



T.C

**TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI ve DOĞUM ANA BİLİM DALI**

**İNTRAUTERİN İNSEMINASYON (IUD) SIKLUSLARINDA
HYALÜRAN BAĞLANMA TESTİNİN (HBA) PROGNOSTİK
ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

HAZIRLAYAN:

Dr. Melahat YILDIRIM

TEZ DANIŞMANI:

Doç. Dr. Z. Candan İLTEMİR DUVAN

ANKARA 2013

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim süresince engin bilgi, beceri ve deneyimlerinden yararlandığım, hiçbir zaman destek ve imkanlarını esirgemeyen başta Kadın hastalıkları ve doğum ana bilim dalı başkanı Prof. Dr. Hasan Kafalı'ya, tez hocam Doç. Dr. Z.Candan İltemir Duvan ve diğer bütün öğretim görevlisi hocalarıma, Embriyolog Aslı ve Gülsüm hanıma, her zaman yanımda olan asistan arkadaşlarım, hemşire ve personelimize, eşime ve çocuklarıma sonsuz destekleri için teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Melahat Yıldırım

Temmuz 2013

ÖZET

İnfertil çiftlerde yardımcı üreme tekniklerinden (YÜT) hangisinin kullanılarak en kısa sürede gebelik elde edileceği konusu tam bir muammadır. En önemli sorun, hangi hastanın IUI denemesi için yönlendirileceği ve hangi hastanın da IUI ile vakit kaybetmeden in vitro fertilizasyon/ intrastoplazmik sperm injeksiyonu (IVF/ICSI) prosedürüne yönlendirileceğidir. IUI'da başarının kısıtlı olması nedeniyle bu tedavide başarıyı arttırmak amacıyla kaba spermiograma ek olarak en azından spermlerin matürasyonu hakkında bize bilgi verecek ve tedavide de yol gösterici olacak testlere ihtiyaç vardır. Biz bu çalışma ile daha önce IVF/ICSI hastalarında sperm seçim metodu olarak kullanılan HBA testinin, IUI sikluslarındaki prognostik değerini araştırmayı planladık. Hyaluran oosit etrafındaki kümülüs ooforusta bulunan bir kollajen olup spermin oosite bağlanmasına yardımcı olur. Ne kadar çok sperm hyalurona penetre olursa fertilizasyon yeteneğinin o kadar iyi olduğu var sayılır. Bundan yola çıkılarak hazırlanan kitte (HBA-hyalurone binding assay) spermin maturasyonu ve fertilizasyon kapasitesi ölçülmektedir.

HBA testi ile matürasyonu yüksek, DNA hasar oranı düşük spermler seçildiğinden, HBA oranı yüksek sperme sahip çiftlerde, IUI başarısının artacağını, böylece bu testle, IUI tedavisinden gerçekten fayda görebilecek bir hasta grubu seçebileceğimizi düşündük. Bu çalışma 01.03.2012-15.03.2013 tarihleri arasında Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı polikliniğine infertilite yakınması ile başvuran hastalarda prospektif olarak gerçekleştirildi. Çalışmaya temel infertilite değerlendirmesi sonrası izah edilemeyen

veya erkek faktör infertilitesi tanısı konulan ve birinci basamak tedavi olarak IUI planlanan 55 hastada uygulanan 55 siklus dahil edildi. Bütün hastalara 3-4 günlük cinsel perhiz süresinden sonra, planlanan IUI işleminden birkaç saat önce mastürbasyon yoluyla steril kutuda toplanan ve hastanemiz androloji laboratuvarında dansite gradient yöntemiyle hazırlanan sperm numunesiyle tek seans IUI yapıldı. IUI işlemi öncesi alınan taze sperm örneğinden HBA testi yapıldı. HBA oranları ile IUI sonuçları karşılaştırıldı. HBA değerleri ile gebelik arasında bir korelasyon tesbit edilemez iken HBA ile sperm sayısı, motilitesi, morfolojisi, TMSS ve IMSS değerleri arasında anlamlı bir korelasyon tesbit edildi.

ABSTRACT

Assisted reproductive technologies are medical techniques that help couples conceive. The question of which assisted reproductive technique results in pregnancy within the shortest period is still a subject of debate. While intra uterine insemination (IUI) may lead to conception in some couples, it could prove to be unsuccessful in many others despite many trials. Here the vital question is which patient should be scheduled for IUI trial and which patient should start In Vitro Fertilization (IVF) procedure without delay. The objective of this study is to determine sperm maturation and fertilization using Hyaluronan binding assay (HBA) in a fresh semen sample. Using HBA rates patient can be directed to IVF treatment without losing time with IUI procedure.

Hyaluronan is a collagen around oocyte's outer cumulus oophorus layer that helps sperm bind to oocyte. It is usually assumed that greater sperm penetration to hyaluronan leads to better fertilization capacity. The HBA kit prepared based on this premise measures the maturation and fertilization capacity of sperm.

The study is conducted in Turgut Ozal University Medical School, department of obstetrics and gynecology between March 2012 and March 2013. 55 couples with unexplained infertility or mild male factor infertility enrolled in our study.

On the day of IUI procedure, HBA test was performed by using fresh semen samples and sperm binding rates to HBA were calculated. Conception rates and semen parameters were compared. In this study any correlation between HBA values and pregnancy rates could not be found.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR	viii
TABLolar DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
GRAFİKLER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İNFERTİLİTE TANIM, İNSİDANS ve ETYOLOJİ	3
2.2. GAMETLERİN OLUŞUM SÜRECİ	5
2.2.1. Spermatogenezis	5
2.2.1.2. Olgun spermin yapısı	9
2.2.1.3. Spermatozoonun kapasitasyonu	10
2.2.1.4. Akrozom Reaksiyonu	10
2.2.2. Oogenezis	11
2.3. FERTİLİZASYON	14
2.4. İNFERTİL ÇİFTİN DEĞERLENDİRİLMESİ	17
2.4.1. Kadının değerlendirilmesi	18
2.4.1.1. Overlerin değerlendirilmesi	19
2.4.1.1.1. Ovulasyon tespiti	19
2.4.1.1.2. Ovaryan fonksiyon ve ovaryan rezerv testleri	20
2.4.1.2. Fallop tüplerinin değerlendirilmesi	22

2.4.1.3. Uterusun değerlendirilmesi.....	23
2.4.2. Erkek faktör infertilitesi	24
2.4.2.1. Erkek infertilitesi nedenleri (36).....	25
2.4.2.2. Erkek hastanın değerlendirilmesi.....	27
2.4.2.2.1. Laboratuvar araştırmaları	28
2.4.2.2.1.1. Semen analizi.....	28
2.4.2.2.1.2. Semen mikroskopik olarak değerlendirilmesi.....	31
2.4.2.2.1.3. Sperm Sayısı	31
2.4.2.2.1.4. Sperm motilitesi.....	32
2.4.2.2.1.5. Sperm morfolojisi	33
2.4.2.2.1.6. Semende sperm dışı hücreler	38
2.4.2.2.2. Endokrin değerlendirme	38
2.4.2.2.3. Ultrasonografik değerlendirme	39
2.4.2.2.4. Genetik testler	39
2.4.2.2.5. Özel Testler	41
2.4.2.2.5.1. Sperm Otoantikoları	41
2.4.2.2.5.2. Sperm penetrasyon testleri	42
2.4.2.2.5.3. İnsan zona bağlanma testi.....	42
2.4.2.2.5.4. Akrozom reaksiyonu	42
2.4.2.2.5.5. Bilgisayar destekli semen analizi (CASA)	43
2.4.2.2.5.6. Sperm DNA bütünlük testleri	43
2.4.2.2.5.6.1. TUNEL testi.....	44
2.4.2.2.5.6.2. In situ nick translasyon testi (ISNT)	44
2.4.2.2.5.6.3. Sperm kromatin dağılım testi (SCD)	44
2.4.2.2.5.6.4. Comet testi	45
2.4.2.2.5.6.5. Akridin oranj testi (AO).....	45
2.4.2.2.5.7. DNA bütünlük testlerinin klinik kullanımı.....	46
2.4.2.3. Erkek faktör infertilitesinde intrauterin inseminasyonun yeri	47

2.4.3. İzah edilemeyen infertilite	49
2.4.3.1. Prevalans	50
2.4.3.2. Tedavi seçenekleri	51
2.4.3.2.1. Bekle gör tedavisi.....	51
2.4.3.2.2. Tubal yıkama (tubal flushing).....	52
2.4.3.2.3. Fallop tüplerine sperm perfüzyonu	53
2.4.3.2.4. Ovulasyon indüksiyon ajanları.....	53
2.4.3.2.4.1. Klomifen sitrat.....	53
2.4.3.2.4.2. Gonadotropin tedavisi	55
2.4.3.2.4.3. Aromataz inhibitörleri:	57
2.4.3.2.5. İntrauterin inseminasyon	58
2.4.3.2.6. Gamet intra-fallopian transfer (GIFT)	61
2.4.3.2.7. İn vitro fertilizasyon (IVF).....	61
2.6. HYALÜRAN BAĞLANMA TESTİ (HYALURONAN BINDING ASSAY, HBA)	62
2.6.1. HBA testi ve sperm matürasyonu.....	67
2.6.2. HBA'nın ICSI işleminde kullanımı.....	68
3. MATERYAL VE METODLAR	71
3.1. HASTALARIN DEĞERLENDİRİLMESİ	72
3.2. SPERM HAZIRLANMASI VE HYALÜRAN BAĞLANMA TESTİ	73
3.3. İSTATİKSEL ANALİZ	75
4. BULGULAR.....	77
5. TARTIŞMA	85
6. KAYNAKLAR	91

KISALTMALAR

3D-USG	: 3 boyutlu ultrasonografi
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AFS	: Antral follikul sayısı
Aİ	: Aromataz inhibitörleri
AMH	: Anti-müllerian hormon
AO	: Akridin oranj testi
ART	: Yardımla üreme teknikleri
ASA	: Anti Sperm Antikor
ASRM	: American Society of Reproductive Medicine
AZF	: Azoospermik faktör
BMI	: Vücut kitle indeksi
BVI	: Bazal vücut ısısı
CASA	: Bilgisayar yardımlı semen analizi
CFTR geni	: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator geni
DFI	: DNA fragmantasyon indeksi
DM	: Diabetes mellitus
E2	: Estradiol
ESHRE	: European Society of Human Reproduction Society
FISH	: Fluorescence in-situ hybridization
FSH	: Folikül Stimulan Hormon
GIFT	: Gamet İntra Fallopian Transfer
GnRH	: Gonadotropin relasing hormon
HA	: Hyalüronik asit

HBA	: Hyalüran bağlanma testi (Hyaluronan binding assay)
hCG	: Human koryonik gonadotropin
HKS	: Histerosalfingo-kontrast sonografi
HMG	: Human menapozal gonadotropin
HSG	: Histerosalfingografi
HspA2	: Sperm ısı şok proteini(Heat shock protein)
IBT	: Immünobead test
ICSI	: Intrazitoplazmik sperm enjeksiyonu
İEİ	: İzah edilemeyen infertilite
IMSS	: İnsemine motil sperm sayısı
ISI	: İntraservikal inseminasyon
ISNT testi	: İn sutu nick translasyon testi
IUI	: İntrauterin İnseminasyon
IVF	: İn vitro fertilizasyon
KOH	: Kontrollü ovaryan hiperstimülasyon
KS	: Klinefelter sendromu
LH	: Luteinizan hormone
MAR	: Miks antiglobulin reaksiyon
MRI	: Magnetic rezonans görüntüleme
NP	: Nonprogresif motilite
PAS	: Peryodik Asit Shift
PGD	: Preimplantasyon diagnosis
PICSI	: Hiyalüronik asit kullanılan ICSI
PR	: Progresif motilite
rFSH	: Rekombinant folikül stimule edici hormon
SCD	: Sperm kromatin dağılım testi
SCGE	: Single cell gel electrophoresis

SCSA	: Sperm kromatin yapı testi
SHS	: Saline histerosonografi
SHT	: Sperm hemizon testlerinde
SKK	: Sperm kreatinin kinaz
SRY	: Sex determination gene
TESE	: Testisten sperm elde edilmesi
TMSS	: Total motil sperm sayısı
TSH	: Troid stimule edici hormon
TV-USG	: Transvajinal Ultrasonografi
USG	: Ultrasonografi
WHO	: World Health Organization
Yp	: Y kromozomunun kısa kolu
Yq	: Y kromozomunun uzun kolu
YÜT	: Yardımla Üreme Teknikleri
ZIFT	: Zygote İntra fallopian Transfer

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No:</u>
Tablo 1. İnfertiliteye neden olan etyolojik faktörler	17
Tablo 2. WHO 2010 semen analizi referans değerleri	29
Tablo 3. Kruger kesin kriterlerine göre sperm morfolojisi	33
Tablo 4. IEI çiftlerde tedavi yaklaşımlarına göre ortalama siklus fekundabilitesi.....	60
Tablo 5. Kadın hastaların demografik ve bazal hormonal parametreleri	77
Tablo 6. Kadınlarda kontrollü ovaryan hiperstimülasyon parametreleri	78
Tablo 7. Erkek hastaların demografik ve sperm parametreleri	79
Tablo 8. HBA değerinin gebelik durumuna göre karşılaştırılması	80
Tablo 9. İnfertilite nedenlerine ile gebelik durumunun karşılaştırılması	80
Tablo 10. İzah edilemeyen infertil hastalarda gebelik durumuna göre değişkenlerin dağılımı.....	81
Tablo 11. HBA değerleri ile belirtilen değişkenler arasındaki ilişki.....	81
Tablo 12. HBA değerinin sigara öyküsüne göre karşılaştırılması	82
Tablo 13. Bireylerin gebelik durumlarına göre belirtilen değişkenlerin dağılımı.....	83
Tablo 14. HBA değerinin gebelik durumuna göre karşılaştırılması	84

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 1. Testis yan taraftan görünüş	6
Şekil 2. Olgun spermin oluşumu	9
Şekil 3. Folliküler gelişim evreleri	11
Şekil 4. Fertilizasyon	14
Şekil 5. Kadın infertilitesinde etyolojik faktörler	18
Şekil 6. Normal sperm morfolojisi	34
Şekil 7. Sperm baş defektleri	35
Şekil 8. Sperm boyun defektleri	35
Şekil 9. Sperm kuyruk anomalileri	36
Şekil 10. Sperm matürasyon süreci	63
Şekil 11. HBA kitinin görünümü	74
Şekil 12. HBA'ya bağlanan ve bağlanmayan spermde hareket paterni	74

GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa No:

Grafik 1. Yıllık gebe kalma oranı.....	3
Grafik 2. İnfertilite etyolojisi.....	4

1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnfertil çiftlerde yardımcı üreme tekniklerinden (YÜT) hangisinin kullanılarak en kısa sürede gebelik elde edileceği konusu tam bir muammadır. Bazı çiftlerde intrauterin inseminasyon (IUI) ile gebelik sağlanabilirken, bazılarında ise defalarca denenmesine rağmen IUI ile başarı elde edilememektedir. Bu durum hem hasta hem de devlet üzerine yüksek bir mali yüke neden olurken, çiftlerde de ciddi psikolojik travmaya yol açmaktadır. En önemli sorun, hangi hastanın IUI denemesi için yönlendirileceği ve hangi hastanın da IUI ile vakit kaybetmeden in vitro fertilizasyon/ intrastoplazmik sperm injeksiyonu (IVF/ICSI) prosedürüne yönlendirileceğidir.

IUI, infertil çiftlerin tedavisinde 1700 lu yılların sonlarından itibaren, klinik uygulamada yerini almıştır. İnsanlarda ilk olarak 1790 yılında hipospadiaslı bir erkeğin semeninin enjektör yardımıyla insemine edilmesi ile klinik kullanım alanına girmiştir. IUI'da başarılı sonuçların elde edilmesi 19. yüzyılı bulmuştur ve o dönemden beri bir çok infertil hastanın tedavisinde kullanılmaktadır.

IUI'da başarının kısıtlı olması nedeniyle bu tedavide başarıyı arttırmak amacıyla yapılan çalışmaların birçoğu doğru hasta seçimine yönelmektedir. IUI sikluslarında, daha iyi oositi ya da daha iyi spermi spesifik olarak seçme şansımız olmadığından kaba spermiograma ek olarak en azından spermlerin matürasyonu hakkında bize bilgi verecek ve tedavide de yol gösterici olacak testlere ihtiyaç vardır.

Biz bu çalışma ile daha önce IVF/ICSI hastalarında sperm seçim metodu olarak kullanılan HBA testinin, IUI sikluslarındaki prognostik değerini araştırmayı planladık. HBA testi ile matürasyonu yüksek, DNA hasar oranı düşük spermler seçildiğinden,

HBA oranı yüksek sperme sahip çiftlerde, IUI başarısının artacağını, böylece bu testle, IUI tedavisinden gerçekten fayda görebilecek bir hasta grubu seçebileceğimizi düşündük.

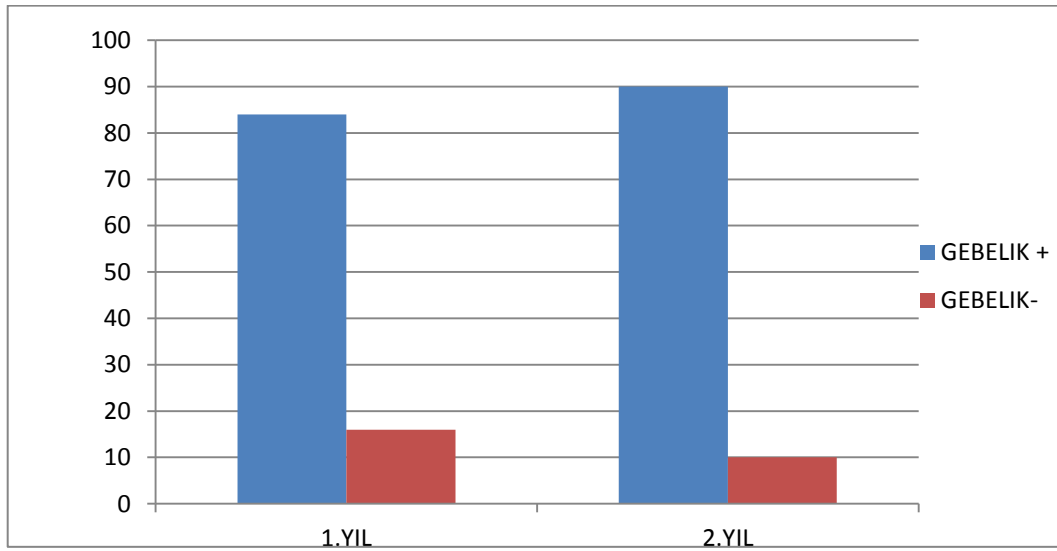
Birçok çalışmada IVF/ICSI sikluslarındaki hassasiyetin, IUI sikluslarında gösterilmesi halinde başarının nasıl etkilenebileceği araştırılmış, örneğin; tıpkı, IVF/ICSI' de olduğu gibi IUI' da mesane doluyken abdominal USG eşliğinde transfer, servikal mukus temizliği ve luteal faz desteği denenerek çeşitli önerilerde bulunulmuştur. Biz de benzer bir mantıkla IVF/ICSI hastalarında daha matür ve fertilizasyon potansiyeli yüksek sperm seçiminde kullanılan HBA testini, izah edilemeyen infertil ve erkek faktör infertilitesi olan ve tedavi olarak IUI planlanan hastaların erkek partnerlerinde kullandık. Böylece, IUI sikluslarında gebeliği öngörebilecek bir HBA sınır değeri belirlemeyi planladık. HBA testinde gebeliği predikte eden bir eşik değer tespiti halinde, bu testi kaba spermiograma ekleyerek, IUI tedavisinden fayda görebilecek spesifik bir hasta grubunu seçebilmeyi planladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İNFERTİLİTE TANIM, İNSİDANS ve ETYOLOJİ

Fertilite, üreme kapasitesine sahip olma durumu olup fekundabilite siklus başına gebe kalabilme olasılığıdır. Fekundite ise tek bir menstrual siklusta canlı doğum elde edebilme yeteneği olarak tanımlanır (1). Normal fertil çiftlerde siklus başına fekundabilite %20-25, fekundite ise %15-18'dir. Genç, sağlıklı çiftlerde 1 yılın sonunda kümülatif gebelik oranı %84, 2 yıl sonunda %90'dır (grafik 1) (2,3). İnfertilite, klasik olarak bir yıl düzenli korunmasız cinsel ilişkiye rağmen gebe kalamama durumu olarak tanımlanır. Son yıllarda infertilite terimi yerine steril olmayan ancak fertilite potansiyeli düşen bu çiftlerde subfertilite ifadesi sıklıkla kullanılmaktadır.

İnfertil hastaya yaklaşım hasta popülasyonlarına göre değişebilmektedir.



Grafik 1. Yıllık gebe kalma oranı

Örneğin, <35 yaş hastalarda süre için 12 ay esas alınırken, >35 yaş üzerinde, yaşa bağlı fertilité azalması nedeniyle süre 6 ay olarak kabul edilmiştir. Ayrıca, hastada infertiliteye neden olabilecek aşikar bir neden varlığında da örneğin; oligomenore/amenore, pelvik operasyon öyküsü, tubal enfeksiyon ve kemoterapi öyküsü ve/veya aşikar erkek faktörü durumlarında da 1 yıl beklenmeden gereken araştırmalar yapılmalıdır (1).

İnfertilite problemi üreme çağındaki çiftlerin %10-15'ini etkilemektedir (4). İnfertil çiftlerde temel değerlendirme yapıldığında, olguların %30-40'ında erkek, %40-50'inde kadın faktörü tespit edilirken %10-15 olguda infertilitenin nedeni izah edilememektedir (5, 6).



Grafik 2. İnfertilite etyolojisi

Yaşam standartlarının artması, kadınların eğitim ve kariyer arzularının ön plana geçmesi, gebelik yaşını geciktirerek, fertilité kapasitesi düşmüş bir kadın popülasyonu yaratmaktadır. Sonuç olarak, yıllar içerisinde infertiliteye yol açan etyolojik faktörler değişse de (kadın yaşı vb.) son 50 yıldır infertilite prevalansında anlamlı bir değişme olmamıştır. Dünya sağlık örgütüne göre infertilite ve sterilite 21. yüzyılın en sık görülen sağlık problemleri arasındadır. Diabetes mellitus, tubal hastalıklar ve polikistik over sendromu giderek artan sıklıkta infertiliteye katkıda bulunmaktadır. A.B.D'de 15-44 yaş arası kadınlarda genel fertilité oranı 2000'li yıllarda %65.3 olarak rapor edilirken ve bu

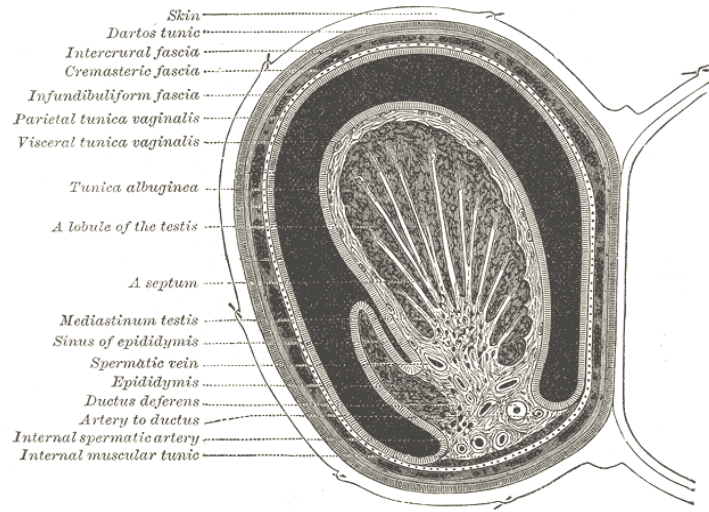
oranın 1970'lere göre %25, 1950'lere göre de %40 düştüğü belirtilmiştir. Uluslararası çok merkezli bir çalışmada 2007 yılında dünyadaki mevcut infertilite prevalansı %3.5 ile %16.7 olarak rapor edilmiştir. Yine yaşam boyu infertilite oranı %5- 25.7 olarak tesbit edilmiştir. İlginç bir şekilde gelişmekte olan ülkelerde de bu oranlar farklı bulunmamıştır (7). Yalnızca A.B.D'de 6.1 milyon insan ve 15-44 yaş arası kadınların %10-20'i infertilite merkezlerine başvurmaktadır. İnfertilite servislerine başvuru 1982 yılında %12'lerde iken, 1995 yılında %15'lere ulaşmıştır (8). İsveçte yapılan bir epidemiyolojik çalışmada da her 13 çiftten birinin infertil olduğu rapor edilmiştir (9).

Gebelik yaşının ertelenmesi, güvenilir kontrasepsiyon yöntemlerinin tercihi, devletlerin yürüttüğü politikalar, çiftlerin ekonomik nedenlerle daha az sayıda çocuk istemi ve sonrasında da kalıcı kontrasepsiyon yöntemlerini tercih etmeleri genel fertilitte oranlarını düşürmüştür. Fertilitte oranı 1970 yılında dünyada kadın başına 4.5 bebek iken 2005 yılında bu oran her bir kadın için 2.7 olarak bulunmuştur (10).

2.2. GAMETLERİN OLUŞUM SÜRECİ

2.2.1. Spermatogenezis

Testisler skrotum içinde yerleşmiş yaklaşık 4- 4.5 cm boyutlarında, 10-14 gr ağırlığında primer üreme organlarıdır (Şekil 1). Testisler tunika albuginea denilen bir bağ dokusu ile kaplıdır. Spermatogenezisin gerçekleştiği bu organ septalarla kompartmanlara bölünmüştür. Bu kompartmanlar içinde seminifer tübüller bulunmaktadır. Seminifer tübüller açık olan iki ucuyla rete testislere bağlanırlar. Rete testisler, leydig hücrelerinin bulunduğu interstisiyel doku ile çevrelenmiştir.



Şekil 1. Testis yan taraftan görünüş

Rete testisler birleşerek duktuli eferentleri oluştururlar. Bunlarda kaput epididimise açılırlar. Seminifer tübüleri çevreleyen adventisya tabakasının altındaki basal membranda sertoli hücreleri ve spermatojenik hücreleri bulunur. Sertoli hücreleri spermatojenik hücrelerin korunması ve beslenmesini sağlarken aynı zamanda testis-kan bariyerini de oluştururlar. Spermatogenezis, testiste seminifer tübüllerde meydana gelir. Spermatogenezis, gonyogenezis, spermatositogenezis ve spermiyogenezis dönemlerini kapsar. Spermatogonyumdan başlayarak spermatozoon oluşuncaya kadar geçen olaylar dizisi çoğalma, büyüme, olgunlaşma ve başkalaşma evrelerinden geçer. Spermatogenezisin tamamlanması insanda ortalama 70-74 gün sürer. Primordial germ hücreleri embriyonel hayatta yolk kesesinde allantoyise yakın bölgede endodermal hücrelerden kaynaklanırlar. İntrauterin hayatın 5. haftasından itibaren genital kabartıya göç ederler. Y kromozom varlığında farklılaşmamış gonadlar testislere dönüşür. Seminifer kordların oluşumunu takiben bu hücreler gonadosit adını alırlar ve seminifer tübülün bazal kısmına yerleşerek spermatogonyum adını alırlar. Pubertenin başlamasına yakın spermatogonyumlarda mitotik aktivite artar ve her bir testiste 600 milyon

spermatogonia bulunur. Bu döneme gonyogenezis denir. Spermatogonyumların A ve B tipleri vardır. Spermatogonyum A'ların bir kısmı kök hücresi olarak kalırken, bir kısmı da spermatogonyum B'lere dönüşür. Spermatogonium B'ler bazal membrandan seminifer tübülüsün lümenine doğru hareket ederler. Spermatogonyum B'ler mitotik bölünme ile sayılarını arttırarak luminal yüze doğru yönelirler ve daha da büyüyerek, primer spermatositleri şekillendirirler (büyüme evresi). Primer spermatositlerden itibaren mitoz sona erer ve olgunlaşma evresi başlar. Primer spermatositler, 22 gün süren mayoz bölünmenin profaz aşamasına girerler. Birinci mayoz sonunda sekonder spermatositler, sekonder spermatositlerden de ikinci mayoz bölünme sonucu, haploid kromozom içeren spermatitler şekillenir. Mayoz bölünmenin ikinci aşamasında diploid kromozom sayısı haploid hale gelir (spermatositogenezis). Mayoz bölünmenin tamamlanmasından sonra spermiyogenezis başlar. Spermatidler başkalaşma evresine girer. Golgi evresinde, endoplazmik retikulumda üretilen enzimler nukleusa yakın yerleşmiş golgi aygıtına taşınarak modifikasyonların yapılması sağlanır. Bu veziküller birleşerek akrozomal yapıyı oluşturur. Ardından akrozomal vezikül nukleer zarın etrafını sararak akrozoma dönüşür. Akrozom evresinde, kromozomlar daha yoğun olarak paketlenir, çekirdek hacmi azalır ve sperm uzun bir hal alır. Birbirine paralel mikrotübüller sperm nukleusundan distale uzanan bir yapı oluştururlar, bu yapı ile stoplazmada uzayarak mitokondrilerde kuyruk kısmına doğru taşınırlar. Uzayan stoplazma flajelluma ulaşır mikrotübüler yapı kaybolur ve sperm kuyruğunun orta parçasını esas parçadan ayıran anüler yapı oluşur. Spermatitler çekirdek ve stoplazmalarında görülen bir seri değişiklikler sonucu, o türe özgü biçimlerini kazanarak spermatozoonlara dönüşürler. Olgunlaştırma aşamasında, gereksiz fazla stoplazma artık cisim olarak hücreden

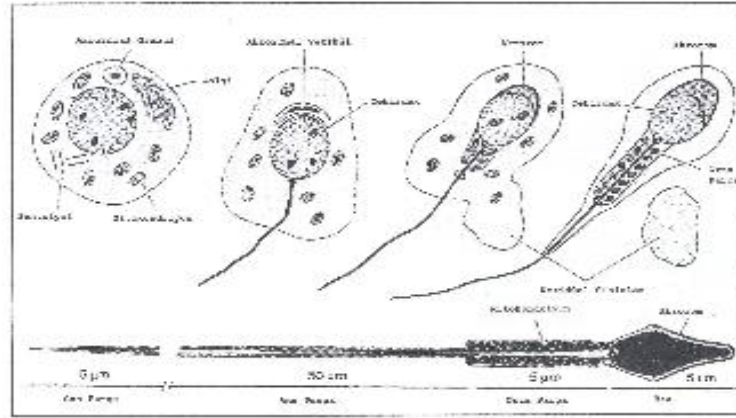
ayrılırken, kromozomal kondenzasyon ve stabilizasyon devam eder. Olgun sperm görünümünde olan hücre sınırsız yapılarından ayrılarak lümene atılır.

