فعال سازی الکتریکی تخمک‌های تزریق شده با اسپرم‌های بد شکل لقاح و تکوین جنینهای حاصله را بهبود می‌بخشد

محمدرضا دارابی .M.Sc[☆]، محمدحسین نصراصفهانی .Ph.D[☆★]
حسین ایمانی .Ph.D[☆★♦]، حسین بهاروند .M.Sc[☆]

☆ پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی

★ دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریح

★ مرکز باروری و ناباروری اصفهان، گروه جنین‌شناسی

★ دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی

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

چکیده

* **هدف:** ارزیابی اثر فعال سازی به روش الکتریکی، بر میزان لقاح و تکوین، بعد از تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم در بیماران تراتواسپرمی

* **مواد و روشها:** تعداد ۱۶۸ تخمک حاصل از تزریق درون سیتوپلاسمی ۱۳ بیمار که همسرانشان مبتلا به تراتواسپرمی شدید بودند، بعد از تزریق به دو گروه کنترل و فعال شده الکتریکی (گروه تجربی) تقسیم شدند. فعال سازی تخمک‌ها به دنبال تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرمها، بوسیله دستگاه الکتروفیوژن مدل CF-150B (Biological Laboratory service, H-1165 A.U.31. Hungary; CF-150B) با جریان مستقیم ۱/۲کیلو ولت بر سانتیمتر و زمان ۵۰μs انجام شد.

* **یافته‌ها:** میزان لقاح بعد از انجام تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرمها در گروه کنترل (۴۲درصد) و فعال شده الکتریکی (۷۱درصد) اختلاف معنی‌دار دارد (P=0.04). از طرفی بین دو گروه از لحاظ میزان تکوین اختلاف معنی داری، ۶۶ ساعت بعد از تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم وجود ندارد (P>0.176)، اما بین میزان درصد ۸ سلولی نسبت به تعداد کل تخکمهای تزریق شده در گروه کنترل (۱۵درصد) و فعال شده الکتریکی (۵۰درصد) اختلاف معنی دار وجود دارد (P=0.009).

* **نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد انجام فعال سازی به روش الکتریکی، ۳۰ دقیقه بعد از تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم، در بیماران تراتواسپرمی شدید، تا حدودی می‌تواند موجب افزایش لقاح و بهبود تکوین جنین شود.

گل واژگان: فعال سازی الکتریکی، لقاح، تکوین جنین، تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم

مقدمه

لقاح یک روند چند جانبه است که با ورود اسپرم به تخمک شروع می‌شود. ورود اسپرم به تخمک سه نقش مهم را ایفا می‌نماید که به ترتیب عبارتند از: ۱ـ انتقال ژنوم پدری، ۲ـ تعیین جنسیت جنین، ۳ـ فعال سازی تخمک.

فعال سازی تخمک تحت تاثیر فاکتورهای اسپرمی فعال کننده تخمک (Sperm Oocyte Activating Factors: SOAF) صورت می‌گیرد. تحقیقات نشان داده است که این فاکتور داخل کلاهک اکروزومی سر اسپرم قرار گرفته که با ورود اسپرم به تخمک و آزاد سازی این فاکتور، کلسیم از رتیکولوم اندوپلاسمیک به داخل تخمک به صورت پکسری نوسانات (Oscillations) مکرر آزاد می‌شود. این نوسانات تا ۴-۳ ساعت و گاهی تا ۲۰ ساعت با فرکانس‌های خاصی ادامه یافته و هنگام تشکیل پیش هسته‌ها متوقف می‌شود (۱، ۲).

علی رغم تزریق اسپرم درون تخمک در روش تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم (Intracytoplasmic sperm injection: ICSI) میانگین درصد لقاح در این بیماران بین ۶۰ الی ۷۰درصد گزارش شده است (۳).

فعال نشدن تخمک، پس از عامل آنوپلوئیدی اصلی‌ترین دلیل عدم تشکیل پیش هسته‌ها در IVF و ICSI است. Zhang و Yamano به تخمک‌های لقاح نیافته، پس از تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم، تحریک الکتریکی اعمال کرده و علائم باروری را مشاهده نمودند (۳، ۴). این مسئله بیانگر آن است که عدم لقاح در این تخمکها می‌تواند بعلت عدم فعال سازی بهینه تخمکها توسط اسپرم تزریق شده باشد.

