

بررسی ارتباط سطح سایتوکاین های MCP، IP-10، TNF- α ، IL-1 β در ترشحات اندومتريال با میزان موفقیت باروری آزمایشگاهی

دکتر صغری ربیعی*، دکتر علیرضا زمانی**، دکتر مهرانوش ابراهیمی***، دکتر مهناز یاونگی****
دکتر مرضیه سنوئی فریمانی****، دکتر فرزانه اثنی عشری*****، دکتر نازنین فلاح*****

دریافت: ۹۳/۱۰/۴ پذیرش: ۹۴/۲/۲۱

چکیده:

مقدمه و هدف: سایتوکاین هایی که به وسیله جنین و مخاط رحم تولید می شوند مسئول تنظیم تعامل بین مادر و جنین هستند که پذیرش رحم را افزایش می دهند و منجر به افزایش میزان موفقیت در لقاح آزمایشگاهی (In Vitro Fertilization; IVF) می شوند. هدف از این مطالعه تعیین رابطه بین سطح سایتوکاین ها IP-10، TNF- α ، IL-1 β و MCP در ترشحات اندومتر با میزان موفقیت روش IVF می باشد.

روش کار: در این مطالعه مورد-شاهدی تو در تو، ۵۰ زن داوطلب درمان ناباروری، کاندیدای IVF مراجعه کننده به درمانگاه بیمارستان فاطمیه همدان انتخاب شدند. آسپیراسیون ترشحات اندومتر در کلیه بیماران پیش از انتقال جنین و با کارگذاری ترانس سرویکال کاتتر و ساکشن سرنگ ۲ میلی لیتری انجام شد. اندازه گیری سطح سایتوکاین موجود در نمونه ها با روش ELISA صورت گرفت.

نتایج: بین ۵۰ زن انتخاب شده، ۵ تن در شروع طرح به علت contact bleeding حین نمونه گیری از مطالعه خارج گردیدند و نمونه های ۴۵ تن از نظر سایتوکاین های IL1، IP10، MPC-1 و TNF- α آزمایش شدند. مقایسه سطح سایتوکاین ها در ترشحات اندومتر نشان داد که میانگین IP10، MPC و TNF- α در گروه با حاملگی بالینی موفق (n=۹) به ترتیب ۲۴/۲±۱۴/۹ و ۳۴۸/۷±۱۱/۳ و ۱۰۹۹±۹۰۶ و ۲۵۷±۱۱۳/۳۶ بطور معنی داری کمتر از گروه با حاملگی ناموفق (n=۳۶) به ترتیب ۱۰۲±۱۲۹/۸، ۶۳۵±۳۵۴ و ۱۰۹۹±۹۰۶ می باشد. هر چند تفاوت معنی داری بین سطح سایتوکاین IL1 بین دو گروه مشاهده نشد.

نتیجه نهایی: در بیماران تحت درمان IVF با لانه گزینی ناموفق، افزایش میزان سایتوکاین های IP10، MPC1 و TNF- α مشاهده شد. کاهش میزان این سایتوکاین ها می تواند مارکر پیشگویی کننده با ارزشی برای IVF با حاملگی موفق محسوب شود.

کلید واژه ها: آبستنی/ بارورسازی آزمایشگاهی / سایتوکاین ها/ لانه گزینی

مقدمه:

ناباروری هستند که ۴/۶ درصد به ناباروری اولیه و ۳/۴ درصد به ناباروری ثانویه مبتلا هستند (۲). طبق آمارهای سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۰۲ در کشورهای در حال توسعه (به جز چین) ۱۸۶ میلیون زوج نابارور وجود داشته است که البته مقدار واقعی آنها بیش از این است. ناباروری از جمله مشکلات سلامت است که تاثیر زیادی بر روابط

ناباروری به عدم باروری پس از یک سال رابطه جنسی بدون استفاده از روش های پیشگیری از بارداری گفته می شود. قریب به ۱۴ درصد زوجین دچار ناباروری هستند (۱). طی مطالعه ای در استانهای مختلف ایران در سال ۲۰۰۷ مشخص شد حدود ۸ درصد از زوجین ایرانی دچار

* استاد گروه زنان و مامایی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان (rabieesogol@yahoo.com)

** استاد گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

*** متخصص زنان و مامایی

**** دانشیار گروه زنان و مامایی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

***** استادیار گروه پزشکی اجتماعی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

***** دکتری حرفه ای پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

آنها یاد می شود (۱۴-۱۲، ۵، ۱).

لانه گزینی موفق وابسته به دو فاکتور عمده است: نخست کیفیت جنین و سپس قابلیت پذیرش اندومتر. این دو فاکتور مسئول برهم کنش جنین و مادرند که برای اتصال و تهاجم بلاستوسیت به داخل اندومتر ضروری است. مطالعات بسیاری در خصوص سایر فاکتورهای دخیل در لانه گزینی موفق رویان انجام شده است. علیرغم اطلاعات ارزشمند حاصل از این مطالعات ارتباط این فاکتورها با حاملگی ناموفق چندان شناخته نیست. بررسی قابلیت پذیرش اندومتر با روش های مختلفی امکان پذیر است. این روش ها عبارتند از: بررسی با میکروسکوپ های نوری و الکترونی، کشت سلول و بافت، ایمونوهمیستوشیمی و آنالیزهای بیوشیمیایی (۲، ۹، ۱۵).

