

بررسی اثر افزایش سن زن در نتایج تزریق اسپرم به داخل اووسیت (ICSI) در مقایسه با IVF

ربابه طاهری پناه^۱، محمد علی کریم زاده میبیدی^۲، عباس افلاطونیان^۲، محمد حسین امیر ارجمند^۳.

۱- استادیار زنان، زایمان و نازایی، مدیر گروه پژوهشی غدد تولید مثل پژوهشکده ابن سینا.

۲- دانشیار گروه زنان، زایمان و نازایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد.

۳- کارشناس آزمایشگاه ART، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد.

چکیده

قدرت باروری زنان مشکلی است که با افزایش سن آنها رو به کاهش می‌رود. حداکثر قدرت باروری زنان در فاصله ۲۰-۲۵ سال است که فاکتورهای مهمی مانند ذخیره تخمدان و پذیرش اندومتر در این امر دخیل هستند. استفاده از روشهای پیشرفته تکنولوژی در باروری از جمله IVF و ICSI توانسته است که به میزان چشمگیری معضل نازایی زوجها را برطرف نماید. ولی همچنان مسئله افزایش سن زنان یکی از نکات مورد بحث می‌باشد. بنحویکه برای جبران کاهش ذخیره تخمدانی پس از سن ۴۰-۳۵ سال استفاده از روش تخمک اهدائی توصیه می‌شود. در این بررسی ۲۰۰ زوج نابارور که بعلت subfertility مرد مراجعه کرده بودند در گروه‌های IVF و ICSI تقسیم شدند. میزان باروری در زنان بالای ۳۵ سال در گروه IVF ۲۶/۷٪ و در افراد زیر ۳۵ سال ۴۱/۳٪ بوده است. همچنین نتایج حاصل موید کاهش میزان باروری در زنان بالای ۳۵ سال ۷۴/۳٪ نسبت به گروه دیگر (۴۹/۵٪) بوده است که از نظر آماری معنی‌دار است، در حالیکه تقسیم سلولی در گروه ICSI تفاوت محسوسی نداشته است. چنین نتیجه‌گیری می‌شود که انجام میکرواینجکشن هم با حذف مانع زوناپلوسیدا و ... در اووسیت‌های زنان مسن نمی‌تواند بر تاثیر سوء افزایش سن بیمار فائق آید و بنظر می‌رسد مشکلات ساختمانی و شیمیایی داخل اووسیت هم در این امر دخیل باشند

واژه‌های کلیدی: سن مادر، IVF، ICSI.

آدرس مکاتبه: تهران، اوین، دانشگاه شهید بهشتی، انتهای بلوار پژوهشکده ابن‌سینا، صندوق پستی: ۱۷۷-۱۹۸۳۵.

