زيادة كفاءة القدرة التخصيبية في عمليات التلقيح الاصطناعي و الحقن المجهري لمرضى العقم المصابين بوهن النطف الحاد بأستخدام الوسط FertiCult Flushing Medium

سماح عامر حمود حريب العبيدي كلية العلوم / جامعة الكوفة

الخلاصة

تم فحص وتنشيط 45 عينة من المني للرجال المصابين بوهن النطف الحاد،وقد هدف البحث الى تحسين القدرة الاخصابية وتنشيط معالم النطف في الزجاج بأستخدام الوسط الزرعي FertiCult flushing medium وثلاث تقنيات مختلفة والمتمثلة بالسباحة للأعلى والغسل والنبذ والخلط بعد الغسل والنبذ وبمدد حضن 30-45-60 دقيقة لعمليات التلقيح الاصطناعي داخل الرحم واستخدام تقنية الغسل والسباحة للأعلى وبمدد حضن (5-30-45)دقيقة لعمليات الحقن المجهري . بينت النتائج ارتفاعاً معنوياً ($p<0.05$) في النسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف ومعامل حركة النطف وانخفاضاً معنوياً في تركيز النطف والنسبة المئوية للنطف غير السوية وتركيز خلايا الدم البيض بعد استخدام الوسط الزرعي والتقنيات الثلاث وتركز في تقنية السباحة للأعلى وعند مدة حضن 60 دقيقة. اما في عمليات الحقن المجهري وعند مدة حضن 45 دقيقة وجد حصول زيادة معنوية ($P<0.05$) في النسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف ومعامل حركة النطف والنسبة المئوية للنطف السوية، وانخفاض معنوي ($P<0.05$) في تركيز النطف وتركيز خلايا الدم البيض مقارنة بقيمها قبل التنشيط وبعده باستخدام مدتي حضن (5 - 30) دقيقة . .نستنتج من الدراسة الحالية ان للوسط الزرعي FertiCult flushing medium دور واضح في تنشيط معالم النطف واستخدامها لزيادة فرص نجاح عمليات الإخصاب الخارجي .

المقدمة

يعد العقم مسؤولية مشتركة بين الذكر و الأنثى، لذا من الضروري تقويم الزوجين سوية كوحدة متممة لبعضها الآخر عند البدء بدراسة أسباب العقم (Pal *et al*.,2006). ويعد المريض مصاباً بوهن النطف عندما تكون النسبة المئوية للنطف المتحركة اقل من 32% في ظرف ساعة واحدة من القذف (WHO,2010). وتمثل قلة حركة النطف واحدة من أهم الأسباب الشائعة في عدم خصوبة الذكر اذ ان حوالي أكثر من 20% من الرجال غير الخصبين يعانون من وهن النطف Asthenospermia(Curi *et al* ., 2003), واستعمل العلماء تقنيات متعددة لعزل النطف ،واغلب هذه التقنيات تسعى الى حصاد أعلى نسبة مئوية للنطف المتحركة سوية الأشكال، ومن بين هذه التقنيات غسل النطف والسباحة نحو الأعلى Washing and swim up(Wikland *et al* .,1987)، وتقنية ترشيح صوف الزجاج Glass wool –column filtration (Paulson and Polakoski,1977)، وتقنية الترسيب بالهجرة والجذب Migration –Gravity sedimentation (Tea *et al*.,1984)، وتقنية تدرج الكثافات Density gradient (Pousette *et al*.,1986). ويحتوي الوسط الزرعي FertiCult flushing medium على البيكاربونات والأملاح والكلوكوز والبايروفيت واللاكتيت والانسولين والبومين مصل الدم (Bandularatne and Bongso , 2002) ، وان تحضير النطف عن طريق استخدام وسط يحوي على الكلوكوز واللاكتيت والبيكاربونات ينتج عنه زيادة معنوية في الحركة التقدمية للنطف بنسبة 16 - 40% من الخلايا النطقية (Holt and Harrison , 2002)واختلفت الاساط الزرعية المستخدمة لغرض تنشيط معالم النطف خارج الجسم الحي ومنها مستنبت آيرل (Earle's)، وهام أف- 10(Ham's F-10) ، وبيكر ويتنغام –ويتين (BWW) وويتنغام-ت 6 (Whittingham's-T6)، ومستنبت مينزو-ب2 (Menezo's-B2) (Sepalla,1985) .و المستنبتات المستخدمة لتنشيط المني البشري والذي ينتج بفعلها نوعية مني جيدة تعد واحدة من بين مختلف العوامل المهمة في نجاح عملية علاج عدم الخصوبة في الزجاج (Kaewnoonual *et al.*, 2008)، . وتعالج حالات العقم المتمثلة بمتلازمة قلة ووهن وتشوه النطف بوساطة عملية التلقيح الاصطناعي داخل الرحم Intrauterine insemination(IUI) باستخدام نطف الزوج Artificial insemination by husband (AIH)وايضاً باستخدام عملية الحقن المجهري داخل سايتوبلازم البيضة Intracytoplasmic sperm injection(ICSI) اذ اظهرت نتائجها في داخل الرحم نسبة نجاح جيدة في علاج العقم المفسر وغير المفسر (Motazedian *et al.*, 2010).