2.2.1.1. Spermatogenezisin hormonal regülasyonu

Spermatogenezisin oluşumunda FSH, LH, testosteron ve androjen taşıyıcı proteinlerin rolü vardır. Spermatogenezisin başlatılması ve devamı için olmazsa olmaz hormon testosterondur. Puberteye ulaşıldığında, hipofiz ön lobundan salgılanan LH, testisin intertisyel dokusunda bulunan leydig hücrelerini etkileyerek testosteronun salgılanmasına neden olur. Dolaşım ile seminifer tübüllere gelen testosteronun androjen taşıyıcı protein ile oluşturduğu kompleks, spermatogoniumları etkileyerek çoğalma sürecini başlatır. Testis içerisindeki yüksek testosteron düzeyi sperm üretiminin devamını sağlamaktadır. Hipofizin ön lobundan salgılanan FSH, seminifer tübüllerde sertoli hücrelerinin çoğalmasını ve bu hücrelerde androjen taşıyıcı proteinlerin sentezlenmesini sağlar. FSH, spermatogenezisin başlatılması, LH ve testosteron ise sürekliliği için gereklidir.

Spermatogenezisin başlamasından 72 gün sonra spermler kaudal epididimise ulaşırlar. Bu esnada hareketsiz olan ve döllenme kapasitesi düşük spermler epididim içerisinde gelişimini tamamlayıp hareket kabiliyeti kazanırlar. Bu depolanma sırasında optimal fonksiyonlar için yeterli düzeyde testosteron yanısıra düşük ısıya ihtiyaç vardır.

2.2.1.2. Olgun spermin yapısı



Şekil 2. Olgun spermin oluşumu

Olgun sperm baş ve kuyruk olarak iki kısımdan meydana gelir. Baş kısmı akrozomal ve post akrozomal olarak iki kısma ayrılır. Spermin baş bölgesinde lokalize olan nükleus sitoplazmanın büyük kısmını kaplar ve içerisinde katlanmış halde genetik materyal bulunur. Sperm haploid kromozom içerdiklerinden (X ya da yalnızca Y kromozomu) zigotun cinsiyetini belirlerler. Erişkin spermelerde plazma membranı ile nükleus arasında yerleşmiş litik enzimler içeren akrozom bulunur. Akrozom sperm nükleusuna bir zarla bağlıdır. İç akrozomal membran nükleusa sıkıca tutunurken dış akrozomal membranda plazma membranı yanındadır. Hücre zarı ile akrozom arasındaki alan periakrozomal alan olarak adlandırılır ve spermle ovumun birleşmesinde rol aldığı düşünülmektedir. Spermin kuyruk kısmı spermin hareketini sağlayan bölümdür. En iç kısmında bulunan aksonem ve etrafında sarılı 9 çift mikrotubullerden meydana gelen bir flagella oluşturur.

Semen ejakülasyondan hemen sonra jel kıvamında iken prostattan salınan enzimlerin etkisiyle 20-30 dakika içinde likefiye olmaktadır. Semen alkalik pH'ı spermleri bir süre için vajenin asidik ortamından korur. Sperm servikal mukusa

ulaştıklarında bu mukustaki kendi baş kısımlarından daha küçük gözeneklerden aktif itme hareketi ile geçerler. Spermde motilite bozukluğu varsa ya da baş anomalisi varsa bu bariyerden geçemeyeceklerdir. Uterin kontraksiyonlar ile yukarı doğru itilen sperm fallop tüplerine ulaşarak oositle buluşurlar. Koit sonrası spermelerin 80 saat kadar fallop tüplerinde bulunduğu gösterilmiştir (11).

2.2.1.3. Spermatozoonun kapasitasyonu

Spermatozoonun sekonder oositi dölleyebilmesi için kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunun oluşması gerekir. Kadın genital sistemine geçen spermatozoalar başlangıçta dölleme yeteneğine sahip değildirler. Spermatozoalar bu yeteneklerini, kadın genital kanalından geçişleri sırasında kazanırlar. Bu olaya kapasitasyon denir. Kapasitasyon esnasında özellikle uterus ve fallop tüplerinde bulunan salgıların etkisiyle akrozom bölgesini örten hücre membranı üzerindeki glikoproteinler ve seminal plazma proteinleri tamamen uzaklaştırılır. Sperm oosite yaklaştığında ya da folikuler sıvı ile muamele edildiğinde daha ileri değişimler ortaya çıkar. Kapasitasyon işlemi dişi genital kanalda gerçekleşmesine rağmen invitro şartlarda medyumlarda da kısa bir inkübasyon süresi sonrasında kapasitasyon sağlanabilir. Kapasitasyondan sonra akrozom reaksiyonu başlar.

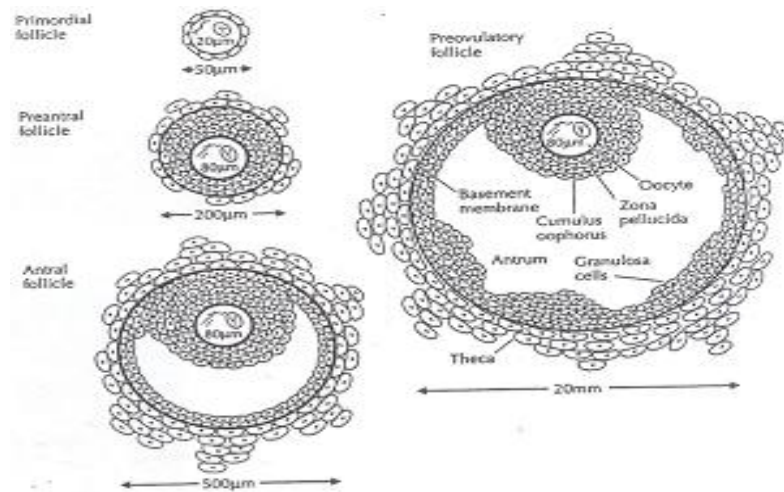
2.2.1.4. Akrozom Reaksiyonu

Kapasitasyonu tamamlanmış olan spermatozoalar hücre membranlarında bulunan yüzey reseptörleri vasıtasıyla ampullada bulunan sekonder oositi yakalarlar. Sekonder oositin zona pellusidasında, değişik tür glikoproteinlerin oluşturduğu, spermatozoonların yüzey reseptörleri için türe özgü bağlanma bölgeleri bulunur. Spermatozoonların bu bölgelere bağlanmasıyla kalsiyum iyonlarının spermatozoonlara alınması hızlanır ve böylece

akrozom reaksiyonu başlar. Akrozom reaksiyonunda plazma membranı ve dış akrozom membranı yıkılır. Akrozomun dış zarı, spermatozoanın hücre zarı ile yer yer kaynaşır. Bu olay sperm nükleusunu bir başlık gibi saran yapı içindeki enzimlerin salınımına neden olur. Kısa sürede eriyerek açılan bu bölgelerden, akrozom enzimleri (hyalüronidaz, akrozin, proteaz, glikuronidaz, nöroaminidaz benzeri faktör, kümülüs açıcı enzim) dışarı çıkarlar. Bu bölgelerdeki hücre zarı ve akrozomun dış zarı tamamen erir, geriye sadece iç akrozom zarı kalır. Bu olaya akrozom reaksiyonu adı verilir (11). Sperm başında meydana gelen bu değişiklikler aynı zamanda sperm oosit membranı ile füzyonunu da kolaylaştırmaktadır.

2.2.2. Oogenezis

Spermatogeneziste olduğu gibi, oogeneziste de çoğalma, büyüme ve olgunlaşma evreleri vardır. Çoğalma evresi prenatal dönemde gözlenir. Fetal yaşamda primordiyal germ hücreleri gonad taslaklarına geldiğinde oogonyumlara farklılaşırlar. Oogonyumlar mitozla bölünerek sayılarını arttıırırlar.



Şekil 3. Follüküler gelişim evreleri

Embriyonik hayatın 1. ayından itibaren oogonyumlar vitellus kesesinin allatoyise yakın duvarında endoderm hücreleri arasında görülmeye başlanır. Bu hücreler genital kabartıya göç ederler. Fetal yaşamın 5. ayına kadar mitoz bölünme devam eder. Oogoniumların bir kısmı büyüyerek primer oositlere dönüşürler. DNA 'ları replike olur ve 1. mayoz bölünmenin profaz evresine girerler ve tek katlı yassı granüloza hücreleri ile sarılarak primordiyal folikülleri meydana getirirler. Primordiyal foliküllerdeki primer oositler puberte dönemine kadar 1. mayoz bölünmenin profaz evresinde beklerler. Büyüme evresi puberte ile başlar. Primordiyal foliküllerdeki primer oositler büyürler ve çevrelerindeki tek katlı yassı granüloza hücreleri önce tek katlı kübik, tek katlı prizmatik ve mitoz ile çoğalarak çok katlı folikül epiteline (stratum granulozum) dönüşerek primer follikülü oluştururlar. İmmatur oosit büyürken çevresine glikoprotein ve glikozaminoglikanları salgılar. Oosit yaklaşık 50-80 mikron çapa ulaştığında Peryodik Asit Shift (PAS) ile pozitif boyanan, zona pellusida oluşur. Follikülde değişiklikler olurken bağ dokusunda değişir kan damarlarından zengin teka interna ve düz kaslardan zengin teka eksterna oluşur. Teka internanın endokrin hücrelerinden LH etkisiyle östrojen prekürsörleri olan androjenler salgılanır. Teka internadan salgılanan androstenodion, granüloza hücrelerinden FSH'ın etkisiyle salgılanan aromataz enzimiyle östrojene dönüşür. Stratum granulozum tabakasının 8-12 katlı prizmatik epitele dönüşmesi ile hücreler arası boşluklar oluşur ve sekonder follikül ortaya çıkar. Sekonder follikül antrumu hyalüronik asitten zengin sıvı içerir. Follikül büyüdükçe ve içerisindeki sıvı arttıkça oosit folikül kenarına itilir. Oosit ve çevresindeki granüloza hücreleri folikül lümenine doğru uzanan bir çıkıntı oluştururlar ki buna kümülus ooforus denmektedir. Oositi çevreleyen granüloza hücreleri ise korona radyatayı oluşturur. Follikül büyüyerek tersiyer follikülü oluşturur. Korona radyatayı oluşturan hücreler ile

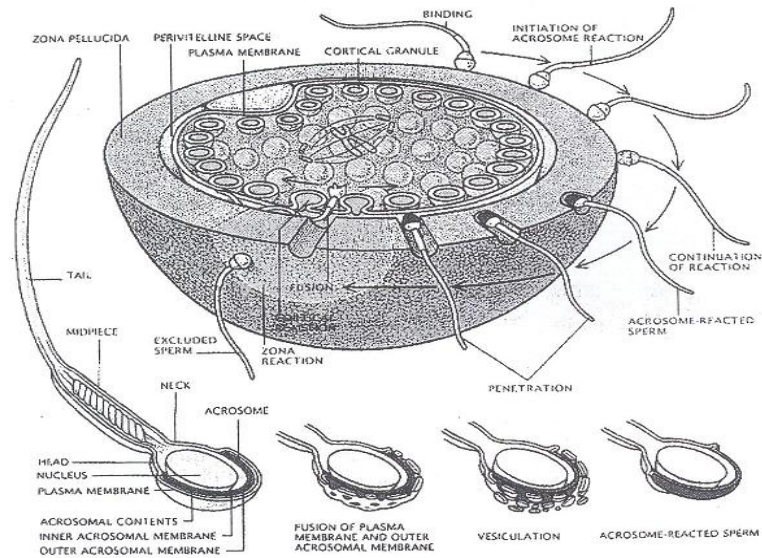
oosit arasında bağlantılar (gap junction) oluşur. İnterselüler ortam granüloza hücreleri tarafından üretilen hyalüronik asit ve proteoglikanlardan zengin bir sıvı ile doludur. Böylece FSH ve LH'nin etkisiyle tersiyer ve graaf folikülleri gelişir. Folliküldeki büyüme devam ederken birinci mayoz bölünme, ovulasyondan az önce ya da ovulasyon sırasında tamamlanır. Birinci mayoz bölünme sonucunda sekonder oosit ve birinci polar cisimcik oluşur. Birinci polar cisimciğin sitoplazması çok az olup, sekonder oositin yüzeyine tutunmuş halde bulunur. Graaf follikülünde antral boşluğu çevreleyen granüloza hücreleri membrana granüloza adını alır. Oosit etrafında zona pellusida ile temasta olan ve granüloza hücrelerinin oluşturduğu korona radyata görülür. Bu dönemde kümülus ooforus belirgindir. Büyüklüğü 10 mm ulaşan follikül over yüzeyinde kabarrır. Oosit ve oositi çevreleyen hücrelerin granüloza hücreleri ile bağlantısı gevşer ve oosit atılır. İkinci mayoz bölünme, ovulasyondan sonra tuba uterinada spermatozoonun sekonder oosite girişi sırasında tamamlanır. İkinci mayoz bölünme sonunda sekonder oositten, haploid kromozom içeren ovum ile ikinci polar cisimcik oluşur. Böylece olgunlaşma evresi sonunda primer oositten olgun bir ovum ile buna bitişik olan kutup hücreleri (polar cisimcik) meydana gelir.

Oogeneziste birinci ve ikinci mayoz bölünmeleri ile meydana gelen kutup hücrelerinin (polosit 1 ve 2) sitoplazmaları azdır ve tam gelişmediklerinden ovuma dönüşmezler, döllenmeye de uygun olmadıklarından dejenere olurlar. Bu nedenle oogeneziste mayotik bölünmeler sonucu bir adet primer oositten bir adet ovum meydana gelir. Spermatogeneziste ise 1 adet spermatositten 4 adet olgun spermatit meydana gelmektedir.

Erişkin bir kadında her iki overde yaklaşık 400 bin follikül bulunur. Doğurganlık sürecinde sadece 450-500'ü tersiyer follikül safhasına ulaşır. Ovulasyonda, kendisini

saran korona radiata hücreleri ile birlikte ovaryumdan atılan oosit, tubal fimbriyal uçtan yakalanarak tubal silyumlarının ve düz kas kontraksiyonlarının etkisiyle fertilizasyon bölgesi olan ampullaya ulaşır. Sekonder oosit 24-48 saat canlılığını sürdürebilir. Sekonder oosit döllenmezse uterusu geçer ve dejenere olarak atılır. Cinsel ilişki ya da inseminasyon yoluyla, dişinin genital kanalına verilen spermilerin seminal plazması uterus mukozası tarafından absorbe edilir ve spermatozoalar serbest kalırlar. Serbest kalan spermatozoalar kuyruk hareketleri ve koit sırasında salgılanan oksitosinin vagina, serviks ve uterus düz kaslarında oluşturduğu kontraksiyonlar sonucu önce serviks, sonra uterus ve fallop tüplerine geçerler. Spermatozaların bir kısmı 5. dakika gibi kısa bir sürede fallop tüplere ulaşırken, bazıları da serviks ve uterustaki depolanma bölgelerinde toplanırlar. Serviks ve uterusun müköz örtüsü, bu bölgelerde spermatozoonların tutunmasını sağlayarak bir nevi depo görevi görürler.

2.3. FERTİLİZASYON



Şekil 4. Fertilizasyon

Oositin ovulasyon sonrası yaşam süresi yaklaşık 12-24 saattir. Sperm ise kadın genital sisteminde 48-72 saat canlılığını sürdürebilir (12). Kapasitasyonunu tamamlamış olan spermatozoalar ile ikinci mayoz bölünmenin metafaz aşamasında bulunan sekonder oosit fallop tüpünün ampulla bölgesinde karşılaşırlar. Oosit etrafındaki kümülüs ooforus hücreleri ampulla bölgesinde ekspansiyon almış olarak bulunurlar. Sperm bu kümülüstaki akrozom enzimlerini salgılamadan kolayca geçmektedirler.

Oositin etrafını saran aseluler zona pellusida (ZP) tabakası fertilizasyonda önemli fonksiyonlara sahiptir. ZP, oosit oolemması ile perivitellin aralık dışında ve 15-18 mikrometre kalınlığında hücre içermeyen ve oositi kesintisiz kuşatan bir kılıftır. Elektron mikroskopunda ZP düzgün kompakt ağırsı bir yapı olarak görülmektedir. ZP türe spesifik sperm için bağlanma bölgeleri içerir. Spermin penetrasyonu sonrasında ZP zona reaksiyonu geçirerek diğer sperm için geçişine engel olmakta ve buda poliploidiyi önlemektedir (13). ZP içerisinde uzun bağlantılı mikrofilamanlar içerir. Spermin ZP'ya penetrasyonunda yalnızca kuyruk değil aynı zamanda başında hareketi gerekmektedir. Spermin başında nukleusun hemen üzerinde bir başlık gibi bulunan akrozom içerisinde akrozom reaksiyonunu oluşturan enzimler bulunur. Akrozom reaksiyonu, vezikül içeriğinin salınmasına neden olan bir ektositoz olayı şeklinde gerçekleşmektedir. Akrozom reaksiyonunun gerçekleşmesi için spermin ZP'ya bağlanması gerekmektedir. Bu olayın gerçekleşmesini sağlayan faktörün ZP'da bulunan glikoprotein yapısındaki sperm reseptörü olduğu sanılmaktadır. ZP'da oosit tarafından sentezlenmiş ZP1, ZP2, ZP3 glikoproteinleri bulunmaktadır. Bunlardan ZP3'e sperm bağlanmakta olup, ZP2'de akrozomal reaksiyon sonrasında polisperminin önlenmesinde görev almaktadır. ZP3 geni sadece büyüyen oositte eksprese edilip aynı zamanda türler arasında farklılık göstermektedir (14). Spermin ZP'ya bağlanabilmesi için spermde

bulunan türe spesifik glikoprotein molekülün tanınması gerekmektedir. Bağlanma gerçekleşince ardından akrozom reaksiyonu başlar, protein kinaz C de sperm akrozom reaksiyonu için gerekli bir basamak olup sperm proteinlerinin fosforilasyonunu sağlar. ZP ile oosit membranı arasındaki boşluğa perivitellin aralık denilir. Spermatozoa ZP'yi geçtikten sonra perivitellin aralığa açılıp girer. Oosit membranı sperm başını sararak oosit ve sperm füzyonu gerçekleşir. Bu füzyonda görev alan sperm başında lokalize çeşitli proteinler vardır. PH-20 proteini ZP'ya bağlanmaya yardım eden aynı zamanda hyalüronidaz aktivitesi ile kümülüs hücrelerinin ayrışmasını sağlayan bir proteindir. Diğer protein ise fertilizasyonda görev alan PH-30 proteindir. Oosit plazma membranı ile spermın iç akrozom membranı füzyona uğrar. Açılan bu noktadan spermatozoon, baş ve kuyruğu ile birlikte sekonder oositin stoplazması içine girer. Spermatozoon girer girmez zona reaksiyonu denilen ve diğer spermatozoonların geçişine izin vermeyen bir olay meydana gelir. Bu olay sekonder oositin sitoplazmasındaki kortikal granüllerin salgılarıyla şekillenir. Bu olaydan sonra sekonder oosit, haploid kromozumlu ovuma dönüşür (11). Ovuma giren spermatozoon ikinci mayoz bölünmesi tamamlanıp ikinci polar cisimciği atılınca kadar ovumun stoplazması içinde belli bir değişikliğe uğramadan durur. İkinci mayoz bölünmesi tamamlandıktan sonra oluşan nükleusa pronükleus adı verilir. Bu da yuvarlak ve oldukça küçük bir nükleustur. Bu anda boş kısmı önde ve kuyruk arkada olmak üzere ovuma girmiş bulunan spermatozoon da bir takım değişiklikler belirtmeye başlar. İlk önce kuyruk diğer kısımlardan ayrılır. Bundan sonra baş ve boyun 180 derecelik bir dönüş yaparak boyun önde ve baş arkada olmak üzere dişi hücre içerisinde ilerler. Bu anda baş içinde bulunduğu stoplazmadan su emerek şişer ve en sonunda gevşek kromatinli bir nükleus halini alır. Bu şekilde yeniden oluşmuş bulunan bu nükleusa

erkek pronukleus adı verilir. Bu olaylar olurken erkek pronukleusun etrafında bir ışınlanma belirir. Bu ışınlanmanın ortasında spermatozoonun proksimal sentrozomu bulunduğundan bu olaya spermatik aster de denir. Bundan sonra her iki pronukleus birbirine doğru giderek, polar cisimcikleri arasından geçen bir plak üzerinde yer alırlar. Her iki pronükleusun birbirine değip kaynaşmasından sonra döllenme gerçekleşir ve zigot oluşur. Zigot oluşumunu takiben bölünmeler başlar.

2.4. İNFERTİL ÇİFTİN DEĞERLENDİRİLMESİ

İnfertilite çiftin hastalığıdır bu sebeble infertilite değerlendirilmesi yapılırken çiftler beraber görüşmeye alınmalıdır. Çiftin hikayesi detaylı biçimde alınmalı, evlilik süresi, korunmasız birliktelik süresi yanısıra özellikle cinsel yaşamla ilgili hikaye (cinsel ilişki sıklığı, zamanlaması, cinsel fonksiyon bozukluğunun varlığı vb.) irdelenmelidir. Ailedeki genetik hastalıklar, akrabalık, geçirilmiş hastalıklar, kullanılan ilaçlar ve operasyonlar yanısıra sigara öyküsü de sorgulanmalıdır.

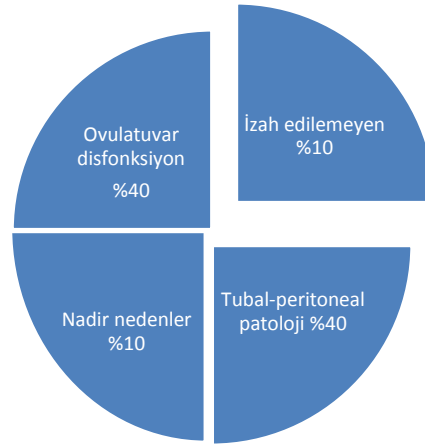
Koruyucu hekimlik açısından kadın hastaların rubella titrelerinin ölçülmesi, özellikle obez polikistik over sendromu olan kadınlarda insulin direnci taramasının yapılması ve çiftlerin her ikisindende hepatit B, C ve HIV açısından gerekli tetkikler yapılmalıdır.

Tablo 1. İnfertiliteye neden olan etyolojik faktörler

Kadına ait nedenler	
• Ovulatuar (%30-40)	
• Tubal/Peritoneal Faktör (%20-40)	%40-45
• Servikal ve İmmünolojik Faktörler (%1-2)	
• Diğer	
Erkeğe ait nedenler	%30-40

2.4.1. Kadının değerlendirilmesi

Kadın kaynaklı infertilitede etyolojiye bakıldığında olguların %40'ını ovulatuvar disfonksiyon, %40'ını tuba-peritoneal patoloji ve geri kalan %10'unu ise izah edilemeyen grup oluşturmaktadır (1).



Şekil 5. Kadın infertilitesinde etyolojik faktörler

İnfertiliteye yol açan her etken çiftin yaşından etkilenir. Genç kadınlarda ovulasyon bozuklukları daha sıkken tubal-peritoneal patolojiler genç ve yaşlılarda benzer sıklıkta görülmektedir. Kadın hastada detaylı anamnezden sonra (menstrual öykü, obstetrik öykü, cinsel yolla bulaşan hastalıklar, daha önceki kontrasepsiyon yöntemleri, pelvic enfeksiyon, operasyon vb.) jinekolojik (pelvik) muayene yapılmalıdır. Ayrıca vücut kitle indeksi hesaplanmalı, endokrin hastalıkları (tiroid, hiperprolaktinemi, hiperandrojenemi vb.) düşündürülen semptom ve bulgular detaylı bir şekilde değerlendirilmelidir. Kadın genital sistemi (overler, tuba uterinalar ve uterus) ve fonksiyonları sistematik bir biçimde incelenmelidir.

2.4.1.1. Overlerin değerlendirilmesi

2.4.1.1.1. Ovulasyon tespiti

Ovulasyonun tespitinde direkt ve indirekt birçok yöntem kullanılabilir. Örneğin, menstrual öykü basitçe ovulatuvar durumun değerlendirilmesinde yardımcı olabilir. Düzenli, 24-35 günlük menstrual siklus, dismenore öyküsü %97 oranında ovulasyonla uyumlu (15) iken düzensiz siklus da (oligomenore/amenore öyküsü) anovulasyonla ilişkilidir. Bazal vücut ısısı (BVI), ovulasyonun tespitinde kullanılan eski bir yöntemdir. BVI, sabahları yataktan kalkmadan önce oral derece ile ölçülerek kaydedilir. Normal şartlarda, LH pikinden 2 gün sonra vücut ısısı 0.2- 0.5 C artar ve ısıdaki bu artış ortalama 11-16 gün sürer. Bifazik bazal vücut ısısı ovulasyonu teyid ederken luteal fazın uzunluğu hakkındada bilgi verir. Ancak ovulasyonun zamanını belirlemede yetersiz kalması ve hasta için zahmetli bir yöntem olması nedeniyle kullanımı tercih edilmemektedir.

Bundan başka idrarda siklus ortası LH artışını tespit için, ovulasyon belirleyici LH kitleri kullanılabilir. Üriner LH kitleri mid-siklus LH dalgalanmasını ve fertil dönemi tesbit etmeye yardımcı olur (16).Siklus ortası LH artışı ortalama 48-50 saattir. LH'nın yarıömrü kısadır, idrardan hızla temizlenir. Kanda LH seviyesi kritik düzeyi geçtiğinde ovulasyon belirleyici kitler pozitifleşir ve 48 saat içinde ovulasyon gerçekleşir. Fertilitenin en yüksek olduğu dönem LH artışının olduğu gün ve takip eden 2 gündür. Bununla beraber yalancı pozitifliği %7 dir. Mid-luteal serum progesteron seviyelerinin ölçümünde ovulasyonun tesbitinde kullanılan testlerdendir. Midluteal serum progesteron ölçümü, geriye dönük olarak ovulasyon varlığını gösterir. Ancak progesteron konsantrasyonundaki dalgalanmalar normal kadınlarda bile yanlış

yorumlanmalara neden olabilir. Genel olarak 3 ng/ml üzerindeki değerlerin muhtemel ovulasyonu gösterdiği kabul edilmektedir (17).

Endometrial biyopsi ve günleme de ovulasyonu değerlendiren diğer testlerdendir, ancak bu testlerin fertilitite ile ilişkisi net olmadığından klinik kullanımı sınırlıdır. Bugün en sık kullanılan test mid-luteal faz serum luteal progesteron ölçümüdür. Ayrıca TV-USG ile foliküler fazın sonuna doğru gelişen dominant folikül ve sonrasında bu folikülün kollapsının izlenmesi ovulasyonun indirekt göstergesi kabul edilmektedir.

2.4.1.1.2. Ovaryan fonksiyon ve ovaryan rezerv testleri

Menstrual siklusun 2-5. günleri arasında (erken folliküler faz) serum follikul stimüle edici hormon (FSH) ve östradiol (E2) düzeyleri ölçülür. FSH, ovaryan rezervi gösteren indirekt bir belirteçtir. FSH, E2 tarafından negatif feed-back ile regüle edildiğinden, bu iki hormon birlikte değerlendirilmelidir. FSH üst eşik değeri 10-25 IU/L arasındadır (18,19). FSH değeri ne kadar yüksekse ovaryan rezerv o kadar kötüdür. Siklusun 3. günü bakılan FSH değerlerinin yada FSH/LH oranlarının IVF siklus sonuçlarına etkisini araştıran sayısız çalışmalar yapılmıştır. Bu oranların ekzojen gonadotropinlere olan ovaryan cevapla ve IVF başarı oranları ile korele olduğu gösterilmiştir. FSH değeri arttıkça; E2 değerleri, toplanan oosit sayısı ve gebelik olasılığı azalmaktadır. FSH >10 IU/L (10–20 IU/L) ovaryan stimülasyona kötü cevap anlamına gelmektedir (sensitivite %10-30, spesifite %80–100). FSH >18 IU/L ise canlı doğum oranının %100 spesifite ile sıfır olacağı gösterilmiştir (20). Bazal FSH normal seviyelerde ve E2 konsantrasyonu yüksek ise (>60–80 pg/mL), hem ovaryan stimülasyona yanıt oranı hem de gebelik

şansı azalacaktır. FSH ve E2 seviyeleride artmış ise ovaryan stimulasıyona yanıt çok kötü olacaktır (21).

Ovaryan rezerv için kullanılan diğer bir belirteçte anti-müllerian hormondur (AMH). Kadınlarda sadece overlerden üretilen ve transforme edici growth faktörü-beta (TGF-beta) ailesine ait bir dimerik glikoproteindir. AMH primordial follükülden eksprese edilmemekte ve esas olarak primer follüküldeki granüloza hücrelerinde bulunmaktadır. Pre-antral ve antral follüküllerde boyalarla AMH gösterilmiştir. AMH büyüyen follüküllerde follükül dominant oluncaya kadar bulunur (22). Dolayısıyla AMH farklı seviyelerde büyüyen follükülleri temsil eden ve direkt olarak ovaryan rezervi gösteren bir belirteçtir. AMH menapoz sonrası tesbit edilemez düzeylere iner (23). AMH'ın siklik değişkenliği çok az olduğundan siklusun herhangi bir döneminde ölçülebilmektedir. Ovaryan rezerv değerlendirmesinde AMH diğer ovaryan belirteçlerden daha hassas görünmektedir. Düşük AMH düzeyleri (0.2–0.7 ng/mL) ovaryan situmulasıyona kötü yanıtla beraberdir (21). AMH'ın aynı zamanda polikistik over sendromu için tanısal kriter (>3 ng/ml) olduğunu savunan görüşlerde vardır (24).

Transvajinal ultrasonografi (TV-USG) değerlendirmesi, infertilite araştırmasında olmazsa olmaz bir yöntem olup uterus, overler ve tuba uterinalardaki patolojilerin değerlendirilmesini sağlar. TV-USG ile ölçülen erken follüküler fazdaki antral folikül sayısı (AFS) ovaryan rezervin direkt bir belirtecidir. Ovaryen cevap açısından 2-6 mm arasındaki AFS'nın, 7-10 mm arasındaki AFS'dan daha fazla prediktif değerı vardır (25). AFS 3-10 arasında değerismektedir. Yine TV-USG'de overlerin görünüşü değerlendirilebilir. Follüküllerin progresif olarak azalması ile over volümüde azalacaktır. Over volümü (uzunluk x genişlik x derinlik x 0.52) genellikle toplanan oosit sayısı ile koreledir. Düşük over volümü (<3mL) ovaryan stimulasıyona kötü yanıtla beraberdir.

