

بررسی عوامل موثر بر درمان ناباروری به کمک انجماد جنین

علیرضا رضائی M.D.*، محمد خبازیان M.D.*، سید فواد احمدی M.D.**، سیده‌هدی احمدی M.D.***
شهناز رضوی Ph.D.****، محمد حسین نصر اصفهانی Ph.D.*****

* دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی

** دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی

*** مرکز باروری و ناباروری اصفهان

**** گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

***** گروه جنین‌شناسی پژوهشکده رویان اصفهان و مرکز باروری و ناباروری اصفهان

وصول: فروردین ۸۵، پذیرش: خردادماه ۸۵

چکیده

هدف: بررسی عوامل موثر بر درمان ناباروری به کمک روش انجماد جنین است.

مواد و روشها: این مطالعه از نوع مورد-شاهدی است و در مرکز باروری و ناباروری اصفهان انجام شده است. روش نمونه‌گیری آن سرشماری تمام زوجهای نابارور دارای انجماد جنین و حجم نمونه آن هفتصد مورد است. داده‌ها از پرونده‌های انجماد جنین IVF و ICSI این مرکز مربوط به تیرماه ۱۳۷۹ الی خردادماه ۱۳۸۲ جمع‌آوری و با استفاده از نرم افزار SPSS 11 آنالیز آماری شده است.

یافته‌ها: عوامل موثر بر میزان باروری پس از انجماد عبارتند از: تعداد جنینهای هفت تا هشت سلولی با بقای بیش از هفتاد و پنج درصد (دارای بیشترین تاثیر)، نسبت جنینهای ذوب شده با بقای بیش از هفتاد و پنج درصد به کل جنینهای ذوب شده، تعداد جنینهای منجمد شده، ضریب بقا - مرحله تسهیم، ضریب بقای جنینهای ذوب شده. همچنین عوامل موثر بر تعداد جنینهای هفت تا هشت سلولی با بقای بیش از هفتاد و پنج درصد عبارتند از تعداد جنینهای هفت تا هشت سلولی با ضریب سه قبل از انجماد، ضریب مرحله تسهیم جنینها قبل از انجماد، ضریب کیفیت جنینها قبل از انجماد، تعداد جنینها در روز سوم، تعداد تخمک گرفته شده و سن مادر که دارای ارتباط معکوس است.

نتیجه‌گیری: بالا رفتن میزان بقا و تعداد جنینهای ذوب شده، شانس درمان ناباروری را با استفاده از انجماد جنین افزایش می‌دهد. در این میان جنینهای هفت تا هشت سلولی با بقای بیش از هفتاد و پنج درصد، بیشترین کمک را به درمان می‌نمایند. همچنین، ارتقای عوامل قبل از انجماد مانند تعداد تخمک گرفته شده، تعداد و کیفیت جنینهای حاصل منجر به افزایش میزان بقا و تعداد جنینهای ذوب شده می‌شود و از این طریق درمان ناباروری را با استفاده از انجماد جنین بهبود می‌بخشد.

کلیدواژه‌ها: انجماد جنین، IVF، ICSI، باروری

✉ آدرس مکاتبه: تهران، پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی
صندوق پستی: ۱۹۳۹۵-۴۶۴۴ E-mail: mh_nasr@med.mui.ac.ir

مقدمه

از زمان تولد اولین نوزاد توسط روش کمک باروری روشهای نوین باروری در سال ۱۹۷۸ میلادی افق جدیدی برای درمان نازایی با علت زنانه باز شد و ابداع روش ICSI در سال ۱۹۹۱ میلادی نیز باعث انقلابی در درمان نازایی به علت مردانه شد [۱ و ۲]. مسائل مرتبط با سلامت این روشها که نگرانی عمده محققین را به همراه داشت، در مطالعات متعدد از دیدگاههای مختلف بررسی قرار شد [۳-۵].

