

Sperm motilite bozuklukları: Terminoloji, etioloji ve tedavide yenilikler

Dr. Erdal Alkan, Prof. Dr. M. Murad Başar
Memorial Şişli Hastanesi, Üroloji Bölümü

Sperm motilitesi ile doğal gebelik şansı arasındaki yakın ilişki bilinmesine rağmen, Palermo'nun 1992'de İntra-sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) yöntemini tanımlamasından sonra motilite problemi olan olgularda dahi gebelik elde edilmeye başlanmıştır (1). Bununla birlikte, her ne kadar ICSI endikasyonu ve sonuçları bazal semen analiz parametreleri ile ilişkisi olmasa da ejakülatta motil spermatozoa saptanmayan olgularda ICSI sonrası negatif fertilizasyon ve gebelik sonuçları izlenebilmektedir. Yapılan bir çalışmada, ICSI sonuçları üzerine sayı, motilite ve morfoloji olmak üzere üç temel semen analizi parametresinin etkisi değerlendirildiğinden de en önemli etkenin sperm motilitesi olduğu belirtilmiştir (2).

Testiküler spermier fizyolojik olarak hareketsizdirler. Bu durumun spermierin henüz matürasyonunu tamamlanmamış olması veya Sertoli hüceleri ile olan sıkı bağlantıları ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bedford ve ark. duktuli efferentisten aspire edilen spermierin immotil olduklarını veya salıntı hareketi gösterdiklerini ve bu durumun epididimin başlangıç kısmında da devam ettiğini göstermişlerdir (3). Spermierin progresif hareketleri ilk olarak epididimin korpus bölgesinde izlenmeye başlamakta ve kauda bölgesinde hareketli sperm oranı %50'nin üzerine çıkmaktadır. Yapılan bir çalışmada, kültür ortamında tutulan spermierde hareket oranları spermierin elde edildiği lokalizasyon göz önüne alındığında efferent kanallar, kaput epididimis, proksimal korpus, distal korpus ve kaudada sırası ile %0, %3, %12, %13 ve %60 olarak belirtilmiştir (4). Bu sonuçlar dikkate alındığında, sperm motilitesinin epididimal transit sırasındaki matürasyon ile sağlandığı kabul edilmektedir. Bununla birlikte, motilite ile epididim temas süresi de önemlidir. Yapılan deneysel çalışmalarda kaput epididimiden elde edilen spermier genel olarak immotil iken, epididimin korpus bölgesinde yapılan ligasyon sonrası bu bölgeden alınan spermierde motile izlendiği gösterilmiştir (4). Benzer şekilde konjenital duktus deferens

agenezi (CBAVD) olan olgularda epididimal aspirasyonla distalden alınan spermierde motilite daha düşük olarak izlenirken proksimalden alınan spermierde daha yüksek motilite oranı elde edilmektedir (4). Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, spermatozoanın motilite yeteneğini kazanması esas olarak proksimal epididim ile olan temas süresine bağlı olarak değişiklik göstermektedir.

Sperm kuyruk yapısının anatomisi

Sperm motilitesinin sağlanmasında spermierin dört bölümden oluşan kuyruk yapısı son derece önemli rol oynar.

Spermierin baş ile kuyruk arasında devamlılığını sağlayan bağlantı parçası (connecting piece) yoğun bir fibröz yapıdan oluşur. Sperm matürasyonunun son evresinde proksimal sentriyolden meydana gelir (4,5).

Orta parça (mid piece) enerji için gerekli olan helikseyal dizilmiş mitokondriilerin bulunduğu bölümdür. Bu bölgede ayrıca kuyruk yapısının %50'sini oluşturan dış dens fibröz lifler (outer dense fiber=ODF) yer alır. Çapı distale doğru gittikçe incelen orta parça esas parçaya bağlantıyı sağlayan annulus ile sonlanır (4,6).

