

Spermatozoa Dondurma Yöntemi Gebelik Sonuçlarını Etkiler mi?

Does Spermatozoa Freezing Methods Effects Pregnancy Rates?

Derya Aka¹, Tayyar Alp Özkan², İbrahim Çevik³

1Yeni Yüzyıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

2Sağlık Bilimleri Üniversitesi Derince Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği, Kocaeli, Türkiye

3Okan Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ÖZ

GİRİŞ ve AMAÇ: Spermin dondurularak saklanması kemoterapi-radyoterapi ve testis cerrahisi gibi infertilite etkeni olabilecek durumlarda, fertilitenin korunması amacı ile kullanılan bir yöntemdir. Bu çalışmada farklı spermatozoa dondurma (SD) tekniklerinin gebelik başarı oranlarına etkilerini değerlendirmeye çalıştık.

GEREÇ ve YÖNTEM: Çalışmaya aylık 30'un üzerinde ICSI uygulaması yapılan ve SD yöntemini kullanan 5 merkez dahil edildi. Dahil olan merkezlerin SD yöntemi, medium oranları, dondurma süreleri, dondurma derecesi ve spermatozoa vitalite oranları kayıt altına alınarak değerlendirmek üzere bir veri tabanında birleştirildi. Kullanılan yöntemlere göre gebelik oranlarını karşılaştırmak amacıyla ki-kare testi kullanıldı. Yapılan tüm testlerde p değeri <0,05 istatistiksel anlamlı kabul edildi.

BULGULAR: Çalışmaya dahil edilen merkezlerin yıllık dondurulmuş spermatozoa kullanım oranları % 4,7-5 arasında idi. Dondurulmuş spermatozoa kullanılarak elde edilen gebelik oranlarının B (Yavaş), C (Hızlı), D (Hızlı) merkezlerinde, taze spermatozoa kullanılarak elde edilen gebelik oranlarından istatistiksel anlamlı olarak farklı olmadığı saptanmıştır ($p>0,05$). A (Hızlı) ve E (Yavaş) merkezlerinde ise dondurulmuş spermatozoa kullanılarak elde edilen gebelik başarı oranları, taze spermatozoa kullanılarak elde edilen gebelik oranlarından istatistiksel anlamlı olarak daha düşük saptanmıştır ($p=0,01$ ve $p=0,04$).

TARTIŞMA ve SONUÇ: Çalışmamızda değişik dondurma yöntemlerinin ICSI başarısı üzerine farklı etkisi olduğu net olarak gösterilememiştir. Bunun nedeni, bu çalışmada merkezler arası farklılıklar, heterojen hasta popülasyonu ve spermatozoa kalitesi hakkındaki bilginin eksik olması olabilir.

Anahtar Kelimeler: Sperm dondurma, yardımcı üreme teknikleri, ICSI

ABSTRACT

INTRODUCTION: Sperm cryopreservation is the process of sperm cryopreservation after spermatozoa procurement before IVF (In vitro fertilisation) or ICSI (Intra Cytoplasmic Injection) procedure. Sperm cryopreservation not only increased the success rate of assisted reproductive treatment methods in the order of but also contributed to future fertility preservation after chemotherapy-radiotherapy, or testicular surgery etc. Aim of the study is to evaluate effect of cryopreservation methods on pregnancy rates.

METHODS: Data of 5 centres which have performs mean 30 ICSI procedure monthly were included in the study. Freezing method, medium, time, and spermatozoa vitality rates were collected in a data base. For statistical analysis chi-square test was used.

RESULTS: Annual cryopreserved sperm using ratio were between 4.7-5%. Quick method were used in A,C and D centres. Slow method were used in B and E centres. Pregnancy rates for fresh and cryopreserved used sperm were not statistically significantly different for except for A and E centres ($p=0,01$ and $p=0,04$, respectively).

DISCUSSION and CONCLUSION: In the present study we could not demonstrate a difference between different freezing methods on pregnancy rates. A possible explanation for this may be difference between included centres, heterogeneity of patient population and lack of data on frozen spermatozoa quality.

