اثرات هورمون های تحریک کننده فولیکول نو ترکیب و HMG بر بلوغ اووسیت های نابالغ انسانی در محیط کشت و میزان جنین های ۸ سلولی حاصل از تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم

جواد بهار آراء[1]، نزهت موسوی فر[2]، محسن جلالی[3]، مریم مغانی[4]

۱- استادیار گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی مشهد

۲- استادیار دانشگاه علوم پزشکی مشهد ، مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروی منتصریه

۳- متخصص علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری منتصریه

۴- کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی تکوینی

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۲/۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۴/۹

خلاصه

مقدمه: استفاده از روش بلوغ تخمک ها در محیط کشت (IVM) برای درمان ناباروری در زنان دارای سندرم پلی کیستیک تخمدان (PCOS) و یا افراد مبتلا به سندرم تحریک بیش از حد تخمدان (OHSS) مفید می باشد و باعث کاهش میزان مصرف داروهای گنادوتروپین و در نتیجه کاهش هزینه های درمان می گردد. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات هورمون های HMG و r-FSH بر بلوغ اووسیت های نابالغ انسانی و میزان جنین های هشت سلولی ایجاد شده ، حاصل از تزریق اسپرم به سیتوپلاسم تخمک (ICSI) انجام شده است.

روش کار: این مطالعه از نوع تجربی و در سال ۱۳۸۶-۱۳۸۵ در مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری منتصریه و دانشگاه آزاد اسلامی مشهد انجام شده است. تعداد ۱۵۶ تخمک نابالغ حاصل از تخمدان زنان کاندید لقاح درمحیط کشت (IVF) به سه گروه تقسیم شد. در گروه شاهد به محیط کشت اووسیت آلبومین سرم انسانی ۱۰٪ و در محیط کشت گروه های تجربی ۱ و ۲ به ترتیب r-FSH و HMG به مقدار ۰.۰۷۵ IU/ml اضافه شد. سپس تخمک های بالغ را با تزریق اسپرم به داخل سیتوپلاسم آنها بارور وتعداد رویان های هشت سلولی ایجاد شده توسط میکروسکوپ معکوس بررسی گردید. داده های کمی حاصل با استفاده از روش آماری مجذور کای و نرم افزار SPSS در سطح معنی داری $P<0.05$ تحلیل گردید.

نتایج: میزان بلوغ اووسیت های نابالغ انسانی تا مرحله متا فاز ۲ و رسیدن رویا ن ها به مرحله هشت سلولی به طور معنی داری در گروه های HMG و r-FSH نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد($P<0.001$).

نتیجه گیری: هردو هورمون HMG و r-FSH باعث افزایش میزان بلوغ اووسیت های نابالغ انسانی در محیط کشت می شود ونیز میزان رسیدن رویان ها را به مرحله هشت سلولی افزایش می دهند. (مجله زنان، مامائی و نازائی ایران، دوره یازدهم، شماره سوم، پاییز۸۷: ۵۰-۴۳)

