مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۴۰/هفته دوم مرداد ماه ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۸/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۳/۴

فعال‌سازی مصنوعی تخمک: انواع روش‌ها و تأثیر کلینیکی آن پس از تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم

محمدرضا دیمه[۱]، مرضیه تولایی[۲]، دکتر محمدحسین نصر اصفهانی[۳]

مقاله مروری

چکیده

مقدمه: عدم دستیابی به لقاح یک پدیده‌ی نادر پس از تزریق اسپرم به درون سیتوپلاسم تخمک (Intracytoplasmic sperm injection یا ICSI) است. یکی از دلایل اصلی آن، فعال نشدن تخمک توسط اسپرم می‌باشد. جهت غلبه بر عدم دستیابی به لقاح، از روش‌های مصنوعی جهت فعال‌سازی تخمک استفاده می‌گردد. هدف از ارائه‌ی این مقاله‌ی مروری، آشنایی مختصر با مکانیسم فعال شدن تخمک توسط اسپرم است و سپس شرحی بر روش‌های استفاده‌شده جهت فعال‌سازی مصنوعی تخمک و نگرانی‌های مرتبط با آن، بود. همچنین در این مطالعه‌ی مروری، به بررسی اثرات استفاده از روش‌های فعال‌سازی مصنوعی تخمک بر روی بیماران مختلف و نتایج کلینیکی آن پرداخته شد.

روش‌ها: در این مطالعه مقالات جستجوشده در پایگاه‌های اطلاعاتی PubMed و پایگاه‌های مرتبط با مقالات ISI از سال‌های ۱۹۳۰ تا ۲۰۱۲ میلادی بررسی شدند.

یافته‌ها: استفاده از روش‌های فعال‌سازی مصنوعی تخمک می‌تواند باعث افزایش میزان لقاح و دستیابی به حاملگی در برخی بیماران گردد. به طور عمده روش‌های مکانیکی، الکتریکی و شیمیایی جهت فعال‌سازی مصنوعی تخمک پس از عمل ICSI مورد استفاده قرار می‌گیرند که روش فعال‌سازی شیمیایی کاربرد گسترده‌تری دارد.

نتیجه‌گیری: مطالعات انجام‌شده در این زمینه نشان می‌دهد که استفاده از روش‌های فعال‌سازی مصنوعی تخمک در برخی از بیمارانی که کاندیدای استفاده از این روش‌ها می‌باشند، نتیجه بهتری داشته است و باعث افزایش میزان لقاح و دستیابی به حاملگی شده است. اگر چه روش‌هایی جهت پیشگویی و بررسی پتانسیل لقاح نمونه‌ی سمن افراد مورد توجه و تحقیق قرار گرفته است، ولی هنوز مطالعات گسترده‌ای برای تثبیت یک روش ایمن بدین منظور نیاز است.

واژگان کلیدی: تزریق اسپرم به درون سیتوپلاسم تخمک، عدم دستیابی به لقاح، فعال شدن تخمک

ارجاع: دیمه محمدرضا، تولایی مرضیه، نصر اصفهانی محمدحسین. **فعال‌سازی مصنوعی تخمک: انواع روش‌ها و تأثیر کلینیکی آن پس از تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۴۰): ۸۶۶-۸۵۱

۱- کارشناس ارشد، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده‌ی زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری تولید مثل و مرکز باروری و ناباروری اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشجوی دکتری و عضو هیأت علمی، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده‌ی زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری تولید مثل، اصفهان، ایران

۳- دانشیار، گروه تولید مثل و تکوین، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده‌ی زیست فناوری جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه زیست فناوری تولید مثل و مرکز باروری و ناباروری اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر محمدحسین نصر اصفهانی

Email: mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org

مقدمه

استفاده از تکنیک تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم یا(Intracytoplasmic sperm injection یا ICSI) که برای اولین بار در سال ۱۹۹۲ توسط Palermo و همکاران ابداع شد و مورد استفاده قرار گرفت، امید بسیاری را در زوج‌های نابارور با فاکتور مردانه جهت فرزنددار شدن به وجود آورد (۱). استفاده از تکنیک ICSI، به محققان این فرصت را داده است تا درباره‌ی مراحل مختلف فرایندهای دخیل در روند لقاح و فعال‌سازی تخمک تحقیقات زیادی انجام دهند. اگر چه در تکنیک ICSI انتظار می‌رود که همه‌ی اسپرم‌های وارد شده به داخل تخمک منجر به لقاح شوند، اما در برخی موارد (۳-۲ درصد)، لقاح با موفقیت مواجه نمی‌گردد (۲).این نافرجامی در لقاح، زمانی که در تمامی تخمک‌های بالغ بیمار رخ دهد، عدم دستیابی به لقاح (Total fertilization failure) نامیده می‌شود.

عوامل زیادی در عدم دستیابی به لقاح پس از ICSI دخیل هستند. این عوامل هم می‌توانند وابسته به تخمک و هم وابسته به اسپرم باشند. از عوامل مربوط به تخمک می‌توان به تعداد تخمک به دست‌آمده، کیفیت تخمک‌ها و وجود ناهنجاری‌های کروموزومی در آن‌ها اشاره کرد (۳). همچنین از جمله عوامل مرتبط با اسپرم می‌توان به تحرک، مورفولوژی، زنده بودن، وضعیت کروماتین و DNA و توانایی اسپرم جهت خروج از حالت متراکم در درون تخمک اشاره کرد (۶-۴). عدم مهارت شخص تزریق‌کننده، عدم سوراخ شدن غشای تخمک و در نتیجه عدم ورود اسپرم و یا خروج اسپرم از تخمک بعد از تزریق نیز از عوامل مرتبط با تکنیک ICSI می‌باشد (۸-۷). اما بررسی‌ها نشان داده است که مهم‌ترین دلیل در عدم دستیابی به لقاح، فعال نشدن تخمک توسط عوامل وابسته به اسپرم (SAOAF یا Sperm associated oocyte activation factors) می‌باشد، به طوری که تا حدود ۶۶ درصد از تخمک‌ها دچار عدم فعال‌سازی می‌شوند (۹).

عدم دستیابی به لقاح بعد از ICSI می‌تواند آسیب‌های شدید روحی به زوج‌های نابارور وارد نماید و همچنین هزینه‌های بسیاری را بر این زوج‌ها تحمیل کند. مهم‌تر از همه این اتفاق باعث سرخوردگی زوج نابارور از روند درمانی می‌شود. بنا بر دلایل ذکرشده محققان در صدد ایجاد راه کارهایی هستند تا بتوانند پس از شناسایی مسیرهای منتهی به فعال شدن تخمک در طی لقاح طبیعی، با استفاده از روش‌های مصنوعی تخمک را فعال نمایند و شانس ایجاد لقاح را افزایش دهند. هدف از ارائه‌ی این مقاله‌ی مروری، ابتدا آشنایی مختصر با مکانیسم فعال شدن تخمک، آشنایی با روش‌های فعال‌سازی مصنوعی تخمک و در نهایت بررسی آخرین مطالعات انجام‌شده در زمینه‌ی فعال‌سازی مصنوعی تخمک بود.

مروری بر مکانیسم فعال شدن طبیعی تخمک انسان

روند فعال شدن تخمک شامل تعداد زیادی از فرآیندهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی می‌باشد که بعضی از این فرایندها چند ثانیه و یا دقیقه و برخی دیگر ممکن است ساعت‌ها پس از ادغام اسپرم با تخمک صورت گیرند (۱۰).

