

Sperm dondurma: Güncel gelişmeler

Sperm cryopreservation: Current developments

Fikret Erdemir¹

ÖZ

Sperm dondurma spermilerin soğutulmasıyla -196°C'de likit nitrojenle saklanmasıdır. Bu teknik 1960'lerden beri çiftlerin infertilitesini tedavi etmek için kullanılmaktadır. Kanser sperm dondurulmasında temel endikasyondur. Ancak, yakın zamanlarda sperm dondurma için kullanılan klinik endikasyonların alanı oldukça genişlemiştir. Buna göre sperm dondurma retrograd ejakülasyon, şiddetli oligospermi, metabolik hastalıklar, spinal kord hasarı ve kranial tümörler gibi olgularda kullanılmaktadır. Bu süreç soğutma, dondurma ve ısıtma basamaklarını içermektedir. Sperm dondurma membran lipid yapısı, akrozom içeriği, sperm motilitesi, sperm canlılığı ve sperm DNA'sı üzerine negatif olarak etki edebilmektedir. Bu olumsuz etkileri önlemek için pek çok kriyoprotektan ajan kullanılmıştır. Genelde sperm dondurma sonrası gebelik oranları %12 ile %35,2 arasında değişmektedir. Bu derlemede sperm dondurma alanındaki son gelişmeler değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Erkek, infertilite, sperm dondurma, gebelik

ABSTRACT

Sperm cryopreservation involves the cooling of semen samples and their storage at -196°C in liquid nitrogen. This technique has been used widely since the 1960s to treat couples with infertility. Cancer is the major indication for sperm cryopreservation. However currently, the scope of clinical indications used for sperm cryopreservation has expanded widely. In this context, sperm cryopreservation is used in patients with retrograde ejaculation, severe oligospermia, metabolic disorders, spinal cord injury, cranial tumors. Cryopreservation process involves cooling, freezing, and thawing steps. Cryopreservation of sperm may negatively affect on membrane lipid composition, acrosome status, sperm motility, vitality and DNA damage. To prevent of this negative effects several cryoprotectants have been used. In general the pregnancy rates after sperm cryopreservation are changes between 12% and 35.2%. In this review current advances have been evaluated in the era of sperm cryopreservation.

Keywords: Male, infertility, sperm cryopreservation, pregnancy

Fertilite için gerekli olan sperm bazı durumlarda sınırlı olarak elde edildiği ya da gelecekte azalacağı bilindiği için sperm gerektiğinde kullanılmak üzere dondurularak saklanması gündeme gelmiştir. Fertilite ile ilişkili mücadele ve gayretler çiftlerin ruh sağlığını bozduğu için bu stresi azaltabilmesi açısından da sperm dondurma işlemi büyük önem arz etmektedir.^[1,2] İlk olarak 1940'lı yıllarda veteriner hekimler tarafından uygulanan sperm dondurma işlemi spermilerin -80°C ile -196°C arasında gerektiğinde tekrar kullanılmak üzere saklanması içermekte olup insanlarda 1950'li yıllardan beri yapılmaktadır.^[3] Başlangıçta kullanımı sadece intrauterin inseminasyon (IUI) için sınırlı olan sperm dondurma ile ilişkili endikasyonlar günümüzde ol-

dukça genişlemiştir.^[4] Sperm dondurma geleneksel olarak sperm sayısının ciddi derecede az olduğu oligospermilere ilave olarak spinal kord hasarı, multipl skleroz gibi gelecekte sperm sayısının azalma potansiyelinin olduğu durumlarda yapılabilmektedir. Bunun haricinde azospermi gibi durumlarda yapılan testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) ve mikroepididimal sperm aspirasyonu (MESA) gibi girişimlerde sperm elde edilmesi sonrası, vazektomi öncesi, retrograd ejakülasyon, üriner sistemde sperm yapımı ya da çıkımını etkileyen cerrahi girişimler, kanser tanısı nedeniyle uygulanacak olan kemoterapi tedavisi, testis tümörü, kraniofarinjioma ve kronik nefropati gibi klinik durumlarda fertilitenin sağlanmasının normal yollarla kısmen ya da tamamen bozulduğu patolojilerde yapılabilmektedir.^[5] Günümüzde sperm dondurma yaklaşımının yaşam sonrası bile yapılabileceği görülmektedir. Ölüm sonrası sperm alınması ilk kez 1980 yılında ölümden sonra alınan spermden dondurulup çözünme sonrası gebelik ise 1993 yılında bildirilmiştir.^[6] ABD'deki verilere göre sperm donörlerinin %85,9'u, infertil olguların ise %83,8'i öldükten sonra genetik materyallerinin kullanılmasını istediklerini bildirmişlerdir.^[7]

Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tokat, Türkiye

Yazışma Adresi / Correspondence:

Prof. Dr. Fikret Erdemir
Bahçelievler M. Ülkü C. 4. S. No: 16, C Blok. Genç İnşaat. Merkez, Tokat, Türkiye
Tel. +90 505 697 10 52
E-mail: fikreterdemir@myynet.com

Geliş / Received: 07.06.2018

Kabul / Accepted: 21.06.2018

Sperm dondurma işleminin önemi özellikle son 10 yılda ülkemizde ve dünyada gerek ürologlar ve onkologlar gerekse de hastalar arasında klinik pratikte giderek artmıştır. [8] Kanserli hastalarda 1980'li yıllarda hem hasta hem de hekim için sağkalım düşünülen tek konu iken cerrahi tedavi yöntemleri, kemoterapi ve radyoterapideki gelişmeler ile erken tanıdaki artışlar hastaların kür şansını ve sağkalımlarını belirgin olarak arttırmıştır. Buna bağlı olarak yaşam kalitesi ile ilişkili olan üreme olgusu ön plana çıkmıştır. Sheth ve ark.'nın çalışmalarında 18–55 yaş arasındaki kanserli olguların %6,3'ünde sperm dondurma işleminin önerildiği bildirilmiştir. [9] Machen ve ark.'nın çalışmalarında ise 27 yıllık dönemde sadece 271 onkoloji hastasının spermelerini dondurduğu bildirilmiştir. Bu oranın toplam 3050 kanser hastası içinde %8,9 olduğu bildirilmektedir. [10] ABD'deki bir başka çalışmada 1991–2010 yılları arasındaki 19 yıllık dönemde 423 hasta olduğu bildirilmiştir. [11] Yakın dönem çalışmalarında anlaşıldığı üzere hem hasta ve yakınları hem de hekimler tarafından sperm dondurma programlarına olan farkındalığın artması daha fazla kullanılmasına yol açmıştır. [12] Sağkalım artışı ve sperm saklanması ile bağlantılı olarak Japonya'daki bir araştırmada sperm dondurma hematolojik olgularda %82,5, testis kanserli olgularda ise %95,6 olarak belirtilmiştir. [13] Bir çalışmada kanserli olguların %96'sının sperm dondurmayı diğer hastalara önerdiği bildirilmiştir. [1] Bir başka araştırmada onkoloji çalışanlarının yarısına yakınının bu durumu erkek hastaları ile konuştuğu ve bilgilendirdiği bildirilmiştir. [14] Sperm dondurma kullanma oranları varolan hastalığın ciddiyetine ilave olarak, infertilitenin kişideki risk durumu, farkındalık, önceden çocuk sahibi olup olmama, yaş ve kültürel tutumlar gibi faktörlerden etkilenmektedir. [5,15]

