View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by shahrekord university of medical scinces

مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۹، شماره ۲/ تابستان ۱۳۸۶/ ۷-۱

اثر نیتریک اکساید و سیگنال داخل سلولی آن (cGMP) در حرکت پیشرونده اسپرم انسان

دکتر حسین حسن پور*[۱]
*استادیار گروه فیزیولوژی- دانشگاه شهرکرد.

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۱/ ۳۰ تاریخ تأیید: ۸۶/۳/۳۱

چکیده:

زمینه و هدف: نیتریک اکساید مولکولی فعال و ناپایدار است که در تنظیم بسیاری از اعمال اسپرم، منجمله واکنش آکروزومی و کموتاکسی اسپرم نقش دارد. هدف از این مطالعه بررسی اثر نیتریک اکساید و cGMP (cyclic Guanosine Mono Phosphate) در حرکت پیشرونده اسپرم انسان می باشد.

روش بررسی: در یک مطالعه تجربی بعد از انکوباسیون اسپرم نمونه های منی افراد سالم (۲۰ نمونه) به مدت ۹۰ دقیقه در حضور ODQ (مهار کننده آنزیم گوانیلات سیکلاز محلول)، GSNO (دهنده نیتریک اکساید)، 8-bromo- cGMP (آنالوگcGMP)، GSNO+ODQ و گروه کنترل، حرکت پیشرونده اسپرم توسط سیستم کامپیوتری آنالیز کننده اسپرم (CASA) در فواصل زمانی ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه مورد ارزیابی قرار گرفت. داده ها با استفاده از آزمون t زوجی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها: حرکت پیشرونده اسپرم در انکوباسیون با GSNO به میزان ۴/۱٪ در دقیقه ۹۰ و با 8-bromo- cGMP به میزان ۴٪ در دقیقه ۶۰، نسبت به گروه کنترل افزایش یافت ($p<0/05$). ODQ به میزان ۱۰/۷٪ در دقیقه ۳۰، ۱۱/۲٪ در دقیقه ۶۰ و ۱۲/۲٪ در دقیقه ۹۰ حرکت پیشرونده اسپرم را بطور معنی داری نسبت به گروه کنترل کاهش داد ($p<0/05$). GSNO+ODQ نیز موجب کاهش حرکت پیشرونده اسپرم به میزان۹/۷٪، ۱۰/۸٪ و ۹/۹٪ به ترتیب در دقایق ۳۰، ۶۰ و ۹۰ نسبت به گروه کنترل شد ($p<0/05$).

نتیجه گیری: نیتریک اکساید کنترل کننده حرکت پیشرونده اسپرم از طریق فعال کردن آنزیم گوانیلات سیکلاز و ساختن cGMP در انسان است.

واژه های کلیدی: اسپرم، حرکت پیشرونده، نیتریک اکساید.

مقدمه:

نیتریک اکساید (NO) مولکولی فعال، قابل انتشار، غیرآلی، آزاد و ناپایدار بوده که اولین بار در عروق به عنوان یک فاکتور شل کننده مورد توجه قرار گرفت. این ماده در سلولهای متنوعی تولید شده و اعمال متفاوتی را انجام می‌دهد. بعنوان مثال در سلول های ایمنی به خصوص ماکروفاژها، تولید شده و در کشتن باکتریها و یا سلول هـــای تومـــوری مشارکت می کند و یا در سیستم عصبی به عنوان ناقل عصبی مطرح بوده و در بسیاری از اعمال مغزی دخالت دارد. همچنین مشخص شده است که نیتریک اکساید در سیستم (Non-Adrenergic Non-Cholinergic=NANC) نقش مهمی را بعهده دارد. به هر حال، امروزه حضور NO در بسیاری از اعمال فیزیولوژیک دستگاه های بدن ثابت شده است (۱). نیتـریک اکساید در طـی یک فـرآینـد آنزیمی از

[۱] **نویسنده مسئول:** شهرکرد- جاده سامان- دانشگاه شهرکرد- دانشکده دامپزشکی- گروه فیزیولوژی- تلفن: ۰۹۱۲۵۴۳۴۹۸۹، E-mail: hassanpour@yahoo.com

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 7:39 +0430 on Sunday September 3rd 2017

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 7:39 +0430 on Sunday September 3rd 2017

