

بالغ سازی و لقاح تخمک در شرایط آزمایشگاهی در بیماران مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک بدون تحریک تخمک گذاری

ابوطالب صارمی (M.D.)^۱، مهنز آذرنیا (Ph.D.)^۲، مجتبی دشتی زاد (M.Sc.)^۳.

۱- عضو هیات علمی، گروه زنان و زایمان، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- متخصص زنان و زایمان، فوق تخصص درمان نوین ناباروری، مرکز پزشکی صارم، تهران، ایران.

۳- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم، تهران، ایران.

۴- کارشناس ارشد، بخش تحقیقات و توسعه، مرکز پزشکی صارم، تهران، ایران.

چکیده

تولد فرزند به عنوان یکی از رویدادهای مهم، نقش عمده‌ای در زندگی هر فرد ایفا می‌کند. عدم موفقیت در این امر که به منزله ناباروری است، از مسائل آزاردهنده‌ای است که قریب به ۲۰٪ زوجها با آن دست به گریبانند. این حقیقت را نباید از نظر دور داشت که هنوز در مورد علل ناباروری، نکات مبهم و ناشناخته و مشکلات بسیاری وجود دارد. از جمله این مسائل و مشکلات می‌توان به وجود عارضه تخمدانهای پلی کیستیک (PCO) اشاره کرد. این مطالعه در مورد ارائه روشی است که برای اولین بار در ایران انجام شد و طی آن تخمک‌های افراد مبتلا به سندرم تخمدان پلی کیستیک در شرایط آزمایشگاهی بدون تحریک تخمک گذاری، بالغ شده است. هدف از این مطالعه کاهش بسیاری از خطرات جانبی ناشی از روشهای فعلی تحریک تخمک گذاری نظیر سندرم تحریک بیش از حد تخمدان (OHSS)، آسیت، اختلال در گردش خون، اختلال در عملکرد کلیه، احتمال ترومبوز، چند قلو زایی و ... و نیز کاهش چشمگیر در هزینه‌های درمانی می‌باشد. بدین منظور تخمک‌های نابالغ بدون هیچگونه تحریک تخمک گذاری با کمک سونوگرافی واژینال بوسیله سوزن پونکسیون مخصوص برداشت شدند و روند بالغ سازی آنها به جای بدن در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از محیط کشت کامل، مشتمل بر ترکیبات مورد نیاز بلوغ تخمک انجام شد. سپس با تلقیح تخمک‌های بالغ شده نسبت به تشکیل جنین اقدام گردید. در این مطالعه از تعداد ۵۲ تخمک نابالغ بدست آمده، ۵۱ تخمک برای کشت در محیط IVM در نظر گرفته شد که تمامی آنها (۱۰۰٪) به مرحله متافاز II رسیدند و گوچه قطبی آنها نیز دیده شد. از این تعداد ۴۹ تخمک با اسپرم شوهر تلقیح شدند (ICSI)، که ۳۵ مورد آن (۷۱٪) منجر به تشکیل جنین گشت. با توجه به آمارهای موفقیت آمیزی که در زمینه IVM و حاملگی‌های حاصل از آن منتشر شده است و نیز مزایای این روش و همچنین کاهش چشمگیر در هزینه‌های درمانی، این روش می‌تواند گامی بلند در درمان ناباروری محسوب گردد.

کل واژگان: بالغ سازی، تخمک، بالغ سازی در شرایط آزمایشگاهی، و بدون تحریک تخمک گذاری.

آدرس مکاتبه: دکتر ابوطالب صارمی، مرکز پزشکی صارم، پلاک ۱۹، کوی برنا، خیابان خردمند جنوبی، خیابان کریم خان، تهران، ایران.

پست الکترونیک: sarem@Kanoon.net

مقدمه

«ناباروری حادثه‌ای است که رویدادش محسوس نیست»
 جویدیت دانیلوک(۱)
 فرزندان شدن یکی از رویدادهائی است که نقش عمده‌ای در زندگی هر فرد ایفا می‌کند. عدم موفقیت در این مهم به منزله ناباروری بوده و از مسائل آزاردهنده‌ای است که قریب به ۲۰٪ زوجها با آن دست به گریبانند. ماحصل تمامی تلاشها و مطالعاتی که در زمینه تولیدمثل صورت می‌گیرد، توسعه روشهای تشخیصی و درمانی جدیدی است که می‌تواند در جهت حل مشکل ازدواجهای ناموفق گام برداشته و امید فرزندان شدن را به تمامی زوجهای نابارور نوید دهد. از مواردی که مطالعات زیادی در مورد شناخت علل و درمان آن صورت گرفته است می‌توان به عارضه تخمدان‌های پلی کیستیک اشاره نمود. سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS)^۱ شایعترین علت عدم تخمک گذاری در زنان و یک بیماری هتروژن است که با هیپرآندروژنیسم^۲، عدم تخمک گذاری پایدار^۳، اولیگومنوره^۴ یا آمنوره^۵، افزایش شاخص توده بدنی (BMI)^۶، افزایش سطح LH و تجمع کیست‌های کوچک در تخمدان مشخص می‌شود. زنان مبتلا درصد قابل‌توجهی از مبتلایان به ناباروری را شامل می‌شوند(۲،۳).

سندرم تخمدان پلی کیستیک که اولین بار توسط اشتین و لونتال تحت عنوان سندرم اشتین- لونتال معرفی شد، یکی از شایعترین اختلالات اندوکروینی می‌باشد که هنوز علت خاص و معینی برای آن شناسایی نشده است(۴).

Swanson در سال ۱۹۸۱ یافته‌های سونوگرافی را در PCOS گزارش کرد (۵). تا اینکه در سال ۱۹۸۵

Adams معیارهای تشخیصی دقیقی برای بیماری PCO تعریف نمود و تشخیص PCO بر اساس یافته‌های سونوگرافی مورد پذیرش قرار گرفت(۶). یکی از مشکلات این افراد عدم تخمک گذاری مزمن می‌باشد. در روشهای رایج فعلی برای درمان این افراد از تحریک تخمک گذاری به وسیله کلومیفن سیترات و گونادوتروپین‌ها استفاده می‌شود. باتوجه به تحریک‌پذیری شدید تخمدان‌های این افراد نسبت به گنادوتروپین‌های تزریقی^۷، استفاده از این دارو خطراتی را برای فرد به دنبال خواهد داشت. از جمله می‌توان به خطر بروز سندرم تحریک بیش از حد تخمدان (OHSS)^۸ و آسیت اشاره نمود که حتی می‌تواند منجر به مرگ شود. ترومبوز، نارسایی‌های قلبی و کلیوی، چند قلوژیایی، زایمان زودرس، از جمله خطراتی است که در استفاده از روش‌های فعلی وجود دارد. روش درمانی جدیدی برای حل این مشکل پیشنهاد شده است. یکی از این روشها بالغ‌سازی تخمک در شرایط آزمایشگاهی(IVM)^۹ است. کشف موضوع رشد و بلوغ، تخمک پستانداران در محیط آزمایشگاه برای اولین بار به سال ۱۹۳۵ یعنی زمانی بر می‌گردد که Pincus و Enzamanm نشان دادند تخمک‌های بدست آمده از فولیکولهای بالغ خرگوشهای تحریک نشده می‌توانند به طور خود به خودی در محیط *in vitro* به مرحله بلوغ برسند(۷). این کشف نشان داد که در فاصله زمانی LH Surge و تخمک‌گذاری اتفاقاتی در محیط کشت رخ می‌دهد.

