تاثیر کمبود پروتامین روی لقاح و رشد و نمو جنینی پس از انجام ICSI

شهلا روزبهانی Ph.D. ☆، محمدحسین نصراصفهانی Ph.D. ☆♦، کاظم پریور Ph.D. ☆، شهناز رضوی Ph.D. ★

☆ دانشگاه آزاد اسلامی فلاورجان، گروه زیست شناسی

★ پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی

★ دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، گروه علوم تشریح

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی: ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵، پژوهشکده رویان، گروه جنین‌شناسی

پست الکترونیک: Email: mh_nasr@med.mul.ac.ir

چکیده

دریافت مقاله: ۱۳۸۳/۳/۹، پذیرش مقاله: ۱۳۸۳/۴/۱۴

* **هدف:** بررسی تاثیر کمبود پروتامین روی لقاح و رشد و نمو جنینی پس از ICSI

* **مواد و روشها:** نمونه‌های سمن از ۲۷ بیمار کاندید ICSI جهت تعیین پارامترهای سمن، ارزیابی شد. با استفاده از روش پیور اسپرم، اسپرمها آماده شد و درصد کمبود پروتامین در آنها به وسیلهٔ رنگ‌آمیزی کروموماپسین A3 پس از آماده‌سازی تعیین شد. ارتباط بین میزان لقاح، کیفیت جنین و ضریب تسهیم با کمبود پروتامین با استفاده از نرم‌افزار SPSS تعیین شد.

* **یافته ها:** بین میزان لقاح و ضریب کیفیت جنین در روز سوم با درصد کمبود پروتامین اسپرمها ارتباط منفی و معنی‌دار وجود داشت.

* **نتیجه گیری:** نمونه‌های سمن محتوی اسپرمهای با درصد بالای کمبود پروتامین درصد لقاح کمتری داشته و پتانسیل ضعیف‌تری برای رشد و نمو جنینی دارند.

گل واژگان: کمبود پروتامین، ICSI، درصد لقاح

نشریه پزشکی یاخته، سال ششم، زمستان ۸۳، شماره ۲۴، صفحات ۲۳۵-۲۳۲

مقدمه

در اکثر پروسه‌های IVF حدود ۷۰-۶۰ درصد از اووسیتها، لقاح موفقیت‌آمیزی دارند، اما در طی تزریق سیتوپلاسمی (ICSI) درصد لقاح بالاتری مشاهده می‌شود (۱، ۲). برخی از فاکتورهای شناخته شده، از جمله پارامترهای اسپرمی که ممکن است روی لقاح تاثیر بگذارند، پس از انجام ICSI ارزیابی شده‌اند. نتایج این مطالعه، نشان داد که ICSI وابسته به پارامترهای اصلی اسپرمی نیست.

مطالعه اخیر VOS و همکارانش (۳) پیشنهاد کرد که مورفولوژی اسپرم در افرادی که ICSI انجام داده‌اند، دارای ارتباط خوبی با لقاح است، اما روی رشد و نمو جنینی تاثیری ندارد. آنها همچنین نشان دادند که میزان لانه‌گزینی در جنینهای حاصله از لقاح اسپرمهای غیر نرمال، پایین است. در مطالعهٔ دیگری، Bartoov و همکاران (۴) نشان دادند که مورفولوژی نرمال در اسپرم افرادی که ICSI انجام داده‌اند، رابطه مثبت و معنی‌داری با درصد لقاح دارد در حالی که مورفولوژی نرمال هسته اسپرم ارتباط معنی‌دار و مثبتی با درصد لقاح و میزان حاملگی دارند. بنابراین پیشنهاد می‌شود که میزان حاملگی، وابسته به ICSI ممکن است تحت تاثیر مورفولوژی هسته اسپرم باشد و در روشهای معمول انتخاب اسپرم، این پارامترها تشخیص داده نمی‌شود. یکی از اصلی‌ترین وقایع طی اسپرمیوژنز که منجر به ایجاد اسپرمهای با هسته نرمال می‌شود جایگزینی ۸۵ درصد هسیتونها با پروتامین است (۵). جایگزینی هسیتونها توسط پروتامین موجب نتایج زیر می‌شود:

۱- تراکم بالای DNA و احتمالاً تسهیل انتقال DNA

۲- محافظت DNA از عوامل آسیب زای اگزوژن و اندوژن (۶)

۳- بیان ژنهای imprinted پس از لقاح

بنابراین هدف از این مطالعه، تعیین تاثیر کمبود پروتامین روی لقاح و رشد و نمو جنینی طی فرآیند ICSI است.

