

고환조직 동결-융해 후 회수된 고환 정자에 대한 Hypo-osmotic Swelling (HOS) Test의 효과

성균관대학교 의과대학 삼성제일병원 생식생물학 및 불임연구실, 산부인과¹, 비뇨기과²
박용석 · 이형송 · 송상진 · 김정욱 · 강인수¹ · 서주태²

Effect of Hypo-osmotic Swelling (HOS) Test on Subsequent Post-thaw Testicular Spermatozoa

Yong-Seog Park, Hyoung-Song Lee, Sang Jin Song, Jeong-Wook Kim,
Inn Soo Kang¹, Ju Tae Seo²

Laboratory of Reproductive Biology & Infertility, Department of OB/GYN¹,
Department of Urology², Samsung Cheil Hospital & Women's Healthcare Center,
Sungkyunkwan University School of Medicine³, Seoul, Korea

Objectives: We have previously reported that thawed testicular sperm and sperm extracted from seminiferous tubule could achieve optimal fertilization and pregnancy in azoospermic patients. However, thawed testicular sperm did not show motility in many cases. Therefore we studied the viability of immotile sperm extracted from frozen-thawed seminiferous tubule using hypo-osmotic swelling (HOS) test and eosin-Y test.

Materials and Methods: After sperm extraction using for ICSI, the remaining sections of seminiferous tubules were frozen with a computerized freezer. For thawing and preparation of testicular sperm, the seminiferous tubules were thawed by removing from LN₂ and letting them at room temperature for 10 min followed by 37°C water bath for 10 min. The prepared samples were washed free of preservation medium and sperm preparation method described previously. Sperm was suspended in 0.1 ml hypoosmotic solution. After 30 minutes, the type of distally coiled sperm were assessed.

Results: In 44 cases of cryopreservation of seminiferous tubules in obstructive azoospermic patients, the fertilization rates with 2PN were 71.4% and pregnancy rates were 34.1%. The presence of motile spermatozoa on subsequent post-thaw testicular sperm was 15.1% and was increased to 77.3% just before ICSI. After sperm extracted from frozen-thawed seminiferous tubule, 3 hrs later in *in vitro* culture, the cases of presence of motile sperm, reaction of hypo-osmotic swelling test and viable sperm were 63.6% (28/44), 93.2% (41/44), and 77.3% (34/44), respectively.

Conclusions: Just after post-thawed testicular sperm did not show motility. Although motility was gained after *in vitro* culture, many cases showed non-motile sperm until optimal insemination time. However, HOS test showed positive reaction in non-motile sperm. Therefore, HOS test is an alternative method for the selection of viable sperm for ICSI.

Key Words: TESE, Seminiferous tubule, HOS test, Eosin-Y

고환조직 정자채취술 (testicular sperm extraction; TESE, 이하 TESE)과 세포질내 정자주입술 (intracytoplasmic sperm injection; ICSI, 이하 ICSI)은 무정자증으로 인한 남성불임 환자에서 수정률과 임신율을 높일 수 있는 유용한 방법으로 알려져 있으나,¹⁻⁶ 임신에 실패하였을 경우 반복적인 고환조직 절개는 불가피하며 이를 피하기 위해 고환 정자를 동결하거나,^{7,8} 세정관을 몇 부분으로 나누어 보존, 이를 반복 융해하여 사용하는 방법이 많은 연구자들에 의해 보고되었다.^{9,10} 고환 정자 동결의 중요성이 높아지는 이유는 임신에 실패하였을 경우, 반복적, 다중적 TESE없이 고환 정자를 이용할 수 있고, 고환조직의 손상을 줄일 수 있으므로 신체적, 경제적 부담을 줄일 수 있다. 그러나, 고환 정자의 경우 부고환 정자나 사정 정자에 비해 적은 농도와 낮은 운동성,^{11,12} 세정관내에 정자와 spermatid 외에 발달 단계의 정자세포 (spermatogenic cell), Sertoli cell, red blood cell, white blood cell, interstitial cell 등의 혼재¹³ 등의 요인으로 고환 정자의 동결-융해 후 생존율이 매우 낮은 것으로 보고되고 있다. 일반적으로 고환 정자의 경우, TESE 후 회수된 정자수가 극히 적거나 비활력 정자가 대부분이며, 특히 동결-융해 직후 회수된 고환 정자의 경우 다수가 죽었거나 생존했다라도 비활력 정자가 확인되는 경우가 많으므로 이러한 문제점을 극복하기 위하여 비활력 정자 중 살아 있는 정자를 선별하는 방법이 무엇보다 중요하다.

