

KHẢ NĂNG SỐNG SÓT CỦA TINH TRÙNG NGƯỜI SAU TRỮ LẠNH BẰNG NITƠ LỎNG ĐƠN THUẦN

Nguyễn Hoàng Thảo, Nguyễn Văn Thoại

Khoa Hiếm muộn - vô sinh, Bệnh viện Phụ Sản Nhi Bình Dương

Tóm tắt

Mục tiêu: Khảo sát tỷ lệ tinh trùng sống sót sau trữ lạnh bằng hơi nitơ lỏng đơn thuần, ứng dụng cho IUI và IVF/ICSI. **Đối tượng và phương pháp:** 94 mẫu tinh dịch đồ trong giới hạn bình thường theo tiêu chuẩn của WHO 2010. Mô tả thực nghiệm cận lâm sàng, mẫu tinh dịch được đánh giá tỷ lệ sống và di động trước và sau khi trữ bằng hơi nitơ lỏng, từ đó tính được hệ số sống sót (CSF) và tỷ lệ sống sau rã của tinh trùng. **Kết quả:** sau rã đông, tỷ lệ PR trung bình là 13.18%, SD \pm 5.04; tỷ lệ tinh trùng sống trung bình là 28.55%, SD \pm 6.74. Chỉ số CSF và tỷ lệ sống sau trữ rã trung bình đạt lần lượt là 40.73% \pm 13.72 và 46.31% \pm 9.92. **Kết luận:** Việc áp dụng quy trình trữ bằng hơi nitơ lỏng đơn thuần là đơn giản, có hiệu quả, ứng dụng được cho điều trị và chi phí thấp. Phương pháp này trước mắt nên áp dụng cho ICSI, tiếp đến nên nghiên cứu ứng dụng cho IUI xem có thành công không.

Abstract

THE CRYOSURVIVAL OF HUMAN SPERM AFTER FREEZING IN LIQUID NITROGEN VAPOUR

Objective: To investigate the ratio of cryosurvival sperm frozen in liquid nitrogen vapor, applications for IUI and IVF / ICSI. **Materials & methods:** 94 semen sample in the normal range according to WHO 2010 criteria. Motility, vitality was assessed before and after storage in liquid nitrogen vapor. After that, evaluate the cryosurvival factor (CSF) and vitality of sperm after freeze-thawing. **Results:** After thawing, the average of motility percentage is 13.18%, SD \pm 5.04; percentage of vitality 28.55%, SD \pm 6.74. CSF and vitality after freeze-thawing were measured (40.73%, SD \pm 13.72 vs. 46.31%, SD \pm 9.92, respectively). **Conclusion:** The application of the liquid nitrogen vapor storage is simply, effectively for the treatment applications and low cost. This method should be applied for immediate ICSI, followed by applied for research to see if IUI can be successful.

Đặt vấn đề

Trữ lạnh và lưu trữ mẫu ở nhiệt độ thấp cho các loại tế bào khác nhau trong đó có trứng, tinh trùng và phôi người đã được áp dụng từ rất lâu và ngày nay trữ lạnh là một kỹ thuật không thể thiếu ở một trung tâm thụ tinh trong ống nghiệm hiện đại [1].

Việc trữ lạnh tinh trùng mang lại nhiều lợi ích như: bảo tồn khả năng sinh sản cho nam giới trước khi điều trị các bệnh lý ác tính, sử dụng thuốc điều trị 1 số bệnh lý mạn tính như tiểu đường, rối loạn miễn dịch; Lập ngân hàng tinh trùng; Trữ mẫu tinh trùng từ phẫu thuật; Chồng không có mặt hay không thể lấy được tinh trùng vào ngày chọc hút trứng hay bơm tinh trùng

Việc trữ lạnh tinh trùng theo phương pháp hạ nhiệt độ chậm có thể được thực hiện qua hệ thống máy hạ nhiệt độ hay dùng phương pháp thủ công để giảm đầu tư chi phí mua máy [3] [4]

Tinh trùng người chịu được một biên độ làm lạnh và làm ấm nhất định. Chúng không dễ dàng bị tổn hại bởi quá trình làm lạnh nhanh ban đầu (sốc lạnh).

