

T.C.
YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SPERM DONDURMA YÖNTEMLERİNİN GEBELİK
SONUÇLARINA ETKİSİ

DERYA AKA

DANIŞMAN
PROF. DR. İBRAHİM ÇEVİK

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ BİLİM DALI
KLİNİK EMBRİYOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2014

T.C.
YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SPERM DONDURMA YÖNTEMLERİNİN GEBELİK
SONUÇLARINA ETKİSİ

DERYA AKA

DANIŞMAN
PROF. DR. İBRAHİM ÇEVİK

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ BİLİM DALI
KLİNİK EMBRİYOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2014

T.C.
YENİ YÜZYIL ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji Bilim Dalı Klinik Embriyoloji Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Yüksek
Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 24/12/2014

Jüri Başkanı
Prof. Dr. İbrahim Çevik
Yeni Yüzyıl Üniversitesi Tıp Fak.
Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Tülay İrez
Yeni Yüzyıl Üniversitesi Tıp Fak.

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Klin. Emb. Yüksek Lisans program sorumlusu

Prof. Dr. Gül Baktır
Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Müdür V.

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 çalışmayla elde edilmeyen 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.

Derya AKA

İTHAF

Değerli anneme ve babama ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Tezimin her aŐamasında değerli bilgileriyle bana yol gosteren ve desteğini hiğbir zaman esirgemeyen sayın danışman hocam Prof. Dr. İbrahim ÇEVİK'e, lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım baŐta Klinik Embriyoloji Koordinatörü Sayın Prof. Dr. Tülay İrez olmak üzere tüm değerli öğretim üyelerine, çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen tüm embriyolog arkadaşlarıma, her konuda sabırla yardımcı olan eŐim Hasan AKA'ya, bütün hayatım boyunca sevgi, anlayıŐ, sabır ve tüm maddi-manevi desteklerini benden esirgemeyen ANNEME VE BABAMA sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

ABSTRACT

Sperm cryopreservation is the process of sperm cryopreservation after spermatozoa procurement before IVF (In Vitro Fertilization) or ICSI (Intra Cytoplasmic Injection) procedure. Sperm cryopreservation not only increased the success rate of assisted reproductive treatment methods in the order of 10 % but also contributed to future fertility preservation after chemotherapy-radiotherapy, or testicular surgery etc.

Five different centers of cryopreservation with monthly turn-over of over 30 ICSI procedures have been questioned in İstanbul. In this study centers have been questioned regarding methods of sperm cryopreservation and rate of pregnancy success by using a predetermined questionnaire. Also, sperm freezing mediums and methods were recorded.

The sperm freezing method was mostly (60%) quick freezing. Approximately 4,7 % to 5 % of sperm used was cryopreserved sperm and in most of them (60 %) sperm freezing medium was Test Yolk buffer/ Irvine. The average overall pregnancy rate and the average pregnancy rate obtained with frozen sperm were 43 to 45 %, and 26 to 40 %, respectively. No statistically significant difference was found between pregnancy rates obtained by using frozen sperm and normal sperm in B (LN2), C (Quick Manual), and D (Quick Manual) clinics. In A (Quick Manual) and E (Slow Manual) clinics, pregnancy rate obtained by using frozen sperm was significantly less than that obtained by using normal sperm.

As a result, we could not show a clearly different effect of different freezing methods on success of ICSI in our study. This may be because of the lack of information regarding the quality of sperm in different clinics in this study.

ÖZET

Sperm kriyoprezervasyonu, spermatozoa elde edildikten sonra in vitro fertilizasyon (IVF) ya da intra sitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) öncesi spermatozoaların dondurularak saklanması işlemidir. Spermin dondurularak saklanması hem yardımcı üreme tedavilerindeki başarıyı %10 arttırmış, hem de kemoterapi-radyoterapi, testis cerrahisi vb.'den önce, gelecekteki fertilitenin korunmasına katkıda bulunmuştur.

Yaptığımız bu çalışmada İstanbul il sınırları içerisinde aylık ortalama 30'un üzerinde hastaya ICSI uygulanan ve dondurma imkanı olan 5 merkez görüşme yapılmak üzere ziyaret edildi. Anket usulu yapılan bu çalışmada, kliniklerdeki kullanılan sperm dondurma yöntemleri ve gebelik başarı oranları soruşturuldu. Kullanılan sperm dondurma mediumları ve dondurma yöntemleri kaydedildi.

Çoğunlukla (%60) kullanılan dondurma yöntemi hızlı dondurma idi. Tüm kliniklerde yılda yaklaşık olarak % 4.7-5 oranında dondurulmuş sperm kullanıldığı ve bunların çoğunda (%60) kullanılan sperm dondurma ortamı ise Test Yolk buffer/ Irvine olarak belirlendi. Tüm kliniklerdeki ortalama gebelik oranları ve dondurulmuş sperm ile elde edilen ortalama gebelik oranları sırasıyla % 43 - 45 ve % 26 - 40 olarak belirtilmiştir. B, C, D kliniklerinde dondurulmuş sperm kullanılarak elde edilen gebelik oranı, normal sperm kullanılan yöntem ile yapılan gebelikten istatistiksel anlamlı olarak farklı olmadığı tespit edildi. A ve E kliniklerinde dondurulmuş sperm kullanılarak elde edilen gebelik oranı, normal sperm kullanılarak elde edilen gebelikten istatistiksel anlamlı olarak azdır.

Sonuç olarak, çalışmamızda değişik dondurma yöntemlerinin ICSI başarısı üzerine farklı etkisi olduğu net olarak gösterilememiştir. Bunun nedeni, bu çalışmada klinikler arasında sperm kalitesi hakkındaki bilginin eksik olması olabilir.

İÇİNDEKİLER

beyan	4
ithaf	5
teşekkür	6
ABSTRACT	7
ÖZET	9
1 GİRİŞ	13
2 YÖNTEM VE GEREÇLER	18
2.1 Manual Yöntem	18
2.2 Otomatik Yöntem	18
2.3 Dondurma Teknikleri	19
2.3.1 Yavaş Dondurma	19
2.3.2 Hızlı Dondurma	20
2.3.3 Vitrifikasyon	20
3 SONUÇLAR	25
4 TARTIŞMA	30
5 KAYNAKLAR	35

1 GİRİŞ

Onkolojik, immünolojik hastalıklar ve bu hastalıkların tedavilerinden kaynaklanabilecek fertilizasyon problemlerinde, gelecekteki □çocuk isteği arzusu göz önünde bulundurularak hasta spermlerinin saklanması ihtiyacı duyulur. Saklama işleminde kullanılan yöntem de kriyoprezervasyon denir. Kriyoprezervasyonun genel prensibi, dondurulacak materyalin kriyoprotektanlarla dengelendikten sonra soğutulması, sıvı nitrojen içinde - 196⁰C'de depolanması ve çözülürken de kriyoprotektanların uzaklaştırılarak dondurulan materyalin canlılığını sürdürülebileceği fizyolojik ortamlara geçirilmesidir. (1).

