

مقدمه

علیرغم وجود تست های متعدد آزمایشگاهی در بررسی قدرت عملکردی اسپرم، متاسفانه در حال حاضر، توانایی باروری یک نمونه Semen بطور دقیق قابل پیش بینی نیست. معیارهای بررسی توانایی عملکردی اسپرم همچون حرکت، مرفولوژی، تعداد و موقعیت آکروزوم و بسیاری مشخصات دیگر قادر به پیش بینی قدرت باروری اسپرم بطور دقیق و معنی داری نیستند. (۱و۲) علاوه بر این بدست آوردن اطلاعات دقیق و قابل اعتماد از باروری اسپرم بوسیله تست های آزمایشگاهی معرفی شده، چندان آسان نیست. این مشکل در هنگام انتخاب بهترین روش مناسب درمان ناباروری یک زوج نابارور از قبیل IVF^۱ و ICSI^۲ بیشتر محسوس میشود. یکی از مهمترین موارد غیر منتظره که یک زوج نازا در یک سیکل IVF با آن مواجه میشوند، اشکال در عدم باروری تخمک و عمل لقاح می باشد. عدم باروری تخمک و عدم انتقال جنین منجر به توقف سیکل درمانی و ایجاد یاس و ناامیدی در بیمار می گردد، و اثرات روحی و مالی فراوانی را بر زوج وارد می نماید. عدم باروری یا میزان بسیار کم باروری در سیکل درمانی IVF میتواند ناشی از شرایط هورمونی ناشی از پروتکل های تحریک تخمک گذاری و یا اختلالات خاص مربوط به سیکل و همچنین در مواردی اختلال در توانایی عملکردی اسپرم در نفوذ بداخل تخمک باشد.

به منظور نجات تخمک های باور نشده، بدنبال IVF Trounson و همکاران در سال ۱۹۸۴ و Pampiglione و همکاران در سال ۱۹۹۰ اقدام به تلقیح مجدد تخمک به روش IVF نمودند که نتایج حاصل حاکی از میزان

پایین باروری بود. اگر چه تلقیح مجدد تخمک بوسیله میکرواینجکشن با تکنیک های (PZD)^۳ و (SUZI)^۴ موجب بالا رفتن میزان باروری شد. ولی متاسفانه در این روش تخمک های با بیش از ۳ پرونوکلئوس (PN)^۵ که نشانه غیر طبیعی بودن لقاح بود، به میزان زیادی دیده شد (۵). گزارشات اخیر نشان می دهد که تزریق اسپرم بداخل سیتوپلاسم تخمک های بارور نشده پس از یک روز از شکست IVF و (عدم باروری تخمک ها) می تواند موجب باروری تخمک ها شود (۷و۹). مطالعه حاضر با توجه به وجود تعداد موارد اندک گزارش در این زمینه و عدم وجود اطلاعات در مورد سقف زمانی تزریق به تخمک، پس از جمع آوری تخمک ها انجام پذیرفت. هدف از این مطالعه ارزیابی و بررسی قدرت باروری تخمک های بارور نشده یک و یا دو روز پس از انجام IVF، بوسیله تکنیک ICSI و همچنین توانائی جنین های حاصل در ایجاد حاملگی می باشد.

مواد و روشها

این مطالعه بر روی تخمک های بارور نشده ۳۵ بیمار تحت درمان IVF از شروع مهرماه سال ۱۳۷۷ تا پایان اسفندماه سال ۲۷۸ انجام شد و تمام بیماران با استاندارد های لازم برای انجام IVF مطابقت داشتند. تحریک تخمک گذاری برای انجام IVF به وسیله پروتکل طولانی با استفاده از GnRH (Buserline acetate) و بدنبال آن hMG انجام شد. در طول انجام این مطالعه از منابع تجاری مختلفی از جمله hMG و Humegon (Serono) Metrodin hP، Pergonal و Normagon (Organon) استفاده شد.

