Effect of Selenium on the motility, morphology and viability of sperm cells after freezing and thawing procedure

S. Nasri* F. Amidi** Z. Rezaeian***

*Associate Professor of Biology, Payame-Noor University, Tehran, Iran
**Associate Professor of Anatomy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
***M.Sc. in Animal Biology, Payame-Noor University, Tehran, Iran

Abstract

Background: Selenium is essential for the normal function of sperm cells and spermatogenesis. This element as an antioxidant cofactor reduces oxygen free radicals, and is expected to be effective for increasing fertility.

Objective: The aim of this study was to determine the effect of selenium on motility, morphology and viability of sperm cells after freezing and thawing procedure.

Methods: This experimental study was performed on semen samples from 42 males with normal semen parameters referred to Shariati infertility center in Tehran during February and March 2013. Each sample was divided into four equal parts (two parts were washed and the other two parts were remained unwashed). 5 µg/l selenium was added to one of the washed and one of the unwashed sperm parts. Two other parts were remained untreated as control groups. Every four parts were freezed for two weeks, and subsequently they were thawed and motility, morphology, and viability of sperm cells were assessed. Data were analyzed by one-way ANOVA.

Findings: After defreezing, motility, morphology, and viability of sperm cells in selenium groups were significantly different from control groups.

Conclusion: With regards to the results, 5 µg/l selenium can be used in infertility clinics in order to increase sperm quality after freezing and thawing procedure.

Keywords: Sperm Motility, Freezing, Thawing , Selenium

Corresponding Address: Sima Nasri, Department of Biology, Payame-Noor University, PO BOX 19395-3697 Tehran, Iran
Email: s_nasri1@pnu.ac.ir
Tel: +98-21-44736795
Received: 7 Sep 2013
Accepted: 11 Nov 2013

اثر سلنیوم بر میزان حرکت، مورفولوژی و زنده‌مانی اسپرم پس از پدیده انجماد و ذوب

دکتر سیما نصری* دکتر فردین عمیدی** زهرا رضاییان موحد***

* دانشیار زیست‌شناسی دانشگاه پیام نور تهران
** دانشیار علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی تهران
*** کارشناس ارشد علوم جانوری دانشگاه پیام نور تهران

آدرس نویسنده مسؤول: تهران، دانشگاه پیام نور، گروه زیست‌شناسی، صندوق پستی ۳۶۹۷- ۱۹۳۹۵، تلفن ۴۴۷۳۶۷۹۵- ۰۲۱
Email: s_nasri1@pnu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۲۰

چکیده

زمینه: وجود سلنیوم برای عملکرد طبیعی و انجام فرایند اسپرماتوژنز ضروری است. این ماده به عنوان عامل کمک‌کننده آنتی اکسیدانی به کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن منجر می‌شود و انتظار می‌رود در افزایش باروری مؤثر باشد.

هدف: مطالعه به منظور تعیین اثر سلنیوم بر حرکت، مورفولوژی و زنده‌مانی اسپرم بعد از فرایند انجماد و ذوب انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه تجربی بر ۴۲ نمونه مایع سمن با شاخص‌های طبیعی، از مردان مراجعه‌کننده به مرکز ناباروری بیمارستان شریعتی تهران در بهمن و اسفند ماه سال ۱۳۹۱ انجام شد. نمونه‌های اسپرم به چهار قسمت مساوی تقسیم شدند (دو قسمت شسته شده و دو قسمت دیگر شسته نشده). به یک قسمت از اسپرم‌های شسته شده و یک قسمت از شسته نشده سلنیوم (۵ میکروگرم در لیتر) اضافه شد و دو قسمت دیگر بدون سلنیوم به عنوان شاهد محسوب شدند. هر چهار گروه به مدت دو هفته منجمد و سپس ذوب شدند و حرکت، مورفولوژی و زنده مانی اسپرم ارزیابی شد. داده‌ها با آزمون آماری آنوای یک طرفه تحلیل شدند.

یافته‌ها: سلنیوم به صورت معنی‌داری بر حرکت، مورفولوژی و زنده مانی اسپرم‌ها پس از فرایند ذوب نسبت به گروه شاهد تأثیر مثبت داشت.

