مجلـــه‌ی علمـــی، پژوهشـــی دانشـــگاه علـــوم پزشـــکی زنجـــان
دوره‌ی ۲٤، شماره‌ی ۱۰۲، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۵، صفحات ۲۱ تا ۳۱

ارتباط بین سطح ویتامین E مایع فولیکولی با مورفولوژی تخمک و کیفیت جنین در بیماران IVF در بیمارستان الزهرا (س) رشت

صفورا صفاری[۱]، دکتر محمد هادی بهادری[۲]، دکتر سیده هاجر شارمی[۳]، دکتر پروین تراب‌زاده[۴]، دکتر مهدی گودرزوند[۵]

نویسنده‌ی مسوول: گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت bahadori.mh@gmail.com

دریافت: ۹۳/۱۲/۲۰ پذیرش: ۹۴/۴/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: *با توجه به افزایش جهانی ناباروری استفاده از روش‌های کمک باروری برای حل آن پیشنهاد می‌شود. از آن جاکه ویتامین E آنتی‌اکسیدان قوی با نقش حفاظتی در بدن می‌باشد، هدف این مطالعه تعیین ارتباط بین سطح ویتامین E مایع فولیکولی با مورفولوژی تخمک و کیفیت جنین در بیماران IVF است.*

روش بررسی: *این مطالعه به صورت مقطعی توصیفی تحلیلی بر روی تخمک‌ها و جنین‌های حاصل از ۵۰ زن تحت IVF در بیمارستان الزهرا رشت انجام شد. معیارهای ورود شامل زنان بین ۲۰ تا ۴۵ سال بودند که نازایی با علت فاکتور لوله رحم و اختلال در تخمک‌گذاری و همچنین فاکتور مردانه داشتند. بیماران تحت پروتکل مشابه تحریک تخمک گذاری قرار گرفته و سپس ده هزار واحد hCG به آنان تزریق شده و پس از ۳۶ ساعت تحت ساکشن فولیکول قرار گرفتند و تخمک‌های بالغ جهت لقاح جدا شدند و میزان ویتامین E مایع فولیکولی اندازه‌گیری شد. مورفولوژی تخمک و کیفیت جنین با میکروسکوپ نوری معکوس مورد ارزیابی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *از ۵۰ زن تحت درمان IVF، ۵۸۳ تخمک و ۲۷۵ جنین مورد بررسی قرار گرفتند. ارتباط معنی‌دار آماری بین سن، BMI، مدت نازایی و علت نازایی و ویتامین E مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$). در سطح ۰/۵ تا ۱ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر ویتامین E تعداد تخمک MII به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها بیشتر بود ($P=۰/۰۱٤$). اگرچه میانگین تعداد جنین 2PN در این سطح بالاتر از سایرسطوح ویتامین E بود اما این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P=۰/۸۷۲$).*

نتیجه گیری: *به‌طور کلی می‌توان گفت در سطح ۰/۵ تا ۱ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر ویتامین E مورفولوژی تخمک و کیفیت جنین به‌طور معنی‌داری بهبود پیدا کرده است.*

واژگان کلیدی: ناباروری، مایع فولیکولی، IVF، ویتامین E، تخمک، جنین، آنتی اکسیدان

۱- کارشناس ارشد زیست شناسی تکوین جانوری، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج
۲- دکترای تخصصی جنین شناسی و بافت شناسی، استاد گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت
۳- متخصص زنان و زایمان، استاد مرکز تحقیقات بهداشت باروری الزهرا، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت
۴- دکترای تخصصی زیست شناسی، استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج
۵- دکترای تخصصی فیزیولوژی، استادیار گروه فیزیولوژی فارماکولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

با توجه به استفاده از روش‌های ART (Assisted Reproductive Technology) برای درمان انواع نازایی و افزایش میزان موفقیت آن، امروزه روش‌های کمک باروری بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است. پژوهش‌های بسیاری برای شناسایی عوامل موثر بر موفقیت روش‌های کمک باروری صورت گرفته است (۱). با این وجود هنوز بسیاری از زوجین، تجربه یک بارداری موفق را نداشته‌اند (۳و۲). یکی از عوامل موثر بر موفقیت این روش‌ها ارزیابی تغییرات هسته‌ای و سیتوپلاسمی و بلوغ تخمک می‌باشد (۴). مورفولوژی تخمک و کیفیت جنین تحت تاثیر ترکیبات مایع فولیکولی می‌باشد (۵و۴). می‌دانیم که نحوه‌ی تغذیه در کنار تامین نیازهای غذایی مادران در جهت ارتقای سلامت مادر و جنین ضروری می‌باشد (۶). با توجه به این که رژیم غذایی مادر بر روی تکامل تخمک و رویان موثر بوده وبر شانس باروری طبیعی نیز اثرگذار است، در صورت وجود اختلال در بسیاری از ویتامین‌ها و مواد مغذی می‌تواند شانس باروری موفق کاهش یابد (۷).

