

بررسی اثر فاکتور مهار کننده لوسمی در غلظت های متفاوت بر حرکت و بقای اسپرمهای مردان نابارور مبتلا به آستنواسپرمی

© قاسم ساکی Ph.D.*، فخرالسادات سجادیان M.Sc.*، سید رشید الدین کلانتر مهدوی M.Sc.*، علیقلی سبحانی Ph.D.**

* گروه علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
** گروه علوم تشریحی دانشگاه علوم پزشکی تهران و مرکز تحقیقات بهداشت باروری ولیعصر

تاریخ وصول: دیماه ۸۴، تاریخ پذیرش: اسفندماه ۸۴

چکیده

هدف: بررسی اثر غلظتهای متفاوت فاکتور مهارکننده لوسمی انسانی بر حرکت و بقای اسپرمهای کم تحرک افراد نابارور مبتلا به آستنواسپرمی

مواد و روشها: در این تحقیق که به روش تجربی انجام شده ۱۵ مرد نابارور مبتلا به آستنواسپرمی که بر اساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی شناخته شده اند جمع آوری شد. اسپرمهای این افراد پس از آماده سازی در قطرات محیط کشت Ham's F10+FCS%10 بدون فاکتور مهار کننده لوسمی و با غلظتهای ۳، ۵، ۱۰ و ۵۰ نانوگرم در میلی لیتر گذاشته شدند. حرکت اسپرمها طی زمانهای ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از کشت ارزیابی و همچنین بقای اسپرمها بر اساس آزمون HOS ارزیابی شدند. اطلاعات حاصل با استفاده از آزمون ANOVA توسط نرم افزار SPSS آنالیز شدند.

یافتهها: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که فاکتور مهار کننده لوسمی در غلظتهای متفاوت در مدت ۶ ساعت کشت بر حرکت رو به جلو اسپرمها و بقای آنها تاثیر معنی داری ندارد اما پس از ۲۴ ساعت مشاهده شد که در محیط کشت با غلظت ۱۰ ng/ml فاکتور مهار کننده لوسمی حرکت و بقای اسپرمها را به طور معنی داری بهبود می دهد ($P < 0.05$).

تحرک رو به جلو و قابلیت حیات اسپرمها نیز در مدت ۴۸ ساعت در غلظت ۵۰ ng/ml به طور معنی داری بهبود می یابد ($P < 0.05$).

نتیجه گیری: فاکتور مهار کننده لوسمی می تواند با غلظتهای معین و طی مدت زمان کشت معین حرکت و بقای اسپرمهای کم تحرک مردان نابارور مبتلا به آستنواسپرمی را بهبود بخشد.

کلیدواژهها: فاکتور مهار کننده لوسمی، حرکت اسپرم، بقای، اسپرم، آستنواسپرمی

مقدمه

این در حالی است که نیمی از موارد، مردان به نحوی عامل ناباروری هستند. از علل مردانه مربوط به ناباروری می توان به کاهش تعداد، مورفولوژی غیر طبیعی اسپرم و قدرت حرکتی ضعیف اسپرم اشاره کرد. در حال حاضر امکان بهبود کیفیت اسپرم از نظر تعداد و مورفولوژی در محیط آزمایشگاه امکان پذیر نیست؛ در صورتی که امکان بهبود کیفیت تحرک

امروزه بیش از ۶۰ میلیون نفر از مردم جهان در برهه ای از زندگی مشترک خود با مشکلات ناباروری مواجه هستند و

© آدرس مکاتبه: اهواز، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، گروه علوم تشریح

E-mail: gourabi@royaninstitute.org

حفره را روی آن گذاشته تا این دو سطح روی هم قرار گیرند سپس به حفره شمارش اسپرمها در زیر میکروسکوپ منتقل شد. اولین کاری که انجام شد شمارش کل اسپرمها و بعد شمارش اسپرمهای متحرک با درجه a و b است.