Theo WHO (2010), tinh trùng người được trữ lạnh bằng máy điều chỉnh nhiệt độ hoặc bằng hơi lạnh. Việc

trữ lạnh bằng phương pháp thủ công có nhiều cách khác nhau, nhiệt độ không được điều khiển tự động nhưng vẫn có thể cho kết quả thích hợp. Có nhiều quy trình được áp dụng [3] như:

1. Đặt ống nhựa vào tủ trữ lạnh -20°C trong 30 phút sau đó đặt lên đá khô -9°C trong 30 phút trước khi chuyển vào nitơ lỏng -196°C

2. Ống nhựa có thể chuyển từ thùng trữ lạnh -20°C sang tủ lạnh khác ở -70°C, hoặc cho vào giá và đặt vào phần cổ của bình chứa nitơ lỏng, vùng này chứa hỗn hợp không khí và hơi nitơ lỏng, nhiệt độ trong khoảng -80°C đến -100°C trong 10-15 phút, trước khi chuyển vào nitơ lỏng. Ngoài ra, có thể đặt mẫu trên một khay lớn chứa nitơ lỏng, cách mực nitơ khoảng 10-20cm trong 1 giờ để đạt gradient nhiệt độ trên nitơ lỏng.

Quy trình đông lạnh dành cho các mẫu tinh trùng ít (oligospermic) và tinh trùng thu nhận bằng phẫu thuật: [3]

- Mẫu tinh dịch chỉ có 1 vài tinh trùng di động hay tinh trùng thu nhận từ đường sinh dục có thể được trữ lạnh dùng cho ICSI sau này

- Nếu cần thiết, ly tâm tinh dịch 1500g trong 10

phút để cô đặc tinh trùng trong một thể tích nhỏ (0.4ml) bổ sung chất bảo vệ đông lạnh và xử lý theo quy trình đã nêu ở trên.

Dịch mào tinh, mẫu mô trích từ tinh hoàn hoặc các dịch huyền phù tinh trùng khác có thể được xử lý bằng phương pháp bơi lên hoặc thang nồng độ, sau đó cho vào môi trường dành cho chuẩn bị tinh trùng có chứa Hesper và albumin huyết thanh người (HSA) với nồng độ 4mg/ml, bổ sung thêm Tyrode's glucose glycerol (TGG) hoặc các chất bảo vệ đông lạnh có sẵn trên thị trường có chứa albumin người.

Tỷ lệ tinh trùng di động sau khi đông lạnh bằng hơi nitơ lỏng cao hơn nhiều so với nhúng trực tiếp mẫu ngập trong nitơ lỏng (54.9% (SD +/- 15.4) so với 21.5% (SD +/- 10.0), $p < 0.05$). Mật độ tinh trùng ban đầu không ảnh hưởng đến tỷ lệ tinh trùng di động thu được sau rã đông. Thể tích tinh trùng di động qua lọc rửa được đông lạnh cũng không ảnh hưởng đáng kể đến tỷ lệ tinh trùng di động thu được sau rã. Không có sự tác động đáng kể đến tỷ lệ tinh trùng di động thu được đối với tổng số tinh trùng đông lạnh, thời gian để mẫu trên hơi nitơ lỏng [9]

Tỷ lệ tinh trùng di động sau rã của mẫu không lọc rửa trước khi trữ cao hơn nhiều so với mẫu lọc rửa trước trữ. [10]

Đa số các trung tâm TTON ban đầu tại VN đều sử dụng máy hạ nhiệt độ theo chương trình hoặc tự động. Phương pháp đông lạnh tinh trùng bằng hơi nitơ lỏng đơn thuần mới được áp dụng tại Việt Nam trong vài năm nay và chỉ mới có 1 đề tài nghiên cứu của Nguyễn Hữu Duy về trữ lạnh tinh trùng người bằng hơi nitơ lỏng đơn thuần được xây dựng dựa theo chương trình đông lạnh của máy được báo cáo năm 2009.