Serum inhibin B ölçümü de over rezerv belirteci olarak kullanılmaktadır. İnhibin B bir glikoprotein olup erken ve mid-folikuler fazda büyüyen folliküllerden salınır. Ancak güvenilirliği düşük olduğundan rutin olarak kullanılmamaktadır. Dinamik ovaryan rezerv testleri olan klomifen sitrat challenge testi ve ekzojen FSH ovaryan rezerv testleri de çok zaman alması ve prediktif değerinin diğer testlere göre düşük olması nedeniyle kullanılmamaktadır (26). Ovaryan rezervi ve ovaryan stimülasyona yanıtı en iyi predikte eden testler, serum AMH ölçümü ve AFS'dir. Aynı zamanda ovaryan hiperstimülasyon sendromu içinde iyi prognostik faktörlerdir (27). Bununla beraber ovaryan rezerv belirteçlerinden hiçbirisi gebelik için iyi bir prognostik faktör değildir.

2.4.1.2. Fallop tüplerinin değerlendirilmesi

Tubal açıklığı göstermek için histerosalpingografi (HSG), histerosalpingo-kontrast sonografi (HKS) veya laparoskopi ile kromotübasyon yapılabilir. HSG ve HKS infertil kadınlarda fallop tüplerini değerlendirmede kullanılan ilk basamak testleridir. IVF endikasyonu olan hastalarda tubal açıklığın varlığının ispatı gerekmemektedir. HSG'nin tubal açıklık için sensitivitesi %65, spesifitesi %83'dür. HSG'de radyografik görüntü yağ-bazlı yada su-bazlı kontrast maddenin enjeksiyonundan sonra aralıklı olarak alınır. Kontrast madde alerjisi, gebelik ve aktif pelvik enfeksiyon HSG için kontrendikasyon oluşturur. HSG, endometriyumun ince olduğu, proliferatif fazda, menstrual siklusun 6-11. günleri arasında yapılır. HSG ile uterin kavite, fallop tüplerinin yapısı, hidrosalfinks varlığı ve tubal fimozis değerlendirilebilir. İşleme bağlı enfeksiyonu (%0.3- %3.1) önlemek amacıyla profilaktik antibiyotik tedavisi önerilir. Proksimal tubal oklüzyonlar, tubal spazm, küçük debrisler ya da minimal adezyonlara bağlı olabilir. Tubal hasar için yüksek risk taşıyan hastalarda, HSG işlemi yanında klamidya trohomatis

immunglobulin G taramasında yapılabilir. Negatif seroloji ve normal HSG düşük olasılıkla tubal hastalığı düşündürür. Pozitif serolojisi olan hastalarda HSG sonrası yüksek tubal patoloji ve komplikasyon riski vardır (28). Klamidya trohomatis IgG taraması rutin uygulamada kullanılmamaktadır. HKS ise ultrasonografi eşliğinde uterin kaviteye salin ya da kontrast madde verilmesi işlemidir. Kaviteye sıvı verilmesi sonrasında douglas boşluğunda sıvının olması en azından bir tubanın açık olduğunu gösterir (29).

Laparoskopik kromotübasyon işlemi ise tubal açıklığı değerlendirmek için altın standart tetkiktir. Laparoskopi ile abdominal kavite visualize edilir, eş zamanlı hem tanı hem de tedavi yapılabilir. Ancak laparoskopi invaziv bir tetkik olduğundan, HSG'de tubal patoloji düşünüldüğünde endikedir (17).

2.4.1.3. Uterusun değerlendirilmesi

Endometrial polip, submukozal myom, adezyon ya da uterin septum gibi intrauterin lezyonlar spontan fertiliteye engel olabilir, YÜT'de gebelik oranlarını azaltabilirler (30). İki boyutlu TV-USG ile uterus kolay ve ucuz bir şekilde değerlendirilebilir. HSG ile hem tubalar hem de uterin kavite değerlendirilebilir. HSG'de görülen dolma defektleri, hava kabarcıkları ve mucus, menstrual kalıntılara bağlı olabileceği gibi yer kaplayan bir lezyonu da gösteriyor olabilir. HSG'nin histeroskopi ile karşılaştırıldığında uterin kaviteyi değerlendirmedeki, sensitivitesi %60-%98, spesifitesi %15-%80'dir (31,32). Dolayısıyla yalnızca uterin kaviteyi değerlendirmek için HSG spesifik olarak çekilmemelidir.

Saline histerosonografi (SHS), USG eşliğinde uterin kaviteye salin infüzyonu verilmesi işlemidir. SHS sensitivitesi %78 -%100, spesifitesi ise %71-%91 arasındadır

(33,34,35). SHS endometriyal polip yada submukkozal myom tanısında son derecede etkilidir. Ancak uterin kaviteyi en doğru şekilde değerlendiren yöntem histeroskopidir. Uterin kavitenin değerlendirilmesi sonrası tüplerdeki bütünlüğü değerlendirmek için HKS yapılabilir. Uterin anomaliler için MRI ve 3 boyutlu USG (3D-USG) yada histerescope ile laparoskopi kombinasyonu da yapılabilir. MRI noninvaziv ama pahalı bir tetkik olup laparoskopi de invaziv ancak güvenilirliği yüksek bir tetkiktir. Mülleryan konjenital anomalileri tesbit etmede 3D-USG yüksek başarıya sahiptir.

2.4.2. Erkek faktör infertilitesi

İnfertilite problemi reproduktif çağıdaki erkeklerin %6'ında bulunmaktadır. Geçmişte erkek infertilitesinin nadir bir neden olduğu düşünüldüğünden, bütün ilgi kadın üzerine yoğunlaşmış, infertilitede erkeğin rolü gözardı edilmiştir. Oysaki infertil çiftler araştırıldığında %20 olguda erkek faktörü tek başına neden iken, diğer %20- 40 olguda eşlik eden faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü tarafından 1993 yılında 7273 evli infertil çift üzerinde yapılan bir çalışmada infertil çiftlerin %48'inde mutlaka erkek faktörün işin içine girdiği gösterilmiştir. Erkek partnerin değerlendirmesine, 1 yıl düzenli korunmasız ilişkiye rağmen gebe kalamama durumunda kadın ile eş zamanlı başlanmalıdır. Ancak, erkek açısından infertiliteye neden olabilecek aşırı bir risk varsa ya da kadın partner >35 yaş ise değerlendirme daha erken yapılmalıdır. İnfertilite araştırması yapan klinisyen erkek üreme fonksiyonlarını temel olarak nasıl değerlendireceğini bilmeli, daha ileri ve sofistike değerlendirmeye ihtiyaç duyan hastalarında uygun biçimde yönlendirebilmelidir. Doğru tanı ve tedavi ile birçok infertil erkeğin partneri gebe kalabilmektedir.

2.4.2.1. Erkek infertilitesi nedenleri (36)

I. Hipotalamik- pituitar bozukluklar (%1-2)

a. Konjenital nedenler

- İdiopatik izole gonadotropin eksikliği
- Kallmann sendromu
- Tek gen mutasyonları (GnRH reseptör, FSH-beta, LH-beta, pituitar gelişime etki eden herhangi bir transkripsiyon defekti)

b. Edinilmiş nedenler

- Hipotalamik ve pituitar tümörler (makroadenom, kraniyofarenjiyom)
- İnfiltratif hastalıklar (sarkoidozis, histositozis, tranfüzyon siderozis, hemokromatozis)
- Hiperprolaktinemi
- İlaçlar (GnRH analogları, androjenler, östrojenler, glukokortikoidler, opioidler)
- Şiddetli hastalıklar yaralanma
- Enfeksiyonlar (menenjitis)
- Obezite

II. Primer gonadal bozukluklar (%30-40)

a. Konjenital nedenler

- Klinefelter sendromu
- Y kromozom delesyonları
- Tek gen mutasyonları ve polimorfizm (androjen, östrojen yada FSH reseptörleri ile ilgili)
- Kriptorşidizm

b. Edinilmiş nedenler

- Varikosel
- Enfeksiyonlar (orşit, lepra, tuberkülozis)

- İlaçlar (aklileyici ajanlar, alkol, antiandrojenler, simetidin)
- Radyasyon
- Çevresel gonadotoksik maruziyeti (ısı, sigara, metaller, organik çözücüler, pestisitler)
- Kronik hastalıklar (renal yetmezlik, siroz, kanser, orak hücreli anemi, amiloidoz, vaskülitler, çöliyak hastalığı)

III. Sperm transport bozukluklar (%10-20)

- Epididimal obstrüksiyon veya disfonksiyon
- Konjenital bilateral vas deferens yokluğu (kistik fibrozis gen mutasyonu-CFTR ile ilgili)
- Vas deferenste obstrüksiyona neden olan enfeksiyonlar (gonore, klamidya, tüberkülozis)
- Vazektomi
- Kartagener sendromu (primer silier diskinezi)
- Young sendromu
- Ejakulatuvar disfonksiyon (spinal kord hastalıkları, otonomik disfonksiyon)

IV. İdiopatik nedenler (%40-50)

Erkek infertilitesinin %40-50'inin nedeni bilinmemekle beraber GnRH ve gonadotropin eksikliğine neden olan herhangi bir durum, erkekte infertiliteye yol açabilir. En sık görülen konjenital neden, defektif GnRH sekreyonuna ya da GnRH yokluğuna bağlı ortaya çıkan idiyopatik izole gonadotropin eksikliğidir. Kallmann sendromunda, seksüel infantilizm ile beraber renal anomali, sinkinezi, işitme kaybı, orta hat defektleri, anozmi gibi semptomların varlığı tipiktir. Hipotalamik yada hipofizer tümörler, infiltratif hastalıklar (sarkoidozis, hemokromatozis vb.), kronik sistemik hastalık (DM), kafa travması, şiddetli malnutrisyon ve obezitede hipogonadotropik

hipogonadizmle ilişkili olabilir. Azospermi ve oligozoosperminin başlıca nedeni olan primer testiküler yetmezlik (hipergonadotropik hipogonadizm) konjenital ve edinsel nedenlerle ortaya çıkabilir (Klinefelter sendromu, Y kromozom delesyonları, tek gen mutasyonları ve kriptorşidizm, polimorfizm). Klinefelter sendromu, primer testiküler yetmezliğin en sık nedenidir. En sık 47, XXY formu görülür. Uzun boy, düşük kemik mineral dansitesi, jinekomasti, azalmış penil uzunlukla karakterizedir. Klinefelter sendromlu erkeklerde seminifer tübüller ve sertoli hücre hasarına sekonder olarak küçük ve sert testisler vardır. Serum FSH ve LH seviyeleri artmış, testosteron sentezi azalmıştır. Y kromozom mikrodelesyonları infertil erkeklerin %20'ini etkileyerek şiddetli oligozoospermi ve azospermiye neden olur. Spinal kord hasarlarına ya da sempatektomiye bağlı olarakta sperm transportu bozulduğundan infertilite ortaya çıkabilir.

2.4.2.2. Erkek hastanın değerlendirilmesi

İnfertilite bir jinekolog tarafından araştırılıyorsa, erkek partneri değerlendirmede (öyküsünde genital sistemde bir anormallik, travma, cerrahi veya seksüel disfonksiyon olmadığı sürece) tek başına sperm analizi yeterlidir. Şüpheli öykü veya anormal semen analizi (en az iki) varlığında, infertilitenin etyolojisine yönelik ek testler istenmelidir (endokrin değerlendirme, ultrasonoğrafi, genetik tarama, post-ejakulatuar idrar analizi, semen ve spermle ilgili özel testler).

Erkek partner değerlendirilirken, çocukluk çağında geçirilen hastalıklar ve gelişimsel hikaye yanında geçirilmiş cerrahi/sistemik hastalıklar, çevresel toksinlere maruziyet, sıcak, sigara, alkol kullanımı gibi detaylar sorgulanmalıdır. Alt üriner sistem ile ilgili semptomların yanısıra ereksiyon ya da ejakülatuar fonksiyonlarda dikkatli bir

şekilde irdelenmelidir. Ek olarak sistemlerle ilgili sorgulamada (pulmoner hastalık, üst solunum yol enfeksiyonu vs.) kartegener sendromu (immotil silia sendromu), genetik geçişli young sendromu ve kistik fibrozis gibi hastalıkların teşhisi açısından önemlidir.

Erkeğin fizik muayenesi bu konuda eğitimi ve tecrübesi olan bir jinekolog tarafından ya da sıklıkla bir ürolog tarafından yapılır. Fizik muayene genel olarak sekonder seks karakterleri üzerinde yoğunlaşmaktadır. Vücuttaki kılların dağılımı, jinekomastinin varlığı, iskelet gelişimi ve eksternal genitalia incelenmelidir. Genital muayenede penil üretral meatusun lokalizasyonu, testislerin büyüklük ve oranları değerlendirilmelidir. Testis büyüklüğü Prader orşimetrisi ile ölçülür normal büyüklük 12-30 ml arasında olmalıdır. Küçük testisler testiküler disfonksiyon yada hipogonadizmle beraber olabilir. Epididimisin pozisyonu, büyüklüğü ve bilateral vas deferensler dikkatli bir şekilde değerlendirilmelidir. Epididimisin kistik yada nodüler olarak ele gelmesi konjenital yada inflamatuvar değişikliklere bağlı obstruksiyonları düşündürür. Konjenital bilateral vas deferenslerin yokluğu kistik fibrozisle birlikte olabilir. Hasta ayakta iken spermatik kordların değerlendirilmesi de varikozel tesbiti için önemlidir. Yine dijital rektal muayene ile seminal veziküllerdeki kistler ya da prostat neoplazileri tesbit edilebilir.

2.4.2.2.1. Laboratuvar araştırmaları

2.4.2.2.1.1. Semen analizi

Semen analizi infertil çiftin değerlendirilmesinde önemli bir parametre olmakla beraber fertilité için bir kriter olarak kabul edilmemektedir. Semen analizi belli kriterlere uyularak androloji formasyonu olan laboratuvarlarda yapılmalıdır. İlk semen analizi 1902 yılında Edward Martin tarafından yapılmış, 1956 yılında Macleod sperm

hareketlilik ve morfolojisinin önemine değinmiştir. Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) 1980 yılında semen analizi için bir kitapçık çıkartarak ilk standart tetkik kriterlerini belirlemiştir (37).

Semen analizi için cinsel perhiz süresi ortalama 2-7 gün olmalıdır. Bu süre uzadığında sperm hareketliliği olumsuz etkilenirken, süre kısalsa sperm sayı ve volümü azalmaktadır. Sperm örnekleri mastürbasyon yöntemi ile ya da spermid içermeyen özel prezervatifler kullanılarak cinsel ilişki sırasında toplanabilir. Eğer örnek dışarıdan getiriliyorsa 1 saat içerisinde ve vücut sıcaklığında taşınarak laboratuvara teslim edilmelidir. Sperm örneğin nasıl verildiği, örnek vermede zorluk olup olmadığı, örnekte kayıp olup olmadığı rapor edilmelidir. Aspermi semenin olmamasını tanımlar ki bu durum retrograt ejakülasyon, psikolojik ya da nörolojik nedenlere bağlı olabilir. Retrograt ejakülasyon durumunda orgazm sonrası idrar analizi yapılarak (idrara çeşitli solusyonlarla alkali hale getirilir) sperm değerlendirilmelidir. Semen analizinde, volüm, pH, konsantrasyon, canlılık, motilite ve morfoloji değerlendirilir. WHO semen analizinde kullanılan referans değerleri 2010 yılında yeniden gözden geçirilerek değiştirdi (Tablo 2).

Tablo 2. WHO 2010 semen analizi referans değerleri

Volume	1.5 (1.4-1.7) mL
Sperm konsantrasyonu	15 (12-16) milyon/mL
Total sperm sayısı	39 (33-46) milyon/ejakulat
Total motilite	%40 (38-42)
Progresif motilite	%32 (31-34)
Normal morfoloji	%4 (3-4)
Vitalite	%58 (55-63)

WHO'nun 2010 yılında tekrar değerlendirilerek revizyon yapılan referans değerlerinin nasıl seçildiğini anlamak son derece önemlidir. Öncelikle referans değerlerini oluşturan populasyon 12 aydan kısa sürede gebelik oluşturmuş fertil erkeklerden oluşmuştur (38). Dolayısıyla referans değerlerinin altındaki erkeklerde infertil olarak değerlendirilemezler. İkinci olarak referans populasyonun ejaküle edilmiş spermatozoaları esas alınarak yapılan ölçümler hastaların fertilizasyon kapasitesini tanımlayamaz. Dolayısıyla semen analizi gebe kalmakta güçlük çeken çiftlerin değerlendirilmesi ve ileri araştırmaların yapılmasını sağlamak amaçlı klinisyene yön verecek olmazsa olmaz bir tetkiktir ancak YÜT'de bile fertilitate başarısını predikte etmek için kullanılamaz.

Semen analizi ile ilgili bazı tanımlamalar:

- Normozoospermi: Referans değerlerle tanımlanan normal ejakülat
- Oligozoospermi: Referans değerden düşük sperm konsantrasyonu
- Astenoospermi: Hareketlilik için referans değerden daha düşük değer
- Teratoospermi: Morfoloji için referans değerden daha düşük değer
- Oligoastenoteratoospermi: Her üç değişkenin de bozukluğu durumu ifade eder
- Azospermi: Ejakülatta hiç spermatozoa bulunmaması
- Aspermi: Ejakülat elde edilememesi
- Kriptoospermi: Ejakülatta, yalnızca santrifüj sonrası spermatozoa görülmesi

Ejakülatın akıcı özellik kazanmasına likefaksiyon denir. Örneğin verilmesini takiben semen 5-30 dakika içerisinde likefiye (sıvılaşma) olmalıdır. Seminal vezikülden gelen sıvılar semenin koagüle olmasını sağlarken, prostattan salgılanan ve prostat spesifik antijen ile plazminojen aktivatörü içeren proteolitik enzimler de likefaksiyona neden olurlar. Likefaksiyon için ejakülat 37 C'de bekletilir. Normal süre 30 dakika olup 60 dakika üzerinde sıvılaşmanın olması aksesuar glandlarla ilgili patolojiyi düşündürür.

Normal ejakülat volümü 2-5 ml arasındadır. Semen volümünü esas olarak erkek aksesuar glandları olan seminal veziküller ve prostattan gelen sekresyonlar oluşturur. Düşük semen volümü, seminal vezikülün ya da prostatın içindeki ejakülatuvar duktusun yokluk veya tıkanıklığı ile ilişkili olabilir. Konjenital bilateral vas deferenslerin olmadığı erkeklerde düşük semen volümü seminal veziküllerin yetersiz gelişimine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Ayrıca düşük volüme, örneğin toplanması ile ilgili problemler, androjen eksikliği ve parsiyel retrograd ejakülasyonda neden olabilir. Artmış semen volümü aksesuar glandlardaki aktif inflamasyona sekonder artmış eksüdasyon nedeniyle olabilir. Volümün 6 ml üzerinde olması sıklıkla azospermik erkeklerde görülmektedir.

Normal semen pH değeri 7.2-8.0 arasındadır. Semen pH'ı seminal vezikülden gelen alkalın sekresyonlar ile prostatdan üretilen asidik sekresyonlar arasındaki dengeyi gösterir. Artmış pH, enfeksiyonu, azalmış değerlerde ejakülator kanal (konjenital bilateral vaz deferens agenezisi) ve seminal vezikül anomalisini düşündürür.

2.4.2.2.1.2. Semen mikroskopik olarak değerlendirilmesi

Semen analizinde mikroskopik değerlendirme faz kontrast ataçmanlı mikroskopta ve 10 x 20 büyütmede yapılmalıdır.

2.4.2.2.1.3. Sperm Sayısı

Likefaksiyonu tamamlanmış örnekte sperm sayısı ya spermilerin tamamının immobilize edilmesi ile ya da hareketli ve hareketsiz spermilerin tamamının değerlendirilmesi ile yapılır. Sperm sayımı için hemositometre, microcell, CellVU, Standart Count, Makler gibi kamaralar mevcut olup en yaygın kullanılanı Makler sayım kamarasıdır. Makler kamarada doğru değerlendirme için koyulan ejakülat 10 µL'i geçmemelidir. Kamaranın kapağı kapatıldığında 4 noktada olan indikatörlerdeki renk değişikliğinin görülmesi,

hava kabarcığının olmaması ve kamaranın 37 °C'de beklemiş olması gerekmektedir. Sağlıklı sonuç için 100 karelik alanda en az 10 karede sayım yapılır ve 10 karede saptanan sayı milyon/ml olarak değerlendirilir. Geleneksel yaklaşımda sperm dansitesi $<20 \times 10^6$ /mL ise oligozoospermiden sözedilir. Sperm konsantrasyonu $<5 \times 10^6$ /mL ise şiddetli oligozoospermi olarak tanımlanır. Şiddetli oligozoospermisi olan hastalara ek olarak endokrin ve genetik değerlendirme yapmak gerekmektedir. WHO'nun 2010 sperm hazırlama klavuzunda, sperm sayısı için alt sınır 15 milyon/ml olarak belirlenmiştir.

2.4.2.2.1.4. Sperm motilitesi

Sperm motilitesi Makler kamara altında, oda ısısında (20- 24 °C) değerlendirilir. Doğru sonuç için sayım kamarasının sayım yapılacak 10 sahası önceden laboratuvar protokolleri ile belirlenir. Sperm sayısı düşük ise 100 karede spermler sayılarak kaydedilmelidir. Sağlıklı değerlendirme için 2 ayrı incelemede en az 200 sperm hücresinin hareket özellikleri değerlendirilmeli ve iki sonuç arasındaki fark %5'den fazla olmamalıdır.

WHO'nun 2010 yılında yayınlanan klavuzunda sperm hareketliliği, progresif motilite (PR), nonprogresif motilite (NP) ve immotilite olarak sınıflandırmıştır.

1. Progresif motilite (PR): Spermatozoanın hızına bakılmaksızın ileri doğru aktif hareketi
2. Nonprogresif motilite (NP): Spermatozoanın ileri doğru aktif hareketi olmaksızın yerinde hareketliliği
3. İmmotilite: Hareketsiz spermatozoa

Spermlerin %32'i progresif motil (PR) olmalıdır. PR+NP alt sınırı da %40 olarak belirlenmiştir (39). Daha önceden tariflenen ileri hızlı (+4) ve ileri yavaş (+3) hareketlilik tanımlamaları, ileri hareketlilik hızının objektif değerlendirilememesi

nedeniyle artık kullanılmamaktadır (39). Bununla beraber motilite değerlendirmesinde kullanılan ifade, PR+NP motilitemi yoksa progresif motilitemi belirtilmelidir. Ayrıca yüksek oranda hareketsiz sperm içeren semen örneklerinde, boyama teknikleri (eosin boyama, eosin-nigrosin boyama) ya da hipo-osmotik şişme testi ile canlı sperm oranları tesbit edilmelidir.

2.4.2.2.1.5. Sperm morfolojisi

Fertil erkeklerin infertil erkeklerden ayrılmasında sperm konsantrasyonu ve progresif motilite kullanılmasına rağmen esas belirleyici kriter sperm morfolojisidir. Sperm morfolojisi mikroskopun keşfedilmesi sonrası tanımlanmış ve ilk morfolojik sınıflandırmayı Williams 1934 yılında yapmıştır. Günümüzde bir çok merkezde WHO sınıflandırması esas alınmakla beraber 1987 yılında Kruger'in tanımladığı kesin kriterler, fertilizasyon ve gebelik oranları ile yakın ilişkisi nedeniyle morfolojik değerlendirmede tercih edilmektedir (Tablo 3).

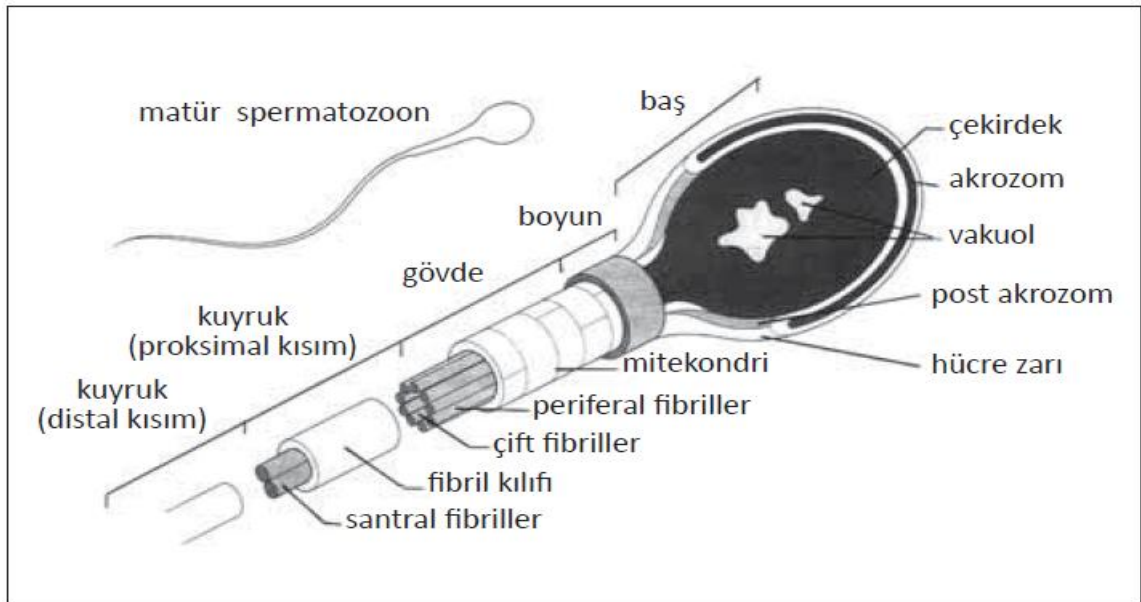
Tablo 3. Kruger kesin kriterlerine göre sperm morfolojisi

Baş	Uzunluk 5-6 mikron Genişlik 2.5-3.5 mikron
Akrozom	Başın %40-%70 ini oluşturmali
Orta parça	Genişlik 1 mikron Uzunluk başın 1.5 katı olmalı
Kuyruk	Uzunluk yaklaşık 45 mikron Uniform Orta parçadan daha ince Kıvrılmamış ve kırık yok
Sitoplazmik damlacık	Baş alanının %30-70 inden az ve Sadece ora kısımda lokalize

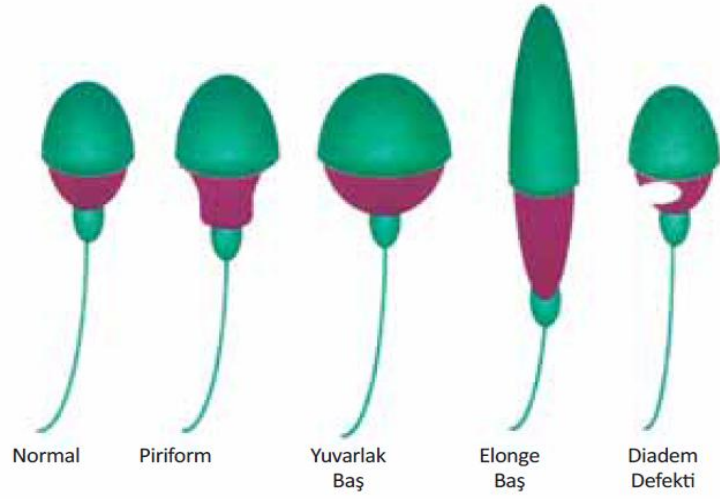
Sperm morfolojisini değerlendirmek, biyologlar arası yorum farklılıkları ve eksternal kontrol mekanizmalarının olmaması nedeniyle zordur.

Sperm boyu yaklaşık olarak 60 μm uzunluğunda olup baş, boyun, gövde ve kuyruktan oluşmaktadır (Şekil 6). Normal morfolojiye sahip spermlerin başı 2.5- 3.5 μm eninde, 5-6 μm boyunda kontürleri düzgün, oval olmalıdır (Şekil 6).

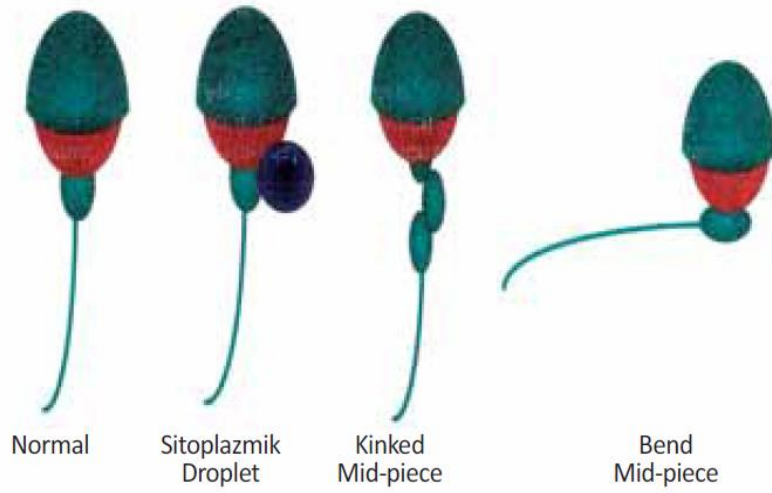
Spermatozoaların morfolojik anomalileri baş, boyun-orta kısım ve kuyruk anomalileri şeklinde sınıflandırılır. Morfolojik anomaliler genel olarak spermin birden fazla kısmında ortaya çıkmaktadır. Baş anomalileri küçük, büyük, yuvarlak, uzamış, amorf ve vakuollü olarak sınıflandırılır (Şekil 7). Sperm boyun bölgesi, 4-5 μm uzunluğunda başın aksiller kısmına düzgün olarak bağlanmış olmalıdır. Boyun bölgesinde lokalize stoplazmik cisimcik başın yarısından büyük olmamalıdır. Başın asimetrik olarak orta parçaya girmesi, kalın ve düzensiz boyun, ince boyun veya bunların kombinasyonu olabilir (Şekil 8).



Şekil 6. Normal sperm morfolojisi

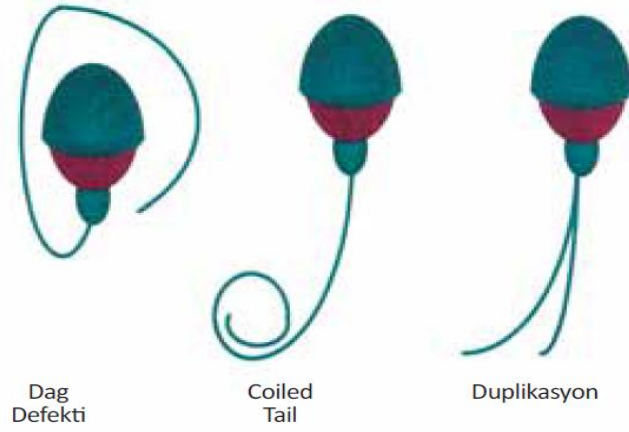


Şekil 7. Sperm baş defektleri



Şekil 8. Sperm boyun defektleri

Kuyruk bölgesi, 45-50 μm uzunluğunda, boyun bölgesinden daha ince düzgün kıvrımlı ve son kısmına doğru incelen bir yapı oluşturmaktadır. Kuyruklar anomalileri, birden çok kuyruk, kısa, keskin açılı, koil şekilli, düzensiz yada bunların kombinasyonu olabilir (Şekil 9). Spermatogenik süreç anormalliklerine bağlı olarak spermatozoa sitoplazması büyük ve düzensiz bir sitoplazma kalıntısı olarak da görülebilir.



