

تاثیر پنتوکسی فیلین روی قدرت حرکتی و مرفولوژی اسپرم استخراج شده از ناحیه اپیدیدیم یا بیضه مردان نابارور

محمد علی خلیلی (Ph.D)^۱، سراج الدین وحیدی (M.D)^۲، ناصر سفائی (MSc)^۳، علی محمد علی حیدری (MSc)^۴

- ۱- استادیار گروه جنین شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
- ۲- استادیار گروه ارولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
- ۳- مربی گروه بافت شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
- ۴- مربی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

چکیده

بطور کلی سه فاکتور دخیل در ناباروری مردان شامل کاهش تعداد اسپرم، قدرت حرکتی ضعیف و مرفولوژی غیر طبیعی اسپرم میباشد. در حال حاضر امکان بهبود کیفیت اسپرم از نظر تعداد و مرفولوژی در محیط آزمایشگاه امکان پذیر نیست. در صورتی که امکان بهبود کیفیت تحرک اسپرم با استفاده از داروهای افزاینده تحرک ممکن می باشد. هدف از مطالعه اخیر بررسی اثر پنتوکسی فیلین (PX) بر روی تحرک و مرفولوژی اسپرمهای استخراج شده از اپی دیدیم و بیضه افراد آستنوزوسپرمی می باشد. نمونه های اسپرم از طریق Percutaneous epididymal sperm aspiration (PESA) یا (TESE) Testicular sperm extraction از مردان دچار آستنوزوسپرمی انسدادی حاصل گردید. مجموعاً ۴۰ نمونه PESA و ۴۰ نمونه TESE به این مطالعه آینده نگر اختصاص داده شد. پس از بررسی اولیه، روی هر نمونه روش Swim-up انجام گرفت و نمونه اصل به دو بخش کنترل (بدون PX) و بخش تحت اثر PX (۳/۵ mM) تقسیم گردید. پس از ۴۵ دقیقه نگهداری در دمای ۳۷°C، درصد اسپرمهای متحرک و مرفولوژی اسپرمها به ترتیب با استفاده از Mackler chamber و رنگ آمیزی پاپانیکولا مورد ارزیابی قرار گرفت. میانگین تعداد اسپرم در گروه های TESE, PESA به ترتیب $10^6 \times 7/47 \pm 7/3$ و $10^6 \times 1/3 \pm 2/43$ بود. درصد اسپرم دارای مرفولوژی نرمال در گروه های بالا $11/6 \pm 22/67$ و $9/2 \pm 14/9$ ، که پس از انکوباسیون با PX به ترتیب $23/2 \pm 15/7$ و $9/5 \pm 1/9$ تغییر یافت. علاوه بر این درصد اسپرمهای دارای حرکت پیشرونده در گروه کنترل TESE, PESA $4/2 \pm 13/9$ و $0/26 \pm 0/6$ بود که به ترتیب به $20/1 \pm 9/7$ (p < 0/001) و $0/95 \pm 0/03$ (p < 0/05) افزایش یافت، نتایج فوق اشاره بر این دارد که PX در افزایش تحرک اسپرم بویژه در گروه PESA مؤثر بوده و اثر سوء قابل تشخیصی بر روی مرفولوژی اسپرم نداشته است. تصور می رود PX به عنوان یک ترکیب مطمئن و ارزان دارای کاربرد آسان بوده و می تواند برای بهبود روشهای درمان ناباروری مردان مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به عملکرد دوگانه آن به عنوان افزاینده تحرک و مشخص کننده حیات اسپرم، با اطمینان می توان از آن برای درمان ICSI در موارد استنوزوسپرمی شدید استفاده نمود.

کل واژگان: پنتوکسی فیلین، تحرک، شکل، مردان نابارور

آدرس مکاتبه: یزد، صفائیه، خیابان بوعلی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری

مقدمه

امروزه، بیش از ۶۰ میلیون نفر از مردم جهان با مشکلات ناباروری در برهه ای از زندگی مشترک خود مواجه هستند، و این در حالی است که در نیمی از موارد، مردان به نحوی عامل ناباروری می‌باشند. در حدود ۱۰٪ موارد، عدم وجود اسپرم در مایع انزال^۱ علت اصلی ناباروری مردان می‌باشد. هر گاه در ناحیه ای از مجاری دستگاه تناسلی انسداد ایجاد شود سلولهای اسپرم قادر به عبور از مجاری نخواهند شد و به آن آزوسپرمی انسدادی^۲ اطلاق می‌شود (۱ و ۲).