Keywords: Sperm cryopreservation, assisted reproductive techniques, ICSI

İletişim / Correspondence:

Dr. Tayyar Alp ÖZKAN

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Derince Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği, Kocaeli, Türkiye

E-mail: alpozkan@gmail.com

Başvuru Tarihi: 27.05.2016

Kabul Tarihi: 04.01.2017

GİRİŞ

1950'li yıllarda başlayan spermatozoa dondurma çalışmaları özellikle yardımcı üreme tekniklerinin geliştiği 90'lı yıllardan itibaren hız kazanmıştır (1-3). Fertilizasyonu tehdit eden ileriye dönük önlenemez durumlar ya da infertilite varlığında, gebelik sağlamak için kullanılan en önemli yöntem spermatozoa dondurmadır (SD).

SD'nin genel prensibi, dondurulacak materyalin kriyo-protaktan maddeler ile dengelendikten sonra sıcaklığının düşürülerek -196°C sıvı azot içerisinde depolanması, çözülme işlemi sırasında kriyo-protaktanların uzaklaştırılarak dondurulan materyalin canlılığını sürdürülebileceği fizyolojik ortama geçirilmesidir. Kullanılan kriyo-protaktan maddeler ile hücre dışında hiperozmolar bir ortam yaratılır, hücre içi su moleküllerinin hücre dışına difüzyonu ile hücre su hacmi azalır, membran stabilizasyonu sağlanarak hücre membran hasarı önlenir (4).

Spermatazoayı dondurarak saklama esnasında spermatozoada oluşabilecek zararlı etkiler kriyo-protaktan maddeler kullanılarak azaltılabilmektedir. Farklı türler arası spermatozoa farklılıkları nedeni ile dondurma işleminden önce spermatozoa ile karşılaştırılacak olan kriyo-protaktanın çeşidi, yoğunluğu ve spermatazoanın kriyo-protektana maruz bırakılma süresinin o türe göre ayarlanması gerekir (5). Kriyo-protaktan maddeler hücre içine hızlı bir şekilde diffüze olarak su dağılımı ile hücreleri ozmotik şoktan korumaktadır (1, 2). Bu amaçla alkoller (etanol, propanol, metanol, 1,2 propanediol ve gliserol), dimetilsülfoksit ve şekerler (glukoz, laktoz, sükroz ve nişasta) kullanılmaktadır.

Biz bu çalışmada farklı teknikler kullanılarak yapılan spermatozoa dondurma işlemlerinin gebelik başarı oranlarına etkilerini değerlendirmeye çalıştık.

GEREÇ ve YÖNTEM

SD'de manuel veya otomatik olarak iki temel yöntem kullanılmaktadır. Otomatik yöntemin manuel yöntemle göre kanıtlanmış bir üstünlüğü bulunmaması ve maliyeti nedeni ile kullanımı henüz yaygınlaşmamıştır. Yapılan işlemde temel prensip hücre içi sıvıda oluşabilecek buz kristallerinin engellenmesidir. Buz kristallerinin oluşumu hücre zarında parçalanma, akrozomal

sızıntı, mitokondri hasarı ve DNA fragmentasyonuna neden olabilir. Hücre içi sıvının kriyo-protaktan maddeler ile yer değiştirmesi bu olumsuz etkileri önleyebilir (6).

Dondurma işleminde 3 ayrı teknik kullanılmaktadır. Konvansiyonel yavaş dondurma tekniği uzun yıllardır çok fazla değiştirilmeden kullanılmaktadır. Bu teknikte kademeli olarak uygulanan yavaş dondurmada hücreler 1-10 °C / dk hızı ile soğutulurlar. Kullanılan bir diğer teknik olan hızlı dondurma ve vitrifikasyon da hücrelerin soğutulma hızı 40-1000 °C / dk arasında değişmektedir (6). Yavaş veya hızlı dondurma tekniklerinin her ikisinde de kullanılan kriyo-protaktan hücre içine geçerek dehidratasyonu sağlar. Dondurma işlemi tamamlandıktan sonra hücreler korunma amacı ile -196°C'de sıvı azota daldırılır. Vitrifikasyonda kullanılan kriyo-protaktan yüksek ozmolariteli olduğu için dehidratasyon hızı çok yüksektir. Bu yöntem ile su kristalize olmadan tüm yapı vitreus haline dönüşür (7). İşlem sırasında soğutma hızı kritik önem taşır. Optimum soğutma hızı ile spermatazoanın motilitesi, canlılığı, mitokondrial fonksiyonları ve hücre zarı bütünlüğü korunabilir (8).

