

INTRACITOPLAZMATSKO INJICIRANJE SPERMIJA: OSVRT NA TEHNIKU I NJENU USPJEŠNOST U LIJEČENJU NEPLODNOSTI, TE PRAĆENJE RAZVOJA DJECE ZAČETE OVOM METODOM

INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION: REVIEW OF TECHNIQUE AND ITS SUCCESSFUL IN TREATMENT OF INFERTILITY WITH FOLLOW UP CHILDREN CONCEIVED WITH THIS METHOD

Sanja Vujisić Živković¹

SAŽETAK

Intracitoplazmatsko injiciranje spermija (ICSI) predmet je rasprava s obzirom na indikacije za postupak, način provođenja postupka, te utjecaj na potomstvo. Namjera ovog članka je iznijeti novine u tehnici provođenja postupka ICSI, literaturne podatke o uspješnosti postupka, te podatke o praćenju razvoja djece začete u postupku IVF/ICSI.

Ključne riječi: ICSI, probir spermija, diobeno vreteno, ishod postupka

ABSTRACT

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) has been the subject of ongoing debate regarding its indication, techniques and impact on offspring. The intention of this article is to review newer progress in the field of performing ICSI technique, presentation of literature outcome data as well as data of follow up studies children conceived after IVF/ICSI procedure.

Key words: ICSI, sperm selection, meiotic spindle, outcome, follow up

¹ Klinika za ginekologiju i porodništvo, Opća Bolnica "Sveti Duh", Zagreb

Primljeno: 29. 6. 2007.

Prihvaćeno: 27. 9. 2007.

Adresa za dopisivanje: Dr. sc. Sanja Vujisić Živković, Laboratorij za humanu reprodukciju, Klinika za ginekologiju i porodništvo, Opća Bolnica "Sveti Duh", Sveti Duh 64, 10000 Zagreb. E-mail: sanja_vujisic@hotmail.com

UVOD

Više od dvadeset godina pratimo ubrzani razvoj tehnika medicinski pomognute oplodnje. Izvantjelesna oplodnja (engl. *in vitro* fertilization – IVF) je metoda liječenja neplodnosti uzrokovane tubarnim čimbenikom, endometriozom, u blažih oblika neplodnosti uzrokovanih muškim čimbenikom, te kod neplodnosti nepoznatog uzroka. Provodi se tako da se spolne stanice stavljaju u izravni kontakt u *in vitro* uvjetima¹.

Sredinom 80-ih godina 20. stoljeća počinju se razvijati eksperimentalni modeli novih metoda mikromanipulacije na svim stadijima gameta i preimplantacijskih zametaka, kako u dijagnostičke, tako i u terapeutske svrhe²⁻⁴, što tehnički omogućava mikromanipulator – uređaj koji manualne pokrete prevodi u fine pomake radnih mikropipeta. Zona pelucida je membrana glikoproteinske strukture koja okružuje jajnu stanicu i preimplantacijski zametak. Odgovorna je za indukciju akrosomske reakcije, vezanje vrsno-specifičnih spermija, blokiranje polispermije, mehanički štiti oocitu i priječi prodor biokemijskih toksikanata. S obzirom na to da je zona pelucida barijera penetraciji spermija, razvili su se postupci koji omogućuju što bliži kontakt gameta: djelomično razaranje zone pelucide (engl. partial zona dissection – PZD)^{5,6} i inseminacija spermija u perivitelinu prostor (engl. subzonal insemination – SUZI)⁷⁻⁹. Nasuprot očekivanog, navedenim tehnikama nisu postignuti zadovoljavajući rezultati. Stupanj fertilizacije je nizak uz visoku stopu polispermije.