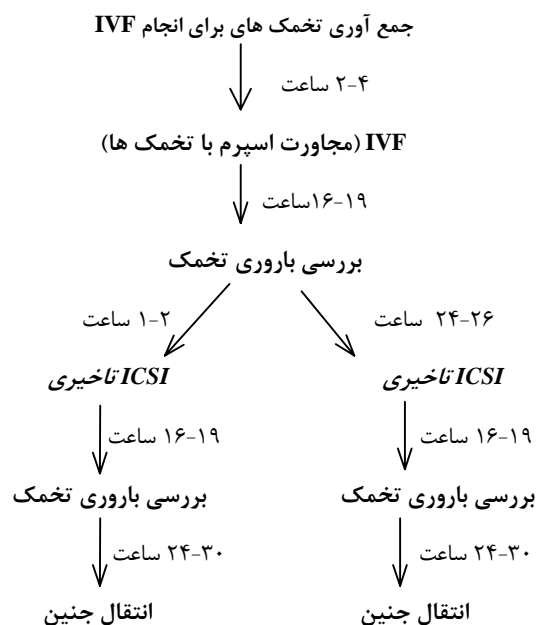
3- Partial Zona Dissection
4- Subzonal Insemination
5- Pronucleuse

1- In vitro Fertilization
2- Intracytoplasmic Sperm Injection

از جمع آوری تخمک ها، اسپرم متحرک با مرفولوژی طبیعی که از اسپرم های تهیه شده از روز جمع آوری تخمک در درجه حرارت اتاق نگه داری شده بود انتخاب و بعد از غیر متحرک کردن آن بداخل تخمک تزریق شد. سپس تخمک های تزریق شده سه بار در محیط کشت IVF شستشو داده شده و به قطره های ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت IVF در پتری دیش های با اندازه 60×15 mm در زیر روغن پارافین منتقل و در انکوباتور با $5\% \text{ CO}_2$ و درجه حرارت 37°C درجه سانتیگراد نگهداری شدند. تخمک ها ۱۸-۱۶ ساعت پس از تزریق مجدداً از نظر وجود پرونوکلئوس و گویچه قطبی مورد بررسی قرار گرفتند.

کشت جنین ۷۲ تا ۹۶ ساعت بعد از جمع آوری تخمک ادامه یافت و جنین هایی که به مرحله ۸-۴ سلولی رسیده بودند بداخل رحم منتقل شدند. دو هفته بعد از انتقال آزمایش βhCG بعمل آمد. در صورت جواب مثبت ۶ تا ۸ هفته بعد از حاملگی سونوگرافی جهت دیدن کیسه جنینی انجام شد.

مراحل انجام ICSI تأخیری



بیماران در طی درمان بوسیله سونوگرافی و اندازه گیری استرادیول تحت کنترل بودند. زمانی که در بیماران حداقل ۴ فولیکول با قطر متوسط ۱۹-۱۷ میلی متر دیده شد hCG با دوز 10000 IU تزریق گردید و فولیکول های رسیده ۳۶-۳۴ ساعت پس از تزریق hCG بوسیله پمپ خلاء متصل به سوزنی که از Transvaginal ultrasound probe به طرف تخمدانها هدایت می شد، تخلیه و جمع آوری شد.

مایع فولیکول حاوی کمپلکس سلولهای کومولوس و تخمک به داخل لوله آزمایش استریل آسپیره شدند. سپس تخمک ها از مایع فولیکولی برداشته و در محیط کشت Ham's F10 برای ۲-۳ ساعت زیر روغن پارافین کشت داده شد و سپس در مجاورت اسپرم های متحرک به تعداد $10^6 \times 0.5$ که بوسیله درجات مختلف پرکل شستشو و جداسازی شده بودند قرار داده شدند.