در طی دوران جنینی نوزاد دختر، سلول‌های زایای تخمک وارد مراحل تقسیمات میوزی می‌گردند. در این دوره اولین تقسیمات میوز صورت می‌گیرد و

تخمک وارد مرحله‌ی پروفاز میوز I می‌شود و به مدت بسیار طولانی که ممکن است حتی ده‌ها سال طول بکشد، در این مرحله باقی می‌ماند. پس از بلوغ جنسی و در زمان مناسب همراه با تحریکات هورمون‌های ترشح‌شده در طی هر سیکل تخمک‌گذاری، تخمک‌ها شروع به ادامه‌ی تقسیم میوز می‌کنند، به صورتی که تخمک وارد مرحله‌ی متافاز میوز II می‌شود. پس از این تغییرات و ادامه‌ی تقسیم میوز، تخمک در ناحیه‌ی آمپول لوله‌ی اوویداکت منتظر رسیدن اسپرم و انجام فرایند لقاح می‌شود (۱۰). در هنگام فرایند لقاح و ادغام اسپرم با تخمک، اسپرم باعث القا و شروع یک سری از واکنش‌های درون سلولی تخمک می‌گردد. این امر منجر به خروج تخمک از حالت توقف در مرحله‌ی متافاز میوز II می‌شود. این واکنش‌ها فعال‌سازی تخمک نام دارد و جهت انجام پروسه‌ی لقاح و رشد جنینی امری ضروری می‌باشد (۱۱). ابتدایی‌ترین فرایند در روند فعال‌سازی تخمک، افزایش درون سلولی غلظت یون کلسیم از ذخایر شبکه‌ی اندوپلاسمیک (Endoplasmic reticulum یا ER) است. زمان شروع روند افزایش کلسیم درون سلولی حدود ۱ تا ۳ دقیقه بعد از ادغام اسپرم با تخمک است و مکان شروع این افزایش غلظت، از ناحیه‌ی محل ورود اسپرم به درون تخمک می‌باشد (۱۲).

به دنبال افزایش غلظت کلسیم درون سلولی، یک سری نوسانات کلسیم به عنوان نوسات ثانویه مشاهده می‌شود. این نوسانات Oscillation نام دارند (۱۳). وجود این روندهای افزایش کلسیم باعث القای فرآیندهای آبشاری در درون تخمک می‌شود که در نهایت منجر به برخی رخدادهای سلولی در تخمک مانند ادامه‌ی تقسیم میوز، خروج کروماتین اسپرم از حالت تراکم، بیان mRNAهای مادری، تشکیل پیش هسته‌های مادری و پدری، شروع سنتز DNA و انجام تقسیمات سلولی می‌گردد (۱۰). به علاوه افزایش در غلظت کلسیم درون سلولی باعث القای روند اگزوسیتوز گرانول‌های قشری می‌شود که روند واکنش قشری (Cortical granule reaction) نام دارند. این گرانول‌ها حاوی آنزیم‌هایی می‌باشند که به فضای پیش زرده‌ای ریخته می‌شود و نتیجه‌ی آن تغییراتی در ناحیه‌ی شفاف و غشای تخمک می‌باشد. این امر از ورود اسپرم‌های دیگر به درون تخمک جلوگیری می‌کند (۱۴). تحقیقات نشان داده است که اگر چه افزایش ابتدایی در میزان یون کلسیم درون سلولی جهت فعال نمودن تخمک و ایجاد لقاح کافی می‌باشد، اما به نظر می‌رسد افزایش تناوبی در میزان یون کلسیم در روند رشد طبیعی و تقسیمات سلولی جنینی تأثیرگذار باشد (۱۵).

عوامل دخیل در روند فعال‌سازی تخمک

همان طور که اشاره شد در روند فعال‌سازی تخمک افزایش میزان کلسیم درون سلولی نقش اولیه و مهمی را ایفا می‌کند. در ابتدا نظریه‌های متفاوتی جهت چگونگی فعال شدن تخمک توسط اسپرم مطرح شد که از آن جمله می‌توان به دو نظریه اشاره کرد: ۱- اتصال اسپرم به گیرنده‌ی مخصوص در غشای تخمک و سپس فعال شدن تخمک (۱۶) ۲- وارد شدن تعدادی از عوامل فعال‌کننده از اسپرم به درون تخمک و در ادامه فعال شدن آن (۱۸-۱۷). هر دو نظریه بر دلایلی استوار است، ولی تحقیقات اخیر نشان داده‌اند که نظریه‌ی دوم صحیح‌تر می‌باشد. بدین

صورت که پس از ورود اسپرم به درون تخمک تعدادی از عوامل از اسپرم به درون تخمک رها می‌شوند. این عوامل مسؤول افزایش یون کلسیم درون سلولی و در نهایت آغاز فرایندهای آبشاری جهت فعال شدن تخمک می‌باشند (۱۸).این عوامل تحت عنوان کلی SAOAF شناخته می‌شوند که در پوشش دور هسته‌ای سر اسپرم (Prenuclear theca) وجود دارند (شکل ۱). محققان در ادامه دریافتند که افزایش اولیه در میزان کلسیم درون سلولی توسط یک فعالیت فسفولیپازی ویژه‌ی بیضه و اسپرم (Testis specific) انجام می‌شود. در اثر فعالیت این آنزیم، فسفاتیدیل اینوزیتول موجود در سیتوپلاسم تخمک تبدیل به دی آسیل گلیسرول (DAG) و اینوزیتول تری فسفات (IP3) می‌گردد. DAG و IP3 در سلول تخمک می‌توانند به عنوان یک پیامبر ثانویه عمل کنند و شروع‌کننده‌ی واکنش‌های آبشاری دیگر باشند (۱۷). تحقیقات بسیاری در مورد ساختار این فسفولیپاز در اسپرم انجام شد. محققان پی به یک ساختار پروتئینی با فعالیت فسفولیپازی در اسپرم بردند که ویژه بیضه و اسپرم می‌باشد و نام آن را فسفولیپاز سی‌زتا (ζ Phospholipase C یا ζ PLC) گذاشته‌اند. تحقیقات نشان داد که ζ PLC در منطقه‌ی استوایی (Equatorial) ناحیه‌ی سر اسپرم قرار دارد (۱۸). IP3 تشکیل‌شده توسط ζ PLC، وارد شبکه‌ی اندوپلاسمی که ذخایر کلسیم درون سلولی در آن قرار دارد، می‌شود و سپس باعث آزاد شدن یون‌های کلسیم و در نهایت افزایش میزان کلسیم درون سلولی می‌گردد. از سوی دیگر، DAG تشکیل‌شده توسط ζ PLC باعث شروع برخی از واکنش‌ها می‌گردد و در نهایت واکنش قشری رخ می‌دهد، که نتیجه‌ی آن جلوگیری از ورود اسپرم‌های دیگر به درون تخمک می‌شود. به تازگی در مطالعه‌ای نشان داده شده است که ورود SAOAF به درون تخمک باعث فعال نمودن آنزیم‌های فسفولیپاز در سطح غشای ER درون تخمک می‌گردد و با اثر بر روی ذخایر کلسیم در ER باعث افزایش سطح این یون در درون تخمک می‌شود (۱۹). اسپرم‌هایی که قادر به افزایش میزان کلسیم درون سلولی نباشند، حتی پس از ICSI نیز پتانسیل تشکیل لقاح را ندارند و به احتمال بسیار زیاد این اسپرم‌ها فاقد ζ PLC در ساختار خود می‌باشند. مکانیسم احتمالی عمل ζ PLC در درون تخمک در شکل ۱ نشان داده شده است (شکل ۱).

از سوی دیگر مطالعات جدید نشان می‌دهد که علاوه بر ζ PLC عوامل دیگری نیز بر فعال شدن تخمک تأثیرگذار هستند که از این عوامل می‌توان به PAWP (Postacrosomal sheath ww domain-binding protein) نیز اشاره کرد.

PAWP یک پروتئین است که در قسمت پوشش دور هسته‌ای سر اسپرم قرار دارد. این پروتئین همانند ζ PLC باعث ایجاد افزایش یون کلسیم و شروع روند فعال‌سازی تخمک می‌گردد. مطالعات نشان داده است که تزریق پروتئین نوترکیب PAWP باعث شروع روند افزایش غلظت درون سیتوپلاسمی تخمک می‌شود و در نهایت منجر به فعال شدن تخمک می‌گردد (۲۰). البته مطالعات کمتری بر روی این عامل انجام شده است که نشان از اهمیت کمتر آن نسبت به ζ PLC دارد.

