تأثیر غلظت سایتوکاین‌های مایع فولیکولی با بلوغ تخمک، کیفیت جنین و نتایج بارداری در طی سیکل‌های تحریک تخمدان در زنان نابارور

دکتر فرزانه فصاحت[۱]، نسرین علیپور[۲]، مریم ایمانی[۳]، دکتر محمدحسین رازی[۴]، یاسمین رازی[۵]، دکتر آمنه جاوید[۶]، دکتر فاطمه زارع[۷*]

۱. استادیار گروه بیولوژی تولیدمثل، مرکز تحقیقات ایمونولوژی تولید مثل، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی، دانشگاه علم و هنر یزد، یزد، ایران.
۳. کارشناس ارشد ژنتیک، مرکز تحقیقات ایمونولوژی تولید مثل، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.
۴. دکتری پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات و درمانی ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.
۵. دانشجوی کارشناسی ارشد حرکت‌شناسی، دانشگاه لیکهد، تاندربی، کانادا.
۶. استادیار گروه بیولوژی، دانشگاه علم و هنر یزد، یزد، ایران.
۷. دکتری ایمنی‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی تولید مثل، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۰۸ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۱/۰۶/۰۸

خلاصه

مقدمه: از آنجا که سایتوکاین‌های مایع فولیکولی، بلوغ تخمک و تخمک‌گذاری را تحت تأثیر قرار می‌دهند، در فرآیندهای تولید مثل از جمله لقاح، رشد اولیه جنین و پتانسیل لانه‌گزینی نیز نقش مهمی را ایفا می‌کنند. مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر این سایتوکاین‌ها در بلوغ تخمک و کیفیت جنین‌ها در طی درمان کمک باروری (ART) و نتایج حاملگی زنان نابارور اولیه انجام شد.

روش‌کار: این مطالعه مورد شاهدی در سال ۱۳۹۹ بر روی ۴۴ زن نابارور تحت ART در پژوهشکده علوم تولیدمثل شهر یزد انجام شد. ارتباط بین غلظت سایتوکاین‌های اینترلوکین ۶ (IL-6) و اینترلوکین ۱۲ (IL-12)، فاکتور رشد تغییر دهنده بتا (TGF-ß) و فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا (TNF-α) در سطح مایع فولیکولی هر بیمار با استفاده از کیت سنجش الایزا بررسی شد. نتایج حاصل با متغیرهای دموگرافیک و جنین‌شناسی بیماران مورد آنالیز آماری قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه۲۱) و آزمون های آماری غیرپارامتریک انجام شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: در بیماران مورد مطالعه میزان کلی لقاح ۶۲/۷٪، میزان بلوغ تخمک ۷۸/۶٪ و میزان کلی بارداری ۲۲٪ بود. همبستگی مثبت و معنی‌داری بین غلظت IL-6 و میزان لقاح مشاهده شد (p=۰/۰۴) درصورتی‌که همبستگی معناداری بین غلظت دیگر سایتوکاین‌های مورد مطالعه با سن، BMI، بلوغ تخمک، میزان لقاح و کیفیت جنین یافت نشد (p≥۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر ارتباطی بین غلظت IL-6، IL-12، TGF-ß و TNF-α در مایع فولیکولی زنان نابارور با بلوغ تخمک، کیفیت جنین و نتایج حاملگی یافت نشد، مطالعات وسیع‌تر با تعداد نمونه‌های بیشتر در جهت اعتباربخشی نتایج پیشنهاد می‌گردد.

کلمات کلیدی: تکنیک کمک باروری، اینترلوکین ۱۲، فاکتور نکروز توموری آلفا، فاکتور رشد تغییردهنده بتا، تحریک تخمدان

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** دکتر فاطمه زارع؛ مرکز تحقیقات ایمونولوژی تولید مثل، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران. **تلفن:** ۰۳۵-۳۶۲۸۵۴۰۶؛ **پست الکترونیک:** fatemezare91@gmail.com

