دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیست و دوم، شماره ۵، صفحه ۳۰۶ - ۲۹۶ (آذر و دی ۱۳۹۸)

Iran South Med J 2019; 22(5): 296-306

بررسی ارتباط بین میزان هورمون آنتی‌مولرین و گونادوتروپین کوریونیک انسانی (بتا) مایع فولیکولی و بلوغ تخمک

افسانه قاسمی (MD)[1*]، زهرا دورودیان (MD)[1]، مریم برکت (MD)[2]، فاطمه سادات امجدی (PhD)[1]، مریم طباطبایی (MSc)[1]**

[1] مرکز توسعه تحقیقات بالینی شهید اکبرآبادی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران
[2] بخش زیست پزشکی ترمیمی، مرکز زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی، پژوهشگاه رویان، تهران

(دریافت مقاله: ۹۷/۱۱/۱۶- پذیرش مقاله: ۹۸/۶/۲۳)

چکیده

زمینه: مایع فولیکولی [Follicular Fluid (FF)] در آماده‌سازی محیط، جهت رشد و باروری تخمک نقش مهمی ایفا می‌کند. در این رابطه، تغییرات بیوشیمیایی و هورمونی پیرامون تخمک، ممکن است در کیفیت تخمک و باروری آن تأثیر بگذارد. هدف این تحقیق، بررسی ارتباط بین سطح هورمون گونادوتروپین کوریونیک انسانی [Beta Human Chorionic Gonadotropin (Beta-HCG)] و هورمون آنتی مولرین [Anti (AMH) Mullerian Hormone] مایع فولیکولی بر بلوغ تخمک در چرخه‌های لقاح آزمایشگاهی [In Vitro Fertilization(IVF)] است.

مواد و روش‌ها: FF مربوط به ۳۰ زن در چرخه تحریک کنترل شده تخمدان، تحت نظارت قرار گرفت. پس از بررسی بلوغ تخمک سطح AMH و Beta-HCG در FF که شامل تخمک‌های متافاز I(MI) و II(MII) و [Germinal Vesicle (GV)] بود بررسی گردید. ۱۴ روز بعد از انتقال جنین، سطح سرمی Beta-HCG اندازه‌گیری شد. وجود ضربان قلب جنین به عنوان بارداری بالینی تلقی گردید.

یافته‌ها: تفاوت قابل توجه‌ای بین میانگین سطح Beta-HCG در تخمک بالغ (۲۱/۰۸۱±۵۳/۷۳ واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر) و نابالغ (۲۱/۰۰۰±۵۲/۹۰ واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر) وجود نداشت (p=۰/۸۰۰). سطح Beta-HCG در FF حاوی تخمک‌های MII به‌طور قابل توجه‌ای با بارداری بالینی مرتبط بود (p=۰/۰۴۰، ۱۴/۴۰۰±۶۴/۷۳). رابطه قابل توجه‌ای بین سطح AMH در FF و بلوغ تخمک و بارداری بالینی وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: مطالعه ما ارتباط قابل توجه‌ای بین Beta-HCG و AMH در FF و بلوغ تخمک نشان نداد. سطح Beta-HCG در FF با بارداری بالینی مرتبط بود. بنابراین احتمالاً سایر محتویات FF به همراه AMH و Beta-HCG بر بلوغ تخمک تأثیر گذارند.

واژگان کلیدی: بلوغ تخمک، Beta-HCG، هورمون آنتی مولرین، لقاح آزمایشگاهی، مایع فولیکولی

**تهران، بخش زیست پزشکی ترمیمی، مرکز زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی، پژوهشگاه رویان، تهران

Email: Zhr.dorodian@gmail.com
***ORCID: 0000-0001-9782-2067**
****ORCID: 0000-0002-5736-461X**

مقدمه

برای رسیدن به نرخ باروری بهینه در روش IVF و اجتناب از مشکلات مربوط به تولید جنین مازاد و فریز جنین، گزینش تخمک بالغ ضروری است (۱). بلوغ فولیکول تخمدان و همچنین محیط اندوکرین فولیکول، تأثیر به‌سزایی در کیفیت تخمک و نهایتاً نتیجه بارداری دارد. تا به امروز، گزینش تخمک بر اساس ارزیابی ریخت‌شناسی، خصوصیات درونی و بیرونی سیتوپلاسم مجموعه کومولوس تخمک انجام می‌گرفت (۲). در گذشته، کاستا (Costa) و همکاران پیشنهاد استفاده از سایر اجزای مایع فولیکولی را به عنوان نشانگر بیوشیمیایی، جهت پیش‌بینی کیفیت تخمک‌ها با پتانسیل بالای باروری و رشد جنین ارائه کردند. در میان آن‌ها، هورمون‌های استروئید که توسط سلول‌های فولیکول هنگام بلوغ فولیکول ساخته می‌شوند، با نتایج بارداری ارتباط بیشتری داشتند (۲ و ۳). همچنین، مطالعات ایمونوهیستوشیمی (بافت شیمی ایمنی) بیانگر این مطلب است که غلظت بالای هورمون تحریک کننده فولیکول (FSH)، هورمون (Beta-HCG) و هورمون لوتینیزه کننده (LH) (هورمون مبدل فولیکول به جسم زرد)، با بلوغ تخمک و نرخ باروری ارتباط بیشتری دارند (۴).

اولین تقسیم سلولی، پارگی فولیکول، بلوغ تخمک و تخمک‌گذاری در پی به اوج رسیدن میان چرخه‌ایِ LH، رخ می‌دهد (۵). از سالیان گذشته هورمون Beta-HCG به دلیل شباهت بیوشیمیایی به LH، برای تحریک تخمک‌گذاری و جمع‌آوری تخمک‌های بالغ، حین چرخه‌های کمک باروری استفاده شده است (۵).