اثرات نامطلوب وجود استرس اکسیداتیو و اکسیژن فعال (ROS) در بدن و یا در شرایط آزمایشگاهی بر کیفیت سلول‌های جنسی اثبات شده است (۸) وجود ROS در محیط کشت جنین در IVF کیفیت جنین را کاهش و میزان فراگمنتاسیون را افزایش می‌دهد (۹) و از این طریق شانس موفقیت در باروری را کاهش می‌دهد (۱۰). آنتی اکسیدان‌ها سبب جلوگیری از تجزیه‌ی اکسیداسیونی می‌شوند و از افزایش آسیب‌پذیری و تخریب سلولی جلوگیری می‌نمایند. ویتامین E از جمله آنتی‌اکسیدان‌هایی است که نقش محافظت کنندگی آن در برابر تجزیه ی اکسیداسیونی مورد تایید است و در تولید اسپرماتوزویید و تخمک نقش مثبت دارد (۱۱). در سال ۲۰۰۰ براساس تحقیق انجام شده توسط اولسون و همکارانش مشخص شد که با افزایش ۱۰۰ میکرومولار ویتامین E، درصد رشد و تکامل جنین گاو تا ۶۳ درصد در مرحله مورولا افزایش می‌یابد (۱۲) همچنین در مطالعه‌ی انجام شده توسط بیسواس و همکارانش بر روی مرغ‌ها در سال ۲۰۱۰ مشخص شد که مصرف ویتامین E با سطح متوسط ۱۵۰ واحد بین المللی بر کیلوگرم منجر به بهبود صفات کیفی تخم مرغ می شود (۱۳). در تحقیق انجام گرفته توسط تیگاگارجان و همکارانش در سال ۲۰۰۹، با توجه به این که یکی از دلایل عیوب تکامل جنین وجود استرس اکسیداتیو در محیط کشت است و ویتامین E به عنوان یک آنتی اکسیدان محلول در چربی می‌تواند در محافظت از غشای سلول از آسیب‌های پراکسیداتیو سلولی نقش داشته باشد و سبب شایستگی رشد و نمو جنین پیش ازلانه گزینی جنین در بوفالو باشد، در آزمایش خود به بررسی غلظت های (۴۰۰/۲۰۰/۱۰۰/۵۰/۰) میکرومولار از ویتامین E در محیط کشت پرداختند و نتایج نشان داد که در ۷۲ ساعت اول تعداد کل بلاستوسیت‌ها در محیط کشت گروه ۱۰۰ میکرومولار در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته است (۱۴). اکثر مطالعات انجام شده در زمینه نقش ویتامین E بر تکامل تخمک و جنین، بر روی حیوانات انجام شده و توجه زیادی بر مطالعه بر روی موارد انسانی نشده است. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط بین سطح ویتامین E مایع فولیکولی و مورفولوژی تخمک و کیفیت جنین در بیماران IVF است.

روش بررسی

این مطالعه به‌صورت مقطعی توصیفی تحلیلی بر روی زنان تحت IVF در کلینیک درمان ناباروری مرکز آموزشی درمانی بیمارستان الزهرا (س) رشت از اول اسفند ۹۲ تا اول مرداد ۹۳ انجام شد.

این مطالعه توسط کمیته‌ی اخلاق دانشگاه علوم پزشکی گیلان مورد تایید قرار گرفت. از بیماران قبل از ورود به مطالعه رضایت نامه‌ی آگاهانه اخذ شد. معیار ورود به مطالعه، سن

Archive of SID

www.SID.ir

زنان بین ۲۰ تا ۴۵ سال، همراه با نازایی با علت فاکتور لوله‌ی رحم و اختلال در تخمک‌گذاری و هچنین فاکتور مردانه بود و افراد سیگاری و الکلی از این مطالعه حذف شدند. تعداد حجم نمونه بر اساس فرمول حجم نمونه برای برآورد میانگین ویتامین E مایع فولیکولی و با توجه به نتایج مطالعات قبلی در سطح اطمینان ۹۵ درصد، با انحراف معیار ۰/۷ میکرومول بر لیتر و دقت قابل قبول ۰/۲ میکرومول بر لیتر بر اساس فرمول محاسبه حجم نمونه حداقل ۴۷ نفر محاسبه گردید که در این مطالعه ۵۰ نفر وارد مطالعه شدند. سن، مدت نازایی، علت نازایی، سابقه‌ی مصرف مکمل‌های حاوی ویتامین E در طی دو ماه گذشته با پرسش از بیماران جمع‌آوری شد. وزن و قد اندازه گیری شده و BMI (Body Mass Index) زنان محاسبه گردید.

تحریک تخمک‌گذاری: همه‌ی بیماران تحت پروتکل مشابه تحریک تخمک‌گذاری قرار گرفتند. جهت تحریک تخمک‌گذاری از آگونیست GnRH (Organon, Holland) استفاده شد. (لوپرولایداستات ۱ میلی گرم در روز به‌صورت S.C) به مدت دو هفته تجویز گردید تا تولید گنادوتروپین‌های درون‌زا مهار شود. تجویز عضلانی hMG (Organon,Oberschlelsshei, Germany) به مقدار ۲۲۵ تا ۳۰۰ واحد بین المللی در روز باعث تحریک رشد فولیکولی می‌شود و تجویز هم زمان آگونیست GnRH با حداقل مقدار، باعث پیش‌گیری از ترشح ناگهانی LH می‌شود. مقدار تجویز hMG مطابق رشد فولیکول‌ها (با بررسی سونوگرافی) و سطح سرمی استرادیول تنظیم می‌گردد. هنگامی که فولیکول‌های تخمدانی به بلوغ کامل رسیدند، تجویز hCG (LG Life, Sciences, Korea) باعث تحریک تخمک گذاری می‌گردد. اندازه‌ی فولیکول (۱۸ میلی‌متر) و غلظت سرمی استرادیول (۲۰۰ پیکوگرم در میلی‌لیتر) دو عامل تعیین کننده برای زمان بلوغ فولیکول‌ها می‌باشد.