واکنش ال-آرژینین و اکسیژن حاصل می‌شود (۳،۲). آنزیم‌های سازنده نیتریک اکساید شامل سه ایزومر بوده، دو ایزومر این آنزیم به شکل ساختمانی در سلول دیده می شوند در حالی که ایزومر سوم تنها در سلول‌های تحریک شده، دیده می‌شود. یکی از اشکال ساختمانی این آنزیم که اولین بار نرونها یافت شد، اصطلاحاً nNOS (neuronal Nitric Oxide Synthase) نامیده می شود. در حالی که شکل ساختمانی دیگر آنزیم که در ابتدا در سلولهای آندوتلیال کشف گردید، تحت عنوان eNOS (endothelial Nitric Oxide Synthase) نام گذاری شد (۴). اکنون این دو نوع ایزوفرم NOS در انسان و برخی پستانداران کاملاً شناسایی شده و با توجه به اینکه در قسمت های دیگر بدن نیز دیده شده اند نام آنها را به NOS-1 و NOS-3 تغییر داده اند. نوع سوم NOS در سلولهای فعال ساخته می شود، این ایزوفرم ابتدا در ماکروفاژهای موش کشف گردید و با توجه به اینکه در سلولها القاء می شود، آن را تحت عنوان NOS-2 (inducible Nitric Oxide Synthase= iNOS) نامگذاری کردند (۲).

اثر NO در بسیاری از اعمال فیزیولوژیک اندامها و دستگاههای مختلف بدن بویژه دستگاه تولید مثل مورد توجه قرار گرفته است. به طوری که مطالعات مختلف، بیانگر نقش این ماده در عملکرد دستگاه تولید مثل جنس نر و ماده نیز بوده است. به عنوان مثال در جنس ماده، نیتریک اکساید در تخمک زائی، استروئیدوژنز، غلیان LH (Luteinizing Hormone Surge)، تخمک‌گذاری، تنظیم سیکل جنسی، لانه گزینی، لقاح، فعل و انفعالات رحم و تخمدان، ترشح پروستاگلاندینها، تنظیم عمل جسم زرد، تنظیم قابلیت انقباض رحم و آغاز زایمان دخالت دارد. از اثرات متنوع نیتریک اکساید در جنس نر می‌توان به تحرک اسپرم، ظرفیت‌پذیری، واکنش آکروزومی، کموتاکسی، قابلیت اتصال اسپرم با تخمک، اسپرماتوژنز، تنظیم عملکرد محور هیپوتالاموس- هیپوفیزی-گنادی اشاره نمود (۷،۶،۵).

اسپرم طبیعی انسان آنزیم eNOS را بیان می کند و این در حالی است که بیان این آنزیم در اسپرم های با تحرک کم بیشتر بوده است (۸). مطالعات همچنین نشان می‌دهند که در شرایط آزمایشگاهی غلظت های کم نیتریک اکساید تحرک اسپرم موش (۹) گوسفند و انسان را افزایش می‌دهد (۱۱،۱۰). در تحقیقی دیگر، ارتباط مستقیم و معنی‌داری بین غلظت نیتریک اکساید و تعداد اسپرم‌های بی تحرک مشاهده گردید (۱۳،۱۲). تعدادی از مطالعات نشان می‌دهند که نیتریک اکساید، فعال کننده اصلی آنزیم گوانیلات سیکلاز محلول در اسپرم است و مقدار قابل توجه‌ای از cGMP (cyclic Guanosine Mono Phosphate) حاصله از عمل این آنزیم، موجب واکنش آکروزومی، کموتاکسی اسپرم و واکنش اسپرم- تخمک می شود (۱۵،۱۴). چنین بنظر می رسد که cGMP در تحرک اسپرم نیز نقش داشته باشد و در واقع هدف از این تحقیق نیز روشن شدن این موضوع و ارتباط آن با نیتریک اکساید است.

روش بررسی:

در این مطالعه تجربی، از افراد سالمی که جهت ارزیابی باروری به بیمارستان S. Anna در تورین ایتالیا مراجعه کرده بودند (در پائیز و زمستان ۱۳۸۴)، تعداد ۲۰ نمونه منی تهیه گردید. بعد از قرار دادن منی به مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد جهت تبدیل شدن آن به حالت مایع، نمونه ها با استفاده از سیستم کامپیوتری آنالیز کننده اسپرم CASA (Computer-Aided Sperm Analysis) مطابق با دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی، مورد ارزیابی اولیه قرار می گرفتند (۱۶). تنها نمونه هائی که از پارامتر های طبیعی (غلظتی بیشتر از ۲۰×۱۰^{۶}/ml و

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 7:39 +0430 on Sunday September 3rd 2017

حرکت پیشرونده بالاتر از ۵۰٪) برخوردار بودند، در تحقیق مورد استفاده قرار می گرفتند.

