

ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ THỤ TINH ỒNG NGHIỆM VỚI TINH TRÙNG TRỮ LẠNH BẰNG PHƯƠNG PHÁP NITƠ LỎNG TẠI BỆNH VIỆN TRUNG ƯƠNG HUẾ

Phan Cảnh Quang Thông, Lê Minh Toàn
Khoa Phụ Sản, Bệnh viện Trung Ương Huế

Tóm tắt

Mục tiêu: 1. Khảo sát ảnh hưởng của phương pháp trữ lạnh bằng Nitơ lỏng lên chất lượng tinh trùng. 2. Đánh giá kết quả thụ tinh ống nghiệm bằng tinh trùng được trữ lạnh bằng Nitơ lỏng. **Đối tượng & phương pháp:** 45 mẫu tinh dịch với vận động và số lượng bình thường được thu thập từ 50 người đàn ông hoặc là bệnh nhân phòng vô sinh hiếm muộn hoặc là người hiến tinh trùng. Các mẫu tinh dịch này sẽ được trữ lạnh bằng phương pháp nitơ lỏng và được đánh giá theo tiêu chuẩn WHO 2010 trước và sau trữ lạnh. 50 chu kỳ thụ tinh trong ống nghiệm – tiêm tinh trùng vào bào tương trứng với tinh trùng trữ lạnh được đánh giá kết quả về tỉ lệ trứng được thụ tinh, tỉ lệ phôi tốt, tỉ lệ thai hóa sinh và thai lâm sàng. **Kết quả:** Đánh giá 45 mẫu tinh dịch, tỉ lệ tinh trùng di động và chỉ số tinh trùng sống giảm sau trữ lạnh ($27,4 \pm 5,1\%$ so với $12,2 \pm 5,6\%$, và $62,6 \pm 9,1\%$ so với $30,5 \pm 10,1\%$) rất có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$. Đánh giá kết quả thụ tinh, tỉ lệ trứng được thụ tinh là 79,7%, tỉ lệ tạo phôi là 92,1%. Trong 50 chu kỳ chuyển phôi tươi, có 23 trường hợp có thai sinh hóa chiếm tỉ lệ 52% và 20 trường hợp có thai lâm sàng chiếm tỉ lệ 46%. Không có trường hợp dị tật quan sát thấy ở những trẻ sinh ra sống. **Kết luận:** Có sự giảm đáng kể về chất lượng tinh trùng trước và sau trữ lạnh bằng hơi Ni tơ. Tuy nhiên trữ lạnh tinh trùng không làm thay đổi kết quả của chu kỳ thụ tinh trong ống nghiệm.

Abstract

EVALUATING THE RESULTS OF IN VITRO FERTILIZATION WITH FROZEN SPERM IN LIQUID NITROGEN VAPOR AT HUE

CENTRAL HOSPITAL

Objective: 1. to investigate the influence of cryopreservation in liquid nitrogen vapor on the quality of human sperm. 2. To evaluate the results of in vitro fertilization with cryopreserved sperm in liquid nitrogen vapor. **Materials & methods:** 45 semen samples with normal motility and sperm count were collected from 45 men who were either patients of an infertility clinic or had donated sperm for research. These semen samples were cryopreserved in liquid nitrogen vapor and were evaluated according to WHO 2010 criteria before and after their cryopreservation. 50 cycles of in vitro fertilization (IVF) - Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with frozen sperm's result were assessed through the fertilization rate, good embryo-rate, biochemical pregnancy rate and clinical pregnancy rate at Hue Central Hospital. **Results:** Assessed 45 semen samples, there was a similar significant decrease of the motile sperm rate and survival sperm index after cryopreservation ($27.4 \pm 5.1\%$ vs. $12.2 \pm 5.6\%$, and $62.6 \pm 9.1\%$ vs. $30.5 \pm 10.1\%$; $p < 0.05$). Evaluated the results of cycle of IVF-ICSI, the fertilization rate was 79.7% and the embryo rate was 92.1%. Among 50 cycles of IVF-ICSI with frozen sperm, a biochemical pregnancy was observed in 23 cases (52%) and clinical pregnancy was determined in 20 cases (46%). No congenital malformations were observed in these IVF children. **Conclusion:** Cryopreservation of sperm in liquid nitrogen vapor decreased the quality of the sperm. However, it didn't influence results of IVF cycles.