در جهان برای اولین بار Pryor و همکاران در سال ۱۹۸۴ روش تخلیه اسپرم از ناحیه اپیدیدیم را انجام دادند (۳). این روش به PESA^۳ معروف شد. در همین راستا، اولین نوزاد به روش فوق توسط Silber و همکاران بدنیا آمد (۴). متأسفانه درصد موفقیت PESA با روش IVF بعلت تحرک ضعیف سلولهای اسپرمی بسیار پایین بود. البته باید اذعان نمود که قابلیت باروری این اسپرمها توسط محققین گزارش شده است (۵). در افراد آزوسپرمی انسدادی در ناحیه اپیدیدیم و یا در مجاری درون بیضه، معمولاً بعد از عمل بیحسی موضعی مستقیماً از بیضه نمونه گیری می‌شود این روش غیرتهاجمی به روش (TESE)^۴ معروف می‌باشد. اولین تولد حاصله از روش TESE و میکرواینجکشن در سال ۱۹۹۶ توسط Tournaye گزارش شد (۶). با این روش میتوان به مردان آزوسپرم که علاقه به داشتن فرزند ژنتیکی خود را دارند امید زیادی داد قبلاً این دسته از بیماران می‌بایست در انتظار برنامه اهداء اسپرم باشند و یا فرزند خواندگی را بعنوان یک راه حل پایانی تقبل کنند. اگر چه، روش ICSI+TESE موفقیت‌های چشمگیری را

بدنبال داشته است ولی اسپرمهای استخراج شده از بافت بیضه معمولاً فاقد تحرک پیشرونده بوده و گاهاً فاقد هر گونه تحرک^۵ می‌باشند (۷).

یکی از روشهای استاندارد جهت افزایش قدرت تحرک اسپرم، بکارگیری داروی پنتوکسی فیلین (PX)^۶ می‌باشد که در محیط *in vitro* و در کمترین زمان میتواند افزایش تحرک اسپرم را بدنبال داشته باشد. تاریخچه استفاده این دارو به سال ۱۹۷۲ بر می‌گردد که در بیماریهای عروقی نظیر تصلب شرائین جهت بهبودی در وضعیت جریان خون شریانی استفاده می‌شد (۸) در درمان ناباروری، PX در مرحله اول جهت افزایش جریان خون بیضه مصرف می‌شد. در چند سال اخیر، PX مورد توجه محققین آندرولوژی قرار گرفته است. PX به عنوان مهار کننده آنزیم فسفودی استراز عمل کرده و افزایش سطح cAMP سلولی را بدنبال خواهد داشت (۸) این افزایش متعاقباً باعث ازدیاد گلیکولیز سلولی و تولید ATP می‌شود. لذا، افزایش در سطح تولید ATP میتواند افزایش تحرک^۷ اسپرم را ایجاد کند. با توجه به موارد فوق و تعداد معدود مراجعه کننده آزوسپرم به مراکز ناباروی، هدف این مطالعه بررسی اثر PX روی قدرت تحرک و مرفولوژی اسپرمهای استخراج شده از ناحیه سر اپیدیدیم (PESA) و بافت بیضه (TESE) مردان آزوسپرم بوده است.

مواد و روشها

تعداد ۸۰ مرد نابارور با مشکل آزوسپرمی انسدادی مراجعه کننده به مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری یزد مورد مطالعه قرار گرفتند. از آنجا که سن و مدت ناباروری فاکتورهای دخیل در ناباروری مردان مطرح

5- Total Immotility

6- Pentoxifylline

7- Motility

1- Azoospermia

2- Obstructive Azoospermia

3- Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration

4- Testicular Sperm Extraction

(حداکثر ۱ سانتی متر) روی پوست اسکروتوم، لایه واژینالیس و لایه سفید انجام گرفت و یک تکه کوچک (کمتر از نیم سانتی متر) از بافت مجاری منی ساز جدا شد. بلافاصله آنرا داخل لوله فالکن حاوی ۱ میلی لیتر محیط قرار داده و در آزمایشگاه با استفاده از میکروسکوپ استریو و تیغ استریل به تکه های کوچکتر تبدیل شد. محتویات دوباره به لوله فالکن برگردانده و با استفاده از شیکر لوله برای مدت ۲ دقیقه مخلوط شد مراحل بعد همچون PESA انجام گرفت.

