

# Does using testicular sperm retrieval rather than ejaculated spermatozoa improve reproductive outcomes in couples with previous ART failure and poor ovarian response? A case-controlled study

Ejakulat spermlerinden ziyade testiküler sperm kullanımı ART başarısızlığı öyküsü ve kötü overian yanıtı olan çiftlerde reproduktif sonuçları iyileştirir mi? Bir vaka-kontrol çalışması

## ÖZET

Bu çalışmanın amacı; kötü overian yanıtı olan ve daha önce ART başarısızlığı olan kadınlarda, testiküler alınan spermlerin, taze ejakulat spermleri ile kıyaslandığında, reproduktif sonuçları arttıran etkisinin değerlendirilmesidir.

Çalışma; Montreal, Quebec ve Kanada'daki üniversite merkezli bir üreme merkezinde; retrospektif bir vaka-kontrol çalışması olarak yapıldı. 18 kötü yanıtı hasta 54 kontrol ile eşleştirildi (3:1). Kötü yanıt verenler, oosit toplamada  $\leq 3$  oosit elde edilenler olarak belirlendi. Vakalar; kötü yanıtı olanlar olarak tanımlandı ve daha önce ivf başarısızlığı olan testiküler sperm kullanımı endikasyonu olanlar dahil edildi. Kontroller yaş ve siklus girişim sayısı ile eşleştirildi. Tüm hastalar sadece bir kez dahil edildi. 1 Ocak 2009'dan 31 Aralık 2015'e kadar, tüm hastalar ve kontroller testiküler sperm veya ejakulat spermi ile ICSI kullanılarak IVF siklusuna başlatıldılar. Sonuçlar canlı doğum oranı, gebelik oranı, düşük oranı, oosit sayısı ve embryo transfer (ET) gününü içermektedir. Her iki grupta canlı doğum oranları, gebelik oranları ve düşük oranları benzer bulunmuştur. Testikül sperm grubunda kontrollerden daha az 2. gün ET'ler (% 8.5'e karşı % 48.6,  $p = 0.01$ ) ve daha fazla 5. gün blastosist transferleri (% 25.0'e karşı % 5.4,  $p = 0.05$ ) vardı. Böylece testiküler sperm grubunda daha iyi embriyo kalitesine dair genel bir düşünce oluştu. Bununla birlikte, genel olarak, testiküler sperm kullanımının az katkı sağladığı görülmektedir. Kötü overian yanıtı olan kadınlar tipik olarak canlı doğum oranları açısından kötü prognoz gösterirler ve bu da bu çalışmada desteklenmektedir. Testiküler sperm grubunda daha iyi embriyo kalitesi düşüncesi daha geniş çok merkezli bir çalışmada tekrar değerlendirilmesi gerekmektedir.

## GİRİŞ

Geleneksel olarak, testiküler spermatozoa etiyolojide obstrüktif veya obstrüktif olmayan azospermi vakalarında kullanılmıştır (Stahl ve ark., 2011). Yakın zamanda, testiküler sperm kullanımının zayıf sperm parametrelerinde veya önceki ART başarısızlıklarında iyileşmiş gebelik oranları ile sonuçlanacağına dair bazı kanıtlar bulunmuştur (Ben-Ami ve ark., 2013; Esteves ve ark., 2015).

Ancak , testiküler sperm alımı erkek hastada risk taşıyor; kanama, enfeksiyon ve geri dönüşümsüz testiküler doku hasarı gibi potansiyel komplikasyonları bulunan invaziv bir cerrahi prosedürdür (Gnoth ve ark., 2014). Bu nedenle, potansiyel yararların risklerden daha fazla olmasını sağlamak için hastalara bu prosedürü önerirken dikkatli olmamız gerekir. Tipik olarak, overian yanıtı kötü olan kadınlar, testiküler spermlere bakan çalışmalardan dışlandı ve literatürde tekrarlayan IVF

başarısızlıkları olan ve kadın overian yanıtı azalmış çiftlerde testikular sperm kullanımını inceleyen rapor bulunmamıştır. Bir çalışmada, yumurtalık rezervi azalmış kadınlarda anormal sperm DNA parçalanmasının üreme sonuçları üzerinde olumsuz bir etkisi olduğu bulundu; ancak çalışmada sadece ejakulat spermatozasi incelenmiştir (Jin ve ark., 2015).

