دانشگاه صنعتی اصفهان
دانشکده مکانیک

شبیه سازی و طراحی یک سیستم میکروسیال برای انتخاب و پالایش اسپرم پویا

پایان‌نامه کارشناسی ارشد مهندسی مکانیک - طراحی کاربردی

مصیب شیری

اساتید راهنما

دکتر مهدی مقیمی‌زند

دکتر احمد صداقت

۱۳۹۲

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده مهندسی مواد

پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته مهندسی مکانیک آقای مصیب شیری

تحت عنوان

شبیه سازی و طراحی یک سیستم میکروسیال برای انتخاب و پالایش اسپرم پویا

در تاریخ۱۳۹۲/۱۱/۰۱ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهایی قرار گرفت.

۱- استاد راهنمای پایان‌نامه	دکتر مهدی مقیمی‌زند
۲- استاد راهنمای پایان‌نامه	دکتر احمد صداقت
۳- استاد داور	دکتر محمود کدخدایی
٤- استاد داور	دکتر محمد رضا توکلی
سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده	دکترمحمد رضا سلیم‌پور

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه صنعتی اصفهان است.

با تقدیر و تشکر از

استادی گرانقدر،

برادری مهربان و

پژوهشگری متعهد

جناب آقای دکتر مهدی مقیمی‌زند

و

با تقدیر و تشکر از استاد گرانقدرم،

جناب آقای دکتر صداقت

تقدیم به

شهدای علم و فناوری

و

پدر و مادر مهربانم

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

چکیده ۱

فصل اول ۲

۱-۱ مقدمه ۲

۱-۲ درمان ناباروری ۳

۱-۳ تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم درابعاد میکرو ۳

۱-۳-۱ علل پیدایش تزریق اسپرم درون‌سیتوپلاسمی : ۵

۱-۴ باروری دستی: ۵

۱-۵ لقاح خارج‌رحمی ۶

۱-۵-۱ موارد کاربرد ۶

۱-۵-۲ مراحل انجام لقاح خارج‌رحمی ۶

۱-۵-۳ مزایا و محدودیت‌های روش لقاح خارج‌رحمی ۷

۱-۶ پویایی اسپرم: ۷

۱-۷ برآورد مورفولوژی اسپرم: ۸

۱-۸ آماده‌سازی اسپرم برای فرآیند لقاح خارج‌رحمی و تزریق اسپرم درون‌سیتوپلاسمی ۱۰

۱-۹ گردآوری اسپرم ۱۲

۱-۱۰ روش‌های آماده‌سازی اسپرم: ۱۲

۱-۱۱ شرح و بیان مساله تحقیق ۱۳

۱-۱۲ اهمیت و ضرورت تحقیق ۱۴

۱-۱۳ تکنیک‌ها و روش‌های انتخاب اسپرم ۱۴

۱-۱۳-۱ شستن اسپرم ۱۴

۱-۱۳-۲ مهاجرت اسپرم‌ها ۱۶

۱-۱۳-۳ شنای مستقیم و رو به بالا در مایع سمن ۱۷

۱-۱۳-۴ شناکردن اسپرم‌ها با استفاده از روش‌های شستن ۱۷

۱-۱۳-۵ رسوبات اسپرمی حاصل از مهاجرت ۱۹

۱-۱۳-۶ پالایش ۲۱

۱-۱۳-۷ سانتریفیوژ شیب غلظتی ۲۲

۱-۱۴ تکنیک‌های پیشرفته و جدید برای جداسازی اسپرم‌ها ۲۳

۱-۱۴-۱ بارسطحی اسپرم برای انتخاب اسپرم ۲۳

۱-۱۴-۲ انتخاب اسپرم‌های غیرآپوپتوز (مرتب‌سازی سلول‌های مغناطیسی فعال) ۲۵

۱-۱۴-۳ انتخاب براساس بلوغ غشایی اسپرم (اتصال اسپرم به اسیدهیالورونیک) ۲۶

۱-۱۴-۴ انتخاب بر اساس مورفولوژی اسپرم زنده ۲۷

۱-۱۴-۵ روش‌های جدید برای انتخاب اسپرم ۲۸

۱-۱۵ ساختار تحقیق ۲۹

۱-۱۶ مروری بر کارهای عددی انجام شده ۲۹

۱-۱۶-۱ طرح پیشنهادی سئو ۳۰

۱-۱۶-۲ سیستم میکروسیال مرتب کردن اسپرم (MSMS) ۳۱
۱-۱۶-۳ کنترل جریان در کانال‌ها و بهینه‌سازی طراحی TRMS ۳۳
۱-۱۶-۴ کنترل جریان ناشی از فشار در کانال‌های اصلی TRMS ۳۳
۱-۱۶-۵ بهینه‌سازی TRMS تک‌کاناله (SMC-TRMS) ۳۵
۱-۱۶-۶ TRMS دوکاناله (DMC-TRMC) ۳۸
۱-۱۷ نتیجه‌گیری ۳۹
فصل دوم ۴۰
۲-۱ مقدمه ۴۰
۲-۲ هندسه و دامنه‌ی مدلسازی ۴۱
۲-۳ فرضیات ۴۳
۲-۴ معادلات حاکم ۴۳
۲-۵ شرایط مرزی ۴۳
۲-۶ نتایج عمومی مدلسازی ۴۳
۲-۶-۱ استقلال نتایج از شبکه ۴۳
۲-۶-۲ همگرایی ۴۵
۲-۷ نتایج مدل سازی ۴۵
۲-۷-۱ تطبیق نتایج ۴۶
۲-۷-۲ انتخاب مقادیر مناسب ۴۸
۲-۷-۳ بهینه‌سازی کار حاضر ۵۰
۲-۸ نتیجه‌گیری: ۵۱
فصل سوم ۵۳
۳-۱ مقدمه ۵۳
۳-۲ بهینه‌سازی توسط ژای و همکاران ۵۵
۳-۳ فرضیات ۵۶
۳-۴ شبیه‌سازی و بهینه‌سازی یک سیستم جدید با الهام از سیستم ارائه‌شده توسط ژای و همکاران ۵۶
۳-۵ نتیجه‌گیری ۶۰
فصل چهارم ۶۲
۴-۱ مقدمه ۶۲
۴-۲ ویژگی‌های اسپرم: ۶۲
۴-۳ ویژگی‌های روش جداسازی مناسب ۶۳
۴-۴ پتانسیل زتا ۶۳
۴-۴-۱ پتانسیل زتا و لایه مضاعف الکتریکی ۶۳
۴-۴-۲ اثرات الکتروکینتیک ۶۴
۴-۴-۳ اثر الکتروفرتیک ۶۵
۴-۵ نگاهی کوتاه به چند روش نوین برای جداسازی: ۶۵
۴-۵-۱ بارسطحی اسپرم برای انتخاب اسپرم ۶۵
۴-۵-۲ سیستم‌های میکروسیال: ۶۷
۴-۶ روشی جامع و نوین برای جداسازی و مرتب کردن اسپرمهای پویا ۶۷
۴-۶-۱ تشریح روش: ۶۷
۴-۶-۲ محاسبات و بهینه‌سازی سیستم ۶۸