روش‌های مصنوعی جهت فعال‌سازی تخمک

همان طور که اشاره شد افزایش غلظت یون کلسیم

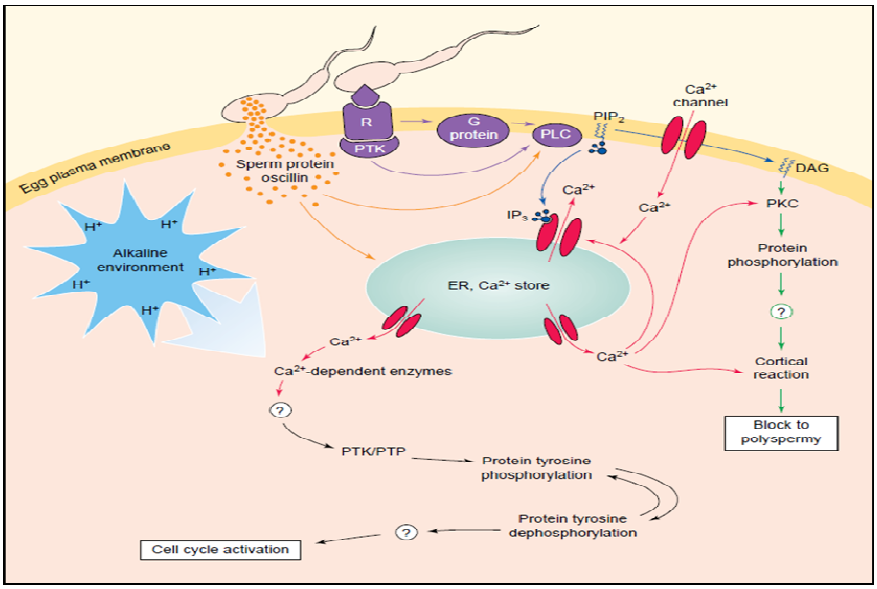
درون سلولی به عنوان عامل اصلی شروع‌کننده‌ی فعال‌سازی تخمک و ادامه‌ی تقسیم میوز و فرایند لقاح می‌باشد. بنابراین به نظر می‌رسد در صورتی که بتوان پس از ورود اسپرم به درون تخمک با استفاده از روش‌های مصنوعی میزان کلسیم درون سلولی را افزایش داد، بتوان تخمک را فعال نمود و شانس ایجاد لقاح و تشکیل جنین را بالا برد. بر پایه‌ی این اصل، روش‌های متعددی جهت فعال‌سازی مصنوعی تخمک به کار برده شده است.

به طور کل روش‌های مصنوعی جهت فعال‌سازی تخمک به سه دسته‌ی روش‌های مکانیکی، الکتریکی و شیمیایی تقسیم می‌شوند که باعث به وجود آمدن یک یا چندین بار افزایش در غلظت یون کلسیم می‌گردند (۲۲-۲۱).

روش فعال‌سازی مصنوعی تخمک به صورت مکانیکی به این صورت است که ابتدا تخمک‌ها با سوزن‌های مخصوص نگه‌دارنده به صورت محکم نگه داشته می‌شوند. سپس با سوزن‌های بسیار ریز دیگری، به صورت خیلی دقیق آسیب جزیی به غشا وارد می‌آید. این عمل باعث می‌شود که میزان کلسیم درون سلولی تخمک افزایش یابد. به دنبال این فعال‌سازی مکانیکی، اسپرم به درون تخمک تزریق می‌گردد (۲۳).

روش دیگر فعال‌سازی مکانیکی تخمک به این صورت است که پس از تزریق اسپرم به درون تخمک، با استفاده از سوزن‌های بسیار نازک ترکیبات یون کلسیم مانند کلرید کلسیم به صورت مستقیم به درون تخمک تزریق می‌شوند و به این ترتیب میزان یون کلسیم درون سلولی افزایش می‌یابد.

این روش‌های مکانیکی جهت فعال‌سازی تخمک‌های خوک و انسان در طی روند ICSI به کار رفته است و منجر به ایجاد لقاح گردیده است (۲۵-۲۴). اگر چه این روش ممکن است در فعال‌سازی تخمک و ایجاد لقاح مؤثر باشد ولی انجام این روش معمول نیست و کاربرد تحقیقاتی و کلینیکی آن بسیار کم می‌باشد.



شکل ۱. نگاهی اجمالی بر مکانیسم فعال شدن تخمک و دو نظریه‌ی اصلی درباره‌ی فعال شدن تخمک

یکی دیگر از روش‌های فعال‌سازی تخمک استفاده از تحریک‌های الکتریکی می‌باشد. در این روش پس از انجام عمل ICSI تخمک‌ها، تحت اثر پالس‌های الکتریکی با مقدار تنظیم‌شده، قرار می‌گیرند. این تحریکات الکتریکی بر دریچه‌های ورود کلسیم به درون تخمک اثر می‌کند و باعث باز شدن آن‌ها می‌گردد. این افزایش غلظت از طریق تشکیل منافذی در غشای پلاسمایی انجام می‌شود. موفقیت در این روش فعال‌سازی بستگی زیادی به اندازه‌ی منافذ تشکیل‌شده در غشأ و همچنین محتوای یونی محیط کشت و سلول دارد. علاوه بر این موارد زمان بازگشت غشأ به حالت قبلی وابسته به میزان دما می‌باشد. تشخیص جهت میزان فعال‌سازی الکتریکی، وابسته به میزان غلظت یون کلسیم خارج سلولی موجود در محیط‌های نگه‌داری اسپرم است. به طور معمول زمان فعال‌سازی مصنوعی به روش تحریک الکتریکی حدود ۳۰ دقیقه پس از انجام تکنیک ICSI می‌باشد. از این روش جهت فعال‌سازی تخمک‌ها پس از عمل ICSI در انسان و حیوانات دیگر استفاده شده است. حتی نوزادانی با استفاده از این روش جهت فعال‌سازی تخمک پس از تکنیک ICSI نیز به دنیا آمده‌اند (۳۰-۲۶). هر چند که استفاده از این روش در برخی تحقیقات و موارد کلینیکی هنوز انجام می‌شود، ولی مطالعه‌ای نشان داده است که میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS یا Reactive oxygen species) پس از فعال‌سازی الکتریکی تخمک افزایش می‌یابد که این امر به نوبه‌ی خود می‌تواند اثرات زیان‌باری را بر رشد و تکامل جنینی داشته باشد (۳۱).

اما یکی از روش‌هایی که کاربرد گسترده‌ای جهت فعال‌سازی مصنوعی تخمک هم در تحقیقات و هم در قسمت کلینیکی دارد، روش‌های شیمیایی می‌باشد. در این روش، از مواد شیمیایی خاصی که توانایی افزایش میزان کلسیم درون سلولی را دارا هستند، استفاده می‌گردد. تاکنون مواد شیمیایی بسیاری مانند اتانول (۳۲)، کلسیم یونوفور (۳۳)، یونومایسین (۳۴)، پوروماسین (۳۵)، کلریداسترونسیوم ($SrCl_2$) (۳۶)، استر فوربل (۳۷) و تیمرزول (۳۸)، جهت فعال‌سازی شیمیایی تخمک مورد استفاده قرار گرفته‌اند. برخی از این ترکیبات باعث افزایش میزان کلسیم درون سلولی از طریق آزاد نمودن کلسیم از ذخایر درون تخمک می‌شوند و برخی دیگر باعث تسهیل در ورود کلسیم خارج سلولی به درون تخمک می‌شوند. نکته‌ی دیگر که باید به آن اشاره شود این است که برخی از این ترکیبات تنها باعث یک موج افزایش در میزان کلسیم درون تخمک می‌گردند و برخی دیگر به تناوب باعث افزایش غلظت کلسیم درون سلولی می‌گردند (۲۱). همچنین، در برخی مطالعات جهت کارایی بهتر در فعال نمودن تخمک و افزایش کلسیم درون سلولی از برخی از این مواد شیمیایی به صورت ترکیبی استفاده شده است (۳۹).