Đặt vấn đề

Trữ lạnh tinh trùng là một kỹ thuật mà trong đó, các mẫu tinh trùng được lưu giữ ở nhiệt độ rất thấp, -196°C , trong một thời gian cho đến khi cần sử dụng lại. Kỹ thuật này đã được các nhà khoa học biết đến ngay từ những năm cuối của thế kỷ XVIII. Vào thời đó Spallanzani đã nhận thấy rằng tinh trùng của người có thể duy trì khả năng di động của chúng cho dù đã trải

qua quá trình làm lạnh và rã đông [5]. Cho đến nay, phẫu thuật tinh hoàn thu hồi tinh trùng và trữ lạnh tinh trùng là một kỹ thuật đang được áp dụng một cách rộng rãi và không thể thiếu trong các trung tâm điều trị vô sinh lớn ở các nước trên thế giới và Việt Nam.

Kỹ thuật trữ lạnh tinh trùng được ứng dụng trong các trường hợp không thể lấy tinh trùng vào ngày định trước. Đối với trường hợp không có tinh trùng trong

mẫu xuất tinh, người ta có thể tiến hành phẫu thuật lấy tinh trùng từ mào tinh hay từ tinh hoàn, hoặc tinh trùng còn dư có thể được trữ lạnh để sử dụng sau này. Đối với người cho tinh trùng hoặc những bệnh nhân có bệnh lý ác tính cần hóa trị, xạ trị hoặc trước khi thắt ống dẫn tinh thì việc lưu trữ tinh trùng là cần thiết [5],[14].

Hiện nay, trữ lạnh tinh trùng, bên cạnh trữ lạnh phôi, trữ lạnh trứng, là một trong những kỹ thuật được áp dụng một cách thường quy tại các trung tâm thụ tinh trong ống nghiệm lớn trên thế giới. Kỹ thuật này có thể được ứng dụng rất nhiều trong lĩnh vực điều trị vô sinh, nhằm tăng hiệu quả của việc điều trị. Với các biện pháp hỗ trợ sinh sản, người ta đã có thể mang lại kết quả có thai mong muốn cho bệnh nhân.

Làm thế nào để đạt được hiệu quả tối ưu cho một chương trình trữ lạnh tinh trùng, giảm chi phí tốn kém. Hiện nay trên thế giới đã có nhiều nghiên cứu về kỹ thuật trữ lạnh tinh trùng với mục đích giảm chi phí, tiết kiệm thời gian nhưng mẫu tinh trùng vẫn lưu trữ đảm bảo và có thể sử dụng hiệu quả [8]. Xuất phát từ những vấn đề trên, chúng tôi tiến hành đề tài nghiên cứu này nhằm các mục tiêu:

1. Nghiên cứu ảnh hưởng của kỹ thuật trữ lạnh bằng nitơ lỏng đối với chất lượng của tinh trùng của người
2. Đánh giá kết quả của thụ tinh trong ống nghiệm với tinh trùng trữ lạnh bằng nitơ lỏng.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đây là một nghiên cứu tiến cứu tiến hành trong thời gian 2 năm từ 1/4/2011 đến 30/06/2013 tại Phòng Vô sinh, Khoa Phụ - Sản khoa, Bệnh viện Trung ương Huế.

Phân tích tinh dịch và trữ lạnh tinh trùng

45 mẫu tinh dịch với vận động và mật độ tinh trùng bình thường được thu thập từ 45 người đàn ông hoặc là bệnh nhân của phòng khám vô sinh hoặc là người hiến tặng tinh trùng. Những mẫu tinh dịch được trữ lạnh trong hơi nitơ lỏng và được đánh giá theo tiêu chuẩn WHO 2010 trước và sau khi được bảo quản lạnh. Môi trường đông lạnh tinh trùng là Sperm-freeze. Sau khi 10 phút cân bằng ở 37°C, ống hút được đặt theo chiều ngang 10 cm trên bề mặt nitơ lỏng trong 15 phút và sau đó nhúng vào nitơ lỏng. Giải băng các ống hút được thực hiện ở 37°C.