اسپرم های پر تحرک با روش شناور سازی (Swim up) و با استفاده از محیط اصلاح شده مایع توبولی انسان HTF (Human Tubal Fluid) که از شرکت Irvine Sientific خریداری شده بودند جدا گردیدند. بدین صورت که در یک لوله آزمایش ته مخروطی، مقدار ۱ میلی لیتر محیط اصلاح شده HTF ریخته، سپس ۱ میلی لیتر از منی به ته لوله اضافه می شد. حدود ۶۰ دقیقه در ۳۷°C با زاویه ۴۵° قرار داده، بعد از زمان مذکور، ۰/۵ میلی لیتر از مایع روئی لوله به یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری منتقل می گردید. جهت شستشوی اسپرم های بدست آمده، حدود ۱ میلی لیتر از محیط اصلاح شده HTF به میکروتیوب اضافه شده و در دور ۵۰۰ g سانتریفوژ گردید سپس مایع روئی دور ریخته شد. اسپرمهای بدست آمده بعد از شناور سازی، دارای حداقل سلول های گرد (اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید و گلبولهای سفید) (کمتر از 1×10^6/ml) بودند.

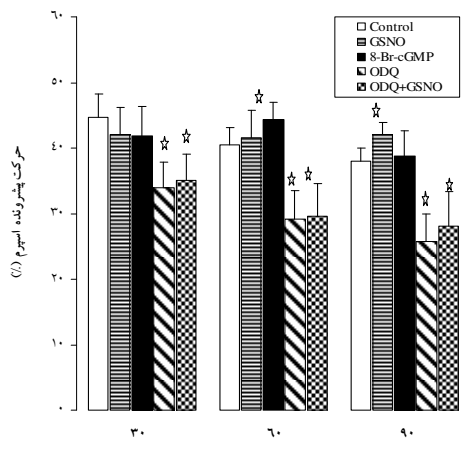
سوسپانسیونی از اسپرم و محیط اصلاح شده HTF به میزان ۲۰۰ میکرولیتر محتوی حدود 2×10^6 اسپرم در پنج تیمار از هر نمونه تهیه و در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۹۰ دقیقه در تیمار اول در معرض GSNO ۱۵۰μM (S-nitrosoglutathion)، تیمار دوم، ODQ ۱۰۰ μM (1H-[1,2,4] oxadiozolo [4,3-α]quinoxalin-1-one)، 8-bromo-cGMP ۱۵۰ mM تیمار سوم (ساخت شرکت Sigma) و در تیمار چهارم در معرض ODQ+GSNO قرار داده شد (مقادیر ذکر شده مربوط به هر ماده، با توجه به تست اولیه دوزهای مختلف این مواد بر روی اسپرم، انتخاب شد). در تیمار پنجم سوسپانسیونی از اسپرم و محیط اصلاح شده HTF بدون مواد مذکور (حجم مساوی از HTF جایگزین مواد مذکور می شد) به عنوان گروه کنترل، آماده شده و اسپرمهای معلق در آن همانند نمونه های دیگر مورد ارزیابی قرار گرفت.

حرکت پیشرونده اسپرم که شامل مجموعه حرکات سریع و آهسته متمایل به جلو بود با استفاده از سیستم CASA (Color Sperm Analysis System,WLJY-900, China) در شرایط زیر مورد ارزیابی قرار گرفت: سرعت تصویر برداری دستگاه، ۲۰ زمینه در ثانیه، زمان آنالیز در هر زمینه، کمتر از ۱۵ ثانیه، سرعت اسپرم های قابل آنالیز، ۰-۱۸۰ μm/s، تعداد میدان میکروسکوپی مورد ارزیابی، ۶ میدان برای هر نمونه و درشت نمائی عدسی مورد استفاده x ۲۰۰. در این تحقیق از لام مخصوص Mackler با عمق μ ۲۰ جهت آنالیز اسپرمها استفاده گردید. آنالیز حرکتی اسپرمها در فواصل زمانی ۰، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه برای هر یک از نمونه های تحت آزمایش و کنترل انجام می گرفت. داده ها با استفاده از آزمونهای آماری t تجزیه و تحلیل گردید.