Tại BV Phụ Sản-Nhi BD hiện cũng đang sử dụng phương pháp Trữ lạnh tinh trùng người bằng hơi nitơ lỏng đơn thuần. Mục đích nghiên cứu của chúng tôi nhằm đánh giá tỷ lệ tinh trùng sống sót và độ di động sau rã đông bằng quy trình đông lạnh mà chúng tôi đang áp dụng.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Mô tả thực nghiệm cận lâm sàng

Tiêu chuẩn chọn mẫu

Mẫu tinh dịch đổ đến thử tại khoa HM-VS của BV.

Mẫu tinh dịch của những người tình nguyện hiến cho nghiên cứu

Cỡ mẫu

Được tính theo công thức

$$n = \frac{t^2 \times p \cdot (1-p)}{d^2} = 94$$

$t=1,96$ với độ tin cậy là 95%

$p=0,42$, tỷ lệ tinh trùng sống sót sau rã đông qua 10 mẫu pilot

$d=0,1$ (độ chính xác)

Tiêu chuẩn loại trừ

Những mẫu tinh dịch oligoasthenozoospermia theo WHO 2010, với các điều kiện: mật độ < 15.106 , PR+NP $< 40\%$

Mẫu có thể tích tinh dịch < 1 ml.

Những mẫu của người có xét nghiệm máu dương tính về các bệnh như: HIV, giang mai, HBsAg, HCV.

Thời gian nghiên cứu: 1/4/2012 – 30/11/2012

Địa điểm nghiên cứu: Khoa Hiếm muộn-Vô sinh BV Phụ sản-Nhi BD

Các định nghĩa

- CSF (Cryosurvival factor): hệ số sống sót sau trữ lạnh

- Độ di động của tinh trùng: phần trăm tinh trùng di động tiến tới PR (progressive) theo tiêu chuẩn đánh giá của WHO 2010

- Tỷ lệ sống: tỷ lệ tinh trùng bắt màu trắng sau khi nhuộm bằng Eosin-Nigrosin theo tiêu chuẩn đánh giá của WHO 2010

Vật liệu

- Môi trường trữ: Sperm freeze của hãng Fertipro, Belgium

- Cryotube 1.8ml (Nunc) để đựng mẫu trữ

- Cane nhôm

- Ống nghiệm 14ml vô trùng

- Hộp xốp kích thước bên trong: dài 33cm x rộng 23.5cm x cao 27cm

- Nitơ lỏng và bình trữ mẫu

Các bước thực hiện

- Mẫu sau khi ly giải được chia ra 2 phần: 1 phần làm tinh dịch đồ, 1 phần sẽ dùng để trữ lạnh (1ml)

- Công việc được phân chia cho 2 người hoạt động độc lập nhau. Một người đảm nhiệm việc phân tích tinh dịch đồ, các thông số trước, trong và sau rã (theo hướng dẫn của WHO 2010). Một người khác sẽ phụ trách việc trữ rã, đánh mã số, thu nhập số liệu.

- Đánh giá độ di động và tỷ lệ tinh trùng sống trong mẫu tinh dịch trước trữ

- Tinh dịch sẽ được đông lạnh bằng hơi nitơ lỏng đơn thuần theo quy trình đông lạnh thủ công, ứng dụng nghiên cứu của Nguyễn Hữu Duy:

- Ghi mã số của mẫu, ngày trữ lên cryotube và cane nhôm

- Nhỏ từ từ từng giọt 1ml môi trường vào 1ml tinh dịch trong ống 14ml vô trùng trong 3-5 phút

- Hút 1,8ml hỗn hợp vừa pha cho vào

cryotube, để yên 15 phút. Phần hỗn hợp dư được dùng để đánh giá độ di động (PR) và tỷ lệ tinh trùng sống trước khi đông lạnh.

