

بررسی ارتباط پارامترهای اسپرم (تحرک-تعداد و مورفولوژی) و منبع برداشت اسپرم بر پیامد درمان تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI)

مرضیه مهرافزا^{۱*}، زهرا پناهنده^۲، مونا عودی^۳، سودابه نیکفرجام^۴، سلمان نیکفرجام^۵، حوا دشتدار^۶، پروانه بدالهیان^۷، احمد حسینی^۷

(۱) متخصص زنان و مامایی، فلوشیپ IVF و نازایی از کانادا، استادیار دانشگاه علوم پزشکی گیلان

(۲) متخصص پزشکی اجتماعی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی گیلان

(۳) کارشناس مامایی، موسسه درمان ناباروری مهر

(۴) پزشک عمومی

(۵) فوق لیسانس جنین شناسی، موسسه درمان ناباروری مهر

(۶) متخصص زنان و مامایی

(۷) دکترای جنین شناسی، استاد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

تاریخ پذیرش: ۸۵/۱۲/۲

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۱/۲

چکیده

مقدمه: آزمایش مایع منی امری ضروری جهت بررسی زوج نابارور می باشد و نتایج آن انتخاب نوع روش درمان را تحت تاثیر قرار می دهد. یافته های اخیر نشان دادند که مورفولوژی اسپرم بر اساس معیار کروجر که بر اساس پروگنوز درمان به سه گروه: (۱) $> 14\%$ (عالی)، (۲) $14-4\%$ (متوسط) و (۳) $< 4\%$ (بد) تقسیم می شود، بیومارکری عالی برای پیشگویی کارکرد اسپرم و پیامد درمان می باشد. در مقابل مطالعات دیگری نشان داده اند که پیامد درمان ICSI به معیار کروجر وابسته نیست.

هدف: هدف از این مطالعه بررسی ارتباط پارامترهای اسپرم (تحرک-تعداد و مورفولوژی) و منبع برداشت اسپرم بر موفقیت درمان ICSI می باشد.

مواد و روش ها: مطالعه حاضر مقطعی-تحلیلی می باشد که بر روی ۵۰۰ بیمار با اندیکاسیون ICSI که به مرکز درمان ناباروری مهر مراجعه نمودند، انجام شد. متغیرهای مورد بررسی شامل سن زن-سن مرد-علت و مدت نازایی-پارامترهای اسپرم (تعداد-تحرک و مورفولوژی)-منبع تهیه اسپرم-تعداد تخمک برداشت شده-تعداد جنین های منتقل شده-تعداد جنین جایگزین شده و میزان حاملگی می باشد. بعد از جمع آوری داده ها آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار آماری SPSS.10 با آزمونهای کای اسکور و تی تست انجام پذیرفت.

نتایج: بررسیها نشان داد که میزان حاملگی ۳۹ درصد (۱۹۵ نفر از ۵۰۰ بیمار) می باشد. میانگین سن زن ارتباط آماری معنی داری بر پیامد درمان داشت (در زنان حامله $29/6 \pm 5/6$ و زنان غیر حامله $31/6 \pm 5/5$ سال). نتایج نشان داد که علت و مدت نازایی-پارامترهای اسپرم (تعداد-تحرک و مورفولوژی) و منبع تهیه اسپرم بر نتیجه درمان ICSI تاثیر معنی دار آماری ندارد.

بحث و نتیجه گیری: باتوجه با نتایج مطالعه حاضر، بنظر می رسد که پارامترهای اسپرم و منبع تهیه آن فاکتور پیشگویی کننده خوبی جهت تعیین موفقیت بارداری در عمل ICSI نمی باشد.

* نویسنده مسئول: دکترمرضیه مهرافزا، متخصص زنان و مامایی، فلوشیپ IVF و نازایی از کانادا- استادیار دانشگاه علوم پزشکی گیلان

Email: dr_mehrafza@yahoo.com

واژه های کلیدی: پیامد حاملگی، پارامترهای اسپرم (تعداد-تحرک و مورفولوژی)، منبع تهیه اسپرم، تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI)

مقدمه

تحریک تخمک گذاری با GnRH اگونست در

روز ۲۱ قاعدگی سیکل قبل از سوپراوولیشن و بدنال آن تزریق (HMG (150-225 IU) در روز سوم قاعدگی بعدی انجام گرفت. زمانیکه حداقل ۲ فولیکول به قطر ۱۸ میلیمتر رسید ، 10000 واحد HCG برای بیماران تجویز شد. برداشت تخمک ۳۹-۳۶ ساعت بعد زیر بیهوشی عمومی سبک با کمک سونوگرافی واژینال انجام گرفت.