Ejakulat spermatozasi ile tekrarlayan IVF başarısızlıkları nedeniyle testikuler spermatazoa kullanılan çiftlerin kötü overian yanıtı olan kadın partnerleri önceki IVF başarısızlıklarında hem dişi hem de erkek faktörlerin rol oynayabileceği için, ilginç bir mücadele oluşturmaktadır. Bu nedenle, cerrahi olarak alınmış spermatozoa kullanımının kararı, kadın partnerin kötü overian yanıtı göz önünde tutularak, testiküler sperm alımı ile ilişkili riskler ve taze ejakulat spermatozasi kullanımına ek bir yarar sağlayacağı yönündeki belirsizlikler ile birlikte değerlendirilmelidir.

Bu çalışmanın amacı, overian yanıtı azalmış ve ART başarısızlığı öyküsü olan hastalarda testiküler spermatozoa kullanımının ejakulat spermatozasi ile kıyaslayıp üreme sonuçlarını arttırmayı arttırmadığını belirlemektir.

#### MATERYAL-METOD

Bu vaka kontrol çalışması için bir üniversiteye tabanlı üreme merkezindeki elektronik veritabanı veri toplama amacıyla kullanılmıştır.

Fertilizasyon için testikuler spermleri kullanan tüm ART siklusları 1 Ocak 2009 ile 31 Aralık 2015 arasında tanımlandı. Sekiz yüz iki döngü bulundu ve çizelgeler gözden geçirildi. Bologna kriterlerine (Ferraretti ve ark., 2011) göre kötü overian yanıtı hastalar, oosit toplama işleminde  $\leq 3$  oosit bulunan hastalar olarak tanımlandı. Yüz on beş hasta bu limite takıldı. Bu olgular cerrahi sperm alımı endikasyonuna göre analiz edildi: obstrüktif azospermi, obstrüktif olmayan azospermi ve tekrarlayan ART başarısızlıkları. Ejakulat spermatozasi ile önceki IVF başarısızlık(lar) için testiküler spermatozoa kullanılan 18 siklus geçiren 18 hasta çalışmaya alındı. Ejakulat spermatozasi ile ICSI uygulanan kontrol grubu yaş(12 ay içinde) ve siklus girişim sayısı ile vaka grubu ile eşleştirildi; 3:1 oran tespit edildi. 7. siklusunda 37 yaşında bir hasta ve 3. siklusunda 29 yaşında bir hasta mevcuttu ve ikisinde yalnız yaş veya yalnız siklus sayısı ile eşleştirebilen kontrolü mevcuttu. Bu iki hasta yaşları gözetilerek kontroller ile eşleştirildi, kontroller sırasıyla 6. ve 2. siklustaydılar. Tüm kontroller, aynı Bologna kriterleri (Ferraretti ve ark., 2011) kullanılan kötü overian yanıtı hastalardı.

Tüm hastalar sadece bir kez dahil edildi ve testiküler spermatozoa kullanılan vakalarda, değerlendirilen siklus, hastanın testiküler spermatozoa kullanılan ilk siklusuydu.

18 erkek hastanın 16'sına, lokal anestezi altında 10 mL'lik şırıngaya bağlanan 14 ila 18 ölçülerinde anjiyokateter ile testiküler dokudan perkütan aspirasyonu ile testiküler sperm aspirasyonu (TESA) uygulandı. Geriye kalan iki hastaya daha önce literatürde tanımlanan mikrodiseksiyon testiküler sperm ekstraksiyonu (mTESE) uygulandı (Schlegel, 1999). Spermatozoanın bulunmadığı tek bir hasta (mTESE uygulanmış) vardı. Çoğu, antagonist protokolu, mikrodoz flare protokolu ve uzun agonist protokolu olmak üzere çeşitli overian stimülasyon protokolleri kullanıldı. Toplam dört hastada midluteal pach protokolu veya doğal IVF siklus kontrol grubunda uygulandı.