Esas parça (principal piece) fibröz kılıf ve aksonemden oluşur. Fibröz kılıf üzerinde enerji düzeni ve hücre sinyalizasyonu ile görevli proteinler (AKAP3, AKAP4 ve TAKAP80) yer almaktadır ve içeride yer alan aksonem ve ODF'yi sarar (4,6). Aksonem spermierin kuyruk hareketinin temelini oluşturan yapıdır. Dışta 9 adet tubulin dimerlerinden oluşan komplet A ve inkomplet B lifleri bulunur. A lifleri nexin adı verilen yapılar ile B liflerine bağlanırlar (Şekil-2). Bu liflerin her biri radyel uzantılar ile santraldeki çifte bağlanır. Santralde ise iki adet A lifi vardır ve birbirine çapraz köprüler ile bağlanmıştır. Flajellanın motoru her iki çiftten çıkan protein yapıdaki iç ve dış dyein uzantıdır. Bu yapılar mikrotübüleri sabitler ve ATP'nin oluşturduğu kimyasal enerjiyi mekanik enerjiye çevirerek hareketi sağlar (4,5).

Son parça (terminal piece) ise sadece 9+2 aksonemal yapıyı içerir; etrafında fibröz kılıf ve ODF yer almaz (4,6).

Aksonemal fonksiyonların düzenlenmesi

Spermatozoa enerjisini oksidatif fosforilizasyon, pentoz fosfat yolu ve glikolizis olmak üzere üç yolla sağlar. Oksidatif fosforilizasyon mitokondride spermin orta parçasında gerçekleşir. En etkin ATP üretimi bu yolla elde edilir. Elde edilen ATP'nin büyük bir bölümü aksonemin yapısındaki dynein kollarında dyneinATPaz'lar tarafından kullanılır. Kuyruğun esas parçası ve son parçasında ise enerji gereksinimini glikolizis ile sağlar (5).

Spermatozoanın motilite kazanmasındaki önemli faktörlerden birisi de epididimde ortaya çıkan metabolik değişimler ve özellikle sperm membranındaki sülfidril gruplarının disülfid bağlarına okside olmasıdır. Ayrıca, epididimal sıvı da bulunan ileri motilite proteini, sperm survival faktör, progresif motilite sağlayıcı madde, sperm motilite inhibe edici madde, asidik epididimal glikoprotein ve EP2-EP3 proteinleri sperm fonksiyonları ve motilitesi için önemli rol oynarlar (4,5).

Terminoloji

Astenozospermi WHO 2010 kılavuzuna göre a (+4) ve b (+3) sperm motilitesinin %32'den az olduğu durumları tanımlar (7).

Total immotil sperm örneği olan olgularda santrifüj ve/veya dansite gradient yöntemi ile sperm hazırlığı sonrası motil spermatozoa izlendiği durumlar "virtual astenozospermi" olarak adlandırılır. Buna karşın, tüm değerlendirmelerde total inmotil sperm varlığı "mutlak astenozospermi" olarak ifade edilir (8,9). "Nekrozospermi" ise %0,2-0,5 oranında nadir izlenen bir durumdur ve hareketsiz gözlenen tüm spermlerin canlı olmadığı durumu ifade eder (9,10).

Astenozospermi etiyojisi

Flagella (kuyruk) patolojileri sperm hareket bozukluklarının en önemli nedenlerindedir. İki türlü sperm kuyruk sorunu tanımlanmıştır: Non-spesifik flagella anomalisi (NSFAs) ve siliyer diskinezi veya fibröz kılıf displazisini içeren genetik kökenli spesifik flagella bozuklukları. Ayrıca, etiyojik faktörler konjenital veya akkiz nedenler olarak da değerlendirilebilir. Akkiz nedenler genellikle NSFAs'ne yol açarlar. Genital enfeksiyonlar, oksidatif stres,

anti-sperm antikorların varlığı, ATP üretimi etkileyen metabolik sorunlar, çevresel toksik ajanlar, epididimal transit zamanının uzaması, uzamış seksüel abstinens veya sperm kriyoprezervasyonu gibi nedenlere bağlı olarak ortaya çıkarlar. Altta yatan etiyojisi düzeltilirse NSFAs düzelir ve spontan gebelik dahi elde edilebilir. Ancak, tedaviye yanıt vermeyen olgularda ICSI alternatif yöntem olarak dikkate alınmalıdır (9, 11).