مواد و روشها

آماده‌سازی اسپرم

نمونه‌های سمن از ۵۵ زوج مراجعه کننده به مرکز باروری و ناباروری اصفهان جهت انجام ICSI جمع‌آوری شد. بخش اعظم نمونه‌های سمن با استفاده از روش گرادیان پیور اسپرم جهت انجام ICSI آماده گردید (۴۰:۸۰).

پس از انجام ICSI، بخش باقی‌مانده از هر نمونه سمن و اسپرمهای آماده شده، جهت آنالیز مایع اسپرمی و سنجش میزان کمبود پروتامین با استفاده از رنگ‌آمیزی کروموماپسین CMA3 مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش کمبود پروتامین (رنگ‌آمیزی CMA3)

اسمیرهای آماده شده از مایع اسپرمی که در محلول کارنوی (carnoy)، (متانول و استیک گلاسیال با نسبت ۳:۱) فیکس شده بود، به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. به منظور انجام رنگ‌آمیزی CMA3 هر اسلاید به مدت ۲۰ دقیقه با ۱۰۰میکرولیتر از محلول CMA3 رنگ‌آمیزی شد (۰/۲۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر مک کلوین: ۷میلی‌لیتر اسید استیک ۰/۱میلی و ۳۲/۹میلی‌لیتر از Na_2HPO_4، $7H_2O$ و با غلظت ۰/۲مولار، pH=۷ شامل ۱۰میلی‌مولار از $MgCl_2$).

سپس اسلایدها در بافر قرار گرفته و با بافر گلسیرول (۱:۱) فیکس شدند. آنالیز میکروسکوپی اسلایدها توسط میکروسکوپ فلوئورسانس Nikon Eclipse (ToKyo, Japan) و با استفاده از فیلتر (۴۶۰-۴۷۰نانومتر) صورت گرفت پس از رنگ‌آمیزی CMA3، اسپرمهای با رنگ زرد درخشان (مثبت CMA3) و اسپرمهایی با رنگ زرد کم‌رنگ (منفی CMA3) قابل مشاهده بودند (۷).

سنجش مایع اسپرمی

برای شمارش اسپرمها از روش شمارش چتر Makler استفاده شد. پس از قرار گرفتن سلولها در محلولهای فیکس کننده شمارش بر حسب میلیون در میلی‌لیتر انجام شد و میزان حرکت از طریق مشاهده مستقیم میکروسکوپی تعیین گردید. مورفولوژی اسپرم نیز با استفاده از نمونه‌های تازه تعیین شد.

تزریق درون سیتوپلاسمی اسپرم

پس از جداسازی اووسیت، اووسیتها به مدت ۱ دقیقه درون Hyase در G-Mop قرار گرفتند. سپس اووسیتها درون G-Mop تازه، شستشو داده شده و در همان محیط به داخل پتری دیش منتقل گردید (1006 Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA). اسپرمهای آماده شده با استفاده از اپندروف ۱۰۰ مخصوص ICSI و در زیر میکروسکوپ معکوس Nikon، به داخل اووسیت تزریق شدند. اسپرمهای با بهترین مورفولوژی از میان جمعیت اسپرمی، انتخاب شدند. اسپرم انتخاب شده به داخل پی‌پت تزریق کننده، مکیده شد و به داخل اووسیت تزریق گردید. اووسیتهای تزریق شده در محیط G1 سری III انکوبه شدند. در این مطالعه، اووسیتهای بالغ از نابالغ جهت انجام ICSI جدا شدند. تمامی بیماران انتخاب شده برای این مطالعه، حداقل دارای چهار اووسیت بالغ بودند. بنابراین از میان ۵۵ بیمار، ۲۷ نفر از آنها در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند.

