



1993

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**ERKEK İNFERTİLİTESİ NEDENİYLE YAPILAN
İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU SIKLUSLARINDA
MİKROAKIŞKAN ÇİP İLE SEÇİLEN SPERMLERİN KLİNİK
SONUÇLARA ETKİSİ VAR MI?**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Şirin AYDIN DENİZ

Adana / 2017



1993

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**ERKEK İNFERTİLİTESİ NEDENİYLE YAPILAN
İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU SİKLUSLARINDA
MİKROAKIŞKAN ÇİP İLE SEÇİLEN SPERMLERİN KLİNİK
SONUÇLARA ETKİSİ VAR MI?**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Şirin AYDIN DENİZ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Esra BULGAN KILIÇDAĞ

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu (Proje No: KA16/232) ve T.C Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmış, Başkent Üniversitesi Araştırma fonunca desteklenmiştir.

Adana / 2017

TEŞEKKÜR

İlk teşekkürümü, mesleğini hayat biçimi olarak benimsemiş ve bunu keyifle, merakla, hiç azalmayan coşkusuyla yapmaya devam eden, sadece mesleki değil her anlamda örnek aldığım hocam Prof. Dr. Esra BULGAN KILIÇDAĞ'a etmek istiyorum. Kadın Hastalıkları ve Doğum ihtisasım süresince hayranlık duyduğum bilgi birikimiyle, cerrahi becerisi ve sabrıyla beni eğiten, ihtisasımdaki en büyük emeğin sahibi, hem tez danışmanım, hem bölüm başkanım Sayın Prof. Dr. Esra BULGAN KILIÇDAĞ'a sonsuz teşekkür ederim.

Bulunduğumuz her vakada, cerrahi bilgi ve mesleki tecrübelerini benimle paylaşarak, beni mesleğime hazırlayan hocam Prof. Dr. Hüsni ÇELİK'e

Cerrahinin sanat olduğuna inanan, yetiştirdiği her bir kadın doğum hekiminin kendisinden daha iyi birer hekim ve cerrah olması gerektiğine inanarak, bizleri yetiştirmeye özen gösteren hocam Doç. Dr. Bülent HAYDARDEDEOĞLU'na

Başkent Üniversitesinde ihtisasımı tamamlamış olmaktan duyduğum gurur, buna bir anlamda sebep olan ve cerrahi olarak eğitimime sağladıkları katkılar ve kendime güven duymam için verdikleri fırsatlar için Doç. Dr. Tayfun ÇOK ve Doç. Dr. Erhan ŞİMŞEK'e,

İhtiyaç duyduğum her zaman yanımda olan ve benden desteklerini hiç esirgemeyen, bildiklerini benimle paylaşan, mesleki anlamda bana ışık olan, yolumu aydınlatan sevgili ablam Yrd. Doç. Dr. Pınar Çağlar AYTAÇ, ağabeyim Öğr. Gör. Dr. Hakan KALAYCI ve ablam Öğr. Gör. Dr. Gonca ÇOBAN ve tüm uzmanlarımla, benden desteklerini hiç esirgemeyen sevgili kıdemlilerim Dr. Didem Alkaş YAĞINÇ ve Dr. Selçuk YETKİNEL'e teşekkür ederim. Her zaman birlikte çalışmaktan zevk aldığım ve ihtisas süremi birlikte geçirdiğim servis hemşirelerimize ve tüm personel arkadaşlarıma teşekkür ederim. Tez sürecim boyunca benden desteklerini esirgemeyen Kışla yerleşkesindeki tüm infertilite ekibine sonsuz teşekkürler.

Son olarak, başarılarımın arkasındaki gizli kahramanım canım annem Nesrin Bulgan, her konuda bana destek olan ablam Burcu Aydın, anasınıfından üniversiteye hiç ayrılmadığım kardeşim Ayça AYDIN'a teşekkür ederim. Ailemde başarısı, meslek aşkı ve ahlakıyla örnek aldığım, eğitim hayatımın en büyük destekçilerinden olan eniştem Doç. Dr. Hasan KILIÇDAĞ'a ve son olarak da bana hayata daha pozitif bakmayı öğreten, en büyük desteğim eşim Eflatun DENİZ'e teşekkür ederim.

Dr. Şirin AYDIN DENİZ
Adana, 2017

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
TABLO LİSTESİ	IV
ŞEKİL LİSTESİ	V
KISALTMALAR LİSTESİ	VI
ÖZET	VIII
ABSTRACT	X
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İnfertilite Giriş	3
2.2. İnfertilite Nedenleri	3
2.3. İnfertil Çiftin Değerlendirilmesi	5
2.3.1. Kadın İnfertilitesinin değerlendirilmesi	5
2.3.1.1. Anamnez	5
2.3.1.2. Fizik Muayene	6
2.3.1.3. Tanı Testleri	7
2.3.2. Erkek İnfertilitesinin Değerlendirilmesi	11
2.3.2.1. Spermatogenez	12
2.3.2.2. Erkek İnfertilitesi Nedenleri	14
2.3.2.3. Anamnez	15
2.3.2.4. Fizik Muayene	16
2.3.2.5. Semen Analizi	17
2.3.2.6. Sperm Fonksiyon Testleri	23
2.3.2.7. Endokrin Testler	25
2.3.2.8. Biyokimyasal Testler	26
2.3.2.9. Anti-Sperm Antikorları	26
2.3.2.10. Genetik Testler	26
2.4. Erkek İnfertilitesinde Tedavi	27
2.5. Yardımcı Üreme Teknikleri	28
2.5.1. İntrasitoplazmik Sperm İnjesiyonu (ICSI)	28
2.5.2. ICSI Tedavisinde Sperm Seçimi ve Önemi	28
2.5.2.1. Konvansiyonel Sperm Seçme Teknikleri	29
2.5.2.2. İleri Düzey Sperm Seçme Teknikleri	31

3. GEREÇ ve YÖNTEM	38
3.1. Hasta Seçimi	38
3.2. Sperm Seçimi	39
3.3. Embriyo Takibi	40
3.4. İstatistiksel Metot.....	40
4. BULGULAR	41
5. TARTIŞMA.....	47
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	52
7. KAYNAKLAR.....	53
8. ÖZGEÇMİŞ.....	63



TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Sık Görülen Kadın İnfertilitesi Nedenleri	4
Tablo 2.2. Herhangi Bir Partnere veya Her İki Partnere Bağlı İnfertilite Nedenleri.....	5
Tablo 2.3. Over Rezervi Belirteçleri	10
Tablo 2.4. Erkek İnfertilite Nedenleri	15
Tablo 2.5. DSÖ Sınıflamasına Göre Normal Semen Parametreleri	21
Tablo 4.1. Demografik Veriler	42
Tablo 4.2. Kontrollü Ovarian Hiperstimülasyon Siklus Karakteristikleri.....	43
Tablo 4.3. Intrasiitoplazmik Sperm Enjeksiyonu Sonrası Embriyoloji Verileri	45
Tablo 4.4. Gebelik Sonuçları.....	46

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Olgun spermin şematik görüntüsü.....	13
Şekil 2.2. Seminifer tübüllerde spermatogenezis	13
Şekil 2.3. Spermin morfolojik değişiklikleri	21
Şekil 2.4. Zeta potansiyeli ile spermin ayrıştırılması	31
Şekil 2.5. MACS yöntemi ile spermin ayrıştırılması	32
Şekil 2.6. PICSI petrisinde spermin görünümü	33
Şekil 2.7. Elektroforetik yöntemle spermin ayrıştırılması-MicroflowCS-10.....	34
Şekil 2.8. IMSI için spermin seçimi	35
Şekil 2.9. Polarize ışık mikroskobu ile reaktif akrozomlu spermin seçimi	36
Şekil 2.10. Mikroakışkan kanal sistemi.....	37

KISALTMALAR LİSTESİ

AFS	: Antral Folikül Sayısı
AMH	: Anti Mülleryen Hormon
BVS	: Bazal Vücut Sıcaklığı
CASA	: Computer Assisted Sperm Analysis
CCD	: “Lensless Charge-Coupled” Cihaz
CFTR	: Kistik Fibrozis Transmembran Düzenleyici Gen
CSW	: Konvansiyonel Swim-Up
DGS	: Dansite Gradyent Santrifüj
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
DSW	: Direk Swim-Up
FSH	: Folikül Stimüle Edici Hormon
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HA	: Hyaluronik Asit
hCG	: Human Chorionic Gonadotropin
HOST	: Hipoosmotik Şişme Testi
HSG	: Histerosalfingografi
ICSI	: İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IUI	: İntra Uterin İnseminasyon
IVF	: In Vitro Fertilizasyon
KAT	: Klamidya Antikor Testi
KF	: Kistik Fibrozis
LH	: Lüteinize Hormon
MACS	: Magnetic-Activated Cell Sorting System (Manyetik Aktive Sperm Seçimi)
MR	: Manyetik Rezonans
MSOME	: Motil Sperm Organellerinin Morfolojik Değerlendirilmesi
O₂⁻	: Süperoksit Anyonları
OH	: Hidroksil Radikalleri
PCOS	: Polikistik Over Sendromu
PPD	: Pozitif Prediktif Değer
ROS	: Reaktif Oksijen Radikalleri
SCSA	: Sperm Chromatin Structure Assay

SIS	: Salin İnfüzyon Sonografisi
TESE	: Testiküler Sperm Ekstraksiyonu
TMSS	: Toplam Motil Sperm Sayısı
TUNEL	: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Dntp Nick And Labeling
USG	: Ultrasonografi
VKE	: Vücut Kitle Endeksi
YÜT	: Yardımcı Üreme Teknikleri



ÖZET

Erkek İnfertilitesi Nedeniyle yapılan İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu Sikluslarında Mikroakışkan Çip ile Seçilen Spermilerin Klinik Sonuçlara Etkisi Var mı?

Günümüzde ileri düzey sperm seçme yöntemleri, yalnızca motilite ve morfolojisi iyi spermeleri değil, aynı zamanda Deoksiribonükleik Asit (DNA) hasarı ve DNA fragmantasyon oranı daha düşük, DNA bütünlüğü daha yüksek spermeleri seçmeye olanak tanımaktadır. İleri düzey sperm seçme yöntemlerinden MACS, IMSI ve çift kırılma tekniklerinde klinik çalışmalar yapılmış olup, mikro akışkan sıvı bazlı bir sperm seçme yöntemi olan Fertile Chip® ile yapılan, yayınlanmış klinik çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle prospektif randomize planlanan çalışmamızda erkek infertilitesi nedeniyle tüp bebek tedavisi planlanan hastalarda fertile chip kullanılarak yapılan intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) sonrası fertilizasyon oranları, embriyo kalitesi ve gebelik oranlarını araştırmayı amaçladık.

Çalışmamızda power analiz sonucuna göre erkek infertilitesi nedeniyle ICSI tedavisi uygulanacak toplam 128 hasta randomize edilerek 64 hastanın sperm seçimleri konvansiyonel swim-up yöntemiyle, 64 hastanın sperm seçimi de fertile chip kullanılarak yapıldı. Siklusa başlanan tüm hastalara oosit toplama işlemi yapıldı. Çalışma sonucu yapılan analizlerde kontrol grubu ve çalışma grubunun demografik verileri, uygulanan tedavi protokolleri ve tedavi dozları arasında istatistiksel fark saptanmadı. Primer sonuçlarımızdan biri olan fertilizasyon oranları arasında istatistiksel fark saptanmadı ($p=0,41$). Siklus başına/ oosit toplama işlemi başına implantasyon oranları fertile chip grubunda %53,17, kontrol grubunda %30,16 olarak bulundu, bu fark istatistiksel olarak fertile chip grubu lehine anlamlı saptandı ($p=0,004$). Embriyo transferi başına gebelik oranları incelendiğinde, fertile chip grubunda %66,7, kontrol grubunda %47,6 olarak bulundu ($p=0,047$). Embriyo transferi başına klinik gebelik oranlarına bakıldığında ise, fertile chip grubunda %57,1, kontrol grubunda %36,5 bulundu ($p=0,032$). Embriyo transferi başına gebelik ve klinik gebelik oranları, fertile chip grubunda, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptandı. Tüm hastalar incelendiğinde çalışmaya dahil edilen hasta başına klinik gebelik oranları fertile chip grubunda %56,3 kontrol grubunda %35,9 olarak saptandı. Bu fark istatistiksel olarak fertile chip grubu lehine anlamlı bulundu ($p=0,033$).

Çalışmamız sonucunda, erkek infertilitesi nedeniyle ICSI tedavisi planlanan hastalarda, sperm seçim yöntemi olarak fertile chip kullanımının, konvansiyonel yöntemlere kıyasla, klinik gebelik başarısını arttırdığını saptadık. Ancak daha yüksek sayıda çalışma gruplarıyla yapılan analizlerle çalışmanın desteklenmesi gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: DNA bütünlüğü, DNA fragmantasyon indeksi, Fertile Chip, ICSI.



ABSTRACT

Is There any Effect on the Clinical Outcomes of the Spermatozoa Selected by Microfluidic Chip in the Intracytoplasmic Sperm Injection Cycle in Patients with Male Factor?

Today, advanced sperm selection methods allow not only good sperm motility and morphology, but also high sperm integrity with lower deoxyribonucleic acid (DNA) damage and DNA fragmentation rates. Clinical studies have been performed on advanced sperm selection methods such as MACS, IMSI and sperm birefringence techniques but there is no clinical study performed with Fertile Chip®, a micro fluidic liquid based sperm selection method. In this study, we aimed to evaluate the fertilization rates, embryo quality and pregnancy rates after ICSI using the fertile chip in patients with male infertility.

A total of 128 patients according to the power analysis who would undergo ICSI therapy for male infertility were randomized. Sixty-four patients were allocated to the conventional swim-up method (control group) and 64 patients were allocated to the fertile chip as the sperm sorting method (study group). Oocyte pick-up was performed in all the patients. There was no statistically significant difference in the demographic data, treatment protocols and doses between the study and control groups. There was no statistically significant difference between fertilization rates ($p=0,41$). The implantation rates per cycle were 53,17% in the fertile chip group and 30,16% in the control group, and this difference was statistically significant in favor of the fertile chip group ($p=0,004$). When the pregnancy rates per embryo transfer were examined, it was found as 66,7% in the fertile chip group and 47,6% in the control group ($p=0,047$). When the clinical pregnancy rates per embryo transfer were examined, it was 57,1% in the fertile group and 36,5% in the control group ($p=0,032$). The rates of pregnancy and clinical pregnancy per embryo transfer were significantly higher in the fertile chip group than in the control group. When all patients were examined, the clinical pregnancy rates per patient included in the study were 56,3% in the fertile chip group and 35,9% in the control group. This difference was statistically significant in favor of the fertile chip group ($p=0,033$).

As a result of our study, we found that the use of fertile chip as a sperm selection method increases the success of clinical pregnancy in patients who are planned for ICSI

treatment due to male infertility. However, this study needs to be supported by analysis with higher number of working groups.

Keywords: DNA integrity, DNA fragmentation index, Fertile Chip, ICSI.



1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnfertilite dünya geneli yaklaşık %10-15 çifti etkileyen önemli bir sağlık sorunudur (1). Günümüzde infertil çiftlerin %20'sinde erkek faktörün tek neden olduğu, %30-40'nda ise önemli bir etken olarak kadın infertilitesine eşlik ettiği bilinmektedir (2,3). Primer testiküler yetmezliğe bağlı düşük sperm sayısı erkek infertilitesinin yaygın sebeplerinden biridir. Nutrisyonel bozukluklar, stres, kronik inflamasyon sperm sayı ve kalitesini düşürür. Düşük sperm sayısı, düşük sperm hareketi ile sperm yapısal bozuklukları, spermin oositi doğal yoldan fertilize etme gücünü zayıflatır (10).

Erkek infertilitesinin değerlendirilmesi geleneksel olarak Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) standartlarına göre klasifiye edilen (11), sperm volümü, konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisini içeren semen analizine dayalıdır. Ancak erkek faktör nedeniyle takip edilen infertil hastaların yaklaşık olarak %15'inin semen parametreleri normaldir (12). Sperm DNA hasarı, semen kalitesini gösteren, fertilizasyon, implantasyon ve babaya ait genetik bilginin yavruya aktarılmasında önemli rol oynayan, yeni bir parametre olarak kabul edilmektedir (5,6). Son dönemde özellikle erkek infertilitesinde, sperm DNA hasarının potansiyel etkileri üzerine dikkat çekilmiştir(4). Ek olarak infertil erkeklerin semen örneklerinin, hidroksil radikalleri (OH), süperoksit anyonu (O_2^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi, yüksek derecede reaktif oksijen radikalleri (ROS) içerdiği gözlenmiştir (9). Azalmış DNA bütünlüğünün fertiliteyi azalttığı, infertil erkeklerde artmış ROS ve DNA fragmentasyonunun fertiliteyi olumsuz etkilediği gösterilmiştir (7,8,9).

Bu nedenle günümüzde spermilerin DNA bütünlüğünü, DNA fragmentasyon oranlarını, ROS miktarını ölçen, üst düzey semen analiz yöntemleri üzerine çalışılmaktadır (13). Yardımcı üreme tekniklerinde sperm seçimi için günümüzde halen kullanılmakta olan konvansiyonel yöntemler, DNA bütünlüğü, ROS miktarı, membran maturasyonu ve apoptoza uğramamış sperm seçimi gibi önemli faktörleri ihmal ederek, spermeleri hareket ve morfolojilerine göre seçmeye dayanır(9). Yapılan çalışmalarda konvansiyonel yöntemlerde sıkça kullanılan santrifüj, pipetle karıştırma ve yıkama gibi işlemlerin ROS üretimine neden olduğu ve bunun bir sonucu olarak DNA bütünlüğünün bozulması ve DNA fragmentasyon oranının artmasına neden olduğu iddia edilmektedir (14,15). Ayrıca santrifüj esaslı sperm seçme teknikleri fazla zaman alan, sonuçların teknisyenden teknisyene farklı değerlendirildiği tekniklerdir (16,17).

Kadın genital traktusunda doğal sperm seçilimi; serviks ve uterusla başlayan ve fertilizasyonun gerçekleştiği tuba uterinada sonlanan bir dizi anatomik bariyerden etkilenir

(18). Mikro-akışkan sıvı teknolojileri ise kimyasal ve reaktif oksijen radikalleri oluşmasına neden olabilecek santrifüj basamakları yerine, kadın genital traktusundaki doğal sperm seçim yollarını taklit eder. Böylece daha az oksijen radikali oluştuğu, spermilerin DNA fragmantasyonlarının daha düşük, DNA bütünlüklerinin daha yüksek olduğu belirtilmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalarda diğer yöntemlere göre sperm canlılık oranı, sperm toplam hareketlilik oranı, sperm hız oranlarının daha yüksek olduğu gösterilmiştir (14,15).

Mikro akışkan sıvı bazlı sperm seçim kiti olan ‘Fertile Chip®’ kullanımının DNA hasarı açısından daha iyi spermi seçtiğine dair çalışmalar olmakla birlikte bu seçilen spermilerle yapılan mikroyenjeksiyonun klinik sonuçları ile ilgili yayın bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda, erkek faktör sebebiyle infertilite tedavisi alan hastalarda fertile chip kullanılarak yapılan ICSI sonrası fertilizasyon oranları, embriyo kalitesi ve gebelik oranlarını araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnfertilite Giriş

İnfertilite dünya çapında yaklaşık 72,4 milyon çifti etkileyen ciddi bir sağlık sorunudur. İnfertil çiftler gelişmiş ülkelerde üreme çağındaki çiftlerin %3,5-16,7'sini, gelişmekte olan ülkelerde %6,9-9,3'ünü ve ortalama tüm dünyada %8-12'sini oluşturur (21,22). İnfertilite, 35 yaş altındaki kadınlar için 12 ay boyunca hiçbir korunma yöntemi kullanmaksızın, düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebe kalamama durumudur. Otuz beş yaş ve üzerinde olan kadınlarda ise bu süre 6 aydır (19). Daha önceden gebeliği olmayan çiftler primer, gebeliği olan çiftler ise sekonder infertil olarak kabul edilirler.

Fekundabilite; bir menstrual siklusta gebe kalabilme olasılığı olarak tanımlanmaktadır. Fekundite ise bir siklusun canlı doğumla sonlanabilme ihtimalidir. Görünürde normal olan çiftlerin korunmasız ve düzenli cinsel ilişki ile %80-90'ının 12 ay içerisinde gebelik elde edebildiği saptanmıştır. Fekundabilitenin ise ilk üç ayda %25 iken, sonraki dokuz ayda %11'e düştüğü görülmüştür. İlk bir yıldan sonra fekundabilitenin daha da azaldığı saptanmıştır (20).

Fertilite ise gebelik elde etme kapasitesidir ve yaş ile fertilite azalmaktadır. Kadınlarda 20'li yaşların sonlarından itibaren, erkeklerde ise 35 yaşından itibaren fertilite azalmaktadır. Kadınlarda 35 yaşından itibaren belirgin azalma görülürken, erkeklerde belirgin azalma görülen yaş 50'li yaşlardır. Kadınlarda yaşa bağlı fertilite azalması erkeklerden daha belirgindir (23).

2.2. İnfertilite Nedenleri

İnsanlarda üreme süreci komplekstir. Temel öğelerine ayırmak gerekirse sağlıklı bir üreme için:

- Sperm; ovulasyon zamanında ya da ovulasyona yakın bir zamanda servikste ya da servikse yakın bir yerde bulunmalı, kadın genital traktusundan ilerleyerek, fallop tüplerine çıkmalı ve oositi dölleyebilmelidir. (erkek faktör)
- Matür bir oosit, ideal olarak düzenli bir şekilde ovüle olmalıdır. (overyan faktör)
- Serviks vajene gelen spermleri yakalayıp, süzüp, beslemeli ve fallop tüplerine ulaşmasına yardımcı olmalıdır. (servikal faktör)

- Uterus, kavitesine ulaşan embriyo için reseptif olmalı ve embriyonun büyüme ve gelişmesini desteklemelidir. (uterin faktör)
- Fallop tüpleri ovüle olan oositi yakalayabilmeli, spermi oosite yakınlaştırmalı ve oluşan embriyoyu kaviteye etkin bir şekilde taşıyabilmelidir. (tubal faktör)

İnfertilite değerlendirilmesi tüm bu öğeleri ayırabilmek, işlevselliğini kontrol etmek ve gebelik oluşmasını engelleyebilecek herhangi bir anormalliği saptamak üzerine kurulmuştur. Primer ve sekonder infertilitede bu sıklıklar benzer olmakla beraber son 25 yılda gelişmiş ülkelerde infertilite nedenleri belirgin olarak değişmemiştir (25).