저장 용액 팽창 (hyposmotic swelling; HOS, 이하 HOS) test는 정자의 기능 검사를 하는 방법 중 매우 간단하고 반복성이 있다는 WHO¹⁴의 보고 이후, 많은 연구자들에 의해 그 방법이 보고되었다.^{15,16} HOS test는 정상적인 세포막 기능을 갖고 있는 살아 있는 정자의 경우 저장액 용액에 노출되었을 때 수분 유입으로 미부가 말리는 특성으로 Jeyendran 등¹⁵에 의해 정자의 수정 능력을 평가할 수 있는 간접적인 방법으로 시도되었으나 결과가 다른 수정 능력 검사 방법과의 상관관계,¹⁷ 그리고 IVF 시술시 결과치의 일치성 등 기능 평가를 위한 임상적 적용에 대한 논란은 많은 연구자들에 의해 제기되어 왔다.¹⁸⁻²² 그러나, 이 방법은 비활력 정자로부터 생존 정자를 선별할 수 있는 덜 침습적인 생존력 검사법이라 할 수 있으며,²³ Desmet 등²⁴은 비활력 정자로부터 HOS test 방법을 이용하여 생존이 확인된 정자를 회수, 일반적인 IVF 방법으로 수정에 실패한 난자에 ICSI를 이

용하여 30%의 수정률을 보고하였다.

이에 본 연구에서는 정상적인 시험관 아기 시술 후 임신에 실패하였을 경우 다음 IVF-ET 주기에 사용하기 위하여 동결된 세정관 일부를 융해 후 회수된 비활력 고환 정자를 대상으로 HOS test를 실시하여 이들의 이용 가능성을 조사하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

본 연구는 1998년 8월부터 1999년 5월까지 삼성제일병원 불임클리닉을 내원하여 시험관 아기 시술을 시행한 환자 중 전 주기에서 TESE를 시행 시 정자 생산 기능에 문제가 없는 것으로 판명된 폐쇄성 무정자증 환자 44례에서 TESE 실시 후 세정관을 동결 보존하였으며, 다음 시험관 아기 시술 주기에 반복적인 고환조직 절개를 피하기 위하여 동결 보존된 세정관 일부를 회수하여 HOS test를 시행하였다. 이들의 평균 연령은 남편이 37.3±6.0세였으며, 배우자의 평균 연령은 34.5±7.3세였다.

2. 고환조직 정자채취술 (TESE)

고환조직 정자채취술은 이미 보고된 바와 같다.^{6,25} 방법을 요약하면, 초막 (tunica vaginalis)과 백막 (tunica albuginea)을 절개하여 세정관 (seminiferous tubule)을 추출한 후 0.4% BSA가 첨가된 Ham's F-10 배양액으로 옮겨 해부현미경하에서 조심스럽게 세정관을 미세검자로 짜내어 (squeezing) 추출물을 얻은 후, 현미경하에서 정자의 존재 여부를 확인하였다. 정자가 확인된 경우 세정관을 몇 부분으로 나누어 동결 보존하였다.

3. 난자 확인과 세포질내 정자주입술 (ICSI)

난자 채취와 확인 및 세포질내 정자주입술은 이미 보고된 바와 같다.²⁵ 방법을 요약하면, FSH/hMG와 GnRH agonist를 병용하여 과배란을 유도한 후, 채취한 난자-난구 복합체를 현미경하에서 난자의 성숙 정도를 판정하여 제1극체가 방출된 제2감수분열 중기의 난자만을 ICSI에 사용하였다.

4. 수정 확인, 배아 이식 및 임신 확인

수정 여부는 ICSI 시행 후 16~20시간에 전핵 형성 여부로 확인한 후, 난자 채취 후 72시간 동안 배양하여 정상적으로 발생된 4-8 세포기 배아

Table 1. Outcome of ICSI using spermatozoa extracted from frozen-thawed seminiferous tubule

	Total
No. of cycles	44
No. of retrieved oocytes	601
No. of injected oocytes	507 (84.4%)
No. of fertilized oocytes	362 (71.4%)
No. of transferred embryos	174 (40.1%)
No. of pregnancies	15 (34.1%)
No. of ongoing pregnancies	13 (29.5%)

를 확인하고, 배아를 자궁내에 이식하였으며, 임신 여부는 배아 이식 13일 후에 혈청내 β -hCG 양으로 판정하였고, 임신낭 (gestational sac)이 확인된 경우를 임상적 임신 (clinical pregnancy)으로 정의하였으며, 현재까지 임신이 유지된 경우를 ongoing pregnancy로 정의하였다.