Sonuçlar; canlı doğum oranı (LBR), alınan oosit sayısı, MII oosit sayısı, elde edilen 2PN embriyo sayısı, fertilizasyon oranı (2PN embriyo sayısı / MII oosit sayısı), embriyo transferi(ET) yapılmayan hasta sayısı, 2.gün ET, 3.gün ET, 5.gün ET yapılan hasta sayısı, gebelik oranı (oosit toplama başına pozitif kantitatif bHCG olarak tanımlandı) ve düşük oranı idi.

Embriyo transferinin zamanlanması için kriterler, hasta yaşı ve siklus sayısına (yani birinci siklus ve sonraki sikluslar) dayandırıldı. İlk sikluslarını geçiren 36 yaş altı hastalarda, iki veya daha fazla kaliteli,

8-hücreli 3. gün embriyosu varsa, embriyo blastosist evresine kültürlendi. Yoksa, 3.gün embriyo transferi yapıldı. Birinci siklusta bir blastosist elde edildiyse, ≤36 yaşındaki hastalar için sonraki sikluslarda embriyo blastosist evresine kültürlendi. Aksi takdirde, herhangi bir blastosist elde edilemediyse, ilk siklusta blastosisti bulunmayan hastalarda 3. günembriyo transferi düşünüldü. Ancak 3. günde embriyoların kalitesi iyi görünüyorsa, görüşme sonrasında blastosist evresine kültürleme uygulanması düşünüldü. 36 yaşın üzerindeki ilk siklusutaki hastalarda, dört veya daha fazla iyi kalitede, 8 hücreli 3. gün embriyosu varsa embriyo blastosist evresine kültürlendi. Yoksa , 3.gün embriyo transferi yapıldı. 36 yaş üstü sonraki sikluslarda olan hastalar; eğer birinci siklusta iki veya daha fazla blastosist elde edilmişse embriyo blastosiste kültürlendi (daha önce elde edilen blastosistlerin kalitesi çok zayıf olmadığı sürece).

İstatistiksel analiz, STATSDIRECT istatistiksel yazılımı (sürüm 3.0, StatsDirect Ltd., Cheshire, İngiltere) kullanılarak yapıldı. Bağımsız gruplar t-testi ve Mann-Whitney U-testi kullanılarak iki grubun temel özellikleri karşılaştırıldı. Sonuçlar bağımsız gruplar t-testi ve ki-kare testi kullanılarak analiz edildi.

Bu çalışmanın retrospektif grafik incelemesi ve analizi için kurumsal etik onayı alındı (IRB # 15- 388-MUHC). Bu çalışma, insan deneklerini içeren Helsinki Tıbbi Araştırmalar Bildirgesi'ne uygun olarak yürütülmüştür.

## SONUÇLAR

Kadın ve erkek yaşı, siklus sayısı ve ejakülat sperm parametrelerini içeren temel özellikler iki grup arasında benzerdi (tablo1). Testiküler sperm grubunda hastaların çoğunluğuna antagonist protokolü [% 33.3 (n = 6)] ve mikrodoz flare protokolü [% 33.3 (n = 6)] uygulandı, ardından overian stimülasyon için uzun agonist protokolu, doğal siklus IVF ve midluteal patch protokolu [sırasıyla % 16.7 (n = 3); % 11.1 (n = 2); % 5.6 (n = 1)] uygulandı. Kontrol grubunda hastaların çoğunluğuna mikrodoz flare protokolü [% 46.3 (n = 25)] uygulandı, bunu antagonist protokolu, uzun agonist ve midluteal pach protokolü izledi [sırasıyla % 40.7 (n = 22); % 11.1 (n = 6); % 1.9 (n = 1)]. Kontrol grubundaki hiçbir hastada overian stimülasyon için doğal siklus IVF protokolü uygulanmadı. Cerrahi sperm alınmasında TESA % 88.9, mTESE % 11.1 oranında uygulandı. Reprodüktif sonuçlar Tablo 2'de gösterilmektedir.

Bu sonuçlar, testikül sperm grubunda, kontrollere kıyasla, daha az 2. gün ET'leri ve daha fazla blastosist transferini göstermektedir, bu da testiküler sperm grubunda daha iyi embriyo kalitesi olduğunu düşündürmüştür . Bununla birlikte, her iki grup arasındaki diğer reprodüktif sonuçları benzerdi.