Şekil 9. Sperm kuyruk anomalileri

Defektif spermatogenezis ve epididimal patolojiler sperm morfolojisinde anormalliklere neden olabilir. Anomalinin tipine bağlı olarak anormal görünümlü spermeler düşük fertilizasyon potansiyeline ve anormal DNA yapısına sahiptirler. Özellikle ciddi morfolojik anomalilerin (teratozoospermi, globozoospermi vs.) fertilizasyon, gebelik ve implantasyon üzerine olumsuz etkileri nedeniyle bu olgularda ICSI altın standart tedavi olmuştur (40).

Koitus ile vajene boşalan spermeler ilk olarak mukus bariyeri ile karşılaşır. Bu bariyer bir nevi filtre görevi görür ve fertilizasyon kapasitesi yüksek spermeler mukusu geçerek uterusun kaviteye ulaşır. Normal morfolojiye sahip sperm, postkoital testlerden elde edilen ya da zona pellusidaya bağlanan spermelerden elde edilen morfolojik kriterlere göre tanımlanır (41-44).

Morfolojik değerlendirme immersiyon objektifi ile (10x100) ve lam üzerine ince tabaka yayılmış boyanmış spermelerin incelenmesiyle yapılır. Kullanılacak lamalar %70 etanol içeren kaplarda saklanıp kullanılmadan önce iyice kurutularak olası yanlış değerlendirmeler önlenmelidir. Bazal sperm sayısı ≥ 20 milyon/ml ise örnekten 5 μ L alınmalıdır. Sperm sayısı daha az ise örnekten 10-20 μ L alınarak 45 derecelik açı ile

homojen bir şekilde lama yayılarak kurutulup sonrasında boyanmalıdır. Kuruma sonrası 10 x 40 büyütmede her sahada 40 spermin görülmesi, kümeleşme olmaması ve düzgün yayılım olması işlemin başarılı olduğunu gösterir.

WHO'un 2010 yılındaki bildirgesinde normal sperm morfoloji alt sınırı %4 olarak belirlenmiştir. Kruger kriterlerine göre de bu alt sınır %5 olarak kabul edilmiştir. Kruger kriterlerinde tanımlanan sınırlar zona pellusidaya bağlanan spermlerin morfolojik görüntüleri esas alınarak hazırlanmıştır. Boyama öncesinde spermlerde bir miktar küçülme olacağından morfolojik değerlendirme için kullanılan boyama türüne göre spermler farklı boyutlarda olabilir. Örneğin Quik yönteminde spermler normal boyutlarına yakın büyüklükte iken Papanicolau yada Spermac ile yapılan boyamalarda sperm daha küçük olarak ölçülecektir. WHO'nun 2010 yılında yayınladığı klavuzda Papanicolau boyamasının sperm morfolojisi için ideal yöntem olduğu belirtilmiştir (45).

Sperm morfolojisi spermatogenez kalitesini ve fertilizasyon yeteneğini gösterir (46-48). Sripada ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptığı bir çalışmada azoospermi ya da anovulasyonu olmayan 1426 subfertil çiftin takiplerinde spontan gebelik oluşturan 488 çift ile gebelik meydana gelmeyen 988 çift karşılaştırılmış ve spontan gebelik üzerine etkili parametrelerin; infertilite süresi, sperm sayısı ve morfolojisi olduğu gösterilmiştir (49). Genel olarak sperm morfolojisindeki bozulma ile gebe kalma olasılığı ve gebe kalmak için geçen sürenin uzadığı görülmektedir (50). Van Zyl ve arkadaşlarının 1990 yılında yapılan çalışmalarında da normal morfoloji oranı <%4 olan grupta spontan gebelik oranı %11.5, %4-9 olan grupta %21.5 olarak tesbit edilmiştir (51). Yine Sofikitis ve arkadaşlarının bir çalışmasında fertil erkeklerle, IVF programına katılmış infertil erkeklerin semen örnekleri karşılaştırılmış ve normal sperm morfolojisi >%22 olduğunda %96 oranında gebelik elde edildiği bildirilmiştir (52). Kruger ve arkadaşları ise 1994 yılında sperm dansitesi >20 milyon/ml ve motilite >%30'un üzerinde olan bir

grup erkekte normal sperm morfolojisi <%14 ise IVF ile gebelik oranının %37 >%14 ise %91 olduğunu göstermişlerdir (53). Coetze tarafından yapılan bir meta analizde 18 yayın değerlendirilmiş ve IVF olgularında gebelik oranları normal sperm morfolojisi >%5 olan grupta %26, <%5 olan grupta %15.2 olarak bulunmuştur (54). Bir çok merkezde %0-4 arasındaki normal sperm morfolojisi (şiddetli teratozoospermi) IVF ve ICSI için endikasyon kabul edilmektedir. Spermde anormal görünüm oluşturan durumlardan biriside akrozom yokluğu olup nükleer yapıdaki değişikliğe bağlı olarak sperm başının yuvarlak (globozoospermia) olması ile karakterizedir. Bu patolojide sperm hareketleri normal iken akrozom reaksiyonu gerçekleşemediğinden oosit aktivasyonu (fertilizasyon) olmayacaktır. Genel populasyonda %0.1-0.5 oranında görülen bu durum infertil erkeklerde %2-3'e çıkmaktadır (55).

2.4.2.2.1.6. Semende sperm dışı hücreler

Ejakülat içerisinde ürogenital sisteme ait epitel hücreleri, prostata ait hücreler, spermatogenetik seriye ait hücreler ya da lökositler bulunabilir. Bu hücreler “yuvarlak hücreler” olarak adlandırılır. Spermogramda yuvarlak hücre üst limiti 5 milyon/ml olarak belirlenmiştir (39). Lökositler, semende çoğunlukla nötrofiller şeklinde bulunmakta olup >1 milyon/ml olduğunda (lökositospermi) tam idrar tahlili, idrar kültürü ve semen kültürü yapılmalıdır (56,57). Semende bulunan lökositler, spermin hareketliliğini ve oksidatif stress oluşturarak DNA bütünlüğünü bozabilir.

2.4.2.2.2. Endokrin değerlendirme

Semen analizi anormal ise testiküler disfonksiyon ve genital yol obstrüksiyonlarını, hipotalamo-pituiter aks bozukluklarından ayırmak için ileri testler yapılmalıdır. Tüm oligozoospermik hastalarda serum FSH ve total testosteron ölçümleri yapılmalıdır. Eğer

klirik bulgular uyumlu ise ek olarak LH, prolaktin ve TSH istenebilir. Düşük FSH, LH (<2 IU/L) ve testosteron seviyeleri hipogonadotropik hipogonadizmi düşündürür. Primer testiküler yetmezlikte ise sperm konsantrasyonu düşük, FSH ve LH düzeyleri yüksek (>8 IU/L) olacaktır. Testiküler yetmezlik yalnızca spermatogenezisi bozarsa bu durumda testosteron ve LH seviyeleri normal sınırlarda olacaktır.

2.4.2.2.3. Ultrasonografik değerlendirme

Ultrasonografi, erkek fertilitesi değerlendirilirken kullanılabilen noninvaziv bir tetkiktir. Fizik muayenede şüphelenilen patolojilerin ya da semen ve hormonal analizdeki anormalliklerin değerlendirilmesi için kullanılabilir. Skrotal ve inguinal patolojileri değerlendirmek için skrotal, prostat ve ejakülatuar kanalları değerlendirmek için de transrektal USG tercih edilir.

2.4.2.2.4. Genetik testler

Şiddetli oligozoospermi ve testiküler yetmezlik olgularında, karyotip analizi ve Y-kromozom mikrolelesyonları araştırılmalıdır. Karyotip analizi ile kromozomal yapısal anomaliler (Robertson ya da resiprokal translokasyonlar) ve sayısal kromozomal anomaliler tesbit edilebilir. İnfertil erkeklerde en sık görülen kromozomal anomali klinefelter sendromudur (KS). Azospermilerin %11'ini non-mozaik KS oluştururken, şiddetli oligozoospermi vakalarının %0.5'ini mozaik KS oluşturur. (58). Azospermili KS hastalarının yarısında elde edilen sperm ICSI işlemi için yeterli olmaktadır. Bu gruptaki artmış sperm kromozomal anöploidi riski nedeniyle YÜT öncesinde preimplantasyon genetik tanı (preimplantasyon diagnosis-PGD) açısından çiftler bilgilendirilmelidir.

Y kromozomunun kısa kolunda (Yp) cinsiyet belirleyici gen (sex determination gene-SRY) bulunur. Y kromozomunun uzun kolu (Yq) ise spermatogenezisde etkili genleri içerir. Y kromozom mikrodelsyonları, Yq'da bulunan 3 spesifik gen bölgesinden birini etkileyerek (azoospermik faktör –AZF a, b, c) spermatogenezisi ciddi bir şekilde bozar. AZFa Yq11'in proksimalinde (Yq11.21), AZFb ve AZFc, Yq11'in distalinde (q11.23) lokalizedir (59). Azospermik erkeklerin %7'inde AZF mikrodelsyonları saptanır (60). AZFc, Y kromozom mikrodelsyonlarının %60'ını oluşturur. AZFc mikrodelsyonu olan erkeklerin 1/3'ünde şiddetli oligozoospermi varken geri kalanı azospermiktir. AZFc delesyonu olan azospermik erkeklerin yarısında testisten sperm elde edilmesi (TESE), ICSI işlemi için yeterli olmaktadır. Eğer sperm elde edilir ve ICSI gerçekleştirilirse mutasyonun vertikal geçişine bağlı olarak infertilite de kaçınılmaz bir şekilde erkek çocuğa geçecektir. AZFa ile AZFb bölgelerini içeren delesyonlarda hastalar genel olarak azospermiktirler (61). AZFa delesyonlu erkeklerde histolojik olarak testiste yalnızca sertoli hücreleri varken, AZFb delesyonu olan erkeklerde primer spermatosit aşamasında germ hücre duraklaması olduğundan, bu grupta TESE ile sperm elde edilmesi oldukça zordur.

Primer obstrüktif azosperminin en sık nedeni, konjenital bilateral vas deferens yokluğudur. Bu erkeklerin %50'inden fazlasında heterozigot CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) gen mutasyonu vardır (62). Kistik fibrozis, otozomal resesif geçiş gösteren bir hastalıktır. Sıklığı etnik ırklar arasında farklılık göstermekle beraber Ashkenazi Yahudileri arasında 1/25 oranında görülmektedir. Klinik fenotip obstrüktif azospermi ile uyumludur. Konjenital bilateral vas deferenslerin yokluğu olan hastaların %10'unda renal anomaliler mevcuttur. Obstrüktif azospermili erkeklerde CFTR gen mutasyonu mutlaka bakılmalıdır. Kistik fibrozis ile ilişkili

1200'den fazla mutasyon bulunmuştur, dolayısıyla negatif sonuç bilinmeyen mutasyonları ekarte ettirmemektedir. Erkekte CFTR gen mutasyonu tesbit edilirse kadın partnerinde CFTR açısından taranması gerekmektedir. Her iki partnerde de CFTR gen mutasyonu tesbit edilirse IVF/ICSI uygulamasında PGD önerilmelidir.

2.4.2.2.5. Özel Testler

2.4.2.2.5.1. Sperm Otoantikoları

Kan-testis bariyeri spermlerin dolaşıma geçişine izin vermediğinden spermlere karşı bir immun yanıt oluşmaz. Bu bariyerin bozulduğu durumlarda (testikuler torsiyon, travma, genital enfeksiyonlar vb.) spermler dolaşıma geçerek antijenik yanıtı uyatabilirler. Sperm otoantikolarının dolaşımında bulunması klinik açıdan her zaman anlamlı değildir. Ancak sperme bağlı antikor varlığında sperm motilitesinde bozukluk ya da fertilizasyonda düşüş izlenebilir. İzole astenozoospermilerde anti-sperm otoantikoları akla gelmelidir. Sperm otoantikoları servikal faktör infertilitesine neden olabilmektedirler.

Sperme bağlı antikorları tesbit etmek için lateks partiküller kullanılır. Bu partiküller insan immunglobulinine karşı geliştirilmiş antikorlara bağlı bulunurlar ve selektif olarak antikor bağlı spermlere bağlanırlar. Spermlerin %50'den fazlası lateks ile işaretlenmiş antikorlarla kaplanırsa test klinik olarak anlamlı kabul edilir. Sperm otoantikor testi rutin olarak kullanılmamaktadır, çünkü yol açtığı servikal faktör infertilitesinin tedavisi IUI işlemi olup bu işlemle başarı elde edilemezse de IVF veya ICSI uygulanmaktadır.

2.4.2.2.5.2. Sperm penetrasyon testleri

Oositi saran zona pellusida hem aynı türe ait birden fazla spermin hemde farklı türlere ait spermelerin oosit içine girişine engel olur. Bu tabaka enzimatik sindirim ile ortadan kaldırılırsa farklı türlere ait spermeler yumurtaya penetre olabilirler. Bu esasa dayanılarak hazırlanan testte, hamster yumurtasının etrafındaki zona uzaklaştırdıktan sonra yıkanmış insan spermi ile inkübe edilerek zonasız yumurtaya penetre olan sperm oranları ölçülür. Teorik olarak bu test ile spermin kapasitasyonu, akrozom reaksiyonu, oolemma ile füzyonu ve yumurta stoplazması ile dekonduksiyonu değerlendirilir. Testin güvenilirliğinin kısıtlı olması rutin kullanımını engellemektedir.

2.4.2.2.5.3. İnsan zona bağlanma testi

Spermin zonasız yumurtaya bağlanması oosite penetrasyonunu test ederken, zonaya penetrasyonunu değerlendirememektedir. İnsan zona bağlanma testinde ise insan oositi etrafındaki zona tabakası alınarak ikiye bölünür ve daha önce spermle karşılaşmamış olan bu tabakaya bağlanan sperm oranı fertil kontrol spermeler ile karşılaştırılır. Bu test, insan zona pellusida tabakasının sınırlı sayıda elde edilebilmesi nedeniyle klinik kullanımda yerini alamamıştır.

2.4.2.2.5.4. Akrozom reaksiyonu

Akrozom spermin baş kısmında lokalize olup, zona pellusidaya penetrasyon için gerekli olan proteolitik enzimleri içeren membranöz bir yapıdır. Akrozom reaksiyonu; spermin zona pellusidaya bağlanmasını takiben akrozomal enzimlerin salınımı sonucu akrozom ile plazma membranının birleşmesi olayıdır. Bu test ile akrozomdan salınan

enzimlerden biri olan akrozin enzimi ölçülerek anormal akrozom reaksiyonları değerlendirilir. Klinikte yalnızca in-vitro şartlarda deneysel amaçlı kullanılmaktadır.

2.4.2.2.5.5. Bilgisayar destekli semen analizi (CASA)

Bilgisayar yardımıyla statik ve dinamik sperm görüntülerini ayırt ederek dijital ortama aktaran yarı otomatik bir sistemdir. CASA ile sperm sayısı ve hareketliliği ölçülebilir. CASA sperm sayımında manuel yöntemlerle eş değer olarak kabul edilir. Özellikle bilimsel araştırmalarda motilite detaylarını vermesi bir üstünlük sağlar. Ancak, çok yüksek yada çok düşük sperm konsantrasyonlarında hata oranları artar.

2.4.2.2.5.6. Sperm DNA bütünlük testleri

Sperm DNA'sı spermatogenezis sırasında ve spermın reproduktif kanalda ilerlemesi sırasında çeşitli modifikasyonlara uğrar. Bu modifikasyonlar çeşitli mekanizmalarla DNA fragmentasyonlarının oluşumuna neden olabilir (63). Yüksek seviyede DNA hasarı sıklıkla kötü semen parametreleri ve infertilite ile ilişkili olmasına rağmen, normal semen analizi olan erkeklerde de sperm DNA hasarı olabilmektedir (64).

Sperm kalitesinin değerlendirmesinde kullanılan testlerden biride sperm DNA bütünlük testleridir. Sperm DNA bütünlüğü sperm kalitesini gösteren aynı zamanda infertilite prognozunu ve YÜT sonuçlarını etkileyen önemli bir parametredir. Dünya sağlık örgütü kriterlerine göre bakılan sperm parametreleri; spermatozoaların konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi olup bunlar üreme sonuçlarını değerlendirmede yetersiz kalmaktadır.

Fertil erkeklerde sperm parametreleri infertil erkeklerden daha yüksek olmasına rağmen, infertil erkeklerin %15'inde sperm parametreleri normaldir (65). Rutin semen

analizlerine ek olarak spermin fertilizasyon kapasitesini değerlendirebilmek için sperm DNA bütünlük testleri gündeme gelmiştir (66). Sperm DNA'ında ortaya çıkan hasarlar; reaktif oksijen radikalleri, defektif apoptozis veya spermatogenez sırasında anormal kromatin paketlenmesine bağlı olabilir. Tüm bu hasarlar sigara içimi, hava kirliliği, yüksek testiküler ısı ve ileri yaşı gibi bir çok etmene bağlı oluşabilir.

Sperm DNA bütünlük testleri değişik metodlar ile çalışılabilir. Örneğin, TUNEL tekniği sperm DNA fragmentasyonunu, Comet DNA bütünlüğünü, Akridin oranj boyama ise DNA denatürasyonunu değerlendirmede kullanılır. Güvenilirlikleri birbirine yakın olan bu testlerden en yaygın kullanılanı TUNEL metodudur.

2.4.2.2.5.6.1. TUNEL testi

TUNEL testi, kalıp bağımlı olmayan terminal deoksinükleotidil transferaz enziminin katalizlediği reaksiyonu kullanarak DNA çift sarmalındaki kırıklarda bulunan biotinlenmiş dUTP'ı ölçer. Bu testte işaretli DNA'sı olan hücreler floresan veya aydınlık saha mikroskopla yada flow sitometri ile değerlendirilir.

2.4.2.2.5.6.2. In situ nick translasyon testi (ISNT)

Toluidin mavisi, kalıp bağımlı DNA polimeraz 1 tarafından parçalanmış tek sarmal DNA'da biotinlenmiş dUTP'a bağlanarak spermdede floresan bir görüntü oluşturur.

2.4.2.2.5.6.3. Sperm kromatin dağılım testi (SCD)

Spermler denatüre edici asit ya da alkali solüsyonla muamele edilerek nükleer proteinlerinden arındırılmakta ve ardından agaroz jel içine gömülerek, sperm DNA'nın tek sarmal hale gelmesi sağlanmaktadır. Spermler lizise uğratıldıktan sonra DNA'sı

intakt olan sperm halo görünümü oluştururken, fragmente DNA'ı olan spermde halo görünümü ya hiç yoktur ya da minimal olmaktadır.

2.4.2.2.5.6.4. Comet testi

Comet testinde spermier agaroz tabakaları arasına sıkıştırılır, ardından lizise uğratılıp elektroforez yapılır. Fragmente DNA'ı olan hasarlanmış sperm kromatinlerinin hareketi kuyruklu yıldız şeklinde (comet) izlenir. Comet testinde boyanma yoğunluğu ve kuyruğun uzunluğu, artmış DNA fragmentasyonu ile koreledir (67). Comet testinin limitasyonları, pahalı ve 2 gün gibi uzun bir sürede yapılabilmesidir.

2.4.2.2.5.6.5. Akridin oranj testi (AO)

AO, nükleik asite (tek sarmal yada çift sarmal DNA) spesifik floresan, katyonik bir boyadır. Hasarlı DNA hafif asit ile muamele edildiğinde denatüre olur ardından akridin oranj uygulandığında tek sarmalda hasar varsa kırmızı floresan, çift sarmalda hasar varsa yeşil floresan renk ortaya çıkar.

Floresan mikroskop kullanılarak yapılan bu teknik, hızlı, basit ve ucuz bir yöntem olmakla beraber heterojen boyanma, boyanmanın hemen ardından renklerin solması, ara renklerin ortaya çıkması gibi dezavantajlara sahiptir.

Sperm chromatin structure assay (SCSA), akridin oranj boyamanın flow sitometrik versiyonudur. Kırmızı ve yeşil hücreler vizuel olarak sayma yerine flow sitometri ile sayılırlar. Anilin blue, kromomisin A3 boyama testide sperm nükleuslarındaki proteinlere karşı yüksek affinitesi olan bir boyama tekniğidir (68).

2.4.2.2.5.7. DNA bütünlük testlerinin klinik kullanımı

Spermin genomik bütünlüğü, hem invivo hem de in vitro başarılı üreme sonuçları için gereklidir. DNA bütünlük testleri, geleneksel sperm analizinden farklı olarak sperm kalitesini gösteren, diagnostik ve prognostik değeri olan tamamlayıcı, bağımsız testlerdir. Çeşitli çalışmalarda da sperm DNA fragmentasyonlarının değerlendirilmesinin başarılı gebelik sonuçları üzerinde prediktif etkisi olduğu gösterilmiştir. Örneğin >%30 hasarlı DNA'ı olan spermle gerçekleştirilen IUI'da başarı şansı sıfır olarak bulunmuştur (69,70). DNA fragmentasyon indeksi (DFI) >%30 olan infertil erkeklerde YÜT sonuçlarında başarısızlığın arttığı rapor edilmiştir (71). Benzer şekilde TUNEL testi için DFI >%12, düşük gebelik oranları ile ilişkili bulunmuştur (72).

Sperm DNA hasarının IVF işleminde de embriyo kalitesi ile negatif korele olduğu gösterilmiştir (73). Tekrarlayan gebelik kaybı olan çiftlerde, TUNEL ile tesbit edilen sperm DNA hasarı %38 iken gebelik kaybı olmayan kontrol grubunda bu oran %22 olarak bulunmuştur (74).

Paternal genom, embriyoner gelişiminin 4 ila 8 hücreli aşamasında aktive edilmektedir. Dolayısıyla yüksek DNA hasarı fertilizasyonda etkili olmamasına rağmen sonraki embriyoner gelişim aşamasında etkili olabilir (75).

Yine DNA hasarı ile sperm konsantrasyonu, morfoloji ve oosit penetrasyonu arasındaki ilişki de yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Oligozoospermik erkeklerde %20, astenozoospermiklerde %24, teratozoospermik erkeklerde de %28 oranında DNA hasarına rastlanmıştır. Bu üç grubun kombinasyonunda ise DNA hasar oranı %43'lere ulaşmaktadır (76). İnfertil normozoospermik erkeklerde sperm DNA hasarı %27 iken kontrol grubu (fertil) için bu oran %16 olarak tesbit edilmiştir (77). Bu güne kadar

yapılan testlerin hiç biri DNA hasarını hatasız bir şekilde gösterme kapasitesine sahip değildir. Bu testlerle konsepsiyon şansını doğru bir şekilde predikte etme oranı kullanılan metodun hassasiyetine ve DNA'daki gerçek patolojik hasarları tesbit etme yeteneğine bağlıdır. Spermde patolojik DNA hasarlarını, kusursuz bir şekilde tespit eden ve spermın reproduktif profilini kusursuz bir şekilde predikte eden bir test bulunamamıştır.

2.4.2.3. Erkek faktör infertilitesinde intrauterin inseminasyonun yeri

Artifisyal (suni) inseminasyon; nörolojik impotans, şiddetli hipospadias, cinsel işlev bozuklukları, retrograt ejakülasyon gibi infertiliteye neden olan durumlarda 200 yıldan beri etkin bir tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır. Ayrıca oligozoospermi, astenozoospermi gibi semen parametresi bozukluklarında, sperm oto antikörlerinin varlığında ve servikal faktor infertilitesinde de kullanılan bir tedavi yöntemidir.

Artifisyal inseminasyon, intraservikal ya da intrauterin olarak gerçekleştirilebilir. Servikal inseminasyonun erkek infertilitesinde spontan cinsel ilişkiye üstünlüğü gösterilememiştir. IUI işlemi ile konsantre edilmiş spermmler servikal mukus engelini geçerek direkt olarak uterin kavite içerisine verilir.

Spontan, klomifen sitrat ve gonadotropinle ovulasyon indüksiyonu ile kombine IUI yapılan 4056 siklus incelenmiş ve gebeliği öngören minimum sperm konsantrasyonu 5×10^6 /ml, total sperm sayısı 10×10^6 /ml, total motil sperm sayısı (TMSS) 5×10^6 /ml, normal morfoloji %5 ve progresif motilite (PR) %30 olarak belirlenmiştir. Belirlenen referans değerlerde gebelik oranı siklus başına %8 iken daha düşük değerlerde %2.5 olarak rapor edilmiştir. Total sperm sayısı $>80 \times 10^6$ /ml, TMSS $>40 \times 10^6$ ve progresif motilite $>\%50$ olduğunda gebelik oranları %50'lere ulaşır (78).

İnsemine edilen motil sperm sayısı (İMSS) arttıkça IUI'da başarı oranında artmaktadır. En iyi sonuç TMSS $>10 \times 10^6$ da elde edilmektedir (79). Daha yüksek değerler gebelik oranını dahada fazla artırmazlar. IMSS $<1 \times 10^6$ ise IUI başarısı son derece düşük olacaktır. Strict sperm kriterleri IVF sonuçları üzerinde prediktif değeri vardır. Yine morfolojik olarak normal sperm yüzdesinde IUI sonuçları üzerinde prediktif değeri vardır (79). Yapılan birçok çalışma sperm morfolojisi ile başarılı IUI sonuçları arasındaki güçlü korelasyonu göstermiştir. IUI sikluslarında normal sperm morfolojisi ≥ 14 başarı oranı yüksek iken < 4 olduğunda başarı düşmektedir.

Şiddetli teratozoospermisi olan (normal sperm morfolojisi < 4) erkek infertil hastalar başarız IUI denemeleri sonrası IVF/ ICSI işlemine yönlendirilmelidir.

Hafif erkek faktör infertilitesinin infertilite ile ilgili kaynaklarda net bir tanımı yapılmamıştır, ancak Dünya Sağlık Örgütünün sperm parametreleri ile ilgili kriterlerinde < 5 persentilin hemen altındaki değerlere sahip olan erkekleri, hafif erkek faktör infertilitesine sahip olarak kabul etmektedir (sperm konsantrasyonu $> 5 - < 15 \times 10^6$ /ml, normal morfoloji < 4). Hafif erkek faktör infertilitesi olan çiftlerde, KOH ile IUI işleminin doğal siklusa göre gebe kalma oranlarını önemli ölçüde artırdığı gösterilmiştir. (80) Bununla beraber yapılan çalışmalarda düşük doz FSH kullanımının klomifen sitrat kullanımına üstün olduğu gösterilmiştir (81). IUI öncesi yapılan sperm hazırlığı ile düşük volümde yüksek konsantrasyonlu ve hareketli sperm sağlandığından, IUI eklenecek sikluslar, IUI uygulanmayan doğal siklusa göre daha başarılıdır.

Sonuç olarak erkek faktör infertilitesinde olguların neredeyse %40'ında etyolojik bir neden bulunamadığından IUI ampirik bir tedavi yöntemi olarak yerini korumaktadır.

2.4.3. İzah edilemeyen infertilite

İzah edilemeyen infertilite tanısı infertil hastalarda standart testlerle bir problem saptanamaması durumunda konulur (82,83). Oranlar değişmekle beraber infertil çiftlerin yaklaşık %15'i izah edilemeyen infertil olarak tanımlanmaktadır (84). İzah edilemeyen infertilite tanısı almak, infertil çiftler için son derece moral bozucudur. Çiftler, infertiliteye neden olan problemin tam olarak açıklanamaması nedeniyle efektif bir tedavisinin de olmadığını düşünerek umutsuzluğa kapılmaktadırlar. İzah edilemeyen infertiliteye neden olabilecek potansiyel sorunlar; endokrin, immün veya genetik sistemle ilgili ya da üreme fizyolojisinde tesbiti zor dengesizliklerle ilişkili olabilir (85). Ayrıca gametlerle ya da implantasyonla (endometrial reseptivite) ilgili anormalliklerinde İEİ'ye yol açabileceği düşünülmektedir (82). Günümüzde üreme sistemi ve fonksiyonlarını değerlendirmede kullanılan mevcut testler, gametlerin fertilizasyon yeteneğini ve fertilizasyon aşamalarını değerlendirmede yetersiz kalmakta, dolayısıyla bu süreçte meydana gelen anormallikleri tespit edememektedir. Örneğin; spermatozoanın kadın genitalyasındaki yolculuğu, kapasitasyonu, akrozom reaksiyonu, zona pellusidaya penetrasyonu ve tubal silier hareketler de rutin tetkiklerle değerlendirilememektedir.

Tedavi edilmemiş İEİ çiftlerde siklus fekundabilitesi %2-4 arasında olup bu oran normal fertil çiftlerde %20-25'dir. İzah edilemeyen infertil çiftlerde gebelik açısından en önemli prognostik faktör, kadın yaşı ve infertilite süresidir. Özellikle infertilite süresi 3 yılı geçmiş ve kadın partner >35 yaş ise prognoz kötüdür (86). Kadın yaşı <35 ve infertilite süresi <2 yıl ise prognoz rölatif olarak daha iyidir (87). Bu sebeble İEİ'de kadın yaşı ve infertilite süresi tedaviye başlama kararında belirleyici olmaktadır (86,88).

Amerikan Fertilité Derneđininin 1992 yılında yayınladığı yönergesinde (American Society of Reproductive Medicine, ASRM 1992) İEİ tanısı için, semen analizi, post koital test, ovulasyon tespiti, HSG ve gerek duyulduğunda diagnostik laparoskopi yapılması önerilmiştir. Ancak ASRM bu yönergeyi 2006 yılında yenileyerek İEİ tanısı için; ovulasyon tespitinin, normal sperm analizi ve normal HSG sonucunun yeterli olduğunu rapor etmiştir (89). Eskiden kullanılan postkoital test ve luteal faz yetmezliğini değerlendirmek için önerilen endometriyal biyopsi de bugün İEİ araştırmasında maliyet-etkin olmaması ve tedavi kararını etkilememesi nedeniyle terkedilmiştir (82).

İzah edilemeyen infertilitenin üreme sisteminde tespit edilemeyen defektler dışında, tamamen normal bir durum olduğu, bu durumun çiftlerdeki fekundite oranlarının normal dağılımın alt sınırlarında olması (konsepsiyonun rastgele bir şekilde ertelenmesi) ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Özellikle İEİ'ye dahil edilen ileri kadın yaşının bu ertelenmeye yol açabileceği belirtilmektedir. Nitekim 7000 infertil kadının katıldığı bir çalışmada >35 yaş kadınlarda izah edilemeyen infertilite tanısı 2 kat artmıştır (90).