۴-۶-۳ زمان تخمینی فرآیند جداسازی ۷۰
۴-۷ نتیجه‌گیری، مزایای سیستم جامع ۷۰
فصل پنجم **۷۲**
۵-۱ جمع‌بندی کلی ۷۲
۵-۲ پیشنهادات ۷۴
ضمیمه الف **۷۶**
مراجع **۸۴**

چکیده

امروزه برای درمان انواع ناباروری، اصلاح نژاد، جلوگیری از انتقال بیماری از مادر به جنین، جلوگیری از تولد نوزادان دارای نقص عضو، تعیین جنسیت پیش از لقاح و ... از روش‌های تلقیح مصنوعی استفاده می‌گردد. در تلقیح مصنوعی از روش‌هایی همچون IVF، ICSI و IUI استفاده می‌شود. لازمه‌ی موفقیت در این‌گونه روش‌های تلقیح مصنوعی، جداسازی و انتخاب اسپرم‌های قوی‌تر سالم‌تر و در مجموع باکیفیت‌تر است. از آنجا که پویا بودن به عنوان یک پارامتر مهم در ارتباط با کیفیت اسپرم در نظر گرفته می‌شود، عملیاتی که بتواند اسپرم-های پویا را به بهترین شکل و کمترین خطر جدا کند، برای درمان ناباروری مطلوب است. برای جداسازی اسپرم پویا روش‌های متفاوتی ارائه گشته‌است که در این پژوهش در مورد اغلب این روش‌ها بحث رانده شده‌است. برخی از این روش‌ها ماهیتی پزشکی - مکانیکی - الکتریکی دارند. در میان روش‌های مختلف برای جداسازی و سرندکردن اسپرم‌های پویاتر ، روش‌هایی که از میکروکانال استفاده می-کنند، از نظر سادگی و کاربرپسندی و سازگاری با طبیعت، از دیگر روش‌ها پیش افتاده‌اند. سئو و همکاران سیستمی را طراحی کرده‌اند که متشکل از چهار کانال و سه مخزن می باشد. در این طراحی جریان موجود در کانال‌ها، با استفاده از فشار هیدرواستاتیک ناشی از ارتفاع سیال در مخازن، تولید می‌گردد و با ایجاد یک جریان معکوس در کانال اصلی، فقط به اسپرم‌های پویا اجازه شنا در خلاف جهت جریان داده می‌شود. در این پژوهش، سیستم طراحی شده توسط سئو با استفاده از نرم‌افزار گمبیت شبکه بندی و به وسیله‌ی نرم‌افزار فلوئنت تحلیل شده‌است. ابتدا، نتایج سئو اعتبار سنجی شده است و سپس اندازه میکروکانال‌ها بهینه شده، که طول کانال اصلی برابر ۵ mm پیشنهاد شده-است. یکی دیگر از روش‌های میکروسیالی موفق روش ژای و همکاران بوده است که در این پژوهش به توسعه و شبیه‌سازی روش مذکور پرداخته شده‌است. علاوه بر موارد فوق، در این پژوهش روشی با نام "روش جامع" ارائه گشته‌است، که با در نظر گرفتن ویژگی‌ها و خصوصیات سلول اسپرم و با درنظرگرفتن تجربیات محققان پیشین قادر است، اسپرم‌هایی با بالاترین کیفیت را ارائه کند.

کلمات کلیدی: ۱- ناباروری ۲-تلقیح مصنوعی ۳- اسپرم ٤-میکروسیال ۵- الکتروفرسیس

فصل اول
درمان ناباروری

۱-۱ مقدمه

درمان مشکل ناباروری از دیرباز مورد توجه خانواده‌های مواجه با این مشکل، و کشورهای فاقد نیروی جوانّ کار، قرار داشته‌است. یکی از مسائلی که درمان مشکل ناباروری را در گذشته سخت و تا حدی غیرممکن وانمود می‌کرد، عدم دستیابی به اطلاعات کافی درباره‌ی بیولوژی بدن و دستگاه‌های بارورسازی مرتبط با آن بوده‌است. اما امروزه، با ظهور تکنولوژی‌های پیشرفته‌ی در دست انسان، و با شناخت و بررسی سلول‌های جنسی و ترکیب اطلاعات پزشکی – مهندسی و شیمیایی، عوامل موجب عدم باروری به روشنی شناخته شده‌است. و در بسیاری موارد راه‌های درمانی برای آن پیشنهاد گردیده‌است.