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌ها، می‌توان از دوز ۵ میکروگرم در لیتر سلنیوم در درمانگاه‌های ناباروری برای افزایش کیفیت اسپرم پس از پدیده انجماد وذوب استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: حرکت اسپرم، انجماد، ذوب، سلنیوم

مقدمه:

علل ناباروری ممکن است مردانه، زنانه، هر دو با هم و یا به دلایل ناشناخته باشد.[۱] عامل مردانه ۵۰ درصد موارد ناباروری را تشکیل می‌دهد و با شاخص‌های غیرطبیعی سمن همراه است.[۲] حالت‌های مختلفی ممکن است در این افراد مشاهده شود مانند: کاهش تعداد اسپرم، کاهش حرکت اسپرم (استنو اسپرمیا)، بد شکلی اسپرماتوزوا از نظر ظاهری (تراتو اسپرمیا)، ۳ مورد بالا با هم (اولیگو استنو تراتو اسپرمیا) و عدم مشاهده اسپرم (آزواسپرمیا).[۲] انجماد اسپرم انسان، به طور گسترده‌ای در درمان‌های کمک باروری از جمله قبل از شیمی درمانی،

رادیوتراپی و برخی از درمان‌های جراحی، امیدی را برای باروری بعدی فراهم می‌کند.[۳]

فرایند ذوب بسیار مهم است و باید با توجه به سلول و آهنگ سرمایش ذوب به صورت آهسته یا سریع انجام شود.[۴] تنش اکسیداتیو (ROS) و رادیکال‌های آزاد اکسیژن جزء مولکول‌های مشتق شده از اکسیژن هستند که در صورت فعالیت بیش از حد، جزء اکسیدانت‌های مضر محسوب می‌شوند.[۵] اجزای تشکیل دهنده مایع منی که توانایی تولید ROS را دارند عبارتند از: اسپرماتوزوای غیرطبیعی، پیش‌ساز سلول زاینده (PGC) و لکوسیت‌ها.[۶] به دلیل حساسیت بالای اسپرماتوزوا به شرایط تنش اکسیداتیو، صدمه‌های زیادی از جمله پراکسیداسیون لیپیدها، آسیب DNA، آپوپتوز، تخریب و تحرک اسپرم متوجه آن خواهد شد.[۷]

آنتی اکسیدان مولکولی است که توانایی جلوگیری یا آهسته کردن روند اکسیداسیون سایر مولکول‌ها را دارد.[۸و۹] آنتی اکسیدان‌ها شامل دو گروه آنزیمی و غیر آنزیمی هستند. انواع غیر آنزیمی شامل ویتامین A,C,E پیرووات، گلوتاتیون، سلنیوم، کوآنزیم Q و انواع آنزیمی شامل سوپرکسید دسموزتاز (SOD) گلوتاتیون پراکسیداز (GPX)، کاتالاز و گلوتاتیون ردوکتاز است.[۱۰] مکانیسم عمل آنتی اکسیدان‌ها علیه تنش اکسیداتیو شامل مکانیسم پیشگیری، ترمیمی و پاک‌سازی است.[۱۱] فرایند انجماد و ذوب کاهش معنی‌داری را در فعالیت متابولیک و تحرک اسپرم خواهد داشت و سلنیوم و ویتامین E نیز کاهش تحرک اسپرم و صدمه‌های ناشی از انجماد را بهبود می‌بخشند.[۱۲]

سلنیوم یک ریزمغذی شبه فلز در رژیم غذایی مورد نیاز پستانداران است و در محصول‌های گیاهی و حیوانی به خصوص غذاهای دریایی، جگر، حبوبات، زرده تخم مرغ، شیر، آب و خاک یافت می‌شود.[۱۳] گزارش‌های متعدد دانشمندان حاکی از تأثیر مثبت سلنیوم در سلامت انسان و کاهش علایم و بهبود بیماری‌ها و اختلال‌هایی مانند ناباروری، عفونت‌های ویروسی، سرطان، بیماری‌های قلبی- عروقی و غیره است. سلنیوم آنتی اکسیدانی است که برای روند طبیعی اسپرماتوژنز و باروری مردان ضروری است.[۱۴و۱۵] مطالعه اثر سلنیوم از طریق رژیم غذایی بر اسپرم گراز وحشی نشان داده است که سلنیوم باعث افزایش تحرک اسپرم می‌شود.[۱۶] لذا پژوهش حاضر با هدف تعیین اثر سلنیوم بر حرکت، مورفولوژی و زنده مانی اسپرم بعد از فرایند انجماد و ذوب انجام شد.

