

## Sperm dondurma

Prof. Dr. Fikret Erdemir

Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı

Ağır oligospermi, azospermi, spinal kord travması, retrograd ejakülasyon, üriner sistemi etkileyen cerrahi girişimler, vazektomi, sitotoksik tedavi, multipl skleroz, testis tümörü, kraniyofaringioma ve kronik nefropati gibi klinik durumlarda fertilitenin sağlanmasının normal yollarla oldukça zor olduğu ve sonraki yıllarda da bu şansın azaldığı hatta olanaksız hale geldiği bilinmektedir (1,2). Yukarıda bahsedilen durumlarda ya da sperm parametrelerinin daha da bozulacağı klinik durumlarda, genetik materyalin aktarılmasını sağlayan spermin korunması ve saklanması oldukça önemli bir olgu olarak karşımıza çıkmaktadır. Buna göre, sperm, ovum, testiküler doku ve erken embriyoların dondurularak saklanması seçeneği ortaya çıkmaktadır.

Sperm dondurma, spermilerin -80 ile -196 derece arasında gerektiğinde tekrar kullanılmak üzere saklanmasıdır (2). İlk kez, 1940'lı yıllarda veterinerler tarafından geliştirilen sperm dondurma işleminden sonra, 1950 yılında insan sperminin dondurulduğu ve 1954 yılında da ilk canlı doğumun gerçekleştirildiği görülmektedir (3). Takip eden dönemlerde, 1962 yılında Sherman ve arkadaşları nitrojen buharı kullanarak spermeleri dondurmuş ve saklamış, bundan on yıl sonra da bu dondurulmuş spermelerden gebelik ve canlı doğum elde etmişlerdir (4). Sperm dondurma, bir süreç olup bu süreç sperm dondurma, saklama ve çözünme gibi evreleri kapsamaktadır. Bu evreler içerisinde, dondurma aşaması oldukça önemli olup spermin çift membran yapısında, su miktarı az olduğu için dondurma sırasında oluşan buz kristalleri sperm membranının hasarlanmasına neden olarak metabolizmasını ve iyon transferini etkileyebilmektedir (5). Bu aşamada, oluşan buz kristallerinin en aza indirgenmesi ve dolayısı ile hücre sağkalımının artırılması için hücre zarındaki su oranının azaltılması gerçeğinden hareketle suyun yerini alan kriyoprotektanlar olarak adlandırılan maddeler kullanılmaktadır. Gliserol, dimetilsülfoksit ve pentoksifilin gibi maddelerden oluşan bu ajanlar, suyun yerini alırken

donma noktasını düşürmekte, hücrenin solüt ve tuz oranını azaltmakta, hücreyi yüksek osmolariteden korumakta, kontrollü dehidratasyon sağlamakta ve bu özelliklere bağlı olarak hücreyi korumaktadır (6-8).

Spermin dondurma aşamasında karşılaşılabilecek enfeksiyonlar, oldukça önemli olduğu için laboratuvar ortamı ve kullanılan inkübatörlerin tam dezenfeksiyonu sağlanmalı ve bu amaçla iyodin ve amfoterisin gibi ajanlar uygun biçimde kullanılmalıdır (2,9,10). Yine enfeksiyon açısından, klamidya, sfiliz, gonore, HBV, HCV, HIV ve CMV gibi virüsler incelenmelidir. Bütün bu işlemler yapılırken spermin korunması için bulunan laboratuvar ortamının elektrik sistemi, alarm düzeneği, CO<sub>2</sub> desteği ve spermelerin karışmaması için gerekli olan evrak kayıtları tam olarak yerine getirilmelidir.

Sperm dondurma işlemine bağlı olarak sperm canlılığının ve motilitesinin %31-50'ye 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 motilite azalması ile yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir (11). Araştırmacılar, donma sırasında sperm ATP yapımının bozulduğunu ve bunda motilite bozukluğuna yol açabileceğini bildirmelerine rağmen pek çok çalışmada ATP bozukluğunun fertilitenin ile ilişkili olmadığı belirtilmiştir (12). Bonetti ve arkadaşları ise hem kanser hastaları hem de sağlıklı hastalar için çözünme işlemi sonrası spermelerdeki ortalama viabilite oranının %30'dan düşük olduğunu bildirmişlerdir (13). Bununla birlikte, kanser hastalarının zaten dondurma işlemi öncesinde sperm kalitesinin diğer hastalara göre düşük olduğu, bu nedenle de çözme işlemi sonrası daha düşük kalitede sperme sahip oldukları bilinmektedir (14). İlk sperm kalitesi iyi olanlarda tekrarlayan donma ve çözünme işlemlerine dayanıklılığın daha iyi olduğu belirtilmektedir (15). Öte yandan, spermin seminal sıvı ile birlikte dondurulmasının ya da az sayıda sperm

