

## تحقیقی

### مقایسه پارامترهای اسپرم در روش Swim up با یک و دوبار شستشو

دکتر زهرا بصیرت\*<sup>۱</sup>، دکتر سید غلامعلی جورسرای<sup>۲</sup>، دکتر مهرداد فارسی<sup>۲</sup>

۱- دانشیار گروه زنان و زایمان، دانشگاه علوم پزشکی بابل. ۲- استادیار گروه آناتومی و جنین‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی بابل.

#### چکیده

**زمینه و هدف:** روش‌های مختلفی برای بهبود پارامترهای اسپرم وجود دارد که از آن جمله می‌توان به روش Swim up اشاره کرد. شستشوی اسپرم مرحله‌ای در این روش ضروری می‌باشد. به نظر می‌رسد: دوبار شستشو به‌ویژه در نمونه‌هایی با غلظت بالا و مواردی که سیمین به‌خوبی مایع نمی‌شود؛ نتایج بهتری به‌دنبال داشته باشد. این مطالعه به منظور مقایسه پارامترهای اسپرم در روش Swim up با یک‌بار و دوبار شستشو انجام شد.

**روش بررسی:** این مطالعه آزمایشگاهی روی ۵۰ نمونه اسپرم مرد مراجعه‌کننده به مرکز ناباروری حضرت فاطمه الزهرا (س) دانشگاه علوم پزشکی بابل، طی سال ۱۳۸۶ صورت گرفت. نمونه‌ها دارای حجم ۲-۵ میلی‌لیتر، تعداد بیش از ۲۰ میلیون، حرکت بالای ۵۰ درصد و مورفولوژی طبیعی بیشتر از ۱۴ درصد برابر معیار کروگر بودند. با در نظر گرفتن شرایط نمونه‌گیری، شستشوی اسپرم در طی دو مرحله صورت گرفت. داده‌ها توسط نرم افزار SPSS-10 و با استفاده از آزمون Paired T-test و repeated measurement آنالیز شدند و  $P < 0/05$  معنی‌دار تلقی گردید.

**یافته‌ها:** میانگین حجم مایع سیمین در افراد مورد مطالعه  $4/05 \pm 1/006$  بود. میانگین حرکت اسپرم در یک‌بار و دوبار شستشو نسبت به قبل از شستشو افزایش یافت ( $P < 0/05$ )، ولی بین یک و دوبار شستشو این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود. با انجام شستشوی دوم، حرکت اسپرم به صورت معنی‌داری در گرید III و IV افزایش یافت و گرید I نیز کاهش پیدا کرد ( $P < 0/05$ ). میانگین مورفولوژی طبیعی اسپرم‌ها با شستشو افزایش یافت، لیکن بین یک بار و دوبار شستشو این افزایش معنی‌دار نبود.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه نشان داد که Swim up روش مناسبی برای آماده‌سازی اسپرم می‌باشد و دوبار شستشو سبب بهبود قابل توجه پارامترهای اسپرم می‌گردد.

**کلید واژه‌ها:** ناباروری، مورفولوژی، گریدینگ، Swim up، اسپرم

\* نویسنده مسؤول: دکتر زهرا بصیرت، پست الکترونیکی: zahra\_basirat@yahoo.com

نشانی: بابل، دانشگاه علوم پزشکی بابل، مرکز تحقیقات باروری و ناباروری حضرت فاطمه الزهرا (س) کابلی، تلفن: ۲-۲۲۷۴۸۸۱ (۰۱۱۱)، نمابر: ۲۲۷۴۸۸۰  
وصول مقاله: ۸۷/۶/۱۷، اصلاح نهایی: ۸۸/۱/۱۷، پذیرش مقاله: ۸۸/۲/۲۹

