

Ruolo di un'associazione tra antiossidanti e stimolanti immunitari naturali nel trattamento dell'astenoteratospermia con leucocitosi.

Evaluation of treatment with natural antioxidant and beta glucan in men affected by asthenoteratospermia and abacterial leukocytosis.

Laura Gambera, Giovanna Campanella, Paola Piomboni, Serafini Francesca.

Giuseppe Morgante, Vincenzo De Leo.

Centro Sterilità di Coppia, Dipartimento di Ginecologia e Ostetricia, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese.

Autore corrispondente:

Prof. Vincenzo De Leo

Dip. Pediatria, Ostetricia e Medicina della Riproduzione,

Policlinico Le Scotte,

Viale Bracci, Siena.

0577-586606,;deleo@unisi.it.

RIASSUNTO

Obiettivo:

La presenza di un elevato numero di leucociti nel liquido seminale, osservata più frequentemente nei maschi infertili rispetto ai controlli normali, è associata ad alterazioni strutturali e funzionali degli spermatozoi. La risposta infiammatoria determinata dall'attivazione delle cellule del sistema immunitario porta ad una aumentata produzione di metaboliti reattivi dell'ossigeno non sempre controbilanciata dall'aumento dell'attività delle difese antiossidanti. Il contatto tra radicali liberi e spermatozoi, durante le fasi di maturazione e migrazione dai tubuli seminiferi all'epididimo, può causare danni a livello delle strutture assonemali, acrosomali e nucleari portando a necrosi e conseguente teratospermia. Sono stati valutati gli effetti dell'attività immunomodulante e antiossidante del beta glucano, della papaia, della lattoferrina in associazione a vitamine C ed E sulle caratteristiche spermatiche di pazienti affetti da astenoteratospermia associata a leucocitosi di origine batterica.

Metodi:

Sono stati selezionati 20 pazienti afferenti presso il Centro di Sterilità di Coppia, dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, per sottoporsi ad analisi del seme che presentavano una concentrazione di leucociti nel liquido seminale superiore a 1×10^6 . La valutazione dei parametri spermatici è stata eseguita secondo le indicazioni WHO (1999) utilizzando la colorazione di Papanicolau modificata e la colorazione mediante eosina, un mese prima e dopo trattamento con beta glucano, lattoferrina, papaia e vitamine C ed E.

Risultati:

Dopo 90 giorni di trattamento è stata osservata una riduzione significativa della concentrazione di linfociti presenti nel liquido seminale associata ad un incremento della percentuale di forme morfologicamente normali e della motilità progressiva totale degli spermatozoi.

Conclusioni:

L'azione sinergica dell'attività immunomodulante e antiossidante sembra aver determinato una protezione degli spermatozoi sia durante la maturazione che durante la migrazione lungo le vie seminali portando ad un recupero della funzionalità spermatica.

Parole chiave: astenoteratospermia, leucocitospermia, antiossidanti, beta glucano, papaia, lattoferrina, vitamina C, vitamina E.

ABSTRACT

Objective:

Leukocytes are often present in human seminal plasma and more frequently in infertile men. Leukocytospermia is associated with sperm morphological and functional alteration. Immune cell activation cause an increase of free radical production, without any antioxidant defence activation. Leukocyte presence during sperm maturation and migration through male genital tract and consequently exposure to reactive oxygen species led to sperm alteration: axonemal, acrosomal and nuclear structure damage, associated with necrosis. In order to evaluate the immune-modulating and anti-oxidative activity of beta-glucane, fermented papaya and lactoferrin associated with C and E vitamins, we analysed sperm characteristics of selected infertile male with asthenoteratospermia and abacterial leukocytosis.

Methods:

We select 20 patients referred to our sterility centre for semen analysis with leukocyte concentration higher than 1×10^6 cell/ml. Seminal quality evaluation was performed according to WHO guidelines (1999) using Papanicolau and Eosin staining, before and after three months of treatment with beta glucan, papaya, lactoferrin, vitamin C and E.

