ارتباط اختلالات کروموزومی در تخمک‌های بارور نشده و هورمون‌های FSH و LH در سیکل‌های IVF

سیدمهدی کلانتر (Ph.D.)[1]، علی‌اصغر پیله‌وریان (Ph.D.)[2]، سید پیمان مقدسی (M.Sc.)[3]

۱ـ واحد تولید مثل و ژنتیک، مرکز تحقیقاتی ـ درمانی ناباروری دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.

۲ـ دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، مرکز اصفهان، اصفهان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: امروزه تکنیک‌های کمکی تولیدمثل (ART) می‌تواند منجر به تولد نوزاد و کمک به حل مسأله ناباروری گردد. به رغم بهره‌گرفتن از این تکنیکها، در حدود ۱۰ تا ۱۵٪ از تخمکها بارور شده باقی می‌مانند که عدم موفقیت کامل لقاح (TFF) نامیده می‌شود. این مسأله باعث افزایش هزینه‌های زوج نابارور و اتلاف وقت تیم درمانی می‌گردد. هدف این مطالعه بررسی ارتباط بین اختلالات کروموزومی تخمک‌های نابارور و هورمون های زنانه FSH و LH می‌باشد.

روش بررسی: تخمک‌های بارورنشده پس از انجام سیکل‌های درمانی IVF ، طبق روش Tarkowski برای مطالعات کروموزومی آماده شدند و بعد از رنگ‌آمیزی با گیمسا مورد تجزیه و تحلیل کروموزومی قرار گرفتند. برای سنجش هورمون های FSH و LH از تست ELISA استفاده گردید. سپس نتایج با استفاده از آزمون χ^2 و ضریب همبستگی با استفاده از برنامه آماری SPSS بررسی شد. مقدار $p<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج: از مجموع ۵۲ سیکل درمانی تعداد ۳۶۲ تخمک دریافت شد که پس از انجام IVF تعداد ۲۸۵ تخمک بارور گردید و ۷۷ تخمک بارور نشد. با توجه به حذف ۲۶ عدد از تخمک‌های بارور شده تجزیه و تحلیل کروموزومی روی ۵۱ تخمک انجام شد که در ۹ سیکل درمانی ۱۶ تخمک اختلال کروموزومی داشتند. بیشترین اختلالات مربوط به کروموزوم‌های گروه C و کمترین اختلالات مربوط به گروه G در دسته‌بندی استاندارد بود. ارتباط معنی‌داری بین اختلالات کروموزومی، سطح FSH و LH (به ترتیب با میانگین ۸/۱*IU/L* ±۱۶/۲۲ و ۳/۸*IU/L* ±۷/۷۴)، سن و مدت زمان ناباروری بدست نیامد.

نتیجه‌گیری: نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان می‌دهد ارتباط معنی‌داری بین اختلالات کروموزومی تخمک‌های نابارور و فاکتورهای زنانه وجود ندارد. بنابراین به نظر می‌رسد برای مشخص نمودن علت اصلی عدم موفقیت تخمکها در سیکل‌های ناباروری، در صورتیکه در سیکل خاصی اختلالات تخمکی یا هورمون زنانه مرتبط نباشد، سایر فاکتورهای مرتبط از جمله عملکرد اسپرم در فرآیند لقاح باید مدنظر قرار گیرد.

کلید واژگان: اختلالات کروموزومی، هورمون‌های زنانه، ناباروری، لقاح خارج از رحمی، تخمک بارور نشده.

مسئول مکاتبه: دکتر سید مهدی کلانتر، واحد تولید مثل و ژنتیک، مرکز تحقیقاتی ـ درمانی ناباروری یزد، یزد، ایران.

پست الکترونیک: smkalantar@yahoo.com

Downloaded from http://www.jri.ir

زمینه و هدف

۱۰ تا ۱۵٪ زوجها در سنین باروری قادر نیستند که به طور طبیعی صاحب فرزند شوند. با پیشرفت‌های انجام شده در دو دهه اخیر در زمینه طب و بیولوژی تولید مثل و با استفاده از تکنیک‌های کمکی تولید مثل (ART)[1] درصد قابل توجهی از این گروه از بیماران قابل درمان می‌باشند (۱). با استفاده از این تکنیکها میزان موفقیت در سطح باروری بسته به علت اولیه ناباروری تا ۵۰٪ و در سطح لقاح تا ۸۰٪ هم گزارش شده است (۲). با این وجود عدم موفقیت لقاح در تمامی تخمک‌های بدست آمده پس از تلقیح اسپرم در ۱۰ تا ۱۵٪ سیکل‌های درمانی رخ می‌دهد، که به عنوان عدم موفقیت کامل لقاح (TFF)[2] نامیده شده است. این عدم موفقیت باعث تکرار سیکل‌های درمانی و کاهش دست‌یابی به درمان اینگونه زوجها می‌گردد.

