

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



**BİLGİSAYAR TEMELLİ BİR SPERM HAREKET
ANALİZ SİSTEMİNİN AMACA UYGUN ŞEKİLDE
GELİŞTİRİLEREK GEBELİK BAŞARISININ
ÖNGÖRÜLMESİNDE KULLANIMI**

Kadın Hastalıkları ve Doğum Uzmanlık Tezi

Dr. Esra SELVİ

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Özlem DURAL

İstanbul, 2021

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmemiş bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Esra SELVİ



ÖNSÖZ

Kadın Hastalıkları ve Doğum ihtisasım süresince uzmanlaşmam için gerekli olanakları sağlayan, bir baba şefkatiyle yol gösteren Anabilim Dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Alkan Yıldırım'a ve eski başkanımız Prof. Dr. Atıl Yüksel'e

Önümüzde yeni ufuklar açıp her zaman daha iyi olmamız için çaba sarfeden İnfertilite Bilim Dalı eski başkanımız sayın Prof. Dr. N. Erkut Attar'a

Doktorluk bakış açımın olgunlaşmasında çok değerli katkıları olan, beraber çalışmaktan büyük zevk aldığım hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Özlem Dural'a

Bilgi ve deneyimlerini her daim bizlerle paylaşan, her zaman desteklerini hissettiren Prof. Dr. Funda Güngör Uğurlucan ve Doç. Dr. Cenk Yaşa'ya

Biz asistan hekimlere binbir emek ile hekimliğinin inceliklerini öğreten tüm İstanbul Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyeleri ve uzman hekimlerine

İnfertilite Bilim Dalında çalışmakta olan hemşirelerimize, embriyolog Dr. Ayşe Altun ve Dr. Yeşim Erkan'a,

Beraber çalıştığım anılarımı paylaştığım tüm hekim arkadaşlarım başta olmak üzere İstanbul Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı ailesine,

Her zaman yanımda ve yardımcım olan eşime, aileme sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Esra Selvi

İÇİNDEKİLER

BEYAN	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
KISALTMALAR	vii
ÖZET	ix
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER	1
1.1. İnfertilite	1
1.1.1. İnfertilite Etiyolojisi	1
1.1.2. İnfertil Çiftin Değerlendirmesi	2
1.1.2.2. Erkek İnfertilitesinin Değerlendirilmesi	2
1.1.2.2.a. Semen Analizi	2
1.1.2.2.a.1. Semen Analizi Makroskopik İncelemesi	4
1.1.2.2.a.1.1. Likefaksiyon	4
1.1.2.2.a.1.2. Viskozite	4
1.1.2.2.a.1.3. Semen Hacmi	4
1.1.2.2.a.1.4. Semen Ph'ı	5
1.1.2.2.a.2. Semen Analizi Mikroskopik İncelemesi	5
1.1.2.2.a.2.2. Sperm Sayısı	6
1.1.2.2.a.2.3. Sperm Morfolojisi	6
1.1.2.2.a.2.4. Sperm Canlılığı	7
1.1.3. İnfertil Çiftin Tedavisi	7
1.1.3.1. Yaşam Biçimi Tedavileri	7
1.1.3.2. Saptanan Nedenin Düzeltilmesi	7
1.2. Açıklanamayan İnfertilite	8
1.2.1. Ovaryen Stimulasyon	8
1.2.2. Ovulasyon İndüksiyonu	8
1.2.3. Human Chorionic Gonadotropin (HCG)	9

1.2.4 İntrauterin inseminasyon.....	9
2. AMAÇ.....	11
3. METOD.....	12
A. Hastaların Özellikleri.....	12
B. İnfertilitenin değerlendirilmesi.....	12
B.1. Semen analizi	12
C. Ovulasyon İndüksiyonu.....	13
D. Sperm Hazırlığı.....	13
E. İntrauterin İnseminasyon	14
F. Bilgisayarlı Sperm Sayma ve Takip Analiz Sistemi.....	14
G. Gebelik Teşhisi.....	21
S. İstatiksel Yöntem.....	22
4. BULGULAR	23
5. TARTIŞMA	36
6. SONUÇ	42
7. KAYNAKLAR	43

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: DSÖ 2010 Kılavuzuna göre normal semen analizi değerler	4
Tablo 2: Tanımlayıcı özelliklerin dağılımı.....	23
Tablo 3: Fertiliteye ilişkin değişkenlerin dağılımı	24
Tablo 4: Tanımlayıcı özelliklerin gebelik durumuna göre değerlendirmeleri	26
Tablo 5: Fertiliteye ilişkin değişkenlerin gebelik durumuna göre değerlendirmeleri	27
Tablo 6: Karışıklık Matrisi üzerinden elde edilen model performans sonuçları	34



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Sperm hareket analizi için uygulanan üç aşamalı analiz yaklaşımı	15
Şekil 2. Telefon sabitleyici tasarım ve mikroskop üzerinden görüntünün elde edilmesi.....	16
Şekil 3. Sperm Hareket Analizi yazılımında (CSCTAS) kullanılan görüntü işleme teknikler	16
Şekil 4. İlgi Alanı belirleme modülü, a) Orijinal Makler Görüntüsü, b) Arka Planı soyutlama ve LSD ile ızgara mimarisinin tespiti, c) Izgaraların eliminasyonu, d) 6x6 lık bölgenin bölütlenmesi, e) ROI bölgesinin Makler havzası içerisinde gösterimi, f) Hareket analizinin yapılacağı bölge.....	17
Şekil 5. Önerilen cep telefonu tabanlı analiz sisteminde titreşimlerin etkisi	18
Şekil 6. Yazılımsal çerçeve sabitleştirme modülü sonrası iyileştirilmiş görüntü seti: a) Orijinal görüntü, b) Arkaplan modülü, c) Çerçeve sabitleme modülü uygulanmamış görüntü, d) Çerçeve sabitleme modülü neticesinde iyileştirilmiş görüntü, e) Sabitleme yapılmış video seti üzerinde hareketli hücre tespitleri	18
Şekil 7. Takibi gerçekleştirilerek elde edilen yörüngenin 3 saniyelik alt yörüngelere ayrıştırılması.....	19
Şekil 8. Dünya Sağlık Örgütü tarafından tanımlanmış hareket karakteristiklerini belirleyen özellikler.....	20
Şekil 9. CSCTAS’a göre sperm hareket tipleri a)Grade A, b)Grade B, c)Grade C, d)Grade D	21
Şekil 10. Gebelik durumu.....	26
Şekil 11. Gebelik durumuna göre WOB ölçümleri dağılımı.....	29
Şekil 12. CSCTAS ve Manuel hareket ölçümü arasındaki ilişki	30
Şekil 13. CSCTAS tarafından oluşturulan karar ağacı.....	32
Şekil 14. Kural tabanlı karar ağacı modelinin 184 çift üzerinde gebelik sürecini tahminlemede kullanılması	33

KISALTMALAR

BCF: Beat Cross Velocity

BMI: Body Mass İndeks

CASA: Computer-aided sperm analysis

CC: Klomifen sitrat

CSCTAS: Computerized Sperm Counting and Tracking Analysis System

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

FSH: Folikül Stimulan Hormon

HCG: Human Chorionic Gonadotropin

HMG: Human Menopozal Gonadotropin

HSG: Histerosalpingografi

IUI: İntrauterin inseminasyon

IVF: İn Vitro Fertilizasyon

LH: Luteinize Edici Hormon

LSD: Line Segment Detector

LIN: Linearity

NCSS: Number Cruncher Statistical System

OS: Ovaryen Stimulasyon

Oİ: Ovulasyon İndüksiyonu

r-HCG: Rekombinant Human Chorionic Gonadotropin

ROI: Region of Interest

STR: Straightness

TN: True Negative

TP: True Positive

u-hCG: Üriner Human Chorionic Gonadotropin

USG: Ultrasonografi

VAP: Average Path Velocity

VCL: Curvi Linear Velocity

VSL: Straight Line Velocity

WOB: Wobble

ÖZET

GİRİŞ: İnfertilite, herhangi bir kontraseptif yöntem kullanmadan düzenli cinsel ilişkide bulunan bir çiftin bir yıl boyunca gebelik elde edememesidir. İnfertil çiftlerde erkek faktörünün değerlendirmesinde semen analizi altın standart yöntemdir. Semen analizi manuel olarak ve/veya otomatize sistemler (computer-assisted sperm analysis/CASA) ile gerçekleştirilmektedir. Sperm motilitesi fertilitiyi etkileyen önemli bir parametredir.

AMAÇ: CASA sistemleri ülkemizde maliyetinden dolayı kullanılmamakta olup manuel semen analizi yapılmaktadır. CASA'nın ölçtüğü motilite parametrelerini analiz eden, Yıldız Teknik Üniversitesi Mühendislik Fakültesi tarafından geliştirilen CSCTAS (Computerized Sperm Concentration and Tracking Analysing System) ile daha az maliyetle, daha hızlı, standardize ve tekrarlanabilen sonuçlar elde edilerek; bu sistemin gebelik başarısını öngörmede kullanılması amaçlanmıştır.

METOD: Çalışmaya Ocak 2018 - Aralık 2019 tarihleri arasında İstanbul Tıp Fakültesi İnfertilite Polikliniği'ne başvurmuş ve çalışmaya katılmaya rızası olan, kadın yaşı 35'in altında erkek yaşı 41'in altında açıklanamayan infertilite tanısı almış 184 çift dahil edilmiştir. Ovulasyon induksiyonu (OI) sonrasında intrauterin inseminasyon (IUI) için hazırlanan örneklerin, manuel yöntem ve CSCTAS ile ayrıntılı sperm motilite analizleri yapılmıştır. Sonuçların gebelik ile ilişkileri araştırılmıştır.

BULGULAR: Gebelik sağlanabilen çift sayısı araştırmanın devam ettiği sürede 29/184'tür (%15,76). Grupların; bayan yaşları, erkek yaşları, infertilite süreleri, kadın ve erkek sigara kullanımları, kadın beden kitle indeksi ve kullanılan indüksiyon ajanı dağılımları benzerdi. Hareket parametrelerinin analizlerinde WOB (salınım) gebelik saptanan olgularda anlamlı düzeyde yüksektir ($p=0.004$). Kohen kappa analizi ile oluşturulan karar ağacı mimarisine göre ise yaş en önemli kök değeridir. LIN (doğrusallık) gebeliği belirleyen en önemli sperm hareket karakteristiği olarak değerlendirilmiştir; 0,73 üzerindeki değerlerde gebelik oranı anlamlı derecede artmaktadır. Karışıklık matriksi kullanılarak yapılan değerlendirmeye; ağaç modelinin başarısı %95,65 olarak ölçülmüştür ($kappa=0.845$).

SONUÇ: Çalışmamızda en yüksek gebelik olasılığına sahip olan çiftlerde en önemli demografik parametre yaş; en önemli sperm hareket parametreleriyse doğrusallık ve

kararsızlık olarak belirlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçların daha büyük hasta gruplarının dahil edildiği analizlerle doğrulanması gerekmektedir.

ANAHTAR KELİMELEER: İnfertilite, semen analizi, sperm motilitesi, intaruterin inseminasyon, gebelik



ABSTRACT

INTRODUCTION: Infertility is defined as 1 year of regular unprotected intercourse without conception. Semen analysis is the gold standard method for the evaluation of male factor in infertile couples. Semen analysis is performed manually and/or with automated systems (computer assisted sperm analysis - CASA). Sperm motility is an important parameter affecting fertility.

OBJECTIVES: In our country we perform manual semen analysis due to CASA systems costs. CSCTAS software developed by Yıldız Technical University Department of Computer Engineering, which analyzes the motility parameters measured by CASA. It provides faster, standardized and reproducible results with less cost. This system is intended to be used to predict pregnancy rates.

METHOD: The study was conducted between January 2018 and December 2019 at Division of Reproductive Endocrinology and Infertility, İstanbul University Faculty of Medicine. The study group consisted of 184 unexplained infertile couples willing to participate in the study. Women were under 35 years old, men were under 41 years old. Detailed sperm motility analyzes of the samples prepared for intrauterine insemination (IUI) after ovulation induction (OI) were performed by manual method and CSCTAS. The relationship between the results and pregnancy was investigated.

RESULTS: The number of couples who can get pregnant is 29/184 (%15,76) during the study period. The distribution of the groups was similar in terms of female age, male age, infertility duration, female and male smoking, female body mass index and used induction agents. In the analysis of movement parameters, WOB (wobble) is significantly higher in cases with pregnancy ($p=0.004$). According to the decision tree architecture created by Kohen kappa analysis, age is the most important root value. LIN (linearity) was evaluated as the most important sperm motility characteristic determining pregnancy, pregnancy rate increases significantly at values above 0.73. The success of the tree model was measured as 95,65% with the evaluation made using the confusion matrix ($kappa=0.845$).

CONCLUSION: Whereas the most important demographic parameter in couples with the highest probability of pregnancy was age; The most important sperm movement parameters were determined as linearity and wobble. Our results need to be confirmed by analyzes involving larger patient groups.

KEYWORDS: Infertility, semen analysis, sperm motility, intrauterine insemination, pregnancy



1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

1.1. İnfertilite

İnfertilite, herhangi bir kontraseptif yöntem kullanmadan düzenli cinsel ilişkide bulunan bir çiftin bir yıl boyunca gebelik elde edememesidir. Kadının 35 yaş ve üzerinde olduğu çiftler için bu süre 6 ay olarak kabul edilmiştir (1).

İnfertilite, çiftlerin %8-10'unu etkileyen küresel bir sağlık problemidir (2).

Siklus fekundabilitesi bir siklusun gebelikle sonuçlanması olasılığı iken, fekundite bir siklusun canlı doğumla sonuçlanma olasılığıdır (3). Doğurganlığı normal olan çiftlerde, siklus fekunditesi ortalaması %20'dir ve cinsel ilişki zamanlaması dikkatli bir şekilde yapılsa bile yaklaşık %35'i geçmemektedir (4).

Yapılan çalışmalar doğurganlığın 20-24 yaşları arasında en yüksek düzeye ulaştığını ve yaştan artmasıyla birlikte doğurganlıkta düşüş olduğunu göstermektedir. Genel olarak doğurganlık oranları 25-29 yaş kadınlarda %4-8, 30-34 yaştakilerde %15-19, 35-39 yaş kadınlarda %26-46 ve 40-45 yaş kadınlarda da %95 daha düşüktür (5).

1.1.1. İnfertilite Etiyolojisi

İnfertilite hem kadınları hem erkekleri etkiler. Başarılı gebelik için ovulasyon, ovumun fallop tüpü tarafından tutulması, fertilizasyon, fertilize ovumun uterus içine taşınması ve reseptif uterin kavite içine implantasyonu gibi olaylar sırası gereklidir. Erkek fertilitesinde, yeterli sayı ve nitelikteki sperm ovulasyon zamanına yakın servikste depolanmış olmalıdır (6).

İnfertilite etyolojisinde faktör dağılımı; erkek faktörü %30-40, ovulatuar faktör %10-20, tubal/peritoneal faktörler %20-30, açıklanamayan %10-30 ve uterin faktörler ise %5 oranındadır (7).

İnfertil çiftler standart değerlendirilme sonrasında %30'a varan oranlarda açıklanamayan infertilite tanısı almaktadır. Bu değerlendirme; tipik olarak en az bir patent fallop tüpünün gösterilmesini, kadın partnerin ovulatuar siklusların belgelenmesini ve erkek partner için yeterli sayıda hareketli sperm içeren bir semen analizini içerir (8).

1.1.2. İnfertil Çiftin Değerlendirmesi

Anamnez ve fizik muayene ile infertil çiftin değerlendirilmesine başlanmalıdır. İnfertil çiftin değerlendirilme zamanı:

Kadının 35 yaş altında olduğu çiftler, infertilite için bilinen bir neden yoksa korunmasız düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edememişse 1 yıl sonra değerlendirilmelidir.