Uvođenjem tehnike intracitoplazmatske mikroinjekcije spermija došlo je do značajnog pomaka u razvoju medicinski pomognute oplodnje. Kod težih oblika muške neplodnosti sa smanjenim brojem (manje od 500 000 spermija po ml ejakulata), smanjenom pokretljivošću, neodgovarajućom morfoloijom spermija, zatim kod neopstruktivne azoospermije s održanom spermatogenezom, opstruktivne azoospermije, te retrogradne ejakulacije, primjenjuje se metoda izravnog unošenja spermija/spermatida u citoplazmu jajne stanice (engl. intracytoplasmic sperm injection – ICSI)¹⁰⁻¹³. Nadalje, primjenjuje se i u slučaju kada je fertilizacija reducirana ili izostaje nakon inseminacije oocita u *in vitro* uvjetima, zatim nakon kriopohrane spermija, nakon kriopohrane oocita, te nakon preimplantacijske genetske dijagnostike oocita (prvog polarnog tjelešca) za monogenske bolesti. Neki autori zastupaju mišljenje da bi se ICSI metoda trebala primjenjivati kod svih parova uključenih u postupak izvantjelesne oplodnje.

Priprema sjemena za postupak ICSI ovisi o kvaliteti i vrsti uzorka. Najčešći oblik pripreme sjemena je metodom isplivavanja ("swim up") ili pomoću gradijenta gustoće. Na navedene načine može se pripremiti sjeme dobiveno postupkom masturbacije, punkcijom i aspiracijom epididimisa (engl. microsurgical epididymal sperm aspiration – MESA), te u slučaju retrogradne ejakulacije. Izolacija spermija i spermatida iz tkiva testisa nakon (engl. testicular sperm extraction – TESE; testicular sperm aspiration – TESA) složen je postupak koji zahtijeva dobiveno tkivo testisa prvotno macerirati kemijskim i/ili mehaničkim putem, višestruko ispirati i pregledavati dobiveni materijal, te izolirati spermije/elongirane spermatide za postupak ICSI^{14,15}.

NOVE METODE ODABIRA SPERMIJA

Neposredno prije postupka ICSI, suspenzija spermija stavlja se u odgovarajuću otopinu medija povećane viskoznosti s ciljem usporavanja pokretljivosti. Odabir spermija još uvijek je daleko od zadovoljavajućeg jer se odabir zasniva na morfološkoj prosudbi (engl. morphologically selected sperm injection – IMSI). Odabrani spermij samo na osnovi zadovoljavajuće morfoloije može sadržavati fragmentiranu DNA ili kromosomske nepravilnosti. Rezultati studija pokazali su da oblik spermija ne može predvidjeti prisustvo numeričkih kromosomskih aberacija¹⁶.

Značajno mjesto u maturaciji spermija ima ekspresija gena HspA2 (engl. heat shock protein A2). Razina navedenog proteina povezana je sa stupnjem stanične zrelosti spermija, integritetom DNA, zrelošću kromatina, učestalošću kromosomske aneuploidije i funkcijom spermija uključujući fertilizacijski potencijal. Tijekom dozrijevanja spermija, preoblikovanje plazma membrane uključuje i formiranje veznih mjesta za zonu pelucida i receptora za hijaluronsku kiselinu. Metoda selekcije spermija pomoću hijaluronske kiseline je nova tehnika. Učestalost spermija s kromosomskom disomijom je smanjena za četiri do pet puta u spermija odabranih pomoću hijaluronske kiseline. Nadalje, isključeni su nezreli spermiji s ekstruzijom citoplazme, perzistentnim histonima i lomovima DNA lanca¹⁷⁻¹⁹.

Druga metoda odabira spermija zasniva se na morfoloiji organela pokretnih spermija (engl. motile sperm organellar morphology examination MSOME). Tehnika koristi svjetlosni mikroskop s Nomarski optikom pojačanom digitalnom tehnologijom koja omogućava povećanje od 6300x. Prikaz podataka Bartoova i sur.²⁰ te Berkovitz i sur.²¹ ukazuju da je stopa fertilizacije i trudnoće značajno veća pri odabiru spermija po kriterijima MSOME. Autori iznose podatak da je uspješnost postupka MSOME 60% naspram IMSI 25%, dok je stopa spontanih pobačaja nakon MSOME 14% u usporedbi s onom u IMSI koja iznosi 40%.

PRIMJENA LASERA U POSTUPKU ICSI

Smatra se da je degeneracija oocita nakon postupka ICSI u rasponu od 5% do 19%. Razlog degeneracije nije jasan. Analizom zone pelucide pokazano je da nema fragmentacije zone pelucide tijekom postupka. Otvor se zatvara neposredno nakon što se ICSI igla makne, dok se injekcijsko mjesto nakon 15 min više ne može detektirati²². Prisutna je i mogućnost oštećenja oocite zbog mehaničke kompresije. Oocite nisu jednako osjetljive na postupak ICSI; tako se pokazalo da su osjetljivije one s fragilnom oolemom koja lagano puca pri samom postupku mikroinjekcije^{23,24}.

