تأثیر یونومایسین به عنوان یک ماده مصنوعی فعال کننده تخمک بر نتایج لقاح پس از انجام تزریق سیتوپلاسمی اسپرم به درون تخمک

دکتر شهناز رضوی[1*]، دکتر زینب جاودان[2]، دکتر محمد حسین نصر اصفهانی[3]، مسعود صادقی[4]

۱. دانشیار گروه بافت شناسی و جنین شناسی، گروه علوم تشریح و بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
۲. پزشک عمومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
۳. دانشیار گروه جنین شناسی، گروه جنین شناسی و آندرولوژی پژوهشکده رویان، مرکز باروری و ناباروری اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
۴. مربی گروه بافت شناسی، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱/۲۸ **تاریخ پذیرش مقاله:** ۱۳۹۱/۶/۱۹

خلاصه

مقدمه: جهت افزایش احتمال لقاح در مواردی که عدم موفقیت لقاح بعد از انجام تزریق سیتوپلاسمی اسپرم به درون تخمک (ICSI)، ناشی از فعال نشدن تخمک باشد، فعال کردن تخمک به صورت مصنوعی توصیه می شود. روش های فعال کردن مصنوعی تخمک از طریق استفاده از یک ماده شیمیایی یا به طریق الکتریکی می باشد. مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر یونومایسین به عنوان یک ماده شیمیایی که به طور مصنوعی باعث فعال سازی تخمک می شود، بر میزان لقاح، تسهیم، رشد و نمو جنین و میزان بارداری بعد از انجام ICSI انجام شد.

روش کار: این مطالعه مداخله ای در سال ۸۴-۱۳۸۳ بر روی ۸۷ زوج نابارور مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان که علت ناباروری آنها فاکتورهای مردانه بود، انجام شد. مایع سمن از افراد مورد مطالعه جهت درمان ICSI جمع آوری شد. بخشی از آن جهت آنالیز معمول سمن که شامل بررسی غلظت، تحرک و مورفولوژی است، بر اساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی استفاده شد و باقیمانده نمونه ها به روش با Pure Sperm شستشو داده شد و جهت انجام عمل ICSI مورد استفاده قرار گرفت. برای هر بیمار، اووسیت ها به طور تصادفی در دو گروه کنترل و تیمار قرار گرفتند. اووسیت های گروه تیمار به مدت ۱۰ دقیقه در مجاورت با ۱۰ میکرو مولار یونومایسین قرار گرفتند. پس از گذشت ۱۸- ۱۶ ساعت از تزریق به داخل اووسیت، میزان لقاح بر اساس مشاهده پیش هسته ها بررسی شد. میزان تسهیم و کیفیت جنین ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از لقاح برای هر دو گروه بررسی و ثبت شد. داده ها پس از گردآوری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (نسخه ۱۱/۵) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. جهت مقایسه میانگین داده ها بین دو گروه از آزمون تی استفاده شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: بین دو گروه از نظر میزان لقاح و درصد تسهیم ۷۲ ساعت بعد از ICSI تفاوت معنی داری مشاهده شد ($p<۰/۰۰۱$). به علاوه در بیمارانی که گروه کنترل آنها فاقد لقاح بود، از گروه تیمار با یونومایسین، ۲ عدد بارداری به دست آمد. در حالی که در گروهی که میزان لقاح پایین (۳۳-۱٪) بود، میانگین میزان لقاح در گروه تیمار آنها (۵۸/۳۱٪) نسبت به گروه کنترل (۱۴/۳٪) به طور معنی داری افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: فعال سازی مصنوعی تخمک با استفاده از یونومایسین نه تنها بر میزان موفقیت در لقاح، بلکه بر میزان تسهیم و همچنین رشد جنین اثر مثبت دارد.

کلمات کلیدی: تزریق اسپرم به داخل تخمک، عدم لقاح، فعال سازی تخمک، یونومایسین

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** دکتر شهناز رضوی؛ گروه علوم تشریح و بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
تلفن: ۰۳۱۱-۷۹۲۲۴۵۵؛ **پست الکترونیک:** razavi@med.mui.ac.ir

مقدمه

همراه با گسترش تکنولوژی در زمینه درمان ناباروری، تکنیک تزریق مستقیم اسپرم به داخل سیتوپلاسم تخمک (ICSI)[1]، امکان ایجاد لقاح و بارداری را در ناباروری های با علت مردانه فراهم کرده است. در طی تکنیک ICSI، سدهایی که در طی روند لقاح طبیعی مانع دسترسی اسپرم های نابالغ و آسیب دیده به تخمک می شوند، حذف می شود. در این صورت میزان لقاح با استفاده از این روش به ۶۰ تا ۷۰ درصد می رسد. معمولاً در بیش از ۸۰٪ از تخمک های لقاح نیافته، اسپرم تزریق شده مشاهده می شود (۱، ۲). اما عدم موفقیت لقاح در این تخمک ها ممکن است ناشی از عدم توانایی اسپرم برای فعال سازی تخمک و یا عدم توانایی تخمک برای خارج کردن اسپرم از حالت تراکم خود باشد (۵-۳). مطالعات مختلف پیشنهاد می کنند که دومین علت اصلی عدم موفقیت در لقاح بعد از انجام ICSI، فعال نشدن تخمک پس از آناپلوئیدی کروموزومی می باشد (۸-۵). دلیل عدم موفقیت در لقاح، گذر از مرحله میوز یا میتوز به فاز استراحت (G1) می باشد، یعنی گذر از مرحله میوز یا میتوز به فاز استراحت در متافاز ۲ دچار اختلال می شود. عبور تخمک از مرحله میوز به فاز استراحت، "فعال شدن تخمک" نام دارد. فعال شدن تخمک باعث ایجاد یک سری فرآیندهای آبشاری می شود که شامل: رهاسازی جسم قطبی ثانویه، خارج شدن کروموزوم های هاپلوئیدی (دارای یک نسخه کروموزومی) از حالت متراکم، تشکیل غشای هسته اطراف کروموزوم ها و شروع رشد جنینی می باشد (۱۰-۹). همچنین فعال شدن تخمک باعث ایجاد دو واقعه مولکولی می شود که شامل افزایش میزان یون کلسیم درون سلولی و همراه با آن غیر فعال شدن فاکتورهای شروع کننده میوز در مرحله گذر از فاز میوز به فاز استراحت می باشد (۱۱). اعتقاد بر این است که هم فاکتورهای مربوط به اسپرم و هم فاکتورهای تخمک در عدم فعال شدن تخمک بعد از انجام ICSI مؤثر هستند (۱۲).