تحقیقات گذشته نشان داده که کاهش غلظت سطح هورمون Beta-HCG در هنگام تخمک‌گذاری و در ادامه بلوغ ضعیف تخمک، در کاهش نرخ باروری و بارداری بالینی مؤثر است (۶). ژانگ (Zhang) و همکاران، رابطه قابل توجهی بین سطح هورمون Beta-HCG در FF، بلوغ تخمک، باروری، رشد جنین و نتایج بالقوه IVF نشان دادند. همچنین آن‌ها گزارش کردند که سطح بسیار بالای Beta-HCG در FF حین جمع‌آوری تخمک، ممکن است در بلوغ تخمک و رشد جنین تأثیر منفی بگذارد (۷). از سوی دیگر، تعدادی محدود از مطالعات پیشین، از تأثیر غلظت بالای هورمون آنتی مولرین در مایع فولیکولی (FF-AMH)، به عنوان یک عامل زیستی اندوکرین بالقوه برای باروری تخمک و نتایج بالینی IVF خبر دادند (۸ و ۹).

AMH یک گلیکوپروتئین دیمریک متعلق به فراخانواده TGF بتا بوده و در جنس مؤنث، منحصراً از سلول‌های گرانوزولای تخمدانی (Granulosa Cells) و سلول‌های کومولوس ترشح می‌شود. به نظر می‌رسد که ترشح AMH وابسته به شرایطی است که در فولیکول‌های بدوی آغاز می‌شود و در فولیکول‌های پیش- آنترال و آنترال کوچک، به بالاترین مقدار خود می‌رسد و در ادامه تا توقف کامل ترشح در فولیکول‌ها، در مرحله قبل از تخمک‌گذاری کاهش پیدا می‌کنند. همچنین، ترشح AMH مستقل از محور غدد هیپوتالاموس – هیپوفیزی-گوناد است و تغییرات ما بین و حین چرخه‌ای اندکی دارد (۱۰).

AMH منعکس کننده تعداد فولیکول‌های پیش- آنترال است و با میزان ذخیره فولیکول‌های بدوی در ارتباط است. از اینروغلظت مناسب AMH بیانگر ذخیره خوب تخمدانی و نشانگری جهت پاسخ مناسب به گونادوتروپین است. هر چند در مورد غلظت مناسب FF-AMH جهت پیش‌بینی کیفیت تخمک و باروری آن، بحث و اختلاف نظر وجود دارد (۸). غلظت سرمی AMH بین ۱/۶۶ تا ۴/۵۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر نشان‌دهنده کیفیت بالای تخمک است. کاپیستی (Cupisti) و همکاران، رابطه‌ای معکوس، بین غلظت AMH در فولیکول‌های منفرد با بلوغ تخمک

و پتانسیل رشد نشان دادند (۱۱). در مطالعه تاکاهاشی (Takahashi) نشان داده شد احتمال لقاح تخمک‌هایی که غلظت بالاتری از AMH در مایع فولیکولی دارند، بیشتر است (۱۲). در مطالعات متعدد، به رابطه مستقیم بین غلظت AMH و کیفیت جنین اشاره شده است (۱۳ و ۱۴). مطالعه حاضر با هدف بررسی نقش هورمون AMH و Beta-HCG به‌صورت همزمان به عنوان عوامل کیفی بلوغ تخمک و همچنین بررسی ارتباط احتمالی بین سطح هورمون Beta-HCG و AMH و بارداری بالینی در حین چرخه‌های کنترل شده تحریک تخمک‌گذاری، انجام شد.

خصوصیات بیمار

این تحقیق مقطعی بر روی ۳۰ زن نابارور در بازه سنی ۳۹-۲۴ سال با شاخص توده بدنی کمتر از ۳۰ کیلوگرم بر متر مربع در مرکز ناباروری "بیمارستان شهید اکبرآبادی" انجام شد. این مطالعه در بیمارستان اکبرآبادی از سال ۱۳۹۶ شروع گردید و به مدت یکسال ادامه داشت. نمونه مورد نظر به صورت در دسترس و آسان در این مدت زمان مطالعه جمع‌آوری گردید. حجم نمونه در این مطالعه تعداد بیماران مراجعه کننده در طول یکسال به بیمارستان اکبرآبادی بود. بیماران انتخاب شده تحت لقاح مصنوعی (IVF/ICSI) قرار گرفتند و علت ناباروری در میان بیماران، نازایی فاکتور لوله‌ایی و یا نازایی توجیه نشده بود. بیمارانی که از این تحقیق خارج گردیدند شامل خانم‌های دارای بیماری جسمی، سابقه عدم موفقیت بیش از ۳ لقاح مصنوعی، واکنش ضعیف به گونادوتروپین‌ها، پیشینه وجود حساسیت یا عدم سازش به گونادوتروپین‌ها و وجود ناهنجاری‌های رحمی و فیبروم رحمی، بیماران با ناباروری‌های تخمدانی همانند سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS) یا اندومتریوز و بیماران با ذخیره تخمدانی پایین بودند.

همه بیماران سیکل‌های منظم قاعدگی داشتند. به دنبال اسکن اولتراسوند که شش هفته بعد از انتقال جنین، به منظور بررسی بارداری بالینی انجام گرفت، بیماران به دو گروه باردارشده و باردارنشده تقسیم‌بندی گردیدند. وجود ساک حاملگی و ضربان قلب جنین [Fetal Heart(FHR)] به عنوان بارداری بالینی تلقی شد. مشخصات فردی و دموگرافیک بیماران در جدول ۱ نشان داده شده است.

