تغییرات کروموزومی در تخمکهای لقاح نیافته در لقاح آزمایشگاهی

حسین مزدارانی Ph.D.☆♦، فرین عقدایی M.Sc.★

☆ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه رادیولوژی و پژوهشکدهٔ رویان

★ جهاددانشگاهی علوم پزشکی ایران، پژوهشکدهٔ رویان، گروه ژنتیک

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵ پژوهشکده رویان، گروه ژنتیک

چکیده

* **هدف:** بررسی سیتوژنتیکی تخمکهای لقاح نیافته با روشهای لقاح آزمایشگاهی (IVF: In Vitro Fertilization) و تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI: Intra Cytoplasmic Sperm Injection) به‌منظور تعیین فراوانی و انواع ناهنجاریهای کروموزومی مؤثر در عدم لقاح تخمک

* **مواد و روشها:** تعداد ۳۶۴ تخمک از ۱۰۱ بیمار نابارور مراجعه‌کننده به پژوهشکده رویان‌که ۴۸-۴۶ ساعت پس از مجاورت یا تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم لقاح نیافته بودند، بررسی شد. از این تعداد ۹۱ تخمک در روش IVF و ۲۷۳ تخمک در روش ICSI لقاح نیافته بود. به‌منظور تهیه متافاز، قشر شفاف تخمکها با استفاده از محلول اسیدتایرود برداشته شد و سپس تحت‌تأثیر شوک هیپوتونیک قرار گرفت. تخمکها به‌طور تدریجی در محلولهای تثبیت‌کننده شامل متانول، اسید استیک و آب‌مقطر تثبیت شدند و با روش air-dry تارکووسکی لام تهیه شد. لامها با محلول گیمسای ۱۰ درصد رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰۰× بررسی شدند.

* **یافته‌ها:** به‌طور کلی ۳۹ درصد از تخمکهای بررسی شده هاپلوید و ۶۱ درصد آنیوپلوئید بودند. انواع دیگری از ناهنجاریهای کروموزومی مانند ناهنجاریهای ساختاری (۵/۲ درصد)، پلی پلوییدی (۲/۸۱ درصد) و تراکم پیش‌رس کروموزومهای اسپرم (PCC: Premature Chromosome Condensation) (۲۴/۳ درصد)، چسبندگی کروموزومهای تخمک (۵/۸ درصد) و عدم تراکم کروماتین تخمکها (۶/۶ درصد) نیز مشاهده شد. تفاوت معنی‌داری بین فراوانی انواع ناهنجاریهای کروموزومی در تخمکهای لقاح نیافته در روشهای IVF و ICSI مشاهده نشد. تنها فراوانی PCC کروموزومهای اسپرم در روش ICSI با تفاوت آماری معنی‌دار بیش از روش IVF ($P<0.01$) بود.

* **نتیجه‌گیری:** نتایج نشان می‌دهد که بروز ناهنجاریهای کروموزومی از دلایل عمدهٔ عدم لقاح تخمکها در هر یک از روشهای IVF و ICSI است. رخداد ناهنجاریهای کروموزومی به عوامل متعددی همچون جدا نشدن کروموزومها در هنگام تقسیم آنافازی که عامل اصلی ایجاد آنیوپلوییدی است، عوامل شیمیایی و فیزیکی، هورمونی و زمینه ژنتیکی فرد بستگی دارد. از این‌رو فراوانی رخداد هر یک از این ناهنجاریها در جوامع مختلف متفاوت است. نتایج نشان می‌دهد که آنیوپلوییدی عامل اصلی عدم لقاح در روشهای لقاح آزمایشگاهی است.

گل واژگان: تخمک انسان، لقاح آزمایشگاهی، ناهنجاریهای کروموزومی

مقدمه

میزان بارداری در نتیجه لقاح آزمایشگاهی حدود ۱۵ تا ۲۵ درصد گزارش شده است (۱)؛ این درصد پایین موفقیت لقاح آزمایشگاهی به رخداد ناهنجاریهای کروموزومی در گامتها نسبت داده می‌شود (۲). در طی گامتوژنز اشتباهاتی در جدا شدن کروموزومها رخ می‌دهد و سبب می‌شود تا گامتهایی با کروموزومهای اضافی یا برعکس با تعداد کروموزومهای کمتر از تعداد طبیعی ایجاد شوند. از این‌رو آنیوپلوییدی (ناهنجاریهای تعدادی کروموزومها) به‌وسیلهٔ گامتها تا مرحله لقاح انتقال می‌یابند زیرا ارتباط نزدیکی بین بارداری‌های غیرطبیعی و ناهنجاریهای کروموزومی گزارش شده است (۳). تحقیقات انجام شده نشان می‌دهند که میزان آنیوپلوییدی در تولدهای زنده حدود ۳ درصد؛ در نوزادان نارس حدود ۵ درصد و در بین سقطهای خودبه‌خودی ۲۵ درصد است (۴). به این آمار باید درصد اختلالات کروموزومی را در جنینهایی که قبل از مرحله لانه‌گزینی یا در مراحل اولیه لانه گزینی سقط می‌شوند نیز اضافه نمود که تصور می‌شود فراوانی این اختلالات بین ۲۳ تا ۴۰ درصد باشد (۵). تخمکهای با ناهنجاریهای کروماتیدی می‌توانند سبب سقط خود به خودی شده یا سبب تشکیل جنینهای ناهنجار از نظر کروموزومی شوند (۶). ناهنجاریهای کروموزومی در جنین عامل ۵۰ تا ۶۰ درصد سقطهای سه ماهه اول بارداری هستند (۳، ۷)، از طرفی دامنه وسیعی در حدود ۴ تا ۵۹ درصد آنیوپلوییدی در تخمکهای بارور نشده بعد از IVF گزارش شده است (۱۲-۸) که می‌تواند عامل عمده عدم موفقیت لقاح آزمایشگاهی باشد (۱۳).

بررسی سیتوژنتیکی تخمکها بعد از ابداع روش لقاح آزمایشگاهی میسر شد و از اوایل دهه ۱۹۸۰ به طور متداول بر روی تخمکهای لقاح نیافته انجام گرفت (۱۴، ۱۵). بررسی تخمکهای لقاح نیافته بعد از IVF که دارای بیش از دو پرونوکلئای بودند نشان داد که گامتهای تشکیل دهنده زیگوتها از نظر کروموزومی غیر طبیعی بوده‌اند (۱۶) و زیگوتهای دارای سه پرونوکلئای قادر به ادامه تقسیمات بعدی هستند، اما جنینهای تریپلوید ایجاد می‌کنند (۱۷). درصدهای متفاوتی از ناهنجاریهای عددی و ساختاری کروموزوم در تخمکهای لقاح نیافته فاقد پرونوکلئای نیز گزارش شد. این ناهنجاریها که شامل هاپیرهاپلوییدی، هایپرهاپلوییدی، پلی‌پلوییدی و هایپردیپلوییدی، تریزومی و همچنین G_1 PCC کروموزومهای اسپرم می‌شده است، با فراوانی ۱۴ تا ۴۰ درصد گزارش شده است (۱۱، ۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۱).