یافته ها:

یافته های این مطالعه نشان می دهد که GSNO در غلظت ۱۵۰ μM موجب افزایش حرکت پیشرونده اسپرم ها بعد از ۶۰ دقیقه گردید که البته تنها در زمان ۹۰ دقیقه این افزایش (۴/۱٪) نسبت به نمونه کنترل معنی دار بود ($p<0/05$). 8-Br-cGMP در غلظت ۱۵۰ mM، در زمان های ۶۰ و ۹۰ دقیقه موجب افزایش حرکت پیشرونده اسپرم ها شد که تنها در دقیقه ۶۰ این افزایش (۴٪) معنی دار بود ($p<0/05$). قرار دادن ODQ با غلظت ۱۰۰ μM به تنهائی و یا همراه با GSNO ۱۵۰μM در محیط حاوی اسپرم، موجب کاهش در حرکت پیشرونده اسپرم ها

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 7:39 +0430 on Sunday September 3rd 2017



نمودار شماره ۱: اثرات ODQ، GSNO و 8-Br-cGMP و GSNO+ODQ بر حرکت پیشرونده اسپرم در زمانهای مختلف
** $p<۰/۰۵$ نسبت به گروه کنترل.* *$n=۲۰$*
GSNO= S-nitrosoglutathione
8-Br-cGMP= 8-Brom-cyclic Guanosine Mono Phosphate
ODQ=(1H-[1,2,4] oxadiozolo [4,3-α]quinoxalin-1-one)

شد. بدین صورت که، ODQ به میزان ۱۰/۷ درصد در دقیقه ۳۰، ۱۱/۲ درصد در دقیقه ۶۰ و ۱۲/۲ درصد در دقیقه ۹۰ حرکت پیشرونده اسپرم را نسبت به گروه کنترل کاهش داد ($p<۰/۰۵$) و GSNO+ODQ نیز موجب کاهش در حرکت پیشرونده اسپرم به میزان ۹/۷ درصد، ۱۰/۸ درصد و ۹/۹ درصد به ترتیب در دقایق ۳۰، ۶۰ و ۹۰ نسبت به گروه کنترل شد ($p<۰/۰۵$). البته باید توجه داشت که دو ماده ODQ و GSNO با یکدیگر، حرکت پیشرونده اسپرمها را به میزان کمتری کاهش دادند (نمودار شماره ۱).

بحث:

نیتریک اکساید مولکولی با اهمیت بیولوژیک بالاست و نقش مهم آن را در فیزیولوژی اسپرم مانند کموتاکسی اسپرم، حرکت اسپرم، اسپرماتوژنز و غیره به اثبات رسیده است (۱۴،۹). مطالعات نشان می دهند که نیتریک اکساید اثرات خود را از طریق یک مسیر داخل سلولی که منجر به فعال شدن آنزیم گوانیلات سیکلاز و تولید cGMP می شود، ایفاء می کند (۱۸،۱۷). این مسیرهای سیگنال دهنده داخل سلولی مرتبط با نیتریک اکساید، در بسیاری از سلول های پیکری و سلولهای جنسی مانند اسپرم یافت شده اند (۱۹). البته مطالعاتی هم حاکی از آن است که نیتریک اکساید اثرات خود را از طریق مسیرهای غیر وابسته به cGMP نیز انجام می دهد (۲۰).

در مطالعه حاضر، GSNO به عنوان دهنده نیتریک اکساید، در محیط پیرامون اسپرم با تولید نیتریک اکساید موجب افزایش حرکت پیشرونده اسپرم بعد از ۹۰ دقیقه گردید. Hassanpour و همکاران نیز که از SNP به عنوان دهنده نیتریک اکساید استفاده کرده بودند، توانستد موجب افزایش حرکت پیشرونده اسپرم شوند (۱۰). در همین مطالعه، نشان داده شد که مهار آنزیم سازنده نیتریک اکساید (توسط L-NAME) می تواند حرکت اسپرم را به طور چشمگیری کاهش دهد (۱۰). به هر حال مطالعات مذکور تائیدی بر نتیجه بدست آمده در این تحقیق است اگرچه زمان اثر GSNO نسبت به مواد مشابه در مطالعات قبلی متفاوت بوده که حاکی از ویژگی این ماده و مقدار متفاوت تولید نیتریک اکساید توسط آن، در محیط اسپرم می تواند باشد.

