تعیین ارتباط لانه‌گزینی جنین با غلظت هورمون‌ها و سیتوکین‌های انتخابی مایع فولیکولر در زنان تحت درمان به روش میکرواینجکشن (ICSI) در بخش نازایی کوثر بیمارستان شهید مطهری ارومیه

بهروز ایلخانی‌زاده[۱]، علی نهالی مقدم[۲]*، معصومه حاجی‌شفیع‌ها[۳]، مهزاد مهرزاد صدقیانی[٤]، فریبا نانبخش[٥]، یعقوب دلدار[٦]، ناهید اسدی[۷]، نازیلا کیارنگ[۸]، ویدا سعیدی[۹]

تاریخ دریافت 1392/02/03 تاریخ پذیرش 1392/04/07

چکیده

پیش زمینه و هدف: غلظت مواد مختلفی در مایع فولیکولی تخمدان ممکن است با نتیجه درمان کمک باروری ارتباط داشته باشد. هدف این مطالعه بررسی مارکرهایی از مایع فولیکولر است که بتوانند لانه گزینی جنین را پیش گویی کنند.

مواد و روش‌ها: غلظت هورمون‌ها و سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد انتخابی مایع فولیکولی در طی درمان کمک باروری، روش تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI)اندازه‌گیری شده و با نتیجه درمان مقایسه گردید.

یافته‌ها: میانگین غلظت ۱۷- بتا استرادیول(E2)، پرولاکتین (PRL) و فاکتور رشد شبه انسولینی (IGF-I) به طور چشمگیری در گروهی از بیماران که به حاملگی موفق دست یافتند بالاتر از گروهی بود که به حاملگی دست نیافتند. هورمون لوتئینئزه کننده(LH) ، هورمون رشد(GH) ، پروژسترون و اینتر لوکین ۱ (IL-1) در دو گروه با حاملگی موفق و ناموفق تفاوت معنی‌داری نداشت.

بحث و نتیجه گیری: نتیجه درمان ICSI با سطوح E2, PRL و IGF-I ارتباط دارد ولیLH, GH, IL-I و پروژسترون مارکرهای بیانگر موفقیت درمان نیستند.

گل واژگان: لانه گزینی، هورمون، سیتوکین، مایع فولیکولی و تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI)

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و چهارم، شماره پنجم، ص ۳۳۸-۳۲۹، مرداد ۱۳۹۲

آدرس مکاتبه: ارومیه، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، تلفن: ۰۴۴۱-۲۲۳۷۰۷۷

Email: ilkhanib@gmail.com

مقدمه

ناباروری یک مشکل عمده خانوادگی و اجتماعی در سطح جهان می‌باشد، بنا به گزارش سال ۱۹۹۳ سازمان بهداشت جهانی ۱۵درصد زوج‌ها از این مشکل رنج می‌برند. با بالا رفتن سن ازدواج این مشکل بیشتر آشکار شده است. با احتساب ناباروری‌های ثانویه تعداد زوج‌هایی که به روش‌های کمک باروری رو می‌آورند بیشتر شده است. در سال ۱۹۷۸ میلادی اولین نوزاد حاصل از لقاح خارج رحمی[۱۰] در انگلستان به دنیا آمد و رشته تخصصی فن‌های کمک باروری[۱۱] به جهان معرفی شد (۱).

[۱] دانشیار پاتولوژی ، مرکز تحقیقات بهداشت باروری، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه،ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)

[۲] پاتولوژیست

[۳] دانشیار بخش نازایی، مرکز تحقیقات بهداشت باروری، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

[٤] استادیار دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

[٥] دانشیار ، مرکز تحقیقات بهداشت باروری، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

[٦] فوق لیسانس بیوشیمی بالینی بخش نازایی کوثر، بیمارستان شهید مطهری

[۷] مسئول بخش نارایی کوثر، بیمارستان شهید مطهری

[۸] پرسنل بخش نارایی کوثر، بیمارستان شهید مطهری

[۹] پرسنل بخش نارایی کوثر، بیمارستان شهید مطهری

[۱۰] In Vitro Fertilization (IVF)

[۱۱] (ART) Assisted Reproductive Technology

در سیکل درمانی لقاح خارج رحمی (IVF) پس از تحریک تخمدان توسط FSH یا HMG، تخمک‌های حاصله تحت نظارت سونوگرافی جمع‌آوری شده و سپس در مجاورت اسپرم شسته شده قرار می‌گیرند. پس از لقاح و تشکیل جنین، تعداد ۵-۲ جنین به داخل رحم انتقال داده می‌شود. روش IVF اولین بار برای مشکلات لوله رحمی[1] به کار رفت و چون نیاز به اسپرم و متحرک داشت، در درمان ناباروری‌های مردان به‌خصوص الیگواسپرمی‌های شدید موفقیت چشمگیری نداشت (۲).

با پیشرفت تکنولوژی و تولید میکروسکوپ‌هایی که امکان دست‌کاری در سطح سلولی[2] را فراهم آوردند، روش‌های خاصی از ART معرفی شدند؛ در روش Zona Drilling زونای تخمک توسط جریان شدیدی از یک مایع اسیدی سوراخ می‌شد تا اسپرم به راحتی بتواند نفوذ کرده و لقاح صورت گیرد. در Partial Zona Dissection قسمتی از زونا شکافته می‌شود که نسبت به روش قبلی درصد لقاح بیشتر است. Sub zonal Inseminization روشی است که تعدادی اسپرم متحرک و نرمال به ناحیه زیر زونا تزریق می‌شود. در هر سه روش فوق احتمال پلی پلوئیدی بالا بود (۱).

با پیشرفت تکنولوژی ساخت میکروپیپت‌های ظریف، فن تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم[3] توسط Palermo از کشور بلژیک معرفی شد. در این روش توسط یک میکروپیپت ظریف، اسپرم به داخل تخمک تزریق می‌گردد. این روش اغلب در مواردی به کار می‌رود که کیفیت اسپرم پایین بوده و احتمال شکست روش IVF کلاسیک زیاد می‌باشد. موفقیت روش ICSI حتی با استفاده از اسپرم‌های با کیفیت پایین نیز، قابل ملاحظه می‌باشد.

