

Research Article

The Relationship between BPA Concentration Increasing and Changes of the Expression of *Notch1-3* and *Caspase 3/7* Genes in the Cumulus Cells of Infertile Women with Poor Ovarian Response¹

Somayeh Aftab Savad	PhD. Student, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. somaye.aftab@gmail.com
Zahra Noor Mohammadi	Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran (Corresponding Author). z-nouri@srbiau.ac.ir
Ashraf Moieni	Professor, Department of Endocrinology and Gynecology Infertility, Reproductive Medicine Research Center, Royan Reproductive Biomedical Institute, Tehran, Iran. ashraf.moieni@gmail.com
Morteza Karimipour	Professor, Department of Molecular Medicine, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. mortezakarimi@yahoo.com

Abstract

Introduction: The aim of this study was to investigate the relationship between BPA concentration and alterations of *Notch1*, *Notch2*, *Notch3*, *Caspase-3* and *Caspase-7* genes expression in the cumulus cells of infertile women with poor ovarian stimulation response (POR) following the antagonist protocol.

Materials and Methods: In this case-control study performed on 80 POR patients under 35 years of age, with 4-9 oocyte in puncture date, patients were divided into two groups. The first group consisted of 40 POR women who used plastic containers and the second group consisted of 40 POR women who used less plastic containers. Changes in the expression of *Notch* and *Caspase* genes in cumulus cells were evaluated using Q-PCR technique.

1. **The present study is taken from:** The PhD. thesis in Biology- Molecular genetics, Entitled: **The Relationship between BPA Concentration Increasing and Changes of the Expression of Notch1-3 and Caspase3/7 Genes in the Cumulus Cells of Infertile Women with Poor Ovarian Response**. By Somayeh AftabSavad; Supervisor: Zahra Noormohamadi; Advisors: Ashraf Moieni & Morteza Karimi Poor, was presented at the Islamic azad university, Research and science branch, Tehran, 1399.

Received: 2021/02/13 ; **Accepted:** 2021/05/28

**Copyright © the authors

<http://sjoapb.journal.qom-iau.ac.ir>



Results: In the POR patients, the expression of *Notch1-3* genes in the first group was significantly lower than the second group ($p<0.05$). In contrast, the expression of *Caspase-3* and *Caspase-7* genes in the first group was significantly higher than the second group ($p<0.05$). On the other hand, in both groups, was a statistically significant correlation ($p<0.05$) between the expression levels of *Notch1-3*, *Caspase-3* and *Caspase-7* genes and quality of Oocytes. Also, concentration of BPA in the follicular fluids of the first group was higher compared to the second group ($p<0.05$).

Conclusion: Alterations in the expression of *Notch* and *Caspase* genes in POR patients are associated with increased BPA concentration. Also, Increasing of the BPA concentration can be considered as an effective factor on the reducing of reproduction and oocyte growth.

Keywords: Reproduction, Oocyte growth, Embryo quality, BPA concentration.

بررسی رابطه بین افزایش غلظت BPA و تاثیر آن بر روی تغییرات بیان ژن های *Notch1-3* و *Caspase3/7* در سلول های کومولوس زنان نابارور با پاسخ ضعیف تخمدان^۱

سمیه افتاب سواد | دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. somaye.aftab@gmail.com
زهرا نورمحمدی | دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (نویسنده مسئول). z-nouri@srbiau.ac.ir
اشرف معینی | استاد، گروه غدد درون‌ریز و ناباروری زنان، مرکز تحقیقات پزشکی باروری، موسسه زیست پزشکی باروری رویان، تهران، ایران. ashraf.moieni@gmail.com
مرتضی کریمی‌پور | استاد، گروه پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران. mortezakarimi@yahoo.com

چکیده

هدف: هدف این پژوهش بررسی رابطه بین غلظت BPA موجود در مایع فولیکولی و تاثیر آن بر روی تغییرات بیان ژن های *Notch1*، *Notch2*، *Notch3*، *Caspase-3* و *Caspase-7* در سلول های کومولوس زنان نابارور با پاسخ ضعیف تخمدان (POR Response) به دنبال تحریک تخمدانی با پروتکل آنتاگونیست هورمون آزادکننده گنادوتروپین (GnRH) است.

مواد و روش: این مطالعه مورد-شاهدی بر روی ۸۰ بیمار زن POR با سن کم‌تر از ۳۵ سال انجام شد که در روز پانچر تخمدان دارای ۹-۴ تخمک بالغ بودند. بیماران در دو گروه دسته‌بندی شدند. گروه اول شامل ۴۰ زن POR بودند که از ظروف پلاستیکی استفاده می‌کردند و گروه دوم شامل ۴۰ زن POR بودند که استفاده کم‌تری از ظروف پلاستیکی داشتند. تغییرات بیان ژن در سلول های کومولوس با استفاده از Real time PCR ارزیابی شد.

۱. پژوهش حاضر در پژوهشگاه رویان با شماره طرح (۹۴۰۰۰۱۶۳) انجام شد.

پژوهش حاضر برگرفته از: رساله دکتری تخصصی رشته زیست‌شناسی - ژنتیک مولکولی، دانشجو: سمیه افتاب سواد با عنوان: مقایسه‌ی الگوی بیان ژن، متیلایسون و پروتئین های *ICAM-1* و *ICAM-2* بین گروه پاسخ به درمان و عدم پاسخ به درمان در زنان نابارور Poor Response. استاد راهنما: زهرا نورمحمدی؛ اساتید مشاور: اشرف معینی و مرتضی کریمی‌پور، ارائه شده در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران در سال ۱۳۹۹ است.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۲۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۰۷

نتایج: میزان بیان ژن‌های *Notch1*، *Notch2* و *Notch3* در گروه اولیه به طور معنی‌داری کمتر از گروه دوم بود ($p < 0/05$). در مقابل، میزان بیان *Caspase-3* و *Caspase-7* در بیماران POR در گروه اول در مقایسه با گروه دوم بالاتر بود ($p < 0/05$). از طرف دیگر، همبستگی آماری معنی‌داری ($p < 0/05$) بین سطح بیان ژن‌های *Notch1*، *Notch2*، *Notch3*، *Caspase-3* و *Caspase-7* با کیفیت تخمک بین دو گروه وجود داشت. میزان غلظت BPA در مایعات فولیکولی گروه اول در مقایسه با گروه دوم بیشتر بود ($p < 0/05$).

نتیجه‌گیری: تغییرات بیان ژن‌های مورد مطالعه در بیماران POR با افزایش غلظت BPA ارتباط مثبت معناداری دارد. افزایش غلظت BPA را می‌توان به عنوان یک عامل موثر در کاهش تولیدمثل و کاهش رشد تخمک در نظر گرفت.