در یک تخمک لقاح نیافته، اسپرم ممکن است وضعیت های گوناگونی مانند سر سالم و دست نخورده، خروج کامل یا نسبی از تراکم و یا تراکم ناقص کروموزوم ها در مرحله متافاز را داشته باشد (۵، ۱۳، ۱۴). نقص در توانایی خروج از حالت تراکم کروماتین در هسته با کیفیت اسپرم، میزان بالای شکستگی های DNA و عدم میزان کافی یون کلسیم درون سلولی در ارتباط است (۱۵، ۱۶). مطالعه لوپز و همکاران (۱۹۹۸) نشان داد که بین میزان فراگمنتاسیون DNA و از بین رفتن "سیکلین" یک رابطه وجود دارد (۲). به علاوه عدم موفقیت در لقاح می تواند با وجود نقص در آکروزوم در رابطه باشد (۱۹-۱۷). مطالعات نشان داده اند که اسپرم های با سر گرد[2]، فاقد غشای آکروزومی و محتویات آکروزین می باشند (۲۰) که این اختلال نه تنها باعث عدم نفوذ اسپرم به داخل تخمک می شود، بلکه اسپرم تزریق شده توانایی فعال سازی تخمک را نداشته که این امر به دلیل وجود اختلال در فاکتورهای فعال کننده تخمک وابسته به اسپرم (SAOAF)[3] می باشد که در آکروزوم و یا غلاف اطراف هسته وجود دارند (۲۱، ۲۳). به طور کلی جهت جلوگیری از عدم فعال شدن تخمک بعد از انجام ICSI، فعال سازی مصنوعی تخمک به روش های مختلفی انجام می شود که شامل فعال سازی به روش الکتریکی (۲۴)، به روش شیمیایی (۲۵، ۲۶) و روش ICSI تغییر یافته (۱۲، ۲۷) می باشد. در بین این روش ها، فعال سازی شیمیایی بیشتر مورد استفاده قرار می گیرد. در مطالعاتی که تاکنون انجام گرفته است، روش فعال سازی عمدتاً به صورت گزارشات موردی و یا استفاده از روش های فعال کردن تخمک های لقاح نیافته در حدود ۲۴ ساعت بعد از انجام ICSI می باشد (۲۶، ۲۸، ۲۹). لذا مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر یونومایسین بر لقاح، میزان تسهیم، رشد و نمو جنین و میزان بارداری بعد از ICSI انجام شد.

روش کار

آماده سازی اسپرم:

این مطالعه مداخله ای در سال ۸۴-۱۳۸۳ بر روی ۸۷ زوج نابارور مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان که علت ناباروری آنها فاکتورهای مردانه بود، انجام شد. بیماران پس از انجام مشاوره و با اخذ رضایت،

[1] Intra Cytoplasmic Sperm Injection

[2] Globozoospermia

[3] Sperm Associated Oocyte Activating Factor

وارد مطالعه شدند. ضرورت انجام این مطالعه در کمیته علمی - اخلاقی مرکز باروری و ناباروری اصفهان و پژوهشکده رویان مورد بررسی قرار گرفت و در این مورد هیچ گونه مخالفتی صورت نگرفت. نمونه های مایع منی پس از ۳-۴ روز خودداری از نزدیکی در روز تخمک گذاری جمع آوری شد. آنالیز نمونه های سمن که شامل بررسی غلظت، تحرک و مورفولوژی اسپرم بود، بر اساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی انجام شد. بخشی از نمونه توسط روش شیب غلظت Pure Sperm (80:40) شستشو داده شد و جهت انجام عمل ICSI، مورد استفاده قرار گرفت. نمونه هایی که از همسر آنها بیش از ۴ تخمک بالغ به دست آمد، تحت روند فعال سازی تخمک قرار گرفتند.