سپس در صد اسپرمهای متحرک (حرکت رو به جلو) به دست آمد. این مرحله به منظور مشخص شدن نمونه‌های آستنو اسپرمی است که در این تحقیق نمونه‌هایی مطالعه شدند که در صد تحرک اسپرمها بیش از ۳۰ در صد و کمتر از ۵۰ در صد کل اسپرمها را به خود اختصاص داده اند یعنی آستنواسپرمی خفیف.

آماده سازی نمونه‌ها

در این مطالعه به منظور آماده سازی نمونه‌ها از غلظتهای غیر متوالی محلول Pure sperm استفاده شد. روش کار به این صورت بود که ابتدا ۲ میلی لیتر از محلول Pure sperm هشتاد در صد در لوله یکبار مصرف ۱۲ میلی لیتری ریخته شد. سپس به همان میزان از محلول Pure sperm چهل در صد به آن اضافه شد و پس از آن آن ۱/۵ تا ۲ میلی لیتر از مایع منی به آرامی روی محلول اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه با ۳۵۰g سانتریفیوژ شد. بعد از سانتریفیوژ، رسوب حاصل از ته لوله برداشته و بعد ۲ میلی لیتر از محیط کشت به آن اضافه شد. سپس به مدت ۵ دقیقه و با ۲۰۰g سانتریفیوژ شده قسمت بالای لوله برداشته و حدود نیم میلی لیتر محیط کشت به رسوب اسپرمها اضافه شد. محلول حاصل به مدت یک ساعت در انکوباتور و تحت شرایط 37°C و CO_2 ۵ درصد نگهداری شدند.

قطره گذاری

بعد از آماده سازی محیط کشت و صاف کردن آن حدود ۱۰-۱۲ ساعت قبل از جمع آوری نمونه در سه ظرف کشت و در هر کدام در سه ردیف قطره‌هایی از محیط کشت قرار داده شد. بدین ترتیب که در ردیف اول یک قطره و در ردیف دوم دو قطره و در ردیف سوم دو قطره از محیط کشت

اسپرم با استفاده از داروهای افزایشده تحرک ممکن است. تا به حال تلاشهای زیادی در جهت بهبود حرکت اسپرم در محیط کشت انجام شده است که از جمله می‌توان به استفاده از فاکتور فعال کننده پلاکت [۲۱]، پروژسترون [۳] مایع فولیکولی [۴ و ۵] و پنتوکسی فیلین [۶ و ۷] اشاره کرد. این مواد در محیط کشت توانستند حرکت اسپرمها را بهبود بخشند. فاکتور مهار کننده لوسمی یک سیتوکین از خانواده اینترلوکین-۶ و با وزن مولکولی ۳۸-۶۷ کیلو دالتون است و بر انواع مختلف سلولها فعالیت دارد [۸]. گیرنده این فاکتور بر سطح سلولهای عصبی، مگاریوسیتها، میوبلاستها، استئوبلاستها، ماکروفاژها، سلولهای توده‌ای داخلی و سلولهای اندومتر رحم [۹ و ۱۰ و ۱۱] مشاهده شدند. اخیراً در مورد اثر فاکتور مهار کننده لوسمی بر تحرک اسپرمهای طبیعی مطالعاتی انجام شده و در این مطالعات مشخص شده است که این فاکتور باعث بهبود حرکت و افزایش بقای اسپرمهای طبیعی می‌شود [۱۲]. حال با توجه به اینکه هیچ گزارشی در مورد اثر فاکتور مهار کننده لوسمی بر اسپرمهای کم تحرک افراد نابارور مبتلا به آستنواسپرمی داده نشده است در این مطالعه اثر غلظتهای متفاوت ۰، ۳، ۵، ۱۰ و ۵۰ نانوگرم در میلی لیتر این فاکتور و در مدت زمانهای ۶، ۲۴، ۴۸ ساعت بر حرکت رو به جلو اسپرمها و قابلیت حیات اسپرمها بررسی می‌شود.

مواد و روشها

نمونه منی ۱۵ نابارور مبتلا به آستنواسپرمی که به بخش نازایی بیمارستان امام خمینی (ره) اهواز مراجعه کرده اند جمع آوری شد. لازم به ذکر است که نمونه افرادی مورد مطالعه قرار گرفت که از قبل رضایت آنها دریافت شده بود.

