تأثیر انجماد سریع برقدرت حرکتی، مرفولوژی و بقای اسپرم

مرتضی انوری M.Sc.☆، محمدعلی خلیلی Ph.D.☆، سیدمهدی کلانتر Ph.D.☆،
صادق یادگاری M.Sc.☆

☆ دانشگاه علوم‌پزشکی شهید صدوقی یزد، مرکز تحقیقاتی،درمانی ناباروری، گروه علوم تشریح

آدرس مکاتبه: یزد، صندوق پستی ۹۹۹-۸۹۱۹۵، مرکز تحقیقاتی و درمانی ناباروری دانشگاه

چکیده

* **هدف:** بررسی تأثیر انجماد به روش سریع روی مشخصه‌های قدرت حرکتی، مرفولوژی و بقای اسپرماتوزوئید نمونه‌های انزالی طبیعی (normozoospermia)

* **مواد و روشها:** در تحقیق حاضر ۳۷ نمونه نورمواسپرمی بر اساس معیارهای WHO انتخاب شد. پس از بررسی مشخصه‌های اسپرمی هر نمونه به روش استاندارد سریع (Quick freezing) منجمد شد و مشخصه‌های غلظت، حرکت پیشرونده و درجا، مرفولوژی طبیعی و تست حیاتی ائوزین اسپرم بعد از انجماد و ذوب ارزیابی و با مشخصه‌های قبل از انجماد مقایسه شد. سپس میزان حرکت بازگشتی اسپرم محاسبه و ارتباط آن با مشخصه‌های اسپرمی مطالعه شد.

* **یافته ها:** نتایج نشان داد میزان غلظت، مرفولوژی طبیعی، حرکت پیشرونده و درصد اسپرمهای زنده بعد از انجماد و ذوب به طور معنی داری کاهش می‌یابد ($P<0.001$). میانگین حرکت پیشرونده بازگشتی ۲۱/۷۲±۳۵/۶۲ درصد است که با مشخصه‌های حرکت پیشرونده، تست حیاتی و مرفولوژی قبل از انجماد در ارتباط مستقیم است ($P<0.05$) ولی با مشخصه‌های حرکت درجا و غلظت اسپرم ارتباط معنی داری ندارد ($P>0.05$).

* **نتیجه گیری:** انجماد موجب کاهش در وضعیت مشخصه‌های اسپرمی می‌شود. با این حال، بسیاری از اسپرمها پس از انجماد نیز تحرک، مرفولوژی طبیعی و قدرت زیست خود را حفظ می‌کنند. بنابراین می‌توان در زمان مناسب برای درمان ناباروری از آنها استفاده نمود. همچنین در نمونه‌های انزالی، مشخصه‌های حرکت پیشرونده، تست حیاتی و مرفولوژی طبیعی نقش مهمی را در میزان حرکت بازگشتی اسپرم ایفا می‌کنند.

گل واژگان: انجماد سریع، اسپرم، حرکت، مرفولوژی

مقدمه

در طول چند دهه گذشته راههای مختلفی برای کمک به حل مشکل ناباروری ارائه شده است که یکی از مهمترین آنها به کارگیری روش انجماد[1] در دوره درمان ناباروری است. با استفاده از این روش می‌توان اسپرم، تخمک و جنین چندسلولی را برای مدت زمان طولانی منجمد کرد و در شرایط مناسب برای درمان ناباروری از آنها استفاده نمود. اسپرم طبیعی انسان پس از آماده سازی و محافظتهای لازم، قابلیت زنده ماندن خود را طی فرآیند انجماد حفظ خواهد نمودار (۱) و قادر به بارور ساختن تخمک و القای باروری است (۲) اگرچه اسپرم به عنوان اولین سلولی است که به طور موفقیت آمیز در شرایط انجماد نگهداری شده ولی همچنان تحقیقات برای بهبود روشهای انجماد و چگونگی تأثیر آن بر اسپرم بنابر دلایل زیر ادامه دارد:

۱- نتایج ضعیف باروری مربوط به کیفیت نامطلوب اسپرم در تعداد قابل توجهی از زوجین نابارور

۲- ارتقای کیفیت کار مراکز ذخیره اسپرم برای اهدای موفقیت آمیز اسپرم

۳- مدل بودن اسپرم به عنوان یک سلول تجربی در زمینه بیولوژی سرمایی به علت دسترسی آسان و مشاهدهٔ قابلیتهای زیستی آن

۴- نگهداری یک سلول در انجماد شامل منجمد نمودن و نگهداری در دمایی است که کلیه فعالیتهای متابولیکی سلولی متوقف می‌شود.

