Journal of Animal Biology, Spring 2025; 17(3):39-50

ISSN: 1735-9724

Research Article

Evaluation of the Quality and Health of Embryos Resulting from In Vitro Maturation (IVM) under the Influence of Stem Cell Secretome

Hilda Rastegari[1], Nasim Hayati Roudbari[1]*, Somayeh Kazemnezhad[2], Soheila Ansaripour[2]

1- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Reproductive Biotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, Iran
*Corresponding author: hayati@iau.ac.ir

Received: 18 March 2025 Accepted: 13 April 2025

DOI:

Abstract

The role of mesenchymal stem cells (MSCs) is mainly dependent on their paracrine components, namely their secretome. The use of stem cells has been recognized as a novel approach in the treatment of infertility and in vitro oocyte maturation (IVM) and has shown promising results, especially in women with polycystic ovary syndrome (PCOS). However, the health of the resulting embryos remains a major challenge. In this study, menstrual blood stem cell secretome was used for in vitro oocyte maturation in 100 patients with PCOS, and the health of the embryos was assessed by preimplantation genetic screening for aneuploidy (PGT-A). The resulting embryos were cultured to the blastocyst stage and their chromosomal status was assessed by next-generation sequencing (NGS). The results showed that the total number of embryos produced did not differ significantly between the two groups. In the age group under 30 years, the difference in the total number of embryos between the control and experimental groups was not statistically significant, and although the percentage of high-quality embryos in the secretome group increased compared to the control group, this difference was not statistically significant ($p = 0.207$). In the age group over 30 years, the number of embryos between the two groups was not significantly different, but the percentage of high-quality embryos in the secretome group was significantly higher than the control group. Also, in people over 30 years, the quality of the embryos improved and there was no significant difference in terms of aneuploidy, euploidy, and mosaicism. IVM had no significant effect on the health of the embryos in terms of aneuploidy and mosaicism. These findings indicate the safety and efficacy of the in vitro maturation method of oocytes using stem cell secretome in the treatment of infertility.

Keywords: Stem cells, In Vitro Maturations, Polycystic Ovary, Preimplantation Genetic Screening, aneuploidy.

زیست‌شناسی جانوری، سال هفدهم، شماره سوم، بهار ۱٤۰٤، صفحات ۵۰-۳۹

ISSN:۱۷۳۵-۹۷۲٤

مقاله پژوهشی

ارزیابی کیفیت و سلامت جنین‌های حاصل از بلوغ آزمایشگاهی تخمک (IVM) تحت تأثیر سکرتوم سلول‌های بنیادی

هیلدا رستگاری[۱]، نسیم حیاتی رودباری[۱*]، سمیه کاظم‌نژاد[۲]، سهیلا انصاری‌پور[۲]

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی تولیدمثل، پژوهشگاه فن‌آوری‌های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی، ابن سینا، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: hayati@iau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱٤۰۳/۱۲/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱٤۰٤/۰۲/۱۹

DOI:

چکیده

نقش سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) عمدتاً به اجزای پاراکرین آن‌ها، یعنی سکرتوم آن‌ها بستگی دارد. استفاده از سلول‌های بنیادی به‌عنوان روشی نوین در درمان ناباروری و بلوغ آزمایشگاهی تخمک (IVM) شناخته شده و نتایج امیدوارکننده‌ای به‌ویژه در زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS) نشان داده است. با این حال، سلامت جنین‌های حاصل یکی از چالش‌های مهم است. در این مطالعه، سکرتوم سلول‌های بنیادی خون قاعدگی برای بلوغ آزمایشگاهی تخمک در ۱۰۰ بیمار مبتلا به PCOS استفاده شد و سلامت جنین‌ها با روش غربالگری ژنتیکی پیش از لانه‌گزینی برای آنیوپلوئیدی (PGT-A) بررسی گردید. جنین‌های حاصل تا مرحله بلاستوسیست کشت داده شدند و وضعیت کروموزومی آن‌ها با تکنیک توالی‌یابی نسل جدید (NGS) بررسی شد. نتایج نشان داد که تعداد کل جنین‌های حاصل بین دو گروه اختلاف معنی‌داری نشان نداد. در گروه سنی زیر ۳۰ سال، اختلاف در تعداد کل جنین‌ها بین گروه کنترل و آزمایش از نظر آماری معنی‌دار نبود و با اینکه درصد جنین‌های با کیفیت عالی در گروه سکرتوم نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد، اما این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود (p = ۰/۲۰۷). در گروه سنی بالای ۳۰ سال، تعداد جنین‌ها بین دو گروه دارای اختلاف معنی‌دار نبود اما درصد جنین‌های با کیفیت عالی در گروه سکرتوم نسبت به گروه کنترل بطور قابل توجهی بیشتر بود. همچنین در افراد بالای ۳۰ سال، کیفیت جنین‌ها بهبود یافت و تفاوت معنی‌داری از نظر آنوپلوئیدی، یوپلوئیدی و موزاییسم وجود نداشت. IVM تأثیر معنی‌داری بر سلامت جنین‌ها از نظر آنوپلوئیدی و موزاییسم نداشت. این یافته‌ها حاکی از ایمنی و کارایی روش بلوغ آزمایشگاهی تخمک با استفاده از سکرتوم سلول‌های بنیادی در درمان ناباروری است.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی، بلوغ آزمایشگاهی تخمک، تخمدان پلی‌کیستیک، غربالگری ژنتیکی پیش از لانه‌گزینی، آنوپلوئیدی.