Semen dondurulma işleminden önce Swim-up gibi yöntemlerle motilite ve canlılık açısından en uygun sperm örnekleri seçilmek üzere hazırlıklar yapılır. [15] Sperm dondurma işleminde hızlı ya da yavaş dondurma olarak bilinen teknikler uygulanabilmektedir. Hızlı dondurma işlemi sırasında su kaybına bağlı hücre yıkımı sözkonusu olabilirken yavaş dondurma işlemi buz kristal formasyonu artışına neden olmaktadır ki bu durumların spermde hasara neden oldukları bilinmektedir. Sperm dondurularak gerektiğinde kullanılmak üzere saklanması sperm dondurmanın yanı sıra, belirli bir dönem saklama ve sonrasında çözünme olmak üzere 3 aşamayı içermektedir. Sperm dondurma sırasında sperm membran yapısında, su miktarı az olduğu için buz kristalleri oluşumuna bağlı olarak membran hasarlanması sonrası sperm metabolizması ile iyon transferi olumsuz olarak etkilenmektedir. [5] Buz kristallerinin en aza indirgenmesi ve dolayısı ile hücre sağkalımının artırılması için hücre zarındaki su oranının azaltılmasına yönelik suyun yerini alan ve

kriyoprotektanlar olarak adlandırılan maddeler kullanılmaktadır. [5] Kriyoprotektan ajanlar, suyun yerini alırken donma noktasını düşürmekte, hücrenin solüt ve tuz oranını azaltmakta, hücreyi yüksek osmolariteden korumakta, kontrollü su kaybı sağlamak ve bu özelliklere bağlı olarak hücreyi korumaktadır. [16,17] Pek çok çalışmada farklı kriyoprotektanların kullanılması sonucu sperm dondurma işlemine bağlı oluşabilecek hasarın azaltıldığı gösterilmiştir. Bu amaçla asetil-L-karnitin, melatonin, monotiogliserol, çinko oksit, sistein, glutamin, propolfenol, leptin, trehaloz, sukroz, kuarsetin, nevre growth faktör (NGF), katalaz, tokoferol, vitamin E, taurin, MitoTEMPO, monotiogliserol ve vitamin C gibi ajanlar kullanılmıştır. [18–26] Bir çalışmada MitoTEMPO (5–50 µM) eklenmesinin çözünme sonrası sperm motilite, canlılık, membran bütünlüğü ve mitokondrial membran potansiyelini anlamlı olarak düzelttiği gösterilmiştir. Bu arada antioksidan enzim aktiviteleri artarken malondialdehit (MDA) seviyeleri azalmıştır. [18] Astenoospermik 35 olgudan alınan örneklerde asetil karnitinin etkisi kontrol grubu ile kıyaslanarak incelenmiştir. Bu çalışmadaki sonuçlar, özellikle 7,5 mmol/L konsantrasyon dozunun motilite, canlılık, deoksiribonükleik asit (DNA) bütünlüğü ve reaktif oksijen radikalleri (ROS) açısından faydalı olduğunu göstermiştir. [19] Sperm dondurmanın spermatozoada oksidatif stresi arttırdığı bilinmektedir. Bir araştırmada 0–15 mM arası konsantrasyonlarda melatonin kullanılması sonucu motilite, canlılık gibi parametrelerin arttığı buna karşılık ROS seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir. Melatoninin PI3K/AKT sinyal yoluyla koruyucu etkilerini gösterdiği bildirilmiştir. [20] İnsan seminal sıvısına yakın mediumların elde edilmesiyle sperm dondurmada başarı oranlarının artırılacağı gösterilmiştir. Buna göre bir araştırmada 30 normal ejakülatın incelenmesiyle albumin, sukroz gibi kriyoprotektanların uygulanması sonrası progresif motilite (46,09±10,33'ye karşılık 36,80±13,75), grade A motilite (36,59±11,40'a karşılık 16,41±11,24), normal morfoloji (18,74±8,35'e karşılık 11,85±5,84) ve viabilite (68,22±10,83'e karşılık 60,86±11,72) anlamlı olarak artmıştır. [27] Ayrıca, kontrol grubunda kriyoprotektan grubuna göre akrozom hasarı, plazma membran kaybı, kromatin vakualizasyonu, mitokondrial yapıların bozukluğu daha fazla görülmüştür. [28] Yukarıda bahsedilen ajanlar tek başına ya da kombine olarak verilmişlerdir. Bu ajanların kullanımına bağlı olarak deneysel çalışmalarda fertilizasyon oranlarının arttığı da bildirilmiştir. [21] Kullanılan bu ajanlara bağlı olarak motilitenin arttığı, kromatin hasarının azaldığı, serum MDA seviyelerinin azaldığı, apoptozisinin azaldığı, akrozom reaksiyonlarını olumlu etkilediği bildirilmiştir. [18–25] Trehaloz ve sukroz yüksek derecede etkili protektanlar olarak saptanmış olup sperm motilitesini sırasıyla %69 ve %68,9 oranlarında arttırmışlardır. [29]

