บทความพิเศษ

รีแอ็คทีฟ ออกซิเจน สปีชีส์ กับภาวะมีบุตรยากในเพศชาย

นเรศร สุขเจริญ*

Sukcharoen N. Reactive oxygen species and male infertility. Chula Med J 1996 Jan; 40(1): 7-14

Evidence has accumulated in recent years to indicate that a significant factor in the etiology of male infertility is a loss of sperm function as a consequence of oxidative stress. This stress originates from the excessive generation of reactive oxygen species by the spermatozoa and results in the peroxidation of unsaturated fatty acids in the sperm plasma membrane. It is possible that reactive oxygen species originating from leucocytes infiltrating the ejaculate at the moment of ejaculation could also stress the spermatozoa, although the powerful antioxidant properties of seminal plasma would counteract this source of damage. However, leucocytes infiltrating the seminal compartment at the level of the rete testes or epididymis may be in a better position to launch a free radical - mediated attack on the spermatozoa. Whatever the source, the reactive oxygen species exhibit powerful negative correlations with the movement characteristics of the spermatozoa and their capacity for sperm-oocyte fusion. These findings have implication in terms of the fundamental cell biology of human spermatozoa, the diagnosis of male infertility and the treatment of this condition.

In terms of diagnostics, the use of simple biochemical tests to detect peroxidative damage in human spermatozoa, the development of extremely sensitive chemiluminescence assays to screen human sperm suspensions for ROS generation, and the introduction of protocols for differentiating between leukocytes and spermatozoa as the source of oxidative stress are all of interest.

*ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

If leukocyte contamination of the sperm preparations is a major source of oxidative stress then the selective removal of these cells using magnetic beads is a possible therapeutic option. Alternatively, anti-oxidants might be incorporated into the IVF culture media.

Key words : *Reactive oxygen species, Male infertility, Spermatozoa, Leukocyes.*

Reprint request : Sukcharoen N, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

Received for publication. October 1,1995.

สาเหตุที่พบบ่อยของภาวะมีบุตรยากคือความผิดปกติของการทำงานของอสุจิ แต่เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการที่เชื่อถือได้ในการตรวจวินิจฉัยและรักษาสาเหตุดังกล่าว เหตุผลสำคัญคือ เรายังไม่เข้าใจถึงกลไกระดับโมเลกุลของเซลล์ที่ทำให้เกิดความผิดปกติของการทำงานของอสุจิ ทั้งการเปลี่ยนแปลงในด้านโครงสร้างและชีวเคมีที่ทำให้อสุจินั้นสูญเสียความสามารถในการเข้าปฏิสนธิกับไข่ การเข้าใจความรู้พื้นฐานดังกล่าวจะช่วยให้สามารถวินิจฉัยและให้การรักษาได้อย่างถูกต้อง ในบทความนี้จะได้กล่าวถึงความก้าวหน้าของการศึกษาความผิดปกติของการทำงานของอสุจิซึ่งเกิดจากผลของ Reactive oxygen species ต่อเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ

Reactive oxygen species กับอสุจิ

การผลิตและการปล่อย Reactive oxygen species เป็นคุณสมบัติปกติของ Phagocytes ซึ่งใช้ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย สารดังกล่าวก่อให้เกิดกระบวนการ Peroxidation ขึ้นซึ่งสามารถยับยั้งได้ด้วย Enzyme Catalase และ Peroxidase Reactive oxygen species ประกอบด้วย Superoxide, Hydrogen peroxide, Hypohalous acid และ Hydroxyl radical จากการศึกษาในระยะหลังพบว่า Reactive oxygen species มีส่วนเกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของโรคและความผิดปกติต่างๆ หลายอย่างในมนุษย์ เนื่องจาก Reactive oxygen species ก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ของร่างกาย

