大韓不妊學會誌: 第29卷 第2號 2002
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 29, No. 2, 2002, 6

심한 무력정자증 환자의 ICSI 시행시 Pentoxifylline을 사용한 정자처리법이 임상결과에 미치는 영향

차병원 여성의학연구소[1], 포천 중문의과대학[2]

손지온[1] · 신지수[1] · 정창진[1,2] · 조용선[1,2] · 엄기붕[1,2] · 최동희[1,2] · 김현주[1,2]

Effect of Pentoxifylline on the ICSI Program Undergone in Severe Asthenozoospermia

Jie Ohn Sohn[1], Ji Su Shin[1], Chang Jin Jeong[1,2], Yong Seon Cho[1,2], Ki Boong Oum[1,2], Dong Hee Choi[1,2], Hyun Joo Kim[1,2]

Infertility Medical Center, CHA General Hospital of Seoul[1] College of Medicine, Pochon CHA University[2]

Objective: The aim of this study was to evaluate the effect of pentoxifylline (PF) on the conventional ICSI program undergone in severe asthenozoospermia.

Method: Total 348 cycles of ICSI programs undertaken at CHA General Hospital from January, 1996 to September, 2000, were divided into two groups - injected with pentoxifylline-treated sperm (PFT, 204 cycles) or non-treated sperm (NPFT, 144 cycles) and the clinical results of PFT group were compared with those of NPFT.

Results: PF-treatment on sperm increased their motility of normozoospermia and severe asthenozoospermia. Fertilization rate of PFT group was higher than those of ICSI programs undertaken using sperm of NPFT (70.6% vs. 62.9%, $p<0.01$). And, ET and clinical pregnancy rates of PFT were slightly higher than those of NPFT (93.1%, 44.2% vs. 90.3%, 36.2%).

Conclusion: These results showed that treatment of pentoxifylline has a beneficial role on selection of viable sperm in severe asthenozoospermia.

Key Words: Pentoxifylline, Asthenozoospermia, ICSI

정자의 운동성은 시험관 아기 (IVF-ET) 시술과정에 중요한 영향을 미치는 요인으로 수정능력을 예측할 수 있는 척도중 한가지로 여겨져 많은 연구가 진행되었다.[15,21,25] 1992년 인간의 시험관 아기 시술에 도입된 난세포질내 정자 직접주입술 (ICSI; Intracytoplasmic Sperm Injection)[24]에서 이러한 정자의 운동성이 아주 낮거나 그 수가 아주 적더라도 수정이 가능한 것으로 보고되어 수정에는 별 영향을 주지 않는 것으로 보고된 바 있다.[22,23,29] 그러나 수술적인 방법으로 채취되거나 또는 극단적인 무력정자증 환자 (severe asthenozoospermia)에서 운동성이 없는 정자의 경우 생존성의 여부가 수정에 중대한 영향을 미치므로 운동성 증진을 통한 생존 정자의 구별이 이러한 환자군에서 수정률 향상에 필수적이다.

정자의 운동성을 향상시킬 수 있는 방법으로, 생물학적 물질로서는 혈청,[18] 난포액,[19] peritoneal fluid[28]

주관책임자: 손지온, 우) 135-081 서울특별시 강남구 역삼1동 650-9, 차병원 여성의학연구소
Tel: (02) 3468-3434, Fax: (02) 501-8704, e-mail: androwin@unitel.co.kr

등의 배양액내의 첨가가 효과적인 것으로 알려져 있으며, 화학적으로 정제된 물질로는 caffeine,[1,25] 2-deoxyadenosine,[2] creatine phosphate,[8] prostaglandins,[3] hyaluronic acid,[15] pentoxifylline[20,30,34] 등이 운동성 증진에 효율적인 것으로 알려져 있다. 이중 pentoxifylline은 methylxanthine의 유도체중 하나로서 남성 환자의 정자가 매우 좋지 않은 운동성을 가지고 있는 경우에 적용하여 체외수정을 실시한 결과 정자의 운동성의 향상과 더불어 좋은 결과를 얻을 수 있었다고 보고된 바 있다.[38] 또한 정자의 수정능 획득을 향상시키는 효과도 관찰되며,[33] 나아가서 reactive oxygen species의 영향을 감소시키는 효과도 있는 것으로 보고되고 있다.[11]