مقدمه

ناباروری، یک اختلال سیستم تولیدمثل است که میلیون‌ها نفر را در سراسر جهان تحت تأثیر قرار می‌دهد. عوامل بسیاری در ایجاد ناباروری نقش دارد که از جمله این عوامل می‌توان به اختلالات ایمونولوژیک اشاره کرد که منجر به ناباروری ایمونولوژیک می‌شود (۱، ۲). سیستم ایمنی بدن نقش مهمی در بسیاری از فرآیندهای تولیدمثل انسان دارد (۳). طبق مطالعات، اختلال در عملکرد لنفوسیت T کمکی (Th)-۱ و سایتوکاین‌های مرتبط با آنها در ایجاد ناباروری نقش دارند (۱). سایتوکاین‌ها از پروتئین‌های اصلی تنظیم‌کننده سیستم ایمنی بدن هستند و به تنظیم چرخه تخمدان نیز کمک می‌کنند و برای رشد طبیعی فولیکول نیز مورد نیاز می‌باشند (۴). سایتوکاین‌ها از بلوغ تخمک‌ها و فولیکول‌ها، پارگی به‌موقع فولیکول‌ها و نئوآنژیوژنز پشتیبانی می‌کنند و به‌طور غیرمستقیم در تحویل اکسیژن، مواد مغذی و سوبسترا برای استروئیدوژنز کمک می‌کنند (۵). بسیاری از سایتوکاین‌ها در فرآیند تولید مثل دارای اهمیت هستند و نقش آنها در تولید مثل مورد بررسی قرار گرفته است. مطالعات نشان داده‌اند که پاسخ ایمنی بالاتر لنفوسیت T کمکی ۲ و سایتوکاین‌های مترشحه از آنها نسبت به پاسخ ایمنی لنفوسیت T کمکی ۱ (Th2/Th1) در موفقیت بارداری فیزیولوژیک مؤثرتر می‌باشند (۶). سایتوکاین‌هایی مانند اینترلوکین ۱ بتا (IL-1ß[1])، اینترلوکین۶ (IL-6[2]) و فاکتور رشد تغییردهنده بتا (TGF-β[3]) در تنظیم چرخه تخمدان ضروری هستند و عملکرد مهمی در رشد و نمو فولیکول تخمدان دارند (۷). اعضای خانواده TGF-ß در تمام مراحل فولیکولوژنز دخیل هستند (۸). سایتوکاین التهابی TNF-α با تنظیم عملکرد گیرنده گنادوتروپین‌ها و تنظیم فولیکولوژنز تخمدان، بر بیوسنتز هورمون جنسی تأثیر می‌گذارد (۹). اینترلوکین ۶ می‌تواند در مکانیسم انتخاب تخمک دخیل باشد و به‌نظر می‌رسد غلظت آن در مایع فولیکولی با میزان بلوغ تخمک ارتباط دارد (۱۰، ۱۱). افزایش سطح IL-6 در مایع فولیکولی زنان با عامل ناباروری ایمونولوژیک، نشان‌دهنده یک عملکرد تنظیمی و آنتاگونیسمی نسبت به TNF-α است (۱۲، ۱۳). تولید سایتوکاین در مایع فولیکولی یک مثال واضح از خودتنظیمی است که با هدف کاهش تأثیر واکنش التهابی مشخص به‌دلیل سطوح بالای TNF-α انجام می‌شود. چنین یافته‌هایی معمولاً در زنان مبتلا به ناباروری ایمونولوژیک مشاهده می‌شود (۱۴).

TNF-α یک سایتوکاین التهاب‌زا چندمنظوره است که عمدتاً توسط مونوسیت‌ها/ماکروفاژها ترشح می‌شود و بر متابولیسم لیپیدها، انعقاد، مقاومت به انسولین و عملکرد اندوتلیال تأثیر دارد و شواهد مطالعات انجام شده، سطح سرمی بالای TNF-α را در گروه‌های با سقط مکرر خودبه‌خودی تأیید می‌کنند (۹).

مطالعه حاضر با هدف بررسی ارتباط بین غلظت سایتوکاین‌های TNF-α، TGF-β، IL-6 و IL-12 در مایع فولیکولی زنان نابارور با بلوغ تخمک، کیفیت جنین و نتایج بارداری در طی سیکل‌های تحریک تخمدان انجام شد.

روش‌کار

این مطالعه مورد شاهدی در سال ۱۳۹۹ بر روی ۴۴ زن با سابقه ناباروری اولیه؛ کاندید درمان کمک باروری (ART)[4] مراجعه کننده به پژوهشکده علوم تولیدمثل شهر یزد انجام شد. حداقل حجم نمونه مورد نظر بر اساس میزان فراوانی ناباروری در جمعیت جهانی و کشورهای در حال توسعه و با استفاده از فرمول آماری کوپاک تعیین گردید (۱۵، ۱۶). معیارهای ورود به مطالعه شامل: زوجین با سابقه ناباروری اولیه با علل ناشناخته، زنان دارای سن کمتر از ۴۲ سال، با میزان FSH کمتر از ۱۰ و دارای سیکل قاعدگی منظم که همسران آنها طبق معیارهای سازمان جهانی بهداشت دارای اسپرم انزالی با پارامترهای نرمال بودند (۱۷). معیار خروج از مطالعه شامل: بیماران مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک، آندومتریوز، اختلالات غدد درون‌ریز، دارای

[1] Interleukin 1 beta
[2] Interleukin-6
[3] Transforming growth factor beta
[4] Assisted Reproductive Technology

سابقه دیابت و تجربه IVF ناموفق بیش از ۳ بار بود و افرادی که دارای عوامل شدید مردانه مانند عدم انزال و یا نمونه‌های آزواسپرمی و ناهنجاری‌های اسپرمی از جمله مورفولوژی اسپرم کمتر از ۱٪ بودند، از مطالعه خارج شدند. پس از تأیید مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی شهید صدوقی یزد، بخشی از اطلاعات مورد نیاز تحقیق به‌طور محرمانه با استفاده از چک‌لیست اولیه توزیع شده بین تمام بیماران جمع‌آوری شد. چک‌لیست اصلی شامل: اطلاعات دموگرافیک مانند سن بیمار، شاخص توده بدنی (BMI)[1] و مدت ناباروری بود. طبق ضوابط کمیته اخلاقی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یزد، افراد واجد شرایط توسط پژوهشگر پیرامون مطالعه توجیه شدند و پس از پر کردن فرم رضایت‌نامه آگاهانه وارد مطالعه شدند. با توجه به سن، تمام بیماران در ۵ گروه سنی کمتر از ۲۴، ۲۹-۲۵، ۳۴-۳۰، ۳۹-۳۵ و بیشتر از ۴۰ سال طبقه‌بندی شدند و با توجه به BMI، تمام بیماران در ۴ گروه کمتر از ۱۸/۵، ۲۵-۱۸/۵، ۳۰-۲۵ و بیشتر از ۳۰ کیلوگرم در مترمربع طبقه‌بندی شدند.