การศึกษาในระยะแรกพบว่าอสุจิของมนุษย์สามารถสร้างสาร Hydrogen peroxide ได้[1] ในการศึกษาต่อมาพบว่าอสุจิของวัวสามารถสร้าง Hydrogen peroxide ได้และ Metabolite ของสารดังกล่าวทำให้เกิดอันตรายต่อการเคลื่อนไหวของอสุจิ[2] และยังพบว่า Enzyme Catalase และ Peroxidase สามารถช่วยในการป้องกันผลเสียที่เกิดจาก Hydrogen peroxide ต่อการเคลื่อนไหวของอสุจิ นอกจากนั้นยังพบว่าอสุจิมีความสามารถจำกัดในการกำจัด Hydrogen peroxide[2] การศึกษาต่อมาพบว่าปริมาณ Enzyme Catalase ในน้ำอสุจิแกะมีระดับต่ำซึ่งไม่อาจป้องกันอันตรายจาก Hydrogen peroxide ได้ [3] ต่อมาพบว่าตัวอสุจิของหนู[4] และกระต่าย[5] สามารถสร้าง Hydrogen peroxide ได้ การศึกษาต่อมาพบว่าอสุจิของมนุษย์สามารถสร้าง Reactive oxygen species ได้[6,7]

การศึกษาในระยะแรกพบว่าการสร้าง Hydrogen peroxide ในอสุจิสามารถผลิตได้โดยผ่าน ทาง Oxidative deamination ของ Aromatic amino acids เช่น Phenylalanine, Tyrosine หรือ Tryptophan แต่พบว่า Amino acids ดังกล่าวไม่ได้มีผลต่อการสร้าง Reactive oxygen species ในอสุจิของมนุษย์ อสุจิของมนุษย์จะใช้ NADPH เป็นแหล่งของ Electron ในกระบวนการ Reduction ของ Oxygen ทำให้เกิดเป็น Superoxide ซึ่งจะถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็น Hydrogen peroxide โดย Superoxide dismutase[8,9]

Reactive oxygen species กับภาวะมีบุตรยาก

ได้มีรายงานในระยะหลังแสดงให้เห็นว่าการสร้าง Reactive oxygen species มีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับความสามารถในการปฏิสนธิของอสุจิภายนอกร่างกาย โดยมีผลต่อการทำงานของอสุจิ[7,10,11] หลักฐานทางคลินิคที่ทำให้เห็นความสำคัญของ Reactive oxygen species ต่อภาวะมีบุตรยาก ได้แก่ การพบความสัมพันธ์ในเชิงลบของ Reactive oxygen species ที่ตรวจพบภายหลังการเตรียมอสุจิกับอุบัติการของการตั้งครรภ์เองจากการตรวจติดตามเป็นเวลา 4 ปี[12] จากการศึกษาดังกล่าวพบว่าการตรวจน้ำอสุจิด้วยวิธีมาตรฐานไม่สามารถทำนายภาวะการตั้งครรภ์ได้ แต่การตรวจวัด Reactive oxygen species จะให้ข้อมูลเสริมที่สำคัญในการทำนายความสามารถในการปฏิสนธิของอสุจิ

การศึกษาในระยะต่อมาได้สนับสนุนรายงานในระยะแรกเกี่ยวกับผลการตรวจพบ Reactive oxygen species มีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับความสามารถในการปฏิสนธิของอสุจิ[13,14] โดยพบว่าผู้ป่วยในกลุ่มที่ไม่ตั้งครรภ์ด้วยการรักษาด้วยการฉีดเชื้อภายในโพรงมดลูก

หรือในรายที่เป็น Hypogonadotropic hypogonadism ที่ได้รับการรักษาด้วยฮอร์โมนจะมีระดับ Reactive oxygen species สูง[13] นอกจากนั้นพบว่ามีการสร้าง Reactive oxygen species มากผิดปกติในน้ำอสุจิของผู้ชายที่มาปรึกษาด้วยปัญหามีบุตรยากถึงประมาณ 40% แต่ไม่พบในกลุ่มที่ไม่มีตัวอสุจิหรือในกลุ่มที่มีบุตรตามปกติ[14]