مقدمه

کاهش قدرت باروری با افزایش سن زن موضوع جدیدی نیست. مطالعات مختلف نشان میدهد که قدرت باروری زنان تحت تاثیر سن آنها است بنحوی که قدرت باروری در عرض یکسال از ۸۶٪ در سن ۲۴-۲۰ ساله به ۵۲٪ در زنان ۳۹-۳۵ ساله کاهش میابد (۱)، بنحویکه حتی کاهش قدرت باروری را در زنان قبیله Hutterite که به طور متوسط هر یک ۱۴-۱۲ فرزند دارند هم میتوان پس از سن ۳۰ سالگی مشاهده کرد (۲). Guttmacher در سال ۱۹۹۵ در ایالات متحده مقایسه‌ای را بر روی میزان حاملگی در زنان گروه سنی ۲۴-۲۵ و ۴۴-۳۵ سال انجام داده و مشاهده نمود که در گروه اول، میزان حاملگی تقریباً دوبرابر گروه دیگر بوده است (۳). به عبارت دیگر به نظر می‌رسد که به ازای هر سال افزایش سن زن قدرت باروری ۹٪ کاهش میابد (۴). علل مختلفی همچون کاهش دفعات مقاربت یا افزایش سن ازدواج و دیگر بیماریهای سیستمیک هم در کاهش باروری دخالت دارند (۵). البته مسائل مختلفی از جمله ذخیره تخمدان و پذیرش اندومتر نیز در این مساله دخیل هستند. تجارب بالینی حاصل از تخمک‌اهدایی نشان میدهد که پیر شدن اووسیتها و کاهش ذخیره تخمدان بیش از محیط داخلی رحم تحت تاثیر سن بیمار قرار می‌گیرد (۶). با افزایش سن و همچنین سن اووسیت‌های نابالغ احتمال بروز اختلالات کروموزومی در هنگام تقسیم سلولی افزایش میابد (۷). از طرف دیگر تغییرات شیمیایی داخل و خارج اووسیت باعث افزایش ضخامت زوناپلوسیدا و سختی آن میگردد که عامل بسیار مهمی در نفوذ اسپرم به داخل اووسیت و لانه‌گزینی است. محققین نشان داده‌اند که انجام Zona Hatching در زنان مسن یا افرادی که ضخامت زونا پلوسیدای بالای ۱۵ میکرون دارند، در افزایش قدرت باروری نقش مهمی را ایفا مینماید (۸). هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر سن زن در روشهای کمک باروری و مقایسه آن در

دو روش (In Vitro Fertilization) IVF و ICSI (Intracytoplasmic sperm Injection) است. سوال مطرح شده این است که آیا در مواردی که IVF با شکست مواجه میشود و یا در زنان مسن میتوان با حذف زوناپلوسیدا و تزریق اسپرم به داخل اووسیت مانع از تاثیر افزایش سن گردید؟ چنین به نظر میرسد که میکرواینجکشن هم نمیتواند بر تاثیر سوء افزایش سن زنان فائق آید و غیر از زوناپلوسیدا، تغییرات دیگری از جمله محیط شیمیایی اووسیت و محتویات کروموزومی هم در مسئله باروری دخیل است و در میکرواینجکشن فقط بر برخی از این عوامل از جمله زوناپلوسیدا و فعال کردن محیط داخلی اووسیت میتوان غلبه نمود و تغییرات ذاتی و بالقوه اووسیت تاثیر خود را همچنان برجای خواهد گذاشت و باروری در زنان مسن موجب کاهش میزان لقاح و حاملگی و افزایش عوارض جانبی مثل سقط خواهد شد (۹).

مواد و روش اجرا

این مطالعه از نوع تحلیلی و به روش Clinical trial آینده نگر که از تاریخ ۷۴/۷/۱ لغایت ۷۶/۵/۳۱ در مورد زوجهایی که به علت ناباروری به مرکز درمان ناباروری یزد مراجعه کرده بودند اجرا گردید. در این بررسی ۲۰۰ زوج که به علت subfertility مرد دچار مشکل ناباروری بودند و اشکالی از نظر فاکتورهای زن از جمله علل تخمدانی یا لوله ای نداشتند، وارد مطالعه شدند. زوجهایی که تعداد کل اسپرم متحرک شوهران آنها بین ۲۰-۵ میلیون در میلی لیتر یعنی در حد قابل قبول برای انجام IVF بوده است در این بررسی شرکت داده شدند. بیماران بطور تصادفی به دو گروه میکرواینجکشن و IVF تقسیم شدند. زنان مورد مطالعه تحت تحریک تخمک‌گذاری با روشهای مختلف از جمله تزریق آمپولهای عضلانی (Human Menopausal hMG) Gonadotropin روزی ۲ عدد برای زنان زیر ۳۵ سال

