

Phân tích mối liên quan giữa bạch cầu tinh dịch và một số chỉ số tinh dịch đồ ở nam giới vô sinh

Đoàn Thị Kim Phượng^{1,2*}, Phan Văn Hưởng¹, Vũ Thị Hà^{1,2}, Nguyễn Hoài Bắc^{1,2}, Hoàng Thị Ngọc Lan¹

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Bệnh viện Đại học Y Hà Nội

Ngày nhận bài 26/5/2020; ngày chuyển phản biện 29/5/2020; ngày nhận phản biện 22/6/2020; ngày chấp nhận đăng 26/6/2020

Tóm tắt:

Bạch cầu (BC) tăng cao trong tinh dịch có thể là nguyên nhân gây giảm số lượng và chất lượng của tinh trùng, cũng có thể liên quan tới các bệnh đường sinh dục như: nhiễm trùng đường sinh dục - tiết niệu, tắc ống dẫn tinh... Nghiên cứu này nhằm mục đích tìm mối liên quan giữa số lượng BC tinh dịch với số lượng, độ di động và hình thái tinh trùng ở nam giới vô sinh. 400 mẫu tinh dịch của những bệnh nhân nam trong độ tuổi 28-50 đã được xác định là vô sinh, đến khám tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội, được phân tích tinh dịch đồ theo tiêu chuẩn của Tổ chức Y tế thế giới (WHO) 2000. Các mẫu có số lượng tế bào tròn ≥ 1 triệu/ml (tế bào tròn cao) được tiến hành nhuộm và đếm BC tinh dịch bằng phương pháp nhuộm peroxidase. Kết quả cho thấy, tỷ lệ mẫu có số tế bào tròn cao chiếm 26%; tỷ lệ mẫu có BC tinh dịch cao chiếm 6,25%. Mật độ tinh trùng trung bình trong nhóm bệnh nhân có số lượng BC cao và nhóm bệnh nhân có số lượng BC thấp tương ứng là 90,48 triệu/ml và 71,16 triệu/ml. Sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$. Nhóm bệnh nhân có số lượng BC thấp có trung bình tỷ lệ tinh trùng hình thái bình thường là 9,22%, cao hơn giá trị trung bình này là 7,44% ở nhóm bệnh nhân có số lượng BC cao. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Nhóm bệnh nhân có số lượng BC thấp có trung bình tốc độ di động là 41,6 $\mu\text{m/s}$, cao hơn đáng kể ($p < 0,05$) so với nhóm bệnh nhân có số lượng BC cao (35,3 $\mu\text{m/s}$). Kết luận: số lượng BC trong tinh dịch tăng cao ≥ 1 triệu/ml có liên quan với giảm tốc độ di động trung bình và giảm tỷ lệ hình thái bình thường của tinh trùng. Số lượng BC trong tinh dịch không ảnh hưởng đến mật độ tinh trùng. Đây là một gợi ý cho mục đích tăng chất lượng tinh trùng thì cần giảm sự xuất hiện BC trong tinh dịch nam giới vô sinh.

Từ khóa: bạch cầu tinh dịch, tinh dịch đồ, vô sinh nam.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Tinh dịch đồ là một trong những xét nghiệm cơ bản nhất đánh giá chức năng sinh sản của nam giới trong độ tuổi sinh sản [1, 2]. Trong tinh dịch người, ngoài tinh trùng trưởng thành còn có các loại tế bào như tế bào bong, tinh trùng non, BC. Các tế bào này được gọi chung là các “tế bào tròn”, để phân biệt với các tinh trùng trưởng thành. Số lượng tế bào tròn trong tinh dịch bình thường cho phép < 1 triệu/ml [3]. Khi các tế bào này tăng quá mức cho phép, dù là BC hay tinh trùng non đều là một trong các nguyên nhân gây vô sinh ở nam giới. Một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng, BC > 1 triệu/ml liên quan tới các bệnh đường sinh dục như: nhiễm trùng đường sinh dục - tiết niệu, tắc ống dẫn tinh, giãn tĩnh mạch thừng tinh, giảm chức năng tuyến sinh dục phụ. BC tăng cao còn liên quan đến giảm số lượng và chất lượng của tinh trùng do BC có thể sản xuất ra các sản phẩm chuyển hóa như ROS (reactive oxygen species) [4]. Các sản phẩm này làm tăng stress oxy hóa, gây tổn thương tế bào tinh