## مقدمه

۱۰ تا ۱۵ درصد از زوجها دارای مشکل ناباروری هستند. اتیولوژی آنها شامل پاتولوژی لوله‌ای یا لگنی (۳۵ درصد)، عامل مردانه (۳۵ درصد)، مشکلات تخمک‌گذاری (۱۵ درصد) و ناباروری توجیه نشده (۱۵ درصد) می‌باشد (۱). طی دو دهه اخیر استفاده از فناوری‌های کمک باروری، تحولی شگرف ایجاد کرده که موجب کمک فوق‌العاده‌ای به زوجین نابارور شده است. تحریک تخمدانی همراه با تلقیح داخل رحمی (IUI)، امید به حاملگی را در زوجها مبتلا به ناباروری افزایش داده است (۲). سازمان بهداشت جهانی، پارامترهای طبیعی اسپرم را که فقط به‌عنوان یک راهنمای استاندارد در نظر گرفته می‌شود را به صورت مقادیر، حجم ۲ تا ۵ میلی‌لیتر، تعداد ۲۰ میلیون در میلی‌لیتر، حرکت بیش از ۵۰ درصد و مورفولوژی بیش از ۳۰ درصد بیان کرده است (۳). اگرچه تعداد بسیار اندک اسپرم (کمتر از ۵ میلیون در میلی‌لیتر) و حرکت بسیار کم (کمتر از ۲۰ درصد) نشانه به مخاطره افتادن باروری است؛ ولی گاهی اوقات با این مقادیر بسیار کم نیز حاملگی رخ می‌دهد. روش‌هایی وجود دارد که بتوان کیفیت اسپرم‌ها را برای تلقیح افزایش داد. یکی از روش‌هایی که برای آماده‌سازی اسپرم وجود دارد؛ Swim up است که باعث بهبود پارامترهای اسپرم می‌شود (۴). در مقایسه‌ای که بین چهار روش Swim up، Percoll Gradient، Filtration و Sucrose Washing برای آماده‌سازی اسپرم صورت گرفت؛ گرچه درصد اسپرم‌های متحرک و طبیعی، پس از شستشو در تمام این روش‌ها افزایش یافت؛ ولی بیشترین میزان آن مربوط به روش Swim up بود. مخصوصاً کاهش تعداد اسپرم‌های آپوپتیک نسبت به نمونه اولیه از جمله موارد قابل توجه این روش بود (۵). عده‌ای هم روش Mini Percoll را با Swim up مقایسه کرده تا برتری روش دوم را مشخص نمایند (۶). بعضی از مطالعات نیز حاکی از آن است که در آماده‌سازی اسپرم به روش Swim up می‌توان به صورت Double washing عمل نمود، به دلیل این که آن را موجب بهبود پارامترهای اسپرم خصوصاً افزایش درصد اسپرم‌ها با مورفولوژی طبیعی می‌داند (۷). اگرچه این روش در مراکز مختلف باروری و ناباروری در بوته آزمایش قرار دارد؛ ولی

بعضی از محققین تاکید بر انجام آن دارند. البته چگونگی اجرای آن در مراکز مختلف ممکن است؛ متفاوت باشد. مطالعه ما نیز به مقایسه روش یک بار شستشو و دو بار شستشو در Swim up پرداخته است که اهمیت انجام آن مورد اختلاف در آزمایشگاه‌های ART است و تاکنون تحقیق زیادی روی آن صورت نگرفته است. با فرض این که افزایش دفعات شستشو باعث افزایش در جمع‌آوری اسپرم‌های زنده با مورفولوژی طبیعی شود؛ لذا با بهبود کیفیت اسپرم انتظار داریم که موفقیت سیکل‌های درمانی نیز افزایش یابد. مطالعه ما نیز با هدفمندی این که بتوان با اجرای دقیق شستشوی اسپرم به روش Swim up به دلیل این که در بسیاری از مراکز ناباروری از روش Swim up با یک بار شستشو برای آماده‌سازی اسپرم استفاده می‌شود؛ برای دستیابی به اسپرم‌هایی بیشتر با مورفولوژی طبیعی، طراحی گردید. لذا این مطالعه به منظور مقایسه دو روش Swim up با یک بار شستشو و دوبار شستشو بر روی پارامترهای اسپرم انجام شد.

## روش بررسی

این مطالعه آزمایشگاهی دوسوکور روی ۵۰ نمونه اسپرم مرد مراجعه کننده به مرکز ناباروری حضرت فاطمه الزهراء (س) دانشگاه علوم پزشکی بابل طی سال ۱۳۸۶ انجام گرفت. نمونه‌ها با حجم ۵-۲ میلی‌لیتر، تعداد اسپرم بیش از ۲۰ میلیون در میلی‌لیتر، حرکت بالای ۵۰ درصد و مورفولوژی طبیعی بیش از ۱۴ درصد برابر معیار کروگر انتخاب شدند (۲). برای همسان‌سازی نمونه‌ها، همه مردان از نظر سن و عوامل موثر در ناباروری غربال شدند تا عوامل مخدوش کننده حذف شوند. نمونه‌گیری بعد از ۳ تا ۵ روز اجتناب از مقاربت به کمک زوجه در اتاق نمونه‌گیری نزدیک آزمایشگاه انجام گرفت. نمونه‌ها به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه (دنا- ایران) قرار داده شدند، تا به صورت مایع درآیند. سپس پارامترهای اسپرم در طی ۳ مرحله آنالیز شدند.

