مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد
سال یازدهم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۸۲، ص

مقایسه پارامترهای اسپرم ۵۰ نمونه انزال از دو روش Wet Preparation و Makler-Staining

دکتر محمد علی خلیلی [۱]، نعیمه گلدانساز [۲]، نیلوفر ایوبی [۳]

چکیده

مقدمه: آنالیز مایع انزال (Semen Analysis) و بررسی دقیق پارامترهای اسپرم شامل تعداد، درصد تحرک و مورفولوژی طبیعی اسپرماتوزوئید به خصوص در مردان نابارور از اهمیت ویژه ای برخوردار است. امروزه، به طور معمول انتخاب بسیاری از روشهای درمانی (Assisted Reproductive Technology) ART بر اساس وضعیت پارامترهای اسپرم تصمیم‌گیری می‌شود. بنابراین، آنالیز مایع انزال باید به دقت و به وسیله یک روش سریع، استاندارد و کم هزینه انجام پذیرد. در برخی از آزمایشگاههای ایران بدون در نظر گرفتن روشهای معتبر، آنالیز مایع انزال انجام می‌گیرد و پارامترهای اسپرم از طریق روشهای غیراستاندارد نظیر Wet Preparation (روش لام میکروسکوپی) مورد مطالعه قرار می‌گیرد. بنابراین، هدف این تحقیق مقایسه دو روش Wet Preparation با Makler Staining – در جهت ارزیابی پارامترهای اسپرم و سلولهای گرد نمونه انزال مردان بوده است.

روش بررسی: این مطالعه از نوع آینده‌نگر و بر روی ۵۰ نمونه انزال به صورت Blind با دو روش Wet و Makler در مردان مراجعه‌کننده به مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری یزد صورت گرفت. جهت روش Wet یک قطره ۱۰ میکرونی از نمونه اسپرم روی لام میکروسکوپی قرار داده و پارامترهای اسپرمی و سلول گرد سنجیده شدند. جهت روش Makler از وسیله Makler Chamber و رنگ‌آمیزی Geimsa استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که میانگین تعداد اسپرم، درصد تحرک پیشرونده و درجا در دو روش فوق از نظر آماری تفاوت معنی‌دار نداشت. اما، درصد مورفولوژی طبیعی اسپرم و سلول گرد در دو روش فوق دارای تفاوت معنی‌دار بود (به ترتیب $p=0.001$ و $p=0.002$). بیشترین نقایص مربوط به درصد مورفولوژی طبیعی اسپرم بود که برای مثال ۵ نمونه از روش Wet و تعداد ۳۲ نمونه از روش Makler وضعیت غیر طبیعی را طبق WHO نشان داد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج حاصله، مورفولوژی اسپرم و سلولهای گرد را باید با دقت بیشتری مورد مطالعه قرار داد که نیاز به رنگ‌آمیزی نمونه دارد. بنابراین آنالیز مایع انزال را باید حتی المقدور با روش Makler – Staining انجام داد تا بتوان یک گزارش صحیح را ارایه نمود.

واژه‌های کلیدی: آنالیز سیمن، اسپرم، Wet Preparation،Makler-Staining

مقدمه

امروزه، بیش از ۵۰ میلیون نفر از مردم دنیا به نحوی با مشکلات ناباروری در برهه‌ای از زندگی خود روبرو هستند و بدین جهت زوجین نابارور به طور دایم به دنبال درمانی مناسب جهت رفع نازایی خود می باشند. به طور معمول، اولین آزمایش زوج نازا در نظر گرفته [۱] و با توجه به موارد فوق و مطالعات گسترده توسط سازمان بهداشت جهانی و محققین باید با کنترل کیفی مناسب‌ترین روشی را که نیازمند به تجهیزات گسترده نباشد مورد ارزیابی قرار داد. ولی در بعضی موارد نتایج آزمایشات مایع انزال از آزمایشگاههای تشخیصی با یکدیگر همخوانی ندارد و بدین جهت گاهاً باعث سردرگمی بیمار می شود و متخصصین درمان ناباروری را با مشکل روبرو می سازد. آزمایشگاهها از روشهای متفاوتی جهت بررسی مایع انزال استفاده می کنند که برخی از آن‌ها بر اساس دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی و یا مراکز پیشرفته نابارروی نمی‌باشد. مهمترین متغیرهای مورد بررسی در هر آنالیز تعداد اسپرم به همراه وضعیت تحرک و مورفولوژی اسپرم و سلول گرد می‌باشد [۲].