برداشت اسپرم با روش انزال طبیعی، اسپیراسیون اسپرم از اپیدیدیم (PESA) و یا برداشت اسپرم از بیضه (TESE) در روز گرفتن تخمک انجام گرفت. مورفولوژی اسپرم بر اساس معیار کروجر (۷) تقسیم بندی گردید. ICSI با تخمکهای برداشت شده بالغ (متافاز II) انجام شد. ارزیابی لقاح با مشاهده دو پرونوکلئوس (2PN) ، ۱۸-۱۶ ساعت بعد از ICSI بود. در صورت وجود تقسیم سلولی نرمال جنین ۷۲-۴۸ ساعت بعد از ICSI ، انتقال جنین به رحم انجام می شد. حاملگی بیوشیمیایی بر حسب مثبت شدن نتیجه تست BHCG سرم ۱۴ روز بعد از انتقال جنین به رحم مادر و حاملگی بالینی (PR) با مشاهده ساک حاملگی و جنین زنده در هفته ششم حاملگی در بررسی سونوگرافی تعیین گردید. پس از تکمیل داده ها تجزیه و تحلیل نهایی با استفاده از نرم افزار آماری SPSS.10 و با بهره گیری از آزمونهای تی تست و کای دو انجام گرفت. ($P < 0.05$) بعنوان سطح معنی دار تعیین گردید)

نتایج

بطور کلی از ۵۰۰ سیکل درمانی انجام گرفته میزان حاملگی بیوشیمیایی (۳۹ درصد) ۱۹۵ گزارش گردید. میزان حاملگی بالینی، سقط، ادامه حاملگی و تولد نوزاد زنده بترتیب (۳۷/۲ درصد) ۱۸۶، (۶/۲ درصد) ۱۵۵، (۳۱ درصد) ۱۵۵ و (۱۹/۸ درصد) ۹۹ بود. بررسی سن زنان در موارد حامله $29/6 \pm 5/6$ سال نسبت به غیر حامله $31/6 \pm 5/5$ سال و نتیجه ICSI ارتباط آماری معنی داری را نشان داد ($P < 0.05$). میانگین سن مردان بر پیامد درمان اثری نداشت ($35/6 \pm 5/5$ سال در گروه با

تلقیح داخل رحمی (IVF) نقش مهمی در درمان انواع مختلف نازایی شامل: علل لوله ای ، اندومتریوز ، ایمونولوژیک ، علت مردانه و غیره دارد. امروزه تزریق داخل سیتوپلاسمی اسپرم (ICSI) جایگزین مناسب IVF در درمان موارد شدید نازایی با علت مردانه شده است (۱). اما از آنجائیکه کاربرد این روش گران و پرهزینه بوده و نیاز به تجهیزات آزمایشگاهی پیشرفته دارد، شناخت عوامل پیشگویی کننده نقش مهمی در پیامد درمان دارد ، مهم است (۲-۳). در بررسی زوجین نابارور آزمایش مایع منی مهمترین و اساسی ترین روش ارزیابی علت نازایی می باشد و انتخاب روش درمان کمک باروری را تحت تاثیر قرار می دهد (۴). مطالعات مختلفی در مورد نقش پارامترهای مختلف اسپرم بر میزان لقاح و حاملگی بعد از ICSI انجام شده است (۵-۶). نتایج این مطالعات نشان داد که ارزیابی مورفولوژی اسپرم بر طبق معیار کروجر مفیدترین روش بررسی قدرت لقاح در زوجین نابارور می باشد. طبق معیار کروجر زمانیکه میزان مورفولوژی طبیعی اسپرم کمتر از ۱۴ درصد باشد، میزان حاملگی کاهش می باید. بطوریکه در میزان کمتر از ۴ درصد بدترین نتیجه درمان را خواهیم داشت (۷). اما از آنجائیکه در ICSI تنها تزریق یک اسپرم بداخل سیتوپلاسم تخمک انجام می شود، بنظر می رسد که نباید مورفولوژی اسپرم بر موفقیت درمان تاثیر گذار باشد (۳-۸). در واقع در این مورد مطالعات کمی انجام شده و هنوز بحثهای بسیاری در این رابطه وجود دارد هدف از این مطالعه بررسی تاثیر مورفولوژی و منبع تهیه اسپرم بر موفقیت درمان ICSI می باشد.