عدم باروری کامل تخمکها در یک سیکل درمانی باعث اتلاف وقت و هزینهٔ بیماران و تیم درمانی می‌گردد و یکی از موارد مورد توجه در زمینه درمان ناباروری می‌باشد. مطالعات متعدد بیانگر این مسأله است که هر دوی گامتها در این عدم موفقیت می‌توانند نقش عمده‌ای را داشته باشند؛ از جمله اختلالات شمارشی، مرفولوژی اسپرم، غیرطبیعی بودن DNA اسپرم، عدم توانایی در انجام واکنش‌های آکروزومی و ریز حذف‌های کروموزوم Y را می‌توان نام برد (۸-۳). علاوه بر این، تخمک‌های نابالغ در مرحله وزیکول ژرمینال و تخمک‌های اولیه و یا تخمک‌های در مرحله تخمک ثانویه همراه با اختلالات کروموزومی از دلایل عدم لقاح ذکر شده‌اند (۱۶-۹). ضمن اینکه فاکتورهای محیطی از جمله رادیکال‌های آزاد، نوع داروهای تحریک تخمک‌گذاری، پروتکل‌های درمانی، میزان هورمون‌های مرتبط با تولیدمثل ممکن است به طور مستقیم و یا مرتبط با اختلالات یاد شده بالا باعث عدم موفقیت در لقاح گردد (۱۷). در مطالعهٔ دیگری نیز نشان داده شده است که اختلالات کروموزومی در تخمک‌های بارور نشده قابل توجه بوده و یکی از علل مورد توجه در موارد سیکل‌های درمانی بدون انتقال جنین می‌باشد (۱۸).

با توجه به اینکه سطح سرمی هورمون‌های زنانه می‌تواند یکی از علل عدم لقاح تخمکها در سیکل‌های درمان ناباروری باشد. در این مطالعه سعی گردید تا ارتباط بین اختلالات کروموزومی در تخمک‌های بارور نشده در سیکل‌های درمانی IVF و سطح سرمی هورمون های FSH و LH مورد بررسی قرار گیرند.

روش بررسی

بیماران: خانم‌های وارد این مطالعه شدند که همسران آنها دارای آنالیز اسپرم طبیعی براساس معیارهای ارائه شده WHO (۱۹) نرمال بوده و در مرحله آسپیراسیون حداقل ۳ تخمک بالغ در مرحله تخمک ثانویه بدست آمده و تحت سیکل‌های درمانی IVF بودند. در مجموع ٤٦٢ تخمک از ٥٢ سیکل درمانی بدست آمد که از این تعداد ۷۷ تخمک بارور نگردید. پس از گذشت ۱۸ تا ۲۰ ساعت از تلقیح اولیه اسپرم یا تلقیح مجدد هیچ نشانه‌ای از لقاح دیده نشد، بعنوان تخمک های بارور نشده تلقی و مراحل بعدی برروی آنها انجام گردید. پس از اخذ رضایت از بیماران تخمک‌های بارور نشده جهت انجام مطالعات سیتوژنتیکی مورد استفاده قرار گرفتند.

سیکل درمانی: پروتکل درمانی مرکز (۲۰) برای نمونه‌های مطالعه انجام شد. به طور خلاصه، ۳۵ ساعت بعد از تجویز hCG به کمک دستگاه اولتراسوند تخمکها از مایع فولیکولی جمع‌آوری شدند. تخمکها به محیط کشت Ham's F10 که محتوی آلبومین سرم انسانی (HSA)[3] (Vitrolife, Sweden) ۱۰٪ بود منتقل شدند. تلقیح ٤ تا ٦ ساعت بعد از مجاور ساختن ٥٠٠٠٠

1- Assisted Reproductive Technology
2- Total Fertilization failure
3- Human Serum Albumin

Downloaded from http://www.jri.ir

تا ۱۰۰۰۰۰ اسپرم در میلی‌لیتر که از پلاسمای منی جدا شده بودند انجام گرفت. ۱۸ تا ۲۰ ساعت پس از IVF[1]، با عدم مشاهده دو پیش هسته (2PN) به عنوان تخمک‌های نابارور مجدداً در مجاورت اسپرم قرار داده شد و در صورت عدم مشاهده دو پیش هسته و تائید مجدد عدم موفقیت لقاح، تخمک‌های نابارور جهت آنالیز کروموزومی مورد استفاده قرار گرفتند.