با این پیشرفت‌ها موانع ناباروری که تا چند دهه پیش زوج‌ها را از داشتن فرزند محروم می‌کردند قابلیت درمان یافتند. تعدادی از زوج‌ها بدون علت مشخصی نابارور هستند[4] و ۳۷ درصد زوج‌های نابارور را تشکیل می‌دهند. در اکثر این بیماران نیز جنین قابل انتقال به رحم با روش‌های IVF و ICSI حاصل می‌شود ولی پس از انتقال جنین به داخل رحم، لانه گزینی[5] اتفاق نمی‌افتد(۳).

تلاش‌هایی برای غلبه بر این مشکل یعنی عدم لانه گزینی صورت گرفته است از جمله روش Laser Hatching که در آن قسمتی از زونا توسط اشعه لیزر سوراخ می‌شود با فرض بر اینکه احتمال چسبندگی جنین به دیواره رحم افزایش یابد(۴). در روش دیگر موادی به مدیا در هنگام انتقال جنین به رحم اضافه می‌گردد و ادعا می‌شود احتمال لانه گزینی را بالا می‌برد (۵).

فرضیه دیگری که در مورد لانه گزینی جنین تحت بررسی است، احتمال وجود ارتباط غلظت مواد موجود در مایع فولیکولی با میزان رسیده بودن تخمک، میزان موفقیت لقاح و میزان لانه گزینی جنین انتقال یافته به داخل رحم است. در طی مراحل مختلف رشد فولیکول تخمدانی، سلول تخمک در میان سلول‌های گرانولوزا و محیطی مایع قرار گرفته است که ترکیب این مایع با پلاسمای خون متفاوت است. مراحل نهایی تقسیم میوز و بلوغ سیتوپلاسمی تخمک در ارتباط با مکانیسم‌های آندوکرین، پاراکرین و اتوکرین است. هورمون‌ها و سایر مواد تنظیم کننده مرتبط با این مکانیسم‌ها یا به‌صورت لوکال داخل تخمدان ترشح می‌شوند (مثل هورمون‌های استروئیدی و سیتوکین‌ها)، یا بیرون از تخمدان تولید شده و به طور ثانویه به داخل فولیکول وارد می‌شوند. غلظت داخل فولیکولی بعضی از این مواد در طی تکامل فولیکول احتمالاً با میزان پیشرفت تکاملی اووسیت مرتبط است و برای قابلیت باروری تخمک لازم به نظر می‌رسد.

در این مطالعه ما بر آن شدیم تا غلظت بعضی هورمون‌ها و سیتوکین‌های داخل مایع فولیکولی را در روش درمان ناباروری ICSI اندازه بگیریم و ارتباط آن‌ها را با میزان لانه گزینی جنین بررسی کنیم. بدیهی است نتایج حاصل از این مطالعه ضمن ارائه تصویر عملی و واضح از فرضیه فوق، در صورت تائید، راه‌گشای روش‌های عملی جدیدی برای بهبود نتایج درمان ناباروری این افراد می‌شود بدین شکل که می‌توان در محیط‌های نگهداری تخمک، محیط کشت تخمک لقاح یافته و یا مدیایی که جنین در داخل آن به داخل رحم انتقال می‌یابد تغییراتی داد تا میزان موفقیت لانه گزینی جنین افزایش یابد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ۹۰ زوج نابارور که به علت مشکلات مردانه، توسط روش کمک باروری میکرواینجکشن (ICSI) در مرکز ناباروری کوثر بیمارستان شهید مطهری ارومیه تحت درمان قرار گرفتند، بررسی شدند.

معیارهای ورود به مطالعه: حد اکثر سن ۴۰ سال باشد. عدم وجود پاتولوژی مشخص که بتوان ناباروری را به آن نسبت داد. در هیستروسالپنگوگرافی یافته غیر طبیعی گزارش نشود. سطوح هورمون‌های LH, FSH, TSH,FT4, PRL و Estradiol سرم قبل از شروع درمان نرمال باشند.

معیارهای خروج از مطالعه: وجود بیماری عفونی حاد یا مزمن، مشکل روان‌پزشکی شدید، عدم رضایت ورود به مطالعه و زنانی که مایع فولیکولار آن‌ها ظاهر خونی داشته است.

[1] Tubal Factor
[2] Micromanipulation
[3] Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI)
[4] Unexplained Infertility
[5] Implantation

رضایت کتبی از هر دو زوج برای مطالعه گرفته شد.

تحریک کنترل شده تخمدان[1] به روش Long Protocol صورت گرفت ؛ ابتدا ساپرس هیپوفیز توسط داروی آگونیست GnRH (Buserelin با نام تجاری Suprefact ساخت شرکت Aventis Pharma کشور آلمان) با تزریق زیر جلدی روزانه 0.1 mg از روز۲۱ سیکل قبلی شروع و تا روز قبل از گرفتن تخمک ادامه یافت. تجویز HMG (Merional حاوی FSH 75 I.U.& LH 75 I.U.) یا FSH نوترکیب (GONAL-F ساخت شرکت Serono کشور سوئیس حاوی FSH 75 I.U.) با دوز روزانه 450 I.U. – 150 به صورت تزریق زیر جلدی که از روز ۸-۷ سیکل شروع شد. دوز داروها نسبت به سن و پاسخ تخمدان تنظیم شد. رشد فولیکول‌های تخمدان توسط سونوگرافی واژینال تا زمانی که حد اقل ۳ فولیکول به اندازه 18 mm< برسد انجام شد. در این زمان HCG (Pregnyl ساخت شرکت Organon، Netherlands) به میزان 10000 IU به صورت عضلانی تزریق شد و ۳۶ ساعت بعد تحت گاید سونوگرافی ترانس واژینال، فولیکول‌ها آسپیره شدند.

تمامی مایع فولیکولر حاصل از آسپیراسیون جمع‌آوری شد و بعد از ۱۰ دقیقه سانتریفوژ در دور ۳۰۰۰ و جداسازی مایع رویی در ۷۰- درجه سانتی‌گراد فریز شدند.

