

## Sperm kriyoprezervasyon teknikleri ve fertilizasyon başarısındaki rolü

Uzm. Dr. Gülden Tunalı

Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları E.A.H., ÜYTEM Laboratuvar Sorumlusu

**Kriyoprezervasyon (dondurarak saklama);** hücrelerin ve dokuların sıfır derecenin altındaki ısıya kadar soğutulmuş, bütün biyolojik aktivitelerinin durdurulması ve gelecekte kullanılması amacıyla saklanmasını ifade eder (ASRM 2012). Kriyoprezervasyon işlemindeki amaç çok düşük ısıda canlı bir hücre veya dokunun, minimum hasarla ve fonksiyon kaybı olmaksızın uzun süreli saklanmasıdır (1). Üreme hücreleri ve dokularının da başarılı bir şekilde dondurulup saklanabilmesi ve istendiğinde çözülebilmesi Yardımla Üreme Teknolojilerinin (YÜT) gelişimi açısından büyük önem taşımaktadır (2).

Spermin dondurularak saklanması, azospermik erkeklerden 1990'lı yıllarda cerrahi yöntemlerle testiküler sperm alınarak kullanılmaya başlanmasıyla zorunlu hale gelmiştir. Batı ülkelerinde uygulanan donör programları ve ticari sperm bankalarının kurulması kriyoprezervasyonu çok kullanılabilir bir yöntem haline getirmiş ve semen kriyoprezervasyonu tekniklerinin hızla gelişmesini sağlamıştır. Kriyoprezervasyon hem üremeye yardımcı tedavilerdeki başarıyı arttırmış, hem de testis cerrahisi, kemoterapi ve radyoterapi'den önce, gelecekteki fertilitenin korunmasına katkıda bulunmuştur. Sperm hücreleri çözüldüğünde mümkün olan en az hasarla geri dönmeli ve canlı türlerinin devamlılığını sağlayabilecek kapasitede olması gerekmektedir (3). Gamet ve embriyo kriyoprezervasyonunun genel prensibi; materyalin kriyoprotektanlarla dengelendikten sonra soğutulması, sıvı nitrojen içinde  $-196^{\circ}\text{C}$ 'de depolanması ve çözülürken de kriyoprotektanların uzaklaştırılarak gamet ve embriyoların canlılıklarını koruyabilecekleri fizyolojik ortamlara geçirilmesidir (4).

### Kriyoprezervasyonun tarihçesi

Sperm dondurma ile ilgili ilk fikirler 1776 da Spallanzani'nin soğukun semen üzerindeki etkilerini inceleyen araştırmasında dondurulan spermilerin çözüldüklerinde motilitelerini bir miktar koruyabildiklerini gözlem-



lemesinden sonra gelişmeye başlamıştır. 1886'da askeri doktor olan Montegazza ilk kez insan spermini dondurarak saklama fikrini ortaya atmıştır. 1940'larda gliserolün spermeleri dondurmanın zararlı etkilerinden koruyabildiğinin tesadüfen keşfi,  $-79^{\circ}\text{C}$ 'de kuru buz üzerinde saklanmış insan spermelerinin kullanılmasının yolunu açmış ve ilk kez insan spermi dondurma işlemi 1949'da Polge ve arkadaşları tarafından gliserol kullanılarak başarılmıştır. 1953'de ise Bunge ve Sherman tarafından dondurulmuş çözülmüş donör sperminden elde edilen ilk fertilizasyon ve embriyo gelişimi yayınlanmıştır.

1960-70'li yıllar kriyoprotektanların özellikleri ve dondurulacak materyale olan olası etkilerinin incelendiği, daha sonra da kriyobiyolojinin prensiplerinin oluşturulduğu dönem olmuştur. 1964 yılında insan sperm örneğinin gliserol ile dondurulup sıvı nitrojen ile saklanması sonrası ilk canlı doğum gerçekleşmiştir. İlk canlı hücre dondurma bankası 1972 yılında kurulmuştur. Bir yıldan fazla süre ile dondurulup bekletilmiş ve çözülmüş sperm ile doğan ilk sağlıklı bebek 1973 yılında dünyaya gelmiş, 1998 yılında da 20 yıldan fazla süredir saklanan sperm ile canlı bebek doğmuştur (1, 2, 5, 6, 7 ve 8).