۱۸ تا ۲۰ ساعت بعد اوسیتها به منظور تایید باروری یعنی وجود ۲ عدد پرونوکلئوس در آن مورد ارزیابی قرار گرفت. امبریوهای با کیفیت خوب پس از ۷۲-۴۸ ساعت در مرحله ۸-۴ سلولی به داخل رحم ترانسفر و به منظور حمایت از فازلوتئال پروژسترون به میزان 100mg روزانه حداقل تا زمان نتیجه آزمایش $\beta\text{-hcG}$ تجویز شد. میزان باروری (Fertilization Rate) براساس درصد اوسیت‌های تلقیح شده که پس از ۲۴ ساعت از تزریق دارای ۲ پرونوکلئوس بودند و به میزان تقسیم سلولی بر اساس درصد اوسیت‌های بارور شده‌ای که وارد مرحله تقسیم ۴-۲ سلولی شده و به علت مناسب بودن به مرحله ترانسفر می‌رسیدند محاسبه گردید. مقایسه بین گروهها و نسبتها بر اساس آزمون Chi-square انجام گرفته است. $P\text{ value} < 0.05$ از نظر آماری معنی دار و قابل قبول انتخاب شده است.

نتایج

بیماران هر دو گروه ICSI و IVF بر اساس گروه‌های سنی مختلف تقسیم شدند و همانطور که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌گردد، توزیع فراوانی در گروه‌های سنی مختلف در دو گروه تقریباً مشابه بوده است و بیشترین گروه را زنان بین ۳۴-۲۵ سال تشکیل می‌دهند. متوسط سن زن در گروه IVF $30 \pm 4/45$ سال و در گروه ICSI $33 \pm 3/7$ سال بوده است و نشان می‌دهد که سن زنان گروه ICSI نسبت به گروه IVF اندکی بیشتر است. پس از اینداکشن اولاسیون تعداد اوسیت‌های بدست آمده و با کیفیت مناسب در گروه IVF، ۴۷۴ عدد بوده که فقط ۱۹۰ عدد از آنها بارور گردیدند. بدین ترتیب میزان باروری محاسبه شده ۴۰٪ بوده است. در گروه میکرواینجکشن ۵۲۵ اوسیت مناسب بدست آمد که ۴۴۷ عدد آنها یعنی ۸۵/۱۴٪ بارور شدند. ارتباط افزایش سن زن با میزان باروری در هر دو گروه محاسبه گردید که در جدول شماره ۲ ذکر

و ۳ عدد برای زنان بالای ۳۵ سال و یا روش Flare-up یعنی با استفاده از GnRh-a (Gonadotropin Releasing Hormone Agonist) زیر جلدی (Lupron, 1mg) از روز اول hMG یا FSH (Follicle Stimulating Hormone) به کمک سونوگرافی روزانه، از روز پنجم شروع hMG اندازه‌گیری فولیکولها آغاز گردید. بر اساس میزان رشد فولیکولها تعداد آمپول مورد مصرف بیمار کم یا زیاد شد. هنگامی که قطر فولیکول در دو بعد به طور متوسط به حدود 18mm رسید، $10/000$ واحد Serono, hCG profasi بطور عضلانی تزریق شد. ۳۶-۳۴ ساعت پس از تزریق hMG (Human Chorionic Gonadotropin) اوسیت‌های با کیفیت مناسب یعنی دارای کومولوس اووفروس پراکنده، زوناپلوسیدیای مشخص و اووپلاسم شفاف برای تلقیح انتخاب شدند. نمونه منی شوهر بیمار را به روش swim-up آماده کرده و تعداد اسپرم‌های متحرک، تحرک، مورفولوژی و حرکت رو به جلوی آنها مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس در گروه IVF پس از ۵-۴ ساعت از جمع‌آوری اوسیت، ۱۰۰ هزار اسپرم به ازای هر اوسیت به ظرف مخصوص petri dish اضافه کرده و انکوبه میگردید. در گروه میکرواینجکشن اسپرم‌های متحرک و با مورفولوژی نرمال را انتخاب کرده و بداخل اوسیت تزریق میگردید.

