بررسی شیوع آنتی‌بادی‌های علیه گامت در مایع فولیکولی بیماران نابارور کاندیدای ICSI

سهیلا عارفی (M.D.)[۱،۲]، **محمدمهدی آخوندی** (Ph.D.)[۱]، **محمدرضا صادقی** (Ph.D.)[۱]، **محمود جدی تهرانی** (Ph.D.)[۳]، **مهناز حیدری** (M.Sc.)[۴]، **اصغر طالبیان** (M.Sc.)[۴]، **علی احمد بیات** (B.Sc.)[۵]، **علی صادق‌پورطبائی** (M.D.)[۶]

۱- استادیار، گروه غدد تولید مثل و جنین‌شناسی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولید مثل، پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا، تهران، ایران.

۲- استادیار، گروه ایمونولوژی تولید مثل، مرکز تحقیقات آنتی‌بادی مونوکلونال، پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا، تهران، ایران.

۳- دانشیار، گروه ایمونولوژی تولید مثل، مرکز تحقیقات آنتی‌بادی مونوکلونال، پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا، تهران، ایران.

٤- مربی، گروه غدد تولید مثل و جنین‌شناسی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولید مثل، پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا، تهران، ایران.

٥- کارشناس، گروه ایمونولوژی تولید مثل، مرکز تحقیقات آنتی‌بادی مونوکلونال، پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا، تهران، ایران.

٦- استادیار، گروه جراحی قلب و عروق، بیمارستان قلب و عروق شهید رجایی، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: اختلالات ایمونولوژی را باید یکی از دلایل ناباروری به حساب آورد. آنتی‌بادی‌های علیه گامت شامل آنتی‌بادی علیه اسپرم (ASA) و آنتی‌بادی علیه زونا (AZA) در ایجاد ناباروری مؤثر می‌باشند که عمدهٔ این اثرات روی فرآیند لقاح و همچنین مراحل تکامل جنین می‌باشد. بنابراین بررسی این آنتی‌بادیها در بیماران داوطلب لقاح خارج رحمی (IVF) توصیه می‌شود؛ زیرا در صورت حضور این آنتی‌بادیها در سرم و مایع فولیکولی، درمان بیمار از IVF به میکرواینجکشن (ICSI) تبدیل می‌شود. هدف این مطالعه بررسی حضور آنتی‌بادی علیه اسپرم و آنتی‌بادی علیه زونا در مایع فولیکولی بیماران نابارور کاندیدای لقاح خارج رحمی (ICSI) می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه آینده‌نگر، مایع فولیکولی ۹٦ بیمار نابارور در محدودهٔ سنی ۳۹-۲۰ سال، (۳۱/۵±۵/۱) کاندیدای ICSI جمع‌آوری گردید. براساس علت ناباروری، ۸۰ بیمار دارای علت ناباروری مشخص و ۱٦ بیمار با علت ناباروری نامشخص بودند. مایع فولیکولی تمام بیماران با روش الایزا برای بررسی AZA و دو روش الایزا و Sperm Mar برای ارزیابی حضور ASA بررسی شد و نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون آماری χ^2 آنالیز و نتایج در سطح $p<۰/۰۵$ معنی‌دار تلقی شد.

نتایج: براساس نتایج روش الایزا و Sperm Mar، در مایع فولیکولی هیچ یک از بیماران آنتی‌بادی علیه اسپرم دیده نشد. این در حالی است که ۲۰ بیمار، (۲۰/۸٪) AZA را در مایع فولیکولی نشان دادند. همچنین، در بیماران با ناباروری با علت ناشناخته، شیوع AZA به طور واضحی بالاتر از بیماران نابارور با علت مشخص بود ($p=۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: شیوع پائین ASA و شیوع بالای AZA در بیماران نابارور، به خصوص در ناباروری با علت ناشناخته در ایران باید مهم تلقی شود. بررسی آنتی‌بادی علیه گامت به خصوص آنتی‌بادی علیه زونا در بیماران نابارور مخصوصاً در موارد ناشناخته توصیه می‌شود.

کلید واژگان: آنتی‌بادی علیه زونا، آنتی‌بادی علیه اسپرم، مایع فولیکولی، ناباروری با علت ناشناخته، لقاح خارج رحمی، میکرواینجکشن، اتوآنتی‌بادی، آنتی‌بادی علیه گامت.

مسئول مکاتبه: دکتر سهیلا عارفی، گروه غدد تولید مثل و جنین‌شناسی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولیدمثل، پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا، صندوق پستی: ۱۷۷-۱۹۸۳۵، اوین، تهران، ایران.

