

بررسی بهبود پارامترهای اسپرم انسان بعد از آماده سازی به روش Swim up

زهرا بصیرت^۱، سید غلامعلی جورسرای^۲

۱- دانشیار زنان و زایمان، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل

۲- استادیار آناتومی و جنین شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل

تاریخ دریافت: ۸۷/۶/۲۰

تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۸/۸

خلاصه

مقدمه: حدود ۱۰ الی ۱۵ درصد زوجها دارای مشکل ناباروری اند و برای آنهایی که به درمان دارویی پاسخ نمی دهند استفاده از روشهای کمک باروری، اجتناب ناپذیر است. swim up یکی از روشهایی است که باعث بهبود کیفیت اسپرم می شود. این مطالعه با هدف بررسی تاثیر swim up بر حرکت، غلظت و مورفولوژی اسپرم انجام پذیرفت. روش کار: این مطالعه تحلیلی - آزمایشگاهی، بر روی نمونه های طبیعی مایع منی ۳۰ مرد مراجعه کننده به مرکز ناباروری فاطمه الزهراء (س) دانشگاه علوم پزشکی بابل کاندید لقاح خارج رحمی انجام شد. قبل و بعد از swim up اطلاعات لازم شامل تعداد، حرکت و مورفولوژی اسپرم ها ثبت گردید. اطلاعات توسط نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۰ و آزمون تی تست زوج آنالیز شد.

نتایج: میانگین تعداد اسپرم ها بعد از swim up ($164/1 \times 10^6$) بطور معنی داری کمتر از قبل از swim up ($87/3 \times 10^6$) بود ($p < 0/001$). میانگین حرکت اسپرم $60/3\%$ قبل از swim up و $85/8\%$ بعد از swim up بود ($p < 0/001$). swim up به ترتیب سبب بهبود $2/5$ ($p = 0/083$)، $12/6$ ($p < 0/001$) و $21/6$ درصد ($p = 0/003$) در گرید I، II، III اسپرم شده بود. میانگین درصد مورفولوژی طبیعی قبل و بعد از swim up به ترتیب $11/2\%$ و $16/3\%$ بود ($p < 0/001$). نتیجه گیری: بعد از آماده سازی به روش swim up، میزان مورفولوژی طبیعی، حرکت و گریدینگ اسپرم به نحو مطلوبی افزایش می یابد.