5. 세정관의 동결 및 융해

세정관을 0.4% BSA가 첨가된 Ham's F-10 배양액에 넣은 후 0.4% BSA가 첨가된 human semen preservation medium (HSPM)과 1:1로 섞어 2 ml 동결용 ampule에 넣었다. Ampule은 세포자동동결기 (Kryo-10, Planar Biomed, UK)에 옮긴 후 $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 속도로 4°C 까지 하강시키고 4°C 에서 -90°C 까지 $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 의 속도로 하강시킨 후 -196°C 의 액체질소에 24시간 이상 보관하였다. 융해는 ampule을 액체질소에서 꺼내어 실온에서 10분간 정치시킨 후 37°C 항온수조에서 10분간 정치시켜 실시하였다. 융해가 끝난 후 동해방지제를 제거하기 위하여 배양액으로 몇 차례 세척하고 회수된 세정관은 전술한 바와 같은 방법으로 정자 추출과정을 시행하였다.

6. 생존성 검사와 저장액 팽창 검사 (Hypo-osmotic swelling test)

추출된 정자의 생존 여부를 확인하기 위하여 다시 신선한 배양액으로 몇 차례 세척한 후 eosin-Y 용액을 이용하여 생존성을 확인하였다. 고환조직의 일부에서 회수된 정자는 그 수가 극히 제한되어 있으므로 50마리의 정자를 세어 계산하였다. 저장 용액 (hypo-osmotic solution)은 증류수 100 ml

Table 2. Comparison of presence of motile spermatozoa after thawing

No. of cycles	Motile sperm present	
	just after thawing	just before ICSI
44	7 (15.9%)*	34 (77.3%)*

* $p < 0.05$

에 sodium citrate 0.735 g과 fructose 1.351 g을 용해시켜 제작한 후 Eppendorf tube에 용액 1 ml를 넣어 -20°C 에서 얼려 보관하였다. 사용 전 저장 용액 (hypo-osmotic solution)을 녹이고 37°C 에서 약 5분간 가온한 후 액화된 정액 0.1 ml를 첨가하여 피펫으로 부드럽게 섞었다. 그 후 37°C 에서 30분이 경과하지 않도록 정치시킨 후 위상차 현미경 하에서 꼬리 모양의 변화로 정자의 팽창 여부를 확인하였다. 저장 용액에 반응한 정자수는 100마리 정자 총 마리 수에서 팽창 정자의 수를 두 번 반복해서 세어 평균수를 계산하였다.

7. 분석 및 통계 방법

결과에 대한 통계적 분석은 χ^2 -test를 이용하였고, p 값이 0.05 이하인 경우를 통계적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

IVF 시술을 시행한 환자 중 TESE 시행시 정자 생산 기능에 문제가 없는 것으로 확인된 폐쇄성 무정자증 환자 44례에서 601개의 난자를 회수하였으며, 507개의 난자에 동결된 고환조직을 융해 후 회수된 정자를 이용하여 ICSI를 시행하였다. 총 수정률은 71.4% (362/507)였으며 평균 4.0 ± 1.2 개 (mean \pm SD)의 수정란을 이식하여 15례 (34.1%)와 13례 (29.5%)의 임신 및 임상적 임신율을 보였다 (Table 1).

IVF 시술시 TESE 시행 직후와 ICSI를 시행하기 직전에 정자의 움직임을 관찰하였다 (Table 2).

정자 꼬리의 미약한 움직임도 ICSI에 이용하기 위한 살아 있는 정자의 기준으로 정하기 위하여 정자 꼬리의 움직임을 관찰한 결과 TESE 후 움직임이 관찰된 정자는 7례 (15.9%)에서 34례 (77.3%)로 증가하여 TESE 후 일정 시간 체외배양은 정자의 운동성을 높이는 효과가 있었다.

IVF 전주기에서 임신에 실패하였을 경우, 반복

Table 3. Comparative results of differential evaluative methods after thawing

No. of cycles	Motile sperm present	No. of HOS react	No. of viable sperm
	3 hrs after thawing		
44	28 (63.6%)*	41 (93.2%)*	34 (77.3%)*

*p<0.05

적인 고환조직 생검을 피하기 위하여 동결 보존된 고환조직내 정자의 이용 가능성을 알아보기 위하여 보관된 조직의 일부를 용해한 후 3시간째 정자의 운동성 관찰, HOS test와 생존성 검사를 시행하였다 (Table 3).