پست الکترونیک: arefi@avesina.ac.ir

Downloaded from http://www.jri.ir

زمینه و هدف

در مردان و زنان عوامل متعددی از جمله علل ایمونولوژی بر فرآیند باروری اثر می‌گذارد. این عوامل در خانمها با اثر بر روند تخمک‌گذاری، لقاح و لانه‌گزینی و در مردان با اثر بر حرکت اسپرم و نیز فرآیند لقاح به عنوان عامل اصلی یا فاکتور همراه در کاهش باروری نقش دارند. از این عوامل می‌توان به حضور آنتی‌بادی‌های علیه گامت مانند آنتی‌بادی علیه اسپرم (ASA)[1] و آنتی‌بادی علیه زونا (AZA)[2] اشاره کرد. در واقع اتصال اسپرم به تخمک اولین مرحله در روند لقاح و باروری تخمک می‌باشد و آنتی‌بادی علیه سر اسپرم و آنتی‌بادی‌های علیه زونا پلوسیدا با متوقف کردن واکنش‌های آکروزومی باعث اختلال در فرآیند لقاح می‌شوند (۱). مطالعات نشان می‌دهد آنتی‌بادی‌های علیه گامت در ٤٥٪ زوج‌های نابارور وجود داشته و در باروری طبیعی و آزمایشگاهی دخالت می‌کند (۲). زونا پلوسیدا به عنوان لایه شفاف اطراف تخمک حاوی گیرنده‌های اختصاصی (zp1,zp2,zp3) برای اسپرم است (۳،٤). آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه گلیکوپروتئین‌های اسیدی زونا پلوسیدا باعث اختلال در لقاح طبیعی یا آزمایشگاهی می‌شوند (٥). تا آنجا که از این آنتی‌بادی به عنوان واکسن علیه بارداری استفاده می‌گردد (٦). وجود آنتی‌بادی متصل شده علیه سر اسپرم بیش از ۸۰٪ (با استفاده از روش ایمینوبید مستقیم) باعث کاهش واضح در میزان لقاح می‌شود (۷). آنتی‌بادی علیه دم اسپرم، با اثر روی حرکت اسپرم و همچنین اثر بر ظرفیت‌پذیری اسپرم[3] باعث ناباروری می‌شود (۸). Check و همکاران نشان دادند که حضور آنتی‌بادی علیه اسپرم در مایع سرویکال با اثر روی حرکت اسپرم باعث اختلال در نتایج آزمایش PCT[4] شده و برای این بیماران استفاده از روش درمانی IUI موفقیت‌آمیز خواهد بود (۱۰، ۹). همچنین برخی مقالات به اثر مهاری آنتی‌بادی علیه اسپرم در پیشرفت و تکامل جنین اشاره نموده‌اند. از طرف دیگر اهمیت بررسی آنتی‌بادی علیه اسپرم در مایع فولیکولی در آن است که مایع فولیکولی خود در تحریک و شروع واکنش آکروزومی در اسپرم مؤثر است (۱۱). بنابراین وجود آنتی‌بادی علیه‌اسپرم در مایع فولیکولی می‌تواند روی این عملکرد مایع فولیکولی مؤثر باشد. در بررسی Madresic و همکاران روی ٤٤ بیمار نابارور با منشاء ایمونولوژی نشان دادند که وجود آنتی‌بادی‌هایی مانند آنتی‌زونا و آنتی‌اسپرم و آنتی‌فسفولیپید با کاهش میزان لقاح در IVF همراه بوده و این بیماران باید تحت درمان به روش میکرواینجکشن (ICSI)[5] قرار گیرند (۱۲). مطالعه Chang نیز همین نتایج را نشان داد (۱۳). در ایران تاکنون شیوع آنتی‌بادی علیه‌گامت در مایع فولیکولی بررسی نشده است. با توجه به اهمیت حضور آنتی‌بادی علیه‌اسپرم و علیه‌زونا در مایع فولیکولی و اثر احتمالی آنها در باروری، بررسی شیوع این اتوآنتی‌بادیها، به خصوص در مایع فولیکولی افراد کاندید درمان‌های لقاح خارج رحمی، ضروری به نظر می‌رسد. در این مطالعه میزان حضور آنتی بادی علیه اسپرم و علیه زونا در مایع فولیکولی بیماران نابارور مراجعه کننده به مراکز درمان ناباروری شهر تهران بررسی شده است.

روش بررسی

بیماران تحت مطالعه: این مطالعه مقطعی یک ساله در پژوهشکده فن‌آوری‌های نوین علوم پزشکی جهاددانشگاهی- ابن‌سینا انجام شد. تمام بیماران (۹٦ نفر) به صورت متوالی وارد طرح شده و پس از گرفتن تاریخچه بالینی و معاینات فیزیکی و آزمایشات معمول

1- Anti Sperm Antibody
2- Anti Zona Antibody
3- Capacitation
4- Poor PCT
5- Microinjection

Downloaded from http://www.jri.ir

هورمونی (E2، LH، FSH روز سوم سیکل، TFT[1]، پرولاکتین[2]، پروژسترون نیمه سیکل)، سونوگرافی و اسپرموگرام در دو گروه نابارور با علت مشخص (۸۰ نفر) و نابارور با علت نامشخص (۱۶ نفر) تقسیم شدند. معیارهای ورود به مطالعه شامل سن کمتر از ۴۰ سال، انتخاب روش ICSI جهت درمان (تعداد کل اسپرم کمتر از یک میلیون، عدم وجود لقاح در یک نوبت IVF با تعداد اسپرم کمتر از ۱۰ میلیون، عدم وجود لقاح در دو نوبت IVF قبلی با تعداد اسپرم بالای ۱۰ میلیون، دریافت اسپرم با دو روش TESEو PESA) و معیارهای خروج شامل وجود تاریخچه قبلی بیماری‌های روماتولوژی و ایمونولوژی مانند لوپوس، آرتریت روماتوئید، تیروئیدیت اتوایمیون بود.

تحریک تخمک‌گذاری: برای تمامی خانم‌های مورد بررسی (۹۶ نفر)، پروتکل طولانی مدت[3] جهت تحریک تخمک‌گذاری استفاده شد. در این خانمها از روز ۲۱ سیکل قبل از سیکل تحریک تخمک‌گذاری، داروی سوپرفکت (Aventis, Germany) ۰/۵*mg* (۰/۵*ml*) در روز به صورت زیر جلدی تزریق شد. روز سوم سیکل تحریکی پس از انجام سونوگرافی واژینال و اندازه‌گیری مقدار استرادیول خون، در صورت داشتن استرادیول کمتر از ۵۰*pg/ml* و نازک بودن اندومتر، عدم وجود کیست flare با قطر بیشتر از ۱۲*mm*، تجویز آمپول hMG، حاوی گنادوتروپین‌های FSH و LH با دوز ۱۵۰ *IU/d* شروع و سپس با کنترل سونوگرافی هر ۴-۳ روز یک بار دوز گنادوتروپینها و در نتیجه تعداد آمپول‌های hMG، تنظیم شد.

