



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**AÇIKLANAMAYAN İNFERTİLİTE HASTALARININ IN VİTRO FERTİLİZASYON
BAŞARISINI ARTTIRMADA FERTİLE KULLANIMININ YARARI VAR MI?**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Selçuk YETKİNEL

Adana / 2016



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

**AÇIKLANAMAYAN İNFERTİLİTE HASTALARININ IN VİTRO FERTİLİZASYON
BAŞARISINI ARTTIRMADA FERTİLE KULLANIMININ YARARI VAR MI?**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Selçuk YETKİNEL

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Esra BULGAN KILIÇDAĞ

**Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu(Proje No: KA15/132) ve
T.C Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmış, Başkent
Üniversitesi Araştırma fonunca desteklenmiştir.**

Adana / 2016

TEŞEKKÜR

Kadın hastalıkları ve doğum uzmanlık eğitimimde her an tüm ilgi ve alakasıyla, engin bilgisiyle beni yetiştiren, sadece mesleki olarak değil, insani olarak da büyük hayranlık duyduğum, örnek aldığım hem tez danışmanım hem bölüm başkanım Sayın Prof. Dr. Esra BULGAN KILIÇDAĞ'a sonsuz teşekkür ederim.

Tüm tecrübelerini ve bilgilerini benimle paylaşan, eğitimimde büyük payı olan Prof. Dr. Hüsnü ÇELİK ve Prof. Dr. Ebru TARIM'a, eğitim sürem boyunca cerrahi becerime büyük katkısı olan Doç Dr. Bülent HAYDARDEDEOĞLU'na, emekleri için Doç. Dr. Tayfun ÇOK ve Doç. Dr. Erhan ŞİMŞEK'e çok teşekkür ederim.

Her ihtiyaç duyduğumda yanımda olan, desteklerini hiç esirgemeyen, tüm bildiklerini sabırla benimle paylaşan, ağabeyim Öğr. Gör. Dr. Hakan KALAYCI ve ablalarım Öğr. Gör. Dr. Pınar ÇAĞLAR AYTAÇ, Öğr. Gör. Dr. Gonca ÇOBAN ve tüm uzmanlarıma teşekkür ederim.

Yıllar boyu varlığını ve desteğini hep hissettiğim, yol arkadaşım, can dostum Uzm. Dr. Didem ALKAŞ'a, her günümü evimdeymişim gibi sıcak ve güvende hissettiren başta sorumlu hemşirem Vahide KÖKEN ve Ayten SAMSA olmak üzere tüm ekibimize teşekkür ederim.

Son olarak doğduğum günden bu güne, yetişmemde büyük emeği olan, her başarıyı adadığım sevgili babam Sedat YETKİNEL, annem Nesibe YETKİNEL ve kardeşim Necati YETKİNEL'e, yıllardır en zor zamanlarımızı kolayca beraber aştığımız, her kararında bana destek olan sevgili eşim Selin YETKİNEL'e, varlığıyla yaşamıma renk katan, bakış açımı ve hayat amacımı değiştiren oğlum Demir'e teşekkür ederim.

Dr. Selçuk YETKİNEL

Adana,2016

ÖZET

Açıklanamayan İnfertilite Hastalarının In Vitro Fertilizasyon Başarısını Arttırmada Fertile Kullanımının Yararı Var Mı?

Açıklanamayan infertilite hastalarında ICSI tedavileri için yeni nesil sperm seçme yöntemleri yalnızca morfolojisi daha iyi spermleri değil, aynı zamanda daha az DNA hasarı ve DNA fragmantasyon oranı, daha yüksek DNA bütünlüğüne sahip spermleri de seçmeye olanak tanımaktadır. Yeni nesil sperm seçme yöntemlerinden mikro akışkan sıvı bazlı bir sperm seçme yöntemi olan Fertile Chip® ile yapılan klinik çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle prospektif randomize planlanan çalışmamızda açıklanamayan infertilite hastalarında Fertile Chip kullanılarak yapılan ICSI sonrası fertilizasyon oranları, embriyo kalitesi ve gebelik oranlarını araştırmayı amaçladık.

Çalışmamızda power analiz sonucuna göre açıklanamayan infertilite nedeniyle ICSI tedavisi uygulanacak toplam 122 hasta randomize edilerek 61 hastanın sperm seçimleri konvansiyonel swim-up yöntemiyle, 61 hastanın sperm seçimi de fertile chip kullanılarak yapıldı. Siklusa başlanan tüm hastalara oosit toplama işlemi yapıldı. Çalışma sonucu yapılan analizlerde kontrol grubu ve çalışma grubunun demografik verileri, uygulanan tedavi protokolleri ve tedavi dozları arasında istatistiksel fark saptanmadı. Primer sonuç olan fertilizasyon oranları ve ICSI işlemi sonrası elde edilen embriyo sayıları arasında istatistiksel fark saptanmadı ($p=0,098$ ve $p=0,409$). Siklus başına klinik gebelik oranları incelendiğinde fertile chip grubunda %41, kontrol grubunda %41 olarak izlendi ($p=0,57$). Embriyo transferi başına klinik gebelik oranlarına bakıldığında ise fertile grubunda %46,3, kontrol grubunda %44,6 bulundu ($p=0,39$). Gebelik ve klinik gebelik oranları arasında da istatistiksel bir fark saptanmadı. Embriyo transferi sonrası geriye kalan embriyoların dondurulabildiği hastaların oranı Fertile grubunda %81,5, kontrol grubunda %64,3 saptandı ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,04$).

Çalışmamız sonucunda ICSI tedavisinde gebelik başarısında fertile chip kullanımının konvansiyonel yöntemlerle farkının olmadığını ancak transfer sonrası embriyo dondurma işlemine giden hasta oranının daha fazla olduğunu gösterdik. Bu durum açıklanamayan infertilitede olası diğer etkenlerin daha baskın olduğunu gösterebilir ya da fertile chip için açıklanamayan infertilite hastalarının uygun çalışma grubu olmayabileceği ile açıklanabilir.

Anahtar kelimeler: DNA bütünlüğü, DNA fragmantasyon indeksi, Fertile Chip, ICSI

ABSTRACT

Is The Use Of Fertile Chip Beneficial In Increasing In Vitro Fertilization Rate In Patients With Unexplained Infertility?

New generation sperm selection methods for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) procedure in patients with unexplained infertility not only allow the selection of sperms with an improved morphology, but also allow the selection of sperms with lower deoxyribonucleic acid (DNA) damage and DNA fragmentation rate. There is no clinical study on the Fertile Chip® sperm selection method, which is one of the new generation micro-fluid liquid-based sperm sorting method. In this study, we aimed to evaluate the fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates after ICSI using the Fertile Chip in patients with unexplained infertility.

A total of 122 patients according to the power analysis who would undergo ICSI therapy for unexplained infertility were randomized. Sixty-one patients were allocated to the conventional swim-up method (control group) and 61 patients were allocated to the Fertile Chip as the sperm sorting method (study group). Oocyte pick-up was performed in all the patients.

There was no statistically significant difference in the demographic data, treatment protocols and doses between the study and control groups. The fertilization rate was $57,42 \pm 21,90\%$ in the control group and $63,64 \pm 19,11\%$ in the study group ($p=0,098$). The mean number of embryos recovered after ICSI was $6,48 \pm 4,87$ in the control group and $7,49 \pm 4,31$ in the study group ($p=0,409$). The clinical pregnancy rate per cycle were both 41% in the study group and control group ($p=0.57$). The clinical pregnancy rate per embryo transfer was 46,3% in the study group and 44,6% in the control group ($p=0,39$). There was no statistically significant difference in the pregnancy and clinical pregnancy rates between the groups. The proportion of surplus embryos after transfer which has cryopreserved was 81,5% in Fertile group and was 64,3% in control group. There was statistically significant difference between two groups ($p=0,04$).

Our study results show that the use of fertile chip is not superior to conventional methods in increasing the success of ICSI on fertilization rate but we also showed cryopreserved embryos rate was higher in Fertile group. These results suggest that there may be other possible factors which play a role in unexplained infertility or patients with unexplained infertility may not be suitable for the Fertile Chip method.

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

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İnfertilite	3
2.1.1. Kadında İnfertilite Değerlendirmesi.....	4
2.1.1.1. Uterin Kavite Ve Tubal Patensin Değerlendirilmesi.....	5
2.1.1.2. Ovülasyonun Değerlendirilmesi.....	8
2.1.1.3. Over Rezervinin Değerlendirilmesi.....	10
2.1.2. Erkekde İnfertilite Değerlendirmesi.....	12
2.1.2.1. Semen Analizi	13
2.1.2.2. Özel Sperm Analiz Testleri	16
2.2. Açıklanamayan İnfertilite	18
2.3. Açıklanamayan İnfertilitede Tedavi Seçenekleri	20
2.3.1. Doğal Sikluslarda İntra Uterin İnseminasyon (IUI)	20
2.3.2. Klomifen Sitrat (CC)	20
2.3.3. Klomifen Sitrat ve IUI.....	20
2.3.4. Gonadotropinler + IUI.....	21
2.3.5. Klomifen Sitrat+IUI ve Letrozol+IUI	21
2.3.6. Gonadotropin+IUI ve Klomifen Sitrat+IUI	21
2.3.7. Gonadotropin+IUI ve Letrozol+ IUI.....	22
2.3.8. Gonadotropin + IUI ve IVF.....	23
2.3.9. IVF ve IVF-ICSI.....	23
2.3.10. FASTT Çalışması	23
2.4. IVF-ICSI Tedavisinde Sperm Seçimi ve Önemi	24

2.4.1. Konvansiyonel Sperm Seçme Teknikleri	26
2.4.2. İleri Düzey Sperm Seçme Teknikleri	28
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	36
3.1. Hasta Seçimi.....	36
3.2. Sperm Seçimi.....	38
3.3. Embriyo Takibi.....	38
3.4. İstatistiksel Analiz	38
4. BULGULAR	40
5. TARTIŞMA	46
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	51
7. KAYNAKLAR	52



KISALTMALAR

- IUI:** İntra Uterin İnseminasyon
IVF: İn Vitro Fertilizasyon
ICSI: İntrastoplazmik Sperm Enjeksiyonu
PIH: Pelvik İnflamatuvar Hastalık
Tv-USG: Transvajinal Ultrasonografi
NSAİİ: Non Steroid Anti İnflamatuvar İlaç
HSG: Histerosalpingografi
MR: Manyetik Rezonans
BVS: Bazal Vücut Sıcaklığı
DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü
LH: Lüteinize Hormon
AOR: Azalmış Over Rezervi
FSH: Folikül Stimüle Edici Hormon
AFS: Antral Folikül Sayısı
AMH: Anti Mülleryen Hormon
ESHRE: European Society Of Human Reproduction And Embryology
DNA: Deoksiribonükleik Asit
TUNEL: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Dntp Nick And Labeling
SCSA: Sperm Chromatin Structure Assay
IUI: İntra Uterin İnseminasyon
CC: Klomifen Sitrat
FASTT: The Fast Track And Standart Treatment
OH: Hidroksil Radikalleri Ve ()
O²⁻: Süperoksit Anyonları
H₂O₂: Hidrojen Peroksit
DGS: Dansite Gradyent Santrifüj
CSW: Konvansiyonel Swim-Up
DSW: Direk Swim-Up
MMP: Mitokondriyal Membran Potansiyelleri
MACS: Magnetic-Activated Cell Sorting System (Manyetik Aktive Sperm Seçimi)

PS: Fosfatidil Serin

HA: Hyaluronik Asit

MSOME: Motil Sperm Organellerinin Morfolojik Değerlendirilmesi

CCD: “Lensless Charge-Coupled” Cihaz

OHSS: Overlerin Hiperstimülasyon Sendromu

VKE: Vücut Kitle Endeksi

hCG: Human Chorionic Gonadotropin

TESE: Testiküler Sperm Ekstraksiyonu



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.Sperm Seçiminde Kadın Genital Traktusun Yeri

Şekil 2.Gradyent Yöntemi

Şekil 3.Swim Up Tekniği

Şekil 4.Zeta Potansiyeline Göre Sperm Seçimi

Şekil 5.MACS Yöntemi.

Şekil 6.Hyalüronik Asit Bağlanma Yöntemi.

Şekil 7.MSOME İle Sperm Seçimi.

Şekil 8.Çift Kırılma Yöntemi İle Sperm Seçimi

Şekil 9.Polarize Işık Altında ICSI Prosedürü.

Şekil 10.Mikro Kanallara Spermilerin Yüklenmesi

Şekil 11.Mikro Akışkan Yöntemlerle Sperm Seçimi.

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Hasta seçimi akış seması

Tablo 2. Demografik veriler

Tablo 3. Kontrollü Ovarian Hiperstimülasyon Siklus Karakteristikleri

Tablo 4. Intrastoplazmik Sperm Enjeksiyonu Sonrası Embriyoloji Verileri

Tablo 5. Gebelik Sonuçları

Tablo 6. Regresyon analizi



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Açıklanamayan infertilite tüm infertilite sebeplerinin %10-30'unu oluşturur. Tanı koymak için infertil çifte yapılan standart fertilitte araştırmaları testleri sonucunda bir patoloji saptanmaması gerekir ve bu nedenle de bir ekartasyon tanısıdır (1).

2016 yılında Gunn ve arkadaşları tarafından yayınlanan bir derlemede bir kez daha gösterildiği üzere, açıklanamayan infertilite hastalarına uygulanan ovülasyon indüksiyonu ve intra uterin inseminasyon (IUI) tedavilerin başarı şanslarının yaklaşık aynı bulunması, invitro fertilizasyon (IVF) yönteminin siklus başına daha yüksek başarı göstermesi (2), açıklanamayan infertiliteyi "açıklama" yolunda spermilerin fonksiyonları konusunda daha derin araştırmalar yapılmasına yol açmıştır. Bu, konvansiyonel erkek infertilite araştırmalarında spermilerin morfolojileri yerine özel sperm analiz testlerinin bulunmasına neden olmuştur. Günümüzde spermilerin DNA bütünlüğünü, DNA fragmentasyon oranlarını, reaktif oksijen radikalleri miktarını ölçen üst düzey semen analiz yöntemleri çalışılmaktadır (3). Bu ileri düzey semen analiz çalışmaları sonucunda infertil hastalarda morfolojisi normal olan ancak DNA bütünlüğü, DNA fragmentasyon oranı normal olmayan spermilerin gösterilmesi (3) sonucu IVF- intra stoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) tedavileri sırasında kullanılacak spermilerin fertilizasyondaki potansiyel önemlerini arttırmıştır.

Günümüzde ileri düzey sperm seçme yöntemleri ile daha sağlıklı ve daha normal spermeleri seçmek için yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Mikro-akıştan sıvı teknolojileri kullanılarak yapılan sperm seçme yöntemleri de klinik sonuçları henüz bilinmese de son zamanlarda üzerinde en çok çalışılan ileri düzey sperm seçme yöntemlerinden biridir. Yapılan çalışmalarda konvansiyonel yöntemlerde sıkça kullanılan santrifüj, pipetle karıştırma ve yıkama gibi reaktif oksijen radikalleri üretimine ve bunun bir sonucu olarak DNA bütünlüğünün bozulmasına ve DNA fragmentasyon oranının artmasına neden olduğu iddia edilmektedir. Mikro-akışkan sıvı teknolojilerinde ise kimyasal ve reaktif oksijen radikalleri oluşmasına neden olabilecek santrifüj basamakları yerine kadın genital organlarında doğal sperm seçim yollarını taklit ederek daha az oksijen radikali oluşumuna, DNA fragmentasyonları daha düşük, DNA bütünlükleri daha yüksek spermilerin seçilebildiği belirtilmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalarda diğer yöntemlere göre sperm canlılık oranı, sperm toplam hareketlilik oranı, sperm hız oranlarının daha yüksek olduğu gösterilmiştir (4, 5).

Mikro akışkan sıvı bazlı sperm seçim kiti olan 'Fertile Chip®' kullanımının DNA hasarı açısından daha iyi spermi seçtiğine dair çalışmalar olmakla birlikte bu seçilen spermle yapılan mikro enjeksiyonun klinik yansımaları ile ilgili çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda açıklanamayan infertilite hastalarında Fertile Chip kullanılarak yapılan ICSI sonrası fertilizasyon oranları, embriyo kalitesi ve gebelik oranlarını araştırmayı amaçladık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1.İNFERTİLİTE

İnfertilite 12 aydan uzun süredir düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebe kalınmaması durumudur (6). Fekundabilite bir siklusun gebelikle sonuçlanabilme ihtimalidir. Fekundite ise bir siklusun canlı doğumla sonlanabilme ihtimalidir. Doğurganlığı normal olan sağlıklı çiftlerde fekundite ortalaması %20'dir. Kümülatif olarak hesaplandığında bu sağlıklı genç çiftlerin %85-90'ı, çoğu ilk altı ay içinde olmak üzere 1 yıl içinde gebe kalmaktadır (7, 8). İnfertilite prevalansı genel popülasyonda %14'tür, yani yaklaşık her 7 çiftin biri infertildir (9-11).

Popülasyon tarama çalışmalarında göre infertilite nedenleri sınıflandırılacak olursa:

1. Erkek faktör (%26) (hipogonadizm, testiküler problemler, seminifer tübül disfonksiyonları)
2. Ovülatuar disfonksiyon %21
3. Tubal problemler %14
4. Endometriozis %6
5. Koital problemler %6
6. Servikal faktör %3
7. Açıklanamayan infertilite %28 olarak değerlendirilebilir (12).

İnfertilite nedenlerinin dağılımı demografik (merkezden merkeze, popülasyondan popülasyona) farklılıklar gösterse de geçtiğimiz 25-30 yılda infertilite nedenleri büyük değişiklikler göstermemiştir (13).

İnsanlarda üreme süreci karmaşıktır. İnfertilite nedenlerinde üreme sürecindeki her basamakta sorun olabilir. Temel öğelerine ayırmak gerekirse sağlıklı bir üreme için:

- Sperm, oositin ya ovüle olduğu ya da yakın zamanda ovüle olduğu/olacağı bir zamanda servikte ya da servikse yakın vajende bulunmalı, serviksten, endometriumdan ve tubalardan ilerleyerek oosite ulaşabilmeli ve onu dölleyebilmelidir (erkek faktör).
- Düzenli ve önceden tahmin edilebilir- takip edilebilir şekilde matür bir oosit ovüle edilmelidir (overyan faktör).

- Serviks gelen spermleri süzmeli ve servikal kanaldan spermler endometriuma ulaşabilmelidir (servikal faktör).
- Uterus, kavitesine ulaşan embriyo için reseptif olmalı, geliştireceği embriyo için uygun şekilde büyüme gelişmeyi sağlayabilmelidir (uterin faktör).
- Fallop tüpleri ovüle olan oositi yakalayabilmeli, spermle oositin dölllenmesine olanak sağlayabilmeli, siliyer hareketleriyle oluşan embriyoyu kaviteye etkin bir şekilde taşıyabilmelidir (tubal faktör).

Her infertilite değerlendirilmesi dikkatli bir öykü ve fizik muayene ile başlamalıdır. İyi bir öykü ve fizik muayene infertilite sebepleri arasından olası faktörleri araştırma üzerine eğilime yardımcı olacaktır.

2.1.1.KADINDA İNFERTİLİTE DEĞERLENDİRMESİ

Kadında tıbbi öykü ve fizik muayene şunları içermelidir (14) :

ÖYKÜ

- Gravida, parite, gebelik sonuçları ve ilişkili komplikasyonlar
- Menstrüel hikaye (menarş yaşı, siklus süresi, karakteristikleri, dismenore, kanama miktarı)
- Medikal, cerrahi ve jinekolojik hikaye (Cinsel yolla bulaşan hastalıklar, pelvik inflamatuvar hastalıklar, Pap smear sonuçları ve aldığı tedaviler, tiroid hastalıkları semptomları, galaktore, hirşutizm bulguları, pelvik ya da abdominal ağrıları, disparoni, geçirilen cerrahilerin sorgulanması)
- Seksüel hikaye (seksüel disfonksiyon sorgulanması, cinsel ilişki sıklığı, lubrikan kullanımı)
- Aile hikayesi (kalıtsal hastalıkların sorgulanması)
- Kişisel ve yaşam şekli hikayesi (yaş, meslek, egzersiz sıklığı, stres, diyet, sigara, alkol ve madde kullanımı, çevresel maruziyetlerin araştırılması)
- Kullanılan ilaçlar ve alerjiler
- İnfertilite süresi ve önceki tedavileri

FİZİK MUAYENE

- Hastanın kilosu ve vücut kitle indeksi

- Tiroid bezinde büyüme, nodülerite ya da gerginlik
- Meme muayenesi, sekresyonları ve karakteristikleri
- Androjenizm bulguları
- Pelvik ya da abdominal gerginlik, hassasiyet, organomegali ya da kitle
- Vajinal ya da servikal anormallikler, sekresyonlar ve akıntı
- Uterus büyüklüğü, şekli, pozisyonu ve mobilitesi
- Adneksiyal kitle ya da gerginlik
- Kul de sakta kitle, gerginlik ya da nodülerite

TARAMA TESTLERİ

Pap smear 21 yaş üzeri serviksi olan ve cinsel aktif tüm bireylere önerilmelidir. Kan grubu ve Rh antikör tayini, hepatit belirteçleri çalışılmalıdır. Diğer ek tarama testleri tıbbi öykü ve fizik muayene ışığında gerek görülürse yapılmalıdır.

2.1.1.1.UTERİN KAVİTE VE TUBAL PATENSİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Tubal patolojiler infertilite nedenlerinin yaklaşık % 14'ünü oluşturur (12). Pelvik inflamatuvar hastalık (PIH), septik düşük, rüptüre appendiks, endometriozis, geçirilmiş tubal cerrahi ve ektopik gebelik öyküsü en sık sebeplerini oluşturur. Laparoskopi ile PIH tanısı konulan hastalardaki çalışmalar, takip eden tubal faktör infertilitesinin pelvik enfeksiyonun sayısı ve şiddeti ile arttığını göstermiştir. Genel olarak infertilite oranı bir atak sonrası %10-12, iki atak sonrası %23-35, üç atak sonrası %54-75'e kadar yükselir (15).