آنالیز کروموزومی: جهت حذف کومولوس‌های اضافی از هیالورونیداز ۰/۱٪ (Sigma, USA) استفاده گردید. سپس بر مبنای روش Tarkowski و همکاران زوناپلوسیدا به کمک عمل پیپت کردن دهانی که به طور مکرر تخمک به داخل و خارج رانده می‌شد، جدا گردید. تمام تخمکها در محلول هیپوتونیک سیترات سدیم ۱٪ برای مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند و سپس با انداختن قطره‌ای از محلول کارنوی که به صورت روزانه تهیه می‌گردید (۳ قسمت اتانول، ۱ قسمت اسید استیک گلاسیال) عمل تثبیت انجام گرفت.

لام‌های حاوی تخمک‌های تثبیت شده، بر روی صفحات گرم‌کننده[2] خشک، به کمک محلول گیمسا رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری (Nikon, Japan) در زیر روغن امرسیون و عدسی ۱۰۰ بررسی می‌شدند.

وضعیت کروموزوم تخمک‌های نابارور با استفاده از پروتکل استاندارد آنالیز کروموزومی (ISCN, 1995) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

میزان هورمون‌های FSH و LH با استفاده از روش ELISA و براساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گردید (Tecan, Switzerland) و میزان هورمون FSH روز سوم در سطح کمتر از ۱۰ واحد، طبیعی تلقی گردید.

نتایج حاصله با استفاده از آزمون χ^2 و رگرسیون با استفاده از برنامه آماری SPSS ویرایش۱۱ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. $p<0.05$ به عنوان سطح معنی‌داری تلقی گردید.

نتایج

از ۳۶۲ تخمک بدست آمده از ۵۲ سیکل درمانی، تعداد ۲۸۵ تخمک پس از مجاورت با اسپرم لقاح یافتند (2PN). در ۷۷ تخمک علائمی از لقاح دیده نشد. تعداد ۲۶ (۳۳٪) تخمک هنگام رنگ‌آمیزی و در حین بررسی گم شدند. از ۵۱ تخمک باقیمانده ۳۶ (۷۰٪) تخمک از نظر کروموزومی هاپلویید بودند و ۱۵ (۳۰٪) تخمک حاصل از ۹ سیکل دارای اختلالات کروموزومی بودند. سن زنان مورد بررسی بین ۱۹ تا ۴۰ سال با میانگین ۳/۱±۲۹/۵ سال بود. همچنین دوران ناباروری از ۱ تا ۲۱ سال با میانگین ۲/۳±۸/۵ سال متفاوت بود.

از میان ۹ سیکل بیمارانی که تخمک‌های آنها دارای اختلالات کروموزومی بود، ۸ تخمک 2n، ٤ تخمک n+1، ۱ تخمک n-1 و ۲ تخمک n+2 بود. یعنی اختلالات کروموزومی ۷ تخمک آنیوپلوییدی[3] بود که اختلال هایپرهاپلوییدی[4] مربوط به ٦ تخمک و هایپوهاپلوییدی[5] مربوط به ۱ تخمک و ۸ تخمک نیز دیپلوییدی[6] بودند.

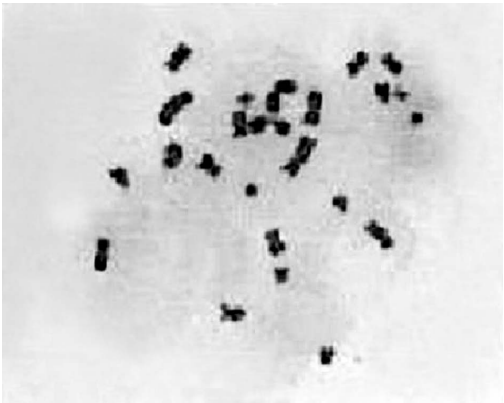
وضعیت اختلالات کروموزومی در ٦ تخمک هایپوهاپلوییدی، به صورت X+C، ۲٤ و X+2C، ۲۵ و X+G، ۲٤ و در تخمک هایپوهاپلوییدی به صورت X-C، ۲۲ و در ۸ تخمک دیپلوییدی، به صورت XX، ٤٦ (G و C مربوط به دسته کروموزومی مربوطه) مشاهده گردید (شکل ۱).

