

Sperm DNA Fragmantasyonu %30'un Üzerinde Olan Hastaların Microchip ve TESA Yöntemleriyle Elde Edilen Sperm ile Yapılan Mikroenjeksiyon İşlemi Sonucu Embriyo Gelişim Hızı, Kalitesi ve Gebelik Sonuçlarının Karşılaştırılması

Comparison Between Microinjection Procedure with Sperms that are Obtained by
Microchip and TESA Methods, in Embryo Development Rate, Quality and
Pregnancy Outcomes of Patient Whose Sperm DNA Fragmentation %30 or More

¹Mustafa AKBAYIR^a, ²Ahmet Hakan HALİLOĞLU^c, ³Tufan ARSLANCA^b, ⁴Recai PABUÇCU^{b,d},
⁵Emre G. PABUÇCU^b, ⁶Müge KESKİN^b

^aUfuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Klinik Embriyoloji, Ankara, TÜRKİYE
^bUfuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD, Ankara, TÜRKİYE
^cUfuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji ABD, Ankara, TÜRKİYE
^dCentrum Tüp Bebek Merkezi, Ankara, TÜRKİYE

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada; sperm DNA fragmantasyonu %30 ve üzerinde olan hastaların, sperm elde etme yöntemlerinden olan TESA ve microchip tedavisi sonrası embriyo gelişimleri ve gebelik oranları üzerine etkileri incelenmiştir. Böylece tedavilerin ne derece etkili olduğunu gözlemleyip tüp bebek merkezlerine başvuran infertile hastalara sunulacak tedavi yöntemlerini arttırmak amaçlanmıştır. **Gereç ve Yöntemler:** 2016-2017 yılları arasında Centrum Tüp Bebek Kliniğinde hastaların verileri retrospektif olarak incelenerek yapılmıştır. Araştırma grupları, TESA ve microchip teknikleri ile DNA fragmantasyonuna uğramamış sperm elde etmek için İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) işlemine tabi tutulan hastalardan oluşturulmuştur. **Bulgular:** TESA ve microchip tekniklerinin embriyo gelişimine olan etkisi karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). TESA ve microchip tekniklerinin uygulandığı iki ayrı gruba gebelik sonuçları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Ancak sayısal verilerdeki gebelik sonucuna bakıldığında, TESA %52,8'lik bir oranla microchip tekniğinin %40'lık oranına göre daha avantajlı sayılabilir. **Sonuç:** Her iki sperm elde etme yönteminde de elde edilen spermdeki DNA fragmantasyon oranının düştüğü birçok çalışmada desteklenmiştir. Buna itafen seçilecek olan spermelerin büyük bir kısmı hasarsız olup, hasarsız sperm ile ICSI yapılan ve sonucunda oluşan embriyo parametrelerinin daha iyi olacağı düşünülmektedir. Dolayısıyla gebelik oranının embriyo kalitesine bağlı olarak artacağı savunulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: İnfertilite; DNA fragmantasyonu; TESA; microchip

ABSTRACT

Objective: In this study, we examined the effect of TESA and Microchip sperm in patients who has 30% or more Sperm DNA Fragmentation to the Development Rate and Pregnancy Outcomes. It was aimed to observe how effective treatments were and improve the treatment methods to be offered to infertile patients who applied to IVF centers. **Material and Methods:** Between 2016 and 2017, the data of the patients at Centrum IVF Clinic were retrospectively analyzed. Research groups were composed of patients who underwent Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) to obtain sperm that had not undergone DNA fragmentation using TESA and microchip techniques. **Results:** There is no significant difference between the use of TESA and Microchip sperm to the Embryo Development Rate, and Pregnancy outcomes ($p>0.05$). However, when we checked the pregnancy rate outcomes in numerical data TESA can be considered to the advantageous at a rate of 52.8% compared to the rate of 40.0% of microchip technique. **Conclusion:** The both of sperm retrieval method reduces the sperm DNA fragmentation rate and this is highlighted by many researches. It is thought that most of the sperms to be selected for this purpose are will be undamaged, So the embryo parameters that are made with ICSI and resulting with undamaged sperm will be better. It is therefore argued that the pregnancy rate will increase depending on the embryo quality.

