

بررسی ارتباط برخی از پارامترهای مایع منی با میزان موفقیت باروری به روش Intra Cytoplasmic Sperm Injection در مردان نابارور مبتلا به ضایعه نخاعی

*زهرا نادیا شریفی^۱، شبنم موثقی^۱، فرشته مظفریان^۲، ناصر سلسبیلی^۳، محمود محمودی^۴

خلاصه:

سابقه و هدف: یکی از عوامل مهم ناباروری مردان، ضایعات نخاعی است که با توجه به سابقه جنگ تحمیلی درصد بالایی از جمعیت مردان نابارور را در کشور ما تشکیل میدهد. بر اساس مطالعات انجام شده، مهمترین مشکل این بیماری ناتوانی در انزال و کیفیت پائین مایع منی است. هدف این تحقیق تعیین رابطه کیفیت مایع منی مردان مبتلا به ضایعات نخاعی بر روی میزان ناباروری به روش Intra Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI) و مقایسه آنها با مردان سالم می باشد.

مواد و روش ها: مطالعه بصورت گذشته نگر در مرکز ناباروری کوثر بر روی ۷۱ مرد ضایعه نخاعی و ۴۴ مرد سالم (زوجهای نابارور Unexplain) که هر دو گروه به روش ICSI تحت معالجه قرار گرفته اند، انجام شد. پارامترهای بررسی شده عبارتند از: حجم مایع منی، PH، Viscosity، Liquification، داده ها تحت بررسی آماری قرار گرفتند.

یافته ها: اختلاف آماری معنی داری از لحاظ تأثیر پارامترهای مورد بررسی بر روی میزان باروری به روش ICSI در دو گروه شاهد و مورد وجود نداشت. P-value بدست آمده در مورد متغیرهای Liquification، Volume و PH به ترتیب عبارتند از ۰/۰۶۶، ۰/۳۲ و ۰/۰۶۶ فقط در مورد Viscosity اختلاف آماری معنی داری (P=۰/۰۴۲) در دو گروه وجود داشت.

نتیجه گیری و توصیه ها: با توجه به یافته های آماری و مقایسه اثرات فاکتورهای مورد بررسی بر روی میزان باروری به روش ICSI، به نظر می رسد یکی از بهترین روشهای باروری برای درمان ناباروری مردان مبتلا به SCI استفاده از روش ICSI-IVF است. اگرچه مشخص است که وضعیت باروری وابسته به متغیرهای زیادی است و کار بیشتری را در این زمینه می طلبد.

کلمات کلیدی: پارامترهای منی، ضایعه نخاعی، باروری آزمایشگاهی

مقدمه:

افراد کیفیت پائین مایع منی و اختلال در عمل انزال است. (۱، ۲) تحقیقات نشان میدهد که در اکثریت این افراد شمارش اسپرم نرمال بوده ولی Viability و Motility و مورفولوژی اسپرم غیر طبیعی است (۳، ۴). برخی از محققین معتقدند که ناقص بودن و نیز بالا بودن سطح ضایعه در مقایسه با ضایعات کامل و در سطوح پائین نخاع، منجر به کیفیت بهتر مایع منی می گردد (۵، ۶). البته هنوز علل اصلی

یکی از عوامل مهم ناباروری در مردان، ضایعات نخاعی (Spinal cord injury=SCI) است که با توجه به سابقه جنگ تحمیلی، درصد بالایی از جمعیت مردان نابارور را در کشور ما تشکیل میدهد. امروزه به خوبی ثابت شده که باروری در مردان مبتلا به ضایعات نخاعی دچار اختلال می گردد و اکثریت این افراد قدرت باروری خود را بعد از ابتلا به ضایعه ازدست می دهند. دو علت عمده ناباروری در این

۱- مربی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران - دانشکده پزشکی - گروه علوم تشریحی. (*نویسنده مسئول)

۲- مربی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران - دانشکده پزشکی - گروه علوم تشریحی