trùng, đặc biệt là DNA và màng tế bào [5]; tăng nguy cơ vô sinh, sảy thai, đẻ non và các bệnh lý di truyền [6]. Việc phân biệt các tế bào tròn nhiều quá mức trong tinh dịch là tế bào sinh tinh non hay BC có vai trò quan trọng trong chẩn đoán và quyết định điều trị [7]. Chúng tôi tiến hành nghiên cứu: “Phân tích mối liên quan giữa BC tinh dịch và một số chỉ số tinh dịch đồ ở nam giới vô sinh” nhằm mục đích tìm mối liên quan giữa số lượng BC tinh dịch với số lượng, độ di động và hình thái tinh trùng ở nam giới vô sinh.

Đối tượng và phương pháp

Đối tượng nghiên cứu là 400 mẫu tinh dịch của những bệnh nhân nam trong độ tuổi 28-50 đã được xác định là vô sinh, đến khám tại Bệnh viện Đại học Y Hà Nội từ tháng 8/2018 đến tháng 6/2019. Nam giới vô sinh đã rõ nguyên nhân không thuộc đối tượng nghiên cứu.

Nghiên cứu mô tả cắt ngang. Bệnh nhân được thu thập thông tin, lấy mẫu tinh dịch bằng phương pháp thủ dâm

*Tác giả liên hệ: Email: doankimphuong@hmu.edu.vn

Analysis of the relationship between leucospermia and seminal parameters in infertile men

Thi Kim Phuong Doan^{1,2*}, Van Huong Phan¹,
Thi Ha Vu^{1,2}, Hoai Bac Nguyen^{1,2}, Thi Ngoc Lan Hoang¹

¹Hanoi Medical University

²Hanoi Medical University Hospital

Received 26 May 2020; accepted 26 June 2020

Abstract:

Leucospermia may cause a decrease in the number and quality of sperm, which may also be related to genital tract diseases such as urogenital tract infections, vasectomy, etc. This study aims to find out a link between leucospermia and some semen parameters in infertile men. A total of 400 semen samples of infertility males aged from 28 to 50 were tested for semen parameters according to WHO 2000 standards. The samples with round cells ≥ 1 million/ml were stained and counted leucocytes in semen by the peroxidase staining method. The results showed that the percentage of samples with round cells ≥ 1 million/ml accounted for 26%, the proportion of samples with leucospermia accounted for 6.25%. The mean sperm densities in the group of leucospermia and the group of non-leucospermia were 90.48 million/ml and 71.16 million/ml, respectively. This difference was not statistically significant with $p > 0.05$. The group of non-leucospermia had an average normal morphological sperm count of 9.22%, higher significantly than this average value of 7.44% in the group of leucospermia. The group of non-leucospermia had mean sperm motility of 41.6 $\mu\text{m/s}$, significantly higher ($p < 0.05$) than the group of leucospermia (35.3 $\mu\text{m/s}$). Conclusions: an increased number of white blood cells in the semen ≥ 1 million/ml related to a reduction in the average rate of motility and reduced the normal morphological sperm ratio. Leucospermia did not affect sperm density. This is a suggestion for the improvement of sperm quality by reducing the number of white blood cells in the male infertility semen.

Keywords: leucospermia, male infertility, semen parameters.

Classification number: 3.2

(kiêng xuất tinh từ 2-7 ngày). Các mẫu tinh dịch được đánh giá số lượng tế bào tròn, độ pH tinh dịch, mật độ, tốc độ di động và hình thái tinh trùng theo tiêu chuẩn của WHO. Các mẫu có số lượng tế bào tròn ≥ 1 triệu/ml được tiến hành nhuộm BC tinh dịch bằng phương pháp nhuộm peroxidase (kit Baso diagnostics của Hãng Inc. Zhuhai, Đài Loan). Tế bào dương tính với peroxidase (tế bào/ml bắt màu nâu) là các tế bào BC. Đếm số lượng tế bào tròn bằng buồng đếm Makler. Tế bào tròn là những tế bào có hình tròn, bờ rõ, không có đầu, cổ, đuôi.