Keywords: Infertility; DNA fragmentation; TESA; microchip

Correspondence: Tufan ARSLANCA
Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum ABD, Ankara, TÜRKİYE/TURKEY
E-mail: drtufanarlanca@hotmail.com



Peer review under responsibility of Turkish Journal of Reproductive Medicine and Surgery.

Received: 16 Dec 2020 **Accepted:** 23 Jan 2021 **Available online:** 03 Feb 2021

2587-0084 / Copyright © 2020 by Reproductive Medicine, Surgical Education, Research and Practice Foundation.
This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

İnfertilite, bir çiftin herhangi bir kontrasepsiyon yöntemi kullanmaksızın bir yıl boyunca düzenli ilişkiye girdiği halde gebelik elde edememesi durumudur. İnfertiliteye yol açan nedenlerden bir kısmı genetik temele dayanırken, bir kısmı ise sonradan oluşmaktadır.¹

Erkek ilişkili faktörler, infertilitenin yaygın sebebi olmaya devam etmektedir. İnfertilite vakalarının yaklaşık %20'sinden tek başına sorumludur, erkek ve kadın faktörünün bir arada olduğu vakaların %30-40'ında ek bir artışa neden olmaktadır.^{2,3} Buna bağlı olarak fertil ve infertil erkeği kesin olarak birbirinden ayıracak, gebelik sonuçlarının ilerisini kestirecek yeni belirteçlere ihtiyaç artmıştır ve sperm Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) bütünlüğü üzerine dikkatler artmıştır. Son on yılda yapılan araştırmalarda, erkek infertilitesinde sperm DNA bütünlüğü üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmalarda, sperm DNA'sının bütünlüğünün, erkek infertilitesinin belirlenmesinde iyi bir öngörü sağlayabileceği gözlemlenmiştir.⁴

Spermiyogenez sırasında ve sonrasında apoptoz, hasarlı sperm hücrelerinin yok edilmesi için gereken normal bir mekanizmadır. Germ hücrelere hafif ila orta derecede genotoksik ve sitotoksik etkiler apoptozu etkiler. Somatik hücrelerin aksine, ejakülattaki spermilerin apoptoza girme kabiliyeti tam olarak bilinmemektedir. Literatürdeki çalışmalarda apoptozun, spermatogenez düzenleyen en önemli mekanizmalardan biri olduğunu ve insanlar da dahil olmak üzere birçok memeli türdeki germ hücrelerinin ölümünün bu mekanizmaya dayanarak gerçekleştiği düşünülmektedir.^{5,6} Apoptoz, spermatogenez sırasında çeşitli patolojilerin oluşması veya spermatogenez kontrol sisteminin başlattığı bir sürecin sonucu olarak düşünülebilir.⁷ Yapılan bir diğer çalışmada ise; DNA onarım seviyelerinin azalması ve oluşan DNA hasarı sonucunda hatalı genetik bilgilerin embriyoya aktarılmasını engellemek için son adım olarak apoptoz düşünülmektedir.⁸

Sperm örneklerinde DNA fragmentasyon oranı; infertil bireylerdeki oranın, fertile bireylerdeki orana göre daha yüksek seviyede olduğu bilinmektedir.⁹ DNA fragmentasyonu tespit yöntemleri ile her yöntemde farklı değerler elde edilmiştir. Fakat sonuçlar genellenecek olursa, fertil bireylerin sperm DNA

hasar oranı karşılaştırıldığında, infertil bireylerin sperm DNA hasar oranının anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür.^{9,10}

Bu çalışmada Sperm DNA Fragmentasyonu %30 ve üzerinde olan hastaların Testiküler Sperm Aspirasyonu (TESA) ve microchip tedavisi sonrası embriyo gelişimleri ve gebelik oranları üzerine etkilerini saptayarak, tedavilerin ne derece etkili olduğunu görüp tüp bebek merkezlerine başvuran infertil hastalara sunulacak tedavi yöntemlerini arttırmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma 2016-2017 yılları arasında Centrum Tüp Bebek Kliniğinde hastaların verileri retrospektif olarak incelenerek yapılmıştır. Araştırma grupları, TESA ve microchip teknikleri ile DNA fragmentasyonuna uğramamış sperm elde edilme amacı güdülen İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) işlemine tabi tutulan hastalardan oluşturulmuştur. Araştırmamız bu iki tekniği karşılaştırmaya yönelik olduğu için TESA ve microchip teknikleri embriyo gelişimi ve gebelik sonuçlarına göre karşılaştırılmıştır. Çalışmanın Helsinki Deklarasyonu Prensipleri'ne uygun olarak yapılmıştır.