سن زن	IVF	ICSI
۲۰-۲۴	۱۴	۴
۲۵-۲۹	۳۴	۲۸
۳۰-۳۴	۲۸	۳۰
۳۵-۳۹	۱۴	۳۱
≥ 40	۱۰	۷
جمع	۱۰۰	۱۰۰

جدول شماره ۱: توزیع فراوانی گروه‌های سنی

سن زن	میزان باروری		IVF			ICSI		
	تعداد کل اووسیت	میزان باروری (%)	میزان تقسیم سلولی (%)	میزان باروری (%)	میزان تقسیم سلولی (%)	تعداد کل اووسیت	میزان باروری (%)	میزان تقسیم سلولی (%)
۲۰-۲۴	۷۴	۳۱(۴۱/۹)	۲۲(۷۰/۹)	۳۳	۳۰(۹۰/۹)	۲۴(۷۲/۷)		
۲۵-۲۹	۲۰۷	۹۹(۴۷/۸)	۷۷(۷۷/۷)	۸۷	۷۸(۸۹/۶)	۷۶(۵۸/۸)		
۳۰-۳۴	۱۱۱	۳۸(۳۴/۲)	۲۹(۷۶/۳)	۱۵۴	۱۳۵(۸۷/۶)	۱۲۱(۸۹/۶)		
۳۵-۳۹	۵۲	۱۴(۲۶/۹)	۸(۶۱/۵)	۲۱۵	۱۸۰(۸۳/۷)	۱۶۸(۳۹/۳)		
>۴۰	۳۰	۸(۲۶/۶)	۳(۳۷/۵)	۳۶	۲۴(۶۶/۷)	۱۵(۶۲/۵)		
جمع	۴۷۴	۱۹۰(۴۰)	۱۳۹(۷۳/۱)	۵۲۵	۴۴۷(۸۵/۱)	۳۹۰(۸۷/۲)		

جدول شماره ۲-مقایسه میزان باروری و تقسیم سلولی بین دو گروه IVF و ICSI

گردیده است. همانطوری که مشاهده می‌شود در گروه IVF میزان باروری در افراد زیر ۳۵ سال، ۴۱/۳٪ در مقایسه با زنان بالای ۳۵ سال ۲۶/۷٪ می‌باشد. از طرف دیگر میزان باروری در گروه ICSI بترتیب ۸۹/۳٪ و ۷۵/۲٪ است که در هر دو گروه با اختلاف معنی داری بالاتر است (p value<0.001). بنابراین میکرواینجکشن نتوانسته است که بر عامل سن و احتمالاً تغییرات بیوشیمیایی سلولی تخمک غالب گردد. همچنین توزیع فراوانی میزان cleavage rate در دو گروه در گروه‌های سنی مختلف مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که مشاهده می‌شود میزان تقسیم سلولی در زنان زیر ۳۵ سال در گروه IVF ۷۴/۳۸٪ و در زنان بالای ۳۵ سال بطور متوسط ۴۹/۵٪ است که از نظر آماری اختلاف معنی‌دار است (p value<0.001). در گروه میکرواینجکشن میزان تقسیم سلولی بترتیب ۸۵/۱۷٪ و ۸۵/۱۵٪ است که تفاوت بارزی بچشم نمی‌خورد. در نهایت تعداد ۱۳۹ از امبریوهای با کیفیت مناسب در ۴۲ نفر از بیماران گروه اول در مقابل ۲۸۶ عدد امبریو در گروه دوم بدخل رحم ۷۲ نفر ترانسفر گردید. در گروه میکرواینجکشن ۶۴ امبریو دچار Fragmentation شد و ۴۰ امبریو به علت تعداد زیاد یا خطر OHSS (ovarian hyper stimulation syndrome) منجمد گردید. همانطور که مشاهده می‌شود باروری در