İlk kriyoprezervasyon 1776'da Spallanzani tarafından kar ile gerçekleştirilmiştir ve başarılı olmuştur (2). 1950'li yıllarda ise deney hayvanlarında ve sığırlarda semen kriyoprezervasyonu uygulanmış ve canlı doğumlar elde edilmiştir (3,4). Dondurulmuş insan spermi ile ilk çalışma 1950'de Sherman tarafından yapılmış, daha sonra araştırmacılar Sherman'ın çalışmalarını geliştirmişlerdir (5). 1953'te dondurulmuş insan spermi ile ilk donör inseminasyonu yapılmış ve gebelik elde edilmiştir (6). Gonadların kriyoprezervasyonu konusundaki çalışmalarmalar 1950'lerde yapılmış, deney hayvanlarında testis dokularının implantları ile spermatogenez sağlanmıştır (7,8). 1980'lerde ise insan semen kriyoprezervasyonu tekniklerinin optimizasyonu konusunda çalışmalar yapılmış, 1990'lardan sonra ise donmuş sperm ve testis dokuları In vitro fertilization (IVF)/ İntra Sitoplasmik Sperm İnjection (ICSI) uygulamalarında kullanılmaya başlamıştır (9). Shoysman 1993'de testis spermini kullanarak ilk kez gebelik elde edilmesi ve nonobstrüktif azoospermik

olgularda %40–70 oranında sperm elde edilmesi testiküler biyopsi metodlarının gelişmesine neden olmuştur (10,11).

Kriyoprezervasyonun Üroloji'deki kullanım yerleri; sperm parametreleri normal olan, kemoterapi, radyoterapi veya spermatogenezi inhibe edebilecek ilaçların alınımından öncesinde ejakülattan sperm alınıp saklanması, testis veya prostat cerrahisi öncesinde ejakülattan sperm alınıp saklanması, obstrüktif azoospermiden şüphelenilen durumlarda ve yardımcı üreme tekniklerinin (YÜT) kullanılması planlanan hastalarda öncesinden testis histopatolojisi hakkında bilgi sahibi olunması, nonobstrüktif azoospermik hastalarda testiküler sperm ekstraksiyon (TESE) ile bulunan spermlerin saklanması, donör sperm bankası amacıyla alınan örneğin saklanması, azoospermik hastalarda başarılı veya başarısız bir işlem sonrasında istenen gebeliklerde cerrahi işlem tekrarlamamak için saklanan örneğin kullanılması ve prepubertal dönemde malignensi sebebiyle kemoterapi yada radyoterapi alınacaksa testisten örnek alınıp saklanması olarak sıralanabilir (12,13).

Spermayı dondurarak saklama esnasında spermatozoada oluşabilecek zararlı etkiler kriyoprotektan maddeler kullanılarak azaltılabilmektedir. Hemen hemen her türün sperması farklı özelliklere sahip olduğu için dondurma işleminden önce spermaya katılacak olan kriyoprotektanın çeşidi, yoğunluğu ve spermanın kriyoprotektana maruz bırakılma süresi türe göre ayarlanması gerekir (14). Kriyoprotektan maddeler hücre içine hızlı bir şekilde diffüze olup su dengesini sağlayarak hücreleri osmotik şoktan korumaktadır. Ayrıca bu ajanların, dondurma ve çözme sırasında suyu bağlayarak hücre içinde elektrolit miktarını ve aynı zamanda mevcut suyun buz kristallerine dönüşmesini azalttığı da bilinmektedir (15,16).

Kriyoprotektanlar; alkoller (etanol, propanol, metanol, 1,2 propanediol (PROH) ve gliserol), dimetilsülfoksit (DMSO) ve şekerler (glukoz, laktoz, sükroz ve nişasta) olmak üzere üç grupta sınıflandırılabilirler (17).

a. DMSO : Molekül ağırlığı düşük non-elektrolit bir maddedir. Toksikitesi diğer protektanlara göre daha fazladır. Bu etki ısının düşürülmesi ile azaltılamaz. Yavaş dondurma ve çözme işleminde hücre harabiyete karşı koruyucu etkisinin olduğu bilinmektedir.

b. Gliserol ve 1,2 Propanediol (PROH) : Düşük molekül ağırlıklı bir kriyoprotektan olup genellikle 1M ve 2M olarak kullanılır. Toksikitesi ısıya bağlıdır ve ısının düşmesiyle azalır. Viskozitesi yüksek olduğu için dondurma solüsyonlarına dikkatli bir şekilde ilave edilmelidir.

c. Sükroz: Diğer kriyoprotektanlarla birlikte kullanılır. Hücre membranına penetre olamadığından ekstrasellüler solüsyon içerisinde bulunması ani ozmotik etki yaratabilir. Dilüsyon ve ani çözme fazında hücre kendini tekrar toparlayıp hidrate olurken koruyucu etki gösterir.

Kriyoprotektanların özelliği, dondurma işlemi sırasında koruyucu özelliğe ve yüksek oranda H₂ bağlama kapasitesine sahiplerdir. Koruyucu özelliklerini göstermeleri için her zaman hücre içine girmelerine gerek yoktur. Çünkü hücre harabiyetin en hızlı ve etkili meydana geldiği yer hücre zarıdır.

Kriyoprotektanlar hücre içine geçip geçmemelerine göre, İntrasellüler (permeable) ve ekstrasellüler (impermeable) ajanlar olmak üzere 2'ye ayrılırlar (18).

İntrasellüler ajanlar (dimetilsülfoksit, gliserol) , kutuplaşma ve lipofilik özellikleri hücre içine geçiş hızlarını etkileyen küçük moleküllerdir. Dondurma işlemi sırasında hücre içerisinde oluşabilecek buz kristallerinin oluşumunu -40°C 'ye kadar düşürebilmektedir. Bu ajanlar hücreyi dondurma işleminin zararlı etkilerine karşı olabildiğince korurlar. Hücre içine geçişleri solüsyonun kendi geçiş gücü, hücre içi ve hücre dışı kriyoprotektanların konsantrasyon farkı, ısı ve hücre yüzeyi ile doğru orantılıdır.