Tubal faktör infertilitesindeki mekanizma sperm ve ovumun karşılaşmasını engelleyen anatomik anormalliklerdir. Tubal blokaajlar fallop tüplerinin proksimal, orta ya da distal kısmında olabilir. Proksimal tubal tıkanıklıklar spermin, fallop tüplerinde döllemenin gerçekleştiği ampulla kısmına ulaşmasına engellemektedir. Distal tubal tıkanıklıklar ise over dokusundan atılan ovumun yakalanmasını engeller.

Transvajinal Ultrasonografi ve Salin Sonohisterografi

Transvajinal ultsasonografi (Tv-USG) infertil kadınlarda uterin faktörlerin ve tubaların değerlendirilmesinde sıkça kullanılan bir yöntemdir. Salin sonohisterografi bir kataterle kavite içine salin verilirken eş zamanlı Tv-USG yapılmasını gerektirir. Oldukça sensitiftir ve küçük patolojileri bile gösterebilir (16) ancak endometrial işlev ve sensitivite ile ilgili yararlı bir bilgi vermekte yeterli değildir.

Histerosalpingografi

Tubal patensin değerlendirilmesinde en çok kullanılan, geçerli ve etkin bir başlangıç testidir. Laparoskopiyeye göre daha az invaziv oluşu, genel anestezi gerektirmeyişi ve laparoskopiden daha ucuz oluşu testin avantajlarıdır. Histerosalpingografi (HSG) uterin kavitenin boyutunu, şeklini, uterin gelişimsel anormalliklerin çoğunu (unikornu, bikornu, septat uterus, dismorfik uterus alt tipleri olan T şeklinde ve infantil tipte uterus, septat uterus, bikorporeal uterus, didelfis), submüköz myomları, kavite içi adezyonları ve tubal lümenin iç yapısını gösterir. Bu değerlendirmeler laparoskopi ile yapılamamaktadır. Testin dezavantajları ise radyasyona maruziyete neden olması ve nadir de olsa enfeksiyonla ilişkili komplikasyonlarıdır (17).

HSG çekimi için en uygun zaman, enfeksiyon ve intrauterin kanama veya pıhtıların görüntü kalitesini etkilemesini en aza indirecek, olası bir gebelikte çekim yapmayı engelleyecek olan adet sonrası 2-5. gündür. Herhangi bir ön hazırlık gerektirmez. Ancak işlemden 30-60 dakika öncesi alınacak bir nonsteroidal antiinflatuar ilaç (NSAİİ), işleme bağlı oluşabilecek rahatsızlık hissini azaltmaya yardımcı olabilir. Enfeksiyonla ilgili komplikasyonlar, yüksek riskli popülasyonlarda bile oldukça nadirdir (%1-3) (17-19). Akut PIH atağı sonrası HSG çekimini birkaç hafta ertelemek, olası bir enfeksiyon riskini en aza indirebilir.

HSG çekiminde kullanılan kontrast maddenin suda ya da yağda çözünür olması tartışmalı bir konudur. Bazı araştırmacılar tarafından yağda çözünen maddelerin, tüplerin iç yapısını göstermede fazla koyu kıvam nedeniyle yetersiz olduğu, pelviste dağılımının yetersiz olduğu, granülatöz reaksiyon, damar içine geçiş ve emboli riskleri olduğu, bu nedenle suda çözünen maddelerin kullanılması gerektiği düşünülmektedir (20-22). Karşıt görüşlü araştırmacılar ise granülatöz reaksiyonların, damar içine geçiş ve embolinin oldukça nadir olduğunu savunmakta ve yağda çözünen maddelerle yapılan HSG sonrası takip eden aylar içerisinde doğurganlığın arttığını gösteren çalışmalara atıfta bulunmaktadırlar (23, 24).

Uterin anomaliler 2013 yılında ESHRE/ESGE (*European Society of Human Reproduction and Embryology/ European Society for Gynaecological Endoscopy*) konsensusunda yeniden revize edilmiş ve sınıflandırılmıştır (25). Normal uterin kavite pürüzsüz, simetrik ve ters üçgen şekillidir. Fundusta en geniştir. Dismorfik uteruslar T şeklinde görülür ve istmustan fundusa kadar dar bir kaviteyle karakterizedir. Septat

uteruslar parsiyel olarak fundustan kaviteye basık şekilde de izlenebilir, servikse hatta vajinaya kadar devam eden komplet septumları da oluşturabilir. Y şeklinde izlenirler. Bikornu uterusların tanısı tek başına HSG ile büyük oranda şüphe duyulsa bile kesin karar verilemez. 2D-3D ultrasonografi, MR ya da laparoskopi gereklidir. Myomlar ve polipler büyüklüklerine göre eğri ve genelde düzgün yüzeyle dolma defektleri oluşturur. Adhezyonlar ise genelde kenarları düzensiz dolma defektleri oluşturur.

İnfertil popülasyonda tubal patens değerlendirmesinde HSG duyarlılığı laparoskopiyle kıyaslandığında orta derecededir. Vakaların %84'ünde HSG'nin en az 1 patolojiyi atladığı gösterilmiştir (26). Ayrıca HSG'nin normal bulgular saptadığı hastaların %21-68'inde laparoskopiyle anormal bulgular saptanmıştır (27-29). HSG'nin tüpler açık olduğunda, bunu saptama yeteneği %65, tüpler kapalı olduğunda ise bunun doğru olma ihtimali %83'tür. Yani HSG de bilateral tüpler tıkalı saptansa bile gerçekte açık olma ihtimali yüksektir. Ama HSG'de tüpler açık saptandıysa, bu tüplerin gerçekte tıkalı olma ihtimali düşüktür (30, 31).

Histeroskopi

Histeroskopi infertiliteye yol açabilecek intrauterin patolojilerin tanı ve tedavisinde kullanılan altın standart bir yöntemdir. 3-4 mm çapındaki histeroskoplara poliklinik şartlarında bile uygulamaya olanak sağlayabilmektedir. Büyük patolojiler içinse daha fazla işlevsel özellikler gereken operatif histeroskoplara kullanılmaktadır.

Laparoskopi

Laparoskopi tubal patensinin değerlendirilmesinde mevcut en güvenilir tanı testidir. Genel anestezi gerektirmesi, pahalı olması ve invaziv bir işlem olması negatif taraflarıdır. Laparoskopi ile inceleme sırasında sistematik olarak uterus, ön arka cul de sac boşlukları, bilateral tubalar, overler ve fossa ovarikalar incelenmelidir. Tubal patensler, servikse konulan uygun bir kanül ya da intrauterin manipülatör ile metilen mavisi ya da indigo karmin boyası yavaşça verilerek değerlendirilir. Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz eksikliği olanlarda metilen mavisinin yol açabileceği akut methemoglobinemiden kaçınmak için indigo karmin boyası tercih edilmelidir (32). Pelvik anatomiye hakimiyeti sağlaması, endometriozisi saptamayabilmesi, hem tanı hem de tedavi aracı olarak kullanılabilmesi belirgin üstünlükleridir.

2.1.1.2.OVÜLASYONUN DEĞERLENDİRİLMESİ

Ovülasyon normalde her ay overden matür bir oositin salınmasıyla oluşur. Ovülasyon bozuklukları infertil çiftlerin %21-25'ini etkiler (12). Dünya Sağlık örgütü ovülasyon bozukluklarını 3 grupta inceler:

Grup 1: Hipotalamo-hipofizer yetmezlik (%10). Düşük gonadotropin seviyeleri ile ilişkilidir. Endojen östrojen düşüktür. Endometrial proliferasyon oluşamaz. Bu nedenle progesteron çekilme testine kanama yanıtı oluşturamaz. Vücut kitle endeksi 20'nin altında olan kaşektik kadınlarda ve yoğun egzersiz yapan kadınlarda görülebilir.

Grup 2: Hipotalamik-hipofizer-ovaryan aks disfonksiyonu: Polikistik over sendromu ve hiperprolaktinematik amenore bu gruptadır. Ovülasyon bozukluklarının %85'ini oluşturur. Gonadotropin düzeyleri normaldir. Endojen östrojen üretilebilir ve progesteron çekilme testine kanama yanıtını verebilir.

Grup 3: Ovaryan yetmezlik (%5). Yüksek gonadotropin düzeyleri ile ilişkilidir. Reprodüktif çağda genelde ovaryan zedelenmeye yol açacak kemoterapi, radyasyon ya da cerrahiye bağlı oluşmaktadır. İdiyopatik olarak da görülebilir. Düşük follikül rezervli bu kadınlar follikül stimüle edici hormon stimülasyonuna cevap veremezler.

Ovülasyonun değerlendirilmesinde kesin bir tanı kriteri bulunmamaktadır. Hiçbir test de en iyi test değildir. Ovülasyonun tek kesin kriteri gebeliktir.

Menstrüel öykü

Menstrüel öykü tek başına ovülatuar disfonksiyon tanısı koymak için yeterlidir. Normal ovülasyonu olan bir kadının menstrüasyonu regüler ve tutarlıdır. Hacmi ve süreleri benzerdir. Düzenli adetleri olan bir kadının çoğunlukla siklusları ovülatuardır. Düzensiz ve seyrek adet gören kadınların yumurtlamaları da düzenli değildir.

Bazal vücut sıcaklığı

Bazal vücut sıcaklığı(BVS) vücudun dinlenme halindeki sıcaklığıdır. Sabah uandıktan sonra kalkmadan ölçülmelidir. Ovülasyonu saptamada progesteronun termojenik etkisi ile kullanılır. Progesteron arttıkça bazal vücut sıcaklığı da artar. Günlük ölçümlerin kayıt tutulmasıyla kolayca saptanabilir. Luteal faz sırasında bazal vücut sıcaklığı 0,4-0,8 °C artar. Adet başlangıcı ile yeniden düşer. Isı artışından yaklaşık 12 gün sonra adet başlar (33). BVS ile izlenen sikluslarda doğurganlığın en yüksek olduğu aralık

BVS'nin siklus ortasındaki artışından hemen önceki 7 gündür ve bu aralıkta gün aşırı cinsel birliktelik önerilir.

Serum progesteron konsantrasyonu

Uygun zamanda yapılan serum progesteron ölçümü ovülatuar fonksiyon değerlendirmesinin basit ve objektif bir testidir. Regüler olmayan sikluslarda haftalık ölçümler gerektirse de yine de mid-luteal progesteron ölçümü en uygun maliyetli testtir. Normalde progesteron düzeyi folliküler fazda 1ng/mL altında seyretmekte, LH pikiyle birlikte giderek artmakta ve ovülasyon sonrası 7-8. günde en yüksek değerine ulaşmaktadır. Uygun zamanda alınan örnekte progesteron düzeyinin 3 ng/mL altında olması anovülasyonu gösterir (34). Yüksek düzeyde progesteron salınımı ise korpus luteumdan yeterli derecede progesteronun salındığını ve geriye dönük olarak ovülasyonun olduğunu gösterir. Serum progesteron düzeyi ölçümü için ideal gün beklenen adet tarihinden 7 gün öncesidir. Yani siklusu 28 gün olan bir kadın için ideal test günü 21. günken, siklusu 35 gün olan bir kadın içinse ideal test günü siklusun 28. günüdür. Siklus günü belli olmayan kadınlarda progesteron seviyesi haftalık tekrarlanmalıdır (35).

Ovülasyonu gösteren en düşük progesteron değeri konusunda bir görüş birliği sağlanamamıştır. Çeşitli çalışmalarda Ovülasyonu predikte eden progesteron düzeyleri 5ng/mL'den 10 ng/mL'ye kadar değişmektedir (36, 37). DSÖ' ye göre 5,6 ng/mL ovülasyon göstergesidir. Günlük pratikte sıkça kullanılan değer ise 10 ng/mL' dir (38). Bu referans değerlerin üstünde çıkan progesteron düzeyleri lüteinizasyon göstergesidir, ovülasyon olmaksızın yükseklikleri lüteinize rüptüre olmamış follikül sendromunu gösterebilir.

Üriner Lüteinize Hormon atılımı

Ovülasyon öngörme kitleri ya da lüteinize hormon (LH) kitleri olarak da bilinir. LH piki yaklaşık 48 saat sürer ve ardından hızla idrarla atılır. Bu kitlerle LH piki sonrası idrarda saptanan eşik değeri aşan LH düzeyi testi pozitifleştirir. Siklusun toplam uzunluğu göz önünde bulundurularak tahmini LH piki gününden 2-3 gün önce başlanarak günlük olarak test uygulanır. Test için en uygun saat genellikle LH piki sabaha karşı olduğundan ve ilk birkaç saat idrarda atılımı yeterli düzeyde olmayacağından saat 16.00-22.00 arasındır. İlk pozitif test sonrası testi tekrar etmek gerekmez (35).

Ovülasyon genellikle LH pikinden sonraki 48 saat içinde olur (39). Bu nedenle doğurganlığın en yüksek olduğu zaman LH piki ve sonrası 2 gündür. İlk pozitif test sonrası gün, zamanlanmış ilişki ya da intra uterin inseminasyon için en iyi gündür.

Transvajinal Ultrasonografi

Seri transvajinal ultrasonografi (Tv-USG) ölçümleri folliküllerin boyutu ve sayısı ile ilgili ayrıntılı bir bilginin ve ovülasyon zamanının tahminini sağlar. Ovülasyon öncesi follikül ortalama günde 2 mm büyür ve ovülasyon sonrası rüptüre olur. Kenarları daha düzensiz bir hal alır, ekojenitesi artar ve douglas boşluğunda hafif miktarda serbest sıvı izlenir (40).

Tüm bu testlere rağmen, ovülasyonun olduğu saptanabilir ancak ovüle olan oositin kalitesi hakkında bilgi sahibi olunamaz.

2.1.1.3. OVER REZERVİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Over rezervi, gebe kalma ihtimalini öngören, overlerdeki geriye kalan oosit havuzunu tanımlar. Tüm tarama testlerinin korumaya yönelik bir hastalığı olduğu gibi over rezerv testleri de azalmış over rezervini (AOR) saptamaya yönelik testlerden oluşur. İdeal over rezerv testi asıl over rezervini oluşturan primordial folikül havuzunu öngörmelidir. Ancak primordial folliküllerin sayısını ve kalitesini belirlemek oldukça güçtür. Folliküler gelişim uzun bir süreçtir, primordial follikülden antral folliküle gelişim 6-8 ay sürer (41).

Hipotalamo-hipofizer aks fonksiyonları hakkında bilgi veren fakat ovaryan rezerv açısından tarihsel değeri olan follikül stimüle edici hormon (FSH), lüteinize hormon (LH) ve östrojen değerleri ilk basamak tarama testleridir. Yaş ise doğumdan menapozu kadar hızla azalan ovaryan rezervin en önemli göstergesidir. Transvajinal ultrasonografi eşliğinde antral folikül sayısı (AFS) ve anti mülleryen hormon ölçümü son zamanlarda kullanılan over rezervini ön gören yeni ve en güvenilir tarama testlerindedir.

2011 yılında ESHRE (*European Society of Human Reproduction and Embryology*) düşük over rezervi tanımını için bir konsensus oluşturmuş ve Bologna kriterlerini sunmuştur. Bologna kriterlerine göre aşağıdaki 3 tanımlamadan 2 tanesinin olması düşük over rezervi ve buna bağlı IVF tedavisinde zayıf yanıt olarak tanımlanır (42).

1. İleri yaş (<40) ya da azalmış over rezervi için bir risk faktörü sahibi olmak

2. Daha önce düşük over rezervi öyküsü olması (konvansiyonel bir stimülasyon programıyla 3 ya da daha az oosit elde edilmesi)
3. Anormal ovaryan rezerv testi (AFS<5-7 follikül veya anti mülleryen hormon (AMH) <0,5-1,1 ng/ml)

Bazal Follikül Stimüle Edici Hormon ve Östradiol Düzeyleri

Yüksek FSH kadınlarda ovarian yaşlanmayla ilgili en erken göstergelerdendir. Düzeyleri siklus boyunca değişkenlik gösterdiğinden düzey takibi için en uygun zaman siklusun 2-4. günleridir. 3.gün FSH düzeyi arttıkça maksimum östradiol düzeyi, indüksiyonla elde edilebilecek oosit sayısı, gebelik ya da canlı doğum oranları düşmektedir (43-45). Güncel testlerde 10 IU/L'den daha yüksek değerler ovaryan stimülasyona kötü yanıt vermede %80-100 oranında yüksek öngörüye sahiptir (46).

Bazal serum östradiol seviyesi tek başına over rezervi ön görüşünde düşük değere sahiptir. Ancak Bazal FSH yorumlanmasına katkıda bulunur.

İnhibin B

İnhibin B foliküler fazda, küçük antral foliküllerin granüloza hücrelerinden salınır. Her bir siklusta ve her siklusun kendi içinde büyük değişkenlikler gösterir. Bu nedenle over rezervini ön görmede güvenilir bir belirteç olarak kabul edilmemektedir. (47, 48).

Over Hacmi

Genelleme yapılırsa overdeki folikül havuzu azaldıkça over hacmi düşer (49). Ancak bu parametrenin ölçülebilirliği siklus arası, ölçüm yapan kişi faktörü, endometrioma ve polikistik over gibi ovaryan patolojiler nedeniyle yüksek değişkenlik göstermesi nedeniyle genellebilirliğini kısıtlamaktadır. Over hacmi genel olarak toplanan oosit sayısı ile koreledir, ancak gebelik oranlarıyla korelasyonu yoktur (49-51).

Anti Mülleryen Hormon

Anti mülleryen hormon (AMH) preantral ve küçük antral foliküllerin granüloza hücrelerinden salınır (52). Küçük antral folikül sayısı over rezervi ile ilişkilidir ve menopoza kadar saptanamaz hale gelir (53).

AMH preantral ve antral foliküllerden köken aldığından seviyesi FSH ve LH seviyelerinden bağımsızdır. Siklus fazından etkilenmez, sikluslar arasında az miktarda

değişkenlik gösterir (54). Düşük seviyelerde bulunması, ovaryan stimülasyona kötü yanıt, az sayıda oosit elde edilmesi ve düşük gebelik oranlarıyla ilişkili bulunmuştur(48).

2011 yılında ESHRE tarafından hazırlanan azalmış over rezervini tanımlayan Bologna kriterlerinde AMH sınır değeri 0,5-1,1 ng/ml olarak kabul edilmiştir (42).

Antral Folikül Sayısı

Üreme çağındaki bir kadında herhangi bir zamanda büyümeye ve olgunlaşmaya devam etmekte olan ortalama 20-150 adet follikül bulunmaktadır. Tv-USG ile ancak 2 mm üzeri olanlar görülebilir. Bu 2 mm üstündeki folliküller FSH duyarlı bir evreye ulaşmışlardır (55). Yapılan histolojik çalışmalarda overlerdeki antral folliküllerle geriye kalan primordiyal folliküller arasında orantı olduğu gösterilmiştir (56). Bu nedenle antral follikül sayısı over rezervinin dolaylı yoldan değerlendirilmesini sağlar. Tv-USG’de 2-10 mm arası ölçülen antral folliküllerin toplam sayısı hesaplanarak belirlenir.

Tv-USG’ görülen antral folliküllerin büyük kısmı FSH uyarısı alamayacağından atreziye gidecektir. Antral follikül sayısı ovaryan stimülasyona cevap verecek oositlerin sayısı ile de koreledir. Bu durum IVF tedavisinde ekzojen gonadotropinlerle atreziye gidecek olan folliküllerin de kurtarılabildiğini düşündürmektedir (57).

Azalmış over rezervi için yüksek riskli gruplarda IVF tedavisi öncesi değerlendirmelerde antral follikül sayısının eşik değeri için birçok çalışma yapılmıştır. Eşik değer 3-4 follikül alındığında, elde edilecek oosit sayısı ve gebelik elde etmede kritik değer olduğu görülmüştür (49, 57-61).

2011 yılında ESHRE tarafından hazırlanan azalmış over rezervini tanımlayan Bologna kriterlerinde antral follikül sayısı sınır değeri 5-7 follikül altı olarak kabul edilmiştir (42).

2.1.2. ERKEKTE İNFERTİLİTE DEĞERLENDİRMESİ

Erkek infertilitesi 4 ana grupta incelenebilir:

1. Hipotalamik-hipofizer bozukluklar (sekonder hipogonadizm) %1-2
2. Primer hipogonadizm %30-40
3. Sperm transport bozuklukları %10-20
4. İdiyopatik %40-50

Erkekte tıbbi öykü ve fizik muayene şunları içermelidir (62):

ÖYKÜ

- Cinsel ilişki sıklığı ve zamanlaması
- Önceki fertilitate öyküsü, infertilitate süresi
- Çocukluk çağı hastalıkları ve gelişimsel hikayesi
- Geçirilmiş cerrahiler ve endikasyonları
- Sistemik hastalıklarının sorgulanması
- İlaç kullanımı ve alerjiler
- Seksüel hikaye ve cinsel yolla bulaşan hastalıkların sorgulanması
- Gonodal toksinlere maruziyetin sorgulanması
- Meslek, sigara, alkol ve madde kullanımı

FİZİK MUAYENE

- Penis muayenesi ve üretral açıklık yeri
- Testis palpasyonu ve testiküler hacim
- Vasa ve epididimisin varlığı ve sertliği
- Varikosel varlığı
- Vücut duruşu, tüylerin dağılımı, meme gelişimi gibi sekonder seks karakterlerinin tayini
- Rektum muayenesi

İnfertilitate değerlendirmesi jinekolog tarafından yapılıyorsa erkek fizik muayenesi infertil çift değerlendirmesinde anormal bir hikaye varlığı ya da semen analizinde bir problem saptanmazsa ertelenebilir. Ancak anormal semen analizi ya da hikayede anormallik fizik muayene için endikasyon oluşturur ve ürolog tarafından muayene edilmelidir.

