

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 تخمک‌گذاری 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 ($P > 0.05$). در سطح ۰/۵ تا ۱ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر ویتامین E تعداد تخمک MII به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها بیشتر بود ($P = 0.014$). اگرچه میانگین تعداد جنین 2PN در این سطح بالاتر از سایر سطوح ویتامین E بود اما این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P = 0.872$).

نتیجه‌گیری: 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، آنتی‌اکسیدان

۱- کارشناس ارشد زیست‌شناسی تکوین جانوری، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج

۲- دکترای تخصصی جنین‌شناسی و بافت‌شناسی، 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 زیست‌شناسی، استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج

۵- دکترای تخصصی فیزیولوژی، استادیار گروه فیزیولوژی فارماکولوژی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج

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 (۲۳). 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 (۴و۵). می‌دانیم که نحوه 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 و بر 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 فراگمتاسیون 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 آنتی اکسیدان‌هایی است که نقش محافظت کنندگی آن در برابر تجزیه‌ی اکسیداسیونی مورد تایید است و در تولید اسپرماتوزوید 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 می‌شود (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 از لانه‌گزینی جنین در یوفالو باشد، در آزمایش خود به بررسی غلظت‌های (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 به صورت 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

استخراج فولیکول و مایع فولیکولی؛ با توجه به اندازه‌ی فولیکول‌ها، برداشت تخمک در روز ۱۰ تا ۱۴ از چرخه‌ی قاعدگی انجام شد. اکثر تخمک‌های جمع‌آوری 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 سانتی‌گراد و ۶CO₂ 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 فالتون 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 پرونوکلئوس نر و پرونوکلئوس 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

زنان بین ۲۰ تا ۴۵ سال، همراه با نازایی با علت فاکتور لوله‌ی رحم و اختلال در تخمک‌گذاری و همچنین 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 اندازه‌گیری 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 به صورت S.C) به مدت دو هفته تجویز گردید تا تولید گنادوتروپین‌های درون‌زا مهار شود. تجویز عضلانی hMG (Organon, Oberschleissheim, 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 تخمک‌گذاری می‌گردد. اندازه‌ی فولیکول (۱۸ میلی‌متر) و غلظت سرمی استرادیول (۲۰۰ پیکوگرم در میلی‌لیتر) دو عامل تعیین کننده برای زمان بلوغ فولیکول‌ها می‌باشد.

هموار و یا در نهایت جنین با مقدار تکه تکه شده موجود باشد به عنوان درجه ۱ و ۲ و ۳ و ۴ به ترتیب طبقه بندی می شود.

اندازه گیری ویتامین E: برای سنجش میزان ویتامین E مایع فولیکولی به وسیله ی لوله های فالكون به آزمایشگاه منتقل شد. برای به دست آوردن سطح نرمال در ابتدا ۱ سی سی مایع فولیکولی هر بیمار به طور جداگانه نیاز بود تا به روش HPLC اندازه گیری شود سپس میانگین حد نرمال این آنتی اکسیدان سنجیده شده $(1/67 \pm 1/79)$ میکروگرم بر میلی لیتر) و اثر کمبود و یا افزایش آن نسبت به میانگین، مورد ارزیابی قرار گرفت تا بتوانیم تاثیر ویتامین E را در مورفولوژی تخمک ها و کیفیت جنین های حاصله از IVF مشاهده کنیم. برای سنجش سطح ویتامین E مایع فولیکولی از کیت الیزا مارک IBL ساخت کشور آلمان استفاده شد.

آنالیز آماری: داده های جمع آوری شده به وسیله ی نرم افزار 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 مقایسه ی فراوانی نسبی بین گروه ها از آزمون آماری کای دو، برای مقایسه میانگین بین دو گروه و بیشتر از دو گروه به ترتیب از آزمون های آماری تی تست 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 معنی داری P کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته ها