ارزیابی باروری بعد از IVF

سلولهای کومولوس ۲۲-۱۹ ساعت بعد از جمع آوری تخمک، یا ۱۹-۱۶ ساعت بعد از تلقیح^۱ بوسیله پیپت پاستور و با آسپیراسیون آرام و بطور مکانیکی، زیر میکروسکوپ معکوس از تخمک ها جدا شده، سپس تخمک های کشت داده شده را از نظر وجود پرونوکلئوس (PN) و گویچه قطبی بررسی گردید. باروری در صورت وجود دو پرونوکلئوس مشخص با دو گویچه قطبی، طبیعی محسوب شد و تنها تخمک هایی که باروری نداشتند برای این مطالعه استفاده شدند.

آماده سازی تخمک های بارور نشده برای ICSI

۱۰۲ تخمک که از نظر مرفولوژی فاقد نشانه های باروری بودند و در مرحله متافاز II قرار داشتند برای میکرواینجکشن انتخاب شدند و بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت

1- Insemination

نتایج

جدول ۲: خلاصه نتایج ICSI تأخیری در ۱۴ سیکل درمانی (زمان تزریق پس از ۴۸ ساعت)

سال ۳۲/۲۸	- میانگین سنی
۱۱۷	- میزان تخمک بدست آمده
۴۵	- تعداد تخمک با انجام ICSI تأخیری
۳۱ (۴۶/۶٪) درصد باروری	- تعداد تخمک بارور شده
۹ (۴۲/۷٪ تقسیم سلولی)	- تعداد جنین با تقسیم طبیعی
۹	- تعداد جنین منتقل شده
۱۱ (۷۸٪)	- تعداد بیمارانی که انتقال جنین در آنها انجام گرفته است

بحث:

اختلال در باروری بدنبال IVF ممکن است بدلیل عدم توانایی اسپرم در نفوذ به داخل تخمک باشد، که چنین اتفاقی احتمالاً به آسانی با استفاده از ICSI قابل درمان می باشد. از طرف دیگر عدم باروری بدنبال IVF ممکن است بدلیل اشکالات اساسی در کیفیت اسپرم و تخمک، از جمله عدم توانایی سر اسپرم برای متراکم شدن کروماتین و یا اختلال در فعال شدن تخمک باشد که چنین اختلالاتی بوسیله ICSI قابل درمان نیست. لذا با توجه به اینکه تعدادی از تخمک های بارور نشده در IVF توسط ICSI بارور و تعدادی دیگر پس از عدم باروری در IVF و انجام ICSI بارور نشد. لذا می توان حدس زد که هر دو نوع اختلال باروری در این مطالعه دیده میشود.

در این مطالعه میزان باروری بدنبال ICSI تأخیری در تخمک های یک روزه ۸۰/۵٪ و در تخمک های دو روزه ۴۶/۶٪ بود که در مقایسه با میزان باروری در تخمک های تازه و بدنبال انجام ICSI (۹۰٪)، بطور معنی داری پایین می باشد. نتایج بیان کننده این موضوع است، که اگر چه تخمک های بارور نشده ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از انجام IVF، قادر به باروری با انجام ICSI می باشد، ولی میزان باروری با افزایش سن