İzah edilemeyen infertilite tanımı 40 yaş üzeri kadınlarda değişebilmektedir. Bu grupta infertilite için esas faktör ovaryan rezervin azalmasıdır, ancak bu durum her zaman tanısal testlerde gösterilemeyebilir.

2.4.3.1. Prevalans

İzah edilemeyen infertilite oranı %16 ile %37 arasında değişmektedir. (91) Bu farklılık kadın partnerin yaşı ve infertilitenin süresi ile ilgili olup, erkek partner yaşı, meslek, koit sıklığı gibi faktörler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (91). İzah

edilemeyen infertilite prevalansı spesifik testlerin olmaması ya da yanlış olarak izah edilemeyen infertilite tanısı konulması nedeniyle tartışmalıdır. Yanlış tanılamaya neden olan en sık durum ise hafif endometriozisdir. Bundan başka prematür ovaryan yetmezlik ya da immunolojik nedenler de yanlış tanılamaya neden olabilir.

2.4.3.2. Tedavi secenekleri

İEİ'si olan çiftlerde tedavinin amacı aylık fekundabiliteyi normal fertil bir çiftin değerine yaklaştırmaktır. İEİ'nin nedeni tam olarak açıklanamadığından tedavi yaklaşımı da ampirik olmaktadır. Amaç belli bir zaman diliminde karşılaşan sperm ve yumutra sayısını artırarak gebelik olasılığını artırmaktır.

2.4.3.2.1. Bekle gör tedavisi

İzah edilemeyen infertilitesi olan çiftlerde spontan gebelik oranının 1 yıllık bekleme süresinde %14 gibi yüksek oranlara ulaştığını gösteren çalışmalar olmasına rağmen (92,93) tedavi edilmeyen çiftlerde ortalama siklus fekunditesi %3.8 (randomize çalışmalarda %1.8 nonrandomize çalışmalarda %11) olarak gösterilmiştir (94) Gebelik oranı bu grupta kadın hastanın yaşı, infertilite süresi ve daha önceki gebelik öyküsünden etkilenir.

Gleicher ve arkadaşlarının yaptığı retrospektif bir çalışmada, IVF tedavisi için bekleme listesinde olan hastaların %19.9'unda 12 aylık bir dönemde spontan gebelik bildirilmiştir (95). Evers ve arkadaşlarının yaptığı benzer bir çalışmada bu oran %5.9 olarak bulunmuştur (96). İskoçya'da 2011 yılında yapılan ve 6 aylık bir dönemi kapsayan bir çalışmada, klomifen sitrat kullanımı ile kombine IUI uygulaması ile bekle-gör uygulanan 580 hasta (~32 yaş, ~ infertilite süresi 2.5 yıl) karşılaştırılmış ve bu iki

grup arasında canlı doğum oranları açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır (Klomifen+IUI: %22; bekle-gör: %17, $p>0.05$) (97). Yine bir diğer çalışmada 99 İEİ olguda (~30 yaş ve infertilite süresi 20 ay) doğal siklusta IUI ile bekle-gör yaklaşımı karşılaştırılmış, iki grup arasında gebelik oranları bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır (doğal siklusta IUI: %22, bekle-gör: %19, $p>0.05$) (98). Sonuç olarak spontan gebelik oranı izah edilemeyen infertilitesi olan çiftler için düşük ama hiçbir zaman sıfır olmadığından, yardımcı üreme tekniklerine ulaşamayan, seçilmiş bir hasta grubunda, düzenli koit ile bekle-gör yaklaşımı önerilebilecek bir seçenektir.

2.4.3.2.2. Tubal yıkama (tubal flushing)

Literatürde izah edilemeyen infertilitesi olan çiftlerde ve erken evre endometrioziste tubadan basınçlı sıvı geçişinin gebelik oranlarını artırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur (99). HSG'de kontrast madde kullanımının spontan gebeliği arttırdığı gösterilmiştir (100,101). Basınçlı sıvının hem mekanik hemde immunolojik (peritoneal sitokin konsantrasyonunu azalttığı) etkisinin olduğu düşünülmektedir (97,102,103). Özellikle, yağ bazlı kontrast madde kullanımının, su bazlı kontrast maddeye daha üstün olduğu bildirilmiştir (104). Yağ bazlı kontrast maddenin, tubal debrisleri temizleyip, peritonda spermatozoanın mast hücreleri tarafından fagositozunu önleyerek gebelik oranlarını arttırdığı ileri sürülmüştür (104). Edelstam ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptığı 130 İEİ çiftin katıldığı bir çalışmada klomifen sitrat ile ovulasyon indüksiyonunu takiben IUI yapılmadan önce yağ bazlı kontrast madde kullanılarak HSG işlemi yapılmasının gebelikleri anlamlı bir şekilde artırdığı ve bu gebelik oranlarındaki rölatif artışın %46, kesin artışın ise %11.7 olduğu gösterilmiştir (105).

2.4.3.2.3. Fallop tüplerine sperm perfüzyonu

Fallop tüplerine sperm perfüzyonu işlemi, uterin kavite ve tüplerin spermden zengin bir solusyonla yıkanmasını kapsar. Bu perfüzyon işlemi spermatozoanın uterus, tüpler ve son olarak douglas boşluğuna geçişini kolaylaştırır (106). Bu işlem laparoskopik ya da transvajinal tubal kateter ile gerçekleştirilir (107-109). Tubal geçişin sağlanması için yüksek intrauterin perfüzyon basıncı gerekir ki bu durum hasta da ciddi anlamda rahatsızlığa neden olmaktadır (110). Ayrıca işleme bağlı artmış pelvik enfeksiyon riski mevcuttur. Yapılan çalışmalarda da fallop tüplerine sperm perfüzyon yönteminin klasik IUI'ya üstünlüğü gösterilemediğinden rutin uygulamada yer bulamamıştır.

2.4.3.2.4. Ovulasyon indüksiyon ajanları

2.4.3.2.4.1. Klomifen sitrat

Klomifen sitrat, ovulasyon indüksiyonunda en sık kullanılan ajanlardan biri olup nonsteroidal trifeniletillen yapısında, östrojen agonisti- antagonist etkileri beraber barındıran bir ilaçtır (30). Östrojenik etkisi ancak östrojen seviyesi düşük olduğu zaman ortaya çıkmaktadır. Klomifen, enklomifen ve zuklomifen olarak bilinen 2 izomerin karışımıdır. Ovulasyonu sağlayan enklomifendir. Enklomifen, östrojene olan yapısal benzerliği sebebiyle üreme sisteminde mevcut olan östrojen reseptörlerine bağlanır. Östrojenden farklı olarak reseptöre uzun süre bağlı kalarak ortamdaki aktif reseptör sayısını azaltır (111). Hipotalamik seviyede östrojen reseptörlerinin azalması, östrojen seviyesinin olduğundan daha düşük algılanmasına yol açarak hipotalamo-pitüiter aksı uyarır. Klomifen sitrat, spontan veya progesteron ile uyarılmış menstürasyonun üç ile beşinci günü arası başlanır. Tedaviye genellikle 50 mg tabletlerle başlanır ve 5 günlük

bir süreç boyunca verilir, eğer bu tedavi ile ovulasyon sağlanamazsa bir sonraki siklusta doz 50 mg artırılabilir (maksimum 150 mg/gün).

Klomifen sitrat kullanımına bağlı yan etkiler; hafif düzeyde sıcak basmaları, meme hassasiyeti, pelvik basınç ve bulantıdır. Görme bozuklukları (bulanık veya çift görme, skotomlar) ise sık rastlanmayan (~%2), geri dönüşümlü yan etkilerdendir. Klomifen sitrat ovulasyon indüksiyonunda sıkça kullanılmasına rağmen, regüler menstrual siklusu olan kadınlarda kullanımı tartışmalıdır. Fujii ve arkadaşlarının 1997 yılında yaptığı, 33 IEI çiftin katıldığı bir çalışmada 50 mg/gün klomifen sitrat tedavisi alan çiftler (18 hasta) ile hiç bir tedavi almayan (15 hasta) çiftler karşılaştırılmış ve spontan takip edilen grupta gebelik oranları daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla, %22.2- %73.3, $p<0.05$) (112). Bhattacharya ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptığı bir çalışmada IEI hasta grubunda canlı doğum oranları açısından klomifen sitrat tedavisinin bekle-gör yöntemine üstün olmadığı gösterilmiştir (sırasıyla, %14, %17, $p>0.05$) (88). Deaton ve arkadaşları ise 1990 yılında izah edilemeyen infertilitesi ya da cerrahi olarak düzeltilmiş endometriozisi olan 67 çiftin katıldığı çalışmalarında, klomifen sitrat ile kombine IUI yapılan 148 siklus ile tedavisiz takip edilen 150 siklusu karşılaştırmış ve klomifen sitrat ile IUI yapılan grupta siklus fekdutesini %9, tedavisiz grupta ise %3 olarak bulmuşlardır ($p<0.05$) (113). Yine 1989 yılında Fisch ve arkadaşlarının yaptığı çift kör randomize prospektif çalışmada, 4 ay süre ile 100 mg/gün klomifen sitrat ve plasebo tedavisi alan 148 IEI çift karşılaştırılmıştır. Plasebo grubunda gebelik oluşmazken, klomifen sitrat grubunda yüksek gebelik oranları (%19) elde edilmiştir ($p<0.05$) (114). Sonuç olarak, 3 yıldan uzun süre infertil olan hastalarda klomifen sitratın fertilite oranlarını en az 2 kat artırdığı gösterilmiştir (112-115). Glazener ve arkadaşları tarafından 1990 yılında yapılan ve 118 izah edilemeyen infertilitesi olan

çiftin katıldığı bir çalışmada, 3 aylık bir takip döneminde (infertilite süre >3 yıl) klomifen sitrat kullanımının plaseboya oranla kümülatif gebelik oranlarını %53 artırdığı gösterilmiştir (115).

Hughes ve arkadaşlarının 2010 yılında 7 çalışmayı inceleyen (1159 İEİ çift) Cochrane sistematik metaanalizinde, klomifen sitrat kullanımının (IUI ile kombine veya tek başına) canlı doğum veya klinik gebelik oranları açısından plaseboya üstün olmadığı (OR 0.79, %95 CI 0.45–1.38) gösterilmiştir. Böylece, izah edilemeyen infertilite tedavisinde klomifen sitratın yerinin olmadığı yorumu yapılmıştır (36).

2.4.3.2.4.2. Gonadotropin tedavisi

Tek başına gonadotropin tedavisi ile ovulasyon indüksiyonu yapılan İEİ olgular ile herhangi bir tedavi uygulanmayan İEİ'ler karşılaştırıldığında, gonadotropinlerin siklus başına fekundabiliteyi arttırdığı ancak bu artışın klomifen+ IUI tedavisine bir üstünlüğünün olmadığı tespit edilmiştir (117). İEİ çiftlerde tek başına IUI yapılmaksızın gonadotropin tedavisini değerlendiren çalışma sayısı çok azdır. Guzick ve arkadaşlarının 1999 yılında yaptığı 932 İEİ olan çiftlerin dahil edildiği çalışmada (~32 yaş, infertilite süresi 3.6 yıl) çiftler gonadotropin ile IUI, yalnızca IUI, gonadotropinlerle intraservikal inseminasyon (ISI) ve yalnızca ISI olarak dört gruba ayrılmışlar ve gebelik oluşana kadar maksimum dört siklus takip edilmişlerdir. Gonadotropin ile IUI yapılan grupta en yüksek gebelik oranı elde edilirken (%33), yalnızca IUI yapılan grupta bu oran %18 olarak bulunmuştur. Gonadotropin ile ISI grubunda gebelik oranı %19, yalnızca ISI yapılan grupta ise bu oran %10 olarak tesbit edilmiştir. Sonuç olarak gonadotropinlerle IUI yapılan grupta gebelik oranı siklus başına %12 iken yalnızca ISI yapılan grupta %3 olarak bulunmuştur (118). Hollanda'da

yapılan ve gonadotropin+ IUI tedavisi uygulanan 127 İEİ (676 siklus) çift ile hiç bir tedavi almayan 127 İEİ (737 siklus) çiftin katıldığı çalışmada (~33 yaş, infertilite süresi 2 yıl) gebelik oranları gonadotropin ve IUI grubunda siklus başına %4, kontrol grubunda %5 olarak bulunmuştur ($p>0.05$) (119). Çalışmalardaki farklı sonuçların, hasta yaşları ve infertilite sürelerinden etkilendiği düşünülmektedir. Kadın partner ne kadar genç ve infertilite süresi ne kadar kısa ise hem spontan hem de tedavi ile gebe kalma şansı o kadar artmaktadır.

Gonadotropin ile IUI uygulaması 3 yıldan daha uzun süre infertilitesi olan İEİ çiftlerde ve daha önce klomifen ile IUI yapılmış ve gebelik elde edilememiş hastalarda tedavi seçeneği olmaktadır (117). İzah edilemeyen infertilite olgularında zaten ovulasyon var olduğundan herhangi bir gonadotropin preparatı birden fazla olgun oosit oluşturulması amaçlı kullanılabilir. Athallah ve arkadaşlarının 2009 yılında Cochranede yayınlanan derlemelerinde, izah edilemeyen infertilitesi olan 231 çiftin katıldığı 5 randomize kontrollü çalışma incelenmiş, oral (anti-östrojenler-klomifen sitrat) ajanlar ile gonadotropinlerin ovulasyon indüksiyonundaki etkinliği karşılaştırılmıştır. İEİ çiftlerde ovulasyon indüksiyonu ajanlarının tek başlarına gebelik (OR 0.33, %95 CI 0.09-1.20) ve canlı doğum oranlarını (OR 0.06, %95 CI 0.00-1.15) arttırmadıkları gösterilmiştir (120). Balasch ve arkadaşlarının 1994 yılında yaptığı bir çalışmada, 40 İEİ'si olan ve 60 hafif erkek faktör infertilitesi olan hasta, 98 siklus klomifen sitratla, 94 siklus gonadotropinle tedavi edilmiş ve gebelik oranları, klomifen sitratla IUI grubunda %4, gonadotropinle IUI grubunda ise %13 olarak bulunmuştur ($p<0.05$) (121). İEİ ve erken evre endometriozisi olan 148 çiftin (4 grup) dahil edildiği bir çalışmada, sadece ovulasyon indüksiyonu yapılan (klomifen ve gonadotropin) ve spontan koit ile takip edilen hastalarda gebelik oranları açısından anlamlı bir fark

bulunmazken (%13-%17, $p>0.05$), hMG ile IUI'n kombine edildiği grupta gebelik oranları, klomifen sitratla IUI yapılan gruba göre yüksek bulunmuştur (sırasıyla, %19-%4, $p<0.05$) (122). Bu ve benzeri çalışmalar gonadotropinlerin İEİ çiftlerde klomifen sitrata üstünlüğünü göstermektedir. Chung ve arkadaşları İEİ çiftlerde, 3 siklus gonadotropinlerle kombine IUI ile yalnızca gonadotropin kullanımını karşılaştırdıkları çalışmalarında, kümülatif gebelik oranları (sırasıyla, %42 -%20, $p<0.05$) ve siklus feconditesini (sırasıyla, %21.8 - %8.5, $p<0.05$) gonadotropinlerle IUI grubunda yüksek bulmuşlardır (123). Melis ve arkadaşlarının 1995 yılında yaptığı bir başka çalışmada ise İEİ ve hafif erkek faktör infertilitesi olan 200 çiftte, 3 siklus gonadotropin ile kombine IUI tedavisi ile yalnızca gonadotropin kullanımı karşılaştırılmış, gebelik oranları açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p<0.05$) (124).

2.4.3.2.4.3. Aromataz inhibitörleri:

Aromataz enzimi sitokrom P450 enzim kompleksinin bir üyesi olup, östrojen üretiminin son basamağını katalizler (androstenedion- östron /testosterondan-östradiol). Aromataz enzimi hem reproduktif (overler, plasenta) hemde non-reproduktif dokularda (meme, yağ dokusu, beyin, kas, fibroblast, karaciğer ve osteoblast) aktif olarak bulunur (125-128).

Aromataz inhibitörleri (Aİ), ilk olarak post menapozal kadınlarda ileri evre meme kanseri tedavisinde kullanılmıştır. Letrozol, faz 3 çalışmalarda ileri evre meme kanserinde tamoksifene üstünlüğü gösterilmiş bir ilaçtır (129).

Letrozol ve anastrozol 1-5 mg/gün olarak kullanılır, östrojen seviyelerinin %97-99'unu inhibe ederler. Aİ'nin meme kanseri tedavisinde kullanımı sonrası ilacın östrojen bağımlı diğer jinekolojik hastalıklarda da kullanımı gündeme getirmiştir. Özellikle infertil hastalarda, östrojen seviyelerinin düşmesine cevaben FSH düzeylerini

arttırdığından, ovulasyon indüksiyon amaçlı kullanılmıştır. Klomifen sitrata dirençli polikistik over sendromu olan kadınlarda ovulasyon indüksiyonunda kullanımının etkili olduğu gösterilmiştir (130). AI'leri östrojen üretimini suprese ederler ancak klomifen sitratin geç folliküler fazda oluşturduğu anti-östrojenik etkiyi oluşturmazlar (131).

2006 yılında 50 İEİ çiftin katıldığı prospektif randomize bir çalışmada 1 mg anastrozol ve 100 mg klomifen sitrat alan iki grup follikül sayısı, E2 düzeyleri, endometrial kalınlık ve gebelik oranları açısından karşılaştırılmış ve matür oosit sayısı (0.6-1.6, $P<0.05$), E2 düzeyleri (131 -. 613 pg/mL, $P<0.05$) ve gebelik oranları (%12- %20, $p<0.05$) anastrozol grubunda daha düşük iken, endometrial kalınlık oranları benzer bulunmuştur (132).

Wu ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları bir çalışmada 25-41 yaş arası 33 İEİ çiftte anastrozol (1 mg) ve klomifen sitrat (100 mg) karşılaştırılmış ve anastrozol grubunda endometrial kalınlık (10.6 mm-7.8 mm, $p<0.05$) daha fazla bulunmuştur (133). Yapılan diğer çalışmalarda İEİ olan çiftlerde AI'lerinin kullanımının etkinliği net olarak gösterilememiştir (134-136). Sonuç olarak, İEİ tedavisinde AI kullanımı ile ilgili veriler yetersiz olup ilacın dozu ve süresi ile ilgili net bir görüş birliği yoktur. Bununla beraber hayvan deneylerinde letrozolun embriyotoksik (vertebra anomaliler) olduğu ve post-implantasyon fetal kayıpları arttırdığı gösterilmiştir (137).

2.4.3.2.5. İntrauterin inseminasyon

İzah edilemeyen infertilitesi olan çiftlerde, özellikle regüler ovulatuvar siklusun varlığı ya da normal sperm analizinin olması ve infertiliteye neden olacak belirgin bir servikal faktörün olmaması, bu hasta grubunda IUI ile beraber kontrollü ovaryan stimülasyonun gerekli olup olmadığı ile ilgili soruları gündeme getirmiştir. Bununla beraber dansitesi

yüksek motil spermatozoaların uterin kavite içine verilmesinin siklus başına gebelik şansını arttırabileceği düşünülmektedir. İEİ olgularda IUI yapılmaksızın tek başına klomifen tedavisini değerlendiren çalışma sayısı azdır. İEİ’i olan 146 çiftin katıldığı bir çalışmada (~30 yaş, infertilite süresi~ 4.3 yıl) klomifen grubunda siklus başına gebelik oranı %3 iken plasebo alan grupta %1 olarak rapor edilmiştir (138). Yine 385 İEİ çiftin katıldığı bir çalışmada da (~32 yaş, infertilite süresi 2.5 yıl) klomifen tedavisi alan ve hiçbir tedavi almayan hastalar karşılaştırılmış, gebelik oranları açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır (%14-%17, $p<0.05$) (88) Mevcut bu çalışmalardan yola çıkılarak İEİ’de tek başına klomifen kullanımının efektif bir tedavi yaklaşımı olamayacağı sonucuna varılmıştır (111). Tek başına klomifen kullanımı ile klomifen ile kombine IUI uygulanan 932 siklusun dahil edildiği bir çalışmada, klomifen ile tedavide siklus fekunditesi %5.6 iken, klomifen+ IUI’da %8.3 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak klomifen+ IUI tedavisi (%8.3) ile siklik fekundabilite oranları tedavi edilmeyen İEİ (%3) çiftlerdekinden daha yüksek olmaktadır. Dolayısıyla hiç tedavi almamaktansa ucuz ve kolay bir yöntem olan klomifen+ IUI tedavisi İEİ hastalarda denenebilir (111). NICE’nin 2004 yılındaki yönergesinde izah edilemeyen infertilite tedavisi için IUI işlemini yapıldığı sırada uterin kavite içine fazla miktarda (4 ml) sperm solusyonu verilebileceği, bu yaklaşımın standart IUI (0.3-0.5 ml) ile karşılaştırıldığında gebelik oranlarını daha fazla arttırdığı belirtilmiştir (139).

IUII sikluslarında gonadotropinlerin etkinliğini gösteren bir çok çalışma yapılmıştır. Guzick ve arkadaşlarının 27 çalışmayı içeren bir metaanalizinde, İEİ’i olan çiftlerde, yalnızca gonadotropin kullanımında siklus başına gebelik oranı %8 iken gonadotropin kullanımına IUI eklendiğinde gebelik oranlarının %18’lere ulaştığı ifade edilmiştir (94). Yine 2009 yılında Veltman ve arkadaşları, gonadotropinlerle stimüle

edilmiş siklusta IUI uygulamasının doğal siklusta yapılan IUI ile karşılaştırıldığında, gebelik oranlarını 3.5 kat arttırdığını rapor etmişlerdir (140). Türkiye’den Bağış ve arkadaşları tarafından 2010 yılında yapılan bir çalışmada, İEİ ve hafif erkek faktör infertilitesi olan 228 çiftte, hCG enjeksiyonundan 36 saat sonra yapılan tekli IUI ile hCG enjeksiyonundan 18 saat ve 40 saat sonra yapılan ikili IUI sonuçları karşılaştırılmış, ikili uygulamanın tekli IUI uygulamasına bir üstünlüğünün olmadığı gösterilmiştir (canlı doğum oranları: %11-%18, $p>0.05$) (141). Arıcı ve arkadaşları, İEİ ve hafif erkek faktör infertilitesi olan 60 çiftin dahil edildiği çalışmalarında, doğal siklusta IUI yapılan çiftleri klomifen sitratla kombine IUI yapılanlarla karşılaştırmışlar ve klomifen sitratla kombine IUI yapılan grupta gebelik oranlarını yüksek bulmuşlardır (%5- %26, $p<0.05$) (142). Tüm bu çalışmalar (142,94) İEİ çiftlerde IUI yapılacaksa ovulasyon indüksiyonu ile kombine edilmesi gerekliliğini göstermiştir. İEİ’lerde stimüle edilen ya da edilmeyen IUI sikluslarındaki gebelik oranları, hiç tedavi edilmeyen siklulardan daha yüksektir. Zikopoulos ve arkadaşlarının çalışmaları da 84 İEİ çiftte, hMG ile kombine IUI ile doğal siklusta koit karşılaştırılmış, siklus fekunditesi IUI grubunda anlamlı bir şekilde yüksek (%11-%2, $p<0.05$) bulunmuştur (143).

Tablo 4. İEİ çiftlerde tedavi yaklaşımlarına göre ortalama siklus fekundabilitesi (117)

Tedavi	Siklus Fekundabilitesi
Tedavi yok	%2-4
IUI	%2-4
Klomifen sitrat	%2-4
Gonadotropinler	%5-7
Klomifen sitrat + IUI	%5-10
Gonadotropin + IUI	%7-10
IVF	%25-45

2.4.3.2.6. Gamet intra-fallopian transfer (GIFT)

GIFT, oosit toplanması sonrası oosit ve spermatozoanın direkt olarak fallop tüplerine transferini kapsar. Oositin direkt olarak fallop tüplerine verilmesi ile oosit için invitro kültür medyasından daha fizyolojik bir çevre sağlanmış olur. Avrupa İnsan Üreme ve Embriyoloji cemiyetinin (European Society of Human Reproduction and Embryology-ESHRE) yürüttüğü 444 hasta ve 649 siklusun dahil edildiği çok merkezli bir çalışmada, siklus başına gebelik oranları: Ovulasyon indüksiyonu için %15, ovulasyon indüksiyonu ile IUI için %27, ovulasyon indüksiyonu ile intraperitoneal inseminasyon için %27, GIFT için %28 ve IVF için ise %26 olarak bulunmuştur (144). Ancak bu çalışmalarda kontrol grubunun olmaması çalışmanın temel açmazını oluşturmaktadır.

2.4.3.2.7. İn vitro fertilizasyon (IVF)

IVF, İEİ'de kullanılan pahalı ve invaziv bir metottür. Ortalama başarı oranı İngiltere'de <35 yaş kadınlarda %28.2, 35–37 yaş arası kadınlarda %23.6, 38–39 yaş arası kadınlarda %18.3 ve 40–42 yaş arası kadınlarda %10.6 dır (145). Benzer şekilde Amerika Üreme Sağlığı Cemiyeti'nin 2006 yılındaki bildirgesinde de İEİ çiftler de IVF başarı oranı (canlı doğum oranı) %30.4 olarak bildirilmiştir (146). Artan IVF başarısı beraberinde %25 gibi yüksek çoğul gebelik oranını da getirmiştir (147). IVF ve GIFT etkinliğini karşılaştıran bir çalışmada canlı doğum oranları açısından (OR 2.57, %95 CI 0.93–7.08) bir fark izlenmezken klinik gebelik oranları IVF'da daha yüksek bulunmuştur. (OR 2.14, CI 95%1.08–4.22) (148). Crosignani ve arkadaşları İEİ'lerde FSH ile IUI uygulaması ve IVF tedavisini karşılaştırmışlar ve gebelik oranlarını sırasıyla IUI için %24.5, IVF için %22.9 bulmuşlardır (144). Goverde ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptığı İEİ ve hafif erkek faktör infertilitesi olan çiftlerin katıldığı

çalışmalarında IVF’de kümülatif gebelik oranlarını daha yüksek (%12) bulmuşlardır (149).

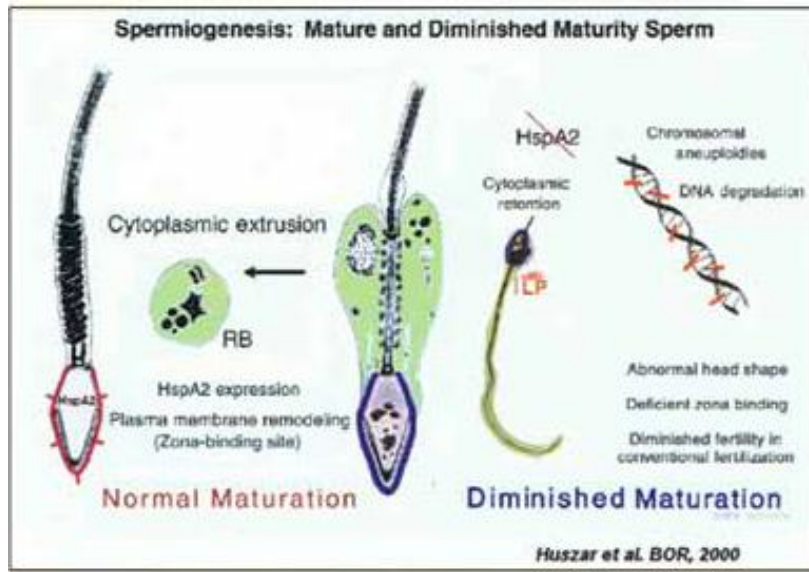
İEİ çiftlerde, kadın partner <35 yaş ve infertilite süresi <2 yıl ise bekle-gör tedavisi denenebilir. Bekle-gör tedavisi ile gebelik elde edilemezse 3-4 siklus gonadotropinlerle IUI sonrası çiftler IVF’e yönlendirilmelidir. Hasta yaşı >35 yaş, infertilite süresi >2 yıl ise beklenmeden IUI tedavisine yönlendirilmelidir. Kadın yaşı 35-39 yaş arası olan İEİ çiftlerde 3- 4 siklus gonadotropinlerle IUI sonrası IVF’e verilmelidir. Kadın yaşı >40 yaş olan çiftlerde infertilite süresine bakmaksızın en fazla 2 siklus gonadotropinlerle IUI sonrasında IVF tedavisine geçilmelidir.

2.6. HYALÜRAN BAĞLANMA TESTİ (HYALURONAN BINDING ASSAY, HBA)

Hyalüronik asit (HA), kümülus ooforusun major komponentini oluşturur (150). Oogenez sırasında primer folikül oluşumundan sonra stratum granulozum tarafından salgılanan foliküler sıvı artarak sekonder follikülü oluşturur. Sekonder folikül büyüdükçe oosit kenara itilir ve etrafındaki granüloza hücreleri lümene doğru uzananarak kümülus ooforusu oluştururken, oositi çevreleyen granüloza hücreleride korona radyatayı oluşturur. Folliküler gelişim devam ederek tersiyer folikül oluştuğunda korona radyata ve kümülus ooforusu oluşturan granüloza hücreleri interselüler ortama hyalüronik asit ve proteoglikanlardan zengin bir sıvı salgırlar.

Spermatogenez sırasında seminifer tübüllerdeki immotil spermatozoalar, epididimise geldiklerinde androjen bağımlı matürasyon evresine girerler. Matürasyon evresinde sitoplazmik membran yeniden şekillenir (membran fazlalığı gelişimin bir parçası olarak atılır), sperm üzerinde de zona pellusida ve HA’e bağlanma bölgeleri oluşur (151). Sperm yüzeyinde oluşan bu HA bağlanma bölgeleri spermin hem motilite

kazanması hem de oosite bağlanması için gereklidir. Spermiogenezisin bu son basamağında meydana gelen gelişimsel bir defektte sperm uzayarak rezidüel cisimcikler oluşturur (152). İnkomplet spermatogenetik süreçte, plazma membranının yeniden yapılanması ve hyalüronik asit bağlanma bölgelerinin oluşamaması nedeniyle matürasyonunu tamamlayamamış spermatozoalar oluşur. Matürasyon defekti olan bu spermatozoalar kümülüs ooforusu geçip zona pellusidaya bağlanamadığından hem spontan koit hem de IVF tedavisinde fertilizasyon başarısızlığına neden olurlar.