کلیدواژه‌ها: تولیدمثل، رشد تخمک، کیفیت جنین، غلظت BPA.

۱. مقدمه

اشیاء پلاستیکی با ترکیبات مختلفی که دارند، برای سلامت افراد مضر هستند، برخی از این مواد به طور مستقیم بر عملکرد سیستم جنسی زنانه و مردانه آثار منفی می‌گذارند (۱). مواد پلاستیکی از پلی‌کربنات ساخته شده‌اند و پلی‌کربنات نوعی پلاستیک است که حاوی بیس فنول A (BPA) می‌باشد. BPA در بسیاری از موارد روزمره مانند بطری‌های آب، قوطی‌های کنسرو و... وجود دارد (۲). این ماده شیمیایی سبب کاهش کیفیت تخمک و اختلال در عملکرد تخمدان و رحم می‌گردد. از طرف دیگر، دیده شده است که جنین‌هایی که در معرض ماده شیمیایی BPA قرار می‌گیرند، پس از تولد با مشکلات سلامت روبه‌رو هستند (۳). یافته‌های پژوهشی نشان داده است، جنین‌هایی که در معرض BPA حتی با مقدار کم قرار می‌گیرند، سال‌ها بعد با احتمال بیشتری به سرطان سینه مبتلا می‌شوند (۴). در حقیقت، بیشترین موارد استفاده از BPA در پلاستیک‌های شفاف و نشکن است که از آنها برای ساخت شیشه کودکان، بطری‌های آب معدنی، بطری‌های مخصوص نوشیدنی‌های ورزشی و نظایر آن استفاده می‌شود. BPA ممکن است بر بیان ژن‌های مربوط به باروری که از نزدیک با تولیدمثل ارتباط دارند، مانند ژن‌هایی که در فرایند فولیکولوژنیز دخیل هستند، تأثیر بگذارد. فولیکولوژن به ارتباط بین تخمک و سلول‌های سوماتیک، مانند سلول‌های کومولوس اطراف احتیاج دارد. شاخص‌ترین تأثیر BPA بر هورمون استروژن (هورمون جنسی زنانه) است که می‌تواند بر عملکرد جنسی و تولیدمثل زنان تأثیر منفی بگذارد (۵، ۶). در سال‌های اخیر، مطالعات بر روی چگونگی اثر BPA و نقش آن در تغییرات بیان ژن و همچنین اثر آن بر روی تغییرات عملکرد تخمدان، رحم، تخمک‌گذاری، رشد تخمک و سایر اندام‌های تولیدمثل بسیار افزایش یافته است (۷). همان‌طور که گفته شد، یکی از عوارض این مواد کاهش تحریک تخمک‌گذاری در بیماران IVF می‌باشد. در واقع سیکل بدون تخمک‌گذاری سیکلی است که در طی آن تخمدان از رهاسازی تخمک ناتوان بوده و تخمک‌گذاری اتفاق نمی‌افتد، به خانمی که در او تخمک‌گذاری اتفاق نمی‌افتد، زنان با تحریک ضعیف تخمدان (POR response) ^۱ گویند (۸).

زنان با تحریک ضعیف تخمدان، زنان جوان‌تر از ۳۵ سال با سیکل‌های ذخیره تخمدانی پایین

1. Bis- Phenol A

2. Poor Ovarian Response

و AMH کم تر از ۰/۷ و FSH^۱ بالاتر از ۱۲ هستند، که ممکن است پر یو ده ای مرتب و یا نامرتب داشته باشند و تعداد فولیکول های آنترال در تخمدان هایشان کم تر از ۹ فولیکول است. تشخیص POR response با استفاده از آزمایش خون و سونوگرافی است. در واقع پاسخ ضعیف تخمدان با کاهش تولید فولیکول/تخمک پس از تحریک بیش از حد تخمدان در درمان IVF^۳ مشخص می شود. در مقایسه با پاسخ دهندگان تحریک تخمدان طبیعی، بیماران مبتلاء به POR نرخ لقاح و کیفیت پایین تر جنین را نشان می دهند (۹). علاوه بر این، زنان مبتلاء به POR دارای کیفیت پایین تری از تخمک در چرخه IVF نسبت به سایر زنان نابارور هستند که باعث کاهش کلی موفقیت IVF و کاهش نرخ بارداری می شود. با این حال، علت اساسی POR در زنان در سن تولیدمثل، هنوز روشن نشده است. درصد موفقیت بارداری زنان POR موجود در درمان IVF از ۹% تا ۲۴% می باشد، اگرچه پروتکل ها و مواد کمکی مختلف برای تحریک تخمدان آنها، برای بهبود پاسخ تخمدان پیشنهاد شده است، اما به نظر می رسد که برای بیماران مبتلاء به POR سود چندانی نداشته است (۱۰). امروزه پارامترهای تشخیصی زیادی برای بیماران POR شناسایی شده که معتبرترین آنها از نظر متخصصان ناباروری معیارهای پوزیدون^۴ است (۱۱). همانطور که اشاره شد، زنان POR دارای کیفیت پایین تری از تخمک هستند، عوامل زیادی بر روی کیفیت تخمک تاثیر می گذارند، که امروزه مواد موجود در مواد پلاستیکی جزء یکی از مهم ترین عوامل اختلال در بلوغ تخمک شناسایی شده اند (۱۲). از طرف دیگر، همانطور که اشاره شد، یکی دیگر از مضرات BPA تغییر میزان بیان ژن های مرتبط با تخمک و جنین است. مسیر سیگنالینگ Notch نقش مهمی در مسیر تکامل سلولی شامل تکثیر سلولی، حفظ بقای سلول های تمایز یافته و کاهش آپوپتوز دارد، هر چند جزئیات عمومی این عملکرد کاملاً مشخص نیست. به نظر می رسد اعمال آنتی آپوپتوزی Notch از طریق اینتراکشن با مولکول هایی مثل Akt و NF-Kb یا پروتئین های ریمادلینگ میتوکندریایی مثل Bax اعمال می گردد. ژن های Notch به طور فعال بوسیله سلول های کومولوس نیز در حین فولیکولوژنز بیان می شوند و نقش مهمی در فولیکولوژنز ایفا می کنند که

-
1. Anti Müllerian Hormone
 2. Follicular Stimulation Hormone
 3. In Vitro Fertilization
 4. Poseidon group