به منظور مایع شدن کامل نمونه‌ها (Liquefaction) ابتدا به مدت ۳۰-۴۵ دقیقه آنها را در انکوباتور با دمای 37°C درجه ساتی گراد گذاشته و بعد با استفاده از نوک پی پت قطره ای از مایع منی برداشته و روی بخش تحتانی حفره شمارش اسپرم (Mackler chamber) قرار داده شد سپس بخش فوقانی

اسپرما و همچنین بقای آنها پس از کشت در غلظتهای متفاوت فاکتور مهار کننده لوسمی آمده است.

الف) بررسی حرکت رو به جلو و بقای اسپرما پس از ۶ ساعت کشت در محیط کشت حاوی ۰ تا ۵۰ نانوگرم در میلی لیتر فاکتور مهار کننده لوسمی

در صد تحرک رو به جلو اسپرم در محیط کشت کنترل، ۳، ۵، ۱۰ و ۵۰ ng/ml به ترتیب برابر با $10/62 \pm 50/47$ ، $9/94 \pm 47/87$ ، $10/94 \pm 47/07$ و $51/40 \pm 10/54$ بود. آنالیز آماری انجام شده نشان می‌دهد که در غلظتهای فوق تحرک رو به جلو اسپرم هیچ گونه تغییر معنی داری نمی‌کنند ($P > 0.05$).

در صد بقای اسپرما در محیط کشت کنترل، ۳، ۵، ۱۰ و ۵۰ ng/ml به ترتیب برابر با $88/53 \pm 5/86$ ، $87/20 \pm 4/58$ ، $86/60 \pm 5/87$ و $86/40 \pm 6/04$ می‌باشد. آنالیز آماری انجام شده نشان می‌دهد که در غلظتهای فوق میزان بقای اسپرم هیچ گونه تغییر معنی داری نمی‌کند ($P > 0.05$).

ب) بررسی حرکت رو به جلو و بقای اسپرما پس از ۲۴ ساعت کشت در محیطهای کشت حاوی ۰ تا ۵۰ نانوگرم در میلی لیتر فاکتور مهار کننده لوسمی

در صد تحرک رو به جلو اسپرم در محیط کشت کنترل، ۳، ۵، ۱۰ و ۵۰ ng/ml به ترتیب برابر با $31/33 \pm 8/07$ ، $29/20 \pm 7/47$ ، $30/87 \pm 7/30$ و $32/20 \pm 8/62$ بود. آنالیز آماری انجام شده نشان می‌دهد که در محیط کشت حاوی، 10 ng/ml تحرک رو به جلو بهبود می‌یابد ($P < 0.05$).

در صد بقای اسپرما در محیط کشت کنترل، ۳، ۵، ۱۰ و ۵۰ ng/ml به ترتیب برابر با $55/20 \pm 7/67$ ، $54/40 \pm 6/01$ ، $70/33 \pm 7/13$ ، $55/53 \pm 7/63$ ، $53/87 \pm 8/47$ بود. آنالیز آماری انجام شده نشان می‌دهد که در محیط کشت حاوی 10 ng/ml فاکتور مهار کننده لوسمی بقای اسپرما به‌طور معنی داری نسبت به سایر گروهها بهبود می‌یابد ($P < 0.05$).