از بیش از یک دهه قبل، انجماد جنینهای اضافی به دست آمده در روشهای کمک باروری برای حل برخی از مشکلات این روشهای مطرح شد. این جنینها در صورت عدم بارداری ذوب شده و در سیکلهای بعدی مورد استفاده قرار می گیرند. ایجاد جنین امروزه با توجه به فواید آن مانند کاهش ریسک تحریک بیش از حد دارویی تخمدان، بارداریهای چندقلویی و در نهایت افزایش تجمعی احتمال باروری آنها به عنوان جزء لاینفک روشهای کمک باروری محسوب می شود [۶-۸]. از آنجاکه موفقیت روشهای کمک باروری تحت تأثیر عوامل مختلفی است، در این مطالعه به مقایسه نتایج انتقال جنینهای تازه در مقابل جنینهای منجمد شده حاصل از IVF و ICSI که در مرکز باروری و ناباروری اصفهان انجام شده پرداخته شد تا عوامل موثر بر باروری جنینهای منجمد و ذوب شده تعیین شود و بتوان با دید بهتری به درمان بیماران پرداخت. با توجه به آنکه فاکتورهای مانند پروتکلهای انجماد و ذوب و یا رژیمهای آماده سازی اندومتر قبل از انتقال جنین بر موفقیت باروری حاصل از جنینهای منجمد و ذوب شده موثر است، [۹]. بنابراین در این مطالعه آماده سازی رحم و روش انجماد و ذوب برای همه بیماران به صورت یکسان صورت گرفته است.

مواد و روشها

روش مطالعه

این مطالعه یک مطالعه گذشته نگر است و به صورت مورد شاهدهی و روی هفتصد زوج نابارور که از تیرماه ۱۳۷۹ تا

خرداد ماه ۱۳۸۲ در مرکز باروری و ناباروری اصفهان تحت درمان ART بوده اند، انجام گرفته است.

تحریک تخمدان

در این مطالعه تحریک رشد فولیکولهای تخمدان با تجویز آگونیست GnRH (Gonadotropin releasing hormone) و HMG (Human meapusal gonadotropin) صورت گرفت که با حداقل دوز دو آمپول Menogon (Ferring/Germany) یا Oregonen (Humogon/Netherlands) آغاز شد. در ادامه درمان پس از ارزیابی رشد فولیکولها توسط سونوگرافی ترانس واژینال^۱ بیماران ده هزار واحد HCG (Orgonen/Netherlands) (Human chronic gonadotropin) دریافت کردند. اووسیستها ۳۶-۳۲ ساعت بعد با هدایت TVS جمع آوری شدند. پس از جمع آوری تخمکها و انجام IVF یا ICSI، سه تا چهار جنین مناسب به بیماران منتقل و جنینهای اضافی منجمد شدند.

آماده سازی اندومتر بیماران برای دریافت جنین

حاصل از انجماد

بیمار ابتدا تحت درمان با RHGn Agonist (Superfact/Netherlands) به میزان یک میلی گرم در روز از میانه فاز لوتئال قرار می گیرد که این مقدار با شروع دوره قاعدگی به نیم میلی گرم در روز رسید تا فعالیت هیپوفیز متوقف شود. سپس به بیمار روزانه به ترتیب چهار، شش، هشت میلی گرم استروژن والرات برای چهار، چهار و پنج روز داده شد. ضخامت اندومتر بیمار در روز سیزدهم با سونوگرافی واژینال مشخص می شود و در صورتی که ضخامت آن بیش از هشت میلی متر باشد درمان با استروژن با مقدار شش میلی گرم روزانه به همراه پروژسترون (پنجاه

1. TVS: Trans Vaginal Sonography

رسیدند. سرانجام با سرعت منفی ده درجه سانتی گراد جنینها سرد شدند تا به دمای منفی یکصد و هشتاد درجه سانتی گراد رسیدند. در این زمان جنینها مستقیماً به داخل ازت مایع انتقال داده شدند و تا زمان ذوب در آنجا نگهداری شدند.

برای ذوب، ابتدا نی انجمادی به مدت چهل ثانیه در دمای آزمایشگاه نگهداری و سپس به مدت یک دقیقه در آب سی درجه سانتی گراد قرار داده شد. در مرحله بعد جنینها از نی خارج و به ترتیب به مدت پنج دقیقه در محیط PBS + پروپاندیول یک مولار + ساکاروز دو دهم مولار + سرم آلبومین انسانی ده درصد + Pbs + پروپاندیول نیم مولار + ساکاروز دو دهم مولار + سرم آلبومین انسانی ده درصد ساکاروز دو دهم مولار قرار گرفتند. در پایان جنینها در محیط GI شستشو داده شده و در همان محیط تا زمان انتقال در زیر روغن نگهداری شدند. در زمان انتقال مرحله تسهیم و میزان بقای جنینها بررسی شد و در صورتی که حداقل یک جنین با کیفیت مناسب وجود داشت؛ انتقال جنین به رحم بیمار انجام شد.

