

# SPERM KRİYOPREZERVASYONU

Dr. Mehmet CINCIK (\*)

Gülhane Tıp Dergisi 45 (1) : 100 -106 (2003)

## ÖZET

Günümüzde infertil (kısır) popülasyonun %40'ında erkek faktörünün sebep olduğu bilinmektedir. 1992'de ilk mikroenjeksiyon uygulaması ile beraber erkek infertilitesine çözüm arayışları için yardımcı üreme tekniklerinde baş döndürücü gelişmeler olmakla birlikte gebelik başarısı henüz istenen düzeye ulaşamamıştır. 1995'te azospermik erkeklerden cerrahi yöntemlerle testiküler sperm alınarak kullanılmaya başlanması, ayrıca batı ülkelerinde uygulanan donör programları, spermin dondurularak saklanması zorunlu hale getirmiş ve bu konudaki tekniklerin gelişmesine de ivme kazandırmıştır. Spermin dondurularak saklanması hem üremeye yardımcı tedavilerdeki başarıyı %10 nispetinde arttırmış, hem de kemoterapi-radyoterapi, testis cerrahisi v.b.'den önce, gelecekteki fertilitenin korunmasına katkıda bulunmuştur. Bu derlemede amaçlanan, ejakülat spermi ve testiküler spermlerin dondurularak saklanma endikasyonları ve teknikleri hakkında bilgi vermek ve gelecekteki fertilitenin nasıl korunabileceğinin ipuçlarını göstermektir.

**Anahtar Kelimeler:** Sperm, Kriyoprezervasyon, Yardımcı Üreme.

## SUMMARY

### Sperm Cryopreservation

Nowadays, it's known that 40% of reasons for the infertile population consists of the male factor. Since 1992, when the first microinjection was applied, although amazing improvements have been done for treating the male infertility, the pregnancy rate hasn't reached the desired level. Starting the use of testicular sperm aspiration with surgical techniques from azospermic males in 1995 and the donor programmes applied in the western countries have caused the cryoconservation of the sperm to be an obligation and led an acceleration in the improvements of the techniques used. The cryopreservation

of the sperm has increased the success in the assisted reproduction treatments by 10% and also has helped the conservation of the 'future fertility' before the application of procedures like radio-chemotherapy, testicular surgery i.e. The aim of this article is to give knowledge about the indications and techniques in cryopreserving ejaculatory and testicular sperm and to show the key points of how future fertility should be saved.

**Key Words:** Spermium, Cryopreservation, Assisted Reproduction.

## TARİHÇE

Sperm dondurma işlemi ilk defa 1949'da Polge ve arkadaşları tarafından gliserol kullanılarak başarılmış, kriyokoromalı insan donör semeni ile artifisyel donör inseminasyonu (AID) ile gebelik sonrası ilk doğum raporu 1954'de Bunge ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır (1,2,3).

1972'de Whittingam ve arkadaşları ilk defa memeli embriyolarını dondurup çözerek transfer etmiş ve gebelik bildirmişlerdir. İnsanda dondurulup çözülmüş embriyo transferi ile ilk gebelik 1983'te Trounson ve arkadaşlarınınca başarılmıştır (4). 1985'de de dondurulmuş blastosistten ilk canlı doğum gerçekleşmiştir. (Cohen S. ve arkadaşları) ]. 1997'de Cohen ve arkadaşları tek bir sperm ya da çok az sayıdaki spermi boş zona (empty zona) içinde dondurdu (5). 1998'de Montaj M. ve arkadaşları ise bunu biraz modifiye ederek, zonayı lazerle delip tek spermi dondurduktan sonra (single sperm freezing) bunu vital Hoechst 33258 boyası ile boyayarak test edip kullandılar.

## GİRİŞ

Bütün bu gelişmeler, doğal olarak, infertil çiftlerin %40-50'sinin etyolojisinde yer alan erkek faktörüne çözüm arayan Yardımcı Üreme Tekniklerinde (YÜT) (Assisted Reproduction Techniques-ART) çalışanların ilgi odağı olmuştur.

Günümüzde, erkek faktörünün tedavisinde kullanılacak sperm freezing kriterlerinde henüz bir üniformite sağlanamamış olmakla birlikte, bazı konservatif ülkeler hariç birçok Avrupa ülkesi ve Amerika'da özellikle terapötik donör inseminasyonunun (TID) ve heterolog fresh ya da dondurulup çözülmüş sperm (frozen-thawed sperm) ile intrasito-

(\*) GATA T. Histoloji ve Embriyoloji AD.

