مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی
تابستان ۱۳۹۲؛۵(۲): ۳۳۹-۳۴۸

Journal of North Khorasan University of Medical Sciences
Summer2013;5(2): 339-348

مقاله پژوهشی

بررسی رابطه بین بیو مارکر مترشحه از جنین های حاصل از ICSI در مقایسه با مورفولوژی جنین

*محمد حسن حیدری[۱]، معرفت غفاری نوین[*۲]، ساغر صالحپور[۳]، فرزانه احمدی[۴]، محسن نوروزیان[۵]، آیدین بلوکی[۶]، متینه حیدری[۷]، مژگان بنده پور[۸]*

[۱] PhD آناتومی، دانشیار گروه بیولوژی و علوم تشریحی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، آزمایشگاه پروتئومیکس، تهران، ایران
[۲] MD,PhD جنین شناسی، دانشیار مرکز تحقیقات بهداشت باروری و ناباروری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
[۳] MD متخصص زنان وزایمان، دانشیار، مرکز تحقیقات بهداشت باروری و ناباروری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
[۴] دانشجوی کارشناسی ارشد اناتومی، گروه بیولوژی و علوم تشریحی دانشکده پزشکی شهید بهشتی، آزمایشگاه پروتئومیکس، تهران، ایران
[۵] PhD آناتومی ، استادیار گروه بیولوژی و علوم تشریحی دانشکده پزشکی شهید بهشتی ، تهران ، ایران
[۶] PhD بیوتکنولوژی، دانشیار، دانشگاه UPM، کوالالامپور مالزی
[۷] دانشجوی رشته پزشکی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۸] PhD بیوتکنولوژی، استادیار بخش بیوتکنولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه علو م پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
[*] **نویسنده مسئول:** دکتر معرفت غفاری نوین. جنین شناس، دانشیار مرکز تحقیقات بهداشت باروری و ناباروری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی .تهران ایران
پست الکترونیک: mghaffarin@yahoo.com

وصول: ۹۲/۴/۱۶ اصلاح:۹۲/۵/۳۰ پذیرش: ۹۲/۶/۱۶

چکیده

زمینه و هدف: *لانه گزینی جنین یکی از مسائل پیچیده و قابل توجه در تکنیک های کمک باروری است. که این روند به عدم رد جنین توسط سیستم ایمنی مادربستگی دارد. مطالعات انجام شده نشان می دهد که بیومارکر sHLA-G در مراحل قبل از لانه گزینی هم در جنین و هم در محیط کشت جنین توسط سلول های تروفوبلاستی جنینی تولید می شود. این مولکول نقش مهمی در روند لانه گزینی جنین و همچنین تحمل جنین بوسیله مادر ایفاء می کند. بنظر می رسد که با متعادل کردن ساینوکاین های TH1 و TH2 در اندومتریوم ترشحی و دسیدوا در لانه گزینی موفق جنین و بدنبال ان تشکیل جفت نقش دارد براین اساس این مطالعه با هدف بررسی رابطه بین بیو مارکر محیط کشت جنین های حاصل از ICSI در مقایسه با مورفولوژی جنین انجام پزیرفته است.*

مواد و روش کار: *نمونه های مورد استفاده، ۸۳ محیط کشت جنین ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از ICSI می باشد. بیان پروتئین sHLA-G در محیط کشت جنین بوسیله تکنیک ELISA [enzyme-linked immunosorbent assay] و مونوکلونال انتی بادی MEM-G9 مورد ارزیابی قرار گرفت. و بیان sHLA-G را با مورفولوژی جنین بررسی کردیم.*

یافته ها: *بین جنین های با کیفیت بالا و میزان ترشح sHLA-G ارتباط وجود دارد. تفاوت معنی داری از لحاظ اماری بین بیان این پروتئین در محیط کشت جنین های با کیفیت پائین در گروه های مختلف دیده نشد.*

نتیجه گیری: *بنظر می رسد، با در نظر گرفتن مورفولوژی جنین ها و بررسی این پروتئین در محیط کشت انها، می توان از ان بعنوان یک مارکرغیر تهاجمی جهت انتخاب یک جنین مناسب با قدرت لانه گزینی بالا استفاده کرد.*

واژه های کلیدی: *sHLA-G، موفولوژی جنین، محیط کشت*

مقدمه

یکی از مسائل پیچیده در تکنیک های کمک باروری، لانه گزینی جنین است که درباره ان اطلاعات کمی وجود دارد. بطوری که بالای ۷۰٪ از جنین های انتقالی، قادر به لانه گزینی نیستند و فقط ۱۴٪ از انها سالم به دنیا می ایند [۱]. این میزان لانه گزینی در رویان ها در طول دهه ی

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-08-10]

گذشته بهبود نیافته است. دو عامل مهم که در لانه گزینی نقش دارند پذیرش اندومتر و کیفیت مناسب جنین می باشد.