کلمات کلیدی: بلوغ آزمایشگاهی، HMG و r-FSH ، ICSI،

* **نویسنده مسؤول:جواد بهارآراء**

آدرس: میدان راهنمایی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد

baharara@yahoo.com

تلفن و نمابر: ۶۲۲۴۸۲۲ (۵۱۱) ۹۸+

مقدمه

برای درمان ناباروری به روش لقاح درمحیط کشت (IVF)[1]نیاز به تخمک های زیادی می باشد ، به همین دلیل این افراد دو یا سه هفته از داروهای گنادوتروپین استفاده می کنند که از نظر اقتصادی هزینه بالائی دارد وممکن است باعث سندرم تحریک بیش ازحد تخمدان و ترومبوز سیاهرگ ها، و در صورت استفاده طولانی مدت باعث ایجاد سرطان تخمدان شود (۱). همچنین با توجه به اینکه افراد مبتلا به سندرم پلی کیستیک تخمدان نیز نمی توانند به میزان لازم از این داروها استفاده کنند و از طرف دیگر برای انجام IVF موفق نیاز به تخمک هایی است که قبل از لقاح بالغ شده و به مرحله متافاز ۲ رسیده باشند در حالیکه ۱۰ تا ۱۵ درصد از تخمک هایی که گرفته می شود بالغ نیستند و درمرحله وزیکول ژرمینال قرار دارند، برایIVF مورد استفاده قرار نمی گیرند و دور ریخته می شوند(۱). با روش IVM[2] می توان از این تخمکها استفاده کرد، در آزمایشگاه بالغ نمود و از طریق ICSI[3] بارور و رویان های حاصل را منتقل نمود(۲). به کمک این روش عوارض جانبی فوق الذکر و نیز هزینه های اقتصادی مربوطه کاهش می یابد. اولین بلوغ آزمایشگاهی اووسیت پستانداران در خرگوش توسط انزمان[4] و پنسوس[5] در سال ۱۹۳۵ گزارش شد (۳). در انسان مطالعات بلوغ آزمایشگاهی توسط ساندرس[6] و پنسوس در سال ۱۹۳۹ شروع شد . در ۱۹۶۰محققی بنام Edward Further نشان داد که اووسیتهای انسانی بالغ شده در محیط کشت می توانند در vitro لقاح یابند (٤) و اولین تولد موفقیت آمیز توسط این روش درسال ۱۹۹۱گزارش شد. پس از آن سعی شد ترکیبات مختلف را در بلوغ اووسیتهای نابالغ وکیفیت جنین های حاصل از آن رامورد بررسی قرار داده و کیفیت محیط های کشت IVM را افزایش دهند و شرایطی مشابه in vivo برای حفظ کیفیت تخمک فراهم کنند. بیشتر مطالعات IVM برروی حیواناتی مثل موش ، گوسفند، گاو، خوک و میمون انجام شده چون دسترسی به اووسیتهای نابالغ در آنها آسانتر از انسان است (۵). استفاده از گنادوتروپین ها در روش بلوغ آزمایشگاهی بسیار مورد توجه پژوهشگران بوده و تحقیقات نشان داده که اضافه کردن این ترکیبات به محیط کشت برای بلوغ هسته وسیتوپلاسم ضروری و برای ایجاد تخمک های مطلوب مفید می باشد. هورمون HMG[7] گنادوتروپین دوران یائسگی است که از ادرار زنان یائسه بدست می آید و ویال های تزریقی آن شامل 75 IU FSH و 75 IU LH است، r-FSH [8] بوسیله کشت سلول های تخمدان هامستر چینی تولید می شود و خلوص بیشتری نسبت به HMG دارد . هردو هورمون در تحریک رشد فولیکولی و بلوغ موثرند (٦). مطالعه اکاردو [9] و همکاران در مورد اثر هورمون های r-LH و r-FSH بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک های نابالغ گوسفند نشان داده است، میزان بلوغ، تسهیم و ایجاد بلاستوسیست در تخمک ها یی که در معرض هر دو هورمون قرار گرفتند افزایش معنی دار دارد ($p<۰/۰۵$) (۷). مطالعه دیگری توسط اندریسز[10] و همکاران نشان داده است، بلوغ تخمک های نابالغ انسان و گاو در محیط کشت حاوی نسبت ۱:۱۰ هورمون های r-LH و r-FSH افزیش معنی دار می یابد ($p<۰/۰۵$)، در حالیکه تاثیری در بلوغ تخمک های موش ندارد (۸). مطالعه کلینیکی دیگری نشان داده است که HMG باعث افزایش بلوغ وتسهیم در تخمک های نابالغ بدست آمده از فولیکول های کوچک انسان می شود (۹). گزارش دایا [11]و همکاران نشان داده است که درسیکل های

1- in vitro fertilization
2- In vitro maturation
3- Intracytoplasmic sperm injection
4- Enzmann
5- Pincus
6- Saunders
7- Human -menopausal gonadotropin
8- recombinant –follicle stimulating hormone
9- Accardo
10- Anderiesz
11- Daya

درمانی،r- FSH باعث افزایش میزان حاملگی نسبت به HMG می شود (۱۰). همچنین تجربیات دیگر بیانگر آن است که زنانی که تحت ICSI قرار گرفتند و FSH ادراری دریافت نمودند، تخمک های متافازی آنها مورفولوژی طبیعی تری نسبت به افراد گروه HMG نشان می دهد(۱۱). در حالیکه مطالعات Agarwal و Hung و همکارانشان در زنانی که تحت سیکل درمانی IVF قرار دا شتند نشان داده است که r- FSH وHMG اثرات مشابهی در کیفیت تخمک ها و جنین ها دارند (۱۳،۱۲). با توجه به نتایج متفاوت گزارش های منتشره، جهت رفع ابهام های موجود و همچنین اهمیت بلوغ تخمک ها در محیط کشت برای درمان ناباروری ، در این پژوهش سعی شد تا اثر هورمون های r- FSH و HMG بعنوان یک عامل تاثیر گذار بر بلوغ تخمک های نابالغ انسانی و رشدونمو جنین های بدست آمده از این تخمک ها در محیط کشت مورد بررسی قرار گیرد.