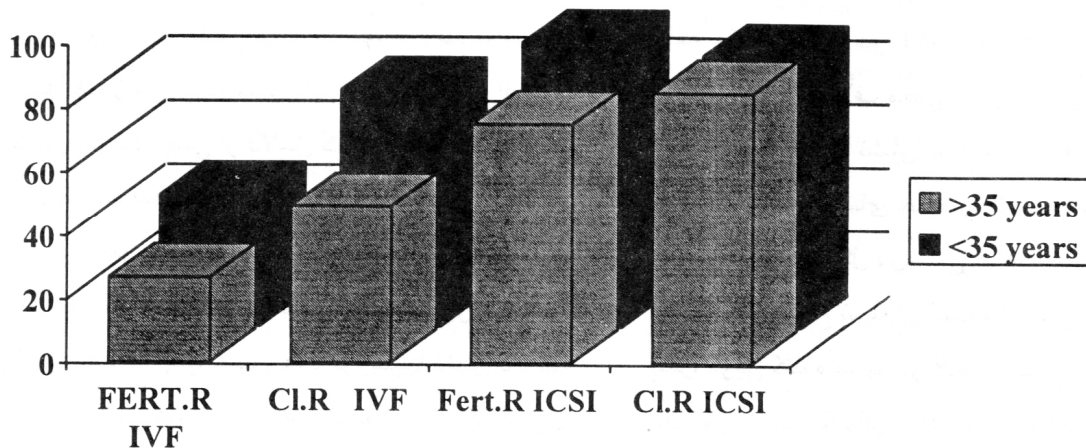
گروه ICSI بترتیب ۸۹/۳٪ و ۷۵/۲٪ تعداد ترانسفر امبریو در زنان بالای ۳۵ سال در گروه IVF کمتر از گروه ICSI است (p value<0.001). بنابراین ارتباط واضحی بین سن زن و میزان باروری در گروه IVF و ICSI وجود دارد. بطوریکه بالاترین میزان را گروه سنی ۲۰-۲۴ سال تشکیل می‌دهند ولی این ارتباط معکوس افزایش سن در میزان تقسیم سلولی در گروه ICSI بسیار خفیف است، که شاید به علت حذف مانع زوناپلوسیدا که در اثر افزایش سن دچار تغییراتی میگردد و همچنین تحریک اووسیت در اثر تزریق اسپرم در روش ICSI باشد (نمودار شماره ۱).

بحث

یکی از دلایل کاهش قدرت باروری همزمان با افزایش سن مادر، اختلالاتی است که در غشاء اووسیت بوجود می‌آید. بعنوان مثال عدم فعال شدن اووسیت طی پدیده باروری بعلت سخت و ضخیم بودن زوناپلوسیدا مانعی در برابر لقاح موفق اسپرم و اووسیت خواهد بود. چه بسا که در سنین بالای ۳۷ سال هم میزان لقاح بدون توجه به پروتکل تحریک تخمک‌گذاری و کیفیت و درجه اووسیت کمتر است (۱۰). حتی ICSI هم نتوانسته بر این مشکل فائق آید و در زنان بالای ۳۵ سال بطور

الگوی موقتی در میان ژن در مراحل اولیه رشد امبریو باشد (۱۳). تحقیقات انجام گرفته موید آن است که آنپلوئیدی کروموزوم ۱۶ که از علل نادر در سقط

محسوسی میزان لانه گزینی و حاملگی کاهش پیدا میکند. در این بررسی میزان باروری ۷۸٪ و تقسیم سلولی ۸۵٪ بوده است (۱۱).



خودبخودی است شیوع بالایی در عدم موفقیت لانه گزینی دارد (۱۴). بررسی سیتوژنتیکی بر روی اوسیت‌های غیر بارور زمانی که تحت IVF قرار گرفته اند نشان داد ۷۷/۷٪ موارد از نظر کاریوتیپ‌ها پلوئیداست ولی در بقیه موارد دچار آنپلوئیدی، دی پلوئیدی و تتراپلوئید هستند که از میان آنها فقط دیپلوئیدی است که با اختلاف معنی داری با افزایش سن افزایش می‌یابد (۱۵). با توجه به اینکه میتوز و رشد لازم اوسیت و مراحل نهایی است، بنظر میرسد که با افزایش سن کاهش در پروسه فولیکولوژنیز باعث کاهش کیفیت اوسیت میشود و با افزایش سن سن زنان دی‌جانکشن یکی از علائم اختلال در رشد اوسیت است (۱۶). قدرت باروری زنان با افزایش سن بخصوص پس از سن ۳۰ سال بطور محسوسی کاهش می‌یابد.