Makler و همکاران گزارش نموده‌اند که انجام کنترل کیفی جهت آنالیز اسپرم به منظور کاهش اختلاف در شیوع مربوط به پارامترهای اسپرم به

۱- استادیار گروه علوم تشریحی و جنین شناسی
۱- مرکز تحقیقاتی درمانی ناباروری
۲و۳ ـ دانشجوی پزشکی عمومی
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید صدوقی یزد

که توسط متخصص درخواست می‌شود آنالیز مایع انزال می‌باشد تا بتوان علت مربوط به ناباروری اولیه را به استناد نتایج حاصله از آنالیز انزال شناسایی نمود. بنابراین با استفاده از یک روش غیراستاندارد جهت بررسی آنالیز ممکن است که متخصص امر درمان ناباروری نتواند مناسب‌ترین روش درمانی را جهت

www.SID.ir

خصوص وضعیت مورفولوژی در نتایج مربوط به گزارش پارامترهـای اسپرمی ضروری است. در ضمن، با دقت و همچنیـن بـهبودی روشـهای بررسـی آنـالیز اسپرم توسط مسئولین آزمایشگاه می‌توان نتایج مربوط را به صورت مناسب‌تری گزارش نمود تا بدین‌وسیله به متخصصین نیز در انتخاب روش درمـانی مناسـب یاری نمود [۳]. همچنیـن بیشـترین اختـلاف مربـوط بـه تحـرک و مورفولـوژی اسپرم می‌باشد که احتمالاً در انتخاب روش درمانی و نتایج حاصله تأثیر مستقیم دارد. WHO و Makler همگـی در مـورد آمـوزش تکنیسـین‌های آزمایشگاهی تأکید دارند تا بتوان دقت کار و صحـت گـزارش در آنـالیز مـایع اسپرم را افزایش داد و در این راستا نباید از انتخاب روشهای استاندارد و متغـیر غافل شد. برای مثال، مطالعه مورفولوژی اسپرم نیاز بـه فیکـس نمـودن و رنـگ آمیزی اختصاصی دارد تا بتـوان در اسـرع وقـت حداقـل تعـداد یکصـد اسـپرم مطالعه شوند [۳و٤].

روش بررسی

این مطالعه از نوع آینده نگر و بر روی ۵۰ نمونه انزال از مردان مراجعـه کننده به مرکز تحقیقاتی درمانی نابـاروری یـزد جـهت درمـان صـورت گرفتـه است. مراجعین در محدوده‌ی سنی ۵۰-۲۰ سـال قـرار داشـتند. نمونـه انـزال در یک ظرف دهانه گشاد و استریل جمع‌آوری شده، ضمن اینکه اصول مربوط به روش نمونه‌گیری و حفظ و نگهداری نمونه در آزمایشگاه نیز کـاملا" رعـایت شدند. پس از نگهداری نمونه انزال در انکوباتور ۳۷ درجه برای ۱۵-۱۰ دقیقـه، اطلاعات ماکروسکوپی جمع‌آوری شده و سپس جهت آنالیز اسپرم، هر نمونـه به دو بخـش مسـاوی تقسـیم و گـروه اول Wet (W) و دوم Makler (M) نامیده شد.

اطلاعات ماکروسکوپی

در مرحله اول حجم هر نمونه به میلـی لیـتر گـزارش گردیـده سـپس بـا قـرار دادن کـاغذ PH، میزان آن مشخص گردیـد. وضعیـت ویـسکوزیتی بـا اسـتفاده از سـه سـمپلر انجـام و بـه سـه وضعیت Mild, Normal و High تقسیم شد.

اطلاعات میکروسکوپی نمونه های Wet

جهت مطالعه پارامترهای اسپرم، پس از مخلوط نمودن نمونه، یک قطره به حجم ۱۰ میکرولیتر روی لام میکروسکوپی قرار داده و تعداد اسپرم، درصـد تحرک پیشـرونده و درجا،درصـد مورفولـوژی طبیعی اسـپرم و تعـداد سـلول گـرد در هـر شـان میکروسکوپی مشخص گردید. در روش Wet، ارزیابی تمام موارد فوق بدون فیکس نمـودن و یا رنگ آمیزی صورت گرفت.