❋ مواد و روش‌ها:

این مطالعه تجربی بر ۴۲ نمونه مایع سمن با شاخص‌های طبیعی، از مردان مراجعه‌کننده به مرکز ناباروری بیمارستان شریعتی تهران در بهمن و اسفند ماه سال ۱۳۹۱ انجام شد. نمونه‌ها پس از تهیه به روش استمناء، در داخل ظرف پلاستیکی درپوش‌دار ریخته شدند و به مدت ۳۰ تا ۴۰ دقیقه داخل انکوباتور۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. شستشوی اسپرم با روش مهاجرت انجام شد. سپس به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در انکوباتور قرار داده شدند تا اسپرم‌های متحرک به طرف بالا حرکت کنند. مایع رویی که حاوی اسپرم متحرک بود جمع‌آوری شد و نمونه‌های اسپرم به چهار قسمت مساوی تقسیم شدند (دو قسمت شسته شده و دو قسمت دیگر شسته نشده). به یک قسمت از اسپرم‌های شسته شده و یک قسمت از شسته نشده سلنیوم (۵ میکروگرم در لیتر) اضافه و دو قسمت دیگر بدون سلنیوم به عنوان شاهد محسوب شدند. هر چهار گروه به مدت دو هفته منجمد و سپس ذوب شدند، در نهایت حرکت، مورفولوژی و زنده مانی اسپرم ارزیابی شد. به یک قسمت از مایع منی شسته شده، محیط فریز اسپرم FP01SF05 بدون سلنیوم (هم حجم مایع منی) اضافه و انتهای آن با خمیر هماتوکریت گرفته شد. هم حجم قسمت دیگر مایع منی شسته شده، مایع فریز دارای سلنیوم با غلظت ۵ میکروگرم اضافه و داخل نی انجماد کشیده شد. سپس انتهای نی‌ها با خمیر هماتوکریت بسته شد. کدهای مخصوص روی نی‌ها نصب شد. نی‌های انجماد درون کِن‌های فلزی و گابلت قرار

گرفت و به مدت ۲ هفته درون مخزن ازت قرار داده شدند که دمای آن ۱۸۶- درجه بود. نمونه‌ها دو هفته بعد از تانک نیتروژن خارج و برای ذوب شدن حدود ۵ تا ۱۰ دقیقه در آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از ذوب شدن، محیط ضد انجمادی و دیگر قسمت‌های مایع منی از اسپرم‌ها جدا و ۲ میلی‌لیتر محیط Hams-F10 به پلت (رسوب) باقی‌مانده اضافه شد. مخلوط به دست آمده از نظر حرکت، مورفولوژی و زنده مانی اسپرم بررسی شد. جهت بررسی حرکت اسپرم از میکروسکوپ نوری با بزرگ نمایی ×۴۰ و براساس دستور کار سازمان جهانی بهداشت استفاده شد.[۱۶] برای بررسی مورفولوژی اسپرم از رنگ آمیزی پاپا نیکولائو استفاده شد که در آن ناحیه سر آکروزم به رنگ آبی روشن، ناحیه پشت آکروزوم به رنگ آبی تیره، قطعه گردن اسپرم کمی قرمز، دم آن به رنگ آبی و بقایای سیتوپلاسمی اطراف گردن صورتی می شود.[۱۶]