نتایج حاصل از بررسی‌های هورمونی در بین بیماران به صورت زیر بود: بیشترین مقدار FSH در بیماران ۹٦/۹ *IU/L* و کمترین مقدار FSH در بیماران ۰/۵ *IU/L* بود. از میان بیمارانی که تست الایزا در مورد آنها انجام شد، ۲۳ بیمار میزان FSH کمتر از ۱۱ *IU/L* و ۲۰ بیمار

1- In Vitro Fertilization
2- Warming plate

3- Aneuploidy
4- Hyperhaploidy
5- Hypohaploidy
6- Diploidy

Downloaded from http://www.jri.ir



شکل ۱- یک نمونه ازاختلال کروموزومی هیپرهاپلوییدی در تخمک‌های نابارور (با روش Tarkowski)

FSH به میزان بیشتر از *IU/L* ۱۱ داشتند. میانگین FSH، *IU/L* ۸/۱ +۱۶/۲۲ بود. بیشترین مقدار LH در بیماران *IU/L* ۴۰ و کمترین مقدار LH، صفر بود. از میان بیمارانی که تست الایزا در مورد آنها انجام شد، میزان LH در ۲۰ بیمار کمتر از *IU/L* ۲ و در ۱۵ بیمار بیشتر از *IU/L* ۲ بود. میانگین LH، *IU/L* ۳/۸±۷/۷۴ بود و همبستگی معنی‌داری با اختلالات کروموزومی مشاهده نشد.

بحث

تخمک‌های بارورنشده که در سیکل‌های مختلف درمانی ART باقی می‌مانند، ممکن است به دلیل غیرطبیعی بودن هر یک از دو گامت، اسپرم یا تخمک، باشد (۲۳). در بسیاری از مطالعات از روش Tarkowski برای ارزیابی اختلالات کروموزومی تخمک استفاده شده است. اگرچه در این روش تعدادی از تخمکها گم می‌شوند (۹،۱۵).

روش دیگر ثابت کردن مرحله‌ای و خشک کردن با هوا است، که در این روش از پخش‌شدن کروموزومها در خارج از سیتوپلاسم تخمک جلوگیری می‌شود اما در این روش گسترش کروموزومی خوبی تهیه نمی‌شود و تجزیه و تحلیل داده‌ها به سختی صورت می‌گیرد (۲۴).

در مطالعه حاضر که با روش Tarkowski انجام شد میزان اختلالات کروموزومی ۱۹/۴٪ بود که با گزارش‌های قبلی (۲۱/۵٪-۱۹/۵٪) اختلاف معنی‌داری نداشت (۳۰-۲۵). اما میزان آن از مطالعات انجام شده بوسیله Smith و همکاران در سال ۱۹۹۸ (۳۷/۲٪) و Almida & Bolton در سال ۱۹۹۴ (۴۷٪) به طور قابل ملاحظه‌ای کمتر بود.

آنیوپلوییدی در ۱۳/۷٪ از تخمکها دیده شد، که گرفتن یا از دست دادن dyads به علت عدم جدا شدگی یا گرفتن یا از دست دادن Monads که پیش از تقسیم[1] اتفاق می‌افتد از دلایل آنیوپلوییدی است. آنیوپلوییدی در تمام گروه‌های کروموزومی انسان مشاهده می‌شود؛ اما میزان آن در کروه C و G بیشتر است (۱۴،۳۲).

در مطالعه حاضر هایپوهاپلوییدی در ۲٪ از تخمک‌های آنالیز شده مشاهده گردید که نزدیک به گزارش Kamiguchi (۳/۱٪) (۱۴) بود. همچنین میزان دیپلوییدی ۱۵/۷٪ بود که Kamiguchi و همکاران ۲ مکانیسم را برای توجیه علت بوجود آمدن این نوع از اختلالات مطرح نموده‌اند: ۱- به دلیل عدم رها شدن جسم قطبی در میوز I، ۲- تبدیل تخمک تتراپلوییید به سلول دیپلوییدی با تقسیم هسته و سیتوکینز.