یکی از این مواد شیمیایی که در بسیاری از مراکز درمانی و تحقیقاتی مورد استفاده قرار می‌گیرد یونوفورها هستند. یونوفورها ملکول‌هایی هستند که در چربی قابل حل هستند و به طور معمول توسط میکرواورگانیسم‌ها سنتز می‌گردند. کار عمده‌ی یونوفورها انتقال یون‌ها از غشای سلولی می‌باشد. یونوفورها نسبت به برخی یون‌ها تمایل بسیار بالایی دارند و این یون‌ها را از طریق انتقال فعال به درون یا خارج سلول انتقال می‌دهند. کلسیم یونوفور A23187

و یونوماسین دو یونوفوری هستند که به طور گسترده در مراکز کلینیکی جهت افزایش میزان کلسیم درون سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

نتایج کلینیکی استفاده از فعال‌سازی تخمک پس از ICSI

با وجودی که روش‌های فعال‌سازی مصنوعی تخمک به صورت یک روش استاندارد و برنامه‌ریزی‌شده در کلینیک‌های کمک باروری مورد استفاده قرار نمی‌گیرد، اما استفاده از این روش‌ها روز به روز جهت دستیابی به لقاح در بیمارانی که عدم دستیابی به لقاح در سیکل‌های قبلی ICSI را داشته‌اند و یا بیمارانی که پتانسیل کمتری جهت ایجاد لقاح را دارند، رو به افزایش می‌باشد. بیشتر مطالعات در این زمینه مربوط به مطالعات موردی و یا مطالعه بر روی جمعیت کم بیماران می‌باشد. بنابراین نتیجه‌گیری درباره‌ی اثر فعال‌سازی مصنوعی تخمک پس از تکنیک ICSI بسیار دشوار می‌باشد. جدول ۱ برخی مطالعات موردی انجام‌شده بر روی بیماران کاندید ICSI و نتایج به دست‌آمده از آن‌ها را نشان می‌دهد.

جدول ۱. برخی مطالعات موردی (Case report) انجام‌شده بر روی ناباروران کاندید ICSI و نتایج حاصل از آن‌ها

نویسنده، سال	نوع فعال‌سازی	معیار استفاده از AOA	نتایج به دست‌آمده
Battaglia و همکاران (۴۰)	CA	زوج گلوبوزواسپرمیا	باعث ایجاد لقاح بالا پس از ICSI شد.
Rybouchkin و همکاران (۴۱)	CaCl2 andCA	زوج گلوبوزواسپرمیا	AOA باعث ایجاد حاملگی و به دنیا آمدن نوزاد شد.
Kim و همکاران (۴۲)	CA	زوج گلوبوزواسپرمیا	بعد از انتقال جنین‌های فریز حاملگی به دست آمد.
Eldar-Geva و همکاران (۴۳)	CA	بیمارانی که عدم دستیابی به لقاح را داشته‌اند.	میزان لقاح افزایش یافت و حاملگی به دست آمد.
Chi و همکاران (۴۴)	CA	بیمارانی که عدم دستیابی به لقاح را داشته‌اند	میزان لقاح افزایش یافت و حاملگی به دست آمد.
Murase و همکاران (۴۵)	CA and puromycin	زوج بیمار با عدم دستیابی به لقاح	میزان لقاح افزایش یافت و حاملگی و تولد نوزاد به دست آمد.
Ahmady و همکاران (۴۶)	CA	بیمار که اسپرم زنده در نمونه‌ی سمن مشاهده نشد	پس از تزریق اسپرم مرده و AOA حاملگی به دست آمد.
Check و همکاران (۴۷)	CA	بیمار گلوبوزواسپرمیا و بیمار با عدم دستیابی به لقاح	بهبودی در وضعیت میزان لقاح به دست نیامد.
Tejera و همکاران (۴۸)	CA	زوج گلوبوزواسپرمیا	میزان لقاح و کیفیت جنین در گروه AOA نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت.
Yanagida و همکاران (۲۸)	Strontium Chloride	بیمارانی که عدم دستیابی به لقاح قبلی را داشته‌اند.	میزان لقاح بالا به دست‌آمد و حاملگی نیز حاصل شد.
Dirican و همکاران (۴۹)	Mechanical oocyte activation	دو بیمار گلوبوزواسپرمیا	حاملگی در هر دو گروه AOA و شاهد به دست آمد.

CA: Calcium ionophore A23187 AOA: Assisted oocyte activation ICSI: Intracytoplasmic sperm injection

جدول ۲. برخی مطالعات گسترده‌ی انجام‌شده بر روی ناباروران کاندید ICSI و استفاده از فعال‌سازی مصنوعی تخمک

نویسنده، سال	جمعیت مورد مطالعه	نوع فعال‌سازی	معیار استفاده از AOA	نتایج به دست‌آمده
Tesarik و Sousa (۵۰)	بیماران ناباروری	CA	تخمک‌های لقاح‌نیافته بعد از ICSI	AOA باعث افزایش میزان لقاح گردید.
Tesarik و همکاران (۵۱)	۵ بیمار	CA	تزریق اسپرماتید به درون تخمک	میزان لقاح در تخمک‌هایی که با اسپرماتید کامل تزریق شده‌اند افزایش پیدا کرد.
Nakagawa و همکاران (۵۲)	۱۷۲ تخمک	CA و Puromycin	زوج گلوبوزواسپرمیا	AOA باعث ایجاد لقاح و تقسیم سلولی گردید.
Heindryckx و همکاران (۵۳)	۱۷بیمار	Ionomycin	بیمارانی که عدم دستیابی به لقاح را داشته اند	AOA باعث افزایش معنی‌داری در میزان لقاح شد و حاملگی در برخی از بیماران مشاهده شد.
Lu و همکاران (۵۴)	۱۱۷ تخمک	CA و Puromycin	تخمک‌های لقاح‌نیافته پس از ICSI	AOA به طور مؤثری باعث ایجاد تقسیمات سلولی بعد از ICSI شد.
Moaz و همکاران (۵۵)	۵۶ بیمار	Ionomycin	بیمارانی که میزان لقاح کم در سیکل‌های ICSI قبلی داشتند	AOA در بیمارانی که ناهنجاری‌های مورفولوژیکی شدید در قسمت سر داشتند باعث افزایش لقاح گردید.
Borges و همکاران (۵۶)	۱۰۴ بیمار	CA	بیمارانی که اسپرم آن‌ها از طریق عمل جراحی به دست آمد.	در بیماران فاقد اسپرم که اسپرم از اپیدیدیم به دست آمد میزان لقاح افزایش داشت ولی در ICSI با اسپرم‌های به دست‌آمده از بیضه تغییر معنی‌داری در میزان لقاح مشاهده نشد.
Heindryckx و همکاران (۵۷)	۳۰ بیمار	تزریق CaCl2 و CA	بیماران گلوبوزواسپرمیا و آستنوزواسپرمیا	AOA باعث ایجاد لقاح در سطح طبیعی شد و میزان حاملگی افزایش یافت.
نصر اصفهانی و همکاران (۵۸)	۸۷ بیمار	Ionomycin	بیماران تراتوزواسپرمیا شدید و آستنوزواسپرمیا	AOA باعث افزایش میزان لقاح و کیفیت جنین در مقایسه با گروه شاهد شد.
Yanagida و همکاران (۲۸)	۲ بیمار	تحریک الکتریکی	بیمارانی که عدم دستیابی به لقاح داشتند	AOA باعث ایجاد ۱۰۰ درصد لقاح گردید.
Mansour و همکاران (۳۰)	۲۴۶ بیمار	تحریک الکتریکی	الیگوآستنوزواسپرمیای شدید، آزواسپرمیای غیر انسدادی و اسپرم‌های بی حرکت	میزان لقاح در بیماران الیگوآستنوزواسپرمیای شدید و آزواسپرمیای غیر انسدادی افزایش داشت.
Kyono و همکاران (۵۹)	۹ بیمار	Strontium Chloride	بیمارانی که عدم دستیابی به لقاح قبلی را داشتند.	AOA باعث افزایش میزان لقاح شد و حاملگی و تولد نوزاد به دست آمد.