Şekil 10. Sperm matürasyon süreci

Hyalüronik asitin sperm yüzey belirteci olarak kullanılması fikri 1990'lı yılların başında Gabor Huszar ve arkadaşları tarafından gündeme getirilmiştir. Kümülüs ooforus içerisindeki hyalüronik asit, fertilizasyon için sperm kapasitasyonunu indüklediği gibi oosite penetrasyonu içinde uygun bir mikroçevre oluşturur. Matür spermier selektif bir şekilde HA'e bağlanmaktadır (yüzeylerinde oluşan hyalüronik asit bağlanma bölgeleri aracılığıyla, oositi çevreleyen kümülüs ooforusta bulunan hyalüronik asiti tanıyarak). Fertilizasyonun gerçekleşmesi için sperm-oosit bağlanmasını takiben bir dizi değişim başlar (zona pellusidaya penetrasyon, perivitellin aralığa geçiş, oolemnaya

bağlanma, füzyon-oosit aktivasyonu ve dekonduksiyon). Sperm üzerinde HA bağlanma bölgesi olması aynı zamanda sperm matürasyonunu tamamladığını gösteren bir bulgudur. Bu sebeple sperm örneğinde HA bağlanma bölgeleri olan spermilerin yüksek oranlarda bulunması hastanın fertilité potansiyelini de gösterecektir.

Matür spermilerin plazma membranlarının immatür spermilerden farklı olduğunun gösterilmesi ve matür sperm bu membran farklılıkları nedeniyle fertilizasyon yeteneğinin yüksek olduğunun anlaşılması, sperm matürasyonunu tespit edebilecek belirteç arayışlarını gündeme getirmiştir. Sperm matürasyon testi olarak ilk gündeme giren belirteç, sperm kreatinin kinazdır (SKK). SKK sperm matürasyonu ve fertilité potansiyelini gösteren objektif bir belirteçtir. Yapılan çalışmalarda oligozoospermik erkeklerde normozoospermik erkeklere oranla 10-20 kat artmış SKK düzeyleri tesbit edilmiştir (153,154). Spermilerin immünohistokimyasal çalışmalarında, artmış SKK düzeylerinin spermdeki sitoplazmik kalıntılarla birlikte olduğu gösterilmiştir (fizyolojik olarak spermiogenez sırasında fazla sitoplazma atılarak sperm matür hale dönüşür).

Sperm ısı şok proteinide (Heat shock protein A2, HspA2) matür spermde yüksek düzeylerde bulunmuş ve sperm fertilizasyonun değerlendirmek için deneysel amaçlı kullanılmıştır (155). HspA2 proteini mayoz bölünme sırasında ve spermilerin uzayarak matür sperm haline dönüşmesi evresinde eksprese edilir. Yüksek HspA2 düzeyleri; spermatogenez sırasında mayoz bölünmenin normal seyrettiğini, matürasyonun bir parçası olarak fazla sitoplazmanın atıldığını, normal baş morfolojisinin geliştiğini, spermde zona pellusida ve hyalüronik asit bağlanma bölgelerinin oluştuğunu gösterir. Bununla beraber düşük HspA2 düzeylerine bağlı olarak defektif sinaptonemal

kompleksler (mayoz bölünme) oluşur, bu spermelerde de DNA kırıkları ve kromozomal anöploidi oranlarında artış görülür (156-159).

Hem SKK hem de HspA2 konsantrasyonları semen de matür ve immatür sperm oranlarını göstermektedir (160). Huszar ve arkadaşları tarafından 1990 yılında yapılan bir çalışmada IUI yapılan oligozoospermik erkeklerde düşük SKK aktivitesinin gebelik için prediktif değerinin olduğu gösterilmiştir (160,161).

Daha sonraki yıllarda ise yapılan sperm hemizon testlerinde (SHT) zona pellusidaya bağlanan spermelerin sitoplazmik kalıntı içermeyen ve baş anomali olmayan matür sperm olduğu gösterilmiştir. İmmatür spermelerde HspA2 proteinin daha düşük düzeylerde eksprese edildiği ve bu spermelerin SKK düzeyleri yüksek sitoplazmik kalıntılar içerdiği ve zona bağlanma bölgelerinde defektler olduğu gösterilmiştir (162).

Yine Huszar ve arkadaşları tarafından 1992 yılında yapılan 84 IVF çiftini kapsayan (62 normozoospermik, 22 oligozoospermik) bir çalışmada da SKK konsantrasyonları araştırılmış ve $>10\%$ hasta grubunda fertilitizasyon oranlarının anlamlı düşük olduğu gösterilmiştir (163). Yine bu çalışmada SKK konsantrasyonları $>10\%$ grubundaki çiftlerin 40% 'inin normozoospermik hastalar olduğu rapor edilmiştir (normozoospermik ancak sperm matürasyonu tamamlanmamış).

Ergür ve arkadaşları tarafından 2002 yılında yapılan 194 çiftin katıldığı IVF çalışmasında sperm HspA2 konsantrasyonu $<10\%$ olan çiftlerde gebelik elde edilememiştir (164).

Azalmış veya duraksamış sperm matürasyonu ile kromozomal anöploidiler arasındaki ilişki net olarak ortaya konulmuştur. Kovancı ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptığı bir çalışmada 10 erkekte alınan 7000 sperm nükleusu FISH (fluorescence in-

situ hybridization) yöntemi ile incelenmiş ve sitoplazmik kalıntıları olan spermelerde artmış oranlarda dizomik nükleus varlığı tespit edilmiştir (165,166).

Spermin matürasyonunu değerlendiren çalışmalarla eş zamanlı olarak 1990 yılında Huszar ve arkadaşları, hyalüronik asit içeren medyumların, taze ya da dondurulup çözülmüş spermelerin motilitesini ve canlılığını arttırdığını göstermiştir (167). Yine Sbracia ve arkadaşları 1997 yılında dondurulup çözülmüş spermelerin HA içeren medyumlara konulduğunda, spermelerin motilitelerinin arttığını ve bu durumun HA medyumdan uzaklaştırıldıktan sonra da 4 saat kadar devam ettiğini göstermişlerdir (168). Bu çalışmalarda HA'e maruz kalan spermelerin kuyruk vuru hareketlerinde ve hızlarında ani bir artış meydana gelmiştir. HA'e maruz kalan spermeler HA içeren medyumdan ayrıldıklarında (dansite gradient santrifüjü ile) spermelerin hareket ve hızlarının azalarak kontrol grubu ile eşitlendiği tesbit edilmiştir (167,168). HA'in bu etkisi reseptör aracılığı ile olmaktadır, sitoplazmik yeniden yapılanmasını tamamlamamış, matürasyonu duraksamış spermeler HA ile karşıla

ştığında stimule olmaktadır (169-171). HA'e bağlanan spermatozoalar, spermin zona pellusidaya bağlanmasına benzer bir şekilde baş önde olacak şekilde akrozom bölgesinden penetre olmaktadır. HA'e bağlanma paterni maymun spermeleri ile yapılan çalışmalarla da doğrulanmıştır (171,172). Sperm hemizona bağlanma deneylerinde olduğu gibi, HA'e bağlanan spermelerin Kruger klasifikasyonunda tariflenen uniform normal morfolojili spermeler olduğu gösterilmiştir (173-175). Spermin HA'e bağlanması; sitoplazmik kalıntı, persiste histon, fragmente DNA ya da apoptotik belirteç olan caspase 3 içermediği anlamına da gelmektedir. Spermdeki nükleer ya da sitoplazmik immatürite ve DNA fragmentasyonlarının varlığı, spermin zigot oluşumuna olan paternal katkısını bozmaktadır (176-185).

HBA kiti matür spermatozoanın selektif olarak HA'e bağlandığı gerçeğinden yola çıkılarak hazırlanmıştır. Spermin HBA'e bağlanması 8-10 dakika içerisinde gerçekleşir. HBA kitine bağlanan spermelerin baş kısmı sabit olup kuyruk vuru frekansları artarken, kite bağlanmayan spermeler serbest bir şekilde yüzmeye devam etmektedirler (Şekil 12).

Spermelerin HA'e bağlanması ile artmış hücre içi SKK oranları arasında ters bir korelasyon vardır. Yani sperm ne kadar çok HA'e bağlanıyorsa o kadar düşük intrastoplazmik SKK düzeyine sahiptir.

IUI ve IVF çalışmalarında SKK aktivitesi ve HspA2 konsantrasyonlarının değerlendirilmesinin klinik yararlılığı net olarak ortaya konmuştur (163,186,187).

2.6.1. HBA testi ve sperm matürasyonu

Huszar ve arkadaşları 2002 yılında HA'e bağlanan spermelerin SSK ve HspA2 düzeyleri ve kromatin yapılarını araştırmışlardır. Bu çalışmada HA'e bağlanan spermeler özel tekniklerle toplanıp canlılık, kromozomal bütünlük ve SKK düzeyleri değerlendirilerek, HA'e bağlanan spermelerin sitoplazmik kalıntı içermediği ve düşük SKK oranlarına sahip olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda HA'e bağlanan spermelerin HspA2 oranlarının da yüksek olduğu (>%10) rapor edilmiştir.

Spermelerin matürasyon aşamasında DNA'larındaki histonlar yerlerini protaminlere bırakır böylece anilin mavisi, histon içeren immatür spermeleri koyu renge boyarken, matür spermeleri (protamin içeren) etkilemeyecektir. Yine bu çalışmada HA'e bağlanan spermelerin anilin mavisinden etkilenmediği, HA'e bağlanamayan spermelerin ise koyu renge boyandıkları rapor edilmiştir.

2.6.2. HBA'nın ICSI işleminde kullanımı

HBA'nın matür, fertilizasyon potansiyeli yüksek spermin seçimindeki etkinliği ilk olarak erkek faktörü nedeniyle ICSI yapılan hastalardaki çalışmalarda gösterilmiştir. Matür sperm üzerinde HA'e bağlanma bölgelerinin olduğunun keşfedilmesi HA taşıyan bir kitin matür spermleri kendine çekerek tespit edebileceği düşüncesini gündeme getirmiştir. Böylece ICSI'de DNA bütünlüğü yüksek, kromozomal anöploidi oranı düşük matür spermatozoa seçimi için HBA testi kullanılmaya başlanmıştır. ICSI işlemi için HA'e bağlanan spermlerin (diploid ve anöploid spermatozoaların elimine edildiği) test edildiği çalışmalarda bu spermlerin DNA fragmantasyonu içermeyen, nükleer matürasyonunu tamamlamış spermler olduğu gösterilmiştir (187,188). Jakab ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptığı, 32 hastadan alınan sperm örneklerinin değerlendirildiği, 3 farklı deneyi kapsayan çalışmalarında, aynı hastadan alınan spermler yıkandıktan sonra bir kısmına HBA testi uygulanmış ve HA'e bağlanan spermler ICSI pipeti ile alınarak ayrılmış, diğer kısmı ise yıkama sonrası ileri bir teste tabi tutulmadan seçilmiş spermlerden oluşmuştur (189). HA'e bağlanan spermlerle (Grup 1), HBA'in uygulanmadığı spermler (Grup 2) kromozomal dizomi ve diploidi sıklığı açısından karşılaştırılmıştır. Bu amaçla özel olarak hazırlanmış, HA'in olduğu işaretli dört adet nokta içeren, Falcon Petri kabı (PICSI dish) kullanılmaktadır. Yıkamış sperm Falcon Petri kabına damlatılıp bu dört noktada HA'e bağlanan, plazma membran yapılanmasını tamamlamış matür spermler sayılır. Matüritesi tamamlanmamış spermlerde HA reseptör konsantrasyonu az olduğundan bunlar slayt üzerinde serbest bir şekilde hareket ederler. HA bağlanan spermatozoalar 15 dakika sonra ICSI pipeti ile toplandıktan sonra metanol asetik asitle fikse edilmiş ve FISH metodu ile kromozomları

(X, Y, ve 17. Kromozom) incelenerek gruplar arasında dizomi ve diploidi sıklığı karşılaştırılmıştır.

Birinci deneyde, 12 orta derecede oligozoospermik erkek ($20.6 \pm 1.7 \times 10^6$ /ml, motilite: $\%52.1 \pm 2.5$) incelenmiş ve HA'e bağlanan spermatozoalarda 4 kat daha az kromozom 17 dizomisi, 5.7 kat daha az sex kromozom dizomileri ve 6.2 kat daha az diploidiler izlenmiştir. İkinci deneyde, 12 normozoospermik erkek (sperm konsantrasyonu: $121.3 \pm 21.4 \times 10^6$ /ml, motilite: $\%59.5 \pm 4.9$) incelenmiş ve beklenildiği gibi normozoospermik örneklerde dizomi ve diploidi sıklığı oligozoospermiklerden daha düşük saptanmıştır. Bu deneyde HA'e bağlanma ile sex kromozom dizomilerinde 4.3 kat, diploidilerde ise 5.8 kat azalma tesbit edilmiştir. Üçüncü deneyde ise 10 oligozoospermik erkek (sperm konsantrasyonu: $12.6 + 1.2 \times 10^6$ /ml, motilite: $\%49.3 \pm 4.0$) incelenmiş ve Falcon Petri kabı kullanılmadan HA bağlanan spermier embriyolog tarafından sayılmıştır. Yine 1. ve 2. deneye benzer şekilde HA bağlanan spermierde, dizomilerde ve diploidilerde belirgin azalma tesbit edilmiştir (189). Bu çalışmada ayrıca matür spermatozoanın HA tarafından selektif seçilmesinin seminal sperm konsantrasyonundan bağımsız olduğu da gösterilmiştir.

HA ile sperm seçimi ile yapılan ICSI'ler (PICSI) ile vizüel sperm seçimi ile yapılan ICSI sonuçları karşılaştırılmış, fertilizasyon oranlarının ($\%69.7 -\%67$, $p>0.05$) ve iyi kalite embriyo oranlarının ($\%56.6-\%51.7$, $p>0.05$) istatistiksel olarak farklı olmadığı gösterilmiştir (190).

Sperm DNA hasarları hem doğal siklusta hem de YÜT'de (fertilizasyon, zigot gelişimi, gebelik kayıpları) başarı oranlarını azaltmıştır. (179,181,183,185). HBA'nın matür DNA bütünlüğü olan spermi seçebilmesi nedeniyle infertil hastaların değerlendirilmesinde faydalı olabileceği düşünülmektedir.

Literatürde HBA'nın sperme bağlanma oranları esas alınarak 3 bağlanma zonu oluşturulmuş ve HBA için bir eşik değeri belirlenmiştir (mükemmel bağlanma: >%90; orta: %60–90; düşük: %<60) (192). Bu değerlere göre düşük bağlanma grubuna IUI ile vakit kaybetmeden ICSI işleminin yapılması, HBA >%60 grubuna ise IUI işleminin yapılması tavsiye edilmiştir (192).

DNA hasarlı, azalmış ya da duraksamış matürasyonu olan spermlemlerle hem doğal hem de IUI sikluslarında fertilizasyon gerçekleşemeyecektir. Bu sebeple, IUI hastalarında HA ile matür sperm oranlarının tespiti uygun hasta popülasyonunun seçiminde yol gösterici olacaktır. HBA testinin hem ucuz hem de uygulanmasının kolay olması da (15 dakika) rutin olarak androloji laboratuvarlarında kullanımını mümkün kılacaktır.

3. MATERYAL VE METODLAR

Bu çalışma 01.03.2012-15.03.2013 tarihleri arasında Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı polikliniğine infertilite yakınması ile başvuran hastalarda prospektif olarak gerçekleştirildi. Çalışmaya temel infertilite değerlendirmesi sonrası izah edilemeyen veya hafif erkek faktör infertilitesi tanısı konulan ve birinci basamak tedavi olarak IUI planlanan 55 hastada uygulanan 55 siklus dahil edildi. Çalışma için Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan onam alındı. Çalışmaya katılacak infertil çiftler çalışma hakkında bilgilendirildi ve onayları alındı. Hastaların tümünden detaylı anamnez alınarak fizik muayene ve jinekolojik değerlendirmeleri yapıldı. Hastaların demografik özellikleri, sperm analizleri, HBA sonuçları ve IUI sonuçları kaydedildi.

Çalışmaya en az 12 aylık primer veya sekonder infertilitesi olan, 18-40 yaş arası, BMI ≥ 18 kg/m² ve ≤ 30 kg/m² olan, düzenli spontan menstürel siklusa sahip (21-35 gün) kadın hastalar dahil edildi.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri kadın hastalarda; ovulatuvar olmak, pelvik muayenede kadın genital sistem anormalliğinin olmaması, normal histerosalpingografi ve tubal açıklığın olması, menstrual siklusun 3. günü yapılan TV-USG değerlendirmesinde normal ovaryan rezervin olması (AFS 8-15, bazal serum FSH < 12 IU/L, E2 < 85 pg/ml), PRL ve TSH değerlerinin normal sınırlarda olması olarak belirlendi.

Erkek hastalar için çalışmaya kabul edilme kriterleri ise izah edilemeyen infertilite grubunda, normal sperm analizine sahip olmak (WHO 2010 kriterlerine göre

sperm sayısı >15 milyon/ml, progresif motilite >%32, Krugere göre >%4 normal morfoloji) olarak belirlendi. Hafif erkek faktör infertilitesi olan grupta ise sperm analizi yukarıda belirtilen referans kriterlere ulaşamamış ancak TMSS>5 milyon olan hastalar bu gruba dahil edildi. Çalışmaya dahil edilmeme kriterleri ise <18 yaş, >40 yaş kadınlar, meme, over, endometrial kanseri olan kadınlar, menstrual siklusun 3. günü yapılan TV-USG'da >15 mm ovaryan kist varlığı, şiddetli endometriozis (Amerikan Fertilite Derneğine göre Evre 3 ve 4) ve İMSS <1×10⁶ olması ya da overleri stimüle eden ilaçların kullanımının kontrendike olması. Çalışmaya ayrıca klinik olarak anlamlı kronik sistemik hastalığı veya endokrin hastalığı olan, adneks veya uterusu yönelik cerrahi öyküsü, polikistik over sendromu veya hiperandrojenizm bulgusu olan hastalar dahil edilmedi.

3.1. HASTALARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

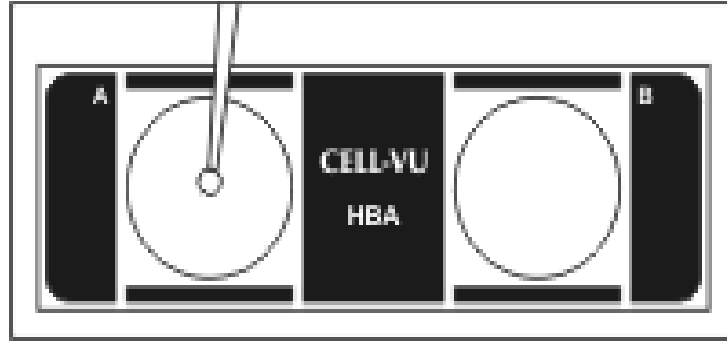
Çalışmaya dahil edilen hastaların ve eşlerinin özgeçmişi, soygeçmişi, infertilitenin süresi, etyolojiye yönelik aydınlatıcı bilgiler, infertilite tedavisi amacıyla yapılan önceki tetkik, tedavi ve operasyonların detayları çiftin anamnezlerinden ve tıbbi kayıtlarından elde edildi. Bazal değerlendirmede menstrüel siklusun 2.-3. günleri tüm hastaların genel fizik ve jinekolojik muayeneleri yapıldı. Kilo ve boyları ölçülerek vücut kitle indeksleri (BMI) hesaplandı. Hastaların tiroid fonksiyon testleri ve prolaktin düzeyleri değerlendirildi. TÖÜTF Tüp Bebek Ünitesi, Androloji laboratuvarında spermiyogram analizi yapıldı. Sperm örnekleri 3 – 5 günlük cinsel perhiz sonrası mastürbasyon yöntemi ile elde edildi. WHO'nun 2010 yılında yayınladığı semen analizi ile ilgili yönergedeki normal semen analizi değerleri esas alınarak hastaların sperm değerlendirmesi yapıldı. Normal semen parametrelerinde belirtilen alt sınıra yakın

değerlerdeki hastalar (sperm sayısı $<15 \times 10^6$ /mL, PR<32, normal sperm morfolojisi <%4) erkek faktor infertilitesine sahip olarak kabul edildi. Menstrual siklusun 3. günü TV-USG yapılarak overlerde 15 mm den büyük kist olmadığı aynı zamanda endometrial kalınlığın <5 mm olduğu gösterildi. Tüm hastalara bazal hormonal ve ultrasonografik değerlendirmeyi takiben siklusun 3. günü rekombinant (rFSH) başlandı (Gonal-F® (Serono,Istanbul), Puregon® (Merck Sharp Dohme, Istanbul)). Hastalarda gonadotropin dozu, yaş, BMI, varsa önceki tedavilerdeki cevaplarına göre ayarlandı (75-100 IU/gün). Gonadotropin tedavisi, siklusun 2- 3. günü başlandı ve ilk folikül kontrolü siklusun 6.-7. günü yapılarak, foliküler gelişim ve endometrial kalınlık değerlendirildi. Ovaryan yanıt seri TV-USG ve ihtiyaç halinde serum östradiol düzeyleri ile değerlendirildi. HCG günü en az bir adet 17-18 mm ve üzeri folikül elde edildiğinde recombinant hCG (Ovitrelle® 250 µgr, Serono, İstanbul) verilerek 35-36 saat sonrasına IUI işlemi planlandı. HCG günü üçten fazla >14 mm folikül, östradiol >1500 pg/ml varlığında multifoliküler gelişim olduğu kabul edilerek siklus iptali gerçekleştirildi.

3.2. SPERM HAZIRLANMASI VE HYALÜRAN BAĞLANMA TESTİ

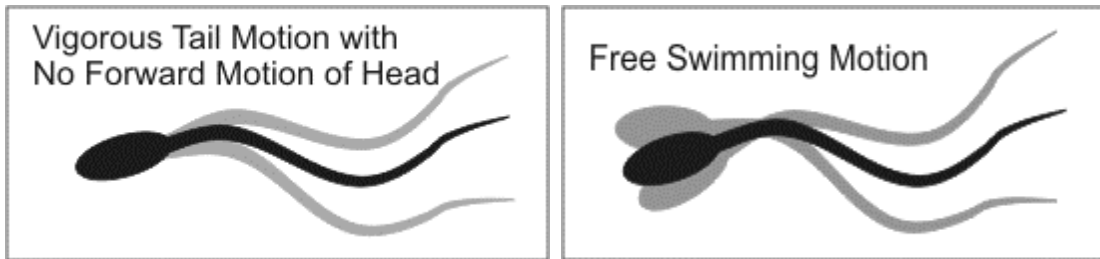
Bütün hastalara 3-4 günlük cinsel perhiz süresinden sonra, planlanan IUI işleminden birkaç saat önce mastürbasyon yoluyla steril kutuda toplanan ve hastanemiz androloji laboratuvarında dansite gradient yöntemiyle hazırlanan sperm numunesiyle tek seans IUI yapıldı. Alınan semen örneğinin oda ısısında 30 dakika bekletilerek likefiye olması sağlandıktan sonra sperm parametreleri değerlendirildi. Volüm, viskozite, motilite ve sperm sayısı Dünya Sağlık Örgütü Kriterleri (WHO 2010) esas alınarak değerlendirildi.

Spermilerin hazırlanması için dansite gradiyent santrifügasyonu kullanıldı. Sonrasında sperm örnekleri tekrar incelenerek 10 µl sperm örneği alınarak HB kitine (BioCoat, Washington, USA) eklendi. Hyalürona kovalan bağlanmış tabaka ile kaplı çember yapıya 10 µl sperm örneği yerleştirildi ve üzerine özel hazırlanmış şeffaf tabaka (Cell-Vu grid cover slip) hava kalmayacak şekilde kapatıldı (Şekil 11).



Şekil 11. HBA kitinin görünümü

Hyalürona kovalan bağlanmış tabaka ile kaplı çember yapı üzerine kapatılan şeffaf tabaka üzerindeki 100 adet karenin her biri 0.1 x 0.1 mm büyüklüğünde olup doğru sayım ve sperm vizualizasyonu için uygun ortam sağlandı. Ardından oda ısısında 10 dakika beklendi ve hyalürona bağlanan ve bağlanmayan matür motil sperm mikroskop altında sayıldı. Hyalüronik asite bağlı olan spermelerin kuyruklarının hızlı hareketlerine devam ettiği ancak ileri progresif baş hareketlerinin olmadığı gözlemlendi (Şekil 12).



Şekil 12. HBA'ya bağlanan ve bağlanmayan spermde hareket paterni

Bununla beraber bağlanmayan motil spermlerin serbest bir şekilde hareketlerine devam ettikleri izlendi. Ardından HB oranı hyalürona bağlanan sperm sayısı/ total sperm sayısı formülü ile hesaplandı.

İnseminasyon işlemi, hasta dorsal litotomi pozisyonunda iken, antevent uterus olanların mesanesi dolu iken abdominal USG eşliğinde yapıldı. Böylece uterus ve serviks arasındaki açı düzeltilerek servikal kanaldan geçişin kolaylaştırılması planlandı. IUI işlemi öncesi, vajinal spekulum uygulandıktan sonra serviks ve vajen 5 cc steril izotonik sıvı ile yıkandı, 1 cc lik steril enjektöre 0.3 ml hava çekildi devamında sperm örneğinin hastanın eşine ait olduğu doğrulandıktan sonra hazırlanan 0.3 ml sperm örneği enjektöre çekilerek ucuna steril yumuşak inseminasyon kanülü (Wallace, PM Group, İstanbul, Türkiye) yerleştirildi. Abdominal ultrasound eşliğinde kanül servikal kanaldan geçirildi, kanülün ucunun kavite içinde olduğu gözlendikten sonra uterin fundusa dokunulmadan sperm örneği yavaş bir şekilde bırakıldı. Hastalara ertesi sabah koit önerilerek, 15 dakika istirahat etmeleri sağlandı. IUI işleminden 15 gün sonra hala adet görmeyen hastalarda serum β -HCG değerleri ölçüldü. Gebelik testi pozitif olan (β -HCG>50 mIU/ ml) hastalarda serum β -HCG değeri 48 saat sonra tekrarlandı. Klinik gebelik tanısı TV-USG ile uterin kavite içinde gestasyonel kesenin tesbit edilmesi ile konuldu.

3.3. İSTATİKSEL ANALİZ

Çalışmada yer alan hastaların yaş, FSH, LH, E2, BMI, HBA, TMSS, IMSS değişkenlerinin normal dağılıma uygunluğu grafiksel olarak ve Shapiro-Wilks testi ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren FSH, E2, hCG günü endometrial kalınlık ve kadın yaşı gibi değişkenler için ortalama \pm standart sapma tanımlayıcı istatistiği verilirken; BMI, LH,

TSH, indüksiyon süresi, normal sperm morfoloji oranı vb. gibi normal dağılım göstermeyen değişkenlere ilişkin tanımlayıcı istatistiklerin gösteriminde ortanca (Çeyreklikler Arası Genişlik – ÇAG) kullanıldı. Çalışma kapsamında elde edilen gravida, parite, yaşayan, sigara öyküsü, gebelik durumu gibi kategorik değişkenler için sayı (n) ve yüzde değerleri verildi. HBA değişkeni, izah edilemeyen infertilitesi olanlarda erkek yaşı, cinsel perhiz süresi, yıkama öncesi sperm sayısı, TMSS, IMSS, normal sperm morfolojisi, sperm baş anomalisi gibi değişken değerlerini gebelik durumu (gebe olan, gebe olmayan) açısından karşılaştırmak için Mann-Whitney U testi kullanıldı.

İnfertilitenin gebelik durumuna göre farklılık gösterip göstermediği Ki-kare en çok olabilirlik (Likelihood ratio) testi ile incelendi. HBA değerleri ile erkek yaşı, TMSS, IMSS, yıkama öncesi sperm sayısı, sperm baş anomalisi, sperm kuyruk anomalisi gibi belirtilen değişkenler arasındaki ilişkiyi belirleyebilmek amacıyla Spearman Rho korelasyon katsayısı hesaplandı.

İstatistiksel analizler için MS-Excel 2007 ve SPSS for Windows Ver. 15.0 (SPSS Inc., Chicago, ILL, USA) programları kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmada dahil edilen 55 kadının yaş ortalaması 31.73 ± 4.68 , erkek hastaların yaş ortancası 34 yıl (ÇAG: 7) idi (Tablo 1). Kadın hastaların BMI değerleri 24 kg/m^2 (ÇAG: 3.7), infertilite süresi 24 ay (ÇAG: 24.0). Hastaların bazal hormon parametreleri; FSH $8.1 \pm 3.7 \text{ mIU/mL}$, LH $5.3 (2.1) \text{ mIU/mL}$, E2 $49.5 \pm 16.2 \text{ pg/mL}$, TSH 2 (ÇAG:1.9) mIU/mL , PRL 11 (ÇAG:8.4) ng/mL olarak hesaplandı. Hastaların IUI sayısı 1.0 (ÇAG:2.0) olarak hesaplandı (Tablo 5).

Tablo 5. Kadın hastaların demografik ve bazal hormonal parametreleri

Değişkenler	Ortalama \pm SS
	Ortanca (ÇAG)
Yaş (yıl)	31.73 ± 4.68
BMI (kg/m^2)	24 (3.7)
İnfertilite süre (ay)	24.0 (24.0)
FSH (mIU/mL)	8.1 ± 3.7
LH (mIU/mL)	5.3 (2.1)
E2 (pg/mL)	49.5 ± 16.2
TSH (mIU/mL)	2 (1.9)
PRL (ng/mL)	11 (8.4)
IUI sayısı	1.0 (2.0)

Hastaların ovulasyon indüksiyon parametreleri; ovulasyon indüksiyon süresi 7 gün (ÇAG: 3.0), HCG günü endometrial kalınlık ortalaması 8.2±1.4 mm, max folikül boyutu 18.5 (ÇAG:1.0), dominant folikül sayısı 1.0 (ÇAG:1.0) ve kullanılan total gonadotropin dozu 450 (238.0) IU idi (Tablo 6).

Tablo 6. Kadınlarda kontrollü ovaryan hiperstimülasyon parametreleri

İndüksiyon süresi (gün)	7.0 (3.0)
HCG günü endometrial kalınlık (mm)	8.2±1.4
HCG günü max folikül boyutu (mm)	18.5 (1.0)
HCG günü dominant folikül sayısı (n)	1.0 (1.0)
Total gonadotropin doz (IU)	450 (238.0)

Erkeklerin yaş ortancası 34.0 yıl (ÇAG: 7.0), cinsel perhiz süresine ait ortanca 3.0 (ÇAG: 1.0) idi. Erkek hastaların %47.9'u sigara içtiğini, %52.1'i ise sigara içmediğini belirtti. Çalışmada tüm hastalar için HBA ortancası 71.5 (ÇAG: 31.0) olarak hesaplandı. Erkek hastalarda yıkama öncesi sperm volümü 2 ml (ÇAG: 1.0), normal sperm morfolojisine ait ortanca %3.0 (ÇAG: 2.0) olarak tespit edildi. Yıkama öncesi sperm sayısı değerleri 39.0 (ÇAG=38.0) milyon/mL, progresif motilite (PR) %'si 34.0±13.3 idi. TMSS ortancası 20.0 (ÇAG: 26.3) x 10⁶ ve IMSS ortancası 5.9 (ÇAG: 6.2) x10⁶ olarak hesaplandı (Tablo 7).

