ICSI یک یا دو روز پس از عدم باروری تخمک ها بوسیله IVF

محمد مهدی آخوندی(Ph.D.)[۱،۴]، معرفت غفاری(Ph.D., M.D)[۲] ، مهناز اشرفی(M.D)[۳]، انسیه شاهرخ تهرانی(M.D)[۳]، اشرف معینی(M.D)[۳]، طاهره معدنی (M.D)[۳]، محمد رضا صادقی(Ph.D.)[۲]، لیلا کریمیان (M.Sc.)[۳]

۱- استادیار گروه ژنتیک ، بیوتکنولوژی و جنین شناسی، پژوهشکده ابن سینا

۲- استادیار گروه غدد تولید مثل، پژوهشکده ابن سینا

۳- عضو گروه آندوکرینولوژی و ناباروری، پژوهشکده رویان

۴- عضو تیم تخصصی نازایی، پژوهشکده رویان

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی توانایی باروری تخمک‌های بارور نشده یک و یا دو روزه پس از انجام IVF، بوسیله تکنیک ICSI بود. بدین منظور ۳۵ بیمار تحت درمان ناباروری با تکنیک IVF که عدم باروری تخمک های آنها ۱٦ الی ۱۸ ساعت پس از زمان تلقیح (Insemination) به اثبات رسیده بود، دردو گروه جداگانه مورد بررسی واقع شدند. در گروه اول ۲۱ بیمار و با ۷۲ تخمک، پس از مدت ۲٤ ساعت وگروه دوم ۱٤ بیمار با ٤٥ تخمک پس از مدت ٤۸ ساعت بوسیله اسپرم های جمع آوری شده برای IVF مربوطه و نگهداری شده در انکوباتور مورد تزریق با تکنیک ICSI قرارگرفتند. جنین های طبیعی تشکیل شده از گروه اول ۷۲ ساعت و از گروه دوم ۹٦ ساعت پس از جمع آوری تخمک ها به رحم منتقل شدند. نتایج این بررسی باروری تخمک ها را پس از انجام ICSI در گروه اول به میزان ۸۰/٥ درصد و درگروه دوم بمیزان ٤٦/٦ درصد مشخص نمود که اختلاف معنی داری را بین این دو گروه نشان می‌داد. میزان جنین های تقسیم شده در تخمکهای تزریق شده در گروه اول ۷۹/۳ درصد و در گروه دوم ٤۲/۸ درصد بود. و نهایتاً انتقال جنین ها در ۱۹ بیمار ازگروه اول (۹٤ درصد) و ۱۱ بیمار از گروه دوم (۷۸ درصد) انجام پذیرفت. هیچگونه حاملگی پس از انتقال جنین درگروه اول مشاهده نشد در حالیکه یک مورد حاملگی و تولد نوزاد سالم درگروه دوم صورت پذیرفت.

نتایج حاصل بیان کننده این مطلب است که انجام ICSI تاخیری پس از ۲٤ یا ٤۸ ساعت از عدم باروری تخمک ها با تکنیک IVF، سبب باروری تخمک ها و تشکیل جنین، بمیزان بسیار بالایی خواهد بود. استفاده از این روش بعنوان یک پروتکل ایده آل در برنامه درمانی مراکز لقاح خارج رحمی، شانس زوجهای نابارور را در داشتن فرزند، بمراتب افزایش خواهد داد.

گل واژگان: ICSI تاخیری – تلقیح مجدد – IVF مختل شده، اختلال در لقاح

آدرس مکاتبه: تهران، اوین،دانشگاه شهید بهشتی،انتهای بلوار پژوهشکده ابن سیناصندوق پستی۱۷۷-۱۹۸۳۵

Downloaded from http://www.jri.ir

مقدمه

علیرغم وجود تست های متعدد آزمایشگاهی در بررسی قدرت عملکردی اسپرم، متاسفانه در حال حاضر، توانایی باروری یک نمونه Semen بطور دقیق قابل پیش بینی نیست. معیارهای بررسی توانایی عملکردی اسپرم همچون حرکت، مرفولوژی، تعداد و موقعیت آکروزوم و بسیاری مشخصات دیگر قادر به پیش بینی قدرت باروری اسپرم بطور دقیق و معنی داری نیستند. (۲و۱) علاوه بر این بدست آوردن اطلاعات دقیق و قابل اعتماد از باروری اسپرم بوسیله تست های آزمایشگاهی معرفی شده، چندان آسان نیست. این مشکل در هنگام انتخاب بهترین روش مناسب درمان ناباروری یک زوج نابارور از قبیل IVF [1] و ICSI [2] بیشتر محسوس میشود. یکی از مهمترین موارد غیر منتظره که یک زوج نازا در یک سیکل IVF با آن مواجه میشوند، اشکال در عدم باروری تخمک و عمل لقاح می باشد. عدم باروری تخمک و عدم انتقال جنین منجر به توقف سیکل درمانی و ایجاد یاس و ناامیدی در بیمار می‌گردد، و اثرات روحی و مالی فراوانی را بر زوج وارد می‌نماید. عدم باروری یا میزان بسیار کم باروری در سیکل درمانی IVF میتواند ناشی از شرایط هورمونی ناشی از پروتکل های تحریک تخمک گذاری و یا اختلالات خاص مربوط به سیکل و همچنین در مواردی اختلال در توانایی عملکردی اسپرم در نفوذ بداخل تخمک باشد.