Yapılan bir popülasyon tarama çalışmasının sonucuna göre infertilite nedenleri; erkek faktör %26 (hipogonadizm, testiküler problemler, seminifer tübül disfonksiyonları), ovülatuar disfonksiyon %21, tubal hasar %14, endometriozis %6, koital problemler %6, servikal faktör %3 ve %28'i açıklanamayan infertilite olarak değerlendirilebilir (24). Sık görülen kadın infertilitesi nedenleri ve herhangi bir partnere veya her iki partnere bağlı infertilite nedenleri Tablo 2.1 ve 2.2'de belirtilmiştir.

Tablo 2.1. Sık Görülen Kadın İnfertilitesi Nedenleri (26)

➤ Ovulatuvar Bozukluklar *Polikistik over sendromu (PCOS) *Hiperprolaktinemi *Hipotalamik hipogonadizm *Prematur ovaryan yetmezlik *Hipotiroidizm *Konjenital adrenal hiperplazi	➤ Tubal Patolojiler *Tubal tıkanıklık *Endometriyozis *Pelvik adezyon
➤ Uterin Patolojiler *Myom *Endometriyal polip *Mülleryan anomali *Servikal stenoz *İntrauterin sineşi	➤ Oosit Kalitesi *Yaşa bağlı anoplidi

Tablo 2.2. Herhangi Bir Partnere veya Her İki Partnere Bağlı İnfertilite Nedenleri (26)

➤ Açıklanamayan infertilite * Fertilizasyon defekti
➤ Dengeli translokasyon taşıyıcılığı
➤ İlişki sıklığının az oluşu

2.3. İnfertil Çiftin Değerlendirilmesi

İnfertilite değerlendirilmesi, kadın yaşı 35'in altındaysa, çiftlerin korunmadan ve düzenli olarak 12 ay cinsel ilişki sonrası, gebelik elde edememeleri durumunda başlanmalıdır. Kadın yaşının 35 yaşın üzerinde olması, bilinen veya şüpheli erkek faktör olması, uterin-tubal-peritoneal hastalık olması, evre 3-4 endometriozis olguları veya oligomenore-amenore hikayesi olması durumunda düzenli ilişki ile 6 ay boyunca gebelik elde edilememişse erken değerlendirme gerekir (42). Eşlerin geçmişteki performanslarına bakılıp, yalnızca eşlerden birine odaklanarak değerlendirme yapılmamalı, çift olarak kapsamlı tıbbi öykü ve fizik muayene ile değerlendirilmelidir.

2.3.1. Kadın İnfertilitesinin değerlendirilmesi

2.3.1.1. Anamnez

İnfertil bir kadının değerlendirilmesine, dikkatli alınan bir ayrıntılı anamnez ile başlanmalıdır. Ve anamnez şunları içermelidir (43,44);

- İnfertilite Değerlendirmesi:
 - Kontrasepsiyon yöntemleri ve cinsel ilişki sıklığı
 - İnfertilite süresi ve önceki infertilite değerlendirmesine ait sonuçlar ve tedaviler
- Obstetrik Hikaye:
 - Gravida, parite
 - Daha önce gebe kalındıysa gebelik sonuçları ve ilişkili komplikasyonlar
- Jinekolojik Hikaye:
 - Menarş yaşı, siklus süresi, sıklığı ve dismenore başlangıcı, şiddeti

- Geçirilmiş cerrahi; endikasyonları ve sonuçları, hospitalize olmasını gerektiren durumlar, pelvik inflamatuvar hastalık öyküsü, cinsel yolla bulaşan hastalık öyküsü
- Önceki anormal pap smear sonucu ve ona bağlı görülen tedaviler
- Medikal Hikaye:
 - Olağandışı çocukluk çağı hastalıkları
 - Sürekli kullanılan ilaçlar ve allerji öyküsü
 - Fertiliteye olumsuz etkileri olabilecek tiroit hastalıkları, diyabet, adrenal yetmezlik gibi kronik hastalıklar, radyoterapi ve kemoterapi öyküsü,
 - Tütün, alkol, uyuşturucu kullanımı
- Aile öyküsü:
 - Ailede, infertilite, tiroid hastalıkları, PCOS, obezite ya da tekrarlayan gebelik kayıpları öyküsü,
 - Ailede meme ya da over kanseri öyküsü

2.3.1.2. Fizik Muayene

Fizik muayene, anamnez ile birlikte çiftlerin infertilitesine katkıda bulunan faktörlerin saptanmasına yardımcı olabilir. İnfertil bir kadın için fizik muayene aşağıdaki değerlendirmeyi içermelidir (44):

- Genel Muayene:
 - Boy ve kilo; obezite ya da anoreksiya gibi yeme bozukluklarına bağlı hormon anormallikleri açısından değerlendirilmelidir.
 - Nabız; taşikardi ya da bradikardi, tiroid hastalıkları açısından yol gösterici olabileceğinden, nabız ölçülmelidir.
- Baş ve Boyun:
 - Tiroidler, boyut, hassasiyet ve nodülerite açısından kontrol edilmelidir.
 - Servikal, submandibular ve supraklaviküler lenfadenopatiler açısından boyun değerlendirilmelidir.
- Meme:
 - Tanner evrelemesine göre meme gelişimi incelenmeli, kitle varlığı ya da cilt değişikliği değerlendirilmelidir.
 - Galaktore varlığına bakılmalıdır.

- Batın:
 - Ele gelen kitle ve hassasiyet açısından değerlendirilmelidir.
 - Ameliyat skarı açısından incelenmelidir.
- Pelvis:
 - Eksternal genitalya gelişimi değerlendirilmelidir. (Tanner evrelemesi)
 - Spekulum muayenesi sırasında vajinal ve servikal enfeksiyon veya patoloji olup olmadığı değerlendirilmelidir.
 - Bimanuel ve rektovajinal muayene ile uterusu ait patoloji olup olmadığı, adneksiyal yer kaplayan kitle, endometriyozis açısından uterosakral nodularite değerlendirilmelidir.
- Cilt:
 - Hirsutizm; ekstra kıllar açısından yüz, göğüs ve karın orta hattı kontrol edilmelidir.
 - Akantosis nigrikans; tipik olarak boyun kenarında veya deri katlarında mevcut olduğundan, bu bölgeler dikkatle incelenmelidir.

2.3.1.3. Tanı Testleri

Ayrıntılı anamnez ve fizik muayene sonrası yapılacak olan değerlendirme, en başta infertilitenin en yaygın sebepleri düşünülerek, infertilitenin nedenlerini belirlemeye yönelik, en az invaziv, sistematik, hızlı ve maliyet-etkin olmalıdır (43). İlk tanısal değerlendirme aşağıdaki basamakları içermelidir (45);

- Ovulasyonun değerlendirilmesi
- Over rezervinin değerlendirilmesi
- Tüplerin ve endometriyal kavitenin değerlendirilmesi

Ovülasyonun Değerlendirilmesi: Ovülasyon üremenin vazgeçilemez bir bileşenidir (44). Tüm infertil çiftlerin yaklaşık %15'inde ovulatuar işlev bozukluğu saptanırken, bu oran infertil kadınlar arasında %40 olarak bilinmektedir. Ovulasyonu değerlendirmek için aşağıdaki yöntemler kullanılabilir (46).

- **Menstürel hikaye:** Memede hassasiyet, bulantı, duygu durum değişikliği, akne, dismenore gibi premenstural semptomların görüldüğü düzenli menstruasyon tipik olarak ovulasyonu işaret eder (45).

- **Bazal vücut sıcaklığının (BVS) monitörizasyonu:** Basit ve ucuz bir yöntemdir. Ovülasyon döngülerinde bifazik paternler karakteristiktir, monofazik patern ya da lüteal faz sıcaklık yükselmesinin oldukça kısa sürdüğü (11gün>) hastalar, anovulatuvar ya da düşük kalitede ovulasyona sahip hastalar olarak tanımlanırlar. Ancak bazı kadınlar monofazik BVS paterni sergiler ve bu kişilerde, bu yöntemle ovulasyon zamanı güvenilir bir şekilde tanımlanamaz (47).
- **Serum progesteron düzeyi ölçümü:** Luteal evre boyunca, ovulasyon foksiyonunu değerlendirmek için kullanılır; 3,0 ng/mL'den daha yüksek değerler, ovulasyona ilişkin varsayımsal kanıt sağlar (48). Progesteronun 5 ng/ml üzerinde olduğu değerler her zaman ovulasyonun gerçekleştiğini gösterir ancak ne zaman olduğunu veya yüksek değerleri ovulasyonun kalitesini göstermez. Rutinde bakılan 21. gün progesteron değeri menstrual siklus uzunluğu 28 gün olan hastalar için optimal zamanlamadır. Serum progesteron düzeyini değerlendirmek için en uygun zaman, menstrüel siklusun uzunluğuna bağlı olarak, beklenen adet gününden yaklaşık bir hafta öncesidir (45,49).
- **Lüteinize Hormon (LH) monitörizasyonu:** Ticari "ovulasyon öngörme kitleri", idrardaki pre-ovulatuvar LH artışını saptamak üzere tasarlanmıştır ve konsantrasyon normalde yalnızca LH dalgalanması sırasında gözlemlenen bir eşik değeri aştığında, bu kitler "pozitif" olur. Testi uygulamaya, siklusun toplam uzunluğu göz önünde bulundurularak tahmini LH piki gününden 2-3 gün önce başlanır ve test günlük olarak uygulanır. Test bir günden daha uzun süre pozitif olabilir ancak ilk pozitif test ovulasyon zamanını en iyi öngörür ve ilk pozitif test sonrası testi tekrar etmek gerekmez. Ovulasyon genellikle dalgalanmanın tespit edilmesinden 14-26 saat sonra gerçekleşir ve oosit yalnızca yaklaşık 24 saat döllenebilir olduğu için, doğurganlığın en yüksek olduğu zaman LH piki ve sonrası iki gündür. İlk pozitif test sonrası gün, zamanlanmış ilişki ya da intra uterin inseminasyon (IUI) için en iyi gündür (49).
- **Seri Transvajinal Ultrasonografi:** Seri transvajinal ultrasonografi, gelişmekte olan foliküllerin boyut ve sayısını gösterir ayrıca; progresif foliküler büyüme, pre-ovulatuvar follikülün ani çöküşü, açıkça tanımlanmış foliküllerin sınırlarının düzensizleşmesi, ekojenitesinin artması ve cul-de-sac'taki sıvı volümü artışı, ovulasyon ve luteinizasyona dair fikir edinmemizi sağlar.

İnfertil kadında, menstrual siklus ya da diğer testler, anovulasyon düşündürüyorsa, daha ileri tetkik olarak, endokrin değerlendirme düşünülmelidir. Oligo-ovulasyon veya anovulasyonun sık nedenleri olan; PCOS, tiroid hastalıkları, hipogonadotropik hipogonadizm, hiperprolaktinemi ve adrenal hastalıklar için laboratuvar değerlendirilmesi yapılmaz. Kanda follikül stimüle edici hormon (FSH), LH, östrodiol, prolaktin, tiroid stimüle edici hormon (TSH) ve androjenler bakılmalıdır. Patoloji saptanması durumunda tedavi altta yatan nedene yönelik olarak düzenlenmelidir (44).

Over Rezervinin Değerlendirilmesi: “Over rezervi” terimi overde kalan oosit sayı ve kalitesini tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Over rezerv testleri, tanısal ve prognostik önemi olan, tüm infertil kadınlarda olmasa da birçoğunun değerlendirmesinde, yararlı bilgi sağlayan testlerdir (51). Kadınların yaşı ile fertilite ilişkisi iyi bilinmektedir; 4. dekat boyunca fertilite gittikçe azalır ve 40 yaşından sonra çok daha hızlı bir şekilde düşer (52).

Donör oosit ile gerçekleştirilen in vitro fertilizasyon (IVF) döngülerini takiben elde edilen gebelik oranları, tedavinin başarısının, alıcınınkinden ziyade oosit vericisinin yaşına göre belirlendiğini ortaya koymaktadır; bu, yaşın oosit kalitesi üzerine etkisini göstermektedir.

Yaygın olarak, yumurtalık rezervini test etmek için; erken foliküler dönemde (siklus 2-4 gün) serum FSH düzeyi bakılmış ve 10-11 mIU/mL’den daha yüksek FSH seviyeleri, azalan oosit kalitesi ve infertilite ile ilişkilendirilmiştir. Erken foliküler fazda, 2-10 mm’lik antral folliküllerin sayısı (AFS) ovaryan rezervi göstermede ve infertilite tedavisinin başarısını öngörmeye yararlı bir belirteçtir (53). Serum anti-müllerian hormon (AMH), yumurtalık rezervinin en yeni işaretidir ve AFS’ye göre, siklustan bağımsız olması ve daha objektif olması nedeniyle daha avantajlıdır. AMH geç preantral ve küçük antral foliküllerin granülosa hücreleri tarafından salgılanan, overin kalan follikül havuzunun ölçümünde kullanılan bir belirteçtir (54). Düşük AMH düzeyleri, ovaryan stimülasyona zayıf cevap, IVF için düşük embriyo kalitesi ve olumsuz gebelik sonuçlarıyla ilişkilidir (55,56). 2011 yılında ESHRE tarafından hazırlanan azalmış over rezervini tanımlayan Bologna kriterlerinde AMH sınır değeri 0,5-1,1 ng/ml olarak kabul edilmiştir (120).

Tablo 2.3. Over Rezervi Belirteçleri

• Yaş • FSH düzeyi • AFS • AMH düzeyi

Tuba Uterinaların ve Endometriyal Kavitenin Değerlendirilmesi:

• **Uterusun Değerlendirilmesi:** Uterus özellikle endometrial tabaka, embriyonun implantasyonu ve fetal gelişimi için önemlidir. Uterus, erken embriyonik gelişim sırasında müllerian kanalların orta hatta füzyonuyla oluşur. Füzyon esnasındaki başarısızlıklar, uterusun uterin septum gibi infertiliteye eşlik eden konjenital anomalilerine neden olabilir. Ayrıca, kadınlarda yaşla birlikte endometriyum işlevini bozan ve implantasyonu engelleyen uterus fibroidleri veya endometrial polip gelişebilir. Uterusa yönelik cerrahi, serviks veya endometrial kavitenin skarı ile sonuçlanabilir (44).

Uterus ve endometrial kaviteyi değerlendirilme yöntemleri:

Histerosalpingografi (HSG): Uterin kavitenin büyüklüğü ve şeklini tanımlar, gelişimsel anomaliler olan unikorn, septat, bikornu uterusu ya da sonradan gelişen endometrial polip, submukoz myom ve sineşiler gibi, fertilitiyi etkileyen oluşumları gösterir. Ancak asemptomatik infertil bir kadında HSG, endometrial polip ve submukoz myomlar açısından düşük sensitivite (%50) ve düşük pozitif prediktif değere (PPD; %30) sahiptir (57). Aynı zamanda HSG septat uterus ile bikornu uterusu birbirinden ayırt edemez ve ileri bir tetkik olarak pelvik manyetik rezonans (MR) görüntüleme ya da 3D ultrasonografi (USG) gerekebilir (42).

Salin-infüzyon Sonografi (SIS) : Bu pelvik USG’de, uterin boşluğa steril salin aşılacak için küçük bir kateter kullanılır ve uterin kavitenin ile mevcut patolojilerin daha duyarlı bir değerlendirmesi yapılır (44).

Histeroskopi: İntrauterin patolojilerin tanı ve tedavisinde en kesin yöntemdir. Bu yöntem uterusu değerlendirmek için, daha pahalı ve invaziv bir yöntem olduğundan,

genellikle, daha az invaziv yöntemler olan HSG ve SIS'te tanımlanan anormalliklerin ileri değerlendirmesi ve tedavisi için kullanılır (58).

- **Tuba Uterinaların Değerlendirilmesi:**

Bir oosit serbest bırakıldıktan sonra fallop tüpü tarafından yakalanmalı ve uterusu doğru hareket ettirilmelidir. Enfeksiyon, postoperatif yapışıklık veya endometriyozis nedeniyle fallop tüpü zarar gördüğünde, tubal fimbria ve siliyaların fonksiyonu bozulabilir. Fertilizasyon fallop tüpünde gerçekleşir.

Komplet tubal tıkanıklık, fertilizasyonu önler, çünkü sperm oosite ulaşamaz; kısmi tubal tıkanıklıkta, döllenme gerçekleşebilir, ancak oositin veya embriyonun normal taşınması bozulduğundan, ektopik gebelik riski artmıştır (44).

Tuba Uterinaları değerlendirilme yöntemleri (44):

Histerosalpingografi (HSG): Bu floroskopik görüntüleme yönteminde, serviksten radyopak boya enjekte edilir. Boya, endometriyal kaviteyi doldurduktan sonra, eğer tuba uterinalar patent ise, uzunluğu boyunca tuba uterinaları doldurur ve ardından pelvik boşluğa dökülür.

Kromotubasyon: Kromotubasyon, laparoskopi sırasında metilen mavisinin dilüe solüsyon şeklinde serviks yoluyla enjekte edilmesidir. Böylece tuba uterinaların patensi, proksimal ya da distal tıkanıklığı hakkında bilgi edinilir. Kromotubasyonla, daha az invaziv bir yöntem olan HSG'de ayırt edilemeyen, fimbriyal fimozis, peritubal adezyonlar gibi tubal faktörler ayırt edilip düzeltilebilir.

Klamidyal Antikor Testi (KAT): Bu test, tubal patolojiyle ilişkili olan Chlamidya trachomatis antikorlarını saptamaya yönelik, noninvaziv bir serum testidir. Ancak klinik kullanımı sınırlıdır. Bu test tubal adezyon açısından yüksek riskli hastalar ile invaziv test gerektirmeyen düşük riskli hastaları ayırt etmek için kullanılır (59).

2.3.2. Erkek İnfertilitesinin Değerlendirilmesi

Erkek faktörün infertil çiftlerin en az yarısına katkıda bulunduğu ve çiftlerin % 15 ile % 20'sinde infertilitenin tek nedeni olduğu bilinmektedir (60).

Fertilizasyon için spermin normal spermatogenez basamaklarını tamamlaması gerekir. Normal fertilizasyon için gereken spermatogenez basamakları; maturasyon ve

kapasitasyon, hiperaktivasyon, zona pellusidaya bağlanma, akrozom reaksiyonu, sperm-oosit membran füzyonu, kromatin dekonpensasyonu ve erkek – kadın pronukleuslarının füzyonunu içerir (27). Tüm bu basamakların gerçekleşebilmesi için normal genetik yapı ve normal çalışan hormonal aks gerekir.

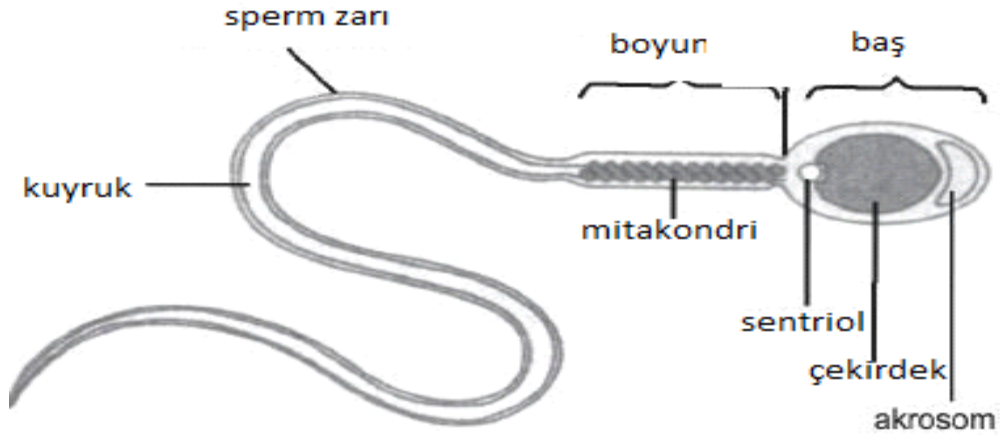
Son 20 yılda erkek üreme sisteminin anlaşılması ve infertilitede erkek faktörün öneminin ortaya konması nedeni ile erkek infertilitesi ve yaklaşımları ile ilgili tedavilerde gelişmeler hızlanmıştır. Hafif fakat önemli erkek faktöründe IUI, daha ağır patolojilerde ise IVF yöntemi gebelik elde etmek için kullanılabilir (28).

2.3.2.1. Spermatogenez

Spermatogenez, primordial germ hücrelerinden sperm üretimidir. Spermatogonyalardan matür sperm oluşması için gereken süre yaklaşık 75 gündür. İnsanlarda her 16 günde bir, yeni spermatogonya kohortu spermatogenez için sıklıkla girmektedir (34).