مقدمه

فاکتورهای پاراکرینی ترشح شده یا سکرتوم سلول-های بنیادی به طور رو به افزایشی به‌عنوان عاملی برای بازسازی بافت مورد قبول قرار گرفته‌اند. این فاکتورها شامل طیفی از پروتئین‌ها، لیپیدها، میکروRNAها و وزیکول‌های خارج‌سلولی مانند اگزوزوم‌ها و میکروذره‌ها هستند. بلوغ آزمایشگاهی تخمک یا IVM (In Vitro Maturation) یک انتخاب مناسب برای زنانی که پاسخ ضعیفی به درمان

گنادوتروپین می‌دهند، دارای ذخیره تخمدان پایین و نارسایی زودرس تخمدان هستند و به ویژه بیماران با سندرم تخمدان پلی‌کیستیک (PCOS: Polycystic Ovary Syndrome) می‌باشد (۱). حدود ۱۵ درصد از تخمک‌های حاصل از سیکل‌های روش‌های کمکی درمان ناباروری (ART Assisted Reproductive Technologies:) نابالغ هستند (۲). با این حال، کیفیت تخمک‌های بالغ شده در محیط آزمایشگاه اغلب پایین‌تر از تخمک‌های بالغ شده در بدن است، که این امر می‌تواند منجر به کاهش نرخ لقاح و کیفیت جنین شود. به همین دلیل، بهبود محیط کشت IVM به عنوان یک چالش مهم در تحقیقات تولیدمثل مطرح شده است. استفاده از سلول‌های بنیادی در فرآیند IVM به عنوان یک روش نویدبخش در درمان ناباروری مطرح شده است (۳). سلول‌های بنیادی با توانایی تمایز به انواع سلول‌ها و ترشح فاکتورهای رشد، می‌توانند محیطی مناسب برای بلوغ تخمک‌ها فراهم کنند. استفاده از سکرتوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC-CM) به عنوان یک افزودنی به محیط کشت IVM، به دلیل توانایی آن در تأمین فاکتورهای رشد و سایر مولکول‌های ضروری، می‌تواند راهکاری امیدوارکننده برای بهبود بلوغ تخمک و کیفیت جنین باشد که در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است (٤، ۵). در شرایط سنتی، محیط‌های کشت IVM به دلیل کمبود برخی فاکتورهای زیستی، اغلب قادر به فراهم‌آوری شرایط ایده‌آل برای بلوغ هسته‌ای و سیتوپلاسمی تخمک نیستند. مطالعات جدید نشان داده‌اند که افزودن سکرتوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌تواند این نواقص را جبران نموده و باعث افزایش نرخ بلوغ تخمک، بهبود کیفیت جنین و افزایش بیان ژن‌های مرتبط با تکثیر و تمایز سلولی شود. برای مثال، پژوهش‌های انجام‌شده بر روی مدل‌های حیوانی و انسانی نشان داده است که افزودن سکرتوم MSCs به محیط کشت IVM منجر به افزایش بلوغ تخمک و بهبود پارامترهای جنینی مانند تعداد سلول‌های جداره بلاستوسیست و کاهش آپوپتوز می‌شود (٦، ۷). علاوه بر این برخی از تحقیقات تأیید کرده‌اند که محیط‌های غنی‌شده با کاندیشن مدیوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) میزان تولید جنین‌های با کیفیت بالاتر را افزایش داده است (۸، ۹). یکی از منابع سلولی که اخیرا بواسطه دسترسی آسان و غیرتهاجمی و توانایی تمایز به انواع سلول‌ها، به‌عنوان منبعی ارزشمند در پزشکی بازساختی و درمان بیماری‌های زنان مورد توجه قرار گرفته سلول‌های بنیادی مشتق از خون قاعدگی (MenSCs) است. سکرتوم این سلول‌ها که حاوی فاکتورهای رشد، سیتوکین‌ها و اگزوزوم‌ها است، به‌عنوان یک ماده غنی‌ساز برای بهبود بلوغ تخمک و کیفیت جنین مورد بررسی قرار گرفته که نتایج امیدبخشی داشته است (٤). از سوی دیگر، پتانسیل لانه‌گزینی جنین‌های انسانی همچنان پایین است. یکی از دلایل این است که جنین‌های انسانی تولید شده در محیط آزمایشگاه ممکن است از نظر کروموزومی غیرطبیعی باشند، در حالی که انتخاب جنین‌ها بر اساس معیارهای مورفولوژیکی همیشه روشی قطعی برای تشخیص قابلیت باروری و رشد تخمک و جنین نیست. در مطالعه‌ای بر روی بیش از ٦۰۰۰ جنین نشان داده شد که ناهنجاری‌های کروموزومی فارغ از سن مادر و مورفولوژی جنین به طور گسترده‌ای وجود دارند. متأسفانه، ارزیابی سیتوژنتیک با آزمایش اجسام قطبی و بلاستومرها اطلاعات کمی در مورد فرآیندهای ژنتیکی که در تخمک رخ می‌دهند، ارائه می‌دهد. همچنین، ارتباط بین مورفولوژی جنین و آنوپلوئیدی همچنان نامشخص است (۱۰). آنوپلوئیدی شایع‌ترین نوع ناهنجاری کروموزومی و عامل شکست لانه‌گزینی و

سقط جنین است. تشخیص ژنتیکی پیش از لانه‌گزینی یا PGD (Preimplantation Genetic Diagnosis) و غربال‌گری ژنتیکی پیش از لانه‌گزینی یا PGS (Preimplantation Genetic Screening) می‌توانند منجر به افزایش نرخ بارداری در IVF و تولد نوزادان سالم بیشتر شوند. با این حال اطلاعات کمی در مورد فراوانی آنوپلوئیدی در جنین‌های تولید شده از طریق IVM، وجود دارد و همواره نگرانی‌هایی در مورد تأثیرات احتمالی این روش بر سلامت جنین وجود دارد. مطالعات نشان داده‌اند که جنین‌های حاصل از تخمک‌های بلوغ‌یافته در محیط آزمایشگاهی ممکن است با افزایش خطر ناهنجاری‌های ژنتیکی، اختلالات متیلاسیون DNA و مشکلات تکوینی مواجه شوند (۱۱) که می‌توانند ناشی از تغییرات اپی‌ژنتیکی یا استرس‌های محیطی در طول فرآیند IVM باشند. علاوه بر این، تخمک‌های نابالغ به دست آمده در سیکل ICSI دور انداخته می‌شوند در حالی که شواهد قابل استنادی مبنی بر نرخ بالاتر آنوپلوئیدی بر اساس وضعیت بلوغ تخمک‌ها در روز تخمک‌گیری وجود ندارد. برخی مطالعات روی جنین‌های انسانی تولید شده با ART، نرخ بالای آنوپلوئیدی را با استفاده از PGS نشان داده‌اند. همچنین، PGS اغلب برای بررسی میزان آنوپلوئیدی در جنین‌های IVM، در افرادی که به دلیل سابقه سقط مکرر کاندیدای غربالگری ژنتیکی بودند، استفاده می‌شد. امروزه روش‌های پیشرفته‌ای مانند توالی‌یابی نسل جدید یا NGS (Next Generation Sequencing) مورد استفاده قرار می‌گیرند. تاکنون مطالعه موردی-شاهدی در مورد سلامت جنین‌های حاصل از تخمک‌های بالغ شده در آزمایشگاه با استفاده از سکرتوم سلول‌های بنیادی، منتشر نشده است. بنابراین، هدف این مطالعه بررسی کیفیت جنین و نرخ آنوپلوئیدی در جنین‌های بلاستوسیست تکوین یافته از تخمک‌های حاصل از بلوغ آزمایشگاهی با استفاده از سکرتوم سلول‌های بنیادی حاصل از خون قاعدگی بود (۵، ٦، ۱۲).