لقاح پس از ۱۹-۱۷ ساعت پس از نطفه‌ریزی صورت گرفت و درصد لقاح و میزان تسهیم در هر گروه تعیین شد. اووسیتهای لقاح یافته در محیط G1.III به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند و کیفیت جنینی و ضریب تسهیم در آنها تعیین شد. سلولهای جنین مورد بررسی قرار گرفت و جنینها در گریدهای C, B, A تقسیم شدند.

گرید A: جنینهایی با بلاستومرهای هم اندازه و فراگمانتاسیون کمتر از ۱۰درصد، به این جنینها ضریب ۳ تعلق گرفت.

گرید B: جنینهای با بلاستو مرهای هم اندازه و فراگمانتاسیون بین ۵۰-۱۰درصد، به این جنینها ضریب ۲ تعلق گرفت.

گرید C: جنینهای با بلاستومرهای غیر هم اندازه یا با فراگمانتاسیون بیش از ۵۰درصد به این جنینها ضریب ۱ تعلق گرفت.

برای هر بیمار ضریب کیفیت جنینها در هر گروه به شرح زیر محاسبه شد: مجموع ضرایب جنینی تقسیم بر تعداد کل جنینها. به هر جنین نیز یک ضریب تسهیم اختصاص داده شد که به شرح زیر محاسبه شد: جنینهای ۲ سلولی= ضریب ۱، جنینهای ۴-۳ سلولی = ضریب ۲، جنینهای بین ۶-۵ سلولی = ضریب ۳، جنینهای ۸-۷ سلولی = ضریب ۴ و جنینهای بین ۱۶-۸ سلولی = ضریب ۵

ضرایب تسهیم هر گروه برای هر بیمار نیز به شکل زیرمحاسبه شد: تعداد کل جنینها /مجموع ضرایب تسهیم جنینی

آنالیز داده‌ها

تمامی محاسبات شامل آزمون T-test و آنالیز ضریب همبستگی با استفاده از برنامه SPSS-10 انجام شد.

یافته‌ها

نتایج موجود در جدول ۱ نشان دادکه از میان پارامترهای اسپرمی، فقط دانسیته و مورفولوژی اسپرم، یک رابطه معنی‌دار با درصد اسپرمهای با کمبود پروتامین دارد. پیشنهاد می‌شود که در نمونه‌های با تعداد کم سلول، تعداد بیشتری از اسپرمهای با کمبود پروتامین وجود دارد و همچنین نمونه‌های با پارامترهای اسپرمی غیر نرمال، دارای درصد بالاتری از اسپرمهای با کمبود پروتامین هستند. همچنین بین کمبود پروتامین و درصد لقاح، رابطه منفی و معنی‌داری وجود داشت. بنابراین در نمونه‌های با تعداد بالای اسپرم CMA3 مثبت، میزان لقاح کاهش می‌یابد.

جدول ۱: ارتباط بین پارامترهای اسپرمی و کمبود پروتامین

پارامتر اسپرمی	ضریب همبستگی	P-Value
دانسیته (million/ml)	-۰/۲۴۶	۰/۰۴۱
درصد حرکت اسپرم	۰/۱۴۲	NS
درصد مورفولوژی نرمال اسپرم	۰/۳۱۵	۰/۰۱۵

جدول ۲: ارتباط بین درصد لقاح و ضریب کیفیت تسهیم و جنین در روز دوم و سوم با کمبود پروتامین در بیماران ICSI

کمبود پروتامین	Coefficient of correlation	P-Value
درصد لقاح	-۰/۶۴۰	۰/۰۰۱
ضریب کیفیت تسهیم در روز دوم	-۰/۳۳۶	NS
ضریب کیفیت تسهیم در روز سوم	-۰/۲۶۶	NS
ضریب کیفیت جنین در روز دوم	-۰/۳۳۳	NS
ضریب کیفیت جنین در روز سوم	-۰/۴۱۸	۰/۰۵

بین ضریب تسهیم جنینی در روز دو م و سوم پس از انجام ICSI با کمبود پروتامین رابطه معنی‌داری وجود نداشت. در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین درصد لقاح پس از انجام ICSI و پارامترهای اسپرمی مشاهده نشد، بنابراین پیشنهاد می‌شود که پارامترهای اسپرمی بر روی میزان لقاح طی پروسه ICSI، تاثیری ندارد.

