



T.C

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

**İDİYOPATİK ERKEK FAKTÖR
İNFERTİLİTESİ TANISIYLA ICSI
(İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU)
TEDAVİSİ YAPILAN HASTALARDA MEDİKAL
TEDAVİNİN FERTİLİZASYON, GEBELİK VE CANLI
DOĞUM ORANLARINA
ETKİSİ**

Dr. Hasan YILMAZ

ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

UZMANLIK TEZ

KOCAELİ-2011

T.C

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

**İDİYOPATİK ERKEK FAKTÖR
İNFERTİLİTESİ TANISIYLA ICSI
(İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU)
TEDAVİSİ YAPILAN HASTALARDA MEDİKAL
TEDAVİNİN FERTİLİZASYON, GEBELİK VE CANLI
DOĞUM ORANLARINA
ETKİSİ**

Dr. Hasan YILMAZ

ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Melih ÇULHA

Anabilim Dalı Başkanı: Prof. Dr. Ali GÖKALP

Etik Kurul Onayı: 27/ 12/ 2010 KAEK-1/8, Proje No:2010/7

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca her türlü pratik bilgi ve deneyimlerini bizlerle paylaşan, mesleki ve sosyal ufukumun gelişmesinde büyük payları olan değerli hocalarım Prof. Dr. Ali Gökalp' e, Prof. Dr. Özdal Dillioğlugil' e, Prof. Dr. Melih Çulha' ya, Prof. Dr. Sıtkı Özdamar' a, Prof. Dr. Cüneyd Özkürkçügil' e ve Yard. Doç. Dr. Levend Özkan' a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Bu çalışmanın yapılmasında büyük katkıları olan ve yardımlarını esirgemeyen, Prof. Dr. Melih Çulha' ya ayrıca teşekkür ediyorum.

Birlikte çalışmaktan onur duyduğum araştırma görevlisi arkadaşlarım Dr. Alp Özkan' a, Dr. Mücahit Kart' a, Dr. Ufuk Yavuz' a, Dr. Murat Üstüner' e, Dr. Seyfettin Çiftçi' ye, Dr. Serkan Aynur' a, Dr. Kerem Teke' ye ayrıca beraber çalıştığımız tüm hemşire arkadaşlarıma ve klinik personeline teşekkür eder, sevgilerimi sunarım.

Bu günlere gelmemde emeğini ve desteğini esirgemeyen sevgili aileme şükranlarımı sunarım.

Tıp eğitimine başladığım ilk günden beri sevgisini ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim sevgili eşim Dr. Senem Yılmaz' a sonsuz sevgimi ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Hasan YILMAZ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
KISALTMALAR	III
TABLolar DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
GEREÇ VE YÖNTEM	41
BULGULAR	45
TARTIŞMA	48
SONUÇ	57
ÖZET	58
İNGİLİZCE ÖZET	59
KAYNAKLAR	60

KISALTMALAR

OAT:	Oligoastenoteratospermi
iOAT:	İdiyopatik Oligoastenoteratospermi
IVF:	İn Vitro Fertilizasyon
ICSI:	İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
GnRH:	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
FSH:	Folikül Uyarıcı Hormon
LH:	Lüteinize Edici Hormon
ER:	Östrojen Reseptörü
AR:	Androjen Reseptörü
T:	Testosteron
E2:	Östradiol
cAMP:	Siklik Adenozin Monofosfat
ATP:	Adenozin Trifosfat
ASA:	Antisperm Antikorlar
hCG:	İnsan Koryonik Gonadotropin
hMG:	İnsan Menopozal Gonadotropin
TESE:	Testiküler Sperm Eldesi
recFSH:	Rekombinant Follikül Uyarıcı Hormon
GV:	Germinal Kesecik
ROT:	Reaktif Oksijen Türleri
PVP:	Polivinilprolidon
2-PN:	2-Polar Nükleus
WHO:	Dünya Sağlık Örgütü
PHGPx:	Fosfolipid Hidroperoksit Glutatyon Peroksidaz

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1: Erkek infertilitesi ile birlikte görülebilecek durumlar	13
Tablo 2: Erkek faktör infertilitesi etiyolojik sebepleri ve sıklığı	15
Tablo 3: Semen parametrelerinin alt referans değerleri	24
Tablo 4: ICSI 'nın Güncel Endikasyonları	34
Tablo 5: Demografik Özellikler ve Fertilite Özellikleri	45
Tablo 6: Semen Parametreleri ve ICSI Başarısı	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1: Hipotalamogonadal Aks	4
Şekil 2: Memeli Spermatozoası tipik şeması	12

1.GİRİŞ

İnfertilite üreme yaşındaki çiftlerin %15' ini etkileyen ciddi bir sağlık sorunudur. İnfertilite olgularının %30' u tek başına erkek faktöründen kaynaklanırken (1) %50'sinden fazlasında da bir erkek faktörü mevcuttur (2).

Subfertilite 1 yıllık korunmasız cinsel ilişkiye rağmen çocuk sahibi olamamadır. Bu durum sperm üretim azlığından(oligozoospermi), sperm hareket azlığından (astenospermi) veya morfoloji bozukluğundan (teratospermi) kaynaklanabilir. Fakat genelde bunların kombinasyonu görülür ki; bu durum oligoastenoteratospermi (OAT) olarak adlandırılır ve erkek subfertilitesinin en sık nedeni olarak kabul edilir (3). Günümüzde erkek faktör infertilitesinin büyük bir kısmında bu duruma yol açan bir sebep bulunamaz ve idiyopatik olarak adlandırılır. İdiyopatik oligoastenoteratospermi (iOAT) etiyojisi bilinmeyen spermatogenez patolojisidir ve etiyojik nedeni genel laboratuvar testleriyle ortaya konulamaz kabul edilir (4). Bu durum infertil erkeklerin yaklaşık %60-75' ini etkiler (5).

1978' de ilk bebeğin (Louise Brown) doğmasından itibaren IVF (İnvitro fertilizasyon) / ICSI (İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu) kullanılarak dünya çapında 1 milyondan fazla bebek dünyaya gelmiştir (6, 7). Günümüzde gelişmiş ülkelerde doğumların yaklaşık %1-3' ü bu yöntemlerle gerçekleşmektedir (8, 9). IVF/ICSI, ciddi erkek faktör infertilitesine sahip çiftlerde gebeliğe imkân tanır. Bu etkinin bir sonucu ve yan ürünü olarak çoğu zaman erkek partnerin tam değerlendirilmeden yardımla üreme teknikleri kullanımına eğilim vardır. Ancak erkek partnerin tam değerlendirilmemesi hastalar, eşleri ve olası çocukları için güvenli olmayabilir ve maliyet-yarar açısından uygun değildir (10).

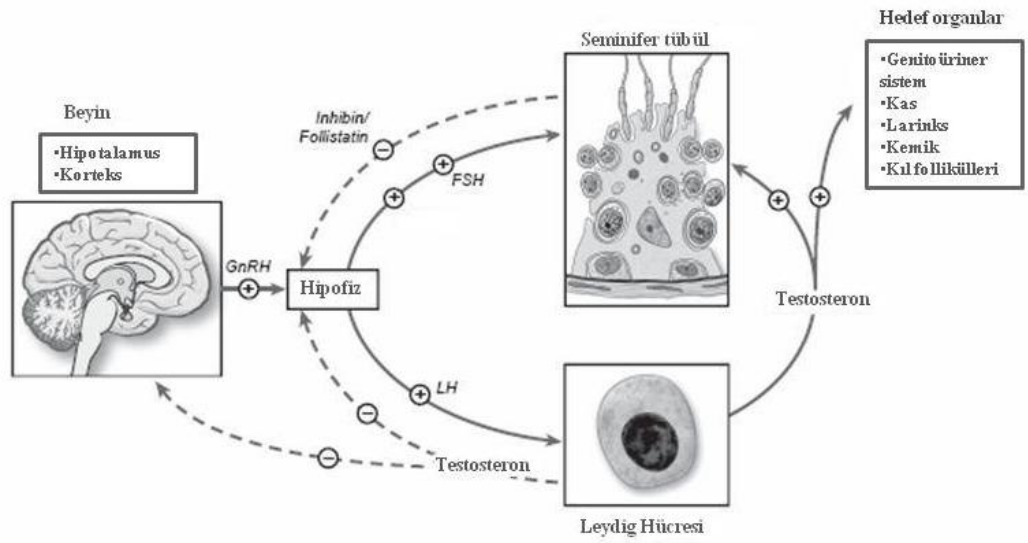
Bir tek spermle dahi gebeliğin başarılabilirdiği ICSI ağında idiyopatik erkek faktör infertilitesi gerçekten de tedavi edilmeli midir? IVF/ICSI ile tedavi edilecek hastalar için sperm konsantrasyonunda artışı ne derece gerekli olduğu tartışılabılır fakat uygulanacak tedaviler ile sperm kalitesinin iyileştirilmesi fertilite potansiyelinde düzelmeler sağlayarak bizi IVF/ICSI de daha iyi sonuçlara ulaştırabilecektir (11). Antioksidanlar, sperm hareketini artırarak (12, 13) ve spermilerin DNA fragmantasyonunu azaltarak; aromataz inhibitörleri de sperm yapımını indükleyerek ve normal genotipte spermilerin sayısını artırarak (14) sperm kalitesinin iyileştirilmesine katkı sağlayabilirler.

Çalışmamızda ICSI tedavisi almış idiyopatik erkek faktör infertilitesine sahip hastaları retrospektif olarak değerlendirerek medikal tedavinin fertilizasyon, gebelik ve canlı doğum oranlarına etkisini inceledik.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 ERKEK ÜREME AKSI

Erkek üreme fonksiyonu, hipotalamus, hipofiz ve testisler olmak üzere 3 komponentli reproduktif aks tarafından kontrol edilir (15). Hipotalamus ve hipofiz endokrin fonksiyonlar üzerine etkilidir. Hipotalamustan GnRH (Gonadotropin Salgılatıcı Hormon) salgılanır. Bu görevi medyan eminense yönelen aksonlarla preoptik alanda lokalize hipotalamik nöronlar üstlenmiştir. GnRH, hipotalamus ile hipofiz arasındaki kan damarlarının oluşturduğu hipotalamohipofizer portal sistem ile ön hipofize (adenohipofiz) ulaştırılır (15). Ön hipofize GnRH uyarısı buradan FSH (Folikül Uyarıcı Hormon) ve LH (Lüteinize Edici Hormon) salınmasına yol açar. Kan yoluyla testise ulaşan FSH, sertoli hücreleri stimülasyonu ile seminifer tübül epitelinde spermatogenezi uyarırken LH ise testise ulaştıktan sonra intertisyumdan Leydig hücrelerinden testosteron salgılanmasını sağlar (15). Testosteron ve onun metaboliti olan östradiol ise hem hipotalamus hem de hipofiz üzerine baskılayıcı etki gösterir. Bu etki, aynı zamanda erkek üreme aksı üzerinde negatif-feedback bir düzenlenmenin göstergesidir. Ayrıca sertoli hücrelerinden salgılanan inhibin hipofizden FSH salınımını baskılar (15). İnsan Sertoli hücrelerinden salgılanan inhibin formuna inhibin B adı verilir (16). İnhibinin alt grupları olan alfa ve beta ile beta alt grubun B değişkenine sahip olduğu için bu ad verilmiştir. İnhibin B, seçici olarak FSH 'ın beta subünitesini kodlayan genlerin transkripsiyonunu inhibe eder (17).



Şekil 1. Hipotalamogonadal Aks

2.2 HİPOTALAMUS ve HİPOFİZ

Hipotalamustan GnRH salınımı 3 şekilde olmaktadır; aylara göre farklılık gösteren ve ilkbahar aylarında en yüksek düzeylere ulaşan ‘mevsimsel’, sabah erken saatlerde yüksek testosteron seviyesine ulaşan ‘sirkadien’, ortalama her 90-120 dk arasında gerçekleşen ‘pulsatil’ salınımıdır (15).

FSH ve LH salınımı adenohipofiz tarafından gerçekleştirilir. LH, 2 saatlik atımlar şeklinde pulsatil salgılanır (18). Bunun dışında adenohipofizde adrenokortikotropik hormon, prolaktin, büyüme hormonu, tiroit uyarıcı hormonu salgılamak için özelleşmiş hücreler bulunur. Adenohipofizden salgılanan bu diğer hormonlar da erkek reproduktif sistemi üzerine önemli etkilere sahiptirler.

Erkek üreme sisteminin hormonal kontrolünde negatif-feedback baskılama önemli yer tutar. Testosteron aromataz enzimi ile östradiole (E2), 5-alfa redüktaz enzimi ile dihidrotestosterona metabolize olur. Negatif-feedback etki öncelikli olarak

E2 bağlayan ER (östrojen reseptörü) ve testosteron bağlayan AR (androjen reseptörü)' den kaynaklanıyor gibi gözükmektedir (15). Östrojenler, her iki GnRH dalgalanmasına yanıt veren gonadotropin sekresyonunu ayarlamak için hipofize feed-back' i sağlarken, testosteron öncelikli olarak hipotalamus düzeyinde feed-back' de rol oynar(19). Testosteronun LH sekresyonunu baskılayıcı etkisi öncelikli olarak androjenlerin kendisi ile kontrol edilirken, FSH sekresyonuna baskılayıcı etkisi aromatize formu E2 tarafından kontrol edilmektedir (20). Böylece E2 erkeklerde FSH sekresyonunun esas düzenleyicisidir.

Spermatogenez için FSH' ın mutlak gerekliliği tartışma konusudur. FSH ve FSH reseptör genlerinde knockout mutasyon olan erkek farelerde yapılan çalışmalarda bunların fertil oldukları ortaya konulmuştur. Son çalışmalarda, hasarlı testislerde artmış T/E2 oranı ile belirlenen testosteronun E2' ye dönüşümünde artış olduğu gösterilmiştir. Bu bozukluk, testosteronun E2' ye dönüşümünü azaltan aromataz inhibitörleri ile tedavi edilebilir. Bunun dışında yapılan çalışmalar 'kök hücre faktörü' gibi spermatogenez için açıkça gerekli olan faktörleri ortaya çıkarmıştır (15).

2.3 TESTİS

Erkek üreme aksının son bileşeni ise testistir. Testis iki fonksiyonel anatomik yapıdan oluşmuştur. Birincisi testosteron salgılayan Leydig hücrelerinin yer aldığı intertisyel doku, ikincisi ise spermatogenezin gerçekleştiği seminifer tübüllerdir (21). Erişkin testis ağırlığının yaklaşık %90' ı seminifer tübüllerden oluşurken intertisyel doku tubuler kıvrımlar içinde ince bir alandır (15).

İntertisyum kan damarları, lenfatik damarlar, fibroblastik destek hücreleri, makrofajlar, mast hücreleri ve Leydig hücrelerini içerir (22, 23). Leydig hücreleri

testiküler steroid üretiminin çoğundan sorumludur. Kolesterolde sentezlenen testosteron, insan testisinde sentezlenen ana steroittir. LH' in Leydig hücrelerine ıveğen (akut) ve süreğen (kronik) etkisi mevcuttur (21). LH' in ıveğen etkisinde önce Leydig hücresi üzerindeki reseptörüne bağlanır. LH' in reseptörüne bağlanması cAMP üretimi ve diğere bazı hücre içi olaylar aracılığı ile mitokondri içine kolesterol transportunu başlatır. Bunların sonucu testosteron sentezi artar. LH' in süreğen etkisi ile ise, hücrenin steroidale enzim miktarının devamlılığı ve hücre içi düz endoplazmik retikulum içeriğinin düzenlenmesi sağlanır (21). Ratlarda LH uyarımının kesilmesi, Leydig hücre volümünün azalması ve testosteron miktarının azalmasına sebep olurken Leydig hücre sayısı değışmez (24). Leydig hücre volümü, testisin testosteron üretim kapasitesi ile orantılıdır. Bu durum Leydig hücre volümü ve steroidogenezin LH' in trofik uyarısına bağılı olduğunu gösterir. Erkeklerde periferik kanda bulunan testosteron düzeyleri yaşam boyu farklılık gösterir (21). Gestasyonun 12-18. haftaları arasında insan fetüsünde testosteronun ilk pikini yaptığı ortaya konulmuştur. Bunun amacı erkek üreme organlarının erkek yönünde gelişimini sağlamaktır. Bir diğere testosteron artışı neonatal 2. ayda olur. Bu pik sırasında androjen bağımlı hedef organların pubertede uygun gelişimini sağlamak için organizasyon yapılır. Testosteron, yaşamın 2-3. dekadında maksimum düzeyine ulaşır. Bu sırada maskülanizasyon sağlanır (21). Serum testosteron düzeyi yaşamın 5. dekadına kadar belli bir düzeyde seyrederek ve bu zamandan başlayarak serum düzeyinde düşme meydana gelir (25). Erişkinde testosteron androjen bağımlı organlardaki büyüme ve fonksiyonun devamlılığının sağlanmasından sorumludur (25-29). Ayrıca testosteron seviyesinde aylık ve yıllık ritimler de meydana gelir. Bu ritme olan aşırı yüklenmeler periferik kanda testosteron konsantrasyonunda düzensiz dalgalanmalara neden olur (15).

Spermatozoa üretimi androjene bağımlıdır. Eğer androjenler nötrale edilirse spermatogenez mayozun erken dönemlerinde durur ve erkek fetüs azospermik olur. Androjen verilmesi ile spermatogenez yeniden başlar (30).

Seminifer túbüller germinal elemanlar ve destek hücrelerinden oluşur. Sertoli hücreleri ve bazal membranın destek hücreleri, seminifer túbüllerin destek hücreleridir. Germinal elemanlar ise yavaş büyüyen primitif kök hücre grupları, hızla proliferen olan spermatogonya, mayoza giden spermatositler ve metamorfoz spermatidleri içeren epitelyumal hücre gruplarından oluşur (15).

Seminifer túbül bazal membranı üzerinde sertoli hücreleri yer alır. Sertoli hücreleri túbül lümenine ipliksi sitoplazmik dallanmalar gösterirler. Germinal hücreler, Sertoli hücrelerinin bu sitoplazmik uzantıları arasında yer alır (31). Birbirini izleyen daha ileri evre spermatosit ve spermatidler bu epitelyumun daha üst seviyelerinde yerleşmişken, diferensiyen olamamış spermatogonya, bazal membranın yakınında yer alır (31). Bu yüzden seminifer epitelyum, çoğalmayan sertoli hücre popülasyonu ile bazalde çoğalan yüzeyde farklılaşan germ hücre popülasyonundan oluşur. İki hücre popülasyonu arasında dinamik ilişki seminifer túbülü ayrıcalıklı kılan bir özelliktir (32). Sertoli hücreleri, spermatogonyumların çoğalmasının kontrolünde, yaşamlarının devam ettirilmesinde ve spermiyumların gelişmesinde hayati öneme sahip bir destek görevi görür. Sertoli hücreleri fonksiyonları sperm hücreleri ile belirgin fiziksel temas, fagositoz, sıvı sekresyonu ve üretimi ile çeşitli moleküllerin sekresyonunu olarak sıralanabilir (15). Sertoli hücrelerinin fonksiyonundaki bir bozukluk, normal spermatogenezi kesintiye uğratar. Bununla birlikte asıl patoloji germinal hücre dizisinde ise sertoli hücresi üzerinde bir etki görülmez (33). Sertoli hücreleri sadece fetal, neonatal ve prepubertal dönemde çoğalırlar. Puberteden sonra artık çoğalmazlar. Sertoli hücrelerinin prepubertal çoğalması FSH ve Leydig parakrin faktörlerin uyarısıyla gerçekleşir. Ayrıca sertoli hücrelerinin fonksiyonlarının düzenlenmesinde FSH ve testosteron önemli rol oynar (15). FSH sekresyonunun feed-back baskılanması sertoli hücreleri tarafından salgılanan inhibin B ile de olmaktadır (15).