در عمل برای این منظور از نیتروژن مایع (۱۹۶° سانتی گراد) استفاده می‌شود (۳).

برای اولین بار Spallonzani گزارش داد که اسپرم انسان پس از اینکه برای مدتی در دمای پایین نگهداری شد می‌تواند دوباره حرکت خود را به دست آورد (۳ see).

باکشف گلیسرین به عنوان ماده محافظ انجماد در سال ۱۹۴۹ توسط Polge تحول عظیمی در نگهداری و فریز اسپرم اتفاق افتاد و از آن به بعد گزارشهای مختلف در مورد روند موفقیت آمیز انجماد و تولد نوزادان سالم از اسپرم منجمد شده- ذوب شده ارایه شد (۴ see).

بررسی تاثیر انجماد بر مشخصه‌های استاندارد اسپرم از قبیل تعداد، مرفولوژی و حرکت برای ارزیابی قدرت باروری نمونه بسیار مهم است. تاکنون با توجه به نوع نمونه، روشهای مختلف انجماد، نوع و ترکیب مواد محافظ انجماد، مدت زمان نگهداری و روش برگشت از انجماد[2] گزارشهای مختلفی ارائه شده است (۵، ۶، ۷، ۸). با این حال بعضی از محققین اذعان داشته‌اند که انجماد می‌تواند بر مشخصه‌های اسپرم تأثیر منفی داشته باشد که نتایج مختلفی را نیز در بر دارد (۹).

اگر چه تنها حرکت اسپرم به طور کامل در ارتباط با ظرفیت باروری نیست ولی معمولاً با بررسی حرکت اسپرم بعد از انجماد میزان موفقیت انجماد و گرم کردن را ارزیابی می‌کنند (۷، ۱۰). انجماد همچنین ممکن است باعث کاهش درصد مرفولوژی طبیعی اسپرم شود. در بررسی میکروسکوپی نشان داده شده است که این تغییرات بیشتر در ارتباط با خمیدگی و پیچ خوردگی در دم اسپرم است (۱۱). اخیراً بعضی از محققین به این نکته اشاره دارندکه هر چه تراکم و تعداد سلولهای با قابلیت زیست، بالا باشد؛ درصد بیشتری از این سلولها پس از انجماد زنده خواهند ماند و برعکس (۱). در مقابل برخی معتقدند مشخصه‌های اسپرم از قبیل تعداد، حرکت و مرفولوژی قبل از انجماد هیچ ارتباطی با وضعیت بعد از انجماد آنها ندارد (۳). بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعات فوق، هدف از این تحقیق مقایسه تأثیر انجماد بر مشخصه‌های اسپرمی قبل و بعد از انجماد به روش سریع است.

مواد و روشها

از بین مراجعین به مرکز ناباروری یزد، تعداد ۳۷ نمونه منی طبیعی بر طبق استانداردهای WHO انتخاب شد (۱۲). هر نمونه از طریق استمنا و بعد از چند روز خودداری جنسی در ظرفی استریل جمع آوری شد. سپس برای یکنواخت شدن به مدت ۳۰ الی ۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷° سانتی‌گراد نگهداری شد. بعد از بررسی اولیه، نمونه به دو قسمت یکی برای انجماد (آزمون) و دیگری برای بررسی نمونه تازه (شاهد) تقسیم شد. در هر گروه مشخصه‌های تعداد، درصد حرکت پیشرونده و درجا، با استفاده از حفره ویژه شمارش اسپرم[3] بررسی و مرفولوژی و تست حیاتی اسپرمها نیز براساس استاندارد WHO ارزیابی شدند (۱۲).