پاتوفیزیولوژی افزایش سن بر دستگاه تناسلی علیرغم توجهی که به آن شده هنوز نکات ابهام زیادی دارد. علیرغم مشخص بودن کاهش کیفیت اوسیت بدنبال افزایش سن، هنوز نقش آن در روی پذیرش

یکی از دلایل کاهش میزان لانه گزینی در سنین بالا افزایش ضخامت زوناپلوسیدا است و به همین علت عده‌ای خدشه‌دار کردن زونا یعنی zona hatching را در زنان بالای ۳۵ سال با میزان موفقیت بالاتری افزایش دادند (۸). یکی از دلایلی که میتواند کاهش قدرت باروری اوسیت‌های زنان با سن بالاتر را توجیه نماید، تغییرات کروموزومی و موتاسیون‌هایی است که در گامتها بوجود می‌آید. البته روشن شدن این نکات مستلزم تحقیقات مولکولی و ژنتیکی گسترده است که در آینده با انجام روش‌های تشخیص ژنتیکی قبل از تولد PIGD امکان پذیر خواهند بود. بعنوان مثال آنپلوئیدی با افزایش سن مادر افزایش می‌یابد (۱۲). بعبارت دیگر همین اختلالات کروموزومی است که منشا کاهش میزان رشد امبریو تا مرحله بلاستوسیت در زنان با سن بالاتر می‌باشد.

همچنان که بررسی‌های انجام شده نشان میدهند تشکیل بلاستوسیت از ۸۲٪ از زنان زیر ۳۰ سال به ۳۶٪ در زنان بالای ۴۰ سال افت میکند (۱۳) و شاید ناشی از مواد به ارث رسیده از اوسیت، زمان فعالیت ژنوم و

عنوان یک فاکتور پیشگویی کننده خیلی مهم حتی در روشهای پیشرفته باروری است (۲۴). میزان لقاح و تقسیم سلولی در زنان بالای ۳۵ سال بدین دو گروه کاملاً یکسان که از دو IVF که فقط از نظر سن بدو گروه شده بودند با اختلاف معنی داری پایین تر بوده است. (۲۵) زیرا مطالعات نشان داده است که بیماران بایستی بر اساس کریتریای خاصی انتخاب شوند تا میزان کنسل کردن سیکل درمانی کاهش پیدا نکند. ولی با اینحال بطور قطع نمیتوان گفت که سن مادر یک عامل پیش گویی کننده مهم در لانه گزینی جنین یا پذیرش اندومتر در سیکلهای IVF نیست (۲۶). در یک بررسی دیگر میزان حاملگی در بالای ۴۰ سال ۱۱/۳٪ در مقایسه با ۲۸/۲٪ در زنان زیر ۴۰ سال بوده است (۲۷). حتی تاثیر سن در باروری بعدی است که در زنان زیر ۳۰-۳۵ سال حداکثر ۳-۴ جنین توصیه میشود، در حالیکه در سن بالای ۳۴ سال اینگونه نیست (۲۸). بنظر میرسد عوامل محیطی و تغذیه هم در میزان پاسخدهی تخمدان موثرند. خوب نشان داده شده که تجویز Vit-E و Vit-C از روز اول حاملگی تا هفته ۱۲ یا ۲۴ حاملگی میتواند مانع تاثیر سوء سن بالای مادر خواهد شد ولی تاثیری روی رشد امبریو یا لقاح نخواهد داشت (۲۹).

