

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI**

**AÇIKLANAMAYAN İNFERTİLİTE NEDENİYLE
İNTRAUTERİN İNSEMİNASYON UYGULANAN HASTALARDA
EJAKÜLATTAKİ PREAPOPTOTİK SPERM ORANININ
İNTRAUTERİN İNSEMİNASYON BAŞARISINDAKİ
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr.Gökhan BOYRAZ

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA
2013**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI**

**AÇIKLANAMAYAN İNFERTİLİTE NEDENİYLE
İNTRAUTERİN İNSEMINASYON UYGULANAN HASTALARDA
EJAKÜLATTAKİ PREAPOPTOTİK SPERM ORANININ
İNTRAUTERİN İNSEMINASYON BAŞARISINDAKİ
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Gökhan BOYRAZ

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. G. Serdar GÜNALP**

**ANKARA
2013**

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında tüm aşamalarında gösterdiği ilgi, sabır ve katkıları nedeniyle Sayın Anabilimdalı Başkanı ve Danışman Hocam Prof. Dr. Serdar GÜNALP'e ve asistanlık eğitimim boyunca, eğitimime yapmış oldukları katkılarından dolayı tüm hocalarıma teşekkürlerimi sunarım. Asistanlık dönemimde Anabilim Dalı Başkanlığı yapmış ve bu süreçte yapmış oldukları bilimsel aktivitelerle eğitimimize büyük katkıları olan sayın Prof.Dr.Sinan BEKSAÇ ve Prof.Dr.Hakan YARALI'ya teşekkürlerimi sunarım. Bu tezin hazırlanması aşamasında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr.Gürkan BOZDAĞ'a ve ayrıca plan ve kurgu aşamasından yazım aşamasına kadar her basamakta sonsuz desteği ve emeği olan Doç.Dr. Lale KARAKOÇ SÖKMENSÜER'e göstermiş olduğu sabır ve güleryüz için teşekkür ederim. Androloji laboratuvarında spermlerin hazırlanmasında büyük emeği geçen Yaşar TEKİN'e, asistanlığım süresince birlikte çalıştığımız tüm asistan, hemşire, sekreter ve teknisyen arkadaşlara teşekkür ederim.

Sevgilerini ve desteklerini benden esirgemeyen, hayat boyu yanımda olan, önüme çıkan her zorlukta bana yol gösteren, tüm başarılarım temel mimarı olan annem, babam ve abime sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ve tabi ki huzur ve mutluluk kaynaklarım, biricik kızım Zeynep Nil ve eşim Meryem Seda'ya bu zorlu süreçte bana göstermiş oldukları anlayış, destek ve sevgilerinden dolayı minnettirim.

Dr. Gökhan BOYRAZ

ÖZET

Boyras G, Açıklanamayan İnfertilite Nedeniyle İntrauterin İnseminasyon Uygulanan Hastalarda Ejakülattaki Preapoptotik Sperm Oranının İntrauterin İnseminasyon Başarısındaki Etkisinin Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2013

İnfertil çiftlerde, olumsuz intrauterin inseminasyon sonuçlarının bir bölümünden ejakülattaki apoptotik spermilerin sorumlu olabileceği ve açıklanamayan infertilite etyolojisinde ejakülattaki apoptotik spermilerin rolünün de olabileceği düşünülerek bu çalışma planlanmıştır. Mart 2012-Aralık 2012 tarihleri arasında, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Üreme Endokrinolojisi, İnfertilite ve Androloji Ünitesine başvuran ve açıklanamayan infertilite tanısı konularak ovulasyon indüksiyon ve intrauterin inseminasyon uygulanacak hastalar araştırma kapsamına alınmıştır. Bu çalışmada, hastalardan alınan ejakulat dansite gradient santrifügasyon (DGS) yöntemi ile hazırlandıktan sonra annexin V ticari kiti (Annexin V- FITC Apoptoz Saptama Kiti -Santa Cruz Biotechnology) ile boyanarak preapoptotik sperm oranı saptandıktan sonra bunun gebelik sonuçları ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Gebelik elde edilen hastaların sonuçları gebelik elde edilemeyen hastaların sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Açıklanamayan infertilite nedeniyle rFSH kullanılarak ovulasyon indüksiyon ve intrauterin inseminasyon yapılan 94 hasta çalışmaya alınmıştır. Araştırma grubundaki 94 hastanın intrauterin inseminasyon sonucu gebelik oranları %13.8 (n:13) olarak bulunmuştur. Araştırma grubuna dahil edilen subfertil erkeklerin semenlerinden yıkama sonrası alınan örnek annexin V ile boyanıp immünfloresan mikroskopta incelendi ve annexin V pozitif sperm oranı ortalama 20.03 ± 13.73 (1-70) olarak bulundu. Gebe kalan gruptaki hastaların sperm örneklerinde annexin V pozitif sperm oranı (%15.69), gebe kalamayan gruba (%20.72) göre daha düşük bulunmuştur ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0.17$).

Anahtar Kelimeler: İnfertilite, apoptoz, semen analizi, annexin V

ABSTRACT

We hypothesis that the apoptotic sperm in ejaculate may be responsible for failure of intrauterine insemination in infertile couples and also may play a role on the etiology of unexplained infertility. This study includes the patients who consulted Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, Reproductive Endocrinology, Infertility and Andrology Unit between March 2012 - December 2012 and were undergoing ovulation induction and intrauterine insemination with diagnosis of unexplained infertility. In this study, the ejaculate from patients is stained with annexin V kit (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit-Santa Cruz Biotechnology) after prepared by the density gradient centrifugation (DGS) method to determine the sperm proapoptotic rate and its relation to pregnancy outcome. The results of the patients who achieved pregnancy are compared to the results of the patients who couldn't achieve pregnancy. This study included 94 patients for whom ovulation induction was performed using rFSH due to unexplained infertility. The pregnancy rate of those 94 patients was 13.8% (n=13). The samples taken from subfertile men ejaculate were stained with annexin V after washing and were examined under immunofluorescence microscope. Annexin V-positive sperm rate was found as approximately $20.03\% \pm 13.73$ (1-70). Annexin V-positive sperm rate has been found lesser among the patients who achieved pregnancy (15.69%) when compared to the patients who didn't achieve pregnancy (20.72%). However, the difference was not statically significant ($p=0.17$).

Key words: Infertility, apoptozis, semen analysis, annexin V

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No:
TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar VE GRAFİKLER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. GEREKÇE VE HİPOTEZ.....	1
1.2. AMAÇLAR	3
1.3. KAPSAM	3
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. GİRİŞ.....	4
2.2. İNFERTİLİTE NEDENLERİ.....	5
2.2.1. Kadın İnfertilitesi ve Nedenleri	6
2.2.2. Erkek İnfertilitesi ve Nedenleri.....	12
2.3. İNFERTİLİTE NE ZAMAN DEĞERLENDİRİLMELİ?.....	22
2.4. İNFERTİL ÇİFTİN DEĞERLENDİRİLMESİ	23
2.4.1. Öykü ve Fizik Muayene.....	23
2.4.2. Tanısal Testler.....	24
2.4.3. Erkek İnfertilitesinin Değerlendirilmesi	27
2.5. AÇIKLANAMAYAN İNFERTİLİTE	32
2.6. İNTRAUTERİN İNSEMINASYON	33
2.6.1. İUİ Başarısını Etkileyen Faktörler	34
2.6.2. Ampirik Overyan Stimülasyon	35
2.6.3. İUİ için Sperm Hazırlama Teknikleri	35
2.6.4. İUİ Zamanlaması	37
2.6.5. İnseminasyon Kateterleri	38
2.6.6. İna Uterin İnseminasyon Uygulaması	38

2.7. SPERMATOGENEZ VE APOPTOZ	39
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	44
3.1. BİREYLER	44
3.2. SPERM HAZIRLANMASI	44
3.3. SPERM APOPTOZUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ (Annexin V ile Boyama ve Direkt İmmü Floresan)	45
3.3. OVULASYON İNDÜKSİYONU VE İNTRAUTERİN İNSEMİNASYON.....	48
3.4. DİĞER BİLGİLER.....	49
4. BULGULAR.....	50
5. TARTIŞMA	59
6. KAYNAKLAR	71

SİMGELER VE KISALTMALAR

İÜİ	: İntrauterin inseminasyon
İVF	: İnvitro fertilizasyon
İCSİ	: İntrastoplazmik sperm enjeksiyonu
YÜT	: Yardımcı üreme teknikleri
TVUSG	: Transvajinal ultrasonografi
HSG	: Histerosalpingografi
MRG	: Manyetik rezonans görüntüleme
Oİ	: Ovulasyon indüksiyonu
KOH	: Kontrollü overyan hiperstimülasyon
FSH	: Folikül stimüle edici hormon
rFSH	: Rekombinant folikül stimüle edici hormon
LH	: Lüteinize edici hormon
E2	: Östradiol
AMH	: Antimüllerian hormon
PHSS	: Progresif hareketli sperm sayısı
PHS	: Progresif hareketli sperm
DGS	: Dansite gradient santrifügasyon
SHBG	: Seks hormon bağlayıcı globülin
GnRH	: Gonadotropin releasing hormon
hCG	: İnsan koryonik gonadotropin
PRL	: Prolaktin
TRH	: Tirotropin releasing hormon
TSH	: Tiroid stimüle edici hormon
KSST	: Klomifen sitrat stimülasyon testi
TGF-beta	: Transforme edici büyüme faktörü-beta
DNA	: Deoksiribonükleik asit
TUNEL	: Terminal deoksinükleotidil transferaz-mediated deoksiüridin trifosfat- dUTP nick end-labeling
SCSA	: Sperm chromatin structure assay
CASA	: Computer assisted sperm analysis

AZF	: Azospermik faktör
WHO	: World Health Organization- Dünya sağlık örgütü
DAPI	: 4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate
HIV	: İnsan immün yetmezlik virüsü
DES	: Dietilstilbestrol
YÜT	: Yardımcı üreme tekniği
Ark	: Arkadaşları
MACS	: Magnetic-activated cell sorting
CFTR	: Kistik fibrosis transmembran regülatör gen
Ca	: Kalsiyum

ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa No:
Şekil 1. Seminifer tübüllerde spermatogenez.....	13
Şekil 2. Seminifer tubulde spermatogenez aşamaları	14
Şekil 3. Matür spermin şematik görünümü.....	15
Şekil 4. Diff quik boyası sonrası normal spermin mikroskopik görünümü	16
Şekil 5. İntrauterin inseminasyon prosedürünün şematik görünümü.....	38
Şekil 6. Apoptozun şematik görünümü.....	40
Şekil 7. Erişkinde spermatogenez sürecinde germ hücre apoptozisi	41
Şekil 8. Annexin V apoptozis ilişkisi.....	42
Resim 1A. Annexin V pozitif spermler yeşil ile boyalı; bunlar preapoptotik veya nekrotik olabilir	46
Resim 1B. DAPI ile boyalı spermler mavi olarak görülmektedir	47
Resim 2 A. DAPI pozitif spermler mavi ile boyalı görülmektedir.....	47
Resim 2 B. Annexin V ile boyalı yeşil spermler	48

TABLOLAR VE GRAFİKLER DİZİNİ

	Sayfa No:
Tablo 1. İnfertilite nedenleri	5
Tablo 2. Kadın infertilitesi nedenleri	6
Tablo 3. Dünya Sağlık Örgütü Anovulasyon Klasifikasyonu	7
Tablo 4. Anovulasyon nedenleri	9
Tablo 5. Erkek İnfertilitesine neden olan hipotalomo-hipofizer hastalıklar.....	17
Tablo 6. İnfertiliteye neden olan testiküler hastalıklar	19
Tablo 7. Seminal sıvıyı oluşturan sekresyonların yüzde olarak dağılımı	28
Tablo 8. Açıklanamayan infertilitede uygulanan tedavi seçenekleri ve siklus başına gebelik oranları	32
Tablo 9. Konvansiyonel swim-up metodunun avantaj ve dezavantajları	36
Tablo 10. Dansite gradient santrifügasyon yönteminin avantaj ve dezavantajları.....	37
Tablo 4.1. Araştırma grubuna ait genel klinik özellikler. Ortalama değerler standart sapmaları ile birlikte verilmiştir.....	50
Tablo 4.2. Yıkama öncesi ve sonrası spermiogram değişkenlerinin ortalama değerleri	51
Tablo 4.3. Araştırma grubunda gebe kalan ve kalamayan olguların klinik özelliklerinin karşılaştırması	52
Tablo 4.4. Primer infertil çiftlerde ve sekonder infertil çiftlerde gebelik oranları.....	53
Tablo 4.5. Gebe kalan ve kalamayan olguların sperm parametreleri açısından karşılaştırılması.....	53
Tablo 4.6. Gebe kalan ve kalamayan olguların ortalama annexin V pozitif sperm yüzdelerinin karşılaştırılması.	54
Tablo 4.7. Annexin V sperm yüzdesi \leq % 18.5 ve altında olan ve $>$ % 18.5 üzerinde olan hasta gruplarının gebelik yüzdeleri	54

Tablo 4.8.	Annexin V pozitif sperm yüzdesi \leq % 18.5 ve altında olan ve $>$ % 18.5 üzerinde olan hasta gruplarının yıkama sonrası sperm sayıları ve yıkama sonrası PHSS'lerinin karşılaştırılması.....	55
Tablo 4.9.	Sigara içen ve içmeyen erkeklerin sperm örneklerinde annexin V pozitif sperm yüzdelerinin karşılaştırılması	57
Tablo 4.10.	Yıkama sonrası morfolojisi $<$ %4 olanlarda annexin V pozitif sperm oranı ile \geq %4 olanlarda annexin V pozitif sperm oranının karşılaştırılması	58
Tablo 4.11.	Erkek yaşı ile semedeki ortalama annexin V pozitif sperm oranı arasındaki ilişki.....	58
Grafik 4.1.	Araştırma grubuna ait intrauterin inseminasyon gebelik oranları.....	52
Grafik 4.2.	Yıkama sonrası sperm sayısı ile annexin V pozitif sperm yüzdesinin korelasyonunu gösteren grafik	56
Grafik 4.3.	Yıkama sonrası PHSS ile annexin V pozitif sperm yüzdesi arası korelasyonu gösteren grafik	57

1. GİRİŞ

1.1. GEREKÇE VE HİPOTEZ

İnfertilite bir çiftin, kadın yaşı 35'in altında olduğunda 12 ay veya daha uzun süre; kadın yaşı 35'in üstünde olduğunda ise 6 ay veya daha uzun süre korunmasız ve düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edilememesi olarak tanımlanır [1]. Daha önce gebeliği olmayan çiftler primer infertil, daha önce gebeliği olan çiftler ise sekonder infertil olarak kabul edilirler.

Fekundabilite, bir menstrual siklusta gebe kalabilme olasılığıdır. Görünürde normal olan çiftlerin korunmasız ve düzenli cinsel ilişki ile %80-90'ı 12 ay içerisinde gebelik elde edebilmektedir. Fekundabilite ilk 3 ayda %25 iken, sonraki 9 ayda %11'e düşmektedir. İlk bir yıldan sonra fekundabilite daha da azalmaktadır [2]. Bu nedenle infertilitenin değerlendirilmeye başlama zamanı ile ilgili genel kanı, 12 ay korunmasız ve düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edilememesidir [1]. Kadın yaşı 35'in üzerinde ise, oligo-amenore öyküsü varsa, bilinen veya şüphelenilen uterin/tubal hastalık ve endometriozis varsa daha erken değerlendirme ve tedavi gerekir [3].

İnfertil çiftlerin değerlendirilmesinde tam bir medikal öykü ve fizik muayeneyi de içeren başlangıç tanısal değerlendirme yapılmalıdır. Erkek faktörün değerlendirilmesi için semen analizi, ovulatuvar fonksiyonun değerlendirilmesi için menstrual hikaye ve luteal faz progesteron ölçümü, tubal açıklığın ve uterin kavitenin değerlendirilmesi için histerosalpingografi, 3.gün serum FSH (folikül stimüle edici hormon) ve E2 (östradiol) ölçümü çoğu infertil çiftin başlangıç değerlendirmesinde faydalı olan testlerdir. Bazı seçilmiş hastalarda ise uterin myom ve over kistlerini değerlendirmek için pelvik ultrasonografi, endometriozis veya diğer pelvik patolojileri değerlendirmek için laparoskopi, tiroid fonksiyonlarının değerlendirilmesi, 35 yaş üstü kadınlarda over rezervini değerlendirmek için erken foliküler dönemde antral folikül sayımı, 3.gün serum inhibin B düzeyi veya antimüllerian hormon ölçümünü içeren testler gerekebilir [4].

Semen analizi, ovulasyonun değerlendirilmesi, histerosalpingografiyi içeren standart infertilite testlerinin sonuçları normal olan ve infertilite için gösterilebilir bir

nedenin saptanamadığı çiftlere açıklanamayan infertilite tanısı konulur [5]. Açıklanabilir ve düzeltilebilir bir nedenin yokluğunda infertilite tedavisi ampiriktir. Önerilen tedavi yaklaşımları intrauterin inseminasyon (İÜİ), ovulasyon indüksiyon, ovulasyon indüksiyon ile İÜİ kombinasyonu ve diğer yardımcı üreme teknikleridir [6].

Erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde kullanılan ilk ve temel test standart semen analizidir. Tüm infertil erkeklerin değerlendirilmesinde kullanılmalıdır [7]. Standart semen analizinde semen volümü ve Ph, sperm konsantrasyonu, hareketliliği, morfolojisi, sperm lökosit sayısı değerlendirilen parametrelerdir. Standart semen analizi erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde rutin olarak kullanılmakla birlikte değerlendirilen parametreler fertil ve infertil erkeklerin kesin ayrımında yetersiz kalabilmektedir. Sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi ile ilgili eşik değerler erkeklerin subfertil veya fertil olarak klasifikasyonunda kullanılabilir ancak değerlendirilen parametrelerin hiçbiri infertilite için tanısal değildir [8].

Standart semen analizi çok önemli bilgiler vermesine rağmen gebelik elde etmeyi öngörmede bazı sınırlamaları vardır. Daha güvenilir başka teknolojilere hala gereksinim duyulmaktadır. Bu nedenle son zamanlarda çalışmalar, normal spermatogenez sürecinde olan, fizyolojik hücre ölümünün fertilite üzerindeki etkisinin araştırılması üzerine odaklanmıştır [9]. Apoptozis sürecinde meydana gelen en erken olaylardan biri fosfotidilserin molekülünün hücre membranının iç katmanından dış katmanına translokasyonudur [10]. Fosfotidilserinin hücre yüzeyine transloke olması hücrelerin apoptozisin erken evresinde saptanmasına imkan verir. Bu hücreler hücre yüzeyine eksprese olmuş fosfotidilserine kalsiyum bağımlı bağlanan annexin V molekülü ile saptanabilir [9].

Bu çalışmada, açıklanamayan infertilite etyolojisinde ejakülattaki apoptotik spermilerin rolünün olabileceği düşünülerek, açıklanamayan infertilite tanısı konulan, ovulasyon indüksiyon ve intrauterin inseminasyon uygulanan 94 hasta değerlendirmeye alınmıştır. Hastalardan alınan ejakulat dansite gradient santrifügasyon (DGS) yöntemi ile hazırlandıktan sonra 'annexin V' ticari kiti ile boyanarak preapoptotik sperm oranı saptandıktan sonra bunun gebelik sonuçları ile ilişkisi değerlendirilmiştir.

Hipotez: ‘Açıklanamayan infertilite tanısı konulan hasta grubunda etyolojide ejakülattaki preapoptotik sperm oranının rolü olabileceği düşünülerek Oİ (ovulasyon induksiyon) ve İÜİ uygulanan hastalarda tedavinin başarısı ejakülattaki preapoptotik sperm oranı saptanarak öngörülebilir.’

1.2. AMAÇLAR

- Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Üreme Endokrinolojisi, İnfertilite ve Androloji Ünitesine başvuran hastalardan, açıklanamayan infertilite tanısı konularak Oİ ve İÜİ tedavisi uygulanacak hastalarda İÜİ için alınan ejakülattın dansite gradient santrifügasyon yöntemi kullanılarak hazırlanması sonrasında alınan sperm örneğinde annexin V sperm oranının saptanması.

- Açıklanamayan infertilite nedeniyle Oİ ve İÜİ uygulanan ve gebelik elde edilen olgularda ejakülattaki preapoptotik sperm oranı ile gebelik elde edilemeyen olgularda ejakülattaki preapoptotik sperm oranlarının karşılaştırılması.

- Açıklanamayan infertilite nedeniyle Oİ ve İÜİ uygulanan hastalarda ejakülattaki preapoptotik sperm oranının İÜİ başarısını öngörmede kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi.

1.3. KAPSAM

Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı alındıktan sonra Mart 2012-Aralık 2012 tarihleri arasında, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Üreme Endokrinolojisi, İnfertilite ve Androloji Ünitesine başvuran ve açıklanamayan infertilite tanısı konularak Oİ ve İÜİ uygulanacak tüm hastalar araştırma kapsamına alınmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. GİRİŞ

Üreme çağındaki çiftlerin %15'i infertilite problemi ile karşılaşmaktadır [11]. İnfertilite dünya sağlık örgütü tarafından bir halk sağlığı sorunu olarak tanımlanmıştır. Dünya popülasyonunda mevcut infertil birey sayısı yaklaşık 72,4 milyondur ve bugün ki infertilite prevalansı yaklaşık %9 olarak tahmin edilmektedir [12].

Overlerdeki oosit sayısı atrezi sürecinde progresif olarak azalır. Kız fetuslarda oosit sayısı gebeliğin 20.haftasında maksimum olur ve doğumda 1-2 milyona, pubertede 300.000-500.000'e, 37 yaşında 25.000'e, ortalama menopoz yaşı olan 51 de ise yaklaşık 1.000'e düşer. Fekundite yavaş yavaş azalır ancak 32 yaşından itibaren azalma daha anlamlı olmaya başlar ve 37 yaşından sonra azalma daha hızlı olur. Fekunditedeki azalmanın nedeni kesin olarak bilinmemekle beraber multiple faktörler sorumlu tutulmaktadır [13].

Fertilite gebelik elde etme kapasitesi olarak tanımlanır. Konsepsiyon ihtimali sikluslar arasında neredeyse stabil olmasına rağmen, korunmasız cinsel ilişkinin ilk ayında en yüksektir ve sonrasında yavaş yavaş azalır. Üç ay içerisinde konsepsiyon olmaz ise fekundabilite ciddi oranda azalır [14]. Fertilite hem kadınlarda hemde erkeklerde yaşla beraber azalmakla birlikte, yaşın fertilite üzerine etkisi kadınlarda daha belirgindir. Erkeklerde semen parametrelerinde bozulma 35 yaşından sonra saptanabilmekle birlikte erkek fertilitesinde belirgin azalma yaklaşık 50 yaşından önce görülmemektedir. Kadınlarda ise erken 20'li yaşlardan geç 30'lu yaşlara kadar fertilite yaklaşık yarı yarıya azalır [15].

Konsepsiyon, ilişki sadece ovulasyon zamanı yakınlarında olduğunda olur. Ovulasyon günü sonrasındaki 6 gün fertilizasyon penceresi olarak tanımlanır. Bu 6 günlük dönem hem sperm hem de oosit viabilitesinin ve fonksiyonlarının maksimum olduğu dönemdir. İlişki ovulasyon gününden sonraki 2 gün içinde olursa gebelik ile sonuçlanma olasılığı ve fekundabilite en yüksektir [16].

Hayat tarzı ve diyet fertilite üzerinde etkilidir. Çok zayıf veya çok şişman kadınlarda fertilite belirgin olarak azalır. Sigara foliküler tükenmeyi artırarak fertilitiyi olumsuz etkiler. Aşırı alkol ve kafein tüketimi(>250mg/gün), seksüel

geçişli hastalık öyküsü, çevresel ve medikal toksinler de fertilitiyi olumsuz etkilemektedir [16].

2.2. İNFERTİLİTE NEDENLERİ

İnfertilite nedenlerinin erkek ve kadın olarak dağılımı kesin olarak tanımlanamamıştır. Dünya sağlık örgütünün yaptığı çok merkezli bir çalışmaya göre, infertil çiftlerde nedenlerinin dağılımı; %20'sinde erkek faktörü, %38' inde kadın faktörü, %27'sinde erkek ve kadın faktörü birlikte, %15'inde ise açıklanamayan şekilde bulunmuştur [17]. Sonrasında yine dünya sağlık örgütünün 8500 infertil çift üzerinde yaptığı bir çalışmada infertil çiftlerin %37'sinde kadın faktörü, %8'inde erkek faktörü, %35'inde hem erkek hem kadın faktörü, %5'inde açıklanamayan infertilite sorumlu bulunmuş çiftlerin %15'i ise çalışma sırasında gebelik elde etmişlerdir. Ancak bu dağılım toplumun demografik ve çevresel özelliklerine bağlı olarak oldukça değişim göstermektedir [18]. Tablo 1 de infertilite nedenleri özetlenmiştir.

Tablo 1. İnfertilite nedenleri

Erkek Faktörü	%20
Kadın Faktörü	%38
Erkek ve Kadın Faktörü Birlikte	%27
Açıklanamayan İnfertilite	%15

Populasyon tabanlı bir çalışmada ise infertilite nedenleri aşağıdaki gibi dağılmıştır [19].

- Erkek faktörü(hipogonadizm, post-testiküler defekt, seminifer tübül disfonksiyonu) %26
- Ovulatuvar disfonksiyon %21
- Tubal Hasar %14
- Endometriozis %6
- Koitus problemleri %6

- Servikal faktör %3
- Açıklanamayan %28

İnfertilite primer de olsa sekonder de olsa bu faktörlerin sıklığı benzerdir ve son 25 yılda önemli bir değişim olmamıştır [20].

2.2.1. Kadın İnfertilitesi ve Nedenleri

En sık görülen kadın infertilitesi nedeni ovulatuvar bozukluklardır. Kadın infertilitesinin diğer sık nedenleri tablo 2’de belirtilmiştir. Bunlar tüm nedenlerin %81 ini oluştururlar [18].

Tablo 2. Kadın infertilitesi nedenleri

Ovulatuvar Bozukluk	%25
Endometriozis	%15
Pelvik Adezyonlar	%12
Tubal Tıkanıklık	%11
Diğer Tubal Patolojiler	%11
Hiperprolaktinemi	%7

Ovulatuvar Bozukluk: Fertilizasyon için her ay düzenli oosit atlamadığı için oligoovulasyon veya anovulasyon infertilite ile sonuçlanır. Her ay düzenli adet gören ve memede hassasiyet, dismenore, bulantı gibi menstrual semptomları olan kadınlar tipik olarak ovulatuvardır. Birçok endokrin hastalık ovulatuvar bozukluğa yol açarak infertiliteye neden olur. Dünya sağlık örgütü anovulasyonu 3 ana grupta sınıflandırmış ve hiperprolaktinemi ek bir etyoloji olarak kabul etmiştir (Tablo3).

Tablo 3. Dünya Sağlık Örgütü Anovulasyon Klasifikasyonu**WHO grup 1: Hipogonadotropik hipogonadal anovulasyon (hipotalamik amenore)**

GnRH (gonadotropin releasing hormon)'un hipotalamik sekresyonunda azalma veya hipofizin GnRH'ya yanıtınlığına bağılı olarak bu kadınlarda düşük veya düşük-normal serum FSH konsantrasyonu ve düşük serum östradiol konsantrasyonu vardır. En az görülen gruptur ve anovulatuvar kadınların %5-10'unda görülür.

WHO grup 2: Normogonadotropik normoöstrojenik anovulasyon

Bu kadınlar normal miktarda gonadotropin ve östrojen sekrete edebilirler. Bununla birlikte siklusun foliküler fazı sırasında FSH sekresyonu subnormaldir. Bu grup polikistik over sendromlu kadınları da içerir. Çoğu hastada oligomenore olur. En sık görülen gruptur ve vakaların %70-85'i bu gruba girer.

WHO grup 3: Hipergonadotropik hipoöstrojenik anovulasyon

Primer nedenler prematür over yetmezliğı ve overyan rezistansdır. Vakaların %10-30'u bu gruba girer.

Hiperprolaktinematik anovulasyon

Hiperprolaktinemi gonadotropin salınımını inhibe ettiğı için bu kadınlar anovulatuardır. Bunlar regüler anovulatuvar siklulara sahip olabilirler, ancak çoğu oligomenoreik veya amenoreiktir. Serum gonadotropin konsantrasyonları genellikle normaldir.