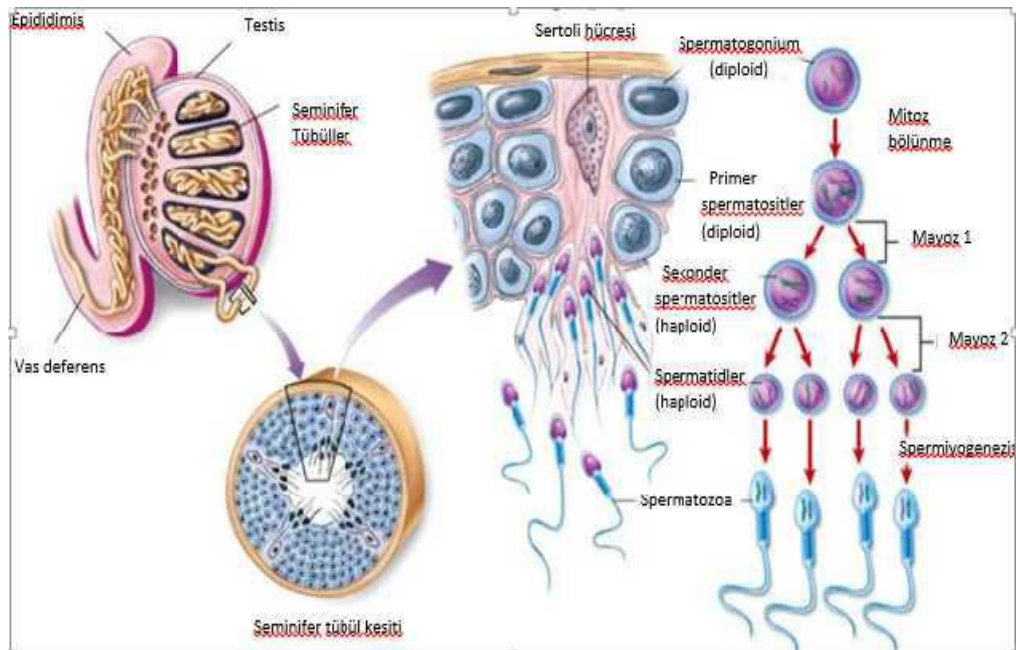
Spermatogenez, doğumdan sonra spermatogonial kök hücrelerin değişimiyle başlayan, kompleks bir farklılaşma sürecidir (30). Spermatogoniumların mitotik çoğalması, spermatosit mayozu ve spermatidlerin haploid diferansiyasyonu olmak üzere üç fazdan oluşur (29). Farklılaşan spermatogonialar (46 kromozomlu) mitoz bölünmelerle sayılarını çoğaltır. Proliferasyon evresinden sonra, spermatositlerin uzun süreli kaldığı, homolog kromozom çiftleri ve sinaps ve homolog rekombinasyonların olduğu 1. Mayoz bölünmenin profaz evresi başlar (31). Daha sonra spermatositler, kardeş kromozomlarına ayrılarak iki hücreye bölünürler ve sekonder spermatositleri üretir. Bu hücreler yine çok hızlı bir şekilde bölünürler ve elde edilen haploid yuvarlak spermatidler, spermiyogenez adı verilen farklılaşma evresini başlatır. Spermiyogenez sırasında, flagellum ve akrozom gibi spermilere özgü yapılar oluşur, bunun yanı sıra nukleus kondanse olur, DNA yapısındaki histonların çoğunun yerini sperm-spesifik protaminleri alır böylece kromatinler kompakt hale gelir (32). Tübüler lümen içine salınan spermatozoalar, spermasyon denilen bu süreçte, son matürasyonun sağlanması ve depo edilmek için epididime giderler (33). Spermatozoalar yaklaşık 10 gün epididimde progresif hareket kazanırlar ve olgunlaşmaya devam ederler (35).

Sperm ejakulasyona kadar epididimiste depolanır. Kadın genital traktusunda kapasitasyon olur ve hiperaktivasyon oluşur (36).



Şekil 2.1. Olgun spermin şematik görüntüsü

Spermatogenezisin hormonal kontrolü, pulsatil olarak salınan, hipotalamik gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) salınımı ile uyarılan, hipofizden salgılanan FSH ve LH ile sağlanır. Hipotalamus, hipofiz, testis aksında negatif feed-back kontrol sistemi vardır. Yüksek serum testosteron düzeyleri GnRH ve LH salınımını baskımlarken, fizyolojik testosteron düzeyleri FSH üzerinde baskılanma yaratmaz. FSH uyarımı ile sertoli hücreleri tarafından salgılanan İnhibin B, hipofizer düzeyde FSH salgılanmasını baskılar (37).



Şekil 2.2. Seminifer tübüllerde spermatogenezis

2.3.2.2. Erkek İnfertilitesi Nedenleri

Erkek infertilitesi 4 ana grupta incelenebilir (28):

- Hipotalamik-hipofizer bozukluklar (pretestiküler bozukluklar, sekonder hipogonadizm) %1-2
- Testiküler Bozukluklar (primer spermatogenez başarısızlığı ve primer hipogonadizm) %30-40
- Posttestiküler Defektler (Sperm transport bozuklukları) %10-20
- İdiyopatik %40-50

Pretestiküler nedenlerden en sık görüleni idiyopatik izole gonadotropin eksikliğidir (38). Pretestiküler nedenler diğerlerine göre infertilite tedavisinde daha iyi prognoza sahiptirler ve sıklıkla medikal olarak tedavi edilirler. Testiküler sebepler sıklıkla gonadal yetmezliğe neden olurlar. Primer gonadal yetmezliğin (hipergonadotropik hipogonadizm) en sık sebebi Klinefelter sendromudur (39). Testiküler sebepler sıklıkla ciddi testiküler hasara neden olur ve hastalar genelde kötü prognoza sahiptirler (28). Posttestiküler nedenler arasında sıklıkları değişken olan kistik fibrozis (%1- 2), Kartagener sendromu gibi genetik kökeni olan patolojiler mevcuttur (40, 41).

Tablo 2.4. Erkek İnfertilite Nedenleri

Hipotalamik Hipofizer Nedenler: -İdiopatik izole gonadotropin eksikliği -Kallmann sendromu (konjenital GnRH eksikliği) -Tek gen mutasyonları (ör. GnRH reseptör, FSH veya hipofizer gelişimi İlgilendiren transkripsiyon faktör defektleri) -Hipotalamik ve hipofizer tümör (ör. Kraniofaringioma, makroadenom) -İnfiltratif hastalıklar (sarkoidoz, histiositozis, transfüzyon siderozis, hemokromatozis) -Hiperprolaktinemi -İlaçlar (GnRH analog, androjenler, östrojenler, glukokortikoidler, opiatlar) -Kronik hastalık veya malnütrisyon -Enfeksiyonlar (ör. meninjit) -Obezite
Primer Gonadal Bozukluklar -Klinefelter sendromu -Y kromozom delesyonu -Tek gen mutasyonları ve polimorfizmler (ör. Androjen, östrojen veya FSH reseptör mutasyonu) -Kriptorşidizm -Varikosel -Enfeksiyonlar (ör. Viral orşit, Lepra, Tüberküloz) -İlaçlar (ör. Alkilleyici ajanlar, alkol, antiandrojenler, simetidin) -Radyasyon -Çevresel toksinler (ör. Sıcaklık, sigara, metaller, organik çözücüler, böcek öldürücüler) -Kronik hastalıklar (Böbrek yetmezliği, siroz, kanser, orak hücreli anemi, amiloidoz, vaskülit, çölyak hastalığı)
Sperm Transport Bozuklukları -Epididimal obstrüksiyon veya disfonksiyon -Konjenital bilateral vaz deferens yokluğu (CFTR mutasyonuna sekonder) -Vaz deferens obstrüksiyonuna neden olan enfeksiyonlar (ör. Gonore, klamidy, tüberküloz) -Vazektomi -Kartagener sendromu (primer silier diskinezi) -Young sendromu -Ejakülatuar disfonksiyon (ör. Spinal kord hastalığı, otoimmün disfonksiyon)

2.3.2.3. Anamnez

Erkek partnerin değerlendirilmesi, kadın partnerle aynı zamanda yapılmalı ve ayrıca dikkatli medikal anamnez ile başlamalıdır. Ve anamnez şunları içermelidir (44).

- İnfertilite Değerlendirmesi:
 - Hastanın geçmişte birini gebe bırakma durumu
 - Başka bir partnerle çocuk yapmayı deneyip denemediği
- Genitoüriner Hikaye
 - Penil veya testiküler hastalık, örneğin inmemiş testis öyküsü varlığı

- Daha önce geçirilmiş herhangi bir genital enfeksiyon varlığı
- Ereksiyonu sürdürmede ya da ejakülasyonda sıkıntı yaşıyor mu?
- Kasık travması öyküsü
- Testisler arası boyut farkı
- Medikal Hikaye
 - Sperm üretimini etkileyebilecek, geçirilmiş yüksek ateşli hastalık ya da kronik hastalık varlığı
 - Hastanın kullandığı ilaçların sorgulanması ve bu ilaçlardan herhangi birinin sperm üretimine veya işlevine olan etkisinin değerlendirilmesi
 - Hastanın genitoüriner yapıları etkileyecek, orşiektomi, inguinal herni onarımı veya vazektomi vb. operasyon öyküsü
 - Sigara, alkol kullanımı
 - Pestisit ya da radyasyon gibi, mesleki maruziyetler
- Aile öyküsü:
 - Ailede infertilite öyküsü varlığı
 - Kaç kardeşi olduğu, kardeşler arası yaş farkı

2.3.2.4. Fizik Muayene

İnfertilite değerlendirmesi bir jinekolog tarafından yapılıyorsa, erkek hastanın ilk değerlendirmesinde anormal bir anamnez varlığı ya da semen analizinde bir problem saptanmazsa, fizik muayene ertelenebilir. Ancak anormal semen analizi ya da anamnezde anormallik, fizik muayene için endikasyon oluşturur ve hasta ürolog tarafından değerlendirilmelidir (61). İnfertil bir erkek için fiziksel muayene aşağıdaki değerlendirmeyi içermelidir (44):

- Genel Muayene:
 - Boy ve kilo; vücut kitle endeksi (VKE) hesaplanmalıdır.
 - Sekonder seks karakterleri açısından değerlendirilmelidir
- Göğüs:
 - Jinekomasti varlığı değerlendirilmelidir.
- Pelvis:
 - Penil gelişim ve üretral meatusun yeri değerlendirilmelidir.
 - Testiküler hacim değerlendirilmeli

- Vaz deferens varlığı ve epididimal endurasyonun değerlendirilmesi yapılmalıdır.
- Endikasyonu varsa, dijital rektal muayene yapılmalıdır.

Dikkatli bir fizik muayene ile erkekte, hipogonadizmi düşündüren ikincil cinsiyet özelliklerinin eksikliği veya obstrüktif azoosperminin bir nedeni olan vaz deferensin yokluğu ortaya konabilir. Her ne kadar, fizik muayene semen analizinden önce başvurulacak bir yöntem olmasa da, klinik öyküde potansiyel bir sorun olduğu zaman veya olası anormal sperm analiz parametrelerinin tersine çevrilebilir nedenlerini araştırmak için oldukça gereklidir (44).

2.3.2.5. Semen Analizi

Semen analizi, erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde; seminifer tübüllerin, epididimlerin ve aksesuar seks bezlerinin fonksiyonel durumu hakkında bilgi veren, en önemli parametredir (62). İdeal semen örneği için 2-5 günlük bir cinsel perhiz süresi gerekir. Perhiz süreleri kısaltıldığında semen volüm ve yoğunluğunda azalma olurken sperm motilite ve morfolojileri değişmez, perhiz süreleri uzadığında ise semen volümünde ve yoğunluğunda artmayla birlikte ölü, hareketsiz ve morfolojisi bozuk olan spermelerde artış olur (64). Semen, mastürbasyon yoluyla bir numune kabına alınabilir veya spermelere karşı toksik maddeler içermeyen özel sperm toplama prezervatiflerinin kullanımı ile toplanabilir. İdeal olarak, numune laboratuarda toplanmalıdır. Numune evde toplanırsa, nakliye esnasında oda veya vücut sıcaklığında tutulmalı ve toplandıktan sonraki 1 saat içinde laboratuarda incelenmelidir. Bazı parametreler incelemedeki gecikmeden etkilenebilir. Örneğin 2 saat sonunda serbest radikal aktivitesi arttığı için motilitede progresif bir şekilde azalma görülür.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2010 klavuzuna göre semen analizinde şu sıralar takip edilmelidir (63).

- **İlk 5 dakika:** Spesimen likefaksiyon için inkübatörde veya uygun ortamda (37 °C) bekletilmelidir.
- **30. ve 60. Dakikalar arası:**
 - Semen likefaksiyonunun ve görünümünün değerlendirilmesi
 - Semen volümünün değerlendirilmesi
 - Semen Ph'sının değerlendirilmesi (gerekliyorsa)
 - Mikroskopik değerlendirme (vitalite, motilite, morfoloji)
 - Sperm sayısının hesaplanması için dilüsyonunun yapılması

- Mixed antiglobulin reaksiyon testinin (MAR) yapılması (gerekiyorsa)
- Peroksidaz pozitif hücrelerin belirlenmesi (yuvarlak hücreler var ise)
- İmmunobead testi için spermatozoaların hazırlanması (gerekiyorsa)
- Semen santrifüjü (biyokimyasal belirteçler taranacaksa)
- **İlk 3 saat içerisinde:** Gerekiyorsa örnekler mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilmelidir.
- **4 saat sonrasında:** Morfolojinin değerlendirilmesi için sürüntülerin hazırlanması
- **Daha sonra veya materyal donduruldu ise birkaç gün sonra**
 - İndirekt immunobead testi yapılması (gerekiyorsa)
 - Aksesuar bez belirteçleri taraması (gerekiyorsa)

Sperm değerlendirmesi, makroskopik ve mikroskopik olarak 2 şekilde yapılır:

Makroskopik Değerlendirme: Makroskopik olarak değerlendirilen parametreler: koagulasyon, likefaksiyon süresi, renk, görünüm, viskozite, hacim ve pH'dır.

Koagülasyon: Ejakülasyon sonrası semenin sıvı halden semisolid hale geçmesidir. Semende bulunan veziküler ve epididimal proteinler nedeniyle koagulasyon olur. Koagülasyonun olmaması durumunda seminal vezikülün veya vas deferensin yokluğundan şüphelenilir (85).

Likefaksiyon (sıvılaşma süresi): Seminal sıvının tekrar sıvı hale geçmesidir. Prostattan sekrete edilen prostat spesifik antijen (PSA) ile veziküler proteinlerin etkileşimi ile gerçekleşir. Koagülasyon sonrası genellikle ilk 15 dakikada görülür. Ancak 60 dakikaya kadar uzayabilir. Nadiren sıvılaşma olmayabilir, mekanik veya enzimatik çözme gerekebilir. Likefaksiyon normal prostat işlevinin göstergesi olarak kabul edilir (86).

Viskozite: Likefiye olan semenden bir pipet ile alınan örnek, yerçekimi etkisiyle damlamaya bırakılır, pipet ile damla arasında oluşan iplikçiğin boyu 20 mm'yi geçmemelidir, geçmesi durumunda artmış viskoziteden bahsetmek mümkündür. Artmış viskozite sperm hareketinde azalmaya neden olur ve yapılan bir çalışmada infertil erkeklerde artmış viskozitenin görülme sıklığı %26,6 olarak bulunmuştur. Viskozite seminal veziküllerin ve prostatın sekretuar aktivitesinin göstergesidir ve artmış viskozite vezikül ve prostat fonksiyon bozukluğunu gösterir. Fonksiyon bozukluğunun pek çok nedeni olabilmekle beraber sıklıkla enfeksiyon ve inflamasyon sorumlu tutulmaktadır (85).

Görünüm: Sıvılaşmadan sonra normal bir örnek homojen ve gri-opak görünümündedir. Cinsel perhiz süresi arttıkça rengi sarımsı renge dönüşür. Normal koku

prostat sekresyonu ile oksidasyonu sonucu oluşur. Normal dışı kokular enfeksiyon göstergesi kabul edilir.

Semen volümü: DSÖ çalışmasına göre ortalama semen volümü 3,7 mL'dir. Semen hacminin çoğunu seminal veziküller oluşturur. Seminal veziküller früktoz içerir ve alkali vasıftadır. Obstrüksiyonunda semen pH değeri düşer, semen früktoz ve sperm içermez. Ejekülatör kanal tıkanıklıklarında, transrektal ultrasonografide dilate seminal veziküllerin gösterilmesi ile tanı konulabilir.

Azoospermi ya da ciddi oligozoospermi ile birlikte olan düşük semen volümleri genital traktusta obstrüksiyon düşündürür. Bu obstrüksiyonlar; vas deferens ya da seminal veziküllerin konjenital yokluğu veya seminal vezikül ile ejakülatör duktusun obstrüksiyonu olabilir.

Normal sperm konsantrasyonu ile birlikte düşük semen volümü muhtemelen sperm toplama hataları sonucu ya da parsiyel retrograd ejakülasyon sonucu oluşur. Ejekülasyon sonucu idrar analizinde sperm görülmesi ile retrograd ejakülasyon tanısı konulur.

Semen pH'sı: Örnek iyice karıştırıldıktan sonra bir damla semen pH kağıdı üzerine konur ve 30 saniye içindeki renk değişimi kalibrasyon çubuğu ile karşılaştırılır. Normal pH, seminal vezikül sekresyonlarına bağlı olarak alkali özelliktedir. Normal bir örnek için alt referans değeri 7,2'dir.

Mikroskopik Değerlendirme

Sperm agregasyonu: Hareketsiz spermilerin birbirleri ile ortamdaki mukus iplikleri gibi debris materyali ile veya sperm dışı hücreler ile yapışması sonucu gözlenebilir.

Sperm aglütinasyonu: Hareketli spermilerin birbirine baş-baş, kuyruk-kuyruk veya karışık olarak yapışarak bir arada bulunmasıdır. Grade 1-4 olarak sınıflandırılır.

Sperm konsantrasyonu: Sperm konsantrasyonu mililitrede bulunan sperm sayısıdır. Makler sayım kamerası ile sayım yapıldığında 10 tane orta boy karedeki toplam sperm sayısı milyon/ml olarak kaydedilir. Aynı sayım dört kez 10 farklı karede tekrarlanır ve ortalaması alınır. Normal bir semende alt referans değeri $15 \times 10^6/\text{ml}$ 'dir (69). Bu değerin altındaki sperm konsantrasyonları kötü fertilite prognozu ile ilgili iken $15 \times 10^6/\text{ml}$ üzerindeki konsantrasyonun fertilite prognozunu arttırdığına dair kesin kanıtlar yoktur (72). Bazı kaynaklara göre ise de konsepsiyon ihtimali konsantrasyon $40-50 \times 10^6/\text{ml}$ olana dek artar, üzerinde ise değişmez (70,71). Konsantrasyon $5 \times 10^6/\text{ml}$ altında ise ciddi oligozoospermi olarak adlandırılır. Ciddi oligozoospermide endokrinolojik ve genetik tarama yapılmalıdır.

Total sperm sayısı: Tüm ejakulattaki toplam sperm sayısıdır ve alt referans değeri 39×10^6 'dır. Sperm konsantrasyonunun total hacim ile çarpımından elde edilir. İlk mikroskopik incelemede sperm hücresi görülmemiş ise tüm ejakulat 3000g ile 15 dakika santrifüj edilerek dip kısımdan (pellet) damlalar yapılarak lam-lamel arası incelenir, sperm hücresi görülürse (kriptozoospermi), toplam sayı, hareket ve belirgin bir morfolojik özelliği varsa kaydedilir. Tüm pellette sperm hücresi görülememişse azoospermi olarak adlandırılır. Sperm yokluğu en az iki incelemede ispatlanmalıdır.

Sperm motilitesi: Motilite, kuyruk hareketi olan spermelerin yüzdesidir. Likefaksiyondan sonra 1 saat içinde yapılmalıdır. Sperm hareketleri 5 skalaya ayrılır (65);

- 0- Hiç motilite yok,
- 1- İleri progresyon göstermeyen, tembel hareket,
- 2- Yavaş, doğrusal olmayan, dolambaçlı ileri hareket,
- 3- Oldukça doğrusal ama orta hızda hareket,
- 4- Doğrusal ve hızlı hareket.

Alternatif bir sistemle sperm hareketi 4 kategoride ele alınır;

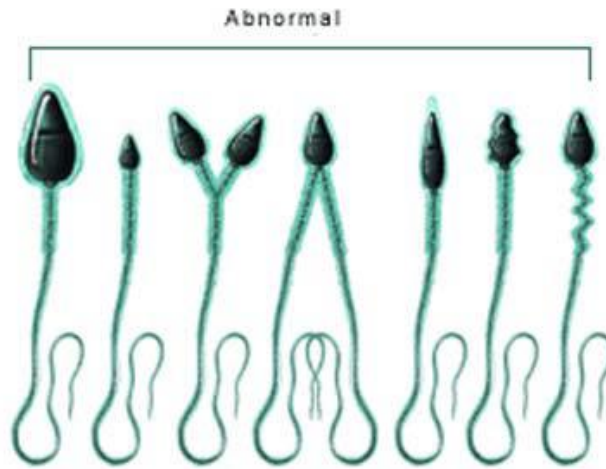
- A- İleri hızlı hareket,
- B- Yavaş ya da tembel ileri hareket,
- C- İleri olmayan hareket,
- D- Hareket yok.

Bu sisteme göre her bir kategoriye giren sperm yüzdesi değerlendirilir. DSÖ'ye göre 'a+b'nin %40'ın üstünde, sadece 'a'nın ise %32'nin üzerinde olması gerekmektedir (66). Hareket bozukluğu (astenospermi), motilitede veya ileri harekette ya da her ikisinde de azalmayı belirtir. Bu hastalarda spermatozoanın yapısal anomalileri, uzamış cinsel perhiz süresi, genital enfeksiyonlar, anti-sperm antikorlar, varikosel, parsiyel duktal obstrüksiyon ve idiopatik faktörler sorumlu olabilir.

Tablo 2.5. DSÖ Sınıflamasına Göre Normal Semen Parametreleri (66)

Parametre	Referans Aralığı
Hacim	1,5 ml (1,4–1,7)
Toplam sperm sayısı	39×10^6 (33–46)
Sperm konsantrasyonu	$15 \times 10^6/\text{ml}$ (12–16)
Toplam motilite	% 40 (38–42)
İleri doğrusal motilite	% 32 (31–34)
Canlılık	% 58 (55–63)
Sperm morfolojisi	% 4 (3–4)

Sperm morfolojisi: Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi için spermin boyanması gerekmektedir. Boyama için en sık kullanılan yöntemler ‘Papanicolau’ yöntemi ve ‘Diff-Quick’ yöntemidir. Sperm morfolojisi değerlendirilirken en fazla kullanılan kriterler DSÖ kriterleri ve Kruger’in strict kriterleridir (67). Spermin normal olarak kabul edilmesi için spermin baş, boyun, orta kısım ve kuyruğunun normal olması gerekmektedir. Spermde normal morfolojiye sahip olan spermelerin oranı Kruger’in strict kriterlerine göre $\geq 14\%$, WHO’ya göre $> 4\%$ olmalıdır. Semen analizindeki normal değerler fertilitiyi sağlamak için gereken minimum değerler değildir. Bu değerler dışında da erkek fertil olabilir. Ancak, sperm parametreleri normal aralıklarda olanlar da infertil olabilirler (68).



