

بررسی عوامل موثر بر کیفیت جنین های حاصل از لقاح آزمایشگاهی به روش تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم با بکارگیری روش معادلات برآوردی و مدل های جمعی تعمیم یافته

سمانه منصورى^۱، کرامت نوری جلیانی^{۲*}، محمد حسین نصر اصفهانی^۳، کاظم محمد^۴، محمدرضا اشراقیان^۴، مهدی یاسری^۵،
محمودرضا گوهری^۶، مرضیه تولایی^۳، محمدرضا دیمه^۳

^۱ کارشناس ارشد آمار زیستی، گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
^۲ دانشیار آمار زیستی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
^۳ پژوهشگاه روبان، پژوهشکده زیست فناوری جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه زیست فناوری، اصفهان، ایران
^۴ استاد آمار زیستی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
^۵ دانشجوی دوره دکتری تخصصی آمار زیستی، گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
^۶ استادیار آمار زیستی، گروه آمار و ریاضی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
^{*} نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی
پست الکترونیک: nourik@tums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: در تکنیک های لقاح آزمایشگاهی بهتر است یک جنین با کیفیت بالا به رحم انتقال داده شود تا موفقیت این روشها را بالا ببرد. لذا پژوهشی جامع برای شناسایی عوامل مرتبط که علاوه بر در نظر گرفتن همبستگی جنین های حاصل از یک زوج نابارور، روابط غیر خطی آنها را نیز بررسی می کند انجام پذیرفت.

مواد و روش کار: در این مطالعه، روش آماری که از طریق مدل های جمعی تعمیم یافته ارائه شده است برای بررسی روابط غیر خطی متغیرهای پیشگوی کمی با متغیر پاسخ مورد استفاده قرار گرفت و از نتایج حاصل از آن در روش معادلات برآوردی تعمیم یافته برای تجزیه و تحلیل داده ها و تعیین عوامل موثر بر کیفیت جنین های حاصل از لقاح مصنوعی استفاده شد.

یافته ها: بر اساس نتایج حاصل از بررسی روابط خطی اثر دارو، نوع ناباروری و سندروم تخمدان پلی کیستیک بر روی کیفیت جنین معنی دار شد. این درحالی است که بعد از بررسی روابط علاوه بر این متغیرها، استعمال دخانیات و میزان تحرک اسپرم و فاکتور رحمی نیز معنی دار گزارش شد.

نتیجه گیری: علاوه بر در نظر گرفتن همبستگی درون خوشه ای در آنالیز این نوع داده ها توسط روشهایی مثل معادلات برآوردی تعمیم یافته، روابط غیر خطی نیز باید مورد بررسی قرار گیرد. نتایج این مطالعه حاکی از اثر مصرف دخانیات، مصرف دارو، ابتلا به سندروم پلی کیستیک، نوع ناباروری و تحرک اسپرم می باشد که میزان تحرک اسپرم به صورت غیر خطی به طور معنی داری باعث بهبود کیفیت جنین گردید.

واژه های کلیدی: مدل های جمعی تعمیم یافته (GAM)، معادلات برآوردی تعمیم یافته (GEE)، رگرسیون لجستیک رتبه ای، لقاح مصنوعی، تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم

مقدمه

زیادی ایجاد شده است. لقاح خارج از رحمی روشی از باروری کمکی است که امکان لقاح اسپرم و تخمک زوج متقاضی درمان ناباروری را در شرایط آزمایشگاهی فراهم می آورد. امروزه درمان انتخابی برای زوجهای نابارور

از آغاز به کارگیری تکنیک لقاح آزمایشگاهی برای درمان ناباروری، بیش از ۲۵ سال می گذرد و در طول این زمان در همه جنبه های تکنیکهای کمک باروری پیشرفتهای

فاکتورها استفاده می‌کند بسیارحایز اهمیت بوده تا بدین وسیله بتوان فاکتورهای مرتبط را یافته و اقدامات لازم جهت پیشگیری و یا بهبود فاکتورهای بررسی شده را انجام داد. برای تعیین عوامل مؤثر بر کیفیت جنین با توجه به همبستگی بین جنین های هر فرد نمی توان از مدل رگرسیون لجستیک رتبه ای استفاده نمود زیرا پیش فرض این مدل مستقل بودن مشاهدات می باشد در حالی که این فرض برای داده های مربوط به جنین برقرار نمی باشد. در صورت استفاده از مدل لجستیک رتبه ای برآوردهای حاصل از ریب و مقدار واریانس متغیرها کمتر از مقدار واقعی خواهد بود. کم برآورد کردن واریانس سبب ایجاد بازه های اطمینان باریکتر و در نتیجه معنی داری متغیرها به صورت ناصحیح می گردد. برای برطرف کردن این مشکل از مدل های حاشیه ای با روشی از برآورد تحت عنوان معادلات برآوردی تعمیم یافته^۴ (GEE) استفاده می شود که در این روش نه تنها همبستگی مربوط به جنین های هر فرد در نظر گرفته می شود بلکه راهکاری را برای محاسبات بکار می برد که نیاز به داشتن پیش فرض درباره توزیع متغیر پاسخ ندارد از طرفی یکی از محدودیتهای مدلهایی مانند رگرسیون لجستیک و GEE در اینست که فقط می‌توانند رابطه خطی میان متغیرهای کمکی و لگاریتم نسبت شانس متغیر پاسخ را مورد بررسی قرر دهند. مگر اینکه محقق خود رابطه‌ایی غیر خطی را در نظر داشته باشد بنابراین این مدل‌ها در کشف روابط غیر خطی که در ابتدا مد نظر محقق نبوده قاصرند در این تحقیق ما از روشی موسوم به مدل های جمعی تعمیم یافته^۵ (GAM) برای یافتن روابط غیرخطی متغیرهای مورد بررسی در صورت وجود نیز استفاده می کنیم.