استخراج فولیکول و مایع فولیکولی: با توجه به اندازه‌ی فولیکول‌ها، برداشت تخمک در روز ۱۰ تا ۱۴ از چرخه‌ی قاعدگی انجام شد. اکثر تخمک‌های جمع آوری شده از فولیکول‌های غالب در مرحله متافاز II بودند (MII). تخمک‌ها ۳۲ تا ۳۶ ساعت پس از تزریق hCG جمع‌آوری شدند. در استخراج فولیکول از طریق سونوگرافی واژینال، ابتدا تخمدان‌ها مورد بررسی قرار گرفته و سپس ساکشن انجام شد. طی عمل پانکچر برای برداشت تخمک از تخمدان، فولیکول‌هایی که قطرشان حداقل به ۱۸ میلی‌متر رسیده بود همراه مایع فولیکولی به وسیله‌ی کاتتر آسپیره می‌شد و مجموعه‌ی آن داخل لوله‌ی آزمایش جمع‌آوری و سپس داخل پلیت ریخته شدند. تخمک‌ها پس از شستشو با (Vitrolife GMOPS ^{PLUS} ,sweden) به مدت ۲ تا ۴ ساعت در انکوباتور و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد و ۶CO_2 درصد نگهداری شدند، سپس تخمک‌ها برهنه و در دیش‌های حاوی محیط (Vitrolife ,sweden) G1 V5 ^{PLUS} برای انجام IVF و ICSI در داخل انکوباتور نگهداری شدند. مایع فولیکولی به وسیله‌ی لوله‌های فالکون در ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد پس از ساکشن نگهداری و به آزمایشگاه منتقل گردیدند. به منظور جلوگیری از تماس با نور، لوله‌ها در فویل آلومینیومی محصور شدند.

لقاح، ارزیابی تخمک و جنین: ارزیابی لقاح ۱۵ تا ۲۰ ساعت بعد از تلقیح انجام شد. تشکیل پرونوکلیوس نر و پرونوکلیوس ماده ابزاری برای تایید لقاح بود و پس از ارزیابی جنین‌های 2PN با استفاده از سیستم نمره بندی Z برای زیگوت انجام شده و سپس جهت انتقال به رحم جدا سازی شد. این سیستم درجه‌بندی به این ترتیب است که زیگوت z1 تعداد یکسانی از هستک‌های آرایش یافته در مقابل پیش هسته‌های قرار گرفته مجاور یکدیگر را دارند. تعداد مطلق مشخص نیست اما بین ۳ تا ۷ عدد است. z2 تعداد یکسانی از هستک‌ها را با اندازه‌ی یکسان دارد که در یک هسته در

Archive of SID
www.SID.ir

قسمت کناری آرایش یافته اما در هسته‌ی دیگر پراکنده است. زیگوت z3 تعداد و اندازه یکسانی از هستک (۳ تا ۷ هستک) را دارند که در هر دو هسته پراکنده هستند. زیگوت‌های z4 که پیش هسته‌ها آرایش نیافته است و اندازه‌های تقریبا متفاوتی دارند که در مرکز تخمک قرار نگرفته‌اند. برای درجه‌بندی جنین‌ها از مدل استاسن و همکارانش استفاده شد (۱۴). به این ترتیب که گرید I: بلاستومرهای هموژن و یکسان بدون فراگمنتاسیون، گرید II: بلاستومرهای هموژن و یکسان با کمتر از ۲۰ درصد فراگمنتاسیون گرید III: بلاستومرهای غیریکسان و غیر هموژن با ۲۰تا۵۰ درصد فراگمنتاسیون، گرید IV: بلاستومرهای غیریکسان و غیر هموژن با ۵۰ درصد فراگمنتاسیون بلاستومرهای غیریکسان و غیرهموژن با ۲۰تا۵۰ درصد فراگمنتاسیون، گرید IV: بلاستومرهای غیریکسان و غیرهموژن با بیشتر از ۵۰ درصد فراگمنتاسیون (۱۶و ۱۵). معمولا بدشکلی‌ها به‌صورت ناهنجاری‌های خارج سیتوپلاسمی و داخل سیتوپلاسمی مثل تغییر در گرانولاریته سیتوپلاسمی، وجود اینکلوژن‌های سیتوپلاسمی مانند واکوئل‌ها وتوده‌های شبکه‌ی آندوپلاسمی صاف، انحراف‌ها از فضای حول زرده‌های طبیعی و در مورفولوژی اولین جسم قطبی می‌باشد، تقریبا ۶۰تا۷۰ درصد از تخمک‌های به دست آمده از چرخه‌های تحریک شده یک یا تعداد بیشتری از ویژگی‌های غیرطبیعی مورفولوژیکی را نشان می‌دهند. برای ارزیابی بلوغ تخمک و توده‌های کومولوس از بلوغ هسته‌ای استفاده شد. بنابراین ارزیابی کیفیت تخمک بر اساس نتیجه‌ی لقاح در ۱۵ تا ۲۰ ساعت پس از تلقیح انجام شد. تخمک‌های بارور شده در مدت ۲۰ تا ۲۴ ساعت در محیط ^{PLUS} G1 V5 (Vitrolife ,sweden) در شرایط استاندارد کشت داده شدند. با توجه به سیستم درجه‌بندی جنین بولتون و همکارانش در سال ۱۹۸۹، بلاستومرها باید به‌صورت منظم و کروی و بدون هیچ قطعه‌ای دیده شوند و مواردی که با برخی از قطعات یا بلاستومرهای هموار و یا در نهایت جنین با مقدار تکه تکه شده موجود باشد به عنوان درجه ۱ و ۲ و ۳ و ۴ به‌ترتیب طبقه‌بندی می‌شود.