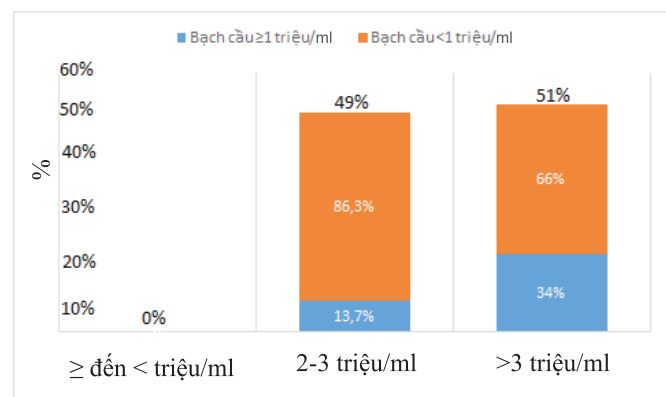
Đánh giá mật độ và độ di động tinh trùng bằng máy CASA (Computer - Aided Semen Analysis). Khả năng di động của tinh trùng được phân loại như sau: di động tiến tới nhanh (tốc độ di động $\geq 25 \mu\text{m/s}$) và tiến tới chậm (tốc độ di động từ 5-25 $\mu\text{m/s}$); di động không tiến tới hoặc di động tại chỗ (tốc độ di động từ 0-5 $\mu\text{m/s}$); không di động (IM - immotility): tất cả các trường hợp tinh trùng không di động, nằm yên tại chỗ. Đánh giá hình thái tinh trùng bằng kỹ thuật nhuộm Hematoxylin và Eosin sử dụng kính hiển vi độ phóng đại 400 lần và phân loại tinh trùng bình thường, tinh trùng bất thường đầu, cổ, đuôi và bất thường bào tương.

Quản lý số liệu bằng phần mềm Microsoft Excel 2010 và xử lý số liệu thu thập được trên phần mềm SPSS phiên bản 20.0. Bệnh nhân được giải thích rõ về mục đích của nghiên cứu và hoàn toàn tự nguyện tham gia nghiên cứu.

Kết quả

Tỷ lệ mẫu có BC tinh dịch cao trong quần thể nghiên cứu

Trong quần thể 400 nam giới vô sinh đến khám tại Phòng khám Nam khoa - Tiết niệu và Trung tâm Tư vấn di truyền, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội, có 104 mẫu tinh dịch xuất hiện số lượng tế bào tròn ≥ 1 triệu/ml (tế bào tròn cao), chiếm 26%. Trong đó có 25 mẫu có số lượng BC ≥ 1 triệu/ml (tế bào BC cao), chiếm 6,25% tổng số mẫu tinh dịch của nam giới vô sinh; chiếm 24% tổng số mẫu có tế bào tròn cao.



Biểu đồ 1. Tỷ lệ xuất hiện BC cao ở các nhóm tinh dịch có số lượng tế bào tròn cao.

Trong 104 mẫu có tế bào tròn cao, nhóm có số lượng tế bào tròn trong khoảng 2-3 triệu/ml chiếm 49%, nhóm có số lượng tế bào tròn >3 triệu/ml chiếm 51%. Không có mẫu nào thuộc nhóm có số lượng tế bào tròn từ 1 đến <2 triệu/ml.

Trong nhóm tế bào tròn từ 2-3 triệu/ml và nhóm tế bào tròn >3 triệu/ml, tỷ lệ mẫu có BC cao tương ứng là 13,7 và 34%. Như vậy, tỷ lệ mẫu có BC cao tăng cao tương ứng với số lượng tế bào tròn cao trong mẫu tinh dịch (biểu đồ 1).

Mối liên quan giữa số lượng BC với mật độ tinh trùng

Mật độ tinh trùng trung bình trong nhóm bệnh nhân có số lượng BC cao (≥ 1 triệu/ml) và nhóm bệnh nhân có số lượng BC thấp (<1 triệu/ml) tương ứng là 90,48 triệu/ml và 71,16 triệu/ml (bảng 1). Sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$ ($p = 0,094$) theo kiểm định T-test, độ tin cậy 95%.

Bảng 1. Số lượng BC và trung bình mật độ tinh trùng.

Số lượng mẫu có BC cao/thấp	n=79 (<1 triệu/ml)	n=25 (≥ 1 triệu/ml)	P
Trung bình mật độ tinh trùng (triệu/ml)	71,16 $\pm$ 47,88	90,48 $\pm$ 55,75	0,094

Trong nhóm mật độ tinh trùng <15 triệu/ml, có 19% số trường hợp có BC <1 triệu/ml, 8% số trường hợp có BC ≥ 1 triệu/ml. Trong nhóm mật độ tinh trùng ≥ 15 triệu/ml, có 81% số trường hợp có BC <1 triệu/ml, 92% số trường hợp có BC ≥ 1 triệu/ml. Không có sự khác biệt với $p > 0,05$ ($p = 0,351$) theo kiểm định Fisher's Exact với độ tin cậy 95% (bảng 2).