Sertoli hücresinin tabanı plazma ortamında, apeksi ise seminifer túbül lümenindedir. Komşu sertoli hücreleri birbirlerine sitoplazmik özelleşmiş birleşme

komplekslerinden oluşan sıkı bağlantılarla bağlıdırlar (15). Seminifer tübül bazal membranı, bunun dışında kalan kan damarının endotel hücresi ve sıkı bağlantı kompleksleriyle sertoli hücreleri kan-testis bariyerini oluşturur (26, 34, 35). Kan-testis bariyeri, spermatogenezin başlamasıyla fonksiyonel olarak gelişir (36). Bununla birlikte, germ hücrelerinin varlığı bariyerin gelişimi için gerekli değildir (37). Kan-testis bariyerinin klinik önemi puberteden sonra anlaşılır. Çünkü germ hücrelerinde mayoz sırasında gelişen antijenler sadece pubertenin başlangıcından sonra bulunurlar. Böylece biyopsi, torsiyon ya da travma gibi testiküler bir hasar, eğer puberteden önce olursa antisperm antikor üretmeyecektir (38). Ancak puberte sonrasında meydana gelirse germ hücrelerle birlikte antijenlerin immun reaksiyon oluşturmaya neden olabilir (38).

Seminifer tübül germinal epitelyumu insanda günlük yaklaşık 123 milyon spermatozoa üretir (39). Bu sperm üretim olayı 'spermatogenez' olarak adlandırılır (15). Spermatogenez, başlıca proliferatif faz, mayotik faz ve spermiyojenik faz olmak üzere üç kısımdan oluşur. Proliferatif fazda spermatogonyalar bölünerek sayılarını arttırırken, mayotik fazda haploit spermatid ile sonuçlanan redüksiyon bölünmesi gerçekleşir ve spermiyojenik fazda ise spermatidler dramatik bir metamorfoz ile şekil ve boyut olarak matür spermatozoa haline dönüşür (15). İnsanda spermatogenezin altı aşamada gerçekleştiği ve yaklaşık 74 gün sürdüğü görülür. Spermiyumun epididimden geçmesi ise 12-16 gün sürer. Aşamaların süresi ve spermatogenez için gerekli zaman sabittir ve her tür için spesifiktir (15). FSH ve LH, spermatogenezin esas düzenleyicileridir. FSH ve testosteron normal spermatogenez için yaşamsal önem taşır. Germ hücrelerinde reseptörleri olmadığından bunlar asıl etkilerini sertoli hücreleri aracılığıyla gerçekleştirir. FSH'ın spermatogonyal proliferasyonu uyarıcı etkisi sayesinde sertoli hücreleri spermatogenezde esas düzenleyici olarak görev alırlar. Testosteron, sertoli hücrelerinin spermatidlere yapışmasını, dolayısıyla spermiyogenezini indükler, ayrıca peritübüler hücreleri de etkiler. Hem FSH hem de testosteron, germ hücre apoptozisini sertoli hücresi aracılığıyla baskılar (15).

Spermatogonyumlar, küçük diploit ($2n$ DNA' lı) germ hücreleridir, seminifer tübül bazal membranı üzerinde yer alırlar ve puberteye kadar bölünmezler (40, 41). Spermatogonyumlar ışık mikroskopisinde nükleuslarının belirgin koyu görünümüleriyle ayırt edilirler (34). Spermatogonyumlar gelişim basmağına göre sırasıyla 'koyu tip A spermatogonyum', 'açık tip A spermatogonyum' ve 'tip B spermatogonyum' olarak adlandırılırlar (42). Bunlar puberte sonrası mitoz bölünme ile hem kendi sayılarını arttırlar hem de bir sonraki basamaktaki hücelere dönüşürler. En ilkelleri olan koyu tip A spermatogonyum mitoz ile bölünerek bir sonraki basmağı oluştururken nükleus bölünmesini tam bir sitoplâzma bölünmesi takip etmez ve oluşan yeni hüceler ince sitoplazmik köprülerle birbirine bağılı kalır (34, 40, 41, 43, 44). Bu sitoplazmik bağılantılar, spermatid olgunlaşmasının son bölümüne kadar devam eder. Böylece aynı koyu tip A spermatogonyumdan ortaya çıkan yeni hüceler inci dizileri gibi birbirine bağılı kalır (34, 43-45).

Tip B spermatogonyumlar mitoz ile bölünerek primer spermatositleri oluştururlar (41). Primer spermatositler DNA' larını replike eder ve $4n$ durumuna geçerler (40, 41, 46). Bunlar birinci mayoz bölünme ile sekonder spermatositlere ($2n$) dönüşür. İkinci mayoz bölünmeyle de sekonder spermatositlerden spermatidler (n) meydana gelir (34, 40, 41, 47, 48).

Spermatidler haploit kromozom yapısında hücelerdir. Tek bir açık tip A spermatogonyumdan meydana gelen bütün spermatidler, hüceler arası sitoplazmik köprülerle birbirine bağılıdır (41). Spermatid oluştuktan sonra bölünme olmaz ve spermatidler spermiyojenik faz ile olgun spermiyuma farklılaşır (34, 41). Böylece spermatidler spermilerin olgun şekline dönüşürler. Farklılaşma işlemi sona eren spermiyumların tübül lümenine salınması işlemine 'spermiyasyon' denir (42). Yeni oluşan bu spermiyum hareketsizdir ve henüz fertilize etme yeteneğine sahip değildir (41).

Epididimin asıl görevi spermiyumun fertilizasyon yeteneğine kavuşturulmasıdır. Epididim, spermiyumları vas deferense doğru nakleder. Bu işlem 2 günden 11-12 güne kadar herhangi bir zamanda olabilir (49-51). Epididimden sperm transit zamanı günlük sperm üretim miktarıyla doğru orantılıdır (51). Epididim boyunca spermatozoa hareketsiz kabul edildiğinden buradaki spermatozoa hareketinden esas olarak epididimal kanalı çevreleyen kontraktıl hücrelerin spontan ritmik kontraksiyonları sorumludur (52-55).

Epididim spermleri bir süreliğine depolar. İnsanlarda, total epididimal spermatozoa sayısının yaklaşık yarısı kaudal bölgede depolanır (51). Kauda epididimde depolanan spermatozoa, progresif hareket geliştirme ve yumurtayı fertilize etme kapasitesindedir. Buna karşın normal zamandan daha fazla epididimde kalan spermlerin ise fertilizasyon yetenekleri azalmaktadır (sperm yaşlanması ?) (51).

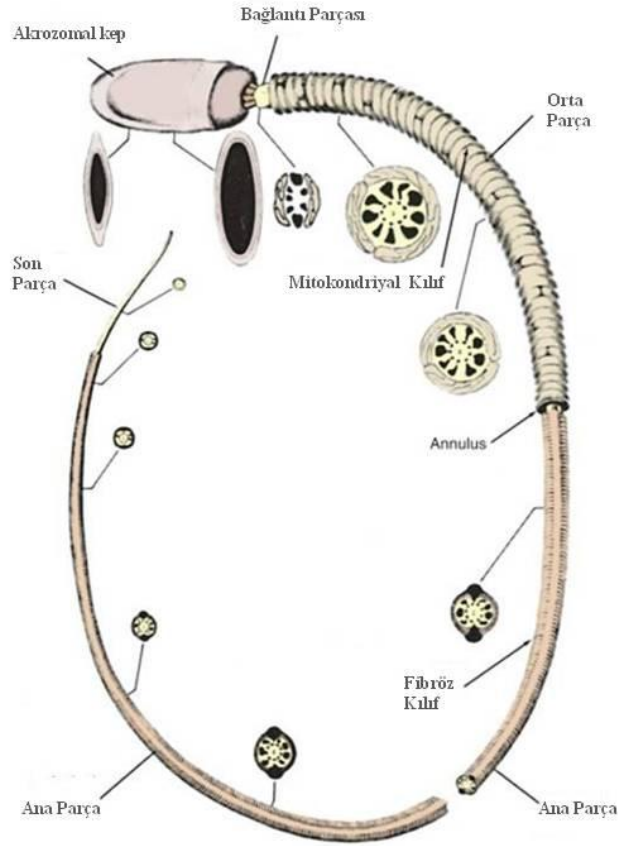
Epididimde spermler hareket kabiliyeti kazanır. Eferent kanalcık, kaput, proksimal korpus ve epididim kaudasından alınan spermatozoaların hareket oranları sırasıyla %0, %3, %12, %30 ve %60' dır (56-58). Tersine epididimal obstrüksiyonu olan hastalarda distal epididimden elde edilen spermler zayıf hareket gösterirken proksimal epididimden elde edilen spermlerde optimal sperm hareket kalitesi olduğu rapor edilmiştir (59-61).

Epididim spermin fertilizasyon için matürasyonunu sağlar. Eldeki bilgiler testiküler spermatozoaların yumurtayı fertilize etme yeteneği olmadığını göstermektedir (62, 63). Sperm fertilizasyon kapasitesi epididim boyunca daha ileri migrasyon ile artmaktadır. Fertilizasyon kapasitesine sahip spermler kaputta çok az iken, korpus distalinde veya kauda proksimalinde artmaktadır (15).

Epididimde 5 α -redüktazın yüksek düzeyi ve dihidrotestosteronun rölâtif olarak fazlalığı, bu androjenlerin epididimal fonksiyonda önemli olduğunu desteklemektedir (64). Epididimal fonksiyonlar androjen bağımlıdır (63, 65, 66). Yapılan çalışmalarda diğer aksesuar seks bezleriyle karşılaştırıldığında epididimin yapısı ve fonksiyonunun devamı için yüksek androjen düzeylerine ihtiyaç duyduğunu göstermektedir (67). Yine çalışmalarda epididim fonksiyonunun artan ısıdan negatif yönde etkilendiğini göstermiştir (68, 69). Bu durum varikozel ve kriptorşidizmde yaşanan infertilitede epididimin rolünü ortaya koymaktadır. Bunun dışında epididimde spermatozoa depolama yeteneği sempatik sinir sisteminden etkilenir. Epididimin parsiyel denervasyonu, kauda epididimde anormal spermatozoa birikimi ve mevcut spermatozoaların eğimli ve düz hatlı yüzme hareketlerinde azalma ile sonuçlanır (70).

Kauda epididim ve duktus deferenste depolanan spermatozoaların özellikleri ise kısaca şöyledir. Olgun sperm hücresi yaklaşık 60 mikron boyunda (71) olup baş, boyun, orta parça ve kuyruk bölümlerinden oluşur. Yaklaşık 4,5 μ m boyunda ve 3 μ m genişliğinde olan oval sperm başı esas olarak son derece sıkı kromatin materyal bulunduran bir nükleus ve membran bağlı organel olan akrozomu içerir (72, 73). Başın büyük kısmını nükleus kaplar. Başın 2/3 ön kısmı akrozom denen bir kılıfla kaplanmıştır. Akrozomda fertilizasyondan önce yumurtanın dış kılıfının penetrasyonu sağlayan enzimler bulunur (15). Spermatozoanın orta parçası mitokondri ile çevrelenmiştir. Bu bölge, dış çevresinde bir seri yoğun lifler bulunan heliksiyal dizilmiş mitokondriler ve sperm aksonunun tipik 9+2 mikrotübüler yapısını içeren oldukça organize olmuş bir segmenttir (74). Kuyruğu oluşturan esas parça kısmı(aksonem) ve dış yoğun fibrillerden meydana gelmiştir. Dışarıdaki disülfid bağlarından zengin yoğun liflerin, progresif hareket için gerekli sperm kuyruğu rijiditesini sağladığı düşünülmektedir (15). Sperm aksonomu, hareket ile sonuçlanan mekanik harekete ATP 'nin kimyasal enerjisinin iletimi için gerekli proteinleri ve enzimleri içerir. Dış yoğun lifler ve aksonemal yapılar, çevresi fibröz bir kılıf ile sarılmış spermatozoanın esas parçası boyunca ve hafif değişiklikler ile orta parçada bulunur. Esas parçanın distal ucunda dış yoğun lifler sonlanır ve son

parçada öncelikli yapı olan aksonomu terk eder (15). Son parça hariç spermatozoa iyon ve diğer moleküllerin transmembran hareketini kontrol eden oldukça özelleşmiş bir plazma membranıyla sarılıdır (75). Sperm baş bölgesini örten plazma membranı, fertilizasyonun erken evrelerinde sperm-yumurta etkileşiminde rol alan özelleşmiş proteinleri içerir (76, 77).



Şekil 2. Memeli Spermatozoası Tipik Şeması

2.4 ERKEK İNFERTİLİTESİ

İnfertilite dünya sağlık örgütünün tanımına göre “ herhangi bir kontrasepsiyon yöntemi kullanmayan cinsel aktif eşlerin 1 yıl içinde gebeliğe ulaşamaması” dır (5).

İnfertilite yaygın görülen bir bozukluktur. Normal bir çiftin bir ay içinde gebe kalma şansı %20-25, 6 ay içinde %75, bir yıl içinde %90' dır (78). Son yayınlar çiftlerin %15' inin ilk çocuk denemelerinde sorun yaşadığını göstermektedir (10). Son yıllarda infertilite tedavisinde önemli gelişmeler yaşanmıştır ki bu gelişmelerin en son ulaştığı nokta ICSI' dir. Daha önce steril kabul edilen hastalar bu yöntemle çocuk sahibi olabilmişlerdir ve bu nedenle artık steril kavramından vazgeçilmiş ve subfertilite/ infertilite kavramları yerleşmiştir (79). ICSI ile hem kadın hem de erkek infertilitesine sebep olan birçok faktör geride bırakılarak çiftlerin çocuk sahibi olması sağlanmaktadır (79).

Çiftlerin yaklaşık %15' i ilk bir yıl içinde gebelik sağlayamaz ve infertilite tedavisi için başvururlar (80-82). Çiftlerin %5' i çocuksuzdur (79). İnfertilite olgularının %30' u tamamıyla bir erkek faktörden kaynaklanır (1). %50' sinde ise hem erkek hem de kadın faktörü birlikte görülür (2). Tablo 1' de erkek infertilitesiyle birlikte görülebilecek durumlar özetlenmiştir.

Tablo1. Erkek infertilitesi ile birlikte görülebilecek durumlar (79)

- I. Düşük ejakulat volümü
 - A. İlaçlar
 - B. Retroperitoneyal veya mesane boynu ameliyatları
 - C. Ejekulatuvar kanal tıkanıklıkları
 - D. Diyabet
 - E. Spinal kord yaralanması
 - F. Psikolojik rahatsızlıklar
 - G. İdiyopatik

H. Örnek toplama hatası

II. Azospermi

A. Hipogonadotropik hipogonadizm

1. Kallman Sendromu
2. Hipofiz tümörleri

B. Spermatogenez bozuklukları

1. Kromozom bozuklukları
2. Y kromozomu mikrolelesyonu
3. Gonadal toksinler
4. Varikozel
5. Viral orşit
6. Torsiyon
7. İdiyopatik

C. Duktal Obstrüksiyon

1. Konjenital bilateral vas agenezi
2. Vazal obstrüksiyon
3. Epididim obstrüksiyonu
4. Ejekulatuvar kanal obstrüksiyonu

III. Oligoastenoteratospermi

- A. Varikozel
- B. Kriptorşidizm
- C. İdiyopatik
- D. İlaçlar, ısı, toksinler
- E. Sistemik enfeksiyonlar
- F. Endokrinopati

IV. Normal Ama İnfertil

- A. Jinekolojik Bozukluklar
- B. Koit alışkanlığında bozukluk
- C. Akrozom defektleri
- D. Antisperm antikozlar
- E. İzah edilemeyen

- V. Astenospermi
- A. Spermatozoanın yapısal defekti
 - B. Uzamış cinsel perhiz süresi
 - C. İdiyopatik
 - D. Genital sistem enfeksiyonu
 - E. Antisperm antikorlar
 - F. Varikosel
 - G. Parsiyel obstrüksiyon

Konjenital veya kazanılmış ürogenital anomalilerden, ürogenital sistem enfeksiyonlarından, skrotal ısının artmasından (varikosel gibi), endokrin bozukluklardan, genetik anormalliklerden ve immünolojik faktörlerden dolayı erkek fertilitesi azalabilir (79). Erkek faktör infertilitesinin etiyolojik sebepleri ve sıklıkları tablo 2’ de özetlenmeye çalışılmıştır (83). En sık sebep idiyopatik erkek infertilitesidir (83). İdiyopatik erkek infertilitesi hastalarının özgeçmişinde, fizik muayenesinde ve endokrin testlerinde hiçbir anormallik yoktur. Buna rağmen semen analizlerinde spermatozoa sayısı azalmıştır (oligozoospermi), sperm hareketleri azalmıştır (astenospermi), çeşitli anormal sperm formları vardır (teratospermi). Bu üç anomali sıklıkla birlikte görülür ve ‘oligoastenoteratospermi (OAT) sendromu’ olarak adlandırılır (84).

Tablo 2. Erkek faktör infertilitesi etiyolojik sebepleri ve sıklığı (83)

İdiyopatik erkek faktör	%31
Varikosel	%15,6
Hipogonadizm	%8,9
Ürogenital enfeksiyonlar	%8,0

İnmemiş testis	%7,8
Cinsel ilişki ve ejakulasyon bozukluğu	%5,9
İmmünolojik faktörler	%4,5
Sistemik hastalıklar	%3,1
Obstrüksiyon	%1,7
Diğer	%5,5

Oligozoospermi nedeniyle infertil olan çiftlerin 2 yıl içinde çocuk sahibi olma oranı %27' dir (85) . Çiftlerin çocuk sahibi olmasında kadın yaşı da önemli bir faktördür. Bir kadın 25 yaşında sahip olduğu fertilitésinin 35 yaşında %50' sini, 38 yaşında %75' ini, 40 yaş üstünde %95' ten fazlasını kaybeder (86)

2.4.1 ERKEK İNFERTİLİTESİ NEDENLERİ

2.4.1.1 Hipogonadotropik Hipogonadizm:

Genellikle gecikmiş puberte ve sekonder seks karakterlerinin gelişmemesi nedeniyle doktora başvururlar. Problem GnRH yetmezliğinden (Kallmann sendromu), hipofizer tümörler, hipofiz operasyonları, travma, enfarktüs veya enfeksiyondan kaynaklanabilir (38).

2.4.1.2 Hiperprolaktinemi:

Karakteristik olarak libido kaybı, erektil disfonksiyon ve infertilite ile kendini belli eder. Hiperprolaktinemi, GnRH salınımını ve gonadotropik hormonların salgılanmasını etkileyerek olmaktadır (38).

2.4.1.3 Testiküler nedenler:

Primer testiküler yetmezlik azospermi veya şiddetli oligozoospermi ile karakterizedir. Bunlarda testisler küçük ve plazma FSH düzeyi oldukça yükselmiştir (38).

2.4.1.3.1 Klinefelter sendromu:

İnfertil erkeklerde kromozom anomalilerinin bulunma sıklığı %2-20' dir (38). En sık rastlanılan kromozom anomalisi Klinefelter sendromudur (XXY). 500-1000 canlı doğumda bir görülür. Erkek fenotipiyle birlikte küçük sert testisler, jinekomasti ve gonadotropinlerin yüksekliği görülür. Çoğunda sekonder seks karakterlerinde kadın tipi hakimdir. Olguların %93' ünde azospermi vardır. Mozaik Klinefelter sendromlularda şiddetli oligozoospermi vardır (38).

2.4.1.3.2 İnmemiş testis:

İnmemiş testisler, skrotum dışında inguinal kanal veya karın içi gibi sıcak bir ortamda kaldıklarında spermatogenez bozulur. Bunun dışında bu testislerin içyapıları

kalıtsal olarak bozuktur. Bu testislerde Leydig hücreleri normal bulunur ve germinal epitelyum atrofiktir (38).

2.4.1.3.3 Varikosel:

Testisleri drene eden pampiniform pleksusu oluşturan spermatik venlerde kanın geriye reflüsü ile birlikte venlerin dilate ve kıvrıntılı hal alması olarak tanımlanır. İnfertilite ile gelen erkeklerin %20-40' ında varikosel hastalığı mevcuttur (83). Varikosel testislerde atrofi ve boyutlarında küçülmeye neden olur. Bu hastaların %90' ında subnormal sperm hareketi ve morfolojik bozukluklar gelişir. Varikosektomi sonrası hastaların ortalama %66' sında semen parametrelerinde düzelme izlenirken bu tedavi sonrası gebelik oranları da %40 civarındadır (38). Tek taraflı varikosel olgularında, daha hafif olmakla birlikte karşı testiste de bazı değişiklikler ortaya çıkabilmektedir (38).

