

Sperm Morfolojisi ve Kromatin Kondensasyon Defektleri Arasındaki Korelasyon

Sevilay Erimşah¹, İsmail Seçkin¹, Seyfettin Uludağ², Tülay İrez²

¹İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

²İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, İstanbul

Özet

Amaç: Sperm kromatin kondensasyonu spermiyogenesis süresince paternal histonların protaminlerle değişimi ile sonuçlanan ve erkek genomunun sağlıklı taşınabilir hale gelmesinde önem kazanmaktadır. Bu çalışmada sperm morfolojisinin normal veya teratospermik sınırlarda olduğu durumlarda ve astenospermide oraya çıkan kromatin bozukluklarının histokimyasal ve ultrastrüktürel olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmamızda sperm morfolojisi ve motilitesi göz önünde bulundurularak, intrastoplazmik sperm enjeksiyonu uygulanan 29 -55 arasında yaş dağılımı gösteren 60 olgu normospermik, oligoastenospermik ve teratospermik olarak üç guruba ayrıldı. Bu çalışmada asidik anilin mavisi ve toluidin mavisi boyaları kullanılarak lizinden zengin olan histonların ve argininden zengin olan protaminlerin boyanma eğilimleri ve ultrastrüktürel analizler göz önünde bulundurularak sperm kromatin kondensasyon derecesi incelendi.

Bulgular: Anilin mavisi (AB) ve toluidin (TB) mavisi boyaları ile yapılan ışık mikroskopi çalışmalarında, sperm baş yapısındaki anomalilerin, kondensasyon defektlerinin ve DNA hasarlarının oranlarının teratozoospermi (\leq % 4 normal morfoloji), astenozoospermi ($<$ % 50 motilite) olgularında, normozoospermi ($>$ %14 normal morfoloji) olgularına oranla daha fazla olduğunu belirledik Sperm baş morfolojisi ile AB ve TB pozitifliği arasında negatif bir korelasyon bulundu ($p=0.01$ ve $p=0.01$). Ultrastrüktürel analiz sonucu; akrozomal anomaliler, kromatin kondensasyon bozuklukları ve apoptotik değişimler olarak özetlenebilecek üç farklı ultramorfolojik değişim gözlemlendi.

Sonuç: Bu çalışmada tüm gruplarda asidik anilin mavisi ve toluidin mavisi pozitifliğinin sperm morfolojisi ile negatif korelasyon gösterdiği bulunmuştur ($p=0.01$ ve $p=0.01$). Ultrastrüktürel düzeyde teratospermik ve astenospermik olgularda kondensasyon kusurlarının yanında akrozomal anomaliler ve apoptotik değişimler dikkati çekmektedir.

Anahtar kelimeler: Spermatozoa, kromatin morfolojik anormallikler, elektron mikroskobu, erkek infertilitesi

Cerrahpaşa Tıp Derg 2008; 39: 128-135

The correlation between sperm morphology and chromatin condensation defects

Abstract

Objectives: Chromatin condensation is vital for the function of sperm which is the motile carrier of paternal genome and sperm genome quality has been emphasized for several years as playing a major role in early embryogenesis. The purpose of this study was to determine the relation of sperm morphology and motility with chromatin condensation.

Methods: In this study, intracytoplasmic sperm injection (ICSI) program of 60 patients were divided into three groups according to sperm morphology and motility (teratospermic, asthenospermic and normospermic). Acidic aniline blue and toluidine blue staining were used for chromatin condensation and abnormal packaging and Transmission EM for ultrastructural level of chromatin and nuclear or acrosomal structures.

Results: In this study chromatin packaging was significantly correlated with normal sperm morphology namely for toluidine blue and aniline blue, respectively ($p=0.01$ and $p=0.01$). Electron microscopic examinations revealed that acrosomal abnormalities, apoptotic changes and condensation defects are important parameters for teratozoospermic and asthenospermic patients.

Conclusion: Sperm nuclear staining with acidic aniline blue and toluidine blue and ultrastructural analysis are important parameters for infertility investigation ($p=0.01$ and $p=0.01$). In the teratospermic and asthenospermic subjects, there are acrosomal anomalies and apoptotic changes besides condensation deformities at ultrastructural level.

Key words: Spermatozoa, chromatin, morphological abnormalities, electron microscopy, male infertility

Cerrahpaşa J Med 2008; 39: 128-135

Alındığı Tarih: 20 Haziran 2008

Yazışma Adresi (Address): Msc. Sevilay Erimşah

Kaynak Mah. Alişan Apt. A-Blok Kat: 5

Karamürsel - Kocaeli

e-posta: sevilayerimsah@yahoo.com

Spermiyogenezis süresince, protamin proteinleri spermatid kromatin kondensasyonunda önemli rol oynarlar [1]. Paternal genomun taşınmasında rol alan sperm için kromatin kondensasyonu ciddi bir önem ta-

şımaktadır [1]. Spermiyogenezis boyunca, spermatid kromatini gerçek kompaksiyon sürecine girer [2]. Histonlar ile protaminlerin yer değiştirmesi sayesinde kromatin kondensasyonu gerçekleşir [3]. Sperm kromatin yoğunlaşması, spermatogonyumdan matür sperm oluşmasına kadar geçen sürede proliferasyon ve hücre farklılaşmalarının olduğu kompleks ve dinamik bir süreçte meydana gelmektedir [4].