مواد و روش ها

پژوهش حاضر مطالعه ای مقطعی - تحلیلی می باشد. در این بررسی میزان حاملگی طی ۵۰۰ سیکل درمانی ICSI در ۵۰۰ زوج با نازایی اولیه یا ثانویه مراجعه کننده به مرکز درمان ناباروری مهر ارزیابی گردید.

نتیجه مثبت ICSI در برابر $3/3 \pm 2/36$ سال نتیجه منفی ICSI ($P > 0.05$). یافته ها نشان داد که اختلاف آماری معنی داری بین طول مدت نازایی و پیامد بارداری وجود ندارد ($P > 0.05$).

بیشترین میزان حاملگی در زنان با نازایی اولیه ($3/3$ درصد) 170 در مقایسه با زنان با علت ثانویه ($1/32$ درصد) 25 مشاهده شد ($P > 0.05$). همچنین بیشترین میزان حاملگی در بیماران با علت زنانه رخ داد ($5/61$ درصد) ، با این وجود اختلاف آماری معنی داری بین علت نازایی و میزان حاملگی دیده نشد ($P > 0.05$) (جدول ۲). در مورد منشاء اسپرم بیشترین میزان حاملگی در روش انزالی یافت گردید ($3/92$ درصد) 180 مورد در مقابل میزان حاملگی در اسپرم بدست آمده از بیضه و اپیدیدیم بترتیب 13 مورد ($7/6$ درصد) و 2 مورد (1 درصد) مشاهده شد ($P > 0.05$) همچنین نتایج بررسیها نشان داد که اختلاف آماری معنی داری در مورد منشاء اسپرم و پیامد حاملگی در زوجین با علت نازایی مردانه وجود ندارد ($P > 0.05$) (جدول ۳). یافته ها نشان داد که مورفولوژی اسپرم بر اساس معیار کروجر و پارامترهای دیگر یعنی تعداد و تحرک اسپرم بر میزان حاملگی تأثیری ندارد ($P > 0.05$). داده ها نشان داد که بین کیفیت جنین و پیامد حاملگی اختلاف آماری معنی داری وجود داشت ($P < 0.05$) (جدول ۴).

بحث

نتایج بررسی حاضر نشان داد که پارامترهای اسپرم نظیر تعداد، تحرک و مورفولوژی تأثیری بر پیامد درمان ICSI ندارد. بنظر میرسد معیار کروجر نقش تعیین کننده تری نسبت به سایر روشهای ارزیابی جهت پیشگویی پیامد حاملگی بخصوص در بیماران IVF می شوند، دارد (12). در واقع شاخص دفرمیتی اسپرم پیشگویی کننده قابل اطمینانی در تعیین موفقیت میزان لقاح در بیماران تحت عمل IVF در مقایسه با افرادی که اسپرم با مورفولوژی طبیعی دارند، می باشد (13). در این رابطه معیار کروجر اهمیت بالینی قابل توجهی داشته و بیومارکری عالی در تعیین قابلیت لقاح آزمایشگاهی بدون ارتباط به تحرک و تعداد