مواد و روش‌ها

شرکت‌کننده‌ها: این مطالعه به بررسی تأثیر محیط کشت غنی‌شده با سکرتوم سلول‌های بنیادی بر کیفیت و سلامت جنین‌های حاصل از بلوغ آزمایشگاهی تخمک در بیماران مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک پرداخته است. در این پژوهش، ۱۰۰ بیمار با بازه سنی ۲۰ تا ٤۰ سال که بر اساس معیارهای تعیین‌شده توسط انجمن تولیدمثل انسان و جنین‌شناسی اروپا (روتردام) و انجمن پزشکی تولیدمثل آمریکا (۲۰۰۳) تشخیص PCOS دریافت کرده بودند، در مرکز ابن‌سینا تحت درمان IVF قرار گرفتند. جنین‌های حاصل از تخمک‌های بالغ شده به روش بلوغ آزمایشگاهی در دو گروه کنترل و گروه کشت غنی‌شده با سکرتوم سلول‌های بنیادی از نظر کیفیت و سلامت مورد ارزیابی قرار گرفتند. پیش از آغاز مطالعه، به تمام شرکت‌کنندگان اطلاعات کامل درباره شرایط پژوهش ارائه شد و رضایت آگاهانه کتبی از آنان اخذ گردید.

بلوغ آزمایشگاهی تخمک (IVM): بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های نابالغ حاصل از سیکل IVF با استفاده از سکرتوم حاصل از سلول‌های بنیادی خون قاعدگی تهیه شده از بانک سلول پژوهشگاه ابن سینا انجام شد. سکرتوم سلولی طبق پروتکل استفاده شده توسط فتحی کازرونی و همکاران تهیه شد (٦). پس از ذوب سلول‌های بنیادی در محیط کشت DMEM-F12 حاوی Dulbecco's platelet lysate کشت داده شدند تا به تراکم ۷۰ درصد رسیدند. پس از دور ریختن محیط اضافی، سلول‌ها در محیط DMEM-F12 بدون فنول قرار داده شدند و به مدت ٤۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط ۵ درصد

دی‌اکسید کربن انکوبه شدند. سپس، مایع رویی از فیلتر سرنگ ۰/۲ میکرومتری عبور داده شد و درنهایت، بخش محلول جمع‌آوری شده و در میکروتیوب‌های ۵ میلی‌لیتری بسته‌بندی و ذخیره گردید. تخمک‌های نابالغ در مرحله ژرمینال وزیکل (GV) تازه به‌دست‌آمده از عمل تخمک‌گیری از زنان مبتلا به تخمدان پلی‌کیستیک که کیفیت قابل قبولی داشتند در دو گروه سکرتوم حاوی ٤۰ درصد سکرتوم +٦۰ درصد محیط کلیو و گروه کنترل (محیط کلیو که محیط روتین و پایه آزمایشگاه برای کشت و بلوغ تخمک می‌باشد) با غلظت مشابه مطالعات انجام شده (۱۳، ۱٤) در شرایط ٦درصد CO2 و ۲۰درصد اکسیژن کشت داده شدند.

لقاح و کشت جنین: تخمک‌های بالغ شده حاصل از لقاح آزمایشگاهی بعد از تزریق توسط اسپرم به روش داخل سیتوپلاسمی یا ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection) در دو گروه کنترل و سکرتوم در انکوباتور دمای ۳ درجه و میزان CO2 ٦ درصد در محیط Cleav کشت داده شدند و جنین‌های حاصل بعد از ۷۲ ساعت در روز سوم در مرحله کلیواژ و با تعویض محیط کشت به Blast بعد از ۱۲۰ ساعت در روز پنجم کشت در مرحله بلاستوسیست از نظر تکوین جنین و کیفیت با استفاده از استریو میکروسکوپ (Nikon, SMZ800N, Japan) مورد ارزیابی قرار گرفته و بین دو گروه مقایسه شدند.

