

Sperm Morfolojisi ve Acridine Orange Boyamanın ICSI'deki Fertilizasyon Oranları ve Embriyo Kalitesi ile İlişkisi

Fatma Bahar CEBESOY¹, Cihat ÜNLÜ², Kaan AYDOS³, Volkan BALTACI⁴

¹Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Gaziantep University, Gaziantep, Turkey

²Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey

³Infertility Research Unit, Faculty of Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey

⁴IVF Center, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Ankara University, Ankara, Turkey

Received 06 March 2006; received in revised form 24 April 2006; accepted 25 April 2006

Abstract

The Relationship Between Sperm Morphology-Acridine Orange Staining and Fertilization Rate-Embryo Quality in ICSI

Objective: The aim of this study is to determine the relationship of sperm morphology with fertilization ratio and embryo quality in ICSI cycles and also the relationship of sperm morphology with sperm DNA damage.

Materials and Methods: Fifty six infertile couples were included in this prospective study. Azospermic patients and women over the age 35 were excluded from the study.

Controlled ovarian hyperstimulation was applied in the context of long protocol, using gonadotropin releasing hormone analogue (GnRHa) and after the second day of her menses, recombinant gonadotropin (r-FSH) or human menopausal gonadotropin (hMG) was applied. After the administration of 10.000 IU hCG IM, oocytes were collected by the transvaginal route. Sperm morphology was evaluated in preparates dyed using Diff-Quick method, using Kruger strict criteria. If more than 4% of spermatocytes had normal morphology then that patient was included in the normal group. Acridine orange dye was used to determine the sperm DNA damage and if >56% green or <56% red fluorescence was evident then that sample was included in the AO(-) and the others in the AO(+) group. Fertilization was confirmed by the presence of 2 pronuclei and polar body at 16-18 hours. The quality of embryos were evaluated in the third day and due to their being fragmented or even they were classified as grade I,II,III.

Results: Fertilization ratio was 73.28%, in normal sperm morphology group and was 51.69% in abnormal morphology group. When the two groups were compared according to embryo quality, normal group had a mean 50.17 grade I, 37.19 grade II, 46.91 grade III embryo's. Abnormal group had a mean 53.50 grade I, 42.55 grade II, and 53.91 grade III embryo's.

In the group stained normal (undamaged DNA) with acridine orange (AO) sperm morphology was 60.6% normal and 39.4% abnormal.

In the group stained abnormal (damaged DNA) with AO, sperm morphology was 21.27% normal and 78.3% abnormal.

Discussion: There is significant relationship between sperm morphology and DNA damage. It is shown by ICSI that sperm morphology has an effect on fertilization ratios but no relation was found between sperm morphology and embryo quality.

Keywords: sperm morphology, fertilization, embryo quality, DNA damage

Özet

Amaç: Bu çalışmanın amacı ICSI sikluslarında, sperm morfolojisi ile fertilizasyon oranlarının ve embriyo kalitesinin ilişkisini araştırmak, ayrıca sperm morfolojisi ile sperm DNA hasarının karşılıklı etkileşimini analiz etmektir.

Materyal ve Metot: Prospektif olarak planlanan çalışmaya 56 infertil çift alınmıştır. Azoospermik hastalar çalışmaya dahil edilmezken, kadın yaşı 35'in altında tutulmuştur. Kontrollü overyan hiperstimulasyon uzun protokol kapsamında gonadotropin salıverme hormon analogu (GnRHa) ve adetin 2. gününden itibaren rekombinan gonadotropin (r-FSH) ve ya insan menopozal gonadotropini (hMG) ile yapılmış, 10 000 IU hCG'nin IM uygulanması sonrasında 36. saatte transvajinal olarak oosit toplama işlemi gerçekleştirilmiştir. Sperm morfolojisi Diff-Quick yöntemiyle boyanan preparatlar,

Corresponding Author: Dr. Fatma Bahar Cebesoy
Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum AD
Kilis Yolu Üzeri PK 27310 Şehitkamil, Gaziantep, Türkiye
Phone : +90 533 575 60 23
E-mail : fbcebesoy@yahoo.com; fbcebesoy@mynet.com

Kruger kesin kriterlerine göre değerlendirilmiş, >%4 normal morfolojili spermi olanlar normal olarak kabul edilmiştir. Sperm DNA hasarına "Acridine Orange" (AO) ile boyanarak bakılmış, <%56 kırmızı floresans verenler AO (-), diğerleri ise AO (+) grubu oluşturmuşlardır. Fertilizasyon 16-18. saatte 2 pronukleus ve polar cismin görülmesi ile teyit edilirken, embriyo kalitesi embriyoların 3. günde morfolojik olarak değerlendirilmesiyle fragmentasyon veya homojen ve eşit dağılımlı olma durumuna göre grad I, II, III olarak klasifiye edilmiştir.