Mogućnost da se neposredno prije postupka ICSI načini otvor na zoni (engl. drilling zone pellucide) laserom omogućuje manipulaciju ICSI mikropipete manje traumatski po oocitu²⁵⁻²⁸. Kanal u zoni promjera 5-6 µm napravi se pomoću 3 do 5 pulsa niske energije (1,48 µm valne duljine) pri trajanju pulsa manje od 2 mikro sekunde. Rienzi i sur.²⁵ prvi su izvijestili o trudnoći koja je uslijedila

nakon laserom pomognutog postupka ICSI u bračnog para koji je prethodno imao četiri ICSI postupka sa slabim preživljenjem oocita. Autori su izvijestili o minimalnoj deformaciji oocita i preživljenju 8 od 13 oocita.

Druge skupine autora²⁶⁻²⁹ također su izvijestile o značajnom smanjenju degeneracije oocita u bolesnica s fragilnom oolemom, kao i bolju kvalitetu zametaka. Međutim, podatci koje su iznijeli Richter i sur.³⁰ na osnovi opsežne studije dovode do zaključka da laserom pomognuti postupak ICSI nema utjecaja u ukupnoj populaciji ICSI bolesnica, kao ni u onih s fragilnom oolemom.

ICSI POSTUPAK POMOĆU POLARIZACIJSKOG MIKROSKOPA

Diobeno vreteno tijekom mejoze ima važnu ulogu u segregaciji kromosoma. Pokazano je da se nepravilnosti strukture diobenog vretena povećavaju s dobi bolesnica³². Položaj diobenog vretena u metafazi II u oocitama određuje se u odnosu na položaj polarnog tjelešca. Da bi se izbjeglo oštećenje diobenog vretena prilikom ulaska ICSI mikroigle u oocitu, oocita se fiksira tako da je polarno tjelešce na položaju 6 sati. Međutim, pokazano je da se na osnovi položaja polarnog tijela ne može sa sigurnošću predvidjeti položaj diobenog vretena³³.

Korak dalje u postupku ICSI postignut je primjenom svjetlosnog polarizacijskog mikroskopa (Polscope) koji omogućava neinvazivan prikaz diobenog vretena³¹. Moon i sur.³⁴ uspoređivali su oocite u ovisnosti je li diobeno vreteno vidljivo i pokazali su da je značajno veći postotak kvalitetnih zametaka nakon postupka ICSI oocita s vidljivim diobenim vretenom. Autori su zaključili da se analizom oocita Poloskopom može predvidjeti razvojni potencijal zametaka. Međutim relativni položaj diobenog vretena unutar oocita ne pokazuje utjecaj na razvojni potencijal zametaka.

NEONATALNI I OPSTETRIČKI PODATCI O TRUDNOĆAMA NAKON ICSI POSTUPKA

Bonduelle i sur.³⁵ iznijeli su u opsežnoj studiji podatke o trudnoćama nakon postupka ICSI. Prije iznošenja podataka potrebno je navesti da su autori definirali sljedeće: *gestacijsku dob* računali su tako da je aspiracija oocita na 14. dan ciklusa; *biokemijsku trudnoću* kao značajan porast HCG (>10 IU/l) između 10. i 20. dana nakon porasta LH; *spontani pobačaj* kao gubitak fetusa do 20 tjedana trudnoće; *mrtvorodenče* kao intrauterinu smrt ili rođenje

djeteta u gestacijskoj dobi višoj od 20 tjedana ili težinu djeteta veću od 500g; *prijevremeni porod* kao porod prije napunjenog 37. tjedna trudnoće.

Od ukupnog broja ICSI trudnoća (3 073) biokemijskih trudnoća bilo je 8,2% (251), izvanmateričnih 1,6% (49), spontanih pobačaja 13,9% (428), prekida trudnoće 0,6% (18), te je 2 254 djece rođeno. Studijom nije obuhvaćeno 2,4% (73) trudnoća jer se bolesnice nisu javile u centar. Iz podataka proizlazi da približno 75% trudnoća završava i porodom.