Spermatogenezin son aşamasında somatik nükleoproteinler yüksek oranda arginin ve sistein içerirler. Sistein molekülleri disülfid bağları ile birleşerek mekanik ve kimyasal bir stabilite sağlamaktadırlar. Pozitif yüklü protamin ve negatif yüklü DNA iskeleti arasında, moleküller arası kuvvetli etkileşim DNA'nın bazik karakterli protamin bağlanmasını kolaylaştırarak kromatin yoğunlaşmasına sebep olmaktadır [5].

Normal kromatin kondensasyonunun olmaması spermelerde gelişim anomalilerinin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Sperm kromatini çeşitli testler ile incelenmektedir. Bunlardan biri anilin mavisi boyası, diğeri toluidin mavisi boyasıdır. Nükleusun anilin mavisi ile boyanması ve toluidin mavisi ile koyu mavi veya violet boyanması sperm kromatin kondensasyonunda hatalar olduğunun belirtisidir. Sperm kromatin kondensasyonuna ilişkin çalışmalarda araştırmacılar sperm kromatin strüktürü ile fertilite arasında yakın ilişki bulmuşlardır ayrıca anormal DNA'ların sperm baş morfolojisini de değiştirdiği gösterilmiştir [6].

Sperm morfolojisi, konsantrasyonu ve motilitesinden oluşan en önemli üç parametreden morfolojik değerlendirme, in vivo dölleme kapasitesinin en iyi göstergelerinden biri olarak görülmektedir [7].

Detaylı ve etraflı bir sperm analizi, infertil çifte yaklaşımda ilk yapılması gerekenlerden biridir. Semen kalitesi, klasik olarak spermelerin ejakülat içerisindeki sayısı, motilitesi ve morfolojisine bakılarak değerlendirilir [5]. Bu parametreler içerisinde sperm morfolojisi, bir erkeğin dölleyebilme potansiyelini en iyi biçimde gösterenidir [7].

Konvansiyonel semen analizi infertil erkeklerin sperm nükleuslarında daha yüksek oranda gevşek paketlenmiş kromatin ve hasarlı DNA bulunduğunu göstermiştir [8].

Işık mikroskopisi ile yapılan incelemeler ancak sınırlı bilgi vermektedir. Elektron mikroskopisi çalışmalarıyla ise, hiç şüphe edilmeyen ultrastrüktürel anomaliler bile ortaya çıkarılabilmektedir. Elektron mikroskopisi ile sitolojik detaylar daha iyi incelenebilmektedir. Transmisyon elektron mikroskopla yapılan sperm incelemeleri sayesinde subfertiliteye yol açan durumlar daha net ortaya konabilir ve fertilizasyon potansiyelleri ile ilgili daha net bilgiler elde edilebilir [9].

Bizde bu yönden hareket ederek ışık mikroskopik çalışmaların, ultrastrüktürel çalışmalarla desteklenmesi ile sperm morfolojisi ve kromatin kondensasyon defektleri arasındaki ilişkiyi normospermik, astenospermik ve teratospermik olgularda araştırdık.

Gereç ve Yöntem

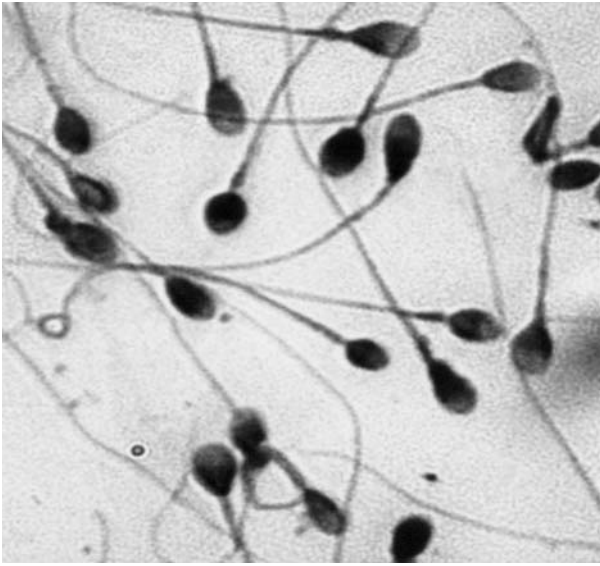
Çalışmamızda Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Tüp Bebek Ünitesine çeşitli infertilite nedenleriyle başvuruda bulunan teratozoospermik, astenozoospermik ve normozoospermik vakaların semen örnekleri kullanıldı. Kruger kriterlerine göre normal morfolojisi $\leq 4\%$ olanlar teratozoospermi, normal morfolojisi $> 14\%$ olanlar ise normozoospermi, WHO kriterlerine göre motilitesi $\%50$ 'nin altında olan olgularda astenozoospermi olarak gruplandı. Toplam 85 olgu (median yaş, 38; dağılım aralığı: 29-55) (normospermik 30, astenospermik 25 ve teratospermik 30 olgu) takip edildi. Olguların tümünü infertilite nedeniyle ICSI (intrastoplazmik sperm injeksiyonu) uygulanan çiftler oluşturdu. Sperm kromatin kondensasyonunun değerlendirilmesi için her olgudan 2'şer preparat hazırlandı. Preparatlardan biri asidik anilin mavisi boyasında diğeri de metakromatik özellik gösteren toluidin mavisi boyasında bekletilerek boyama yapıldı. Kondensasyonu yeterince gerçekleşemeyen spermelerde, histon/protamin değişimindeki yetersizlik nedeniyle uyguladığımız anilin mavisi boyası ile histonlar pozitif reaksiyon vererek nükleus koyu mavi boyandı. Metakromatik özellik gösteren toluidin mavisi boyası sayesinde anormal kromatin kondensasyonu gösteren spermeler koyu mavi veya mor renkte boyanırken, normal kromatin kondensasyonu gösteren spermeler yeşil veya açık mavi renkte boyandı. Koyu mavi veya mor renkteki spermeler pozitif kabul edilerek her preparat için 100 spermdeki pozitif