تخمک های ۳۵ بیمار که بدنبال انجام IVF بارور نشده بودند بوسیله ICSI مجدداً مورد تزریق قرار گرفتند. تخمک های بدست آمده از ۲۱ بیمار گروه اول ۲۴ ساعت پس از جمع آوری تخمک ها و عدم ناباروری، ICSI انجام شد. همچنین تخمک های ۱۴ بیمار گروه دوم، ۴۸ ساعت بعد از جمع آوری تخمک ها بعلت عدم باروری بوسیله ICSI تزریق شدند. میانگین سنی گروه اول ۳۱ سال (۲۲-۴۲) و گروه دوم ۳۲ سال (۲۱-۴۲) بود که این اختلاف بین دو گروه معنی دار نبود. در گروه اول ۱۶۴ تخمک و در گروه دوم ۱۱۷ تخمک بدست آمد. از این تعداد ۷۲ تخمک در گروه اول و ۴۵ تخمک در گروه دوم برای انجام ICSI انتخاب شدند. میزان باروری تخمک ها بدنبال ICSI در گروه اول ۸۰/۵٪ و در گروه دوم ۴۶/۶٪ بود. که اختلاف معنی داری ($p < 0.05$) را بین دو گروه نشان میداد. میزان تقسیم سلولی به تخمک های تزریق شده ۷۹/۳٪ در گروه اول و ۴۲/۷٪ در گروه دوم بود. انتقال جنین در ۱۹ بیمار از گروه اول (۹۴٪) و ۱۱ بیمار از گروه دوم (۷۸٪) انجام شد. انتقال جنین در گروه اول منجر به حاملگی نشد ولی در گروه دوم یک مورد حاملگی و تولد نوزاد سالم گزارش شد.

جدول ۱: خلاصه نتایج ICSI تأخیری در ۲۱ سیکل درمانی (زمان تزریق پس از ۲۴ ساعت)

سال ۳۱/۷۶-۳۲	- میانگین سنی
۱۶۴	- میزان تخمک بدست آمده
۷۲	- تعداد تخمک با انجام ICSI تأخیری
۵۸ (درصد باروری ۸۰/۵٪)	- تعداد تخمک بارور شده
۴۶ (۷۹/۳٪ تقسیم سلولی)	- تعداد جنین با تقسیم طبیعی
۴۶	- تعداد جنین منتقل شده
۱۹ (۹۴٪)	- تعداد بیمارانی که انتقال جنین در آنها صورت گرفته است

کاریوتایپ و سیتوژنتیک در این جنین ها باشد (۱۷). که منجر به اختلاف معنی دار ($p < 0.05$) در میزان حاملگی بین ICSI روی تخمک های تازه و تخمک های مسن شود (۱۸).

بطور طبیعی بالاترین شانس لانه گزینی جنین هنگامی می باشد که حداکثر هماهنگی بین رشد و تکامل جنین و اندومتر وجود داشته باشد. و بهترین زمان این هماهنگی در زمان Implantation window یعنی ۶-۵ روز بعد از تخمک گذاری می باشد (۱۹). انتقال جنین در این زمان یا نزدیک به این زمان شانس لانه گزینی را بالا می برد. در این مطالعه بدنبال انتقال جنین حاصل از ICSI تأخیری (تخمک دو روزه) بعد از حدود ۵ روز از تخمک گذاری داخل رحم یک مورد حاملگی منجر به تولد نوزاد طبیعی و سالم حاصل شد. انتقال جنین در زمان Implantation window در این مورد میتواند توجیه کننده حاملگی در این مورد باشد.

علاوه بر این مطالعه، مطالعات دیگری نیز وجود دارد که حاملگی و تولد نوزاد سالم را گزارش نموده اند. اگر چه هنوز گزارشی از اختلالات ژنتیکی متولدین ناشی از ICSI بر روی تخمک های یک روزه و دو روزه نشده است (۹ و ۸ و ۷). ولی بسیار زود است که بدون هیچگونه تردیدی به سلامت این نوزادان اطمینان حاصل نمود زیرا این نوزادان از نظر تئوری در معرض خطر بیشتر اختلالات سیتوژنتیکی می باشند و تعداد چنین نوزادانی بسیار کم بوده و از این درصد کم نمی توان نتیجه گیری نمود، لذا بهتر است در اینگونه موارد از تشخیص ژنتیکی قبل از تولد استفاده گردد. با توجه به میزان کم حاملگی و اختلالات کروموزومی بالا، ICSI تأخیری و حاملگی موفق بعد از انجام ICSI بدنبال شکست قبلی IVF (۲۰)، استفاده از این روش بعنوان روش درمانی، مورد قبول عده ای نمی باشد. این گروه بدلیل میزان بالای باروری و تقسیم سلولی بدنبال ICSI تأخیری از این روش بعنوان مقاصد تشخیصی