Sperm dondurma işleminde her aşamada olası enfeksiyonlar oldukça önemli olduğu için laboratuvar ortamı ve kullanılan inkübatörlerin dezenfeksiyonunun tam olarak sağlanması ve bu amaçla iyodin ya da amfoterisin gibi ajanların kullanılması büyük önem taşımaktadır.^[30] Enfeksiyon açısından rutin olarak klamidy, sfiliz, gonore, HBV, HCV, HIV ve CMV gibi virüsler incelenmelidir. Sperm dondurma işleminin gerçekleştirildiği birim ve binanın elektrik sistemi, alarm düzeneği, CO₂ desteği ve spermilerin karışmaması için gerekli olan evrak kayıtları tam olarak yerine getirilmelidir.^[5,31] Sperm dondurma işlemine bağlı olarak sperm canlılığının ve motilitesinin %31–66'ya yakın oranlarda azaldığı bilinmektedir. Bununla ilişkili olarak, sperm sayısının 10 milyon/cc ve üzerinde olduğu 56 olgunun incelenmesi sonucu motilitenin %66 azaldığı ve Kruger morfolojinin sperm hareket azalması ile yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir.^[31] Sperm hareketindeki azalmanın temel sebebi donma sırasında hücre membranındaki hasar olarak belirtilmektedir. Buna karşılık Yogev ve ark. sperm bankası için donör spermelerinden alınan örneklerin dondurulup çözülmesiyle progresif hareketle anlamlı azalma olmadığını belirtmektedirler.^[32] Sperm dondurmanın epididimal spermatozoa için de hareket, ileri hızlı hareket, spermatozoa kapasitesini ve lateral baş hareketleri gibi komponentleri olumsuz etkilediği gösterilmiştir.^[33] 2013–2015 yılları arasında Uruguay'da yapılan bir çalışmada 623 örneğin 324'ü analiz edilmiştir. Bu çalışmada sperm %58,64 oranında üremeye yardımcı teknikler (ÜYT) ve %34,88 oranında da onkolojik nedenlerle saklanmıştır. Ortalama yaşın 34 yıl olarak bildirildiği bu çalışmada kanserli olguların %61,95'ini testis kanseri oluşturmuştur. Progresif hareketli sperm örneklerde ÜYT ve kanser olguları için sırasıyla %47 ve %56 olarak bildirilirken çözülme sonrası total sperm hareketi sırasıyla %27 ve %32, progresif hareket %19 ve %22, canlılık ise %48 ve %56 olarak belirtilmiştir.^[34] Testis kanserli toplam 543 olgudan alınan spermelerin dondurularak saklandığı bir diğer çalışmada ise hiposperm %28 olarak görülürken sperm konsantrasyonu 18 mil/mL olarak saptanmıştır. Olguların %35'i oligospermik, %4,1'i azospermik, %12,7'si şiddetli oligozoospermik olarak saptanmıştır. Toplam 261 sperm (%44,3) tamamen normal olarak bildirilmiştir. Total motil sperm sayısı sperm dondurma öncesi ile dondurulup çözülme sonrası sırasıyla 12 (0–412,2) ve 7 (0–303,9) milyon olarak bildirilmiştir. Ortalama düşüş %32 olarak saptanmıştır.^[35] Sperm hareketi üzerine ısısında etkili olabileceği düşünülmektedir. Bir çalışmada parsiyel çözülme ile tam çözülme sonrası 99'ar olgu karşılaştırılmıştır. İki grup arasında oosit fertilizasyonu açısından anlamlı fark saptanmamıştır. Sperm motilitesi tam çözünenlerde %37, diğer grupta %6,5 azalmıştır.^[36] İnkübasyon ısısının kristalizasyon sonrası semen

parametrelerine olan etkisinin incelendiği bir araştırmada 22–25°C ile 37°C karşılaştırılmış olup 2, 4 ve 6 saat sonra yapılan incelemelerde oda ısısının reaktif oksijen radikalleri (ROS) hariç canlılık açısından daha uygun olduğu saptanmıştır. Progresif motilitenin özellikle oda ısısında azaldığı gösterilmiştir.^[37] Çözme işlemi sonrası sperm hareketinin, dondurma işlemi öncesi hareketli sperm sayısı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.^[38] Spermatozoanın dondurma sonrası ısı dalgalanmalarına karşı oldukça az duyarlı olduğu belirtilmektedir. Raspa ve ark. -80°C'de iki yıl boyunca fare spermatozoalarının anlamlı viabilite kaybı olmadan saklandığını belirtmişlerdir.^[39] Bonetti ve ark.'nın 2009 yılında yaptıkları bir araştırmada sperm dondurma ve çözme işlemi sonrası viabilite oranı %30'un altında saptanmıştır. Sperm dondurma ve çözülme belirgin protein değişiklikleri de yapmaktadır.^[40] Bu arada kanser hastalarında sperm dondurma işlemi öncesi sperm kalitesinin kanserli olmayan hastalara göre düşük olduğu, bu nedenle de çözme işlemi sonrası daha düşük kalitede spermeler sahip oldukları unutulmamalıdır.^[41] Ayrıca dondurma işlemi öncesi sperm kalitesi iyi olanlarda tekrarlayan donma ve çözülme işlemlerine dayanıklılığın daha iyi olduğu belirtilmektedir.^[42] Sperm dondurma işleminin ATP yapımına olan etkisi konusundan tam bir açıklık söz konusu değildir.^[43] Sperm dondurmanın sperm DNA üzerine olan etkinliği ile ilgili de çalışmalar yapılmıştır. Sperm seminal sıvı ile birlikte dondurulmasının ya da az sayıda sperm varsa pellet ile birlikte dondurulmasının sperm motilite ve DNA bütünlüğünü daha iyi koruduğu belirtilmiştir.^[44] Bir çalışmada, 166 infertil erkek ve 34 fertil erkek değerlendirilmiş olup infertil olgulardan alınan ve saklanan spermelerde, DNA hasarının daha yüksek olduğu başlangıç teratoospermi ve teratoastenoosperminin önemli bir prediktif faktör olduğu belirtilmiştir.^[45] Thomson ve ark.'nın bir çalışmasında ise 60 erkek olgunun incelenmesi sonrası mitokondriden apoptozis indükleyici maddelerin salınımının sperm DNA hasarı oluşturabileceği belirtilmiştir.^[46] Sperm dondurma sırasında meydana gelen DNA hasarının mekanizması açık olmayıp çoklu faktörler etkilidir. Sperm dondurma öncesi sperm DNA hasarının, spinal kord travmasının, soğuk şoku, osmotik stres, hücre içi kristal oluşumu, oksidatif hasar ya da bunların kombinasyonu, kullanılan teknik ve saklama zamanının, tekrarlayan dondurma ve çözülme ile başlangıç sperm sayısı ve morfoloji anomalisi gibi faktörlerin sperm dondurması sonrasında tespit edilen sperm motilitesi ve diğer sperm parametrelerini predikte etme ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. Antioksidanlar ROS üzerine olan etkileri ile soğuk şokunu önleyebilmektedir.^[47] Örneğin leptin verilmesi ile kontrollere göre DNA fragmentasyon oranlarının azaldığı gösterilmiştir.^[48] Benzer şekilde 25 astenoospermik olguda alınan spermeler taze

