

Sperm kriyoprezervasyonu: Kriyo-hasar ve DNA fragmantasyonu ilişkisi

Dr. Bilge Özsait^{1,2}, Ar. Gör. Tuba Özcan³, Uzm. Bio. Gözde Köksal⁴, Prof. Dr. Nihan Erginel Ünaltuna²

¹İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, ÜYTE Merkezi;

²İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı;

³Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı;

⁴Şişli Memorial Hastanesi, Yardımcı Üreme Teknikleri ve Üreme Genetiği Merkezi

Kriyoprezervasyon (dondurularak saklanma), hücrelerin kriyojenik sıcaklıklarda canlılık kapasitesini ve işlevselliğini kaybetmeden saklanmasını amaçlayan tekniktir. İnsanlarda sperm kriyoprezervasyonu, fertilitite kliniklerinde ve yardımla üreme teknikleri merkezlerinde yaygın olarak kullanılan güncel bir uygulama olarak tedavide yerini almıştır.

Sperm kriyoprezervasyonu, infertiliteye neden olabilecek cerrahi operasyonların varlığında, radyoterapi/ke-moterapi gibi sitotoksik tedavi öncesinde, testis hasarına neden olabilecek otoimmün hastalıklar veya diyabet gibi malign olmayan bazı hastalıklarda spermilerin saklanarak fertilitenin korunması amacı ile kullanılabilir (1). Diğer yandan, bu teknik erkek infertilitesinin tedavisinde, özellikle azospermik hastalarda testis biyopsisi ya da epididimal aspirasyon ile elde edilen sperm saklanması, önemli bir yer tutmaktadır (1).

Bununla birlikte, kriyoprezervasyonun sperm yapısında ve işlevinde bir takım zararlı değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir (2). Bu değişimler temel olarak, motilitenin azalması, morfolojik değişimlerin olması (3), membran bütünlüğü ve akışkanlığının kaybı (4), DNA fragmantasyonu (5) ve mitokondri fonksiyon kaybı (6) şeklinde özetlenebilir.

Sperm DNA bütünlüğü sadece genetik materyalin gelecek nesillere başarılı olarak aktarılmasında değil, fertilitasyonun düzgün bir şekilde gerçekleşmesi, kaliteli embriyo gelişimi ve gebeliğin sağlanması açısından da önem taşımaktadır. Yakın zamanda yapılan çalışmalar, sperm DNA hasarının fertilitasyon potansiyeli (7), gebelik oranları ve canlı doğum oranları ile ters ilişkili olduğunu göstermektedir (8). Ek olarak, sperm DNA hasarının, yenidoğan anomali riskini ve çocukluk çağı kanser riskini arttırabildiği de öne sürülmüştür (9, 10).

Bu derleme kapsamında, kriyoprezervasyon tarafın-

dan tetiklenen hücresel hasarlar ve DNA hasarlarından, DNA hasarının tespit edilmesinde kullanılan güncel yöntemlerden ve sperm DNA hasarının klinik sonuçlarından bahsedilecektir.

Spermlerde kriyo-hasar

Kriyoprezervasyon işlemi temel olarak, kriyoprotektan ile dengelenme, soğutma, dondurma ve sıvı nitrojende -196°C'de saklama basamaklarından oluşmaktadır. Bu ısıda hücreler metabolik olarak etkin değildirlir ve canlılıklarını kaybetmeden uzun zaman boyunca saklanabilirler. Dondurulan hücrelerde kriyo-hasarın en aza indirgenmesi ve sağkalım oranlarının en yüksek olarak elde edilmesi için hücre tipine özel olarak kriyoprotektanlar ve dondurma koşulları kullanılmaktadır (1). Diğer hücre tipleri ile karşılaştırıldığında, sperm sitoplazmasındaki düşük su içeriği (yaklaşık %50) ve yüksek membran akışkanlığı nedeni ile kriyoprezervasyon hasarına karşı daha dirençli olduğu gösterilmiştir (5). Ancak, en uygun dondurma-çözme protokollerinin uygulanması sonrasında bile genelde çözme sonrasında %30-50 oranında motilite kaybı gözlenmektedir (5). Kriyoprezervasyonda hücre hasarının nedenleri, buz kristalleri kaynaklı yapısal hasarlar ve oksidatif stres ile ilişkili reaktif oksijen radikallerinden kaynaklanan hasarlar şeklinde özetlenebilir. Bununla birlikte, spermlerde en sık karşılaşılan kriyo-hasarlar membran hasarı, organel hasarı ve DNA bütünlüğünün bozulması (DNA fragmantasyonu) şeklinde karşımıza çıkmaktadır.

