بالغ سازی و لقاح تخمک در شرایط آزمایشگاهی در بیماران مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک بدون تحریک تخمک‌گذاری

ابوطالب صارمی(M.D.) [۱،۲]، **مهناز آذرنیا (Ph.D.)** [۳]، **مجتبی دشتی‌زاد (M.Sc.)** [۴].

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.

٤- 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 جملهٔ این مسائل و مشکلات می‌توان به وجود عارضهٔ تخمدانهای پلی‌کیستیک (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 پلی‌کیستیک در شرایط آزمایشگاهی بدون تحریک تخمک گذاری، بالغ شده است. هدف از این مطالعه کاهش بسیاری از خطرات جانبی ناشی از روشهای فعلی تحریک‌تخمک‌گذاری نظیرسندرم تحریک بیش از حد تخمدان (OHSS)، آسیت، اختلال در گردش خون، اختلال در عملکرد کلیه ، احتمال ترومبوز ، چند قلوزایی و ... و نیز کاهش چشمگیر در هزینه‌های درمانی می‌باشد . بدین منظور تخمک‌های نابالغ بدون هیچگونه تحریک تخمک گذاری با کمک سونوگرافی واژینال بوسیلهٔ سوزن پونکسیون مخصوص برداشت شدند و روند بالغ‌سازی 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 گویچه قطبی آنها نیز دیده شد . از این تعداد ٤۹ 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.

گل واژگان: بالغ‌سازی، تخمک، بالغ‌سازی در شرایط آزمایشگاهی، و بدون تحریک تخمک‌گذاری.

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

پست الکترونیک: sarem@Kanoon.net

Downloaded from http://www.jri.ir

مقدمه

«ناباروری حادثه‌ای است که رویدادش محسوس نیست»

جودیت دانیلوک(۱)

فرزنددار شدن یکی از رویدادهائی است که نقش عمده‌ای در زندگی هر فرد ایفا می‌کند. عدم موفقیت دراین 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 فرزنددارشدن 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)[1] شایعترین علت عدم تخمک گذاری در زنان و یک بیماری هتروژن است که با هیپرآندروژنیسم[2]، عدم تخمک گذاری پایدار[3]، اولیگومنوره[4] یا آمنوره[5]، افزایش شاخص تودهٔ بدنی (BMI)[6]، افزایش سطحLH و تجمع کیستهای کوچک در تخمدان مشخص می‌شود. زنان مبتلا درصد قابل‌توجهی از مبتلایان به ناباروری را شامل می‌شوند(۳،۲).

سندرم تخمدان پلی کیستیک که اولین بار توسط اشتین و لونتال تحت عنوان سندرم اشتین- لونتال معرفی شد، یکی از شایعترین اختلالات اندوکرینی می‌باشد که هنوز علت خاص و معینی برای آن شناسایی نشده است(٤).

Swanson در سال ۱۹۸۱ یافته‌های سونوگرافی را در PCOS گزارش کرد (٥). 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(٦). 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.باتوجه‌به تحریک‌پذیری شدید تخمدان‌های این افراد نسبت به گنادوتروپین‌های تزریقی[7]، 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)[8] و آسیت اشاره نمود که حتی می‌تواند منجر به مرگ شود. ترومبوز، نارسایی‌های قلبی و کلیوی، چند قلوزایی، 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)[9] 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 ۱۹٦٥ Edwards این یافته‌ها را تایید نمود(۸) و نتایج را از گونهٔ 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