sperm oranı hesaplandı. Nikon Diaphot ışık mikroskobu ile incelendi ve dijital fotoğrafları alındı. Ultrastruktürel tetkikler içinde hastaların hazırlanmış sperm örnekleri %4'lük gluteraldehit ile (5saat-30gün) fikse edildikten sonra Milloning fosfat tamponunda 1 saat yıkanan spermiler daha sonrada Milloning tamponu ile tamponlanmış Ph'ı 7,2 olan %1 osmium tetroksit ile 1 saat ikincil olarak fikse edildi. Dehidratasyonu takiben örnekler araldite gömüldü. Reihard ultramikrotomu ile

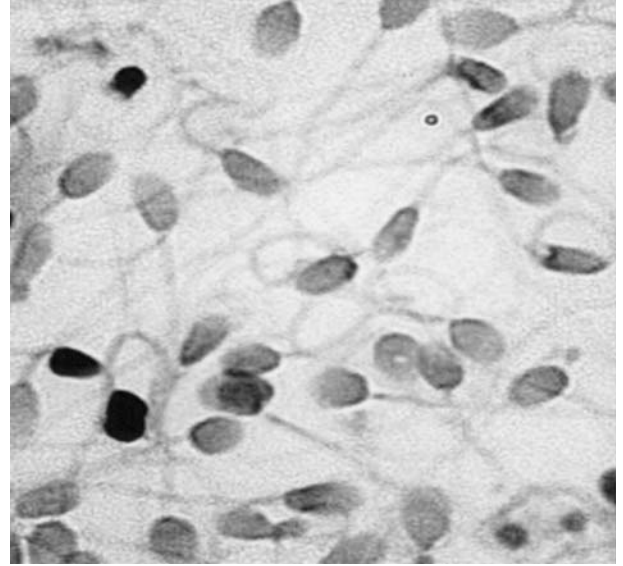
500 Å kalınlığında kesitler alındı ve uranil asetat-kurşun sitrat boyası ile kontrast elde edildi. Zeiss EM 10 elektron mikroskobu ile incelendi ve fotoğraflandı.

Bulgular

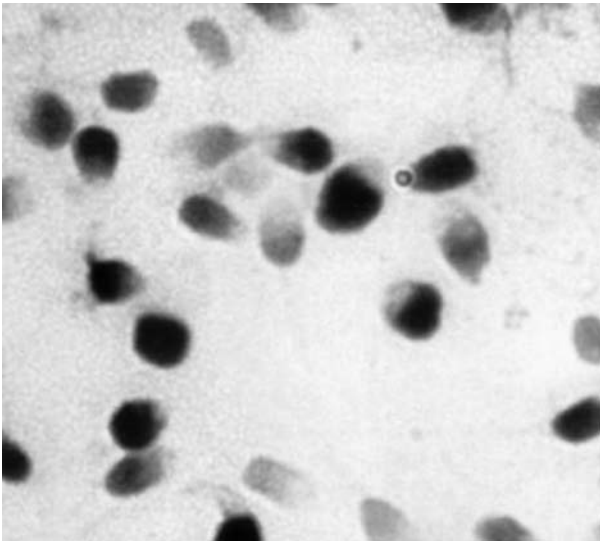
Yaptığımız çalışmada anormal morfolojideki spermilerin, anilin mavisi ve toluidin mavisi ile boyanma miktarı, normal morfolojideki spermilerin boyanma mikta-



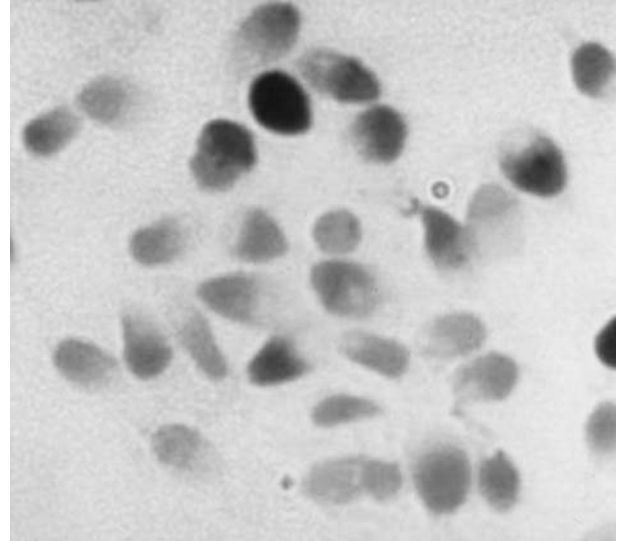
Şekil 1. Anilin mavisi uygulanan teratozoospermik olgu.



