

بررسی تأثیر سلنیوم بر تغییرات ظرفیت آنتی اکسیدانی اسپرم موش‌های مسن و بالغ

شبنم محمدی^۱، دکتر منصوره موحدین^۲، دکتر سید جواد مول^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم تشریح، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشیار گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران (مؤلف مسؤول) تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۸۴۵۰۲ mansoureh@modares.ac.ir

۳- دانشیار گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: سلنیوم یک ماده آنتی اکسیدانی است که برای عملکرد طبیعی بیضه و انجام پروسه اسپرماتوژنیز ضروری می‌باشد. این ماده قادر به کاهش رادیکالهای آزاد اکسیژن می‌باشد و لذا انتظار می‌رود که در افزایش باروری مؤثر باشد. هدف از این مطالعه بررسی تغییرات ظرفیت آنتی اکسیدانی کل اسپرم موشهای مسن پس از تجویز ۰/۲ mg/kg سلنیوم بوده است.

روش بررسی: این پژوهش به شیوه تجربی و با آزمایش بر روی ۱۵ سر موش بالغ ۲-۳ ماهه و ۱۵ سر موش مسن ۱۰-۱۲ ماهه انجام شد. هر گروه سنی از موشها به صورت تصادفی به سه گروه (کنترل، شم و آزمون) تقسیم شدند. به گروه کنترل تزریقی انجام نشد. به گروه شم، هم حجم گروه آزمایش حلال سلنیوم (نرمال سالین) بصورت داخل صفاقی تزریق شد. موشهای گروه آزمون هر رده سنی (مسن و بالغ) ۰/۲ mg/kg سلنیوم بصورت داخل صفاقی دریافت کردند. تزریقات به مدت ۵ هفته، روزانه یک بار انجام گرفت. بعد از ۴۲ روز از شروع تزریقات موشها به روش در رفتگی مهره‌های گردن، کشته و پس از بدست آوردن اسپرم، میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی اسپرم با استفاده از روش FRAP اندازه‌گیری شد. میزان جذب $TPTZ-Fe^{2+}$ با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۳nm قرائت شد. سپس داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون کروسکال والیس و من ویتنی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح معنی‌داری $P<0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از این پژوهش تفاوت معنی‌داری را بین میانگین غلظت آنتی اکسیدانی اسپرم در گروه کنترل و آزمون هر دو گروه سنی نشان داد ($P<0/05$). همچنین مقایسه میانگین غلظت آنتی اکسیدانی در محلول اسپرم گروه کنترل بالغ ($742/26 \pm 1/06$) و گروه کنترل مسن ($672/06 \pm 0/78$) تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز ۰/۲ mg/kg سلنیوم به مدت ۳۵ روز ظرفیت آنتی اکسیدانی کل اسپرم موشهای مسن را بهبود می‌بخشد. با توجه به پایین بودن سطح آنتی اکسیدانها در موشهای مسن می‌توان پیشنهاد کرد که استرس اکسیداتیو منجر به کاهش سطح آنتی اکسیدانهای محلول اسپرم می‌شود. بنابراین تقویت دفاع آنتی اکسیدانی بعنوان یک راهکار در بهبود کیفیت اسپرم مردان مسن باید در نظر گرفته شود.

کلیدواژه‌ها: سلنیوم، آزمون FRAP، موش مسن، اسپرم.

وصول مقاله: ۸۷/۶/۲۴ اصلاح نهایی: ۸۷/۲/۱۴ پذیرش مقاله: ۸۸/۳/۱۰

مقدمه

برای بررسی سن تولید مثل در مردان، رت و موش، مدل‌های حیوانی مناسبی هستند، زیرا تفاوت‌های کمی در اسپرماتوژنیز انسان و جوندگان وجود دارد (۱). با افزایش سن موشها تغییرات دژنراتیوی در بافت بیضه به همراه کاهش در کیفیت اسپرم دیده می‌شود (۵-۲). از جمله عواملی که اثر سمی روی کیفیت اسپرم دارد زیاد

این ناهنجاریها در رابطه با افزایش شکنندگی کپسول میتوکندری اسپرم است (۱۲). بنابراین سلیوم برای ایجاد انرژی جهت حرکت اسپرم و همچنین برای اسپرماتوژنیز ضروری است (۱۲).