การตรวจวิเคราะห์ Reactive oxygen species สามารถทำได้โดยใช้ Chemiluminescence techniques ได้มีการปรับปรุงเทคนิคดังกล่าว โดยใช้ Horseradish peroxidase ร่วมด้วยเพื่อตรวจหา Hydroxygen peroxide[15] และการค้นพบ Luminol analogs ในการใช้ตรวจด้วยวิธี Chemiluminescene techniques ทำให้มีประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ Reactive oxygen species จากอสุจิเพิ่มขึ้นกว่าเดิม 2-3 เท่า[16] นอกจากจะใช้เทคนิคดังกล่าวแล้วยังมีการพัฒนานำไปใช้ในการตรวจ Reactive oxygen species ที่สร้างจากเม็ดโลหิตขาวได้[17] ซึ่งเป็นส่วนที่สำคัญของการสร้าง Reactive oxygen species ในน้ำอสุจิ

Reactive oxygen species กับเม็ดโลหิตขาว

เนื่องจากน้ำอสุจิมีการปนเปื้อนโดยเม็ดโลหิตขาว[18] และเม็ดโลหิตขาวส่วนใหญ่เป็น Neutrophil ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการสร้าง Reactive oxygen species ได้ปริมาณมากกว่าอสุจิมาก จึงมีความจำเป็นในการตรวจหาและตรวจนับเม็ดโลหิตขาวที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำอสุจิ ในรายที่มีการติดเชื้อของอวัยวะสืบพันธุ์เพศชายจะมีการปนเปื้อนของเม็ดโลหิตขาวมากในน้ำอสุจิและจะพบ Reactive oxygen species ในระดับสูง[13] การตรวจพบเม็ดโลหิตขาวในน้ำอสุจิมากผิดปกติ (Pathologic leucocytosis) ที่องค์การอนามัยโลกกำหนดไว้ คือ มีความเข้มข้นของเม็ดโลหิตขาวมากกว่า 1×10^6/มล.[19] ซึ่งพบได้น้อยมากเพียงประมาณ 5% ของผู้ชายที่มารับการตรวจรักษาเรื่องปัญหามีบุตรยาก[20] ในกรณีที่มีเม็ดโลหิตขาวปนเปื้อนในน้ำอสุจิจะไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหน้าที่เนื่องจากน้ำอสุจิ (Seminal plasma) มี Antioxidants ที่มีประสิทธิภาพสูง[21] ได้แก่ Enzyme ต่างๆ เช่น Superoxide dismutase, Glutathione peroxidase และ Glutathione reductase นอกจากนั้นยังมีสารที่มีโมเลกุลเล็กๆ เช่น Uric acid, Glutathione, Ergothioneine, Hypotaurine, Ascorbic acid และ α-Tocopherol แต่ในกรณีที่มีการเติมเม็ดโลหิตขาวลงใน Sperm suspension จะทำให้การทำงานของอสุจิลดลง[22] เนื่องจากไม่มีการป้องกันจาก Antioxidant จากน้ำอสุจิ (Seminal plasma) ในการศึกษาต่อมาพบว่าการสร้าง Reactive oxygen species จากเม็ดโลหิตขาวที่ปนเปื้อนใน Sperm suspension ที่ใช้ในกระบวนการปฏิสนธินอกร่างกาย (IVF) จะมีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับอัตราการปฏิสนธิของไข่ภายนอกร่างกาย[23] ดังนั้นการเติม Antioxidants ลงในสารละลายเลี้ยงอสุจิอาจช่วยในการปฏิสนธิในรายที่มีปัญหาจาก Reactive oxygen species ได้ ในการที่จะเลือก Antioxidants ที่เหมาะสมจำเป็นต้องทำความเข้าใจกับกระบวนการของ Lipid peroxidation ของอสุจิก่อน

Lipid peroxidation

กลไกที่ Reactive oxygen species รบกวนการทำงานของอสุจิเชื่อว่าเกิดจากกระบวนการ Peroxidation ของ Unsaturated fatty acids ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ โดยปกติเยื่อหุ้มอสุจิมีปริมาณ Unsaturated fatty acid ในปริมาณสูงโดยเฉพาะอย่างยิ่ง Docosahexanoic acid ซึ่งเป็น Unsaturated fatty acid ที่มี Unsaturated double bond ถึง 6 Bond ในโมเลกุล[24] ทำให้สามารถในการเชื่อมกันของเยื่อหุ้มอสุจิกับเยื่อหุ้มไข่ได้ดีซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญของการปฏิสนธิ แต่เนื่องจาก Reactive oxygen species โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Hydrogen peroxide ก่อให้เกิดกระบวนการ Lipid peroxidation เปลี่ยน Unsaturated fatty acid เป็น Lipid peroxides ทำให้คุณสมบัติของเยื่อหุ้มอสุจิเสียไปและความสามารถในการปฏิสนธิเสียไปด้วย จากการศึกษาต่อมาพบว่า Lipid peroxidation ของอสุจิมี