Konjenital nedenler ise flajellanın yapısal bozukluklarını içerir (9,11). Spermatozoa flagella yapısı başta solunum sistemi olmak üzere diğer siliyer hücreler ile aynı özellikleri taşırlar. Dolayısı ile sperm motilite bozuklukları sıklıkla üst solunum yolu hastalıkları ile birliktelik göstermektedir. Bu nedenle sık sinüzit atakları ve/veya trakeobronşit öyküsü olan infertil erkeklerde sperm motilitesi yönünden dikkatli inceleme gereklidir.

İmmotil siliya sendromu ilk defa Afzelius tarafında 1976 yılında tanımlanmıştır (12). Siliyer hücreler ve spermatozoanın mikrotübül yapısının defekti ile karakterli bu durum otozomal resesif geçişlidir ve günümüzde Primer Siliyer Diskinezi (PCD) olarak adlandırılmaktadır. Dynein kolların parsiyel veya total yokluğundan fibröz kılıf yapısındaki bozukluklara kadar değişik çeşitleri vardır. Bu hastalarda ejakülat volümü ve sperm sayısı normaldir. Ancak, semen analizinde hareket bozukluğu ile birlikte belirgin morfolojik defektler vardır. Kısa, kalın, düzensiz veya disorganize flajella yapısı gözlenir. Eşlik eden diğer yapısal bozukluklar içinde genellikle "pin-head" olarak da adlandırılan dekapite veya asefalik spermatozoalar ve abaksiyel implantasyon olarak ifade edilen baş-kuyruk bileşim defektleri de yer almaktadır (9,13,14).

Sperm fonksiyonel bozukluğuna yol açan sorunlardan bir diğeri de sperm mitokondri bozukluklarıdır. Sayısal bozukluklar, irregüler organizasyon, kısa veya uzun mitokondriyal kılıf anomalileri ve artmış matriks yoğunluğu veya lipid içerikleri bu sorunlardan bazılarıdır. Bu durum semen analizinde orta parça defekti olarak ifade edilir (15,16).

Testiküler spermatozogenez sırasında annulus migrasyonundaki bozukluk orta parçada mitokondri yokluğu ve dışarıdaki yoğun liflerin yapısal değişimine neden olur. Yapısal bozukluk 9+2 aksonemal düzenin olması durumudur. Aksonem yapısı 9+0 şeklinde orta liflerin yokluğu veya iç ve dış dynein bağlarının olmaması ile kendini gösterir. Tanı elektron mikroskopu (EM) ile bu bozuklukların

ortaya konulması ile sağlanır (9, 11).

Olguların %20'sinde genetik faktörlerin rol oynadığı belirtilmektedir. Farelerde sperm flagella mikrotübül sentezi ile ilişkili proteinleri kodlayan 200'den fazla gen olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte bugüne kadar dynein yapısının oluşumunu kontrol eden AKAP4 geni ve proteinlerde veya sperm kuyruk yapısı ile ilişkili diğer noktalarda herhangi bir genetik sorun net olarak ortaya konulmamıştır (17-19).

Nekrozoospermi çevresel faktörler veya kalıtsal yapısal durumlardan kaynaklanır. Reaktif oksijen ürünleri (ROS) gibi maddeler hücre içine penetre olabilir ve DNA hasarına yol açabilirler. Diğer taraftan ürogenital enfeksiyonlar, kronik prostatit, hipogonadotropik hipogonadizm gibi hormonal sorunlar, anti-sperm antikör varlığı, uzamış ejakülasyon periyodu, hipertermi, Ca in-stu, ileri yaş, toksik ve kimyasal maddelere maruziyet nekrozoosperminin diğer nedenleridir (9). Bu olguların detaylı değerlendirilmesi önerilmektedir. Çünkü, önemli bir bölümü tedavi ile düzelebilmektedir. Ayrıca, bu olgularda ejakülatta canlı sperm izlenmezken testiste canlı sperm elde edilebilmektedir.

Astenozoospermili olgularda değerlendirme

Hastalardan dikkatli anamnez alınarak etiolojide neden olabilecek faktör ortaya konulmalıdır. Öyküde ailede de benzer olguların olduğu saptanır. Solunum yolu enfeksiyonları başta olmak üzere eşlik eden patolojiler dikkatlice değerlendirilmelidir. PCD adult polikistik böbrek hastalarında sıklıkla izlenir. Hormonal değerlendirmede serum FSH düzeyi normal olgulara göre bir miktar daha yüksek izlenmektedir ve bu durum testiste spermatogenezde bir sorun olduğunun göstergesidir (9,11).