Çalışmaya İstanbul'da bulunan aylık 30'un üzerinde ICSI uygulaması yapılan ve SD yöntemini kullanan 5 merkez dahil edildi. Dahil olan merkezlerin spermatozoa dondurma yöntemi, medium oranları, dondurma süreleri, dondurma derecesi ve spermatozoa vitalite oranları kayıt altına alınarak değerlendirmek üzere bir veri tabanında birleştirildi (Tablo 1).

İstatistiksel Analiz:

Toplanan verilerin istatistiksel analizi için STATA MP Parallel Edition (Statistics/Data Analysis StataCorp Texas USA) sürüm 13 istatistik programı kullanıldı. Kullanılan yöntemle göre gebelik oranlarını karşılaştırmak amacıyla ki-kare testi (χ^2) kullanıldı. Yapılan tüm testlerde p değeri <0,05 istatistiksel anlamlı kabul edildi.

Tablo 1: Çalışmaya Katılan Kliniklerde Kullanılan Yöntemler ve Sonuçları

MERKEZLER	A	B	C	D	E
Kullanılan dondurma yöntemi	Quick Manual Yöntem(Hızlı Dondurma)	Slow Freezing (LN2 Buhar Yöntemi)	Quick Manual Yöntem(Hızlı Dondurma)	Quick Manual Yöntem (Hızlı Dondurma)	Slow Freezing (Statik buhar yöntemi)
Medium	Test yolk buffer/Irvine	Sperm Store	Sperm Freze Solution/Vitrolife	Test yolk buffer/Irvine	Test yolk buffer/Irvine
Medium oranı	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1
Dondurma derecesi(°C)	-191.8 °C	-196°C	-196°C	-185°C	-196°C
Dondurma-çözdürme sonrası elde edilen sperm (%)	% 40 vitalite	%50 vitalite	%45 vitalite	%50 vitalite	%40 Vitalite

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen merkezlerin yıllık dondurulmuş spermatozoa kullanım oranları % 4,7-5 arasında idi. Üç klinik kriyo-protaktan medium olarak Test Yolk buffer/ Irvine kullanılırken 2 klinik Sperm Store ve Sperm freze solution tercih etmekte idi. Klinikler arasında dondurma-çözdürme sonrası elde edilen canlı spermatozoa oranları %40 ile %50 arasında değişmekte idi. Tüm kliniklerdeki ortalama gebelik oranları ve dondurulmuş spermatozoa ile elde edilen ortalama gebelik başarı oranları %43 ile %45 arasında değişmektedir (Tablo 2).

Tablo 2. Kliniklerdeki dondurulmuş sperm ile normal spermden elde edilen gebelik oranlarının istatistiksel karşılaştırılması

	Gebelik Sayısı, n (%)	Toplam ICSI deneme sayısı	p
A Merkezi			
Donmuş sperm	12 (25,5)	47 (100)	0,01
Taze sperm	418 (45,8)	913 (100)	
B Merkezi			
Donmuş sperm	18	47	0,41
Taze sperm	407	893	
C Merkezi			
Donmuş sperm	18	45	0,53
Taze sperm	393	855	
D Merkezi			
Donmuş sperm	18	45	0,81
Taze sperm	376	875	
E Merkezi			
Donmuş sperm	11	42	0,04
Taze sperm	376	858	