Mekanik etki ve membran hasarı

Kriyoprezervasyon sürecinde en önemli sorunlardan birisi suyun buza dönüşüm aşamasını içeren soğutma basamağında gözlenmektedir. Kontrolsüz soğutma ve de uygun olmayan çözme ısılarında meydana gelen hücre içi

ve hücre dışı buz kristalleri, mekanik etki ile hücre ve organel membranlarında yapısal hasara neden olarak işlev bozukluğuna yol açmaktadır (11). Bu durum, spermin canlılık ve fertilizasyon kapasitesinin azalmasına ve hareketlilik oranında düşüşe neden olmaktadır (1, 5).

Diğer yandan, soğutma basamağı membran lipidlerinde değişime ve iyon taşınmasından sorumlu olan membran-ıçi proteinlerin işlevinin bozulmasına da neden olabilmektedir (12). Olası bir soğutma hasarının, kolesterol ve fosfolipidten oluşan plazma membran yapısı ve bütünlüğünü değiştirebileceği gösterilmiştir (13). Örneğin, sperm plazma membranının karbonhidrattan zengin glikokaliks dış tabakası membran-ıçi protein ve lipidlere bağlanma özelliğine sahiptir. Bu tabakada karbonhidrat zincirlerinin yapısında bir başkalaşım olduğunda, iyon taşınması, metabolizma ve fertilizasyon süreçlerinde işlev kaybı gözlemlenmektedir (14).

Buz kristalleri, plazma membranının yanı sıra organel membranlarında da hasara neden olabilmektedir. Mitokondriyel membranda bu tip bir mekanik hasar meydana geldiğinde oksidatif fosforilasyon da olumsuz etkilenmekte ve reaktif oksijen radikallerinin (ROS) hücre içerisine salınımı gerçekleşmektedir. Ek olarak, membran bütünlüğünde azalmanın, sperm DNA fragmentasyon oranları ile de ilişkili olduğu belirtilmektedir (15).

Reaktif oksijen radikalleri ve kriyo-hasar

Düşük seviyelerdeki ROS'nin sperm işlevi için gerekli olduğu belirtilirken (16) yüksek seviyelerdeki ROS'nin işlevselliği olumsuz yönde etkilediği ve düşük canlılık oranları ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir (17). Artmış ROS konsantrasyonu ile uyarılan peroksidatif hasarın, membran akışkanlığında değişim, aksonemal yapıda bozulma ve sperm plazma membran hasarı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (18).

Bununla birlikte, kriyoprezervasyonun spermdeki antioksidan etkinliğinde azalmaya neden olduğu ve spermelerin ROS hasarına karşı daha eğilimli hale geldiği öne sürülmektedir (19). Bu etkiyi araştırmak için yapılan çalışmaların bazılarında, kriyoprezervasyonun "bazı" örneklerde ROS oluşumuna neden olduğu ve hali hazırda ROS içeren örneklerde ise bu oranın yükseldiği öne sürülmüştür (4). Bununla birlikte, kriyoprezervasyon sonrasında ROS içeren örnekler içermeyenlerle karşılaştırıldığında motilite ve canlılık oranlarında anlamlı derecede azalma olduğu be-

lirlenmiştir (4). Benzer şekilde, infertil erkeklerde özellikle oligoastenozoospermi varlığında kriyo-hasarın daha fazla olduğu gözlenmiştir (12, 20). Ek olarak, soğutma sırasında 4°C'nin üzerinde insan spermi ve seminal lökositleri tarafından üretilen ROS'nin arttığı bildirilmiştir. Bu nedenle, dondurulmakta olan ve lökosit içeren semen örneklerinin DNA fragmentasyonu oluşumuna daha eğilimli olabileceği bildirilmiştir (21).