اطلاعات میکروسکوپی نمونه های Makler-Staining

جهت بررسی پارامترهای تعداد اسپرم به همراه وضعیـت تحـرک از وسـیله Makler Chamber استفاده شد. این وسیله دارای دو قسمت می باشد که قسمت اصلی آن شـامل یـک پایه فلزی است که در مرکز آن یک دیسکت پهن می‌باشد که نمونه اسپرم روی آن قرار می‌گـیرد. در قسمت بالای دیسک یک شیشه مدرج قرار دارد که مساحت آن یک میلی متر مربـع بـوده و بـه یکصد مربع تقسیم شده است. با قرار دادن یک قطره بـه حجـم ۱۰میکـرون در مرکـز دیسـک و بـا بزرگنمایی ۲۰۰ میکروسکوپ نوری وضعیت اسپرمهای متحـرک پیشـرونده و درجـا در ۱۰ یـا ۲۰ مربع شمرده شده و درصد آنها محاسبه می شود. جهت بررسی تعداد اسـپرم، در مرحلـه اول مقـدار کمی از مایع سیمن در لوله فالکن ریختـه و لولـه را در ظـرف آب داغ قـرار داده تـا اسـپرم‌ها فـاقد تحرک شـوند. یـک قطـره ۱۰ میکرولیـتر از ایـن نمونـه روی وسـیله Makler قـرار و بـا بزرگنمایی ۲۰۰ تعداد کل اسپرم‌ها در ۱۰ مربع شمارش شده کـه بیـانگر تعـداد اسپرم به میلیون در یک میلی لیتر نمونه انزال است. جهت بررسـی مورفولـوژی اسپرم و تعداد سلولهای گرد نیـازی بـه اسـتفاده از وسـیله Makler نمی‌باشـد. یک یا دو لام میکروسکوپی از نمونه تهیه شده و پس از خشک شدن بـا متـانل برای حدود ۵ دقیقه ثابت گشته و بـه روش پیشـنهادی WHO و بـا اسـتفاده از Geimsa نمونه رنگ‌آمیزی شد. سپس لامها در محلول بافر فسفات قـرار داده (۵ دقیقه) تا رسوبات اضافی رنگ از روی لام پاک شوند. پس از خشک شدن لامها و چسباندن لامل، مطالعه میکروسکوپی با بـزرگنمـایی ۴۰۰ و ۱۰۰ انجـام شد. با شمارش یکصد اسپرم، وضعیت مورفولـوژی طبیعـی بـه درصـد محاسـبه شد. در نهایت،تعداد سلولهای گرد به ازای هر یکصد اسپرم مشاهده شـده و بـا استفاده از فرمول WHO تعداد سلول گرد به میلیون در هر میلی لیتر مایع انزال محاسبه گردید. لازم بـه ذکـر اسـت جـهت کـاهش مـیزان خطـا، بـه وضعیـت مورفولیک سلولها توجه شده و فقط سلولهای گرد هسته‌دار وارد مطالعه شـدند و بقیه که فاقد هسته بودند از مطالعه خارج شدند.

اطلاعات حاصله با استفاده از نرم‌افزار SPSS تجزیـه و تحلیـل شـدند. جهت سلولهای گـرد در دو گـروه M و W از تسـت Mann-Whitny و از آزمون Chi-Square جهت تجزیه و تحلیل پارامترهای اسپرمی استفاده شد.

نتایج

نتایج نشان داد که میانگین حجم مایع انزال ۲/۲ ±۳/۷ میلی‌لیتر بود که حداقـل حجـم ۰/۵ میلی‌لیـتر در یـک مـورد و حداکـثر ۸ میلی‌لیـتر در ۳مـورد مشـاهده شـد. میـانگین PH مـایع انـزال ۰/۵ ± ۷/٤ بود یا حداقل ۷/۲ در ۳ مورد و حداکثر ۸ که در تعـداد ۱۰ نمونـه دیـده شـد. در ضمـن، ویسـکوزیتی Normal در ٤۳ مورد وجود داشت و ویسکوزیتی Mild و High به ترتیب در۵ و ۲ مـورد مشاهده گردید.