Sperm kriyoprezervasyonunun kilometre taşları:  
 1953: Dondurulmuş ejaküle sperm'den ilk doğum (Bunge ve Sherman),  
 1995: Dondurulmuş epididimal sperm'den ilk doğum (Devme ve ark.),  
 1996: Dondurulmuş testiküler sperm'den ilk doğum (Gil-Salmon ve ark.) (9).

### Kriyobioloji

Kriyobiyolojide hücrelerin dondurma ve soğutma prosedürleri organizmadan organizmaya hatta hücreden hücreye değişmektedir. Kriyobiyolojide amaç; hücre dondurulurken izotonik bir ortam olması, ısının azalmasına bağlı olarak su moleküllerinin sayısının azalması, ortamın osmolaritesinin artması ve oluşan hipertonik ortamda hücrenin su kaybetmesi sonucu hücrede dehidrasyon olmasıdır. Dehidrasyon hızı hücrenin canlılığının devamı için önemlidir. Dehidrasyon hızını belirleyen parametreler: Suya karşı plazma membran geçirgenliğinin yeterliliği, kriyoprotektanın tipi ve kriyoprotektanların aktivasyon enerjileridir (1).

Dondurma ve çözündürme sonrası hücre sağkalımı, hücre içinde buz kristalleri oluşumu oranıyla ilişkilidir. Buz oluşumuna neden olan hücre içi su miktarını en alt düzeye indiren soğutma ve ısıtma oranlarının uygulanması ve uygun koruyucu maddeler kullanılmasıyla buz kristallerinin oluşması engellenmektedir (7). İnsan spermeleri belli soğutma ve ısıtma hızlarını tolere etmektedir. Soğutma hızı dondurma işlemi sırasında çok hızlı olursa hücre içindeki su dışarı çıkamaz ve intrasellüler buzlanma olur ve hücre ölebilir. Tersine çok yavaş olursa, zararsız hücre dışı buzlanma gerçekleşirken ortamın osmolaritesindeki artış ve hücrenin dehidrate olması hücre hasarına veya ölümüne yol açabilir. Buz oluşmaması nedeniyle düşük soğutma hızı tercih edilmektedir, ancak bu yöntemin en büyük olumsuzluğu uzun süre yüksek osmolarite ile karşı karşıya kalan hücrede membran lipoproteinlerinde denatürasyona yol açarak sitoliz yapmasıdır (10). Merryman 1977 yılında, her hücrenin maksimum sıvı kaybetme kapasitesi olduğunu ve bu eşik değer aşıldığında hücrenin canlılığını kaybedebileceğini "Minimum hücre teorisi" ile açıklamıştır (11).

Hızlı soğutmada enerji kaybı çok olur. Azalan enerji ile azalan hücre suyunun yeterince atılmaması sonucu hücre içinde çok fazla su kalır, bu da hücre içi buzlanmaya ve sonuçta hücre ölümüne neden olur. Dolayısıyla optimal bir soğutma hızı kullanılmalıdır (12).

Sperm hücre zarındaki iki sıralı doymamış yağ asitlerinin sağladığı yüksek membran akışkanlığı nedeniyle başlangıçtaki hızlı soğutmanın (soğuk şoku) neden olduğu hasara çok duyarlı değildir. Düşük su içerikleri de (%50) kriyoprezervasyon hasarına karşı daha dirençli olmasını sağlar. Diğer yandan ise kriyoprezervasyon insan spermının motilitesi üzerine olumsuz etkiye sahiptir. Hareketli spermilerin ancak yarısı dondurma çözündürme sonrası hareketliliğini koruyabilmektedir. Kriyoprezervasyon sürecini optimal düzeye getirmek bu hasarı azaltacak ve gebelik oranlarını yükseltebilecektir (7).

Spermin saklanma koşulları optimal ise saklanma süresinin sperm kalitesine olumsuz etkisi olmamaktadır. Yirmi sekiz yılı aşkın süre saklanan spermle elde edilen gebelikler mevcuttur (7).

