

정자의 형태가 IVF와 ICSI의 결과에 미치는 영향

피엘 산부인과 체외수정연구실

권윤정 · 강희규 · 김수경 · 양현원 · 최규완 · 차영범 · 이승재 · 박종민

Effects of Sperm Morphology on the Results of Conventional IVF and ICSI

Yoon-Jung Kwon, Hee Gyoo Kang, Soo Kyung Kim, Hyun Won Yang,
Kyoo Wan Choi, Young Beom Cha, Seung Jae Lee and Jong Min Park

IVF Research Laboratory, Park & Lee Infertility Clinic, Seoul 135-270, Korea

= Abstract =

Objective: To investigate the effects of sperm morphology and their co-incubation with oocytes on the outcome of IVF and ICSI.

Design: Strict morphology of washed sperm was assessed by Diff-Quick staining method before or after insemination. And the relationships between strict morphology and outcome (fertilization, embryo development and pregnancy) of IVF(with co-incubation) and ICSI (without co-incubation) were determined.

Patients: Two-hundreds-and-sixty-three cycles of IVF and ninety-six cycles of ICSI were analyzed in order to clarify the influence of strict sperm morphology of spermatozoa on outcome of IVF and ICSI. These were divided into four groups. according to fertilization method and sperm morphology(Group 1: IVF, $\geq 12\%$, n=227; Group 2: IVF, $< 12\%$, n=36; Group 3: ICSI, $\geq 12\%$, n=48; Group 4: ICSI, $< 12\%$, n=48).

Results: The fertilization rates of better morphology groups were higher than those of poor groups: Group 1(68.1%) > Group 2(62.1%), Group 3(78.1%) > Group 4(71.5%). There was no difference in embryo cleavage rates among four groups (>90%), Regarded with the good embryo rates, Group 1(56.8%) was significantly higher than Group 2(42.3%)($p < 0.01$), but there was no difference between Group 3(64.7%) and Group 4(61.2%). The pregnancy rates were also higher in better morphology groups as well as fertilization rates: Group 1(34.8%)> Group 2(16.7%)($p < 0.05$), Group 3(40.0%) > Group 4(23.0%)($p = 0.08$).

Conclusion: Co-incubation with poor morphology sperm might adversely affect the quality of embryos. And strict sperm morphology may represent the ability to establish successful pregnancy. In short, the strict sperm morphology can be a good predictor of IVF and ICSI outcome.

서 론

체외 수정에서 수정 및 임신 결과는 난자의 수와 질, 정자의 성상과 기능 및 면역학적 요인 등에 의해 영향을 받는다. 여성 불임 요인은 여러 가지 약제 및 치료술에 의해 교정이 되어 왔으

나, 남성 불임 요인은 임상적으로 진단과 교정이 쉽지 않았다. 남성 불임의 진단은 정자의 양적 검사와 임신 결과에만 의존했던 과거에 비해 근래에는 여러가지의 진단방법의 개발로 비교적 정확하게 진단할 수 있게 되었으며, 그 결과 불임의 요인 중 남성 불임의 비율이 여성과 비슷한 40% 정도로 알려져 있다. 또한 근래 체외 수정

및 미세 수정술의 발달로 남성 요인의 불임도 상당한 수준으로 극복되고 있다.

남성의 가임 여부를 평가하기 위한 기본적인 검사로서 정액 검사는 정자의 수, 운동성, 형태를 분석하였다. 과거 불임으로 판단했던 기준은 부부 관계를 통한 임신 여부에 기초했으나, 근래에는 체외 수정을 통하여 수정과 임신 결과를 동시에 관찰함으로써 정상치의 기준이 매우 낮아 졌다. 또한 정자의 양적 검사뿐 아니라 질적, 즉 정자의 수정 능력 획득, 투명대 부착 및 통과 능력 등의 기능적 검사는 다양한 기준을 제공해 주었다. 그러나 이러한 정자의 기능적 평가는 검사 방법의 복잡성과 소요 시간 및 낮은 민감도로 체외 수정 및 임신 결과를 예측하는데 용이하지 않았다.