Downloaded from http://www.jri.ir

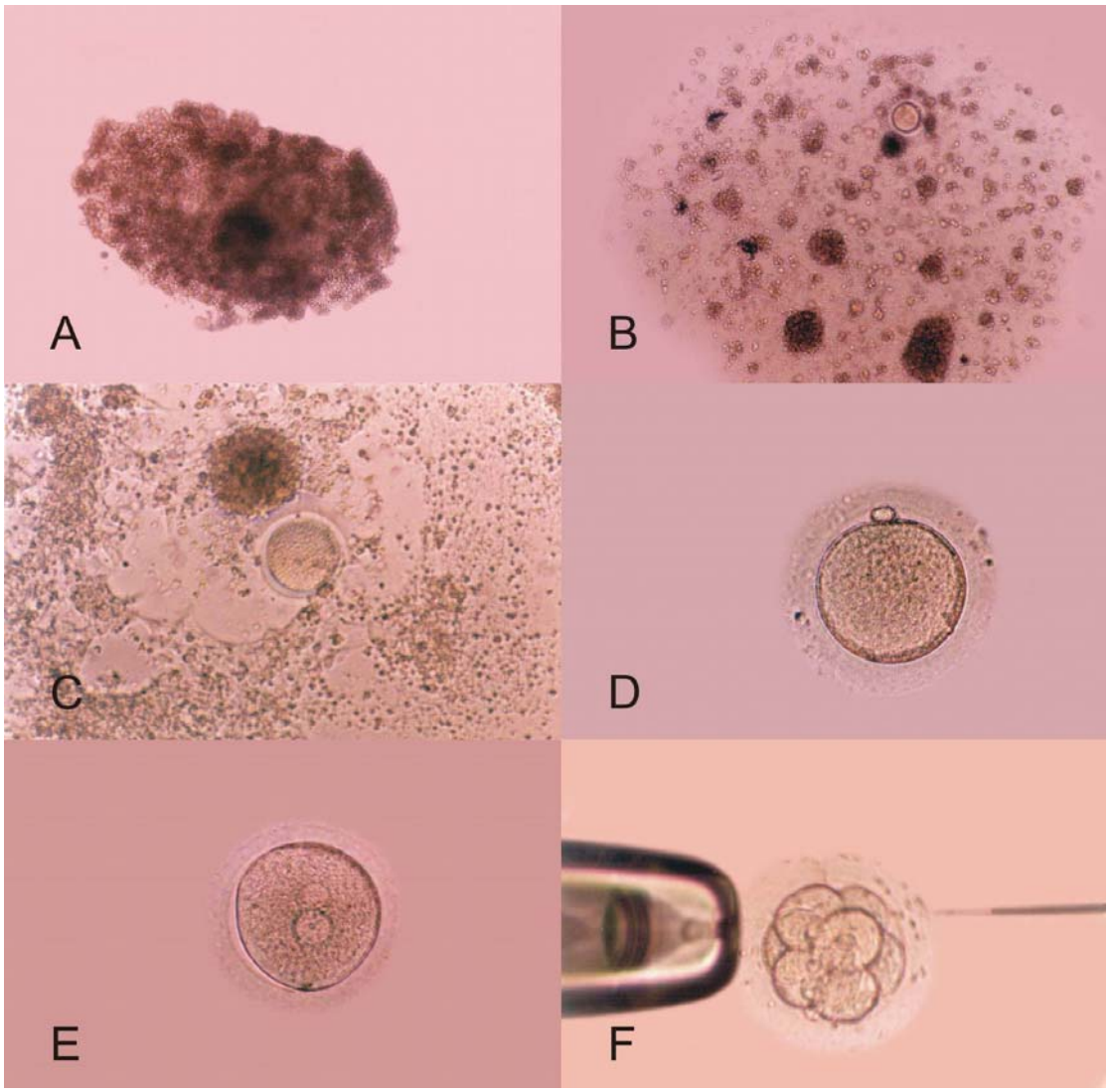
آزمایشی در حال انجام می‌باشد. استفاده از این روش که برای اولین بار در ایران راه‌اندازی شده است برای بیمار و پزشک آسانتر بوده و با دورهٔ درمانی کوتاهتر وکاهش قابل توجه هزینه‌ها همراه است و بیماران بیشتری به آن دسترسی خواهند داشت. بدین طریق خطر بروز دو عارضه بالقوه کوتاه مدت و دراز مدت تحریک تخمک‌گذاری 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، عدهٔ بیشتری از زنان خود را برای اهداء تخمک به منظورتحقیقات و یا برای کمک به زوجهای نابارور آماده می‌کنند. در این روش به‌جای تلاش در جهت رشد فولیکول‌ها در بدن تا مرحلهٔ متافاز II، با کمک سوزن پونکسیون مخصوص و با استفاده از سونوگرافی واژینال، تخمک‌های نابالغ به قطر ۱۰*mm*-۲ 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 فوق‌الذکرمورد 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 سال۱۳۸۲ انجام شد. این تحقیق از نوع نیمه تجربی[1] می‌باشد.معیارهای ورود بیماران PCO به این مطالعه شامل تظاهرات سونوگرافی تخمدان PCO بر طبق معیارهای Adams (۱- وجود حداقل ده کیست به قطر *mm* ۸-۲ در اطراف استرومای مرکزی متراکم به شکل گردنبند۲-افزایش حجم تخمدان ۳- ضخیم شدن تونیکا)،هیرسوتیسم[2]، افزایش شاخص توده بدنی(BMI)، اختلالات قاعدگی، هیپرآندروژنیسم و نسبت بالای LH به FSH بود(۹،۱۰).افراد یائسه، مبتلایان به آمنورهٔ ناشی از وزن، بیماری‌های هیپوفیزی، پرولاکتینوما[3]، هیپرپلازی مادرزادی آدرنال(CAH)[4] و اختلال‌های تیروئیدی و افرادی که شوهر آنها دچار آزواسپرمی بودند از این مطالعه حذف شدند. پس از تشخیص قطعیPCO و PCOS، فرم‌های خاصی در اختیار زوجین قرار گرفت که در آن کلیهٔ اطلاعات ، اعم از مزایا و خطرات ناشی از شرکت در این طرح، ذکرشده 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 ، T_3 ، T_4 ، TSH به روش الایزا اندازه‌گیری شد. برای شروع قاعدگی در افراد PCOS که دچار اختلال قاعدگی بودند، ۱۰۰*mg* پروژسترون تزریق گردید. بعداز شروع سیکل، در روز دوم سیکل برای اطمینان از عدم وجود کیست، سونوگرافی واژینال انجام شد. از روز ششم سیکل به فاصلهٔ هر ٤٨ ساعت سونوگرافی صورت گرفت تا فولیکول به قطر ۱۰*mm* مشاهده گردد(۱۱،۱۲). سپس یک آمپول HCG حاوی ۱۰۰۰۰*IU*هورمون به بیمار تزریق شد. پس از ٣٦ ساعت بوسیله سوزن‌های پونکسیون مخصوص و با کمک سونوگرافی واژینال، تخلیهٔ فولیکول‌ها آغاز گردید. سوزن پونکسیون مخصوصی که استفاده شد از نوع 17G (K-OPS-1235-Wood,Cook,Australia) بود(۱۳). برای جلوگیری از ایجاد لختهٔ خون در محتوی فولیکولی آسپیره شده، می‌توان به محلول فلاشینگ ۲*IU/ml* هپارین اضافه نمود(١٤). مایع فولیکولی حاصله بلافاصله به آزمایشگاه جنین‌شناسی منتقل و نسبت به جدا نمودن تخمک های نابالغ اقدام شد. برای جدا نمودن