Sonuç: Sperm morfolojisine göre normal olan grupta fertilizasyon oranı %73.28 iken, anormal olan grupta %51.69 bulunmuştur. Bu 2 grup hasta embriyo kaliteleri açısından karşılaştırıldığında normal olan grupta grad I embriyo ortalaması 50.17 iken, grad II embriyo ortalaması 37.19, grad III embriyo ortalaması ise 46.91'dir. Anormal morfolojili grupta ise grad I embriyo oranı 53.50, grad II embriyo oranı 42.55 ve grad III oranı 53.91 olarak gözlenmiştir. Sperm DNA hasarı, yani AO ile boyanmayanla sperm morfolojisi karşılaştırıldığında, AO ile normal boyananlarda sperm morfolojisi %60.6 normal iken, %39.4 anormaldir. AO ile anormal boyananlarda ise sperm morfolojisi %21.27 normal iken %78.3 anormaldir.

Tartışma: Sperm morfolojisi ile sperm DNA hasarı arasında anlamlı bir ilişki mevcuttur. ICSI'da sperm morfolojisinin fertilizasyon oranlarını etkilediği saptanmış, fakat sperm morfolojisi ile embriyo kalitesi arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır.

Anahtar sözcükler: sperm morfolojisi, fertilizasyon, embriyo kalitesi, sperm DNA hasarı

Giriş

İnfertilitede erkek faktörünün önemi uzun zamandır bilinmektedir. Günümüzde IVF'deki ilerlemeler sonucunda gündeme gelen ve kullanılan intra stoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI), özellikle erkek faktörü infertilite için önemli bir tedavi yöntemidir. Üremeye yardımcı tekniklerde kaydedilen ilerlemeler neticesinde, ciddi spermatojenез bozukluğu gösteren, hatta tek bir canlı spermi bulunan erkekler için bile çocuk sahibi olabileme şansı ortaya çıkmıştır (15).

Erkek faktörü infertiliteyi değerlendirmeye yönelik bilinen en eski ve yaygın test standart semen analizidir (18). Ne var ki, standart semen analizi spermin fertilizasyon potansiyelini tam olarak gösterememektedir. Fertilizasyon potansiyelinin bilinmesi ise, özellikle ICSI başarısızlığı olan durumların açıklanabilmesi açısından önemli görülmektedir (26,6). İşte bu noktada da sperm morfolojisi ve DNA'nın sağlam olması önem kazanmaktadır.

Bu çalışmada amaç, sperm morfolojisinin sperm DNA hasarı ile olan ilişkisinin yanı sıra, sperm morfolojisinin ICSI ile fertilizasyon oranları ve embriyo kalitesi üzerine etkilerinin araştırılmasıdır.

Materyal ve Metot

Bir yılı aşkın süredir çocuk sahibi olamamış 56 infertil çift çalışmaya alındı. Tüm olgularda kadın yaşı 35'in altındaydı. Kadınların yaş ortalamaları 29.7 iken, erkeklerin ki 33.4 idi. Çiftlerin 31'inde (%55.3) erkek faktörü infertilite, 7'sinde (%12.5) tubal faktör, 18'inde ise (%32.1) açıklanamayan in-

fertilite mevcuttu. Semen analizleri WHO kriterlerine göre değerlendirildi. Semen 3-5 günlük cinsel perhiz sonrasında, oosit toplama gününde alındı. ICSI işlemi için semen hazırlığı sperm sayısı 20 milyon/ml'nin altında olanlarda gradient yöntemiyle, 20 milyon/ml'nin üstünde olanlarda ise "swim-up" tekniğiyle yapıldı.

Azoospermik erkekler çalışma dışı bırakıldı. Sperm morfolojisine Diff-Quick solüsyonları ile boyanan preparatlarda bakıldı ve Kruger'in kesin kriterlerine göre değerlendirildi (Tablo 1). Hastalar, normal morfolojili sperm sayısı %4'ün üstünde olan ve olmayanlar olarak 2 gruba ayrıldı.