چک‌لیست ثانویه شامل تمام مشخصات جنینی و IVF توسط محقق مطالعه تکمیل شد و سپس اطلاعات ثبت شده توسط یک متخصص در زمینه جنین‌شناسی تأیید گردید. این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد با کد اخلاق IR.SSU.RSI.REC.1396.309 تأیید شده است.

جمع‌آوری مایع فولیکولی

ابتدا برای بیماران به‌منظور تحریک تخمک‌گذاری از روز دوم سیکل، هورمون محرک فولیکول (FSH)[2] (سینال-اف، سیناژن، ایران) به میزان ۱۵۰ واحد در روز تجویز شد. هنگامی که حداقل یک فولیکول با قطر بیش از ۱۴ میلی‌متر از طریق سونوگرافی تشخیص داده شد، روزانه به میزان ۰/۲۵ میلی‌گرم آنتاگونیست هورمون آزادکننده گنادوتروپین (GnRH)[3] (Organon و Ganirelex) (Cetrotide، Merck Serono، Aubonne، سوئیس) به‌صورت زیرجلدی تزریق شد. پاسخ تخمدان از طریق سونوگرافی ترانس واژینال و سطح سرمی استرادیول (E2) بررسی شد. بیمارانی که محدوده سطح استرادیول در آنها ۵۰۰۰-۵۰۰ پیکوگرم در میلی‌لیتر بود و قطر بزرگ‌ترین فولیکول به بیش از ۱۸ میلی‌متر رسیده بود، برای آنها ۱۰۰۰۰ واحد هورمون گنادوتروپین جفتی انسان (HCG)[4] (پرگنیل، ارگانون، هلند) به صورت عضلانی تزریق شد و بعد از ۳۶-۳۴ ساعت، بازیابی تخمک‌ها انجام شد. در طی پروسه تخمک‌گیری، مایع فولیکولی در لوله‌های استریل جمع‌آوری شده و سپس برای حذف خون، سلول یا بافت، سانتریفوژ لوله‌های حاوی مایع فولیکولی هر بیمار به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت چرخش ۳۰۰۰ دور در دقیقه انجام شد و محیط رویی جمع‌آوری گردید و در دمای ۸۰- نگه‌داری شد.

ویژگی‌های مورفولوژیکی تخمک و جنین

مورفولوژی تخمک جهت ارزیابی کیفیت آن با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس مورد بررسی قرار گرفت. میزان بلوغ تخمک و تعداد کل تخمک‌های مرحله متافاز میوز II بررسی شدند (۱۸). همه تخمک‌های جدا شده، تحت تزریق اسپرم داخل سیتوپلاسمی (ICSI) قرار گرفتند. ۱۸ ساعت پس از ICSI تخمک‌ها از نظر لقاح مورد بررسی قرار گرفتند و میزان لقاح، تعداد تخمک‌های لقاح یافته (دو پیش هسته‌ای[5]) هر بیمار نسبت به تعداد کل تخمک‌های بیمار در نظر گرفته شد. سپس کیفیت جنین با استفاده از سیستم رتبه‌بندی Hill ارزیابی شد. بر اساس این پروتکل، تمام جنین‌های مشتق شده به درجه‌های از A تا D طبقه‌بندی شدند: درجه A: بلاستومرهای گرد و هم‌اندازه و بدون قطعه‌قطعه شدن. درجه B: بلاستومرها با اندکی تفاوت در اندازه، بالای ۱۰٪ از واکوئل‌ها و گرانول‌ها. درجه C: بلاستومرهای غیرمشابه با حداکثر ۳۰٪ گرانول و درجه D: بلاستومرهای غیرمشابه با میزان بالای قطعه‌قطعه شدن و گرانول‌ها و همچنین واکوئل‌های تیره و بزرگ مشاهده شدند. جنین‌هایی با درجه‌بندی A یا B در گروه جنین های با کیفیت خوب شناخته شدند و آنهایی که دارای

[1] Body Mass Index
[2] Follicle-Stimulating Hormone
[3] Gonadotropin-releasing Hormone
[4] Human chorionic gonadotropin
[5] two pronuclei

درجه‌بندی C یا D بودند، در گروه جنین‌های با کیفیت پایین در نظر گرفته شدند (۱۹، ۲۰).

انتقال جنین

برای انتقال جنین ۷۲-۴۸ ساعت پس از بازیابی تخمک (مرحله کلیواژ)، جنین‌هایی با بهترین کیفیت انتخاب شدند. بسته به کیفیت جنین و شرایط سنی و فیزیولوژیک بیمار، یک تا دو جنین با کیفیت خوب با استفاده از کاتتر Labotect (Labotect، Gottingen، آلمان) منتقل شدند. حمایت فاز لوتئال با پروژسترون (پروژسترون، شرکت ابوریحان، تهران، ایران) به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم روزانه از زمان بازیابی تخمک آغاز و تا ثبت فعالیت قلب جنین توسط سونوگرافی ادامه یافت. وضعیت حاملگی شیمیایی با تست beta-hCG مثبت، ۱۴ روز پس از انتقال جنین مورد ارزیابی قرار گرفت و ثبت گردید.