در طی تقسیم میوز تخمکها از دوران جنینی تا بلوغ در مرحله دیپلوتن باقی می‌ماند و وقتی تخمک‌گذاری انجام می‌شود، تخمکها به سرعت میوز I را طی می‌کنند؛ بطوریکه تصور می‌شود با افزایش سن مادر، خطای جدا نشدن کروموزومها بیشتر می‌شود؛ هرچند این مسأله در بعضی از مطالعات انجام شده به اثبات نرسیده است و رابطه‌ای بین سن مادر و آنیوپلوییدی یافت نشده است (۱۲،۱۴،۲۸،۳۳،۳۵). در حالیکه، مطالعات انجام شده بوسیله Plachot نشان دهنده رابطه بین آنیوپلوییدی و سن مادر هنگام تخمک‌گذاری می‌باشد (۸).

در مطالعه حاضر به دلیل کم بودن تعداد تخمکها رابطهٔ بین سن مادر و آنیوپلوییدی قابل بررسی نبود. در این

1- Predivision

Downloaded from http://www.jri.ir

مطالعه همچنین وضعیت اختلالات کروموزومی در گروه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت که بیشتر اختلالات مربوط به کروموزوم‌های گروه C و یک اختلال در کروموزوم گروه G و دیپلوپیدی نیز به صورت XX ٤٦ مشاهده گردید؛ که این نتایج با یافته‌های دیگران مطابقت دارد (۲۸،۳۳). همچنین اختلالات دیپلوییدی در این مطالعه، بیشتر از دیگر انواع اختلالات بود که این نتیجه با دیگر یافته‌های انجام شده مطابقت دارد (۱۲،۱٤،۱۵).

در مطالعه حاضر ارتباط معنی‌داری بین درصد لقاح و میزان FSH مشاهده نگردید، (p=۰/٤۹۵، r=۰/۱۱۸) که این نتایج با یافته‌های مطالعات قبلی مطابقت دارد (۳٦،۳۷). همچنین ارتباط معنی‌داری بین تعداد تخمکها و میزان FSH مشاهده نگردید که این نتایج در تأیید تعدادی از مطالعات قبلی می‌باشد (٤۰-۳۷).

در این مطالعه به رابطه بین میزان FSH، سن و مدت ناباروری نیز توجه گردید که ارتباط معنی‌داری بین میزان FSH و سن افراد و یا مدت ناباروری بدست نیامد که با مطالعات (۳۷،۳۸) همخوانی دارد. همچنین ارتباط معنی‌داری بین لقاح، تعداد تخمک، سن، مدت ناباروری و میزان LH مشاهده نگردید.

یافته‌های مطالعه اخیر کم و بیش در تأیید نتایج حاصله از تحقیقات قبلی در خصوص رخداد اختلالات کروموزومی در تخمک‌های بارور نشده بود. هرچند میزان این اختلالات در مطالعات مختلف متفاوت می‌باشد که با توجه به علت ناباروری، جمعیت متفاوت مورد بررسی، محیط کشت متفاوت یا شرایط درمانی مختلف، پروتکل‌های متفاوت تحریک تخمک‌گذاری و حتی داروی مصرفی و میزان آن مورد توجه قرار گرفته است. ضمن اینکه عواملی از جمله پروتئین‌های OMA-2, OMA-1 به دلیل نقش عمده‌ای که در بلوغ و رشد تخمک دارند می‌توانند در عدم موفقیت لقاح به دلیل توقف رشد تخمک نقش داشته باشند (٤۱).

نتیجه گیری

هرچند ارتباط میزان FSH و اختلالات کروموزومی در این مطالعه تأیید نشد؛ ولی با توجه به مکانیسم اثر این هورمون همراه با LH و استرادیول می‌تواند شرح‌دهنده اثرات منفی یا مثبت آن در مراحل مختلف باروری از مرحله تخمک‌گذاری تا مرحله لانه‌گزینی باشد. حتی می‌توان با در نظر گرفتن مکانیسم لقاح و عوامل متعدد مرتبط با اسپرم که می‌تواند پروسه لقاح را دچار اختلال کند، بایستی مورد توجه قرارداد. بنابراین به نظر می‌رسد به منظور مشخص نمودن علت اصلی میزان موفقیت تخمکها در سیکل‌های ناباروری، در صورتیکه در سیکل‌هایی با اختلالات تخمکی یا هورمون زنانه مرتبط نباشد، بایستی فاکتورهای مرتبط با عملکرد اسپرم در زمان پروسه لقاح را نیز مدنظر داشت.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله نویسندگان مقاله از همکاری صمیمانه سرکارخانم قیصری و جناب آقایان حسین فضلی و مهرداد سلیمانی از مرکز تحقیقاتی ـ درمانی ناباروری یزد و سرکار خانم رضایف استادیار محترم دانشکده علوم دانشگاه تهران تشکر می‌نمایند. همچنین از راهنمایی‌های آقایان دکتر محمد حسن شیخهاو دکتر عباس افلاطونیان در انجام تحقیق تشکر و قدرانی می‌شود.