Kriyoprezervasyon prosedüründe beş önemli aşama vardır:

1. Su kristalizasyonundan kaynaklanabilecek hücresel hasarı azaltan kriyoprotektanlarla ilk etkileşim,
2. Sıfır derecenin altındaki sıcaklıklara kadar dondurma,
3. Saklama,
4. Çözme,
5. Dilüsyon ve kriyoprotektanların ortamdaki uzaklaştırılması, fizyolojik mikroçevreye geri dönüş ve ileri gelişim.

Bütün bu işlemler yapılırken hücre hasarı minimal olmalı, hücrenin yapısal bütünlüğü ve fonksiyonel özellikleri korunmalıdır. Hücre canlılığı için en kritik aşamalar; başlangıç fazından düşük sıcaklıklara iniş dönemi ve fizyolojik ortama geri dönüştür. Saklama koşulları için ideal olan -196°C'deki sıvı nitrojenidir. Bu sıcaklıklara ulaşıldıktan sonra geçen sürenin canlılık üzerine etkisi yoktur (2,4).

Dondurma işleminde, damla damla kriyoprotektan eklenmiş sperm - 5°C ile - 15°C arasında soğutulduklarında, aşağıdaki sırayı izleyen bir dizi olay gerçekleşir:

1. Önce hücrenin içinde bulunduğu ortamdaki su donar.
2. Hücre dışında buz kristalleri oluşarak sitoplazmayı soğutur.
3. Bu sırada, eklenen kriyoprotektan madde sebebiyle hücre dışında osmolarite daha yüksektir, bu nedenle hücre dışı ortama su geçişi başlar, (hızlı su kaybı-dehidratasyon) ve hücre önce büzülür (bu sırada sitoplazmanın kimyasal potansiyeli hücre dışından fazladır).

4. Hücre dışına çıkan su donar (dehidratasyona bağlı olarak hücre içi ile dışı arasındaki kimyasal potansiyel farkı

giderek azalır).

5. Böylece, hücre harabiyetinin esas sebebi olabilecek, hücre içinde buz kristalleri oluşmadan önce suyun büyük bölümü dışarı çıkmış olur. Böylece, hücre harabiyetine neden olabilecek hücre içi kristal oluşumu en aza indirilmiş olur (2, 13, 14).

### **Dondurma hasarları**

Dondurulma esnasında hücrelerin maruz kaldığı iki temel ve fiziksel stres kategorisi mevcuttur:

1. Düşük sıcaklığın doğrudan etkileri
2. Buz oluşumuna bağlı fiziksel değişiklikler.

Sıcaklıkta ani düşüşten kaynaklanan hücre yapısı ve fonksiyonu hasarı, membran geçirgenliğindeki ve hücre iskeleti yapısındaki değişimlerle ilgilidir (13).

Dondurma hasarı nedeniyle çözme sonrası sperm motilitesi, sperm oosit füzyon kapasitesi azalabilir veya plazma membran lipid peroksidasyonuna bağlı olarak fertilizasyon olumsuz etkilenebilir. Serbest oksijen radikallerinin (hidrojen peroksit gibi) üretiminin artmasıdır. Sperm dondurma işleminin sperm motilitesi ve canlılığı üzerine olumsuz etkilerini önlemek amacıyla bazı araştırmacılar kültür ortamına askorbik asit, E vitamini, katalaz gibi antioksidan maddelerin eklenmesini önermektedirler (1).

Dondurma hasarının sebepleri:

1. Hücre içi buz kristallerinin oluşumu
2. Yoğun dehidratasyon
3. pH değişiklikleri
4. Protein denatürasyonudur.

Ayrıca; ortam ısısı, hücre zarı geçirgenliği, konsantrasyon farkı, hücre yüzeyinin hücre hacmine oranı, kriyoprotektan niteliği, hücre zarının yapısı da kriyoprotektan maddelerin hücre içine geçişlerini düzenleyeceği için dondurma hasarında etkili faktörlerdir. Kriyoprotektif maddenin kendisinin yol açabileceği veya lizozomal enzimlerin serbestleşmesi ve aktiflenmesi ile meydana gelebilecek toksik hasarları da saymak gerekir. Elektron mikroskopik incelemelerde hücre zarının ilk etkilenen bölge olduğu verifiye edilmiştir. Bu yöntemle gözlenebilen hücre zarındaki yapısal değişiklikler; protrüzyonlardan, dalgalanmalardan ve vezikülasyonlardan, stoplazma içeriğinin dışarı çıktığı membran kayıpları, yırtılmaları ve erimeleri gibi membran bütünlüğünün bozulduğu ağır harabiyete kadar gidebilir. Spermatozoada fertilizasyon kapasitesini azaltan boyun

kırıkları görülebilir. Biyokimyasal yöntemlerle spermatozoada bulunan intraakrozomal penetrasyon enzimlerinin (hyaluronidaz, akrozin gibi) kaybı gösterilebilir (16).