Ekstrasellüler ajanlar, monosakkaritler(glukoz ve heksoz), disakkaritler (sükroz), ve trisakkaritler (rafinnoz) bu gruba örnek olarak gösterilebilir. Tek başlarına kriyoprotektan olarak kullanılmamakla birlikte, diğerleriyle birlikte kullanılmaları halinde ozmotik basınç farklılıklarının oluşturacağı zarara karşı koruyucudur. Bu ajanlar arasında günümüzde en çok sükroz kullanılmaktadır (19).

Sperm kriyoprezervasyonunda, kriyoprotektan olarak gliserol kullanılarak danelarda ilk canlı doğum gerçekleştirilmiştir (20,21). İnsan semeninin kriyoprezervasyonun ile donör inseminasyonlarının uygulanabilirliği artmış ve insanlarda ilk canlı doğum 1953 yılında yayınlanmıştır (22). Devam eden süreçte dondurulmuş semen ile artifisiyel inseminasyon yöntemi şiddetli erkek infertilisinde tedavi amaçlı kullanılmaya başlanmıştır. İlk olarak gliserolün kriyoprotektan olarak kullanımından sonra, diğer bazı kriyoprotektif özellikli kimyasallar da sperm dondurma amacıyla kullanılmaya başlanmıştır (23). İnsan sperminde en iyi sonuçlar etilen glikol ile elde edilmektedir (24). Dondurulmuş spermlerle taze spermlerin kullanımına benzer fertilitite oranları bildirilmiştir (25,26).

Sperm dondurmanın sperm motilitesi ve canlılığı üzerine olumsuz etkisi olabilir. Bunu önlemek için bazı araştırmacılar kültür ortamına koruyucu olarak askorbik asit, katalaz, E vitamini, vs gibi antioksidanların eklenmesini önerirler (27). Sperm hareketlilik ve canlılık oranları yardımcı üreme teknikleri tedavisinde gebelik oranlarını etkilemektedir (28,29). Taze ve dondurulmuş spermatozoa ile intrastoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) gebelik sonuçları karşılaştırıldığında fark bulunmamıştır (30). Taze ve dondurulmuş spermlerle yapılan intrauterin inseminasyonlar (IUI) arasında başarı araştırıldığında, tek etkili faktörün kadının yaşı olduğu bulunmuştur (31). TESE ile alınan örneğin dondurulması ve çözülmesi ile yapılan ICSI başarısının, taze spermden daha az olmasının sebebinin spermin dondurma işlemi ile ilgili olmadığı, spermin immatüritesi ile ilgili olduğu söylenmektedir.

Günümüzde obstrüktif azoospermik hastalardan elde edilen epididimal veya testis spermlerinin dondurulması sonucunda taze örneğin kullanımına benzer fertilizasyon, klinik gebelik ve implantasyon oranları bildirilirken , nonobstrüktif vakalardan elde edilen testis spermlerinin dondurulması sonucu taze sperm kullanımına göre daha düşük gebelik ve implantasyon oranlarının elde edildiği gösterilmiştir (32).

2 YÖNTEM VE GEREÇLER

Kriyoprezervasyonda kullanılan yöntemler başlıklar halinde aşağıda belirtilmiştir:

2.1 Manual Yöntem

Semen örnekleri ejakülasyondan sonraki 1-2 saat içerisinde dondurulmalıdır. Daha sonra, likefiye olmuş semene oda ısısında yaklaşık 2 dakikalık bir süre içerisinde 1:1 oranında kriyoprotektif solüsyon ilave edilir. Ejakülat volümü 5 ml.den fazla ise örnek kriyoprotektan ilave etmeden ikiye bölünmedir. Hazırlanan örnek saklama malzemesine, straw ya da ampüle koyulur. 30 dakika sıvı nitrojen buharında sıvı nitrojene yaklaşık 10cm. olacak şekilde bekletilir. Straw ya da kriyovialin ısı; 30 sn. sonra -65°C , 1 dak. sonra -115°C , 90 sn. sonra -130°C , 2 dak. sonra -135°C , 3 dak. 30 sn. sonra -140°C , 4dak. sonra -150°C , 5dak. sonra -152°C ' ye kadar düşer. 30 dakikanın bitiminde örnek doğrudan sıvı nitrojen içine kaldırılması şeklinde sıralanabilir (33).

2.2 Otomatik Yöntem

Birçok IVF laboratuvarında programlanabilir dondurucu olarak Planer (Series III, UK) kullanılmaktadır. Manuel yönetime göre üstünlüğü halen kanıtlanamadığı ve daha uzun zaman alan detaylı bir yöntem olduğu için fazla tercih edilmemektedir. En çok kullanılan yöntemlerden 2 tanesi;

1. İşleme oda ısısında (yaklaşık 20°C) başlanır, $-0,5\text{C/dk}$. İle -7°C 'e inilir. Bu sıcaklıkta 10 dk. Bekledikten sonra -10°C/dk ile -80°C 'e kadar inilir ve program sonlandırılarak örnek sıvı nitrojen tankına kaldırılır.

2. İşleme 24 °C ile başlanır. Önce 2 °C /dk ile 0 °C 'e inilir, ardından -10 °C /dk. ile -100 °C'e inilir. Burada 10 dk. bekletildikten sonra numuneler sıvı nitrojen tankına kaldırılır (34).

2.3 Dondurma Teknikleri

Tüm kriyoprezervasyon yöntemlerinde uygulanan temel prensip, donma ve çözme sırasında hücre içersinde oluşabilecek buz kristallerinin oluşumunun engellenmesi ve meydana getirecekleri zararların önüne geçilmesidir. Buz kristalleri; aşırı dehidrasyon, plazma membranında parçalanma, akrozom sızıntı, mitekondrial hasar ve DNA fragmentasyonuna sebep olur. Öncelikle hücre içersinde bulunan sıvının kriyoprotektan denilen soğugun zararlı etkilerinden koruma özelliğine sahip kimyasal maddeler ile yer değıştirmesi gerekmektedir.

Her biyolojik materyalin farklı olmasından dolayı, farklı yoğunlukta kriyoprotektan madde kullanımı, farklı dondurma hızları ve protokollerin uygulanması söz konusudur. Uygulanan dondurma yöntemleri Yavaş Dondurma, Hızlı Dondurma ve Vitrifikasyondur (35).