تصاویر میکروسکوپ الکترونی اسپرم‌های سر گرد نشانگر فقدان اکروزوم بوده و لذا شانس لقاح در آنها بدلیل عدم فعال سازی تخمک بسیار ناچیز و در حد صفر می‌باشد (۵، ۶).

مطالعه دیگری در این زمینه نشان داده است که در پی فعال سازی این تخمک‌ها توسط کلسیم یونوفور، کلسیم داخلی سلولی افزایش یافت و به بارداری و تولد انجامید (۷، ۸).

Yanagida نشان داد که اگر اسپرم‌های بیمارانی را که قبلاً ICSI شده ولی لقاح نداشته‌اند را به داخل تخمک‌های لقاح نیافته موش تزریق نماییم، در صورت مشاهده جسم قطبی دوم و پیش هسته ماده به فعال شدن تخمک موش و در نتیجه وجود SOAF در اسپرم این افراد پی می‌بریم، در غیر این صورت علت ناباروری می‌تواند کمبود یا کمکاری بعضی از فاکتورهای فعال کنندهٔ تخمک باشد و وی نشان داد، که استفاده از ICSI به همراه فعال سازی الکتریکی، روش مفیدی در درمان این بیماران است (۷، ۸). در واقع اگر SOAF حاوی یک سوییچ فیزیولوژیک برای نوسانات کلسیم باشد تزریق SOAF یک گونه به تخمک سایر گونه‌ها احتمالاً می‌تواند نوسانات کلسیم را در آنها ایجاد نماید، که این تست را تست فعال سازی تخمک موش (Mouse oocyte activition assay) می‌نامند (۱).

غیر طبیعی بودن ساختار اسپرمها در طی اسپرماتوژنز می‌تواند با غیر طبیعی بودن یا کمبود فاکتور فعال کننده تخمک (SOAF) در اسپرم همراه باشد (۸). این فاکتور احتمالاً در طی اسپرماتوژنز تولید شده و بروز هر گونه نقص در طی اسپرماتوژنز می‌تواند همراه با ایجاد اشکال در تولید این فاکتور باشد، فعال نشدن تخمک توسط اسپرماتید مؤید این مطلب است (۹).

تحقیقات اولیه نشان داده است که در روش ICSI بین پارامترهای اسپرمی و درصد لقاح ارتباط زیادی وجود ندارد، ولی Bartoov و همکاران نشان دادند که اگر طی انجام ICSI، با بررسی مرفولوژی اسپرم می‌توانیم بین شکل اسپرم و هسته آن از یک سو و درصد لقاح و حاملگی از سوی دیگر ارتباط مستقیم و معنی داری پیدا کنیم (۱۰، ۱۱).

تحقیقات نشان داده که درصد لقاح در بیماران فاقد اسپرم (Azospermia) بدون انسداد در مجاری (nonobstractive) نسبت به بیمارانی که برای لقاح از اسپرم بیوپسی شده از بیضه بیماران دارای انسداد، یا اسپرم انزال شده استفاده گردد، معمولاً پایین‌تر است که این تفاوت می‌تواند ناشی از عدم فعال شدن تخمک توسط اینگونه اسپرمها باشد (۱۱).

هدف این تحقیق بررسی تاثیر فعال سازی الکتریکی بر روی تخمک‌هایی است که با اسپرم‌های فوق‌العاده آمورف تزریق می‌شوند.

مواد و روشها

* انتخاب بیمار

نمونه‌های اسپرمی مورد آزمایش جهت انجام ICSI در این طرح از بین نمونه‌های بیمارانی انتخاب شدند که جزو یکی از سه گروه زیر بودند:

۱ـ بیماران مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان، که طبق آزمایشات قبلی فاقد اسپرمهای نرمال و دارای اسپرمهای فوق العاده آمورف در نمونه شستشو شده خود بودند (۵ بیمار).

۲ـ بیمارانی که سابقه انجام ICSI بدون لقاح داشته‌اند (۲ بیمار).

۳ـ بیمارانی که دارای اسپرمهای فوق العاده آمورف بوده و جهت عمل تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم به مرکز باروری و ناباروری اصفهان مراجعه نمودند (۶ بیمار).