اندازه‌گیری ویتامین E: برای سنجش میزان ویتامین E مایع فولیکولی به‌وسیله‌ی لوله‌های فالکون به آزمایشگاه منتقل شد. برای به دست آوردن سطح نرمال در ابتدا ۱ سی‌سی مایع فولیکولی هر بیمار به‌طور جداگانه نیاز بود تا به روش HPLC اندازه‌گیری شود سپس میانگین حد نرمال این آنتی‌اکسیدان سنجیده شده (۱/۷۹±۱/۶۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و اثر کمبود و یا افزایش آن نسبت به میانگین، مورد ارزیابی قرار گرفت تا بتوانیم تاثیر ویتامین E را در مورفولوژی تخمک‌ها و کیفیت جنین‌های حاصله از IVF مشاهده کنیم. برای سنجش سطح ویتامین E مایع فولیکولی از کیت الیزا مارک IBL ساخت کشورآلمان استفاده شد.

آنالیز آماری: داده‌های جمع‌آوری شده به وسیله‌ی نرم‌افزار SPSS ۲۱ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از آمار توصیفی شامل میانگین و انحراف معیار و فراوانی مطلق و نسبی استفاده شد. همچنین برای مقایسه‌ی فراوانی نسبی بین گروه‌ها از آزمون آماری کای دو، برای مقایسه میانگین بین دو گروه و بیشتر از دو گروه به‌ترتیب از آزمون‌های آماری تی‌تست مستقل و آنالیز واریانس یک طرفه با آزمون تعقیبی LSD استفاده شد. همچنین از ضریب همبستگی پیرسون برای بررسی ارتباط بین سطح ویتامین E با متغیرهای کمی مورد بررسی استفاده شد. سطح معنی‌داری P کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

اطلاعات پایه‌ی زنان مورد بررسی در جدول ۱ آمده است. ۱۶ نفر از زنان یعنی ۳۲ درصد شان اهدا کننده‌ی تخمک بودند.

Archive of SID

www.SID.ir

سطح ویتامین E و ارتباط آن با متغیرهای پایه مورد بررسی: میانگین سطح ویتامین E در نمونه‌های مورد بررسی ۱/۶۷±۱/۷۹ میکروگرم بر میلی لیتر بود. کمترین مقدار ویتامین E ۰/۱ و بیشترین مقدار آن ۹ بود. همبستگی بین سطح ویتامین E با سن زنان (P=۰/۴۴۵، r=-۰/۱۰۸)، BMI (P=۰/۹۳۹، r=۰/۰۱۱) و مدت ناباروری (P=۰/۵۶۵، r=-۰/۰۸۵) از نظر آماری معنی‌دار نبود. میانگین سطح ویتامین E در بین گروه‌های مختلف علت ناباروری از نظر آماری معنی‌دار نبود (P=۰/۵۹۵). هر چند میانگین سطح ویتامین E در گروهی که در طی دو ماه گذشته مصرف مکمل‌های حاوی ویتامین E داشتند (۲/۳۷±۰/۷۱) کمی بالاتر از گروهی بود که مصرف این گونه مکمل‌ها را نداشتند (۱/۵۹±۰/۲۵) ولی این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود (P=۰/۲۲۲).

جدول ۱: اطلاعات پایه زنان مورد بررسی

مشخصات دموگرافیک		میانگین و انحراف معیار
سن زنان		۳۰/۳۸±۵/۱٤
سن مردان		۳۷/٤٤±۷/٤٤
BMI		۲٦/۹٤±۳/٦٦
مدت ناباروری (سال)		۷/۷۲±٤/٦۹
علت نازایی	مردانه	۱۵ (٤٤/۱)
	زنانه	۹ (۲٦،۵)
	هر دو (مردانه و زنانه)	٦ (۱۷/٦)
	نا مشخص	٤ (۸/۱۱)
مصرف مکمل حاوی ویتامین E در طی دو ماه گذشته	بلی	۱۱ (۲۲)
	خیر	۳۹ (۷۸)