DNA hasarının nedenleri

İnsanlarda sperm DNA'sının çok büyük bir bölümü protaminlerle sıkı paketlenmiş haldedir ve bu yapı içerisindeki DNA spermin testis dokusundan transportu sırasında potansiyel zararlardan korunmaktadır. Sperm DNA'sını hasara yatkın hale getiren mekanizmalar arasında protamin eksikliği, oksidatif stres ve DNA tamir mekanizmasındaki yetersizlikler yer almaktadır (22).

Spermilerin sayılı miktarda tamir mekanizmasına sahip olmasına rağmen (23) iyi kalitedeki oositlerin sperm DNA hasarını belli bir oranda tamir etme kapasitesinin olduğu belirtilmiştir (24). Öte yandan, DNA fragmentasyon oranı çok yüksek olduğunda oosit tamir mekanizmasının da yetersiz kaldığı belirtilmektedir (24). Ancak, hangi tip DNA hasarının yardımcı üreme tekniklerinin başarısını olumsuz olarak etkilediği henüz bilinmemektedir.

Oksidatif stres, spermde DNA fragmentasyonunu potansiyel olarak uyarabilen temel mekanizmalardan birisidir (15). Somatik hücreler ile karşılaştırıldığında sperm hücresinin membranının özelliğinden dolayı oksidatif stres hasarına karşı açık olduğu belirtilmektedir (15). Bununla birlikte, çeşitli germ hücre ve myoblastoid hücre soyları ile kıyaslandığında insan sperminin nükleer ve mitokondriyel DNA'sının oksidatif strese karşı daha dayanıklı olduğu da öne sürülmüştür (9).

DNA fragmentasyonunun etiyolojisinin açıklanması amacı ile üzerinde çalışılan hücresel mekanizmalardan bir diğeri ise apoptozdur. Yakın zamanda yapılan araştırmalarda kriyoprezervasyon ve takiben çözme işleminin kaspaz aktivasyonuna neden olduğu ve bu mekanizma aracılığı ile apoptozun uyarıldığı belirlenmiştir. Öte yandan, kaspaz aktivasyonun membran hasarına yol açmasına rağmen DNA bütünlüğünün bozulması ile bir ilişkisi gösterilememiştir (25). Ek olarak, DNA hasarı ve sperm işlevselliğinin kaybında kaspazlardan çok oksidatif stresin daha etkin rol oynadığı belirtilmektedir (26).

DNA fragmentasyonunun belirlenmesinde kullanılan teknikler

Günümüzde, DNA fragmentasyonunun değerlendirilmesinde en sık olarak TUNEL (The Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Deoxyuridine (TdT) Triphosphate (dUTP) Nick End Labeling Assay), Tek Hücre Jel Elektrofrezisi (COMET), Sperm Kromatin Yapısı Tayini (SCSA) ve Sperm Kromatin Dağılımı (SCD) gibi çeşitli tekniklerden yararlanılmaktadır. Bu analizlerde DNA hasarının ölçümü doğrudan (TUNEL, COMET) ya da DNA denatürasyonunun uyarılması ile dolaylı olarak (SCSA, SCD) yapılmaktadır.

TUNEL yönteminde, DNA içerisindeki serbest uçlara terminal deoksiniükleotidil transferaz (Tdt) enziminin katalize ettiği bir reaksiyonla floresans işaretli nükleotidler eklenmektedir. Değerlendirme, mikroskopik olarak ya da akım sitometrisi ile gerçekleştirilmektedir. Çok sayıda protokol ile uygulanabilir olması tekniğin kendi dezavantajını oluşturmaktadır ve çeşitli çalışmalarda çok farklı klinik eşikdeğerler öne sürülmüştür (15).

COMET analizinde, her bir spermdeki DNA iplik kırıklarının oranı ayrı olarak belirlenmektedir. Özet olarak, spermier elektroforetik ortama yüklenirler ve DNA fragmentleri sperm başının arka tarafına doğru göç ederken DNA fragmentasyon oranına bağlı bir yoğunlukta kuyruklu yıldız görüntüsü ortaya çıkar. Teknik ismini buradan almaktadır. COMET analizine bağlı olarak belirlenen eşikdeğerde erkek infertilitesi için sınır değeri %25 olarak belirlenmiştir (27). Oligozoospermik ve testiküler doku gibi az sayıda sperm hücresi içeren örneklerin de incelenebildiği bu analizin diğer teknikler ile karşılaştırıldığında daha hassas olduğu belirtilmektedir (23).