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

قسمت کناری آرایش یافته اما در هسته ی دیگر پراکنده است. زیگوت z3 تعداد و اندازه یکسانی از هستک (۳ تا ۷ هستک) را دارند که در هر دو هسته پراکنده هستند. زیگوت های z4 که پیش هسته ها آرایش نیافته است و اندازه های تقریباً متفاوتی دارند که در مرکز تخمک قرار نگرفته اند. برای درجه بندی جنین ها از مدل استاسن و همکارانش استفاده شد (۱۴). به این ترتیب که گرید I: بلاستومرهای هموژن و یکسان بدون فراگمتاسیون، گرید II: بلاستومرهای هموژن و یکسان با کمتر از ۲۰ درصد فراگمتاسیون گرید III: بلاستومرهای غیریکسان و غیر هموژن با ۲۰ تا ۵۰ درصد فراگمتاسیون، گرید IV: بلاستومرهای غیریکسان و غیر هموژن با ۵۰ درصد فراگمتاسیون بلاستومرهای غیریکسان و غیر هموژن با ۲۰ تا ۵۰ درصد فراگمتاسیون، گرید IV: بلاستومرهای غیریکسان و غیر هموژن با بیشتر از ۵۰ درصد فراگمتاسیون (۱۵ و ۱۶). معمولاً بدشکلی ها به صورت ناهنجاری های خارج سیتوپلاسمی و داخل سیتوپلاسمی مثل تغییر در گرانولاریته سیتوپلاسمی، وجود اینکلوزن های سیتوپلاسمی مانند واکوئل ها و توده های شبکه ی آندوپلاسمی صاف، انحراف ها از فضای حول زرده های طبیعی و در مورفولوژی اولین جسم قطبی می باشد، تقریباً ۶۰ تا ۷۰ درصد از تخمک های به دست آمده از چرخه های تحریک شده یک یا تعداد بیشتری از ویژگی های غیرطبیعی مورفولوژیکی را نشان می دهند. برای ارزیابی بلوغ تخمک و توده های کومولوس از بلوغ هسته ای استفاده شد. بنابراین ارزیابی کیفیت تخمک بر اساس نتیجه ی لقاح در ۱۵ تا ۲۰ ساعت پس از تلقیح انجام شد. تخمک های بارور شده در مدت ۲۰ تا ۲۴ ساعت در محیط Vitrolife, sweden) G1 V5 PLUS در شرایط استاندارد کشت داده شدند. با توجه به سیستم درجه بندی جنین بولتون و همکارانش در سال ۱۹۸۹، بلاستومرها باید به صورت منظم و کروی و بدون هیچ قطعه ای دیده شوند و مواردی که با برخی از قطعات یا بلاستومرهای

سطح ویتامین E و ارتباط آن با متغیرهای پایه مورد بررسی؛ میانگین سطح ویتامین E در نمونه‌های مورد بررسی $1/79 \pm 1/67$ میکروگرم بر میلی لیتر بود. کمترین مقدار ویتامین E $0/1$ و بیشترین مقدار آن ۹ بود. همبستگی بین سطح ویتامین E با سن زنان ($r = -0/108$, $P = 0/445$), BMI ($r = 0/11$, $P = 0/939$) و مدت ناباروری ($r = 0/565$, $P = 0/085$) از نظر آماری معنی‌دار نبود. میانگین سطح ویتامین

E در بین گروه‌های مختلف علت ناباروری از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P = 0/595$). هر چند میانگین سطح ویتامین E در گروهی که در طی دو ماه گذشته مصرف مکمل‌های حاوی ویتامین E داشتند ($2/37 \pm 0/71$) کمی بالاتر از گروهی بود که مصرف این گونه مکمل‌ها را نداشتند ($1/59 \pm 0/25$) ولی این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P = 0/222$).

جدول ۱: اطلاعات پایه زنان مورد بررسی

مشخصات دموگرافیک	میانگین و انحراف معیار
سن زنان	$30/38 \pm 5/14$
سن مردان	$37/44 \pm 7/44$
BMI	$26/94 \pm 3/66$
مدت ناباروری (سال)	$7/72 \pm 4/69$
علت نازایی	مردانه $15 (44/1)$
	زنانه $9 (26.5)$
	هر دو (مردانه و زنانه) $6 (17/6)$
	نا مشخص $4 (8/11)$
مصرف مکمل حاوی ویتامین E در	بلی $11 (22)$
طی دو ماه گذشته	خیر $39 (78)$