2.1.2.1. SEMEN ANALİZİ

Semen analizi erkek infertilitate değerlendirilmesinde laboratuvar testlerinin en önemli ve en değerlisidir. Erkek faktörünün infertilitatedeki ciddiyetini gösterir. Semen toplama talimatları hastalara detaylı olarak anlatılmalıdır. Cinsel perhiz süresi 2-5 gün olmalıdır. Kısa perhiz süreleri semen volüm ve yoğunluğunda azalmaya neden olur ancak sperm motilite ve morfolojileri değişmez (63). Daha uzun perhiz sürelerinde ise semen volümünde ve yoğunluğunda artmayla birlikte ölmüş, hareketsiz ve morfolojisi bozuk olan spermelerde artış olur (64). Ancak ciddi oligospermilerde kısa cinsel perhizlerle daha

iyi sperm konsantrasyonları sağlanabilmektedir. Semen örneği mastürbasyonla temiz bir kutuya alınabilir ya da koitus sırasında spermlere toksik maddeler içermeyen özel semen toplama kondomları kullanılabilir. Semen toplama ideal olarak laboratuvarında olmalıdır ancak evde toplanacaksa laboratuvara 1 saat içinde ve vücut sıcaklığında saklanarak getirilmelidir. Örnek toplama metodundan bağımsız olarak semen elde edildikten sonra 1 saat içinde analiz edilmelidir.

Normal Referans Değerleri

Normal referans değerleri fertilizasyon için gereken minimum değerleri göstermez. Semen analizi normal değerlerde olmayan birçok fertil erkek mevcutken, semen analizi normal olan birçok erkek infertil hasta da mevcuttur (65-67).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO-DSÖ), 12 ay içinde gebelik oluşturan, 8 ülkeden toplam 1900 fertil erkeğin sperm analizlerini referans alarak, %5'lik dilimdeki analiz sonuçlarını sperm analizinde alt referans değerler olarak tanımlamıştır (68).

Bu minimal kriterler:

- Volüm 1,5 mL
- Sperm konsantrasyonu 15 milyon spermatozoa/mL
- Total sperm sayısı 39 milyon spermatozoa/ejekülat
- Morfoloji "strict" kriterlerine göre % 4 normal formda
- Vitalite %58
- Progresif motilite %32
- Total (progresif+nonprogresif) motilite %40'tır.

Semen volümü: WHO çalışmasına göre ortalama semen volümü 3,7 mL'dir. Azospermi ya da ciddi oligozoospermi ile birlikte olan düşük semen volümlerinde genital traktusların obstrüksiyonları düşünülmelidir. Bu obstrüksiyonlar vas deferens ya da seminal veziküllerin konjenital yokluğu veya seminal vezikül ya da ejakülator duktusun obstrüksiyonu olabilir. Semen hacminin çoğunu seminal veziküller oluşturur. Seminal veziküller ve vas deferens aynı embriyojenik orijinden gelişir. Seminal veziküller früktoz içerir ve alkali vasıftadır. Obstrüksiyonunda semen pH değeri düşer, früktoz ve sperm içermez. Ejekülatör kanal tıkanıklıkları transrektal ultrasonografide dilate seminal veziküllerin gösterilmesi ile tanı alabilir.

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

Sperm konsantrasyonu ve total sperm sayısı: Sperm konsantrasyonu alt limit referans değeri 15 milyon/mL'dir. Daha alt değerlere sahip erkekler fertil olabilirken in vitro fertilizasyon için 10 milyon spermatozoa/mL yeterli olarak değerlendirilmektedir (69).

Azospermi mikroskopik incelemede hiç sperm bulunmamasıdır. Tüm erkeklerin %1'inde bulunur (70). İnfertil erkeklerin %10-15'inde bulunur (71). Tanı için semen yüksek derecede santrifüj edilir ve pellet yüksek büyütmede incelenir. Sperm yokluğu en az iki incelemede gösterilmelidir.

Oligospermi sperm yoğunluğunun 15 milyon/mL'den az olmasıdır. 5 milyonun altında ise ciddi oligospermi olarak adlandırılır. Ciddi oligospermisi olan hastalara endokrin ve genetik değerlendirme yapılmalıdır.

Total sperm sayısı ise sperm hacmi ve sperm konsantrasyonu çarpımı ile elde edilir.

Sperm motilitesi, ileri hareket, total motil sperm sayısı ve vitalite: Sperm motilitesi total sperm popülasyonunda hareketli spermlerin yüzdesidir. Sperm hareketleri 0-4 arası derecelendirme ile değerlendirilir. Hızlı ileri hareket derece 3-4, yavaş hareket derece 2, progresif olmayan hareket 0-1 dereceleri alır. Total motil sperm sayısı derece 2-3-4'ü kapsayan ileri hareketli spermleri kapsar. WHO tarafından progresif motilite alt limiti %32'dir.

Sperm motilitesinin kötü olmasına astenospermi denir ve testiküler disfonkiyon ile ilişkilidir. Antisperm antikorlar, genital organ enfeksiyonları, ejakülator kanallarda parsiyel obstrüksiyon, varikosel ya da uzamış cinsel perhiz sorgulanmalı ve incelenmelidir.

Fazla miktarda canlı fakat motil olmayan sperm saptanırsa immotil silia sendromu akla gelmelidir. Sperm kuyruklarında anormallik ve kuyruk hareketlerinin olmaması ile karakterizedir. Spermin elektron mikroskopisinde incelenmesi ile kesin tanı konur.

Hiç motil sperm izlenememişse sperm viabilite testleri ile canlı spermlemlerle ölü spermlemler ayrılabilir. Hipoosmotik şişme testi ve taze sperm boyama testleri sık kullanılan viabilite testlerindendir.

Sperm morfolojisi: Sperm morfolojisinde anormalliğine teratospermi denir. Varikosel, primer ve sekonder testiküler yetmezliklerle ilişkili olabilir. Sperm morfoloji kriterleri önceden spermin şekli baz alınarak yapıldı ancak artık şeklinin yanında uzunluğu, genişliği, genişlik oranına, boyun ve kuyruk defektleri de incelenmektedir. Sperm morfolojisi 1999 yılında WHO tarafından tanımlanan Kruger (Tygerberg) veya “strict” (sıkı) kriterleri ile incelenmektedir (72, 73). Bu kriterler IVF sonrası fertilizasyon oranı ve gebelik oranlarıyla yüksek korelasyon gösteren bir prediktif değere sahiptir (72, 74). Normal sperm oranları %14 ve üstündeyse in vitro fertilizasyon tedavisinde fertilizasyon oranları yüksektir. Normal sperm morfoloji oranı %4 ve altındaysa başarı oldukça azalır. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalar strict kriterlerinin IVF başarısını göstermedeki gücünü teyit etmiş ve morfoloji oranının %0-4 olduğu ciddi teratozoospermide IVF tedavisinde intrastoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) için bir endikasyon oluşturabileceği gündeme gelmiştir (75, 76).

Yuvarlak hücreler ve lökospermi: Lökositlerle birlikte immatür spermlemler (spermatogonia, yuvarlak spermatidler, spermatositler), prostat hücreleri ve epitel hücreleri de rutin semen analizinde yuvarlak hücre olarak görünür ve birbirinden ayrılamaz. Yuvarlak hücrelerin sayısı 5 milyon/mL’yi geçtiğinde lökospermi tanısı için lökositleri ayırmada özel boyalar ve immünhistokimyasal testler gibi ek testler gerekir. Lökospermi için kanıta dayalı olmasa da önerilen sınır değer 1 milyon lökosit/mL’dir (77). Semen kültürü için bir endikasyon oluşturur. Lökosperminin sperm morfoloji ve fonksiyonunu kötü yönde etkileyebileceği düşünülse de yeni çalışmalarda lökospermi ile anormal sperm parametreleri arasında ilişki gösterilememiştir (78).

Semen vizkositesi: Klinik olarak anlamı çok azdır. Kişiyeye bağılı olarak 0-4 arası bir derecelendirme yapılır. Hipervizkos semen nedenleri kesin olarak bildirilmemiştir. Genital enfeksiyonlarla, prostat ve seminal vezikül kanallarının anormallikleriyle ilişkili olabilir.

2.1.2.2. ÖZEL SPERM ANALİZ TESTLERİ

Sperm Otoantikoları: Kan testis bariyeri, spermlemleri immün sistemden korur. Ancak bu bariyerin bozulabileceği duktus obstrüksiyonu, genital enfeksiyonlar, testis

torsiyonu, travma ya da testise yapılan cerrahi müdahaleler sonucunda sperm kanla karşılaşabilir ve spermelere karşı antikor oluşabilir. Sperme karşı oluşan antikorlar sperm motilitesini etkiler, fertilizasyonu bozar. Antisperm antikor testinde spermatozoaların %50'den fazlasının antikorlar tarafından sarılması durumunda test anlamlı kabul edilir. 2016 yılında yapılan bir çalışmada sperm kinematikleri karşılaştırıldığında sperm antikorları pozitif olanlarla negatif olanlar arasında fark bulunmamıştır (79). DSÖ tarafından 2010 yılında yayınlanan insan semeni inceleme ve değerlendirme rehberinde anti sperm otoantikorlarının normal sperm konsantrasyonunda, motilite ve morfolojisinde dahi görülebileceği gösterilmiştir ve bu durumlarda klinik olarak anlamsızdır (80).

Semen Biyokimyası: Klinik kullanımı nadirdir. Sperm kreatinin fosfokinaz spermin enerji üretmesi ve transportunda önemli bir enzimdir. Fruktoz seviyesi seminal vezikül fonksiyonları için kullanılabilir. Düşük bulunması ya da saptanamaması vas deferens ve seminal veziküllerin konjenital yokluğu ya da obstrüksiyonunu gösterebilir. Tanı transrektal ultrasonda dilate seminal veziküllerin görülmesi ile konfirme edilir.

Semen Kültürü: Sıklıkla semen örneğinde lökospermi saptandığında uygulanır. Büyük ölçüde diagnostik değerler taşımaz. Örnek verilirken cilt kontaminasyonu olmamasına dikkat edilmelidir.

Sperm Oosit Penetrasyon Testi:1970'lerde tanımlanan bu testte insan spermeleri kobaylardan alınan oositlerle inkübe edilerek penetre olan oosit ve penetre eden sperm oranları incelenir. Testin standardizasyonu zordur. Yanlış pozitif ve yanlış negatif oranları yüksektir. Kullanışsız, pahalı, zaman alıcıdır.

İnsan Zonasına Bağlanma Testi: Spermelerin zonası olmayan oositleri penetre etme yeteneğini test eder. Zonaya karşı penetrasyonu gösteremez. IVF sonuçlarını predikte etmekte kullanılır ancak insan zonası ve oositini bulma zorluğu ve testin teknik zorlukları klinik kullanımını oldukça azaltmıştır.

Bilgisayar Yardımlı Sperm Analizleri: Kesin, otomatize ve objektif değerlendirmeleri sağlar. Ancak test sonuçları operatörün tecrübesine, teknik şartlara ve sperm konsantrasyonuna bağlıdır. Bazı çalışmalarda alınan sonuçların in vivo ve in vitro fertilizasyonun ön görüşünde etkisi olduğu gösterilse de, bazı çalışmalarda da gösterilmemiştir (81-83).

Akrozom Reaksiyonu: Akrozom, spermin baş bölgesinde membrana bağlı ve proteolitik enzimler içeren bir yapıdır. Spermin zona pellusidaya temasıyla reaksiyonu başlar. Akrozom reaksiyonlarındaki bozukluklar spermin zonaya bağlanmasını engeller. İmmün floresan ve spesifik monoklonal antikorlarla reaksiyon ölçümü yapılır.

Sperm Kromatin Yapısı ve DNA: DNA bütünlüğü ve sağlamlığı normal embriyo gelişimi için önemli role sahiptir. Sperm DNA bütünlüğü protaminler arasında çapraz disülfid bağları ile sağlanır ve bu yapı nucleus kromatin yapısını oluşturur. Sperm DNA hasarı protamin eksikliği veya DNA mutasyonları gibi intrinsik faktörler sebebiyle oluşabilir. Isı, radyasyon ve gonadotoksinler gibi ekstrinsik faktörler de DNA hasarına neden olabilir. DNA fragmentasyonu tamir edilemez hale gelen denatüre ya da hasarlı sperm DNA'sına denir. Sperm DNA fragmentasyon oranlarını ölçmek için birçok test geliştirilmiştir. Single-cell gel electrophoresis assay (Comet) ve terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick and labeling (TUNEL) assay gibi direk yöntemler DNA'daki kırıkların sayısını analiz edebilirler. Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) gibi indirek testler anormal kromatin yapısını saptarlar (84). DNA fragmentasyon indeksi sınır değeri 2013 yılında yapılan bir çalışmada TUNEL testi için $\geq 17,5$ olarak önerilmiştir (85). İnfertil erkeklerin büyük çoğunluğunda sperm DNA hasarı saptanmıştır. Çalışmalarda yüksek DNA fragmentasyon indeksine sahip spermatozoaların azalmış oosit fertilizasyonu, kötü embriyo kalitesi, azalmış gebelik oranları ve tekrarlayan gebelik kayıpları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (86, 87). Ancak DNA hasarına rağmen spermin canlı, morfolojisinin normal görünümde olabileceği hatta oositi fertilize edebileceği de gösterilmiştir. Anormal DNA bütünlüğü ile reproduktif sonuçlar arasındaki bu kısıtlı ilişki nedeniyle sperm DNA fragmentasyon indeksi infertil çiftlere rutin istenen bir test olamamıştır.

2.2.AÇIKLANAMAYAN INFERTİLİTE

Açıklanamayan infertilite, sistematik bir değerlendirme sonrası neden saptamada başarısız olduktan sonra konulabilen bir tanıdır. Kadın infertilitesinin % 40'ını, infertil çiftlerin ise %10-30'unu oluşturur (1). Çalışmalardaki insidansların bu kadar çeşitlilik göstermesi çalışma grubunun seçim kriterlerinin ve yaşların farklılık göstermesi olabilir. Açıklanamayan infertilite tanısında ovülasyon, tubal patens, normal uterin kavite, normal semen analizi ve yeterli oosit rezervi olduğu dökümanente edilmelidir (88). Geçmişte bu testlere ek olarak servikal patolojiler için uygulanan post koital test, endometriyumun

tarihlemesi için yapılan testler ve rutin laparoskopi günümüzde yapılan çalışmalar sonucunda geçerliliği olmadığı ya da değerlendirmeyi değiştirmeyecek çok az etkinlikleri olması nedeniyle terk edilmiştir.

Açıklanamayan infertilitenin olası iki açıklaması vardır. Ya gerçekte bir anormallik yoktur. Ancak çiftin fekunditesi muhtemel çiftlerin yaşına ya da üremeyle ilgili yaşlanmaya bağlı olarak normal aralığın en alt seviyesindedir. Ya da mevcut tanı testleri ile infertilite tanısı bulunamamaktadır. Artan yaşla birlikte doğurganlıktaki doğal azalma muhtemelen açıklanamayan infertilite tanısı alanların büyük kısmını oluşturur ve bu nedenle de 35 yaş üstü kadınlarda 2 kata kadar daha fazla görülür (89). Olası saptanamayan nedenler servikal mukus, kapasitasyon, akrozom reaksiyonları, zona pelludisaya penetrasyon sorunları, defektif oositler ve/ veya embriyolar, tubal motilite bozuklukları ve implantasyonlardaki anormallikler olabilir.

İnfertil çiftler için açıklanamayan infertilite tanı süreci sıkıntılıdır ve onlar için bir sebep bulunamaması aynı zamanda bir tedavinin de olmayacağı anlamına gelebilir. Gerçekte de infertilite süresi 3 yıldan fazla olan veya kadın yaşının 35 üstü olduğu çiftlerde prognoz diğerlerinden daha kötüdür (90). İnfertilite süresi 2 yıldan daha az ve kadın yaşı 35 yaş altıysa prognoz herhangi bir tedavi vermeden de daha iyi olabilmektedir. İnfertilite tedavisinin 2 yıl ve daha üzeri infertilite süresi mevcutsa ya da kadın yaşı 35 yaş üstüyse başlanması önerilir (91). İnfertilite süresinde 1 aylık her artış gebelik ihtimalinde aylık %2, yıllık ortalama %25'lik bir düşüşe neden olur. Kadın yaşının 30 yaş üstü her 1 yıllık artışı gebelik oranında %9'luk bir azalmaya neden olur (91). İnfertilite süresinin etkisinin anlaşılması önemlidir. Bekle gör yaklaşımı ile kendiliğinden oluşan gebeliklerin oranı, infertilite süresi görece daha kısa olan çiftlerde daha yüksek olduğu, infertilite süresi uzadıkça ve çiftin yaşı ilerledikçe tedavisiz gebe kalma ihtimalinin hızla azaldığı bilinmelidir. IVF dışında açıklanamayan infertilite nedeniyle verilen tedavilerin tümünün başarısı benzerdir ve bu nedenle uzamış infertilite süresi olan ve tedavisiz gebe kalma olasılığı düşük olan çiftler için IVF seçeneği ön planda olmalıdır.

Açıklanamayan infertilitenin nedeni bilinmediğinden verilen tedaviler de ampiriktir. Yöntemler değişse de amaç doğru yer ve doğru zamanda daha fazla sperm ve oositi bir araya getirmektir.

2.3.AÇIKLANAMAYAN İNFERTİLİTEDE TEDAVİ SEÇENEKLERİ

2.3.1. DOĞAL SIKLUSLARDA İNTRA UTERİN İNSEMINASYON

Açıklanamayan infertilitesi olan bir grupta yapılan çalışmada kontrol grubunda bekle gör yaklaşımı seçilmiştir. Ortalama yaşın 32, ortalama infertilite süresinin 2,5 yıl olduğu çalışma grubunda 6 ay sonucunda kümülatif olarak IUI yapılan 191 çiftin 43'ünde (%23), bekle gör yaklaşımı uygulanan 193 çiftin 32'sinde (%17) canlı doğum gözlenmiştir (92). Ortalama yaşın 30, ortalama infertilite süresinin 1,7 yıl olduğu bir başka çalışmada IUI yapılan 51 çiftten 11'inde (%22), bekle gör yaklaşımı izlenen 48 çiftin 9'unda (%19) devam eden gebelik izlenmiştir.

Eldeki iyi kanıtlar doğal siklus IUI tedavilerinin klinik öneme sahip olmadığını göstermektedir.

2.3.2. KLOMİFEN SİTRAT (CC)

Açıklanamayan infertilite tedavisinde IUI yapılmadan klomifen tedavisinin etkinliğini inceleyen çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalardan 2 tanesinde sadece açıklanamayan infertilitesi olan hastalar alınmıştır ve karşı gruba plasebo verilmiş ya da bekle gör yaklaşımı tercih edilmiştir. Ortalama yaşın 30 olduğu, ortalama infertilite süresinin 4,3 yıl olduğu bir çalışmada 290 siklusta klomifen alan 76 çiftte 10 gebelik (%13, siklus başına %3), 274 siklusta plasebo alan 72 çiftte 4 gebelik (%6, siklus başına %1) izlenmiştir. Ortalama yaşın 32, ortalama infertilite süresinin 2,5 yıl olduğu diğer çalışmada ise klomifen alan 192 çiftte 26 gebelik (%14), bekle gör yaklaşımı tercih edilen 193 çiftte 32 gebelik (%17) izlenmiştir. Oluşan farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

2.3.3. KLOMİFEN SİTRAT ve IUI

Klomifen sitratla indüklenen IUI tedavisinin etkinliğini araştıran çalışmalar mevcuttur. 8 çalışmada toplam 932 siklusu içeren bir derlemede siklus başına tahmini fekundite klomifen için %5.6, klomifen+IUI için %8.3 olarak bulunmuştur (93). Ortalama yaşın 33, ortalama infertilite süresinin 3,5 yıl olduğu diğer bir çalışmada ise klomifen+IUI yapılan 23 çiftin toplamdaki 73 siklusunda 8 gebelik (%35, siklus başına %11), herhangi bir tedavi verilmeden zamanlanmış ilişki ile takip edilen 28 çiftin toplamda 103 siklusunda 4 gebelik (%14, siklus başına %4) izlenmiştir (94). Aradaki fark anlamlı bulunmamıştır.

2.3.4. GONADOTROPİNLER + IUI

253 hastayı içeren ortalama yaşın 33, ortalama infertilite süresinin 2 yıl olduğu bir çalışmada gonadotropinler + IUI tedavisi ile bekle gör yaklaşımı karşılaştırılmıştır. 6 ay süren çalışma sonucunda devam eden gebelik oranlarında fark saptanmamıştır. 127 tedavi hastasından 29 devam eden gebelik (%23) ve 26 canlı doğum meydana gelmiştir. Bekle gör tedavisi izlenen 126 hastadan 34 devam eden gebelik (%27), 30 canlı doğum meydana gelmiştir. Bu sonuçlar arasından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (95).

2.3.5. KLOMİFEN SİTRAT+IUI ve LETROZOL+IUI

Klomifen+IUI ile letrozol+IUI karşılaştırmasını yapan iki çalışma mevcuttur. Ortalama yaşın 26 olduğu, ortalama infertilite süresinin letrozol grubunda 3,7 ve klomifen grubunda 3,4 olduğu 214 hastalık bir çalışmada letrozol+IUI grubu devam eden gebelik oranı %33, klomifen+IUI grubunda ise %19 bulunmuştur. Bu fark istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur (95).

Bir başka çalışmada 900 hasta 3 gruba randomize edilip klomifen, letrozol ve gonadotropinlerle IUI sonuçları incelenmiştir. Ortalama hasta yaşının 32, ortalama infertilite süresinin 35 ay olduğu bu çalışmada kümülatif 4 siklus sonrası klomifen grubu ile %23,3'lük letrozol grubundan ise %18.7 canlı doğum elde edilmiştir (96). Ancak bu fark istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır.

