

Time-lapse (tam zamanlı görüntüleme sistemi) ile takip edilen IVF sikluslarında, teratozoospermi ile normozoospermi vakalarının embriyo morfokinetiğinin retrospektif karşılaştırılması

Retrospective comparison of embryo morphokinesis between cases of teratozoospermia and normozoospermia in IVF cycles followed by time-lapse imaging system

Özge Berberoğlu¹, Mehmet Cıncık², Belgin Selam³

¹Maltepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye

²Maltepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

³Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

İletişim: bselam@hotmail.com

ÖZET

Amaç: Çalışmanın amacı, ICSI sikluslarında sperm morfolojisi ile fertilizasyon, gebelik oranı ve embriyo kalitesinin ilişkisini araştırmak ayrıca sperm morfolojisi ile erken yarıklanma yüzdesini karşılaştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Retrospektif olarak planlanan çalışmaya 60 infertil çift alınmıştır. Azospermik hastalar çalışmaya dahil edilmezken kadın yaşı 40'ın altında tutulmuştur. Sperm morfolojisi hematoksilen yöntemiyle boyanan preparatlar, Kruger morfoloji kriterlerine göre değerlendirilmiştir. Sperm morfolojisi \geq %4, normal kabul edilmiştir. Fertilizasyon, 16-18. saatte 2 pronukleus olarak kabul edilirken, embriyo kalitesi embriyoların 3. günde morfolojik olarak gününle uyumlu blastomer sayısı, blastomer büyüklüklerinin eşitliği ve fragmentasyon durumuna göre grade 1, 2, 3 olarak klasifiye edilmiştir. Çalışmada, sperm morfolojisi ile fertilizasyon, morfokinezis, embriyo kalitesi, erken yarıklanma ve gebelik oranları değerlendirildi.

Bulgular: Normal morfolojili sperm oranı $<$ %4, (n=30; çalışma grubu), ve \geq %4, (n=30; kontrol grubu) olmak üzere toplam 60 hastanın verileri istatistiksel değerlendirmeye alındı. Fertilizasyon oranı, normozoospermi grubunda %53, teratozoospermi grubunda %46 bulunmuştur ($p>$ 0,01). Bu gruplar embriyo kalitesi olarak karşılaştırıldığında grade 1, 2, 3 embriyo oranlarında, gruplar arasında fark izlenmemiştir ($p>$ 0,01). Erken yarıklanma ile sperm morfolojisi arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p>$ 0,01). Gebelik oranları incelendiğinde sonuç, teratozoospermi grubunda %45, normozoospermi grubunda %55'dir ($p>$ 0,01).

Sonuç: Bu çalışmada, sperm morfolojisi ile fertilizasyon, embriyo kalitesi, erken yarıklanma ve gebelik yüzdeleri arasında anlamlı bir ilişki görülmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Sperm morfolojisi, embriyo, erken yarıklanma

SUMMARY

Aim: To investigate the correlation of embryo quality, fertilization and pregnancy rates with sperm morphology in ICSI (Intracytoplasmic sperm injection) cycles. Also, to compare early cleavage percentage with the sperm morphology.

Methods: 60 infertile couples were included in this retrospective study. Azoospermic patients were not included in the study and female age was kept below 40. Sperm preparates were stained with hematoxylin method and morphology was evaluated according to Kruger criteria. Sperm morphology $>$ 4% was accepted as normal. Fertilization was accepted as 2 pronuclei between 16th and 18th hours; embryo quality was classified as grade 1, 2, 3 depending on the morphology and uniform distribution of blastomeres, and fragmentation on the third day. Fertilization, morphokinesis, embryo quality, early cleavage and pregnancy rates were evaluated according to sperm morphology in the current study.

Results: Study group with teratozoospermi (normal morphology $<$ %4, n=30) and control group with normozoospermi (normal morphology \geq %4, n=30; kontrol grubu) were evaluated among 60 patients. Fertilization rates were 53% and 40% in the normal and abnormal groups, respectively ($p>$ 0,01). Embryo quality were similar among both groups according to grade 1, grade 2 and grade 3 embryos ($p>$ 0,01). There was no significant correlation between the early cleavage and sperm morphology ($p>$ 0,01). Pregnancy rates were similar in both groups (45% and 55% in study and control groups, respectively ($p>$ 0,01).