۳- دانشیار دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران - دانشکده پزشکی - گروه علوم تشریحی

۴- استاد دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران - دانشکده بهداشت - گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی



از تغییرات PH منی، مثانه تخلیه و شستشو داده شد (۸). تمامی زوجهای گروه مورد و شاهد توسط تکنیک ICSI تحت درمان ناباروری (لقاح آزمایشگاهی) قرار گرفتند (۹). در این تحقیق برخی از پارامترهای مایع منی که عبارتند از: حجم، PH، liquification، Viscosity توسط استانداردهای WHO (۱۹۹۹) اندازه گیری شدند (۱۰). و درصد گروههای شاهد و مورد با توجه به پارامترهای فوق الذکر و طبیعی یا غیرطبیعی بودن اندازه شان در جدول ۱ مرتب گردید.

جدول ۱- مقایسه پارامترهای منی در دو گروه مورد و شاهد

| پارامترها | گروه | مورد | شاهد |
|---------------|------|-----------|-----------|
| Volume | NL | ۶۳ (۸۷۷) | ۴۲ (۹۵/۵) |
| | AbN | ۸ (۱۱۳) | ۲ (۴/۵) |
| Liquification | NL | ۳۲ (۴۵/۱) | ۳۸ (۸۷/۴) |
| | AbN | ۳۹ (۵۴/۹) | ۶ (۱۷/۶) |
| PH | NL | ۵۳ (۷۴/۷) | ۳۸ (۸۷/۴) |
| | AbN | ۱۸ (۲۵/۳) | ۶ (۱۷/۶) |
| Viscosity | NL | ۱۹ (۲۶/۷) | ۱ (۲/۳) |
| | AbN | ۵۲ (۷۳/۳) | ۲۳ (۹۷/۷) |

و سپس افراد گروههای شاهد و مورد بر حسب میزان باروری به روش ICSI در جدول ۲ توزیع شدند. داده ها توسط آزمون آماری فیشردقیق مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و سطح معنی داری ($P < 0/05$) در نظر گرفته شد (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه تاثیر پارامترهای منی بر روی میزان باروری در گروههای مورد و شاهد

| نتیجه پارامتر | گروه | مورد | | شاهد | | نتیجه آزمون |
|---------------|-----------------------------|-----------|-----------|------------|-----------|-------------|
| | | بارور شده | جمع | بارور شده | جمع | |
| Volume | Normal (1-6 ^{cc}) | 45 (71/4) | 63 (100) | 37 (88/1) | 42 (100) | P = 0/07 |
| | Low (0-0/5 ^{cc}) | 1 (3/14) | 7 (100) | 0 (0%) | 0 (0%) | P = 0/8 |
| Liquification | High | 1 (100) | 1 (100) | 2 (100) | 2 (100) | P = 0/066 |
| | جمع | 19 (26/8) | 52 (73/2) | 39 (88/7) | 44 (100) | P = 0/38 |
| P. H | Abnormal (>30) | 13 (28/6) | 39 (100) | 1 (16/7) | 5 (83/3) | P = 0/26 |
| | Normal | 6 (18/7) | 26 (81/2) | 4 (10/5) | 34 (89/5) | P = 0/32 |
| Viscosity | جمع | 19 (26/8) | 52 (73/2) | 5 (11/3) | 39 (88/7) | P = 0/065 |
| | Ab (5-6/8) | 0 (0) | 5 (100) | 0 (0) | 0 (0) | P = 0/54 |
| P. H | NL (7-7/5) | 17 (67/9) | 36 (67/9) | 33 (86/84) | 33 (13/2) | P = 0/07 |
| | Ab (8-10) | 11 (84/6) | 11 (48/6) | 0 (0) | 6 (100) | P = 0/85 |
| Viscosity | جمع | 52 (73/2) | 71 (100) | 19 (26/8) | 39 (88/7) | P = 0/68 |
| | Normal | 3 (15/8) | 16 (84/2) | 0 (0%) | 1 (100) | P = 0/13 |
| Viscosity | Thick | 10 (14/3) | 6 (85/8) | 1 (20) | 4 (80) | P = 0/042 |
| | Thin | 15 (33/3) | 30 (66/7) | 4 (10) | 34 (90) | |
| جمع | 19 (26/8) | 52 (73/2) | 5 (11/3) | 39 (88/7) | | |