پس از رسیدن حداقل ۳ فولیکول غالب به قطر ۱۹*mm*، میزان ۱۰۰۰۰*IU* hCG به صورت عضلانی تزریق و ۳۶-۳۴ ساعت بعد، عمل دریافت تخمک انجام شد. مایع فولیکولی بیماران پس از جستجو و برداشت تخمک و پس از گرفتن رضایت به صورت جداگانه در دمای ۲۰ *°C*- منجمد گردید و جهت انجام تست AZA وASA تمامی نمونه‌ها کدبندی شد.

مایع فولیکولی تمام افراد از نظر حضور آنتی‌بادی علیه زونا با استفاده از روش الایزا و از نظر آنتی‌بادی علیه اسپرم با روش الایزا و روش Sperm Mar بررسی شد.

۱- بررسی آنتی‌بادی علیه اسپرم:

به منظور تهیه آنتی‌ژن‌های سطحی اسپرم با استفاده از دترژانت LIS[4] (۱۴) (Sigma, USA) ۱*ml* اسپرم شسته شده با ۲/۵*ml* محلول LIS (۰/۳*M*) مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه (۲۵ *°C*) انکوبه شد، سپس مخلوط حاصل با قدرت ۱۵۰۰۰*g*به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ *°C* سانتریفوژ گردید. در مرحله بعد محلول رویی برداشته و دوباره به رسوب حاصل ۲/۵*ml* محلول LIS اضافه و سانتریفوژ شد. مجموع محلول رویی در هر دو مرحله جمع‌آوری شده و در مقابل بافر Tris–HCL (۱۰ *mM*، pH=۷/۴) دیالیز شد و در نهایت غلظت آنتی‌ژن‌های سطح اسپرم با استفاده از روش برادفورد اندازه‌گیری شد. در این مطالعه، روش الایزای غیرمستقیم متشکل از سه لایه طراحی شد.

لایه اول: اتصال آنتی‌ژن به کف پلیت الایزا: از آنتی‌ژن‌های تهیه شده به روش فوق، یک محلول آنتی‌ژن با غلظت ۴*μg/ml* و به حجم مورد نیاز تهیه گردید و به مقدار ۱۰۰*μl* در هر چاهک پلیت الایزا اضافه و به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ *°C* قرار داده شد. در پایان زمان انکوبه‌کردن، محتوای پلیت تخلیه و سپس داخل چاهکها سه مرتبه با بافر (۰/۰۵٪، PBS-T) شسته شدند. سپس ۱۵۰ *μl* از بافر بلاک کننده (۲/۵٪ PBS-T) به هر چاهک اضافه و ۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ *°C* قرار گرفت و سپس داخل چاهکها ۳ مرتبه با بافر شستشو داده شد.

1- Thyroid Function Test
2- Prolactine
3- Long protocol
4- Lithium 3,5 diodosalicylate

Downloaded from http://www.jri.ir

لایه دوم: مایع فولیکولی به مقدار μl ۱۰۰ به هر چاهک اضافه گردید و به مدت ۱ ساعت در انکوباتور $37^{\circ} C$ قرار داده شد. سپس مطابق قبل داخل چاهکها سه بار شستشو داده شد.

لایه سوم: افزودن آنتی‌بادی موشی علیه IgG انسانی کونژوگه شده[1] با HRP به رقت اپتیموم ۱/۱۵۰۰ در بافر رقیق‌کننده به حجم مورد نیاز تهیه و مقدار μl۱۰۰ به هر چاهک اضافه و به مدت ۱ ساعت در انکوباتور $37^{\circ}C$ قرار داده شد. سپس داخل چاهکها ۵ بار مطابق قبل شستشو و مقدار μl۱۰۰ از سوبسترای آماده TMB (تترا متیل بنزیدین) به هر چاهک اضافه گردید و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه و در محیط تاریک برای توقف واکنش از اسید سولفوریک ۱ نرمال به مقدار μl۵۰ به هر چاهک اضافه و به کمک دستگاه الایزا جذب نمونه‌ها در طول موج nm۴۵۰ ثبت شد. در این روش، کنترل منفی شامل چاهک‌های فاقد مایع فولیکولی و نمونه سرمی حاوی مقادیر بالای آنتی‌بادی علیه اسپرم جهت کنترل مثبت استفاده شد.

تعیین نقطه برش[2]: برای تعیین نقطه برش پس از تعیین رقت مناسب کونژوگه، آنتی‌بادی و آنتی‌ژن، تعدادی نمونه‌های سرم فاقد آنتی‌بادی علیه اسپرم و نمونه‌های دارای آنتی‌بادی علیه اسپرم به روش فوق جهت بررسی حضور آنتی‌بادی علیه اسپرم جذب نوری چاهکها تعیین گردید. سپس با محاسبه میانگین و انحراف معیار جواب‌های حاصل با استفاده از آزمون t، نقطه برش محاسبه گردید. در این تست جذب نوری ۰/۹۴۸، به عنوان نقطه برش در نظر گرفته شد.

به منظور معتبرسازی نتایج، کلیه نمونه‌های مایع فولیکولی با تست Sperm Mar مورد بررسی مجدد قرار گرفتند.

روش Sperm Mar: این روش شامل بررسی آنتی‌بادی علیه اسپرم از دو کلاس IgG و IgA می‌باشد که IgA آنتی‌بادی ترشحی بوده و در مخاط به همراه IgG وجود دارد؛ لذا در این روش آنتی‌بادی علیه اسپرم از کلاس IgG مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه از روش Sperm Mar غیرمستقیم استفاده شد. لذا برای بررسی حضور آنتی‌بادی علیه اسپرم، اسپرم متحرک اهدا کننده[3] و مایع فولیکولی رقیق شده مورد استفاده قرار گرفت.