Dondurma işlemi sırasında karşımıza çıkabilecek en temel hücre hasarı dondurma ve özellikle çözme aşamasında olur. Osmotik rüptür ile hücre zarı hasarlanır. Yavaş dondurma ve hızlı çözme bu nedenle önemlidir.

### **Kriyoprotektan maddeler**

İşlemler sırasında hücreyi dondurulma hasarından koruduğu düşünülmektedir, ancak kendileri hücreler için toksik maddelerdir. Yüksek oranda H<sub>2</sub>O bağlama kapasitesine sahiptirler. Kriyoprotektanların koruyucu etkilerini göstermek için her zaman hücre içine girmelerine gerek yoktur. Çünkü hücre zarı, harabiyetin en yoğun ve hızlı geçtiği yerdir.

Hücre içine girenler ve hücre dışında kalarak etkinliğini gösteren kriyoprotektan maddeler vardır; Gliserol, DMSO (Dimetil sülfoksit), ProH (Propilen glikol) hücre içine girebilen koruyucu maddelerdir. Bunlar intrasellüler buz kristalleri oluşumunu -40°C'a kadar düşürürler. Ayrıca hücreyi solüsyonun toksik etkilerinden korurlar. Hücre dışında kalanlar ise monosakkaritler (glukoz, hekzoz), disakkaritler (sükroz) ve trisakkaritler (raffinoz) dir. Bunlar hücre zarını osmotik basınç değişikliğine karşı korurlar ve hücrenin çözme işlemi sırasında aşırı şişmesini önlerler (17).

Sperm freezing solüsyonlarında intrasellüler ajan olarak % 5-15'lik gliserol tercih edilmesine karşın en verimli sonuçlar etilen glikol ile alınmaktadır. Ekstrasellüler ajan olarak sükroz tercih edilmektedir. Sükroz büyük bir moleküldür ve hücre zarından geçemez. Bu nedenle soğutma işlemi sırasında osmotik olarak dehidratasyonu başlattığı gibi, çözme işlemi sırasında da hücrenin lizisini önler, konsantrasyon farkı ile intrasellüler kriyoprotektanın hücre içinden uzaklaşmasını sağlar. Dondurulan spermelerin çözüldüğünde canlılık oranlarını artırmak amacıyla glisin, yumurta akı ve sitrat gibi ek kriyoprotektanlarında katılımıyla daha kompleks solüsyonlar elde edilmektedir. Bunlardan en çok kullanılanı gliserol egg yolk sitrattır (GEYC) (18,19).

Değişik maturasyon evresindeki spermatozoa farklı kriyobiyolojik özellikler gösterirler ve farklı dondurma-çözme teknikleri gerektirir. Sperm evresine spesifik kriyoprezervasyon yapılabilir. Spermatozoa testisten çıktıktan sonra plazma membran lipid ve proteinlerinde fiziksel ve kimyasal değişiklikler olur. Ejakülat spermının don-

durma ve çözme sensitivitesi epididimal ya da testiküler spermenden daha yüksektir (12).

Dondurulmuş spermelerin saklanabileceği süreler ile ilgili çeşitli görüşler vardır. Eksi 196 °C' de sıvı nitrojen içerisinde hücre harabiyetinin nedeni, DNA'nın geri dönen radyasyon nedeniyle kırılmasıdır. Bu radyasyonun miktarında 0,1 rad/yıl'dır ve tipik memeli hücresinin %63'ünün ölümü için gerekli süre 2000 yıldır. Doğal olarak gamet hücrelerinin saklanma süreleri ile ilgili olarak her ülkenin etik komisyonu ve IVF merkezlerinin ortak kuruluşlarının kararları geçerlidir.