DAHİL EDİLME KRİTERLERİ

Çalışmaya 20-40 yaş arasında, DNA Fragmentasyon İndeksi (DFI) değerinin %30 ve üzerinde olan erkekler dahil edilmiştir. Varikosel, inmemiş testis, testis tümörü gibi ek hastalıkları olanlar çalışma dışında tutulmuştur. Bunu dışında Toluidin Mavis testi gözleme fazlasıyla dayalı bir boyama olması sayımın rahat olması ve doğruluk oranının artması sebebiyle sperm sayıları 5 milyon/ml'den yüksek olan ve en az 200 sperm sayılan hastalar araştırmaya dahil edilmiştir.

Kadınlarda ise dahil edilme kriterleri olarak Anti Müllerien Hormon (AMH) seviyesi 1-7 aralığında olması, myom ya da herhangi bir tubal faktör bozukluğunun olmaması yaş aralığının 20-44 aralığında olması olarak belirlenmiştir.

YÖNTEM

Sperm DNA fragmentasyonu %30'un üzerinde olan hastaların bir kısmının tedavisinde TESA, bir kısmının tedavisinde de microchip kullanılmıştır. Tedavi

günü örnek vermeye gelen hastaların tümüne DNA fragmentasyon tayini yapılmak üzere öncelikle makler kamerasında sperm sayılarına bakılmıştır. Sperm sayısı 5 milyon/ml' den yüksek olan hastaların DNA fragmentasyonuna bakılmıştır.

Bu çalışmada hastaların DNA fragmentasyonu tayini için toluidin mavisi boyama yöntemi kullanılmıştır. Bu teknikle hazırlanan preparatlar kontrast ışık mikroskopunda incelenerek DNA fragmentasyon oranı belirlenmiştir. Bu hastalar arasında %30 ve üzeri olanların DNA Fragmentasyon verileri çalışmada karşılaştırılmak üzere toplanarak TESA uygulanan hastalar ve microchip uygulanan hastalar olmak üzere iki grup oluşturulmuştur. Bu hastaların tedavi sonucu embriyo gelişimleri ve gebelik takipleri karşılaştırılmıştır.

Araştırma grubuna alınan hastaların embriyo gelişimi için istatistiksel bir sonuç almak için embriyo kaliteleri üç grupta sayısal olarak sınıflandırılmıştır. 0: kötü kalite, 1: orta kalite ve 2: kaliteli olarak nitelendirilmiştir. Bu değerlendirmede embriyo günü beklenen kaliteye göre Gardner ve Schoolcraft'ın BKS sistemi üzerinden sınıflandırma yapılmıştır. BKS 24 ve üzeri olanlar kaliteli yani "2", 16 ve 24 e kadar olanlar orta kalitede yani "1", 16'dan daha düşük değerdeki embriyolar ise kötü kalite yani "0" olarak gruplandırılmıştır. Embriyolar skorlandıktan sonra her hasta için embyoların aritmetik ortalaması alınarak kaydedilmiştir.