علت برخی ناباروری‌ها، مربوط به محیط اسیدی و یا بازی رحم مادر است که معمولا با یک رژیم غذایی مناسب قابل حل خواهد بود. برخی از ناباروری‌ها حاصل ترشح موادی در ورودی واژن است که به دم سلول اسپرم آسیب می-رساند و مانع از شناکردن مناسب آن می‌گردد.

اما در میان علل مختلف ناباروری برخی به صورت مستقیم به جنس مذکر مربوط می‌باشد. از جمله‌ی این نوع عوامل که در ادامه به صورت مستندتر معرفی خواهند شد، مربوط به تولید کم اسپرم، نقص وضعف در سلول اسپرم (از جمله ضعف در مورفولوژی، ناقص بودن دم، ضعف در پتانسیل الکتریکی و ...) و .... می‌باشد.روشی که بتواند اسپرم‌های بالغ و سالم، با توان باروری بالا را از دیگر اسپرم‌ها جدا کند شانس باروری را افزایش می‌دهد.

علاوه بر موارد فوق ریشه‌ی برخی نقص‌های نوزادان در تشکیل نطفه و به‌علت مشکلات ژنتیکی والدین است. به همین دلیل با انتخاب مناسب اسپرم می‌توان از این دسته نقص‌ها تا حدودی جلوگیری کرد.

امروزه محققان، در مورد والدین ناقل ویروس ایدز، جهت انتقال ویروس مذکور به نوزاد به فکر جداکردن سلول جنسی مناسب و پالایش سلول‌های جنسی و رشد نوزاد خارج از رحم در مادران ناقل ایدز افتاده‌اند.

یکی از ارکان حفظ سلامت جامعه‌ی امروز و همچنین یکی از چالش‌های جهانی، مساله‌ی غذاست. ازجمله منابع غذایی مردم دنیا، دام، طیور و آبزیان هستند. محققان اعتقاد دارند با اصلاح نژاد، می‌توان به گوشت و همچنین شیر بشتری دست پیدا کرد.

علاوه بر مطالب فوق امروزه در اصلاح نژاد حیوانات اهلی و مخصوصا اسب، سرمایه‌داران این زمینه‌ها، به‌دنبال حفظ، تربیت و تکثیر نژاد برتر این حیوانات و منافع بیشتر در این زمینه هستند.

۱-۲ درمان ناباروری

از زمان تولد لوئیس براون اولین نوزاد تولد یافته درآزمایشگاه درسال ۱۹۷۸، بارورسازی یا تلقیح مصنوعی به عنوان یک روش معالجه معتبر برای درمان ناباروری‌های طولانی به خاطر بیماری لوله‌ی رحمی، آندومتریوز، ناباروری‌های توضیح داده نشده، یا ناباروری‌هایی که با عامل مذکر به وجود می آیند، مطرح شد. هرچند آشکار شد که در زوج-هایی که ناباروری آن‌ها به دلیل عقیمی شدیدّ جنسِ مذکر است، روش لقاح خارج رحمی[1] کارساز نیست. تعداد اسپرم به شدت پایین، پویایی کم اسپرم و مورفولوژی ضعیف دلایل اصلی عدم درمان ناباروری با لقاح خارج رحمی ذکر شده‌اند. برای حل این مسئله، چندین روش باروری مبتنی برکار با سلول‌های جنسی در ابعاد میکرو ارائه گشته-است. این استراتژی‌ها در تزریق اسپرم درون‌سیتوپلاسمی[2]، به اوج می‌رسد، جایی که یک اسپرم را مستقیما در یک تخم تزریق می‌کند. به دلیل کاربرد گسترده‌ی تزریق اسپرم درون سیتوپلاسمی به عنوان گزینه‌ی نهایی در درمان نا-باروری شدید در مردان – که به دلیل بیضه ناتوان یا مجراهای مسدود اتفاق می‌افتد– مناسب است، که درباره‌ی کارآیی، سلامت و ایمنی آن تمرکز کنیم [۱].

۱-۳ تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم درابعاد میکرو

حداقل در ۵۰ درصد از زوج‌هایی که برای درمان ناباروری مراجعه می‌کنند، طرف مذکر عامل ناباروریست. ناباروری عامل مذکر، می‌تواند عوامل متعددی داشته باشد. که ازجمله آن، تعداد کم اسپرم و نقص در مورفولوژی یا کارآیی می‌باشد.

تحلیل مفصل تخمین و کارآیی اسپرم برای تشخیص دقیق، بسیار مهم است و در کتاب‌های مشهور مردشناس و آنالیز سمن به آن‌ها به صورت مفصل پرداخته شده‌است.

راهنمای عملیات آزمایشگاهی سازمان جهانی بهداشت[3]، شرایط استاندارد برای جمع‌آوری نمونه‌ی اسپرم را شرح داده است. کاربردهای معمول تزریق اسپرم درون سیتوپلاسمی درمان موثری را برای سخت‌ترین موردهای ناباروری، که تا به حال امیدی به باروری نداشتند مهیا کرده است [۲].