Tất cả 50 chu kỳ ICSI được thực hiện trong thời gian này đã được tiến hành. Tất cả các bệnh nhân nữ đã được điều trị với phác đồ GnRH-antagonist. Tế bào trứng được lấy ra bằng cách chọc xuyên âm đạo có hướng dẫn siêu âm vào nang buồng trứng 36 giờ sau khi tiêm HCG (Pregnyl®).

Thực hiện ICSI và đánh giá thụ tinh và phát triển của phôi thai: ICSI được thực hiện trên bàn soi kính hiển

Bảng 1. Phân tích tinh dịch theo tiêu chuẩn WHO 2010 [3]

Thông số	Bình thường
Thể tích (ml)	≥ 1,5
pH	7,2 - 8
Nồng độ (x 10 ⁶ /ml)	≥ 15
Số lượng (x 10 ⁶)	≥ 39
Vận động: % PR	≥ 32
% (NP + PR)	≥ 40
% IM	
Sức sống (%)	≥ 58
Hình thái bình thường (%)	≥ 4
Bạch cầu (x 10 ⁶ /ml)	<1

vi đảo ngược với độ phóng đại 150 lần bằng cách sử dụng hệ thống tương phản điều biến Hoffman 16 đến 18 giờ sau ICSI, tế bào trứng được kiểm tra dưới kính hiển vi soi ngược với độ phóng đại 150 lần để phát hiện hai tiền nhân. Bốn mươi tám giờ sau khi phôi ICSI được ghi nhận về chất lượng theo một hệ thống có tính đến tỷ lệ phần trăm các phần không nhân và kích thước của phôi bào. Cấy chuyển phôi được thực hiện vào ngày thứ 2.

Mang thai: Mang thai được chẩn đoán bằng cách đo HCG huyết thanh ít nhất là 14 ngày sau khi chuyển phôi. Mang thai lâm sàng được xác định bằng quan sát túi thai với nhịp tim của thai nhi bằng siêu âm qua âm đạo vào tuần 7 của thai kỳ.

Phân tích thống kê: Tất cả các kiểm định thống kê được thực hiện hai phía ở mức có ý nghĩa thống kê 5%. Kiểm định χ^2 được sử dụng để so sánh tỷ lệ thụ tinh, tỉ lệ phôi thai tốt cũng như tỉ lệ mang thai. Số tế bào trứng trung bình và số phôi trung bình mỗi lần cấy truyền được so sánh bằng cách sử dụng thống kê mô tả và phép kiểm t, trong khi các thông số của tinh dịch trước và sau khi bảo quản bằng đông lạnh được so sánh bằng cách sử dụng kiểm định t với hai biến ghép cặp.

Kết quả

Tổng cộng có 45 mẫu với tinh dịch đồ bình thường đã thu được trong nghiên cứu này. Tất cả các mẫu đều khỏe mạnh, không có vấn đề y tế được biết. Độ tuổi trung bình của người cho tinh trùng là 38,7 ± 5,3 tuổi. Có 50 người phụ nữ nhận tinh trùng và làm thụ tinh trong ống nghiệm. Độ tuổi trung bình của người nhận tinh trùng là 34,2 ± 4,4 tuổi. Thời gian mong con trung bình là 6,2 ± 2,3 năm.

Các dữ liệu phân tích tinh dịch nghiên cứu được thể hiện trong Bảng 2. Sự giảm đáng kể mật độ và khả năng vận động của tinh trùng sau khi rã đông đã được quan sát ($p < 0,05$). Giảm tỉ lệ sống của tinh trùng có ý nghĩa thống kê cũng đã được ghi nhận giữa các tinh dịch trước và sau trữ lạnh ($p < 0,05$).