- Dùng hộp xốp chứa 1 lượng nitơ lỏng có chiều cao 3cm
- Gắn cryotube vào cane nhôm (ở vị trí giữa của cane)
- Đặt cane nhôm nằm ngang vào hộp xốp cách mặt nitơ lỏng 15cm trong thời gian 15 phút
- Sau đó cho cane nhôm ngập trong nitơ lỏng rồi cắt vào bình trữ mẫu
- Ghi lại vị trí giá đặt mẫu vào sổ theo dõi
- Mẫu trữ sau 1 tuần được tiến hành rã đông ở nhiệt độ phòng
- Đánh giá 2 chỉ số: [4]

$$CSF (\%) = \frac{\% \text{ độ di động của tinh trùng sau rã đông}}{\% \text{ độ di động của tinh trùng trước trữ}} \times 100$$

$$TLSSRD (\%) = \frac{\% \text{ tinh trùng sống sau rã đông}}{\% \text{ tinh trùng sống trước trữ}} \times 100$$

CSF (%)=(% độ di động của tinh trùng sau rã đông)/(% độ di động của tinh trùng trước trữ) x100

TLSSRD (%)=(% tinh trùng sống sau rã đông)/(% tinh trùng sống trước trữ) x100

Bảng 1

Thông số	Trung bình ± SD
Tuổi	30 (21 - 45) ± 5.5

Bảng 2

Thông số	Trung bình	Ngưỡng bình thường theo WHO 2010 [12]
Thể tích mẫu (ml)	2.99 ± 1.25 (1-7.75)	≥ 1.5
Mật độ (10 ⁶ /ml)	69.45 ± 48.98 (15 - 331.8)	≥ 15
Tỷ lệ di động PR (%)	32.74 ± 7.62 (13 - 48)	≥ 32
Tỷ lệ di động NP (%)	26.25 ± 6.2 (13 - 43)	PR+NP ≥ 40
Tỷ lệ IM (%)	40.8 ± 7.57 (17 - 58)	
Tỷ lệ tinh trùng sống (%)	61.78 ± 7.43 (44 - 80)	≥ 58
Hình dạng bình thường (%)	2.93 ± 1.45 (1 - 8)	≥ 4

Bảng 3

Thông số	Tinh dịch đa pha với môi trường trữ	Tinh dịch trước trữ
Tỷ lệ di động PR (%)	32.47 ± 7.51 (14 - 51)	32.74 ± 7.62 (13 - 48)
Tỷ lệ tinh trùng sống (%)	60.36 ± 7.41 (42 - 78)	61.78 ± 7.43 (44 - 80)

Bảng 4

Thông số	Trung bình	SD
Tỷ lệ di động PR (%)	13.18 (7 - 27)	5.04
Tỷ lệ tinh trùng sống (%)	28.55 (11 - 46)	6.74
Chỉ số CSF (%)	40.73 (5.71 - 70)	13.72
Tỷ lệ sống sau rã (%)	46.31 (17.74 - 67.86)	9.92

Kết quả

Tuổi trung bình của bệnh nhân:

Bệnh nhân đến thử tinh dịch đồ đa số là trẻ, tuổi từ 21 đến 45 tuổi, tuổi trung bình là 30 tuổi, SD ± 5.5 (bảng 1).

Các giá trị tinh dịch đồ: (bảng 2)

Thể tích xuất tinh trung bình của các mẫu nghiên cứu là 2.99, SD ± 1.25. thể tích nhỏ nhất là 1ml, nhiều nhất là 7.75ml.

Mật độ tinh trùng nhìn chung là tương đối cao, từ 15 triệu đến 331,8 triệu, trung bình là 69.45 ± 48.98.

Tỷ lệ di động tiến tới PR từ 13% đến 48%, trung bình là 32.74% ± 7.62. Tỷ lệ di động không tiến tới trung bình là 26.25% ± 6.2 (từ 13% đến 43%). Tỷ lệ tinh trùng bất động IM trung bình là 40.8% ± 7.57 (giá trị từ 17% đến 58%). Tỷ lệ tinh trùng sống từ 44% đến 80%, trung bình là 61.78% ± 7.43. Về hình dạng bình thường của tinh trùng nhìn chung khá thấp, từ 1% đến 8%, trung bình là 2,93% ± 1.45.