روش کار

در این مطالعه مقطعی از بین افراد مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان ۶۴ زوج نابارور که کاندیدای انجام روش درمانی ICSI بودند، وارد مطالعه شدند. برای تمام بیماران در بدو ورود پرسشنامه ای تکمیل شد که این پرسشنامه حاوی اطلاعات اولیه زوج نابارور شامل سن

استفاده از روشهای کمک باروری^۱ است. از عمده ترین روشهای درمانی مورد استفاده در این زمینه تکنیک تزریق درون سیتوپلاسمی^۲ (ICSI) و باروری در محیط آزمایشگاه^۳ (IVF) می باشد [۱]. معمولاً پس از انجام لقاح ، جنینها به مدت ۲ تا ۳ ویا حداکثر ۵ روز در محیط کشت قرار داده شده و سپس به رحم مادر انتقال داده می شوند [۲]. در این روشها به دلیل پایین بودن شانس حاملگی، چندین جنین به رحم مادر انتقال داده می شود که این خود باعث ایجاد حاملگی چند قلوبی (تقریباً ۳۰٪) می گردد [۳]. جهت جلوگیری از این مشکل بعضی از کشورها تعداد این جنین های انتقالی را کاهش داده و حتی به ۲ عدد رسانده اند، اما با این شیوه، با وجودی که از چند قلوبی جلوگیری می شود در عوض شانس ایجاد حاملگی پایین تر می آید [۴]. به منظور کاهش انتقال جنین ها بایستی یک جنین دارای کیفیت بالا جهت انتقال انتخاب شود تا موفقیت این روش ها را بالا ببرد. جهت دستیابی به لقاح و تکامل جنین نیاز به تعامل متقابل اسپرم و تخمک و بدنبال آن وقوع یکسری وقایع متوالی می باشد. در برخی از موارد کاهش غلظت ، تحرک و مورفولوژی اسپرم می تواند منجر به تولید جنین های معیوب، کاهش میزان حاملگی و سقط جنین ها گردد [۵]. علی رغم پیشرفتهایی که در سالهای اخیر در تکنیکهای مختلف درمان نازایی روی داد هنوز میزان لانه گزینی و حاملگی متعاقب انتقال جنینهای رشد یافته در محیط آزمایشگاه به رحم پایین و سقط خودبه خودی و شکست حاملگی های ایجاد شده از این جنینهابالامی باشد [۶]. کیفیت پایین جنین به عنوان یکی از مهمترین عوامل احتمالی پایین بودن میزان موفقیت باروری در روشهای کمک باروری مطرح است [۷]. امروزه در تکنیکهای نا باروری سعی بر این است که جهت جلوگیری از حاملگی های چند قلوبی و تحمیل هزینه های اضافی بر زوج نا بارور تنها یک جنین با کیفیت بالا به رحم مادر منتقل شود. لذا انجام پژوهشی جامع، که از آنالیز های مرتبط با داده های همبسته برای شناسایی عوامل موثر بر کیفیت جنین و برآورد اندازه اثر این

- 1- Assisted Reproduction Techniques
- 2- Intra cytoplasmic sperm injection
- 3- In Vitro Fertilization

- 4- Generalized Estimating Equation
- 5- Generalized Additive Models

خوب یا A شامل جنین هایی با ۶ یا ۸ سلول، بدون فراگمنتاسیون و بلاستومرهای با اندازه یکسان است. کیفیت متوسط یا B شامل جنین هایی با ۶ تا ۸ سلول، ۳۰٪-۵۰ فراگمنتاسیون یا بلاستومرهای نامساوی می باشد. جنین هایی با کمتر از ۶ بلاستومر و/یا بیشتر از ۵۰٪ فراگمنتاسیون و بلاستومرهای با اندازه نامساوی به عنوان جنین های با کیفیت ضعیف (C) تلقی می شوند [۸].

تحلیل آماری؛ رگرسیون لجستیک رتبه ای: این مدل شبیه مدل رگرسیون لجستیک با پاسخ دو حالتی می باشد که تابع اتصال آن لوجیت تجمعی می باشد و در آن گروه های ۱ تا J با هم ترکیب شده اند تا یک گروه را تشکیل دهند و گروه های J+۱ تا J گروه دوم را می سازند. برای حالتی که یک متغیر پیشگو وجود دارد مدل به صورت

$$\text{logit}[P(Y \leq j)] = \alpha_j + \beta x$$

$$j=1, \dots, J-1$$

با پارامتر β می باشد که این پارامتر اثر متغیر X را روی لگاریتم شانس پاسخ در گروه J یا پایین تر از آن توصیف می کند [۹-۱۰].

در صورتی که از همبستگی بین مشاهدات چشم پوشی شود دقت نتایج و متعاقب آن معنی داری آن ها بیش برآورد خواهد شد [۱۱] و ممکن است از این فراتر رفته باعث نتیجه گیری نادرست نیز شود [۱۲].