منجر به رشد صحیح و کامل تخمک می‌گردد (۱۳). از طرف دیگر، همان‌طور که قبلاً نیز ذکر شد، ارتباط بین تخمک و سلول‌های کومولوس دوطرفه بوده، لذا، به دلیل این وابستگی، به احتمال زیاد هر فرایند مرتبط با آپوتوز نیز که بر سلول‌های کومولوس تاثیر می‌گذارد، اثر مشابهی بر روی تخمک هم خواهد داشت. کاسپازها، خانواده محافظت شده تکاملی پروتئین‌های سیستمین هستند که برای مکانیسم آپوتوز بسیار ارزشمند می‌باشند، به ویژه کاسپاز ۳ و ۷ در فرایند آپوتوز بسیار حائز اهمیت هستند. مطالعاتی وجود دارد که اذعان می‌نماید بین آپوتوز سلول‌های گرانولوزا و کومولوس و توانایی تکوین سیتوپلاسمی، میوز تخمک، توانایی لقاح و میزان کلیواژ، ارتباط معنی‌داری وجود دارد (۱۴). چندین گزارش نیز در مورد ارتباط شفاف بین آپوتوز خودبه‌خودی سلول‌های گرانولوزا و نتیجه IVF وجود دارد (۱۵). شیوع بالای آپوتوز خودبه‌خودی سلول‌های گرانولوزا با اندازه کوچک فولیکول، تعداد تخمک بدست آمده، کیفیت پایین تخمک و میزان پایین حاملگی مرتبط است (۱۶). بقای سلول‌های گرانولوزا برای تبدیل به بافت لوتئینه‌زده بعد از تخمک‌گذاری امری لازم و ضروری است. بافت لوتئینه‌زده، تولید پروژسترون می‌کند که خود خاصیت ضد آپوتوزی دارد و نقش مهمی در بقای بارداری ایفا می‌کند (۱۷). لذا، شیوع آپوتوز سلول‌های کومولوس می‌تواند به عنوان پیش‌بینی‌کننده کیفیت تخمک، نتیجه IVF-ET و کاهش باروری مرتبط با افزایش سن باشد (۱۸).

از این‌رو هدف مطالعه حاضر ارزیابی رابطه بین غلظت BPA و تغییرات بیان ژن‌های *Notch1*، *Notch2*، *Notch3*، *Caspase-3* و *Caspase-7* در سلول‌های کومولوس زنان POR ناباروری است که در روز پانکچر آنها بین ۹-۴ تخمک بالغ داشتند، همچنین دارای $AFC > 5^1$ و $AMH > 1.2 \text{ ng/ml}$ بودند. از طرف دیگر، در این مطالعه ارتباط بین غلظت BPA با کیفیت تخمک و جنین در زنان نابارور مبتلاء به POR به دنبال تحریک کنترل شده تخمدان نیز بررسی شد.

۲. روش‌شناسی پژوهش

۲-۱. جامعه آماری و پروتکل تحریک تخمدان

در این مطالعه ۸۰ زن نابارور POR که قبلاً توسط معیارهای Poseidon به عنوان زیرگروه 1b

تشخیص داده شده بودند، شرکت کردند (۱۹). این زنان همگی تحت تزریق اسپرم داخل سیتوپلاسمی (ICSI) قرار گرفتند. سن همه بیماران کم‌تر از ۳۵ سال بود و همسران آنها نتایج اسپرموگرام طبیعی داشتند.

بیماران در دو گروه طبقه‌بندی شدند: گروه اول شامل ۴۰ بیمار POR که بیش از اندازه از ظروف پلاستیکی استفاده داشتند و گروه دوم شامل ۴۰ بیمار POR که کم‌تر از ظروف پلاستیکی استفاده می‌کردند. اطلاعات استفاده از ظروف پلاستیکی با استفاده از پرسشنامه معتبر جمع‌آوری شد (۱۹).

در این مطالعه گروه سبک زندگی سالم شامل زنانی بود که در زندگی روزمره خود از ظروف پلاستیکی به میزان کم برای گرم کردن غذا، غذاهای گرم، نوشیدنی‌های گرم و همچنین نگهداری مواد غذایی استفاده می‌کردند. از طرف دیگر، گروه بدون عادات سبک زندگی سالم شامل زنانی بودند که از ظروف پلاستیکی بیش از حد برای ذخیره غذا، گرم کردن غذا، نوشیدنی‌های گرم و مواد غذایی گرم استفاده می‌کردند. اطلاعات مربوط به عادات سبک زندگی سالم با استفاده از پرسشنامه معتبر نحوه سبک زندگی بدست آمد. این پرسشنامه شامل سوالات دقیقی بود، از جمله: شما در زندگی روزمره به چه میزان برای غذای گرم، نوشیدنی گرم و مواد غذایی از ظروف پلاستیکی استفاده می‌کنید؟ در چه مواردی از ظروف پلاستیکی استفاده می‌کنید؟

بیماران بر مبنای نتیجه پرسشنامه‌هایشان در دو گروه زنان POR با عادات سبک زندگی سالم و زنان POR با عادات سبک زندگی غیر سالم گروه‌بندی شدند.

برای آمادگی تخمدان‌های بیمار و تحریک تخمک‌گذاری در این طرح از پروتکل آنتاگونیست استفاده شد. جمع‌آوری سلول‌های کومولوس از اطراف تخمک‌ها ۳۶ ساعت پس از تزریق hCG^2 و پس از پانکچر تخمدان‌ها انجام شد (۱۹).

۲-۲. استخراج RNA

۲-۲-۱. استخراج RNA و سنتز cDNA

RNA کل سلول‌های کومولوس استخراج شد و سنتز cDNA از RNA کل سلول‌های کومولوس انجام گردید (۱۹).

1. Intracytoplasmic Sperm Injection
2. Human Chorionic Gonadotropin

برای سنتز cDNA ۱ میکروگرم از RNA تیمار شده با DNase I برداشته شد و به یک ویال ۰/۲ میکرولیتر منتقل شد. سپس ۱ میکرولیتر پرایمر هگزامر تصادفی (Random Hexamer) و ۱ میکرولیتر پرایمر Oligo Dt Primer به ویال اضافه گردید و در نهایت حجم محلول حاصل با آب مقطر حاوی DEPC به ۲۰ میکرولیتر رسید. ویال به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد تا واکنش اتصال پرایمر به RNA به خوبی صورت پذیرد. سپس مجدداً ویال به روی یخ منتقل شد.