پس از طی مراحل میکرواینجکشن، سلول‌های لقاح یافته به مدت ۴۸ ساعت در مدیای Ham's F 10 در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۵درصد و CO2 ۵درصد نگهداری شدند. جنین‌ها بررسی شده و ۵-۲ جنین ۸-۴ سلولی به داخل رحم منتقل شد.

پروژسترون واژینال 400 micro gr روزانه یا 100 mg عضلانی از روز انتقال جنین تا ۱۵ روز بعد تجویز شده و سپس HCG سرم برای اثبات حاملگی اندازه‌گیری شد. در صورت وقوع حاملگی، پروژسترون تا هفته ۱۰-۸ ادامه می‌یابد. وقوع حاملگی قطعی با سونوگرافی واژینال در هفته ششم و دیدن ساک حاملگی مشخص می‌شد.

اندازه‌گیری غلظت هورمون‌های استرادیول(E2) و پروژسترون (Prog) (شرکت DRG آلمان)، پرولاکتین (PRL) و هورمون لوتئینیزه کننده (LH) (شرکت تولیدی تحقیقاتی پیشتاز طب زمان ایران) و هورمون رشد(GH) (شرکت MONOBIND آمریکا) به روش الیزا انجام گرفت.

اندازه‌گیری غلظت اینترلوکین‌های(IL) ۱، ۶ (شرکت Bender MedSystems آلمان) و فاکتور رشد شبه انسولینی ۱(IGF-I) (شرکت IBL آلمان) به روش الیزا انجام گرفت.

جمع‌آوری داده‌ها به صورت ثبت در چک لیست بوده و پس از انجام آزمایشات و جمع‌آوری اطلاعات طبق فرم زمینه از قبیل سن، سن ازدواج، طول مدت ناباروری و نتیجه ART قبلی، نتایج در نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۵ وارد شده و از آمار استنباطی شامل آزمون t استفاده شد.

جهت ورود به مطالعه و استفاده از مایع فولیکولی، از بیماران رضایت کتبی اخذ شد. مشخصات فردی و یا نتایج آزمایشات که قابل ردیابی باشد انتشار نیافت.

نتایج

از بهمن ماه سال ۱۳۸۵ تا مرداد ماه سال ۱۳۸۷ تعداد ۱۶۵ زن نابارور تحت درمان به روش ICSI در مرکز نازایی کوثر بیمارستان شهید مطهری ارومیه قرار گرفتند که تعدادی به دلایل عدم رضایت خود یا همسر، ناقص بودن اطلاعات و یا سن بالای ۴۰ سال معیارهای ورود به مطالعه را نداشتند. ۹۰ نفر بقیه تحت بررسی قرار گرفتند.

نتیجه درمان ۳۴ نفر از افراد مورد مطالعه به لانه گزینی منجر شد (۳۷/۷%) و ۵۶ نفر لانه گزینی موفقی نداشتند(۶۲/۳%).

سن افراد مورد مطالعه از ۱۹ تا ۴۰ سال متغیر بوده است (30.3 ± 5.1). سن افراد مورد مطالعه با نتیجه درمان (وقوع یا عدم وقوع حاملگی) ارتباط معنی‌داری نداشت.

طول دوره ناباروری از ۱ تا ۲۰ سال متغیر بوده است (7.5±4.8)، که با نتیجه درمان (وقوع یا عدم وقوع حاملگی) ارتباط معنی‌داری نداشت.

از بین افراد مورد مطالعه، ۷۷ نفر ناباروری اولیه و ۱۳ نفر ناباروری ثانویه داشتند. که نوع ناباروری با نتیجه درمان ارتباط معنی‌داری نداشت.

تعداد تخمک‌های پانکچر شده از زنان مورد مطالعه بین ۲۰-۱ عدد متغیر بود (6.52 ± 3.73) و از ۸۸/۸درصد افراد مورد مطالعه، تعداد ۱۲ – ۳ عدد تخمک پانکچر شد.

کیفیت جنین‌های تشکیل شده پس از انجام ICSI در ۸۰درصد افراد از نوع A (nuclear fragment <10%) بقیه از نوع B (nuclear fragment: 10-20%) یا C (nuclear fragment >20%) بوده است که تفاوت معنی‌داری بین کیفیت جنین و نتیجه لانه گزینی بدست نیامد.

تعداد جنین‌های منتقل شده به رحم افراد مورد مطالعه در ۸۰درصد افراد ۵-۲ عدد بود (۱/۴۴ ± ۳/۱).

[1] Controlled Ovarian Hyperstimulation

تعداد سلول‌های تشکیل دهنده جنین‌های منتقل شده به رحم در ۸۶/۷ درصد افراد بین ۸-۴ سلول (۲/۴ ± ۶/۶۴) بوده است.

میانگین غلظت استروژن مایع فولیکولی در زنانی که حاملگی موفق داشتند64 ± 1638 pg/ml و در زنانی که حامله نشدند، 149 ± 1572 pg/ml بوده است که این تفاوت معنی‌دار بوده است (P=0.016).

میانگین غلظت پروژسترون مایع فولیکولی در زنانی که حاملگی موفق داشتند1819 ± 1873 pg/ml و در زنانی که حامله نشدند، 1690 ± 2170 pg/ml بوده است که تفاوت معنی‌داری یافت نشد.

میانگین غلظت پرولاکتین مایع فولیکولی در زنانی که حاملگی موفق داشتند 256 ± 575 Ng/ml و در زنانی که حامله نشدند، 205 ± 432 Ng/ml بوده است که این تفاوت معنی‌دار بوده است(P=0.004) .

میانگین غلظت هورمون رشد (GH) مایع فولیکولی در زنانی که حاملگی موفق داشتند 1.8 ± 3.26 Ng/ml و در زنانی که حامله نشدند، 1.9 ± 2.85 Ng/ml بوده است که تفاوت معنی‌داری یافت نشد.