در بخش دیگری از این تحقیق، 8-Br-cGMP به عنوان یک آنالوگ cGMP قابل نفوذ به داخل سلول، مورد استفاده قرار گرفت که موجب افزایش حرکت پیشرونده اسپرم شد و برای اولین بار نشان داده شد که cGMP به عنوان پیامبر ثانویه در حرکت پیشرونده اسپرم انسان نقش دارد. جهت تائید این نتیجه، از ODQ به عنوان مهارکننده آنزیم سازنده cGMP (گوانیلات سیکلاز محلول) نیز استفاده شد. هنگامی که ماده اخیر به محیط اسپرم افزوده شد، حرکات اسپرم را کاهش داد که این هم دلالت بر ساخته شدن cGMP در داخل

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 7:39 +0430 on Sunday September 3rd 2017

اسپرم و مشارکت آن در مکانیسم حرکت پیشرونده اسپرم دارد. البته Burger و همکاران و نیز Lefivre و همکاران در مطالعات خود نیز با مهار آنزیم فسفودی استراز سلول (آنزیم مذکور cGMP سلول را کاهش می دهد) توانستند فعالیت اسپرم را افزایش دهند که به طور غیر مستقیم حاکی از دخالت cGMP در تحرک اسپرم بوده است (۲۲،۲۱). اطلاعات متضادی نیز در این رابطه منتشر شده است که نشان می دهد مهار آنزیم فسفودی استراز توسط Sildenafil تغییر قابل توجه ای را در حرکت اسپرم ایجاد نمی کند (۲۴،۲۳).

با توجه به تحقیقات گذشته نکته قابل توجه در مورد ODQ، این است که این ماده اثر مهاری خود را، بر آنزیم گوانیلات سیکلازی که وابسته به نیتریک اکساید است، اعمال می کند (۲۵). با توجه به این موضوع و با تکیه بر اثر مهاری ODQ بر حرکت پیشرونده اسپرم، می توان بر اثر نیتریک اکساید در حرکت اسپرم از طریق فعال کردن گوانیلات سیکلاز و تولید cGMP صحه گذارد. جهت تائید این مطلب، به محیط حاوی GSNO، ماده ODQ نیز اضافه گردید که موجب کاهش اثر تحریکی GSNO در تحرک اسپرم شد که می توان چنین استنباط کرد که نیتریک اکساید با افزایش فعالیت آنزیم گوانیلات سیکلاز در اسپرم، موجب کنترل حرکت پیشرونده آن می شود.

با توجه به این مطالعه که نشان دهنده دخالت نیتریک اکسید در حرکت طبیعی اسپرم است پیشنهاد می گردد در مطالعه بر روی علل ناباروری های مربوط به عدم تحرک اسپرم نیتریک اکسید و عوامل وابسته به آن نیز مورد توجه قرار گیرد.

نتیجه گیری:

نیتریک اکساید کنترل کننده حرکت پیشرونده اسپرم از طریق فعال کردن آنزیم گوانیلات سیکلاز و ساختن cGMP در انسان است.

تشکر و قدردانی:

مطالعه حاضر بخشی از یافته های پژوهشی در دانشگاه تورین ایتالیا می باشد. ضمن تشکر و قدردانی از مسئولین این دانشگاه و بخش IVF (In vitro fertilization) بیمارستان S. Anna، بدین وسیله از دکتر آلبرتو ریولی استاد دانشکده پزشکی آن دانشگاه که مرا دراین امر راهنمائی نموده اند، صمیمانه تشکر می نمایم.

منابع:

1. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. Physiol Rev. 2007 Jan; 87(1): 315-424.

2. Garcia X, Stein F. Nitric oxide. Semin Pediatr Infect Dis. 2006 Apr; 17(2): 55-7.

3. Bode-Boger SM. Effect of L-arginine supplementation on NO production in man. Eur J Clin Pharmacol. 2006; 62(1): 91-9.

4. Liaudet L, Soriano FG, Szab C. Biology of nitric oxide signaling. Crit Care Med. 2000; 28: 37-52.

5. Rosselli M, Keller PJ, Dubey RK. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. Hum Reprod Update. 1998 Jan-Feb; 4(1): 3-24.