پس از آن مخلوطی به نام RT-Mix، تهیه گردید. مخلوط تهیه شده (RT-Mix) نیز به ویال اضافه شد، سپس ویال مذکور به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. در نهایت، به ویال ۱ میکرولیتر از آنزیم نسخه بردار معکوس اضافه شد. این ویال، RT^+ نام گرفت. برای اطمینان از درستی انجام واکنش، ویال RT^- نیز تهیه شد. در واقع ویال RT^- ، همه مواد مورد نیاز جهت سنتز cDNA را دارا است، با این تفاوت که به جای اضافه کردن ۱ میکرولیتر از cDNA، ۱ میکرولیتر آب مقطر حاوی DEPC به آن افزوده می شود. در نتیجه در ویال RT^+ ، به دلیل حضور cDNA واکنش رونوشت برداری معکوس انجام و cDNA سنتز می شود، در حالی که در ویال RT^- به دلیل عدم وجود cDNA، این واکنش انجام نمی شود. ویال های RT^+ و RT^- در دستگاه PCR قرار داده شدند. برنامه دستگاه ۱ سیکل، ۲۵ دقیقه و ۴۲ درجه و سیکل بعدی ۱ سیکل، ۷ ثانیه و ۸۵ درجه بود.

۲-۳. بررسی بیان ژن های *Notch1*, *Notch2*, *Notch3*, *Caspase-3*, *Caspase-7* با

تکنیک Quantitative Real time PCR

سطوح بیان ژن های مورد مطالعه با qRT-PCR و به وسیله دستگاه ترموسایکلر^۱ اندازه گیری شد. ژن های *Notch1*, *Notch2*, *Notch3*, *Caspase-3*, *Caspase-7* به عنوان ژن هدف انتخاب شدند و از 18srRNA برای نرمال سازی هر نمونه استفاده گردید. واکنش ها برای ۵ ژن *Notch1*, *Notch2*, *Notch3*, *Caspase-3* و *Caspase-7* با سه تکرار بیولوژیک برای هر ژن و در هر نمونه، با استفاده از کیت تاکارا (TAKARA, Japan, cat Number: 6210B) انجام شد.

واکنش‌ها در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر مستر میکس همراه با سایر گرین، ۱ میکرولیتر cDNA، ۱ میکرولیتر پرایمر Forward و ۱ میکرولیتر پرایمر Reverse (۵۰۰ nM) و بر اساس پروتوکول شرکت انجام شد. ژن 18srRNA به عنوان ژن مرجع استفاده گردید. پرایمرها توسط نرم‌افزار Primer Express 3.0 طراحی شده‌اند. برای ارزیابی ویژگی PCR از تحلیل منحنی ذوب استفاده شد. برای ارزیابی کارایی پرایمرها از منحنی‌های استاندارد استفاده گردید. داده‌های Ct با استفاده از تنظیمات آستانه پیش فرض (threshold) تعیین شد. از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ برای تجزیه و تحلیل سطح بیان نسبی ژن‌ها استفاده گردید. تجزیه و تحلیل منحنی ذوب برای تعیین اختصاصیت روش qPCR انجام شد. برای بررسی اینکه آیا تفاوتی بین بیان ژن‌های *Notch1*، *Notch2*، *Notch3*، *Caspase-3* و *Caspase-7* وجود دارد یا خیر؟ از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد.

۲-۴. ارزیابی BPA در مایعات فولیکولی با استفاده از روش کروماتوگرافی

جهت شناسایی کمی و کیفی ترکیبات BPA در نمونه‌های مایع فولیکولی زنان POR از دستگاه کروماتوگرافی گازی طیف‌سنجی جرمی استفاده شد. دستگاه مورد استفاده GC اجیلنت مدل ۶۸۹۰ مجهز به دکتور جرمی اجیلنت مدل (Agilent Technologies, Pali Alto, Ca, USA) ۵۹۷۳ بود. ستون مورد استفاده HP-5MS بود. دمای اولیه ستون ۹۰ درجه سلسیوس بود که پس از یک دقیقه و با سرعت ۵۰ درجه سلسیوس در دقیقه تا ۱۵۰ درجه سلسیوس افزایش یافت و پس از یک دقیقه، با سرعت ۸ درجه سلسیوس در دقیقه تا ۳۳۰ درجه سلسیوس افزایش پیدا کرد و سه دقیقه در این دما ثابت ماند. دمای انژکتور و دکتور به ترتیب ۲۵۰ و ۲۵۰ درجه سلسیوس تنظیم شدند. گاز حامل هلیوم بود که با سرعت ۱ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده می‌شد. برای ترسیم منحنی کالیبراسیون، از غلظت‌های ۰/۲ تا ۵۰ نانوگرم در لیتر مخلوط آنالیت‌های مورد نظر استفاده شد و میزان ضریب پیرسون بین غلظت و سطح زیر منحنی برای آنالیت‌های مختلف بین ۰/۹۶ تا ۰/۹۹ بدست آمد. شناسایی کیفی آنالیت‌های مورد نظر بر اساس میزان زمان بازدارندگی، اسپکترم یونها و نسبت یونها انجام شد. جهت جلوگیری از مداخله حلال‌ها، فیالمان در ۵ دقیقه ابتدایی شناسایی، خاموش بود. با این روش شناسایی آنالیت‌های مورد نظر در حد نانوگرم در لیتر امکان‌پذیر گردید. حد تشخیص مشتقات BPA، ۱/۱۴ نانوگرم در هر لیتر گزارش شد.

۲-۵. بررسی کیفیت تخمک

ارزیابی مورفولوژیکی از کیفیت تخمک‌ها با استفاده از میکروسکوپ اینجکت و بر اساس سیستم‌های رتبه‌بندی و طبقه‌بندی استاندارد آزمایشگاه ناباروری رویان آزمایشگاه IVF انجام شد.

رتبه‌بندی کیفیت تخمک‌ها بر اساس بررسی ۵ معیار شامل:

۱. بررسی کمپلکس تخمک-کومولوس،

۲. بررسی جسم‌های قطبی تخمک،

۳. بررسی دوک میوزی تخمک،

۴. میزان فراگماتاسیون تخمک،

۵. تشکیل بلاستوسیست انجام شد.

پس از بررسی این ۵ مورد در تخمک‌ها با توجه به نظر کارشناسان جنین‌شناسی آزمایشگاه ناباروری رویان، IVF تخمک‌ها را بر اساس کیفیت در ۵ گروه زیر دسته‌بندی می‌کنند.