Şekil 2. Anilin mavisi uygulanan normozoospermik olgu.



Şekil 3. Toluidin mavisi uygulanan teratozoospermik olgu.



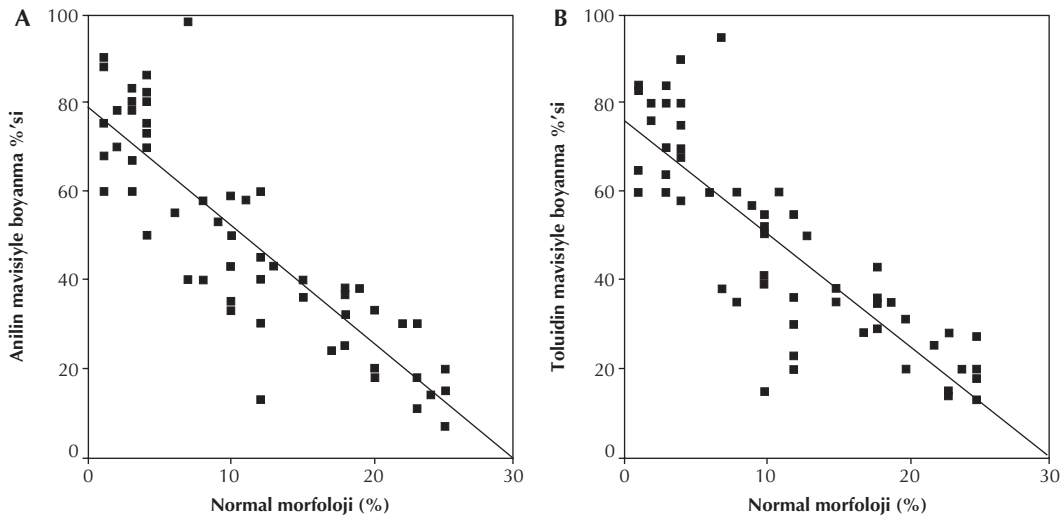
Şekil 4. Toluidin mavisi uygulanan normozoospermik olgu.

rından oldukça fazlaydı (Şekil 1-4). Buna paralel olarak anormal morfolojili sperm daha fazla sayıda bulunduğu teratozoospermi olgulardaki boyanma yüzde oranı, normozoospermi olgulara oranla fazla bulundu (Tablo 1). Anilin mavisi ve toluidin mavisi boyaları ile yapılan ışık mikroskopi çalışmalarında, sperm baş yapısındaki anomalilerin, kondensasyon defektlerinin ve DNA hasarlarının oranlarını teratozoospermi (72.45 ± 11.427 , 72.35 ± 10.05), astenozoospermi (62.60 ± 17.31 , 63.60 ± 14.91) vakalarda ve normozoospermik (28.60 ± 19.67 ,

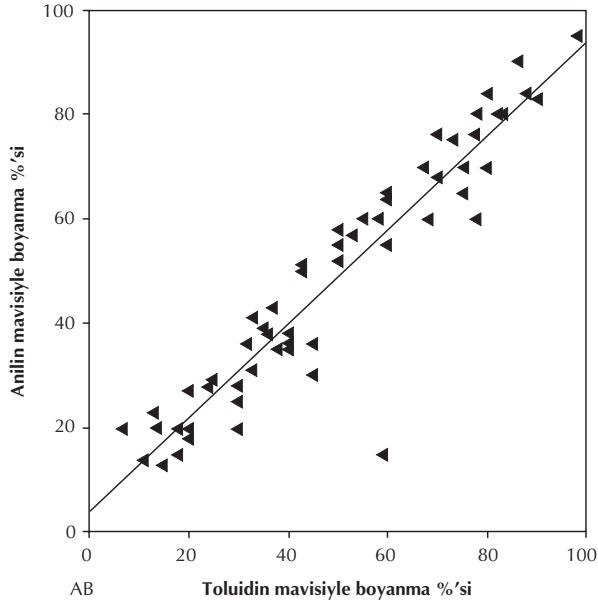
$28,6500 \pm 17.40$) vakalara oranla daha fazla olduğunu belirledik (Tablo 1). Tüm olgulardaki sperm morfolojisi ve kondensasyon defektleri göstergesi olan boyamalardan elde ettiğimiz sonuçlar arasındaki korelasyonuda diğer sonuçlara paralel bir şekilde $P=0.01$ düzeyinde ileri derecede anlamlı negatif korelasyon olarak saptadık (Şekil 5). Ayrıca sperm kondensasyonu ve DNA hasarı konusunda bilgi veren Anilin mavisi ve Toluidin mavisi boyama sonuçları arasındaki ilişkiyi araştırdığımızda $P=0.01$ düzeyinde ileri derecede anlamlı pozitif

Tablo 1. Boyanma oranlarına göre grupların değerleri.