varsa pellet ile birlikte dondurulmasının sperm motilite ve DNA bütünlüğünü daha iyi koruduğu belirtilmiştir (16). Araştırmacılar tarafından başlangıç sperm DNA hasarının, spinal kord travmasının, kullanılan teknik ve saklama zamanının, tekrarlayan dondurma ve çözünmeler 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 belirtilmiştir (17-19). Çözme işlemi sonrası sperm motilitesinin de, dondurma işlemi öncesi motil sperm sayısı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (19). Çözünme sonrası sperm parametreleri ile dondurulup saklandığı süre arasında ise tam bir ilişki gösterilememiştir (44). Bununla ilişkili olarak, sperm bankasında dondurulup saklanan donör örneklerinde 14 yıllık bir saklama sonu progresif motilitede anlamlı bir azalma olduğu ortaya konulamamıştır. Bu bulgu, progresif motil sperm sayısı ve konsantrasyonu, donör spermle yapılan yapay inseminasyonlar için en önemli prognostik faktör olduğundan ümit verici olarak bulunmuştur (20). Yogev ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada sıvı nitrojen içinde uzun süreli spermilerin saklanmasıyla çözme sonrası progresif motil sperm konsantrasyonunu etkilemediğini ve bu nedenle donasyon spermelerindeki fertilizasyon potansiyelini değiştirmedikleri sonucuna varmışlardır (21). Spermin saklandığı süreden ziyade dondurma ve çözme işlemlerinin sperm kalitesindeki azalmayla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Sperm dondurma işleminde sadece motilite değil akrozom reaksiyonu, mitokondrial aktivite ve morfolojinin de bozulduğu görülmektedir. Çalışmalarda, akrozom membranı ve sperm mitokondrium membranında da etkilenmeler olabileceği ve bunun akrozom reaksiyonu ile gametler arasındaki erken etkileşim ve mitokondrial fonksiyonları bozabileceği ileri sürülmüştür (22). Boitrelle ve arkadaşları ise dondurma işleminin motil insan sperminin organel morfolojisini değiştirebileceğini ve sperm kromatin dekondeksasyonunu indükleyebileceğini bildirmişlerdir (23). Bununla ilişkili olarak araştırmacılar, yardımcı üreme tekniğinde kullanılan dondurulmuş çözünmüş spermelerin yüksek büyütme mikroskopla incelenerek özellikle motil spermelerin organel morfolojilerinin değerlendirilmesini (MSOME) ve klasik intrastoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) yerine ve morfolojik olarak daha iyi motil spermelerin kullanılmasını (IMSI) tavsiye etmişlerdir (24). Buna göre, morfolojik açıdan seçilen spermelerin injeksiyonu ile daha

yüksek blastokist ve implantasyon oranı ve daha düşük abortus oranları bildirilmiştir (24).

Sperm dondurma ve çözünme aşamalarında sperm DNA'sı da olumsuz olarak etkilenmektedir. 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 (25). Yine infertil 25 erkeğin incelendiği bir çalışmada, sperm dondurma işleminin sperm kromatin hasarı oluşturduğu belirtilmektedir (23). Thomson ve arkadaşlarının bir çalışmada ise 60 erkek olgunun incelenmesi sonrası mitokondriden apoptozis indükleyici maddelerin salınımının sperm DNA hasarı oluşturabileceği belirtilmiştir (26). Yine çalışmalarda, sperm DNA hasarının oksidatif stres olarak adlandırılan süreçle ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Dondurma ve çözme işlemleri sırasında oluşan reaktif oksijen radikalleri plazma membranının lipid yapısını bozarak motilitede azalmaya neden olabilmektedir (26-29). Oksidatif strese temel stratejinin antioksidan kullanımı olduğu bilirse de verilen antioksidanların motiliteyi artırıp sperm DNA hasarını azaltmasına rağmen fertilite oranları üzerine etkili olmadığı gösterilmiştir (30-32).