Şekil 2.3. Spermin morfolojik değişiklikleri

Sperm canlılığı: Sperm hücre membranı bütünlüğünün değerlendirilmesi esasına dayanır ve progresif hareketli sperm oranı $<40\%$ olduğu durumlarda sperm canlılık testleri özellikle önem kazanır. Eozin-nigrosin veya eosin-Y testinde membran bütünlüğü bozulmuş sperm boyayı alırlar ve boyalı olarak gözlenirler, hipoozmotik şişme (HOS) testinde ise membran bütünlüğü olan sperm hipoozmolar sıvıyı hücre içine alarak şişerler ve kuyrukları kıvrık izlenir. Sperm canlılığı için en az 200 sperm hücresi sayılmalıdır. Sperm canlılığı testleri en düşük referans değeri 58% 'dir.

Sperm dışı hücreler: Ejakulatta genitoüriner sisteme ait epitelyum hücreleri, immatur germinal hücreler ve lökosit hücreleri gözlenebilir. Lökosit dışında olanlara yuvarlak hücre de denir. Normal ejakulatta yuvarlak hücre ve lökosit sayısının $<1 \times 10^6/\text{ml}$ olması gerekir, yuvarlak hücre artışı saptanırsa lökosit peroksidaz testi veya lökosit belirteçleri çalışılmalı, lökosit olup olmadıkları tanımlanmalıdır.

Standart semen analizi normal değer sınırlarının dışında olan bazı semen anormallikleri aşağıdaki şekilde tanımlanır:

- Aspermi: Ejakulata olmaması, semen üretme başarısızlığıdır.
- Hipospermi: Ejakulat hacminin $<1,5 \text{ mL}$ olmasıdır (73).
- Hiperspermi: Ejakulat hacminin $>5,5 \text{ mL}$ olmasıdır (73).
- Hematospermi: Ejakulatta kan görünümü olarak tanımlanmaktadır.
- Lökositospermi: DSÖ tanımlamasına göre ejakulatta $1 \times 10^6/\text{ml}$ peroksidaz pozitif lökosit varlığıdır (74,75).
- Azoospermi: Ejakulatta sperm olmamasıdır.
- Oligospermi: Ejakulatta $<15 \times 10^6/\text{mL}$ sperm olmasıdır.
- Polispermi: Ejakulatta $>250 \times 10^6/\text{mL}$ sperm olmasıdır.
- Asthenospermi: Hareketliliğin ve/veya ileri doğru hareketliliğin zayıf olması
- Teratospermi: anormal morfolojisi olan sperm varlığı ile karakterize olan bir durumdur (normal şekil yüzdesi $<4\%$ kruger).
- Nekrospermi: Supravital boyama ile tüm spermilerin ölü olmasıdır.
- Globospermi: Yuvarlak başlı akrozomsuz sperm olmasıdır.

Standart semen analizi parametrelerinin hiçbirisi spermin fertilizasyon kapasitesini göstermede spesifik değildir ve standart semen analizi kesin fertil - infertil ayırımında yetersiz kalabilmektedir. Bu nedenle sperm fonksiyon testlerine ihtiyaç duyulmaktadır (76).

2.3.2.6. Sperm Fonksiyon Testleri

Sperm fonksiyon testleri, DSÖ tarafından araştırma testleri olarak kabul edilir ve spermin fertilizasyon potansiyelini in vitro olarak öngörülmesini amaçlar (76).

Bilgisayar yardımlı sperm analizi: CASA (computer assisted sperm analysis), kapasitasyon süresince spermin kazanmış olduğu hızlı spiral hareket paterni ve hiperaktivasyonunun yanı sıra sperm konsantrasyonunun, motilitesinin ve morfolojisinin değerlendirilmesinde kullanılabilmektedir (77).

Akrozom Reaksiyonu: Akrozom, proteolitik enzimler içeren spermin baş bölgesindeki membrana bağlı, zona pellusida penetrasyonu için gerekli bir yapıdır. Akrozin bu proteolitik enzimlerden biridir. İnfertil erkeklerde prematür spontan akrozom reaksiyonu vardır, bu da zona pellusidada penetrasyon bozukluğu yapar (78).

Zona pellusida bağlanma testi: Zona pellusida (ZP); fertilizasyonun kontrolünde temel rol oynar. Spermatozoanın zona pellusidaya ZP3 reseptörü ile bağlanması akrozom reaksiyonunu tetiklemektedir (79), bu bağlanma akrozom reaksiyonunun tek fizyolojik uyarandır. Oosit fertilizasyonu için sperm mutlaka ZP'deki türe spesifik reseptörleri tanımalı ve bağlanmalıdır.

Zona pellusida bağlanma testi olarak sıklıkla kullanılan iki test vardır; 'Hemizona assay' ve 'competitive intact zona binding assay' (77). Her iki testte insan oosit bulma zorluğundan dolayı, erkek infertilite değerlendirmesinde çok kullanılmamaktadır.

Hamster oosit penetrasyon testi: İnvivo ve invitro fertilizasyon başarısını göstermede belirleyici test olarak kullanılır (80). Test spermatozoanın kapasitasyonu, akrozom reaksiyonu, oolemmayı penetre etme yeteneğini ve oositle füzyonunu değerlendirmektedir.

Hipo - osmolar şişme testi (HOST): Su geçirgenliği tüm hücre membranlarının önemli fizyolojik özelliğidir. Membranlar sıvı ve moleküllerin seçici geçirgenliğine izin verir. Fertilizasyon süresince önemli fonksiyonel rol oynayan sperm membranı HOS testi ile değerlendirilebilir. Semen örneğinde şişen sperm sayısı ile kapasitasyonunu tamamlamış çıplak hamster oositine penetre olan sperm sayısı arasında ilişki izlenmiştir. HOS testi canlı spermatozoanın orta şiddetli hipootmotik strese canlı kalma yeteneğine dayanır. Ölü spermatozoaların membranları intakt olmadığından şişemezler. HOS reaksiyonu olan hücreler şişme miktarına ve kuyruk kıvrılmalarına göre A-G arasında sınıflanırlar. 200 sperm sayısına ulaşıncaya kadar raporlanırlar. %60'ın üzerinde HOS reaksiyonu olan sperm normal kabul edilir. %50'nin altında kuyruk kıvrılması anormal

kabul edilir. %50 ile 60 arası ara değer kabul edilir. HOS sperm canlılığının ek göstergesi olarak ve immotil silya sendromunun tanısında kullanılabilir (77, 81).

Reaktif oksijen radikalleri: Oksidatif stres, erkek infertilitesinin çeşitli etyolojilerinde en önemli mediatörlerden biridir; DNA hasarı da dahil olmak üzere spermilere karşı birçok zararlı etkiye sahiptir. Oksidatif stres; ROS ve diğer serbest radikal seviyeleri büyük oranda arttığında veya oksitleyici maddeler ile antioksidanlar arasındaki hassas denge bozulduğunda ya da antioksidan seviyeleri önemli ölçüde düştüğünde meydana gelir. Oksidatif stresin azaltılması, erkek infertilitesi için potansiyel bir tedavi stratejisini oluşturur. Seminal oksidatif stres ölçümü, tedaviden fayda sağlayabilecek hastaların belirlenmesinde ve izlenmesinde kritik bir role sahiptir (82).

Mitokondriyal aktivite testleri: Spermatozoa, flajellar hareketi için gereken enerjiyi spermatozoanın orta bolmnde bulunan mitokondrilerde üretilen adenozin trifosfattan (ATP) sağlar. Spermatozoa kadın genital traktusunda, oosite ulaşıncaya kadarki hareketi süresince gerekli ATP'yi sağlayabilecek yeterlilikte mitokondriyal aparata ihtiyaç duyar. Mitokondriyal oksido-redüktaz enzimin gösterilmesinde kullanılan nitro blue tetrazolium ve benzeri indikatörler vardır. Bu indikatörlerle hareketli, bol mitokondrili spermilerin orta kısmı belirgin boyanırken, hareketsiz ve az mitokondri aktivitesi olan spermiler ya hiç boyanmaz ya da az boyanırlar. Boyanmalarına göre mitokondriyal aktiviteleri ve sperm hareketleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki gösterilmiştir (77).

DNA hasarı testleri: DNA bütünlüğü normal embriyo gelişimi için önemlidir. Sperm DNA bütünlüğü kısmen nucleusta kromatin kondensasyonunu sağlayan protaminler arasındaki disülfit çapraz bağlarının etkisi ile korunur. Sperm DNA hasarı, protamin eksikliği ve mutasyonlar gibi i faktörlerin bir sonucu olarak olabileceği gibi, ısı, radyasyon ve gonadotoksin gibi ekstrinsik faktörlerden de kaynaklanabilir. "DNA fragmentasyonu" terimi, tamir edilemeyen denatüre edilmiş veya hasar görmüş sperm DNA'sını ifade eder. Sperm DNA fragmentasyon oranlarını ölçmek için çeşitli klinik testler geliştirilmiştir (60). Yıllar geçtikçe, sperm DNA bütünlüğünü değerlendirmek için geliştirilen testler artmaktadır. DNA bütünlüğünün değerlendirildiği bu testlerde mekanizma çeşitlilik göstermektedir; bazı testler doğrudan DNA sarmalındaki kırıkları ölçerken, bazı testler sperm kromatin yapısındaki anormallikleri gösterir (87). Erkek germ hücrelerinde DNA hasarının kötü semen kalitesi, preimplantasyonel gelişimde bozulma, abortus riskinde artma ve infertilite ile ilişkili olduğu görülmektedir (88).

1. Nükleer kromatin dekonkonsasyon testi: DNA miktarının yarısına sahip olmasına rağmen sperm hacmi normal ökaryotik bir hücrenin 1/30'u kadardır. Hacimdeki azalma nedeniyle DNA paketlenmesi oldukça zor bir süreçtir. Fertilizasyon öncesi spermatozoanın kromatini yüksek derecede kondanse halde bulunur. Uygun nükleer kromatin dekonkonsasyonu ve takiben pronukleus oluşumu fertilizasyon için gereklidir. Spermatozoada kromatinin yüksek derecede kondanse halde bulunmasının sebebi histonlar arasındaki S-S bağlarıdır. Bağlar arasındaki ayrılma in vitro olarak EDTA (etilendiamintetraasetik asit) veya glutatyon ile uyarılabilir. Bu şekilde uyarılan dekonkonsasyon, spermatozoanın iyi fertilizasyon yeteneğinin göstergesidir. Yüzde 70'ten fazla spermin nükleer dekonkonsasyon göstermesi normal kabul edilir (84).

2. DNA fragmentasyon indeksi: 'TUNEL (terminal deoksinukleotidil transferaz mediated deoksiuridin trifosfat) assay', SCSA (sperm chromatin structure assay), 'sperm kromatin dağılımı' veya 'comet assay' ile DNA fragmentasyonu ile DNA hasarı direk olarak değerlendirilebilir. DNA fragmentasyonu olan sperm yüzdesi ile normal sperm morfolojisi ve hareketi arasında negatif ilişki gösterilmiştir. DNA fragmentasyonuna neden olabilecek etkenler; ileri erkek yaşı, genetik nedenler, çevresel toksinler, endokrin bozukluklar, alkol sigara ve diyet olabilir.

2.3.2.7. Endokrin Testler

Hipotalamik-pituitar testiküler eksenin hormonal anormallikleri iyi bilinir, ancak erkek infertilitesinin yaygın nedenlerinden biri değildir. Normal sperm parametrelerinde endokrin bozukluklar oldukça nadirdir.

Bir endokrin değerlendirme şu durumlarda yapılmalıdır:

- 1) Özellikle sperm konsantrasyonu 10×10^6 / ml'nin altında olduğunda
- 2) Cinsel fonksiyon bozukluğu varlığında
- 3) Spesifik bir endokrinopati düşündüren klinik varlığında

Başlangıç hormonal değerlendirmede, serum FSH ve serum testosteron düzeylerine bakılır. Testosteron seviyesi düşükse, total ve serbest testosteron için tekrarlanan bir ölçümün yanı sıra serum LH ve prolaktin düzeylerinin saptanması gerekir. Testosteron, LH, FSH ve prolaktin ilişkisi, klinik durumu tanımlamaya yardımcı olur. Anormal spermatogenez olan birçok erkekte serumda FSH normaldir, ancak serum FSH'sında belirgin yükselme, spermatogenezde bir anormalliğin açık bir göstergesidir (89).

2.3.2.8. Biyokimyasal Testler

Seminal plazma; seminal veziküllerin ve prostat bezinin kendilerine özgü çeşitli sekresyonlarından meydana gelir. Sekresyonlarında bezlerin kendilerine özgü varlığını, yokluğunu, fonksiyon bozukluğunu veya enfeksiyonunu gösteren karakteristik markerları vardır. Bu spesifik markerların sperm fonksiyonları ile ilişkisi tam olarak aydınlatılamamıştır (77). Klinik kullanımı nadirdir.

2.3.2.9. Anti-Sperm Antikorları

Antisperm antikorları (ASA), erkeklerde infertilitenin seyrek bir nedeni olup, rutin test gerektirmez ve bunlarda başvurulacak tedavi yöntemi ICSI'dir. ASA testi, semen analizinde normal sperm konsantrasyonunda izole asthenospermi tespit edildiğinde veya sperm aglütinasyonu varlığında yapılır. ASA'lar serumda, seminal plazmada veya doğrudan sperme bağlı olarak bulunabilir. ASA'lar kan testis bariyer bütünlüğü bozulup, bağışıklık sistemi çok miktarda sperm antijenlerine maruz kaldığında veya vazektomi sonrasında oluşabilir. ASA oluşumu için risk faktörleri travma, torsiyon, biyopsi, orşit, testis kanseri ve vazektomidir. Sperme karşı oluşan antikorlar sperm motilitesini etkiler, fertilizasyonu bozar. İndirekt antikor aglütinasyon testleri, serumda veya seminal plazmada ASA tespit etmek için kullanılırken, sperm başı veya kuyruğuna bağlı ASA (IgG ve IgA) tespiti için doğrudan immünobead testi kullanılır (60).

2.3.2.10. Genetik Testler

Genetik anormallikler, sperm üretimini veya transportunu etkileyerek infertiliteye neden olabilir. Erkek infertilitesiyle ilişkili olduğu bilinen en yaygın üç genetik faktör;

1) Vas deferens'in konjenital yokluğu ile ilişkili kistik fibrozis (KF) gen mutasyonları; Konjenital olarak bilateral vas deferens yokluğu, hemen hemen tüm kistik fibrozis gen mutasyonu (CFTR) olan hastalarda bulunur. Konjenital olarak bilateral vas deferens yokluğu olan hastaların üçte ikisinde diğer KF klinik bulguları olmadan gen mutasyonu görülür. Bu nedenle bu tip hastalar CFTR gen mutasyonu açısından değerlendirilmelidir. CFTR gen mutasyonu olan erkek partnerin spermeleri tedavi için kullanılmadan önce kadın partnerin genetik taraması da yapılmalıdır (83).

2) Testiküler fonksiyon bozukluğuna neden olan kromozom anomalileri; Azoospermik erkeklerin %10-15'inde, oligospermik erkeklerin %5'inde, normospermik erkeklerin %1'inden azında kromozomal anomali bulunur (90).

3) İzole spermatogenik bozukluk ile ilişkili Y-kromozom mikro-delesyonları; Azoospermi veya oligospermisi olan erkeklerin %10-15'inde Y kromozomu mikrolelesyonu bulunur (91). Obstrüktif tip olmayan azoospermik erkeklere ve oligozoospermik erkeklere tedavi öncesi karyotip ve Y kromozomu için genetik test mutlaka önerilmelidir.

2.4. Erkek İnfertilitesinde Tedavi

Kadın kaynaklı infertilitenin aksine, primer erkek infertilitesinde medikal tedaviye cevap sınırlıdır. Yıllardır, erkek faktör kaynaklı infertilitenin yönetimi ve tedavisi kanıta dayalı olmaktan ziyade deneyime dayalı olmuştur (92).

A) Medikal tedavi: Patoloji hipotalamus ve hipofizde ise (prolaktinoma, Kallmann Sendromu, izole gonadotropin eksikliği vb.) yani hipogonadotropik hipogonadizm grubunda medikal tedavinin fertilité üzerine katkısı büyüktür (78). Fakat hipergonadotropik hipogonadizmi olan olgularda testiküler yetmezlik vardır. İnfertil erkeklerde semen kalitesinin ve fertilitenin herhangi bir medikal tedavi ile düzeltilebileceğine dair bir kanıt yoktur (78).

Ögonadotropik-hipogonadizmi olan grupta ciddi oligozoospermisi, anormal derecede düşük testosteron düzeyi olan erkeklerde androjen tedavisi ve aromataz inhibitörleri ile semen kalitesi artırılabilir (93,94).

Retrograd ejakulasyon gibi özel sebepler gösterilmiş erkek infertil hastalar semptomimetikler gibi medikal tedavilerden fayda görebilirler, ayrıca gösterilmiş genital enfeksiyonu olan hastalarda lökositospermi de medikal tedaviye yanıt verir.

B) Cerrahi tedavi: Obstrüktif azospermi veya varikoselin kötü etkilerine maruz kalmış erkek grubunda özel cerrahi yöntemlerin (vazovazostomi, vazoepididimostomi, ejakulatuar kanalların transüretal rezeksiyonu, varikosel onarımı) önerilmesi hala geçerlidir. Hasta seçimi özenle yapılmalıdır (95,96).

Erkek infertilitesi çoğunlukla idiopattiktir, birkaç önemli ve özel istisna dışında erkek infertilitesi genelde medikal tedaviye cevap vermez (78). Spesifik tedavilerin endike olmadığı veya başarısız olduğu durumlarda, yardımcı üreme teknikleri (YÜT), erkek faktör infertilitesinde popüler tedaviler haline gelmiştir. YÜT, fertilizasyon olasılığını artırmak için, spermatozoanın fonksiyonel bozuklukları nedeniyle aşamayacağı bazı basamakları aşmaya yardım ederek, spermatozoayı oosite yaklaştırmayı ya da oositin içerisine yerleştirmeyi amaçlar. YÜT'leri erkek infertilitesinde en popüler tedavi yöntemleridir (92).

2.5. Yardımcı Üreme Teknikleri

Yardımcı üreme tekniklerinin çoğu, infertil çiftlerin çocuk sahibi olmalarına yardımcı olmak için, laboratuvar şartlarında konsepsiyonu kolaylaştırmaya yarayan yöntemlerdir. En yaygın kullanılan YÜT'ler, intrauterin inseminasyon (IUI), in vitro fertilizasyon (IVF) ve intrasitoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI)'dir (99). YÜT'e hazırlık için erkekten spermatozoa alınması gereklidir. Semen toplanır ve en hareketli sperm, yıkama sonrası swim-up veya dansite gradiyent santrifüj teknikleri ile seçilerek hazırlanır. IUI için, ovulasyon döneminde, spermatozoa uterusu insemine edilir. IVF ve ICSI için, overlerde folliküler gelişim uyarıldıktan sonra, primer oosit evresinde, oositler toplanır. İmplantasyon için birden çok embriyo elde etmek için birden fazla oosit toplanır. Daha sonra IVF veya ICSI'yi tamamlamak için sperm ve oosit kullanılır (66).

2.5.1. İntrasitoplazmik Sperm İnjesiyonu (ICSI)

ICSI tekniği öncelikle sperm motilitesinin veya morfolojisinin spermatozanın zona pellusidayı geçmesini sağlayamadığı durumlarda, fertilizasyona yardımcı olmak için geliştirilmiştir. Bu teknik, oositin fertilizasyonuna yardımcı olmak için doğrudan oosit sitoplazmasına bir spermatozoon enjekte etmeyi içerir (100).

ICSI ise spermatozoanın doğal konsepsiyonda karşılaştığı zorluklarla artık karşılaşmaması ve doğal seleksiyonunun olmaması nedeniyle, endişe yaratmaktadır. Doğal seleksiyon bu yöntemde engellendiğinden, başarılı bir hamilelik gerçekleşmesi için iyi bir DNA'ya sahip, canlı bir spermatozoanın oositin içine enjekte edilmesi gerekir (101). Doğal yollarla sperm seçimi olmadığından doğru spermi seçmek büyük önem taşır.

2.5.2. ICSI Tedavisinde Sperm Seçimi ve Önemi

İnfertilitenin tedavisinde uzun yıllar YÜT'ün yaygın olarak kullanılmasına rağmen, canlı doğum oranları nispeten düşük kalmaktadır(97). Hastalık kontrol merkezine (Center for Disease Control- CDC) göre, birçok YÜT siklusunun yalnızca üçte biri canlı doğumla sonuçlanırken, neden bu kadar çok inseminasyon girişiminin fertilizasyon ile sonuçlanmadığı belli değildir (98). İnfertil erkekler, düşük sperm konsantrasyonu, zayıf motilite, anormal morfoloji ve yüksek sperm DNA hasarı seviyeleri gibi anormal sperm parametrelerine sahip olma eğilimindedirler. Kapasitasyon, hiperaktivasyon ve akrozom reaksiyonu gibi temel sperm fonksiyonları için düşük ROS konsantrasyonları gereklidir ve aşırı ROS üretimi genellikle antioksidanlar tarafından kontrol edilir (103). Bununla birlikte, yüksek ROS seviyesi ve azalmış antioksidan seviyeleri oksidatif strese neden

olabilir, bu da sperm hareketliliğini, DNA bütünlüğünü ve yaşayabilirliğini azaltır. DNA bütünlüğündeki azalma, IVF ile elde edilen gebelik oranlarında azalma, implantasyon öncesi gelişim anormalliklerinde ve erken gebelik kaybında artma ile sonuçlanır (103).