بررسی ژنتیکی پیش از لانه‌گزینی برای آنیوپلوئیدی یا PGT-A به کمک NGS: همه جنین‌های تشکیل شده در محیط Blast شرکت Origio تا روز پنجم و رسیدن به مرحله بلاستوسیست کشت داده شدند و جنین‌هایی که در هر دو گروه به این مرحله رسیدند با استفاده از روش هچینگ کمکی (Assisted Hatching) به کمک لیزر هچ شدند و بر اساس سیستم درجه‌بندی گاردنر (۱۵) از نظر میزان انبساط، کیفیت توده سلولی داخلی و تروفکتودرم (TE) مورد ارزیابی قرار گرفتند. بیوپسی TE روی بلاستوسیست‌های روز ۵ با درجه بهتر از ۳ BB انجام شد. ۵ تا ۱۰ سلول برای ازمایش ژنتیکی جمع‌آوری شد. از سلول‌های جمع اوری شده DNA استخراج شد. پس از آن، روش تکثیر کل ژنوم روی تمام نمونه‌های فردی و همچنین کنترل خالی انجام شد. مقدار غلظت واجد شرایط برای نمونه‌های فردی باید بین ۲۰ تا ۸۰ نانوگرم بر میکرولیتر باشد. برای بررسی آنیوپلوییدی از روش توالی‌یابی کل ژنوم یا WGS (Whole Genome Sequencing) آماده‌سازی کتابخانه با استفاده از نمونه‌های DNA که به صورت تصادفی به اندازه ۲۰۰ تا ۵۰۰ جفت باز قطعه‌قطعه شده بودند و از بلاستوسیست‌های بیوپسی‌شده در روز ۵ به دست آمده بودند (کیت توالی‌یابی Ion SingleSeq، شرکت Thermo Fisher Scientific) انجام شد. به انتهای قطعات DNA، آداپتورهای اختصاصی متصل شدند تا امکان توالی‌یابی در پلتفرم‌های توالی‌یابی نسل جدید (NGS) مانند Ion Torrent فراهم شود. آماده‌سازی نمونه و ایجاد قالب (Templating) روی دستگاه خودکار Ion Chef شرکت Thermo Fisher Scientific امریکا انجام شد. تراشه‌های قالب‌بندی‌شده با استفاده از سیستم Ion S5 توالی‌یابی شدند. تحلیل داده‌های حاصل از توالی‌یابی با نرم‌افزار Ion Reporterانجام شد. نتایج با ژنوم مرجع انسانی با استفاده از سایت https://www.pgxcloud.com هم‌تراز شدند. قابل توجه است که وضعیت پلوئیدی به عنوان یوپلوئید (با درصد آنوپلوئیدی کمتر از ۲۰ درصد)، آنوپلوئید (با درصد آنوپلوئیدی بیش از ۸۰ درصد) یا موزائیسم (با درصد آنوپلوئیدی بین۲۰ تا ۸۰ درصد) گزارش شد.

تجزیه و تحلیل آماری: با استفاده از SPSS نسخه ۱۸ و رسم نمودارها بوسیله نرم‌افزار Graphpad PRISM

9.4.1 انجام شد. برای مقایسه تعداد و کیفیت جنین‌ها بین دو گروه از نرم‌افزار SPSS و با توجه به کوچک بودن حجم نمونه از تست‌های Fisher's Exact Test و Mann-Whitney U Test استفاده شد. برای بررسی نتایج حاصل از PGT-A و تفاوت معنی‌داری بین درصد توزیع یوپلوئیدی، آنوپلوئیدی و موزاییسم در گروه کنترل و آزمایش، از آزمون آماری Chi-Square (کای-دو) استفاده شد.

نتایج

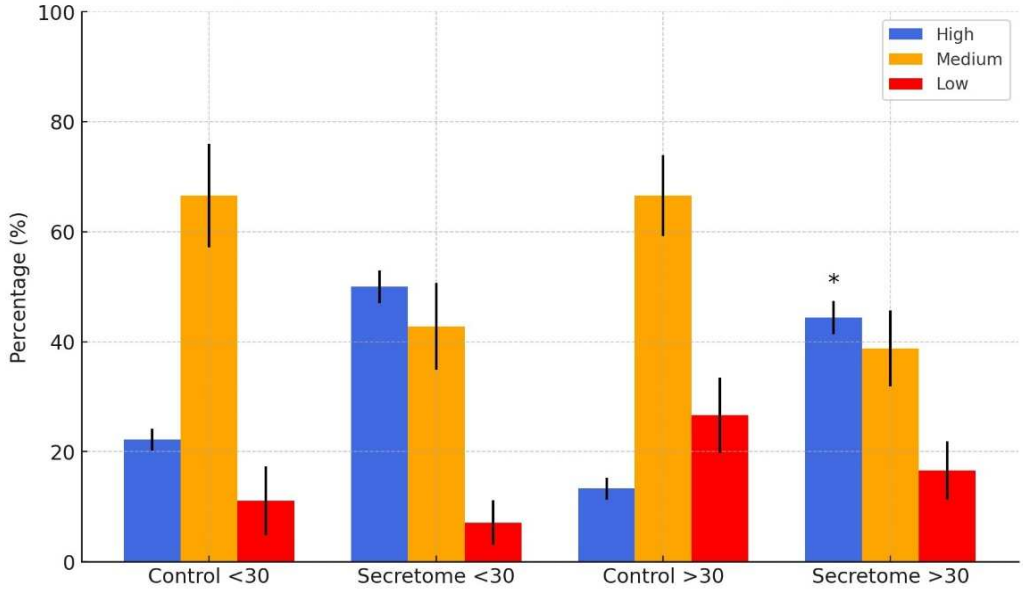
کیفیت جنین‌های مرحله کلیواژ در گروه سنی زیر ۳۰ و بالای ۳۰ سال: تأثیر استفاده از سکرتوم سلول‌های بنیادی بر افزایش تعداد و کیفیت جنین‌ها در دو گروه سنی (زیر ۳۰ سال و بالای ۳۰ سال) بررسی شد. جنین‌های حاصل از زنان با تخمدان پلی-کیستیک و میانگین سنی ۳/۷۵ ± ۳۲/۷۷ و هورمون آنتی‌مولرین بالاتر از ۳/۶۳ ± ٤/١٤ (نانوگرم/میلی‌لیتر) از نظر کیفیت ارزیابی شده و در دو گروه سنی زیر و بالای ۳۰ سال دسته‌بندی شدند. مقایسه تعداد کل جنین‌های حاصل بین دو گروه اختلاف معنی‌داری نشان نداد. در گروه سنی زیر ۳۰ سال، اختلاف در تعداد کل جنین‌ها بین گروه کنترل و آزمایش از نظر آماری معنی‌دار نبود (p = ۰/۰۸۲). همچنین درصد جنین‌های با کیفیت عالی در گروه آزمایش (۵۰ درصد) نسبت به گروه کنترل (۲۲/۲ درصد) افزایش نشان داد، اما این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود (p = ۰/۲۰۷). در گروه سنی بالای ۳۰ سال از نظر تعداد بین دو گروه اختلاف معنی‌دار نبود (p = ۰/۳۱۷) اما درصد جنین‌های با کیفیت عالی در گروه سکرتوم نسبت به گروه کنترل به طور قابل‌توجهی بیشتر بود (p = ۰/۰٤۹). در حالیکه در هر دو گروه سنی (زیر ۳۰ سال و بالای ۳۰ سال)، تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و سکرتوم در جنین‌های با کیفیت متوسط و بد مشاهده نشد (p > ۰/۰۵) (جدول۱، شکل ۱).

