

Sperm motilite bozukluklarına güncel yaklaşım

Current approach to sperm motility problems

Murad Mehmet Başar¹, Emre Soysal²

ÖZ

Motilite bozuklukları, doğal yolla gebeliğe ulaşma önündeki en önemli engel olduğu gibi yardımcı üreme yöntemlerinde başarı sonuçları üzerine etkili en önemli sperm parametresidir. Ejakülatta motil ve canlı spermatozoa elde edilerek yapılan işlemlerde başarı şansının daha yüksek olduğunun ortaya konulması, sağlıklı ve canlı bir sperm elde etme çalışmalarının en önemli nedenidir. Yardımcı üreme yöntemlerinde 25 yılı aşkın süredir uygulanan metodlara rağmen sağlıklı canlı ve hareketli sperm elde etmeye yönelik arayışlar halen daha devam etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Astenozoospermi, ICSI, HOS testi, TESA, mikroçip

ABSTRACT

Motility disorders are the most important sperm parameters affecting the results of success in assisted reproductive methods as it is the most important obstacle parameter in reaching pregnancy naturally. To demonstrate the high success rates in the procedures performed by obtaining motile and live spermatozoa in the ejaculate is the most important reason for obtaining a healthy and live spermatozoa for artificial reproductive techniques. Despite the methods used for assisted reproduction for over 25 years, researches for healthy-living and motile spermatozoa are still going on.

Keywords: Asthenozoospermia, ICSI, HOS test, TESA, microchip

Cinsel ilişki sonrası doğal bariyerler ve eliminasyonlar nedeniyle spermelerin ancak %10'u kadın genital sisteminde serviks'e ulaşırken; %1'i uterus'a; %0,1'i ise Fallop tüplerine kadar gelebilmektedir. Sonuçta ejakülata içindeki milyonlarca spermatozoanın sadece 100–1000 adeti kumulus ooforus kompleksine ulaşmakta ve sonunda bir adet spermatozoa oosit ile etkileşime girerek fertilizasyonu sağlamaktadır.^[1] Sperm motilitesi ile doğal gebelik şansı arasındaki yakın ilişki bilinmesine rağmen, Palermo'nun 1992'de İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) yöntemini tanımlamasından sonra motilite problemi olan olgularda dahi gebelik elde edilmeye başlanmıştır.^[2] Bununla birlikte, her ne kadar ICSI endikasyonu ve sonuçları bazal semen analiz parametreleri ile ilişkisi olmasa da ejakülatta motil spermatozoa saptanmayan olgularda ICSI sonrası daha dü-

şük ve hatta negatif fertilizasyon ve gebelik sonuçları izlenebilmektedir. Yapılan bir çalışmada, ICSI sonuçları üzerine sayı, motilite ve morfoloji olmak üzere üç temel semen analizi parametresinin etkisi değerlendirildiğinden de en önemli etkenin sperm motilitesi olduğu belirtilmiştir.^[3,4]

Testiküler spermler fizyolojik olarak hareketsizdirler. Bu durumun spermelerin henüz matürasyonunu tamamlanmamış olması veya Sertoli hücreleri ile olan sıkı bağlantıları ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.^[5,6] Bedford ve ark. duktuli efferentisten aspire edilen spermelerin immotil olduklarını veya salıntı hareketi gösterdiklerini ve bu durumun epididimin başlangıç kısmında da devam ettiğini belirtmişlerdir.^[7] Spermelerin progresif hareketleri ilk olarak epididimin korpus bölgesinde izlenmeye başlamakta; kauda bölgesinde ise hareketli sperm oranı %50'nin üzerine çıkmaktadır. Yapılan bir çalışmada, kültür ortamında tutulan spermelerde hareket oranları sperm elde edildiği lokalizasyon göz önüne alındığında efferent kanallar, kaput epididimis, proksimal korpus, distal korpus ve kaudada sırası ile %0, %3, %12, %13 ve %60 olarak belirtilmiştir.^[6] Bu sonuçlar dikkate alındığında sperm motilitesinin epididimal transit sırasındaki matürasyon ile sağlandığı kabul edilmektedir. Yapılan deneysel çalışmalarda kaput epididimisten elde edilen spermler genel olarak immotil iken,

¹Memorial Şişli Hastanesi İvf Ünitesi/Embriyoloji-Androloji Laboratuvarı, İstanbul, Türkiye

²Memorial Şişli Hastanesi, Üroloji Kliniği, İstanbul, Türkiye

Yazışma Adresi / Correspondence:

Prof. Dr. Murad Mehmet Başar
Piyalepaşa Bulvarı 34385 Okmeydanı, Şişli 34385 İstanbul, Türkiye
Tel. +90 533 655 76 23
E-mail: muradbasar66@hotmail.com

Geliş / Received: 06.06.2018

Kabul / Accepted: 22.06.2018

epididimin korpus bölgesinde yapılan ligasyon sonrası bu bölgeden alınan spermelerde motilite izlendiği gösterilmiştir.^[6] Benzer şekilde konjenital duktus deferens agenezi (CBAVD) olan olgularda da epididimal aspirasyonla distalden alınan spermelerde motilite daha düşük olarak izlenirken proksimalden alınan spermelerde daha yüksek motilite oranı elde edilmektedir.^[6] Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, spermatozoanın motilite yeteneğini kazanması esas olarak proksimal epididim ile olan temas süresine bağlı olarak değişiklik göstermektedir.

Sperm Kuyruk Yapısının Anatomisi

Sperm motilitesinin sağlanmasında spermin dört bölümden oluşan kuyruk yapısı son derece önemli rol oynar (Şekil 1a).

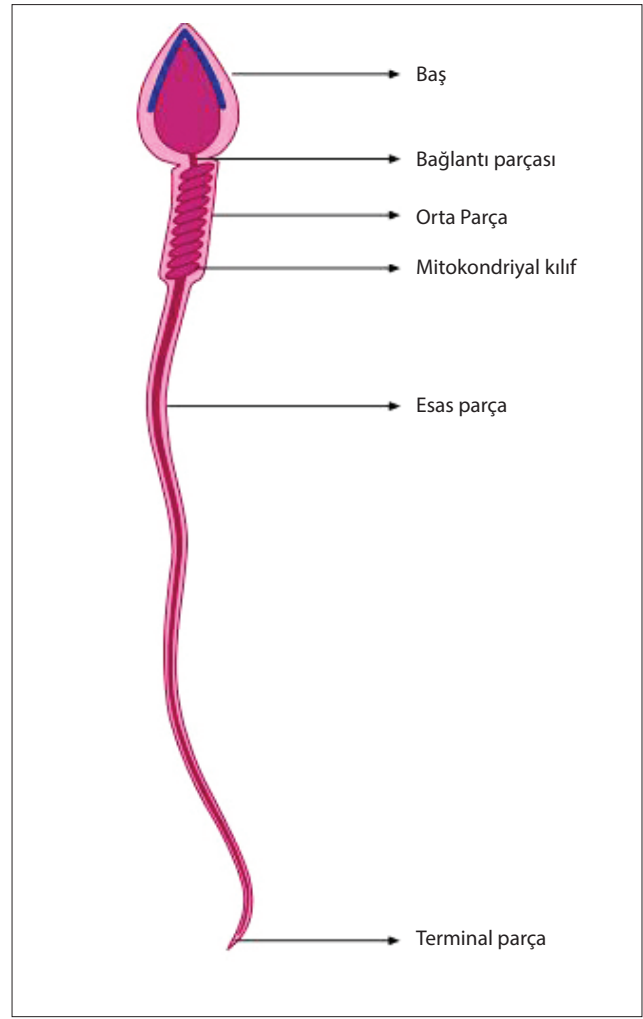
Spermin baş ile kuyruk arasında devamlılığını sağlayan bağlantı parçası (*connecting piece*) yoğun bir fibröz yapıdan oluşur ve sperm matürasyonunun son evresinde proksimal sentriyolden meydana gelir.^[5,6]