عواملی که در این مطالعه بررسی شده‌اند، عبارتند از: باروری پس از انجماد، مدت زمان انجماد، تعداد جنینهای منجمد شده در هر سیکل، تعداد جنینهای ذوب شده در هر سیکل، جنینهای ذوب شده بر اساس مرحله تسهیم و در صد بقاء (که در دوازده دسته جای گرفتند: چهار تا شش سلولی، هفت تا هشت سلولی، نه سلولی و بیشتر با بقاء صفر تا بیست و پنج درصد، بیست و پنج تا پنجاه درصد، پنجاه درصد تا هفتاد و پنج درصد و هفتاد و پنج تا صد درصد)، نسبت جنینهای ذوب شده با بقا بیش از هفتاد و پنج درصد سلولها به کل جنینهای ذوب شده، نسبت جنینهای ذوب شده با بقاء کمتر از بیست و پنج درصد سلولها به کل جنینهای ذوب شده، سن مادر، تعداد تخمک گرفته شده، روش لقاح (IVF یا ICSI)، تعداد جنینها در روز دوم و سوم، جنینها قبل از انجماد بر اساس مرحله تسهیم و کیفیت (در نه دسته جای گرفتند: چهار تا شش سلولی، هفت تا هشت سلولی، نه سلولی و

میلی گرم دو بار در روز) ادامه پیدامی کند. پس از تزریق دو تا سه روز پروژسترون، بیمار برای انتقال جنین حاصل از انجماد به مرکز باروری و ناباروری مراجعه کرد.

روش انجماد و ذوب

انجماد روی جنینهای روز سوم و در مرحله هشت تا شانزده سلولی انجام شد. جنینها قبل و بعد از انجماد بر اساس بلاستومر و قطعات سیتوپلاسمی درجه بندی شدند. بر این اساس برای جنینهای با بلاستومرهای مساوی و فراگماتاسیون کمتر از ده درصد ضریب ۳ جنینهای با سایز بلاستومر مساوی و فراگماتاسیون ده درصد تا پنجاه درصد ضریب دو و جنینهای با سایز بلاستومر مساوی و فراگماتاسیون بیشتر از پنجاه درصد ضریب یک در نظر گرفته شد.

در این مطالعه جنینها بر اساس یک پروتکل انجماد آهسته منجمد شدند [۱۰]. برای انجماد ابتدا جنینها به مدت پنج دقیقه به محیط فسفات بافر (Phosphate buffer saline) (PBS: Gibco/England) انتقال داده شدند و سپس به ترتیب به محیط فسفات بافر حاوی پروپاندیول یک و نیم مولار (Merck/Germany) و محیط فسفات بافر حاوی پروپاندیول یک و نیم مولار و ساکاروز یک دهم مولار انتقال داده شدند. تمام محیطهای فوق حاوی سرم آلبومین انسانی (HSA: Human Serum Albumin, Stockholm Pharmecy) ده درصد بودند. سپس جنینها در نی های با حجم دویست و پنجاه میکرولیتر از دمای آزمایشگاه با سرعت منفی دو درجه سانتی گراد در دقیقه به منفی هفت درجه رسید و در این زمان فرایند القای یخ زدگی^۱ انجام گرفت. پس از پنج دقیقه توقف در این مرحله جنینها با سرعت منفی سه دهم درجه سانتی گراد در دقیقه به دمای منفی سی درجه سانتی گراد

1. Seeding

بیشتر دارای اسکور یک، دو و یا سه)، ضریب بقاء و مرحله تسهیم جنینهای ذوب شده (که مشابه متغیر قبلی است با این تفاوت که علاوه بر درصد بقا تعداد سلولها هم در این ضریب ضرب شده‌اند بدین صورت که جنینهای چهار تا شش سلولی ضریب یک، هفت تا هشت سلولی ضریب دو، نه سلولی و بیشتر ضریب سه گرفتند).

تشخیص بارداری

تشخیص بارداری بر اساس افزایش در غلظت HCG در خون و دو نوبت به فاصله پانزده روز از انتقال جنین صورت گرفت [۱۱].