Tanıda mutlaka ardışık ejakülat ile semen analizi yapılmalı; cinsel perhiz süresine dikkat edilmeli ve ejakülatın 370C'de inkübe edilmesine özen gösterilmelidir. İnceleme 60 dk, tercihan 30 dk. içinde yapılmalıdır (7). Hazırlık sonrası motilite incelemesi IVF/ICSI kararının değerlendirilmesi için önemlidir. Geçmişte uygulanan servikal mukus penetrasyon testleri, kumulus penetrasyon testleri gibi testlerin günümüzde fazla önemi yoktur. Motilitenin incelenmesinde CASA yöntemi ile spermatozoanın hızı da değerlendirilebilir (20).

Mutlak astenozoospermi olgularında nekrozoospermi ayrımının yapılması önem taşımaktadır. WHO 2010 kılavuzuna göre sperm motilitesi %40'dan az olan olgularda

canlılığı değerlendirmek için sperm membran bütünlüğünü değerlendiren testlerin yapılması önerilmektedir (7). Bu testlerden en yaygın kullanılanı Eosin-Y testidir. Eosin boyası ile membran yapısı bozulmuş spermelerde spermin baş kısmını boyar. Ölü spermeler bu boyayı içlerine alırlar ve baş bölgelerinde kırmızı veya koyu pembe boyanma izlenir. Buna karşın membran yapısı sağlam olan canlı spermeler boyayı almaz ve parlak-beyaz olarak görülürler (7, 21).

İlk defa 1984 yılında Jeyendran tarafından tanımlanan Hipoosmolar Şişme Testi (HOST testi) WHO tarafından boyama yöntemlerine alternatif olarak önerilmektedir (7,22). Çünkü, bu test sonrası canlı olduğu ortaya konulan spermelerin üremeye yardımcı yöntemlerde kullanılma imkanı vardır. ICSI için sperm seçiminde HOST testi ilk kullanımı Desmet tarafından tanımlanmıştır (23). Daha sonra Casper ve ark. inmotil spermeler ile yapılan ICSI'de HOST testini kullandıklarında fertilizasyon ve kilivaj oranlarını sırası ile %43 ve %39 bulmuşlardır (24). Bu oranlar rastgele seçilmiş spermelerde sırası ile %26 ve %23'dür. HOST testi taze spermde canlılığın değerlendirmesinde etkin bulunmasına rağmen, freezing/thawing sonrası sperm canlılığını değerlendirmede yeterli değildir.

Geçmişte kullanılan sperm kuyruğuna ICSI pipeti ile yapılan mekanik temas veya lazer ile yapılan temas sonrası hareketliliğin değerlendirilmesi yöntemleri günümüzde yeri yoktur (25, 26).

Spermatozoanın yapısal bozukluğunun ortaya konulabilmesi için elektron mikroskopik inceleme önerilmektedir. Bu yöntemle sperme ait yapısal defekt daha net ortaya konulabilmektedir.

Astenozoospermili olgularda üremeye yardımcı teknikler ve laboratuvar işlemleri

Hücre içi cAMP konsantrasyonunun sperm motilitesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir ve bu konuda yapılmış pek çok çalışma vardır (27-29). Pentoksifilin (PTX) intraselüler cAMP düzeyini artırarak sperm motilitesini etkilemektedir. Deneysel çalışmalarda, PTX ile muamele edilmiş spermelerle yapılan işlemlerde fertilizasyon oranları (FR) ve blastokist formasyonu düşük bulunmamış; ancak oosit PTX ile muamele edilmişse bu oranlar daha düşük saptanmıştır (30). PTX'in embryo üzerine toksik etkileri gösterilmiş olmasına rağmen, PTX uygulaması sonrası sperm yıkama ile bu etkileri uzaklaşmaktadır (31). Terriou ve ark. kısa süreli PTX uygulaması sonrası sperm yıkaması

yapılırsa ICSI sonrası klivaj oranları, gebelik oranı (PR) ve implantasyon oranı (IR) sırası ile %95.4, %30.6 ve %12,3 olarak belirtmişlerdir. Bu nedenle astenozoospermili olgularda sperm motilitesinin artırılması amacıyla PTX uygulaması uzun zamandır kullanılmaktadır (32).