Sperm DNA hasarı AO ile boyanarak araştırıldı. AO ile boyanmak için kullanılacak sperm örneği ICSI işlemi yapıldıktan sonra kalan semenden alındı. İki kuru lamele 1'er damla işlem görmüş semen örneğinden alınarak kalın yayma yapıldı ve havada bir gece bekletilerek kurutuldu. Daha sonra fiksasyon işlemi için yaymalar 20 dakika Carnoy solüsyonunda (3:1 volüm oranında metanol ve glacial asetik asit) bekletildi. Fiksasyondan sonra kurutulan yaymaların boyanması, günlük hazırlanan boyama solüsyonu ile gerçekleştirildi. Boyama solüsyonunu hazırlamak için, 10 ml stok solüsyonu, 40 ml 0.1 M sitrik asit ve 2.5 ml 0.3M Na₂HPO₄·7H₂O kullanılmıştır. Stok solüsyonu ise 1000 ml distile su içinde 1 g "Acridine Orange" yarı çinkoklorid içerecek şekilde hazırlanmış olup, karanlıkta ve + 4°C'da saklanabilmektedir. Boyama solüsyonunun pH'si 2.5'e ayarlandıktan sonra boyama işlemine geçildi. Fikse edilmiş yayma, üzerine 2-3 ml boyama solüsyonundan damlatıldıktan sonra boyandı ve 15 dakika bekletil-

Tablo 1. Kruger kesin kriterleri

Tablo 1. Kruger kesin kriterleri	
Baş	Düz, oval Uzunluk 5-6 µ; genişlik 2.5-3 µ. Genişlik/uzunluk 3/5-2/3 arasında akrozom başın %40-70'ini örtecek
Boyun	Baş eksenini ile aynı ekseninde uzanmalı, bütünlüğü bozulmuş olmamalı
Orta kısım	Silindirik şekilde ve 1 µ genişlikte olup, baş uzunluğunun 1.5 katını geçmemeli Baş büyüklüğünün yarısından büyük sitoplazmik droplet içermemeli
Kuyruk	Orta kısımda hafifçe incelen, kıvrım içermeyen, 45 µ uzunlukta

dikten sonra, yaymalar saf suyla yıkanarak kurumadan lamelle kapatıldı. Bir kağıt havlu yardımıyla neminin alınmasını takiben, şeffaf tırnak cilasıyla lamel lama yapıştirıldı. Yaymalar aynı gün içinde, 490 nm eksitasyon, 530 nm bariyer filtresi olan floresans mikroskopla 10x100 büyütme altında 100'er hücre sayılarak değerlendirildi. Değerlendirmede, belirgin yeşil floresans veren tüm spermeler, “yeşil” olarak skorlandı. Sarı-turuncu-kırmızı renklerde floresans veren tüm spermeler ise DNA içeriklerinde az (sarı-portakal rengi) ya da çok (kırmızı) oranda denatürasyon sürecinin başladığı düşünülerek “kırmızı” olarak skorlandı. Spermatozoaların %56’dan fazlasının kırmızı olarak skorlanması, semen örneğinde DNA hasarının çok olduğu şeklinde yorumlandı. Bunlar AO pozitif (+) olarak kabul edildi (20,23).

Kontrollü ovaryen hiperstimulasyon için, uzun protokol kapsamında bir önceki adet 21. gününde başlanan 500 mikrogram dozunda Gonadotropin Salıverme Hormon Analogu (GnRH α) ve adet 2. gününden itibaren rekombinan gonadotropin (r-FSH) veya insan menopozal gonadotropini (hMG) uygulandı. Transvajinal ultrasonografi (TV-USG) ile yapılan follikül takibinde en büyük follikül çapı 18 mm olduğunda son r-FSH veya hMG dozundan 24 saat sonra 10 000 IU hCG IM olarak uygulandı. Oosit toplama işlemi (OPU) hCG uygulamasından 36 saat sonra, TV-USG eşliğinde, follikül aspirasyonu ile gerçekleştirildi. Follikül aspirasyonu, ultrasonografi cihazı vajinal probuna adaptör aracılığıyla takılan aspirasyon iğnesiyle vajen yan fornikslerinden girilerek yapıldı.