۱. Dysmorph & Highly Dysmorph

۲. Slightly Dysmorph & Dysmorph

۳. Slightly Dysmorph & Highly Dysmorph

۴. Slightly Morph

۵. Morph

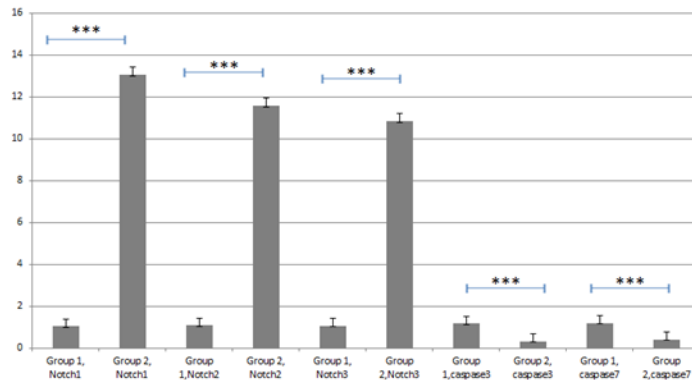
۲-۶. تجزیه و تحلیل آماری

تحلیل داده‌های PCR در زمان واقعی با استفاده از روش مقایسه‌ای ΔCT تجزیه و تحلیل شد. آنالیز داده‌های بیان ژن با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه گردید. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از آنالیز heat map و PCoA و همچنین نرم‌افزار SPSS V22.0 (IBM Crop., Armonk, NY, USA) انجام شد. برای بررسی رابطه‌ی بین بیان ژن‌ها با کیفیت تخمک، از ضریب همبستگی پیرسون استفاده گردید. مقادیر $P < 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد (۱۹).

۳. نتایج

پروفایل بیان کمی ژن‌های مذکور در نمونه سلول‌های کومولوس بدست آمده از گروه‌های

بیماران POR گروه اول (Group1, G1) و گروه دوم (Group2, G2) در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- نتایج آنالیز حاصل از ریل تایم PCR با روش Fold change برای مقایسه بیان ژن‌های *Notch2*، *Notch1*، *Notch3*، *Caspase-3* و *Caspase-7* در سلول‌های کومولوس زنان POR گروه اول و دوم (داده‌ها به عنوان میانگین \pm SD ارائه شده‌اند. حروف مختلف (*Notch1*، *Notch2*، *Notch3*، *Caspase-3* و *Caspase-7*) با خط بالا در همان ستون، تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهد) ($p < 0.05$).

میزان بیان ژن‌های *Notch-1*، *Notch-2*، *Notch-3* در نمونه‌های سلول‌های کومولوس به دست آمده از زنان POR گروه اول نسبت به گروه دوم به طور معنی‌داری کاهش یافته است ($P < 0.05$). بیان ژن‌های *Caspase-3* و *Caspase-7* در نمونه‌های سلول‌های کومولوس به دست آمده از زنان POR گروه اول نسبت به گروه دوم به طور معنی‌داری بالاتر بود ($P < 0.05$). برای بررسی رابطه‌ی بین بیان ژن‌های *Notch-1*، *Notch-2*، *Notch-3*، *Caspase-3*، *Caspase-7* در سلول‌های کومولوس با کیفیت تخمک از ضریب همبستگی پیرسون استفاده گردید. نتایج نشان داد که بیان ژن‌های *Notch-1*، *Notch-2*، *Notch-3*، *Caspase-3*، *Caspase-7* در سلول‌های کومولوس با کیفیت تخمک ارتباط مثبت معناداری وجود دارد ($P < 0.05$). کیفیت تخمک در نمونه‌های سلول‌های کومولوس به دست آمده از زنان POR گروه اول نسبت به گروه دوم به طور معنی‌داری کاهش یافته بود ($P < 0.05$) (جدول ۱).

جدول ۱- بررسی رابطه‌ی بین بیان ژن‌های *Notch 1-3, Caspase3, Caspase7* در سلول‌های کومولوس با کیفیت تخمک

Oocyte quality	Genes expression			Caspase3	Caspase7
	Notch-1	Notch-2	Notch-3		
Mature	r=0.028 p=0.021*	r=0.026 p=0.023*	r=0.023 p=0.027*	r=0.013 p=0.014*	r=-0.023 p=0.011*
Approximately mature	r=0.063 p=0.380	r=0.030 p=0.683	r=0.022 p=0.922	r=0.021 p=0.878	r=-0.019 p=0.953
Post-mature oocytes	r=-0.220 p=0.322	r=-0.129 p=0.152	r=-0.168 p=0.222	r=-0.182 p=0.325	r=0.196 p=0.333

Pearson correlation coefficients between genes expression and oocyte quality
* Significance values

به منظور بررسی ارتباط بیان ژن‌های *Notch-1, Notch-2, Notch-3, Caspase-3, Caspase-7* در سلول‌های کومولوس با میزان BPA از ضریب همبستگی پیرسون استفاده گردید. نتایج نشان داد که بیان ژن‌های *Notch-1, Notch-2, Notch-3, Caspase-3, Caspase-7* در سلول‌های کومولوس با افزایش میزان BPA در مایع فولیکولی ارتباط مثبت معناداری وجود دارد ($P < 0.05$). میزان BPA در مایع فولیکولی نمونه‌های سلول‌های کومولوس به دست آمده از زنان POR گروه اول نسبت به گروه دوم افزایش معنی داری را نشان داد ($P < 0.05$) (جدول ۲).

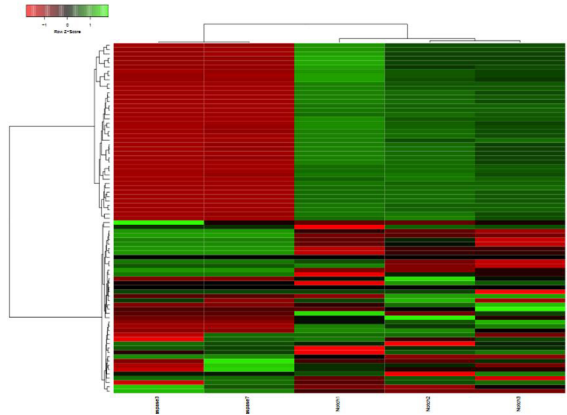
جدول ۲- بررسی رابطه‌ی بین بیان ژن‌های *Notch 1-3, Caspase3, Caspase7* در سلول‌های کومولوس با میزان BPA

BPA Concentration	Genes expression			Caspase3	Caspase7
	Notch-1	Notch-2	Notch-3		
BPA Concentration	r=0.018 p=0.023*	r=0.036 p=0.021*	r=0.029 p=0.027*	r=0.079 p=0.034*	r=0.033 p=0.082*

Pearson correlation coefficients between genes expression and BPA Concentration
* Significance values