CA: Calcium ionophore A23187 AOA: assisted oocyte activation ICSI: Intracytoplasmic sperm injection

همچنین، جدول ۲ مطالعات انجام شده بر روی تعداد بیشتری از بیماران و نتایج کلینیکی آن را نشان می‌دهد.

آیا استفاده از فعال‌سازی مصنوعی تخمک در بیماران یک روش مطمئن کلینیکی می‌باشد؟

اگر چه برخی از مطالعات نشان می‌دهند که در بعضی از بیماران که در طی ICSI موفق به ایجاد لقاح نشده‌اند، پس از استفاده از فعال‌سازی مصنوعی تخمک موفق به ایجاد لقاح و حاملگی شده‌اند، اما هنوز ایمن بودن استفاده از فعال‌سازی مصنوعی تخمک به طور کامل تأیید نشده است و استفاده از این روش‌ها نگرانی‌های زیادی را به دنبال دارد. جهت ایمن بودن استفاده از فعال‌سازی مصنوعی تخمک در قسمت کلینیکی نیاز به انجام تحقیقات بسیاری در زمینه‌های مختلف اعم از تحقیقات ژنتیکی و سیتوژنتیکی می‌باشد که تنها پس از تأیید این تحقیقات می‌توان به طور گسترده از این تکنیک‌ها استفاده کرد.

تحقیقات نشان داده‌اند که استفاده از کلسیم یونوفور A23187 به صورت ترکیبی با پوروماپسین و یا کلرید استرونسیوم ($SrCl_2$)، هنگامی که در غلظت‌های مناسب خود استفاده شوند تأثیرات سیتوتوکسیک بر روی تخمک‌ها ندارد (۵۹، ۳۹).

از سوی دیگر مطالعات نشان داده است که پس از استفاده از فعال‌سازی مصنوعی تخمک (به طور خاص کلسیم یونوفور و پروماپسین) نزدیک به ۸۰ درصد از تخمک‌های لقاح‌یافته، تعداد کروموزوم طبیعی هاپلوییید را از خود نشان می‌دهند. این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده‌ی این مطلب باشد که تخمک میوز II تحت اثر ترکیباتی که باعث افزایش غلظت درون سلولی یون کلسیم می‌شود، توانایی به پایان رساندن تقسیمات میوز را دارا می‌باشد (۳۹). همچنین مطالعه‌ی جنین‌های تشکیل‌شده پس از استفاده از فعال‌سازی مصنوعی تخمک با کلسیم یونوفور A23187 نشان داد که این جنین‌ها حاوی کروموزوم‌های طبیعی جنسی می‌باشند (۵۴). این مطالعات در زمینه‌ی لقاح و آنوپلوییدی‌های کروموزومی بعد از استفاده از فعال‌سازی مصنوعی تخمک انجام شده است. اما اثر استفاده از فعال‌سازی مصنوعی تخمک بر روی تغییرات اپی‌ژنتیک بعد از لقاح، رشد و تکامل جنینی و سلامت نوزادان به دنیاآمده بعد از استفاده از فعال‌سازی مصنوعی تخمک، هنوز به طور کامل مورد بررسی قرار نگرفته است. به تازگی در مطالعه‌ای، نشان داده شد که الگوی بیان ژن‌ها در بلاستوسیت‌های حاصله از IVF (In-vitro fertilisation) با بلاستوسیت‌های حاصله از ICSI به همراه فعال‌سازی مصنوعی تخمک، به همدیگر شباهت بیشتری نسبت به الگوی بیان ژن‌ها در بلاستوسیت‌های به دست‌آمده از IVF با بلاستوسیت‌های به دست‌آمده از ICSI تنها را دارد. این امر می‌تواند گویای این حقیقت باشد که روند افزایش یون کلسیم درون سلولی می‌تواند در بیان بسیاری از ژن‌ها تا رسیدن به مرحله‌ی بلاستوسیت دخیل باشد (۶۰).

تاکنون در دو مطالعه نوزادان به دنیاآمده پس از ICSI به همراه فعال‌سازی مصنوعی تخمک مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. در مطالعه‌ی اول ۵ نوزاد که با استفاده از ICSI به همراه استفاده از ماده‌ی شیمیایی $SrCl_2$ به عنوان فعال‌ساز مصنوعی تخمک به دنیا

آمده بودند، به مدت یک سال پس از به دنیا آمدن مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج مطالعه نشان داد که استفاده از ماده‌ی شیمیایی $SrCl_2$ در طی فعال‌سازی مصنوعی تخمک تأثیرزیان‌آوری بر روند رشد، سلامت و رفتار نوزادان نداشته است (۵۹). در مطالعه‌ی دیگری که توسط دیمه و همکاران انجام شد، تعداد ۷۹ نوزاد که با استفاده از ICSI و فعال‌سازی مصنوعی تخمک با ماده‌ی شیمیایی یونومایسین به دنیا آمده بودند، از نظر وضعیت جسمانی، عقلانی و رفتاری مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج این مطالعه برای اولین بار نشان داد که استفاده از یونومایسین تأثیر زیان‌باری بر وضعیت جسمانی، عقلانی و رفتاری نوزادان به دنیا آمده نداشت (۶۱).

هر چند این مطالعات نشان‌دهنده‌ی عدم وجود اثر زیان‌بار استفاده از فعال‌سازی مصنوعی تخمک بر روی رشد و تکامل جنینی و همچنین سلامت نوزادان به دنیاآمده می‌باشد، اما هنوز مطالعات گسترده و زیادی در این زمینه باید صورت بگیرد تا بتوان با اطمینان ایمن و مفید بودن این روش‌ها را تأیید کرد.

استفاده از فعال‌سازی مصنوعی تخمک برای چه بیمارانی می‌تواند مفید باشد؟

اگر چه در بسیاری از کلینیک‌های ناباروری استفاده از روش‌های فعال‌سازی تخمک را تنها برای بیمارانی که در سیکل‌های قبلی ICSI خود عدم دستیابی به لقاح یا میزان کم لقاح را داشته‌اند، مورد استفاده قرار می‌دهند، اما به نظر می‌رسد برخی از بیماران از همان ابتدا نقص در روند فعال‌سازی تخمک را دارا هستند. در بسیاری از کلینیک‌های نازایی هنگام مواجهه با این بیماران، پس از انجام عمل ICSI، تخمک‌های آن‌ها تحت فعال‌سازی مصنوعی قرار می‌گیرد. یک گروه مهم از این نوع بیماران، افراد دارای اسپرم با سر گرد یا Globozoospermia می‌باشند.

Globozoospermia به دسته‌ای از افراد نابارور اطلاق می‌شود که اسپرم آن‌ها دارای سر گرد و فاقد آکروزوم می‌باشد (۶۲). به دلیل عدم وجود آکروزوم، اسپرم‌ها توانایی لازم جهت ورود به درون تخمک را ندارند و به همین علت این افراد نابارور می‌باشند. همراه با ابداع تکنیک ICSI این گزینه به عنوان یک روش درمان مناسب جهت ایجاد لقاح و حاملگی در این بیماران معرفی شد. ولی به زودی مشخص شد که تخمک‌های تزریق‌شده با اسپرم‌های دارای سر گرد نیز میزان بسیار کمی از لقاح را نشان می‌دهد (۶۳). تحقیقات متعدد نشان داد که عدم وجود آکروزوم باعث عدم فعال شدن تخمک در این گونه از بیماران به دلیل نقص در میزان عوامل فعال‌کننده‌ی تخمک SAOAF می‌باشد (۶۲). به همین دلیل محققان در مطالعات دیگر بر آن شدند تا با استفاده از روش‌های مصنوعی فعال‌سازی تخمک، بتوانند تخمک‌ها را پس از تزریق با اسپرم دارای سر گرد فعال نمایند. در چند مطالعه دستیابی به حاملگی و تولد نوزاد پس از استفاده از فعال‌سازی مصنوعی تخمک در این گونه از بیماران گزارش شده است. به نظر می‌رسد که بیماران Globozoospermia کاندیدای اصلی جهت استفاده از روش‌های فعال‌سازی مصنوعی تخمک می‌باشند (جدول ۱).