1-Quasi Experimental
2-Hirsutism
3-Prolactinoma
4-Congenital Adrenal Hyperplasia

Downloaded from http://www.jri.ir



شکل ۱- مراحل بالغ سازی 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 تودهٔ کومولوس D) تخمک بالغ جدا شده از تودهٔ کومولوس اطراف E) مشاهده پرونوکلئوس ۱۲ ساعت بعد از بارورسازی F) جنین هشت سلولی (به طریق Assisted Hatching در زوناپلوسیدا شکاف ایجاد شده است).

محتویات خونی از تخمک نابالغ، تخمک چندین بار در محیط TCM-199 شستشو داده شد و سپس هر تخمک به درون قطرات ۲۵µl از محیط IVM منتقل و برای مدت ۴۸-۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷° C و CO_2 ۵٪ انکوبه گردید. محیط IVM شامل TCM-199: (Sigma,USA)، ۰/۰۷۵*IU/ml* هورمون محرکه فولیکولی (FSH) (Sigma,USA)، ۰/۰۷۵ *IU/ml* هورمون لوتئینی (LH) (Sigma,USA)، ۱ *IU/ml* انسولین (Sigma,USA)، ۱ *IU/ml* استرادیول (Sigma,USA)، ۰/۴٪ سرم آلبومین انسانی (HAS)[1] (Sigma,USA)، ۵۰ *IU/ml* پنی‌سیلین G (Sigma,USA)، ۵۰ *IU/ml* استرپتومایسین سولفات و ۰/۳۳*mM* پیرووات سدیم (Sigma,USA) می‌باشد. تخمک نابالغ

1-Human Serum Albumin

Downloaded from http://www.jri.ir

جدول ۱- مقادیر متغیرهای کمی مورد سنجش در ۱۱ بیمار نابارور مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک تحت درمان با روش بالغ سازی و لقاح تخمک در شرایط آزمایشگاهی بدون تحریک تخمک‌گزاری مراجعه کننده به مرکز پزشکی صارم