سایتوکاین ها و فاکتورهای رشد، پلی پپتیدها و پروتئین های ساخته شده توسط سلول های مختلفی هستند که به گیرنده های خاصی در سطح سلول های هدف متصل می شوند و با آغاز پیام های داخل سلولی در تنظیم عملکرد سلول های اندومتر نقش دارند. این پروتئین ها تنظیم، تکثیر، تمایز و آپوپتوز سلول های اندومتر را با مکانیسم های اتوکراین، پاراکراین و اندوکراین بر عهده دارند. سایتوکاین های تولید شده توسط موکوس رحم و جنین در فعل و انفعالات مابین مادر و جنین نقش عمده ای را بر عهده دارند و موجب تقویت قابلیت پذیرش اندومتر با کنترل بیان پروتئین های دخیل در پروسه چسبندگی می گردند. از میان سایتوکاین ها و فاکتورهای رشد که ممکن است از طریق افزایش پذیرش اندومتر در لانه گزینی نقش داشته باشند می توان به برخی از آنها اشاره کرد: Interlukin1، Leukemia Inhibitory Factor، Colony Stimulating Factor، Keratinocyte Growth Factor و ... با این همه تا به حال هیچ فاکتور منفردی که برای لانه گزینی در انسان ضروری باشد شناخته نشده است. یک بیومارکر ایده آل در قابلیت پذیرش اندومتر باید واجد این ویژگی ها باشد: ۱. در اندومتر موجود باشد ۲. نزدیک به محل لانه گزینی باشد ۳. در طی دوره لانه گزینی ظاهر شود و پس از این دوره ناپدید گردد (۱، ۲).

شناسایی بیومارکرهای با قابلیت پذیرش اندومتر میتواند تأثیر بالینی به سزایی در افزایش لانه گزینی در سیکل های نرمال و سیکل های ART (assisted reproductive technology) داشته باشد. همچنین شناسایی این مارکرها می تواند در

زناشویی، سلامت روان و اعتماد به نفس فرد مبتلا بر جای می نهد. در برخی از کشورها ناباروری به معنای پایان زندگی مشترک و جدایی محسوب می شود (۲). بسیاری از زوج ها دارای نوعی از مشکلات ناباروری اند که با استفاده از روش های کمک باروری قابلیت باروری خود را باز می یابند (Sub-fertile). پیشرفت های اخیر در تکنیک های کمک باروری موجب شده است که این روشها در دسترس تر و کارآمدتر باشند. دیگر درمان های ناباروری اغلب بسیار پر هزینه اند، بار اقتصادی زیادی را بر خانواده تحمیل می کنند و تضمینی در خصوص کارآمدی و اثربخشی آن ها وجود ندارد (۳-۵).

یکی از روش های رایج کمک باروری لقاح خارج رحمی (In Vitro Fertilization یا IVF) است. در این روش سلول تخمک بالغ گرفته شده از زن با اسپرم مرد در خارج از بدن زن لقاح می یابد و رویان حاصل برای ادامه بارداری طبیعی در رحم همان زن یا زن دیگری کاشته می شود. اگر IVF موفقیت آمیز باشد، رویان در دیواره رحم کاشته می شود و بارداری رخ می دهد. هر مرحله IVF ممکن است دچار مشکلاتی شود، اما حساس ترین و مشکل سازترین مرحله، کاشتن موفقیت آمیز رویان وارد شده به رحم است (۱۰-۱، ۴، ۶).

علیرغم پیشرفت های صورت گرفته در تکنولوژی های کمک باروری در تمامی پروسه های IVF گاه به رغم انتقال رویان های متعدد بارداری موفق ایجاد نمی گردد. علل متعددی برای شکست مکرر پروسه IVF شناخته شده است که می توان از چاقی، مصرف سیگار، اختلال تیروئید، میوم های رحم، آنومالی های رحم، اشتباه در تکنیک انتقال رویان، مشکلات ارثی و ناهنجاری های کروموزومی جنین نام برد (۱۱) اما درصد قابل توجهی از شکست IVF به سبب اختلال در پذیرش رحم است. اندومتر انسان در یک دوره زمانی محدود در طی فاز میدلوتال در یک سیکل تخمک گذاری نرمال قابلیت پذیرش رویان را دارد. طول این دوره که Window of Implantation خوانده می شود از طریق استروئیدهای جنسی تعیین می گردد. این استروئیدها، بیان فاکتورهای رشد، فاکتورهای رونویسی، سایتوکاین ها و کموکاین هایی که به صورت موضعی بر اندومتر اثر می گذارند را تنظیم می کنند. این مرحله همراه با بیان پپتیدها و پروتئین هایی است که تحت عنوان نشانه های زیستی قابلیت پذیرش اندومتر از

انتقال جنین از ۳ نوبت تزریق hCG (هر نوبت 5000 IU) و یا آمپول پروژسترون (100mg/day) به منظور تداوم فاز لوتئال استفاده گردید. به منظور تشخیص لانه‌گزینی آزمایش hCG سرمی در روز ۱۰ پس از انتقال جنین انجام گرفت. در صورت مثبت بودن نتیجه، آزمایش ۴۸ ساعت بعد تکرار شد. افزایشی معادل دو برابر انحراف معیار در میانگین تغییرات روزانه hCG نشانه لانه‌گزینی جنین در نظر گرفته شد. تشخیص حاملگی بالینی با استفاده از تست ادراری تشخیص حاملگی در روز هیجدهم پس از دست‌یابی به تخمک صورت گرفت. تست حاملگی منفی به دنبال افزایش میزان hCG معادل از دست رفتن حاملگی پره کلینیکال در نظر گرفته شد. بروز قاعدگی با فاصله اندک از مثبت شدن تست ادراری تحت عنوان از دست رفتن حاملگی بیوشیمیایی تلقی گردید. از دست رفتن محصولات حاملگی تشخیص داده شده با روش‌های اولتراسونوگرافیک در طی ۳ ماهه اول معادل سقط در نظر گرفته شد. مشاهده ساک در هفته پنجم و یا مشاهده حرکات قلب جنین در هفته ششم بارداری به عنوان نشانه حاملگی در حال پیشرفت تلقی گردید.