Hipotalamik amenore GnRH'nın normal epizodik ve pulsatil salınımında bozulma sonucunda meydana gelir. Hipotalamik amenorenin fonksiyonel nedenleri; aşırı egzersiz, nutrisyonel defekt, psikolojik stres, fizyolojik nedenleri; doğum sonrası dönem ve emzirme, farmakolojik nedenleri; opiatlar, antipsikotikler, antidepresanlar ve psikiyatrik nedenleri ise anoreksiya nervoza ve bulimia olarak sıralanabilir. Ayrıca hipotalamik amenore hipotalamo-hipofizer aksın organik defektinden de kaynaklanabilir. Fonksiyonel hipotalamik amenore tanısı diğere nedenlerin dışlanması ile konulur [21].

Prolaktinoma en sık görülen hipofizer tümördür ve hiperprolaktineminin de en sık nedenlerindendir. Serum prolaktin konsantrasyonu gebelikte, laktasyon sırasında ve stres ile fizyolojik olarak yükselir. Ayrıca dopamin antagonisti gibi ilaçlar, hipotiroidizm ve renal hastalıklarda patolojik olarak yükselebilir. Hiperprolaktinemi GnRH salınımını bozarak ovulatuvar disfonksiyona neden olur [22].

Tiroid hastalıkları infertil hastalarda sık görülen nedenlerdendir. Hipertiroidi serum SHBG (seks hormon bağlayıcı globulin) ve E2 seviyelerinde artışa neden olur. Bu hastalarda serum LH (luteinize edici hormon) ve FSH düzeyi yükselir ancak bunun mekanizması açık değildir, hipertiroidili hastalarda GnRH'ya olan FSH/LH salınımı yanıtında artışa bağlı olabilir. Hipertiroidili hastalarda serum PRL (prolaktin) düzeylerinde anlamlı bir değişim yoktur [23]. Hipertiroidili kadınlarda primer veya sekonder infertilite prevalansı %5.8'dir [24]. Hipotiroid kadınlarda SHBG'in bağlama kapasitesinde azalma olur ve testosteron ve östradiolün total plazma konsantrasyonları düşer. Ancak bunların serbest fraksiyonları artar. Bu kadınlarda serum FSH ve LH konsantrasyonları genellikle normal olmakla birlikte artmış hipotalamik TRH (tirotrop releasing hormon) sekresyonuna bağlı serum PRL düzeyleri artmış bulunabilir. Anovulasyona sekonder olarak bu kadınlarda siklus uzunluğu ve kanama miktarı değişkendir [23]. Hipotiroid kadınlarda primer veya sekonder infertilite sıklığı %6.2 olarak bulunmuştur [24].

Ovulatuvar fonksiyon bozukluğu ile giden bir diğer hastalık polikistik over sendromudur(PCOS). Polikistik over sendromu klinik özellikler açısından geniş bir spektruma sahip olan heterojen bir hastalıktır. Tanısında Rotterdam kriterleri kullanılmaktadır. [25] Buna göre oligo-anovulasyon, hiperandrojenizmin klinik veya biyokimyasal bulguları ve polikistik over görünümü bulgularından en az 2 tanesinin bulunması ile PCOS tanısı konulur. Polikistik overleri tanımlayan ultrasonografi kriteri; subkapsüler yerleşimli çapı 10 mm'den küçük 12 veya daha fazla overyan kistlerin olmasıdır [26]. Yeni Rotterdam kriterlerinin kullanımı ile PCOS prevalansı %18 olarak bulunmuştur ve PCOS'lu hastaların %60'ı fertildir [27, 28].

Over nedenli infertilitenin diğer bir nedeni prematür overyan yetmezliktir. Prematür overyan yetmezlik normal over fonksiyonlarının 40 yaşından önce bozulmasıdır ve 40 yaşında kadınların %1'ini, 35 yaşında kadınların 1/250'sini etkiler. En sık görülen semptomlar adet düzensizliği, sıcak basması, vajinal kuruluktur. Tanısı artmış FSH, düşük östradiol ve düşük AMH (antimülleriye hormon) seviyesi ile konulabilir. Çoğu kadında neden bilinmemekle birlikte herediter ve otoimmün nedenler etyolojide rol oynayabilir [21].

Ovulatuvar bozukluğa yol açan nedenler tablo 3'de sıralanmıştır.

Tablo 4. Anovulasyon nedenleri**Primer Hipotalamik Hipofizer Disfonksiyon**

- Kallman's sendromu (Amenore+Anosmi)
- İdiopatik hipogonadotropik hipogonadizm
- Hipotalamik veya hipofizer bölgenin tümörleri, travması veya radyoterapisi
- Sheehan's sendromu (Postpartum pituiter apopleksi)
- Boş sella sendromu
- Hipofizer adenom veya diğer hipofizer tümörler
- Lenfositik hipofizitis (otoimmün hastalıklar)
- Laktasyonel Amenore
- Stres
- Yeme Bozuklukları
- Aşırı Egzersiz
- Menarş veya perimenopozal dönem

Diğer hastalıklar

- Polikistik over sendromu
- Hipertiroidi veya hipotiroidi
- Hormon üreten tümörler (adrenal, over)
- Kronik karaciğer veya böbrek hastalıkları
- Cushing hastalığı
- Konjenital adrenal hiperplazi
- Prematür over yetmezliği(otoimmün, genetik, cerrahi, idiyopatik veya ilaç ve radyasyona sekonder)
- Turner sendromu (45,X0)
- Androjen insensitivite sendromu

İlaçlar

- Oral kontraseptifler
- Progesteronlar
- Antidepresan ve antipsikotik ilaçlar
- Kortikosteroidler
- Kemoterapötik ajanlar

Fallop Tüpü Anomalileri: Tubal ve peritoneal patoloji sık görülen infertilite nedenlerindedir ve infertil çiftlerin yaklaşık %30-35'inde görülmektedir [29]. Tubal hastalıklar sperm ve oositin transportunu bozarak infertiliteye neden olurlar. Tubal faktör infertilitesinin en sık nedeni pelvik inflamatuvar hastalıktır [30]. Diğer sık nedenler ise ciddi endometriozis ve daha önce geçirilmiş ameliyatlara bağlı yapışıklıklardır.

Tüpün distal kısmının obstrüksiyonu hidrosalpinks ile sonuçlanabilir. Hidrosalpinks oosit ve sperm transportunda bozulmanın yanı sıra, tubal içeriğin endometrial kaviteye retrograd akımı sonucu embriyonun implantasyonunda da bozulmaya neden olmaktadır. Hidrosalpinksin çıkarılması İVF (in vitro fertilizasyon) başarısını artırır [31]. Hidrosalpinks olan kadınlarda İVF başarısı, salpenjektomi yapılan veya normal kadınların yarısı kadardır. Bu nedenle hidrosalpinks olan tüm kadınlara İVF'den önce salpenjektomi yapılması önerilir [32].

Uterin Faktör: Mekanik veya endometrial reseptivitede azalmaya bağlı implantasyon başarısızlığı infertilitenin uterin nedenlerinin temelini oluşturur. Fertilitiyi olumsuz etkileyen uterin anormallikler; konjenital malformasyonlar, myomlar, intrauterin adezyonlar ve endometrial poliplerdir.

Myomlar yaygın görülen uterusun dış kasından köken alan monoklonal tümörlerdir. Myomlarla infertilite arasındaki ilişki tartışmalıdır. Submukozal olan veya intrakaviter komponenti olan myomlar muhtemelen implantasyonu bozarak daha düşük gebelik oranları ile ilişkilidir [33]. Myomların fertilitiyi diğer etkileme mekanizmaları; tüplerin interstisyel kısmını tutan kornual tıkanma, ovum ve sperm transportunu engelleyen bozulmuş uterin kontraktilite ve fokal endometrial ülserasyona neden olan bölgesel kan akımında azalmadır [34].

Gelişimsel uterin anomaliler gebelik kayıpları ve obstetrik komplikasyonlarla ilişkilidirler fakat genellikle gebe kalabilme potansiyelini etkilememektedir. Yapılan çalışmalarda uterin septum sıklığının fertil ve infertil kadınlarda benzer ve yaklaşık %1 olduğu fakat tekrarlayan gebelik kaybı olanlarda daha yüksek olduğu (%3-5) bulunmuştur. Tüm konjenital uterin anomaliler içerisinde uterin septum en sık görülen ve reproduktif yetersizlik ve obstetrik komplikasyonlarla en sık ilişkili olan anomalidir [35].

İnfertilite ile ilişkili diğer yapısal anomali intrauterin sineşilerdir. İntrauterin adezyonlarda en sık görülen semptomlar; hipomenore, amenore, dismenore gibi menstrüel bozukluklar ve infertilitedir. Patofizyolojisi travma sonrası endometrium damarlanması ve fonksiyonunda bozulmadır [36]. Etiyolojide postpartum, missed abortus nedeniyle veya istemli gebelik sonlandırması nedeniyle yapılan küretaj işlemleri önemli yer tutmaktadır. Diğer nedenler arasında kronik inflamatuvar veya enfeksiyöz durumlar, submüköz myomlar için yapılan myomektomi işlemi sayılabilir [37].

İnfertil kadınlar arasında endometrial polip sıklığı %3-5'dir [38]. Anormal uterin kanaması ve endometriozisi olan kadınlarda prevalansı daha yüksektir. HSG (histerosalpingografi) veya TVUSG (transvajinal ultrasonografi) ile tanınabilirler [39].

Endometriozis: Endometriozis; endometrial bez ve stromanın endometrium dışında ektopik olarak bulunmasıdır. Pelvik ağrı ve infertilitenin eşlik ettiği benign bir hastalıktır. Endometriozis infertilite ile güçlü bir ilişki gösterir ve infertil kadınların %20-40'ında görülür. Endometriozis ile ilişkili infertilitede ovulasyon sonrası ovum yakalanmasını inhibe eden ya da engelleyen pelvik adezyonlara bağlı bozulmuş adneksiyel anatomi, oosit gelişimi veya erken embriyogenezin engellenmesi, salgılamış olduğu sitokinlerle azalmış endometrial reseptiviteye yol açması sorumlu mekanizmalar olarak açıklanmaktadır [40, 41].

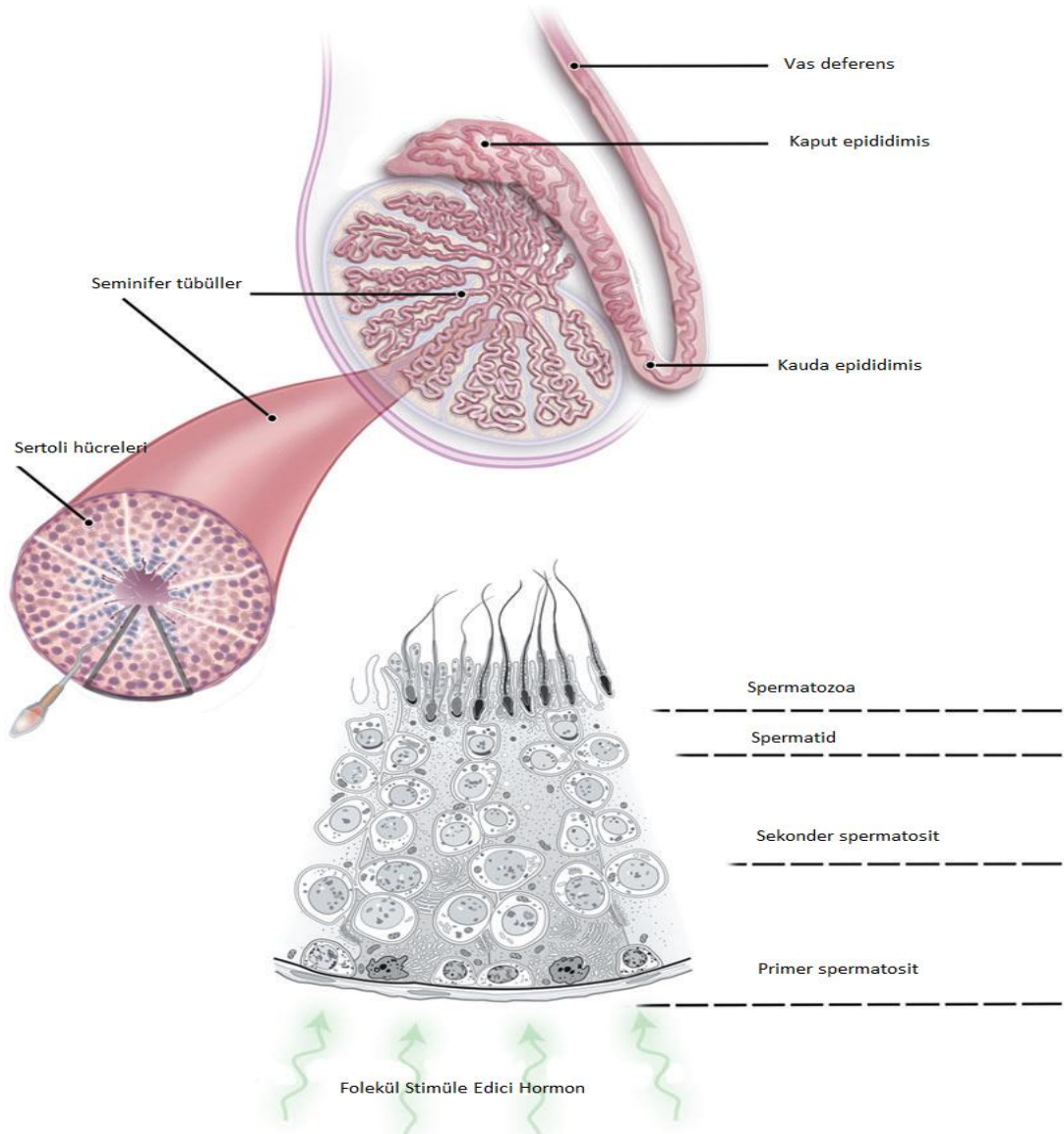
Servikal Faktör: Servikal mukus ejakülden spermleri yakalayarak diğer seminal proteinleri ayırır, anormal morfolojili spermleri filtre eder ve sperm için rezervuar görevi yapar. Bu şekilde spermin canlı kalma süresini uzatır [42]. Steroid hormon seviyelerinde değişikliklere bağlı olarak menstrüel siklus boyunca servikal mukusun yapısında değişim olmaktadır. Östrojen foliküler faz boyunca servikal mukus üretimini, miktarını ve akışkanlığını artırarak sperm geçişine olanak sağlar. Progesteron ise servikal mukus üretimini ve akışkanlığını azaltarak sperm geçişine engel olur. Servikal mukustaki siklik değişiklikler, gebelik olasılığının ovulasyona yaklaştıkça artmasını açıklar [43-45]. Konjenital malformasyon veya servikal travma, stenoz ve normal servikal mukus üretiminde azalmaya yol açarak infertiliteye neden olabilir.

Genetik Nedenler: İnfertil çiftlerde anormal karyotip analizi bulunma ihtimali genel populasyondan daha yüksektir. İnfertilite ile ilişkili en sık görülen anöploidi kadınlarda 45,X (Turner sendromu), erkeklerde 47,XXY (Klinefelter sendromu)'dur [46].

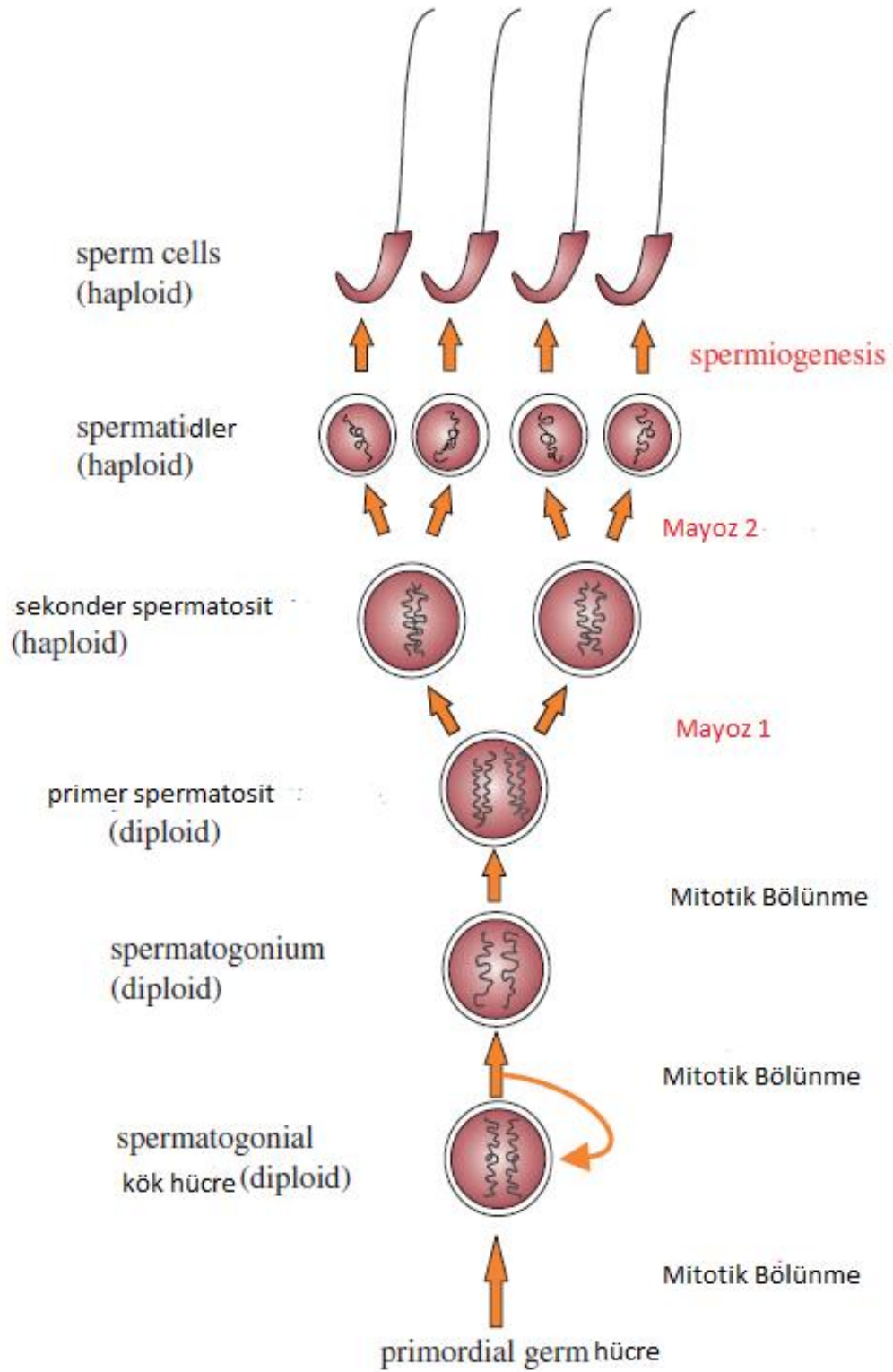
2.2.2. Erkek İnfertilitesi ve Nedenleri

Testiküler fonksiyon ve spermatogenez: Testisler seminifer tübül ve leydig hücreleri olmak üzere iki farklı yapıdan oluşurlar. Leydig hücreleri testosteron üretiminin yapıldığı yerdir. Seminifer tübüller, spermatogonia ve sertoli hücrelerinden oluşur. Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar kan-testis bariyerini oluşturur. Bu bariyer sayesinde germ hücreleri antikorlardan ve çevresel toksinlerden korunurlar.

Spermatogenezis, seminifer tübüllerde meydana gelir ve tamamlanması yaklaşık 74 gün sürer. Seminifer tübüllerde spermatogenezis şekil-1 ve 2'de gösterilmiştir [47]. Spermatogenezis üç fazda olmaktadır. İlk faz spermatositogenezisdir(proliferatif/mitotik faz) ve spermatogenezisin başlaması ile 46 kromozumlu spermatogonia büyür, olgunlaşır ve primer spermatositi oluşturur. İkinci faz mayotik fazdır ve mayoz 1'in tamamlanması ile 2 adet 23 kromozumlu sekonder spermatosit oluşur. Oluşan her iki sekonder spermatosit 2.mayoz bölünmeye girer ve 4 adet 23 kromozumlu spermatit oluşur. Üçüncü faz spermiyogenezisdir ve oluşan spermatidlerin her biri olgun spermatozoaya dönüşür. Spermatozoalar seminifer tübül lümenine salınır ve buradan kaput epidimise taşınırlar. Epididimiste spermler maturasyona uğrarlar ve hareket yeteneklerini burada kazanırlar. Spermler ejakülasyona kadar epididimiste depolanır. Epididimisin kuyruk bölgesi hareketli ve fertilizasyon yeteneğine sahip spermlerin saptanabileceği ilk yerdir [47].Spermin testisten ejakülatuar kanala taşınması 12-21 gün sürer. Semen; prostat, seminal veziküller, distal vas deferens salgılarının birleşimidir. Normal bir spermin şematik görünümü şekil- 3'de, mikroskopik görünümü ise şekil- 4'de gösterilmiştir.

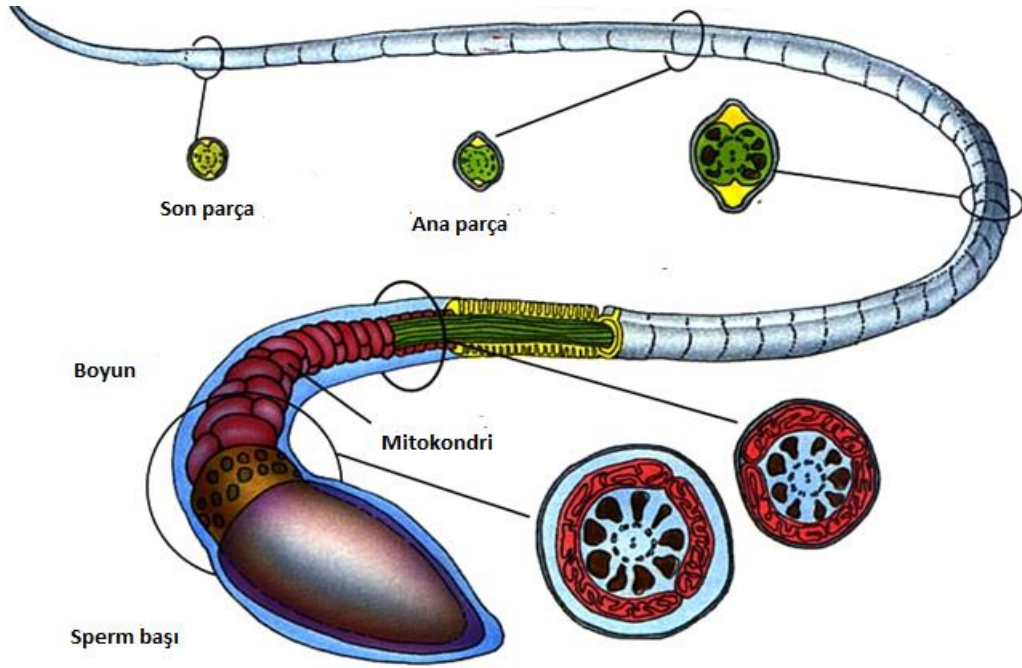


Şekil 1. Seminifer tübüllerde spermatogenezis



Şekil 2. Seminifer tubulde spermatogenez aşamaları

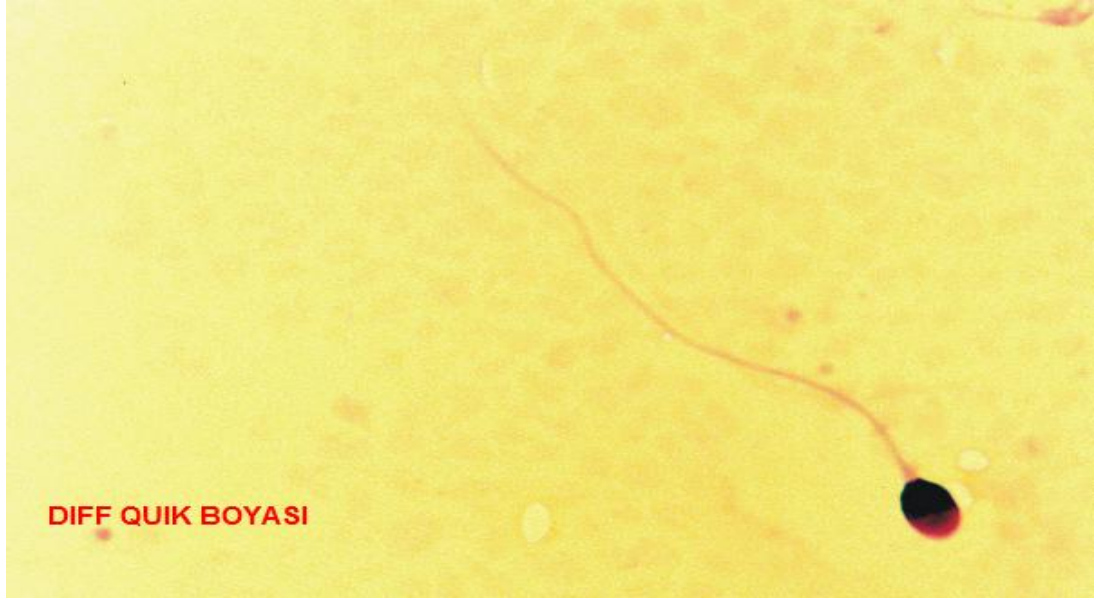
Spermatogenezisin başlaması ile 46 kromozumlu spermatogonia büyür, olgunlaşır ve primer spermatozoidi oluşturur. Mayoz-1 in tamamlanması ile 2 adet 23 kromozumlu sekonder spermatozoid oluşur. Oluşan her iki sekonder spermatozoid 2.mayoz bölünmeye girer ve 4 adet 23 kromozumlu spermatit oluşur ve her biri olgun spermatozoaya dönüşür [48].



Şekil 3. Matür spermin şematik görünümü

Normal spermin morfolojik özellikleri:

- Baş düzgün oval şekildedir.
- Akrozom başın apikal (ön) kısmının %40-70'ini kaplar.
- Başın en ve boy olarak ölçümleri kullanılan boyaya göre değişmesine rağmen ortalama $4-6\mu \times 2.5-3.5\mu$ 'dur.
- Orta kısım başın tam alt ortasından aksiyal olarak birleşir ve silindirik şeklinde olup eni $< 1\mu$ boyu ise baş uzunluğunun 1.5 katıdır. ($6-10\mu$)
- Stoplazmik droplet (artık) ise sadece orta kısımda olmalı ve başın oluşturduğu alanın yarısından fazlasını kaplamamalıdır.
- Kuyruk ise düzgün ve orta kısımdan biraz daha ince olmak üzere, kırılmamış ve kıvrıklaşmamış ve yaklaşık 45μ uzunluğundadır.



Şekil 4. Diff quik boyası sonrası normal spermin mikroskopik görünümü

Normal testiküler fonksiyon ve spermatogenez için hipofizden salgılanan gonadotropinlere ihtiyaç vardır. LH, Leydig hücrelerini stimüle ederek testosteron üretimini uyarır. FSH ise Leydig hücrelerinde LH reseptörlerinin oluşumunu indükler. Seminifer tübüllerde spermatogenez için ve epididimiste sperm maturasyonu için yüksek konsantrasyonda testosterona ihtiyaç vardır. FSH sertoli hücrelerine bağlanarak androjen bağlayıcı protein salınımını artırarak lokal etkili yüksek testosteron konsantrasyonlarının oluşumuna yardımcı olur.

Yüksek serum testosteron seviyeleri, hipotalamik GnRH pulsatil salınımını ve hipofizer seviyede LH salınımını azaltır. Fizyolojik testosteron seviyeleri FSH salınımını baskılamaz. Hipofizer FSH salınımının kontrolü sertoli hücreleri tarafından salınan inhibin B ile sağlanır. İnhibin B sertoli hücrelerinden FSH stimülasyonuna yanıt olarak salgılanır ve hipofizer FSH sekresyonunu inhibe eder.

Erkek İnfertilitesi Nedenleri: Erkek infertilitesi nedenleri dört ana grupta incelenebilir:

- Hipotalamik hipofizer hastalıklar(sekonder hipogonadizm): %1-2
- Testiküler hastalıklar(Y kromozomu mikrodelsiyonlarını da içeren primer testiküler defektler): %30-40
- Post testiküler nedenler (sperm transport problemleri): %10-20

- İdiopatik (belirlenebilir bir nedenin bulunamadığı ve normal semen analizine sahip erkekler): %40-50

Hipotalamik-Hipofizer Hastalıklar: GnRH veya gonadotropin eksikliğine yol açan tüm hipotalamik veya hipofizer hastalıklar infertiliteye neden olabilir. Bu hastalıklar konjenital, edinsel ve sistemik hastalıklar olarak 3 grupta incelenir.

