



تاثیر روش Swim up بر پارامترهای اسپرم

مقدمه حدود ۱۰ الی ۱۵ درصد زوجها دارای مشکل ناباروری می‌باشند و برای آن‌هایی که به درمان‌های دارویی پاسخ نمی‌دهند استفاده از روش‌های کمک باروری، اجتناب ناپذیر است. Swim up یکی از روش‌هایی است که باعث بهبود کیفیت اسپرم می‌شود.

هدف این مطالعه با هدف بررسی تاثیر Swim up بر حرکت، غلظت و مورفولوژی اسپرم انجام پذیرفت.

این مطالعه‌ی تحلیلی-آزمایشگاهی، بر روی نمونه‌های مایع منی ۳۴۵ مرد مراجعه کننده به مرکز ناباروری نوین مشهد کاندید لقاح داخل رحمی (IUI) انجام شد. قبل و بعد از Swim up اطلاعات لازم شامل تعداد، حرکت و مورفولوژی اسپرم‌ها ثبت گردید. اطلاعات توسط نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۱ و آزمون‌های تی تست زوج، تی تست دو نمونه‌ای مستقل و ANOVA آنالیز شد.

نتایج میانگین تعداد اسپرم‌ها بعد از Swim up ($10^6 \times 84/14$) به طور معنی‌داری کمتر از قبل از Swim up ($10^6 \times 55/92$) بود. میانگین حرکت اسپرم قبل از Swim up ۵۵/۶ درصد و بعد از Swim up ۹۲/۳ درصد بود. Swim up منجر به بهبود حرکت اسپرم در گرید a به میزان $22/11 \pm 7/40$ واحد شده بود.

نتیجه‌گیری بعد از آماده‌سازی به روش Swim up، میزان مورفولوژی طبیعی، حرکت و گریدینگ اسپرم به نحو مطلوبی افزایش می‌یابد.

واژه‌های کلیدی Swim Up sperm count, Morphology, Swim up Grading, Motion

محمود عرفانیان احمدپور

دکتری تخصصی آناتومی، استادیار
دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد

نقیسه فاضل‌نسب

کارشناس ارشد بیوشیمی

مهناز منصوری ترشیزی

متخصص زنان و زایمان، فلوشیپ نازایی

سیما افشارنژاد

دکتری تخصصی بیوشیمی، استادیار
دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد

نگارنده پاسخ‌گو: دکتر محمود عرفانیان
احمدپور

آدرس: مشهد، خیابان آزادی، دانشکده
پزشکی شاهین‌فر

تلفن: ۰۵۱۱-۲۲۵۰۰۴۲

نمابر: ۰۵۱۱-۲۲۵۰۰۴۹

پست الکترونیک:

Mahmood_erfanian@yahoo.com

تاریخ وصول: ۱۳۸۸/۱۱/۵

تاریخ تایید: ۱۳۸۹/۲/۹

مقدمه

ناباروری به عدم ایجاد حاملگی پس از یک سال مقاربت بدون استفاده از هر گونه روش جلوگیری گفته می‌شود. بر اساس آمار جهانی حدود ۱۰ الی ۱۵ درصد زوجها دارای مشکل ناباروری می‌باشند (۱). طی دو دهه‌ی اخیر استفاده از فناوری‌های کمک باروری تحولی شگرف در این زمینه به وجود آورده است. تحریک تخمدانی همراه با تلقیح داخل رحمی (IUI) یا لقاح خارج‌رحمی و تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (IVF-ICSI) امید به حاملگی را در زوجها افزایش داده است (۲). به منظور انجام موفقیت‌آمیز تمامی روش‌های فوق، آماده‌سازی مناسب اسپرم‌ها ضروری به نظر می‌رسد. آماده‌سازی دقیق و مناسب اسپرم، به انتخاب یک روش مناسب بستگی دارد تا بهترین نتیجه را در زنده ماندن اسپرم، حرکت و دیگر پارامترهای مرتبط با ظرفیت پذیری و توانایی لازم در بارور ساختن اووسیت‌ها را به دست دهد (۳).