سلامت جنین‌ها: تفاوت کلی بین گروه کنترل و آزمایش از نظر توزیع یوپلوئیدی (p = ۰/۷٦)، آنوپلوئیدی (p = ۰/٦۵) و موزاییسم (p = ۰/۹۰) معنی‌دار نیست و IVM باعث افزایش معنی‌دار آنوپلوئیدی یا کاهش معنی‌دار یوپلوئیدی نشده است (p = ۰/۸۵). این نتایج نشان می‌دهد که IVM تأثیر معنی‌داری بر سلامت جنین‌ها از نظر آنوپلوئیدی و موزاییسم ندارد (جدول۱، شکل ۲).

جدول ۱- مقایسه ویژگی‌های جنین‌های حاصل در گروه‌های مداخله و گروه کنترل در گروه سنی زیر و بالای ۳۰ سال

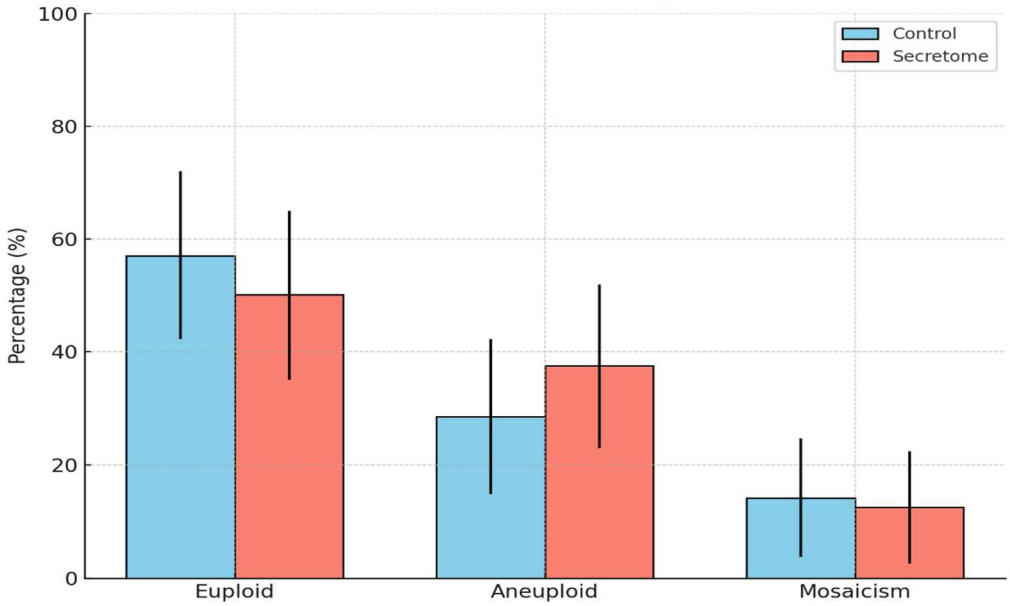
Table 1. Comparison of characteristics of embryos obtained in the intervention and control groups in the age group under and over 30 years

	Control < 30	Control > 30	Secretome < 30	Secretome > 30
Number of oocytes	100	100	100	100
Grade A embryos	2.9 (22.2%)	2.15(13.3%)	7.14 (50%)	8.18 (44.4%)
Grade B embryos	6.9 (66.6%)	10.15 (66.6 %)	6.14 (42.8 %)	7.18 (38.8%)
Grade B and C embryos	1.9 (11.1%)	4.15 (26.6%)	1.14 (7.1%)	3.18 (18.8%)
Aneuploid Blastocysts	(28.5 %) (ns)		(37.5 %) (ns)	
Euploid Blastocysts	(57.1%) (ns)		(50 %) (ns)	
Mosaicism Blastocysts	(14.2 %) (ns)		(12.5 %) (ns)	



شکل ۱- نمودار مقایسه کیفیت جنین‌های تکوین یافته در روز سوم کشت (مرحله کلیواژ) در گروه سکرتوم و کنترل بین زنان زیر ۳۰ سال و بالای ۳۰ سال. * نشان‌دهنده اختلاف $p \leq$ ۰/۰۵ نسبت به گروه کنترل می‌باشد. تعداد جنین‌ها به تعداد کل جنین‌ها در هر گروه بصورت درصد محاسبه شده است.

Fig 1. Graph comparing the quality of embryos developed on the third day of culture (cleavage stage) in the secretome and control groups between women under 30 years and over 30 years of age. * indicates a difference of $p \leq 0.05$ compared to the control group. The number of embryos was calculated as a percentage of the total number of embryos in each group.



شکل ۲- نمودار مقایسه سلامت جنین‌های تکوین یافته در روز پنجم کشت (مرحله بلاستوسیست) در گروه سکرتوم و کنترل. تعداد جنین‌ها به تعداد کل جنین‌ها در هر گروه بصورت درصد محاسبه شده است و اختلا بین گروه‌ها معنی‌دار نبود ($p >$ ۰/۰۵).

Fig 2. Graph comparing the health of embryos developed on the fifth day of culture (blastocyst stage) in the secretome and control groups. The number of embryos was calculated as a percentage of the total number of embryos in each group, and the difference between the groups was not significant ($p > 0.05$).