2.3.1 Yavaş Dondurma

Behrman ve Sawada tarafından bulunmuştur (36). 2-4 saat periyotlarda soğuyan spermler 2 ve ya 3 basamakta ya manual ya da otomatik soğutucuyla kademeli olarak oluşur. Manual methodda sıvı nitrojen içersine örnek batırıldıktan sonra aşamalı olarak bir kriyoprotektan eklendiğinde semen sıcaklığında azalış aynı anda gerçekleşir (37). Örnek dondurma, 5°C'den -80°C'ye kadardır. Örnek sonra -196°C 'de sıvı nitrojene batırılır (38). Soğutucularda tüpleri tutmak için bir plaka

kullanılır. Sıvı nitrojen tarafından soğutulmuş, plaka altında depo tankı tutulur. Sıvı nitrojen tank içersine dökülür. Cihaz bir kez programlanır. Bilgiler yazılıma yüklenir. 20⁰C'den -80⁰C'ye soğutma tutulur ve sonra dondurma tamamlanır. Tüpler taşınır ve -196⁰C sıvı nitrojende saklanır, 40 dak.'yı alır (39).

2.3.2 Hızlı Dondurma

Hızlı dondurma Sherman tarafından önerilmiştir (40). Bu teknik tüpler ve sıvı nitrojen gazı arasında 8-10 dakikada direkt bağlantı gerektirir. -196⁰C'de sıvı nitrojene daldırılır. Nitrojen gazı içerisinde sıcaklık değişim derecesi vardır. Örnek başlangıçta eşit hacimli soğuk kriyoprotektan ile damla damla şeklinde karıştırılır. Tüpler içersine karışım yüklenir ve 4⁰C'de 10 dakika inkübatöre bırakılır. Tüpler sıvı nitrojen seviyesinin 15-20 cm. üzerinde yerleştirilir (-80⁰C'de min. 15 dak.). Sonra bu evrede tüpler sıvı nitrojene daldırılır.

2.3.3 Vitrifikasyon

Sperm hücresinin dondurulmasında kullanılan yöntemlerden biri de vitrifikasyon tekniğidir. Sperm kriyoprezervasyonunda güvenilir ve etkili bir yöntemdir. Bu yöntemde viskozitenin artarak su bazlı çözeltinin sıvıdan katıya dönüşmesi sağlanır. Vitrifikasyon yavaş dehidratasyon ortamı yerine çok yüksek ozmolarite ortamının kullanıldığı çok hızlı dondurma yöntemidir. Çok hızlı dehidratasyon sonrası örnekler doğrudan sıvı azota yerleştirilir. Su kristalize olmaz ve buz oluşmaz. Bütün yapı vitreus haline dönüşür (41). Vitrifikasyon solüsyonlarına anti oksidanların ve hepes eklenmesi, protein katkısı, parafin oil

uygulamasının canlılık oranlarını önemli ölçüde arttırdığı konusunda çalışmalar yapılmıştır (42,43).

Yaptığımız bu çalışmada İstanbul il sınırları içerisinde aylık ortalama 30'un üzerinde hastaya ICSI uygulanan ve dondurma imkanı olan 10 merkez görüşme yapılmak üzere ziyaret edildi. Anket usulu yapılan bu çalışmaya; bilgi paylaşmak istemeyen ya da görüşme zamanı ayaralanamayan 5 klinik dahil edilmedi. Seçtiğimiz kriterlere uygun diğer 5 kliniklerdeki kullanılan sperm dondurma yöntemleri ve başarı oranları soruşturuldu. Kullanılan sperm dondurma mediumları ve dondurma yöntemleri öğrenildi. Kliniklerde kullanılan sperm dondurma yönteminin gebelik sonuçlarına etkisi araştırıldı.

Bu kliniklerde kullandığımız anket soruları aşağıda maddeler halinde belirtilmiştir. Bunlar:

1. Sperm kriyoprezervasyonunda kullanılan yöntemin adı nedir ?
2. Sperm kriyoprezervasyonunda kullanılan mediumun adı nedir ?
3. Sperm kriyoprezervasyonunda kullanılan mediumun oranı nedir ?
4. Kriyoprezervasyon işlemini ne kadar sürede gerçekleştiriyorsunuz ?
5. Kullanılan cihazın parametrelerini(sic./dak.) belirtiniz.
6. Dondurma-çözdürme sonrası elde edilen spermin oranı % kaçtır?

Kliniklerin uyguladığı sperm dondurma yöntemleri aşağıda belirtilmiştir.

A kliniği:

İki ve ya 3 günlük bir abstinesten sonra semen alınır. rnek 30 dak. boyunca 37⁰C'de svılaşmaya bırakılır. Bir vial medyum zndrlr ve 37⁰C'ye getirilir. Svılaştırılan rnek steril, 15ml konik santrifüj tüpüne aktarılır, hacim belirlenir ve 1:1'lik bir örnek medyum oranına ulaşılana kadar medyum damla damla eklenir. rnek -medyum karışımı , 37⁰C su içeren bir behere veya başka uygun bir kaba konur. Karışımın yavaşça soğumasını sağlamak için kap 2⁰C-5⁰C sıcaklıkta soğutulur. 90 dak. sonra örnek geleneksel yöntemler kullanılarak payetler, viyaller veya pelletler içinde dondurulmaya hazırdır.

B kliniği:

Artı 4 derecede saklanan dondurma mediumu oda sıcaklığına çıkarılır ve 30 dk. bekletilir. Daha sonra aynı oranda alınan sperm rneği ile titre edilerek birbiri içersine karışması sağlanır. Burada önemli olan çok yavaş bir Şekilde karışımı sağlamaktır. Karışım hazırlandıktan sonra 10 dk. kendi haline bırakılır. Daha sonra vial ya da straw içersine alınan karışım azot buharında 10 dk. bekletilir ve saklanacağı yere kaldırılır.

C kliniği:

Sperm ve medyum 1:1 oranında damla damla çalkalanarak karıştırılır. Kriyotp 10 dk. Sıvı azotta bekletilir.Sonra azot buharına daldırılır. -196⁰C'de saklanır.

D kliniği:

Santrifüjde sperm örneği konsantre edilir (1800 rpm'de 5 dk.). Örneğ 0,5 ml kalıcak şekilde üst kısım dökülür. Daha sonra 0,5 ml. örneğ cryovial içine yerleştirilir. Sperm freeze medyum aynı oranda 1:1 şekilde vial içersine yavaş yavaş damlalar halinde bırakılır. Sonra vial kapağı kapatılır. Örneğ yavaşça karıştırılır. 175-185 °C deki buhar kaplı saklama tankına yerleştirilir.

E kliniği:

Sperm yıkama işleminin sonrası konik tüpün dibinde kalan sperm (0.5-1ml) örneğine yavaş bir şekilde (damla- damla) sperm freezing mediumundan eklenir. (1:1 oranda) ve saklamak için vial konulur. Azot buharında yaklaşık olarak 10 dak. beklettikten sonra -196° C'de azot tankına bırakılır.