### Kriyoprezervasyon yöntemleri

Dondurma işlemi sırasındaki dondurma hızı hücre özelliğine uygun olmalıdır. Yavaş soğutmada fazla miktarda buz kristalleri oluşur ve büyüklükleri farklıdır. Buna karşılık ani soğutmada (nitrojen buharı ile uygulanan Quick Manuel protokolü) buz kristalleri daha küçüktür ve çok hızlı oluştukları için küçük hücreler bunların arasına sıkışıp daha fazla sayıda hayatta kalma oranı gösterirler. Optimum hız, dondurulan materyale göre değişir. Örneğin parçalanmış sperm dokularının homojenizasyonu ya da semen ve aspirasyonlar dondurulurken hızlı dondurma tercih edilirken, doku dondurulması ve single sperm freezing sırasında yavaş dondurma tercih edilmektedir. Hızlı dondurma işlemlerinin yavaş dondurma protokollerinden en önemli farkı kullanılan kriyoprotektan maddelerin yüksek konsantrasyonda olmasıdır.

Spermiler genellikle ejakülasyondan 1-2 saat sonra semen likefiye olduktan veya yıkama işleminden sonra dondurulur. İşlem oda ısısında gerçekleştirilir. Likefiye olan semen kriyoprotektif ajanlarla 1/1 oranında ve çok yavaş karıştırılır. Karışım kriyovial ya da straw içine alınıp 30 da-

kika süreyle nitrojen buharında tutulur ve bu sırada ısının tedricen düşmesi sağlanır. Sürenin sonunda strawlar sıvı nitrojen tankına aktarılır. Daha fazla zaman almasına ve üstünlüğü kanıtlanmamasına rağmen, sperm kriyoprezervasyonu programlı dondurucularda da gerçekleştirilebilir. Testiküler doku kriyoprezervasyonu da aynı yöntemlerle yapılır (4, 7, 12, 17, 20). Ancak sperm sayısı çok az olan örneklerde spermier mikromanipulasyon yöntemiyle içi boşaltılmış zona pellusida içine yerleştirilerek %8 gliserol içinde strawlara yerleştirilerek standart protokolle dondurulabilir (Şekil 1).

### Kriyoprezervasyon endikasyonları

#### 1. Fertilitenin korunması

Fertilite yeteneğini engelleyen ya da bozabilen işlemlerden önce semen alınıp dondurularak saklanması ileride olabilecek bir infertilitenin garantisi olarak kullanılabilir.

Bu işlemler;

- Kemoterapi, radyoterapi gibi spermatogenezi kalıcı olarak bozabilen tedavilerin öncesinde (testis tümörleri, lösemi, lenfoma gibi). Testis neoplazileri ve lenfomalı hastaların %60'ında oligospermi görülebilmektedir. Bu durumdaki hastalara bir de kemoterapi veya radyoterapi yapıldığında, spermatogenezi bazen ancak 4-5 yılda normale dönebilecek veya kalıcı olacak şekilde bozabilmektedir. Böyle bir durumun bilinmesi, hastanın bilgilendirilmesi ve tedavi şeklinin belirlenmesi açısından önem taşımaktadır. Böyle bir hastadan tedavi öncesi semen örneği alınarak spermierin dondurulması gelecekteki fertilitenin korunması açısından önem taşımaktadır.
- Testis cerrahisi öncesinde; total ya da parsiyel orşiektomi, vazo-vazostomi, vazo-epididimostomi, varikoselektomi.



Şekil 1. Sperm hücrelerinin zona pellusida içerisinde dondurularak saklanması.



- Vazektomi öncesi; ileride evlilik durumunda değişiklik olduğunda ya da daha fazla çocuk istendiğinde kullanılmak üzere,
- Erkek partnerin ölümünden sonra gebeliğin kabul edilebilir olduğu ülkelerdeki tehlikeli mesleklerde (askerlik gibi) aktif görev alanlarda,
- Spinal kord hasarı, seksüel disfonksiyon, gibi ejakülasyon bozukluklarında elektroejekülatör ile sperm elde edilmişse,
- Spermatogenezi bozmakla suçlanan ilaçların (Nitrofurantoin, simetidin, sulfasalazin, alkol, nikotin, kafein gibi) zorunlu kullanımı sözkonusu ise kriyoprezervasyon bir seçenek olabilir. Ca++ kanal blokerlerinin sperm membran fonksiyonlarını bozdukları ve fertilizasyon kapasitesini azalttıkları öne sürülmektedir. Ayrıca sporcuların kullandıkları anabolizanların da spermatogenezi arreste götürebildikleri bildirilmektedir.