2.3.6. GONADOTROPİN+IUI ve KLOMİFEN SİTRAT+IUI

Gonadotropinlerle klomifeni karşılaştıran 3 çalışma mevcuttur. Ortalama yaşın 28 olduğu, ortalama infertilite süresinin klomen grubunda 44, gonadotropin grubunda 48 ay olduğu bir çalışmada açıklanamayan infertilite tanısı alan 93 hasta randomize edilmiştir. Klomen ve gonadotropinlerle yapılan IUI'lar sonucunda devam eden gebelik oranları klomifen kolunda 43 hastanın 5'i (%11,6), gonadotropin kolunda 50 hastanın 9'unda (%18) saptanmıştır. İki grup arasında istatistiki bir fark saptanmamıştır (97).

Ortalama hasta yaşının 31, ortalama infertilite süresinin 33 ay olduğu, 68'i açıklanamayan infertilite olmak üzere toplam 138 hastanın klomifen ve gonadotropin grubuna randomize edildiği bir çalışmada 4 siklusa kadar IUI ile yapılan tedaviler sonrasında canlı doğum oranları karşılaştırılmıştır. Klomen grubunda canlı doğum

oranları %31,4, gonadotropin grubunda %30,4 saptanmıştır. Yine önceki çalışmadaki gibi aralarında istatistiksel bir fark saptanmamıştır (98).

Üçüncü çalışmada yine bu iki çalışma kolu karşılaştırılmıştır ancak canlı doğum oranları kümülatif 4 siklus sonrası gonadotropin grubunda %32,2, klomen grubunda %23,3 bulunarak istatistiksel anlamlı bir fark oluşmuştur. Bu çalışma gonadotropin grubundaki yüksek çoğul gebelik oranlarıyla (10 üçüz, 24 ikiz) dikkat çekmektedir (96).

2.3.7. GONADOTROPİN+IUI ve LETROZOL+IUI

IUI programında overlerin uyarılmasında gonadotropin /letrozol kullanımının başarısını karşılaştıran 3 çalışma mevcuttur. İlk çalışma grubunda 80 hasta letrozol ve gonadotropin grubuna randomize edilmiştir. Ortalama yaş 28, ortalama infertilite süresi letrozol grubunda 5,3 yıl, gonadotropin grubunda 5,9 yıl olarak saptanmıştır. Primer sonuçların klinik gebelik oranı olarak açıklandığı çalışmada letrozol grubunda klinik gebelik oranı %18,4, gonadotropin grubunda %15,7 saptanmıştır. Ancak aralarında istatistiksel bir fark saptanmamıştır (99).

50 hastanın randomize edildiği letrozol ve gonadotropinlerle yapılan IUI tedavisinin başarısının araştırıldığı diğer bir çalışmada klinik gebelik oranı ve canlı doğum oranları arasında yine istatistiksel bir fark saptanamamıştır (100).

Gonadotropinlerle klomen karşılaştırması yapan diğer bir çalışmada, 3. çalışma kolu olarak letrozol başarısı da karşılaştırılmıştır. Kümülatif 4 siklus sonrası gonadotropin+IUI ve klomen+IUI tedavilerinde anlamlı fark saptanarak gonadotropini daha başarılı bulan bu çalışmada yine letrozole karşı gonadotropinler anlamlı fark oluşturacak kadar daha başarılı bulunmuşlardır. Bu çalışmada canlı doğum oranları gonadotropin grubunda %32,2, klomen grubunda %23,3, letrozol grubunda ise %18,7 olarak saptanmıştır (96). Bu çalışmada gonadotropin kullanımı diğer iki oral ajandan daha etkili gibi görünse de çalışmada kullanılan 150 IU FSH ile indüksiyonun başlanması, gonadotropin grubunda yan etki olarak 1 overlerin hiperstimülasyon sendromu (OHSS) görülmesi, ikiz ve üçüz oranlarının fazla olması, normalden fazla bir doz kullanımını düşündürmektedir.

Sonuç olarak yine de gonadotropin ve IUI tedavisi, infertilite süresi uzun olan çiftlerde gebelik sonucuna ulaşmada bir miktar daha etkin olabilir. Klomifen ve letrozol ile yapılan IUI tedavilerinde gebe kalınamamışsa, ya da klomen ya da letrozol ile yeterli

folikül gelişimi uyarılamamışsa, IVF tedavisi planlanmıyorsa gonadotropin IUI tedavisi denenebilir.

2.3.8. GONADOTROPİN+IUI ve IVF

2000 yılında yayınlanan bir çalışmada açıklanamayan infertilite hastalarının tedavisinde gonadotropin/IUI ile IVF başarısı karşılaştırılmıştır. Ayrıca bu çalışmada maliyet etkinliği analizi de yapılmıştır. Bu çalışmada 181 hasta spontan siklus IUI, gonadotropin/IUI ve IVF olmak üzere üç gruba randomize edilmiştir. Ortalama hasta yaşı 32, ortalama infertilite süresi ise sırasıyla 3,9, 4,2 ve 4,4 yıldır. Kümülatif tedaviler sonrası canlı doğum oranları karşılaştırıldığında doğal siklus IUI'da %24, gonadotropin/IUI'da %36, IVF grubunda %39 saptanmıştır. Gebelik oranlarında IUI ve IVF grupları karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmamıştır ancak siklus başına gebelik oranı hesaplandığında IVF grubunun başarısı daha yüksek saptanmıştır. Maliyet analiz hesaplamalarında da IUI ile yapılan tedavinin gebeliğe ulaşmada daha ucuz olduğu saptanmıştır (101).

2.3.9. IVF ve IVF-ICSI

Açıklanamayan infertilite hastalarında yapılan bir çalışmada klasik IVF ile IVF-ICSI (intrastoplazmik sperm enjeksiyonu) başarısı karşılaştırılmıştır. 60 hasta ile yapılan çalışmada ortalama hasta yaşı 33, ortalama infertilite süresi klasik IVF grubunda 57 ay, IVF-ICSI grubunda 64 aydır. Gruplar arasında istatistiksel fark yoktur. Primer sonucun fertilizasyon oranı olarak açıklandığı çalışmada klinik gebelik oranları ve canlı doğum oranları da karşılaştırılmıştır. Canlı doğum oranları klasik IVF grubunda %46,7, IVF-ICSI grubunda %50 olarak bulunmuştur. Canlı doğum oranlarıyla birlikte diğer tüm sonuçlarda da istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (102).

2.3.10. FASTT ÇALIŞMASI

2010 yılında Rendollar R. H. ve arkadaşları açıklanamayan infertilite hastalarında gebeliğe daha hızlı ulaşmada hangi tedavilerin yapılması gerektiğine dair bir çalışma yayınladılar. “*The fast track and standart treatment (FASTT)*” çalışması sonucunda siklus başına gebelik elde etmede IVF tedavisinin oral ajanlarla ya da gonadotropinlerle yapılan IUI'dan daha üstün olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada hastalar iki kola ayrılmışlardır. İlk kolda hastalar 3 siklus klomifen sitrat, ardından 3 siklus gonadotropinlerle tedavi edildikten sonra 6 siklus IVF tedavisi görmüşlerdir. 2. kolda ise

hastalar 3 siklus klomifen sitrat tedavisi sonrası direk 6 siklus IVF tedavisine geçmişlerdir. Bu çalışmada ortalama hasta yaşı 33'tü ancak ortalama infertilite süreleri belirtilmemiştir. Primer sonuç doğuma ulaşan gebeliği elde etme süresidir. Siklus başına gebelik oranları CC/IUI'da %7,6, FSH/IUI'da %9,8, IVF kolunda ise %30,7 olarak bulunmuştur (103).

Sonuç olarak IVF tedavisi siklus başına gebelik elde etmede diğer tedavi yöntemlerine göre oldukça yüksek başarıya sahiptir. Günümüzde de klasik IVF tedavisi yerini rutin IVF-ICSI uygulamalarına bırakmıştır. Yardımcı üreme tekniklerindeki gözlemler açıklanamayan infertilite hastalarının infertilite nedenlerini ortaya çıkarmaya olanak sağlayabilir çünkü işlemler sırasında aslında bilinmeyen birçok yön tedavinin her basamağında gösterilebilir duruma gelmektedir. Sperm ve oosit etkin şekilde birleştirilebilir, fertilizasyon ve embriyo oluşumu gözlemlenebilir. Embriyoların kromozom analizleri yapılabilir. Embriyo transferi doğrudan kaviteye yapılarak diğer yollar elimine edilebilir. Ancak tüm bunlara rağmen hala bilinmeyen birçok yön bulunmaktadır.

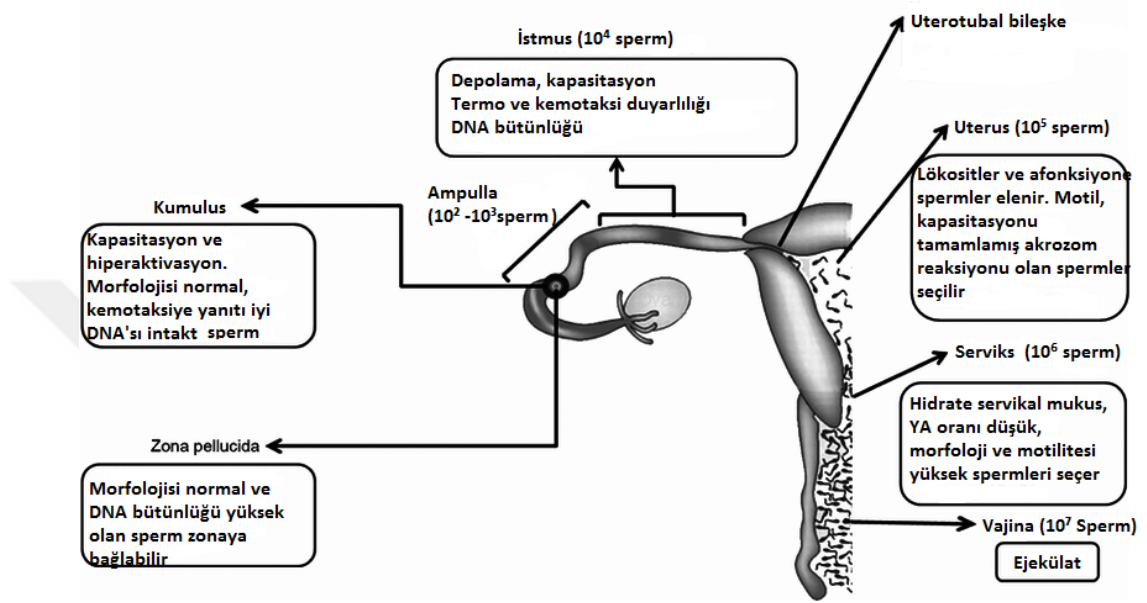
2.4.IVF-ICSI TEDAVİSİNDE SPERM SEÇİMİ VE ÖNEMİ

IVF ile tedavi edilen açıklanamayan infertilite çiftlerinde oosit fertilizasyonu, embriyo klivaj oranları ve fertilizasyon oranları, diğer sebepler nedeniyle tedavi gören hastalara oranla daha düşük olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar muhtemel oosit ve spermelerde anomaliler olabileceğini düşündürmektedir. Sperm seçimi bu nedenle IVF-ICSI başarısında anahtar role sahiptir. Doğal yollarla sperm seçimi olmadığından doğru spermi seçmek büyük önem taşır.

Sperm seçimi sırasında motilitesi bozuk olanlar, morfolojisi normal olmayanlar ve mümkünse sperm DNA hasarı az olan spermelerin seçimine özen gösterilmelidir. İnfertil erkeklerden elde edilen semen analizlerinde de %40-88 oranlarında reaktif oksijen radikalleri saptanmıştır. Bu oksijen radikalleri hidroksil radikalleri (OH), süperoksit anyonları (O_2^-) ve hidrojen peroksittir (H_2O_2) (104). Reaktif oksijen radikalleri düşük konsantrasyonlarda sperm fonksiyonları için gereklidir. Oositi penetre ve fertilize etme için gereken akrozom reaksiyonuna olgunlaşmayı sağlayan kapasitasyon, düşük miktarda reaktif oksijen radikalleri sayesinde tetiklenir. Hiperaktivasyon ve akrozom reaksiyonlarının oluşmasını da sağlar. Ancak gereğinden fazla miktarda reaktif oksijen radikali oksidatif stres oluşumuna neden olur, sperm motilitesi azalır, DNA bütünlüğü

bozular, sperm gövde anomalilerine sebep olabilir. Gövdede düzensiz şekiller ve kuyruk kayıplarına sebep olabilir (104, 105).

Vajinaya dökülen milyonlarca spermde yalnızca çok küçük bir kısmı oosite ulaşabilir. Bu kadın genital yollarında doğal yollarla oluşan mükemmel bir eleme sistemidir.



Şekil 1. Sperm seçiminde kadın genital traktusunun yeri

Spermilerin vajinaya ilk ulaşmasıyla birlikte oluşan vajinal mekanik stimülasyonlar spermilerin yüzme hareketine destek olarak spermeleri uterus ve tubalara doğru yönlendirir. Depolama alanına ulaşan spermeler burada kapasitasyon adı verilen matürasyona uğrarlar. Kapasitasyon sonrası matüre olan spermeler oosite doğru kemotaksi ve termotaksi ile ilerler. Kemotaksi ve termotaksi sonucunda spermeler kümülüs hücrelerine penetre olur, oositteki sperm reseptörlerine bağlanır ve akrozom reaksiyonu başlar. Bunun sonucunda da fertilizasyon sağlanır (106).

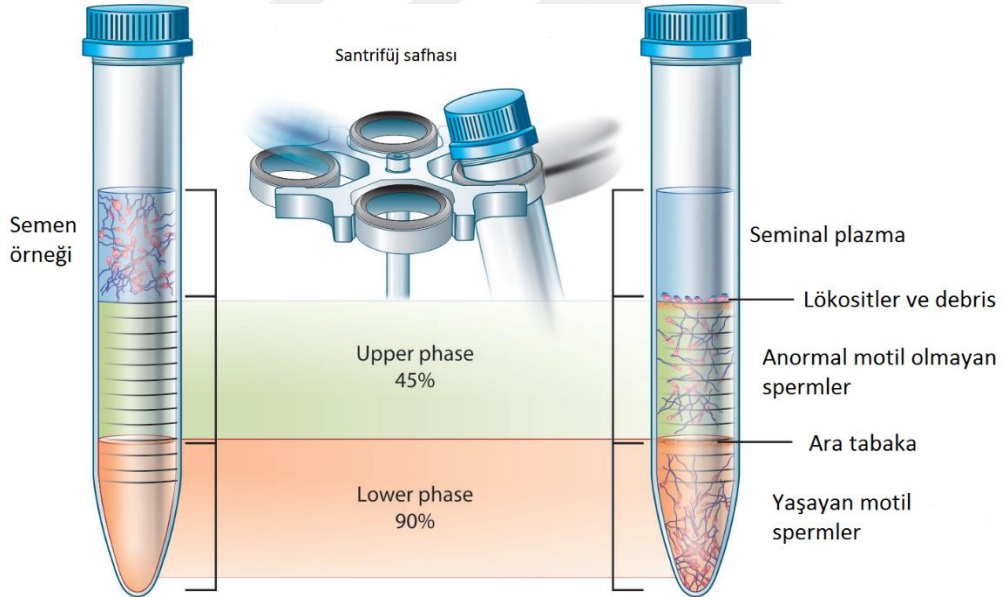
Gelişen teknolojiyle yardımcı üreme teknikleri kullanımında gereken spermelerin seçimi doğal seçim yollarına oldukça yakın, sadece basit motilite ve morfolojisi ile yetinmeyip DNA bütünlüğü, reaktif oksijen radikalleri miktarı, membran matürasyonlarına göre de seçim sağlayan çeşitli yollarla yapılabilmektedir. DNA hasarı yardımcı üreme tekniklerinde kullanılacak sperm kalitesini belirlemede önemlidir. Ayrıca fertilize oositlerin DNA tamir mekanizmalarına sahip olduğu ancak spermelerin

spermiogenez sonrası DNA tamir mekanizmalarının olmayışı da doğru sperm seçiminin önemini gösteren bir başka noktadır (107).

2.4.1. KONVANSİYONEL SPERM SEÇME TEKNİKLERİ

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

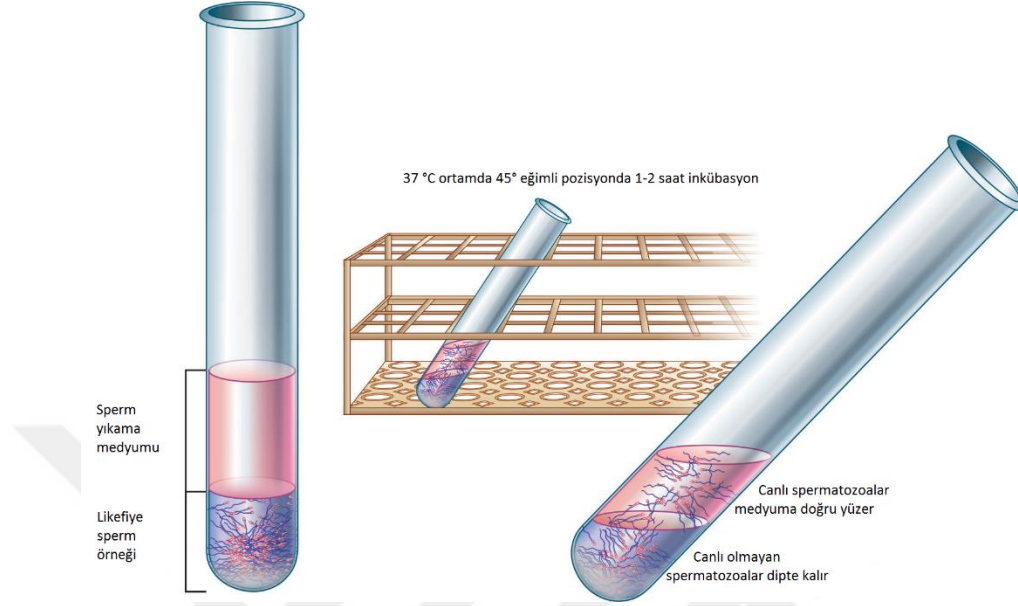
Dansite gradiyent santrifüj (DGS) tekniğinde genellikle daha az toksik olması nedeniyle tercih edilen silika partikülleri içeren medyumlar kullanılır. Her bir tüp farklı oranda gradiyent solüsyonları içeren tabakalarla 2'li ya da 3'lü tabakalar halinde hazırlanır. Daha yoğun partiküllü sıvı tüpün dibine, daha hafif olan onun üzerine yayılır. En üste semen örneği yerleştirilir ve santrifüje edilir. Üstteki süpernatant kısım atılır, altta kalan pellet toplanarak yıkanır. Düşük sperm konsantrasyonu olan hastalarda tercih edilebilir. Sperm kaybı oldukça azdır.



Şekil 2. Gradyent yöntemi(108).

Direkt swim-up tekniğinde sperm ayrı tüplere konur ardından üzerlerine sperm yıkama medyumları eklenir. %5 karbondioksitli 37 °C ortamda 45° eğimli pozisyonda 1-2 saat inkübe edilir. Konvansiyonel swim-up tekniğinde ise inkübasyon öncesi sperm santrifüj edilerek çöktürülür. Ardından üst tarafta yüzen 1 ml'lik kısım pipetle alınarak

kullanılır. Tamamen sperm hareketliliğine bağlı bir yöntemdir. Astenozoospermi ve oligozoospermi vakalarında uygun olmayabilir. Bu nedenle şiddetli erkek infertilitesi vakalarında kullanımı kısıtlıdır.



Şekil 3. Swim up tekniği (108).

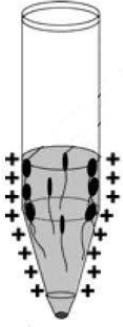
DGS ve CSW tekniklerinde santrifüj basamaklarında oluşan reaktif oksijen radikalleri sperm fonksiyonlarını bozabilmekte, oksijene DNA atıklarına ve fragmentasyonlarına yol açabilmektedir. Sağlıklı erkeklerden alınan semenlerden yapılan analizlerde CSW ve DGS teknikleri sonucu oluşan reaktif oksijen radikalleri ve mitokondriyal membran potansiyelleri (MMP) arasından anlamlı bir fark saptanmamıştır. Ancak DGS yönteminde en yüksek DNA fragmentasyon oranı saptanmıştır. CSW ve DSW yöntemleri karşılaştırıldığında konvansiyonel yöntemde, yani santrifüj sonrasında anlamlı bir şekilde hidrojen peroksit ve süperoksit anyonlarının fazla olduğu saptanmıştır. Bu fazlalığın santrifüjün kendisinin oluşturabileceği strese başka, seminal plazmadan ayrılan antioksidanlar sebebiyle de oluşabileceği düşünülmüştür (109).

Konvansiyonel yöntemler motil ve morfolojik olarak normal spermleri seçmede oldukça başarılı olsalar da, sperm DNA bütünlüğü, membran matürasyonu, ayrıntılı yapısal özellikleri ve apoptotik spermleri seçmede yetersizlerdir (102).

2.4.2. İLERİ DÜZEY SPERM SEÇME TEKNİKLERİ

Zeta Potansiyeli

Spermlerin epididimde matürasyonları sırasında normal morfolojisini ve kapasitasyonunu sağlayan negatif yüklü çeşitli proteinler bulunmaktadır. Spermatozoaların sahip olduğu bu elektriksel yükler çeşitli sperm seçme yöntemlerinin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Spermin elektrokinetik potansiyeline zeta potansiyeli adı verilir. Sperm membranı ve etrafında ölçülen bu değer matür bir sperm için -16 ile -20 mV'tur (110). Bu yöntemde pozitif yüklenmiş santrifüj tüpüne yıkanmış sperm örneği alınır, lateks eldiven kullanılarak karıştırılır ve ardından santrifüj edilir. Tüp kenarına yapışmayan spermier uzaklaştırılır. Ucuz ve kolay bir işlemdir. Oligozoospermide başarısı düşüktür. DGS yöntemine göre daha iyi sperm morfolojisi, daha hareketli, DNA bütünlüğü yüksek spermier seçmektedir ancak elde edilen spermierin motilitesi düşüktür (111).