به منظور نجات تخمک های باور نشده، بدنبال IVF Trourson و همکاران در سال ۱۹۸٤ و Pampiglione و همکاران در سال ۱۹۹۰ اقدام به تلقیح مجدد تخمک به روش IVF نمودند که نتایج حاصل حاکی از میزان پایین باروری بود. اگر چه تلقیح مجدد تخمک بوسیله میکرواینجکشن با تکنیک‌های (PZD) [4] (۵) و یا (SUZI) [5] (٦) موجب بالا رفتن میزان باروری شد. ولی متاسفانه در این روش تخمک های با بیش از ۳ پرونوکلئوس (PN) [6] که نشانه غیر طبیعی بودن لقاح بود، به میزان زیادی دیده شد (۵). گزارشات اخیر نشان می دهد که تزریق اسپرم بداخل سیتوپلاسم تخمک های بارور نشده پس از یک روز از شکست IVF و (عدم باروری تخمک ها) می تواند موجب باروری تخمک ها شود (۷و۸و۹). مطالعه حاضر با توجه به وجود تعداد موارد اندک گزارش در این زمینه و عدم وجود اطلاعات در مورد سقف زمانی تزریق به تخمک، پس از جمع آوری تخمک ها انجام پذیرفت. هدف از این مطالعه ارزیابی و بررسی قدرت باروری تخمک های بارور نشده یک و یا دو روز پس از انجام IVF، بوسیله تکنیک ICSI و همچنین توانائی جنین‌های حاصل در ایجاد حاملگی می‌باشد.

مواد و روشها

این مطالعه بر روی تخمک های بارور نشده ۳۵ بیمار تحت درمان IVF از شروع مهرماه سال ۱۳۷۷ تا پایان اسفندماه سال ۳۷۸ انجام شد و تمام بیماران با استاندارد های لازم برای انجام IVF مطابقت داشتند. تحریک تخمک‌گذاری برای انجام IVF به وسیله پروتکل طولانی با استفاده از GnRH (Busereline acetate) و بدنبال آن hMG انجام شد. در طول انجام این مطالعه hMG از منابع تجاری مختلفی از جمله Metrodin hP, Pergonal (Serono) ، Humegon و Normagon (Organon) استفاده شد.

1- *In vitro* Fertilization
2- Intracytoplasmic Sperm Injection
3- Partial Zona Dissection
4- Subzonal Insemination
5- Pronucleuse

Downloaded from http://www.jri.ir

بیماران در طی درمان بوسیله سونوگرافی و اندازه گیری استرادیول تحت کنترل بودند. زمانی که در بیماران حداقل ٤ فولیکول با قطر متوسط ١٩-١٧ میلی متر دیده شد hCG با دوز *IU* 10000 تزریق گردید و فولیکول های رسیده ٣٦-٣٤ ساعت پس از تزریق hCG بوسیله پمپ خلاء متصل به سوزنی که از Transvaginal ultrasound probe به طرف تخمدانها هدایت می شد، تخلیه و جمع آوری شد.

مایع فولیکول حاوی کمپلکس سلولهای کومولوس و تخمک به داخل لوله آزمایش استریل آسپیره شدند. سپس تخمکها از مایع فولیکولی برداشته و در محیط کشت Ham's F10 برای ٣-٢ ساعت زیر روغن پارافین کشت داده شد و سپس در مجاورت اسپرم های متحرک به تعداد $۱۰^{٦} \times ۰/۰۵$ که بوسیله درجات مختلف پرکل شستشو و جداسازی شده بودند قرار داده شدند.