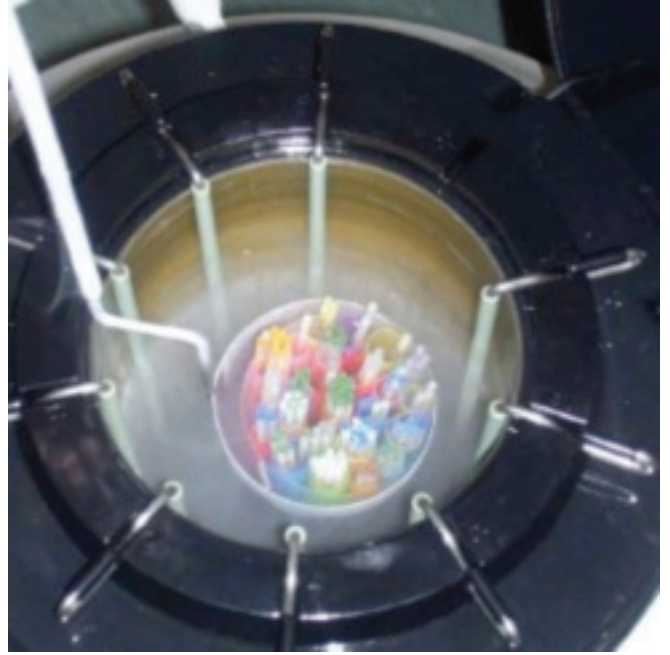
## 2. İnfertilite tedavisi

- Testiküler ya da epididimal yoldan sperm elde edilen özellikle nonobstrüktif azospermik olgularda
- Ağır oligozoospermi veya semende aralıklı olarak hareketli spermelerin varlığında ardışık örneklerin dondurulup saklanması ile ICSI'ye destek olarak. ICSI prosedürü için her oosite tek bir sperm yeterli olduğundan bir canlı spermin bile kriyoprezervasyonu önemlidir.
- Hipotalamo-hipofizer hipogonadizm için gonadotropin tedavisi veya kalıcı olmayabilen genital trakt obstrüksiyonu cerrahisi gibi infertilite tedavisi için,
- ART prosedürü sırasında sperm veremeyen hastalar,
- Spinal kord travması geçiren hastalarda, yardımcı ejakülasyon için veya retrograt ejakülasyonla idrardan veya cerrahi girişimle genital yoldan alınan sperm.

## 3. Donasyon spermeleri

Fertil olduğu bilinen sağlıklı erkek vericiden alınan sperm ileride kullanılmak üzere dondurularak saklanır. Ancak ülkemizde donasyon yasal değildir (2,4,7,12).

Erkek infertilitesinin tedavisinde özellikle cerrahi yöntemlere başvurulması alınan testiküler spermelerin korunmasında (TESE, TESA, MESA), testis cerrahisi yada kemoterapi-radyoterapi uygulamasından önce spermin kriyoprezervasyonu, legal olan ülkelerde donör programları sırasında bu yöntemlere başvurulması, yardımcı üreme tekniklerinde başarıyı kayda değer bir şekilde arttırmaktadır.



## Kriyoprezervasyonda hukuksal durum

Ülkemizde sperm kriyoprezervasyonu ile ilgili uygulamalar Sağlık Bakanlığı tarafından hazırlanıp 6 Mart 2010 tarihinde yürürlüğe giren "Üremeye Yardımcı Tedavi Uygulamaları Ve Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezleri Hakkında Yönetmelik"le yasal düzenleme altına alınmıştır. Bu yönetmeliğe göre aşağıda belirtilen tıbbi zorunluluk halleri dışında erkek üreme hücreleri ve gonad dokularının saklanması yasaktır

1. Cerrahi yöntemlerle sperm elde edilmesi halinde,
2. Kemoterapi ve radyoterapi gibi gonad hücrelerine zarar veren tedaviler öncesinde,
3. Üreme fonksiyonlarının kaybedilmesine yol açacak olan ameliyatlarda (testislerin alınması vb.) öncesinde,