یافته های پژوهشی پس از جمع آوری اطلاعات بین گروه کنترل و گروه PX با استفاده از برنامه نرم افزاری SPSS مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج

سن مردان گروه PESA بین ۲۴ تا ۴۸ سال مشخص شد که از نظر کلینیکی اهمیت خاصی ندارد. در ضمن، سن افراد گروه TESE بین ۵۶-۲۱ سال گزارش شد. وضعیت کلینیکی هر دو گروه در جدول شماره یک مشخص شده است. در ضمن تعداد ۸ و ۶ نمونه به ترتیب از گروه های PESA, TESE فاقد سلول گرد بودند. در گروه PESA تحرک پیشرونده و درجا از ۴/۲ ± ۱۳/۹٪ و ۴/۹ ± ۵/۳٪ در نمونه های کنترل به ۷/۱ ± ۹/۷٪ و ۲۰/۱ ± ۹/۷٪ در نمونه های PX افزایش یافت. بطور کلی تاثیر PX در افزایش تحرک اسپرم قابل توجه بود. در ضمن در گروه TESE حرکت پیشرونده و همچنین در جای اسپرم از ۰/۶ ± ۲۶/۰٪ و ۰/۶ ± ۴۸/۱٪ در نمونه های کنترل به ۰/۳ ± ۹/۵٪ و ۰/۸ ± ۷/۸٪ در نمونه های PX افزایش یافت. افزایش حرکت درجا در نمونه PX در مقایسه با کنترل در گروه TESE قابل توجه بود ($p < 0.001$) همچنین درصد مرفولوژی طبیعی اسپرم در نمونه های کنترل PESA و TESE بترتیب ۱۱/۶ ± ۲۲/۶٪ و ۹/۲ ± ۱۴/۹٪ بوده که هر دو به ترتیب به ۷/۱ ± ۲۳/۲٪ و ۱/۹ ± ۹/۵٪ تغییر یافته بود. بطور کلی

نمی باشد، در این تحقیق افراد با شرایط سنی متفاوت مورد بررسی قرار گرفتند. جمعاً ۴۰ نمونه PESA و ۴۰ مورد TESE مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند.

گروه PESA: با استفاده از بیحسی موضعی با لیدوکائین ۲٪ و سر سوزن ۲۱ از طریق پوست وارد ناحیه سر اپیدیدیم شده و عمل آسپیراسیون اسپرم انجام گرفت. محتویات بداخل لوله فالکن حاوی ۱ میلی لیتر محیط Ham's F10 و سرم بند ناف ۱۰٪ کشیده شد. بعد از مخلوط نمودن، یک قطره ۱۰ μl از نمونه با بزرگنمایی ۴۰۰ مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفت. در بعضی موارد جهت دستیابی به نمونه مناسب تر بیش از یک نمونه آسپیره شده و یا از اپیدیدیم طرف مقابل نمونه گیری شد. تعداد اسپرم و سلولهای گرد مشخص شده و بعد عمل شستشو^۱ با سانتریفوژ دور ۲۰۰۰ rpm برای دوبار (هر دفعه ۵ دقیقه) انجام گرفت. در مرحله بعد، رسوب بعلاوه ۰/۳ میلی لیتر از مایع نگهداری شد و دو نمونه (کنترل و PX) هر کدام ۱۰۰ μl تهیه شدند که هر دو برای ۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ °C نگهداری شدند. مقدار استاندارد PX ۲/۶mM مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت تحرک اسپرم (پیشرونده و درجا) به همراه مرفولوژی طبیعی اسپرم در هر دو نمونه کنترل و PX مورد مطالعه قرار گرفت. جهت بررسی تحرک از روش Mackler chamber استفاده شد. همچنین از هر نمونه حداقل ۲ لام تهیه شده و با متانول تثبیت شدند بعد از آماده سازی لام با استفاده از درصد های مختلف الکل، نهایتاً رنگ آمیزی اختصاصی Papaniclau طبق دستورالعمل WHO^۲ انجام گرفت (۹). تعداد یکصد اسپرم از هر نمونه جهت مرفولوژی بررسی شد.