## TARTIŞMA

Bildiğimiz kadarıyla bu çalışma, azalmış overian yanıtı olduğu bilinen, tekrarlayan IVF başarısızlığı bulunan çiftlerde testiküler spermatozoa kullanımını inceleyen ilk çalışmadır.

Özellikle subnormal sperm kalitesi (Ben-Ami ve ark, 2013; Esteves ve ark, 2015)ve/veya artmış sperm DNA fragmantasyonu (Esteves ve ark, 2015) durumlarında ICSI ile başarısızlık öyküsü olan çiftlerde ejakülat spermere karşı testiküler spermlerin kullanılmasının son literatürde desteklenmesine giderek artan bir ilgi duyulmaktadır. Testisten alınan spermlerin, daha az oksidatif hasara sahip olduğu, böylece fresh ejakülatın kullanımına kıyasla ICSI ile daha iyi sonuçlara yol açabilecek daha iyi sperm kromatin yapısının bütünlüğünün sağlanması önerilmiştir (Abhyankar ve ark., 2016). Tekrarlanan IVF başarısızlıkları için testiküler spermlerin kullanılmasını öneren çalışmalar literatürde sınırlıdır ve çelişkili sonuçlar vermektedir ; ama yinede çoğunluk testiküler sperm kullanımını fresh ejakülatta tercih etmektedir(Ben-Ami ve ark., 2013; Negri ve ark., 2013; Alrabeeah ve ark, 2014).

Tekrarlayan IVF başarısızlığı durumunda testiküler sperm kullanımı ve kötü overian yanıtı kadın partner henüz birlikte incelenmemiştir.

Testiküler sperm ekstraksiyonunun potansiyel faydasını artifisyel olarak arttırmak istemediğimiz için, bilerek testiküler sperm grubunun sonuçlarını önceki başarısız sikluslarının sonuçlarıyla karşılaştırmamayı seçtik. Bunun yerine, testiküler sperm alımının reproduktif sonuçlar üzerindeki etkisinin daha iyi bir şekilde karşılaştırılabilmesi için, aynı çalışma döneminde aynı merkezden yaş ve siklus sayısının eşleştirildiği kontrolleri kullanmayı seçtik.

Bu çalışmada, testiküler sperm grubu ile olgu eşleştirmeli kontroller arasında sonuçlar benzerdir, ancak kontrol vakalarının sayısı, bunu kesin olarak sonuçlandırmak için çok azdır. Testiküler sperm veya ejakulat sperm kullanıldığında kötü prognozlu popülasyonda hem gebelik oranları hem de canlı doğum oranları düşüktür. Bununla birlikte, testiküler sperm grubunda daha iyi embriyo kalitesi (daha fazla 5.gün ET'i ve daha az 2.gün ET'i tespit edildiği için) düşüncesi vardır. LBR testiküler sperm grubunda (% 16.7) , ejakulat sperm grubuna (% 11.1) kıyasla daha yüksek olmasına rağmen, az sayıdaki olgu nedeniyle büyük oranda istatistiksel olarak anlamlı değildir. Kötü overian yanıtı olanlarda toplam gebelik oranının % 11 ve odds oranı 1.5 olarak varsayıldığında; örneklem büyüklüğü hesaplamaları, kötü overian yanıtı ile ilişkili tekrarlayan IVF başarısızlıkları öyküsünde testiküler spermatozoa kullanılan 644 olgu ve 1932 kontrolün (3: 1 oranı için) % 5 ve % 80'lik test gücü ile istatistiksel olarak anlamlı olması için incelenmesi gerektiğini göstermektedir. Bu sayının tek bir merkezde başarılması mümkün değildir.