Reprint Request: Dr. Mehmet CINCIK, GATA T. Histoloji ve Emb. AD. 06108 Etlik/ANKARA

Kabul Tarihi: 29.1.2003

plazmik sperm enjeksiyonu (ICSI)'nin da serbest olması dolayısıyla dondurarak sperm saklamanın YÜT'de klinik sonuçları iyileştirdiği bildirilmektedir (6,7).

Bugün ovaryan korteksin ve testis dokusunun kriyoprezervasyonu ile artık fertilitenin dondurulması tartışılmakla birlikte, kriyotekniklerin hiçbiri henüz optimal düzeyde değildir.

## SPERM KRİYOPREZERVASYON ENDİKASYONLARI

1. Şiddetli oligospermide ya da virtual azospermide havuzlamak için (pooling):

Peşpeşe birkaç masturbasyon ile elde edilen spermelerin dondurulması ve yeterince ejakülat toplanınca hepsini birlikte eritip swim-up v.b. bir yöntemle konsantre ederek mevcut şiddetli oligospermideyi kompanse etme amacını güder.

- Ejakülatın split-fraksiyonunun havuzlanması önerilmektedir.

2. Sperm örneği vermede güçlük, ya da erkeğin yardımcı üreme tekniği uygulama günü gelemeyecek olması,

3. Donör inseminasyon programlarında AID veya ICSI için (Türkiye'de yasal değildir) fresh yerine dondurulmuş sperm kullanılması (donörler o gün hastane koridorunda karşılaşmayı psiko-sosyal bir problem olarak yaşamaktadır) (8,9).

Ayrıca, bu donör programları ile, HIV, Hepatit B ve C virüsleri açısından donör testleri yapılmış olsa da, bu testlerin henüz inkübasyon periyodunda yapılmış olmasından dolayı negatif çıkması olasılığına karşı, 6 ay sonra markerlara yeniden bakıldıktan sonra inseminasyonun yapılması avantajı olabilmektedir. Ayrıca, koca genetik geçişli bir hastalık açısından risk altında ise yine donör kullanılmaktadır. Esas olarak donör kullanımının serbest olduğu ülkelerde sperm bankalarına bağışlanan spermelerin kullanılması bu şekilde pratik bir hale gelmektedir (8,10,11,12).

4. Fertilite profilaksisinde: (Pretherapy semen cryopreservation)

a. Kemoterapi veya radyoterapiden önce; testis tümörleri, lösemi ve lenfomalar v.b.

b. Testis cerrahisi öncesinde,

A- Total ya da partial orşiektomi

B- Vazo-vazostomi, vazo-epididimostomi, bazen varikosektomiden önce kullanılmaktadır (8,9,10,13).

c. Spinal kord injury, seksüel disfonksiyon, ejakülatuar hastalıklarda, elektroejakülatör ile sperm elde edilmişse uygulanmaktadır (13).

d. Spermatogenezi bozmakla suçlanan ilaçların zorunlu kullanımı sözkonusu ise kullanılmaktadır (13,14);

a. Nitrofurantoin

b. Simetidin

c. Sulfasalazin

d. Alkol, nikotin, koksin, marihuana, kafein gibi.

Ayrıca Ca<sup>++</sup> kanal blokörlerinin sperm membran fonksiyonlarını bozdukları ve fertilizasyon kapasitesini azalttıkları öne sürülmektedir.

e. Sporcuların sık kullandıkları anabolizan ilaçların (Androjenik komponenti negatif feed-back yolu ile hipofiz bezi üzerinden, hidrojen salınmasını engelleyerek) intraselüller testosteron sentezini azaltarak spermatogenezi araste kadar götürebildikleri bildirilmektedir. Zira, sperm üretimi için eksojen değil intraselüller testosteron gerekmektedir (8,10,14,15).

Testis neoplazileri ve lenfomalı hastaların % 60'ında, zaten oligospermi görülmektedir. 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 spermelerin dondurulması gelecekteki fertilitenin korunması açısından önem taşımaktadır (13,14,16,17,18).

Mikroepididimal sperm aspirasyonu (MESA) ve testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) süpernatantlarının da dondurulması ile bu dondurma spektrumu gün geçtikçe genişlemektedir (10,19,20,21).