ความสัมพันธ์ในเชิงลบกับการเคลื่อนไหวของอสุจิและการที่อสุจิเข้าปฏิสนธิกับไข่[25]

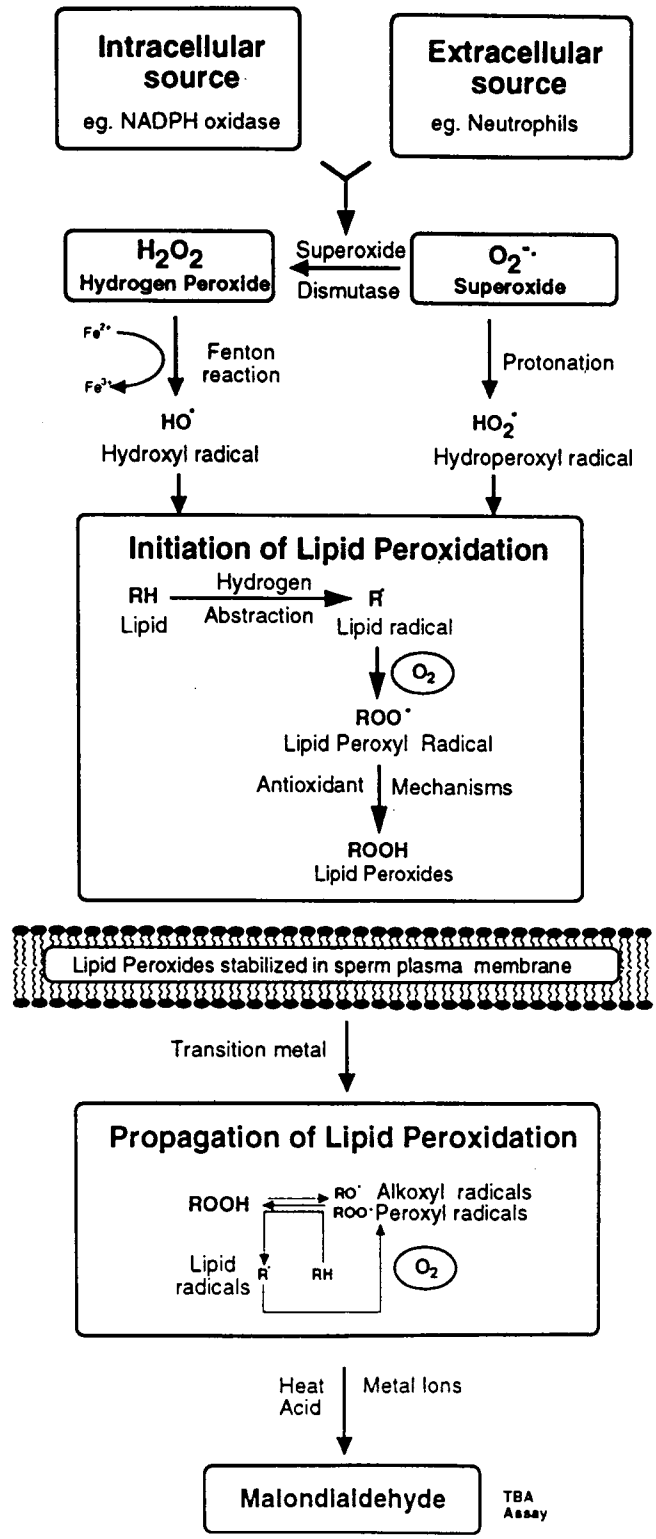
Reactive oxygen speicies ก่อให้เกิดปฏิกิริยาที่เรียกว่า Harber-Weiss reaction[7] ทำให้เกิด Hydroxyl radical (OH) ซึ่งเป็นสารสำคัญที่ก่อให้เกิด Lipid peroxidation ดังแสดงในสมการต่อไปนี้

$$H_2O_2 + O^-_2 \cdot \text{---------} > OH\cdot + OH^- + O_2$$

รายละเอียดเกี่ยวกับผลของ Reactive oxygen species ต่อกระบวนการ Lipid oxidation บนผิวของอสุจิแสดงในรูปที่ 1