تعداد اسپرم بشدت پایین، موتالیتی معیوب و پایین و مورفولوژی غیرعادی، دلایل اصلی عدم باروری با روش لقاح

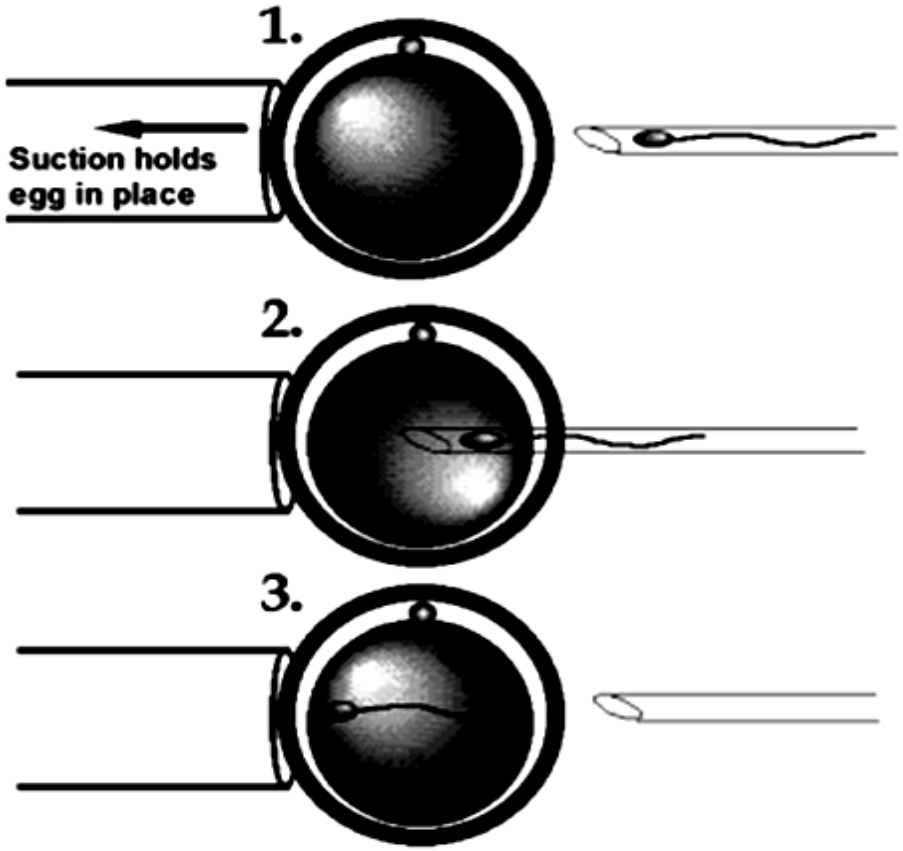
---

[1] In vitro fertilization (IVF)

[2] Intracytoplasmic Sperm Injection(ICSI)

[3] World Health Organization (WHO)

خارج‌رحمی را نشان می‌دهند. امروزه تزریق اسپرم درون‌سیتوپلاسمی گزینه‌ی نهایی برای درمان این موارد ناباروری شدید در مردان است. در این روش، یک تک‌اسپرم با دوام و با خصوصیات مورفولوژی برتر، به وسیله‌ی رویان‌گران انتخاب شده و در یک تخم در دسترس، تزریق می‌گردد. تزریق اسپرم درون سیتوپلاسمی مبتنی بر برخورد دستی درابعاد میکرو با اسپرم و تخم است. در ابتدا اقدام به برش قسمتی از جداره‌ی تخم جهت کمک کردن به نفوذ اسپرم می‌کنند. مانع باروری، دیواره شفاف تخم است که با روش مکانیکی پاره می‌گردد. در شکل‌های ۱-۱ و ۱-۲ روند انجام فرآیند ICSI نمایش داده شده‌است [۳و۴].



شکل ۱-۱ مراحل تزریق اسپرم درون سیتوپلاسم [۳]

بدین ترتیب با دسترسی به فضای مخصوص داخل تخم، امکان کاشت مستقیم اسپرم فراهم می‌گردد. کاشتن زیر-غشایی[1] به‌عنوان مرحله‌ی بعدی ازکارِ دستی بیان می‌گردد. کاشتن زیرغشایی امکان سریع رسیدن چند اسپرم پویا به فضای مخصوص داخل تخم را به وسیله داخل کردن پیپت فراهم می‌سازد.

تزریق اسپرم درون سیتوپلاسمی درابتدا به صورت موفق برای زاد و ولد خرگوش و احشام به کارگفته شد و یک ارزیابی پیش‌بالینی توسط گروه نرفولک[2] ارائه شد.

اولین باروری موفق بشری از طریق این روش باروری جدید درسال ۱۹۹۲ گزارش شده‌است. به عنوان نتیجه، تزریق

[1] SUZI
[2] Norfolk

اسپرم درون سیتوپلاسمی در سرتاسر جهان برای درمان ناباروری‌های ایجادشده توسط تولید اسپرم ضعیف و یا عدم تولید اسپرم به خاطر عملکرد بیضه‌های معیوب ویا مسدود بودن مجرای دفعی استفاده می‌گردد. اسپرم‌های پویا را انتخاب می‌کنند و جهت وارد کردن از حرکت بازمی‌دارند. ضمنا مورفولوژی اسپرم وارد شده جهت باروری ارتباط مستقیمی با موفقیت و حاصل باروری دارد [۱].

شکل ۱-۲ تزریق اسپرم درون سیتوپلاسم تخم [۴]

۱-۳-۱ علل پیدایش تزریق اسپرم درون سیتوپلاسمی :

پیش از ظهور تزریق اسپرم درون‌سیتوپلاسمی، تلاش‌هایی برای اصلاح وتصحیح روش لقاح خارج‌رحمی برای دست‌یافتن به افزایش سرعت باروری، در زمینه‌ی ناباروی مردان صورت گرفت. امروزه به وضوح تزریق اسپرم درون‌سیتوپلاسمی بر روش لقاح خارج‌رحمی برای درمان ناباروری در مردان، سایه افکنده است. تزریق اسپرم درون-سیتوپلاسمی فقط یک اسپرم با کیفیت مناسب برای باروری تخم نیاز دارد. مزیت‌های تزریق اسپرم درون‌سیتوپلاسمی فقط محدود به مورفولوژی معیوب اسپرم نمی‌باشد، بلکه شامل تعداد کم اسپرم وکیفیت جنبشی کم اسپرم نیز می-شود. در تزریق اسپرم درون سیتوپلاسمی همچنین درصورت انسداد مجراهای دفعی می‌توان از اسپرم برداشته شده از بیضه یا رگ انتهایی بیضه استفاده کرد. آزواسپرمیا به خاطر عملکرد معیوب بیضوی ایجاد می‌شود. درصورتی که بتوان به میزان کافی نمونه از بیضه تهیه کرد، به وسیله‌ی تزریق اسپرم درون سیتوپلاسمی قابل درمان خواهدبود [۱].