آسپیراسیون ترشحات اندومتر در کلیه بیماران پیش از انتقال جنین و با کارگذاری ترانس سرویکال کاتتر انتقال جنین و ساکشن سرنگ ۲ میلی لیتری صورت پذیرفت. نمونه حاصل از آسپیراسیون در نیتروژن مایع و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا انتهای دستیابی به نتیجه نگهداری شد. پس از تکمیل شدن تعداد نمونه محاسبه شده، نمونه‌ها به دو زیر گروه مورد و شاهد (دارای حاملگی و فاقد حاملگی بالینی) تقسیم شده و مقدار سایتوکاین موجود در نمونه‌های جمع‌آوری شده (Monocyte MCP-1 = Chemoattractant Protein-1, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β inducible protein of 10=IP-10) با استفاده از کیت‌های استاندارد و به روش ELISA (ساخت شرکت R&D آمریکا) اندازه‌گیری شد. توصیف داده‌ها با استفاده از میانگین و انحراف معیار صورت گرفت و مقایسه میانگین مقادیر سایتوکاین‌های مختلف در دو گروه با حاملگی موفق و ناموفق با استفاده از آزمون آماری تی و من‌ویتنی انجام شد. سطح معنی‌داری، $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج:

در این مطالعه ۵۰ نفر از افراد کاندیدای IVF قبیل از

به کارگیری مطلوب تر روش‌های پیشگیری از بارداری موثر باشد. ماهیت غیرتهاجمی آنالیز ترشحات اندومتر، بررسی قابلیت پذیرش اندومتر پیش از انتقال جنین در سیکل‌های IVF را بیش از مارک‌هایی همچون زمانبندی اندومتری (Endometrial Dating) با استفاده از هیستولوژی امکان‌پذیر می‌سازد. علاوه بر این استفاده از این ابزار می‌تواند به درک بهتر تعاملات پیچیده مولکولی رویان و جنین در محیط رحم یاری رساند.

این مطالعه با هدف و به منظور تعیین ارتباط برخی سایتوکاین‌ها با میزان لانه‌گزینی موفق در زنان داوطلب درمان ناباروری انجام شد.

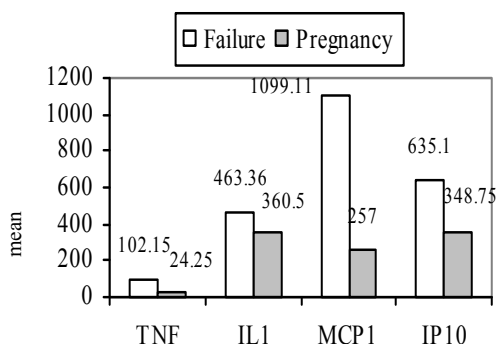
روش کار:

این مطالعه از نوع مورد شاهدی تو در تو (Nested case control Study) بود. بر اساس نتایج مطالعات قبلی (۸)، انحراف معیار و میانگین IL-1 β در گروه شاهد و گروه با لقاح نا موفق و با توجه به ریزشی که در حجم نمونه پس از گذاشتن نمونه‌های آزمایشگاهی در کیت‌های مربوطه ایجاد شد، حجم نمونه به دست آمده در ۱/۵ ضرب گردید و حجم نمونه نهایی ۴۵ نفر محاسبه شد. روش جمع‌آوری داده‌ها: زنان مراجعه‌کننده به درمانگاه‌های تخصصی بیمارستان فاطمیه همدان، که به علت ناباروری کاندیدای انجام IVF شده بودند با ارائه توضیحات کافی و اخذ رضایت آگاهانه وارد مطالعه شدند. به منظور یکسان سازی زمان انجام معاینه و پیشگیری از اثرات اثبات شده تغییرات هورمونی در طول چرخه قاعدگی بر پارامترهای مختلف، معاینه کلیه بیماران در فاز فولیکولار اولیه چرخه قاعدگی انجام پذیرفت.

برای تحریک تخمک‌گذاری از تزریق روزانه rFSH (با دوزاژ متناسب با شرایط بیمار) از روز سوم سیکل قاعدگی استفاده شد. به منظور پیشگیری از Luteinization پیش از موعد از تزریق روزانه GnRH Antagonist (0.25mg) از روز پنج سیکل IVF استفاده گردید. به منظور تنظیم سیکل از روز ۱۸ سیکل قبلی از GnRH Agonist استفاده شد. به منظور تحریک نهایی بلوغ اووسیت‌ها از تزریق عضلانی یک دوز hCG (Pregnyl 10000 IU) استفاده گردید. ۳ روز پس از Puncture انتقال حداقل دو جنین برای زنان با سن کمتر از ۳۶ سال و ۲ جنین برای زنان با سن بیشتر از ۳۶ سال صورت گرفت. انتقال جنین در فاز لوتئال صورت پذیرفت. در طی ۵ روز نخست پس از

یافته ها در افراد با پیامد مثبت: کمترین میزان TNF- α ، ۸ و بیشترین ۴۴ با میانگین $14/97 \pm 24/25$ گزارش شد. در مورد IL-1 β کمترین ۷۲ و بیشترین ۷۳۲ با میانگین $360/50 \pm 312$ گزارش شد و در مورد MPC1 کمترین ۱۲۱ و بیشترین ۳۹۷ با میانگین $257/113 \pm 3$ گزارش شد. در مورد IP10 کمترین ۱۸۶ و بیشترین ۴۳۵ با میانگین $348/75 \pm 11/3$ گزارش گردید.