جدول (۱) بیانگر وضعیت پارامترهـای اسپرم می‌باشـد کـه نشـان می‌دهـد کـه میانگین تعداد اسپرم، همچنین تحرک پیشرونده و درجـا در دو گـروه Wet و Makler – Staining تقریباً یکسان بوده و تفاوت معنی داری وجود ندارد. اما قابل توجه است که درصد مورفولوژی طبیعـی اسپرماتوزوئید در دو گـروه فوق دارای تفاوت معنی داری بود (p=0.001). همچنین میانگین تعداد سلول

Archive of SID

www.SID.ir

گرد در گروه Wet ۵/۸۱ میلیون بود ولی تعداد سلول گرد در گروه Makler ۳/۱۵ میلیون در هر میلی لیتر نمونه انزال بود(p=0.002).

جدول (۲) بیانگر میزان حداقل و حداکثر پارامترهای اسپرم در دو گروه می باشد. تعداد ۵۰ نمونه از روش Wet و ۳۲ نمونه از روش Makler Staining – وضعیت غیر طبیعی را طبق WHO نشان دادند که این تفاوت فاحش می‌تواند در ارایه گزارش آنالیز اسپرم و تصمیم جهت انتخاب روش درمانی مناسب مشکل ساز شود. عدم وجود سلولهای گرد در دو گروه فوق به ترتیب در ۱ و ۹ مورد مشاهده گردید.

جدول ۱: وضعیت پارامترهای اسپرم در دو روش Wet و Makler

متغیر	Makler – Staining	Wet	P.Value
تعداد اسپرم ($X10^6$)	۱۰۱/۳۰ ± ۶۰/۰۴	۹۹/۸۱± ۷۰/۰۷	۰/۲۵۳
حرکت پیشرونده (٪)	۵۹/۸۷± ۲۰/۵۹	۶۱/.۰± ۱۷/۳۸	۰/۱۶۴
حرکت درجا (٪)	۲۰/۹۶± ۹/۴۹	۲۰/۷۲ ± ۶/۱۱	۰/۰۱۲
مورفولوژی طبیعی (٪)	۲۳/۲۴± ۱۰/۱۲	۵۱/۲۰± ۱۷/۲۰	۰/۰۰۱
سلول گرد (٪)	۵/۸۱± ۲/۲۱	۳/۱۵± ۲/۸۱	۰/۰۰۲

جدول ۲: وضعیت حداقل و حداکثر پارامترهای اسپرم در دو روش Wet و Makler

متغیر	Wet	Makler – Staining
تعداد اسپرم ($X10^6$)	۴-۲۴۵	۱۱-۲۲۵
حرکت پیشرونده (٪)	۵-۵۹	۶-۹۳
حرکت درجا (٪)	۱۰-۳۵	۷-۳۴
مورفولوژی طبیعی (٪)	۱۵-۸۵	۱۳-۵۲
سلول گرد (٪)	۰-۱۹	۰-۲۱