Vajinaya dökülen milyonlarca spermden yalnızca çok küçük bir kısmı oosite ulaşabilir. Bu kadın genital yollarında doğal yollarla oluşan, çok sıkı ve mükemmel bir eleme sistemidir. Spermilerin vajinaya ulaşmasıyla vajinal mekanik stimülasyonlar spermilerin yüzme hareketine destek olarak spermeleri uterus ve tubalara doğru yönlendirir. Depolama alanına ulaşan spermier burda kapasitasyon adı verilen matürasyona uğrarlar. Kapasitasyon sonrası matüre olan spermier oosite doğru kemotaksi ve termotaksi ile ilerler. Kemotaksi sonucunda spermier kümülüs hücrelerine penetre olur, oositteki sperm reseptörlerine bağlanır ve akrozom reaksiyonu başlar. Bunun sonucunda da fertilizasyon sağlanır (102).

Günümüzde YÜT için sperm seçimi teknikleri, doğal seleksiyon engellerini atlamakta ve DNA bütünlüğü, ROS üretimi, membran olgunlaşması ve apoptotik olmayan sperm seçimi gibi diğer önemli faktörleri ihmal ederek başlıca motilite ve morfolojiye dayanarak, sperm seçmektedirler (104). Ek olarak, dansite gradient santrifüjleme (DGS), konvansiyonel yüzme (CSW) ve direkt yüzme (DSW) gibi geleneksel sperm seçme yöntemleri, çeşitli santrifüj basamaklarını kullanarak, yüksek seviyede ROS oluşumuna sebep olur, böylece oluşan oksidatif stres sperm DNA'sına zarar verir (105). Klinik veriler DNA fragmentasyon indeksinin %30'un üzerinde olmasının, hem doğal hem de yapay yollardan konsepsiyon şansını azalttığını göstermiştir (106).

Ayrıca fertilize oositler DNA tamir mekanizmalarına sahipken, spermatozoalarda DNA tamir mekanizması yoktur, bu nedenle spermiyogenez sonrası DNA kırıklarını onaramaz (106). Bu nedenle, normal DNA ve daha az ROS içeren spermier seçmek, YÜT başarı oranlarını iyileştirmek için, var olan sperm seçim yöntemlerini geliştirmenin yanı sıra yeni yöntemler bulmak gerekmektedir. Yeni sperm seçme yöntemleri, sağlıklı spermierin seçilmesini sağlamak için kadın genital traktusunun doğal seçiciliğini yakından taklit etmelidir.

2.5.2.1. Konvansiyonel Sperm Seçme Teknikleri

Geleneksel sperm seçme teknikleri, çoklu yıkama ve santrifüj basamaklarını içerir. En sık kullanılan konvansiyonel sperm seçme yöntemleri dansite gradiyent santrifüj (DGS), konvansiyonel swim-up (CSW) ve direkt swim-up (DSW) olarak sıralanabilir.

Dansite Gradyent Santrifüj (DGS) Tekniği: iyi kalitede spermilerin seçilmesini, spermilerin diğer hücre tipleri ve hücre döküntülerinden ayırt edilebilmesini sağlayabilir. Swim-up tekniğine göre standardize edilmesi daha kolay olduğu için, daha tutarlı sonuçlar vermektedir. IVF ve ICSI için sperm eldesi amacıyla bu teknik kullanılır. Bu yöntem, dansite gradyanlarına göre seminal plazmanın santrifüjlenmesini kullanır. Bu yöntemde, kolloidal silika kaplı silan içeren dansite gradyanları, hücreleri dansitelerine göre ayırır. Ayrıca, hareketli spermier yüzerek gradyan materyali içinden geçip tüpün dibinde yumuşak bir pellet oluşturur. En yaygın biçimde kullanılan basit iki aşamalı kesintili dansite gradyan hazırlama yöntemi, tipik olarak % 40 (v/v) dansiteli üst katman ve % 80 (v/v) dansiteli alt katmandan ibarettir. Dansite gradyanı santrifüjlemesi kullanarak hazırlanan sperm preparatları; genellikle hücre döküntüleri, kontamine edici lökositler, germ dışı hücreler ve dejeneratif germ hücrelerinden arınmış yüksek derecede hareketli spermierin elde edilmesini sağlamaktadır (66).

Direkt Swim-up (DSW) Tekniği: Spermier seminal plazmadan dışarı, kültür medyumu içine yüzmeye yetilerine göre seçilebilir. Bu yaklaşım yüzdürme (“swim-up”) tekniği olarak bilinmektedir. Bu tekniğin uygulanmasından önce semen, tercihen seyreltilmemeli ve santrifüjlenmemelidir. Aksi halde, sperm membranlarında peroksidatif hasara yol açılabilmektedir (107). O halde, hareketli spermier ayırt etmede direkt yüzdürme tekniği tercih edilen bir yöntemdir. Kültür medyumunu likefiye olmuş semen üzerine veya sıvılaşmış semeni kültür medyumunun altına bir tabaka halinde yayarak direkt yüzdürme tekniği gerçekleştirilebilir. Daha sonra, hareketli spermier kültür medyumu içine doğru yüzerler. Bu prosedür, yıkama yöntemine göre daha az sayıda sperm eldesi sağlarsa da, spermier arasında motiliteye göre seçim yaptığı için semendeki hareketli sperm yüzdesinin düşük olduğu durumlarda (örn. IVF ve ICSI için) yararlıdır (66).

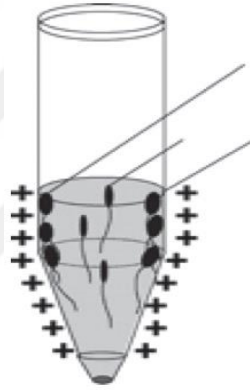
Konvansiyonel Swim-up (CSW) Tekniği: Konvansiyonel swim-up tekniğinde inkübasyon öncesi spermier santrifüj edilerek çöktürülür. Ardından üst tarafta yüzen 1 ml’lik kısım pipetle alınarak kullanılır. Tamamen sperm hareketliliğine bağlı bir yöntemdir. Astenozoospermi ve oligozoospermi vakalarında uygun olmayabilir. Bu nedenle şiddetli erkek infertilitesi vakalarında kullanımı kısıtlıdır.

Konvansiyonel yöntemler motil ve morfolojik olarak normal spermier seçmede oldukça başarılı olsalar da, sperm DNA bütünlüğü, membran matürasyonu, ayrıntılı yapısal özellikleri ve apoptotik olmayan spermier seçmede yetersizlerdir (108).

2.5.2.2. İleri Düzey Sperm Seçme Teknikleri

Zeta Potansiyeli: Spermin zeta potansiyeli, sperm zarı ve çevresi arasındaki elektriksel potansiyeldir ve yaklaşık -16 mV ile -20 mV'dir. Bu yöntemde; pozitif yüklü santrifüj tüpünün içine, yıkanmış olan sperm örneği pipetle alınır, lateks bir eldiven kullanılarak, 2–3 kez tüp içinde hafifçe karıştırılır. Bir dakika sonra, tüp santrifüj edilir, tüp kenarına yapışmayan sperm ve diğer hücreler uzaklaştırılır (Şekil 2). Zeta metotta, bir elektroforez ekipmanına ihtiyaç duyulmadığından ucuz ve yapılması kolaydır. Zeta işlemi, dondurup-çözülen sperm örneklerinde de başarılı olarak uygulanmıştır (109). Fakat düşük sperm sayısının olduğu oligozoospermik örneklerde başarısı sınırlıdır.

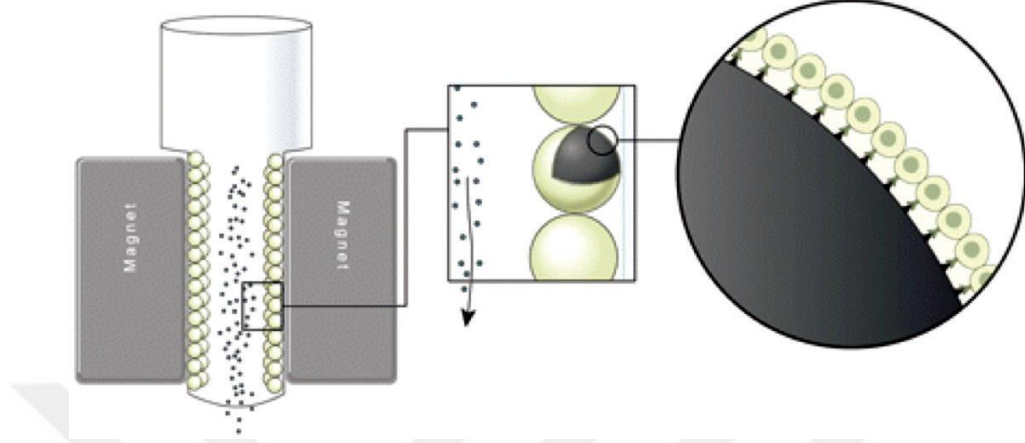
Elektroforetik yöntemler, DGS yöntemi ile karşılaştırıldığında, elde edilen spermelerin maturite, morfoloji ve DNA bütünlüğünün yüksek, motilitesinin ise düşük olduğu gözlenmiştir (109, 110).



Şekil 2.4. Zeta potansiyeli ile spermin ayrıştırılması

Manyetik Aktive Sperm Seçimi (Magnetic-Activated Cell Sorting System) (MACS): Sperm membranının dış yüzeyinde bulunan fosfatidilserinin (PS), eksternalizasyonu erken apoptozisin bir özelliğidir. Bu yöntemde bir MACS kullanılarak, apoptotik olmayan sperm seçimi sağlanır (111). PS'nin eksternalizasyonu durumunda, Anneksin V ile bağlı paramagnetik mikrobeadlere bağlanarak apoptotik spermelerin işaretlenip ayrılması sağlanır. İlk başta heterojen bir sperm hücre konsantrasyonu Anneksin V-konjuge mikrobeadlerle inkübe edilir, sadece eksternalize PS'li apoptotik sperm bu beadlere bağlanır. Bead/sperm karışımı içine bir mıknatıs yerleştirilmiş MACS kolonundan geçirilir. Bu mıknatıs, kolonun iç kısmında mikrobeadlerle işaretli hücrelerin tutulmasını, işaretlenmemiş hücrelerinde akıp giderek uzaklaştırılmasını sağlamaktadır (112). MACS

ile lökositler ve germ hücreleri uzaklaştırılmadığından, bu teknik DGS ile kombine uygulanmaktadır (113) (Şekil 2.5).

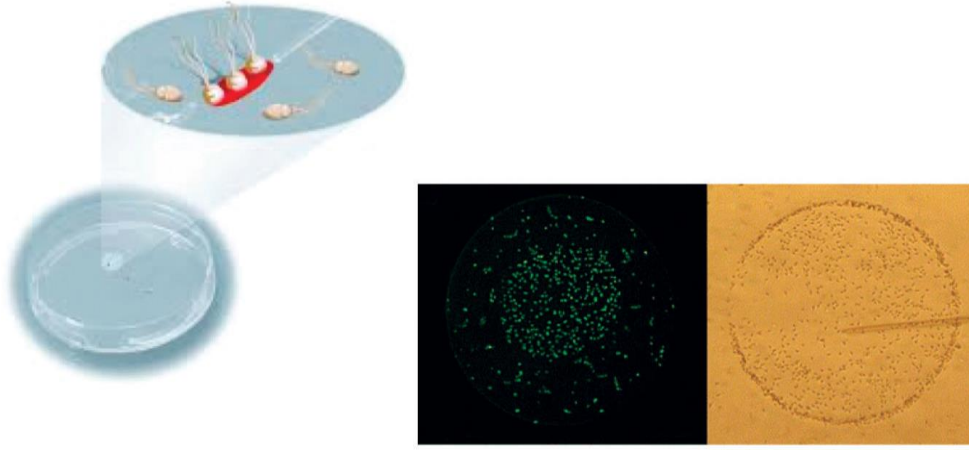


Şekil 2.5. MACS yöntemi ile spermin ayrıştırılması

ICSI ile yapılan son çalışmalar, MACS ile veya MACS olmadan hazırlanan sperm örneklerini karşılaştırdığında, örneklerde fertilizasyon, gebelik, embriyo kalitesi, implantasyon oranları, düşük doğum oranları ve canlı doğum oranları arasında anlamlı bir fark olmadığını gösterdi (114). Bu teknik yalnızca sınırlı sayıdaki örneklerle değerlendirildi ve ICSI prosedürlerinde etkinliği konusunda herhangi bir karara varılmadan önce daha büyük örneklem boyutlu çalışmalarla değerlendirilmelidir.

Hyaluronik Asit Bağlanma: Hyalüronik asit (HA), cumulus oophorus'un hücre dışı matriksinin ana bileşenidir. Sperm plazma membranındaki hiyalüronik asit bağlama alanları, sperm olgunluğunu gösterir. HA'ya bağlı spermi seçmek için fizyolojik intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (PICSİ) ve sperm-slow prosedürü de dahil olmak üzere iki yöntem vardır; Her iki yöntem sperm yıkama veya santrifüjleme yoluyla sperm hazırlığı gerektirir.

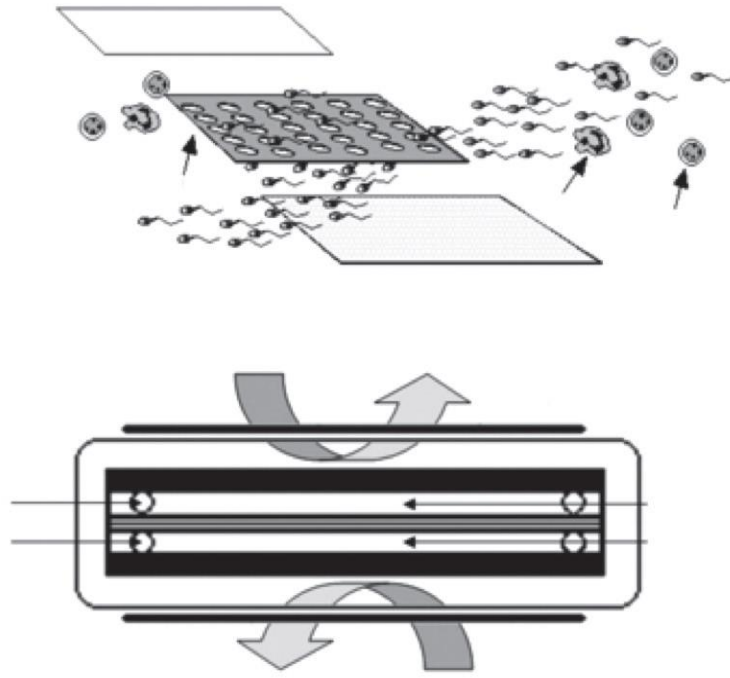
Spermin seçilebilmesi için, HA'nın sabitlendiği 4 işaretli kutucuğun olduğu "PICSİ dish" diye adlandırılan bir ürün geliştirilmiştir. Yıkanan spermin bir damlası HA noktasının kenarına bırakılır ve HA-bağlı sperm 15 dk sonra enjeksiyon pipeti ile toplanarak ICSI için kullanılır (115) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. PICSİ petrisinde spermin görünümü

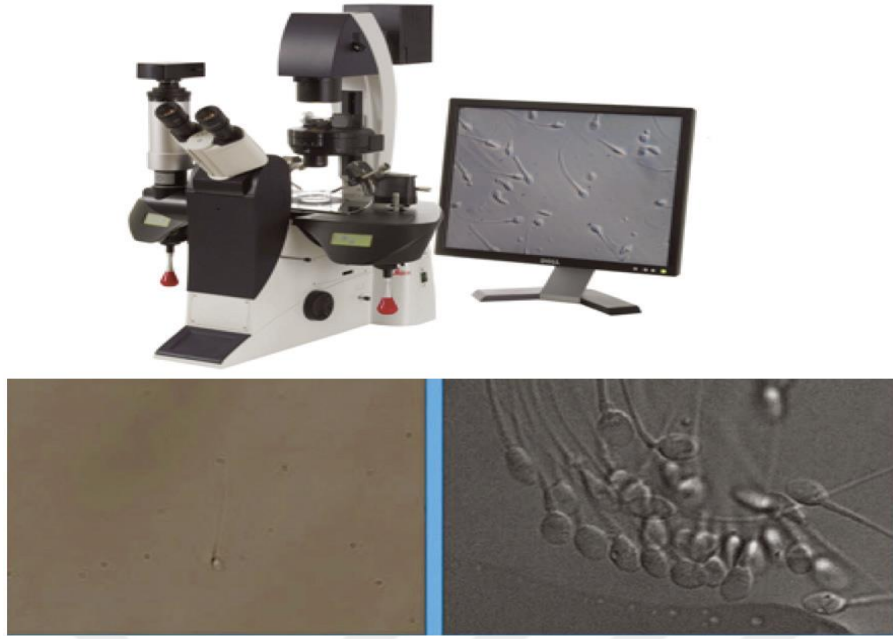
HA bağlanması kromozomal anomali sıklığı düşük olan matür spermi seçmede de sıklıkla kullanılmaktadır. Bu da ICSI sonrası genetik komplikasyon riskini azaltabilmektedir. Fertilite tedavisi gören erkeklerin semen örnekleri çalışıldığı bir çalışmada, HA bağlı spermiler ile bağlanmayan spermiler karşılaştırıldığında otozomal dizomi, diploidi, seks kromozomu dizomisi önemli oranda düşük bulunmuştur (115).

Elektroforez Bazlı Sperm Seçimi: Elektroforez (Microflow CS-10), spermilerin yüzey yüklerine göre seçilmesine dayanan bir teknolojidir. Normalde matür spermiler yüzeylerinden eksprese edilen CD52 ve glikolize fosfatidilinositol nedeniyle negatif yüklüdür. Elektroforez cihazı, bir bölme bir semen örneğinin yerleştirildiği ve bir voltaj uygulandığı ve morfolojik olarak normal, negatif yüklü spermin, 5µm polikarbonat membran boyunca pozitif elektroda doğru hareket ettiği, olgunlaşmamış sperm ve lökositleri geride bıraktığı, bir kasetten oluşur (116). DGS ile elektroforez arasında, DNA bütünlüğü, sperm morfolojisi ve motilitesi arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Ek olarak, elektroforezle sperm seçiminde, santrifüj basamağı olmadığından, ROS maruziyetindeki azalma nedeniyle daha az oksidatif DNA hasarı olur (116).



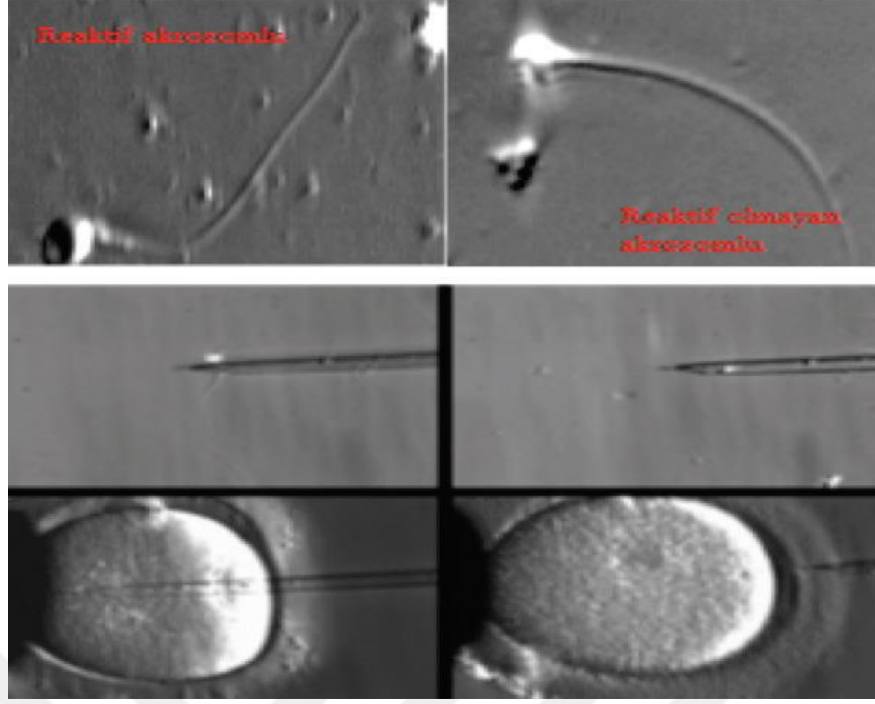
Şekil 2.7. Elektroforetik yöntemle spermin ayrıştırılması-MicroflowCS-10

Motil Sperm Organellerinin Morfolojik Değerlendirilmesi (Motile Sperm Organellar Morphology Examination) (MSOME): Motil sperm organellerinin morfolojik değerlendirilmesi ile yapılan sperm seçimi yüksek büyütme mikroskopları altında spermelerin morfolojisi incelenerek yapılır. Standart ICSI 600x büyütme yapılırken MSOME ise 6300 kata kadar büyütme yapılarak uygulanır. Bartoov ve arkadaşları tarafından bulunan bu yöntemde spermin yapısal özellikleri ayrıntılarıyla incelenir. Akrozomal bölge, post akrozomal bölge, boyun, mitokondri, flajella, kuyruk kısmı, vakuol alanları ve bu vakuol alanlarının baş bölgesine oranı hesaplanarak en sağlıklı sperm seçilmeye çalışılır (117). MSOME standart ICSI prosedürleri ile birlikte kullanılarak intrasitoplazmik morfolojisine göre seçilen sperm enjeksiyonu (IMSI) adını almıştır. Ciddi erkek infertilitesi olan hastaların sperm seçiminde önemli role sahiptir.