متغیر / میانگین- حداقل- حداکثر	M ± SD	حداکثر	حداقل
سن (سال)	۲۷/۰۰± ٤/۷۹	۳۹/۰۰	۲۱/۰۰
شاخص توده بدنی(kg/m^2)	۲۷/۳۳ ± ٤/۲۸	۳٤/٤۰	۲۱/۳۵
تخمک‌های بدست آمده(تعداد)	٤/۷۲ ± ۲/۹۰	۱۰/۰۰	۱/۰۰
تخمک‌های کشت داده شده(تعداد)	٤/٦۳ ±۲/۸۷	۱۰/۰۰	۱/۰۰
تخمک‌های بالغ شده(تعداد)	٤/٦۳± ۲/۸۷	۱۰/۰۰	۱/۰۰
تخمک‌های بارورشده (تعداد)	٤/٤٥± ۲/۸٤	۱۰/۰۰	۱/۰۰
جنین‌های تقسیم شده (تعداد)	۳/۱۸ ±۲/۱۳	۷/۰۰	/۰۰
حجم تخمدان (mm^3)	۲٤۰۹۷/۷۲ ± ۱۰۱۸۱/۲۹	٤۷۲۰۳/۰۰	۱۲۹٦۰/۰۰

دارای توده کومولوس فشرده و متراکمی است که به علت این فشردگی، خود تخمک به طور واضح نمایان نیست (شکلA-۱). بعد از گذشت ٤۸- ۲٤ ساعت، از میزان تراکم توده کومولوس اطراف تخمک کاسته شده و با بازشدن کومولوس ، تخمک به طور مشخصی نمایان می‌گردد(شکلB-۱وC-۱). تخمک‌های بالغ با توجه به گستردگی تودهٔ کومولوس و وجود گویچه قطبی اولیه قابل تشخیص می‌باشد(۱۵). تخمک‌های نابالغ کشت داده شده بعد از ٤۸-۲٤ ساعت از تودهٔ کومولوس اطراف تخمک با کمک آنزیم هیالورونیداز جدا شدند (۱٦) و در صورت بلوغ (آزادشدن گویچه قطبی) (شکلD-۱وC-۱) با اسپرم شوهر از طریق تکنیک تزریق سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI)[1] بارور گردید. برای آماده‌سازی اسپرم با روش swim up بدین صورت عمل شد که پس از مایع شدن سیمن در مدت ۳۰-۱۵ دقیقه، مقداری ازآن را در یک لوله آزمایش ریخته و به ازاء هرمیلی 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 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 CO_2 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 ٤۸-۲٤ ساعت درقطرات ۲۵ μl محیط IVF کشت و در انکوباتور CO_2 ۵٪ و $37^{\circ}C$ 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 تشکیل‌شده را می‌توان بعد از هچینگ[2] (F-۱) به مادر انتقال داد.

نتایج

در این مطالعه میانگین سنی ۱۱ بیمار مورد بررسی، ۲۷ ±۱٤/۸ سال بود و به طور متوسط بیش از ٤ تخمک از هر نمونه بدست آمد. سایر متغیرهای مورد بررسی در