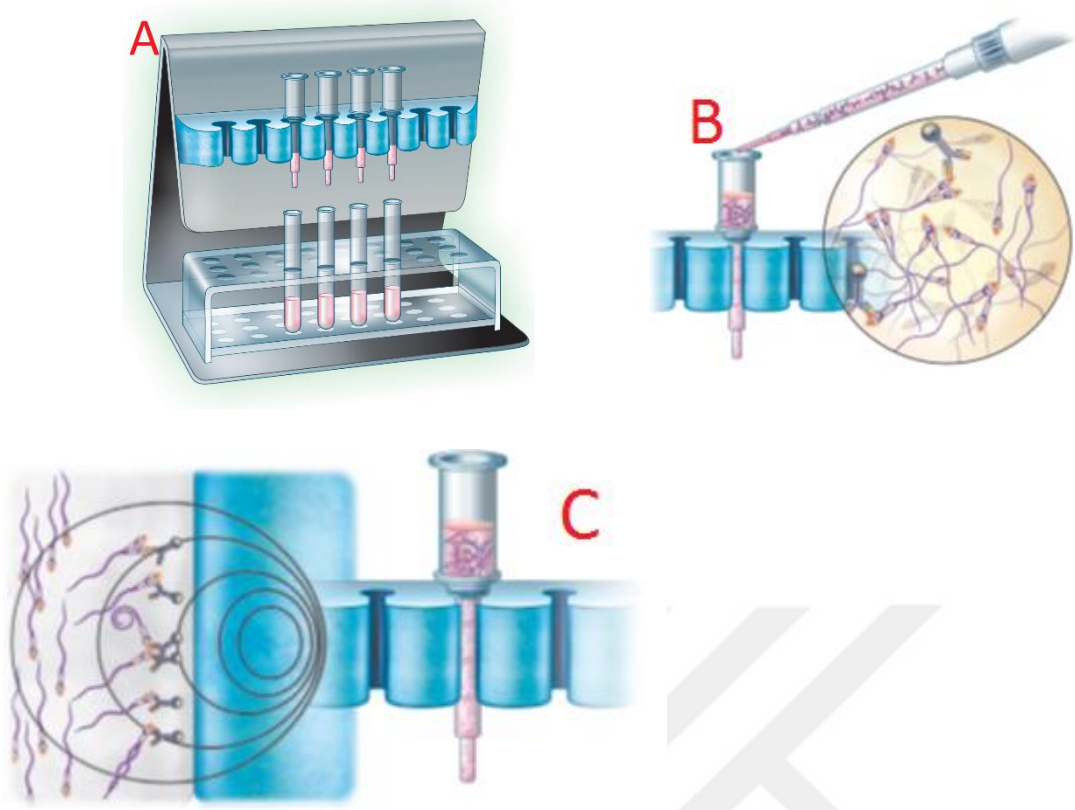


Şekil 4. Zeta potansiyeline göre sperm seçimi

Magnetic-Activated Cell Sorting System (MACS) (Manyetik Aktive Sperm Seçimi)

Apoptotik olmayan spermierin seçimi için manyetik aktive sperm seçimi (MACS) kullanılmaktadır. Bu yöntemde apoptotik spermierin işaretlenebilmesine olanak sağlanır. Spermierde membranlarının dış yüzeyinde bulunan fosfatidilserinin (PS) dışa yerleşimi erken apoptozisin bir bulgusudur. Dışa dönmüş fosfatidilserinler, anneksin V ile bağlı manyetik özellikli tutucularla işaretlenir ve MACS kullanılarak apoptotik spermier ayrıştırılır. MACS ile lökosit ve diğer germ hücreleri ayrıştırılmadığından konvansiyonel sperm seçme yöntemleri ile kombine halde kullanılmalıdırlar.

Bu yöntem oldukça basit, hızlı ve yüksek spesifiteye sahiptir. Ancak konvansiyonel yöntemlerle kombinasyonuna ihtiyaç duyulur.



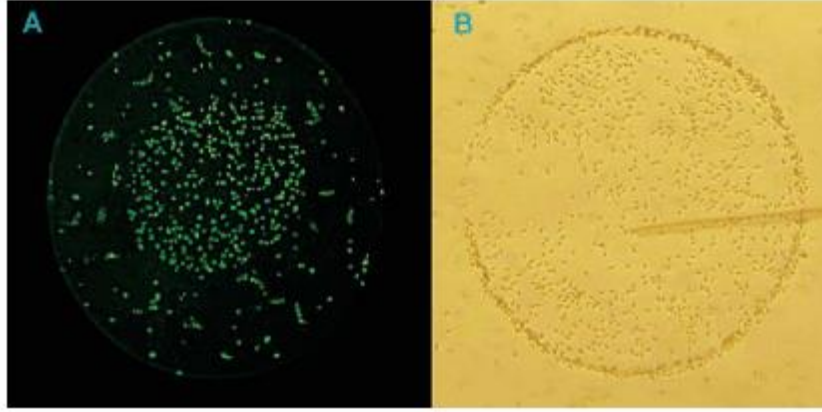
Şekil 5. MACS yöntemi. Tüplerin cihaza yüklenişi (A), Annexin V ile işaretli apoptotik olan spermle ve apoptotik olmayan spermilerin tüplere konulması (B), Annexin V ile bağlı apoptotik sperm manyetik olarak yakalanması ve Apoptotik olmayan sperm toplama tüpüne ilerleyişi (C) (108).

2013 yılında yapılan bir derlemede DGS ile birlikte kullanılan MACS yöntemiyle elde edilen spermilerin yüksek motilite, canlılık, normal morfolojiye yakınlığı fazla, apoptoz ve DNA fragmantasyon oranlarının düşük olduğu saptanmıştır. Ancak bu yöntemle elde edilen spermle yapılan tedavilerde fertilizasyon, implantasyon, gebelik, embriyo kalitesi, düşük oranları ve canlı doğum oranları arasında fark saptanmamıştır (112). Bu yöntemle yapılan klinik çalışmalar oldukça kısıtlı hasta grubunda yapılmıştır. Gerçek etkinliğini saptamak için daha büyük çalışma gruplarına sahip araştırmalar gerekmektedir.

Hyaluronik Asit Bağlanma

Hyaluronik asit (HA) bağlanma alanları sperm matüritesini gösteren, sperm plazma membranında bulunan alanlardır. Oositlerin etrafındaki kümülüs hücrelerinin ekstrasellüler matrikslerinde HA bulunur ve matür spermilerin bağlanarak fertilizasyonuna olanak sağlar. Spermilerin HA ile seçilebilmesi için HA'ların sabitlendiği "PICI kabı"

adı altında geliştirilen bir ürünle sperm seçimleri yapılabilmektedir (113). Yöntemin güvenilirliği yüksektir çünkü HA zaten normalde servikal mukus, kumulus ooforus ve folliküler sıvısının normal bileşeni olarak bulunmaktadır. Dezavantajı ise spermilerin HA'lara bağlanması zaman gerektirmektedir ve mikroenjeksiyon yapılacak çok miktarda oosit varsa süre oldukça uzayabilir.



Şekil 6. Hyalüronik asit bağlanma yöntemi. A. Spermier periferde doğru ilerleyip hyalüronik asitle bağlanır. B. HA bağı spermier ICSI pipetiyle seçilir (113)

DGS yöntemi ile karşılaştırıldığında HA bağlanma yöntemiyle elde edilen spermierde canlılık ve motilite oranlarının yüksek, DNA fragmentasyon oranlarının düşük olduğu izlenmiştir. HA ile bağlanmayan spermierde anöploidi ve DNA fragmentasyon oranlarının yüksek olduğu izlenmiştir (114, 115).

Elektroforez Bazlı Sperm Seçimi

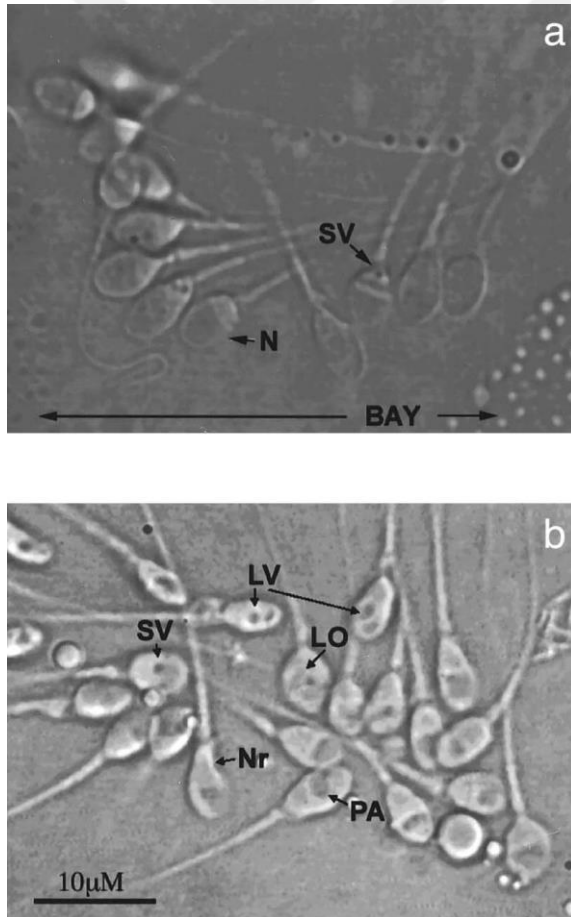
Elektroforez bazlı sperm seçimi spermierin yüzey elektriksel yükleri baz alınarak spermierin membranda yürütülmesiyle yapılır. Normalde matür spermier yüzeylerinden eksprese edilen CD52 ve glikolize fosfatidilinositol nedeniyle negatif yüklüdür. Elektroforez aparatı semenlerin yerleştirildiği bir kasete bağlanır, uygulanan elektriksel akımla morfolojisi normal ve negatif yüklü spermier geride immatür spermier ve lökositleri bırakarak pozitif elektroda doğru ilerler (116).

Bu yöntemin avantajı DGS'ye göre daha kısa sürede tamamlanması, santrifüj kullanılmamasıdır. Ancak seçilen spermierle yapılmış klinik bir çalışma olmadığından gebelik üzerine katkısı bilinmemektedir.

Motil Sperm Organellerinin Morfolojik Değerlendirilmesi

Motil sperm organellerinin morfolojik değerlendirilmesi (MSOME) ile yapılan sperm seçimi yüksek büyütme mikroskopları altında sperm morfolojisi incelenerek yapılır. Standart ICSI 600x büyütmede yapılırken MSOME ise 6300 kata kadar büyütme yapılarak uygulanır. Bartoov B. ve arkadaşları tarafından bulunan bu yöntemde sperm yapısal özellikleri ayrıntılarıyla incelenir. Akrozomal bölge, post akrozomal bölge, boyun, mitokondri, flajella, kuyruk kısmı, vakuol alanları ve bu vakuol alanlarının baş bölgesine oranı hesaplanarak en sağlıklı sperm seçilmeye çalışılır (117).

MSOME standart ICSI prosedürleri ile birlikte kullanılarak intrastoplazmik morfolojisine göre seçilen sperm enjeksiyonu (IMSI) adını almıştır. Ciddi erkek infertilitesi olan hastaların sperm seçiminde önemli role sahiptir.

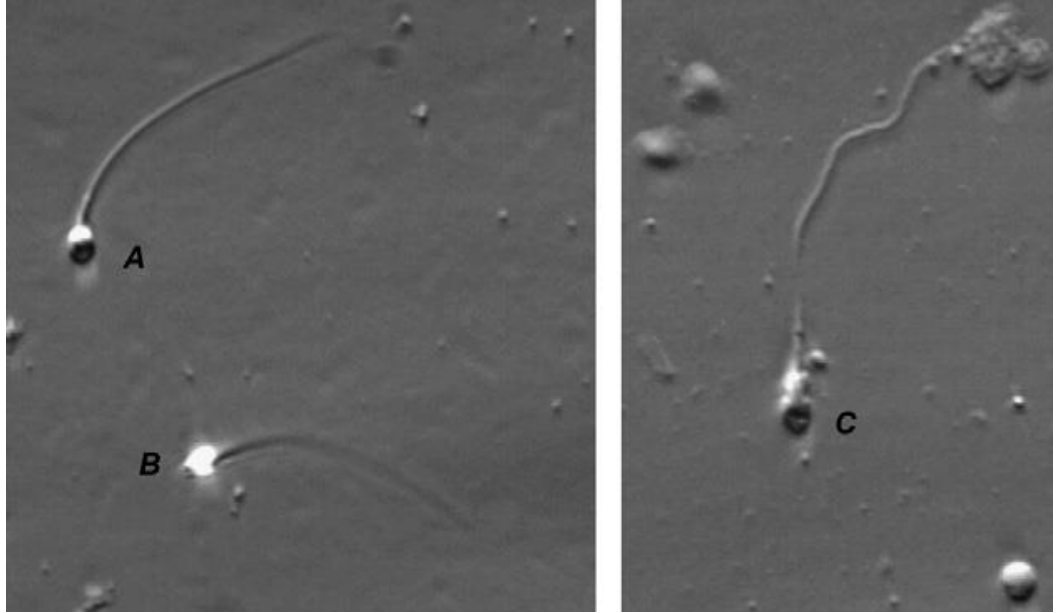


Şekil 7. MSOME ile sperm seçimi. N:Normal sperm, LV: büyük nükleer vakuol, SV: küçük nükleer vakuol, LO: büyük oval sperm hücreleri, PA: parsiyel akrozom Nr: postakrozomal alanı daralmış bir spermatozoa (117).

Yapılan bazı çalışmalarda IMSI kullanımının seks kromozom anöplöidi ve düşük oranlarında azalmayı sağladığına dair bulgular saptanmıştır (118, 119) ancak yapılan meta analizlerde sonuçların ICSI'den farklı olmadığı görülmüştür (120).

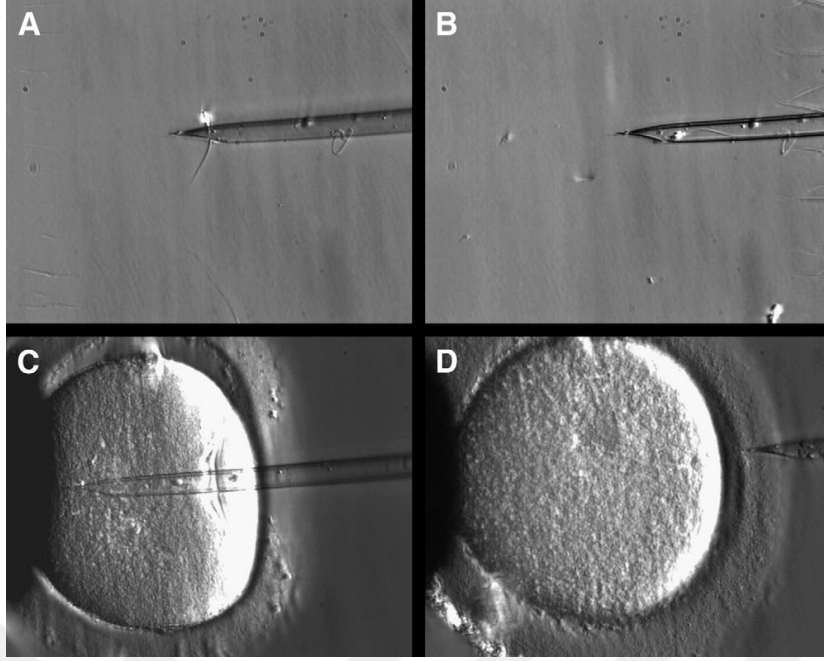
Çift Kırılma

DSÖ kriterlerine göre normal ve anormal sperm ayrıldığında, normal spermelerin ışığı çift kırıdıkları, bu yöntemle de sağlıklı spermelerin seçilebileceği anlaşılmıştır. Çift kırılmayı sağlayan matür spermelerin boynundaki subakrozomal protein mikrofilamentleridir. Polarize invert ışık mikroskopları kullanılır. Çift kırılma ile sperm morfolojisi, motilitesi ve canlılığı etkilenmeden akrozomu matür sağlıklı spermelerin seçilebilmesi sağlanmaktadır (121).



Şekil 8. Çift kırılma yöntemi ile sperm seçimi. A: Akrozom reaksiyonu gösteren sperm, B: akrozom reaksiyonu göstermeyen sperm C: çift kırılma göstermeyen, morfolojisi bozuk sperm (121)

Çift kırılmaya sahip spermeler seçilerek mikroenjeksiyon için kullanılabilir. Bu yöntemle yapılan mikroenjeksiyon yönteminde rutin ICSI işlemine göre daha yüksek gebelik oranı ve daha düşük gebelik kaybı oranı saptanmıştır (121).

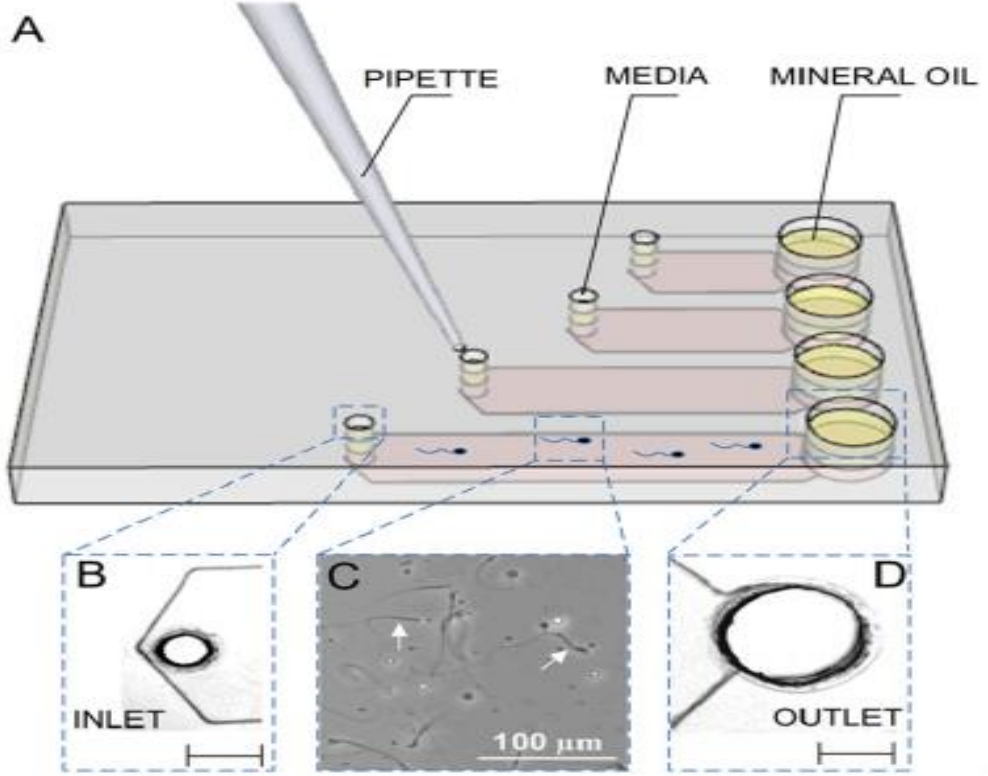


Şekil 9. Polarize ışık altında ICSI prosedürü. A: çift kırılma gösteren sperm seçimi, B: aspire edilmesi, C: oosit içine enjekte edilmesi D: oosit sitoplazmasında çift kırılma gösteren sperm (121)

Mikro Akışkan Sıvı Modeliyle Sperm Seçimi

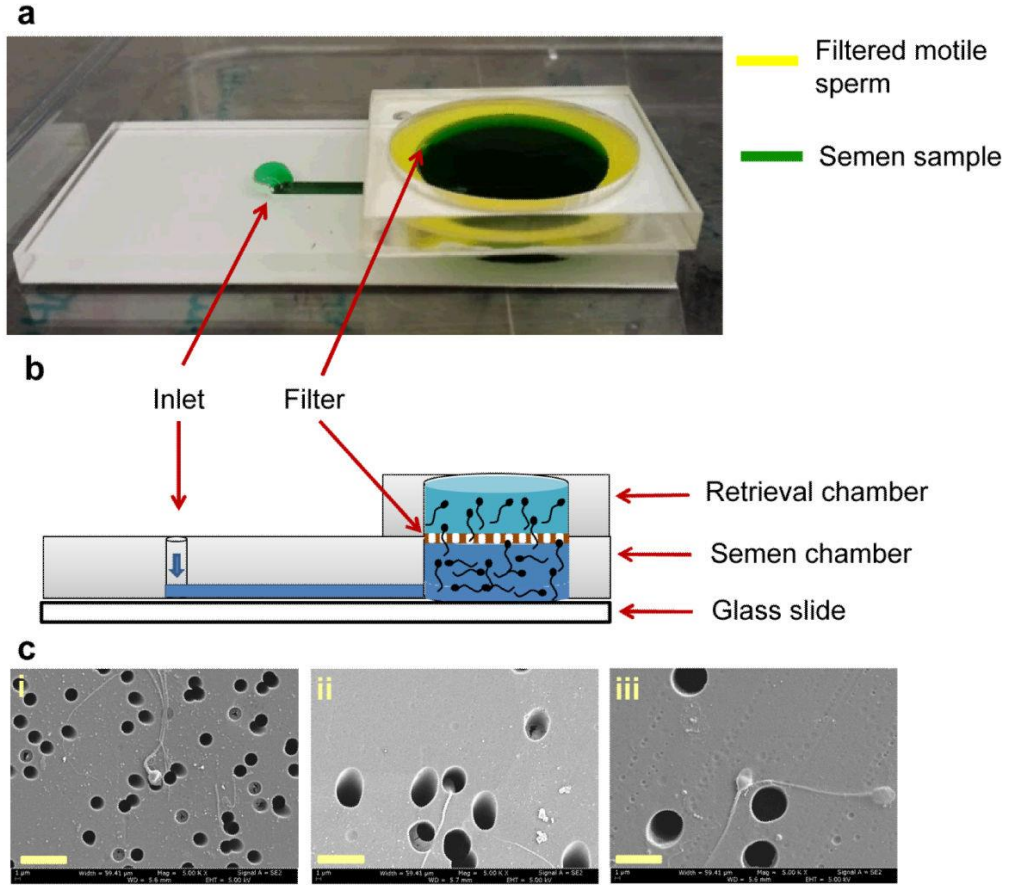
Mikro akışkan sıvı teknolojisi kendine özgün, konvansiyonel metotlara alternatif oluşturabilecek, küçük hacimlerdeki örneklerde bile etkili olması için tasarlanmış yeni sperm seçme yöntemleridir. Şu anda yaygın bir şekilde biyolojik ve kimyasal analizleri devam etmektedir. Mikro akışkan teknolojisinin temel amacı zarar verici santrifüj basamaklarını elimine etmektir. Bu araçlar spermeleri morfoloji ve motilitesine göre ayıklayan mikro kanallar içerir.