Dondurarak saklamanın yeterince anlaşılabilmesi için kriyobiyojinin temel prensiplerine kısaca göz atmak yararlı olacaktır : (7,13,22)

## KRİYOBİYOLOJİNİN TEMEL PRENSİPLERİ

1. Dondurularak spermelerin önce kriyoprotektan maddelerle bir araya getirilerek DENGELENMESİ,

2. Belirli bir hızla soğutulularak, sıvı nitrojen içinde DEPOLANMASI,

3. ÇÖZÜLME aşamasında dilüsyon ile kriyoprotektanların ortamdaki uzaklaştırılması ve gelişimlerine izin verecek fizyolojik solüsyonlar içerisine alınması esasına dayanır.

Bütün bu işlemler yapılırken;

- Hücre hasarı minimal olmalıdır

- Hücrenin yapısal bütünlüğü ve fonksiyonel özellikleri korunmalıdır

- İdeal olanı, -196 °C'da sıvı nitrojenle saklamaktır. Ancak - 80 °C - 196 °C arasında daha kısa süre saklanabilir. (( 2 ay)

- - 130°C'ın altında artık çok az ATP harcanır.

- 37°C'dan 7 °C'a indiğinde hücredeki enzim reaksiyonları çok azalır.

- 0-5 °C arasında hücre içi birçok reaksiyon stabilize olur (13,14,17,22,23,24,25).

Dondurma işleminde, damla damla kriyoprotektan eklenmiş spermiler - 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 sebeple hücreden dış 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 intraselüler kristal oluşumu en aza indirilmiş olur (13,22,23, 24,26,27).

Genel prensip olarak, tedricen dondurma sayesinde, zamanla, kriyoprotektanın hücre içine geçişi ve dengenin yeniden kurulması ile hücre tekrar eski büyüklüğüne döner (28).

• İşte, hücreler (spermium ya da embriyolar) tedricen değil de, aniden dondurulursa, hücre dışına su aktarımı ani ve fazla olacağından hücre içi ile dışı arasındaki dengelenme için yeterli zaman kalmaz ve zarda ozmotik rüptür olur. Tam tersine, hızlı değil de, yavaş çözülsünce bu defa, intraselüler buz kristalleri birbirleriyle birleşip büyüyebilir. O nedenle hızlı çözme tercih edilerek buz kristallerinin hücrede etkili olabileceği süre en aza indirilmiş olmalıdır (15,18, 22,26,28).

### KRİYOİNJURY (HÜCRE HASARI)

Sperm freezing esnasında, dondurma ve özellikle çözme anı kritiktir ve ozmotik rüptür ile hücre zarı hasarı en çok bu sırada olur. O yüzden yavaş soğutma, hızlı çözme tercih edilir. Depolama sırasında hücreler bir zarar görmez. Hasar en çok işlem sırasında aşağıdaki sebeplerle oluşur:

Kriyoinjürinin sebepleri;

- İntra sellüler buz kristallerinin oluşumu
- Aşırı dehidratasyon
- PH değişiklikleri
- Protein denatürasyonu

Ayrıca bu sırada kriyoprotektanların hücre içine geçişlerini etkiledikleri için:

- Konsantrasyon farkı
- Ortam ısısı
- Hücre yüzeyinin hücre hacmine oranı
- Hücre zarının geçirgenliği
- Kriyoprotektanın niteliği
- Membran biyokimyası, permeabilitesi, stabilitesi ve integritesi de önemlidir. Hatta genetik faktörler bile tartışmaya açılmıştır.

Kriyoprotektif maddenin kendisinin yol açabileceği veya lizozomal enzimlerin serbestleşmesi ve aktiflenmesi ile meydana gelebilecek toksik hasarları da saymak gerekir. Hasara yol açan etkilerin ilk plan-daki hedefi hücre zarıdır. Ayrıntılı elektron mikroskoptik analizleri bunun için inandırıcı kanıtlar getirmişlerdir. Bu işlemle gözlenebilen yapısal membran değişiklikleri, protrüzyonlardan, dalgalanmalardan ve vezikülasyonlardan, stoplazma içeriğinin dışarı çıktığı membran kayıpları, yırtılmaları ve erimeleri gibi membran bütünlüğünün bozulduğu ağır harabiyete kadar gidebilir. Biyokimyasal yöntemlerle spermallerdeki intraakrozomal penetrasyon enzimlerinin (hyaluronidaz, akrozin gibi) kaybı gösterilebilir (22,28,29).