عوامل متعددی از جمله هورمونهای تحریک تخمک‌گذاری، سن مادر و عوامل شیمیایی مورد استفاده در آزمایشگاه می‌توانند در ساختار کروموزومی تخمکها تأثیر بگذارند. در بررسیهای به عمل آمده در مورد اثر بوسرلین (آنالوگ GnRH[1]) بر ناهنجاریهای کروموزومی تخمکها نشان داده شد که بوسرلین سبب ناهنجاری کروموزومی نمی‌شود (۲۲، ۲۳). میزان آنیوپلوییدی تخمکها در زنانی که با hMG[2] و hCG[3] به طور همزمان درمان شده بودند ۳۵ درصد و در زنانی که فقط بوسرلین مصرف کرده بودند ۳۲ درصد گزارش شد (۲۴) ولی میزان آنیوپلوییدی در تخمکهای زنانی که GnRH/hMG استفاده کرده بودند در مقایسه با گروهی که با کلومیفن سیترات درمان شده بودند بالاتر بود (۲۰، ۲۵). به طور کلی از جمع‌بندی نتایج گزارشهای مختلف چنین استنباط می‌شود که هورمونهای تحریک تخمک گذاری اثر مستقیمی بر ایجاد ناهنجاریهای کروموزومی در تخمکها ندارند (۲۰، ۲۶، ۲۷).

اثر دما بر عملکرد دوک تقسیم در تخمکها (۲۸) و اثر انکوباسیون در زمانهای مختلف (۲۹) نشان داد که دما می‌تواند در ایجاد ناهنجاریهای کروموزومی نقش داشته باشد. همچنین نشان داده شد که استفاده از پوروماپسین منجر به فعالیت پارتنوژنز تخمکهای انسان (۲۵) و DMSO[4] سبب کاهش لقاح تخمکها می‌شود (۳۰). افزایش سن مادر سبب کاهش تعداد تخمکها و میزان لقاح می‌شود، این در حالی است که میزان آنیوپلوییدی در تخمکها نیز با بالا رفتن سن مادر افزایش می‌یابد (۳۱). بررسیها نشان داد که بالا رفتن سن مادر از مهمترین عوامل تشکیل تریزومی‌ها است (۳۲) و در تخمکهای زنان مسن‌تر ناهنجاری ساختاری کروموزوم نیز به میزان بالایی مشاهده می‌شود.

مطالعات متعددی بر روی تخمکهای لقاح نیافته پس از توسعه روش ICSI نیز انجام شد. در سال ۱۹۹۰، Kola و همکارانش میزان ناهنجاریهای کروموزومی در تخمکهای لقاح نیافته بعد از ICSI را ۲۲ در صد و بعد از IVF را ۳۵ درصد گزارش کردند (۳۳). در بررسیهای دیگر انجام شده تفاوت چندانی در میزان آنیوپلوییدی در تخمکهای لقاح نیافته از دو روش IVF و ICSI گزارش نشد (۱۲، ۳۴). بررسیهای انجام شده با روش دورگ‌گیری فلوئورسانس در جا (FISH)[5] نیز فراوانی بالای ناهنجاریهای کروموزومی در تخمکهای لقاح نیافته از روشهای IVF و ICSI را نشان می‌دهند (۱۱، ۳۵، ۳۶، ۳۷).

با توجه به بروز تعداد زیاد اختلالات کروموزومی در تخمکهای لقاح نیافته، گزارشهای متفاوت از میزان وقوع این ناهنجاریها در جوامع مختلف و نظر به اهمیت موضوع سعی شد با انجام تحقیق حاضر در مورد نقش تغییرات سیتوژنتیکی در بارور نشدن تخمکها در جامعه ایران و تفاوت میزان ناهنجاریها در روشهای لقاح آزمایشگاهی IVF و ICSI، اطلاعات جامعی فراهم و با نتایج منتشر شده مقایسه شود.

مواد و روشها

این مطالعه بر روی تخمکهای لقاح نیافته ۱۰۱ نفر از بیماران مراجعه کننده به پژوهشکده رویان برای درمان IVF (۲۷ نفر) و ICSI (۷۴ نفر) انجام گرفت. علت ناباروری این بیماران طیف وسیعی داشت. از این رو انجام این تحقیق مختص بیماری خاصی نبوده است. سن بیماران تحت درمان با روش IVF، ۲۰ تا ۴۰ سال با میانگین ۵/۵ ± ۲۹/۷۴ سال و محدوده سنی بیماران تحت درمان با روش ICSI، ۲۱ تا ۴۴ سال با میانگین ۵/۲ ± ۳۱/۲۷ سال بود. در مجموع تعداد ۳۶۴ تخمک از این بیماران مورد مطالعه قرار گرفت که ۹۱ تخمک پس از IVF و تعداد ۲۷۳ تخمک پس از ICSI لقاح نیافته بودند.

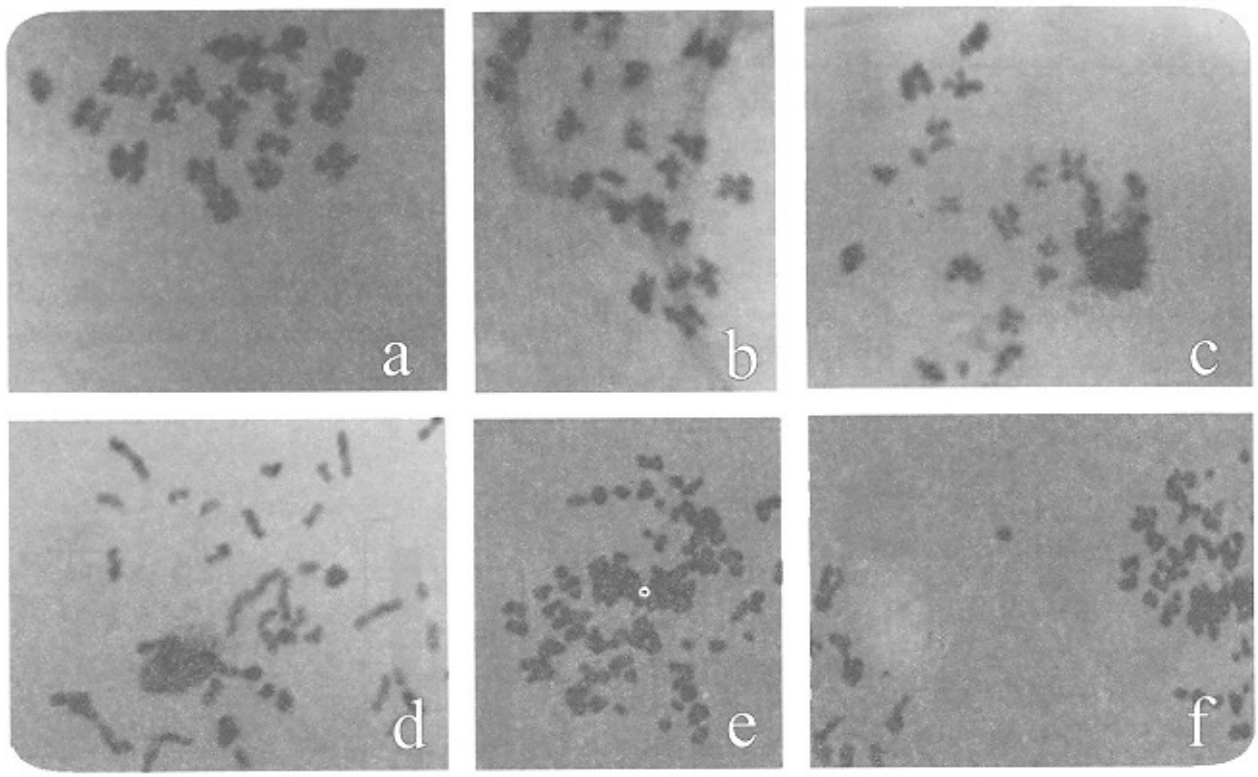
1. Gonadotropin Releasing Hormone
2. human Menoposal Gonadotropin
3. human Chrionic Gonadotropin
4. Dimethyl Sulfoxide
5. Fluorescent In Situ Hybriridization

