

بررسی همخوانی سنجش سطح هورمون استرادیول به روش الایزا در دو حالت رقیق شده و بدون رقت در سرم خانم‌های تحت درمان با داروهای محرک تخمک گذاری

رضا نصیری: کارشناس زیست شناسی، پژوهشگاه فناوری های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی ابن سینا، تهران، ایران. reza.nasiri550@gmail.com
 دکتر هاله سلطان قرانی: استادیار پاتولوژی، پژوهشگاه فناوری های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی ابن سینا، تهران، ایران. haleh53sg@yahoo.com
 دکتر افسانه محمدزاده: استادیار زنان و زایمان، پژوهشگاه فناوری های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی ابن سینا، تهران، ایران. mohammadzadeh@avicenna.ac.ir
 دکتر امیرحسین زرنانی: دانشیار ایمونولوژی، پژوهشگاه فناوری های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی ابن سینا، تهران، ایران. zarnani@avicenna.ac.ir
 دکتر محمود جدی تهرانی: استاد ایمونولوژی، پژوهشگاه فناوری های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی ابن سینا، تهران، ایران. mahjed@avicenna.ac.ir
 دکتر علی صادقی تبار: دکتری علوم آزمایشگاهی، پژوهشگاه فناوری های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی ابن سینا، تهران، ایران (نویسنده مسئول). asadeghitabar@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۲

تاریخ دریافت: ۹۱/۶/۱

چکیده

زمینه و هدف: بررسی سطح هورمون استرادیول در سرم خانم های تحت درمان با داروهای محرک تخمک گذاری به منظور اطمینان از وجود میزان مناسب این هورمون جهت دست یافتن به تعداد کافی تخمک در فرآیند درمان ناباروری و همچنین جلوگیری از بروز عوارض سندرم تحریک بیش از حد تخمدان، امری مهم و ضروری می باشد. در موارد بالا بودن هورمون استرادیول، روش های معمول، توانایی اندازه گیری غلظت واقعی مولکول هورمون را ندارند. بررسی میزان حساسیت روش الایزا برای اندازه گیری هورمون استرادیول و تعیین محدوده قابل اطمینان برای این آزمایش، هدف این مطالعه می باشد. **روش کار:** در این مطالعه مقطعی (Cross-Sectional)، تعداد ۱۳۲ خانم که برای درمان ناباروری به مرکز فوق تخصصی درمان ناباروری ابن سینا مراجعه نموده و با داروهای محرک تخمک گذاری، تحریک شده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه از کیت استرادیول الایزا DRG ساخت کشور آلمان استفاده شد. با توجه به شرایط مراجعینی که مورد مطالعه قرار گرفتند، میزان استرادیول سرم آنها بالاتر از ۲۰۰ Pg/ml بود. جهت بررسی میزان خطی بودن این روش، نمونه سرم تمام این بیماران با نسبت ۱:۴ رقیق شد و با استفاده از نرم افزار Excel و رسم نمودار مقایسه شدند. **یافته‌ها:** مشاهده شد که با افزایش غلظت استرادیول بیش از ۲۰۰۰ Pg/ml، اختلاف بین نمودار مستقیم و رقیق شده افزایش می یابد و اصطلاحاً خطی بودن نمودار روش بدون رقت از بین می رود.

نتیجه گیری: در غلظت‌های استرادیول سرمی بیش از ۲۰۰۰ Pg/ml نیاز به رقیق نمودن نمونه‌ها می باشد و نتایج روش بدون رقت قابل اعتماد نخواهد بود. این موضوع باید در آزمایشگاه های مراکز درمان ناباروری و یا حتی آزمایشگاه های دیگر نیز مورد توجه قرار گیرد که میزان خطی بودن روش های مورد استفاده مشخص گردد تا در هنگام مواجهه با مقادیر بالاتر، رقیق سازی صورت گیرد.

کلیدواژه‌ها: استرادیول، ELISA، ناباروری، تحریک تخمک گذاری، ایران.