بررسی های مورفولوژی جنین یکی از راه های می باشد که به صورت روتین در مراکزدرمان ناباروری جهت انتخاب جنین با کیفیت مناسب جهت انتقال، انجام می شود. برای بررسی مورفولوژی رویان، یک سیستم درجه بندی جینی [GES] تعریف شده است که مبنی بر ویژگی های جنین در مراحل اولیه رشد از جمله: میزان فراگمانتاسیون، تعداد هسته داخل هر بلاستومر، سرعت تقسیم و اندازه بلاستومرها نسبت به هم می باشد. با این وجود تقریبا ۴۰٪ از جنین های انتقالی که از نظر GES نرمال بودند ایجاد حاملگی نمی کنند [۲]. بررسی ژنتیکی جنین ها قبل از لانه گزینی PGD[PCK & FISH] نشان داده است که جنین های با موفولوژی خوب نیز دارای اختلالات کروموزومی و ژنتیکی می باشند. بنابراین مورفولوژی به تنهایی نمی تواند قدرت حیات جنین را تعیین کند. همچنین ارزیابی موفولوژی نمی تواند قدرت لانه گزینی جنین هایی را که کیفیت بالا دارند، پیش گویی کند. متأسفانه استفاده از تکنیک های PGD بدلیل نیاز به انجام بیوپسی از جنین کار تهاجمی بوده و می تواند سبب اختلال در روند تکامل جنین شود. بنابراین، این روش نیز روش مناسبی جهت بررسی کیفیت جنین نمی باشد. بر پایه مشاهدات گذشته سقط های زود هنگام با نقص های کروموزمی در ارتباط هستند. همچنین جنین هایی که از لحاظ شکل نرمال هستند نیز می توانند دارای نقص های کروموزومی مثل انوپلوئیدی باشند. جهت تشخیص این نقص از تست FISH استفاده می شود. برای انجام تست از بلاستومر بیوپسی میگیرند. ولی مشکل این کار این است که، پروب های تست FISH فقط ۸ تا ۹ کروموزم را می تواند بررسی کند و ۱۴ کروموزم دیگر رااز نظر انوپلوئیدی نمی توان با این پروب ها چک کرد [۳] بنابراین استفاده از FISH برای انتخاب رویان سالم جهت انتقال نیز زیاد کارساز نمی باشد.

یکی از راه های انتخاب جنین مناسب با روشی غیر تهاجمی، بررسی ترشحات محیط کشت جنین است. یکی از پروتئین های ترشح شده از جنین در محیط کشت sHLA-G می باشد. HLA-G یک انتی ژن غیرکلاسیک [انتی ژن کلاس Ib] بوده و دارای پلی مورفیسم محدود می باشد ولی ۷ ایزوفرم دارد. ۴ تا از ایزوفرم های ان، متصل به غشاء اند و ۳ تای دیگر بصورت محلول می باشند. طبق دانسته ها، روند لانه گزینی به عدم رد جنین توسط سیستم ایمنی مادر، احتیاج دارد [۴-۵-۶]

هر دو ایزوفرم محلول و باند شده به غشاء، سرکوب کننده سیستم ایمنی هستند. با متناسب کردن لنفوسیت های T کمکی در محل تماس سلول های رویانی و دسیدوا، در تحمل جنین توسط سیستم ایمنی مادر و به دنبال ان تشکیل جفت نقش دارند[۷-۸] همان طور که می دانید NK cell ها عمده ترین سلول های دوره لوتئال اندومتر و در مراحل اولیه دسیدوا می باشند. این NK cell ها دارای رسپتور هایی برای HLA-G بیان شده توسط سلول های تروفوبلاست بینابینی در محل تماس مادر-جنین، می باشند [۹-۱۰]که اندوسیتوز HLA-G توسط رسپتور این سلول ها باعث تحریک واسطه های اختصاصی پروااینفلمیتوری/پروانژیوژنیک و سایتوکان های کمک کننده به لانه گزینی و تشکیل جفت می شود [۱۱] حضور این پروتئین در سلول های تروفوبلاست اولین بار توسط Ellisدر سال ۱۹۹۰ گزارش شد [۱۲]. و حضور ان در محیط کشت رویان در سال ۱۹۹۹ توسط مینی سوسی[1] اعلام گردید [۱۳].

گزارش شد رویان های ترشح کننده sHLA-G بودند ایجاد حاملگی می کردند در صورتی که رویان های sHLA-G منفی نیز باعث حاملگی می شدند. در مقابل اعلام کردند که در رویان های sHLA-G مثبت قدرت حاملگی نسب به رویان های sHLA-G منفی، ۳ برابر بهبود می یابد ۱] همچنین میزان سقط در رویان های sHLA-G منفی افزایش یافته بود [۱۱]. در جایی دیگر امده است که بیان sHLA-G بطور دقیقی با قدرت لانه گزینی و میزان حاملگی کلینیکی ارتباط دارد. می توان از sHLA-G برای پیش گویی حاملگی بالینی در زنانی که تحت درمان نازایی قرار گرفته اند، استفاده کرد [۱۴].

1 -Menicucci

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-08-10]

sHLA-Gیک مارکر تشخیصی غیر تهاجمی در انتخاب رویان هاست که میزان لانه گزینی و حاملگی را بهبود می دهد بطوری که میزان حاملگی بالینی تقریبا ۴۵٪ می باشد و استفاده از تست sHLA-G بصورت تئوری می تواند احتمال حاملگی رابه ۷۲٪ افزایش دهد [۱۵].

[1] و همکارانش در سال ۲۰۰۵ اعلام کردند ارتباط مثبتی بین این دو معیار وجود ندارد [۱]. درمقابل، در تحقیقی که بین جنین هایی که بصورت گروهی و منفرد کشت داده شده بودند، مقایسه ای انجام گرفت و رابطه جنین های حاصل با مورفولوژی انها بررسی شد. که این تحقیق مشخص کرد در جنین هایی که بصورت انفرادی کشت داده شده بودند میزان ترشح sHLA-G با مورفولوژی انها، ارتباط مستقیم دارد. اما در این بررسی ها رابطه میزان ترشح sHLA-G با مورفولوژی جنین در روزهای مختلف انتقال با هم مقایسه نشده بود [۱۴].