آنالیز آماری

برای بررسی فاکتورهای موثر بر موفقیت انتقال جنینهای ذوب شده اطلاعات مربوط به سیزده متغیر در مورد هر انتقال جمع آوری و توسط نرم افزار SPSS 11 آنالیز شد.

یافته‌ها

در این مطالعه هفتصد مورد انجماد جنین بررسی شده. بیماران بر حسب اینکه از روش IVF یا ICSI و نیز جنین تازه یا منجمد شده استفاده کرده بودند به چهار دسته کلی تقسیم شدند. از هفتصد مورد انجماد به ترتیب ۲۷۹ و ۴۰۳ مورد

جدول ۱. نتایج انتقال جنینهای تازه و منجمد و ذوب شده حاصل از IVF و ICSI

روش لقاح	انتقال جنین تازه یا ذوب شده	تعداد انتقال	تعداد بارداری	درصد بارداری به ازای هر انتقال	فراوانی تجمعی به ازای انتقال
IVF	تازه	۲۹۷	۷۸	۲۶/۳	۳۳ درصد
	ذوب شده	۱۸۶	۲۰	۱۰/۸	
ICSI	تازه	۴۰۳	۷۹	۱۹/۶	۳۰/۳ درصد
	ذوب شده	۲۴۶	۴۵	۱۸/۳	

جدول ۲. عواملی که به صورت معنی‌دار بر نتایج انتقال جنینهای ذوب شده موثر است

Eta	p.value	بدون بارداری	همراه با بارداری	
۰/۲۴۸	۰/۰۰۰	۰/۹۹	۱/۸۹	میانگین تعداد جنینهای ۷ تا ۸ سلولی با بقای بیش از ۷۵ درصد
۰/۱۴۵	۰/۰۰۳	۰/۲۷	۰/۳۸	میانگین نسبت جنینهای ذوب شده با بقای بیش از ۷۵ درصد به کل جنینهای ذوب شده
۰/۱۱۵	۰/۰۳۸	۶/۶۰	۷/۷۹	میانگین تعداد جنینهای منجمد شده
۰/۱۰۱	۰/۰۲۹	۲/۲۹	۲/۷۵	میانگین ضریب بقا- مرحله تسهیم جنینهای ذوب شده
۰/۱۰۰	۰/۰۳۷	۱/۲۹	۱/۵۲	میانگین ضریب بقا جنینهای ذوب شده

$P < 0.05$ معنی دار محسوب می شود

هشت سلولی با بقای بیش از هفتاد و پنج درصد که بیشترین تاثیر را بر باروری به کمک انجماد جنین دارد و این پارامترها متغیرهای زیر ارتباط آماری معنی دار وجود دارد:

۱: تعداد جنینهای هفت تا هشت سلولی با اسکور سه قبل از انجماد ($P = 0.000$)، ۲: ضریب مرحله تسهیم جنینها قبل از انجماد ($P = 0.001$)، ۳: تعداد جنینها در روز سوم پس از لقاح ($P = 0.000$)، ۴: ضریب کیفیت جنینها قبل از انجماد ($P = 0.006$)، ۵: تعداد تخمک گرفته شده ($P = 0.010$)، ۶: سن مادر ($P = 0.016$) (جدول ۳).

از میان متغیرهای بررسی شده در این مطالعه، متغیرهای زیر با باروری پس از انجماد بیشترین ارتباط را داشتند: میانگین تعداد جنینهای هفت تا هشت سلولی با بقای بیش از ۷۵ درصد ($P = 0.000$)، میانگین نسبت جنینهای ذوب شده با بقای بیش از ۷۵ درصد به کل جنینهای ذوب شده ($P = 0.003$)، میانگین تعداد جنینهای منجمد شده ($P = 0.038$)، میانگین ضریب بقا مرحله تسهیم جنینهای ذوب شده ($P = 0.029$) و میانگین ضریب بقای جنینهای ذوب شده ($P = 0.037$) (جدول ۲). همچنین به کمک آزمون همبستگی و ضریب همبستگی اسپرمن مشخص می شود که بین تعداد جنینهای هفت تا

جدول ۳. عوامل دارای ارتباط آماری معنی دار با تعداد جنینهای ۷ تا ۸ سلولی با بقای بیش از ۷۵ درصد