مواد وروش ها

جمع آوری تخمک های نابالغ

این مطالعه در مدت ۱۲ ماه در سالهای ۱۳۸۵-۱۳۸٦ در مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری منتصریه و آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی تکوینی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد انجام شد. تخمک های لازم برای این تحقیق از تخمک های زنان کاندید IVF که به مرکز منتصریه مراجعه کرده وتحت درمان داروهای هورمونی FSH و HMG قرارگرفته بودند بدست آمد. هیچ یک از این افراد سندرم تحریک بیش از حد تخمدان نداشتند (تخمدان تمام بیماران توسط سونوگرافی های مداوم بررسی می شد). همه آنها ۳٦ ساعت قبل از عمل تخمک گیری HCG (به میزان۱۰۰۰۰واحد) دریافت کرده بودند. در هنگام تخمک گیری بعضی از فولیکول های کمتر از ۱۸ میلی متر هم تخلیه می شوند که تخمک های نابالغ مربوط به این فولیکو لها است. اطراف اووسیت ها در این مرحله توسط سلول های گرانولوزه پوشیده شده است و تشخیص تخمک بالغ و نابالغ مشکل می باشد برای دیدن گویچه قطبی آزاد شده (نشانه تخمک متافازی ۲) باید سلول های گرانولوزه را حذف نمود که اینکار به کمک آنزیم هیالورونیداز (Hyase,Vitro life,Sweden) انجام می شود. در حقیقت تخمک های نابالغ که کیفیت لازم برای لقاح را ندارند در بیشتر مراکز دور ریخته می شوند و ما در این پژوهش از این تخمک ها با رعایت ملاحظات اخلاقی و رضایت بیماران استفاده کردیم.

آماده سازی محیط کشت

جهت انجام تجربیات از محیط کشت (Version G1 3,Vitro life,Sweden) به اضافه آلبومین سرم انسانی human serun albumin (HSA)(Vitro life, Sweden) ده درصد ، در سه گروه ذیل استفاده شد:

گروه شاهد : شامل محیط کشتG1 +HSA 10%

گروه تجربی ۱ شامل:
G1+HSA10%+r-FSH0.075IU/ml(Gonal-F,Sereno)

گروه تجربی۲ شامل:
G1+HSA10%+HMG0.075IU/ml(Menogon,Germany)

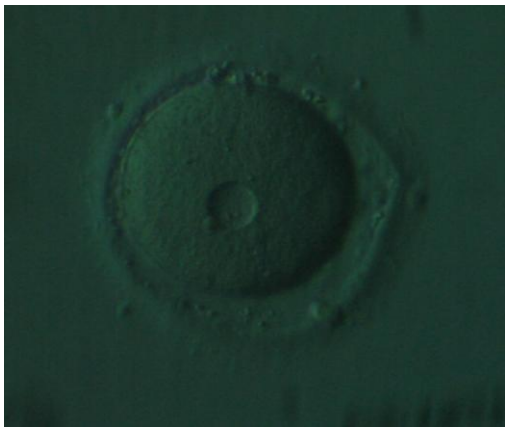
قراردادن نمونه ها در محیط کشت و تلقیح تخمک ها

تعداد ۱٥٦ تخمک نابالغ که در مدت این تحقیق بدست آمد بصورت تصادفی در سه گروه مساوی (شاهد ۱، تجربی ۱، تجربی ۲) تقسیم بندی شدند (چون این مطالعه برروی انسان انجام شده حجم نمونه ها انتخابی نبوده است) و تخمک های هرگروه در محیط کشت مربوط فوق الذکر قرار داده شدند و روی آنها توسط mineral oil (Ovoil,Vitrolife,Sweden) پوشانده شد. سپس به مدت ۲٤ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد با دی اکسید کربن ٥ درصد قرار داده شدند و در ادامه مراحل بلوغ آزمایشگاهی و از سرگیری میوز توسط میکروسکوپ معکوس (olympus,Japan.) مورد مطالعه قرار گرفت. تخمک های بدون تغییر در هسته، تخمک نابالغ و تخمک های دارای جسم قطبی بعنوان تخمک بالغ در نظر گرفته شد. از تخمک های بالغ تهیه شده جهت