المواد وطرائق العمل

جمعت عينات السائل المنوي في مركز الخصوبة / مدينة الصدر الطبية/ محافظة النجف الأشرف في أطباق بتري نبيذه Petri–dishes نظيفة ومعقمة وجافة بطريقة الاستمناء باليد Masturbation بعد مدة انقطاع Abstinence period لا تقل عن ثلاثة أيام ولا تزيد عن خمسة أيام،ثم وضعت العينات قبل فحصها في الحاضنة بدرجة 37˚م للسماح لها بالاماعة الطبيعية و تم فحصها عيانياً ومجهرياً بعد تثبيت زمن الاماعة Liquefaction time كالأتي :

1. **الفحص العياني - Macroscopic Examination**

A:- زمن الاماعة Liquefaction Time: يمتاز المني المتدفق حديثاً بكونه سائلاً وسرعان ما يتحول الى حالة شبه صلبة Semisolid أو متخثرة تحت تأثير أنزيم Protienkinase الذي تفرزه الحويصلات المنوية, وتحدث الاماعة الطبيعية خلال 15 – 20 دقيقة بعد جمع العينة.

B:- الأس الهيدروجيني PH: تم قياس الأس الهيدروجيني بعد الاماعة بوساطة أشرطة خاصة لهذا الغرض(Germany) Universalindkator PH مرقمة من 1-14, ويكون الأس الهيدروجيني للسائل المنوي نوعاً ما قاعدياً يتراوح ما بين 7.0 – 8.5 (WHO,2010) .

C:-حجم السائل المنوي : تم قياس حجم العينة بوساطة أنابيب الاختبار المدرجة (المرشدي, 2007).

D: اللزوجة Viscosity: تم تقدير لزوجة المني المائع من خلال ملاحظة الخيط المخاطي ، وذلك بدفق العينة من ماصة باستور,ويعد قوام المني سوياً عند تدفقه قطرة فقطرة من الماصة, بينما يكون القوام شاذاً عندما تكون العينة خيطاً أكثر من 3سم (WHO,1999).

2.الفحص المجهري Microscopic Examination :- أخذت قطرة واحدة من كل عينة ممزوجة جيدا بعد الاماعة التامة ووضعت القطرة في مركز جهاز ماكلر(Sperm meter)Makler chamber وغطيت بغطاء الجهاز ثم فحصت العينات تحت القوة 10X ومن ثم تحت القوة 40X قبل التنشيط وبعده لتحديد معالم النطف الآتية :-

A:- تركيز النطفSperm concentration:–تم تقدير تركيز النطف من وضع20مايكروليتر من عينة السائل المنوي في حفرة خاصة في مركز العداد والمخصصة لهذا الغرض ،و تم حساب عدد النطف في عشرة مربعات بخط مستقيم من بين 100 مربع.

B:- النسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف

Percentage of Sperm Motility and Grade of Sperm Activity

تم تحديد النسبة المئوية للنطف المتحركة باستخدام جهاز Sperm meter وحسب المعادلة الآتية :

$$\text{النسبة المئوية للنطف المتحركة\%} = \frac{\text{عدد النطف المتحركة حركة تقدمية}}{\text{عدد النطف الكلي}} \times 100$$

وتم تحديد درجة نشاط النطف بالاعتماد على ما ورد في دليل منظمة الصحة العالمية (WHO,1999) وذلك وفق التدرج الاتي :-

0 – نطف غير متحركة ،1- نطف ذات حركة موضعية،2- حركة متوسطة تقدمية بطيئة ،3- حركة جيدة تقدمية مستقيمة ،4- حركة جيدة جداً تقدمية خطية مستقيمة .

C:- معامل حركة النطف Sperm Motility Index (SMI): تكون بعض العينات ذات نسبة مئوية عالية لحركة النطف ولكنها ذات درجة نشاط قليلة ، بينما تظهر عينات آخرى نسبة مئوية للنطف المتحركة قليلة ودرجة نشاط عالية ، لذلك سعت البحوث الى قياس معامل حركة النطف للربط بين هذين المعلمين المهمين (Bartoov *et al.*,1991) ويحسب معامل حركة النطف من حاصل ضرب:

SMI = النسبة المئوية للنطف المتحركة × درجة نشاط النطف

D:- النسبة المئوية للنطف السوية Percentage of Normal Sperm Morphology : تم تميز شكل النطف باستخدام Spermac stain kit قبل التنشيط وبعده (Oettle,1986)، وفحصت بالمجهر الضوئي تحت العدسة الكبرى (100x) باستعمال Oil immersion وحسبت النسبة المئوية للنطف السوية وفق المعادلة الآتية :

$$\text{النسبة المئوية للنطف السوية\%} = \frac{\text{عدد النطف السوية}}{\text{عدد النطف الكلي}} \times 100$$

ويعد المريض مصاباً بتشوه النطف إذا كانت النسبة المئوية للنطف السوية اقل من 30 % (WHO,2010) .