Erkek infertilitesine neden olan hipotalamo-hipofizer hastalıklar aşağıdaki tablo-5’de özetlenmiştir.

Tablo 5. Erkek İnfertilitesine neden olan hipotalamo-hipofizer hastalıklar

Konjenital hastalıklar

Konjenital GnRH eksikliği(Kallmann Sendromu)

Hemokromatozis

Multiorgan genetik hastalıklar (Prader-Willi Sendromu, Laurence-Moon-Biedl Sendromu, Familial serebellar ataksi)

Edinsel nedenler

Hipofiz ve Hipotalamus tümörleri (makroadenom, kraniofaringiom)

İnfiltratif Hastalıklar (sarkoidoz, histiyositoz, tüberküloz, fungal enfeksiyonlar)

Travma, ameliyat ve radyoterapi

Vasküler nedenler (anevrizma, infarkt)

Hormonal (hiperprolaktinemi, androjen artışı, östrojen artışı, kortizol artışı)

İlaçlar (opioidler ve psikotropik ilaçlar, GnRH agonist veya antagonistleri)

Sistemik Hastalıklar

Kronik Hastalıklar

Nütrisyonel Hastalıklar (Anoreksia nervoza ve bulimia)

Obezite

Konjenital idiyopatik hipogonadotropik hipogonadizm; seksüel infantilizm, önükoidizm ve bazende anozmiye neden olan izole gonadotropin eksikliği ile karakterize klinik durumdur. İlave olarak çoğu hastada orta hat yüz defektleri, renk körlüğü, işitme problemleri, renal malformasyonlar ve kriptorşidizm bulunur. Hipogonadizmin altında yatan neden GnRH salınımındaki defektidir [49].

Bazı erkeklerde gonadotropin alt ünitesinde mutasyon sonucu hipogonadotropik hipogonadizm görülür. Yapılan bir çalışmada FSH beta geni promoter bölgesinde meydana gelen tek nükleotid polimorfizmi serum FSH konsantrasyonu ve reproduktif parametrelerle ilişkili bulunmuştur. Bu erkeklerde daha küçük testis volümü, daha düşük sperm konsantrasyonu ve daha düşük FSH düzeyi saptanmıştır [50, 51].

Gonadotropin sekresyonunda anormalliğe yol açan diğer genetik nedenler; Laurence-Moon-Biedl sendromu, Prader-Willi sendromu, Lowe (Oküloserebral distrofi) sendromu ve Familial Serebellar Ataksi sendromunu içeren multiorgan genetik sendromlardır [52].

Fonksiyonel hipogonadotropik hipogonadizm ve infertilite hiperprolaktinemi, androjen artışı, östrojen artışı ve kortizol artışından kaynaklanabilir. Östrojen artışı, östrojen tedavisinden veya östrojen salgılayan bir testiküler tümörden kaynaklanabilir [53]. Androjen artışı, testosteron veya diğer anabolik steroidlerin kullanımına veya konjenital adrenal hiperplazi, testis veya adrenal bezdeki tümöre bağlı aşırı androjen üretimine bağlı olabilir [54, 55].

Opioidler, psikotrop ilaçlar ve GnRH analogları, GnRH veya gonadotropin salınımını inhibe ederek sekonder hipogonadizme ve infertiliteye neden olabilir.

Obezite erkeklerde düşük serum gonadotropin, total testosteron, serbest testosteron düzeyleri ve hipogonadotropik hipogonadizm ile ilişkilidir. Obezite serum SHBG düzeyinde azalma ile ilişkili olarak serum total testosteron konsantrasyonunun da azalmaya neden olur. İlâveten serum serbest testosteron konsantrasyonu SHBG' deki değişiklikten bağımsız olarak vücut ağırlığı ve vücut kitle indeksi ile ters ilişkili olarak azalır [56]. Sperm kalitesi de vücut kitle indeksi ile ters ilişkili olabilir [57].

Testiküler Hastalıklar: Primer gonadal yetmezlik (hipergonadotropik hipogonadizm) oligozoospermi ve azoosperminin önemli nedenlerindedir.

İnfertiliteye neden olan testiküler hastalıklar tablo-6'da özetlenmiştir.

Tablo 6. İnfertiliteye neden olan testiküler hastalıklar**Konjenital Hastalıklar**

Klinefelter's Sendromu (XXY)

Kriptorşidizm

Myotonik distrofi

Konjenital anorşi

Varikosel

Androjen insensitivite sendromu

5 α Redüktaz eksikliği

Y kromozom delesyonları

Edinsel nedenler

Viral orşit (kabakulak, arbovirus)

Granülamatöz orşit (lepra ve tüberküloz)

Epididimo-orşit(gonore, klamidy)

İlaçlar(alkilleyici ajanlar, alkol, antiandrojenler, ketokonazol, spironolakton, histamin 2 reseptör antagonistleri)

İyonize radyasyon

Çevresel toksinler (Karbon disülfid, kadmiyum, fitoöstrojenler)

Hipertermi

İmmünolojik Hastalıklar(Poliglandüler otoimmün hastalıkları içeren)

Travma

Torsiyon

Sistemik Hastalıklar(Renal yetmezlik, hepatik siroz, kanser, sarkoidoz, orak hücreli anemi, vaskülit, çölyak hastalığı)

Konjenital ve gelişimsel hastalıklar infertil erkeklerin önemli bir kısmından sorumludur. Primer hipogonadizmin ve erkek infertilitesinin en sık nedenlerinden biri Klinefelter sendromudur.1/500-700 sıklıkta görülür ve bu hastalarda genellikle küçük testisler ve hemen her zaman azospermi bulunur.

Y kromozomu mikrodelsyonları azospermi ve ciddi oligosperminin genetik nedenlerindedir [58]. İnfertil erkeklerin %20'si kadarında Y kromozomu uzun

kolunda mikrolezyon vardır ve bunların çoğu azospermik faktör (AZF) olarak isimlendirilen Yq11 bölgesindedir. AZF bölgesi 3 bölümden oluşur: AZFa, AZFb ve AZFc. AZFa ve AZFb bölgelerinin deleyonu ciddi spermatogenezis defekti ve azospermiye neden olur. Bu erkeklerin testis biyopsisinde germinal hücre matürasyonunda arrest görülebilir. AZFc bölgesinin deleyonu oligospermiden azospermiye değişen fenotipe neden olarak infertiliteye neden olur [59, 60]. Y kromozomu deleyonları sadece idiopatik oligospermi veya azospermide değil kriptoorşidizm, varikosel, vas deferensin obstrüktif lezyonları gibi testiküler disfonksiyonun belirlenebilir diğer nedenleri olan hastalarda da saptanabilir [61].

Kriptoorşidizm fetal gelişim sürecinde testislerin skrotuma inmesinde başarısızlık olarak tanımlanır. Bunun sonucunda testis abdomende, inguinal kanalda veya diğer ektopik lokasyonlarda olabilir. Bilateral veya unilateral kriptoorşidizm spermatogeneziste bozulma ve testiküler tümör riskinde artış ile ilişkilidir. Kriporşidizmde görülen spermatogenez defekti olasılıkla gelişimsel anomalilere bağlıdır [62]. Testiküler inme süreci androjen bağımlıdır ve kriptoorşidizm testosteron sekresyon veya aktivitesindeki konjenital bozukluklarda daha sık görülür.

Varikosel, skrotumda panpiniform pleksus venlerindeki dilatasyon olarak tanımlanır. Varikosel, sol spermatik venlerde daha düşük kan akımına bağlı olarak sol tarafta sağa göre 10 kat daha sık görülür [63]. Varikoselin hangi mekanizma ile infertiliteye neden olduğu ve varikosel ameliyatı sonrası infertilitenin düzelmesi tartışmalıdır. Normal erkeklerin %10-15'inde varikosel bulunur ve bu oran infertil erkeklerde daha yüksektir [64].

Androjen reseptör veya postreseptör anomalilere bağlı konjenital androjen insensitivitesi olan erkekler nerdeyse her zaman infertildir. Parsiyel androjen insensitivitesi (Reifenstein Sendromu) olan erkeklerde ambigu eksternal genitalya, hipogonadizm ve infertilite gibi değişik derecelerde klinik durum ortaya çıkabilir [65]. Normal seksüel diferansiyasyon ve spermatogenez için androjen ve normal fonksiyonel reseptör gerekir. Androjen reseptör geninde polimorfizm erkek infertilitesi ile ilişkili olabilir. Androjen reseptör geninde ekzon 1'de CAG trinükleotid tekrar sayısı androjen hedef gen transkripsiyonel aktivitesi ile ters ilişkilidir. Normal fertil erkeklerde kısa CAG tekrarı yüksek sperm üretimi ile ilişkilidir [66].

5-alfa redüktaz eksikliğine sahip erkeklerde psödohermafroditizm görülür. Bu hastalarda infertilite küçük fallus, ciddi hipospadias, kriptorşidizm ve zayıf prostatik sekresyon gibi mekanik problemler bağlı olabilir [67].

Östrojenin alfa reseptöründe inaktivasyona neden olan mutasyonu olan erkeklerde sperm sayısı normaldir ancak sperm motilitesi düşüktür [68].

Erkek infertilitesinin nadir görülen nedenlerinden biri FSH reseptör gen mutasyonlarıdır. Bu hastalarda düşük sperm sayısı ve serum inhibin B konsantrasyonu ve yüksek serum FSH konsantrasyonu vardır [69].

Bütün edinsel testiküler hastalıklar infertiliteye neden olabilir. Viral orşit, özellikle kabakulak, infertilitenin iyi tanımlanmış nedenlerindedir. Kabakulak orşiti prepubertal erkeklerde nadir görülürken yetişkin erkeklerin %15-20'sinde görülür. Bu erkeklerin bazılarında germinal hücre hasarı, iskemi veya enfeksiyona immün cevaba bağlı olarak infertilite görülür [70]. Gonore ve klamidy gibi seksüel geçişli hastalıklar da orşite neden olabilir. HIV (insan immün yetmezlik virüsü) ile enfekte erkeklerde normal sperm parametreleri olabildiği gibi düşük sperm motilitesi ve infertilite de olabilir [71].

Birçok ilaç spermatogenezde bozulma veya leydig hücre disfonksiyonuna neden olarak infertiliteye neden olabilir. Bunlar arasında en önemlisi siklofosfamid ve klorambusil gibi alkilleyici ilaçlardır. Antiandrojenler de testiküler androjen üretimi veya aktivitesini bozarak testiküler disfonksiyona neden olabilir.

İyonize radyasyon spermatogenezini bozar. Doz 0.015 Gy (15rad) gibi düşük olduğunda spermatogenezde geçici bir supresyona neden olurken, doz 6 Gy (600 rad) ın üzerinde genellikle irreversible azospermi ve infertiliteye neden olur [72].

Sigara içmenin sperm sayısı üzerine etkisi ile ilgili çalışmaların meta analizinde, sigara içen erkeklerde düşük sperm sayısı olma ihtimalinin daha fazla olduğu görülmüştür [73].

Uzun süre yüksek testiküler ısı germ hücrelerinde apoptozisi artırarak infertilite ile ilişkili olabilir. Varikosel, spinal kord yaralanması ve uzun süreli sauna kullanımı yüksek testiküler ısıya neden olarak infertilite ile ilişkili olabilir [74, 75].

Sperm Transport Problemleri: Sperm maturasyonu ve transportunda epididimisin çok önemli rolü vardır. Vas deferens matür spermelerin epididimisten

üretmeye transportunda görevlidir. Epididim ve vas deferensde problem infertiliteye neden olabilen posttestiküler nedenlerdir.

Epididim yokluğu, disfonksiyonu veya obstrüksiyonu testiküler sperm üretimi normal olmasına rağmen infertiliteye neden olur. İntrauterin östrojen maruziyeti epididimal disfonksiyona neden olabilir [76].

Erkek infertilitesi vas deferensin konjenital veya edinsel anomalilerinden kaynaklanabilir. Vas deferensin bilateral obstrüksiyonu, ligasyonu, peristaltizmde değişiklik infertiliteye neden olabilir. Obstrüksiyon gonore, klamidya, tüberküloz gibi enfeksiyonlardan kaynaklanabilir. İnfertil erkeklerin %1-2'sinde vas deferensin konjenital yokluğu görülür. Çoğunda kistik fibrozis transmembran regülatör gen (CFTR) mutasyonu vardır [77].

Primer siliyer diskinezi siliya fonksiyonunu ve yapısını etkileyen heterojen genetik bir hastalıktır. Klinik olarak tekrarlayan sinopulmoner enfeksiyonlar, bronşiektazi, situs inversus ve astenozoospermi veya oligozospermi ile birlikte erkek infertilitesi görülür [78, 79].

2.3. İNFERTİLİTE NE ZAMAN DEĞERLENDİRİLMELİ?

İnfertilitenin değerlendirilmeye başlama zamanı ile ilgili genel konsensus; düzenli ve korunmasız 12 ay cinsel ilişki sonrası gebelik elde edilememesi durumudur. Medikal öykü ve fizik muayeneye bağlı bulgular varsa ve kadın yaşı 35'den büyük ise değerlendirmeye daha erken başlanabilir [80]. 35 yaşından sonra overyan yaşlanmaya bağlı olarak fekundite- de anlamlı azalma meydana geldiği için 35-40 yaş arası infertil kadınlarda infertilite değerlendirmesi 6 aylık korunmasız cinsel ilişki sonrası gebelik elde edilemediğinde, 40 yaş üzeri kadınlarda ise 6 ay da beklemeden infertilite değerlendirilmesi başlanmalıdır [81].

Kadında prematür overyan yetmezlik için risk faktörü varsa (geçirilmiş overyan cerrahi, sitotoksik ilaçlara maruziyet, pelvik radyoterapi öyküsü, otoimmün hastalıklar, erken menopoz için güçlü aile öyküsünün bulunması gibi), ileri evre endometriozis, bilinen veya şüphelenilen tubal veya uterin hastalık varsa değerlendirmeye hemen başlanmalıdır [4]. Erkeklerde de tedavi gerektiren testiküler travma öyküsü varsa, erişkin yaşta kabakulak öyküsü, seksüel disfonksiyon, kemoterapi veya radyoterapi öyküsü varsa değerlendirme hemen başlanabilir.

2.4. İNFERTİL ÇİFTİN DEĞERLENDİRİLMESİ

2.4.1. Öykü ve Fizik Muayene

İnfertil çiftin değerlendirilmesine öykü ve fizik muayene ile başlanmalıdır.

İnfertilite öyküsünde önemli noktalar:

- İnfertilite süresi ve daha önceki değerlendirme veya tedavinin sonuçları nelerdir?
- Menstrual öykü; siklusların uzunluğu ve karakteristiği, ovulatuvar durumun belirlenmesinde yardımcı olabilir.
- Medikal, cerrahi ve jinekolojik hikaye; cinsel yolla bulaşan hastalık öyküsü, pelvik inflamatuvar hastalık öyküsü, tiroid hastalığı bulguları, galaktore, hirsutizm, pelvik ağrı, dismenore, dispareni gibi semptomların varlığı, kemoterapi veya radyoterapi öyküsü sorgulanmalıdır.
- Obstetrik öykü; daha sonraki fertilitelerini olumsuz etkileyecek durumların varlığı sorgulanmalıdır.
- Seksüel öykü; seksüel disfonksiyon varlığı, ilişki sıklığı sorgulanmalıdır.
- Aile öyküsü; ailesinde infertilite öyküsü, doğum defekti, genetik mutasyon ve mental retardasyon varlığı sorgulanmalıdır.
- Yaşam tarzı özellikleri; yaş, egzersiz ve diyet öyküsü, stres varlığı, sigara ve alkol kullanımı sorgulanmalıdır.

Fizik muayenede infertilitenin potansiyel nedenlerine ait bulgular değerlendirilmelidir. Hastaların vücut yağ indeksleri hesaplanmalıdır ve yağ dağılımları kaydedilmelidir. Yüksek vücut yağ indeksleri fertilitede azalma ile ilişkilidir.

Sekonder seks karakterlerinin inkomplet gelişimi hipogonadotropik hipogonadizmin bulgusu olabilir.

Guatr, galaktore veya androjen fazlalığı bulguları (hirsutizm, akne, virilizasyon, erkekte saç dökülmesi) varlığı endokrinopati göstergesi olabilir.

Adneksiyal veya douglasta kitle veya hassasiyet kronik pelvik inflamatuvar hastalığın veya endometriozisin bir bulgusu olabilir. Douglasta, uterosakral ligamentte, rektovajinal septumda, palpasyonla hassas nodüllerin varlığı endometriozisin ek bulguları olabilir.

Servikal, vajinal yapısal anomalilerin varlığı fizik muayenede değerlendirilmelidir.

Uterin boyutta artış, irregülarite, mobilizasyonunun kaybı, myom, adenomyozis veya pelvik adezif hastalık gibi uterin anomalilerin bulgusu olabilir.

2.4.2. Tanısal Testler

Öykü ve fizik muayeneye ek olarak başlangıç tanısal değerlendirme aşağıdakileri içermelidir.

- Erkek faktörünün değerlendirilmesi için semen analizi.
- Normal ovulatuvar fonksiyonun değerlendirilmesi. Yaklaşık 4 haftada bir düzenli adet gören kadınların çoğu ovulatuvardır.
- Tubal obstrüksiyonun dışlanması. Bunun için genellikle histerosalpingografi kullanılır.

Ovulatuvar Fonksiyonun Değerlendirilmesi: Ovulatuvar disfonksiyon, infertilitenin en sık nedenlerinden biri olduğundan, ovulatuvar fonksiyonun değerlendirilmesi kadın infertilitesinin değerlendirilmesinde anahtar role sahiptir.

Ovulasyonun belirlenmesinde en kolay yaklaşım beklenen mensten 1 hafta önce midluteal dönemde serum progesteron seviyesinin ölçümüdür. 28 günlük siklusları olan bir hastada 21. gün progesteron seviyesinin >3 ng/ml olması ovulasyon olduğunun kanıtıdır [82]. Ovulasyonun belirlenmesinde diğer bir alternatif idrarda LH ölçümünü sağlayan kitlerdir ancak bu kitlerin %5-10 yanlış pozitif ve yanlış negatif oranları vardır. Ovulasyonun saptanmasında diğer yöntemler, seri ultrasonografi ile folikül gelişimi takibi ve sekretuar değişiklikleri göstermek için endometrial biyopsidir. Fakat bu yöntemler pahalı ve invazivdir.

Eğer 21.gün progesteron seviyesi < 3 ng/ml ise hasta anovulatuvar olarak kabul edilir ve değerlendirmede yapılması gereken başlangıç testleri serum PRL, TSH (tiroid stimüle edici hormon), FSH ölçümü ve polikistik over sendromunun değerlendirilmesidir.

Overyan Rezervin Değerlendirilmesi: İnfertilitenin başlangıç değerlendirmesinde over rezervinin doğru belirlenmesi çok önemli role sahiptir. Ancak over rezervinin değerlendirilmesinde ideal bir yöntem belirlenememiştir. 35 yaşından büyük veya daha genç ama prematür overyan yetmezlik için risk faktörü

olan kadınlarda over rezervini değerlendirmek için 3. gün FSH ölçümü önerilir. Over rezervini değerlendirmede diğer yöntemler antral folekül sayımı, antimüllerian hormon ölçümü ve klomifen sitrat stimülasyon testidir (KSST).

3. gün FSH ölçümü ve KSST- over rezervinin değerlendirmesinde yaygın olarak kullanılan testlerdir. KSST’de siklusun 5-9 günleri arasında 100 mg oral klomifen sitrat uygulanır. 3.gün ve 10.gün FSH ile 3.gün E2 ölçülür. Bu testlerin temeli iyi overyan rezerve sahip hastalarda menstrual siklusun erken dönemlerinde küçük foliküllerden salınan overyan hormonların FSH’yı düşük seviyelerde tutmasına dayanır. Bunun tersine over rezervi azalmış olan ve overyan hormon salınımı yetersiz olan hastalarda hipofizden salınan FSH inhibe edilemez ve siklusun erken dönemlerinde FSH seviyesi artar [83]. İnfertilite tedavisi gören kadınlarda başarılı klinik gebelik elde etmeyi predikte etmede siklusun 3.günü bazal FSH ölçümü ve KSST benzerdir [84, 85]. Sonucun normal olması fertilitiyi predikte etmede kullanışlı değildir. 3.gün FSH düzeyi <10 mIU/ml ise overyan rezervin yeterli olduğu sonucuna varılır. Ancak FSH> 20 mIU/ml ise hastanın kendi oositleri ile gebelik elde etme ihtimali çok düşüktür.

Siklusun 3.günü ölçülen östradiol düzeyi de overyan rezervin ve overyan stimülasyona cevabın değerlendirilmesinde kullanılabilir [86]. 3.gün östradiol düzeyi < 60-80 pg/ml ise overyan rezerv yeterli olarak değerlendirilir. Overyan rezervin azalması sonucunda, inhibin üretimi azalırken FSH düzeyi artmakta ve bunun sonucunda erken foliküler dönemde östradiol düzeyleri yükselmektedir. Östradiol seviyesi >60-80 pg/ml ise siklus iptal etme oranları daha yüksek ve gebelik oranları daha düşük bulunmuştur. Östradiol seviyesi >100 pg/ml ise gebelik oranı neredeyse %0’dır [87]. Hem FSH hem de östradiol seviyesi ölçümü FSH testinin yanlış negatif sonuçlarından kaçınmamızı sağlar.

KSST’inde FSH düzeyi hem 3. hem de 10.günlerde 15 mIU/ml den düşük ise over rezervi yeterlidir. 3.gün veya 10.gün FSH düzeyi > 15 mIU/ ml’den yüksek ise overyan rezerv azalmıştır.

Antral folikül sayımı- ortalama çapları 2-10 mm arası olan foliküller olarak tanımlanır ve ultrasonografi ile sayıları belirlenebilir. Düzenli adetleri olan bir kadında siklusun 2-4.günleri arasında 4-10 adet antral folikül bulunması iyi overyan rezervi yansıtırken 4’den az olması kötü overyan rezervi gösterir [88]. Antral folikül

sayımı overyan rezerv ve cevap için iyi bir prediktör iken oosit kalitesini, İVF başarısını, gebelik sonuçlarını öngörmede daha az prediktiftir [89].

Anti müllerien hormon- TGF-beta (transforme edici büyüme faktörü-beta) ailesinin bir üyesidir ve 8 mm'den küçük preantral ve erken antral foliküllerden eksprese olur. AMH seviyesi primordial folikül havuzunun boyutunu yansıtır. Yetişkin kadınlarda primordial folikül havuzunun yaşla birlikte azalması ile birlikte AMH seviyeside yavaş yavaş azalır [90]. Menopozda ise saptanamayacak seviyeye düşer [91]. AMH seviyesi azalan over fonksiyonunun erken, güvenilir ve direkt göstergesidir ancak eşik değer hakkında tam bir konsensus yoktur [92]. Serum AMH seviyesinin 0.5 ng/ml'nin üzerinde olması iyi overyan rezervi gösterirken daha düşük seviyeler overyan folikül havuzunun azaldığını gösterir. 0.15 ng/ml'nin altındaki değerler İVF'e cevabın kötü olacağını gösterebilir [93]. AMH siklusun herhangi bir zamanında ölçülebilir.

Tubal Açıklığın Değerlendirilmesi: Laparoskopi planlanmayan tüm infertil hastalarda tubal oklüzyonun dışlanması için HSG yapılabilir [94]. HSG uterin kaviteyle ilgili de bilgi sağlar. Ancak peritubal adezyonları veya endometriozisi saptamada kullanışlı değildir [95]. HSG'de proksimal tubal oklüzyon genellikle tubal spazma bağlı test artefaktını yansıtır ve bu durumda HSG tekrarlanabilir. Diagnostik HSG'nin terapötik etkisi de vardır ve HSG yapılan subfertil kadınlarda gebelik oranları HSG yapılmayanlara göre daha yüksektir [96].

Uterin kavitenin değerlendirilmesi: HSG tubal açıklığın değerlendirilmesine ek olarak submuköz myom, DES maruziyeti ile ilişkili T şeklinde kavite, polip, sineşi, konjenital müllerian anomali gibi uterin kavitenin gelişimsel veya kazanılmış anomalilerinin saptanmasına da olanak sağlar. HSG'de anomali saptandığında genellikle USG, MRG, histeroskopi veya laparoskopi gibi ileri görüntüleme modaliteleri gerekir.

USG myomların değerlendirilmesinde oldukça kullanışlıdır ve salin infüzyon sonografi submüköz myomların saptanmasında en iyi görüntüleme modalitesidir. İntrauterin adezyonları, polipleri, konjenital uterin anomalileri saptamada salin infüzyon sonografi rutin ultrasonografiden daha başarılıdır [97].

Endometrial kavite ile ilgili anomalilerin değerlendirilmesinde histeroskopi altın standart metottur. Tanı ile birlikte tedaviye de olanak sağlar [4].

Laparoskopinin Rolü: İnfertilitenin değerlendirilmesinde laparoskopinin rolü tartışmalıdır. Başlangıç infertilite değerlendirmesi normal olan çiftlerde veya ciddi erkek faktörü olan infertil çiftlerde laparoskopik bulgular genellikle başlangıç tedaviyi değiştirmemektedir. Hikaye, fizik muayene veya HSG’de endometriozis şüphesi olan, pelvik adezyon veya tubal hastalık şüphesi olan hastalarda laparoskopik endikasyonu vardır [98].

2.4.3. Erkek İnfertilitesinin Değerlendirilmesi

Erkek infertilitesinin değerlendirilmesi aşağıdaki basamakları içermelidir.

- Hikaye-anamnez
- Fizik muayene
- Semen Analizi
- Genetik testler
- Endokrin Testler

İnfertil bir erkeğin değerlendirilmesine ayrıntılı bir öykü alınarak başlanır. Pubertal gelişim, vücut kıllanması, kronik hastalıklar, kabakulak orşiti, sinopulmoner infeksiyonlar, seksüel geçişli hastalıklar, testis veya skrotal ameliyatlar, ilaç kullanımı, ilişki sıklığı sorgulanmalıdır.

Fizik muayenede infertilite ile ilişkili olabilecek androjen eksikliğinin klinik bulgularına odaklanılmalıdır. Androjen eksikliğinin klinik bulguları başlangıç yaşına bağlıdır. Androjen eksikliği erken gebelikte başlarsa ambigus genitalya ile, gebeliğin ilerleyen haftalarında başlarsa mikropenis ile, çocukluk çağında başlarsa da pubertede gecikme ile, erişkin yaşta ise seksüel fonksiyonda azalma, infertilite, sonuçta da sekonder seks karakterlerinde kayıp ile sonuçlanır.

Standart Semen Analizi: Semen analizi erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde en önemli parametredir. Standart semen analizi; semen volümü ve Ph ölçümü, aglütinasyonun değerlendirilmesi, sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisinin değerlendirilmesi, sperm lökosit sayısının ve immatür germ hücrelerin değerlendirilmesini içerir.

Semen analizinin fiziksel parametreleri:

- Koagülasyon: Ejakülasyon sonrası semenin sıvı halden semisolid hale geçmesidir. Koagülasyon olmadığında seminal vezikül ve vas deferensin yokluğundan şüphelenilir.
- Likefaksiyon: Koagüle olan semen 5-20 dakika içinde likefiye olur. Bu süreç prostatdan yapılan proteolitik bir enzim olan fibrinolizinle olur. Bu nedenle likefaksiyon normal prostat işlevinin bir göstergesidir.
- Viskosite: Likefiye olan semenden bir pipet ile damla yöntemiyle ölçülür. Pipete çekilen semen damlatılarak oluşan iplikçiğin boyu ölçülür. 20 mm'ye kadar normal, 20-40 mm arası hafifçe artmış, 40-80 mm arası oldukça artmış ve 80 mm üstü ise çok artmıştır. Artmış viskozite genital traktusda, prostatda veya seminal vezikülde olan bir enfeksiyonu gösterir. Uygunsuz plastik kap kullanımı, sık ejakülasyon da viskozitede bir artış nedeni olabilir.
- Volüm: 3-5 günlük cinsel yoksunluk sonrası 2-6 ml'dir.
- Renk: Gri opak renktedir ancak cinsel yoksunluk süresi artarsa sarımsı renge dönüşür. Konsantrasyon düşerse renk açık/sulu şekle döner, artarsa bulanıklık artar.
- Koku: Prostat sekresyonu olan sperminin oksidasyonu ile olur. Atkestenesi ağacı çiçeği kokusuna benzetilir. Normalden sapması enfeksiyon göstergesidir.
- pH: 7.2-7.8 arası dağılım normal kabul edilir.

Seminal sıvıyı oluşturan sekresyonların kaynağı ve yüzde dağılımı tablo-7'de özetlenmiştir.