2.4.1.3.4 Germinal Hücre aplazisi (Sertoli Cell Only Sendrom):

Seminifer tübüller tamamen sertoli hücreleriyle döşeli olup germinal hücreler hiç gelişmemiştir. Bazı tübülüslerde nadiren spermatogenez bulunabilir. Bunlara fokal spermatogenez gösteren mikst germ hücre aplazisi denir (38). Hastalar azospermik olup plazma FSH' ı yükselmiştir. İnfertilite nedeniyle alınan biyopsilerde %11-20 saptanır (38). Etiyoloji genelde idiyopatiktir (38).

2.4.1.3.5 Sistemik Hastalıklar ve Gonadotoksinler:

2.4.1.3.5.1 Böbrek Yetmezliği:

Üremi, erkeklerde libido azalması, erektil disfonksiyon, spermatogenezde değişiklikler ve jinekomasti ile birlikte olabilir. Plazma testosteron düşer, LH ve FSH artar (38). Böbrek yetmezliğinde hipogonadizmin nedeni aydınlatılmış değildir ve büyük olasılıkla multifaktöriyeldir (38).

2.4.1.3.5.2 Karaciğer Sirozu:

Sirozlu hastaların büyük bir yüzdesinde testis atrofisi, erektil disfonksiyon ve jinekomasti vardır. Plazma testosteron düzeyi azalır ve testosteronun plazma proteinlerine bağlanması artar. Periferik dokularda androjenlerin östrojenlere dönüşümü artar. LH ve FSH düzeyleri düşük testosteron düzeylerine bağlı olarak orta derecede artmıştır (38).

2.4.1.3.5.3 Orak Hücre Anemisi:

Bunların çoğunda belirgin hipogonadizm belirtileri vardır. Hastalarda serum testosteronu düşük, LH ve FSH ise düşük, normal veya yüksek olabilir (38).

2.4.1.3.5.4 Hemokromatozis:

Hastaların %80' inde testis fonksiyonları bozulmuştur. Karaciğerde, testiste veya hipofizde demir birikimine bağlı olabilir (38).

2.4.1.3.5.5 Kabakulak:

Kabakulak geçiren erkeklerin %15-25' inde orşit gelişir. Orşit geçiren hastaların %10' unda çift taraflıdır. Çift taraflı orşit geçiren hastaların ancak 1/3' ünde sperm parametreleri normale döner (38).

2.4.1.3.5.6 Sigara:

Ultrastrüktürel çalışmalar, nikotinin peritübüler kollajen birikimini arttırdığını, seminifer tübüllerde deformasyon ve sitokeratin, elastin oranlarında değişiklik ortaya çıkardığını göstermiştir (38).

2.4.1.3.5.7 Alkol:

Sirozlu alkoliklerde hipotalamohipofizer aksta değişiklikler olur ve vitamin, eser element yetersizliği testis fonksiyon bozukluğuna, bu da erektil disfonksiyon ve infertiliteye yol açar (38).

2.4.1.3.5.8 Anabolik steroidler:

Atletler arasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlar, hipofiz ve hipotalamusta feedback inhibisyona neden olarak FSH ve LH sekresyonunu azaltır. Sonuçta hipogonadotropik hipogonadizme yol açar (38). Steroidlerin kesilmesinden ortalama 4 ay sonra normal sperm parametrelerine tekrar ulaşılır (38).

2.4.1.3.5.9 İlaçlar:

Spironolakton, allopurinol, kolşisin, nitrofurantoin, simetidin, siklosporin ve sulfosalazin gibi ilaçlar erkek fertilitasını bozar. Bunun dışında prazosin, terazosin, fentolamin, fenoksibenzamin gibi alfa blokerler ile metil dopa, guanetidin, rezerpin gibi ganglion blokerleri retrograd ejakulasyon veya emisyon yetersizliğine yol açarak infertiliteye neden olur (38).

2.4.1.3.5.10 Endüstriyel Gonadotoksinler:

Dibromoklorofran böcek zehiridir ve bu imalatta çalışan işçilerde fertilitayı bozar (38). Kullanımının kesilmesi sonrası azospermik hastalar steril kalabilir. Ayrıca kadmiyum, kurşun ve mangenzin erkekte üreme fonksiyonlarını bozar (38).

2.4.1.3.5.11 Hipertermi:

Ortama ait ve skrotal ısı artımları testis fonksiyonlarını bozabilmektedir (38).

2.4.1.3.5.12 Radyasyon:

Hızlı hücre bölünmesi gösterdikleri için germinal epitelyum radyasyona çok duyarlıdır, leydig hücreleri ise etkilenmez. Bu nedenle testosteron seviyesi düşmez (38).

2.4.1.3.5.13 Kemoterapotik Ajanlar:

Semen parametrelerinde bozulmaların daha önceden mevcut mu olduğu yoksa kullanılan kemoterapötik ilaçlara mı bağlı olduğunu bilmek için tedavi öncesi semen analizi yapılması doğru olur (38). Günümüzde kabul edilen birçok kemoterapi protokolü spermatogenez üzerine etkilidir. Kemoterapiden sonra doğan çocuklarda anomali riski artmış değildir (38). Puberte öncesi devrede testisler alkile edici ajanların etkilerine karşı yetişkinlerden daha dirençlidir (38). Buna rağmen Hodgkin hastalığının kemoterapisinde testislerde hasar görülebilir. Spermatogenezin tekrar normale dönmesi 2 yıl sürebilir. Birden fazla kemoterapik ajanla tedavi edilen testis kanserli hastaların %17-68' inde uzun süreli azospermi gelişir (38). Testis tümörlü hastaların kemoterapi sonrası gebe bırakma oranları %13-31' dir (38). Sisplatin dayalı kemoterapilerde hastaların çoğu azospermik olmakla birlikte, bunların büyük kısmında 4 yıl içinde spermatogenez yeniden başlar (38).

2.4.1.3.6 Enfeksiyon ve Lökospermi:

Enfeksiyon, testislerde hasar meydana getirerek, doğrudan germ hücrelerini etkileyerek veya genital kanal obstrüksiyonu yaparak fertilitiyi bozar (38). Semendeki lökositlerin ve mikroorganizmaların infertilitedeki rolleri tam olarak ortaya konulamamıştır. Bazı çalışmalarda izah edilemeyen erkek infertilitesi

olgularının %85' inde semen kültüründe üroplazma ürediği gösterilmiştir ve antibiyotik tedavisi ile sperm fonksiyon testleri normale dönmektedir (38). İnfertil erkeklerin büyük kısmı asemptomatiktir. Genital sistemin subklinik enfeksiyonlarının infertilitedeki rolü kesin değildir. Asemptomatik olgularda sadece sperm kültür sonucuna göre antibiyotik kullanmak çok faydalı değildir (38). E.Coli, Klamidya Trokomatis, Neisseria Gonorrhoeae, Üroplazma Ürealitikum, Trikomonas Vajinalis ve Tüberküloz infertiliteye yol açabilir (38).

2.4.1.3.7 İmmünolojik infertilite:

Geç spermatozoidler, spermatidler ve spermatozoa immün sistem için yabancı olan antijenleri taşır. Normalde seminifer tübül içinde immün sistem hücreleri bulunmamaktadır. Kan-testis bariyeri mevcuttur. Rete testis ve epididimde morfolojik bariyerin zayıfladığı ve lenfosit ve makrofaj bulundurduğu da bilinmektedir (38). Kan-testis bariyerinde anatomik açıklıklara rağmen immün yanıtın oluşmaması 'aktif immünsüpresyon' modeli ile açıklanmaktadır. Aktif immünsüpresyon; anatomik olarak zayıf noktalardan bir miktar sperm antijenlerinin sürekli sızması ile meydana gelmektedir. Neticede T-süpresör hücrelerin uyarılmasıyla immün sistemde desentizasyon ortaya çıkar (38). Buna karşılık, vazektomi ya da travma gibi büyük miktarda sperm antijenlerinin ortaya çıktığı durumlarda immün yanıtın şiddeti patolojik sınırlara erişir. Erkek üreme sisteminde antikor sekresyonu ve hücreli immünitenin en olası kaynağı epididim olarak düşünülmektedir. İmmünolojik infertilitede temel mekanizmayı antisperm antikorlar (ASA) oluşturur (38). Şu durumlarda ASA ölçümüne yönelik testler önerilir: 1. Semen analizinde spermlerin kümeleşmesi; 2. Kan-testis bariyerini bozan bir hastalıkla birlikte sperm hareketinde bozukluk olması; 3. Lökosit konsantrasyonunda artış; 4. sperm-servikal mukus kontakt testinde "shaking" tarzında sperm hareketi gözlenmesi; 5. Postkoital testte spermin servikal mukusa penetrasyonunda bozukluk; 6. Semen parametreleri normal olmasına karşın izah edilemeyen infertilite (38).

2.4.1.4 Posttestiküler Nedenler:

Ejekulasyon bozukluğu (retrograd ejakulasyon, prematür ejakulasyon, anejekulasyon, seminal emisyon yokluğu) ve ejakulatuvar kanal obstrüksiyonu yer alır (38).

2.5 SEMEN ANALİZİ:

Ejekulat analizi Dünya sağlık Örgütü tarafından standardize edilmiştir (87). Tablo 3' de referans değerler verilmiştir (87). Eğer semen analizi sonuçları normale bir test yeterli gelirken anormal bir sonucun ikinci bir testle verifiye edilmesi gerekir (84). Semen analizine göre şu sonuçlar elde edilebilir:

1. Oligozoospermi : <15 milyon spermatozoa/ml
2. Astenospermi : <%32 motil spermatozoa
3. Teratospermi : < %4 normal form

Tablo 3. Semen parametrelerinin alt referans değerleri (87)

Parametreler	Alt referans değerleri
Volüm (ml)	1,5 (1,4-1,7)
Total sperm sayısı (milyon)	39 (33-46)
Sperm konsantrasyonu (milyon)	15 (12-16)
Total hareket (%)	40 (38-42)

Progresif hareket (%)	32 (31-34)
Vitalite (% , yaşıyan spermatozoa)	58 (55-63)
Sperm morfoloji (% , normal formlar)	4 (3,0-4,0)

2.6 ERKEK İNFERTİLİTESİNİN AMPİRİK MEDİKAL TEDAVİSİ

2.6.1 HORMONAL TEDAVİ

2.6.1.1 GnRH tedavisi:

Hipogonadizmde ve idiyopatik infertilite olgularında kullanılmıştır. Ekzojen GnRH verilmesi gonadotropin yapımını artırır ve spermatogenezi uyarır. HPG aksının uyarılmasında gonadotropinlere göre daha fazla fizyolojik etkiye sahiptir. İntranazal, subkutan depo, taşınabilir pompa tarzında uygulanabilir. Bu tedavi ile hipogonadotropik hipogonadizm başarıyla tedavi edilse de idiyopatik oligospermik erkeklerde yeterli sonuç alınamamıştır (88).

2.6.1.2 Gonadotropinler:

İdiyopatik normogonadotropik oligospermik hastalarda ekzojen gonadotropin tedavisi ile semen parametrelerinde düzelme görülmektedir. İnsan koryonik gonadotropin (hCG) veya insan menapozal gonadotropin (hMG) şeklinde kullanılabilir. hCG, LH' a benzer, Leydig hücrelerini uyararak testosteron ve östrodiol sentezini artırırken negatif feedback etkiyle FSH' ı baskılar (89). hMG, hem LH hem de FSH aktivitesine sahiptir. Rekombinant FSH ise yeni kullanıma başlanan bir preparattır. Spermatogeneze etkilerini maksimum yapabilmek için

tedaviye hCG ile başlanır, testosteronun yükselmeye başladığında veya 8-12 hafta sonra tedaviye hMG/FSH eklenir. Bu tedavilere sperm sayısı 10 milyon/ml' nin üstünde spermi olanlar daha iyi yanıt vermektedir. Bu tedavi ile gebelik oranları ise orta derecede oligospermik hastalarda %16, şiddetli oligospermik hastalarda %8 olarak bildirilmiştir (90, 91). Acosta ve ark. pür hFSH tedavisini takiben IVF ile artmış fertilizasyon oranları bildirmişler fakat semen analizi parametrelerinde değişiklik olmadığını göstermişlerdir (92). Dubin ve Amelar, sperm sayısı 10 milyon/ml' nin altında olan erkeklerde varikosektomi ile adjuvan tedavi gibi hCG kullanmışlar ve tedavi verilmeyen grupta %25, hCG verilen grupta %44 gebelik oranı bulmuşlardır (93)

2.6.1.3 Düşük Doz Androjenler:

Ekzojen androjen kullanımı hipotalamus ve hipofizde feed-back inhibisyona neden olabilir. Düşük doz testosteron preparatları genelde oral olarak verilir. Yapılan birçok androjen preparatı denemesinde semen parametreleri ve gebelik oranlarında iyileşme olmaması düş kırıklığı yapmıştır (94).

2.6.1.4 Testosteron Rebound Tedavisi:

Yüksek doz testosteron, gonadotropin sekresyonunu baskılar, intratestiküler testosteron üretimini durdurur ve spermatogenezi bozar. Bu durum azospermiye kadar gider (94). Tedavinin birden bırakılmasıyla spermatogenezin 4 ay içinde tekrar başlaması ve sperm sayısının artması planlanır (95-97). Tedavi alanlarda %4-8 kalıcı azospermi gelişebilir. Yapılan kontrollü çalışmalarda hiçbir yararı olmadığı anlaşılmıştır (98) ve günümüzde erkek infertilitesinin ampirik tedavisinde yeri yoktur (94).

2.6.1.5 Antiöstrojenler:

İnfertilitede anti östrojen tedavideki amaç dolaşımdaki steroidlerin negatif-feedback etkilerini baskılamak, FSH ve LH sekresyonunu arttırmaktır (95).

2.6.1.5.1 Klomifen Sitrata:

Bu ilacın hafif östrojenik etkisi olmakla birlikte asıl mekanizma yarışmalı östrojen inhibisyonudur (94). Hipotalamus ve hipofizdeki östrojen reseptörlerine bağlanarak östrojenlerin negatif-feedback' ini önler. Bu durumda hipotalamustan GnRH, hipofizden FSH, LH salgınır. Klomifen sitrata için uygun hasta grubu sperm sayısının 20 milyon/ml' nin altında olduğu, serum FSH ve LH düşük veya normal bulunan ve hipofiz GnRH ile uyarıldığı zaman pozitif cevabın alındığı idiyopatik infertil erkeklerle sınırlıdır. Tedavi süresince serum gonadotropin ve testosteron seviyelerinin aylık takibi önerilir (90). Testosteronun normal sınırlarda olması gerekir. Testosteron yükseldiği takdirde spermatogenezi baskılayabilir. Çok sayıda kontrollü olmayan çalışmada sperm kalitesinde ve gebelik oranlarında artış bildirilmektedir (94). Sperm motilitesinden çok sayısını arttırdığı gösterilmiş. Bu ilacın seminal parametrelerde düzelme yapmaksızın veya fertilizasyon kapasitesini değiştirmeksizin de bilinmeyen mekanizmalarla gebelik şansını artırması mümkündür (99). Ancak klomifen sitrataın östrojenik etkileri nedeniyle tamoksifen daha tercih edilir olmuştur.

2.6.1.5.2 Tamoksifen Sitrata:

Anti östrojenik etkisinden dolayı meme kanseri tedavisinde kullanılan tamoksifen yapısal olarak ve etki mekanizması bakımından klomifen sitrata benzer,

fakat östrojenik etkisi daha azdır (95, 100, 101). Tedavi süresince ayda bir LH, FSH ve testosteron takibi yapılmalıdır (95, 102). Çalışmalar tamoksifenin sperm hareket ve morfolojisi üzerine etkisi olmadığını, sperm sayısında ise arttırıcı etkisi olduğunu ortaya koymuştur (94). Tamoksifen ile beraberinde düşük doz androjenin kombine kullanımının sinerjistik etki ile sperm hareket ve dansitesinde düzelme sağladığı gösterilmiştir (103, 104). Seçilmiş hastalarda etkili olabilir.

2.6.1.5.3 Aromataz İnhibitörleri:

Androjenler öncelikli olarak Leydig hücrelerinden salgılanırken; östrojenlerin büyük kısmı testosteronun yağ hücrelerinde aromataz enzimiyle östrojene dönüşümü ile sağlanır. Obez erkeklerde testosteronun östrojene dönüşümü daha fazla olmaktadır. Teorik olarak östrojen/testosteron oranında dengesizlik (artma) sperm üretiminde bozulmaya yol açar (94). Aromataz inhibitörleri testosteronun östrojene dönüşümünü engelleyerek serum ve intratestiküler testosteron seviyesini arttırmalar, spermatogenezi düzeltirler. Ayrıca serum östrojeninde düşme yaparak östrojenin santral inhibisyonunu ortadan kaldırır ve FSH ile LH salgısı da artmış olur (38).

Testosteron/E2 oranının normalde $>14,5$ olması gerekirken, testosteron/östrojen oranında dengesizlik düşünülen hastalarda bu oran $<5'$ in altında kalmaktadır. Oranın $5'$ in altında olduğu hastalara aromataz inhibitörü verildiğinde semen parametrelerinde ve gebelik oranlarında anlamlı iyileşme sağlanmaktadır (38). Başlıca aromataz inhibitörleri anastrozol, letrazol ve testolaktondur (94).

Aromataz inhibitörleri ile idiyopatik erkek infertilitesi olan hastalarda sperm sayısında %80 düzelme, %33' ünde gebelik elde edilmiştir. Herhangi bir etkisi olmadığını bildiren çalışmalar da vardır. Başka bir çalışmada azospermik Kleinfelter'

li hastalarda aromataz inhibitörü kullanımı ile TESE ile %69 matür spermatozoa bulunabileceği ortaya konmuştur (38).

2.6.1.6 Büyüme Hormonu:

Büyüme hormonu, normal spermatogenez için otokrin veya parakrin büyüme faktör rolü olan insülin benzeri büyüme hormonunun testislerden salınımını sağlar (91, 105, 106). Ancak çalışmalarda eksternal büyüme hormonu verilmesinin etkisi net olarak ortaya konulamamıştır.

2.6.1.7 Klonidin:

Büyüme hormonu salınımını sağlayan alfa adrenerjik agonist bir ilaçtır. Kullanılan hastaların %50' sinde sperm sayısında ve gebelik oranlarında artış sağlanmıştır (91, 107).

2.6.1.8 Bromokriptin:

Prolaktinin dopamin tarafında inhibe edilmesi nedeniyle dopamin agonisti olarak bromokriptin kullanılır. Serum prolaktin seviyesi normal olsa bile idiyopatik erkek infertilitesi ampirik tedavisinde bromokriptin kullanılabilir (94). Vandekerckhove ve ark.' in yaptığı meta-analiz sonucu bromokriptin kullanımı ile serum prolaktin seviyesinde düşme görülmesine rağmen semen parametrelerinde ve gebelik oranlarında değişme görülmediği rapor edilmiştir (91).

2.6.2 HORMONAL OLMAYAN TEDAVİ:

2.6.2.1 L-Arginin:

Putrascin, spermidin ve spermin sentezinde prekürsör olarak rol oynayan bir aminoasittir. Bu maddelerin sperm motilitesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Bozkırlı ve ark., klomifen sitrat ile L-Arginin kombinasyonu kullanarak yaptıkları çalışmada hastaların %75' inde sperm sayısında artış, %77,9' unda sperm motilitesinde düzelme olduğunu saptamışlardır. Gebelik oranlarının ise %25,9 olduğunu bildirmişlerdir (108).

2.6.2.2 L-Karnitin:

Vitamin benzeri bir bileşiktir. Asetilkarnitin membran stabilizasyonu için, L-Karnitin ve asetilkarnitin yağ asit oksidasyonu ve sentezi için önemlidir. Aktive olan açıl grupların transportunu sağlayarak intrasellüler enerji metabolizmasında rol oynar (94). Epididimal sıvıda L-Karnitin konsantrasyonu plazmadan 2000 kat fazladır. İdiyopatik astenospermik erkeklerde sperm hareket, sayı ve ileri hızlı harekette artma sağlamaktadır. Azospermik hastalarda bu tedavi ajanının kullanımı önerilmez (91).