طراحی تحقیقات

پروتکل تحریک، پروتکل طولانی بود که در طی آن انحصاراً از هورمون اگونیست هیپوتالاموس گونادوتروپین (GnRH) و هورمون نوترکیب FSH استفاده شد. رشد فولیکول با استفاده از سونوگرافی ترانس واژینال مورد ارزیابی قرار گرفت. و وقتی دو یا بیشتر از ۲ فولیکول و کمتر از ۱۰ فولیکول ۲۰-۱۸ میلی‌متر رشد کردند. تزریق عضلانی ۱۰۰۰۰ واحد HCG-Beta، انجام گرفت. آسپیراسیون فولیکول، برای جذب تخمک و کمپلکس کومولوس- تخمک، ۳۴ تا ۳۶ ساعت بعد از تزریق HCG انجام شد.

تحت هدایت اولتراسوند، تخمک و مایع فولیکولی از طریق واژینال جذب شدند. (aspirator Labotect، Germany، Gottingen، ۴۰۱۴). همچنین جذب و آسپیراسیون تا زمانی ادامه یافت که فولیکول‌ها به کلی کلاپس شدند. تخمک‌ها توسط جنین‌شناس، از سلول‌های کومولوس (CCS) مجاورشان جدا شدند و سپس بلوغ میوتیک سلول‌ها ارزیابی گردید. تخمک‌های نابالغ MI و بالغ MII از طریق اولین جسم قطبی انتخاب شدند. تخمک‌های نابالغ و تخمک‌های ژرمینال وزیکول (GVS) جهت انجام لقاح مصنوعی در نظر گرفته نشدند. از میان مجموع ۲۵۲ تخمک جمع‌آوری شده، ۱۵۵ عدد بالغ، ۹۷

عدد در وضعیت بینابینی و نابالغ بودند. مایع فولیکولی آسپیره شده و به سرعت در ظروف پتری ریخته شد. ظروف آزمایش به سه گروه تقسیم گردید؛ در گروه اول ظروف حاوی تخمک بالغ (MII) قرار گرفت و در گروه دوم، ظروف حاوی تخمک نابالغ (MI) و در گروه سوم، ظروف پتری حاوی هم تخمک بالغ (MII) و هم نابالغ (MI) و یا تخمک‌های ژرمینال وزیکول (GVS) بود که این گروه امحا شده و از مطالعه خارج گردیدند. مایع فولیکولی که مستقیماً همراه تخمک‌ها آسپیره شدند، جهت ارزیابی هورمونی در تیوب ویژه در دمای منفی۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. مجموع ۱۵۵ تخمک از طریق لقاح مصنوعی بارور و انکوبه شدند. باروری تخمک ۱۸ الی ۲۲ ساعت بعد از تلقیح و با بررسی وجود دو پیش‌هستک (Pronuclei)، پیدایش دو جسم قطبی و در نهایت تقسیم سلولی ارزیابی گردید. باروری ناموفق (عدم وجود پیش‌هستک) و باروری غیر عادی (وجود یک یا سه پیش‌هستک) به عنوان باروری ناموفق دسته‌بندی گردید. یک یا دو جنین که از نظر ریخت‌شناسی، برتری داشتند و دارای بالاترین تعداد بلاستومر (سلول‌های ناشی از تقسیمات اولیه سلولی) بودند، برای انتقال جنین تازه انتخاب گردید. به ازای هر بیمار، حداقل یک جنین حاصل گردید که به صورت منجمد نگهداری شده و یا به‌صورت تازه بداخل رحم انتقال یافت.

روش سنجش هورمون (ELISA)

غلظت‌های هورمون AMH (نانوگرم بر میلی‌لیتر) و Beta-HCG (میلی واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر) از طریق روش‌های اندازه‌گیری آنزیمی با واسطه واکنش‌های آنتی‌بادی - آنتی‌ژن (ELISA) به ترتیب با کیت AMH (Beckman Coulter California-USA) و کیت Beta-HCG (Pishtaz Teb Zaman Tehran Iran) اندازه‌گیری شد. برای بررسی بارداری بالینی، بعد از ۱۴ روز از انتقال جنین، میزان سرمی Beta-HCG اندازه‌گیری گردید و به دنبال آن جهت تحت نظر گرفتن FHR سونوگرافی واژنی انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۲۳ تحلیل گردید و نتایج متغییرهای کمّی به شکل "میانگین ± انحراف معیار" و نتایج متغییرهای کیفی به صورت درصد نمایش داده شدند. تست نمونه مستقل t و تست یک‌سویه ANOVA جهت مقایسه متغییرهای کمّی استفاده شدند. از تست "کای دو" جهت مقایسه داده‌های کیفی استفاده گردید. در این مطالعه جهت بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنوف استفاده گردید.مقدار P کمتر، ۰/۰۵ در این مطالعه معنی‌دار در نظر گرفته شد. این مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی ایران مطرح و با کد IR.IUMS.FMD.REC ۹۳۱۱۲۹۰۰۰۶. ۱۳۹۶ به ثبت رسیده است. انجام تحقیق پس از اخذ رضایت کتبی و شفاهی از بیماران انجام گردید.