### KRİYOPROTEKTANLAR

#### A. İntrasellüler (permeabl) ajanlar

Gliserol, 1-2 propanediol, DMSO, ProH (Propilen glikoller). Bunlar intraselüler buz kristalleri oluşumunu -40°C'a kadar düşürürler. Ayrıca hücreyi solüsyonun toksik etkilerinden korurlar (22,29,30).

#### B. Ektrasellüler (non-permeabl) ajanlar

Sükroz, glukoz, hekzoz gibi sakrolitler ozmotik basınç değişikliğine karşı zarı korurlar. Çözme döneminde hücrenin aşırı şişmesini önlerler.

Sperm freezing işleminde intraselüler ajan olarak % 5-15'lik gliserol, ekstrasellüler ajan olarak sükroz tercih edilmektedir (28).

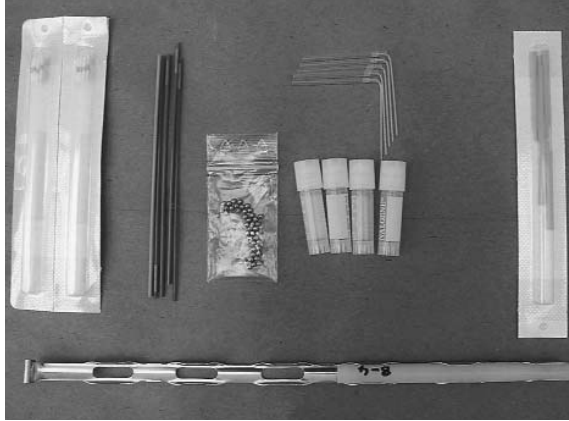
Sükroz büyük bir moleküldür ve permeasyon gösteremez. Bu sebeple de soğutma işlemi sırasında ozmotik olarak dehidratasyonu başlattığı gibi, çözme işlemi esnasında da hücrenin lizisini önler, konsantrasyon farkı ile intraselüler kriyoprotektanın hücre içinden uzaklaşmasını sağlar (22,28,30,31,32).

Ayrıca kriyoprotektan dışındaki gerekli ekipman şunlardır;

1. Dondurulacak hücreler için taşıyıcılar
  - a. Straw
  - b. Vial
  - c. Ampul
2. Biyolojik dondurucu (opsiyonel)
  - a. Planer
  - b. CT Erlangen v.b.

## Sperm Kriyoprezervasyonu

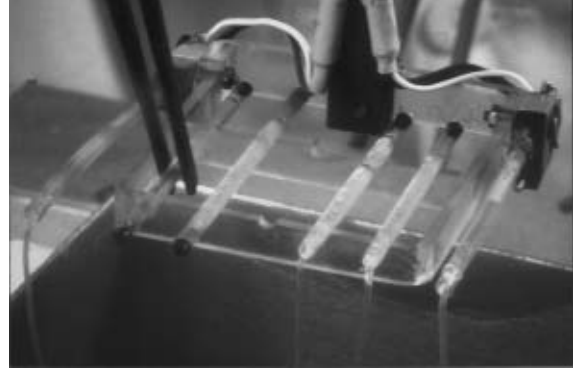
3. Dondurma işlemi için sıvı azot buharı ve sıvı azot (NH<sub>2</sub>)
4. Depolamak için sıvı azot tankı.



Resim-1 : Kriyoprezervasyon için gerekli sarf malzemeleri; soldan sağa şeffaf ministraw, ministraw, metal küre, polistren vial ve L ministraw, ministraw tıkaçı. Altta vial ve strawların muhafaza edileceği goblet görülmektedir.



Resim - 2: Otomatik biyolojik dondurucu (Planar Serial 10).



Resim-3 : Sıvı azot buharına tutmaya yarayan ızgara ve üzerinde strawlar.

Çözdükten sonra, motilitenin korunması açısından kullanıma hazır solüsyonlardan aşağıda içerikleri yazılı "test yolk buffer", "Sperm freeze medium"a göre daha başarılı bulunmuştur. Ticari formları kullanılmak istenmezse kriyoprotektif medium hazırlanabilir, ancak uzun bir prosedürü vardır (29).