به طور کلی همانطور که مشاهده می شود میانگین سطح سایتوکاین ها در افراد با پیامد مثبت کمتر از افراد با پیامد منفی می باشد (شکل ۱).



شکل ۱: مقایسه مقادیر سیتوکاین ها در بیماران تحت درمان منجر به حاملگی بالینی و عدم حاملگی بالینی

طبق آنالیز آماری مقادیر این سایتوکاین ها مشخص شد که میزان IP10، MPC1 و TNF- α در افرادی که پیامد مثبت داشتند نسبت به افرادی که از نظر تست حاملگی منفی بودند پایین تر بود. ارزش P در مورد MPC1 ($<0/001$), در مورد IP10 ($0/005$) و در مورد TNF- α ($0/007$) بود. اما در مورد IL-1 β تفاوت معنی داری دیده نشد (جدول ۲).

جدول ۲: ارتباط حاملگی موفق و ناموفق با مقادیر

سایتوکاین های مطالعه شده در ترشحات آندومتر زنان

تحت درمان ناباروری با IVF

ارزش P	صدک			
	۷۵	۵۰	۲۵	
0/007	۱۳۳	۷۰	۲۱	شکست
	۳۹/۲۵	۲۲/۵۰	۱۱	حاملگی
>0/05	۵۲۱	۲۸۹	۲۱۰	شکست
	۶۷۵	۳۱۹	۸۷/۵۰	حاملگی
0/001	۱۴۶/۵۰	۱۱۵۴	۳۵۶/۵۰	شکست
	۳۶۵/۲۵	۲۵۵	۱۵۰/۷۵	حاملگی
0/005	۹۰۰/۵۰	۶۰۷	۳۳۸/۵۰	شکست
	۴۳۰/۲۵	۳۸۷	۲۲۹	حاملگی

انتقال رویان تحت آسپیراسیون موکوس قرار گرفتند. ۵ بیمار از همان ابتدا به علت contact bleeding حین نمونه گیری از مطالعه خارج شدند و ترشحات ۴۵ نفر از نظر سایتوکاین ها (TNF- α , IL1, IP10, MPC) مورد بررسی قرار گرفت. برای تعداد ۳۶ نفر (۸۰٪) از این افراد با بررسی آزمایشگاهی طی پیگیری انجام شده، تست β hCG منفی گزارش شد و تعداد ۹ نفر (۲۰٪) در نهایت به حاملگی بالینی دست یافتند و تست β hCG مثبت گزارش شد.

ویژگی های افراد با پیامد منفی (negative outcome): در این گروه در ۲۷ نفر (۷۵٪) انتقال بدون هدایت سونوگرافی و در ۹ نفر (۲۵٪) انتقال زیر هدایت سوند انجام شد. ۳۲ نفر (۸۸/۹٪) افراد هیچ سابقه ناهنجاری آناتومیک یا مادرزادی رحم نداشتند و تنها ۴ نفر (۱۱/۱٪) دارای ناهنجاری رحم بودند.

از نظر کیفیت جنین، رویان های انتقال یافته در ۲۰ نفر (۵۵/۶٪) رتبه A و ۱۵ نفر (۴۱/۷٪) رتبه B و ۱ نفر (۲/۸٪) رتبه C داشتند.

ویژگی های افراد با پیامد مثبت (positive outcome): مطابق یافته های مطالعه هیچ یک از افراد حامله نقص آناتومیک رحمی نداشتند و جنین های انتقال یافته دارای کیفیت A بودند. ویژگی های افراد در گروه های با پیامد مثبت و با پیامد منفی از نظر حاملگی در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: ویژگی های افراد در گروه های با پیامد مثبت و

پیامد منفی حاملگی

	میانگین سن		میانگین تعداد	میانگین مدت نازایی
	(سال)	رویان		
گروه پیامد مثبت	۲۹/۷	۳	۳	۸/۳
	(۲۵-۳۵)	(۱ تا ۴)	(۱ تا ۲۶)	
گروه پیامد منفی	۲۸	۲/۲	۲	۵/۷
	(۲۲-۳۵)	(۱ تا ۴)	(۱ تا ۲)	(۸ تا ۲)

در ۴۵ نفر از بیماران شرکت کننده در طرح، سایتوکاین ها (TNF و IL-1 β , IP10, MPC) تحت آنالیز قرار گرفتند.

یافته ها در افراد با پیامد منفی: در افراد با پیامد منفی کمترین میزان TNF- α ، ۵ و بیشترین میزان ۵۷۳ با میانگین 102 ± 129 گزارش شد. همچنین در مورد IL-1 β کمترین میزان ۳۴ و بیشترین ۲۷۴۳ با میانگین 463 ± 546 گزارش شد. در مورد MPC1 کمترین میزان ۱۵۰ و بیشترین ۳۸۵۶ با میانگین 1099 ± 906 گزارش شد. در مورد IP10 کمترین میزان ۱۶۵ و بیشترین ۱۳۹۶ با میانگین 635 ± 354 گزارش گردید.

را تنظیم کنند (۲۲). شواهد جدید نشان می دهند آسیب مختصر به اندومتر در زنان با شکست مکرر IVF به عنوان یکی از راه های جایگزین درمانی موجب ارتقای نتایج و دستیابی به میزان بیشتری از حاملگی بالینی شده است که تاییدی بر فرضیه جدید محسوب می شود (۲۵-۲۳).

هدف مطالعه حاضر مقایسه ای بود میان سطح سایتوکاین های $IL-1\beta$ ، IP10، MPC1 و $TNF-\alpha$ در ترشحات آندومتر دو گروه با IVF موفق و ناموفق. مطالعه نشان داد که میزان سایتوکاین های IP10، MPC1 و $TNF-\alpha$ به طور معناداری در گروه با IVF ناموفق بالاتر است اما در خصوص $IL-1\beta$ میان دو گروه تفاوت معناداری از لحاظ آماری مشاهده نشد.