یافته‌ها

میانگین سنی بیماران ۴/۳۶۱±۳۲/۶۰ سال بود (۲۴ تا ۳۹ ساله). میانگین شاخص توده بدنی ۱/۷۲۶±۲۴/۸۶ کیلوگرم بر متر مربع، مدت زمان ناباروری ۳/۲۰۰±۵/۹۰ سال بود. علت ناباروری میان ۱۵ نفر از بیماران عوامل لوله‌ایی (۵۰ درصد بیماران) و علت ناباروری ۱۵ نفر دیگر (۵۰ درصد) توجیه نشده بود. از میان ۳۰ زنی که در لیست انجام لقاح مصنوعی بودند، ۲۵۲ تخمک به دست آمد که از میان آن‌ها ۱۵۵ عدد تخمک MII و ۹۷ عدد دیگر تخمک‌های MI و GV بودند. در این مطالعه میانگین نمایه توده بدنی؛ سن و طول مدت ناباروری در دو گروه باردار

شده و نشده مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت که نتایج آن نشان داد در گروه باردار شده میانگین سن برابر با ۳۱/۸۰ با انحراف معیار ۳/۳۲۱ بود در حالی که در گروه باردار نشده این میانگین برابر با ۳۳/۰۰ با انحراف معیار ۴/۸۳۱ بود. اختلاف سنی مورد نظر در دو گروه از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (p=۰/۴۰۰). همچنین میانگین نمایه توده بدنی در گروه باردار شده کمتر از گروه باردار نشده بود که اختلاف مورد نظر از لحاظ آماری نزدیک معنی‌دار بوده است (p=۰/۰۵۰). میانگین طول مدت ناباروری در گروه باردار شده برابر با ۶/۲۰ با انحراف معیار ۴/۲۳۰ بود؛ در صورتی که در گروه باردار نشده این میانگین برابر با ۵/۷۵ با انحراف معیار ۲/۶۷۰ بود. این اختلاف برای طول مدت ناباروری از لحاظ آماری در این مطالعه معنی‌دار نبود (p=۰/۷۰۰)(جدول ۱).

جدول ۱) خصوصیات فردی و دموگرافیک بیماران بر اساس نتایج بارداری بالینی

متغیرها	نتایج بارداری		P.value
	باردار شده	باردار نشده	
سن به سال (میانگین ± انحراف معیار)	۳/۳۲۱±۳۱/۸۰	۴/۸۳۱±۳۳/۰۰	۰/۴۰۰
شاخص توده بدنی (کیلوگرم بر مجذور متر) (میانگین ± انحراف معیار)	۱/۷۲۱±۲۴/۰۱	۱/۵۹۰±۲۵/۲۸	*۰/۰۵۰
طول مدت ناباروری (سال) (میانگین ± انحراف معیار)	۴/۲۳۰±۶/۲۰	۲/۶۷۰±۵/۷۵	۰/۷۰۰
تعداد قبلی IVF			
هرگز	۹	۱۵	
۲بار	۰	۴	۰/۳۰۰
۳بار	۱	۱	
علت ناباروری (تعداد)			
عامل لوله‌ایی	۴	۱۱	۰/۷۰۰
بارداری توجیه نشده	۶	۹	
تعداد تخمک (میانگین ± انحراف معیار)			
MI & GVs	۱/۷۸۰±۳/۵۰	۲/۱۵۰±۳/۱۰	۰/۵۰۰
MII	۲/۵۴۰±۵/۶۰	۲/۷۶۰±۴/۹۵	۰/۵۰۰
Normal fertilization	۲/۵۳۰±۵/۲۰	۲/۷۰۰±۴/۴۰	۰/۳۰۰

میانگین تعداد تخمک‌های MI & GVs؛ و MII در گروه باردار شده به ترتیب برابر با ۱/۷۸۰±۳/۵۰ و ۲/۵۴۰±۵/۶۰ بود در صورتی که این مقادیر در گروه باردار نشده به‌ترتیب برابر با ۲/۱۵۰±۳/۱۰ و ۲/۷۶۰±۴/۹۵ بود. در این مطالعه نتایج نشان داد که میانگین تعداد تخمک‌های MI & GVs؛ و MII در گروه باردار شده بالاتر از گروه باردار نشده بود اما در این مطالعه این اختلافات از لحاظ آماری معنی‌دار نشد (جدول ۱).

Beta-HCG

میانگین میزان Beta-HCG در FF بیماران ۱۸/۷۳۰±۴۳/۶۵ میلی واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر بود. این میانگین بر اساس سن با استفاده از آنالیز واریانس در گروه سنی ۳۱ تا ۳۴ سال مقدار بالاتری به نسبت سنین ۲۴ تا ۳۰ و ۳۵ تا ۳۹ سال داشت که از لحاظ آماری معنی‌دار بود (p=۰/۰۰۲)(جدول ۲). اختلاف قابل توجه بین میانگین میزان Beta-HCG در FF حاوی تخمک‌های MII در زنان با سنین مختلف وجود داشت. این آناالیز واریانس فقط اختلاف تمام گروه‌ها را نشان می‌دهد که مقدار F یا آزمون برابر با ۵/۶۷۳ بود. برای بررسی اختلاف دو به دوی

گروه‌ها از آزمون توکی استفاده شد که هیچ یک از گروه‌ها از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند.

همچنین میانگین میزان Beta-HCG در FF بیماران با نمایه توده بدنی مساوی و بالاتر از ۲۵ برابر با ۲۰/۰۱۰±۵۵/۱۱ و در نمایه توده بدنی پایین‌تر از ۲۵ برابر با ۵۲/۳۴±۲۲/۷۲۴ بود. میانگین میزان Beta-HCG در FF بیماران با نمایه توده بدنی ≤۲۵ بیشتر از بیماران با نمایه توده بدنی پایین‌تر از ۲۵ بود که از لحاظ آماری در این مطالعه معنی‌دار نبود (p=۰/۷۰۰)(جدول ۲). میانگین میزان Beta-HCG در FF با استفاده از آزمون تی مستقل با سطح اطمینان ۹۵ درصد در گروه زنان باردار به طور معنی‌داری بالاتر از زنان باردار نشده بود (p=۰/۰۴۰)(جدول ۲).