تخمک رابطه معکوس دارد. مطالعات دیگر نیز تأیید کننده ارتباط معکوس بین میزان باروری و سن تخمک می باشد (۹ و ۱۱ و ۷) Morton و همکاران (۹) و Nagy و همکاران (۱۱) از اسپرم مشابه بکار برده شده در IVF اولیه و Sjren و همکاران از اسپرم تازه برای انجام ICSI تأخیری استفاده نمودند که در هر دو مورد میزان باروری بالا بود. Lundin و همکاران (۱۳) نشان دادند که اختلاف معنی داری در میزان باروری بین دو منبع اسپرم استفاده شده در ICSI تأخیری وجود ندارد. میزان باروری در این مطالعه، مشابه یا حتی بالاتر از میزان باروری در موارد استفاده شده از اسپرم تازه با نمونه اولیه بکار برده در IVF بود. یکی از مزیت های استفاده از نمونه اسپرم اولیه برای این مرکز، عدم لزوم مراجعه مجدد بیمار جهت دادن نمونه مجدد منی بود، اگر چه در این مطالعه باروری غیر طبیعی بررسی نشده است ولی مطالعات اخیر بیان کننده این موضوع می باشد، که میزان باروری غیر طبیعی (هاپلوئیدی، آنوپلوئیدی، تری پلوئیدی) با مسن شدن تخمک افزایش می یابد (۹ و ۱۴). برای مثال مشخص شده است که میزان 3PN بدنبال ICSI در تخمک تازه ۵٪ (۱۵) تخمک ۱ روزه ۲۵-۲۰٪ (۱۶) و تخمک ۲ روزه تا ۴۰٪ افزایش می یابد. همچنین کاریوتایپ از ۱۰ جنین ناشی از ICSI تأخیری نشان داد که ۵ تا از آنها غیر طبیعی (3PN) می باشند (۱۱) که بیان کننده این موضوع می تواند باشد که مسن شدن تخمک سبب اختلال دوک میوزی و میکرو فیلامنت ها شده که منجر به اختلال اختصاصی در خروج دومین گویچه قطبی و اختلالات کروموزومی می شود. اگر چه میزان باروری (۸۰/۴٪ در تخمک های یک روزه و ۶۶/۶٪ در تخمک ها دو روزه) تقسیم سلولی (۸۱٪ در تخمک یک روزه و ۷۳٪ در تخمک های دو روزه) در این مطالعه و مطالعات دیگر بالا می باشد. ولی میزان حاملگی بسیار پایین می باشد. که این میتواند به دلیل درصد بالای اختلالات

سیتوزنتیکی در این جنین‌ها افزایش می‌یابد، بهتر است تشخیص ژنتیکی قبل از تولد در حاملگی‌های ناشی از ICSI تأخیری انجام شود.

استفاده می‌کنند این روش می‌تواند پیش‌آگهی ICSI روی تخمک‌های تازه در سیکل‌های بعدی را مشخص نماید.

نتیجه

نتیجه نهایی اینکه دلایل موجود حاکی از آن است که ICSI تأخیری یکی از راه‌های نجات اختلال باروری کامل یا نزدیک به کامل در سیکل‌های IVF می‌باشد. این روش باید در مواردی که بنظر نمی‌رسد کیفیت تخمک عامل اختلال باروری می‌باشد در اولین فرصت بعد از تأیید عدم باروری بدنبال IVF انجام شود. از آنجائیکه از نظر تئوریک پتانسیل خطر اختلالات

تقدیر و تشکر

از همکاران محترم گروه جنین‌شناسی و آزمایشگاه جنین‌شناسی و همچنین همکاران محترم اتاق عمل پژوهشکده رویان بواسطه همکاری در انجام این تحقیق و از سرکار محترم خانم دکتر اشرف معینی و سرکار محترم خانم صادقی بواسطه پی‌گیری مراحل حاملگی و زایمان و تولد نوزاد، تقدیر می‌گردد.