کلمات کلیدی: swim up، اسپرم، مورفولوژی، حرکت، گریدینگ

* نویسنده مسؤول: زهرا بصیرت

آدرس: بابل، مرکز تحقیقات باروری و ناباروری حضرت فاطمه الزهرا (س)،

دانشگاه علوم پزشکی بابل Zahra_basirat@yahoo.com

تلفن: ۲۲۷۴۸۸۱ (۱۱۱) ۹۸+



مقدمه

ناباروری به عدم ایجاد حاملگی، بعد از یکسال مقاربت بدون استفاده از هرگونه روش جلوگیری گفته می شود. بر اساس آمار جهانی حدود ۱۰الی ۱۵ درصد زوجها دارای مشکل ناباروری اند (۱). طی دو دهه اخیر، استفاده از فن آوریهای کمک باروری، تحولی شگرف در این زمینه بوجود آورده است. تحریک تخمدانی همراه با تلقیح داخل رحمی (IUI) یا لقاح خارج رحمی و تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (IVF-ICSI)؛ امید به حاملگی را در زوجهای نابارور افزایش داده است (۲). با شروع روش های کمک باروری بسیاری از محققین در صدد بر آمدند تا با ارزیابی دقیق بیماران، مناسبترین روش ممکن را انتخاب نمایند (۳). برخی به دنبال آن هستند تا روشهای درمانی کم هزینه و آسان تری را پیش روی بیماران خود قرار دهند. با توجه به اینکه عوامل مردانه، علت ۳۵٪ از ناباروری می باشد، لذا بررسی مایع منی و پارامترهای اسپرم، اولین قدم در ارزیابیهای تشخیصی است (۱). در اینگونه ارزیابیها، معمولاً، حجم مایع منی، تعداد، حرکت و شکل اسپرمها مدنظر قرار خواهد گرفت (۴) و به دلیل اینکه، آنالیز اسپرم اولین گام و یک روش ساده و غیر تهاجمی است، لذا باید دقت لازم در ارزیابی آن صورت پذیرد (۳). البته آماده سازی دقیق و مناسب اسپرم، به انتخاب یک روش مناسب بر می گردد تا بهترین نتیجه لازم را در زنده ماندن اسپرم، حرکت و دیگر پارامترهای مرتبط با آن مثل ظرفیت پذیری و توانایی لازم در بارورساختن اووسیت ها را بدست دهد (۵). لذا روشهای تهیه اسپرم در حال پیشرفته تر شدن هستند تا بتوانند به نحو مطلوبی اسپرم های متحرک با نمای مورفولوژی طبیعی را از لکوسیتها، باکتری ها و اسپرم های مرده که باعث آزاد شدن رادیکال های آزاد اکسیژن شده و بر روی توانایی اسپرم در لقاح پذیری تخمک تاثیر منفی دارند جدا سازند (۶). اگرچه

تعداد اندک اسپرم و حرکت بسیار کم آن نشانه به مخاطره افتادن باروری است، ولی گاهی اوقات با این مقادیر بسیار کم نیز بعد از آماده سازی مایع منی، حاملگی رخ می دهد (۷). به همین دلیل روشهای مختلفی برای آماده سازی اسپرم طراحی شده است تا بتوان اسپرمهای طبیعی را برای لقاح جدا کرد.

علی رغم اینکه از روشهای مختلف آماده سازی مثل Percoll، Pure sperm، Filtration و یا Sucrose washing برای جداسازی اسپرمها می توان استفاده نمود، ولی بسیاری از محققین، همچنان روی شستشو و swim up مایع منی و کارایی این تکنیک در جداسازی اسپرم، تاکید دارند (۸،۹). گرچه این روش توسط مراکز مختلف باروری و ناباروری دائماً در بوته آزمایش قرار می گیرد ولی ممکن است چگونگی اجرای آن متفاوت باشد. این مطالعه با هدف بررسی شستشوی اسپرم و انجام swim up، برای دستیابی به اسپرمهای بهتر با تاکید بر حرکت، غلظت و مورفولوژی آن انجام گرفت.

روش کار

این مطالعه بصورت تحلیلی-آزمایشگاهی بر روی ۳۰ مرد مراجعه کننده به مرکز فاطمه الزهراء بابل جهت ورود به سیکل درمانی IVF با روش نمونهگیری آسان انجام پذیرفت. مردان سیگاری و معتاد به مواد مخدر از مطالعه حذف شدند. نمونههایی در این مطالعه قرار گرفتند که برابر معیار سازمان بهداشت جهانی (۱۰)، دارای حجم مایع منی ۵-۲ میلیلیتر، تعداد اسپرم بیشتر از ۲۰ میلیون، حرکت اسپرم بالای ۵۰٪ و مورفولوژی طبیعی بیش از ۱۴٪ برابر معیار کروگر بودند (۲). برای همسان سازی نمونهها، مردان از نظر سن و فاکتورهای موثر در ناباروری، غربال شدند تا عوامل مخدوشکننده حذف گردد. ضمناً شرایط نمونهگیری، از نظر مدت زمان سپری شده بعد از آخرین نزدیکی، تهیه نمونه در محیط آزمایشگاه و انتقال آن به آزمایشگاه ناباروری بلافاصله بعد از قرار گرفتن در ظروف استریل، کاملاً مدنظر قرار

1- Intrauterine insemination

2- In vitro fertilization-Intracytoplasmic sperm injection

در نظر گرفته شدند و با شمارش قریب ۴۰۰ اسپرم در هر نمونه، درصد طبیعی آنها محاسبه گردید. سپس تمام اطلاعات به دست آمده وارد نرم افزار SPSS 10 گردید و با استفاده از تی تست زوج، داده ها آنالیز شدند و مقادیر کمتر از ۰/۰۵ معنی دار تلقی گردید.