تمام نمونه ها با استفاده از روش ریچارد منجمد شدند (۱۳). محلول انجمادکه شامل نیترات سدیم ۰/۱ نرمال، گلوکز ۰/۳۳ مولار، فروکتوز ۰/۳۳ مولار، گلیسرول (۱۵ درصد) و زرده تخم مرغ (۲۰ درصد) است، ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت ۵۶° سانتی گراد قرار داده شد. سپس به ازای هر میلی‌لیتر بافر ۱۰ میلی گرم گلیسین اضافه و با استفاده از سود ۰/۱ نرمال pH محلول برابر با ۷/۳-۷/۲ تنظیم و در مرحله بعد نمونهٔ منی به آهستگی به نسبت ۱:۱ به بافر اضافه شد. مخلوط منی و بافر به داخل نی‌های ۰/۵ میلی لیتری کشیده و باکمک حرارت انتهای آن مسدود شد. نی‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در فاصله ۱۵ سانتی متری بالای بخار نیتروژن مایع قرار گرفتند و سپس به مدت حداقل ۴۸ ساعت در داخل مخزن نیتروژن مایع نگهداری شدند (۱۹۶° سانتی گراد). برای عمل ذوب، نی‌های حاوی منی منجمد در دمای آزمایشگاه (۲۵° سانتی گراد) برای ۵ دقیقه در داخل لیوان آب قرار گرفتند. سپس با محیط Ham's F-10 سرم دار (۱۰ درصد) به نسبت ۲:۱ مخلوط شدند.بعد از ۱۰ دقیقه نگهداری در دمای ۳۷° سانتی‌گراد با دور ۵۰۰g برای ۵ دقیقه سانتریفوژ و به ته‌نشین لوله ۱ سی‌سی محیط اضافه شد.

برای بررسی مرفولوژی، ۱۰ میکرولیتر از مایع منی را روی لام قرار داده و با لامل (Wet prepration) پوشانیده شد. سپس تعداد یکصد اسپرم از هر لام مطالعه و درصد اسپرمهای طبیعی گزارش شد. در بررسی تست حیاتی اسپرم ۱۰ میکرولیتر رنگ ائوزین ۵ درصد را با ۱۰ میکرولیتر مایع منی مخلوط کرده و با لامل ۲۲×۲۲mm پوشانیده شد. پس از ۲-۱ دقیقه تعداد ۱۰۰ اسپرم از هر نمونه بررسی و درصد اسپرمهای رنگ نگرفته به عنوان اسپرمهای زنده گزارش شد.

در گروه آزمون پس از گرم کردن نمونه‌ها علاوه بر بررسی مشخصه‌های اسپرمی، میزان حرکت بازگشتی بعد از انجماد و

1. Cryopreservation
2. Thawing
3. Makler chamber

ذوب شدن[1] با استفاده از فرمول ۱۰۰× حرکت بعد / حرکت قبل محاسبه شد (۳):

باتوجه به اینکه دامنهٔ حرکت پیشرونده قبل از انجماد بین ۵۰ تا ۸۴ درصد بود، میزان حرکت بازگشتی پیشرونده در دو گروه بالای ۷۰ و زیر ۷۰ درصد ارزیابی شد. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان و با استفاده از paird, student *t*-test از لحاظ معنی دار بودن یا نبودن مقایسه شدند. با استفاده از ضریب همبستگی پیرسون ارتباط بین مشخصه‌های اسپرمی و میزان حرکت بازگشتی محاسبه شد.

یافته‌ها

میانگین سن افراد مورد مطالعه و حجم نمونه به ترتیب (۲۴-۴۵) ۵/۲±۳۲/۲ سال و (۵/۱-۳/۱) ۰/۲۵±۲/۱ میلی‌لیتر و میانگین غلظت اسپرم پس از انجماد و قبل از شستشو، در هر میلی لیتر مخلوط مایع منی و ماده محافظ ۲۷/۵±۵۳/۵ میلیون در میلی لیتر بود. درصد حرکت پیش رونده در گروه شاهد (قبل از انجماد) ۶۴/۵۶و در گروه آزمون (بعد از ذوب) ۲۳/۹۲ درصد بود. درصد حرکت درجا در گروه شاهد و آزمون به ترتیب ۱۵/۸ و ۱۹/۵ درصد بود. درصد اسپرمهای زنده و مرفولوژی طبیعی اسپرمها در گروه شاهد به ترتیب ۸۲/۱ و ۶۴/۵ و در گروه آزمون ۵۲/۶ و ۴۷ درصد بود. در گروه آزمون درصد حرکت پیش رونده، مرفولوژی طبیعی و درصد اسپرمهای زنده نسبت به گروه شاهد کاهش معنی داری را نشان می‌دهد (P<0.001).