در روش IVF، ۳ تا ٦ ساعت پس از جمع آوری و آماده سازی تخمکها، مجاورسازی[1] انجام گرفت که هر تخمک همراه با ۲۵۰۰۰ تا ۱۵۰۰۰۰ اسپرم زیر روغن پارافین (Merck) در محیط کشت Ham's F-10 (Seromed) قرار داده شد. ظروف کشت در انکوباتور CO_2 دار در دمای ۳۷° سانتی گراد نگهداری شد. در روش ICSI انکوباسیون تخمک پس از تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم به داخل تخمک انجام شد. عدم مشاهده دو پرونوکلئای نر و ماده ۴۸-۴٦ ساعت پس از تزریق اسپرم یا مجاورسازی نشان دهنده عدم موفقیت در باروری تخمکها است. از این رو این تخمکها مورد بررسی سیتوژنتیکی قرار گرفتند. روش سیتوژنتیکی مورد استفاده تلفیق روشهای تارکوفسکی (۳۸) و کامپگوچی و همکارانش (۳۹) با انجام اصلاحاتی در برخی از مراحل بود که قبلاً توضیح داده شد (۴۰)؛ به‌طور خلاصه، پس از برداشتن قشر شفاف تخمک توسط اسیدتایرود، تخمکها به محلول هیپوتونیک متشکل از مخلوط ٥٦ درصد کلرید پتاسیم، آب مقطر و ۱/۹۳ درصد سیترات سدیم به نسبت ۳:۱:۱ به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه منتقل شد تا حالت تورژسانس یا تورم در آنها ایجاد شود. سپس با گذر تخمکها از محلولهای مختلف تثبیت کننده شامل نسبتهای متفاوت متانول، اسید استیک و آب مقطر در زمانهای مختلف به طور تدریجی تثبیت شدند. پس از خشک شدن لامها، تخمکها در محلول گیمسای ده درصد رنگ‌آمیزی و زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰۰× بررسیهای سیتوژنتیکی انجام گرفت. مجموعه‌های کروموزومی مشاهده شده به‌صورت زیر تقسیم بندی و تجزیه و تحلیل شد:

۱) تخمکهایی دارای متافاز شمارش و بررسی بودند که شامل هاپلوید (n=۲۳ شکل ۱، a)، هاپوهاپلوید (تعداد کروموزومها بین ۱۴ تا ۲۲) (شکل ۱، b و c) هایپودیپلوید (تعداد کروموزومها بین ۳۰ تا ۴۵) (شکل ۱، d) هایپردیپلوید (تعداد کروموزومها بیش از ۴٦) (شکل ۱، e) و پلی‌پلوید (شکل ۱، f) بودند. در این گروهها بعضی از ناهنجاریهای ساختاری کروموزومی به ویژه از نوع شکست کروماتیدی و شکاف[2] مشاهده شد. در تعدادی از تخمکها با مجموعه‌های کروموزومی متفاوت تراکم پیش رس کروموزوم (PCC) اسپرم یا سر اسپرم نیز مشاهده شد (شکل ۱، f,d,c).

۲) تخمکهای غیر قابل شمارش؛ تعداد زیادی از تخمکهای مورد بررسی از کروموزومهای قابل شمارش برخوردار نبوده یا فاقد کروموزوم بودند. در این میان تخمکهای با چسبندگی کروموزومها، کروموزومهای روی‌هم افتاده و کروماتین تراکم‌نیافته[3] وجود داشت.

آنالیز نتایج به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و روش آماری χ^2 انجام شد.



شکل ۱: تصاویری از مجموعه‌های کروموزومی تخمکهای لقاح نیافته در روشهای IVF و ICSI

(a): هاپلوید، (c,b): هاپوهاپلوید، (d): هایپودیپلوید، (e): دیپلوید، (f): پلی‌پلوید

1. Insemination
2. Gap
3. Decondenced

یافته‌ها

* نتایج بررسی تخمکهای لقاح نیافته با روش IVF

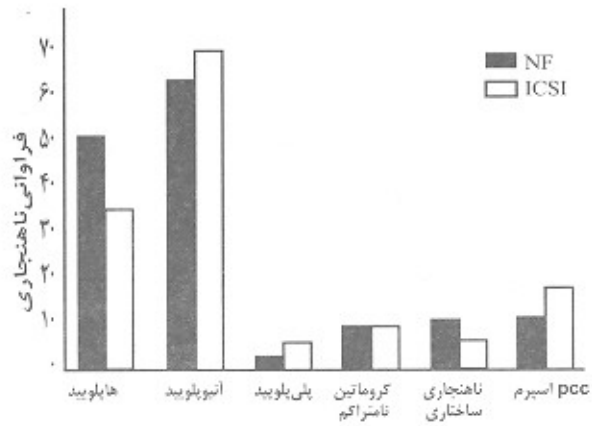
از ۹۱ تخمک بررسی شده در این گروه، ۴۵ نمونه دارای متافاز قابل بررسی بودند که ۲۰ تخمک دارای تعداد کروموزومهای طبیعی یا هاپلوئید (n=۲۳) بودند و ۴۴/۴ درصد کل تخمکهای بررسی شده با متافاز قابل شمارش در این گروه را تشکیل می‌دهند (جدول ۱).