نتایج

میانگین حجم مایع منی در ۳۰ نفر از مردان مورد مطالعه برابر با $۰/۱۳ \pm ۳/۲$ میلی لیتر بود. میانگین تعداد اسپرم های شمارش شده در میلی لیتر، قبل از swim up برابر $۸۷/۳ \times ۱۰^6$ و بعد از swim up با $۶۴/۱ \times ۱۰^6$ بدست آمد که این اختلاف با توجه به انحراف معیار معنی دار بود (جدول ۱).

حرکت اسپرم ها نیز با محاسبه میانگین آن بین ۳۰ نفر، برابر $۶۰/۳\%$ ، قبل از swim up و $۸۵/۸\%$ بعد از swim up، بدست آمد. این اختلاف با توجه به محاسبه انحراف معیار، از نظر آماری معنی دار بود. در بررسی مورفولوژی اسپرم، میزان طبیعی از $۱۱/۲\%$ قبل از swim up به $۱۶/۳\%$ بعد از swim up رسید. این افزایش با اختلاف $۳/۷ \pm ۵/۱$ ، بین دو مرحله، معنی دار بود ($p < ۰/۰۰۱$) (جدول ۱).

در بررسی گریدینگ مربوط به حرکت اسپرم، برابر معیار WHO چهار گرید (I, II, III و IV) در نظر گرفته شد. GI اسپرم، روند رو به کاهشی را قبل از swim up تا بعد از swim up داشته است. این روند در G II و G III، از قبل به بعد، افزایش نشان داد. همچنین هیچیک از افراد مورد مطالعه، قبل از swim up دارای اسپرم با G IV نبودند ولی بعد از swim up این میزان به $۱۱/۶ \pm ۴$ درصد رسید (نمودار ۱).

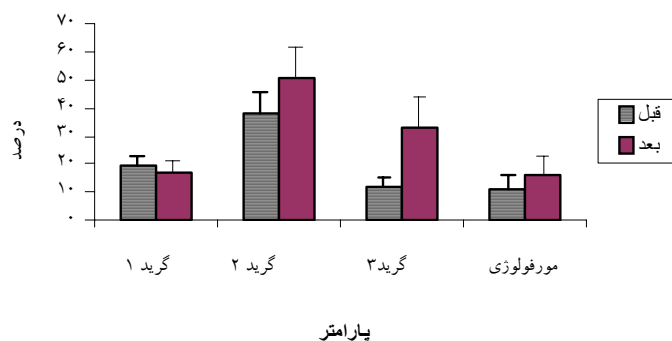
گرفت. سپس نمونه ها به داخل انکوباتور ۳۷ درجه منتقل شدند. آنالیز پارامترهای اسپرم در دو مرحله انجام گرفت.

۱- بعد از ۳۰ دقیقه انکوباسیون، به اندازه ۱۵ میکرولیتر از مایع منی بر روی لام کشیده شد و با میکروسکوپ نوری، پارامترهای اسپرم مثل تعداد، حرکت و گریدینگ، مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس لام اسپرم تهیه گردید و بعد از خشک شدن و انجام مراحل تثبیت (فیکساسیون)، رنگ آمیزی پاپانیکلا برای بررسی مورفولوژی صورت پذیرفت. در این مرحله هیچگونه شستشویی صورت نگرفت.