بیشتر آنتی اکسیدانها در طول حیات موجودات زنده با افزایش سن دچار تغییر می شوند (۱۳). تحقیقات Lopez و همکارانش نشان داد که فعالیت آنزیمهای آنتی اکسیدان کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز و گلوکاتایون ردوکتاز در پوست موشهای جوان و پیر مشابه است، در حالیکه فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز با افزایش سن کاهش می یابد (۱۳). Vohra و همکارانش تحقیقی روی ارتباط سن خو کچه های هندی با آنزیمهای آنتی اکسیدان سیستم عصبی مرکزی انجام دادند. آنها نشان دادند که فعالیت آنزیمهای سوپر اکسید دیسموتاز و گلوکاتایون ردوکتاز، در تمام نواحی سیستم عصبی مرکزی در حیوانات پیر کاهش پیدا می کند (۱۴).

همان طور که گفته شد سلیوم قادر به کاهش تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن می باشد (۷) و از اسپرم در برابر استرس اکسیداتیو جلوگیری می کند. از طرفی استرس اکسیداتیو با فرایند پیری در ارتباط است (۱۵) که با تجویز آنتی اکسیدانها می توان اثر آنها را خنثی کرد. در مطالعات انجام شده گزارشی مبنی بر تعیین دوز مناسب و تأثیرگذار سلیوم بر اسپرم موش مسن وجود ندارد و همچنین مشخص نشده است که آیا تجویز سلیوم باعث تغییر ظرفیت آنتی اکسیدانی و بهبود پارامترهای اسپرم موش مسن می شود یا نه؟ لذا هدف از تحقیق حاضر بررسی تغییرات ظرفیت آنتی اکسیدانی کل اسپرم موشهای مسن پس از تجویز ۰/۲ mg/kg سلیوم بوده است.

شدن رادیکالهای آزاد اکسیژن است که میزان کم آنها برای اسپرم ضروری است تا توانایی باروری را کسب کند ولی مقدار زیاد آنها باید دائماً غیر فعال شوند تا عملکرد سلول طبیعی بماند (۶). انواعی از آنتی اکسیدانها، رادیکالهای آزاد را خنثی می کنند (۶). دو نوع آنتی اکسیدان وجود دارد: آنتی اکسیدانهای پیشگیری کننده که شامل پروتئینهایی مثل آلبومین، سرولوپلاسمین و ... است که متصل به فلزات هستند و جلو تشکیل شدن ROS را می گیرند و به این ترتیب از شروع واکنش زنجیره ای جلوگیری می کنند در حالیکه آنتی اکسیدانهای جاروب کننده مثل ویتامین E، ویتامین C، آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز، سلیوم ROS بوجود آمده را حذف می کنند تا از غشا پلاسمایی در برابر پراکسیداسیون لیپید حمایت کنند (۷). آنتی اکسیدان سلیوم به مقدار زیاد در فرآورده های دریایی، جگر و غلات یافت می شود (۸). این عنصر برای سیستم آنتی اکسیدانی داخل سلولی به عنوان یک جزء ساختاری گلوکاتایون پراکسیداز است و به شکل گلوکاتایون پراکسیداز اثرات ویتامین E را تکمیل می کند (۹). بیضه یکی از ارگانهای مهم هدف برای سلیوم است (۱۰). غلظت سلیوم بافت بیضه در طول بلوغ با شروع اسپرماتوژنیز افزایش می یابد (۱۱). شاید علت غلظت بالای سلیوم در بیضه نقش حمایتی آن و نیز دخالتش در ساختمان آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز در طول اسپرماتوژنیز باشد (۱۱). سلیوم در ساخت سلنوپروتئینها شرکت می کند (۱۲). سلنوپروتئینها قسمت عمده ای از کپسول میتوکندری ناحیه میانی اسپرم را تشکیل داده است (۱۲). کمبود سلیوم در موش صحرایی، منجر به ایجاد تغییر شکل غیرطبیعی اسپرم (دمهای غیر طبیعی و بی حرکت) می شود. مشخص شده