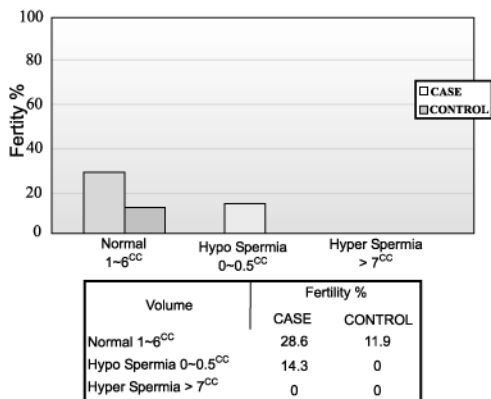
کاهش کیفیت مایع منی در افراد SCI بطور قطعی شناخته نشده است گرچه اکثر محققین معتقدند عوامل موجود در پلاسما منی رل مهمی در کاهش این کیفیت ایفا می کند (۳).

یکی دیگر از علل ناباروری در افراد SCI، اختلال در عمل انزال است از این رو، برای بدست آوردن منی در این گروه از دو تکنیک تحریک ارتعاشی آلت (penile vibratory stimulation) و تحریک الکتریکی (Electro - Ejaculation) در کلینیکهای ناباروری استفاده شود (۳). به منظور درمان ناباروری در افراد SCI از روشهای مختلف آزمایشگاهی استفاده میشود نظیر: IUI (Intra Uterine Insemination)، ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection)، IVI (Intra Vaginal Insemination) و غیره. گرچه هنوز تحقیقات برای انتخاب مناسبترین روش باروری در این گروه از افراد ادامه دارد. عده ای از محققین بر این باورند که استفاده از روش ICSI در درمان ناباروری مردان SCI موثر است (۷). در این تحقیق برخی از پارامترهای منی در گروه مردان SCI و سالم اندازه گیری شده و تأثیر این پارامترها بر روی میزان باروری تخمک به روش ICSI در دو گروه شاهد مورد ارزیابی می گردد تا مشخص شود آیا پارامترهای فوق الذکر بر روی میزان باروری به روش ICSI در افراد SCI تأثیر گذار است یا خیر.

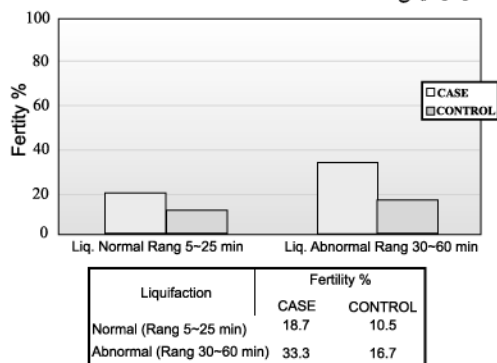
مواد و روشها:

در این مطالعه که بصورت مورد - شاهدی انجام شد تعداد ۷۱ جانباز ضایعه نخاعی از جمعیت مردان دچار SCI بصورت تصادفی انتخاب شدند. همچنین ۴۴ مرد سالم از جمعیت مردان سالم (زوجهای نابارور Unexplain) را نیز بصورت تصادفی برگزیدیم. این تحقیق در مرکز ناباروری کوثر بر روی زوجهای ناباروری که در طی سالهای ۸۰-۱۳۷۶ به این مرکز مراجعه کرده بودند، انجام شد.