	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart sapma
Teratozoosperm					
Anilin mavisi	20	50	90	72.45	11.43
Toluidin mavisi	20	58	90	72.35	10.05
Astenozoosperm					
Anilin mavisi	20	37	90	62.60	17.31
Toluidin mavisi	20	36	84	63.60	14.91
Normozoosperm					
Anilin mavisi	20	7	98	28.60	19.68
Toluidin mavisi	20	13	95	28.65	17.40



Şekil 5. Anilin mavisi (panel A, pearson katsayısı -0.875 , $p= 0.01$, $N= 60$) ve toluidin mavisi (panel B, Pearson katsayısı -0.852 , $p= 0.01$, $N= 60$) ile boyanan sperm yüzdeleri ile normal morfoloji arasında ileri derecede anlamlı negatif korelasyon gösterilmektedir.



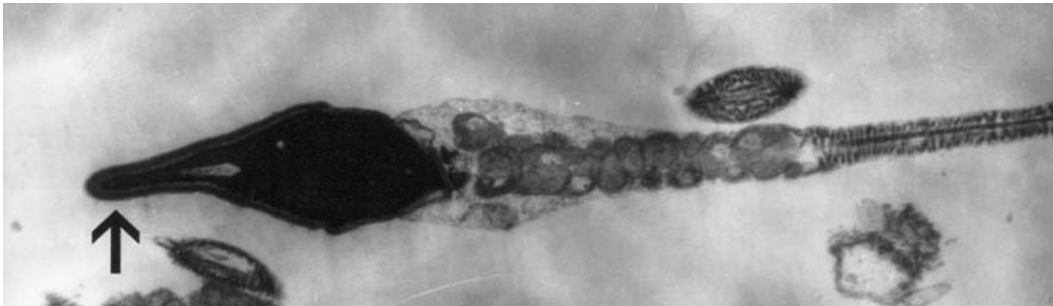
Şekil 6. Anilin ve toluidin mavileri ile boyanan spermiler arasında korelasyon Pearson kat sayısı 0.937, $p=0.01$, $N=60$.

korelasyon olarak saptadık (Tablo 4, Şekil 6). Gruplarımızı anilin mavisi ve toluidin mavisi ortalama boyanma oranlarına göre kıyasladığımızda teratozoospermi ve astenozoospermi ile normozoospermi grupları arasında $p<0.001$ düzeyinde ileri derecede anlamlı fark saptandı (Şekil 6). Transmisyon elektron mikroskop ile yapılan incelemelerde normospermik olgularda normal nüve kondensasyonu ve normal akrozomal yapı gösteren spermilere sıklıkla rastlandı (Şekil 7). Teratospermik olgularda ise amorf, uzamış, immatür formlar ve akrozom defektlerine, kromatin kondensasyon anomalilerine, vakoullere ve apoptotik spermatozoonlara sıkça rastlanıldı (Şekil 8-13).

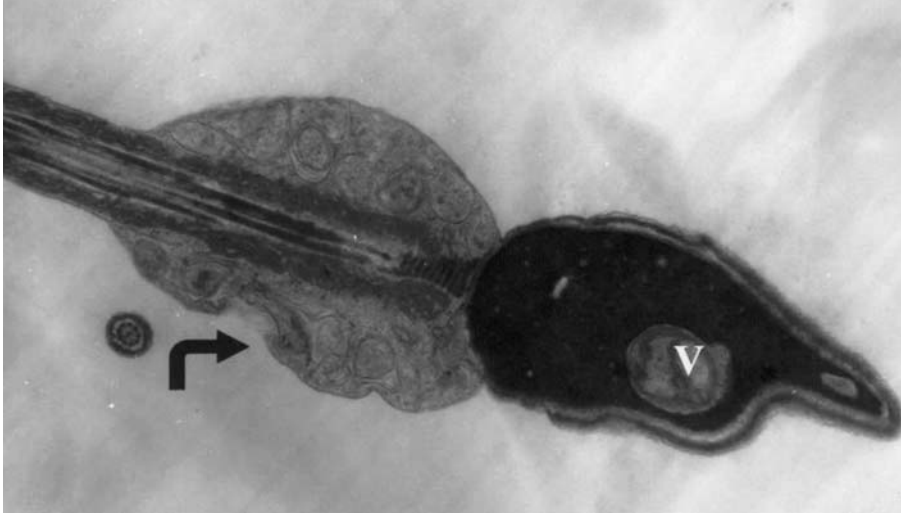
Tartışma

Yapılan birçok çalışmada infertil erkeklerin sperm nükleuslarında gevşek paketlenmiş kromatin ve hasarlı DNA izlenmektedir. Bizde çalışmamızda infertil vakalarda gevşek paketlenmiş kromatin ve apoptotik özellikler gösteren spermilere sıklıkla rastladık. Kromatin anomalili spermilerin sık sık anormal baş şekline, azalmış fertilizasyon potansiyeline veya ilk trimester düşüklüklerine neden olduğu desteklenmektedir [10]. Nüklear defektler, sperm nükleusunun genişlemesi ve DNA dekon-densasyonu sırasında ooplazmaya salgılanan bazı faktörlerin yokluğu ile ilişkili bulunmuştur. Bu faktörlerin eksikliğinde, spermatozoa ile birleşmesine rağmen ovum gelişimini sürdürmemektedir [11]. Tek iplikli DNA, DNA kırıkları, anormal histon protamin geçişleri veya apoptotik değişiklikler, başarısız kondensasyon, immatürite ve intranükleer lakunalar şeklinde ultrastruktürel olarak gösterilmektedir. Nüvede büyük lakunalar defektler (2-3 μm), bunlar kompakt kromatinin bulunacağı yerlerde, granülofibrillar veya nükleusun %20-50'sini kapsayabilecek şekilde ki boş alanların bulunması ile oluşmaktadır. Bu defektlerin sık sık granüler immatüritesi bulunan spermelerde ortaya çıktığı ifade edilmiştir [12]. Nüklear vakuollerin; seminal infeksiyon, varikosel, ateş, testiküler tümörler, inflamatuvar bağırsak hastalıklarında gözlemlendiği bilinmektedir [13]. Teratozoospermik vakalarda yüksek oranda aneuploidi ve kromozomal struktürel aberasyonlar görülmektedir, fakat kromatin matürasyon ve kompleksi yönündeki farklılıklarla ilişkili net bir bilgi bulunamamıştır [14].