سنجش غلظت سایتوکاین‌های مورد مطالعه

غلظت سایتوکاین‌های اینترلوکین ۶، ۱۲، TNF-α و TGF-β در مایع فولیکولی هر بیمار با استفاده از تکنیک و کیت الایزا کارمانیا پارس ژن و دستگاه الایزا ریدر از برند EMPEROR مورد سنجش قرار گرفت. حساسیت اندازه‌گیری برای سایتوکاین IL-6، ۲ پیکوگرم بر میلی‌لیتر و برای سایر سایتوکاین‌ها (IL-12، TGF-β و TNF-α)، ۵ پیکوگرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج حاصل با متغیرهای دموگرافیک و جنین‌شناسی بیماران مورد آنالیز آماری قرار گرفت. ارتباط بین غلظت سایتوکاین‌های اینترلوکین ۶، ۱۲، TGF-β و TNF-α در مایع فولیکولی و متغیرهای مختلف مانند سن، BMI، بلوغ تخمک (نسبت تخمک MII به تخمک‌های کل هر فرد)، میزان لقاح، کیفیت جنین و وضعیت بارداری بیماران از نظر آماری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

داده‌ها پس از گردآوری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه۲۱) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. جهت بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیروویلک استفاده شد و سپس با توجه عدم نرمال بودن توزیع داده‌ها، جهت بررسی ارتباط سن و BMI بیماران با غلظت سایتوکاین‌ها در مایع فولیکولی از آزمون آماری کروسکال والیس و به‌منظور بررسی ارتباط بین غلظت سایتوکاین‌های مایع فولیکولی و کیفیت جنین از آزمون من‌ویتنی استفاده شد. همچنین همبستگی بین سایتوکاین‌ها، لقاح، بلوغ تخمک‌ها و میزان بارداری با استفاده از آزمون اسپیرمن مورد بررسی قرار گرفت. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه ۴۴ زن نابارور تحت ART با توجه به معیارهای ورود و خروج انتخاب شدند. میزان کلی لقاح در بیماران ۶۲/۷٪ و میزان بلوغ اووسیت در بیماران ۷۸/۶٪ بود. همچنین میزان کلی بارداری ۲۲٪ بود. بر اساس طبقه‌بندی بیماران در ۵ گروه سنی، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین سن بیماران و غلظت سایتوکاین‌های مایع فولیکولی وجود نداشت ($p\geq0/05$) (جدول ۱).

جدول ۱- ارتباط سن بیماران و غلظت سایتوکاین‌ها در مایع فولیکولی زنان نابارور کاندید ART

غلظت سایتوکاین	سن بیماران					سطح
(پیکوگرم بر میلی‌لیتر)	کمتر یا مساوی ۲۴	۲۵-۲۹	۳۰-۳۴	۳۵-۳۹	بیشتر یا مساوی ۴۰	معنی‌داری*
اینترلوکین ۶	۱/۸۲±۱۲/۲۵	۲/۰۹±۷/۰۱	۱/۴۴±۳/۷۲	۰/۸۲±۳/۳۵	۲/۶۹±۴/۴	۰/۱۸
اینترلوکین ۱۲	۹/۷±۵۴	۷±۶۴	۶/۹۶±۶۳/۶	۶/۶۴±۶۳/۷۵	۴/۰۴±۴۶/۱	۰/۷۱
فاکتور رشد تومور بتا	۳۵/۰۳±۵۰	۴/۷±۲۵/۰۹	۱۱/۴۷±۳۷/۵	۶/۵۶±۲۸/۲۷	۲۲/۱±۴۳/۰۸	۰/۸۶
فاکتور نکروز توموری آلفا	۰/۳±۵/۶۴	۰/۴۴±۴/۵۶	۰/۱۴±۴/۱۴	۰/۲۴±۴	۰/۳۶±۴/۴۱	۰/۳۰

داده‌ها به‌صورت میانگین± خطای استاندارد میانگین(SEM[1]) گزارش شده‌اند. * آزمون کروسکال والیس

[1] standard error of the mean

از نظر آماری بر اساس طبقه‌بندی بیماران از نظر شاخص توده بدنی در چهار گروه، تفاوت معنی‌داری بین BMI بیماران و غلظت سایتوکاین‌های مایع فولیکولی مشاهده نشد (p≥۰/۰۵) (جدول ۲).

جدول ۲- رابطه بین شاخص توده بدنی و غلظت اینترلوکین‌ها در مایع فولیکولی زنان نابارور کاندید ART

غلظت سایتوکاین (پیکوگرم بر میلی‌لیتر)	شاخص توده بدنی (BMI)				سطح معنی‌داری*
	کمتر از ۱۸/۵	۲۵-۱۸/۵	۳۰-۲۵	بیشتر از ۳۰	
اینترلوکین ۶	۲/۱۵±۲/۶۵	۰/۸۸±۳/۶۵	۱/۹۴±۷/۱۶	۳/۳۹±۶/۶	۰/۳۵
اینترلوکین ۱۲	۱۴/۲۵±۵۳/۹۵	۶/۱±۷۱/۱	۳/۵۵±۴۹/۶۵	۴/۶۴±۶۱/۵۵	۰/۰۸
فاکتور رشد تغییردهنده تومور بتا	۳/۲±۲۰/۰۴	۸/۳۴±۳۱/۹	۷/۰۵±۳۸/۵۵	۹/۶۸±۲۵/۹۴	۰/۴۸
فاکتور نکروز توموری آلفا	۰/۳±۳/۶۲	۰/۲۸±۴/۳۷	۰/۱۶±۴/۲۳	۰/۴۶±۴/۷۱	۰/۶۳

داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده‌اند. * آزمون کروسکال والیس

در جدول ۳ کیفیت جنین بیماران به‌ترتیب در دو گروه کیفیت پایین و کیفیت خوب ارائه شده است که نتایج بررسی کیفیت جنین‌های تشکیل شده تفاوت معنی‌داری با غلظت سایتوکاین‌های مورد مطالعه (اینترلوکین ۶، ۱۲، TGF-β و TNF-α) نشان نداد (p≥۰/۰۵).