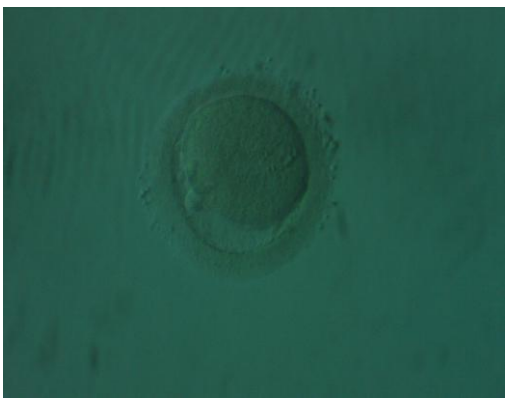
انجام لقاح به روش ICSI استفاده شد. بدین ترتیب که اسپرم لازم برای انجام ICSI به روش Percoll gradiant آماده سازی گردید (١٤). سپس ٢ میکرولیتر از اسپرم های مذکور در قطره ای از محلول کاهش دهنده تحرک اسپرم (Vitrolife, Sweden PVP,) در پلیت حاوی تخمک های بالغ قرار داه شد و توسط سوزن میکرواینجکشن، اسپرم فعال انتخاب وبه سیتوپلاسم تخمک بالغ شده در محیط آزمایشگاهی تزریق گردید. پس از انجام ICSI اووسیت های لقاح یافته به مدت ٧٢ ساعت جهت مطالعه تسهیم تا مرحله ٨ سلولی مورد بررسی قرار گرفتند. داده های کمی حاصل از این پژوهش به کمک آزمون آماری کای اسکوئر و با استفاده از نرم افزار SPSS در سطح معنی دار $p< ٠/٠٥$ تحلیل گردیدند.

نتایج

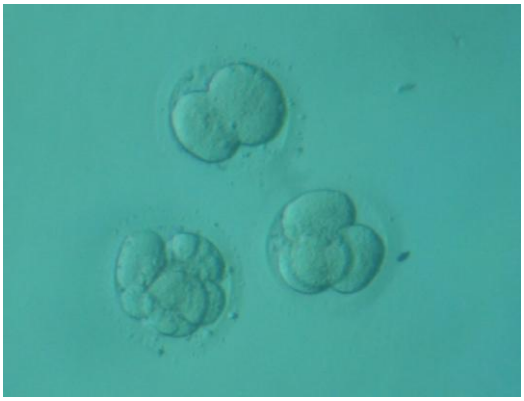
مطالعه میزان از سرگیری میوز و بلوغ آزمایشگاهی تخمک های نابالغ تحت تاثیر هورمون های HMG و-r FSH در مقایسه با گروه شاهد نشان داد که از ٥٢ تخمک نابالغ مربوط به گروه شاهد بعد از ٢٤ ساعت٨٦/٥٣ درصد به مرحله متافاز ٢ رسیدند در حالیکه از ٥٢ تخمک نابالغ مربوط به گروه تجربی ١ (r-FSH) ٩٦/١٥ درصد به مرحله متافاز ٢ رسیدند و همچنین از ٥٢ تخمک نابالغ مربوط به گروه تجربی ٢ (HMG) ٩٨/٧٠ درصد به مرحله متافاز ٢ رسیدند. بررسی آماری نتایج فوق الذکر نشان داده است که از نظر میزان بلوغ نمونه های مربوط به گروه های تجربی ١ و ٢ افزایش معنی دار ($p<٠/٠٥$) در مقایسه با شاهد دارند. بررسی تکوین تخمک های لقاح یافته ٧٢ ساعت پس از ICSI نشان داده است که از ٤٥ تخمک بالغ لقاح یافته مربوط به گروه شاهد ٦٦/٦٦ درصد در مرحله دوسلولی و ٣٣/٣٣ درصد نکروز شده بودند در حالیکه از ٥٠ تخمک بالغ لقاح یافته مربوط به گروه تجربی ١ (r-FSH) ٢٤ درصد از جنین ها در مرحله دوسلولی ، ٨ درصد در مرحله ٤ سلولی ، ٣٢ درصد در مرحله ٨ سلولی قرار داشتند و ٣٦ درصد نکروز شده بودند.همچنین از ٥١ تخمک بالغ لقاح یافته مربوط به گروه تجربی ٢(HMG) ١٩/٦ درصد از جنین ها در مرحله دوسلولی، ٢٣/٥٢ درصد در مرحله ٤ سلولی، ٣٩/٢١ درصد در مرحله ٨ سلولی قرار داشتند و ١٧/٦٤ نکروز شده بودند (شکل های ١و ٢و ٣). بررسی آماری نتایج فوق الذکر نشان داده است که از نظر تکوین تخمک های بالغ لقاح یافته و ایجاد جنین های ٨ سلولی بین گروه های تجربی ١ و ٢ در مقایسه با شاهد افزایش معنی دار وجود دارد ($p< ٠/٠٥$ نمودارهای ١و ٢).