در سال ۱۹۶۵ Edwards این یافته‌ها را تایید نمود(۸) و نتایج را از گونه پستانداران به انسان گسترش داد، ولی بالغ سازی و بارورسازی تخمک‌های نابالغ انسانی به روش کنونی و انتقال جنین حاصل از آن به مادر، چند سالی است که در بعضی از کشورهای جهان به صورت

- 1-Polycystic ovary syndrome
- 2-Hyperandrogenism
- 3-Chronic unovulation
- 4-Oligomenorrhea
- 5-Amenorrhea
- 6-Body Mass Index

7-Exogenous gonadotropin
 8-Ovarian Hyper stimulation Syndrome
 9-In Vitro Maturation

بدنی (BMI)، اختلالات قاعدگی، هیپراندرورژنیسم و نسبت بالای LH به FSH بود (۹، ۱۰). افراد یائسه، مبتلیان به آمنوره ناشی از وزن، بیماری‌های هیپوفیزی، پرولاکتینوما^۳، هیپرپلازی مادرزادی آدرنال (CAH)^۴ و اختلال‌های تیروئیدی و افرادی که شوهر آنها دچار آزواسپرمی بودند از این مطالعه حذف شدند. پس از تشخیص قطعی PCO و PCOS، فرم‌های خاصی در اختیار زوجین قرار گرفت که در آن کلیه اطلاعات، اعم از مزایا و خطرات ناشی از شرکت در این طرح، ذکر شده بود و افراد با امضاء و رضایت کامل، وارد طرح گردیدند. برنامه درمانی: قبل از شروع مطالعه، سطح سرمی هورمون‌های LH و FSH، پرولاکتین، تستوسترون، T₃، T₄، TSH به روش الیزا اندازه‌گیری شد. برای شروع قاعدگی در افراد PCOS که دچار اختلال قاعدگی بودند، ۱۰۰mg پروژسترون تزریق گردید. بعد از شروع سیکل، در روز دوم سیکل برای اطمینان از عدم وجود کیست، سونوگرافی واژینال انجام شد. از روز ششم سیکل به فاصله هر ۴۸ ساعت سونوگرافی صورت گرفت تا فولیکول به قطر ۱۰mm مشاهده گردد (۱۱، ۱۲). سپس یک آمپول HCG حاوی ۱۰۰۰ IU هورمون به بیمار تزریق شد. پس از ۳۶ ساعت بوسیله سوزن‌های پونکسیون مخصوص و با کمک سونوگرافی واژینال، تخلیه فولیکول‌ها آغاز گردید. سوزن پونکسیون مخصوصی که استفاده شد از نوع 17G (K-OPS-1235-Wood, Cook, Australia) بود (۱۳). برای جلوگیری از ایجاد لخته خون در محتوی فولیکولی آسپیره شده، می‌توان به محلول فلاشینگ ۲IU/ml هپارین اضافه نمود (۱۴). مایع فولیکولی حاصله بلافاصله به آزمایشگاه جنین‌شناسی منتقل و نسبت به جدا نمودن تخمک‌های نابالغ اقدام شد. برای جدا نمودن

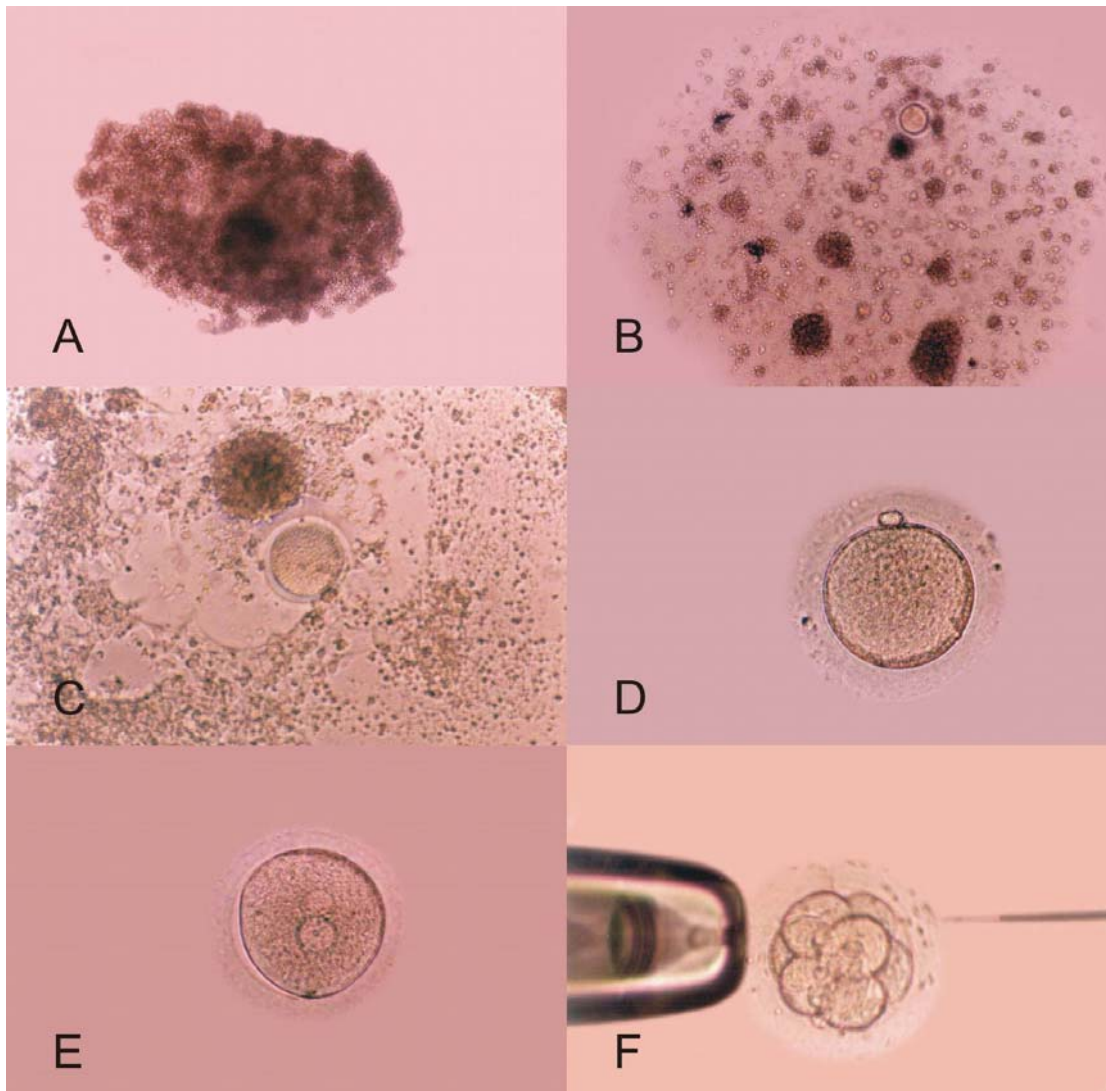
آزمایشی در حال انجام می‌باشد. استفاده از این روش که برای اولین بار در ایران راه‌اندازی شده است برای بیمار و پزشک آسانتر بوده و با دوره درمانی کوتاهتر و کاهش قابل توجه هزینه‌ها همراه است و بیماران بیشتری به آن دسترسی خواهند داشت. بدین طریق خطر بروز دو عارضه بالقوه کوتاه مدت و دراز مدت تحریک تخمک‌گذاری یعنی سندرم تحریک بیش از حد تخمدان و احتمال نئوپلازی و دیگر عوارض ذکر شده بطور کامل برطرف می‌شود و بالاخره، باتوجه به سهولت انجام این عمل، عده بیشتری از زنان خود را برای اهداء تخمک به منظور تحقیقات و یا برای کمک به زوجهای نابارور آماده می‌کنند. در این روش به جای تلاش در جهت رشد فولیکول‌ها در بدن تا مرحله متافاز II، با کمک سوزن پونکسیون مخصوص و با استفاده از سونوگرافی واژینال، تخمک‌های نابالغ به قطر ۱۰-۲mm تخلیه شده، سپس تخمک‌های نابالغ بدست آمده در شرایط آزمایشگاه تا مرحله بلوغ کشت و نگهداری می‌شوند. این روش نوین می‌تواند به عنوان یک روش مناسب به منظور کاهش خطرات درمانی فوق‌الذکر مورد استفاده قرار بگیرد.