Results:

After therapy, seminal analysis showed a significant reduction of leukocyte concentration and an increase of sperm motility and normal sperm morphology.

Conclusion:

Our results suggest that a combined immunomodulating and antioxidant treatment protect sperm cells during maturation and migration through male genital tract, resulting in a functional rescue demonstrated by the improvement of semen quality.

Key words: asthenoteratospermia, leukocytosis, antioxidant, beta glucan, papaya, lactoferrin, vitamin C, vitamin E.

INTRODUZIONE

Numerosi fattori possono influenzare negativamente la capacità riproduttiva di un uomo, determinando condizioni di infertilità transitorie o definitive.

Elevate concentrazioni di leucociti sono frequentemente presenti nel liquido seminale, anche in assenza di sintomi infiammatori e possono essere segni indiretti di un'infezione virale, di traumi testicolari passati o di varicocele. Sebbene le cellule della linea bianca del sangue (WBC) svolgano un ruolo fisiologico nella sorveglianza immunitaria nonché nell'eliminazione degli spermatozoi anomali, numerosi studi indicano che un aumentato numero di leucociti nel liquido seminale è associato ad alterazione dei parametri spermatici (1, 2, 3).

In base ai criteri di valutazione del manuale del WHO (1999) (4), una concentrazione di leucociti superiore a $1 \times 10^6/\text{ml}$ è da considerarsi patologica. Di tale popolazione leucocitaria il 50-60% è rappresentato da granulociti, seguiti dai macrofagi (20-30%) e dai linfociti T (2-5%).

La frequenza di leucocitospermia tra gli uomini infertili è di circa il 30% e nell'80% dei casi non è associata ad infezioni batteriche di alcun tipo a carico dell'apparato uro-genitale. Gli effetti della leucocitospermia sulla qualità del liquido seminale sono stati, e sono tutt'oggi, oggetto di numerose indagini dall'esito controverso: alcuni studi, infatti, non hanno dimostrato nessuna correlazione tra i due parametri (5,6) mentre, in altri casi, è stata dimostrata una relazione certa tra presenza di leucociti e alterazione dei parametri spermatici. Poco chiaro rimane quale possa essere l'elemento di connessione tra infiammazione dell'apparato genitale e ridotta fertilità. È noto che stimoli di diversa natura (chimici, biologici o fisici), attivando le cellule del sistema linfocitario, inducono una risposta infiammatoria che si accompagna alla produzione di metaboliti reattivi dell'ossigeno (ROS). Tali specie radicaliche, allorché i meccanismi di difesa non ne riescono a controbilanciare l'aumentata produzione, possono determinare stress ossidativo con conseguenti alterazioni a livello delle cellule spermatiche. Attraverso la perossidazione dei lipidi essi causano alterazioni strutturali dell'acrosoma, della testa, della regione del collo (7) e, innescando processi apoptotici, inducono frammentazione del DNA (8). La funzionalità gametica risulta quindi

compromessa a causa di una riduzione della motilità e della capacità fecondante dovuta all'inibizione della reazione acrosomiale e della capacità fusigenica (9,10,8,11,12).

Le difese antiossidanti enzimatiche presenti nel plasma seminale giocano, pertanto, un ruolo fondamentale poiché si sostituiscono agli enzimi citoplasmatici persi dagli spermatozoi durante la spermatogenesi. Nel plasma seminale, oltre a tale componente, sono presenti sistemi antiossidanti non enzimatici quali le vitamine C ed E, il piruvato, il glutatione e la carnitina.

L'invecchiamento, le abitudini alimentari, il fumo e, in generale, gli attuali stili di vita, abbassando le difese immunitarie e riducendo le attività antiossidanti, possono determinare riduzione della qualità del liquido seminale e quindi compromettere la capacità fecondante (13,14,15,16).