Tüm matür oositlere (metafaz-II) 4-6 saat içinde ICSI prosedürü uygulandı. İnseminasyonu takip eden 16-18. saatlerde insemine edilmiş oositlerde pronükleus kontrolü yapıldı. İki pronükleus ve polar cisim varlığı normal fertilizasyon olarak kabul edildi. Oosit ve embriyo kültürü için ardışık kültür ortamları kullanıldı.

Transfer öncesinde embriyolar 3. günde morfolojik olarak değerlendirildi. Grad I, II, III (A, B, C kalite) embriyolar olarak klasifiye edildiler. Grad I-A, blastomerlerin homojen olduğu, fragmentasyon bulunmayan; Grad II-B, blastomerlerin biraz bozuk veya düzensiz bir şekilde olduğu ve %10’a kadar fragmentasyon gösteren, Grad III-C blastomerlerin homojen ve eşit dağılımlı olmadığı, %50’ye kadar fragmentasyon bulunan embriyolar olarak kabul edildiler.

İstatistiksel analizler SPSS kullanılarak “student’s-t” testi, “Mann-Whitney U” ve χ^2 testi ile yapılmıştır.

Tablo 2. Fertilizasyon ile sperm morfolojisi karşılaştırması

Morfoloji	n	Fertilizasyon % \pm SD	p
Normal	25	73.28 \pm 18.08	0.003
Anormal	31	51.69 \pm 30.08	0.002*
*p <0.01			

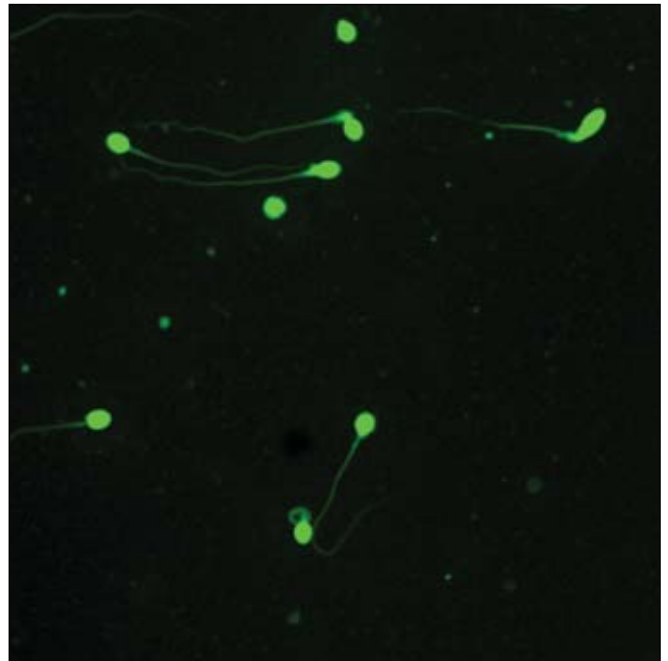
Tablo 3. Embriyo kaliteleri ile sperm morfolojisinin karşılaştırılması

	Morfoloji	n	Fertilizasyon % \pm SD	p
Embriyo A	Normal	18	50.17 \pm 23.69	0.680*
	Anormal	17	53.50 \pm 23.70	
Embriyo B	Normal	18	37.19 \pm 22.46	0.477*
	Anormal	22	42.55 \pm 24.22	
Embriyo C	Normal	17	46.91 \pm 31.47	0.514*
	Anormal	16	53.91 \pm 29.21	
*p <0.05				