Conclusion: There is no significant relationship between sperm morphology and fertilization, embryo quality, early cleavage and pregnancy rates in the current study.

Keywords: Sperm morphology, embryo, early cleavage

GİRİŞ

Embriyo gelişimi çok dinamik bir süreçtir ve embriyonun morfolojik görünümü, birkaç saat içerisinde çok hızlı bir şekilde değişebilir. Klasik morfolojik değerlendirme süreçlerinde embriyolar, transfer gününde, çok sınırlı zaman içerisinde değerlendirilir. Konvansiyonel morfolojik gözlemlerle embriyonun her bir farklılaşmasını analiz etmek olası değildir ve yarıklanma zamanları tam olarak tespit edilemez. Time-lapse görüntüleme sistemleri ile embriyolar sürekli ve tam zamanlı izlenerek, embriyonun gelişimini karakterize eden kinetik parametreler elde edilir (1). Yarıklanma dönemindeki embriyonun gelişimine ait morfokinetik bilgiler, transfer için en iyi embriyonun seçimine daha erken safhada karar verebilmemize imkan sağlar (2).

Farklı sebeplere bağlı olarak ortaya çıkan erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde öykü ve fizik muayeneyi takiben semen analizi önem taşımaktadır. Sperm morfolojisinin değerlendirilmesinde ışık mikroskobu, elektron mikroskobu ya da farklı boyama teknikleri (Papanicolaou, Spermac, Diff-Quick, Hematoksilen gibi) kullanılır. İncelemeler sonucu bir spermatozoanın anormal veya normal olduğunu belirleyen kriterleri ortaya koymak oldukça zordur. Kruger'in Tygerberg kriterlerine göre, morfolojik değerlendirmenin sonuçları; normal (%14'ten fazla normal form mevcut), iyi prognozlu (%4 -14 arası normal form mevcut) ve kötü prognozlu (%4'ten az normal form mevcut) olmak üzere 3 gruptur (3). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2010 yılındaki rehberinde, Tygerberg kriterlerinin %4 oranının altında olmasının tedavi yardımı gerektiren kriter olarak alındığı görülmektedir (4).

Çoğul gebelikler, hem anne, hem de bebekler açısından erken doğum, düşük doğum ağırlığı gibi riskler teşkil etmektedir. Çoğul gebeliklerde karşılaşılan sorunlar, tekil gebeliklerde karşılaşılan komplikasyonlardan çok daha fazladır. Gebelik olasılığını azaltmadan çoğul gebelikleri azaltmak için az sayıda embriyo transfer edilmesi ve transfer edilecek doğru embriyonun seçilmesi çok önemlidir.

Bu çalışmada özellikle erkek infertilitesi ile ilgili parametreler incelenmiştir. Rastgele seçilmiş 40 yaş altı kadınlarda eşlerinin sperm morfolojisi Kruger yöntemine göre incelenmiş ve fertilize olmuş yumurtalar Time-Lapse yani tam zamanlı görüntüleme sistemi ile takip edilmiştir. Böylece embriyo morfokinetiğinin sperm morfolojisi ile ilişkisi araştırılmıştır. Amacımız morfokinetik parametreler ile seçilen en kaliteli embriyonun, sperm morfolojisi ile bağlantılı olup olmadığını araştırmaktır.

METHODS

Çalışmamız 2014-2015 tarihleri arasında EuroFertil Tüp Bebek Merkezi'ne başvuran 60 hastanın verileri kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmamız için Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı alındı. Bu çalışma retrospektif olarak çalışılmış olup randomize olarak seçilen çiftlerde, 40 yaş altı kadınların yumurtaları ile eşlerinin spermeleri kullanılmıştır. Ejakülat sperm elde edilen hastaların, globozoospermisi olanlar ile, total immotil sperm tanısı almış olanlar çalışmamız dışında tutuldu. Böylece normal morfolojili sperm oranı $<4\%$, ($n=30$; çalışma grubu), ve $\geq 4\%$, ($n=30$; kontrol grubu) olmak üzere toplam 60 hastanın verileri istatistiksel değerlendirmeye alındı.