References

1- Edirisinghe WR, Murch AR, Yovich JL. Cytogenetic analysis of human oocytes and embryos in an In vitro fertilization programme. Hum Reprod. 1992;7:230-6.

2- Bedford JM, Kim HH. Sperm/egg binding patterns and oocytes cytology in retrospective analysis of fertilization failure In vitro. Hum Reprod. 1993;8:453-63.

Downloaded from http://www.jri.ir

3- Wall MB, Marks K, Smith TA. Cytogenetic and fluorescent in-situ hybridization chromosomal studies on In-vitro fertilized and intracytoplasmic sperm injected failed-fertilized. University Press, Cambridge, UK. 1996;pp:235-242.

4- Abruzzo MA, Hassold TA. Etiology of nondisjunction in humans. Environ Mol. Mutagen 1995;25(Suppl. 26): 38-47.

5- Kalantar SM, Lenton EA, Barratt CLR. Sperm function tests and fertilization failure following IVF. In Human sperm acrosome reaction. Fenichel P, Parinaud J, (Editors). Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. 1995;236:pp.439-440.

6- Kalantar SM, Lenton EA. Evaluating the ability of biological substancesfor induction of acrosome reaction in normospermic samples. Midd East Ferti Soci J. 2000; 5:2;71-78.

7- Kalantar SM, Lenton EA, Brewis I, Barratt C, Moore H. Fertilization failure of IVF predictive power of SFT. Andrologia. 1998;30(4-5):180-181.

8- Plachot M. Oocyte- genetic aspects. In Grudzinskas J G, Yovich JL (Editors). Gametes- The Oocyte. Cambridge University Press, Cambridge. 1995;pp:95-107.

9- Nakaoka Y, Okamoto E, Miharu1 N, Ohama K. Chromosome analysis in human oocytes remaining unfertilized after In-vitro insemination: effect of maternal age and fertilization rate. Hum Reprod. 1998;13:419-424.

10- Ma S, Robinson W, Ryan Lam, Basil Ho Yuen. Maternal origin of monosomy 21 derived from ICSI: Case report. Hum Reprod. 2001:16;1100-3.

11- Macas E, Floresheim Y, Hotz E, Imthurn B, Keller PJ, Walt H. Abnormal chromosomal arrangements in human oocytes. Hum Reprod. 1990;5:703-7.

12- Pellestor F, Anahory T, Hamamah S. The chromosomal analysis of human oocytes. An overview of established procedures. Hum Reprod Update. 2004;1-18.

13- Tarin JJ, Gomez E, Sampaio M. Cytogenetic analysis of human oocytes from fertile women. Hum Reprod. 1991;8:1100-3.

14- Kamiguchi Y, Rosenbusch B, Sterizik K, Mikamo K. Chromosome analysis of unfertilized human oocytes prepared by a gradual fixation-air human oocytes. Hum Reprod. 1993;11:2230-8.

15- Almeida PA, Bolton VN. The relationship between chromosomal abnormalities in the human oocytes and fertilization in vivo. Hum Reprod. 1994;9:343-6.

16- Sengoku K, Tamate K, Takuma N, Yoshida T, Goishi K, Ishikawa M. The chromosomal normality of unfertilizes oocytes from patients with polycystic ovarian syndrome Hum Reprod. 1997;12(3):474-7.

17- Agarwal A, Said TB, Bedaiw MAy, Banerjee J, Alvarez JG. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. Fertil Steril. 2006;86: 503-14.

18- Kalantar SM, Ebrahimi A, Fazli H, Soleimani M, Aflatoonian A. The chromosomal abnormality of unfertilized oocytes in In Vitro Fertilization program. I.J. R.M. 2003;1(1):32-36.

19- World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 4th Edition. Cambridge. 1999.