Tablo 7. Seminal sıvıyı oluşturan sekresyonların yüzde olarak dağılımı

Sekresyon yeri	% Ejakülat
Testisler	5 (0.2 ml)
Seminal Vezikül	45-80
Prostat	13-33
Bulboüretal bez	2-5

Semen örneği 2-7 günlük bir cinsel perhiz sonrası alınmalıdır. 1-2 hafta ara ile en az 2 sperm örneği alınmalıdır. İdeal semen toplama metodu masturbasyon ile temiz bir kutuya alınmasıdır. Semen örneği toplandıktan sonra bir saat içinde incelenmelidir. Standart semen analizinin değerlendirilmesinde Dünya Sağlık Örgütü'nün belirlediği en düşük sınır değerler aşağıda gösterilmiştir [99].

- Volüm: 1.5 ml
- Sperm konsantrasyonu: 15 milyon spermatozoa/ml
- Total sperm sayısı: 39 milyon spermatozoa/ejakülat
- Morfoloji: %4 normal morfoloji
- İleri hareketli sperm oranı: %32
- Total hareketli sperm oranı: %40

Semen volümü için en düşük referans limit değeri 1.5 ml'dir [99]. Azoospermi ve oligozoospermi ile birlikte düşük semen volümü genital trakt obstrüksiyonunu gösterir.

Sperm motilitesi mikroskopik olarak değerlendirilir ve progresif motil, nonprogresif motil, ve immotil olarak sınıflandırılır. Spermatozoaların en az %40'ı motil olmalı ve en az %32'si progresif motil olmalıdır.

Semen anormalliklerinin tanımları;

- Aspermia: Ejakülatın olmaması
- Hematospermia: Ejakülatta kan olması
- Lökositospermia: Ejakülatta beyaz küre olması
- Hipospermia: Ejakülat volümünün <1 ml olması
- Hiperspermia: Ejakülat volümü >6 ml.
- Azoospermia: Ejakülatta sperm olmaması
- Oligozoospermia: <15 x 10⁶ sperm /ml olması
- Polizoospermia: >250 x 10⁶ sperm /ml olması
- Asthenozoospermia: Zayıf motilite ve/veya ileri doğru hareketlilik olması.
- Teratozoospermia: Normal şekilli sperm yüzdesinin azalmış olması (<% 14 Kruger)
- Nekrozoospermia: Supravital boyama ile tüm spermilerin ölü olması.
- Globozoospermia: Yuvarlak başlı akrozomsuz sperm olması

Standart semen analizi tanımlayıcı bilgiler sağlamakla birlikte her zaman fertil ve infertil erkeğin ayrımını sağlayamamaktadır.

Sperm Fonksiyon Testleri

Bilgisayar yardımlı sperm analizi: CASA (computer assisted sperm analysis), açıklanamayan infertilite grubundaki erkeklerde sperm hareket karakteristiklerini, in vivo ve in vitro fertilizasyon kapasitesini öngörmede kullanışlı bir yöntemdir. Sperm konsantrasyonunun, motilitesinin ve morfolojisinin değerlendirilmesinde kullanılabilir [100].

Akrozom Reaksiyonu: Akrozom, proteolitik enzimler içeren ve sperm ön bölgesinde bulunan, zona pellusida penetrasyonu için gerekli yapıdır. Akrozom içerisindeki proteolitik enzimler zona pellusidayı sindirirler ve sperm-oolemma füzyonunu sağlarlar. Bu süreçte meydana gelen bir bozukluk infertilite ile sonuçlanabilir. İnfertil erkeklerde spontan akrozom reaksiyonu kaybında bir artış görülür [47].

Zona-free hamster oosit penetrasyon testi: İn vivo ve in vitro fertilizasyon başarısını öngörmede kullanılır [101]. Test, zona pellusidası soyulmuş hamster oositini spermın penetre etme yeteneğinin izlemi esasına dayanır. Spermatozoanın kapasitasyonu, akrozom reaksiyonu, oolemmayı penetre etme yeteneğini ve oositle füzyonunu değerlendirir.

Human zona pellusida binding test: Spermatozoanın zona pellusidaya, ZP3 reseptörü ile bağlanması akrozom reaksiyonunu tetikler [102]. Hemizona assay ve sperm-zona bağlanma oranı olmak üzere zona pellusidaya bağlanmayı test eden iki test vardır.

Hemizona assay testi ile insan oosit dokusundan ayrılmış zona kullanılarak spermın zona pellusidaya bağlanması test edilir [47].

Spermatozoa DNA hasar testleri: Oksidatif stresin spermatozoa üzerindeki etkisi DNA (deoksiribonükleik asit) hasarı ve apoptozisin monitörizasyonu ile değerlendirilebilir [103]. İnfertil erkeklerde spermatozoa DNA hasarı daha fazla görülmektedir. Sperm DNA'sının flow sitometrik incelenmesi ile matür haploid ve matür anormal diploid spermatozoalar, hücresel fragmanlar ve immatür germ hücreleri birbirinden ayrılabilir [104]. TUNEL (terminal deoksinükleotidil transferaz-mediated deoksiuridin trifosfat-dUTP nick end-labeling) veya DNA

oksidasyonu ile DNA hasarı direkt olarak değerlendirilebilir. İndirekt olarak ise SCSA (sperm chromatin structure assay) ile değerlendirilebilir. Erkek germ hücrelerinde DNA hasarı kötü semen kalitesi, preimplantasyonel gelişimde bozulma, abortus riskinde artma ve infertilite ile ilişkilidir [103].

Genetik Testler

Seks Kromozom ve Genetik Mutasyonlar: İnfertil erkeklerin yaklaşık %10-18 inde Y kromozomu mikrolelesyonu vardır. AZFa veya AZFb bölgelerinin komplet delesyonu azoospermi ve Sertoli Cell Only Sendromuna neden olur. Bu bölgelerin parsiyel delesyonu veya AZFc bölgesinin komplet delesyonu hipospermatogenezisten Sertoli Cell Only Sendroma kadar değişik fenotiplere neden olur ve ciddi oligozoospermi veya azoospermi ile prezente olur. Bu delesyonlar sperm konsantrasyonu 5milyon/ml nin üstünde olan erkeklerde nadir görülürler [105]. Genetik tanı önemlidir çünkü; testislerden derive edilmiş spermatozoalarla İCSİ (intrastoplazmik sperm injeksiyonu) AZFa veya AZFb bölgelerinin komplet delesyonlarında mümkün olmamaktadır. Y kromozomu mikrolelesyonları babadan oğula İCSİ ile geçebilir [106]. Sperm konsantrasyonu 10 milyon/ml'den düşük olan infertil erkeklerde rutin karyotip önerilmektedir [107]. Y kromozom delesyonları ciddi oligozoospermi ve azoospermi varsa önerilmektedir.

Endokrin Testler

İnfertil erkeğin endokrin değerlendirmesinde serum testosteron, LH ve FSH seviyeleri ölçülmelidir [108]. Serum testosteron konsantrasyonu düşükken, serum FSH ve LH konsantrasyonu yüksekse primer hipogonadizm tanısı konulur, düşük veya normale sekonder hipogonadizm tanısı konulur. Sperm sayısı ve serum LH konsantrasyonu düşük olan erkeklerde eksojen anabolik veya androjenik steroidlerin kullanımı düşünülmelidir. Düşük serum testosteron konsantrasyonu ve normal veya düşük serum LH konsantrasyonu olan erkeklerde ise serum prolaktin düzeyi ölçülmelidir.

Obstrüktif Azoospermi

Eğer hastada normal testiküler volüm varsa, normal serum FSH, LH ve testosteron düzeyi varsa ve azoospermi mevcutsa obstrüktif azoospermiden şüphe edilmelidir.

2.5. AÇIKLANAMAYAN İNFERTİLİTE

İnfertil çiftlerde gösterilebilir bir neden bulunamaz ise açıklanamayan infertilite olarak tanımlanır [80]. Bu hastalarda; ovulasyonun objektif kanıtları, bilateral tubal açıklık ve normal uterin kavitenin varlığı, semen analizinin normal olduğu ve yeterli overyan rezervin olduğu gösterilmelidir. Nedeni açıklanamayan infertilite, normal reproduktif dağılımın alt sınırını veya standart değerlendirme metodları ile tanısı konulamayan sperm veya oosit fonksiyon anormalliklerini, fertilizasyon veya implantasyon bozukluklarını içerir.

Açıklanamayan infertiliteye sahip çiftlerin yönetimi etkinlik, maliyet dikkate alınarak bireyselleştirilmelidir. Tedavi ampiriktir ve belirli zamanda karşılaşılan sperm ve oosit sayısını artırmaya yöneliktir. Açıklanamayan infertilite için ampirik tedavide ilk basamakta üç siklus klomifen ve İÜİ tedavisi ile başlanır. Eğer gebelik elde edilemez ise üç siklus gonadotropin ve İÜİ tedavisi, eğer yine gebelik elde edilemez ise İVF önerilir. Açıklanamayan infertilitede uygulanan tedavi seçenekleri ve siklus başına gebelik oranları tablo 8’de gösterilmiştir [109]. Gebelik olasılığı artan kadın yaşı ve infertilite süresiyle ters orantılıdır. Tedavi planlanmadan önce çiftlerin yaşı, infertilite süresi, daha önceki gebelikleri göz önüne alınmalıdır.

Tablo 8. Açıklanamayan infertilitede uygulanan tedavi seçenekleri ve siklus başına gebelik oranları

Uygulama	Siklus başına gebelik oranı
İzlem	%1-3
İÜİ	%4-6
Klomifen Sitrat	%4-6
Klomifen+İÜİ	%7-9
Gonodotropin injeksiyonu	%4-10
Gonodotropin+İÜİ	%9-16
İVF	%20-40

Genel olarak spesifik bir fertilite tedavisi 3 siklus sonunda gebelik ile sonuçlanmaz ise alternatif tedaviler değerlendirilmelidir [110].

Expectant Yönetim: Açıklanamayan infertilitesi olan ve aktif tedavi uygulanmayan çiftlerin her ay %1-3'ü gebelik elde etmektedirler [111]. İzlem yönetiminde kadın yaşı gebelik oranlarıyla yakından ilişkilidir. Bu nedenle açıklanamayan infertilitesi olan çiftlerde kadın yaşı 32'den küçük olduğunda expectant yönetim bir seçenek olabilir.

Sigara içmek, anormal vücut kitle indeksi, aşırı kafein ve alkol tüketimi, fertilitiyi azaltabilmektedir. Hayat tarzı değişiklikleri ile bu faktörlerin kontrol altına alınması açıklanamayan infertilitesi olan çiftlerde fertilitiyi olumlu etkiler [112].

Intrauterin İnseminasyon: İÜİ ile amaçlanan konsantre edilmiş çok sayıda spermin küçük bir katater yardımıyla uterus içine enjeksiyonudur. FSH tedavisinde ise multiple foliküler gelişim ve ovulasyon amaçlanmaktadır.

Açıklanamayan infertilitesi olan çiftlerde sadece IUI tedavisi ile siklus başına gebelik oranı yaklaşık %5'dir ve bu oran expectant yönetimden yüksektir [113].

Klomifen Sitrat: Açıklanamayan infertilitede tek başına klomifen sitrat tedavisi ile ilgili veriler çok açık olmamakla birlikte siklus başına gebelik oranları yaklaşık %4-6'dır.

Klomifen Sitrat ve İÜİ: Klomifen sitrat ve İÜİ kombine edildiğinde siklus başına gebelik oranı yaklaşık %7-9 olmaktadır.

Gonadotropin Tedavisi ve İÜİ: Gonadotropin tedavisi ve İÜİ birlikte uygulandığında tek başlarına uygulandıklarına göre daha etkilidir siklus başına gebelik oranları yaklaşık %9-16'dır [5, 114]. Açıklanamayan infertilitesi olan kadınların gonadotropinlerle tedavisinde ana komplikasyonlar çoğul gebelik ve OHSS (overyan hiperstimülasyon sendromu)'dir. Çoğul gebelik riski %14-39 arasındadır [115]. Gonadotropin tedavisi ve İÜİ 3 siklus ile sınırlandırılmalıdır. Çünkü gebeliklerin çoğu ilk üç siklusda olmaktadır [116].

İn vitro fertilization: Kısa zaman aralığında siklus başına gebelik oranı en yüksek olan tedavidir [117].

2.6. İNTRAUTERİN İNSEMINASYON

İÜİ özel yöntemler ile yıkanmış ve konsantre edilmiş motil spermlerin ovulasyon sırasında bir katater aracılığı ile direkt olarak uterin kavite içerisine verilmesi işlemidir.

İÜİ Endikasyonları;

- Ejakülatuar disfonksiyon(ciddi hipospadias, retrograd ejakülasyon, seksüel disfonksiyon ve impotans dahil)
- Ciddi vajinismus
- Servikal faktör infertilitesi
- Erkek faktör infertilitesi(oligozoospermi, astenozoospermi, düşük ejakülat volümü, sperm otoantikorları)
- Açıklanamayan infertilite
- Evre 1veya 2 endometriozis

İÜİ aktif servikal, intrauterin veya pelvik infeksiyon varlığında kontrendikedir. İÜİ sonrası kümülatif gebelik oranları %5-20 arasında değişmektedir. İnfertilite süresi uzun olduğunda, kadın yaşı 40'ın üzerinde olduğunda ve ciddi erkek faktörü olduğunda gebelik oranları düşük olmaktadır [118].

2.6.1. İÜİ Başarısını Etkileyen Faktörler

1) Semen Parametreleri: Sperm yoğunluğu, motilitesi ve morfolojisi infertil eş sperm ile yapılan İÜİ başarısını belirgin şekilde etkiler. Toplam hareketli sperm sayısı arttıkça İÜİ başarı olasılığı artar. İÜİ için yıkama sonrası minimum motil sperm sayısı tartışmalıdır [119]. Yıkama sonrası motil sperm sayısı 5 milyondan az olduğunda da gebelik ihtimali olmakla birlikte yıkama sonrası motil sperm sayısı 5-10 milyonun üzerinde olduğunda gebelik oranları daha yüksek olmaktadır [120]. Yıkama sonrası motil sperm sayısının 5 milyonun altında olduğu ciddi erkek faktörü olan hastalarda İCSİ sıklıkla gerekebilir. Toplam hareketli sperm sayısı 10milyon/ml eşik değeri üzerine çıktığında başarı olasılığı belirgin şekilde artmakta iken daha yüksek sayılar başarıyı daha fazla artırmamaktadır [121, 122].

2) Strict Sperm Morfolojisi: İÜİ başarısı morfolojik olarak normal sperm arttıkça artar. Morfolojik olarak normal sperm oranı %14 ve üzerinde ise İÜİ başarısı en yüksek, %4-14 arasında ise orta, %4'ün altında ise oldukça düşüktür [123].

3) Diğer Faktörler:İÜİ başarısı üzerinde kadın yaşı, ovulatuvar fonksiyon, uterin ve tubal faktörler de etkilidir. Kadın yaşı infertilite tedavisinde anahtar rol oynar ve kadın yaşı arttıkça başarı olasılığı düşer. Ovulatuvar bozukluğu olan ve ovulasyon indüksiyon uygulanan hastalarda, ovulasyon indüksiyonu İÜİ ile kombine

edildiğinde gebelik oranları daha yüksek olmaktadır [124]. İÜİ başarısı erkek ve tubal faktör birlikteliğinde belirgin olarak azalmaktadır.

2.6.2. Ampirik Overyan Stimülasyon

Erkek faktörüne bağlı infertilitede ekzojen gonodotropinler ile ampirik overyan stimülasyon İÜİ ile kombine edilebilir. İÜİ ovulasyon indüksiyonu ile kombine edildiğinde daha yüksek gebelik oranları elde edilir [113]. Kontrollü overyan hiperstimülasyonda klomifen sitrat standart ilk basamak tedavidir. Eğer başarısız olursa injektabl gonadotropinler ikinci basamak olarak kullanılır [125]. Overyan rezervi azalmış ileri yaştaki hastalarda injektabl gonadotropinler ilk basamak olarak başlanabilir.

2.6.3. İÜİ için Sperm Hazırlama Teknikleri

Semen toplanması için en uygun zaman 2-3 günlük cinsel perhiz sonrası işlem sabahıdır. Ejakülat steril bir kaba toplanır. Lubrikanların çoğu sperm üzerine toksik etki gösterdiği için kullanılmaması önerilir [126]. İnseminasyon öncesi spermi prostoglandinlerden, hücresel debrislerden arındırmak ve motil spermleri konsantre hale getirmek için ejakülatın hazırlanmasının kritik önemi vardır. Swim up ve dansite gradiyent santrifügasyon olmak üzere yaygın olarak kullanılan iki sperm hazırlama tekniği vardır.

Swim-up yöntemi: İÜİ öncesi sperm hazırlamada en sık kullanılan yöntemdir. Bu tekniğin esasını; belli bir solüsyon içine konan sperm örneğinde iyi kalite, motilitesi iyi spermlerin yüzerek yüzeye çıkması oluşturur. Bir ml sperm örneği tüp içine konur, üzerine 4ml kültür solüsyonu konup karıştırılır, daha sonra 500g'de 10 dakika santrifüj edip süpernatant atılır. Karışım başka bir 4ml kültür solüsyonu içine konur. Tekrar 250g'de 5 dakika santrifüj edilir. 1ml daha üst tabakaya kültür solüsyonu dikkatlice konup, test tüpü 45 derece eğimli olarak 37 °C'de 1 saat inkübe edilir. Sonuçta üstteki 500 µl solüsyon içinde toplanan hareketli ve kaliteli sperm kısmı alınıp temiz bir tüpe konur, inceleme ve İÜİ için hazırlanır. Kültür solüsyonu genelde earle media olup, bunun yanında Ham's F10, insan tübal sıvısı (HTF) da kullanılabilir. Bu yöntemin yararları kolay uygulanabilir, ucuz, motilitesi yüksek olan (çoğu >%90'de) temiz bir örnek elde edilebilmesidir. Dezavantajları ise sadece

sperm sayı ve motilitesi iyi olan örnekler için kullanılabilir (20 x 10/ml sayı, motilite >%30 ise). Sperm sayısı zaten az ise önerilen bir metod değildir. Ayrıca işlem sonrası örnek hacmi azdır ve spermatozoa reaktif oksijen radikallerinden zarar görebilir [127]. Konvansiyonel swim-up metodunun avantaj ve dezavantajları tablo 9’da özetlenmiştir.

Tablo 9. Konvansiyonel swim-up metodunun avantaj ve dezavantajları [127]

Avantajları	Dezavantajları
• Uygulaması kolay	• Yüksek sperm sayısı ve hareketliliğine sahip ejakülate sınırlı
• Maliyeti uygun	• Verimi düşük
• Genellikle oldukça hareketli	• Spermatozoa reaktif oksijen radikalleri spermatozoalardan oluşan tarafından hasara uğrayabilir çok temiz bir örnek sağlar
• Normal kromatin yoğunluğuna sahip	spermatozoa yüzdesinde anlamlı azalma olur

Dansite gradient santrifüjasyon yöntemi: Bu yöntem için en sık kullanılan solüsyon Percoll solüsyonu idi ama toksisitesi nedeni ile bugün Percoll kullanılmamaktadır. Bunun yerine *SpermGrad*, *IxaPrep*, *Puresperm*, *Silselect*, *Isolate* vb ‘de kullanılabilir. Percoll PVP ile kaplanmış 15-30 nm çapındaki kolloidal silika partiküllerinden oluşmaktadır. Matür spermier solüsyondan daha yüksek gradiente sahip oldukları için alt tabakada toplanırken, immatür olanlar ise üst kısımda toplanacaktır. Gradient işlemi için sperm likefiye olması için 20 dakika süre ile bekletilir, 15ml’lik tüpte ejakülat volümüne eşdeğer olmak üzere yıkama sıvısı katılır (SpermRinse, GAMETE 100). 1800g’de 10 dakika santrifüj edilir, süpernatant atılır ve 0,5 ml yıkama çözeltisi pellete eklenerek tekrar karıştırılır. Sperm konsantrasyonuna uygun gradient tabakaları (Sperm-Grad veya Percoll) 0,5 ml konarak hazırlanır. Bunun üzerine yıkanmış 0.5ml sperm konur 300g’de 20 dakika santrifüj edilir. Sonrasında dipte kalan pellet pasteur pipeti ile aspire edilir, üzerine 4ml yıkama solüsyonu konup 1800g’de 5 dakika santrifüj edilir. Sonrasında

süpernatant atılıp 4ml yıkama solüsyonu konur ve 5 dakika santrifüj edilip, süpernatant atılır ve pellet miktarına göre solüsyon katılıp işlem için hazır hale getirilir. Bu yöntem ile motilitesi iyi olan temiz sperm örneği elde edilir, ejakülatta az sayıda sperm olduğu durumda en uygun yöntemdir, örnekten lökositler büyük oranda elimine edilir, reaktif oksijen radikalleri azalır, elde edilen sperm örneği yeterlidir. Farklı solüsyonlar kullanılması nedeni ile biraz zaman kaybettirir, biraz pahalı bir yöntemdir, endotoksin riski vardır. Dansite gradient santrifügasyon yönteminin avantaj ve dezavantajları tablo 10'da özetlenmiştir [127].

Tablo 10. Dansite gradient santrifügasyon yönteminin avantaj ve dezavantajları

Avantajları	Dezavantajları
<ul style="list-style-type: none"> • Genellikle son derece hareketli spermatozoalardan oluşan temiz bir örnek sağlar • Çok düşük sperm yoğunluğuna sahip ejakülattan spermatozao elde edilebilir • Verimi iyidir • Lökositler büyük ölçüde temizlenir • Reaktif oksijen radikalleri önemli ölçüde azaltılır 	<ul style="list-style-type: none"> • Biraz pahalıdır • Endotoksin riski • Percoll spermatozoa için toksik olabilir

2.6.4. İÜİ Zamanlaması

Başarı şansının en yüksek olması için İÜİ spontan ovulasyon veya indüklenmiş ovulasyon zamanı ile aynı zamanda yapılmaya çalışılmalıdır. Normalde sperm kadın genital sisteminde fertilizasyon yeteneğini koruyarak 72 saat kalır. Oosit ise 12-24 saat fertilizasyon yeteneğini koruyabilir. Cinsel ilişki ovulasyondan bir gün önce veya sonra ise konsepsiyon olasılığı artar. Doğal veya stimüle sikluslarda İÜİ zamanının en iyi tespiti beklenen ovulasyondan 3 gün önce başlanan üriner LH monitörizasyonu ile olur. LH artışından bir gün sonra İÜİ yapılması önerilir. İnjektabl gonadotropin tedavisine yanıt transvajinal ultrasonografi ile takip edilir ve folikül boyutu 15-18 mm'ye ulaştığında ovulasyonu tetiklemek için 5000-10000

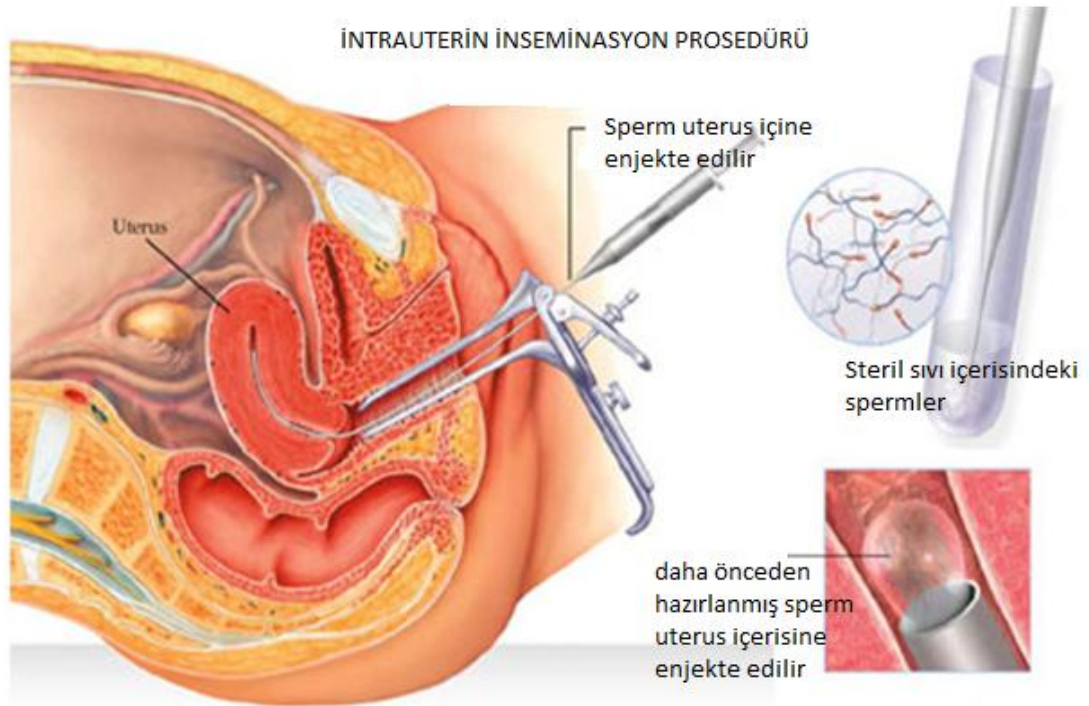
ünite insan koryonik gonadotropin subkutan veya intramusküler olarak yapılır. Ovulasyon hCG ile uyarıldığında İÜİ 36 saat sonra yapılmalıdır [128].

2.6.5. İnseminasyon Kateterleri

İÜİ’da kullanılan flexible veya sert kateterler arasında gebelik ve canlı doğum oranları açısından fark bulunamamıştır [129].

2.6.6. İntra Uterin İnseminasyon Uygulaması

Intrauterin inseminasyon için gerekli ekipmanlar; hazırlanmış sperm, spekulum, 1cc’lik steril enjektör ve inseminasyon kateteridir. İşlem öncesi antibiyotik profilaksisi gerekmez. Serviksi temizlemek için povidon iyot kullanılmamalıdır çünkü sperm üzerine toksik etki gösterir. Sperm hazırlandıktan sonra inseminasyona kadar vücut sıcaklığında saklanmalıdır.



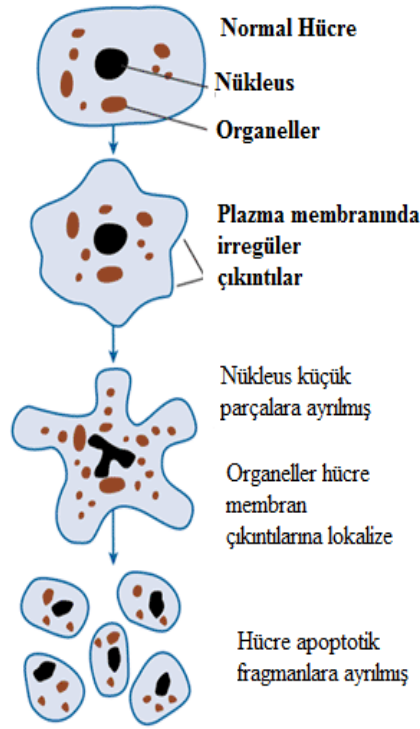
Şekil 5. İntrauterin inseminasyon prosedürünün şematik görünümü

Hasta dorsolitotomi pozisyonunda yattıktan sonra serviksi vizualize etmek için spekülum kullanılır. Kateterin uç kısmının tıkanmaması için servikal mukus

temizlenir. Hazırlanmış sperm 1 cc'lik steril enjektöre alındıktan sonra inseminasyon kateteri takılır. Uç kısmına değmeden kateterin ucu servikal kanala yerleştirilir ve yavaşça uterin kavite içine ilerletilir. Kateterin uterin fundusa değmemesine çalışılır. Çünkü bu uterin kramplara, bazı hastalarda endometriumun hasarına ve embriyo gelişimi üzerine toksik etkiye neden olabilir. Sperm yavaşça uterin kavite içine enjekte edilir ve kateter yavaşça geri çekilir. Sperm enjeksiyonundan sonra hastanın supin pozisyonda veya ters trendelenburg pozisyonunda yaklaşık 10 dakika kalması önerilir. Bununla ilgili verilerin kısıtlı olmasına rağmen yapılan bir randomize çalışmada işlem sonrası hemen mobilizasyona göre daha yüksek gebelik oranları bulunmuştur [130]. İnseminasyon sonrası hasta normal aktivitesine dönebilir. İÜİ ile ilgili komplikasyonlar nadir olmakla birlikte vajinal kanama, infeksiyon, uterin kramplara bağlı alt abdominal rahatsızlık görülebilen komplikasyonlardır.