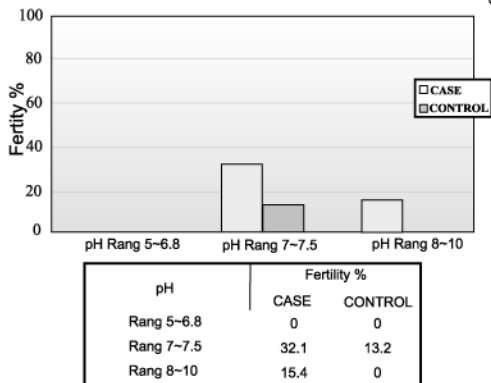
طول مدت ضایعه (time post injury) از زمان وقوع ضایعه تا اولین نمونه منی که در آزمایشگاه از فرد گرفته شده، حساب گردید. گروه شاهد شامل زوجهای ناباروری بود که مرد و زن سالم بوده ولی بدلیلی نامشخص قادر به بچه دار شدن نبودند (Unexplain Factor) در گروه مورد، زنان همگی سالم و مردان بدلیل ضایعه نخاعی دچار ناباروری بودند. تمامی افراد از لحاظ جسمانی در سلامت کامل بوده و در طی ۶ ماه قبل از جمع آوری نمونه هیچگونه درمان دارویی نداشتند. کلیه افراد گروه مورد، فاقد قدرت انزال بوده و جمع آوری منی به روش Electro Ejaculation انجام شد و قبل از آن برای جلوگیری



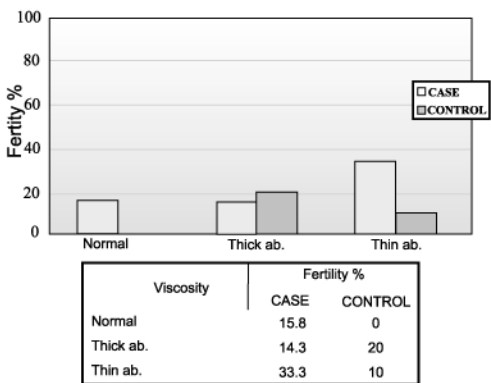
نمودار ۱- رابطه بین حجم منی و درصد موفقیت باروری به روش ICSI در دو گروه شاهد و آزمایش



نمودار ۲- رابطه بین LIQ و درصد موفقیت باروری به روش ICSI در دو گروه شاهد و آزمایش



نمودار ۳- رابطه بین pH و درصد موفقیت باروری به روش ICSI در دو گروه شاهد و آزمایش



نمودار ۳- رابطه بین Viscosity و درصد موفقیت باروری به روش ICSI در دو گروه شاهد و آزمایش

درعین حال با استفاده از آزمون Mantle - Hanszel و حذف اثر این پارامترها به مقایسه میزان باروری در دو گروه، مستقل از اثر فاکتور مورد نظر پرداختیم.

● استانداردهای اخلاقی: شیوه‌های اعمال شده در این تحقیق مطابق استانداردهای اخلاقی در تحقیقات علوم پایه به منظور حمایت از افراد مورد تحقیق و بررسی، در مرکز ناباروری کوثر انجام شد.
یافته‌ها:

در این تحقیق ۷۱ جانباز SCI در سنین ۲۵-۴۳ سال (میانگین سنی ۳۳/۸+۵/۲۸) مورد بررسی قرار گرفتند. سطح ضایعه نخاعی در این مردان در سطوح C5 - L5 نخاع بود که از این میان ۴/۲٪ ضایعه در حد C5 - C7، ۸۳/۱٪ در سطح T2 - T12 و ۱۲/۷٪ در حد L1 - L5 قرار داشت. میانگین مدت ۷-۱۱ سال از زمان وقوع ضایعه در این افراد گذشته بود.