بحث

یکی از مهمترین فاکتورهای دخیل در شناسایی وضعیت باروری یک زوج نابارور و همچنین انتخاب مناسب ترین روش درمانی، مطالعه آنالیز مایع انزال می‌باشد. این آزمایش که از سالها پیش مورد تحقیق و بررسی قرار گرفته، با ابداع روشهای پیشرفته ART مورد توجه خاصی واقع شده است چرا که معمولاً روش درمانی بر اساس نتیجه حاصله از آنالیز مایع انزال تعیین می‌شود. در این راستا سازمان بهداشت جهانی نیز طریقه جمع‌آوری نمونه انزال توسط بیمار،همچنین روش انزال اسپرم و بررسی پارامترهای اسپرمی را در سری کتابهای WHO ارایه نموده است. آنالیز مایع انزال باید توسط تکنیسین خبره و با استفاده از یک روش استاندارد و کم هزینه و در فاصله یک ساعت انجام گیرد تا بتوان نتیجه را در اسرع وقت به متخصص امر اعلام نمود [۱و۴]. محققین از مراکز متعدد مطالعات گسترده ای را بر روی جزئیات مایع انزال و بالاخره عوامل دخیل در سرنوشت باروری انجام داده‌اند. در همین راستا نتایج متفاوتی از آزمایشگاههای تخصصی دنیا گزارش شده است. آنها بیان داشته‌اند که آموزش تخصصی تکنیسین‌های آزمایشگاه، بررسی و کنترل کیفی آزمایشگاه آندرولوژی و دقت در بررسی آنالیز سیمن می‌تواند نتایج صحیح را در رابطه با وضعیت پارامترهای اسپرم بیان دارد. البته نباید از انتخاب روش استاندارد جهت مطالعه موارد فوق غافل شد. مؤسسه معتبر بین المللی Jones آمریکا، استفاده از سیستم کامپیوتری CASA را مناسب‌ترین وسیله جهت مطالعه تحرک و تعداد اسپرم را می‌داند که در صورت عدم دسترسی به‌آن باید از وسیله ساده و کم هزینه Makler Chamber استفاده شود. در ضمن، مطالعه مورفولوژی اسپرم طبق دستور WHO، نیاز به فیکس نمودن و رنگ آمیزی، اولین گام در شناسایی ساختار مورفولوژیکی اسپرم می باشند و باید در موارد خاص به خصوص برای زوجین نابارور با مشکل نامعلوم (Unexplained) حتماً از رنگ‌آمیزی‌های فلورسنتی Chromomomycin A3, Aniline blue و یا Acridne orange استفاده نمود تا بتوان ساختمان بخش اصلی اسپرم یعنی هسته را مطالعه نمود [۵و۴]. در یک مطالعه گسترده، نقش اسپرماتوزوئید در نتایج باروری مورد بررسی قرار گرفت که با استفاده از نمونه های انزالی با پارامترهای اسپرم طبیعی، باروری در حد ۶۷/۴٪ حاصل گردید. این در حالی بود که در وضعیت تراتوزسپرمی (مورفولوژی طبیعی کمتر از ۳۰٪) با IVF هیچگونه باروری حاصل نگردید. بنابراین یکی از فاکتورهای بسیار مهم و حیاتی، مورفولوژی طبیعی اسپرم است که طبعاً در نتایج مربوط به باروری و حاملگی

Archive of SID

www.SID.ir

دخیل می‌باشد. از آنجا که در روش Wet، اسپرمها در حال حرکتند و با نمونه ثابت و رنگ آمیزی نشده، فقط می توان به طور تخمینی وضعیت مورفولوژی اسپرم را حدس زد که از واقعیت به دور می‌باشد. نقش مورفولوژی اسپرم به خصوص در روش درمانی IVF حایز اهمیت است [۶]. در سال ۱۹۹۲، Parelmo و همکاران گزارش نمودند که هیچیک از پارامترهای اسپرم به تنهایی به عنوان عامل مخدوش کننده محسوب نمی‌شوند، بلکه هر سه فاکتور با هم در نتایج بارروی دخیل هستند، اما با این حال نباید از نقش مخدوش‌کننده تراتوزسپرمی شدید غافل شد. پارامتر مورفولوژی اسپرم نه تنها در لانه گزینی بلکه در کاهش حاملگی و افزایش سقط جنین دخیل است [۷]. جالب توجه آنکه Tasdemir و همکاران بیان نمودند آنومالی سر اسپرم بیشترین نقش را در کاهش باروری ایفا می کند و بالعکس آنومالیهای ناحیه قطعه میانی نقش ویژه‌ای را در نتایج باروری ندارند. احتمالاً آنومالی ناحیه سر اسپرم نشان دهنده‌ی اختلالات درونی سلول می‌باشد که می‌تواند پتانسیل باروری اسپرم را تحت تأثیر خود قرار دهد. برای مثال Lee و همکاران اختلالات کروموزومی را در آنومالی سر بزرگ و یا کوچک مشاهده نکردند، ولی اینگونه اختلالات را در حد بسیار بالا در سرهایی بی‌شکل (Amophous) گزارش نمودند. بنابراین شمارش تعداد بی‌شماری از اسپرماتوزوئید در نمونه انزال رنگ آمیزی شده و توجه خاص به ساختار آناتومیکی ناحیه سر حایز اهمیت می‌باشد [۸]. در آنالیز مایع انزال علاوه بر مطالعه پارامترهای اسپرم باید تعداد و نوع سلولهای گرد را گزارش نمود. سازمان بهداشت جهانی تنها یک روش را جهت شمارش سلولهای گرد پس از رنگ‌آمیزی نمونه پیشنهاد نموده است که در این مطالعه از آن استفاده شد و اختلالات فاحش بین دو روش Wet و Makler – Staining بیانگر تفاوت در شناسایی اینگونه سلولها در دو روش فوق بوده است. در ضمن، باید فقط سلولهای رنگ شده با هسته را جزو سلولهای گرد محاسبه نمود و توده‌های سیتوپلاسمی که فاقد هسته هستند را از دور مطالعه حذف نمود. تشخیص و افتراق توده های سیتوپلاسمی در روش Wet مشکل می‌باشد. این توده‌ها معمولاً در طی دوره اسپرمیوژنز به وجود آمده و مشخصه‌ی عفونت و یا وجود سلولهای جنسی نمی‌باشند [۷]. در ضمن باید توجه داشت نظر به اهمیت نوع سلولهای گرد، WHO پیشنهاد نموده است که از تست‌های پیشرفته حیاتی نظیر Hydrogen Peroxide و یا Monoclonal استفاده شود. شایان ذکر است که مراکز تخصصی نازایی روش دوم را ارجح می‌دانند چرا که علاوه بر تشخیص اولیه و تفکیک سلولهای گرد به دو گروه سلولهای جنسی و گلبولهای سفید، نوع WHO را نیز مشخص می کند تا بتوان در صورت نیاز، درمان با آنتی بیوتیک مناسب را قبل از شروع درمان ART آغاز نمود [۴].