Orta parça (*mid piece*) enerji için gerekli olan heliksel dizilmiş mitokondriilerin bulunduğu bölümdür. Bu bölgede ayrıca kuyruk yapısının %50'sini oluşturan dış dens fibröz lifler (*outer dense fiber=ODF*) yer alır. Çapı distale doğru gittikçe incelen orta parça esas parçaya bağlantıyı sağlayan *annulus* ile sonlanır.^[5,6] Esas parça (*principal piece*) fibröz kılıf ve aksonemden oluşur. Fibröz kılıf üzerinde enerji düzeni ve hücre sinyalizasyonu ile görevli proteinler (*AKAP3*, *AKAP4* ve *TAKAP80*) yer almaktadır ve içeride yer alan aksonem ve ODF'yi sarar.^[5,8] Aksonem spermin kuyruk hareketinin temelini oluşturan yapıdır. Dışta dokuz adet tubulin dimerlerinden oluşan komplet A ve inkomplet B lifleri bulunur. A lifleri *nexin* adı verilen yapılar ile B liflerine bağlanır (Şekil 1b). Bu liflerin her biri radyel uzantılar ile santraldeki çifte bağlanır. Santralde ise iki adet A lifi vardır ve birbirine çapraz köprüler ile bağlanmıştır. Flajellanın motoru her iki çiftten çıkan protein yapıdaki iç ve dış *dyein* uzantıdır. Bu yapılar mikrotübülleri sabitleyici ve ATP'nin oluşturduğu kimyasal enerjiyi mekanik enerjiye çevirerek hareketi sağlar.^[5,6]

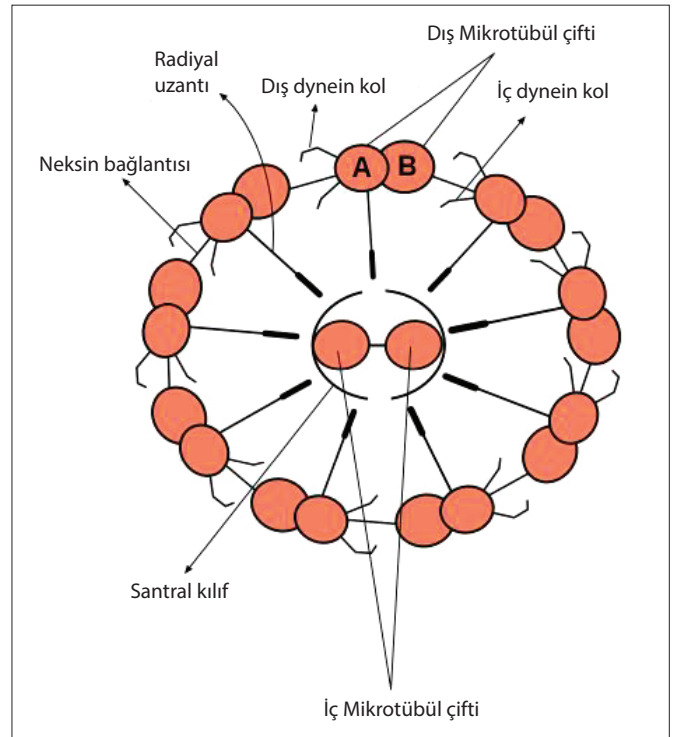
Son parça (*terminal piece*) ise sadece 9+2 aksonemal yapıyı içerir; etrafında fibröz kılıf ve ODF yer almaz.^[5,8]

Sperm Motilite Bozukluklarında Terminoloji

Astenozospermi, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2010 kılavuzuna göre a (+4) ve b (+3) sperm motilitesinin %32'den az olduğu durumları tanımlar.^[9]



Şekil 1A. Spermatozoa anatomik yapısı. b) Spermatozoa kuyruk yapısı kesitsel görüntüsü.



Şekil 1B. Spermatozoa kuyruk yapısı kesitsel görüntüsü.

Total immotil sperm örneği olan olgularda santrifüj ve/veya dansite gradient yöntemi ile sperm hazırlığı sonrası motil spermatozoa izlendiği durumlar “virtual astenozoospermi” olarak adlandırılır. Buna karşın, tüm değerlendirmelerde total inmotil sperm varlığı “mutlak astenozoospermi” olarak ifade edilir.^[10,11] “Nekrozoospermi” ise %0,2–0,5 oranında nadir izlenen bir durumdur ve hareketsiz gözlenen tüm spermelerin canlı olmadığı durumu ifade eder.^[10,12]

Astenozoospermi Etiyolojisi

Kuyruk patolojileri sperm hareket bozukluklarının en önemli nedenlerindedir. İki türlü sperm kuyruk sorunu tanımlanmıştır: Non-spesifik flagella anomalisi (*NSFAs*) ve siliyer diskinezi veya fibröz kılıf displazisini içeren genetik kökenli spesifik flagella bozuklukları. Ayrıca, etiyolojik faktörler konjenital veya akkiz nedenler olarak da değerlendirilebilir. Akkiz nedenler genellikle non-spesifik flagella patolojisine yol açarlar. Genital enfeksiyonlar, oksidatif stres, anti-sperm antikörlerin varlığı, ATP üretimi etkileyen metabolik sorunlar, çevresel toksik ajanlar, epididimal transit zamanının uzaması, uzamış seksüel abstinens veya sperm kriyoprezervasyonu gibi nedenlere bağlı olarak ortaya çıkarlar. Altta yatan etiyoloji düzeltilirse bu durum ortadan kalkar ve spontan gebelik dahi elde edilebilir. Ancak, tedaviye yanıt vermeyen olgularda ICSI alternatif yöntem olarak dikkate alınmalıdır. Konjenital nedenler ise kuyruğunun yapısal bozukluklarını içerir.^[11,13]

Spermatozoanın kuyruk yapısı başta solunum sistemi olmak üzere diğer siliyer hücreler ile aynı özellikleri taşırlar. Dolayısı ile sperm motilite bozuklukları sıklıkla üst solunum yolu hastalıkları ile birliktelik göstermektedir. Bu nedenle sık sinüzit atakları ve/veya trakeobronşit öyküsü olan infertil erkeklerde sperm motilitesi yönünden dikkatli inceleme gereklidir.