اندومتر بخوبی آشکار نشده است (۱۷) و به همین علت علیرغم استفاده از اووسیت اهدایی و آماده سازی رحم با تجویز هورمونها هنوز میزان سقط در این زنان بالاتر از افراد با سن کمتر است. یکی از دلایل کاهش قدرت باروری کاهش ذخیره تخمدانی است که با اندازه گیری Inhibin و FSH روز سوم قاعدگی است که میتواند نتیجه حاملگی را بخصوص در هنگام استفاده از IVF یا میکرواینجکشن پیش گویی کند (۱۸). به همین علت بررسیها نشان داد که در زنان مسن و آگوناتال با استفاده از تخمک اهدایی تفاوتی در میزان حاملگی مشاهده نگردیده است که نشان دهنده اهمیت کمتر پذیرش اندومتر در میزان باروری است (۱۹). Federick هم به این مساله رسید که میزان موفقیت حتی با IVF هم در زنان بالای ۴۰ سال کاهش داخلی میکند (۲۰). در بررسی دیگری هم که انجام داده کمترین میزان حاملگی در بین زنان ۴۰ سال اتفاق افتاده است و به همین علت توصیه شده دفعات CO H/UII Control ovarian Hyperstimulation/ Intra Uterine Insemination در زنان بالای ۴۰ سال به ۳ دفعه محدود گردد (۲۱) و حتی در برخی موارد حتی IVF هم در زنان بالای ۴۰ سال حدوداً توصیه نمیشود (۲۲) از طرف دیگر علیرغم میزان پایین موفقیت در این افراد حتی میزان سقط در این افراد بالاتر حدود ۶۰٪ است (۲۳). بنابراین سن بیمار به

References

- 1- Hendershot GE, Mosher WD, Pratt WF. Infertility and age: an unresolved issue, Fam Plan Perspect. 14:287;1982.
- 2- Tietze: Reproductive span and rate of reproduction among Hutteriete women, Fertil Steril. 1957;89-8.
- 3- Guttmasher AF. factors affecting normal expectancy of conception. JAMA. 1976;161:855-860.
- 4- Collins JA, Roue TC., Age of female partner is a prognostic factors in prolonged unexplained infertility: a multicenter study. Fertil Steril. 1989; 52:15-20.
- 5- Levin RM, Latimore J, Wein AJ, Van Arsdalen KN. Correlation of sperm count and frequency of ejaculation. Fertil Steril. 1986;45:732-34.
- 6- Saur MV, Paulson RJ, Lobo RA. A preliminary report on oocyte donation extending reproductive potential to women over 40. N Engl J Med. 1990; 323:1157.
- 7- Key, Chang, Rebar, Soules. Infertility. Evaluation and treatment. First Edition. 1995;10.
- 8- Cohen J, Alikani M, Trowbridge J. Impairments of the hatching process following IVF in the human and implantation by assisting hatching. Hum Reprod. 1992;7:685.