Bảng 2. Số lượng BC trong tinh dịch và tình trạng thiểu tinh, vô tinh.

Số lượng BC	BC <1 triệu/ml		BC ≥ 1 triệu/ml		Tổng		P
	n	%	n	%	n	%	
Mật độ tinh trùng <15 triệu/ml (thiểu tinh, vô tinh)	15	19	2	8	17	16,3	0,351
≥ 15 triệu/ml	64	81	23	92	87	83,7	
Tổng	79	100	25	100	104	100	

Mối liên quan giữa số lượng BC với hình thái tinh trùng

Nhóm bệnh nhân số lượng BC thấp có trung bình tỷ lệ tinh trùng hình thái bình thường là 9,22%, cao hơn giá trị trung bình này là 7,44% ở nhóm bệnh nhân có số lượng BC cao (bảng 3). Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ theo kiểm định T-test.

Trung bình tỷ lệ tinh trùng bất thường đầu, cổ, đuôi ở hai nhóm bệnh nhân có số lượng BC cao và thấp là không khác biệt với $p > 0,05$ theo kiểm định T-test.

Bảng 3. Mối liên quan giữa số lượng BC trong tinh dịch với hình thái tinh trùng.

Số lượng mẫu có BC cao/thấp	n=79 (<1 triệu/ml)	n=25 (≥ 1 triệu/ml)	p
Trung bình tỷ lệ tinh trùng hình thái bình thường (%)	9,22 $\pm$ 3,97	7,44 $\pm$ 3,00	0,043
Trung bình tỷ lệ tinh trùng bất thường đầu (%)	58,33 $\pm$ 17,78	61,36 $\pm$ 8,22	0,413
Trung bình tỷ lệ tinh trùng bất thường cổ (%)	14,61 $\pm$ 7,27	15,16 $\pm$ 5,34	0,727
Trung bình tỷ lệ tinh trùng bất thường đuôi (%)	14,05 $\pm$ 9,60	13,96 $\pm$ 3,86	0,963

Mối liên quan giữa số lượng BC trong tinh dịch với độ di động tinh trùng

Nhóm bệnh nhân có số lượng BC trong tinh dịch thấp có trung bình tốc độ di động là 41,6 μ m/s, cao hơn đáng kể ($p < 0,05$) so với nhóm bệnh nhân có số lượng BC cao (35,3 μ m/s) (bảng 4).

Các mức độ di động nhanh, chậm, không tiến tới và không di động ở hai nhóm bệnh nhân có số lượng BC trong tinh dịch cao và thấp không có sự khác biệt với $p > 0,05$ theo kiểm định T-test.

Bảng 4. Mối liên quan giữa số lượng BC trong tinh dịch với độ di động tinh trùng.

Số lượng mẫu tinh dịch có BC cao/thấp	n=79 (<1 triệu/ml)	n=25 (≥ 1 triệu/ml)	P
Trung bình tốc độ di động (μ m/s)	41,6 $\pm$ 14,27	35,3 $\pm$ 9,59	0,042
Trung bình tỷ lệ di động nhanh (%)	36,39 $\pm$ 19,38	40,48 $\pm$ 16,30	0,343
Trung bình tỷ lệ di động chậm (%)	9,43 $\pm$ 4,47	8,16 $\pm$ 2,78	0,184
Trung bình tỷ lệ di động không tiến tới (%)	7,78 $\pm$ 5,75	7,72 $\pm$ 5,31	0,96
Trung bình tỷ lệ không di động (%)	39,94 $\pm$ 20,25	42,44 $\pm$ 17,04	0,578