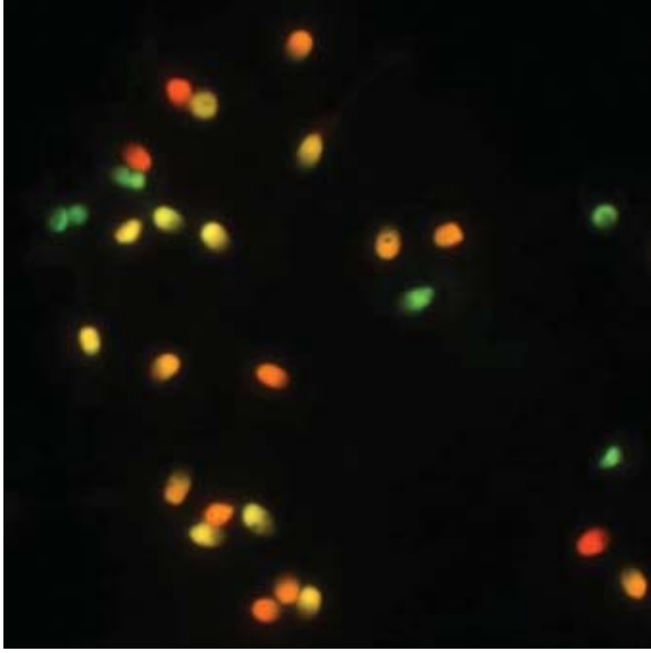
Sonuç

Fertilizasyon oranları, sperm morfolojisine göre normal grupta %73.28 iken anormal olan grupta %51.69 olarak bulundu ($p < 0.01$) (Tablo 2). Bu 2 grup hasta embriyo kaliteleri açısından karşılaştırıldığında, morfolojisi normal olan grupta grad I embriyo ortalaması 50.17 iken, grad II embriyo ortalaması 37.19, grad III embriyo ortalaması 46.91 şeklinde kaydedildi. Anormal morfolojili grupta ise grad I embriyo oranı 53.5, grad II embriyo oranı 42.55 ve grad III oranı 53.91 olup, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0.053$) (Tablo 3).

Sperm DNA hasarı, yani AO ile boyanmayla sperm morfolojisi karşılaştırıldığında, AO ile normal boyananlarda sperm morfolojisi de %60.6 normal iken, %39.4 anormal bulundu. AO ile anormal boyananlarda ise sperm morfolojisi %21.27 normal iken %78.3 anormaldi. Bu grupta istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır (Resim 1 ve 2).



Resim 1. AO ile boyandığında yeşil floresans veren normal DNA’lı spermeler



Resim 2. AO ile normal (yeşil) ve anormal (kırmızı) boyanan spermeler

Tartışma

Sperm morfolojisinin, fertilizasyon kapasitesinin önemli bir göstergesi olduğu uzun zamandır düşünülmektedir. Literatürdeki verilere göre %4 normal morfolojinin eşik değeri olarak alındığı IVF sikluslarında fertilizasyon şansının maksimum olduğu gösterilmiştir. Birçok çalışma morfolojinin fertilizasyonda sınırlı değeri olduğunu gösterse de, farklı sonuçların, farklı boyama teknikleri, sperm hazırlama protokolleri ve morfoloji klasifikasyon sistemlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (11,2,17,14). Ayrıca, morfolojik olarak normal spermelerin, fertilizasyon oranları ve gebelik oranları ile belirgin olarak doğrudan ilişkili olduğu görülmekte ve bu nedenle de morfolojik olarak normal sperm yüzdesinin fertilizasyon ve gebelik oranlarını etkilediği söylenmektedir (11,25).

Grow ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, sperm morfolojisi kesin kriterlerine göre, normal sayısı $<4\%$, $4-14\%$, $>14\%$ olan 3 grup hastada IVF (*In vitro* fertilizasyon) sonuçlarına bakılmış, $>14\%$ olan grupta fertilizasyon oranları $>85\%$ olarak saptanmış, bu nedenle de morfolojinin fertilizasyon kapasitesini belirleyen mükemmel bir biyolojik göstergesi olduğu belirtilmiştir (8). Donnelly ve arkadaşlarının yaptıkları başka bir çalışmada da, 50% 'nin üzerinde fertilizasyonun olduğu hastalarda sperm morfolojisinin anlamlı olarak daha iyi olduğu gösterilmiştir ($p<0.05$) (5). Başka bir yayında ise, bunu destekler şekilde morfolojinin fertilizasyon oranlarını etkilediği bildirilmiş ve hatta her bir morfolojik bozukluk için fertilizasyon oranlarına bakılmıştır. Fertilizasyon oranları; elonge başta 63.4% , sitoplazmada droplet varlığında 63.3% , amorf başta 59.6% , kırık boyunda 34.1% olarak bildirilmiştir. Normal morfolojide ise fertilizasyon oranı 74.4% 'tür (9).

Bizim çalışmamızda ortalama fertilizasyon oranı 61.5% olarak bulundu. Sperm morfolojisi normal olanlarda fertilizasyon oranı 73.2% iken, anormal olanlarda 51.6% 'da kaldı. Bu da anormal morfolojinin, fertilizasyonu anlamlı oranda düşürdüğünü göstermektedir. Çalışmada sperm morfolojisinin anormalliklerine göre ayırım yapılmadığından, her bir morfolojik bozukluk için olan fertilizasyon oranları belirlenmemiştir.