راه های مختلفی برای بسط مدل های خطی تعمیم یافته^۶ جهت بررسی داده ای خوشه ای وجود دارد که در تمامی آنها همبستگی درون خوشه ای بین مشاهدات داخل یک خوشه را لحاظ می کنند که تفاوت آنها در روشهای محاسباتی می باشد.

مدل های حاشیه ای^۷

یکی از این راه ها استفاده از مدل های حاشیه ای می باشد. واژه حاشیه ای نشان دهنده مدلی برای میانگین پاسخ می باشد که در آن میانگین پاسخ تنها به متغیر مورد نظر وابسته است و نه به اثر تصادفی یا پاسخ قبلی. مدل های حاشیه ای نیاز به پیش فرض های توزیعی برای

هر یک از زوجین، مصرف دخانیات، مصرف دارو به صورت روتین توسط هر یک از زوجین بود. مایع سیمین در روز تخمک گیری، پس از ۳ الی ۴ روز خودداری زوجین از مقاربت، جمع آوری شد و با استفاده از میکروسکوپ نوری بر اساس معیار WHO [۱۴] مورد بررسی قرار گرفت. غلظت^۱، ناهنجاریهای مورفولوژی^۲ و تحرک اسپرم^۳ به عنوان پارامترهای اسپرمی محاسبه شدند. تخمک گذاری توسط داروهای حاوی HCG و FSH، فولیکولها توسط سونوگرافی واژینال تخلیه شده و اووسیت های به دست آمده از آنها در محیط G-MOPS شستشو داده شدند. جهت انجام ICSI، به اووسیت ها آنزیم هیالورونیداز اضافه شد تا سلولهای اطراف اووسیت جدا گردند و پس از چندین بار شستشو، اووسیت ها به داخل دیش میکرواینجکشن حاوی قطرات G-MOPS منتقل شدند. اسپرمهای شستشو شده توسط گراداینت های Pure Sperm نیز به داخل قطره ICSI-100 در همین دیش انتقال داده شدند و سپس با استفاده از دستگاه میکرومانیپولار اسپرم دارای حرکت و مورفولوژی مناسب انتخاب شده و توسط پیپت مخصوص به داخل اووسیت تزریق گردید. ۱۸-۱۶ ساعت بعد جهت حصول اطمینان از صورت گرفتن لقاح، وجود یا عدم وجود پیش هسته ها مورد بررسی قرار گرفت. میزان لقاح به روش ICSI، ۲۰-۱۸ ساعت پس از انجام این تکنیکها، وجود یا عدم وجود لقاح با توجه به تشکیل دو پیش هسته درون زیگوت ارزیابی شده و و میزان لقاح به صورت حاصل تقسیم تعداد تخمک های لقاح یافته به کل تخمک ها محاسبه شد و به صورت درصد بیان گردید. اطلاعات مربوط به سندروم تخمدان پلی کیستیک^۴ (PCO) و فاکتور رحمی^۵ از طریق طریق پرونده های بیماران جمع آوری شد. در روز سوم کشت، کیفیت جنین ها ارزیابی شد. با این روش جنین ها به یکی از ۳ گروه بر اساس تعداد و اندازه سلول های جنینی (blastomeres)، درصد فراگمنتاسیون و حضور سلول های چندهسته ای تقسیم بندی می شوند. کیفیت

- 1- Denstiy
- 2 -abnormal morphology
- 3 -Motility
- 4- polycystic ovarian syndrome
- 5 -Uterine factors

6- Generalized Linear Models

7 -Marginal models

خطی تعمیم یافته به مدل های حاشیه ای می گردد. اگرچه می توان این مدل سه جزئی را با در نظر گرفتن توزیع هم زمان Y ها نیز بسازیم [۱۳].

مدل جمعی تعمیم یافته^۲: برای بررسی اثرات غیر خطی متغیرهای پیشگو بر متغیر پاسخ از این مدل ها استفاده می شود. در این مدل ها فرض بر این است که پاسخ Y دارای توزیعی از خانواده نمایی با میانگین $\mu = E(Y|X_1, \dots, X_p)$ می باشد که از طریق تابع زیر به متغیرهای پیشگو متصل می شود.

$$g(\mu) = \alpha + \sum_{j=1}^p f_j(X_j)$$

این مدل ها جمعی هستند به این معنا که می توان در حالی که مدل به داده ها برازش شده است اثرات هر یک از متغیرهای پیشگو را به طور جداگانه آزمون کرد. برآورد α و f_1, \dots, f_p با جایگزین کردن رگرسیون خطی با الگوریتمی مناسب برای برازش یک مدل تجمعی حاصل می شود که f_j ها توابع هموار (smooth function) برای هر متغیر پیشگو هستند. یک مدل جمعی تعمیم یافته با مدل خطی تعمیم یافته از این جهت متفاوت است که پیشگوهای جمعی جایگزین پیشگوهای خطی می شوند [۱۴].