Spermier çeşitli endikasyonlara bağlı olarak dondurulup saklansa da daha sonraki dönemlerde farklı nedenlere bağlı olarak bu spermilerin kullanım oranları %3.7-14.8 arasında değişmektedir (33-37). Sperm saklanması sonrası gebelik oranları %12-35.2 arasında değişmektedir. Gebelik elde etmede tekrarlayan donma ve çözünmeler, 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 (38). Bir diğer soru, taze ya da donmuş sperm ile yapılan yardımcı üreme yöntemlerinde elde edilen gebeliklerin durumudur. Testisten elde edilen spermelerin hemen kullanılmasıyla yapılan ICSI ile bu spermelerin dondurulup sonrasında yapılan ICSI sonuçları karşılaştırılınca donmuş spermelerdeki sonucun taze spermelere göre daha düşük olduğu belirtilmiştir (39). Buna karşılık, pek çok çalışmada da taze ya da donmuş sperm kullanılmasıyla yapılan ICSI sonuçlarının anlamlı olarak farklı olmadığı belirtilmektedir (40,41). Buna göre, taze spermde %30 ve donmuş spermde ise %26 oranlarında gebelik elde edildiği bildirilmiştir.

Epididimden elde edilen spermelerin taze ya da donmuş olmasının gebelik oranları üzerine etkili olmadığı bildirilmektedir (42-44). Obstrüktif azospermili 160 olgunun motil ve immotil olmayan spermelere ayrılarak incelendiği bir çalışmada ise motil olanlarda %33.9 immotil olanlarda ise %27.3 oranında fertilité sağlandığı anlaşılmaktadır (45). Bir başka araştırmada da motil spermi azlığının gebelik oranlarını anlamlı olarak etkilemediği belirtilmektedir (46). Epididim (n=77) ve testisten (n=79) alınarak dondurulan spermelerde gebelik oranları açısından karşılaştırılmıştır. Wood ve arkadaşları tarafından 164 ICSI siklusunun incelendiği bir araştırmada 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 (47). Benzer sonuçların diğer çalışmalarda da belirtildiği anlaşılmaktadır (48). Yine önemli bir nokta, sperm dondurma sonrası anomali oranının artıp atmadığı konusudur (49-52). Bu konuda, genel yaklaşım, anomali riskini arttırmadığı yönündedir. Belva arkadaşlarının çalışmalarında dondurma işlemi sonrası yapılan IVF/ICSI işlemi takiben taze örnekler göre majör malformasyon oranının daha fazla olduğu belirtilmektedir (53). Wada ve arkadaşları ise donmuş örneklerdeki anomali oranının taze örneklerle göre daha düşük olduğunu belirtmektedir (54). Yakın zamanda yapılan bir araştırmada da, donmuş olanlarda riskin taze olanlara göre azaldığı belirtilmektedir (55).

Dondurma işleminde bir diğer önemli nokta çocuklar ve adölesanlardır. Bu olgularda elektroejakülasyon, vibroejakülasyon, mikroepididimal sperm aspirasyonu (MESA) ve testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) ile spermelerin

saklanabileceği belirtilmektedir (56, 57). Öte yandan günümüzde adölesan dönemde saklanan testis dokusu ya da sperm sonrası gebelik elde edildiğini belirten bir çalışma bulunmamaktadır. Deneysel çalışmalarda rat testislerinin alınıp saklandıktan sonra çözünme aşamasında incelenmesi ile çözünen parçaların taze örnekler gibi olduğu, kültür ortamında tübül büyümesinin benzer olduğu ortaya konulmuştur (58). Yine dondurma işleminin seminifer tübül bazal membranından ziyade spermatogonia Sertoli hücreleri ve spermatositleri etkilediği anlaşılmaktadır (59). Yukarıda belirtilen bu durumlar sperm dondurmada ziyade doku dondurma başlığı altında ayrıntılı olarak ele alınıp incelenmesi gereken konulardır. Ancak bilinen bir gerçek, sperm dondurmada önemli mesafelerin alındığı ve spermelerin çeşitli şekillerde elde edilerek uzun süreler saklandığı konusudur. Günümüzde en uzun süre saklanan sperm kansen olgusundan alınıp 28 yıl bekletilen sperm olduğu ve 28 yılın sonunda bu olgudaki saklanan sperm kullanılmasıyla yapılan intrauterin inseminasyon (IUI) yöntemiyle gebe kalındığı bildirilmektedir. Bundan başka 21 yıl saklanan bir sperm kullanılması ile de ICSI sonrası doğum elde edildiği belirtilmektedir (60).