جدول ۳- ارتباط بین غلظت سایتوکاین‌های مایع فولیکولی و کیفیت جنین در زنان نابارور

متغیرها		اینترلوکین۶	اینترلوکین ۱۲	فاکتور رشد تغییردهنده بتا	فاکتور نکروز توموری آلفا
کیفیت جنین	خوب	۱/۶۶ ±۷/۱۴	۵/۳۱±۵۹	۶/۹۱±۲۹/۱۵	۰/۲±۴/۲۸
	ضعیف	۰/۶۱±۳/۲۴	۵/۱۵±۶۴/۶۹	۶/۸۱±۳۵/۸	۰/۲۶±۴/۳۹
	سطح معنی‌داری*	۰/۱۵	۰/۴۱	۰/۵۴	۰/۷۲

داده‌ها به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین (SEM) گزارش داده شده‌اند. * آزمون من‌ویتنی

طبق جدول ۴، همبستگی مثبت و معنی‌داری بین غلظت اینترلوکین ۶ و میزان لقاح مشاهده شد (p=۰/۰۴)، در صورتی‌که این میزان با غلظت سایر سایتوکاین‌های مورد بررسی معنی‌دار نبود (p≥۰/۰۵). همبستگی معنی‌داری بین میزان بلوغ اووسیت و میزان بارداری بیماران با غلظت سایتوکاین‌های مورد مطالعه (اینترلوکین ۶، ۱۲، TGF-β و TNF-α) مشاهده نشد (p≥۰/۰۵).

جدول ۴- همبستگی بین سایتوکاین‌ها، لقاح، بلوغ تخمک‌ها و میزان بارداری

متغیر	لقاح	بلوغ تخمک	بارداری
اینترلوکین ۶	۰/۳۱	۰/۱۴	-۰/۰۸
	۰/۰۴	۰/۳۸	۰/۵۸
اینترلوکین ۱۲	-۰/۰۵	-۰/۰۶	-۰/۰۸
	۰/۷۵	۰/۷	۰/۵۸
فاکتور رشد تغییردهنده بتا	۰/۰۴	۰/۰۱	-۰/۰۰۵
	۰/۷۷	۰/۹۲	۰/۹۷
فاکتور نکروز توموری آلفا	۰/۲۵	-۰/۰۸	-۰/۱۷
	۰/۱۱	۰/۵۸	۰/۲۸

بلوغ؛ تعداد کل تخمک‌های گرفته شده (مرحله متافاز میوز II)، بارداری؛ تعداد کل زنان باردار (بارداری بیوشیمیایی) به کل جمعیت مورد مطالعه. بر اساس آزمون همبستگی اسپیرمن. در هر سلول، عدد بالایی ضریب همبستگی (r) و عدد پایین سطح معنی‌داری داده (p) است.

بحث

در مطالعه حاضر، ارتباط غلظت سایتوکاین‌های اینترلوکین ۶، ۱۲، TGF-β و TNF-α در مایع فولیکولی ۴۴ زن نابارور تحت ART با فاکتورهای سن، BMI، میزان بلوغ تخمک، کیفیت جنین، میزان لقاح و باردار شدن در طی چرخه تحریک تخمدان مورد بررسی قرار گرفتند. همبستگی مثبت و معنی‌داری بین غلظت اینترلوکین ۶ و میزان لقاح مشاهده شد (p=۰/۰۴)، در صورتی‌که ارتباط میزان لقاح با غلظت سایر سایتوکاین‌های مورد بررسی معنی‌دار نبود (p≥۰/۰۵). در مطالعه قدسی و همکاران (۲۰۲۰) که با هدف سنجش غلظت اینترلوکین‌های ۳، ۵ و ۶ در مایع فولیکولی زنان نابارور با علت ناشناخته انجام شد، اختلاف معنی‌داری در غلظت اینترلوکین‌های ۳ و ۶ در گروه بیمار در مقایسه با گروه سالم مشاهده نشد و تنها غلظت اینترلوکین ۵ در گروه بیماران نسبت به گروه سالم با کاهش معنی‌داری مواجه بود (p<۰/۰۰۰۱). آنها نتیجه گیری کردند که غلظت فولیکولی اینترلوکین ۵ ممکن است در پاتوژنز ناباروری با علت ناشناخته دخیل باشد (۲۱). در مطالعه نیو و همکاران (۲۰۱۷) که با هدف بررسی ارتباط بین متابولیسم لیپید و سطح سایتوکاین‌های مایع فولیکولی و کیفیت جنین زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک با سندرم متابولیک انجام شد، سطح TNF-α در مایع فولیکولی گروه PCOS در مقایسه با گروه کنترل به‌طور قابل توجهی بالاتر بود. در نتیجه ممکن است TNF-α از سایتوکاین‌های کلیدی درگیر در کاهش پتانسیل رشد جنین در بیماران مبتلا به PCOS با سندرم متابولیک باشد (۲۲). همچنین در مطالعه باسکیند و همکاران (۲۰۱۴) که با هدف بررسی سایتوکاین‌های مایع فولیکولی در مراحل مختلف چرخه طبیعی فولیکولی و فاز تخمک‌گذاری انجام شد، نوسانات در سایتوکاین‌های مختلف مایع فولیکولی در مرحله فولیکولار مشهود بود و غلظت اینترلوکین ۶ و ۸ در نمونه‌های پیش از تخمک گذاری به‌طور معنی‌داری بیشتر بود. نتایج این تحقیق نشان داد که سایتوکاین‌های مایع فولیکولی با فولیکوژنز آنترال مرتبط است (۵). شایان ذکر است که این مطالعات از نظر نوع مطالعه و نمونه و همچنین گروه‌های مورد بررسی با مطالعه حاضر تفاوت دارد، اما با توجه به نقش مهم سایتوکاین‌ها در تولید مثل و مطالعات انجام شده، غلظت سایتوکاین‌های مایع فولیکولی می‌تواند یک عامل تعیین‌کننده در میزان لقاح و بلوغ تخمک، کیفیت جنین و در نهایت بهبود نتایج ART در زنان نابارور باشد.

