

## Dondurulmuş Ejekülat ve Dondurulmuş Testiküler Spermin Sonuçlarının İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) Parametrelerine Etkisinin Değerlendirilmesi

Evaluation of the Effect of Frozen Ejaculate and Frozen Testicular Sperm Results on Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) Parameters

Seda Karabulut<sup>1,2</sup>, Oya Korkmaz<sup>1,2</sup>, Yusuf Sağıroğlu<sup>3</sup>, İlknur Keskin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> İstanbul Medipol Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Histoloji ve Embriyoloji AD

<sup>2</sup> İstanbul Medipol Üniversitesi, Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi, REMER

<sup>3</sup> Florence Nightingale Hastanesi, Tüp Bebek Merkezi

### Özet

**Amaç:** Çalışmamızda, dondurulmuş ejakülat ve dondurulmuş testiküler spermin İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) sonuçları üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntemler:** Çalışmamızda 11.10.2016-12.09.2017 tarihleri arasında infertilite nedeniyle ICSI tedavisine alınan ve spermleri dondurulan 36 çift çalışmaya alınmıştır. Hastaların 14 tanesine ejakülat sperm kriyoprezervasyonu, 22 tanesine de micro testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) sperm kriyoprezervasyonu gerçekleştirilmiştir. İki grubun ICSI sonuçları (fertilizasyon oranı, embriyo gelişme oranı ve gebelik oranları) karşılaştırılmıştır.

**Bulgular:** Sperm parametreleri değerlendirildiğinde ejakülat ve TESE spermlerinde dondurma öncesi ve dondurma sonrası toplam motilite ve canlılık oranları arasında istatistiksel bir fark belirlenmemiştir (>0.05). Fertilizasyon oranları, implantasyon oranları ve embriyo gelişme oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir (>0.05). Gebelik oranları ise dondurulmuş ejakülat grubunda dondurulmuş testiküler sperm grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (<0.05).

**Sonuç:** Sperm kriyoprezervasyonun uzun yıllardır ICSI tedavilerinde kullanılmasına rağmen yöntemin etkinliği üzerine araştırmalar devam etmektedir. Çalışmamızın bulguları doğrultusunda spermin ICSI sürecini olumsuz etkilememesine rağmen gebelik oranlarında anlamlı düşüşe neden olduğu sonucuna varılmıştır. Bunun, implantasyon sürecinde spermin oynadığı rol nedeniyle olabileceği düşünülmektedir. Bu etkinin ortaya koyulabilmesi ve implantasyon sürecinde görev alan mekanizmaların aydınlatılabilmesi için, daha büyük hasta gruplarıyla yapılmış moleküler seviyede çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Kriyoprezervasyon, Sperm, TESE, ICSI

### Abstract

**Objective:** The aim of the present study is to investigate the effect of frozen ejaculate and frozen testicular sperm on ICSI results.

**Materials and Methods:** 36 infertile couples that underwent an ICSI cycle and that the semen samples were frozen between 11.10.2016-12.09.2017 in were included in the study. Ejaculate sperm cryopreservation was performed in 14 patients and micro TESE sperm cryopreservation was performed in 22 patients. ICSI results (fertilization rate, embryo development rate and pregnancy rates) of the two groups were compared.

**Results:** There were no statistically significant difference between total motility and viability rates before and after freezing in ejaculate and testicular sperm extraction (TESE) sperm (> 0.05). When ICSI parameters were compared no statistically significant difference were observed between fertilization rates, implantation rates and embryo development rates (> 0.05). But pregnancy rates were found statistically significantly higher in frozen ejaculate group than frozen testicular sperm group (<0.05).

**Conclusion:** Although sperm cryopreservation has been used in ICSI treatments for many years, research and debate on the effectiveness of the method continues. According to our results frozen testicular sperm had no adverse effect on ICSI parameters but we analyzed a significant decrease in pregnancy rates. This may be partially explained by the role of sperm in the implantation process. In order to demonstrate this effect and to elucidate the mechanisms involved in the implantation process, molecular studies with larger patient groups are needed.