Çalışmanın en zayıf yönü, küçük örneklem büyüklüğüdür. Buna ek olarak, olgular yaş ve siklus girişim sayıları ile kontrollerle eşleştirilmesine rağmen, analizde yer almayan altta yatan female faktör ve parite gibi başka karıştırıcı değişkenler mevcut olabilir. Buna ek olarak, olgular sadece kadın yaşına göre eşleştirildi ve olgular ve kontroller arasında erkek yaşta istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmamasına rağmen, gruplar arasında eşleştirme özellikle erkek yaş için yapılmadı. Bu popülasyondaki genel düşük LBR ve gebelik oranları nedeniyle, testiküler ve ejakulat spermatozoa arasında anlamlı bir fark olup olmadığını değerlendirmek için daha büyük sayılara ihtiyaç vardır. Genellikle, infertilite tedavisi gören hastaların yalnızca küçük bir alt grubunu temsil etmesi ve nispeten kötü prognozu göz önüne alındığında, birden fazla IVF siklusundan geçme olasılığı düşük olması nedeniyle, bu ölçütlere uyan çok sayıda hastayı almak zordur. Belirtildiği gibi, üreme sonuçları üzerine istatistiksel ve klinik olarak anlamlı bir etki göstermek için daha büyük bir örneklem büyüklüğü gereklidir.

Embriyo kalitesi daha iyi olmasına rağmen, LBR halen çok düşüktür. Bu; kötü overian yanıtı, male faktör infertilitesi ve önceki ART başarısızlıkları gibi zorlu klinik durumlarda hastalara danışmanlık yaparken önemlidir. Bu hastalara genel olarak daha düşük olan LBR'nın gerçekçi olasılıklarının anlatılması onların prognozunu tam olarak anlamaları için çok önemlidir. Çalışmamızda testiküler sperm alımından herhangi bir komplikasyon olmasa da (tartışılan gibi) cerrahi sperm alımı ile ilişkili potansiyel önemli riskler vardır ve eve sağlıklı bebek götürmenin makul beklentileri çiftle birlikte ayrıntılı olarak konuşulmalıdır. Testiküler sperm kullanımı ile gelişen embriyo kalitesi ile muhtemel ılımlı sonuçlarda bile, genel gebelik oranları düşüktür ve bu muhtemel etkiyi doğrulamak veya çürütmek için daha fazla çalışma gerekmektedir.

## ÖNERİLER

Kötü overian yanıtı olan hastalar klinisyenler için sıkıntı teşkil eder; çünkü otolog oositler kullanıldığında herhangi bir müdahalenin (testiküler sperm kullanımı dahil) gebelik ve canlı doğum oranlarını anlamlı olarak iyileştirdiğine dair çok az kanıt bulunmaktadır. Bu çalışmanın sonuçları, çiftlere prognoz konusunda danışmanlık alırken yardımcı olabilir ve cerrahi sperm alımının potansiyel

riskleri ile ve aynı zamanda kötü overian rezervi ile karşı karşıya kaldıklarında gerçekçi beklentiler de bulunmaları için yardımcı olabilir. Fertilizasyon için testiküler spermlerin kullanıldığı kötü overian yanıtı kadın hasta popülasyonunda daha fazla araştırma gerekmektedir.

Bu; kötü overian yanıt ile tekrarlayan ART başarısızlığı olan çiftlerde testikuler spermlerin kullanımını değerlendiren ilk çalışmadır. Bu popülasyondaki canlı doğum oranı düşüktür ve muhtemelen çok faktörlüdür ve özellikle oosit kalitesi düşük olduğu için provake edilmektedir. Testiküler sperm kullanımı, canlı doğum oranını artırabilir, ancak, bu soruya kesin olarak cevap vermek için çok daha büyük, prospektif randomize bir çalışmaya ( $n > 1000$ ) ihtiyaç vardır; çünkü bu popülasyondaki canlı doğum oranındaki küçük artışlar bile anlamlıdır. Testikuler spermatozoa kullanılan 800'den fazla IVF siklusunun gözden geçirildiği kendi kurumumuzda bile, bunların içinden sadece 18 çift IVF başarısızlığı öyküsü ve kötü overian yanıtı sahip olma kriterlerine uymaktadır. Amacımız, bu çalışmanın bu zorlu klinik soruyu daha iyi cevaplamak için gerekli olabilecek potansiyel çok merkezli bir çalışmanın başlangıç noktası olmasıdır.