Chỉ số tinh trùng sống sót sau trữ lạnh được thể

hiện ở bảng 3. Trong đó chỉ số CSF PR là $42,9 \pm 15,4\%$ và CSF của PR + NP là $71,6 \pm 17,1\%$.

Đặc điểm chu kỳ thụ tinh trong ống nghiệm ở người phụ nữ thực hiện kích thích buồng trứng và thụ tinh với tinh trùng trữ lạnh được thể hiện trong bảng 4. Số nang noãn thu được trung bình là $9,3 \pm 3,5$ noãn, số phôi thu được trung bình là $6,8 \pm 3,0$ phôi. Tỷ lệ thụ tinh và tỷ lệ tạo phôi trong nghiên cứu này lần lượt là 79,7% và 92,1%.

Bảng 5 cho thấy kết quả của thụ tinh trong ống nghiệm với tinh trùng trữ lạnh. Trong số 50 chu kỳ chuyển phôi tươi với số phôi chuyển trung bình là $3,4 \pm$

Bảng 2. Dữ liệu phân tích dịch trước và sau khi bảo quản đông lạnh

Thông số	Trước trữ	Sau trữ	P
Thể tích (ml)	$2,9 \pm 0,7$		
Mật độ trung bình x 10 ⁶	$58,8 \pm 13$	$36,6 \pm 6,4$	<0,05
Trung bình % PR	$27,4 \pm 5,1$	$12,2 \pm 5,6$	<0,05
Trung bình % (PR+NP)	$52,6 \pm 7$	$38 \pm 11,6$	<0,05
Tỷ lệ tinh trùng sống trung bình	$62,6 \pm 9,1$	$30,5 \pm 10,1$	<0,05

Bảng 3. Chỉ số tinh trùng sống sót sau trữ lạnh

Thông số sau trữ lạnh	Giá trị (%)
CSF TT di động tiến tới PR	$42,9 \pm 15,4$
CSF TT di động PR+NP	$71,6 \pm 17,1$

Bảng 4. Đặc điểm chu kỳ thụ tinh trong ống nghiệm với tinh trùng trữ lạnh

Đặc điểm	Giá trị
Độ dày nội mạc tử cung	$10,3 \pm 0,9$
Số nang noãn trung bình mỗi chu kỳ	$9,3 \pm 3,5$
Số trứng thụ tinh trung bình	$7,4 \pm 3,3$
Tỷ lệ thụ tinh	79,7%
Số lượng phôi trung bình	$6,8 \pm 3,0$
Tỷ lệ tạo phôi	92,1%

Bảng 5. Kết quả của thụ tinh trong ống nghiệm với tinh trùng trữ lạnh

Đặc điểm	Giá trị
Số phôi trung bình mỗi lần chuyển	$3,4 \pm 0,8$
Số HCG dương tính	26
% trên mỗi lần chuyển	52%
Số mang thai lâm sàng	23
% trên mỗi lần chuyển	46%
Đơn thai	20/23 (86%)
Song thai	3/23 (14%)

Bảng 6. Tình trạng thai và em bé của thụ tinh trong ống nghiệm với tinh trùng trữ lạnh

	Số lượng	Tỷ lệ %
Đã sinh	6	26,1
Cân nặng lúc sinh	2900 ± 200	
Dị tật bẩm sinh	0	
Đang thai nghén	17	73,9
3 tháng đầu	6	26,1
3 tháng giữa	3	13,0
3 tháng cuối	8	34,8

0,8 phôi, kết quả có 26 trường hợp có thai sinh hóa chiếm 52%. Trong 26 trường hợp này có 3 trường hợp ra máu sau ngày thử thai dương tính và không siêu âm thấy túi thai ở thời điểm 5 tuần sau chuyển phôi dẫn đến tỷ lệ thai lâm sàng trong nghiên cứu này là 46%.