مرحله اول: قبل از شستشو، ۲۰ میکرولیتر از مایع سیمن بر روی لام کشیده شد و با میکروسکوپ نوری و بزرگ‌نمایی ۴۰ برابر مورد ارزیابی قرار گرفت. پارامترهای اسپرم مثل تعداد، حرکت و گریدینگ آنها ثبت شد. متعاقباً با تهیه اسمیر و انجام مراحل فیکس و رنگ‌آمیزی H&E، مورفولوژی آن

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار تعداد و حرکت اسپرم، قبل از Swim up، بعد از یک بار و دوبار شستشو در ۵۰ مرد مراجعه کننده به مرکز ناباروری حضرت فاطمه الزهراء (س) دانشگاه علوم پزشکی بابل

پارامتر اسپرم	قبل از شستشو (صفر)	یک بار شستشو	دو بار شستشو	P*	P ۰-۱**	P ۰-۲**	P ۱-۲**
تعداد اسپرم (۱۰ <sup>۶</sup> )	۸۷/۸۰±۲۳/۹۳	۵۹/۸۸±۲۸/۵۳	۴۸/۲۸±۲۶/۳۴	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱
تحرك	۵۷/۸۰±۷/۰۸	۸۸/۸۰±۴/۸۰	۸۹/۶۰±۱/۹۸	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۱۵۹

\* مقایسه سه مرحله بر اساس آزمون repeated measurement

\*\* P ۰-۱ اختلاف میانگین نمونه قبل از شستشو و یک بار شستشو بر اساس آزمون تی زوج.

\*\* P ۰-۲ اختلاف میانگین نمونه قبل از شستشو و دوبار شستشو بر اساس آزمون تی زوج.

\*\* P ۱-۲ اختلاف میانگین نمونه یک بار و دوبار شستشو بر اساس آزمون تی زوج.

پیچ خورده، گردن کوتاه و یا بلند و یا بدون گردن بودند، جزء اشکال غیر طبیعی اسپرم در نظر گرفته شدند و با شمارش قریب ۴۰۰ اسپرم در هر نمونه، درصد طبیعی آن محاسبه گردید. داده‌ها بعد از این که وارد نرم افزار SPSS-10 گردید، با استفاده از آزمون‌های Repeated Measurement و Paired T-test آنالیز شدند و  $P < ۰/۰۵$  معنی دار تلقی گردید.

#### یافته‌ها

میانگین حجم مایع منی در افراد مورد مطالعه  $۴/۰۵ \pm ۱/۰۰۶$  به دست آمد. میانگین تعداد اسپرم‌ها و حرکت آنها در جدول یک آورده شده است.

در بررسی Grading مربوط به حرکت اسپرم‌ها که چهار Grade برای آن در نظر گرفته می‌شود؛ مشاهده گردید که در شستشوی بار دوم، حرکت اسپرم در Grade II، III و IV، نسبت به قبل از شستشو افزایش یافته است و Grade I کاهش پیدا کرده است که تمامی این موارد از نظر آماری معنی دار بود ( $P < ۰/۰۵$ ). همچنین در مقایسه Grading بین یک بار و دوبار شستشو افزایش در Grade III، G IV از نظر آماری معنی دار بود ( $P < ۰/۰۵$ ).

میانگین مورفولوژی طبیعی اسپرم‌ها با شستشو افزایش یافت، لیکن بین یک بار و دوبار شستشو این افزایش معنی دار نبود.

#### بحث

در این مطالعه روش Swim up با یک بار شستشو و دوبار شستشو بر روی پارامترهای اسپرم مقایسه شد. افزایش یافتن

مورد بررسی قرار گرفت (۸).