تزریق اسپرم به درون سیتوپلاسم اووسیت (ICSI): بعد از تخمک گیری، اووسیت ها در محیط G-MOPS (Vitrolife, Gothenburg, Sweden) حاوی هیالورونیداز[1] (Hyaluronidase)، قرار داده شدند. سپس اووسیت ها را در G-MOPS تازه شسته و به زیر روغن در داخل یک پتری دیش فالکون ۱۰۰۶ جهت انجام تزریق به داخل سیتوپلاسم تخمک منتقل شد. برای هر بیمار، اووسیت ها به طور تصادفی در دو گروه کنترل و تیمار قرار گرفتند. اووسیت های گروه تیمار به مدت ۱۰ دقیقه در مجاورت با ۱۰ میکرو مولار یونومایسین قرار گرفتند. به علاوه اسپرم شسته شده به محیط ICSI ۱۰۰ (محیطی غلیظ جهت تسهیل کار برای اسپرم که همانند محیط پلی وینیل پیرولیدون است) منتقل شد. از میکرومانیپلاتور اپندروف نصب شده روی میکروسکوپ اینورت (Nikon) برای تزریق اسپرم استفاده شد. بدین ترتیب اسپرم با بهترین مورفولوژی و تحرک از جمعیت اسپرمی انتخاب شد و پس از بی حرکت نمودن، اسپرم به داخل یک پیپت تزریق کشیده شد و سپس به داخل اووسیت ها تزریق شد. تزریق معمولاً ۳-۲ ساعت پس از جمع آوری اووسیت ها انجام گرفت. اووسیت های تزریق شده در محیط G1 انکوبه شدند و پس از ۱۸-۱۶ ساعت، میزان لقاح در هر دو گروه تعیین شد. وجود و یا عدم وجود لقاح بر اساس مشاهده پیش هسته ها در زیر میکروسکوپ اینورت بررسی شد. اووسیت های لقاح یافته به قطرات محیط G1 در زیر روغن معدنی منتقل شد و پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت، درصد لقاح با محاسبه نسبت تخمک های لقاح یافته به تعداد کل تخمک های تزریق شده در مرحله متافاز II ضربدر ۱۰۰ در هر گروه ثبت شد. درصد تسهیم روز دوم با تقسیم تعداد جنین‌های روز دوم بر تعداد تخمک‌های دارای دو پیش هسته ضربدر ۱۰۰ و درصد کلیواژ روز سوم با تقسیم مجموع جنین‌های بیش از ۴ سلولی روز سوم بر مجموع جنین‌های روز دوم ضربدر ۱۰۰ محاسبه شد. در روز سوم با توجه به کیفیت جنین های تشکیل شده در دو گروه، جنین های دارای کیفیت بالا جهت انتقال به داخل رحم مادران انتخاب شدند. وجود بارداری با توجه به تست HCG و وضعیت لانه گزینی و با توجه به سونوگرافی تعیین شد. در نهایت نتایج بارداری و به دنبال آن نتایج لانه گزینی در رحم در دو گروه ارزیابی شد و درصد لانه گزینی به صورت تعداد جنین‌های لانه‌گزینی شده (جواب سونوگرافی مثبت بوده) تقسیم بر تعداد کل جنین انتقال داده شده ضربدر ۱۰۰ محاسبه شد. درصد بارداری به صورت تعداد مواردی از انتقال جنین که منجر به بارداری شده (جواب آزمایش ß-HCG مثبت بوده) تقسیم بر تعداد کل موارد انتقال جنین ضربدر ۱۰۰ محاسبه شد. میزان بارداری ابتدا به وسیله سطح HCG ارزیابی و در مراحل بعدی روش های اولتراسوند بر پایه ضربان قلب تأیید شد.

برای به حداقل رساندن تأثیر فاکتورهای اووسیتی، بیماران دارای زیگوت های حاوی یک پیش هسته، ۳ پیش هسته و یا بیشتر، اووسیت های دارای وزیکول ژرمینال، دژنره، گرانولار، بدون جسم قطبی و واکوئله یا دفرم و همچنین بیماران دارای کمتر از ۴ اووسیت، از این مطالعه خارج شدند. داده ها پس از گردآوری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (نسخه ۱۱/۵) و آزمون های آماری ضریب همبستگی و تی دانشجویی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

اطلاعات توصیفی مربوط به پارامترهای مایع منی و میزان تخمک ها در گروه کنترل و تیمار (تخمک های فعال شده) در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- اطلاعات توصیفی مربوط به پارامترهای سمن و تعداد اووسیت ها در گروه کنترل و تیمار (اووسیت های فعال شده) در بررسی تأثیر یونومایسین به عنوان یک ماده مصنوعی فعال کننده تخمک بر نتایج لقاح پس از انجام ICSI

پارامتر	حداقل	حداکثر	میانگین ± انحراف معیار
غلظت (میلیون درمیلی لیتر)	۱	۸۰	۱۵/۰۹ ± ۱۸/۳۷
تراکم کل اسپرم	۰/۱	۴۰۰	۵۶/۴۳ ± ۸۷/۵۳
درصد تحرک اسپرم	۰	۸۰	۱۹/۵۶ ± ۱۶/۷۰
درصد ناهنجاری های مورفولوژیک اسپرم	۹۰	۱۰۰	۹۶/۰۲ ± ۳/۲۸
سن مرد	۱۹	۴۵	۳۰/۰۴ ± ۴/۳۹
سن زن	۱۸	۴۰	۴/۲۷ ±۲۶/۱۰
تعداد کل اووسیت های متافاز II جمع آوری شده	۴	۳۵	۱۵/۹۴ ± ۷/۰۱
تعداد اووسیت ها در گروه کنترل	۲	۱۷	۷/۶۱ ± ۲/۷۷
تعداد اووسیت ها در گروه تیمار	۲	۱۸	۷/۷۳ ± ۳/۷۴

جدول ۲ میانگین تعداد تخمک ها، میزان لقاح، تسهیم و درصد جنین ها با کیفیت بالا را ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از انجام ICSI نشان می دهد.