Çalışmaya katılan merkezler arası ICSI gebelik başarı oranları istatistiksel anlamlı olarak farklı değildir ($p>0,05$). Dondurulmuş spermatozoa kullanılarak elde edilen gebelik oranlarının B (Yavaş dondurma), C (Hızlı dondurma), D (Hızlı dondurma) merkezlerinde, taze spermatozoa kullanılarak elde edilen gebelik oranlarından istatistiksel anlamlı olarak farklı olmadığı saptanmıştır ($p>0,05$). A (Hızlı dondurma) ve E (Yavaş dondurma) merkezlerinde ise dondurulmuş spermatozoa kullanılarak elde edilen gebelik başarı oranları, taze spermatozoa kullanılarak elde edilen gebelik oranlarından istatistiksel anlamlı olarak daha düşük saptanmıştır ($p=0,01$ ve $p=0,04$).

TARTIŞMA

Spermatozoa sıcaklık değişimlerine duyarlıdır. Dondurma işlemi esnasında soğutma gereğinden daha hızlı olursa intraselüler sıvının difüzyonu yeterli olamayacağı için hücre içi donma gerçekleşir. Soğutma hızı çok yavaş olursa hücrel dehidratasyon ve ozmolarite değişikliklerine bağlı hücre hasarı ve ölümü gerçekleşebilir. Soğutma işleminin optimum sürede yapılması hücre canlılığının korunması kritik öneme sahiptir (9). Yavaş soğutmada extraselüler buz kristalleri çok miktarda ve büyük boyutlu olur. Hızlı soğutma yönteminde (sıvı azot buharı ile uygulanan Quick Manuel protokol) buz kristalleri çok hızlı oluşur ve yavaş soğutma yönteminde oluşan buz kristallerinden daha küçük boyutludur. Spermatozoalar küçük buz parçacıkları arasında daha az sıkıştıkları için çözülme sonrası daha yüksek oranlarda canlı hücre bulunmasına olanak

sağlar. Spermatazoalar yavaş yöntemle donduruma sonrası hızlı çözündürülürler ise hücre içine hızlı difüzyon sonucu ödem ve ozmotik şok ile karşılaşarak hasara uğrayabilir (10).

Dondurulan materyale göre ideal yöntem (yavaş veya hızlı) değişiklik göstermektedir. Semen aspirasyonu veya parçalanmış spermatozoa örneklerinde hızlı dondurma daha fazla tercih edilmektedir. Tek spermatozoa veya doku örneğinin dondurulmasında yavaş yöntem daha çok tercih edilmektedir (11-14).

Kriyoprezervasyon ile yapılan ICSI oranları ülkelerin gelişmişlik durumu, sosyo kültürel durum gibi değişkenlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bu çalışmaya dahil edilen merkezlerde çoğunlukla (%60) teknik hızlı dondurma yöntemi kullanılmaktadır. Katılan merkezlerde yıllık ortalama dondurulmuş spermatozoa kullanma oranı %4.7-5 arasında değişmektedir.

Donnelly ve ark. çalışmasında kriyoprezervasyon ile spermatozoa motilitesinde ortalama %45 azalma olduğunu bildirmiştir (15). Dondurma işleminde spermatozoa membran fosfolipidlerinde peroksidasyon ve oksijen radikallerinin artışı motilite azalmasından sorumlu tutulmuştur. Spermatozoa motilitesini korumak amacıyla dondurma öncesi kültür ortamına koruyucu olarak askorbik asit, katalaz, E vitamini gibi antioksidanların eklenmesini önerilmiş ancak motilitede anlamlı değişiklik izlenmemiştir (16). Kuczynski ve ark. çalışmalarında taze ejakülat (%35,2) veya dondurulmuş spermatozoa (%23,7) ile yapılan ICSI'de gebelik başarı oranları arasında farklılık saptamışlardır ancak bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bildirmişlerdir (17). Bizim çalışmamızda da Kuczynski ve ark. çalışmasına benzer olarak B, C ve D merkezlerinde donmuş spermatozoa ile elde edilen gebelik başarı oranlarının taze spermatazoadan daha düşük oranda olduğu saptanmasına rağmen bu farklılığın istatistiksel anlamlı olmadığı tespit edildi ($p=0,41$, $p=0,53$, $p=0,8$). Taze ve dondurulmuş spermlerle yapılan daha yüksek hasta sayılı bir başka çalışmada intrauterin inseminasyon da taze spermatozoa ile gebelik oranlarının dondurulmuş spermatazoaya göre 3 kat daha yüksek olduğu,