จะเห็นได้ว่ากระบวนการ Lipid peroxidation มีความสำคัญต่อความผิดปกติของการทำงานของอสุจิ การตรวจกระบวนการ Lipid peroxidation ที่ใช้กันอยู่ทั่วไปใช้ปฏิกิริยา Thiobarbituric acid (TBA) ในการตรวจวัด Malondialdehyde ซึ่งเป็นสารที่ได้จากกระบวนการ Lipid peroxidation[4,5,10] ดังแสดงในรูปที่ 1

ความรู้ดังกล่าวอาจนำมาใช้ในการปรับปรุงให้ประสิทธิภาพของการปฏิสนธิภายนอกร่างกายให้ดี ขึ้นได้โดยการให้ Antioxidants ร่วมกับการรักษาด้วยวิธี IVF ดังที่ได้กล่าวแล้วในตอนต้นว่าน้ำอสุจิ (Seminal plasma) มี Antioxidants ซึ่งมีคุณสมบัติในการป้องกันอสุจิจาก Reactive oxygen species จากเม็ดโลหิตขาว ดังนั้นขั้นตอนในการเตรียมอสุจิ (Sperm preparation) จะเป็นการแยกอสุจิที่มีคุณภาพดีออกมาเพื่อใช้ในเทคโนโลยีในการช่วยเจริญพันธุ์ต่อไป จะเป็นการแยกอสุจิจากน้ำอสุจิ (Seminal plasma) ด้วย การเตรียมอสุจิทำได้หลายวิธี เช่น ปั่นแยกโดยใช้สารละลาย Percoll แยกชั้น (Percoll gradient centrifugation), การว่ายขึ้นของอสุจิจากน้ำอสุจิ (Swim-up) หรือการแยกอสุจิโดยใช้ Albumin columns วิธีการที่แยกอสุจิจากน้ำอสุจิโดยการปั่นแยกอสุจิใน สารละลายเลี้ยงเชื้อปกติจะได้ตะกอนอสุจิที่มีเม็ดโลหิตขาวปนเปื้อนมาก ซึ่ง



รูปที่ 1. การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของกระบวนการ Lipid peroxidation บนเยื่อหุ้มอสุจิจาก Reactive oxygen species

จะมีการสร้าง Reactive oxygen species มากแต่ไม่มี Antioxidants จากน้ำอสุจิ (Semenial plasma) วิธีนี้จึงไม่ควรใช้ในการเตรียมอสุจิเพื่อใช้ในการช่วยเจริญพันธุ์ ส่วนการเตรียมอสุจิด้วยการปั่นแยกอสุจิ โดยใช้สารละลาย Percoll แยกชั้นและการว่ายขึ้นของอสุจิ (Swim-up) จะสามารถแยกอสุจิที่มีคุณภาพดี ปราศจากเม็ดโลหิตขาวและน้ำอสุจิ (Seminal plasma) อย่างไรก็ตามควรมีการตรวจการปนเปื้อนของเม็ดโลหิตขาวซึ่งสามารถทำได้ง่ายในสารละลายอสุจิภายหลังการเตรียม[17] ในกรณีที่พบว่ายังมีการปนเปื้อนของเม็ดโลหิตขาวอยู่จะสามารถแยกเม็ดโลหิตขาวออกโดยใช้ Magnetic beads ซึ่งเคลือบโดย Monoclonal antibodies ต่อ Common leucocyte antigen (CD45) หรืออาจเติม Antioxidants ลงในสารละลายอสุจิเพื่อจับกับ Reactive oxygen species ก่อนที่จะทำให้เกิด Lipid peroxidation กับเยื่อหุ้มอสุจิ[26] การเติม Antioxidants ที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก เช่น Pentoxyfylline ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม Phosphodiesterase inhibitors และมีคุณสมบัติในการกำจัด Reactive oxygen species ที่สร้างจากตัวอสุจิ[27] โดยสารนี้ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของระดับ Cyclic AMP ภายในเซลล์ ซึ่งทำให้การเคลื่อนไหวของอสุจิดีขึ้น