مواد و روشها

این مطالعه بر روی ۱۱ بیمار مبتلا به PCO و PCOS در مرکز پزشکی صارم به شکل پیوسته در فاصله خرداد تا مرداد سال ۱۳۸۲ انجام شد. این تحقیق از نوع نیمه تجربی^۱ می‌باشد. معیارهای ورود بیماران PCO به این مطالعه شامل تظاهرات سونوگرافی تخمدان PCO بر طبق معیارهای Adams (۱- وجود حداقل ده کیست به قطر ۸-۲mm در اطراف استرومای مرکزی متراکم به شکل گردنبند^۲-افزایش حجم تخمدان^۳- ضخیم شدن تونیکا)، هیرسوتیسم^۲، افزایش شاخص توده

3-Prolactinoma
4-Congenital Adrenal Hyperplasia

1-Quasi Experimental
2-Hirsutism



شکل ۱- مراحل بالغ‌سازی و لقاح تخمک حاصل از افراد نابارور مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک تحت درمان با روش بالغ‌سازی و لقاح تخمک در شرایط آزمایشگاهی بدون تحریک تخمک‌گذاری مراجعه کننده به مرکز پزشکی صارم (A) تخمک نابالغ برداشت شده قبل از کشت در محیط IVM (B) تخمک بالغ شده ۴۸ ساعت بعد از کشت در محیط IVM (C) تخمک بالغ در بین توده کومولوس (D) تخمک بالغ جدا شده از توده کومولوس اطراف (E) مشاهده پروتوکلوس ۱۲ ساعت بعد از بارورسازی (F) جنین هشت سلولی (به طریق Assisted Hatching در زوناپلوسیدا شکاف ایجاد شده است).

هورمون لوتئینی (LH) (Sigma, USA) 1 IU/ml ،
 انسولین (Sigma, USA) 1 IU/ml ،
 سرم آلبومین انسانی (HAS) 0.4% (Sigma, USA)،
 پنی‌سیلین G (Sigma, USA) 50 IU/ml ،
 استرپتومایسین سولفات و 0.33 mM ،
 پیرووات سدیم (Sigma, USA) می‌باشد. تخمک نابالغ

محتویات خونی از تخمک نابالغ، تخمک چندین بار در محیط TCM-199 شستشو داده شد و سپس هر تخمک به درون قطرات $25 \mu\text{l}$ از محیط IVM منتقل و برای مدت ۴۸-۲۴ ساعت در انکوباتور 37°C و CO_2 ۵٪ انکوبه گردید. محیط IVM شامل TCM-199 (Sigma, USA) 0.075 IU/ml هورمون محرکه فولیکولی (FSH) (Sigma, USA) 0.075 IU/ml

جدول ۱- مقادیر متغیرهای کمی مورد سنجش در ۱۱ بیمار نابارور مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک تحت درمان با روش بالغ‌سازی و لقاح تخمک در شرایط آزمایشگاهی بدون تحریک تخمک‌گذاری مراجعه‌کننده به مرکز پزشکی صارم

متغیر	میانگین - حداقل - حداکثر	M ± SD	حداکثر	حداقل
سن (سال)		۲۷/۰۰ ± ۴/۷۹	۳۹/۰۰	۲۱/۰۰
شاخص توده بدنی (kg/m^2)		۲۷/۳۳ ± ۴/۲۸	۳۴/۴۰	۲۱/۳۵
تخمک‌های بدست آمده (تعداد)		۴/۷۲ ± ۲/۹۰	۱۰/۰۰	۱/۰۰
تخمک‌های کشت داده شده (تعداد)		۴/۶۳ ± ۲/۸۷	۱۰/۰۰	۱/۰۰
تخمک‌های بالغ شده (تعداد)		۴/۶۳ ± ۲/۸۷	۱۰/۰۰	۱/۰۰
تخمک‌های بارور شده (تعداد)		۴/۴۵ ± ۲/۸۴	۱۰/۰۰	۱/۰۰
جنین‌های تقسیم شده (تعداد)		۳/۱۸ ± ۲/۱۳	۷/۰۰	/۰۰
حجم تخمدان (mm^3)		۲۴۰۹۷/۷۲ ± ۱۰۱۸۱/۲۹	۴۷۲۰۳/۰۰	۱۲۹۶۰/۰۰