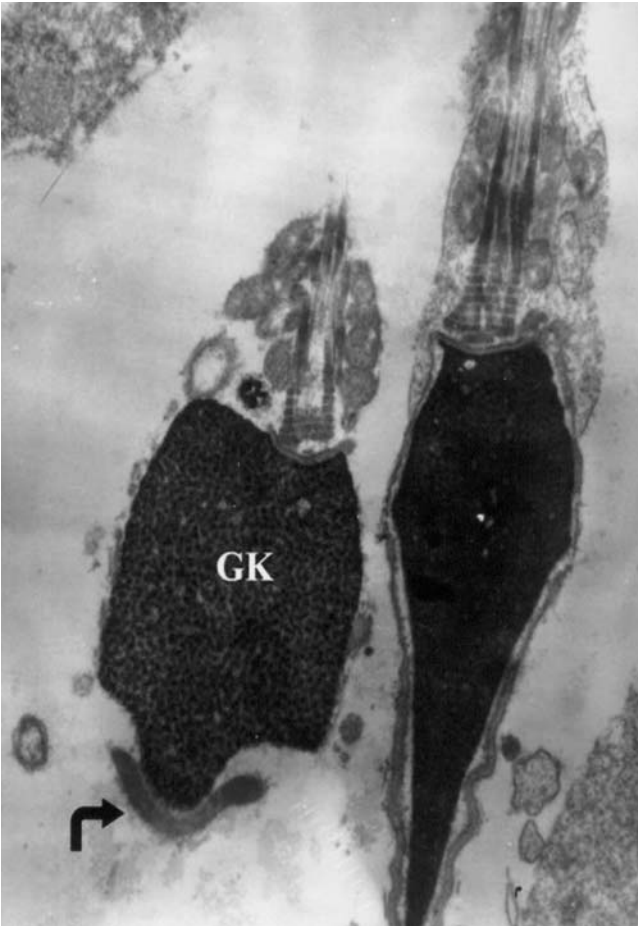
Morfolojisi bozuk spermilerin ICSI ile membran yapıları by-pass edildiğinde normal fertilizasyon yapabilecekler bile genetik aberasyonlara bağlı metabolik hata ne-



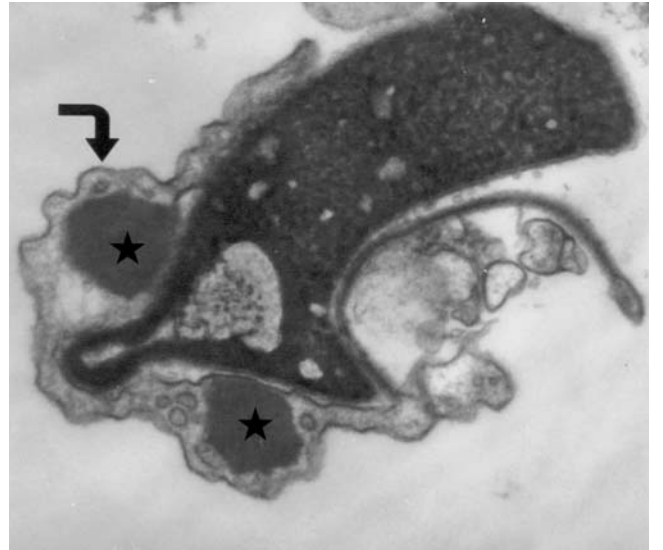
Şekil 7. Normal kromatin kondensasyonu ve akrozom yapısı (ok işaretli) (x 8000).



Şekil 8. Nüklear kısımda büyük vakuollü (V işaretli) ve stoplazmik dropletli (ok işaretli) spermatozoon (x 25000).

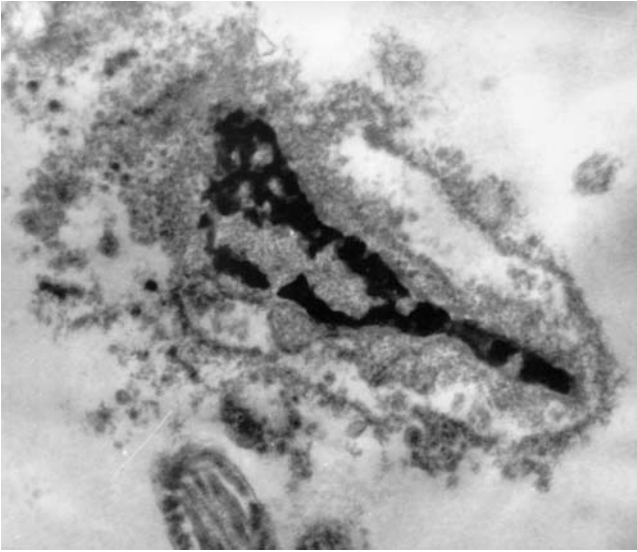


Şekil 9. Kromatin kondensasyonu normal olan sperm ile küçük akrozomlu (ok işaretli) granüler kromatinli (GK işaretli) sperm bir arada (x16000).