1986년 Kruger 등은 정자의 형태를 평가하는 새로운 방법으로 strict criteria를 도입하여 WHO 기준과 다른 정자의 형태학적 정상 개념을 변화시켰으며, 정상정자의 백분율은 체외 수정 결과를 예측하는 간편하고, 좋은 지표가 될 수 있다고 보고하였다(Kruger et al., 1988; Oehninger et al., 1988). 특히 형태적 정상정자는 투명대와의 결합과 상당히 밀접한 관계가 있고(Liu & Baker, 1992), strict criteria에 의한 정자의 형태와 자궁 점액질의 통과 능력이 양성 관계를 갖는 것으로 보아(Eggert-Kruse et al., 1995), 정자의 형태는 정자의 수정 능력을 잘 나타내는 지표가 될 수 있다고 보고하고 있다(Kruger et al., 1988; Liu et al., 1988; Check et al., 1992).

한편, 정자의 운동성 저하, 형태적 비정상 정자 증가 및 정액내의 백혈구의 증가는 수정률, 배아의 발달과 임신율에 저해 요인으로 작용하는 것으로 보고되었다(Aiken et al., 1990; Iwasaki et al., 1992). 이는 비정상적 정자와 백혈구 세포로부터 발생된 발생기 산소(reactive oxygen species: ROS)가 정자, 난자 및 배아의 원형질막에 영향을 줌으로써 수정시 정자의 수정 능력 획득과 침체 반응을 저해하여 수정율을 감소시키며 수정중 정자 또는 정자로 부더의 발생기 산소의 영향으로 수정란의 발생이 저해되어 임신율에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 그리고 성상이 비정상적인 정자의 정액에서 발생기 산소의 생성이 많으며(Agarwal et al., 1994a), 정자의 세정 과정에서 발생기 산소가 발생된다고 보고하였다(Agarwal et al., 1994b). 또한 수정을 위한 정

자와의 공배양 시간에 관계없이 수정률은 차이가 없으나, 배아 발달 및 임신율은 공배양 시간이 짧은 것이 좋은 것으로 보고하였다(Dirnfeld et al., 1995). 즉 정자의 형태와 정자와의 공배양 여부는 수정율, 배아 발생, 임신율의 차이를 나타낼 것으로 기대된다.

따라서 본 연구는 IVF와 ICSI에서 난자와 정자와의 공배양 유무와 strict criteria에 의한 정자의 형태가 수정율, 배아 발달 및 임신율에 미치는 영향을 비교 분석함으로써 정자의 형태와 정자의 잠재적 생식능력과의 관계를 알아보고자 한다.

재료 및 방법

1. 연구 대상

본 연구는 1994년 2월부터 1995년 5월까지 본원에서 시행한 IVF 263주기와 ICSI 96주기를 대상으로 하였다. IVF의 대상 환자는 정자의 성상이 정상이었고, ICSI는 정자의 성상이 정상이나 수정 실패의 경험이 있었거나, 아주 심한 정자 이상으로 통상적 IVF로는 수정이 불가능할 것으로 기대되는 환자를 대상으로 하였다. 시행한 환자중 면역학적 요인, 자궁의 요인, 회수된 난자의 수가 3개 미만인 주기와 환자의 나이가 40세 이상인 경우는 분석 대상에서 제외하였다.

실험군은 정상적 형태율 12%를 cut-off (Kobayashi et al., 1991)로 하여 IVF군과 ICSI군을 나누었다. Group 1 (IVF, $\geq 12\%$, n=227), Group 2 (IVF, $< 12\%$, n=36), Group 3 (ICSI, $\geq 12\%$, n=48), Group 4 (ICSI, $< 12\%$, n=48)로 하였다.