برای بررسی اثر عوامل سن زن، وجود سندروم تخمدان پلی کیستیک، مصرف سیگار توسط هر یک از زوجین، مصرف دارو به طور روتین، پارامترهای اسپرمی (غلظت، تحرک و ناهنجاری های مورفولوژیک) تعداد کل تخمک ها و درصد تخمک های نابالغ و مرده و همین طور درصد لقاح حاصل از ICSI به طور همزمان بر روی کیفیت جنین حاصل از لقاح مصنوعی به روش ICSI ابتدا اثرات غیر خطی متغیرهای کمی با استفاده از مدل GAM مورد بررسی قرار گرفت و در صورتی که متغیری دارای اثر غیر خطی با $P\text{-value} < 0.05$ بود شکل غیر خطی آن وارد مدل شد و با مدل GEE و رگرسیون لجستیم رتبه ای مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزار SAS 9.2 و با استفاده از دستور PROC GENMOD برای مدل GEE و رگرسیون لجستیک رتبه

مشاهدات ندارند و تنها بیان رابطه میان میانگین و متغیرهای کمی برای برازش این مدل ها کافی است. بنابراین این مدل ها روشی را برای به مدل درآوردن پاسخ های وابسته فراهم می سازد که در آن از فرض در مورد توزیع بردار پاسخ خودداری می شود. از آنجایی که هیچ توزیع توأم چند متغیره ای برای Y در مدل های حاشیه ای با پاسخ گسسته وجود ندارد نیاز به جایگزینی برای برآوردهای درست نمایی بیشینه^۱ می باشد که روش GEE این جایگزین را فراهم می کند. مدل های کناری مخصوصا برای استنباط راجع به میانگین های جامعه مورد استفاده قرار می گیرند. بنابراین مدل های کناری به صورت جداگانه میانگین پاسخ و ساختار وابستگی میان پاسخ های مکرر یا درون خوشه را مدل بندی می کنند. هدف اصلی در مدل های کناری استنباط راجع به اولین قسمت است در حالی که دومین قسمت به عنوان پارامتر نویز یا مزاحم برای استنباط شناخته می شود.

یک مدل حاشیه ای از سه قسمت زیر تشکیل یافته است.
۱- میانگین شرطی یا میانگین هر پاسخ، $E(Y_{ij}|X_{ij}) = \mu_{ij}$ فرض می شود که این میانگین از طریق تابع اتصال زیر به متغیرهای کمی متصل می شود.

$$g(\mu_{ij}) = \eta_{ij} = \beta_0 + \sum_{h=1}^p \beta_{ih} X_{ih} = X'_{ij} \beta$$

۲- واریانس شرطی Y_{ij} به شرط متغیرهای کمی از طریق معادله زیر به میانگین داده ها متصل است

$$Var(Y_{ij}) = \phi \times v(\mu_{ij})$$

۳- وابستگی درون فردی (یا خوشه ای) شرطی میان بردار پاسخ ها به شرط متغیرهای کمی که فرض می شود تابعی از مجموعه دیگری از پارامترها مانند α (و همچنین μ_{ij}) است. α می تواند نمایانگر ضریب همبستگی میان داده ها یا لگاریتم بخت میان داده ها باشد.

به این ترتیب با این سه جزء مدل حاشیه ای را می توان بنا کرد. دو جزء اول همان اجزاء سازنده مدل های خطی تعمیم یافته می باشند گرچه در این جا بر خلاف مدل های خطی تعمیم یافته هیچ فرضی در مورد توزیع داده های پاسخ نداریم. اما جزء سوم که در نظر گرفتن ساختار وابستگی میان داده ها است موجب گسترش مدل های

شماره ۳ مشاهده می کنید از بین متغیرهای مورد بررسی مصرف دارو، نوع ناباروری، مصرف دخانیات، تحرک اسپرم و PCO دارای اثر معنی داری بر روی کیفیت جنین بودند به این معنی که استعمال دخانیات و دارا بودن سندروم تخمدان پلی کیستیک اثر معنی داری به صورت کاهش بر روی کیفیت جنین های حاصل از ICSI داشت یعنی نسبت شانس^۱ (OR) زوج هایی که دخانیات مصرف نمی کردند برای داشتن جنین بدتر نصف زوج هایی بود که دخانیات استعمال می کردند یا به عبارتی زوجینی که دخانیات مصرف نمی کردند شانس حدود ۲ برابر برای داشتن جنین بهتر داشتند ($P\text{-value} = 0/0009$). همین طور شانس داشتن جنین با کیفیت پایین تر برای زوج هایی که زن سندروم تخمدان پلی کیستیک نداشت ۰/۲۷ زوج هایی بود که زن این سندروم را داشت یعنی داشتن این سندروم ایجاد جنین با کیفیت پایین تر را حدوداً ۴ برابر می کرد. شانس بدتر شدن کیفیت جنین به ازاء هر واحد افزایش میزان تحرک اسپرم حدوداً نصف (۰/۵۸) $(OR = 0/58)$ می شود ($P\text{-value} < 0/0001$). نوع ناباروری نیز بر روی کیفیت جنین اثرگذار است به این صورت که شانس زوج هایی که هر دو نابارور هستند نسبت به زوج هایی که ناباروری با فاکتور مردانه دارند برای داشتن جنین با کیفیت پایین تر ۳ برابر می شود. این شانس نسبت به زوج های با عامل ناباروری زنانه ۱/۴ برابر بدست آمد. همین طور در شکل شماره ۱ مشاهده می کنید که از

ای و دستور PROC GAM برای مدل های جمعی تعمیم یافته انجام شد.