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 ($11/62 \pm 7/63$) بود. بیشترین تعداد تخمک یعنی ۴۶۶ عدد ($79/9$ درصد) به صورت بالغ (فاز MII) و ۱۱۷ عدد ($20/1$ درصد) نابالغ و دژنره ($MI + GV +$ دژنره) بودند. همبستگی بین سطح ویتامین E با تعداد کل تخمک ($r = 0/075$, $P = 0/759$)، تعداد تخمک MII ($r = 0/600$, $P = 0/076$)، تعداد تخمک GV ($r = -0/182$, $P = 0/206$)، و

تعداد تخمک دژنره ($r = -0/171$, $P = 0/235$) از نظر آماری معنی‌دار نبود. اما تعداد تخمک MII با افزایش سطح ویتامین E مایع فولیکولی به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا می‌کرد ($r = 0/439$, $P = 0/001$) در طبقه‌بندی سطوح ویتامین E بیشترین تعداد تخمک MII ($30/3$ درصد) در سطح ویتامین E ($0/51$ تا ۱) مشاهده شده بود و تفاوت توزیع فراوانی تخمک‌های MII در سطوح مختلف ویتامین E از نظر آماری معنی‌دار بود ($P = 0/014$) (جدول ۲).

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

P value	۲/۰۱-۹		۱/۵۱-۲		۱/۰۱-۱/۵		۰/۵۱-۱		۰۰-۰/۵		ویتامین / تخمک
	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد*	درصد	تعداد	
۰/۰۱۴	۱۹/۳	۹۰	۱۹/۵	۹۱	۱۵/۷	۷۳	۳۰/۳	۱۴۱	۱۵/۲	۷۱	MI
	۳۲/۵	۳۸	۱۲/۸	۱۵	۱۶/۲	۱۹	۲۱/۴	۲۵	۱۷/۱	۲۰	MI, GV و دژنره

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

زنان دارای جنین با کیفیت Z1 یا Z2 به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه سایر گریدها بود ($P=0/011$) اما میانگین سطح ویتامین E در روز دوم در بین دو گروه زنان دارای جنین با کیفیت A+ و زنان بدون جنین با کیفیت A+ از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P=0/733$). (جدول ۳).

کیفیت جنین و ارتباط آن با سطح ویتامین E: در ۴ نفر از زنان مورد بررسی جنینی تشکیل نشده بود. تعداد ۲۷۵ جنین مورد بررسی قرار گرفت. میانگین تعداد جنین در روز اول $0/5 \pm 4/90$ بود. میانگین میزان فراگمتاسیون $11/88 \pm 9/26$ درصد بود. میانگین سطح ویتامین E مایع فولیکولی در گروه

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

P value	میانگین $\pm$ انحراف معیار	تعداد	گرید جنین
۰/۰۱۱	$1/81 \pm 1/68$	۳۲	Z1 یا Z2
	$0/93 \pm 0/52$	۱۴	سایر گریدها
۰/۷۳۳	$1/46 \pm 1/61$	۲۴	جنین با کیفیت A+
	$1/62 \pm 1/39$	۲۱	بدون جنین با کیفیت A+

همبستگی معنی‌دار آماری بین سطح ویتامین E و تعداد جنین 2PN در سطوح مختلف ویتامین E از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P=0/872$) (جدول ۴).

همبستگی معنی‌دار آماری بین سطح ویتامین E و تعداد جنین 2PN در روز اول وجود نداشت ($r=-0/026$, $P=0/855$). همبستگی معنی‌دار آماری بین سطح ویتامین E و میزان فراگمتاسیون در روز دوم وجود نداشت ($P=0/141$).

جدول ۴: تعیین و مقایسه میانگین تعداد جنین 2PN در گروه‌های مختلف سطح ویتامین E

P value	میانگین $\pm$ انحراف معیار	تعداد	سطح ویتامین E (میکروگرم در دسی لیتر)
۰/۸۷۲	$0/45 \pm 0/08$	۹	۰-۰/۵
	$0/60 \pm 4/48$	۱۵	۰/۵۱-۱
	$4/0 \pm 4/50$	۹	۱/۰۱-۱/۵
	$0/86 \pm 0/40$	۷	۱/۵۱-۲
	$7/50 \pm 6/0$	۱۰	۲/۵-۹