İmmotil siliya sendromu ilk defa Afzelius tarafında 1976 yılında tanımlanmıştır.^[14] Siliyer hücreler ve spermatozoanın mikrotübül yapısının defekti ile karakterli bu durum otozomal resesif geçişlidir ve günümüzde Primer Siliyer Diskinezi (PCD) olarak adlandırılmaktadır. *Dynein* kolların parsiyel veya total yokluğundan fibröz kılıf yapısındaki bozukluklara kadar değişik çeşitleri vardır. Bu hastalarda ejakülat volümü ve sperm sayısı normaldir. Ancak, semen analizinde hareket bozukluğu ile birlikte belirgin morfolojik defektler vardır. Kısa, kalın, düzensiz veya disorganize flajella yapısı gözlenir. Eşlik eden diğer yapısal bozukluklar içinde genellikle “*pin-head*” olarak da adlandırılan dekapite veya asefalik spermatozoalar ve abaksiyel implantasyon olarak ifade edilen baş-kuyruk bileşim defektleri de yer almaktadır.^[11,15,16] Sperm fonksiyonel bozukluğuna yol açan sorunlardan bir

diğeri de sperm mitokondri bozukluklarıdır. Sayısal bozukluklar, irregüler organizasyon, kısa veya uzun mitokondriyal kılıf anomalileri ve artmış matriks yoğunluğu veya lipid içerikleri bu sorunlardan bazılarıdır. Bu durum semen analizinde orta parça defekti olarak ifade edilir.^[17,18]

Olguların %20'sinde genetik faktörler rol oynamaktadır. Deneysel çalışmalarda sperm kuyruğunda mikrotübül sentezi ile ilişkili proteinleri kodlayan 200'den fazla gen olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte bugüne kadar dynein yapısının oluşumunu kontrol eden AKAP4 geni ve proteinlerde veya sperm kuyruk yapısı ile ilişkili diğer noktalarda herhangi bir genetik sorun net olarak ortaya konulamamıştır.^[19,20]

Nekrozoospermi çevresel faktörler veya kalıtsal yapısal durumlardan kaynaklanır. Reaktif oksijen ürünleri (ROS) gibi maddeler hücre içine penetre olabilir ve DNA hasarına yol açabilirler. Diğer taraftan ürogenital enfeksiyonlar, kronik prostatit, hipogonadotropik hipogonadizm gibi hormonal sorunlar, anti-sperm antikör varlığı, uzamış ejakülasyon periyodu, hipertermi, *Ca in-stu*, ileri yaş, toksik ve kimyasal maddelere maruziyet nekrozoosperminin diğer nedenleridir.^[8,11]

Astenozoospermili Olgularda Değerlendirme

Hastalardan dikkatli anamnez alınarak etiyolojide neden olabilecek faktör ortaya konulmalıdır. Öyküde ailede de benzer olguların olduğu saptanır. Solunum yolu enfeksiyonları başta olmak üzere eşlik eden patolojiler dikkatlice değerlendirilmelidir. PCD adult polikistik böbrek hastalarında sıklıkla izlenir. Hormonal değerlendirmede serum FSH düzeyi normal olgulara göre bir miktar daha yüksek izlenmektedir ve bu durum testiste spermatozogeneze bir sorun olduğunun göstergesidir.^[8,11,15]

Tanıda mutlaka ardışık ejakülat ile semen analizi yapılmalı; cinsel perhiz süresine dikkat edilmeli ve ejakülatın 37°C'de inkübe edilmesine özen gösterilmelidir. İnceleme 60 dk, tercihan 30 dk içinde yapılmalıdır.^[9] Hazırlık sonrası motilite incelemesi IVF/ICSI kararının değerlendirilmesi için önemlidir. Geçmişte uygulanan servikal mukus penetrasyon testleri, kumulüs penetrasyon testleri gibi testlerin günümüzde fazla önemi yoktur. Motilitenin incelenmesinde CASA yöntemi ile spermatozoanın hızı da değerlendirilebilir.^[21]

Mutlak astenozoospermi olgularında nekrozoospermi ayırımının yapılması önem taşımaktadır. WHO 2010 kılavuzuna göre sperm motilitesi %40'dan az olan olgularda canlılığı değerlendirmek için sperm membran bütünlüğünü değerlendiren testlerin yapılması önerilmektedir.^[9] Bu

testlerden en yaygın kullanılanı *Eosin-Y* testidir. Eosin boyası ile membran yapısı bozulmuş spermelerde sperm baş kısmını boyar. Ölü spermeler bu boyayı içlerine alırlar ve baş bölgelerinde kırmızı veya koyu pembe boyanma izlenir. Buna karşın membran yapısı sağlam olan canlı spermeler boyayı almaz ve parlak-beyaz olarak görülürler.^[9,21,22]

Testiküler spermatogenez sırasında annulus migrasyonu-daki bozukluk orta parçada mitokondri yokluğu ve dışarıdaki yoğun liflerin yapısal değişimine neden olur. Yapısal bozukluk 9+2 aksonemal düzeninin olması durumudur. Aksonem yapısı 9+0 şeklinde orta liflerin yokluğu veya iç ve dış *dynein* bağların olmaması ile kendini gösterir. Tanı elektron mikroskopu (EM) ile bu bozuklukların ortaya konulması ile sağlanır.^[9,13,15]

Yardımcı Üreme Tekniklerinde Sperm Seçiminde Kullanılan Yöntemler

Yardımcı üreme teknikleri (YÜT) sırasında kullanılacak spermatozoanın son aşamaya kadar ulaşmış hiperaktif, normal morfolojide, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu yapabilecek normal DNA yapısında spermatozoa olması gereklidir. Sperm hazırlığı ve izolasyonunda motil sperm eldesinin arttırılması ve aynı zamanda DNA hasarının azaltılmasının döllenme oranı ve embriyo gelişiminde olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir.^[23-25] Motilite, sperm kalitesinin değerlendirilmesi açısından en önemli parametrelerin başında gösterilmektedir. Bu nedenle güvenli ve etkili bir şekilde motil sperm elde etmeyi sağlayacak yöntemler tercih edilmektedir. Bu metodlar arasında geleneksel yöntemlerden *swim-up* ve dansite *gradient* metodu sayılabilir.^[26,27] Bu sperm hazırlama yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Örneğin; dansite *gradient* metodunda işlemlerin santrifüj ile yapılması sebebiyle reaktif oksijen türevlerinin artışı ve bu nedenle DNA hasarı meydana geldiği bilinmektedir. *Swim-up* yönteminde ise elde edilen motil sperm sayılarında değişiklikler gözlenmektedir.^[26,28,29]

Bu nedenle günümüzde bu sofistike yöntemlere alternatif yeni uygulamalar ile motil sperm elde edilebilmektedir.

Hipoozmotik Şişme Testi (HOS Testi)

İlk defa 1984 yılında Jeyendran tarafından tanımlanan Hipo-osmolar Şişme Testi (HOS Testi) WHO tarafından boyama yöntemlerine alternatif olarak önerilmektedir.^[9,30] Çünkü, bu test sonrası canlı olduğu ortaya konulan spermelerin YÜT'de kullanılma imkanı vardır. ICSI için sperm seçiminde HOS testi ilk kullanımı Desmet tarafından tanımlanmıştır.^[31] Daha sonra Casper ve ark. immotil

spermeler ile yapılan ICSI'de HOS testini kullandıklarında fertilizasyon ve kilivaj oranlarını sırası ile %43 ve %39 bulmuşlardır.^[32] Bu oranlar rastgele seçilmiş spermelerde sırası ile %26 ve %23'dür. HOS testi taze spermde canlılığın değerlendirilmesinde etkin bulunmasına rağmen, *freezing/thawing* sonrası sperm canlılığını değerlendirmede yeterli değildir.