전술한 바와 같이 용해 정자의 이용 여부를 결정하기 위하여 정자 꼬리의 움직임 관찰한 결과 움직임이 확인된 예는 28례 (63.6%)로 동결 전 주기 (77.3%)와 비교하여 약간 낮은 비율을 보였으나, 이는 정자의 움직임을 확인하는 시간적 차이 때문으로 사료된다. 그리고 HOS test를 이용하여 정자의 생존 여부를 확인한 결과 41례에서 반응을 나타냈으며 (93.2%), eosin-Y를 이용하여 생존성을 확인한 결과 34례 (77.3%) 생존이 확인되었다. 이와 같이 운동성 관찰에 비해 HOS test와 eosin-Y 검사 방법의 결과가 높은 것으로 관찰되어 비록 운동성은 나타내지 않았더라도 정자의 생존 가능성을 예측할 수 있으며, eosin-Y 방법에 비해 HOS test의 결과가 높은 이유는 두 방법간의 반응에 대한 민감도의 차이에 기인하는 것으로 사료된다.

고 찰

비활력 정자를 이용하여 ICSI를 시행하는 과정의 주요한 문제는 살아 있는 정자와 죽은 정자를 구별하는 것이다. HOS test는 정상적인 세포막을 가지고 있는 정자의 말려진 꼬리만으로도 정자의 정상 여부를 판별할 수 있는 매우 간편한 방법으로 정자를 hypo-osmotic solution에서 회수하여 정자 주입전 배양액으로 옮겼을 때 형태가 정상적으로 돌아오는 것을 관찰할 수 있다.²⁶ 인간 정자의 membrane integrity를 확인하는 방법으로 McLaughlin 등²⁷이 정자 꼬리의 팽창을 확인하는 HOS test법과 손상된 원형질막을 갖고 있는 정자 두부의 핵에 H33258을 이용한 생존성 검사 방법을 비교하였는데, 그들에 의하면 이 두 방법간에는 높

은 상관관계가 있으며 따라서 HOS test는 인간 정자의 membrane integrity를 확인하는 유용한 방법이라 보고하였다. 본 연구에서 HOS test와 eosin-Y 검사 방법이 운동성 관찰에 비해 생존한 정자의 수가 유의하게 (p<0.05) 많음을 알 수 있었으나, HOS test와 eosin-Y 검사 방법간의 결과의 차이는 hypo-osmotic solution에 처리하는 시간의 차이와 동일한 표본의 각기 다른 osmotic pressure에 기인한 원인으로 사료되나 이에 대한 연구는 더 수행되어야겠다. Smikle과 Turek²⁸은 비활력 고환 정자와 사정 정자를 저장 용액에 30분간 처리한 후 13개의 난자에 ICSI를 시행하여 9개의 난자에서 정상적인 수정 (69%)을 확인하였으며, 30분 이상 배양하였을 시 sensitivity는 증가하지만, HOS test 결과에 대한 specificity와 예측가는 감소한다고 보고하였다. Casper 등²⁶은 완전한 무력정자증 (complete asthenozoospermia) 환자의 정액에서도 50% 이상의 생존 정자를 확인하였으나, HOS test 후 선별한 정자를 이용하여 ICSI를 시행한 결과 각각 43%와 39%의 수정률과 배발생율을 보고하여 ICSI를 위해 HOS test 후 정자를 선별하는 방법은 완전한 방법은 아니며, Tsai 등²⁹에 의하면, WHO¹⁴에서 제시한 fructose와 sodium citrate를 이용한 HOS test는 저장 용액에서 30분 이상 처리하였을 경우 생존 정자도 죽기 때문에 ICSI에 적용하기에 부적합하지만 150 mOsm, 0.9% NaCl 용액에서 1분과 30분 처리하였을 시 죽은 정자율이 각각 4%와 10%를 보였으며, Liu 등³⁰은 WHO protocol과 비교하여 자신들의 방법의 장점으로, 첫째, 살아 있는 정자는 용액에 즉시 반응하고 test 후 주입할 수 있으므로 150 mOsm, 0.9% NaCl 용액에서는 30분간 처리 시간이 필요치 않으며, 둘째, 0.9% NaCl 용액은 정자의 capacitation에 영향을 미치지 않는다고 보고하였다.