۱-۴ باروری دستی:

تزریق اسپرم درون‌سیتوپلاسمی به همراه سمن انزال شده می‌تواند به صورت موفق در بیمارانی که فاقد باروری با روش لقاح خارج‌رحمی بوده‌اند و همچنین دربیمارانی که دارای اسپرم نرمال به لحاظ مورفولوژی، کمی هستند

واسپرم‌های پویا رو به پیشرفت گزارش‌شده درانزال (کمتر از ۵۰۰/۰۰۰) استفاده گردد. باروری بالا ونرخ باروری بالا وقتی محقق خواهد شد، که یک اسپرم پویا تزریق شود. داخل کردن یک اسپرم غیرپویا و یا کم‌دوام نرخ باروری کم، را در بردارد. در مواردی که فقط اسپرم‌های کم‌دوام در انزال گزارش می‌گردد، استفاده از اسپرم‌های درون بیضه در دستور کار قرارمی‌گیرد. دیگر پارامترهای سمن، مانند تراکم، موفولوژی و ترشح بالای آنتی‌اسپرم تأثیری بر نرخ موفقیت در تزریق اسپرم درون سیتوپلاسمی ندارد. روش تزریق اسپرم درون سیتوپلاسمی همچنین دربیمارانی با اسپرم‌های فاقد کروموزوم، موفق برآورد شده‌است. برخی ناباروری‌های ناشی از انسداد مجاری خروجی سمن نیز با روش تزریق اسپرم درون‌سیتوپلاسمی قابل درمان هستند، که مستلزم جراحی در ناحیه‌ی زائده‌ی دنباله‌ی بیضه یا بیضه هستند. هنگامی که هیچ اسپرم پویای قابل بازیافتی، به‌خاطر انسداد مجاری نیست، اسپرم مربوط به بیضه می‌تواند به وسیله‌ی بافت‌برداری ازشخص، جدا شود [۱].

۱-۵ لقاح خارج رحمی

۱-۵-۱ موارد کاربرد

در تمام مواردی که شرایط رسیدن اسپرم به تخمک در رحم فراهم نباشد، مانند انسداد لوله های رحمی، چسبندگی های حفره لگنی، تعداد کم اسپرم و تحرک پایین اسپرم از روش لقاح خارج رحمی استفاده می شود.

۱-۵-۲ مراحل انجام لقاح خارج رحمی

روز عمل، نمونه اسپرم از مرد و تخمک تحت یک بیهوشی کوتاه و موقت، از زن گرفته می‌شود. سپس اسپرم و تخمک در آزمایشگاه جنین‌شناسی در محیط کشت مجاور یکدیگر قرار داده می‌شوند تا اسپرم خودش وارد تخمک شده و آن را بارور کند. شکل ۱-۳ طرح شماتیکی از احاطه‌ی سلول تخم توسط اسپرم‌های جداشده از IVF را نشان می‌دهد [۵].

به تخمک لقاح‌یافته، جنین گفته می‌شود. جنین تک‌سلولی شروع به تقسیم می‌کند و یک جنین چند سلولی ایجاد می‌کند. جنین پس از ٤٨ تا ٧٢ ساعت به رحم زن منتقل می‌شود تا در آنجا لانه‌گزینی کند و بارداری انجام شود. پس می‌توان مراحل انجام عمل لقاح خارج‌رحمی را به چهار مرحله تقسیم کرد.