بحث

نتایج حاصله از این مطالعه نشان داد که پارامترهای اسپرمی تاثیر

مشخصی روی میزان لقاح، طی فرآیند ICSI دارند.

این نتایج با گزارشات قبلی (۳، ۴) تطابق داشت. در طی فرآیند ICSI، معمولاً سعی می‌شود یک اسپرم با بهترین مورفولوژی جهت تزریق به اووسیت انتخاب شود. گزارشات اخیر توسط Bartoov و همکارانش (۳، ۴) پیشنهاد می‌کند که اگر مورفولوژی یک اسپرم، در زمان انجام ICSI مورد توجه قرار گیرد، تاثیر مشخص مورفولوژی اسپرم روی نتایج لقاح حاصل از ICSI، را می‌توان مشاهده نمود (۹) از آنجائی که تمامی عملکردهای غیرطبیعی اسپرم در سطوح مورفولوژیک قابل مشاهده نیستند (۷)، بنابراین بررسی سایر عوامل موثر بر عملکرد اسپرم و ارتباط آنها با لقاح و رشد و نمو جنینی حائز اهمیت است. نتایج این مطالعه نشان داد که اسپرم با کمبود پروتامین، بر روی درصد لقاح حاصل از ICSI تاثیر مشخص دارد پیشنهاد می‌شود که در نمونه‌های سمن با درصد بالای CMA3 مثبت، احتمال کاهش میزان لقاح در طی فرآیند ICSI وجود دارد. نتایج این مطالعه نیز نتایج حاصل از کارهای Esterhuizen و همکارانش (۱۰) را تایید می‌کند. آنها نشان دادند درصد لقاح در ICSI، وقتی که اسپرم متعلق به نمونه‌های با درصد بالای CMA3 مثبت به داخل اووسیت تزریق می‌شود، کاهش می‌یابد این محققین همچنین گزارش دادند که اووسیتهای لقاح یافته با اسپرمهای حاصله از نمونه‌های با CMA3 مثبت>۶۰درصد در مقایسه با نمونه‌های با CMA3 کمتر از ۴۴درصد دارای ۱۵/۶ شیار، کاهش در میزان متراکم شدن هسته اسپرم هستند. این نتایج همچنین گزارش قبلی که توسط Bartoov و همکاران (۴) ارائه شده بود را تایید می‌کند. آنها پیشنهاد کردند که ماهیت هسته اسپرم نه تنها روی کاهش درصد لقاح تاثیر می‌گذارد، بلکه روی پتانسیل لانه گزینی جنین نیز تاثیر می‌گذارد. کاهش درصد لقاح می‌تواند ناشی از تاثیر مستقیم کمبود پروتامین باشد. از آنجایی که اسپرمهای با کمبود پروتامین، دارای مقادیر اضافی از هیستونها هستند، بنابراین چنین اسپرمهایی وقتی که وارد متافاز II(MII) می‌شوند در اووسیت، موجب تراکم کروموزومی زودرس (PCC) شده و موجب تشکیل شدن پرونوکلئوس پیش از موعد می‌شوند (۱۱) وقتی یک اسپرم نرمال وارد یک اووسیت M II می‌شود نوکلیوپروتامین کروماتین، فاکتور تحریک کننده میوزی را که در اووسیت MII حضور دارد، نمی‌تواند در کروماتین نوکلیوپروتامینی فعال نماید. در حالی که به آسانی موجب تراکم کروماتین نوکلیوهیستون شده و در نتیجه PCC حاصل می‌شود.

البته آنالیز کروماتین اووسیتهای لقاح یافته انسان نشان می‌دهد که پس از آنپوپلوییدی، PCC عامل بعدی متداول در شکست لقاح در مورد بیماران ICSI,IVF (۱۲، ۱۳، ۱۴) و عدم رسیدگی سیتوپلاسمی نیز عامل القاء PCC است (۱۵).