جدول ۱: نتایج بررسی تغییرات کروموزومی در تخمکهای لقاح نیافته در روشهای IVF و ICSI و مقایسه فراوانی ناهنجاریها در دو روش

مشاهدات	مجموع ناهنجاریها در دو روش (درصد)	روش IVF (درصد)	روش ICSI (درصد)
تعداد تخمکهای ثابت شده	۳۶۴	۹۱	۲۷۳
تعداد تخمکهای با متافاز قابل شمارش	۱۸۷(۵۱/۴)	۴۵(۴۹/۵)	۱۴۲(۵۲)
هاپلوئید	۷۳(۳۹)	۲۰(۴۴/۴)	۵۳(۳۷/۳)
هایپوهاپلوئید	۳۴(۱۸/۲)	۹(۲۰)	۲۵(۱۷/۶)
هایپرهاپلوئید	۳۱(۱۶/۶)	۶(۱۳/۳)	۲۵(۱۷/۶)
دیپلوئید	۲۴(۱۲/۸)	۲(۴/۴)	۲۲(۱۵/۵)
هایپودیپلوئید	۲۳(۱۲/۳)	۸(۱۷/۸)	۱۵(۱۰/۶)
هایپردیپلوئید	۲(۱/۱)	۰(۰)	۲(۱/۴۱)
پلی پلوئید	۱۰(۲/۷۵)	۰(۰)	۱۰(۳/۷)
ناهنجاریهای ساختمانی	۱۹(۵/۲)	۸(۸/۸)	۱۱(۴/۰۲)

در بقیه انواع ناهنجاریهای سیتوژنتیکی از جمله هایپوهاپلوییدی (۲۰ درصد)، هایپرهاپلوییدی (۱۳/۳ درصد)، دیپلوییدی (۴/۴ درصد) و هایپودیپلوییدی (۱۷/۸ درصد) مشاهده شد.

تخمکهای هایپودیپلوئید تقسیم میوز را بدون آزادسازی اولین گویچه قطبی انجام داده‌اند. گروه دیگر ناهنجاریهای مشاهده شده ناهنجاریهای ساختاری کروموزومها بود که در ۸ تخمک، این نوع از اختلالات (۸/۸ درصد) مشاهده شد. در ۶ تخمک (۶/۶ درصد) عدم تراکم کروماتین و در ۸ تخمک (۸/۸ درصد) PCC کروموزومهای اسپرم مشاهده شد (نمودار ۱).



نمودار ۱: بررسی کروموزومی تخمکهای لقاح نیافته در روشهای IVF و ICSI

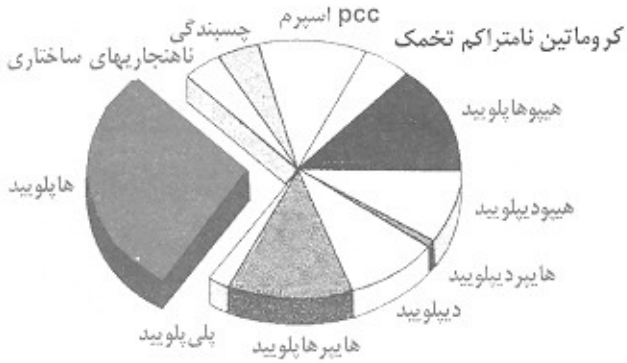
گروهی از تخمکهای بررسی شده علیرغم دارا بودن کروموزومهای متافازی غیر قابل شمارش بودند زیرا با چسبندگی شدیدی بین کروموزومها دیده می‌شد (۸/۸ درصد موارد) یا امکان شمارش کروموزومها به علت روی‌هم افتادن آنها وجود نداشت (۳۰/۸ درصد موارد) در ۱۱ تخمک (۱۲/۱ درصد) هیچ کروموزومی مشاهده نشد.

* نتایج بررسی تخمکهای لقاح نیافته بعد از روش ICSI

جدول ۱ جزییات بررسی ۲۷۳ تخمک لقاح نیافته بعد از روش ICSI را نشان می‌دهد. از این تعداد ۱۴۲ نمونه کروموزومهای قابل شمارش داشتند. آنیوپلوییدی در ۹۴ تخمک (۶۲/۷ درصد) دیده شد. ۲۵ تخمک (۱۷/۶ درصد) هایپوهاپلوئید، ۲۵ تخمک هایپرهاپلوئید، ۲۲ مورد دیپلوئید (۱۵/۵ درصد) و ۱۵ تخمک هایپوهاپلوئید (۱۰/۶ درصد) دیده شد. هایپردیپلوییدی فقط در دو تخمک یا ۱/۴۱ درصد موارد در این گروه مشاهده شد. از دیگر ناهنجاریهای سیتوژنتیکی، ناهنجاریهای ساختاری در کروموزومهای ۱۱ تخمک (۴/۴ درصد)، عدم تراکم کروماتین در ۱۸ تخمک (۶/۶ درصد) و PCC کروموزومهای اسپرم در ۴۴ مورد (۱۶/۱ درصد) مشاهده‌شد (نمودار ۱). ۲۸/۶ درصد کل تخمکهای مورد بررسی دارای کروموزومهای غیر قابل شمارش بودند و در ۴۶/۵ درصد تخمکها هسته اسپرم مشاهده شد.

مقایسه فراوانی ناهنجاریهای کروموزومی در تخمکهای لقاح نیافته از دو روش

کل ناهنجاریهای مشاهده شده در تخمکهای لقاح نیافته در این دو روش در نمودار ۲ نشان داده شده که در آن نسبت تخمکهای هاپلوئید (سالم از نظر کروموزومی) به تخمکهای دارای ناهنجاری سیتوژنتیکی به‌طور مقایسه‌ای نشان داده شد. بررسی ۳۶ تخمک نشان داد که ۶۱ درصد آنها دارای اختلال عددی کروموزومی (آنیوپلوییدی) هستند (نمودار ۲).



نمودار ۲: مقایسه انواع ناهنجاریهای مشاهده شده در تخمکهای لقاح نیافته در روشهای IVF و ICSI

در تخمکهای لقاح نیافته از روش IVF، ۵۵/۱۴ درصد و در تخمکهای لقاح نیافته از روش ICSI، ۶۲/۷ درصد تخمکها آنیوپلوئید بوده‌اند که

از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین این دو گروه وجود ندارد. بیشترین میزان آنیوپلوییدی مشاهده شده از نوع هایپوهاپلوییدی بود که در ۲۰ درصد تخمکهای لقاح نیافته از IVF و در ۱۸/۲ درصد تخمکهای لقاح نیافته در ICSI دیده شد (نمودار ۱). هایپرهاپلوییدی در ۱۶/۶ درصد از تخمکها مشاهده شد (۱۳/۲ درصد مربوط به تخمکهای حاصل از IVF و ۱۷/۶ درصد مربوط به تخمکهای حاصل از ICSI).