در این روش، برای غیرفعال نمودن کمپلمان μl۱۰۰ مایع فولیکولی برای ۴۵ دقیقه در دمای $^{\circ}C$ ۶۵ حرارت داده شد. اسپرم متحرک اهدایی با استفاده از روش Swim up آماده و غلظت نهایی sp/ml 2×10^{7} جهت انجام بررسی تهیه شد. در مرحله بعد مایع فولیکولی به صورت سریال تا غلظت ۱/۱۶ با محیط کشت Ham's F10 رقیق گردید. سپس μl۵۰ از مایع فولیکولی غیرفعال با μl۵۰ اسپرم شسته شده متحرک مخلوط و در دمای $37^{\circ} C$ به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه شد. پس از آن در یک لام در سه نقطه نزدیک هم و به شکل مثلث، محلول‌های زیر قرار گرفتند: نقطه ۱: μl۱۰ مخلوط مایع فولیکولی و اسپرم‌های متحرک. نقطه ۲: μl۱۰ ذرات لاتکس پوشیده شده با آنتی‌بادی. نقطه ۳ : μl۱۰ آنتی‌سرم علیه آنتی‌بادی انسانی. سپس نقطه ۱ و۲ به آرامی با هم مخلوط و به دنبال آن نقطه ۳ با مخلوط ۱و۲ مخلوط گردید و روی آن یک لامل قرار داده شد و پس از ۳-۲ دقیقه با میکروسکوپ نوری در بزرگنمایی ×۴۰۰ مشاهده و درصد اسپرم‌های متحرک متصل به لاتکس شمارش گردید. نمونه‌های منفی پس از ۱۰ دقیقه انکوبه شدن در محیط مرطوب دوباره ارزیابی شدند.

۲- بررسی آنتی بادی علیه زونا:

الف- تست الایزا: آنتی‌بادی موشی علیه زونا پلوسیدا انسان بر طبق روش‌های پیشین با کمی تغییرات ساخته شد. به‌طور خلاصه تخمک‌های لقاح نیافته[4] (که از این به بعد به اختصار تخمک نامیده می‌شود) با

1- Conjugated mouse anti human IgG
2- Cut off
3- Donor
4- Unfertilized oocyte

Downloaded from http://www.jri.ir

زونای سالم حاصل از IVF و یا ICSI پس از گرفتن رضایت از بیماران به عنوان منبع زونا پلوسیدا، به منظور تولید آنتی‌بادی طی ٤ مرحله با فواصل زمانی معین در پریتوئن موش BALB/C تزریق گردید. پس از چهار تزریق رقت‌های متفاوتی از سرم موش جهت تأیید حضور آنتی‌بادی علیه زونا، با استفاده از روش ایمونوفلورسانس روی تخمک‌های انسانی با استفاده از کونژوگه FITC علیه ایمونوگلوبولین موشی ارزیابی شد.

جهت بررسی نمونه‌های مایع فولیکولی، تخمک پس از تهیه با استفاده از PBS شستشو و در زیر روغن پارافین مایع در قطره‌های جداگانه‌ای حاوی ٤-٣ تخمک در پتری‌دیش قرار داده شد. قطره حاوی PBS و تخمک به عنوان کنترل منفی، قطره حاوی تخمک و PBS و سرم موش ایمن شده حاوی آنتی‌زونا با رقت ١/١٠٠ به عنوان کنترل مثبت و قطرات حاوی تخمک و مایع فولیکولی انسانی جهت بررسی آنتی‌بادی علیه زونا در مایع فولیکولی در نظر گرفته شدند. پس از ٣٠ دقیقه انکوبه کردن و سه بار شستشو با PBS، قطرات کنترل مثبت و قطرات حاوی مایع فولیکولی خانمها، با ایمونوگلوبولین علیه موشی کونژوگه شده با پراکسیداز (HRP) به مدت ٣٠ دقیقه انکوبه شدند. سپس تمام تخمکها سه بار با PBS شستشو و به داخل چاهک‌های پلیت الایزا منتقل گردید. سپس به هر چاهک ٥٠μl محلول سوبسترای OPD اضافه و در محیط تاریک به مدت ١٥ دقیقه انکوبه شد و در نهایت با افزودن ٥٠ μl اسید سولفوریک ٢٠٪ واکنش متوقف شد. جذب نوری چاهکها با استفاده از دستگاه الایزا در طول موج ٤٩٢ nm اندازه‌گیری شد.

تعیین نقطه برش: برای تعیین نقطه برش پس از تعیین رقت مناسب کونژوگه، آنتی‌بادی و آنتی‌ژن، برای تعدادی سرم فاقد آنتی‌بادی علیه زونا و سرم‌های موشی حاوی آنتی‌بادی علیه زونا آزمون الایزا گذاشته شد و جذب نوری آنها بدست آمد و سپس با محاسبه میانگین و انحراف معیار جواب‌های حاصل با استفاده از آزمون t و نقطه برش محاسبه شد. در این تست جذب نوری ٠/٦١٢، به عنوان نقطه برش تعیین و مقادیر جذب نوری بالای آن مثبت در نظر گرفته شد.

به منظور معتبرسازی نتایج تست، مایع فولیکولی تمام نمونه‌ها جهت حضور آنتی‌بادی علیه‌زونا، با استفاده از کیت تجاری الایزا (Bioserva Diagnostia, Germany) دوباره بررسی شدند. هیچ مورد مثبت و منفی کاذب مشاهده نگردید و تمامی نتایج آزمون الایزای طراحی شده با نتایج کیت تجاری هم‌خوانی داشتند و نتایج تست تائید شد.

بررسی آماری: اطلاعات پس از ورود در جداول اطلاعاتی Excel و کدبندی برای متغیرهای کمی به صورت میانگین ± انحراف استاندارد و در متغیرهای کیفی به صورت درصد نشان داده شد و با آزمون χ^2 با نرم‌افزار SPSS آنالیز گردید. $p<0/05$ معنی‌دار تلقی شد.