یافته ها

در این مطالعه تعداد جنین های با کیفیت خوب (درجه A) برابر ۱۱۳، تعداد جنین های با کیفیت متوسط (درجه B) ۱۲۱ و جنین های با کیفیت پایین (درجه C) ۱۱۱ بود که جمعاً ۳۴۵ جنین از این ۶۴ زوج حاصل شد و مورد ارزیابی قرار گرفت. همان طور که در جدول شماره ۱ مشخصات زوج های تحت درمان با روش ICSI را نشان می دهد. میانگین سنی زنان در این مطالعه ۳۰/۷۶ سال و میانگین سنی مردان ۳۶/۱۸ سال بود که این میانگین به تفکیک کیفیت جنین در جنین های با کیفیت خوب ۳۰/۸۹، در جنین های با کیفیت متوسط ۳۰/۵۲ و در جنین های با کیفیت پایین ۳۰/۸۸ و میانگین سن مردان نیز به ترتیب ۳۶/۳۱، ۳۶/۱۶ و ۳۶/۰۵ بود. تعداد کل تخمک های گرفته شده از یک زن به طور متوسط برابر ۱۴/۲۷ و میزان لقاح حاصل از ICSI دارای میانگین ۸۲/۶۲ درصد بود. در مورد پارامترهای اسپرمی میانگین برای غلظت اسپرم ۴۰/۷، برای ناهنجاری های مورفولوژی ۸۶ و برای میزان تحرک اسپرم ۳۸/۵ بود. در جدول ۲ فراوانی جنین های با کیفیت خوب که پدر یا مادرشان دارو مصرف می کردند ۴۹ جنین بود که این تعداد در جنین های با کیفیت متوسط ۵۸ و در جنین های با کیفیت ضعیف ۵۹ بود. ۱۹ جنین درجه A مادرانی با فاکتور رحمی داشتند تعداد برای جنین های با کیفیت متوسط و پایین به ترتیب، ۲۵ و ۳۱ بود. تعداد جنین هایی با مادران PCO، ۳۹ جنین از درجه A، ۵۰ جنین از درجه B و ۵۱ جنین از درجه C بودند.

قبل از بررسی اثرات غیر خطی عوامل مورد بررسی، آنالیزی بدون در نظر گرفتن این اثرات بر روی متغیرها صورت گرفت که اثرات خطی آنها آزمون شد و نتیجه آن معنی داری متغیرهای مصرف دارو، نوع ناباروری و PCO بود. بعد از انجام آنالیز GAM که نتایج آن در شکل ۱ آمده است با در نظر گرفتن P-value کمتر از ۰/۲ فرم غیر خط متغیرهای سن زن، تحرک اسپرم، تعداد کل تخمک ها و میزان تخمک های مرده و نابالغ وارد مدل گردید که در این مدل جدید همان طور که در جدول

جدول ۱: مشخصات زوج های نابارور تحت درمان به روش ICSI

کل	جنین درجه C		جنین درجه B		جنین درجه A		میانگین	انحراف معیار
	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار		
۵/۸۸	۳۰/۷۶	۵/۸۷	۳۰/۸۸	۶/۲۳	۳۰/۵۲	۵/۵۶	۳۰/۸۹	سن زن
۵/۲۵	۳۶/۱۷	۵/۲۴	۳۶/۰۵	۵/۱۵	۳۶/۱۶	۵/۴۱	۳۶/۳۱	سن مرد
۷/۹۹	۱۴/۲۷	۷/۴۴	۱۴/۱۴	۷/۶۲	۱۴/۱۳	۸/۹	۱۴/۵۶	تعداد کل تخمک ها
۲۳/۳۴	۴۰/۷۵	۲۴/۲۷	۴۳/۱۴	۲۳/۶۹	۴۰/۲۷	۲۱/۹۹	۳۸/۹۲	غلظت اسپرم
۷/۲۳	۸۶/۰۳	۷/۸۸	۸۵/۰۹	۷/۸۸	۸۶/۵	۷/۳۸	۸۶/۴	ناهنجاری مورفولوژی اسپرم
۱۳/۸۹	۳۸/۵۱	۱۵/۳۲	۴۰/۴۲	۱۲/۴۵	۳۸/۲	۱۳/۸۲	۳۶/۹۷	تحرک اسپرم
۱۷/۴۷	۸۲/۶۲	۱۹/۷۵	۸۱/۶۹	۱۷/۰۴	۸۲/۱۴	۱۵/۴۹	۸۴/۰۵	میزان لقاح ICSI
۱۲/۱۱	۱۵/۸۴	۱۶/۲	۱۱/۳۲	۱۸/۵۱	۱۳/۷۵	۱۱/۹۲	۱۱/۱۳	میزان تخمک های مرده و نابالغ