**Keywords:** Cryopreservation, Sperm, TESE, ICSI

Geliş tarihi (Submitted): 28.12.2017

Kabul tarihi (Accepted): 14.02.2018

Yazışma / Correspondence

Oya Korkmaz

İstanbul Medipol Üniversitesi,

Rejeneratif ve Restoratif Tıp

Araştırmaları Merkezi, REMER

E-mail: oyakorkmaz@medipol.edu.tr

## GİRİŞ

Kriyoprezervasyon, hücre ve dokuların  $-176^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulularak, biyolojik aktivitelerinin durdurulması ve daha sonra kullanılmak amacıyla saklanması olarak tanımlanmaktadır. Kriyoprezervasyonun amacı canlı bir hücre veya dokunun düşük ısı altında minimum hasarlı ya da hasarsız olarak uzun süreli saklanmasıdır (1).

Üreme hücreleri ve dokularının da dondurulup saklanabilmesi ve istendiğinde çözülebilmesi Yardımla Üreme Teknolojileri'nin (YÜT) gelişimi açısından büyük önem taşımaktadır (2). Ülkemizde Üremeye Yardımcı Teknikler (ÜYTE)Yönetmeliği'ne göre sperm hücreleri, cerrahi yöntemlerle sperm elde edilmesi halinde, kemoterapi ve radyoterapi gibi gonad hücrelerine zarar veren tedaviler öncesinde, üreme fonksiyonlarının kaybedilmesine yol açacak olan ameliyatlara (testislerin alınması vb.) öncesinde ve çok az sayıda sperm olması (kriptozoospermi) durumlarında, çeşitli yöntemlerle elde edilen sperm hücreleri hastanın onayı alınarak dondurulabilmekte, böylece fertilitenin uzun yıllar korunabilmesi mümkün hale gelmektedir(3).

Kriyoprezervasyon, hem ejakülat spermine hem de testiküler yöntemlerle elde edilen spermere uygulanabilmektedir. Testiküler sperm elde edildiğinde hastanın ikinci bir cerrahi müdahaleye gerek kalmadan aynı spermelerinin kullanılabilmesi mümkün olabilmektedir. Bu da hem hastanın cerrahi müdahaleden doğacak risklerini ortadan kaldırmakta, hem maliyeti düşürmekte hem de bir daha sperm elde edilemeyecek vakalarda hastaya yeni bir şans verilmesini olanaklı kılmaktadır.

Testiküler sperm elde etme yöntemleri azospermi olarak tanımlanan ejakulatta sperm olmaması durumlarında ya da kriptozoospermi olarak adlandırılan sperm sayısının çok az olması durumlarında uygulanabilmektedir. Azospermi, erkek nüfusun %1-3'ünde ve infertil erkeklerin yaklaşık %10'unda bulunmaktadır (4). TESE yöntemiyle elde edilen spermier intrasitoplazmik sperm enjeksiyonunda(ICSI) kullanılarak sağlıklı gebelikler sağlanabilmektedir. ICSI, ilk olarak 1992 yılında Palermo tarafından uygulanmış ve gebelik gerçekleşmiştir (5). TESE, önceleri konvansiyonel çoklu biyopsilerle yapılmaktayken günümüzde mikrodiseksiyon yöntemi ile (mikro TESE) uygulanmaktadır. Mikro TESE ilk

kez Schlegel tarafından 1999 yılında tanımlanmıştır (6). Micro TESE, testisten farklı bölgelerin mikroskop altında açılarak biyopsi ile sperm elde edilmesi işlemidir (7). Çalışmamızda, dondurulmuş ejakülat ve dondurulmuş testiküler sperminin ICSI sonuçlarına etkisinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaç için yaş ortalaması, toplam oosit ortalaması, olgun oosit ortalaması, fertilizasyon oranı, embriyo gelişme oranı ve gebelik durumları gibi parametreler karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamızda 11.10.2016-12.09.2017 tarihleri arasında infertilite nedeniyle ICSI tedavisine alınmış ve spermieri dondurulmuş ve bir sonraki siklusta spermieri çözümlenerek ICSI uygulanmış 36 çift örneklemimizi oluşturmuştur. Hastaların 9 tanesi kemoterapi, 5 tanesi kriptozoospermi nedeniyle olmak üzere toplam 14 tanesine ejakülat kriyoprezervasyonu, azospermik 22 hastaya ise micro TESE işlemi nedeniyle sperm kriyoprezervasyonu gerçekleştirilmiştir. İki grubun ICSI sonuçları (fertilizasyon oranı, embriyo gelişme oranı ve gebelik oranları)karşılaştırılmıştır. Bu hastalardan eşleri > 35 yaş olan, endometriozisli, genetik hasar belirlenen, düşük over rezervine sahip (FSH  $\geq 10$ ) olanlar alınmamıştır.