2.6.2.3 Kallikrein:

Kininojenin bradikinin ve kallidine dönüşümünü sağlayan polipeptid yapıda bir enzimdir. Aynı zamanda spermatogenezde rol oynayan bradikinin ve kallidin spermin servikal mukusa penetrasyon ve migrasyonu artırır. Kininlerin ayrıca vasküler permeabilityi artırıcı, glukoz taşınmasını kolaylaştırıcı, düz kas kasıcı ve

testislere kan akımını arttırıcı özellikleri de ortaya konmuştur (90, 91, 109, 110). Çalışmalarda kallikreinin sperm parametrelerinde düzelme ve gebelik oranlarında artma olduğu görülmektedir (94).

2.6.2.4 Non-Steroidal antinflamatuarlar:

Prostaglandinlerin testiküler steroidogenez ve sperm motilitesi üzerine inhibitör etkileri vardır. Bu nedenle indometazin ve ketoprofen oligospermik erkeklerde prostaglandin inhibisyonu için kullanılmaktadır (91, 93, 97).

2.6.2.5 Pentoksifilin:

Pentoksifilin, teofilin ve kafein gibi metilksantin türevleri invitro spermin stimülasyonunu sağlar. Semene pentoksifilin eklenmesi sperm hareket ve akrozom reaksiyonunu düzeltmesi sebebiyle invitro fertilizasyon yöntemlerinde kullanılabilir (111). İnfertilite tedavisinde pentoksifilin kullanımına ait farklı sonuçlar bildirilmekle birlikte, sperm motilitesinde %25–42 artış olduğu görülmektedir (94).

2.6.2.6 Antioksidanlar:

İdiyopatik infertil erkeklerin %40' ının semeninde reaktif oksijen radikallerinin arttığına gösterilmiş olması infertiliteye sebep olabileceğini düşündürmüştür (94). Reaktif oksijen radikaller, spermin normal fizyolojik işlemleri ve normal sperm fonksiyonları, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonları için sperm tarafından üretilen bir mediyatördür. Düşüklüğünde bir problem olmayan reaktif oksijen radikallerinin yüksekliğinde ise pozitif oksidatif stres meydana gelir. Reaktif

oksijen radikalleri sperm membranına yapışır ve lipid peroksidasyonuna yol açarak spermatozoaya zarar verir (38). Yapılan çalışmalarda E ve C vitaminlerinin sperm parametrelerinde değişiklik yapmadığı, sperm oosit füzyonunu düzelttiği gösterilmiştir (91).

2.6.2.7 Alfa Blokerler:

Ratlarda yapılan çalışmalarda alfa blokerlerin kimyasal sempatektomi yaparak, spermin taşınması ve depolanmasında düzelme meydana getirdiği gösterilmiştir (112, 113). İnfertilite tedavisinde terazosin hidroklorid kullanımına ait farklı sonuçlar bildirilmekle birlikte, sperm sayı ve motilitesinde artış olduğu görülmektedir (113, 114).

2.6.2.8 Mast Hücre Blokerleri:

İnfertil erkeklerin testiküler dokularında mast hücrelerinin artışının gözlenmesi (115) nedeniyle mast hücre blokerlerinin kullanımı gündeme gelmiştir. Mast hücre blokerleri, histamin ve diğer vazoaaktif ürünlerin salınımını inhibe ederler ve bu etkisi sebebiyle idiyopatik erkek infertilitesi tedavisinde kullanılmaktadır (94).

2.7 ICSI (İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU)

1978' de ilk tüp bebeğin doğmasından beri IVF tubal hastalıklar, endometriozis, açıklanamayan infertilite ve erkek faktör infertilitesi gibi belli infertilite nedenlerinde yerleşik tedavi olmuştur (116). Buna rağmen ciddi erkek faktör infertilitesi olan bazı çiftlerde konvansiyonel IVF' nin yeterli gelmediği

görülmüştür. Özellikle düşük sperm sayıları, hareket bozukluğu ve kötü morfoloji IVF başarısızlığının ana nedenleridir (116). Bunları sonucu olarak 1992’ de tek bir spermatozoanın ooplazma içine enjekte edilmesi tekniği olan ICSI ile ilk canlı doğum yayınlanmıştır (117). Sonrasında artarak devam eden ve günümüzde oldukça yaygın kullanılan ICSI, ağır erkek faktör infertilitesinin esas tedavisidir (116).

2.7.1 ICSI Endikasyonları:

ICSI endikasyonları spermatozoanın bozulmuş morfolojine sınırlı değildir, düşük sperm sayılarını ve sperm hücrelerinin kötü hareket kalitesini de içerir (116). Obstrüktif durumlarda epididimden veya testisten elde edilen spermatozoalarla ICSI gerçekleştirilebilir. Eğer testis dokusundan yeteri kadar spermatozoa elde edilebilirse testis yetmezliğinden kaynaklanan azospermi de ICSI ile tedavi edilebilir (116). ICSI’ nın güncel endikasyonları tablo 4’ de özetlenmiştir.

Tablo 4. ICSI’ nın Güncel Endikasyonları (116)

- Ejakule spermatozoa
 - Oligospermi
 - Astenospermi
 - Teratospermi
 - Yüksek titreli antisperm antikorlar
 - Konvansiyonel IVF ile tekrarlayan başarısızlık
 - Remisyondaki kanser hastasının dondurulmuş spermleri
 - Ejeksiyon bozuklukları

- Epididimal spermatozoa

Konjenital bilateral vaz agenezisi

Young sendromu

Başarısız vazoepididimostomi

Başarısız vazovazostomi

Bilateral Ejekulatuvar kanal obstrüksiyonu

- Testiküler spermatozoa

Epididimal spermelerin tüm endikasyonları

Fibrozis nedeniyle epididimal sperm elde edilememesi

Testiküler yetmezliğe bağlı azospermi

Nekrozoospermi

2.7.2 ICSI Öncesi Gamet Eldesi:

Başarılı bir ICSI ovaryan stimülasyona bağlıdır. Ovaryan stimülasyon yöntemleri konvansiyonel IVF ile benzerdir. Güncel ovaryan stimülasyon tekniklerinde kumulus-oosit kompleks elde etmek için GnRH agonist ve antagonistleri ile insan menapozal gonadotropini (hMG) veya Rekombinant follikül stimüle edici hormon (recFSH) kombinasyonu kullanılır (116). Önce hipotalamik GnRH bloke edilir, ardından ekzojen FSH verilir. Ovulasyon genellikle serum E2 seviyeleri 1000pg/ml.'nin üzerine çıktığında ve USG ile 18 mm ve üzerinde 3 follikül görüldüğünde hCG verilerek indüklenir (116). Ultrason eşliğinde oosit aspirasyonu için optimal zaman hCG verilmesinden 36 saat sonradır. Siklus başına ortalama 11 kumulus-oosit kompleksi elde edilir (118). Kumulus ve korona

hücrelerinin uzaklaştırılmasından sonra siklus başına mikroenjeksiyon için uygun yaklaşık 9 metafaz II oosit elde edilir (116).

Embriyolog tarafından seçilen tercihen iyi morfolojili tek bir spermatozoa hazır bir oosit içine enjekte edilir. ICSI' nin temeli oosit ve spermatozoanın mikromanipulasyonudur (116). Mikromanipulasyon yoluyla fertilizasyon için oositlerin denudasyonu (oositleri çevreleyen kümülüs ve korona hücrelerinin uzaklaştırılması) gerekir. Bu uygulama ICSI için kritik önemli olan oosit olgunlaşmasını sağlar (116). Enzimatik ve mekanik işlemlerin kombinasyonu kullanılarak kümülüs ve korona hücreleri uzaklaştırılır (119). Enzim konsantrasyonu ve uygulama zamanı oositlerde patolojik aktivasyona yol açabileceğinden sınırlı tutulmalıdır (120). Denude olmuş oosit, mikroskopik olarak zona pellusida ve oosit incelenmesi ve germinal kesecik (GV) veya ilk polar cisimciğin varlığı veya yokluğu ile değerlendirilir (116). Elde edilmiş kümülüs oosit komplekslerinin %95' i intakt oosit içerir. Kalan %5' te ise boş zona, çatlak zona veya morfolojik olarak abnormal oositler mevcuttur.

ICSI sadece metafaz II oositler ile uygulanabilir çünkü bunlar normal olarak fertilize olabilecekleri haploit evreye ulaşmışlardır. Metafaz II oositler, ilk polar cisimciğe sahiptirler ve olgunlaşan oositlerin yaklaşık %85,8' ini oluştururlar (118).

Rutin olarak ICSI' da kullanılacak sperm örnekleri hareketli ve iyi morfolojili spermatozoa sayısını arttırmak için dansite-gradyent santrifürjünden geçirilir (Silanla işlenmiş silika partikülleri içeren kolloid solusyonu kullanarak). Sadece şiddetli oligospermi olgularında sperm kaybını azaltmak için basit yıkama yöntemleri kullanılır. Basit yıkama sonrası spermler hareket kabiliyetlerini kaybettikleri ve öldükleri için çok kısa süre içinde oosit içine enjeksiyon yapılmalıdır. Bu durum reaktif oksijen türleri (ROT) veya diğer zararlı maddelerin varlığıyla ilgili olabilir (121, 122).

2.7.3 ICSI İşlemi:

ICSI işlemi için mikromanipulatörler ve mikroenjektörlerle birlikte inversiyon mikroskobu hazır bulunmalıdır (123). Mikroskobun magnifikasyon kapasitesi 200x ve 400x olmalıdır. Mikroskopik bakı sırasında örneğin ısısını 37°C' de sabit tutan ısıtma aygıtına ihtiyaç vardır. Oositler ortamdaki ısı değişimlerine çok duyarlıdır ve ısı düşmeleri mayotik içciklerde geri dönüşümsüz hasarlara yol açabilir (124). Bu nedenle ortamın ısı kontrolü çok önemlidir. Mikromanipulatörler üç boyutta manipülasyona izin vermelidir.

ICSI işlemi, oosit içine tek bir spermatozoanın enjeksiyonudur. ICSI şu basamaklarla gerçekleştirilir; canlı sperm hücresinin önce seçilmesi ardından hareketsizleştirilmesi, enjeksiyon öncesi oositin doğru pozisyona getirilmesi ve oosit içine sperm salınmadan önce oosit hücre membranının rüptürü (116).

Polivinilprolidon (PVP) solusyonunun visköz karakteri spermlerin hareketini yavaşlatır ve böylece manupulasyonu mümkün olur. PVP dolu enjeksiyon pipeti ile tek bir canlı ve morfolojik olarak normal görünümlü sperm aspire edilir. Sperm kuyruğunda hafif bir seğirme ile kendini gösteren hareket, spermin canlı olduğunun kanıtıdır. Ardından pipet, spermin immobilizasyonunu sağlayan dikey konuma getirilir. Bir sperm hücresinin immobilizasyonu orta parçanın altında bir noktada kırılma ile sonuçlanır. Spermin immobilizasyonunun oosit aktivasyonu için önemi kanıtlanmıştır ki bu aktivasyon da rüptüre membrandan sperm sitozolik faktörlerinin salınımı ile sağlanır (116). Çeşitli araştırmalarda sperm kuyruğunun plazma membranının agresif hasarlanmasını içeren işlemlerin kullanımının ICSI ile fertilizasyon oranlarını arttırdığı ortaya konulmuştur (125, 126).

İmmobilizasyon sonrası kullanılan medyumun minimal düzeyde tutulması için sperm hücresi tekrar aspire edilir (bu sefer kuyruk önde). Bekleme pipetinde minimal emme ile oosit gerekli pozisyona getirilir. İğcıkların hasarlanmasını engelleyen polar cisimcik saat 6 pozisyonuna getirilir (127). Ardından oosit ekvatoriyal düzleminde saat 3 pozisyonundan immobilize sperm hücresi enjekte edilir.

Enjeksiyon sonrası oositler, düşük ağırlıklı parafin yağı kaplı mikro ortamda kültüre edilir. Oositler 37°C' de, %5 O₂, %5 CO₂ ve %90 N₂ içeren ortamda saklanır. ICSI sonrası 16-18. saatlerde oositler içerik ve fertilizasyon açısından değerlendirilir (116). Nukleolusta bulunan iki açıkça görülebilen pronükleus (2-PN) ile birlikte fragmente olmuş polar cisimcikler görüldüğünde fertilizasyon normal kabul edilir (116). Fertilizasyon oranları sperm orijinine bağlı olarak %57-67 arasında değişir. 1-PN veya 3-PN görülmesi durumunda fertilizasyon anormal kabul edilir ve bu embriyolar enjekte edilmezler (118, 128). Fertilizasyon sonrası 2-PN oositlerin %90' ı çoklu hücreli embriyo oluşumu ile sonuçlanan bölünme olayına başlar. Fertilize oositlerin bölünme karakteristikleri günlük takip edilir. İyi kalitedeki embriyolar 2. günde dört hücreye, 3. günün sabahında 8 hücreye ulaşır. Embriyolar blastomer çaplarının eşitliği ve çekirdeksiz fragmanların oranına göre skorlanır. Bu skorlamaya göre embriyolar A, B, C ve D olmak üzere dört tipe ayrılır. Embriyo volümünün %50' sinden fazlasını kaplayan çekirdeksiz fragmanları olan D tip embriyolar dışında her üç tip embriyo transfer edilir (116). Günümüzde birçok merkezde oosit toplanmasından sonraki 3 veya 5. günde embriyo transferi uygulanır. Bu zamanda embriyolar 8 hücreli aşamadır. Transfer edilecek embriyo sayısı kadının yaşına bağlıdır. 37 yaşın altındaki ilk veya ikinci siklus ICSI uygulanan kadınlarda iyi kalitede 2 embriyo transfer edilirken diğer durumlarda 3 veya daha fazla embriyo transfer edilir (116).

Bu günlerde embriyolar blastosit evresine kadar kültürde bekletilebilmektedir (5 veya 6. Gün). Blastosit transferinin daha iyi embriyo seçimi sağlayan ve

implantasyon oranlarını arttıran embriyo ile endometriyum arasında daha iyi senkronizasyon sağlayan avantajları vardır (129, 130). Bu durum çoklu gebelikleri azaltan daha az sayıda embriyo transferine imkân verir (131).

2.7.4 ICSI Sonuçları ve Çocukların Sağlığı:

Tüm yardımla üreme tekniklerinin en önemli başarı ölçücü parametresi sağlıklı canlı doğumdur (132).

2.7.4.1 Gebelik Komplikasyonları:

IVF'in 1978-2002 yılları arasındaki perinatal sonuçları son zamanlardaki bir meta analizde ortaya konulmuştur (133). Çalışma 12283 IVF ve ICSI çocuğuyla 1,9 milyon spontan gebeliğe karşılaştırmıştır. Karşılaştırılan tüm parametrelerde (perinatal mortalite, erken doğum, düşük doğum ağırlığı, çok düşük doğum ağırlığı ve küçük gestasyonel yaş) spontan gebeliğe göre IVF ve ICSI' da istatistiksel anlamlı yüksek oranlar saptanmıştır. Yardımla üreme teknikleri ile gebeliklerde, erken doğum eylemi, spontan erken doğum, plasenta previa, gestasyonel diyabet, preeklampsi ve yeni doğan yoğun bakım ihtiyacı prevelansları yüksek saptanmıştır. Helmerhorst ve ark. tarafından yapılan sistematik gözden geçirme bu sonuçları desteklemektedir (134). Karşılaştırmalı ve karşılaştırmaz çalışmaları benzer sonuçlar vermektedir (116).

2.7.4.2 Major Malfarmasyonlar:

Son zamanlarda yapılan iki meta analizde IVF ve ICSI ile mayor konjenital malfarmasyon riskinin arttığı ortaya konulmuştur (135, 136). Lie ve ark. 'nın yaptığı meta analizde 5935 ICSI çocuğu ile 13086 IVF çocuğunu mayor malfarmasyon açısından karşılaştırmıştır (137). ICSI sonrası mayor malfarmasyon rölatif riski 1,2 saptanmıştır (%95 CI 0.97-1.28). Çok merkezli bir kohort çalışmada 5 yaşındaki çocukların fiziksel sağlığı ICSI (n=540) , IVF (n=538) ve doğal gebelik açısından karşılaştırılmıştır (138). Major malfarmasyon açısından ICSI için ihtimal oranı (odds ratio) 2.77 (CI 1.41-5.46) ve IVF için 1.80 (CI: 0.85-3.81) saptanmıştır. Sonuç olarak IVF ve ICSI çocukları doğal gebelik çocuklarına göre çocukluk hastalıkları, cerrahi gereksinimi, medikal tedavi gereksinimi ve hastanede yatış açısından yüksek risklidir.

Eşlerin genetik faktörleri sonuçları etkiler. İnfertil çiftlerde daha fazla oranlarda yapısal karyotip anomalileri olduğu iyi anlaşılmıştır. Çeşitli çalışmalarda anormal spermlerin daha fazla kromozomal anomali taşıdığını ortaya konmuştur. Ailelere genetik danışmanlık verildiği 1298 ICSI içeren kohort çalışmada bunların çocuklarının 557 tanesinde artan genetik risk mevcut(118). İnfertil erkeklerin %5' inde ve test edilen kadınların %1,5' unda anormal karyotip mevcuttu. Yardımla üreme teknikleri sonrası fetal karyotipler açısından sistematik veriler ICSI için mevcuttur (139). 1586 fetal karyotip koryon villus biyopsisi veya amniyosentez ile analiz edilmiştir. Tespit edilen 47 anomalinin 22' si ailesel geçişli iken 25' i ise yeni gelişen anomali olarak saptanmıştır. Anlamli derecede yeni gelişen anomaliler mevcuttur (%1,6) fakat genel olarak risk düşüktür. Sperm konsantrasyonu 20 mil./ml' nin altına düştüğünde ve sperm hareketi bozulduğunda daha fazla anomali gözlenmiştir.

2.7.4.3 Yardımla Üreme Sonrası ođul Gebelikler:

Tüm yardımla üreme teknikleri sonrası en büyük riskin çoğul gebelikler olduğu konusunda giderek artan kanıtlar vardır (140). IVF-ICSI ile yaklaşık 2 milyon doğum gerçekleşmiştir. Bunların en az yarısı tekli gebelik değildir. Bunun sebebi tabii ki birden fazla embriyo yerleştirmeyle ilgilidir. Çoklu gebelik ve doğumların hem gebelik ve doğum sırasında hem de hayatın daha sonraki aşamalarında daha fazla problemle karşılaştıkları konusunda artan kanıtlar vardır (116). Bu nedenle, infertilite tedavilerinde birincil öncelik çoklu gebeliklerin önlenmesi olmalıdır.

3.GEREÇ VE YÖNTEM:

2008-2010 yılları arasında Kocaeli Üniversitesi Üroloji Anabilim Dalı Androloji Polikliniğinde idiyopatik erkek faktör infertilitesi tanısı alan ve Kocaeli Üniversitesi Yardımla Üreme Teknikleri Merkezinde ICSI tedavisi uygulanan hastalar retrospektif olarak değerlendirildi.

Çalışmaya sadece Kocaeli Üniversitesi Yardımla Üreme Teknikleri Merkezinde ICSI tedavisi olmuş hastalardan yaş ortalaması 33 (20-50) olan, kriterlere uyan 97 hasta dahil edildi.