Kadının 35 yaşın üzerinde olduğu çiftler korunmasız düzenli cinsel ilişkiye rağmen 6 ay içinde gebelik elde edememişse değerlendirilmelidir.

Altı aydan az bir sürede korunmasız düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edememiş çiftlerden; *oligomenore/amenore, ileri evre endometriozis, geçirilmiş pelvik enfeksiyon, bilinen veya şüphelenilen erkek faktörü öyküsü olanlar ve azalmış over rezervi açısından riskli (ovaryan cerrahi, aile öyküsü, kemoterapi veya radyoterapi öyküsü) olanlar* başvuru anında değerlendirilmelidir (9) .

1. 1.2.1. Kadın İnfertilitesinin Değerlendirilmesi

İnfertil kadınlarda anamnez ve fizik muayeneyi takiben transvaginal ultrasonografi, endokrin testler ve histerosalpingografi ile temel değerlendirme yapılmaktadır (10).

1.1.2.2. Erkek İnfertilitesinin Değerlendirilmesi

İnfertil erkeklerde anamnez ve fizik muayeneyi takiben semen analizi ve bazı durumlarda endokrin testler ile temel değerlendirme yapılmaktadır (11).

1.1.2.2.a. Semen Analizi

Çeşitli sınırlılıkları olmasına rağmen, ‘semen analizi’ infertilitede erkek faktörün araştırılmasında en önemli tetkiktir (12).

Semen analizinde *klasik manuel yöntem ve CASA (computer-aided sperm analysis) sistemleri* olarak adlandırılan tam veya yarı-otomatik bilgisayar-yardımlı sperm analizi yapan sistemler kullanılmaktadır.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), manuel sperm analizini seminolojik incelemenin standart ve referans yöntemi olarak önermektedir. *CASA sistemleri* DSÖ'nün 2010 yılında yayınladığı kılavuzda "opsiyonel prosedürler" başlığı altında tartışılmaktadır (13).

CASA sistemlerinin sperm konsantrasyon ve motilite ölçümlerini en az klasik manuel metod kadar güvenilir bir şekilde, üstelik çok daha kısa sürede yapabildiği gösterilmiştir (14). Ölçümlerin tekrarlanabilirliği ve objektifliği, bilgisayar yardımlı sperm analizi (CASA) başta olmak üzere otomatik sistemlerin avantajıdır (15).

CASA, belirli donanım ve yazılım formlarını, yüksek çözünürlüklü bir kamerayı ve bir mikroskobu birleştiren sistemdir. Sperm konsantrasyonunu, hızını ve morfolojisini tahmin eder. Bununla birlikte, güvenilir sonuçlar elde etmek için üretici tarafından tavsiye edilen numune hazırlama yöntemleri ve ayarlarına kesinlikle uyulmalıdır (16). Ciddi maliyet getirmesi, kullanılan kamera sistemi ve mikroskoba göre görüntünün değişmesi buna bağlı olarak da farklı analiz sonuçları elde edilmesi gibi kısıtlılıkları bulunmaktadır. Ülkemizde *CASA sistemleri* kullanılmamaktadır.

Klasik manuel semen analizi için numune, 2-7 günlük cinsel perhiz sonrası alınmalı ve optimal analiz için ejakülasyondan sonraki ilk 1 saat içinde incelenmelidir. Analizde makroskobik (sıvılaşma süresi, viskozite, renk, hacim, ph) ve mikroskobik değerlendirmeler (sayı, motilite, canlılık, morfoloji) yapılır.

DSÖ 2010 yılında normal kabul edilen semen analizini açıklamıştır (Tablo 1).

Parametreler	Normal değerler
Volüm (ml)	1,5
pH	≥7.2
Spermatozoa sayısı/ml (106/ml)	15 (12-16)
Total spermatozoa sayısı (106/ejakülat)	39 (33-46)
Total progresif hareketlilik (%)*	32 (31-34)
Canlı spermatozoa (%)	58 (55-63)
Şekil (normal %)	4 (3,0-4,0)
Peroksidaz (+) lökosit (106/ml)	< 1.0
*Ejakülasyondan sonra 60 dakika içinde, ileri hızlı hareketli ve ileri yavaş hareketli, sperm sayısı %40'dan veya ileri hızlı hareketli spermilerin sayısı %32'den fazla olmalıdır.	

Tablo 1: DSÖ 2010 Kılavuzuna göre normal semen analizi değerler

İnfertil erkeklerin %40-60'ında anamnez, fizik muayene ve endokrin testlerde anormallik olmadan sadece semen analizinde anormallik görülmektedir.

Semen analizi spermatozoa sayısının azaldığını (oligozoospermi), hareketliliğin azaldığını (astenozoospermi) ve morfolojik incelemede birçok anormal formu (teratozoospermi) ortaya koyabilmektedir. Bu anormallikler bir arada olabilir. Bunların dışında semende hiç sperm bulunmaması (azospermi), seminal sıvının olmaması (aspermi) tanıları da semen analizi ile konulabilmektedir (6). Semen analizinde anormallik varsa en erken 1 ay sonra tekrarlanmalıdır (17).

1.1.2.2.a.1. Semen Analizi Makroskopik İncelemesi

1.1.2.2.a.1.1. Likefaksiyon

Semen analizine, ejakülasyondan sonraki ilk 30 dakika ile bir saat içinde gözlem yapılarak başlanmaktadır. Likefaksiyon (incelme) genellikle ilk 15 dakika içinde gerçekleşmektedir. Altmış dakikaya kadar devam edebilir. Tam likefaksiyon 60 dakikayı aşarsa bildirilmelidir.

1.1.2.2.a.1.2. Viskozite

Likefiye olmuş semenin; geniş ağızlı (yaklaşık 1.5 mm) plastik pipetle dikkatlice çekilmesinin ardından, yerçekiminin etkisiyle damlaması beklenir. Damla ile pipet arasında oluşan ince ipliğin uzunluğu ölçülerek viskozite değerlendirilmektedir. 2 cm'den uzun iplikçiğin oluştuğu durumlarda viskozite anormaldir. Normal semen pipetten küçük ve belirgin damlalar şeklinde düşer.

1.1.2.2.a.1.3. Semen Hacmi

Ejakülatın hacminin oluşumuna ağırlıklı olarak seminal vezikül ve prostat salgıları, az bir oranda da bulboüretal bezler ve epididim katkıda bulunur. Total sperm hücresi ve sperm olmayan hücrelerin sayısının hesaplanmasında kullanılacağı için hacmin hassas bir şekilde ölçülmesi gerekir. Hacim en iyi şekilde örneğin içine toplandığı kabın ağırlığı tartılarak ölçülebilir. Semen hacmi için en düşük referans değeri 1.5 ml'dir.

1.1.2.2.a.1.4. Semen Ph'ı

Ph likefaksiyondan sonra o laboratuvar için belirlenmiş standart bir zamanda, tercihen 30 dk içinde ölçülmelidir. Semen pH'ı için alt referans değeri 7.2 olarak kabul edilmiştir.

1.1.2.2.a.2. Semen Analizi Mikroskopik inceleme

1.1.2.2.a.2.1. Sperm Motilitesi

Ejakülasyondan sonraki ilk bir saat içinde, tam likefaksiyondan sonraki 30 dakikada motilite değerlendirilmelidir.

Motilite değerlendirmesi, faz kontrast mikroskopta 200-400 büyütmede yapılır. Sperm motilitesi 37°C'de ısıtılmış tabla üzerinde veya oda sıcaklığında bakılabilir. Farklı motilite kategorilerindeki spermilerin oranlarını hesaplayabilmek için en az beş mikroskopik alanda en az 200 sperm hücresinin değerlendirilmesi gerekir. Aynı semen örneğinden hazırlanmış başka bir preparatta tekrar 200 sperm sayılıp birbirinden bağımsız bir şekilde motilite yüzdeleri kıyaslandığında kabul edilebilir farklılık oranları varsa işleme devam edilir. Büyük farklar varsa bu durumda yeni preparat hazırlamak gerekir.

DSÖ'nün semen analizi için yayınladığı el kitabının 5. baskısında en büyük değişikliğin sperm motilitesinin sınıflamasında yapıldığı görülmektedir. Yeni baskıda sperm hücrelerinin; A, B, C veya D yerine progresif hareketli, non-progresif hareketli ve hareketsiz şeklinde sınıflandırılmaları tavsiye edilmektedir.

Progressif hareket: Sperm hücresi doğrusal ya da geniş bir dairesel düzlemde hızdan bağımsız olarak ilerleyici bir şekilde hareket eder.

Nonprogresif hareket: İlerleyici olmayan hareketlerin tamamını içerir. Örneğin çok küçük daireler şeklinde, kuyruğun hareketiyle baş kısmının çok zor olarak yer değiştirmesi, sadece kuyruğun hareket etmesi gibi.

Hareketsiz: Hiç hareketin olmaması.

Total hareketlilik için en düşük referans değer %40 iken, progresif hareketlilik için en düşük referans değer %32'dir.

1.1.2.2.a.2.2. Sperm Sayısı

Tüm ejakülattaki sperm sayısını ifade eder. Total sperm sayısı, semen analizi sırasında her bir ünite semen volümü başına düşen sperm sayısı (sperm konsantrasyonu) ve ejakulat volümü kullanılarak hesaplanır.

Sperm sayımı için 100 µm derinlikte hemositometre sayma kamaraları tavsiye edilmektedir. Spermilerin doğru bir şekilde sayılıp hesaplanabilmesi için semenin dilüe edilmesi gerekir. Ne kadar dilüe edileceği taze preparatta 200 veya 400 büyütmede görüntü alanı başına sayılan sperm hücresi sayısına göre belirlenebilir.

Sperm konsantrasyonu için en düşük referans değer 15 milyon/ml'dir. Total sperm sayısı için en düşük referans değeri 39 milyondur (13).

1.1.2.2.a.2.3 Sperm Morfolojisi

Normal formda görünen sperm hücrelerinin oranı ile fertilite sonuçları (gebelik oranları veya gebeliğe kadar geçen süre) arasında bir ilişki olduğu sonucuna varılmıştır (18).

Sperm morfolojisinin mikroskopik değerlendirmesi şu aşamalardan oluşur:

- Semen smear preparatlarının hazırlanması
- Preparatın havada kurutulması, fiksasyonu ve boyama
- Eğer uzun süre saklanacaksa laminin üzerinin lamelle kapatılması
- Parlak alan objektifi ile 1000 büyütmede immersiyon yağı kullanılarak preparatın incelenmesi
- Normal ve anormal formdaki spermeleri değerlendirebilmek için yaklaşık 200 spermin sayılması
- Sayım hatalarını azaltmak için iki kez sayım yapmak.

Sonuçlar karşılaştırıldığında kabul edilebilir fark varsa devam edilir ama öyle değilse yeniden sayım yapılmalıdır.

Normal formlu sperm hücreleri için en düşük referans değeri %4'tür.

1.1.2.2.a.2.4. Sperm Canlılığı

Sperm canlılığının tespiti, hücre membranının bütünlüğünün değerlendirilmesi esasına dayanır ve progresif hareketli sperm oranının %40'dan az olduğu durumlarda özellikle önemlidir. Canlı spermlerin oranı, boya eksklüzyonu ya da hipoozmotik şişme yöntemleri ile hücre zarı sağlam olan spermlerin oranının saptanması ile hesaplanabilir. Boya eksklüzyonu metodu ölü hücrelerde hasarlanan plazma zarının bazı boyaları alması prensibine dayanır. Bu yöntem eosin-nigrosin veya sadece eosin boyaları kullanılarak yapılabilir. Hipoozmotik şişme ise sadece sağlam membranı olan hücrelerin hipotonik solüsyonlarda şişmesi prensibine dayanır. Isı değişikliği ve dehidratasyonun sperm canlılığı üzerine olumsuz etkilerini azaltmak amacıyla likefaksiyondan sonraki 30 dakikada ya da ejakülasyondan sonraki ilk bir saat içinde canlılık değerlendirilmelidir.

Sperm canlılığı için en düşük referans değer %58'dir (13).

1.1.3 İnfertil Çiftin Tedavisi

Üreme çağındaki çiftlerin %10-15'i infertildir (19).

İnfertilite tedavisi birçok faktörden etkilenen karmaşık bir süreçtir. Genel olarak ilk adım altta yatan neden ve ona eşlik eden faktörlerin saptanmasını kapsar ve tedavi ile onların düzeltilmesi amaçlanır.

1.1.3.1.Yaşam Biçimi Tedavileri

Sigaranın bırakılması, alkolden kaçınılması, kafein alımının azaltılması, ideal kiloya ulaşılması ve stres yönetiminin sağlanması infertil çiftte önerilen yaşam biçimi tedavileridir.

1.1.3.2 Saptanan Nedenin Düzeltilmesi

Over disfonksiyonu, azalmış over rezervi, anatomik anomaliler ve erkek infertilitesi (semen anomalileri) infertil çiftin değerlendirilmesi sırasında saptanabilen problemlerdir. Saptandıklarında probleme yönelik tedavilere başlanmaktadır (20,21).

1.2 Açıklanamayan İnfertilite

Standart infertilite değerlendirmesinin sonuçları normal ise açıklanamayan infertilite tanısı konulur (22). Açıklanamayan infertilite infertil çiftlerin %15-30 unda görülmektedir (23).

Açıklanamayan infertilite durumunda tedavi edilebilir bir neden belirlenemediğinden, tedavi zorunlu olarak ampiriktir.

Açıklanamayan infertilite için temel tedavi; hayat tarzı değişiklikleri ve oral ilaçlar veya enjektabl gonadotropinlerle ovaryen stimülasyon sonrası, intrauterin inseminasyon ve in vitro fertilizasyondur. Tedavide kullanılan yöntemler değişmesine rağmen temel strateji hepsinde aynıdır: doğru zamanda doğru yerde olağandan daha fazla sayıda sperm ve oositi bir araya getirmektir.

Açıklanamayan infertilite tedavilerini değerlendiren çalışmalarda tedavi edilmeyen hastaların siklus fekundabilitesi tipik olarak %2 ve %4 arasında değişmektedir (24). Tedavisiz gebelik olasılığı artan kadın yaşı ve infertilite süresi ile ilerleyici bir şekilde düşmektedir (25,26).

1.2.1 Ovaryen Stimülasyon

Ovaryen stimülasyon(OS): superovulasyon, ovaryen hiperstimülasyon ve kontrollü ovaryen hiperstimülasyon olarak da adlandırılan farmakolojik tedaviler ile multipl matur foliküler gelişimin uyarılmasıdır (27).

1.2.2 Ovulasyon İndüksiyonu

Anovulatuvar siklusların baskın olduğu infertilite tipinin öncelikli tedavisi ovulasyon indüksiyonudur(Oİ). Ancak gebelik olasılığını artırmak için ovulatuvar kadınlarda da kullanılabilir. Folliküler gelişimin ilaçlarla desteklenmesi ile ovulasyonun tetiklenmesi sağlanır. Ayrıca açıklanamayan infertilitesi olan çiftlerde de bu yöntemden

yararlanılmaktadır. Ovulasyon indüksiyonu için klomifen sitrat, letrozol ve gonadotropinler kullanılmaktadır (28).

1.2.3 Human Chorionic Gonadotropin (HCG)

Luteinize edici hormonun (LH) preovulatuvar dalgalanması, final oosit maturasyonu için fizyolojik uyarı sağlar ve ovulasyonu indükler. Üriner HCG (u-hCG) ve rekombinant hCG (r-HCG) olarak üzere 2 tipi bulunmaktadır.