Seçtiğimiz 5 klinikteki kullanılan dondurma yöntemi, medyum oranları, dondurma süreleri, dondurma derecesi ve sperm vitalite oranları Tablo 1'de özetlenmiştir. Ayrıca kliniklerdeki yıllık gebelik oranları , dondurulmuş spermle yapılan gebelik oranları ve yıllık gebelik sayıları Tablo 2'de belirtilmiştir.

İstatistiksel Yöntem

Toplanan verilerin istatistiksel analizi için STATA MP Parallel Edition (Statistics/Data Analysis StataCorp Texas USA) sürüm 13 istatistik programı kullanıldı. Kullanılan yöntemle göre gebelik oranlarını karşılaştırmak amacıyla ki-

kare testi (χ^2) kullanıldı. Yapılan tüm testlerde p değeri $<0,05$ istatistiksel anlamlı olarak kabul edildi.

Tablo 1: Kliniklerde Kullanılan Dondurma Teknikleri

Klinikler	A	B	C	D	E
Kullanılan dondurma yöntemi	Quick Manual Yöntem (Hızlı Dondurma)	LN2 Buhar Yöntemi	Quick Manual Yöntem (Hızlı Dondurma)	Quick Manual Yöntem (Hızlı Dondurma)	Slow Freezing (Yavaş Dondurma)
Medium	Test yolk buffer/Irvine	Sperm Store	Sperm Freze Solution/Vitrolife	Test yolk buffer/Irvine	Test yolk buffer/Irvine
Medium oranı	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1
Dondurma işleminin süresi	10 dk.	10 dk.	10 dk.	10dk.	10 dk.
Dondurma derecesi($^{\circ}$C)	-191.8 $^{\circ}$ C	-196 $^{\circ}$ C	-196 $^{\circ}$ C	-185 $^{\circ}$ C	-196 $^{\circ}$ C
Dondurma-çözdürme sonrası elde edilen sperm (%)	% 40 vitalite	%50 vitalite	%45 vitalite	%50 vitalite	%40 Vitalite

3 SONUÇLAR

Seçtiğimiz kliniklerde çoğunlukla (%60) kullanılan dondurma yöntemi hızlı dondurmadır. Tüm kliniklerde yılda yaklaşık olarak % 4,7 - 5 oranında dondurulmuş sperm kullanıldığı ve bunların çoğunda (%60) kullanılan sperm freezing medium ise Test Yolk buffer/ Irvine olarak belirlendi. Dondurma-çözdürme sonrası elde edilen sperm %40-50 oranında belirtildi. Tüm kliniklerdeki ortalama gebelik oranları ve dondurulmuş sperm ile elde edilen ortalama gebelik oranları sırasıyla % 43 - % 45 ve % 26 - % 40 olarak belirtilmiştir (Tablo 2). Klinikler arasında ortalama gebelik oranları açısından istatistiksel olarak fark olmadığı tespit edildi ($p>0.05$). Dondurulmuş sperm kullanılarak elde edilen gebelik oranları açısından B (LN2 Buhar Yöntemi), C (Hızlı Dondurma), D (Hızlı Dondurma) kliniklerinde, normal sperm kullanılan yöntem ile yapılan gebelikten istatistiksel anlamlı olarak farklı olmadığı tespit edildi ($p:0.41$, $p:0.53$, $p:0.8$). A (Hızlı Dondurma) ve E (Yavaş Dondurma) kliniklerinde ise dondurulmuş sperm kullanılarak elde edilen gebelik oranı, normal sperm kullanılarak yapılan gebelikten istatistiksel anlamlı olarak azdır ($p: 0.01$ ve $p:0.04$) (Tablo3.).

Tablo 2: Kliniklerdeki Gebelik Oranları

Klinikler	A	B	C	D	E
Gebelik Oranı*	% 45	% 43	%43	%45	%43
Dondurulmuş Sperm ile Gebelik Oranı	% 26	% 38	% 40	% 40	% 26
Yıllık Siklus Sayısı	960	950	900	920	900
Yıllık dondurulmuş spermle yapılan gebelik sayısı	47	47	45	45	42
Dondurulmuş spermle yapılan gebelik yüzdesi*	% 4.9	% 5	% 5	% 4.9	%4.7

* Total siklus sayısına göre hesaplanmış oranlardır.

Tablo 3. Kliniklerdeki dondurulmuş sperm ile normal spermde elde edilen gebelik oranlarının istatistiksel karşılaştırılması

A KLİNİĞİ

		ICSI gebelik		
		Pozitif	Negatif	Toplam
Kryo gebelik	Pozitif	12 (%1.3)	35 (%3.6)	47 (%4.9)
	Negatif	418 (%43.5)	495 (%51.6)	913 (%95.1)
	Toplam	430 (%44.8)	530 (%55.2)	960 (%100)

p=0.01

B KLİNİĞİ

		ICSI gebelik		
		Pozitif	Negatif	Total
Kryo gebelik	Pozitif	18 (%2)	29 (%3)	47 (%5)
	Negatif	407 (%40.5)	486 (%54.5)	893 (%95)
	Total	425 (%42.5)	515 (%57.5)	940 (%100)

p = 0.41

C KLİNİĞİ

		ICSI gebelik		
		Pozitif	Negatif	Total
Kryo gebelik	Pozitif	18 (%2)	27 (%3)	45 (%5)
	Negatif	393 (%41)	462 (%54)	855 (%95)
	Total	411 (%43)	489 (%57)	900 (%100)

p = 0.53

D KLİNİĞİ

		ICSI gebelik		
		Pozitif	Negatif	Total
Kryo gebelik	Pozitif	18 (%2)	27 (%2.9)	45 (%4.9)
	Negatif	376 (%43)	499 (%52.1)	875(%95.1)
	Total	394 (%45)	526 (%55)	920 (%100)

p = 0.8

E KLİNİĞİ

		ICSI gebelik		
		Pozitif	Negatif	Total
Kryo gebelik	Pozitif	11 (%1.2)	31 (%3.4)	42 (%4.7)
	Negatif	376 (%41.8)	482 (%53.6)	858(%95.3)
	Total	387 (%43)	513 (%57)	900 (%100)

p = 0.04

4 TARTIŞMA

Kriyoprezervasyon (dondurarak saklama yöntemi) dokuların ve hücrelerin gelecekte kullanılması amacıyla sıfır derecenin altında soğutulmuş bütün biyolojik aktivitelerinin durdurulması işlemidir. Düşük ısıda doku veya canlı hücrenin en az hasarla fonksiyon kaybı olmadan uzun süreli saklanması amacıyla kriyoprezervasyon yapılır (44).