با توجه به منابع و سؤالات موجود در این تحقیق سعی شد رابطه میزان ترشح sHLA-G با مورفولوژی جنین هایی که بصورت انفرادی کشت داده شده اند، بررسی شود و تفاوت این میزان در ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از لقاح با هم مقایسه گردد.

روش کار و تکنیک های مورد استفاده

تعداد۸۳ نمونه محیط کشت از جنین بیمارانی درحدود سنی ۲۴ تا ۳۴ سال، در کلنیک باروری ناباروری بیمارستان طالقانی در فاصله زمانی بین ماه اردیبهشت و مرداد ماه سال ۸۹ تهیه شد. بیماران از نظر بیماری های زمینه ای ایجاد کننده ناباروری مثل اندومتریوز مورد بررسی قرار گرفتند. تحریک تخمدان توسط پزشک متخصص در بیمارستان انجام شد. بعد از گرفتن تخمک و اسپرم از زوجین، به روش تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم ICSI، لقاح انجام گرفت. هر جنین در قطره ای جداگانه کشت داده شد. ۴۸ ساعت بعد از لقاح جنین را به کمک میکروسکوب invert بررسی کرده و مشخصات ان یادداشت شد و در ادامه جنین را به محیط کشت بلاستوسیت منتقل کرده و محیط کشت sage cleavage سؤالی که هنوز جواب داده نشده است وجود رابطه بین مورفولوژی جنین با میزان ترشح sHLA-G می باشد. در بررسی های محدود انجام شده در باره رابطه بین مورفولوژی و میزان ترشح sHLA-G، گزارشات متناقضی وجود دارند. نوسی

به عنوان نمونه ازمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفت. محیط کشت های تهیه شده بر اساس روز انتقال [۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت بعد از لقاح] و تعداد تقسیمات به سه گروه A , B , C تقسیم شده اند، گروه A محیط کشت جنین هایی بود که ۴۸ ساعت بعد از لقاح، انتقال داده شده بودند. گروه B و C محیط کشت جنین هایی بود که ۷۲ ساعت بعد از لقاح، انتقال داده شده بودند. گروه B شامل جنین های ۸ سلولی بود و گروه C شامل جنینهایی بود که به مرحله مورولا رسیده بودند. و هر گروه بر اساس کیفیت جنین به دو زیر گروه ۱ و ۲ تفکیک شده است. گروه شماره یک نسبت به گروه شماره ۲، جنین های مناسب تری از لحاظ مورفولوژی داشت. گروه A1[n=20]، گروهA2[n=19] گروه B1[n=15]، گروه B2[n=7]، گروه c1[n=7]، گروه c2[n=7] در یکی از چاهک های کیت بعنوان کنترل منفی محیط کشت مورد استفاده در لقاح ازمایشگاهی اضافه شد محیط کشت از نظر بیان و میزان ترشح sHLA-G به کمک تست ELISA مورد ارزیابی قرار گرفت. اندازه گیری غلظت sHLA-G در محیط کشت رویان به کمک تست الایزا انجام شد. [شرکت BioVendor] پلیت توسط انتی بادی مونوکلونال ضد sHLA-G [mem-G9 MoAb] پوشش دهی شده و اماده استفاده بود. استانداردها [n=۶]، نمونه ها [n=۸۳] و بافر رقیق کننده به wellها اضافه شد. پلیت دردمای ۲-۸ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶-۲۰ ساعت انکوبه گردید. بعد از۵ بار شستشو، به هر well که حاوی کمپلکس Ab-sHLA-G است محلول کونژوگه mouse monoclonal anti-human B2-microglobulin antibody که با انزیم horseradish peroxidase نشان دار شده اضافه و پلیت به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. بعد ازمرحله شستشوی مجدد، انتی بادی کونژوگهHRP با سوبسترای اضافه شده به هر well وارد واکنش شده، و تغییر رنگ ایجاد کرد [پلیت به مدت ۳۰ دقیقه دور از نور

1- Noci

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-08-10]

انکوبه شود]. جهت اتمام واکنش به هر well، stop solution اضافه شد. در انتها تغییر رنگ ایجاد شده که قابل رویت بود، با استفاده از دستگاه ELISA reader با طول موج 450 nm اندازه گیری شد. میزان جذب به غلظت sHLA-G بستگی دارد. این دستگاه بر اساس غلظت های متفاوت استانداردها یک نمودار ارائه می دهد که به کمک ان غلظت sHLA-G نمونه ها اندازه گیری شد.

انالیز داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS11.0[statistics package social sciences] انجام شد. برای مقایسه ای داده ها بین دو گروه ازروش اماری T-TEST استفاده شد. و در مقایسه بین سه گروه یا بیشتر از روش اماری ANOVA با [$P\ value \leq 0.05$] استفاده شد.