گروه TESE: با استفاده از بیحسی موضعی، پوست اسکروتوم با استفاده از روشهای استریل جهت انجام بیوپسی آماده شد. یک برش طولی کوچک

1- Swim-up

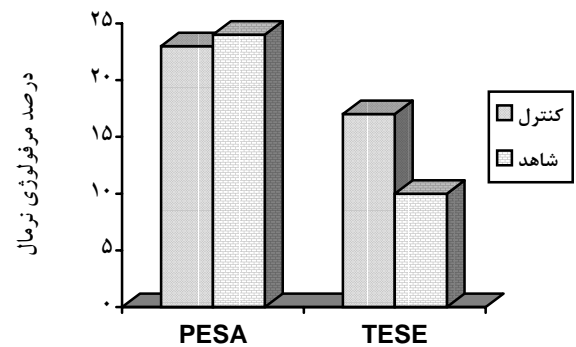
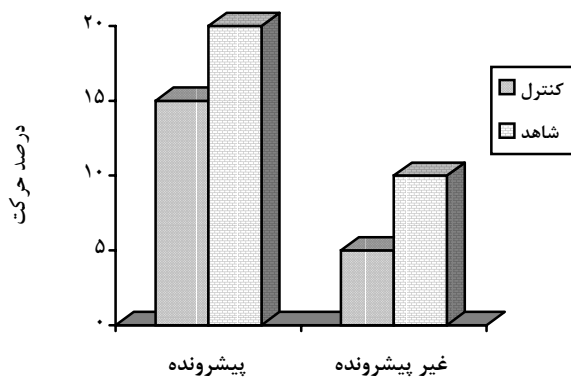
2- World Health Organization

تعداد بیش از حد طبیعی سلولهای گرد در هر میدان دید میکروسکوپی بودند ($9/2 \pm 1/8$) که این میتواند بیانگر عفونتهای دستگاه تولید مثل باشد.

نمونه های TESE دارای اسپرمهای با مورفولوژی غیر طبیعی بودند. نمودارهای ۱-۳ نشان دهنده وضعیت حرکتی اسپرم و مورفولوژی طبیعی اسپرم در PESA و TESE می باشند. همچنین نمونه های TESE دارای

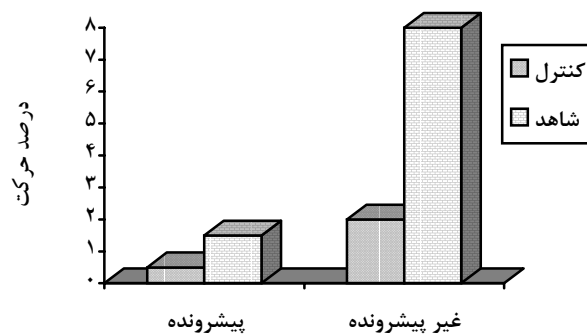
جدول (۱): پارامترهای کلینیکی نمونه های آروسپرمی

متغیر	PESA	TESE
تعداد نمونه	۴۰	۴۰
سن مرد (سال)	$29/5 \pm 5$	$34 \pm 7/7$
تعداد سلول گرد (hpf)	$2/8 \pm 1/1$	$9/2 \pm 1/8$
تعداد اسپرم ($\times 10^6$)	$7/47 \pm 7/3$	$2/43 \pm 1/3$



نمودار (۲) میانگین های تحرک اسپرم PESA در گروه کنترل و شاهد

نمودار (۱) میانگین های مورفولوژی طبیعی اسپرم در دو گروه کنترل و شاهد



نمودار (۳) میانگین تحرک اسپرم TESE در دو گروه کنترل و شاهد

بحث

امروزه، مشخص شده است که سه عامل مهم در ناباروری مردان، کاهش تعداد اسپرم^۱، کاهش قدرت حرکتی^۲ و مرفولوژی غیر طبیعی^۳ می باشد بنابراین یک فاکتور اصلی در موفقیت سیکل‌های ART فعالیت حرکتی اسپرم می‌باشد. بدیهی است که هر چه کیفیت حرکتی اسپرمها بهبود یابد، درصد موفقیت سیکل درمانی بخصوص در روشهای درمانی IUI و IVF افزایش می یابد (۸و۴).