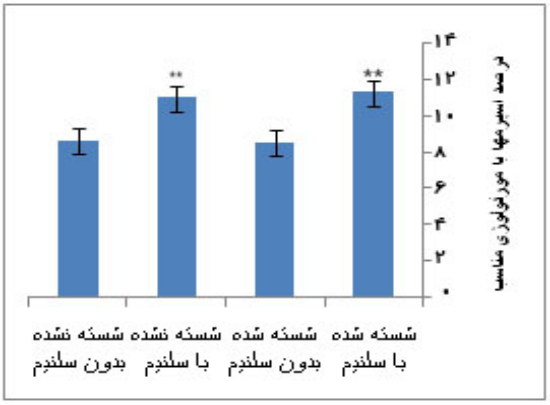
برای بررسی حیات و زنده بودن اسپرم از رنگ آمیزی ائوزین- نگروزین استفاده شد که اساس آن بر میزان نفوذ پذیری رنگ ائوزین- نگروزین به درون غشای سلولی آسیب دیده است و عدم نفوذ رنگ به درون غشای سلول، بیان‌گر سلامت غشا است. اگر سر اسپرم به رنگ قرمز یا صورتی تیره در آید، آن اسپرم مرده محسوب می‌شود و اگر سر آن صورتی روشن یا سفید شود زنده تلقی می‌شود.[۱۶]

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS ۱۸ و آزمون آماری آنوای یک طرفه با سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ تحلیل شدند.

❋ یافته‌ها:

میزان اسپرم‌های با مورفولوژی طبیعی در نمونه‌های مایع سمن شسته شده و شسته نشده بدون سلنیوم به طور معنی‌داری کم‌تر از نمونه‌های مشابه همراه با سلنیوم پس از فرایند ذوب بود (P<۰/۰۰۱). میزان اسپرم‌های با مورفولوژی طبیعی در نمونه‌های مایع سمن شسته نشده با سلنیوم به طور معنی‌داری بیش‌تر از نمونه‌های شسته شده بدون سلنیوم بود (P<۰/۰۰۱). در نمونه‌های مایع منی شسته شده با سلنیوم، میزان اسپرم‌های با مورفولوژی طبیعی به طور معنی‌داری بیش‌تر از نمونه‌های شسته نشده بدون سلنیوم پس از انجماد و ذوب بود (P<۰/۰۰۱) (نمودار شماره ۱).

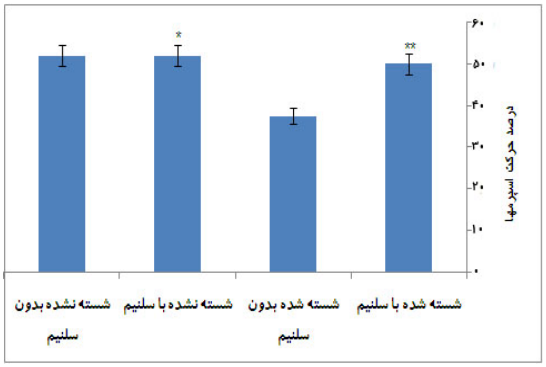
نمودار۱- مقایسه میزان اسپرم‌های با مورفولوژی طبیعی در نمونه‌های سمن شسته نشده و شسته شده تحت تأثیر سلنیوم و بدون سلنیوم پس از فرایند انجماد و ذوب



** P<۰/۰۰۱ تفاوت میزان اسپرم‌های با مورفولوژی مناسب در نمونه‌های سمن شسته شده و شسته نشده تحت تأثیر سلنیوم و بدون سلنیوم

میزان متوسط حرکت اسپرم‌ها در نمونه‌های سمن شسته نشده همراه با سلنیوم به طور معنی‌داری بیش‌تر از نمونه‌های شسته نشده بدون سلنیوم پس از فرایند ذوب بود (P<۰/۰۵). در نمونه‌های اسپرم شسته شده نیز این تفاوت معنی‌داری در نمونه‌های همراه با سلنیوم در مقایسه با نمونه‌های بدون سلنیوم مشاهده شد (P<۰/۰۰۱). در نمونه‌های شسته نشده همراه با سلنیوم، پس از فرایند ذوب میزان حرکت اسپرم‌ها به طور معنی‌داری بیش‌تر از نمونه‌های شسته شده بدون سلنیوم بود (P<۰/۰۱). در نمونه‌های شسته نشده بدون سلنیوم میزان تحرک اسپرم‌ها به طور معنی‌داری کم‌تر از نمونه‌های شسته شده همراه با سلنیوم بود (P<۰/۰۱) (نمودار شماره ۲).