Üriner hCG, hCG ile LH arasında yapısal benzerlik olması ve her iki hormonun aynı reseptörü uyarması nedeniyle endojen LH dalgalanmasını taklit etmek için kullanılmaktadır (29). HCG, gebe kadınların idrarında kolaylıkla bulunurken, menopoz sonrası kadınların idrarında sadece düşük konsantrasyonlarda LH bulunur (30).

Rekombinant HCG, genetiği değiştirilmiş Çin hamsteri over hücrelerinden rekombinant DNA teknolojisi ile elde edilmektedir. Üriner HCG ye alternatif olarak sunulmuştur.

Yapılan çalışmalarda r-HCG 250 µg ve u-HCG 5000 veya 10000 IU'nun yardımcı üreme teknikleri uygulanan kadınlarda foliküler olgunlaşmayı indüklemeye eşit derecede etkili olduğu gösterilmiştir (31). Fertilizasyon, gebelik oranları açısından u-HCG ve r-HCG uygulamaları arasında fark izlenmemiştir (32).

1.2.4 İntrauterin inseminasyon

Yardımcı üreme tekniklerinde ilk terapötik adımdır. Özellikle hafif erkek faktör infertilitesi, anovulasyon, en az bir patent tüpün olduğu endometriozis ve açıklanamayan infertilite vakaları için uygundur (33).

Klomifen sitrat veya letrozol kullanımı ile zamanlanmış cinsel ilişki, gebelik sonuçlarını belirgin değiştirmediğinden açıklanamayan infertilitesi olan hastalarda tedavi olarak önerilmemektedir. Bu hastalara IUI uygulanmalıdır (27).

Hazırlanmış olan semen örneğinin ovulasyon zamanı gözetilerek ince esnek bir kateter yardımıyla uterin kaviteye yerleştirilmesiyle gerçekleştirilir (33). Ovulasyonu sağlamak için

yapılan hCG enjeksiyonunu takiben 0-36 saat içerisinde tek bir IUI uygulaması önerilen tedavi şeklidir (27).

Hasta seçim kriterleri, infertilite tipi, infertilite süresi, ovulasyon indüksiyonu metodlarının ve monitorizasyonunun farklılığı, uygulanan siklus sayısı ve sperm parametrelerindeki farklılıklar IUI başarısını etkileyen faktörler olarak dikkat çekmektedir (34).



2. AMAÇ

İnfertilite önemli psikolojik ekonomik demografik ve tıbbi sonuçları olan yaygın bir durumdur. İnfertilite prevalansı sabit olmasına rağmen infertilite polikliniklerine başvuran hasta sayısında artış görülmektedir.

İnfertil çiftlerin ilk değerlendirmesi yapılırken; erkek infertilitesinin araştırılmasında en önemli tetkik semen analizidir. Günümüzde bilgisayar tabanlı tıbbi sistemler pek çok farklı hastalığın taranmasında, tanısında ve tedavisinde kullanılmaktadır. Dünyanın birçok farklı yerinde, CASA olarak nitelendirilen biyomedikal sistemler sperm analizinde kullanılmaktadır. Ancak, bu sistemlerin ciddi maliyet getirmesi, kullanılan kamera sistemi ve mikroskoba göre görüntünün değişmesi buna bağlı olarak da farklı analiz sonuçları elde edilmesi gibi kısıtlılıkları bulunmaktadır. Ülkemizde CASA sistemleri kullanılmamaktadır. Bilgisayar tabanlı sistemler yerine, mikroskop ile semen analizlerinin yapıldığı laboratuvarlarda Makler çemberleri kullanılarak uzmanların mikroskop altında gözlemleri ile gerçekleştirilmektedir. Bu ise analizi yapan kişiye bağlı sonuçların elde edilmesine neden olmaktadır. Görsel analiz veya CASA sistemleri yerine geliştirilen yazılımlar ile spermiyogram testlerinin sonuçları elde edilebilmektedir. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı İnfertilite Bilim Dalı ile Yıldız Teknik Üniversitesi Elektrik Elektronik Fakültesi Bilgisayar Mühendisliği Bölümü tarafından gerçekleştirilen bu araştırmada, güncel olarak geliştirilmiş olan bir yazılımın, her hastanede kullanılabilecek hızlı, isabetli ve minimum maliyetli spermiogram test sonuçlarının elde edilmesi doğrultusunda geliştirilmesi hedeflenmektedir. Ayrıca geliştirilen yazılım ile elde edilecek spermiyogram test sonuçlarının gebelik başarısının öngörülmesinde kullanılabilmesi için ek modül oluşturulması araştırmanın esas amacını oluşturmaktadır.

3. METOD

A. Hastaların Özellikleri

Çalışmanın tamamı İstanbul Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, İnfertilite Bilim Dalı polikliniklerine infertilite nedeniyle başvurmuş ve açıklanamayan infertilite tanısıyla takip edilmiş; kadın yaşı 35'in altında erkek yaşı 40 yaş ve altında olan, urogenital sisteme ait hastalık veya cerrahi öyküsü bulunmayan ve kontrolsüz medikal durumu bulunmayan çiftlerle yapılmıştır. Ocak 2018 –Aralık 2019 arasında infertilite nedeniyle tetkik edilen 344 çiftten, açıklanamayan infertilite tanısı alan 184 çift çalışmaya dahil edildi. Kırkiki çift, kadın yaşı 35 ve üzerinde olması nedeniyle; 11 çift ise erkek yaşı 40'ın üzerinde olması nedeniyle dışlandı. Otuzdört çift, erkekte varikosel nedeniyle takip veya operasyon öyküsü olduğu için çalışmadan dışlandı. Onüç çift, semen analizinde Kruger kriterleri karşılanmaması nedeniyle (androlojik değerlendirilmesinde sorun saptanmamasına rağmen) çalışmadan dışlandı. Yirmiiki çift, kadın faktörü (endometriozis, polikistik over sendromu, ovulatuvar faktör, geçirilmiş adneksial cerrahi, azalmış over rezervi) nedeniyle dışlandı. İki çift ise kadın ve erkek faktörü nedeniyle dışlandı. Otuzaltı çift, tıbbi kayıtlarında eksiklikler olduğu için dışlandı.

B. İnfertilitenin değerlendirilmesi

İnfertilite araştırmaları için 3-7 günlük cinsel perhiz sonrası semen analizi, adet 3. günü yapılan hormon analizi ve pelvik ultrasonografi, adet sonrası çekilen histerosalpingografi (HSG) temel testler olarak alındı. Bulgulara göre hastalar, tek başına erkek faktörü, tek başına kadın faktörü, erkek ve kadın faktörü veya açıklanamayan infertilite olarak sınıflandırıldı. Sadece açıklanamayan infertilitesi olan hastalar dahil edildi.

B.1. Semen analizi

Yapılan incelemeler DSÖ 2010 İnsan Semeninin İncelenmesi ve İşlemlerden Geçirilmesi Laboratuvar El Kitabı 5. Basım'a göre yapıldı.

C. Ovulasyon İndüksiyonu

Ovulasyon indüksiyonu (Oİ) için klomifen sitrat (CC), letrozol ve gonadotropin [rekombinant folikül stimülan hormon (r-FSH) veya insan menopozal gonadotropin (HMG)] preparatları kullanıldı.

CC veya letrozol ile Oİ uygulanan hastalara bazal ultrasonografik (USG) değerlendirme yapıldı. Adetin 2-5 günleri arasında CC 50 mg/gün veya letrozol 2,5 mg/gün başlandı. 5 günlük tedaviden 2 gün sonra USG ile follikül gelişimi kontrol edildi.

Gonadotropinlerle ile yapılan Oİ'lerinde tedaviye adetin 2. veya 3. günü; bazal USG'de antral follikül sayısı, daha önce ovulasyon indüksiyonu uygulanan hastalarda gelişen folikül sayısı gibi faktörlere bağlı olarak 37.5-150 IU arasında değişen dozlarla başlandı. Sonografik takiplere tedavinin 6. gününde başlandı. Follikül büyüklüğüne göre takip sıklığı belirlendi. Ovulasyonu tetiklemek için hedef olarak bir veya iki adet 16 mm'nin üzerinde follikül bulunması kriter olarak alındı. Üç ve daha fazla 16 mm den büyük folikülü bulunan hastalarda siklus iptali yapıldı. Oİ amacıyla 250 µg (6500 IU) rekombinan HCG kullanıldı. Tüm siklularda HCG den 36 saat sonra inseminasyon gerçekleştirildi.

D. Sperm Hazırlığı

Konik tüp içerisine % 90 lık gradient mediumundan (SpermGrand-Vitrolife, Sweden, AB) 1 ml'lik pipet yardımıyla 1 ml alınarak tüpün çeperinde yavaşça bırakıldı. Bunun üzerine %45 lik gradient mediumundan (SpermGrand-Vitrolife, Sweden, AB) 1 ml alınarak tüpün çeperinden yavaşça bırakıldı. Likefaksiyon olmuş semen numunesinin tamamı 1 ml'lik pipet yardımıyla yavaşça karıştırılıp sayıldıktan sonra, tamamı gradient mediumu üzerine çeperden yavaşça bırakılarak 300 g'de 20 dakika santrüfjü edildi. Süre bitiminde süpernatant kısım alınarak konulan (Spermrinse-Vitrolife, Sweden, AB) yıkama mediumundan 1 ml pelet üzerine eklenerek resüspanse edildi. 300 g'de 10 dakika santrüfjü edildi. Santrüfjü sonrası süpernatant kısmı alındı. Pelet üzerine son hacim 0,6 ml kalacak şekilde yıkama mediumundan (Spermrinse-Vitrolife, Sweden, AB) konularak resüspanse edildi. Tüpe konularak sperm sayı konsantrasyon ve motilite değerlendirmesi yapılarak laminar flow da bekletildi.

E. İntrauterin İnseminasyon

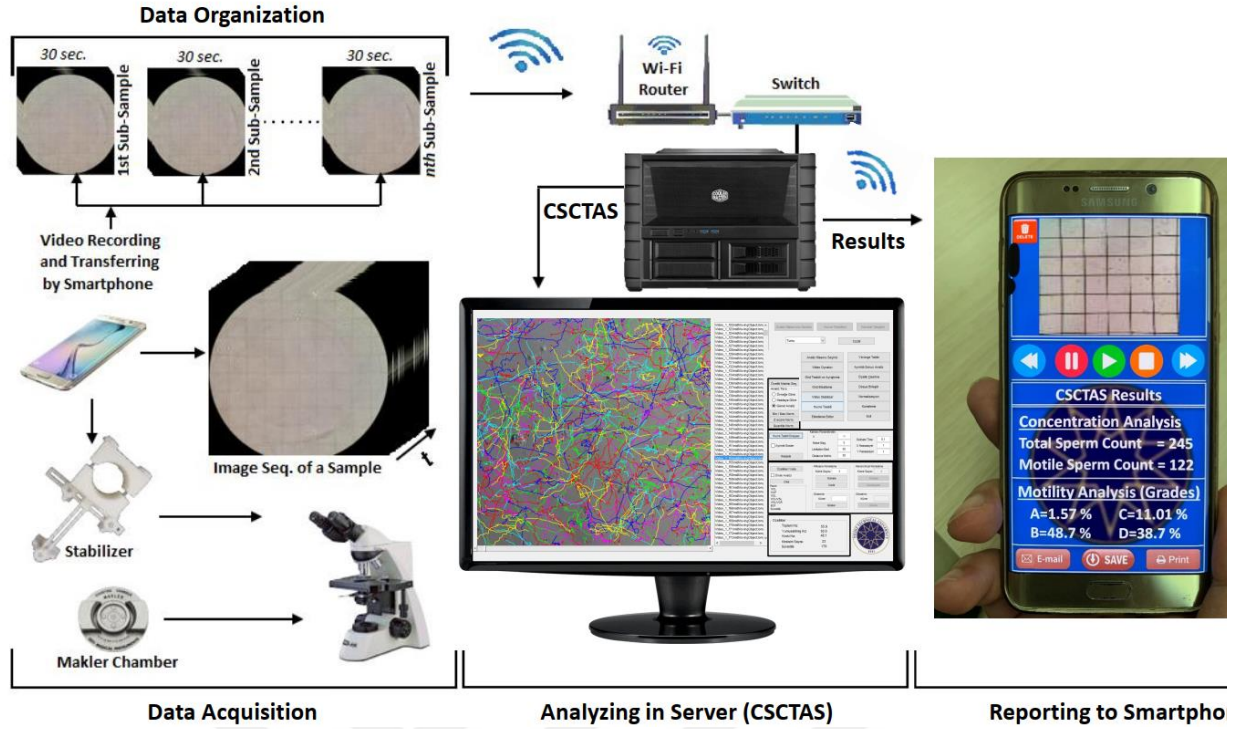
Tüm hastalardan inseminasyon işlemi için idrara sıkışık olarak gelmeleri istendi. Spekulum ile serviks vizualize edilmesinin ardından serum fizyolojik ile yıkandı. Hazırlanmış sperm, total volüm 0,6 ml olacak şekilde, inseminasyon kateteri kullanılarak yavaşça intrauterin kaviteye enjekte edildi. Hastalara 10 -15 dakika dinlendikten sonra normal aktivitelerine dönebileceği söylendi. İnseminasyonu takip eden günlerde bir hafta boyunca gün aşırı cinsel ilişki önerildi.

IUI uygulanan hastalarda inseminasyon için hazırlanan sperm örnekleri; standart görsel değerlendirmenin dışında, Yıldız Teknik Üniversitesi Elektrik Elektronik Fakültesi Bilgisayar Mühendisliği Bölümü tarafından oluşturulan sperm hareketinin analizini yapabilen bir yazılım sistemi ile de değerlendirildi. Bu değerlendirme infertilite bilim dalı içerisinde yer alan embriyoloji laboratuvarına kurulan sistem ile gerçekleştirildi.

F. Bilgisayarlı Sperm Sayma ve Takip Analiz Sistemi

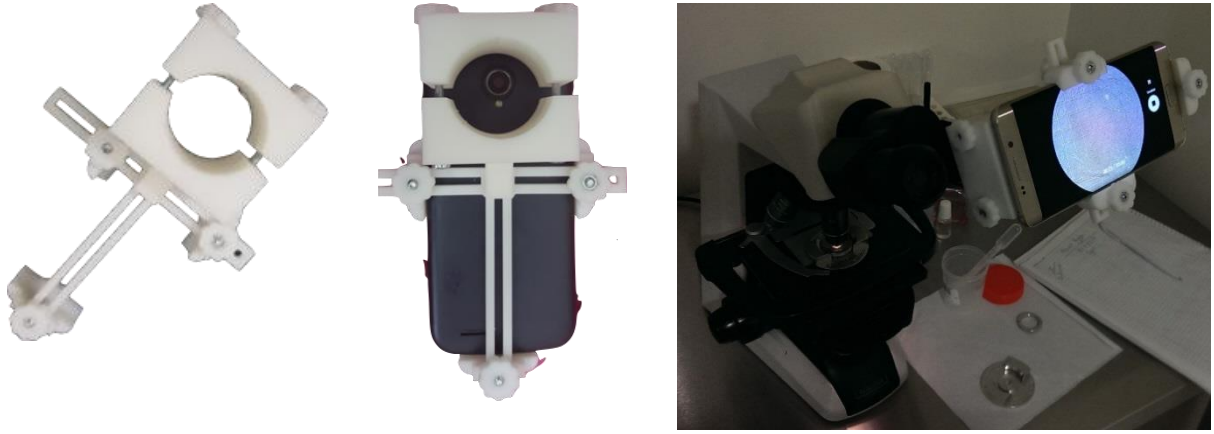
Klinikte elde edilen semen örneklerindeki sperm hücrelerinin detaylı hareket analizleri, Yıldız Teknik Üniversitesi, Bilgisayar Mühendisliği bölümü tarafından geliştirilen yazılım ile gerçekleştirilmiştir. Mühendislik temelinde görüntü/video işleme konseptleri üzerine geliştirilen yazılım “Bilgisayarlı Sperm Sayma ve Takip Analiz Sistemi – BSSTAS (Computerized Sperm Counting and Tracking Analysis System - CSCTAS) olarak isimlendirilmiştir. Çalışmanın bu kısmında, CSCTAS yazılımına ait açıklamalara yer verilmiştir.