بحث

بر اساس نتایج این مطالعه تعداد تخمک MII با افزایش سطح ویتامین E مایع فولیکولی به طور معنی داری افزایش پیدا کرد اما همبستگی معنی داری بین سطح ویتامین E مایع فولیکولی در سایر انواع تخمک مشاهده نشد. در طبقه بندی سطوح ویتامین E بیشترین تعداد تخمک MII (۳۰/۳ درصد) در سطح ویتامین E (۵۱/۰ تا ۱) مشاهده شده بود و تفاوت توزیع فراوانی تخمک های MII در سطوح مختلف ویتامین E از نظر آماری معنی دار بود. در مطالعه ای در سال ۲۰۱۲ مشخص شد که ترکیب ۲۰ و ۷۵۰ میکرومولار از ترکیب های آلفاتوکوفرول اثرات مفیدی بر بلوغ سیتوپلاسمی دارد ولی اثرات مضر کمی هم در بلوغ هسته نیز دیده شده است (۱۷). از مطالعات گذشته می توان این طور نتیجه گرفت که در یک سطح مشخص از ویتامین ها در بدن موجودات مختلف می توان اثرات قابل توجهی در روند تکامل بلوغ تخمک مشاهده کرد اما سطوح پایین تر و یا بالاتر از سطح گزارش شده می تواند نتیجه ی معکوس را در روند تکاملی تخمک بر داشته باشد. بر اساس نتایج این مطالعه میانگین سطح ویتامین E مایع فولیکولی در مواردی که جنین با گرید Z1 یا Z2 داشتند، به طور معنی داری بالاتر از مواردی بودند که جنین با سایر گریدها را داشتند. اما ارتباط معنی داری بین کیفیت جنین در روز دوم، تعداد جنین 2PN و میزان فراگمتاسیون با سطح ویتامین E مایع فولیکولی وجود نداشت. در مطالعه ای در سال ۲۰۰۰ مشخص شد که با افزایش ۱۰۰ میکرومولار ویتامین E نرخ توسعه ی بلاستوسیت جنین گاو تا ۶۳ درصد در مرحله ی مورولا افزایش می یابد (۱۲). همچنین در مطالعه ی دیگری که در سال ۲۰۱۰ بر روی مرغ ها انجام شد، نشان داد مصرف ویتامین E با سطح متوسط ۱۵۰ واحد بین المللی بر کیلوگرم منجر به بهبود صفات کیفی تخم مرغ می شود ولی از طرف دیگر نتیجه ی تحقیقات بر روی مرغ ها

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 سلول ها 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 جزئی از آنتی اکسیدان های مهم در جهت حفاظت از استرس اکسیداتیو در بدن افراد می باشد، وجود آن ها در بسیاری از ناباروری ها با فاکتور مردانه نیز می تواند مفید باشد.

در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۲ انجام گرفت این چنین بیان شد که عدم وجود دفاع آنتی اکسیدانی در مقابل اثرات رادیکال های آزاد در تخمک و اسپرم و جنین سبب عدم موفقیت روش های ART در داخل بدن خواهد شد (۱۸). نتیجه ی این تحقیق به گونه ای با مطالعه ی حاضر مشابه است، زیرا نشان داده شد که وقتی که سطح آنتی اکسیدانی مثل ویتامین E در مایع فولیکولی پایین است، تعداد تخمک های با بلوغ مناسب کمتر دیده می شود. همچنین مطالعه ی دیگری که در سال ۲۰۱۵ انجام شده نشان می دهد که ویتامین E می تواند سبب بهبود میزان بلوغ تخمک جدا شده از بافت تخمدان منجمد شده ی موش با روش انجماد شیشه ای شود (۱۹). این مطالعات تجربی که بر روی حیوانات آزمایشگاهی انجام شده نشان داده که وجود آنتی اکسیدان ها سبب بهبود وضعیت باروری شده و می توان با بررسی های بیشتر و انجام مطالعات کلینیکی انسانی اثر آنتی اکسیدان ها را به عنوان درمان بالقوه برای بسیاری از معضلات ناباروری در نظر گرفت. همچنین در پژوهشی در سال ۲۰۰۷ به استرس اکسیداتیو و عدم تعادل آنتی اکسیدانی اثرات نامطلوب آن بر باروری اشاره شده است (۲۰)، که می تواند دلیل مناسبی برای تحقیقات بیشتر در این زمینه باشد. یکی از امتیازات این مطالعه با سایر پژوهش های