جدول ۲- مقایسه میانگین تعداد اووسیت ها، میزان لقاح، تسهیم و کیفیت جنین ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از انجام ICSI بین دو گروه کنترل و تیمار در بررسی تأثیر یونومایسین به عنوان یک ماده مصنوعی فعال کننده تخمک بر نتایج لقاح پس از انجام ICSI

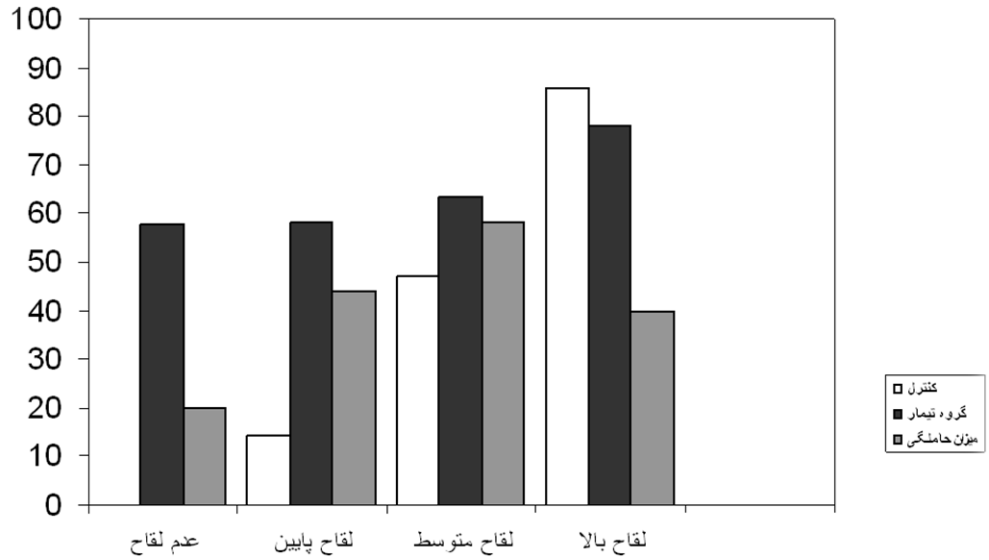
متغیر	گروه کنترل (میانگین ± انحراف معیار)	گروه تیمار (میانگین ± انحراف معیار)	سطح معنی داری
تعداد اووسیت	۷/۷۳ ±۳/۷۴	۷/۲۴± ۳/۰۴	۰/۲۵۱
میزان لقاح	۵۲/۷۳± ۳۱/۷۱	۲۳/۵۷ ±۶۶/۷۹	*۰/۰۰۱
میزان تسهیم (۴۸ ساعت پس از ICSI)	۸۸/۴۵± ۳۰/۸۷	۹۵/۷۳ ± ۳۶/۱۶	۰/۱۵
میزان تسهیم (۷۲ ساعت پس از ICSI)	۴۹/۹۵± ۳۸/۵۸	۷۴/۷۷ ±۳۶/۲۲	*۰/۰۰۱
جنین با کیفیت بالا (۴۸ ساعت پس از ICSI)	۶۹/۴۹± ۳۹/۹۴	۷۵/۱۲ ±۳۹/۸۹	۰/۳۰۹
جنین با کیفیت بالا (۷۲ ساعت پس از ICSI)	۳۸/۴۳±۶۷/۱۶	۶۷/۹۹ ± ۳۶/۲۴	۰/۸۵

* ارتباط در سطح p<۰/۰۰۱ معنی دار است.

بر اساس نتایج این مطالعه، بین میانگین تعداد تخمک ها در گروه کنترل و تیمار تفاوت معنی داری مشاهده نشد (p=۰/۲۵۱). در حالی که بین میزان لقاح و درصد تسهیم ۷۲ ساعت بعد از ICSI تفاوت معنی داری بین دو گروه مشاهده شد (p=۰/۰۰۱). به علاوه بین درصد تسهیم ۴۸ ساعت بعد از ICSI و درصد جنین با کیفیت بالا ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از انجام ICSI بین دو گروه اختلاف معنی داری مشاهده نشد (p>۰/۰۵). برای تعیین تأثیر فعال سازی مصنوعی تخمک در بیماران مختلف، این بیماران بر اساس میزان لقاح در گروه کنترل تقسیم بندی شدند.

نتایج موجود در نمودار ۱ نشان می دهد که در گروه کنترل، در ۱۰ بیمار هیچ لقاحی به دست نیامد. در حالی که در گروه تیمار در این بیماران میانگین لقاح ۵۷/۷۸٪ بود. میانگین میزان لقاح در بیمارانی که در گروه کنترل میزان لقاح پایین (بین ۱ تا ۳۳٪) داشتند، ۱۴/۳۰٪ بود که پس از فعال سازی مصنوعی، افزایش معنی داری در میانگین لقاح (۵۸/۳۱٪) مشاهده شد. در بیماران با میزان لقاح متوسط (بین ۳۴ تا ۶۵٪) نیز میانگین لقاح در گروه تیمار (۶۳/۴٪) نسبت به گروه کنترل (۴۷٪) افزایش معنی داری داشت. اما بر خلاف گروه های قبلی، در بیماران با میزان لقاح بالا (بین ۶۶ تا۱۰۰٪) میانگین لقاح در گروه تیمار (۷۷/۹٪) نسبت به گروه کنترل (۸۳-۸۵٪) کاهش غیر معنی داری را نشان داد. به علاوه نتایج بارداری فقط در ۵۴ بیمار (از ۸۷ زوج) قابل دسترس بود، به گونه ای که در ۲۵ نفر بارداری مشاهده شد و در