Tình trạng thai và em bé của thụ tinh trong ống nghiệm với tinh trùng trữ lạnh được thể hiện qua bảng 6. Trong hơn 2 năm nghiên cứu có 6 em bé đã ra đời mà không có bất kỳ dị tật bẩm sinh nào. Cân nặng lúc sinh trung bình là 2900 ± 200 gram. Hiện tại còn 17 phụ nữ đang thai nghén và quá trình sàng lọc trong thai kỳ chưa phát hiện bất thường.

Bàn luận

Trong nghiên cứu này, tỷ lệ di động và tỷ lệ di động tiến tới của tinh trùng đều thấp hơn rõ rệt so với trước bảo quản. Theo Phạm Thị Thu Thủy (2011) tỷ lệ tinh trùng di động và tỷ lệ tinh trùng di động tiến tới đều giảm so với trước khi trữ lạnh phù hợp với kết quả nghiên cứu của chúng tôi. Kết quả này phù hợp với các kết quả đã được báo cáo của nhiều tác giả [6],[7],[12],[17]. Diễn biến của quá trình giảm khả năng di động và khả năng di động tiến tới của tinh trùng

Theo tác giả Feldschuh thời gian bảo quản tinh trùng có thể dài mà không ảnh hưởng đến sự di động của tinh trùng sau khi rã đông và kết quả có thai [13]. Do tác động của quá trình đông lạnh, khả năng di động của tinh trùng giảm là đương nhiên. Tuy nhiên, mong muốn của các tác giả là có được tỷ lệ tinh trùng di động cao nhất có thể sau BQL. Hiệp hội ngân hàng mô Hoa Kỳ đã đưa ra tiêu chuẩn để đánh giá chất lượng tinh trùng sau bảo quản lạnh sâu là: tỷ lệ tinh trùng di động sau bảo quản phải đạt được 50% so với tỷ lệ tinh trùng di động trước bảo quản [15]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi là $71,6 \pm 17,1\%$, như vậy là đạt được giá trị khuyến cáo.

Tỷ lệ tinh trùng sống sau trữ lạnh giảm $30,5 \pm 10,1$ sự khác biệt này với $p < 0,05$ có ý nghĩa thống kê. Theo Trần Thị Lục Hà (2009) thì tỷ lệ tinh trùng sống sau bảo quản lạnh giảm rõ rệt và phù hợp với nghiên cứu của chúng tôi.

Trong quá trình BQL, do xảy ra hiện tượng shock lạnh nên tỷ lệ tinh trùng sống sót sau bảo quản sẽ giảm đi. Tỷ lệ các TT có biểu hiện chết theo chương trình shock lạnh tăng lên [9]. Theo tác giả Counsel (2004) sau BQL tỷ lệ sống của tinh trùng ở mẫu bình thường [11].

Nghiên cứu về sự biến đổi hình thái TT sau BQL, tác giả Esteves (2007), Nguyễn Phương Thảo Tiên (2007) đã cho biết sau BQL tỷ lệ TT có hình thái bình thường giảm đi có ý nghĩa thống kê so với trước BQ [7], [12]. Nghiên cứu này của chúng tôi cũng cho kết quả tương tự: sau thời gian BQL tỷ lệ TT hình thái bình thường đã giảm đi 34,2

$\pm 8\%$ so với trước BQ ($p < 0,05$). Như vậy, quá trình BQL không chỉ làm giảm khả năng di động của TT, giảm tỷ lệ sống của TT mà nó còn tác động đến hình thái của TT.

Nghiên cứu của Yogev (2010) cho thấy ảnh hưởng của BQL lên sự toàn vẹn DNA của TT. Tác giả nhận thấy ở các mẫu TT bất thường xuất hiện nhiều các mảnh vỡ nhiễm sắc thể sau quá trình BQL [17]. Kết quả nghiên cứu của Yogev cũng tương tự với các báo cáo trước đó của các tác giả [10],[16]. Các kết quả này cũng là tiền đề để triển khai các nghiên cứu sâu hơn về sự biến đổi nhiễm sắc thể và hình thái siêu vi, thậm chí đánh giá cấu trúc DNA, gen của TT sau BQL mà chúng tôi chưa có điều kiện để thực hiện trong nghiên cứu này.