یافته ها

جدول شماره یک نتایج مقایسه ای بین کیفیت جنین و OD نمونه ها در گروه های مختلف را نشان می دهد. با اشاره به جدول شماره یک در مقایسه میزان OD در بین گروه A1 و A2 تفاوت معنی داری در میزان رنگ پذیری نمونه ها در کیت الایزا با توجه به کیفیت جنین های انتقالی ۴۸ ساعت بعد از ICSI وجود دارد. بین گروه های A1، B1 وC1 تفاوت معنی دار بود. بین گروه های A1 ، B2 و C2 تفاوت معنی داری دیده نشد. همچنین تفاوتی در میزان OD، بین گروه های B2 و C2 وجود نداشت. ولی همانطور که ملاحظه می شود بین گروه های B1 و B2که جنین های انتقالی ۷۲ ساعت بعد از لقاح می باشند تفاوت معنی داری در جنین های با کیفیت متفاوت دیده می شود. میزان OD در گروه B1 نسبت به گروه A1 وA2 افزایش می یابد و تفاوت بین این گروه ها کاملا مشهود است. بین B1 و C2 نیز تفاوت قابل تفسیری از لحاظ اماری وجود دارد. بین B2 و گروه های A1 و A2تفاوت معنی دار نیست. بین گروه B وC تفاوت معنی دار نبود. بین گروه C1 و C2 تفاوت میزان OD معنی دار است ولی در مقایسه بین گروه C و گروه B تفاوت معنی داری دیده نشد. در مقایسه بین گروه C1 با گروه A1 و A2، تفاوت کاملا مشهود بود. در مقایسه بین گروه C2 با گروه های A وB بین این گروه و گروه B1 تفاوت معنی دار بود. ولی با گروه های A1، A2 و B2 تفاوت معنی داری وجود داشت.

جدول شماره دو نتایج مقایسه ای بین کیفیت جنین و غلظت sHLA-G در گروه های مختلف را نشان می دهد. با توجه به نتایج بدست امده در مقایسه میزان غلظت sHLA-G بین گروه های A1 وA2 تفاوت معنی داری بنا به کیفیت جنین های انتقالی ۴۸ ساعت بعد از ICSI وجود دارد. بین گروه A1، B2 و C2 تفاوت معنی داری دیده نشد. بین گروه A2 و گروه های B2 و C2تفاوت معنی دار نبود. ولی بین گروه A2 و گروه های B1 وC1 تفاوت اماری وجود داشت. همچنین بین گروه های B1 و B2 [جنین های انتقالی ۷۲ ساعت بعد از لقاح] نیز تفاوت معنی داری در جنین های با کیفیت متفاوت [Aو B]دیده می شود. غلظت sHLA-G در گروه B نسبت به گروه های A1 و A2 افزایش می یابد. ولی با گروه C1 تفاوت معنی دار نمی باشد. اما با گروه C2 تفاوت قابل تفسیری دیده می شود. در بین گروه های C1 و C2 تفاوت میزان غلظت sHLA-G معنی دار است ولی در مقایسه بین گروه های B و C تفاوت معنی داری دیده نشد. در مقایسه بین گروه C1 با گروه های A و B، این گروه با گروه های A1، A2 وB2 تفاوت وجود دارد ولی با گروه B1 تفاوت ندارد. در مقایسه بین گروه C2 با گروه های A و B، بین این گروه با گروه های A1، A2 و B2 تفاوت معنی دار نمی باشد. ولی با گروه B1 معنی دار است.

در نمودار شماره یک مقدارهای متفاوت OD در گروه های مختلف با هم مقایسه شده است

در گروه A جنین هایی که ۴۸ ساعت بعد از ICSI انتقال داده شده بودند، قرار دارند.

سطح OD در گروهA1 بین ۰/۵۲ – ۰/۱۸ و غلظت پروتئین دراین گروه بین ۵۴/۱۷ – ۱۰/۱۱ می باشد. در حالیکه سطح OD در گروه A2 بین ۰/۴۲ – ۰/۲۲ بدست امد و غلظت پروتئین در گروه A2 بین۳۴/۷۳ – ۱۴/۶۴ می باشد.

در گروه B جنین هایی که۷۲ ساعت بعد از ICSI انتقال داده شده بودند، قرار دارند.

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-08-10]

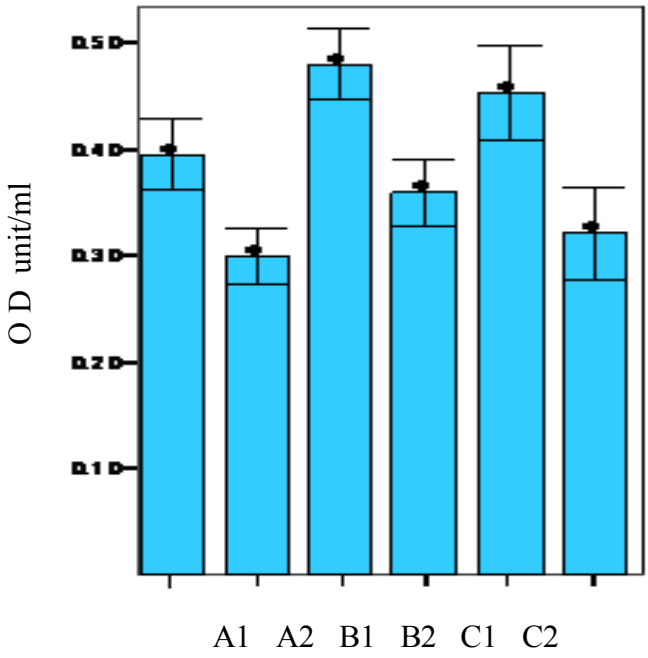
جدول ۱: مقایسه OD با کیفیت جنین در ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از ICSI

	تعداد تقسیمات جنین	میانگین	تعداد نمونه ها	انحراف معیار
۴۸ ساعت بعداز لقاح	۲-۴ سلولی باکیفیت ۱	۰/۳۹	۲۰	۰/۰۶۶
	۲-۴ سلولی با کیفیت۲	۰/۳۰	۱۹	۰/۰۵۳
۷۲ ساعت بعداز لقاح	۸سلولی با کیفیت۱	۰/۴۵	۱۵	۰/۰۶۲
	۸سلولی با کیفیت۲	۰/۳۶	۷	۰/۰۳۹
	مورولا باکیفیت۱	۰/۴۹	۷	۰/۰۴۱
	مورولا با کیفیت۲	۰/۳۲	۷	۰/۰۴۶