Sperm dondurma ile ilgili ilk bilgiler 1176 yılında Spallanzani tarafından ortaya atılmış, ilk canlı sperm dondurma bankası 1972 yılında kurulmuştur. 1973 yılında 1 yıldan uzun bir süre dondurulmuş bekletilen spermden ilk canlı doğum, 1998 yılında ise 20 yıldan uzun süre dondurulmuş saklanan sperm hücresinden canlı doğum gerçekleşmiştir (45,46,47).

Sperm hücreleri belli oranda ısıtma ve soğutma hızlarına dayanabilmektedir. Dondurma işlemi esnasında soğutma hızı çok hızlı olursa hücre içindeki su dışarı çıkamaz ve hücre içi buzlanma meydana gelir. Soğutma hızı çok yavaş olursa hücre dışı buzlanma gerçekleşir, hücrenin dehidrate olması ve ortamın osmolaritesindeki artış hücre hasarına veya hücre ölümüne yol açabilmektedir. Dolayısıyla sperm dondurmada optimal soğutma hızı kullanılmalıdır (48,49). Yavaş soğutmada çok miktarda buz kristalleri oluşmakta ve oluşan bu buz kristallerinin büyüklükleri farklı olmaktadır. Hızlı soğutma yönteminde ise (nitrojen buharı ile uygulanan Quick Manuel protokolü) buz kristalleri daha küçük ve çok hızlı oluştukları için küçük hücreler bu buz kristalleri arasında sıkışarak daha fazla hayatta kalma oranı göstermektedirler.

Literatürde dondurulan materyale göre ideal hız değışiklik göstermektedir. Örneğin semen ve aspirasyonları yada parçalanmış sperm dokuları dondurulurken hızlı dondurma tercih edilmektedir. Tek sperm dondurulması yada doku dondurulmasında yavaş dondurma tercih edilmektedir (50,51,52,53). Yaptığımız çalışmada seçtiğimiz kliniklerde çoğunlukla (%60) kullanılan dondurma yöntemi hızlı dondurma yöntemidir. Tüm kliniklerde yılda yaklaşık olarak %4.7-5 oranında dondurulmuş sperm kullanıldığı ve bunların çoğunda (%60) kullanılan sperm freezing medium ise Test Yolk buffer/ Irvine olduğu görüldü. Literatürde ise konu ile ilgili yapılan çalışmalarda ortalama ICSI için %5 oranında dondurulmuş sperm kullanıldığı bildirilmiştir buda araştırma yaptığımız kliniklerle paralellik göstermektedir (54).

Sperm dondurmanın sperm motilitesi ve canlılığı üzerine olumsuz etkisi olabilir. Donnelly ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kriyoprezervasyonun sperm motilitesinde ortalama %45 azalmaya neden olduğunu bildirmiştir (54). Bunu önlemek için bazı araştırmacılar kültür ortamına koruyucu olarak askorbik asit, katalaz, E vitamini gibi antioksidanların eklenmesini önermektedirler (55). Yaptığımız çalışmada seçtiğimiz kliniklerde sperm motilitesini arttırmaya yönelik koruyucu madde kullanımına dair yeterli veriye ulaşamadı. Kuczynski ve arkadaşları yaptıkları çalışmada sperm kalitesi düşük erkeklerde sperm dondurmanın ICSI sonrası fertilizasyon ve gebelik oranı üzerine olumsuz etkisi olmadığını ifade etmişlerdir. Ayrıca taze ejakülat ve dondurulmuş sperm ile ICSI sonrası gebelik oranlarında (sırasıyla% 23.7 ve% 35.2) fark olmadığı belirtilmiştir (56). Gebelik oranı dondurulmuş sperm ile yapılan intrauterin inseminasyonda taze spermle

yapılan intrauterin inseminasyona kıyasla daha azdır (57). Richter ve arkadaşları yaptıkları çalışmada taze spermin dondurulmuş sperme nazaran 3 kat daha fazla gebeliği indüklediğini belirtmişlerdir (58). Ayrıca, TESE ile alınan örneğin dondurulması ve çözülmesi ile yapılan ICSI başarısının, taze spermde daha az olmasının sebebinin spermin dondurma işlemi ile ilgili olmadığı, spermin immatüritesi ile ilgili olduğu söylenmektedir. Günümüzde obstrüktif azoospermik hastalardan elde edilen epididimal veya testis spermlerinin dondurulması sonucunda taze örneğin kullanımına benzer fertilizasyon, klinik gebelik ve implantasyon oranları bildirilirken , nonobstrüktif vakalardan elde edilen testis spermlerinin dondurulması sonucu taze sperm kullanımına göre daha düşük gebelik ve implantasyon oranlarının elde edildiği gösterilmiştir (59,60,61). Bu çalışmada taze spermin dondurulmuş sperme nazaran daha başarılı olduğu A ve E kliniklerinde gösterilmiştir. Diğer kliniklerde istatistiksel olarak fark saptanmamıştır. Başka bir çalışmada ise taze ve dondurulmuş spermlerle yapılan intrauterin inseminasyonlar arasında başarı araştırıldığında, tek etkili faktörün kadının yaşı olduğu bulunmuştur (58). Bu çalışmada, kadın yaşı datasına ulaşamamasıda önemli eksikliklerdendir.

Yaptığımız çalışmada seçtiğimiz kliniklerde ICSI ile gebelik oranı A kliniğinde %45, B kliniğinde %43 , C kliniğinde %43 , D kliniğinde %45 ve E kliniğinde %43 bulundu. B, C, D kliniklerinde dondurulmuş sperm kullanılarak elde edilen gebelik oranı, normal sperm kullanılan yöntem ile yapılan gebelikten istatistiksel anlamlı olarak farklı olmadığı tespit edildi (p:0.41, p:0.53, p:0.8). A ve E kliniklerinde aynı yöntemle dondurulmuş sperm kullanılarak elde edilen gebelik oranı, normal sperm kullanılarak yapılan gebelikten istatistiksel anlamlı olarak az olduğu bulundu (p:0.01

ve p:0.04). Literatürde ise konu ile ilgili yapılan çalışmalarda ortalama ICSI başarısı %65-80 arasındadır. ICSI için %5 oranında dondurulmuş sperm kullanılmaktadır. Literatürde taze spermin canlılık oranı %95.8, hızlı dondurma yöntemiyle dondurulmuş spermin canlılık oranı % 40 olarak bulunmuştur (62,63,64,65). Bu oranlar araştırma yaptığımız kliniklerle uyumludur.