بلوغ تخمک و ارتباط آن با سطح ویتامین E: از ۵۰ زن مورد بررسی ۵۸۳ تخمک پس از تحریکات تخمک‌گذاری به دست آمد. میانگین تعداد تخمک (۷/٦۳± ۱۱/٦۲) بود. بیشترین تعداد تخمک یعنی ٤٦٦ عدد (۷۹/۹ درصد) به صورت بالغ (فاز MII) و ۱۱۷ عدد (۲۰/۱ درصد) نابالغ و دژنره (MI +GV+ دژنره) بودند. همبستگی بین سطح ویتامین E با تعداد کل تخمک (P=۰/۷۵۹، r=۰/۰۷۵) تعداد تخمک MII (P=۰/۶۰۰، r=-۰/۰۷۶)، تعداد تخمک GV (P=۰/۲۰۶، r=-۰/۱۸۲)، و تعداد تخمک دژنره (P=۰/۲۳۵، r=-۰/۱۷۱) از نظر آماری معنی‌دار نبود. اما تعداد تخمک MII با افزایش سطح ویتامین E مایع فولیکولی به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا می‌کرد (P=۰/۰۰۱، r=۰/۴۳۹) در طبقه‌بندی سطوح ویتامین E بیشترین تعداد تخمک MII (۳۰/۳ درصد) در سطح ویتامین E (۰/۵۱ تا ۱) مشاهده شده بود و تفاوت توزیع فراوانی تخمک‌های MII در سطوح مختلف ویتامین E از نظر آماری معنی‌دار بود (P=۰/۰۱۴) (جدول ۲).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲: مقایسه‌ی درصد فراوانی تخمک MII با فراوانی تخمک‌های GV,MI و دژنره در گروه‌های مختلف ویتامین E

ویتامین / تخمک	۰-۰/۵		۰/۵۱ -۱		۱/۰۱-۱/۵		۱/۵۱-۲		۲/۰۱-۹		P value
	تعداد	درصد	تعداد*	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	
MII	۷۱	۱۵/۲	۱۴۱	۳۰/۳	۷۳	۱۵/۷	۹۱	۱۹/۵	۹۰	۱۹/۳	۰/۰۱۴
MI,GV و دژنره	۲۰	۱۷/۱	۲۵	۲۱/۴	۱۹	۱۶/۲	۱۵	۱۲/۸	۳۸	۳۲/۵	

GV (Germinal Vesicle) نابالغ‌ترین نوع تخمک، تخمک (**MI**) **تخمک نابالغ در مرحله متافاز اول تقسیم میوز، تخمک (MII) بالغ‌ترین نوع تخمک در مرحله متافاز دوم تقسیم میوز**

کیفیت جنین و ارتباط آن با سطح ویتامین E: در ٤ نفر از زنان مورد بررسی جنینی تشکیل نشده بود. تعداد ۲۷۵ جنین مورد بررسی قرار گرفت. میانگین تعداد جنین در روز اول ٤/۹۰±۵/۵ بود. میانگین میزان فراگمنتاسیون ۹/۲٦±۱۱/۸۸ درصد بود. میانگین سطح ویتامین E مایع فولیکولی در گروه زنان دارای جنین با کیفیت Z1 یا Z2 به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه سایر گریدها بود (P= ۰/۰۱۱) اما میانگین سطح ویتامین E در روزدوم در بین دو گروه زنان دارای جنین با کیفیت +A و زنان بدون جنین با کیفیت +A از نظر آماری معنی‌دار نبود (P=۰/۷۳۳). (جدول ۳).

جدول ۳: مقایسه میانگین سطح ویتامین E در بین گروه‌های مختلف کیفیت جنین در روز اول و دوم بعد از لقاح

گرید جنین		تعداد	میانگین±انحراف معیار	P value
گرید جنین در روز اول	Z1 یا Z2	۳۲	۱/۸۱±۱/٦۸	۰/۰۱۱
	سایر گریدها	١٤	۰/۹۳±۰/۵۲	
کیفیت جنین روز دوم	جنین با کیفیت +A	۲٤	۱/٤٦±۱/٦۱	۰/۷۳۳
	بدون جنین با کیفیت +A	۲۱	۱/٦۲±۱/۳۹	

همبستگی معنی‌دار آماری بین سطح ویتامین E و تعداد جنین 2PN در روز اول وجود نداشت (P=۰/۸۵۵، r=-۰/۰۲۶). همبستگی معنی‌دار آماری بین سطح ویتامین E و میزان فراگمنتاسیون در روز دوم وجود نداشت (P=۰/۱۴۱، r=-۰/۲۳۴). تفاوت میانگین تعداد جنین 2PN در سطوح مختلف ویتامین E از نظر آماری معنی‌دار نبود (P=۰/۸۷۲) (جدول ۴).

جدول ٤: تعیین و مقایسه میانگین تعداد جنین 2PN در گروه‌های مختلف سطح ویتامین E

سطح ویتامین E (میکروگرم در دسی لیتر)	تعداد	میانگین±انحراف معیار	P value
۰_۰/۵	۹	۵/٤۵±۵/۰۸	۰/۸۷۲
۰/۵۱-۱	۱۵	۵/٦۰±٤/٤۸	
۱/۰۱-۱/۵	۹	٤/۰±٤/۵۰	
۱/۵۱-۲	۷	۵/۸٦±۵/٤۰	
۲/۵-۹	۱۰	٦/۵۰±٦/۰	