روش بررسی

این مطالعه به صورت تجربی و بر روی مدل حیوانی (موش سوری) انجام شد. موشهای نر نژاد NMRI پس از خریداری از انستیتو پاستور تهران، برای تطابق با شرایط محیط به مدت ۲ هفته در حیوانخانه دانشگاه تربیت مدرس نگهداری شدند. حیوانات تحت شرایط استاندارد از نظر غذایی و محیطی قرار گرفتند. گروههای سنی مورد استفاده در این تحقیق عبارت بودند از:

۱۵ سر موش بالغ ۲-۳ ماهه و ۱۵ سر موش مسن ۱۰-۱۲ ماهه.

در این تحقیق سلنیوم به صورت سدیم سلنیت (Na_2SeO_3) از شرکت سیگما آلمان خریداری شد. سلنیوم به شکل تزریقی استفاده گردید که روشی آسان و مطمئن است. ابتدا دوز 0.2 mg/kg سلنیوم (براساس دوزیابی انجام شده در مطالعه قبلی رفرائس ۱۸) به موشهای گروه آزمایش مسن و بالغ تزریق شد و سپس بررسی بیوشیمیایی در روز ۴۲ بعد از تزریق انجام شد. به این منظور ۱۵ سر موش نر سوری ۱۰-۱۲ ماهه و ۱۵ سر موش ۲-۳ ماهه بطور تصادفی به ۳ گروه (کنترل، شم و آزمون) تقسیم شدند. تعداد موشها در هر گروه ۵ سر بود. به ۵ سر موش گروه کنترل تزریقی انجام نشد. به ۵ سر موش گروه شم، هم حجم گروه آزمایش حلال سلنیوم (نرمال سالین) بصورت داخل صفاقی تزریق شد. ۵ سر موش گروه آزمایش هررده سنی (مسن و بالغ) 0.2 mg/kg سلنیوم بصورت داخل صفاقی (*intraperitoneally*) دریافت کردند. با توجه به اینکه طول دوره اسپرما توژنزیس ۳۵ روز است، پس تزریقات به مدت ۵ هفته، روزانه یک بار انجام گرفت. به منظور تأثیرگذاری سلنیوم، بعد از ۱ هفته از اتمام تزریقات، ارزیابی بیوشیمی انجام شد. موشها به روش در رفتگی

مهره‌های گردن کشته و بعد از باز کردن حفره شکمی، ناحیه انتهایی اپیدیدیم آنها جدا شده و توسط قیچی کاملاً قطعه قطعه گردید. قطعات خرد شده آن در PBS (phosphate buffer saline) قرار گرفتند و به مدت ۲۰ دقیقه در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. بعد از خارج کردن نمونه از انکوباتور قطعات خرد شده اپیدیدیم از محلول بیرون آورده شد و محلول اسپرمی باقیمانده با دور $100 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس مایع رویی به کمک سمپلر دور ریخته شد و به رسوب اسپرمی باقیمانده ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات حاوی 0.1 مول EDTA اضافه شد (۱۶). این محلول در حجمهای مناسب در میکروتیوبهای 0.5 میلی‌لیتری تقسیم شدند و جهت مراحل بعدی به فریزر -80 درجه سانتیگراد منتقل گردید (۱۶).