مردان سالم در سنین ۲۷-۴۶ سال (میانگین سنی ۳۶/۹+۵/۳) بعنوان جمعیت شاهد در نظر گرفته شدند. سن زنان گروه آزمون ۱۹-۴۰ سال (میانگین سنی) و سن زنان گروه شاهد ۲۱-۴۲ سال (میانگین سن ۳۷/۶+۴/۸) بود. از نظر سنی بین دو گروه شاهد و مورد تفاوت معنی داری وجود نداشت. درصد باروری در گروه مورد که سطح ضایعه نخاعی در حد نخاع گردنی بود ۰٪، در حد سینه‌ای ۲/۸٪ و در حد کمری ۲۲/۲٪ بود. بررسی‌های آماری اختلاف معنی داری را بین سه گروه نشان نداد (P=۰/۵۴).

با توجه به جدول ۲ هیچگونه اختلاف آماری معنی داری بین گروه‌های شاهد و مورد از لحاظ تأثیر پارامترهای حجم منی، PH و Liq بر روی میزان باروری به روش ICSI مشاهده نشد (نمودارهای ۱ و ۲ و ۳). ولی در نمونه‌هایی که Viscosity مایع منی آنها حالت thin داشت اختلاف آماری معنی داری بین دو گروه مشاهده شد (P=۰/۰۱۳) و درعین حال با حذف عامل Viscosity، نسبت باروری هر دو گروه نیز تفاوت آماری معنی داری را در حد P=۰/۰۴۲ نشان داد (نمودار ۴).

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج بدست آمده نشان میدهد که سطح ضایعه نخاعی تأثیری بر روی میزان باروری به روش ICSI ندارد که این نتیجه، نظریه Hulting را تأیید می‌کند (۱۱).

در گذشته عقیده داشتند تأخیر در Liquefaction نمایانگر عفونت

تغذیه و تهویه اسپرم اثر دارد و بعلت داشتن فسفوکیناز A می تواند در تماس بیش از یک ساعت با اسپرم، بر روی Viability و Motility اسپرم تأثیر بسزا گذاشته و در موارد مایع شدن اسپرم می تواند آنرا کاپاسیته کرده و اکروزوم را از اسپرم آزاد نماید در نتیجه مواردی از عقیمی اسپرم در باروری تخمک را بوجود بیاورد. dys function سمنینال و زیکول احتمالاً یکی از علل Hyperviscosity منی است. در این نمونه ها سطح فروکتوز پائین بوده و Motility اسپرم کم است (۱۷). از طرفی برخی عفونتها (تریکوموناس) موجب Hyperviscosity منی می شوند در نتیجه میتوانند موجب کاهش باروری در مرد گردند (۱۸). در تحقیق حاضر Hyperviscosity هیچ تأثیری بر روی میزان باروری به روش ICSI نداشت ولی در نمونه هایی که viscosity آنها حالت thin داشت، میزان باروری در گروه مورد بطور معنی داری بیش از گروه شاهد بود که مخالف نظریات و فرضیات معمول است، بنابراین بهتر است در زمینه تأثیر viscosity بر روی باروری به روش ICSI بررسی های بیشتری انجام شود.

به نظر می رسد یکی از بهترین روشهای درمانی در درمان زوجهای ناباروری که مردان مبتلا به SCI می باشند و خصوصیات ظاهری مایع منی آنها مغایر با افراد نرمال است، استفاده از تکنیک IVF - ICSI می باشد. گرچه با توجه به مطالب یاد شده مشخص است که وضعیت باروری در دو گروه مورد و شاهد وابسته به متغیرهای زیادی است و کار بیشتری را می طلبد که با استفاده از مدل های رگرسیونی مانند Logit می توان اثر فاکتورهای مختلف را کنترل نموده و نتیجه نهایی را بدست آورد که این قسمت از کار مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

تشکر و قدردانی :

بدینوسیله از همکاری متخصصین و پرسنل محترم مرکز ناباروری کوثر همچنین سرکار خانم بهشته ابو حمزه عضو محترم هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی ارتش که زمینه اجرای این تحقیق را فراهم آوردند تقدیر و تشکر می نمایم.