L'utilizzo di farmaci antinfiammatori di varia natura nel trattamento delle leucocitospermie, spesso asintomatiche, è ampiamente dimostrato (17,18,19) così come un miglioramento della qualità spermatica è stato riscontrato in seguito alla somministrazione orale di antiossidanti (20,21).

L'effetto di una terapia che associ le proprietà immunostimolanti del beta glucano e della papaia fermentata, quelle antiossidanti delle vitamine C ed E, nonché l'effetto batteriostatico e battericida della lattoferrina non è stato ad oggi valutato in maschi astenospermici. Il beta glucano, polisaccaride estratto dalla parete delle celle di lievito di birra, è infatti noto per la sua attività immunostimolante. Esso potenzia le difese naturali contro le infezioni da virus, batteri, funghi, parassiti e cellule neoplastiche e ne stimola il processo riparativo dei tessuti (22,23). Numerosi studi, negli ultimi anni, hanno avvalorato l'utilità dell'assunzione della papaia nel contrastare gli effetti perossidativi e genotossici dei radicali liberi (24,25). Le proprietà antiossidanti della papaia fresca, dovute alla presenza di vitamine e aminoacidi sono notevolmente potenziate dal processo di fermentazione, che ne determina, anche, l'aumento dell'attività immunomodulante. La lattoferrina, proteina presente nel latte e in altri prodotti delle ghiandole esocrine del sistema digestivo, respiratorio e riproduttivo, è un naturale antiossidante e un potente attivatore di cellule natural-killer. Essa modula la migrazione, la maturazione e la funzionalità delle cellule del sistema immunitario (26).

L'acido ascorbico e l'alfa-tocoferolo, precursori rispettivamente della vitamine C ed E, sono normalmente presenti nel plasma seminale dove grazie alla loro attività antiossidante svolgono un ruolo primario nei fenomeni perossidativi. La loro concentrazione, nel liquido seminale, è correlata all'*intake* giornaliero (27,28).

Lo scopo del presente studio è quello di valutare l'azione sinergica dell'attività immunomodulante e antiossidante del beta lucano, della papaia, della lattoferrina e delle vitamine C ed E sulle caratteristiche spermatiche in soggetti affetti da astenoteratospermia associata a leucocitosi.

MATERIALI E METODI

Pazienti

Sono stati selezionati 20 pazienti afferenti presso il nostro Centro di Sterilità di Coppia, dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, per sottoporsi ad analisi del seme dopo 12-18 mesi di rapporti sessuali liberi senza concepimento. I pazienti presentavano una concentrazione di leucociti nel liquido seminale superiore a 1×10^6 . Sono stati esclusi dallo studio i pazienti azoospermici. La diagnosi di leucocitospermia associata a astenoteratospermia è stata confermata eseguendo uno spermioγραμμα di controllo dopo un mese dalla prima indagine. Tutti i pazienti selezionati sono stati sottoposti ad analisi microbiologica del liquido seminale e delle urine per la ricerca di batteri comuni quali *Mycoplasma*, *Trichomonas vaginalis* e *Chlamydia trachomatis*. L'età media dei pazienti selezionati era 32 anni (range 22-47 anni). Come gruppo di controllo sono stati selezionati 15 uomini (età media 30 anni) con spermioultura negativa a cui non era stato prescritto alcun trattamento.

Trattamento farmacologico

I pazienti selezionati con leucocitospermia non associata ad infezioni nel liquido seminale sono stati trattati con una dose giornaliera di 2 cpr al giorno, per tre mesi, di un preparato a base di beta lucano, papaia fermentata, lattoferrina, vitamine C ed E (Fattore M. Progine s.r.l. Firenze, Italia).

Analisi del liquido seminale

Per effettuare lo spermioγραμμα i pazienti hanno osservato 4 giorni di astinenza da rapporti sessuali. I campioni sono stati valutati secondo i parametri del WHO (1999) (4), utilizzando un microscopio polarizzato invertito, con lente di Hoffmann e piatto riscaldato a 37°C. La colorazione mediante eosina Y è stata utilizzata per evidenziare l'eventuale presenza di spermatozoi necrotici.