Mikro akışkan yöntemlerin birinde 1,5 mm kalınlığında polimetilmetakrilat kombinasyonu ve 50 µm kalınlığında çift taraflı yapışkan filmler kullanılarak akışkan kanallar oluşturulur. Bu kanallara sperm hareketlerini izlemek için “lensless charge-coupled” cihaz (CCD) eklenebilir ve istendiğinde sperm hareketlerini kaydedebilir. Sperm örneği daha önceden taze human tuba fluid medyum sıvısı ile doldurulmuş mikro kanalların girişine yüklenir. 37°C inkübatörde 30 dakika inkübe edilir. Ardından çıkış kısmındaki spermeler alınır (5).



Şekil 10. Mikro kanallara spermelerin yüklenmesi(5)

Bir diğer mikro akışkan yönteminde 3 mm kalınlığında polimetilmetakrilat ile 120 μm kalınlığında çift taraflı yapışkan filmler kullanılarak üst çember ve alt çemberlerin oluşturduğu bir huni oluşturulur. Üst ve alt çemberin oluşturduğu huni içerisine 3,5, 5 ve 8 μm kalınlığında polikarbonat membran filtrelerinden biri mevcuttur. Daha önceden yine bovine serum albümin ile zenginleştirilmiş human tubal fluid medyumunu ile doldurulmuş olan giriş alanına sperm enjekte edilir ve 37°C inkübatörde 15 dakika inkübe edildikten sonra sperm çıkış kısmından alınır. Sağlıklı ve motilitesi yüksek sperm aşağıdan yukarı doğru hareket ederek membranları aşar ve yukarı taraftaki çıkış kısmına ulaşır(4).



Şekil 11. Mikro akışkan yöntemlerle sperm seçimi. A: Sperm seçme kitinin yapısı, yeşil renkle gösterilen spermelerin sarı renkle gösterilen filtrelerden geçişi B: Sperm seçme kitinin çalışma prensibinin şematize hali C: spermeler ve i) 3µm ii) 5µm iii) 8µm porların fotoğrafları (4).

Mikro akışkan yöntemlerin kullanılmasıyla zor ve zahmetli sperm seçme yöntemlerinin yerine basit ve kullanışlı yöntemler geliştirilmesi planlanmıştır. Sperm seçen kişinin tecrübe faktörü de böylece ortadan kaldırılmış olur. Bu yöntemle elde edilen sperm örnekleri konvansiyonel yöntemlere göre daha düşük reaktif oksijen radikalleri ve daha düşük DNA fragmentasyon oranlarına sahip olduğunu gösteren çalışmalar vardır (4, 5).

Mikro akışkan sistemlerin yardımcı üreme tekniklerinde kullanımı ve gebelik sonuçları için hala klinik çalışmaların sonuçları beklenmektedir.

Çalışmamızda açıklanamayan infertilite hastalarının etiyolojisinde yer aldığı düşünülen defektif spermelerin yerine, mikro akışkan sıvı bazlı sperm seçme yöntemi olan Fertile Chip sperm seçme kitleri kullanarak ve konvansiyonel swim up yöntemi ile seçilen spermeler ile yapılan IVF-ICSI sikluslarının sonuçlarını karşılaştırmayı amaçladık.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1.Hasta Seçimi

Prospektif randomize kontrollü planlanan bu araştırma Başkent Üniversitesi Adana Uygulama ve Araştırma Merkezi Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite kliniğinde 27 Haziran 2015 ve 13 Nisan 2016 tarihleri arasında gerçekleştirildi. Klinik araştırma sürecine Klinik Araştırma ve Etik Kurul onayı (Proje No: KA15/132) ve T.C Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu onayı alındıktan sonra başlandı. *ClinicalTrials.gov*'dan NCT02488434 onay numarası ile onay alındı. 2010 yılında kliniğimizde Kılıçdağ E.B. ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada fertilizasyon oranı %65 bulunmuştu (122). Çalışma öncesi biyoistatistik ile yapılan çalışmalar sonrasında, bu çalışma baz alınarak fertilizasyon oranını %65'ten %80'e çıkaran %15'lik bir artış için, %10 hata payı ve %95 güvenilirlikle yapılan power analiz sonucunda 61 kontrol grubu ve 61 Fertile Chip grubu olmak üzere toplam hasta sayısı 122 olarak belirlendi. Hasta seçimleri ve randomizasyonu, açıklanamayan infertilite tanısı ile kontrollü ovaryan hiperstimülasyon tedavisine başlanan hastalarda hCG günü çalışmayla ilgisi olmayan bir hemşire tarafından seçilmesiyle oluşturuldu. Randomizasyon için kapalı zarflar 'Fertile Chip' ve 'Kontrol Grubu' olarak 1/1 oranında hazırlandı. Kontrol grubunda spermier konvansiyonel swim-up yöntemiyle seçildi, çalışma grubunda ise spermier Fertile sperm seçme çipleri ile seçildi. Ardından her iki gruptan elde edilen spermier ICSI ile oositlere enjekte edildi.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri:

- 20-37 yaş arası kadın hasta olması
- İlk iki siklusta olması
- Yapılan testler ve muayeneler sonucunda normal tubal pantesinin, normal uterin kavitesinin ve normal ovülasyonunun olması
- Bologna kriterlerine göre kötü ovaryan rezerv kriterlerine sahip olmaması
- 20-40 yaş arası erkek hasta olması
- DSÖ kriterlerine göre normal semen analiz sonuçlarına sahip olması
- Açıklanamayan infertilite hastaları olmasıdır.

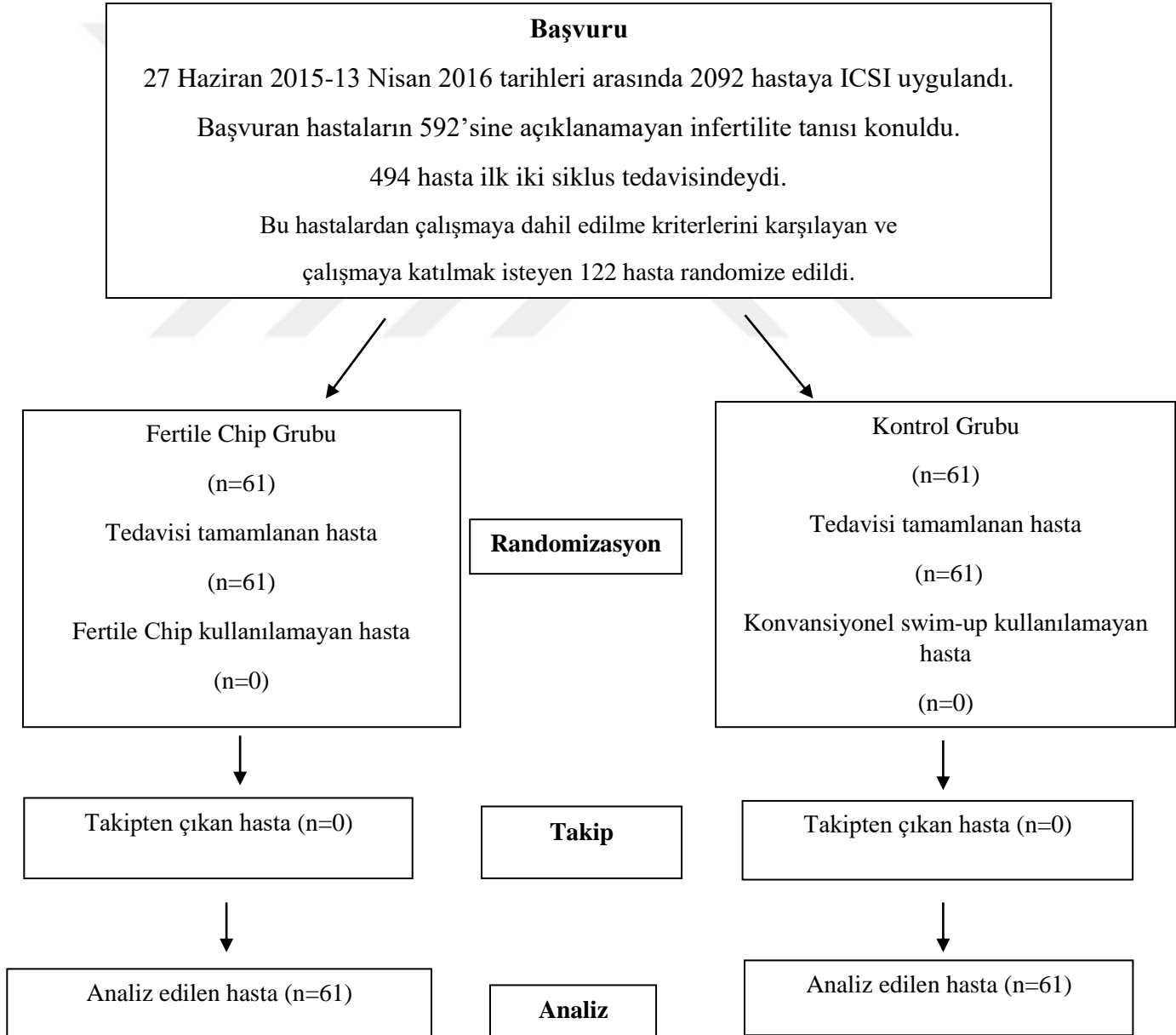
Çalışma dışı bırakılma kriterleri:

- Bologna kriterlerine göre kötü ovaryan rezerve sahip hastalar

- DSÖ kriterlerine göre anormal semen analiz sonucu olan erkek hastalar
- Ovülatuar veya tubal problemi olan hastalar,
- Endometrioması olan hastalar,
- Normal uterin kaviteye sahip olmayan hastalardır.

Çalışmanın birincil sonucu fertilizasyon oranı olarak alınmıştır. İkincil sonuçları ise klinik gebelik oranları olarak alınmıştır. Çalışmaya ilk hasta 27 Haziran 2015 tarihinde alındı ve 13 Nisan 2016 tarihinde son hastalar çalışmaya alınarak toplam 122 hastalık çalışma grubuna ulaşıldı. Aşağıda akış hasta seçimi akış seması özetlendi (Tablo1).

Tablo 1. Hasta seçimi akış seması



3.2.Sperm Seçimi

Sperm her iki grupta da hastalardan perhiz süreleri uygun şekilde mastürbasyonla alındıktan sonra 30 dakika likefaksiyona bırakıldı. Likefaksiyon sonrası sperm her gruplarına göre işlemlere alındılar.

Kontrol grubu:

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

Fertile Chip Grubu:

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

3.3.Embriyo Takibi

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

3.4.İstatistiksel Metot

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

değişkenler Multivariate Logistik Regresyon analizi ile test edilerek gebeliği etkileyen risk faktörleri belirlendi. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0.05 olarak alındı.



4. BULGULAR

Başkent Üniversitesi Adana Uygulama ve Araştırma hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite Merkezinde prospektif randomize olarak planlanan çalışmamızda power analiz sonucunda çalışmaya dahil edilen toplam 122 hastanın sonuçları analiz edildi.

Hastaların genel özellikleri

Çalışmaya dahil edilen infertil çiftlerde kontrol grubunda kadınların yaşı minimum 22, maksimum 37 yaş, ortalama yaşı $28,21 \pm 3,31$ yaş saptandı. Erkeklerin yaşı kontrol grubunda minimum 23, maksimum 40 yaş, ortalama yaşı $32,82 \pm 3,73$ yaş bulundu. Fertile chip grubunda ise kadınların yaşı minimum 20, maksimum 37 yaş, ortalama yaşı $28,61 \pm 2,96$ yaş olarak bulundu ($p=0,49$). Erkeklerin yaşı ise minimum 25, maksimum 40 yaş, ortalama yaş $32,74 \pm 3,72$ olarak saptandı ($p=0,90$). İnfertil çiftlerin ortalama yaşlarında istatistiksel olarak bir fark saptanmadı. Kontrol grubundaki hastaların infertilite süreleri minimum 1 yıl, maksimum 20 yıl, ortalama infertilite süresi $4,36 \pm 2,94$ yıl saptandı. Fertile grubunda minimum 1,5 yıl, maksimum 20 yıl, ortalama infertilite süresi ise $5,23 \pm 3,49$ yıl olarak saptandı. İnfertilite süreleri arasında istatistiksel bir fark saptanmadı ($p=0,14$) (Tablo 2).

Tedaviler öncesi kadın hastaların vücut kitle endeksi oranları, erkek hastaların semen analizleri incelendiğinde kontrol grubu ve Fertile grubunda vücut kitle endeksi (VKE) oranları ($p=0,86$), ortalama sperm sayısı ($p=0,27$) ve A+B grubu motilitesi olan spermelerin sayılarında ($p=0,37$) istatistiksel bir fark saptanmadı. Kadınların ise antral follikül sayıları kontrol grubunda ortalama $7,72 \pm 2,18$, Fertile grubunda ise $7,97 \pm 2,02$ olarak saptandı. İki grup arasında istatistiki olarak fark saptanmadı ($p=0,52$). Bulgular aşağıda özetlenmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Demografik veriler

	Fertile Chip (n=61)	Kontrol Grup (n:61)	p
Kadın Yaşı	28,61±2,96	28,21±3,31	0,49
Erkek Yaşı	32,74±3,72	32,82±3,73	0,90
İnfertilite Süresi (yıl)	5,23±3,49	4,36±2,94	0,14
VKE	24,19± 3,55	24,33± 4,37	0,86
Sperm Sayısı (x10 ⁶ /ml).	66 ±37	58±41	0,27
A+B Motilite (%)	57,08±14,84	54,70± 14,37	0,37
Antral Follikül Sayısı (n)	7,97± 2,02	7,72± 2,18	0,52

VKE: Vücut kitle endeksi

Hastaların tedavi özellikleri

Hastalara kontrollü ovaryan hiperstimülasyon tedavileri için başlanan ortalama FSH dozları kontrol grubunda 209,79±64,65 IU, Fertile grubunda ise 217,01±58,92 IU olarak saptandı (p=0,519). Hastalara kontrol grubunda ortalama 8,82±1,83 gün, Fertile grubunda ortalama 9,05±1,44 gün indüksiyon yapılarak totalde kontrol grubunda 2086,87±778,79 IU, Fertile grubunda 2111,89±650,61 IU FSH dozu kullanıldı (p=0,439 ve p=0,849). Tedaviye başlanan FSH dozları, indüksiyon süreleri ve total alınan FSH dozları karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 3).

Ovaryan hiperstimülasyon sonrası 14 mm ve üzeri follikül sayıları kontrol grubunda ortalama 11,43±5,58, Fertile grubunda ise ortalama 12,05±4,91 olarak hesaplandı. İki grup arasında anlamlı fark saptanmadı (p=0,519). Human chorionic gonadotropin (hCG) günü serumda bakılan estradiol düzeyleri kontrol grubunda ortalama 2125,20±1137,82 pg/mL, Fertile grubunda ise 2605,90±1391,47 pg/mL saptandı (p=0,040). hCG günü bakılan progesteron düzeyleri ise kontrol grubunda ortalama 0,92±0,43 ng/mL, Fertile grubunda ise 1,14±0,65 ng/mL olarak saptandı (p=0,032). Hem estradiol düzeyleri hem de progesteron düzeyleri Fertile grubunda anlamlı olarak daha yüksek izlendi. Hastaların hCG günü endometrial kalınlıkları kontrol grubunda ortalama 10,54±1,92 mm, Fertile grubunda 10,82±1,88 mm olarak saptandı. İki grup arasında anlamlı fark saptanmadı (p=0,403) (Tablo 3).

Kontrollü ovaryan hiperstimülasyon sonrası oosit toplama işlemlerinde aspire edilmesi öngörülen follikül sayıları kontrol grubunda 13,43±5,47, Fertile grubunda

13,30±4,97 olarak hesaplandı (p=0,885). Oosit toplama işlemlerinde elde edilen oosit sayıları kontrol grubunda 15,45±8,43, Fertile grubunda 16,62±7,30 (p=0,415), metafaz II (MII) oositler kontrol grubunda ortalama 11,70±7,29, Fertile grubunda 12,79±5,73 adet saptandı (p=0,363). İki grup arasında istatistiksel fark saptanmadı (Tablo 3).

Tablo 3. Kontrollü Ovarian Hiperstimülasyon Siklus Karakteristikleri

	Fertile Chip (n=61)	Kontrol Grup (n=61)	P
FSH başlangıç Dozu (IU)	217,01±58,92	209,79±64,65	0,519
İndüksiyon Süresi (gün)	9,05±1,44	8,82±1,83	0,439
Total GnRH Dozu (IU)	2605,90±1391,47	2086,87±778,79	0,849
hCG günü serum östradiol (pg/mL)*	2605,90±1391,47	2125,20±1137,82	0,040*
hCG günü serum progesteron (ng/mL)*	1,14±0,65	0,92±0,43	0,032*
hCG günü endometrium (mm.)	10,82±1,88	10,54±1,92	0,403
İndüksiyon sonrası oluşan follikül (n)	13,30±4,97	13,43±5,47	0,885
Aspire edilen oosit sayısı (n)	16,62±7,30	15,45±8,43	0,415
Metafaz II Oosit sayısı (n)	12,79±5,73	11,70±7,29	0,363

Pronükleus sayıları kontrol grubunda 6,62±4,90, Fertile grubunda 7,90±4,15; klivaj olan oosit sayıları kontrol grubunda ortalama 6,50±4,86, Fertile grubunda ortalama 7,51±4,27 olarak saptandı. Gruplar arasında pronükleus (p=0,122) ve klivaj olan oosit sayıları arasında (p=0,227) istatistiksel bir fark bulunmadı. Fertilizasyon oranları kontrol grubunda ortalama %57,42±21,90, Fertile grubunda ortalama %63,64±19,11 olarak hesaplandı. Çalışmamızın primer sonucu olan fertilizasyon oranları arasında istatistiksel fark saptanmadı (p=0,098) (Tablo 4).

ICSI işlemi sonrası elde edilen embriyo sayıları kontrol grubunda ortalama 6,48±4,87, Fertile grubunda ortalama 7,49±4,31 olarak saptandı (p=0,409). Kontrol grubunda transfer edilen grade 1 embriyo sayısı ortalama 0,62±0,61, grade 2 embriyo sayısı 0,54±0,65 saptanırken, Fertile Chip grubunda transfer edilen grade 1 embriyo sayısı ortalama 0,74±0,44, grade 2 embriyo sayısı ortalama 0,36±0,61 bulundu. Her iki grup arasında transfer edilen ortalama grade 1 embriyo sayısında (p=0,237) ve grade 2 embriyo sayısında (p=0,115) istatistiksel fark saptanmadı. Transfer edilen embriyo sayıları kontrol grubunda ortalama 1,11±0,52, Fertile Chip grubunda ortalama 0,98±0,46

bulundu. Bu fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p=0,095$). Ortalama transfer günü kontrol grubunda $4,83\pm 1,40$, Fertile Chip grubunda $3,72\pm 1,62$ olarak saptandı, bu fark anlamlı bulunmadı ($p=0,686$). Transfer günleri ayrı ayrı incelendiğinde her iki gruptaki hastaların 3, 4 ve 5. günlerdeki embriyo transferi yapılma oranları arasında istatistiksel olarak bir fark saptanmadı ($p=0,942$). Siklusu iptal edilen 12 hasta hariç, geriye kalan ve transferi yapılan 110 hasta için, transfer sonrası arda kalan embriyoların dondurulma oranları incelendi. Fertile grubunda transferi yapılan 54 hastanın 44'ünde (%81,5) embriyo dondurulma işlemi yapıldı. Kontrol grubunda ise transferi yapılan 56 hastanın 36'sında (%64,3) embriyo dondurma işlemi yapılabilirdi. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,04$). Bulgular aşağıda özetlenmiştir (Tablo 4).

Tablo 4.ICSI Sonrası Embriyoloji Verileri

	Fertile Chip	Kontrol Grup	p
Pronükleus (n)	7,90±4,15	6,62±4,90	0,122
Klivaj oosit (n)	7,51±4,27	6,50±4,86	0,227
Fertilizasyon oranı (%)	63,64±19,11	57,42±21,90	0,098
Embriyo Sayısı (n)	7,49±4,31	6,48±4,87	0,409
Grade1 embriyo (n)(Transfer edilen)	0,74±0,44	0,62±0,61	0,237
Grade2 embriyo (n)(Transfer edilen)	0,36±0,61	0,54±0,65	0,115
Transfer edilen Embriyo sayısı (n)	0,98±0,46	1,11±0,52	0,095
Transfer günü			
3.Gün (n)	20 (%32,8)	24 (%39,3)	
4.Gün (n)	3 (%4,9)	2 (%3,3)	0,942
5.Gün (n)	32 (%50,8)	29 (%49,2)	
Transfer sonrası dondurulmuş embriyosu olan hasta sayısı (n)*	44/54 (%81,5)	36/56 (%64,3)	0,04*

Kontrol gurubunda 5, Fertile grubunda ise 7 hastanın transferi yapılamadı. Kontrol grubundaki 5 hastadan ilkinde fertilizasyon olmaması nedeniyle, ikincisinde klivaj arresti nedeniyle, üçüncüsünde preimplantasyon genetik tanı nedeniyle, dördüncüsünde östradiol yüksekliği ve beşincisinde de progesteron yüksekliği nedeniyle tüm embriyoları donduruldu. Fertile Chip grubundaki 7 hastadan birisinde yüksek östradiol seviyesi nedeniyle, üçünde progesteron yüksekliği nedeniyle, birisinde klivaj

arresti, diğer ikisinde ise endometriumunun ince olması nedeniyle tüm embriyoları donduruldu. Bu transfer iptalleri için yapılan analizde her iki grup arasında anlamlı bir fark saptanmadı (%8,1-%11,4, p=0,208). Fertile grubundan 6 hastaya, kontrol grubundan 2 hastaya thawing transfer yapıldı. Taze ve dondurulmuş siklusları beraber değerlendirdiğimizde Fertile grubundan 1 hastanın klivaj arresti olması nedeniyle toplam 60 hastaya, kontrol grubunda 1 hastada PGD ile normal embriyo bulunamadığı için, 1 hastada fertilizasyon başarısızlığı ve 1 hastada da klivaj arresti olduğu için 58 hastaya transfer yapılabildi.