따라서 본 저자들은 pentoxifylline를 처리한 204례의 임상결과에 대해 분석해 봄으로써, pentoxifylline이 정자의 운동성과 ICSI결과에 미치는 영향을 찾아 보고자 본 연구를 시행하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

본 연구는 차병원 여성의학연구소에서 1996년 1월부터 2000년 9월까지 통상적인 체외수정방법으로는 수정이 불가능할 것으로 진단되어 ICSI를 시행한 4175례 중 운동성이 매우 떨어져서 ICSI를 시행하는데 있어서 어려움이 예상되었던 348례를 대상으로 시행하였다. ① 이전의 체외수정시도에서 1회 이상 수정에 실패했던 경우, ② 운동성 있는 정자의 수가 50만 이하이고, ③ 선천적으로 정관이 없거나, 또는 정관폐색 등으로 인하여 외과수술적 부정소 정자 흡인술 (MESA: microsurgical epididymal sperm aspiration),[4] 경피적 부정소 정자 흡인술 (PESA: pe epididymal sperm aspiration),[27] 정소 정자 추출술 (TESE: testicular sperm extraction)[6]의 수술적 방법으로 정자를 얻은 경우, ④ 항정자 항체가 높게 관찰되는 경우 및 또는 ⑤ Kruger의 기준[16]으로 판단해 볼 때 정자의 정상적인 형태가 4% 이하인 경우 중 운동성이 200배 배율의 현미경하에서 20개의 필드를 관찰하였을 때 살아 움직이는 정자가 2~3개 이하인 경우를 연구대상으로 하였다.

2. 연구방법

1) 난자의 회수

난자의 회수를 위한 과배란 유도는 FSH/hMG (Pergonal, Serono or Humegon, Organon)와 GnRH-a (Lupron, TAB/abott)를 병용하는 방법을 사용하였으며, hCG (Profasi, Serono or Pregnyl, Organon) 투여 후 36시간째에 질식 초음파를 이용하여 난자를 채취하였다. 회수된 난자는 즉시 실체현미경하에서 성숙도를 판정한 후 50 IU/ml의 hyaluronidase (Sigma Chemical Co, USA)와 내경이 130~150 μm인 유리피펫을 사용하여 난자의 cumulus와 corona cell을 제거한 후 ICSI 전까지 5% CO_2가 유지되는 37℃의 배양기에서 배양시켰다.

2) 정액채취 및 pentoxifylline처리

시험관 아기를 위한 정액은 수음을 통하여 채취하였으며, 사정된 정액 내에 정자가 없는 경우는 Fructose test와 생검을 통한 검사로 정관폐색이나 정자생성부전이 보이면 MESA, PESA, 또는 TESE를 시행하여 정자를 얻었다.

회수된 정액은 정자의 상태에 따라 swim-up 또는 Percoll gradient 원심분리법 (50%, 80% 2 layer)을 통하여 활동성 있는 정자만을 회수하여 ICSI에 사용하였으며, 상기의 방법을 적용하기 어려운 상태일 때는 정자세척 후 pellet에 pentoxifylline (Sigma Co. USA) 3.8 mmol을 가하고 일정시간 배양 후 ICSI에 사용하였다.

3) 정자의 운동성 확인

Pentoxifylline을 처리한 정자의 운동성의 확인은 Hamilton Thorn (Version 10.6 HTM-IVOS, USA)을 통하여 운동성을 측정하였다.

4) ICSI과정 및 ICSI 후 수정 확인

ICSI에 사용된 피펫 (Drummond Co. USA)의 크기는, holding pipette의 경우 외경은 80~100 μm, 내경은 10~15 μm로 조정하였으며, 정자주입용 피펫의 경우 외경은 7~8 μm, 내경은 5~6 μm로 하였다. ICSI 시에는 0.3%의 BSA가 첨가된 EBSS (Earle's Balanced Salt Solution, Gibco Co. USA) 배양액과 5% PVP (PVP-360, Sigma. USA) 배양액을 5 μm의 소적으로 만든 다음 Mineral oil (M-3516, Sigma)을 덮어서 사용하였다. ICSI 시 전배양된 난자는 EBSS 소적에 옮

기고, 정자는 또 다른 EBSS에 넣은 뒤 주입용 피펫으로 활동성 있는 정자를 골라서 PVP 소적으로 옮긴 다음 주입용 피펫으로 정자의 미부에 물리적으로 손상을 주어 활동성이 없게 한 후 난자에 주입하였다. 주입이 끝난 난자는 2~3회 신선한 배양액으로 세척한 후 배양하였다.