گذاشته شد. قطره اول فاقد فاکتور مهار کننده لوسمی و چهار قطره دیگر به ترتیب دارای ۳، ۵، ۱۰، ۵۰ نانوگرم در میلی لیتر فاکتور مهار کننده لوسمی بود. بعد به منظور جلوگیری از تبخیر و اسیدیته و جلوگیری از نفوذ میکروارگانیسمها به قطرات، آنها توسط روغن معدنی (mineral oil) پوشیده شدند. روز بعد با سمپلر مقداری از نمونه که قبلا آماده شده بود به هر کدام از قطرات محیط کشت اضافه شد و ظرفها در انکوباتور تحت شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد کشت داده شدند. مطالعه نمونه‌ها طی ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از کشت انجام شد. بدین ترتیب که پس از زمانهای فوق ابتدا با استفاده از حفره شمارش اسپرم، اسپرماهای متحرک شمارش و به صورت در صد در جدول ثبت اطلاعاتی نوشته شدند. روش مورد استفاده در تعیین قابلیت حیات اسپرم به روش آزمون HOS بود [۱۳ و ۱۴]. در این روش ابتدا سرم فیزیولوژی ۰/۹ در صد با حجم مساوی آب مقطر مخلوط شد. سپس نمونه آماده شده و مایع هیپوسمولار تهیه شده رابه نسبت یک به دو مخلوط و پس از نیم ساعت اسپرما در زیر میکروسکوپ بررسی شدند و تغییرات ایجاد شده با الگوهای مختلف به عنوان HOS مثبت ثبت و به صورت در صد نوشته شدند.

روش آماری

یافته‌های پژوهشی یعنی در صد تحرک و بقای اسپرم در محیط کشت با و بدون فاکتور مهار کننده لوسمی و طی مدت زمانهای کشت متفاوت پس از جمع‌آوری با استفاده از برنامه آماری SPSS ارزیابی شدند. میانگین در صد تحرک و بقای اسپرما در گروههای مورد مطالعه با استفاده از روش ANOVA حاصل گردید. P کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌های آماری

میانگین سن افراد مورد مطالعه $28 \pm 6/8$ است. در جدول شماره یک کلیه اطلاعات لازم مربوط به تحرک رو به جلو

جدول ۱. میانگین در صد حرکت رو به جلو و در صد بقای اسپرمهای انسانی کشت داده شده در محیطهای کشت با غلظتهای متفاوت فاکتور مهار کننده لوسمی

پس از ۴۸ ساعت کشت		پس از ۲۴ ساعت کشت		پس از ۶ ساعت کشت		گروههای درمان
بقا	حرکت پیشرونده	بقا	حرکت پیشرونده	بقا	حرکت پیشرونده	
۲۳/۴۷±۴/۶۸	۱۵/۰۷±۵/۳۷	۵۵/۲۰±۷/۶۷	۳۱/۳۳±۸/۰۷	۸۸/۵۳±۵/۸۶	۵۰/۴۷±۱۰/۶۲	کنترل(بدون LIF)
۲۳/۷۳±۳/۸۰	۱۶±۶/۱۳	۵۳/۸۷±۸/۴۷	۳۰/۸۷±۷/۴۱	۸۷/۲۰±۴/۵۸	۴۷/۰۷±۱۰/۹۴	۳ ng/ml LIF
۲۵/۸۰±۶/۵۰	۱۶/۳۳±۴/۰۱	۵۵/۵۳±۷/۶۳	۲۹/۲۰±۷/۴۷	۸۶/۴۰±۶/۰۴	۴۷/۸۷±۹/۹۴	۵ng/ml LIF
۲۶/۴۷±۴/۸۳	۱۵± ۵/۶۸	*۷۰/۳۳±۷/۱۳	*۳۵/۷۳±۶/۶۱	۸۶/۶۰±۵/۸۷	۵۱/۴۰±۱۰/۵۴	۱۰ ng/ml LIF
**۴۱/۳۳±۶/۳۵	*۲۲/۲۰± ۶/۸۹	۵۴/۴۰ ±۶/۰۱	۳۲/۲۰±۸/۶	۸۷/۲۰±۵/۳۴	۵۲/۴۰±۱۰/۱۳	۵۰ng/ml LIF

*: معنی دار بودن حرکت رو به جلو و بقای اسپرمها در این محیط کشت نسبت به سایر محیطها