TOLUIDİNE BOYAMA

Likefiye olan örnekler laminar flow içerisinde lam üzerine pastör pipeti yardımı ile bir damla alınarak damlatıldı. Lamel ile 45 derecelik açı oluşturduktan sonra örnek lam üzerine yayılarak, oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruyan örnek önceden hazırlanıp +4 derecede bekletilen fiksatif içerisinde 30 dakika tutulmuştur. Fiksasyon sonrası lam 5 dakika

boyunca +4 derecede bulunan HCL içerisinde bekletildi. Ayrı ayrı hazırlanan 3 adet distile su şalesine 2'şer dakika olmak üzere toplamda 6 dakika bekletildi. Yıkama işleminin ardından lam %5'lik Toluidine Blue ile doldurulan şaleye 5 dk bırakıldı Son aşamada boyanın lam üzerinden akması için üzerinden distile su akıtılarak odasıcaklığında kurumaya bırakıldı. Preparat ışık mikroskopunda 1000x'lik büyütmede bakılarak 300 adet sperm sayılır ve ortalaması yüzde olarak belirlenir.

İSTATİKSEL ANALİZ

Bu çalışmanın istatistiksel analizi SPSS v:24.0 kullanılarak yapılmıştır. Gruplar frekans analizi ile ortaya konmuş olup, gruplar arasında nonparametrik Mann-Whitney U testi kullanıldı. Grupların sonuçlarla olan ilişkisini saptamak için ise Chi-Square testi kullanıldı. $P<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Embriyo gelişim sonuçları incelendiğinde TESA ve microchip tekniklerinin embriyo gelişimine olan etkisi karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 1).

Embriyo transferinden 12 gün sonra kanda belirlenen ≥ 15 mIU/mL β -hCG değeri ve bundan 2 gün sonra tekrarlanan β -hCG testinde en az iki katına çıkmış olan β -hCG değeri, başarılı gebelik olarak değerlendirilmiştir. TESA ve microchip tekniklerinin uygulandığı iki ayrı grubun gebelik sonuçları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p>0,05$) (Tablo 2).

TARTIŞMA

TESA epididime iğne ile invaziv girişim yapılarak sperm elde etme yöntemidir. TESA; IVF ve ICSI için

TABLO 1: TESA ve microchip gruplarında embriyo gelişimi karşılaştırılması.

Uygulanan İşlem	N	Embriyo Gelişimi					p
		Mean	Std. Deviation	Median	Minimum	Maximum	
TESA	40	1.59	0.34	1.6	0.75	2	0.379
Microchip	40	1.64	0.35	1.68	0.33	2	
Toplam	80	1.61	0.34	1.64	0.33	2	

Mann-Whitney U test.

TABLO 2: TESA ve microchip gruplarında gebelik sonucu karşılaştırılması.

Uygulanan İşlem	Gebelik Sonucu		Total	p
	Pozitif	Negatif		
TESA	19 %52,8	17 %47,2	36 %100	0,26
Microchip	16 %40	24 %60	40 %100	
Toplam	35 %46,1	41 %53,9	76 %100	

Chi-Square Tests

diğer yöntemlere göre sperm elde etme başarısı yönünden ortalamayı yakalamıştır. Bazı merkezlerde ilk seçenek olarak kullanılmaktadır çünkü doku hasarının ve doku kaybı riskinin az olması nedeniyle tercih edilen minimal invaziv girişimdir.^{11,12}

Asgar ve ark. swim-up yöntemi ile microchip yöntemini DNA fragmentasyon oranı ve ROS açısından değerlendirmişlerdir. DNA fragmentasyon incelemesi açısından kullanılan chip metaryelinin kanal boyu uzunluğu 8 µm olarak belirlendiğinde fragmente DNA'ya sahip sperm hücrelerinin elenerek geride kaldığını gözlemişlerdir. Swim-up yöntemi kullanıldığında ROS ve DNA fragmentasyon oranları anlamlı ölçüde daha yüksek saptanmıştır. Bu çalışmaya göre microchip yöntemi, santrifüzsüz motil ve morfolojik olarak normal sperm elde edilmesi açısından swim-up yöntemine alternatif bir teknik olarak sunulmuştur.¹³ Wang S. ve ark. ise swim-up ve microchip yöntemleriyle ROS ve DNA fragmentasyon oranlarını karşılaştırmak üzere yaptıkları çalışmada, microchip yönteminin swim-up yöntemine kıyasla santrifüj kullanmadan motil ve morfolojik olarak normal sperm seçilmesi ve fragmente DNA ya sahip hücrelerin ayıklanması açısından daha verimli bulmuşlardır.¹⁴ Biz de yapmış olduğumuz çalışmada, DNA fragmentasyon oranı %30 ve üzeri olan hasta gruplarından microchip yöntemi uygulananları tespit ettik ve bu hastaların embriyo gelişim ve gebelik sonuçlarını araştırdık. Microchip uygulanan 40 infertil erkekte yapmış olduğumuz incelemelerde embriyo gelişimini 0, 1 ve 2 olarak gruplandırdığımız embriyoların gelişim ortalaması $1,6427 \pm 0,35610$ olarak saptanmıştır. TESA uygulanan hastalarla karşılaştırdığımızda ise istatistiksel