başarı oranlarında ayrıca kadının yaşının da önemli bir parametre olduğu bildirilmiştir (18). Yapılan bir başka retrospektif çalışmanın sonuçlarına göre düşük kaliteli spermatazoaların SD sonrası DNA hasarı ve hücre ölümüne daha yatkın olduğu ve fertilizasyon kapasitesinin daha düşük olduğu öne sürülmüştür (19). Bizim çalışmamızda A ve E merkezlerinde taze veya dondurulmuş spermatozoa ile yapılan ICSI gebelik başarı oranları arasında istatistiksel anlamlı farklılık izlenmiştir ($p=0,01$ ve $p=0,04$). Bu merkezlerden dondurma işlemi birinde hızlı diğerinde ise yavaş yöntemin kullanılmıştır. Ancak kadın yaşı, spermatozoa kalitesi, donörün ek patolojileri gibi verilerin yeterli olmaması nedeni ile yöntemlerin gebelik başarı oranları arasında kesin bir yargıya varmak mümkün olamamaktadır.

Obstrüktif azospermik hastalardan elde edilen epididimal veya testiküler kaynaklı spermatazoaların dondurulması sonucunda taze örneğin kullanımına benzer fertilizasyon, klinik gebelik ve implantasyon oranları bildirilirken, nonobstrüktif vakalardan elde edilen testis spermlerinin dondurulması sonucu taze spermatazoa kullanımına göre daha düşük gebelik ve implantasyon oranlarının elde edildiği bildirilmektedir (11-13). ICSI gebelik başarısının doğal olmayan yolla alınan dondurulmuş spermlerde, taze spermatozoa ile yapılan ICSI gebelik başarısından daha az olmasının sebebinin sadece dondurma işlemi ile ilgili olmadığı, ek olarak spermin maturasyon derecesi ve dondurma öncesi spermatozoa kalitesi ile ilgili olabileceği de bildirilmiştir (20, 21). Sonuçta dondurma işlemi uygulanan spermatazoanın kalitesi, donma işlemi nedeni oluşan serbest radikaller ve spermin maturasyon derecesi gibi etkenler gebelik oranlarını doğrudan etkilemektedir.

Yayınlanmış çalışmalarda ortalama ICSI gebelik başarısı %65-80 olarak bildirilmektedir (14, 22-24). Çalışmamıza katılan kliniklerde ICSI başarısı %50 civarında olup bu oranın literatürde bulunan çalışmalardan düşüktür. Ancak dondurulmuş spermatozoa kullanılarak elde edilen ICSI gebelik başarı oranları (yaklaşık %5) benzerdir. Dondurma işleminde kullanılan spermin kalitesi çok önemlidir. Uygun saklama koşulları ve optimize edilmiş dondurma protokolleriyle spermin canlılığını koruması ve sağlıklı bir şekilde fertilizasyonun

gerçekleşmesi sağlanmaktadır. A ve E kliniklerinde dondurulmuş spermatozoa ile yapılan ICSI gebelik başarısının düşük olmasının nedeni düşük spermatozoa kalitesi olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada merkezlerin hasta data eksiklikleri ve bir kısım verinin ayrıntılarının paylaşılmamış olması nedeni ile literature göre daha düşük başarı oranları sağlıklı olarak değerlendirme yapmamıza engel olmaktadır.

Çalışmanın sınırlılıkları, dondurma işleminin farklı merkezlerde uygulanması, çalışma popülasyonunun heterojen olması ve gebelik başarısına etki eden yaş, ek hastalık, anatomik varyasyon ve dondurma işlemi öncesi spermatozoa kalitesi gibi parametrelerin bulunmaması, dondurulmuş spermatozoa kullanılan hasta sayısının az olmasıdır.