R	p.value	
۰/۲۴۷	۰/۰۰۰	تعداد جنینهای ۷ تا ۸ سلولی با اسکور ۳ قبل از انجماد
۰/۲۴۱	۰/۰۰۱	ضریب مرحله تسهیم جنینها قبل از انجماد
۰/۱۸۹	۰/۰۰۰	ضریب کیفیت جنینها قبل از انجماد
۰/۱۳۰	۰/۰۰۶	تعداد جنینها در روز سوم بعد از لقاح
۰/۱۲۵	۰/۰۱۰	تعداد تخمک گرفته شده
-۰/۱۱۹	۰/۰۱۶	سن مادر

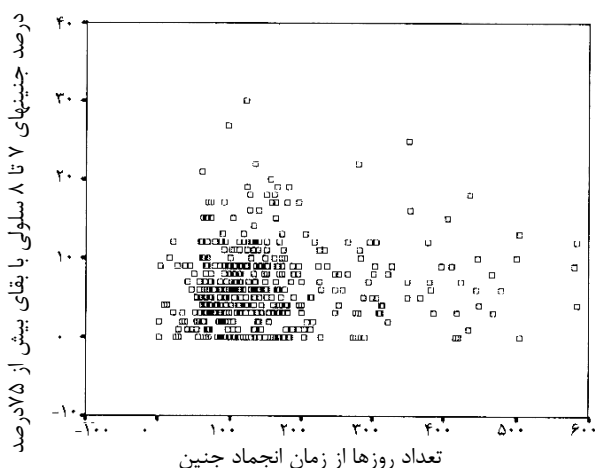
$P < 0.05$ معنی دار محسوب می شود

جدول ۴. پارامترهای بعد از انجماد جنینهای حاصل از IVF و ICSI

Eta	p.value	ICSI	IVF	
۰/۰۷۸	۰/۰۰	۲/۶۱±۰/۳۸	۳/۳۵±۶/۴۳	تعداد جنینهای ذوب شده
۰/۱۰۱	۰/۰۰۰	۱/۶۷±۲/۶۲	۱/۵۶±۲/۰۴	ضریب بقا-مرحله تسهیم
۰/۰۹۳	۰/۰۰۰	۰/۲۸±۰/۳۲	۰/۲۹±۰/۴۲	نسبت جنینهای با بقای کمتر از ۲۵ درصد به کل جنینها
۰/۱۴۵	۰/۰۳۸	۰/۲۸±۰/۳۱	۰/۲۵±۰/۲۶	نسبت جنینهای با بقای بیشتر از ۷۵ درصد به کل جنینها
۰/۲۴۸	۰/۰۲۷	۰/۲۶±۱/۲۱	۱/۴۱±۱/۰۴	تعداد جنینهای ۷ تا ۸ سلولی با بقای بیش از ۷۵ درصد

P<0.05 معنی دار محسوب می شود

گروه تفاوت معنی داری را از خود مشاهده می شود (جدول ۴).



نمودار ۱. ارتباط بین مدت زمان انجماد جنینها و دستیابی به جنینهای ۷ و ۸ سلولی با بقای بیشتر از ۷۵ درصد

بحث

با توجه به مزایای انجماد جنین، این روش امروزه جزء لاینفک روشهای کمک باروری است که توسط مراکز نازایی ارائه می شود [۱۲]. از آنجایی که عوامل متعددی بر میزان باروری و بقای جنینهای منجمد و ذوب شده موثرند در این مطالعه سعی بر روشن سازی این عوامل و نیز بررسی اثر آنها شده است. این اطلاعات از بررسی پرونده بیماران در مرکز باروری و ناباروری اصفهان به دست آمده است. لازم به ذکر

در این مطالعه بین مدت زمان انجماد با درصد باروری پس از انجماد ارتباط معنی داری مشاهده نشد، ولی از آنجایی که بین درصد باروری و تعداد جنینهای هفت تا هشت سلولی با بقای بیش از هفتاد و پنج درصد ارتباط معنی دار و قوی وجود داشت، در این مطالعه رابطه بین مدت زمان انجماد و این پارامتر نیز بررسی شد و اگر چه رابطه معنی داری بین این دو پارامتر مشاهده نشد، ولی روند نمودار Scatterplot (نمودار ۱) این دو متغیر به گونه ای است که به نظر می رسد در صورتی که مدت زمان انجماد از پانصد روز افزایش یابد، شانس دستیابی به جنینهای هفت تا هشت سلولی با بقای بیش از هفتاد و پنج درصد کاهش می یابد. در ضمن در این مطالعه درصد باروری پس از انجماد در بیماران IVF و ICSI مقایسه شد و تفاوت آماری معنی داری بین دو گروه دیده نشد.