بحث

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که استفاده از سکرتوم سلول‌های بنیادی ممکن است به بهبود کیفیت جنین‌ها، به ویژه در بیماران بالای ۳۰ سال، کمک کند. این یافته با مطالعات قبلی همسو است که نشان داده‌اند سکرتوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC-CM) حاوی فاکتورهای رشد، سایتوکاین‌ها و miRNAهایی است که می‌توانند محیط تخمدان و رحم را برای بهبود کیفیت اووسیت‌ها و جنین‌ها بهینه کنند. تاثیر مثبت کاندیشن مدیوم حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در انواعی از بیماری‌ها و نیز بلوغ تخمک در مطالعات مختلف اثبات شده است که می‌تواند به مکانیسم‌های گسترده‌ای مربوط باشد (۱٦). همچنین در مطالعات جدید وجود وزیکل‌های خارج سلولی مترشحه از این سلول‌ها بویژه سلول‌های مشتق از خون قاعدگی مورد بحث می‌باشد که مکانیسم اثر آنها به این صورت است که می‌توانند بعنوان حامل-هایی برای مولکول‌های زیستی باشند که اثرات ذکر شده را القا کنند همچنین انواعی از لیپیدها و پروتیین-ها و RNA micro ها را در خود حمل می‌کنند (۱۷). به عنوان مثال، مکانیسم‌های مولکولی از طریق مسیرهای سیگنالینگ، مانند مسیر PI3K/AKT و MAPK/ERK، فاکتورهای رشد مانند IGF-1، VEGF و TGF-β موجود در سکرتوم می‌توانند باعث افزایش بلوغ اووسیت‌ها، بهبود تکثیر سلول‌های گرانولوزا و کاهش استرس اکسیداتیو شوند (۱۸). این مکانیسم‌ها ممکن است توضیح‌دهنده بهبود کیفیت جنین‌ها در گروه آزمایش باشد. در این راستا نتایج یک مطالعه حیوانی توسط امینی و همکاران نشان داد استفاده از مواد مغذی سلول‌های بنیادی خون قاعدگی در تشکیل جنین‌های بلاستوسیست با کیفیت تاثر گذار می‌باشد (۸). به این ترتیب، عدم معنی‌داری اختلاف در تعداد کل جنین‌ها ممکن است نشان‌دهنده این باشد که سکرتوم سلول‌های بنیادی بیشتر بر کیفیت جنین‌ها تأثیر می‌گذارد تا بر تعداد آن‌ها که این امر می‌تواند ناشی از عدم بلوغ سیتوپلاسمی تخمک‌ها باشد که منجر به کاهش نرخ بلوغ و در نتیجه تشکیل جنین خواهد شد (۱٤). همچنین، تفاوت نتایج بین دو گروه سنی ممکن است به دلیل کاهش ذخیره تخمدانی و افزایش استرس اکسیداتیو در بیماران بالای ۳۰ سال باشد، که باعث می‌شود این گروه بیشتر از تأثیرات ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی سکرتوم سلول‌های بنیادی مثل IL-10 و SOD بهره‌مند شوند. همچنین در مطالعه دیگر با استفاده از کاندیشن مدیوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی بهبود تشکیل جنین در مدل موشی گزارش شد و این امر می‌تواند به احتمال وجود اختلاف در ترکیبات کاندیشن مدیو و سکرتوم نیز نسبت داده شود. از سوی دیگر یکی از دلایل احتمالی عدم بهبود قابل‌توجه در تعداد و نیز کیفیت جنین در گروه سنی زیر ۳۰ سال می‌تواند حذف سلول‌های کومولوس در طی فرآیند بلوغ آزمایشگاهی باشد. سلول‌های کومولوس نقش حیاتی در بلوغ و کیفیت تخمک‌ها ایفا می‌کنند. این سلول‌ها از طریق اتصالات شکاف‌دار با تخمک‌ها در ارتباط بوده و تبادل مولکول‌های سیگنالینگ و مواد مغذی بین آن‌ها صورت می‌گیرد. حذف یا آسیب به این سلول‌ها می‌تواند منجر به کاهش کیفیت تخمک و در نتیجه کاهش کیفیت جنین شود (۱۹). اما چنانچه میدانیم مکانیسم‌های بین سلولی و ارتباط و تبادل بین سلول‌های گرانولوزا و تخمک تاثیر زیادی بر بلوغ تخمک و مسیرهای منجر به ان دارد اما در آزمایشگاه-های درمان ناباروری برای تشخیص مرحله بلوغ تخمک حذف این کمپلکس‌های سلولی از اطراف تخمک گریزناپذیر است. در همین راستا مطالعات دیگر نیز نشان داده‌اند که بیان ژن‌های خاص در