Teofilin de benzer mekanizma ile etki göstermekte olup, PTX'e üstünlüğü toksik etkisinin olmamasıdır. Diğer taraftan teofilin ile işleme alınmış spermatozoalarda mikroenjeksiyon öncesi yıkama gerektirmemesi bir diğer avantajdır. Teofilin uygulaması genelde sperm freezing işlemlerinde dondurma öncesi motilitenin korunması veya çözme sonrası motilitenin tekrar yüksek oranda sağlanması amacı ile yapılmaktadır. Bu konuda yapılan çalışmalarda, fertilizasyon ve gebelik oranları sırası ile %79,9 ve %53,9 olarak bildirilmiştir (33).

Son yıllarda polarize mikroskop ile sperm değerlendirilmesinde spermin baş ve orta bölgesinde birefring incelemesini sağlıklı sperm yapısı olarak tanımlamıştır (34). Bu yöntemle seçilen spermle yapılan ICSI uygulamasında gebelik oranlarını %46 olarak bildirilmiştir (35). Crippa ve ark. ise bu yöntem ile intakt DNA yapısı olan sperm seçiminin yapılabildiğini belirtmişlerdir (36). Bununla birlikte bu konuda daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Nekrozoospermi olan olgularda testiküler sperm kullanımı önerilen yaklaşımdır. Yapılan çalışmalar, testiküler sperm kullanımında elde edilen sonuçların daha iyi olduğunu ortaya koymaktadır. Diğer taraftan testisten elde edilen spermilerin erken dönemde immotil oldukları da

bilinmektedir. Bu nedenle testiküler spermilerin öncelikle canlılıklarının değerlendirilmesi sonrasında da motilte kazanmaları için PTX veya teofilin ile inkübe edilmeli önerilmektedir. Motil ve immotil spermle yapılan ICSI uygulamalarında implantasyon ve gebelik oranları farklı olmasa da fertilizasyon oranı motil testiküler spermle yapılan uygulamalarda daha yüksektir (37-39).

Immotil spermle yapılan ICSI uygulamalarında fertilizasyon ve gebelik oranları sırası ile %3-76,4 ve %0-38,3 arasında değişmektedir (29, 40, 41). Testiküler spermle yapılan uygulamada ise bu oranlar sırası ile %66 ve %38,3 olarak bildirilmiştir (29).

Sonuç olarak, astenozoospermi erkek infertilitesinde gerek doğal gebelik şansını gerekse yardımcı üreme tekniklerini sonuçları etkileyen önemli bir sorundur. Etiyolojik olarak enfeksiyonlara bağlı tedavi edilebilir durumlardan, PCD'nin eşlik ettiği konjenital faktörlere kadar geniş etkenlere bağlı olarak ortaya çıkan astenozoospermili olgular yardımcı üreme teknikleri uygulanmadan önce dikkatlice değerlendirilmelidir. Hem etiyolojik faktörün net olarak ortaya konulması ve tedavisi, hem de astenozoospermi ve eşlik eden yapısal defektlerin saptanması sonrası gerek yapılacak tedavi gerekse sperm fonksiyonunu iyileştirmeye yönelik ek laboratuvar teknikleri veya uygulamada kullanılmak üzere gerekirse cerrahi yolla sperm eldesi yardımcı üreme tekniklerinde elde edilecek başarı oranını artıracaktır.