جدول ۱: میانگین مشخصه‌های اسپرمی قبل از انجماد و بعد از ذوب

مشخصه‌های اسپرمی	شاهد(قبل‌ازانجماد)	آزمون(بعدازذوب)
غلظت (10^6×ml)	۱۰۸/۳±۵۷/۷ (۳۰-۲۸۰)	۵۳/۵±۲۷/۵ (۴-۷۵)****
درصد تست حیاتی انوزین*	۸۲/۱±۱۳/۵ (۳۸-۱۰۰)	۵۲/۶±۱۵/۵ (۲۲-۷۷)****
درصد حرکت پیشرونده**	۶۳/۵۶±۹ (۵۰-۸۳)	۲۳/۹۲±۱۷/۴ (۴-۷۵)****
درصد حرکت درجا***	۱۵/۸±۸/۷ (۰-۳۵)	۱۹/۵±۷/۸ (۵-۳۸)
درصد مرفولوژی طبیعی	۶۴/۵±۱۲/۵ (۴۵-۹۳)	۴۷±۱۱/۹ (۲۵-۷۰)****

* درصد اسپرمهای زنده یا انوزین منفی

** مجموع حرکت رو به جلو سریع (a+b) براساس WHO99

*** گروه حرکتی C براساس WHO99

**** اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه شاهد (P<0.001)

اعداد داخل جدول، Mean±SD و اعداد داخل پرانتز دامنه تغییر را نشان می‌دهد

میانگین حرکت بازگشتی پیشرونده[2] ۲۱/۷۲±۳۵/۶۲ درصد است و بیشترین حرکت بازگشتی پیشرونده مربوط به گروهی از نمونه‌هاست که حرکت پیشرونده قبل از انجماد آنها بیش از ۷۰ درصد است. این میزان حرکت نسبت به آن دسته از نمونه‌ها که حرکت پیشرونده آنها کمتر از ۷۰ درصد است به طور معنی‌داری افزایش دارد (جدول ۲).

جدول ۲: مقایسه میانگین حرکت بازگشتی در دو گروه حرکتی

حرکت‌پیشرونده قبل از انجماد*	تعداد نمونه	میانگین حرکت بازگشتی**
<٪۷۰	۲۷	۲۹/۶۸±۱۵/۵۷
>٪۷۰	۱۰	۵۱/۶۵±۲۷/۹۴

* مجموع حرکت رو به جلو سریع و کند بر اساس WHO99 (P<0.05)

** ۱۰۰× حرکت بعد از انجماد / حرکت قبل از انجماد — اعداد ستون سه Mean±SD را نشان می‌دهد

حرکت بازگشتی پیشرونده با مشخصه‌های حرکت پیشرونده (r=۰/۳۵)، درصد اسپرمهای زنده (r=۰/۳۴) و مرفولوژی طبیعی اسپرمها (r=۰/۳۳) به طور معنی‌داری در ارتباط است (P<0.05).

بحث

غلظت اسپرم پس از انجماد در مخلوط مایع منی و ماده محافظ تقریباً به نصف کاهش می‌یابد که به دلیل اضافه شدن نسبت ۱:۱ مایع منی با ماده محافظ انجماد است. مطالعات نشان داده است که حضور پلاسمای منی و ماده محافظ برای بقای اسپرمها در طی انجماد ضروری به نظر می‌رسد (۵، ۸).