Hipoozmotik şişme testi (HOS) ile total veya totale yakın immotil sperm örneklerinde canlı spermelerin seçilmesinde kullanılır. Sağlam membranlı spermeler hipoozmotik ortamda 5 dakikada şişer ve kuyruk yapısının tümü kıvrılarak 30 dakika içerisinde stabilize olur. Bu test sayesinde hem vitalite testi yapılabilen hem de canlılığı ortaya konulan hücrelerin hücre yapısı bozulmadığı için ICSI işleminde kullanılabilir.^[9]

Hipoozmotik Şişme Testi (HOS) Yönteminin Uygulanması:

100 ml saf su içerisine 0,735 gram sodyum sitrat hidrat ve 1,351 gram D-fruktuzu çözülürerek reaktif hazırlanır. İyice sıvılaştırılmış semen örneğinden 100 µl bir kısmı alınır ve hipoozmotik çözeltiye eklenir. Daha sonra 5 ile 30 dk arasında 37°C'de inkübe edilir. İnkübe edilen örnek ICSI dişine insemine edilir, canlı spermeler hipoozmotik ortamda kuyrukları kıvrılırken cansız sperm örneklerinde bu değişim görülmez (Şekil 2). Vital spermelerle ICSI işlemi uygulanır.

Yapılan bir çalışmada, ICSI işleminde HOS testi ile seçilen spermeler ve dansite gradient yöntemi ile hazırlanan spermeler karşılaştırılmış ve fertilizasyon oranı ve iyi kalite embriyo gelişimi HOS testi ile seçilen spermelerde daha yüksek bulunmuştur.^[33]



Şekil 2: HOS testi uygulanmış kuyruğu kıvrılan ve baş kısmı şişen canlı spermatozoa (solda) ve herhangi bir değişiklik göstermeyen spermatozoa (sağda).

IMSI (Yüksek Mikroskopik Büyütmeye Seçilmiş Sperm Mikroenjeksiyonu)

IMSI yöntemi ilk kez 2004 yılında Bartoov tarafından tanımlanmıştır.^[34] Sağlıklı bir embriyonun gelişebilmesi için oositin yanı sıra sperm de iyi kalitede olması oldukça önemlidir. Klasik ICSI yöntemiyle sperm seçilimi 200–400 kat büyütmeye yapılmaktadır. Ancak, IMSI yöntemiyle gelişmiş mikroskop ve mercekler sayesinde 4000–8000 kat büyütmeye spermelerde bulunan en küçük morfolojik bozukluklar bile ayırt edilebilmektedir. Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarda, sperm başı içerisindeki genetik materyali içeren çekirdek kısmında bulunan vakuollerin DNA yapısında hasar bulunabileceği konusunda ipucu vermektedir. Sperm DNA yapısındaki hasarlar, döllenme başarısızlığı, embriyo gelişiminin durması, kötü ve/veya yavaş embriyo gelişimi gibi problemlere sebep olabilmekte ve dolayısıyla gebelik şansını olumsuz etkilemektedir. Bu yöntem ile kaliteli sperm seçilir ve seçilen bu spermle ICSI işlemi uygulanır.

IMSI yöntemiyle sperm seçilimi: Sperm örnekleri PVP (*polyvinylpyrrolidone*) denilen yoğun ortama insemine edilir. Görece yavaşlatılan sperm ile morfolojik değerlendirme ve vakuol durumuna göre aşağıdaki sınıflandırma yapılır (Şekil 3)^[35,36]:

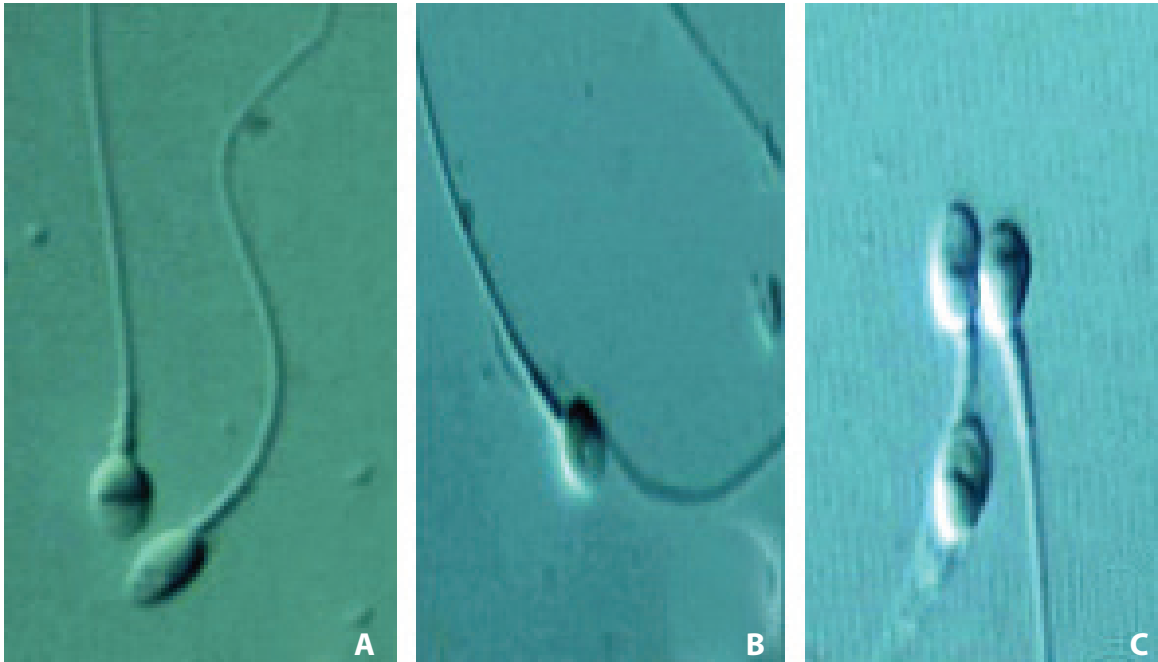
- Grade I; Düzgün baş ve kuyruk yapısına sahip, vakuol bulunmayan sperm
- Grade II; Düzgün baş ve kuyruk yapısına sahip, 1–2 küçük vakuol ($<4\%$) sahip sperm

- Grade III; Düzgün baş ve kuyruk yapısına sahip, büyük vakuole ($>4\%$) sahip sperm
- Grade IV; Anormal baş ve yapısına sahip ve/veya büyük vakuollü sperm

ICSI ile IMSI arasındaki korelasyonu incelemek amacıyla pek çok randomize çalışma yapılmıştır. *Cochrane* meta-analizinde IMSI yöntemiyle sperm seçiminde canlı doğum oranlarında istatistiksel bir fark olmamasına rağmen klinik gebelik oranlarında IMSI'nin daha başarılı olduğu belirtilmiştir.^[37] Bununla birlikte, aynı değerlendirmede IMSI'nin sadece tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olan olgularda uygulanması önerilen bir yöntem olduğu belirtilmektedir.