Çalışmamızın, İstanbul Medipol Üniversitesi, girişimsel olmayan klinik araştırmalar etik kurulundan etik onayı alınmıştır.

### Sperm Dondurma ve Çözme

Likefiye olan semen kriyoprotektif ajanlarla (Sperm Freeze, Vitrolike, İsviçre) 1/1 oranında ve çok yavaş bir şekilde karıştırıldı. Karışım kriyovial ya da straw içine alınıp 30 dakika süreyle nitrojen buharında tutuldu ve bu sırada ısının tedricen düşmesi sağlandı. Sürenin sonunda strawlar sıvı nitrojen tankına aktarıldı.

### İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)-

#### Mikroenjeksiyon Ovülasyon indüksiyonu

Çeşitli infertilite nedenleriyle ICSI uygulanacak hastalara, gonadotrophin-releasing hormon (GnRH) analoglarıyla kısa ya da uzun ovaryanstimülasyon protokolü uygulandı. Foliküllerin gelişmesi için humanme-

nopozalgonadotropin (HMG) ya da rekombinant folikül stimülasyon hormonu (FSH) kullanıldı. Oositler, 10000 IU human koryonik gonadotropin (hCG) enjeksiyonundan 36 saat sonra transvajinal yolla ultrasonografi eşliğinde toplandı.

### Oosit Denüdasyonu ve ICSI

Toplanan oositler enzimatik (Hyase 10X, Vitrolife, Kungsbacka, Sweden) yöntemle soyularak Narishige mikroenjeksiyon sistemi ataçmanlı ve Hoffmanmodülasyonlu inverted mikroskop (Olympus IX71, Japan) kullanılarak mikroenjekte edildi. Mikroenjeksiyon işlemi Van Steirteghem ve ark. tarafından belirtildiği şekilde uygulandı (8).

### Embriyo Kültürü

Enjekte edilen oositler 1 gün önceden hazırlanıp %5 O<sub>2</sub> ve %6 CO<sub>2</sub> ortamına sahip inkübatörde (ESCO) bekletilen sequential kültür medyumuna (Sagemedia, Origio) aktarılıp 16-18 saat sonra fertilizasyon varlığı (2 pronükleus ve 2 polar cisimcik varlığı), 24, 48 ve 72. saatlerde de embriyo gelişim (hücre sayısı ve bölünme hızı) ve kaliteleri (fragmentasyon seviyesi, blastomer büyüklüğü, sitoplazmik yapı) kontrol edilerek skorlandı ve not edildi.

### Embriyo Transferi

Embriyo transferleri, gelişen embriyoların sayısı ve kalitesine göre 3. ya da 5. günde ultrasonografi eşliğinde transvajinal yolla gerçekleştirildi. Embriyo transfer işleminden 12 gün sonra kandaki  $\beta$ -hCG seviyesi ölçülerek gebelik oluşup oluşmadığı belirlendi. 10 mIU/ ml  $\beta$ -hCG değeri pozitif gebelik olarak değerlendirildi.

### İstatistiksel Analiz

SPSS 22.0 software for Windows kullanılarak iki grubun verileri Mann-Whitney U Test ve t-test ile karşılaştırıldı.  $p < 0.05$  değeri anlamlı olarak kabul edildi.