## REFERENCES

- Abhyankar N, Kathrins M & Niederberger C. (2016) Use of testicular versus ejaculated sperm for intracytoplasmic sperm injection among men with cryptozoospermia: a meta-analysis. *Fertil Steril* 105, 1469–1475. e1461.
- Alrabeeh K, Yafi F, Flageole C, Phillips S, Wachter A, Bissonnette F, Kadoch IJ & Zini A. (2014) Testicular sperm aspiration for nonazoospermic men: sperm retrieval and intracytoplasmic sperm injection outcomes. *Urology* 84, 1342–1346.
- Ben-Ami I, Raziel A, Strassburger D, Komarovsky D, Ron-El R & Friedler S. (2013) Intracytoplasmic sperm injection outcome of ejaculated versus extracted testicular spermatozoa in cryptozoospermic men. *Fertil Steril* 99, 1867–1871.
- Esteves SC, Sanchez-Martin F, Sanchez-Martin P, Schneider DT & Gosalvez J. (2015) Comparison of reproductive outcome in oligozoospermic men with high sperm DNA fragmentation undergoing intracytoplasmic sperm injection with ejaculated and testicular sperm. *Fertil Steril* 104, 1398–1405.
- Ferraretti AP, La MA, Fauser BC, Tarlatzis B, Nargund G & Gianaroli L. (2011) ESHRE working group on Poor Ovarian Response Definition. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod* 26, 1616–1624.
- Gnoth C, Markhinin V, Maxrath B, Skonieczny T, Friol K, Roos J, Rahimi G & Godehardt E. (2014) Impact of sperm cell source on the results of intracytoplasmic sperm injection. *Arch Gynecol Obstet* 291, 663–669.
- Jin J, Pan C, Fei Q, Ni W, Yang X, Zhang L & Huang X. (2015) Effect of sperm DNA fragmentation on the clinical outcomes for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in women with different ovarian reserves. *Fertil Steril* 103, 910–916.
- Negri L, Patrizio P, Albani E, Morengi E, Benaglia R, Desgro M & Levi

Setti PE. (2013) ICSI outcome is significantly better with testicular spermatozoa in patients with necrozoospermia: a retrospective study. *Gynecol Endocrinol* 30, 48–52.

Schlegel PN. (1999) Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. *Hum Reprod* 14, 131–135.

Stahl PJ, Stember DS & Goldstein M. (2011) Contemporary management of male infertility. *Annu Rev Med* 63, 525–540.

**Table 1** Baseline characteristics (mean  $\pm$  standard deviation is shown when data are normally distributed, and median  $\pm$  IQR is shown when data are not normally distributed)

	Testicular sperm group (n = 18)	Control group (n = 54)	p-value
Mean female age	38.0 ( $\pm$ 3.79)	38.1 ( $\pm$ 3.67)	0.95
Mean male age	42.9 ( $\pm$ 5.59)	40.6 ( $\pm$ 5.83)	0.14
Mean IVF attempt number	3.8 ( $\pm$ 1.42)	3.8 ( $\pm$ 1.36)	0.84
Median basal semen volume	2.5 ( $\pm$ 1.5)	2.1 ( $\pm$ 2)	0.89
Mean sperm concentration	29.6 ( $\pm$ 47.60)	48.9 ( $\pm$ 58.11)	0.21
Median total sperm motility	25.5% ( $\pm$ 0.41)	47% ( $\pm$ 0.56)	0.30
Median normal morphology by Kruger strict criteria	3% ( $\pm$ 1.3)	4% ( $\pm$ 0.12)	1.00

**Table 2** Reproductive outcomes (mean  $\pm$  standard deviation is shown when data are normally distributed, and percentages are shown when two independent proportions are examined)

	Testicular sperm group (n = 18)	Control group (n = 54)	p-value
Mean oocytes retrieved	2.2 ( $\pm$ 0.86)	2.0 ( $\pm$ 0.75)	0.54
Mean MII	1.8 ( $\pm$ 0.79)	1.6 ( $\pm$ 0.74)	0.21
Mean 2PN	1.2 ( $\pm$ 0.99)	1.0 (0.80)	0.58
Fertilization rate	54.7%	50.9%	0.71
No ET	33.3%	31.5%	0.88
Day 2 ET	8.3%	48.6%	0.01*
Day 3 ET	66.7%	45.9%	0.21
Day 5 ET	25.0%	5.4%	0.05*
Pregnancy rate	22.2%	16.7%	0.60
Miscarriage rate	25.0%	33.3%	0.76
LBR	16.7%	11.1%	0.54

\*Statistical significance.