از این رو روش‌های آماده‌سازی اسپرم در حال پیشرفت هستند تا بتوانند به نحو مطلوبی اسپرم‌های متحرک با نمای مورفولوژی طبیعی را از لکوسیت‌ها، باکتری‌ها و اسپرم‌های مرده که باعث آزاد شدن رادیکال‌های آزاد اکسیژن شده و بر توانایی اسپرم در لقاح‌پذیری تخمک تاثیر منفی دارند، جداسازند (۴).

از بین چهار روش (gradient filtration) (percoll) (swim up) و (sucrose washing) و که برای آماده‌سازی اسپرم مورد استفاده قرار می‌گیرد، گرچه درصد اسپرم‌های طبیعی و متحرک پس از شستشو در تمام این روش‌ها افزایش می‌یابد ولی بیشترین میزان آن مربوط به روش Swim up است. مخصوصاً کاهش تعداد اسپرم‌های آپوپتیک نسبت به نمونه‌ی اولیه، از جمله موارد قابل توجه این روش می‌باشد (۵). هم‌چنین این روش برای افزایش قابلیت باروری در دوره‌ی

درمانی و حذف اسپرم‌هایی که از بلوغ کمتری برخوردار بوده و یا در مرحله‌ی آنپلوئیدی به سر می‌برند مناسب می‌باشد (۶). بررسی مطالعات انجام شده نشان داد که مورفولوژی اسپرم با استفاده از معیار سازمان جهانی بهداشت و تعداد اسپرم‌های متحرک پس از آماده‌سازی اسپرم از مهم‌ترین عوامل موثر در نتایج IUI می‌باشد.

بر اساس معیار سازمان بهداشت جهانی (WHO)، حرکت اسپرم‌ها را می‌توان به صورت زیر درجه‌بندی کرد: **گراید a:** اسپرم دارای حرکت سریع رو به جلو (به این معنی که در دمای ۳۷ سانتی‌گراد دارای سرعت بیشتر از ۲۵ میکرومتر در ثانیه (حدوداً برابر با طول ۵ سر اسپرم یا نصف طول دم اسپرم می‌باشد) و در دمای ۲۰ دارای سرعت بیشتر از ۲۵ میکرومتر در ثانیه باشد).

گراید b: اسپرم دارای حرکت رو به جلوی آهسته.

گراید c: اسپرم فاقد حرکت رو به جلو (حرکت رو به جلوی کمتر از ۵ میکرومتر در ثانیه).

گراید d: اسپرم بدون تحرک.

با وجود این که روش‌های مختلفی برای جداسازی اسپرم وجود دارد (۷)، اما بسیاری هم‌چنان به روش شستشو و swim up مایع سیمن تاکید داشته و آن را برای دستیابی به اسپرم‌های با حرکت بیشتر و پیش‌رونده، مناسب می‌دانند (۹،۸،۵). گرچه این روش توسط مراکز مختلف باروری و ناباروری دائماً در بوته‌ی آزمایش قرار می‌گیرد، ولی ممکن است چگونگی اجرای آن متفاوت باشد.

از این رو این مطالعه با هدف بررسی میزان تاثیر آماده‌سازی اسپرم به روش swim up در بهبود پارامترهای حرکت، غلظت و مورفولوژی اسپرم انجام پذیرفت.

روش کار

این مطالعه به صورت تحلیلی-آزمایشگاهی بر روی ۳۴۵ مرد مراجعه کننده به مرکز ناباروری نوین مشهد جهت ورود به سیکل درمانی IUI انجام پذیرفت. از تمامی بیماران خواسته شد که سه روز قبل از گرفتن نمونه‌ی مایع منی، نزدیکی نداشته باشند. ضمناً شرایط نمونه‌گیری از نظر تهیه نمونه در محیط

¹.Intrauterine insemination

².In vitro fertilization-Intracytoplasmic sperm injection

از آزمون تی تست استفاده شد. اما اختلاف معنی داری بین RY این دو گروه به دست نیامد ($P=0/088$). از عدم وجود اختلاف معنی دار بین این دو گروه این گونه برداشت می شود که تکنیک Swim up خصوصیات هر دو گروه را به یک اندازه بهبود می بخشد.