** : معنی دار بودن حرکت رو به جلو بقای اسپرم در این محیط کشت نسبت به سایر محیطها

غلظتهای مختلف ۳ تا ۵۰ نانوگرم در میلی لیتر فاکتور مهار کننده لوسمی به مدت ۶ ساعت هیچ گونه تغییر معنا داری در حرکت رو به جلو و بقای اسپرمها مشاهده نمی شود که این یافته با مطالعه اخیر آتار (Attar) در مورد اثر فاکتور مهار کننده لوسمی بر حرکت و بقای اسپرمهای طبیعی انسانی همخوانی دارد [۱۲]. مطالعات نشان داده است که با هم کشتی سلولهای اپی تلیالی لوله فالوپ و اسپرمها میزان تحرک و بقای اسپرمها افزایش می یابد. اما این اثر در مدت زمان کمتر از ۵ ساعت مشاهده نمی شود [۱۵ و ۱۶] و این نتیجه تقریباً مشابه همان نتیجه ای است که از این مطالعه گرفته شده است.

حقیقت این است که اطلاعات در مورد اثر ترشحات لوله رحم انسان بر عمل اسپرم خیلی محدود و در بعضی موارد متناقض است. اما بعضی مطالعات انجام شده نشان داده است که باهم کشتی اسپرمها با لوله اپی تلیالی لوله رحم یا با کشت اسپرمها در محیط کشت مخصوص (Conditional Medium) حرکت و بقای اسپرمها بهبود می یابد. در مورد مکانیسم اثر مایع لوله رحمی دو تئوری مطرح است که اولین آن بیان می دارد که مایع لوله رحمی اثر تغذیه ای دارد و همچنین تمام ضروریات اولیه برای بقای گامتها و تکامل جنینها را فراهم

چ) بررسی حرکت رو به جلو و بقای اسپرمها پس از ۴۸ ساعت کشت در محیط کشت حاوی ۰ تا ۵۰ نانوگرم در میلی لیتر فاکتور مهار کننده لوسمی

در صد تحرک رو به جلو اسپرم در محیط کشت کنترل، ۳، ۵، ۱۰ و ۵۰ ng/ml به ترتیب برابر با ۳۷/۰۷±۵/۱۵، ۱۶±۶/۱۳، ۱۶/۳۳±۴/۰۱، ۱۵± ۵/۶۸، ۲۲/۲۰±۶/۸۹. آنالیز آماری انجام شده نشان می دهد که در محیط کشت حاوی ۵۰ ng/ml فاکتور مهار کننده لوسمی بقای اسپرمها به طور معنی داری نسبت به سایر گروهها بهبود می یابد (P< 0.05).

در صد بقای اسپرمها در محیط کشت کنترل، ۳، ۵، ۱۰ و ۵۰ ng/ml به ترتیب برابر با ۲۳/۷۳±۳/۲۳، ۲۳/۸۰/۴۷±۴/۶۸، ۲۳/۷۳±۳/۲۳، ۲۵/۸۰±۶/۵۰، ۲۶/۴۷±۴/۸۳، ۴۱/۳۳±۶/۳۵ بود. آنالیز آماری انجام شده نشان می دهد که در محیط کشت حاوی ۵۰ ng/ml فاکتور مهار کننده لوسمی بقای اسپرمها به طور معنی داری نسبت به سایر گروهها بهبود می یابد (P< 0.05).

بحث

در این مطالعه مشخص شد که با کشت اسپرمهای کم تحرک مردان نابارور مبتلا به آستنواسپرمی در محیط کشت حاوی