semen (kontrol), dondurulup çözünenler, dondurulup çözünen ancak sinir büyüme faktörü (NGF) uygulananlar, olmak üzere gruplara ayrılmışlardır. Dondurma sperm viabilite, motilitesini azaltırken intrasellüler nitrik oksit konsantrasyonu ve DNA hasarını artırmıştır. Buna karşılık NGF verilmesi sperm DNA hasarını azaltmıştır.^[49] Spermeleri dondurma işleminin negatif etkilerine karşı korumak için farklı yöntemler halen geliştirilmektedir.^[50] Çözünme sonrası sperm parametreleri ile dondurulup saklandığı süre arasında ise tam bir ilişki gösterilememiştir.^[51] Toplam 20 semen örneğinin kontrol grubu, 24, 48, 72 ve 96 saatleri baz alınarak beş gruba ayrıldığı bir çalışmada çözünme sonrası yeniden inceleme yapılmıştır. Buna göre -80°C sonrası sperm motilite, vitalite ve mitokondriyal aktivitelerde zamanla anlamlı azalma gözlenmiştir.^[52] Sperm saklandığı süreden ziyade dondurma ve çözme işlemlerinin sperm kalitesindeki azalmayla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Sperm dondurma işleminde sadece motilite değil akrozom reaksiyonu, mitokondriyal aktivite ve morfolojinin de bozulduğu görülmektedir. Çalışmalarda, akrozom membranı ve sperm mitokondri membranında da etkilenmeler olabileceği ve bunun akrozom reaksiyonu ile gametler arasındaki erken etkileşim ve mitokondriyal fonksiyonları bozabileceği ileri sürülmüştür.^[5,53] Boitrelle ve ark. dondurma işleminin motil insan sperminin organel morfolojisini değiştirebileceğini ve sperm kromatin dekonduksiyonunu indükleyebileceğini bildirmişlerdir.^[54] Araştırmacılar tarafından mikroskopik değerlendirme sonrası yardımcı üreme tekniğinde kullanılacak dondurulmuş çözülmüş sperm içerisnde özellikle morfolojik olarak daha iyi seçilmiş motil sperm kullanılması (IMSI) önerilmektedir.^[55] Buna göre, morfolojik açıdan seçilen spermelerin injeksiyonu ile daha yüksek blastokist ve implantasyon oranı ve daha düşük abortus oranları bildirilmiştir.^[55]

Sperm çeşitli endikasyonlara bağlı olarak dondurulup saklansa da daha sonraki dönemlerde farklı nedenlere bağlı olarak bu spermelerin kullanım oranları %1,5–19,3 arasında değişmektedir.^[10,56–61] Machen ve ark.nın çalışmalarındaki %1,5'lik sperm kullanma oranı ABD'deki diğer çalışmalarda %5–10 arasında bildirilmiştir.^[10,32,62] Japonya'da 695 enstitüyü içeren bir çalışmada spermeleri dondurulup saklanan toplam 820 kanser olgusunda sperm dondurmanın kullanılmasının temel sebepleri azospermi ve kötü semen parametreleri olarak belirtilmiştir.^[13] Toplam 898 kanserli olguda dondurulmuş sperm kullanma oranları ise %10,7 olarak bildirilmiştir.^[57] Sperm bankasının kanserli hastalarda az kullanılmasının nedenleri bazı hastaların spermatogenezini yeniden kazanmasıdır. Çalışmalarda doğal yoldan konsepsiyon bu olgularda %23–47 olarak bildirilmiştir.^[63,64] Bundan başka

kanserli olguların çok azı fertilitiyi istemektedir. Örneğin bir çalışmada, 64 erkek olgunun sadece %15,6'sı gebelik sağlamak için ilişkiye girdiğini belirtmiştir.^[65]

İlk sperm bankasının 1953 yılında Sherman tarafından kurulmasından sonra sperm dondurma açısından oldukça önemli ilerlemeler sağlanmıştır. Toplam 1113 makaleden 44'ünün incelendiği bir çalışmada kanserli hastalarda sperm dondurulanlardaki gebelik sperm dondurmaya göre daha yüksek saptanmıştır. Yine sperm saklanması radyoterapi ve kemoterapi öncesi testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) ve benzerlerine göre maliyet açısından oldukça avantajlı olduğu belirtilmiştir.^[62] Dondurulup ısıtılan spermde gebelik ilk kez 1953 yılında bildirilmiştir.^[66] Sperm saklanması sonrası gebelik oranları %12–35,2 arasında değişmektedir.^[5] Günümüze kadar en uzun saklanan spermde elde edilen gebelik 28 yıl olarak bilinirken bunu 21 yıl süreyle saklanan bir sperm alınması ile ICSI sonrası canlı doğumun izlediği bilinmektedir.^[67,68] 1988–2015 yılları arasında 1442 sperm örneğinin dondurulduğu bir çalışmada spermelerin büyük bir kısmı endikasyondan bağımsız olarak ilk bir yılda kullanılmıştır. Kanser olgularında kullanım %1,5 ve IVF/ICSI olgularında kullanım %12,3 olarak belirtilmiştir. Saklanma ve gebelik arasında en uzun süre 2,7 yıl olarak bildirilmiştir. Gebelik oranları IVF/ICSI'de %35,4, IUI'de %9,8 ve kanserli dört olguda ise %25, olarak belirtilmiştir.^[10] Yukarıda da belirtildiği üzere başarı oranlarını arttırmak için sperm dondurma çözünme sonrası spermelerin organel morfolojilerinin değerlendirilmesi (MSOME) ya da IMSI gibi yaklaşımlar önerilmektedir.^[69] Geniş bir literatür incelenmesinde toplam 30 çalışmanın 19'unda spermelerin kullanılmasıyla babalık sağlandığı belirtilmiştir.^[56] Gebelik sağlanması esas başarıyı teşkil etmekte olup bir çalışmada yeni bir sperm dondurma yaklaşımı ile 126 spermatozoanın (obstrüktif olmayan azospermi ve şiddetli oligozoospermi olanlar) %83'ünde spermatozoa canlı kalmış ve motilite oranı %47,5 olarak verilmiştir. Bu çalışmada ICSI ile fertilizasyon %73 olarak bildirilirken termde doğum 4 olguda bildirilmiştir.^[70] Gebelik elde etmede tekrarlayan donma ve çözümler, akrozom reaksiyonu bozukluğu, globozoospermi, anne yaşı ve başlangıç sperm parametrelerinin son derece önemli olduğu bilirse de bu parametrelere sahip olan ya da olmayan olgularda bir kere gebelik elde edildikten sonra oluşan embriyo kalitesinin benzer olduğu bildirilmektedir.^[5,71] Taze ya da donmuş sperm ile yapılan yardımcı üreme yöntemlerinde elde edilen gebeliklerin başarısı da üzerinde çalışılan konulardan biridir. Testisten elde edilen spermelerin hemen kullanılmasıyla yapılan ICSI ile bu spermelerin dondurulup sonrasında yapılan ICSI sonuçları karşılaştırılınca donmuş spermdeki sonucun taze spermelere göre