میانگین غلظت LH مایع فولیکولی در زنانی که حاملگی موفق داشتند 0.21 ± 0.296 IU/L و در زنانی که حامله نشدند، 0.19 ± 0.249 IU/L بوده است که تفاوت معنی‌داری یافت نشد.

میانگین غلظت IL-1 مایع فولیکولی در زنانی که حاملگی موفق داشتند9 ± 18.4 pg/ml و در زنانی که حامله نشدند، 10 ± 19.7 pg/ml بوده است که تفاوت معنی‌داری یافت نشد.

میانگین غلظت IL-6 مایع فولیکولی در زنانی که حاملگی موفق داشتند 2.7 ± 4.3 pg/ml و در زنانی که حامله نشدند، 3.3 ± 4.1 pg/ml بوده است که تفاوت معنی‌داری یافت نشد.

میانگین غلظت IGF-I مایع فولیکولی در زنانی که حاملگی موفق داشتند 27 ± 60.6 pg/ml و در زنانی که حامله نشدند، 26 ± 46.1 pg/ml بوده است که این تفاوت معنی‌دار بوده است (P=0.014).

جدول شماره (۳-۸): میانگین غلظت هورمون‌ها و سیتوکین‌های انتخابی مایع فولیکولر در زنانی که روش درمانی ICSI آن‌ها به حاملگی موفق یا عدم حاملگی منجر شده است.

Sabstances	Concentration in Pregnant Women	Concentration in Non Pregnant Women	P-value
Estradiol (pg/ml)	1638 ± 64	1572 ± 149	0.016
Progestrone (pg/ml)	1873 ± 1819	2170 ± 1690	NS*
Prolactin (ng/ml)	575 ± 256	432 ± 205	0.004
Growth hormone (ng/ml)	3.26 ± 1.8	2.85 ± 1.9	NS
LH (IU/L)	0.296 ± 0.21	0.249 ± 0.19	NS
IL-1(pg/ml)	18.4 ± 9	19.7 ± 10	NS
IL-6(pg/ml)	4.3 ± 2.7	4.1 ± 3.3	NS
IGF-I(pg/ml)	60.6 ± 27	46 ± 26	0.014

بحث

جنین فقط در یک دوره زمانی کوتاه می‌تواند به آندومتر متصل شده و در آن رشد کند (Window of Implantation)، در این مدت محیط رحم برای بلاستوسیست آماده می‌باشد. آندومتر اکثر پستانداران تغییرات تکاملی متعددی را در طول سیکل قاعدگی طی می‌کنند. طبق مطالعات انجام شده در سیکل‌های ART، روزهای ۲۰-۱۵ سیکل قاعدگی برای پذیرش بلاستوسیست مناسب است و بیشتر موارد موفقیت‌آمیز لانه گزینی بین روزهای ۱۹-۱۶ می‌باشد. (۳, ۶) مایع فولیکولار، محیطی است که اووسیت تا موقع ovulation داخل آن قرار دارد و ترکیب مواد، هورمون‌ها و بیومولکول‌هایش به نظر می‌رسد در کیفیت و میزان تکامل اووسیت موثر باشد(۷). مطالعات متعددی، در

سیکل‌های ART، هورمون‌های استروئیدی مایع فولیکولار را با احتمال وجود ارتباط با نتیجه حاملگی، اندازه‌گیری کرده‌اند.

هورمون‌های استروئیدی:

تغییرات رحمی برای پذیرش بلاستوسیست توسط استروژن و پروژسترون تنظیم می‌شود. پروژسترون فاز پرولیفراتیو آندومتر را به فاز ترشحی تبدیل می‌کند. پروژسترون برای بقای حاملگی ضروری است و با تنظیم منفی matrix (MMP-9) metalloproteinase-9، قدرت تهاجمی تروفوبلاست‌ها به آندومتر و در نهایت تخریب آندومتر را کم می‌کند(۳، ۸). سطح سرمی پروژسترون در سیکل‌های IVF به علت ساپرس آگونیست GnRH و هورمون درمانی، پایین می‌باشد با این حال پیشرفت بافت آندومتر اتفاق می‌افتد بنابراین میزان پاسخ آندومتر به پروژسترون مهم‌تر از سطح سرمی آن است (۳).

تعدادی از مطالعات غلظت بالای استروژن و پروژسترون مایع فولیکولار را با میزان بلوغ اووسیت (۹) میزان باروری در Conventional IVF (۱۰) و پتانسیل تکامل سریع جنین بلافاصله بعد از لقاح مرتبط دانسته‌اند (۱۱).

در مطالعه ما تفاوت چشمگیری در غلظت پروژسترون مایع فولیکولار بین دو گروه با نتیجه حاملگی مثبت و منفی یافت نشد که با اکثر مطالعات سازگار می‌باشد.

استروژن یک هورمون میتوژنیک بوده و باعث رشد آندومتر و بروز رسپتورهای استروژن و پروژسترون در آن می‌شود (۳) . در یک مطالعه استروژن مایع فولیکولار در افراد تحت درمان به روش ICSI در گروهی که به حاملگی موفق منجر شده بودند، به طور چشمگیری بالاتر از غیر حامله‌ها بوده است(۶).

در مطالعه ما غلظت استروژن مایع فولیکولار افراد با حاملگی موفق نسبت به افراد با حاملگی نا موفق به طور چشمگیری بالاتر بوده است (P=0.016).

گنادوتروپین‌ها:

در مورد ارزیابی رزرو تخمدان، روش‌های بررسی و حتی ارزش آن‌ها برای پیش گویی نتیجه باروری نرمال یا ART هنوز مورد بحث است.

سطح سرمی FSH بازال (روز 1-4 فاز فولیکولار سیکل قاعدگی) به علت راحتی و هزینه کم آن، به عنوان پیش گویی کننده رزرو تخمدان در ART استفاده شده است. زنانی که سطح سرمی بازال FSH و LH آنان طبیعی است به عنوان Normal Responder، و آن‌هایی که نسبت LH / FSH بالایی دارند به عنوان High Responder شناخته می‌شوند این‌ها به دنبال تحریک استاندارد تخمدان، به تعداد کافی اووسیت mature تولید می‌کنند. بیماران با FSH سرمی بالا به طور ضعیفی به تحریک استاندارد تخمدان جواب می‌دهند و تعداد اووسیت کمتری از آن‌ها حاصل می‌شود و نتیجه درمان نیز کمتر موفقیت آمیز است (۱۱).