انجماد ممکن است باعث کاهش درصد حرکت، مرفولوژی طبیعی و تعداداسپرمهای زنده شود. این مطلب در ارتباط با آسیبی است که به اسپرمها در طی فرآیند انجماد و ذوب شدن وارد می‌شود. آسیب سلولی در طی انجماد اغلب به علت آسیب به غشا است. غشای سلولی ممکن است به علت تشکیل بلورهای یخ داخل سلولی، در طی انجمادسریع یا بر اثر فشارهای اسموتیک یا مکانیکی به علت تشکیل یخ خارج سلولی در طی انجماد آهسته، آسیب ببینند (۱۴).

نتایج این تحقیق نشان داد که انجماد باعث کاهش درصد حرکت، مرفولوژی طبیعی و تعداد اسپرمهای زنده می‌شود. در این تحقیق، از روش انجماد سریع استفاده شد و به‌نظر می‌رسد این کاهش به علت تشکیل بلورهای یخ داخل سلولی باشد. مطالعهٔ سایر محققین بر انجماد اسپرم که با استفاده از روشهای مختلف (۶، ۱۵) و محیطهای محافظ متفاوت (۳، ۵) انجام شده است نیز کاهش در مشخصه‌های اسپرمی را نشان می‌دهد. در این راستا Hallak و همکارانش با استفاده از بافر TEST- Yolk و گلیسرول ۱۰ نمونهٔ اسپرم اهدایی را منجمد کردند و مشخصه‌های حرکت، مرفولوژی و یکپارچگی غشای اسپرم را قبل و بعد از انجماد مقایسه کردند. درصد حرکت پیشرونده و مرفولوژی بعد از انجماد و ذوب به طور مشخصی نسبت به قبل از فریز در هر دو نوع محیط کاهش یافت ولی درصد این کاهش برای محیط گلیسرول و TEST- Yolk buffer به ترتیب ۵۱ و ۳۲ درصد بود. به نظر این محققین گلیسرول به تنهایی نمی‌تواند باعث حفاظت از آسیبهای انجماد شود؛ بلکه باید با سایر مواد محافظتی مانند زردهٔ تخم مرغ و بافر تریس همراه باشد. زردهٔ تخم مرغ احتمالاً باعث پایداری سیستم آنزیمی غشا می‌شود (۵).

در مورد مکانیسمی که باعث آسیب اسپرم در حین انجماد می‌شود ابهامات بسیاری وجود دارد. در مطالعات اخیر؛ Morris به وسیله میکروسکوپ الکترونی و با روشهای مختلف انجماد روی اسپرم، در هیچ یک از مراحل انجماد تشکیل بلور یخ داخل سلولی مشاهده نشد. وی چنین نتیجه گیری کرد که قدرت حیاتی اسپرم بعد از انجماد و ذوب شدن هیچ ارتباطی با تئوریهای رایج در مورد آسیب سلولی در حین انجماد ندارد. او پیشنهاد کرد که احتمالاً فاکتورهای دیگری تعیین کننده

1. Recovered motility
2. Recovered progressive motility

قدرت حیاتی اسپرم پس از انجماد و ذوب است (۶). جدیدترین تئوری که در این مورد ارائه شده مربوط به Glimore است. بر طبق این نظریه اسپرم دارای هدایت هیدرولیکی[1] یا Lp[2] نسبتاً بالایی است که در حضور مواد محافظ انجماد (CPA)[3] کاهش می‌یابد. از طرفی؛ انرژی فعالیت (E_a)[4] مربوط به LP در اسپرم نسبتاً پایین است که در حضور CPA افزایش می‌یابد و اسپرم می‌تواند تا ۱/۱ برابر متورم و تا ۰/۷۵ مرتبه چروکیده شود ولی هنوز توانایی زنده ماندن خود را تا بیش از ۹۰ درصد حفظ کند. انرژی فعالیت اسپرم عبارت است از مدت زمان لازم برای لیز شدن ۵۰ درصد اسپرمهایی که از محلول هیپوتونیک به محلول گلیسرولی با اسمولاریتی بالا منتقل شده‌اند. آنها پیشنهاد می‌کنند که افزایش E_a مربوط به LP در حضور CPA در درجه حرارت پایین احتمالاً دلیلی بر وجود تفاوت بین پیش‌بینی‌های تئوریکی و داده‌های تجربی حاصل از انجماد اسپرم باشد (۱۶).