Genel olarak IMSI endikasyonları dikkate alındığında aşağıdaki olgularda sonuçların daha iyi olduğu ve IMSI'nin bu hastalara uygun bir yöntem olduğu düşünülmektedir:

- IMSI özellikle şiddetli morfolojik bozukluklara sahip oligoastenoteratozoospermi vakalarında uygulanması önerilmektedir. Bu sayede yüksek büyütmeye en kaliteli sperm elde edilir ve başarılı döllenme ile iyi embriyo gelişimi sağlanabilmektedir.
- Tekrarlayan tüp bebek başarısızlığında ve nedeni izah edilemeyen kısırlık durumlarında, sperm rolünü anlamaya ve uygun yapıdaki sperm seçilmesinde IMSI yöntemi önerilmektedir.
- Karşılaştırmalara bakılacak olursa ICSI'ye kıyasla IMSI ile, özellikle az sayıda oosit sayısı olan kadınlarda gebelik ve tutunma oranlarının anlamlı olarak arttığı görülmüştür.



Şekil 3. IMSI ile sperm incelemesi: **a)** düzgün baş ve kuyruk yapısına sahip normal görünümlü grade-I spermatozoa; **b)** Düzgün baş ve kuyruk yapısına sahip, büyük vakuol içeren ($>4\%$) grade-III spermatozoa; **c)** Anormal baş yapısına sahip ve büyük vakuollü grade-IV spermatozoalar.

Mikrofluidik Sistemler ve Mikroçip Yöntemi

Mikrofluidik sistemler son yıllarda hızla gelişim gösteren ve çeşitli teknik alanlarda kullanımı umut vaat eden yeni bir tekniktir.^[38,39] Yöntemin temeli bir mikro-çevre ortamında sıvıların hareketi fizik prensiplerine dayanmaktadır. Günümüze kadar androloji alanında kullanılmak üzere çeşitli mikrofluidik sistemler geliştirilmiştir. Ancak ilk defa Kricka ve ark., mikrofluidik bir sistemle motil spermelerin bir semen örneğinden ayrıştırılabileceğini göstermişlerdir.^[40]

Mikroçip motilite, morfolojik bozukluklar ve özellikle DNA hasarlarını azaltmak için kullanılan yeni bir sperm hazırlama yöntemidir. IVF laboratuvarlarında sperm yıkama tekniği için *swim-up* ve *gradient* yöntemleri kullanılır. *Swim-up* yöntemiyle ileri hareketli spermelerin seçilimi yapılmakta, *gradient* yöntemiyle de morfolojik olarak daha iyi spermeler ayırt edilebilmektedir. Ancak, bu iki yöntemle de DNA hasarlı ve hasarsız spermelerin ayırımı ve seçilimi mümkün değildir. Mikroçip yönteminde spermeler mikro kanallar içerisinde hareket ederler (Şekil 4). Bu kanallar içerisindeki biyokimyasal tabakalar insan vücudundaki servikal kanal mekanizmasını taklit eder. Bu sayede DNA hasarlı spermeler, immotil spermeler ve morfolojik olarak düzgün olmayan spermeler elenir. Sağlıklı ve düzgün spermeler ise sperm kuyucuğunda toplanır.^[41]

Mikroçip Yönteminin Uygulaması: Mikroçip yönteminde, numunenin giriş ve işlem görmüş numunenin toplandığı çıkış kuyucuğu (beş adet) vardır. Giriş kuyucuğuna 13 µl özel sperm medyumunu konur, daha sonra ise 2 µl bazal sperm örneği konur ve 30 dakika inkübe edilir.

Bu sürecin ardından çıkış kuyucuğunda biriken sağlıklı spermeler şırınga aracılığıyla çekilir ve daha sonra ICSI işlemi uygulanır.

Mikroçip yöntemiyle embriyo gelişimi, dölleme başarısı, canlı doğum oranı, gebelik oranı gibi verilerle yapılmış randomize bir çalışma henüz yoktur. Ancak, bu yöntemle DNA hasarsız spermelerin seçildiği, serbest radikallerin elendiği, örneklerin kontaminasyon oranının azaldığı, daha kolay ve hızlı bir yöntem olduğuyla ilgili çalışmalar mevcuttur.^[41-43] Bu yöntem özellikle tekrarlayan başarısız YÜT denemesi olan hasta grubunda, şiddetli DNA hasarlı ve morfolojik bozuklukları olan oligoastenoteratozoospermik erkek infertil hastalarda kullanımı önerilmektedir.

Sperm Slow

Hyaloronik asit (HA) kümülüs-ooforus içeriğinde doğal olarak bulunmaktadır. Doğal yöntemle oosite ulaşan spermeler akrozomda yer alan hyaluronidaz enzimiyle oosit bariyerini geçer ve döllemeyi başarır. Bazı olgularda, özellikle oligoastenoteratozoospermi vakalarında spermelerde bu enzim yok veya yetersiz olmakta ve başarısız YÜT sonuçlarına sebep olmaktadır. Bu durumun önüne geçmek için "*sperm slow*" yöntemi önerilmektedir. Bu yöntemde PVP yerine *sperm slow* medyumunu kullanılır ve ardından ICSI veya IMSI ile sperm seçilimi yapılır.

Sperm Slow Yönteminin Uygulaması: ICSI ya da IMSI petri kaplarına 10 µl *sperm slow* medyumunu ile sperm havuzu oluşturulur. Bu havuzun dışına yıkanmış spermelerle insaminasyon işlemi yapılır. *Sperm slow* medyumunu ile



Şekil 4. Mikrochip sperm seçim havuzu.

spermiler arasına köprü oluşturulur, spermiler bu köprü üzerinden *sperm slow* havuzuna ulaşır. Bu havuz içerisinde hiyaluronidaz enzimine sahip olan spermiler *sperm slow* medyumuyla enzimatik reaksiyona geçer, spermiler hızlı bir kuyruk hareketi gerçekleştirmesine rağmen daha sonra yavaşlamaya veya durmaya başlar. Duran veya yavaşlayan spermiler içeriden ICSI veya IMSI yöntemiyle düzgün morfolojili spermiler seçilir.

Parmegiani ve ark., yaptıkları bir çalışmada *sperm slow* yöntemiyle klasik ICSI yöntemini karşılatırmışlardır.^[44] Bu çalışmada embriyo gelişiminin ve kalitesinin *sperm slow* ile daha başarılı olduğunu belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada, istatistiksel açıdan fark olmamasına rağmen gebelik oranını klasik ICSI'de %21,6 ile daha iyi olmasına rağmen canlı doğum oranını *sperm slow* tekniğinde %32,8 ile daha yüksek olarak belirtmişlerdir.