Sperm hücrelerine ait hareketlerin analizlerinde Şekil 1’de gösterilen analiz yaklaşımı uygulanmıştır. Bu yaklaşımda, cep telefonu kullanılarak verilerin elde edilmesi, uzak sunucu tarafında elde edilen video görüntü (her bir örnek için 4 video) setlerinin sperm hareket bazında CSCTAS yazılımı ile incelenmesi ve cep telefonu üzerinde raporların görselleştirilmesi üzerine üç aşamalı analiz sürecini içermektedir.



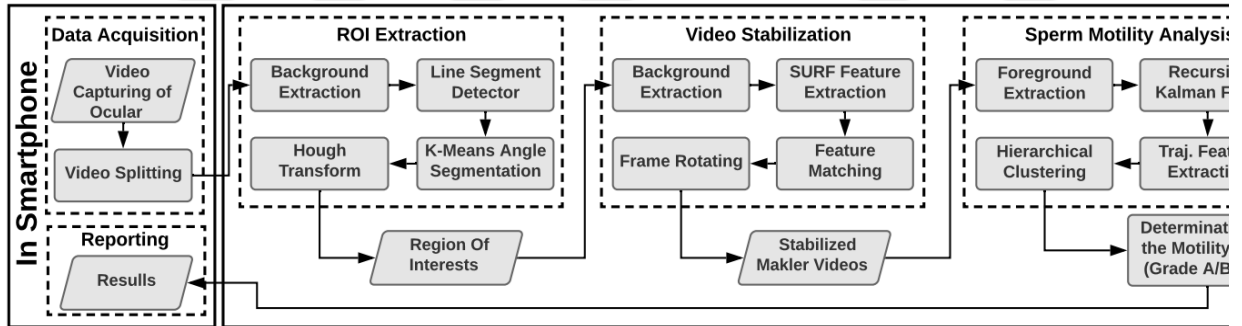
Şekil 1. Sperm hareket analizi için uygulanan üç aşamalı analiz yaklaşımı

Örneklerin toplandığı İstanbul Tıp Fakültesi İnfertilite Bilim Dalı embriyoloji laboratuvarında kullanılan mikroskobun dahili kamerasının bulunmaması, ve mevcut literatür incelendiğinde de dahili kameraların kullanıldığı mikroskopların getirdiği düşük çözünürlük, kısıtlı görüş alanı ve yazılımsal sorunlar gözlenmiştir. Bu nedenlerle cep telefonuna entegre bir sistemle veri toplama üzerine yeni bir yaklaşım planlanmıştır. Bu yaklaşım ile geliştirilen hareket analiz yazılımının; dahili mikroskop kamerası bulunmayan laboratuvarlarda da bilgisayar destekli hareket analizlerinin yapılabilmesi mümkün hale gelmiştir. Ayrıca farklı mikroskop kameralarının kullanılması ile görüntülerde meydana gelen değişimlere göre farklı analiz sonuçlarına neden olabilecek hatalar; cep telefonu tabanlı veri toplama yaklaşımı ile görüntülerin uygulama üzerinden standart formata getirilmesi yoluyla giderilmiştir. Cep telefonu, mikroskop oküler kısmına tasarlanan bir sabitleyici ile Şekil 2’de gösterildiği gibi monte edilmiş ve görüntüler yerel ağ üzerinden analizlerin gerçekleştirileceği yazılımın yer aldığı sunucuya gönderilmiştir.



Şekil 2. Telefon sabitleyici tasarım ve mikroskop üzerinden görüntünün elde edilmesi

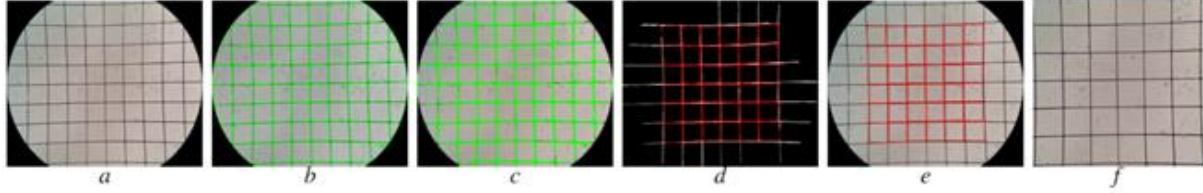
Yerel ağ üzerinden görüntüler, analizlerin ve iletimin daha hızlı olabilmesi için 30 sn'lik alt video görüntülerine ayrılarak, alt video parçaları şeklinde gönderilir. Sunucu tarafında her alt video seti üzerinden CSCTAS uygulaması çalıştırılarak analizler gerçekleştirilir. CSCTAS yazılımı içerisinde üç modül içermektedir. Yazılım ve önerilen analiz yaklaşımında kullanılan tekniklere ait akış diyagramı Şekil 3'te verilmiştir.



Şekil 3. Sperm Hareket Analizi yazılımında (CSCTAS) kullanılan görüntü işleme teknikler

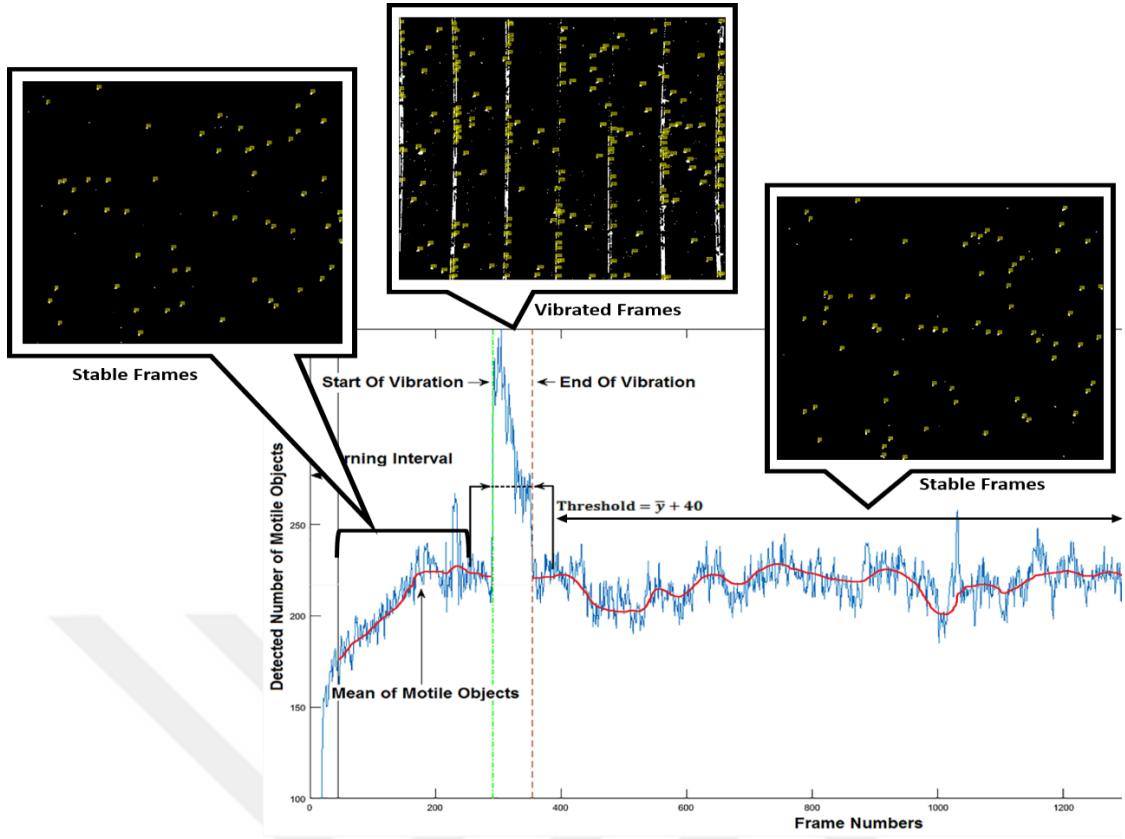
CSCTAS yazılımında ilk aşama olarak “ilgi bölgelerinin” (Region of Interest - ROI) tespiti alt modülü çalıştırılmaktadır. Farklı cep telefonları ve mikroskop oküler yapılarından doğan kenar bölgelerin kararması, bulanıklaşması gibi sorunlar nedeniyle orta bölgenin analizinin yapılması daha doğru sonuçların elde edilmesini sağlamaktadır. Bu modül sayesinde, Makler video görüntülerinin sadece 6x6'lık orta alan ızgara bölgesinin tespiti hedeflenmiştir. Bu amaç doğrultusunda, çerçeve farkı alma tekniği ile arka plan soyutlaması gerçekleştirilmiş, Çizgi Bölütleme Tespiti (Line Segment Detector - LSD) ile Maklerden

doğın ızgaralar tespit edilmiş ve son olarak tespit edilen ızgaraların açısıl bölütlemesi gerçekleştirilerek ızgara mimarisinin yazılıma tanımlandırılması sağlanmıştır. 6x6'lık orta bölgenin ilgi alanı olarak belirlenmesi için ise tespit edilen ızgara yapısının bir dalgacık dönüşüm temelinde kullanılan Hough Dönüşümü ile eliminasyonu sağlanmıştır. Bu alt modülün işlem akışında elde edilen çıktıları Şekil 4'de gösterilmiştir.



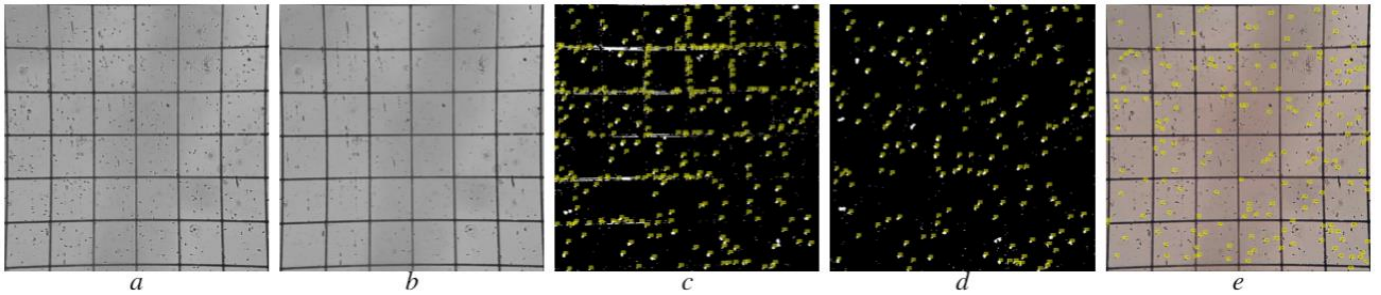
Şekil 4. İlgi Alanı belirleme modülü, a) Orijinal Makler Görüntüsü, b) Arka Planı soyutlama ve LSD ile ızgara mimarisinin tespiti, c) Izgaraaların eliminasyonu, d) 6x6 lık bölgenin bölütlenmesi, e) ROI bölgesinin Makler havzası içerisinde gösterimi, f) Hareket analizinin yapılacağı bölge

BSSTAS - CSCTAS yazılımının ikinci aşaması, oluşabilecek titreşimlerden dolayı görüntü üzerinde hareketlerin analizini yanıltabilecek bozuntu etkilerinin giderilmesini sağlayan yazılımsal video sabitleme yaklaşımını içerir. Bu modül sayesinde, hareketler üzerinde analizlerin daha doğru yapılabilmesi sağlanmıştır. Video sırasında hücre tespitleri hücrelerin hareketleri bilgisi kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Okülere monte edilen ara aparat üzerinde gerçekleşen ani titreşimler, elde edilen video görüntülerinin analizinde hareketsiz hücrelerin hareketli, makler ızgara yapılarının ise hareketli hücre sınıfı olarak algılanmasına neden olacaktır. Bu problemi önlemek için, videoların içerisinde oluşan titreşimlerin tespiti sağlanmış ve bu titreşimlerin yazılımsal sabitlemesi üzerine modül geliştirilmiştir. Titreşim esnasında hücre tespitlerinde yaşanan ani değişimlere örnek olarak Şekil 5 görseli sunulmuştur.



Şekil 5. Önerilen cep telefonu tabanlı analiz sisteminde titreşimlerin etkisi

Yazılımsal çerçeve sabitleme modülünde, bölgesel özelliklerin eşleştirilmesi (Feature Matching) tekniği kullanılmıştır. Özellik boyutunda SURF öznitelikleri kullanılmıştır. Özniteliklerin eşleştirme süreci Öklid uzaklığı metrik birimine göre gerçekleştirilmiştir. Şekil 6’da geliştirilen yazılımsal çerçeve sabitleme tekniği uygulanmış ve uygulanmamış örnek çıktılar görselleştirilmiştir.



Şekil 6. Yazılımsal çerçeve sabitleştirme modülü sonrası iyileştirilmiş görüntü seti: a) Orijinal görüntü, b) Arkaplan modülü, c) Çerçeve sabitleme modülü uygulanmamış görüntü, d) Çerçeve sabitleme modülü neticesinde iyileştirilmiş görüntü, e) Sabitleme yapılmış video seti üzerinde hareketli hücre tespitleri

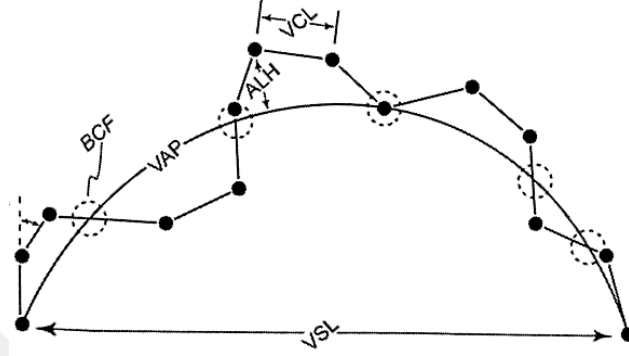
The diagram illustrates the connectivity between various brain regions. Key nodes and pathways include:

- VAP** (Visual Association Pathway)
- VCL** (Visual Cortex Lateral)
- BCF** (Basal Ganglia Frontal)
- VSL** (Visual Sensory Lateral)
- VAP-VCL** (Visual Association Pathway - Visual Cortex Lateral)

Arrows indicate the direction of connectivity, and dashed lines highlight specific regions of interest.

19

Yörüngelerin çıkartılması neticesinde, Dünya Sağlık Örgütü tarafından hareket karakteristiklerini belirleyen parametreler temelinde yörüngeler analiz edilmiştir. Bu parametrelerin hareket üzerindeki gösterimi Şekil 8’de belirtilmiştir.