2.7. SPERMATOGENEZ VE APOPTOZ

Apoptozis ve nekroz hücre ölümünün iki farklı formudur. Nekroz bir travma sonucu meydana gelir, oluşturduğu inflamatuvar yanıt ile çok sayıda hücreyi etkiler, hücrenin şişmesine ve membran rüptürüne neden olur [131]. Apoptozis veya programlı hücre ölümü, inflamatuvar bir cevap ortaya çıkarmadan hücrenin dokudan temizlendiği, bir dizi morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerle karakterize olan hücre ölümünün özel bir formudur [132]. Bu değişiklikler, kromatin yoğunlaşması ve fragmantasyonu, sitoplazmik organellerin yoğunlaşması, mitokondriden sitokrom c'nin salınması, reaktif oksijen radikallerinin üretimi, endoplazmik retikulumun dilatasyonu ve hücre volümünün azalmasıdır [133]. Daha sonra hücre apoptotik parçalara ayrılır ve bu parçalar makrofajlar tarafından temizlenir.

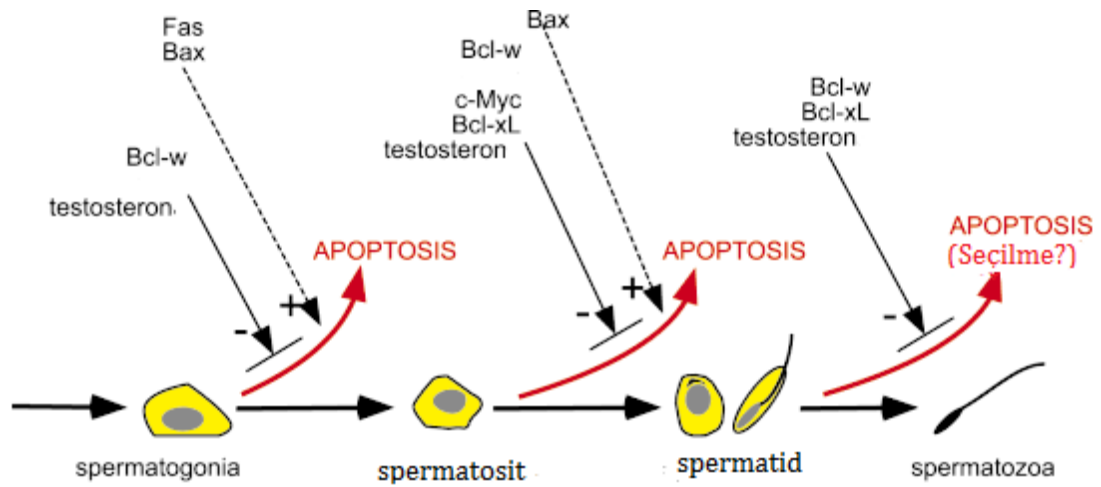


Şekil 6. Apoptozun şematik görünümü

Ekstrinsik ve intrinsik olmak üzere iki farklı ana apoptotik yolak vardır. Diğer ilave yolaklar ise apoptozu granzim A/B yoluyla indükleyen perforin/granzim yolağı ve genotoksik ve nongenotoksik stres ile indüklenen P53 yolağıdır [134]. Büyüme faktörleri düzeyinde geri çekilme, DNA hasarı, Fas ligand bağlanması, kemoterapötik ilaçlara maruziyet gibi apoptozisi tetikleyen birçok faktör bilinmektedir. Bu tetikleyicilerin hepsi apoptozla sonuçlanan kaspaz sistemini aktive ederler. Bazı genler apoptozisin başlangıç fazını kontrol ederler. Örneğin Bcl gen ailesi hücreleri apoptozise karşı korurken, bax gen ailesi bunun tersi yönde etki gösterir. Kaspaz ailesi proteazlarının aktivasyonu hücre proteinlerinde yıkılma ile sonuçlanır [135].

Apoptoz birçok fizyolojik ve patolojik süreçte rol oynar. Spermatogenezis, spermatogoniaların mitotik bölünmesi, spermatositlerin mayotik bölünmesi, spermatidlerin morfolojik diferansiyasyonu ve maturasyonu ve sonuç olarak sperm formasyonunun oluşmasını içeren dinamik bir süreçtir [132]. Apoptozis normal spermatogenezis sürecinde genetik olarak defektif hücrelerin eliminasyonunda önemli rol alır. Diğer taraftan normal apoptozis sürecinde bozulmanın erkek

infertilitesi ile yakından ilişkili olduğu saptanmıştır. Normal spermatogenezisi olan hastalarla karşılaştırıldığında azospermi ve oligospermisi olan erkeklerin testiküler dokusunda apoptotik germ hücrelere daha çok rastlanması ve testiküler yetmezliği olan infertil hastaların testiküler biyopsisinde daha yüksek apoptozis oranları görülmesi bunu desteklemektedir [136]. Defektif germ hücrelerin apoptozis ile seçilmesinde meydana gelen bir yetersizlik semende anormal sperm sayısında artışa ve fertilitede azalmaya yol açmaktadır. İnfertil erkeklerin ejakulatlarında apoptotik sperm oranları daha yüksek bulunmaktadır [131].

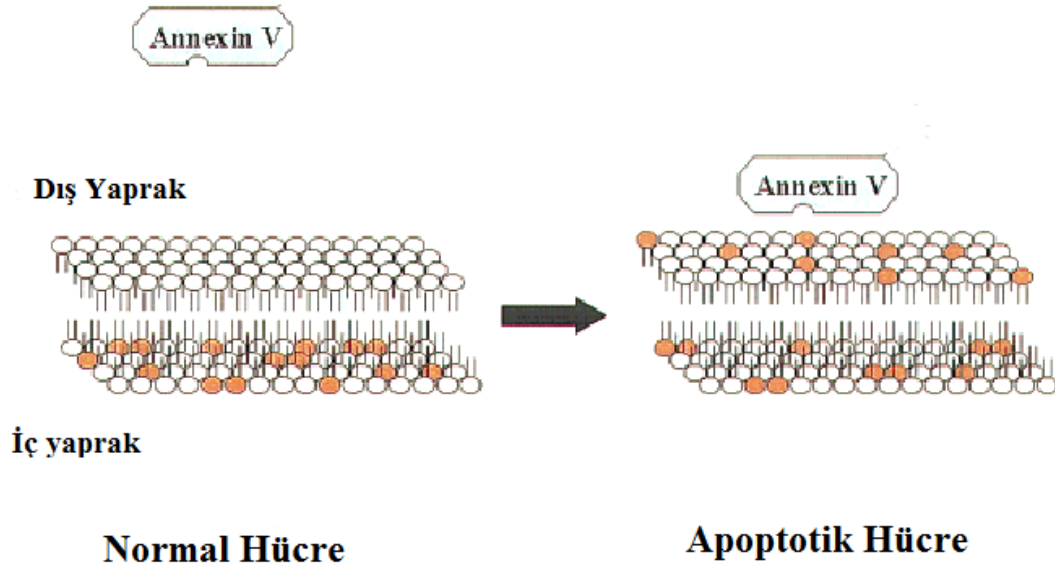


Şekil 7. Erişkinde spermatogenezis sürecinde germ hücre apoptozisi

Spermatogenezis sürecinde germ hücre apoptozisi devam etmektedir ve hasarlı hücreler seçilmektedir. Çeşitli sinyaller germ hücre apoptozisini regüle etmektedir.(+) ile gösterilen sinyaller apoptozisi uyarırken (-) ile gösterilen sinyaller tersi yönde etki etmektedir [137].

Canlı hücreler plazma membranının iç ve dış yaprakları arasında değişik fosfolipidlerin asimetrik dağılımını sürdürmek zorundadırlar [135]. Apoptozun erken evresinin biyokimyasal özelliği fosfatidilserinin plazma membranının iç tabakasından dış tabakasına translokasyonu ve bunun kaspaz kaskadını (apoptozis spesifik proteazlar) aktive ederek apoptozu başlatmasıdır [134]. Fosfatidilserin normalde sperm plazma membranının iç yüzünde bulunur ve bunun plazma membranının dış yüzüne translokasyonu sperm hücrelerinde apoptozisin erken bir bulgusudur [136]. Fosfatidilserinin hücre membranının iç yüzünden dış yüzüne translokasyonu apoptotik hücreyi fagositik hücrelere tanıtan ve komşu normal hücrelerden ayırt edilmesini sağlayan mekanizmadır [131].

Annexin V fosfotidilserine yüksek afinitesi olan kalsiyum bağımlı fosfolipid bağlayıcı proteindir ve sperm plazma membranına bağlanması apoptozisin erken bir bulgusudur [138].



Şekil 8. Annexin V apoptozis ilişkisi

Apoptozis sürecinde membran lipid asimetrisi bozulur. Fosfotidilserin (turuncu boyalı) hücre membranının iç yaprağından dış yaprağına transloke olur. Annexin V' in hücre membranı dış yaprağındaki fosfotidilserine yüksek afinite ile bağlanması apoptozisin erken bir bulgusudur [135]

Klinik pratikte fertilité potansiyelinin öngörülmesinin geliştirilmesinde apoptotik markırlar gibi sperm fonksiyon markırları kullanılabilir. Konvansiyonel sperm analizi ile belirlenen sperm parametreleri apoptotik markırların flow sitometri ile ölçülmesinden daha subjektiftir [139]. Apoptotik markırlar spermatozoanın fertilizasyon yeteneğini ve viabilitesini değerlendirmede kullanılabilir. Bunlar fosfotidilserin eksternalizasyonu, mitokondriyal membran potansiyelinde azalma, kaspaz aktivitesinde artış ve DNA fragmentasyonudur [134, 140]. Ancak bunların klinik pratikteki prognostik güçleri halen belirsizdir [139]. Ancak bu markırlar infertil erkeklerden elde edilen ejakülatta fertil erkeklere göre daha yüksek oranda bulunmaktadır [141].

Daha önce yapılan çalışmalarda annexin V pozitif sperm popülasyonunun annexin V negatif sperm popülasyonuna göre morfolojik olarak daha üstün olduğu

gösterilmiştir [142]. Ancak bunun klinik kullanılabilirliği hakkında net bilgi bulunmamaktadır.

İnfertil çiftlerde, olumsuz yardımcı üreme teknikleri sonuçlarının bir bölümünden ejakülattaki apoptotik spermlerin sorumlu olabileceği düşünülerek bu çalışma planlanmıştır. Ejakülattaki preapoptotik spermler Annexin V kiti ile saptanabilmektedir. Sonuç olarak ejakülattaki preapoptotik sperm oranının annexin V ile saptanarak, bunun infertil çiftlerde tedavi başarısına etkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. BİREYLER

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Üreme Endokrinolojisi, İnfertilite Ünitesine başvuran ve açıklanamayan infertilite tanısı konularak rekombinant FSH ile Oİ ve İÜİ planlanan infertil çiftler araştırma kapsamına alınmıştır. Çalışmaya alınan bayan hastalarda aranan kriterler:

- Ovuluar düzenli siklusa sahip olmak
- Over rezervinin antral folikül sayımı ile yeterli olduğunun gösterilmesi
- Tubal patolojinin dışlanması için yapılan HSG'nin normal olması

Çalışmaya alınan erkek hastaların hepsi standart semen analizi ile değerlendirilmiş ve sperm konsantrasyonu > 15 milyon spermatozoa/ml olan hastalar araştırma kapsamına dahil edilmiştir. Semen parametreleri, World Health Organization (WHO) klavuzu olan 'Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction' a göre değerlendirilmiştir.

3.2. SPERM HAZIRLANMASI

İnseminasyon gününde, 2-6 gün koitus yasağı sonrasında sabah saat 09:00'da eş, sperm örneği vermek için androloji laboratuvarına çağrıldı. Mastürbasyon ile elde edilen sperm örneği özel steril plastik bir kaptan toplandı. Likefaksiyon için oda sıcaklığında 30 dakika bekledikten sonra değerlendirilmeye başlandı. Sperm örneğinin volümü, vizkositesi, motilitesi, sperm sayısı ve morfoloji WHO/Kruger kriterlerine göre değerlendirildi. Semen örneği DGS yönteminde, %80 ve %40'luk *Puresperm* ile semen kalitesini arttırmak için seminal sıvıdan ayrıştırıldı. En fazla 2 ml semen örneği, 1 ml %80 ve 1 ml %40 dansite gradient *Puresperm* içeren 15 ml'lik koni şeklinde tüpün içine kondu. Daha sonra 10 dakika 340g'de santrifüj edildi. Süpernatant atılıp kalan pellet 2 ml *Purewash* ile resüspanse edilip 5 dakika 340g'de santrifüj edildi. Sonrasında tekrar süpernatant atılıp 0,5 ml yıkama solüsyonu ile resüspanse edilip İÜİ için hazır hale getirildi. 20 dakika içinde İÜİ yapıldı. İÜİ yapıldıktan sonra örnek 37°C'de CO₂'li inkübatörde bekletildi. Yıkama öncesi ve sonrası elde edilen sperm örneğinden sperm sayısı, konsantrasyon, motilite, progresif motilite, morfoloji çalışmak için örnek alındı. Bu örnekler *Makler Chamber*

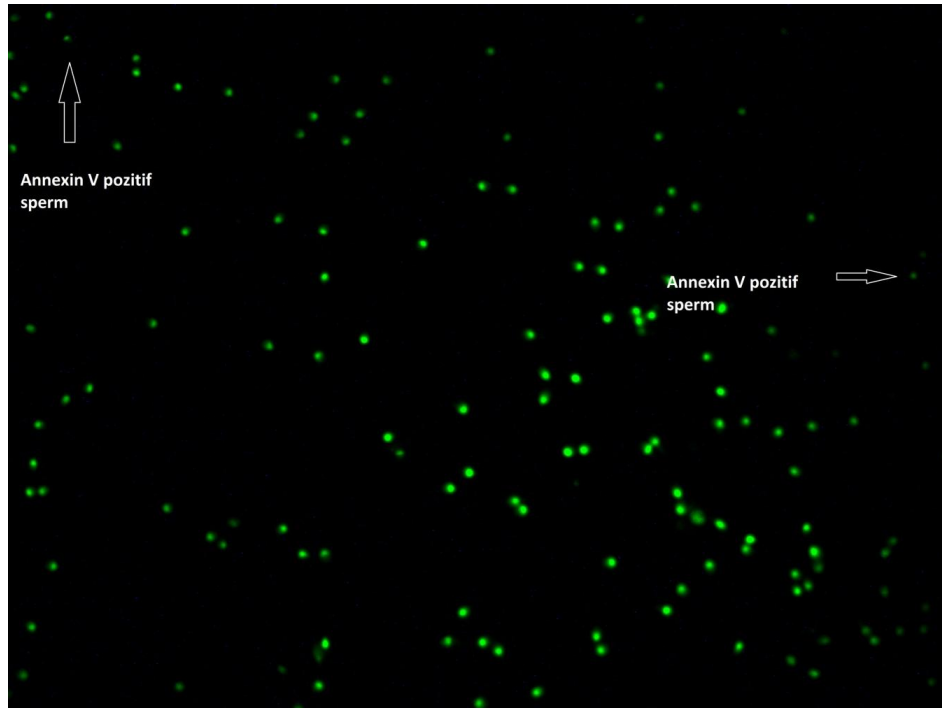
kullanılarak, mikroskop altında değerlendirildi. İlk gelen örnekte total ejakülat volümünden, (ml) x total motilite (%) x konsantrasyon (10^6 /ml) = 5-10 milyon motil sperm elde ediliyor ise İÜİ denemesi planlandı. Ayrıca yıkama sonrası elde edilen spermden Annexin V ile boyanma testi yapmak için örnek alındı. Morfoloji değerlendirilmesi için yıkama öncesi ve sonrası alınan örnekler lama yayıldı, *Diff-Quick* yöntemi ile boyandıktan sonra, tek kör tekniğine uygun olarak tek kişi tarafından Kruger/WHO kriterlerine göre değerlendirildi. 100 sperm sayılıp anormal olanların yüzdesi kaydedildi.

3.3. SPERM APOPTOZUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ (Annexin V ile Boyama ve Direkt İmmüfloresan)

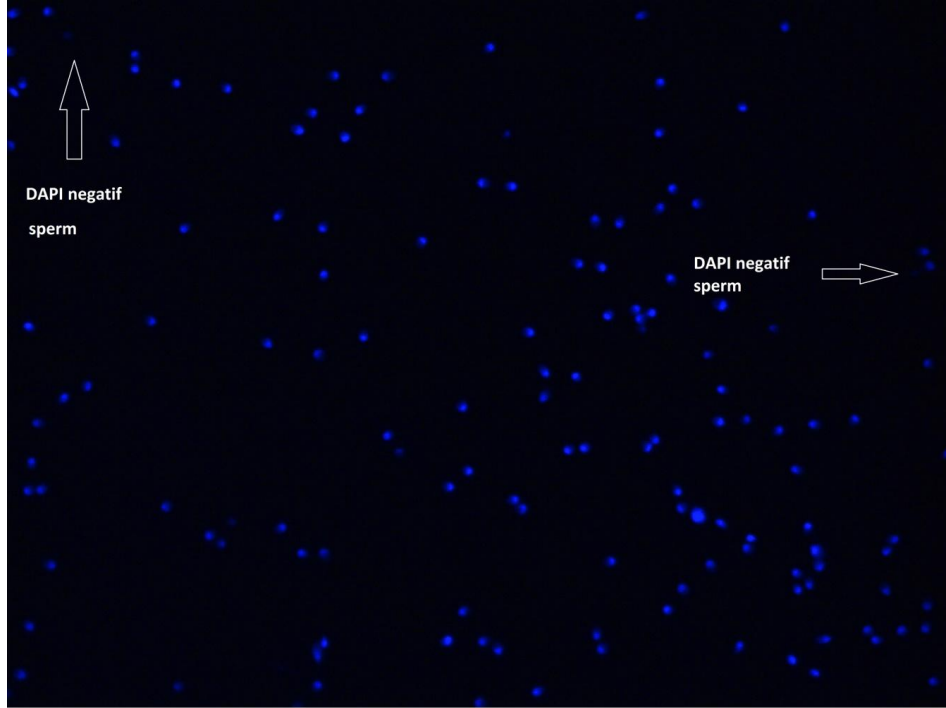
Apoptotik sperm hücreleri Annexin V- FITC Apoptoz Saptama Kiti (Santa Cruz Biotechnology) kullanılarak belirlendi. Apoptozun erken evrelerinde, sperm membranında fosfotidilserinin iç yapraktan dış yaprağa translokasyonu olmaktadır. Annexin V antikoru kalsiyum bağımlı fosfolipid bağlayıcı proteindir ve spesifik olarak eksternalize olmuş fosfotidilserin molekülüne bağlanmaktadır. Annexin V ile bağlı fosfotidilserinin vermiş olduğu floresans sperm apoptozu için markır olarak kullanılabilir. Fosfotidilserin eksternalizasyonu sadece apoptoza özgü değildir ve hücre nekrozu sırasında da olmaktadır. Hücre ölümünün bu iki formunun farkları; apoptozun başlangıç evrelerinde yani preapoptotik evrede hücre membranı ve nükleer membran intakt iken nekroz sırasında hücre membranı ve nükleer membran integritesini kaybeder. Bu nedenle nekrotik hücreler ile preapoptotik hücreleri ayırt etmek için DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate) çekirdek boyası kullanılmıştır. Nekrotik hücrelerde çekirdek membranı integritesini kaybettiği ve fosfotidilserin hücre membranında eksternalize olduğu için nekrotik hücreler annexin V ile pozitif boyanırken DAPI çekirdek boyası ile boyanmamaktadırlar (Annexin V +, DAPI -). Preapoptotik hücrelerde ise çekirdek membranı integritesini koruduğu için ve fosfotidilserin hücre membranında eksternalize olduğu için preapoptotik hücreler hem annexin V ile hem de DAPI çekirdek boyası ile pozitif boyanırlar (Annexin V +, DAPI +).

HTF (human tubal fluid) medyumunu ile yıkama sonrasında, spermatozoalar poly L- lizin kaplı lam üzerine yayıldı ve hazırlanan preparat oda sıcaklığında

kurumaya bırakıldı. Sonrasında 5 dakika aseton ile fikse edilen lamalar en az 30 dakika oda ısısında kurutuldu. Daha sonra hazırlanan preparat 60 dakika Annexin V (FL) FITC(fluorescein isothiocyanate) Antikorları (1:20 dilüsyon) (Cat. # 4252; Santa Cruz Biotechnology, CA) ile nemli ortamda inkübe edildi. 0.01M PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4) ile yıkanan lamalar DAPI çekirdek boyaması yapılarak, floresan kapatıcı solüsyon ile kapatıldı (Cat. # D9542; Sigma, St. Louis, MO). İmmünofloresan işaretli lamalar Leica DM6000B mikroskop (Wetzlar, Germany) ve DC490 dijital kamera (Leica) ile incelenerek fotoğraflandı. Her vakada 100 sperm sayıldı. Annexin V pozitivitesi yeşil-boyalı spermelerde izlendi. Annexin reaktivitesi olmayan ve DAPI pozitif spermeler ise mavi-boyalı olarak görüldü.

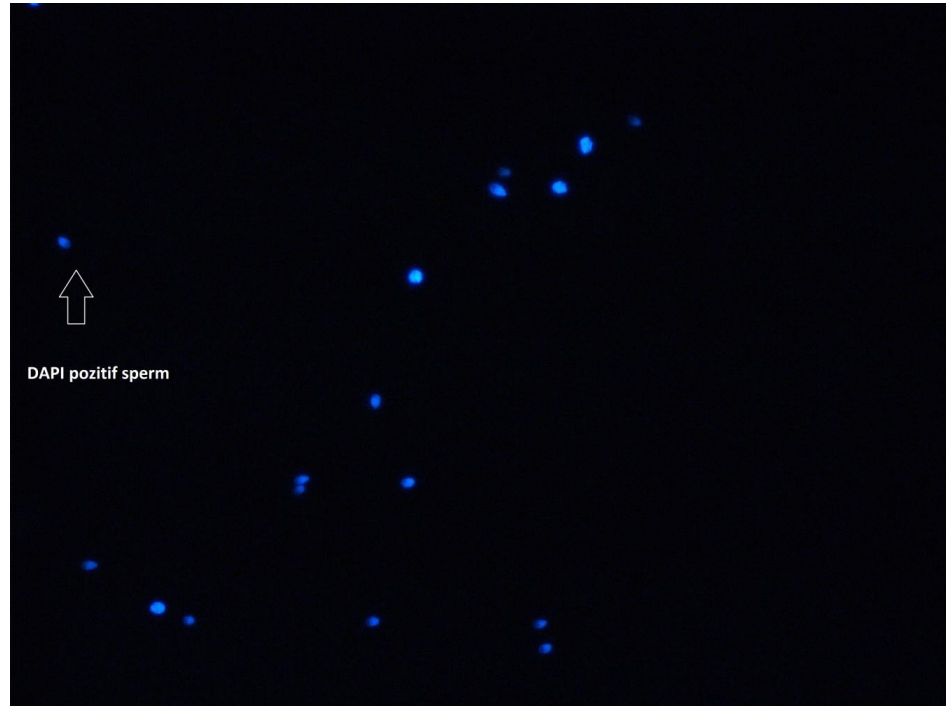


Resim 1A. Annexin V pozitif spermeler yeşil ile boyalı; bunlar preapoptotik veya nekrotik olabilir

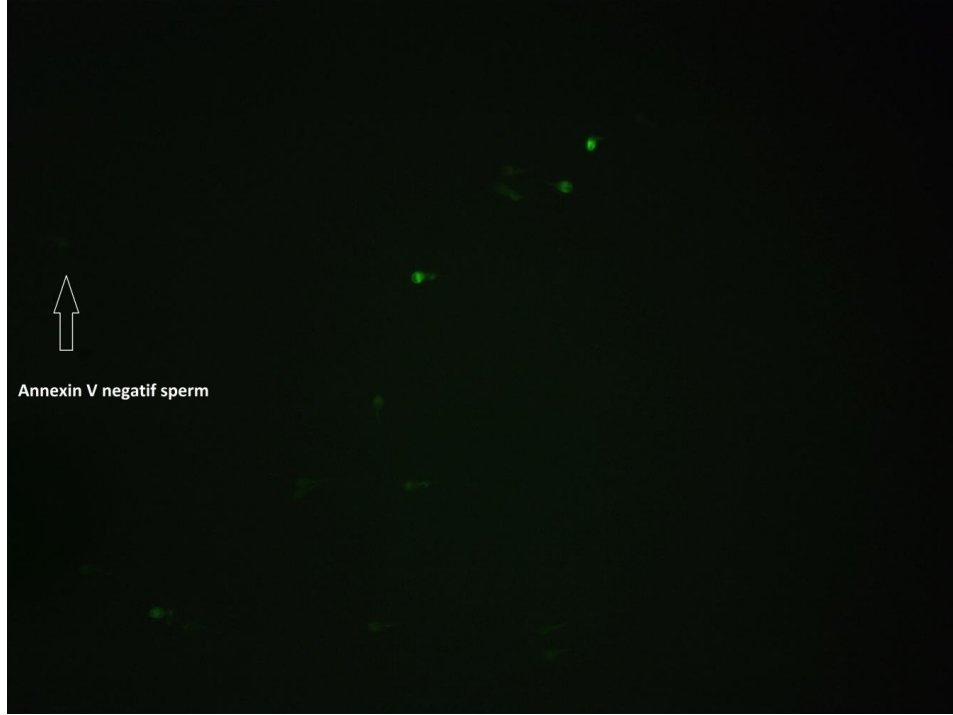


Resim 1B. DAPI ile boyalı spermeler mavi olarak görülmektedir

Resim 1 A'da annexin V pozitif boyalı olarak işaretli spermelerin resim 1B' de DAPI ile boyanmadıklarına dikkat ediniz. Bu spermelerin Annexin V pozitif ancak DAPI negatif nekrotik spermeler olduğu anlaşılmıştır. Resim1 A'da annexin V ile boyalı ve resim 1 B' de DAPI ile boyalı spermelerin preapoptotik olduğu saptanmıştır. DAPI pozitif boyanan ancak annexin V ile boyanmayan spermeler ise normal viabl spermelerdir.



Resim 2 A. DAPI pozitif spermeler mavi ile boyalı görülmektedir



Resim 2 B. Annexin V ile boyalı yeşil sperm

Resim 2 A'da DAPI pozitif boyalı olarak işaretli sperm resim 2 B 'de annexin V ile boyanmadığına dikkat ediniz. Bu sperm DAPI pozitif ancak annexin V negatif normal viabl sperm olarak saptanmıştır.

3.3. OVULASYON İNDÜKSİYONU VE İNTRAUTERİN İNSEMINASYON

Hastalara, bazal antral folikül sayısını saptamak için adet 2-4. günleri arası transvajinal ultrasonografi yapıldı ve antral folikül sayısına göre 75-150 İÜ rekombinant FSH içeren subkutan gonadotropin enjeksiyonu ile ovulasyon indüksiyonuna başlandı. Hastaların takibinde transvajinal ultrasonografi ve serum östradiol seviyesi ölçümü kullanıldı ve sonuçlara göre uygulanan gonadotropin dozu ayarlandı. Folikül boyutu 16-20 mm ye ulaştığında 10.000 İÜ hCG (insan koryonik gonadotropin) uygulanarak ovulasyon indüksiyonu sağlandı. hCG uygulaması sonrası 36-40. saatte intrauterin inseminasyon uygulaması yapıldı.

İnseminasyon işlemi steril şartlarda cook kateteri kullanılarak gerçekleştirildi. Hazırlanmış sperm örnekleri hasta dorsolitotomi pozisyonu aldıktan sonra inkübatörden çıkarılarak insülin enjektörü yardımı ile 0,5 ml olarak intrauterin kaviteye verildi. Tüm olguların inseminasyon işlemi sonrası 10-15 dakika odada dinlenmesi sağlandı. İnseminasyon sonrası olgulara 12. günde serum β -hCG testi uygulandı. Kliniğimizde kanda gebelik testi yaptıramayan çiftler evlerinden telefon

ile aranarak gebelik testi sonucu sorularak kaydedildi. β -hCG >2000 mIU/ml olanlar ve TVUSG değerlendirilmesinde kese izlenen olgular kesin gebelik olarak değerlendirildi.

3.4. DİĞER BİLGİLER

Araştırma Bölgesi: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite Ünitesi Sıhhiye, Ankara, Türkiye

Araştırma Tipi: Prospektif kohort çalışma

Araştırma grubu: Mart 2012- Aralık 2012 arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Üreme Endokrinolojisi, İnfertilite ve Androloji Ünitesi'ne başvuran hastalardan açıklanamayan infertilite tanısıyla gonadotropinler kullanılarak Oİ ve İÜİ uygulanacak olan tüm olgular araştırma kapsamına alınmıştır.