Nhìn chung, trong 94 mẫu nghiên cứu, tỷ lệ di động tiến tới (trung bình 32.74%) và tỷ lệ sống (trung bình 61.78%) tương đối cao, giá trị trung bình cao hơn trị số giới hạn bình thường theo WHO 2010 lần lượt là 32% và 58%. Nhưng tỷ lệ tinh trùng có hình dạng bình thường bình quân (2.93%) thấp hơn ngưỡng bình thường theo WHO 2010 (4%)

Đánh giá tinh trùng sau khi trộn với môi trường trữ lạnh: (bảng 3)

Sau khi trộn mẫu với môi trường trữ lạnh, tiến hành đánh giá tỷ lệ di động PR và tỷ lệ tinh trùng sống trước khi trữ trên hơi nitơ lỏng. Hai chỉ số này lần lượt là 32.47% (với SD ± 7.51) và 60.36% (SD ± 7.41) xấp xỉ với giá trị tinh dịch đồ 32.74% (± 7.62) và 61.78% (SD ± 7.43) (bảng 3)

Đánh giá tinh trùng sau rã đông: (bảng 4)

Sau rã đông, tỷ lệ di động PR từ 7% đến 27%, trung bình là 13.18% ± 5.04. Tỷ lệ tinh trùng sống trung bình là 28.55% ± 6.74.

Chỉ số CSF từ 5.71% đến 70%, giá trị trung bình đạt 40.73% ± 13.72 tương đương với nghiên cứu của tác giả Nguyễn Hữu Duy đối với mẫu trong giới hạn bình thường theo WHO 1999 là 42.23% ± 11.24

Tỷ lệ sống sau rã trung bình đạt 46.31% cao hơn so với nghiên cứu của Nguyễn Hữu Duy là 43.8%

Bàn luận

Theo nghiên cứu của Somsin Petyim và Rounsin Choavaratana, năm 2006, tỷ lệ tinh trùng di động và

hệ số sống sót sau rã đều bị ảnh hưởng bởi quá trình trữ lạnh ở cả 2 phương pháp bằng máy và bằng hơi nitơ lỏng[13]. Chỉ số CSF và tỷ lệ sống sót sau rã là 2 giá trị quan trọng đánh giá sự thành công của một quy trình trữ rã.

So sánh các giá trị về tỷ lệ PR, tỷ lệ tinh trùng sống của tinh trùng sau khi trộn môi trường trữ lạnh với giá trị tinh dịch đồ ta thấy 2 giá trị này không giảm đáng kể chứng tỏ thao tác và thời gian trộn, lắc mẫu không ảnh hưởng nhiều đến 2 thông số này qua nghiên cứu của chúng tôi.

Chỉ số CSF trung bình đạt 40.73% và tỷ lệ sống sót sau rã trung bình là 46.31%, các giá trị này là chấp nhận được. Các giá trị này cũng phù hợp với nghiên cứu của NHDuy, lần lượt là 42.23 % và 43.8%, mặc dù nghiên cứu của tác giả này có cỡ mẫu thấp hơn (50 mẫu) và dựa vào tiêu chuẩn của WHO 1999 trong khi chúng tôi dựa vào WHO 2010 có các chỉ số bình thường thấp hơn. Các giá trị này cũng tương đương khi so sánh với kết quả của tác giả này trữ bằng máy lần lượt là 42.03% và 44.36%.[4]