بحث

هدف از آماده سازی مایع منی، دستیابی به اسپرم هایی است که از حرکت و مورفولوژی بهتری برخوردار باشند. جمع آوری تمام اسپرم های متحرک و طبیعی در یک مرحله از نمونه گیری، جزء اهداف اصلی انجام درمان های کمک باروری است تا بتوان شانس باروری را افزایش داد (۱۱). در این مطالعه با ارزیابی تعداد اسپرم، مشاهده گردید که این میزان از ۵۵/۹۲ میلیون در میلی لیتر قبل از Swim up به ۴۸/۱۴ میلیون در میلی لیتر بعد از آن رسید اما در مطالعه ای که Jameel Tahir در سال ۲۰۰۸ به انجام رساند، تعداد اسپرم ها پس از Swim up افزایش معنی داری یافت (۱۲).

Michael و همکاران نیز به نتایج مشابهی در مورد بهبود پارامترهای اسپرم در روش Swim up دست یافتند. به طوری که اسپرم های جمع آوری شده هم از نظر تعداد و هم از نظر مورفولوژی طبیعی از میزان بیشتری نسبت به روش های دیگر برخوردار بود (۱۳). اما در مطالعه ای زهرا بصیرت در سال ۱۳۸۷ نیز هم چون مطالعه ای حاضر، میانگین تعداد اسپرم ها بعد از Swim up به طور معنی داری کمتر از قبل از Swim up بود. شاید علت این امر کاهش احتمال حرکت در بخش کوچکی از لوله ی سانتریفیوژ در زمانی که اسپرم ها تراکم بیشتری پیدا کرده اند باشد.

علت این امر می تواند کاهش حرکت اسپرم ها به واسطه ی تراکم شدن در لوله ی سانتریفیوژ باشد.

یکی دیگر از پارامترهای اصلی اسپرم، میزان مورفولوژی طبیعی آن است که نقش تعیین کننده ای در باروری افراد دارد. در مطالعه ای حاضر، میزان مورفولوژی طبیعی اسپرم از ۳۲/۸۹ درصد قبل از Swim up به ۴۲/۹۲ درصد بعد از آن افزایش

در بررسی گریدینگ حرکت اسپرم معیار WHO در نظر گرفته شد و اطلاعات به دست آمده قبل و بعد از Swim up به تفکیک در جدول (۲) دیده می شود. اختلاف مقادیر به دست آمده در قبل و بعد از Swim up برای تمامی گریدها از نظر آماری معنی دار بود ($P<0/001$).

جدول ۲: مقایسه میانگین حرکت گرید های مختلف اسپرم در

قبل و بعد از swim up

گرید حرکت اسپرم	قبل از انجام Swim up	بعد از انجام Swim up
Gd	۴۴/۳۲±۷/۳۳	۸/۲۱±۷/۷۹
Gc	۱۴/۱۷±۵/۳۸	۷/۴۲±۵/۸۶
Gb	۳۰/۸۵±۸/۲۲	۴۹/۸۲±۹/۵۶
Ga	۳/۱۵±۱/۴۱	۳۳/۵۲±۱۰/۵۵

از مقادیر به دست آمده می توان نتیجه گرفت که گرید c و گرید d اسپرم، بعد از Swim up کاهش داشته است. دو گرید b و گرید a پس از انجام Swim up افزایش پیدا کرده اند.

جدول ۳: فراوانی اشکال مختلف مایع منی در افراد مورد مطالعه

انواع وضعیت های مایع منی	جامعه آماری
نرمال	۱۹۶
آستنو اسپرمی	۱۳۲
اولیگو اسپرمی	۴
آستنو-اولیگو اسپرمی	۸
آستنو-تراآتو اسپرمی	۲
آستنو-اولیگو-تراآتو اسپرمی	۱
تراآتو اسپرمی	۱

جدول ۴: نمایش RY در افراد با وضعیت های مختلف مایع منی

انواع وضعیت ها	RY (درصد)
طبیعی	۵۶/۴۷
غیر طبیعی	۶۴/۴۵

در دسته بندی بالا: نمونه ها در دو گروه طبیعی (۱۹۶ نفر) و غیر طبیعی (آستنواسپرمی ۱۳۰ نفر) و سایر (۱۳ نفر) قرار گرفتند (جدول ۴). سپس به منظور مقایسه ی مقادیر RY این دو گروه