ICSI 후 16~18시간이 지난 다음 ICSI를 시행한 난자에 대해 전핵과 극체형성을 확인함으로써 수정 여부를 판단하였으며, 2일간 배양한 후 수정란 이식을 실시하였다.

결 과

본 연구에서는 pentoxifylline을 임상에 사용하기에 앞서서 pentoxifylline이 정자의 운동성에 미치는 영향을 살펴보고자 WHO기준에 의거하여 희소무력정자증 (oligo-asthenozoospermia)의 정자성상을 나타내는 10개의 정액에 대해 각각 pentoxifylline을 처리한 군과 처리하지 않은 군으로 나눠서 실험을 하였으며, 그 결과는 Table 1에 나타내었다. 정자의 운동성을 pentoxifylline을 처리한 경우와 pentoxifylline을 처리하지 않은 경우로 나누어 살펴볼 때, pentoxifylline을 처리한 후 1시간째 이후에 pentoxifylline을 처리하지 않은 군과 비교할 때에 운동성이 매우 증가되는 것을 볼 수 있었다 ($p<0.01$). 또한 시간이 지남에 따라 정자의 운동성이 감소되는 것을 볼 수 있는데 특히 24시간 후 pentoxifylline을 처리한 군에서 정자운동성의 급격한 감소가 관찰되었다.

본 논문의 연구대상인 348례의 결과를 pentoxifylline을 처리한 군과 처리하지 않은 두 군으로 나누어 Table 2에 나타내었다. 우선 348례의 총 결과를 보면 총 4069개의 난자가 회수되어 이 중 2899 (71.2%)개를 ICSI하였으며 손상받지 않은 난자 2714 (93.6%)개중 정상적으로 수정된 것은 1826 (67.3%)개였다. 총 348례중 320 (91.93%)례에서 수정란 이식이 가능하였고 그 중 131 (40.9%)례에서 임신이 성립되었다.

이 중 pentoxifylline을 처리한 군의 결과를 보면 총 204례에 있어서 정자를 pentoxifylline으로 처리하였다. 2318개의 난자가 회수되어 그 중 1702 (73.4%)개를 ICSI하였으며 1540 (90.5%)개가 ICSI 후 손상받지 않아서 1088 (70.6%)개가 정상적으로 수정되었다. 총 204례중 수정란 이식이 가능했던 경우는 190 (93.1%)례로 나타났으며 이 중 84 (44.2%)례에서 임신이 이루어졌다.

수정율에 있어서 pentoxifylline을 처리하지 않은 군과 처리한 군과 비교해 보았을 때 62.9%, 70.6%로 pentoxifylline으로 처리한 군에서 높았다 ($p<0.01$). 정상적으로 배아를 이식할 수 있었던 경우를 보면 pentoxifylline으로 처리하지 않은 군과 처리한 군에서 90.3%, 93.1%로 pentoxifylline을 처리한 군에서 다소간 높은 경향을 나타내었으며 임신율에 있어서도 pentoxifylline을 처리하지 않은 군과 처리한 군에

Table 1. Results of sperm motility after culturing with or without pentoxifylline (PF)

Incubation time (h)	0	1	2	4	24
PF-untreated	5.1±2.4	4.9±2.4	4.9±2.4	4.8±2.3	3.6±1.7
PF-treated		6.9±3.5*	7.3±3.6*	6.2±2.4*	3.5±1.8