مجموع میزان بارداری ۳۷/۴٪ به دست آمد. در بیمارانی که در گروه کنترل هیچگونه لقاحی نداشتند و تمام جنین های انتقال داده شده از گروه تیمار بود، ۲ مورد بارداری گزارش شد. در حالی که در گروه میزان لقاح پایین، ۴ مورد بارداری از ۹ بیمار (۴۴٪)، در گروه میزان لقاح متوسط، ۱۱ مورد بارداری از ۱۹ بیمار (۵۸٪) و در گروه میزان لقاح خوب ۸ مورد بارداری از ۲۰ بیمار (۴۰٪) به دست آمد. در گروه با میزان لقاح بالا ۲ مورد بارداری چند قلویی گزارش شد. پس از تماس با والدین فرزندان به دنیا آمده و گردآوری اطلاعات مشخص شد که این نوزادان هیچگونه بیماری های ژنتیکی خاص نداشتند.



نمودار ۱- مقایسه میانگین لقاح و بارداری در گروه های فاقد لقاح، میزان لقاح پایین، متوسط و بالا در گروه کنترل و تیمار

بحث

عدم موفقیت لقاح در بیماران داوطلب ICSI می تواند ناشی از عدم توانایی کامل یا نسبی اسپرم ها در فعال کردن تخمک و یا عدم توانایی تخمک در خارج کردن سر اسپرم از حالت متراکم خود باشد (۳، ۴). توانایی اسپرم در فعال کردن تخمک به دلیل وجود فاکتورهای فعال کننده تخمک وابسته به اسپرم (SAOAF) می باشد که این فاکتورها در غلاف اطراف هسته وجود دارند و در ارتباط نزدیک با آکروزوم می باشند (۷، ۲۶، ۳۲، ۳۳). مطالعات نشان داده اند که اسپرم دارای نقص در آکروزوم و یا ناهنجاری مورفولوژیک در مقایسه با اسپرم های دارای مورفولوژی طبیعی، توانایی کمتری در باروری تخمک دارند (۱۷، ۳۴، ۳۵). همچنین مطالعات قبلی نشان داده اند که اسپرم های دارای ناهنجاری مورفولوژیک و یا حاوی آکروزوم کوچک، توانایی کمتری در فعال سازی تخمک دارند (۳۲، ۳۳، ۳۶). بر این اساس جهت پیشگیری از عدم فعال شدن تخمک، روش های متفاوتی برای فعال سازی مصنوعی به کار می رود که این روش ها شامل فعال سازی تخمک به صورت الکتریکی و شیمیایی می باشند (۸، ۲۵، ۲۶، ۳۷، ۳۸). کاربردهای کلینیکی این روش ها برای تخمک انسان بسیار محدود می باشد. به طور عمده، این روش ها در گزارشات موردی و جهت فعال سازی تخمک در روش های کمک باروری (ART) به کار رفته است (۲۶، ۲۸، ۳۴). در مطالعه حاضر اثر یونومایسین بر فعال سازی تخمک انسان در بیماران داوطلب ICSI مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که میزان لقاح به طور معنی داری از ۳۱/۷۱ ± ۵۲/۷۳ در گروه کنترل به ۲۳/۷۵ ± ۶۶/۷۹ در گروه تیمار افزایش یافت که این تفاوت ممکن است در سطح کلینیکی قابل اندازه گیری نباشد. در حالی که هنگامی که بیماران گروه