- 9- Romeo A., Muasher SJ, Acosta AA. Results of in vitro fertilization attempts in women 40 years of age and older: the Norfolk experience. *Fertil Steril.* 1987;47:130.
- 10- Yie SM, Collins JA, Daya S, Hughes E, Sagle M, Younglai EV. Ployploidy and failed fertilization in in vitro fertilization are related to patient's age and gamete quality. *Hum Reprod.* 1996 Mar; 11:3, 614-7.
- 11- Abdelmassih R, Solliia S, Moretto M, Acosta AA. Female age is an important parameter to predict treatment outcome in intracytoplasmic sperm injection *Fertil Steril.* 1996 Mar;65:3,573-7.
- 12- Ishikawa H, Endo A. Combined effects of maternal age and delayed fertilization on the frequency of chromosome anomalies in mice. *Hum Reprod.* 1995Apr;10:4,883-6.
- 13- Janny L, Menezo Y. Maternal age effect on early human embryonic development and blastocyst formation. *J Mol Reprod Dev.* 1996 Sep; 45:1,31-7.
- 14- Benadiva CA, Kligman T, Munne S. Aneuploidy 16 in human embryos increases significantly with maternal age *Fertil Steril.* 1996Aug 66:2,248-55.
- 15- Robert CG, O'Neill C. Increase in the rate of diploidy with maternal age in unfertilized in vitro fertilization oocytes. *Hum Reprod.* 1995 Aug;10: 8,2139-41.
- 16- Volarcik K, Sheean L, Goldfarb J, Woods L, Abdul Karim FW, Hunt P. the meiotic competence of in vitro matured human oocytes is influenced by donor age: evidence that folliculogenesis is compromised in the reproductively aged ovary. *Hum Reprod.* 1998 Jan;13:1,154-60.
- 17- Meldrum DR. Female reproductive aging-ovarian and uterine factors, *Fertil Steril.* 1993;59:1-5.
- 18- Toner JP, Philput CB, Jones GS, Basal FSH level is a better predictor of in vitro Fertilization performance than age. *Fertil Steril.* 1991;55:784-91.
- 19- Reversing the natural decline in human fertility. An extended clinical trial of oocyte donation to women of advanced reproductive age [Published erratum appears in *JAMA.* 1993 Jan; 27,269(4):476.
- 20- Federick JL, Denken MS, Rojas A, Horta I, Stone SC, Asch RH. Is there a role for ovarian stimulation and intra-uterine insemination after age 40? *Hum Reprod.* 1994;9:2284-96.
- 21- Marine Sahakyan, Bernard L, Harlow, Mark D. Influence of age, diagnosis, and cycle number on pregnancy rate with gonadotropin-induced controlled ovarian hyperstimulation and intra-uterine insemination. *Fertil Steril.* 1999;3:1:500-4.
- 22- Michelmann HW, Micheels P, Mettler L. Effect of maternal age on the success rate of in vitro fertilization. A comparison of human and animal experiment data. *Geburtshilfe frauenheilkd.* 1987 Jul; 47:7,495-8.
- 23- Romeu A, Muasher SJ, Acosta AA, Veeck LL, Diaz J, Jones GS, Jones HW. Jr, Rosenwaaks Z. results of in vitro fertilization attempts in experience. *Fertil Steril.* 1987 Jan, 47:1,130-6.
- women 40 years of age and older: the Norfolk
- 24- Di Castro Stringher P, Hernandez Vazquez J, Kably Ambe A, Gavi? O Gavi? O F, Calder? n Salda? a MC. Impact of the maternal age variable on ovular harvesting fertilization and segmentation in a program of assisted reproduction *Ginecol Obstet Mex.* 1992 Mar;60, 86-90.
- 25- Cordeiro I, Calhaz-Jorge C, Barata M, Leal F, Proence H, Coelho AM. The effect of the woman's age, the rate of cleavage and embryo quality on obtaining a pregnancy by in vitro fertilization. *Acta Med Port.* 1995 Mar;8:3,145-50.
- 26- Arthur ID, Anthony FW, Masson GM, Thomas EJ. The selection criteria on an IVF program can remove the association between maternal age and implantation. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1994 Aug;73:7,562-6.
- 27- Lass A, Croucher C, Duffy S, Dawson K, Margara R, Winston RM. One thousand initiated cycles of in vitro fertilization in women > or=40 years of age *Fertil Steril.* 1998 Dec;70:6,1030-4.
- 28- Svendsen TO, Jones D, Butler L, Muasher SJ. The incidence of multiple gestations after in vitro fertilization is dependent on the number of embryos transferred and maternal age. *Fertil Steril.* 1991 Mar; 65:3,561-5.
- 29- Tar ?n J, Ten J, Vendrell FJ, de Oliveria MN, Cano A Effects of maternal ageing and dietary antioxidant. Supplementation on ovulation, Fertilization and embryo development in vitro in the mouse. *Reprod Nutr Dev.* 1998 Sep;-Oct, 38:5,499-508.