6. Dixit VD, Parvizi N. Nitric oxide and the control of reproduction. Anim Reprod Sci. 2001 Jan; 65(1-2): 1-16.

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 7:39 +0430 on Sunday September 3rd 2017

7. Drazen DL, Klein SL, Burnett AL, Wallach EE, Crone JK, Huang PL, et al. Reproductive function in female mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. Nitric Oxide. 1999 Oct; 3(5): 366-74.

8. O'Bryan MK, Zini A, Cheng CY, Schlegel PN. Human sperm endothelial nitric oxide synthase expression: correlation with sperm motility. Fertil Steril. 1998 Dec; 70(6): 1143-7.

9. Herrero MB, de Lamirande E, Gagnon C. Nitric oxide is a signaling molecule in spermatozoa. Curr Pharm. 2003 Des; 9(5): 419-25.

10. Hassanpour H, Mirshokrai P, Shirazi A, Aminian A. Effect of nitric oxide on ram sperm motility in vitro. Pak J Biol Sci. 2007; 10(14): 2374-78.

11. Liu L, Zhang SM, Ma AY, Zheng ZQ. Different levels of nitric oxide in seminal plasma of fertile and abnormospermic men. Zhonghua Nan Ke Xue. 2003; 9(4): 254-6.

12. Balercia G, Moretti S, Vignini A, Magagnini M, Mantero F, Boscaro M, et al. Role of nitric oxide concentrations on human sperm motility. J Androl. 2004 Mar-Apr; 25(2): 245-9.

13. Wu TP, Huang BM, Tsai HC, Lui MC, Liu MY. Effects of nitric oxide on human spermatozoa activity, fertilization and mouse embryonic development. Arch Androl. 2004; 50(3): 173-9.

14. Revelli A, Ghigo D, Moffa F, Massobrio M, Tur-Kaspa I. Guanylate cyclase activity and sperm function. Endocr Rev. 2002 Aug; 23(4): 484-94.

15. Yang MG, Yang Y, Huang P, Zheng SL, Fan AL, Cheng XD, et al. Sodium nitroprusside facilitates human sperm capacitation and acrosome reaction. Zhonghua Nan Ke Xue. 2005; 11(6): 422-5.

16. WHO. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm: cervical mucus interaction. Cambridge, Uk: Cambridge University Press. 1999; 90-3.

17. Krumenacker JS, Hanafy KA, Murad F. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclaes. Brain Res Bull. 2004 Feb; 62(6): 505-15.

18. Levonen AL, Patel RP, Brookes P, Go YM, Jo H, Parthasarathy S, et al. Mechanisms of cell signaling by nitric oxide and peroxynitrite: from mitochondria to MAP kinases. Antioxid Redox Signal. 2001 Apr; 3(2): 215-29.

19. Revelli A, Costamagna C, Moffa F, Aldieri E, Ochetti S, Bosia A. Signaling pathway of nitric oxide-induced acrosome reaction in human spermatozoa. Biol Reprod. 2001 Jun; 64(6): 1708-12.

20. Ghosh DK, Salerno JC. Nitric oxide syntheses: domain structure and alignment in enzyme function and control. Front Biosci. 2003; 18: 193-209.

21. Burger M, Sikka SC, Bivalacqua TJ, Lamb DJ, Hellstrom WJ. The effect of sildenafil on human sperm motion and function from normal and infertile men. Int J Impot Res. 2000 Aug; 12(4): 229-34.

22. Lefivre L, De Lamirande E, Gagnon C. The cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor, sildenafil, stimulates humansperm motility and capacitation but not acrosome reaction. J Androl. 2000 Nov-Dec; 21(6): 929-37.

23. Andrade JR, Traboulsi A, Hussain A, Dubin NH. In vitro effects of sildenafil and phentolamine, drugs used for erectile dysfunction, on human sperm motility. Am J Obstet Gyneco. 2000; 182: 1093-5.

24. Aversa A, Mazzilli F, Rossi T, Delfino M, Isidori AM, Fabbri A. Effects of sildenafil (Viagra) administration on seminal parameters and post-ejaculatory refractory time in normal males. Hum Reprod. 2000 Jan; 15(1): 131-4.

25. Schrammel A, Behrends S, Schmidt K, Koesling D, Mayer B. Characterization of 1H-[1,2,4] oxadiazolo[4,3-α] quinoxalin-1-one as a home-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. Mol Pharmacol. 1996 Jul; 50(1): 1-5.

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 7:39 +0430 on Sunday September 3rd 2017