مجدداً با اضافه کردن ۲ml از محیط فوق به رسوب و مخلوط نمودن آن، با دور ۲۰۰g و برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس مایع رویی را مجدداً تخلیه و ۱-۰/۵ ml محیط IVF (Medi-cult, Denmark) به آرامی به رسوب اسپرم اضافه گردید و لوله برای نیم ساعت در انکوباتور CO₂ قرار داده شد. با برداشتن قسمت رویی محیط کشت که حاوی اسپرم‌های زنده و فعال می‌باشد، این اسپرم‌ها جهت استفاده در روش ICSI مورد استفاده قرار گرفت. تخمک‌های بالغ شده لقاح یافته ۲۴-۴۸ ساعت در قطرات ۲۵ μl محیط IVF کشت و در انکوباتور CO₂ ۵٪ و ۳۷°C نگهداری شد. در این مدت می‌توان مراحل مختلف تشکیل جنین، تشکیل پرونوکلئوس‌های نر و ماده (شکل E-۱) و جنین ۸ سلولی (شکل F-۱) را مشاهده نمود. جنین‌های تشکیل شده را می‌توان بعد از هچینگ^۲ (F-۱) به مادر انتقال داد.

نتایج

در این مطالعه میانگین سنی ۱۱ بیمار مورد بررسی، ۲۷ ± ۱۴/۸ سال بود و به طور متوسط بیش از ۴ تخمک از هر نمونه بدست آمد. سایر متغیرهای مورد بررسی در

دارای توده کومولوس فشرده و متراکمی است که به علت این فشردگی، خود تخمک به طور واضح نمایان نیست (شکل A-۱). بعد از گذشت ۲۴-۴۸ ساعت، از میزان تراکم توده کومولوس اطراف تخمک کاسته شده و با بازشدن کومولوس، تخمک به طور مشخصی نمایان می‌گردد (شکل B-۱ و C-۱). تخمک‌های بالغ با توجه به گستردگی توده کومولوس و وجود گویچه قطبی اولیه قابل تشخیص می‌باشد (۱۵). تخمک‌های نابالغ کشت داده شده بعد از ۲۴-۴۸ ساعت از توده کومولوس اطراف تخمک با کمک آنزیم هیالورونیداز جدا شدند (۱۶) و در صورت بلوغ (آزادشدن گویچه قطبی) (شکل D-۱ و C-۱) با اسپرم شوهر از طریق تکنیک تزریق سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI)^۱ بارور گردید. برای آماده‌سازی اسپرم با روش swim up بدین صورت عمل شد که پس از مایع شدن سیمین در مدت ۳۰-۱۵ دقیقه، مقداری از آن را در یک لوله آزمایش ریخته و به ازاء هر میلی لیتر، ۲ml محیط شستشوی اسپرم (Medi-cult, Denmark) به آن اضافه و به آرامی مخلوط شد. نمونه به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۰۰g سانتریفوژ گردید و بلافاصله مایع رویی دور ریخته و

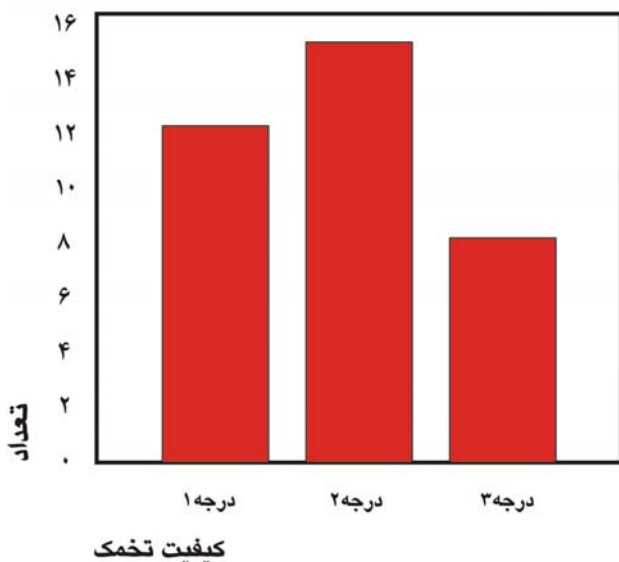
2-Hatching

1-Intracytoplasmic sperm Injection

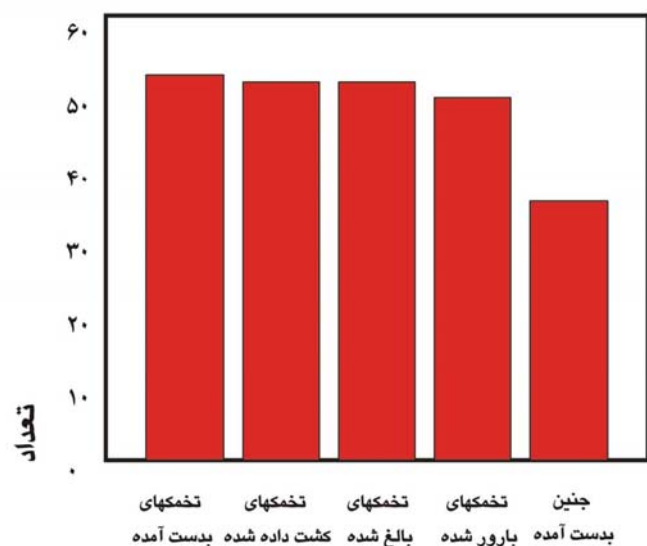
جدول شماره ۱ آمده است.

نمودار ۱ نشان می‌دهد که از تعداد ۵۲ تخمک نابالغ به دست آمده از نمونه‌ها تعداد ۵۱ تخمک برای کشت در محیط IVM در نظر گرفته شد که خوشبختانه تمامی تخمک‌ها به مرحله متافاز II رسیدند و گویچه قطبی آنها نیز دیده شد (۱۰۰٪ موارد). از تعداد ۵۲ تخمک بالغ شده ۴۹ عدد آنها با اسپرم شوهر لقاح یافتند (به روش ICSI) که از این تعداد ۳۵ مورد آن منجر به تشکیل جنین‌گشت (۷۱٪ موفقیت). ناباروری همه افراد مورد مطالعه از نوع اولیه بود. ۸/۸۱٪ بیماران دچار اولیگو منوره، ۹/۱٪ افراد دچار آمنوره و ۹/۱٪ نیز دچار پلی منوره بودند. آکنه در ۴/۳۶٪ از بیماران دیده شد. نمودار شماره ۲، کیفیت جنین‌های حاصل را نشان می‌دهد. همانگونه که مشاهده می‌شود ۴۳٪ جنین‌ها دارای کیفیت درجه ۲ بودند. نمودار ۳ همبستگی میان حجم تخمدان و BMI را نشان می‌دهد. این همبستگی از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($p < 0.005$) و ضریب همبستگی خطی پیرسون ۰/۷۸