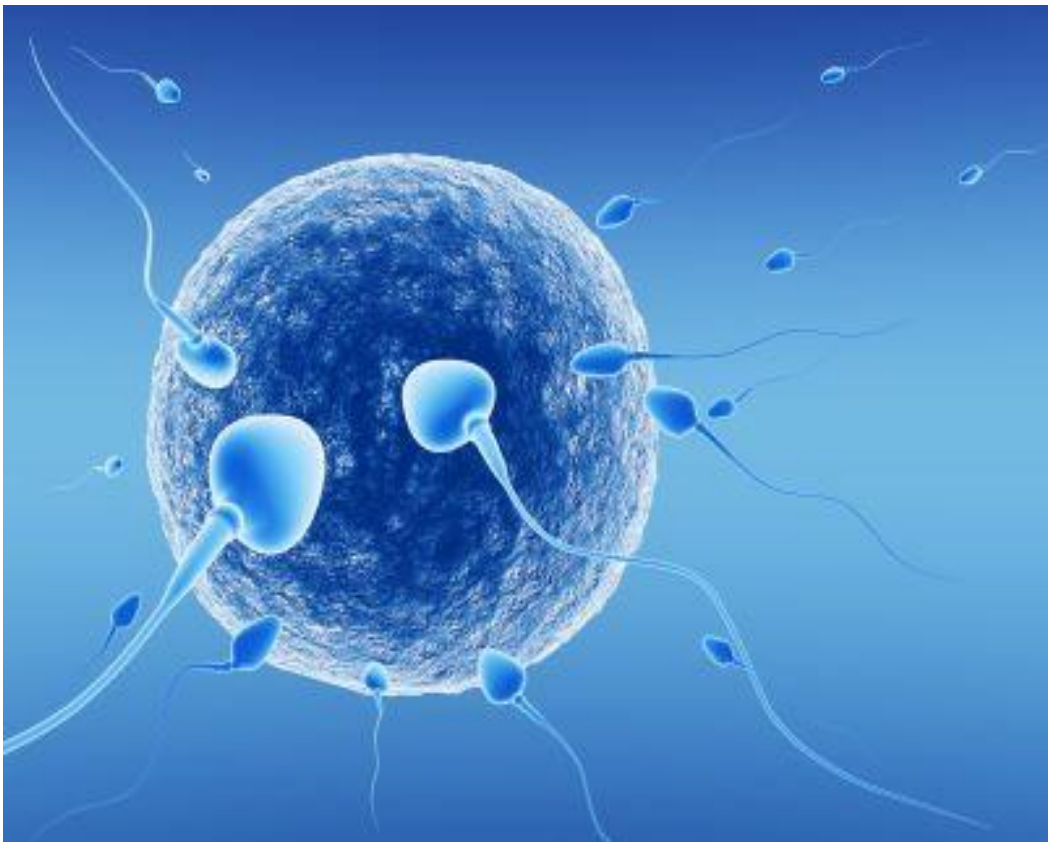
مرحله اول: تحریک تخمدان،

مرحله دوم: تخمک‌گیری،

مرحله سوم: لقاح اسپرم و تخمک،

مرحله‌ی چهارم: انتقال جنین.

در مرحله‌ی اول برای تحریک تخمدان‌ها، از داروهای هورمونی استفاده می‌شود. تزریق عضلانی آمپول تخمدان‌ها را برای رشد فولیکول تحریک می‌کند و تزریق عضلانی آمپول دیگری باعث بلوغ تخمک‌ها و انجام تخمک‌گذاری می‌شود. در مرحله‌ی عمل، تخمک‌گیری با یکی از دو روش لاپاراسکوپی یا با مشاهدات سونوگرافی از طریق واژینال امکان‌پذیر است که در پژوهشکده رویان این کار با استفاده از روش دوم انجام می‌گیرد. در روش دوم نیازی به بیهوشی عمومی نیست و با یک بیهوشی کوتاه‌مدت یا بی‌حسی موضعی قابل انجام است. با استفاده از دستگاه سونوگرافی، پزشک فولیکول‌ها را مشاهده می‌کند و مایع فولیکولی همراه با تخمک کشیده می‌شود که به این عمل اصطلاحا پانکچر می گویند.



۱-۳ احاطه‌ی سلول تخم توسط اسپرم‌های پویا [۵]

در مرحله‌ی سوم، عمل لقاح اسپرم و تخمک در محیط کشت آزمایشگاه انجام می گیرد. با توجه به اینکه برای بالا بردن درصد موفقیت چندین تخمک لقاح می‌یابد. تعداد جنین های تشکیل یافته زیاد است. اگر این جنین‌ها کیفیت مطلوبی داشته باشند تعدادی از آن‌ها با صلاح‌دید زوج، منجمد و نگهداری می‌شوند تا درصورت نیاز برای بارداری-های بعدی از این جنین‌ها استفاده شود.

در مرحله‌ی چهارم یا انتقال جنین نیز نیازی به بیهوشی نیست. جنین یا جنین‌ها به وسیله‌ی یک کاتر به داخل رحم منتقل می‌شوند و یکی، دو ساعت بعد از انتقال جنین، بیمار مرخص می‌شود.

۱-۵-۳ مزایا و محدودیت‌های روش لقاح خارج رحمی

یکی از مزایای لقاح خارج رحمی این است که قبل از انتقال جنین، عمل لقاح قابل مشاهده است و در صورتی که اسپرم با تخمک لقاح پیدا نکند می‌توان در نوبت‌های بعدی شرایط لقاح را تغییر داد.

مزیت دیگر لقاح خارج رحمی این است که اگر یک بیمار فاقد لوله‌های رحمی باشد نیز بدون مشکل، عمل لقاح خارج رحمی انجام می‌شود. اما محدودیت لقاح خارج رحمی آن است که میزان بارداری در زنان بالای ۴۰ سال به علت پایین بودن کیفیت تخمک‌های زن کاهش می‌یابد [۶].

۱-۶ پویایی اسپرم:

سه جنبه مهم، برای تخمین درست پویایی اسپرم وجود دارد:

- دما: شیشه میکروسکوب برای شناسایی درستّ درجه پویایی، می‌بایست در 70C نگهداری شود.

- میکروسکوب
- سیستم رتبه‌بندی
- اسپرم‌های متراکم شده (به‌هم‌چسبیده): متراکم شدن یا به هم چسبیدن تعداد زیادی اسپرم تخمین پویایی را غیر-ممکن می‌کنند. در این صورت باید فقط از شنای آزاد استفاده کرد. کمتر از ۵۰٪ از اسپرم‌ها پویا هستند. اگر کمتر از ۵۰٪ اسپرم‌ها پویا باشند. تست‌های زنده‌ماندن به منظور محاسبه‌ی این‌که اسپرم زنده است، یا مرده، در دستور کار قرار می‌گیرد. روش تمرکز اسپرم برای محاسبه‌ی تمرکز اسپرم‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد.

در بین چمبرهایی که انتخاب می‌شوند، پرداختن توجه بیشتر به نمونه‌هایی که هیچ اسپرمی در آن‌ها ملاحظه نمی‌شود اهمیت دارد. این نمونه‌ها می‌بایست در (3000g<) به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردند و هر نمونه درصورتی در دسته‌ی صدق آزواسپرمیا قرارمی‌گیرد که پس از سانتریفیوژ هیچ اسپرمی در آن دیده نشود. قبل از اجرای شمارش، به‌خاطر حضور هم‌چسبی، تعداد مخروبه[1] و سلول‌هایی علاوه بر اسپرم، مانند گلبول سفید یا قرمز خون باید ثبت شود. آزمون شمارش به‌صورت شبکه‌بندی است و اسپرم‌های پویا موجود در ۲۰ مربع شمرده می‌شود. اگر شمارش ابتدایی کمتر از ۱۰/ml میلیون باشد، تمام ۱۰۰ مربع می‌بایست شمرده شوند.