Prekidi trudnoće su učinjeni u devet slučajeva nakon prenatalne kariotipizacije, jedna nakon prenatalne DNA dijagnostike i osam nakon ultrazvučne dijagnostike. Nepravilan fetalni kariotip nađen je u 42 slučaja od 1 437 prenatalno ispitanih ICSI fetusa (2,9%), od čega su 23 nepravilnosti *de novo* (devet je nepravilnosti spolnih kromosoma, 14 nepravilnosti autosoma, kako numeričke, tako i strukturne), dok je u 19 slučajeva uočena nasljedna nepravilnost i to u njih 15 naslijeđena od oca.

Srednja gestacijska dob iznosila je 37,9 (+/-2,6) tjedana trudnoće. Srednja porođajna težina djece bila je 2 807 g, duljina 47,9 cm, opseg glave 33,4 cm. Mala porođajna težina (<2 500 g) prisutna je u 26,7% slučajeva. Perinatalna smrt u 1,87%.

Veće malformacije prisutne su u 3,38% rođene djece (srčana greška 1%, nepce 0,21%, mišično/skeletni sustav 0,8%, živčani sustav 0,42%, mokraćni sustav 0,24%, spolni sustav 0,38%, gastrointestinalni 0,1%, uho i oko 0,03%, metabolički 0,07%).

Min i sur.³⁶ iznose da su zabilježena ukupno 644 pozitivna testa na trudnoću od ukupno 2 600 započetih ciklusa (24,8%). U 509 bolesnica bila je prisutna pozitivna srčana akcija (19,6%), a poroda je bilo 448 (17,0%). Autori zaključuju da bi kao mjerilo uspješnosti postupka trebalo uzimati broj poroda jednog djeteta u terminu po broju ciklusa koji su započeti. U svojoj studiji iznose da je po ovom kriteriju njihova uspješnost 11,1%.

Horak i sur.³⁷ svojom su studijom pokazali da strukturne razlike između spermija dobivenih u postupku MESA i spermija iz ejakulata nemaju značajan utjecaj na ishod ICSI postupka. Nadalje, Schwarzer i sur.³⁸ iznose da se postotak vraćanja zametaka, postotak trudnoća i poroda po ICSI ciklusu ne razlikuje između postupka sa spermijima dobivenim prilikom TESE i spermija dobivenim postupkom MESA. Retrospektivna studija Pasqualotto i sur.³⁹ donosi podatke da je pravilna i nepravilna fertilizacija nakon ICSI postupka uzrokovana opstruktivnom azospermijom 60,5%

i 16,6% dok u slučaju neopstruktivne azoospermije iznosi 54% i 16,4%. Postotak trudnoća po bolesnici i postotak spontanih pobačaja iznosi 39,8% i 28% u skupini bolesnica s opstruktivnom azoospermijom, dok u skupini neopstruktivne azoospermije iznosi 28,3% i 40%. Uspoređujući postupak PESE (engl. percutaneous epididymal sperm aspiration) i TESA, postotak pravilne i nepravilne fertilizacije iznosi 58,7% i 21,4% vs. 57,3% i 14,5%. Postotak trudnoća po bolesnici i spontanih pobačaja za postupak PESE iznosi 54,5% i 11,1%, odnosno za postupak TESE 31% i 41%. Autori navode da pokretni spermiji dobiveni iz epididimisa ili testisa rezultiraju manjim postotkom spontanih pobačaja u usporedbi s nepokretnim spermijima. Zanimljivo je istraživanje skupine Dozortsev i sur.⁴⁰ koji iznose podatke da je postotak fertilizacije veći u skupini PESA bolesnika, ali je postotak implantacija značajno bolji u TESA skupini bolesnika uz tendenciju većeg postotka trudnoća koje se razvijaju i manji postotak spontanih pobačaja u slučajevima opstruktivne azoospermije.

Filicori i sur.⁴¹ ističu problem prijevremenog poroda u žena nakon postupka izvantjelesne oplodnje. Uz veću incidenciju višeplođnih trudnoća koje utječu na prijevremeni porod, uključeni su i drugi čimbenici. Autori smatraju da prijevremeni porodi mogu biti povezani s anamnezom neplodnih bolesnica. Pokazalo se da, ukoliko je samo muški čimbenik neplodnosti prisutan, nije zamijećena veća incidencija prijevremenih poroda.