20- Aflatounian A, Karimzadeh MA, Dehghani R, Kalantar SM, Soliman M. The role of aspiration of half ovarian follicles prior to admistration of hCG or GnRH -a for prevention of severe OHSS in ART programs. Midd. East. Fertil Soci. 2000;5(1):73-5.

21- Tarkowski AK. An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs. Cytogenetics. 1996;5:394-400.

22- Mitelman F. An International System for Human Cytogentic Nomenclature. Karger. Switzerland. 1995

23- Bedford JM, Kim HH. Sperm/egg binding patterns and oocytes cytology in retrospective analysis of fertilization failure in vitro. Hum Reprod. 1993;8:453-63.

24- Tarin JJ, Gomez E, Sampaio M. Cytogenetic analysis of human oocytes from fertile women. Hum Reprod. 1991;8:1100-3.

25- Wall MB, Marks K, Smith TA, Gearou CM, Maggleton-Harris AL. Cytogenetic and fluorescent in-situ hybridization chromosomal studies on in-vitro fertilized and intracytoplasmic sperm injected 'failed-fertilized' human oocyte. Hum Reprod. 1996;11(10): 2230-8.

26- Mozdarani H, Aghaei F. Cytogenetics analysis of failed-fertilized oocytes from Iranian infertile women after in vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) procedures. MEFSJ. 2001;6(3): 216-225.

27- Dyban A, De Sutter P, Verlinsky Y. Preimplantation cytogenetic analysis. In Verlinsky Y, Kuleiy AM (Editors). Preimplantation Diagnosis of Genetic Disease. 1993; Wiley-Liss New York, pp.98.

28- Nakaoka Y, Okamoto E, Miharu N, Ohama K. Choromosome analysis in human oocytes remaining unfertilizes after in-vitro insemination: effect of maternal age and fertilization rate. Hum Reprod. 1998; 13(2):419-24.

29- Lim AST, Ho ATN, Tsakok MFH. Chromosomes of oocytes failing in-vitro fertilization. Hum Reprod. 1995;10:2570-5.

30- Pellestor F, Andréo B, Arnal F, Humeau C, Demaille J. Mechanisms of non-disjunction in human female meiosis: the co-existence of two modes of malsegregation evidenced by the karyotyping of 1397 in-vitro unfertilized oocytes. Hum Reprod. 2002;17: 2134-45.

Downloaded from http://www.jri.ir

31- Smith R, Walker L, Cobo AC, Contribution of chromosomal abnormalities to in vitro fertilization failures. Rev Med Chil. 1998;126(5):511-9.

32- Zenzes MT, Casper RF. Cytogenetics of human oocytes, zygotes and embryos after in vitro fertilization. Hum Genet. 1992;88:367-37.

33- Angell R. First-meiotic-division nondisjunction in human oocytes. Am J Hum Genet. 1997;61:23-32.

34- Pellestor F. Frequency and distribution of aneuploidy in human female gametes. Hum Genet. 1991;86:283-8.

35- Pellestor F, Andréo B, Arnal F, Humeau C, Demaille J. Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes. Hum Genet. 2003;112:195-203.

36- Takehiro I, Masayuki K, Hiroyuki A, Yutaka S, Hiroyoshi H. Growth, antrum formation and estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free medium. Biol Reprod. 2002;67:1099-105.

37- Lin YH, Hwang JL, Huang LW, Mu SC, Seow KM, Chung J, et al. Combination of FSH priming and hCG priming for in-vitro maturation of human oocytes. Hum Reprod. 2003;18:1632-36.

38- Gras L, McBain J, Trounson A, Kola I. The incidence of chromosome aneuploidies in stimulated and unstimulated (natural) uninseminated human oocytes. Hum Reprod. 1992;7:1396-401.

39- Gomes CM, Raineki C, de Paula PR, Severino GS, Helena CVV, Anselmo-Franci JA, et al. Neonatal handling and reproductive function in female rats. J Endocrinol. 2005;184(2):435-45.

40- Mousset-Siméon N, Jouannet P, Le Cointre L, Coussieu C, Poirot C. Comparison of three in vitro culture systems for maturation of early preantral mouse ovarian follicles. Zygote. 2005;13:167-75.

41- Detwiler MR, Reuben M, Lix D, Rogers E, Lin R. Two zinc finger protein, OMA-1 and OMA-2 are edundantly required for oocyte maturation in C elegans. Dev Cell. 2001;1:187-99.

Downloaded from http://www.jri.ir