*$p<0.01$

Table 2. Overall clinical ICSI results of treatment cycles with pentoxifylline

구 분	No. of case	No. of oocyte (%)						ET	Preg
		retrieved	ICSI	survived	2PN	1PN	3PN		
PF-untreated	144	1751	1197	1174 (98.1)	738 (62.9)	27	22	130 (90.3)	47 (36.2)
PF-treated	204	2318	1702	1540 (90.5)	1088 (70.6)	48	45	190 (93.1)	84 (44.2)
Total	348	4069	2899	2714 (93.6)	1826 (67.3)	75	67	320 (91.9)	131 (40.9)

*$p<0.01$

Table 3. ICSI results according semen characteristics

Sperm characteristics		No. of case	No. of oocyte						ET	Preg
			retrieved	ICSI	survived	2PN	1PN	3PN		
single factor*		62	797	586	541 (92.3)	372 (68.8)	15	19	61 (92.4)	29 (47.5)
double factor**		125	1292	960	859 (89.5)	616 (71.7)	26	25	113 (90.4)	49 (43.4)
triple factor***		17	229	156	140 (89.7)	100 (71.4)	3	1	16 (94.1)	6 (37.5)
Sperm frozen-thawed		3	20	12	12 (100)	11 (91.7)	-	-	3 (100)	2 (66.7)
PESA	fresh	4	48	42	36 (85.7)	21 (58.3)	1	1	4 (100)	1 (25.0)
	frozen-thawed	10	111	76	69 (90.8)	44 (63.8)	5	2	9 (90.0)	4 (44.4)
TESE		4	44	34	34 (100)	15 (44.1)	2	-	4 (100)	1 (25.0)

*oligozoospermia, asthenozoospermia, teratozoospermia, **oligo-astheno, oligo-terato, astheno-terato, ***oligo-astheno-terato

서 각각 36.2%, 44.2%로 나타나 pentoxifylline을 처리한 군에서 높은 경향을 나타내었다.

정자를 pentoxifylline으로 처리한 204례에 대해 정자성상에 따른 ICSI결과를 Table 3에 요약하였다. WHO기준에 의거하여 정자의 성상에 따른 ICSI결과를 보았을 때 정자의 성상이 정상인 경우는 204례 중 없었으며, 정자의 성상에 한가지 결함을 가지고 있었던 경우가 62례인 30.4%로 나타났으며 모두 무력정자증을 보였다. 두 가지 결함을 가지고 있었던 경우가 125례인 61.2%, 그리고 세 가지 결함을 가지고 있었던 경우가 17례인 8.3%를 보였다. 또한 각각의 경우에 있어서 수정율은 정자가 한 가지 결함을 가지고 있는 경우에서는 68.8%, 두 가지 결함을 가지고 있는 경우에는 71.7%, 그리고 세 가지 결함을 가지고 있는 경우의 수정율은 71.4%로 나타났으며 이 경우 정자의 결함수에 따른 수정율의 변화는 정자가 세 가지 결함을 가지고 있는 경우가 다소간 높게 나타났으나 유의차는 보이지 않았다.

외과적 수술방법으로 정자를 얻어서 ICSI를 시행한 경우는 pentoxifylline을 처리한 204례중 17례인 8.3%를 점하였으며, 이 중 9례 52.9%가 경피적 부정소 정자 추출술에서 얻어진 정자를 동결-해동 후 ICSI에 사용한 경우였다. 그리고 정자의 동결-해동하여 ICSI에 사용한 경우도 3례, 1.4%를 보였다.

고 찰

정자가 운동성이 거의 없는 경우에 pentoxifylline을 처리하여 ICSI를 시행한 결과, 정자의 운동성의 향상과 아울러서 ICSI 후 좋은 결과를 얻게 되었다. Pentoxifylline은 정자의 운동성이 정상이거나 또는 무력정자증을 가지고 있는 환자 모두에서 운동성의 향상을 가져왔으며,[26] 또한 정자의 성상이 정상이거나 또는 희소정자증 (oligozoospermia)을 가지고 있는 환자 모두에서 수정율의 증가를 가져왔다.[39] 본 연구의 결과에서도 무력정자증을 가지고 있는 환자와 무력정자증 및 희소정자증 두 가지 모두를 가지고 있는 환자의 정자에 pentoxifylline을 처리한 결과 수정율과 임신율에서 좋은 결과를 보였다.