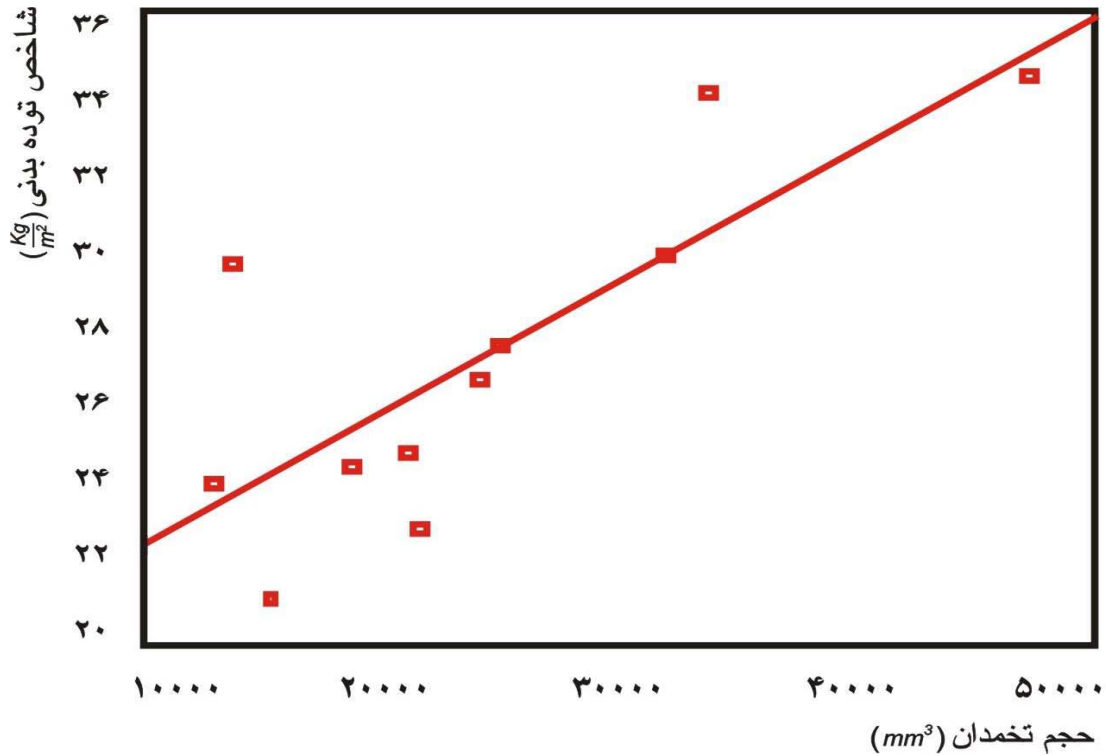
محاسبه گردید. با هدف بررسی ارتباط میان متغیرهایی که به نظر می‌آید بر روی تعداد تخمک به دست آمده و تعداد جنین موثر باشند مدل رگرسیون خطی طراحی گردید. در تجزیه و تحلیل مدل رگرسیون، ابتدا تعداد تخمک به دست آمده به عنوان متغیر وابسته و سن، BMI و حجم تخمدان، به عنوان متغیر مستقل مطرح گردید که ارتباط معنی‌داری چه از لحاظ ارزش بالینی و چه از لحاظ آماری دیده نشد اما در بررسی مدل رگرسیون دوم که در آن تعداد جنین به عنوان متغیر وابسته وارد شد با سن، BMI، حجم تخمدان و تعداد تخمک به دست آمده، به عنوان متغیرهای مستقل، ارتباط معنی‌داری دیده شد ($p < 0.005$). بر اساس این مدل، سن و BMI ارتباطی با تعداد جنین ندارند. اما حجم تخمدان و تعداد تخمک بدست آمده، دارای ارتباط معنی‌داری با تعداد جنین می‌باشد ($P < 0.001$). با توجه به ضرایب β که نشانگر قدرت ارتباط می‌باشد، تعداد تخمک به دست آمده دارای ارتباط بسیار قوی‌تری



نمودار ۲- توزیع فراوانی کیفیت تخمک‌های بدست آمده در ۱۱ بیمار نابارور مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک تحت درمان با روش بالغ‌سازی و لقاح تخمک در شرایط آزمایشگاهی بدون تحریک تخمک‌گذاری مراجعه‌کننده به مرکز پزشکی صارم



نمودار ۱- تعداد تخمک‌های دریافت‌شده، کشت داده شده و ... در ۱۱ بیمار نابارور مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک تحت درمان با روش بالغ‌سازی و لقاح تخمک در شرایط آزمایشگاهی بدون تحریک تخمک‌گذاری مراجعه‌کننده به مرکز پزشکی صارم



نمودار ۳- نمودار پراکنش حجم تخمدان و شاخص توده بدنی (BMI) در ۱۱ بیمار نابارور مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک تحت درمان با روش بالغ‌سازی و لقاح تخمک در شرایط آزمایشگاهی بدون تحریک تخمک‌گذاری مراجعه‌کننده به مرکز پزشکی صارم

پونکسیون کرد و هم در صورت لزوم از طریق لاپاروسکوپی برداشت نمود. جمع‌آوری تخمک از فولیکولهای نابالغ بسیار مشکل است و دیگر نمی‌توان نمای کلاسیک کمپلکس تخمک - کومولوس را به صورت مشخص مشاهده نمود. بجای آن تخمک‌هایی وجود دارند که سلولهای کومولوس و کورونا در اطراف آنها جمع شده و به سختی می‌توان آنها را از غشاء سلولهای گرانولوزا افتراق داد (۱۷). ولی در صورت مهارت کافی می‌توان تخمک‌های نابالغ را بدست آورد (۸، ۱۸).