daha düşük olduğu belirtilmiştir.^[72] Buna karşılık, taze ya da donmuş sperm kullanılmasıyla yapılan ICSI sonuçlarının anlamlı olarak farklı olmadığını gösteren çalışmalarda bulunmaktadır.^[73,74] Epididimden elde edilen spermelerin taze ya da donmuş olmasının gebelik oranları üzerine etkili olmadığı bildirilmektedir.^[75,76] Obstrüktif azospermili 160 olgunun hareketli ve hareketli olmayan spermere ayrılarak incelendiği bir çalışmada ise hareketli olanlarda %33,9 hareketli olmayanlarda ise %27,3 oranında fertilitte sağlandığı anlaşılmaktadır.^[77] Bir başka çalışmada da hareketli sperm azlığının gebelik oranlarını anlamlı olarak etkilemediği belirtilmektedir.^[78] Wood ve ark. tarafından 164 ICSI siklusunun incelendiği bir çalışmada obstrüktif azospermik olgularda epididimden alınan spermelerin dondurulması sonrası testisten elde edilip dondurulanlara göre fertilizasyon ve gebelik açısından anlamlı olacak şekilde daha yüksek başarı elde edildiği belirtilmektedir.^[79] Bu sonuçlarda sperm kalitesi, yaş, kadına ait faktörler, hatta mevsimler bile önemli olabilmektedir. Dondurulup çözünen spermelerde gebelik başarısı IVF ve ICSI'ye yaklaşmış olup %12–73 arasında bildirilmiştir.^[80,81] 1999–2011 yılları arasında obstrüktif olmayan azospermik olgulardan elde edilen spermatozoidlerin kullanılmasıyla taze ve donmuş sperm kullanımı sonrası ICSI yapılan olgulardaki motil sperm oranları taze ve donmuş spermelerde %96 ve %88 olarak saptanmıştır. Fertilizasyon oranları %64 ve %56 olarak bildirilmiştir (90).^[82] 1998–2013 yılları arasında spinal kord hasarı olan 78 erkek olgunun incelendiği bir çalışmada taze ve donmuş sperm örnekleri karşılaştırılmıştır. Donmuş spermle yapılan yardımcı üreme tekniği sonuçları infertil popülasyonla benzer olarak saptanmıştır.^[83] Klinefelter sendromlu toplam 83 olgudan alınan taze ve dondurulmuş spermle yapılan ICSI sonuçlarının incelendiği bir çalışmada toplam sperm elde etme oranı TESE ile %38,9 olarak saptanırken 41 embriyo transferinin 30'unun taze örnekler 10'unun dondurulmuş-çözülmüşlerde olduğu belirtilmiştir. Fertilizasyon oranları %52,7 ve %51,6 olarak saptanmıştır.^[84]

Sperm dondurma çözünme işlemi sonrası elde edilen gebeliklerde anomali oranının artıp artmadığı sıkça sorulan bir sorudur. Anomali açısından genel görüş riskin artmadığı yönündedir.^[5] Belva ve ark.'nın çalışmalarında sperm dondurma işlemi sonrası yapılan IVF/ICSI işlemi takiben taze örnekler göre majör malformasyon oranının daha fazla olduğu belirtilmektedir.^[85] Wada ve ark. ise donmuş örneklerdeki anomali oranının taze örnekler göre daha düşük olduğunu belirtmektedir.^[86] Yakın zamanda Li ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada da, donmuş olanlarda riskin taze olanlara göre benzer olduğu ve toplam 3125 çocuğun değerlendirildiği belirtilmektedir.^[87] Dondurma işleminde bir

diğer önemli nokta çocuklar ve adolesanlardır. Bu olgularda elektroejakülasyon, vibroejakülasyon, mikroepididimal sperm aspirasyonu (MESA) ve TESE ile spermeleri saklanabilmektedir.^[5,88] Öte yandan günümüzde adolesan dönemde saklanan testis dokusu ya da sperm sonrası gebelik elde edildiğini belirten bir çalışma bulunmamaktadır. Hayvan çalışmalarında testislerin alınıp saklandıktan sonra çözünme aşamasında incelenmesi ile çözünen parçaların taze örnekler gibi olduğu, kültür ortamında tübül büyümesinin benzer olduğu ortaya konulmuştur.^[89]

Sperm dondurma işleminin klinik pratikte gerek kanser gerekse de kanser dışı olgularda giderek artan oranlarda kullanılmaya başlandığı, yeni teknik ve kriyoprotektanlarla sperm dondurma işleminin pek çok aşamasındaki olumsuz sonuçların azaltıldığı ve bununla ilişkili olarak gebelik oranlarının artmakta olduğu anlaşılmaktadır.

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. Saito K, Suzuki K, Iwasaki A, Yumura Y, Kubota Y. Sperm cryopreservation before cancer chemotherapy helps in the emotional battle against cancer. *Cancer* 2005;104:521–4. [CrossRef]
2. Pacey A, Merrick H, Arden-Close E, Morris K, Rowe R, Stark D, Eiser C. Implications of sperm banking for health-related quality of life up to 1 year after cancer diagnosis. *Br J Cancer* 2013;108:1004–11. [CrossRef]
3. Bunge RG, Keettel WC, Sherman JK. Clinical use of frozen semen; report of four cases. *Fertil Steril* 1954;5:520–9. [CrossRef]
4. Brezina PR. Fertility preservation for social and oncofertility indications. *Minerva Endocrinol* 2018;43:69–79. [CrossRef]
5. Erdemir F. Sperm dondurma. *Androloji Bülteni* 2014;16:191–5.
6. Rothman CM. Live sperm, dead bodies. *J Androl* 1999;20:456–7. [CrossRef]
7. Pastuszak AW, Lai WS, Hsieh TC, Lipshultz LI. Posthumous sperm utilization in men presenting for sperm banking: an analysis of patient choice. *Andrology* 2013;1:251–5. [CrossRef]
8. Agarwal A, Tolentino MV, Sidhu RS, Ayzman I, Lee JC, Thomas AJ, Shekarriz M. Effect of cryopreservation on semen quality in patients with testicular cancer. *Urology* 1995;46:382–9. [CrossRef]
9. Sheth KR, Sharma V, Helfand BT, Cashy J, Smith K, Hedges JC, et al. Improved fertility preservation care for male patients with cancer after establishment of formalized oncofertility program. *J Urol* 2012;187:979–86. [CrossRef]