جدول ۲: مقایسه غلظت پروتئین با کیفیت جنین در ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از ICSI

	تعداد تقسیمات جنین	میانگین	تعداد نمونه ها	انحراف معیار
۴۸ ساعت بعداز لقاح	۲-۴سلولی باکیفیت۱	۳۷/۱۶	۲۰	۸/۴۵۳
	۲-۴سلولی با کیفیت۲	۲۵/۱۴	۱۹	۵/۸۱۴
۷۲ ساعت بعداز لقاح	۸سلولی باکیفیت۱	۴۵/۷۰	۱۵	۸/۱۳۹
	۸سلولی با کیفیت۲	۳۳/۵۲	۷	۵/۱۷۶
	مورولا باکیفیت۱	۵۱/۲۰	۷	۵/۳۱۵
	مورولا باکیفیت۲	۲۸/۵۲	۷	۶/۰۴۲

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-08-10]



نمودار ۱: بررسی میزان غلظت پروتئین درگروه های مختلف

سطح OD در گروهB1 بین ۰/۵۵ – ۰/۳۵ و غلظت پروتئین در این گروه بین ۵۸/۰۶ – ۳۲/۱۴، سطح OD در گروه B2 بین ۰/۴۲ – ۰/۳۲ و غلظت پروتئین دراین گروه بین ۴۰/۵۶ – ۲۷/۶۰ بود . در گروه c جنین هایی که ۷۲ ساعت بعد از ICSI [مرحله مورولا] انتقال داده شده بودند، قرار دارند.

میزان OD در گروه C1 بین ۰/۵۶ – ۰/۴۲ و غلظت پروتئین در این گروه بین ۵۹/۳۶ – ۴۱/۸۶ ومیزان OD در گروه C2 بین ۰/۳۹ – ۰/۲۲ بود. در حالیکه غلظت پروتئین در گروه C2 بین ۳۷/۳۲ – ۱۹/۸۳ می باشد.

نمودار شماره یک: در محور عمودی مقادیر متفاوت OD را بر حسب Unit/ml نشان می دهد. و محور افقی محیط کشت جنین ها در روزهای مختلف انتقال نشان داده شده است. ۱ و ۲ نشان دهنده کیفیت جنین است. A1 جنین های انتقالی ۴۸ ساعت بعد از لقاح هستند. A2 جنین های انتقالی ۴۸ ساعت بعد از لقاح با کیفیت ۲ هستند. B1 جنین های انتقالی ۷۲ ساعت بعد از لقاح با کیفیت ۱ می باشند. B2 جنین های انتقالی ۷۲ ساعت بعد از لقاح با کیفیت ۲ می باشند. شماره پنج مورولای انتقالی ۷۲ ساعت بعد از لقاح با کیفیت 1 می باشند. شماره شش مورولای انتقالی ۷۲ ساعت بعد از لقاح با کیفیت ۲ می باشد.

بحث

روش غیر تهاجمی جهت تعیین جنین با کیفیت بالا در ازمایشگاه جنین شناسی در جهت بالا بردن شانس حاملگی از مسائل مهم در مراکز نازائی می باشد. یکی از روش هایی که در انتخاب جنین های با کیفیت بالا در حال بررسی می باشد بررسی ترشحات حاصل از جنین ها در محیط ازمایشگاه می باشد. در مطالعه حاضر بیان پروتئین sHLA-G در محیط کشت در تمامی نمونه [۱۰۰٪] در ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از لقاح با روش ELISA دیده شد.

با توجه به اینکه در انسان اولین تقسیمات برای تشکیل جنین، توسط ژنوم مادری تنظیم می شود و فعال شدن

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-08-10]

ژنوم جنین بین مرحله ۴ سلولی و ۸ سلولی بعد از لقاح اتفاق می افتد. لذا در این مطالعه جنین ها را در این مرحله مورد بررسی قرار دادیم. با توجه به این یافته ها بعید نیست که بتوان مقدار پروتئین sHLA-G تولید شده بوسیله جنین در محیط کشت را، در روزهای دوم و سوم بعد از ICSI تشخیص داد. به این وسیله می توان جنین هایی را که ژنوم مادری سالم تر ی دارند تشخیص داد. بیان این پروتئین و تشخیص ان نشان دهنده فعالیت ژنوم جنین و قدرت حیات ان است.

در این تحقیق نشان دادیم که میزان غلظت sHLA-G در جنین های ۸ سلولی بیشتر از ۴ سلولی ها بوده است. افزایش این پروتئین در محیط کشت به عواملی همچون تعداد و سرعت تقسیمات و کشت طولانی مدت جنین بستگی دارد. مطالعه حاضر با مطالعه ربمن[1] و همکارانش در سال ۲۰۱۰ در انالیز sHLA-G محیط کشت به کمک Luminexw-based technology نشان دادند که تعداد جنین های که sHLA-G ترشح می کنند در طی مراحل تکاملی افزایش می یابند، مثلا در زایگوت ها ۱۱٪، در ۲ تا ۴ سلولی ۲۱٪، بالاتر از ۱۰ سلولی ۳۰٪ قدرت ترشح sHLA-G دارند [۱۷]. یائو[2] و جریسیکووا[3] در سال های ۲۰۰۵ و ۱۹۹۶ این گفته را تایید کردند که در طی مراحل تکامل، میزان بیان sHLA-G قبل از لانه گزینی افزایش می یابد [۱۸-۱۹]. همچنین گزارشات دیگر نیز بیان داشتند که افزایش غلظت sHLA_G در محیط کشت حاصل ازIVF با سرعت تقسیمات ان ارتباط دارد، و به همان اندازه لانه گزینی و حاملگی را بعداز انتقال جنین بهبود می بخشد [۱۳].