جدول ۲: توزیع فراوانی متغیرهای کیفی در درجات مختلف جنین

متغیرها	جنین درجه A	جنین درجه B	جنین درجه C
مصرف دارو	۴۹(۲۹/۵)	۵۸(۳۴/۹)	۵۹(۳۵/۵)
عدم مصرف دارو	۶۴(۳۵/۸)	۶۳(۳۵/۲)	۵۲(۲۹/۱)
ناباروری با عامل مردانه	۱۶(۱۹/۰)	۳۴(۴۲/۰)	۳۱(۳۸/۳)
ناباروری با عامل زنانه	۹۷(۳۶/۷)	۸۷(۳۳/۰)	۸۰(۳۰/۳)
ناباروری با هر دو عامل	۳۲(۳۰/۵)	۴۱(۳۹/۰)	۳۲(۳۰/۵)
فاکتور رحمی دارد	۱۹(۲۸/۸)	۲۱(۳۱/۸)	۲۶(۳۹/۴)
فاکتور رحمی ندارد	۶۲(۳۵/۶)	۵۹(۳۳/۹)	۵۳(۳۰/۵)
سندروم تخمدان پلی کیستیک	۱۹(۲۵/۳)	۲۵(۳۳/۳)	۳۱(۴۱/۳)
عدم ابتلا به سندروم پلی کیستیک	۹۴(۳۴/۸)	۹۶(۳۵/۶)	۸۰(۲۹/۶)
کل	۳۹(۲۷/۹)	۵۰(۳۵/۷)	۵۱(۳۶/۴)
	۷۴(۳۶/۱)	۷۱(۳۴/۴)	۶۰(۲۹/۳)
	۱۱۳(۳۲/۸)	۱۲۱(۳۵/۱)	۱۱۱(۳۲/۲)

جدول ۳: برآورد نسبت شانس (OR)، فاصله اطمینان OR و P-value

P - value*		فاصله اطمینان ۹۵٪		نسبت شانس		متغیرها
رگرسیون لجستیک	مدل GEE	رگرسیون لجستیک	مدل GEE	رگرسیون لجستیک	مدل GEE	
رتبه ای		رتبه ای		رتبه ای		دارو
۰/۰۲۳	۰/۰۴۸	(۰/۳۸ و ۰/۹۳)	(۰/۳۹ و ۰/۹۸)	۰/۶۴	۰/۶۴	
						ناباروری با فاکتور مردانه
۰/۰۰۴	۰/۰۰۹	(۰/۱۵ و ۰/۷)	(۰/۱۴ و ۰/۷۵)	۰/۳۲	۰/۳۲	
						ناباروری با فاکتور زنانه
۰/۵۸۹	۰/۶۱۸	(۰/۲۴ و ۲/۲۷)	(۰/۲۱ و ۲/۵)	۰/۷۳	۰/۷۳	
				۱	۱	ناباروری با هر دو فاکتور
						دخانیات
۰/۰۰۷	۰/۰۰۰۹	(۰/۲۵ و ۰/۸)	(۰/۲۸ و ۰/۷۲)	۰/۴۴	۰/۴۴	
						سن زن
۰/۴۱	۰/۳۷	(۰/۸۳ و ۱/۵۸)	(۰/۸۵ و ۱/۵۴)	۱/۱۵	۱/۱۵	
				۱	۱	سن زن ^۲
۰/۲۵۶	۰/۲۰۸	(۰/۹۹ و ۱)	(۱ و ۱/۰۳)	۱/۰۱	۱/۰۱	غلظت اسپرم
						ناهنجاری مورفولوژی اسپرم
۰/۱۷۲	۰/۱۵۴	(۰/۹۸ و ۱/۰۹)	(۰/۹۹ و ۱/۰۹)	۱/۰۴	۱/۰۴	
						تحرك اسپرم
<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	(۰/۴۴ و ۰/۷۴)	(۰/۴۵ و ۰/۷۳)	۰/۵۸	۰/۵۸	
						تحرك اسپرم ^۲
<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	(۱/۰۱ و ۱/۰۳)	(۱/۰۱ و ۱/۰۳)	۱/۰۲	۱/۰۲	
						میزان لقاح ICSI
۰/۲۴۴	۰/۱۸۱	(۰/۹۹ و ۱/۰۲)	(۱ و ۱/۰۲)	۱/۰۱	۱/۰۱	
						فاکتور رحمی
۰/۰۵۴	۰/۰۸۸	(۰/۲۷ و ۱/۰۲)	(۰/۲۴ و ۱/۱۱)	۰/۵۱	۰/۵۱	
						تعداد کل تخمک
۰/۴	۰/۳۸	(۰/۸۳ و ۱/۰۸)	(۰/۸۳ و ۱/۰۷)	۰/۹۵	۰/۹۵	
						تعداد کل تخمک ^۲
۰/۱۸	۰/۱۵	(۱ و ۱/۰۱)	(۱ و ۱/۰۱)	۱	۱	
						سندروم تخمدان پلی کیستیک
۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	(۰/۱۴ و ۰/۵۵)	(۰/۱۲ و ۰/۶۲)	۰/۲۷	۰/۲۷	
						میزان تخمک های مرده و نابالغ
۰/۲۲۱	۰/۲۲۶	(۰/۲۱ و ۲/۰۸)	(۰/۲ و ۳/۴۸)	۱۳/۰۵	۱۳/۰۵	
						میزان تخمک های مرده و نابالغ ^۲
۰/۱۷	۰/۲	(۰ و ۸/۵۱)	(۰ و ۱۳/۹۴)	۰/۰۱	۰/۰۱	

*P-value < /۰۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد

وجود همبستگی بین جنین های هر فرد و همین طور ارزیابی اثرات غیر خطی این عوامل در صورت وجود نشان داده شد که عواملی همچون PCO، استعمال دخانیات، مصرف دارو به صورت روتین به عنوان عواملی که به طور معنی داری موجب کاهش کیفیت جنین می شوند شناسایی شدند. همین طور اثر افزایش میزان تحرک اسپرم به عنوان عاملی که به طور معناداری باعث بهبود کیفیت جنین می گردد گزارش گردید. در مطالعات قبلی نشان داده شده است که پارامترهای ضعیف اسپرمی در هر دو روش IVF و ICSI بر روی شکل جنین و ظرفیت پیشرفت و نرخ کاشت آن اثرگذارند [۱۹-۱۶] در مطالعه حاضر نیز از بین پارامترهای اسپرمی، میزان تحرک اسپرم بر روی کیفیت جنین اثر معنی داری دارد این در حالی است که در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۰ انجام شد محققان نشان دادند که پارامترهای اسپرمی بر روی تخریب جنین و کاهش کیفیت آن در هر دو روش ICSI و IVF اثر معنی داری ندارد [۲۰].