Pentoksifilin ve Teoflin

Hücre içi cAMP konsantrasyonunun sperm motilitesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir ve bu konuda yapılmış pek çok çalışma vardır.^[45,46] Pentoksifilin (PTX) intraselüler cAMP düzeyini artırarak sperm motilitesini etkilemektedir. Deneysel çalışmalarda, PTX ile muamele edilmiş spermilerle yapılan işlemlerde fertilizasyon oranları ve blastokist formasyonu düşük bulunmamış; ancak oosit PTX ile muamele edilmişse bu oranlar daha düşük saptanmıştır.^[47] PTX'in embryo üzerine toksik etkileri gösterilmiş olmasına rağmen, PTX uygulaması sonrası sperm yıkama ile bu etkileri uzaklaşmaktadır. Terriou ve ark. kısa süreli PTX uygulaması sonrası sperm hazırlığı yapırsa ICSI sonrası klivaj, gebelik ve implantasyon oranlarını sırası ile %95,4, %30. ve %12,3 olarak belirtmişlerdir. Bu nedenle astenozoospermili olgularda sperm motilitesinin artırılması amacıyla PTX uygulaması uzun zamandır kullanılmaktadır.^[48]

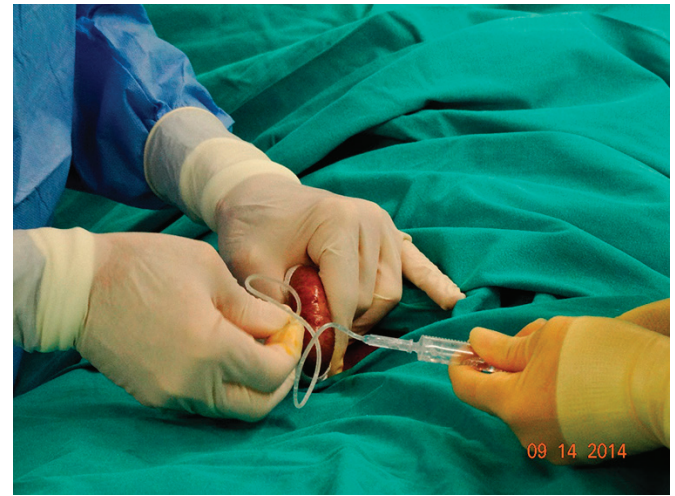
Teofilin de benzer mekanizma ile etki göstermekte olup, PTX'e üstünlüğü toksik etkisinin olmamasıdır. Diğer taraftan teofilin ile işleme alınmış spermatozoalarda mikroenjeksiyon öncesi ayrıca yıkama gerektirmemesi bir diğer avantajdır. Teofilin uygulaması genelde sperm *freezing* işlemlerinde dondurma öncesi motilitenin korunması veya çözme sonrası motilitenin tekrar yüksek oranda sağlanması amacıyla yapılmaktadır. Bu konuda yapılan çalışmalarda, fertilizasyon ve gebelik oranları sırası ile %79,9 ve %53,7 olarak bildirilmiştir.^[49]

Testiküler Sperm Aspirasyonu (TESA)

İleri oligoastenoteratozoospermi vakalarında özellikle total veya totale yakın hareketsiz sperm izlenen vakalarda TESA başarılı ve önerilen bir yöntemdir. Bu olgularda

ejaküllataki hareketsiz spermere sperm canlılık testleri ile yapılan değerlendirme sonrası canlı sperm oranı ileri düzeyde düşük ise epididimde bekleme süresi geçirmemiş ve toksik etkenlere maruz kalmamış testis spermeleri TESA yöntemi ile alınarak kullanılabilir. Yapılan çalışmalarda testiküler spermelerin ejakülat spermelerine göre yüksek canlılık gösterdiği belirtilmiştir.^[50]

TESA işleminin uygulanması: TESA işlemi lokal anestezi altında gerçekleşir. İşlemden önce ilk olarak testis volümü kontrol edilir ve aspire edilecek bölge belirlenir. %1 lidokain HCL ile kord anestezisi yapılarak uyuşturulur. Beş ml'lik enjektöre 1–2 ml sperm *buffer* ile çekilir, 19G kelebek iğne ile skrotal cilde girilir, ardından iğne ile testis içine girilip çıkılır, negatif basınç ile testiküler dokular görülünceye kadar bu işleme devam edilir (Şekil 5). Elde edilen dokular steril petri kabına alınır ve mekanik parçalama işleminin ardından mikroskop altında incelenir. Sperm görülmediği durumlarda işlem tekrarlanır. Elde edilen vital spermelerle ICSI işlemi gerçekleştirir. İşlem genel olarak 3–5 dk içinde gerçekleştirilir ve hasta işlem sonrası günlük hayatına devam edebilmekte, herhangi bir yara veya iz olmaksızın işlem tamamlanabilmektedir. Nadiren hematoma gelişebilir.



Şekil 5. TESA işlemi uygulanışı. Lokal anestezi altında 19G kelebek iğne ile tampon solüsyon 5 cc'lik enjektöre negatif basınç ile testiküler doku aspirasyonu.

Negri ve ark. nekrozoospermi olan olgularda ejakülat ve testis spermi kullanarak yaptıkları ICSI sonuçlarını karşılaştırdıklarında fertilizasyon oranı ejakülat spermi ile %60,8'a %59,6 oranında daha yüksek izlenmesine rağmen, implantasyon ve gebelik oranları testis/ejakülat spermelerinde sırası ile %36,8/ %19,9 ve %23,7/ %12,7 olarak bulunmuştur.^[50] Canlı doğum oranı da TESA ile %28,6 iken ejakülat spermeleri ile %13,7 olarak belirtilmiştir. Bununla birlikte testiküler spermiler ile döllenmiş embriyolarda PGT ile yüksek anöploidi gelişimi bu yöntemin önemli bir dezavantajı olarak belirtilmektedir.^[51]

Antioksidan Tedavi

Sperm DNA'sı tamir yeteneği sınırlı olduğu için hasarlara karşı korunma önemlidir. Spermiyogenezin son aşamasında sperm DNA'sı protaminler yolu ile histon bağlarının yenilenmesini sağlayan önemli bir yapılanma olur. İnsanlarda 1:1 oranında Protamin-1 (P1) ve protamin-2 (P2). Protaminlerin sperm nükleusunun kondensasyonu, paternal genomun tanınması ve nükleaz ve serbest radikallerden paternal genomun korunması gibi önemli etkileri vardır. Protamin/DNA içeriğindeki değişimler DNA hasarına neden olur. Protamin dağılımındaki bozukluğa bağlı anormal spermatid matürasyonu, spermatogenez sırasındaki bozulmuş rekombinasyon ve yoğun apoptozis gelişir.^[52-54]

Seminal plazmada fizyolojik olarak bulunan oksidatif stres ürünleri düşük miktarlarda kapasitasyon, fertilizasyon, motilite ve akrozomal reaksiyon için gereklidir. Antioksidanlar oksidatif stres sonucu ortaya çıkan serbest radikalleri engellemek amacıyla kullanılır. Seminal plazmadaki total antioksidan kapasite, oksidatif stres gelişiminde önemli bir parametredir. Ancak, ürogenital enfeksiyonlar, skrotal cerrahi girişimler, çevresel faktörler, iyonize radyasyon, testis torsiyonu, obstrüksiyonlar, yüksek ısı, hipertroidi, varikosel, obezite, diyabet, sigara, yaş gibi etkenler nedeni ile ROS düzeyi artarsa spermlerde DNA hasarı da artış gösterir. Sperm DNA hasarının semen analizindeki göstergelerinden birisi morfolojik bozukluk ve motiltedeki azalmadır.