Tỷ lệ trứng thụ tinh trong nghiên cứu của chúng tôi là 79,7% (371/465). Nếu so sánh với kết quả nghiên cứu của Phan Yến Anh (2008) là 77,3% [1], thì kết quả của chúng tôi cao hơn.

Theo Ariff Bongso (1999): Một Lab TTTON được coi là thành công khi tỷ lệ trứng thụ tinh $> 70\%$ [19]. Chúng tôi cho rằng kết quả nghiên cứu của Phan Yến Anh (2008) khi Việt Nam mới bắt đầu làm TTTON. Điều này càng chứng tỏ kinh nghiệm là một trong những yếu tố rất quan trọng đối với những chuyên gia trong lĩnh vực TTTON. Hơn nữa, đến hôm nay TTTON ở Việt Nam đã có nhiều tiến bộ vượt bậc.

Số phôi trung bình thu được trong nghiên cứu của chúng tôi là $6,8 \pm 3$. theo kết quả của Phan Yến Anh tại BVPSTU $6,4 \pm 4,5$; ở Jordan là $7 \pm 3,6$ [21]; ở Trung Đông và Châu Âu là $7,1 \pm 5,2$ [18]. Như vậy, tỷ lệ của chúng tôi tương đương với các nghiên cứu trong nước và ngoài nước.

Tỷ lệ tạo phôi trong nghiên cứu của Nguyễn Xuân Huy (2004) là 3186/3707 (85,9%) [1]; Còn trong nghiên cứu của chúng tôi là 341/371 (92%).

Tỷ lệ trứng thụ tinh cao làm tăng tỷ lệ tạo phôi và tăng tỷ lệ có thai, đồng thời với sự phát triển của kỹ thuật trữ lạnh phôi sẽ giúp cho bệnh nhân giảm được chi phí trong những lần điều trị sau và làm tăng hy vọng cho những cặp vợ chồng không may bị hiếm muộn vô sinh.

Tỷ lệ có thai lâm sàng là kết quả cuối cùng của hàng loạt các chu trình kế tiếp nhau trong kỹ thuật TTTON, tỷ lệ thành công được các tác giả công bố rất khác nhau do nó phụ thuộc vào số lượng và chất lượng phôi chuyển, cách lựa chọn bệnh nhân, trình độ kỹ thuật của từng trung tâm. Kết quả có thai lâm sàng trên một chu kỳ chuyển phôi trong nghiên cứu của chúng tôi là 46%, cao hơn so với các tác giả khác Makhsee M (1998) là 32,6% [19]; Xingji Zhang (2005) là 43,1% [20] và Phan Yến Anh là 27% [2]. Điều này có thể được giải thích do nhóm nghiên cứu của chúng tôi chủ yếu vô sinh do nam, hầu như không có các nguyên nhân vô sinh phối hợp khác. Như vậy, tình trạng trữ lạnh không làm thay đổi kết quả kết quả của các chu kỳ thụ tinh trong ống nghiệm bằng phương pháp ICSI, bao gồm tỉ lệ thụ tinh, tỉ lệ tạo phôi, tỉ lệ có thai sinh hóa và tỉ lệ có thai lâm sàng.

Kết luận

Tiến trình trữ lạnh làm giảm chất lượng của tinh trùng về cả mật độ, di động và tỉ lệ tinh trùng sống. Tuy nhiên, quá trình này lại không ảnh hưởng đến các tỉ lệ thụ tinh và tỉ lệ mang thai khi thực hiện ICSI với tinh trùng trữ lạnh.