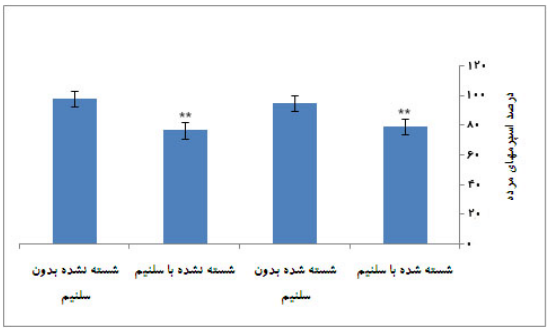
نمودار۲- مقایسه حرکت اسپرم‌ها در نمونه‌های سمن شسته شده و شسته نشده همراه با سلنیوم و بدون سلنیوم پس از فرایند انجماد و ذوب



* P<۰/۰۵ تفاوت حرکت اسپرم‌ها در نمونه‌های سمن شسته نشده تحت تاثیر سلنیوم و بدون سلنیوم
** P<۰/۰۰۱ تفاوت حرکت اسپرم‌ها در نمونه‌های سمن شسته نشده تحت تأثیر سلنیوم و و اسپرم شسته نشده بدون سلنیوم

میزان سلول‌های مرده در نمونه‌های شسته شده و شسته نشده همراه با سلنیوم به طور معنی‌داری کم‌تر از نمونه‌های مشابه بدون سلنیوم بود (P<۰/۰۰۱). در نمونه‌های شسته نشده همراه با سلنیوم پس از فرایند ذوب میزان سلول‌های مرده به طور معنی‌داری کم‌تر از نمونه‌های شسته شده بدون سلنیوم بود (P<۰/۰۱). در نمونه‌های شسته نشده بدون سلنیوم درصد اسپرم‌های مرده به طور معنی‌داری بیش‌تر از نمونه‌های شسته شده همراه با سلنیوم بود (P<۰/۰۱) (نمودار شماره ۳).

نمودار۳- مقایسه میزان سلول‌های مرده در نمونه‌های سمن شسته شده و شسته نشده همراه با سلنیوم و بدون سلنیوم پس از فرایند انجماد و ذوب



** P<۰/۰۰۱ تفاوت میزان سلول‌های مرده در نمونه‌های سمن شسته نشده و شسته شده تحت تأثیر سلنیوم و بدون سلنیوم

❋ بحث و نتیجه‌گیری:

این مطالعه نشان داد که افزایش سلنیوم به مایع منی قبل از انجماد باعث افزایش کیفیت شاخص‌های اسپرم، پس از ذوب و انجماد شد.

در مطالعه حاضر میزان اسپرم‌های با مورفولوژی طبیعی در گروه شسته شده و نشده با سلنیوم به طور معنی‌داری نسبت به گروه بدون سلنیوم افزایش نشان می‌دهد (P<۰/۰۰۱). محمدی و همکاران در سال ۱۳۸۷ مطالعه‌ای را به منظور بررسی اثر سلنیوم بر روی موش سوری نر با دوز ۰/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت تزریق داخل صفاقی به مدت ۵ هفته روزانه ۱ بار انجام دادند و میزان مورفولوژی را که با ائوزین و نکروزین رنگ‌آمیزی شده بود با میکروسکوپ نوری مشاهده کردند. میزان مورفولوژی طبیعی در گروه تیمار با سلنیوم در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافت.[۱۷] مورفولوژی اسپرم علامتی مناسب برای چگونگی وضعیت اپی‌تلیوم لوله‌های منی‌ساز است. تغییرات دژنراتیو اپی‌تلیوم لوله‌های منی‌ساز روی مورفولوژی اسپرم‌ها تأثیر منفی می‌گذارد.[۱۸]