در مواردی هم کروموزومهای اسپرم در لابه‌لای کروموزومهای هایپوهاپلویید تخمکها مشاهده شد. دیپلوییدی تخمکها که نشانه عدم بلوغ آنهاست در ۱۲/۸ درصد نمونه‌ها مشاهده شد. با وجود آنکه فقط ۴/۴ درصد تخمکهای لقاح نیافته از IVF دیپلویید بوده‌اند در تخمکهای لقاح نیافته از ICSI، ۱۵/۵ درصد دیپلوییدی مشاهده شد که علیرغم تفاوت ارقام، آزمون آماری تفاوت معنی داری بین این دو گروه نشان نمی‌دهد. تخمکهای هایپودیپلویید با درصد نسبتاً بالا (۱۲/۳ درصد) در کل تخمکها مشاهده شد که از این رقم، ۱۷/۸ درصد مربوط به تخمکهای لقاح نیافته بعد از IVF و ۱۰/۶۵ درصد مربوط به روش ICSI بوده است که تفاوت معنی‌داری بین دو گروه دیده نمی‌شود. در ۱۰ تخمک لقاح نیافته (۳/۷ درصد) بعد از ICSI، پلی پلوییدی مشاهده شد که در هیچ یک از تخمکهای لقاح نیافته بعد از IVF دیده نشد. ناهنجاریهای ساختاری کروموزومها، PCC کروموزومهای اسپرم و چسبندگی کروموزوم در هر دو گروه مشاهده شد که نتایج حاصل نشان دهنده آن است که در بروز این ناهنجاریها اختلاف معنی‌داری بین دو گروه مورد مطالعه وجود ندارد.

نتایج در جدول ۱ خلاصه شده است. علت بالا بودن ارقام در بعضی موارد به دلیل آن است که در یک تخمک پدیده‌های مشترکی مشاهده شد که هر یک به عنوان یک مورد اختلال ثبت شد. به عنوان مثال تخمکی که دارای تعداد کروموزومهای هایپوهاپلوییدی و در آن سر اسپرم هم وجود داشت به عنوان دو ناهنجاری گزارش شد (یکی تخمک هایپوهاپلویید و دیگری تخمک دارای سر اسپرم).

بحث

فقط یک هسته اسپرم با یک پیش هسته ساده در تخمک فعال می‌تواند یک زیگوت را تشکیل دهد. برای انجام لقاح باید وقایع متعددی رخ دهد، مانند ورود صحیح اسپرم به تخمک، کامل شدن بلوغ میتوزی تخمک که با خروج دومین گویچه قطبی همراه است. اختلال در هر یک از مراحل شروع فعالیت متابولیکی تخمکی که قبلاً غیرفعال بوده، نامتراکم شدن هسته اسپرم و تبدیل کروموزومهای پدر و مادری به پرونوکلئوسهای نر و ماده؛ سبب مرگ زیگوت شده و میتواند دلیلی بر ناباروری باشد (۴۱).

امروزه دیگر شکی در اهمیت بررسی سیتوژنتیکی تخمکها و جنینهایی که بعد از IVF و ICSI لقاح نیافته یا تقسیم نشده‌اند وجود ندارد. اولین بار که با بررسی تخمکها، درصد چشمگیری (حدود ۶۰ درصد) از کروموزومهای غیرطبیعی دیده شد، علت عدم توانایی برای لقاح بیشتر تخمکها مشخص شد (۱۹، ۴۲). از آن پس محققین متعددی به بررسی سیتوژنتیکی تخمکهای لقاح نیافته پرداختند و موردی که در همه این مطالعات به‌طور مشترک عنوان شده است، مشکل کار با تخمکها است. در بررسی کروموزومهای تخمکها برخلاف بررسی کروموزومهای لنفوسیتها، نتیجه گیری کاملاً به یک متافاز وابسته است (۴۳). علاوه بر مشکلات تکنیکی در این بررسیها مسئله کار با کروموزومهای میوزی نیز مطرح است. این کروموزومها بسیار کوچک و منقبض هستند و سبب می‌شود تا تشخیص تعلق هر کروموزوم به گروههای کروموزومی A تا G بسیار مشکل باشد. تکنیکهای نواربندی هم در این زمینه کمک نمی‌کنند زیرا تنها با یک سلول مواجه هستیم. بررسی سیتوژنتیکی تخمکهای لقاح نیافته مراحل مختلفی را که در آن متوقف شده‌اند نشان می‌دهند (۴۱): توقف در طی مراحل تقسیم میوز I، توقف بعد از ورود اسپرم به تخمک و توقف در طی مراحل تقسیم میوز II.

در تحقیق حاضر، در کل تخمکهای بررسی شده ۵۱/۲ درصد دارای کروموزومهای قابل شمارش بودند که از مجموعه کروموزومی هاپلویید، آنیوپلویید یا پلی‌پلویید برخوردار بودند (جدول ۱).

* تخمکهای هاپلویید

در اولین تقسیم متافاز تخمکها، کروموزومهای بی والانت با تعداد هاپلویید (n=۲۳) وجود دارند. این بی والانتها در نتیجه جفت شدن کروموزومهای همساخت ایجاد می‌شوند. پس از آن در دومین تقسیم متافاز تخمکها، در نتیجه جفت شدن بی والانتها کروموزومهای دایاد[1] ایجاد می‌شوند. بنابراین در یک تخمک مرحله متافاز II، ۲۳ یونی والانت وجود دارد که انتظار داریم تخمکهای لقاح نیافته بعد از مجاورسازی یا تزریق اسپرم در این مرحله از تقسیم (MII) باشند.

بیشتر مطالعات نشان داده‌اند که تخمکهای لقاح نیافته تخمکهای هاپلویید (MII) هستند که فراوانی آن در مطالعات متعدد، متفاوت گزارش شده است؛ به‌عنوان مثال ۸۱/۹ درصد در مطالعه Nishino و همکارانش (۲۱)، ۵۳/۳ درصد (۴۴)، ۵۲/۳ درصد (۴۵) و در مطالعه حاضر از ۱۸۷ تخمک قابل شمارش ۷۳ مورد (۳۹ درصد) جزء تخمکهای هاپلویید و در مرحله (MII) بودند (جدول ۱، نمودار ۱). علت درصد کمتر تخمکهای هاپلویید در بررسی حاضر می‌تواند ناشی از درمانهای مختلف بیماران قبل از مراجعه برای انجام آزمایشهای لقاح آزمایشگاهی، زمینه ژنتیکی متفاوت بیماران در مقایسه با سایر جوامع بررسی شده باشد.