تاثیر $TNF-\alpha$ ، مفید یا مضر؟ مطالعات اولیه بر روی نقش $TNF-\alpha$ در باروری نشان می داد که تزریق این سایتوکاین در موش ها موجب مرگ رویان می شود (۲۶) اما مطالعات بعدی نشان دادند که $TNF-\alpha$ به عنوان یک سایتوکاین پیش التهابی مترشح از سلول های Th-1 در "پنجره لانه گزینی" یک عملکرد فیزیولوژیک مناسب برای لانه گزینی ایفا می کند (۲۷). تودر و همکاران نشان دادند که $TNF-\alpha$ نه تنها برای روند لانه گزینی مضر نیست که برای رویان موش هایی که تحت استرس تراژونیک قرار گرفته اند نقشی محافظت کننده دارد (۲۸). مطالعات دیگر نیز نشان دادند که $TNF-\alpha$ یک تنظیم گر مهم برای متالوپروتئینازهای ماتریکسی (MMP-2 و MMP-9) تروفوبلاست هاست که ویژگی تهجمی تروفوبلاست ها را تنظیم می کند (۲۹،۳۰). از سوی دیگر برخی مطالعات نشان می دهند که افزایش بیش از حد $TNF-\alpha$ می تواند این تنظیم را بر هم بزند (۳۱) همچنین میزان زیاد این سایتوکاین در بیماری های باروری مختلف همچون عفونت های اندومتر و سقط مکرر خود به خود یافت شده است (۲۷). بومسما و همکاران در سال ۲۰۰۹ به این نتیجه رسیدند که حاملگی بالینی با میزان بالای $TNF-\alpha$ در ترشحات اندومتر رابطه ای معنادار دارد (۲) اما یافته های مطالعه حاضر عکس این موضوع را نشان می دهد. به عبارتی ما دریافتیم که $TNF-\alpha$ در ترشحات اندومتر زنان با حاملگی بالینی به طور معناداری کمتر از کسانی است که دچار شکست IVF می شوند که این یافته ها مشابه مطالعات اولیه بر روی حیوانات هستند. علاوه بر ابهامات تئوریک، ممکن است مواردی چون تفاوت های تکنیکی در آسپیراسیون ترشحات و یا زمان بندی

طبق نتایج جدول ۲ درمورد TNF در افرادی که دچار شکست شدند میزان TNF در صدک های ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد به ترتیب ۲۱، ۷۰ و ۱۳۳ می باشد و در افراد با پیامد مثبت (۱۱، ۲۲، ۳۹/۲۵) می باشد ($P=0/007$). این یافته ها همچنین نشان می دهند که مقادیر سایتوکاین ها در افرادی که پیامد منفی داشتند بالاتر است.

بحث:

در این مطالعه، میزان دستیابی به IVF موفق تنها ۲۰٪ بود. در مطالعات گذشته نیز، حتی با وجود غربالگری رویان ها از لحاظ مشکلات کروموزومی با استفاده از روش PGD (Pre-implantation genetic diagnosis)، میزان لانه گزینی حاصله در کل کمتر از ۵۰٪ بوده است (۱۶،۱۷). به همین دلیل به نظر می رسد فاکتورهای دیگری نیز علاوه بر مشکلات کروموزومی در افزایش میزان شکست IVF نقش داشته باشند. در مطالعه ای مشابه مطالعه حاضر، رجایی و همکاران نشان دادند که سلول های استرومای اندومتر میزان بیشتری از سایتوکاین های IL-6 و IL-8 را در لانه گزینی طبیعی نسبت به گروه با شکست مکرر لانه گزینی تولید می کنند. این در حالی است که IL-10 در گروه اول به میزان کمتری تولید می شود (۱۸). به نظر میرسد کنش متقابل بین سلولهای اندومتر و سلول های ایمنی منجر به تولید میزان بالاتری از سایتوکاین ها می شود. شواهد متعددی نشان می دهد که پیش از این بر اساس یک الگوی غالب (موسوم به الگوی نسبت Th1 و Th2) تصور می شد سایتوکاین های پیش التهابی مترشح از Th1 (همچون $TNF\alpha$) برای لانه گزینی و سلامت رویان مضرند، در کنار آن برخی سایتوکاین های ضدالتهابی مترشح از Th2 (همچون IL10) برای لانه گزینی ضروری اند (۱۹) اما در سال ۲۰۰۴ و متعاقب آن در سال ۲۰۰۷ این فرضیه توسط چائوت و همکاران زیر سوال رفت. در واقع آنان فرضیه پیشین را نوعی ساده سازی بیش از حد اتفاقات ایمونولوژیک روند لانه گزینی قلمداد کرده و نقش سایتوکاین های مختلف را بازتعریف نمودند (۲۰،۲۱). مطالعات اخیر نشان می دهد سایتوکاین های التهابی ترشح شده از Th1، نه تنها اختلالی در لانه گزینی ایجاد نمی کنند، بلکه برای بازسازی دوباره اندومتر ضروری هستند. همچنین این سایتوکاین ها می توانند با فراخوانی ماکروفاژها و دندریتیک سل ها اتفاقات متعاقب لانه گزینی

بارداری تنظیم می کند (۳۹). علاوه بر آن مشخص شده است که IP10 موجب تحریک بیان ساب یونیت های اینترگرین در سلول های تروفوبلاست می شود و همچنین IP10 نوترکیب چسبندگی سلول های تروفوبلاست را به سلول های اپیتلیال اندومتر افزایش می دهد (۴۰). علی رغم شواهد حمایت کننده مبنی بر رابطه مثبت بین سطح IP10 و نتایج موفقیت آمیز IVF، در مطالعه حاضر رابطه معکوسی مشاهده شد که نیازمند بررسی های آتی با نمونه های بیشتر و همچنین توجه به تمام فاکتورهایی است که سیستم ایمنی درگیر با لانه گزینی را تحت تاثیر قرار می دهد.