Trounson جهت سهولت در امر پونکسیون تخمک‌های نابالغ دو تغییر مهم ایجاد نمود: اولاً از سوزن آسپیراسیون جدید با سطح مورب کوتاهتر استفاده کرد

نسبت به حجم تخمدان است. باید توجه داشت که حجم تخمدان با تعداد جنین دارای ارتباط معکوس می‌باشد؛ یعنی هر چه حجم تخمدان بالاتر رود تعداد جنین کاهش می‌یابد. با توجه به تعداد بیمار مورد بررسی، این نتیجه نمی‌تواند مورد استناد قرار گیرد و نیاز به بررسی بیشتر می‌باشد. ضرایب B و همچنین β را در مدل آماری زیر می‌توان مشاهده نمود:

$$+ \text{حجم تخمدان} \times 0.000596 - 20782 = \text{تعداد جنین}$$

$$\text{تعداد تخمک‌های بدست آمده} \times 0.749$$

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که تخمک‌های نابالغ حاصل را هم می‌توان از طریق واژینال با کمک سونوگرافی

و ثانیاً فشار اسپیراسیون را به 80mmHg کاهش داد. در مطالعه حاضر نیز از سوزن 17G (-K-OPS-1235) (Wood, Cook, Australia) طراحی شده برای برداشت تخمک‌های نابالغ، استفاده گردید. مسئله‌ای که باید به آن توجه زیادی شود، دقت در تعیین قطر فولیکول‌های نابالغ در سونوگرافی‌های روز ششم به بعد است. چرا که معمولاً سلول‌های گرانولوزای تخمدان طبیعی تا زمانی که قطر آنها به $9/5\text{mm}$ نرسیده است نمی‌توانند نسبت به FSH پاسخ دهند؛ ولی سلول‌های گرانولوزا در افراد مبتلا به PCOS، حتی فولیکول‌های با قطر 4mm هم نسبت به LH حساس بوده و به آن پاسخ می‌دهند (۱۹). در نتیجه، این امر موجب شروع زودرس وقایعی می‌گردد که بطور طبیعی در میانه سیکل اتفاق می‌افتد و باعث افزایش یا ترشح پروژسترون و توقف رشد فولیکول می‌گردد. فرض براین است که افزایش سطح داخل فولیکولی انسولین توأم با افزایش سطح LH موجب وقوع لوتئینه شدن زودرس فولیکولها می‌گردد. دلایل Almahboobi مبنی بر افزایش اتصال FSH در سلول‌های گرانولوزای PCOS مبتلا به عدم تخمک‌گذاری دلالت بر کسب و ایجاد گیرنده‌های LH در عرض ۴۸ ساعت در محیط کشت دارد (۲۰). واکنش‌های واقعی بین تخمک و سلول‌های گرانولوزا که برای بقا و رشد طبیعی لازم است، اهمیت زیادی در طراحی و کاربرد استراتژی‌های خاص برای بلوغ تخمک در محیط آزمایشگاه (in vitro) دارد. تهیه محیط کشتی که بتواند شرایط لازم برای عمل سلول‌های گرانولوزا را فراهم آورد، برای بلوغ تخمک مناسب خواهد بود. در این مطالعه محیط کشت استفاده شده TCM-199 به همراه هورمون‌های FSH، LH، استرادیول و انسولین بود. تخمک برای انجام تقسیمات میوزی و رسیدن به ظرفیت وپتانسیل‌رشد و تکامل خود، حداقل به هورمون‌های FSH و LH نیازمند است. FSH به عنوان اولین محرک رشد فولیکولی، تبدیل آندروژن به

استروژن را در سلول‌های گرانولوزا توسط آنزیم‌های سیستم آروماتاز تحریک می‌کند. استرادیول در محیط کشت به طور مستقیم با تحریک سنتز پروتئین‌های گیرنده، بر تعداد گیرنده‌ها می‌افزاید. نکته متمایز کننده محیط کشتی که در این مطالعه استفاده شده است وجود انسولین در محیط کشت می‌باشد انسولین نیز حساسیت سلول‌های گرانولوزا را نسبت به FSH افزایش می‌دهد و پاسخ به LH نیز به میزان محسوسی بالا می‌رود. در پاسخ به FSH و انسولین موجود در محیط کشت تعداد زیادی اتصالات سلولی بین سلول‌های کومولوس و همچنین بین سلول‌های کومولوس و تخمک بوجود می‌آید. پس از اینکه این سلولها در معرض مقادیر بالای FSH و LH در محیط *in vitro* قرار گرفتند، لوتئینه شدن کنترل شده سلولها و سیگنال پاراکرین موجب گسسته شدن این ارتباطات شکننده شده و در نتیجه به شروع روند بلوغ هسته‌ای داخل تخمک کمک می‌نماید. باید توجه داشت که افزودن سرم و مایع فولیکولی به محیط انکوباسیون، موجب پرولیفراسیون سلولی و اتصال به سطح سلول می‌شود و در نتیجه منجر به از بین رفتن زودرس ارتباطات بین کومولوس و تخمک شده و پتانسیل بلوغ تخمک را دچار مشکل و اختلال خواهد نمود (۱۴)، که می‌توان به جای آن از نوع مناسب آلبومین (همانند این مطالعه) یا ماکرومولکولهای مناسب فیزیولوژیک مثل هیالورونات استفاده نمود (۲۱). در تحقیقات اولیه که در مورد IVM انسان صورت گرفت، مدت زمان بلوغ، بیش از ۴۸ - ۴۰ ساعت ذکر شده است (۲۲). متعاقب آن، اغلب مطالعات بعدی هم زمان ۴۸ ساعت را ملاک قرار داده‌اند (۲۳).

روش لقاح نیز بر تعداد و کیفیت جنین‌های حاصل از بلوغ آزمایشگاهی تخمک انسان مؤثر می‌باشد. ICSI اثرات مخرب ناشی از کشت طولانی مدت بر روی زوناپلوسیدا را به حداقل می‌رساند (۲۴). کشت طولانی مدت تخمک در غیاب سرم موجب آزاد شدن گرانولهای قشری