Seminal plazmada enzimatik (Katalaz, superoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz) ve enzimatik olmayan (glutatyon, ürat, taurin, hipotaurin, A/E/C vitaminleri, ubikinol, transferin, laktoferrin vb.) antioksidanlar bulunmaktadır.^[55-57]

Son yıllarda ekzojen antioksidan ajanlar erkek infertilitesinde popüler bir tedavi yöntemi olmuştur. L-karnitin ve L-asetil sperm metabolizması ve spermatazoanın kullanılacağı enerjisi sağlamak, toksik bir ara ürün olan açılkoA'yı ortadan kaldırarak apoptozisi önlememek ve sperm hareketliliğinin başlamasında rol oynar.^[58] Aynı şekilde, Konenzim Q10'da hareket problemi olan spermlerde etkili bir yöntemdir.^[59] Ancak, yaygın kullanımına rağmen antioksidan ajanlar ile ilgili olarak etkinliklerine ortaya koyan kanıta dayalı plasebo kontrolü randomize çalışma bulunmamaktadır. Hangi sperm parametrelerine etkili olduğu ve tedavi başarısını ölçmede hangi parametrelerin kullanılacağına ait net bir belirteç bulunmamaktadır.

Sonuç olarak, astenozoospermi erkek infertilitesinde gerek doğal gebelik şansını gerekse yardımcı üreme tekniklerini sonuçları etkileyen önemli bir sorundur. Bu olguların YÜT öncesi dikkatlice değerlendirilmesi yanı sıra gerek yapılacak tedavi gerekse sperm fonksiyonunu iyileştirmeye

yönelik ek laboratuvar teknikleri veya uygulamada kullanılmak üzere gerekirse cerrahi yolla sperm elde edilmesi YÜT'de elde edilecek başarı oranını artıracaktır. YÜT'de sperm elde edilmesi için geleneksel sperm hazırlama yöntemlerinde ortaya çıkan sperm kayıpları ve DNA hasarının önüne geçebilecek, ayrıca var olan sperm DNA hasarını ortaya koyarak sağlıklı ve fertilizasyon şansı yüksek sperm seçimine yönelik hızlı teknikleri geliştirmek amacıyla araştırmalar devam etmektedir. Bu konuda ortaya konulmuş tek ve etkili bir yöntem halen daha yoktur.

Hakem Değerlendirmesi

Dış bağımsız

Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar ilişkisi olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansal Destek

Herhangi bir mali destek alınmamıştır.

Peer-review

Externally peer-reviewed.

Conflict of Interest

No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure

No financial disclosure was received.

KAYNAKLAR

1. Henkel R. Sperm preparation: state-of-the-art-physiological aspects and application of advanced sperm preparation methods. *Asian J Androl* 2012;14:260-9. [CrossRef]
2. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992;340:17-8. [CrossRef]
3. Nagy ZP, Liu J, Joris H, Verheyen G, Tournaye H, Camus M, et al. The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum Reprod* 1995;10:1123-9. [CrossRef]
4. Tomlinson M, Lewis S, Morroll D; British Fertility Society. Sperm quality and its relationship to natural and assisted conception: British Fertility Society guidelines for practice. *Hum Fertil (Camb)* 2013;16:175-93. [CrossRef]
5. Cooper TG, Yeung C. Physiology of sperm maturation and fertilization. In: Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S, editors. *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction*. Berlin: Springer-Verlag; 2010. pp.61-85.
6. Turek JP. Male Reproductive Physiology. In: Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA. *Campbell-Walsh Urology*. Philadelphia: Saunders; 2013. pp.591-615.
7. Bedford JM. Components of sperm maturation in the human epididymis. *Adv Biosci* 1973;10:145-55.
8. Altay B. Sperm motilite bozuklukları ve tedavisi. Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman MÖ, Usta MF, Kendirci M. *Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi*. İstanbul, Türk Androloji Derneği, 2004;264-82.
9. WHO. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen, 5th ed., 2010. [Erişim]
10. Vandervorst M, Tournaye H, Camus M, Nagy ZP, Van Steirteghem A, Devroey P. Patients with absolutely immotile spermatozoa and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997;12:2429-33. [CrossRef]