نتیجه گیری

در مواجهه با داده های خوشه ای یا طولی که دارای همبستگی درون خوشه ای یا فردی، جهت استنباط صحیح باید از مدل هایی استفاده کرد که این همبستگی را در نظر بگیرند و یکی از این مدل ها مدل GEE می باشد. اما این مدل ها تنها توانایی یافتن روابط تابعی و به فرم خطی بین متغیر پاسخ و متغیرهای پیشگو را دارند. مدل GAM یک روش مناسب برای یافتن روابط غیر خطی می باشد که با در نظر گرفتن برآورد ناپارامتریکی از روابط، سعی در یافتن ارتباطات واقعی دارد که با بکارگیری آن ها در این مجموعه از داده ها نتایج حاکی از اثر معنادار PCO، مصرف دارو و استعمال دخانیات بر کاهش کیفیت جنین، میزان تحرک اسپرم بر افزایش و بهبود آن می باشد. همین طور نوع ناباروری نیز دارای اثر معنادار روی کیفیت جنین می باشد به طوری که شانس داشتن جنین هایی با کیفیت پایین تر در زوج هایی که هر دو نابارورند نسبت به زوج هایی که یکی از آن ها نابارور است بیشتر می باشد به ویژه این شانس در زوج های با فاکتور مردانه در مقایسه با زوج ها با فاکتور زنانه بارزتر می باشد.

بین متغیرهای کمی اثرات غیر خطی تحرک اسپرم و تعداد کل تخمک ها معنی دار شده است که با وارد کردن اثرات غیرخطی حاصل در مدل اصلی تنها تحرک اسپرم است که در حضور سایر متغیرها دارای اثر معنی دار می باشد.

بحث

در بسیاری از مطالعات از جمله مطالعات بالینی، اپیدمیولوژیکی و اجتماعی فرض کلاسیک استقلال مشاهدات و برقراری توزیع نرمال متغیر پاسخ معتبر نیست و چشم پوشی از آن باعث بیش برآورد دقت و معنی داری نتایج می گردد [۱۱]. به همین خاطر مدل های مناسب برای آنالیز داده های همبسته با توزیع غیر نرمال متغیر پاسخ مثل داده هایی که پاسخ آنها کیفی یا رتبه ای باشد به سرعت پیشرفت کردند. مطالعات نشان داده اند که مدل GEE در مقایسه با روش هایی که فرض بر استقلال مشاهدات دارد دارای برآوردهای صحیح و با ثبات بیشتر می باشد اما مدل های GEE با وجود این مزیت که همبستگی درون خوشه ای را لحاظ می کنند ایراد مهمی دارند و آن این است که در این مدل ها تنها اثرات خطی متغیرها بر روی پاسخ مورد بررسی قرار می گیرد و آزمون می شود در صورتی که ممکن است اثر متغیرها بر روی پاسخ اثری غیر خطی باشد. به عبارتی به طور کلی مدل های خطی تعمیم یافته نیاز به پیش فرض روابط تابعی بین متغیرهای پیشگو و متغیر پاسخ دارند. بنابراین همان طور که لندوهر^۱ و همکارانش [۱۵] نیز اشاره کردند انتخاب نادرست فرض تابعی بودن شکل رابطه، روابط صحیح را می پوشاند و برآوردهای نادقیق ارائه می دهد و باعث مغلطه در نتیجه گیری می گردد. برای رفع این مشکل از مدلی تحت عنوان مدل جمعی تعمیم یافته (GAM) استفاده می شود. این مدل با بکارگیری توابعی از متغیرها و نه خود آنها سعی به حل این موضوع و پیدا کردن رابطه واقعی بین متغیرهای پیشگو و متغیر پاسخ دارد. با استفاده از این مدل ها در مطالعه حاضر برخلاف مطالعات قبلی که عمدتاً به صورت تک متغیره به بررسی این فاکتورها پرداخته بود اثر هر یک از متغیرها در کنار سایر متغیرها مورد بررسی قرار گرفت و با در نظر گرفتن