سطح سرمی بازال LH ارتباطی با نتیجه سیکل‌های ART از جمله حاملگی، لانه گزینی و تولد زنده ندارد (۱۱).

در سیکل‌های ART که از آنتاگونیست GnRH استفاده شده بود، سطح سرمی بازال پایین FSH و استروژن بر خلاف LH به طور چشمگیری با پاسخ خوب تخمدان و نتیجه موفق IVF همراه بوده است. و سطح سرمی FSH با صحت (Accuracy) بالاتری از استروژن و LH می‌تواند نتیجه درمانی سیکل‌های IVF را که در آن‌ها از آنتاگونیست GnRH استفاده شده است، پیشگویی کند (۱۲).

در مطالعه ما اگرچه میانگین غلظت LH مایع فولیکولارICSI در افرادی که درمان آن‌ها به حاملگی منجر شده است بیشتر از غیرحامله‌ها است ولی تفاوت معنی‌داری یافت نشد.

هورمون رشد و پرولاکتین:

هورمون رشد به عنوان ماده‌ای که داخل فولیکول، بلوغ اووسیت را پیش می‌برد شناخته شده است (۲) و اعمال مختلفی را به آن نسبت می‌دهند از جمله: افزایش تولید استروژن وابسته به FSH توسط سلول‌های گرانولوزای انسان، در in-vivo (۱۳) و in-vitro (۱۴)؛ افزایش تولید رسپتور LH و HCG وابسته به FSH در سلول‌های گرانولوزای rat (۱۵)، افزایش تولید پروژسترون وابسته به FSH توسط سلول‌های گرانولوزای rat (۱۶) و خوک (۱۷)، تحریک تولید آندروژن توسط سلول‌های تکای rat (۱۸) و تسهیل تولید پروژسترون غیروابسته به FSH توسط سلول‌های گرانولوزا و تسریع بلوغ میوتیک اووسیت در rat (۱۹،۲۰).

در مطالعه Mendoza و همکارانش غلظت هورمون رشد و پرولاکتین در مایع فولیکولی که از آن‌ها اووسیت بالغ بدست آمده بود به طور چشمگیری کمتر از فولیکول‌هایی بود که به اووسیت نابالغ منتج شده بودند. در بررسی اووسیت‌های بالغ، پترن باروری نرمال (وجود دو عدد pronucleus) با غلظت بالای هورمون رشد و پرولاکتین همراه بوده است (۲، ۶) همچنان که سرعت بالای cleavage نیز با غلظت بالای این هورمون‌ها ارتباط معنی‌دار داشت. اووسیت‌های نابالغ از نظر میوز، با غلظت بالای هورمون رشد داخل مایع فولیکولی همراهی دارد. هورمون رشد داخل فولیکول می‌تواند تنظیم سیتوکین‌های داخل فولیکول را طوری تغییر دهد که نفوذپذیری جدار فولیکول به هورمون‌های خارج فولیکول تحت تأثیر قرار گیرد و وجود غلظت بالای هورمون پرولاکتین و LH در فولیکول‌های دارای قابلیت باروری بالا این توجیه را تقویت می‌کند. (۲)

در مطالعه حاضر غلظت هورمون رشد در مایع فولیکولار افرادی که به حاملگی رسیدند بیشتر از افراد غیرحامله بود ولی

این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود. اما غلظت پرولاکتین مایع فولیکولار در افرادی که به حاملگی رسیدند به طور چشمگیری بیشتر از افراد غیر حامله بود (p=0.004).

IL-1

اینترلوکین ۱ (IL-1) به گروهی از پپتیدها اطلاق می‌شود که شامل IL-1α، IL-1β و مهارگر آن، به نام آنتاگونیست رسپتور-IL (IL-1 Ra) 1 می‌باشد. IL-1β توسط استرومای آندومتر و ماکروفاژ تولید می‌شود. سیستم IL-1 همچنین در محل لانه گزینی بررسی شده است و در ماکروفاژهای داخل پرزهای تروفوبلاستی یافت شده‌اند. در آندومتر، IL-1 عملکرد سلول‌های اپیتلیال را تنظیم می‌کند که بیانگر این تئوری است که جنین لانه گزینی خود را آسان کرده و به دسیدوالیزاسیون کمک می‌کند. رسپتورهای IL-1β دو زیرگروه دارند: IL-1 R tI وIL-1 R tII که در جزء اپیتلیالی آندومتر یافت شده‌اند (۳) IL-1 می‌تواند فعالیت MMP-9 را در تروفوبلاست‌ها تحریک کند (۱۳).

Simon و همکارانش IL-1 R را در تمام طول سیکل قاعدگی در آندومتر انسان اندازه‌گیری کردند و دریافتند که در اواسط و اواخر فاز ترشحی میزان آن زیاد می‌شود. همچنین IL-1 Ra را در تمام طول سیکل قاعدگی به طور لوکالیزه در اپیتلیوم آندومتر یافتند ولی به طور چشمگیری در فاز فولیکولار مقدارش بیشتر از مراحل اولیه و اواسط فاز ترشحی بود (۲۱).

در موش‌ها IL-1 Ra به طور موفقیت آمیزی برای بلوک لانه گزینی استفاده شده است. میزان لانه گزینی در موش‌های ماده‌ای که به آن‌ها IL-1 Ra تزریق شده بود بسیار کمتر بوده است این کاهش علاوه بر اثرات توکسیک این ماده به جنین بود. این بیانگر این نکته است که IL-1 در لانه گزینی نقش اساسی دارد (۳).

از دیگر اثرات IL-1 حین لانه گزینی، اثر تحریکی آن روی پروستاگلاندین E2 و آزاد شدن HCG از تروفوبلاست‌های انسان می‌باشد. IL-1βرشد سلول‌های استروما را مهار می‌کند و اتصال بلاستوسیست را به فیبرونکتین مهار می‌کند. IL-1α و IL-1β همچنین برای مراحل اولیه جنین توکسیک گزارش شده است (۳،۱۳).