3.1 Çalışmaya Dahil Etme Kriterleri

- Kocaeli Üniversitesi Üroloji Anabilim Dalı Androloji polikliniğinde ayrıntılı anamnez, fizik muayene (testis boyutları ve varikozel muayenesini içeren), semen analizi, hormon analizini içeren tam bir infertilite değerlendirmesi olması
- Eşlerine Kocaeli Üniversitesi Kadın-Doğum Polikliniği tarafından jinekolojik değerlendirilme (bifazik bazal vücut ısısı, luteal fazdaki progesteron değerlendirilmesi, hematolojik ve biyokimyasal testler, hormon profili, over ve uterusun ultrason ile değerlendirilmesi, tubal değerlendirme için histerosalpingogram) yapılmış olması
- İdiyopatik erkek faktör infertilitesi olması
- Oligoastenospermi veya Testosteron/E2 oranında düşüklük (<10) saptanması
- Primer infertil olması
- ICSI 'nın ilk siklusu olması

- Semen analizlerinin, infertilite polikliniğinde ilk değerlendirilmesi sırasında en az 15 gün arayla, en az iki kez bakılması ve medikal tedavi alan hastalar tedavi bitiminde, tedavi almayanların ise ICSI öncesi en az bir kez bakılmış olması

3.2 Çalışma Dışı Bırakma Kriterleri

- Erkek faktör infertilitesi nedeniyle daha önceden medikal tedavi alanlar
- Eş zamanlı birden fazla medikal tedavi alanlar
- İnfertiliteye yol açacak sistemik veya endokrinolojik hastalığı olanlar
- Kriptorşidizm öyküsü olanlar
- Genital sistem obstrüksiyonu olanlar
- Varikosel ile ilişkili testiküler atrofisi olanlar
- Ciddi çift taraflı kabakulak orşiti geçirmiş olanlar
- Hipogonadotropik hipogonadizmi olan veya kromozom anomalisi saptanan hastalar
- Eşlerinde ICSI sonuçlarını etkileyebilecek infertilite patolojileri olanlar

3.3 Çalışma Yöntemi

Kocaeli Üniversitesi Yardımla Üreme Teknikleri Merkezinde 2008-2010 yılları arasında ICSI tedavisi uygulanan ve çalışmaya dahil kriterlerine uyan hastalar; Proxeed plus® tedavisi alanlar, anastrozol tedavisi alanlar ve medikal tedavi almayanlar olarak üç grupta değerlendirildi.

Androloji polikliniğinde, beraberinde kadın faktörü olmayan idiyopatik erkek faktör infertilitesi nedeniyle ampirik medikal tedavi önerilen hastalardan 61' i çalışma için seçildi. Bu hastalardan oligoastenospermi saptanan ve T/ E2 oranı 10'

un altında olmayan 33' ü, 6 ay boyunca günde iki kez Proxeed plus® (L-karnitin fumarat 3450 mg, fruktoz 2000 mg, asetil L- karnitin 1000 mg, C vitamini 180 mg, sitrik asit 100 mg, koenzim Q10 40 mg, çinko 20 mg, folik asit 400 mcg, selenyum 100 mcg, B12 vitamini 3 mcg) tedavisi almıştı(Grup I). Testosteron/E2 oranı azalmış (testosteron(ng/dl)/E2(pg/ml)<10) olan 28 hasta ise 6 ay boyunca 1 mg/gün anastrozol (aromataz inhibitörü) verilmişti(Grup II). Medikal tedaviyi kabul etmeyen ve Kocaeli Üniversitesi Yardımla Üreme Teknikleri Merkezine yönlendirilen ve sonrasında 0-6 ay içinde ICSI uygulanmış 36 hasta ise kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi (Grup III).

Medikal tedavilerinin ardından spontan gebelik saptanmayan ve Kocaeli Üniversitesi Yardımla Üreme Teknikleri Merkezinde ICSI uygulanan hastalar çalışma için seçildi. ICSI başarısı fertilizasyon oranları, gebelik ve canlı doğum oranları olarak değerlendirildi. Fertilizasyon, ICSI sonrası 16-18. saatlerde oositlerde 2PN ve 2 polar cisimcik olması durumunda normal kabul edildi. 5-6. haftalarda ultrasonografide fetal kardiyak aktivite saptanması klinik gebelik olarak değerlendirildi.

Semen analizine göre total ileri hareketli spermilerin oranı %50' nin altında olan ve sperm sayısı 20 mil/ml.' nin altında olanlar oligoastenospermi olarak değerlendirildi.

Semen analizi 3-5 günlük cinsel perhiz sonrası WHO kriterlerine göre değerlendirildi (141). Semen analizlerinde sperm konsantrasyonu, sperm hareketi ve sperm morfolojisi değerlendirildi, sperm konsantrasyonu sayı/ml olarak, sperm hareketi total sperm içinde hareketli spermilerin yüzdesi olarak ve sperm morfolojisi total sperm içinde normal olan spermilerin yüzdesi olarak saptandı (141).

3.4 İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen bulguların istatistiksel analizi için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 13,0 programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel yöntemleri olarak sürekli değişkenler için parametrik test varsayımları sağlandığında (Parametrik test) student t testi, sağlanmadığında (nonparametrik test) Mann Whitney U testi, kategorik değişkenler için Ki-Kare testi ve çok değişkenli analizler için lojistik regresyon analizi kullanılmıştır. İstatistikî danışmanlık Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı tarafından yapılmıştır.

4. BULGULAR

Hastalar 3 grupta incelendi. Dahil edilen hasta sayıları Grup I' de 33, Grup II' de 28 ve Grup III' de 36 idi. Her üç grup için hastaların demografik özellikler ve fertilitite özellikleri tablo 5' de özetlenmiştir. Her üç grupta da erkek ve kadın yaşları benzerdi. Hastaların hepsi idiyopatik erkek faktör infertilitesine sahipti ve hiç birinde belirleyici kadın faktörü yoktu. Gruplar için infertilite süreleri benzerdi. Grup I' de bulunan hastalarda hormonal dengesizlik yoktu. Grup II' deki hastaların ise T/E2 oranları düşüktü (<10).

Tablo 5. Demografik Özellikler ve Fertilitite Özellikleri

	Grup I (n=33)	Grup II (n=28)	Grup III (n=36)	P değeri
Erkek Yaşı (yıl)	33 ± 5,0	33 ± 5,6	33 ± 4,7	P=0,85
Kadın Yaşı (yıl)	29 ± 4,2	29 ± 4,6	30 ± 4,0	P=0,42
İnfertilite Süresi (yıl)	6 ± 3,0	7 ± 4,8	6 ± 4,1	P=0,71

Hastaların tedavi öncesi ve sonrası semen parametrelerindeki değişimler ile fertilizasyon, gebelik ve canlı doğum oranları tablo 6' da özetlenmiştir. Başlangıç semen analizleri değerlendirildiğinde tüm hastalarda oligoastenospermi mevcutken grup I' de hareket azlığı, grup II' de sperm sayısı azlığı belirgindi. Grup I' de T/E2 oranı normaldi. Tedavi ile hiçbir hasta normal semen parametrelerine ulaşamadı. Ancak tedavi alan her iki grupta semen parametrelerinde istatistiksel anlamlı

düzelme izlendi ($p<0,01$). Grup I' de sperm hareketinde, Grup II' de sperm sayısında düzelme daha belirgindi.

Fertilizasyon oranları değerlendirildiğinde tüm grupların enjeksiyon yapılan oosit sayıları benzerdi. Tedavi alan gruplarda fertilizasyon oranları daha yüksek saptansa da her üç grup birlikte değerlendirildiğinde gruplar arasında fertilizasyon oranları açısından istatistiksel anlamlı fark izlenmedi (Kruskal-Wallis; $p=0,29$). Ancak grup I' de daha yüksek fertilizasyon oranları elde edildi (%72,9). Grup I ve grup II ayrı ayrı grup III ile karşılaştırıldığında fertilizasyon oranları açısından istatistiksel anlamlı fark bulunmadı (sırasıyla $p=0,16$, $p=0,86$; Mann-Whitney).

Gebelik değerlendirildiğinde, grup I veya grup II' de, grup III' e göre oranlar daha yüksek bulundu. Grup II' de gebelik elde etme oranları diğer gruplara göre daha yüksekti (%60,7). Her üç grup birlikte değerlendirildiğinde gruplar arasında gebelik açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (Ki-kare; $p=0,41$). Grup I ve grup II, ayrı ayrı grup III ile karşılaştırıldığında gebelik açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla $p=0,55$, $p=0,29$; Ki-kare).

Canlı doğum oranları değerlendirildiğinde grup I ve grup II' de daha yüksek canlı doğum oranları bulundu. Grup II' de canlı doğum oranları diğer gruplardan daha yüksekti (%46,4). Her üç grup birlikte değerlendirildiğinde gruplar arasında canlı doğum oranları açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (Ki-kare; $p=0,80$). Grup I ve grup II, ayrı ayrı grup III ile karşılaştırıldığında canlı doğum oranları açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla $p=0,72$, $p=1,00$; Ki-kare).

Tablo 6. Semen Parametreleri ve ICSI Başarısı

		Grup I	Grup II	Grup III	P değeri
Başlangıç Sperm Sayısı (mil/ml)		11,8 ± 5,8	8,1 ± 4,0	12,3 ± 4,9	p<0,05
Başlangıç Sperm Hareketi (%)		24,6 ± 8,5	40,2 ± 7,5	37,6 ± 22,2	p<0,05
ICSI Öncesi Sperm Sayısı (mil/ml)		14,3 ± 6,8*	12,8 ± 6,3*	13,0 ± 6,1	p=0,63
ICSI Öncesi Sperm Hareketi (%)		38,3 ± 9,6**	41,5 ± 6,4**	38,5 ± 22,7	p=0,33
Enjeksiyon Yapılan Oosit Sayısı (adet)		9 ± 4,7	10 ± 6,7	10 ± 7,4	p=0,91
Fertilize Olan Oosit Sayısı (adet)		6 ± 3,3	6 ± 3,8	7 ± 5,9	p=0,95
Fertilizasyon Oranı (%)		72,9 ± 20,4	67,3 ± 16,5	66,6 ± 20,0	p=0,29
Gebelik Oranı (%)		54,5	60,7	44,4	p=0,41
Canlı Doğum Oranı (%)		36,4	46,4	30,6	p=0,80

* Grup I ve II' deki hastaların medikal tedavi sonrası ortalama sperm sayıları

** Grup I ve II' deki hastaların medikal tedavi sonrası ortalama sperm hareketleri

5.TARTIŞMA

Tek bir spermatozoanın ooplazma içine enjekte edilmesi tekniği olan ICSI ilk defa 1992' de uygulanmıştır (117). ICSI, ağır erkek faktör infertilitesinin en önemli tedavisidir (116). Günümüzde ejakulattan elde edilmiş sperm ile uygulanan ICSI ile bir deneme için fertilizasyon oranları %76 (142), gebelik oranları %39 (142) ve canlı doğum oranları %25' dir (143). Çalışmamızda ortaya konulan fertilizasyon, gebelik ve canlı doğum oranları bu oranlar ile benzerdir. Canlı doğum ile sonuçlanmayan ICSI denemelerinde başarısızlığın sebebi kadına ait faktörler olabileceği gibi erkek faktör de başarısız sonuç oluşmasında önemli bir yer tutar (144). Erkek faktörün ayrıntılı değerlendirilmesiyle ve uygulanacak tedaviler ile ICSI başarısında artışlar sağlanabilir.

Bazı yazarlar yardımıyla üreme tekniklerinde elde edilen başarılar nedeniyle sınırlı bir erkek faktör değerlendirmesini savunmaktadırlar ve bu durum yardımıyla üreme teknikleri kullanımını arttırmaktadır (145, 146). ICSI ile tek bir sperm ile yumurtayı dölleyerek erkek faktör infertilitesi önemsizleşiyor gibi gözükse de ICSI başarısızlığı erkek faktör ile de ilişkilidir (144). ICSI gebeliklerinde anomali insidansında artış vardır (147, 148) ve IVF' ye göre ICSI daha yüksek abortus oranına sahiptir (149-151). Bu bulgular sperm kalitesinin arttırılmasının ICSI' da daha iyi sonuçlar sağlayacağını düşündürmektedir. Çalışmamızda ICSI öncesi medikal tedavi alan gruplarda, medikal tedavi almayanlara göre daha yüksek fertilizasyon, gebelik ve canlı doğum oranları saptanması bu düşünceyi desteklemek için yapılacak çalışmalara temel oluşturabilir.

Tüm sperm tipleriyle birlikte tüm yaşlarda ICSI ile fertilizasyon oranları yaklaşık %60-70' dir (142). Bu durum sperm doğrudan oosit içine enjekte edilse de başarısız fertilizasyonların gerçekleştiğini göstermektedir. Fertilizasyon başarısızlıkları oosite bağlı faktörlerden (oosit morfolojisi, oosit olgunlaşması, oosit

aktivasyonu veya zayıf ovaryan cevabı) veya sperme bağlı faktörlerden (sperm hareket ve ilerleyişi, sperm kaynağı, sperm yapısal bozuklukları, sperm olgunlaşması, prematür kromozomal kondansasyonu, sperm DNA hasarı) kaynaklanabilir (144).

Tek bir spermle dahi gebelik elde edilebiliyor olsa da en iyi sonuçlar en sağlıklı spermle sağlanmaktadır (152). Aboulghar ve ark. semen parametreleri normal olan ejakulattan elde edilmiş spermelerin, diğerleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek fertilizasyon sağladığını ortaya koymuşlardır (152). Bazı araştırmacılar genetik materyal aktarımında kritik bir basamak olan fertilizasyonun ICSI ile atlanmasının doğal yolla sperm seçimini bozduğunu ve bu durumun defektif genetik materyalin aktarımına yol açtığını ileri sürmüşlerdir (153-155). ICSI tekniklerinde fertilizasyon doğrudan enjeksiyonla sağlanırken IVF 'de ise fertilizasyon spermatozoanın kendisi ile sağlanır (116). Bu durumda IVF, doğal bir bariyer görevindeki zona pellucida sayesinde oositi morfolojisi bozuk bazı spermle fertilizasyondan korumaktadır (156). Bonduelle ve ark. ICSI ile elde edilmiş 1558 gebelikte fetüsün amniyosentez ve koryonik villus biyopsisi ile değerlendirilmesinde, normal popülasyona göre artmış yapısal kromozom anomalileri riskini ortaya koymuşlardır (139). Kurinczuk ve Bower, ICSI ile fetal malformasyonun daha fazla görüldüğünü ileri sürmüşlerdir (147). Bowen ve ark. da ICSI ile dünyaya gelen yeni doğanlarda gelişimsel bozuklukların daha fazla görüldüğünü ileri sürmüşlerdir (148). Yine muhtemel bu nedenledir ki IVF' ye göre ICSI' da spontan düşük ve doğum anomalileri daha fazla görülmektedir (149-151). Ancak yardımla üreme teknikleri uygulanmadan önce erkek faktörün tam olarak değerlendirilmesi ve uygulanacak tedaviler ile sperm kalitesinin optimize edilmesi yardımla üreme teknikleri sonuçlarını ve başarısını iyileştirebilecektir.

İdiyopatik erkek faktör infertilitesinde antioksidan kullanımı, infertilite ile serbest oksijen radikalleri arasında kurulan ilişkiye dayanır (13, 153). Memeli spermatozoa membranları çoklu doymamış yağ asiti açısından zengindir. Bunlar

oksijenle indüklenen lipid peroksidasyon hasarına duyarlıdırlar. Bir veya daha fazla kararsız elektron barındıran moleküllere serbest radikal denir. ROT, hidroksil (-OH) ve süperoksit anyon (O⁻²) içeren güçlü serbest oksijen radikalleridir. Çeşitli diferensiasyon kademelerindeki erkek germ hücreleri ROT üretir (157, 158).

Sperm kapasitasyonu, akrozom reaksiyonu ve sperm oosit füzyonu için ROT'ların düşük fizyolojik düzeylerine ihtiyaç duyulur (159, 160). Hücrelerin normal fonksiyonlarını devam ettirebilmeleri için artan ROT değerleri, seminal plazmadaki antioksidanlarla sürekli inaktive edilmelidir. Sağlıklı kişilerde reproduktif sistem içinde ROT ve antioksidanlar arasında hassas bir denge mevcuttur (161). ROT ve diğer oksijen radikallerinde aşırı erkek infertilitesiyle ilgilidir (13, 157, 162-167). Bazı çalışmalarda infertil erkeklerin seminal plazmasında yüksek ROT değerleri saptanırken fertil erkeklerde seminal plazmada ROT saptanmamıştır (157, 158). Sharma ve ark. semen parametreleri normal olanlara kıyasla oligospermik hastaların spermatozoalarının daha yüksek oranda ROT ürettiğini ortaya koymuşlardır (168). Aitken ve ark.'ın yaptığı bir prospektif çalışmada da seminal plazmada yüksek ROT düzeyleri olan hastaların ROT düzeyleri düşük olanlara göre 7 kat daha düşük gebelik elde etme şansı olduğu ortaya konulmuştur (169).

Antioksidanlar, idiyopatik erkek faktör infertilitesinde özellikle semen parametrelerinde astenospermi saptanan olgularda kullanılmaktadır (170). Astenospermik hastalarda, seminal plazmada serbest oksijen radikallerinin üretiminin arttığı ve sperm membranında serbest oksijen radikallerine bağlı hasarın olduğu ortaya koyulmuştur (158, 165, 171-175). Serbest oksijen radikalleri membran bütünlüğünü bozarak sperm motilitesini azalttığı gibi sperm yaşama kabiliyetini de azaltır (174). Bu nedenle serbest oksijen radikallerine karşı kullanılacak ajanlar erkek faktör infertilitesi tedavisinde kullanılabilir. Astenospermik infertilite hastalarının antioksidanlarla tedavisinin semen parametrelerinde ve gebelik oranlarında düzelmeye yol açtığını gösteren çok sayıda kanıt vardır (12, 13). Proxeed plus®, içinde çeşitli türlerde antioksidan içeren bir

ilaçtır (L- karnitin fumarat 3450 mg, fruktoz 2000 mg, L- asetil karnitin 1000 mg, C vitamini 180 mg, sitrik asit 100 mg, koenzim Q10 40 mg, çinko 20 mg, folik asit 400 mcg, selenyum 100 mcg, B12 vitamini 3 mcg) (176). Karnitin, idiyopatik erkek faktör infertilitesi tedavisinde en çok araştırılan ve kullanılan antioksidanlardan biridir. Hareket kabiliyeti için sperme enerji sağlayan ve sperm enerji metabolizmasında rol alan, suda çözünebilen bir antioksidandır (177). Epididimde dolaşımdakinden 2000 kat daha fazla konsantrasyonda bulunur (178). Karnitin, spermatozoa membranından pasif difüzyonla hücre içine girer (177). Sadece olgun spermatozoa içinde asetillenir (177). Spermin hareket kazanması, epididimal lümende karnitin konsantrasyonunda artış ve spermatozoada L- asetil karnitin artışıyla eş zamanlıdır (177, 179, 180). Karnitin, yağ asiti oksidasyonunu azaltarak mitokondriyal membrandaki fosfolipidleri onarır (181-183). Sonuçta, hücre membranı ve DNA' yı serbest oksijen radikallerinin yol açtığı oksidatif stresten korur (183-186). Oral karnitin kullanımı ile sperm motilitesinin arttığı pek çok yazar tarafından gösterilmiştir (187-191).

L-karnitin uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriyal oksidasyonu için de gereklidir (177). Uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriyal membranı geçebilmek için önce bir taşıyıcı olan asetil koenzim A' ya bağlanarak aktive olması gerekir (177). Uzun zincirli yağ asiti-asetil koenzim A kompleksi, iç mitokondriyal membranı geçemez, bu yüzden L- karnitini taşıyıcı olarak kullanan bir enzimatik reaksiyona ihtiyaç duyar (177, 192, 193). L- karnitin, koenzim A' dan asetil grubunu alarak uzun zincirli yağ asitleriyle kompleks oluşturur ve bunların mitokondriyal iç membrandan transportunu sağlar (177, 192, 193). Sperm enerji metabolizmasının düzenlenmesinde, asetillenmiş koenzim A ve serbest koenzim A oranı ile asetillenmiş L- karnitin ve serbest L- karnitin oranı arasındaki denge önemli rol oynar (177, 194, 195). Proxeed plus® içinde, L- karnitin ve L- asetil karnitinin birlikte bulunması sperm enerji metabolizmasındaki dengeye katkı yapabilir. Balercia ve ark. yaptıkları çalışmada, L-karnitin ve L- asetil karnitinin birlikte kullanımının, sperm hareketini tek başlarına kullanıma göre istatistiksel anlamlı olmasa da daha fazla arttırdığını göstermişlerdir (196).