کنترل از نظر میزان لقاح به گروه های بدون لقاح، میزان لقاح کم، متوسط و بالا تقسیم شدند، نتایج نشان داد که در ۱۰ بیمار که هیچ لقاحی نداشتند، میزان لقاح در گروه تیمار به ۵۷/۷۸٪ افزایش یافت و ۲ بارداری نیز مشاهده شد. همچنین فعال سازی مصنوعی تخمک باعث شد که در این ۱۰ بیمار، سیکل ICSI لغو نشود. به علاوه فعال سازی مصنوعی تخمک باعث افزایش تعداد جنین های به دست آمده یا جنین های با کیفیت بالا جهت انتقال شد. در مطالعه حاضر میزان لقاح به دست آمده طی فعال سازی تخمک نسبت به میزان فعال شدن تخمک در مطالعات دیگر که در آن از یونوفور کلسیم A23187 استفاده شده بود (۴۱/۴۲٪)، بالاتر بود. مطالعه ساوسو و همکار (۱۹۹۴) نشان داد که ۸۸٪ از تخمک هایی که ۲۴ ساعت بعد از انجام ICSI به طور خود به خود لقاح نیافته بودند، بعد از قرار گرفتن در محیط حاوی یونوفور کلسیم A23187 تشکیل دو پیش هسته دادند و ۸۲٪ از تخمک های فعال شده، به مرحله ۲ سلولی رسیدند (۶). نتایج مطالعات قبلی بر روی عدم فعال سازی تخمک با استفاده از یونومایسین نیز با این یافته ها همخوانی دارد (۵). میزان لقاح در گروه تیمار در زیر گروه های با میزان لقاح پایین و متوسط به ترتیب افزایش کم و متوسط اما معنی داری نسبت به گروه کنترل نشان داد (نمودار ۱). با این حال در زیر گروه با میزان لقاح بالا، بین میانگین لقاح در گروه کنترل و تیمار تفاوت معنی داری مشاهده نشد. نتایج موجود در نمودار ۱ نشان می دهد که روش فعال سازی شیمیایی برای همه بیماران مؤثر نمی باشد. به همین دلیل تست های تشخیصی مانند تست فعال سازی تخمک موش، ممکن است در موارد کلینیکی جهت بررسی توانایی بالقوه اسپرم در فعال سازی تخمک مؤثر باشد (۴۱، ۴۲). انجام تست فعال سازی تخمک موش در آزمایشگاه ها یک روش معمول نمی باشد. بنابراین روش های دیگری مانند تست های وابسته به آکروزوم (مانند تست ژلاتینولیز که جهت بررسی سلامت آکروزوم و توانایی اسپرم برای فعال سازی تخمک به کار می رود)، ممکن است مفید باشد (۴۳، ۴۴). نتایج جدول ۲ نشان داد که نه تنها میزان لقاح در تخمک هایی که به طور مصنوعی فعال شده اند، بهبود یافته است، بلکه میزان تسهیم ۷۲ ساعت پس از انجام ICSI نیز افزایش داشته است. بنابراین می توان نتیجه گرفت که در بیماران نابارور، فعال سازی مصنوعی تخمک می تواند باعث افزایش میزان لقاح و تسهیم ۷۲ ساعت پس از انجام ICSI شود. این نتایج مانند نتایج به دست آمده از روش های متفاوت فعال سازی تخمک های گاوی، نشان می دهد که بکارگیری این روش ها میزان رشد جنینی و تشکیل بلاستوسیست را افزایش می دهد (۴۵). مطالعه ناکاگاوا و همکاران (۲۰۰۱) نشان داد در ۸۴/۹٪ از تخمک هایی که پس از انجام ICSI لقاح نیافته بودند، پس از قرارگیری در محیط یونوفور کلسیم A23187 و پورومایسین فعال شده، ۶۴٪ از آنها تقسیم می شوند (۲۵). آنها همچنین نشان دادند که فعال سازی تخمک باعث افزایش میزان لقاح در نمونه های اسپرمی غیر متحرک می شود که با نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر همخوانی دارد. در مطالعه موآز و همکاران (۲۰۰۶) اسپرم ها را از لحاظ ناهنجاری های مورفولوژیکی به زیر گروه های سر بدون شکل خاص (آمورف)، سرکشیده و گردن خمیده تقسیم کردند و همانند مطالعه حاضر از روش فعال سازی شیمیایی استفاده کردند. نتایج نشان داد که میزان لقاح پس از فعال سازی شیمیایی در اسپرم های با سر بدونه شکل خاص و سر کشیده افزایش می یابد، در حالی که تفاوتی در زیر گروه اسپرم های با گردن خمیده مشاهده نشد (۴۷). مطالعات قبلی نشان داد که مورفولوژی اسپرم و وجود هسته سالم بر میزان لقاح و رشد جنینی تأثیر دارد (۳۵، ۴۸) و عدم موفقیت در لقاح در این نمونه ها ممکن است وابسته به عدم فعال سازی تخمک باشد. به علاوه عدم موفقیت لقاح حتی در نمونه های اسپرمی سالم نیز گزارش شده است (۲۹). نتایج این مطالعه و مطالعات دیگر نشان می دهد که استفاده از فعال سازی مصنوعی تخمک می تواند باعث کاهش احتمال عدم لقاح تخمک شود. در حالی که عده ای معتقدند بکارگیری فعال سازی مصنوعی تخمک می تواند باعث لقاح غیر طبیعی که دارای اختلالات کروموزومی است شود و تکامل طبیعی جنین را کاهش دهد (۴۹). به علاوه این مطالعه تنها مطالعه ای است که

در آن تعداد زیادی از بیماران تحت فعال سازی مصنوعی تخمک با یونومایسین قرار گرفتند. تنها نگرانی عمده که در فعال سازی مصنوعی تخمک مطرح می شود، تأثیر آن بر روی سلامت نوزادان متولد شده می باشد. نتایج این مطالعه و مطالعات دیگر نشان می دهد که فعال سازی تخمک هیچ تأثیر سویی بر سلامت نوزادان متولد شده نداشته است (۲۸، ۳۷، ۳۸، ۵۰). به علاوه آنالیز کروموزومی توسط متد FISH نشان داده است که نوزادان متولد شده از طریق فعال سازی تخمک تعداد کروموزوم طبیعی دارند (۳۸). به هر حال پیشنهاد می شود که برای بررسی اختلالات زنتیکی و مولکولی این روش مطالعات بیشتری بر روی مدل های حیوانی انجام شود. همچنین برای اطمینان از سلامت بکارگیری این روش تعداد بیشتری از نوزادان متولد شده باید مورد بررسی قرار بگیرند.

نتیجه گیری

فعال سازی مصنوعی تخمک علاوه بر تأثیر بر میزان موفقیت لقاح، بر میزان بالای تسهیم و همچنین رشد جنینی اثر مثبت دارد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از مسئولین محترم پژوهشکده رویان، متخصصین و پرسنل محترم مرکز باروری و ناباروری اصفهان که ما را در انجام این مطالعه یاری کردند، تشکر و قدردانی می شود.