References

1. Land JA EJ, Risks and complication in assisted reproduction techniques: Report of an ESHRE consensus meeting, *Human Reproduction* 2003;18:455-7.
2. De Neubourg D GJ, Van Royen E, Mangelschots K, Valkenburg M. Prevention of twin pregnancy after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection based on strict embryo criteria: a prospective randomized clinical trial. *Human Reproduction* 1999;14:2581-7.
3. Bergh T EA, Hillensjo T, Nygren KG, Wennerholm UB. Deliveries and children born after in-vitro fertilization in Sweden 1982-95 a retrospective cohort study, *Lancet* 1999;354:1579-85.
4. Ustillo M. Imposing limits on the number of oocytes and embryos transferred: is it necessary/wise of naughty/nice? *Human Reproduction* 1997;13:1616-7.
5. Edirisinghe WR MA, Junk S, Yovich JL, Cytogenetic abnormalities of unfertilized oocytes generated from in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: a double-blind study, *Hum Reprod* 1997;12(12):2784-91.
6. Simon C LJ, Zuzuarregui JL, Martin JC, Remohi J, Early pregnancy losses in in vitro fertilization and oocyte donation, *FertilSteril* 1999;72(6):1061-5.
7. Dirnfeld M KM, Goldman S, Calderon I, Gonen Y, Abramovici H, A simplified coculture system with luteinized Granulosa Cells Improves Embryo Quality And Implantation Rates: A Controlled Study, *Fertilsteril* 1997;67(1):120-3.
8. Vanderzwalmen P, AH, PR, MB, AN, AS," Et Al", Blastocyst Development After Sperm Selection At High Magnification Is Associated With Size And Number Of Nuclear Vacuoles. *Reproductive Biomedicine* 2008;17(5):617-27.
9. Agresti A, *Categorical Data Analysis (2nd Edn)*, Wiley I, Editor 2002.
10. Mccullagh P, *Regression Models For Ordinal Data (With Discussion)*, *Journal Of The Royal Statistical Society, Series B* 1980;42:109-42.
11. Sherman M, Cessie L, A Comparison Between Bootstrap Methods And Generalized Estimating Equations For Correlated Outcomes In Generalized Linear Models, *Communications In Statistics-Theory And methods* 1997;26(901-925).
12. Cannon MJ, Warner, L, Taddei, J. A. And Kleinbaum, D. G. What Can Go Wrong When You Assume That Correlated Data Are Independent: An Illustration From The Evaluation Of A Childhood Health Intervention In Brazil, *Statistics In Medicine* 2001; 20:1461-7.
13. Garret M. Fitzmaurice NML, James H, Ware. *Applied Longitudinal analysis* Wiley I, Editor 2004.
14. Hastie TJ, Tibshirani RJ, *Generalized Additive Models* 1990.
15. Landwehr JM, Pregibon D And Shoemaker A, Graphical Methods For Assessing Regression Models, *Journal Of The American Statistical Association* 1984;79:61-3.
16. Grow DR OS, Seltman HJ, Toner JP, Swanson RJ, Kruger TF MS, Sperm Morphology As Diagnosed By Strict Criteria: Probing The Impact Of Teratozoospermia On Fertilization Rate And Pregnancy Outcome In A Large In Vitro Fertilization Population *Fertilsteril* 1994;62:559-67.
17. Nagy ZP V, Liu J, Jorish, Janssenswillenc, Wisanto A, Devroey P, Van Steirteghem AC Results Of 55 Intra Cytoplasmic Sperm Injection Cycles In The Treatment Of Male-Immunological Infertility, *Hum Reprod* 1995;10:1775-80.
18. Nijs M VP, Vandamme B, Segal-Bertin G, Lejeune B, Segal L, Van Roosendaal E, Schoysman R, Fertilizing Ability Of Immotile Spermatozoa After Intracytoplasmic Sperm Injection, *Hum Reprod*, 1996;11:2180-5.
19. Parinaud J MR, Vieitez G, Labal B, Richoille G, Influence Of Sperm Parameters On Embryo Quality, *Fertil Steril* 1993;60:888-92.
20. John L, Frattarelli. Mark P Leondires, Bradley T. Miller, Segars JH, Intracytoplasmic Sperm Injection Increases Embryo Fragmentation Without Affecting Clinical Outcome, *Journal Of Assisted Reproduction And Genetics* 2000;17(4):207-12.

Investigating effective factors on intra cytoplasmic sperm injection embryo quality using the marginal and generalized additive statistical models

Mansouri S¹, Nourijelyani K^{2*}, Nasr-Esfahani MH³, Mohammad K⁴, Eshraghian MR⁴, Yaseri M⁵, M R Gohari⁶, Tavalaei M³, Deemeh MR³

¹M.sc of Biostatistics, Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

²Associated Professor of Biostatistics, Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³Department of Reproduction and Development, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran

⁴Professor of Biostatistics, Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁵PhD Student of Biostatistics, Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁶Assistant Professor of Biostatistics, Department of Statistics and Mathematics, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

***Corresponding Author:**
Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Email: nourik@tums.ac.ir

Abstract

Background & Objectives: In *in vitro* fertilization techniques it is always better to transform a high quality embryo into uterus to enhance the chance of the success. Therefore, a comprehensive research was conducted to identify important factors related to the embryo quality. We considered potential correlation between embryos derived from an infertile couple. In addition, possible nonlinear relationships between the factors and the embryo quality were investigated.

Materials & Methods: In this study, the statistical method of generalized additive models (GAM) has been employed to determine any nonlinear relationship between quantitative exploratory variables and the response. Then, the results were used to analyze the data using the Generalized Estimating Equation (GEE) technique.

Result: Based on results of the GEE, linear relationships of drugs, type of infertility, and polycystic ovary syndrome was statistically significant on embryo quality. Interestingly, after examining the non linear relationships with GAM, in addition to the above variables, smoking status, sperm motility, and uterine factor were also shown to be significant.

Conclusion: Since observations on a single subject in fertilization techniques are correlated and the relationship between factors and outcomes of fertilization may not be linear, the usual methods of GAM should incorporate the potential intra-cluster correlation using models such as the GEE.

Keywords: Generalized Additive Models (GAM), Generalized Estimating Equations (GEE), Intra Cytoplasmic Sperm Injection, In Vitro Fertilization