* تخمکهای آنیوپلویید

تخمکهای هایپوهاپلویید، هایپرهاپلویید، دیپلویید، هایپودیپلویید و هایپردیپلویید از زیر مجموعه تخمکهای آنیوپلویید هستند که جمعاً ۶۱ درصد کل تخمکهای قابل شمارش در این بررسی را تشکیل می‌دهند (نمودار ۱).

آنیوپلوییدی در گزارشهای متعددی با فراوانیهای متفاوت گزارش شده است. شاید فراوانیهای متفاوت گزارش شده ناشی از استفاده از

1. Diad

روشهای مختلف بررسی، اشتباه در هنگام تثبیت تخمکها یا آنالیز لامها باشد که به علت روی‌هم افتادن کروموزومها، شمارش دقیق آنها میسر نبوده است. همچنین مطالعه در جمعیتهای مختلف نیز می‌تواند دلیل این تفاوتها باشد (۲۵). پدیده جدا نشدن کروموزومها[1] می‌تواند عامل اصلی رخداد آنیوپلوییدی باشد. این پدیده ناشی از جدا نشدن کروموزومها در هنگام تقسیم آنافازی (I و II) است. پدیده جدا نشدن کروموزومها می‌تواند در کل ژنوم یا در تعدادی از کروموزومها رخ دهد. اگر در کل ژنوم رخ دهد، تخمکها یا گویچه‌های قطبی تریپلوزوم ایجاد خواهند شد. توقف آزاد سازی دومین گویچه قطبی به‌میزان زیادی در اووگونی‌ها رخ می‌دهد به‌ویژه پس از تحریک با هورمونهای تخمک‌گذاری که می‌تواند سبب دیپلوییدی در تخمکها شود (۲۵). اگر این پدیده برای تعدادی از کروموزومها رخ دهد تخمکهای هایپوهاپلوید و هایپرهاپلوید ایجاد خواهند شد. Pellestor در سال ۱۹۹۱ (۸) نشان داد که امکان رخداد پدیده جدا نشدن کروموزومها در کروموزومهای گروه D و G بیشتر است اما در واقع این پدیده در مراحل مختلف میوز و در کروموزومهای مختلفی رخ می‌دهد. مکانیسم دیگری که سبب آنیوپلوییدی می‌شود ایجاد تک کروماتید در Predivision است (۴۶). Predivision، تقسیم پیش از موعد سانترومرها در یونی والانتهاست. تک کروماتیدها در دومین تقسیم میتوزی به طور اتفاقی یا وارد دومین گویچه قطبی می‌شوند یا در تخمک باقی می‌مانند. تخمکهای واجد تک کروماتیدها بعد از لقاح تریزومی را تشکیل می‌دهند اما اگر تک کروماتید به گویچه قطبی ثانویه منتقل شود لقاح طبیعی صورت می‌پذیرد.

Hansmann و همکارانش (۴۷) معتقدند که بالاترین درصد تریزومی در انسان در نتیجه Predivision رخ می‌دهد. نشان داده شد که بین هایپرهاپلوییدی و هایپوهاپلوییدی در تخمکها اختلاف معنی داری وجود ندارد (۸). در این مطالعه نیز تفاوت معنی‌داری بین درصد هایپوهاپلوییدی (۱۸/۲ درصد) و هایپرهاپلوییدی (۱۶/۶ درصد) در کل تخمکها دیده نشد.

در تخمکهای مطالعه شده بعد از روش IVF ۲۰ درصد هایپوهاپلوییدی و ۱۳/۳ درصد هایپرهاپلوییدی دیده شد ($P>0.05$) و در تخمکهای لقاح نیافته بعد از ICSI، ۱۷/۶ درصد هایپوهاپلوییدی و ۱۷/۶ درصد هایپرهاپلوییدی مشاهده شد که با گزارش محققان دیگر همخوانی دارد (۱۲، ۴۲، ۴۸، ۴۹).

دیپلوییدی نیز از ۸/۵ درصد (۲۲) تا ۲۱/۵ درصد در مطالعات بر روی تخمکها توسط محققین مختلفی گزارش شد (۱۱). در این مطالعه در ۱۲/۸ درصد تخمکها دیپلوییدی مشاهده شد. هاپیودیپلوییدی و هایپردیپلوییدی در بررسیهای Ma و همکارانش (۴۵) در ۶/۳ درصد کل تخمکها دیده شد در حالی‌که Rosenbusch و همکارانش (۲۰) هاپیودیپلوییدی را در ۱۵/۲ درصد هایپردیپلوییدی را در ۴/۷ درصد از تخمکهای مورد بررسی گزارش دادند. در این مطالعه ۱۲/۳ درصد هاپیودیپلوییدی و ۱/۱ درصد هایپرهاپلوییدی مشاهده شد. در تخمکهای لقاح نیافته بعد از IVF، ۱۷/۸ درصد هاپیودیپلوییدی مشاهده شد که فراوانی این ناهنجاری در تخمکهای لقاح نیافته بعد از ICSI، ۱۰/۶ درصد بوده است که تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نیست.

❋ پلی پلوییدی

تعداد زیاد اسپرمهای متحرک در اطراف تخمکها در IVF سبب افزایش پلی‌پلوییدی در این سلولها می‌شود. (۵۰، ۵۱). بعضی از دانشمندان بر این عقیده‌اند که پدیده پلی اسپرمی فقط در تخمکهای نابالغ رخ می‌دهد (۵۰)، اما بعضی دیگر معتقدند که در تخمکهای بالغ نیز پلی‌اسپرمی دیده می‌شود به‌طوری‌که اگر تخمکها به‌مدت نسبتاً طولانی در انکوباتور باقی بمانند قدرت مقابله با ورود اسپرم را از دست می‌دهند (۵۱). مکانیسم دیگری که می‌تواند سبب ایجاد پلی‌پلوییدی شود، آزاد نشدن گویچه‌های قطبی در تخمکها و به‌دنبال آن تزریق اسپرم یا ورود اسپرم به درون جنین تخمکها است. از انواع پلی‌پلوییدی‌ها، تریپلوییدی بیش از همه موارد روی می‌دهد. ورود یک اسپرم هاپلوید به یک تخمک دیپلوید یک زیگوت تریپلوید را ایجاد می‌کند. در IVF ۷۵ درصد کل پلی‌پلوییدها را تریپلوییدی تشکیل می‌دهد (۵۲). زیگوتهای تریپلوید در هنگام تقسیم میوزی ابتدا به سه سلول و سپس به شش سلول تقسیم می‌شوند در حالیکه دیپلوییدها به دو سلول و سپس به چهار سلول تقسیم می‌شوند (۵۲، ۵۳). پلی‌پلوییدی از ۳ درصد (۱۹) تا ۱/۲ درصد (۲۰) گزارش شده که در این بررسی فراوانی پلی پلوییدی در ۳/۷ درصد تخمکها مشاهده شد که تأیید کننده گزارشهای محققان دیگر است.