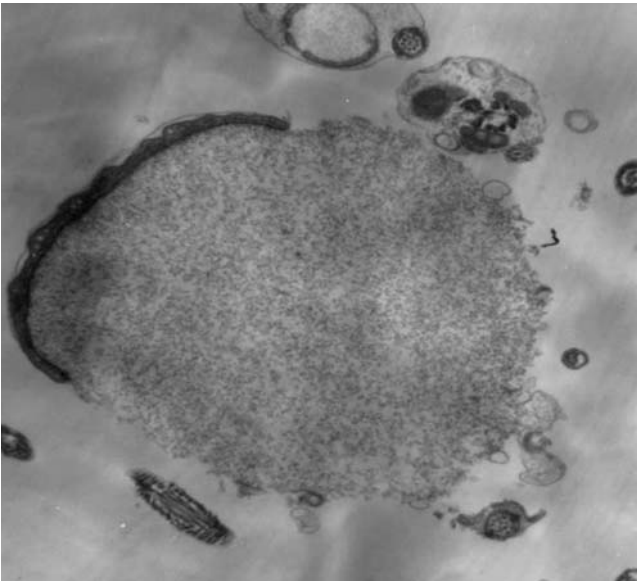


Şekil 10. Akrozomal irregülasyon (ok işaretli) ve akrozomal inklüzyonlar (yıldız işaretli) ve kromatinde laküner defektli spermatozoon (x16000).

ticesi fonksiyonel normal bir embriyo oluşturamayacakları anlaşılmaktadır [10]. Zaten, sperm morfolojisinin kesin kriterler ile değerlendirilmesinin fertilizasyon şansını tahmin etmede son derece önemli olduğu ve fertilizasyon ile anlamlı bir pozitif korelasyon gösterdiği çok sayıda çalışmada vurgulanmıştır [15,16]. Sperm morfoloji bozukluğu ne derece şiddetli ise, fertilizasyon oranları da o derece azalmaktadır.

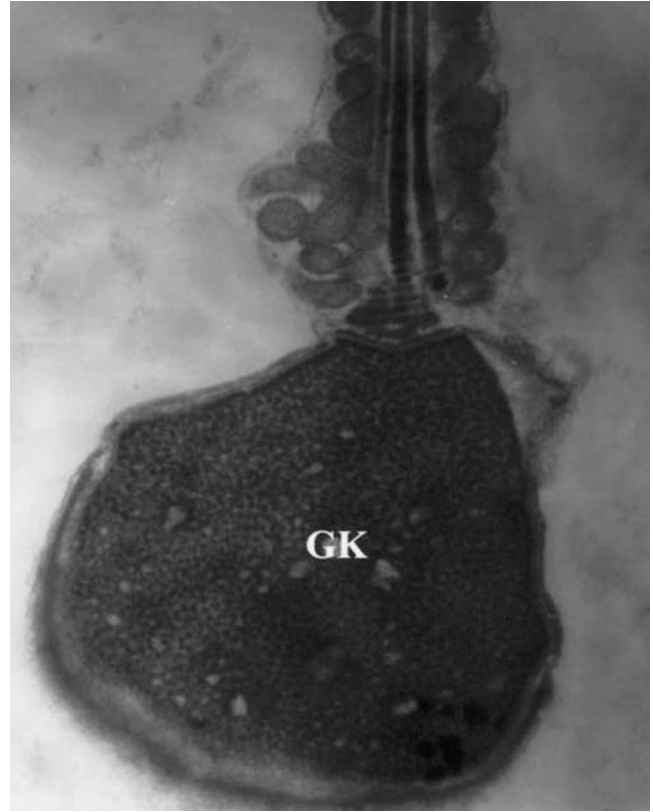


Şekil 11. Apoptotik spermatozoon (x25000).



Şekil 12. İmmatür spermde gevşek kromatin ve küçük akrozom yapısı (x6300).

Sperme ait diğer defektlerden biri de sperm akrozomuna ait yapısal defektlerdir. Akrozoma ait yapısal defektler genellikle, düzensizlik, yoğunluk azalması, hipoplazi, lakünasyon, nüveden ayrılma ve akrozom olmayışı (agenesis) şeklindeydi [6]. Akrozomu olmayan spermatozoalar, fertil olguların semenlerinde %0.5 olarak çok az miktarda bulunurlar. İnfertil olgularda ise bu oran %2-3 kadar artmaktadır [17].



Şekil 13. Kromatin kondensasyonu anormal, granüler kromatinli nüve (GK işaretli) yapısına sahip yuvarlak spermatozoon (x 16000).