40 yaş altı kadınların olgun yumurtaları Oosit Pick-up (OPU) yapılmasından sonra inkübatörde, minimum 2 saat inkübe edildi. Ardından hyase enzimi ile cumulus kümeleri denude edilip corona hücreleri soyulduktan sonra, eşinin spermi ile mikroenjeksiyon yapıldı. Tam zamanlı morfokinetik takibe alınarak kaydedildi. Sperm morfolojisinin döllenme üzerindeki etkisini embriyoskop cihazı eşliğinde tam zamanlı inceledik ve aynı zamanda embriyo morfolojisi üzerindeki etkilerini araştırdık.

Kruger strict kriterlerine göre normal morfolojili sperm oranı $<4\%$ olan hasta grubu ile $>4\%$ olan hasta grubu ICSI siklusuna alınarak elde edilen embriyoların kaliteleri, fertilizasyon ve klinik gebelik oranları karşılaştırıldı.

Fertilizasyon, 16-18. saatte 2 pronukleus olarak kabul edilirken, embriyo kalitesi embriyoların 3. günde morfolojik olarak günülle uyumlu blastomer sayısı, fragmentasyon oranı veya eşit büyüklükte blastomer durumuna göre grade 1,2 ve 3 olarak sınıflandırılmıştır. Çalışmada ana parametreler olarak fertilizasyon, erken yarıklanma, morfokinetiz, gebelik ve embriyo kalitesi değerlendirildi.

İSTATİSTİK ANALİZ

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 17.0 paket programı kullanılmıştır. Kategorik ölçümler sayı ve yüzde olarak, sürekli ölçümlerse ortalama ve standart sapma olarak değerlendirilmiştir. Gruplar arası sürekli ölçümlerin karşılaştırılmasında Hosmer- Lemeshow test tekniği kullanılmıştır. Tüm testlerin istatistiksel önem düzeyi 0,05 olarak alınmıştır.

BULGULAR

Çalışmada her iki grup arasında sırasıyla fertilizasyon, erken yarıklanma, embriyo kalite değerlendirmesi, gebelik ve embriyo morfokinetiği açısından istatistiksel

anlamli sonuç izlenmedi.

Fertilizasyon oranları, sperm morfolojisine göre normal grupta ($n \geq 4$) %53 iken anormal olan grupta ($n < 4$) %46 olarak bulundu ($p > 0.01$) (Tablo 1). Gruplar, embriyo kaliteleri açısından karşılaştırıldığında, normozoospermili grupta grade I embriyo ortalaması %36 iken, grade II embriyo ortalaması %36, grade III embriyo ortalaması %29 şeklinde kaydedildi. Teratozoospermili grupta, grade I embriyo oranı %35, grade II embriyo oranı %37 ve grade III oranı %26 olup, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.053$) (Tablo 2).

Bizim çalışmamızda Grade 1 kalitesinde embriyo transferi yapılan 40 hastanın sperm morfolojisine göre klinik gebelik sonuçları Tablo 3 de görüldüğü gibi olup istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır ($p > 0,01$).

Aynı zamanda bu çalışmada Embriyoskop cihazı varlığında gözlemlenen 60 hastadan alınan yumurtalarla elde edilen 183 embriyonun, 25.0 ile 27.5 saatleri arasında ve dışında kalan embriyoların erken yarıklanma yüzdelerinin sperm morfolojisi ile bağlantısına bakılmıştır. 183 embriyonun sperm morfolojisine bağlı olarak erken yarıklanma zamanları veri olarak girilmiş ve Tablo 4’de görüldüğü gibi görece olarak morfoloji normal ≥ 4 olanlarda biraz daha yüksek olmakla birlikte istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır ($p > 0,01$).