در این تحقیق به این نتیجه رسیدیم که، میزان ترشح sHLA-G با مورفولوژی جنین ارتباط دارد و هر چه جنین بر اساس سیستم GES نرمال تر باشد میزان ترشح sHLA-G بالاتری دارد. ربمن و همکارانش در سال ۲۰۰۷ میزان بیان sHLA-G محیط کشت جنین های حاصل از IVF و ICSI را بررسی کردند. انها به دنبال رابطه ای بین کیفیت جنین های با میزان ترشح -sHLA G بودند.که بیان داشتند، در جنین های که بصورت منفرد کشت داده شده بودند بین کیفیت جنین و ترشح این پروتئین ارتباط معنی داری وجود داشت. و اظهار داشتند که ازاد شدن حداقل میزان sHLA-G، بطور نسبی با کیفیت جنین ارتباط دارد [۱۴]. نوسی و دیسای[4] در سال های ۲۰۰۵ و ۲۰۰۶ به این نتیجه رسیدند که هیچ رابطه ای بین عدم ترشح sHLA-G و مورفولوژی جنین وجود ندارد [۱-۱۶]. در مقاب ورسمن[5] و همکارانش در سال ۲۰۰۷ در بررسی جنین های منفرد و میزان sHLA-G محیط کشت اعلام کردند که رابطه ای بین میزان ترشح sHLA-G و کیفیت جنین وجود ندارد [۲۰].

استفاده از این دو معیار [کیفیت جنین و میزان ترشح sHLA-G] نتایج ART را در مقایسه با انتقال جنین بر اساس یکی از این معیارها، بهبود می بخشد. چنانکه مارتی کاینن[6] و همکارانش در سال ۲۰۰۴ میزان حاملگی بالینی را حدودا ۳۵٪ اعلام کردند[۲۱] جفری[7] و همکارانش در سال ۲۰۰۷ در بررسی کیفیت جنین و ترشحات محیط کشت ها در روز ۳ قبل از انتقال نشان دادند استفاده از جنین هایی که ترشح sHLA-G نداشتند ولی GES بالا داشتند درصد حاملگی را به ۳۷٪ می رساند. استفاده از جنین های حاصل از ICSI دارای کیفیت عالی از نظر GES میزان حاملگی کلنیکی را تا ۵۳٪ افزایش می دهند. حضور sHLA-G در محیط کشت جنین میزان حاملگی را بین ۴۰٪ تا ۷۰٪ بالا می برد. اگر در یک انتقال از دو جنین با کیفیت مناسب که sHLA-G مثبت باشند استفاده شود ۵۸٪ احتمال حاملگی وجود دارد. در انتقال ۳ جنین با کیفیت مناسب که sHLA-G مثبت باشند میزان حاملگی به ۶۶٪ می رسد. با این وجود sHLA-G یک مارکر تشخیصی خیلی مهم برای انتخاب جنین قبل از لانه گزینی است [۲۲].

در گزارشات مختلفی امده است که مولکول sHLA-G با لانه گزینی جنین رابطه دارد و باعث افزایش میزان لانه

1- Rebmann
2 -Yao
3- Jurisicova

4 -Desai
5- Vercammen
6 -Martikainen
7-Jeffrey

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-08-10]

گزینی در جنین انتقالی می شود. فوزی[1] و همکارانش در سال ۲۰۰۲ وجود sHLA-G بصورت محلول در محیط کشت اطراف جنین را به عنوان یک پیش نیاز برای لانه گزینی اعلام کردند [۲۳]. ولی این مکانیزم که چگونه sHLA-Gباعث بهبود لانه گزینی می شود زیاد مشخص نیست. ویگانو[2] و همکارانش در سال ۲۰۰۳ نشان دادندکه این پروتئین باعث بهبود تماس مادر-جنین می شود[۲۴]. لی گال[3] و همکارانش در سال ۱۹۹۹ بیان داشتند که این پروتئین باعث سرکوب سیستم ایمنی مادر شده و تحمل جنین را توسط مادر افزایش می دهد در نتیجه میزان لانه گزینی و حاملگی را بهبود می بخشد [۲۵].

مشاهدات نشان داده اند که sHLA-G مولکولی است که بوسیله ان می توان میزان زنده ماندن جنین ها را تخمین زد و یک فاکتور مهم برای حمایت از لانه گزینی بعد از ICSI می باشد. ربمن و همکارانش در سال ۲۰۰۷ گزارش کردند که در ۱۹٪ از زنانی که بوسیله انتقال جنین های sHLA-G منفی، حامله شده بودند میزان سقط سه برابر [نسبت به زنانی که بوسیله جنین های که sHLA-G مثبت بودند] افزایش می یابد [۱۴]. پاندی[4] و ویلزنسکی[5] در سال های۲۰۰۵ و ۲۰۰۶ بیان کردند که فاکتورهای ایمنولوژیکی مثل sHLA-G / HLA-G نقش مهمی در فرایند سقط خودبخودی بازی می کنند[۲۶-۲۷]. دیرک[6] و همکارانش در سال ۲۰۱۰ میزان سقط را در جنین های انتخابی بر اساس GES و بیان sHLA-G بعد از انتقال بررسی کردند. انها نشان دادند که میزان سقط بعد از لانه گزینی در جنین های sHLA-G مثبت در بین ۶ هفتگی و ۱۲ هفتگی کاهش می یابد. با این تفاسیر sHLA-G باعث تداوم لانه گزینی و به دنبال ان میزان حاملگی را نیز افزایش می دهد. پس می توان از sHLA-G به عنوان یک مارکر پیش بینی کننده نتایج حاملگی استفاده کرد [۲۸].