2. 난자의 준비 및 수정

배란 유도는 hMG(IVF-M LG 화학)와 FSH (Metrodin, Sereno)를 병용하거나 GnRH-a(Buserelin acetate, Superfact, Hoechst)를 함께 투여하여 과배란 유도를 하였고, 여성 난포의 지름이 16-18mm 정도에서 hCG 10000 unit를 근육 주사하였고, 34시간 후 질식 초음파를 이용하여 난자를 채취하였다.

IVF는 난자의 성숙도에 따라 채취 4-8시간 후 percoll gradient로 준비된 고탈성 정자를 배양접시당 5-10만 농도로 수정시켰다. ICSI를 위한 난자는 0.1% hyaluronidase와 pipette의 물리적인 flushing으로 난구 세포를 제거한 후, 도립현미경

(Diaphot-200, Mikon)에 장착된 1쌍의 미세구조작기(NT-88, Narishige)를 이용하여 통상적 방법으로 미세수정을 시행하였다.

3. 정액 처리 방법 및 형태 분석

난자 채취 당일 아침에 채취된 정액은 37°C의 warm plate위에서 30분간 액화시킨 후 정액의 양, 정자의 농도, 운동성, 형태등을 측정하였고(WHO), percoll gradient 방법에 의해 분리된 고활성 정자를 IVF또는 ICSI의 수정에 사용하였다. 형태 분석을 위해서 수정 또는 미세 수정 전후에 5 μ l를 slide위에 잘퍼지도록 도말하여 실온의 공기 중에 건조시켰다. 완전히 건조된 slide는 Diff-Quick 고정액(1.8ml/l triarylmethane in methyl alcohol)에 15초 동안 고정시킨 후, DQ sol 1에 (1g/l xanthene in sodium azide-preserved buffe)에 10초간, Diff-Quick solution 2(0.625g/l azurea and 0.625g/l methylene blue in buffer)에 5초간 염색하였다. 정자 형태는 광학 현미경하에서 1000배의 배율로 200개 이상의 정자를 평가하였다. 비정상적 정자의 형태는 두부, 체부, 미부의 부위별로 나누었으며, 정상치는 이들 이상 형태의 정자를 제외한 정상적 정자의 백분율로 나타내었다(Kruger et al., 1988).

4. 통계 분석

각 군에서 수정율, 양질의 배아 발달률, 임신율을 서로 비교 분석하였으며, 결과에 대한 통계적 분석은 chi-square test로 검정하였고, P값이 0.05이하인 경우를 통계적 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

대상 환자의 평균 나이는 Group 1,2,3,4에서 32.9 \pm 3.4, 33.4 \pm 3.8, 33.0 \pm 2.9, 34.0 \pm 3.3으로 군간에 차이가 없었으며, 정자의 평균수($\times 10^6$ /ml)는 83.0 \pm 42.6, 65.4 \pm 30.7, 77.3 \pm 77.2, 36.0 \pm 34.8였고, 정자의 운동성(%)은 60.8 \pm 14.0, 59.5 \pm 14.7, 49.0 \pm 20.9, 32.0 \pm 24.8로, 정자수와 운동성은 Group 1과 2에서는 유의한 차이가 없었으나 Group 3은 Group 4에 비해 통계적으로 유의하게 높았다(P<0.05, Table 1).

수정율은 IVF와 ICSI에서 공히 정상 형태가 많은 정자군이 높았으나(Group 1(68.1%) > Group

2(62.1%); Group 3(78.1%) > Group 4(71.5%)), 통계적 유의성은 없었다(Table 2, Figure 1).

배아 발달율은 모든 군에서 수정란의 90% 이상으로 실험군들 간에 차이는 없었다. 양질의 배아 발달은 Group 1,2,3,4에서 56.7%, 42.3%, 64.7%, 61.2%로, 정자와의 공배양 여부에 따라서는 ICSI군이 IVF군보다 높았고, 정자의 형태에 따라서는 Group 1이 Group 2보다 통계적으로 유의하게 높았으나(P<0.01), Group 3과 Group 4는 차이가 없었다(Table 2, Figure 1).