Tablo 7. Erkek hastaların demografik ve sperm parametreleri

Değişkenler	Ortalama ± SS
	Ortanca (ÇAG)
Erkek yaş (yıl)	34.0 (7.0)
Cinsel perhiz süresi (gün)	3.0 (1.0)
HBA %	71.5(31.0)
Yıkama öncesi sperm volumü (mL)	2.0 (1.0)
Yıkama öncesi sperm sayısı (milyon/mL)	39.0 (38.0)
Yıkama öncesi progresif motilite (PR) %	34.0±13.3
TMSS(milyon)	20.0 (26.3)
Yıkama sonrası sperm sayı (milyon/mL)	21.0 (21.5)
Yıkama sonrası progresif motilite (PR) %	95.0 (1.0)
IMSS (milyon)	5.9 (6.2)
Morfoloji normal (%)	3.0 (2.0)
Baş anomalisi (%)	60.0 (5.0)
Boyun anomali (%)	18.0 (4.0)
Kuyruk anomali (%)	19.0 (3.0)

Gebe olanlarda HBA değeri ortancası %80.5 (ÇAG =24.0), gebe olmayanlarda HBA değeri ortancası %69.5 (ÇAG =34.0) olarak hesaplandı (Tablo 8). Gebelik elde edilen hastalarda HBA değerleri daha yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlılık göstermedi ($p>0.05$).

Tablo 8. HBA değerinin gebelik durumuna göre karşılaştırılması

Gebelik durumu	HBA (ÇAG)	Z	P
Gebe	80.5 (24.0)	1.413	0.164
Gebe değil	69.5 (34.0)		

Hastaların %59.3'ü primer, %47'si sekonder infertil olgulardan oluşuyordu. İnfertil çiftlerin %58.2'i izah edilemeyen (n: 32), %41.8'i erkek faktör infertiliteye (n: 23) sahipti. Siklus başına gebelik oranı %14.5 olarak hesaplandı. Hastalar infertilite nedenine göre gruplara ayrıldığında gebelik oranları açısından anlamlı farklılık saptanmadı (p>0.05).

Tablo 9. İnfertilite nedenlerine ile gebelik durumunun karşılaştırılması

Gebelik durumu	İnfertilite		χ^2	P
	Erkek n (%)	İEİ n (%)		
Gebe	2 (25.0)	6 (75.0)	1.147	0.284
Gebe değil	21 (44.7)	26 (55.3)		

Hastalar infertilite nedenine göre subgruplara ayrıldığında, izah edilemeyen infertilite olgular gebe olan ve olmayanların parametreleri karşılaştırıldı. Gebe olan ve olmayanların yaş ortalaması (p>0.05) ve infertilite süresi istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0.05). İEİ çiftlerde gebe olanların HBA değerleri %77.5 (ÇAG: 21.0), gebe olmayanların HBA değerleri %80.5 (ÇAG: 26.0) olarak hesaplandı. İEİ'si olanlarda, HBA değerleri gebe olma durumuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermedi (p>0.05). İEİ hastalarda, gebe olan ve olmayanlarda TMSS değerleri sırasıyla 20.0×10^6 (ÇAG: 27.1) ve 28.4×10^6 (ÇAG: 21.5) olup bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Z: 0.854; p>0.05). Hastalardan elde edilen İMSS

değerlerinin de gebelik durumuna göre farklılık göstermediği tespit edildi (gebe olan ve olmayanlarda sırasıyla 7.6×10^6 (IQR: 7.0), 5.9×10^6 (IQR: 5.9) (Z: 0.915; $p>0.05$) (Tablo 10).

Tablo 10. İzah edilemeyen infertil hastalarda gebelik durumuna göre değişkenlerin dağılımı

Değişkenler	GEBELİK DURUMU			
	Gebe (n=6)		Gebe değil (n=26)	
	Ortanca(ÇAG)	Ortanca(ÇAG)	Z	p
Kadın yaş (yıl)	32.5 (11.0)	32.5 (6.0)	0.340	0.760
Erkek yaş (yıl)	32.0 (9.0)	33.5 (5.0)	0.536	0.621
İnfertilite süresi (ay)	12.0 (15.0)	24.0 (30.0)	1.188	0.251
İndüksiyon süresi (gün)	6.0 (4.0)	6.5 (3.0)	0.657	0.548
Total gonadotropin doz (Ü)	300.0 (338.0)	450.0 (197.0)	1.080	0.305
HBA (%)	80.5 (26.0)	77.5 (21.0)	0.629	0.556
Yıkama öncesi sperm sayısı (milyon/mL)	55.0 (37.0)	44.0 (34.0)	0.334	0.746
Yıkama öncesi progresif motilite (%)	39.0 (16.0)	40.0 (16.0)	0.529	0.627
TMSS (milyon)	28.4 (21.5)	20.0 (27.1)	0.854	0.411
IMSS (milyon)	7.6 (7.0)	5.9 (5.9)	0.915	0.378
Morfoloji normal (%)	8.0 (6.0)	4.0 (2.0)	0.766	0.495

Gebe olmayan çiftlerde normal sperm morfoloji yüzdesi 4.0 (ÇAG =2.0) iken gebe olan çiftlerde 8.0 (ÇAG =6.0) olarak elde edilmiş ancak bu oranlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.495$) (Tablo 10).

HBA değerleri ile erkek yaşı, cinsel perhiz süresi, yıkama sonrası sperm sayısı (milyon/mL) arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmedi ($p>0.05$). HBA değerleri ile TMSS ve IMSS değerleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlemlendi (sırasıyla, rho: 0.524; $p<0.05$ ve rho: 0.537; $p<0.05$). HBA değeri arttıkça hem TMSS

hem de IMSS değerleri artmakta idi (Tablo 11). Benzer şekilde, normal sperm morfolojisi ile HBA değerleri arasında da anlamlı bir korelasyon izlendi. HBA değerleri arttıkça sperm normal morfoloji oranlarında artmaktadır ($p<0.05$). Ancak sperm morfolojik anomalileri gruplandırıldığında (baş, boyun, kuyruk) HBA ile bu morfolojik tipler gebe olan ve olmayan hastalarda farklı değildi ($p>0.05$) (Tablo 11).

Tablo 11. HBA değerleri ile belirtilen değişkenler arasındaki ilişki

Değişkenler	Rho	P
Erkek Yaş (yıl)	-	0.451
Cinsel perhiz süresi (gün)	-	0.683
Yıkama öncesi sperm sayısı (milyon/mL)	0.380	0.007
Yıkama öncesi progresif motilite (%)	0.304	0.034
TMSS (milyon)	0.524	0.000
Yıkama sonrası sperm sayısı (milyon/mL)	0.539	0.000
IMSS (milyon)	0.537	0.000
Morfoloji normal (%)	0.322	0.048
Baş normal	-	0.834
Boyun anomaly	-	0.153
Kuyruk anamoli	-	0.845

Sigara içen ve içmeyen hastalarda HBA değerleri karşılaştırıldığında, sigara içenlerin HBA değerleri 71.0 (ÇAG=35.0), içmeyenlerin ise 70.0 (ÇAG =31.0) idi. Bu hastalar arasında HBA değerleri açısından anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$) (Tablo 12).

Tablo 12. HBA değerinin sigara öyküsüne göre karşılaştırılması

Sigara öyküsü	HBA Ortanca(ÇAG)	Z	P
İçmeyen (n=25)	70.0 (31.0)	0.053	0.957
İçen (n=22)	71.0 (35.0)		

Çalışmada gebe olan ve olmayan hastaların demografik özellikleri ve kontrollü ovaryan hiperstimülasyon parametreleri karşılaştırıldığında da anlamlı bir fark izlenmedi ($p>0.05$) (Tablo 13).

Tablo 13. Bireylerin gebelik durumlarına göre belirtilen değişkenlerin dağılımı

Değişkenler	GEBELİK DURUMU		Z	p
	Gebe Ortanca (ÇAG)	Gebe değil Ortanca (ÇAG)		
Kadın yaş (yıl)	33.0 (8.0)	32.0 (6.0)	0.611	0.550
Erkek yaş (yıl)	33.5 (7.0)	34.0 (7.0)	.528	0.614
İnfertilite süre (ay)	12.0 (18.0)	24.0 (24.0)	1.168	0.259
Kadın BMI(kg/m ²)	25.2 (3.5)	23.8 (3.7)	1.137	0.262
HBA %	80.5 (24.0)	69.5 (34.0)	1.413	0.164
İndüksiyon süresi (gün)	6.0 (5.0)	7.0 (3.0)	0.558	0.599
Total gonadotropin dozu (Ü)	300.0 (312.0)	450.0 (213.0)	1.440	0.159
Folikül sayısı	1.0 (1.0)	1.0 (1.0)	.129	0.914
Yıkama öncesi sperm sayısı (milyon/mL)	43.5 (35.0)	39.0 (37.0)	.565	0.582
Yıkama öncesi progresif motilite (%)	36.5 (15.0)	35.0 (19.0)	.565	0.582
TMSS	28.4 (21.5)	20.0 (27.1)	.854	0.411
IMSS	7.6 (7.0)	5.9 (5.9)	.915	0.378
Morfoloji normal (%)	4.0 (6.0)	3.0 (2.0)	.373	0.734

HBA için literatürdeki cut-off değeri esas alınacak olursa gebe olanların %87.5'inde ve gebe olmayanların %67.4'ünde HBA değeri 60 ve üzerindedir. Gebe

olma durumuna göre HBA değişkeni için belirlenen gruplarda dağılım istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($\chi^2 = 1.322$; $p=0.250$).

Tablo 14. HBA değerinin gebelik durumuna göre karşılaştırılması

Gebelik durumu	HBA		χ^2	p
	<60 n (%)	≥ 60 n (%)		
Gebe	1 (12.5)	7 (87.5)	1.322	0.250
Gebe değil	15 (32.6)	31 (67.4)		

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada hyalüran bağlanma testininin, İEİ ve erkek faktör infertilitesi nedeniyle IUI yapılan siklularda kullanımının prognostik değerinin olup olmadığını araştırmayı planladık. Aynı zamanda HBA'nın sperm parametreleri ile korelasyonu da değerlendirildi.

HBA ile hastaların demografik özellikleri; erkek hasta yaşı, cinsel perhiz süresi, sigara öyküsü ve infertilite süresi vb. arasında bir ilişki saptanmadı. IUI sonrası gebelik oluşan ve oluşmayan infertil hastalar karşılaştırıldığında, gebe olan çiftlerde HBA oranlarının %80.5, olmayan çiftlerde %69.5 olduğu tespit edildi. Gebelik elde edilen çiftlerde HBA oranı daha yüksek olmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Literatürde HBA'nın IUI sikluslarındaki prediktif değerini araştıran çalışma sayısı son derece sınırlıdır. Bunlardan ilki 2005 yılında Wu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma olup HBA'nın TMSS, sperm morfolojisi ve gebelik sonuçları ile korelasyonu araştırılmış ve HBA değerleri bir korelasyon saptanmamıştır (193). Bizim çalışmamızda da Wu ve arkadaşlarının çalışmasında olduğu gibi IUI sikluslarında, HBA ile gebelik oranları arasında bir ilişki saptanmadı. Ancak bu çalışmadan farklı olarak bizim çalışmamızda, HBA ile TMSS ve morfoloji arasında anlamlı bir ilişki bulundu. HBA değerlerinin yüksek ve gebeliğin de pozitif olduğu hastalarda, TMSS 28×10^6 idi. Oysa ki Wu ve arkadaşlarının çalışmalarında gebe olan hastaların %90'ında TMSS $>10 \times 10^6$ idi (193). Wu ve arkadaşlarının çalışmaları yüksek bir hasta sayısında (90 çiftte) gerçekleştirilmesine rağmen, malesef yalnızca poster aşamasında kalmıştır. HBA'nın

IUI sonuçları üzerinde prediktif etkisini araştıran bir diğer çalışmada Roudebush ve arkadaşları tarafından 2007 yılında gerçekleştirilmiştir (194). Otuzdokuz çiftin katıldığı bu IUI çalışmasında, bizim sonuçlarımızın aksine, gebe olan grupta HBA oranları gebe olmayan gruba göre anlamlı yüksek bulunmuştur. Bu sebeble Roudebush ve arkadaşları, IUI sikluslarında hiyalüronik asitin fonksiyonel olarak yeterli spermin seçiminde (fertilizasyon kapasitesi yüksek, matür sperm) kullanılabileceği sonucuna varmışlardır. Bizim alışmamızda gebe kalanlarda ki HBA değerleri (%80.5) bu çalışmadaki HBA değerlerine (%82.) yakın olmasına rağmen, biz HBA'nın gebeliği predikte edemediğini gördük. Roudebush ve arkadaşlarının çalışmasında gebelik oranları %33.3 iken bizim gebelik oranlarımız %14.5 idi. Bu iki çalışma arasındaki farklılıklar, hasta sayısı ve seçilen hasta popülasyonunun farklı olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Bir diğer çalışmada Türkiye'den Boynukalın ve arkadaşları tarafından 2012 yılında İEİ iftlerde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada da HBA'nın IUI sikluslerinde gebelik sonuçları üzerine etkisi incelenmiş ve bizim çalışmamız sonuçlarına benzer şekilde, gebe olan ve olmayan gruplar arasında HBA değerleri açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır (sırasıyla 50.2 ± 25.2 , 48.3 ± 26.2 , $p > 0.05$) (195).

Boynukalın ve arkadaşları bu çalışmayı İEİ hastalarda gerçekleştirmiş ve gebelik oranlarını %14.1 olarak rapor etmişlerdir. Bizim alışmamızda ise hastaların %58.2'i izah edilemeyen (n: 32), %41.8'i erkek faktör (n: 23) infertil hastalardan oluşmasına rağmen siklus başına gebelik oranlarının birbirine yakın olduğu gözlendi. Biz hastaları infertilite nedenine göre ayırdığımızda, siklus başına gebelik oranımız İEİ olgularda %18.7, erkek faktörde ise %9'dur. İEİ olgulardaki gebelik oranlarımız, literatürle (%7-10) karşılaştırdığında, KOH+IUI sikluslarında daha yüksek idi (117). Erkek infertil

olgularda gebelik oranımız daha düşük olup sebebi sperm parametrelerinin kısıtlayıcı faktör olması olabilir.

Boynukalın ve arkadaşlarının çalışmalarında, İEİ çiftlerde ortalama HBA değeri 48.6 ± 25.9 olarak belirlenmiş olup, bu değer literatürde bildirilen HBA sınır değerinin (HBA>%60) altında olduğu gözlemlendi. Bizim çalışmamızda ise ortalama HBA değeri 71.5 olup, literatür ile benzer idi. Ayrıca bu çalışma da bizim sonuçlarımızı destekler şekilde, gebelik ile sperm konsantrasyonu ve progresif motilitesi arasında bir ilişki saptanmamıştır.

HBA için literatürde belirlenen eşik değeri (HBA>%60) esas alınarak 55 çift yeniden değerlendirildiğinde, HBA >%60 olan hastaların %18.4 'ü gebe kalırken, HBA <%60 olan hastaların sadece %6.2'si gebe kalmıştır. Bu çalışmada, HBA >%60 olan olguların gebelik oranlarının (%18.4) literatürde ki IUI sonuçları ile uyumlu olduğu gözlemlendi (%15-18). Ancak, HBA için eşik değeri %60 alındığında, eşik değerin alt ve üstündeki olgularda da gebelik oranları farklı değildi.

Literatürde IUI sikluslarında HBA eşik değerini araştıran bir çalışma mevcut değildir. Bu konu ile ilgili çalışmalar IVF/ICSI çalışmalarıdır. Kovacs ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları bir çalışmada (60 İEİ çift), HBA oranlarını esas alarak hastaların IVF ya da ICSI işlemine yönlendirilmelerini sağlayabilecek bir eşik değeri bulmaya çalışmışlardır. Böylece, düşük HBA değeri olan hastaların IVF'de fertilizasyon başarısızlığının olacağını hipotez ederek, hastaları ICSI işlemine yönlendirmeyi düşünmüşlerdir. Bu çalışmada, HBA oranları için %60, %70 ve %80 olarak 3 eşik değeri belirleyip bu değerler ile IVF'deki fertilizasyon oranlarını karşılaştırmışlardır. Fertilizasyon oranları, HBA <%60 grubunda %53.9, HBA >%80 grubunda %52.2 olup,

bu fark anlamlı bulunmamıştır. Yine diğer eşik değerleri için de istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit etmemişlerdir (196).

Çalışmamızda HBA ile sperm parametreleri arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, HBA değerleri ile sperm sayısı ve progresif motilite (PR) oranları arasında pozitif yönde anlamlı bir ilişki saptandı. HBA değerleri arttıkça, sperm sayısı ve progresif motilite değerlerinde de artış izlendi.

HBA oranları ile, IUI sikluslarında prognostik önemi olan, yıkama öncesi TMSS ve yıkama sonrası İMSS değerleri arasında da anlamlı bir ilişki tespit edildi. HBA değeri arttıkça hem TMSS hem de İMSS değerleri anlamlı düzeyde artmaktaydı. HBA oranları ile normal sperm morfolojisi arasında da anlamlı bir korelasyon bulundu. Ancak, HBA ile anormal sperm morfolojilerinin (baş, boyun, kuyruk anomalileri) tipleri arasında bir ilişki tespit edilmedi.

Benzer şekilde HBA ile semen parametreleri arasındaki ilişkiyi inceleyen bir IVF çalışması 2009 yılında Nijs ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (197). Bu çalışmada HBA'nın sperm morfolojisi, motilite ve konsantrasyonu ile korelasyonu aynı zamanda da embriyo kalitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Aynı zamanda, sperm yıkama öncesi ve sonrası HBA değerleri de karşılaştırılmış yıkama sonrası HBA değerinin (%82) yıkama öncesinden (%71) daha yüksek olduğu ve bu değerlerin sperm morfolojisi ile korele olduğu görülmüştür. HBA'nın sperm konsantrasyonu, motilitesi ve gebelik oranları ile korele olmadığı ancak fertilizasyon oranı <%50 olan grupta, >%50 olan gruba göre HBA'nın daha düşük olduğu (sırasıyla %69.7 -%79.2) tesbit edilmiştir. Bizim çalışmamızda da HBA ile gebelik arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon olmamasına rağmen, gebe olanlarda HBA değerinin (%80.5 (ÇAG=24.0)), gebe olmayanlardan daha yüksek (%69.5 (ÇAG=34.0)) olduğu tesbit edilmiştir. Nijs ve

arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada ayrıca taze semenden alınan örneklerle yapılan HBA ile embriyo kalitesi arasında korelasyon tesbit edilmiştir. Buna dayanılarak HBA'nın matür spermleri seçtiği (DNA fragmentasyonu yada nükleer immatüritesi olmayan) dolayısıyla, embriyo kalitesinde iyi olduğu sonucuna varılmıştır. Yine abortus yapan grupta HBA oranları daha düşük bulunmuştur (%72-% 87) (197).

Tarozzi ve arkadaşları ise 2009 yılında HBA'nın erkek infertilitesi tedavisinde klinik kullanımını değerlendirmek amacıyla 60 IVF hastasının dahil olduğu bir çalışma yapmışlardır (198). Bu çalışmada sperm parametreleri, HBA değerleri ve DNA fragmentasyon oranlarını incelemişler ve HBA değerleri ile fertilizasyon, implantasyon, klinik gebelik ve abortus oranları arasında bir korelasyon tespit edemezken sperm morfolojisi arasında yüksek korelasyon tespit etmişlerdir ($P < 0.05$). Ayrıca HBA değerleri yüksek olan grupta düşük DNA fragmentasyon oranları gözlemişlerdir ($P < 0.05$). Bu sonuçlar ışığında HBA'nın yüksek DNA bütünlüğü olan normal morfolojideki spermleri seçebildiğini ancak IVF'de rutin kullanımı için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu belirtmişlerdir (198).

Çalışmamızda ayrıca, IUI yapılan İEİ ve erkek faktör infertilitesi olan hasta grubumuzda gebeliği predikte eden faktörler araştırıldı. Gebe olan ve olmayanlarda hastaların demografik özellikleri; kadın yaşı, BMI, erkek yaşı ve infertilite süresi ve sigara öyküsü arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Gebe olan ve olmayanlarda kontrollü ovaryan hiperstimülasyon parametreleri karşılaştırıldığında; indüksiyon süresi, kullanılan total gonadotropin dozu, hCG günü gelişen folikül sayısı, maksimum folikül boyutu ve endometriyal kalınlık arasında da bir fark izlenmedi.

Gebe olan ve olmayanlarda, sperm parametreleri arasında; yıkama öncesi sperm sayısı, progresif motilite, TMSS, morfoloji ve yıkama sonrası İMSS'ında da anlamlı bir fark gözlenmedi.

İnfertilite için prognostik önemi olan kadın yaşı ve infertilite süresi gebe olan ve olmayanlarda benzerdi. Gebe olan hastalarda TMSS 28.4×10^6 iken gebe olmayan hastalarda 20×10^6 idi. Bu oranlar arasında aşikar bir fark olmasına rağmen, istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu durum muhtemelen hasta sayımızın az olması ile ilişkili idi. Çünkü literatürde de gebe olan hastaların %90'ında TMSS $>10 \times 10^6$ olarak belirtilmiştir (193).

Sonuç olarak, HBA testi ile DNA fragmentasyonu az olan düşük anöploidili ve matürasyonunu tamamlamış spermier seçilmektedir. Bu özelliklere sahip spermierin fertilizasyon sırasında kümüulus ooforus tarafından salınan HA'e bağlanarak oosite penetre olma ihtimali daha yüksektir. Bu mantıkla HBA oranı yüksek spermierin uterin kaviteye verilmesi HBA oranı düşük spermierlere göre daha yüksek gebelik oranları ile birlikte olacaktır. Bu çalışmamızda HBA ile gebelik arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon tesbit edememize rağmen gebe olan grupta HBA oranlarının yüksek olması ve HBA <40 olan hastalarda hiç gebelik elde edilememesi nedeniyle, hasta sayısı arttırıldığında HBA'nın klinik olarak anlamlı olabileceğini düşünmekteyiz. Ancak HBA'nın IUI sikluslarında rutin kullanımını önerebilmek için daha fazla klinik çalışmaya ihtiyaç vardır.

6. KAYNAKLAR

1. Leon Speroff and Marc A. Fritz. Female infertility. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility, Eighth Edition, LWW, 2011: 1137-1190
2. Maruani P, Schwartz D. Sterility and fecundability estimation. J Theor Biol. Nov 21 1983;105(2):211-9.
3. Trussell J, Wilson C. Sterility in a population with natural fertility. Popul Stud. 1985;29:269-86)
4. Mosher WD, Pratt WE, Fecundity and infertility in the United States incidence and trends, Fertility Sterility 1991;56:192,.
5. Kışnişçi HA, Gökşin E, Durukan T, Üstay K, Ayhan A, Gürkan T, Öneroğlu LS. Erkeğe bağlı infertilite, Androloji. Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi. Ed. Ankara: Güneş, 1996.s 1119-1129,1287.
6. Shoham Z, Di Carlo C, Patel A, Conway GS, Jacobs HS. Is it possible to run a successful ovulation induction program based solely on ultrasound monitoring? The importance of endometrial of endometrial measurements. Fertil Steril 1991; 56:836-841.
7. Jacky Boivin Bunting L, Collins JA, Nygren KG, International estimates of infertility.Prevalance and treatment seeking.Human Reproduction 2007;22:1506-12
8. Stephen EI, Chandra. A, Use of infertility services in the United States 1995, Fam Plann Perspect 2000;3:132,.
9. Hogberg U. Reproductive patterns among Swedish women born 1936-1960 Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica 1992;171:207-14
10. International Fertility comparison-Australian Bureau of statistics 2007.
11. Leon Speroff and Marc A. Fritz. Female infertility. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility, Eighth Edition, LWW, 2011: 1250-6

12. Zanzaveld LJD, Polakoski KL, Williams WL, Properties of a proteolytic enzyme from rabbit sperm acrosomes. *Biol Reprod* 1972;6:30,
13. Ward CR, Storey BT, Kopf GS, Selective activation of G_{i1} ve G_{i2} in mouse sperm by the zona pellucida, the egg's extracellular matrix. *J Biol Chem* 1994;269:13254,
14. Swann K, Soluble sperm factors and Ca²⁺ release in eggs at fertilization, *Rev Reprod* 1996;1:33,
15. Magyar DM, Boyers SP, Marshall JR, Abraham GE. Regular menstrual cycles and premenstrual molimina as indicator of ovulation. *Obstet Gynecol* 1979;53:411-14
16. McGovern PG, Myers ER, Silva S, et al. Absence of secretory endometrium after false- positive home urine luteinizing hormone testing. *Fertil Steril* 2004;82:1273-1277.
17. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Optimal evaluation of the infertile female. *Fertil Steril* 2006;86(5 suppl 1):s264-7
18. Scott RT, Toner JP, Muasher SJ, et al. Follicle-stimulating hormone levels on cycle day 3 are predictive of in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1989;51:651-4
19. Muasher SJ, Oehninger S, Simonetti S, et al. The value of basal and/or stimulated serum gonadotropin levels in prediction of stimulation response and in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1988;50:298-307
20. Scott RT Jr, Elkind-Hirsch KE, Styne-Gross A, Miller KA, Frat-tarelli JL, The predictive value for in vitro fertility delivery rates is greatly impacted by the method used to select the thresh old between normal and elevated basal follicle-stimulating hormone, *Fertil Steril* 2008;89:868.
21. Leon Speroff and Marc A. Fritz.. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, Eighth Edition, LWW, 2011: 1148-9
22. Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, et al. Anti-mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod* 2004;10:77-83.

23. Bath LE, Wallace WH, Shaw MP, Fitzpatrick C, Anderson RA. Depletion of ovarian reserve in young women after treatment for cancer in childhood: detection by anti-Müllerian hormone, inhibin B and ovarian ultrasound. *Hum Reprod* 2007;22:1837-40
24. Pigny P, Jonard S, Robert Y, Dewailly D. Serum anti-Müllerian hormone as a surrogate for antral follicle count for definition of the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:941-5
25. Haadsma ML, Bukman A, Groen H, et al. The number of small antral follicles (2-6 mm) determines the outcome of endocrine ovarian reserve tests in a subfertile population. *Hum Reprod* 2007;22:1925-31
26. Sills ES, Alper MM, Walsh AP. Ovarian reserve screening in infertility: practical applications and theoretical directions for research. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;146:30-6
27. Broer SL, Dolleman M, Opmeer BC, et al. AMH and AFC as predictors of excessive response in controlled ovarian hyperstimulation: a meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2011;17:46-54.
28. Nelson LM, Covington SN, Rebar RW. AN update: spontaneous premature ovarian failure is not an early menopause. *Fertil Steril* 2005;83:1327-32
29. Habibaj J, Kosova H, Bilali S, Bilali V, Qama D. Comparison between transvaginal sonography after diagnostic hysteroscopy and laparoscopic chromopertubation for the assessment of tubal patency in infertile women. *J Clin Ultrasound* 2011
30. D. K, Weissman A, Howles C, Shomam Z, Textbook of Assisted Reproductive Techniques. 4. th edition. 2012
31. Roma Dalfo A, Ubeda B, Ubeda A, et al. Diagnostic value of hysterosalpingography in the detection of intrauterine abnormalities: a comparison with hysteroscopy. *AJR Am J Roentgenol* 2004;183:1405-9
32. Gaglione R, Valentini AL, Pistilli E, Nuzzi NP. A comparison of hysteroscopy and hysterosalpingography. *Int J Gynaecol Obstet* 1996;52:151-3

33. Grimbizis GF, Tsolakidis D, Mikos T, et al. A prospective comparison of transvaginal ultrasound, saline infusion sonohysterography, and diagnostic hysteroscopy in the evaluation of endometrial pathology. *Fertil Steril* 2010;94:2720-5
34. Bingol B, Gunenc Z, Gedikbasi A, et al. Comparison of diagnostic accuracy of saline infusion sonohysterography, transvaginal sonography and hysteroscopy. *J Obstet Gynaecol* 2011;31:54-8
35. Soares SR, Barbosa dos Reis MM, Camargos AF. Diagnostic accuracy of sonohysterography, transvaginal sonography, and hysterosalpingography in patients with uterine cavity disease. *Fertil Steril* 2000;73:406-11
36. Leon Speroff and Marc A. Fritz.. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, Eighth Edition, LWW, 2011:1645-1920
37. Celik O. Yardımcı Üreme Teknikleri, 2011, Nobel Kitabevi
38. Tournaye H, Staessen C, Camus M et al. No evidence for a decreased fertilizing potential after in-vitro fertilization using spermatozoa from polyzoospermic men. *Hum Reprod* 1997;12:2183-5
39. World Health Organization. WHO laboratory manual for the Examination and Processing of Human Semen, 4th edn. Cambridge: Cambridge University Press, 2010.
40. Oehninger S, Chaturvedi S, Toner J, Morshedi M, Mayer J, Lanzendorf S, Muasher S. 1998 seen Quality: Is there paternal effect on pregnancy outcome in in vitro fertilization /intracytoplasmic sperm injection? *Hum Reprod*, 13:2161-64
41. Fredericson B, and Bjork R. Morphology of postcoital spermatozoa in the cervical secretion and its clinical significance. *Fertil Steril*, 1977;28:841-45
42. Mortimer D, Leslie EE, Kelly RVV, Temleton A. Morphological selection of human spermatozoa in vivo and in vitro. *J Reprod Fertil* 64:391-9
43. Menkveld R, Stander F, Kotze T, Kruger TF, van Zyl JA The evaluation of morphological characteristics human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod*, 1990;5:586-592.

44. Liu DY, Baker HWG..Morphology of spermatozoa that bound to the human oocytes that failed to fertilize in vitro.J Reprod.Fertil 1992;94:71-84
45. Ford WC. World Health Organization (WHO) laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th edition. 2010;56-63.
46. Menkveld R, Stander FS, Kotze TJ, Kruger TF, van Zyl JA. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. Hum Reprod 1990;4:586-92.
47. Menkveld R, Lacquet FA, Kruger TF, Lombard CJ, Sanchez Sarmiento CA, de Villiers A. Effects of different staining and washing procedures on the results of human sperm morphology evaluation by manual and computerised methods. Andrologia 1997;29:1-7.
48. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. Fertil Steril 1988;49:112
49. Sripada S, Townend J, Campbell D, Murdoch L, Mathers E, Bhattacharya S. Relationship between semen parameters and spontaneous pregnancy. Fertil Steril 2010;94:624-30.
50. Bostofte E, Serup J, Rebbe H. Relation between morphologically abnormal spermatozoa and pregnancies obtained during a twenty-year follow-up period. Int J Androl 1982;5:379-86.
51. Van Zyl JA, Kotze TJ, Menkveld R. The predictive value of spermatozoa morphology in naturel fertilization. In Acosta AA,Swanson RJ, Ackerman SB (eds). Human spermatozoa in assisted reproduction. Williams and Wilkins, Baltimore, 1990;319-24.
52. Sofikitis NV, Miyagawa I, Zavos PM, Toda T, Iino A, Terakawa N. Confocal scanning laser microscopy of morphometric human sperm parameters: correlation with acrosin profiles and fertilizing capacity. Fertil Steril 1994;62:376-86.
53. Haidi G, Schill WB. Sperm morphology in fertile men. Arch Androl 1993;31:153-7.