مرحله دوم: برای شستشوی مرحله اول، به اندازه ۲ میلی لیتر مایع سیمن در داخل لوله آزمایش قرار گرفت و به آن ۵ میلی لیتر محیط کشت Ham's F10 اضافه گردید. محیط Ham's به صورت تازه تهیه شده و بعد از اضافه شدن ۱۰ درصد آلبومین انسانی و انکوبه شدن، مورد استفاده قرار گرفت (۸). سپس تمام نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰ سانتریفیوژ شدند. بعد از انجام سانتریفیوژ و جمع شدن اسپرم‌ها در ته لوله، مایع بالای رسوب تشکیل شده، خارج گردید و کمتر از ۰/۵ میلی لیتر محیط کشت در بالای رسوب باقی گذاشته شد و به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه برای Swim up در دمای ۳۷ درجه قرار گرفت تا اسپرم‌هایی که دارای شکل طبیعی و حرکت مناسب هستند؛ به سطح آمده و در داخل محیط کشت بالای خود قرار گیرند. سپس ۲۰ میکرو لیتر از مایع بالای رسوب بر روی لام قرار گرفت و با میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفت و پارامترهای اسپرم ثبت گردید. بعد از آن با تهیه اسمیر و انجام مراحل فیکس و رنگ آمیزی، مورفولوژی آن مورد بررسی قرار گرفت.

مرحله سوم: در این مرحله، نمونه اسپرم با اضافه شدن ۵ میلی لیتر محیط کشت برای بار دوم شستشو گردید و تمام مراحل قبلی تکرار شد.

در بررسی مورفولوژی تمام مواردی که شامل سر بزرگ، سر کوچک، سر شلاقی، سر گلابی شکل، سر بی شکل، سردراز، سر گرد، دوسر، دو دم، دم بلند و یا کوتاه، دم

درصد در شستشوی مرحله اول و ۲۹ درصد در شستشوی مرحله دوم افزایش یافت. Scott به مقایسه تاثیر یکبار و دوبار شستشو در روش Swim up بر مورفولوژی سر اسپرم پرداخت (۶) و به این نتیجه دست یافت که دو بار شستشو در روش Swim up باعث می‌گردد تا اسپرم‌هایی که دارای شکل طبیعی و دارای واکنش آکروزومال بهتری هستند؛ جدا شوند (۶) و یا اسپرم‌هایی جدا شوند که از توانایی بیشتری در مقابل محیط هیپواسماتیک برخوردارند (۱۵). لذا با توجه به تطابق نتایج به‌دست آمده می‌توان شستشوی مرحله دوم در روش Swim up را مناسب دانست و Double washing، که برابر مطالعات بعضی از محققین می‌تواند موجب بهبود در تعداد اسپرم‌ها با مورفولوژی طبیعی شود (۱۶) را به عنوان یک الگوی آزمایشگاهی ارائه داد. عده‌ای نیز بر این باورند که در روش Swim up میزان فراگماتاسیون DNA نیز به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد (۱۷). نتیجه این تحقیق موید آن است که در صورت کاهش میزان فراگماتاسیون در مرحله اول آماده‌سازی اسپرم، بهبودی پارامترهای اسپرم را در مرحله دوم شستشو بیشتر مشاهده خواهیم کرد. بعضی از مطالعات نشان می‌دهد 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 (۱۸)، ولی این روش در نمونه‌های اولیگواسپرمی، آستنواسپرمی و تراواسپرمی کاملاً تاثیر خود را نشان داده و باعث می‌گردد تا اسپرم‌های طبیعی بیشتری جدا شوند و درمان ناباروری از نتایج بهتری برخوردار باشد (۱۹). به همین دلیل، بعضی از محققین انجام Swim up double washing را پیشنهاد داده و معتقدند که این روش مخصوصاً برای انجام IVF که اسپرم‌ها باید در اطراف اووسیت قرار گرفته و در محیط انکوباتور، لقاح انجام پذیرد؛ بسیار مناسب بوده و نتایج بهتری را به‌دنبال خواهد داشت (۱۰). همین ایده در روش آماده‌سازی اسپرم برای انجام IUI نیز وجود داشته و بسیار موثر بوده؛ منتها روش Swim up تک مرحله‌ای آسان‌تر و کم‌هزینه‌تر بوده است (۲۰).