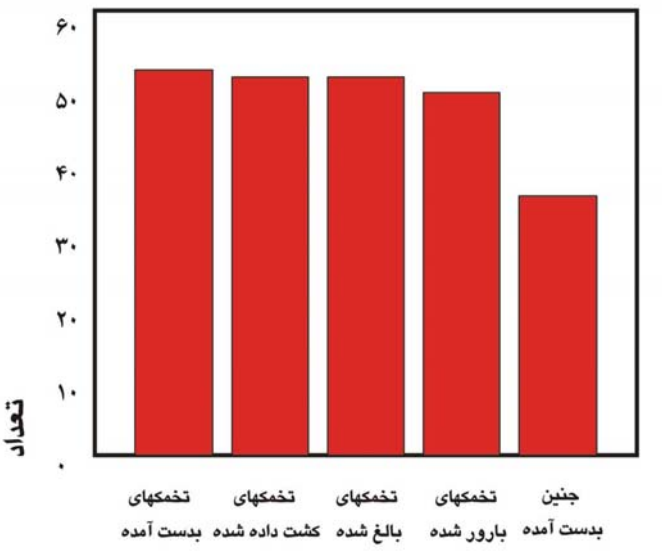
1-Intracytoplasmic sperm Injection

2-Hatching

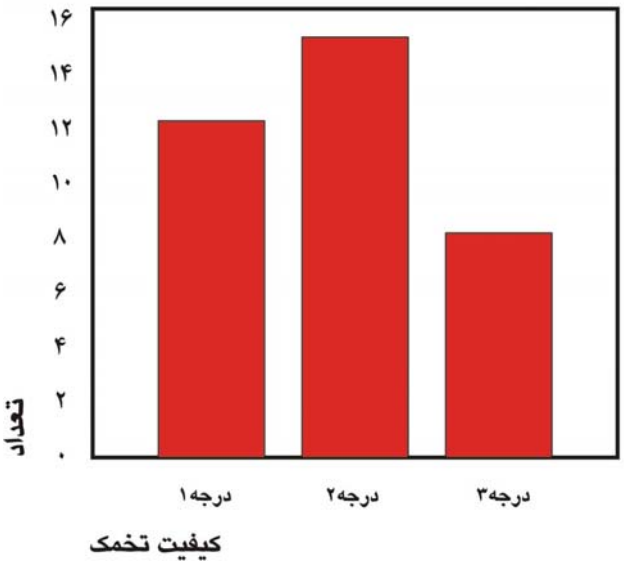
Downloaded from http://www.jri.ir

جدول شمارهٔ ۱ آمده است.

نمودار ۱ نشان می‌دهد که از تعداد ۵۲ تخمک نابالغ به دست آمده از نمونه‌ها تعداد۵۱ تخمک برای کشت در محیط IVM در نظر گرفته شد که خوشبختانه تمامی تخمک‌ها به مرحله متافاز II رسیدند و گویچهٔ قطبی آنها نیز دیده شد(۱۰۰٪ موارد). از تعداد ۵۲ تخمک بالغ شده ٤۹ عدد آنها با اسپرم شوهر لقاح یافتند (به روشICSI) که از این تعداد ۳۵ مورد آن منجر به تشکیل‌جنین‌گشت (۷۱٪موفقیت). ناباروری همهٔ افراد مورد مطالعه از نوع اولیه بود. ۸۱/۸٪ بیماران دچار اولیگومنوره، ۹/۱٪ افراد دچار آمنوره و ۹/۱٪ نیز دچار پلی‌منوره بودند. آکنه در ۳٦/٤٪ از بیماران دیده شد. نمودار شمارهٔ ۲، کیفیت جنین‌های حاصل را نشان‌می‌دهد. همانگونه که مشاهده می‌شود ٤۳٪ جنین‌ها دارای کیفیت درجه ۲ بودند. نمودار۳ همبستگی میان حجم تخمدان وBMI را نشان می‌دهد. این همبستگی از لحاظ آماری معنی‌دار بود (p<۰/۰۰۵) و ضریب همبستگی خطی پیرسون ۰/۷۸ محاسبه گردید. با هدف بررسی ارتباط میان متغیرهایی که به نظر می‌آمد بر روی تعداد تخمک به دست آمده و تعداد جنین موثر باشند مدل رگرسیون خطی طراحی گردید. درتجزیه 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 معنی داری 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 معنی داری دیده شد(p<۰/۰۰۵). 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 <۰/۰۰۰۱). با توجه به ضرایب ß که نشانگر قدرت ارتباط می‌باشد، تعداد تخمک به دست آمده دارای ارتباط بسیار قوی‌تری