임신율은 Group 1(34.8%)이 Group 2(16.7%)보다 통계적으로 유의하게 높은 것으로 나타났으며 (P<0.05), Group 3(40.0%)이 Group 4(23.0%)보다 높은 경향을 보였다(P=0.08)(Table 3, Figure 1).

전체적으로 수정율, 양질의 배아 발달율, 임신율 모두 IVF보다 ICSI군이 높았고, 정상 형태가 많은 정자군(Group 1, 3)이 적은 군(Group 2, 4)보다 높았다(Figure 1).

고 찰

본 연구에서는 strict sperm morphology에 의한 정상 정자 12%를 기준으로 IVF군과 ICSI군에서 수정율, 배발달, 임신율을 비교해 본 결과 12% 이상인 군에서 수정율, 배발달, 임신율이 모두 높은 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 이전의 보고들과 큰 차이가 없었다(Oehninger et al., 1988; Kobayashi et al., 1991; Choi et al., 1994).

체외수정 시술 방법의 발달에 따라 남성 요인의 불임증에 대한 진단 및 치료술이 크게 발달하였다. 특히 남성 요인 또는 기타의 요인으로 인한 수정의 실패를 극복하는 방법으로 세포질내 정자 직접 주입법(intracytoplasmic sperm injection; ICSI)이 개발된 후, 이전의 진단 및 남성의 약물적, 수술적 치료술 개발의 중요성은 격감되었다. 그러나 생식에 미치는 여러가지 요인에 대한 연구는 현재에도 꾸준히 진행되고 있다.

남성의 생식 능력을 평가하는 가장 기초적이고 중요한 방법인 정액 검사는 개략적인 양적 검사에 지나지 않았으나, 근래 정확한 형태에 의한 정자의 평가는 생식 능력 평가에 보다 민감하며 체외수정의 결과 예측에 도움을 줄 수 있는 지표로 보고되었다(Corcostegui et al., 1992).

본 연구에서 IVF와 ICSI의 수정율은 각 군간 통계적 유의성은 없었지만, 대부분의 다른 저자

Table 1. Comparisons of patients' mean age and sperm characteristics among 4 groups, divided by fertilization methods and strict sperm morphology

Groups	IVF		ICSI	
	Group1	Group2	Group3	Group4
Criteria(morphology)	≥12%	<12%	≥12%	<12%
No. of Cycles	227	36	48	48
Mean Age(yrs)	32.9±3.4	33.4±3.8	33.0±2.9	34.0±3.3
Sperm Character				
Count(x10 ⁶ /ml)	83.0±42.6	65.4±30.7	77.3±77.2	36.0±34.8
% Motility	60.8±42.6	59.5±14.7	49.0±20.9	32.0±24.8
% Morphology	28.9±13.5	8.9±2.5	26.0±11.6	5.8±3.1

Table 2. Comparisons of fertilization rates and embryo development

Groups	IVF		ICSI	
	Group1	Group2	Group3	Group4
No. of Cycles	227	36	48	48
No. of Oocytes	2633	385	480	576
No. of 2PN Ova	1725	248	375	412
%Fertilization	68.1	62.1	78.1	71.5
%Development	89.6	92.5	95.4	91.5
%Good Embryos	56.7	42.3	64.7	61.2

Table 3. Comparisons of pregnancy outcome of conventional IVF and ICSI

Groups	IVF		ICSI	
	Group1	Group2	Group3	Group4
No. of Cycles	227	36	48	48
No. of Cycles transferred	225	36	48	47
% Transferred C	99.1	100	100	97.9
No. of Pregnancies	79	6	19	11
%Pregnancy/Cycle	34.8	16.7	40.0	23.0
%Pregnancy/Transfer	35.1	16.7	40.0	23.4