La valutazione morfologica dei campioni è stata effettuata mediante la colorazione modificata per gli spermatozoi di Papanicolau (28). Sono stati contati 100 spermatozoi per campione e le

caratteristiche morfologiche degli organelli spermatici (nucleo, regione acrosomiale e postacrosomiale, flagello) sono state valutate secondo il manuale del WHO (1999) (4). Tutti i pazienti hanno ripetuto uno spermioγραμμα di controllo dopo tre mesi di terapia con antiossidanti e beta lucano.

Colorazione mediante perossidasi

I leucociti sono stati contati avvalendosi del metodo di Politch (1993) (29) adattato da Endtz (1974) (30). In breve, 0.0375% di H₂O₂ sono stati aggiunti a 4 ml di una soluzione stock di benzidina (0.0125% w/v benzidina, Sigma Aldrich, in 50% di etanolo). 10µl dell'eiaculato sono stati mixati con 20µl di una soluzione fresca di benzidina-H₂O₂. Dopo 5 minuti, sono stati aggiunti 160µl di PBS e sono state così contate le cellule perossidasi positive (rotonde e di colore marrone) e quelle perossidasi negative (non colorate) avvalendosi di una camera di Mackler con microscopio a contrasto di fase.

RISULTATI

I pazienti selezionati non presentavano all'anamnesi patologie di tipo endocrinologico o anatomico. Le indagini microbiologiche non hanno rivelato la presenza di batteri comuni, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma* e *Trichomonas vaginalis*. La diagnosi di leucocitosi e alterazioni del liquido seminale è stata confermata da un secondo spermogramma ripetuto a distanza di un mese rispetto al primo.

Lo spermogramma eseguito prima della terapia ha evidenziato una astenoteratozoospermia associata a leucocitospermia. I pazienti selezionati avevano infatti un numero medio di spermatozoi/ml pari a $48,5 \pm 8,9 \times 10^6$ ed una motilità progressiva (a+b) media del $22,0 \pm 7,8\%$ (Tab. I). La morfologia spermatica valutata dopo opportuna colorazione ha evidenziato una percentuale media di spermatozoi tipici del $19,0 \pm 5,2\%$ (Tab. I), risultando quindi, in tutti i pazienti, inferiore ai parametri di normalità. La diagnosi finale degli spermogrammi dei pazienti selezionati indicava un'astenoteratospermia. Inoltre, in questi pazienti il metodo di colorazione mediante perossidasi specifico per i leucociti ha rivelato che la concentrazione media di queste cellule era elevata ($2,8 \pm 1,3 \times 10^6$). La colorazione mediante eosina Y ha evidenziato che oltre la metà ($56,3 \pm 12,1$) degli spermatozoi analizzati avevano la membrana plasmatica rotta, indice di morte cellulare.

La valutazione morfologica degli spermatozoi, eseguita dopo colorazione di Papanicolau modificata per gli spermatozoi, ha evidenziato una più alta percentuale di anomalie spermatiche nei campioni analizzati prima della terapia con antiossidanti e beta glucano. In particolare, l'acrosoma è risultato assente nel $43,3 \pm 5,8\%$ circa degli spermatozoi e ridotto od alterato nel $48,6 \pm 5,9\%$; nel $60,0 \pm 4,9\%$ dei casi il nucleo era malformato; le code si presentavano avvolte o alterate nel $61,5 \pm 6,1\%$ delle cellule esaminate. La membrana plasmatica era rotta in circa il 52% degli spermatozoi osservati. I pazienti appartenenti al gruppo di controllo presentavano parametri spermatici sovrapponibili a quelli del gruppo di pazienti trattati.