References

1. Brackett NL , Davi RC padron OF , Lynne CM: seminal plusma of spinal cord injures men inhibits sperm motility of normal men. J - urol, 1996 May, 155 : 1632 -1635

در مجاری تناسلی است ولی تحقیقات جدید هیچگونه ارتباطی را بین تغییرات Liq و ناباروری تأیید نمی کند که با نتایج حاصل از این تحقیق همخوانی دارد (۱۲).

PH مایع منی ناشی از بالانس بین ترشحات اسیدی پروستات و ترشحات آلكالین کیسه منوی است حجم کم انزال با PH نرمال در بعضی از افراد طبیعی محسوب می شود اما ممکن است نشانگر جمع آوری ناقص یا انزال رتروگرا باشد در حالیکه حجم کم انزال یا PH اسیدی نشانگر اختلال در مجرای انزالی یا کیسه منوی است (۱۳ و ۱۴). در افراد مبتلا به SCI ، UTI به وفور دیده میشود که یکی از علل بروز آن التهاب و انسداد در مجاری انزالی از جمله اپیدیدیم است (گرچه هنوز بطور قطعی این مسئله ثابت نشده است) بنابراین می توان دریافت که احتمال دارد PH اسیدی در افراد SCI ناشی از انسداد مجاری و UTI باشد که ایندو به نوبه خود می توانند یکی از عوامل تأثیر گذار بر روی میزان باروری باشند. (۲)، در حالیکه در تحقیق حاضر ارتباط معنی داری بین PH منی و میزان باروری به روش ICSI مشاهده نگردید. محققین نشان داده اند که حجم خیلی زیاد و یا خیلی کم مایع منی با ناباروری مرتبط است (۱۶) غالباً حجم خیلی کم منی (کمتر از ۱ cc) همراه با شمارش پائین اسپرم می باشد. این امر ممکن است مربوط به انسداد مجاری انزالی و یا التهاب غدد فرعی جنسی باشد که با عدم وجود اسپرم یا پائین بودن سطح فروکتوز در مایع منی مشخص می شود (۱۴ و ۱۳). در عین حال Hulting در سال ۱۹۹۷ اعلام نمود که هیچ ارتباط معنی داری بین شمارش اسپرم و باروری به روش ICSI وجود ندارد. Elliott نیز در سال ۲۰۰۰ با بررسی بر روی مردان SCI عنوان نمود که ICSI یکی از مؤثرترین راهها برای باروری این افراد حتی در موارد Azospermia می باشد (۱۱ و ۷). در تحقیق حاضر نیز هیچگونه ارتباط معنی داری بین میزان باروری به روش ICSI و حجم زیاد یا کم منی دیده نشد.

Viscosity جزء متغیرهای وابسته کیفی است که بر روی حرکت ،

2. Todd A , Linsenmeyer TA , Perakash I : Infertility in men with spinal cord injury. Arch - Phys - Med - Rehabil , 1991 sep , 72 (10) : 747 -54.