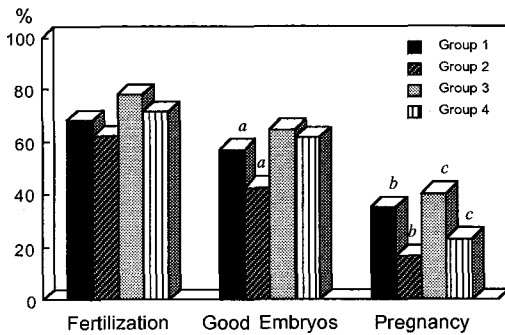


Figure 1. Comparisons of fertilization rates, proportion of good embryos and pregnancy rates among experimental groups. a: $p<0.01$, b: $p<0.05$, c: $p=0.08$

들의 결과와 마찬가지로 좋은 형태의 정자가 높은 수정율을 보였다(Regers et al., 1983; Acosta et al., 1988; Chan et al., 1988; Kruger et al., 1988b; Turner et al., 1989; Hinting et al. 1990). 이는 형태가 좋지 않은 정자에서의 발생기 산소의 영향으로 정자의 운동성과 수정능력 획득이 저해되어 수정율이 감소될 수 있으나(Aiken et al., 1987), 수정시키는 정자수에 의해 극복될 수 있다는 Oehninger 등(1988)의 결과와 수정시 정상 정자가 충분하다면 공존하는 비정상적 형태의 정자에 의해 수정현상이 저해 받지 않는다는 Rosenberg 등(1990)의 결과를 반영하는 것으로 생각된다. 즉 수정 결과에 의하면 정자의 형태적 비정상이

만드시 침체 반응등의 기능적 비정상을 수반하지 않을 수도 있음을 시사한다.

배아의 초기 발생은 난자의 성장 및 성숙 시기에 이미 축적된 물질의 활성화에 의해 조절된다. 본 연구에서의 정자 형태에 따른 배아 발달율의 차이가 없는 것도 이러한 이유이며, 정자가 초기 배아의 발달의 조절 인자가 아님을 시사한다. 하지만 배아의 할구 모양과 fragment의 유무 등은 정자의 형태에 유의하게 영향을 받는 것으로 나타났다. 이는 정자로부터의 발생기 산소에 의한 영향으로 생각된다. 정자로부터의 발생기 산소는 정자의 운동성과 형태 및 정액내의 백혈구의 수 등과 관계가 있으며, 생식 능력이 낮은 것으로 알려진 사정 불능 환자 및 정계 정맥류 환자에 높은 것으로 알려져 있다(Aiken et al., 1990). 이러한 발생기 산소는 정자 또는 난자와 배아의 원형질막의 지질을 peroxidation시키고, 이로 인해 원형질막 단백질이 산화되어 세포의 구조와 기능에 치명적 영향을 미친다.

IVF에서는 ICSI와 다르게 발생기 산소를 생성하는 비정상 형태의 정자와 수정중 공배양함으로 수정 및 수정 이후 배아 발달에 악영향을 받게 될 것이다. 따라서 양질의 배아 비율이 IVF와 ICSI에서 다른 양상을 보인 이유는 정자로부터의 발생기 산소의 영향에 의한 것으로 사료된다.

임신은 배우자를 포함한 수정란의 상태, 체외 배양 조건 및 자궁 내막의 환경과 같은 요인들의 종합적 표현이다. 실험군들간의 정자 형태 이외의 요인들은 서로 다르지 않았으나, 정자의 형태에 따른 임신율은 좋은 형태의 정자군이 IVF와 ICSI군 모두에서 유의하게 높았다. 특히 ICSI군에서 배아의 상태가 유사했음에도 임신율은 크게 차이를 보였다. 이는 정자의 형태가 잠재적 발생 능력과 밀접한 관계가 있음을 보여주는 증거로, 다른 보고자들과 유사한 결과를 보여준다(Oehninger et al., 1988; Grow et al., 1994). 즉 정자의 형태적 결함은 정자핵에서의 결함이나 염색체 이상을 수반할 수도 있고, 이로 인해 착상율은 낮고 유산율이 높을 수 있다(Zamboni, 1987; Abramsson et al., 1982). 정자의 형태적 비정상은 정자형성 (spermatogenesis)의 비정상을 반영하고, 이는 정자의 수정 능력과 배아발달(embryogenesis)을 감소시켜 정상적 임신을 위한 잠재력이 낮아진다고 사료된다(Marsh et al., 1987; Daniel et al., 1994).