جمعاً تعداد ۱۶۸ عدد تخمک بدست آمد، که پس از تزریق به روش معمول ICSI به دو گروه تقسیم شدند: ۱ـ گروه کنترل با ۸۳ عدد تخمک و ۲ـ گروه فعال سازی الکتریکی با ۸۵ عدد تخمک

* روش تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم

پس از سوپروالاسیون و القاء تخمک گذاری، فولیکولها، توسط متخصصین زنان و نازایی از طریق سونوگرافی واژینال تخلیه شدند و سپس تخمک‌ها در محیط کشت IVF F20 (Vitrolife-Sweden) قرار گرفتند و سپس سلولهای گرانولوزا توسط ۸۰ واحد بین‌المللی آنزیم هیالورونیداز، (lot 64H7110 Sigam Germany,) حذف شدند. سمن‌هم نیز به روش Pure Sperm Gradiant (Nidacon cat.no. pS100-250 Sweden durg Gothen burg) و سه بار شستشو با محیط Ham,s F10 (Seromed-Germany) آماده شد. سپس تخمک‌ها و اسپرم‌های آماده شده بطور جداگانه در

قطرات محیط کشت در داخل دیش (Falcon 1006) مخصوص تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم حاوی قطرات PVP منتقل شد و پس از القاء واکنش آکروزومی (تحریک دم اسپرم توسط سوزن تزریق)، طبق روش معمول به داخل تخمک یک اسپرم تزریق شد. تخمک‌هایی که در طی تزریق یا بلافاصله بعد از آن دژنره شده بودند از مطالعه حذف شدند (۱۲، ۱۳).

سپس ضمن مشاوره و کسب رضایت از بیمار تخمک‌های تزریق شده به دو گروه تقسیم شدند. گروه اول به عنوان گروه کنترل مستقیماً به محیط کشت rS1(Vitrolife-Sweden) منتقل شدند و گروه دوم یا گروه تیمار پس از حداکثر ۳۰ دقیقه به روش زیر تحت تاثیر فعال سازی الکتریکی قرار گرفته و سپس به محیط کشت (rS1) انتقال داده شدند. تخمکهای تزریق شده در زمانهای ۱۸، ۴۲ و ۶۶ ساعت پس از ICSI از نظر وجود پیش هسته و رشد جنین‌ها بررسی شدند، تا در روز سوم پس از ICSI تعدادی از جنین‌ها به رحم منتقل گردند یا منجمد شوند.

انتخاب جنین‌ها جهت انتقال به بیماران بر اساس تعداد و کیفیت جنین و نه بر اساس تعلق آنها به گروه کنترل و فعال صورت گرفت.

* روش فعال سازی الکتریکی

تخمک‌های ICSI شده ابتدا بطور گروهی در بافر فیوژن شامل ۰/۳ مولار مانیتول و ۰/۰۵ میلی مولار کلرید کلسیم و ۰/۱ میلی مولار کلرید منیزیم با pH=۷/۲-۷/۴ (فاقد افزودنی) دوبار شستشو شدند سپس داخل قطره‌ای از همین بافر که چند لحظه قبل از آن بین دو الکترود از جنس فولاد ضد زنگ (Steel Stainless) که با فاصله یک میلیمتر از هم در روی لام گذاشته بود، قرار داده شد و فوراً توسط دستگاه الکتروفیوژن (Biological Laboratory Service, CF 150B H-1165 Budapest, Zselyi A.U.31. Hungray; CF 150) تحت تاثیر یک پالس جریان مستقیم (Direct current) با ولتاژ ۱/۲kV/cm و زمان ۵۰μs قرار گرفت، بطوریکه مدت قرار گرفتن جنین‌ها در بافر، مجموعاً از ۱۵ تا ۲۰ ثانیه تجاوز نکرد. سپس تخمک‌های تحریک شده، پس از ۳-۴ بار شستشو در قطرات rS1 در همین محیط و در شرایط CO2 ۵درصد در دمای ۳۷°C کشت داده شدند.