### BULGULAR

Sperm parametreleri değerlendirildiğinde ejakülat ve TESE spermlerinde dondurma öncesi (DÖ) ve dondurma sonrası (DS) toplam motilite ve canlılık oranları Tablo 1de gösterilmiştir. Çözme sonrasında gruplar ara-

**Tablo 1:** Hasta gruplarının toplam motilite ve vitalite oranlarının karşılaştırılması.

DÖ: Dondurma Öncesi ÇS: Çözme Sonrası

Hasta grupları	Ejakülat Grubu			TESE Grubu			p değeri
	DÖ	ÇS	Fark	DÖ	ÇS	Fark	
Toplam Motilite oranı (%)	48	32	-16	32	18	-14	>.08
Vitalite oranı (%)	53	38	-15	42	20	-22	>1

**Tablo 2:** Hasta gruplarının dağılımları ve ICSI parametrelerinin karşılaştırılması.

Hasta grupları	1.Grup Dond. Ej/ Sp.	2.Grup Dond. TESE	p değeri
Yaş ortalaması	32,07	33,5	>.19
Toplam oosit	7,14	9,86	>.3
Olgun oosit	4,78	7,18	>1
Fertilizasyon oranı(%)	66,9	72,8	0.07
Embriyo gelişme oranı(%)	100	88,8	>.6
Transfer yapılmayan hasta sayısı	1	3	
Gebelik oranı(%)	35,7	9,09	0.034
İmplantasyon oranı	28,2	6,3	>.15

sında toplam motilite ve vitalite oranları arasında istatistiksel bir fark bulunmadı ( $p > 0.05$ ).

ICSI parametreleri açısından değerlendirildiğinde, gruplar arasında toplam oosit, olgun oosit, implantasyon oranları ve embriyo gelişme oranları farklı olmasına rağmen gruplar arasında istatistiksel olarak bir farklılık gözlemlenmedi ( $p > 0.05$ ). Her iki gruptaki hasta dağılımları ve gebelik sonuçları Tablo 2 de gösterilmiştir.

Fertilizasyon oranları, TESE işlemi uygulanarak dondurulmuş ejakülat normal dondurulmuş ejakülatlı gruba göre daha yüksek olarak gözlemlenmesine rağmen sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p = 0.07$ ). İmplantasyon oranları ve embriyo gelişme oranları arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi ( $p > 0.05$ ). Gebelik oranları ise dondurulmuş ejakülat grubunda dondurulmuş testiküler sperm grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p < 0.05$ ).

## TARTIŞMA

Dondurulmuş spermelerin fertilitede ilk kez 1949 yılında Polge ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır (9). Kriyoprezerve edilmiş sperm ve taze spermin ICSI sonuçları üzerine etkisi çeşitli çalışmalarda tartışılmıştır. Taze sperme oranla dondurulmuş spermde fertilizasyon oranı, embriyo gelişme oranı ve gebelik oranları gibi parametrelerin düşmesine rağmen, sonuçlar kabul edilebilir sınırlar içerisinde (10).

Borges ve ark. taze ejakülat spermin, dondurulmuş ejakülat sperme oranla daha yüksek fertilizasyon oranına sahip olduğunu ileri sürerken (11) Kuczynski ve ark. ise taze ejakülat sperm ile dondurulmuş ejakülat spermin fertilizasyon ve implantasyon oranlarında herhangi bir farklılığın olmadığını ileri sürmüşlerdir (12).

Testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) azoospermi ya da kriptozoospermi belirlenen hastalardan sperm elde etmek amacıyla biyopsi alınması işlemleridir. Ejeküle sperm ile testiküler spermin avantajları ve dezavantajları birçok araştırmacı tarafından araştırılarak çeşitli çalışmalarda tartışılmıştır. Bazı araştırmacılar, ejaküle sperm ve testiküler spermin taze olarak kullanıldığında ICSI parametreleri üzerine daha faydalı sonuçlar verdiğini ileri sürerlerken bazıları da ejaküle sperm ve testiküler spermin dondurularak kullanılmasının taze halleri kadar iyi sonuçlar verdiğini ileri sürmüşlerdir. Romero ve ark. dondurulmuş testiküler spermde fertilizasyon oranı ve gebelik oranının düşük olduğunu ileri sürerken (13), Gil-Salom ve ark. taze sperm kadar iyi fonksiyon yapabildiğini savunmuştur (14). Hessel ve ark. ise yaptıkları çalışmada, testiküler sperm kullanımının gebelik ve doğum oranını etkilemediği sonucuna varmışlardır (15).