Bàn luận

Trong 400 trường hợp vô sinh nam trong nghiên cứu, có 104 trường hợp có số lượng tế bào tròn trong tinh dịch cao (≥ 1 triệu/ml), tương đương với 24%. Tỷ lệ này lớn hơn so với 5,4% mẫu có tế bào tròn cao trong nghiên cứu trên 4810 mẫu tinh dịch của nam giới vô sinh của Gianpiero D. Palermo và cs (2016) [7]. Tỷ lệ số mẫu có BC cao trong tinh dịch (≥ 1 triệu/ml) chiếm 6,25% trong tổng số 400 trường hợp vô sinh nam đến làm xét nghiệm tinh dịch đồ, tỷ lệ này thấp hơn so với nghiên cứu của M. Punab và cs (2017) [8] (13,4%). Có sự khác nhau về tỷ lệ xuất hiện tế bào tròn cao và tỷ lệ xuất hiện BC cao trong nam giới vô sinh ở các nghiên cứu khác nhau có thể là do các nghiên cứu với cỡ mẫu khác nhau trên đối tượng nghiên cứu đến từ các chủng tộc khác nhau. Có 49% số mẫu có số lượng tế bào tròn trong khoảng 2-3 triệu/ml; 51% số mẫu có số lượng tế bào tròn >3 triệu/ml; không có trường hợp nào có số lượng tế bào tròn từ 1 đến <2 triệu/ml. Vì thế, các chỉ định xét nghiệm tìm BC

trong tinh dịch cần được chú ý không bỏ sót khi số lượng tế bào tròn trong tinh dịch ≥ 2 triệu/ml. Hầu hết các trường hợp có số lượng BC cao trong tinh dịch đều không có biểu hiện viêm nhiễm đường sinh dục - tiết niệu, lên đến 96%. Vì vậy, khi xuất hiện số lượng tế bào tròn cao trong tinh dịch, cần làm thêm những phương pháp tiếp theo để xác định tình trạng viêm nhiễm sinh dục - tiết niệu như: tìm BC trong tinh dịch, nuôi cấy vi khuẩn trong tinh dịch/dịch niệu đạo, PCR vi khuẩn chí hệ sinh dục - tiết niệu... Trong đó, phương pháp tìm BC trong tinh dịch có ưu điểm vượt trội về mặt thời gian, giá thành, dễ triển khai thực hiện.

Nhóm bệnh nhân có số lượng BC thấp có tỷ lệ tinh trùng hình thái bình thường là 9,22%, cao hơn đáng kể ($p < 0,05$) so với giá trị này ở nhóm bệnh nhân có số lượng BC cao (7,44%). Điều này cho thấy, sự xuất hiện của số lượng BC cao trong tinh dịch ≥ 1 triệu/ml có tác động tiêu cực lên hình thái bình thường tinh trùng. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của J.E. Lackner và cs (2010) [9] về mối liên quan giữa chất lượng tinh trùng và mật độ BC trong tinh dịch. Nghiên cứu của ông đưa ra kết luận rằng, tỷ lệ tinh trùng với hình thái bình thường ở các mẫu tinh dịch với nồng độ BC từ 0 đến 1×10^6 /ml cao hơn so với các mẫu có nồng độ BC $> 1 \times 10^6$ /ml. Nghiên cứu của J.E. Lackner và cs (2010) [9] cũng đưa ra kết luận: tỷ lệ tinh trùng di động tiến tới ở các mẫu tinh dịch với nồng độ BC từ 0 đến 1×10^6 /ml cao hơn so với các mẫu có nồng độ BC $> 1 \times 10^6$ /ml. Nghiên cứu của chúng tôi nhận thấy, tốc độ di động trung bình của tinh trùng ở các mẫu tinh dịch với nồng độ BC từ 0 đến 1×10^6 /ml cao hơn so với các mẫu có nồng độ BC $> 1 \times 10^6$ /ml. Việc tăng cao số lượng BC trong tinh dịch ≥ 1 triệu/ml làm giảm đáng kể tốc độ di động của tinh trùng. Khi tốc độ di động của tinh trùng thấp sẽ làm giảm khả năng gặp được trứng, ảnh hưởng đến khả năng thụ thai của tinh trùng với trứng, giảm tỷ lệ thụ thai thành công. Mật độ tinh trùng trung bình ở hai nhóm mẫu có số lượng BC cao và thấp lần lượt là 71,16 triệu/ml và 90,48 triệu/ml với sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Moubasher Alaa và cs (2018) [10] về tác động của tăng BC lên các thông số vận động của tinh trùng, DNA và tính toàn vẹn của nhiễm sắc thể.