최근에 들어서 정상적인 사정방법으로 정자를 얻을 수 없는 환자들에게 외과수술적 방법으로 정자를 얻는 방법들이 사용되는데 이러한 방법들로는 외과수술적 부정소 정자 흡인술, 경피적 부정소 정자 흡인술, 정소 정자 추출술 등의 방법들이 있다. 이러한 방법들을 통하여 얻어진 정자는 운동성이 정상적인 경우도 있지만 대부분의 경우 운동성이 매우 떨어지며 운동성을 향상시키기 위해서 공배양 등의 방법들을 사용하여 정자의 운동성을 향상시켜서 ICSI에 사용하고 있다. 하지만 공배양 등의 방법은 시간이

많이 소요되고 공배양시 사용되는 세포들을 미리 배양해야 하는 번거로움과 비용도 문제가 된다. 그래서 짧은 시간에 운동성의 극대화를 유도하기 위해 pentoxifylline을 사용하였다. 본 연구의 결과에서도 pentoxifylline을 처리한 204례중 18 (8.8%)례가 외과적 수술방법을 통하여 정자를 얻은 경우였으며 이중 10 (55.6%)례가 동결-해동 후 ICSI를 시행한 경우였다. 또한 일반정자를 동결-해동 후 ICSI를 시행한 경우도 3례가 있었다. 동결-해동 후 정자의 운동성은 여러 가지 요인으로 인하여 동결전 보다 운동성이 떨어진다.[9,13] 다시 말하자면 외과수술적으로 정자를 얻거나 또는 정자의 동결-해동에 있어서 pentoxifylline를 사용하는 것이 정자의 운동성 향상에 좋은 영향을 줄 것이라 사료된다.

Mbizbo 등은 1993년에 정자에 pentoxifylline을 처리하였을 때 처리한 후 2시간째에 정자의 운동성이 매우 증가된 것을 관찰할 수 있었다고 보고하였으며, Lewis 등도 이와 유사한 보고를 한 바 있다.[17] 이와는 대조적으로 정자가 정상적인 성상을 가지고 있거나 또는 무력정자증을 가지고 있는 두 가지 모두의 경우에 있어서 pentoxifylline을 처리한 결과 처리한 후 10분 정도에 매우 높은 운동성을 관찰할 수 있었다는 보고도 있다.[33] 본 연구에서는 정자를 pentoxifylline으로 처리한 결과 처리 후 1시간째에 운동성이 처리전보다 증가된 것을 관찰할 수 있었다. 그래서 정자의 운동성이 매우 떨어져 pentoxifylline을 처리해야 하는 경우에는 pentoxifylline처리 후 1시간 이후에 ICSI를 시행하고 있다.

정자의 운동성을 증가시키는 pentoxifylline의 작용기전으로는 pentoxifylline이 methylxanthine group의 phosphodiesterase inhibitor로서 nucleotide의 분해를 방해함으로써 세포 내에 cyclic nucleotides, cyclic adenosine monophosphate (cAMP), cyclic guanosine monophosphate (cGMP)의 농도를 증가시키기 때문이다.[35] cAMP는 ATP로부터 합성되는데 이때 adenylate cyclase에 의하여 두 개의 phosphate가 떨어져 나가고 phosphodiester bond를 형성하며 cAMP가 만들어 지게 된다. 위의 기전으로 합성된 cAMP는 다시금 phosphodiesterase에 의하여 5'-AMP로 만들어진다.[7]

정자의 성숙과정 중에서 부정소에서의 정자의 운동성의 획득과정에서 뿐만 아니라 여러 가지 실험조건하에서 cAMP가 정자의 운동성에 좋은 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다.[5,12,30,32] 정자의 과활성운동성 (hyperactivated motility)은 flagellum의 높은 진폭의 움직임으로 정의되는데 이는 세포 내부의 cAMP의 농도에 의존하는 것으로 보고되고 있다.[37] cAMP는 세포내의 중요한 이차 전달자로 정자의 운동성을 조절하는데 있어서 중요한 역할을 하며 이러한 운동성의 조절은 cAMP-dependent 단백질 분해제의 활성화를 통하여 이루어 진다.[10,14,31] cAMP-dependent 단백질 분해제의 활성화는 막단백질의 phosphorylation에 영향을 주어 막의 이온 투과성과 유동성을 변화시켜서 결국 정자의 운동성에 영향을 주게 된다.[36]