Tablo 1: Fertilizasyon oranları

Sperm Morfoloji=n	Embriyo sayısı	% Fertilizasyon
$n \geq 4$	98	0.53
$n < 4$	85	0.46
Toplam embriyo sayısı	183	

n=sperm morfolojisi $p > 0.01$

Tablo 2: Sperm morfolojisine bağlı olarak embriyo skorlaması

Hasta sayısı =60	$n < 4$	$n \geq 4$	p
Grade 1	26/75 (0,35)	39/108 (0.36)	$p > 0.01$
Grade 2	29/75 (0,37)	38/108 (0.36)	
Grade 3	20/75 (0.26)	31/108 (0.29)	
Toplam embriyo sayısı	75	108	

n=sperm morfolojisi, $p > 0.01$

Tablo 3: Sperm morfolojisi ile gebelik oranlarının karşılaştırılması

Sperm morfolojisi	$n < 4$	$n \geq 4$	Toplam	P
Gebelik sayısı	9	11	20	$p > 0.01$
% Gebelik	%45 (9/20)	%55 (11/20)	%50 (20/40)*	

n=sperm morfolojisi; $p > 0.01$, *ortalama gebelik

Tablo 4: Erken yarıklanmanın sperm morfolojisi ile karşılaştırılması

	Hasta sayısı =60		P
	$n \geq 4$	$n < 4$	
	34	26	
Erken klivaj gösteren embriyo yüzdesi	41/76 (%53)	35/76 (%47)	$> 0,01$
Erken klivaj göstermeyen embriyo yüzdesi	60/107 (%56)	47/107 (%44)	$> 0,01$
Toplam embriyo sayısı (183)	101	82	

n=Sperm morfolojisi

TARTIŞMA

Sperm morfolojisi başka çalışmalarda da gösterildiği gibi sperm nükleer bütünlüğü ile ilişkilidir. Kötü morfoloji, DNA hasarının ve dolayısıyla da ICSI’deki düşük fertilizasyon oranlarının öncüsü olabilir.

ICSI’de teratosperminin fertilizasyon, implantasyon ve klinik gebelik oranları üzerine etkisinin olmadığını savunan çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalardan, Nagy ve Ark, 966 vakalık serisinde sperm sadece morfoljik olarak değil, diğer parametrelerin de ICSI sonuçlarını etkilemediğini rapor etmektedir (5). IVF programında, yüksek sayı ve hareketlilikte spermler fertilizasyonu artırırken, morfoloji ile belirgin etki izlenmemektedir (6). Her ne kadar implantasyon ve gebelik oranları düşük olsa da, morfolojisi tümünden bozuk olan hastalardaki tek tedavi yöntemi olarak ICSI önem kazanmaktadır. Bu düşüncelere karşı olarak morfolojinin sonuçları negatif yönde etkilediğini savunan yayınlar da mevcuttur (7, 8). Sperm morfolojisinin ICSI sonuçlarını kötü yönde etkilerinde, şekil bozukluğu olan sperm kromozomal sayı anomalisi ya da DNA zincir fragmentasyonuna sahip olması rapor edilmektedir (8). Özellikle baş anomalilerinin bu sonuçlara yol açabileceği belirtilmektedir (9).

Çalışmamız sırasında sperm değerlendirmesinde, baş defekti olmayıp boyun ya da kuyruk defekti olan spermiler de anormal olarak değerlendirildi. Boyun ve kuyruk anomalileri in vivo ortamda ya da konvansiyonel IVF de gebelik oranlarını negatif yönde etkilerken ICSI sonuçlarını etkilemediğinden ve ICSI işlemi esnasında embriyolog, sperm seçiminde normale en yakın baş yapısına sahip olan spermi seçtiği için baş deformitelerinin oluşturacağı fark azaltılmış olabilir.

Birçok çalışma morfolojinin fertilizasyonda sınırlı değeri olduğunu gösterse de, farklı sonuçların, farklı boyama teknikleri, sperm hazırlama protokolleri ve morfoloji klasifikasyon sistemlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. (10-13).

Grow ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, sperm morfolojisi Kruger kriterlerine göre, normal sayısı <%4, %4-14, >%14 olan 3 grup hastada IVF sonuçlarına bakılmış, >%14 olan grupta fertilizasyon oranları >%85 olarak saptanmış, bu nedenle morfolojinin fertilizasyon kapasitesini belirleyen önemli bir gösterge olduğu belirtilmiştir (14). Donnelly ve arkadaşlarının yaptıkları başka bir çalışmada, %50'nin üzerinde fertilizasyon olduğu hastalarda sperm morfolojisinin anlamlı olarak daha iyi olduğu görülmüştür (15).