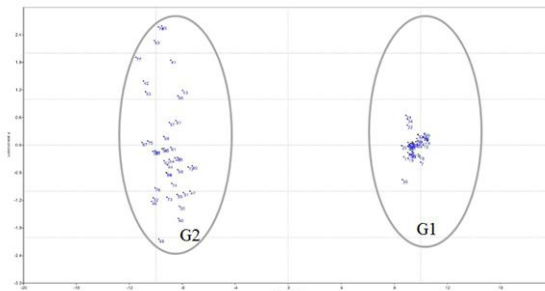
داده‌های تجزیه و تحلیل نقشه حرارتی^۱ تغییرات میزان بیان ژن‌ها در بیماران POR گروه G2 در مقابل بیماران POR گروه G1 را به صورت تصویری نشان می‌دهد. در تجزیه و تحلیل نقشه حرارتی، نتایج بیان ژن‌های *Notch 1, Notch 2, Notch 3* در یک خوشه، نشان‌دهنده شباهت میزان بیان در نمونه‌های مورد مطالعه است. چنین نتایجی در خصوص پروفایل بیانی دو ژن

Caspase-7 و *Caspase-3* مشهود است. بررسی گروه‌بندی نمونه‌های مورد مطالعه بر اساس بیان ۵ ژن نشان‌دهنده شباهت بیانی نمونه‌های گروه ۱ و قرارگیری آنها در یک خوشه و متفاوت از پروفایل بیانی افراد گروه ۲ است (شکل ۲). دسته‌بندی (PCoA) Principle component analysis (PCoA) تاییدی بر جدایی دو گروه مورد مطالعه از نظر پروفایل بیانی است (شکل ۳).



شکل ۲- نقشه گرما بر اساس بیان ژن‌های مورد مطالعه

(اعداد ۱-۴+ مربوط به داده‌های بیان ژن گروه G1 و همچنین شماره ۸۱-۴۱ مربوط به داده‌های بیان ژن گروه G2 است. هر خط نشان‌دهنده داده‌ها برای یک بیمار منفرد است. رنگ سبز بیانگر افزایش بیان در بیماران POR گروه G2 در مقابل بیماران POR گروه G1 است. رنگ قرمز نشان‌دهنده کاهش بیان در بیماران POR گروه G2 در مقابل بیماران POR گروه G1 است. رنگ مشکی بیانگر عدم تغییر در بیان می‌باشد).



شکل ۳- نتایج حاصل از PCoA بر اساس بیان ژن‌های دو گروه مورد مطالعه (اعداد ۱-۴+ مربوط به داده‌های بیان ژن گروه G1 و همچنین شماره ۸۱-۴۱ مربوط به داده‌های بیان ژن گروه G2 است).

۴. نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، یافته‌ها نشان داد که سطح بیان ژن‌های *Notch1*، *Notch2* و *Notch3* در

بیماران POR ای که از ظروف پلاستیکی، کم تر استفاده می کنند (گروه دوم) نسبت به بیماران POR ای که از ظروف پلاستیکی بیش تر استفاده می کنند (گروه اول)، به طور قابل توجهی بالاتر است، در حالی که سطح بیان کاسپاز ۳ و کاسپاز ۷ در گروه اول بالاتر از گروه دوم بود ($P < 0.05$). همچنین، یافته های قبلی (۱۹) ما نشان دادند که، غلظت BPA در گروه اول در مقایسه با گروه دوم بالاتر بود (۱۹). در حقیقت، غلظت BPA ممکن است سبب تغییرات رونوشت ژن ها در سلول های کومولوس بیماران POR شود و همچنین BPA می تواند بر کیفیت تخمک نیز تاثیر بگذارد و مانع از بلوغ صحیح تخمک گردد. Huo و همکاران نشان دادند که BPA بر بیان ژن ها و اصلاح اپی ژنتیکی مرتبط با تولیدمثل که از نزدیک با ناباروری ارتباط دارند، تاثیر می گذارد. همچنین Ziv-Gal و همکاران نشان دادند که BPA بر روی عملکرد بیان ژن، سطح پروتئین ها، هورمون های مربوط به تولیدمثل و کیفیت تخمک، تاثیر می گذارد. یافته های حاضر نشان داد که باروری و تولیدمثل مردان و زنان توسط بیس فنول A مختل می شوند. مطالعات حیوانات نشان دادند BPA تاثیرات منفی زیادی در پیشرفت چرخه سلولی، ساختار دوک، سازماندهی کروموزوم و بیان ژن ها در طول بلوغ تخمک دارد. علاوه بر این، افزایش نرخ بلوغ غیر طبیعی در تخمک های در معرض BPA بسیار بیشتر از تخمک هایی است که در معرض BPA قرار نداشتند و این مسئله سبب کاهش باروری در زنان گزارش شده است (۲۰). اگر زن بارداری در معرض موادی شبیه استروژن که در BPA یافت می شوند، قرار گیرد، رشد اندام تناسلی او نیز آسیب دیده و در بارداری های آینده دچار مشکل می شود. در حقیقت BPA دارای تعدادی اثرات بیولوژیکی است که، مهم ترین آن ایجاد اختلالات تولیدمثل است (۲۱).

کیفیت تخمک عامل کلیدی در تولیدمثل جنس ماده است. اطلاعات کمی از مکانیسم های موثر بر شکل گیری کیفیت تخمک در دسترس است (۲۲). ارتباط تخمک با سلول های کومولوس دو طرفه است، این ارتباط به وسیله ی فاکتورهای رشد قدرتمند ترشحی تخمک، که به شکل موضعی به منظور هدایت تمایز و عملکرد سلول های کومولوس عمل می کنند، برقرار می شود. ژن های بیان شده در سلول های کومولوس بر بلوغ تخمک تاثیر می گذارند. سلول های کومولوس، سلول های اطراف تخمک هستند که نقش های بسیار مهمی برای تخمک ایفا می کنند و از مهم ترین نقش های آن ها می توان به محافظت از تخمک قبل از تخمک گذاری، هدایت تخمک در طول تخمک گذاری به سمت لوله رحمی و در اختیار قرار دادن تخمک به اسپرم اشاره کرد (۲۳).