Allen i sur.⁴² smatraju da trudnoće nakon hormonske stimulacije gonadotropinima imaju veći rizik za perinatalne komplikacije. Ovaj rizik pojačava kako uzrok neplodnosti, tako i višeplođne trudnoće, te bračni par treba biti obaviješten o povećanom riziku opstetričkih intervencija kao što je inducirano poroda i porod carskim rezom. S obzirom na to da se radi o neplodnom bračnom paru koji je ostvario trudnoću, nije zanemariv ni psihološki čimbenik.

PRAĆENJE RAZVOJA DJECE ZAČETE POSTUPKOM ICSI

Belva i sur.⁴³ pokazali su kroz psihološka i neurološka ispitivanja djece začete postupkom ICSI i spontano rođene djece, da nema značajne razlike između ove dvije skupine djece u predpubertetnom i pubertetnom razdoblju. Što se tiče intelektualnih funkcija, ICSI djeca pokazuju nešto više rezultate u, kako ukupnoj, tako i verbalnoj inteligenciji⁴⁴. U pogledu motoričkog razvoja, ono je podjednako

kod djece začete postupkom ICSI i spontano rođene djece u dobi do osam godina. Nadalje, nakon detaljnih oftalmoloških istraživanja u djece začete postupkom ICSI pokazano je da nema nikakve razlike u pogledu vizualne funkcije i okularne morfologije u odnosu na spontano rođenu djecu⁴⁵. Međutim kongenitalne malformacije su značajno više zastupljene u djece rođene nakon ICSI postupka, ali većina malformacija je ispravljena manjim kirurškim zahvatima⁴³.

Pretpostavka da je jedna trećina muške neplodnosti uzrokovana genskom etiologijom izaziva zabrinutost ulaska bolesnika s azoospermijom i oligoasthenozoospermijom u postupak medicinski pomognute oplodnje, a to je većina bolesnika uključenih u postupak ICSI. Kongenitalna neplodnost može biti uzrokovana mutacijom gena, kvantitativnim i strukturalnim nepravilnostima spolnih kromosoma i autosoma. Vjerojatnost nasljeđivanja CFTR gena u postupku ICSI u sljedeću generaciju je 50%, za Klinefelterov sindrom mozaika kariotipa i do 70%, dok je prijenos AZF mutacije na djecu muškog spola 100%⁴⁶. Stoga se parovima uključenim u postupak zbog muškog čimbenika neplodnosti preporučuju genetsko savjetovanje zbog rizika od *de novo* kromosomskih nepravilnosti (posebice spolnih kromosoma), uz prenatalno praćenje zbog kongenitalnih strukturalnih nepravilnosti, uključujući biokemijski i ultrazvučni probir, te prenatalnu dijagnostiku, kao što je CVS ili amniocenteza. U obzir treba također uzeti i mogućnosti koje pruža preimplantacijska dijagnostika.

LITERATURA

1. Edwards RG, Brody SA. Principles and practice of assisted human reproduction. London: W.B. Saunders Company, 1995.
2. Thadani VM. Injection of sperm heads into immature rat oocytes. J Exp Zool 1979;210:161-8.
3. Keefe CL. Fertilization by sperm injection in the rabbit. Gamete Res 1989;22:59-69.
4. Goto K. Bovine microfertilization and embryo transfer. Mol Reprod Devel 1993;36:288-90.
5. Cohen J, Malter M, Fehilly C, Wright G, Elsner C, Kort H, Massey J. Implantation of embryos after partial opening of oocyte zona pellucida to facilitate sperm penetration. Lancet 1988;2:162.
6. Gordon JW, Grunfeld J, Garrisi GJ, Talansky BE, Richards C, Laufer N. Fertilization of human oocytes by sperm from infertile males after zona pellucida drilling. Fertil Steril 1988;50:68-73.