مقدمه

در مراکز درمان ناباروری، به منظور آماده سازی خانم‌های مراجعه کننده برای درمان از طریق روش‌های کمک باروری (Assisted reproductive technology) از داروهای محرک تخمک گذاری (گنادوتروپین‌ها) استفاده می‌شود. معمولاً گنادوتروپین‌ها در حیوانات و انسان برای تحریک افزایش تخمک گذاری استفاده شده و باعث افزایش تعداد تخمک‌های قابل دسترس برای پژوهش‌های رشد و نمو و تولید مثلی نظیر لقاح خارج رحمی (In Vitro Fertilization) یا به اختصار (IVF) و ایجاد جانوران ترانسژنیک می‌شوند (۱). برای تحریک تخمک گذاری از داروهای

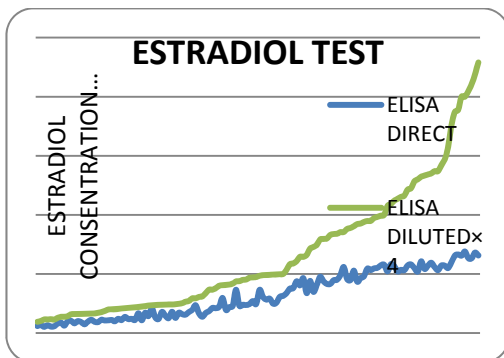
مختلف استفاده می‌شود که برخی از این داروها شامل Gonadotropins Human Menopausal (hMG)، Gonadotropin Chorionic Human (hCG) و آنالوگ Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) می‌باشند (۲).

یکی از نگرانی‌های در رابطه با سیکل‌های تحریک تخمک گذاری، بروز سندرم تحریک بیش از حد تخمدان Ovarian Hyper Stimulation Syndrome (OHSS) (۳) و حاملگی چند قلوئی است (۴، ۵). در حال حاضر برای پیشگیری از بروز آن، سیکل‌های تحریک تخمک گذاری را کنسل می‌کنند. در غیر این صورت علائم OHSS بصورت تهوع، استفراغ، درد و نفخ شکم و نهایتاً آسیت بروز

در این مطالعه اندازه گیری هورمون استرادیول در دو حالت مستقیم و رقیق شده با آب مقطر به نسبت ۱:۴ با روش ELISA و با استفاده از کیت DRG Estradiol ساخت کشور آلمان صورت گرفت. علت استفاده از این رقت، مشاهدات تجربی بوده و بر اساس غلظت استرادیول در اکثر بیماران، به این نتیجه رسیدیم که در اکثر موارد، رقیق سازی نمونه ها به نسبت ۱:۴ می تواند غلظت این هورمون را به کمتر از مقدار بحرانی کیت کاهش دهد. پس از بدست آوردن نتایج، نمودار مربوطه با استفاده از نرم افزار Excel رسم شد.

یافته‌ها

در این بررسی همانطور که در نمودار ۱ مشخص است، تغییرات غلظت استرادیول سرم در هر دو حالت مستقیم و رقیق شده تا 2000 Pg/ml همراستا و اختلاف ناچیزی دارند. ولی با افزایش این غلظت اختلاف افزایش می یابد و اصطلاحاً خطی بودن نمودار روش بدون رقت از بین می رود. از طرف دیگر همانطور که در نمودار مشخص است، میزان عدد گزارش شده در حالت مستقیم از عدد 3000 Pg/ml بالاتر نمی رود و این در حالیست که نتیجه تست همان بیمار در حالت رقیق شده بیشتر از 9000 Pg/ml می باشد. بنابراین در این روش، فقط نتایج آزمایشاتی که میزان هورمون استرادیول برابر یا کمتر از Pg/ml 2000 باشد قابل اعتماد بوده و در مورد نتایج بیش از این غلظت لازم است پس از رقیق کردن نمونه، مجدداً تست انجام شود. در غیر اینصورت، نتایج بطور کاذب پایین تر از مقدار واقعی بدست