I pazienti selezionati trattati con antiossidanti e beta glucano non hanno riferito alcun tipo di effetti collaterali e tutti hanno riferito uno stato di benessere fisico. In particolare un gruppo di sette

uomini che soffriva di infezioni ricorrenti a livello dell'apparato respiratorio, ha dichiarato di aver contratto meno infezioni durante il trattamento. Lo spermogramma di controllo è stato eseguito dopo circa 30 giorni dalla fine della terapia. La colorazione mediante perossidasi ha evidenziato una diminuzione da $2,8 \pm 1,3 \times 10^6$ a $0,7 \pm 0,2 \times 10^6$ del numero di leucociti presenti nel liquido seminale. Il test dell'eosina, eseguito dopo il trattamento, ha rivelato una significativa riduzione degli spermatozoi necrotici con una media percentuale del $28,7 \pm 6,7$. Non abbiamo osservato variazioni nel numero di spermatozoi/ml, mentre la morfologia e la motilità sono significativamente migliorati dopo la terapia. La colorazione di Papanicolau utilizzata per la valutazione della morfologia spermatica ha dimostrato infatti un generale miglioramento delle caratteristiche spermatiche: la forma del nucleo è risultata normale nel $46,2 \pm 6,4\%$ delle cellule e il complesso acrosomiale nel $64,0 \pm 8,1\%$, così come le strutture della coda sono risultate ben conformate nel $57,3 \pm 6,1\%$ degli spermatozoi osservati. I pazienti appartenenti al gruppo di controllo hanno eseguito uno spermogramma a tre mesi dal primo senza aver assunto alcun tipo di terapia, non rivelando alcuna variazione nel numero, motilità e morfologia spermatica (Tab.1).

Tabella I. Parametri spermatici valutati in pazienti trattati con antiossidanti ed in pazienti non trattati

	Trattati (n=20)		Non trattati (n=15)		Parametri di riferimento WHO (1999)
	Prima	Dopo	Prima	Dopo	
Numero spermatozoi ($10^6/ml$)	$48,5 \pm 8,9 \times 10^6$	$46,2 \pm 9,3 \times 10^6$	$51,1 \pm 6,2 \times 10^6$	$49,0 \pm 5,4 \times 10^6$	$>20 \times 10^6$
Motilità progressiva (a+b%)	$22,0 \pm 7,8\%$	$44,8 \pm 6,8\%$ *	$24,3 \pm 5,1\%$	$26,8 \pm 4,2\%$	$>50\%$
Morfologia normale (%)	$19,0 \pm 5,2\%$	$34,5 \pm 6,5\%$ *	$21,5 \pm 6,2\%$	$24,1 \pm 4,1\%$	$>30\%$
Leucociti ($10^6/ml$)	$2,8 \pm 1,3 \times 10^6$	$0,7 \pm 0,2 \times 10^6$ *	$1,8 \pm 0,9 \times 10^6$	$2,1 \pm 1,4 \times 10^6$	$<1 \times 10^6$
Test eosina (% necrotici)	$56,3 \pm 12,1$	$28,7 \pm 6,7$ *	$55,1 \pm 9,8$	$57,2 \pm 6,5$	$<40\%$

I risultati sono espressi come medie \pm SD.

Signed rank test: * $P < 0.05$

DISCUSSIONE

L'aumentata presenza di leucociti nel liquido seminale può rappresentare un fattore di rischio per la riduzione della fertilità naturale (32,33) e può influenzare negativamente anche l'esito delle tecniche di riproduzione medicalmente assistita (18). Nei pazienti con infertilità idiopatica la presenza di leucocitospermia è più frequente rispetto ai controlli fertili. Sebbene non ne siano stati chiariti i meccanismi, diversi studi hanno dimostrato la stretta associazione tra leucocitospermia e alterazioni morfologiche o funzionali degli spermatozoi, tra cui teratospermia e necrosi spermatica (1,2,3). Secondo tali studi l'elevata presenza di leucociti nel liquido seminale compromette l'integrità strutturale degli spermatozoi, determinando alterazioni a livello dell'acrosoma, del nucleo e della coda. La produzione di radicali dell'ossigeno da parte dei leucociti potrebbe rappresentare l'elemento di connessione tra leucocitospermia e infertilità; infatti, i ROS interferiscono con i processi fisiologici legati alla riproduzione ed è noto che un incremento della loro concentrazione possa compromettere la fertilità maschile (34).