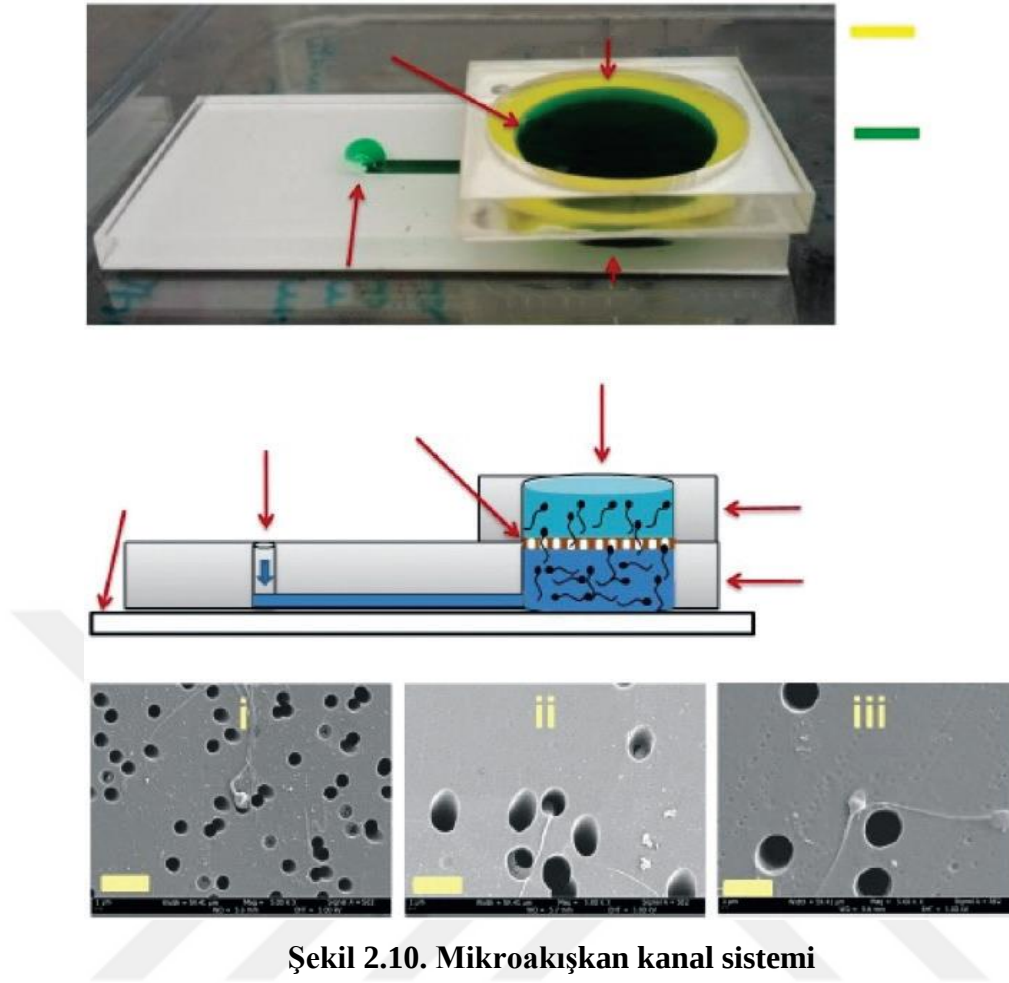
Şekil 2.8. IMSI için spermin seçimi

Çift Kırılma: Spermin çift kırılımı polarize lenslerin olduğu bir inverted mikroskop ekipmanı kullanılarak değerlendirilmektedir. Çift kırılım ile sperm motilite ya da canlılığı negatif etkilenmeden ICSI sırasında reaktif akrozomlu spermin seçilmesi sağlanmaktadır (118) (Şekil 2.9). Çift kırılıma sahip sperm mikroyenjeksiyon için seçilebilmektedir ve bu spermelerin kalitesinin iyi olduğu öne sürülmektedir. Çift kırılımlı spermelerin oranı ile konsantrasyon, motilite ve canlılık gibi diğer sperm parametreleri arasında önemli bir pozitif korelasyon bulunmaktadır (118). MSOME ve IMSI’de olduğu gibi yine polarize mikroskobu ile sperm seçimi sırasında ek ekipman, zaman ve teknik deneyime ihtiyaç duyulmaktadır. Yine sperm çift kırılımının değerlendirilmesi ile yapılan mikroyenjeksiyon yöntemi ile rutin ICSI’nin kıyaslandığı ağır erkek faktörlü hastalarda bu yeni yöntemle yüksek gebelik oranı ve azalmış düşük oranı gözlenmiştir (118).



Şekil 2.9. Polarize ışık mikroskobu ile reaktif akrozomlu spermin seçimi

Mikro Akışkan Sıvı Modeliyle Sperm Seçimi: Geleneksel sperm hazırlama yöntemlerinde ortaya çıkan sperm kayıpları ve DNA hasarının önüne geçebilecek, sperm seçimine yönelik geliştirilen yöntemlerden biri de “mikroakışkan kanal sistemi (spermchip)” yöntemidir. Bu yöntem geliştirilirken doğal konsepsiyonda spermin izleyeceği yol örnek alınmıştır. Bu sistem, spermin intrauterin ortam, servikal ve vajinal kanal mikroçevresine benzeyen bir mikrokanal içerikli çip özelliğindedir. Mikroçipte, 1,5 mm kalınlığında Polimetilmetakrilat kombinasyonu (PMMA) ve 50 mikron kalınlığında çift taraflı yapışkan (DSA) film mikroakışkan kanalları oluşturmaktadır. Mikroakışkan kanal içinde sperm hareketini otomatik kaydını etkinleştirmek için çipe bir mikroçip birleştirilmiş cihaz (CCD) entegre edilmiştir. Entegre sistem mikroakışkan kanala yerleştirilmiştir. Mikroakışkan kanal ortamı serum ile desteklenmiş, taze human tubal fluid (HTF) medium ile önceden doldurulmuştur. Sperm örneği sütunun en üst kanal girişine pipetle yüklenir. Belirli uzunluktaki kanal sistemlerinden spermlerin yüzmesi beklenir. Yüzen spermler toplanarak ICSI için kullanılır. Ayrıca mikroçip birleştirilmiş cihaz (CCD) üzerine yerleştirilebildiğinden spermin gölge hareketi izlenerek kayıt da yapılabilir (119) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Mikroakışkan kanal sistemi

Mikro-akışkan sıvı teknolojileri, ROS oluşmasına neden olabilecek santrifüj basamakları yerine, kadın genital organlarında gerçekleşen doğal sperm seçim yollarını taklit eder. Böylece daha az oksijen radikali oluştuğu, spermilerin DNA fragmentasyonlarının daha düşük, DNA bütünlüklerinin daha yüksek olduğu belirtilmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalarda diğer yöntemlere göre sperm canlılık oranı, sperm toplam hareketlilik oranı, sperm hız oranlarının daha yüksek olduğu gösterilmiştir (14,15), ancak bu yöntemle seçilen spermle yapılan mikroenjeksiyonun klinik sonuçları ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda, erkek faktör sebebiyle infertilite tedavisi alan hastalarda fertile chip kullanılarak yapılan ICSI sonrası fertilizasyon oranları, embriyo kalitesi ve gebelik oranlarını araştırmayı amaçladık.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hasta Seçimi

Prospektif randomize kontrollü planlanan bu araştırma Başkent Üniversitesi Adana Uygulama ve Araştırma Merkezi Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite kliniğinde 03 Mart 2017 ve 20 Eylül 2017 tarihleri arasında gerçekleştirildi. Klinik araştırma sürecine Klinik Araştırma ve Etik Kurul onayı (Proje No: KA16/232) ve T.C Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu onayı alındıktan sonra başlandı. 2010 yılında kliniğimizde Kılıçdağ E.B. ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada fertilizasyon oranı %65 bulunmuştu (127). Çalışma öncesi biyoistatistik ile yapılan çalışmalar sonrasında, bu çalışma baz alınarak fertilizasyon oranını %65'ten %80'e çıkaran %15'lik bir artış için, %10 hata payı ve %95 güvenilirlikle yapılan power analiz sonucunda 64 kontrol grubu ve 64 Fertile Chip grubu olmak üzere toplam hasta sayısı 128 olarak belirlendi. Hasta seçimleri ve randomizasyonu, erkek inferilitesi tanısı ile kontrollü ovaryan hiperstimülasyon tedavisine başlanan hastalarda hCG günü çalışmayla ilgisi olmayan bir hemşire tarafından seçilmesiyle oluşturuldu. Randomizasyon için kapalı zarflar 'Fertile Chip' ve 'Kontrol Grubu' olarak 1/1 oranında hazırlandı. Kontrol grubunda spermier konvansiyonel swim-up yöntemiyle seçildi, çalışma grubunda ise spermier Fertile sperm seçme çipleri ile seçildi. Ardından her iki gruptan elde edilen spermier ICSI ile oositlere enjekte edildi.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri:

Kadın için;

- 20-39 yaş arası kadın olması
- Hastanın erkek faktörü olan infertilite grubunda olması

Erkek için;

- 20-45 yaş arası, spermierinde hareket ve/veya sayıca azalma tespit edilen erkek olması
- Sperm sayısı; >1milyon - < 15 milyon olması
- Sperm hareketliliğinin %32'den az olması

Çalışmaya dahil edilmeme kriterleri:

Kadın için;

- 20-39 yaş aralığının dışında kalan kadın hastalar

- 3'ten fazla sayıda IVF başarısızlığı olanlar
 - Endometriozisi ya da endometrioması olan kadın hastalar
- Erkek için;
- 20-45 yaş aralığının dışında kalan erkekler
 - Sperm sayısı 1 milyon altında olan erkek hastalar ile 15 milyon üzerinde olan erkek hastalar
 - Sperm hareketliliği %32 den fazla olan erkek hastalar
 - OPU gününde sperm veremeyip, cerrahi yöntemle sperm alınan hastalar

Çalışmanın birincil sonucu fertilizasyon oranı olarak alınmıştır. İkincil sonuçları ise klinik gebelik oranları olarak alınmıştır. Çalışmaya ilk hasta 03 Mart 2017 tarihinde alındı ve 20 Eylül 2017 tarihinde son hastalar çalışmaya alınarak toplam 128 hastalık çalışma grubuna ulaşıldı.

3.2. Sperm Seçimi

Her iki grupta da spermler, hastalardan perhiz süreleri uygun şekilde mastürbasyonla alındıktan sonra 30 dakika likefaksiyona bırakıldı. Likefaksiyon sonrası spermler gruplarına göre işlemlere alındılar.

Kontrol grubu: Santrifüj tüplerine altta %80, üstte %55 gradiyentler hazırlanarak en üste likefiye olmuş spermler konuldu. Tüpler santrifüj cihazında 20 dakika 1200 rpm'de santrifüje edildi. Ardından üstte kalan süpernatant alındı ve 3 ml IVF medyum eklenerek resüspanse edildi. 1200 rpm'de 10 dakika da santrifüje edilerek supraspermdeki kolloidal parçalar ayrıştırıldı. Süpernatant kısım yeniden uzaklaştırıldı. Kalan pellet 0,5 ml IVF medyum ile resüspanse edildi ve swim-up'a bırakılmak üzere 37 °C inkübatörde 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra spermler pipetle alındı ve ICSI işlemine başlandı.

Fertile Chip Grubu: Fertile Chip mikrotünelleri sorting solüsyondan alınan medyumla inlet kısmından 14 mikrolitre verilerek hat dolduruldu. Likefiye sperm 2'şer mikrolitre alınarak inlet kısmına temas olmadan bırakıldı. Oil ile önce outlet üstü ardından inlet üstü kapatıldı. 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında outlet kısmından her kuyucuktan 4-5 mikrolitre çekildi ve ICSI için seçime geçildi.

3.3. Embriyo Takibi

Embriyologlarımız tarafından ICSI işlemi sonrası oluşan embriyolar günlük takip edildi. Embriyoların morfolojilerine göre hastalara 3, 4 ve 5. ve 6. günlerde transferleri yapıldı.

3.4. İstatistiksel Metot

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 17.0 paket programı kullanıldı. Kategorik ölçümler sayı ve yüzde olarak, sürekli ölçümlerse ortalama ve standart sapma (gerekli yerlerde minimum - maksimum) olarak özetlendi. Gruplar arasındaki sürekli ölçümlerin karşılaştırılmasında dağılımlar kontrol edildi, parametrik dağılım ön şart varsayımı sağlandığında Student T testi; parametrik dağılım ön şartı sağlanmadığında Mann Whitney U testi kullanıldı. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında da Ki-Kare ve ya Fisher Exc. testi kullanıldı. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0.05 olarak alındı.

4. BULGULAR

Başkent Üniversitesi Adana Uygulama ve Araştırma hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite Merkezinde prospektif randomize olarak planlanan çalışmamızda, power analiz sonucunda çalışmaya dahil edilen toplam 128 hastanın sonuçları analiz edildi.

Hastaların genel özellikleri: Çalışmaya dâhil edilen infertil çiftlerde kontrol grubunda kadınların yaşı minimum 19, maksimum 38 yaş, ortalama yaşı $29,80 \pm 4,91$ yaş saptandı. Erkeklerin yaşı kontrol grubunda minimum 24, maksimum 44 yaş, ortalama yaşı $33,61 \pm 4,39$ yaş bulundu. Fertile chip grubunda ise kadınların yaşı minimum 20, maksimum 38 yaş, ortalama yaşı $30,69 \pm 4,83$ yaş olarak bulundu ($p=0,29$). Erkeklerin yaşı ise minimum 26, maksimum 45 yaş, ortalama yaşı $34,03 \pm 4,47$ olarak saptandı ($p=0,59$). İnfertil çiftlerin ortalama yaşlarında istatistiksel olarak bir fark saptanmadı. Kontrol grubundaki hastaların infertilite süreleri minimum 1 yıl, maksimum 15 yıl, ortalama infertilite süresi $5,45 \pm 3,56$ yıl saptandı. Fertile chip grubunda minimum 1 yıl, maksimum 18 yıl, ortalama infertilite süresi ise $5,16 \pm 3,46$ olarak saptandı. İnfertilite süreleri arasında istatistiksel bir fark saptanmadı ($p=0,64$) (Tablo 4.1).

Kadın hastaların vücut kitle endeksi oranları, erkek hastalarinsa semen analizleri incelendiğinde kontrol grubu ve fertile chip grubunda VKE oranları ($p=0,73$) ve toplam motil sperm sayısı (TMSS) ($p=0,57$) açısından istatistiksel bir fark saptanmadı.

Kadınların antral follikül sayıları kontrol grubunda ortalama $7,25 \pm 2,80$, fertile chip grubunda ise $6,71 \pm 2,32$ olarak saptandı. İki grup arasında istatistiksel olarak fark saptanmadı ($p=0,29$).

Çalışmaya dahil edilen hastaların kontrol grubunda olanların %71,90'nın 1. Siklus, %28,10'unun 2. Siklusu olduğu, fertile chip grubundaki hastaların %68,80'inin 1. Siklus, %31,20'sinin 2. Siklusu olduğu belirlendi ve her iki grup arasında siklus sayıları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,14$).

Bulgular aşağıda özetlenmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Demografik Veriler

	Fertile Chip (n=64)	Kontrol Grup (n=64)	P
Kadın Yaşı	30,69±4,83	29,80±4,91	0,29
Erkek Yaşı	34,03±4,47	33,61±4,39	0,59
İnfertilite Süresi (yıl)	5,16±3,46	5,45±3,56	0,64
VKE	24,86±5,03	25,17±4,27	0,73
TMSS (x10 ⁶)	4,70±2,70	4,90±2,74	0,66
Antral Follikül Sayısı (n)	6,71±2,32	7,25±2,80	0,29
Siklus no(%) 1. Siklus	68,80	71,90	0,14
2. Siklus	31,20	28,10	

VKE: Vücut Kitle Endeksi

TMSS: Toplam Motil Sperm Sayısı

Hastaların tedavi özellikleri: Hastalara uygulanan tedavi protokollerine bakıldığında, kontrol grubundaki hastaların %28,60'sına agonist protokol uygulanırken, %71,40'üne antagonist protokol uygulandığı saptandı. Fertile chip grubunda hastaların %32,80'ine agonist protokol uygulanırken, %67,20'sine antagonist protokol uygulandığı saptandı. Her iki grup arasında uygulanan tedavi protokolleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmadı(p=0,53) (Tablo 7).

Hastalara kontrollü ovaryan hiperstimülasyon tedavileri için başlanan ortalama FSH dozları kontrol grubunda 235,90±60,93 IU, fertile chip grubunda ise 226,71±59,63 IU olarak saptandı (p=0,45). Hastalara kontrol grubunda ortalama 9,04±2,68 gün, fertile chip grubunda ortalama 9,0±2,14 gün indüksiyon yapılarak totalde kontrol grubunda 2494,16±878,68 IU, fertile chip grubunda 2456,74±830,66 IU gonadotropin dozu kullanıldı (p=0,93 ve p=0,80). Tedaviye başlanan FSH dozları, indüksiyon süreleri ve total alınan gonadotropin dozları karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 4.2).

Human chorionic gonadotropin (hCG) günü serumda bakılan estradiol düzeyleri kontrol grubunda ortalama 2158,36±1075,64 pg/mL, fertile chip grubunda ise 2117,32±1057,69 pg/mL saptandı (p=0,83). Hcg günü bakılan progesteron düzeyleri kontrol grubunda ortalama 1,10±0,91 ng/mL, fertile chip grubunda ise 0,98±0,34 ng/mL olarak saptandı(p=0,36). Hastalara hCG günü bakılan estradiol düzeyleri ve progesteron düzeyleri arasında, iki grup arasında istatistiksel olarak fark saptanmadı. Hastaların hCG günü endometrial kalınlıkları kontrol grubunda ortalama 11,21±2,55 mm, fertile chip

grubunda $11,11 \pm 1,97$ mm olarak saptandı. İki grup arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0,80$) (Tablo 4.2).

Kontrollü ovaryan hiperstimülasyon sonrası oosit toplama işlemlerinde 14 mm ve üzeri aspire edilmesi öngörülen follikül sayıları kontrol grubunda $13,28 \pm 4,97$, fertile chip grubunda $12,46 \pm 6,44$ olarak hesaplandı. İki grup arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0,43$). Oosit toplama işlemlerinde elde edilen oosit sayıları kontrol grubunda $16,35 \pm 8,53$, fertile chip grubunda $14,0 \pm 7,60$ olarak saptandı ve iki grup arasında istatistiksel fark saptanmadı ($p=0,10$).

MII oosit sayısı kontrol grubunda ortalama $13,48 \pm 7,40$, fertile chip grubunda $10,71 \pm 6,55$ adet saptandı. Kontrol grubunda, fertile chip grubuna kıyasla MII oosit sayısı istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptandı ($p=0,03$) (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Kontrollü Ovarian Hiperstimülasyon Siklus Karakteristikleri

	Fertile Chip (n=64)	Kontrol Grup (n=64)	P
Tedavi protokolleri (%) Agonist	32,80	28,60	0,53
Antagonist	67,20	71,40	
FSH başlangıç Dozu (IU)	$226,71 \pm 59,63$	$235,90 \pm 60,93$	0,45
İndüksiyon Süresi (gün)	$9,0 \pm 2,14$	$9,04 \pm 2,68$	0,93
Total Gonadotropin Dozu (IU)	$2456,74 \pm 830,66$	$2494,16 \pm 878,68$	0,80
hCG günü serum östradiol (pg/mL)	$2117,32 \pm 1057,69$	$2158,36 \pm 1075,64$	0,83
hCG günü serum progesteron (ng/mL)	$0,98 \pm 0,34$	$1,10 \pm 0,91$	0,36
hCG günü endometrium (mm)	$11,11 \pm 1,97$	$11,21 \pm 2,55$	0,80
İndüksiyon sonrası oluşan follikül (n)	$12,46 \pm 6,44$	$13,28 \pm 4,97$	0,43
Aspire edilen oosit sayısı (n)	$14,0 \pm 7,60$	$16,35 \pm 8,53$	0,10
Metafaz II Oosit sayısı (n)	$10,71 \pm 6,55$	$13,48 \pm 7,40$	0,03

Fertilizasyon oranları kontrol grubunda ortalama $\%57,88 \pm 20,39$, fertile chip grubunda ortalama $\%60,84 \pm 19,10$ olarak hesaplandı. Çalışmamızın primer sonuçlarından biri olan fertilizasyon oranları açısından iki grup arasında istatistiksel fark saptanmadı ($p=0,41$) (Tablo 4.3).

ICSI işlemi sonrası elde edilen embriyo sayıları kontrol grubunda ortalama $7,77 \pm 4,78$, fertile chip grubunda ortalama $6,16 \pm 3,99$ olarak saptandı. Kontrol grubunda fertile chip grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde fazla sayıda embriyo geliştiği izlendi ($p=0,045$) (Tablo 4.3).

Kontrol grubunda transfer edilen ortalama grade 1 embriyo sayısı $0,75 \pm 0,61$, ortalama grade 2 embriyo sayısı $0,53 \pm 0,73$ saptanırken, fertile chip grubunda transfer edilen ortalama grade 1 embriyo sayısı $0,83 \pm 0,65$, ortalama grade 2 embriyo sayısı $0,53 \pm 0,73$ bulundu. Her iki grup arasında transfer edilen ortalama grade 1 embriyo sayısında ($p=0,48$) ve grade 2 embriyo sayısında ($p=1$) istatistiksel fark saptanmadı. Transfer edilen embriyo sayıları kontrol grubunda ortalama $1,39 \pm 0,49$, fertile chip grubunda ortalama $1,44 \pm 0,50$ bulundu. Bu fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=0,59$).

Kontrol grubunda elde edilen total grade 1 embriyo sayısı $2,13 \pm 2,46$, total grade 2 embriyo sayısı $1,87 \pm 2,40$ olarak bulundu. Fertile chip grubunda elde edilen total grade 1 embriyo sayısı $1,84 \pm 2,15$, total grade 2 embriyo sayısı $2,36 \pm 6,97$ bulundu. Her iki grup arasında total grade 1 ($p=0,47$) ve grade 2 ($p=0,59$) embriyo sayısı açısından istatistiksel bir fark saptanmadı. Total grade 3 embriyo sayısı kontrol grubunda $3,04 \pm 3,95$, fertile chip grubunda $1,84 \pm 2,68$ olarak saptandı. Elde edilen total grade 3 embriyo sayısı kontrol grubunda fertile chip grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek izlendi ($p=0,046$).