نمودار ۱- مقایسه نتایج غلظت استرادیول بدون رقت و رقیق شده

می کند (۶). غلظت سرمی استرادیول در روز چهارم درمان با گنادوتروپین، پیش بینی خوبی از موفقیت تحریک تخمک گذاری و نتیجه بارداری در سیکل IVF را ارائه می دهد (۷) همچنین افزایش سریع سطح استرادیول در روز شروع درمان با hCG، به عنوان پیش بینی بروز OHSS استفاده می شود (۸). بنابراین اندازه گیری هورمون استرادیول در خانم هایی که جهت انجام تکنیک های کمک باروری آماده می شوند، از اهمیت بالایی برخوردار بوده و گزارش نتیجه نزدیک به واقعیت از سوی آزمایشگاه به متخصصین به منظور اطلاع از شرایط بیمار، ضرورت دارد. هدف این بررسی، نشان دادن اهمیت حساسیت روش های اندازه گیری استرادیول برای مراکز درمان ناباروری با توجه به شرایط بیماران این نوع مراکز می باشد. از آنجایی که روش های موجود، برای افراد نرمال طراحی شده اند نه برای بیمارانی که تحت درمان با داروهای محرک هستند، لذا توانایی تشخیص غلظت های بالا را ندارند. این میزان را می بایست مشخص کرد و بدیهی است که برای دست یافتن به غلظت واقعی، رقیق سازی نمونه های با غلظت بالاتر از این میزان اجتناب ناپذیر است؛ چرا که در صورت بدست آمدن نتایج کمتر از میزان واقعی که بدلیل محدودیت های اندازه گیری کیت می باشد، احتمال بروز علائم کنترل نشده OHSS افزایش یافته و خطرات بالینی قابل توجهی را برای بیماران در بر خواهد داشت.

روش کار

این مطالعه یک بررسی مقطعی (Cross-Sectional) می باشد که بر روی تعداد ۱۳۲ بیمار زن انجامش شده است که جهت درمان ناباروری به مرکز فوق تخصصی درمان ناباروری و سقط مکرر ابن سینا مراجعه کرده و تحت تحریک تخمک گذاری (صرف نظر از نوع داروی محرک) قرار گرفته بودند. نمونه ها بصورت خون لخته در لوله های ونوجکت قرمز جمع آوری شده و پس از انعقاد کامل، در دور 4400 rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سپس سرم آنها جداسازی شد.

سرکار خانم نرگس مشرف بهزاد سوپروایزر آزمایشگاه تشخیص طبی مرکز فوق تخصصی درمان ناباروری و سقط مکرر ابن سینا سپاس گذاری کنیم که در این طرح کمک های بسیاری مبدول داشتند.

آمده و منجر با تصمیم گیری نادرست توسط پزشک خواهد شد و بروز مشکلات مرتبط با OHSS اجتناب ناپذیر خواهد بود. این مسئله نشان دهنده حساسیت و ظرفیت پایین روش های معمول اندازه گیری هورمون استرادیول است.

بحث و نتیجه گیری

هدف این مطالعه بررسی و مقایسه روش های مختلف با هم نیست بلکه هدف، نشان دادن اهمیت تشخیص و گزارش مقدار واقعی هورمون استرادیول می باشد. در برخی از آزمایشات، پاسخ دستگاه یا هر ابزار اندازه گیری در برابر غلظت نمونه خطی نیست (۹). نتایج بدست آمده نشان دهنده ضعف روش های معمول اندازه گیری هورمون استرادیول نیست چراکه در حالت نرمال و بدون مصرف داروهای تحریک تخمک گذاری، کیت های رایج قابلیت اندازه گیری میزان استرادیول را بدون نیاز به رقیق سازی دارند و تنها در صورت مصرف این دسته از داروها که منجر به افزایش استرادیول خون افراد می گردد و آن هم در غلظت های بیش از ۲۰۰۰ Pg/ml نیاز به رقیق نمودن نمونه هاست و نتایج روش بدون رقت قابل اعتماد نخواهد بود. این موضوع باید در آزمایشگاه های مراکز درمان ناباروری و یا حتی آزمایشگاه های دیگر نیز مورد توجه قرار گیرد که میزان خطی بودن روش های مورد استفاده باید مشخص گردد تا در هنگام مواجهه با مقادیر بالاتر، رقیق سازی صورت گیرد. بدیهی است که استرادیول یک مثال از اهمیت توجه به خطی بودن تست ها می باشد و همکاران محترم می بایست این توجه را در مورد کلیه تست های کمی داشته باشند.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از جناب آقای دکتر محمد مهدی آخوندی ریاست محترم پژوهشگاه فناوری های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی- ابن سینا و مرکز فوق تخصصی درمان ناباروری و سقط مکرر ابن سینا که ما را در اجرای این طرح یاری فرمودند کمال تشکر را داریم. در ضمن جا دارد از