olarak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır ($p=0,379$). Yani embriyo gelişim hızı ve kalitesini bu skala çerçevesinde düşündüğümüzde ortalaması 1,5 ve üzeri olan değerleri kaliteli olarak sınıflandırabiliriz. Bu nedenle ortalama $1,6427 > 1,5$ olduğundan microchip uygulanan hastaların embriyoları kalitelidir diyebiliriz. Aynı şekilde gebelik oranı ise %40 pozitif olduğu görülmüştür. TESA uygulanan hastaların %52,8'lik oranına karşılık istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki kurulamamıştır ($p=0,264$).

Esteves SC. ve ark. DNA fragmentasyon oranı %30 olan 172 hastayı çalışmaya dahil etti. 81 hastanın ICSI' sinde testis spermi kullanıldı. 91 hastanın ise ejakülat spermi kullanıldı. Klinik gebelik oranları; testis spermelerinde %51,9, ejakülat spermelerinde %40,2 olarak belirlemişlerdir. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamsız kabul edilmiştir.¹⁵ Al-Malki ve ark. asthenozoospermi olan hastalarda TESA yöntemi ile elde ettikleri sperm ile ICSI sonucu gebelik oranlarını değerlendirmişlerdir. Verilere göre şiddetli asthenozoospermi olan çiftlerde gebelik oranları, TESA/ICSI ve ejakülat-ICSI grupları arasında anlamlı bir fark olmadığını öne sürmüşlerdir.¹⁶ Bizim çalışmamızda da DNA fragmentasyonu %30 ve üzeri olan hasta gruplarından TESA yöntemi uygulananları tespit ettik ve bu grubun gebelik sonuçlarını araştırdık. TESA uygulanan 40 infertil erkekte yapmış olduğumuz çalışmada embriyo gelişim ortalaması $1,5924 \pm 0,34618$ olarak saptanmıştır. Microchip uygulanan hastalarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0,379$). Bu sonuca göre kalite yönünden ortalama $1,5924 > 1,5$ olduğundan TESA uygulanan hastaların embriyoları kalitelidir diyebiliriz. TESA grubunun gebelik oranı ise %52,8 pozitif olduğu tespit edilmiştir. Microchip uygulanan hasta grubumuzla gebelik sonuçları karşılaştırıldığında %40'lık orana karşılık aralarında anlamlı bir ilişki kurulamamıştır ($p=0,264$).

Sonuç olarak 40 microchip ve 40 TESA uygulanan hastalar birbirleri ile karşılaştırılarak embriyo gelişimleri ve gebelik sonuçlarının incelendiği bu çalışmada, TESA ve microchip uygulamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Araştırmanın daha geniş hasta gruplarıyla yapılacak olan yeni çalışmaların yararlı olabileceği düşünülmektedir.

Finansal Kaynak

Bu çalışma sırasında, yapılan araştırma konusu ile ilgili doğrudan bağlantısı bulunan herhangi bir ilaç firmasından, tıbbi alet, gereç ve malzeme sağlayan ve/veya üreten bir firma veya herhangi bir ticari firmadan, çalışmanın değerlendirme sürecinde, çalışma ile ilgili verilecek kararı olumsuz etkileyebilecek maddi ve/veya manevi herhangi bir destek alınmamıştır.

Çıkar Çatışması

Bu çalışma ile ilgili olarak yazarların ve/veya aile bireylerinin çıkar çatışması potansiyeli olabilecek bilimsel ve tıbbi komite üyeliği veya üyeleri ile ilişkisi, danışmanlık, bilirkişilik, herhangi

bir firmada çalışma durumu, hissedarlık ve benzer durumları yoktur.