결론적으로 Diff-Quick 방법에 의한 정자의 정확한 형태 분석은 빠르고, 간편한 경제적인 방법이며, 원래의 사정된 정액에서의 형태와 다르게 (Kruger et al., 1986), Percoll처리 후의 정자의 형태는 배아 발달 및 임신 결과 예측에 좋은 지표라고 사료된다. 하지만 정자의 형태적 이상이 정자의 잠재적 발생 능력에 어떻게 영향을 미치는지를 알기 위하여 정자의 형태와 염색체 이상과의 관계도 규명되어야 할 것으로 생각된다. 또한 착상율을 높이기 위한 방안으로 수정시 antioxidant를 첨가하거나, 정자의 형태가 좋지 않고 반복적으로 배아 발생이 저조한 환자에서 통상적 IVF보다 ICSI에 의해 수정시키는 것이 임신을 얻을 수 있는 바람직한 방법으로 사료된다.

인 용 문 헌

- Abramsson L, Beckman G, Duchek M, Nordenson I: Chromosomal aberrations and male infertility. *J Urol* 1982, 128, 52.
- Acosta AA, Oehninger S, Morshedi M, Swanson RJ, Scott R, Irianni F: Assisted reproduction in the diagnosis and treatment of the male factor. *Obstet Gynecol Surv* 1988, 44, 1-18.
- Agarwal A, Ikemoto I, Loughlin KL: Relationship of sperm parameters with levels of reactive oxygen species in semen specimens. *J Urol* 1994, 152, 107-100.
- Agarwal A, Ikemoto I, Loughlin KL: Effect of sperm washing on levels of reactive oxygen species in semen. *Arch Androl* 1994, 33, 157-162.
- Aiken RJ, Clarkson JS: Cellular basis of defective spermatozoa function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1987, 81, 459-469.
- Aiken 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, 13, 433-451.
- Chan SYW, Wang C, Chan STH, Ho PC, So WWK, Chan YF, Ma HK: Predictive value of sperm morphology and movement charac-