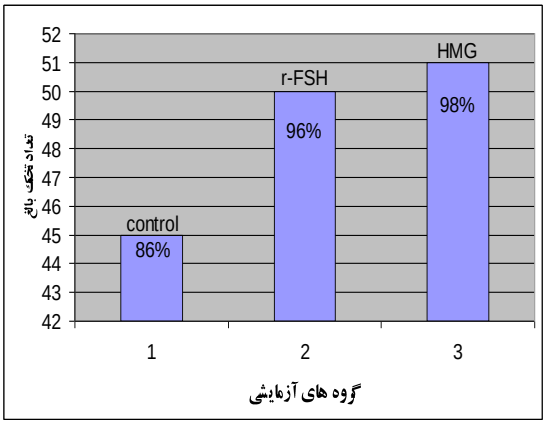
شکل ١- تخمک نابالغ انسان که وزیکول ژرمینال در مرکز قرار دارد.



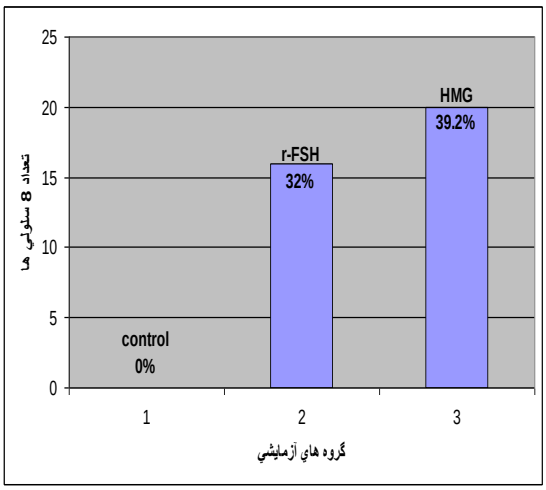
شکل ٢- تخمک بالغ انسان در مرحله متافاز ٢ که اولین گویچه قطبی آزاد شده است.



شکل ۳- جنین های ۲و٤و۸ سلولی حاصل از لقاح تخمکهای بالغ شده در محیط کشت به روش ICSI



نمودار ۱-مقایسه میزان بلوغ در گروه های تجربی ۱ و ۲ و شاهد، ٢٤ ساعت پس از کشت



نمودار ۲- مقایسه میزان رویان های۸ سلولی۷۲ ساعت پس از لقاح در گروه های شاهد و تجربی ۱ و۲

بحث

بلوغ آزمایشگاهی تخمک های انسانی یک تکنولوژی تولید مثلی با فواید زیادی است . موفقیت این مراحل مستلزم بلوغ هسته و سیتوپلاسم است (۱۹). وقتی یک تخمک رشد می کند و بالغ می شود توانائی ادامه و تکمیل میوز را بدست می آورد(بلوغ هسته) در مسیر کسب این صلاحیت ها تغییرات سیتوپلاسمی نظیر رونویسی، ترجمه، تعدیل پس از ترجمه و تغییرات ساختاری رخ می دهد (بلوغ سیتوپلاسمی) (۱٦). پروتیئن ها یی نظیر فاکتور پیش برنده بلوغ (maturation promoting factor) در پیشرفت میوز و کنترل سیکل سلولی دخالت دارند (۱۷). درvivo فاکتور پیش برنده بلوغ در شروع بلوغ تخمک در پاسخ به افزایش LH یا فاکتور لوتئینی کننده فعال می شود.اگر تخمک پستانداران از محیط فولیکولی خارج شود ، میوز بطور خودبخودازسر گرفته می شوداما علیرغم بلوغ هسته ای در محیط کشت این تخمک ها موفق به بلوغ سیتوپلاسمی نمی شوند چون محیط کشت در سیگنال دهی به تخمک ناتوان است (۱۸). استفاده از گنادوتروپینها به عنوان یک روش شناخته شده برای القاء رشد و نمو، افزایش تعداد فولیکول ها و تخمک گذاری در حیوانات و انسان می باشد (۱۹). در این مطالعه هورمونهایr-FSH و HMG به عنوان یکی از عوامل موثر در ادامه میوز وبلوغ سیتوپلاسمی وهسته ای تخمکهای نابالغ انسانی و تکوین جنین های حاصل از آنها در محیط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد که این هورمونها بلوغ آزمایشگاهی تخمک را افزایش داده و تکوین جنین را بهبود می بخشند. همانطور که در نمودار ۱ آمده است میزان بلوغ دردو گروه تجربی HMG و r-FSH نسبت به گروه کنترل بیشتر بوده است و اختلاف معنی داری دارد($p=۰/۰۳$) که با یافته های Mikkelsen و Lindenberg در مورد استفاده از r-FSH قبل از برداشت تخمک در بیماران مبتلا به سندرم PCO باعث بهبودی پتانسیل بلوغ تخمکها