نتایج

براساس نتایج حاصل از مطالعهٔ حاضر، میانگین و انحراف معیار سن بیماران تحت بررسی ٣١/٥±٥/١ سال با طیف سنی ٣٩-٢٠ سال بود. براساس نتایج در ١٦/٦٪ بیماران تحت بررسی، علت ناباروری ناشناخته و در ٨٣/٤٪ علت ناباروری مشخص می‌باشد؛ که از این بین بیشترین علت ناباروری، فاکتور مردانه[1] (٥٨/٣٪) بود. در بررسی آنتی‌بادی علیه زونا با روش الایزا بالاترین OD خوانده شده در طول موج ٤٩٢nm، ١/٥٣ بود که نشانگر حساسیت قابل قبول تست می‌باشد.

همانطور که نتایج نشان می‌دهد در بررسی مایع فولیکولی از ٩٦ بیمار تحت مطالعه، با استفاده از روش الایزا که پیشتر شرح داده شد، در ٢٠ نفر (٢٠/٨٪)

1- Male factor

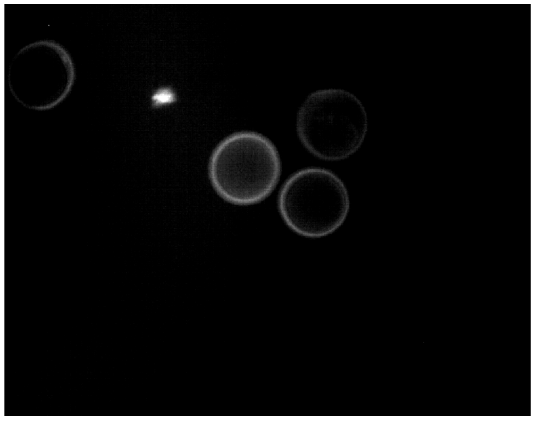
Downloaded from http://www.jri.ir

جدول ۱- حضور آنتی‌بادی علیه گامت در ارتباط با علت ناباروری در بیماران ناباروری کاندید میکرواینجکشن

علت ناباروری	فراوانی (n=۹۶)		موارد مثبت آنتی‌زونا آنتی بادی (n=۲۰)	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد
علت مردانه	٥٦	٥٨/٣	١١	١٩
علت لوله‌ای	١٠	١٠/٤	٢	٢٠
علت تخمدانی	٧	٧/٢	--	--
علت مردانه و لوله‌ای توام	٣	٠/١	--	--
علت تخمدانی و مردانه توام	٤	٤/١	--	--
علت نامشخص	١٦	١٦/٦	٧	٤٣

حضور آنتی‌بادی علیه‌زونا در مایع فولیکولی مثبت بود. این نتایج با استفاده از کیت الایزای تجاری نیز تأیید شد که نشان‌دهنده حساسیت الایزای طراحی شده در این بررسی و شیوع بالای این آنتی بادی در بیماران نابارور است. همچنین در مقایسه نتایج بین دو گروه نابارور با علت مشخص و نابارور با علت نامشخص آنتی‌بادی علیه زونا در بیماران با ناباروری با علت نامشخص با شیوع بالاتری (٤٣/٧٥٪)، نسبت به باروری با علت مشخص (١٦/٢٥٪) وجود دارد (p=٠/٠٠١). این در حالی است که در نمونه‌های مایع فولیکولی با استفاده از روش‌های Sperm Mar و الایزا چه با استفاده از اسپرم کامل و چه با استفاده از آنتی‌ژن‌های سطح اسپرم به عنوان لایه اول، آنتی‌بادی علیه اسپرم مشاهده نگردید.

در بررسی ارتباط سن و حضور آنتی‌بادی علیه زونا در مایع فولیکولی، مقایسه میانگین سنی در گروه بیماران با AZA مثبت (٣٢/٥٥±٥/١ سال) و گروه بیماران با AZA منفی (٣١/٤±٥/٠٦ سال) ارتباط معنی‌داری را نشان نداد (p>٠/٠٥) (جدول ١).



شکل ۲- رنگ‌آمیزی ایمینوفلورسانت آنتی‌زونا آنتی‌بادی موشی علیه زونا پلوسیدای سالم انسان

بحث

ناباروری به عنوان مشکلی که حدود ١٥-١٠٪ زوجین در سنین باروری درگیر آن می‌باشند دارای اتیولوژی گسترده‌ای با منشاء مردانه و زنانه می‌باشد. بعضی مطالعات به احتمال دخالت اختلالات ایمونولوژیک مانند آنتی‌بادی‌های علیه گامت در ناباروری به خصوص ناباروری بدون علت مشخص، اشاره داشته‌اند (٢). نقش اتوآنتی‌بادیها از جمله آنتی‌بادی‌های علیه گامت در شکست‌های مکرر در IVF نیز مطرح گردیده است. Putowski و همکاران ١٧ بیمار نابارور با شکست‌های مکرر درIVF را از نظر حضور اتوآنتی‌بادی‌های مختلف مانند آنتی‌بادی علیه هسته (ANA)[1] ، آنتی‌بادی علیه تیروئید (ATA)[2]، آنتی‌بادی علیه فسفولیپید (APA)[3]، آنتی‌بادی علیه سلول‌های ماهیچه‌ای صاف (ASMA)[4] و آنتی‌بادی علیه اسپرم (ASA) را به روش فلوسیتومتری بررسی و نشان دادند در ٨٢/٣٪ موارد، حداقل یکی از تست‌های ایمونولوژی غیرطبیعی است و نتیجه گرفتند که بررسی تست‌های ایمونولوژی در بیماران نابارور با شکست‌های مکرر از اهمیت زیادی برخوردار است (١٥). همچنین Mardesic و همکاران اثر معکوس حضور APA، ASA و AZA روی نتایج IVF و لزوم ICSI در این بیماران را مطرح نمودند (١٢). Unlu نیز در بررسی اثر AZA و ASA در میزان حاملگی در سیکل‌های IVF، انجام این تستها را در بررسی اولیه بیماران نابارور پیشنهاد نمود (١٦). ارتباط آنتی‌بادی‌های علیه گامت در مایع فولیکولی با

1- Antinuclear Antibody
2- Antithyroid Antibody
3- Antiphospholipid Antibody
4- Anti Smooth Muscle cell Antibody