Khi so sánh với nghiên cứu của Somsin Petyim và Rounsin Choavaratana năm 2006, trên 50 mẫu tinh dịch trong giới hạn bình thường theo WHO 1999, tác giả thu được chỉ số CSF (di động A+B) khi trữ bằng hơi nitơ lỏng so với trữ bằng máy lần lượt là $60.75\% \pm 18.11$ và $68.31\% \pm 19.9$ và tỷ lệ sống sót sau rã theo công thức của chúng tôi, khi trữ bằng hơi nitơ lỏng so với trữ bằng máy lần lượt là 66.45% và 71.85% [13]. Hai giá trị này ở 2 phương pháp trữ đều cao hơn kết quả của chúng tôi, có thể do tác giả trữ bằng cọng rạ (straw) 0.25ml có diện tích tiếp xúc với hơi nitơ lỏng cao hơn và thể tích tinh dịch trữ ít hơn, trong khi chúng tôi dùng cryotube 1.8ml, ngoài ra, quy trình trữ bằng hơi nitơ lỏng, chất bảo quản lạnh khác với chúng tôi, tiêu chuẩn chọn mẫu và cách đánh giá cũng áp dụng theo tiêu chuẩn của WHO 1999.

Theo một nghiên cứu khác cũng của hai tác giả Somsin Petyim và Rounsin Choavaratana cùng với các cộng sự, năm 2007, nghiên cứu trên 40 mẫu tinh dịch trong giới hạn bình thường theo WHO 1999, chỉ số CSF (di động A+B) khi trữ bằng hơi nitơ lỏng so với trữ bằng máy lần lượt là $(44.6 \pm 19.4)\%$ và $(61.7 \pm 20.6)\%$ còn tỷ lệ sống sót sau rã theo công thức của chúng tôi lần lượt là 39.28% và 42.27%. Như vậy, chỉ có chỉ số CSF cao hơn khi trữ tinh trùng bằng máy, các thông số còn lại ở cả 2 phương pháp đều tương đương với kết quả của chúng tôi.[14]

Kết quả của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu của Thitikan Ngamwuttivong & Somboon Kunathikom, chỉ số CSF và tỷ lệ sống sót sau rã lần lượt là 44.1% và 38.5%[15]. Tuy nhiên, việc đánh giá chỉ số CSF có phần chủ quan nên việc so sánh với các nghiên cứu khác cũng mang tính tương đối.

Khả năng di chuyển của tinh trùng sau rã đông và hệ số sống sót rõ ràng bị ảnh hưởng bởi quá trình trữ rã ở cả 2 phương pháp trữ. Perderson và Lebech, cũng như Keel và cộng sự, cho rằng khả năng thụ tinh của tinh trùng giảm sau bảo quản lạnh là do tổn thương cấu trúc. Ảnh hưởng này đã được giải thích theo nhiều cách bao gồm bảo quản lạnh gây hư hại ty thể và thay đổi hình thái tinh trùng như cuộn đuôi [13,15]

Trên thực tế khi áp dụng bất kỳ phương pháp trữ rã trong một trung tâm điều trị vô sinh, việc xem xét tính khả thi của từng phương pháp chẳng hạn như thời gian thực hiện và chi phí của các công cụ rất cần thiết. Thời gian cũng như chi phí cho trữ lạnh bằng máy đều cao hơn so với hơi nitơ lỏng [14] nên việc áp dụng trữ lạnh tinh trùng bằng hơi nitơ lỏng cho kết quả tương đương thì cũng chấp nhận được.

Tuy nhiên, theo nghiên cứu của Richter và cộng sự nhận thấy dùng tinh trùng tươi có tỷ lệ có thai gấp 3 lần so với tinh trùng trữ. Tỷ lệ có thai tương ứng ở nhóm sử dụng tinh trùng tươi và tinh trùng trữ lần lượt là 18.9% và 5%[7]. Do đó cần cân nhắc sử dụng tinh trùng trữ cho IUI hay chỉ nên sử dụng cho ICSI mà thôi.