7. Lews-King A, Trounson A, Sathananthan H, Kola I. Fertilization of human oocytes by microinjection of a single spermatozoon under the zona pellucida. *Fertil Steril* 1987;48:637-42.
8. Ng S-C, Bongso TA, Ratnam SS, Sathannanthan AH, Chan CLK, Wong PC, Hagglund L, Anandakumar C, Wong YC, Goh VHH. Pregnancy after transfer of multiple sperm under the zona. *Lancet* 1988;2:722.
9. Fishel S, Timson J, Antinori S, Lisi F, Rinaldi L. Sub-zonal insemination and zona breaching techniques for assisted fertilisation. U: Fishel A, Symodns M (ur.) Gamete and embryo micromanipulation in human reproduction. London: Edward Arnold, 1993;79-97.
10. Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smits J, Wisanto A, Devroey P. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1993;8:1061-6.
11. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992;340:17-8.
12. Silber SJ, Van Steirteghem AC, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Devroey P. High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy. *Hum Reprod* 1995;10:148-52.
13. Tournaye H, Devroey P, Liu J, Nagy Z, Lissens W, Van Steirteghem A. Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: a new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deferens. *Fertil Steril* 1994;61:1045-51.
14. Schlegel PN. Micromanipulation of gametes for male factor infertility. *J Urol Clin N Am* 1994; 21:477-86.
15. Silber SJ et al. The use of epididymal and testicular spermatozoa for intra-cytoplasmic sperm injection: the genetic implication for male infertility. *Hum Reprod* 1995;10:2031-43.
16. Celik-Ozenci C, Jakab A, Kovacs T, Catalanotti J, Demir R, Bray-Ward P, Ward D, Huszar G. Sperm selection for ICSI: shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations. *Hum Reprod* 2004;20:52-9.
17. Cayli S, Jakab A, Ovari L, Delpiano E, Celik-Ozenci C, Sakkas D, Ward D, Huszar G. Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI. *Reprod Biomed Online* 2003;7:462-8.
18. Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovaci E, Ward D, Revelli A, Huszar G. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertil Steril* 2005;84:1665-73.
19. Huszar G, Ozkavukcu S, Jakab A, Celik-Ozenci C, Sati GL, Cayli S. Hyaluronic acid binding ability of human sperm reflects cellular maturity and fertilizing potential: selection of sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2006;18:260-7.
20. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezo Y, Barak Y. Real time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl* 2002;23:1-8.
21. Berkovitz A, Eltes F, Lederman H, Peer S, Ellenbogen A, Feldberg B, Bartoov B. How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection. *Reprod Biomed Online* 2006;12:634-8.
22. Shwartz P, Magerkurth C, Michelmann HW. Scanning electron microscopy of the zona pellucida of human oocytes during intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Hum Reprod* 1966;11:2693-6.
23. Palermo GD, Alikani M, Bertoli M, Colombero LT, Moy F, Cohen J, Rosenwaks Z. Oolemma characteristics in relation to survival and fertilization patterns of oocytes treated by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996;11:172-6.
24. Ebner T, Qaman C, Moser M, Sommergruber M, Jesacher K, Tews G. A prospective study on oocyte survival rate after ICSI: influence of injection technique and morphological features. *J Assist Reprod Genet* 2001;18:623-8.
25. Rienzi L, Greco E, Ubaldi F, Iacobelli M, Martinez F, Tesarik J. Laser assisted intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2001;76:1045-7.
26. Abdelmassih S, Cardoso J, Abdelmassih V, Dias JA, Abdelmassih R, Nagy ZP. Laser-assisted ICSI: a novel approach to obtain higher oocyte survival and embryo quality rates. *Hum Reprod* 2002;17: 2694-9.
27. Eroglu A, Nahum RT, Isaacson K, Toth TL. Laser-assisted intracytoplasmic sperm injection in human oocytes. *J Reprod Med* 2002;47:199-203.
28. Nagy ZP, Oliveira SA, Abdelmassih V, Abdelmassih R. Novel use of laser to assist ICSI for patients with fragile oocytes: a case report. *Reprod Biomed Online* 2002;4:27-31.
29. Rienzi L, Ubaldi F, Martinez F, Minasi MG, Iacobelli M, Ferrero S, Tesarik J, Greco E. Clinical application of laser assisted ICSI: a pilot study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;115(suppl 1):S77-9.
30. Richter KS, Davis A, Carter J, Greenhouse SJ, Mottla GL, Tucker MJ. No advantage of laser-assisted over conventional intracytoplasmic sperm injection: a randomized controlled trial (NCT00114725). *J Exp Clin Assist Reprod* 2006;3:1-7.
31. Liu L, Oldenbourg R, Trimarchi JR, Keefe DL. A reliable, noninvasive technique for spindle imaging and enucleation of mammalian oocytes. *Naure Biotechnol* 2000;18:223-5.
32. Chang CH, Wang TH, Horng SG, Wu HM, Wang HS, Soong YK. The concentration of inhibin B in follicular fluid: relation to oocyte maturation and embryo development. *Hum Reprod* 2002;17: 1724-8.
33. Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Oldenbourg R, Keefe DL. The spindle observation and its relationship with