Aşağıda bazı kriyoprotektanların içerikleri verilmiştir;

### Test Yolk Buffer

- %12 v/v gliserol
- %20 yumurta akı (56° ısıda 30 dk. inaktive edilmiş)

- 1.000 ünite Penisilin-G

- 1.000 µg/mL Streptomisin Sülfat

### Sperm Freezing Medium

- Modifiye Tyrodes solüsyonu, sükröz, glukoz ve sodyum laktat içeren HEPES buffer

- Gliserol
- Human Serum Albumin
- Penisilin (50.000 IU/I)
- Streptomisin (50mg/l)

## YÖNTEMLER

### I. SPERM DONDURMA PROSEDÜRÜ:

A. (Slow Rate Freezing) Manuel olarak azot buharında dondurma:

En kolay, en çabuk ve en çok tercih edilen yöntemdir. Manuel olarak yapılan bu işlemler için;

1. Önce kriyoprotektan medium (Test Yolk Buffer, Sperm Freze v.b.) derin dondurucudan çıkarılarak 30' süreyle bekletilip oda sıcaklığına getirilir.

2. Silinmez cam kalemi ile, straw ya da viallere hastanın adı soyadı ve konulacağı yerin numarası yazılır. Aynı bilgiler dondurarak saklama defterine işlenir.

3. Uygun bir kaba sıvı nitrojen konularak dondurulacak örnek ile sıvı nitrojen arasında ~ 8 cm. olacak şekilde ızgara ayarlanır.



4. Dondurulacak spermin, volümü, konsantrasyonu, motilitesi, progresyonu ve vitalitesi değerlendirilerek freezing defterine işlenir. Tank numarası, canister numarası, cane numarası, straw ya da vial ya da ampul sayısı kaydedilir.

5. Sperm eşit miktarlarda tüplere (Falcon 2003 gibi) aktarılır. Freezing solüsyonundan üzerlerine damla damla ve yavaş olarak eklenerek 1/1 oranında karıştırılır.

6. Sonra 0.5 ml.'lik bölümler halinde vial ya da strawlara bölünür.

7. 8-10 cm. mesafeden ızgara üzerinde sıvı azot buharına 10-15 dk. tutulur.

8. Örnekler dikkatlice sıvı azot tankına aktarılır.

B. İşlem otomatik olarak yapılmak istenirse:

20°'den -7°'ye kadar -0.5°/ dk.

-80°'ye kadar

-10°/ dk.'ya programlanır ve sonra

Sıvı azota aktarılır (7,8,22,29).

## II. SPERM ÇÖZME PROSEDÜRÜ (SPERM THAWING PROCEDURE)

Eritmenin tek adımda ve mümkün olduğu kadar hızlı yapılması gerekir. 37°'deki su banyosuna alınıp 5 dk. inkübasyondan sonra çok iyi sonuçlar alındığına dair raporlar vardır. Örnek olarak, bizim GATA'daki klinik uygulamamız şu şekildedir:

Vial için → Oda sıcaklığında 5 dk. Eritme

Sonra,

37 °C su banyosunda 10 dk. Eritme

Straw için → Oda sıcaklığında 10 dk. Eritme

(Önce kapalı uç sonra diğer ucu kesilerek strawın ucu bir falkon tüpe ittirilir.)

Çözülen örneğe sperm yıkama solüsyonu (sperm washing medium) damla damla eklenir ve 3000 rpm'de 10' santrifüj edilir. Süpernatant atılır, tekrar 0.1 ml. sperm yıkama mediumu eklenir ve karıştırılır. Konsantrasyon, motilite ve vitalite değerlendirilir (7,8,22,25,33).

## SPERM DONDURMANIN DEZAVANTAJLARI

1. Sayının yarıya yakın azalması normaldir. Dondurma öncesinde motilite çok düşükse, bu problem göz önünde bulundurulmalıdır.

2. Genetik materyalin zarar görme olasılığı oositteki kadar yüksek değildir. Zira, oosit kriyoprezervasyonunun başarısızlığı 2. mayotik sürecin bitmemiş olması sebebiyle mayoz ipliğinde kutuplara çekilen kromozomların zarar görmesinde yatmaktadır. Halbuki sperm, spermatid aşamasından itibaren 2. mayoz bölünmeyi bitirmişlerdir. Bu sebeple genellikle, doğan bebeklerdeki konjenital anomali oranı aynı olarak bildirilmektedir. Biyokimyasal yöntemlerle bu spermlerdeki

intraakrozomal penetrasyon enzimleri kaybı, GOT ve LDH'nın önceki ve sonraki ölçümleri, biyoluminisens işlemi ile solunun zinciri nükleotidleri olan ATP, ADP ve AMP tayinleri incelenerek, soğuşun yaptığı hasarlar halen araştırılmaktadır. Soğuşun sperm mitokondriyal konfigürasyonuna etkisi son yıllarda üzerinde çalışılan bir konudur (12,13,15,26,34,35).