SCSA, asit ortamda DNA'nın denatüre olma yatkınlığını ölçen bir yöntemdir. Test prensibi, floresans işaretli normal DNA içeren ve Akridin Orange ile boyanan fragmente DNA içeren hücrelerin akım sitometrisine ayrıştırılması esasına dayanmaktadır. Değerlendirme, analiz sonucunda belirlenen DNA fragmentasyon indeksi (DFI)'ne göre yapılmaktadır. Ancak, bu teknik az sayıda hücre içeren örnekler için önerilmemektedir (15).

SCD analizinde (hale testi), nükleer proteinlerin uzaklaştırılmasının ardından sperm baş çevrelerindeki hale oluşumu değerlendirilmektedir. Normal DNA bütünlüğüne sahip spermier geniş haleler oluştururken oluşan halenin

küçüklüğü ya da yokluğu yoğun DNA fragmentasyonunu işaret etmektedir. SCD, diğer teknikler ile karşılaştırıldığında uygulaması daha basit ve masrafsız bir yöntemdir. Öte yandan, bu tekniğin uygulanması ile bir çalışmanın sonucunda DNA hasarı ve gebelik oranlarında azalma ile ilişki kurulmuş (28) olsa da büyük vaka sayısına sahip çalışmalarda dahi DNA hasarı ve yardımla üreme başarısı arasında bir ilişki sağlanamamıştır.

Diğer yandan, bu yöntemlerin hepsi hasarlı DNA'ya sahip sperm yüzdesinin değerlendirilmesi sürecinde sperm yıkımını (denatürasyon, lizis, fiksasyon ve/veya boyama) içeren aşamaları gerektirmektedir (22). Bu tekniklere alternatif olarak kullanılacak yaklaşımlardan birisi Raman spektroskopisi ve konfokal mikroskopun bir birleşimi olan Raman mikrospektroskopisidir. Canlı spermier üzerinde uygulanabilen bu yöntem, hücrenin bütünlüğüne zarar vermeden oksidatif DNA hasarlı spermier belli bir seviyeye kadar belirleme yeteneğine sahiptir (29). Bununla birlikte, klinik tanıda Raman mikrospektroskopisinin diğer tekniklere üstünlüğünü gösteren bir çalışma bulunmamaktadır.

Yakın zamanda yapılan araştırmalarda, sperm DNA fragmentasyonunun değerlendirilmesinde moleküler genetik temelli tekniklerden de yararlanılmıştır. Bu tekniklere, Ligasyon Aracılı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (LM-PCR) (30) ve kantitatif PCR analizi (9) örnek olarak gösterilebilir.

Kriyoprezervasyon kaynaklı sperm dna hasarının klinik sonuçları

İnfertil bireylerin sperm örneklerinin fertil bireylere oranla daha yüksek düzeyde DNA fragmentasyonu içerdiği bilinmektedir (31). Ek olarak, canlı doğum oranlarını temel alan bir çalışmada açıklanamayan infertilite endikasyonu olan çiftlerin %80'inde DNA fragmentasyonu neden olarak gösterilmiştir (8). Değişik DNA fragmentasyon tayin yöntemleri ile farklı klinik eşik değerler elde edilmiş olsa da genel sonuç fertil bireyler ya da donör spermierle karşılaştırıldığında, infertil erkeklerin örneklerinde DNA hasar oranının anlamlı derecede yüksek olduğu yönündedir (8, 15, 27, 28). Testis dokusu DNA fragmentasyonu açısından araştırıldığında, nonobstrüktifazoospermik ve normal spermatogenez gözlenen dokular arasında DNA fragmentasyon oranının anlamlı derecede farklı olduğu tespit edilmiştir. Ek olarak, DNA fragmentasyon oranları ile fertilizasyon ve gebelik oranları arasında bir ilişki gözlenmezken, embriyo simetrisi ve blastomer sayısı açısından

anamlı bir ilişki olduğu belirlenmiştir (28).