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

بر اساس نتایج این مطالعه تعداد تخمک MII با افزایش سطح ویتامین E مایع فولیکولی به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد اما همبستگی معنی‌داری بین سطح ویتامین E مایع فولیکولی در سایر انواع تخمک مشاهده نشد. در طبقه‌بندی سطوح ویتامین E بیشترین تعداد تخمک MII (۳۰/۳ درصد) در سطح ویتامین E (۰/۵۱ تا ۱) مشاهده شده بود و تفاوت توزیع فراوانی تخمک‌های MII در سطوح مختلف ویتامین E از نظر آماری معنی‌دار بود. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۲ مشخص شد که ترکیب ۲۰ و ۷۵۰ میکرومولار از ترکیب‌های آلفاتوکوفرول اثرات مفیدی بر بلوغ سیتوپلاسمی دارد ولی اثرات مضر کمی هم در بلوغ هسته نیز دیده شده است (۱۷). از مطالعات گذشته می‌توان این طور نتیجه گرفت که در یک سطح مشخص از ویتامین‌ها در بدن موجودات مختلف می‌توان اثرات قابل توجهی در روند تکامل بلوغ تخمک مشاهده کرد اما سطوح پایین‌تر و یا بالاتر از سطح گزارش شده می‌تواند نتیجه ی معکوس را در روند تکاملی تخمک در بر داشته باشد. بر اساس نتایج این مطالعه میانگین سطح ویتامین E مایع فولیکولی در مواردی که جنین با گرید Z1 یا Z2 داشتند، به‌طور معنی‌داری بالاتر از مواردی بودند که جنین با سایر گریدها را داشتند. اما ارتباط معنی‌داری بین کیفیت جنین در روز دوم، تعداد جنین 2PN و میزان فراگمنتاسیون با سطح ویتامین E مایع فولیکولی وجود نداشت. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۰ مشخص شد که با افزایش ۱۰۰ میکرومولار ویتامین E نرخ توسعه‌ی بلاستوسیت جنین گاو تا ۶۳ درصد در مرحله‌ی مورولا افزایش می‌یابد (۱۲). همچنین در مطالعه‌ی دیگری که در سال ۲۰۱۰ بر روی مرغ‌ها انجام شد، نشان داد مصرف ویتامین E با سطح متوسط ۱۵۰ واحد بین المللی بر کیلوگرم منجر به بهبود صفات کیفی تخم مرغ می‌شود ولی از طرف دیگر نتیجه‌ی تحقیقات بر روی مرغ‌ها مشخص کرد، ویتامین E تغییر قابل توجهی بر میزان جوجه آوری نداشته است (۱۳). پژوهش دیگری در سال ۲۰۰۹ نشان داد وجود ویتامین E اثر قابل توجهی در بلوغ تخمک بوفالو نداشته است، ولی تعداد بلاستوسیت و تعداد کل سلول‌ها در گروه ۱۰۰ میکرومولار افزایش یافته بود (۱۴). در هر دو مطالعه تایید شده که ویتامین E بر روی روند افزایشی تعداد جنین موثر واقع شده است. علاوه بر این که ویتامین E جزیی از آنتی‌اکسیدان‌های مهم در جهت حفاظت از استرس اکسیداتیو در بدن افراد می‌باشد، وجود آن‌ها در بسیاری از ناباروری‌ها با فاکتور مردانه نیز می‌تواند مفید باشد.

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۲ انجام گرفت این چنین بیان شد که عدم وجود دفاع آنتی‌اکسیدانی در مقابل اثرات رادیکال‌های آزاد در تخمک و اسپرم و جنین سبب عدم موفقیت روش‌های ART در داخل بدن خواهد شد (۱۸). نتیجه‌ی این تحقیق به گونه‌ای با مطالعه‌ی حاضر مشابه است، زیرا نشان داده شد که وقتی که سطح آنتی‌اکسیدانی مثل ویتامین E در مایع فولیکولی پایین است، تعداد تخمک‌های با بلوغ مناسب کمتر دیده می‌شود. همچنین مطالعه‌ی دیگری که در سال ۲۰۱۵ انجام شده نشان می‌دهد که ویتامین E می‌تواند سبب بهبود میزان بلوغ تخمک جدا شده از بافت تخمدان منجمد شده‌ی موش با روش انجماد شیشه‌ای شود (۱۹). این مطالعات تجربی که بر روی حیوانات آزمایشگاهی انجام شده نشان داده که وجود آنتی‌اکسیدان‌ها سبب بهبود وضعیت باروری شده و می‌توان با بررسی‌های بیشتر و انجام مطالعات کلینیکی انسانی اثر آنتی‌اکسیدان‌هارا به عنوان درمان بالقوه برای بسیاری از معضلات ناباروری در نظر گرفت. همچنین در پژوهشی در سال ۲۰۰۷ به استرس اکسیداتیو و عدم تعادل آنتی‌اکسیدانی اثرات نامطلوب آن بر باروری اشاره شده است (۲۰)، که می‌تواند دلیل مناسبی برای تحقیقات بیشتر در این زمینه باشد. یکی از امتیازات این مطالعه با سایر پژوهش‌های