3. Motiliteyi yarıya yakın azaltabilir (9,17,25).

Buna dair bizim GATA'da yaptığımız 25 hastalık serideki bulgularımız aşağıda görüldüğü gibidir.

Taze semen total motilite yüzdesi (A+B)→ %68±2

Çözme sonrası total motilite yüzdesi (A+B)→ %27±6

Cryosurvival oranı → ~ % 40±5

(Çözme sonrası motilite/ Dondurma öncesi motilite) x 100 = % Cryosurvival

## SONUÇ

Erkek infertilitesinin tedavisinde özellikle cerrahi yöntemlere başvurulması alınarak testisler spermilerin 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 arttırabilmektedir (7,21,22,24,31,33).

Son olarak, belirtilmelidir ki, Türkiye belki donör programları vb. için hazır olmasa da, en azından testis cerrahisi öncesi, kemoterapi-radyoterapi öncesi yada YÜT için TESE ve MESA gibi cerrahi yöntemler ile toplanan spermilerin dondurulması konusunda daha fazla konservatif kalınmamalıdır. Bu konuyla ilgili hukuksal düzenlemeler etik kurallar da gözetilerek yapılmalı ve oluşabilecek süistimal ve spekülasyonlar önlenmelidir.

## KAYNAKLAR

1. Polge, C., Smith, A.U., Parkes, A.S.: *Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature (London) 1949; 164:666-70.*
2. Bunge, R.G., Sherman, J.K.: *Fertilization capacity of frozen human spermatozoa. Nature (London) 1953;172:767-8.*
3. Bunge, R.G., Keetel, W.C., Sherman, J.K.: *Clinical use of frozen semen; report of 4 cases. Fertil, Steril 1954:5:520.*