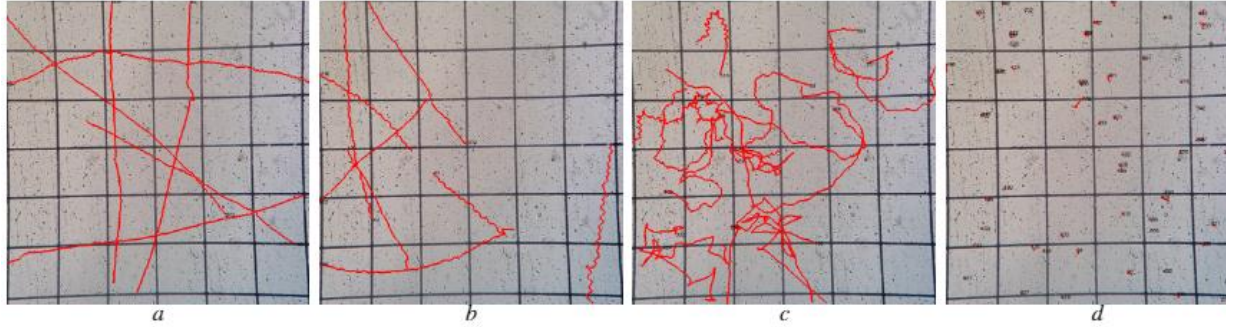


Şekil 8. Dünya Sağlık Örgütü tarafından tanımlanmış hareket karakteristiklerini belirleyen özellikler

- VCL (Curvi Linear Velocity): Tespit edilmiş semen hücresinin aldığı toplam yoldan hızının ölçülmesi (Şekil 8).
- VAP (Average Path Velocity): Alınan toplam yolun yumuşatılarak hesaplanması ve bu yol üzerinden hızının değeri (Şekil 8).
- BCF (Beat Cross Velocity): Semen hücresinin, yörüngesi ile yaptığı ortalama kesişme frekansı
- VSL (Straight Line Velocity): Semen hücresinin başlangıç ve bitiş arasındaki doğrusal uzaklığının kullanılarak hızının hesaplanması (Şekil 8).
- STR (Straightness): VSL / VAP formülü ile hesaplanır ve semenin doğrusal hareket oranını simgeler.
- LIN (Linearity): VSL / VCL formülü ile hesaplanır ve semen hareketinin düzgün çizgisel harekete yatkınlık oranını simgeler.

- WOB (salınım-gerçek yolakta ilerlerken izlenen dalgalanmasının ölçüsü): VAP / VCL formülü ile hesaplanır

CSCTAS yazılımı elde edilen her alt yörünge parçasını, bu parametrelere göre analiz eder. Grade A, B, C ve D olarak sperm hareket tipini, belirlenen parametrelere göre raporlar. CSCTAS yazılımı neticesinde 4 hareket tipine göre raporlanmış örnek hareketler Şekil 9'da gösterilmiştir.



Şekil 9. CSCTAS'a göre sperm hareket tipleri a)Grade A, b)Grade B, c)Grade C, d)Grade D

İlk aşamada cihazın sonuçları ve IUI uygulanan hastalarda inseminasyon için hazırlanan sperm örneğinin standart görsel değerlendirmesinin karşılaştırılması yapılarak kalibrasyon yapıldı. Ardından IUI uygulanan hastalar da gebelik elde edilenler ile edilmeyenler arasında motilite parametreleri açısından karşılaştırmaları yapıldı.

G. Gebelik Teşhisi

Hastalar B-hCG gününden sonraki 14 gün içinde adet olmamışlarsa β -hCG testi yapıldı. B-hCG pozitifliği saptanan hastalar gebe olarak kabul edildi.

Açıklanamayan infertilitesi olan OI-IUI uygulanmış tüm çiftlere ait yaş, vücut kitle indeksi, sigara kullanımı, ek hastalıklar, ovulasyon indüksiyonunda kullanılan ajan, inseminasyona hazır olan sperm örneklerinin motilite değeri (%), infertilite süresi (yıl), gebelik sağlanıp sağlanmadığı, yazılım sisteminin değerlendirdiği: VCL (eğrisel hız), VSL (doğrusal hız), VAP (ortalama yol hızı), LIN (doğrusallık-eğrisel yolların doğrusallığı), WOB (salınım-gerçek yolakta ilerlerken izlenen dalgalanmasının ölçüsü), STR (doğrusallık-

ortalama yolun doğrusallığı), BCF (çapraz geçiş frekansı ritmi) bilgileri kaydedildi. Gebelik elde edilen ve gebelik elde edilemeyen hastalar belirlenerek olarak analizler gerçekleştirildi.

S. İstatiksel Yöntem

İstatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) Statistical Software (Utah, USA) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart sapma, medyan, sıklık, oran) yanısıra değişkenlerin normal dağılıma uygunluklarında Shapiro Wilk test ve box plot grafikler kullanıldı. Normal dağılım gösteren değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmalarında Student t test; normal dağılım göstermeyen parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Mann Whitney U test kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Ki-Kare testi ve Fisher's Exact test kullanıldı. Anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

Aynı zamanda başarılı gebelik sağlanan çiftlerin sonuçlarıyla, kural tabanlı karar ağacı modeli istatistiği yapıldı. Elde edilen karar ağacı medolinin anlamsal bütünlüğünün yorumlanmasında geçerli parametre olan Kohen Kappa analizi yapıldı. Anlamlılık kappa > 0.8 düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

Çalışma Ocak 2018-Aralık 2019 tarihleri arasında, kadınların yaşları 20 ile 34 arasında değişen (ortalama $27,82 \pm 3,29$), erkeklerin yaşları ise 22 ile 40 arasında değişen (ortalama $31,68 \pm 3,86$) 184 olgu üzerinde yapılmıştır. İnfertilite süresi ortalama $3,48 \pm 2,45$ yıldır. Kadınların %85,3'ü erkeklerin %56'sı aktif olarak sigara içmekteydi. Vücut kitle indeksi(BMI) 30'un üzerinde olan kadın oranı %15,8'dir. Hastaların tamamında infertilite ile doğrudan veya dolaylı ilişkisi olabilecek ek hastalık bulunmamaktadır (Tablo 2). Hastaların tamamı açıklanamayan infertilite tanısı ile takipteydi; %51'inde Gonadotropin, %30'unda femara, %13,6'sında menogon, kalanında da CC tedavisi ile ovülasyon indüksiyonu yapılmıştır (Tablo 3).

Tablo 2: Tanımlayıcı özelliklerin dağılımı

		Ort $\pm$ SD	Medyan (min-max)
Bayan Yaş	184	$27,82 \pm 3,29$	28 (20-34)
Erkek Yaş	184	$31,68 \pm 3,86$	31 (22-40)
İnfertilite Süresi(yıl)	184	$3,48 \pm 2,45$	2,5 (1-12)
Kadın Sigara	N	%	
İçiyor	157	85.3%	
İçmiyor	25	13.6%	
Bilinmiyor	2	1.1%	
Kadın BMI			
<18.5	3	1.6%	
18.5-24.9	103	56.0 %	
25-29.9	39	21.2%	
30-34.9	25	13.6%	
35-44.9	4	2.2%	
Bilinmiyor	10	5.4	
Erkek sigara			
İçiyor	104	56.5%	

İçmiyor	73	39.7%
Bilinmiyor	7	3.8%
Kadın ek hastalık		
Yok	172	93.5
Var	12	6.5
Erkek ek hastalık		
Yok	183	99.5
Var	1	0.05

Kadın ve erkek özelliklerinin dağılımı Tablo 2’de görülmektedir.

Tablo 3: Fertiliteye ilişkin değişkenlerin dağılımı

	n	%	
İndüksiyon ajanı			
Gonal F	94	51.1%	
Menagon	25	13.6%	
Femara	55	29,9%	
Klomen	10	5.4%	
İnfertilite Nedeni			
Açıklanamayan	184	100.0%	
Gebelik			
Var	29	15.76	
Yok	155	84.24	
	N	Ort±SD	Medyan (min-max)
Volüm	170	3,79±1,33	3,7 (1-8,4)
Sperm Sayısı ($\times E^6$)	178	333,76±188,36	280 (50-880)
Motilite (%)	177	47,69±12,82	48 (20-75)
Morfoloji (%)	168	1,77±1,36	1 (0-10)
İşlemden Hemen Önce Motilite (%)	184	45,51±9,89	45 (2-63)
İşlemden Hemen Önce Sayı ($\times E^6$)	184	346,24±184,51	310 (40-880)
Yıkama Sonrası Motilite (%)	184	89,83±7,89	92 (20-98)

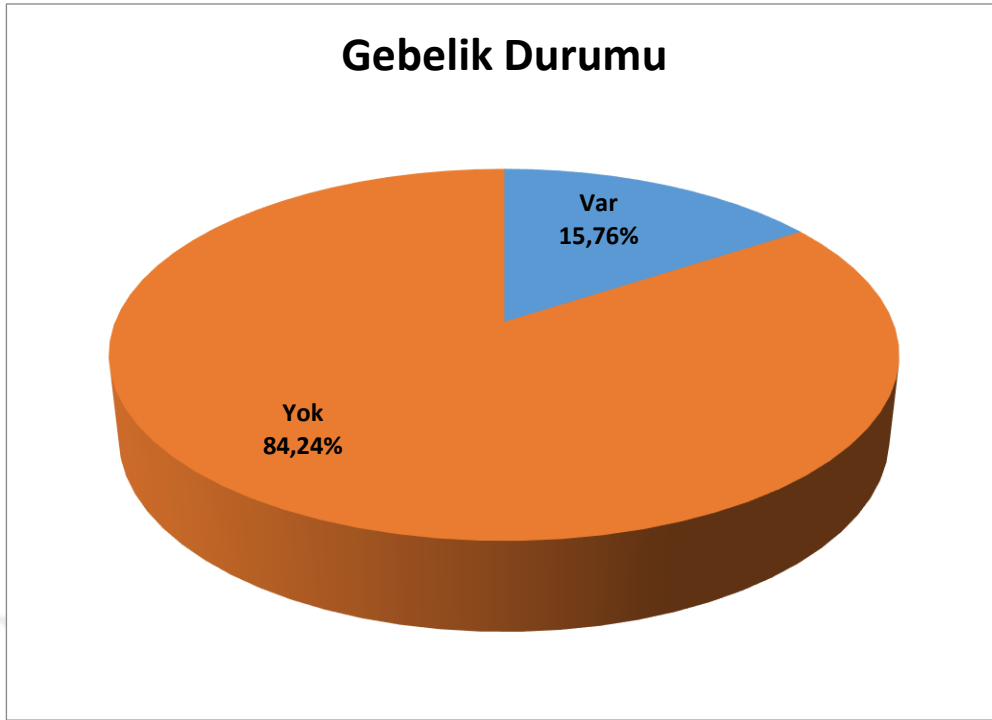
Yıkama Sonrası Sayı ($\times E^6$)	184	36,14 $\pm$ 32,78	276 (18-3240)
Hareketli Hücre Sayısı ($\times E^6$)	137	32,00 $\pm$ 24,83	23320 (1320-151050)
VAP	184	12,82 $\pm$ 3,92	13,3 (2,5-22,3)
VSL	184	9,64 $\pm$ 2,93	9,9 (1,7-16,2)
STR	184	0,68 $\pm$ 0,07	0,7 (0,4-0,8)
LIN	184	0,6 $\pm$ 0,09	0,6 (0,3-0,8)
WOB	184	0,81 $\pm$ 0,09	0,8 (0,3-0,9)
Grade A (İleri hareketli)	184	5,16 $\pm$ 5,69	3 (0-32,8)
Grade B (İleri Yavaş Hareketli)	184	31,33 $\pm$ 12,68	31,8 (6-65,5)
Grade C (Yerinde Hareketli)	184	49,58 $\pm$ 17,71	50,5 (4-86)
Grade A+B+C	184	86,08 $\pm$ 13,37	90,3 (23-100)
Grade D	184	14 $\pm$ 13,36	9,8 (0-76)

Fertiliteyle daha yakın ilişkisi olan değişkenlerin genel dağılımları da Tablo 3 de görülmektedir.

Manuel spermioqram tetkikiyle yapılan ölçümlerden; yıkama sonrası motilite ortalama %89,83 $\pm$ 7,89; yıkama sonrası sayı ortalama 36,14 $\pm$ 32,78 $\times 10^6$; hareketli hücre sayısı ortalama 32,00 $\pm$ 24,83 $\times 10^6$ olarak hesaplanmıştır.

CSCTAS sistemiyle yapılan ölçümlerden VAP ortalama 12,82 $\pm$ 3,92; VSL ortalama 9,64 $\pm$ 2,93; STR ortalama 0,68 $\pm$ 0,07; LIN ortalama 0,6 $\pm$ 0,09 WOB ortalama 0,81 $\pm$ 0,09 olarak hesaplanmıştır. CSCTAS sistemiyle yapılan hareket gruplamalarında Grade A hareketli sperm oranı ortalama %5,16 $\pm$ 5,69; Grade B hareketli sperm oranı ortalama %31,33 $\pm$ 12,68; Grade C hareketli sperm oranı ortalama %49,58 $\pm$ 17,7 olarak hesaplanmış olup, toplam hareketli sperm oranı (A+B+C) ortalama %86,08 $\pm$ 13,37'dir. Hareketsiz sperm oranı ortalama %14 $\pm$ 13,36 olarak hesaplanmıştır.

Olguların %15,76'sı (n=29) pozitif gebelikle sonuçlanmıştır.



Şekil 10. Gebelik durumu

Tablo 4: Tanımlayıcı özelliklerin gebelik durumuna göre değerlendirmeleri

	Gebelik (-)	Gebelik (+)	<i>p</i>
Bayan Yaş; <i>ort±SD</i>	27,72±3,06	28,34±4,34	^a 0.466
Erkek Yaş; <i>ort±SD</i>	31,59±3,65	32,21±4,86	^a 0.518
İnfertilite Süresi(yıl); <i>medyan (IQR)</i>	2,5 (1,5-4,5)	4 (2-7)	^b 0.051
	n (%)	n (%)	^c <i>p</i>
Kadın Sigara			^d 0.563
İçiyor	23 (14.8)	2 (6,9)	
İçmiyor	130 (83.9)	27 (93,1)	
Bilinmiyor	2 (1.3)	0	
Kadın BMI			0.619
Normal	91 (61.9)	15 (55.6)	
Fazla Kilo	31 (21.1)	8 (29.6)	
Obez	25 (17.0)	4 (14.8)	

Erkek sigara			0.361
İçiyor	63 (40.6)	10 (34.5)	
İçmiyor	85 (54.8)	19 (65,5)	
Bilinmiyor	7 (4.5)	0	
Kadın ek hastalık			^d0.219
Yok	143 (92.3)	29 (100)	
Var	12 (7.7)	0	
Erkek ek hastalık			^d1.000
Yok	154 (99.4)	29 (100)	
Var	1 (0.6)	0	

^aStudent t test

^bMann Whitney U test; sonuçlar medyan (birinci çeyreklik, üçüncü çeyreklik) şeklinde sunulmuştur.

^cKi kare test

^dFisher Exact test

* $p < 0,05$

Gebelik durumuna göre bayan yaşları, erkek yaşları ve infertilite sürelerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p > 0,05$).

Kadın-erkek sigara kullanımı, kadın BMI, kadın ve erkek ek hastalık oranları da gruplara göre anlamlı farklılık göstermemektedir ($p > 0,05$).