شواهد متعدد نشان می دهند که حاملگی رویدادی است پیچیده و وابسته به فرایندهای پیچیده ایمونولوژیک. شناخت بیشتر این پدیده های ایمونولوژیک موجب می شود فاکتورهای دخیل در موفقیت و عدم موفقیت روند حاملگی بیش از پیش تحت کنترل درآیند. این مطالعه اهمیت سایتوکاین ها را در کنش بین رویان و مادر نشان می دهد.

نتیجه نهایی:

این مطالعه نشان داد که میزان کم سایتوکاین های IP10،MPC1 و TNF- α می تواند پیشگویی کننده با ارزشی برای یک IVF با حاملگی موفق محسوب شود که البته با توجه به نتایج متفاوت مطالعات حاضر نسبت به مطالعات مشابه، این نتایج نیازمند تایید در بررسی های آینده است. طبیعت غیر تهاجمی آنالیز اسپیراسیون ترشحات رحم این امکان را فراهم می کند که قبل از انتقال رویان در فرایند IVF وضعیت پذیرش رحم، بدون وارد آوردن آسیب های روش های جایگزین همچون endometrial dating بررسی گردد. این روش جدید باعث ارتقای اطلاعات ما از اتفاقات ایمونولوژیکی خواهد شد که رویان، در نخستین روزهای حیاتش با آن درگیر است.

سپاسگزاری:

این مقاله برگرفته از پایان نامه دوره دستیاری زنان و مامایی میباشد. بدینوسیله از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان که بخشی از هزینه انجام آن را تامین نمودند صمیمانه سپاسگزاری می شود. لازم بذکر است نتایج این مطالعه با منافع نویسندگان در تعارض نمی باشد.

آسپیراسیون و همچنین حجم کم نمونه ها از دلایل این اختلاف باشد که بررسی های وسیع تر با حجم نمونه بیشتر را می طلبد.

تاثیر IL-1: در مطالعه ای که توسط ایناگاکی و همکاران در سال ۲۰۰۳ و بومسما و همکاران در سال ۲۰۰۹ صورت گرفته بود نشان داده شد که میزان IL-1 β در زنان با شکست در لانه گزینی به طور معنی داری بالاتر از گروه کنترل بارور بوده است (۲،۸). همچنین پژوهش های دیگری نیز به اثبات رسانده اند که بیان نامناسب IL-1 β در فاز مید-سکرتوری با سقط مکرر مرتبط است (۳۲). این مورد در مطالعه حاضر فاقد تفاوت معنی دار از نظر آماری بود.

تاثیر MPC1 و IP10: در این مطالعه ارتباط سطح پایین MPC1 و IP10 با حاملگی بالینی موفق نشان داده شد. در مطالعه بومسما و همکاران میزان MPC1 به صورت منفی و میزان IP10 به صورت مثبت با لانه گزینی اولیه رویان رابطه ای معنادار داشت (۲). مشخص شده است که هر دوی این سایتوکاین ها نقشی تعیین کننده در مهاجرت لکوسیت ها بر عهده دارند (۳۳). IP-10 با اتصال به گیرنده خود - CXCR3 - موجب فعال شدن سلول های NK، Th1 و دندریتیک سل ها می شود (۳۴). تعداد زیادی از سلول های ایمنی در فاز لوتئال در اندومتر جمع می شوند و از جمله تنظیم گرهای مهم برای لانه گزینی محسوب می شوند. شواهدی یافت شده است مبنی بر اینکه تطابق آشکاری میان مراحل مختلف لانه گزینی رویان انسانی و مراحل مختلف مهاجرت لکوسیت ها وجود دارد (۳۳). همچنین نشان داده شده است که رویان رسپتورهایی را برای MPC1 و IP10 بیان می کند (۳۵). MPC1 با تزریق پروژسترون در بدن افزایش می یابد و میزان آن در فاز ترشحي اندومتر بیشتر از فاز پروليفراتیو است (۳۶) علاوه بر آن نشان داده شده است که این سایتوکاین یک جذب کننده و فعال کننده قوی سلول های natural killer رحم هستند (۳۷). میزان بالای این سلولها با سقط و ناباروری مرتبط است (۳۸). این مطلب احتمالاً با یافته های این مطالعه در خصوص همراهی میزان بالاتری از لانه گزینی با سطح پایین تر این سایتوکاین سازگار است.

مطالعات قبلی نشان می دهند IP-10 شروع کنش بین تروفوبلاست و سلول های اندومتر را در مراحل اولیه