بنابراین مطالعات اخیر نشان پیشنهاد می‌کند که سایر فاکتورها نظیر کروماتین غیرطبیعی اسپرم نیز مستلزم ارزیابی است (۱۶) و گزارش اخیر نیز نشان می‌دهد که اسپرم با کمبود پروتامین ممکن است در القاء PCC دخالت داشته باشد (۱۱). توجیه دیگری که برای کاهش درصد لقاح می‌توان نمود، ناتوانی در فعال ساختن اووسیت است. از آنجایی که در طی اسپرمیوژنز، همزمان با تعویض هیستون با پروتامین، آکروزوم شکل می‌گیرد، بنابراین اسپرم با کمبود پروتامین می‌تواند آکروزوم غیرنرمال را با خود حمل کند.

همچنین در اسپرمهای با سر گرد نیز نشان داده شده است که کروماتین غیرطبیعی وجود دارد. این آنومالیها در بسته‌بندی DNA طی اسپرماتوژنز رخ می‌دهد (۱۷) و ممکن است به طور نادرست روی متورم شدن کروماتین اسپرم تاثیر گذارد این در حالی است که به عنوان یکی از فاکتورهای مرتبط با شکست لقاح در بیماران ICSI شناخته شده است (۱۸). بنابراین اسپرمهای با کمبود پروتامین، بیشتر مستعد آسیب DNA هستند و وجود سطوح بالایی از آسیب DNA می‌تواند درصد لقاح کمتر را در نمونه‌های با کمبود پروتامین را توضیح دهد. اما چنین توضیحی با نتایج گزارش شده توسط Twiggs و همکارانش (۱۹) در تضاد است.

این محققین، اسپرمها را در معرض غلظت بالایی از عوامل فعال کننده اکسیژن قرار دادند و نشان دادند که آسیب DNA روی تشکیل پرونوکلئوس تاثیر عمیقی ندارد. با این حال این مطالب می‌تواند عامل پایین بودن ضریب کیفیت جنین در نمونه‌های با کمبود پروتامین باشد (جدول ۲).

توضیح دیگر برای کاهش درصد لقاح می‌تواند ناشی از imprinting باشد. ژنهای محصور شده، (imprinting) ضمن تشکیل نوکلئوهیستون پردازش می‌شوند، در حالی که ژنهای non-imprinte هنگام تشکیل نوکلئوپروتامین بسته‌بندی می‌شوند. به محض لقاح، طی تعویض پروتامین/هیستون، non-imprinted DNA دستخوش متیلاسیون وسیعی می‌شود که این فرآیند برای پردازش ژنوم ضروری است. بنابراین ژنهای non imprinted که دارای کمبود پروتامین هستند مانند نوکلئوهیستون باقی می‌مانند، ممکن است دچار متیلاسیون DNA نشوند، در نتیجه ممکن است موجب عدم موفقیت لقاح و کیفیت ضعیف جنین شود. نتایج حاصله از این مطالعه نشان داد که ارتباط منفی و معنی‌داری، بین کمبود پروتامین و ضریب کیفیت جنین در روز سوم وجود دارد و چنین ارتباطی در روز دوم مشاهده نمی‌شود (جدول ۲).

این امر ناشی از این حقیقت است که فعال شدن ژنوم حدود روز سوم و در مرحله ۱۶-۸ سلولی رنج می‌دهد (۴) و آنومالی کروماتینی مثل آسیب DNA می‌تواند تاثیر منفی روی رشد و نمو جنین حدود روز سوم پس از انجام ICSI داشته باشد. این نتایج با گزارشات قبلی Estechuizen و همکاران (۲۰) مطابقت دارد. آنها نشان دادند که در بیماران با درصد CMA3 مثبت بالا، درصد ایجاد بلاستوسیست و میزان لانهٔ گزینی در مقایسه با بیمارانی با سطوح پائین CMA3 مثبت کمتر است. بنابراین این مطلب نشان می‌دهد که کاهش اسپرمهای با بسته‌بندی غیرطبیعی کروماتین (به خصوص با CMA3 مثبت بالا) یا مورفولوژی غیر نرمال، برای دست‌یابی به لقاح موفق در IVF یا ICSI ضروری است و این هدف می‌تواند از طریق دارو و یا عمل جراحی از قبیل

تکنولوژیهای پیشرفته تولید مثل (ART) یا توسط روشهای آماده‌سازی اسپرم طی ART حاصل شود (۲۱، ۲۲، ۲۳).