می شود (۲۰). بین دوگروه تجربی از نظر میزان بلوغ اختلاف معنی داری مشاهده نشد (p=۰/۵) که با یافته های Agarwal و Hung مبنی بر اثرات مشابه FSH و HMG (۱۳و۱۲)در افزایش تخمک های بالغ انسانی در شرایط invivo ونتایج حاصل از تحقیقات Accardo و همکارانش در مورد افزایش بلوغ تخمک های گوسفند در محیط کشت حاویr-FSH +r-LH و r-FSH نسبت به محیط r-LHومحیط فاقد هورمون مطابقت دارد (۷). همچنین مطالعاتZhang و همکارانش نشا ن داد که HMGباعث افزایش بلوغ آزمایشگاهی تخمکهای فولیکولهای کوچک می شود(۲). یافته های Anderiesz نیز نشان دادکه r-LH, r-FSH باعث افزایش بلوغ آزمایشگاهی تخمک های انسانی وگاوی ورشد و نموجنین های حاصل ازآن می شود و علت آنرا افزایش بیان پروتئین های تخمک در حضور گنادوتروپین ها می داند. در حالیکه ایندو هورمون تاثیری در بلوغ تخمک های موش وجنین های آن نداشت(۸). تحقیقات Mercan وهمکارانش برروی بیمارانی که FSH ,FSH+HMG دریافت کردند نشان داد که میزان بلوغ آزمایشگاهی در گروه FSH+HMG بیشتر از گروه FSH است . آنها پیشنهاد می کنند که این امر ممکن است ناشی از LHموجود در هورمون HMG باشد (۲۲). در حالیکه گزارش Imthurn بیانگر آن است که تحت تاثیرFSH با خلوص بالا و HMG تعداد تخمک های متافازی ۲ افزایش می یابد و این افزایش در گروهFSH با خلوص بالا بیشتر از گروه HMG می باشد (۱۱). در تحقیق حاضر ما تخمکهای بالغ شده در محیط کشت را به روش ICSI بارور کرده و سیر تکوین جنین را تا ۷۲ ساعت بعد از لقاح بررسی نمودیم. همانطور که در نمودار آمده است تعداد جنین های ۸سلولی در گروههای تجربی نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری نشان می دهد (p<۰/۰۰۱). در گروه کنترل هیچ جنین ۸ سلولی ایجاد نشد در حالیکه در گروه r- FSHحدود۳۲٪ ودر گروه HMG حدود۳۹.۲٪ جنین ها به مرحله۸سلولی رسیده اند. همچنین بین دوگروه آزمونr- FSH,HMG از نظر میزان جنین های۸ سلولی ایجادشده اختلاف معنی داری دیده می شود(p<۰/۰۰۱) این نتایج نشان می دهد که هورمونها ی گنادوتروپین در in vitro نیز باعث بهبودی رشد و نمو و تقسیمات جنین می شوند و هورمون HMG تاثیر بیشتری نسبت r-FSH در این مورد داشته است که این نتیجه با یافته های مطالعهAnderson و همکاران که در سال۲۰۰۶ میلادی صورت گرفته سازگاری داردآنها نشان داد ند کیفیت جنین ها در زنان دریافت کنندهHMG نسبت به r- FSH بهتر است وعلت آنرا حضور LH در HMG می دانند(۲۳). تحقیقات Bagratee و همکاران در مورد مقایسه اثر هورمونهای (HP-FSH High Purify) باHMG نشان داد که اثر این دو هورمون برای تحریک تخمدان میزان لقاح و حاملگی یکسان است و نیاز بهLH خارجی برای تحریک تخمدان در برنامه های IVF نمی باشد(۲٤). در حالیکه گزارشات Daya و همکارانش بیانگرآن است که استفاده از FSH ادراری یا r-FSH در vivo باعث افزایش میزان حاملگی نسبت بهHMG می شودو فقدان LH در FSH ادراری یا r-FSH را دلیل اصلی پیشرفت حاملگی در زنان دریافت کنندهFSH می داند(۱۰). نتایج متفاوت بدست آمده از مطالعات مختلف بر روی هورمونهایFSHو HMG ممکن است به خاطر تفاوت در میزانLH و یا ترکیب ایزوفورم های مختلف FSH در HMG و FSH ادراری وr-FSH باشد. با توجه به اینکه هورمونHMG ترکیب مساوی از FSH و LH دارد حضور LH باعث افزایش تولید آندروژن ها و استرادیول می شود که در بلوغ تخمک و رشد و نمو جنین نقش داردهمچنین اضافه کردن LH به محیط کشت باعث تحریک germinal vesicle breakdown یا شکستن وزیکول ژرمینال و بلوغ می شود (۲۱). تحقیقات Brackett, Zuelke نشان داد که بلوغ آزمایشگاهی با LH باعث افزایش فعالیت گلیکولیتیک و اکسیداسیون میتوکندریایی گلوکز در تخمک های گاو می شود و ممکن است مکانیسمی که LH باعث افزایش بلوغ تخمک می شود را بیان کند(۲۵). LH و FSH سنتز پروتئین را در تخمک القاء می کنند. عدم ایجاد رویانهای ۸ سلولی و کاهش میزان بلوغ در