Embriyo transfer günleri kontrol grubunda %30,2'si 3.gün, %4,8'i 4.gün, %63,5'i 5.gün, %1,6'sı 6.gün olarak saptandı. Fertile chip grubunda %44,4'ü 3.gün, %1,6'sı 4.gün, %52,4'ü 5.gün, %1,6'sı 6.gün olarak saptandı, bu fark anlamlı bulunmadı ($p=0,34$). Kontrol grubunda %55,6 hastanın kalan embriyolarına dondurma işlemi yapılırken, fertile chip grubunda bu oran %58,7 olarak saptandı. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,85$). Bulgular aşağıda özetlenmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Intrasioplazmik Sperm Enjeksiyonu Sonrası Embriyoloji Verileri

	Fertile Chip (n=64)	Kontrol Grup (n=64)	P
Fertilizasyon oranı (%)	60,84±19,10	57,88±20,39	0,41
Embriyo Sayısı (n)	6,16±3,99	7,77±4,78	0,045
Transfer edilen Grade1 embriyo (n)	0,83±0,65	0,75±0,61	0,48
Transfer edilen Grade2 embriyo (n)	0,53±0,73	0,53±0,73	1,0
Transfer edilen Embriyo sayısı (n)	1,44±0,50	1,39±0,49	0,59
Transfer Günü 3.Gün (n) (%)	28 (%44,4)	19 (%30,2)	0,34
Transfer Günü 4.Gün (n) (%)	1 (%1,6)	3 (%4,8)	
Transfer Günü 5.Gün (n) (%)	33 (%52,4)	40 (%63,5)	
Transfer Günü 6.Gün (n) (%)	1 (%1,6)	1 (%1,6)	
Total Grade1 embriyo (n)	1,84±2,15	2,13±2,46	0,47
Total Grade2 embriyo (n)	2,36±6,97	1,87±2,40	0,59
Total Grade3 embriyo (n)	1,84±2,68	3,04±3,95	0,046
Dondurulmuş embriyo oranı (n) (%)	37 (%58,7)	35 (%55,6)	0,85

Her iki hasta grubunda oosit toplama işlemi yapılmayan hasta olmadı. Her iki grupta da ikişer hastanın transferi yapılamadı. Kontrol grubundaki iki hastadan ilkinde fertilizasyon olmaması nedeniyle, ikincisinde progesteron yüksekliği nedeniyle embriyo transferi gerçekleştirilemedi. Fertile chip grubundaki iki hastadan birinde fertilizasyon olmaması, diğerinde embriyo sayısı az olduğu için, embriyo havuzu oluşturmak amacıyla transfer yapılamadı.

Kontrol grubundan bir, fertile chip grubundan bir hastanın embriyoları dondurularak bu hastalara thawing transfer yapıldı.

Taze ve dondurulmuş siklusları beraber değerlendirdiğimizde kontrol grubunda bir hastada fertilizasyon başarısızlığı nedeniyle toplam 63 hastaya, fertile chip grubunda da aynı şekilde bir hastada fertilizasyon başarısızlığı nedeniyle toplam 63 hastaya transfer yapılabildi. İmplantasyon ve gebelik oranları hesaplanırken taze transfer yapılan 124 siklus ve iki thawing transfer siklusu incelemeye dahil edilmiştir.

Toplam 128 hasta için siklus başına/oosit toplama işlemi başına implantasyon oranları kontrol grubunda %30,16, fertile chip grubunda %53,17 olarak bulundu. Fertile

chip grubunda kontrol grubuna kıyasla siklus başına implantasyon oranları istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0,004$).

Embriyo transferi başına gebelik oranları incelendiğinde kontrol grubunda %47,6, fertile chip grubunda ise %66,7 bulundu ($p=0,047$). Embriyo transferi başına klinik gebelik oranlarına bakıldığında ise, kontrol grubunda %36,5, fertile chip grubunda %57,1 bulundu ($p=0,032$). Embriyo transferi başına gebelik ve klinik gebelik oranları arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı. Tüm hastalar incelendiğinde çalışmaya dahil edilen hasta başına klinik gebelik oranları fertile chip grubunda %56,3 kontrol grubunda %35,9 olarak saptandı. Bu fark fertile chip lehine istatistiki olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0,033$).

Oluşan gebeliklerin takibinde, kimyasal gebelik oranı kontrol grubunda %16,7, fertile chip grubunda %7,1 olarak bulundu, istatistiksel olarak iki grup arasında fark saptanmadı ($p=0,43$). Abortus oranı kontrol grubunda %6,7, fertile chip grubunda %9,5 olarak izlendi, istatistiksel olarak iki grup arasında fark saptanmadı ($p=1$). Çoğul gebelik kontrol grubunda %3,3 iken, fertile chip grubunda %7,1 olarak bulundu ve iki grup arasında istatistiksel fark saptanmadı ($p=0,44$). Bulgular aşağıda özetlenmiştir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Gebelik Sonuçları

	Fertil Chip (n=64)	Kontrol Grup (n=64)	P
İmplantasyon oranı (siklus başına) (%)	%53,17	%30,16	0,004
Klinik gebelik oranı (E.T başına) (n) (%)	36/63 (%57,1)	23/63 (36,5)	0,032
Gebelik oranı (E.T başına) (n) (%)	42/63 (%66,7)	30/63 (%47,6)	0,047
Kimyasal gebelik oranı (n) (%)	3/42 (%7,1)	5/30 (%16,7)	0,43
Abortus oranı (n) (%)	4/42 (%9,5)	2/30 (%6,7)	1
Çoğul Gebelik (n) (%)	3/42 (%7,1)	1/30 (%3,3)	0,44
Çalışmaya alınan hasta başına klinik gebelik oranı (n) (%)	36 (%56,3)	23 (%35,9)	0.033

E.T: Embriyo transferi

5. TARTIŞMA

Bu prospektif randomize kontrollü çalışmada, erkek infertilitesi nedeniyle ICSI planlanan hastaların tedavileri sırasında sperm seçiminde fertile chip kullanımının klasik konvansiyonel swim-up yöntemine göre üstünlüğü gösterilmiş olup, çalışmaya alınan hasta başına klinik gebelik oranında anlamlı bir etkisi gözlenmiştir.

Erkek faktörü, günümüzde infertil çiftlerin %20'sinde infertilitenin tek nedeni olarak biliniyorken, %30-40'nda önemli bir etken olarak kadın infertilitesine eşlik ettiği bilinmektedir (2,3). Semen analizi, erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde önemli bir parametredir. Motilite, morfoloji, canlılık, DNA bütünlüğü, apoptoz ve maturite gibi sperm parametreleri, YÜT başarısının kritik belirleyicileri arasındadır. Özellikle, son dönemde sperm DNA bütünlüğünün, normal fertilizasyon ve embriyo gelişimi için temel bir faktör olduğu ortaya çıkmıştır. Bu nedenle ileri düzey sperm seçim teknikleri ile ICSI tedavisinde kullanılacak daha kaliteli ve daha sağlıklı sperm bulunmaya çalışılmaktadır. Daha önce de bahsedilen bu yeni sperm seçme yöntemlerinin büyük çoğunluğunda, sperm arasında DNA bütünlüğü daha yüksek, DNA fragmentasyon oranı daha düşük spermilerin seçilebildiği gösterilmesine rağmen, yalnızca MACS, IMSI ve çift kırılma tekniklerinde klinik çalışmalar yapılmış ve gebelik üzerine etkisinin olup olmadığı gösterilmiştir (118,121,122).

Mikro-akışkan sıvı teknolojileri kullanılarak yapılan sperm seçme yöntemleri de, klinik sonuçları henüz net olarak bilinmese de son zamanlarda üzerinde en çok çalışılan ileri düzey sperm seçme yöntemlerinden biridir. Yapılan çalışmalarda konvansiyonel yöntemlerde sıkça kullanılan santrifüj, pipetle karıştırma ve yıkamanın ROS üretimine ve bunun bir sonucu olarak DNA bütünlüğünün bozulması ve DNA fragmentasyon oranının artmasına neden olduğu iddia edilmektedir. Mikro-akışkan sıvı teknolojilerinin ise kimyasal ve reaktif oksijen radikalleri oluşmasına neden olabilecek santrifüj basamakları yerine, kadın genital traktusundaki doğal sperm seçim yollarını taklit ettiği, böylece daha az oksijen radikali oluşumuna yol açtığı, elde edilen spermilerin DNA fragmentasyonlarının daha düşük, DNA bütünlüklerinin daha yüksek olduğu iddia edilmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalarda diğer yöntemlere göre sperm canlılık oranı, sperm toplam hareketlilik oranı, sperm hız oranlarının daha yüksek olduğu gösterilmiştir (14,15).

Mikro akışkan sıvı bazlı sperm seçim kiti olan 'Fertile Chip®' kullanımının DNA hasarı açısından daha iyi spermi seçtiğine dair çalışmalar olmakla birlikte bu seçilen spermilerle yapılan mikroyenjeksiyonun klinik sonuçları ile ilgili yayın bulunmamaktadır.

Bu nedenle çalışmamızda, erkek faktör sebebiyle infertilite tedavisi alan hastalarda fertile chip kullanılarak yapılan ICSI sonrası fertilizasyon oranları, embriyo kalitesi ve gebelik oranlarını araştırdık. Sonuçlarımızı karşılaştırmak için diğer ileri düzey sperm seçme yöntemlerinin klinik çalışma sonuçlarını ve henüz yayın olmayan ESHRE'17 de ve 19. Dünya IVF kongresinde poster olarak sunulan fertile chip çalışmalarını baz aldık.

2008 yılında Gineroli L. ve arkadaşlarının çift kırılma yöntemiyle yaptığı bir çalışmada 112 adet normal, oligoastenospermik ve testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) spermelerinden oluşan örnekleri çift kırılma yöntemi ile seçerek ICSI tedavisi uygulanmıştır. Yüz on dokuz adet aynı özellikli kontrol grubunda ise spermeler konvansiyonel yöntemlerle seçilmiş ve ICSI işlemi yapılmıştır. Çalışmalarında fertilizasyon oranları kontrol grubunda % 72, çalışma grubunda %74 saptanmış ve aralarında istatistiksel fark saptanmamıştır. Klivaj oranları arasında istatistiksel fark saptanmamıştır. Grade 1 embriyo oluşumu kontrol grubunda %20, çalışma grubunda %33 bulunmuştur ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,025$). Transfer edilen embriyo sayıları arasında ve klinik gebelik oranlarında anlamlı bir fark saptanamamıştır. Abortus yüzdeleri kontrol grubunda % 41, çalışma grubunda %16 saptanmıştır ($p=0,035$). Devam eden gebelik oranları da kontrol grubunda % 11, çalışma grubunda %23 saptanmıştır ($p<0,025$). Çalışma grubundaki düşük abort oranı ve yüksek devam eden gebelik oranı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (118).

2013 yılında IMSI için Teixeira DM. ve arkadaşları tarafından derlenen cochrane derlemesinde ICSI ve IMSI tedavilerinin başarıları karşılaştırılmıştır. Bu meta-analizde 2008-2012 yılları arasında yayınlanan dokuz çalışma derlenmiştir. Meta-analiz sonucunda klinik gebelik, canlı doğum, düşük ve konjenital anomaliler karşılaştırılmış ve klinik gebelik oranları hariç anlamlı fark saptanmamıştır. Dokuz randomize kontrollü çalışmada 2014 kadın hasta sonucunda sadece klinik gebelik oranları IMSI kullanımında ICSI'ye göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla bulunmuştur (RR 1.29, 95% CI 1.07-1.56 $I^2=57\%$, kanıt düzeyi oldukça düşük) (122).

2013 yılında Gil M. ve arkadaşlarının MACS kullanımının sonuçları hakkında yayınladığı sistematik derleme ve meta-analizde beş prospektif randomize çalışma değerlendirmeye alınmıştır. Meta-analiz sonucunda gebelik oranları dört çalışmadan 367 hasta analizi sonrası gebelik oranları MACS kullanımı sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek saptanmıştır (RR=1.50, 95 % CI 1.14–1.98 $I^2=4\%$). İki çalışmada toplam 834 hasta ile yapılan meta analiz sonrası implantasyon oranlarında istatistiksel fark

saptanmamıştır. Sadece bir çalışmada düşük oranları raporlanmış ve 60 hastalık çalışma grubunda yapılan analiz sonucunda istatistiksel bir fark saptanmamıştır (121).

2017 yılında ESHRE kongresinde poster olarak O. Alagöz ve arkadaşlarının yapmış olduğu retrospektif bir çalışmada fertile chip kullanımı ile DGS kıyaslanmış. Fertilizasyon ve implantasyon oranları açısından iki grup arasında istatistiksel olarak bir fark saptanmazken fertile chip grubunda istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha fazla gebelik rapor edilmiştir ($p=0,03$). Çalışma detaylı olarak incelendiğinde hastaların ilk IVF siklusu olan ya da daha önce bir defa IVF siklusu olan hastalar, daha önce iki ya da üç IVF siklusu olanlar, daha önce dört ya da daha fazla IVF siklusu olan hastalar olarak gruplandırıldığı görülmüştür. Gruplar arası gebelik, fertilizasyon ve implantasyon oranları incelendiğinde, iki-üç IVF başarısızlığı olan grupta gebelik ve implantasyon oranlarını arttırdığı ($p=0,01$ ve $p=0,02$) gösterilmiştir (123). Biz, çalışmamızda ise ilk ya da ikinci siklusta erkek faktörü olan hastalarda implantasyon ve gebelik oranları üzerine etkili olduğunu bulduk.

2017 yılında ESHRE kongresinde poster olarak sunulan, S. Ramakrishnan ve arkadaşları tarafından yapılan, sperm seçme yöntemlerinden DGS tekniği ile Fertile chip karşılaştırmasında, fertile chipin işlenmiş numunede DNA fragmentasyon endeksini (DFE) önemli ölçüde azalttığını göstermektedir. DFE fertile chip grubunda, DGS grubuyla kıyaslandığında anlamlı derecede düşük olarak saptanmıştır ($p<0,05$). Bizim çalışmamızda saptadığımız gibi, bu çalışmada da iki grup arasında fertilizasyon ve embriyo kalitesi açısından belirgin fark saptanmamıştır. Ancak fertile chip, daha az semen volümü gerektiren, kullanımı kolay ve basit bir yöntem olarak gözlemlenmiştir (124). Biz de çalışmamızda fertilizasyon oranları açısından iki grup arasında belirgin bir fark bulamadık ancak, embriyo kalitesi açısından fertile chip grubunda grade 3 embriyo sayısını anlamlı olarak az ve klinik gebelik oranlarını anlamlı olarak yüksek bulduk.

2017 Dünya IVF Kongresinde G. Özkara ve arkadaşları tarafından poster olarak sunulan; mikroakışkan çip kullanımının blastokist gelişimine etkisi başlıklı çalışmada, toplam 364 hastada sperm ayrıştırma tekniği olarak mikroakışkan çip kullanımının DGS yöntemine göre blastokist gelişimine etkisi retrospektif ve randomize olarak karşılaştırılmıştır. Hasta verilerinin karşılaştırılmasında, hasta yaşı, elde edilen toplam oosit ve MII oosit sayıları, döllenme oranları ve sperm sayıları ile total hareketlilik, progresif hareketlilik oranı, kruger kriterlerine göre normal morfolojide sperm oranı benzer olarak bulunmuştur. Blastokist gelişimi (toplam blastokist/döllenmiş oosit (%)) açısından her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir (DGS: $42,76\pm 28,42$, Çip: $39,91\pm 26,64$ $p=0,08$) (125).

2017 Dünya IVF Kongresinde G. Özkara ve arkadaşlarının retrospektif olarak yaptıkları, düşük sperm değerlerine sahip hastalarda mikroakışkan chip kullanımının blastokist gelişimine katkısı ile ilgili çalışmada, fertile chip kullanımı ile DGS yöntemi karşılaştırılmıştır. Oligozoospermi hastalarında DGS grubunda blastokist gelişimi $40,69 \pm 28,05$ ve fertile chip grubunda $35,91 \pm 25,42$ olarak bulunmuştur. İki grup arasında istatistiksel fark saptanmamıştır ($p=0,45$). Astenozoospermi hastalarında DGS grubunda blastokist gelişimi $41,49 \pm 28,46$ ve fertile chip grubunda $37,81 \pm 31,09$ olarak bulunmuştur. İki grup arasında istatistiksel fark saptanmamıştır ($p=0,54$). Teratozoospermi hastalarında DGS grubunda blastokist gelişimi $41,59 \pm 28,07$ ve fertile chip grubunda $37,87 \pm 25,64$ olarak bulunmuştur. İki grup arasında istatistiksel fark saptanmamıştır ($p=0,26$). Sonuç olarak sperm değerleri düşük hastalarda sperm ayırıştırma tekniği olarak mikroakışkan chip kullanımının DGS yöntemine göre blastokist gelişimi üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi gözlenmemiştir (126).

Kliniğimizde daha önce yapılan prospektif randomize kontrollü çalışmada; açıklanamayan infertilite nedeniyle ICSI tedavisi uygulanacak toplam 122 hasta randomize edilerek 61 hastanın sperm seçimleri CSW yöntemiyle, 61 hastanın sperm seçimi de fertile chip kullanılarak yapıldı. Çalışma sonucu yapılan analizlerde kontrol grubu ve çalışma grubunun demografik verileri, uygulanan tedavi protokolleri ve tedavi dozları arasında istatistiksel fark saptanmadı. Primer sonuç olan fertilizasyon oranları ve ICSI işlemi sonrası elde edilen embriyo sayıları arasında istatistiksel fark saptanmadı ($p=0,098$ ve $p=0,409$). Siklus başına klinik gebelik oranları ($p=0,57$) ve embriyo transferi başına klinik gebelik oranları ($p=0,39$) arasında da istatistiksel bir fark saptanmadı. Çalışma grubunun açıklanamayan infertilite yerine erkek faktör gibi sperm morfolojik parametreleri bozuk ya da DNA fragmentasyon oranları yüksek olan gruplar seçilerek farklı bulgular saptanabileceğinden yola çıkarak, biz de erkek infertilitesi nedeniyle ICSI planlanan hastalarda fertile chip kullanımının yararını araştırdık.

Biz çalışmamızın sonucunda, MII oosit sayıları ve embriyo sayıları kontrol grubunda fertile chip kullanılan gruba göre anlamlı olarak yüksek olmasına rağmen her iki grupta transfer edilen grade 1 ve grade 2 embriyo sayıları arasında istatistiksel fark saptamadık. Ancak elde edilen total grade 3 embriyo sayısını, kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulduk. Fertile chip ile seçilen spermle yapılan ICSI işlemi sonrası düşük kalitedeki embriyo sayısının, istatistiksel olarak anlamlı derecede az olması, tezimizi desteklemektedir.

Gineroli L. ve arkadaşları çift kırılma yönteminde grade 1 embriyo sayısında anlamlı yüksek fark saptamışlardı (118) ancak biz çalışmamızda grade 1 ve grade 2 embriyo sayıları arasında fark saptamadık. Transfer edilen embriyo sayısı ve transfer günü arasında da fark saptamadık.

Gebelik oranlarını incelediğimizde, biz de çalışmamızda, MACS ve IMSI klinik başarılarına ait meta-analizlerdeki anlamlı yüksek klinik gebelik başarılarına benzer (121, 122), fertile chip kullanılan grupta, siklus ve embriyo transferi başına klinik gebelik oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı yüksek fark saptadık.

Sonuç olarak erkek infertilitesi nedeniyle tedaviye aldığımız hastaların, ICSI tedavilerinde sperm seçimi işlemi sırasında fertile chip kullanımının klinik gebelik başarısını etkilediğini bulduk. Ancak hasta sayımız sınırlı olduğundan, daha yüksek sayıda çalışma gruplarıyla yapılan analizlerle desteklenmesi gerekmektedir. Bu nedenle ileri düzey araştırmaların devamı uygun olacaktır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızın sonucunda her iki çalışma grubunun demografik verileri arasında istatistiksel fark saptanmadı.

Çalışma gruplarında hastaların tedavi protokolleri arasında istatistiksel fark saptanmadı.

Kontrol grubunda iki, fertile chip grubunda iki siklus iptal edildi ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

İki grup arasında MII oositler açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı. Kontrol grubunda MII oosit sayısı yüksek bulundu ancak regresyon analizinde bu farkın gebelik oranları üzerinde anlamı olmadığı anlaşıldı.

Çalışma gruplarında elde edilen total grade 1 embriyo ve grade 2 embriyo açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken, ICSI işlemi sonrası elde edilen toplam embriyo sayısı ve elde edilen total grade 3 embriyo sayısı, kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu.

Fertile chip ve kontrol grubunda transfer edilen embriyo sayısı ve transfer günü arasında istatistiksel fark saptanmadı.

Çalışma gruplarında hastaların fertilizasyon oranları, hastalara transfer edilen grade 1 ve grade 2 embriyo sayısı arasında istatistiksel fark saptanmadı.

Çalışmamızın primer sonuçlarından olan embriyo transferi başına klinik gebelik oranları ile siklus başına klinik gebelik oranları, kontrol grubuna göre, fertile chip grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptandı.