- teristics in the outcome of *in vitro* fertilization of human oocytes. *J IVF ET* 1988, 6, 142-148.
- Check J H, Bollendorf A, Press M, Blue T: Standard sperm morphology as a predictor of male fertility potential. *Arch Androl* 1992, 28, 39-41.
- Choi KW, Kim SK, Yang HW, Cha YB, Lee SJ, Park JM, Kim MK: Influence of sperm parameters and capacitation methods on the outcome of subzonal insemination(SUZI). *Kor J Fertil Steril* 1994, 21, 21-19.
- Corcostegui B, Aparicio MV, Barrenetxea G, Matorras R, Melchor JC, Rodriguez Escudero FJ: Strict morphology evaluation as prognostic factors in *in vitro* fertilization programme. *Human Reprod* 1992, 7, 45-46.
- Dadoue JP, Mayaux MJ, Guihard-Moscato ML: Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia* 1988, 20, 211-217.
- Dirnfeld M, Goldman S, Koifman M, Gonen Y, Calderon I, Abramovici H: Very short exposure of oocytes to normal sperm *in vitro* improves implantation rates: a prospective randomized study. Abstracts of the 51th annual meeting of the American Society for Reproductive Medicine, In Abstract Book, 0.154.
- Enginsu ME, Dumoulin JCM, Pieters MHEC, BrasM, Evers JLH, Geraedts JPM: Evaluation of human sperm morphology using strict criteria after Diff-Quik staining: correlation of morphology with fertilization *in vitro*. *Human Reprod* 1991, 6, 854-858.
- Eggert-Kruse W, Pohl S, Reimann-Andersen J, Wolfgang T, Rohr G, Runnebaum B: Clinical relevance of sperm morphology assessment using strict criteria and relationship with sperm-mucus interaction *in vivo* and *in vitro*. *Fertil Steril* 1995, 63, 612-624.
- Escalier D: Human spermatozoa with large heads and multiple flagella: a quantitative ultrastructural study of 6 cases. *Biol Cell* 1983, 48, 65-74.
- Fukuda M, Morales P, Overstreet JW: Acrosomal function of human spermatozoa with normal and abnormal head morphology. *Gamete Res* 1989, 24, 59-65.
- Grow DR, Oehninger S, Sel tman HJ, Toner JP, Swanson RJ, Kruger TF, Muasher SJ: 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, 559-567.
- Hinting A, Comhaire F, Vermeulen L, Dhont M, Vermeulen A, Vandekerckhove D: Value of sperm characteristics and the result of *in vitro* fertilization for predicting the outcome of assisted reproduction. *Int J Androl* 1990, 13, 59-64.
- Iwasaki A, Gagnon C: Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril* 1992, 57, 409-415.
- Kobayashi MJ, Sugimura K, Nozawa S, Bugiyama T, Iida E: Sperm morphological assessment based on strict criteria and *in vitro* fertilization outcome. *Human Reprod* 1991, 6, 983-986.
- Koulicher L, Schoysman R: Chromosome et sterilité masculine. *Schweiz Med Wochenschr* 1973, 103, 1269-1277.
- Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH, Lombard CJ, Van der Merwe JP, Van Zyl JA, Smith K: Sperm morphologic features as a prognostic factor in *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1986, 46, 1118-1123.
- Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S: Predictive value of abnormal sperm morphology in *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1988, 49, 112-117.
- Kruger TF, Swanson RJ, Oehninger S, Morsedhi M: Abnormal sperm morphology and other sperm parameters related to the outcome of the hamster oocyte human sperm penetration assay. *Int J Androl* 1988b, 11, 107-113.
- Lessley BA, Garner DL: Isolation of motile spermatozoa by density gradient centrifugation in percoll. *Gamete Res* 1983, 7, 49-61.
- Liu DY, Baker HWG: Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and fertilization

- rates *in vitro*. *Fertil Steril* 1992, 58, 1178-1184.
- Marsh SK, Bolton VN, Brande PR: The effect of morphology on the ability of human spermatozoa to penetrate zona free hamster oocytes. *Human Reprod* 1987, 2, 499.
- Oehninger S, Swanson RJ, Acosta AA, Simmons K, Morshedi M, Rosenwaks Z, Veeck L: Corrective measures and pregnancy outcome in *in vitro* fertilization in patients with severe sperm morphology abnormalities. *Fertil Steril* 1988, 50, 283-287.
- Rogenborg L, Gustafson O, Lunell NO, Nylund L, Pousette A, Slotte H, Akerlof E, Fredricsson B.: Morphology of seminal and swim-up spermatozoa and the outcome of *in vitro* fertilisation and embryo transfer. *Andrologia* 1990, 22, 368-375.
- Rogers BJ, Bentweod BJ, Van Campen H, Helmbrecht G, Soderdahl D, Hale RW: Sperm morphology assesment as an indicator of human fertilizing capacity. *J Androl* 1983, 4, 119-125.
- Ron-El R, Nachum H, Herman A, Golan A, Caspi E, Soffer V: Delayed fertilization and poor embryonic development associated with impaired semen qulaity. *Fertil Steril* 1991, 55, 338-344.
- Shanis BS, Katsoff D, Check JH, Hoover L: Sperm morphology using strict criteria not useful in predicting poor pregnancy rates(PRs) despite adequate fertilization. IX World Congress on IVF AAR 1995, 591-594.
- Turner TW, Schrader SM, Perez-Pelaez M, Karuhn RF, Van der Ven HH, Jeyendran RS: Morphomeric and volumetric comparison of human spermatozoa. *Arch Androl* 1989, 23, 201-206.
- Zamboni L: The ultrastructural pathology of the spermatozoon as a cause of infertility : the role of electron microscopy in the evaluation of semen quality. *Fertil Steril* 1987, 48, 711.