اسپرم می باشد (8). تعدادی از محققین ثابت نموده اند که میزان حاملگی با انجام IVF در اسپرمهای نرمال بیشتر از اسپرمهای غیرطبیعی می باشد (14). با معرفی ICSI در چرخه جدیدی بروی درمان ناباروری گشوده شد. میزان لقاح بطور قابل توجهی افزایش یافت. این امر بخصوص در موارد با نازایی شدید مردانه و نقص در پارامترهای اسپرم که با IVF معمولی بچه دار نمی شوند، تحول بزرگی ایجاد نماید ($5-6$). بطوریکه میزان لقاح با مورفولوژی ضعیف اسپرم (کمتر از 4 درصد مورفولوژی طبیعی) تفاوت آماری معنی داری با اسپرمهای نرمال نداشت. میزان حاملگی نیز در آنها اختلاف آماری معنی داری نداشت (15). میزان لقاح و حاملگی در بیماران با مشکلات شدید مردانه (آستنواسپرمی و تراتواسپرمی کامل) تحت درمان با ICSI قابل توجه گزارش گردید (16). Mansour و همکاران با بررسی تأثیر پارامترهای اسپرم در موفقیت درمان ICSI اعلام نمودند که میزان لقاح و حاملگی در بیماران با تراتواسپرمی کمتر یا بیشتر از 95 درصد تفاوتی ندارد (17). یافته های بررسی حاضر نیز نشان داد که پارامترهای اسپرم بخصوص، مورفولوژی اسپرم در پیامد درمان نقش ندارد. یک علت برای توضیح این مسئله انتخاب اسپرم بهتر بر اساس قضاوت جنین شناس است که سعی در یافتن بهترین اسپرم برای تزریق دارد ($18-19$).

مباحثات بسیاری در مورد ارتباط منبع برداشت اسپرم و پیامد ICSI وجود دارد. اما Bukulmez و همکاران عنوان نمودند میزان لقاح اسپرم بدست آمده از بیضه در بیماران با آزواسپرمی انسدادی و غیرانسدادی و اسپرم انزالی مشابه است (2). Sukcharoen و همکاران میزان لقاح در بیماران با اولیگوآستنواسپرمی شدید با اسپرم انزالی و اسپرم بازیافت شده بطریقه PESA یا TESE را بترتیب $5/78$ درصد، $3/83$ درصد و $8/80$ درصد گزارش نمود که اختلاف آماری معنی داری را بین منابع مختلف تهیه اسپرم نشان نداد (20). اما Goker و همکاران دریافتند که میزان لقاح در ICSI با اسپرم انزالی نسبت به اسپرم بدست آمده از بیضه بیشتر بود (21). در بررسی حاضر ارتباط آماری قابل توجهی بین پیامد درمان و منبع تهیه اسپرم وجود نداشت. کیفیت

نتیجه گیری

بطور کلی مورفولوژی اسپرم را باید تنها بعنوان شاخصی جهت پیشگویی میزان لقاح دانست که تاثیری مستقل در مورد درمان نازایی به روش ICSI ندارد. با توجه به شباهت موجود بین نتایج بررسی محققان بایستی تاکید نمود که معیار کروجر ارزش پیشگویی کننده ای در موفقیت ICSI نداشته و تنها وجود یک اسپرم متحرک طبیعی برای موفقیت و ایجاد حاملگی در ICSI کافی بوده و یکبار شکست در درمان نباید موجب ناامیدی زوجین و اجتناب از تکرار ICSI و تلاش برای بچه دار شدن شود.

جنین بهترین معیار جهت پیشگویی پیامد درمان و حاملگی می باشد. Parinanud و همکاران عنوان نمودند که کیفیت جنین به کیفیت پارامترهای منی (مورفولوژی، تحرک، تعداد) بخصوص مورفولوژی اسپرم وابسته است (۲۲). De Vos و همکاران نشان دادند که مورفولوژی اسپرم در زمان انجام ICSI بر روند رشد جنین تاثیری نداشته اما با میزان لقاح ارتباط دارد (۲۳) Host و همکاران دریافتند که ارتباط آماری معنی داری بین مورفولوژی اسپرم و میزان تسهیم (کلیواژ) یا حاملگی وجود ندارد (۲۴).