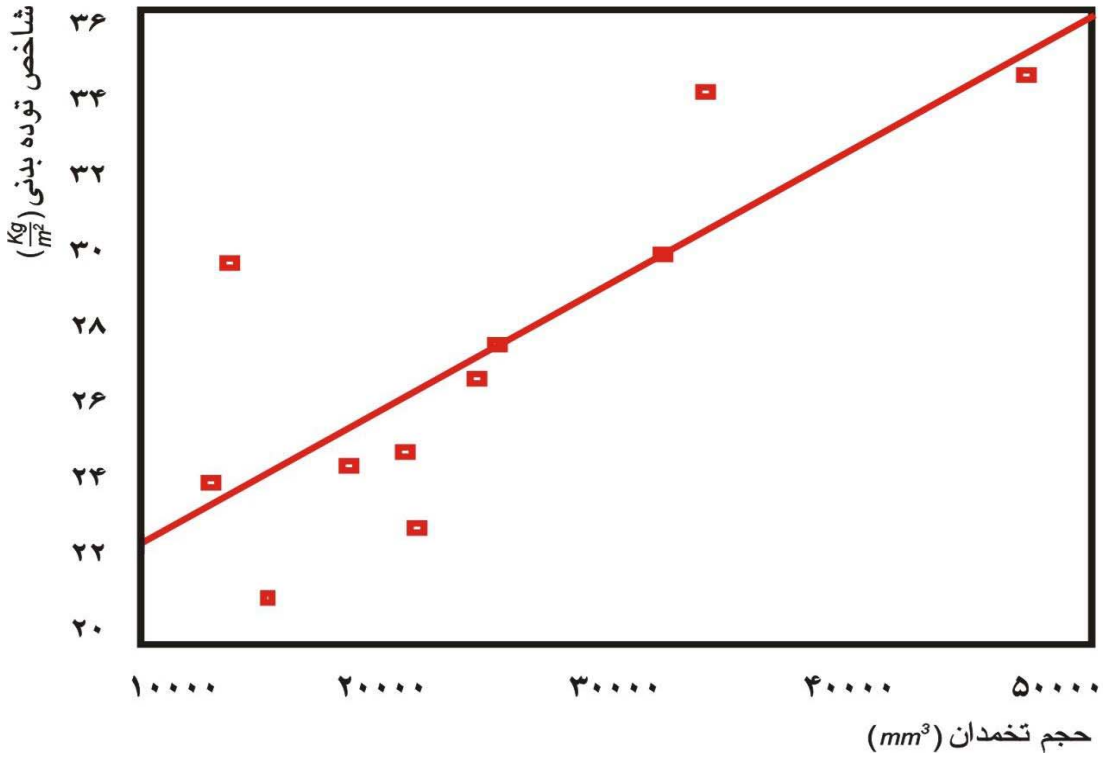


نمودار ۱- تعداد تخمک‌های دریافت‌شده، کشت داده شده و ... در ۱۱ بیمار نابارور مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک تحت درمان با روش بالغ سازی و لقاح تخمک در شرایط آزمایشگاهی بدون تحریک تخمک‌گذاری مراجعه‌کننده به مرکز پزشکی صارم



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

Downloaded from http://www.jri.ir



نمودار۳- نمودار پراکنش حجم تخمدان و شاخص تودهٔ بدنی(BMI) در ۱۱ بیمار نابارور مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک تحت درمان با روش بالغ سازی و لقاح تخمک در شرایط آزمایشگاهی بدون تحریک تخمک‌گذاری مراجعه‌کننده به مرکز پزشکی صارم

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 ß را در مدل آماری زیر می توان مشاهده نمود:

+ حجم تخمدان × ۰/۰۰۰۰۵۹۶- ۲۰۷۸۲- = تعداد جنین

تعداد تخمک‌های بدست آمده × ۰/۷۴۹

بحث

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

Downloaded from http://www.jri.ir

و ثانیاً فشار آسپیراسیون را بـه ۸۰*mmHg* کـاهش داد. در مطالعه حاضر نیـز از سـوزن 17G (K-OPS-1235-Wood,Cook,Australia) طراحی شـده بـرای برداشـت تخمک‌های نابالغ، استفاده گردید. مسئله‌ای که باید به آن توجه زیادی شـود، دقـت در تعیـین قطـر فولیکـول‌هـای نابالغ در سونوگرافی‌های روز ششم به بعد اسـت. چـرا که معمولاً سلول‌های گرانولـوزای تخمـدان طبیعـی تـا زمانی که قطر آنها به۹/۵*mm* نرسیده اسـت نمـی‌تواننـد نسبت به FSH پاسخ دهند؛ ولی سلول‌های گرانولوزا در افراد مبتلا به PCOS، حتی فولیکول‌های با قطـر *mm* ٤ هـم نـسبت بـه LH حـساس بـوده و بـه آن پاسـخ می‌دهند(۱۹). در نتیجه، این امر موجـب شـروع زودرس وقایعی می‌گردد که بطور طبیعی در میانه سـیکل اتفـاق می‌افتد و باعث افزایش یا ترشح پروژسـترون و توقـف رشد فولیکول می‌گردد. فرض بـراین اسـت کـه افـزایش سطح داخل فولیکولی انسولین توأم با افزایش سطح LH موجب وقوع لوتئینه شدن زودرس فولیکولها مـی‌گـردد. دلایل Almahboobi مبنی بـر افـزایش اتـصال FSH در سـلول‌هـای گرانولـوزای PCOS مبـتلا بـه عـدم تخمک‌گذاری دلالت بر کسب و ایجاد گیرنده‌های LH در عرض ٤٨ ساعت در محیط کشت دارد(۲۰). واکنش‌هـای واقعی بین تخمک و سلول‌های گرانولوزا که برای بقـا و رشـد طبیعـی لازم اسـت، اهمیـت زیـادی در طراحـی و کاربرد استراتژی‌های خاص برای بلوغ تخمک در محیط آزمایشگاه (in vitro) دارد. تهیه محیط کشتی که بتوانـد شرایط لازم برای عمل سلول‌هـای گرانولـوزا را فـراهم آورد، بـرای بلـوغ تخمـک مناسـب خواهـد بـود.در ایـن مطالعه محیط کشت استفاده شده TCM-199 بـه همـراه هورمونهـای FSH، LH ، اسـترادیول و انـسولین بود.تخمک برای انجام تقسیمات میـوزی و رسـیدن بـه ظرفیـت وپتانـسیل‌رشـدوتکامل خود،حـداقل بـه هورمون‌های FSH وLH نیازمند اسـت.FSH بـه عنـوان اولـین محـرک رشـد فولیکـولی،تبـدیل آنـدروژن بـه استروژن را در سلول‌های گرانولوزا توسط آنـزیم‌هـای سیستم آروماتاز تحریک می‌کند. اسـترادیول در محـیط کشت به طور مـستقیم بـا تحریـک سـنتز پـروتئین‌هـای گیرنده، بر تعداد گیرنده‌ها می‌افزاید. نکتهٔ متمـایز کننـدهٔ محیط کـشتی کـه در ایـن مطالعـه اسـتفاده شـده اسـت وجود انسولین در محیط کشت مـی‌باشـد انـسولین نیـز حـساسیت سـلول‌هـای گرانولـوزا را نـسبت بـه FSH افزایش می‌دهد و پاسخ به LH نیز به میزان محـسوسی بالا می‌رود. در پاسـخ بـه FSH و انـسولین موجـود در محـیط کـشت تعـداد زیـادی اتـصالات سـلولی بـین سـلول‌هـای کومولـوس و همچنـین بـین سـلول‌هـای کومولوس و تخمک بوجـود مـی‌آیـد. پـس از اینکـه ایـن سلولها در معرض مقادیر بـالای FSH و LH در محـیط in vitro قرار گرفتند، لوتئینه شدن کنترل شدهٔ سلولها و سیگنال پاراکرین موجب گسـسته شـدن ایـن ارتباطـات شکننده شده و در نتیجه به شروع روند بلـوغ هـسته‌ای داخل تخمک کمک می‌نماید. باید توجه داشت که افزودن سرم و مایع فولیکولی بـه محـیط انکوباسـیون، موجـب پرولیفراسیون سلولی و اتصال به سطح سلول می‌شـود و در نتیجه منجر به از بین رفتن زودرس ارتباطات بـین کومولوس و تخمک شده و پتانسیل بلوغ تخمک را دچار مشکل و اختلال خواهد نمود(١٤)، که می‌تـوان بـه جـای آن از نـوع مناسـب آلبـومین (هماننـد ایـن مطالعـه) یـا ماکرومولکولهای مناسب فیزیولوژیک مثـل هیالورونـات استفاده نمود(۲۱). در تحقیقات اولیه که در مورد IVM انسان صورت گرفت، مدت زمان بلوغ، بیش از ٤٨ – ٤٠ ساعت ذکر شده است(۲۲). متعاقـب آن، اغلـب مطالعـات بعدی هم زمان ٤٨ ساعت را ملاک قرار داده‌اند(۲۳).

روش لقاح نیز بر تعداد و کیفیـت جنـین‌هـای حاصـل از بلوغ‌آزمایشگاهی‌تخمک انسان مؤثرمی‌باشد.ICSI اثرات مخرب‌ناشی‌ازکشت‌طولانی‌مدت بر روی زوناپلوسیدا را به حداقل می‌رساند(٢٤). کشت طـولانی مـدت تخمـک‌در غیـاب سـرم موجـب آزادشـدن گرانولهـای قـشری