۱-۷ برآورد مورفولوژی اسپرم:

تخمین (برآورد) مورفولوژی اسپرم از جمله بحث‌برانگیزترین اندازه‌گیری‌ها در رابطه با آنالیز سمن است. این ناشی از چندین تغییر در گزارش ابعاد اسپرم نرمال در ویرایش‌های پی‌درپی (who) می‌باشد. همچنین ناشی از سخت‌بودن اندازه‌گیری صحیح مورفولوژی، بدون استفاده از کامپیوتر می‌باشد. تمامی اندازه‌گیری‌های اسپرم می‌بایست از آغشته‌شدن ثابت به‌وسیله‌ی روش پاپانیکومو یا دیف‌کوییک یا شوراستین استفاده کنند. اسلایدهای رنگ‌شده، سپس باید تحت میدان‌های نوری برای دیدن قرار بگیرند. حداقل ۱۲۰۰ اسپرم می‌بایست مورد بررسی قرار بگیرند ودر صورت نیاز از سر عدسی دوربین گراتیک‌دار برای بررسی ابعاد یک اسپرم منفرد، البته درصورت نیاز استفاده گردد. یک سر نرمال، به شکل بیضی است و دارای نسبت طول به عرض $\frac{1.5}{1.75}$ است. شکل ۱-٤ به‌صورت شماتیک یک اسپرم نرمال را به تصویر کشیده‌است [۷].

یک قرینه‌ی قدامی که به‌صورت خوب تعریف می‌شود، می‌بایست ٤۰ تا ۷۰ درصد از سطح را پوشش داده باشد. درقسمت گردن، میانی و دم نباید عیبی مشهود باشد، و قطره‌های سیتوپلاسمی می‌بایست کمتر از یک‌سوم از سر یک اسپرم نرمال را تشکیل دهند. شکل ۱-۵ چند مثال از بیماری‌های اسپرم را روشن می‌سازد. انواع اسپرم به چند دسته، دسته‌بندی می‌شوند:

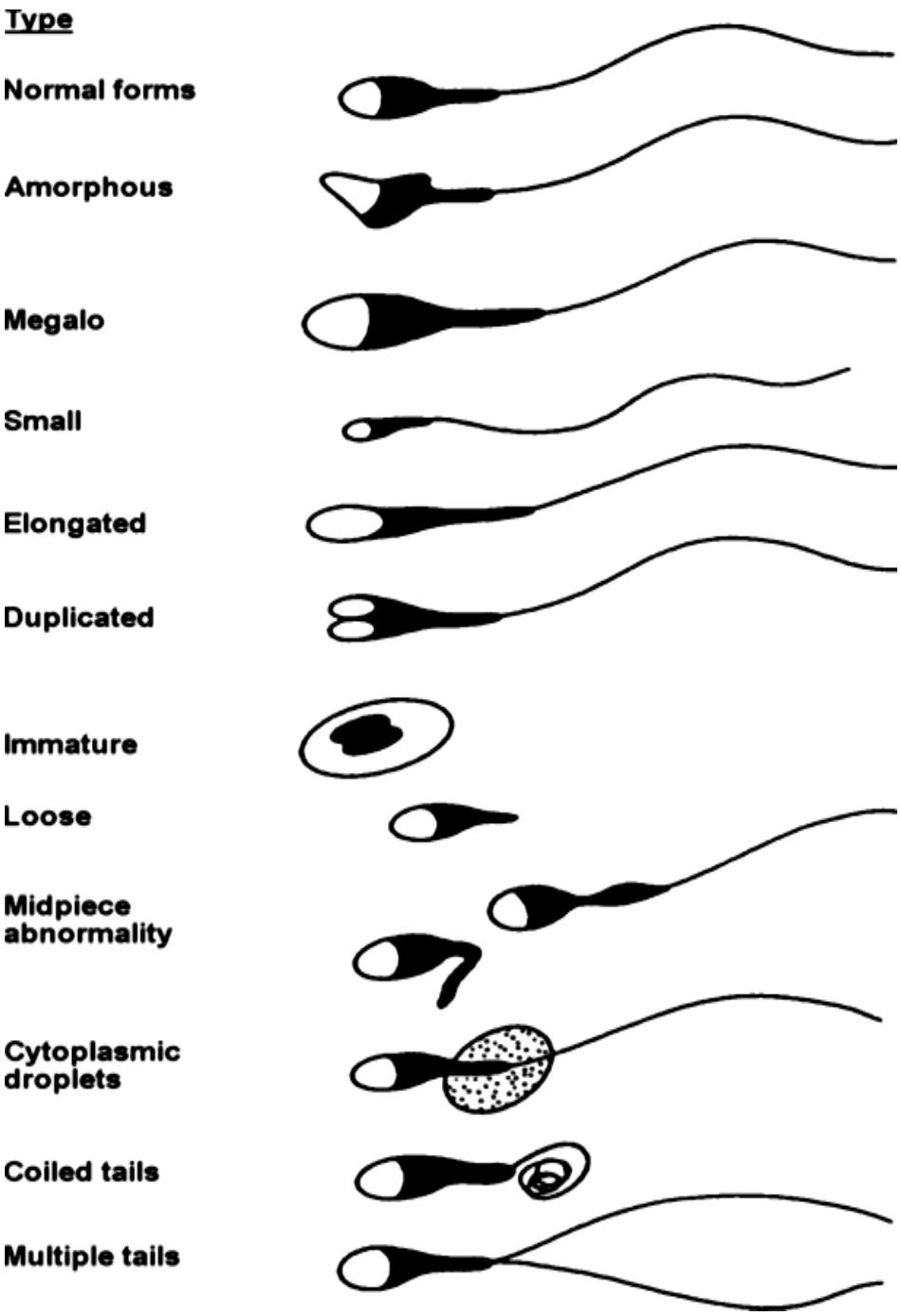
- سرهای غیرعادی
- دم غیرعادی
- بخش میانی غیرعادی
- شکل نابالغ