جدول ۱. مقایسه میانگین لقاح - تقسیم سلولی و جنین منتقل شده بر حسب پیامد حاملگی در جمعیت مورد پژوهش

نتیجه آزمون تی تست	غیر حامله	حامله	متغیر
	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار	
P<0.05	۵/۵±۳۲/۸	۷±۴/۳	تخمک تزریق شده (متافاز دو)
P<0.05	۴/۱±۳۲	۵/۵±۳/۳	تقسیم سلولی جنین
P<0.05	۳/۱±۱۲/۴	۳/۷±۱۲/۲	جنین منتقل شده

جدول ۲. پیامد ICSI بر حسب علت و مدت نازایی و منبع برداشت اسپرم در جمعیت مورد پژوهش

جمع	حامله (%)	متغیر
علت نازایی		
۲۷۹	۱۲۰ (۶۱/۵)	مردانه
۱۳۶	۴۲ (۲۱/۵)	زنانه
۶۰	۲۱ (۱۰/۸)	مشترک
۲۵	۱۲ (۶/۲)	نامشخص
مدت نازایی (سال)		
۲۲۰	۹۵ (۴۸/۷)	<۵
۱۴۸	۵۹ (۳۰/۲)	۵-۱۰
۷۶	۲۶ (۱۳/۳)	۱۰-۱۵
۴۳	۱۲ (۶/۱)	۱۵-۲۰
۱۳	۳ (۱/۵)	>۲۰
۵۰۰	۱۹۵	جمع
p value was >0.05		

جدول ۳. پیامد ICSI بر حسب منبع تهیه اسپرم در زوجین با علت نازایی مردانه در جمعیت مورد پژوهش

متغیر	حامله (%)	جمع
انزالی	۱۲۶(۸۹/۴)	۲۹۷
بیضه	۱۳(۹/۲)	۳۶
اپیدییم	۱۴(۱/۴)	۶
جمع	۱۴۱(۱۰۰)	۳۳۹
p value was >0.05		

جدول ۴. پیامد ICSI بر حسب پارامترهای اسپرم و کیفیت جنین در جمعیت مورد پژوهش

متغیر	حامله (%)	جمع
تعداد اسپرم		
۱۰۶×(۱-۵)	۵۱(۲۶/۲)	۱۱۳
۱۰۶×(۵-۱۰)	۱۳(۶/۷)	۳۲
۱۰۶×(۱۰-۲۰)	۱۴(۷/۲)	۴۵
۱۰۶×>۲۰	۱۱۷(۶۰)	۳۱۰
تحرک اسپرم (%)		
<۲۰	۸۵(۴۳/۶)	۲۰۰
۲۰-۳۰	۳۹(۲۰)	۱۱۶
>۳۰	۷۱(۳۶/۴)	۱۸۴
مورفولوژی اسپرم (%)		
<۴	۵۳(۳۰/۱)	۴۲۷
۴-۱۴	۵۲(۲۹/۵)	۷۹
>۱۴	۷۱(۴۰/۳)	۱۷
* کیفیت جنین		
A	۱۶۲(۸۳/۱)	۳۹۰
B	۳۲(۱۶/۴)	۹۴
C	۱(۰/۵)	۱۶
جمع	۱۹۵(۱۰۰)	۵۰۰
*p value was <0.05		