Archive of SID

www.SID.ir

انجام گرفته در گذشته این است که در تحقیقات قبلی بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی ویتامین‌های E روی بلوغ تخمک نمونه‌های حیوانی بوده، اما در مطالعه‌ی حاضر نمونه‌های مورد بررسی، انسانی می‌باشند که نتایج حاصله در حوزه‌ی ناباروری می‌تواند بسیار قابل توجه باشد. همچنین در پژوهش‌های گذشته معمولا دوزهای مختلفی از این ویتامین‌ها به صورت مقدار مصرفی به نمونه‌های مورد بررسی داده می‌شد و سپس مورد ارزیابی قرار می‌گرفت که می‌توانسته اثرات مضری نیز از خود به جا گذاشته باشد. اما در پژوهش حاضر میزان ویتامین E در مایع فولیکولی افراد بدون دخالت داروی مصرفی خوراکی یا تزریقی به بدن فرد، مورد اندازه‌گیری قرار گرفته و گزارش شده است. با توجه به ارزشمندی مطالعات مداخله گر، این پژوهش نشان داده است که پزشک مربوطه می تواند در ابتدایی‌ترین سطح ناباروری زوجین در زمینه ی آنتی اکسیدان‌های موثر در روند باروری بررسی‌های لازم را انجام داده و کمبود این ویتامین‌ها را قبل از اقدامات لازم جهت استفاده از ART ،جبران و یا برای جلوگیری از اثرات سوء آن به دلیل مصرف بیش از اندازه در بسیاری از زوجین آگاهی‌های لازم را به آن ها ارایه نماید.این پژوهش یک مطالعه ی پایه است و بر اساس نتایج این مطالعه ما نمی‌توانیم توصیه‌هایی برای اندازه‌گیری سطح آنتی‌اکسیدان‌ها یا تجویز دارو به بیمار بدهیم. همچنین این تحقیق نیاز به مطالعات بیشتر و حجم نمونه بالاتری دارد و نیاز به بررسی بیشترعوامل موثر بر نتایج IVF می‌باشد.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج این مطالعه با افزایش سطح ویتامین E مایع فولیکولی تعداد تخمک MII تا یک سطح مشخص افزایش می‌یابد و مجددا با ادامه روند افزایشی، سطح این ویتامین در مایع فولیکولی کاهش می‌یابد. تعداد تخمک MII در سطح ویتامین E (۰/۵۱ تا ۱) به‌طور معنی‌داری بیش از سایر سطوح ویتامین E خواهد بود که نشان می‌دهد در این سطح مشخص، تعداد بیشتری تخمک بالغ آماده‌ی لقاح وجود دارد و می‌تواند شانس لقاح موفق را بالاتر برده و در نتیجه تعداد جنین 2PN در هر سیکل درمانی افزایش یابد. با توجه به مطالعات کمی که در زمینه‌های مشابه انجام شده است پیشنهاد می‌شود برای درمان ناباروری در زوج‌های نابارور پس از بررسی کمبود ویتامین C و E قبل از شروع روند درمانی با تحریک تخمک‌گذاری، مصرف این ویتامین‌ها را با توجه به تجویز پزشک و با دوز مناسب توصیه کرد تا نمونه‌ی تخمک و اسپرم در این افراد کیفیت بهتر و شانس لقاح بالاتر و قابلیت باروری بیشتری داشته باشند. در بررسی دیگری می‌توان به آنتی‌اکسیدان‌های قوی موجود در مایع فولیکولی و یا سرم خون پرداخته و سطح مناسب و موثر در بلوغ تخمک و کیفیت جنین را بررسی کرد. همچنین در آینده می‌توان برای کاهش ناباروری با فاکتور مردانه و زنانه مطالعات بیشتری در زمینه‌ی بررسی اثر آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند گلوتاتیون، سلنیوم و کوآنزیم Q10، را روی مردان و زنان انجام دادکه این امر مستلزم تعیین دوز مناسب از هر ترکیب به منظور بهبود افزایش اسپرم و تخمک مناسب می‌باشد.

در برخی از بیماران با وجود اینکه تخمک مورفولوژی خوبی دارد اما جنین با فراگمنتاسیون بالا ایجاد شده و یا موجود نمی‌باشد و نتیجه‌ی مثبتی در بارداری دیده نمی‌شود احتمالا این امر می‌تواند ناشی از افزایش شیوع آنوپلوئیدی در اووسیت‌های پیر باشد که دراثراختلال مکانیسم‌های تنظیمی حاکم برتشکیل و عملکرد دوک تقسیم میوزی رخ می‌دهد و یا دلایل ناشناخته‌ای وجود دارد که نیاز به تحقیق و بررسی بیشتری دارد.

تقدیر و تشکر

با تشکر و قدردانی از بخش IVF، اتاق عمل و پرسنل محترم بخش یک بیمارستان الزهرا رشت، معاونت پژوهشی

Archive of SID

www.SID.ir

دانشگاه علوم پزشکی گیلان، مرکز تحقیقات بهداشت باروری و درمانی الزهرا رشت، آزمایشگاه رازی رشت و تمامی افرادی که در مسیر انجام این پروژه‌ی تحقیقاتی همکاری نموده‌انـد و همچنین از آقای داوود پـورمرزی کـه مـشاوره‌ی آمـاری ایـن پژوهش را بر عهده داشتند سپاسگزاری می‌شود.

References

1- Coticchio C, Sereni E, Serrao L, Mazzone S, Ladarola I, Borini A. What criteria for the definition of oocyte quality. Annals of the New York Academy of Sciences. 2004; 1034: 132-44.

2- Fortune JE, The early stages of follicular development: Actiration of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Rep Sci.* 2003; 78: 135-63.

3- Loutradis D, Kiapekou E, Xapanti E, Antsaklis A. Oocyte maturation assisted reproductive techniques. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006; 1092: 235-245.