[1] debris

۱-۴ تصویر یک اسپرم پویای معمولی [۷]

درصد هر نوع از ناهنجاری‌های شکلی گرفته می‌شود و با جمع کردن این درصدها، درصد اسپرم‌های غیرعادی نمونه، سنجیده می‌شود [۲]. یک نمونه سمن پربار (بارور) نرمال، حاوی شکل‌های غیرعادی با تعداد بالا نیست. مورفولوژی غیرعادی اسپرم پتانسیل باروری را کاهش می‌دهد، درصد آنومایلی[1] صحیح در اسپرم‌های غیرعادی به صورت جزئی با نقص‌های خاصی مانند جلد غشای ضعیف شفاف و قابل نفوذ، عکس‌العمل ضعیف به کشمکش‌های درون‌سلولی برای تعدیل کلسیم و همچنین با علائم بیوشیمی مانند تولید اجزاء دارای اکسیژن فعال، توصیف می گردد [۲].

[1] anomailes



شکل ۱-۵ ناهنجاری‌های رایج یافت شده در شکل اسپرم انسان [۲]

۱-۸ آماده‌سازی اسپرم برای فرآیند لقاح خارج‌رحمی و تزریق اسپرم درون‌سیتوپلاسمی

انتخاب روش آماده‌سازی به موارد زیر بستگی دارد:

- تعداد اسپرم پویا
- نسبت تعداد اسپرم پویا به غیرپویا
- حجم

- حضور و وجود آنتی‌بادی‌ها، هم‌چسبی، انباشتگی روی‌هم و مخروبه‌های سلولی.

سمن انزال‌شده مایعی ویسکوز است که مخلوطی از تراوش غدد بیضوی و اپیدمال می‌باشد و حاوی مخلوطی از اسپرم و ترشحات غده‌ی پروستات در زمان انزال می‌باشد. هدف از آماده‌سازی سمن جمع‌کردن اسپرم‌ها در بخشی است که پلاسما و مواد مخروبه‌ی روی‌هم در آن‌جا نباشند. در ابتدا لقاح خارج‌رحمی مستلزم آماده‌سازی اسپرم به‌وسیله‌ی شستن ساده و سانتریفیوژ است، ولی این روش همچنین سلول‌ها و مخروبه‌ها و اسپرم‌های غیرپویا که می‌توانند باروری را به خطر بیندازند، را جمع می‌کند.

ایتکن و کلارکسون (۱۹۷۸) ثابت کردند گلبول‌های سفید و اسپرم‌های مرده در سمن می‌توانند از خود اجزاء اکسیژن فعال[1] ساتر کنند و این می‌تواند چربی اکسیدشده را وارد غشا اسپرم کند.

اکسیده‌شدن غشاء اسپرم موجب از دست رفتن سیالیت غشا می‌گردد که مانع عملیات امتزاج اسپرم درطول باروری می‌گردد. در هنگام آماده‌سازی برای تلقیح مصنوعی، اینکه اسپرم‌های پویا را از گلبول‌های سفید و اسپرم‌های مرده به صورت موثر و کارآمد تا حدممکن جدا کنیم سودمند است.

اگر تزریق اسپرم درون‌سیتوپلاسمی عملیات انتخاب‌شده باشد، عملیات امتزاج اسپرم، البته کنار گذاشته می‌شود و سانتریفیوژ مستقیم با سرعت بالای نمونه‌ی اسپرم موجب به‌خطرانداختن باروری در تزریق اسپرم درون‌سیتوپلاسمی نمی‌گردد.

نمونه‌های اسپرمی که تعداد متوسط یا زیاد اسپرم بزرگتر از ($< 35 \times 10^6 \frac{\text{تعداد اسپرم پویا}}{\text{میلی لیتر}}$) با پیشروی و پویایی خوب رانشان می‌دهند، می‌توانند با استفاده از یک سطح اندودشده وتکنیک شناکردن[2] آماده گردند.

روش سانتریفیوژ بر اساس گرادیان شناور چگالی روش منتخب برای نمونه‌هایست که موارد زیر را نشان دهند:

-پویایی کم

-پیشروی ضعیف

-تعداد زیاد مخروبه یا تعداد زیاد سلول

-پادتن ضد اسپرم

در پایان هر فرآیند آماده‌سازی PH نمونه‌ها را به‌وسیله‌ی ۵٪ گاز CO2 به‌تدریج معتدل می‌کنند و تا آماده‌سازی نهایی برای کاشتن، نمونه‌ها را در دمای اتاق نگهداری می‌کنند [۲].

اسپرم بشر پس‌از انزال برای باروری آزمایشگاهی[3] ناتوان است و باید تحت آماده‌سازی و تغییرات خاصی قرار بگیرد تا توانایی لازم برای بارروی تخم را بدست آورد. این فرآیند که باعنوان کاپاسیتیشن (توانگری) مشهور است، ۵۰ سال قبل، توسط آویستن و چانگ ارائه شد. توانگری مانع اختلاط اسپرم انزال شده با پلاسمای سمن است.

اگر اسپرم به‌مدت طولانی در معرض پلاسمای سمن باشد، از توانایی قسمت قدامی اسپرم برای فعالیت جلوگیری می‌کند و توانایی باروری آن را کاهش می‌دهد. در آلت‌تناسلی مؤنث، اسپرم‌های پویا خودشان را از اسپرم‌های غیرپویا و

[1] Reactive oxygen species (ROS)
[2] Swim up
[3] Vivo