References

- 1-Aytoz A, Camus M, Tournaye H, Bonduelle M, Van Steirteghem A, Devroey P. Outcome of pregnancies after intracytoplasmic sperm injection and the effect of sperm origin and quality on this outcome . *Fertile Steril* .1998 ; 70(3) : 500-5 .
- 2-Bukulmez O, Yucel A, Yarali H, Bildirici I, Gurgan T. The origin of spermatozoa does not affect intracytoplasmic sperm injection outcome . *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* .2001; 94(2): 250 – 5 .
- 3-Lundin K, Soderlund B, Hamberger L. The relationship between sperm morphology and rates of fertilization, pregnancy and spontaneous abortion in an in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection programme. *Hum Reprod*. 1997 ;12(12):2676-81.
- 4-Dua A, Vaidya SR. Sperm motility and morphology as changing parameters linked to sperm count variations. *J Postgrad Med*. 1996 ;42(4):93-6.
- 5-Tasdemir I, Tasdemir M, Tavukcuoglu S, Kahraman S, Biberoglu K. Effect of abnormal sperm head morphology on the outcome of intracytoplasmic sperm injection in humans. *Hum Reprod*. 1997 ;12(6):1214-7.
- 6-Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancy after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*.1992; 340: 14-18.
- 7-Kruger TF, Du Toit TC, Franken DR, Menkveld R, Lombard CJ . Sperm morphology: assessing the agreement between the manual method (strict criteria) and the sperm morphology analyzer IVOS. *Fertil Steril*. 1995;63(1):134-41.
- 8-Ombelet W, Menkveld R, Kruger TF, Steeno O. Sperm morphology assessment : historical review in relation to fertility. *Hum. Reprod. Update* 1995;1(6); 543-557.
- 9-Madgar I, Hourvitz A, Levron J, Seidman DS, Shulman A, Raviv GG, et al. Outcome of invitro fertilization and intracytoplasmic injection of epididymal and testicular sperm extracted from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril*.1998; 69(6):1080-4.
- 10-Kruger TF, du Toit TC, Franken DR, Menkveld R, Lombard CJ. Sperm morphology: assessing the agreement between the manual method (strict criteria) and the sperm morphology analyzer IVOS. *Fertil Steril*.1995 ;63(1):134-41.
- 11-Van den Abbeel E, Van der Elst J, Van Waesberghe L, Camus M, Devroey P, Khan I, Smits J, Staessen C, Wisanto A, et al. Hyperstimulation: the need for cryopreservation of embryos. *Hum Reprod*. 1988 ;3 Suppl 2:53-7.
- 12-Menkveld R, Kruger TF. Advantages of strict (Tygerberg) criteria for evaluation of sperm morphology. *Int J Androl*. 1995 ;18 Suppl 2:36-42 .
- 13-Aziz N, Buchan I, Taylor C, Kingsland CR, Lewis-Jones I. The sperm deformity index : a reliable predictor of the outcome of oocyte fertilization in vitro. *Fertil Steril*. 1996;66(6):1000-8.
- 14-Haidl G, Schill WB. Sperm morphology in fertile men. *Arch. Androl*. 1993;31:153-157.
- 15-Gunalp S, Onculoglu C, Gurgan T, Kruger TF, Lombard CJ. A study of semen parameters with emphasis on sperm morphology in a fertile population: an attempt to develop clinical thresholds. *Hum Reprod*. 2001 ;16(1):110-114.
- 16-Nagy ZP, Liu J, Joris H, Verheyen G, Tournaye H, Camus M, et al. The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum Reprod*. 1995 ;10(5):1123-9.
- 17-Mansour RT, Aboulghar MA, Serour GI, Amin YM, Ramzi AM. The effect of sperm parameters on the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 1995 ;64(5):982-6.
- 18-Celik-Ozenci C, Jakab A, Kovacs T, Catalanotti J, Demir R, Bray-Ward P, et al. Sperm selection for ICSI: shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations. *Hum Reprod*. 2004 Sep;19(9):2052-9.

- 19-Svalander P, Jakobsson AH, Forsberg AS, Bengtsson AC, Wikland M. The outcome of intracytoplasmic sperm injection is unrelated to 'strict criteria' sperm morphology. *Hum Reprod.* 1996;11(5):1019-22.
- 20-Sukcharoen N, Sithipravej T, Promviengchai S, Chinpilas V, Boonkasemsanti W. Comparison of the fertilization rate after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using ejaculated sperms, epididymal sperms and testicular sperms. *J Med Assoc Thai.* 1998; 81(8) : 565 – 71.
- 21-Goker EN, Sendag F, Levi R, Sendag H, Tavmergen E. Comparison of the ICSI outcome of ejaculated sperm with normal, abnormal parameter and testicular sperm. *Eur J Obstet Gynecol Repord Biol.* 2002 ;104(2) : 129 – 36.
- 22-Parinaud J, Mieusset R, Vieitez G, Labal B, Richoilley G. Influence of sperm parameters on embryo quality. *Fertil Steril.* 1993 ;60(5):888-92.
- 23-De Vos A, Van De Velde H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A. Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology, and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2003 ;79(1):42-8.
- 24-Host E, Lindenberg S, Ernst E, Christensen F. Sperm morphology and IVF: embryo quality in relation to sperm morphology following the WHO and Kruger's strict criteria. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1999 ;78(6):5.