Bazı çalışmalarda morfolojik olarak normal spermlerle yapılan ICSI sonucunda %5.1 oranında biyokimyasal gebelik elde edildiğinin gösterilmesi, morfolojik olarak normal sperm hücrelerinde de embriyo gelişimine ve gebeliğe etki eden saklı hasarların bulunabildiğine işaret etmektedir. Kötü sperm kalitesinin, sperm nükleer bütünlüğü ile ilgili olduğu kabul edilmiştir. Sperm anormalliklerinin olduğu erkeklerde, spermde gevşek kromatin paketi ve endojen sarmal kırıkları daha çoktur. Bu durum gebelik sonuçlarını etkilemektedir (16-18). Genetik olarak hasarlı sperm, ICSI sonrasında fertilizasyon sağlayabilse de, erkek pronükleusunun ilk klivaj bölünmesi ve sonrasındaki kaderi belirsizdir (19,20). Daha önceden tekrarlayan ICSI başarısızlığı olan hastalarda, IMSI, PICSI gibi ileri yöntemlerle morfolojisi ve motilitesi normal olarak spermiler seçilerek denenen ICSI sikluslarında gebelik başarısının belirgin olarak artması, ICSI sırasındaki sperm nükleusunun üstün morfolojik durumunun gebelik sağlanmasında önemli olduğunu göstermektedir. Ayrıca embriyo kalitesinde, implantasyon ve gebelik oranlarında kesin bir artışın saptanması da bunu desteklemektedir (21).

Sperm morfolojisinin IVF başarısının öngörülmesinde önemsiz ya da az öneme sahip olduğunu vurgulayan çalışmaların yanı sıra (7, 8), farklı çalışmalarda morfolojinin IVF/ ICSI başarısı yönünde belirleyici etken olduğu izlenmektedir (22,23). Bu farklı sonuçların nedeni, kullanılan morfoloji kriterlerinin farklı olmasındandır

Erkek infertilitesinin tedavisindeki ICSI ile, daha önceden başarısız olunmuş IVF denemeleri olan veya ciddi derecede bozuk sperm parametreleri bulunan infertil hastalarda fertilizasyon ve gebelik elde edebilme şansı doğmuştur (24). ICSI ile birkaç hareketli sperm varlığında bile fertilizasyon elde edilmektedir, çünkü anormal sperm varlığında, söz konusu olan doğal seleksiyon basamakları ekarte edilmektedir (25).

Sperm morfolojisinin embriyo kalitesi ile ilişkisi, bizim çalışmamızda istatistiksel anlamlı saptanmamış olmakla beraber literatürde bu ilişkiyi destekleyen ve önemli bulan araştırmalara ait sonuçlar vardır. Daha geniş hasta serilerini içeren yeni, detaylı çalışmalar daha doğru sonuçlar için şarttır. Bizim çalışmamızda sperm morfolojisi ile erken yarıklanma ve fertilizasyon yüzdesi arasında anlamlı bir sonuç bulunmamaktadır. Gebelik oranı ise embriyo transferi yapılan 40 hasta üzerinden değerlendirilmiş olup anlamlı olarak katkı sağlamadığı görülmüştür.

Morfolojinin ICSI sonuçları üzerindeki etkisinin en büyük sebebi olarak spermin kromozomal yapı anomalileridir; ancak direkt gözlem ile bu ayırım yapmak mümkün olmamaktadır. Sperm kromatin değerlendirmesi gibi daha kompleks yöntemlerin kullanılması objektif sonuçların elde edilmesine yardımcı olacaktır.

Sonuç olarak, globozoospermi ve immotil silia sendromu haricinde, sperme ait başka hiçbir bozukluk tam zamanlı (embriyoskop eşliğinde) izlendiğinde ICSI sonuçlarına önemli bir şekilde etki etmemektedir. Ancak tek embriyo transferinde en iyi kalitede embriyonun seçilmesi ve impantasyon oranlarının artması için time-lapse, konvansiyonel takip yöntemlerine göre daha avantajlıdır.