Bu çalışmada değişik dondurma yöntemlerinin ICSI başarısı üzerine farklı etkisi olduğu net olarak gösterilememiştir. Bunun nedeni, bu çalışmada merkez arası farklılıklar, heterojen hasta popülasyonu ve spermatozoa kalitesi hakkındaki bilginin eksik olması olabilir.

KAYNAKLAR

1. Sherman JK. Research on Frozen Human Semen: Past, Present, and Future. *Fertility and sterility*. 1964;15:485-99.
2. Bunge RG, Sherman JK. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature*. 1953;172:767-8.
3. Parkes AS, Smith AU. Regeneration of rat ovarian tissue grafted after exposure to low temperatures. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 1953;140:455-70.
4. McCoshen JA, Fernandes PA. Male infertility: the use and efficacy of frozen sperm. *Current opinion in obstetrics & gynecology*. 1990;2:850-6.
5. Ragni G, Somigliana E, Restelli L, et al. Sperm banking and rate of assisted reproduction treatment. *Cancer*. 2003;97:1624-9.
6. Woods EJ, Benson JD, Agca Y, Critser JK. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*. 2004;48:146-56.

7. Trounson A, Peura A, Kirby C. Ultrarapid freezing: a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertility and sterility*. 1987;48:843-50.

8. Henry MA, Noiles EE, Gao D, Mazur P, Critser JK. Cryopreservation of human spermatozoa. IV. The effects of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function. *Fertility and sterility*. 1993;60:911-8.

9. Lovelock JE. The denaturation of lipid-protein complexes as a cause of damage by freezing. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 1957;147:427-33.

10. Curry MR, Watson PF. Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology*. 1994;31:39-46.

11. Prins GS, Dolgina R, Studney P, et al. Quality of cryopreserved testicular sperm in patients with obstructive and nonobstructive azoospermia. *The Journal of urology*. 1999;161:1504-8.

12. Palermo GD, Schlegel PN, Hariprashad JJ, et al. Fertilization and pregnancy outcome with intracytoplasmic sperm injection for azoospermic men. *Human reproduction*. 1999;14:741-8.

13. Friedler S, Raziel A, Soffer Y, et al. Intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved testicular spermatozoa in patients with nonobstructive azoospermia--a comparative study. *Fertility and sterility*. 1997;68:892-7.

14. Oates RD, Lobel SM, Harris DH, et al. Efficacy of intracytoplasmic sperm injection using intentionally cryopreserved epididymal spermatozoa. *Human reproduction*. 1996;11:133-8.

15. 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. *Human reproduction*. 2001;16:1191-9.

16. Askari HA, Check JH, Peymer N, Bollendorf A. Effect of natural antioxidants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of

sperm activity during freeze-thaw process. Archives of andrology. 1994;33:11-5.

17. Kuczynski W, Dhont M, Grygoruk C, et al. The outcome of intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved ejaculated spermatozoa--a prospective randomized study. Human reproduction. 2001;16:2109-13.

18. Richter MA, Haning RV, Jr., Shapiro SS. Artificial donor insemination: fresh versus frozen semen; the patient as her own control. Fertility and sterility. 1984;41:277-80.

19. Borges E, Rossi LM, de Freitas CVL, et al. Fertilization and pregnancy outcome after intracytoplasmic injection with fresh or cryopreserved ejaculated spermatozoa. Fertility and sterility. 2007;87:316-20.

20. de Paula TS, Bertolla RP, Spaine DM, et al. Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia. Fertility and sterility. 2006;86:597-600.

21. Rath SK, Tarneja P, Singh SM. Effect of cryopreservation on semen sample. Medical Journal Armed Forces India. 2004;60:42-4.

22. Devroey P, Silber S, Nagy Z, et al. Ongoing pregnancies and birth after intracytoplasmic sperm injection with frozen-thawed epididymal spermatozoa. Human reproduction. 1995;10:903-6.

23. Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. Human reproduction. 1998;13:1864-71.

24. Linfor JJ, Meyers SA. Detection of DNA damage in response to cooling injury in equine spermatozoa using single-cell gel electrophoresis. Journal of andrology. 2002;23:107-13.