در مطالعه حاضر، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین سن بیماران و غلظت سایتوکاین‌های مایع فولیکولی زنان نابارور وجود نداشت (p≥۰/۰۵). در مطالعه ایلخانی‌زاده و همکاران (۲۰۱۳) که به تعیین ارتباط لانه‌گزینی جنین با غلظت هورمون‌ها و سایتوکاین‌های انتخابی مایع فولیکولی زنان تحت درمان به روش میکرواینجکشن (ICSI)[1] پرداختند؛ ارتباط معنی‌داری بین سن افراد مورد مطالعه با نتیجه درمان (وقوع یا عدم وقوع حاملگی) یافت نشد که با نتایج مطالعه حاضر همسو بود (۲۳).

در این مطالعه بین BMI بیماران و غلظت سایتوکاین‌های مایع فولیکولی زنان نابارور ارتباط معنی‌داری وجود نداشت (p≥۰/۰۵). در مطالعه گونزالز و همکاران (۲۰۱۸) که به‌منظور بررسی ارتباط بین التهاب تخمدان زنان با اضافه وزن انجام شد و میزان سایتوکاین‌های TNF-α، IL-10 و IL-6 را در مایع فولیکولی بیماران اندازه‌گیری کردند، هیچ ارتباط معنی‌داری بین BMI و غلظت سایتوکاین‌های مورد بررسی وجود نداشت که با نتایج مطالعه حاضر همسو بود (۲۴). همچنین بر اساس مطالعه مهدی (۲۰۱۱) که با هدف اندازه‌گیری سطح سرمی سایتوکاین‌های التهاب‌زا از جمله TNF-α، اینترفرون گاما (IFN-γ) و سایتوکین‌های ضدالتهابی (IL-10 و IL-6) در زنان نابارور انجام شد، تفاوت معنی‌داری بین شاخص توده بدنی و میانگین سنی زنان نابارور و گروه شاهد مشاهده نشد که به خوبی نتایج مطالعه حاضر را اثبات می‌کرد (۶).

در مطالعه حاضر، نتایج حاصل از بررسی کیفیت جنین‌های تشکیل شده تفاوت معنی‌داری با غلظت

[1] Intracytoplasmic sperm injection

سایتوکاین‌های مورد مطالعه نشان نداد ($p\geq$۰/۰۵) و همبستگی معنی‌داری بین میزان بلوغ اووسیت و میزان بارداری بیماران با غلظت سایتوکاین‌های مورد مطالعه (اینترلوکین ۶، ۱۲، TGF-β و TNF-α) مشاهده نشد ($p\geq$۰/۰۵). نوری و همکاران (۲۰۰۰) با بررسی سطح اینترلوکین ۶ در نمونه سرمی و مایع فولیکولی و ارتباط آن با میزان حاملگی در زنان نابارور مبتلا به اندومتریوز تحت درمان ART، به این نتیجه رسیدند که میزان IL-6 در سرم و مایع فولیکولی بیماران باردار و غیرباردار بعد از انتقال جنین یکسان بوده و اختلاف معنی‌داری بین آنها وجود نداشت ($p>$۰/۰۵)، ولی ارتباط معنی‌داری بین سطح IL-6 مایع فولیکولی در بین بیماران اندومتریوز غیرباردار و باردار وجود داشت ($p<$۰/۰۵). این شواهد نشان داد که افزایش سطح IL-6 در مایع فولیکولی می‌تواند با کاهش میزان حاملگی خصوصاً در بیماران اندومتریوز همراه باشد (۲۵). همچنین در مطالعه آلتون و همکاران (۲۰۱۱) که با هدف بررسی ارتباط بین سطح IL-6 مایع فولیکولی با پاسخ تخمدان و حاملگی بالینی در چرخه IVF-ET انجام شد، همبستگی مثبت و معنی‌داری بین اینترلوکین ۶ و سن ($p=$۰/۰۳۵) و همبستگی مثبت و معنی‌داری بین اینترلوکین ۶ و استرادیول در روز hCG ($p=$۰/۰۱۱) وجود داشت و سیکل‌های IVF در بیماران با سطح اینترلوکین ۶ کمتر از ۴/۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر (مقدار متوسط برای گروه)، احتمال افزایش ۴ برابری بارداری بالینی را نشان دادند ($p=$۰/۰۴۵) و به این نتیجه رسیدند که کاهش سطح اینترلوکین ۶ در مایع فولیکولی بیماران IVF با افزایش احتمال بارداری همراه است (۲۶).

به‌طورکلی، این اختلاف در یافته‌ها را می‌توان به تفاوت در نوع نمونه، طراحی مطالعه و سابقه ناباروری بیماران نسبت داد.