Downloaded from http://www.jri.ir

باروری آزمایشگاهی بحث انگیز بوده و اطلاعات علیه و نقیضی وجود دارد. Kohl و همکاران ارتباطی بین حضور آنتی‌بادی علیه اسپرم در مایع فولیکولی و باروری مشاهده ننمودند (۱۷). همچنین Curtis و همکاران ارتباطی بین حضور آنتی‌بادی علیه زونا در مایع فولیکولی و حاملگی در سیکل‌های IVF مشاهده نکردند (۱۸). علاوه بر این Shibahara و همکاران نشان دادند که حضور یا عدم حضور ASA به تنهایی میزان لقاح را پیش‌بینی نمی‌کند و آزمون اتصال اسپرم به زونا ارزیابی مناسبتری جهت این پیش آگهی است (۷). از طرفی Ivanova در بیماران با میزان بالای AZA شیوع بالائی از کاهش یا عدم باروری در روش IVF را نشان داد (۱۹). Tuneichi و همکاران نشان دادند قبل از انکوبه کردن اسپرم و تخمک در محیط کشت IVF در صورت مجاورت سرم حاوی آنتی‌بادی علیه اسپرم با اسپرم، اثر مهاری روی لقاح و تشکیل جنین خواهد گذاشت (۲۰). تا به حال شیوع آنتی‌اسپرم و آنتی‌زونا آنتی‌بادی در مایع فولیکولی در ایران تعیین نشده است و با توجه به اثر احتمالی AZA و ASA در باروری و موفقیت IVF شناسائی آنتی‌بادی علیه اسپرم در بیماران نابارور و تعیین شیوع آن قابل تأمل خواهد بود. در تحقیق حاضر نمونه‌های مایع فولیکولی جهت بررسی آنتی‌اسپرم آنتی‌بادی با استفاده از Sperm Mar غیرمستقیم تحت بررسی قرار گرفتند؛ زیرا تست Sperm Mar غیرمستقیم نسبت به تست‌های دیگر از حساسیت بالاتری برخوردار می‌باشد و ساده‌تر انجام می‌شود (۲۱). در هیچیک از نمونه‌های مورد مطالعه آنتی‌بادی علیه اسپرم مشاهده نشد. با توجه به اینکه نمونه‌های مورد بررسی با تست Sperm Mar از نظر وجود آنتی‌بادی علیه اسپرم منفی شدند، کلیه نمونه‌ها مجدداً با تست الایزا نیز تحت بررسی قرار گرفتند که در این تست نیز کلیه نمونه‌ها از نظر حضور آنتی‌بادی علیه اسپرم منفی شدند. این در حالی است که مطالعات قبلی شیوع بالایی از آنتی‌بادی علیه اسپرم را در سرم بیماران نابارور نشان می‌دهد. Chiu در سال ۲۰۰۳ نشان داد آنتی‌بادی علیه اسپرم در ۲۰٪ از زوج‌های نابارور، علت یا عامل همراه در ناباروری است (۲۲). همچنین Naz شیوع این آنتی‌بادی را ۳۶-۹٪ نشان داده است (۲۳). Menge در سال ۱۹۸۲، شیوع آنتی‌بادی علیه اسپرم را در سرم زوج‌های نابارور ۳۱٪ نشان داد (۲٤). مطالعات محدودی در خصوص حضور آنتی‌بادی علیه اسپرم در مایع فولیکولی انجام گرفته است. de Almedia در مطالعه خود این شیوع را ٤٥٪ گزارش نمود (۲۵). همچنین Mandelbaum و همکاران، شیوع آنتی‌بادی علیه اسپرم در مایع فولیکولی بیماران با ناباروری با علت ناشناخته ۳٦٪ و در بیماران با ناباروری با علت مشخص، ٤٪ گزارش نمود. Mandelbaum نشان داد آنتی‌بادی علیه اسپرم در درصد قابل توجهی از بیماران نابارور با علت نامشخص وجود داشته که لزوم بررسی این آنتی‌بادی را در این گروه از بیماران نشان می‌دهد (۲٦). همچنین در مطالعه‌ای که در یکی از مراکز ناباروری تهران در سال‌های ۸۲-۸۱ انجام شد، میزان آنتی‌بادی علیه اسپرم (IgG) در سرم بیماران مرد آزواسپرم ٤۳٪ گزارش شد (۲۷).

یکی از مکانیسم‌های احتمالی برای ایجاد آنتی‌بادی علیه زونا، جذب تخمک حاوی زونا در داخل پریتوئن و تحریک سیستم ایمنی توسط آنتی‌ژن‌های زونا می‌باشد (۲۸). شیوع آنتی‌بادی علیه زونا در سرم به‌طور وسیعی بررسی شده است (۳۱-۲۹، ۲)؛ اما اطلاعات کمی در خصوص شیوع این آنتی‌بادی در مایع فولیکولی وجود دارد. Papale نشان داد که از ٥٥ بیمار مورد بررسی کاندید IVF، ۳٦/٦٪ AZA در مایع فولیکولی نشان داده‌اند (۳۱). همچنین Ulcova-Gallova نشان داد که در ۷۲٪ بیماران نابارور در موکوس سرویکال و در ۱۷٪ در سرم AZA وجود دارد (۳۰).