Askorbik asit suda eriyebilen güçlü bir reaktif oksijen metaboliti temizleyicisidir (197). Seminal plazmada serumda bulunduğundan 10 katı fazla miktarda bulunur (197, 198). Spermatozoaları oksijen radikallerine karşı ve sperm aglütinasyonuna karşı korur (199). Seminal plazma askorbik asit konsantrasyonları morfolojik olarak normal spermatozoa konsantrasyonuyla paralellik gösterir (200). Kodama ve ark. fertil hastalara göre infertil hastalarda DNA hasarının anlamlı oranda fazla olduğunu saptamışlardır (201). Fraga ve ark. C vitamininin insan spermatozoasını endojen oksidatif DNA hasarından koruduğunu göstermişlerdir (199). Proxeed plus® içinde 180 mg C vitamini bulunur (176). Literatürde hem düşük (200mg/gün) hem de yüksek (1000mg/gün) doz C vitamini kullanımıyla ilgili araştırmalar vardır. Dawson ve ark.'ın yaptığı plasebo kontrollü çalışmada, yüksek doz C vitamini kullanımıyla daha fazla olsa da düşük doz C vitamini kullanımıyla plaseboya göre sperm hareketinde, aglütinasyonunda, immatür prekürsörlerde ve morfolojide istatistiksel anlamlı düzeltilmeler sağlandığı ortaya konulmuştur (197). Burada yüksek doz C vitamini kullanımıyla artan yan etkiler göz ardı edilmemelidir (197).

Proxeed plus®'da antioksidan etkileri güçlendirmek için selenyum, çinko, folik asit ve koenzim Q da kullanılmıştır (176). Selenyum, sperm DNA 'sının oksidatif hasarlanmasına karşı koruyucudur ve normal testiküler gelişim, spermiyogenez, motilite ve fonksiyon için gereklidir (202). Selenyum bu etkilerini fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz (PHGPx) gibi seloenzimler aracılığıyla (203) veya bir sperm kapsül selenoprotein olan glutatyon peroksidaz aracılığıyla (204, 205) gerçekleştirir. Selenyum eksikliği sonucu sperm motilitesi azalır, spermatozoanın orta parçası kırılabilirliği artar (206, 207) ve çoğunlukla sperm başını etkileyen morfolojik bozukluklarda artış izlenir (208). Bleau ve ark. ile Behne ve ark. infertilite hastalarında sperm konsantrasyonu ile seminal plazma selenyum konsantrasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptamışlardır (209, 210). Scott ve ark. selenyumun sperm hareketini artırdığını göstermişlerdir (211). Süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimlerin optimal fonksiyon gösterebilmeleri için diyetle yeterli miktarda çinko ve bakır alınmasına ihtiyaç vardır (212). Fertil ve

subfertil erkeklerde seminal plazma çinko seviyelerinde anlamlı oranda farklılık vardır (213). Çinko yetmezliğinde spermelerde fibröz kılıf hipertrofisi ve hiperplazisi ile kendini gösteren flajella anormallikleri, aksonemal bozukluklar ve içyapısı bozulmuş aksonem ve zayıf oluşmuş veya hiç oluşmamış orta parça ile birlikte mikrotübül çiftlerinin dinein kollarında parsiyel defektler görülür (214). Prospektif çalışmalarda subfertil erkeklerde çinko kullanımı ile sperm konsantrasyonunda (215, 216) ve ileri harekette (217) düzelme ortaya konmuştur. İn vitro ve in vivo hayvan çalışmaları, çinko yetmezliğinin, diyetle alınan folatın ince barsaktan emilimini ve metabolizmasını bozduğunu göstermiştir (218-220). Wong ve ark.'ın randomize çift kör kontrollü çalışmasında çinko ve folik asitin sperm kalitesini artırmakta sinerjistik çalıştığı gösterilmiştir (221). Ancak eser elementlerin aşırı miktarda alımı da tam tersine oksidatif reaksiyonlarda katalizör görevi görerek serbest oksijen radikalleri oluşumuna neden olan prooksidan etki gösterir (222). Koenzim Q 10 (Ubiquinon)'un antioksidan, hücreye enerji sağlayıcı, membran koruyucu ve mitokondriyal geçirgenlikte düzenleyici rolleri vardır (223). Sperm hücresinde çoğu orta parçadaki mitokondrielerde konsantre halde bulunur ve enerji bağımlı olaylarda rol alır (224). Seminal sıvıdaki koenzim Q 10 konsantrasyonu, semen parametreleriyle doğrudan korelasyon gösterir (225). In vitro ortamda semenin koenzim Q 10 ile inkübasyonu sperm motilitesini artırır (226). Yapılan bir çalışmada idiyopatik astenospermi hastalarında koenzim Q 10 verilmesiyle sperm hareketlerinde düzelme sağlandığı ortaya konulmuştur (227). Thomas ve ark.'ın yaptığı çalışmada ise 60 mg oral koenzim Q 10 verilmesi ile semen parametrelerinde değişiklik yapmadan fertilizasyon oranlarını arttığı gösterilmiştir (226).

Antioksidanların semen parametreleri üzerine etkileri kombine kullanımlarıyla arttırılmaya çalışılmıştır (228). Tremellen ve ark. kombine antioksidan tedavisinin gebelik oranları üzerine etkilerini araştırmışlardır (228). Menevit; C vitamini, E vitamini, çinko, folik asit, likofen, garlik yağı ve selenyum içeren bir oral antioksidan preperatıdır. Tremellen ve ark.'ı menevit ile yaptıkları prospektif randomize çift kör çalışmada daha önce başarısız IVF/ICSI denemesi olan ve sperm DNA fragmantasyonu bulunan (TUNEL pozitifliği >%25) hastaları iki

gruba randomize etmişler ve bir gruba 3 ay plasebo, bir gruba 3 ay menevit tedavisi vermişlerdir (228). Sonuçları fertilizasyon, gebelik ve canlı gebelik oranları açısından karşılaştırmışlardır. Antioksidan tedavisi alanlarda, plaseboya göre gebelik oranları (%63,9-%37) ve canlı gebelik oranları (%38,5- %16) açısından anlamlı fark saptamışlardır (228). Fertilizasyon oranları (%68,8- %63,0) açısından anlamlı fark saptamamışlardır. Fertilizasyon oranlarının plaseboya göre yüksek saptanması çalışmamıza temel oluşturmuştur. Menevit çalışmasında gebelik oranları çalışmamıza göre biraz daha yüksek saptanmıştır (%63,9-%54,5) (228). Gebelik oranları arasındaki bu farklılık, Tremellen ve ark.' ın β hCG pozitifliğini gebelik olarak kabul etmesinden kaynaklanıyor olabilir. Çalışmamızda 5-6. haftada saptanan fetal kardiyak aktiviteyi gebelik olarak kabul ettik. Tremellen ve ark. ilk trimester sonuna kadar devam eden gebelikleri, canlı gebelik olarak değerlendirmişlerdir (228). Ortaya konulan canlı gebelik oranları, çalışmamızda saptadığımız canlı doğum oranlarıyla benzerdir (%38,5-%36,4). Sonuç olarak menevit çalışmasında antioksidan tedavisi ile IVF/ICSI başarısı artmıştır. Çalışmamızda ise plasebo kontrol grubu olmadığından elde ettiğimiz bulgular, gelecekteki prospektif randomize plasebo kontrollü çalışmalara temel oluşturabilir.

Medikal tedavi için seçilen diğer ajan ise bir aromataz inhibitörü olan anastrozoldur. T/E2 oranı azalmış (subnormal testosteron seviyesi ve artmış E2 seviyesi olan) infertil erkekler aromataz inhibitörleriyle tedavi edilebilir (229). Tedavi ile testiküler testosteron seviyelerinde artış ile spermatogenezde uyarılma görülür (14). Böylece T/E2 oranlarında düzelmeye paralel olarak semen parametrelerinde iyileşmeler gözlenir (14).

Spermatogenez hormonal olarak düzenlenmektedir (230). Bu düzenlemede pulsatil GnRH salınımı kadar bu salınımın negatif feed back kontrolü de önemlidir. Testosteron, her iki gonadotropin üzerine negatif feed back etkiyle, E2 de hipotalamopitüitotestiküler aks üzerine inhibisyon etkisiyle (231, 232) spermatogenezin negatif feedback hormonal kontrolünde yer alır. Aromataz,

çoğunlukla testis, yağ dokusu ve beyinde bulunan bir sitokrom p 450 enzimidir (233, 234). Bu enzim testosteron ve andrestenodionu, E2 ve östrona çevirir (235).

Anastrazol, 4. kuşak aromataz inhibitörü olarak sunulan non-steroid bir ajandır (14). Aromataz enzimine yüksek poteste ve spesifitededir (236). Kendinden öncekilerden temel farkı daha düşük oranda agonist ve antagonist steroidal özellikler göstermesidir (236). Anastrazol, E2 seviyesinde %80' den fazla azalmaya ve gonadotropin ile testosteron konsantrasyonunda artışa neden olur (14, 229).

İdiyopatik erkek faktör infertilitesinde bir tedavi seçeneği olarak aromataz inhibitörleri kullanımıyla ilgili pek çok yazar tarafından çalışmalar yapılmıştır (237). Akiyama testiküler E2 artışına neden olan aromataz aktivitesi artışının erkek faktör infertilitesine yol açtığını ileri sürmüştür (238). Pavlovich ve ark. ciddi erkek faktör infertilitesi olgularında T/E2 oranında azalma olduğunu ve testolakton (aromataz inhibitörü) tedavisiyle oligospermik hastalarda semen parametrelerinde düzelme sağlandığını ileri sürmüşlerdir (239). Raman ve Schegel, hem testolakton hem de anastrazol tedavisinin T/E2 oranını arttırarak semen parametrelerini düzelttiğini göstermişlerdir (14). Çalışmamızda, T/E2 oranı azalmış hastalarda anastrazol tedavisi ile T/E2 oranlarında anlamlı artış vardı ve bu hastaların semen parametrelerinde anlamlı iyileşmeler saptandı. Bunun yanında ICSI öncesi 6 ay anastrazol tedavisi alan grupta, medikal tedavi almayanlara göre fertilizasyon, gebelik ve canlı doğum oranlarında istatistiksel anlamlı olmasa da iyileşmeler izlendi.

Medikal tedavi alan gruplar içinde hastaların, başlangıç semen analizi ve hormon profili açısından farklı özelliklere sahip olması nedeniyle sonuçlar açısından birbiriyle karşılaştırılması bu çalışma için uygun değildir. Bunun yanında medikal tedavi alan gruplarda semen parametrelerinde istatistiksel anlamlı artış izlenmesine rağmen hiçbir hastada spontan gebelik izlenmedi. Bu sonucun en büyük nedeni

Çalışma dzeninin ICSI uygulanmış hastaların retrospektif olarak incelenmesini içermesidir. Benzer nedenle muhtemeldir ki çalışmaya dahil edilen hastalar içinde sperm konsantrasyonu 20 mil./ml.' nin uzerinde olan hasta bulunmamaktadır.

Hem antioksidan hem de anastrazol grubunda ICSI sonuçlarında iyileşmeler izlense de istatistiksel anlamlı fark bulunmaması hasta sayısıyla ilgili olabilir. Çok merkezli büyük hasta gruplarıyla yapılacak çalışmalar ile istatistiksel anlamlı sonuçlar elde edebilir.

6. SONUÇ

Çalışmamızda idiyopatik erkek faktör infertilitesine sahip hastalarda medikal tedavi ile fertilizasyon, gebelik ve canlı doğum oranlarında artış sağlanabileceğine dair bulgular saptandı. Bir pilot çalışma olarak sonuçlarımız, erkek faktör infertilitesinin ayrıntılı değerlendirilmesi ve seçilmiş hastaların uygun tedavisiyle yardımla üreme teknikleri başarısının arttırılabilineceğine yol gösteriyor. Çalışmamız temel alınarak yapılacak iyi planlanmış prospektif araştırmalar bu konuda daha yüksek kanıtlar sağlayabilir.

7.ÖZET

Amaç: ICSI tedavisi öncesi erkek faktör infertilitesine yönelik uygulanacak ampirik tedavilerin ICSI başarısına etkisini değerlendirmek.

Yöntem ve Gereçler: 2008–2010 yılları arasında idiyopatik erkek faktör infertilitesi tanısı alan ve ICSI tedavisi uygulanan hastalar retrospektif olarak değerlendirilerek çalışmaya dahil kriterlerine uyan 97 hasta çalışma için seçildi. İdiyopatik oligoastenospermi ve/veya T/E2 oranı düşük olan, beraberinde kadın faktörü olmayan primer infertil hastalara ampirik medikal tedavi önerildi. Tedaviyi kabul edenlerden semen parametrelerinde astenospermi belirgin olan ve T/E2 oranı normal olan 33 hastaya 6 ay boyunca antioksidan tedavisi, T/E2 oranı düşüklüğü saptanan 28 hastaya 6 ay boyunca aromataz inhibitörü tedavisi verildi. Medikal tedaviyi kabul etmeyen 36 hasta ise kontrol grubu olarak değerlendirildi. ICSI başarısı fertilizasyon, gebelik ve canlı doğum oranları olarak değerlendirildi.

Bulgular: Tedavi alan her iki grupta semen parametrelerinde istatistiksel anlamlı düzelme izlendi($p<0,01$). Antioksidan tedavisi alan grupta sperm hareketinde, aromataz inhibitörü alan grupta sperm sayısında düzelme daha belirgindi. Tedavi alan her iki grupta da fertilizasyon, gebelik ve canlı doğum oranları daha yüksek saptandı. Ancak her üç grup birlikte değerlendirildiğinde fertilizasyon($p=0,29$), gebelik($p=0,41$) ve canlı doğum($p=0,80$) oranları açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmadı.

Sonuçlar: Çalışmamız, ortaya çıkan sonuçları ile erkek faktör infertilitesinin ayrıntılı değerlendirilmesi ve seçilmiş hastaların uygun tedavisiyle yardımla üreme teknikleri başarısının arttırılabileceğini gösteren pilot bir çalışmadır. Çalışmamız temel alınarak yapılacak iyi planlanmış prospektif araştırmalar bu konuda daha yüksek kanıtlar sağlayabilir.

Anahtar Kelimeler: Ampirik, antioksidan tedavi, aromataz inhibitörü tedavisi, idiyopatik erkek faktör infertilitesi, ICSI

8. SUMMARY

Purpose: To evaluate the effect of the empirical treatments for male factor infertility before intracytoplasmic sperm injection (ICSI).

Materials and Methods: A retrospective review of ICSI-treated patients between 2008-2010 was done. Ninety-seven idiopathic male factor infertility diagnosed patients with to fit the inclusion criteria were included in this study. Empirical medical treatment offered to non-female factor, primary idiopathic oligoasthenospermia and/or low rate T/E2 ratio infertility patients. Of the 33 patients semen evaluation resulted oligoasthenospermia with normal rate T/E2 ratio were treated with antioxidant therapy for 6 months. Aromatase inhibitor therapy was given to 28 patients for 6 months with low rate T/E2 detected. Thirty-six patients who did not accept medical treatment were included in the control group. Success in ICSI was accepted as fertility, pregnancy and live birth rates.

Results: Improvement in semen parameters were statistically significant for both treated groups ($p < 0.01$). In antioxidant-therapy group, sperm motility, in aromatase inhibitor therapy group sperm count improvement was remarkable. All three groups were evaluated for fertilization ($p = 0.29$), pregnancy ($p = 0.41$) and live birth ($p = 0.80$) rates; statistical significance not detected. In both treatment groups, fertilization, pregnancy and live birth rates were detected high, compared with untreated group.

Conclusions: This is a pilot study to show that the success rate of assisted fertilization may increase when male factor infertility evaluated completely and treated accurate indication. On the basis of our study, well-planned prospective studies may obtain better evidences.

Key Words: Antioxidant treatment, aromatase inhibitory treatment, empirical, idiopathic male factor infertility, ICSI

9. KAYNAKLAR

1. Poland ML, Moghissi KS, Giblin PT, Ager JW, Olson JM. Variation of semen measures within normal men. *Fertil Steril*. 1985 Sep;**44**(3):396-400.
2. Siddiq FM, Sigman M. A new look at the medical management of infertility. *Urol Clin North Am*. 2002 Nov;**29**(4):949-63.
3. 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. *N Engl J Med*. 2001 Nov 8;**345**(19):1388-93.
4. Bonanomi M, Lucente G, Silvestrini B. Male fertility: core chemical structure in pharmacological research. *Contraception*. 2002 Apr;**65**(4):317-20.
5. WHO. *WHO Manual for the Standardized Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple*. Cambridge: Cambridge University Press; 2000.
6. Steptoe PC ER. Birth after the reimplantation of a human embryo. In: . editor. *Lancet*1978.
7. Adamson GD dMJ, Lancaster P, Nygren KG, Sullivan E, Zegers-Hochschild F. World collaborative report on in vitro fertilization, 2000. *Fertil Steril*. 2006 Jun;**85**(6):1586.
8. Wright VC, Chang J, Jeng G, Macaluso M. Assisted reproductive technology surveillance--United States, 2005. *MMWR Surveill Summ*. 2008 Jun 20;**57**(5):1-23.
9. Klemetti R, Gissler M, Hemminki E. Comparison of perinatal health of children born from IVF in Finland in the early and late 1990s. *Hum Reprod*. 2002 Aug;**17**(8):2192-8.
10. Alukal JP, Lipshultz LI. Why treat the male in the era of assisted reproduction? *Semin Reprod Med*. 2009 Mar;**27**(2):109-14.
11. Liu DY, Baker HW. Evaluation and assessment of semen for IVF/ICSI. *Asian J Androl*. 2002 Dec;**4**(4):281-5.
12. Lenzi A, Culasso F, Gandini L, Lombardo F, Dondero F. Placebo-controlled, double-blind, cross-over trial of glutathione therapy in male infertility. *Hum Reprod*. 1993 Oct;**8**(10):1657-62.

13. Balercia G, Mosca F, Mantero F, Boscaro M, Mancini A, Ricciardo-Lamonica G, et al. Coenzyme Q(10) supplementation in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: an open, uncontrolled pilot study. *Fertil Steril*. 2004 Jan;**81**(1):93-8.
14. Raman JD, Schlegel PN. Aromatase inhibitors for male infertility. *J Urol*. 2002 Feb;**167**(2 Pt 1):624-9.
15. Schlegel PN HM, editor. *Male reproductive physiology*. 8 ed. Philadelphia: Saunders; 2004.
16. De Kretser DM, Robertson DM. The isolation and physiology of inhibin and related proteins. *Biol Reprod*. 1989 Jan;**40**(1):33-47.
17. Clarke IJ, Rao A, Fallest PC, Shupnik MA. Transcription rate of the follicle stimulating hormone (FSH) beta subunit gene is reduced by inhibin in sheep but this does not fully explain the decrease in mRNA. *Mol Cell Endocrinol*. 1993 Feb;**91**(1-2):211-6.
18. Hayes FJ, Crowley WFJ. Gonadotropin pulsations across development. *Horm Metab Res*. 1988;**49**:163-8.
19. Santen RJ. Is aromatization of testosterone to estradiol required for inhibition of luteinizing hormone secretion in men? *J Clin Invest*. 1975 Dec;**56**(6):1555-63.
20. Hayes FJ, DeCruz S, Seminara SB, Boepple PA, Crowley WF, Jr. Differential regulation of gonadotropin secretion by testosterone in the human male: absence of a negative feedback effect of testosterone on follicle-stimulating hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Jan;**86**(1):53-8.
21. Kandıralı E. Leydig hücresi ve fonksiyonları. In: Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman MÖ, Usta MF, Kendirci M, editor. *Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi*. İstanbul: Acar Matbaacılık; 2004. p. 75-82.
22. Hutson JC. Testicular macrophages. *Int Rev Cytol*. 1994;**149**:99-143.
23. Trainer T. Testes and Excretory Duct System. In: Sternberg S, editor. *Histology for Patologists*. 2 ed. Philadelphia-New York: Lippincott-Raven; 1995. p. 1019-39.