4. Trounson, A.O., Mohr, L.R., Wood, C., et al.: Effect of delayed insemination on in vitro fertilization culture and transfer of human embryos. *Reprod, Fertil* 64:285, 1982.
5. Cohen, J., Garrisi, G.J., Congedo-Ferrara, T.A., Kieck, K.A., Schimmel, T.W., Scott, R.T.: Cryopreservation of single human spermatozoa. *Hum Reprod* 1997;12:994-1001.
6. Veeck, L.L., Amundson, C.H., Brothman, L.J.: Significantly enhanced pregnancy rates through cryopreservation and thaw: a 15 year clinical study. *Fertil, Steril* 59:1202, 1993.
7. *İn vitro* fertilizasyon ve mikromanipülasyon uygulamalarında laboratuvar. Kubilay Vicdan, Ahmet Zeki Işık. Çağdaş Medikal Yayın Dağıtım, Ankara 1. Baskı 1999.
8. Baker, H. W. G., and Burger, H. G. (1986): Male Infertility. In 'Reproductive Medicine'. (Eds E. Steinberger, G. Fraiese and A. Steinberger.) pp. 187-97. (Raven Press: New York.).
9. Kovacs, G., Baker, G., Burger, H. G., de kretser, D., and Lording, D. (1988): AID with cryopreserved semen: a decade of experience. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 95, 354-60.
10. Jeulin, C., Feneux, D., Serres, C., Jouannet, P., Guillet-Rosso, F., Belaisch-Allart, J., Frydman, R., and Testart, J. (1986): Sperm factors related to failure of human in vitro fertilization. *J. Reprod. Fertil.* 76, 735-44.
11. Wilton, L. J., Temple-Smith, P. D., Baker, H. W. G., and de Kretser, D. M. (1988): Human male infertility caused by degeneration and death of sperm in the epididymis. *Fertil. Steril.* 49, 1052-8.
12. Goldstein, M. (1992): Surgery of male infertility and other scrotal conditions. In 'Campbell's Textbook of Urology'. 6th Edn. (Eds P. C. Walsh, A. B. Retik, T. A. Stamey and E. D. Vaughan Jr.) pp. 3114-49. (W. B. Saunders: Philadelphia.).
13. Silber, S. J. (1994): A modern view of male infertility: brief report. *Reprod. Fertil. Dev.* 6, 93-104.
14. Avery, S. M., and Elder, K. T. (1992): Routine gamete handling: semen assessment and preparation. In 'A Textbook of in Vitro Fertilization and Assisted Reproduction'. (Eds P. R. Brinsden and P. A. Rainsbury.) pp. 171-85. (Parthenon Publishing Group: Carforth.).
15. A novel approach to sperm cryopreservation. Morris G.J., Acton E. and Avery S. (1999) *Hum. Reprod.* In press.
16. World Health Organization (1987). 'WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction'. (Cambridge University Press: Cambridge.).
17. Hammitt, D. G., Bedia, E., Rogers, P. R., Syrop, C. H., Donovan, J. F., and Williamson, R. A. (1989): Comparison of motility stimulants for cryopreserved human semen. *Fertil. Steril.* 52, 495-502.
18. *The Infertile Male Advanced Assisted Reproductive Technology*, Editors: Sean P., Csira Publication Austria 1994.
19. Ord, T., Patrizio, P., Silber, S. J., Jones, G., Marelllo, E., and Asch, R. H. (1991): A new technique for sperm preparation in cases of epididymal sperm aspiration. 47th Annual Meeting of the American Fertility Society, *Fertil. Steril. Suppl.*, S29-S30 [Abstr.].
20. Patton, P. E., Burry, K. A., Thurmond, A. Et al.: Intrauterine insemination out performs intracervical insemination in a randomized, controlled study with frozen, donor sperm. *Fertil. Steril.* 57(3):559-564,1992.
21. Schulze W, Thoms F, Knuth, U.A.: Testicular sperm extraction: comprehensive analysis with simultaneously performed histology in 1418 biopsies from 766 subfertile men. *Hum Reprod* 1999;14(Suppl 1):82-96.
22. Tüp Bebek Yardımcı Üreme Tekniklerinde Laboratuvar Yöntemleri, Lale Delilbaşı. Baysed Yayın No:10 Ankara 1997.
23. Wang, R., Sikka, S. C., Veeraragavan, K. Et al.: Platelet activating factor and pentoxifylline as human sperm cryoprotectants. *Fertil. Steril.* 60(4):711-715, 1993.
24. Yavetz, H., Yogev, L., Homaonnai, Z. and Paz, G.: Prerequisites for successful human sperm cryobanking: sperm quality and prefreezing holding time. *Fertil. Steril.* 55(4): 812-815,1991.
25. Watson, P.F.: Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod, Fertil Dev* 1995;7:871-91.
26. Gilmore, Ja, Liu J, Woods, E.J., Peter, A.T., Critser, J.K.: 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.
27. Gao, D., Critser, J.K.: Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR* 2000;41:187-96.
28. Morris, G.J., Acton, E., Avery, S.: A novel approach to sperm cryopreservation. *Hum Reprod* 1999;14:1013-21.
29. Workshop book in Gamete and Embryo Cryopreservation. Bourn Hall Clinic Bourn Cambridge CB37TR Copyright 2000.
30. Wowk, B., Leidl, E., Rasch, C.M., Mesbah-Karimi, N., Harris, S.B., Fahy, G.M.: Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. *Cryobiology* 2000;40:288-36.
31. A programme of semen cryopreservation for patients with malignant disease in a tertiary infertility centre: lessons from 8 years experience. Lass A., Akagbosu F., Abusheikha N., Hassouneh M., Blayney M., Avery S and Brinsden P. (1998) *Hum. Reprod.* 13,(11), 3256-3261.

32. *Safe cryopreservation of sperm and embryos.* Avery S.M., MacLaughlin E.A., and Dawson K.J., (1998) *Human Fertility* 1, 84-86.
33. *Brinsden, P.R., Regulation of assisted reproductive technology: Brinsden P.R. (Ed.) A Textbook of In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction (Second Edition) (1999) Parthenon Publishers, Carnforth and New York.*
34. *İnfertilitede Laboratuvar ve Uygulamalar.* Ali İhsan Taşçı, Mustafa Samast. Hayat Sağlık ve Sosyal Hizmetler Vakfı Yayınları İstanbul 1997.
35. *Assisted Reproductive Technology in the Treatment of Male Factor Infertility.* Brinsden P.R. and Avery, S.A. (1992) In: Hillier, S.G., (Ed.) *Gonadal Development and Function*, pp. 273-291. New York: Raven Press.