Araştırma yaptığımız kliniklerdeki ICSI başarısı literatürdeki diğer çalışmalara göre daha düşüktür. Dondurma işleminde kullanılan spermin kalitesi çok önemlidir. Uygun saklama koşulları ve doğru dondurma protokolleriyle spermin canlılığını koruması ve sağlıklı bir şekilde fertilizasyonun gerçekleşmesi sağlanmaktadır. A ve E kliniklerinde dondurulmuş sperm ile yapılan ICSI başarısının düşük olmasının en büyük nedeni sperm kalitesi olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızdaki veri eksiklikleri kliniklerin hasta datalarının ayrıntılarını paylaşmamaları literatüre göre daha düşük başarı oranlarının nedenlerini sağlıklı olarak değerlendirme yapmamıza engel olmaktadır. Bu çalışmanın en büyük eksikliğide bu verilere ulaşılamaması olmuştur.

Sperm dondurulması yardımcı üreme yöntemlerinde devrim yapmıştır. Dondurma yöntemlerindeki düzelmeler sperm çözüldükten sonra spermin sağ kalımını arttırmıştır. Araştırma yapılan kliniklerde (B, C, D) intrauterin inseminasyonda gebelik oranları taze spermle yapılan inseminasyonda daha yüksek olmasına rağmen, dondurulmuş sperm kullanarak yapılan ICSI de döllenme ve gebelik oranları taze spermle yapılanlarla paraleldir.

Sonuç olarak, çalışmamızda değişik dondurma yöntemlerinin ICSI başarısı üzerine farklı etkisi olduğu net olarak gösterilememiştir. Bunun nedeni, bu çalışmada klinikler arasında sperm kalitesi hakkındaki bilginin eksik olması olabilir.

5 KAYNAKLAR

1. Lowelock J, Bishop M. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulfoxide. *Nature* 183:1384-95,1959
2. Spallanzani L. *Opuscoli di Fisica Anamale e vegetabile Opuscola II Modena 1776*
3. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*. 164 : 666-76, 1949
4. Polge C, Rowson LEA. Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing. *Nature* 165:158-62,1950
5. Sherman JK Research on frozen human semen: past, present and future. *Fertil Steril* 15:485-99,1950
6. Bunge RG, Sherman JK Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature* 172:767-8, 1953
7. Parkes A, Smith A Regeneration of rat ovarian tissue grafted after exposure to low temperatures. *Proc. Roy. Soc.* 140: 455-67,1953
8. Obrant KO, Persson PS. Cytological study of the testis by aspiration biopsy in the evaluation of fertility. *Urol. Int.* 20: 176-89,196
9. Picton H, Kim S, Gosden R. Cryopreservation of gonadal tissue and cells *Brit. Med. Bull.* 56:603-15,2000
10. Shoysman R, Vanderzvalmen P, Nijs M et al. Successful fertilization by testicular spermatozoa in an invitro fertilization program. *Hum Rep* 8: 1339-40,1993

- 11.Silber SJ, Nagy ZP, Liu J Conventional in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. Hum Rep. 9,1705-09, 1994
- 12.McCoshen JA, Fernandes PA: Male infertility: the use and efficacy of frozen sperm. Curr. Op. Obstet Gyn 1990; 2: 850-856.
- 13.Rengi G, Somigliana E, Retselli L, Salvi R, Arnoldi M, Paffoni A. Sperm banking and rate of assisted reproduction treatment: insights from a 15 year cryopreservation
- 14.Morris GJ. Cryopreservation: an introduction to cryopreservation in culture collections, Institute of Terrestrial Ecology, Cambridge (England) 1981.
- 15.Sherman JK Research on frozen human semen: past, present and future. Fertil Steril 15:485-99,1950
- 16.Bunge RG, Sherman JK Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. Nature 172:767-8, 1953
- 17.Delilbaşı L,editor. İnvitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri .Ankara.Öncü Basımevi,1997
- 18.Delilbaşı L,editor. İnvitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri .Ankara.Öncü Basımevi,1997
- 19.Delilbaşı L,editor. İnvitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri .Ankara.Öncü Basımevi,1997
- 20.Spallanzani L. Opuscoli di Fisica Anamale e vegitabile Opuscola II Modena 1776

21. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*. 164 : 666-76, 1949
- 22 Stewart DL. Storage of bull spermatazoa at low temperatures.(1951). *Vet Rec*, 63:65-6
23. Cohen J, Garrisi GJ , Congedo-Ferrera TA, et al.(1997). Cryopreservation of a single human spermatazoa . *Hum Reprod* , 12:994-1001.
24. Curry MR. (2000). Criopreservation of semen from domestic livestock. *Rev Preprod*, 5(1):46-52.
25. Heuchel V, Schwartz D, Czyglik F. (1983). Between and within subject correlations and variances for certain semen characteristics in fertile men. *Andrologia*, 15(2): 171-6
26. Mahadevan MM, Trounson AO, Leton JF.(1983) . Successful use of human semen cryobanking for in vitro fertilization . *Fertil Steril* , 40(3) : 340-3
27. Askari HA, Check JH, Peymer N, Bollendorf A. Effect of natural antioxidants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze thaw process. *Arch Androl* 1994; 33:11-15.
28. Mahadevan MM, Tounson AO, Milne BJ, Leeton JF. Influence of semen and donor factors on the success rate of artificial insemination with frozen semen. *Clin Reprod Fertil* 1982; 1: 185-193.

29. Johnston RC, Kovacs GT, Lording DH, Baker HWG. Correlation of semen variables and pregnancy rates for donor insemination: A 15-year retrospective. *Fertil Steril* 1994; 61: 355-359.
30. Kupker W, Al-Hasani S, Johannisson R, Sandmann J, Ludwig M, Jocham D, Diedrich K. The use of cryopreserved mature and immature testicular spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection: risks and limitations. *Semin Reprod Med.* 2002 Feb; 20(1): 25-35
31. Ferrara I, Balet R, Grudzinskas JG. Intrauterin insemination with frozen donor sperm. Pregnancy outcome in relation to age and ovarian stimulation regime. *Hum Reprod* 2002; 17(9): 2320-2324.
32. Cochrane data, 2004-2005 ogram for male cancer patients. *Cancer* 2003; 97(7): 1624-1633.
33. Delilbaşı L, editor. İnvitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri .Ankara. Öncü Basımevi, 1997.
34. Delilbaşı L, editor. İnvitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri .Ankara. Öncü Basımevi, 1997
35. Tolga A, Deneysel IVF Kriyobiyoloji Uyg.
36. S. J. Behrman and Y. Sawada , 'Heterologous and homologous inseminations with human semen frozen and stored in a liquid- nitrogen refrigerator ,' *Fertility and Sterility*, vol. 17, no. 4, pp. 457-466, 1966.