سلول‌های کومولوس با کیفیت تخمک و جنین مرتبط است. به عنوان مثال، افزایش بیان ژن‌های GDF9 و BMP15در سلول‌های کومولوس با بهبود بلوغ تخمک، لقاح و کیفیت جنین همراه بوده است (۲۰). بنابراین، در حالی که سکرتوم MSC ممکن است فاکتورهای ضروری برای بلوغ تخمک را فراهم کند، حذف سلول‌های کومولوس می‌تواند تأثیرات منفی بر کیفیت جنین داشته باشد. در نتیجه غنی‌سازی محیط IVM با استفاده از سکرتوم می‌تواند برای بلوغ هستهای مفید باشد اما از نظر مکانیسم‌های دخیل این امر کافی نیست تا دیسمتیالسیون ناشی از کشت IVM را جبران کند یا قابلیت رشد و پیشرفت جنین را پس از آن بهبود بخشد (۱٤). کیفیت جنین همیشه معیار کاملا دقیقی مبنی برای سلامت جنین نیست و مطالعات نشان میدهند که تنها معیار ظاهری نمی‌تواند تضمین کننده انتقال مثبت باشد. انتخاب یک جنین مناسب برای انتقال که منجر به یک لانه‌گزینی و بارداری موفق می‌شود در کلینیک‌های درمان ناباروری اهمیت بسزایی دارد اما جنین‌های یوپلوئید که دارای مجموعه کروموزومی طبیعی انسان شامل ٤٦ کروموزوم هستند، به‌طور ترجیحی برای انتقال انتخاب می‌شوند تا جنین‌های آنوپلوئید (مجموعه کروموزومی غیرطبیعی)، زیرا با نتایج بالینی بهتری همراه هستند. یکی از مباحث مورد توجه سلامت جنین‌های حاصل در آزمایشگاه است و بویژه با توجه به استفاده از تخمک‌های نابالغ و تاثیرات منفی احتمالی زمان کشت و محیط کشت های مورد استفاده برای بلوغ آزمایشگاهی تخمک بررسی سلامت جنین‌های حاصل از این روش‌ها برای استفاده کلینیکی و درمان ناباروری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است که مطالعات بسیار محدودی در این زمینه منتشر شده است. همچنین برخی بیماران به دلیل ناباروری با علت نامشخص و سقط برای بررسی آنیوپلوئیدی که یکی از دلایل مهم در شکست لانه‌گزینی است معرفی می‌شوند. اما نتایج این مطالعه نشان داد که از نظر میزان انیوپلوییدی و یوپلوییدی و همچنین جنین‌های موزاییک در گروه تیمار شده با سکرتوم سلول‌های بنیادی خون قاعدگی تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل وجود ندارد. به این معنی که ترکیبات موجود در محیط کشت بلوغ آزمایشگاهی تخمک نسبت به محیط تجاری روتین آزمایشگاه منجر به ایجاد ناهنجاری در جنین نمی‌شوند. علاوه بر این، اووسیت‌های نابالغ که در طول چرخه‌های IVF تحریک‌شده با گنادوتروپین بازیابی می‌شوند، معمولاً در کلینیک‌ها دور انداخته می‌شوند؛ در حالی که هیچ شواهد جامع و قابل استنادی مبنی بر نرخ بالاتر آنوپلوئیدی بر اساس وضعیت بلوغ اووسیت‌ها در روز بازیابی وجود ندارد (۲۱). همچنین در مطالعه دیگری همراستا با نتایج ما نشان داده شد که بلوغ آزمایشگاهی تخمک میزان تشکیل جنین‌های انیوپلوییدی را افزایش نداد (۹). و مطالعه ما نیز نشان داد تغییرات اپی‌ژنتیکی یا استرس‌های محیطی احتمالی در طول فرآیند IVM منجر به تشکیل جنین‌هایی با نرخ انیوپلوییدی بالاتر نشد که این امر می‌تواند ناشی از تاثیر آنتی‌اکسیدانی سکرتوم سلول‌های بنیادی خون قاعدگی باشد (۱۸، ۲۲). اما ارتباط بین مورفولوژی جنین و آنوپلوئیدی همچنان نامشخص است و برخی مطالعات نشان می‌دهند که صرفا انتخاب یک جنین بر اساس ویژگی‌های ظاهری با گرید خوب نمی‌تواند دلیلی بر سلامت جنین و لانه‌گزینی موفق شود و با توجه به کوچک بودن حجم نمونه مطالعه ما از نظر تعداد جنین‌های حاصل امکان بررسی ازتباط بین سن و سلامت و مورفولوژی جنین‌ها در این تحقیق وجود نداشت. در هر صورت باید در نظر گرفت که تخمک زنان PCO با وجود کاندید بودن برای مطالعات از نظر کیفیت در مقایسه با

افراد غیر پلی‌کیستیک در درجه پایینتری هستند و بر طبق نتایج برخی مطالعات بر نتایج بلوغ آزمایشگاهی تخمک و نرخ تشکیل جنین و کیفیت جنین‌های حاصل موثر خواهد بود اما طبق بررسی‌های انجام شده همسو با تحقیق ما، نمی‌تواند عامل قطعی موثر بر عدم سلامت جنین‌های حاصل باشد (۲۱). در نتیجه روش بلوغ آزمایشگاهی تخمک با استفاده از سلول‌های بنیادی برای درمان ناباروری همچنان می‌تواند در زنان دارای تخمدان پلی‌کیستیک به عنوان یک گزینه امید بخش در نظر گرفته شود (۲۳) و گرچه نتایج متناقضی در مورد ارزشمند بودن روش-های بیوپسی یک جنین برای بررسی وضعیت کروموزومی و وضعیت کشت جنین ارایه می‌شود اما در نهایت با اینکه ممکن است PGT-A یک تست مرسوم برای کمک به بیماران در سیکل IVF نباشد هر کلینیک باید اثربخشی استفاده از آن را بر اساس مهارت و محدودیت‌ها و بیمارانش ارزیابی کند (۲٤، ۲۵). اغلب مطالعات انجام شده گذشته‌نگر یا با سایز نمونه کوچک هستند در نتیجه برای حصول نتیجه‌ای قابل استنادتر مطالعات وسیع‌تر با جامعه آماری بزرگتر و یا استفاده از روش‌های غیرتهاجمی و بررسی سلامت بر اساس مورفولوژی به‌ویژه با استفاده از پلتفرم‌های هوش مصنوعی پیشنهاد می‌گردد که در طرح‌های آتی گروه ما مورد بررسی قرار خواهد گرفت. با توجه به شیوع نرخ انیوپلوییدی در جنین‌های آزمایشگاهی استفاده از روش‌های غربالگری با توجه به شرایط بیماران در کلینیک‌های درمان ناباروری در حصول نتایج بهتر توصیه می‌شود.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر تاثیر استفاده از سکرتوم سلول‌های بنیادی خون قاعدگی بر جنین‌های حاصل از بلوغ آزمایشگاهی تخمک مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان داد که استفاده از محیط کشت غنی شده با این ترکیب مغذی در گروه سنی بالای سی سال در بهبود کیفیت جنین موثر بود اما میزان ناهنجاری‌های کروموزومی (آنوپلوئیدی) را در جنین‌ها بواسطه تاثیرات کشت بیش از آنچه در سایر چرخه‌های درمان ناباروری گزارش شده است، افزایش نداد و نتایج این مطالعه همراستا با سایر تحقیقات بود. در نتیجه ترکیب IVMبا PGT-A می‌تواند دقت انتخاب جنین‌های سالم را افزایش داده و نتایج درمان را بهبود بخشد. استفاده از روش‌های غربالگری در کلینیک‌های درمان ناباروری با در نظر گرفتن شرایط بیمار برای افزایش نرخ لانه‌گزینی و همچنین مطالعات بیشتر در زمینه ارتباط بین مورفولوژی و سلامت جنین پیشنهاد می‌شود.

منابع

1. Walls M, Hunter T, Ryan JP, Keelan JA, Nathan E, Hart RJ. In vitro maturation as an alternative to standard in vitro fertilization for patients diagnosed with polycystic ovaries: a comparative analysis of fresh, frozen and cumulative cycle outcomes. Hum Reprod. 2015;30(1):88-96.