ارزیابی باروری بعد از IVF

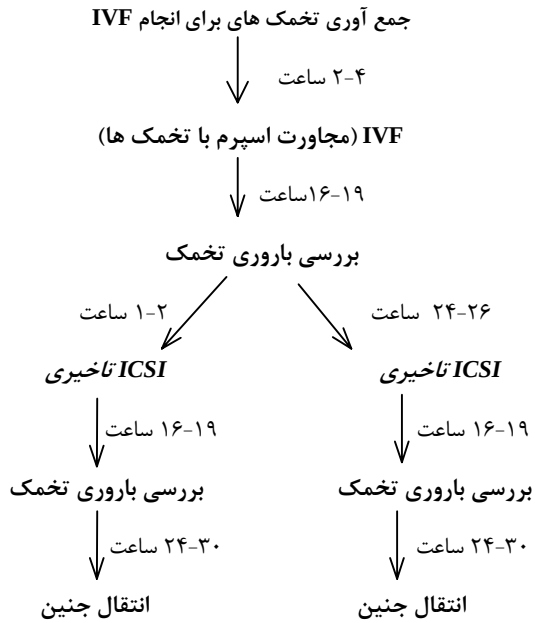
سلولهای کومولوس ٢٢-١٩ ساعت بعد از جمع آوری تخمک، یا ١٩-١٦ ساعت بعد از تلقیح [1] بوسیله پیپت پاستور و با آسپیراسیون آرام و بطور مکانیکی، زیر میکروسکوپ معکوس از تخمک ها جدا شده، سپس تخمک های کشت داده شده را از نظر وجود پرونوکلئوس (PN) و گویچه قطبی بررسی گردید. باروری در صورت وجود دو پرونوکلئوس مشخص با دو گویچه قطبی، طبیعی محسوب شد و تنها تخمک هایی که باروری نداشتند برای این مطالعه استفاده شدند.

آماده سازی تخمک های بارور نشده برای ICSI

١٠٢ تخمک که از نظر مرفولوژی فاقد نشانه های باروری بودند و در مرحله متافاز II قرار داشتند برای میکرواینجکشن انتخاب شدند و بعد از ٢٤ تا ٤٨ ساعت از جمع آوری تخمک ها، اسپرم متحرک با مرفولوژی طبیعی که از اسپرم های تهیه شده از روز جمع آوری تخمک در درجه حرارت اتاق نگه داری شده بود انتخاب و بعد از غیر متحرک کردن آن بداخل تخمک تزریق شد. سپس تخمک های تزریق شده سه بار در محیط کشت IVF شستشو داده شده و به قطره های ١٠٠ میکرولیتر محیط کشت IVF در پتری دیش های با اندازه mm ١٥×٦٠ در زیر روغن پارافین منتقل و در انکوباتور با CO_2 ٥٪ و درجه حرارت ٣٧ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. تخمک ها ١٨-١٦ ساعت پس از تزریق مجدداً از نظر وجود پرونوکلئوس و گویچه قطبی مورد بررسی قرار گرفتند.

کشت جنین ٧٢ تا ٩٦ ساعت بعد از جمع آوری تخمک ادامه یافت و جنین هایی که به مرحله ٨-٤ سلولی رسیده بودند بداخل رحم منتقل شدند. دو هفته بعد از انتقال آزمایش βhCG بعمل آمد. در صورت جواب مثبت ٦ تا ٨ هفته بعد از حاملگی سونوگرافی جهت دیدن کیسهٔ جنینی انجام شد.

مراحل انجام ICSI تاخیری



1- Insemination

Downloaded from http://www.jri.ir

نتایج

تخمک های ۳۵ بیمار کـه بدنبـال انجـام IVF بـارور نشده بودند بوسـیله ICSI مجدداً مـورد تزریـق قـرار گرفتند. تخمک های بدست آمـده از ۲۱ بیمـار گـروه اول ۲٤ سـاعت پـس از جمـع آوری تخمـک هـا و عـدم ناباروری، ICSI انجـام شـد. همچنیـن تخمـک هـای ١٤ بیمار گروه دوم ، ٤٨ ساعت بعد از جمع آوری تخمک ها بعلت عدم باروری بوسیله ICSI تزریق شـدند. میـانگین سـنی گـروه اول ۳۱ سـال (٤٢-٢٢) و گـروه دوم ۳۲ سـال(٤٢-٢١) بـود کـه ایـن اختـلاف بیـن دو گـروه معنی‌دار نبود. در گروه اول ١٦٤ تخمک و در گـروه دوم ۱۱۷ تخمک بدست آمد. از این تعداد ۷۲ تخمک در گـروه اول و ٤٥ تخمک در گروه دوم برای انجامICSI انتخـاب شدند. میزان باروری تخمک هـا بدنبـال ICSI در گـروه اول ۸۰/۵٪ و در گـروه دوم ٤٦/٦ ٪ بـود. کـه اختـلاف معنـی داری (p<۰/۰۵) را بیـن دو گـروه نشـان میـداد. میزان تقسیم سلولی به تخمک های تزریـق شـده ۷۹/۳٪ در گروه اول و ٤٢/٧ ٪ در گروه دوم بود. انتقـال جنیـن در ۱۹ بیمـار از گـروه اول (٩٤٪) و ۱۱ بیمـار از گـروه دوم (۷۸٪) انجام شد. انتقال جنین در گروه اول منجر به حاملگی نشد ولـی در گـروه دوم یـک مـورد حـاملگی و تولد نوزاد سالم گزارش شد.