10. Machen GL, Harris SE, Bird ET, Brown ML, Ingalsbe DA, East MM, et al. Utilization of cryopreserved sperm cells based on the indication for storage. *Investig Clin Urol* 2018;59:177–81. [\[CrossRef\]](#)
11. Johnson MD, Cooper AR, Jungheim ES, Lanzendorf SE, Odem RR, Ratts VS. Sperm banking for fertility preservation: a 20-year experience. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013;170:177–82. [\[CrossRef\]](#)
12. Kelleher S, Wishart SM, Liu PY, Turner L, Di Pierro I, Conway AJ, Handelsman DJ. Long-term outcomes of elective human sperm cryostorage. *Hum Reprod* 2001;16:2632–9. [\[CrossRef\]](#)
13. Yumura Y, Tsujimura A, Okada H, Ota K, Kitazawa M, Suzuki T, et al. Current status of sperm banking for young cancer patients in Japanese nationwide survey. *Asian J Androl* 2018;20:336–41. [\[CrossRef\]](#)
14. Schover LR, Brey K, Lichtin A, Lipshultz LI, Jeha SJ. Oncologists' attitudes and practices regarding banking sperm before cancer treatment. *J Clin Oncol* 2002;20:1890–7. [\[CrossRef\]](#)
15. Aygen E. Sperm ve embriyo bankası. İçinde: Aşçı R, Çayan S, Erdemir F, Orhan İ, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, Ekmekçiöğlü O, Kadioğlu A. editörler. *Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi*, 1. Baskı. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi; 2013. pp.411–27.
16. Keros V, Rosenlund B, Hultenby K, Aghajanova L, Levkov L, Hovatta O. Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: comparison of protocols with glycerol, propanediol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants. *Hum Reprod* 2005;20:1676–87. [\[CrossRef\]](#)
17. Jezek D, Schulze W, Kalanj-Bognar S, Vukelić Z, Milavec-Puretić V, Krhen I. Effects of various cryopreservation media and freezing-thawing on the morphology of rat testicular biopsies. *Andrologia* 2001;33:368–78. [\[CrossRef\]](#)
18. Lu X, Zhang Y, Bai H, Liu J, Li J, Wu B. Mitochondria-targeted antioxidant MitoTEMPO improves the post-thaw sperm quality. *Cryobiology* 2018;80:26–9. [\[CrossRef\]](#)
19. Zou YJ, Yang J, Chang S, Xu WM, Yin TL, Long W. Acetyl-L-carnitine: An effective antioxidant against cryo-damage on human spermatozoa with asthenospermia. *Curr Med Sci* 2017;37:915–21. [\[CrossRef\]](#)
20. Najafi A, Adutwum E, Yari A, Salehi E, Mikaeili S, Dashtestani F, et al. Melatonin affects membrane integrity, intracellular reactive oxygen species, caspase3 activity and AKT phosphorylation in frozen thawed human sperm. *Cell Tissue Res* 2018;372:149–59. [\[CrossRef\]](#)
21. Taft R. Mouse Sperm Cryopreservation Using Cryoprotectant Containing Monothioglycerol (MTG). *Cold Spring Harb Protoc* 2017;2017. [\[CrossRef\]](#)
22. Isaac AV, Kumari S, Nair R, Urs DR, Salian SR, Kalthur G, et al. Supplementing zinc oxide nanoparticles to cryopreservation medium minimizes the freeze-thaw-induced damage to spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun* 2017;494:656–62. [\[CrossRef\]](#)
23. Ushiyama A, Tajima A, Ishikawa N, Asano A. Modification of membrane cholesterol and desmosterol in chicken spermatozoa improves post-thaw survival and prevents impairment of sperm function after cryopreservation. *Reprod Fertil Dev* 2017;30:591–9. [\[CrossRef\]](#)
24. Aliabadi E, Jahanshahi S, Talei-Khozani T, Banaei M. Comparison and evaluation of capacitation and acrosomal reaction in freeze-thawed human ejaculated spermatozoa treated with L-carnitine and pentoxifylline. *Andrologia* 2018;50:e12845. [\[CrossRef\]](#)
25. Zhu Z, Ren Z, Fan X, Pan Y, Lv S, Pan C, et al. Cysteine protects rabbit spermatozoa against reactive oxygen species-induced damages. *PLoS One* 2017;12:e0181110. [\[CrossRef\]](#)
26. Nabi A, Khalili MA, Talebi AR, Mangoli E, Yari N, Nottola SA, et al. In-Vitro Application of Pentoxifylline Preserved Ultrastructure of Spermatozoa After Vitrification in Asthenozoospermic Patients. *Urol J* 2017;14:4038–43.
27. Agha-Rahimi A, Khalili MA, Nottola SA, Miglietta S, Moradi A. Cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa in new artificial seminal fluid. *Andrology* 2016;4:1037–44. [\[CrossRef\]](#)
28. Tomlinson M, Morroll D. Risks associated with cryopreservation: a survey of assisted conception units in the UK and Ireland. *Hum Fertil (Camb)* 2008;11:33–42. [\[CrossRef\]](#)
29. Schulz M, Risopatrón J, Matus G, Pineda E, Rojas C, Isachenko V, et al. Trehalose sustains a higher post-thaw sperm motility than sucrose in vitrified human sperm. *Andrologia* 2017;49:e12757. [\[CrossRef\]](#)
30. Mungan AG. Sperm ve embriyo bankası. *Erkek üreme sistemi hastalıkları kitabı*. Editörler: Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman MÖ, Usta MF, Kendirci M. Haziran 2004. İstanbul 365–81.
31. Lee CY, Lee CT, Wu CH, Hsu CS, Hsu MI. Kruger strict morphology and post-thaw progressive motility in cryopreserved human spermatozoa. *Andrologia* 2012;44:81–6. [\[CrossRef\]](#)
32. Yogev L, Paz G, Kleiman SE, Shabtai E, Gamzu R, Botchan A, et al. Freezability and semen parameters in candidates of sperm bank donors:1992–2010. *J Androl* 2012;33:999–1006. [\[CrossRef\]](#)
33. Yoon SJ, Rahman MS, Kwon WS, Ryu DY, Park YJ, Pang MG. Proteomic identification of cryostress in epididymal spermatozoa. *J Anim Sci Biotechnol* 2016;7:67. [\[CrossRef\]](#)
34. Ordoqui R, Barrera N, Montes JM, Canepa M, Bonelli C, Surka C, et al. A retrospective study on sperm banking: a Uruguayan experience. *JBRA Assist Reprod* 2018;22:82–8. [\[CrossRef\]](#)
35. MacKenna A, Crosby J, Huidobro C, Correa E, Duque G. Semen quality before cryopreservation and after thawing in 543 patients with testicular cancer. *JBRA Assist Reprod* 2017;21:31–4. [\[CrossRef\]](#)
36. Baum M, Orvieto R, Kon S, Machtinger R, Yerushalmi GM, Hourvitz A. Comparison of effects of thawing entire donor sperm vial vs. partial thawing (shaving) on sperm quality. *J Assist Reprod Genet* 2018;35:645–8. [\[CrossRef\]](#)
37. Uribe P, Rojas C, Meriño J, Zambrano F, Villegas JV, Treulen F, et al. Effect of incubation temperature after devitrification on quality parameters in human sperm cells. *Cryobiology* 2017;79:78–81. [\[CrossRef\]](#)
38. Padron OF, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Effects of cancer on spermatozoa quality after cryopreservation: a 12-year experience. *Fertil Steril* 1997;67:326–31. [\[CrossRef\]](#)
39. Raspa M, Fray M, Paoletti R, Montoliu L; EMMA/Infrafrontier Technical Working Group, Giuliani A; Scavizzi F. Long term maintenance of frozen mouse spermatozoa at -80°C. *Theriogenology* 2018;107:41–9. [\[CrossRef\]](#)
40. Bogle OA, Kumar K, Attardo-Parrinello C, Lewis SE, Estanyol JM, Ballescà JL, Oliva R. Identification of protein changes in human spermatozoa throughout the cryopreservation process. *Andrology* 2017;5:10–22. [\[CrossRef\]](#)
41. Rives N, Perdrix A, Hennebicq S, Saïas-Magnan J, Melin MC, Berthaut I, et al. The semen quality of 1158 men with testicular cancer at the time of cryopreservation: results of the French National CECOS Network. *J Androl* 2012;33:1394–401. [\[CrossRef\]](#)
42. Verza S Jr, Esteves SC. Feasibility of refreezing human spermatozoa through the technique of liquid nitrogen vapor. *Int Braz J Urol* 2004;30:487–93. [\[CrossRef\]](#)
43. McLaughlin EA, Ford WC, Hull MG. Adenosine triphosphate and motility characteristics of fresh and cryopreserved human spermatozoa. *Int J Androl* 1994;17:19–23. [\[CrossRef\]](#)

44. Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil Steril* 2001;76:892–900. [[CrossRef](#)]
45. Ahmad L, Jalali S, Shami SA, Akram Z, Batool S, Kalsoom O. Effects of cryopreservation on sperm DNA integrity in normospermic and four categories of infertile males. *Syst Biol Reprod Med* 2010;56:74–83. [[CrossRef](#)]
46. Thomson LK, Fleming SD, Aitken RJ, De Iuliis GN, Zieschang JA, Clark AM. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Hum Reprod* 2009;24:2061–70. [[CrossRef](#)]
47. Amidi F, Pazhohan A, Shabani Nashtaei M, Khodarahmian M, Nekoonam S. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell Tissue Bank* 2016;17:745–756. [[CrossRef](#)]
48. Fontoura P, Mello MD, Gallo-Sá P, Erthal-Martins MC, Cardoso MC, Ramos C. Leptin Improves Sperm Cryopreservation via Antioxidant Defense. *J Reprod Infertil* 2017;18:172–8.
49. Saeednia S, Shabani Nashtaei M, Bahadoran H, Aleyasin A, Amidi F. Effect of nerve growth factor on sperm quality in asthenozoospermic men during cryopreservation. *Reprod Biol Endocrinol* 2016;14:29. [[CrossRef](#)]
50. Fabozzi G, Starita MF, Rega E, Alteri A, Colicchia A, Piscitelli C, Giannini P. Evaluation of the Efficiency of Two Different Freezing Media and Two Different Protocols to Preserve Human Spermatozoa from Cryoinjury. *Int J Reprod Med* 2016;2016:6059757. [[CrossRef](#)]
51. Cayan S, Lee D, Conaghan J, Givens CA, Ryan IP, Schriock ED, Turek PJ. A comparison of ICSI outcomes with fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa from the same couples. *Hum Reprod* 2001;16:495–9. [[CrossRef](#)]
52. Vaz CR, Lamim T, Salvador RA, Batschauer APB, Amaral VLL, Til D. Could cryopreserved human semen samples be stored at -80°C? *JBRA Assist Reprod* 2018. [[CrossRef](#)]
53. Rossato M, Zorzi M, Ferlin A, Garolla A, Foresta C. Effects of cryopreservation on progesterone-induced ion fluxes and acrosome reaction in human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000;15:1739–43. [[CrossRef](#)]
54. Boitrelle F, Albert M, Theillac C, Ferfour F, Bergere M, Vialard F, et al. Cryopreservation of human spermatozoa decreases the number of motile normal spermatozoa, induces nuclear vacuolization and chromatin decondensation. *J Androl* 2012;33:1371–8. [[CrossRef](#)]
55. Gatimel N, Leandri R, Parinaud J. Sperm vacuoles are not modified by freezing–thawing procedures. *Reprod Biomed Online* 2013;26:240–6.
56. Ferrari S, Paffoni A, Filippi F, Busnelli A, Vegetti W, Somigliana E. Sperm cryopreservation and reproductive outcome in male cancer patients: a systematic review. *Reprod Biomed Online* 2016;33:29–38. [[CrossRef](#)]
57. Muller I, Oude Ophuis RJ, Broekmans FJ, Lock TM. Semen cryopreservation and usage rate for assisted reproductive technology in 898 men with cancer. *Reprod Biomed Online* 2016;32:147–53. [[CrossRef](#)]
58. Crha I, Ventruba P, Zakova J, Huser M, Kubesova B, Hudecek R, Jarkovsky J. Survival and infertility treatment in male cancer patients after sperm banking. *Fertil Steril* 2009;91:2344–8. [[CrossRef](#)]
59. van Casteren NJ, van Santbrink EJ, van Inzen W, Romijn JC, Dohle GR. Use rate and assisted reproduction technologies outcome of cryopreserved semen from 629 cancer patients. *Fertil Steril* 2008;90:2245–50. [[CrossRef](#)]
60. Garg T, LaRosa C, Strawn E, Robb P, Sandlow JI. Outcomes after testicular aspiration and testicular tissue cryopreservation for obstructive azoospermia and ejaculatory dysfunction. *J Urol* 2008;180:2577–80. [[CrossRef](#)]
61. Chung K, Irani J, Knee G, Efymow B, Blasco L, Patrizio P. Sperm cryopreservation for male patients with cancer: an epidemiological analysis at the University of Pennsylvania. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;113:S7–11. [[CrossRef](#)]
62. Gilbert K, Nangia AK, Dupree JM, Smith JE, Mehta A. Fertility preservation for men with testicular cancer: Is sperm cryopreservation cost effective in the era of assisted reproductive technology? *Urol Oncol* 2018;36:92.e1–9 [[CrossRef](#)]
63. Girasole CR, Cookson MS, Smith JA, Ivey BS, Roth BJ, Chang SS. Sperm banking: use and outcomes in patients treated for testicular cancer. *BJU Int* 2007;99:33–6. [[CrossRef](#)]
64. Magelssen H, Haugen TB, von Düring V, Melve KK, Sandstad B, Fosså SD. Twenty years experience with semen cryopreservation in testicular cancer patients: who needs it? *Eur Urol* 2005;48:779–85. [[CrossRef](#)]
65. Ping P, Zhu WB, Zhang XZ, Yao KS, Xu P, Huang YR, Li Z. Sperm banking for male reproductive preservation: a 6-year retrospective multi-centre study in China. *Asian J Androl* 2010;12:356–62. [[CrossRef](#)]
66. Bunge RG, Sherman JK. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature* 1953;172:767–8. [[CrossRef](#)]
67. Feldschuh J, Brassel J, Durso N, Levine A. Successful sperm storage for 28 years. *Fertil Steril* 2005;84:1017.e3–4 [[CrossRef](#)]
68. Clarke GN, Liu DY, Baker HW. Recovery of human sperm motility and ability to interact with the human zona pellucida after more than 28 years of storage in liquid nitrogen. *Fertil Steril* 2006;86:721–2. [[CrossRef](#)]
69. Freour T, Mirallie S, Jean M, Barriere P. Sperm banking and assisted reproductive outcome in men with cancer: a 10 years' experience. *Int J Clin Oncol* 2012;17:598–603. [[CrossRef](#)]
70. Sun J, Chen W, Zhou L, Hu J, Li Z, Zhang Z, Wu Y. Successful delivery derived from cryopreserved rare human spermatozoa with novel cryopiece. *Andrology* 2017;5:832–7. [[CrossRef](#)]
71. Johnston RC, Kovacs GT, Lording DH, Baker HW. Correlation of semen variables and pregnancy rates for donor insemination: a 15-year retrospective. *Fertil Steril* 1994;61:355–9. [[CrossRef](#)]
72. De Croo I, Van der Elst J, Everaert K, De Sutter P, Dhont M. Fertilization, pregnancy and embryo implantation rates after ICSI with fresh or frozen-thawed testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 1998;13:1893–7. [[CrossRef](#)]
73. Friedler S, Raziel A, Soffer Y, Strassburger D, Komarovskiy D, Ron-El R. Intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved testicular spermatozoa in patients with nonobstructive azoospermia – a comparative study. *Fertil Steril* 1997;68:892–7. [[CrossRef](#)]
74. Habermann H, Seo R, Cieslak J, Niederberger C, Prins GS, Ross L. In vitro fertilization outcomes after intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed testicular spermatozoa. *Fertil Steril* 2000;73:955–60. [[CrossRef](#)]
75. Tournaye H, Merdad T, Silber S, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A. No differences in outcome after intracytoplasmic sperm injection with fresh or with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Hum Reprod* 1999;14:90–5. [[CrossRef](#)]
76. Sukcharoen N, Sithipravej T, Promviengchai S, Chinpilas V, Boonkasemsanti W. Comparison of the outcome of intracytoplasmic sperm injection using fresh and frozen-thawed epididymal spermatozoa obtained by percutaneous epididymal sperm aspiration. *J Med Assoc Thai* 2001;84:S331–7.
77. Park YS, Lee SH, Song SJ, Jun JH, Koong MK, Seo JT. Influence of motility on the outcome of in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection with fresh vs. frozen testicular sperm from men with obstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2003;80:526–30. [[CrossRef](#)]