منابع

1. Flaherty SP, Payne D, Matthews CD. Fertilization failures and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1998 Apr;l3 Suppl 1:155-64.
2. Lopes S, Jurisicova A, Casper RF. Gamete-specific DNA fragmentation in unfertilized human oocytes after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1998 Mar;13(3):703-8.
3. Sakkas D, Urner F, Bianchi PG, Bizzaro D, Wagner I, Jaquenoud N, et al. Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1996 Apr;11(4):837-43.
4. Schmiady H, Tandler-Schneider A, Kentenich H. Premature chromosome condensation of the sperm nucleus after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1996 Oct;11(10):2239-45.
5. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M , Shirazi R , Javanmardi S. The effects of failed oocyte activation and sperm protamine deficiency on fertilization post ICSI. Reprod Biomed Online 2007 Apr;14(4):422-9.
6. Sousa M, Tesarik J. Ultrastructural analysis of fertilization failure after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1994 Dec;9(12):2374-80.
7. Dozortsev D, De Sutter P, Dhont M. Behaviour of spermatozoa in human oocytes displaying no or one pronucleus after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1994 Nov;9(11):2139-44.
8. Tesarik J, Sousa M. More than 90% fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection and artificial induction of oocyte activation with calcium ionophore. Fertil Steril 1995 Feb;63(2):343-9.
9. Swann K, Lai FA.A novel signalling mechanism for generating Ca2+ oscillations at fertilization in mammals. Bioessays 1997 May;19(5):371-8.
10. Schultz RM, Kopf GS. Molecular basis of mammalian egg activation. Curr Top Dev Biol 1995;30:21-62.
11. Tesarik J, Mendoza C, Greco E. The activity (calcium oscillator?) responsible for human oocyte activation after injection with round spermatids is associated with spermatid nuclei. Fertil Steril 2000 Dec;74(6):1245-7.
12. Tesarik J, Rienzi L, Ubaldi F, Mendoza C, Greco E. Use of a modified intracytoplasmic sperm injection technique to overcome sperm-borne and oocyte-borne oocyte activation failures. Fertil Steril 2002 Sep;78(3):619-24.
13. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mozdarani H, Mardani M , Azvagi H. Relationship between protamine deficiency with fertilization rate and incidence of sperm premature chromosomal condensation post-ICSI. Andrologia 2004 Jun;36(3):95-100.
14. Nasr-Esfahani MH, Naghshizadian N, Imani H, Razavi S, Mardani M, Kazemi S, et al. Can sperm protamine deficiency induce sperm premature chromosomal condensation? Andrologia 2006;38(3):92-8.
15. Rawe VY, Olmedo SB, Nodar FN, Doncel GD, Acosta AA, Vitullo AD. Cytoskeletal organization defects and abortive activation in human oocytes after IVF and ICSI failure. Mol Hum Reprod 2000 Jun;6(6):510-6.
16. Collas P, Fissore R, Robl JM, Sullivan EJ , Barnes FL. Electrically induced calcium elevation, activation, and parthenogenetic development of bovine oocytes. Mol Reprod Dev 1993 Feb;34(2):212-23 .
17. Cummins JM, Pember SM, Jequier AM, Yovich JL, Hartmann PE. A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge: relationship to fertility and other seminal parameters. J Androl 1991 Mar-Apr;12(2):98-103.
18. Fenichel P, Donzeau M, Farahifar D, Basteris B, Ayraud N, Hsi BL. Dynamics of human sperm acrosome reaction: relation with in vitro fertilization. Fertil Steril 1991 May;55(5):994-9.
19. Mahutte NG , Arici A. Failed fertilization: is it predictable? Curr Opin Obstet Gynecol 2003 Jun;15(3):211-8.