E: تركيز خلايا الدم البيض والخلايا البلعمية Leukocytes and Phagocytes: Concentration:تم حساب تركيز خلايا الدم البيض والخلايا البلعمية بأستخدام (LeucoScreen kit, Fertipro).

3. تنشيط معالم النطف:- تم تحديد مرضى وهن النطف الحاد وإجراء عملية تنشيط النطف وتحضيرها لعمليات التلقيح الاصطناعي بثلاث تقنيات مختلفة وبمدد حضن(30-45-60)وكالاتي:

اولاً:- تقنية السباحة للأعلى Swim up Technique: تم وضع 0.5 مل من المستنبت الجاهز في أنبوبة اختبار مدرجة ثم دفع 0.2 مل من السائل المنوي بوساطة ماصة باستور الى قعر الأنبوبة برفق وحضنت بصورة مائلة في 37ْم بالحاضنة بالمدد السابقة المشار إليها أعلاه . بعدها تم اخذ قطره من السطح العلوي لغرض الفحص عند كل مدة حضن (المرشدي ، 2006).

ثانياً:- تقنية الغسل والنبذ Centrifugation Wash-Out Technique:استعملت تقنية الغسل والنبذ (الهادي ،1997) حيث تم وضع 0.5 مل من المستنبت مع 0.2 مل من السائل المنوي ثم أجريت عملية النبذ بقوة 2000 دورة / دقيقة لمدة 5 دقائق. وأزيل الطافي بعد عملية النبذ وغطيت الحبيبة النطفية pellet بـ 0.5 مل من المستنبت ثم وضعت الأنبوبة في الحاضنة بشكل مائل وفحصت عند كل مدة حضن مشار اليها سابقاً بأخذ قطرة من السطح العلوي.

ثالثاً :- تقنية الخلط بعد الغسل والنبذ Mixing After Washing and Centrifugation: يوضع 0.5 مل من المستنبت مع 0.2 مل من السائل المنوي وينبذ بقوة 2000 دورة /دقيقة لمدة 5 دقائق ثم أزيل الطافي وغطيت الحبيبة النطفية pellet بـ 0.5 مل من المستنبت وتمزج برفق بوساطة ماصة باستور بعدها تحضن بالمدد الثلاث المذكورة مسبقا بصورة مائلة وتفحص بأخذ قطره من السطح العلوي عند كل مدة. اما الجزء الاخر من العينات فتم تنشيطها لعمليات الحقن المجهري بأستخدام الطريقة الموصوفة فيGardner وجماعته (2007) تقنية الغسل والسباحة للأعلى وهي بأخذ عينة السائل المنوي بشكل كامل ووضعت في أنبوبة اختبار مدرجة وأضيف إليها 5مل من الوسط وأجريت عملية النبذ بقوة 3000 دورة/دقيقة لمدة 10دقائق ،ثم أزيل الطافي وتم إضافة 0.2مل من الوسط الى الحبيبة النطفية وحضنت بثلاث مدد زمنية (5-30-45) دقيقة حيث تم الفحص بأخذ قطرة قريبة من Pellet عند كل مدة حضن.

التحليل الاحصائي

تم استعمال البرنامج الاحصائي (SPSS 10.01) الإصدار 1999 في تحليل النتائج باستخراج المتوسط الحسابي و الخطأ القياسي(Mean+SE)، وكذلك تم استعمال اختبار T-test لتحليل الاختلافات المتواجدة بين المجاميع الرئيسة والثانوية تحت مستوى احتمالية($P<0.05$) (George *et al*.,2003).