Downloaded from http://www.jri.ir

در مطالعه حاضر، در بررسی حضور آنتی‌بادی علیه زونا در مایع فولیکولی بالاترین جذب نوری (OD) خوانده شده در طول موج *nm* ۴۹۲، ۱/۵۳ می‌باشد که نشانگر حساسیت قابل قبول تست است. از آنجائی که پاسخ بدن به زونا پلوسیدا یک پاسخ سیستمیک است؛ حضور این آنتی‌بادی در مایع فولیکولی با حضور آن در سرم ارتباط مستقیم دارد (۳۰،۳۱، ۱۸)، همچنین حضور این آنتی‌بادی در مایع فولیکولی به لحاظ اثرات احتمالی آن بر لقاح از اهمیت کلینیکی بیشتری برخوردار است؛ لذا در این مطالعه به بررسی حضور این آنتی‌بادی در مایع فولیکولی اکتفا گردید. در این بررسی آنتی‌بادی علیه زونا در ۲۰/۸٪ از نمونه‌های مایع فولیکولی بیماران مورد مطالعه دیده شد. مطالعات نشان می‌دهد که آنتی‌بادی علیه زونا در بیماران با ناباروری با علت ناشناخته با درصد بالاتری نسبت به بیماران نابارور با علت مشخص دیده می‌شود. چنانکه Nishimoto و همکاران با استفاده از روش ایمنو-فلورسانس، شیوع آنتی‌بادی علیه زونا را در بیماران نابارور با علت ناشناخته ۷/۵٪ در مقایسه با بیماران نابارور با علت لوله‌ای (۱/۶٪) و افراد بارور (۰٪) گزارش نمود (۲۹). بررسی حاضر نیز نشان داد که آنتی‌بادی علیه زونا در بیماران نابارور با علت نامشخص با شیوع بالاتری (۴۳/۷۵٪) نسبت به بیماران نابارور با علت مشخص (۱۶/۲۵٪) وجود دارد.

در این بررسی آنتی‌بادی علیه زونا در مایع فولیکولی با شیوع ۲۰/۸٪ با ارجحیت در بیماران نابارور با علت ناشناخته وجود داشت، این در حالی است که در هیچیک از همین نمونه‌ها آنتی‌بادی علیه اسپرم با استفاده از دو روش متفاوت دیده نشد. نمونه‌های مورد بررسی از بیماران کاندید ICSI تهیه شده است. هیچکدام از نمونه‌ها با روش الایزا، چه با استفاده از آنتی‌ژن‌های سطح اسپرم و چه با استفاده از اسپرم کامل، آنتی‌بادی علیه اسپرم را نشان ندادند. همچنین کلیه نمونه‌ها نتایج مشابهی را در تست Sperm Mar نشان دادند. ممکن است یکی از فرضیات احتمالی در توجیه شیوع پائین آنتی‌اسپرم آنتی‌بادی در بیماران ایرانی، دخالت مسائل فرهنگی مانند عدم داشتن شرکای جنسی متعدد[1] و کم بودن تعداد شرکاء جنسی در طول دوران فعالیت جنسی و در نتیجه کاهش تماس به انواع متفاوت آنتی‌ژن‌های سطح اسپرم باشد. همچنین با توجه به این واقعیت که آنتی‌بادی علیه اسپرم به خصوص آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن سطح اسپرم با وزن *kD* ۶۹ در بیماران با سابقه قبلی عفونت‌های منتقله از راه جنسی (که در بیماران ایرانی کمتر از جوامع قبلی دیده می‌شود) شیوع بیشتری دارد (۱۰)، این فرضیه را مطرح می‌کند که در بیماران ایرانی آنتی‌بادی علیه اسپرم اهمیت کمتری داشته و ممکن است تنها آنتی‌بادی علیه گامت با اهمیت، آنتی‌بادی علیه زونا باشد، که لزوم بررسی آن را در بیماران نابارور با احتمال دخالت اختلالات ایمونولوژی و یا در موارد ناباروری با علت ناشناخته مشخص توصیه می‌شود. به نظر می‌رسد جهت بررسی بیشتر آنتی‌بادی علیه اسپرم، مطالعه‌ای با جمعیت بزرگتر کمک‌کننده باشد.

نتیجه گیری

با توجه به اثر احتمالی آنتی‌بادی‌های علیه گامت در ناباروری و لزوم استفاده از روش ICSI در این بیماران، بررسی این آنتی‌بادیها در بیماران نابارور به خصوص در موارد با علت ناشناخته توصیه می‌شود؛ گرچه با توجه به شیوع بالاتر آنتی‌بادی علیه زونا در مایع فولیکولی بیماران ایرانی بررسی این آنتی‌بادی در مقایسه با آنتی‌بادی علیه اسپرم از اهمیت بالینی بیشتری برخوردار است.

1- Single partner

Downloaded from http://www.jri.ir

تشکر و قدردانی

این طرح توسط معاونت پژوهش و فناوری جهاددانشگاهی، طی مصوبه به شمارهٔ ۱۱-۷۵۹ و ۱۰-۸۷۱ تأمین اعتبار شده است. بدین وسیله از زحمات بی‌بدیل همکاران پروژه، همچنین جناب آقای دکتر صدری، سرکار خانمها شاکری، ملکی و کورانلو تشکر و قدردانی می‌نماید.

References

1- Bohring C., Krause W. Characterization of spermatozoa surface antigens by antisperm and it's influence on acrosomal exocytosis. Am J Reprod Immunol. 2003;50 (5):411-19.

2- Moustafa M., Ozornek M.H., Krussel J.S., Cupisti S., Bodden-Heidrich R., Koldovsky U., et al. The effect of anti gamete antibodies on the success of assisted Reproduction. Clin Exp Obstet Gynecol. 1997;24(2):7-9.

3- Dunbar B.S., Avery S., Lee V., Prasad S., Schwahn D., Schwoebel E., et al. The mammalian Zona Pellucida: its biochemistry, immunochemistry, molecular biology and developmental expression. Reprod Fertil Dev. 1994;6(3):331-47.

4- Shabanowitz R.B. O' Rand M.G. Characterization of the human zona pellucida from fertilized and unfertilized eggs. J Reprod Fertil. 1988,82:151.

5- Shivers C.A., Dunbar B.S. Autoantibodies to the Zona pellucida: A possible cause for infertility in women. Science.1977; 197:1082-1086.

6- Dietl J., Freye J., Mettler L. Fertility inhibition using low-dose immunization with procine zona. pellucidae. Am J Reprod Immunol.1982;2(3):153-6.