Tablo 5: Fertiliteye ilişkin değişkenlerin gebelik durumuna göre değerlendirmeleri

	Gebelik (-)	Gebelik (+)	p
İndüksiyon ajanı			^c0.920
Gonal F	79 (51.0)	15 (51,7)	
Menagon	22 (14.2)	3 (10.3)	
Femara	45 (29.0)	9 (34,5)	
Klomen	9 (5.8)	1 (3.4)	
	Medyan(IQR)	Medyan(IQR)	^ap
Likefaksiyon (dk)	30 (20-30)	25 (20-30)	^b0.145
Volüm	3,7 (2,8-4,6)	3,9 (3,3-4,3)	^b0.683

Sperm Sayısı ($\times E^6$)	28 (19-48)	29 (19-42)	^b 0.401
Motilite (%)	48 (40-56)	44 (35-59,5)	0.745
Morfoloji (%)	1 (1-3)	1 (1-2)	^b 0.398
İşlemden Hemen Önce Motilite (%)	45 (40-55)	45 (40-52)	^b 0.616
İşlemden Hemen Önce Sayı ($\times E^6$)	32 (20-46)	30 (22-44)	^b 0.909
Yıkama Sonrası Motilite (%)	92 (88-95)	92 (90-93)	^b 0.621
Yıkama Sonrası Sayı ($\times E^6$)	28,8 (15,6-50,4)	25,2 (22,8-37,8)	^b 0.942
Hareketli Hücre Sayısı ($\times E^6$)	24,16 (12,67-50,16)	22,47 (19-39,60)	^b 0.935
VAP	12,72 $\pm$ 3,90	12,84 $\pm$ 3,93	0.878
VSL	9,44 $\pm$ 3,01	9,68 $\pm$ 2,91	0.692
STR	0,69 $\pm$ 0,05	0,68 $\pm$ 0,07	0.533
LIN	0,62 $\pm$ 0,06	0,60 $\pm$ 0,09	0.334
WOB	0,81 $\pm$ 0,09	0,83 $\pm$ 0,03	0.004**
Grade A (İleri hareketli)	3 (1-8)	2 (1-9,5)	^b 0.727
Grade B (İleri Yavaş Hareketli)	32,3 (21,7-38,8)	28,3 (21,5-32,5)	^b 0.353
Grade C (Yerinde Hareketli)	49,5 (37,8-63)	52,5 (38,5-64)	0.755
Grade A+B+C	90,5 (81,5-95)	88 (80,5-93,3)	^b 0.441
Grade D	9,5 (5-18,8)	12,3 (6,5-19,5)	^b 0.453

^aStudent t test

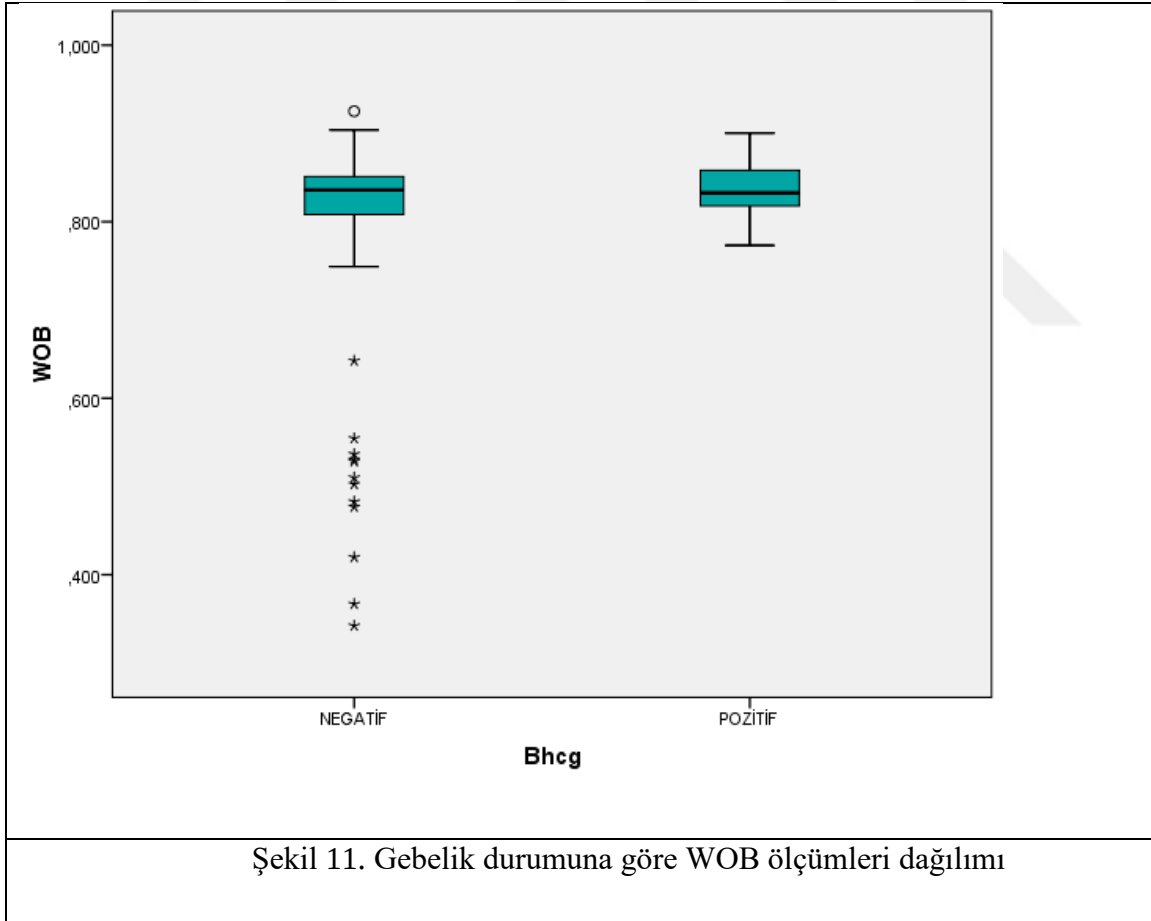
^bMann Whitney U test; sonuçlar medyan (birinci çeyreklik, üçüncü çeyreklik) şeklinde sunulmuştur.

^cKi kare test

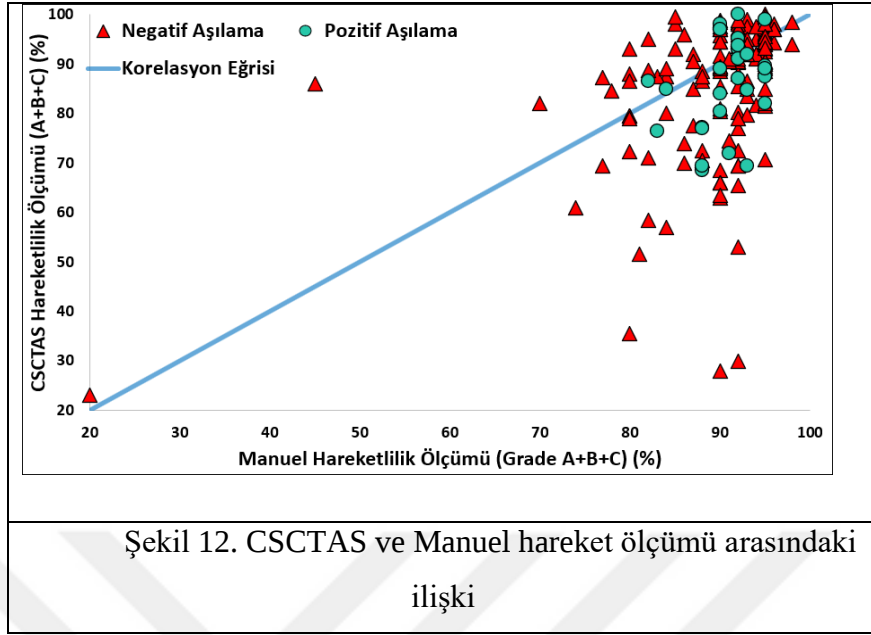
$p < 0,05$ ** $p < 0,01$

Gebelik durumuna göre indüksiyon ajanların kullanım oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0,05$).

Likefaksiyon, volüm, sperm sayısı, motilite, morfoloji, yıkama işleminden önce motilite, sperm sayısı, yıkama işleminden sonra motilite, sperm sayısı ve hareketli hücre sayıları gebelik durumuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiştir ($p>0,05$). Sperm hızlarına ilişkin VAP, VSL, STR ve LIN ölçümleri gebelik durumuna göre anlamlı farklılık saptanmazken; *yalnızca WOB ölçümleri gebelik saptanan olgularda anlamlı düzeyde yüksektir* ($p<0,05$).



CSCTAS yazılımı ile manuel tekniğin korelasyonu amaçlanarak; Grade A + B + C hareketli sperm oranları laboratuvar uzmanları tarafından da aynı örneklerden ölçülerek kaydedilmiştir. Manuel ve CSCTAS ölçümlerinde hareket oranı anlamında korelasyon eğrisi Şekil 12’de sergilenmiştir.



CSCTAS ve manuel ölçümler arası ilişki incelendiğinde korelasyon eğrisine yakın sonuçların yoğunlukta olduğu gözlemlenmektedir. Bu bağlam CSCTAS tekniğinin görsel teknikler dahilinde benzerlerinden ayrı bir sonuç vermediğini göstermektedir. Ancak bazı sperm örneklerinin analiz sonuçları korelasyon eğrisine uzak görülmektedir.

Tüm çiftlerin aynı anda dahil edildiği, tüm değişkenlerin birbirleri ile olan ilişkilerinin incelenmesinin amaçlandığı karar ağacı istatistiğinde; *yaş* ve *linearite* en önemli pozitif gebelik değişkenleri olarak izlenmiştir. Karar ağaçları modeli; kural tabanlı makine öğrenme tekniklerindendir. Profil bilgisinin çıkarımında belli kuralların oluşturulmasını ve örnekleri oluşturulan kurallar çerçevesinde değerlendirmeyi amaçlar.

Yirmiiki yaş altındaki tüm çiftlerde gebelik sağlanmış olması, çalışmamıza ait karar ağacında *yaşı* en önemli faktörlerden birine dönüştürmektedir.

Yirmiiki yaş üzerindeki çiftlerin analizinde, *linearite* 2. Önemli parametre olarak izlenmektedir. Bire yaklaşması sperm hareketinin doğrusallaştığını ifade etmektedir, 0,73 üzerindeki değerler gebelikte daha yüksek ilişkili saptanmıştır.

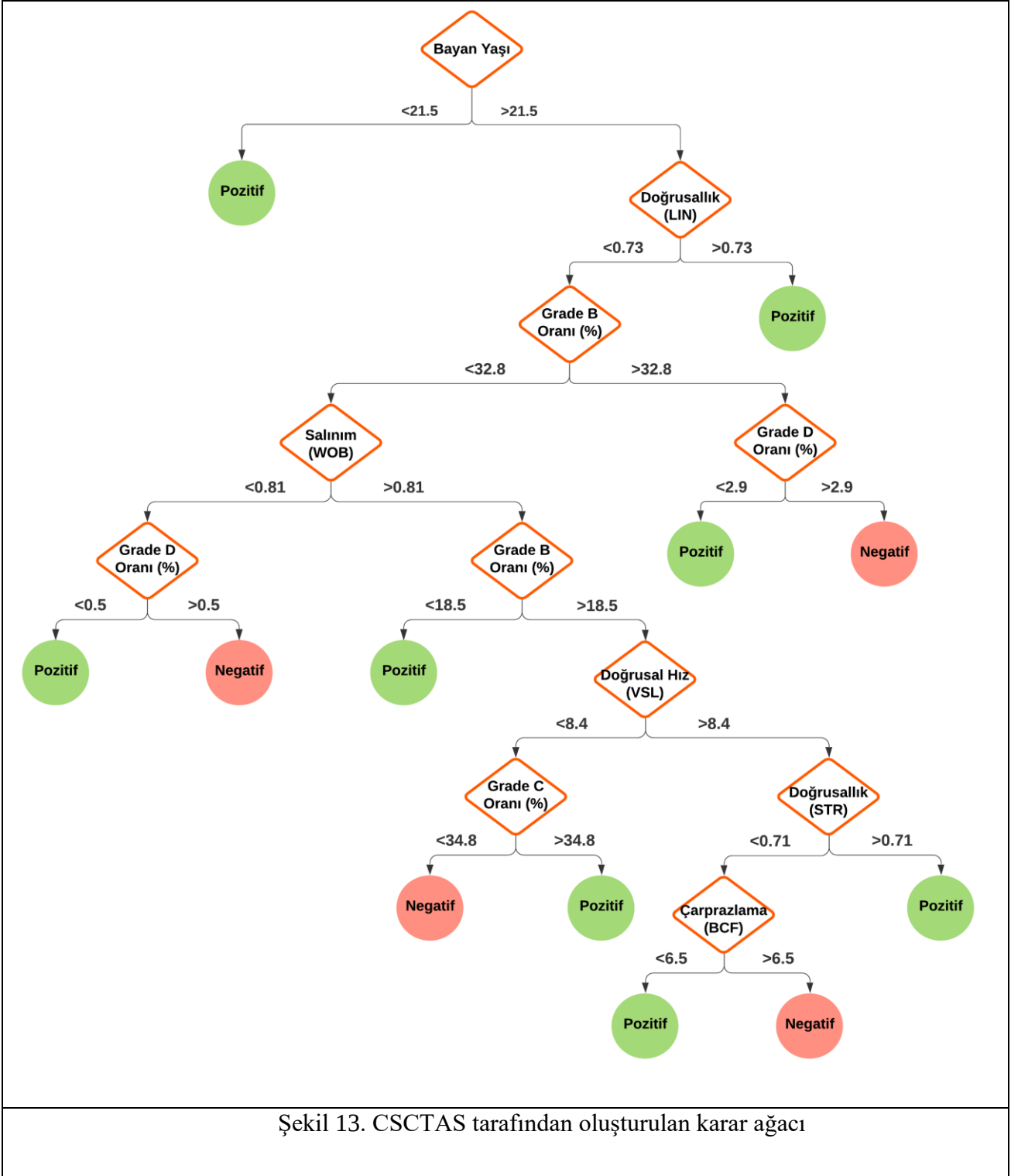
Çalışmamızda linearitenin (LIN) 0.73 altında olduğu değerlerde ise doğrusallık azaldığından spermilerin doğrusallığı noktasında fikir verebilen bir başka parametre olan *Grade B* oranının kararda etkisinin olduğu bulgusuna varılmıştır.

Kümülatif sperm örneği içerisinde Grade B sınıfına giren %32.8 üstü orana sahip örneklerde titretilen veya hareketsiz olarak nitelendirilen Grade D sınıfına ait spermilerin oranlarındaki %2.9 altı örneklerin pozitif gebelik ile sonuçlandığı, ancak Grade B yüksek olsa da Grade D oranının %2.9 oranından yüksek olduğu örnekler için negatif bir gebelik ile sürecin sonlandığı belirlenmiştir. Grade D oranının Grade B oranındaki sperm yoğunluğunu sönümlendirerek negatif gebe durumunun belirlenmesinde burada kritik önemi bulunmaktadır.

Düşük Grade B (%32,8'in altı) oranlarında ise bir başka hareket parametresi olan *Salınım (Wobbl - WOB)* hareket parametresinin etkisi gebe durumunu belirleyici bir etken olduğu gözlemlenmiştir. Sperm hücrelerinde salınım parametresi olarak hesaplanan WOB değerlerinin yüksek olması ise daha az kararsız salınım ile daha düzgün bir hareket karakteristiğini ifade ederken; düşük olması daha fazla kararsız salınımı göstermektedir.

Karar ağacı istatistiği ile saptanabilen WOB eşik değeri olan 0.81 değerinden yüksek olan sperm örneklerde, doğrusal olabilen ancak içerisinde titretilen harekette barındırabilen Grade B oranının %18.5 altında kalması durumunda pozitif gebe ile sonuçlanan aşılama süreci gözlemlenmiştir. WOB değeri olan 0.81'den az olan *Grade D seviyesi de %0.5 gibi çok az değerler* bandından bile yüksek bulunan sperm ile gerçekleştirilen aşılama sürecinin negatif sonuçlandığı gözlemlenmiştir. Burada en önemli bilginin salınımın artmasından dolayı fertilizasyonun gerçekleşmesinin güç olduğu bilgisi çıkartılabilir. Grade D olarak belirlenen hareketsiz sperm hücrelerinin yoğunluğunun çok az olma durumunda (<%0.5) pozitif fertilizasyon oranı artmaktadır.