برخی محققان در هنگام انجام تکنیک ICSI بیماران دیگری را نیز کاندیدای استفاده از روش‌های فعال‌سازی مصنوعی تخمک می‌دانند. از این گروه‌ها می‌توان به افراد دارای اسپرم با ناهنجاری‌های

مورفولوژیک شدید و به میزان بالا و به خصوص ناهنجاری‌های مربوط به آکروزوم مانند اسپرم دارای آکروزوم کوچک اشاره نمود (۵۸). گروه دیگر، بیمارانی هستند که اسپرم‌های به دست‌آمده برای تکنیک ICSI در آنان، از طریق عمل‌های جراحی مانند نمونه‌برداری از بافت بیضه و یا نمونه‌برداری از مجرای اپیدیدیم، به دست آمده باشد. این اسپرم‌ها به دلیل این که بلوغ نهایی خود را در اپیدیدیم طی نکرده‌اند، می‌توانند کاندیدای مناسبی جهت استفاده از روش‌های مصنوعی فعال‌سازی تخمک باشند (۵۶).

آیا روش‌هایی جهت بررسی توانایی فعال‌سازی تخمک بر روی نمونه‌ی سمن افراد قبل از انجام ICSI وجود دارد؟

همان طور که اشاره شد تنها بیماران خاصی هستند که قبل از انجام عمل ICSI می‌توان آن‌ها را کاندیدای استفاده از روش‌های مصنوعی فعال‌سازی تخمک دانست و با استفاده از این روش‌ها شانس ایجاد لقاح را در این بیماران افزایش داد؛ اما در دسته‌ی دیگری از بیماران پس از انجام عمل ICSI، عدم دستیابی به لقاح یا میزان پایین لقاح مشخص می‌شود. این افراد می‌توانند کاندیدای انجام فعال‌سازی مصنوعی در سیکل‌های ICSI بعدی باشند. انجام عمل ICSI بسیار پر هزینه است و همچنین عدم دستیابی به لقاح می‌تواند یک تأثیر روانی و روحی بسیار بدی برای زوجین به همراه داشته باشد. بنابراین ایجاد یک تست کلینیکی جهت بررسی پتانسیل فعال‌سازی تخمک قبل از انجام عمل ICSI ضروری به نظر می‌رسد.

در ابتدا تست‌هایی که وضعیت آکروزوم و آنزیم‌های آن را مورد بررسی قرار می‌دهند مانند تست ژلاتینولیز و بررسی میزان آنزیم آکروزین با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری، مورد توجه قرار گرفت. در مطالعه‌ای که توسط نصر اصفهانی و همکاران انجام شد، نشان داده شد که میزان فعالیت آنزیم آکروزین با استفاده از تست ژلاتینولیز در بیماران کاندید ICSI با درصد لقاح رابطه‌ی مستقیم و معنی‌داری دارد. هر چند این نتایج گویای این امر بود که با کاهش در میزان لقاح پس از ICSI، میزان فعالیت آنزیم آکروزین اسپرم‌ها در نمونه‌ی سمن نیز کاهش می‌یابد، ولی نمی‌توان با استفاده از نتایج این تست پتانسیل فعال‌سازی تخمک را از قبل پیش‌بینی نمود (۶).

در مطالعه‌ی دیگری که توسط نصر اصفهانی و همکاران انجام شد، نشان داده شد که استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری جهت بررسی میزان فعالیت آنزیم آکروزین، می‌تواند به عنوان یک روش مناسب جهت پیش‌بینی پتانسیل فعال‌سازی تخمک استفاده شود، هر چند که نویسندگان این مقاله انجام مطالعات بیشتری را در این زمینه جهت تأیید نتایج به دست‌آمده ضروری دانسته‌اند (۶۴).

MOAT (Mouse oocyte activation test) یکی دیگر از روش‌هایی است که جهت بررسی پتانسیل فعال‌سازی تخمک توسط اسپرم مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این روش، اسپرم بیمار مورد نظر به داخل تخمک موش به روش ICSI تزریق می‌شود. تشکیل پیش هسته‌های نر و ماده می‌تواند پیشگویی‌کننده‌ی میزان لقاح پس از تکنیک ICSI باشد. هر چند این یک روش خوب جهت بررسی پتانسیل اسپرم‌ها در فعال‌سازی تخمک قبل از عمل ICSI می‌باشد، اما کاستی‌های بسیاری را نیز دارد. این تست نیاز به

داشتن لانه‌ی حیوانات در مراکز کلینیکی و یا تحقیقاتی دارد که این امر آلودگی‌های بسیاری را به همراه دارد. همچنین نیاز به پرسنل متخصص و هزینه‌های بالا جهت نگه‌داری از موش‌ها دارد (۶۵).

اما همان طور که اشاره شد، ζ PLC یکی از عوامل اصلی جهت شروع فعال‌سازی تخمک می‌باشد. بنابراین با بررسی نقص در وجود و یا عملکرد این پروتئین می‌توان پتانسیل فعال نمودن تخمک توسط نمونه‌ی اسپرم را پیش‌بینی نمود. به همین منظور آقاجانپور و همکاران نشان دادند که بررسی کمی میزان بیان mRNA فسفولیپاز زتا (ζ PLC) با استفاده از تکنیک Real-Time PCR می‌تواند یک تست کلینیکی مناسب جهت بررسی پتانسیل اسپرم‌ها در فعال نمودن تخمک، باشد. در این مطالعه میزان بیان ζ PLCدر بیمارانی که عدم دستیابی به لقاح را داشته‌اند در مقایسه با گروه بارور و همچنین در مقایسه با گروه بیمارانی که میزان لقاح بالا پس از ICSI داشته‌اند، کاهش محسوس و معنی‌داری داشته است. به نظر می‌رسد استفاده از این روش در مقابل روش MOAT مزایای بهتری داشت و می‌تواند نتایج قابل اعتمادی داشته باشد (۶۶).

نتیجه‌گیری

با توجه به مطالعات انجام‌شده به نظر می‌رسد استفاده از فعال‌سازی مصنوعی تخمک در برخی بیماران خاص مانند بیمارانی که در چرخه‌های قبلی ICSI عدم دستیابی به لقاح را داشته‌اند و یا بیماران دارای اسپرم با سر گرد (Globozoospermia) می‌تواند شانس ایجاد لقاح و دستیابی به حاملگی را در این بیماران افزایش دهد. همچنین ایجاد تست‌هایی که بتوان پتانسیل فعال نمودن تخمک را توسط اسپرم پیشگویی نماید، ضروری به نظر می‌رسد.