자동세포동결기를 이용하여 동결 후 운동성 정자의 회수율과 동결전 HOS test 결과간의 양호한 상관관계가 보고되기도 하였으나,³¹ Keel과

Karow³²는 동결전 정자의 운동성이 동결-융해 후 양호한 운동성과 반드시 일치하는 것은 아니라고 보고하였다. 정액 동결 후 생존력을 평가하는데 HOS test 결과가 여전히 많은 문제점을 갖는데 그 요인으로는 정자의 membrane integrity의 문제보다 각 정액의 질, 동결과정,^{33,34} 융해과정과 사용된 동해방지제^{35,36} 등 여러 복합적인 요인이 보고되었으며, 특히, Critser 등³⁶은 동결-융해 과정시 발생하는 osmotic shock, glycerol과 같은 동해방지제의 사용이 동결-융해 후 운동성을 저하시킨다고 보고하였다. Table 3에서 언급한 바와 같이 융해 후 3시간째 관찰을 시행하는 이유는 다음 IVF 주기 시 관찰 당시 움직임이 보이지 않으면 고환조직의 재생검, 잉여의 동결조직 융해, 혹은 비활력 정자를 이용한 ICSI 여부를 결정하기 때문이다.

이와 같은 결과로 고환조직의 융해 후 회수된 정자의 생존성을 확인한 후 회수된 정자의 사용 여부 또는 TESE 재시도 여부를 결정하는 것이 바람직하며, HOS test는 이들 고환조직 동결-융해 후 회수된 정자의 생존율을 확인할 수 있는 유효한 방법으로, ICSI를 이용한 수정률을 높일 수 있는 유효한 방법이라 하겠다.

참 고 문 헌

- Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M, Segal-Bertin G, Casseye M. Successful fertilization by testicular spermatozoa in an *in vitro* fertilization programme. Hum Reprod 1993; 8: 1339-40.
- Devroey P, Liu J, Nagy A, Tournaye H, Silber SJ, Van Steirteghem AC. Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 1994; 62: 639-41.
- Craft I, Tsirigotis M. Simplified recovery, preparation and cryopreservation of testicular spermatozoa. Hum Reprod 1995; 10: 1623-7.
- Nagy Z, Liu J. Using ejaculated, fresh, and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoon gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 1995; 63: 808-15.
- Silber SJ, Van Steirteghem AC, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Devroey P. High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy. Hum Reprod 1995; 10: 148-52.
- 박용석, 전진현, 변혜경, 김종현, 서주태, 이우식 등. 고환조직 정자채취술과 세포질내 정자 주입술을 이용한 고환조직 정자의 수정률과 임신율. 대한불임학회잡지 1997; 24: 101-9.
- Gil-Salom M, Romero J, Minguez Y, Rubio C, De los Santos MJ, Remohi J, et al. Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. Hum Reprod 1996; 11: 1309-13.
- Romero J, Remohi J, Minguez Y, Rubio C, Pellier A, Gil-Salom M. Fertilization after intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. Fertil Steril 1996; 65: 877-9.
- Allan JA, Cotman AS. A new method for freezing testicular biopsy sperm: three pregnancies with sperm extracted from cryopreserved sections of seminiferous tubule. Fertil Steril 1997; 68: 741-4.
- Oates RD, Mulhall J, Burgess C, Cunningham D, Carson R. Fertilization and pregnancy using intentionally cryopreserved testicular tissue as the sperm source for intracytoplasmic sperm injection in 10 men with nonobstructive azoospermia. Hum Reprod 1997; 12: 734-9.
- Silber SJ, Nagy Z, Liu J, Godoy H, Devroey P, Van Steirteghem AC. The use of epididymal and testicular spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection; the genetic implication for male infertility. Hum Reprod 1995; 10: 2031-43.
- Silber SJ, Van Steirteghem AC, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Devroey P. High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with sperm obtained from testicle biopsy. Hum Reprod 1995; 10: 148-52.
- Verheyen G, Nagy Z, Joris H, Croo ID, Tournaye H, Van Steirteghem A. Quality of frozen-thawed testicular sperm and its preclinical use for intracytoplasmic sperm injection into *in vitro* matured germinal vesicle stage oocytes. Fertil Steril 1997; 67: 74-80.
- World Health Organization: Laboratory manual for the examination of human semen and semen