Bununla birlikte, normal örnekler ile karşılaştırıldığında sperm kalitesi düşük olan örneklerde kriyoprezervasyon kaynaklı DNA hasarının ve hücre ölümüne yatkınlığın arttığı gözlenmiştir (21). Bu bulgu, membran hasarı olan ve anomalili spermilerin normal yapıdaki spermiler ile karşılaştırıldığında kriyoprezervasyon ve çözme süreçlerinden kaynaklanan stresi tolere edememesi ve süreç sonunda normal spermilerin sağkalım oranlarının daha yüksek olması ile açıklanabilir. Ek olarak, infertil erkeklerde dondurma sonrası sperm DNA hasarının daha yüksek olarak bulunmasının nedenlerinden birisi düşük kaliteli örneklerde sperm kromatin kondansasyon oranının daha düşük olması ile şeklinde açıklanmıştır (32).

Fertil erkeklerin semen ve hazırlanmış sperm örneklerinin taze ve dondurulup çözülmüş örnekleri karşılaştırıldığında DNA bütünlüğünde bir fark olmadığı belirtilmektedir (3). Ancak, aynı karşılaştırma infertil erkeklerde yapıldığında kriyoprezervasyon sonrasında semende %24 ve hazırlanmış spermde %40 oranında daha düşük DNA bütünlüğünün olduğu tespit edilmiştir (3). Diğer yandan, teratozoospermik örneklerde, kriyoprezervasyon kaynaklı DNA hasarına yatkınlık olduğunu belirten çalışmalar var olsa da (33) bu ilişkiyi gösteremeyen araştırmalar da bulunmaktadır (5). Teratozoospermi ve DNA hasarı arasındaki ilişki, anormal örneklerde ROS oranlarının yüksek olması açıklanabilir.

Diğer yandan, seminal plazmadan ayrılmadan dondurulan örneklerde çözme sonrasında daha yüksek motilite ve daha az oranda DNA hasarının olduğu gözlenmiştir. Bu durum, seminal plazmada bulunan antioksidan enzimlerin kriyo-hasarı indirgemesi şeklinde açıklanmaktadır (34). Bununla birlikte, yardımcı üreme teknikleri çerçevesinde sperm hazırlanması sırasında kullanılan işlemlerin de (örn. uzamış santrifüj zamanı) reaktif oksijen radikallerinin oranını arttırabildiği bilinmektedir (35). Bu sonuçlar ışığında, sperm konsantrasyonu, canlılık oranı ve lökosit sayısı uygun olduğu durumlarda sperm hazırlık yapılmadan seminal plazma ile dondurulması ROS'ne bağlı membran ve DNA hasarının indirgenmesi açısından daha uygun olarak görünmektedir.

Kaynaklar

1. Özsaıt B. Yardımla Üreme Tekniklerinde Sperm Kriyoprezervasyonu in: Delilbaşı L. (Ed), Klinik Embriyoloji Uygulamaları Atlası, Büyükharf Tıp Yayınları, 2010, Ankara (ISBN No:978-9944-5125-7-2)

Ek olarak, kriyoprezervasyondan sonra ilk olarak belirlenen hasarın yanı sıra spermilerin fertilizasyon işlemine kadar ilerleyen süre içerisindeki sağkalım oranları da önem taşımaktadır. Örneğin, dondurma-çözme işleminden sonra ilk 4 saatte DNA hasarının arttığı gözlenmiş ve bu nedenle de çözülen sperm bir an önce kullanılması gerektiği öne sürülmüştür (36).

Özet olarak, kriyoprezervasyonun kesin olarak DNA hasarına neden olup olmadığı ya da hasar miktarı konusunda henüz kesin bir fikir birliğine varılmamıştır. Di Santo ve arkadaşlarının (37) da özetlediği gibi kriyoprezervasyonun DNA hasarı üzerine etkisini araştıran çalışmalar sonuçlarına göre üç farklı gruba ayrılmaktadır. Çalışmaların büyük bir kısmı kriyoprezervasyonun DNA hasarına neden olduğunu savunurken (38, 39), bir kısım araştırmacı ise bu sonuçların eşlik eden faktörlerle bağlantılı olduğunu göstermişlerdir (33, 34). Diğer bir grup araştırmacı ise kriyoprezervasyonun DNA hasarına neden olmadığını öne sürmektedir (40, 41). Bununla birlikte, DNA hasarının kriyoprezervasyon tekniği ile değil taze örnekteki DNA fragmentasyon oranı ile ilişkili olduğunu gösteren sonuçlar da bulunmaktadır (2). Bu çalışmalar incelendiğinde, sonuç farklılığın olası sebepleri şu şekilde sıralanabilir:

- Çalışma gruplarındaki örnek sayılarının farklılığı
- Dondurma ve çözme prosedürlerinin farklılığı
- DNA bütünlüğünün belirlenmesinde kullanılan genetik testlerin farklılığı
- Dondurma öncesi kullanılan sperm hazırlama tekniklerinin farklılığı

Sonuç

Kriyoprezervasyon son yıllarda üzerinde en fazla çalışılan konular arasında yer almaktadır. Yapılan araştırmaların hepsinde kriyoprezervasyon ve DNA fragmentasyonu arasında kesin bir ilişki gösterilmiş olmasa da, genel olarak normal örnekler ile karşılaştırıldığında sperm kalitesi düşük olan örneklerin kriyoprezervasyon kaynaklı DNA hasarı ve hücre ölümüne yatkınlığının arttığı gözlenmiştir (5,21). Kriyoprezervasyon-çözme işleminin insan sperminde DNA hasarına yol açtığı halen tartışılmakla beraber bu teknik yardımcı üreme tekniklerinde önemini korumaktadır.

2. Thomson LK, Fleming SD, Schulke L, Barone K, Zieschang JA, Clark AM. The DNA integrity of cryopreserved spermatozoa separated for use in assisted reproductive technology is unaffected by the type of cryopro-

- tectant used but is related to the DNA integrity of the fresh separated preparation. *Fertil Steril*. 2009 Sep;92(3):991-1001.
3. Donnelly ET, Steele EK, McClure N, Lewis SE. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Hum Reprod*. 2001;Jun;16(6):1191-9.
 4. Mazzilli F, Rossi T, Sabatini L, Pulcinelli FM, Rapone S, Dondero F, et al. Human Sperm Cryopreservation and reactive oxygen species (ROS) production. *Acta Eur Fertil*. 1995;26:145-8.
 5. Paoli D, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L. Sperm Cryopreservation: Effects on Chromatin Structure. In *Advances in Experimental Medicine and Biology 791: Genetic Damage in Human Spermatozoa* Eds: Baldi E, Muratori M. Springer, New York, 2014
 6. O'Connell M, McClure N, Lewis SEM. The effect of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reprod*. 2002;17:704-9.
 7. Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of the human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Human Reprod*. 1998;13:1429-36.
 8. Simon L, Proutski I, Stevenson M, Jennings D, McManus J, Lutton D, Lewis SE. Sperm DNA damage has negative association with live birth rates after IVF. *Reprod Biomed Online* 2013; 26:68-78.
 9. Sawyer DE, Mercer BG, Wiklendt AM, Aitken RJ. Quantitative of gene-specific DNA damage in human spermatozoa. *Mutation Research* 2003 May;529:21-34.
 10. Sorahan T, McKinney PA, Mann JR, Lancashire RJ, Stiller CA, Birch JM, Dodd HE, Cartwright RA. Childhood cancer and parental use of tobacco: findings from the interregional epidemiological study of childhood cancer (IRESCC). *Br J Cancer* 2001;84:141-6.
 11. Nallella KP, Sharma RK, Allamaneni SS, Aziz N, Agarwal A. Cryopreservation of human spermatozoa: comparison of two cryopreservation methods and three cryoprotectants. *Fertil Steril* 2004 Oct;82(4):913-8.
 12. Oehninger S, Duru NK, Srisombut C, Morshedi M. Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. *Mol Cell Endocrinol* 2000;27(169):3-10.
 13. Giraud MN, Motta C, Boucher D, Grizard G. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Human Reprod*. 2000;15(10): 2160-64.
 14. Benoff S. Carbohydrates and fertilization: an overview. *Molecular Human Reprod*. 1997;3(7):599-637.
 15. Lewis SEM. Sperm DNA fragmentation and base oxidation. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology 791: Genetic Damage in Human Spermatozoa* Eds: Baldi E, Muratori M. Springer, New York, 2014
 16. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*. 2003 Apr;79(4):829-43.
 17. Aitken RJ, Baker MA. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. *Int J Androl*. 2002 Aug;25(4):191-4.
 18. Saleh RA and Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *Journal of Andrology*. 2002;23(6):737-752.
 19. Lasso JL, Noiles EE, Alvarez JG, Storey BT. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. *Journal of Andrology*. 1994; 15(3): 255-65.