20. Florke-Gerloff S, Topfer-Petersen E, Muller-Esterl W, Mansouri A, Schatz R, Schirren C, et al. Biochemical and genetic investigation of round-headed spermatozoa in infertile men including two brothers and their father. Andrologia 1984 May-Jun;16(3):187-202.
21. Escalier D. Failure of differentiation of the nuclear-perinuclear skeletal complex in the round-headed human spermatozoa. Int J Dev Biol 1990 Jun;34(2):287-97.
22. Courtot AM . Presence and localization of the 60 KD calicin in human spermatozoa presenting postacrosomal sheath defects: preliminary results. Mol Reprod Dev 1991 Mar;28(3):272-9.
23. Tesarik J, Testart J. Treatment of sperm-injected human oocytes with Ca2+ ionophore supports the development of Ca2+ oscillations. Biol Reprod 1994 Sep;51(3):385-91.
24. Nakagawa K, Yamano S, Moride N, Yamashita M, Yoshizawa M, Aono T. Effect of activation with Ca ionophore A23187 and puromycin on the development of human oocytes that failed to fertilize after intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 2001 Jul;76(1):148-52.
25. Eldar-Geva T, Brooks B, Margalioth EJ, Zylber-Haran E, Gal M , Silber SJ. Successful pregnancy and delivery after calcium ionophore oocyte activation in a normozoospermic patient with previous repeated failed fertilization after intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 2003 Jun;79 Suppl 3:1656-8.
26. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Jesacher K , Tews G. Complete oocyte activation failure after ICSI can be overcome by a modified injection technique. Hum Reprod 2004 Aug;19(8):1837-41.
27. Murase Y, Araki Y, Mizuno S, Kawaguchi C, Naito M, Yoshizawa M, et al. Pregnancy following chemical activation of oocytes in a couple with repeated failure of fertilization using ICSI: case report. Hum Reprodm 2004 Jul;19(7):1604-7.
28. Chi HJ, Koo JJ, Song SJ, Lee JY, Chang SS. Successful fertilization and pregnancy after intracytoplasmic sperm injection and oocyte activation with calcium ionophore in a normozoospermic patient with extremely low fertilization rates in intracytoplasmic sperm injection cycles. Fertil Steril 2004 Aug;82(2):475-7.
29. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the examination of human semen and sprem–cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge:om:Cambridge University Press;1999 .
30. Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA , et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. Fertil Steril 1986 Dec;46(6):1118-23.
31. Parrington J, Swann K, Shevchenko VI, Sesay AK, Lai FA. Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. Nature 1996 Jan 25;379(6563):364-8 .
32. Kimura Y, Yanagimachi R, Kuretake S, Bortkiewicz H, Perry AC, Yanagimachi H. Analysis of mouse oocyte activation suggests the involvement of sperm perinuclear material. Biol Reprod 1998 Jun;58(6):1407-15.
33. Rybouchkin AV, Van der Straeten F, Quatacker J, De Sutter P, Dhont M. Fertilization and pregnancy after assisted oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection in a case of round-headed sperm associated with deficient oocyte activation capacity. Fertil Steril 1997 Dec;68(6):1144-7.
34. Yanagida K, Katayose H, Yazawa H, Kimura Y, Sato A, Yanagimachi R. Successful fertilization and pregnancy following ICSI and electrical oocyte activation. Hum Reprod 1999 May;14(5):1307-11.
35. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezo Y , Barak Y. Real-time fine morphology of motile human sperm cell is associated with IVF-ICSI outcome. J Androl 2002 Jan-Feb;23(1):1-8.
36. Battaglia DE, Koehler JK, Klein NA, Tucker MJ. Failure of oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection using round-headed sperm. Fertil Steril 1997 Jul;68(1):118-22.
37. Kim ST, Cha YB, Park JM, Gye MC. Successful pregnancy and delivery from frozen-thawed embryos after intracytoplasmic sperm injection using round-headed spermatozoa and assisted oocyte activation in a globozoospermic patient with mosaic Down syndrome. Fertil Steril 2001 Feb;75(2):445-7.
38. Lu Q, Zhao Y, Gao X, Li Y, Ma S, Mullen S, et al. Combination of calcium ionophore A23187 with puromycin salvages human unfertilized oocytes after ICSI. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2006 May 1;126(1):72-6.
39. Winston N, Johnson M, Pickering S, Braude P. Parthenogenetic activation and development of fresh and aged human oocytes. Fertil Steril 1991 Nov;56(5):904-12.
40. Taylor DM, Ray PF, Ao A, Winston RM, Handyside AH. Paternal transcripts for glucose-6-phosphate dehydrogenase and adenosine deaminase are first detectable in the human preimplantation embryo at the three- to four-cell stage. Mol Reprod Dev 1997 Dec;48(4):442-8 .
41. Araki Y, Yoshizawa M, Abe H, Murase Y, Araki Y.Use of mouse oocytes to evaluate the ability of human sperm to activate oocytes after failure of activation by intracytoplasmic sperm injection. Zygote 2004 May;12(2):111-6.
42. Heindryckx B, Van der Elst J, De Sutter P, Dhont M. Treatment option for sperm- or oocyte-related fertilization failure: assisted oocyte activation following diagnostic heterologous ICSI. Hum Reprod 2005 Aug;20(8):2237-41.
43. Henkel R, Muller C, Miska W, Schill WB, Kleinstein J, Gips H. Acrosin activity of human spermatozoa by means of a simple gelatinolytic technique: a method useful for IVF. J Androl 1995 May-Jun;16(3):272-7.
44. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Tavalaee M. Failed fertilization post ICSI and spermiogenic defects. Fertil Steril 2007 Apr;89(4):892-8.
45. Oikawa T, Takada N, Kikuchi T, Numabe T, Takenaka M, Horiuchi T. Evaluation of activation treatments for blastocyst production and birth of viable calves following bovine intracytoplasmic sperm injection. Anim Reprod Sci 2005 Apr;86(3-4):87-94.
46. Chian RC, Tan SL, Sirard MA. Protein phosphorylation is essential for formation of male pronucleus in bovine oocytes. Mol Reprod Dev 1999 Jan;52(1):43-9.

47. Moaz MN, Khattab S, Foutouh IA, Mohsen EA. Chemical activation of oocytes in different types of sperm abnormalities in cases of low or failed fertilization after ICSI: a prospective pilot study. Reprod Biomed Online 2006 Dec;13(6):791-4.
48. Berkovitz A, Eltes F, Yaari S, Katz N, Barr I, Fishman A, et al. The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. Hum Reprod 2005 Jan;20(1):185-90.
49. Heindryckx B, Lierman S, Combelles CM, Cuvelier CA, Gerris J, De Sutter P. Aberrant spindle structures responsible for recurrent human metaphase I oocyte arrest with attempts to induce meiosis artificially. Hum Reprod 2011 Apr;26(4):791-800 .
50. Yuzpe AA, Liu Z, Fluker MR. Rescue intracytoplasmic sperm injection (ICSI)-salvaging in vitro fertilization (IVF) cycles after total or near-total fertilization failure. Fertil Steril 2000 Jun;73(6):1115–9.