İptal edilen siklusların hepsine oosit toplama işlemi yapıldı ve total embriyo dondurma işlemine gidildi. Bu nedenle oosit toplama işlemi yapılmayan hasta olmadı. Toplam 122 hasta için siklus başına/ oosit toplama işlemi başına gebelik oranları Fertile grubunda %47,5, kontrol grubunda %50,8 olarak bulundu, ancak aralarında istatistiksel fark saptanmadı (p=0,43). Siklus başına ya da oosit toplama işlemi yapılan hasta başına klinik gebelik oranları incelendiğinde Fertile grubunda %41, kontrol grubunda %41 olarak saptandı. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p=0,57). Embriyo transferi başına gebelik oranları incelendiğinde Fertile grubunda %57,4, kontrol grubunda ise %51,7 bulundu (p=0,54). Embriyo transferi başına klinik gebelik oranlarına bakıldığında ise Fertile grubunda %46,3, kontrol grubunda %44,6 bulundu (p=0,39). Embriyo transferi başına gebelik ve klinik gebelik oranları arasında da istatistiksel bir fark saptanmadı. Tüm hastalar incelendiğinde çalışmaya dahil edilen hasta başına gebelik oranları Fertile grubunda %47,5, kontrol grubunda %42,6 olarak saptandı. Bu fark istatistiki olarak anlamlı bulunmadı (p=0,36). Bulgular aşağıda özetlenmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. Gebelik Sonuçları

	Fertil Chip	Kontrol Grup	p
Gebelik oranı (siklus başına %) (n)	50,8 (31/61)	47,5(29/61)	0,43
Klinik gebelik oranı (siklus başına %) (n)	41(25/61)	41(25/61)	0,57
Gebelik oranı (Taze ET başına %) (n)	57,4 (31/54)	51,7 (29/56)	0,54
Klinik gebelik (Taze ET başına %) (n)	46,3(25/54)	44,6(25/56)	0,39
Klinik gebelik (Dondurulmuş+Taze ET başına %) (n)	48,3 (29/60)	44,8(26/58)	0,35
Hasta başına gebelik oranı (Dondurulmuş+Taze %) (n)	47,5(29/61)	42,6(26/61)	0,36

E.T: Embriyo transferi

Çalışmamızın sonucunda tek tek incelendiğinde anlamlı sonuç olarak saptanan hCG günü serum östradiol (pg/mL) ve hCG günü serum progesteron(ng/mL) oranları regresyon analizinde incelenmiştir. Regresyon analizi sonucunda tek tek bakıldığında anlamlı görünen bu farkların gebelik sonucuna etkisi olmadığı, anlamlı bir fark yaratmadığı saptanmıştır ($p>0,05$). Regresyon analiz sonucu aşağıdaki tabloda özetlenmiştir (Tablo 6).

Tablo 6. Regresyon analizi

Regresyon analizi parametresi	p
hCG günü serum östradiol (pg/mL)	0,949
hCG günü serum progesteron(ng/mL)	0,586

5. TARTIŞMA

Bu randomize kontrollü çalışmada açıklanamayan infertilite hastalarının ICSI tedavileri sırasında sperm seçiminde Fertile Chip kullanımının klasik konvansiyonel swim-up yöntemine göre fertilizasyon oranı ve gebelik oranlarında farkı saptanmamıştır. Ancak transfer sonrası çalışma grubunda daha çok hastaya embriyo dondurma işlemi yapılmıştır.

Açıklanamayan infertilite kadın infertilitesinin %40, infertil çiftlerin %10-30'unu etkileyen ve sistematik bir değerlendirme sonrası sebep bulunamayan bir ekartasyon tanısıdır. Açıklanamayan infertilite nedeniyle tedavi gören çiftlere infertilite sebeplerinin günümüz teknoloji ve tetkikleriyle bulunamadığını, çiftin her ikisine de yapılan testlerin normal olduğunu belirttikten sonra onları tedavi başarısına inandırmak bazen oldukça güç olabilmektedir. Bu nedenle özellikle bu hastalarda başarıya ulaşmak için hem klinisyenler, hem de diğer bilimlerden araştırmacılar yoğun mesai harcamaktadırlar.

İleri düzey sperm seçim teknikleri ile ICSI tedavisinde kullanılacak daha kaliteli ve daha sağlıklı sperm bulunmaya çalışılmaktadır. Daha önce de bahsedilen bu yeni sperm seçme yöntemlerinin büyük çoğunluğunda, sperm arasında çalışılarak DNA bütünlüğü daha yüksek, DNA fragmentasyon oranı daha düşük sperm seçilebildiği gösterilmesine rağmen, yalnızca MACS, IMSI ve çift kırılma tekniklerinde klinik çalışmalar yapılmış ve gebelik üzerine etkisinin olup olmadığı gösterilmiştir (112, 120, 121). Mikro akışkan sıvı bazlı sperm seçim yöntemlerinden Fertile Chip ile de klinik çalışma bulunmamaktadır.

Mikro akışkan sıvı bazlı sperm seçme yöntemleri ile ilgili klinik bir çalışma bulunmadığından çalışmamızı planlarken daha önce sperm üzerine yapılan çalışmalarını baz aldık. Bu yöntemlerde sperm seçimi yapılırken hem kimyasal maddeler kullanılmadığından, hem de santrifüj ve karıştırma gibi yöntemler kullanılmadığından daha az oksijen radikali üretimine neden olduğu, ayrıca sperm seçme kitinin yapısı sayesinde kadın genital organının doğal yollarla yaptığı sperm seçimini taklit ettiği öne sürülmüştür. Bu sayede hem morfolojisi ve motilitesi en iyi olan sperm, hem de DNA bütünlüğü yüksek ve DNA fragmentasyon oranı düşük sperm seçilebildiği iddia edilmiştir (4, 5). Biz de açıklanamayan infertilite hastalarında konvansiyonel sperm seçimi yerine Fertile Chip ile sperm seçimi yaparak ICSI tedavisi yapılan hastalarda başarıyı arttırıp arttıramayacağımızı araştırdık. Sonuçlarımızı karşılaştırmak için Fertile

Chip ile yapılan klinik çalışma olmadığından diğer ileri düzey sperm seçme yöntemlerinin klinik çalışma sonuçlarını baz aldık.

Çift kırılma yöntemiyle 2008 yılında Gineroli L. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 112 adet normal, oligoastenospemik ve testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) spermlerinden oluşan örnekleri çift kırılma yöntemi ile seçerek ICSI tedavisi uygulanmıştır. 119 adet aynı özellikli kontrol grubunda ise spermler konvansiyonel yöntemlerle seçilmiş ve ICSI işlemi yapılmıştır. Çalışmalarında fertilizasyon oranları çalışma grubunda %74, kontrol grubunda % 72 saptanmış ve aralarında istatistiksel fark saptanmamıştır. Klivaj oranları arasında istatistiksel fark saptanmamıştır. Grade 1 embriyo oluşumu kontrol grubunda %20, çalışma grubunda %33 bulunmuştur ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,025$). Transfer edilen embriyo sayıları arasında ve klinik gebelik oranlarında anlamlı bir fark saptanamamıştır. Abortus yüzdeleri çalışma grubunda %16, kontrol grubunda % 41 saptanmıştır ($p=0,035$). Devam eden gebelik oranları da çalışma grubunda %23, kontrol grubunda % 11 saptanmıştır ($p<0,025$). Çalışma grubundaki düşük abort oranı ve yüksek devam eden gebelik oranı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (121).

Balaban B. ve arkadaşlarının 2011 yılında yayınladığı bir çalışmada 81 IMSI hastasının gebelik sonuçları 87 klasik ICSI hastasının sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Çalışmalarında infertilite sebeplerini erkek faktör, ovülatuar problemler, tubal problemler, çoklu nedenler ve açıklanamayan infertilite olarak sınıflara ayırmış ve her iki çalışma grubu arasında etiyolojik olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Her iki grup arasında sperm ve oosit sayısı ve kalitesi farkı olmayan çalışmanın analiz sonuçlarında pronükleus oranlarında, grade 1 ve grade 2 embriyo oranlarında ve transfer edilen embriyo oranlarında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Siklus başına klinik gebelik oranları ICSI'de %44,4, IMSI'de % 54 bulunmuştur ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Siklus başına canlı doğum oranları ICSI grubunda %38,3, IMSI grubunda %43,7 saptanmıştır. İmplantasyon oranı ICSI'de %16,7, IMSI'de %34 saptanmıştır. Siklus başına canlı doğum oranları ve implantasyon oranları arasında da istatistiksel fark saptanmamıştır (123).

IMSI için 2013 yılında Teixeira DM. ve arkadaşları tarafından derlenen cochrane derlemesinde ICSI ve IMSI tedavilerinin başarıları karşılaştırılmıştır. Bu meta-analizde 2008-2012 yılları arasında yayınlanan 9 çalışma derlenmiştir. Meta-analiz sonucunda

klirik gebelik, canlı doğum, düşük ve konjenital anomaliler karşılaştırılmış ve klinik gebelik oranları hariç anlamlı fark saptanmamıştır. 9 randomize kontrollü çalışmada 2014 kadın hasta sonucunda sadece klinik gebelik oranları IMSI kullanımında ICSI'ye göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla bulunmuştur (RR 1.29, 95% CI 1.07-1.56 $I^2=57%$, kanıt düzeyi oldukça düşük) (120).

2008 yılında Dirican E.K. ve arkadaşları tarafından yayınlanan 200 hastalık prospektif randomize bir çalışmada manyetik aktive hücre seçimi (MACS) ile klasik dansite gradient yöntemi ile yapılan ICSI başarıları karşılaştırılmıştır. Çalışmaya kadın faktör olmayan ancak oligozoospermisi, astenospermisi, oligoastenospermisi ve teratozoospermisi olan tüm erkek faktör hastalar dahil edilmiştir. Çalışma ve kontrol grubu arasında sperm parametreleri açısından anlamlı fark saptanmamıştır. Çalışmanın sonucunda fertilizasyon oranı çalışma MACS grubunda %69,52, kontrol grupta %69,9 saptanmış, her iki grup arasında fertilizasyon oranları arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Oluşan embriyo sayıları çalışma grubunda $7,7\pm 4,52$, kontrol grubunda $7,47\pm 4,11$ saptanmış, MACS grubunda oluşan embriyo sayısı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek saptanmıştır ($p<0,01$). Transfer sonrası implantasyon oranları arasında da fark saptanmamıştır. Kimyasal gebelik oranları ise MACS grubunda %61,47, kontrol grubunda %45,95 saptanmış ve kimyasal gebelik oranı MACS grubunda istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Klinik gebelik oranları ise MACS grubunda %48,36, kontrol grubunda %36,49 saptanmıştır. Klinik gebelik oranında istatistiksel fark saptanmamıştır ($p=0,052$) (124).

2013 yılında Gil M. ve arkadaşları tarafından MACS kullanımının sonuçları hakkında yayınladığı sistematik derleme ve meta-analizde 5 prospektif randomize çalışma değerlendirmeye alınmıştır. Meta-analiz sonucunda 4 çalışmadan 367 hasta analizi sonrası gebelik oranları MACS kullanımı sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek saptanmıştır (RR=1.50, 95 % CI 1.14–1.98 $I^2=4$). 2 çalışmada toplam 834 hasta ile yapılan meta analiz sonrası implantasyon oranlarında istatistiksel fark saptanmamıştır. Sadece bir çalışmada düşük oranları raporlanmış ve 60 hastalık çalışma grubunda yapılan analiz sonucunda istatistiksel bir fark saptanmamıştır (112).

Biz çalışmamızda öncelikle Fertile Chip grubunda kontrol grubuna göre hCG gününde istatistiksel olarak daha yüksek östradiol ve progesteron oranları saptadık. Bu fark ayrıca Fertile grubunda daha fazla iptal edilen siklus sayısının da bir nedeni olarak saptandı. Kontrol grubundaki 5 siklus iptali ve fertile grubundaki 7 siklus iptali istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadı. Analiz sonucunda anlamlı olarak görülen

fertile grubundaki yüksek östradiol ve progesteron oranları da regresyon analizi sonrası belirleyici öneme sahip olmadığı anlaşıldı.

Pronükleus, klivaj olan oosit oranları ve fertilizasyon oranları arasında fark saptanmadı. Gineroli L. ve arkadaşları çift kırılma yönteminde grade 1 embriyo sayısında anlamlı yüksek fark saptamışlardı (121) ancak biz çalışmamızda grade 1 ve grade 2 embriyo sayıları arasında fark saptamadık. Transfer edilen embriyo sayısı ve transfer günü arasında da fark saptamadık. Embriyo transferi yapılan hastaların geriye kalan embriyolarının dondurulma oranları incelendiğinde Fertile Chip grubunda daha fazla sayıda dondurma işlemi yapılabildiğini bulduk.

Çalışmamızın sonucunda gebelik oranları incelendiğinde, MACS ve IMSI klinik başarılarına ait meta-analizlerdeki anlamlı yüksek klinik gebelik başarılarının aksine (112, 120), siklus ve embriyo transferi başına hem gebelik hem de klinik gebelik oranları arasında fark saptanmadı.

Çalışmamızın negatif yönleri olarak çalışma sonucunda devam eden gebelik oranı, ve canlı doğum oranlarının verilmemesi gösterilebilir. Fertile Chip grubunda daha çok embriyo dondurma işlemi yapılabilmiş olması nedeniyle dondurulmuş embriyoların hepsi kullanıldıktan sonra hasta başına kümülatif gebelik oranlarının verilememiş olması çalışmanın gücünü azaltmaktadır.

Sonuç olarak biz çalışmamızda açıklanamayan infertilite hasta grubunun ICSI tedavilerinde sperm seçimi işlemi sırasında Fertile Chip kullanımının fertilizasyon, transfer edilen embriyo kalitesi ve gebelik başarısını etkilemediğini ancak Fertile Chip grubunda kontrol grubuna göre embriyo transferi sonrası arda kalan embriyoların dondurulma oranları daha yüksek olduğunu bulduk.

Daha yüksek sayıda çalışma gruplarıyla yapılan analizlerde sonuçlar değişebilir. Çalışma grubunun açıklanamayan infertilite yerine erkek faktör gibi sperm morfolojik parametreleri bozuk ya da DNA fragmantasyon oranları yüksek olan gruplar seçilerek farklı bulgular da saptanabilir. Konvansiyonel yöntemlerde yeterince tecrübe sahibi olan embriyologlar tarafından morfolojileri ve motiliteleri incelenen sperm, ileri düzey sperm seçme yöntemleri ile elde edilen spermle yakın özelliklerde seçiliyor olabilir. Daha yüksek oranda embriyo dondurma işlemi yapılan Fertile Chip grubunda dondurulmuş embriyoların tümünün kullanılması ile elde edilecek kümülatif gebelik oranlarının sonuçları bilinmediğinden total gebelik oranlarına etkisi olup olmayacağını

net olarak söylemek şimdilik mümkün değildir. Bu nedenle ileri düzey araştırmaların devamı uygun olacaktır.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışma grupları demografik verileri arasında istatistiksel fark saptanmadı.

Çalışma gruplarında hastaların tedavi protokolleri arasında istatistiksel fark saptanmadı.

hCG günü bakılan estradiol ve progesteron miktarları Fertile grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ancak regresyon analizinde bu farkın gebelik oranları üzerinde anlamı olmadığı anlaşıldı.

Kontrol grubunda 5, Fertile grubunda 7 siklus iptal edildi ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Çalışma gruplarında fertilizasyon oranları, grade 1, grade 2 embriyo sayısı ve toplam embriyo sayısı arasında istatistiksel fark saptanmadı.

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

Fertile Chip grubunda transfer sonrası geriye kalan embriyoların dondurulma oranı daha yüksek bulundu.

Çalışma grupları arasında hem siklus başına hem de oosit toplama işlemi başına gebelik oranları arasında istatistiksel fark saptanmadı.

Çalışmamız sonucunda açıklanamayan infertilite hastalarının ICSI tedavileri sırasında sperm seçiminde fertile chip kullanımının konvansiyonel yöntemlere göre gebelik sonuçları üzerine üstünlüğü bulunmadı ancak dondurulmuş embriyo oranları daha yüksek bulundu.

7. KAYNAKLAR

1. Athaullah N, Proctor M , Johnson N, Oral versus injectable ovulation induction agents for unexplained subfertility. *Cochrane Database Syst Rev*, 2002. 3.
2. Gunn DD , Bates GW, Evidence-based approach to unexplained infertility: a systematic review. *Fertility and sterility*, 2016.
3. Rappa KL, Rodriguez HF, Hakkarainen GC, Anchan RM, Mutter GL , Asghar W, Sperm processing for advanced reproductive technologies: Where are we today? *Biotechnology advances*, 2016.
4. Asghar W, Velasco V, Kingsley JL, Shoukat MS, Shafiee H, Anchan RM, Mutter GL, Tüzel E , Demirci U, Selection of functional human sperm with higher DNA integrity and fewer reactive oxygen species. *Advanced healthcare materials*, 2014. 3(10): p. 1671-1679.
5. Zhang X, Khimji I, Gurkan UA, Safaee H, Catalano PN, Keles HO, Kayaalp E , Demirci U, Lensless imaging for simultaneous microfluidic sperm monitoring and sorting. *Lab on a chip*, 2011. 11(15): p. 2535-2540.
6. Medicine. PCoASfR, Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. . *Fertil Steril*, 2008. 90: p. S60.
7. Wang X, Chen C, Wang L, Chen D, Guang W, French J , Group RHS, Conception, early pregnancy loss, and time to clinical pregnancy: a population-based prospective study. *Fertility and sterility*, 2003. 79(3): p. 577-584.
8. Gnoth C, Godehardt D, Godehardt E, Frank-Herrmann P , Freundl G, Time to pregnancy: results of the German prospective study and impact on the management of infertility. *Human Reproduction*, 2003. 18(9): p. 1959-1966.
9. Templeton A , Penney G, The incidence, characteristics, and prognosis of patients whose infertility is unexplained. *Fertility and sterility*, 1982. 37(2): p. 175-182.
10. Greenhall E , Vessey M, The prevalence of subfertility: a review of the current confusion and a report of two new studies. *Obstetrical & Gynecological Survey*, 1991. 46(6): p. 397-398.
11. Buckett W , Bentick B, The epidemiology of infertility in a rural population. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*, 1997. 76(3): p. 233-237.
12. Hull M, Glazener C, Kelly N, Conway D, Foster P, Hinton R, Coulson C, Lambert P, Watt E , Desai K, Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1985. 291(6510): p. 1693-1697.
13. Bhattacharya S, Porter M, Amalraj E, Templeton A, Hamilton M, Lee A , Kurinczuk J, The epidemiology of infertility in the North East of Scotland. *Human reproduction*, 2009. 24(12): p. 3096-3107.
14. Medicine PCotASfR, Optimal evaluation of the infertile female. *Fertility and sterility*, 2006. 86(5): p. S264-S267.
15. Westrom L, Effect of pelvic inflammatory disease on fertility. *Venereology: official publication of the National Venereology Council of Australia*, 1995. 8(4): p. 219-222.
16. Breitkopf D, Goldstein S , Seeds J, ACOG technology assessment in obstetrics and gynecology. Number 3, September 2003. *Saline infusion sonohysterography. Obstetrics and gynecology*, 2003. 102(3): p. 659-662.
17. Forseyl J, Caul E, Paul I , Hull M, Chlamydia trachomatis, tubal disease and the incidence of symptomatic and asymptomatic infection following hysterosalpingography. *Human reproduction*, 1990. 5(4): p. 444-447.