مطالعات متعددی IL-1 را در مایع فولیکولار بررسی کرده‌اند. IL-1 و TNF-α هر دو در مایع فولیکولار انسان یافت شده و ارتباط تنگاتنگی باهم دارند. بروز این سیتوکین‌ها در تخمدان توسط هورمون‌ها تنظیم می‌شود و در حوالی ovulation به اوج خود می‌رسد (۲۲).

سرعت Cleavage بالا بعد از لقاح، با غلظت بالای IL-1β در مایع فولیکولار انسان (۲) و حیوانات (۲۳) همراه بوده است.

در یک مطالعه دیگر، غلظت پایین IL-1 در مایع فولیکولار زنان تحت درمان به روش ICSI، با نتیجه موفق حاملگی همراه بوده است (۶).

در یک مطالعه in-vitro که اووسیت‌های متافاز II را پس از پانکچر در مایع فولیکولار خودش که به آن IL-1 اضافه شده بود کشت داده و سپس به روش ICSI بارور کرده بودند، به این نتیجه رسیدند که رشد جنین در مرحله دو سلولی متوقف می‌شود (۲۴). تزریق IL-1 به داخل فولیکول تخمدان، مانع تکامل جنین بعد از لقاح می‌شود (۲۴) در کل به نظر می‌رسد IL-1 نیاز به بررسی بیشتری دارد چون در مراحل مختلف باروری از بلوغ اووسیت گرفته تا لانه گزینی، اثرات مثبت و منفی مختلفی برای آن منسوب شده است.

در مطالعه ما غلظت IL-1 مایع فولیکولار در افرادی که درمان ICSI آن‌ها به حاملگی موفق منتج شده بود از غیر حامله‌ها کمتر بوده است که با مطالعات قبلی سازگار است ولی این تفاوت غلظت معنی‌دار نبوده است.

IL-6

IL-6 برای اولین بار از مایع رویی محیط کشت لنفوسیت‌های T هلپر به عنوان ماده موثر تکثیر لنفوسیت‌های B و محرک ترشح ایمونوگلوبولین شناخته شد و بعدها اثرات دیگر آن به عنوان سیتوکین مهم ایمنی، هماتوپوئتیک و پیش التهابی نیز مشخص شد.

در روش درمانی IVF، غلظت خونی IL-6 در روز پانکچر اووسیت با نتیجه درمان ارتباط معنی‌داری نداشت (۲۵).

در بررسی روش درمانی ICSI زنانی که در پروسه تحریک تخمدان پاسخ خوبی داده بودند (High Responder)، غلظت IL-6 مایع فولیکولار با وقوع حاملگی ارتباط مستقیم داشت ($r = 0.373 , P = 0.008$) (۷).

در مطالعه ما غلظت IL-6 در مایع فولیکولی زنانی که حاملگی موفق داشتند بیشتر از غیر حامله‌ها بوده است هر چند این تفاوت معنی‌دار نبوده است.

IGF-I

Insulin-like growth factors پپتیدهای کوچک شبیه پروانسولین به وزن مولکولی ۷،۵ کیلو دالتون هستند که خاصیت میتوژنی داشته و در رشد سلول، تمایز[1] و متابولیسم سلولی تأثیر دارند. علاوه بر اثرات آندوکرینی که توسط IGFs در گردش اعمال می‌شوند، این سیتوکین‌ها اثرات پاراکرین و اتوکرین در تکثیر

[1] Differentiation

سلولی دارند. تولید IGF-I توسط FSH و استروژن تحریک می‌شود و رسپتور آن در سلول‌های گرانولوزا یافت شده است (۲۶).

IGF-I به عنوان تنظیم کننده مستقیم بر سلول‌های گرانولوزای انسان و جوندگان تأثیر دارد (۲۷،۱۴). در in-vitro، IGF-I، همراه با گنادوتروپین‌ها نقش promoter رشد فولیکول را به عهده دارد (۲۸). درمان کمکی با GH در زنان تحت درمان تحریکی تخمدان، حساسیت به گنادوتروپین‌های اگزوژن را بالا برده و باعث کاهش IGF-I در مایع فولیکولار شده است (۲۹).

در مورد روش درمانی ICSI و میزان IGF مطالعات متعددی انجام گرفته است. در مطالعه Mendoza و همکارانش، غلظت IGF-I در مایع فولیکولار با نتیجه موفق حاملگی ارتباط معنی‌دار داشت ولی با کیفیت جنین (گرید و سرعت cleavage) ارتباطی نداشت (۶). در مطالعه‌ای دیگر IGF-I مایع فولیکولار با نوع رژیم تحریک تخمدان بررسی شده است. غلظت IGF-I مایع فولیکولار در افرادی که با FSH تحریک شده بودند بالاتر از بقیه گروه‌ها (HMG یا HMG + FSH) بوده است. ولی با نتیجه حاملگی ارتباطی نداشت (۲۶).

اضافه کردن IGF-I به محیط کشت حاوی زیگوت‌های حاصل از insemination گاو، باعث افزایش تکامل قبل از لانه گزینی می‌شود. همچنین IGF-I یک نقش میتوژنیک در مراحل اولیه تکامل جنین دارد (۳۰).

در مطالعه ما غلظت IGF-I در مایع فولیکولار زنانی که به حاملگی موفق دست یافته بودند، به طور چشمگیری بالاتر از زنانی بود که حامله نشده بودند. و این با اکثر مطالعات قبلی سازگار بوده است.

نتیجه گیری

در این مطالعه مشخص گردید که در زنان نابارور تحت درمان به روش ICSI، غلظت بالای استروژن، پرولاکتین و IGF-I در مایع فولیکولار با لانه گزینی موفق (حاملگی موفق) ارتباط معنی‌دار دارد ولی غلظت هورمون رشد، پروژسترون، LH و IL-1 در مایع فولیکولار در زنان با نتیجه لانه گزینی موفق و ناموفق تفاوت معنی‌داری ندارد.