Tài liệu tham khảo

1. Trần Quán Anh, Nguyễn Bửu Triều (2011), "Bệnh học giới tính nam", NXB Y học, Hà Nội, tr 125-169.
2. Phan Yến Anh (2008), Đánh giá kết quả của phương pháp thụ tinh trong ống nghiệm tại bệnh viện phụ sản Hà Nội, Luận văn thạc sỹ y học, trường Đại Học Y Hà Nội.
3. Cẩm nang của tổ chức y tế thế giới cho xét nghiệm chẩn đoán và xử lý tinh dịch người, ấn bản lần V – 2010, NXBYH.
4. Trần Thị Lục Hà (2009), Nghiên cứu chất lượng tinh trùng của người bình thường sau trữ lạnh ở mẫu tinh dịch không lọc rữa và mẫu tinh dịch đã lọc rữa, Luận văn thạc sỹ, trường Đại Học Y Dược Huế.
5. Cao Ngọc Thành (2004), "Nội tiết học sinh sản - Nam học", NXBY học, Hà nội, tr 284-289.
6. Phạm Thị Thu Thủy (2011), Đánh giá chất lượng tinh trùng sau bảo quản lạnh sâu ở những mẫu tinh trùng nhược tinh đã được lọc rữa, Luận văn thạc sỹ y học, Trường đại học Y Hà Nội.
7. Nguyễn Phương Thảo Tiên (2008), "Đánh giá chất lượng tinh trùng sau bảo quản lạnh sâu ở những mẫu tinh dịch người bình thường đã lọc rữa", Tạp chí nghiên cứu Y học, 55 (3).
8. Adranda Gallegos J.E., Alvarez Robles L., et al. (1997), "Efficacy of a program of insemination with cryopreserved semen as treatment of the male", Ginecol Obstet Mex; 65: 520 - 522.
9. Byung Chul Jee và cộng sự (2010), "Comparison of human sperm quality and nuclear DNA integrity between slow and rapid freezing", Journal of Women's Medicine Vol. 3 No. 2, 57-62.
10. Coskun S, Hollanders, Al-hassan S, et al (2000), Day 5 versus day 3 embryo transfer: a controlled randomized trial", hum Reprod. 200sep; 15(9):1947-52
11. Counsel M., Bellinger R., Burton P. (2004), "Vitality of oligozoospermic semen samples is improved by both swim - up and density gradient centrifugation before

- cryopreservation", Journal of Assisted Reproduction and Genetics; 21(5): 137 - 142.
12. Devismita D., Kumar A., Kumar R. (2012), "Cryopreservation of Human Sperm: Effect of Cooling Rate on Intracellular Ice Formation", International Journal of Scientific & Engineering Research, Volume 3, Issue 6, June-2012.
13. Joseph Feldschuh et al. (2005), "Successful sperm storage for 28 year", Fertility and sterility; 84(4): 1016 - 1017.
14. Marlea Di Santo (2012), "Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART", Hindawi Publishing Corporation Advances in Urology, Volume 2012, Article ID 854837, 12 page.
15. Moberley MA (2010), "Electron microscopy in the investigation of asthenozoospermia", Epub; 67(2): 92 - 100.
16. Poongothai J, Gopenath TS, Manonayaki S. (2009), "Genetics of human male infertility", Asian J Adrol; 50(4): 336 - 347.
17. Sharma R.K, Agarwal A (1996), "Sperm quality improvement in cryopreserved human semen", J-Urol; 156(3): 1008 - 12.
18. Timothy G. Schuster, Laura M. Keller, Rodney L. Dunn, Dana A. Ohl, Tsai YC, Lin MY, Kang CY, Tsai YT, Lin LY, Chuan LT, Huang KF. (2004), "Comparing the clinical outcomes of insemination by two different density gradient preparation method", J chin Med Assoc; 67(4): 168 - 171.
19. Vivien Mac Lachlan (1997), The result of assisted reproduction technology. Infertility handbook A: clinical's guide, kovas G, Editor, Cambridge University Pres, pp 235-248.
20. Xingji Zhang, Chi - Huang Chen (2005) "Increased endometrial thickness is associated with improved outcome for selected patients undergoing invitro Fertilization - embryo transfer " Fertility and sterility. Vol 83. Pp 335-340.
21. Yögev L, Kleiman SE, Shabtai E. (201), "Long - term cryostorage of sperm in a human sperm bank does not damage progressive motility concentration", Human Reproduction; 25(5): 1027 - 30.