النتائج والمناقشة

أشارت جميع الدراسات الى ان لتنشيط النطف البشرية خارج الجسم لغرض استخدامها في عمليات التلقيح الاصطناعي ، أهمية كبيرة في التغلب على العديد من مشاكل السائل المنوي غير السوي ، كذلك أهميته في اختزال الوقت اللازم لتمكين النطف مقارنة مع حدوث هذه العملية داخل الجسم الحي (Dugan *et al*.,1997) ، و يعتمد التلقيح في الجسم الحي بصورة رئيسة على حركة النطف وعددها وذلك لان الإخصاب داخل الجسم يحتاج الى مرور النطف داخل مخاط عنق الرحم الذي يعتمد بطبيعته على الحركة التقدمية الخطية للنطف ،وان دراسة تأثير استخدام مختلف الأوساط الزرعية ومختلف التقنيات في الزجاج لزيادة تحسين معالم النطف وعزلها عن البيئة المحيطة وجدت كفرصة لعلاج عدم الخصوبة لمرضى العقم (Kaewnoonual *et al* .,2008) ،وتصمم التقنيات المستخدمة في تنشيط النطف البشرية في الزجاج أو خارج الجسم بشكل يحاكي أو يقلد العمليات التي تحدث في الجسم الحي من حيث الفصل بين النطف والبلازما المنوي ، واختيار النطف ذات الحركة الطبيعية والجيدة (Yogev *et al* , 2000). بينت نتائج الدراسة الحالية وباستخدام الوسط الزرعي FertiCult flushing medium ولجميع التقنيات ولمختلف أوقات الحضن حدوث نقصاً معنوياً ($P<0.05$) في تركيز النطف مقارنة بقيمها قبل التنشيط ، وهذا يتفق مع ما توصل إليه الجراح (2002) ، الى انخفاض في تركيز النطف بعد التنشيط مقارنة بمجموعة السيطرة قبل التنشيط ، وربما يعود السبب الى انخفاض تركيز النطف الى بقاء النطف التي لا تمتلك القابلية على الحركة في قعر أنبوبة التنشيط ولأثر استخدام التقنيات الثلاث في إقصاء النطف عديمة الحركة والميتة وغير الناضجة ،كما اظهرت نتائج الدراسة حصول انخفاضاً معنوياً ($P<0.05$) في تركيز النطف وخاصة باستعمال تقنية السباحة للأعلى وبمدد التحضين الثلاث (30 - 45 - 60) دقيقة في حالة وهن النطف الحاد ، وقد جاءت هذه النتائج منسجمة مع ما توصل إليه الشمرتي (2008) بأن استعمال تقنية السباحة للأعلى (مستنبت آيرل لوحده ومستنبت آيرل+ فيتامين E) سبب نقصاناً معنوياً ($P<0.05$) في تركيز النطف مقارنة مع تقنيتي السباحة للأسفل والخلط ،ويعزى هذا النقصان الى بقاء النطف غير المتحركة والنطف الميتة في قعر أنبوبة التنشيط ، والنطف ذات السرعة الجيدة تكون وحدها قادرة على السباحة للأعلى ومقاومة تأثير الجاذبية(Stovall *et al*.,1994) ،(الجداول 1،2،3) وبينت نتائج الدراسة الحالية عند تنشيط النطف خارج الجسم الحي باستعمال الوسط الزرعي حدوث زيادة معنوية ($P<0.05$) في النسبة المئوية للنطف المتحركة ، ودرجة نشاط النطف ، ومعامل حركة النطف قياساً بقيمها قبل التنشيط وبأستخدام تقنية السباحة للأعلى ، وقد يعزى ذلك الى قابلية

النطف على الاستفادة من المادة الغذائية والايونات اللاعضوية الموجودة في الوسط خلال مدد التحضين حيث تعمل على تجهيز المايتوكوندريا بالمواد الغذائية(الكلكوز) الضرورية لتحفيزها على توليد الطاقة اللازمة لحركة النطف عن طريق تحول مركب الادينوسين ثلاثي الفوسفات (ATP) الى مركب الادينوسين ثنائي الفوسفات (ADP)، وانتقال الطاقة من المايتوكندريا الى ذيل النطفة لزيادة الحركة (Kasai *et al*.,2002)و بينت نتائج هذه الدراسة حدوث انخفاضاً معنوياً ($P<0.05$) في النسبة المئوية للنطف غير السوية بعد التنشيط مقارنة بقيمتها قبل التنشيط بأستخدام تقنية السباحة للأعلى لظاهرة وهن النطف الحاد وجاءت هذه النتائج منسجمة مع ما أكده Harris وجماعته (1981) من حصول نقص معنوي في النسبة المئوية للنطف ذات الاشكال غير السوية السابحة للأعلى باستخدام تقنية السباحة للأعلى ، وربما يعود السبب الى ان النطف ذات الاشكال السوية، والتي تمتاز بنشاطها العالي هي وحدها قادرة على الصعود الى الأعلى بتحفيز وسط التنشيط ، فيما تبقى النطف ذات الاشكال غير السوية التي تتميز بحركتها الضعيفة في قعر أنبوبة التنشيط (Makler *et al* .,1998) .