جدول ۲) میانگین میزان BETA-HCG در FF حاوی MII در گروه‌بندی سن و شاخص توده بدنی و بارداری

متغیر	میانگین میزان BETA – HCGدر FF حاوی تخمک بالغ	P-value
سن (سال)		
۳۰-۲۴	۱۳/۷۹۰±۵۲/۳۷	*۰/۰۰۲
۳۴-۳۱	۱۳/۱۰۰±۶۷/۶۱	
۳۹-۳۵	۲۳/۳۸۱ ±۳۸/۱۶	
BMI (کیلوگرم بر مترمربع)		
۲۵<	۲۲/۷۲۴±۵۲/۳۴	۰/۷۰۰
۲۵≥	۲۰/۰۱۰±۵۵/۱۱	
بارداری		
بله	۱۴/۴۰۰ ±۶۴/۷۳	*۰/۰۴۰
خیر	۲۱/۹۹۰±۴۸/۲۳۱	

اعداد و ارقام به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است
BMI: شاخص توده بدنی، βHCG: beta human chorionic gonadotropin، MII: تخمک بالغ

AMH

میانگین میزان AMH در سرم و FF بیمار بر اساس سن؛ بارداری و شاخص توده بدنی مقایسه گردید که نتایج در جدول ۳ نشان داده شده است. در گروه سنی ۳۵ تا ۳۹ سال میانگین AMH در سرم و FF بیمار بالاتر از سایر گروه‌های سنی دیگر بود. اما از لحاظ آماری این یافته در این مطالعه معنی‌دار نگردید (p=۰/۹۰۰) (جدول ۳). برای این مقایسه از آزمون انالیز واریانس استفاده شد. این آنالیز واریانس فقط اختلاف تمام گروه‌ها را نشان می‌دهد که مقدار F یا آزمون برابر با ۳/۲۳۴ بود. برای بررسی اختلاف دو به دوی گروه‌ها از آزمون توکی استفاده شد که هیچ یک از گروه‌ها از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند.

میانگین میزان AMH در سرم و FF در زنان با نمایه توده بدنی پایین‌تر از ۲۵ و باردار بالاتر از زنان با نمایه توده بدنی بالاتر و مساوی ۲۵ و غیرباردار بود که این اختلاف نیز در این مطالعه معنی‌دارنبود (۰/۷۰۰، p=۰/۰۶۰) (جدول ۳). برای این مقایسه از آزمون تی مستقل استفاده گردید.

جدول ۳) میانگین میزان AMH در FF حاوی MII در گروه‌بندی سن و شاخص توده بدنی

متغیر	میانگین میزان AMH	P-value
سن (سال)		
۳۰-۲۴	۰/۴۰۰ ±۱/۸۲	۰/۹۰۰
۳۴-۳۱	۰/۷۹۰ ±۱/۸۵	
۳۹-۳۵	۱/۲۴۱ ±۱/۹۶	
BMI(kg/m2)		
۲۵<	۱/۰۱۰ ±۲/۲۶	۰/۰۶۰
۲۵≥	۰/۴۹۰ ±۱/۵۰	
بارداری		
بله	۰/۷۴۰ ±۱/۹۵	۰/۷۰۰
خیر	۰/۹۴۰ ±۱/۸۵	

اعداد و ارقام به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است.
BMI: شاخص توده بدنی، AMH: هورمون آنتی مولرین، MII: تخمک بالغ

میانگین میزان AMH در سرم و FF بیمار به ترتیب ۱/۷۶±۰/۹۸۰ (نانوگرم بر میلی‌لیتر) و ۱/۸۸±۰/۸۲۰ (نانوگرم بر میلی‌لیتر) است. هیچ اختلاف قابل توجهی بین میانگین میزان AMH در سرم و FF یافت نشد (p=۰/۶۰۰). با توجه به نتایج ارائه شده در جدول ۴، هیچ

اختلاف محسوسی بین میانگین میزان AMH بین FF حاوی تخمک‌های بالغ ۱/۸۸±۰/۸۷۰ (نانوگرم بر میلی‌لیتر) و تخمک‌های نابالغ ۱/۶۳±۰/۹۱۰ (نانوگرم بر میلی‌لیتر) وجود نداشت (p=۰/۲۰۰).

جدول ۴) مقایسه سطح BETA-HCG و AMH در مایع فولیکولی حاوی تخمک نابالغ MI و تخمک بالغ MII

متغیر مستقل	MI	MII	p-value
BETA-HCG (میلی واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر)	۵۲/۹۰±۲۱/۰۴۱	۵۳/۷۳ ±۲۱/۰۰۰	۰/۸۰۰
AMH (نانوگرم بر میلی‌لیتر)	۱/۶۳±۰/۹۱۰	۱/۸۸±۰/۸۷۰	۰/۲۰۰

اعداد و ارقام به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده است.
AMH: هورمون آنتی‌مولرین، βHCG: beta human chorionic gonadotropin

هیچ‌گونه رابطه قابل توجهی بین میانگین میزان AMH در FF حاوی تخمک MII در زنان با گروه سنی مختلف یافت نشد (p=۰/۹۰۰). همچنین اختلاف شاخصی بین میانگین میزان AMH در FF حاوی تخمک MII میان زنان باردار شده و نشده وجود نداشت (p=۰/۷۰۰). برای این آنالیز از آزمون تی مستقل با سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده گردید.