 20. Donnelly ET, Steele KE, McClure N, Lewis SEM. Assessment of DNA integrity and morphology of ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men before and after cryopreservation. *Human Reprod*. 2001;16:1191-9.
 21. Said TM, Gaglani A, Agarwal A. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reproductive BioMedicine Online*. 2010;21(4):456-462.
 22. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. The clinical utility of sperm DNA integrity testing. *Fertil Steril*. 2006 Nov;86(5 Suppl 1):S35-7.
 23. Simon L, Brunborg G, Stevenson M, Lutton D, McManus J, Lewis SE. Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproduction outcome. *Hum Reprod* 2010;25(7):1594-1608.
 24. Meseguer M, Santiso R, Garrido N, Garcia-Herrero S, Remohí J, Fernandez JL. Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *Fertil Steril*. 2011 Jan;95(1):124-8.
 25. Duru NK, Morshedi MS, Schuffner A, Oehninger S. Cryopreservation thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation. *Journal of Andrology*. 2001;22(4):646-651.
 26. Thomson LK, Fleming SD, Aitken RJ, De Jullis GN, Zieschang JA, Clark AM. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Hum Reprod*. 2009 Sep;24(9):2061-70.
 27. Simon L, Lutton D, McManus J, Lewis SE. Sperm DNA damage measured by alkaline Comet assay as an independent predictor of male infertility and in vitro fertilization success. *Fertil Steril* 2011;95:665-657.
 28. Meseguer M, Santiso R, Garrido N, Gil-Salom M, Remohí J, Fernandez JL. Sperm DNA fragmentation levels in testicular sperm samples from azoospermic males as assessed by the sperm chromatin dispersion (SCD) test. *Fertil Steril* 2009;92:1638-1645.
 29. Sánchez V, Redmann K, Wistuba J, Wübbeling F, Burger M, Oldenhof H, Wolkers WF, Kliesch S, Schlatt S, Mallidis C. Oxidative DNA damage in human sperm can be detected by Raman Microspectroscopy. *Fertil Steril*. 2012 Nov;98(5):1124-9.
 30. Lim JJ, Lee JI, Kim DH, Song SH, Kim HJ, Lee WS, Lee DR. DNA fragmentation of human sperm can be detected by ligation-mediated real-time polymerase chain reaction. *Fertil Steril*. 2013 Dec;100(6):1564-71.
 31. Sun JG, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1997;56(3):602-607.
 32. Bianchi PG, Manicardi GC, Bizzaro D, Bianchi U, Sakkas D. Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and in situ nick-translation of murine and human mature spermatozoa. *Biol Reprod* 1993;49(5):1083-1088.
 33. Kalthur G, Adiga SK, Upadhyaya D, Rao S, Kumar P. Effect of cryopreservation on sperm DNA integrity in patients with teratosperm. *Fertil Steril* 2008;89(6): 1723-1727.
 34. Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil Steril*.2001;76(5):892-900.
 35. Toro E, Fernández S, Colomar A, Casanovas A, Alvarez JG, López-Teijón M, Velilla E. Processing of semen can result in increased sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 2009;92:2109-2112.
 36. Gosálvez J, Cortés-Gutiérrez E, López-Fernández C, Fernández JL, Caballero P, Nuñez R. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation dynamics in fertile donors. *Fertil Steril*. 2009 Jul;92(1):170-3.
 37. Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART. *Adv Urol*. 2012;2012:854837
 38. Spanò M, Cordelli E, Leter G, Lombardo F, Lenzi A, Gandini L. Nuclear chromatin variations in human spermatozoa undergoing swim-up and cryopreservation evaluated by the flow cytometric sperm chromatin structure assay. *Molecular Human Reprod*. 1999;5(1):29-37.
 39. de Paula TS, Bertolla RP, Spaine DM, Cunha MA, Schor N, Cedenho AP. Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia. *Fertil Steril*. 2006;86(3):597-600.
 40. Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, Rahimi G, Schöndorf T, Mallmann P, Dessole S, Nawroth F. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Human Reprod*. 2004;19(4):932-39.
 41. Paasch U, Sharma RK, Gupta AK, Grunewald S, Mascha EJ, Thomas AJ Jr, Glander HJ, Agarwal A. Cryopreservation and thawing is associated with varying extent of activation of apoptotic machinery in subsets of ejaculated human spermatozoa. *Biology of Reprod*. 2004;71(6):1828-1837.