اندازه‌گیری مقدار آنتی اکسیدانها با استفاده از روش Ferric reducing ability of plasma (FRAP) انجام شد که در سال ۱۹۹۶ توسط Benzie و Strain معرفی شد و یک تکنیک حساس، تکرار پذیر و دقیق است (۱۷). در این روش عوامل آنتی اکسیدان موجود در نمونه مورد مطالعه موجب احیاء کمپلکس فریک تری پیریدیل تریازین (TPTZ-Fe^{3+}) به فرم فرو (TPTZ-Fe^{2+}) می‌شوند که در محیط اسیدی آبی رنگ است و حداکثر جذب نوری آن در طول موج 593 nm می‌باشد و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری می‌شود. سرعت واکنش با قدرت احیاء کنندگی نمونه رابطه خطی دارد. در این روش Fe^{3+} به صورت مازاد استفاده می‌شود و عامل محدودکننده سرعت قدرت احیاء کنندگی نمونه است. محلولهای استاندارد در غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ میکرومولار تهیه شد و در نهایت $1/5$ میلی‌لیتر از محلول کار FRAP در یک

لوله آزمایش ریخته شد و ۵۰ میکرولیتر از نمونه استاندارد و نمونه مجهول به آن افزوده شد و کاملاً ورتکس گردید. پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد جذب نوری کلیه نمونه‌ها در طول موج ۵۹۳ nm در مقابل بلانک (غلظت صفر استاندارد) قرائت گردید و میزان FRAP در نمونه‌های مجهول بر اساس نمودار استاندارد محاسبه شد. به منظور افزایش دقت، آنالیز کلیه نمونه‌ها به صورت دوتایی (duplicate) انجام شد. نتایج حاصل از آزمایش بصورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (Mean $\pm$ SEM) بیان گردید. سپس داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS (version 15) و آزمون "کروسکال والیس" و "من ویتنی" مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح معنی داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

پس از رسم منحنی استاندارد میزان جذب و غلظت $TPTZ-Fe^{2+}$ ، غلظت آنتی اکسیدانی محلول اسپرمی موشهای گروه کنترل و آزمون در هر دو گروه سنی موشهای ۲-۳ ماهه و موشهای ۱۰-۱۲ ماهه اندازه‌گیری شد. همان طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود نتایج حاصل از مقایسه میزان تغییرات FRAP بین گروه کنترل مسن $672/0.61 \pm 0.78$ و گروه کنترل بالغ $742/26 \pm 1/0.6$ اختلاف معنی داری را نشان می‌دهد ($P < 0.05$). نتایج نشانگر آن است که با افزایش سن ظرفیت کل آنتی اکسیدانی اسپرم کاهش پیدا می‌کند.

میزان FRAP در موشهای گروه کنترل بالغ ۲-۳ ماهه $742/26 \pm 1/0.6$ میکرومول در لیتر محلول اسپرم و در موشهای گروه آزمون بالغ ۲-۳ ماهه $757/784 \pm 1/54$ میکرومول در لیتر محلول اسپرم بوده است، نتایج حاصل از مقایسه میزان تغییرات غلظت FRAP در این دو گروه

اختلاف معنی داری را نشان داد ($P < 0.05$) و مؤید آن بود که با تجویز آنتی اکسیدان سلنیوم، ظرفیت آنتی اکسیدانی افزایش پیدا می‌کند.

در موشهای گروه مسن ۱۰-۱۲ ماهه، چنانچه در جدول ۱ مشاهده می‌شود، میزان FRAP در موشهای گروه کنترل مسن ۱۰-۱۲ ماهه $672/0.61 \pm 0.78$ میکرومول در لیتر محلول اسپرم و در موشهای گروه آزمون مسن ۱۰-۱۲ ماهه $742/54 \pm 1/37$ میکرومول در لیتر محلول اسپرم بوده است، نتایج حاصل از مقایسه میزان تغییرات غلظت FRAP در این دو گروه نیز اختلاف معنی داری را نشان داد ($P < 0.05$). به این معنا که تجویز آنتی اکسیدان سلنیوم، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل اسپرم را افزایش می‌دهد. نتایج حاصل از مقایسه میزان تغییرات FRAP بین گروه آزمون مسن $742/54 \pm 1/37$ میکرومول در لیتر و گروه آزمون بالغ $757/784 \pm 1/54$ میکرومول در لیتر اختلاف معنی داری را نشان داد ($P < 0.05$). نتایج نشانگر آن است که در موش مسن تجویز سلنیوم باعث افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی اسپرم شد ولی این میزان به موش بالغ نرسید.