أشارت نتائج الدراسة حصول نقصاً معنوياً ($P < 0.05$) في تركيز خلايا الدم البيض باستخدام تقنية السباحة للأعلى وبمدة 60 دقيقة مقارنة بتركيزها قبل التنشيط وبعده (الجدول3) وربما تعزى هذه النتيجة إلى بقاء هذه الخلايا في قعر أنبوبة التنشيط لكونها غير متحركة ولا يمكنها الوصول للأعلى حيث تعمل قوة الجاذبية على بقائها في قعر الأنبوبة وأشارت الدراسات ان عملية النبذ لعينات السائل المنوي تنشط خلايا الدم البيض بتركيز اقل من$10^6\times1$ / خلية وتحفزها لإنتاج الانواع الاوكسجينية الفعالة وتكوين اوكسيد النتريك (Shekarriz *et al*., 1995) ، كما ان تقنية الخلط تزيد من تركيز خلايا الدم البيض بسبب تأثير عملية الخلط مع الوسط في صعود هذه الخلايا إلى السطح العلوي للأنبوبة, وتتفق هذه النتيجة مع ما توصل إليه الخزرجي (2007) في ان معدل إقصاء خلايا الدم البيض باستخدام تقنية السباحة للأعلى كان أعلى من معدل إقصاء هذه الخلايا عند استخدام تقنية السباحة للأسفل والخلط. أظهرت نتائج تنشيط معالم النطف بأستخدام الوسط الزرعيFertiCult flushing medium لمرضى وهن النطف لعمليات الحقن المجهري بأستخدام تقنية الغسل والسباحة للأعلى وبمدد الحضن الثلاث (5-30-45) دقيقة حصول انخفاض معنوي ($P< 0.05$) في تركيز النطف وتركيز خلايا الدم البيض, وزيادة معنوية ($P< 0.05$) في النسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف ومعامل حركة النطف والنسبة المئوية للنطف السوية مقارنة بقيمها قبل التنشيط،الجدول (4) وهذا يتفق مع ما جاء به Kaewnoonual وجماعته (2008) في وجود فروقات معنوية في معالم النطف قبل التنشيط وبعده باستخدام أوساط زرعية مختلفة، وقد يعزى ذلك إلى أثر الوسط الزرعي وطبيعة التقنية أعلاه في حصول هذه الفروقات المعنوية حيث عملت هذه التقنية على إزالة النطف غير السوية الحركة والشكل، وخلايا الدم البيض، والنطف غير الناضجة، والمخلفات من البلازما المنوي بعملية الغسل، ثم إجراء تنشيط للحبيبة النطفية بأضافة الوسط الزرعي الغني بالمواد المنشطة لتحرير الطاقة وزيادة سباحة النطف السوية إلى الأعلى (Lachaud *et al*.,2004). وأظهرت مدة التحضين45 دقيقة حصول تحسناً معنوياً ($P < 0.05$) في معالم النطف كافة و المتمثلة بتركيز النطف والنسبة المئوية للنطف المتحركة ودرجة نشاط النطف ومعامل حركة النطف والنسبة المئوية للنطف السوية وانخفاض في تركيز خلايا الدم البيض مقارنة بمدتي حضن(5- 30) دقيقة، وقد يعود السبب في ذلك الى تكيف النطف في الوسط الزرعي بهذه المدة والاستفادة من محتوياته الملحية الأيونية مثل الصوديوم, والبوتاسيوم, والكالسيوم, والمغنيسيوم, والفوسفات, والبايروفيت, واللاكتيت كما هو الحال في باقي المستنبتات حيث تعمل هذه المكونات على تنشيط النطف وزيادة تنظيم حركتها ونشاطها (Munire *et al*.,2004). ومن المكونات الأخرى لوسط FertiCult flushing medium بروتين ألبومين مصل الدم HSA ،الذي يقلل من التأثير المؤذي لقوة النبذ على حركة النطف، بتغطية جزيئاته للغشاء الخلوي للنطف التي ينتج عنها منع حدوث تحطم غشاء النطف المغسولة (Makler and Jakobi,1981)،ويستخدم الألبومين في عمليات تنشيط النطف ؛كونه يعمل مضاداً للأكسدة حيث يجهز مجاميع الثايول Thiol groups اللازمة لفعالية مضادات الأكسدة (Ernster,1993).و أشارت نتائج الدراسة إلى حدوث زيادة معنوية ($P < 0.05$) في النسبة المئوية للنطف السوية عند تنشيط النطف لعمليات الحقن المجهري في مدة حضن 45 دقيقة، وتعزى هذه النتيجة الى ان النطف السوية وذات الحركة التقدمية هي على الغالب تصل الى الوسط الزرعي و إقصاء النطف غير السوية الشكل بعملية النبذ عند إزالة الطافي ؛لأن هذه الخلايا تكون كثافتها قليلة وعديمة الحركة فلا تصل إلى الحبيبة النطفية (Matchell,2005). ويعد عدد النطف السوية Normal sperm morphology من احد معالم النطف المهمة لحدوث الاخصاب بالـ ICSI (Celik-Ozenci *et al*.,2004)، وأشار Gomes وجماعته (2000) إلى انخفاض معدل الاخصاب عند استخدام النطف ذات الشكل غير السوي باستخدام تقنية الـ ICSI مقارنة مع مجموعة السيطرة, في حين عُد شكل النطف السوي والحركة النشطة من أهم معالم النطف وأفضلها لتقويم عملية نجاح الحقن المجهري بسبب الاعتماد على خطوات الاختيار الحر للنطف لأخصاب البويضة (Karpuz *et al*., 2007) الجدول (4).

الجدول(1) تأثير استخدام الوسط الزرعي FertiCult Flushing Medium في تنشيط معالم النطف للمرضى المصابين بوهن النطف الحاد بثلاث تقنيات مختلفة وبمدة حضن 30 دقيقة.

المعالم المدروسة	قبل التنشيط	بعد التنشيط		
		السباحة للأعلى	الغسل والنبذ	الخلط بعد الغسل والنبذ
تركيز النطف ($\times10^6$ نطفة/مل)	a 44.1 ±9.04	b 9.5 ± 3.5	b 12.6 ± 6.6	c 19.8 ± 6.3

النسبة المئوية للنطف المتحركة	a 13.6 ±1.9	b 35.7 ± 9.04	c 27.1 ± 6.6	a 15.3 ± 4.4
درجة نشاط النطف	a 1.8 ±0.2	b 2.9 ± 0.3	c 2.2 ± 0.5	a 1.9 ± 0.4
معامل حركة النطف	a 23.6 ±5.1	b 92.5 ± 9.9	c 68.2 ±6.6	a 27.5 ± 5.4
النسبة المئوية للنطف غير السوية	a 69.1 ±6.3	b 36.2 ± 8.1	c 47.8 ± 3.9	d 53.5 ± 6.03
تركيز خلايا الدم البيض ($\times 10^6$ خلية/مل)	a 2.9 ±0.3	b 0.1 ± 0.03	c 0.3 ± 0.09	d 1.1 ± 0.3

القيم تمثل المعدل ± الخطأ القياسي S.E

عدد العينات = 11 (P<0.05) الحروف المتباينة دلاله على المعنوية .