Çalışmamız sonucunda erkek infertilitesi nedeniyle tedavi alan hastaların ICSI tedavileri sırasında sperm seçiminde fertile chip kullanımının, konvansiyonel yöntemlere göre gebelik sonuçları üzerine üstün olduğunu saptadık. Ancak daha yüksek sayıda çalışma gruplarıyla yapılan analizlerle çalışmanın desteklenmesi uygun olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Gnoth C, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Friol K, Tigges J, Freundl G: Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Hum Reprod* 2005, 20: 1144-1147.
2. Saleh RA, Agarwal A, Nelson DR, Nada EA, ElTonsy MH, et al. Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertil Steril* 2002; 78: 313–8.
3. Nallella KP, Sharma RK, Aziz N, Agarwal A. Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertil Steril* 2006; 85: 629–34.
4. Sakkas D, Alvarez JG: Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010, 93:1027-1036.
5. Lin MH, Kuo-Kuang Lee R, Li SH, Lu CH, Sun FJ, et al. Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertil Steril* 2008; 90: 352–9.
6. Lewis SE, Agbaje I, Alvarez J. Sperm DNA tests as useful adjuncts to semen analysis. *Syst Biol Reprod Med* 2008; 54: 111–25.
7. Coughlan C, Clarke H, Cutting R, Saxton J, Waite S, et al. Sperm DNA fragmentation, recurrent implantation failure and recurrent miscarriage. *Asian J Androl* 2015; 17: 681–5.
8. Collins JA, Barnhart KT, Schlegel PN. Do sperm DNA integrity tests predict pregnancy with in vitro fertilization? *Fertil Steril* 2008; 89: 823–31.
9. Rappa Kari L., Rodriguez Harold F., Hakkarainen Gloria C., Anchan RaymondM., Mutter George L., AsgharWaseem, Sperm processing for advanced reproductive technologies: Where are we today?, *Biotechnology Advances* (2016), doi:10.1016/j.biotechadv.2016.01.007
10. Frey, K. (2010) Male reproductive health and infertility. *Primary Care* 37, 643–652.
11. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing for Human Semen. 5th ed. Switzerland: WHO Press; 2010. p. 223–5.
12. Agarwal A, Allamaneni SS. Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *Fertil Steril*. 2005; 84: 850–3.

13. Rappa KL, Rodriguez HF, Hakkarainen GC, Anchan RM, Mutter GL, Asghar W, Sperm processing for advanced reproductive technologies: Where are we today? *Biotechnology advances*, 2016.
14. Asghar W, Velasco V, Kingsley JL, Shoukat MS, Shafiee H, Anchan RM, Mutter GL, Tüzel E, Demirci U, Selection of functional human sperm with higher DNA integrity and fewer reactive oxygen species. *Advanced healthcare materials*, 2014. 3(10): p. 1671-1679.
15. Zhang X, Khimji I, Gurkan UA, Safaee H, Catalano PN, Keles HO, Kayaalp E , Demirci U, Lensless imaging for simultaneous microfluidic sperm monitoring and sorting. *Lab on a chip*, 2011. 11(15): p. 2535-2540.
16. Y.-J. Ko, J.-H. Maeng, B.-C. Lee, S. Lee, S. Y. Hwang, Y. Ahn, Separation of progressive motile sperm from mouse semen using on-chip chemotaxis. *Anal. Sci.* 2012, 28, 27.
17. S. Tasoglu, H. Safaee, X. Zhang, J. L. Kingsley, P. N. Catalano, U. A. Gurkan, A. Nureddin, E. Kayaalp, R. M. Anchan, R. L. Maas, E. Tuzel, U. Demirci, Exhaustion of racing sperm in nature-mimicking microfluidic channels during sorting. *Small* 2013, 9, 3374.
18. R. Henkel, Sperm preparation: state-of-the-art--physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. *Asian J. Androl.* 2012, 14, 260.
19. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril* 2008; 90:S60.
20. Zinaman, M.J., et.al., (1996). Estimates of human fertility and pregnancy loss. *Fertil Steril*, 65(3): 503-9.
21. Ombelet, W., et al., Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. *Hum Reprod Update*, 2008. 14(6): p. 605-21.
22. Boivin, J., et al., International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod*, 2007. (6): p. 1506-12.
23. Dunson, D.B., B. Colombo, and D.D. Baird, Changes with age in the level and duration of fertility in the menstrual cycle. *Hum Reprod*, 2002. 17(5): p. 1399-403.
24. Hull MG, Glazener CM, Kelly NJ, et al. Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1985; 291: 1693
25. Bhattacharya S, Porter M, Amalraj E, et al. The epidemiology of infertility in the North East of Scotland. *Hum Reprod.* 2009; 24: 3096

26. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion. Fertil Steril. 2012; 98: 302.
27. Sharlip, I.D., et al., Best practice policies for male infertility. Fertil Steril, 2002. 77(5): p. 873-82.
28. Speroff L, Fritz MA. Clinical Gynaecologic Endocrinology and Infertility. 8nd edition. 2011.
29. MicroRNAs and spermatogenesis (Fertil Steril_ 2014;101:1552–62. _2014 by American Society for Reproductive Medicine.)
30. Kanatsu-Shinohara M, Shinohara T. Spermatogonial stem cell self-renewal and development. Annu Rev Cell Dev Biol 2013;29: 163–87.
31. Miller MP, Amon A, Unal E, Meiosis I. when chromosomes undergo extreme makeover. Curr Opin Cell Biol 2013;25: 687–96.
32. Rathke C, Baarends WM, Awe S, Renkawitz-Pohl R. Chromatin Dynamics during spermiogenesis. Biochim Biophys Acta 2014;1839:155–68.
33. Guyonnet B, Dacheux F, Dacheux J-L, Gatti J-L. The epididymal transcriptome and proteome provide some insights into new epididymal regulations. J Androl 2011;32: 651–64.
34. Amann RP, The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? J Androl 2008;29: 469-487
35. Hinrichsen MJ, Blaquier JA, Evidence supporting the existence of sperm maturation in the human epididymis, J Reprod Fertil 60: 291, 1980.
36. Samplaski, M.K., et al., New generation of diagnostic tests for infertility: review of specialized semen tests. Int J Urol, 2010. 17(10): p. 839-47.
37. Mawhinney, M. and A. Mariotti, Physiology, pathology and pharmacology of the male reproductive system. Periodontol 2000, 2013. 61(1): p. 232-51.
38. Spratt DI, Carr DB, Merriam GR, Scully RE, Rao PN, Crowley WF, Jr.,The spectrum of abnormal patterns of gonadotropinreleasing hormone secretion in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: clinical and laboratory correlations, J Clin Endocrinol Metab 64:283, 1987.
39. Schwartz ID, Root AW, The Klinefelter syndrome of testicular dysgenesis, Endocrinol Metab Clin North Am 20: 153, 1991.
40. Patrizio P, Asch RH, Handelin B, Silber SJ, Aetiology of congenital absence of vas deferens: genetic study of three generations, Hum Reprod 8: 215, 1993.

41. Zariwala MA, Knowles MR, Omran H, Genetic defects in ciliary structure and function, *Annu Rev Physiol* 69: 423, 2007.
42. Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion. *Fertil Steril*, 2012. 98(2): p. 302-7.
43. Medicine PCotASfR, Optimal evaluation of the infertile female. *Fertility and sterility*, 2006. 86(5): p. S264-S267
44. McLaren, J.F., Infertility evaluation. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 2012. 39(4): p. 453-63.
45. Hatasaka, H., An efficient infertility evaluation. *Clin Obstet Gynecol*, 2011. 54(4): p. 644-55.
46. Mosher WD, Pratt WF. Fecundity and infertility in the United States: incidence and trends. *Fertil Steril* 1991;56: 192–3.
47. Luciano AA, Peluso J, Koch EI, Maier D, Kuslis S, Davison E. Temporal relationship and reliability of clinical, hormonal, and ultrasonographic indices of ovulation in infertile women. *Obstet Gynecol* 1990;75: 412– 6.
48. Wathen NC, Perry L, Lilford RJ, Chard T. Interpretation of single progesterone measurement in diagnosis of anovulation and defective luteal phase: observations on analysis of the normal range. *Br Med J* 1984;288:7–9.
49. Fritz, M.A., The modern infertility evaluation. *Clin Obstet Gynecol*, 2012. 55(3): p. 692-705.
50. de Crespigny LC, O’Herlihy C, Robinson HP. Ultrasonic observation of the mechanism of human ovulation. *Am J Obstet Gynecol* 1981;139: 6369.
51. Female age-related fertility decline. Committee Opinion No. 589. *Fertil Steril*, 2014. 101(3): p.633-4.
52. Committee on Gynecologic Practice of the American College of Obstetricians and Gynecologists, The Practice Committee of the American Society of Reproductive Medicine. Age-related fertility decline: a committee opinion. *Fertil Steril* 2008;90 (Suppl 5):S154–5.
53. Hendriks DJ, Mol BW, Bancsi LF, et al. Antral follicle count in the prediction of poor ovarian response and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis and comparison with basal follicle-stimulating hormone level. *Fertil Steril* 2005; 83(2):291–301.
54. Ledger WL. Clinical utility of measurement of anti-mullerian hormone in reproductive endocrinology. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95(12):5144–54.

55. T. Ebner, M. Sommergruber, M. Moser, O. Shebl, E. Schreier-Lechner, G. Tews; Basal level of anti-Müllerian hormone is associated with oocyte quality in stimulated cycles, *Human Reproduction*, Volume 21, Issue 8, 1 August 2006, Pages 2022–2026
56. Muttukrishna, S., McGarrigle, H., Wakim, R., Khadum, I., Ranieri, D.M. and Serhal, P. (2005), Antral follicle count, anti-mullerian hormone and inhibin B: predictors of ovarian response in assisted reproductive technology?. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 112: 1384–1390.
57. Soares SR, Barbosa dos Reis MM, Camargos AF. Diagnostic accuracy of sonohysterography, transvaginal sonography, and hysterosalpingography in patients with uterine cavity diseases. *Fertil Steril*. 2000 Feb;73(2):406-11.
58. Hamilton JA, Larson AJ, Lower AM, Hasnain S, Grudzinskas JG. Routine use of saline hysterosonography in 500 consecutive, unselected, infertile women. *Hum Reprod*. 1998 Sep;13(9):2463-73.
59. den Hartog JE, Morré SA, Land JA. Chlamydia trachomatis-associated tubal factor subfertility: Immunogenetic aspects and serological screening. *Hum Reprod Update*. 2006 Nov-Dec;12(6):719-30.
60. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2012 Aug;98(2):294-301.
61. Collins JA, Burrows EA, Wilan AR. The prognosis for live birth among untreated infertile couples, *Fertil Steril* 1995;64: 22-8.
62. Esteves SC. Clinical relevance of routine semen analysis and controversies surrounding the 2010 World Health Organization criteria for semen examination. *Int Braz J Urol*. 2014 Jul-Aug;40(4):443-53.
63. World Health Organization. 2010 Laboratory manual for the examination and processing of human semen. Available from: URL: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547789_eng.pdf
64. Pellestor F, Girardet A, Andreo B, Effect of long abstinence periods on human sperm quality. *International journal of fertility and menopausal studies*, 1993. 39(5): p. 278-282.
65. Amelar, R.D., L. Dubin, and C. Schoenfeld, Semen analysis. An office technique. *Urology*, 1973. 2 (6) : p. 605-11.
66. WHO, Manual for semen analysis. 2010. 5th. ed.

67. Ombelet, W., et al., Results of a questionnaire on sperm morphology assessment. *Hum Reprod*, 1997. 12 (5) : p. 1015-20.
68. K, A., Erkek infertilitesi. *Temel Üroloji*, 2007. 3: p. 967-1012.
69. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics, *Hum Reprod Update* 16:231, 2010.
70. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men, *New Engl J Med* 345:1388, 2001.
71. Bonde JP, Ernst E, Jensen TK, Hjollund NH, Kolstad H, Henriksen TB, et al. Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners, *Lancet* 352:1172, 1998.
72. Gardner D.K., Weissman A., Howles C. M. , Shoham Z., *Textbook of assisted reproductive techniques*, Fourth Edition, Volume 1: Laboratory Perspectives. Informa Healthcare, 2012.
73. Padubidri, D. (2011). *Shaw's Textbook of Gynaecology*, 15e. 204.
74. Cooper T. (Ed.), (2010). *WHO laboratory manual for processing of human semen* (5th ed.), World Health Organization, Geneva, Switzerland
75. Sandoval, J.S., Raburn, D. Muasher, S. (2013). Leukocytospermia: Overview of diagnosis, implications, and management of a controversial finding; *Middle East Fertility Society Journal*, Volume 18, Issue 3 September, 129–134.
76. Boitrelle, F., Robin, G., Marcelli, F., Albert, M., Leroy-Martin, B., Dewailly, D., Rigot, J.-M., Mitchell, V. (2011). A predictive score for testicular sperm extraction quality and surgical ICSI outcome in non-obstructive azoospermia: a retrospective study. *Hum Reprod*, Dec; 26(12): 3215-21.
77. Talwar, P. and S. Hayatnagarkar, Sperm function test. *J Hum Reprod Sci*, 2015. 8(2): p. 61-9.
78. Fritz M.A., Speroff, L. (2005). *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, Eighth Edition Male Infertility.
79. Oehninger, S., et al., (1992). Hemizona assay and its impact on the identification and treatment of human sperm dysfunctions. *Andrologia*, 24(6): 307-21.
80. Consensus workshop on advanced diagnostic andrology techniques ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) (1996). *Andrology Special Interest Group Hum Reprod*, 11:1463.

81. Stanger, J.D., et al., Hypo-osmotic swelling test identifies individual spermatozoa with minimal DNA fragmentation. *Reprod Biomed Online*, 2010. 21(4): p. 474-84.
82. Agarwal, Ashok et al. "Oxidation-Reduction Potential of Semen: What Is Its Role in the Treatment of Male Infertility?" *Therapeutic Advances in Urology* 8.5 (2016): 302–318. PMC. Web. 15 Aug. 2017.
83. McLachlan, R.I. and M.K. O'Bryan, Clinical Review#: State of the art for genetic testing of infertile men. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010. 95(3): p. 1013-24.
84. Palermo, G.D., et al., Perspectives on the assessment of human sperm chromatin integrity. *Fertil Steril*, 2014. 102(6): p. 1508-17.
85. Du Plessis, S.S., S. Gokul, and A. Agarwal, Semen hyperviscosity: causes, consequences, and cures. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2013. 5: p. 224-31.
86. Mikhailichenko, V.V. and A.S. Esipov, Peculiarities of semen coagulation and liquefaction in males from infertile couples. *Fertil Steril*, 2005. 84(1): p. 256-9.
87. Schulte, Ryan T. et al. "Sperm DNA Damage in Male Infertility: Etiologies, Assays, and Outcomes." *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 27.1 (2010): 3–12. PMC. Web. 16 Aug. 2017.
88. Lewis, S.E. and Aitken, R.J. (2005). DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res*, 322(1): 33-41.
89. Report on optimal evaluation of the infertile male *Fertility and Sterility*, Volume 86, Issue 5, S202 - S209
90. De Braekeleer, M. and T.N. Dao, Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod*, 1991. 6(2): p. 245-50.
91. Pryor, J.L., et al., Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *N Engl J Med*, 1997. 336(8): p. 534-9.
92. Tournaye H. Male factor infertility and ART. *Asian Journal of Andrology*. 2012;14(1):103-108.
93. Pavlovich CP, King P, Goldstein M, Schlegel PN, Evidence of a treatable endocrinopathy in infertile men, *J Urol* 165:837, 2001.
94. Raman JD, Schlegel PN, Aromatase inhibitors for male infertility, *J Urol* 167:624, 2002.
95. Kolettis PN, Thomas AJ, Jr., Vasoepididymostomy for vasectomy reversal: a critical assessment in the era of intracytoplasmic sperm injection, *J Urol* 158:467, 1997.
96. Schlegel PN, Is assisted reproduction the optimal treatment for varicocele-associated male infertility? A cost-effectiveness analysis, *Urology* 49:83, 1997.

97. Wright VC, Chang J, Jeng G, Macaluso M. Assisted reproductive technology surveillance—United States, 2005. *MMWR Surveill Summ* 2008; 57:1–23.
98. Centers for Disease Control and Prevention ASfRM, Society for Assisted Reproductive Technology. 2012 Assisted Reproductive Technology Fertility Clinic
99. Boivin, J., Bunting, L., Collins, J.A., Nygren, K.G. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: Potential need and demand for infertility medical care. 2007. *Hum Reprod.* 22: 2800-2800.
100. Palermo G., Joris H., Devroey P., Van Steirteghem A.C. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *The Lancet.* 1992. 340: 17-18.
101. Schultz R.M., Williams C.J. The science of ART. *Science.* 2002. 296: 2188-2190.
102. Eisenbach M, Giojalas LC, Sperm guidance in mammals—an unpaved road to the egg. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2006. 7(4): p. 276-285.
103. Wright C, Milne S, Leeson H. Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. *Reproductive biomedicine online.* 2014;28:684-703.
104. Henkel R. Sperm preparation: state-of-the-art—physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. *Asian journal of andrology.* 2012;14:260.
105. Aitken R, Bronson R, Smith T, De Iuliis G. The source and significance of DNA damage in human spermatozoa; a commentary on diagnostic strategies and straw man fallacies. *Molecular human reproduction.* 2013;gat025
106. González-Marín C, Gosálvez J, Roy R, Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *International journal of molecular sciences*, 2012. 13(11): p. 14026-14052
107. Aitken R.J., Clarkson J.S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J. Androl.* 1988. 6: 367–376.
108. Foong SC, Fleetham JA, O’Keane JA, Scott SG, Tough SC, Greene CA, A prospective randomized trial of conventional in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in unexplained infertility. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 2006. 23(3): p. 137-140.
109. Kam TL, Jacobson JD, Patton WC, Corselli JU, Chan PJ. Retention of membrane charge attributes by cryopreserved-thawed sperm and zeta selection. *J Assist Reprod Genet* 2007;24:429–434.

110. Razavi SH, Nasr-EsfahaniMH, DeemehMR, Shayesteh M, Tavalae M. Evaluation of zeta and HA-binding methods for selection of spermatozoa with normal morphology, protamine content and DNA integrity. *Andrologia* 2010;42:13–19.
111. Grunewald S, Paasch U, Glander HJ. Enrichment of non-apoptotic human spermatozoa after cryopreservation by immunomagnetic cell sorting. *Cell Tissue Bank* 2001;2: 127–133.
112. Manz R, Assenmacher M, Pfluger E, Miltenyi S, Radbruch A. Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell surface affinity matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92: 1921–1925.
113. Said TM, Grunewald S, Paasch U, Glander H-J, Baumann T, Kriegel C, Li L, Agarwal A. Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. *Reprod BioMed Online* 2005a;10: 740–746.
114. Romany L, Garrido N, Motato Y, Aparicio B, Remohí J, Meseguer M. Removal of annexin V–positive sperm cells for intracytoplasmic sperm injection in ovum donation cycles does not improve reproductive outcome: a controlled and randomized trial in unselected males. *Fertility and sterility*. 2014.
115. Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovanci 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: 1665–1673.
116. Fleming S, Ilad R, Griffin AG, Wu Y, Ong K, Smith H, et al. Prospective controlled trial of an electrophoretic method of sperm preparation for assisted reproduction: comparison with density gradient centrifugation. *Human reproduction*. 2008;23: 2646-51.
117. 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): p. 1-8.
118. Gianaroli L, Magli MC, Collodel G, Moretti E, Ferraretti AP, Baccetti B. Sperm head's birefringence: a new criterion for sperm selection. *Fertil Steril* 2008; 90: 104–112.
119. Assisted Reproductive Microchip Technologies to Improve Infertility ShuQi Wang, Fatih Inci and Utkan Demirci / January 14, 2015.
120. Sallam HN, Ezzeldin F, Agameya A-F, Abdel-Rahman AF, El-Garem Y, The definition of 'poor response': Bologna criteria. *Human reproduction*, 2011: p. der398.

121. Gil M, Sar-Shalom V, Sivira YM, Carreras R, Checa MA, Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 2013. 30(4): p. 479-485.
122. Teixeira DM, Barbosa MA, Ferriani RA, Navarro PA, Raine-Fenning N, Nastri CO, Martins WP, Regular (ICSI) versus ultra-high magnification (IMSI) sperm selection for assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev*, 2013. 7: p. Cd010167.
123. Alagöz O., Özkara G., Koçer Yazıcı M. G., Fıçıcıoğlu C. Improving Pregnancy Rate in IVF Cycles by Preparing Sperm via Microfluid Sperm Chips, Yeditepe University Hospital, IVF Center, İstanbul, Turkey, ESHRE'17 Poster
124. Ramakrishnan S., Balasubramanyam S., Amita S., Kumar P. Sperm separation by Microfluidic Sperm Sorter (MFSS)- Comparison of DNA Fragmentation index, embryo quality, clinical pregnancy rate and implantation rates with density gradient centrifugation. Cloud Nine Hospitals, Fertility Department, Chennai, India. ESHRE'17 Poster.
125. Özkara G., Alagöz O., İsmiçoğlu A., Koçer Yazıcı M. G., Fıçıcıoğlu C. Mikroakışkan Çip kullanımının Blastokist gelişimine etkisi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilimdalı, Yeditepe Üniversitesi Hastanesi, İstanbul. 19th World Congress on IVF, poster.
126. Özkara G., Alagöz O., İsmiçoğlu A., Koçer Yazıcı M. G., Fıçıcıoğlu C. Düşük sperm değerlerine sahip hastalarda Mikroakışkan Çip kullanımının Blastokist gelişimine etkisi. Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilimdalı, Yeditepe Üniversitesi Hastanesi, İstanbul. 19th World Congress on IVF, poster.
127. Kilicdag EB, Haydardedeoglu B, Cok T, Hacivelioglu SO, Bagis T, Premature progesterone elevation impairs implantation and live birth rates in GnRH-agonist IVF/ICSI cycles. *Arch Gynecol Obstet*, 2010. 281(4): p. 747-52.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Şirin AYDIN DENİZ

Doğum Tarihi ve Yeri : 16.07.1987 – ADANA

Adres : Yurt mah. 71377 Sok. Hakan Burak Apt. B blok
Kat:2/4 Seyhan/ADANA

Telefon : 0 (546) 9600601

E-mail : dr.sirinaydinn@gmail.com

Mezun Olduğu Tıp Fakültesi : Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi- 2012-ANKARA

Görev Yerleri : İskenderun Devlet Hastanesi – Acil servis (2ay)-
HATAY
Etlik Zübeyde Hanım Kadın Hastalıkları ve Doğum
E.A.H (2,5 yıl)-ANKARA
Başkent Üniversitesi Dr.Turgut NOYAN Adana
Uygulama ve Araştırma Merkezi Kadın Hastalıkları
ve Doğum- ADANA

Yabancı Diller : İngilizce