Biz de çalışmamızda akrozomsuz spermlere teratospermik olgularda, normal olgulara göre daha sıklıkla rastladık. Yapılan çalışmalarda da akrozomun komple yokluğunun nükleer yapıyı değiştirerek yuvarlak başlı sperm morfolojisine yol açtığı gösterilmiştir [16]. Ancak oval ve amorf başlarda ise daha az sıklıkla rastlanmaktadır. Akrozomsuz spermatozoa ile ilgili birçok yayınlarda; histon protamin değişimindeki bozuluktan meydana gelen kromatin kondensasyon eksikliği ve DNA fragmentasyon artışı bildirilmektedir [17]. Biz de çalışmamızda akrozomsuz sperm nüvelerinde kromatin kondensasyonu eksikliği gözledik.

Akrozomal hipoplazi ciddi teratozoospermi vakalarında araştırılması gerektiği ve ayrıntılı araştırmasının da ancak elektron mikroskobu ile mümkün olabileceği bildirilmiştir [14]. Araştırmacılar akrozomda krater defekti ve akrozomal inklüzyonların nadir görülen akrozomal defektler olduğunu desteklemiştir [14]. Bunların Golgi artıklarından kökenlendikleri düşünülmektedir. Bizim

çalışmamızda akrozomal inklüzyonların nadir olarak rastladık, fakat krater defektlerine rastlanılmadı.

İnsan spermatozoalarının fertilizasyon potansiyellerinin en iyi göstergelerinden biri sperm morfolojisidir. Sperm morfolojisinin değerlendirilmesindeki problem ise spermelerin pleimorfik olmalarıdır. Işık mikroskopisi ile yapılan incelemeleri ancak sınırlı bilgi vermektedir. Elektron mikroskopisi çalışmalarıyla ise, hiç şüphe edilmeyen ultrastrüktürel anomaliler bile ortaya çıkarılabilmektedir

Elektron mikroskopisi ile sitolojik detaylar daha iyi incelenebilmektedir. Erkeğe ait fertilité problemlerinde kullanılması gereken ideal metod da bu olmalıdır [17]. Transmisyon elektron mikroskopla yapılan sperm incelemeleri sayesinde subfertiliteye yol açan durumlar daha net ortaya konabilir ve fertilizasyon potansiyelleri ile ilgili daha net bilgiler elde edilebilir.

Bulgularımız bize sperm baş yapısı ile ilgili yapılan ışık mikroskopik çalışmaların akrozom ve nüve defektleri yönünden ultrastrüktürel çalışmalarla desteklenmesi ile yardımla üreme tekniklerinde spermden kaynaklanan başarısızlıklarda daha net bilgilere sahip olabileceğimizi düşündürmektedir.

Kaynaklar

- Hofmann N, Hilscher B. Use of aniline blue to assess chromatin condensation in morphologically normal spermatozoa in normal and infertile men. *Hum Reprod* 1991; 6: 979-982.
- Vincent W, Aoki, Douglas T, Carrell . Human protamines and the developing spermatid:their structure, function, expression and relationship with male infertility. *Asian J Androl* 2003; 5: 315-324.
- Foresta C, Zorzi M, Rossato M, Varotto A. Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. *Int J Androl* 1992; 15: 330-337
- Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi T, Bizzaro D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biology of reproduction* 2002; 66: 1061-1067.
- Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U, Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Reviews of Reproduction* 1999; 4: 31-37.
- Liu DY, Baker HW. Relationships between human sperm acrosin, acrosomes, morphology and fertilization in vitro. *Hum Reprod* 1990; 5: 298-303.
- Bostofte E, Serup J, Rebbe H. Relation between morphologically abnormal spermatozoa and pregnancies obtained during a twenty-year follow-up period. *Int J Androl* 1982; 5(4): 379-86.
- Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 1980; 210: 1131-1133.
- Alexandre C, Bisson JP, David G. Total asthenospermia with an ultrastructural anomaly of the flagellum in two sterile brothers (author's transl) *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 1978; 7: 31-38.
- Dozortsev D, Rybouchkin A, De Sutter P, Qian C, Dhont M. Human oocyte activation following intracytoplasmic injection: the role of the sperm cell. *Hum Reprod* 1995; 10: 403-407.
- Jack, A.H. and Hrudka, F. Patterns and dynamics of teratospermia induced in rams by parenteral treatment with ethylene dibromide. *J Androl* 1996; 16: 194-211.
- Chemes, H., Fawcett, D.W. and Dym, M. Unusual features of the nuclear envelope in human spermatogenic cells. *Anat Rec* 1979; 192: 493-523.
- Zamboni, L. Sperm structure and its relevance to infertility. An electron microscopic study. *Arch Pathol Lab Med* 1992; 116: 325-344.
- Baccetti, B., Burrini, A.G., Collodel, G., Piomboni, P. and Renieri T.A "miniacrosome" sperm defect causing infertility in two brothers. *J Androl* 1991; 12: 104-111.
- Liu, D.Y. and Baker, H.W. Disordered acrosome reaction of spermatozoa bound to the zona pellucida: a newly discovered sperm defect causing infertility with reduced sperm±zona pellucida penetration and reduced fertilization in vitro. *Hum Reprod* 1994; 9: 1694-1700.
- Kalahanis, J., Rousso, D., Kourtis, A., Mavromatidis, G., Makedos, G. and Panidis, D. Round-headed spermatozoa in semen specimens from fertile and subfertile men. *J Reprod Med* 2002; 47: 489-493.
- 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: 711-734.