Kaynaklar

- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*. 1992 Jul 4;340(8810):17-18.
- Nagy ZP, Liu J, Joris H, Verheyen G, Tournaye H, Camus M, Derde MC, Devroey P, Van Steirteghem AC. The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum Reprod*. 1995 May;10(5):1123-1129.
- Bedford JM. Components of sperm maturation in the human epididymis. *Adv Biosci*. 1973;10:145-155.
- Turek JP. Male Reproductive Physiology. In: Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA. *Campbell Urology*, Philadelphia, Saunders, 2013; 591-615.
- Cooper TG, Yeung C. Physiology of sperm maturation and fertilization. In: Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S. *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction*, Berlin, Springer-Verlag, 2010; 61-85.
- Altay B. Sperm motilite bozuklukları ve tedavisi. Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman MÖ, Usta MF, Kendirci M. *Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi*. İstanbul, Türk Androloji Derneği, 2004; 264-282.
- WHO Manual for the Examination & Processing Of human semen (2010), Fifth Edition
- Vandervorst M, Tournaye H, Camus M, Nagy ZP, Van Steirteghem A, Devroey P. Patients with absolutely immotile spermatozoa and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1997 Nov;12(11):2429-2433.
- Ortega C, Verheyen G, Raick D, Camus M, Devroey P, Tournaye H. Absolute asthenozoospermia and ICSI: what are the options? *Hum Reprod Update*. 2011 Sep-Oct;17(5):684-692. doi: 10.1093/humupd/dmr018. Epub 2011 Aug 3.
- Ahmadi A, Ng SC. Developmental capacity of damaged spermatozoa. *Hum Reprod* 1999; 14: 2279-2285.
- Chemes HE, Seda CA. Tales of the tail and sperm head aches. Changing concepts on the prognostic significance of sperm pathologies affecting the head, neck and tail. *Asian J Androl* 2012; 14: 14-23.
- Azfelius BA. A human syndrome caused by immotile cilia. *Science* 1976; 193:317-319.
- Chemes HE, Puigdomenech ET, Carizza C, Olmedo SB, Zanchetti F, Hermes R. Acephalic spermatozoa and abnormal development of the head-neck attachment: a human syndrome of genetic origin. *Hum Reprod*. 1999 Jul;14(7):1811-1818.
- Chemes HE, Olmedo SB, Carrere C, Osés R, Carizza C, Leisner M, Blaquier J. Ultrastructural pathology of the sperm flagellum: association between flagellar pathology and fertility prognosis in severely asthenozoospermic men. *Hum Reprod*. 1998 Sep;13(9):2521-2526.
- Folgero T, Bertheussen K, Lindal S, Torbergsen T, Oian P. Mitochondrial disease and reduced sperm motility. *Hum Reprod*. 1993 Nov;8(11):1863-1868.
- Rawe VY, Hermes R, Nodar FN, Fiszbajn G, Chemes HE. Results of