بر همین اساس، در طی چند سال گذشته داروی PX در موارد کلینیکی و تجربی (حیوانی) در تعدادی از مراکز ناباروری جهان مورد مطالعه قرار گرفته است. PX بسهولت در آب حل شده و دارای نیمه عمر طولانی می‌باشد، در ضمن میتواند در بهبودی واکنش آکروزومی و همچنین در تشخیص اسپرم زنده از مرده موثر باشد (۷و۱۰). بنابراین مطالعه حاضر بر این اساس پایه ریزی شد تا تاثیر PX بر روی تحرک اسپرمهای بدست آمده از دو روش متداول TESE, PESA از مردان آروسپرم انسدادی مورد بررسی قرار گیرد. معمولاً نمونه‌هایی که از ناحیه اپیدیدیم و یا از بافت بیضه بدست می‌آیند دچار کاهش تحرک اسپرم بوده که همین امر میتواند تاثیر مستقیم در نتیجه درمان داشته باشد. به همین علت روش ساده‌ای نظیر افزودن PX به محیط حاوی نمونه‌های PESA/TESE حائز اهمیت می باشد. در بعضی مواقع حتی میتوان بکمک PX نمونه‌های PESA را در سیکل درمانی IVF مورد استفاده قرار داد. درضمن، اسپرم‌های فعال شده موفقیت بیشتری را در سیکل‌های میکرواینجکشن (ICSI)^۴ کسب می نمایند. در این راستا، پروفیسور Ng و همکاران (۱۹۹۳) در تحقیق کلینیکی خود

کلینیکی خود به این نتیجه رسیدند که موفقیت ICSI وابسته به تزریق یک اسپرم زنده (با مرفولوژی و تحرک طبیعی) و یا افزایش تحرک اسپرم با PX و یا دیگر ترکیبات افزایشده تحرک مانند 2-deoxyadenosine می باشد (۱۱).

بعضی از صاحب‌نظران نظیر Mekinney و همکاران (۱۹۹۴، Yovich و همکاران ۱۹۹۰، Tesarik و همکاران ۱۹۹۲) بر این عقیده اند که مقدار استاندارد PX جهت افزایش تحرک اسپرم بدون ایجاد اثر سوء ناشی از سمیت آن $3/6 \text{ m M}$ (۳/۶ mg/ml) می‌باشد و باید بعد از زمان تقریبی یک ساعت با شستشوی مجدد، PX را از محیط نمونه خارج نمود (۸، ۱۲، ۱۳). به همین علت در مطالعه حاضر مقدار معین شده فوق برای مدت ۴۵ دقیقه در نمونه‌های آروسپرمی نگهداری شد. در ضمن مرفولوژی اسپرمها نیز در گروه PX مورد بررسی قرار گرفتند تا نقش PX بر روی ساختار مرفولوژیکی اسپرمهای نمونه‌های TESE/PESA که معمولاً دچار نقص ساختمانی هستند بررسی شود. از اهمیت PX اینکه، در مدت کمتر از یکساعت توانست تحرک در جا و پیشرونده اسپرمها را افزایش دهد ولی تاثیر سوء قابل توجه‌ای بر روی مرفولوژی اسپرم ایجاد ننماید. البته باید اذعان نمود که تاثیر PX بر روی مرفولوژی اسپرم نیاز به مطالعات متعدد و استفاده از میکروسکوپ الکترونی می باشد. همچنین باید تاثیر PX را بر روی نمونه‌های اسپرم طبیعی^۵ و با مرفولوژی غیر طبیعی^۶ مورد مطالعه دقیق قرار داد.