پیشنهادات

مطالعات انسانی می‌تواند در شناخت فرآیند لانه گزینی جنین موثر باشد شامل:

۱- سیتوکین‌های دیگر نیز در مایع فولیکولار مورد بررسی قرار گیرند.

۲- اندازه‌گیری سیتوکین‌های داخل محیط کشت که جنین بعد از لقاح در آن قرار داشته و Cleavage صورت گرفته است، به نظر می‌رسد در روشن شدن اثرات اتوکرین جنین کمک کننده باشد.

مطالعات پیشنهادی مدل حیوانی شامل:

۳- داخل محیط کشت جنین یا محیط ترانسفر، سیتوکین‌های مختلف اضافه گردیده و نتیجه بررسی و مقایسه شود.

۴- هورمون تراپی همزمان با تحریک تخمک گذاری تخمدان با هورمون‌های مختلف از جمله PRL, LH و GH انجام گرفته و نتایج بررسی و مقایسه شود.

۵- تزریق هورمون‌ها و سیتوکین‌های مختلف به داخل فولیکول‌های در حال رشد تحت گاید سونوگرافی، در مرحله تحریک تخمک گذاری تخمدان می‌تواند طرح مفیدی در بررسی اثرات مواد مختلف روی اووسیت و در نهایت روی جنین باشد.

۶- سلول‌های گرانولوزای اطراف اووسیت در مراحل اولیه Micromanipulation از اووسیت جدا می‌شوند؛ به نظر می‌رسد همراه ساختن این سلول‌ها در محیط کشت همراه با جنین بعد از لقاح شاید بتواند اثرات پاراکرین این سلول‌ها را مشابه حالت طبیعی تأمین کند و نیز می‌توان در این شرایط غلظت سیتوکین‌های تولید شده در این محیط‌های کشت را با محیط‌های بدون این سلول‌ها مقایسه کرد.

۷- پس از لقاح توصیه می‌شود از سلول‌های اپی تلیوم لوله رحمی در محیط کشت جنین همراه کرده و اثرات پاراکرین و نیز غلظت سیتوکین‌های تولید شده در این محیط‌های کشت را با محیط‌های بدون این سلول‌ها مقایسه کرد.

References:

1. Pandolfi PE. History of assisted reproduction: lessons learnt and future challenges. Reviews in Gynaecological Practice 2004;4: 199-202.
2. Mendoza C, Cremades N, Ruiz-Requena E, Martinez F, Ortega E, Bernabeu S, et al. Relationship between fertilization results after intracytoplasmic sperm injection, and intrafollicular steroid, pituitary hormone and cytokine concentrations. Hum Reprod 1999;14(3): 628-35.
3. Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. Textbook of Assisted Reproductive Techniques, Laboratory and Clinical Perspectives.

2 ed. London and New York: Taylor & Francis; 2004.

4. Balaban B, Urman B, Alatas C, Mercan R, Mumcu A, Isiklar A. A comparison of four different techniques of assisted hatching. Hum Reprod. 2002;17(5):1239–43.
5. Valojerdi MR, Karimian L, Yazdi PE, Gilani MA, Madani T, Baghestani AR. Efficacy of a human embryo transfer medium: a prospective, randomized clinical trial study. J Assist Reprod Genet 2006;23(5): 207-12.
6. Makrigiannakis A, Minas V, Kalantaridou SN, Nikas G, Chrousos GP. Hormonal and cytokine regulation of early implantation. Trends Endocrinol Metab 2006;17(5): 178-85.
7. Hammadeh ME, Fischer-Hammadeh C, Georg T, Rosenbaum P, Schmidt W. Comparison between cytokine concentration in follicular fluid of poor and high responder patients and their influence of ICSI-outcome. Am J Reprod Immunol 2003;50(2): 131-6.
8. Hammadeh ME, Fischer-Hammadeh C, Hoffmeister H, Herrmann W, Rosenbaum P, Schmidt W. Relationship between cytokine concentrations (FGF, sICAM-1 and SCF) in serum, follicular fluid and ICSI outcome. Am J Reprod Immunol 2004;51(1): 81-5.
9. Wunder DM, Kretschmer R, Bersinger NA. Concentrations of leptin and C-reactive protein in serum and follicular fluid during assisted reproductive cycles. Hum Reprod 2005;20(5): 1266-71.
10. Vujisic S, Lepej SZ, Emedi I, Bauman R, Remenar A, Tiljak MK. Ovarian follicular concentration of IL-12, IL-15, IL-18 and p40 subunit of IL-12 and IL-23. Hum Reprod 2006;21(10):2650–5.
11. Gruber I, Just A, Birner M, Losch A. Serum estradiol/progesterone ratio on day of embryo transfer may predict reproductive outcome following controlled ovarian hyperstimulation and in vitro fertilization. J Exp Clin Assist Reprod 2007;4: 1.
12. Jurema M, Bracero NJ, Garcia JE. Fine tuning cycle day 3 hormonal assessment of ovarian reserve improves in vitro fertilization outcome in gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles. Fertil Steril 2003;80(5): 1156-61.
13. 1. Lanzone A, Fortini A, Fulghesu AM, Soranna L, Caruso A, Mancuso S. Growth hormone enhances estradiol production follicle-stimulating hormone-induced in the early stage of the follicular maturation. Fertil Steril 1996;66(6):948–53.
14. Mason H, Martikainen H, Beard RW, Anyaoku V, Franks S. Direct gonadotrophic effect of growth hormone on oestradiol production by human granulosa cells in vitro. J Endocrinol 1990;126(3): R1-4.
15. Jia XC, Kalmijn J, Hsueh AJ. Growth hormone enhances follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. Endocrinology 1986;118(4): 1401-9.
16. Hutchinson LA, Findlay JK, Herington AC. Growth hormone and insulin-like growth factor-I accelerate PMSG-induced differentiation of granulosa cells. Mol Cell Endocrinol 1988;55(1): 61-9.
17. Hsu CJ, Hammond JM. Concomitant effects of growth hormone on secretion of insulin-like growth factor I and progesterone by cultured porcine granulosa cells. Endocrinology 1987;121(4): 1343-8.
18. Apa R, Caruso A, A C, Andreani CL, Miceli F, Lazzarin N, et al. Growth hormone stimulates androsterone synthesis by rat theca-interstitial cells. Mol Cell Endocrinol 1996;118(1-2): 95-101.
19. Apa R, Lanzone A, Miceli F, Caruso A, Mancuso S, Canipari R. Growth hormone induction of rat granulosa cell tissue-plasminogen activator

expression and progesterone synthesis. Mol Cell Endocrinol 1994;99(2): 153-9.