In questo studio, la somministrazione di antiossidanti e beta glucano per un periodo di 90 giorni in soggetti affetti da leucocitospermia associata a teratospermia ha determinato un miglioramento delle caratteristiche spermatiche in termini di riduzione della concentrazione di linfociti e miglioramento della motilità e della morfologia degli spermatozoi. Tale risultato può essere addotto alla duplice attività dei componenti del prodotto: il beta glucano, la papaia fermentata e la lattoferrina agiscono, infatti, come modulatori della risposta immunitaria e infiammatoria (24,25) mentre le vitamine C ed E aumentano le difese antiossidanti delle cellule. L'azione immunomodulante della papaia fermentata, del beta glucano e della lattoferrina sono stati oggetto di numerosi studi, sia *in vivo* che *in vitro*, su modelli animali e sull'uomo (35,36,37).

Si può quindi ipotizzare che processi infiammatori testicolari asintomatici, associati a leucocitospermia, possono provocare danni a carico dell'epitelio seminifero, dell'epididimo o dei dotti eiaculatori alterando il processo di formazione e maturazione degli spermatozoi, come

dimostrato dalla presenza nel liquido seminale di una elevata presenza di cellule morfologicamente anomale.

Un altro possibile meccanismo attraverso il quale la leucocitospermia **può alterare** la funzionalità spermatica potrebbe essere legato al contatto tra gli spermatozoi e i metaboliti reattivi dell'ossigeno prodotti dai leucociti durante la comigrazione dai tubuli seminiferi all'epididimo.

Uno dei principali siti di perossidazione lipidica da parte dei metaboliti reattivi dell'ossigeno è rappresentato dal segmento intermedio, costituito essenzialmente da mitocondri. La riduzione della motilità spermatica, osservata nei pazienti selezionati, potrebbe essere dovuta all'alterazione della permeabilità delle membrane che determina perdita di ATP intracellulare e danno assonemiale. L'azione combinata degli antiossidanti e del beta glucano sembra avere un effetto protettivo nei confronti delle strutture assonemali dello spermatozoo, riducendo il danno provocato **dai** radicali liberi. Nella difesa dal danno ossidativo, infatti, oltre ai sistemi enzimatici, fondamentale per lo spermatozoo è la presenza dei sistemi antiossidanti, rappresentati tra l'altro dalle vitamine C ed E. Gli effetti della terapia antiossidante sul liquido seminale sono stati oggetto di *trials* clinici che hanno dimostrato un'azione individuale e sinergica delle vitamine C ed E nella protezione degli spermatozoi dallo stress ossidativo in casi di fertilità idiopatica (38,20). I livelli di vitamina C nel plasma seminale sono positivamente correlati con la presenza di forme morfologicamente normali (28); la vitamina C sembra avere azione protettiva già a livello epididimale. La papaia fermentata ha, inoltre, una spiccata attività antiossidante, eliminando i radicali liberi e aumentando l'attività della superossido dismutasi (24).

L'utilizzo di integratori naturali associati ad alte concentrazioni di vitamine C ed E può essere quindi considerata una valida alternativa per il trattamento dell'astenospermia associata a leucocitosi, rispetto ai farmaci antinfiammatori tradizionali in quanto efficaci e nello stesso tempo privi di effetti collaterali. Poiché lo stress ossidativo sembra avere un ruolo determinante sulla fertilità maschile, potenziando le difese antiossidanti non enzimatiche dell'organismo si possono ottenere dei benefici paragonabili a quelli derivati dall'utilizzo di farmaci tradizionali. I presenti dati

essendo del tutto preliminari, non ci consentono di trarre conclusioni definitive e ci spingono ad approfondire ulteriormente il meccanismo patogenetico dell'astenospermia mediante il dosaggio dei radicali liberi e la valutazione del tasso di frammentazione del DNA, al fine di confermare i benefici del trattamento con antiossidanti naturali nei maschi affetti da astenospermia.