البته این انتظار وجود ندارد که بعد از انجام Swim up در هر نمونه، تفاوت چشمگیری مشاهده گردد. اکثر افرادی که به

تعداد اسپرم‌های گرید III و IV و جمع‌آوری بیشتر آن با داشتن مورفولوژی طبیعی که در شستشوی دوم به روش Swim up، به آن دست یافتیم؛ این نظریه را تقویت می‌نماید که برای دستیابی به اسپرم‌های بیشتر که باید از گریدینگ و مورفولوژی طبیعی خوبی برخوردار باشند، دوبار شستشو مناسب خواهد بود. در شستشوی مرحله دوم به دلیل حذف بسیاری از عواملی که در مایع سیمن وجود دارد؛ اسپرم‌ها از حرکت بهتری برخوردار می‌شوند. چنانچه در این مطالعه حرکت اسپرم‌ها از ۵۷ درصد در نمونه اولیه به ۸۸ درصد در شستشوی مرحله اول و به ۸۹ درصد در شستشوی مرحله دوم افزایش یافت. این روش بر گریدینگ اسپرم‌ها نیز تاثیر گذاشته و در هر مرحله از شستشو، گرید II، III و IV به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت و از میزان گرید I نیز کاسته شد. محققین دیگری نیز به نتایج مشابهی در مورد بهبود پارامترهای اسپرم در روش Swim up دست یافتند؛ به‌طوری که اسپرم‌های جمع‌آوری شده، هم از نظر تعداد و هم از نظر مورفولوژی طبیعی از میزان بیشتری نسبت به روش‌های دیگر برخوردار بود (۹). بعضی از محققین با مقایسه دو روش Swim up و Percoll Gradient به این نتیجه رسیدند که اگرچه تعداد اسپرم در روش Percoll Gradient به صورت معنی‌داری بیشتر از روش Swim up می‌باشد؛ ولی درصد حرکت پیشرونده که مربوط به گرید III و IV اسپرم می‌باشد؛ در روش Swim up بیشتر است (۱۰). همچنین این روش برای افزایش قابلیت باروری در سیکل‌های درمانی و حذف اسپرم‌هایی که از بلوغ کمتری برخوردار بوده و یا در مرحله آنالوئیدی به سر می‌برند؛ مناسب می‌باشد (۱۱). علی‌رغم این که روش‌های مختلفی برای جداسازی اسپرم وجود دارد (۱۲)؛ اما بسیاری همچنان بر روش شستشو و Swim up مایع سیمن تاکید داشته و آن را برای دستیابی به اسپرم‌های با حرکت بیشتر و پیشرونده، مناسب می‌دانند (۱۳ و ۱۴). یکی دیگر از پارامترهای اصلی اسپرم، میزان مورفولوژی طبیعی آن است که نقش تعیین‌کننده‌ای در باروری افراد دارد. لذا اگر طی انجام روشی، بتوان میزان بیشتری از اسپرم‌های طبیعی را جمع‌آوری نمود؛ مسلماً میزان باروری نیز افزایش خواهد یافت. در این مطالعه میزان مورفولوژی طبیعی اسپرم از ۱۹ درصد در نمونه اولیه به ۲۸

شستشو نیز موجب بهبود پارامترهای اسپرم می‌شود.

### نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه ما نشان داد که آماده‌سازی اسپرم به روش Swim up بسیار مناسب بوده و دوبار شستشو موجب بهبود پارامترهای اسپرم می‌شود. همچنین پیشنهاد می‌شود این مطالعه در نمونه‌هایی با ویسکوزیته بالا و نمونه‌هایی با تعداد بالای سلول‌های اپیتلیال و سلول‌های گرد انجام پذیرد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب (شماره ۱۹۵۱۶۸۱۵۳۰) دانشگاه علوم پزشکی بابل بود. بدین وسیله از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی بابل که حمایت علمی و مالی این طرح تحقیقاتی را عهده‌دار بود و همچنین از آقای دکتر قاسم رحمت‌پور رکنی که در جمع‌آوری اطلاعات همکاری داشتند، سپاسگزاری می‌شود.