Yine aynı yönetmeliğe göre "üreme hücreleri ve gonad dokuları, bu materyallerin güvenliği açısından verici adaya ait DNA analizi ile birlikte saklanır. Yukarıda belirtilen tıbbi zorunluluklar nedeniyle sperm veya testis dokusunun saklanması durumunda, dondurulma tarihinden itibaren 90 gün içinde DNA analizi aranmaz. Bu süreyi aşması halinde DNA analizinin bulunması gereklidir. Saklama süresinin bir yılı aşması halinde her yıl dokuların/hücrelerin saklanması için kişi mutlaka başvuruda bulunarak rızasının devam ettiğini ifade eden imzalı dilekçesini vermelidir. Dondurulan üreme hücreleri ve gonad dokuları, alınan kişinin yıllık protokol yenilememesi, isteği ve ölümü durumlarında müdürlükte kurulacak komisyon tarafından tutanak altına alınarak imha edilir".

## Kaynaklar

1. Wetzels AMM, Bras M, Lens JW, Piederiet MH, Rijnders PM, Zeilmaker GH. Laboratory aspects of in vitro fertilization. *Cryopreservation/ Theory* 1996; 229-244.
2. Delilbaşı L. A'dan Z'ye Tüp Bebek Laboratuvar. İstanbul, Veri Medikal Yayıncılık, 2008; 229-258.
3. Bunge RG, Sherman JK. Fertilization capacity of frozen human spermatozoa. *Nature (London)* 1953; 172:767-8
4. Cıncık M. Sperm kriyoprezervasyonu. *Gülhane Tıp Dergisi*. 2003; 45(1): 100-106.
5. 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
6. Verheyen G. Outcomes, safety and effectiveness for cryopreservation of ejaculated, testicular and epididymal sperm. ALPHA Conference Budapest 30th April – 2nd May 2010.
7. Editör: Ateş Kadioğlu. *Who Laboratuvar El Kitabı*. 5. Basım, İstanbul, Nobel Yayıncılık, 2011; 169-176.
8. 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.
9. Lewis S. E. M. Freeze Your Future: Cryopreservation of Semen and Surgically Retrieved Sperm, *Reproductive Medicine Queen's University Belfast* s.e.lewis@qub.ac.uk 05.06.2013, EAA ESHRE Brussels Nov 2007
10. 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.
11. Meryman HT, Williams RT, Douglas MSJ. Freezing injury from solution effects and its prevention by nature or artificial cryoprotection. *Cryobiology* 1977; 14: 287-302.
12. Tuğ L, Bozkırlı İ. Sperm Dondurma: Yardımcı Üreme Tekniklerindeki Uygulamalar, [www.androloji.org.tr/images/file/27.SayÄ±%20Pdf/infertilite4.pdf](http://www.androloji.org.tr/images/file/27.SayÄ±%20Pdf/infertilite4.pdf), 06.06 2013.
13. Elder K, Dale B. İn-Vitro Fertilizasyon. 3. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri Tic. Ltd. Şti., 2013; 191-215.
14. Gao D, Critser JK. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR*. 2000; 41:187-96.
15. Gilmore J, Liu J, Woods EJ, Peter AT, Critser JK: Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Hum Reprod*. 2000; 15: 335-43.
16. Morris GJ, Acton E, Avery S. A novel approach to sperm cryopreservation. *Hum Reprod* 1999; 14: 1013-21.
17. Delilbaşı L. A'dan Z'ye Tüp Bebek Laboratuvar. İstanbul, Veri Medikal Yayıncılık, 2008; 229-258.
18. Wowk B, Leitl E, Rasch CM, Mesbah-Karimi N, Harris SB, Fahy GM. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents *Cryobiology* 2000; 40: 288-36.
19. Avery SM, MacLaughlin EA, Dawson KJ. Safe cryopreservation of sperm and embryos. *Human Fertility* 1998; 1, 84-86.
20. Editör: Hikmet Hassa. *İnfertil olgulara Klinik Yaklaşım ve IVF Laboratuvar Uygulamaları*. Eskişehir, Osmangazi Üniversitesi Yayınları, 2003; 335-352.