در مطالعه حاضر بین میزان بلوغ اووسیت و لقاح و میزان بارداری بیماران با غلظت سایتوکاین‌های اینترلوکین ۱۲، TGF-β و TNF-α) همبستگی معنی‌داری مشاهده نشد ($p\geq$۰/۰۵). در مطالعه رافت گزوانی و همکاران (۲۰۰۰) که با هدف بررسی غلظت مایع فولیکولی اینترلوکین ۱۲ و اینترلوکین ۸ در چرخه‌های IVF انجام شد، لقاح ناموفق در زنانی که اینترلوکین ۱۲ در مایع فولیکولی آنها قابل تشخیص بود؛ نسبت به گروه منفی به‌طور قابل توجهی بالاتر بود و هیچ‌کدام از زنان با اینترلوکین ۱۲ قابل تشخیص در پایان درمان، باردار نشدند. در نتیجه به‌نظر می‌رسد که وجود اینترلوکین ۱۲ در مایع فولیکولی می‌تواند با نتیجه منفی در درمان IVF همراه باشد (۲۷). در مطالعه اوکپالاجی و همکاران (۲۰۱۶) که با هدف تعیین غلظت سرمی سایتوکاین‌هایی از قبیل TNF-α، اینترفرون گاما، اینترلوکین-۶ و اینترلوکین ۱۰ در زنان نابارور و بارور انجام شد، در گروه زنان بارور در مقایسه با گروه زنان نابارور افزایش معنی‌داری در سطوح اینترفرون گاما وجود داشت، ولی هیچ تفاوت معنی‌داری در سطوح TNF-α و اینترلوکین-۶ و اینترلوکین-۱۰ بین دو گروه وجود نداشت. بنابراین افزایش اینترفرون گاما ممکن است در ناباروری نقش داشته باشد (۲۸). لی فنگ آن و همکاران (۲۰۱۵) بیان کردند که تشخیص و اندازه‌گیری سلول T کمکی فولیکولی، اینترلوکین ۱۲، اینترلوکین ۲۱ و TNF-α ممکن است شاخص‌های تشخیصی جدیدی را برای غربالگری ناباروری ایمنی فراهم کند (۱). در مطالعه مهدی (۲۰۱۱) که به اندازه‌گیری سطح سرمی سایتوکاین‌ها از جمله IL-6، IL-10، TNF-α و IFN-γ پرداخت؛ در زنان نابارور افزایش قابل توجهی در IL-10 ($p=$۰/۰۰۲) و IFN-c ($p=$۰/۰۰۰۱) وجود دشت، ولی TNF-α و IL-6 هیچ تفاوتی با گروه بارور نشان ندادند (۶). لازم به ذکر است که اگرچه در این مطالعات ارتباط معنی‌داری بین غلظت برخی سایتوکاین‌ها و میزان بلوغ تخمک و لقاح و میزان بارداری مشاهده نشد، اما با توجه به توضیحات داده شده نمی‌توان نقش احتمالی این سایتوکاین را در ناباروری نادیده گرفت. با اینکه در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین غلظت سایتوکاین‌های اینترلوکین ۶، ۱۲، TGF-ß و TNF-α در مایع فولیکولی زنان نابارور با بلوغ تخمک، کیفیت جنین و نتایج حاملگی یافت نشد؛ با توجه به زمان‌بر بودن جمع‌آوری نمونه