Bizde yapmış olduğumuz çalışmada dondurulmuş ejakülat sperm ile dondurulmuş testiküler spermin ICSI parametreleri üzerine etkisini araştırdık ve gruplar arasında fertilizasyon oranları, embriyo gelişme oranları, implantasyon oranları ve gebelik oranlarını karşılaştırarak değerlendirdik. Ayrıca dondurma-çözme sonrasında sperm parametreleri (%toplam motilite, %vitalite) arasındaki farklılıkları belirleyip gruplar arasında karşılaştırdık.

Her iki grupta, spermeler dondurulup çözüldüğünde toplam motilite ve vitalite oranlarında beklenen düzeyde

bir azalma meydana gelmiştir (%15-%18.5) ancak ejakülat ve testiküler sperm grupları arasında istatistiksel açıdan bir fark gözlemlenmemiştir. Bulgularımız, Hauser ve ark.'nın testiküler spermatozoanın dondurma-çözme işlemi sürecinde motilitenin düştüğünü bildirdikleri çalışmanın bulguları ile benzerdir (16). Levron ve ark. dondurma ve çözme işlemi sürecinde motilitenin konduğunu bildirmişlerdir (17).

Fertilizasyon oranlarını karşılaştırdığımızda, testiküler sperm grubu ile ejakülat sperm grubu arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Bu noktadaki bulgularımız literatürü destekler niteliktedir. Karacan ve ark. da yapmış oldukları çalışmada dondurulmuş testiküler sperm kullanımının toplam oosit, olgun oosit, transfer edilen embriyo sayısı, implantasyon oranı, fertilizasyon oranı ve gebelik oranı gibi ICSI parametreleri üzerine olumsuz bir etki göstermediğini söylemişlerdir (18). Literatürdeki bazı çalışmalar ise bulgularımızdan farklı sonuçlar bildirmişlerdir. Hauser ve ark. yaptıkları çalışmada, testiküler sperm dondurulduğunda hareketliliğinde azalma meydana geldiği için fertilizasyon oranında anlamlı düşüş olduğunu söylemişlerdir (16). Bulgulardaki bu farklılığın çalışmaya alınan hastaların eşlerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Embriyo gelişme oranları açısından her iki grubu karşılaştırdığımızda ejakülat sperm grubunda testiküler sperm grubuna oranla embriyo gelişme oranlarını daha yüksek olarak gözlemlenmesine rağmen belirlenen fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Çalışmamızın bulguları Tsai ve ark.'nın yaptığı çalışmadaki embriyo gelişme oranı sonuçları (%92.3) ile benzer bulunmuştur (19).

Grupları gebelik oranları açısından karşılaştırdığımızda, ejakülat grubunda testiküler sperm grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek gebelik oranları belirledik ( $p < 0,05$ ). Sonuçlarımız bu anlamda literatürü desteklemektedir. Testiküler sperm grubunda gebelik oranlarının düşük bulunmasının nedeni olarak sperm hücrelerinin hücre matürasyonlarını tamamlaması düşünülebilir (20). Ayrıca, microTESE ile alınarak dondurulan spermelerden elde edilen embriyolarda daha yüksek oranda aneuploidi belirlenmesi de bizim sonuçlarımızı destekler niteliktedir (21).

Dondurulmuş ejakülat sperm ile dondurulmuş testiküler sperm gruplarını implantasyon oranları açısından

dan karşılaştırıldığımızda dondurulmuş ejakülat sperm grubunda daha yüksek implantasyon oranları belirledik. Bulgularımız Hauser ve ark.'nın taze ve dondurulmuş testiküler sperm ile ejakülat spermin iimplantasyon oranları açısından karşılaştırdıklarında, taze testiküler spermde implantasyon oranını daha yüksek olarak gözlemledikleri çalışmanın bulgularını destekler niteliktedir (22).