Sonuçta, üreme ve erkek infertilitesi ile ilişkili olarak yaklaşık 60 yıl önce ortaya konularak tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaya başlanan sperm dondurma, çok sayıda klinik ve deneysel araştırmalar sonrasında daha da etkili olarak klinik pratikte yerini almıştır. Gelecekte sperm dondurma konusunda ortaya konulacak teknik ve hücre düzeyindeki yenilik ve gelişmelere paralel olarak sperm motilite, sayı, canlılık, akrozom reaksiyonu ve DNA gibi yapılar açısından minimal düzeyde etkilenmesinin sağlanması ile daha başarılı sonuçların alınacağı anlaşılmaktadır.

## Kaynaklar

- Greenhall E, Vessey M. The prevalence of subfertility: a review of the current confusion and a report of two new studies. *Fertil Steril.* 1990;54:978.
- Dohle GR, Colpi GM, Hargreave TB, Papp GK, Jungwirth A, Weidner W. EAU Working Group on Male Infertility. EAU guidelines on male infertility. *Eur Urol.* 2005;48:703-11.
- Bunge RG, Keettel WC, Sherman JK. Clinical use of frozen semen; report of four cases. *Fertil Steril.* 1954;5:520-9.
- Perloff WH, Steinberger E, Sherman JK. Conception With Human Spermatozoa Frozen By Nitrogen Vapor Technic. *Fertil Steril.* 1964;15:501-4.
- Check ML, Check DJ, Check JH, Long R, Press M. Effect of shortened exposure time to the critical period for ice crystal formation on subsequent post-thaw semen parameters from cryopreserved sperm. *Arch Androl.* 1994;32:63-7.
- Clarke GN, Liu DY, Baker HW. Improved sperm cryopreservation using cold cryoprotectant. *Reprod Fertil Dev.* 2003;15:377-81.
- 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.
- Jezeck 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.
- 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.
- Mungan AG. Sperm ve embriyo bankası. *Erkek üreme sistemi hastalıkları kitabı.* Editörler: Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan I, Aşçı R, Yaman MÖ, Usta MF, Kendirci M. Haziran 2004. İstanbul. 365-81.
- 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 Suppl 1:81-6.
- McLaughlin EA, Ford WC, Hull MG. Adenosine triphosphate and motility