- intracytoplasmic sperm injection in two infertile patients with abnormal organization of sperm mitochondrial sheaths and severe asthenozoospermia. *Fertil Steril.* 2007 Sep;88(3):649-653. Epub 2007 May 4.
17. Chames He, Rawe VY. Sperm pathologia step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Hum Reprod Update* 2003; 9:405-428.
 18. Turner RM, Musse MP, Mandal A, Klotz K, Jayes FC, Herr JC, Gerton GL, Moss SB, Chemes HE. Molecular genetic analysis of two human sperm fibrous sheath proteins, AKAP4 and AKAP3, in men with dysplasia of the fibrous sheath. *J Androl.* 2001 Mar-Apr;22(2):302-315.
 19. Baccetti B, Collodel G, Estenez M, Manca D, Moretti E, Piomboni P. Gene deletions in an infertile man with sperm fibrous sheath dysplasia. *Hum Reprod.* 2005 Oct;20(10):2790-2794. Epub 2005 Jun 24.
 20. Cooper TG. Semen analysis. In: Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S. *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction*, Berlin, Springer-Verlag, 2010; 125-154.
 21. Eliasson R. Semen analysis with regard to sperm number, sperm morphology and functional aspects. *Asian j Androl* 2012; 12: 26-32.
 22. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil.* 1984 Jan;70(1):219-228.
 23. Desmet B, Joris H, Nagy Z, Liu J, Bocken G, Vankelecon A, Van Ranst H, Devroey P, Van Steirteghem A. Selection of vital immotile spermatozoa for intracytoplasmic injection by the hypoosmotic swelling test. *Hum. Reprod.* 1994; 9: 24.
 24. Casper RF, Meriano JS, Jarvi KA, Cowan L, Lucato ML. The hypo-osmotic swelling test for selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection in men with complete asthenozoospermia. *Fertil Steril.* 1996 May;65(5):972-976.
 25. Soares JB, Glina S, Antunes N Jr, Wonchockier R, Galuppo AG, Mizrahi FE. Sperm tail flexibility test: a simple test for selecting viable spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection from semen samples without motile spermatozoa. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.* 2003 Sep-Oct;58(5):250-253. Epub 2003 Nov 11.
 26. Aktan TM, Montag M, Duman S, Gorkemli H, Rink K, Yurdakul T. Use of a laser to detect viable but immotile spermatozoa. *Andrologia.* 2004 Dec;36(6):366-369.
 27. Ward A, Clissold SP. Pentoxifylline. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. *Drugs.* 1987 Jul;34(1):50-97.
 28. Nassar A, Morshedi M, Mahony M, Srisombut C, Lin MH, Oehninger S. Pentoxifylline stimulates various sperm motion parameters and cervical mucus penetrability in patients with asthenozoospermia. *Andrologia.* 1999 Jan;31(1):9-15.
 29. Kovacic B, Vlaisavljevic V, Reljic M. Clinical use of pentoxifylline for activation of immotile testicular sperm before ICSI in patients with azoospermia. *J Androl.* 2006 Jan-Feb;27(1):45-52.
 30. Yovich JL. Pentoxifylline: actions and applications in assisted reproduction. *Hum Reprod.* 1993 Nov;8(11):1786-1791.
 31. Yovich JM, Edirisinghe WR, Yovich JL. Effect of pentoxifylline on mouse embryos. *Hum Reprod.* 1994 Mar;9(3):566.
 32. Terriou P, Hans E, Giorgetti C, Spach JL, Salzmann J, Urrutia V, Roulier R. Pentoxifylline initiates motility in spontaneously immotile epididymal and testicular spermatozoa and allows normal fertilization, pregnancy, and birth after intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet.* 2000 Apr;17(4):194-199.
 33. Ebner T, Tews G, Mayer RB, Ziehr S, Arzt W, Costamaling W, Shebl. Pharmacological stimulation of sperm motility in frozen and thawed testicular sperm using the dimethylxanthine theophylline. *Fertil Steril.* 2011 Dec;96(6):1331-1336. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.08.041. Epub 2011 Sep 29.
 34. Baccetti B. Microscopical advances in assisted reproduction. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 2004 Jul-Oct;36(3-4):333-339.
 35. Ghosh S, Chattopadhyay R, Bose G, Ganesh A, Das S, Chakravarty BN. Selection of birefringent spermatozoa under Polscope: effect on intracytoplasmic sperm injection outcome. *Andrologia.* 2012 May;44 Suppl 1:734-738. doi: 10.1111/j.1439-0272.2011.01258.x.
 36. Crippa A, Magli MC, Paviglianiti B, Boudjema E, Ferraretti AP, Gianaroli L. DNA fragmentation and characteristics of birefringence in human sperm head. *Hum reprod* 2009; 24:i95:0-234.
 37. Devroey P, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Silber SJ, Van Steirteghem AC. Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1994 Sep;62(3):639-641.
 38. Tournaye H, Liu J, Nagy Z, Verheyen G, Van Steirteghem A, Devroey P. The use of testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection in patients with necrozoospermia. *Fertil Steril.* 1996 Aug;66(2):331-334.
 39. Kahraman S, İşik AZ, Vicdan K, Özgür S, Özgun OD. A healthy birth after intracytoplasmic sperm injection by using immotile testicular spermatozoa in a case with totally immotile ejaculated spermatozoa before and after Percoll gradients. *Hum Reprod.* 1997 Feb;12(2):292-293.
 40. Ron-El R, Strassburger D, Friedler S, Komarovskiy D, Bern O, Raziel A. Repetitive ejaculation before intracytoplasmic sperm injection in patients with absolute immotile spermatozoa. *Hum Reprod.* 1998 Mar;13(3):630-633.
 41. Vandervorst M, Tournaye H, Camus M, Nagy ZP, Van Steirteghem A, Devroey P. Patients with absolutely immotile spermatozoa and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1997 Nov;12(11):2429-2433.