۱۸-۱۶ ساعت پس از ICSI، ظهور دو پیش هسته به عنوان لقاح تلقی شد (۱، ۵). جنین‌ها در ساعت ۴۲ بر اساس تعداد ۲ سلولی و بیشتر و در همان ساعت بر اساس تعداد ۴ سلولی و بیشتر و در ساعت ۶۶ بر اساس تعداد ۸ سلولی و بیشتر، دسته بندی شدند.

* روش آنالیز آماری

در این مطالعه از نرم‌افزار آماری SPSS جهت مقایسه میانگین داده‌ها به روش آزمون t بین گروه کنترل و گروه فعال شده استفاده شد.

یافته‌ها

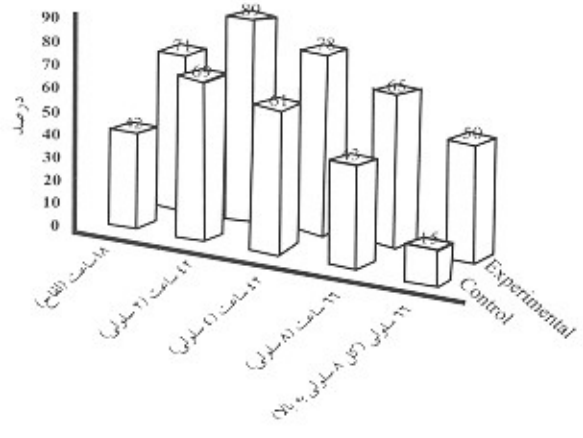
نمودار شماره ۱ بیانگر وجود اختلاف معنی دار (P=0.04) بین میزان لقاح در گروه کنترل ۳۵/۸۰: (۴۲درصد) و فعال شده ۶۰/۸۵: (۷۱درصد)، تا ۱۸ ساعت پس از تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم است.

نمودار شماره ۱ همچنین بیانگر عدم اختلاف معنی دار (P=0.252) بین میزان تکامل جنین‌ها تا مرحله دو سلولی و بیشتر در گروه کنترل ۵۷/۸۳: (۶۹درصد) و فعال شده الکتریکی ۷۶/۸۵: (۸۹درصد) تا ۴۲ ساعت پس از تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم است.

نمودار شماره ۱ همچنین بیانگر عدم اختلاف معنی دار (P=0.150) بین میزان تکامل جنین‌ها تا مرحله چهار سلولی و بیشتر در گروه کنترل ۵۱/۸۳: (۶۱درصد) و فعال شده الکتریکی ۶۶/۸۵: (۷۸درصد) تا تا ۴۲ ساعت پس از تریق درون سیتوپلاسمی اسپرم است.

نمودار شماره ۱ همچنین بیانگر عدم اختلاف معنی دار (P=0.176) بین میزان تکامل جنین‌ها تا مرحله هشت سلولی و بیشتر در گروه کنترل ۳۶/۸۳: (۴۳درصد) و فعال شده الکتریکی ۵۵/۸۵: (۶۵درصد) تا ۶۶ ساعت پس از تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم است.

نمودار ۱ همچنین بیانگر آن است که اگر درصد تکامل جنین‌ها را نسبت به تعداد تخمک‌های تزریق شده بررسی کنیم، میزان درصد ۸ سلولی و بیشتر در گروه فعال شده الکتریکی ۴۳/۸۵: (۵۰درصد) نسبت به گروه کنترل ۱۲/۸۳: (۱۵درصد) تفاوت چشمگیری را نشان می‌دهد (P=0.009). در ضمن تعداد تخمک‌های دژنره ۱۸ ساعت پس از ICSI در گروه کنترل ۶ عدد (۷درصد) و در گروه فعال شده ۵ عدد (۵درصد) بود که اختلاف معنی داری بین آنها وجود ندارد.



نمودار ۱: مقایسه درصدهای لقاح (p=0.04)، جنبهای دو سلولی و بیشتر (p=0.252)، چهار سلولی و بیشتر (p=0.150)، هشت سلولی و بیشتر (p=0.0176) نسبت به تعداد کل تخمکهای تزریق شده، (p=0.009) در دو گروه، کنترل و فعال شده الکتریکی

بحث

تحقیقات نشان داده است که تزریق اسپرم به داخل تخمکی که در متافاز II است به تنهایی جهت لقاح و تکامل جنین کافی نیست و فاکتورهای دیگری از جمله سلامت غشاء اسپرم، کیفیت کروماتین، مرفولوژی اسپرم تزریق شده و قدرت فعال سازی تخمک در این امر تاثیر دارند (۱۱).