ژن‌های مسیر سیگنالینگ Notch در تنظیم مشخصات سلول‌های جنینی و بلوغ تخمک نقش دارند. تحقیقات اخیر نشان داده است که مسیر Notch در تخمدان جنینی و پس از زایمان فعال است و در رویدادهایی از جمله سنتز و رشد فولیکول، بلوغ میوز، و رشد تخمدان و تولید هورمون استروئید و کاهش آپوپتوز نقش مهمی دارد. تحقیقات در موش‌ها نشان داده است که اختلال در مسیر Notch منجر به اختلال در فعالیت تخمدان می‌شود که این امر به نوبه خود بر روی سنتز دوک میوز، هیستونز فولیکول، تکثیر و بقای سلول گرانولوزا، عملکرد مرحله لوتئال در چرخه تخمدان و رشد تخمدان تأثیر می‌گذارد. این انحرافات منجر به فولیکولوزن غیرطبیعی و کاهش باروری می‌شود (۲۴). نتایج بررسی بیان ژن رسپتورهای Notch به کمک متد real time حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که میزان بیان *Notch 1, 2, 3* در گروه دوم بالاتر از گروه اول بوده و این تفاوت‌ها از سطوح معناداری برخوردار است. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که بین بیان ژن‌های این مسیر، با کیفیت تخمک ارتباط مثبت معناداری وجود دارد. بنابراین، این مسیر سیگنالینگ می‌تواند به عنوان بیومارکرهای کیفیت تخمک مطرح شوند. از آنجایی که این مسیر سیگنالینگ خواص آنتی آپوپتوزی دارند، ممکن است کاهش بیان آنها در بیماران POR توجیح‌کننده خوبی در کاهش کیفیت تخمک و به دنبال آن کاهش کیفیت جنین‌های مربوطه باشد. یافته‌های مطالعه حاضر مطابق با نتایج مطالعه Zhang و همکاران می‌باشد. آنها دریافتند که آپوپتوز سلول‌های گرانولوزا در مدل سندرم تخمدان پلی کیستیک خرگوشی که کیفیت تخمک‌هایشان خوب نیست، بیشتر است، البته آنها در مطالعه خود رتبه‌بندی رویان را لحاظ نکرده‌اند (۲۵). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان بیان ژن‌های آنتی آپوپتوتیک در سلول‌های کومولوسی که رویان‌های مشتق شده از آن مجموعه کیفیت خوبی داشته، بالاتر می‌باشد. سایر مطالعات نیز نشان داده‌اند که آپوپتوز سلول‌های کومولوس احتمالاً اثر منفی روی نتایج IVF دارد (۲۶).

یکی از محدودیت‌های اصلی در مطالعه حاضر این بود که میزان سلول بدست آمده از کمپلکس کومولوس - تخمک بسیار کم و محدود بود، بنابراین، امکان انجام دیگر متدهای ارزیابی میزان آپوپتوز همچون TUNEL و فلوسایتمتری در کنار ارزیابی در سطح مولکولی وجود نداشت. نتایج بررسی بیان ژن *Caspase-3* و *Caspase-7* در سطح mRNA نشان داد که میزان این فاکتورهای آپوپتوزی در سلول‌های کومولوس بیماران گروه دوم نسبت به گروه اول کاهش معناداری داشتند.

فاکتورهای متعددی همچون استرس اکسیداتیو، BPA و اختلالات هورمونی ناشی از وجود BPA می‌توانند باعث القای آپوپتوز و مرگ سلولی در سلول‌های کومولوس و گرانولوزا شود (۲۷). همانطور که گفته شد کاسپاز ۳ و ۷ نقش مهمی در طی آپوپتوز ذاتی دارند. در همین راستا مطالعه‌ی اخیر با استفاده از تکنیک *real time* نشان داده است که میزان آپوپتوز در سلول‌های گرانولوزا بیماران POR از افزایش معناداری برخوردار می‌باشد (۲۸).

همانطور که گفته شد شواهد روبه‌رشدی وجود دارد که میزان شیوع آپوپتوز در سلول‌های کومولوس و گرانولوزا با نتایج ART ارتباط دارد، زنان POR دارای کیفیت پایینی از تخمک هستند. Corn و همکاران نشان دادند که بین میزان آپوپتوز سلول‌های کومولوس با کیفیت به خطر افتاده تخمک و توانایی رشد و تکوین جنین مربوطه، ارتباط تنگاتنگی وجود دارد و اینکه فرایند آپوپتوز می‌تواند بلوغ تخمک را دچار نقصان کند. آنها همچنین دریافتند که گامت‌ها و جنین‌های بدست آمده از کمپلکس‌های کومولوسی فاقد یا دارای درجه کمی از آپوپتوز، شانس بیشتری برای رسیدن به مرحله بلاستوسیست را دارا هستند (۲۹). یک دلیل احتمالی برای وجود ارتباط بین میزان آپوپتوز و کیفیت جنین و تخمک شاید این باشد که شیوع میزان بالای آپوپتوز در سلول‌های کومولوس می‌تواند حمایت فیزیکی و تغذیه‌ای این سلول‌ها را کاهش دهد و این کاهش می‌تواند باعث نقصان توانایی رشد و تکوین تخمک و جنین گردد. Bosco نیز نشان داده است که آنالیز آپوپتوز سلول‌های کومولوس می‌تواند یک مارکر انتخابی برای گزینش تخمک قبل از فرایند ICSI باشد (۳۰). در مجموع علی‌رغم وجود یافته‌های ضد و نقیض در مورد وجود این ارتباط، به نظر می‌رسد که ارزیابی فاکتورهای دخیل در مرگ سلولی در کنار فاکتورهای بقاء در سلول‌های کومولوس نقش پیش‌گویی‌کننده بهتر و قابل اعتمادتری را فراهم کند.

به طور خلاصه، یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که اختلاف در میزان بیان ژن‌های *Notch1*، *Notch2*، *Notch3*، *Caspase-3* و *Caspase-7* در سلول‌های کومولوس زنان POR مرتبط با افزایش غلظت BPA در مایع فولیکولی بود. علاوه بر این، BPA به عنوان یک نشانگر مهم در ایجاد اختلالات عملکرد تخمک‌گذاری، رشد جنین و بلوغ تخمک است.

۵. تقدیر و تشکر

تضاد منافع: نویسنده (ها) هیچ‌گونه تضاد منافع‌ای در رابطه با تحقیق، تألیف و انتشار این مقاله با هم ندارند.