CONCLUSIONI

I risultati che emergono da questo studio sembrano suggerire che la somministrazione di vitamine C ed E associate a beta-glucano e papaia, possa essere efficace per migliorare alcuni parametri spermatici che dipendono in particolare dalla integrità delle strutture assonemali e nucleari.

Il recupero della funzionalità cellulare potrebbe consentire una fertilizzazione naturale o comunque essere tale da poter indirizzare la coppia infertile verso tecniche di procreazione assistita meno invasive.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Yanushpolsky EH, Politch JA, Hill JA, Anderson DJ. Is leukocytospermia clinically relevant? *Fertil Steril* 1996;66:822-5.
- (2) Thomas J, Fishel SB, Hall JA, Green S, Newton TA, Thornton SJ. Increased polymorphonuclear granulocytes in seminal plasma in relation to sperm morphology. *Hum Reprod* 1997;12:2418-21.
- (3) Menkveld R, Kruger TF. Sperm morphology and male urogenital infections. *Andrologia* 1998;30 (Suppl 1):49-53.
- (4) World Health Organization WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction, 4th ed, Cambridge: Cambridge University Press; 1999.
- (5) Fedder J. Nonsperm cells in human semen: with special reference to seminal leukocytes and their possible influence on fertility. *Arch Androl* 1996;36:41-65.
- (6) Curi SM, Ariagno JI, Chenlo PH, Mendeluk GR, Pugliese MN, Sardi Segovia LM *et al.* Asthenozoospermia: analysis of a large population. *Arch Androl* 2003;49:343-9.
- (7) Aziz N, Saleh RA, Sharma RK, Lewis-Jones I, Esfandiari N, Thomas AJ Jr *et al.* Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertil Steril* 2004;81:349-54.
- (8) Sharma RK, Pasqualotto AE, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *J Androl* 2001;22:575-83.

- (9) Whittington K, Ford WC. Relative contribution of leukocytes and of spermatozoa to reactive oxygen species production in human sperm suspensions. *Int J Androl* 1999;22:229-35.
- (10) Whittington K, Harrison SC, Williams KM, Day JL, McLaughlin EA, Hull MG *et al.* Reactive oxygen species (ROS) production and the outcome of diagnostic tests of sperm function. *Int J Androl* 1999;22:236-42.
- (11) Erenpreiss J, Hlevicka S, Zalkalns J, Erenpreisa J. Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples. *J Androl* 2002;23:717-23.
- (12) Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Nada EA *et al.* Leucocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human sperm. *Fertil Steril* 2002;78:1215-24.
- (13) Vine MF. Smoking and male reproduction: a review. *Int J Androl* 1996;19:323-37.
- (14) Auger J, Eustache F, Andersen AG, Irvine DS, Jorgensen N, Skakkebaek NE, *et al.* Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partner of pregnant women from European cities. *Hum Reprod* 2001;16:2710-7.
- (15) Kenkel S, Rolf C, Nieschlag E. Occupational risks for male fertility: an analysis of patients attending a tertiary referral centre. *Int J Androl* 2001;24:318-26.
- (16) Eskenazi B, Wyrobek AJ, Slotter E, Kidd SA, Moore L, Young S, *et al.* The association of age and semen quality in healthy men. *Hum Reprod* 2003;18:447-54.

(17) Lackner JE, Herwig R, Schmidbauer J, Schatzl G, Kratzik C, Marberger M. Correlation of leukocytospermia with clinical infection and the positive effect of antiinflammatory treatment on semen quality. *Fertil Steril* 2006;86:601-5.

(18) Oliva A, Multigner L. Ketitofen improves sperm motility and sperm morphology in male patients with leukocytospermia and unexplained infertility. *Fertil Steril* 2006;85:240-3.