رسیدند که اگر چه تعداد اسپرم در روش Percoll به صورت معنی‌داری بیشتر از روش Swim up می‌باشد ولی درصد حرکت پیش‌رونده که مربوط به گرید III, IV (یا همان گرید a, b) اسپرم می‌باشد، در روش Swim up بیشتر است (۱۸). هم‌چنان که در مطالعه‌ی حاضر مشاهده می‌گردد، در این روش گرچه به علت شستشوی مایع منی بخشی از اسپرم‌ها از دست رفته‌اند و باعث کاهش غلظت اسپرم‌ها شده، اما به طور معنی‌داری موجب افزایش اسپرماتوزوئیدهای متحرک زنده و به لحاظ مورفولوژیک طبیعی شده است و مطالعات دیگران نیز نشان می‌دهد که در میان جمعیت اسپرم‌های غیرطبیعی، درصد اسپرم‌ها با نقایص دمی و ذرات سیتوپلاسمیک به طور معنی‌داری کاهش خواهد یافت (۱۹).

در مطالعه‌ی حاضر در مقایسه‌ای که بین میزان تاثیر Swim up بر پارامترهای مایع منی گروه‌های مختلف بیماران انجام گرفت، با این که اختلاف معنی‌داری به دست نیامد، اما این اختلاف بسیار نزدیک به سطح معنی‌داری بود ($P=0/075, 0/088$).

در مطالعاتی مشابه نیز، Vijatrasil و همکارانش در سال ۱۹۹۵ دریافتند که اگرچه روش Swim up شاید کمک چندانی به نمونه‌های طبیعی ننماید و حتی ممکن است در این خصوص روش‌هایی مثل Percoll Gradient بهتر از آن عمل نماید (۲۰)، ولی بر طبق مطالعات Adiga و Kumar در سال ۲۰۰۱، این روش در نمونه‌های اولیگو اسپرمی، آستنواسپرمی و تراتواسپرمی کاملاً تاثیر خود را نشان داده و باعث می‌گردد تا اسپرم‌های طبیعی بیشتری جدا شوند و درمان ناباروری از نتایج بهتری برخوردار باشد (۲۱، ۲۲).

شاید بتوان علت معنی‌دار نشدن در این بررسی را این گونه توجیه کرد که تعداد افراد قرار گرفته در هر گروه ناهمگون بوده‌اند. و یا این که با توجه به مطالعات Adiga و همکارانش که اظهار داشتند میزان RY در افراد نرمال و مبتلا به آستنواسپرمی از بقیه گروه‌ها کمتر است، از آن جایی که در دسته‌بندی ما به جز ۵ مورد (چهار مورد اولیگو اسپرمی یک مورد تراتواسپرمی) بقیه موارد واقع شده در گروه سایرین،

یافت که با توجه به افزایش تعداد اسپرم‌های طبیعی بعد از Swim up می‌توان نتیجه گرفت که این روش کمک زیادی به جمع‌آوری اسپرم‌های طبیعی می‌نماید و ممکن است اسپرم‌هایی جدا شوند که با داشتن سربیزی شکل و ناحیه‌ی آکروزومی وسیع در افزایش میزان موفقیت لقاح، موثرتر باشند (۱۴). از ویژگی‌های مهم Swim up، این است که باعث می‌گردد تا اکثر اسپرم‌هایی که دارای اشکال طبیعی هستند مخصوصاً در نمونه‌های اولیگو اسپرمی، آستنواسپرمی و تراتواسپرمی از رسوب تشکیل شده در ته لوله جدا شده و در مایع بالای رسوب شناور شوند (۱۵). عده‌ای نیز بر این باورند که در روش Swim up میزان فراگامانتاسیون DNA نیز به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد (۱۶).