۲- به اندازه ۱-۲ میلی لیتر مایع منی در داخل لوله آزمایشگاهی قرار گرفت، سپس با اضافه کردن حدود ۵ میلی لیتر محیط کشت Ham's F₁₀ به آن، چند بار پیپتاژ شد تا کاملاً محلول یکنواخت حاصل گردد. سپس محتویات داخل لوله سانتریفیوژ گردید (۱۵۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه) (۱۰). بعد از انجام سانتریفیوژ و جمع شدن اسپرم ها به صورت رسوب در ته لوله آزمایش، مایع بالای آن دور ریخته شد و با باقی گذاشتن کمتر از ۰/۵ میلی لیتر محیط کشت در بالای رسوب، به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه و در دمای ۳۷ درجه، انکوباسیون صورت گرفت تا اسپرم هایی که دارای شکل طبیعی و حرکت مناسبی هستند، رسوب را ترک کرده و با جدا شدن از آن، در داخل محیط کشت بالای خود وارد شوند. سپس ۱۵ میکرولیتر از مایع بالای رسوب را روی لام قرار داده تا با میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گیرد. سپس پارامترهای اسپرم ثبت شدند. متعاقباً با تهیه اسپرم رنگ آمیزی، اسپرم ها از نظر مورفولوژی بررسی شدند. در این بررسی، تمام مواردی که شامل سر بزرگ، سر کوچک، سر شلاقی، سر سوزنی، سر گلابی شکل، سر بی شکل، سر دراز، سر گرد، دو سر، دو دم، دم بلند و یا کوتاه، دم پیچ خورده، گردن کوتاه و یا بلند و یا بدون گردن بودند، جزء اشکال غیر طبیعی

جدول ۱- میانگین (\pm انحراف معیار) تعداد، حرکت و مورفولوژی اسپرم، قبل و بعد از swim up در ۳۰ نفر از مردان مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری حضرت فاطمه الزهرا (س)

P value	اختلاف قبل و بعد از swim up	میانگین \pm انحراف معیار (درصد)	پارامتر اسپرم
<۰/۰۰۱	۲۳/۱ \pm ۱۹/۸	۸۷/۳ \pm ۱۹/۲ ۶۴/۱ \pm ۲۹/۳	تعداد اسپرم قبل از swim up بعد از swim up ۱۰ ^۶ /ml
<۰/۰۰۱	۲۵/۵ \pm ۷/۸	۶۰/۳ \pm ۷/۷ ۸۵/۸ \pm ۸/۶	حرکت اسپرم (به درصد) قبل از swim up بعد از swim up
<۰/۰۰۱	۵/۱ \pm ۳/۷	۱۱/۲ \pm ۴/۸ ۱۶/۳ \pm ۶/۸	مورفولوژی طبیعی قبل از swim up بعد از swim up



نمودار ۱- میانگین (\pm انحراف معیار) درصد گریدینگ و مورفولوژی اسپرم، قبل و بعد از swim up در ۳۰ نفر از مردان مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری حضرت فاطمه الزهرا (س)

به طرف پایین و ته لوله سرازیر شوند، لذا بسیاری از محققین بر این باورند که در این روش، تعداد بیشتری از اسپرم ها را می توان بدست آورد ولی در خصوص حرکت و میزان مورفولوژی، نظری غیر از این دارند و آنرا روش چندان مناسبی نمی دانند (۱۱). در خصوص روش Pure Sperm نیز همین نظریه وجود دارد و عده ای معتقدند که بین دو روش پرکول و Pure Sperm تفاوت چندان وجود ندارد (۱۳). از ویژگیهای مهم swim up، این است که باعث می گردد تا اکثر اسپرم هایی که دارای اشکال طبیعی هستند مخصوصاً در نمونه های اولیگواسپرمی، آستنواسپرمی و تراواسپرمی از رسوب تشکیل شده در ته لوله جدا شده و در مایع بالای رسوب شناور شوند (۱۴). در این مطالعه نیز با توجه به افزایش تعداد اسپرم های طبیعی بعد از swim up می توان نتیجه گرفت که این

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 درمانهای کمک باروری است تا بتوان شانس باروری را افزایش داد (۹). بر اساس معیار کروگر، بیشتر اشکال مختلف اسپرم، غیر طبیعی اند، لذا مورفولوژی طبیعی بیش از ۱۴٪ از یک حد قابل قبولی برخوردار است. در این مطالعه با ارزیابی مورفولوژی اسپرم بر اساس روش کروگر، مشاهده گردید که میزان مورفولوژی طبیعی اسپرم از ۱۱/۲٪ قبل از swim up به ۱۶/۳٪ بعد از آن رسید. این اختلاف نشان می دهد که در روش swim up،