Embriyo kalitesi ile sperm morfolojisi arasındaki ilişkiye bakıldığında, embriyo kalitesinin yine sperm özellikleriyle baş anormalliklerinden etkilendiği gözlemlenmektedir. Çünkü sperm erken embriyogenezde önemli bir role sahiptir (17). Ayrıca sperm morfolojisinin blastomer klivajının, yani embriyonun potansiyel gelişiminin belirlenmesi için önemli bir prognostik faktör olabileceği de söylenmektedir (3). Bununla beraber, yapılan birçok çalışma embriyo gelişiminin sadece sperm hücrelerinin morfolojisinden etkilenmediğini göstermektedir (4,23). ICSI'nın kullanılmasıyla şiddetli erkek infertilitesi faktörü olan olgularda başka seçenek kalmadığında aberan ve immatür spermatozoa türleri enjekte edilebilmektedir. Bu, güvenli embriyo oluşumu açısından tartışılmalı bir durumdur. Çünkü, çalışmamızda da ortaya konduğu gibi, sperm morfolojisi ile kromozom yapısı arasında net bir ilişki olduğu saptanmıştır (5,14). Amorf başlı spermelerde, yapısal kromozomal aberasyonlar normale göre 4 kat daha fazladır. Anormal sperm hücreleriyle ICSI yapıldıktan sonra elde edilen embriyoların transferlerinde daha az gebelik ve implantasyon gözlenmektedir. Yani, morfolojik olarak anormal hücrelerin (amorf, elonge baş, sitoplazmik droplet) enjeksiyonu düşük implantasyon potansiyeli olan embriyoların gelişmesine yol açmaktadır. Bu düşük implantasyon oranlarının, embriyoya enjekte edilen spermde kaynaklanan kromozomal defektlerin seviyesi ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

Bazı çalışmalarda morfolojik olarak normal spermelerle yapılan ICSI sonucunda 5.1% oranında biokimyasal gebelik elde edildiğinin gösterilmesi, morfolojik olarak normal sperm hücrelerinde de embriyo gelişimine ve gebeliğe etki eden saklı defektlerin bulunabildiğine işaret etmektedir. Kötü sperm kalitesinin, sperm nükleer bütünlüğü ile ilgili olduğu kabul edilmiştir. Sperm anormalliklerinin olduğu erkeklerde, spermde gevşek paketlenmiş kromatin ve endojen sarmal kırıkları daha çoktur. Bu durum gebelik sonuçları ile de ilişkilidir (20,22,13). Genetik olarak hasarlı sperm, ICSI sonrasında fertilizasyon sağlayabilse de, erkek pronükleusunun ilk klivaj bölünmesi ve sonrasındaki kaderi belirsizdir (25,10).

Daha önceden tekrarlayan ICSI başarısızlığı olan çiftlerde, morfolojisi ve motilitesi normal olarak seçilen spermelerle denenilen ICSI sikluslarında gebelik başarısının belirgin olarak artması, ICSI sırasındaki sperm nükleusunun üstün morfolojik durumunun gebelik sağlanmasında önemli olduğunu kanıtlamaktadır. Ayrıca embriyo kalitesinde, implantasyon ve gebelik oranlarında keskin bir artışın saptanması da bunu desteklemektedir (1).

Bu çalışmada sperm morfolojisi ile embriyo kalitesi arasındaki ilişkiye bakıldığında, morfolojinin normal ve anor-

mal olduğu grupta, grad A,B,C embriyo oranları açısından anlamlı fark bulunamamıştır. Ne var ki, bu çalışmada implantasyon oranları ve gebelik oranları açısından değerlendirme yapılmadığı için daha ileri bir yorum yapılması da doğru olmayacaktır. Embriyo kalitesinin, gebelik ve implantasyon başarısını etkileyen en önemli faktörlerden biri olduğu bilirse de, her graddaki embriyonun implantasyon ve gebelik sağlama potansiyeli bulunacağı da unutulmalıdır.

Özetlemek gerekirse; sperm morfolojisi başka çalışmalarda da gösterildiği gibi sperm nükleer bütünlüğü ile ilişkilidir. Kötü morfoloji, DNA hasarının ve dolayısıyla da ICSI'daki düşük fertilizasyon oranlarının öncüsü, habercisi olabilir. Sperm morfolojisi ile embriyo kalitesi arasındaki ilişki, bizim çalışmamızda saptanamamış olmakla beraber literatürde bu ilişkiyi destekleyen ve önemli bulan araştırmalara ait sonuçlar vardır. Daha geniş hasta serilerini içeren yeni, detaylı çalışmalar daha doğru sonuçlar için şarttır.