Yazar Katkıları

Fikir/Kavram: Recai Pabuçcu; **Tasarım:** Mustafa Akbayır; **Denetleme/Danışmanlık:** Ahmet Hakan Haliloğlu; **Veri Toplama ve/veya İşleme:** Mustafa Akbayır, Tufan Arslanca; **Analiz ve/veya Yorum:** Emre G. Pabuçcu; **Kaynak Taraması:** Müge Keskin; **Makalenin Yazımı:** Mustafa Akbayır, Emre G. Pabuçcu; **Eleştirel İnceleme:** Recai Pabuçcu; **Kaynaklar ve Fon Sağlama:** Ahmet Hakan Haliloğlu; **Malzemeler:** Mustafa Akbayır, Müge Keskin.

KAYNAKLAR

1. Simpson, Joe Leigh. Disorders of gonads and internal reproductive ducts. Principle and Practice of Medical Genetics. New York: Churchill Livingstone; 1990. p.1599.
2. Mau-Holzmann UA. Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. Cytogenetic and Genome Research. 2005;111(3-4):317-36. [Crossref] [PubMed]
3. Ferlin A, Garolla A, Foresta C. Chromosome abnormalities in sperm of individuals with constitutional sex chromosomal abnormalities. Cytogenetic and genome research. 2005;111: 310-6. [Crossref] [PubMed]
4. Koyuncu H. Methods for the determination of sperm DNA damage. Turk Urol Sem. 2011;2: 18-23. [Crossref]
5. Ricci G, Perticarari S, Fragonas E, Giolo E, Canova S, Pozzobon C, et al. Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. Human reproduction. 2002;17(10):2665-72. [Crossref] [PubMed]
6. Chen Z, Hauser R, Trbovich AM, Shifren JL, Dorer DJ, Godfrey-Bailey L, et al. The relationship between human semen characteristics and sperm apoptosis: a pilot study. Journal of andrology. 2006;27(1):112-20. [Crossref] [PubMed]
7. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, et al. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. Human Reproduction. 2000;15(4): 830-9. [Crossref] [PubMed]
8. Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. Fertility and sterility. 2003;80(6):1420-30. [Crossref] [PubMed]
9. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. Biology of reproduction. 1997;56(3):602-7. [Crossref] [PubMed]
10. Bianchi PG, Manicardi GC, Bizzaro D, Sakkas D, Bianchi U. A cytochemical study of mature mouse spermatozoa after C-banding treatment. European journal of histochemistry: EJH. 1993;37(2):155-9.
11. Esteves SC. Clinical management of infertile men with nonobstructive azoospermia. Asian journal of andrology. 2015;17(3):459. [Crossref] [PubMed] [PMC]
12. Tournaye H. Surgical sperm recovery for intracytoplasmic sperm injection: which method is to be preferred? Human Reproduction. 1999;14(1):71-81. [Crossref] [PubMed]
13. Asghar W, Velasco V, Kingsley JL, Shoukat MS, Shafiee H, Anchan RM, et al. Selection of functional human sperm with higher DNA integrity and fewer reactive oxygen species. Advanced healthcare materials. 2014;3(10): 1671-9. [Crossref] [PubMed] [PMC]
14. Wang S, Inci F, Demirci U. Assisted Reproductive Microchip Technologies to Improve Infertility. 2015.
15. Esteves SC, Sánchez-Martín F, Sánchez-Martín P, Schneider DT, Gosálvez J. Comparison of reproductive outcome in oligozoospermic men with high sperm DNA fragmentation undergoing intracytoplasmic sperm injection with ejaculated and testicular sperm. Fertility and sterility. 2015;104(6):1398-405. [Crossref] [PubMed]
16. Al-Malki AH, Alrabeeh K, Mondou E, Brochu-Lafontaine V, Phillips S, Zini A. Testicular sperm aspiration (TESA) for infertile couples with severe or complete asthenozoospermia. Andrology. 2017;5(2):226-31. [Crossref] [PubMed]