Salınımın az olduğu ancak Grade B oranının yüksek olduğu ($WOB > 0,81$ Grade B > %18,5) örneklerde ise bir başka doğrusallığı tarif eden hareket parametresi *doğrusal hız (VSL)* gebe kalma durumuna etki etmektedir. Doğrusal hızın $8.4 \mu\text{m/s}$ üzeri değerlerinde yüksek ortalama hareket yolunun doğrusallık derecesi (STR) ile beraber gebelik sürecinde pozitif etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Doğrusal Hızın yeterli olduğu ancak ortalama hareket yolunun doğrusallık derecesinin (STR) yeterli olmadığı sperm hareket karakteristiklerine sahip durumlarda ise çarpazlama sıklığı olarak belirtilen sperm başının oynama sıklığı yumurtanın fertilizasyon sürecini etkilediği kanısına varılmıştır. Sperm baş hareketinin çok hızlı olması (6.5 Hz üzeri) fertilizasyon ihtimalinde azalmaya neden olmaktadır.



Genel olarak CSCTAS yazılımı kullanılarak elde edilen kural tabanlı karar ağacı modeli 184 çift verisi üzerinde uygulandığında elde edilen karışıklık matrisi (Confusion Matrix) Şekil 14’de verilmiştir.

True Class	Negative	149 (TP)	6 (FN)
	Positive	2 (FP)	27 (TN)
		Negative	Positive
		Predicted Class	

Şekil 14. Kural tabanlı karar ağacı modelinin 184 çift üzerinde gebelik sürecini tahminlemede kullanılması

Karışıklık matrisi, model performans değerlendirmesi yapılırken, gerçek gözlemlere karşı doğru ve yanlış tahminleri listeler. Ayrıca birkaç içgörülü performans ölçümünün hesaplanmasına izin verir. Birçok yararlı performans ölçütü, karışıklık matrisindeki değerlerden türetilmektedir. Karışıklık matrisi üzerinde yer alan Gerçek Pozitifler (TP), modelin ilgili sınıf için doğru sınıflandırdığı resim sayısını belirtir. Gerçek Negatifler (TN) ise modelin ilgili sınıfa ait olmayan resimler için verdiği doğru kararı gösterir. Yanlış Negatif (FN) ve Yanlış Pozitif (FP) değerleri ise resimlerin ilgili sınıfta olmasına rağmen sınıf dışında veya ilgili sınıfta olmadığı halde sınıf içerisinde değerlendirdiği imge sayısını gösterir. Bu değerler kullanılarak 4 farklı performans metriği sonuçların kıyaslanmasında kullanılmıştır. Metriklerin matematiksel formülleri denklem 1, 2, 3 ve 4'te verilmiştir.

$$\text{Doğruluk Oranı} = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN}$$

$$\text{Hassasiyet} = \frac{TP}{TP + FP}$$

$$\text{Duyarlılık} = \frac{TP}{TP + FN}$$

$$F1 \text{ Skor} = 2 \times \frac{\text{Hassasiyet} \times \text{Duyarlılık}}{\text{Hassasiyet} + \text{Duyarlılık}}$$

Doğruluk oranı, doğru şekilde sınıflandırılmış örneklerin kullanılan tüm veri kümesine oranıdır. Hassasiyet ise elde edilen modelin tahmini olarak oluşturulan pozitif örneklere göre ne kadar kesin olduğunu ve tahmin edilen pozitif verilerin ne oranda gerçek pozitif olduğunu gösterir. Hassasiyet, FP için yapılan tahminlerin maliyetlerinin hangi dilimde yüksek seviyede olduğunu bulabilmek için gerekli ve önemli bir parametredir. Duyarlılık, gerçek pozitif örneklerin ne oranda yakalandığının model tarafından pozitif (TP) olarak etiketlenerek ölçülmesidir. Elde edilen FN örnekleriyle çıkarılan yüksek maliyetlerde kullanılan önemli bir parametredir. F1 skor metriği ise hassasiyetin ve gerçek pozitif değerlerin oranının (duyarlılık) harmonik ortalamasıdır. Sınıflandırıcının performansının ne düzeyde olduğunun bir ölçüsüdür ve sınıflandırıcıları karşılaştırmak için sıklıkla kullanılmaktadır. Şekil 14’de sunulan karışıklık matrisinden elde edilen performans değerleri Tablo 6’de verilmiştir.

(%)	Hassasiyet	Duyarlılık	F1 Skor	Doğruluk Oranı	Kappa
Pozitif	81.8	93.1	87.1	95.65	0.845
Negatif	98.7	96.1	97.4		
Tablo 6: Karışıklık Matrisi üzerinden elde edilen model performans sonuçları					

Elde edilen sınıflandırma değerleri incelendiğinde, gelen veri seti üzerinde oluşturulan ağaç modelinin başarısı %95,65 olarak ölçülmüştür. 184 aşılama sürecinin 176’sında başarılı bir tahminleme oluşturulan ağaç modeli üzerinden gerçekleştirilmiştir. Pozitif ve Negatif gebelik sınıf bazında oluşturulan ağaç mimarisi yorumlandığında ise negatif gebelik sürecinin

tahminlenmesinde %98.7 oranında pozitif gebelik ile ayrıştırılabildiği, pozitif gebelikte ise %81.8 oranında negatif gebelikten ayrı tutabildiği bir tahminleme raporlanmıştır. Kohen kappa olarak bilinen elde edilen gözlemlerin anlamsal bütünlüğünün yorumlanmasında kullanılan parametre altında sonuçlar incelendiğinde 0.845 ile anlamlı sonuçların bulunduğu söylenebilir.



5. TARTIŞMA

Dünyada son 50 yılda bilgisayar destekli sperm analiz sistemleri yaygınlaşmasına rağmen, ülkemizde maliyeti nedeniyle bu sistemler kullanılamamaktadır. Manuel analiz yöntemlerine yaygın bir şekilde başvurulmaktadır. CASA sistemleri ile tekrarlanabilen, daha kesin ve objektif sonuçlar elde edilmektedir (35).

DSÖ tavsiyelerine uygun olarak yapılan manuel semen analizi sonucunda elde edilen sperm parametreleri klinik uygulama için referans olmaya devam etmektedir. Ancak, bu parametreler erkeğin fertilite potansiyelini her zaman gösterememektedir (36). Manuel semen analizinin gerçek fertilite potansiyelinin kesin bir öngörücüsü olmadığı kabul edilmektedir (37).

CASA teknolojisi sadece ölçümlerin objektifliğini artırmakla kalmaz, aynı zamanda ayrıntılı hareket analizlerine de izin verir. Ancak yüksek maliyet, kullanılan kamera sistemi ve mikroskoba göre görüntünün değişebilmesi gibi kısıtlılıklar mevcuttur. Buna bağlı olarak da farklı analiz sonuçları elde edilmesi riski oluşmaktadır (38).

Çalışmamızda kliniğimizde açıklanamayan infertilite tanısı alan çiftlere uygulanan OI-IUI ile ovumun fertilizasyonu sürecinde, CSCTAS yazılımı kullanılarak gebelik oluşmasına etki eden sperm hareketliliğinin araştırılması yapıldı. Manuel spermiogram tetkiki ile patoloji saptanmayarak, androloji kliniklerinden spermiogram tetkiki normal olarak raporlanmış kişilerden alınan örneklerle analizler gerçekleştirildi. CSCTAS yazılımı ile sperm hücrelerinin hareket karakteristikleri; sadece yüzdelik oran ile değil, detaylandırılmış parametreler ile kaydedildi. Gebelik başarısına destek sağlayacak veriler elde edilmeye çalışıldı.

Merviel ve ark. tarafından, 353 infertil çift ile yapılan bir çalışmada; total motil sperm sayısı beş milyonun üzerinde olanlarda, kadın yaşı 30'un altında olanlarda gebelik oranlarının anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptanmıştır (39).

Barratt ve ark. tarafından yapılan 222 çiftin dahil edildiği, sperm analizlerinin CASA ile yapıldığı bir prospektif çalışmada 54'ünde başarılı gebelik sağlanabilmiştir. Spermiogram sonuçlarının analizlerinde VAP değeri gebelik sağlanabilenlerde ortalama 45 $\mu\text{m}/\text{sn}$, sağlanamayanlarda ortalama 39 $\mu\text{m}/\text{sn}$ saptanarak anlamlı derecede farklı bulunmuştur. Total ileri hareketli sperm sayısı ve yüzdesinin de gebelik başarısı ile istatistiksel anlamlı ilişkisi

(Gebelik sağlanabilenlerde ortalama %45, sağlanamayanlarda ortalama %25 hareketlilik) gösterilmiştir (40).

Polansky ve ark. 1998 yılında yaptığı, 1089 tane açıklanamayan infertilitesi olan çiftin dahil edildiği bir çalışmada, 317 gebelik elde edilebilmiştir. Manuel spermiogram parametreleri ile yapılan ileri analizlerde, herhangi bir parametrenin doğrudan gebelik başarısı ile istatistiksel anlamlı bir ilişkisi gösterilememiştir (37).

Dodson ve ark. yaptığı 1987 tarihli bir çalışmada hafif ve orta şiddette kadın faktörü olan 85 infertil çift dahil edilmiştir. Hastalara OI-IUI uygulanmış sonrasında yapılan takiplerde 24 çiftte gebelik sağlanmıştır. Gebelik elde edilen ve edilemeyen kadınların yaş dağılımları benzer olup, inseminasyon için hazırlanan semen örneklerinde motil sperm sayıları benzer saptanmıştır (41).

İrvine ve ark. yaptığı 1994 tarihli bir çalışmaya 303 çift dahil edilerek manuel yöntem ve CASA sistemiyle semen analizi yapılarak gebelik ilişkileri saptanmaya çalışılmıştır. Yüzyirmibeşinde (%41) manuel spermiogram analizi normalken; 111 (%37) erkekte sayı, motilite ve şekil anomalileri saptanmış. Altmışyedi (%22) erkeğin semen analizinde morfolojik veriler eksik iken hareket parametreleri kaydedilmiş. Bunların 32'sinde gebelik elde edilerek hareket parametrelerinin analizi yapılmıştır. Normal semen analizi olan 125 çiftin 77'sinde spontan gebelik sağlanmış, anomali olan 111 çiftin de 50'sinde OI-IUI ile gebelik sağlanabilmiş. Tüm çiftlerin 159'unda gebelik sağlanarak, gebelik sağlanabilen ve sağlanamayan çiftlerin hareket parametrelerinin analizi yapılmıştır. Manuel spermiogram tetkiklerinin analizlerinde sperm konsantrasyonu ve toplam motil sperm yüzdesi; CASA sistemine ait sonuçların analizlerinde ise konsantrasyon, ileri motil sperm yüzdesi, VAP ve VSL gebelik başarısı ile anlamlı ilişkili saptanmıştır (42).

Paston ve ark.yaptığı 1994 tarihli başka bir çalışmada, 43 tane açıklanamayan infertilite hastasının 7'sinde gebelik elde edilerek analiz yapılmıştır. VCL, VSL ve total motil sperm sayısının gebelik ilişkili olabileceği yorumu yapılmıştır (43).

Shibahara ve ark. yaptığı bir çalışmada açıklanamayan infertilitesi olan 160 çift dahil edilmiş, toplamda 682 siklus IUI yapılarak 45'inde (%28) gebelik sağlanabilmiştir. Yıkama sonrası inseminasyona hazır semen örnekleriyle yapılmış olan CASA analizlerinin sonuçları, gebelik sağlanabilen ve sağlanamayan gruplarda karşılaştırılmıştır. Yıkama öncesi - sonrası

normal morfoloji yüzdelerinin ve yıkama sonrası bakılan VCL değerlerinin gebelik başarısı ile ilişkili olduğu saptanmıştır (44).

Garrett ve ark. 1997 ve 1999 yılları arasında açıklanamayan infertilite hastalarını dahil ederek yaptıkları çalışmada, 2001 yılında analizler yapılırken 336 hastada gebelik sağlanmıştır. Doğal yollarla gebelik gerçekleşen çiftlerin sperm hareket parametrelerinin multivariate analizlerinde; ortalamanın üzerinde VSL değeri ve 32 parametrelili morfolojik kriterler taşımanın (%Z kriterlerini) artmış gebelik olasılığı ile anlamlı derecede ilişkili bulunmuştur (45).

Çalışmamızda literatürle uyumlu şekilde, manuel semen analizleri normal olan çiftlerde gebelik elde edilen ve edilemeyen çiftlerin semen parametreleri arasında istatistiksel anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Manuel yöntemle motilite analizi, motilitenin olduğundan fazla değerlendirilmesine eğilim oluşturmaktadır. Bu durum manuel değerlendirmenin subjektif olduğu ve gözün harekete duyarlılığı nedeniyle genellikle daha fazla tahmin edildiği gerçeğine dayandırılabilir. Numune yüksek oranda hareketli sperm konsantrasyonuna sahip olduğunda daha da karmaşık hale gelir (46). Bizim çalışmamızda korelasyon eğrisine uzak olarak değerlendirilen semen analizleri sonuçları olan hasta kayıtları tekrar incelenmiş ve CSCTAS yazılımının bulduğu sonuçların daha doğru olduğu kanısına varılmıştır.

CSCTAS sisteminin yaptığı analiz sonuçlarının; gebelik sağlanabilen ve sağlanamayan çiftlerde karşılaştırılmasıyla sadece WOB değeri istatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır. Gebelik sağlanabilenlerde ortalama $0,83 \pm 0,03$; sağlanamayanlarda ortalama $0,81 \pm 0,09$ olarak saptanmıştır ($p=0,004$).

Gebelik elde edilen çiftlerin verilerinden hareketle Kohen kappa analizi yapılarak, gebelik öngördürücü parametreler belirlenmeye çalışılmıştır. Bu yöntemde yaş tek başına en önemli gebelik öngördürücü parametrelerden olup; yaş arttıkça LIN, Grade B sperm oranı ve WOB gibi parametreler öne çıkmaktadır. Bu parametrelere ait belli eşik değerlere göre yapılan kıyaslamalarla, gebelik ihtimali sınırlı bir şekilde tahmin edilebilir.

Semen viskozitesinin sperm hareket özelliklerini etkilediği bilinmektedir. Bu nedenle Calamera ve ark. 1989 yılında, vizkozite değişkenliğine neden olabilecek debrisleri gidermek için numuneleri yıkama işlemine tabi tutmuşlar (47).

Aitken ve ark. 1987 yılında yaptıkları bir çalışmada prostaglandinleri, enfeksiyöz ajanları ve antijenik proteinleri uzaklaştırmak için yıkama prosedürlerinin gerekli olduğunu belirtmişler. Bu tekniklerin bir diğer önemli avantajı olarak, hareketsiz spermatozoa, lökosit veya olgunlaşmamış germ hücrelerinin uzaklaşması gösterilmiş. Yıkamanın, sperm hazırlandıktan sonra lenfokinlerin ve/veya sitokinlerin salınımını artırarak ve serbest oksijen radikallerinin oluşumunu azaltarak sperm kalitesini artırmada önemli bir faktör olabileceği belirtilmiştir (48).

Lersen ve ark. 2000 yılında yaptığı CASA parametrelerinin fertilitéyle ilişkisinin incelendiği bir çalışmada; semen örnekleri hastalar çalışmaya dahil edildiğinde alınarak sistem tarafından incelenmiş. Çalışma bitiminde gebelik ilişkili parametrelerin değerlendirmeleri; ilk baştaki alınan örnek üzerinden yapılmıştır. Dolayısıyla konsepsiyonu sağlayan semenin özelliklerinin yeterince anlaşılamayabileceği belirtilmiştir (49).

Bizim çalışmamız da ise IUI gerçekleştirileceği gün yıkama işlemine tabi tutulmuş spermeler manuel ve CSCTAS ile incelenmiştir. Bu nedenle konsepsiyonu gerçekleştiren semenin analizi yapılabilmektedir.