جدول ۱: مقایسه تغییرات FRAP در موشهای بالغ ۲-۳ ماهه و مسن ۱۰-۱۲ ماهه پس از تجویز ۰/۲mg/kg سلنیوم

گروه	میانگین FRAP بر حسب میکرومول در لیتر
کنترل مسن	$672/0.61 \pm 0.78$
شم مسن	$672/837 \pm 1/0.6$
آزمون مسن	$742/54 \pm 1/37^{cde}$
کنترل بالغ	$742/26 \pm 1/0.6$
شم بالغ	$740/0.7 \pm 1/54$
آزمون بالغ	$757/784 \pm 1/54^{ab}$

کنترل: موشهایی که هیچ دارویی دریافت نکرده‌اند.

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره چهاردهم / بهار ۱۳۸۸

حاضر اثرات سلیوم بر ظرفیت آنتی اکسیدانی اسپرم موشهای مسن و بالغ مورد مطالعه قرار گرفت.

گزارش شده کمبود سلیوم در رژیم غذایی رتها باعث آسیب لوله‌های منی ساز، کاهش تحرک و تعداد اسپرم می‌شود (۱۹). همچنین مطالعه‌ای که روی توان باروری اسپرماتوزوئید موشها صورت گرفت و در آنها کمبود سلیوم بصورت خوراکی باعث کاهش تحرک اسپرم شد (۲۰). از طرفی نتایج مطالعات دیگر نشان می‌دهد که میزان بالای سلیوم اثر نامطلوبی بر کیفیت اسپرم دارد. از جمله Kaur و همکاران گزارش کردند که دریافت مقدار بالای سلیوم (۸ ppm) به مدت ۶ هفته باعث کاهش وزن بیضه و افزایش مرفولوژی غیر طبیعی اسپرم می‌شود (۲۱). به طور مشابه Shalini و همکاران گزارش کردند که افزایش سلیوم دریافتی باعث مرفولوژی غیر طبیعی اسپرم می‌شود که خود به نحوی با استرس اکسیداتیو مرتبط است (۲۲). در تجویز آنتی اکسیدانها دوز مصرفی بسیار مهم است چرا که مشاهده شد که موش‌هایی که دوز بالا دریافت کرده بودند، تعداد واکوئل‌های زیادی در مقاطع بافتی بیضه داشتند که این نشان می‌دهد مقادیر بالای سلیوم سمی است (۱۸). در این موارد سلیوم خود با تولید ROS باعث توقف سیکل سلولی و افزایش فرایند آپوپتوز می‌شود (۲۳). پس، آنتی اکسیدان‌ها شمشیر دو لبه‌ای هستند که دوز و مدت زمان مصرف آنها مهم است (۲۴). استفاده از دوز نامناسب یا دوره کوتاه درمان آنها، حتی اثر معکوس دارد (۲۵).

چندین مطالعه اثر مثبت تجویز مقدار مناسب سلیوم را بر کیفیت اسپرم بخصوص تعداد اسپرم، میزان زنده ماندن اسپرم، تحرک اسپرم و مرفولوژی اسپرم نشان داده‌اند. از آن جمله Scott و همکاران گزارش کردند

که تجویز $40-30 \mu\text{g/day}$ سلیوم باعث بهبود کیفیت اسپرم و باروری می‌شود (۲۶). مطالعه Agarwal و همکاران نشان داد که تجویز خوراکی $225 \mu\text{g/day}$ از سلیوم به مدت ۳ ماه تحرک اسپرم را بهبود می‌بخشد (۲۷). مطالعه Castellini و همکارانش نشان داد که تغذیه خرگوشها با 0.5 ppm سلیوم باعث افزایش میزان آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز در پلاسمای منی می‌شود (۲۸). Yilmaz و همکارانش گزارش کردند که تزریق داخل صفاقی 0.2 mg/kg سلیوم و 10 mg/kg ویتامین E به رتها برای ۵ هفته، پراکسیداسیون لیپید را در بافت بیضه کاهش می‌دهد (۲۹). مطالعه حاضر با نتایج مطالعات فوق هم خوانی دارد.