이상의 결과를 종합해 보면 정자의 운동성이 현저히 떨어지는 경우 ICSI를 시행하는데 있어서 정자를 찾는데 많은 시간을 소모하게 되고 그로 인하여 난자를 장시간 외부에 노출시키는 결과를 가져오게 된다. 이러한 경우에 pentoxifylline을 사용함으로써 정자의 운동성을 향상시킬 수 있어서 ICSI를 원활히 수행할 수 있고 이로 인하여 ICSI 이후 수정률과 배아 발생률, 임신률을 증진시키는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Aitken RJ, Best F, Richardson DW, Schats R, Simm G. Influence of caffeine on movement characteristics, fertilizing capacity and ability to penetrate cervical mucus of human spermatozoa. J Reprod Fertil 1983; 67: 19-27.
2. Aitken RJ, Mattei A, Irvine S. Paradoxical stimulation of human sperm motility by 2-deoxyadenosine. J Reprod Fertil 1986; 78: 515-27.
3. Aitken RJ, Kelly RW. Analysis of the direct effects of prostaglandins on human sperm function. J Reprod Fertil 1985; 73: 139-46.
4. Asch RH, Silber SJ. Microsurgical epididymal sperm aspiration and assisted reproductive techniques. Ann N Y Acad Sci 1991; 626: 101-10.
5. Cascieri M, Amann RP, Hammerstedt RH. Adenine nucleotide changes at initiation of bull sperm moti-

lity. T Biol Chem 1976; 251: 787.

6. Craft I, Bennett V, Nicholson N. Fertilizing ability of testicular spermatozoa. Lancet 1993; 2: 342: 864.
7. Dohlman HG, Thorner J, Carson MG, Lefkowitz RJ. Model system for the study of seven-transmembrane segment receptors. Ann Rev Biochem 1991; 60: 653-88.
8. Fakih H, MacLusky N, Decherney A, Walliman T, Huszar G. Enhancement of human sperm motility and velocity in vitro: effects of calcium and creatine phosphate. Fertil Steril 1986; 46: 938-44.
9. Fink K, Zech H. Effect of incubation time in deep freezing human sperm. Wien Klin Wochenschr 1991; 103: 707-9.
10. Garbers DL, Kopf GS. The regulation of spermatozoa by calcium cyclic nucleotides. Adv Cyclic Nucleotide Res 1980; 13: 251-306.
11. Gavella M, Lipovac V. Pentoxifylline-mediated reduction of superoxide anion production by human spermatozoa. Andrologia 1992; 24: 37-9.
12. Goltz JS, Gardner TK, Kanous KS, Lindemann CB. The interaction of pH and cAMP on activation of motility in Triton X-100 extracted bull sperm. Biol Reprod 1988; 39: 1129.
13. Grizard G, Lombard-Vignon N, Boucher D. Changes in carnitine and acetylcarnitine in human semen during cryopreservation. Hum Reprod 1992; 7: 1245-8.
14. Hoskins DD, Casillas ER. The function of cyclic nucleotides in mammalian spermatozoa. In Astwood EB, Greep RO. (eds) Handbook of Physiology Section 7 1975; Vol. 5. Williams, Wilkins, Baltimore, MD.
15. Huszar G, Willets M, Corrales M. Hyaluronic acid (sperm selet) improves retention of sperm motility and velocity in normospermic and oligospermic specimens. Fertil Steril 1990; 54: 1127-34.
16. Kruger TF, Swanson RJ, Hamilton M, Simmons KF, Acosta AA, Matta JF, Oehniger S, Morshedi M. Abnormal sperm morphology and other semen parameters related to the outcome of the hamster oocyte human sperm penetration assay. Int J Androl 1988; 11: 107-13.
17. Lewis SE, Mooban JM, Thompson W. Effects of pentoxifylline on human sperm motility in normospermic individuals using computer-assisted analysis. Fertil Steril 1993; 59: 418-23.
18. Makler A, Fisher M, Murillo O, Laufer N, Decherney A, Naftolin F. Factors affecting sperm motility. IX. survival of spermatozoa in various biological media and under different gaseous compositions. Fertil Steril 1984; 41: 428-32.
19. Mendoza C, Tesarik J. Effect of follicular fluid on sperm movement characteristics. Fertil Steril 1990; 54: 1135-9.
20. Moohan JM, Winston RML, Lindsay KS. Variability of human sperm response to immediate and prolonged exposure to pentoxifylline. Hum Reprod 1993; 8: 1696-700.
21. Moohan JM, Winston RML, Lindsay KS. The variable effects of 2-deoxyadenosine on hum sperm motility and hyperactivation in vitro. Hum Reprod 1995; 10: 1098-103.
22. Nagy ZP, Liu J, Joris H, Verheyen G, Tournaye H, Camus M, Derde MC, Devroey P, Van Steirteghem AC. The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. Hum Reprod 1995; 10: 1123-9.
23. Nijs M, Vanderzwalmen P, Vandamme B, Segal-Bertin G, Lejeune B, Segal L, van Roosendaal E, Schoysman R. Fertilizing ability of immotile spermatozoa after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1996; 11: 2180-5.
24. Palermo G, Joris H, Devroey P, Steirtegem AV. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet 1992; 340: 17-8.
25. Schoenfeld CY, Amelar RD, Dubin L. Stimulation of ejaculated human spermatozoa by caffeine. Fertil Steril 1975; 26: 158-236.
26. Shen MR, Chiang PH, Yang RC. Pentoxifylline stimulates human sperm motility both in vitro and