ในรายที่มีภาวะมีบุตรยากเช่นในรายที่มีความเข้มข้นของอสุจิต่ำ (Oligozoospermia) พบว่า Reactive oxygen species จะสร้างมาจากอสุจิมากกว่ามาจากเม็ดโลหิตขาว[28] ดังนั้นกระบวนการ Lipid peroxidation ควรจะเกิดก่อนที่จะมีการหลั่งอสุจิแล้ว ดังนั้นจึงควรใช้วิธีป้องกันไม่ให้เกิดกระบวนการ Lipid peroxidation ตั้งแต่แรก เช่นการให้ Chain-breaking antioxidants เพื่อไม่ให้เกิดกระบวนการ Lipid oxidation อย่างกว้างขวาง จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า α-tocopherol เป็นสาร Antioxidant ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด[26] แนวทางการรักษาอีกวิธีหนึ่งคือการจับสารโลหะออกจากอสุจิ โดยเฉพาะอย่างยิ่งธาตุเหล็กซึ่งเร่งกระบวนการ Lipid peroxidation สารที่ใช้จับธาตุเหล็กดังกล่าวอาจใช้ Desferrioxamine, Diethylene-triaminepenta-acetic acid หรือ Apotransferrin

การเข้าใจถึงกลไกที่ Reactive oxygen species ก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่ออสุจิ และการปฏิสนธิจะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ทางคลินิกเพื่อใช้ในการวินิจฉัยความผิดปกติของอสุจิ การทำนายความสามารถในการปฏิสนธิของอสุจิและในการรักษาความผิดปกติดังกล่าวในที่สุด อย่างไรก็ตามยังคงต้องการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องนี้อีกมาก

สรุป

จากการศึกษาในปัจจุบันพบว่า Reactive oxygen species ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการทำงานของอสุจิ โดยจะก่อให้เกิดกระบวนการ Lipid peroxidation ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่ผิวของอสุจิ Reactive oxygen species สร้างมาจากเม็ดโลหิตขาวที่ปนเปื้อนในน้ำอสุจิ แต่เนื่องจากน้ำอสุจิ (Seminal plasma) มีคุณสมบัติเป็น Antioxidant จึงสามารถป้องกันอันตรายดังกล่าวต่อตัวอสุจิได้ Reactive oxygen species มีความสัมพันธ์เชิงลบกับการเคลื่อนไหวของอสุจิและการที่อสุจิเข้าผสมกับไข่ จากความรู้ดังกล่าวทำให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการวินิจฉัยสาเหตุภาวะมีบุตรยากในเพศชายและการรักษา ในแง่ของการวินิจฉัยโดยการใช้การทดลอบทางชีวเคมีง่ายๆ ในการตรวจหา Reactive oxygen species ว่ามาจากเม็ดโลหิตขาวหรือตัวอสุจิ ในกรณีที่เกิดจากการปนเปื้อนของเม็ดโลหิตขาวอาจให้การรักษาโดยใช้ Magnetic beads ในการแยกเม็ดโลหิตขาวออกไป หรืออาจให้การรักษาโดยเติม Antioxidants ลงในสารละลายเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทำเด็กหลอดแก้วอาจสามารถลดอันตรายที่กิดจากกระบวนการ Lipid peroxidation ลงได้ อย่างไรก็ตามยังคงต้องการการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องนี้อีกมาก