7- Shibahara H., Shiraishi Y., Hirano Y., Suzuki T., Takamizawa S., Suzuki M. Divesity of the inhibitory effects on fertilization by antisperm antibodies bond to the smface of ejaculated human sperm. Hum Reprod. 2003;18(7):1469-73.

8- Kakagawa K., Kamada M., Maegawa M., Irahara M., Aono T. Sperm-immobilizing antibodies block capacitation in human spermatozoa. Arch Androl. 2001;47 (2):135-42

9- Check J.H., Bollendorf A., Katsoff D., Kozak J. The frequency of antisperm antibodies in the cervical mucus of women with poor postcoital tests and their effect on pregnancy rates. Am J Reprod Immunol. 1994;32(1):38-42.

10- Naz R.K. Modalities for treatment of antisperm antibody mediated infertility: Novel Prospective. Am J Reprod Immunol. 2004;51(2):390-7.

11- Saragueta P., Lanuza G., Miranda P.V., Tzon J.G., Baranao J.L. Immunoglobulins from human follicular fluid induce the acrosome reaction in human sperm. Mol Reprod Dev. 1994;39(3):280-8.

12- Mardesic T., Ulcova-Gallova Z., Huttelova R., Muller P., Voboril J., Mikova M., et al. The influence of different types of antibodies on in vitro fertilization results. Am J Reprod Immunol. 2000;43(1):1-5.

13- Chang T.H., Jin M.H., Wu T.C. Relationship of sperm antibodies in women and men to human in vitro fertilization, cleavage and pregnancy rate. Am J Reprod Immunol. 1993;30(2-3):108-12.

۱٤- طالبیان اصغر، زرنانی امیرحسن، جدی‌تهرانی محمود، آخوندی محمدمهدی، صادقی محمدرضا. طراحی روش الایزا با استفاده از آنتی‌ژن‌های سطح اسپرم جهت اندازه‌گیری آنتی‌بادی علیه اسپرم در مقایسه آن با تست آگلوتیناسیون Sperm Mar. باروری و ناباروری: سال پنجم(۱۳۸۲) شمارهٔ ۱. صفحات:۳٤-۲۳.

15- Putowski et al. The immunological profile of infertile women after repeated IVF failure. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2004;112(2):192-6.

16- Unlu C., Bohmer S., Maas D.H. Immunological factors in extracorporeal fertilization. The role of antibodies against spermatozoa and zona pellucida antigen. Fortschr Med. 1990;108(23):450-3.

17- Kohl B., Kohl H., Krause W., Deichert U. The clinical significance of antisperm antibodies in infertile couples. Hum Reprod. 1992;7(10):1384-7.

18- Curtis P., Burford G., Amso N., Keith E., Shaw R.W. Assessment of the relevance of zona pellucida antibodies in serum and cervical mucus in patients who have fertilization failure during in vitro fertilization. Fertil Steril. 1991;56(6):1124-7.

19- Ivanova M., Djarkova T., Mollova M., Petrov M., Tikhomirova T., Dakhno F. Zona pellucida autoantibodies in women undergoing ART. Folia Biol(Praha). 1999;45(2):59-62.

20- Taneichi A., Shibahara H., Takahashi K., Sasaki S., Kikuchi K., Sato I., et al. Effects of sera from infertile women with sperm immobilizing antibodies on fertilization and embryo development in vitro in mice. Am J Reprod Immunol. 2003;50(2):146-51.

Downloaded from http://www.jri.ir

۲۷- کاظمینی سید محمد، صدیقی گیلانی محمدعلی، دادخواه فرید، هادی ندوشن حسین. تعیین آنتی‌بادی علیه اسپرم در سرم و مایع انزالی مردان آزواسپرم به منظور پیشگویی موفقیت استخراج اسپرم از بیضه. باروری و ناباروری: سال چهارم (۱۳۸۲) شمارهٔ ٤. صفحات:۲۷۹-۲۷۳.

28- Mhaskar A., Buckshee K., Talwar G.P.Autoantibodies to zona pellucida in tubectomized women. Contraception. 1984;29(1):75-82.

29- Nishimoto T., Mori T., Yamada I., Nishimura T. Autoantibodies to zonapellucida in infertile and aged women. Fertil Steril. 1980;34(6):552-6.

30- Ulcova-Gallova Z., Babcova K., Novakova P., Micanova Z., Rokyta Z. Antizonal antibodies in ovulatory cervical mucus and in serum of patients with fertility disorders. Ceska Gynekol. 2004;69(3):215-8.

31- Papale M.L., Grillo A., Leonardi E., Giuffrida G., Palumbo M., Palumbo G. Assessment of the relevance of zona pellucida antibodies in follicular fluid of in-vitro fertilization (IVF) patients. Hum Reprod. 1994;9 (10):1827-31.

21- Kay D.J., Boettcher B. Comparison of the Sperm Mar test with the currently accepted procedures for detecting human sperm antibodies. Reprod Fertil De. 1992; 175-81.

22- Chiu W.W., Chamley L.W. Human seminal plasma prolactin-inducible protein is an immunoglobulin G-binding protein. J Reprod Immunol. 2003;60(2):97-111.

23- Naz R.K., Involvement of fertilization anti sperm (FA-1) in involuntary immuno infertility in humans. J Clin Invert. 1987;80(5):1375-83.

24- Menge A.C., Medley N.E., Mangione C.M., Dietrich J.W. The incidence and influence of antisperm antibodies in infertile human couples on sperm-cervical mucus interactions and subsequent fertility. Fertil Steril. 1982;38(4):439-46.

25- de Almedia M., Gazagne I., Jeulin C., Herry M., Belaisch-Allart J., Frydman R., et al. In vitro processing of sperm with autoantibodies and in- vitro fertilization results. Hum Reprod. 1989;4(1):49-53.

26- Mandelbaum S.L., Diamond M.P., DeCherney A.H. The impact of antisperm antibodies on human infertility. J Urol.1987;138(1):1-8.

Downloaded from http://www.jri.ir