یکی دیگر از پارامترهای اسپرم، حرکت آن است. حرکت اسپرم مخصوصاً اگر در مرحله‌ی گرید a و b باشد، مسلماً با نتایج بهتری همراه خواهد بود. لذا شستشوی مایع منی و خارج ساختن اسپرم از محیط منی، باعث افزایش حرکت آن خواهد شد. در این مطالعه، حرکت اسپرم از حدود ۵۵/۶ درصد قبل از Swim up به ۹۲/۳ درصد بعد از Swim up رسید. لذا درصد قابل توجهی از اسپرم‌هایی که در محیط منی قادر به حرکت نبوده و یا احتمالاً در محیط ویسکوزیته خود مهار شده بودند، توانستند در داخل محیط کشت آزادانه حرکت نمایند. البته حرکت اسپرم به گریدینگ آن کاملاً وابسته است و هر چه گرید حرکت به a نزدیک‌تر باشد اسپرم از حرکت بیشتری برخوردار است. در مطالعه‌ی حاضر هم چنین مشاهده شد که گرید b و a بعد از Swim up افزایش چشم‌گیری یافته است. بعضی از مطالعات گرچه افزایش حرکت اسپرم را در روش‌های غیر از Swim up بیشتر دانستند ولی بر این باورند که حرکت خطی و منحنی اسپرم در روش Swim up بیشتر خواهد بود و Swim up را یک روش استاندارد برای آماده‌سازی مایع منی و جداسازی اسپرم می‌دانند (۱۷). عده‌ای کاهش تولید اکسید نیتریک در این روش را باعث حرکت سریع اسپرم می‌دانند. Shee-uanch و همکاران نیز با مقایسه‌ی دو روش Percoll Gradient و swim up به این نتیجه

آن بر روی افزایش حرکت و مورفولوژی اسپرم خصوصا در نمونه‌هایی که در آنها پارامترهای اسپرم دچار اختلال می‌باشند، مورد توجه بسیاری از افراد می‌باشد. مطالعه‌ی ما نیز روش Swim up را برای آماده‌سازی مایع سمن به ویژه در ناباروری با علل مردانه و خصوصا در سیکل IUI توصیه می‌نماید.

تشکر و قدردانی

با تشکر از تمامی کارکنان محترم مرکز ناباروری نوین مشهد به ویژه سرکار خانم راحله آرام و مریم دانشور که ما را در این تحقیق یاری کردند.

علاوه بر ناهنجاری در یکی از پارامترهای اسپرم، دارای ناهنجاری آستنو نیز بوده‌اند، این علت باعث نزدیک شدن داده‌های گروه‌ها به هم و معنی‌دار نشدن اختلاف‌ها از نظر آماری شده است.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه‌ی حاضر و مقایسه‌ی آن با برخی از مطالعات نشان می‌دهد که با وجود تمامی روش‌های جدید و مختلفی که در گزارشات و مقالات گوناگون به آن اشاره شده است (۲۴،۲۳،۵)، Swim up همچنان در صدر روش‌های آماده‌سازی مایع سمن قرار داشته و اگرچه این تاثیر در مورد نمونه‌های طبیعی مایع منی اندک است اما اثر مثبت و معنی‌دار

کاربرد بالینی	یافته‌ی نوین
Swim up همچنان در صدر روش‌های آماده‌سازی مایع سمن قرار دارد.	بعد از آماده‌سازی به روش Swim up، میزان مورفولوژی طبیعی، حرکت و گریدینگ اسپرم به نحو مطلوبی افزایش می‌یابد.

References

1. Matsunoto AM. Pathophysiology of male infertility In: Keye WR, Chang RJ, Rebar RW, Soules MR. Infertility evaluation and treatment. New York: Saunders; 1995. P: 555-6.
2. Gardner DK, Weissmann A, Howles CM, Shoham Z. Textbook of assisted reproductive techniques: laboratory and clinical prospective. Third ed. London: Martiz Dunitz; 2001. P. 62-7.
3. Martí E, Perez-Pe R, Muino-Blanco T, Cebrián-Perez JA. Comparative study of four different sperm washing methods using apoptotic markers in ram spermatozoa. J Androl. 2006; 27(6):746-53.
4. Boomsma CM, Heineman MJ, Cohlen BJ, Farquhar C. Semen preparation techniques for intrauterine insemination. Cochrane Database Syst Rev. 2007;(4):455-67.