(19) Gambera L, Serafini F, Morgante G, Focarelli R, De Leo V, Piomboni P. Sperm quality and pregnancy rate after COX-2 inhibitor therapy of infertile males with abacterial leukocytospermia. *Hum Reprod* 2007;22:1047-51.

(20) Rolf C, Cooper TG, Yeung CH, Nieschlag E. Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia or moderate oligoasthenozoospermia with high-dose vitamin C and vitamin E: a randomized, placebo- controlled, double-blind study. *Hum Reprod* 1999;14:1028-33.

(21) Eskenazi B, Kidd SA, Marks AR, Slotter E, Block G, Wyrobek AJ. Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. *Hum Reprod* 2005;20:1006-12.

(22) Carrow DJ. Beta-1,3-glucan as a primary immune activator. *Townsend Lett* 1996;86-91.

(23) Brown GD, Gordon S. Fungal beta-glucans and mammalian immunity. *Immunity* 2003;19:311-15.

(24) Imao K, Wang H, Komatsu M, Hiramatsu M. Free radical scavenging activity of fermented papaya preparation and its effect on lipid peroxide level and superoxide dismutase activity in iron-induced epileptic foci of rats. *Biochem Mol Biol Int* 1998;45:11-23.

- (25) Aruoma OI, Colognato R, Fontana I, Gartlon J, Migliore L, Koike k, *et al.* Molecular effects of fermented papaya preparation on oxidative damage, MAP Kinase activation and modulation of the benzo[a]pyrene mediated genotoxyciti. *Biofactors* 2006;26:147-59.
- (26) Vorland HL, Ulvatne H, Andersen J, Haukland HH, Rekdal O, Svendsen JS *et al.* Antibacterial effects of lactoferricin B. *Scand J Infect Dis* 1999;31:179-84.
- (27) Moilanen J, Hovatta O. Excretion of alpha-tocopherol into human seminal plasma after oral administration. *Andrologia* 1995;27:133-6.
- (28) Oettle EE. An improved staining technique which facilitates sequential monitoring of the acrosome state. *Dev Growth Differ* 1986; (Suppl) 28: 96.
- (29) Wen Y, Cooke T, Feely J. The effect of pharmacological supplementation with vitamine C on low-density lipoprotein oxidation. *Br J Clin Pharmacol* 1997;44:94-7.
- (30) Politch JA, Wolff H, Hill JA, Anderson DJ. Comparison of method to enumerate white blood cells in semen. *Fertil Steril* 1993;60:372-5.
- (31) Endtz AW. A rapid staining method for differentiating granulocytes from “germinal cell” in Papanicolau-stained semen. *Acta Cytol* 1974;18:2-7.
- (32) Wolff H, Politch JA, Martinez A, Haimovici F, Hill JA, Anderson DJ. Leukocytospermia is associated with poor semen quality. *Fertil Steril* 1990;53:528-36.

(33) Vicino M, Loverro G, Simonetti S, Mei L, Selvaggi L. The correlation between idiopathic leukocytospermia embryo qualità and outcome of FIVET and ICSI procedures. *Minerva Ginecol* 1999;51:413-20.

(34) Fraczek M, Kurpysz. M. Inflammatory mediators exert toxic effects of oxidative stress on human spermatozoa. *J Androl* 2007;28:325-33.

(35) Janusz MJ, Austen KF, Czop JK. Phagocytosis of heat-killed blastospores of *Candida albicans* by human monocyte beta-glucan receptors. *Immunology* 1988;65:181-5.

(36) Czop JK, Valiante NM, Januz MJ. Phagocytosis of particulate activators of the human alternative complement pathway through monocyte beta-glucan receptors. *Prog Clin Biol Res* 1989;297:287-96.

(37) Legrand D, Ellass E, Carpentier M, Mazurier J. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:2549-59.

(38) Baker HW, Brindle J, Irvine DS, Aitken RJ. Protective effect of antioxidants on the impairment of sperm motility by activated polymorphonuclear leukocytes. *Fertil Steril* 1996;65:411-9.