بیشتر آنتی اکسیدان‌ها در طول حیات موجودات زنده با افزایش سن دچار تغییرات می‌شوند (۱۳). تحقیقات Lopez و همکارانش نشان داد که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز و گلوکاتایون ردوکتاز در پوست موش‌های جوان و پیر مشابه است، در حالیکه فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز با افزایش سن کاهش می‌یابد (۱۳). Cao و همکاران گزارش کردند که سطح آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز موجود در سلولهای لیدیگ موشهای ۲۴ ماهه نسبت به موشهای ۵ ماهه به طور معنی‌داری کاهش داشته است (۳۰). به طور مشابه تحقیقات Cameron و همکارانش نشان داد که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گلوکاتایون پراکسیداز با افزایش سن کاهش می‌یابد (۳۱) و استرس اکسیداتیو با فرایند پیری در ارتباط است (۱۵). با توجه به این نتایج آنها پیشنهاد کردند که استرس اکسیداتیو علتی برای کاهش کیفیت اسپرم موش مسن می‌باشد. نتایج تحقیق حاضر هم نشان داد که با افزایش سن، فعالیت

دفاع آنتی اکسیدانی بعنوان یک راهکار در بهبود کیفیت اسپرم مردان مسن باید در نظر گرفته شود.

آنزیم‌های آنتی اکسیدان اسپرم کاهش می‌یابد و تجویز سلنیوم این کاهش را بهبود می‌بخشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از زحمات و همکاری آقای ابوالفضل دادخواه دانشجوی دکتری بیوشیمی دانشگاه تربیت مدرس تهران تشکر و قدردانی نمایند. کلیه هزینه‌های این تحقیق از محل بودجه تحقیقاتی مصوب در دانشگاه تربیت مدرس تهران پرداخت شده است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز ۰/۲mg/kg سلنیوم به مدت ۳۵ روز ظرفیت آنتی اکسیدانی کل اسپرم موشهای مسن را بهبود می‌بخشد. با توجه به پایین بودن سطح آنتی اکسیدانها در موشهای مسن می‌توان پیشنهاد کرد که استرس اکسیداتیو منجر به کاهش سطح آنتی اکسیدانهای محلول اسپرم می‌شود. بنابراین تقویت

References

1. Kidd SA, Eskenazi B, Wyrobek AJ. Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature, *Fertil Steril* 2001; 75: 237-248.
2. Homonnai ZT, Fainman N, David MP, Paz GF. Semen quality and sex hormone pattern of 29 middle aged men. *J Androl* 1982; 14: 164-170.
3. Dondero F, Mazzilli F, Giovenco P, Lenzi A, Cerasaro M. Fertility in older men, *J Endocrinol Invest* 1985; 8: 87-91.
4. Centola GM, Eberly S. Seasonal variations and age-related changes in human sperm count, motility, motion parameters, morphology, and white blood cell concentration, *Fertil Steril* 1972; 72: 803-808.
5. Haidl G, Jung A, Schill WB. Aging and sperm function, *Hum Reprod* 1996; 11: 558-560.
6. Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SR, Said TM. Role of antioxidant in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed Online* 2004; 8: 616-627.
7. Agarwal A, Prabakaran SA, Said TM. Prevention of oxidative stress injury to sperm. *J Androl* 2005; 26: 654-660.
8. Schwatz S. Essentiality and metabolic function of Selenium. *Med Clin North Am* 1976; 60: 745-758.
9. Burk RF, Hill KE, Motley AK. Selenoprotein metabolism and function: evidence for more than one function for selenoprotein P. *J Nutr* 2003; 133: 151-178.
10. Behne D, Weiler H, Kyriakopoulos A. Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. *J Reprod Fertil* 1996; 106: 291-297.
11. Behne D, Hofer T, von Berswardt WR, Elger W. Selenium in the testis of the rat: studies on its regulation and its importance for the organism. *J Nutr* 1982; 102: 1682-1687.
12. Olson GE, Winfrey VP, Hill KE, Burk RF. Sequential development of flagellar defects in spermatids and epididymal spermatozoa of selenium-deficient rats. *Reprod* 2004; 127: 335-342.
13. Lopez M, Shindo Y, Packer L. Effect of age on antioxidants and molecular markers of oxidative damage in murine epidermis and dermis. *J. Int. Dermatol* 1994; 102: 476-480.
14. Vohra BP, Sharma SP, Kansal VK. Age-dependent variations in mitochondrial and cytosolic antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different regions of central nervous system of guinea pigs. *Indian J Biochem Biophys* 2001; 38: 321-326.
15. Jervis KM, Robaire B. The effects of long-term vitamin E treatment on gene expression and oxidative stress damage in the aging brown Norway rat epididymis. *Biol. Reprod* 2004; 71: 1088-1095.
16. Bauche F, Fouchard M.H, Jegou B. Antioxidant system in rat testicular cells. *FEBS Lett* 1994; 349: 392-396.