گروه Yovich در سال ۱۹۹۰ بیان نمودند که PX در افزایش تحرک اسپرمی در نمونه‌های آستنواسپرمی و همچنین الیگواسپرمی بسیار موفق می باشد. گر چه PX

4- Intracytoplasmic Sperm Injection

5- Normozoospermia

6- Teratozoospermia

1- Oligozoospermia

2- Asthenozoospermia

3- Teratozoospermia

نقشی را در افزایش تعداد اسپرم متحرک ایفا خواهد کرد (۸). بر خلاف نتایج گروه فوق، Tesarik از فرانسه نتوانست افزایش چشمگیری را در تحرک اسپرمهای انزالی نورمواسپرمی مشاهده کند (۱۲). ظاهراً PX تاثیر بیشتری بر روی نمونه های استنوازوسپرمی دارد. از دیگر خصوصیات PX باقی ماندن اثر آن بر روی اسپرم حتی بعد از شستشو و جداسازی آن از محیط کشت می باشد. پس از شستشوی PX از محیط، تحرک اسپرمها برای ۳ ساعت باقی میماند، که این امر میتواند اسپرمهای بدست آمده از طریق PESA را جهت نفوذ به تخمک در محیط آزمایشگاه (IVF) یاری دهد. در ضمن، وضعیت نمونه های TESE را تا زمان انجام ICSI در حد مطلوب نگه دارد. اخیراً Tasdemir و همکاران (۱۹۹۸) و Angelopoulos (۱۹۹۹) گزارش نمودند که انکوبه نمودن نمونه TESE با PX برای ۳۰ دقیقه میتواند در افزایش چشمگیر تحرک اسپرم نقش داشته باشد (۱۴ و ۱۷). آنها افزایش ۵۰٪ و ۷۰٪ در تحرک اسپرمهای TESE را به ترتیب بعد از ۳۰ و ۹۰ دقیقه با PX مشاهده نمودند. مطالعه ما نشان داد که نمونه های آروسپرمی معمولاً دچار نقص در تعداد و مرفولوژی اسپرم می باشند. در ضمن نمونه های TESE دارای تعداد زیادی سلولهای گرد بودند که می تواند گویای عفونت دستگاه تولید مثل باشد یک رابطه مستقیم بین افزایش تعداد سلول گرد با فعالیت باکتریهای بیماری زا گزارش شده است. بنابراین اختلال در پارامترهای اسپرمی به همراه وجود سلولهای گرد (نظیر نمونه های آروسپرمی مطالعه ما) ممکن است باعث کاهش و یا عدم تحرک اسپرم گردد (۱۵).

نتایج حاصله از این تحقیق مشخص نمود که PX در هر دو گروه موفق بوده است. نقش PX بخصوص در افزایش حرکت در جا اسپرم TESE حائز اهمیت است.

1- In vitro Fertilization

همچنین باید در نظر داشت که انکوبه نمودن نمونه با PX در نمونه های فاقد تحرک^۲ میتواند نقش یک تست حیاتی را بخوبی ایفا نماید. از آنجا که در روش ICSI فقط یک اسپرم زنده بداخل تخمک بالغ تزریق می گردد. (علامت حیات در موقع تزریق حرکت اسپرم می باشد). تشخیص یک اسپرم زنده از مرده در نمونه های فاقد تحرک اهمیت کلینیکی خاصی را دارد. Buch و همکاران اسپرمهای TESA منجمد - نوب شده را با PX مورد بررسی قرار داده و ۱۲۰ دقیقه بعد از اضافه نمودن PX به محیط، افزایش ۳۰٪ در تحرک پیشرونده اسپرم را به ثبت رساندند (۱۶).