مطالعات زمینه‌ای نشان داد که اسپرمهایی که از نظر مرفولوژیک شدیداً آمورف هستند مانند اسپرماتید گرد (Round Spermatid) با

اسپرمهایی که آکروزوم بسیار کوچک دارند قدرت فعال سازی تخمک را ندارند (۱۶-۱۴) لذا در این تحقیق بر آن شدیم تا در این گروه از بیماران با القاء فعال سازی نیمی از تخمک‌ها به روش الکتریکی، تاثیر این عامل را بر روند لقاح و تکامل جنین تا مرحله ۸ سلولی بررسی نمائیم. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که درصد لقاح در گروه فعال شده الکتریکی (۷۱درصد) نسبت به گروه کنترل (۴۲درصد) تفاوت چشمگیری دارد (نمودار ۱). اما این روند تاثیری بر درصد تکامل جنین‌ها تا مرحله هشت سلولی نشان نداد، گر چه با پیشرفت تکامل این تفاوت بیشتر می‌شود. لذا ما در این مطالعه درصد تکامل جنین‌ها را در روز سوم بر اساس تعداد تخمک‌های تزریق شده محاسبه نمودیم که تفاوت چشمگیری بین تعداد هشت سلولی در دو گروه دیده شد. این امر احتمالاً بیانگر آن است که اگر تعداد تخمک‌ها در دو گروه بیشتر می‌بود در تکامل جنین‌ها بین دو گروه نیز تفاوت دیده می‌شد. نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج گزارش شده توسط Zhang بر روی تخمک‌های غیر لقاحی که ۲۴-۱۶ ساعت قبل ICSI شده‌اند، مطابقت دارد. این محقق نشان داد که اگر چه درصد لقاح ارتباطی با تعداد پالس الکتریکی ندارد، ولی میزان تکوین جنین‌ها تا مرحله بلاستوسیست، در گروهی که تحت تاثیر ۳ پالس جریان الکتریکی (۱/۳۶-۱/۵۰) و Kv/cm (۴۰-۶۰us) قرار گرفته‌اند نسبت به آنهایی که تحت تاثیر یک پالس قرار گرفته‌اند، بیشتر است. لازم به ذکر است که مطالعه ما بر روی تخمکهای تازه بیماران انجام شد، ولی مطالعه Zhang بر روی تخمک‌هایی انجام شد، که ۱۶ تا ۲۴ ساعت از ICSI شدن آنها می‌گذشت. در ضمن این محقق با بررسی‌های سیتوژنتیکی بر روی این جنین‌ها نشان داد که تحریک الکتریکی تاثیری بر ساختار کروموزومی جنین‌ها ندارد (۳).

از این نتایج می‌توان دریافت که میزان فعال سازی سیتوپلاسم در طی لقاح و بعد از آن نه تنها تشکیل شدن یا نشدن پیش هسته‌ها را تعیین می‌کند، بلکه روند تکامل اولیه جنینی را موجب می‌شود. در مطالعات جداگانه‌ای که Zhang و Hwang بر روی انسان و گاو انجام دادند نیز مشخص شد که انجام فعال سازی الکتریکی بعد از ICSI می‌تواند موجب تسهیل در لقاح و تکامل اولیه جنین شود (۱، ۱۷) زیرا تحریک الکتریکی می‌تواند با تشکیل منافذی در دو لایه لیپیدی غشاء موجبات ورود Ca^{++} به داخل تخمک را فراهم نموده، تا تخمک فعال شود (۱۳). از طرفی مقایسه درصد جنین‌های دژنره بین دو گروه، نشان دهنده معنی دار نبودن اختلاف بین آنهاست.

در ضمن نتایج بدست آمده در این مطالعه با نتایج Yanagida و همکاران (۱/۵kV/cm و ۱۰۰μs) که در یک مورد با تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم‌های آمورف انجام شد مطابقت دارد. علاوه بر این وی با بررسی سیتوژنتیکی جنین این بیماران نشان داد که کروموزوم‌های این جنین‌هاپس از تحریک الکتریکی از نظر تعداد نیز طبیعی هستند.