3. Brackett NL , Ferell SM , Aballa TC , Amador MY , Gynn CM : semen quality in spinal cord injured

- men : Does it progressively decline postinjury? Arch - Phys - Med - Rehabil, 1998 Jun,79: 625-8.
4. Heruti RY , Katz H , Menashe Y , Weissenbery R , Ravivv G , Madjar I , Ohry A : Treatment of male infertility due to spinal cord injury using rectal probe electroejaculation. Spinal - Cord, Zool Mar, 39 (3) : 168-75.
 5. Ohi DA, Bennett CY, Mecabe M, Menge AC, Me Guire EY: predictors of success in electroejaculation of spinal cord injured men. J - Urol, 1989 Dec, 142 : 1483 - 6.
 6. Sonksen J , Ohi DA , Giwecman A , Biering Sorensen F, kristensen - JK : Quality of semen obtained by penile vibratory stimulation in men with spinal cord injuries : Observations and predictors. Urology , 1996 Sep , 48(3) : 453 -7.
 7. Elliott SP , Orejuela F , Hirsch IH , Lipshultz LI, Lamb DY , Kim ED : Testis biopsy findings in the spinal cord injured patient . J-Urol , 2000 Mar , 163 (3) : 792 -5.
 8. Lim TC , Mallidis C , Hill ST , Skinner DY , Carter PD , Brown DY , Baker HWG : " A simple technique to prevent retrograde ejaculation during assisted ejaculation. Paraplegia ,1994,32:142 - 9.
 9. Palermo G , Joris H , Devroey P , Van Steireghem AC: Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet , 1992, 340 : 17-18.
 10. World Health Organization . WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm - cervical mucus interaction. Cambridge, England, Cambridge University press, 1999.
 11. Hulting C , Rosenlund B , Levi R , Fridstrom M , Sjoblom P , Hillensjo T : Assisted ejaculation and in - Vitro Fertilization in the treatment of infertile spinal cord injured men : The role of intracytoplasmic sperm injection . Hum - Reprod , 1997 Mar , 12(3): 499 0502.
 12. Munuce MJ , Bregin C , Carizza C , etal : Semen culture , leukocytospermia and the presence of sperm antibodies in seminal hyper viscosity. Arch - Androl , 199 9 , 42 : 21-28.
 13. Diamandis EP , Arnet WP , Foussias G : Seminal plasma biochemical markers and their association with semen analysiz findings. urology, 1999 , 53 : 596-603.
 14. Chia SE , Ong CN , chua LH: comparison of zine concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. J - Androl , 2000 , 21 : 53 -57.
 15. Zopfgen A, priem F, sudhoff: relationship between semen quality and the seminal plasma components carnitine, alpha - glucosidase, fructose, citrate and granulocyte elastase in infertile men compared with a normal population. Hum-Reprod, 2000, 15 : 840 -5.
 16. Amelar RD, Dubine L , walsh PC, Other factors affecting male infertility, philadelphia, W.B. saunders co, 1977 : 69-102.
 17. Gonzales GF, Kortebani G, Mazzolli AB: Hyperviscosity and Hyperfunction of the seminal vesicles. Arch - Androl , 1993 , 30 : 63 -68.

Effects of some parameters of semen on IVF - ICSI technique in spinal cord injured men.

*Nadia Sharifi; MS¹, Shabnam Movassaghi; MS¹, Freshteh Mozaffarian; MS², Naser Salsabali; PHD³, Mahmood Mahmoodi; PhD⁴

Abstract:

Background : One of the most important cause of infertility in men is spinal cord injury (SCI). In our country the incidence of this kind of infertile men raised after the war. Reduced fertility in men with SCI results from inability to ejaculate and poor semen quality. IVF-ICSI technique is one of the most effective methods for treatment of these patients. This study compares the influence of some semen parameters of healthy and SCI men on the rate of successfulness of ICSI method in both groups.

Materials & Methods : 71 male with SCI and 44 healthy men (unexplained infertile couples) were treated with ICSI method between 1376 - 1380 in Kowsar Assisted Reproductive center. Routine semen analysis was performed to evaluate semen's parameters including: volume, PH, Viscosity and Liquification in both group.

Results: The results show that these paramerters of semen don't influence the rate of fertilization on both groups , except Viscosity (p = 0.013)

Conclusion : It seems that the best choice of assisted reproduction treatment for couples with spinal cord injured men is IVF - ICSI technique. Of course several parameters can influence The fertility in these couples, so we need more researches in this field.

Keywords : ICSI-SCI, semen parameter.

1- Member of anatomy department, Islamic Azad University of medical sciences, Tehran medical campus. (*corresponding author)

2- Member of anatomy department, Army University of medical sciences.

3- Associated professor of anatomy, department of anatomy, Tehran University of medical sciences.

4- Professor of department of epidemiology & biostatistic, faculty of health, Tehran university of medical sciences.