مطالعات Derviredy در مورد اثر یخ خارج سلولی و مادهٔ محافظ انجماد روی مشخصه‌های قدرت نفوذ آب از غشای اسپرم در حین انجماد نشان داد که آسیب در اثر تشکیل یخ داخل سلولی احتمالاً بسته به غلظت CPA، در ۲۵ تا ۴۵° سانتی‌گراد در دقیقه انجام می‌شود (۱۷).

درصد حرکت پیشرونده و تست حیاتی اسپرم قبل از انجماد در ارتباط مستقیم با درصد حرکت پیشرونده بازگشتی است؛بنابراین می‌توان امیدوار بود که اسپرمهای با کیفیت بالاتر، پاسخ بهتری نسبت به انجماد بدهند. مطالعات Stanic نشان داد که نمونه‌های منی با مرفولوژی طبیعی بیش از ۵۰ درصد دارای بهترین حرکت بازگشتی بعد از انجماد و ذوب (۵۷±۲۶/۴) هستند (۸). همچنین مطالعات Hallak نشان داد که کاهش در درصد مورفولوژی طبیعی اغلب مربوط به کاهش در وضعیت طبیعی دم است (۵). درضمن سلامت غشا در ناحیه سر و دم، ممکن است یک عامل مهمی در تحرک اسپرم باشد، ولی نمی‌تواند به عنوان تنها عامل در کاهش حرکت پیشرونده بعد از انجماد تلقی شود (۱۸).

نتایج مربوط به نسبت حیاتی با استفاده از الوزین نشان می‌دهد که پس از انجماد، درصد اسپرمهای زنده کاهش می‌یابد که احتمالاً به دلیل تشکیل یخ داخل سلولی یا فشار اسمزی محیط به غشای ناحیه سری باشد (۱۷). کاهش در درصد اسپرمهای با غشای سر سالم (الوزین منفی) مطابق با یافته‌های Mahadevan (۱۱) و Lin (۱۸) است. این موضوع که تا چه اندازه آسیب به غشای ناحیه سر و سایر نواحی مانند قطعهٔ میانی و دم با یکدیگر در ارتباط باشند، احتیاج به مطالعات بیشتری دارد.

با توجه به استفاده از روش لقاح میکروسکوپی در درمان ناباروری مردان علاوه بر حرکت پیشرونده، تعداد اسپرمهای با تحرک غیر پیشرونده و اسپرمهای زندهٔ بعد از انجماد و ذوب شدن دارای اهمیت است. امروزه با استفاده از این روشها می‌توان درصورت وجود حتی یک اسپرم یا اسپرماتید زنده آنها را منجمد نمود و دوباره پس از ذوب برای تزریق داخل سیتوپلاسمی (ICSI)[5] استفاده کرد (۱۵). بنابراین بررسی درصد اسپرمهای زنده بعد از انجماد حایز اهمیت است.

با توجه به نتایج حرکت بعد از انجماد می‌توان انتظار داشت تا درصدی از نمونه‌ها (۲۷ درصد) برای روش درمانی IUI یا IVF استفاده شود؛ ولی با توجه به کاهش حرکت در سایر نمونه‌ها (۷۳ درصد) به نظر می‌رسد که از روش درمانی ICSI بهره‌مند شوند.

بر طبق نظر برخی از محققین، اثر سرمای حاصل از نگهداری مایع انزال در بخار نیتروژن در دمای تقریبی ۸۰- سانتی‌گراد بر تحرک اسپرم مشابه اثر درجه حرارت ۱۹۶- سانتی‌گراد است و تفاوت بارزی بین آنها وجود ندارد. با این حال ترجیح داده می‌شود که برای حفظ اسپرم به مدت زمان طولانی آنهارا در نیتروژن مایع (۱۹۶- سانتی‌گراد) نگهداری کنند (۱). نتایج این بررسی نشان داد که گرچه روش انجماد با استفاده از بخار نیتروژن[6] باعث کاهش مشخصه‌های مهم اسپرمی می‌شود؛ ولی می‌توان با استفاده از این روش ارزان و سریع، اسپرمها را ذخیره کرد و در موقع مناسب از آنها استفاده نمود. همچنین با توجه به اهمیت روش انجماد و محیطهای محافظ انجماد پیشنهاد می‌شود که تأثیر این دو عامل بر مشخصه‌های حرکت، مرفولوژی و توانایی زنده ماندن اسپرم بررسی شود.