5. Marti E, Perez-PE R, Muino-Blanco T, Cebrian-Perez JA. Comparative study of four different sperm washing methods using apoptotic markers in ram spermatozoa. *Journal of Andrology*. 2006; 27(6): 746-53.
6. Jakab A, Kovacs T, Zavaczki Z, Borsos A, Bray-Ward P, Ward D, et al. Efficacy of the swim-up method in eliminating sperm with diminished maturity and aneuploidy. *Hum Reprod*. 2003; 18(7): 1481-8.
7. Paasch U, Grunewald S, Glander HJ. Sperm selection in assisted reproductive techniques. *Soc Reprod Fertil Suppl*. 2007; 65:515-25.
8. Lopata A, Patullo MJ, Chang A, James B. A method for collecting motile spermatozoa from human semen. *Fertil Steril*. 1976; 27(6):677-84.
9. Pardo M, Bancells N. Artificial insemination with husband's sperm (AIH): techniques for sperm selection. *Arch Androl*. 1989; 22(1):15-27.
10. World Health Organization Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge: Cambridge University Press; 1992:10-15.
11. Pardo M, Bancells N. Artificial insemination with husband's sperm: techniques for sperm selection. *Arch Androl* 1989; (22):15-17.
12. Jameel T. sperm swim up: a simple and effective technique processing for intrauterine insemination. *journal of Pakistan medical association*: 2008:71-4
13. Michael M, Peer S, Anderman S, Ballas S, Ellenbogen A. Post swim-up versus original sperm quality, and strict criteria morphology, its influence on fertilization rate in-vitro fertilization program: a pilot study. *Inte Cong Ser* 2004; 1271:181-4.
14. Adiga SK, Kumar P. Influence of swim-up method on the recovery of spermatozoa from different types of semen samples. *J Assist Reprod Genet* 2001; 18(3):160-4.
15. Dominguez LA, Burgos MH, Fornes MW. Morphometrical comparison of human spermatozoa obtained from semen and swim up methodology. *Andrologia*. 1999; 31(1):23-6.
16. Younglai EV, Holt D, Brown P, Jurisicova A, Casper RF. Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. *Hum Reprod*. 2001; 16(9):1950-3.
17. Wu GJ, Ding DC, Chen IG, Huang YC. Less no production and better motion parameter in human sperm by swim-up processing. *Arch Androl* 2004; 50(5):373-7.
18. Shee-Uan Ch, Hong-Nerng H, Hsin-FU Ch, Kuang-Han Ch, Heng-Ru L, Su-Cheng H, et al. Comparison between a two-layer discontinuous percoll gradient and swim-up for sperm preparation on normal and abnormal semen samples. *J Assist Reprod Genet*. 1995; 12(10):698-703.
19. Parkash P, Leykin L, Chen Z, Toth T, Sayegh R, Chiff I, Isaacson K. Preparation by differential gradient centrifugation is better than swim-up in selecting sperm with normal morphology. *Fertil Steril* 1998; 69(4):722-6.
20. Vijatrasil S, Makemaharn O, Upaisilsathaporn P. Application of the hypo-osmotic swelling test to spermatozoa prepared by swim-up and discontinuous Percoll separation. *Int J Androl*. 1995; 18 Suppl 1:19-22.
21. Adiga SK, Kumar P. Influence of swim-up method on the recovery of spermatozoa from different types of semen samples. *J Assist Reprod Genet*. 2001; 18(3):160-4.
22. Satishi Kumar A, Kumar P. Influence of swim-up method on the recovery of spermatozoa from different types of semen samples. *J Assist Reprod Genet*. 2001; 18 (3): 160-4.

23. Lampiao F, du Plessis SS. Comparing the Multi-ZSC one-step standardized swim-up method to the double-wash swim-up method with regard to the effects of sperm separation on morphology, head morphometry, and acrosome reaction inducibility. *Fertil Steril.* 2006; 86(3):739-41.
24. Ng FLH, Liu DY, Baker HWG. Comparison of Percoll, mini- Percoll and swim-up methods for sperm preparation from abnormal semen samples. *Hum Reprod.* 1992; 7(2): 261-6.