- characteristics of fresh and cryopreserved human spermatozoa. *Int J Androl.* 1994;17:19-23.
13. Bonetti TC, Pasqualotto FF, Queiroz P, Iaconelli A, Borges E. Sperm banking for male cancer patients: social and semen profiles. *Int Braz J Urol.* 2009;35:190-7.
  14. Rives N, Perdrix A, Hennebicq S, Saïas-Magnan J, Melin MC, Berthaut I, Barthélémy C, Daudin M, Szerman E, Bresson JL, Brugnon F, Bujan L. 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.
  15. 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.
  16. 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.
  17. Chen SU, Shieh JY, Wang YH, Chang HC, Ho HN, Yang YS. Pregnancy achieved by intracytoplasmic sperm injection using cryopreserved vasal-epididymal sperm from a man with spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 1998;79:218-21.
  18. 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;95:124-8.
  19. 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.
  20. Bolten M, Weissbach L, Kaden R. Cryopreserved human sperm deposits: usability after decades of storage. *Urologe A.* 2005;44:904-8.
  21. Yogev L, Kleiman SE, Shabtai E, Botchan A, Paz G, Hauser R, Lehavi O, Yavetz H, Gamzu R. Long-term cryostorage of sperm in a human sperm bank does not damage progressive motility concentration. *Hum Reprod.* 2010;25:1097-103.
  22. 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.
  23. Boitrelle F, Albert M, Theillac C, Ferfour F, Bergere M, Vialard F, Wainer R, Bailly M, Selva J. Cryopreservation of human spermatozoa decreases the number of motile normal spermatozoa, induces nuclear vacuolization and chromatin decondensation. *J Androl.* 2012;33:1371-8.
  24. Gatimel N, Leandri R, Parinaud J. Sperm vacuoles are not modified by freezing-thawing procedures. *Reprod Biomed Online.* 2013;26:240-6.
  25. 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.
  26. Thomson LK, Fleming SD, Aitken RJ, De Luliis 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.
  27. Zribi N, Feki Chakroun N, El Euch H, Gargouri J, Bahloul A, Ammar Keskes L. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril.* 2010;93:159-66.
  28. Tatone C, Di Emidio G, Vento M, Ciriminna R, Artini PG. Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. *Gynecol Endocrinol.* 2010;26:563-7.
  29. Li Z, Lin Q, Liu R, Xiao W, Liu W. Protective effects of ascorbate and catalase on human spermatozoa during cryopreservation. *J Androl.* 2010;31:437-44.
  30. Taylor K, Roberts P, Sanders K, Burton P. Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. *Reprod Biomed Online.* 2009;18:184-9.
  31. Branco CS, Garcez ME, Pasqualotto FF, Erdtman B, Salvador M. Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. *Cryobiology.* 2010;60:235-7.
  32. Martínez-Soto JC, de DiosHourcade J, Gutiérrez-Adán A, Landeras JL, Gadea J. Effect of genistein supplementation of thawing medium on characteristics of frozen human spermatozoa. *Asian J Androl.* 2010;12:431-41.
  33. 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.
  34. 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.
  35. Garg T, LaRosa C, Strawn E, Robb P, Sandlow JL. Outcomes after testicular aspiration and testicular tissue cryopreservation for obstructive azoospermia and ejaculatory dysfunction. *J Urol.* 2008;180:2577-80.
  36. Lahav-Baratz S, Rothschild E, Grach B, Koifman M, Shiloh H, Ishai D, Dirnfeld M. The value of sperm pooling and cryopreservation in patients with transient azoospermia or severe oligoasthenoteratozoospermia. *Hum Reprod.* 2002;17:157-60.
  37. 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.
  38. 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.
  39. 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.
  40. 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.
  41. 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.
  42. 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.
  43. 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 Suppl 1:331-7.
  44. 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.
  45. 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.
  46. Levron J, Madgar I, Shefi S, Meirow D, Wiser A, Bider D, Dor J, Raviv G. IVF outcome with cryopreserved testicular sperm. *Andrologia.* 2011;43:48-51.
  47. Wood S, Sephton V, Searle T, Thomas K, Schnauffer K, Troup S, Kingsland C, Lewis-Jones I. 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.
  48. Pasqualotto FF, Rossi-Ferragut LM, Rocha CC, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic injection of epididymal and testicular sperm obtained from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia. *J Urol.* 2002;167:1753-6.
  49. Kallen B, Finnstrom O, Nygren KG, Olausson PO. In vitro fertilization (IVF) in Sweden: risk for congenital malformations after different IVF methods. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2005;73:162-9.
  50. Shih W, Rushford DD, Bourne H, Garrett C, McBain JC, Healy DL, et al. Factors affecting low birthweight after assisted reproduction technology: difference between transfer of fresh and cryopreserved embryos suggests an adverse effect of oocyte collection. *Hum Reprod.* 2008;23:1644-53.
  51. Pinborg A, Loft A, Rasmussen S, Nyboe Andersen A. Danish national controlled cohort study on neonatal outcome of 1267 children born after transfer of cryopreserved IVF and ICSI embryos in 1995 to 2006. In: 24th Annual Meeting of the ESHRE. Barcelona, Spain. *Hum Reprod.* 2008;23:51.
  52. Royer D, Levy R, Mouchel T, Janny L, Monrouvin Z, De Mouzon J. Pregnancy issues after frozen embryo transfer analysis based on 3632 pregnancies follow-up. In: 22nd Annual Meeting of the ESHRE. Prague,

- Czech Republic. *Hum Reprod.* 2006;21:133.
53. Belva F, Henriët S, Van den Abbeel E, Camus M, Devroey P, Van der Elst J. 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.
  54. 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.
  55. 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.* 2010;123:1893-7.
  56. Stensvold E, Magelssen H, Oskam IC. Fertility-preserving measures for boys and young men with cancer. *Tidsskr Nor Lægeforen.* 2011;131:1433-5.
  57. 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.
  58. Milazzo JP, Vaudreuil L, Cauliez B, Gruel E, Massé L, Mousset-Siméon N, Macé B, Rives N. Comparison of conditions for cryopreservation of testicular tissue from immature mice. *Hum Reprod.* 2008;23:17-28.
  59. 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.
  60. Feldschuh J, Brassel J, Durso N, Levine A. Successful sperm storage for 28 years. *Fertil Steril.* 2005;84:1017.