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

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

جدول۲ : خلاصه نتایج ICSI تاخیری در ۱۴ سیکل درمانی (زمان تزریق پس از ۴۸ ساعت)

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

بحث:

اختلال در باروری بدنبـال IVF ممکـن اسـت بدلیـل عدم توانایی اسپرم در نفوذ به داخـل تخمـک باشـد، کـه چنین اتفاقی احتمالاً به آسانی با اسـتفاده از ICSI قـابل درمان می باشـد. از طـرف دیگـر عـدم بـاروری بدنبـال IVF ممکـن اسـت بدلیـل اشـکالات اساسـی در کیفیـت اسپرم و تخمک، از جمله عدم توانایی سـر اسـپرم بـرای متراکم شدن کروماتین و یا اختلال در فعال شدن تخمک باشد کـه چنیـن اختلالاتـی بوسـیله ICSI قـابل درمـان نیست. لذا با توجه به اینکه تعدادی از تخمک های بـارور نشده در IVF توسط ICSI بارور و تعدادی دیگـر پـس از عدم باروری در IVF و انجام ICSI بارور نشـد. لـذا می توان حدس زد که هر دو نوع اختلال باروری در ایـن مطالعه دیده میشود.

در این مطالعه میزان باروری بدنبـال ICSI تـاخیری در تخمک هـای یـک روزه ۸۰/۵٪ و در تخمـک هـای دو روزه ٤٦/٦٪ بود که در مقایسـه بـا مـیزان بـاروری در تخمـک هـای تـازه و بدنبـال انجـام ICSI (۹۰٪)، بطـور معنـی داری پـایین مـی باشـد. نتـایج بیـان کننـده ایـن موضوع است، که اگر چه تخمک های بارور نشـده ٢٤ و ٤٨ ساعت پس از انجام IVF ، قادر به باروری با انجـام ICSI می باشد، ولـی مـیزان بـاروری بـا افزایـش سـن

Downloaded from http://www.jri.ir

تخمک رابطه معکوس دارد. مطالعات دیگر نیز تائید کننده ارتباط معکوس بین میزان باروری و سن تخمک می باشد (۱۱و۹ و۷) Morton و همکاران (۹) و Nagy و همکاران (۱۱) از اسپرم مشابه بکار برده شده در IVF اولیه وsjren و همکاران از اسپرم تازه برای انجام ICSI تاخیری استفاده نمودند که در هر دو مورد میزان باروری بالا بود. Lundin و همکاران (۱۳) نشان دادند که اختلاف معنی داری در میزان باروری بین دو منبع اسپرم استفاده شده در ICSI تأخیری وجود ندارد. میزان باروری در این مطالعه، مشابه یا حتی بالاتر از میزان باروری در موارد استفاده شده از اسپرم تازه با نمونه اولیه بکار برده در IVF بود. یکی از مزیت های استفاده از نمونه اسپرم اولیه برای این مرکز ،عدم لزوم مراجعه مجدد بیمار جهت دادن نمونه مجدد منی بود، اگر چه در این مطالعه باروری غیر طبیعی بررسی نشده است ولی مطالعات اخیر بیان کننده این موضوع می باشد، که میزان باروری غیر طبیعی (هاپلوئیدی ، آنوپلوئیدی، تری پلوئیدی) با مسن شدن تخمک افزایش می یابد (۱٤و۹) . برای مثال مشخص شده است که میزان3PN بدنبال ICSI در تخمک تازه ۵٪ (۱۵) تخمک ۱ روزه ۲۵-۲۰٪ (۱٦) و تخمک ۲ روزه تا ٤۰٪ افزایش می یابد. همچنین کاریوتایپ از ۱۰ جنین ناشی از ICSI تاخیری نشان داد که ۵ تا از آنها غیر طبیعی (3PN) می باشند (۱۱) که بیان کننده این موضوع می تواند باشد که مسن شدن تخمک سبب اختلال دوک میوزی و میکرو فیلامنت ها شده که منجر به اختلال اختصاصی در خروج دومین گویچه قطبی و اختلالات کروموزومی می شود. اگر چه میزان باروری (۸۰/٤٪ در تخمک های یک روزه و ٤٦/٦ ٪ در تخمک ها دو روزه)تقسیم سلولی (۸۱٪ در تخمک یک روزه و ۷۳٪ در تخمک های دو روزه) در این مطالعه و مطالعات دیگر بالا می باشد. ولی میزان حاملگی بسیار پایین می باشد. که این میتواند به دلیل درصد بالای اختلالات کاریوتایپ و سیتوژنتیک در این جنین ها باشد (۱۷) . که منجر به اختلاف معنی دار (p<۰/۰۵) در میزان حاملگی بین ICSI روی تخمک های تازه و تخمک های مسن شود (۱۸).