انجام گرفته در گذشته این است که در تحقیقات قبلی بررسی اثر آنتی اکسیدانی ویتامین های E روی بلوغ تخمک نمونه های حیوانی بوده، اما در مطالعه ی حاضر نمونه های مورد بررسی، انسانی می باشند که نتایج حاصله در حوزه ی ناباروری می تواند بسیار قابل توجه باشد. همچنین در پژوهش های گذشته معمولاً دوزهای مختلفی از این ویتامین ها به صورت مقدار مصرفی به نمونه های مورد بررسی داده می شد و سپس مورد ارزیابی قرار می گرفت که می توانسته اثرات مضر 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 اندازه گیری قرار گرفته و گزارش شده است. با توجه به ارزشمندی مطالعات مداخله گر، این پژوهش نشان داده است که پزشک مربوطه می تواند در ابتدایی ترین سطح ناباروری زوجین در زمینه ی آنتی اکسیدان های موثر در روند باروری بررسی های لازم را انجام داده و کمبود این ویتامین ها 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 آگاهی های لازم را به آن ها ارایه نماید. این پژوهش یک مطالعه ی پایه است و بر اساس نتایج این مطالعه ما نمی توانیم توصیه هایی برای اندازه گیری سطح آنتی اکسیدان ها یا تجویز دارو به بیمار بدهیم. همچنین این تحقیق نیاز به مطالعات بیشتر و حجم نمونه بالاتری دارد و نیاز به بررسی بیشتر عوامل موثر بر نتایج IVF می باشد.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج این مطالعه با افزایش سطح ویتامین E مایع فولیکولی تعداد تخمک MII تا یک سطح مشخص افزایش می یابد و مجدداً با ادامه روند افزایشی، سطح این ویتامین در مایع فولیکولی کاهش می یابد. تعداد تخمک MII در سطح ویتامین E (۵۱/۰ تا ۱) به طور معنی داری بیش از

سایر سطوح ویتامین E خواهد بود که نشان می دهد در این سطح مشخص، تعداد بیشتری تخمک بالغ آماده ی لقاح وجود دارد و می تواند 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 زمینه های مشابه انجام شده است پیشنهاد می شود برای درمان ناباروری در زوج های نابارور پس از بررسی کمبود ویتامین C و E قبل از شروع روند درمانی با تحریک تخمک گذاری، مصرف این ویتامین ها را با توجه به تجویز پزشک و با دوز مناسب توصیه کرد تا نمونه ی تخمک و اسپرم در این افراد کیفیت بهتر و شانس لقاح بالاتر و قابلیت باروری بیشتری داشته باشند. در بررسی دیگری می توان به آنتی اکسیدان های 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 می توان برای کاهش ناباروری با فاکتور مردانه و زنانه مطالعات بیشتری در زمینه ی بررسی اثر آنتی اکسیدان هایی مانند گلوکاتینون، سلنیوم و کوآنزیم Q10، را روی مردان و زنان انجام داد که این امر مستلزم تعیین دوز مناسب از هر ترکیب به منظور بهبود افزایش اسپرم و تخمک مناسب می باشد.

در برخی از بیماران با وجود اینکه تخمک مورفولوژی خوبی دارد اما جنین با فراگمتاسیون بالا ایجاد شده و یا موجود نمی باشد و نتیجه ی مثبتی در بارداری دیده نمی شود احتمالاً این امر می تواند ناشی از افزایش شیوع آنپلوئیدی در اووسیت های پیر باشد که در اثر اختلال مکانیسم های تنظیمی حاکم بر تشکیل و عملکرد دوک تقسیم میوزی رخ می دهد و یا دلایل ناشناخته ای 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

همچنین از آقای داوود پورمرزی که مشاوره‌ی آماری این 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: Activation 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 Endocrinol*. 2009; 7: 4330-7.
- 8- Cougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: fact and hypothesis. *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 I, Madaschi c, Borges Jr. Metaphase II human oocyte morphology: contributing 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 buffullos embryos. *J Assist Reprod Genetics*. 2009; 26: 217-225.

- 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.

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

Saffari S¹, Bahadori MH², Sharami H³, Torab Zadeh P¹, Goudarzvand M⁴

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

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

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

⁴Dept.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