انواع ناهنجاری دیگر کروموزومی از نوع شکستهای ساده کروموزومی و کروماتیدی در تخمکهای لقاح نیافته از IVF و ICSI نیز مشاهده شد. عدم لقاح در بسیاری از موارد مربوط به باز نشدن هسته اسپرم یا تراکم پیش‌رس کروموزومهای اسپرم بود؛ در حالی‌که تخمک از نظر کروموزومی سالم بود. عوامل متعددی می‌توانند در عدم تراکم کروموزومهای اسپرم و مشارکت کروموزومهای آن در لقاح مؤثر باشند که به تفصیل در مرجع شماره ۴ مورد بحث قرار گرفته است.

با توجه به نتایج مطالعه حاضر و گزارشهای منتشر شده در خصوص اختلالات سیتوژنتیکی تخمکها می‌توان چند نتیجه گیری مهم داشت:

۱) علت عمده عدم لقاح تخمکها بروز اختلالات سیتوژنتیکی است؛

۲) ناهنجاریهای سیتوژنتیکی سبب ایجاد گامتهای غیرطبیعی، عدم لقاح و عدم بلوغ سیتوپلاسمی می‌شوند که یا وجود کروموزومهای ناهنجار مسئول بروز این گونه اختلال است یا آنکه اختلال در این مراحل، نتیجه بعدی وجود کروموزومهای غیرطبیعی است؛

۳) از آنجایی که در بیشتر موارد تخمکهای مطالعه شده یک بیماریک ناهنجاری یکسان را نشان می‌دادند به‌نظر می‌رسد یک نوع مکانیزم ژنتیکی باعث عدم لقاح در این تخمکها شده است؛

۴- هیچ تفاوت معنی‌داری بین میزان اختلالات کروموزومی در تخمکهای لقاح نیافته بعد از IVF و ICSI دیده نشد. بنابراین می‌توان تصور کرد که تنها دلیل عدم لقاح بعد از ICSI مشکل اسپرم نیست بلکه عدم فعالیت تخمکها نیز می‌تواند دلیل مهمی برای عدم لقاح باشد.

1. Non-disjunction

تقدیر و تشکر

این مطالعه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب شماره ۱۱-۴۶۴ دفترمرکزی جهاد دانشگاهی است و محل اجرای آن بخش تحقیقات پژوهشکده رویان بوده است. نویسندگان مراتب تقدیر خود را از آقایان دکتر مجتبی رضازاده و دکتر محمد مهدی آخوندی و خانم لیلی کریمیان برای در اختیار قرار دادن نمونه‌ها و آقای باغستانی در امور آماری ابراز می‌دارند.

References

1. Bongso, A, Chye NS, Ratham S, Sathanthan H, Wong PC: Chromosome anomalies in human oocytes failing to fertilize after insemination in vitro. Hum Reprod 1998; 3: 645-649

2. Seppala M: The world collaborative report on IVF and embryo replacement: current state of the art in january 1984; Ann NY Acad Sc: 1985; 442: 558-563

3. Hassold T, Chen N, Funkhouser J, Manvel B, Matsura J, Matsuyama A, Wilson C, Yamane A, Jacobs PA: A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. Ann Hum Genet 1980; 46: 282-294

4. Jacobs PA, Hassold T: Trisomy in man. Ann Rev Genet 1984; 18: 69-97

5. Edirisinghe W, Murch AR, Yovich JL: Cytogenetic and analysis of human oocytes and embryos in an in-vitro fertilization programme. Hum Reprod 1992; 7: 230-236

6. Angell R, Hillier S, West D, Glasier F, Rodger M, Baird DT: Chromosome anomalies in early human embryos. J Reprod Fertil 1988; 36: 73-81

7. Boue J, Boue A, Lazer P: Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions. Teratology 1975; 12: 11-26

8. Pellestor F: Differential distribution of aneuploidy in human gametes according to their sex. Hum Reprod 1991; 6: 1552-1528

9. Plachot M: Chromosome analysis of oocytes and embryos. In Verlinsky Y, Kuliev A(eds) premplantation Genetics. Plenum Press, New York, NY, USA, 103-112

10. Abruzzo MA, Hassold TJ: Etiology of non-disjunction in humans. Environ Mol Mutngen 2 1995; 25: 38-47

11. Benkhalifa M, Menezo Y, Janny L, Pouly JL, Qumsiyeh MB: Cytogenetics of uncleaved oocytes and arrested zygotes in IVF programs. J Assist Reprod Genet 1996; 140-148

12. Edirisinghe WR, Murch A, Junk S, Yovich JL: Cytogenetic abnormalities of unfertilized oocytes generated from in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: A double blind study. Hum Reprod 1997; 12: 2748-2791

13. Desutter P, Dhant M, Vanderckhove D: Correlations between follicular fluid steroid analysis and maturity and cytogenetic analysis of human oocytes that remained unfertilized after in vitro fertilization. Fertil Stril, 1991; 55: 958-963

14. Wramsby H, Hasson A, Liedholm P: Chromosome preparations from in vitro matured human oocytes using simple air-drying technique. Clin Reprod Fertil 1982; 1: 323

15. Wramsby H, Liedholm P: A gradual fixation method for chromosomal preparation of human oocytes. Fertil Steril 1984; 41: 436

16. Plachot M, Crozet N: Fertilization abnormalities in human in vitro fertilization. Hum Reprod 1992; 7: 89-98

17. Rudak E, Dor J, Mashiach S, Nebel L, Goldman B: Human embryo chromosomes: Preliminary result of a study to karyotype multipronuclear human oocytes fertilized in vitro. Acta Euro Fertil 1983; 14: 389-393

18. Plachot M, de Grouchy J, Jonca A: Chromosomal analysis of human oocytes and embryos in an IVF program. Am Acad Sci 1988; 541: 381-397

19. Papadopaulos G, Templeton AA, Fish N, Randall J: The frequency of chromosome anomalies in human preimplantation embryos after in vitro fertilization. Hum Reprod 1989; 4: 91-98

20. Rosenbusch B, Sterizik K, Lauritzen C: Cytogenetics of unfertilized or uncleaved oocytes with in the scope of in vitro fertilization. Relations to hormone content of follicular fluid. Geburt Shife Frauenheilkd 1992; 52: 479-482

21. Nishino T, Kamiguchi Y, Tateno H, Segoku K, Islukawa M: A cytogenetic study of human oocytes unfertilized in in vitro fertilization (IVF). Nippon 1994; 46: 95-70

22. Delhanty JD, Penketh RJ: Cytogenetic analysis of unfertilized oocytes retrived after treatment with he LHRH analogue, buserlin. Hum Reprod 1990; 5: 699-702

23. Schimiady H, Kontenich H: Premature chromosome condensation after in vitro fertilization. Hum Reprod 1989; 4: 689-695