بطور طبیعی بالاترین شانس لانه گزینی جنین هنگامی می‌باشد که حداکثر هماهنگی بین رشد و تکامل جنین و اندومتر وجود داشته باشد. و بهترین زمان این هماهنگی در زمان Implantation window یعنی ٦-۵ روز بعد از تخمک گذاری می‌باشد (۱۹). انتقال جنین در این زمان یانزدیک به این زمان شانس لانه گزینی را بالا می برد. در این مطالعه بدنبال انتقال جنین حاصل از ICSI تاخیری (تخمک دو روزه) بعد از حدود ۵ روز از تخمک گذاری داخل رحم یک مورد حاملگی منجر به تولد نوزاد طبیعی و سالم حاصل شد. انتقال جنین در زمان Implantation window در این مورد میتواند توجیه کننده حاملگی در این مورد باشد.

علاوه بر این مطالعه، مطالعات دیگری نیز وجود دارد که حاملگی و تولد نوزاد سالم را گزارش نموده اند. اگر چه هنوزگزارشی از اختلالات ژنتیکی متولدین ناشی از ICSI بر روی تخمک های یک روزه و دو روزه نشده است (۹و ۸ و۷). ولی بسیار زود است که بدون هیچگونه تردیدی به سلامت این نوزادان اطمینان حاصل نمود زیرا این نوزادان از نظر تئوری در معرض خطر بیشتر اختلالات سیتوژنتیکی می باشند و تعداد چنین نوزادانی بسیار کم بوده و از این درصد کم نمی‌توان نتیجه گیری نمود، لذا بهتر است در اینگونه موارد از تشخیص ژنتیکی قبل از تولد استفاده گردد. با توجه به میزان کم حاملگی و اختلالات کروموزومی بالا، ICSI تاخیری و حاملگی موفق بعد از انجام ICSI بدنبال شکست قبلی IVF (۲۰)، استفاده از این روش بعنوان روش درمانی، مورد قبول عده‌ای نمی‌باشد. این گروه بدلیل میزان بالای باروری و تقسیم سلولی بدنبال ICSI تأخیری از این روش بعنوان مقاصد تشخیصی

Downloaded from http://www.jri.ir

استفاده می کنند ایـن روش میتوانـد پیـش آگـهی ICSI روی تخمک های تازه در سیکل های بعـدی را مشـخص نماید.

نتیجه

نتیجهٔ نهایی اینکه دلایل موجود حاکی از آن است که ICSI تاخیری یکی از راهـهای نجـات اختـلال بـاروری کامل یا نزدیک به کامل در سیکل هـای IVF مـی باشـد. این روش باید در مـواردی کـه بنظـر نمـی رسـد کیفیـت تخمک عامل اختلال باروری می باشد در اولیـن فرصـت بعد از تائید عدم بـاروری بدنبـال IVF انجـام شـود. از آنجائیکـه از نظـر تئوریـک پتانسـیل خطـر اختـلالات سیتوژنتیکی در این جنیـن هـا افزایـش مـی یـابد، بـهتر است تشـخیص ژنتیکـی قبـل از تولـد در حـاملگی هـای ناشی از ICSI تأخیری انجام شود.

تقدیر و تشکر

از همکاران محترم گروه جنین شناسی و آزمایشگاه جنین شناسـی و همچنیـن همکـاران محـترم اتـاق عمـل پژوهشکده رویان بواسطه همکاری در انجام این تحقیـق و از سرکار محترم خانم دکتر اشرف معینـی و سـرکار محترم خانم صادقی بواسطه پی گیری مراحـل حـاملگی و زایمان و تولد نوزاد ، تقدیر می‌گردد.

Reference:

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

Downloaded from http://www.jri.ir

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

Downloaded from http://www.jri.ir