Araştırma Grubu Büyüklüğü: 94 infertil çift, 94 İÜİ siklusu değerlendirildi.

Bağımlı-bağımsız değişken: Bağımlı değişken: gebelik eldesi. Bağımsız değişkenler: kadın yaşı, erkek yaşı, infertilite süresi, sperm değişkenleri, Annexin V oranı

Araştırma Süresi: 10 ay

İstatistiksel yöntemler: Çalışmadan elde edilen tüm veriler SPSS – Statistical Package for Social Science- for Windows 11,5 programı kullanılarak kaydedildi. Gebelik elde edilen hastaların sonuçları gebelik elde edilemeyen hastaların sonuçları ile karşılaştırıldı. Kullanılan istatistiksel yöntemler student't test, mann whitney u test ve pearson ki kare, Fisher's exact testidir. P değeri <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sürekli değişkenler için normal dağılım testi yapıldı. Normal dağılmayan değişkenler için karekök dönüşümü yapıldı. Normal dağılım göstermeyen değişkenlerde gruplar arasındaki fark mann whitney u testi ile değerlendirildi.

4. BULGULAR

Araştırma grubuna ait demografik özellikler Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. Araştırma grubuna ait genel klinik özellikler. Ortalama değerler standart sapmaları ile birlikte verilmiştir

Toplam infertil çift sayısı	94
Toplam İÜİ siklus sayısı	94
İÜİ zamanında ortalama kadın yaşı	28.34±4.75(18-41)
İÜİ zamanında ortalama erkek yaşı	32.43±5.57(24-49)
Ortalama infertilite süresi(ay)	47.74±39.80(12-192)
İnfertilite tipi	
Primer	%75.5 (71)
Sekonder	%24.5 (23)
Sigara kullanımı	
Kadın	%23.4
Erkek	%47.9

Açıklanamayan infertilite nedeniyle rFSH kullanılarak ovulasyon indüksiyon ve İÜİ yapılan 94 hasta çalışmaya alınmıştır. Çalışmaya alınan kadınların ortalama yaşı 28.34±4.75, erkeklerin ortalama yaşları 32.43±5.57 olarak bulunmuştur. Araştırmaya alınan çiftlerde ortalama infertilite süresi 47.74±39.80 aydı ve çiftlerin %75.5’i primer infertil, %24.5’i sekonder infertildi. Kadın hastaların %23.4’ü, erkek hastaların ise %47.9’u düzenli olarak sigara kullanmaktaydı.

Araştırma grubuna ait erkeklerin yıkama öncesi ve yıkama sonrası spermogram değişkenleri Tablo 4.2’de verilmiştir.

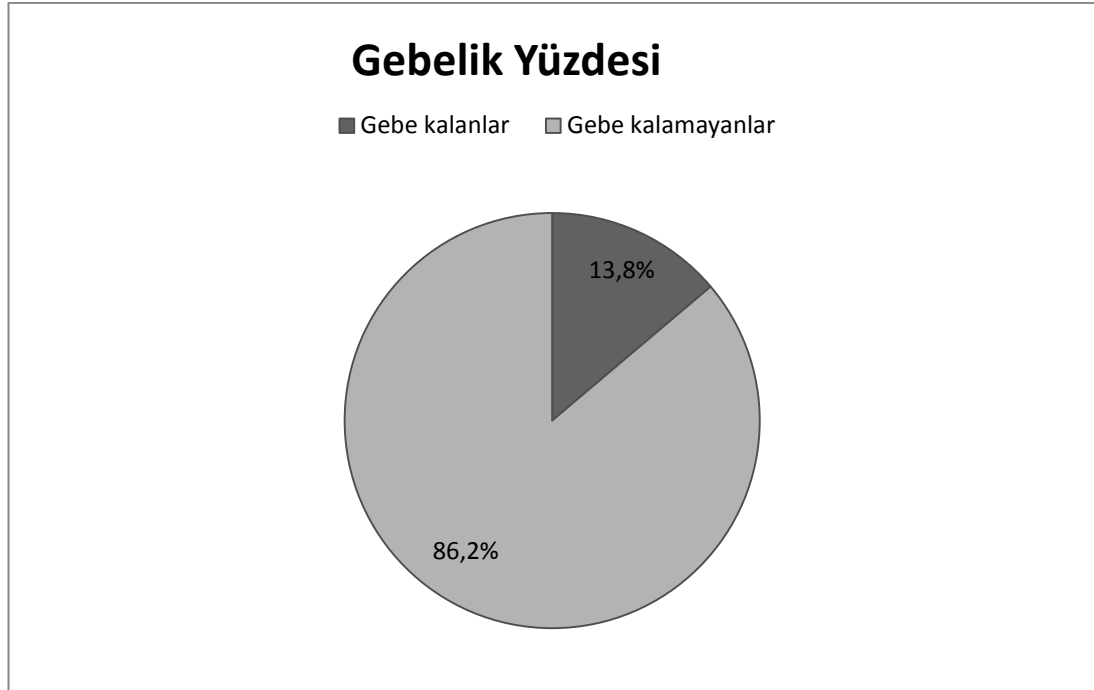
Tablo 4.2. Yıkama öncesi ve sonrası spermiogram değişkenlerinin ortalama değerleri

Ortalama sperm volümü (ml)	2.43±0.72(1.5-5.5)
Cinsel perhiz süresi (gün)	2.81±0.98(2-6)
Ortalama yuvarlak hücre sayısı (x10 ⁶ /ml)	1.1±1.1(0.3-7.2)
Ortalama yıkama öncesi sperm sayısı (x10 ⁶ /ml)	46.77±23.38(15-123)
Ortalama yıkama öncesi toplam motil sperm yüzdesi (%)	68.04±12.17(41-88)
Ortalama yıkama öncesi PHS yüzdesi (%)	57.22±13.41(21-85)
Ortalama yıkama öncesi PHSS (x10 ⁶ /ml)	26.68±15.40(7-89)
Ortalama yıkama sonrası sperm sayısı (x10 ⁶ /ml)	26.97±13.63(6-80)
Ortalama yıkama sonrası toplam motil sperm yüzdesi (%)	93.47±2.5(85-97)
Ortalama yıkama sonrası PHS yüzdesi (%)	87.42±4.52(68-95)
Ortalama yıkama sonrası PHSS (x10 ⁶ /ml)	23.79±12.44(5-70)
Ortalama yıkama öncesi morfoloji (%)	2.04±2,4(0-10)
Ortalama yıkama sonrası morfoloji (%)	3.60±3(0-16)

Ortalama değerler standart sapma değerleri ile birlikte verilmiştir. Parantez içerisinde minimum ve maksimum değerler yazılmıştır.

Araştırmaya alınan erkeklerin yıkama öncesi ortalama sperm sayısı 46.77 x10⁶/ml, yıkama öncesi ortalama PHSS 26.68 x10⁶/ml, yıkama öncesi ortalama morfoloji ise %2.04 olarak bulunmuştur. Yıkama sonrası ortalama sperm sayısı 26.68x10⁶/ml, yıkama sonrası ortalama PHSS 23.79x10⁶/ml, yıkama sonrası ortalama morfoloji %3.6 olarak bulunmuştur.

Araştırma grubundaki 94 hastanın intrauterin inseminasyon sonucu gebelik oranları %13.8 (n:13) olarak bulunmuştur ve Grafik 4.1’de gösterilmiştir.



Grafik 4.1. Araştırma grubuna ait intrauterin inseminasyon gebelik oranları

Araştırma grubunda gebe kalan olgular ile kalamayan olguların genel klinik özelliklerinin karşılaştırılması Tablo 4.3’de verilmiştir.

Tablo 4.3. Araştırma grubunda gebe kalan ve kalamayan olguların klinik özelliklerinin karşılaştırması

Genel özellikler	Gebe kalamayan olgular (n:81)	Gebe kalan olgular (n:13)	P
Kadın yaşı	28- 6.5	26- 7	0.054
Erkek yaşı	32- 6	32- 5.5	0.73
İnfertilite süresi (ay)	36- 36	30- 21	0.65

Kadın yaşı, erkek yaşı ve infertilite süresi normal dağılıma uyum göstermediği için parametrik olmayan mann whitney u test ile değerlendirildi. Değerler ortanca ve çeyrekler arası genişliği yansıtmaktadır.

Gebe kalan ve kalamayan olgularda ortalama erkek yaşı ve infertilite süresi arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Ortalama kadın yaşı gebe kalan grupta daha düşük saptanmıştır.

Primer infertil çiftler ile sekonder infertil çiftlerdeki gebelik oranları tablo 4.4'de gösterilmiştir.

Tablo 4.4. Primer infertil çiftlerde ve sekonder infertil çiftlerde gebelik oranları

	Primer İnfertil Çiftler n: 71	Sekonder İnfertil Çiftler n:23
Gebelik var	% 14.1(n:10)	% 13 (n:3)
Gebelik yok	%85.9 (n:61)	%87(n:20)

p=0.99

Araştırma grubunda gebe kalan olgular ile kalamayan olguların spermiogram parametrelerinin karşılaştırılması Tablo 4.5'de verilmiştir.

Tablo 4.5. Gebe kalan ve kalamayan olguların sperm parametreleri açısından karşılaştırılması.

Genel özellikler	Gebe kalamayan olgular (n:81)	Gebe kalan olgular (n:13)	P
Sperm volümü (ml)	2- 1	2- 0.5	0.80
Yıkama öncesi sperm sayısı (x10 ⁶ /ml)	41- 26.5	46- 30	0.26
Yıkama öncesi PHSS (x10 ⁶ /ml)	22- 16.5	31- 22.5	0.161
Yıkama sonrası sperm sayısı (x10 ⁶ /ml)	24- 13	30- 20	0.172
Yıkama sonrası PHSS (x10 ⁶ /ml)	21- 13	27- 18.5	0.20
Yıkama öncesi morfoloji (%)	1-3	1- 2	0.63
Yıkama sonrası morfoloji (%)	3- 5	3- 5.5	0.87

Sperm parametreleri normal dağılıma uyum göstermediği için parametrik olmayan mann whitney u test ile değerlendirildi. Değerler ortanca ve çeyrekler arası genişliği yansıtmaktadır.

Çalışmaya alınan hastalarda, gebe kalan ve kalamayan olgularda spermiogram parametreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır.

Araştırma grubuna dahil edilen subfertil erkeklerin semenlerinden yıkama sonrası alınan örnek annexin V ile boyanıp immünfloresan mikroskopta incelendi ve annexin V pozitif sperm oranı ortalama 20.03 ± 13.73 (1-70) olarak bulundu.

Araştırma grubunda gebe kalan olgular ile kalamayan olguların annexin V pozitif sperm yüzdesi Tablo 4.6'de verilmiştir.

Tablo 4.6. Gebe kalan ve kalamayan olguların ortalama annexin V pozitif sperm yüzdelerinin karşılaştırılması.

	Gebe kalamayan olgular (n:81)	Gebe kalan olgular (n:13)	p
Annexin V pozitif Sperm	%20.72(4.27±1.60)	%15.69(3.91±0.67)	0.17

Annexin V sperm oranı normal dağılmadığı için karekök dönüşümü yapıldı. Karekök dönüşüm değerleri parantez içerisinde belirtilmiştir.

Gebe kalan gruptaki hastaların sperm örneklerinde annexin V pozitif sperm oranı gebe kalamayan gruba göre daha düşük bulunmuştur ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Yapılan ROC analizinde en yüksek sensitivite (%70) ve spesifiteye (%46) sahip olan annexin V sperm yüzdesi 18.5 olarak saptanmıştır. (Eğri altında kalan alan =0.55, p=0.565, %95 CI(0.43-0.67)). Belirlenen %18.5 değeri esas alınarak hastalar iki gruba ayrılarak istatistiksel değerlendirme yapılmıştır. Bu değerlendirme Tablo 4.7'de yer almaktadır.

Tablo 4.7. Annexin V sperm yüzdesi \leq % 18.5 ve altında olan ve $>$ % 18.5 üzerinde olan hasta gruplarının gebelik yüzdeleri

Annexin V pozitif Sperm oranı	Gebe kalamayan olgular	Gebe kalan olgular	p
\leq % 18.5	44	9	0.314
$>$ % 18.5	37	4	

Araştırma grubundaki olgular annexin V pozitif sperm yüzdesi %18.5 eşik değeri alınarak gruplandırıldığında; %18.5 üzerinde annexin V pozitif sperm yüzdesine sahip olgularda gebelik oranı %9.8 iken, %18.5 ve altında olan hastalarda gebelik oranı %17 olarak bulunmuştur. Ancak gebelik oranındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,314$).

Tablo 4.8. Annexin V pozitif sperm yüzdesi \leq % 18.5 ve altında olan ve $>$ % 18.5 üzerinde olan hasta gruplarının yıkama sonrası sperm sayıları ve yıkama sonrası PHSS'lerinin karşılaştırılması

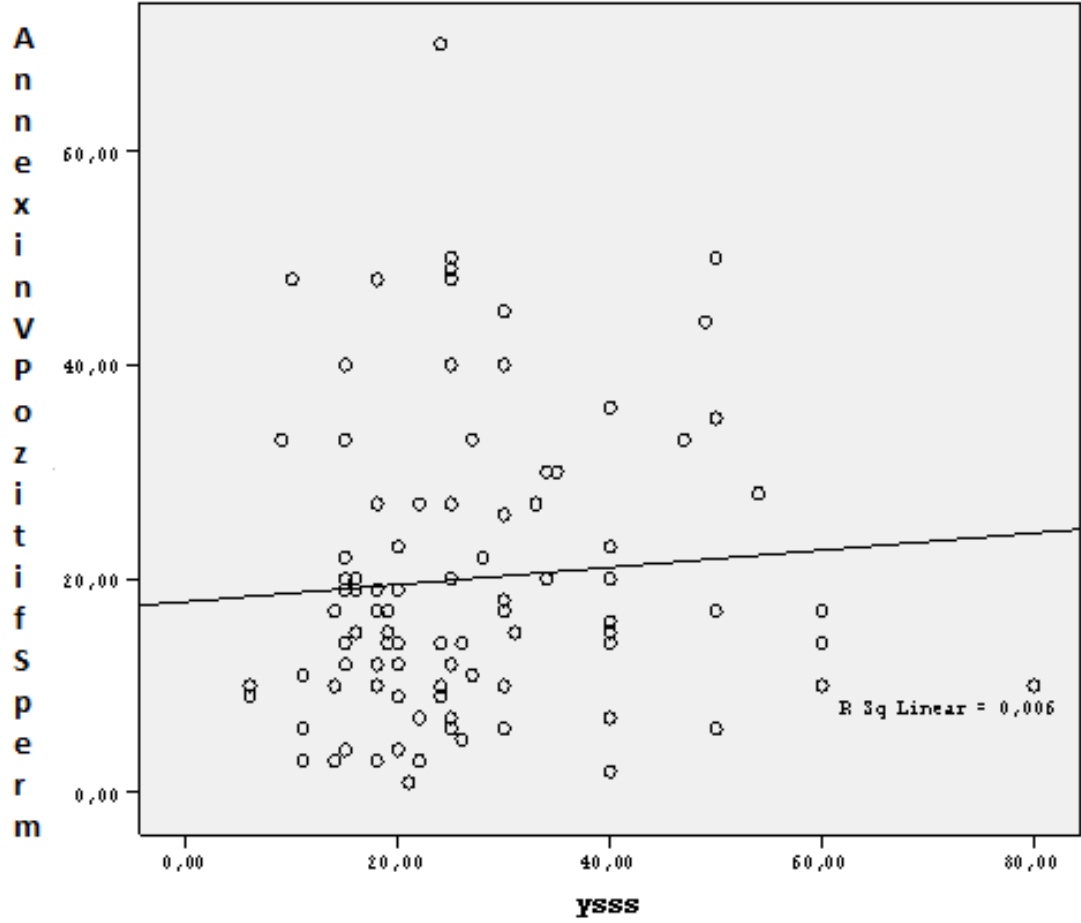
	Annexin V pozitif sperm yüzdesi \leq %18.5 n:53	Annexin V pozitif sperm yüzdesi $>$ %18.5 n:41	p
Yıkama sonrası sperm sayısı ($\times 10^6/ml$)	24- 12.5	25- 17	0.62
Yıkama sonrası PHSS ($\times 10^6/ml$)	20- 12.5	22- 16	0.60

Sperm parametreleri normal dağılıma uyum göstermediği için parametrik olmayan mann whitney u test ile değerlendirildi. Değerler ortanca ve çeyrekler arası genişliği yansıtmaktadır

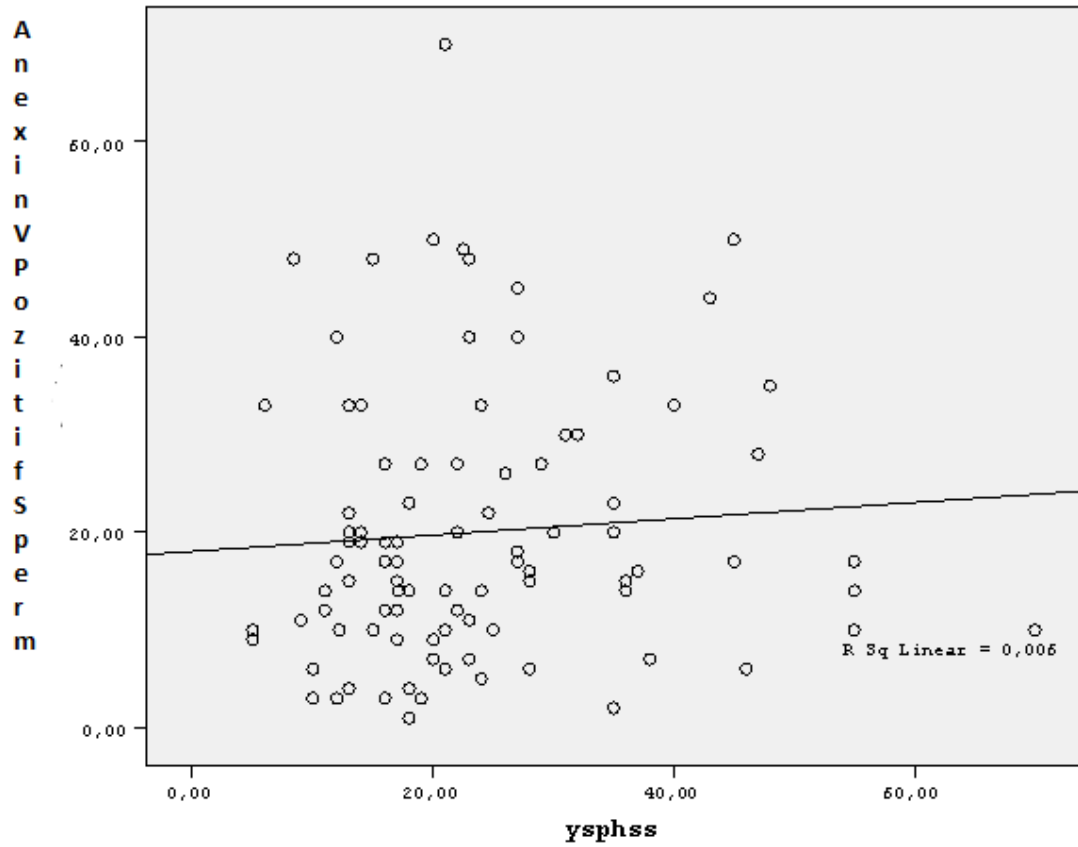
Annexin V pozitif sperm yüzdesi %18.5 ve altında olan grupta ortalama yıkama sonrası sperm sayısı $26.96 \pm 15.03 \times 10^6/ml$ ve yıkama sonrası PHSS $23.79 \pm 13.75 \times 10^6/ml$ iken, annexin V pozitif sperm oranı %18.5'in üzerinde olan grupta ortalama yıkama sonrası sperm sayısı $27 \pm 11.75 \times 10^6/ml$ ve yıkama sonrası PHSS $23.79 \pm 10.69 \times 10^6/ml$ olarak bulunmuştur ancak fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Annexin V pozitif sperm yüzdesi ile yıkama sonrası sperm sayısı arasındaki korelasyon katsayısı 0.08 iken, Annexin V pozitif sperm yüzdesi ile yıkama sonrası PHSS arasındaki korelasyon katsayısı 0.076 olarak bulunmuştur (Grafik 4.2 ve 4.3). Bulunan bu sonuçlar annexin V pozitif sperm yüzdesi ile yıkama sonrası sperm

sayısı ve yıkama sonrası PHSS arasında anlamlı bir korelasyon olmadığını göstermektedir.



Grafik 4.2. Yıkama sonrası sperm sayısı ile annexin V pozitif sperm yüzdesinin korelasyonunu gösteren grafik



Grafik 4.3. Yıkama sonrası PHSS ile annexin V pozitif sperm yüzdesi arası korelasyonu gösteren grafik

Tablo 4.9. Sigara içen ve içmeyen erkeklerin sperm örneklerinde annexin V pozitif sperm yüzdelerinin karşılaştırılması

	Sigara içenler n:45	Sigara içmeyenler n:49	p
Annexin V pozitif Sperm %	%21.62(4.33±1.70)	%18.57 (4.11±1,31)	0.473

Annexin V pozitif sperm oranı normal dağılmadığı için karekök dönüşümü yapıldı. Karekök dönüşüm değerleri parantez içerisinde belirtilmiştir.

Araştırma grubunda sigara içen erkeklerin ortalama annexin V pozitif sperm yüzdesi %21.62 iken, içmeyen erkeklerde %18.57 olarak bulunmuştur. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (p=0,473).

Tablo 4.10. Yıkama sonrası morfolojisi $<4\%$ olanlarda annexin V pozitif sperm oranı ile $\geq 4\%$ olanlarda annexin V pozitif sperm oranının karşılaştırılması

Yıkama Sonrası Morfoloji(%)	Annexin V pozitif sperm oranı	P
$<4\%$	%20.54 (4.26±1.55)	0.73
$\geq 4\%$	%19.36(4.15±1.47)	

Sürekli değişkenlerde normal dağılım testi yapıldı. Normal dağılmayan değişkenler için karekök dönüşümü yapıldı. Karekökü alınmış yüzde değerler fark açısından t test ile değerlendirildi. Karekökü alınmış yüzde değerler parantez içerisinde verilmiştir.

Yıkama sonrası sperm morfolojisi $<4\%$ olanlarda annexin V pozitif sperm oranı %20.54 iken, yıkama sonrası sperm morfolojisi $\geq 4\%$ olan hastalarda annexin V sperm oranı %19.36 olarak bulunmuştur ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Tablo 4.11. Erkek yaşı ile semedeki ortalama annexin V pozitif sperm oranı arasındaki ilişki

	40 yaş ve üzeri erkekler n: 11	40 yaş altı erkekler n:83	p
Annexin V Pozitif sperm oranı(%)	17-17	19-19	0,38

Değerler ortanca ve çeyrekler arası genişliği yansıtmaktadır.

Araştırma grubunda erkek yaşı 40 ve üzeri olan hasta grubunda semedeki ortalama annexin V sperm oranı %19.54±13.61 iken, erkek yaşı 40'ın altında olan hasta grubunda ortalama annexin V pozitif sperm oranı 23.72±14.71 olarak bulunmuştur. Annexin V pozitif sperm yüzdesi ile erkek yaşı arasındaki korelasyonu değerlendiren analizler sonucu korelasyon katsayısı 0.04 olarak saptanmıştır. Bu sonuç annexin V pozitif sperm yüzdesi ile erkek yaşı arasında korelasyon olmadığını göstermektedir.

5. TARTIŞMA

İnfertil çiftlerde **açıklanamayan infertilite** sıklığı %30'a kadar çıkabilmektedir. Çiftleri açıklanamayan infertilite olarak sınıflandırmak için semen analizinin normal olması, tubal açıklığın normal olması ve düzenli ovulatuvar menstrual siklusların bulunması gereken bazal kriterlerdir. Bu hastalarda etyolojiden rutin infertilite değerlendirmesi ile saptanamayan nedenler sorumlu olabilir. Açıklanamayan infertilite tanısı konulan hastalarda tedavisiz izlem ile siklus başına gebelik oranları %1-3 kadardır [109, 143]. Bu hastalarda düzeltilebilir bir anomali saptanamadığı için tedavide ampirik olmaktadır. Açıklanamayan infertiliteli hastalardaki tedavi opsiyonları intrauterin inseminasyon, klomifen sitrat veya eksojen gonadotropinlerle ovulasyon indüksiyon, intrauterin inseminasyon ve ovulasyon indüksiyonun kombinasyonu, ve yardımcı üreme teknikleridir (ART). Literatürde açıklanamayan infertilite nedeniyle KOH+İÜİ yapılan hastalarda siklus başına gebelik oranları %13-18 olarak bulunmuştur [143]. Bu çalışmada da gebelik oranları %13.8 olarak bulunmuştur.

Gebelik oranları **kadın yaşının** artması ile azalmaktadır. Kadın yaşı fertilitte üzerinde bağımsız bir risk faktörüdür. Kadın fertilitesi menopozun başlamasından yıllar önce regülatuar ovulatuvar sikluslar devam etmesine rağmen azalmaya başlar. Yapılan çalışmalarda artan kadın yaşı ile fertilitenin progresif olarak azaldığı saptanmıştır. 12 inseminasyon siklusuna kadar yapılan gözlemlerde kümülatif gebelik oranları 31 yaşından genç kadınlarda %74, 31-35 yaş arası kadınlarda %62, 35 yaşından büyük kadınlarda ise %54 olarak bulunmuştur. İVF embriyo transferi programlarında da ileri yaşın gebelik oranları üzerine benzer olumsuz etkisi bulunmuştur. Canlı doğum ile sonuçlanan embriyo transfer oranı kadın yaşı 35'in altında olduğunda %44.9, kadın yaşı 35-37 olduğunda %37.3, kadın yaşı 38-40 olduğunda %26.6, kadın yaşı 41-42 olduğunda %15.2, 43-44 olduğunda %6,7 olarak bulunmuştur. Yaşın fertilitte üzerine bu olumsuz etkilerinden dolayı 35 yaşın üzerindeki kadınlarda 6 aylık infertilite süresi, değerlendirmenin ve tedavinin başlaması için yeterlidir ve bu yaş grubunda değerlendirme ve tedavi için geç kalınmamalıdır [13]. Yaş ile ilişkili infertilitenin tedavi opsiyonları, KOH+İÜİ, İVF ve oosit donasyonunu içermektedir. İVF de gebelik oranları KOH+İÜİ'dan yüksek

olmakla birlikte yaşla birlikte azalır. Yapılan çok merkezli bir çalışmada 41 yaşının üzerinde İVF yapılan 431 hasta incelenmiştir ve 45 yaş ve üzerindeki hastaların hiç birinde klinik gebelik görülmemiş, 44 yaş ve üzerindeki hastalarda ise hiç canlı doğum görülmemiştir. İVF başarısındaki bu yaşla ilişkili azalma overlerin gonadotropinlere cevabında azalma ve daha da önemlisi embriyo implantasyon oranlarında azalmaya bağlanmıştır. Yaşlı kadınlarda ki implantasyon başarısızlığının muhtemelen major nedeni embriyonik anöploididir. 35 yaşın altındaki kadınlarda siklus başına canlı doğum oranları %17-22 arasında iken, 35-40 yaş arasındaki kadınlarda bu oran %8-10 arasındadır. 40 yaşın üzerinde ve açıklanamayan infertilitesi olan kadınlarda KOH+İÜİ etkinliği sınırlıdır ve siklus başına doğum oranları %1.4 ile %5.2 arasındadır [144, 145]. Bu çalışmada da gebe kalan gruptaki kadınların ortalama yaşı gebe kalamayanlara göre daha düşüktür ancak aradaki fark istatistiksel anlama ulaşmamıştır ($p=0.054$).

Artan **erkek yaşı** semen volümünde, sperm motilitesinde ve sperm morfolojisinde azalma ile ilişkili bulunmuşken, sperm konsantrasyonunda azalma ile ilişkili bulunmamıştır. Semen parametrelerindeki bu azalma 35 yaşından sonra saptanabilmekle birlikte, 50 yaşından önce erkek fertilitesinde belirgin bir azalma görülmemektedir. Özellikle 50 yaş üzerinde, yaşla birlikte erkek fertilitesinde de azalma olur. Ancak erkek yaşının fertilitite ile ilişkisi kadın yaşı kadar kuvvetli değildir [16, 144]. GüvenS ve ark.(arkadaşlarının) yapmış olduğu çalışmada gebe kalamayan grupta ortalama erkek yaşı $35,75\pm 6,19$ iken, gebe kalan grupta $32,92\pm 6,09$ olarak bulunmuştur ($p<0.05$) [146]. Bu tez çalışmasında ise gebe kalan grupta ortalama erkek yaşı 31.30 ± 3.72 iken, gebe kalamayan grupta ise 32.61 ± 5.81 olarak bulunmuştur ($P=0.73$).