اگرچه بررسی پارامترهای قبل از انجماد از جمله تعداد جنینهای منجمد شده، تعداد اووسیت، سن بیمار، ضریب کیفیت جنینها قبل از انجماد و ضریب تسهیم جنینها قبل از انجماد نیز بین دو گروه تفاوت معنی داری را از خود نشان نمی دهد، ولی در بررسی پارامترهای بعد از انجماد جنینهای حاصل از IVF و ICSI در تعداد جنینهای ذوب شده، ضریب بقا-مرحله تسهیم، نسبت جنینهای با بقای کمتر از بیست و پنج درصد به کل جنینها، نسبت جنینهای با بقای بیشتر از هفتاد و پنج درصد به کل جنینها و تعداد جنینهای هفت تا هشت سلولی با بقای بیش از هفتاد و پنج درصد بین این دو

ارتباط مدت زمان انجماد با باروری پس از انجماد و تعداد جنینهای هفت تا هشت سلولی با بقای بیش از درصد از جمله عوامل دیگری است که در این مطالعه بررسی شد. اگر چه در این مطالعه ارتباط معنی داری بین دو فاکتور مشاهده نشد ولی نمودار نشانگر یک روند کاهش در تعداد جنینهای هفت تا هشت سلولی با بقای بیش از هفتاد و پنج درصد پس از حدود پانصد روز انجماد است. مطالعات قبلی نشان داده اند که می توان جنینها را منجمد نمود، بدون اینکه بقا و عملکرد آنها زیاد تحت تاثیر قرار گیرد، به شرط آنکه طی مدت زمان انجماد، جنینها در برابر شوکهای حرارتی قرار نگیرند [۱۶]. در این مطالعه نیز جنینها در داخل تانک ازت به گونه ای نگهداری می شدند، که ورود نی جدید یا خروج نیهای منجمد شده هیچ گونه تاثیری بر جنینهای دیگر نداشت. از آنجایی که نقش روش انجماد جنین در افزایش باروری زنان کمتر از چهل سال که از مشکل ناباروری رنج می برند بارزتر است [۱۴]. به نظر می رسد با شناسایی و کنترل عوامل موثر بر درمان ناباروری به کمک انجماد جنین و در نتیجه افزایش شانس باروری بتوان کمک موثری به این دسته از بیماران کرد.

تقدیر و تشکر

هزینه مطالعه حاضر از محل بودجه های تحقیقاتی پژوهشکده رویان تأمین گردیده است. نویسندگان این تحقیق ضمن درود به روان دکتر سعدی کاظمی آشتیانی از زحمات و حمایت های بی شائبه آقای دکتر حمید گورابی ریاست پژوهشکده رویان و آقای دکتر احمد وثوق معاونت پشتیبانی پژوهشکده قدردانی می نمایند.

Reference

1. Van Steirteghem AC, Liu J, Joris H, Nagy Z, Janssenswillen C, Tournaye H, et al. Higher success rate by intracytoplasmic sperm

است که در این مطالعه روشهای انجماد، آماده سازی رحم، تخمک گیری و تشکیل جنین در تمامی بیماران یکسان بوده است.

نتایج به دست آمده نشان می دهد که از بین عوامل بررسی شده، پنج عامل بر باروری پس از انجماد بیشترین تاثیر را دارند که عبارتند از: ۱- تعداد جنینهای هفت تا هشت سلولی با بقای بیش از هفتاد و پنج درصد، ۲- نسبت جنینهای ذوب شده با بقای بیش از هفتاد و پنج درصد به کل جنینهای ذوب شده، ۳- تعداد جنینهای منجمد شده، ۴- ضریب بقا-مرحله تسهیم، ۵- ضریب بقا. از میان این عوامل بیشترین ارتباط را با باروری پس از انجماد تعداد جنینهای هفت تا هشت سلولی با بقای بیش از هفتاد و پنج درصد داشت که این نتیجه مشابه نتایج پژوهشگران دیگر است. این محققین نیز بیان می نمایند که از عوامل موثر و مهم در بارداری، تعداد جنینهایی است که درصد بقای سلولی بالایی دارند [۱۳].