4- Mirzaei A, Mohammadi J, Mirzaei N, Mirzaei M. The antioxidant capacities and total phenolic contents of some medicinal plants in Iran. *J Fasa Univ Med Sci.* 2011; 1: 160-7.

5- Danforth, David N. Danforth's obstetrics and gynecology. Ed. Ronald S. Gibbs. Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins, 2008: 274-94.

6- Shakeri M, Mazlomzade S, Mohamaian F, Bateni J. Effective of antenatal preparation for childbirth classes on pregnant women nutritional behavior. *J Zanjan Univ Med Sci.* 2013; 21; 102-10.

7- Revelli A, DellePiane L, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Rep Biol Edocrinol.* 2009; 7: 4330-7.

8- Cougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: fact and hypothese. *Endocrine Soc Rev*. 1996; 17: 121-55.

9- Eppig JJ. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev*. 1996: 8: 485-89.

10- Figueira RCS, Braga D, Semiao Francisco l, Madaschi c, Borges Jr. Metaphase II human oocyte morphology: contribating factor and effects on fertilization potential and embryo developmental ability in ICSI cycles. *Fertil Steril.* 2010; 94: 115-7.

11- Ryan KJ, Berkowitz RS, Barbieri RL. Kistner's gynecology: Principles and practice. 6th ed. St Louis: Mosby-Year Book; 1995: 33-34.

12- Olson SE, seidel GE, Seidel JR. Culture of invitro produced bovine embryos with vitamin E improves development invitro and after transfer to recipients. *Biol Rep.* 2000; 62: 248-52.

13- Biswas A, Mohan J, Sastry K. Effect of vitamin E on production performance and egg quality traits in Indian native kadaknath Hen. *J Animal Sci.* 2010; 23: 396-400.

14- Thigagarajan B, Valivittan K, Vating A. Ameliorating effect of vitamin E on invitro development of preimplantation buffullo embryos. *J Assist Reprod Genetics.* 2009; 26: 217-225.

Archive of SID

www.SID.ir

15- Staessen C, Camus M, Bollen N, Devroey P, Van Steirteghem AC. The relationship between embryos. Quality and the occurrence of multiple pregnancies. *Fertil Steril*. 1992; 3: 626-30.

16- Schweigert FJ, Steinhagen B, Raila J, et al. Concentrations of carotenoids, retinol and alpha-tocopherol in plasma and follicular fluid of women undergoing IVF. *Human Reprod.* 2008; 90: 2080-2085.

17- Luck M, Jeyaseelanl I, Scholes R. Ascorbic acid and fertility. *Biol Reprod.* 1995; 52: 262-6.

18- Agarwal A, Aponte Mellado A, Premkumar B, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol Rev*. 2012; 10: 49.

19- Farzollahi M, Tayefinasrabadi H, Mohamadnejad D, Abedelahi A. The effect of vitamin E on the antral follicle development and fertilization rate from vitrified ovarian tissue mic, Abstracts Book, International on Reproduction ISIRB2015. 323-324.

20- Miller SL, Wallace EM, Walker DW. Antioxidant therapies: a potential role in perinatal medicine. *Neuroendocrinology*. 2012; 96: 13-23.

Archive of SID

www.SID.ir

Association of Vitamin E Level in Follicular Fluid with Morphology of Oocyte and Quality of Embryo in IVF Patients, Alzahra Hospital Rasht

Saffari S[1], Bahadori MH[2], Sharami H[3], Torab Zadeh P[1], Goudarzvand M[4]

[1]Dept.of Biology, Karaj Branch, Islamic Azad University , Karaj, Iran.

[2]Dept .of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.

[3]Al-Zahra Reproductive Health Research Center, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.

[4]Dept.of Physiology Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

Corresponding Author: Bahadori MH, Dept .of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

E-mail: bahadori.mh@gmail.com

Received: 11 Mar 2015 **Accepted:** 12 Jul 2015

Background and Objective: As a result of globally increasing trend in infertility, taking advantage of reproductive technology to deal with this issue is recommended. Taking the well-founded claim about Vitamin E as a powerful antioxidant with a protective role in the body, this study was instigated to find the relationship between levels of vitamin E in Follicular fluid and morphology of oocyte along with embryo quality in IVF patients.

Materials and Methods: This cross-sectional analytical study was carried out on oocytes and embryos obtained from 50 women with IVF admitted to Al Zahra Hospital of Rasht city. Patients underwent a similar ovulation stimulation protocol and then ten thousand units of hCG injected. After 36 hours, they underwent Follicle suction and mature oocytes were isolated for fertilization. Vitamin E level was measured and consequently the morphology of oocytes and the quality of embryo were evaluated by means of inverted optical microscopy.

Results: Of 50 treated IVF women, 583 oocytes and 275 embryos were examined. No significant relationship was observed between age, BMI, duration or cause of infertility and Vitamin E (P>0/05). At 0.5-1 mg/dl level of vitamin E, there were higher MII oocytes in comparison with other levels (p= 0.014). Despite the mean number of 2PN embryos at this level of vitamin E was more than other levels, this difference was not statistically significant (P=0.872).

Conclusion: The results prove the evidence that at 0.5-1mg/dl level of Vitamin E, oocyte morphology and embryo quality were significantly improved.

Keywords: Infertility, Follicular Fluid, IVF, Vitamin E, Oocytes, Embryo, Antioxidants

Archive of SID

www.SID.ir