References

1. Xiaona H, Dan Ch, Yonghua He, Zhu W, Zhou W, Zhang J. Bisphenol-A and Female Infertility: A Possible Role of Gene-Environment Interactions. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2015; 12: 11101-11116.
2. Ferraretti, A.-P. ESHRE working group on Poor Ovarian Response. Definition ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: The Bologna criteria. *Hum. Reprod*. 2011; 26: 1616-1624.
3. Nishikawa M, Iwano H, Yanagisawa R, Koike N, Inoue H, Yokota H. Placental transfer of conjugated bisphenol A and subsequent reactivation in the rat fetus. *Environ. Health Perspect*. 2010; 118: 1196-1203.
4. Rochester JR. Bisphenol A and human health: A review of the literature. *Reprod Toxicol*. 2013; 42:132-155.
5. Dang VH, Choi KC, Jeung EB. Tetra bromo diphenyl ether (BDE 47) evokes estrogenicity and calbindin-D9k expression through an estrogen receptor-mediated pathway in the uterus of immature rats. *Toxicol. Sci*. 2007; 97: 504-511.
6. NOLI AS, Ferrari S, Ricci E, Reschini M, Cipriani S, Dallagiovanna CH, Parazzini F, Somigliana E. The role of diet in unexpected poor response to ovarian hyper-stimulation: a cross-sectional study. *Bio Medicine Online*. 2020; S1472-6483(20): 30382-5.
7. Ricci E, Noli S, Cipriani S. Maternal and Paternal Caffeine Intake and ART Outcomes in Couples Referring to an Italian Fertility Clinic: A Prospective Cohort. *Nutrients*. 2018; 10: 1116.
8. Ferraretti AP, Marca La A, Fauser BC, Nargund G, Gianaroli L. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *HumReprod*. 2011; 26(7): 1616-1624.
9. Nagels HE, Rishworth JR, Siristatidis CS, Kroon B. Androgens (dehydroepiandrosterone or testosterone) for women undergoing assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015; 26(11): CD009749.
10. Pandian Z, McTavish AR, Aucott L, Chen SN, Wang PH, Cianci A, Tsai HW, Wen ZH, Lin LT. Interventions for 'poor responders' to controlled ovarian hyper stimulation (COH) in in-vitro fertilisation (IVF). *Cochrane Database Syst Rev*. 2010; 20(1): CD004379.
11. Humaidan P, Alviggi C, Fischer R, Esteves SC. The novel POSEIDON stratification of 'Low prognosis patients in Assisted Reproductive Technology' and its proposed marker of successful outcome. *F1000Research*. 2016; 5:2911.
12. Patrizio P, Vaiarelli A, Setti L, Tobler KJ, Shoham G, Leon M, Shoham Z. How to define, diagnose and treat poor responders? Responses from a worldwide survey of IVF clinics. *Reprod Biomed Online*. 2015; 30(6): 581-592.
13. Vanorny DA, Mayo KE. The role of Notch signaling in the mammalian ovary. *Reproduction*. 2017; 153:187-R204.

14. Salehi E, Aflatoonian R, Moeini A, Yamini N, Asadi E, Khosravizadeh Z, Dehghan Tarzjani M, Naghibi harat J, Abolhassan F. Apoptotic biomarkers in cumulus cells in relation to embryo quality in polycystic ovary syndrome. *Arch Gynecol Obstet.* 2017; 296:1219-1227.
15. Yacobi K, Wojtowicz A, Tsafiriri A, Gross A. Gonado-tropins enhance caspase-3 and-7 activity and apoptosis in the theca-interstitial cells of rat preovulatory follicles in culture. *Endocrinology.* 2004;145(4):1943-1951.
16. rentnall M, Rodriguez-Menocal L, De Guevara RL, Cepero E, Boise LH. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have dis-tinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biol.* 2013; 14(1):32.
17. Yacobi K, Wojtowicz A, Tsafiriri A, Gross A. Gonado-tropins enhance caspase-3 and-7 activity and apoptosis in the theca-interstitial cells of rat preovulatory follicles in culture. *Endocrinology.* 2004;145(4):1943-1951.
18. Salehi E, Aflatoonian R, Moeini A, Yamini N, Asadi E, Khosravizadeh Z, Dehghan Tarzjani M, Naghibi harat J, Abolhassan F. Apoptotic biomarkers in cumulus cells in relation to embryo quality in polycystic ovary syndrome. *Arch Gynecol Obstet.* 2017;296:1219-1227.
19. Aftabsavad S, Noormohammadi Z, Moini A, Karimipoor M. Effect of Bisphenol A on alterations of ICAM-1 and HLA-G genes Expression and DNA methylation profiles in Cumulus Cells of Infertile Women with Poor Response to Ovarian Stimulation. *Scientific Reports.* 2021; 11, Article number: 9595.
20. NOLI AS, Ferrari S, Ricci E, Reschini M, Cipriani S, Dallagiovanna CH, Parazzini F, Somigliana E. The role of diet in unexpected poor response to ovarian hyper-stimulation: a cross-sectional study. *Bio Medicine Online.* 2020; S1472-6483(20): 30382-5.
21. Garg A, Bantle JP, Henry RR, Coulston A, Griver KA, Raatz SK, Brinkley L, Chen I, Grundy SM, Huet BA, Reaven GM. Effects of varying carbohydrate content of diet in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *JAMA.* 1994; 271:1421-14285.
22. Mumm JS, Kopan R. Notch signaling: from the outside in. *Developmental biology.* 2000; 228(2):151-165.
23. Das M, Djahanbakhch O, Hacıhanefioglu B, Saridogan E, Ikram M, Ghali L, Raveendran M, Storey A. Granulosa cell survival and proliferation are altered in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93(3): 881-7.
24. Kaneko T, Ohta N, Saito T, Hiroi M. Effects of controlled ovarian hyperstimulation on oocyte quality in terms of the incidence of apoptotic granulosa cells. *Journal of assisted reproduction and genetics.* 2000; 17(10):580-585.
25. Billig H, Furuta I, Hsueh A. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology.* 1993; 133(5):2204-2212.
26. Al-Gubory KH, Fowler PA, Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *The international journal of biochemistry & cell biology.* 2010; 42(10):1634-1650.
27. Gubory AL, Fowler KH, Garrel C, The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative

- stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2010; 42(10): 1634-1650.
28. Yuting F, Yajie Ch, Wei L, Chen J, Li J, Goldsmith S, Silber Sh, Liang X. Apoptosis of mural granulosa cells is increased in women with diminished ovarian reserve. *Reproductive Physiology and Disease*. 2019; 36: 1225-1235.
29. Corn CM, Hauser-Kronberger C, Moser M, Tews G, Ebner TH. Predictive value of cumulus cell apoptosis with regard to blastocyst development of corresponding gametes. *Fertility and sterility*. 2005; 84(3): 627-633.
30. Bosco L, Ruvolo G, Chiarelli R, Agnello M, Roccheri MC. Apoptotic Analysis of Cumulus Cells for the Selection of Competent Oocytes to Be Fertilized by Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI). *Journal of Cells*. 2015; 1(1): 8-19.

استاد به این مقاله

افتاب سواد، سمیه؛ نورمحمدی، زهرا؛ معینی، اشرف؛ کریمی پور، مرتضی (۱۴۰۰). بررسی رابطه بین افزایش غلظت BPA و تاثیر آن بر روی تغییرات بیان ژنهای *Notch1-3* و *Caspase3/7* در سلولهای کومولوس زنان نابارور با پاسخ ضعیف تخمدان. *بیولوژی کاربردی*، دوره ۱۱(۴۲)، ص ۴۷-۶۶.