KAYNAKLAR

1. Wyngaarden JB, Lloyd SH Jr, Bennett JC (editors). Cecil Textbook of Medicine. In: ennes JA. Gastrintestinal endoscopy. 19th Edition, Philadelphia: W. B. Saunders Company. 1992: 630-634.
2. Ugiagbe RA, Omuemu CE. Diagnostic indications for upper gastrointestinal endoscopy. *Annals of Biomedical Sciences* 2013;11(2):65-70.
3. Sit M, Aktas G, Yılmaz EE. Endoscopy in time can be a life saver: our upper endoscopy results. *Natl J Med Res* 2013;3(3):270-2.
4. Alis H, Oner OZ, Kalayci MU, Dolay K, Kapan S, et al. Is endoscopic band ligation superior to injection therapy for Dieulafoy lesion? *Surg Endosc.* 2009 Jul;23(7):1465-9. doi: 10.1007/s00464-008-0255-8. Epub 2009 Jan 6.
5. Demirören K, Dülger AC, Ölmez Ş, Avcı V, et al. Flexible endoscopic procedure in children with foreign bodies in their upper gastrointestinal system *Dicle Tıp Dergisi / 2014; 41 (1): 205-209 Dicle Medical Journal* doi: 10.5798/diclemedj.0921.2014.01.0400
6. Delaney BC. Prevalence and epidemiology of gastroesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 2004; 20 Suppl 8: 2-4.
7. Woodfield CA, Levine MS. The postoperative stomach *European Journal of Radiology*, 2005; 5:341-352.
8. İhsan yıldız, Yavuz Savaş Koca *Med J SDU/SDÜ Tıp Fak Derg* 2018;25(1):1-6 DOI:10.17343/sdutfd.341514
9. Yusuf Yücel et al. *Endoskopi Dergisi Aralık 2017 Sayı 3 e-ISSN: 2149-0597*
10. Tamer A, Korkut E, Korkmaz U, Akçan Y. The Upper Gastrointestinal Endoscopy Results: Region of Düzce *Kocatepe Tıp Dergisi* 6: 31-34 / Mayıs 2000
11. Günay E, Özkan E, Odabaşı HM, Abuoğlu HH, Cengiz Erişet al. Symptom-histopathology relation in upper GI endoscopy *Ulusal Cer Derg* 2013; 29:115-8 DOI: 10.5152/UCD.2013.2157
12. Özden A, Şahin B, Yılmaz U, Soykan İ. Gastroenteroloji. *Dumlu Ş, Özden A. Peptik Ülser hastalığı. 1. Baskı, Ankara. Fersa Matbaacılık. 2002: 95-98.*
13. Tamer A, Korkut E, Korkmaz U, Akçan Y. Üst Gastrointestinal Endoskopi Sonuçları: Düzce Bölgesi *The Medical Journal of Kocatepe* 2005 6 : 31-34.
14. Memik F (Editör). *Klinik Gastroenteroloji. İçinde: Bayraktar Y. Portal Hipertansiyon. 1. Baskı, İstanbul: Nobel & Güneş Kitabevi. 2004: 646-653*
15. Yılmaz N, Bölükbaş C, Bölükbaş F, ve ark. Üst gastrointestinal endoskopi bulgularımız; Harran Üniversitesi. *Turk J Gastroenterol*, 2003; 14 (Suppl 1): P:198.
16. Özer B, Coşar A, Serin E, ve ark. Endoskopi endikasyon ve tanı oranlarımız. *Turk J Gastroenterol*, 2003; 14 (Suppl 1): P. 251.
17. Ökten A. *Gastroenterohepatoloji. İçinde: Mungan Z. Özofagus Hastalıkları. 1. Baskı, İstanbul: Nobel Kitabevi. 2001: 6-9*
18. Bor S, Mandıracıoğlu A, Kitapçioğlu G, ve ark. Gastroözofageal reflü prevalansı: İzmir-Menderes bölgesinde toplum tabanlı bir çalışma. *17. Türk Gastroenterolojik kongresi, özet bildiri kitabı, Antalya 3-7 Ekim, 2000*
19. Mungan Z, Demir K, Onuk M, ve ark. Ülkemizde gastroözofageal reflü hastalığının karakteristik özellikleri. *Turk J Gastroenterol*, 1999; 10: 101-106.