24. Keeney DS, Sprando RL, Robaire B, Zirkin BR, Ewing LL. Reversal of long-term LH deprivation on testosterone secretion and Leydig cell volume, number and proliferation in adult rats. *J Endocrinol*. 1990 Oct;**127**(1):47-58.
25. Belanger A, Candas B, Dupont A, Cusan L, Diamond P, Gomez JL, et al. Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroids in 40- to 80-year-old men. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994 Oct;**79**(4):1086-90.
26. Schlegel PN HM. Male Reproductive Physiology. In: Lipshultz LI HS, editor. *Sertoli Cell: Morphology, Function and Regulation*. 3 ed. St Louis: Mosby; 1997. p. 1448-52.
27. Braunstein G. Testes. In: Greenspan FS BJ, editor. *Basic and Clinical endocrinology: appleton and lange*; 1994. p. 403-33.
28. Hales DB. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *J Reprod Immunol*. 2002 Oct-Nov;**57**(1-2):3-18.
29. Chen H, Hardy MP, Huhtaniemi I, Zirkin BR. Age-related decreased Leydig cell testosterone production in the brown Norway rat. *J Androl*. 1994 Nov-Dec;**15**(6):551-7.
30. Seli E MN, Arici A. The reproductive system from an immunologic perspective. *Immunology and Allergy Clin North Am* 2002(22):15.
31. Fawcett D. *The Cell Biology of Gametogenesis in The Male* 1979.
32. Fawcett D. *A Textbook of Histology*. 12 ed. New York: Chapman&Hall; 1994.
33. Coşkun B, Çayan S. Sertoli Hücreleri: Morfoloji, Fonksiyon ve Düzenlenmesi. In: Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman MÖ, Usta MF, Kendirci M, editor. *Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi*., İstanbul: Acar Matbaacılık; 2004. p. 82-91.
34. Ross M, Kaye GI, Pawlina W. *Histology: A text and Atlas*. 4 ed. Philadelphia: Lippincott Williams-Wilkins; 2003.
35. Tripp BM LD. Sertoli Cell: Morphology, Function and Regulation. In: Lipshultz LI HS, editor. *Infertility in the Male*. 3 ed. St Louis: Mosby; 1997. p. 71-105.
36. Karmano M. Dye permeability and alkaline phosphatase activity of testicular capillaries in the postnatal rat. *Histochemie*. 1967(9):327-38.

37. Vitale R. The Development of the blood-testis barrier in Sertoly Cell Only rats. *Anat Rec.* 1975(501):181-2.
38. Aydos K. Erkek İnfertilitesi. In: Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N, editor. *Temel Uroloji.* 3 ed. Ankara: Güneş Tıp Kitapevi; 2007. p. 967-1011.
39. Amann RP, Howards SS. Daily spermatozoal production and epididymal spermatozoal reserves of the human male. *J Urol.* 1980 Aug;**124**(2):211-5.
40. Barratt C. Spermatogenesis. In: Grudzinskas JG YJ, editor. *Gametes-The Spermatozoon.* Cambridge Cambridge University Press; 1995. p. 250-67.
41. Gartner L, Hiatt JL. *Color Textbook of Histology.* Pennsylvania: W.B. Saunders Company; 1997.
42. Coşkun B, Çayan S. Spermatogenez. In: Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman MÖ, Usta MF, Kendirci M, editor. *Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi.* İstanbul: Acar Matbaacılık; 2004. p. 91-101.
43. Syed V, Hecht NB. Disruption of germ cell-Sertoli cell interactions leads to spermatogenic defects. *Mol Cell Endocrinol.* 2002 Jan 25;**186**(2):155-7.
44. Niederberger C, Lamb DJ. Spermatogenesis in the Adult. In: Lipshultz L, Howards SS editor. *Infertility in the male.* 3 ed. St Louis: Mosby; 1997. p. 106-22.
45. Martins MR, Silva JR. Ultrastructure of spermatogonia and primary spermatocytes of C57BL6J mice. *Anat Histol Embryol.* 2001 Jun;**30**(3):129-32.
46. Trainer T. Testis and excretory duct system. In: Sternberg S, editor. *Histology for Pathologists.* 2 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven 1997. p. 1022-4.
47. Parks JE, Lee DR, Huang S, Kaproth MT. Prospects for spermatogenesis in vitro. *Theriogenology.* 2003 Jan 1;**59**(1):73-86.
48. Moore K, Persaud TVN. *The Developing Human.* 6 ed. Pennsylvania: W.B Saunders Company; 1998.
49. Amann R. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *J Androl* 1981(2):21.
50. Rowley MJ, Teshima F, Heller CG. Duration of transit of spermatozoa through the human male ductular system. *Fertil Steril.* 1970 May;**21**(5):390-6.
51. Johnson L, Varner DD. Effect of daily spermatozoan production but not age on transit time of spermatozoa through the human epididymis. *Biol Reprod.* 1988 Nov;**39**(4):812-7.

52. Bedford JM. Maturation, Transport and Fate of Spermatozoa in The Epididymis. In: Greep R, Astman EB, editor. *Handbook of Physiology*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1975. p. 303-17.
53. Hamilton D. The Epididymis. In: Greep R, Koblinsky MA, editor. *Frontiers in Reproduction and Fertility Control*. Cambridge: MIT Press; 1977. p. 411.
54. Courot M. Transport and Maturation of Spermatozoa in The Epididymis of Mammals. In: Bollack C, Clavert A, editor. *Progress in Reproductive Biology*. Basel: Karger; 1981. p. 67.
55. Jaakkola UM, Talo A. Relation of electrical activity to luminal transport in the cauda epididymidis of the rat in vitro. *J Reprod Fertil*. 1982 Jan;**64**(1):121-6.
56. Bedford JM. The bearing of epididymal function in strategies for in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer. *Ann N Y Acad Sci*. 1988;**541**:284-91.
57. Hinrichsen MJ, Blaquier JA. Evidence supporting the existence of sperm maturation in the human epididymis. *J Reprod Fertil*. 1980 Nov;**60**(2):291-4.
58. Moore HD, Hartman TD, Pryor JP. Development of the oocyte-penetrating capacity of spermatozoa in the human epididymis. *Int J Androl*. 1983 Aug;**6**(4):310-8.
59. Schoysman RJ, Bedford JM. The role of the human epididymis in sperm maturation and sperm storage as reflected in the consequences of epididymovasostomy. *Fertil Steril*. 1986 Aug;**46**(2):293-9.
60. Silber SJ. Apparent fertility of human spermatozoa from the caput epididymidis. *J Androl*. 1989 Jul-Aug;**10**(4):263-9.
61. Jardin A, Izard V, Benoit G, Testart J, Belaisch-Allart J, Volante M, et al. [In vivo and in vitro fertilizing ability of immature human epididymal spermatozoa]. *Reprod Nutr Dev*. 1988;**28**(5):1375-85.
62. Bedford JM. Report of a workshop: Maturation of the fertilizing ability of mammalian spermatozoa in the male and female reproductive tract. *Biol Reprod*. 1974 Oct;**11**(3):346-62.
63. Orgebin-Crist MC. Studies on the function of the epididymis. *Biol Reprod*. 1969 Jun;**1**:Suppl 1:155-75.

64. Leinonen P, Hammond GL, Vihko R. Testosterone and some of its precursors and metabolites in the human epididymis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1980 Sep;**51**(3):423-8.
65. Turner TT, D'Addario DA, Howards SS. Effects of vasectomy on the blood-testis barrier of the hamster. *J Reprod Fertil.* 1979 Mar;**55**(2):323-8.
66. Brooks DE. Epididymal functions and their hormonal regulation. *Aust J Biol Sci.* 1983;**36**(3):205-21.
67. Rajalakshmi M, Arora R, Bose TK, Dinakar N, Gupta G, Thampan TN, et al. Physiology of the epididymis and induction of functional sterility in the male. *J Reprod Fertil Suppl.* 1976 Sep(24 suppl):71-94.
68. Foldes RG, Bedford JM. Biology of the scrotum. I. Temperature and androgen as determinants of the sperm storage capacity of the rat cauda epididymidis. *Biol Reprod.* 1982 May;**26**(4):673-82.
69. Wong PY, Au CL, Bedford JM. Biology of the scrotum. II. Suppression by abdominal temperature of transepithelial ion and water transport in the cauda epididymidis. *Biol Reprod.* 1982 May;**26**(4):683-9.
70. Billups KL, Tillman S, Chang TS. Ablation of the inferior mesenteric plexus in the rat: alteration of sperm storage in the epididymis and vas deferens. *J Urol.* 1990 Mar;**143**(3):625-9.
71. Flechon J, Hafez ESE. Scanning Electron Microscopy of Human Spermatozoa. In: Hafez E, editor. *Human Semen and Fertility Regulation in Men.* St Louis: CV Mosby; 1976. p. 76.
72. Chang M, Hunter RHF. Capacitation of Mammalian Sperm: Biological and Experimental Aspects. In: Greep R, Astman EB, editor. *Handbook of Physiology.* Baltimore: Williams & Wilkins; 1975. p. 339-51.
73. Yanagimachi R. Sperm-Egg Association in Mammals. In: Moscona A, Monroy A, editor. *Current Topics in Developmental Biology.* New York: Academic Press; 1978. p. 83-105.
74. Bedford JM, Calvin H, Cooper GW. The maturation of spermatozoa in the human epididymis. *J Reprod Fertil Suppl.* 1973 Jul;**18**:199-213.
75. Friend DS. Sperm maturation: membrane domain boundaries. *Ann N Y Acad Sci.* 1989;**567**:208-21.

76. Dietl JA, Rauth G. Molecular aspects of mammalian fertilization. *Hum Reprod.* 1989 Nov;**4**(8):869-75.
77. Saling PM. Mammalian sperm interaction with extracellular matrices of the egg. *Oxf Rev Reprod Biol.* 1989;**11**:339-88.
78. Spira A. Epidemiology of human reproduction. *Hum Reprod.* 1986 Feb;**1**(2):111-5.
79. Sigman M, Jarow JP. Male Infertility. In: Walsh P, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ, editor. *Campbell's Urology.* 8 ed. Philadelphia: Saunders; 2004. p. 1475-531.
80. Hull MG, Glazener CM, Kelly NJ, Conway DI, Foster PA, Hinton RA, et al. Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1985 Dec 14;**291**(6510):1693-7.
81. Greenhall E, Vessey M. The prevalence of subfertility: a review of the current confusion and a report of two new studies. *Fertil Steril.* 1990 Dec;**54**(6):978-83.
82. Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, et al. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Hum Reprod.* 1991 Jul;**6**(6):811-6.
83. Hauser R, Temple-Smith PD, Southwick GJ, de Kretser D. Fertility in cases of hypergonadotropic azoospermia. *Fertil Steril.* 1995 Mar;**63**(3):631-6.
84. Dohle G, T Diemer, A Giwercman, A Jungwirth, Z Kopa, C Krausz. Male Infertility. In: EAU Guidelines Office, editor. *European Association of Urology Guidelines.* Arnhem: Drukkerij Gelderland bv; 2010. p. 1-64.
85. Snick HK, Snick TS, Evers JL, Collins JA. The spontaneous pregnancy prognosis in untreated subfertile couples: the Walcheren primary care study. *Hum Reprod.* 1997 Jul;**12**(7):1582-8.
86. Rowe T. Fertility and a woman's age. *J Reprod Med.* 2006 Mar;**51**(3):157-63.
87. WHO. *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction.* 5 ed. Organization WH, editor. Cambridge: Cambridge University Press; 2010.

88. Crottaz B, Senn A, Reymond MJ, Rey F, Germond M, Gomez F. Follicle-stimulating hormone bioactivity in idiopathic normogonadotropic oligoasthenozoospermia: double-blind trial with gonadotropin-releasing hormone. *Fertil Steril*. 1992 May;**57**(5):1034-43.
89. Aparicio NJ, Schwarzstein L, Turner EA, Turner D, Mancini R, Schally AV. Treatment of idiopathic normogonadotropic oligoasthenospermia with synthetic luteinizing hormone-releasing hormone. *Fertil Steril*. 1976 May;**27**(5):549-55.
90. Schill WB. Treatment of idiopathic oligozoospermia by kallikrein: results of a double-blind study. *Arch Androl*. 1979 Mar;**2**(2):163-70.
91. Göğüş O. Ampirik Medikal tedavi. In: Özdiler E, Aydos K, editor. *Klinik Androloji*. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi; 2000. p. 597-612.
92. Acosta AA, Khalifa E, Oehninger S. Pure human follicle stimulating hormone has a role in the treatment of severe male infertility by assisted reproduction: Norfolk's total experience. *Hum Reprod*. 1992 Sep;**7**(8):1067-72.
93. Dubin L, Amelar RD. Varicocele as therapy in male infertility: a study of 504 cases. *J Urol*. 1975 May;**113**(5):640-1.
94. Bozkırlı I, Tunç L. Erkek İnfertilitesinde Ampirik Medikal Tedavi. In: Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman MÖ, Usta MF, Kendirci M, editor. *Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi*. İstanbul: Acar Matbaacılık; 2004. p. 400-12.
95. Jarow J. Nonsurgical Treatment of Male İnfertility: Empirical Therapy. In: Lipshultz L, Howards SS, editor. *İnfertility in The Male*. 2 ed. St Louis: Mosby-Year Book; 1991.
96. Charny CW, Gordon JA. Testosterone rebound therapy: a neglected modality. *Fertil Steril*. 1978 Jan;**29**(1):64-8.
97. Lamensdorf H, Compere D, Begley G. Testosterone rebound therapy in the treatment of male infertility. *Fertil Steril*. 1975 May;**26**(5):469-72.
98. Wang C, Dahl KD, Leung A, Chan SY, Hsueh AJ. Serum bioactive follicle-stimulating hormone in men with idiopathic azoospermia and oligospermia. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987 Oct;**65**(4):629-33.

99. Ronnberg L. The effect of clomiphene citrate on different sperm parameters and serum hormone levels in preselected infertile men: a controlled double-blind cross-over study. *Int J Androl*. 1980 Oct;**3**(5):479-86.
100. AinMelk Y, Belisle S, Carmel M, Jean-Pierre T. Tamoxifen citrate therapy in male infertility. *Fertil Steril*. 1987 Jul;**48**(1):113-7.
101. Bartsch G, Scheiber K. Tamoxifen treatment in oligozoospermia. *Eur Urol*. 1981;**7**(5):283-7.
102. Willis KJ, London DR, Bevis MA, Butt WR, Lynch SS, Holder G. Hormonal effects of tamoxifen in oligospermic men. *J Endocrinol*. 1977 Apr;**73**(1):171-8.
103. Krause W, Holland-Moritz H, Schramm P. Treatment of idiopathic oligozoospermia with tamoxifen--a randomized controlled study. *Int J Androl*. 1992 Feb;**15**(1):14-8.
104. Torok L. Treatment of oligozoospermia with tamoxifen (open and controlled studies). *Andrologia*. 1985 Sep-Oct;**17**(5):497-501.
105. Ovesen P, Jorgensen JO, Kjaer T, Ho KK, Orskov H, Christiansen JS. Impaired growth hormone secretion and increased growth hormone-binding protein levels in subfertile males. *Fertil Steril*. 1996 Jan;**65**(1):165-9.
106. Shimonovitz S, Zacut D, Ben Chetrit A, Ron M. Growth hormone status in patients with maturation arrest of spermatogenesis. *Hum Reprod*. 1993 Jun;**8**(6):919-21.
107. Terada H, Suziki K, Fujita K. Oral Clonidine improves the spermatogenesis of patients with maturation arrest. *J Urol*. 1998(159(supple) Abstract 772).
108. Bozkırlı I, Sınık Z, Isen K, Biri H. Erkek İnfertilitesinin Ampirik Tedavisinde Klomifen Sitrat ve L-Arginin Kombinasyonu. *Turkish Journal Of Fertility*. 1997;**2**:4.
109. Homonnai ZT, Shilon M, Paz G. Evaluation of semen quality following kallikrein treatment. *Gynecol Obstet Invest*. 1978;**9**(2-3):132-8.
110. Keck C, Behre HM, Jockenhovel F, Nieschlag E. Ineffectiveness of kallikrein in treatment of idiopathic male infertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Hum Reprod*. 1994 Feb;**9**(2):325-9.

111. Nassar A, Mahony M, Blackmore P, Morshedi M, Ozgur K, Oehninger S. Increase of intracellular calcium is not a cause of pentoxifylline-induced hyperactivated motility or acrosome reaction in human sperm. *Fertil Steril*. 1998 Apr;**69**(4):748-54.
112. Gulmez I, Tatlisen A, Karacagil M, Kesekci S. Seminal parameters of ejaculates collected successively with sixty minute interval in infertile men: effect of combination of prazosin and terbutaline on these parameters. *Andrologia*. 1991 Mar-Apr;**23**(2):167-9.
113. Yamamoto M, Hibi H, Miyake K. Comparison of the effectiveness of placebo and alpha-blocker therapy for the treatment of idiopathic oligozoospermia. *Fertil Steril*. 1995 Feb;**63**(2):396-400.
114. Gregoriou O, Vitoratos N, Papadias C, Gargaropoulos A, Konidaris S, Giannopoulos V, et al. Treatment of idiopathic oligozoospermia with an alpha-blocker: a placebo-controlled double-blind trial. *Int J Fertil Womens Med*. 1997 Sep-Oct;**42**(5):301-5.
115. Apa DD, Cayan S, Polat A, Akbay E. Mast cells and fibrosis on testicular biopsies in male infertility. *Arch Androl*. 2002 Sep-Oct;**48**(5):337-44.
116. Steirteghem A. Assisted Fertilization. In: Gardner D, editor. *In Vitro Fertilization A Practical Approach*. USA: Informa Healthcare; 2007. p. 161-82.
117. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*. 1992 Jul 4;**340**(8810):17-8.
118. Bonduelle M, Camus M, De Vos A, Staessen C, Tournaye H, Van Assche E, et al. Seven years of intracytoplasmic sperm injection and follow-up of 1987 subsequent children. *Hum Reprod*. 1999 Sep;**14 Suppl 1**:243-64.
119. Van de Velde H, Nagy ZP, Joris H, De Vos A, Van Steirteghem AC. Effects of different hyaluronidase concentrations and mechanical procedures for cumulus cell removal on the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1997 Oct;**12**(10):2246-50.
120. Pickering SJ, Johnson MH, Braude PR, Houlston E. Cytoskeletal organization in fresh, aged and spontaneously activated human oocytes. *Hum Reprod*. 1988 Nov;**3**(8):978-89.

121. Griveau JF, Le Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl.* 1997 Apr;**20**(2):61-9.
122. Ford WC, Whittington K, Williams AC. Reactive oxygen species in human sperm suspensions: production by leukocytes and the generation of NADPH to protect sperm against their effects. *Int J Androl.* 1997;**20 Suppl 3**:44-9.
123. Joris H, Nagy Z, Van de Velde H, De Vos A, Van Steirteghem A. Intracytoplasmic sperm injection: laboratory set-up and injection procedure. *Hum Reprod.* 1998 Apr;**13 Suppl 1**:76-86.
124. Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, Currie J. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil Steril.* 1990 Jul;**54**(1):102-8.
125. Fishel S, Lisi F, Rinaldi L, Green S, Hunter A, Dowell K, et al. Systematic examination of immobilizing spermatozoa before intracytoplasmic sperm injection in the human. *Hum Reprod.* 1995 Mar;**10**(3):497-500.
126. Palermo GD, Schlegel PN, Colombero LT, Zaninovic N, Moy F, Rosenwaks Z. Aggressive sperm immobilization prior to intracytoplasmic sperm injection with immature spermatozoa improves fertilization and pregnancy rates. *Hum Reprod.* 1996 May;**11**(5):1023-9.
127. Nagy ZP, Liu J, Joris H, Bocken G, Desmet B, Van Ranst H, et al. The influence of the site of sperm deposition and mode of oolemma breakage at intracytoplasmic sperm injection on fertilization and embryo development rates. *Hum Reprod.* 1995 Dec;**10**(12):3171-7.
128. Sultan KM, Munne S, Palermo GD, Alikani M, Cohen J. Chromosomal status of uni-pronuclear human zygotes following in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1995 Jan;**10**(1):132-6.
129. Olivennes F, Hazout A, Lelaidier C, Freitas S, Fanchin R, de Ziegler D, et al. Four indications for embryo transfer at the blastocyst stage. *Hum Reprod.* 1994 Dec;**9**(12):2367-73.
130. Scholtes MC, Zeilmaker GH. A prospective, randomized study of embryo transfer results after 3 or 5 days of embryo culture in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1996 Jun;**65**(6):1245-8.