อ้างอิง

1. Macleod J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. Am J Physiol 1943;138:512-8
2. Tosic J, Walton A. Metabolism of spermatozoa. Formation and elimination of hydrogen peroxide by spermatozoa and effects on motility and survival. Biochem J 1950 Aug;47(2):199-212
3. Mann T. Metabolism of semen. Adv Enzymol 1949;9:329-90
4. Alvarez JG, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa : its effect on sperm motility. Biol Reprod 1982 Dec;27(5):1102-8
5. Alvarez JG, Storey BT. Lipid peroxidation and the reactions of superoxide and hydrogen peroxide in mouse spermatozoa. Biol Reprod 1984 May;30(4):833-41
6. Alvarez JG, Tochstone JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermaotzoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. J Androl 1987 Sep-Oct;8(5):338-48
7. Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. J Reprod Fertil 1987 Nov;81(2):459-69
8. Mennella MR, Jones R. Properties of spermatozoal superoxide dismutase and lack of involvement of superoxides in metal-ion-catalysed lipid-peroxidation reaction in semen. Biochem J 1980 Nov 1;191(2): 289-97
9. Aitken RJ, Clarkson JS. Generation of reactive oxygen species by human spermatozoa. In: Dormandy T, Rics-Evans C, eds. Free Radicals: Recent Developments in Lipid Chemistry,Experimental Pathology and Medicine. London : Richelieu Press, 1987: 333-5
10. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, Lipid peroxidation and human sperm function. Biol Reprod 1989 Jul;40(1):183-97
11. Aitken RJ, Clarkson JS, Hargreave TB, Irvine DS, Wu FCW. Analysis of the relationship between defective sperm function and the gene ration of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. J Androl 1989 May-Jun;10(3):214-20
12. Aitken RJ, Irvine DS, Wu FCW. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. Am J Obstet Gynecol 1991 Feb;164(2): 542-51
13. D'Agata R, Vicari E, Moncada ML, Sidoti G, Calogero AE, Fornito MC, Minacapilli G, Mongioi A, Polosa P. Generation of ractive oxygen species in subgroups of infertile men. Int J Androl 1990 Oct; 13(5):344-5
14. Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. Fertil Steril 1992 Feb;57(2): 409-16
15. Aitken RJ, Buckingham DW, West KM. Reactive oxygen species and human

spermatozoa; analysis of the cellular mechanisms involved in luminol and lucigenin dependent chemiluminescence. J Cell Physiol 1992 Jun;151(3):466-77

16. Aitken RJ, Buckingham D. Enhanced detection of reactive oxygen species produced by human spermatozoa with 7-dimethyl amino-naphthalin-1, 2-dicarbonic acid hydrazide. Int J Androl 1992 Jun;15(3): 211-19
17. Krausz C, West K, Buckingham D, Aitken RJ. Development of a technique for monitoring the contamination of human semen samples with leucocytes. Fertil Steril 1992 Jun;57(6):1317-25
18. Wolff H, Anderson DJ. Immunohistologic characterization and quantitation of leucocyte subpopulations in human semen. Fertil Steril 1988 Mar;49(3):497-504
19. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1992.
20. Aitken RJ, West KM. Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. Int J Androl 1990 Dec;13(6):433-51
21. Jones R, Mann T, Sherins R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties effects of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. Fertil Steril 1979 May;31(5):531-7
22. Maruyama DK Jr,Hale RW, Rogers BJ. Effects of white blood cells on the in vitro penetration of zona-free hamster eggs by human sperm atozoa. J Androl 1985 Jan-Feb;6(1):127-35
23. Sukcharoen N, Keith J, Irvine DS, Aitken RJ. Predicting the fertilizing potential of human sperm suspensions in vitro: importance of sperm morphology and leukocyte contamination. Fertil Steril 1995 Jun;63(6):1293-300
24. Aitken RJ. The role of free oxygen radicals and sperm function. Int J Androl 1989 Mar;12(2):95-7
25. Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham D. Relationship between iron-catalyzed lipid peroxidation potential and human sperm function. J Reprod Fertil 1993 May;98(1):257-65
26. Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. J Androl 1988 Nov-Dec;9(6):367-76
27. Gavella M, Lipovac V, Marotti T. Effect of pentoxifylline on superoxide anion production by human sperm. Int J Androl 1991 Oct;14(5):320-7
28. Aitken RJ, Buckingham D, West K, Wu FC, Zikopoulos K, Richardson DW. Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the high levels of reactive oxygen species recorded in the ejaculates of oligozoospermic patients. J Reprod Fertil 1992 Mar;94(2):451-62