آزادانه حرکت نمایند. البته حرکت اسپرم به گریدینگ آن کاملا وابسته است و هرچه گرید حرکت بالاتر باشد اسپرم از حرکت بیشتری برخوردار است. در این مطالعه مشاهده می شود که گرید سه، افزایش چشمگیری یافته است و علی رغم اینکه قبل از swim up هیچ یک از نمونه ها دارای گرید چهار نبودند، ولی بعد از swim up این میزان به ۱۱/۶٪ رسید که بسیار قابل توجه می باشد. 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 آماده سازی مایع منی و جداسازی اسپرم می دانند (۱۱). عده ای کاهش تولید اکسید نیتریک در این روش را باعث حرکت سریع اسپرم می دانند (۲۰). نتایج مطالعه حاضر و ارزیابی آن در کنار بررسیهای بسیاری از مقالات، نشان می دهد که با وجود تمامی روشهای جدید و مختلفی که در گزارشات و مقالات گوناگون به آن اشاره شده است، Swim up همچنان در صدر روشهای آماده سازی مایع منی و جدا سازی اسپرم قرار داشته و علاوه بر اینکه باعث افزایش پارامترهای اسپرم مثل تعداد و حرکت می شود، میزان حاملگی نیز افزایش پیدا می کند (۲۱، ۲۲) و اثر مثبت و معنی دار آن در جداسازی اسپرمها با نمای مورفولوژی طبیعی کاملا واضح و مشخص است. لذا انجام روش swim up را برای تمام نمونه ها مخصوصا در سیکل تلقیح داخل رحمی پیشنهاد می شود.

تشکر و قدردانی

از تمامی کارکنان محترم مرکز باروری و ناباروری حضرت فاطمه الزهرا (س)، دانشگاه علوم پزشکی بابل، به ویژه خانمها حیدری، فصیحیان، هاشمی و همچنین سرکار خانم دکتر نفیسه فتح نیا طبری تشکر و قدردانی می گردد.

روش کمک زیادی به جمع آوری اسپرم های طبیعی می نماید و ممکن است اسپرمهایی جدا شوند که با داشتن سر بیضی شکل و ناحیه آکروزومی وسیع در افزایش میزان موفقیت لقاح، موثرتر باشند (۱۵). عده ای معتقدند برای انجام IVF که اسپرمها باید در اطراف اووسیت قرار گرفته و در محیط انکوباتور، لقاح انجام پذیرد، دو بار شستشو برای swim up بسیار مناسب است و اسپرم های بهتری جمع آوری خواهند شد (۱۶) و آنرا بهتر از روشهایی مثل، پرکول، filtration و sucrose washing می دانند (۵). شاید بعد از هر swim up، تفاوت چشمگیری مشاهده نکنیم، چون اکثر افرادی که به مراکز ناباروری مراجعه می کنند، دارای مشکل اساسی در تعداد، حرکت و یا مورفولوژی اسپرم خود می باشند، لذا باید به جمع آوری اسپرم های طبیعی و حذف اشکال غیر طبیعی آن کمک نمود تا نتایج به نفع بیمار تغییر یابد. از طرفی باید در نظر داشت که ممکن است swim up در حذف اسپرمهایی که از بلوغ کمتری برخوردار بوده و یا در مرحله آناپلوئیدی بسر می برند، کمک زیادی نماید (۱۳، ۱۷). همچنانکه در مطالعه حاضر مشاهده می گردد این روش بطور معنی داری موجب افزایش اسپرماتوزوای متحرک زنده و به لحاظ مورفولوژیک طبیعی شده است و مطالعات دیگران نیز نشان می دهد که در میان جمعیت اسپرم های غیر طبیعی، درصد اسپرم ها با نقائص دمی و ذرات سیتوپلاسمیک بطور معنی داری کاهش خواهد یافت (۱۸، ۱۹).