20. Apa R, Lanzone A, Miceli F, Mastrandrea M, Caruso A, Mancuso S, et al. Growth hormone induces in vitro maturation of follicle- and cumulus-enclosed rat oocytes. Mol Cell Endocrinol 1994;106(1-2):207–12.
21. Simon C, Piquette GN, Frances A, Westphal LM, Heinrichs WL, Polan ML. Interleukin-1 type I receptor messenger ribonucleic acid expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. Fertil Steril 1993;59(4): 791-6.
22. Zolti M, Meirom R, Shemesh M, Wollach D, Mashiach S, Shore L, et al. Granulosa cells as a source and target organ for tumor necrosis factor-alpha. FEBS Lett 1990;261(2): 253-5.
23. Adashi EY. The potential relevance of cytokines to ovarian physiology: the emerging role of resident ovarian cells of the white blood cell series. Endocr Rev 1990;11(3): 454-64.
24. Caillaud M, Dell'aquila ME, De Santis T, Nicassio M, Lacalandra GM, Goudet G, et al. In vitro equine oocyte maturation in pure follicular fluid plus interleukin-1 and fertilization following ICSI. Anim Reprod Sci 2008;106(3-4):431–9.
25. Hammadeh ME, Ertan AK, Zeppezauer M, Baltes S, Georg T, Rosenbaum P, et al. Immunoglobulins and cytokines level in follicular fluid in relation to etiology of infertility and their relevance to IVF outcome. Am J Reprod Immunol 2002;47(2): 82-90.
26. Hammadeh ME, Braemert B, Baltes S, Georg T, Rosenbaum P, Schmidt W. Relationship between ovarian stimulation regimen and cytokine concentration in follicular fluid and their effect on fertilization and pregnancy outcome of patients undergoing ICSI program. Am J Reprod Immunol 2000;43(1): 12-20.
27. Mason H, Margara R, Winston RM, Seppala M, Koistinen R, Franks S. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) inhibits production of IGF-binding protein-1 while stimulating estradiol secretion in granulosa cells from normal and polycystic human ovaries. J Clin Endocrinol Metab 1993;76(5): 1275-9.
28. Chun S, Eisenhauer KM, Minami S, Billig H, Perlas E, Hsueh AJ. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. Endocrinology 1996;137(4): 1447-56.
29. Owen E, Shoham Z, Mason BA, Ostergaard H, Jacobs HS. Cotreatment with growth hormone, after pituitary suppression, for ovarian stimulation in in vitro fertilization: a randomized, double-blind, placebo-control trial. Fertil Steril 1991;56(6): 1104-10.
30. Sirisathien S, Hernandez-Fonseca HJ, Brackett BG. Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development in vitro. Anim Reprod Sci 2003;77(1-2): 21-32.

Original Article

CORRELATION BETWEEN EMBRYO IMPLANTION AND FOLLICULAR FLUID SELECTED CYTOKINES AND HORMONE LEVELS IN WOMEN UNDER TREATMENT BY MICROINJECTION TECHNIQUE

Behrouz Ilkhanizadeh[1], Ali Nahali Moghaddam[2], Masomeh Hajishafiha[3], Mahzad Mehrzad Sadaghiani[4], Fariba Nanbakhsh[5],Yaghob Deldar[6], Nahid Asadi[7], Nazila Kiarang[8], Vida Saidi[9]

Received: 23 Apr , 2013; Accepted: 28 Jun , 2013

Abstract

Background & Aims: Concentrations of certain substances in follicular fluid (FF) may related to fertilization outcome. The study aim was to identify FF markers with which to predict embryo implantation potential.

Materials & Methods: Concentrations of selected hormones, cytokines and growth factors in FF samples obtained during assisted reproduction treatment, Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) method were related with treatment outcomes.

Results: Mean concentrations of 17beta-estradiol (E2), prolactin (PRL) and insulin-like growth factor (IGF)-I were significantly higher, in treatment attempts leading to a clinical pregnancy as compared with those in which no pregnancy was established. LH, growth hormone (GH), progesterone, and interleukin-1 (IL-1) concentrations are similar in successful and unsuccessful attempts.

Conclusions: Fertilization outcomes were related to FF levels of PRL, E2 and IGF-I. But LH, growth GH, progesterone, and IL-1 are not markers of success.

Keywords: Implantation, Hormone, Cytokine, Follicular fluid, ICSI

Address: Urmia University of Medical Science, Urmia, Iran
Email: ilkhanib@gmail.com

SOURCE: URMIA MED J 2013: 24(5): 338 ISSN: 1027-3727

[1] *Associate Professor of Pathology, Reproductive Health Research Center, Urmia University of Medical Science, Urmia, Iran (Corresponding Author)*
[2] *Pathologist*
[3] *Associate Professor, Reproductive Health Research Center, Urmia University of Medical Science, Urmia, Iran*
[4] *Assistant Professor, Urmia University of Medical Science, Urmia, Iran*
[5] *Associate Professor, Reproductive Health Research Center, Urmia University of Medical Science, Urmia, Iran*
[6] *Master of Biochemistry, Kosar Infertility Center, Shahid Motahhari Hospital, Urmia , Iran*
[7] *Kosar Infertility Center, Shahid Motahhari Hospital, Urmia , Iran*
[8] *Kosar Infertility Center, Shahid Motahhari Hospital, Urmia , Iran*
[9] *Kosar Infertility Center, Shahid Motahhari Hospital, Urmia , Iran*