بطور خلاصه افزودن PX به محیط حاوی اسپرم میتواند باعث افزایش تحرک اسپرم شود و بالعکس اثر سوء بر روی مرفولوژی اسپرم ایجاد ننماید. علاوه بر موارد فوق، PX در بهبودی واکنش آکروزومی نقش دارد و همچنین میتواند بعنوان یک تست حیاتی مناسب مورد استفاده قرار گیرد. در ضمن، Yovich و همکاران (۱۹۹۳) بیان نمودند که PX همچنین میتواند در از بین بردن رادیکالهای آزاد که معمولاً از اسپرمهای دژنره و نکروزه آزاد می شود نقش داشته باشد (۱۰). بنظر می رسد که PX بتواند این نقش را در نمونه های TESE که معمولاً از نظر کیفی از وضع نامطلوبی برخوردارند بخوبی ایفا نماید. موارد ذکر شده همگی می توانند در نتایج باروری و تشکیل جنین نقش داشته باشند. گر چه تاثیر PX بر روی باروری و تشکیل جنین آزمایشگاهی باید بدقت مورد مطالعه قرار گیرد. آنچه در حال حاضر مسلم است اینکه PX را میتوان بدون نگرانی در نمونه های غیر نرمال مورد استفاده قرار داد بشرط اینکه از محیط بطور کامل شستشو و جدا گردد. تا خطر احتمالی سمیت آن بر روی جنین در حال رشد گردد.

2- Total immotility

خانم کوشکی و کادر پرستاری و پذیرش مرکز
صمیمانه تشکر و قدردانی می شود.

تشکر و قدردانی

از کلیه پرسنل آزمایشگاه آندروولوژی مرکز ناباروری
یزد، خصوصاً خانمها فخرالزمان مقیمی و حبیبه قیصری

Reference:

1. Tournaye H, Devroey P, Liu J. Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection a new effective technique in absence of the vas deferens. *Fertil Steril*. 1994, 61:1045-51.
2. Mansour R, Aboulghar M, Serous G. Intracytoplasmic sperm injection using microsurgically retrieved epididymal and testicular sperm. *Fertil Steril*. 1996, 65:566-72.
3. Pryor J, Parsons J, Goswamy R. *In vitro* fertilization for men with obstructive azoospermia. *Lancet*. 1994, 2:762.
4. Silber SJ, Nagy PZ, Liu J. Conventional *in vitro* fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. *Hum Reprod*. 1994, 9:705-9.
5. Temple-Smith PD, Southwick GJ, Yates CA. Human pregnancy by *in vitro* fertilization using sperm aspirated from epididymis. *J in Vitro Fert ET*. 1985, 2:119-22.
6. Tournaye H, Liu J, Nagy PZ. Correlation between testicular histology and outcome after intracytoplasmic sperm injection using testicular spermatozoa. *Hum Reprod*. 1996, 11: 127-32.
7. Tasdemir I, Tasdemir M, Tavukcuoglu S. Effect of pentoxifylline on immotile testicular spermatozoa. *J Assist Reprod Genet*. 1998, 15:90-2.
8. Yovich JM, Edirisinghe WR, Cummins JM, et al. Influence of pentoxifylline in severe male factor infertility. *Fertil Steril*. 1990, 53: 75-22.
9. World Health Organization. WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple Cambridge Uni press. 1993.
10. Yovich JL. Pentoxifylline. actions and applications in assisted reproduction. *Hum Reprod*. 1993, 8:1786-91.
11. Ng FLH, Liu DY, Baker GH. Comparison of percoll, mini-percoll, and swim-up methods for sperm preparation from abnormal semen samples. *Hum Reprod*. 1993, 7:261-6.
12. Tesarick J, Thebault A, Testart J. Effect of pentoxifylline on sperm movement characteristics in normozoospermic and asthenozoospermic specimens. *Hum Reprod*. 1992, 7:1257-63.
13. Nckinney KA, Lewis M, Thompson S. Persistent effects of pentoxifylline on human sperm motility after drug removal in normozoospermic and asthenozoospermic individuals. *Andrologia*. 1994, 26:235-240.
14. Angelopoulos T, Adler A, Krey L, et al. Enhancement of initiation of testicular sperm motility by *in vitro* culture of testicular tissue. *Fertil Steril*. 1999, 71:240-3.
15. Khalili MA, Pourshafie MR, Saifi M, et al. Bacterial infection of urogenital of infertile men in Iran. *MEFS J* 2000.
16. Buch JP, Philips KA, Kolon T. Cropreservation of microsurgical extracted ductal sperm: Pentoxifylline enhancement of motility. *Fertil Steril*. 1994, 62:418-20.