محیط کشت کنترل شاید به علت فقدان یا کمبود پروتئینهای لازم برای شروع رشدو نمو اولیه جنین باشد زیرا محیط کنترل فاقد سیگنالهای لازم برای بلوغ سیتو پلاسمی بوده اگر چه اووسیتها به بلوغ هسته ای نائل می شوند، لکن در ایجاد پروتئینهای لازم برای لقاح و رشد و نمو سلول تخم تا مرحله رویانهای ۸ سلولی نا توان می باشند(۲۶).

نتیجه گیری

یافته های این مطالعه نشان می دهد که هر دو هورمون FSH و HMG در vitro باعث افزایش بلوغ تخمک های نابالغ و تعداد جنین های ۸ سلولی ایجاد شده می شود. همچنین هورمونHMG سبب افزایش میزان جنین های ۸سلولی نسبت بهr-FSH می شود.

بهتر است غلظتهای مختلف این هورمونها واثرات آن در میزان بلوغ آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گیرد . می توان اثر این هورمونها را برروی مراحل بعدی تکوین جنینی مانند مورولاوبلاستولا مطالعه نمود. در صورت امکان جنین های حاصل از این تخمک ها را بداخل رحم منتقل کرد ومیزان حاملگی ایجادشده و تولد نوزادان را مورد بررسی قرار داد.

تشکر و قدردانی

از همکاران محترم مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری منتصریه و آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی تکوینی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد به خصوص خانم ها معصومه غلامیان و طوعه عبداللهی سپاس گزاری می شود. کلیه هزینه ها توسط این دو موسسه تامین شده است.

منابع

1. Jaroudi KA , Hollanders JMG , Elnour AM , Roca GL , Atared AM, Coskun S, et al. . Embryo development and pregnancies from in–vitro matured and fertilized human oocytes,Hum Reprod 1999 Jul;14(7):1749-51.
2. Hwu1 YM, Lee1 RK, Chen CP, Su JT, Chen YW, Lin SP.Development of hatching blastocysts from immature human oocytes following in-vitro maturation and fertilization using a co-culture system .Hum Reprod 1998 Jul;13(7):1916–21.
3. Pincus G, Enzmann EV.The comparative behavior of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*. I The activation of ovarian eggs. J Exp Med 1935; 62: 665-75.
4. Combelles CM, Cekleniak NA, Racowsky C, Albertini DF.Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes.Hum Reprod 2002 Apr;17(4):1006-16.
5. Khashavi Z, Karimzadeh MA.Comparison of unstimulated in vitro maturation and stimulated in vitro fertilization in women with poly cystic ovarian syndrome.J Med Science 2004;6:11-14.
6. Giudice E, Crisci C, Eshkol A and Papoian R. Composition of commercial gonadotropin preparations extracted from human post-menopausal urine: characterization of non-gonadotropin proteins.Hum Reprod 1994 Dec;**9**(12): 2291–9.
7. Accardo C, Dattena M, Pilichi S, Mara L, Chessa B and Cappai P. Effect of recombinant human FSH and LH on in vitro maturation of sheep oocyte; embryo development and viability.Anim Reprod Sci 2004 Mar;81(1-2):77-86.
8. Anderiesz C, Ferraretti A, Magli C, Fiorentino A, Fortini D, Gianaroli L, et al. Effect of recombinant human gonadotrophins on human, bovine and murine oocyte meiosis, fertilization and embryonic development in vitro. Hum Reprod 2000 May;15(5):1140-8.
9. Zhang X, Zerafa A, Wong J, Armstrong DT, Khamsi F. Human menopausal gonadotropin during in vitro maturation of human oocytes retrieved from small follicles enhances in vitro fertilization and cleavage rates. Fertil Steril 1993 Apr;59(4):850-3.
10. Daya S, Gunby J, Hughes EG, Collins JA, Sagle MA. Follicle-stimulating hormone versus human menopausal gonadotropin for in vitro fertilization cycles.Fertil Steril 2001 Oct ;76(4):853-4.
11. Imthurn B, Macas E, Rosselli M, Keller PJ. Nuclear maturity and oocyte morphology after stimulation with highly purified follicle stimulating hormone compared to human menopausal gonadotrophin. Hum Reprod 1996 Nov;11(11):2387-91.