after oral therapy. Br J Clin Phannacol 1991; 31: 711-4.

27. Shrivastav P, Nadkarni P, Wensvoort S, Craft I. Percutaneous epididymal sperm aspiration for obstructive azoospermia. Hum Reprod 1994; 9: 2058-61.
28. Soldati G, Piffaretti-Yanez A, Campana A, Marchini M, Luerti M, Balerna M. Effect of peritoneal fluid on sperm motility and velocity distribution using objective measurements. Fertil Steril 1989; 52: 113-9.
29. Steirteghem AV, Nagy Z, Joris H, Lui J, Staessen C, Smitz J, Wisanto A, Devroey P. High fertilization and implantation rates after incytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1993; 8: 1061-6.
30. Storey BT. Energy metabolism of spermatozoa. IV. Effect of calcium on respiration of mature epididymal sperm of the rabbit. Biol Reprod 1975; 12: 1.
31. Tash JS, Means AR. Cyclic adenosine 3',5'monophosphate, calcium and protein phosphorylation in flagellar motility. Biol Reprod 1983; 28: 75-104.
32. Tash JS, Means AR. cAMP-dependent regulatory processes in the acquisition and control of sperm flagellar movement, in Meiotic inhibition: Molecular control of Meiosis, Halsetine, F. P. and First, N. L., Eds., Alan R. Liss. New York, 1988; 335.
33. Tesarik J, Thebault A, Testart J. Effect of pentoxifylline on sperm movement characteristics in nonnozoospennic and asthenozoospennic specimens. Hum Reprod 1992; 7: 1257-63.
34. Tournaye H, Janssens R, Devroey P, Van Steirteghem A. The influence of pentoxifylline on motility and viability of spermatozoa from normozoospemic semen samples. J Androl 1994a; 17: 1-8.
35. Ward A, Clissold SP. Pentoxifylline: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficiency. Drugs 1987; 34: 50-60.
36. Yanagimachi R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. Zygote 1994; 2: 371-2. Review.
37. Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In Knobil, E.,. NeilL, J.E., Ewing, L.L. et al., (eds), The Physiology of reproduction, Vol. 1- Raven Press, New York, 1988; 135-85.
38. Yovich JM, Edirisinghe WR, Cumniins JM, Yovich JL. Influence of pentoxifylline in severe male factor infertility. Fertil Steril 1990; 53: 715-22.
39. Yovich JM, Edirsinghe WR, Cummins JM, Yovich JL. Preliminary results using pentoxifylline in a pronuclear stage tubal transfer (PROST) program for severe male factor infertility. Fertil Steril 1988; 50: 179-81.