- cervical mucus interaction. 3rd ed. Cambridge, Cambridge university press, 1992.
15. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Zaneveld LJD. The hypo-osmotic swelling test: an update. Arch Androl 1992; 29: 105-16.
 16. Mladenovic I, Mimic S, Genbacev O. Hypo-osmotic swelling test for quality control of sperm prepared for assisted reproduction. Arch Androl 1995; 34: 163-9.
 17. Jeyendran RS, Ohta S, Sakamoto M, et al. Hypoosmotic swelling test with a medium of distilled water. Arch Androl 1993; 30: 111-6.
 18. Barrett CLR, Osborn JC, Harrison PE, Monks N, Dumphy BC, Lenton EA, et al. The hypo-osmotic swelling test and sperm mucus penetration test in determining fertilization of the human oocyte. Hum Reprod 1989; 4: 430-4.
 19. Sjoblom P, Coccia E. On the diagnostic value of the hypoosmotic sperm swelling test in an in vitro fertilization (IVF) program. J In Vitro Fert Embryo Transf 1989; 6: 41-3.
 20. Avery S, Bolton VN, Mason BA. An evaluation of the hypo-osmotic sperm swelling test as a predictor of fertilizing capacity *in vitro*. Int J Androl 1990; 13: 93-9.
 21. Liu DY, Baker HWG. Tests of human sperm function and fertilization *in vitro*. Fertil Steril 1992; 8: 465-83.
 22. Biljan MM, Taylor CT, Manasse PR, Joughlin EC, Kingsland CR, Lewis-Jones DI. Evaluation of different sperm function tests as screening methods for male fertilization potential-the value of the sperm migration test. Fertil Steril 1994; 62: 591-8.
 23. Verheyen G, Joris H, Crits K, Nagy Z, Tournaye H, Van Steirteghem A. Comparison of different hypo-osmotic swelling solutions to select viable immotile spermatozoa for potential use in intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod Update 1997; 3: 195-203.
 24. Desmet B, Joris H, Nagy Z, et al. Selection of vital immotile spermatozoa for intracytoplasmic injection by the hypoosmotic swelling test. 10th Annual Meeting of ESHRE. Hum Reprod 1994; 9 (Supple.4): 24.
 25. 박용석, 전진현, 이호준, 강인수, 김종현, 이유식 등. 동결-융해 후 회수된 고환 정자와 세정 관내 정자의 수정 능력과 효율성에 관한 연구. 대한불임학회잡지 1998; 25: 171-7.
 26. Casper RF, Meriano JS, Jarvi KA, Cowan L, Lucato ML. The hypo-osmotic swelling test for selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection in men with complete asthenozoospermia. Fertil Steril 1996; 65: 972-6.
 27. McLaughlin EA, Ford WCL, Hull MGR. Motility characteristics and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. J Reprod Fertil 1992; 95: 527-34.
 28. Smikle CB, Turek PJ. Hypoosmotic swelling can accurately assess the viability of nonmotile sperm. Mol Reprod Dev 1997; 47: 200-3.
 29. Tsai YL, Liu J, Garcia JE, Katz E, Compton G, Baramki TA. Establishment of optimal hypo-osmotic swelling test by examining single spermatozoa in four different hypo-osmotic solutions. Hum Reprod 1997; 12: 111-3.
 30. Liu J, Tsai YL, Katz E, Compton G, Garcia JE, Baramki TA. High fertilization rate obtained after intracytoplasmic sperm injection with 100% nonmotile spermatozoa selected by using a simple modified hypo-osmotic swelling test. Fertil Steril 1997; 68: 373-5.
 31. Gehring WG. HOS test and standard semen parameters as predictors of viability of cryopreserved human spermatozoa? Hum Reprod 1986; 1 (Supple): 2, 12.
 32. Keel BA, Karow AM. Jr. Motility characteristics of human sperm, nonfrozen and cryopreserved. Arch Androl 1980; 4: 205-12.
 33. Serafini P, Marrs RP. Computerized staged freezing technique improves sperm survival and preserves penetration of zona free hamster ova. Fertil Steril 1986; 45: 854-8.
 34. Hammitt DG, Hade DK, Williamson RA. Survival of human sperm following controlled- and non controlled rate cryopreservation. Andrologia 1988; 21: 311-7.
 35. Mahadevan M, Trounson AO. Relationship of fine structure of head to fertility of frozen human semen. Fertil Steril 1984; 41: 287-93.

36. Critser JK, Huse-Benda AR, Aaker DV, Arneson BW, Ball GD. Cryopreservation of human

spermatozoa. III. The effect of cryoprotectants on motility. *Fertil Steril* 1988; 50: 314-20.