12. Agrawal R, Holmes J, Jacobs HS. Follicle-stimulating hormone or human menopausal gonadotropin for ovarian stimulation in in vitro fertilization cycles: a meta-analysis. Fertil Steril 2000 Feb;73(2):338-43.
13. Ng EH, Lau EY, Yeung WS, Ho PC. HMG is as good as recombinant human FSH in terms of oocyte and embryo quality: a prospective randomized trial. Hum Reprod 2001 Feb;16(2):319-25.
14. Son WY, Yoon SH, Park SJ, Yoon HJ, Lee WD, Lim JH. Ongoing twin pregnancy after vitrification of blastocysts produced by in-vitro matured oocytes retrieved from a woman with polycystic ovary syndrome: Case report. Hum Reprod 2002 Nov;17(11):2963-6.
15. Smith GD. In vitro maturation of oocytes. Curr Womens Health Rep 2001 Oct;1(2):143-51.
16. Krisher RL. The effect of oocyte quality on development.J Anim Sci 2004;82 E-Suppl:E14-23.
17. Balakier H, Sojecki A, Motamedi G, Librach C. Time-dependent capability of human oocytes for activation and pronuclear formation during metaphase II arrest. Hum Reprod 2004 Apr;19(4):982-7.
18. Trounson A, Anderiesz C, Jones G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. Reproduction 2001 Jan;121(1):51-75.
19. Combelles CM, Albertini DF. Assessment of oocyte quality following repeated gonadotropin stimulation in the mouse. Biol Reprod 2003 Mar;68(3):812-21.
20. Mikkelsen AL, Lindenberg S. Benefit of FSH priming of women with PCOS to the in vitro maturation procedure and the outcome: a randomized prospective study. Reproduction 2001 Oct;122(4):587-92.
21. Zhang X, Zerafa A, Wong J, Armstrong DT, Khamsi F. Human menopausal gonadotropin during in vitro maturation of human oocytes retrieved from small follicles enhances in vitro fertilization and cleavage rates. Fertil Steril 1993 Apr;59(4):850-3.
22. Mercan R, Mayer JF, Walker D, Jones S, Oehninger S, Toner JP, et al. Improved oocyte quality is obtained with follicle stimulating hormone alone than with follicle stimulating hormone/human menopausal gonadotrophin combination. Hum Reprod 1997 Sep;12(9):1886-9.
23. Andersen AN, Devroey P, Arce JC.Clinical outcome following stimulation with highly purified HMG or recombinant FSH in patients undergoing IVF: a randomized assessor-blind controlled trial. Hum Reprod 2006 Dec;21(12):3217-27.
24. Bagratee JS, Lockwood G, López Bernal A, Barlow DH, Ledger WL.Comparison of highly purified FSH (metrodin-high purity) with pergonal for IVF superovulation. J Assist Reprod Genet 1998 Feb;15(2):65-9.
25. Zuelke KA, Brackett BG. Effects of luteinizing hormone on glucose metabolism in cumulus-enclosed bovine oocytes matured in vitro. Endocrinology 1992 Dec;131(6):2690-6.
26. Cha KY, Chian RC. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. Hum Reprod Update 1998 Mar-Apr;4(2):103-20