### References

- 1) Matsunoto AM. Pathophysiology of male infertility. In: Keye WR, Chang RJ, Rebar RW, Soules MR. Infertility Evaluation and treatment. 2<sup>nd</sup>. Pennsylvania: Saunders company. 1995; p:555.
- 2) Gardner DK, Weissmann A, Howles CM, Shoham Z. Textbook of assisted reproductive techniques, laboratory and clinical prospective. 1<sup>st</sup>. London: Martiz Dunitz Ltd. 2001; pp:62-67.
- 3) World Health Organization laboratory manual for the examination of human semen and sperm- cervical mucus interaction. Cambridge: Cambridge University Press. 1992;pp:10-15.
- 4) 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): 160-164.
- 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): 746-753.
- 6) 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 Feb; 7(2):261-266.
- 7) 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 Sep;86(3):739-741.
- 8) Jorsaraei SG, Yousefnia YR, Zainalzadeh M, Moghadamnia AA, Beiky AA, Damavandi MR. The effects of methanolic extracts of ginger (*Zingiber officinale*) on human sperm parameters; an in vitro study. Pak J Biol Sci. 2008 Jul 1;11(13):1723-1727.

مراکز ناباروری مراجعه می‌نمایند؛ دارای مشکل اساسی در تعداد، حرکت و یا مورفولوژی اسپرم می‌باشند. لذا هدف این است که چقدر می‌توان به حذف اسپرم‌های غیرطبیعی کمک نمود و گاهی اوقات اختلاف نه چندان قابل توجه، نهایتاً نتایج را به نفع بیمار تغییر می‌دهد. به همین خاطر بایستی نهایت سعی را در جمع‌آوری اسپرم‌های متحرک و طبیعی انجام داد. نتایج مطالعه ما و ارزیابی آن در کنار بعضی از مطالعات نشان می‌دهد که با وجود تمامی روش‌های جدید و مختلفی که در گزارشات و مقالات گوناگون به آنها اشاره شده است (۴-۷)، Swim up همچنان در صدر روش‌های آماده‌سازی مایع سیمین قرار داشته و اثر مثبت و معنی‌دار آن بر روی افزایش حرکت و مورفولوژی اسپرم مورد توجه بسیاری از افراد می‌باشد. مطالعه ما نیز روش Swim up را برای آماده‌سازی مایع سیمین مخصوصاً درسیکل IUI توصیه می‌نماید و این که دوبار

- 9) Michaeli M, Peer S, Anderman S, Ballas S, Ellenbogen A. Post swim-up versus original sperm quality, and strict criteria morphology, it's influence on fertilization rate in in vitro fertilization program: a pilot study. Intranational Congress Series. 2004; 1271:181-184.
- 10) 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.
- 11) Jakab A, Kovacs T, Zavaczki Z, Borsos A, Bray-Ward P, Ward D, Huszar G. Efficacy of the swim-up method in eliminating sperm with diminished maturity and aneuploidy. Hum Reprod. 2003; 18(7): 1481-1488.
- 12) Paasch U, Grunewald S, Glander HJ. Sperm selection in assisted reproductive techniques. Soc Reprod Fertil Suppl. 2007;65:515-25.
- 13) Lopata A, Patullo MJ, Chang A, James B. A method for collecting motile spermatozoa from human semen. Fertil Steril. 1976 Jun;27(6):677-684.
- 14) Pardo M, Bancells N. Artificial insemination with husband's sperm (AIH): techniques for sperm selection. Arch Androl. 1989;22(1):15-27.
- 15) Esteves SC, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Effect of swim-up sperm washing and subsequent capacitation on acrosome status and functional membrane integrity of normal sperm. Int J Fertil Womens Med. 2000 Sep-Oct;45(5):335-341.
- 16) Scott RT Jr, Oehninger SC, Menkveld R, Veeck LL, Acosta AA. Critical assessment of sperm morphology before and after double wash swim-up preparation for in vitro fertilization. Arch Androl. 1989;23(2):125-129.

17) Younglai EV, Holt D, Brown P, Jurisicova A, Casper RF. Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. Hum Reprod. 2001 Sep;16(9):1950-1953.

18) Vijatrasil S, Makemaham O, Upaisilsathaporn P. Application of the hypo-osmotic swelling test to spermatozoa prepared by swim-up and discontinuous Percoll separation. Int J Androl. 1995 Jun;18 Suppl 1:19-22.

19) 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 Mar;18(3):160-164.

20) Inaudi P, Petrilli S, Joghtapour A, Trusso P, Petraglia F. Reduction of steps in the preparation of motile sperm for intrauterine insemination does not reduce efficacy of the procedure: simplified one-step swim-up method versus classic swim-up. Hum Reprod. 2002 May;17(5):1288-1291.