2. Halvaei I, Ali Khalili M, Razi MH, Nottola SA. The effect of immature oocytes quantity on the rates of oocytes maturity and morphology, fertilization, and embryo development in ICSI cycles. J Assist Reprod Genet. 2012;29:803-810.

3. Chen L, Qu J, Cheng T, Chen X, Xiang C. Menstrual blood-derived stem cells: toward therapeutic mechanisms, novel strategies, and future perspectives in the treatment of diseases. Stem Cell Res Ther. 2019;10(1):406.

4. Rastegari H, Kazemnejad S, Hayati Roodbari N, Ansaripour S. Role of menstrual blood stem cell-derived secretome, follicular fluid, and melatonin in oocyte maturation and embryo development in polycystic ovary syndrome. Curr Stem Cell Res Ther. 2025;20(3):291-301.

frozen embryo transfer: a cohort study of 337,148 in vitro fertilisation cycles. BMC Med. 2019;17(1):202.

12. Li J, Chen J, Sun T, Zhang S, Jiao T, Chian RC, Li Y, Xu Y. Chromosome aneuploidy analysis in embryos derived from in vivo and in vitro matured human oocytes. J Transl Med. 2021;19(1):416.

13. Jafarzadeh H, Nazarian H, Ghaffari Novin M, Shams Mofarahe Z, Eini F, Piryaei A., Improvement of oocyte in vitro maturation from mice with polycystic ovary syndrome by human mesenchymal stromal cell–conditioned media. J Cell Biochem. 2018;119(12):10365-10375.

14. Madkour A, Bouamoud N, Kaarouch I, Louanjli N, Saadani B, Assou S, Aboulmaouahib S, Sefrioui O, Amzazi S, Copin H, Benkhalifa M. Follicular fluid and supernatant from cultured cumulus-granulosa cells improve in vitro maturation in patients with polycystic ovarian syndrome. Fertil Steril. 2018;110(4):710-719.

15. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. Fertil Steril. 2000;73(6):1155-1158.

16. Chen L, Qu J, Xiang C. The multi-functional roles of menstrual blood-derived stem cells in regenerative medicine. Stem Cell Res Ther. 2019;10(1):1-10.

17. He Y, Chen D, Yang L, Hou Q, Ma H, Xu X. The therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells in premature ovarian failure. Stem Cell Res Ther. 2018;9(1):263.

18. Chen L, Qu J, Mei Q, Chen X, Fang Y, Chen L, Li Y, Xiang C. Small extracellular vesicles from menstrual blood-derived mesenchymal stem cells (MenSCs) as a novel therapeutic impetus in regenerative medicine. Stem Cell Res Ther. 2021;12(1):433.20.

5. Zafardoust S, Kazemnejad S, Darzi M, Fathi-Kazerooni M, Rastegari H, Mohammadzadeh A. Improvement of pregnancy rate and live birth rate in poor ovarian responders by intraovarian administration of autologous menstrual blood derived-mesenchymal stromal cells: phase I/II clinical trial. Stem Cell Reviews and Reports, 2020;16(4):755-763.

6. Fathi-Kazerooni M, Fattah-Ghazi S, Darzi M, Makarem J, Nasiri R, Salahshour F, Dehghan-Manshadi SA, Kazemnejad S. Safety and efficacy study of allogeneic human menstrual blood stromal cells secretome to treat severe COVID-19 patients: clinical trial phase I & II. Stem Cell Res Ther. 2022;13(1):96.

7. Fesahat F, Kalantar SM, Sheikhha MH, Saeedi H, Montazeri F, Firouzabadi RD, Khalili MA. Developmental and cytogenetic assessments of preimplantation embryos derived from in-vivo or in-vitro matured human oocytes. Eur J Med Genet. 2018;61(4):235-241.

8. Amini MS, Naderi MM, Shirazi A, Aminafshar M, Boroujeni SB, Pournourali M, Malekpour A. Bioactive materials derived from menstrual blood stem cells enhance the quality of in vitro bovine embryos. Avicenna J Med Biotechnol. 2022;14(4):287.

9. Lee SH. Effects of human endothelial progenitor cell and its conditioned medium on oocyte development and subsequent embryo development. Int J Mol Sci. 2020;21(21):7983.

10. Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine, the Society of Reproductive Biologists and Technologists, and the Society for Assisted Reproductive Technology. Electronic address: jgoldstein@asrm.org. In vitro maturation: a committee opinion. Fertil Steril. 2021;115(2):298-304.

11. Smith AD, Tilling K, Lawlor DA, Nelson SM. Live birth rates and perinatal outcomes when all embryos are frozen compared with conventional fresh and

19. Nikoloff N. The key role of cumulus cells in oocytes in vitro maturation protocols. Fertil Steril. 2021;116(6):1663.

20. Massoud G, Spann M, Vaught KC, Das S, Dow M, Cochran R, et al. Biomarkers assessing the role of cumulus cells on IVF outcomes: a systematic review. J Assist Reprod Genet. 2024;41(2):253-275.

21. Montazeri F, Kalantar M, Hoseini SM, Agha-Miri A, Abdoli M, Nikuei P. Comparing aneuploidy rate in arrested human embryos derived from in-vivo and in-vitro matured oocytes, 19 September 2023, PREPRINT (Version 1) available at Research Square, 2023; https://doi.org/10.21203/ rs.3.rs-3309756/v1

22. Song H, Zhang R, Liu Y, Wu J, Fan W, Wu J, Liu Y, Lin J. Menstrual blood-derived endometrial stem cells ameliorate ovarian senescence by relieving oxidative stress-induced inflammation. Reprod Sci. 2025; 32(5):1566-1579.

23. Morales C. Current applications and controversies in preimplantation genetic testing for aneuploidies (PGT-A) in In vitro fertilization. Reprod Sci. 2024;31(1):66-80.

24. Siristatidis C, Sergentanis TN, Vogiatzi P., Kanavidis P, Chrelias C, Papantoniou N, Psaltopoulou T. In vitro maturation in women with vs. without polycystic ovarian syndrome: a systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2015;10(8):e0134696.

25. Fesahat F, Montazeri F, Hoseini SM. Preimplantation genetic testing in assisted reproduction technology. J Gynecol Obstet Hum Reprod. 2020;49(5):101723.