References

1. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet 1992; 340(8810): 17-8.
2. Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smitz J, et al. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1993; 8(7): 1061-6.
3. Emery BR, Wilcox AL, Aoki VW, Peterson CM, Carrell DT. In vitro oocyte maturation and subsequent delayed fertilization is associated with increased embryo aneuploidy. Fertil Steril 2005; 84(4): 1027-9.
4. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M. Relation between different human sperm nuclear maturity tests and in vitro fertilization. J Assist Reprod Genet 2001; 18(4): 219-25.
5. Razavi S, Nasr-Esfahani MH, Mardani M, Mafi A, Moghdam A. Effect of human sperm chromatin anomalies on fertilization outcome post-ICSI. Andrologia 2003; 35(4): 238-43.
6. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Tavalaee M. Failed fertilization after ICSI and spermiogenic defects. Fertil Steril 2008; 89(4): 892-8.
7. Swann K, Homa S, Carroll J. An inside job: the results of injecting whole sperm into eggs supports one view of signal transduction at fertilization. Hum Reprod 1994; 9(6): 978-80.
8. Flaherty SP, Payne D, Swann NJ, Mattews CD. Aetiology of failed and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1995; 10(10): 2623-9.
9. Swain JE, Pool TB. ART failure: oocyte contributions to unsuccessful fertilization. Hum Reprod Update 2008; 14(5): 431-46.
10. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neil JD, editors. The Physiology of Reproduction. 2nd ed. New York, NY: Raven Press; 1994. p. 189-317.
11. Ben-Yosef D, Shalgi R. Early ionic events in activation of the mammalian egg. Rev Reprod 1998; 3(2): 96-103.
12. Lawrence Y, Whitaker M, Swann K. Sperm-egg fusion is the prelude to the initial Ca2+ increase at fertilization in the mouse. Development 1997;

124(1): 233-41.
13. McGuinness OM, Moreton RB, Johnson MH, Berridge MJ. A direct measurement of increased divalent cation influx in fertilised mouse oocytes. Development 1996; 122(7): 2199-206.
14. Raz T, Shalgi R. Early events in mammalian egg activation. Hum Reprod 1998; 13(Suppl 4): 133-45.
15. Ducibella T, Huneau D, Angelichio E, Xu Z, Schultz RM, Kopf GS, et al. Egg-to-embryo transition is driven by differential responses to Ca(2+) oscillation number. Dev Biol 2002; 250(2): 280-91.
16. Runft LL, Jaffe LA, Mehlmann LM. Egg activation at fertilization: where it all begins. Dev Biol 2002; 245(2): 237-54.
17. Parrington J, Jones ML, Tunwell R, Devader C, Katan M, Swann K. Phospholipase C isoforms in mammalian spermatozoa: potential components of the sperm factor that causes Ca2+ release in eggs. Reproduction 2002; 123(1): 31-9.
18. Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, et al. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development. Development 2002; 129(15): 3533-44.
19. Yu Y, Nomikos M, Theodoridou M, Nounesis G, Lai FA, Swann K. PLCzeta causes Ca(2+) oscillations in mouse eggs by targeting intracellular and not plasma membrane PI(4,5)P(2). Mol Biol Cell 2012; 23(2): 371-80.
20. Wu AT, Sutovsky P, Manandhar G, Xu W, Katayama M, Day BN, et al. PAWP, a sperm-specific WW domain-binding protein, promotes meiotic resumption and pronuclear development during fertilization. J Biol Chem 2007; 282(16): 12164-75.
21. Alberio R, Zakhartchenko V, Motlik J, Wolf E. Mammalian oocyte activation: lessons from the sperm and implications for nuclear transfer. Int J Dev Biol 2001; 45(7): 797-809.
22. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Javdan Z, Tavalaee M. Artificial oocyte activation in severe teratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 2008; 90(6): 2231-7.
23. Kawamura T. Artificial parthenogenesis in the frog. I. Chromosome numbers and their relation to cleavage histories. J Sci Hiroshima Univ Ser B1 1939; (6): 115-218.
24. Machaty Z, Funahashi H, Mayes MA, Day BN, Prather RS. Effects of injecting calcium chloride into in vitro-matured porcine oocytes. Biol Reprod 1996; 54(2): 316-22.
25. Dirican EK, Isik A, Vicdan K, Sozen E, Suludere Z. Clinical pregnancies and livebirths achieved by intracytoplasmic injection of round headed acrosomeless spermatozoa with and without oocyte activation in familial globozoospermia: case report. Asian J Androl 2008; 10(2): 332-6.
26. Darabi M, Nasresfahani Mh, Imani H, Baharvand H. Electrical Activation of Post-Intracytoplasmic Severly Amorphous-Sperm Injection Improve Fertilization and Embryo Development. Cell Journal (Yakhteh) 2003; 5(19): 171-5. [In Persian].
27. Hosseini SM, Hajian M, Moulavi F, Shahverdi AH, Nasr-Esfahani MH. Optimized combined electrical-chemical parthenogenetic activation for in vitro matured bovine oocytes. Anim Reprod Sci 2008; 108(1-2): 122-33.
28. Yanagida K, Katayose H, Yazawa H, Kimura Y, Sato A, Yanagimachi H, et al. Successful fertilization and pregnancy following ICSI and electrical oocyte activation. Hum Reprod 1999; 14(5): 1307-11.
29. Zhang J, Wang CW, Blaszcyzk A, Grifo JA, Ozil J, Haberman E, et al. Electrical activation and in vitro development of human oocytes that fail to fertilize after intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 1999; 72(3): 509-12.
30. Mansour R, Fahmy I, Tawab NA, Kamal A, El-Demery Y, Aboulghar M, et al. Electrical activation of oocytes after intracytoplasmic sperm injection: a controlled randomized study. Fertil Steril 2009; 91(1): 133-9.
31. Koo OJ, Jang G, Kwon DK, Kang JT, Kwon OS, Park HJ, et al. Electrical activation induces reactive oxygen species in porcine embryos. Theriogenology 2008; 70(7): 1111-8.
32. Presicce GA, Yang X. Parthenogenetic development of bovine oocytes matured in vitro for 24 hr and activated by ethanol and cycloheximide. Mol Reprod Dev 1994; 38(4): 380-5.
33. Kline D, Kline JT. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. Dev Biol 1992; 149(1): 80-9.
34. Meo SC, Yamazaki W, Ferreira CR, Perecin F, Saraiva NZ, Leal CL, et al. Parthenogenetic activation of bovine oocytes using single and combined strontium, ionomycin and 6-dimethylaminopurine treatments. Zygote 2007; 15(4): 295-306.
35. De SP, Dozortsev D, Cieslak J, Wolf G, Verlinsky Y, Dyban A. Parthenogenetic activation of human oocytes by puromycin. J Assist Reprod Genet 1992; 9(4): 328-37.
36. Yanagida K, Morozumi K, Katayose H, Hayashi S, Sato A. Successful pregnancy after ICSI with strontium oocyte activation in low rates of