- fertilization after intracytoplasmic sperm injection in living human oocytes. *Fertil Steril* 2001;75:348-53.
34. Moon J-H, Hyun C-S, Lee S-W, Son W-Y, Yoon S-H, Lim J-H. Visualization of the metaphase II meiotic spindle in living human oocytes using the Poloscope enables the prediction of embryonic developmental competence after ICSI. *Hum Reprod* 2003;18: 817-20.
 35. Bounduelle M, Liebaers I, Deketelaere V, Derde M-P, Camus M, Devroey P, Steirteghem A V. Neonatal data on a cohort of 2889 infants born after ICSI (1991-1999) and 2995 infants born after IVF (1983-1999). *Hum Reprod* 2002;17(3):671-94.
 36. Min JK, Breheny SA, MacLachlan V, Healy DL. What is the most relevant standard of success in assisted reproduction? The singleton, term gestation, live birth rate per cycle initiated: the BESST endpoint for assisted reproduction. *Hum Reprod* 2004;19:3-7.
 37. Horak S, Huk J, Grettka K, Tomanek G, Ogrodnik M, Polaszek M. Comparison of the efficacy of ICSI using either spermatozoa aspired microsurgically from the epididymis (MESA-ICSI) or obtained from the ejaculation. *Ginekol Pol* 2003;74:12-6.
 38. Schwarzer JU, Fiedler K, Hertwig I, Kerusmann G, Wurfel W, Schleyer M, Muhlen B, Pckl U, Lochner ED. Sperm retrieval procedures and intracytoplasmic spermatozoa injection with epididymal and testicular sperms. *Urol Int* 2003;70:119-23.
 39. Pasqualotto FF, Rossi-Ferragut LM, Rocha CC, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic injection of epididymal and testicular sperm obtained from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia. *J Urol* 2002;167:1753-6.
 40. Dozortsev D, Neme R, Diamond MP, Abdelmassih S, Abdelmassih V, Oliveira F, Abdelmassih R. Embryos generated using testicular spermatozoa have higher developmental potential than those obtained using epididymal spermatozoa in men with obstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2006;86:606-11.
 41. Filicori M, Cognigni GE, Gamberini E, Troilo E, Prmegiani L, Bernardi S. Impact of medically assisted fertility on preterm birth. *BJOG* 2005;112(suppl 1):113-7.
 42. Allen VM, Wilson RD, Cheung A. Pregnancy outcomes after assisted reproductive technology. *J Obstet Gynaecol Can* 2006;28:220-50.
 43. Belva F, Heriet S, Liebaers I, Van Steirteghem A, Celestin-Westreich S, Bonduelle M. Medical outcome of 8-year-old singleton ICSI children (born >=32 weeks' gestation) and a spontaneously conceived comparison group. *Hum Reprod* 2006. (Epub ahead of print)
 44. Verhaak CM, Smeenk JM, Nahuis MJ, Kremer JA, Braat DD. Long-term psychological adjustment to IVF/ICSI treatment in women. *Hum Reprod* 2006. (Epub ahead of print)
 45. Wikstrand MH, Stromblad K, Flodin S, Bergh C, Wennerholm UB, Hellstrom A. Ophthalmological findings in children born after intracytoplasmic sperm injection. *Acta Ophthalmol Scand* 2006;84:177-81.
 46. Serebrovska ZA, Serebrovskaia TV, Pyle RL, Di Pietro ML. Transmission of male infertility and intracytoplasmic sperm injection (mini-review). *Fiziol Zh* 2006;52:110-8.