24. Gras L, Mcbain J, Trounson A, Kola I: The incidence of chromosomal aneuploidy in stimulated and unstimulated (natural) uninseminated human oocytes. Hum Reprod 1992; 740: 1396-1401
25. De sutter P, Dhont M, Nandekerekhove D: Hormonal stimulation for in vitro fertilization: A comparison of fertiliazation rates and cytogenetic findings in unfertilized oocytes. J Assist Reprod Genet 1992; 9: 254-258
26. Pellicer A, Tarin JJ, Miro F, Sampao M, Del los-Santos MJ, Remohi J: The use of gonadotropin releasing hormone analogues (GnRHa) in in vitro fertilization; some clinical and experimental investigations of a direct effect on the human ovary. Hum Reprod. 1992; 7(suppl): 39-47
27. Racowsky C, Prather AL, Johnson MK, Olvera SP, Gelaty TJ: Prematurely condensed chromosomes and abnormalities in unfertilized human oocytes after ovarian stimulation with and without gonadotropin releasing hormone meiotic agonist. Fertil Stril 1997; 62: 932-938
28. Santhananthan AH, Ng SC, Trounson AO, Bongso A, Ratnam SS, Ho J, Mok H, Lee MN: The effects of ultrarapid freezing on meiotic and mitotic spindles of mouse oocyte and embryos. Gamete Res 1988; 21: 285-410
29. Tarin JJ, Gomez E, Pellicer A: Chromosome anomalies in human in vitro. Fertil Steril 1991; 55: 964-969
30. Bouquet M, Selva J, Auroux M: Effects of cooling and equilibration in DMSO and cryopreservation of mouse oocytes, on the rates of in vitro fertilization development and chromosomal abnormalities. Mol Reprod Dev 1995; 40: 110-115
31. Zenezes MT, Casper RF: Cytogenetics of human oocytes, zygotes and embryos after in vitro fetrilization. Hum Genet 1992; 88: 367-375
32. Eichenlaub-Ritter U: Parental age-related aneuploidy in human germ cells and offspring: A story of past and present. Envron Mol Mutagen 1996; 28: 211-236
33. Kola I, Lacham O, Jansen RP, Turner M, Trounson A: Chromosomal analysis of human oocytes fertilized by injection of spermatozoa into the perivitelline space. Hum Reprod 1990; 5: 575-577
34. Coulam CB, Opsahi MS, Sherins RJ, Thorsell LP, Dorfmann A, Krysa L, Fugger E, Schulman JD: Comparisons of pregnancy loss patterns after intracytoplasmic sperm injection and other assisted reproductive technologies. Fertil Stril 1998; 65: 1157-1162
35. Verlinsky Y, Cieslak J, Feidine M, Vakhnenko V, Wolf G, Kovalinskaya L, White M, Lifchez A, Kaplan B, Mosie J: Pregnancies following pre-conception diagnosis of common aneuploidies by fluorescent in situ hybridization. Hum Reprod 1995; 10: 1923-1927
36. Verlinsky Y, Cieslak J, Freidine M, Ivakhnemko V, Wolf G, Kovalinskaya L, White M, Lifchez A, Kaplan B, Moise J, Valle J, Ginsberg N, Storm G, Kuliev A: Polar body diagnosis of common aneuploidies by FISH. J Assist Reprod Genet 1996; 13: 157-162
37. Jakobsson AH, Hanson C, Wikland M, Hamberger L: Fluorescent in situ hybridization analysis of chromosomally normal gametes and abnormal arrested embryos. J Assist Reprod Genet 1995; 12: 422-427
38. Tarkowski AK: An air drying method for chromosome preparations from mouse eggs. Cytogenetics 1966; 5: 394-400
39. Kamiguchi Y, Funaki K, Mikano K: A new technigue for chromosome study of murine oocytes. Proc Jap Acad 1976; 52: 316-321
۴۰. مزدارانی حسینی، عقدایی فرین: تراکم پیش رس کروموزومی اسپرم و تخمک در تخمکهای لقاح نیافته با روشهای لقاح آزمایشگاهی. یاخته، ۱۳۷۸، به شماره ۲، صفحات ۸-۱
41. Asch R, Simerly C, Ord VA, Schatten G: The stages with human fertilization arrests microtubule and chromosome configurarions in inseminated oocytes which faild to complete. Hum Reprod 1995; 10: 1897-1906
42. Wramsby H, Fredge K, Liedholm P: Chromosome analysis of human oocytes recovered from preovulatory follicles in stimulated cycles. N Engl J Med 1987; 316: 121
43. Angell RR, Ledger W, Yong EL, Harkness L, Barid DT: Cytogenetic analysis of unfertilized human oocytes. Hum Reprod 1991; 6: 568-573
44. Makemanam O, Stivannaboon S: Chromosome analysis of unfertilized oocytes after in vitro fertilization program: A preliminary report. southeast-Asian J trop Med Publick Health 1995; 26(suppl): 96-99
45. Ma S, Kalousek DK, Zouves C, Yven BH, Gomel V, Moon YS: Chromosome analysis of human oocytes failing to fertilize in vitro. Fertil Stril. 1989; 51: 992-997
46. Darlington CD: Recent advances in cytology. 2ed, Chirchill, London, 1937
47. Hansmann J, Bartels I, Beerman F, Caspari D,

Franke U, Hummler E, Theuring F: Mechanisms of non-disjunction: Facts and prespectives. In: Dellarco VL, Voytek PE, Hallaender A (eds). Aneuploidy, Plennum Press, NY, London, 1985; pp: 417-432

48. Martin RH, Mahadevan NM, Taylor PJ, Hildebrend K, Simpson LL, Peterson D, Yamanato J, Filletham J: Chromosome analysis of infertilized human oocytes. J. Reprod Fertil 1986, 78: 673-678

49. Djalali M, Rosenbusch B, Wolf M, Sterzik K: Cytogenetics of unfertilized human oocytes. J Reprod Fertil 1988; 84: 647-652

50. Van Der Ven HH, Al-Hassani S, Diedrick: Polyspermy in in vitro fertilization of human oocytes. ferquency and possible causes. Ann NY Acad Sci 1982; 442: 88-95

51. Rudak E, Dov J, Mashiach S, Nebel L, Goldman B: Chromosome analysis of multipronuclear human oocytes fertilization in vitro. Fertil Stril 1984; 41: 538-545

52. Plachot M, Mandelbum J, Janca AM, Grouchy J, de Satalat Baroux J, Chone J: Cytogenetic analysis and development capacity of normal and abnormal embryos after IVF. Hum Reprod 1989; 4: 99-103

53. Kola I, Lacham O, Jansen RP, Turner M, Trounson A: Chromosomal analysis of human oocytes fertilized by microinjection of spermatozoa into the perivitelline space. Hum Reprod 1990; 5: 575-577