18. Stumpf P , March C, Febrile morbidity following hysterosalpingography: identification of risk factors and recommendations for prophylaxis. *Fertility and sterility*, 1980. 33(5): p. 487-492.
19. Dabekausen Y, Evers J, Land J , Stals F, Chlamydia trachomatis antibody testing is more accurate than hysterosalpingography in predicting tubal factor infertility. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 1994. 47(3): p. 318.
20. Moore D, Segars Jr J, Winfield A, Page D, Eisenberg A , Holburn G, Effects of contrast agents on the fallopian tube in a rabbit model. *Radiology*, 1990. 176(3): p. 721-724.
21. Lindequist S, Justesen P, Larsen C , Rasmussen F, Diagnostic quality and complications of hysterosalpingography: oil-versus water-soluble contrast media--a randomized prospective study. *Radiology*, 1991. 179(1): p. 69-74.
22. Grosskinsky CM, Clark RL, Wilson PA , Novotny DB, Pelvic granulomata mimicking endometriosis following the administration of oil-based contrast media for hysterosalpingography. *Obstetrics & Gynecology*, 1994. 83(5): p. 890-892.
23. Nunley Jr WC, Bateman BG, Kitchin III JD , Pope Jr TL, Intravasation During Hysterosalpingography Using Oil-Base Contrast Medium-a Second Look. *Obstetrics & Gynecology*, 1987. 70(3): p. 309-312.
24. Johnson N, Vandekerckhove P, Watson A, Lilford R, Harada T , Hughes E, Tubal flushing for subfertility. *Cochrane Database Syst Rev*, 2007. 11.
25. Grimbizis GF, Gordts S, Sardo ADS, Brucker S, De Angelis C, Gergolet M, Li T-C, Tanos V, Brölmann H , Gianaroli L, The ESHRE–ESGE consensus on the classification of female genital tract congenital anomalies. *Gynecological surgery*, 2013. 10(3): p. 199-212.
26. Karande VC, Pratt DE, Rabin DS , Gleicher N, The limited value of hysterosalpingography in assessing tubal status and fertility potential. *Fertility and sterility*, 1995. 63(6): p. 1167-1171.
27. Henig I, Prough S, Cheatwood M , DeLong E, Hysterosalpingography, laparoscopy and hysteroscopy in infertility. A comparative study. *The Journal of reproductive medicine*, 1991. 36(8): p. 573-575.
28. Cundiff G, Carr BR , Marshburn PB, Infertile couples with a normal hysterosalpingogram. Reproductive outcome and its relationship to clinical and laparoscopic findings. *The Journal of reproductive medicine*, 1995. 40(1): p. 19-24.
29. Corson SL, Cheng A , Jacqueline NG, Laparoscopy in the “normal” infertile patient: a question revisited. *The Journal of the American Association of Gynecologic Laparoscopists*, 2000. 7(3): p. 317-324.
30. Evers J, Land JA , Mol BW. Evidence-based medicine for diagnostic questions. in *Seminars in reproductive medicine*. 2003.
31. Swart P, Mol BW, van der Veen F, van Beurden M, Redekop WK , Bossuyt PM, 3. The diagnostic performance of hysterosalpingography in the diagnosis of tubal pathology, a meta-analysis. *Fertility and sterility*, 1995. 64: p. 486-91.
32. Bilgin H, Özcan B , Bilgin T, Methemoglobinemia induced by methylene blue perturbation during laparoscopy. *Acta anaesthesiologica scandinavica*, 1998. 42(5): p. 594-595.
33. Bates G, Garza D , Garza M, Clinical manifestations of hormonal changes in the menstrual cycle. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*, 1990. 17(2): p. 299-310.

34. Wathen N, Perry L, Lilford R , Chard T, Interpretation of single progesterone measurement in diagnosis of anovulation and defective luteal phase: observations on analysis of the normal range. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1984. 288(6410): p. 7-9.
35. Fritz MA, The modern infertility evaluation. *Clinical obstetrics and gynecology*, 2012. 55(3): p. 692-705.
36. Hull M, McLeod F, Joyce D, Ray B , McDermott A, Human in-vitro fertilisation, in-vivo sperm penetration of cervical mucus, and unexplained infertility. *The Lancet*, 1984. 324(8397): p. 245-246.
37. Landgren B-M, Undén A-L , Diczfalusy E, Hormonal profile of the cycle in 68 normally menstruating women. *Acta Endocrinologica*, 1980. 94(1): p. 89-98.
38. Jordan J, Craig K, Clifton DK , Soules M, Luteal phase defect: the sensitivity and specificity of diagnostic methods in common clinical use. *Fertility and sterility*, 1994. 62(1): p. 54-62.
39. Miller PB , Soules MR, The usefulness of a urinary LH kit for ovulation prediction during menstrual cycles of normal women. *Obstetrics & Gynecology*, 1996. 87(1): p. 13-17.
40. Ecochard R, Marret H, Rabilloud M, Bradaï R, Boehringer H, Giroto S , Barbato M, Sensitivity and specificity of ultrasound indices of ovulation in spontaneous cycles. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2000. 91(1): p. 59-64.
41. McGee EA , Hsueh AJ, Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles 1. *Endocrine reviews*, 2000. 21(2): p. 200-214.
42. Sallam HN, Ezzeldin F, Agameya A-F, Abdel-Rahman AF , El-Garem Y, The definition of 'poor response': Bologna criteria. *Human reproduction*, 2011: p. der398.
43. Barroso G, Oehninger S, Monzó A, Kolm P, Gibbons WE , Muasher SJ, Clinical Assisted Reproduction: High FSH: LH Ratio and Low LH Levels in Basal Cycle Day 3: Impact on Follicular Development and IVF Outcome. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 2001. 18(9): p. 499-505.
44. Bukman A , Heineman M, Ovarian reserve testing and the use of prognostic models in patients with subfertility. *Human reproduction update*, 2001. 7(6): p. 581-590.
45. Scott Jr R , Hofmann G, Prognostic assessment of ovarian reserve. *Fertility and sterility*, 1995. 63(1): p. 1-11.
46. Broekmans F, Kwee J, Hendriks D, Mol B , Lambalk C, A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Human reproduction update*, 2006. 12(6): p. 685-718.
47. McIlveen M, Skull J , Ledger W, Evaluation of the utility of multiple endocrine and ultrasound measures of ovarian reserve in the prediction of cycle cancellation in a high-risk IVF population. *Human reproduction*, 2007. 22(3): p. 778-785.
48. Muttukrishna S, McGarrigle H, Wakim R, Khadum I, Ranieri D , Serhal P, Antral follicle count, anti-mullerian hormone and inhibin B: predictors of ovarian response in assisted reproductive technology? *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 2005. 112(10): p. 1384-1390.
49. Kupesic S, Kurjak A, Bjelos D , Vujisic S, Three-dimensional ultrasonographic ovarian measurements and in vitro fertilization outcome are related to age. *Fertility and sterility*, 2003. 79(1): p. 190-197.
50. Kwee J, Elting ME, Schats R, McDonnell J , Lambalk CB, Ovarian volume and antral follicle count for the prediction of low and hyper responders with in vitro fertilization. *Reprod Biol Endocrinol*, 2007. 5(9).

51. Mercé LT, Barco MJ, Bau S , Troyano JM, Prediction of ovarian response and IVF/ICSI outcome by three-dimensional ultrasonography and power Doppler angiography. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2007. 132(1): p. 93-100.
52. Weenen C, Laven JS, von Bergh AR, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, Kramer P, Fauser BC , Themmen AP, Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Molecular human reproduction*, 2004. 10(2): p. 77-83.
53. Sowers MR, Eyvazzadeh AD, McConnell D, Yosef M, Jannausch ML, Zhang D, Harlow S , Randolph Jr JF, Anti-mullerian hormone and inhibin B in the definition of ovarian aging and the menopause transition. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2008. 93(9): p. 3478-3483.
54. Tsepelidis S, Devreker F, Demeestere I, Flahaut A, Gervy C , Englert Y, Stable serum levels of anti-Müllerian hormone during the menstrual cycle: a prospective study in normo-ovulatory women. *Human reproduction*, 2007. 22(7): p. 1837-1840.
55. Reuss ML, Kline J, Santos R, Levin B , Timor-Tritsch I, Age and the ovarian follicle pool assessed with transvaginal ultrasonography. *American journal of obstetrics and gynecology*, 1996. 174(2): p. 624-627.
56. Scheffer GJ, Broekmans FJ, Dorland M, Habbema JD, Looman CW , te Velde ER, Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility. *Fertility and sterility*, 1999. 72(5): p. 845-851.
57. Hendriks DJ, Mol B-WJ, Bancsi LF, te Velde ER , Broekmans FJ, Antral follicle count in the prediction of poor ovarian response and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis and comparison with basal follicle-stimulating hormone level. *Fertility and sterility*, 2005. 83(2): p. 291-301.
58. Bancsi LF, Broekmans FJ, Eijkemans MJ, de Jong FH, Habbema JDF , te Velde ER, Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertility and sterility*, 2002. 77(2): p. 328-336.
59. Frattarelli JL, Lauria-Costab DF, Miller BT, Bergh PA , Scott RT, Basal antral follicle number and mean ovarian diameter predict cycle cancellation and ovarian responsiveness in assisted reproductive technology cycles. *Fertility and sterility*, 2000. 74(3): p. 512-517.
60. Frattarelli JL, Levi AJ, Miller BT , Segars JH, A prospective assessment of the predictive value of basal antral follicles in in vitro fertilization cycles. *Fertility and sterility*, 2003. 80(2): p. 350-355.
61. Ng EHY, Tang OS , Ho PC, The significance of the number of antral follicles prior to stimulation in predicting ovarian responses in an IVF programme. *Human Reproduction*, 2000. 15(9): p. 1937-1942.
62. Medicine PCotASfR, Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. *Fertility and sterility*, 2012. 98(2): p. 294-301.
63. Tyler J, Crockett N , Driscoll G, Studies of human seminal parameters with frequent ejaculation. I. Clinical characteristics. *Clinical reproduction and fertility*, 1982. 1(4): p. 273-285.
64. Pellestor F, Girardet A , Andreo B, Effect of long abstinence periods on human sperm quality. *International journal of fertility and menopausal studies*, 1993. 39(5): p. 278-282.
65. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, Carson SA, Cisneros P, Steinkampf MP , Hill JA, Sperm morphology, motility,

- and concentration in fertile and infertile men. *New England Journal of Medicine*, 2001. 345(19): p. 1388-1393.
66. Jørgensen N, Andersen A-G, Eustache F, Irvine DS, Suominen J, Petersen JH, Andersen AN, Auger J, Cawood EH, Horte A, Regional differences in semen quality in Europe. *Human Reproduction*, 2001. 16(5): p. 1012-1019.
 67. Swan SH, Brazil C, Drobnis EZ, Liu F, Kruse RL, Hatch M, Redmon JB, Wang C, Overstreet JW, Group SFFFR, Geographic differences in semen quality of fertile US males. *Environmental Health Perspectives*, 2003. 111(4): p. 414.
 68. Cooper TG, Noonan E, Von Eckardstein S, Auger J, Baker HG, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT, World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human reproduction update*, 2009: p. dmp048.
 69. Meeting JFWCoFA, Organization WH, Evaluation of Certain Food Additives: Seventy-first Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Vol. 71. 2010: World Health Organization.
 70. Willott G, Frequency of azoospermia. *Forensic science international*, 1982. 20(1): p. 9-10.
 71. Jarow J, Espeland M, Lipshultz L, Evaluation of the azoospermic patient. *The Journal of urology*, 1989. 142(1): p. 62-65.
 72. Kruger T, Acosta A, Simmons K, Swanson R, Matta J, Oehninger S, Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertility and sterility*, 1988. 49(1): p. 112-117.
 73. Menkveld R, Stander FS, Kruger TF, van Zyl JA, The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Human Reproduction*, 1990. 5(5): p. 586-592.
 74. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Veeck LL, Morshedi M, Brugo S, New method of evaluating sperm morphology with predictive value for human in vitro fertilization. *Urology*, 1987. 30(3): p. 248-251.
 75. Hernandez M, Molina R, Olmedo J, Olmedo SB, Coetzee K, Estofan D, Prognostic value of the strict criteria: an Argentinian experience. *Archives of andrology*, 1996. 37(2): p. 87-89.
 76. Kihaille PE, Misumi J, Hirotsuru K, Kumasako Y, Kisanga RE, Utsunomiya T, Comparison of sibling oocyte outcomes after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization in severe teratozoospermic patients in the first cycle. *International journal of andrology*, 2003. 26(1): p. 57-62.
 77. Wolff H, The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertility and sterility*, 1995. 63(6): p. 1143-1157.
 78. Ludwig M, Vidal A, Huwe P, Diemer T, Pabst W, Weidner W, Significance of inflammation on standard semen analysis in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Andrologia*, 2003. 35(3): p. 152-156.
 79. Veron GL, Molina RI, Tissera AD, Estofan GM, Marin-Briggiler CI, Vazquez-Levin MH, Incidence of Sperm Surface Autoantibodies and Relationship with Routine Semen Parameters and Sperm Kinematics. *Am J Reprod Immunol*, 2016.
 80. Organization WH, WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010.
 81. Barratt C, Tomlinson M, Cooke I, Prognostic significance of computerized motility analysis for in vivo fertility. *Fertility and sterility*, 1993. 60(3): p. 520-525.

82. Krause W, Computer-assisted semen analysis systems: comparison with routine evaluation and prognostic value in male fertility and assisted reproduction. *Human Reproduction*, 1995. 10(suppl 1): p. 60-66.
83. Macleod I , Irvine D, Andrology: The predictive value of computer-assisted semen analysis in the context of a donor insemination programme. *Human Reproduction*, 1995. 10(3): p. 580-586.
84. Evenson D, Jost L, Marshall D, Zinaman M, Clegg E, Purvis K, De Angelis P , Claussen O, Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction*, 1999. 14(4): p. 1039-1049.
85. Hosseinifar H, Sabbaghian M, Chehrazi M, Modarresi T, Alipour FJ , Gilani MAS, Assessment of deoxyribonucleic acid fragmentation index, testicular volume, semen parameters, and hormone profile in gonadotropin-treated men with hypogonadotropic hypogonadism. *Urology*, 2013. 82(6): p. 1291-1295.
86. Aktan G, Dođru-Abbasođlu S, Kűcűkgergin C, Kadiođlu A, ńzdemirler-Erata G , Koćak-Toker N, Mystery of idiopathic male infertility: is oxidative stress an actual risk? *Fertility and sterility*, 2013. 99(5): p. 1211-1215.
87. Wdowiak A, Bakalczuk S , Bakalczuk G, The effect of sperm DNA fragmentation on the dynamics of the embryonic development in intracytoplasmatic sperm injection. *Reproductive biology*, 2015. 15(2): p. 94-100.
88. workshop RotE, on ‘Unexplained Infertility’. Anacapri AY , 1993;8:977Y980 HR.
89. Maheshwari A, Hamilton M , Bhattacharya S, Effect of female age on the diagnostic categories of infertility. *Human reproduction*, 2008. 23(3): p. 538-542.
90. Collins JA, Burrows E , Wilan A, The prognosis for live birth among untreated infertile couples. *Fertility and sterility*, 1995. 64(1): p. 22-28.
91. Ray A, Shah A, Gudi A , Homburg R, Unexplained infertility: an update and review of practice. *Reproductive biomedicine online*, 2012. 24(6): p. 591-602.
92. Bhattacharya S, Harrild K, Mollison J, Wordsworth S, Tay C, Harrold A, McQueen D, Lyall H, Johnston L , Burrage J, Clomifene citrate or unstimulated intrauterine insemination compared with expectant management for unexplained infertility: pragmatic randomised controlled trial. *Bmj*, 2008. 337: p. a716.
93. Guzick D, Sullivan M, Adamson GD, Cedars M, Falk R, Peterson E , Steinkampf M, Efficacy of treatment for unexplained infertility. *Fertility and sterility*, 1998. 70(2): p. 207-213.
94. Deaton JL, Gibson M, Blackmer K, Nakajima S, Badger G , Brumsted J, A randomized, controlled trial of clomiphene citrate and intrauterine insemination in couples with unexplained infertility or surgically corrected endometriosis. *Fertil Steril*, 1990. 54(6): p. 1083-1088.
95. Steures P, van der Steeg JW, Hompes PG, Habbema JDF, Eijkemans MJ, Broekmans FJ, Verhoeve HR, Bossuyt PM, van der Veen F , Mol BW, Intrauterine insemination with controlled ovarian hyperstimulation versus expectant management for couples with unexplained subfertility and an intermediate prognosis: a randomised clinical trial. *The Lancet*, 2006. 368(9531): p. 216-221.
96. Diamond MP, Legro RS, Coutifaris C, Alvero R, Robinson RD, Casson P, Christman GM, Ager J, Huang H , Hansen KR, Letrozole, Gonadotropin, or Clomiphene for Unexplained Infertility. *New England Journal of Medicine*, 2015. 373(13): p. 1230-1240.
97. Berker B, Kahraman K, Taskin S, Sukur YE, Sonmezer M , Atabekoglu CS, Recombinant FSH versus clomiphene citrate for ovarian stimulation in couples

- with unexplained infertility and male subfertility undergoing intrauterine insemination: a randomized trial. *Archives of gynecology and obstetrics*, 2011. 284(6): p. 1561-1566.
98. Dankert T, Kremer J, Cohlen B, Hamilton C, Pasker-de Jong P, Straatman H , van Dop P, A randomized clinical trial of clomiphene citrate versus low dose recombinant FSH for ovarian hyperstimulation in intrauterine insemination cycles for unexplained and male subfertility. *Human Reproduction*, 2007. 22(3): p. 792-797.
 99. Baysoy A, Serdaroglu H, Jamal H, Karatekeli E, Ozornek H , Attar E, Letrozole versus human menopausal gonadotrophin in women undergoing intrauterine insemination. *Reproductive biomedicine online*, 2006. 13(2): p. 208-212.
 100. Gregoriou O, Vlahos NF, Konidaris S, Papadias K, Botsis D , Creatsas GK, Randomized controlled trial comparing superovulation with letrozole versus recombinant follicle-stimulating hormone combined with intrauterine insemination for couples with unexplained infertility who had failed clomiphene citrate stimulation and intrauterine insemination. *Fertility and sterility*, 2008. 90(3): p. 678-683.
 101. Goverde AJ, McDonnell J, Vermeiden JP, Schats R, Rutten FF , Schoemaker J, Intrauterine insemination or in-vitro fertilisation in idiopathic subfertility and male subfertility: a randomised trial and cost-effectiveness analysis. *The lancet*, 2000. 355(9197): p. 13-18.
 102. Foong SC, Fleetham JA, O’Keane JA, Scott SG, Tough SC , Greene CA, A prospective randomized trial of conventional in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in unexplained infertility. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 2006. 23(3): p. 137-140.
 103. Reindollar RH, Regan MM, Neumann PJ, Levine B-S, Thornton KL, Alper MM , Goldman MB, A randomized clinical trial to evaluate optimal treatment for unexplained infertility: the fast track and standard treatment (FASTT) trial. *Fertility and sterility*, 2010. 94(3): p. 888-899.
 104. Pasqualotto FF, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ , Agarwal A, Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertility and sterility*, 2000. 73(3): p. 459-464.
 105. Wright C, Milne S , Leeson H, Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. *Reproductive biomedicine online*, 2014. 28(6): p. 684-703.
 106. Eisenbach M , Giojalas LC, Sperm guidance in mammals—an unpaved road to the egg. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2006. 7(4): p. 276-285.
 107. González-Marín C, Gosálvez J , Roy R, Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *International journal of molecular sciences*, 2012. 13(11): p. 14026-14052.
 108. Tahir Beydola RKS, Ashok Agarwal, Sperm Preparation and Selection Techniques.
erişim: https://www.clevelandclinic.org/reproductiveresearchcenter/info/2010/Beydola-T_Sharma-RK-2013.pdf, 2010. erişim tarihi: 15.05.2016.
 109. Ghaleno LR, Valojerdi MR, Janzamin E, Chehrazi M, Sharbatoghli M , Yazdi RS, Evaluation of conventional semen parameters, intracellular reactive oxygen species, DNA fragmentation and dysfunction of mitochondrial membrane potential after semen preparation techniques: a flow cytometric study. *Archives of gynecology and obstetrics*, 2014. 289(1): p. 173-180.

110. Ishijima S, Okuno M , Mohri H, Zeta potential of human X-and Y-bearing sperm. *International journal of andrology*, 1991. 14(5): p. 340-347.
111. Kheirollahi-Kouhestani M, Razavi S, Tavalae M, Deemeh M, Mardani M, Moshtaghian J , Nasr-Esfahani M, Selection of sperm based on combined density gradient and Zeta method may improve ICSI outcome. *Human reproduction*, 2009. 24(10): p. 2409-2416.
112. Gil M, Sar-Shalom V, Sivira YM, Carreras R , Checa MA, Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 2013. 30(4): p. 479-485.
113. Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovanci E, Ward D, Ravelli A , Huszar G, Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertility and sterility*, 2005. 84(6): p. 1665-1673.
114. Nasr-Esfahani MH, Razavi S, Vahdati A, Fathi F , Tavalae M, Evaluation of sperm selection procedure based on hyaluronic acid binding ability on ICSI outcome. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 2008. 25(5): p. 197-203.
115. Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Ciampaglia W , Filicori M, "Physiologic ICSI": hyaluronic acid (HA) favors selection of spermatozoa without DNA fragmentation and with normal nucleus, resulting in improvement of embryo quality. *Fertility and sterility*, 2010. 93(2): p. 598-604.
116. Fleming S, Ilad R, Griffin AG, Wu Y, Ong K, Smith H , Aitken R, Prospective controlled trial of an electrophoretic method of sperm preparation for assisted reproduction: comparison with density gradient centrifugation. *Human reproduction*, 2008. 23(12): p. 2646-2651.
117. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezo Y , Barak Y, Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl*, 2002. 23(1): p. 1-8.
118. Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, d'Angelo D , Antinori S, Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection: a prospective randomized trial. *Reproductive biomedicine online*, 2008. 16(6): p. 835-841.
119. Rita de Cássia SF, Braga DP, Setti AS, Iaconelli A , Borges E, Morphological nuclear integrity of sperm cells is associated with preimplantation genetic aneuploidy screening cycle outcomes. *Fertility and sterility*, 2011. 95(3): p. 990-993.
120. Teixeira DM, Barbosa MA, Ferriani RA, Navarro PA, Raine-Fenning N, Nastri CO , Martins WP, Regular (ICSI) versus ultra-high magnification (IMSI) sperm selection for assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev*, 2013. 7: p. Cd010167.
121. Gianaroli L, Magli MC, Collodel G, Moretti E, Ferraretti AP , Baccetti B, Sperm head's birefringence: a new criterion for sperm selection. *Fertility and sterility*, 2008. 90(1): p. 104-112.
122. Kilicdag EB, Haydardedeoglu B, Cok T, Hacivelioglu SO , Bagis T, Premature progesterone elevation impairs implantation and live birth rates in GnRH-agonist IVF/ICSI cycles. *Arch Gynecol Obstet*, 2010. 281(4): p. 747-52.
123. Balaban B, Yakin K, Alatas C, Oktem O, Isiklar A , Urman B, Clinical outcome of intracytoplasmic injection of spermatozoa morphologically selected under high magnification: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online*, 2011. 22(5): p. 472-6.

124. Dirican EK, Özgün OD, Akarsu S, Akın KO, Ercan Ö, Uğurlu M, Çamsarı Ç, Kanyılmaz O, Kaya A , Ünsal A, Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. Journal of assisted reproduction and genetics, 2008. 25(8): p. 375-381.