الجدول(2) تأثير استخدام الوسط الزرعي FertiCult Flushing Medium في تنشيط معالم النطف للمرضى المصابين بوهن النطف الحاد بثلاث تقنيات مختلفة وبمدة حضن 45 دقيقة.

المعالم المدروسة	قبل التنشيط	بعد التنشيط		
		السباحة للأعلى	الغسل والنبذ	الخلط بعد الغسل والنبذ
تركيز النطف ($\times 10^6$ نطفة/مل)	a 31±7.8	b 4.7± 0.5	c 6.4±1.5	d 10.1± 2.4
النسبة المئوية للنطف المتحركة	a 13±2.1	b 45.9± 7.5	c 40.6± 6.6	d 22.4± 3.3
درجة نشاط النطف	a 1.4±0.4	b 2.6± 0.5	c 2.1± 0.4	c 2.1± 0.4
معامل حركة النطف	a 18.5±3.6	b 103.5±8.4	c 76.4± 13.3	d 54.1± 10.3
النسبة المئوية للنطف غير السوية	a 80.5±6.03	b 35.5± 3.01	c 46± 7.2	d 55.5± 3.3
تركيز خلايا الدم البيض ($\times 10^6$ خلية/مل)	a 4.4±0.7	b 0± 0.0	c 0.6± 0.4	d 1.5± 0.5

القيم تمثل المعدل ± الخطأ القياسي S.E عدد العينات = 11 (P<0.05) الحروف المتباينة دلاله على المعنوية .

الجدول(3) تأثير استخدام الوسط الزرعي FertiCult Flushing Medium في تنشيط معالم النطف للمرضى المصابين بوهن النطف الحاد بثلاث تقنيات مختلفة وبمدة حضن 60 دقيقة.

المعالم المدروسة	قبل التنشيط	بعد التنشيط		
		السباحة للأعلى	الغسل والنبذ	الخلط بعد الغسل والنبذ
تركيز النطف ($\times 10^6$ نطفة/مل)	a 29.3±1.9	b 3.6± 0.2	b 4.1± 1.4	c 7.8± 0.9
النسبة المئوية للنطف المتحركة	a 13.3±2.2	b 55.9± 9.5	c 44.8± 6.9	d 17.7± 1.6

درجة نشاط النطف	a 1.3±0.2	b 3.2± 0.6	c 2.6± 0.3	d 1.7± 0.2
معامل حركة النطف	a 31.1±4.4	b 170.8± 7.08	c 115.4±11.7	D 42.9± 4.4
النسبة المئوية للنطف غير السوية	a 84±3.8	b 26.8± 6.01	c 41± 6.3	d 52.6± 3.4
تركيز خلايا الدم البيض (×10^6خلية/مل)	a 3.3±0.7	b 0± 0.0	c 0.1± 0.03	d 0.9± 0.2

القيم تمثل المعدل ± الخطأ القياسي S.E عدد العينات = 12 (P<0.05) الحروف المتباينة دلاله على المعنوية .

الجدول(4) تأثير استخدام الوسط الزرعي FertiCult Flushing Medium في تنشيط معالم النطف لعمليات الحقن المجهري بثلاث مدد حضن مختلفة لمرضى وهن النطف.

المعالم المدروسة	قبل التنشيط	بعد التنشيط		
		5 دقيقة	30 دقيقة	45 دقيقة
تركيز النطف (×10^6 نطفة/مل)	a 34.4±7.2	b 9.4± 2.2	c 15.3± 3.4	d 21.8± 5.4
النسبة المئوية للنطف المتحركة	a 25±4.5	b 45.2± 8.1	b 45.2± 8.1	b 47.1± 5.7
درجة نشاط النطف	a 1.6±0.3	b 2.1± 0.3	b 2.2± 0.4	c 2.7± 0.09
معامل حركة النطف	a 42±6.6	b 88.7± 9.6	b 92.4±15.7	c 126.8± 16.6
النسبة المئوية للنطف السوية	a 28.6±5.4	b 47± 8.1	b 50.5± 6.02	c 55.7± 4.5
تركيز خلايا الدم البيض (×10^6 خلية/مل)	a 2.8±0.3	b 0.8± 0.2	b 0.7± 0.2	c 0.5± 0.1

القيم تمثل المعدل ± الخطأ القياسي S.E عدد العينات = 11 (P<0.05) الحروف المتباينة دلاله على المعنوية .

اتبعت طريقة الغسل والسباحة للأعلى washing and swim up الموصوفة في (Gardner *et al.*,2007).