17. Benize IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of (Antioxidant Power): the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239: 70-76.
18. Mohammadi Sh, Movahedin M, Mowla S.J. The effects of selenium antioxidant activity on sperm parameters and testis structure in aging and adult male mice. *Medical Journal of Reproduction & Infertility* 2008; 3: 230-238.
19. Olson GE, Winfrey VP, Hill KE, Burk RF. Sequential development of flagellar defects in spermatids and epididymal spermatozoa of selenium-deficient rats. *Reprod* 2004; 127: 335-342.
20. Sanchez-Gutierrez M, Garcia-Montalvo E.A, Izquierdo-Vega J.A, Del Razo L.M. Effect of dietary selenium deficiency on the in vitro Fertilizing ability of mice spermatozoa. *Cell Biol Toxicol* 2008; 24: 321-329.
21. Kaur R, Parshad VR. Effects of dietary selenium on differentiation, morphology and functions of spermatozoa of the house rat. *Rattus rattus, L. Mutation Res* 1994; 309: 29-35.
22. Shalini S, Bansal M.P. Dietary selenium deficiency as well as excess supplementation induces multiple defects in mouse epididymal spermatozoa: understanding the role of selenium in male fertility. *International journal of andrology* 2008; 31: 438-44.
23. Kaushal N, Bansal MP. Dietary selenium variation-induced oxidative stress modulates CDC2/cyclin B1 expression and apoptosis of germ cells in mice testis. *J Nutr Biochem* 2007; 18: 553-564.
24. Kaur R, Kaur K. Effects of dietary selenium on morphology of testis and cauda epididymis in rats. *Indian J Pharmacol* 2000; 44: 265-272.
25. Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SR, Said TM. Role of antioxidant in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed Online* 2004; 8: 616-627.
26. Scott R, MacPherson A, Yates RW, Hussain B, Dixon J. The effect of oral selenium supplementation on human sperm motility. *Br J Urol* 1998; 82: 76-80.
27. Agarwal A, Prabakaran SA, Said TM. Prevention of oxidative stress injury to sperm. *J Androl* 2005; 26: 654-660.
28. Castellini C, Lattaioli P, Bosco AD, Beghelli D. Effect of supranutritional level of dietary α -tocopheryl acetate and selenium on rabbit semen. *Theriogentology* 2002; 58: 1723-1732.
29. Yilmaz O, Celik S, Dilsiz N. Influences of intraperitoneally and dietary administered vitamin E and selenium on the lipid composition in reproductive organs of male animals. *Biol Chem* 1997; 378: 425-430.
30. Cao L, Sucheta SL, Azhar S. Aging alters the functional expression of enzymatic and non-enzymatic antioxidant defence systems in testicular rat leydig cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004; 88: 61-67.
31. Cameron P, Robaire W, Robaire B. Spermatozoa have decreased antioxidant enzymatic capacity and increased reactive oxygen species production during aging in the brown norway rat. *J Androl* 2007; 28: 229-240.