به حاملگی و در نهایت تولد نوزاد سالم برسد (۲۷).
 Kamal A. Jaroudi و همکاران در سال ۱۹۹۹ با بدست آوردن ۱۷۱ تخمک نابالغ بدون تحریک تخمک‌گذاری توانست ۱۲۱ عدد آنها (۷۰/۸٪) را به مرحلهٔ متافاز II برساند. ۷۱ عدد (۵۸/۷٪) آن را با روش ICSI بارور نمود که ۵۳ تخمک (۷۴/۶٪)، لقاح یافته و تشکیل جنین دادند از این تعداد ۱۴ جنین (۲۶/۴٪) از نظر کیفیت درجهٔ ۱، ۲۳ جنین (۳۴/۴٪) درجهٔ ۲ و ۱۶ جنین (۳۰/۲٪) درجهٔ ۳ بودند (۲۷). Kwangy.cha و همکاران در سال ۲۰۰۰ توانستند به مجموع ۶۲/۲٪ بلوغ آزمایشگاهی و ۸۸/۱٪ تقسیم جنینی دست یابند (۲۷).
 Timj.drild در سال ۲۰۰۱، ۸۴۹ تخمک نابالغ از افراد PCO بدست آورد که از این تعداد ۷۹۲ تخمک سالم بود و برای بالغ شدن، کشت داده شدند. ۷۳/۹٪ آنها بالغ شد که پس از لقاح منجر به تشکیل ۶۴/۷٪ جنین گشت (۲۷).
 از دیگر نکات قابل توجه، اهمیت اثر حجم محیط انکوباسیون بر جنین می‌باشد. این مسئله که جنین در حجم کم و یا به صورت گروهی بطور مشخصی تشکیل بلاستوسیست داده و نیز تعداد سلولهای بلاستوسیست را افزایش می‌دهد (۲۸)، در چند گونه از پستانداران به اثبات رسیده است. در مطالعهٔ حاضر، جنین‌ها را در قطرات ۲۵ μ l از محیط کشت قرار دادیم. کشت جنین در محیط‌های کوچک قابلیت حیات را پس از انتقال افزایش می‌دهد (۲۹). علت این موضوع ناشی از تولید فاکتورهای اتوکراین یا پاراکراین مخصوصی است که رشد جنین را تحریک نموده و جنین را در همان محیط رشد احاطه می‌کنند. بنابراین کشت جنین در محیط‌های بزرگ موجب رقیق شدن فاکتور و در نتیجه غیر مؤثر بودن آن می‌شود. در دو پستاندار موش و گاو ثابت شده است که کاهش نسبت حجم انکوباسیون به جنین به طور خاصی رشد و تکامل ICM را تحریک می‌کند (۳۰، ۳۱). میزان تقسیم سلولها ارتباط مستقیمی با افزایش شانس حاملگی دارد (۳۲، ۳۳).

زودتر از موعد مقرر و در نتیجه سخت شدن زوناپلوسیدا می‌گردد (۲۵). این امر نه تنها در تلقیح معمولی موجب کاهش لقاح می‌گردد بلکه مانع از هچینگ جنینی می‌شود. مطالعات نشان داده‌است که سخت شدن زونا میزان هچینگ بلاستوسیست را در میمونهای رسوس از ۷۷٪ به ۲۵٪ کاهش می‌دهد. بنابراین انجام هر دو عمل ICSI و هچینگ کمک شده در تمامی جنین‌های حاصل از IVM ضرورت دارد (۲۶). Trounson در سال ۱۹۹۴ با بدست آوردن ۴۰۳ اووسیت نابالغ از بیماران PCO در شرایط بدون تحریک تخمک‌گذاری، موفق شد ۴۶/۴٪ آنها را به مرحلهٔ متافاز II برساند. وی ۷۷٪ این مقدار را بارور نمود که ۶۹/۶٪ آنها منجر به تشکیل جنین گشت (۲۷). Carson در سال ۱۹۹۵ نیز به همین صورت، ۳۶ تخمک نابالغ را بدست آورد و با کشت دادن آنها، توانست ۶۳/۸٪ آنها را به مرحلهٔ متافاز II برساند و از این مقدار ۴۰٪ آنها را بارور نمود که در نتیجه ۵۶٪ از آنها تقسیم و تشکیل جنین دادند (۲۷). Barnea در سال ۱۹۹۵، با بدست آوردن ۵۲ تخمک نابالغ و کشت آنها در محیط IVM توانست ۵۷/۶٪ آنها را به مرحلهٔ بلوغ برساند. از این درصد ۴۳/۳٪ آنها را بارور نمود که ۸۴/۶٪ آنها تقسیم شدند (۲۷). Russell در سال ۱۹۹۵ با بدست آوردن ۱۶۲۱ تخمک نابالغ و کشت آن در محیط IVM، ۵۰/۹٪ آنها را به مرحلهٔ متافاز II رساند و با بارور سازی ۷۴/۳٪ آنها توانست ۵۹٪ تخمک‌های بارور شده را به مرحلهٔ تقسیم جنینی برساند (۲۷). Barnea در سال ۱۹۹۶ با بدست آوردن ۲۳۴ تخمک نابالغ و کشت آنها، ۶۷٪ این تخمک‌ها را به مرحلهٔ متافاز II رساند که ۳۲٪ آنها بارور شده که از این مقدار ۱۹٪ آنها تقسیم شدند (۲۷). Carson در سال ۱۹۹۷، ۱۰۹ تخمک نابالغ را بدون تحریک تخمک‌گذاری بدست آورد که ۵۹/۶٪ آنها بعد از کشت به مرحلهٔ متافاز II رسیدند و از این تعداد ۶۳/۵٪ آنها را بارور نمود که ۷۵/۴٪ آنها به مرحله تقسیم جنینی رسیدند و با انتقال جنین حاصله توانست

بالینی رایج استفاده گردد، می‌تواند یک تحول جدید در درمان ناباروری محسوب گردد. دارد. هنوز خیلی زود است که تمامی مشکلات ناشی از IVM برطرف گردد ولی اگر نتایج حاصل در تحقیقات آینده رضایت‌بخش باشد و IVM به صورت روش بالینی رایج استفاده گردد، می‌تواند یک تحول جدید در درمان ناباروری محسوب گردد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله، نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از کلیه پرسنل محترم مرکز پزشکی صارم که صمیمانه ما را در انجام این طرح یاری رساندند، ابراز می‌دارند.

در جنین‌های حاصل از IVM هم احتمال حاملگی در جنین‌های با سرعت تقسیم بالاتر، بیشتر می‌باشد (۳۴). میزان ناهنجاری میوزی واضح در آن دسته از تخمک‌های انسان که از نظر شکل طبیعی هستند (۱۸٪) (۳۵) مشابه تخمک‌هایی است که در محیط Invivo به بلوغ رسیده‌اند (۲۰٪) و نیز کمتر از تخمک‌هایی است که پس از تحریک تخمک‌گذاری جمع‌آوری شده‌اند (۳۶، ۳۷). بررسی و تحقیقات کامل بر روی اثرات IVM بر تقسیمات میوزی و ناهنجاری‌های کروموزومی ادامه دارد. هنوز خیلی زود است که تمامی مشکلات ناشی از IVM برطرف گردد ولی اگر نتایج حاصل در تحقیقات آینده رضایت‌بخش باشد و IVM به صورت روش