References

1. Wolf DP: Sperm Cryopreservation kege WR, Chang RJ, Rebar RW, Soules MR (eds). Infertility Evaluation and Treatment USA, Saunders, 1995, pp 686-695
2. Navarrete T, Tohnson A, Mixon B, Wolf D: The relation between fertility potential measurements on cryobanked semen and fecundity of sperm donors. Hum Reprod 2000; 15: 344-350
3. Van der Elst J, Verheyen G, Van steriteghem A: Cryoconservation: Sperm and Oocytes, Rabe T, Diedrich K, Runnebaum B (eds). Manual on Assisted Reproduction Germany, Spinger, 1997, pp 223-251
4. Sherman JK: Current status of clinical crybanking of human semen. In paulson ID, Negro-Vilar A, Lucena E, Martini L (eds). Andrology: Male fertility and sterility Academic press, Orlando, Fl, USA, 1986, pp 517,547
5. Hallak J, Sharma RK, Wellstead C, Agorwal A: Cryopreservation of Human Spermatozoa. Comparison of test-yolk buffer and glycerol. Int J Fertil 2000; 45: 38-42
6. Morris GJ, Acton E, Avery S: A novel apprach to sperm cryopreservation. Hum Reprod 1999; 14: 1013-1021
7. Royere D, Barthelemy C, Hamamah S, Lansac J: Cryopreservation of spermatozoa a review. Hum

1. Hydrolic conductivity
2. Liquid penetration
3. Cryoprotective agent
4. Acivation energy
5. Intracytoplasmic Sperm Injection
6. Quick cryopreservation

Reprod, Update 1996; 2: 553-559
8. Stanic P, Tandara M, Sonicki Z, Simunic V, Radakovic B, Suchanek E: Comparison of protective media and freezing techniques for cryopreservation of human semen. Eur J Obstet Gynecol Repord Biol, 2000; 91: 65-70
9. Yogev L, Gamzu R, Paz G, kleiman S, Botchan A, Hauser R, Yavetz H: Prefreezing sperm preparation does not impair thawed spermatozoa binding to the zona pllucida. Hum Reprod 1999; 14: 114-117
10. Srisombut C, Morshedi M, Lin MH, Nassar A, Dehninger S: Comparison of Various methods of processing human cryopreserved thawed semen sample. Hum Reprod 1998; 13: 2151-2157
11. Mahadevan MM, Trounson Al: Relationship of fine structure of sperm head to fertility of frozen human semen. Fertil Steril 1984; 41: 287-293
12. World Health Organization (WHO) manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction 4th ed, New York, Cambridge University Press, 1999, pp 4-34
13. IVF Laboratory procedures Bourn-Hallam group. telder K, Averys, Mills C, 1990, pp 39-40
14. Mazur P: Freezing of living cells: mechanisms and implications. Am J Physiol 1984; 247: C125-C142
15. Hsieh Y, Tsai H, Chang C, Lo H: Cryopreservation of human spermatozoa within human or mouse empty zona pellucidae. Hum Reprod 2000; 73(4): 694-698
16. Gilmore IA, LiuJ, Woods EJ, Peter AT, Critser JK: Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilites: Convergent theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. Hum Reprod 2000; 15(2): 335-343
17. Devireddy RV, Swanlund DJ, Roberts KP, Pryor JL, Bischof JC: The effect of extracellular ice and cryoprotective agent on the water permeability Parameters of human sperm plasma membrane during freezing. Hum Reprod 2ooo; 15: 1125-1135
18. Lin MH, Morshedi M, Srisombut C, Nassar A, Oehninger S: Plasma membrane integrity of cryopreserved human sperm: An investigation of the result of the hypoosmotic swelling test, the water test, and eosin-y staining. Fertil Steril 1998; 70: 1148-1155