در این مطالعه، در اکثر موارد جنین‌ها را تا مرحله بلاستوسیست کشت دادیم و در ضمن یکی از ۱۳ بیمار این مطالعه بارور گردید، ولی بعلت آنکه جنین‌های منتقل شده از هر دو گروه بودند، نمی‌توان گفت که حاملگی به جنین‌های کدام گروه (کنترل یا فعال شده) مربوط است.

بنابراین با توجه به نتایج کسب شده در این مطالعه و مطالعات قبلی، می‌توان از این تکنیک در مراکز باروری و ناباروری جهت القاء در بیمارانی که اسپرم یا اسپرماتیدهای آن‌ها توانایی کمتری در فعال سازی تخمک دارند استفاده نمود، بطوریکه حتی تخمک‌هایی که بعد از سپری شدن ۱۶ تا۲۴ ساعت پس از ICSI هنوز آثاری از لقاح در آنها دیده نمی‌شود نیز می‌توانند به این روش فعال شوند (۳، ۱۸). این نکته را نیز نباید از نظر دور داشت که عدم ایجاد لقاح به دنبال ICSI در بعضی از بیمارن می‌تواند به دلیل وجود نقایصی در تخمک باشد، زیرا اولاً این بیماران حتی به دنبال فعال سازی (الکتریکی یا شیمیایی) نیز اثری از لقاح را نخواهند داشت، ثانیاً با انجام تست فعال سازی تخمک موش، اسپرم این بیماران قادر است تخمک موش را فعال نماید (۷)، که این می‌تواند وجود فاکتورهای اسپرمی فعال کننده تخمک را در اسپرم این قبیل از بیماران اثبات کند.

Sousa و همکاران معتقدند فاکتور اسپرمی فعال کننده تخمک در اسپرم و اسپرماتید وجود دارد اما در اسپرماتوسیت‌ها وجود ندارد (۱۹)، لذا بر خلاف مردان سالم، اسپرماتیدهای بیماران مبتلا به نقص تکاملی اسپرمیوژنز فاقد این فاکتورها است (۲۰).

Tearik و همکاران معتقدند از داروهای محرک نوسانات کلسیم می‌توان برای افزایش میزان فعال سازی تخمک بعد از ICSI با اسپرمهای غیر طبیعی استفاده نمود، اما تا وقتی که چنین ترکیباتی هنوز به صورت استاندارد معرفی نشده و جنبه تجاری نیافته‌اند، می‌توانیم از تحریکات الکتریکی به جای محرکهای دارویی استفاده نماییم. زیرا ضمن کاربری آسان، تاثیر بسزایی از خود در انسان نشان می‌دهد (۲۰).

در پایان با توجه این مطالعه و مطالعات قبلی چنین استنباط می‌شود: که روش تحریکات الکتریکی و یا شیمیایی (۲۱) در تخمک‌های غیر لقاح یافته یا تخمک هایی که توسط اسپرمهای آمورف تزریق شده‌اند، می‌تواند روش مناسبی جهت فعال سازی این تخمک‌ها باشد (۷، ۲۲) و جنین‌های حاصل از این روش طبق این گزارش قادرند تا مرحله ۸ سلولی و طبق مطالعات دیگر تا مرحله بلاستوسیست رشد نمایند و منجر به باروری و تولد گردند. از طرفی گزارشات سیتوژنتیک نیز بیانگر آن است که تحریکات الکتریکی تاثیری بر سلامت کروموزومی نداشته و منجر به آنوپلوئیدی نمی‌شود (۷) و این گزارش درباره تحریکات الکتریکی در بیماران با اسپرم فوق العاده آمورف می‌باشد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب پژوهشکده رویان (کد ۲-۲۳۲) است و طرح در آزمایشگاهها در مرکز باروری و ناباروری اصفهان و پژوهشکده رویان اجرا گردید. لذا بدینوسیله مراتب تشکر و قدر دانی خود را از همکاری پزشکان و پرسنل مرکز باروری و ناباروری اصفهان بخصوص آقای دکتر سید مهدی احمدی، دکتر سید اسدالله کلانتری و دکتر باقر فروهان و مسئولین محترم پژوهشکده رویان اعلام می‌دارند.