Mặc dù đã có nhiều nghiên cứu được triển khai để làm sáng tỏ các chiến lược điều trị vô sinh ở nam giới có số lượng BC trong tinh dịch cao, nhưng tiêu chuẩn vàng về điều trị vẫn chưa rõ ràng. Cho đến gần đây, kháng sinh phổ rộng và các chất chống oxy hóa đã được sử dụng trong điều trị tình trạng tăng cao BC tinh dịch cho những trường hợp vô sinh nam để loại bỏ nhiễm trùng và làm giảm các gốc tự do oxy phản ứng được sản xuất bên trong ty thể của tế bào do viêm. Đánh giá hiện tại cho thấy, kháng sinh có thể cải thiện các thông số tinh trùng, giảm số lượng BC trong tinh dịch, tăng tỷ lệ điều trị khỏi viêm nhiễm do vi khuẩn và thậm chí tăng tỷ lệ mang thai, mặc dù một số báo cáo vẫn còn mâu thuẫn.

Không giống với viêm nhiễm ở nhiều cơ quan, bộ phận

khác, đối với viêm nhiễm sinh dục - tiết niệu, các triệu chứng lâm sàng khá nghèo nàn, và không có sự tương đồng rõ về mối liên quan giữa triệu chứng lâm sàng với tình trạng viêm nhiễm. Hầu hết các trường hợp có số lượng BC cao trong tinh dịch đều không gây biểu hiện viêm nhiễm sinh dục - tiết niệu. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, việc điều trị những nam giới vô sinh có số lượng BC cao bằng kháng sinh, kháng viêm, xuất tinh thường xuyên hay kết hợp những phương pháp trên đã cải thiện đáng kể các thông số tinh dịch và tỷ lệ mang thai. Vì vậy, việc chỉ định xét nghiệm tìm BC trong tinh dịch khi có số lượng tế bào tròn cao mặc dù không có biểu hiện viêm nhiễm sinh dục - tiết niệu là điều cần thiết, hỗ trợ cho việc điều trị vô sinh ở nam giới hiện nay. Như vậy, BC tăng cao trong tinh dịch nam giới vô sinh gợi ý liệu pháp điều trị giảm BC tinh dịch để tăng tốc độ di động và giảm hình thái bất thường của tinh trùng, làm tăng tỷ lệ thụ thai.

Kết luận

Nghiên cứu đã cho thấy, tỷ lệ BC cao trong tinh dịch của nam giới vô sinh là 6,25% (25 mẫu). Trong số các mẫu có tế bào tròn cao, mẫu có BC cao chiếm 24%. Số lượng BC trong tinh dịch không ảnh hưởng đến mật độ tinh trùng. Số lượng BC trong tinh dịch tăng cao ≥ 1 triệu/ml có liên quan đến giảm tốc độ di động trung bình và hình thái bình thường của tinh trùng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] WHO (2010), *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*, 287pp.
- [2] WHO (2000), *WHO Manual for the Standardized Investigation, Diagnosis, and Management of the Infertile Male*, Cambridge University Press, pp.32-35.
- [3] E. Kessopoulou, M.J. Tomlinson, C.L. Barratt, et al. (1992), "Origin of reactive oxygen species in human semen: spermatozoa or leucocytes?", *J. Reprod. Fertil.*, **94**(2), pp.463-470.
- [4] R.J. Aitken, G.N. De Iulius, J.M. Finnie, et al. (2010), "Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria", *Hum. Reprod.*, **25**(10), pp.2415-2426.
- [5] A.T. Alahmar (2019), "Role of oxidative stress in male infertility: an updated review", *J. Hum. Reprod. Sci.*, **12**(1), pp.4-18.
- [6] E. Johansson, A. Campana, R. Luthi, et al. (2000), "Evaluation of 'round cells' in semen analysis: a comparative study", *Hum. Reprod. Update*, **6**(4), pp.404-412.
- [7] Gianpiero D. Palermo, Queenie V. Neri, Tyler Cozzubbo, et al. (2016), "Shedding light on the nature of seminal round cells", *PLOS ONE*, **11**(3), DOI: 10.1371/journal.pone.0151640.
- [8] M. Punab, O. Poolamets, P. Paju, et al. (2017), "Causes of male infertility: a 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts", *Hum. Reprod.*, **32**(1), pp.18-31.
- [9] J.E. Lackner, A. Agarwal, R. Mahfouz, et al. (2010), "The association between leukocytes and sperm quality is concentration dependent" *Reprod. Biol. Endocrinol.*, **8**(12), DOI: 10.1186/1477-7827-8-12.
- [10] Moubasher Alaa, Sayed Heba, Mosaad Eman, et al. (2018), "Impact of leukocytospermia on sperm dynamic motility parameters, DNA and chromosomal integrity", *Central European Journal of Urology*, **71**(4), pp.470-475.