Sigaranın fertilitite üzerindeki olumsuz etkisi oldukça önemlidir. Yapılan çalışmalarda sigara içen kadınların içmeyenlere göre infertil olma riskleri daha yüksektir. Aynı zamanda sigara içen kadınlarda siklus fekunditesi normalden düşüktür. Yapılan gözlemlerde sigara içen kadınların içmeyenlere göre 1-4 yıl daha erken menopoza girmesi, sigaranın overlerde foliküler apoptozu ve yıkımı arttırdığını düşündürmektedir. Sigara içen kadınlarda ortalama serum FSH konsantrasyonu içmeyen kadınlara göre daha yüksek bulunmuştur. Sigara içen erkeklerde sperm dansitesinde ve motilitesinde azalma, morfolojideki anormalliklerde ise artış görülür.

Sperm konsantrasyonunda azalma yaklaşık %22 kadardır ve içilen sigara miktarı ile değişmektedir. Ancak eldeki mevcut kanıtlarla sigaranın erkek fertilitasını anlamlı şekilde azalttığı gösterilememiştir [16, 147]. Bu çalışmada kadınların %23.4'ü erkeklerin %47.9'u sigara içmektedir. Ayrıca sigara içen erkeklerin semen örneklerinde preapoptotik sperm oranı yani annexin V pozitif sperm oranı içmeyenlere göre daha yüksekti ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (%21.62, %18.57 sırasıyla ve $p=0.473$).

Açıklanamayan infertilite nedeniyle KOH+İÜİ yapılan hastalarda başarıyı etkileyen faktörlerden bir tanesi de **infertilite süresidir**. İnfertilite süresi uzadıkça başarı oranları düşmektedir ve siklus başına gebelik oranları da azalmaktadır [148]. Gilberto ve ark. yapmış oldukları çalışmada 1010 siklusu değerlendirmişler ve infertilite süresi <3 yıl olduğunda gebelik oranlarını %10,6 olarak, infertilite süresi ≥ 3 yıl olduğunda gebelik oranlarını %7,1 olarak bulmuşlardır($p=0,073$) [149]. Kamath MS. ve ark. infertilite süresinin başarı oranlarına etkisini istatistiksel olarak anlamlı bulmuşlardır(5.36 vs. 6.71 yıl, $P = 0.032$) [150]. Nuojua-Huttunen ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada infertilite süresi 6 yıldan uzun olduğunda gebelik oranları infertilite süresi 6 yıldan kısa olanlara göre anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (%14,2 ye karşın %6,1) [151]. Diğer bir çalışmada Kucuk 578 siklusu değerlendirmiş ve infertilite süresinin siklus başarısı üzerine etkisini istatistiksel olarak anlamlı bulamamıştır [152]. Güven ve ark. 255 siklusu değerlendirdikleri çalışmalarında gebe kalan grupta infertilite süresini gebe kalamayan gruba göre daha düşük bulmuşlar ve fertilitate hızı infertilite süresi arttıkça azalmaktadır sonucuna varmışlardır ($p=0,203$) [146]. Boynukalın ve ark. yapmış olduğu ve 71 siklusun değerlendirildiği tez çalışmasında gebe kalan grupta infertilite süresi ortalama olarak daha kısa olarak saptanmasına rağmen aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p>0.05$). Bu çalışmada da benzer olarak gebe kalan olgularda infertilite süresi gebe kalamayanlara göre daha kısa olmakla birlikte aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

İnfertilite tipinin **primer veya sekonder** olmasının KOH+İÜİ başarısına etkisi ile ilgili literatürde değişik sonuçlar mevcuttur. Dorjpurev U. ve ark. yapmış olduğu ve 1177 siklusu değerlendirdikleri çalışmalarında primer infertil çiftlerde siklus başına gebelik oranı %5,6 olarak bulunmuş iken sekonder infertil çiftlerde

siklus başına gebelik oranı %8,8 olarak bulunmuş ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır [153]. Kamath MS. ve ark. 480 siklusu değerlendirdikleri çalışmalarında primer infertil çiftlerde gebelik oranını %8.93, sekonder infertil çiftlerde ise gebelik oranını %12.6 olarak bulmuşlardır ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.916$) [150]. Yapılan diğer bir çalışmada ise primer infertil çiftlerde gebelik oranı %7.9 iken sekonder infertil çiftlerde gebelik oranı %21.4 olarak bulunmuş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$) [146]. Bu çalışmada primer infertil çiftlerde gebelik oranı ile sekonder infertil çiftlerde gebelik oranı benzer bulunmuştur.

KOH+İÜİ yapılan çiftlerde diğer tüm etkenler dışlanarak sadece **sperm parametrelerinin** gebelik başarısı üzerine etkisini öngörmek oldukça güçtür. Tüm semen parametrelerinin İÜİ başarısı üzerine etkisi olabilmekle birlikte sperm motilitesi ve konsantrasyonu başarıyı etkileyen major faktörler olarak durmaktadır. Yapılan bir retrospektif çalışmada 9963 İÜİ siklusu incelenmiş motil sperm oranı %20'nin altına düştüğünde gebelik oranının anlamlı bir şekilde azaldığı bulunmuş ve sperm motilitesinin sonuçları etkileyen major faktörlerden biri olduğu saptanmıştır (motil sperm oranı <20 iken gebelik oranı %5.5, motil sperm oranı >20 iken gebelik oranı %14, fark istatistiksel olarak anlamlı) [154]. Yalti S. ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada 268 inseminasyon siklusunu değerlendirmişler ve total sperm sayısının, motilitenin ve progresif hareketli sperm oranının İÜİ başarısını öngörmeye bağımsız faktörler olduğunu, sperm motilitesi ≥ 30 olanlarda, <30 olanlara göre kümülatif gebelik oranlarının daha yüksek olduğunu ve motilite ≥ 30 olduğunda gebelik oranlarının 4 kat arttığını bulmuşlardır [155]. Benzer olarak Doripurev U. ve ark. yaptıkları ve 1177 İÜİ siklusunun değerlendirildiği çalışmada motil sperm oranı ≥ 30 ve motil sperm sayısı $10 \times 10^6/\text{ml}$ 'den yüksek olanlarda siklus başına gebelik oranlarının anlamlı şekilde arttığını bulmuşlardır [153]. Robert Wainer ve ark. yaptıkları ve 889 çiftin ve 2564 İÜİ siklusunun değerlendirildiği çalışmada, insemine edilen motil spermatozoa sayısı $<1 \times 10^6$ olduğunda, insemine edilen motil spermatozoa sayısı $\geq 2 \times 10^6$ olduğu durumla karşılaştırıldığında siklus başına gebelik oranlarının anlamlı olarak daha düşük olduğunu bulmuşlardır (%3.13). Aynı çalışmada sperm morfolojisini sperm hazırlanmasından önce ve sonra değerlendirmişler ve sperm morfolojisinin tek başına İÜİ başarı olasılığına

istatistiksel olarak anlamlı etkisi olmadığını bulmuşlardır. Bununla birlikte hazırlama sonrası normal spermatozoa oranı $\geq\%30$ olduğunda insemine edilen motil spermatozoa sayısının gebelik oranlarını anlamlı ölçüde değiştirmedeği veya insemine edilen motil sperm sayısı $\geq 5 \times 10^6$ olduğunda hazırlama sonrası normal sperm oranlarının gebelik sonuçlarını anlamlı ölçüde değiştirmedeği bulunmuştur. Sonuç olarak, hazırlama sonrası normal morfolojiye sahip sperm oranı $<\%30$ olduğunda en az 5×10^6 motil spermatozoanın insemine edilmesini önermişlerdir [120]. David C. Miller ve ark. yapmış oldukları çalışmada, progresif total motil sperm sayısının İÜİ sonrası gebelik olasılığını etkileyen bağımsız bir faktör olduğunu ve progresif total motil sperm sayısı 10 milyonun altında olan çiftlerde gebelik oranının anlamlı olarak az olduğunu bulmuşlardır. Aynı çalışmada motil sperm oranını gebe kalan grupta $\%49.9 \pm 7.8$, gebe kalamayan grupta $\%47.2 \pm 8.9$ olarak, sperm konsantrasyonunu gebe kalan grupta $115.2 \pm 74.5 \times 10^6$, gebe kalamayan grupta $93.1 \pm 77.5 \times 10^6$ olarak bulmuşlardır ve aradaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır [121]. Richard P. Dickey ve ark. yaptıkları ve 1841 çiftin ve 4056 İÜİ siklusunun değerlendirildiği çalışmada, progresif motilitenin ve total motil sperm sayısının gebelikle en yakın ilişkili başlangıç sperm karakteristikleri olduğu bulunmuştur. Başlangıç sperm konsantrasyonu $\geq 5 \times 10^6/\text{ml}$, total sperm sayısı $\geq 10 \times 10^6/\text{ml}$, progresif motil sperm oranı $\geq\%30$ veya total motil sperm sayısı $\geq 5 \times 10^6$ olduğunda siklus başına gebelik oranlarını $\geq\%8.2$ olarak bulmuşlardır. Başlangıç değerleri bu eşik değerlerden daha yüksek olduğunda fekunditedeki artış minimal olmuştur. Gebelikle sonuçlanan en düşük başlangıç değerler, sperm konsantrasyonu $2 \times 10^6/\text{ml}$, total sperm sayısı 5×10^6 , motil sperm oranı $\%17$ ve total motil sperm sayısı 1.65×10^6 olarak bulunmuştur. Başlangıç değerler yukarıda tariflenen eşik değerler ile en düşük değerler arasında olduğunda gebelik oranının $<\%3.6$ olduğu bulunmuştur ve sonuç olarak başlangıç sperm motilitesi $\geq\%30$ ve total motil sperm sayısı $\geq 5 \times 10^6$ olduğunda İÜİ'nin efektif bir tedavi olduğu yorumunu yapmışlardır [156]. Ahmed Badawy ve ark. 393 subfertil çift ve 714 İÜİ siklusunu değerlendirmişlerdir. Motil spermatozoa sayısı $< 5 \times 10^6$ olduğunda siklus başına gebelik oranı $\%5.55$ olarak bulunmuşken, normal motil sperm sayısı $> 5 \times 10^6$ olduğunda ise $\%24.28$ olarak bulunmuştur. Normal morfolojiye sahip sperm oranı $>\%30$ ve insemine edilen motil spermatozoa sayısı $> 5 \times 10^6$ olduğunda, gebelik oranı $\%20.77$ olarak bulunmuştur.

İnsemine edilen motil spermatozoa sayısı $<5 \times 10^6$ veya normal sperm morfolojisi $<30\%$ olduğunda İÜİ başarı oranı azalmıştır [157]. Bu tez çalışmasında spermogram ile ilgili verilerin analizinde ortalama sperm volümü, ortalama yıkama öncesi sperm sayısı, ortalama yıkama öncesi PHSS, ortalama yıkama sonrası sperm sayısı, ortalama yıkama sonrası PHSS gebe kalan grupta kalamayan gruba göre daha yüksekti ancak aradaki fark istatistiksel anlama ulaşmamıştır (Tablo 4.5). Aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmaması çalışmaya alınan hasta sayısının az olması ve çalışmaya sadece açıklanamayan infertilite tanısı alan çiftlerin alınmasına bağlı olabilir.

Üreme çağındaki çiftlerin %15'i infertilite problemi ile karşılaşmaktadır. Bu çiftlerin yapılan standart değerlendirmeler sonucu yaklaşık %75'inde sebepler saptanabilmektedir. Bu sebepler kadın infertilitesinden sorumlu ovulatuvar bozukluklar ya da tubal faktörler gibi nedenlere veya semen anomalilerine bağlıdır. Kalan %25'lik grubun %8'inden endometriozis, %2'lik bir kısmından da servikal faktörler, immünolojik faktörler sorumlu tutulmaktadır. Diğer %15'inde patolojik bir sonuca rastlanmamakta ve bu grup hastalar açıklanamayan infertil grup olarak adlandırılmaktadır. Açıklanamayan infertilitenin etyolojisi günümüzde net olarak bilinmemekle birlikte rutin infertilite tetkikleriyle ortaya çıkarılmayan nedenlere bağlı olabileceği düşünülmektedir. Düzeltilebilir bir patolojinin bulunamaması sebebiyle açıklanamayan infertilite grubundaki hastaların tedavisi ampirik olarak ovulasyon indüksiyonu ve İÜİ veya İVF'dir [11, 158, 159].

Semen analizi erkek infertilitesinin değerlendirilmesinde ilk ve en önemli basamaktır. Günümüzde sperm kalitesi ışık mikroskopu ile sperm konsantrasyonu, hareketi ve morfolojisinin saptandığı konvansiyonel semen analizi ile değerlendirilir. Ancak başarılı bir İÜİ sonucu için gerekli sperm parametreleri, erkek fertilité potansiyelini değerlendiren WHO klavuzlarındaki referans değerlerden genellikle daha düşüktür. Sperm parametrelerinin, sperm konsantrasyonunu (5×10^6) ve motilité (%30) için minimal eşik değerin üzerine çıkması İÜİ sonucu gebelik oranlarını çok fazla artırmamaktadır. Konvansiyonel semen analizi yardımcı üreme tekniklerinde düşük fertilizasyon ve implantasyondan sorumlu olabilen apoptotik spermatozoaların varlığını değerlendirmede yetersizdir. Bu nedenle yardımcı üreme tekniklerinin başarısını öngörmeye klinik değeri limitlidir [160, 161] ve başarılı gebelikleri

öngörmede daha güvenilir testlere ihtiyaç vardır. Günümüzde normal spermatogenezis sürecinde önemli rolü olduğu bilinen fizyolojik hücre ölümü (apoptoz) üzerinde durulmaktadır. Bazı subfertil erkeklerde etyolojinin artmış apoptotik spermelere bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Sperm DNA hasarı ve apoptozis erkek fertilitésinin değerlendirilmesinde yararlı bir belirteç olarak kabul edilmektedir [142]. Spermatozoaların apoptozisi erkek infertilitesi ile ilişkilidir ve infertil erkeklerden alınan testiküler biyopsilerde daha yüksek apoptotik sperm oranı görülmüştür [9, 162]. Apoptozis plazma membranında değişikliklerle karakterizedir. Negatif yüklü bir fosfolipid olan fosfotidilserinin normalde bulunduğu plazma membranının iç yaprağından dış yaprağına translokasyonu ve hücre yüzeyinde ekspresyonu apoptozun erken bir bulgusudur [142]. Annexin V, fosfotidilserine yüksek afinite gösteren kalsiyum bağımlı fosfolipid bağlayıcı bir proteindir ve Annexin V proteini hücre yüzeyinde eksprese olan fosfotidilserini saptamada oldukça sensitif bir belirteç olarak kullanılmaktadır. Annexin V ile fosfotidilserin arasındaki bu bağlanma apoptozisin erken evrede saptanmasını olanaklı kılmaktadır. Literatürde açıklanamayan infertilite nedeniyle İÜİ yapılan hastalarda semendeki preapoptotik sperm oranı ile klinik gebelik oranlarını karşılaştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma ile İÜİ yapılacak hastalarda semendeki preapoptotik sperm oranı ile İÜİ başarısı arasındaki ilişki değerlendirilmiştir.

Alinne Colin ve ark. yapmış oldukları çalışmada erkek yaşının insan spermatozoası üzerinde apoptotik biyomarkırların ekspresyonuna olan etkisini değerlendirmişlerdir. İleri erkek yaşı ile annexin V pozitif sperm oranının anlamlı ve pozitif olarak korele olduğunu bulmuşlardır. Yaş için sınır değeri 40 yaş olarak belirlemişlerdir ve 40 yaş üzeri erkeklerin semenlerinde anlamlı olarak annexin V pozitif sperm oranını daha yüksek bulmuşlardır [163]. Bu çalışmada da 40 yaş üzeri hastalarda ortalama annexin V pozitif sperm oranı 23.72 ± 14.71 , 40 yaş altındaki hastalarda ortalama annexin V pozitif sperm oranı 19.54 ± 13.61 bulunmuştur ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,38$).

Tsung-Hsien Lee ve ark. yapmış oldukları çalışmalarında, açıklanamayan infertilite tanısı alan ve iki kere İÜİ başarısızlığı olan ve YÜT planlanan hastalarda magnetic-activated cell sorting (MACS) yöntemi ile sperm hazırlamanın bu

hastalardaki etkinliğini değerlendirmişlerdir. MACS yöntemi ile annexin V ile konjuge spermatozoaların etkili bir şekilde belirlenmesi ve seçilmesi sağlanır. Açıklanamayan infertilite tanısı olan ve İÜİ başarısızlığı olan hastalarda, bu teknikle sperm hazırlamanın yüksek fertilite potansiyeline sahip spermelerin elde edilmesine yardımcı olabileceği ve takip eden YÜT sonuçlarını geliştirebileceği hipotezi kurulmuştur. YÜT laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan rutin sperm hazırlama teknikleri apoptotik markırlara sahip spermatozoaları tam olarak elimine edememektedir. Dansite gradient santifigürasyon yöntemi ile MACS yönteminin birleştirilmesinin faydası zayıf kalitedeki spermelerin elimine edilebilmesidir. MACS sonrası apoptotik markıra sahip sperm oranının anlamlı olarak azaldığını ve fertilite potansiyelinin arttığını ve MACS yöntemini sperm hazırlamanın bir parçası haline getirmenin YÜT sonuçlarını olumlu etkileyebileceğini göstermişlerdir [161, 164]. Sağlıklı donörlerden alınan semen örneklerinin dansite gradient santifigürasyon yöntemi ile hazırlandıktan sonra fosfotidilserin eksternalizasyonu %4.56 olarak bulunmuştur [133, 164]. Normal sperm konsantrasyonu ve motilitesi olan ancak infertilite tedavisi arayışında olan hastaların semen örnekleri incelendiğinde DGS yöntemi sonrası fosfotidilserin eksternalizasyonu %15.2 olarak saptanmıştır ve bu yüzdenin %6.1'i erken apoptotik markırlar iken, %9.1'i geç apoptotik markırlardan oluşuyordu [165]. İnfertil erkeklerden alınan semen örneklerinde apoptotik semen oranı sağlıklı erkeklerden alınana göre daha yüksek bulunmuştur [166]. K.Tremellen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, infertil erkeklerden alınan sperm örneklerinde, fertil erkeklere göre anlamlı düzeyde daha yüksek annexin V pozitif sperm saptanmıştır ($P=<0.0001$). Bu çalışmada, infertil erkekler, WHO kriterlerine göre anormal sperm konsantrasyonu, motilitesi veya morfolojisine sahip olan ve 12 aydır korunmasız ilişkiye rağmen gebelik elde edemeyen erkekler olarak tanımlanmıştır. Fertil erkek kontrol grubu ise daha önce fertilitesi olan ve WHO kriterlerine göre normal sperm parametrelerine sahip erkekler olarak tanımlanmıştır ve bu iki gruptan alınan semen örneklerinde annexin V sperm oranı karşılaştırılmıştır. İnfertil olan ve semen parametreleri de bozuk olan grupta, fertil olan ve semen parametreleri de normal olan gruba göre annexin V pozitif sperm oranı daha yüksek bulunmuştur [167]. Gerardo Barroso ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 12 infertil erkek ile 5 fertil erkeğin sperm parametrelerini erken apoptotik

markırlar açısından karşılaştırmışlardır. Erken apoptotik fenotipin göstergesi olan fosfotidilserin eksternalizasyonu ve mitokondri membran potansiyeli kaybının düşük hareketli sperm subpopulasyonunda daha yüksek olduğunu saptamışlardır. [141]. Bu tez çalışmasında açıklanamayan infertilite tanısı konulan ve semen parametreleri WHO kriterlerine göre normal olan hastalardan alınan semen örnekleri DGS yöntemi ile hazırlandıktan sonra annexin V pozitif sperm oranı açısından İÜİ sonuçlarına göre karşılaştırılmıştır. İÜİ sonucu gebelik elde edilmeyen çiftlerden elde edilen semende annexin V pozitif sperm oranı ortalama %20.03 olarak, gebelik elde edilen fertil grupta ise annexin V pozitif sperm oranı %15.69 olarak bulunmuştur. Literatür ile uyumlu olarak fertil grupta annexin V pozitif sperm oranı daha düşük saptanmış ancak aradaki fark istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır.

Spermatozoaların fertilize etme yeteneğini değerlendirmede ve fonksiyonel spermelerin seçilmesinde apoptotik markırlar kullanılabilir. Kaspaz aktivitesinde artış, annexin V ile boyanma, DNA fragmantasyonu sperm viabilitesinin ve fertilizasyon yeteneğinin değerlendirilmesinde önemli markırlardır. Düşük motiliteli spermeler daha fazla kaspaz aktivitesine ve fosfotidil serin eksternalizasyonuna sahiptirler. Benzer şekilde düşük motiliteli spermelerde DNA fragmantasyonu saptanmıştır [134]. Ejeküle semende sperm viabilitesi ve motilitesi ile apoptotik sperm oranı arasında anlamlı ilişki olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [166, 168]. Ancak sperm morfolojisi ve apoptoz arasındaki ilişki ile ilgili değişik sonuçlara sahip çalışmalar vardır. Dünya sağlık örgütü kriterlerine göre normal morfolojiye sahip sperm oranı ile kaspaz-3 aktivasyonu veya fosfotidil serin eksternalizasyonu arasında anlamlı ilişki gösterilememiştir [169]. Ancak N.Aziz ve ark. yapmış oldukları çalışmada apoptotik sperm subpopulasyonu ile karşılaştırıldığında, nonapoptotik sperm subpopulasyonunun daha iyi sperm morfoloji profiline sahip olduğunu, normal morfolojiye sahip sperm oranının daha yüksek olduğunu ve daha düşük oranda akrozom defekti, kuyruk ve gövde defekti olan sperm oranına sahip olduğunu göstermişlerdir. Sperm morfolojisi ile apoptotik markır ekspresyonu arasında anlamlı bir korelasyon olduğu ve non apoptotik sperm fraksiyonunun morfolojik olarak daha iyi kalitede olduğu sonucuna varmışlardır [133]. Benzer şekilde Zuying Chen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada apoptotik sperm oranı ile sperm motilitesi, progresif motilite, morfoloji arasında ters bir ilişki saptanmış iken, apoptotik sperm

oranı ile sperm kuyruk defektleri arasında pozitif bir ilişki saptanmıştır ve ejaküle semende apoptotik sperm oranı ile semen kalitesi ilişkili bulunmuştur [170]. G. Jurjen E. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, infertilite polikliniğine başvuran 102 hasta değerlendirmeye alınmıştır. Ortalama apoptotik sperm oranı %20 olarak bulunmuştur. Fosfotidilserin ekspresyonu ile sperm konsantrasyonu ve motilitesi arasında negatif bir ilişki saptanmıştır [171]. Christiaan F. Hoogendijk ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, annexin V negatif sperm subpopulasyonunun morfolojik olarak daha kaliteli sperm grubuna sahip olduğu bulunmuş ve İCSI sırasında morfolojik olarak normal spermilerin seçilmesinin implantasyon ve gebelik oranlarında artış ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür [172]. Han-Ming Shen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, sperm apoptozu ile sperm motilitesi arasında ters ilişki ve apoptotik değişiklikler ile anormal morfolojili sperm oranı arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur ve apoptotik sperm oranının semen kalitesini olumsuz etkilediği yorumu yapılmıştır. Ancak bu çalışmada sadece geç apoptotik markırlar ile semen parametreleri arasındaki ilişki anlamlı bulunmuş erken apoptozis ile semen parametreleri arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır. Bu durumu, sperm fonksiyonlarının apoptozun geç evresinde etkilendiği şeklinde yorumlamışlardır [173]. Sandra Varum ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, seminal parametrelerin DNA hasarı ile ters ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ancak diğer çalışmalarda gösterilen annexin V pozitif sperm oranı ile sperm konsantrasyonu ve motilitesi arasındaki ters ilişki ve annexin V pozitif hücreler ile seminal parametreler arasında ilişki bu çalışmada gösterilememiştir [174]. M. Kotwicka ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, hareketli spermatozoa subpopulasyonu ile, fosfotidilserin translokasyonu gösteren spermatozoa subpopulasyonu arasında negatif bir ilişki olduğu gösterilmiştir [175]. Ancak Perticarari ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada, fosfotidilserin translokasyonu gösteren spermatozoa oranı ile progresif hareketli spermatozoa oranı arasında bir ilişki gözlemleyememişlerdir [176]. Hao-Bo Zhang ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada erken apoptotik markırlara sahip spermatozoalar ile sadece sperm motilitesi arasında negatif bir ilişki saptamışlardır [160]. Bu tez çalışmasında, progresif hareketli sperm sayısı ve total sperm sayısı ile annexin V pozitif sperm oranı arasında ilişki gösterilememiştir. Bunun nedeni çalışmaya sadece

açıklanamayan infertil çiftlerin ve spermiogramı normal erkeklerin alınmış olmasından kaynaklanabilir. Normal sperm morfolojisi $<4\%$ olanlarda annexin V pozitif sperm oranı 20.54% iken, yıkama sonrası sperm morfolojisi $\geq 4\%$ olan hastalarda annexin V sperm oranı 19.36% olarak bulunmuştur, yani annexin V sperm oranı normal sperm morfolojisine sahip sperm subpopulasyonu ile ters ilişkili saptanmış ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Nagla T. El-Melegy ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada sigara içimi ile semendeki apoptotik sperm oranı arasındaki ilişkiyi değerlendirmişlerdir. İnfertil ve sigara içen erkekler ile infertil ve sigara içmeyen erkeklerin semen parametreleri ve apoptotik sperm oranları karşılaştırılmıştır. Sigara içen erkeklerin semenlerinde daha yüksek oranda apoptotik sperm olduğu ve normal morfolojiye sahip sperm oranının daha düşük olduğu bulunmuştur [177]. Bu tez çalışmasında sigara içen subfertil erkeklerin semenlerindeki preapoptotik sperm oranı sigara içmeyenlere göre daha yüksek bulunmuştur ancak aradaki fark istatistiksel anlama ulaşmamıştır.

DNA hasarı fertilizasyonu olumsuz etkilemesinin yanı sıra, implantasyon öncesi gelişimi de olumsuz etkileyebilir ve düşük riskinde artışla ilişkili olabilir [178]. Armand Zini ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ise sperm DNA hasarının İVF ve İCSİ' den sonra gebelik kaybı riskine etkisini değerlendirmişlerdir. 11 çalışmayı değerlendirmeye almışlar ve DNA hasarının İVF ve İCSİ sonrası gebelik kaybı için prediktif olduğunu ve OR' nun $2.48(95\% \text{ CI } 1.52, 4.04, P < 0.0001)$ olduğunu bulmuşlardır [179].

Literatürde açıklanamayan infertilite nedeniyle İÜİ yapılacak hastaların semenlerindeki preapoptotik spermatozoa oranının İÜİ başarısına etkisini değerlendiren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Özellikle açıklanamayan infertilite grubunda, WHO kriterlerine göre semen parametreleri normal olan erkeklerde, etyolojide WHO kriterleri ile değerlendirilemeyen faktörlerin olabileceği açıktır. Bu faktörlerden birisi de semendeki preapoptotik spermatozoa oranı olabilir ve preapoptotik markırlar sperm disfonksiyonun saptanmasında diagnostik olabilir. Fosfotidilserinin eksternalizasyonu ile karakterize olan ve annexin V molekülü ile saptanan preapoptotik spermlerin belirli bir oranın üzerinde olması fertilitiyi olumsuz etkileyerek açıklanamayan infertilite olgularında altta yatan nedenlerden biri olabilir. Preapoptotik spermatozoalar belirlenerek normal spermatozoaların

seçilmesi ise yardımcı üreme tekniklerinin başarısını artırabilir. Bununla ilgili daha fazla olgu sayısına sahip ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.