منابع

- 8- Edwards R.G., Bavister B.C., Steptoe P.C. Early stage of fertilization In Vitro of Human oocytes matured In vitro. *Nature*.1969;221:632-5.
- 9- Jacobs H.S. Polycystic Ovaries and Polycystic Ovary Syndrome. *Gyn Endocrinol*.1987;1:113-31.
- 10- Yen S.S.C. The Polycystic Ovary Syndrome. *Clin Endocrinol*.1980;12:177-86.
- 11- Chian R.C., Gulekli B. Pregnancy and delivery after cryopreservation of zygotes produced by in-vitro matured oocytes retrieved from a woman with Polycystic Ovarian Syndrome. *Hum Reprod*.2001;16,8,1700-2001.
- 12- Tim J. In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated normal ovaries, and women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*.2001;76,5:936-41.
- 13- Trounson A., W., C., In vitro maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertil Steril*. 1994;62; (2):353-62.
- 14- Ben-ze'ev A., Amsterdam A. Regulation of cytoskeletal proteins involved in cell contact formation during differentiation of granulosa cells on extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA*.1998;83:2894-8.
- ۱- اسفندیاری نوید. بررسی تاثیر برخی از عوامل ایمونولوژیک و ناباروری با علت نامشخص. پایان نامه دکترای تخصصی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران، ۱۳۷۲-۷۳.
- 2- Frank S. The Polycystic Ovary Syndrome. *N Engl J Med*.1995;333:853-61.
- 3- Futterweit W. Pathophysiology of Polycystic Ovarian Syndrome. Redmond G.P(Editor)., *Androgenic Disorders*. Raven Press, New York. 1995;77-166.
- 4- Balen A.H. The pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome. *Lancet*. 1999;354:966-7.
- 5-Swanson M., Sauerbrie E.E., Cooperberg P.L. Medical implications of ultrasonically detected polycystic ovaries. *J Clin Ultrasound*.1981;9:219-22.
- 6- Adams J., Frank S., Polson D.W., Mason H.D., Abdulwahid N., Jacobs H.S. Multifollicular ovaries: clinical and endocrine features and response to pulsatile gonadotrophin releasing hormone. *Lancet*. 1985;1375-8.
- 7- Pincus G., Enzmann E.V. The comparative behaviour of mammalian eggs in vivo and in vitro. *J Exp Med*. 1935;65:665-75.

- based on follicular size. *Hum Reprod.* 1999; 14(7):18 64-8.
- 28- Wiley L.M., yanami S., Van Muyden D. Effect of potassium concentration, type of protein Supplement and embryo density on mouse preimplantation development in vitro. *Fertil steril.* 1986;45:111-19.
- 29- Lane M., Gardner D.K. Effect of incubation volume and embryo density on the development and viability of Preimplantation mouse embryos in vitro. *Hum Reprod.* 1992;7:558-62.
- 30- Ahern T., Gardner D.K. Culturing bovine embryos in groups Stimulates blastocyst development and cell allocation to the inner cell mass. *Theriogenology.* 1998;49:194.
- 31-Gardner D.K., Lane M.W., Lane M. Development of the inner cell mass in mouse blastocysts is stimulated by reducing the embryo: incubation volume ratio. *Hum Reprod.* 1997; 12: 132.
- 32- Cumming J.M., Breen T.M., Harrison K.L., et al. A formula for scoring human embryo growth rates in invitro fertilization: its value in predicting pregnancy and in comparison with visual estimates of embryo quality. *J In vitro Fertil Embryo Transf.* 1986;3:284-95.
- 33- Bolton V.N., Hawes S.M., Taylor C.T., Parsons J.H. Development of spare human preimplantation embryos in vitro and analysis of the correlations among gross morphology, cleavage rates and development to the blastocyst. *J In vitro Fertil Embryo Transf.* 1989;6:30-5.
- 34- Trounson A.O., wood C., kausche A. In vitro maturation and fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated-polycystic ovarian Patients. *Fertil Steril.* 1994;62: 353-62.
- 35- Racowsky C., kaufman M.L. Nuclear degeneration and meiotic aberrations observed in human oocytes matured in vitro: analysis by light microscopy. *Fertil Steril.* 1992;58:750-5.
- 36- Gras L., McBain J., Trounson A.o., Kola I. The incidence of chromosomal aneuploidy in stimulated and unstimulated (natural) uniseminated human oocytes. *Hum Reprod.* 1992;7:1396-401.
- 37- Delhanty J.D., Harper J.C., Handyside A.H., Winston R.M. Multicolour fish detects frequent chromosomal mosaicisms and chaotic division in normal Preimplantation embryos from fertile patients. *Hum Genet.* 1997;99:755-60.
- 15- Kwang Y., Cha Se., Han Y. Pregnancies and deliveries after in vitro maturation culture followed by in vitro fertilization and embryo transfer without stimulation in women with Polycystic Ovary Syndrome. *Fertil Steril.* 2000;73(5):978-83.
- 16- Cortvrindt R., Smitz J. In vitro follicle growth: Achievements in mammalian species. *Reprod Dom Anim.* 2001;36: 3-9.
- 17- Liu j., Katze., Garcia J.E., et al. Successful In Vitro maturation of human oocytes not exposed to human chorionic gonadotropin during ovulation induction, resulting in Pregnancy. *Fertil Steril.* 1997;67:566-8.
- 18- Barnes F.L., Kausche A., Tiglias J., et al. Production of embryos from in vitro matured primary human Oocyte. *Fertil Steril.* 1996;65: 1151-6.
- 19- Willis D.S., Mason H.D. Premature response to LH of granulose cells from anovulatory women with PCOS: Relevance to mechanism of anovulation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:3984-91.
- 20- Almahboobi G., Anderiesz C. Functional integrity of granulose cells from polycystic ovaries. *Clin Endocrinol.* 1996;44:571-80.
- 21- Gardner D.K., Lane M., Rodriguez-Martinez H. Fetal development after transfer is increased by replacing protein with the glycosaminoglycan hyaluronate for embryo culture. *Hum Reprod.* 1997;12:0-215.
- 22- Regan L., Owen E.J. Hypersecretion of luteinising hormone, infertility and miscarriage. *Lancet.* 1990;336:1141-4.
- 23- Hardy K., Wright C.S. In vitro maturation of oocytes. *Brith Med Bull.* 2000;56(3):588-602.
- 24- Russell J.B., Knezevich K.M., Fabian K.F., Dickson J.A. Unstimulated immature oocyte retrieval: early versus midfollicular endometrial Priming. *Fertil Steril.* 1997;(67):616-20.
- 25- Green D.P.L. Three- dimensional structure of the zona Pellucida. *Rev Reprod.* 1997;2:147-56.
- 26- Schramm R.D., Baoister B.D. Follicle-Stimulating hormone priming of rhesus monkeys enhances meiotic and developmental competence of oocytes matured invitro. *Biol Reprod.* 1994;51 51:904-12.
- 27- Cobo Ana C., Requena A. Maturation in vitro of human oocytes from unstimulated cycles: Selection of the optimal day for ovum retrieval