بوده است [۱۲]. مطالعه حاضر نشان می‌دهد که حرکت رو به جلوی اسپرم کم تحرک در محیط کشت حاوی ۱۰ نانو گرم بهبود می‌یابد. تفاوت موجود بین دو مطالعه انجام شده احتمالاً به دلیل تفاوت در روش ارزیابی تحرک اسپرمها باشد چرا که در مطالعه آتار (Attar) [۱۲] از دستگاه Sperm Quality Analyzer استفاده شد؛ حال آنکه در مطالعه حاضر از روش مطالعه چشمی استفاده شد همچنین نوع اسپرمهای مورد مطالعه در مطالعه آتار (Attar) اسپرمها طبیعی بوده در صورتی که در مطالعه حاضر اسپرمهای با تحرک کم مطالعه شدند. با کشت اسپرمها به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت حاوی غلظتهای مختلف فاکتور مهار کننده لوسمی مشاهده شد که در محیطهای کشت دارای غلظتهای ۵۰ نانو گرم هم حرکت رو به جلو و هم بقای اسپرمها زیاد می‌شود. بیشترین میزان اسپرمهای زنده به دست آمده در محیط کشت حاوی ۵۰ نانو گرم به دست آمد. حال آنکه آتار (Attar) در مطالعه خود ثابت کرد که در غلظت ۱۰ نانوگرم بیشترین میزان اسپرمهای زنده حاصل می‌شود. نتیجه گیری نهایی حاصل از این مطالعه این است که فاکتور مهار کننده لوسمی با غلظت مشخص و مدت زمان معین و طی مکانیسم ناشناخته می‌تواند حرکت اسپرمهای کم تحرک انسانی و همچنین طول عمر این اسپرمها را افزایش دهد و به نظر می‌رسد که با انجام تحقیقات و مطالعات گسترده تر شاید بتوان محیط کشتی را طراحی کرد که با کشت اسپرمهای کم تحرک مردان نابارور در آن به تحرک این اسپرمها افزوده شود.

تقدیر و تشکر

این تحقیق بخشی از طرح تحقیقاتی شماره ۸/۲۰/۹۰۱۸ مصوب ۸۳/۱۲/۲۳ معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور است و کلیه هزینه‌های این طرح توسط آن معاونت تأمین شده است که بدینوسیله کلیه نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه جندی شاپور کمال تشکر را دارند.

می‌کند و عده دیگری معتقدند که ترشحات لوله فالوپ باعث تنظیم عمل گامتها از طریق عمل متقابل (Interaction) می‌شود و می‌توانند رشد و تمایز جنینها را تحت تاثیر قرار دهد [۱۷]. یائو (Yao) و همکاران در مطالعه خود نشان دادند که سلولهای اپی تلیالی لوله رحم کشت داده شده، فاکتور مهار کننده لوسمی ترشح می‌کنند که این فاکتور باعث حفظ حرکت اسپرمها می‌شود. این مطلب نشان دهنده این است که سلولهای اسپرم دارای گیرنده این فاکتور است [۱۶]. گرچه مطالعات کمی در مورد فاکتورهای رشد بر تکامل و طول عمر اسپرمها انجام شده است اما در بعضی مطالعات دیده شده است که فاکتور مهار کننده مولر (Mullerian Inhibitory Factor) باعث بهبود حرکت و طول عمر اسپرمها در محیط کشت می‌شود [۱۸]. اصولاً سیتوکینها که فاکتور مهار کننده لوسمی یکی از آنهاست عمل سلولها را از طریق گیرنده اختصاصی سطح سلولی تنظیم می‌کنند. عمل بیولوژیکی فاکتور مهار کننده لوسمی بر اسپرم هم از این طریق است یعنی این فاکتور باید با گیرنده اختصاصی سطح اسپرم عمل متقابل داشته باشد [۱۹].

mRNA مربوط به گیرنده فاکتور مهار کننده لوسمی در اسپرماتید در حال دراز شدن (Elongating spermatid) خرگوش بیان می‌شود و این موضوع نشان دهنده این است که فاکتور مهار کننده لوسمی با سلولهای جنسی و اسپرماتیدها عمل متقابل دارد و به صورت غیر مستقیم و به وسیله آزاد شدن ماده ثانویه نیست [۱۹]. کنیس (Kenis) و همکاران [۲۰] مشاهده کردند که گیرنده فاکتور مهار کننده لوسمی به صورت محلول در مایع منی وجود دارد و این امر نشان دهنده اثر فعال این سیتوکین بر عمل اسپرماتوزن دارد. آتار (Attar) در مطالعه خود ثابت کرد که اگر اسپرمهای طبیعی انسانی به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت حاوی غلظتهای متفاوت فاکتور مهار کننده لوسمی کشت داده شوند در غلظتهای ۳ تا ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر حرکت اسپرمها زیاد می‌شود و بیشترین در صد حرکت اسپرمها در محیط کشت دارای ۵ نانوگرم در میلی لیتر