Sperm kriyoprezervasyonu uzun yıllardır ICSI tedavilerinde kullanılmasına rağmen, yöntemin etkinliği ve güvenliği üzerine araştırmalar devam etmektedir. Çalışmamızın bulguları doğrultusunda, sperm kriyoprezervasyonunun spermin ICSI sürecini olumsuz etkilememesine rağmen gebelik oranlarında anlamlı düşüşe neden olduğu sonucuna varılmıştır. Bunun, implantasyon sürecinde spermin oynadığı rol nedeniyle olabileceği düşünülmektedir. Bu etkinin ortaya koyulabilmesi ve implantasyon sürecinde görev alan mekanizmaların aydınlatılabilmesi için, daha büyük hasta gruplarıyla yapılmış moleküler seviyede çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

#### KAYNAKLAR

1. Wetzels AMM, Bras M, Lens JW, et al. Laboratory aspects of in vitro fertilization. Cryopreservation/Theory 1996;229-244.
2. Delilbaşı L. A'dan Z'ye Tüp Bebek Laboratuvar. İstanbul Veri Medikal Yayıncılık, 2008; 229-258.
3. Anger JT, Gilbert BR, Goldstein M. Cryopreservation of sperm: indications, methods and results. J Urol 2003; 170:1079-84.
4. Gardner DK, Weissman A, Howles CM, et al. Textbook of Assisted Reproductive Techniques: Laboratory and Clinical Perspectives First Edition. Martin Dunitz, 2001.
5. Palermo G, Joris H, Devroey P, et al. Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. Lancet 1992; 340:8810: 17-8.
6. Schlegel PN. Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. Hum Reprod 1999; 14:131-5.
7. Popal W, Nagy ZP. Laboratory processing and intracytoplasmic sperm injection using epididymal and testicular spermatozoa: what can be done to improve outcomes? Clinics 2013;68: 125-30.
8. Van Steirteghem AC, Liu J, Joris H, et al. Highersuccess

- rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonalinsemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. Hum Reprod 1993;8:1055-60.
9. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature 1949; 164:666-70.
10. Englert Y, Delvigne A, Vekemans M, et al. Should one use fresh or frozen sperm in in-vitro fertilization with donors? Acta Urol Belg 1989; 57:83-91.
11. Borges E, Rossi LM, Locambo de Freitas CV, et al. Fertilization and pregnancy outcome after intracytoplasmic injection with fresh or cryopreserved ejaculated spermatozoa. Fertil Steril 2007; 87: 316-20.
12. Kuczynski W, Dhont M, Grygoruk C, et al. The outcome of intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved ejaculated spermatozoa—a prospective randomized study. Hum Reprod 2001; 16: 2109-13.
13. Romero J, Remohi J, Minguez Y, et al. Fertilization after intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. Fertil Steril 1996; 65: 877-879.
14. Gil-Salom M, Romero J, Minguez Y, et al. Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. Hum Reprod 1996; 11: 1309-1313.
15. Hessel M, Robben JC, D'Hauwers KW, et al. The influence of sperm motility and cryopreservation on the treatment outcome after intracytoplasmic sperm injection following testicular sperm extraction. Acta Obstet Gynecol Scand 2015;94:1313-21.
16. Hauser R, Yogev L, Amit A, et al. Severe hypospermatogenesis in cases of nonobstructive azoospermia: should we use fresh or frozen testicular spermatozoa? J Androl 2005;26:772-8.
17. Levron J, Madgar I, Shefi S, et al. IVF outcome with cryopreserved testicular sperm. Andrologia 2011;43:48-51.
18. Karacan M, Alwaeely F, Erkan S, et al. Outcome of intracytoplasmic sperm injection cycles with fresh testicular spermatozoa obtained on the day of or the day before oocyte collection and with cryopreserved testicular sperm in patients with azoospermia. Fertil Steril 2013 ;100:975-80.
19. Tsai YR, Lan KC, Kung FT, et al. The effect of advanced paternalage on the outcomes of assisted reproductive techniques among patients with azoospermia using cryopreserved testicular spermatozoa. Taiwan J Obstet Gynecol 2013;52:351-5.
20. Tournaye H. Use of testicular sperm for the treat-

ment of male infertility. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1997;11:53-62.

21. Ravizzini P, Carizza C, Abdelmassih V, et al. Microdissection testicular sperm extraction and IVF-ICSI outcome in nonobstructive azoospermia. *Andrologia* 2008; 40: 219–226.
22. Hauser R, Bibi G, Yogev L, et al. Virtual azoospermia and cryptozoospermia-fresh/frozen testicular or ejaculate sperm for better IVF outcome? *J Androl* 2011;32:484-90.