6. KAYNAKLAR

1. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*, 2008. 89(6): p. 1603.
2. Zinaman, M.J., et al., Estimates of human fertility and pregnancy loss. *Fertil Steril*, 1996. 65(3): p. 503-9.
3. Optimal evaluation of the infertile female. *Fertil Steril*, 2006. 86(5 Suppl 1): p. S264-7.
4. Practice Committee of the American Society for Reproductive, M., Optimal evaluation of the infertile female. *Fertil Steril*, 2006. 86(5 Suppl 1): p. S264-7.
5. Guzick, D.S., et al., Efficacy of treatment for unexplained infertility. *Fertil Steril*, 1998. 70(2): p. 207-13.
6. Effectiveness and treatment for unexplained infertility. *Fertil Steril*, 2006. 86(5 Suppl 1): p. S111-4.
7. Sigman, M., A. Baazeem, and A. Zini, Semen analysis and sperm function assays: what do they mean? *Semin Reprod Med*, 2009. 27(2): p. 115-23.
8. Guzick, D.S., et al., Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med*, 2001. 345(19): p. 1388-93.
9. Oosterhuis, G.J., et al., Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertil Steril*, 2000. 74(2): p. 245-50.
10. Koopman, G., et al., Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 1994. 84(5): p. 1415-20.
11. Mosher, W.D. and W.F. Pratt, Fecundity and infertility in the United States: incidence and trends. *Fertil Steril*, 1991. 56(2): p. 192-3.
12. Boivin, J., et al., International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod*, 2007. 22(6): p. 1506-12.

13. Committee on Gynecologic Practice of American College of, O., Gynecologists, and M. Practice Committee of American Society for Reproductive, Age-related fertility decline: a committee opinion. *Fertil Steril*, 2008. 90(5 Suppl): p. S154-5.
14. Gnoth, C., et al., Time to pregnancy: results of the German prospective study and impact on the management of infertility. *Hum Reprod*, 2003. 18(9): p. 1959-66.
15. Dunson, D.B., D.D. Baird, and B. Colombo, Increased infertility with age in men and women. *Obstet Gynecol*, 2004. 103(1): p. 51-6.
16. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine in collaboration with Society for Reproductive, E. and Infertility, Optimizing natural fertility. *Fertil Steril*, 2008. 90(5 Suppl): p. S1-6.
17. Comhaire, F.H., et al., Towards More Objectivity in Diagnosis and Management of Male-Infertility. *International Journal of Andrology*, 1987: p. R3-53.
18. Acosta, A.A., et al., Recent Advances in Medically Assisted Conception - Introduction. *Who Technical Report Series*, 1992(820): p. 1-1.
19. Hull, M.G., et al., Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1985. 291(6510): p. 1693-7.
20. Bhattacharya, S., et al., The epidemiology of infertility in the North East of Scotland. *Hum Reprod*, 2009. 24(12): p. 3096-107.
21. Unuane, D., et al., Endocrine disorders & female infertility. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2011. 25(6): p. 861-73.
22. Melmed, S., et al., Diagnosis and treatment of hyperprolactinemia: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011. 96(2): p. 273-88.
23. Krassas, G.E., K. Poppe, and D. Glinde, Thyroid function and human reproductive health. *Endocr Rev*, 2010. 31(5): p. 702-55.

24. Joshi, J.V., et al., Menstrual irregularities and lactation failure may precede thyroid dysfunction or goitre. *J Postgrad Med*, 1993. 39(3): p. 137-41.
25. Rotterdam, E.A.-S.P.c.w.g., Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod*, 2004. 19(1): p. 41-7.
26. Balen, A.H., et al., Ultrasound assessment of the polycystic ovary: international consensus definitions. *Hum Reprod Update*, 2003. 9(6): p. 505-14.
27. March, W.A., et al., The prevalence of polycystic ovary syndrome in a community sample assessed under contrasting diagnostic criteria. *Hum Reprod*, 2010. 25(2): p. 544-51.
28. Brassard, M., Y. AinMelk, and J.P. Baillargeon, Basic infertility including polycystic ovary syndrome. *Med Clin North Am*, 2008. 92(5): p. 1163-92, xi.
29. Miller, J.H., et al., The pattern of infertility diagnoses in women of advanced reproductive age. *Am J Obstet Gynecol*, 1999. 181(4): p. 952-7.
30. Westrom, L., Effect of pelvic inflammatory disease on fertility. *Venereology*, 1995. 8(4): p. 219-22.
31. Strandell, A., et al., Hydrosalpinx and IVF outcome: cumulative results after salpingectomy in a randomized controlled trial. *Hum Reprod*, 2001. 16(11): p. 2403-10.
32. Johnson, N., et al., Surgical treatment for tubal disease in women due to undergo in vitro fertilisation. *Cochrane Database Syst Rev*, 2010(1): p. CD002125.
33. Pritts, E.A., Fibroids and infertility: a systematic review of the evidence. *Obstet Gynecol Surv*, 2001. 56(8): p. 483-91.
34. Vollenhoven, B.J., A.S. Lawrence, and D.L. Healy, Uterine fibroids: a clinical review. *Br J Obstet Gynaecol*, 1990. 97(4): p. 285-98.
35. Homer, H.A., T.C. Li, and I.D. Cooke, The septate uterus: a review of management and reproductive outcome. *Fertil Steril*, 2000. 73(1): p. 1-14.

36. Al-Inany, H., Intrauterine adhesions. An update. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2001. 80(11): p. 986-93.
37. Westendorp, I.C., et al., Prevalence of Asherman's syndrome after secondary removal of placental remnants or a repeat curettage for incomplete abortion. *Hum Reprod*, 1998. 13(12): p. 3347-50.
38. La Torre, R., et al., Transvaginal sonographic evaluation of endometrial polyps: a comparison with two dimensional and three dimensional contrast sonography. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 1999. 26(3-4): p. 171-3.
39. Kim, M.R., et al., High frequency of endometrial polyps in endometriosis. *J Am Assoc Gynecol Laparosc*, 2003. 10(1): p. 46-8.
40. Cramer, D.W. and S.A. Missmer, The epidemiology of endometriosis. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. 955: p. 11-22; discussion 34-6, 396-406.
41. D'Hooghe, T.M., et al., Endometriosis and subfertility: is the relationship resolved? *Semin Reprod Med*, 2003. 21(2): p. 243-54.
42. Eggert-Kruse, W., et al., Clinical relevance of sperm morphology assessment using strict criteria and relationship with sperm-mucus interaction in vivo and in vitro. *Fertil Steril*, 1995. 63(3): p. 612-24.
43. Chretien, F.C., Involvement of the glycoproteic meshwork of cervical mucus in the mechanism of sperm orientation. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2003. 82(5): p. 449-61.
44. Katz, D.F., D.A. Slade, and S.T. Nakajima, Analysis of pre-ovulatory changes in cervical mucus hydration and sperm penetrability. *Adv Contracept*, 1997. 13(2-3): p. 143-51.
45. Katz, D.F., Human cervical mucus: research update. *Am J Obstet Gynecol*, 1991. 165(6 Pt 2): p. 1984-6.
46. Clementini, E., et al., Prevalence of chromosomal abnormalities in 2078 infertile couples referred for assisted reproductive techniques. *Hum Reprod*, 2005. 20(2): p. 437-42.

47. Samplaski, M.K., et al., New generation of diagnostic tests for infertility: review of specialized semen tests. *Int J Urol*, 2010. 17(10): p. 839-47.
48. Cheng, C.Y. and D.D. Mruk, The biology of spermatogenesis: the past, present and future. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2010. 365(1546): p. 1459-63.
49. Spratt, D.I., et al., The spectrum of abnormal patterns of gonadotropin-releasing hormone secretion in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: clinical and laboratory correlations. *J Clin Endocrinol Metab*, 1987. 64(2): p. 283-91.
50. Grigороva, M., et al., FSHB promoter polymorphism within evolutionary conserved element is associated with serum FSH level in men. *Hum Reprod*, 2008. 23(9): p. 2160-6.
51. Grigороva, M., et al., Increased Prevalance of the -211 T allele of follicle stimulating hormone (FSH) beta subunit promoter polymorphism and lower serum FSH in infertile men. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010. 95(1): p. 100-8.
52. Castro-Magana, M., B. Bronsther, and M.A. Angulo, Genetic forms of male hypogonadism. *Urology*, 1990. 35(3): p. 195-204.
53. Veldhuis, J.D. and M.L. Dufau, Estradiol modulates the pulsatile secretion of biologically active luteinizing hormone in man. *J Clin Invest*, 1987. 80(3): p. 631-8.
54. Contraceptive efficacy of testosterone-induced azoospermia and oligozoospermia in normal men. *Fertil Steril*, 1996. 65(4): p. 821-9.
55. Freeman, D.A., Steroid hormone-producing tumors of the adrenal, ovary, and testes. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1991. 20(4): p. 751-66.
56. Hammoud, A.O., et al., Obesity and male reproductive potential. *J Androl*, 2006. 27(5): p. 619-26.
57. Kort, H.I., et al., Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *J Androl*, 2006. 27(3): p. 450-2.

58. Ferlin, A., et al., Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men: a 10-year experience in Italy. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007. 92(3): p. 762-70.
59. Krausz, C. and S. Degl'Innocenti, Y chromosome and male infertility: update, 2006. *Front Biosci*, 2006. 11: p. 3049-61.
60. Kuroda-Kawaguchi, T., et al., The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat Genet*, 2001. 29(3): p. 279-86.
61. Foresta, C., et al., Y chromosome microdeletions in cryptorchidism and idiopathic infertility. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999. 84(10): p. 3660-5.
62. Rajfer, J., et al., Hormonal therapy of cryptorchidism. A randomized, double-blind study comparing human chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone. *N Engl J Med*, 1986. 314(8): p. 466-70.
63. Howards, S.S., Subclinical varicocele. *Fertil Steril*, 1992. 57(4): p. 725-6.
64. Pryor, J.L. and S.S. Howards, Varicocele. *Urol Clin North Am*, 1987. 14(3): p. 499-513.
65. Griffin, J.E., Androgen resistance--the clinical and molecular spectrum. *N Engl J Med*, 1992. 326(9): p. 611-8.
66. von Eckardstein, S., et al., Inverse correlation between sperm concentration and number of androgen receptor CAG repeats in normal men. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. 86(6): p. 2585-90.
67. Johnson, L., et al., Characterization of the testicular abnormality in 5 alpha-reductase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*, 1986. 63(5): p. 1091-9.
68. Smith, E.P., et al., Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med*, 1994. 331(16): p. 1056-61.
69. Tapanainen, J.S., et al., Men homozygous for an inactivating mutation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility. *Nat Genet*, 1997. 15(2): p. 205-6.

70. Beard, C.M., et al., The incidence and outcome of mumps orchitis in Rochester, Minnesota, 1935 to 1974. *Mayo Clin Proc*, 1977. 52(1): p. 3-7.
71. Umapathy, E., STD/HIV association: effects on semen characteristics. *Arch Androl*, 2005. 51(5): p. 361-5.
72. Rowley, M.J., et al., Effect of graded doses of ionizing radiation on the human testis. *Radiat Res*, 1974. 59(3): p. 665-78.
73. Vine, M.F., et al., Cigarette smoking and sperm density: a meta-analysis. *Fertil Steril*, 1994. 61(1): p. 35-43.
74. Kandeel, F.R. and R.S. Swerdloff, Role of temperature in regulation of spermatogenesis and the use of heating as a method for contraception. *Fertil Steril*, 1988. 49(1): p. 1-23.
75. Lue, Y.H., et al., Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology*, 1999. 140(4): p. 1709-17.
76. Stillman, R.J., In utero exposure to diethylstilbestrol: adverse effects on the reproductive tract and reproductive performance and male and female offspring. *Am J Obstet Gynecol*, 1982. 142(7): p. 905-21.
77. Patrizio, P., et al., Aetiology of congenital absence of vas deferens: genetic study of three generations. *Hum Reprod*, 1993. 8(2): p. 215-20.
78. Munro, N.C., et al., Fertility in men with primary ciliary dyskinesia presenting with respiratory infection. *Thorax*, 1994. 49(7): p. 684-7.
79. Zariwala, M.A., M.R. Knowles, and H. Omran, Genetic defects in ciliary structure and function. *Annu Rev Physiol*, 2007. 69: p. 423-50.
80. Practice Committee of the American Society for Reproductive, M., Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*, 2008. 89(6): p. 1603.
81. Committee on Gynecologic Practice of American College of, O., Gynecologists, and M. Practice Committee of American Society for Reproductive, Age-related fertility decline: a committee opinion. *Fertil Steril*, 2008. 90(3): p. 486-7.

82. Wathen, N.C., et al., Interpretation of single progesterone measurement in diagnosis of anovulation and defective luteal phase: observations on analysis of the normal range. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1984. 288(6410): p. 7-9.
83. Abdalla, H. and M.Y. Thum, An elevated basal FSH reflects a quantitative rather than qualitative decline of the ovarian reserve. *Hum Reprod*, 2004. 19(4): p. 893-8.
84. Jain, T., M.R. Soules, and J.A. Collins, Comparison of basal follicle-stimulating hormone versus the clomiphene citrate challenge test for ovarian reserve screening. *Fertil Steril*, 2004. 82(1): p. 180-5.
85. Hendriks, D.J., et al., The clomiphene citrate challenge test for the prediction of poor ovarian response and nonpregnancy in patients undergoing in vitro fertilization: a systematic review. *Fertil Steril*, 2006. 86(4): p. 807-18.
86. Broekmans, F.J., et al., A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update*, 2006. 12(6): p. 685-718.
87. Smotrich, D.B., et al., Prognostic value of day 3 estradiol on in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril*, 1995. 64(6): p. 1136-40.
88. Broekmans, F.J., et al., The antral follicle count: practical recommendations for better standardization. *Fertil Steril*, 2010. 94(3): p. 1044-51.
89. Hsu, A., et al., Antral follicle count in clinical practice: analyzing clinical relevance. *Fertil Steril*, 2011. 95(2): p. 474-9.
90. Seifer, D.B., V.L. Baker, and B. Leader, Age-specific serum anti-Mullerian hormone values for 17,120 women presenting to fertility centers within the United States. *Fertil Steril*, 2011. 95(2): p. 747-50.
91. de Vet, A., et al., Antimullerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril*, 2002. 77(2): p. 357-62.
92. Almog, B., et al., Age-related normograms of serum antimullerian hormone levels in a population of infertile women: a multicenter study. *Fertil Steril*, 2011. 95(7): p. 2359-63, 2363 e1.

93. Gnoth, C., et al., Relevance of anti-Mullerian hormone measurement in a routine IVF program. *Hum Reprod*, 2008. 23(6): p. 1359-65.
94. Papaioannou, S., et al., Tubal evaluation in the investigation of subfertility: a structured comparison of tests. *BJOG*, 2004. 111(12): p. 1313-21.
95. Swart, P., et al., The accuracy of hysterosalpingography in the diagnosis of tubal pathology: a meta-analysis. *Fertil Steril*, 1995. 64(3): p. 486-91.
96. Luttjeboer, F., et al., Tubal flushing for subfertility. *Cochrane Database Syst Rev*, 2007(3): p. CD003718.
97. Soares, S.R., M.M. Barbosa dos Reis, and A.F. Camargos, Diagnostic accuracy of sonohysterography, transvaginal sonography, and hysterosalpingography in patients with uterine cavity diseases. *Fertil Steril*, 2000. 73(2): p. 406-11.
98. Smith, S., S.M. Pfeifer, and J.A. Collins, Diagnosis and management of female infertility. *JAMA*, 2003. 290(13): p. 1767-70.
99. Cooper, T.G., et al., World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update*, 2010. 16(3): p. 231-45.
100. Farrell, P.B., R.H. Foote, and M.J. Zinaman, Motility and other characteristics of human sperm can be measured by computer-assisted sperm analysis of samples stained with Hoechst 33342. *Fertil Steril*, 1996. 66(3): p. 446-53.
101. Consensus workshop on advanced diagnostic andrology techniques. ESHRE (European Society of Human Reproduction and Embryology) Andrology Special Interest Group. *Hum Reprod*, 1996. 11(7): p. 1463-79.
102. Oehninger, S., et al., Hemizona assay and its impact on the identification and treatment of human sperm dysfunctions. *Andrologia*, 1992. 24(6): p. 307-21.
103. Lewis, S.E. and R.J. Aitken, DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res*, 2005. 322(1): p. 33-41.
104. Hacker-Klom, U.B., et al., DNA flow cytometry of human semen. *Hum Reprod*, 1999. 14(10): p. 2506-12.
105. De Kretser, D.M. and H.W. Baker, Infertility in men: recent advances and continuing controversies. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999. 84(10): p. 3443-50.

106. Page, D.C., S. Silber, and L.G. Brown, Men with infertility caused by AZFc deletion can produce sons by intracytoplasmic sperm injection, but are likely to transmit the deletion and infertility. *Hum Reprod*, 1999. 14(7): p. 1722-6.
107. McLachlan, R.I. and M.K. O'Bryan, Clinical Review#: State of the art for genetic testing of infertile men. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010. 95(3): p. 1013-24.
108. Sokol, R.Z., Endocrinology of male infertility: evaluation and treatment. *Semin Reprod Med*, 2009. 27(2): p. 149-58.
109. Hull, M.G., Effectiveness of infertility treatments: choice and comparative analysis. *Int J Gynaecol Obstet*, 1994. 47(2): p. 99-108.
110. Smith, J.F., et al., Fertility treatments and outcomes among couples seeking fertility care: data from a prospective fertility cohort in the United States. *Fertil Steril*, 2011. 95(1): p. 79-84.
111. Evers, J.L., Female subfertility. *Lancet*, 2002. 360(9327): p. 151-9.
112. Barbieri, R.L., The initial fertility consultation: recommendations concerning cigarette smoking, body mass index, and alcohol and caffeine consumption. *Am J Obstet Gynecol*, 2001. 185(5): p. 1168-73.
113. Guzick, D.S., et al., Efficacy of superovulation and intrauterine insemination in the treatment of infertility. National Cooperative Reproductive Medicine Network. *N Engl J Med*, 1999. 340(3): p. 177-83.
114. Verhulst, S.M., et al., Intra-uterine insemination for unexplained subfertility. *Cochrane Database Syst Rev*, 2006(4): p. CD001838.
115. Kaplan, P.F., et al., Assessing the risk of multiple gestation in gonadotropin intrauterine insemination cycles. *Am J Obstet Gynecol*, 2002. 186(6): p. 1244-7; discussion 1247-9.
116. Aboulghar, M., et al., Controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination for treatment of unexplained infertility should be limited to a maximum of three trials. *Fertil Steril*, 2001. 75(1): p. 88-91.

117. Kansal-Kalra, S., M.P. Milad, and W.A. Grobman, In vitro fertilization (IVF) versus gonadotropins followed by IVF as treatment for primary infertility: a cost-based decision analysis. *Fertil Steril*, 2005. 84(3): p. 600-4.
118. Merviel, P., et al., Predictive factors for pregnancy after intrauterine insemination (IUI): an analysis of 1038 cycles and a review of the literature. *Fertil Steril*, 2010. 93(1): p. 79-88.
119. van Weert, J.M., et al., Performance of the postwash total motile sperm count as a predictor of pregnancy at the time of intrauterine insemination: a meta-analysis. *Fertil Steril*, 2004. 82(3): p. 612-20.
120. Wainer, R., et al., Influence of the number of motile spermatozoa inseminated and of their morphology on the success of intrauterine insemination. *Hum Reprod*, 2004. 19(9): p. 2060-5.
121. Miller, D.C., et al., Processed total motile sperm count correlates with pregnancy outcome after intrauterine insemination. *Urology*, 2002. 60(3): p. 497-501.
122. van der Westerlaken, L.A., N. Naaktgeboren, and F.M. Helmerhorst, Evaluation of pregnancy rates after intrauterine insemination according to indication, age, and sperm parameters. *J Assist Reprod Genet*, 1998. 15(6): p. 359-64.
123. Lee, R.K., et al., Sperm morphology analysis using strict criteria as a prognostic factor in intrauterine insemination. *Int J Androl*, 2002. 25(5): p. 277-80.
124. Arcaini, L., et al., Superovulation and intrauterine insemination vs. superovulation alone in the treatment of unexplained infertility. A randomized study. *J Reprod Med*, 1996. 41(8): p. 614-8.
125. Dankert, T., et al., A randomized clinical trial of clomiphene citrate versus low dose recombinant FSH for ovarian hyperstimulation in intrauterine insemination cycles for unexplained and male subfertility. *Hum Reprod*, 2007. 22(3): p. 792-7.

126. Agarwal, A., et al., Effect of vaginal lubricants on sperm motility and chromatin integrity: a prospective comparative study. *Fertil Steril*, 2008. 89(2): p. 375-9.
127. Henkel, R.R. and W.B. Schill, Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003. 1: p. 108.
128. Matorras, R., et al., Ovarian stimulation in intrauterine insemination with donor sperm: a randomized study comparing clomiphene citrate in fixed protocol versus highly purified urinary FSH. *Hum Reprod*, 2002. 17(8): p. 2107-11.
129. van der Poel, N., et al., Soft versus firm catheters for intrauterine insemination. *Cochrane Database Syst Rev*, 2010(11): p. CD006225.
130. Saleh, A., et al., A randomized study of the effect of 10 minutes of bed rest after intrauterine insemination. *Fertil Steril*, 2000. 74(3): p. 509-11.
131. Anzar, M., et al., Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biol Reprod*, 2002. 66(2): p. 354-60.
132. Shen, H.M., et al., Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum Reprod*, 2002. 17(5): p. 1266-73.
133. Aziz, N., et al., The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. *Human Reproduction*, 2007. 22(5): p. 1413-1419.
134. Shaha, C., R. Tripathi, and D.P. Mishra, Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2010. 365(1546): p. 1501-15.
135. van Engeland, M., et al., Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*, 1998. 31(1): p. 1-9.
136. Lozano, G.M., et al., Relationship between caspase activity and apoptotic markers in human sperm in response to hydrogen peroxide and progesterone. *J Reprod Dev*, 2009. 55(6): p. 615-21.

137. Print, C.G. and K.L. Loveland, Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bioessays*, 2000. 22(5): p. 423-30.
138. Said, T., et al., Selection of nonapoptotic spermatozoa as a new tool for enhancing assisted reproduction outcomes: an in vitro model. *Biol Reprod*, 2006. 74(3): p. 530-7.
139. Zorn, B., et al., Apoptotic sperm biomarkers and their correlation with conventional sperm parameters and male fertility potential. *J Assist Reprod Genet*, 2012. 29(4): p. 357-64.
140. Zhang, H.B., et al., Early apoptotic changes in human spermatozoa and their relationships with conventional semen parameters and sperm DNA fragmentation. *Asian J Androl*, 2008. 10(2): p. 227-35.
141. Barroso, G., et al., Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations. *Fertility and Sterility*, 2006. 85(1): p. 149-154.
142. Hoogendijk, C.F., et al., A novel approach for the selection of human sperm using annexin V-binding and flow cytometry. *Fertil Steril*, 2009. 91(4): p. 1285-92.
143. Practice Committee of the American Society for Reproductive, M., Effectiveness and treatment for unexplained infertility. *Fertil Steril*, 2006. 86(5 Suppl 1): p. S111-4.
144. Practice Committee of the American Society for Reproductive, M., Aging and infertility in women. *Fertil Steril*, 2006. 86(5 Suppl 1): p. S248-52.
145. Ron-El, R., et al., Outcome of assisted reproductive technology in women over the age of 41. *Fertil Steril*, 2000. 74(3): p. 471-5.
146. Guven, S., G.S. Gunalp, and Y. Tekin, Factors influencing pregnancy rates in intrauterine insemination cycles. *J Reprod Med*, 2008. 53(4): p. 257-65.
147. Practice Committee of American Society for Reproductive, M., Smoking and infertility. *Fertil Steril*, 2008. 90(5 Suppl): p. S254-9.

148. Group, E.C.W., Intrauterine insemination. *Hum Reprod Update*, 2009. 15(3): p. 265-77.
149. Iberico, G., et al., Analysis of factors influencing pregnancy rates in homologous intrauterine insemination. *Fertil Steril*, 2004. 81(5): p. 1308-13.
150. Kamath, M.S., et al., Predictive factors for pregnancy after intrauterine insemination: A prospective study of factors affecting outcome. *J Hum Reprod Sci*, 2010. 3(3): p. 129-34.
151. Nuojua-Huttunen, S., et al., Intrauterine insemination treatment in subfertility: an analysis of factors affecting outcome. *Hum Reprod*, 1999. 14(3): p. 698-703.
152. Kucuk, T., Intrauterine insemination: is the timing correct? *J Assist Reprod Genet*, 2008. 25(8): p. 427-30.
153. Dorjpurev, U., et al., Effect of semen characteristics on pregnancy rate following intrauterine insemination. *J Med Invest*, 2011. 58(1-2): p. 127-33.
154. Stone, B.A., et al., Determinants of the outcome of intrauterine insemination: analysis of outcomes of 9963 consecutive cycles. *Am J Obstet Gynecol*, 1999. 180(6 Pt 1): p. 1522-34.
155. Yalti, S., et al., Effects of semen characteristics on IUI combined with mild ovarian stimulation. *Arch Androl*, 2004. 50(4): p. 239-46.
156. Dickey, R.P., et al., Comparison of the sperm quality necessary for successful intrauterine insemination with World Health Organization threshold values for normal sperm. *Fertil Steril*, 1999. 71(4): p. 684-9.
157. Badawy, A., A. Elnashar, and M. Eltotongy, Effect of sperm morphology and number on success of intrauterine insemination. *Fertil Steril*, 2009. 91(3): p. 777-81.
158. Crosignani, P.G., et al., Recommendations of the ESHRE workshop on 'Unexplained Infertility'. Anacapri, August 28-9, 1992. *Hum Reprod*, 1993. 8(6): p. 977-80.

159. Guzick, D.S., et al., Infertility evaluation in fertile women: a model for assessing the efficacy of infertility testing. *Hum Reprod*, 1994. 9(12): p. 2306-10.
160. Zhang, H.B., et al., Early apoptotic changes in human spermatozoa and their relationships with conventional semen parameters and sperm DNA fragmentation. *Asian Journal of Andrology*, 2008. 10(2): p. 227-235.
161. Lee, T.H., et al., Magnetic-activated cell sorting for sperm preparation reduces spermatozoa with apoptotic markers and improves the acrosome reaction in couples with unexplained infertility. *Hum Reprod*, 2010. 25(4): p. 839-46.
162. Lin, W.W., et al., In situ end-labeling of human testicular tissue demonstrates increased apoptosis in conditions of abnormal spermatogenesis. *Fertility and Sterility*, 1997. 68(6): p. 1065-1069.
163. Colin, A., et al., The effect of age on the expression of apoptosis biomarkers in human spermatozoa. *Fertil Steril*, 2010. 94(7): p. 2609-14.
164. Said, T.M., et al., Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. *Reprod Biomed Online*, 2005. 10(6): p. 740-6.
165. Barroso, G., et al., Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations. *Fertil Steril*, 2006. 85(1): p. 149-54.
166. Taylor, S.L., et al., Somatic cell apoptosis markers and pathways in human ejaculated sperm: potential utility as indicators of sperm quality. *Molecular Human Reproduction*, 2004. 10(11): p. 825-834.
167. Tremellen, K. and O. Tunc, Macrophage activity in semen is significantly correlated with sperm quality in infertile men. *International Journal of Andrology*, 2010. 33(6): p. 823-831.
168. Marchetti, C., et al., Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Human Reproduction*, 2002. 17(5): p. 1257-1265.

169. Said, T., et al., Advantage of combining magnetic cell separation with sperm preparation techniques. *Journal of Andrology*, 2005: p. 56-56.
170. Chen, Z.Y., et al., The relationship between human semen characteristics and sperm apoptosis: A pilot study. *Journal of Andrology*, 2006. 27(1): p. 112-120.
171. Oosterhuis, G.J.E., et al., Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertility and Sterility*, 2000. 74(2): p. 245-250.
172. Hoogendijk, C.F., et al., A novel approach for the selection of human sperm using annexin V-binding and flow cytometry. *Fertility and Sterility*, 2009. 91(4): p. 1285-1292.
173. Shen, H.M., et al., Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Human Reproduction*, 2002. 17(5): p. 1266-1273.
174. Varum, S., et al., Characterization of human sperm populations using conventional parameters, surface ubiquitination, and apoptotic markers. *Fertility and Sterility*, 2007. 87(3): p. 572-583.
175. Kotwicka, M., et al., Decreased motility of human spermatozoa presenting phosphatidylserine membrane translocation-cells selection with the swim-up technique. *Hum Cell*, 2011.
176. Perticarari, S., et al., A new multiparameter flow cytometric method for human semen analysis. *Hum Reprod*, 2007. 22(2): p. 485-94.
177. El-Melegy, N.T. and M.E. Ali, Apoptotic markers in semen of infertile men: Association with cigarette smoking. *Int Braz J Urol*, 2011. 37(4): p. 495-506.
178. Aitken, R.J. and A.J. Koppers, Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J Androl*, 2011. 13(1): p. 36-42.
179. Zini, A., et al., Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*, 2008. 23(12): p. 2663-2668.