fertilization. Reprod Biomed Online 2006; 13(6): 801-6.
37. Cuthbertson KS, Cobbold PH. Phorbol ester and sperm activate mouse oocytes by inducing sustained oscillations in cell Ca2+. Nature 1985; 316(6028): 541-2.
38. Fissore RA, Robl JM. Sperm, inositol trisphosphate, and thimerosal-induced intracellular Ca2+ elevations in rabbit eggs. Dev Biol 1993; 159(1): 122-30.
39. Yamano S, Nakagawa K, Nakasaka H, Aono T. Fertilization failure and oocyte activation. J Med Invest 2000; 47(1-2): 1-8.
40. Battaglia DE, Koehler JK, Klein NA, Tucker MJ. Failure of oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection using round-headed sperm. Fertil Steril 1997; 68(1): 118-22.
41. Rybouchkin AV, Van der Straeten F, Quatacker J, De SP, Dhont M. Fertilization and pregnancy after assisted oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection in a case of round-headed sperm associated with deficient oocyte activation capacity. Fertil Steril 1997; 68(6): 1144-7.
42. Kim ST, Cha YB, Park JM, Gye MC. Successful pregnancy and delivery from frozen-thawed embryos after intracytoplasmic sperm injection using round-headed spermatozoa and assisted oocyte activation in a globozoospermic patient with mosaic Down syndrome. Fertil Steril 2001; 75(2): 445-7.
43. Eldar-Geva T, Brooks B, Margalioth EJ, Zylber-Haran E, Gal M, Silber SJ. Successful pregnancy and delivery after calcium ionophore oocyte activation in a normozoospermic patient with previous repeated failed fertilization after intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 2003; 79(Suppl 3): 1656-8.
44. Chi HJ, Koo JJ, Song SJ, Lee JY, Chang SS. Successful fertilization and pregnancy after intracytoplasmic sperm injection and oocyte activation with calcium ionophore in a normozoospermic patient with extremely low fertilization rates in intracytoplasmic sperm injection cycles. Fertil Steril 2004; 82(2): 475-7.
45. Murase Y, Araki Y, Mizuno S, Kawaguchi C, Naito M, Yoshizawa M, et al. Pregnancy following chemical activation of oocytes in a couple with repeated failure of fertilization using ICSI: case report. Hum Reprod 2004; 19(7): 1604-7.
46. Ahmady A, Michael E. Successful pregnancy and delivery following intracytoplasmic injection of frozen-thawed nonviable testicular sperm and oocyte activation with calcium ionophore. J Androl 2007; 28(1): 13-4.
47. Check JH, Levito MC, Summers-Chase D, Marmar J, Barci H. A comparison of the efficacy of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using ejaculated sperm selected by high magnification versus ICSI with testicular sperm both followed by oocyte activation with calcium ionophore. Clin Exp Obstet Gynecol 2007; 34(2): 111-2.
48. Tejera A, Molla M, Muriel L, Remohi J, Pellicer A, De Pablo JL. Successful pregnancy and childbirth after intracytoplasmic sperm injection with calcium ionophore oocyte activation in a globozoospermic patient. Fertil Steril 2008; 90(4): 1202-5.
49. Dirican EK, Isik A, Vicdan K, Sozen E, Suludere Z. Clinical pregnancies and livebirths achieved by intracytoplasmic injection of round headed acrosomeless spermatozoa with and without oocyte activation in familial globozoospermia: case report. Asian J Androl 2008; 10(2): 332-6.
50. Tesarik J, Sousa M. More than 90% fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection and artificial induction of oocyte activation with calcium ionophore. Fertil Steril 1995; 63(2): 343-9.
51. Tesarik J, Mendoza C, Greco E. The activity (calcium oscillator?) responsible for human oocyte activation after injection with round spermatids is associated with spermatid nuclei. Fertil Steril 2000; 74(6): 1245-7.
52. Nakagawa K, Yamano S, Moride N, Yamashita M, Yoshizawa M, Aono T. Effect of activation with Ca ionophore A23187 and puromycin on the development of human oocytes that failed to fertilize after intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 2001; 76(1): 148-52.
53. Heindryckx B, Van der Elst J, De Sutter P, Dhont M. Treatment option for sperm- or oocyte-related fertilization failure: assisted oocyte activation following diagnostic heterologous ICSI. Hum Reprod 2005; 20(8): 2237-41.
54. Lu Q, Zhao Y, Gao X, Li Y, Ma S, Mullen S, et al. Combination of calcium ionophore A23187 with puromycin salvages human unfertilized oocytes after ICSI. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2006; 126(1): 72-6.
55. Moaz MN, Khattab S, Foutouh IA, Mohsen EA. Chemical activation of oocytes in different types of sperm abnormalities in cases of low or failed fertilization after ICSI: a prospective pilot study. Reprod Biomed Online 2006; 13(6): 791-4.
56. Borges E Jr, de Almeida Ferreira Braga DP, de Sousa Bonetti TC, Iaconelli A, Jr., Franco JG, Jr. Artificial oocyte activation with calcium ionophore A23187 in intracytoplasmic sperm

57. Heindryckx B, De Gheselle S, Gerris J, Dhont M, De Sutter P. Efficiency of assisted oocyte activation as a solution for failed intracytoplasmic sperm injection. Reprod Biomed Online 2008; 17(5): 662-8.
58. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Javdan Z, Tavalaee M. Artificial oocyte activation in severe teratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 2008; 90(6): 2231-7.
59. Kyono K, Kumagai S, Nishinaka C, Nakajo Y, Uto H, Toya M, et al. Birth and follow-up of babies born following ICSI using $SrCl_2$ oocyte activation. Reprod Biomed Online 2008; 17(1): 53-8.
60. Bridges PJ, Jeoung M, Kim H, Kim JH, Lee DR, Ko C, et al. Methodology matters: IVF versus ICSI and embryonic gene expression. Reprod Biomed Online 2011; 23(2): 234-44.
61. Deemeh MR, Tavalaee M, Ahmadi M, Kalantari A, Nasr-Esfahani MH. Health of children born through ICSI and artificial oocyte activation. Hum Reprod 2013. [In Press].
62. Dam AH, Feenstra I, Westphal JR, Ramos L, van Golde RJ, Kremer JA. Globozoospermia revisited. Hum Reprod Update 2007; 13(1): 63-75.
63. Razavi Sh, Nasr Esfahani MH, Tavalee M, Deemeh MR. Evaluation of Protamine Deficiency and DNA Fragmentation in Two Globozoospermia Patients Undergoing ICSI. International Journal of Fertility & Sterility 2007; 1(2): 85-8.
64. Nasr-Esfahani MH, Tavalaee M, Deemeh MR, Arbabian M, Parrington J. Can Assessment of Total Acrosin Activity Help Predict Failed or Low Fertilization Rate ICSI for Implementation of Artificial Oocyte Activation? The Open Andrology Journal 2010; 2: 19-26.
65. Rybouchkin A, Dozortsev D, Pelinck MJ, De SP, Dhont M. Analysis of the oocyte activating capacity and chromosomal complement of round-headed human spermatozoa by their injection into mouse oocytes. Hum Reprod 1996; 11(10): 2170-5.
66. Aghajanpour S, Ghaedi K, Salamian A, Deemeh MR, Tavalaee M, Moshtaghian J, et al. Quantitative expression of phospholipase C zeta, as an index to assess fertilization potential of a semen sample. Hum Reprod 2011; 26(11): 2950-6.

Journal of Isfahan Medical School Received: 18.11.2012

Vol. 31, No. 240, 2nd Week, August 2013 Accepted: 25.05.2013

Artificial Oocyte Activation: Methods and Clinical Efficiency after Intra-Cytoplasmic Sperm Injection

Mohammad Reza Deemeh MSc[1], Marzieh Tavalaee MSc[2], Mohammad Hossein Nasr-Esfahani PhD[3]

Review Article

Abstract

Background: Failed fertilization is a rare event occurring after intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI). Failure of oocyte activation considered as main reason for failed fertilization. For overcome of failed fertilization, Artificial Oocyte Activation (AOA) techniques after ICSI are applied and improved. This review article is a brief introduction to oocyte activation, followed by description of the methods for AOA and related concern regarding AOA. Also, the clinical effect of using AOA in different type of infertile individual was considered.

Methods: Literature search in Entrez PubMed as well as other data sources from1930 to 2012 was done.

Findings: Mechanical, electrical and chemical methods mainly used for AOA and chemical activation methods as the most commonly were performed. Also, using AOA after ICSI, fertilization rate was increased and possibly achieved pregnancy in some infertile individuals.

Conclusion: AOA in some type of infertile individual increased fertilization rate and achieving pregnancy. Although, some techniques may be useful for predict and assessment of semen fertilization potential, but further studies are required for establishing method of this purpose.

Keywords: Intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI), Failed fertilization, Oocyte activation

Citation: Deemeh MR, Tavalaee M, M Nasr-Esfahani MH. **Artificial Oocyte Activation: Methods and Clinical Efficiency after Intra-Cytoplasmic Sperm Injection.** J Isfahan Med Sch 2013; 31(240): 851-66

1- Department of Reproductive Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, Academic Center for Education, Culture and Researc (ACECR) AND Isfahan Fertility and Infertility Center, Isfahan, Iran
2- PhD Student AND Faculty Member, Department of Reproductive Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, Academic Center for Education, Culture and Researc (ACECR), Isfahan, Iran
3- Associate Professor, Department of Reproductive Biotechnology, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, Academic Center for Education, Culture and Researc (ACECR) AND Isfahan Fertility and Infertility Center, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Mohammad Hossein Nasr-Esfahani PhD, Email: mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org