در این مطالعه ارتباط عوامل دیگر با «تعداد جنینهای هفت تا هشت سلولی با بقای بیش از هفتاد و پنج درصد» بررسی شد و نتایج حاصل نشان می دهد که از بین عوامل بررسی شده عوامل زیر بر این عامل تاثیر دارند: تعداد جنینهای ۷ تا ۸ سلولی با اسکور سه قبل از انجماد، ضریب مرحله تسهیم جنینها قبل از انجماد، ضریب کیفیت جنینها قبل از انجماد، تعداد جنینها در روز سوم، تعداد تخمک گرفته شده و سن مادر که دارای ارتباط معکوس است. در مطالعات مشابه عوامل موثر تعداد تخمک برداشت شده، تعداد جنین، مرحله تسهیم و کیفیت جنین قبل از انجماد ذکر گردیده است. [۹ و ۱۴]. همچنین محققین دیگر نیز بیان می دارند که هر چه سن مادر افزایش یابد شانس لقاح، سرعت تسهیم و کیفیت جنین و بنابراین لانه گزینی و باروری کاهش می یابد [۱۵].

injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. Hum Reprod 1993;

- 8(7):1055-60.
2. **Van Steirteghem A, Bonduelle M, Liebaers I, Devroey P.** Children born after assisted reproductive technology. *Am J Perinatol* 2002; 19(2):59-65.
 3. **Ludwig M, Diedrich K.** Follow-up of children born after assisted reproductive technologies. *Reprod Biomed Online* 2002; 5(3):317-22.
 4. **Hansen M, Kurinczuk JJ, Bower C, Webb S.** The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *N Engl J Med* 2002; 346(10):725-30.
 5. **Hansen M, Bower C, Milne E, de Klerk N, Kurinczuk JJ.** Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects--a systematic review. *Hum Reprod* 2005; 20(2):328-38.
 6. **D'Angelo A, Amso NN.** Embryo freezing for preventing ovarian hyperstimulation syndrome: a Cochrane review. *Hum Reprod* 2002; 17(11):2787-94.
 7. **Schnorr JA, Doviak MJ, Muasher SJ, Jones HW,** Impact of a cryopreservation program on the multiple pregnancy rate associated with assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 2001; 75(1):147-51.
 8. **Wiener-Megnazi Z, Lahav-Baratz S, Rothschild E, Abramovici H, Dirnfeld M.** Impact of cryopreservation and subsequent embryo transfer on the outcome of in vitro fertilization in patients at high risk for ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2002; 78(1):201-03.
 9. **Testart J, Lassalle B, Forman R, Gazengel A, Belaisch-Allart J, Hazout A, et al.** Factors influencing the success rate of human embryo freezing in an in vitro fertilization and embryo transfer program. *Fertil Steril* 1987; 48(1):107-12.
 10. **Menezo Y.** Blastocyst freezing. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 115: 12-5
 11. **Ubaldi F, Rienzi L, Baroni E, Ferrero S, Iacobelli M, Minasi MG, et al.** Cumulative pregnancy rates after transfer of fresh and thawed embryos. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 115: 106-9.
 12. **Kolibianakis EM, Zikopoulos K, Devroey P.** Implantation potential and clinical impact of cryopreservation- A review. *Placenta* 2003; 24:27-33.
 13. **El Toukhy T, Khalaf Y, Al Darazi K, Andritsos V, Taylor A, Braude P.** Effect of blastomere loss on the outcome of frozen embryo replacement cycles. *Fertil Steril* 2003; 79(5): 1106-11.
 14. **Karlstrom PO, Bergh T, Forsberg AS, Sandkvist U, Wikland M.** Prognostic factors for the success rate of embryo freezing. *Hum Reprod* 1997; 12(6):1263-6.
 15. **Tucker MJ, Morton PC, Wright G, Ingargiola PE, Jones AE, Sweitzer CL.** Factors affecting success with

intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7(2):229-36.

16. **Machtinger R, Dor J, Levron J, Mashiach S, Levran D, Seidman DS.** The effect of

prolonged cryopreservation on embryo survival. *Gynecol Endocrinol* 2002; 16(4): 293-8.