References

1. Boomsma CM, Kavelaars A, Eijkemans MJ, Fauser BC, Heijnen CJ, Macklon NS. Ovarian stimulation for in vitro fertilization alters the intrauterine cytokine, chemokine, and growth factor milieu encountered by the embryo. *Fertil Steril* 2010; 94(5):1764-8
2. Boomsma CM, Kavelaars A, Eijkemans MJ, Lentjes EG, Fauser BC, Heijnen CJ, et al. Endometrial secretion analysis identifies a cytokine profile predictive of pregnancy in IVF. *Hum Reprod* 2009; 24(6):1427-35.
3. Campbell KL, Rockett JC. Biomarkers of ovulation, endometrial receptivity, fertilisation, implantation and early pregnancy progression. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2006; 20 (Suppl1):13-25.
4. Cavagna M, Mantese JC. Biomarkers of endometrial receptivity-a review. *Placenta* 2003; 24 (Suppl B): S39-47.
5. Dikareva LV, Shvarev EG, Shvarev GE, Teplyi DL. Age, structural and biochemical characteristics of endometrial secretion in patients with hysteromyoma. *Adv Gerontol* 2008; 21(4):596-601. (Russian)
6. Fasouliotis SJ, Spandorfer SD, Witkin SS, Schattman G, Liu HC, Roberts JE, et al. Maternal serum levels of interferon-gamma and interleukin-2 soluble receptor-alpha predict the outcome of early IVF pregnancies. *Hum Reprod* 2004 ; 19(6):1357-63.
7. Haouzi D, Mahmoud K, Fourar M, Bendhaou K, Dechaud H, De Vos J, et al. Identification of new biomarkers of human endometrial receptivity in the natural cycle. *Hum Reprod* 2009; 24(1):198-205.
8. Inagaki N, Stern C, McBain J, Lopata A, Kornman L, Wilkinson D. Analysis of intra-uterine cytokine concentration and matrix-metallo proteinase activity in women with recurrent failed embryo transfer. *Hum Reprod* 2003; 18(3):608-15.
9. Ledee-Bataille N, Olivennes F, Kadoch J, Dubanchet S, Frydman N, Chaouat G, et al. Detectable levels of interleukin-18 in uterine luminal secretions at oocyte retrieval predict failure of the embryo transfer. *Hum Reprod* 2004; 19(9):1968-73.
10. Lieberman JA, Moscicki AB, Sumerel JL, Ma Y, Scott ME. Determination of cytokine protein levels in cervical mucus samples from young women by a multiplex immunoassay method and assessment of correlates. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15(1):49-54.
11. Penzias AS. Recurrent IVF failure: other factors. *Fertil Steril* 2012; 97(5):1033-8.
12. Florio P, Bruni L, Galleri L, Reis FM, Borges LE, Bocchi C, et al. Evaluation of endometrial activin A secretion for prediction of pregnancy after intrauterine insemination. *Fertil Steril* 2010; 93(7):2316-20
13. Horne AW, Lalani EN, Margara RA, Ryder TA, Mobberley MA, White JO. The expression pattern of MUC1 glycoforms and other biomarkers of endometrial receptivity in fertile and infertile women. *Mol Reprod Dev* 2005; 72(2):216-29.
14. Makker A, Tandon I, Goel MM, Singh M, Singh MM. Effect of ormeloxifene, a selective estrogen receptor modulator, on biomarkers of endometrial receptivity and pinopode development and its relation to fertility and infertility in Indian subjects. *Fertil Steril* 2009; 91(6):2298-307.
15. Hugues JN, Theron-Gerard L, Coussieu C, Pasquier M, Dewailly D, Cedrin-Durnerin I. Assessment of theca cell function prior to controlled ovarian stimulation: the predictive value of serum basal/stimulated steroid levels. *Hum Reprod* 2010; 25(1):228-34.
16. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Iammarrone E. Preimplantation genetic diagnosis increases the implantation rate in human in vitro fertilization by avoiding the transfer of chromosomally abnormal. *Fertil Steril* 1997; 68, 1128-1131.
17. Kahraman S, Bahce M, Samli H, Imirzalioglu N, Yakisn K, Cengiz G, et al. Healthy births and ongoing pregnancies obtained by preimplantation genetic diagnosis in patients with advanced maternal age and recurrent implantation failure. *Hum Reprod* 2001; 15, 2003-2007.
18. Rajaei S, Zarnani AH, Jeddi-Tehrani M, Tavakoli M, Mohammadzadeh A, Dabbagh A, et al. Cytokine profile in the endometrium of normal fertile and women with repeated implantation failure. *Iran J Immunol* 2011; 8(4):201-8.
19. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunol Today* 1993; 14(7): 353-6.
20. Chaouat G, Ledee-Bataille N, Dubanchet S, Zourbas S, Sandra O, Martal J. TH1/TH2 paradigm in pregnancy: paradigm lost? Cytokines in pregnancy/early abortion: reexamining the TH1/TH2 paradigm. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; 134:93-119.
21. Chaouat G. The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? *Semin Immunopathol*. 2007; 29(2):95-113.
22. Granot I, Gnainsky Y, Dekel N. Endometrial inflammation and effect on implantation improvement and pregnancy outcome. *Reproduction* 2012; 144(6): 661-8.
23. Karimzadeh MA, Ayazi Rozbahani M, Tabibnejad N. Endometrial local injury improves the pregnancy rate among recurrent implantation failure patients undergoing in vitro fertilisation/intra cytoplasmic sperm injection: a randomised clinical trial. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2009; 49: 677-680.