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از مسئولین محترم پژوهشکده رویان به دلیل تقبل هزینه های انجام این تحقیق و پرسنل محترم آزمایشگاه IVF و ژنتیک مرکز باروری و ناباروری اصفهان تشکر می کنند. لازم به ذکر است که هزینه‌های انجام این تحقیق طبق قرارداد شماره ۸۲/۱۴۷۹/پ، توسط پژوهشکده رویان تامین گردیده است.

References

1. Van Steirteghem AC, Liu J, Joris H, Nagy Z, Janssenwillen C,Tournae H, Devroey PC: Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection by subzonal insemination: report of a second series of 300 consecutive treatments. Hum Reprod, 1993; 8: 1055–1060

2. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC: Pregnancy after intracytoplasmic injection of single sper-matozoa into an oocyte. Lancet, 1992; 340:17–18

3. De Vos A,Van De H,Joris H, MT Verthegen G,Devroey P and Van Steirteghem A: Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. Fertility and Sterility 2003; 79,(1): 42-48

4. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezo Y, Barak Y: Real-time fine morphology of motile human sperm cell is associated with IVF-ICSI outcome. J Androl, 2002; 23:18

5. Balhorn AR: Amodel for the structure of chromatin in mammalian sperm. J Cell Biol: 1982; 93: 298-305

6. Agrwal A, Said TM: Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. Hum Reprod, 2003; 9: 331-345

7. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M: Relation between different human sperm nuclear maturity tests and in vitro fertilization. J Assist Reprod Genet, 2001; 18: 199–205

8. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mardani M, Tofigh Hesabi S: Efficiency of Sil-Select and Percoll to recover sper-matozoa with normal chromatin and morphology and the effect of these parameters on fertilization, embryo quality and cleavage score. Middle East Fertil Soc J. 2003; 8 (1):36–42, Andrologia 31 (6):361–36.

9. Hammadeh ME, Al-Hassani S, Doerr S, Stiber M, Rosen-baum P, Schmidt W, Diedrich K: Comparison between chromatin condensation and morphology from testis biopsy extracted and ejaculated spermatozoa and their relationship to ICSI outcome. Hum Reprod, 1992; 14: 363–367

10. Esterhuizen AD, Franken DR, Becker PJ, Lourens JG, Muller II, van Rooyen LH: Defective sperm decondensation:a cause for fertilization failure. J Androl, 2002; 34 (1): 1–7

11. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Mozdarani H, Mardani M, Azvagi H: Relationship between protamine deficiency with fertilization rate and incidence of sperm premature chromosomal condensation post-ICSI. Androl; In press 2004

12. Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S: A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. Fertil Steril 1984; 42:87–91

13. Schmiady H, Tandler-Schneider A, Kenteni P: remature chromosome condensation of the sperm nucleus after in-tracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod, 1996; 11(10): 2239–2245

14. Mozdarani H, Aghdaei F: Cytogenetic analysis of failed-fertilized oocytes from Iranian infertile women after in vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection(ICSI) procedures. Middle East Fertil Soc J, 2001; 6(3): 216–225

15. Schmiady H, Kentenich H: Premature chromosome condensation after in-vitro fertilization. Hum Reprod, 1989(6): 689–695

16. Rosenbuch BE: Frequency and patterns of premature sperm chromosome condensation in oocytes failing to fertilize after ICSI. J Assist Reprod Genet 2000; 17: 253–259

17. Liu J, Nagy Z, Joris H, Tournay H, Devroey P and Van sterrteghem: A successful fertilization and establishment of pregnancies after intracytoplasmic; sperm injection in patients with glbozoospermia .Hum Reprod, 1995; 10: 626-630

18. Sakkas D, Urner F, Bianchi PG, Bizzaro D, Wagnar I, Jaquenoud N, Manicardi G, Campana I: Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod, 1996; 11: 837–843

19. Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ: Oxydative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprode, 1998; 13: 1864-1871

20. Esterhuizen AD, Franken DR, Lourens JGH, Prinsloo E, Van Rooyen LH: Chromatin packaging as an indicator of human sperm dysfunction. J Assist Reprod Genet, 2000; 17: 508–514

21. Cayan S, Erdemir F, Ozbey I, Turek PJ, Kadioglu A, Tell-alogluS: Can varicocelectomy significantly change