منابع

1. Bahar ara J, MoosaviFar N, Jalali M. Effects of HMG & r-FSH on development of ovarian follicles of Balb/C mouse. KAUMS Journal (FEYZ). 2008; 12 (1):1-8 [Persian].
2. Mehraeen, (The effect of ovulation inducer drugs on endometer). Fertility and Sterility. 1380 [Persian].
3. Allahbadia GN, Das RB. The Art and Science of Assisted Reproductive Techniques (ART). London: Taylor & Francis. 2003.
4. Berek JS .Berek & Novaks Gynecology. 14th edition. Lippincott Williams & Wilkins. 2007; 275-1185.
5. Fritz MA, Speroff L. Clinical Gynecologic Endocrinology and infertility. 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins; 2005: 213-1175.
6. Gardner DK. Textbook of Assisted Reproductive Techniques (ART). CRC press. 2001.
7. Miao MF, Huang HF. Dynamic measurements of serum inhibin B and estradiol: a predictive evaluation of ovarian response to gonadotrophin stimulation in the early stage of IVF treatment. J Zhejiang Univ Sci B. 2009; 10:35-45.
8. Fiedler K, Ezcurra D. Predicting and preventing ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): the need for individualized not standardized treatment. Reprod Biol Endocrinol. 2012; 10:32.
9. Jhang JS, Chang CC, Fink DJ, Kroll MH. Evaluation of linearity in the clinical laboratory. Arch Pathol Lab Med. 2004; 128:44-8.

Evaluation of coordination between diluted and undiluted serum estradiol levels using ELISA method in women under treatment with ovulation induction drugs

Reza Nasiri, BSc, Avicenna research institute, Tehran, Iran. reza.nasiri550@gmail.com

Haleh Soltanghorae, MD, Assistant professor of pathology, Avicenna Research Institute, Tehran, Iran. haleh53sg@yahoo.com

Afsaneh Mohammadzadeh, MD, Assistant professor of gynecology, Avicenna research institute, Tehran, Iran. mohammadzadeh@avicenna.ac.ir

Amir Hasan Zarnani, PhD, Associate professor of immunology, Avicenna research institute, Tehran, Iran. zarnani@avicenna.ac.ir

Mahmud Jeddi-Tehrani, PhD, Professor of immunology, Avicenna research institute, Tehran, Iran. mahjed@avicenna.ac.ir

***Ali Sadeghitabar**, PhD, Avicenna research institute, Tehran, Iran (*Corresponding author). asadeghitabar@yahoo.com

Abstract

Background: Measurement of estradiol level in women under treatment with ovulation induction drugs to make sure about sufficient ovum number in the infertility treatment protocol and also to prevent OHSS phenomenon, is an important and necessary factor. In case of high levels of Estradiol hormone, routine methods are unable to detect the real concentration of the hormone molecules. We are aimed to demonstrate the sensitivity of the ELISA method for Estradiol measurement and reliable range of this test.

Methods: In this cross-sectional study, 132 women were studied who have appealed to Avicenna infertility clinic for infertility treatment and have stimulated with ovulation induction drugs. DRG ELISA Estradiol kit made in Germany was used in this study. According to the studied population, serum Estradiol levels were higher than 200Pg/ml. To check the linearity of this method, serum samples of all these patients diluted 1:4 and were compared using EXCEL software and charts.

Results: It was observed that, in Estradiol hormone concentrations higher than 2000 Pg/ml, the difference between the diluted and undiluted graphs increased and the linearity of the graph disappeared without dilution.

Conclusions: Dilution is necessary for the serum Estradiol concentrations more than 2000 Pg/ml and the results without dilution is not reliable. It should be considered in all infertility laboratories and also in other labs that the test linearity should be appointed in each lab to be applied in cases with higher concentrations.

Keywords: Estradiol, ELISA, Infertility, Ovulation Induction, Iran.