54. Kupker W, Schulze W, Diedrich K, 1998. Ultra-structure of gamete and intracytoplasmic sperm injection: The significance of sperm morphology. *Hum Reprod*, 13:99-106
55. Banker MR, Patel PM, Joshi BV, Shah PB, Goyal R. Successful pregnancies and a live birth after intracytoplasmic sperm injection in globozoospermia. *J Hum Reprod Sci* 2009;2:81-2.
56. Tomlinson MJ, Barrat CLR, Cook ID. Prospective study of leukocytes and leukocyte sub-populations in semen suggests they are not a cause of male infertility. *Fertil Steril*. 1993;60:1069-75
57. Wolff H, Politch JA, Martinez A, Haimovici F, Hill JA, Anderson DJ. Leukospermia is associated with poor sperm quality. *Fertil Steril*, 1990; 53: 528-36
58. Van Assche E, Bonduelle M, Tournaye H, et al. Cytogenetics of infertile men. *Hum Reprod* 1996;11:1-12
59. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, et al. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 1996;5:933-43
60. McLachlan RI, O'Bryan MK. Clinical review: State of the art for genetic testing of infertile men. *J Clin Endocrinol Metab* 95:1013-24
61. Hopps CV, Mielnik A, Goldstein M, et al. Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. *Hum Reprod* 2003;18:1660-5
62. Dork T, Dworniczak B, Aulehla-Scholz C, et al. Distinct spectrum of CFTR gene mutations in congenital absence of vas deferens. *Hum Genet* 1997;100:365-77
63. Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanism of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010;93:1027-36
64. Schulte RT, Ohl DA, Sigman M, Smith GD. Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. *J Assist Reprod Genet* 2010;27:3-12
65. Guzick DS, Sullivan MW, Adamson GD, Cedars MI, Falk RJ, Peterson EP, et al. Efficacy of treatment for unexplained infertility. *Fertil Steril*. 1998;70(2):207-13.

66. Lewis SE, Agbaje I, Alvarez J. Sperm DNA tests as useful adjuncts to semen analysis. *Syst Biol Reprod Med*. 2008;54 (3):111–25.
67. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988;175(1):184–91.
68. Erenpreiss J, Bars J, Lipatnikova V, Erenpreisa J, Zalkalns J. Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity. *J Androl*. 2001;22:45–53.72.
69. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod*. 1999;(14):1039–49.
70. Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril*. 2000;73:43–50.
71. Venkatesh S, Singh A, Shamsi MB, Thilagavathi J, Kumar R, Mitra DK, et al. Clinical significance of sperm DNA damage threshold value in the assessment of male infertility. *Reprod Sci*. 2011.
72. Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod*. 2002;17:3122–8.
73. Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M, et al. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod*. 2001;16:2160–5.
74. Carrell DT, Liu L, Peterson CM, Jones KP, Hatasaka HH, Erickson L, et al. Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl*. 2003;49:49–55.
75. Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature*. 1988;332:459–61.

76. Shamsi MB, Venkatesh S, Tanwar M, Talwar P, Sharma RK, Dhawan A, et al. DNA integrity and semen quality in men with low seminal antioxidant level. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen*. 2009;665(1–2):29–36.
77. Fernandez JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosalvez J, Enciso M, et al. Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil Steril*. 2005;84(4):833–42.
78. Dickey RP, Pyrzak R, Lu PY, Taylor SN, Rye PH. Comparison of the sperm quality necessary for successful intrauterine insemination with World Health Organization threshold values for normal sperm. *Fertil Steril* 1999;71:684-9
79. Leon Speroff and Marc A. Fritz.. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, Eighth Edition, LWW, 2011: 325-327-497
80. Cohlen, B.J., te Velde, E.R., van Kojij, R.J. (1995b) Is there still a place for intra-uterine insemination as a treatment for male subfertility? A review. *Int. J. Androl.*, 18, Suppl 2, 72–75
81. Balasch, J., Balleca', J.L., Pimentel, C. et al. Late low-dose pure follicle stimulating hormone for ovarian stimulation in intra-uterine insemination cycles. *Hum. Reprod.*, 1994;9, 1863–1866.
82. Leon Speroff and Marc A. Fritz.. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, Eighth Edition, LWW, 2011.p: 1137-1186
83. Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, Al-Inany HG. Diagnosis and management of unexplained infertility: an update. *Arch Gynecol Obstet*. 2003 Feb;267(4):177-88. Epub 2002 May 4.
84. Guzick, D.S., Grefenstette, I., Baffone, K., Berga, S.L., Krasnow, J.S., Stovall, D.W., Naus, G.J.,. Infertility evaluation in fertile women: a model for assessing the efficacy of infertility testing. *Hum. Reprod*. 1994;9, 2306–2310.
85. Pellicer, A., Albert, C., Mercader, A., Bonilla-Musoles, F., Remohi, J., Simon, C.,. The follicular and endocrine environment in women with endometriosis; local and systematic cytokine production. *Fertil. Steril*. 1998;70, 425–431.

86. Collins, J.A., Burrows, E.A., Wilan, A.R.,. The prognosis for live birth among untreated infertile couples. *Fertil. Steril* 1995; 64, 22–28.
87. Glazener, C.M.A., Kelly, N.J., Weir, M.J.A., David, J.S.E., Cornes, J.S., Hull, M.G.R.,. The diagnosis of male infertility—prospective time-specific study of conception rates related to seminal analysis and post-coital sperm-mucus penetration and survival in otherwise unexplained infertility. *Hum.Reprod.*1987;2, 665–671.
88. Bhattacharya, S., Harrild, K., Mollison, J., Woodworth, S., Tay, C., Harrold, A., McQueen, D., Lyall, H., Johnston, L., Burrage, J.,Grossett, S., Walton, H., Lynch, J., Johnstone, A., Kini, S., Raja, A., Templeton, A.,. Clomiphene citrate or unstimulated intrauterine insemination compared with expectant management for unexplained infertility: pragmatic randomised controlled trial. *Br. Med. J.* 2008;337, a716.
89. ASRM,. Effectiveness and treatment of unexplained infertility the practice committee of the American Society for Reproductive Medicine. *Fertil. Steril.* 2006;86.
90. Maheshwari A, Hamilton M, Bhattacharya S, Effect of female age on the diagnostic categories of infertility, *Hum Reprod* 2008;23:538,
91. Collins, J.A., Rowe, T.C.Age of female partner is a prognostic factor in prolonged unexplained infertility: a multicentre study. *Fertil. Steril.* 1989;52, 15.
92. Collins JA, Rowe TC. Age of the female partner is a prognostic factor in prolonged unexplained infertility: a multicenter study. *Fertil Steril.*1989 Jul;52(1):15-20.
93. Snick, H.K.A., Snick, T.S., Evers, J.L.H., Collins, J.A., The spontaneous pregnancy prognosis in untreated sub fertile couples: the Walcheren primary care study. *Hum. Reprod.* 1997; 12, 1582–1588.
94. Guzick, D.S., Sullivan, M.W., Adamson, G.D., Cedars, M.I., Falk, R.J., Peterson, E.P., Efficacy of treatment for unexplained infertility. *Fertil. Steril.*1998;70, 207–213.

95. Gleicher, N., Vanderlaan, B., Pratt, D., Karande, V., Background pregnancy rates in infertile population. *Hum. Reprod.* 1996;11, 1011–1012.
96. Evers, J.L., de Haas, H.W., Land, J.A., Dumoulin, J.C., Dunselman, G.A., Treatment-independent pregnancy rates in patients with severe reproductive disorders. *Hum. Reprod.* 1998;13, 1206–1209.
97. Agic, A., Xu, H., Finas, D., Banz, C., Diedrich, K., Hornung, DIs endometriosis associated with systemic subclinical inflammation? *Gynecol. Obstet. Invest.* 2006; 62 (3), 139–147.
98. Steures P, van der Steeg JW, Hompes PG, Bossuyt PM, Habbema JD, Eijkemans MJ, Schols WA, Burggraaff JM, van der Veen F, Mol BW, Effectiveness of intrauterine insemination in subfertile couples with an isolated cervical factor: a randomized clinical trial, *Fertil Steril* 2007;88:1692,
99. Johnson, N., Vandekerckhve, P., Watson, A., Lilford, R., Harada, T., Hughes, E., Tubal flushing for sub fertility. *Cochrane Database Syst. Rev.*2005;18. CD003718.
100. Johnson, N., Vandekerckhve, P., Watson, A., Lilford, R., Harada, T., Hughes, E., Tubal flushing for sub fertility. *Cochrane Database Syst. Rev.*2005;18. CD003718.
101. Nugent, D., Watson, A.J., Killick, S.R., Balen, A.H., Rutherford, N.J. A randomized controlled trial of tubal flushing with lipiodol for unexplained infertility. *Fertil. Steril.* 2002;77,173–175.
102. Edelstam, G.A., Andersson, E., Radestad, A., Flam, F., Gottlieb, C., The effect of lignocaine on sperm phagocytosis in the peritoneal fluid from women with or without endometriosis. *Hum. Reprod.* 1998;13, 1353–1356.
103. Oak, M., Chantler, E.N., Vaughan Williams, C.A., Elstein, M., Sperm survival studies in peritoneal fluid from infertile women with endometriosis and unexplained infertility. *Clin. Reprod. Fertil.* 1985;3, 297–303.
104. Watson, A., Vandekerckhove, P., Lilford, R., Vail, A., Brosens, I., Hughes, E., A meta-analysis of the therapeutic role of oil soluble contrast media at hysterosalpingography: a surprising result? *Fertil. Steril.* 1994;61, 470–477.

105. Edelstam, G., Sjosten, A., Bjuresten, K., EK, I., Wanggren, K., Spira, J., A new rapid and effective method for treatment of unexplained infertility. *Hum. Reprod.* 2008; 23, 852–856.
106. Kahn, J., Sun de, A., Koskemies, A., Von during, V., Sordal, T., Christensen, F., Molne, K., Fallopian tube sperm perfusion (FSP) versus intra -uterine insemination (IUI) in the treatment of unexplained infertility: a prospective randomized study. *Hum. Reprod.* 1993; 8, 890–894.
107. Jansen, R.B.S., Anderson, J.C., Catheterisation of the fallopian tubes from the vagina. *Lancet* 1987;2, 309–310.
108. Pratt, D.E., Bieber, E., Barnes, R., Shangold, G., Vignovic, E., Shreiber, J., 1991. Transvaginal fallopian tube sperm perfusion by tactile sensation: a preliminary report. *Fertil. Steril.* 58, 167–171.
109. Oei, M.L., Surrey, E.S., McCaleb, B., Kerin, J.H., A prospective, randomized study of pregnancy rates after trans-uterotubal and intrauterine insemination. *Fertil. Steril.* 1992;58, 167–171.
110. Baker, V.L., Adamson, G.D., Threshold intrauterine perfusion pressures for intra-peritoneal spill during hydrotubation and correlation with tubal adhesive disease. *Fertil. Steril.* 1995;64, 1066–1069.
111. Leon Speroff and Marc A. Fritz.. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, Eighth Edition, LWW 1296-1306
112. Fujii, S., Fukushi, Y., Kagiya, A., Sato, S., Saito, Y., The effects of clomiphene citrate on normally ovulatory women. *Fertil. Steril* 1997; 68, 997–999.
113. Deaton, J.L., Gibson, M., Blackmer, K.M., Nakajima, S.T., Badger, G.J., Brumsted, J.R., A randomized controlled trial of clomiphene citrate and intrauterine insemination in couples with unexplained infertility or surgically corrected endometriosis. *Fertil. Steril.* 1990;54, 1083–1088.
114. Fisch, P., Casper, R.F., Brown, S.E., Wrixon, W., Collins, J.A., Reid, R.L., Simpson, C., Unexplained infertility: evaluation of treatment with clomiphene citrate and human chorionic gonadotropin. *Fertil. Steril.* 1989;51, 828–833.

115. Glazener, C.M., Coulson, C., Lambert, P.A., Watt, E.M., Hinton, R.A., Kelly, N.G., Hull, M.G., Clomiphene treatment for women with unexplained infertility: placebo-controlled study of hormonal responses and conception rates. *Gynaecol. Endocrinol.* 1990;4, 75–83.
116. Hughes, E., Brown, J., Collins, J.J., Vanderkerchove, P., Clomiphene citrate for unexplained subfertility in women. *Cochrane Database Syst. Rev.*2010. Art. No.: CD000057. doi:10.1002/14651858.CD000057.
117. Leon Speroff and Marc A. Fritz.. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, Eighth Edition, LWW.2011; p:1188-1189
118. Guzik DS, Carson SA, Coutifaris C, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Steinkampf MP, Hill JA, Mastroianni L Jr, Buster JE, Nakajimi ST, Vogel DL, Canfield RE, for the National Cooperative Reproductive Medicine Network, Efficacy of superovulation and intrauterine insemination in the treatment of infertility, *New Engl J Med* 340:177, 1999.
119. Steures P van der Steeg JW, Hompes PG, Habbema JD, 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 randomized clinical trial, *Lancet* 368:216, 2006
120. Athallah, N., Proctor, M., Johnson, N., Oral versus injectable ovulation induction agents for unexplained sub fertility. *Cochrane Database Syst. Rev.*2009. Art. No. CD003052.
121. Balasch, J., Balleca, J.L., Pimentel, C., Creus, M., Fabregues, F., Vanrell, J.A., Late low dose pure FSH for ovarian stimulation in intra-uterine insemination cycles. *Hum. Reprod.* 1994;10, 1863–1866.
122. Karlström, P.O., Bergh, T., Lundkvist, O., A prospective randomized trial of artificial insemination versus intercourse in cycles stimulated with human menopausal gonadotrophin or clomiphene citrate. *Fertil. Steril.* 1993; 59, 554–559.
123. Chung, C.C., Fleming, R., Jamieson, M.E., Yates, R.W.S., Coutts, J.R.T., Randomized comparison of ovulation induction with and without intrauterine

- insemination in the treatment of unexplained infertility. *Hum. Reprod.* 1995; 10, 3139–3141.
124. Melis, G.B., Paoletti, A.M., Ajossa, S., Guerriero, S., Depau, G.F., Mais, V., Ovulation induction with gonadotropins as sole treatment in infertile couples with open tubes: a randomized prospective comparison between intrauterine insemination and timed vaginal intercourse. *Fertil. Steril.* 1995;64, 1088–1093.
 125. Cole, P.A. & Robinson, C.H. Mechanism and inhibition of cytochrome P-450 aromatase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1990;33, 2933–2942.
 126. Steinkampf, M.P., Mendelson, C.R. & Simpson, E.R. Regulation by follicle-stimulating hormone of the synthesis of aromatase cytochrome P-450 in human granulosa cells. *Molecular Endocrinology*, ;1987;1, 465–471.
 127. Means, G.D., Kilgore, M.W., Mahendroo, M.S. et al. Tissue- specific promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human ovary and fetal tissues. *Molecular Endocrinology*, 1991 ;5, 2005–2013.
 128. Nelson, L.R. & Bulun, S.E. (2001) Estrogen production and action. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 45(3 Suppl.),S116–S124.
 129. Mouridsen, H., Gershanovich, M., Sun, Y. et al. Superior efficacy of letrozole versus tamoxifen as first-line therapy for postmenopausal women with advanced breast cancer: results of a phase III study of the international Letrozole Breast Cancer Group. *Journal of Clinical Oncology*, 2001 ;19, 2596–2606.
 130. Mitwally, M.F., Biljan, M.M. & Casper, R.F. Pregnancy outcome after the use of an aromatase inhibitor for ovarian stimulation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2005 192, 381–386
 131. Casper, R.F., Mitwally, M.F., Review; aromatase inhibitors for ovulation induction. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006;91, 760–771.
 132. Sipe, C.S., Davis, W.A., Maifeld, M., Van Voorhis, B.J., A randomized trial comparing anastrozole and clomiphene citrate in an ovulation induction protocol using gonadotropins. *Fertil. Steril.* 2006.;86, 1676–1681.

133. Wu, H.H., Wang, N.M., Cheng, M.L., et al., A randomized comparison of ovulation induction and hormone profile between the aromatase inhibitor anastrozole and clomiphene citrate in women with infertility. *Gynaecol. Endocrinol.* 2007;23, 76–81
134. Al-Fozan, H., Al-Khadouri, M., Tan, S.L., Tulandi, T., A randomized trial of letrozole versus clomiphene citrate in women undergoing super ovulation. *Fertil. Steril.* 2004; 82, 1561–1563.
135. Barroso, G., Menocal, G., Felix, H., Rojas-Ruiz, J.C., Arslan, M., Oehniger, S., 2006. Comparisons of the efficacy of the aromatase inhibitor letrozole and clomiphene citrate as adjuvants to recombinant follicle-stimulating hormone in controlled ovarian hyper stimulation: a prospective, randomized, blinded clinical trial. *Fertil. Steril.* 86, 1428–1431.
136. Fatemi, H.M., Kolibianakis, E., Tournaye, H., Camus, M., Van Steirteghem, A.C., Deveroey, P., 2003. Clomiphene citrate versus letrozole for ovarian stimulation: a pilot study. *Reprod. Biomed. Online* 7, 543–546.
137. Tiboni, G.M., Marotta, F., Rossi, C. et al. Effects of the aromatase inhibitor letrozole on in utero development in rats. *Human Reproduction*, 2008; 23, 1719–1723.
138. Fisch P, Casper RF, Brown SE, Wrixon W, Collins JA, Reid RL, Simpson C, Unexplained infertility: evaluation of treatment with clomiphene citrate and human chorionic gonadotropin, *Fertil Steril* 51:828, 1989.
139. National Institute of Clinical Excellence, 2004. Clinical Guideline 11 Fertility: assessment and treatment for people with fertility problems
140. Veltman-Verhulst, S.M., Cohlen, B.J., Hughes, E., Heineman, M.J., Intra-uterine insemination for unexplained infertility. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2009.Art. No. CD001838.
141. Bagist, T., Hayidaardedeoglu, B., Kilicdag, E.B., Cok, T., Simsek, E., Parlakgumus, A.H., Single versus double IUI multifollicular ovarian stimulation, a randomized trial. *Hum. Reprod.* 2010; 25 (7), 1684–1690.

142. Arici, A., Byrd, W., Bradshaw, K., Kutteh, W.H., Marshburn, P., Carr, B.R., Evaluation of clomiphene citrate and human chorionic gonadotropin treatment: a prospective, randomized, crossover study during intrauterine insemination cycles. *Fertil. Steril* 1994; 61 (2), 314–318.
143. Zikopoulos, K., West, C.P., Thong, P.W., Kacser, E.M., Morrison, J., Wu, F.C., Homologous intra uterine insemination has no advantage over timed natural intercourse when used in combination with ovulation induction for the treatment of unexplained infertility. *Hum. Reprod.* 1993; 8, 563–567.
144. Crosignani, P.G., Walters, D.E., Soliani, A., The ESHRE multicentre trial on the treatment of unexplained infertility: a preliminary report (Centre 19: Martinez, Amsterdam). *Hum. Reprod* 1991; 6, 953–958.
145. HFEA, 2006–2007. Fertility problems and treatment – facts and figures, [212.49.193.187/cps/rde/xbcr/SID-3F57D79B-/hfea/facts_and_figures.pdf](https://www.hfea.gov.uk/docs/212.49.193.187/cps/rde/xbcr/SID-3F57D79B-/hfea/facts_and_figures.pdf). HFEA Guide to Infertility 2006–2007.
146. Practice Committee of ASRM, 2006
147. ESHRE Campus Course Report, 2001. Prevention of twin pregnancies after IVF/ICSI by single embryo transfer. *Hum. Reprod.* 16, 790–800.
148. Tanbo, T., Dale, P.O., Abyholm, T., 1990. Assisted fertilization in infertile women with patent fallopian tubes. A comparison of in-vitro fertilization, gamete intra-Fallopian transfer and tubal embryo stage transfer. *Hum. Reprod.* 3, 266–270.
149. Goverde, A.J., McDonnell, J., Vermeiden, J.P., Schats, R., Rutten, F.F., Schoemaker, J., 2000. Intrauterine insemination or in-vitro fertilisation in idiopathic sub fertility and male sub fertility: a randomised trial and cost-effectiveness analysis. *Lancet* 355, 13–18.
150. Johnson, N., Vandekerckhve, P., Watson, A., Lilford, R., Harada, T., Hughes, E., 2005. Tubal flushing for sub fertility. *Cochrane Database Syst. Rev.* 18. CD003718.

151. Huszar G. Jakab A. Sakkas D. 2007 Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects *Reproductive Biomedicine Online* volume 14 650–663
152. Clermont Y The cycle of the seminiferous epithelium in man. *American Journal of Anatomy* 1963;112. 35—51.
153. Huszar G, Corrales M, Vigue L. Correlation between sperm creatine phosphokinase activity and sperm concentrations in normospermic and oligospermic men. *Gamete Res* 1988; 19:67-75.
154. Huszar G, Vigue L, Corrales M. Sperm creatine phosphokinase activity as a measure of sperm quality in normospermic, variablespermic and oligospermic men. *Biol Reprod* 1988; 38:1061-1066
155. Huszar G. Stone K. Dix D. Vigue L Putative creatine kinase M-isoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein HspA2, *Biology of Reproduction* 2000;63. 925-932.
156. Allen JW. Dix DJ. Collins BW et al. HSP70-2 is part of the synaptonemal complex in mouse and hamster spermatocytes. *Chromosoma* 1996 ;104.414-421
157. Eddy EM 1999 Role (it heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis. *Reviews of Reproduction* 4, 23-30.
158. Son WY. Hwang SH, Han CT et al. Specific expression of heat shock protein HspA2 in human male germ cells. *Molecular Human Reproduction* 1999;45, 1122-1126.
159. Tsunekawa N. Matsumoto M. Tone S et. al. The Hsp70 homolog gene, Hsc70t, is expressed under translational control during mouse spermiogenesis. *Molecular Reproduction and Development* 1999;52.383-391
160. Huszar G. Vigue L (Spermatogenesis-related change in the synthesis of the creatine kinase B-type and M-type isoforms in human spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* 1990 ;25,258-262.

161. Huszar G. Corrales M. Vigue L 1988a Correlation between sperm creatine phosphokinase activity and sperm concentrations in normozoospermic and oligozoospermic men. *Gamete Research* 19. 67-75.
162. Huszar G. Vigue L. Oehninger S Creatine kinase immunocytochemistry of human sperm-hemizona complexes: selective binding of sperm with mature creatine kinase-staining pattern. *Fertility and Sterility* 1994 ;61. 136-142,
163. Huszar G. Vigue L. Morshedi M Sperm creatine phosphokinase M-isoform ratios and fertilizing potential of men: a blinded study of 84 couples treated with in vitro fertilization. . *Fertility and Sterility* 1992;57. 882-888.
164. Ergur AR, Dokras A, Giraldo JR et al. Sperm maturity and treatment choice of IVF or ICSI: Diminished sperm HspA2 chaperone levels predict IVF failure *Fertility and Sterility* 2002;77.910-918.
165. Kovanci E, Kovals T, Morcetti E et al. FISH assessment of aneuploidy frequencies in mature and immature human spermatozoa classified by the absence or presence of cytoplasmic retention. *Human Reproduction* 2001; 16. 1209-1217
166. Egozcue S. Blanco J, Vidal F, Egozcue J Diploid sperm and the origin of triploidy. *Human Reproduction* 2002;17, 5-7.
167. Huszar G. Willetts M. Corrales M 1990b Hyaluronic acid (Sperm Select) improves retention of sperm motility and velocity in normozoospermic and oligozoospermic specimens. *Fertility and Sterility* 54. 1127-1134.
168. Sbracia M, Grasso J. Sayme N et al. Hyaluronic acid substantially increases the retention of motility in cryopreserved/ thawed human spermatozoa. *Human Reproduction* 1997 ;12. 1949-1954.
169. Kornovski BS. McCoshen J. Kredentser J. Turley E The regulation of sperm motility by a novel hyaluronan receptor. *Fertility and Sterility*. 1994;61,935-940,
170. Ranganathan S. Ganguly AK, Datta K Evidence for presence of hyaluronan binding protein on spermatozoa and its possible involvement in sperm function. *Molecular Reproduction and Development* 1994 ;38, 69-76.

171. Cherr GN. Yudin AI , Li MW et al. Hyaluronic acid and the cumulus extracellular matrix induce increases in intracellular calcium in macaque sperm via the plasma membrane protein PH-20. *Zygote* 1999;7,211-222
172. Vines CA. Li MW. Deng X et al. Identification of a hyaluronic acid (HA) binding domain in the PH-20 protein that may function in cell signaling. *Molecular Reproduction and Development* 2001;60. 542-552.
173. Kruger TF. Menkveld R. Stander FSH et al Sperm morphologic features as a prognostic factor in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* 1986; 46. 1118-1123.
174. Huszar G. Vigue L Correlation between the rate of lipid peroxidation and cellular maturity as measured by creatine kinase activity in human spermatozoa. *Journal of Andrology* 1994 ;15,71-77.
175. Gergely A, Kovanci E, Senturk L et al. Morphometrical assessment of mature and diminished maturity human spermatozoa: sperm regions that reflect differences in maturity. *Human Reproduction* 1999 ;14. 2007-2014.
176. Celik-Ozenci C, Jakab A. Kovacs T et al. 2004 Sperm selection for ICSI: shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations. *Human Reproduction* 19. 2052-2059
177. Huszar G, Gordon EL. Irvine DS. Aitken RJ 1998a Absence of DNA cleavage in mature human sperm selected by their surface membrane receptors. Annual Meetinf of the American Society for Reproduction Medicine. San Francisco. CA
178. Aitken RJ. Baker MA. Sawyer D 2003 Oxidative stress in the male germ line and its role in the etiology of male infertility and genetic disease. *Reproductive BioMedicine Online* 7. 63-68.
179. Cayli S. Jakab A, Ovari L ct al. 2003a Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI. *Reproductive BioMedicine Online* 7, 462-468.
180. Celik-Ozenci C, Catalanotti J, Jakab A et al. Human sperm maintain their shape following decondensation and denaturation for fluorescent in situ hybridization: shape analysis and objective morphology. *Biology of Reproduction* 2003;69. 1347-1355.

181. Aitken RJ Founders' Lecture. Human spermatozoa: fruits of creation, seeds of doubt. *Reproduction, Fertility and Development* 2004;16. 655-664.
182. Sati L, Ovari L, Demir R et al. Persistent histones in immature sperm are associated with DNA fragmentation and affect paternal contribution of sperm: a study of aniline blue staining, fluorescence in situ hybridization and DNA nick translation. Abstracts of the Scientific Oral and Poster Sessions. 60th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine, Philadelphia, PA. *Fertility and Sterility* – 2004;82 (suppl. 2). 0-129.
183. Seli E, Sakkas D Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. *Human Reproduction Update* 2005; 11, 337-349.
184. Aioki V, Liu L, Jones K et al. Sperm protamine 1 /protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. *Fertility and Sterility* 2006; 86. 1416- 1422.
185. Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D et al. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Human Reproduction* 2006;21. 2876-2881.
186. Huszar G, Vigue L, Corrales M 1990a Sperm creatine kinase activity in fertile and infertile oligozoospermic men. *Journal of Andrology* 11.40-46.
187. Huszar G, Celik Ozenci C, Vigue L Sperm maturity and fertility: testing by hyaluronic acid binding. Abstracts of the 18th Annual Meeting of the ESHRE. Vienna, Austria 2002. *Human Reproduction* 17 (suppl. 1),O-024,
188. Huszar G, Ozenci CC, Cayli S et al. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertility and Sterility* 2003;79 (suppl. 3), 1616-1624
189. Jakab A, Sakkas D, Delpiano E . et. al. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies *Fertility and Sterility*, 2005;84 (6),1665-1673
190. Sanchez M, Aran B, Blanco J et al. Preliminary clinical and FISH results on hyaluronic acid sperm selection to improve ICSI, Abstracts of the 21 st Annual Meeting of the ESHRE. Copenhagen, Denmark 2005, P-556.

191. Ombelet W, Deblaere K, Bosmans E et al. Semen quality and intrauterine insemination. *Reproductive BioMedicine Online* 2003;7,485-492.
192. Huszar G, Celik-Ozenci C, Vigue L. Sperm maturity and fertility:testing by hyaluronic acid binding. Abstarct 18th Annual meeting of the ESHRE. *Hum Rerod.* 2002;17(Suppl 1):9 O-024
193. Wu T, F. T. Akagbosu,W.-H. Shen. 2005 Relationship between hyaluronan binding assay (hba), motile sperm concentration, kruger morphology and pregnancy outcome in patients treated with intrauterine insemination (IUI). *Fertility and Sterility*Volume 84, Supplement 1 , Pages S288-S289
194. Roudebush W. E., Davis A. L., Mitchell-Leef D, Elsner C. W, J. B. Massey, H. I.Kort. 2007 Relationships Between the Sperm and the Hyaluronan Binding Assay(HBA™) and Intrauterine Insemination Pregnancy Rates. *Reproductive Biology Associates, Atlanta, GA. Fertility and Sterility*Volume 88, Supplement 1 , Page S361
195. Boynukalin F, Esinler I , Guven S, Gunalp S. 2012 Hyaluronan binding assay does not predict pregnancy rates in IUI cycles in couples with unexplained infertility. *Arch Gynecol Obstet.* 286:1577-1580
196. Kovacs P, Kovats T, Sajgo A, Szollosi J, Matyas S, Kaali SG (2011) The role of hyaluronic acid binding assay in choosing the fertilization method for patients undergoing IVF for unexplained infertility. *J Assist Reprod Genet* 28(1):49-54. doi:10.1007/ s10815-010-9479-3
197. Nijs M, Creemers E, Cox A., Janssen M, Vanheusden E, 2009 Relationship between hyaluronic acid binding assay and outcome in ART: a pilot study. *Andrologia* 42,291-296
198. Tarozzi N, Nadalini M, Bizzaro D, Serrao L, Fava L, Scaravelli G, Borini A (2009) Sperm-hyaluronan-binding assay: clinical value in conventional IVF under Italian law. *Reprod Biomed Online* 19(Suppl 3):35-43