Downloaded from http://www.jri.ir

زودترازموعدمقرر 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. مطالعات‌نشان‌داده‌است‌که‌سخت‌شدن زونا میزان هچینگ بلاستوسیست را در میمونهای رسوس از ۷۷٪ به ۲۵٪ کاهش‌می‌دهد.بنابراین انجام هر دو عمل ICSI و هچینگ کمک‌شده در تمامی جنین‌های حاصل از IVM ضرورت دارد(۲۶). Trounson در سال ۱۹۹٤ با بدست آوردن ٤۰۳ اووسیت نابالغ از بیماران PCO در شرایط بدون تحریک تخمک‌گذاری، موفق شد ٤٦/٤٪ آنها را به مرحلهٔ متافاز II برساند. وی ۷۷٪ این مقدار را بارور نمود که ٦۹/٦٪ آنها منجر به تشکیل جنین گشت(۲۷). Carson در سال ۱۹۹۵ نیز به همین صورت، ۳٦ تخمک نابالغ را بدست آورد و با کشت دادن آنها، توانست٦۳/۸٪ آنها را به مرحلهٔ متافاز II برساند و از این مقدار ٤۰٪ آنها را بارور نمود که در نتیجه ٥٦٪ از آنها تقسیم و تشکیل جنین دادند(۲۷). Barnea در سال ۱۹۹۵، با بدست آوردن ٥۲ تخمک نابالغ و کشت آنها در محیط IVM توانست ٥۷/٦٪ آنها را به مرحلهٔ بلوغ برساند. از این درصد ٤۳/۳٪ آنها را بارور نمود که ۸٤/٦٪ آنها تقسیم شدند(۲۷). Russell در سال ۱۹۹۵ با بدست آوردن ۱٦۲۱ تخمک نابالغ و کشت آن در محیط IVM ، ٥۰/۹٪ آنها را به مرحلهٔ متافاز II رساند و با بارور سازی ۷٤/۳٪ آنها توانست ٥۹٪ تخمک‌های بارور شده را به مرحلهٔ تقسیم جنینی برساند(۲۷). Barnea در سال ۱۹۹٦ با بدست آوردن ۲۳٤ تخمک نابالغ و کشت آنها، ٦۷٪ 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 تخمک‌گذای بدست آورد که ٥۹/٦٪ آنها بعد از کشت به مرحلهٔ متافاز II رسیدند و از این تعداد ٦۳/٥٪ آنها را بارور نمود که ۷٥/٤٪ آنها به مرحله تقسیم جنینی رسیدند و با انتقال جنین حاصله توانست به حاملگی و در نهایت تولد نوازد 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(٥۸/۷٪) آن را با روش ICSI بارور نمود که ٥۳ تخمک(۷٤/٦٪)، لقاح یافته و تشکیل جنین دادند از این تعداد ۱٤ جنین (۲٦/٤٪) از نظر کیفیت درجهٔ ۱، ۲۳ جنین(۳٤/٤٪) درجهٔ ۲ و ۱٦ جنین(۳۰/۲٪) درجهٔ ۳ بودند(۲۷). Kwangy.cha و همکاران در سال ۲۰۰۰ توانستند به مجموع ٦۲/۲٪ بلوغ آزمایشگاهی و ۸۸/۱٪ تقسیم جنینی دست یابند(۲۷). Timj.drild در سال ۲۰۰۱، ۸٤۹ 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 ٦٤/۷٪ 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 μl ۲٥ 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 اتوکرین یا پاراکرین مخصوصی است که رشد جنین را تحریک نموده و جنین را در همان محیط رشد احاطه می‌کنند. بنابراین کشت جنین در محیط‌های بزرگ موجب رقیق‌شدن فاکتور ودر 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(۳۱،۳۰). میزان تقسیم سلولها ارتباط مستقیمی با افزایش شانس حاملگی دارد(۳۲،۳۳).

Downloaded from http://www.jri.ir

در جنین‌های حاصل از IVM هم احتمال حاملگی در جنین‌های با سرعت تقسیم بالاتر، بیشتر می‌باشد(۳٤). 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(۳٦،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 وIVM به صورت روش 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 وIVM 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.

منابع

۱- اسفندیاری‌نوید.بررسی‌تاثیر برخی از عوامل ایمونولوژیک و ناباروری با علت نامشخص. پایان نامه دکترای تخصصی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی، درمانی تهران، ۷۳-۱۳۷۲.

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 phatogenesis of Polycystic Ovary Syndrome. Lancet. 1999;354:966-7.

5-Swanson M., Sauerbrie E.E., Cooperberg P.L. Medical implications of ultrasonically detec polycyctic 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.

8- Edwards R.G., Bavister B.C., Steptoe P.C. Early stage of fertifization 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 invo lved in cell contact formation during differentiation of granulosa cells on extracellular matrix. Proc Natl Acad Sci USA.1998;83:2894-8.

Downloaded from http://www.jri.ir

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 anovlatory 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 competerce 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
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 growh 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 preimplatntation 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) uninseminated 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.

Downloaded from http://www.jri.ir