References

1. Ozil JP, Huneau D: Activation of rabbit oocytes: The impact of the ca 2+ signal regime on development. Develop 2001; 128: 917-928

2. Williams CJ: Signalling mechanisms of mammalian oocyte activation. Human Reprod Update 2002; 8(4): 313-321

3. Zhang J, Wang CW, Blaszcyzk A, James A: Electrical activation and in vitro development of human oocytes that fail to fertilizeafter intracytoplasmic sperm injection. Fer and Steril 1999; 72(3): 509-512

4. Yamano S, Koji N, Toshihoro A: Fertilization failure and oocyte activation . The Journal of Med Inves 2000; 47: 1-8

5. Rybouchkin AV, Sutter PD, Straeten FV, Dhont M: Fertilization and pregnancy after assisted oocyte activation and headed spermassociated with deficient oocyte activation capacity. Fer intracytoplasmic sperm injection in a case of round and Steril 1997; 68(6): 1144-1147

6. Battaglia DE, Koehler JK, Klein NA, Tucker MJ: Failure of oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection using round-headed sperm.Fertility and Sterility 1997; 68(1): 118-122

7. Yanagida K, Katayose H, Yazawa H, Kimura Y: Successful fertilization and pregnancy following ICSI and electrical oocyteactivation. Hum Reprod 1999; 14(5): 1307-1311

8. Swann K, Lai FA: A novel signalling mechanism for generating Ca2+ oscillations at fertilization in mammals. Bioassay 1997; 19: 371-8

9. Fissore RA, Gordo AC, Hua Wu: Activation of development in mammals: Is there a role for a sperm cytosolic factor? Theriogenol 1998; 49:43-52

10. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezo Y, Barak Y: Real-time fine morphology of motile human sperm cell isassociated with IVF-ICSI outcome. J Androl 2002; 23: 18-25

11. De Vos A, De Velde HV, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A: Influence of individual sperm morphology onfertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. Fertility and Sterility 2003; 79(1):42-48

12. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC: Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into anoocyte. lancet 1992; 340: 8-12

13. Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Lin J, Staessen C, Smitz J, Wisanto A, Devroey P: High fertilization and implantationratesafter intracytoplasmic sperm injection. Human Reproduction. 1993; 8(7): 1061-1066

14. Grupen CG, Nottle MB, Nagashima H: Calcium release at fertilization: Artificially mimicking the oocyte,s response to sperm. J of Rep and Dev 2002; 48(4): 313-333

15. Kimura Y, Yanagimachi R: Analysis of mouse oocyte activation suggests the involvement of sperm perinuclearmaterial. Biol Reprod 1998 ;58:1407-15

16. Yazawa H, Yanagida K, Sato A: Oocyte activation and Ca2+ oscillation-inducing abilities of mouse round/elongatedspermatids and the developmental capacities of embryos from spermatid injection. Human Reproduction 2001; 16(6): 1221-1228

17. Hwang S, Lee E, Yoon J, Yoon B, Lee J, Choi D: Effects of electric stimulation on bovine oocyte activation and embryo development in intracytoplasmic sperm injection procedure. J Asist Reprod Genet 2000; 17: 310-314

18. Escriba MJ, Garcia XF: Influence of sequence duration and number of electrical pulses upon rabbit oocyte activation andparthenogenetic in vitro development. Animal Reproduction Science 2000; 59: 99-107

19. Sousa M, Mendosa C, Barros A: Calcium responses of human oocytes after intracytoplasmic injection of leucocytesspermatocytes and round spermatids. Hum Reprod 1996; 2: 853-857

20. Tesarik J, Sousa M, Greco E: Spermatids as gametes: inductions and limitations. Hum Reprod 1998; 13: 89-107

21. Loi P, Boyazoglu S, Fulka JrJ, Naitana S, Cappal P: Embryo cloning by nuclear transfer: experiences in sheep. livestockProduction Science 1999; 60: 281-294

22. Nakagawa K, Yamano S, Moride N, Yamashita M, Yoshizawa M, Aono T: Effects of activation with Ca ionophore A23187 andpuromycin on the development of human oocytes that failed to fertilize after intracytoplasmic sperm injection. Fertility andSterility 2001; 76(1): 148-152