References

1. **Minhas BS.** Platelet activating factor treatment of human spermatozoa enhances fertilization potential. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 168:1314-7
2. **Sengoku k, Tamate k, Takaka Y, Ishikawa M.** Effects of platelet activating factor on human sperm function in vitro. *Hum Reprod* 1993; 8:1443-347
3. **Blackmore PF, Beebe SJ, Danforth DR, Alexander N.** Progesterone and 17-alpha-hydroxyprogesterone novel stimulators of calcium influx in human sperm. *J Biol Chem* 1990; 265:1376-85.
4. **Meizel S.** Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with the mammalian sperm surface, *Am J Anat* 1985, 174:285-302
5. **Ravnik SE, Zarutskie PW, Muller CH.** Lipid transfer activity in human follicular fluid relation to human sperm capacitation. *J Androl* 1990, 11:216-26
6. **Yovich JM, Edirisinghe WR, Cummin JM et al.** Influence of pentoxifylline in sever male factor infertility. *Fertil Steril* 1990; .53:75-9
7. **Perreault SG, Roger BJ.** Relationship between fertilizing ability and cAmp in human spermatozoa. *J Androlol.* 1992; 13:396-401
8. **Hilton DJ, Nichola NA, Metcalf D.** Purification of murine leukemia inhibitory factor from Krebs ascites cells. *Ana Biochem* 1998; 173:159-67
9. **Hilton DJ.** Lif: Lots of interesting function. *Treds Biochem Sci* 1992; 17:72-6
10. **Nicholas J, Davidson D, Tagik T, Yoshida K, Chambers I.** Complementary tissue specific expression of LIF receptor m RNA in early mouse embryogenesis. *Mech Dev* 1996; 57:123-31
11. **Cullinicen EB, Abbondazo SJ, Anderson PS.** LIF and LIF receptor expression in human endometrium suggest a potential autocrine / paracrine function in regulation embryo implantation .*Proc. Natl Acad Sci USA* 1996; 93:5115-20
12. **Attar E.** Effect of leukemia inhibitory factor on long-term sperm motility and survival. *Reprod Biol Medicine OnLine* 2003; 7:71-4
13. **Jiaen L, Yieh-Loong T, Eugene K, Campton G, Garcia JE, Baramik TA.** High fertilization rate obtained after intracytoplasmic sperm injection with 100% nonmotile spermatozoa selected by using a simple modified hypo-osmotic swelling test. *Fertil steril* 1997; 68:373-6
14. **Hossain AM, Rizk B, Bairk S, Huff C, Thorneycroft IH.** Time course of hypo-osmotic swelling of human spermatozoa: evidence of ordered transition between swelling subtypes. *Hum Reprod* 1998; 13:1578-83
15. **Mendoza C, Carreras A, Moos J, esarik J.** Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. *J Reorod Fertil* 1992; 95:755-63
16. **Yao Y, Ho P, Yeung WS.** Human oviductal cells produce a factor(s) that maintains the motility of human spermatozoa in vitro. *Fertil Steril* 2000; 73:479-86
17. **Quintero I, Ghersevich S, Caille A. t al.** Effect of human ovidctal in vitro secretion spermatozoa and search of sperm –oviductal proteins interactions. *Int J of Androl* 2005; 28:137-43
18. **Siow Y, Fallat ME, Amin FA.** Mullerian inhibitory substance improves longevity and viability of fresh and cryopreserved sperm. *J Androl* 1998; 19:568-72
19. **Jenab S, Morris PL.** Testicular leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor mediate phosphorylation of signal transducers and activators of transcription (STAT)-3 and STAT-1

and induce c-fos transcription and activator protein-1 activation in rat sertoli but not germ cells. 1998;139:1883-90

20. **Kenis G, Bosmans E, Pitard V.** High levels of soluble LIF receptor in seminal fluid.in:15 th

Annual Meeting of the European society of Human Reproduction and Embryology and Annual Meeting of the Federation Francaise. Human Reproduction, 26-30 june 1999; 14,37