با توجه به نتایج حاصله از این تحقیق و دیگر تحقیقات از مراکز ناباروری، روش Makler – Staining جهت آنالیز مایع انزال ارجح می‌باشد چرا که علاوه بر هزینه کم دارای دقت عمل نیز می باشد که می تواند گزارش صحیح از بررسی مایع انزال را به پزشک مربوطه ارایه نماید تا بدین‌وسیله بتوان با استناد به نتایج حاصله از آنالیز اسپرم دیگر آزمایشگاههای تخصصی به درمان زوج پرداخت. شایان ذکر است که در صورت عدم دسترسی به وسیله Makler می‌توان از روش Wet جهت بررسی تحرک استفاده نمود و وضعیت دیگر پارامترها و سلولهای گرد را با رنگ‌آمیزی نمونه مورد ارزیابی قرار داد.

Archive of SID

References

1- Zarmakoupis – Zavos P.N, Correa JR, Zarmakoupis CN, Zavos P. ***Multiple ejaculate collection via the use of a semen collection device at intercourse versus masturbation***. Mid East Fert Soc J. 1996, 4: 228-236.

2- Macleod J, Gold RZ. ***The male Factor in fertility and infertility. VI, semen quality and certain factors in relation to ease of conception.*** Fertil Steril, 1953, 4: 10-16.

3- Makler A. ***The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation.*** Fertil Steril 1980, 33; 337-8.

4-World Health Organization. ***WHO laboratory manual for the examinaion of human seman and***

www.SID.ir

sperm cervical mucus interaction. 4th ed. NewYork Cambridge university press, 1999, injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet 1992; 340: 17-78.

5- Oehniger S, Kruger T. ***The diagnosis of male infertility by semen quality***. Hum Reprod 1995; 10: 1037-41.

6- Terriou P, et al ***Tratozoospermia influence fertilixation rate in vitro but not embryo quality.*** Hum Reprod 1997; 12: 1069-72.

7- Pryor J, Parsons J, Goswamy R, et al. ***In vitro fertilization from men with obstructive azoospermia.*** Lancet 1984; 2: 762.

8- Tasdemir I, et al. ***Outcome of ICSI with totally morphological abnormal spermatozoa.*** Hum Reprod 1996; 11: 208-12.

9-Wolf H, Anderson DJ. ***Immunihistologic characterzation and quantititation of leukocyte subpopulation in human semen.*** Fertil Steril. 1998, 49: 497-504.

Archive of SID

www.SID.ir