بحث

نتایج تحقیق فوق نشان داد که ارتباط آماری معنی‌داری بین میزان هورمون Beta-HCG در FF حاوی تخمک MI و تخمک MII، وجود ندارد. میانگین غلظتِ Beta-HCG در FF حاویِ تخمکِ MII بیمارانی که باردار شدند، به طرز قابل ملاحظه‌ای نسبت به بیمارانی که باردار نشدند، بالاتر بود. این مطلب نشانگر رابطه مستقیم بین غلظت Beta-HCG در FF و بارداری بالینی می‌باشد. از سوی دیگر، هیچ رابطه قابل توجهی بین میزان AMH و بلوغ تخمک و بارداری بالینی یافت نشد. قبلاً تحقیقاتی جهت بررسی ارتباط بلوغ تخمک، هورمون پروژسترون، استرادیول، هورمون LH و FSH در FF انجام شده اما رابطه بین بلوغ تخمک و میزان Beta-HCG و AMH در روز جمع‌آوری تخمک مورد بررسی قرار نگرفته است (۱۷-۱۵). در تحقیقی مشابه، ژانک و همکاران، رابطه آماری معنی‌داری بین غلظت Beta-HCG در FF و بلوغ تخمک در غلظت ۲۱-۱۴ نانومول بر لیتر نشان دادند. در این محدوده، نرخ باروری و بلوغ تخمک افزایش پیدا کرد؛ در حالی‌که با افزایش غلظت بیشتر از ۲۱ نانومول بر لیتر ، بلوغ تخمک به طرز قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت. این نتایج نشان می‌دهد که میزان مناسب Beta-HCG ممکن است در افزایش بلوغ تخمک مؤثر باشد (۷). اینچنین به نظر می‌آید که Beta-HCG به همراه سایر هورمون‌ها در بلوغ تخمک، نرخ باروری و نتیجه باروری تأثیرگذار است.

همچنین Beta-HCG ممکن است به تنهایی تأثیر به‌سزایی بر کیفیت و بلوغ تخمک نداشته باشد (۱۵، ۱۶ و ۱۸).

لوی (Levy) و همکاران، رابطه‌ای قابل توجه بین میزان Beta-HCG سرم و بلوغ تخمک، گزارش نکردند. آن‌ها قادر به تعیینِ حدی که پایین‌تر از آن حد، تخمک به بلوغ ناکامل برسد، نبودند (۵).

در این تحقیق، افزایش سن بیماران، با کاهش میزان Beta-HCG همراه بود. و کمترین غلظت Beta-HCG در زنان بین ۳۹-۳۴ سال مشاهده شد. این یافته را می‌توان از طریق این قضیه که نرخ باروری زنان با افزایش سن کاهش می‌یابد توجیه کرد (۱۹). که بخشی از آن به علت کاهش کیفیت تخمک و کاهش میزان Beta-HCG است. نزول در غلظت Beta-HCG می‌تواند به علت افزایش

هیپوکسی فولیکولی و کاهش توانایی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان باشد (۲۰ و ۲۱).

از سوی دیگر، در تحقیق حاضر نتایج بررسی هورمونی مایع فولیکولی بیانگر این مطلب است که هیچ رابطه معناداری در میانگین غلظت AMH به‌دست آمده و بلوغ تخمک و بارداری بالینی وجود ندارد. یافته‌های ترامیساک (Tramisak) و همکاران نشان دهنده عدم وجود رابطه بین میزان AMH در FF و مراحل بلوغ تخمک و کیفیت ریخت‌شناسی تخمک MII است. همچنین آن‌ها نشان دادند که غلظت AMH در FF تخمک‌های MII بارور شده کمتر است و همین موضوع می‌تواند عاملی جهت پیش‌بینی توانایی باروری تخمک MII باشد (۲۲). از جمله تفاوت‌های تحقیق حاضر با تحقیق ترامیساک، نحوه نمونه‌گیری بیماران بر اساس گروه‌بندی سن و نوع مطالعه و بررسی رابطه AMH و بارداری بالینی بود. محیط FF بیشترین تأثیر را بر روی کیفیت تخمک‌ها دارد. تعاملی دوجانبه بین تخمک و سلول‌های گرانولوزای تولیدکننده AMH برای رشد نرمال فولیکول وجود دارد (۲۳). مرگ سلول‌های گرانولوزا کاملاً با بلوغ تخمک و باروری مرتبط است و می‌تواند باروری بعد از لقاح مصنوعی را پیش‌بینی کند. نرخ بالای مرگ ومیر سلول‌های گرانولوزا بر توانایی رشد تخمک تأثیر نامطلوبی دارد (۲۴).

در تقابل با نتایج ارائه شده، کیم (Kim) و همکاران، رابطه مستقیم بین میزان AMH در FF و امتیاز جنینِ در روز سوم باروری را نشان دادند و به این نتیجه رسیدند که میزان AMH درFF، عاملی جهت پیش‌بینی کیفیت جنین و تخمک است (۹). کدم (Kedem) و همکاران (۲۵) و مهتا (Mehta) و همکاران (۲۶) به این مسئله اشاره کردند که میزان AMH در FF با کیفیت و بلوغ تخمک رابطه معکوس دارد و ممکن است بر نرخ باروری، نرخ کاشت و بارداری بالینی تأثیرگذار باشد. وقوفر (Weghofer) و همکاران گزارش کردند که غلظت AMH در سرم بر تعداد تخمک مؤثر است و بر کیفیت یا نتیجه لقاح مصنوعی اثرگذار نیست (۲۷). این مشاهدات متفاوت ممکن است به دلیل تفاوت در روش‌ها، تفاوت در حجم نمونه، بررسی سرم یا مایع فولیکولی باشد. فلذا هنوز نقش AMH در کیفیت تخمک مشخص نیست. در تحقیق حاضر و تحقیقات دیگر (۹، ۲۵ و ۲۶)، محاسبه غلظت AMH و Beta-HCG در مجموع چند FFصورت گرفته، فلذا محاسبه غلظت AMH و Beta-HCGبرحسب یک فولیکول منفرد و در نتیجه میکرومحیطی که تخمک در آن تولید می‌شود در نتایج منعکس نمی‌شود. فلذا ما قادر به بررسی نرخ کاشت و بارداری تک تک تخمک‌ها نبودیم. هرچند بررسی هر فولیکول خاص، نیازمند پانکچرهای متعدد واژینال، است که در کار بالینی پزشکی محدودیت دارد (۱۵).