131. Karaki RZ, Samarraie SS, Younis NA, Lahloub TM, Ibrahim MH. Blastocyst culture and transfer: a step toward improved in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril*. 2002 Jan;**77**(1):114-8.
132. Wennerholm UB, Bergh C. What is the most relevant standard of success in assisted reproduction? Singleton live births should also include preterm births. *Hum Reprod*. 2004 Sep;**19**(9):1943-5.
133. Jackson RA, Gibson KA, Wu YW, Croughan MS. Perinatal outcomes in singletons following in vitro fertilization: a meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 2004 Mar;**103**(3):551-63.
134. Helmerhorst FM, Perquin DA, Donker D, Keirse MJ. Perinatal outcome of singletons and twins after assisted conception: a systematic review of controlled studies. *BMJ*. 2004 Jan 31;**328**(7434):261.
135. Hansen M, Bower C, Milne E, de Klerk N, Kurinczuk JJ. Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects--a systematic review. *Hum Reprod*. 2005 Feb;**20**(2):328-38.
136. Rimm AA, Katayama AC, Diaz M, Katayama KP. A meta-analysis of controlled studies comparing major malformation rates in IVF and ICSI infants with naturally conceived children. *J Assist Reprod Genet*. 2004 Dec;**21**(12):437-43.
137. Lie RT, Lyngstadaas A, Orstavik KH, Bakketeig LS, Jacobsen G, Tanbo T. Birth defects in children conceived by ICSI compared with children conceived by other IVF-methods; a meta-analysis. *Int J Epidemiol*. 2005 Jun;**34**(3):696-701.
138. Bonduelle M, Wennerholm UB, Loft A, Tarlatzis BC, Peters C, Henriët S, et al. A multi-centre cohort study of the physical health of 5-year-old children conceived after intracytoplasmic sperm injection, in vitro fertilization and natural conception. *Hum Reprod*. 2005 Feb;**20**(2):413-9.
139. Bonduelle M, Van Assche E, Joris H, Keymolen K, Devroey P, Van Steirteghem A, et al. Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Hum Reprod*. 2002 Oct;**17**(10):2600-14.
140. Fauser BC, Devroey P, Macklon NS. Multiple birth resulting from ovarian stimulation for subfertility treatment. *Lancet*. 2005 May 21-27;**365**(9473):1807-16.

141. WHO. *WHO Laboratory Manual for The Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction* Cambridge University Press; 1999.
142. Palermo GD, Neri QV, Takeuchi T, Rosenwaks Z. ICSI: where we have been and where we are going. *Semin Reprod Med.* 2009 Mar;**27**(2):191-201.
143. Van Steirteghem A, Devroey P, Liebaers I. Intracytoplasmic sperm injection. *Mol Cell Endocrinol.* 2002 Jan 25;**186**(2):199-203.
144. Javed M, Esfandiari N, Casper RF. Failed fertilization after clinical intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Biomed Online.* 2010 Jan;**20**(1):56-67.
145. Nicopoullos JD, Gilling-Smith C, Ramsay JW. Male-factor infertility: do we really need urologists? A gynaecological view. *BJU Int.* 2004 Jun;**93**(9):1188-90.
146. Tournaye H. Evidence-based management of male subfertility. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2006 Jun;**18**(3):253-9.
147. Kurinczuk JJ, Bower C. Birth defects in infants conceived by intracytoplasmic sperm injection: an alternative interpretation. *BMJ.* 1997 Nov 15;**315**(7118):1260-5; discussion 5-6.
148. Bowen JR, Gibson FL, Leslie GI, Saunders DM. Medical and developmental outcome at 1 year for children conceived by intracytoplasmic sperm injection. *Lancet.* 1998 May 23;**351**(9115):1529-34.
149. Wen SW, Leader A, White RR, Leveille MC, Wilkie V, Zhou J, et al. A comprehensive assessment of outcomes in pregnancies conceived by in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010 Jun;**150**(2):160-5.
150. Hindryckx A, Peeraer K, Debrock S, Legius E, de Zegher F, Francois I, et al. Has the prevalence of congenital abnormalities after intracytoplasmic sperm injection increased? The Leuven data 1994-2000 and a review of the literature. *Gynecol Obstet Invest.* 2010;**70**(1):11-22.
151. Ludwig AK, Hansen A, Katalinic A, Sutcliffe AG, Diedrich K, Ludwig M, et al. Assessment of vision and hearing in children conceived spontaneously and by ICSI: a prospective controlled, single-blinded follow-up study. *Reprod Biomed Online.* 2010 Mar;**20**(3):391-7.

152. Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, Fahmy I, Kamal A, Tawab NA, et al. Fertilization and pregnancy rates after intracytoplasmic sperm injection using ejaculate semen and surgically retrieved sperm. *Fertil Steril.* 1997 Jul;**68**(1):108-11.
153. Obasaju M, Kadam A, Sultan K, Fateh M, Munne S. Sperm quality may adversely affect the chromosome constitution of embryos that result from intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1999 Dec;**72**(6):1113-5.
154. Cummins JM, Jequier AM. Concerns and recommendations for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) treatment. *Hum Reprod.* 1995 Oct;**10 Suppl 1**:138-43.
155. Thielemans BF, Spiessens C, D'Hooghe T, Vanderschueren D, Legius E. Genetic abnormalities and male infertility. A comprehensive review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1998 Dec;**81**(2):217-25.
156. Sathananthan AH. Functional competence of abnormal spermatozoa. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol.* 1994 Mar;**8**(1):141-56.
157. Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 1987 Nov;**81**(2):459-69.
158. Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril.* 1992 Feb;**57**(2):409-16.
159. Agarwal A, Saleh RA. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urol Clin North Am.* 2002 Nov;**29**(4):817-27.
160. Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS, Said TM. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed Online.* 2004 Jun;**8**(6):616-27.
161. Sikka SC, Rajasekaran M, Hellstrom WJ. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *J Androl.* 1995 Nov-Dec;**16**(6):464-8.
162. Alvarez JG, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility. *Biol Reprod.* 1982 Dec;**27**(5):1102-8.
163. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod.* 1989 Jul;**41**(1):183-97.

164. Rao B, Soufir JC, Martin M, David G. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. *Gamete Res.* 1989 Oct;**24**(2):127-34.
165. Suleiman SA, Ali ME, Zaki ZM, el-Malik EM, Nasr MA. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *J Androl.* 1996 Sep-Oct;**17**(5):530-7.
166. Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction.* 2001 Oct;**122**(4):497-506.
167. Aitken RJ, Baker MA. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. *Int J Androl.* 2002 Aug;**25**(4):191-4.
168. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology.* 1996 Dec;**48**(6):835-50.
169. Aitken RJ, Irvine DS, Wu FC. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am J Obstet Gynecol.* 1991 Feb;**164**(2):542-51.
170. Agarwal A, Sekhon LH. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. *Hum Fertil (Camb).* 2010 Dec;**13**(4):217-25.
171. Kovalski NN, de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species generated by human neutrophils inhibit sperm motility: protective effect of seminal plasma and scavengers. *Fertil Steril.* 1992 Oct;**58**(4):809-16.
172. Agarwal A, Ikemoto I, Loughlin KR. Relationship of sperm parameters with levels of reactive oxygen species in semen specimens. *J Urol.* 1994 Jul;**152**(1):107-10.
173. Aitken RJ, Buckingham DW, Brindle J, Gomez E, Baker HW, Irvine DS. Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma. *Hum Reprod.* 1995 Aug;**10**(8):2061-71.
174. Aitken RJ. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev.* 1995;**7**(4):659-68.
175. Yeung CH, De Geyter C, De Geyter M, Nieschlag E. Production of reactive oxygen species by and hydrogen peroxide scavenging activity of spermatozoa in an IVF program. *J Assist Reprod Genet.* 1996 Jul;**13**(6):495-500.

176. Proxeed plus. Clin Pharmacol. Available from <http://proceedcom/ingredientsasp>.
177. Jeulin C, Lewin LM. Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa. *Hum Reprod Update*. 1996 Mar-Apr;**2**(2):87-102.
178. Ng CM, Blackman MR, Wang C, Swerdloff RS. The role of carnitine in the male reproductive system. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Nov;**1033**:177-88.
179. Johansen L, Bohmer T. Carnitine-binding related suppressed oxygen uptake by spermatozoa. *Arch Androl*. 1978 Sep;**1**(4):321-4.
180. Radigue C, Es-Slami S, Soufir JC. Relationship of carnitine transport across the epididymis to blood carnitine and androgens in rats. *Arch Androl*. 1996 Jul-Aug;**37**(1):27-31.
181. Gattuccio F, De Rose A. *Varicocele*. Palermo: Cofese; 2000.
182. Vicari E, Calogero AE. Effects of treatment with carnitines in infertile patients with prostatitis-epididymitis. *Hum Reprod*. 2001 Nov;**16**(11):2338-42.
183. Lenzi A, Lombardo F, Sgro P, Salacone P, Caponecchia L, Dondero F, et al. Use of carnitine therapy in selected cases of male factor infertility: a double-blind crossover trial. *Fertil Steril*. 2003 Feb;**79**(2):292-300.
184. Arduini A. Carnitine and its acyl esters as secondary antioxidants? *Am Heart J*. 1992 Jun;**123**(6):1726-7.
185. Lenzi A, Sgro P, Salacone P, Paoli D, Gilio B, Lombardo F, et al. A placebo-controlled double-blind randomized trial of the use of combined l-carnitine and l-acetyl-carnitine treatment in men with asthenozoospermia. *Fertil Steril*. 2004 Jun;**81**(6):1578-84.
186. Cavallini G, Ferraretti AP, Gianaroli L, Biagiotti G, Vitali G. Cinnocicam and L-carnitine/acetyl-L-carnitine treatment for idiopathic and varicocele-associated oligoasthenospermia. *J Androl*. 2004 Sep-Oct;**25**(5):761-70; discussion 71-2.
187. Bornman MS, du Toit D, Otto B, Muller, II, Hurter P, du Plessis DJ. Seminal carnitine, epididymal function and spermatozoal motility. *S Afr Med J*. 1989 Jan 7;**75**(1):20-1.

188. Costa M, Canale D, Filicori M, D'Uddio S, Lenzi A. L-carnitine in idiopathic asthenozoospermia: a multicenter study. Italian Study Group on Carnitine and Male Infertility. *Andrologia*. 1994 May-Jun;**26**(3):155-9.
189. Moncada ML, Vicari E, Cimino C, Calogero AE, Mongioi A, D'Agata R. Effect of acetylcarnitine treatment in oligoasthenospermic patients. *Acta Eur Fertil*. 1992 Sep-Oct;**23**(5):221-4.
190. Menchini-Fabris GF, Canale D, Izzo PL, Olivieri L, Bartelloni M. Free L-carnitine in human semen: its variability in different andrologic pathologies. *Fertil Steril*. 1984 Aug;**42**(2):263-7.
191. Vitali G, Parente R, Melotti C. Carnitine supplementation in human idiopathic asthenospermia: clinical results. *Drugs Exp Clin Res*. 1995;**21**(4):157-9.
192. Bremer J. Carnitine--metabolism and functions. *Physiol Rev*. 1983 Oct;**63**(4):1420-80.
193. Jeulin C, Dacheux JL, Soufir JC. Uptake and release of free L-carnitine by boar epididymal spermatozoa in vitro and subsequent acetylation rate. *J Reprod Fertil*. 1994 Jan;**100**(1):263-71.
194. Lewin SFGaLM. Metabolic roles of carnitine expressed through the carnitine acetyltransferase system in *Candida pintolopesii*. *International Journal of Biochemistry*. 1993;**25**(6):947-53.
195. Fritz IB, Schultz SK, Sreere PA. Properties of partially purified carnitine acetyltransferase. *J Biol Chem*. 1963 Jul;**238**:2509-17.
196. Balercia G, Regoli F, Armeni T, Koverech A, Mantero F, Boscaro M. Placebo-controlled double-blind randomized trial on the use of L-carnitine, L-acetylcarnitine, or combined L-carnitine and L-acetylcarnitine in men with idiopathic asthenozoospermia. *Fertil Steril*. 2005 Sep;**84**(3):662-71.
197. Dawson EB, Harris WA, Rankin WE, Charpentier LA, McGanity WJ. Effect of ascorbic acid on male fertility. *Ann N Y Acad Sci*. 1987;**498**:312-23.
198. Jacob RA, Pianalto FS, Agee RE. Cellular ascorbate depletion in healthy men. *J Nutr*. 1992 May;**122**(5):1111-8.
199. Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob RA, Ames BN. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Dec 15;**88**(24):11003-6.

200. Thiele JJ, Friesleben HJ, Fuchs J, Ochsendorf FR. Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. *Hum Reprod.* 1995 Jan;**10**(1):110-5.
201. Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril.* 1997 Sep;**68**(3):519-24.
202. Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, et al. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science.* 1999 Aug 27;**285**(5432):1393-6.
203. Roveri A, Casasco A, Maiorino M, Dalan P, Calligaro A, Ursini F. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rat testis. Gonadotropin dependence and immunocytochemical identification. *J Biol Chem.* 1992 Mar 25;**267**(9):6142-6.
204. Surai PF, Blesbois E, Grasseau I, Chalah T, Brillard JP, Wishart GJ, et al. Fatty acid composition, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and total antioxidant activity of avian semen. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 1998 Jul;**120**(3):527-33.
205. Alvarez JG, Storey BT. Lipid peroxidation and the reactions of superoxide and hydrogen peroxide in mouse spermatozoa. *Biol Reprod.* 1984 May;**30**(4):833-41.
206. Wallace T, Cooper GW., Calvin HI., Effects of selenium deficiency on the shape and arrangement of rodent sperm mitochondria. *Gamete Res.* 1983;**7**(4):389-99.
207. Wallace T, Calvin E, Ploetz HI, Cooper G. W. Functional and Developmental Studies on The Role of Selenium in Spermatogenesis. In: Combs GFJ, Spallholz, J. E., Levander, O. A., Oldfield, J. E, editor. *Selenium in biology and medicine.* New York: AVI; 1987. p. 181-96.
208. Watanabe T, Endo A. Effects of selenium deficiency on sperm morphology and spermatocyte chromosomes in mice. *Mutat Res.* 1991 Feb;**262**(2):93-9.
209. Bleau G, Lemarbre J, Faucher G, Roberts KD, Chapdelaine A. Semen selenium and human fertility. *Fertil Steril.* 1984 Dec;**42**(6):890-4.

210. Behne D, Gessner H, Wolters G, Brotherton J. Selenium, rubidium and zinc in human semen and semen fractions. *Int J Androl.* 1988 Oct;**11**(5):415-23.
211. Scott R, MacPherson A, Yates RW, Hussain B, Dixon J. The effect of oral selenium supplementation on human sperm motility. *Br J Urol.* 1998 Jul;**82**(1):76-80.
212. Aggett PJ. Physiology and metabolism of essential trace elements: an outline. *Clin Endocrinol Metab.* 1985 Aug;**14**(3):513-43.
213. Chia SE, Ong CN, Chua LH, Ho LM, Tay SK. Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. *J Androl.* 2000 Jan-Feb;**21**(1):53-7.
214. Omu AE, Al-Azemi MK, Kehinde EO, Anim JT, Oriowo MA, Mathew TC. Indications of the mechanisms involved in improved sperm parameters by zinc therapy. *Med Princ Pract.* 2008;**17**(2):108-16.
215. Hartoma TR, Nahoul K, Netter A. Zinc, plasma androgens and male sterility. *Lancet.* 1977 Nov 26;**2**(8048):1125-6.
216. Omu AE, Al-Qattan F, Al-Abdul-Hadi FM, Fatinikun MT, Fernandes S. Seminal immune response in infertile men with leukocytospermia: effect on antioxidant activity. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1999 Oct;**86**(2):195-202.
217. Ross C, Morriss A, Khairy M, Khalaf Y, Braude P, Coomarasamy A, et al. A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility. *Reprod Biomed Online.* 2010 Jun;**20**(6):711-23.
218. Favier M, Faure P, Roussel AM, Coudray C, Blache D, Favier A. Zinc deficiency and dietary folate metabolism in pregnant rats. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis.* 1993 Mar;**7**(1):19-24.
219. Ghishan FK, Said HM, Wilson PC, Murrell JE, Greene HL. Intestinal transport of zinc and folic acid: a mutual inhibitory effect. *Am J Clin Nutr.* 1986 Feb;**43**(2):258-62.
220. Quinn PB, Cremin FM, O'Sullivan VR, Hewedi FM, Bond RJ. The influence of dietary folate supplementation on the incidence of teratogenesis in zinc-deficient rats. *Br J Nutr.* 1990 Jul;**64**(1):233-43.
221. Wong WY, Merkus HM, Thomas CM, Menkveld R, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RP. Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor

subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Fertil Steril*. 2002 Mar;**77**(3):491-8.

222. Lloyd DR, Carmichael PL, Phillips DH. Comparison of the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and single- and double-strand breaks in DNA mediated by fenton reactions. *Chem Res Toxicol*. 1998 May;**11**(5):420-7.

223. Turunen M, Olsson J, Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Jan 28;**1660**(1-2):171-99.

224. Lewin A, Lavon H. The effect of coenzyme Q10 on sperm motility and function. *Mol Aspects Med*. 1997;**18 Suppl**:S213-9.

225. Mancini A, Milardi D, Conte G, Festa R, De Marinis L, Littarru GP. Seminal antioxidants in humans: preoperative and postoperative evaluation of coenzyme Q10 in varicocele patients. *Horm Metab Res*. 2005 Jul;**37**(7):428-32.

226. Thomas SR, Neuzil J, Stocker R. Inhibition of LDL oxidation by ubiquinol-10. A protective mechanism for coenzyme Q in atherogenesis? *Mol Aspects Med*. 1997;**18 Suppl**:S85-103.

227. Balercia G, Buldreghini E, Vignini A, Tiano L, Paggi F, Amoroso S, et al. Coenzyme Q10 treatment in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: a placebo-controlled, double-blind randomized trial. *Fertil Steril*. 2009 May;**91**(5):1785-92.

228. Tremellen K, Miari G, Froiland D, Thompson J. A randomised control trial examining the effect of an antioxidant (Menevit) on pregnancy outcome during IVF-ICSI treatment. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2007 Jun;**47**(3):216-21.

229. Dukes M, Edwards PN, Large M, Smith IK, Boyle T. The preclinical pharmacology of "Arimidex" (anastrozole; ZD1033)--a potent, selective aromatase inhibitor. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1996 Jul;**58**(4):439-45.

230. McLachlan RI. The endocrine control of spermatogenesis. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2000 Sep;**14**(3):345-62.

231. O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev*. 2001 Jun;**22**(3):289-318.

232. Hayes FJ, Seminara SB, Decruz S, Boepple PA, Crowley WF, Jr. Aromatase inhibition in the human male reveals a hypothalamic site of estrogen feedback. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Sep;**85**(9):3027-35.

233. Coffey D, Rafjer, J. Philadelphia: W.B. Saunders; 1986.
234. Inkster S, Yue W, Brodie A. Human testicular aromatase: immunocytochemical and biochemical studies. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995 Jun;**80**(6):1941-7.
235. Brodie AM. Aromatase inhibition and its pharmacologic implications. *Biochem Pharmacol.* 1985 Sep 15;**34**(18):3213-9.
236. Anastrozole(Arimidex). Clin Pharmacol. Available from <http://cpgsmcom/>, Gold Standard Multimedia. 2000.
237. Cakan M, Aldemir M, Topcuoglu M, Altug U. Role of testosterone/estradiol ratio in predicting the efficacy of tamoxifen citrate treatment in idiopathic oligoasthenoteratozoospermic men. *Urol Int.* 2009;**83**(4):446-51.
238. Akiyama H. [A study on testicular aromatase activity--spermatogenic damage in high testicular E2 models of rat]. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi.* 1997 Jul;**88**(7):649-57.
239. Pavlovich CP, King P, Goldstein M, Schlegel PN. Evidence of a treatable endocrinopathy in infertile men. *J Urol.* 2001 Mar;**165**(3):837-41.