در مطالعه حاضر میزان متوسط حرکت در نمونه‌های اسپرم همراه با سلنیوم (گروه‌های شسته شده و نشده)، به میزان معنی‌داری بیش‌تر از گروه‌های شاهد بود. حرکت کلاس A و B کاهش و تقریباً به صفر نزدیک بود. با این حال کاهش حرکت اسپرم‌های کلاس C به میزان A و B نبود. اثر انجماد آن قدر شدید بود که میزان اسپرم‌های گروه D را به طور چشم‌گیری افزایش داد. در این مطالعه حرکت متوسط مجموع حرکت اسپرم‌های کلاس C و D پس از فرایند انجماد و ذوب بود. درستکار و همکاران با مطالعه اثر سلنیوم در دوزهای ۱، ۲، ۴ و ۸ میکروگرم در لیتر بر روی گاو میش، به این نتیجه رسیدند که دوزهای ۱ و ۲ میکروگرم سبب افزایش معنی‌دار تحرک در گروه‌های با سلنیوم نسبت به گروه‌های شاهد و دوزهای ۴ و ۸ میکروگرم باعث کاهش تحرک در مقایسه با گروه شاهد شد.[۱۹] فلورین و همکاران در سال ۲۰۱۲، اسپرم گراز وحشی را به همراه مکمل ویتامین E و C منجمد و

مشاهده کردند که مکمل ویتامین E و C حرکت اسپرم را پس از ذوب بهبود داد. ویتامین E می‌تواند اتصال‌های کووالانتی را (اکسیدان‌ها بین زنجیره‌های جانبی اسیدهای چرب موجود در غشا تشکیل می‌دهند) بشکند و ویتامین C رادیکال‌های آزاد را مهار کند و اثر مخرب حاصل از گرم و سرد شدن را کاهش دهد.[۲۰] اوکازاکی و همکاران در مطالعه‌ای که بر تأثیر انجماد و ذوب روی اسپرم انسان مطالعه کردند و مشاهده کردند که پس از انجماد و ذوب حرکت کلاس A و B و C کاهش یافت، ولی حرکت کلاس نوع D بیش‌تر بود که از نظر کاهش تحرک مشابه نتایج حاصل از مطالعه حاضر بود.[۲۱]

تفاوت نتایج مطالعه‌ها در مورد موراتوری و همکاران با اضافه کردن گلوتاتیون پراکسیداز به نمونه‌های اسپرم حیوان‌های اهلی و خانگی، اثر افزایش حرکت را بعد از فرایند انجماد و ذوب در گروه همراه با گلوتاتیون نسبت به گروه شاهد نشان دادند.[۲۲] تأثیر آنتی اکسیدان‌ها بر کیفیت اسپرم می‌تواند به دلیل استفاده از دوز خیلی کم آنتی اکسیدان‌ها یا دوره کوتاه درمان باشد؛ زیرا مکمل‌ها باید به غلظت خاصی برسند تا روی تنش اکسیداتیو اثر بگذارد.[۲۳و۲۴] در مطالعه حاضر نیز افزایش معنی‌دار تحرک اسپرم در گروه‌های همراه با سلنیوم نسبت به گروه شاهد می‌تواند ناشی از تأثیر سلنیوم بر فسفریلاسیون اکسیداتیو میتوکندری اسپرم باشد.

در این مطالعه زنده مانی اسپرم به طور معنی‌داری در گروه‌های همراه با سلنیوم افزایش بیش‌تری را نسبت به گروه‌های بدون سلنیوم نشان داد. درستکار و همکاران در مطالعه‌ای دوزهای ۱ و ۲ میکروگرم سلنیوم را با ۱ میلی‌لیتر رقیق‌کننده به اسپرم گاو میش اضافه کردند. دوز ۱ و ۲ میکروگرم سلنیوم باعث بهبود تحرک و زنده مانی سلامت غشا شد و آسیب DNA اسپرم را کاهش داد با نتایج پژوهش حاضر همخوانی داشت.[۱۹]

براساس نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر گمان می‌رود سلنیوم باعث بهبود شاخص‌ها و زنده‌مانی اسپرم در فرایند انجماد و ذوب می‌شود.

❋ سپاس‌گزاری:

از همکاری بیماران شرکت‌کننده در مطالعه، صمیمانه قدردانی می‌شود.