نتیجه گیری

بنظر می رسد، بتوان از پروتئین sHLA-G بعنوان یک مارکرغیر تهاجمی جهت انتخاب یک جنین مناسب با قدرت لانه گزینی بالا استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

لازم است از همکاری مرکز تحقیقات بهداشت باروری و ناباروری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، آزمایشگاه پروتئومیکس گروه آناتومی دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علو م پزشکی شهید بهشتی تشکر بعمل آید. شماره گرانت مرکز تحقیقات بهداشت باروری و ناباروری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی: ۸۸-۰۱-۱۵۹-۶۵۸۴ .مجوز کمیته اخلاق: [۱۲۱۲۱ مورخ ۹۱/۱۲/۱۰]

1 -Fuzzi
2 -Viganò
3- Le Gal
4- Pandey
5-Wilczynski
6- Dirk

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-08-10]

References

1. Noci B,Fuzzi, R.Rizzo, L.Melchiorri, L.Criscuoli, S.Dabizzi,"et al" , Embryonic soluble HLA-G as a marker of developmental potential in embryos,Human Reproduction 2005 ;2(1) : 138–146
2. Fisch J, Rodriguez H, Ross R, Overby G, Sher G,The graduate embryo scoring system [GES] predicts blastocyst formation and pregnancy rates from cleaved—stage embryos,Human Reproduction 2001 ;16(9):1970–5.
3. Munne S, Sandalinas M, Escudero T, Velilla E, Walmsley R, Sadowy S, Cohen J and Sable D,Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy, Reprod Biomed Online 2003; 7(1) : 91–97.
4. Hunt JS, Petroff MG, McIntire RH, Ober C , HLA-G and immune tolerance in pregnancy, Federation of American Societies for Experimental Biology Journal 2005 ;19(7) : 681–693.
5. Hviid TV, Hylenius S, Lindhard A, Christiansen OB Association between human leukocyte antigen-G genotype and success of in vitro fertilization and pregnancy outcome, Tissue Antigens 2004 ; 64(1) : 66–69.
6. Moreau P, Paul P, Rouas-Freiss N , Molecular and immunologic aspects of the nonclassical HLA class I antigen HLA-G: evidence for an important role in the maternal tolerance of the fetal allograft , American Journal Reproductive Immunology 1998 ;40(3): 136–144.
7. Ng ST, Chang TH, Wu TC , Prediction of the rates of fertilization, cleavage and pregnancy success by cumulus–coronal morphology in an in vitro fertilization program , Fertility and Sterility 1999 ;72(3) : 412–417.
8. Choudhury SR, Knapp LA Human reproductive failure II , immunogenetic and interacting factors, Human Reproduction Update 2001;7(2): 135–160.
9. Bamberger AM, Jenatschke S, Schulte HM, Loning T, Bamberger MC , Leukemia inhibitory factor [LIF] stimulates the human HLA-G promoter in JEG3 choriocarcinoma cells , J Clin Endocrinol Metab2000; 85(10) :3932– 6.
10. Margreiter M, Weghofer A, Kogosowski A,A prospective randomized multicenter study to evaluate the best day for embryo transfer, does the outcome justify prolonged embryo culture? , J Assist Reprod Genet 2003 ;20(2) : 91– 4.
11. Rebmann V, Switala M, Eue I, Schwahn E, Merzenich M,Grosse-Wilde H, Rapid evaluation of soluble HLA-G levels in supernatants of in vitro fertilized embryos , Hum Immunol 2006 ; 68 (4):251–8
12. SA Ellis, MS Palmer and AJ McMichael, Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA Class I molecule, The Journal of Immunology 1990;144(2): 731-735
13. Menicucci A, Noci I, Fuzzi B, Criscuoli L, Scarselli G, Baricordi O, Non-classic sHLA class I in human oocyte culture medium, Hum Immunol1999 ;60(11) :1054 –7.
14. Rebmann V, Switala M, Eue I, Schwahn E, Merzenich M, Grosse-Wilde H, Rapid evaluation of soluble HLA-G levels in supernatants of in vitro fertilized embryos, Hum Immunol 2007 ; 68 :251–258.
15. Geoffrey Sher, Levent Keskintepe, Mory Nouriani, Roumen Roussev, Joel Batzofin, Expression of sHLA-G in supernatants of individually ultured 46-h embryos: a potentially valuable indicator of 'embryo competency' and IVF outcome, Reproductive BioMedicine Online2004; 9(1) : 74-78
16. Nina Desai, Jessica Filipovits, James Goldfarb, Secretion of soluble HLA-G by day 3 human embryos associated with higher pregnancy and mplantation rates: assay of culture media using a new ELISA kit, Reproductive BioMedicine Online 2006; 13 (2):272-277.
17. V. Rebmann, M. Switala, I. Eue and H , rosse-Wilde , Soluble HLA-G is an independent factor for the prediction of pregnancy outcome after ART , a German multi-centre studyHuman Reproduction 2010; 25(.7): 1691–1698
18. Yao YQ, Barlow DH, Sargent IL Differential expression of alternatively spliced transcripts of HLA-G in human preimplantation embryos and inner cell masses, J Immunol 2005 ; 175(12) : 8379-85
19. Jurisicova A, Casper RF, MacLusky NJ , a HLA-G expression during preimplantation human embryo development , Proceedings of the National Academy Sciences of the USA 1996; 93(1) : 161–165.