Hạn chế của đề tài

Đây là nghiên cứu đầu tiên nên chúng tôi chỉ thực hiện trên mẫu có mật độ và độ di động trong giới hạn bình thường theo WHO 2010 để đánh giá hiệu quả quy trình trữ lạnh mà chúng tôi đang áp dụng. Trong thời gian tới, chúng tôi sẽ nghiên cứu trên mẫu tinh trùng ít, yếu, dị dạng (OAT) và những mẫu tinh trùng từ phẫu thuật PESA, TESE. Cũng nên nghiên cứu đánh giá tỷ lệ có thai đối với những mẫu sử dụng tinh trùng trữ cho IUI và ICSI.

Kết luận

Việc áp dụng quy trình trữ lạnh tinh trùng bằng hơi nitơ lỏng là có hiệu quả, ứng dụng được cho điều trị với kết quả gần như tương đương với sử dụng máy hạ nhiệt độ tự động nhưng thời gian ngắn và chi phí thấp. Phương pháp này trước mắt nên áp dụng cho ICSI, tiếp đến nên nghiên cứu ứng dụng cho IUI xem có thành công không.

Tài liệu tham khảo

1. Đặng Quang Vinh. Các kỹ thuật trữ lạnh tinh trùng người. Hội thảo chuyên đề vô sinh nam lần I, 2010.
2. Đặng Quang Vinh. Trữ lạnh tinh trùng—một số thông tin cơ bản. Tạp chí Sinh sản và sức khỏe số 3.
3. World health organization. Cẩm nang của Tổ chức Y tế thế giới cho Xét nghiệm chẩn đoán và xử lý tinh dịch người ẩn bản lần V-2010. Dịch từ sách tiếng Anh. Người dịch HOSREM. Nhà xuất bản Y học. Quý IV-2011. Chương 6, trang 169-176.
4. NHDuy, NTMai, HTQuế, HMTường. Trữ lạnh tinh trùng người bằng hơi nitơ lỏng đơn thuần, không sử dụng máy hạ nhiệt độ tự động. Hội thảo chuyên đề vô sinh nam lần I, 2010.
5. Hồ Mạnh Tường. Điều trị nội khoa thiếu năng tinh trùng không rõ nguyên nhân. Hội thảo chuyên đề vô sinh nam lần I, 2010.
6. Specialists in reproductive medicine & Surgery, P.A. Cryopreservation of sperm in conventional surrogacy procedures ART. WEB Site: www.DreamABaby.com. Updated: 28/11/2003
7. Anger JT, Gilbert BR, Goldstein M, 2003. Cryopreservation of sperm: indications, methods and result. J Urol. 2003 Oct;170(4 Pt 1):1079-84
8. W. Kuczynski, M. Dhont, C. Grygoruk, D. Grochowski, S. Wotczynski, M. Szamatowicz. The outcome of intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved ejaculated spermatozoa—a prospective randomized study. Human Reproduction Vol 16, Issue 10, pp 2109-2133.
9. Ziegler WF, Chapitis J. Human motile sperm recovery after cryopreservation: freezing in nitrogen vapor vs the direct plunge technique. Prim Care Update Ob Gyns. 1998 Jul 1;5(4):170.
10. Saritha KR, Bongso A. Comparative evaluation of fresh and washed human sperm cryopreserved in vapor and liquid phases of liquid nitrogen. J Androl. 2001 Sep-Oct;22(5):857-62.
11. World health organization. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. New York: Cambridge university press, 1999
12. World health organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th edition 2010
13. Somsin Petyim, Roungsin Choavaratana. Cryodamage on sperm chromatin according to different freezing methods, assessed by AO test. J Med Assoc Thai Vol.89, No.3, 2006, pp 306-312
14. Somsin Petyim, Roungsin Choavaratana, Somboon Kunathikom, Pitak laokirkkiat, Japarath Prechapanich. Freezing effect on post-thawed sperm characteristics especially sperm DNA integrity comparing between liquid nitrogen vapour and computerized program freezer. Siriraj Med J, Vol.59, Sept-Oct 2007, pp 298-302
15. Thitikan Ngamwuttivong & Somboon Kunathikom. Evaluation of Cryoinjury of sperm chromatin according to liquid nitrogen vapour method (I). J Med Assoc Thai Vol.90, No.2, 2007, pp 224-228