Kaynaklar

1. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F et al. Pregnancy rates are higher with intracytoplasmic morphologically selected sperm injection than with conventional intracytoplasmic injection. *Fertil Steril* 2003;80:1413-9.
2. Bartoov B, Eltes F. Estimating fertility potential via semen analysis data. *Hum Reprod* 1993;8:65-70.
3. Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update* 1995;1:91-148.
4. De Croo I, Van der elst J. Fertilization, pregnancy and embryo implantation rates after ICSI in cases of obstructive and nonobstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2000;15:1383-8.
5. Elish T, Donnelly, Sheena E. M. Lewis, James A McNally. In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertil Steril* 1998;70:305-14.
6. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin struction assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002;23:25-43.
7. Evenson DP, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability. In; Darzynkiewicz Z, Robinson JP, Crissman HA, eds. *Methods in cell biology*. Vol. 42. Flow cytometry. Orlando, FL: Academic Press, 1994:159-76.
8. Grow DR, Oehninger S, Seltman HJ et al. Sperm morphology as diagnosed by strict criteria: probing the impact of teratozoospermia on fertilization rate and pregnancy outcome in a large *in vitro* fertilization population. *Fertil Steril* 1994;62(3):559-67.
9. Jan Van Uem FHM, Acosta AA. Male factor evaluation in IVF: norfolk experience. *Fertil Steril* 1985;44:375-80.
10. Janney L, Menezo YJR. Evidence for a strong paternal affect on human preimplantation embryo development and blastocyst formation. *Mol Reprod Dev* 1994;38:36-42.
11. Katayose H, Yanagida K, Hashimoto S, Yamada H, Sato A. Use of diamide-acridine orange flourescence staining to detect aberrant protamination of human- ejaculated sperm nuclei. *Fertil Steril* 2003;79(suppl 1):670-6.
12. Kruger TF, Menkwelt R. Sperm morphological features as aprognostic factor in IVF. *Fertil Steril* 1986;46:1118-23.
13. Larson KL, DeJonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 2000;15:1717-22.
14. Lee JD, Kamiguchi Y, Yanagimachi R. Analysis of chromosome constitution of human spermatozoa with normal and aberrant head morphologies after injection into mouse oocytes. *Hum Reprod* 1996;9:1942-6.
15. Menkveld R, Stander FSH, Kotze TJW, Kruger TP et al. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to strieter criteria. *Hum Reprod* 1990;5:586-92.
16. Nagy ZP, Liu J, Joris H et al. The result of ICSI is not related to any of the three basic sperm parametres. *Hum Reprod* 1995;10:1123-9.
17. Parinaud J, Mieusset R, Vieitez G et al. Influence of sperm parameter.; on embryo quality. *Fertil Steril* 1993;60:888-92.
18. Robinson JN, Lockwood GM. Does isolated teratozoa spermia affect performance in IVF and embryo transfer? *Hum Reprod* 1994;9:870-4.
19. Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, Mellows HJ. WHO Manual for the Standart Investigation and the Diagnosis of the Infertile Couple. Cambridge University press, cambridge, UK; 1993.
20. Sakkas D, Urner F, Bizzaro D et al. Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effecton fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 1998;13(Suppl 4):11-9.
21. Shibahara H, Onagawa T, Jorsaraei A et al. Clinical significance of the Acridine Orange test performed as a routine examination: comparison with the CASA estimates and strict criteria.
22. Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC et al. Interrelationship between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod* 2001;16:2160-5.
23. Tournaye F, Liu J. Corralation between testicular histology and outcome after ICSI using testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 1996;11:127-32.
24. Virant-klum T, Tomazevič T. Sperm single stranded DNA detected by acridine orange staining, reduces fertilization and quality of ICSI-derived embryos. *J Assist Reprod Gened* 2002;19:319-28.
25. Vos AD, Velde HVD, Joris H et al. Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*-2003;79:42-8.
26. Yuea A, Menk FJ. Sperm morphology using strict criteria after Percoll dan-sity separation. *Hum Reprod* 1995;10:1781-5.
27. Zini A, Kamal K, Phang D et al. Biologic variability of sperm DNA denaturation in infertile men . *Urology* 2001;58:258-61.