نتیجه‌گیری

به طور خلاصه نتایج ارائه شده در تحقیق حاضر، بیانگر عدم وجود ارتباط مشهود بین میزان هورمون Beta-HCG و میزان AMH در FF و بلوغ تخمک است. در این مطالعه مشخص گردید غلظت Beta-HCG در FF به طرز قابل ملاحظه‌ای با بارداری بالینی در ارتباط است. این تحقیق نشان می‌دهد که Beta-HCG به تنهایی نمی‌تواند تأثیر بسزایی در کیفیت و بلوغ تخمک داشته باشد. سایر عوامل همچون هورمون‌های استروئیدی فولیکولی به همراه AMH و Beta-HCG در کیفیت و بلوغ تخمک‌ها می‌توانند تأثیرگذار باشند و برای تعیین عوامل درگیر در بلوغ

تخمک و بهبود نتیجه ART به تحقیقات بیشتری نیاز است.

محدودیت‌ها

در تحقیق حاضر، میزان Beta-HCG و AMH در مجموعه‌ای از چند فولیکول اندازه‌گیری شد. مطالعه و تحقیق روی هر فولیکول به طور منفرد و جداگانه، نیازمند بیهوشی طولانی‌تر و ایجاد پانکچرهای متعدد است.

سپاس و قدردانی

ما از آزمایشگاه پاتوبیولوژی سعید تهران- ایران بابت همکاری صمیمانه‌شان کمال تشکر را داریم. بودجه این تحقیق به‌وسیله دانشگاه علوم پزشکی ایران تأمین شده بود. (ردیف بودجه: ۹۳۱۱۲۹۰۰۰۶)

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1.Revelli A, Canosa S, Bergandi L, et al. Oocyte Polarized Light Microscopy, Assay of Specific Follicular Fluid Metabolites, and Gene Expression in Cumulus Cells as Different Approaches to Predict Fertilization Efficiency after ICSI. Reprod Biol Endocrinol 2017; 15(1): 47.

2.Cadoret V, Frapsauce C, Jarrier P, et al. Molecular Evidence that Follicle Development is Accelerated in Vitro Compared to in Vivo. Reproduction 2017; 153(5): 493-508.

3.Costa LO, Mendes MC, Ferriani RA, et al. Estradiol and Testosterone Concentrations in Follicular Fluid as Criteria to Discriminate between Mature and Immature Oocytes. Braz J Med Biol Res 2004; 37(11): 1747-55.

4.Revelli A, Delle Piane L, Casano S, et al. Follicular Fluid Content and Oocyte Quality: from Single Biochemical Markers to Metabolomics. Reprod Biol Endocrinol 2009; 7: 40.

5.Levy G, Hill MJ, Ramirez C, et al. Serum Human Chorionic Gonadotropin Levels on the Day before Oocyte Retrieval do not Correlate with Oocyte Maturity. Fertil Steril 2013; 99(6): 1610-4.

6.ÜÇkardeŞler ÖM, Kiliç S, Özakşit G, et al. Human Chorionic Gonadotropin Levels in Serum and Follicular Fluid are Correlated with Body Mass Index Rather than the Route of Administration of Purified hCG in ART Cycles. Turk J Med Sci 2009; 39(3): 389-96.

7.Zhang L, Wang H, Zhang R, et al. [Correlation of Follicular Fluid Human Chorionic Gonadotrophin Level with Oocyte Maturity and Early Embryonic Development]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao 2014; 34(2): 260-4.

8.Snoeck F, Sarrazin S, Wydooghe E, et al. Age and Anti-Mullerian Hormone Levels Predict the Success of in Vitro Maturation of Cat Oocytes. Reprod Domest Anim 2017; 52(Suppl 2): 98-102.

9.Kim JH, Lee JR, Chang HJ, et al. Anti-Mullerian Hormone Levels in the Follicular Fluid of the Preovulatory Follicle: A Predictor for Oocyte Fertilization and Quality of Embryo. J Korean Med Sci 2014; 29(9): 1266-70.

10.Simoes-Pereira J, Nunes J, Aguiar A, et al. Influence of Body Mass Index in Anti-Mullerian Hormone Levels in 951 Non-Polycystic Ovarian Syndrome Women Followed at a Reproductive Medicine Unit. Endocrine 2018; 61(1): 144-8.

11.Cupisiti S, Dittrich R, Muller A, et al. Correlation between Anti-Mullerian Hormone, Inhibin B, and Activin A in Follicular Fluid in IVF/ICSI Patints for Assessing the Maturation