24. Zhou L, Li R, Wang R, Huang HX & Zhong K. Local injury to the endometrium in controlled ovarian hyperstimulation cycles improves implantation rates. *Fertil Steril* 2008; 89: 1166-1176.
25. El-Toukhy T, Sunkara S, Khalaf Y. Local endometrial injury and IVF outcome: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2012; 25: 345-354.
26. Chaouat G, Menu E, Wegmann TG. Role of lymphokines of the CSF family and of TNF, gamma interferon and IL-2 in placental growth and fetal survival studied in two murine models of spontaneous resorptions. In: Chaouat G, Mowbray JF (eds). *Cellular and molecular biology of the maternal-fetal relationship*. Paris: INSERM/John Libbey Eurotext, 1991: 91-104
27. Haider S, Knöfler M. Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium. *Placenta* 2009; 30: 111-123.
28. Toder V, Fein A, Carp H, Torchinsky A. TNF-alpha in pregnancy loss and embryo maldevelopment: a mediator of detrimental stimuli or a protector of the fetoplacental unit? *J Assist Reprod Genet* 2003; 20:73-81.
29. Meisser A, Chardonnens D, Campana A, Bischof P. Effects of tumour necrosis factor- α , interleukin-1 α , macrophage colony stimulating factor and transforming growth factor on trophoblastic matrix metalloproteinases. *Mol Hum Reprod* 1999; 5:252-260.
30. Cohen M, Meisser A, Haenggeli L, Bischof P. Involvement of MAPK pathway in TNF- α -induced MMP-9 expression in human trophoblastic cells. *Mol Hum Reprod* 2006; 12: 225-232.
31. Lockwood CJ, Oner C, Uz YH, Kayisli UA, Huang SJ, Buchwalder LF, et al. Matrix metalloproteinase 9 (MMP9) expression in pre-clamptic decidua and MMP9 induction by tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta in human first trimester decidual cells. *Biol Reprod* 2008; 78:1064-72.
32. von Wolff M, Thaler CJ, Strowitzki T, Broome J, Stolz W, Tabibzadeh S. Regulated expression of cytokines in human endometrium throughout the menstrual cycle: dysregulation in habitual abortion. *Mol Hum Reprod* 2000; 6(7): 627-34.
33. Jones RL, Hannan NJ, Kaitu'u TJ, Zhang J, Salamonsen LA. Identification of chemokines important for leukocyte recruitment to the human endometrium at the times of embryo implantation and menstruation. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89, 6155-67
34. Inngjerdigen M, Damaj B, Maghazachi AA. Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells. *Blood* 2001; 97(2): 367-75.
35. Dominguez F, Pellicer A, Simon C. The chemokine connection: hormonal and embryonic regulation at the human maternal-embryonic interface-a review. *Placenta* 2003; 24: 48- 55.
36. Caballero-Campo P, Dominguez F, Coloma J, et al. Hormonal and embryonic regulation of chemokines IL-8, MCP-1 and RANTES in the human endometrium during the window of implantation. *Mol Hum Reprod* 2002;8: 375-84.
37. Loetscher P, Seitz M, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *FASEB J* 1994; 8: 1055-60.
38. Moffett A, Regan L, Braude P. Natural killer cells, miscarriage, and infertility. *Br Med J* 2004; 329: 1283-5.
39. Sela HY, Goldman-Wohl DS, Haimov-Kochman R, Greenfield C, Natanson-Yaron S, Hamani Y, et al. Human trophoblast apposition is regulated by interferon gamma-induced protein 10 (IP-10) during early implantation. *Placenta* 2013; 34(3):222-30.
40. Nagaoka K, Nojima H, Watanabe F, Chang KT, Christenson RK, Sakai S, et al. Regulation of blastocyst migration, apposition and initial adhesion by a chemokine, IFN-gamma-inducible protein 10 kDa (IP-10), during early gestation. *J Biol Chem* 2003; 278:29048-56.

Relationship of Some Endometrial Cytokines (IL-1 β , TNF- α , IP-10, MCP) with In Vitro Fertilization Outcome

S. Rabiee, M.D.^{*}; A.R. Zamani, Ph.D.^{**}; M. Ebrahimi, M.D.^{***}; M. Yavangi, M.D.^{****}
M. Sanouei Farimani, M.D.^{*****}; F. Esna Ashari, M.D.^{*****}; N. Fallah, G.P.^{*****}

Received: 25.12.2014

Accepted: 11.5.2015

Abstract

Introduction & Objective: Cytokines produced by fetal and uterine mucus are responsible for regulating interactions between mother and fetus that improve uterus receptivity and leads to higher success rate of in vitro fertilization (IVF). The aim of the present study was to evaluate the relationship between levels of some cytokines (IL-1 β , TNF- α , IP-10, and MCP) in endometrial secretions with success rate of IVF procedures.

Materials & Methods: 50 consecutive women who were candidate for IVF due to infertility and referred to the clinics of Fatemeh Teaching Hospital in Hamadan were enrolled in a nested case-control study. Aspiration of endometrial secretion was performed in all women prior to embryo transfer using trans-cervical catheter insertion. The level of cytokines in aspirated fluid was determined by ELIZA assay and using especial standard kits.

Results: Among 50 enrolled women, 5 samples were initially excluded because of contact bleeding during sampling and thus aspirated endometrial secretions of 45 women were analyzed to assess level of the cytokines. Comparing levels of cytokines in aspirated endometrial secretions showed lower concentrations of TNF- α , IP-10, and MCP in the group who experienced successful clinical pregnancy (n = 9) than the group with failed pregnancy (n = 36), however, no significant difference was revealed in level of IL-1 β between the two groups.

Conclusion: In IVF patients with implantation failure, an elevated level of TNF- α , IP-10, and MCP cytokines is observable. Low levels of these cytokines can be valuable predicting markers for successful IVF pregnancy.

(*Sci J Hamadan Univ Med Sci 2015; 22 (2): 99-107*)

Keywords: Cytokines / Fertilization in Vitro / Implantation / Pregnancy

^{*} Professor, Department of Obstetrics & Gynecology, School of Medicine
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran. (rabieesogol@yahoo.com)

^{**} Professor, Department of Immunology, School of Medicine
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.

^{***} Gynecologist

^{****} Associate Professor, Department of Obstetrics & Gynecology, School of Medicine
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.

^{*****} Assistant Professor, Department of Social Medicine, School of Medicine
Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.

^{*****} General Practitioner, Hamadan University of Medical Sciences & Health Services, Hamadan, Iran.