37. [9] T. M. Said, A. Gaglani, and A. Agarwal, "Implication of apoptosis in sperm cryoinjury," *Reproductive BioMedicine Online*, vol. 21, no. 4, pp. 456–462, 2010.
38. J. V. Thachil and M. A. S. Jewett, "Preservation techniques for human semen," *Fertility and Sterility*, vol. 35, no. 5, pp. 546–548, 1981.
39. W. V. Holt, "Basic aspects of frozen storage of semen," *Animal Reproduction Science*, vol. 62, no. 1–3, pp. 3–22, 2000. 36. P. Mazur, W. F. Rall, and N. Rigopoulos, "Relative contribution of the fraction of unfrozen water and of salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes," *Biophysical Journal*, vol. 36, no. 3, pp. 653–675, 1981.
40. J. Sherman, "Cryopreservation of human semen," in *Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility*, B. Keel and B. W. Webster, Eds., CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 1990.
41. Trounson AO, Peura A, Kirby C. Ultrarapid freezing: a new low cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertil Steril* 1987; 48: 843-849.
42. Renard P, Grizard G Improvement of motility and fertilization potential of post thaw human sperm using glutamine. *Cryobiology* 33: 311- 19,1996
43. Phelps MJ, Lui J, Benson JD et. al. Effects of percoll separation, cryoprotective agents and temperature on plasma membrane characteristics of murine spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *Biol Rep.* 61:1031-41,1999
44. Wetzels AMM. Bras M. Lens JW. Piederiet MH. Rijnders PM. Zeilmaker GH. Laboratory aspects of in vitro fertilization. *Cryopreservation/ Theory* 1996; 229-244.

45. Walters EM, Benson JD, Woods EJ, Critser JK. Sperm Banking: Theory and Practice. The history of sperm cryopreservation. Cambridge University Press. Edited by Pacey AA. and Tomlinson M. 2009; 1-10
46. Verheyen G. Outcomes, safety and effectiveness for cryopreservation of ejaculated, testicular and epididymal sperm. ALPHA Conference Budapest 30th April – 2nd May 2010.
47. Editör: Ateş Kadioğlu. Who Laboratuvar El Kitabı. 5. Basım, İstanbul, Nobel Yayıncılık, 2011; 169-176.
48. Lovelock JE. Denaturation of lipid protein complexes as a cause of damage by freezing. Proceedings of the Royal Society of the London, series B 1957; 147:427-433.
49. Tunç L, Bozkırlı İ. Sperm Dondurma: Yardımcı Üreme Tekniklerindeki Uygulamalar, www.androloji.org.tr/images/file/27.SayÄ±%20Pdf/infertilite4.pdf, 06.06 2013
50. Prins, G. S., Dolgina, R., Studney, P., Kaplan, B., Ross, L. And Niederberger, C.: Quality of cryopreserved testicular sperm in patients with obstructive and nonobstructive azoospermia. J Urol, 161: 1504, 1999
51. Palermo, G. D., Schlegel, P. N., Hariprashad, J. J., Ergun, B., Mielnik, A., Zaninovic, N. et al: Fertilization and pregnancy outcome with intracytoplasmic sperm injection for azoospermic men. Hum Reprod, 14: 741, 1999
52. Friedler, S., Raziell, A., Soffer, Y., Strassburger, D., Komarovskiy, D. and Ron-el, R.: Intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved testicular spermatozoa in patients with nonobstructive azoospermia—a comparative study. Fertil Steril, 68: 892, 1997

53. Oates, R. D., Lobel, S. M., Harris, D. H., Pang, S., Burgess, C. M. and Carson, R. S.: Efficacy of intracytoplasmic sperm injection using intentionally cryopreserved epididymal spermatozoa. *Hum Reprod*, 11: 133, 1996
54. Donnelly, E. T., Steele, E. K., McClure, N. and Lewis, S. E.: Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Hum Reprod*, 16: 1191, 2001
55. Askari HA, Check JH, Peymer N, Bollendorf A. Effect of natural antioxidants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze thaw process. *Arch Androl* 1994; 33:11-15.
56. Kuczynski, W., Dhont, M., Grygoruk, C., Grochowski, D., Wolczynski, S. and Szamatowicz, M.: The outcome of intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved ejaculated spermatozoa—a prospective randomized study. *Hum Reprod*, 16:2109, 2001
57. Sherman, J. K.: Synopsis of the use of frozen human semen since 1964: state of the art of human semen banking. *Fertil Steril*, 24: 397, 1973
58. Richter, M. A., Haning, R. V., Jr. and Shapiro, S. S.: Artificial donor insemination: fresh versus frozen semen; the patient as her own control. *Fertil Steril*, 41: 277, 1984
59. Prins, G. S., Dolgina, R., Studney, P., Kaplan, B., Ross, L. And Niederberger, C.: Quality of cryopreserved testicular sperm in patients with obstructive and nonobstructive azoospermia. *J Urol*, 161: 1504, 1999

60. Palermo, G. D., Schlegel, P. N., Hariprashad, J. J., Ergun, B., Mielnik, A., Zanicovic, N. et al: Fertilization and pregnancy outcome with intracytoplasmic sperm injection for azoospermic men. *Hum Reprod*, 14: 741, 1999
61. Friedler, S., Raziel, A., Soffer, Y., Strassburger, D., Komarovsky, D. and Ron-el, R.: Intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved testicular spermatozoa in patients with nonobstructive azoospermia—a comparative study. *Fertil Steril*, 68: 892, 1997
62. Oates, R. D., Lobel, S. M., Harris, D. H., Pang, S., Burgess, C. M. and Carson, R. S.: Efficacy of intracytoplasmic sperm injection using intentionally cryopreserved epididymal spermatozoa. *Hum Reprod*, 11: 133, 1996
63. Devroey, P., Silber, S., Nagy, Z., Liu, J., Tournaye, H., Joris, H. et al: Ongoing pregnancies and birth after intracytoplasmic sperm injection with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Hum Reprod*, 10: 903, 1995
64. Twigg, J. P., Irvine, D. S. and Aitken, R. J.: Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 13: 1864, 1998
65. Linfor, J. J. and Meyers, S. A.: Detection of DNA damage in response to cooling injury in equine spermatozoa using singlecell gel electrophoresis. *J Androl*, 23: 107, 2002