and Developmental Potential of Oocyte. Eur J Med Res 2007; 12(12): 604-8.
12.Takahashi C, Fujito A, Kazuka M, et al. Anti Mullerian Hormone Substance from Follicular Fluid is Positively Associated with Success in Oocyte Fertilization During in Vitro Fertilization. Fertil Steril 2008; 89(3): 586-91.
13.Fadini R, Comi R, Mignini Renzini M, et al. Anti-Mullerian Hormone as a Predictive Marker for the Selection of Women for Oocyte in Vitro Maturation Treatment. J Assist Reprod Genet 2011; 28(6): 501-8.
14.Zhang Y, Shao L, Xu Y, et al. Effect of Anti-Mullerian Hormone in Culture Medium on Quality of Mouse Oocytes Matured in Vitro. Plos One 2014; 9(6): e99393.
15.Carpintero NL, Suarez OA, Mangas CC, et al. Follicular Steroid Hormones as Markers of Oocyte Quality and Oocyte Development Potential. J Hum Reprod Sci 2014; 7(3): 187-93.
16.Sarhan D, El Mazny A, Taha T, et al. Estradiol and Luteinizing Hormone Concentrations in the Follicular Aspirate During Ovum Pickup as Predictors of in Vitro Fertilization (IVF) Outcome. Mid East Fertil Soc J 2017; 22(1): 27-32.
17.Salehnia M, Zavareh S. The Effects of Progesterone on Oocyte Maturation and Embryo Development. Int J Fertil Steril 2013; 7(2): 74-81.
18.Theofanakis C, Drakakis P, Besharat A, et al. Human Chorionic Gonadotropin: The Pregnancy Hormone and More. Int J Mol Sci 2017; 18(5): 1059.
19.Rahmani E, Ahmadi SH, Motamed N, et al. Study of Association Between Ovarian Volume with the Number of Antral Follicles and Third Day of Menstruation FSH in Infertile Patients Referred to Omid Persian Gulf Infertility Clinic. Iran South Med J 2016; 19(4): 608-19
20.Luddi A, Capaldo A, Focarelli R, et al. Antioxidants Reduce Oxidative Stress in Follicular Fluid of Aged Women Undergoing IVF. Reprod Biol Endocrinol 2016; 14(1): 57.
21.Kudsy M, Alhalabi M, Al-Quobaili F. Follicular Fluid Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Could be a Predictor for Pregnancy Outcome in Normo-Responders and Polycystic Ovary Syndrome Women Undergoing IVF/ICSI Treatment Cycles. Mid East Fertil Soc J 2016; 21(1): 52-6.
22.Tramisak Milakovic T, Panic Horvat L, Cavlovic K, et al. Follicular Fluid Anti-Mullerian Hormone: a Predictive Marker of Fertilization Capacity of MII Oocytes. Arch Gynecol Obstet 2015; 291(3): 681-7.
23.Stojsin Carter A. Anti-Mullerian Hormone as a Marker of Oocyte Quantity, Developmental Potential, and Fetal Sex [dissertation]. Guelph Univ., 2016.
24.Lin D, Ran J, Zhu S, et al. Effect of GOLPH3 on Cumulus Granulosa Cell Apoptosis and ICSI Pregnancy Outcomes. Sci rep 2017; 7(1): 7863.
25.Kedem-Dickman A, Maman E, Yung Y, et al. Anti-Mullerian Hormone is Highly Expressed and Secreted from Cumulus Granulosa Cells of Stimulated Preovulatory Immature and Atretic Oocytes. Reprod Biomed Online 2012; 24(5): 540-6.
26.Mehta BN, Chimote MN, Chimote NN, et al. Follicular-Fluid Anti-Mullerian Hormone (FF AMH) is a Plausible Biochemical Indicator of Functional Viability of Oocyte in Conventional in Vitro Fertilization (IVF) Cycles. J Hum Reprod Sci 2013; 6(2): 99-105.
27.Weghofer A, Kim A, Barad DH, et al. Follicle Stimulating Hormone and Anti-Mullerian Hormone Per Oocyte in Predicting in Vitro Fertilization Pregnancy in High Responders: a Cohort Study. Plos One 2012; 7(4): e34290.

Original Article

The Correlation of the Follicular Fluid Levels of Anti-Mullerian Hormone and Beta Human Chorionic Gonadotropin with Oocyte Maturation

A. Ghasemi (MD)[1*], Z. Doroudian (MD)[1**], M. Barekat (MD)[2], FS. Amjadi (PhD)[1], M. Tabatabaee (MSc)[1]

[1] Shahid Akbarabadi Clinical Research Unit, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Department of Regenerative Biomedicine, Center for Stem Cell Biology and Technology, Royan Institute, Tehran, Iran

(Received 5 Feb, 2019 Accepted 14 Sep, 2019)

Abstract

Background: Follicular fluid (FF) plays a key role in preparing a microenvironment for the development and fertilization of oocytes. Moreover, biochemical and hormonal changes in the FF surrounding the oocyte can affect its quality and successful fertilization. The present study was conducted to investigate the relationship of beta human chorionic gonadotropin (beta-HCG) and anti-mullerian hormone (AMH) levels of FF with oocyte maturation in in-vitro fertilization (IVF) cycles.

Materials and Methods: FF was monitored in 30 women under a controlled ovarian stimulation cycle. Oocyte maturation was examined by an embryologist. Beta-HCG and AMH levels were then investigated in the FF containing metaphase I (MI), metaphase II (MII) and germinal vesicle (GV) oocytes using ELISA. To evaluate clinical pregnancy, serum levels of beta-HCG were measured 14 days after transfering the embryo. Identifying fetal heart rate (FHR) was considered clinical pregnancy.

Results: No significant differences were observed in the mean betal-HCG levels between the mature (53.73±21.081 IU/ml) and immature oocytes (52.90±21.000 IU/ml) (P=0.8). Beta-HCG levels of the FF containing the MII oocytes (64.73±14.49 IU/ml) were significantly related to clinical pregnancy (P=0.04). Oocyte maturation and clinical pregnancy were also found not to be significantly related to AMH levels of FF.

Conclusion: The present study found oocyte maturation not to be significantly associated with the beta-HCG and AMH levels of FF. Beta-HCG levels of FF were also found to be associated with clinical pregnancy. The other constituents of FF along with AMH and beta-HCG might have therefore affected the oocyte quality and maturation.

Keywords: Oocyte maturation, beta-HCG, AMH, IVF, FF

©Iran South Med J.All right sreserved

Cite this article as: Ghasemi A, Doroudian Z, Barekat M, Amjadi FS, Tabatabaee M.The Correlation of the Follicular Fluid Levels of Anti-Mullerian Hormone and Beta Human Chorionic Gonadotropin with Oocyte Maturation. Iran South Med J 2019; 22(5):296-306

Copyright © 2019 Ghasemi, et al This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

[**]Address for correspondence: [2]Department of Regenerative Biomedicine, Center for Stem Cell Biology and Technology, Royan Institute, Tehran, Iran. Email: zhr.dorodian@gmail.com
*ORCID: 0000-0001-9782-2067
**ORCID: 0000-0002-5736-461X