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-08-10]

20. Vercammen MJ, Verloes A, Van de Velde H, Haentjens P, Accuracy of soluble human leukocyte antigen-G for predicting pregnancy among women undergoing infertility treatment: meta-analysis , Hum Reprod Update 2008 ;14(3) :209-18
21. Martikainen H, Orava M, Lakkakorpi J, Tuomivaara L, Day 2 elective single embryo transfer in clinical practice: better outcome in ICSI cycles , Hum Reprod 2004;19(6):1364–6.
22. Jeffrey D, Fisch, M.D.,a Levent Keskintepe, Ph.D.,a Michael Ginsburg, M.S.,a Mark Adamowicz, B.S.,a , Geoffrey Sher, M.D.a,b , Graduated Embryo Score and soluble human leukocyte antigen-G expression improve assisted reproductive technology outcomes and suggest a basis for elective single-embryo transfer , Fertil Steril 2007 ; 87(4) :757–7 63.
23. 23-Fuzzi B, Rizzo R, Criscuoli L, Noci I, Melchiorri L, Scarselli B, Bencini E, Menicucci A, Baricordi OR , HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy , Eur J Immunol 2002 ; 32(2) :311–315.
24. Viganò P, Mangioni S, Pompei F, Chiodo I , Maternal-conceptus cross talk—a review, Placenta, 2003 ;24(2): 56–61.
25. Le Gal FA, Riteau B, Sedlik C, Khalil-Daher I, Menier C, DaussetJ, HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxicT lymphocytes , Int Immunol. 1999 ;11(8) :1351–6.
26. Pandey MK, Rani R, Agrawal S, An update in recurrent spontaneous abortion, Arch Gynecol Obstet 2005 ; 272(2) :95-108 .
27. Wilczynski JR, Immunological analogy between allograft rejection, recurrent abortion and pre-eclampsia–the same basic mechanism , Hum Immunol 2006 ;67(7) :492-511 .
28. Dirk J. Kotze , Polly Hansen , Levent Keskintepe , Ellen Snowden , Geoffrey Sher , Thinus Kruger, Embryo selection criteria based on morphology VERSUS the expression of a biochemical marker [sHLA-G] and a graduated embryo score: prediction of pregnancy outcome, J Assist Reprod Genet 2010; 27(6) : 309-316

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-08-10]

Original Article

Determination of embryo culture supernatants biomarker level after ICSI and correlation with embryo morphology

*Heidari MH[1], Ghaffari Novin M[2 *], Salehpor S[3], Ahmadi F[4], Norozian M[5], Bloki A[6], Heidari M[7], Bandehpor M[8]*

[1]Associate Professor of Anatomy, Biology and Anatomical Sciences Dep. Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2]Associate Professor of Embryology, Infertility and Reproductive Health Research Centre, Shahid Beheshti University of Medical Sciences , Tehran, Iran
[3]Associate Professor of Gynecology, Infertility and Reproductive Health Research Centre, Shahid Beheshti University of Medical Sciences , Tehran, Iran
[4]M.Sc of student of Anatomy, Biology and Anatomical Sciences Dep. Shahid Beheshti University of Medical Sciences, proteomic lab. Tehran, Iran
[5]Assistant Professor of Anatomy, Biology and Anatomical Sciences Dep. Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[6]Associate Professor of Biotechnology , University Putra Malaysia, Kuala Lumpur
[7]Medical Student of Medical School , Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[8]Associated professor of Biotechnology, Biotechnology Research Center of Medical School , Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

***Corresponding Author** : Ghaffari Novin Marefat. Associate Professor of Infertility and Reproductive Health Research Centre, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran, E.Mail: mghaffarin@yahoo.com

Submitted:2013 July 7
Revised:2013 Aug 21
Accepted:2013 Sep 7

Abstract

BACKGROUND & Objectives*: Embryo implantation is a complex and significant problem in assisted reproductive techniques. The process of implantation depends on maternal immune system to avoid rejection of conceptus. Studies have shown that s HLA-G produced by trophoblast cells and present at the feto-maternal interface, plays an important role in the embryo implantation process and in the phenomenon of fetal allograft tolerance .The establishment of a TH-1: TH-2 cytokine balance both in the secretory endometrium and the deciduas appears to play a pivotal role in determining successful embryo implantation as well as subsequent healthy placentation. This study was carried out to compare relation between the produced biomarker of embryo culture media form ICSI method and morphological parameters in embryos.*

Material & METHODS*: The samples were 83 media culture surrounding individual embryos 46 h and 72 h after ICSI. Soluble-HLA-G levels were evaluated by an enzyme linked immunosorbent assay [ELISA] employing monoclonal antibody MEM-G9. We correlated the presence of sHLA-G with embryo morphology.*

RESULTS: *correlation was found between high quality embryos and sHLA-G levels. Our results do not show any statistical correlation between low quality embryos and sHLA-G levels detected in embryo culture supernatants.*

CONCLUSIONS: According to the results given that cmorphological parameters of embryos and sHLA-G protein in culture media ,it could be used as a non-invasive marker in embryo selection

Key Words*: sHLA-G, embryo morphology, media culture*

[Downloaded from journal.nkums.ac.ir on 2024-08-10]