Dunson ve ark. 2004 yılında kadın ve erkek yaşının fekundabiliteye etkisini araştıran çok merkezli 782 çiftin dahil edildiği prospektif bir çalışma gerçekleştirmiş. Aile planlama merkezlerinden yönlendirilen çiftlerden oluşan bu çalışmada, araştırmaya girişten itibaren 18. ay ve 24. ay sonunda analizler yapılmış. 24. ayda; 26 yaş altındaki kadınlarda %63, 27-34 yaş kadınlarda %55, 35-40 yaş arası kadınlardan erkek yaşı 35 altında olanların %51'inde erkek yaşı 35 üstü olanların %43'ünde gebelik elde edilebilmiştir. Kadın yaşının spontan gebelik üzerindeki etkisi iyi bir şekilde gözlemlenmiştir. Erkek faktörü ise literatürle uyumlu olarak 30'lu yaşların geç döneminde daha yüksek saptanmıştır (50) .

Goverde ve ark. 2000 yılında yaptığı açıklanamayan infertilite ve erkek subfertilitesi olan 258 çiftin dahil edildiği bir araştırmada, 86'sına IUI, 85'ine OI-IUI, 87'sine IVF yapılmıştır. IUI gruplarında sırasıyla %7,4 ve %8,7; IVF grubunda %12 oranında gebelik elde edilmiştir. 38 yaş üzerindeki kadınların fertilizasyon başarısı, 28 yaşın altındaki kadınlara kıyasla %50 daha az saptanmıştır. Tüm yaş gruplarının analizlerinde kadın yaşı gebeliği etkileyen en önemli parametre olarak belirtilmiştir (51).

Obezitenin IUI başarısı üzerindeki etkileri hakkında literatürde farklı veriler bulunmaktadır. Moragianni ve ark. 2012 yılında 4609 hastaya ait verilerle yaptıkları analizleri

yayınlanmıştır. Kadınlar malnütrisyonu olan, normal tartılı, fazla tartılı, obez ve morbid obez gibi gruplara ayrılmıştır. Tüm vücut kitle indeksi gruplarında yardımcı üreme tekniği ile olgunlaşan oosit sayısı ve spontan abortus oranları benzer sayılarda saptanmasına rağmen, gebelik elde edilme oranları ile BMI derecesi arasında ters korelasyon saptanmıştır (52) .

Souter ve ark. 2010 yılında yaptıkları 477 subfertil çiftin dahil edildiği bir araştırmada OI-IUI sonrası yapılan değerlendirmede; hafif erkek faktörü olan obez kadınlarda, obez olmayanlara göre istatistik anlamlı daha yüksek gebelik oranları elde edilmiştir. Tüm kadınlar dahil edilerek yapılan analizlerde; fazla kilolu ve obez kadınlarda, düşük BMI gruplarına göre anlamlı derecede daha fazla gebelik başarısı izlenmiştir. Bu durum yüksek BMI'a sahip kadınlardaki yüksek östrojenli ortam ve yüksek dozda kullanılan ilaçların, endometrial resepsiyonu artırmasıyla ilişkilendirilmiştir. Obez kadınlardaki anovulatuvar siklusların daha sık olması ve bu durumun ilaçlarla aşılabilmesi de bu sonuca katkıda bulunmuştur (53).

Çalışmamızda gebelik izlenen ve izlenmeyen gruplar arasında kadın BMI açısından farklılık izlenmemiştir ($p=0,619$).

Kullanılan indüksiyon ajanlarına bağlı olarak gebelik sonuçları literatürle uyumlu şekilde anlamlı bir fark göstermemiştir. Oral ilaçlarla OI sağlanan IUI siklusları ile düşük doz gonadotropin (<150 IU/gün) ile IUI sikluslarının sonuçları arasında farklılık bulunmamaktadır (27).

Bizim çalışmamızda da benzer şekilde kullanılan ajanlara kıyasla, gebelik oranları arasında farklılık izlenmemiştir.

Stilman ve ark. tarafından 1986 yılında yapılan bir metaanalizde kadın sigara içimi, tubal faktöre bağlı infertilite için oldukça geçerli bir faktör olarak kabul edilmiştir (54).

Wesselink ve ark. 2018 yılında yaptıkları 5 yıllık bir kohort araştırmasında 5473 kadına, 1411 erkeğe ait veriler yayınlanmıştır. Kadınlarda 10 yılın üzerinde günde >10 sigara içimi infertilite ile çok güçlü ilişkili olup; aralıklı sigara içiminin zayıf ilişkili olduğu gösterilmiştir. Erkeklerde düzenli veya pasif içiciliğin gebelik sonuçları ile anlamlı bir ilişkisi bulunmamıştır. Ayrıca intrauterin dönemde günde >10 sigara maruziyeti olan kadınların anlamlı olmayan fakat normale göre artmış oranda infertil olabilecekleri belirtilmiştir (55) .

Bizim çalışmamızda erkek veya kadın sigara içiciliği açısından sigara içimi ile gebelik sonuçları arasında bir ilişki saptanmamıştır (sırasıyla $p=0,361$ ve $0,563$).

Çalışmamızda 184 hastanın verilerinin analiziyle; gebelik sağlanabilen ve sağlanamayan gruplar karşılaştırılarak Kohen Kappa analizi yapılmıştır. Çalışmamızda *yaş kısıtlılığı* bulunması nedeniyle ileri yaş çiftlere ait değerlendirmeler sınırlı bir şekilde yapılmıştır. Literatürde, Türk infertil çiftlere ait CASA benzeri sistemlerle yapılmış çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma ilk defa bu alanda yapılmış bir çalışma olması nedeniyle önemlidir. Toplumun tümünü yansıtan, daha büyük hasta gruplarının dahil edildiği araştırmalarla; gebelik başarısının daha iyi yorumlanması mümkün olabilir.



6. SONUÇ

Bu çalışmada YTÜ Bilgisayar Mühendisliği bölümü tarafından geliştirilen bilgisayar temelli sperm analiz yazılımı (CSCTAS) ile sperm hareketlerinin değerlendirilmesi yapılarak, IUI sonrası gebelik için en güçlü prediktif faktörlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Ülkemizde CASA ve CASA benzeri sistemler kullanılarak yapılmış herhangi bir çalışma veya yayınlanmış analiz sonucu bulunmamaktadır. Türk hastalara ait sonuçlar açısından literatürdeki bu boşluğa katkıda bulunulması hedeflenmiştir. İnfertil çiftlerin değerlendirilmesinde CSCTAS ilk kez kullanılmıştır. Çalışmaya dahil edilen hastaların verileriyle %95,65 doğrulukla gebelik tahmininde bulunabilen karar ağacı mimarisi oluşturulmuştur.

Özetle en yüksek gebelik olasılığına sahip olan çiftlerde en önemli parametre kadın yaşı, en önemli sperm hareket karakteristikleri ise kararsız salınım (wobble – WOB) ve doğrusallık (Linearity - LIN) olarak ifade edilen parametrelerdir.

DSÖ tarafından önerilen ve ülkemizde de yaygın olarak kullanılan manuel spermogram analizine ileride alternatif olabilecek CSCTAS'ın; daha büyük hasta gruplarında kullanıldığı araştırmalarla daha sensitif ve spesifik sonuçlara ulaşmak mümkün olabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*. 2008;90(5):60.
2. Roupa Z, Polikandrioti M, Sotiropoulou P, et al. Causes of infertility in women at reproductive age. *Health Science Journal*. 2009;3(2):80-87.
3. Gnoth C, Godehardt D, Godehardt E, et al. Time to pregnancy: results of the German prospective study and impact on the management of infertility. *Hum Reprod*. 2003;18:1959.
4. Zinaman MJ, Clegg ED, Brown CC, et al. Estimates of human fertility and pregnancy loss. *Fertil Steril*. 1996;65:503.
5. Van Noord-Zaadstra BM, Looman CW, Alsbach H, et al. Delaying child-bearing: effect of age on fecundity and outcome of pregnancy. *Br Med J*. 1991;302:1361.
6. WHO manual for the standardised investigation and diagnosis of the infertile couple. *Cambridge University Press*. 2000.
7. American Society for Reproductive Medicine. Aging and Fertility in women. *Fertil Steril*. 2006;86(4):248.
8. Collins JA, Van Steirteghem A. Overall prognosis with current treatment of infertility. *Hum Reprod Update*. 2004;10(4):309–316
9. Brosens I, Gordts S, Valkenburg M, et al. Investigation of the infertile couple: when is the appropriate time to explore female infertility?. *Hum Reprod*. 2004;19(8):1689-1692.
10. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2015;103(6):44-50.
11. Kolettis PN. Evaluation of the subfertile man. *Am Fam Physician*. 2003;67(10):2165-2172.
12. Collins JA, So Y, Wilson EH, et al. The postcoital test as a predictor of pregnancy among 355 infertile couples. *Fertil Steril*. 1984;41(5):703-708
13. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Fifth edition. *World Health Organisation*. 2010.
14. Tomlinson MJ, Pooley K, Simpson T, et al. Validation of a novel computer-assisted sperm analysis (CASA) system using multitarget-tracking algorithms. *Fertil Steril*. 2010;93(6):1911-1920.

15. Coetzee K, Kruger TF, Lombard CJ. Repeatability and variance analysis on multiple computer-assisted (IVOS) sperm morphology readings. *Andrologia*. 1999;31(3):163-168.
16. Davis RO, Katz DF. Standardization and comparability of CASA instruments. *J of Andrology*. 1992;13:81-86.
17. World Health Organization. Manuale di laboratorio della WHO per l'esame del liquido seminale umano e dell'interazione tra spermatozoi e muco cervicale [Laboratory manual of the WHO for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction]. *Ann Ist Super Sanita*. 2001;37(1):I-123.
18. Menkveld R, Wong WY, Lombard CJ, et al. Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. *Hum Reprod*. 2001;16(6):1165-1171.
19. Petraglia F, Serour GI, Chapron C. The changing prevalence of infertility. *Int J Gynaecol Obstet*. 2013;123(2):4-8.
20. Malina A, Błaszkiwicz A, Owczarz U. Psychosocial aspects of infertility and its treatment. *Ginek Pol*. 2016;87(7):527-531.
21. Cunningham J. Infertility: A primer for primary care providers. *JAAPA*. 2017;30(9):19-25.
22. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Optimal evaluation of the infertile female. *Fertil Steril*. 2004;82(1):169-172.
23. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Effectiveness and treatment for unexplained infertility. *Fertil Steril*. 2006;86(5):111-114.
24. Guzick DS, Sullivan MW, Adamson GD, et al. Efficacy of treatment for unexplained infertility. *Fertil Steril*. 1998;70(2):207-213.
25. Collins J, Rowe T. Age of the female partner is a prognostic factor in prolonged unexplained infertility: a multicenter study. *Fertil Steril*. 1989;52:15.
26. Collins JA, Burrows EA, Wilan AR. The prognosis for live birth among untreated infertile couples. *Fertil Steril*. 1995;64:22.
27. American Society for Reproductive Medicine. Evidence-based treatments for couples with unexplained infertility: a guideline. 2020;113(2):309-315
28. Cunningham FG, Williams JW. Williams obstetrics. 23rd edition. *New York: McGraw-Hill Medical*; 2010;1385

29. Pierce JG, Parsons TF. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem.* 1981;50:465-495
30. Zegers-Hochschild F, Fernández E, Mackenna A, et al. The empty follicle syndrome: a pharmaceutical industry syndrome. *Hum Reprod.* 1995;10(9):2262-2265.
31. Chang P, Kenley S, Burns T, et al. Recombinant human chorionic gonadotropin (rhCG) in assisted reproductive technology: results of a clinical trial comparing two doses of rhCG (Ovidrel) to urinary hCG (Profasi) for induction of final follicular maturation in in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril.* 2001;76(1):67-74.
32. Ludwig M, Doody KJ, Doody KM. Use of recombinant human chorionic gonadotropin in ovulation induction. *Fertil Steril.* 2003;79(5):1051-1059.
33. Katzorke T, Kolodziej FB. Bedeutung der Insemination in der Zeit von IVF und ICSI [Significance of insemination in the era of IVF and ICSI]. *Urologe A.* 2010;49(7):842-846.
34. Tomlinson MJ, Amissah-Arthur JB, Thompson KA, et al. Prognostic indicators for intrauterine insemination (IUI): statistical model for IUI success. *Hum Reprod.* 1996;11(9):1892-1896.
35. Agarwal A, Sharma RK. Automation is the key to standardized semen analysis using the automated SQA-V sperm quality analyzer. *Fertil Steril.* 2007;87(1):156-162.
36. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, et al. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med.* 2001;345(19):1388-1393.
37. Polansky FF, Lamb EJ. Do the results of semen analysis predict future fertility? A survival analysis study. *Fertil Steril.* 1988;49(6):1059-1065.
38. Boyers SP, Davis RO, Katz DF. Automated semen analysis. *Current Problems in Obstetrics and Gynecology and Fertility.* 1989
39. Merviel P, Heraud MH, Grenier N, Lourdel E, Sanguinet P, Copin H. Predictive factors for pregnancy after intrauterine insemination (IUI): an analysis of 1038 cycles and a review of the literature. *Fertil Steril.* 2010;93(1):79-88.
40. Barratt CL, Tomlinson MJ, Cooke ID. Prognostic significance of computerized motility analysis for in vivo fertility. *Fertil Steril.* 1993;60(3):520-525.
41. Dodson WC, Whitesides DB, Hughes CL Jr, Easley HA 3rd, Haney AF. Superovulation with intrauterine insemination in the treatment of infertility: a possible alternative to gamete intrafallopian transfer and in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1987;48(3):441-445.

42. Irvine DS, Macleod IC, Templeton AA, et al. A prospective clinical study of the relationship between the computer-assisted assessment of human semen quality and the achievement of pregnancy in vivo. *Hum Reprod.* 1994;9(12):2324-2334.
43. Paston MJ, Sarkar S, Oates RP, et al. Computer-aided semen analysis variables as predictors of male fertility potential. *Arch Androl.* 1994;33(2):93-99.
44. Shibahara H, Obara H, Ayustawati, et al. Prediction of pregnancy by intrauterine insemination using CASA estimates and strict criteria in patients with male factor infertility. *Int J Androl.* 2004;27(2):63-68.
45. Garrett C, Liu DY, Clarke GN, Rushford DD, Baker HW. Automated semen analysis: 'zona pellucida preferred' sperm morphometry and straight-line velocity are related to pregnancy rate in subfertile couples. *Hum Reprod.* 2003;18(8):1643-1649.
46. World Health Organization laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. *Cambridge University Press.* 4th ed. 1999.
47. Calamera JC, Brugo S, Quiros MC, Nicholson RF. Computer assisted measurement in normal and pathological human semen, fresh and post swim-up technique. *Andrologia.* 1989;21(4):340-345.
48. Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 1987;81(2):459-469.
49. Larsen L, Scheike T, Jensen TK, et al. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Hum Reprod.* 2000;15(7):1562-1567.
50. Dunson DB, Baird DD, Colombo B. Increased infertility with age in men and women. *Obstet Gynecol.* 2004;103(1):51-56.
51. Goverde AJ, McDonnell J, Vermeiden JP, et al. Intrauterine insemination or in-vitro fertilisation in idiopathic subfertility and male subfertility: a randomised trial and cost-effectiveness analysis. *Lancet.* 2000;355(9197):13-18.
52. Moragianni VA, Jones SM, Ryley DA. The effect of body mass index on the outcomes of first assisted reproductive technology cycles. *Fertil Steril.* 2012;98(1):102-108.
53. Souter I, Baltagi LM, Kuleta D, et al. Women, weight, and fertility: the effect of body mass index on the outcome of superovulation/intrauterine insemination cycles. *Fertil Steril.* 2011;95(3):1042-1047.

54. Stillman RJ, Rosenberg MJ, Sachs BP. Smoking and reproduction. *Fertil Steril*. 1986 Oct;46(4):545-66.
55. Wesselink AK, Hatch EE, Rothman KJ, et al. Prospective study of cigarette smoking and fecundability. *Hum Reprod*. 2019;34(3):558-567.