11. Ortega C, Verheyen G, Raick D, Camus M, Devroey P, Tournaye H. Absolute asthenozoospermia and ICSI. What are the options? *Hum Reprod Update* 2011;17:684–92. [CrossRef]
12. Ahmadi A, Ng SC. Developmental capacity of damaged spermatozoa. *Hum Reprod* 1999;14:2279–85. [CrossRef]
13. Chemes HE, Sedo CA. Tales of the tail and sperm head aches. Changing concepts on the prognostic significance of sperm pathologies affecting the head, neck and tail. *Asian J Androl* 2012;14:14–23. [CrossRef]
14. Azfeliu BA. A human syndrome caused by immotile cilia. *Science* 1976;193:317–9. [CrossRef]
15. Chemes HE, Olmedo SB, Carrere C, Oses R, Carizza C, Leisner M, Blaquier J. Ultrastructural pathology of the sperm flagellum: association between flagellar pathology and fertility prognosis in severely asthenozoospermic men. *Hum Reprod* 1998;13:2521–6. [CrossRef]
16. Chemes HE, Puigdomenech ET, Carizza C, Olmedo SB, Zanchetti F, Hermes R. Acephalic spermatozoa and abnormal development of the head-neck attachment: a human syndrome of genetic origin. *Hum Reprod* 1999;14:1811–8. [CrossRef]
17. Folgero T, Bertheussen K, Lindal S, Torbergesen T, Oian P. Mitochondrial disease and reduced sperm motility. *Hum Reprod* 1993;8:1863–8. [CrossRef]
18. Rawe VY, Hermes R, Nodar FN, Fiszbajn G, Chemes HE. Results of intracytoplasmic sperm injection in two infertile patients with abnormal organization of sperm mitochondrial sheaths and severe asthenoteratozoospermia. *Fertil Steril* 2007;88:649–53. [CrossRef]
19. Turner RM, Musse MP, Mandal A, Klotz K, Jayes FC, Herr JC, et al. Molecular genetic analysis of two human sperm fibrous sheath proteins, AKAP4 and AKAP3, in men with dysplasia of the fibrous sheath. *J Androl* 2001;22:302–15.
20. Baccetti B, Collodel G, Estenez M, Manca D, Moretti E, Piomboni P. Gene deletions in an infertile man with sperm fibrous sheath dysplasia. *Hum Reprod* 2005;20:2790–4. [CrossRef]
21. Cooper TG. Semen analysis. In: Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S, editors. *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction*. Berlin: Springer-Verlag; 2010. pp.125–54.
22. Eliasson R. Semen analysis with regard to sperm number, sperm morphology and functional aspects. *Asian J Androl* 2010;12:26–32. [CrossRef]
23. Mortimer D. Sperm preparation techniques and iatrogenic failures of in vitro fertilization. *Hum Reprod* 1991;6:173–6. [CrossRef]
24. Donnelly ET, O'Connell M, McClure N, Lewis SEM. Differences in Nuclear DNA Fragmentation and Mitochondrial Integrity of Semen and Prepared Human Spermatozoa. *Hum Reprod* 2000;15:1552–61. [CrossRef]
25. Marchetti C, Obert G, Deffosez A, Formstecher P, Marchetti P. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum Reprod* 2002;17:1257–65. [CrossRef]
26. Englert Y, Vandenberg M, Rodesch C, Bertrand E, Biramane J, Legreve A. Comparative auto-controlled study between swim-up and Percoll preparation of fresh semen samples for in vitro fertilization. *Hum Reprod* 1992;7:399–402. [CrossRef]
27. Trounson AO, Gardner DK. *Handbook of In Vitro Fertilization*, 2nd ed. Boca Raton; CRC Press LLC; 2000.
28. Zini A, Finelli A, Phang D, Jarvi K. Influence of semen processing technique on human sperm DNA integrity. *Urology* 2000;56:1081–4. [CrossRef]
29. Ricci G, Perticarari S, Boscolo R, Montico M, Guaschino S, Presani G. Semen preparation methods and sperm apoptosis: swim-up versus gradient-density centrifugation technique. *Fertil Steril* 2009;91:632–8. [CrossRef]
30. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 1984;70:219–28. [CrossRef]
31. Desmet B, Joris H, Nagy Z, Liu J, Bocken G, Vankelecom A, et al. Selection of vital immotile spermatozoa for intracytoplasmic injection by the hypoosmotic swelling test. *Hum Reprod* 1994;9:24–31.
32. Casper RF, Meriano JS, Jarvi KA, Cowan L, Lucato ML. The hypo-osmotic swelling test for selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection in men with complete asthenozoospermia. *Fertil Steril* 1996;65:972–6. [CrossRef]
33. Charehjooy N, Najafi MH, Tavalaee M, Deemeh MR, Azadi L, Shiravi AH, Nasr-Esfahani MH. Selection of Sperm Based on Hypo-Osmotic Swelling May Improve ICSI Outcome: A Preliminary Prospective Clinical Trial. *Int J Fertil Steril* 2014;8:21–8.
34. Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezes Y, Barak Y. Realtime fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl* 2002;23:1–8. [CrossRef]
35. Oliveira JB, Massaro FC, Mauri AL, Petersen CG, Nicoletti AP, Baruffi RL, Franco JG. Motile sperm organelle morphology examination is stricter than Tygerberg criteria. *Reprod Biomed Online* 2009;18:320–6. [CrossRef]
36. Vanderzwalmen P, Hiemer A, Rubner P, Bach M, Neyer T, Stecher A, et al. Blastocyst formation after intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) according to the morphological integrity of human sperm nuclei. *Reprod Biomed Online* 2008;17:617–27.
37. Teixeira DM, Barbosa MA, Ferriani RA, Navarro PA, Raine-Fenning N, Natri CO, Martins WP. Regular (ICSI) versus ultra-high magnification (IMSI) sperm selection for assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev* 2013;(7):CD010167. [CrossRef]
38. Weigl BH, Yager P. Microfluidics: microfluidic diffusion-based separation and detection. *Science* 1999;283:346–7. [CrossRef]
39. Takayama S, Ostuni E, Le Duc P, Naruse K, Ingber DE, Whitesides GM. Laminar Flows: Subcellular Positioning of Small Molecules. *Nature* 2001;411:1016–6. [CrossRef]
40. Kricka LJ, Nozaki O, Heyner S, Garside WT, Wilding P. Applications of a microfabricated device for evaluating sperm function. *Clin Chem* 1993;39:1944–7.
41. Tasoglu S, Safaee H, Zhang X, Kingsley JL, Catalona PN, Gurhan UA, et al. Exhaustion of Racing Sperm in Nature-Mimicking Microfluidic Channels During Sorting. *Small* 2013;9:3374–84. [CrossRef]
42. Asghar W, Velasco V, Kingsley JL, Shoukat S, Shafiee H, Anchan RM, et al. Selection of Functional Human Sperm with Higher DNA Integrity and Fewer Reactive Oxygen Species. *Adv Healthcare Matter* 2014;3:1671–9. [CrossRef]
43. Huang HY, Wu TL, Huang HR, Li CJ, Fu HT, Soong YK, et al. Isolation of motile spermatozoa with a microfluidic chip having a surface-modified microchannel. *J Lab Autom* 2014;19:91–9. [CrossRef]
44. Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Taraborrelli S, Arnone A, et al. Comparison of two ready-to-use systems designed for sperm-hyaluronic acid binding selection before intracytoplasmic sperm injection: PICSI vs. Sperm Slow: a prospective, randomized trial. *Fertil Steril* 2012;98:632–7. [CrossRef]
45. Nassar A, Morshedi M, Mahony M, Srisombut C, Lin MH, Oehninger S. Pentoxifylline stimulates various sperm motion parameters and cervical mucus penetrability in patients with asthenozoospermia. *Andrologia* 1999;31:9–15. [CrossRef]

46. Kovacic B, Vlaisavljevic V, Reljic M. Clinical use of pentoxifylline for activation of immotile testicular sperm before ICSI in patients with azoospermia. *J Androl* 2006;27:45–52. [\[CrossRef\]](#)
47. Yovich JL. Pentoxifylline: actions and applications in assisted reproduction. *Hum Reprod* 1993;8:1786–91. [\[CrossRef\]](#)
48. Terriou P, Hans E, Giorgetti C, Spach JL, Salzmann J, Urrutia V, Roulier R. Pentoxifylline initiates motility in spontaneously immotile epididymal and testicular spermatozoa and allows normal fertilization, pregnancy, and birth after intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet* 2000;17:194–9. [\[CrossRef\]](#)
49. Ebner T, Tews G, Mayer RB, Ziehr S, Arzt W, Costamoling W, Shebl O. Pharmacological stimulation of sperm motility in frozen and thawed testicular sperm using the dimethylxanthine theophylline. *Fertil Steril* 2011;96:1331–6. [\[CrossRef\]](#)
50. Negri L, Patrizio P, Albani E, Morengi E, Benaglia R, Desgro M, Setti PEL. ICSI outcome is significantly better with testicular spermatozoa in patients with necrozoospermia: a retrospective study. *Gynecol Endocrinol* 2014;30:48–52. [\[CrossRef\]](#)
51. Moskovtsev SI, Alladin N, Lo KC, Jarvi K, Mullen JB, Librach CL. A comparison of ejaculated and testicular spermatozoa aneuploidy rates in patients with high sperm DNA damage. *Syst Biol Reprod Med* 2012;58:142–8. [\[CrossRef\]](#)
52. Aitken R. The role of free oxygen radicals and sperm function. *Int J Androl* 1989;12:95–7. [\[CrossRef\]](#)
53. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003;79:829–43. [\[CrossRef\]](#)
54. Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. *World J Mens Health* 2014;32:1–17. [\[CrossRef\]](#)
55. Matés JM, Sánchez-Jiménez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci* 1999;4:D339–45.
56. Agarwal A, Allamaneni SS. Free radicals and male reproduction. *Indian Med Assoc* 2011;109:184–7.
57. Adeel AL, Jahan S, Subhan F, Alam W, Bibi R. Total anti-oxidant status: a biochemical predictor of human male fertility. *Andrologia* 2011;44:20–5. [\[CrossRef\]](#)
58. Zhou X, Liu F, Zhai S. Effect of L-carnitine and/or L-acetylcarnitine in nutrition treatment for male infertility: a systematic review. *Asia Pac J Clin Nutr* 2007;16:383–90.
59. Lafuente R, González-Comadrán M, Solà I, López G, Brassesco M, Carreras R, Checa MA. Coenzyme Q10 and male infertility: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 2013;30:1147–56. [\[CrossRef\]](#)