78. Levron J, Madgar I, Shefi S, Meirou D, Wisner A, Bider D, et al. IVF outcome with cryopreserved testicular sperm. *Andrologia* 2011;43:48–51. [CrossRef]
79. Wood S, Sephton V, Searle T, Thomas K, Schnauffer K, Troup S, et al. Effect on clinical outcome of the interval between collection of epididymal and testicular spermatozoa and intracytoplasmic sperm injection in obstructive azoospermia. *J Androl* 2003;24:67–72.
80. Vanderzwalmen P, Hiemer A, Rubner P, Bach M, Neyer A, Stecher A, et al. Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. *Reprod Biomed Online* 2008;17:617–27. [CrossRef]
81. Gorrill MJ, Burry KA, Patton PE. Pregnancy outcomes using donor sperm insemination after failed in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection cycles in couples with complex infertility disorders. *Fertil Steril* 2003;80:936–8. [CrossRef]
82. Schachter-Safrai N, Karavani G, Levitas E, Friger M, Zeadna A, Lunenfeld E, Har-Vardi I. Does cryopreservation of sperm affect fertilization in nonobstructive azoospermia or cryptozoospermia? *Fertil Steril* 2017;107:1148–52. [CrossRef]
83. Reignier A, Lammers J, Splingart C, Redhead D, Labat JJ, Mirallié S, et al. Sperm cryopreservation and assisted reproductive technology outcome in patients with spinal cord injury. *Andrologia* 2018;50:e12833. [CrossRef]
84. Vicdan K, Akarsu C, Sözen E, Buluç B, Vicdan A, Yılmaz Y, Biberoglu K. Outcome of intracytoplasmic sperm injection using fresh and cryopreserved-thawed testicular spermatozoa in 83 azoospermic men with Klinefelter syndrome. *J Obstet Gynaecol Res* 2016;42:1558–66. [CrossRef]
85. Belva F, Henriët S, Van den Abbeel E, Camus M, Devroey P, Van der Elst J, et al. Neonatal outcome of 937 children born after transfer of cryopreserved embryos obtained by ICSI and IVF and comparison with outcome data of fresh ICSI and IVF cycles. *Hum Reprod* 2008;23:2227–38. [CrossRef]
86. Wada I, Macnamee MC, Wick K, Bradfield JM, Brinsden PR. Birth characteristics and perinatal outcome of babies conceived from cryopreserved embryos. *Hum Reprod* 1994;9:543–6. [CrossRef]
87. Li HZ, Qiao J, Chi HB, Chen XN, Liu P, Ma CH. Comparison of the major malformation rate of children conceived from cryopreserved embryos and fresh embryos. *Chin Med J (Engl)* 2010;123:1893–7.
88. Tournaye H, Goossens E, Verheyen G, Frederickx V, De Block G, Devroey P, Van Steirteghem A. Preserving the reproductive potential of men and boys with cancer: current concepts and future prospects. *Hum Reprod Update* 2004;10:525–32. [CrossRef]
89. Milazzo JP, Vaudreuil L, Cauliez B, Gruel E, Massé L, Mousset-Siméon N, et al. Comparison of conditions for cryopreservation of testicular tissue from immature mice. *Hum Reprod* 2008;23:17–28. [CrossRef]