یکی دیگر از پارامترهای اسپرم، حرکت آن است. حرکت اسپرم مخصوصا اگر در مرحله گرید سه و چهار باشد، مسلما 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 ۶۰٪ قبل از swim up به ۸۵٪ بعد از swim up رسید. لذا درصد قابل توجهی از اسپرم هایی که در محیط منی قادر به حرکت نبوده و یا احتمالا در محیط ویسکوزیته خود مهار شده بودند، توانستند در داخل محیط کشت

1. Matsunoto AM. Pathophysiology of male infertility In: Keye WR, Chang RJ, Rebar RW, Soules MR. Infertility evaluation and treatment. New York:Saunders;1995:555.
2. Gardner DK, Weissmann A, Howles CM, Shoham Z. Textbook of assisted reproductive techniques: laboratory and clinical prospective. London: Martiz Dunitz ;2001:62-7.
3. Yao MW, Schut DJ. Infertility In: Berek SJ, Rinehart RD, Adams Hillard PJ. Novak's Gynecology. 13th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins;2002:973-1066.
4. Byrd W. Sperm preparation and homologous insemination. In: Keye WR, Chang RJ, Rebar RW, Soules MR. Infertility evaluation and treatment. New York:Saunders;1995:698-9.
5. Martí E, Pérez-Pé R, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. Comparative study of four different sperm washing methods using apoptotic markers in ram spermatozoa. J Androl. 2006;27(6):746-53.
6. Boomsma CM, Heineman MJ, Cohlen BJ, Farquhar C. Semen preparation techniques for intrauterine insemination. Cochrane Database Syst Rev. 2007;(4):CD004507.
7. Speroff L, Colass RH, Kkase NG. Clinical gynecology endocrinology and infertility. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilking;2005:1135-65 .
8. Lopata A, Patullo MJ, Chang A, James B. A method for collecting motile spermatozoa from human semen. Fertis steril 1976;(27)677-84.
9. Pardo M, Bancells N. Artificial insemination with husband's sperm: techniques for sperm selection. Arch Androl 1989;(22):15-17.
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. Chen SU, Ho HN, Chen HF, Chao KH, Lin HR, Huang SC, 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.
12. Hammoud AO, Gibson M, Peterson MC, Carrell DT. Effect of sperm preparation techniques by density gradient on intra-individual variation of sperm motility. Arch Androl. 2007;53(6):349-51.
13. Sakkas D, Manicardi GC, Tomlinson M, Mandrioli M, Bizzaro D, Bianchi PG, et al. The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies. Hum Reprod. 2000;15(5):1112-6.
14. Dominguez LA, Burgos MH, Fornes MW. Morphometrical comparison of human spermatozoa obtained from semen and swim up methodology. Andrologia 1999;31(1):23-6.
15. 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.
16. Scott RT Jr, Oehninger SC, Menkveld R, Veeck LL, Acosta A. A critical assessment of sperm morphology before and after double wash swim-up preparation for in-vitro fertilization. Arch Androl 1989;23(2):123-9.
17. Jakab A, Kavacs T, Zavaczki Z, Borsos A, Bray-ward P, Ward D, et al. Efficacy of swim-up method in eliminating sperm with diminished maturity and aneuploidy. Hum Reprod 2003;18(7):1481-8.
18. 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. Int Cong Ser 2004;1271:181-4.
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. Fertis steril 1998;69(4):722-6.

20. 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.
21. Jameel T. Sperm swim-up: a simple and effective technique of semen processing for intrauterine insemination. J Pak Med Assoc 2008 Feb;58(2):71-4
22. Esteves SC, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agrawal A. Effect of swim up sperm washing and subsequent capacitating on acrosome status and functional membrane integrity of normal sperm. Int J Fertil Womens Med 2000;45(5):335-41.