المصادر:

- الجراح ، ابتسام عباس ناصر (2002). دراسة تأثير استخدام بعض الهرمونات في تنشيط النطف في الزجاج للمرضى المصابين بوهن النطف. رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة بابل.
- الخزرجي ، انعام مهدي داوود (2007) . تنشيط النطف خارج الجسم لمرضى العقم المصابين بقلة النطف ووهنها باستخدام تقنيات مختلفة . اطروحة ماجستير ، كلية التربية، جامعة الكوفة.
- الشمرتي ، ضرغام فالح حسن (2008). تأثير فيتامين E في تنشيط معالم النطف في الزجاج لمرضى العقم المصابين بقلة النطف ووهنها . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة بغداد.
- المرشدي، صاحب يحيى (2006) . تأثير بيروكسيد الهيدروجين وبعض مضادات الاكسدة في معايير النطف البشرية خارج الجسم الحي . اطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، جامعة بابل.
- المرشدي ، صاحب يحيى (2007). تقييم حجم المني باستخدام الانابيب المدرجة او بالوزن للرجال سوي النطف . مجلة القادسية للعلوم الصرفة ، العدد 3(12):64-71.

❖ الهادي ، فارس ناجي عبود (1997) . استخدام التقنية الطبقية المزدوجة الترسيبية في تنشيط مرضى العقم المصابين بقلة ووهن النطف. اطروحة دكتوراه، كلية العلوم ،جامعة بغداد.
❖ Bandularatne , E. and Bongso, A.(2002). Evaluation of human sperm function after repeated freezing and thawing. J. Androl; 23 (2) : 242 – 249.
❖ Bartoov, B.; Ben – Barak, J. and Mayevsky, A.(1991). Sperm motility index: new parameter for human sperm evaluation. Fertil. Steril; 56:108 – 112.
❖ Celik – Ozenci, C.; Jakab, A. and Kovacs, T.(2004). Sperm selection for lCSl: shape properties do not predict the absence of presence numerical chromosomal aberrations. Hum. Reprod;19:2052 – 2059.
❖ Curi, S.M.; Ariagno, J.I.; Chenlo, P.H.; Mendeluk, G.R.; Pugliese, M.N.; Sardi, L.M.; Repetto, H.E. and Blanco, A.M.(2003). Asthenozoospermia: analysis of a large population arch. Androl; 49:343 – 349.
❖ Dugan, K.J.; Shalika, S.; Smith, R.D. and Padilla, S.L.(1997). Comparison of synthetic serum substitute and fetal cord serum as media supplements for *in vitro* fertilization: aprospective, randomized study. Fertil. Steril; 67:166 – 168.
❖ Ernster,I.(1993).Lipid peroxidation in biological membrances: mechanisms and implications.In:Active oxygen lipid peroxides and antioxidants.Ed.Yagi K,CRC press,Boca Raton,1-38(Cited by Sikka, 1996).
❖ Gardner , D.K.(2007) . *In vitro* fertilization practical approach. In forma Healthcare. USA.Inc. New York;147-161.
❖ George, A.; Darren, G.; Mallery, D. and Paul, C.(2003). SPSS for windows step by step. Boston, Pearson Education. Inc, 55 – 65.
❖ Gomes, E.; Cano, I.P.; Amoroco, B.; Landeras, J.; Ballesteros, A. and Pellicer, A.(2000). Effect of injected spermatozoa morphology on outcome of intracytoplasmic sperm injection in human. Fertil. Steril; 74:842 – 843.
❖ Harris , S.J.; Milligan , M.P.; Masson ,G.M.and Dennis , K.J.(1981). Improved separation of motile sperm in astherospermia and its application to artifical insemination homologous (AIH).Fertil. Steril ; 36:219 – 221.
❖ Holt ,W.V. and Harrison ,R.A.P.(2002).Bicarbonate stimulation of boar sperm motility via aprotein Kinase A-dependent pathway :deficiencies in proteinkinase activation .J.Androl;23:557-565.
❖ Kaewnoonual, N.; Chiamchanya, C.; Visutakul, P.; Mauochantr, S.; Chaiya, J. and Tor – Udom, P.(2008). Comparative study of semen quality between pre – washed and post – washed with 3 sperm preparation media. Thammasat Medical Journal; 8(3) : 292 – 300.
❖ Karpuz,V.; Gokturk, A. and Koyuturk, M. (2007). The effect of sperm morphology and motility on the outcome of intracytoplsmic sperm injection. Marmar. Medical Journal; 20(2): 92 – 97.
❖ Kasai, T.J.; Ogawa,K.; Mizuno,K.; Nagea, S.; Uchida, Y.; Ohta,S.; Fujie,M.;Suzuki,K.;Hirata,S. and Hoshi, K.(2002). Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility and fertility potential. Asian. J. Androl; 4:97 – 103.
❖ Lachaud,C.;Tesarik,J.;Canadas,M.L. and Mendoza,C.(2004).Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa .Hum.Reprod;19(3):607-610.
❖ Makler, A.; Stoller, J. and Shiran, E.M. (1998). Dynamic aspects concerned with mechanism of separating motile sperm from non motile sperm, leukocytes, and debris with the use of high – density percoll. Gradients. Fertil. Steril; 70:961 – 966.
❖ Makler,A. and Jakobi,P. (1981).Factors affecting sperm motility washing and resuspension of human spermatozoa in various artificial media.Fertil.Steril;35:442-446.
❖ Matchell, L.M.(2005). Laboratory techniques: sperm preparation for assisted conception. In: Textbook of *in vitro* fertilization and assisted reproduction . Brinsden, P. R.(ed.), Taylor and Francis, Cambridge, United Kingdom; 309 – 317.