❋ مراجع:

1. Rowe PJ, Comhaire FH. WHO manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male. UK: Cambridge: Cambridge Universitty Press; 2000. 930-5

2. World Health Organization. WHO manual for the standrise investigation and diagnosis of the infertal couple. UK: Cambridge: Cambridge University Press; 2000. 12-24

3. Anger J, Gilbert BR, Goldstein M. Cryopreservation of sperm: indication, methods and results. J Urol 2003 Oct; 170 (4 Pt 1): 1079-84

4. Petrunkina AM. Fundamental aspecta of gamete cryobiology. J Reproduktionsmed Endokrinol 2007; 4 (2): 78-91

5. Serviddio G, Bellanti F, Vendemiale G. Free radical biology for medicine: learning from nonalcoholic fatty liver disease. Free Radic Biol Med 2013 Aug 29; 65C: 952-968

6. Mahfouz R, Sharma R, Thiyagarajan A, et al. Semen characteristics and sperm DNA fragmentation in infertile men with low and high levels of seminal reactive oxygen species. Fertil Steril 2010 Nov; 94 (6): 2141-6

7. Hess RA, Renato de Franca L. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. Adv Exp Med Biol 2009; 636: 1-15

8. Kalthur G, Adiga SK, Upadhya D, et al. Effect of cryopreservation on sperm DNA integrity in patients with teratospermia. Fertil Steril 2008 Jun; 89 (6): 1723-7

9. Agarwal A, Saleh RA. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance and

treatment. Urol Clin North Am 2002 Nov; 29 (4): 817-27
10. Alvarez JG, Aitken RJ. Lipid peroxidation in human spermatozoa. In: Alvarez JG, Aitken RJ, editors. Studies on men's health and Fertility. 1st ed. New York: Humana Press; 2012. 119-130
11. Muino-Blanco T, Perez-Pe R, Cebrian-Perez JA. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. Reprod Domest Anim 2008 Oct; 43 Suppl 4: 18-31
12. Paradiso Galatioto G, Gravina GL, Angelozzi G, et al. May antioxidant therapy improve sperm parameters of men with persistent oligospermia after retrograde embolization for varicocele. World J Urol 2008 Feb; 26 (1): 97-102
13. Brown DG, Burk RF.Selenium retention in tissues and sperm of rats fed a Torula yeast diet. J Nutr 1973 Jan; 103 (1): 102-8
14. Kehr S, Malinouski M, Finney L, et al. X-ray fluorescence microscopy reveals the role of selenium in spermatogenesis. J Mol Biol 2009 Jun 26; 389 (5): 808-18
15. Chavarro JE, Toth TL, Wright DL, et al. Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic. Fertil Steril 2010 May 1; 93 (7): 2222-31
16. Lovercamp KW, Stewart KR, LinX, Flowers WL. Effect of dietary selenium on boar sperm quality. Anim Reprod Sci 2013 May; 138 (3-4): 268-75
17. Mohammadi S, Movahedin M, Mowla SJ. Antioxidant Effects of Selenium on Sperm Parameters and Testicular Structure in Young and Aged Mice. J Reproduction and Infertility 2009; Issue 3: 229-37 [In Persian]
18. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 5th ed. UK: Cambrige: Cambrige University Press; 2010. 56-8
19. Dorostkar K, Alavi-shoushtarri SM, Mokarizadeh A. Effect of invitro selenium addition to the semen extender on the spermatozoa characteristics befor and after freezing in water buffaloes. Veterinary Research Forum 2012; 3 (4): 263-8
20. Florin V, Ghioro L, Roman I, et al. Antioxidant medium for mangalita boar semen cryopreservation. Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies 2010; 67 (1-2): 445-51
21. Ozkavukcu S, Erdemli E, Isik A, et al. Effects of cryopreservation of sperm paramenters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. J Assist Reprod Genet 2008 Aug; 25 (8): 403-11
22. Muratori M, Luconi M, Marchiani S, et al. Molecular markers of human sperm functions. Int J Androl 2009 Feb; 32 (1): 25-45
23. Agarwal A, Said TM. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. BJU Int 2005 Mar; 95 (4): 503-7
24. Molina RI, Martini AC, Tissera A, et al. Semen quality and aging: analysis of 9.168 samples in Cordoba. Argentina. Arch Esp Urol 2010 Apr; 63 (3): 214-22