مورد نیاز و همچنین هزینه بالای کیت‌های سنجش سایتوکاین‌ها، در این مطالعه امکان بررسی سایتوکاین‌های بیشتری با حجم نمونه وسیع وجود نداشت، لذا پیشنهاد می‌گردد به‌منظور روشن شدن نقش خاص این سایتوکاین‌ها در ناباروری زنان و کاربرد احتمالی اندازه‌گیری سایتوکاین‌ها و درمان آنتی‌سایتوکاینی، مطالعات وسیع‌تر با تعداد نمونه‌های بیشتر انجام شود. همچنین شناسایی و تعیین غلظت سایتوکاین‌های مایع فولیکولی ممکن است شاخص‌های جدید تشخیصی برای غربالگری ناباروری مرتبط با پاسخ ایمنی را فراهم کند.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر ارتباطی بین غلظت IL-6، IL-12، TGF-ß و TNF-α در مایع فولیکولی زنان نابارور با بلوغ تخمک، کیفیت جنین و نتایج حاملگی یافت نشد، مطالعات وسیع‌تر با تعداد نمونه‌های بیشتر در جهت اعتباربخشی نتایج پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از تمام کسانی که ما را در انجام این مطالعه یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. An LF, Zhang XH, Sun XT, Zhao LH, Li S, Wang WH. Unexplained infertility patients have increased serum IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-21, TNFα, IFNγ and increased Tfh/CD4 T cell ratio: increased Tfh and IL-21 strongly correlate with presence of autoantibodies. Immunological Investigations 2015; 44(2):164-73.
2. Khanbarari F, Vakili M, Samadi M. The relationship between rs2488457 polymorphism of PTPN22 gene and recurrent pregnancy loss (RPL). Iran J Obstet Gynecol Infertil 2017; 20(9):49-55.
3. Malíčková K, Ambrusová Z, Belvončíková S, Bergendiová K, Krátká Z, Lešťan M, et al. Current possibilities of diagnostics and treatment of immunological causes of female infertility. Casopis Lekaru Ceskych 2021; 160(1):5-13.
4. Sarapik A, Velthut A, Haller-Kikkatalo K, Faure GC, Béné MC, de Carvalho Bittencourt M, et al. Follicular proinflammatory cytokines and chemokines as markers of IVF success. Clinical and Developmental Immunology 2012; 2012.
5. Baskind NE, Orsi NM, Sharma V. Follicular-phase ovarian follicular fluid and plasma cytokine profiling of natural cycle in vitro fertilization patients. Fertility and sterility 2014; 102(2):410-8.
6. Mahdi BM. Role of some cytokines on reproduction. Middle East Fertility Society Journal 2011; 16(3):220-3.
7. VS VR, JC HC, ME CO. Serum levels of IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha in infertile patients with ovarian dysfunction. Ginecologia y obstetricia de Mexico 2005; 73(11):604-10.
8. Field SL, Dasgupta T, Cummings M, Orsi NM. Cytokines in ovarian folliculogenesis, oocyte maturation and luteinisation. Molecular Reproduction and Development 2014; 81(4):284-314.
9. El-Far M, El-Sayed IH, El-Motwally AE, Hashem IA, Bakry N. Serum levels of TNF-α and antioxidant enzymes and placental TNF-α expression in unexplained recurrent spontaneous miscarriage. Journal of physiology and biochemistry 2009; 65(2):175-81.
10. Maeda A, Inoue N, Matsuda-Minehata F, Goto Y, Cheng Y, Manabe N. The role of interleukin-6 in the regulation of granulosa cell apoptosis during follicular atresia in pig ovaries. Journal of Reproduction and Development 2007; 53(3):481-90.
11. Kawasaki F, Kawano Y, Kosay Hasan Z, Narahara H, Miyakawa I. The clinical role of interleukin-6 and interleukin-6 soluble receptor in human follicular fluids. Clinical and experimental medicine 2003; 3(1):27-31.
12. Gorospe WC, Hughes Jr FM, Spangelo BL. Interleukin-6: effects on and production by rat granulosa cells in vitro. Endocrinology 1992; 130(3):1750-2.
13. Tilg H, Trehu E, Atkins MB, Dinarello CA, Mier JW. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55; 1994.
14. La Vignera S, Condorelli R, Bellanca S, La Rosa B, Mousavi A, Busa B, et al. Obesity is associated with a higher level of pro-inflammatory cytokines in follicular fluid of women undergoing medically assisted procreation (PMA) programs. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2011; 15(3):267-73.
15. Karabulut S, Keskin İ, Kutlu P, Delikara N, Atvar Ö, Öztürk Mİ. Male infertility, azoozpermia and cryptozoospermia incidence among three infertility clinics in Turkey. Turkish Journal of Urology 2018; 44(2):109.
16. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. PLoS medicine 2012; 9(12):e1001356.
17. Edition F. Examination and processing of human semen. Geneva: World Health; 2010.
18. Rienzi L, Balaban B, Ebner T, Mandelbaum J. The oocyte. Human Reproduction 2012; 27(suppl_1):i2-1.

19. Hill GA, Freeman M, Bastias MC, Rogers BJ, Herbert III CM, Osteen KG, et al. The influence of oocyte maturity and embryo quality on pregnancy rate in a program for in vitro fertilization-embryo transfer. Fertility and sterility 1989; 52(5):801-6.
20. Razi Y, Eftekhar M, Fesahat F, Dehghani Firouzabadi R, Razi N, Sabour M, et al. Concentrations of homocysteine in follicular fluid and embryo quality and oocyte maturity in infertile women: a prospective cohort. Journal of Obstetrics and Gynaecology 2021; 41(4):588-93.
21. Ghodsi M, Hojati V, Atarzadeh A, Saifi B. Assessment Interleukins 3, 5 and 6 Concentration in Follicular Fluid and Their Diagnostic Value in Patients with Unexplained Infertility; 2020.
22. Niu Z, Ye Y, Xia L, Feng Y, Zhang A. Follicular fluid cytokine composition and oocyte quality of polycystic ovary syndrome patients with metabolic syndrome undergoing in vitro fertilization. Cytokine 2017; 91:180-6.
23. Ilkhanizadeh B, Nahali Moghaddam A, Hajishafiha M, Sadaghiani M, Nanbakhsh F, Deldar Y, et al. Correlation Between Embryo Implantion and Follicular Fluid Selected Cytokines and Hormone Levels in Women Under Treatment by Microinjection Technique. Studies in Medical Sciences 2013; 24(5):329-38.
24. Gonzalez MB, Lane M, Knight EJ, Robker RL. Inflammatory markers in human follicular fluid correlate with lipid levels and Body Mass Index. Journal of Reproductive Immunology 2018; 130:25-9.
25. Nouri M, Ghaffari M, Salmasi A, Ghasemzadeh A. Serum and follicular fluid IL-6 and sex steroid hormone levels and their correlation of undergoing IVF-ET with endometriosis and pregnancy rate in women. Journal of Reproduction & Infertility 2000; 1(4).
26. Altun T, Jindal S, Greenseid K, Shu J, Pal L. Low follicular fluid IL-6 levels in IVF patients are associated with increased likelihood of clinical pregnancy. Journal of assisted reproduction and genetics 2011; 28(3):245-51.
27. Gazvani MR, Bates M, Vince G, Christmas S, Lewis-Jones DI, Kingsland C. Follicular fluid concentrations of interleukin-12 and interleukin-8 in IVF cycles. Fertility and Sterility 2000; 74(5):953-8.
28. Okpalaji C, Okerengwo A, Okpani A, Chinko B, Bamigbowu E. Serum cytokine concentrations in infertile and fertile women. A preliminary study in port Harcourt, Nigeria. IOSR J Dent Med Sci 2016; 15(9):77-9.