- Motazedian, S.; Hamedi, B.; Zolghadri, J.; Motjhedi, K. and Asadi, N.(2010). The effect of sperm morphology on 141 outcome in cases with unexplained and male factor infertility. Iranian. Journal of Reproductive Medicine ; 8(1):41 – 44.
- Munire, M.; Shimizu, Y.; Sakata, Y.; Minaguchi, R. and Aso, T. (2004). Impaired hyperactivation of human sperm in patients with infertility. J. Med. Dent. Sci; 51:99 – 104.
- Oettle , E.E.(1986) . Using a new acrosome stain to evaluate sperm morphology . Vet. Med; 81 – 263.
- Pal , P.C. ; Rajalakshmi , M.; manocha , M.; Sharma , R.S; Mittal , S. and Rao , O.N.(2006).Semen quality and sperm function parameters in fertile Indian men . Androl ; 38: 20 – 25 .
- Paulson, J. D. and Polakoski, K. L. (1977). Aglass wool column procedure for removing extraneous material from the human ejaculate Fertil. Steril; 28 : 178 – 181.
- Pousette, A.; Akerlof, E.; Rosenborg, L. and Fredricsson, B. (1986). Increase in progressive motility and improved morphology of human spermatozoa following their migration through percoll gradients. Int. J. Androl; 9: 1 – 13.
- Sepalla, M. (1985). The world collaborative report on *in vitro* fertilization and embryo replacement. Current state of the art in January, 1984, Ann. Ny. Acad. Sci; 422: 588 – 568.
- Shekarriz, M.; Sharma ,R.K.;Thomas,A.J. and Agarwal ,A.(1995). Positive myeloperoxidase staining (Endtz test) as an indicator of excessive reactive oxygen species formation in semen,J. Assist. Reprod.Gent;12:70-74.
- Stovall , D.W.; Guzick , D.S.; Berga , S.L.; Krasnow , J. S. and Zelezink , A . J. (1994) . Sperm recovary and survival : Two tests that predict *in vitro* fertilization outcome . Fertil. Steril ; 62 : 1244 – 1249.
- Tea, N. T.; Joudet, M. and Scholler, R. (1984). Amigration gravity sedimentation method for collecting motil spermatozoa from human semen. In: Harrision RF, Bonner J., Thompson W., Editor. *In Vitro* Fertilization, Embryo Transfer and Early Pregnancy. MTP Press Itd., Lancaster; 117 – 120.
- Wikland, M.; Wik,O.; Steen, Y.; Qvist,K.; Soderlund, B. and Janson, P.O. (1987) : Aself-migration method for Preparation of sperm for *in vitro* fertilization, Hum .Reprod; 2 : 191-195 .
- World Health Organization (1999). Laboratory manual for the semen and sperm cervical mucus interaction, 4th ed , Cambridge University press, Cambridge.
- World Health Organization (2010). Laboratory manual for the examination and processing of human semen 5th ed, Cambridge University press, Cambridge.
- Yogev, L.; Gamzu, R.; Botchan, A.; Hauser, R.; Paz, G. and Yavetz, H.(2000). Zonapellucide binding improvement effect of different sperm preparation techniques is not related to changes in sperm motility characterization. Fertile. Steril; 73: 1120 – 1125.

Increased improvement fertilization capacity to Intrauterine insemination and Intracytoplasmic sperm injection of Infertile Patients Suffering from severe Asthenospermia by using Ferticult Flushing Medium

Samah Amer Hammood Hreab Al-Obaidi

University of Kufa -Science College

Abstract

This study was included examination and activation of 45 samples for asthenozoospermic men.The research was aimed to improvement of infertility capacity and activation sperm parameters in vitro by using FertiCult flushing medium ,three techniques (swim up-

centrifugation wash-out-mixing after washing and centrifugation).The result was revealed significant increase ($p<0.05$) of sperm motility percent ,grade of sperm activatiy and sperm motility index so significant decrease ($p<0.05$) of sperm concentration ,non normal sperm morphology percent and leukocytes concentration after using the medium and swim up in 60 min . In ICSI programs by using the culture medium and centrifugation and swim up technigue with incubation period (45 min.), the results were showed a significant increase ($P<0.05$) of sperm motility percent, grade of sperm activity , sperm motility index and normal sperm percent so it revealed significant decrease ($P<0.05$) of sperm concentration and leucolyte concentration in comparison to that of before activation and after activation incubation periods are 5 - 30 min. In conclusion,the FertiCult flushing medium influence of the result after activation and increase of improvement the chance in vitro fertilization.