Reference:

- World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, third edition. New York: Cambridge University Press. 1992, 3-15, 27-8.
- Kruger TF, Coetzee K. The role of sperm morphology in assisted reproduction. Hum Reprod Update. 1999 5(2):172-8.
- Trounson A, Webb J. Fertilization of human oocytes following reinsemination *in vitro*. Fertil Steril. 1984, 41(6):816-9.
- Pampiglione JS, Mills C, Campbell S, et al. The clinical outcome of reinsemination of human oocytes fertilized *in vitro*. Fertil Steril. 1990, 53(2):306-10.
- Malter H, Talansky B, Gordon J, et al. Cohen J. Monospermy and polyspermy after partial zona dissection of reinseminated human oocytes. Gamete Res. 1989, 23(4):377-86.
- Imocdcmbc DAG, Ligue AB. The influence of subzonal microinsemination of oocytes failing to fertilize in scheduled routine *in vitro* fertilization cycles. Hum Reprod 1994, 51:139-48.
- Tsirigotis M, Nicholson N, Taranissi M, et al. Late intracytoplasmic sperm injection in unexpected failed fertilization *in vitro*: diagnostic or therapeutic? Fertil Steril. 1995, 63(4):816-9.
- Yuzpe AA, Liu Z, Fluker MR, et al. Rescue intracytoplasmic sperm injection (ICSI)-salvaging *in vitro* fertilization (IVF) cycles after total or near-total fertilization failure. Fertil Steril. 2000, 73(6):1115-9.
- Morton PC, Yoder CS, Tucker MJ, et al. Reinsemination by intracytoplasmic sperm injection of 1-day-old oocytes after complete conventional fertilization failure. Fertil Steril. 1997, 68(3):488-91.
- Boldt J, Howe AM, Butler WJ, et al. The value of oocyte reinsemination in human *in vitro* fertilization. Fertil Steril. 1987, 48(4):617-23.
- Nagy ZP, Staessen C, Liu J, et al. Prospective, auto-controlled study on reinsemination of failed-fertilized oocytes by intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril. 1995, 64(6):1130-5.
- Sjogren A, Lundin K, Hamberger L, et al. Intracytoplasmic sperm injection of 1-day-old oocytes after fertilization failure (letter). Hum Reprod. 1995, 10:947.
- Lundin K, Sjogren A, Hamberger L, et al. Reinsemination of one-day-old oocytes by use of intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril. 1996, 66(1):118-21.
- Bongso A, Fong CY, Ng SC, et al. Fertilization, cleavage, and cytogenetics of 48-hour zona-intact and zona-free human unfertilized oocytes reinseminated with donor sperm. Fertil Steril. 1992, 57(1):129-33.

15. Van Steirteghem A, Nagy Z, Liu J, et al. Verheyen G, Smitz J, Tournaye H, Liebaers I, Devroey P. Intracytoplasmic sperm injection (Review). *Ba Clin Obstet Gynecol.* 1994, 8(1):85-93.
16. Nagy ZP, Joris H, Liu J, et al. Intracytoplasmic single sperm injection of 1-day-old unfertilized human oocytes. *Hum Reprod.* 1993, 8(12):2180-4.
17. Plachot M, de Grouchy J, Junca AM, et al. Chromosome analysis of human oocytes and embryos: does delayed fertilization increase chromosome imbalance? *Hum Reprod.* 1988, 3(1):125-7.
18. Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, et al. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1993, 8(7):1061-6.
19. Tabibzadeh S, Babaknia A. The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion (Review). *Hum Reprod.* 1995, 10(6):1579-602.
20. Benadiva CA, Nulsen J, Siano L, et al. Intracytoplasmic sperm injection overcomes previous fertilization failure with conventional *in vitro* fertilization. *Fertil Steril.* 1999, 72(6): 1041-4.