

## EGYSZERŰSÍTETT HIPOOZMOTIKUS TESZT (HOS-TEST) ALKALMAZÁSA MÉNSPERMIUMOK ÉRTÉKELÉSÉRE

CZIMBER GYULA ENDRE - NEMES ANNAMÁRIA - OBÁDOVICS CSILLA - NAGY SZABOLCS

### ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérletekben egy, az alaphígító 1:5 arányú desztillált vizes hígításával előállított oldattal, ill. a Neild és mtsai (1999) által leírt laktóz oldattal elvégzett HOS-tesztet hasonlítottak össze. A kétféle HOS-teszttel párhuzamosan, a fagyasztott/felolvasztott ménsperma-minták (3 méntől 5-5 minta) szubjektív motilitás-vizsgálatát is elvégezték. Az egyes mének mintáit elemezve, a kétféle HOS-teszt eredményei szignifikánsan nem különböztek egymástól. A ménenkénti összehasonlítás során a HOS- tesztek, illetve a szubjektív motilitás alapján eltérő eredményeket kaptak. Az eltérések a leírt módszerek egyedre vonatkozó adaptációjának problémájára, a szubjektív motilitás értékelésének nehézségeire, illetve a motilitás többtényezős meghatározottságára is felhívják a figyelmet. A kipróbált, egyszerűsített HOS-teszt alkalmas lehet a gyakorlatban szokásos spermavizsgálat (motilitás-becslés) kiegészítésére.

### SUMMARY

*Czímber, Gy.E. - Nemes, A. - Obádovics, Cs. - Nagy, Sz.: A SIMPLIFIED HYPOOSMOTIC SWELLING TEST FOR ROUTINE STALLION SEMEN EVALUATION*

The objective of this study was to develop a simplified HOS test to complement the commonly used subjective motility test. The solution for this test was the basic semen preservation medium with dilution of distilled water in the ratio of 1 to 5. There was no significant difference between this HOS test and the other, with lactose-solution described by Neild et al.(1999). The comparison of HOS tests and motility test by stallions (3) showed different results. The mean motility in the sample of stallion 1, was 52%, and the proportion of the swollen spermatozoa was 33,45%. Otherwise, in case of stallion 3, the results were 15 and 41,5%, respectively. This discrepancy reminds the difficulties of applying the trial protocol for individual stallions, in consequence of e.g. different osmotic resistance of spermatozoa. The phenomenon observed at stallion 3 might be because of the motility depends on several factors, not only on membrane status.

## BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A gyakorlatban, a sperma minőségének becslésére a koncentráció megítélése mellett többnyire csak a jól-rosszul végrehajtott fénymikroszkópos, egyszerű motilitási vizsgálatot végzik el. Ez a módszer erősen szubjektív (*Jequier és Ukombe*, 1983), és a vizsgálat körülményei (spermavételtől eltelt idő, hőmérsékleti viszonyok, higiénia, vizsgált csepp nagysága, stb.) az eredményeket erősen befolyásolják. A nyers spermát célszerű hígítva vizsgálni, mivel így kevésbé hajlamosak a spermiumok az agglutinációra, amely a motilitás megítélését nehezíti (*Malmgren*, 1997). A motilitás csupán a spermiumok egyik jellemzője, és vizsgálatával nem diagnosztizálhatók az olyan spermium rendellenességek, amelyek a motilitást ugyan nem, de a termékenyítő képességet negatívan befolyásolják. Ezért a motilitás jellemzése egymagában nem alkalmas a sperma minőségének (fertilitásának) pontosabb meghatározására, még akkor sem, ha a szubjektivitást számítógépes spermavizsgálattal (Computer-assisted Sperm Analysis) zárjuk ki (*Katila*, 2001). A számtalan értékelési módszer közül egy egyszerűen elvégezhető HOS-tesztet (hypo-osmotic swelling test) *Jeyendran és mtsai* (1984) fejlesztettek ki, hogy a humán spermiumok plazmamembránjának funkcionális épségét jellemezzék. Kísérleteik szerint a korreláció a motilitással kisebb, amennyiben a duzzadt sejtek aránya 50 %-nál magasabb (alacsony HOS-teszt pozitivitásnál a motilitás is nagyobb valószínűséggel károsodott, míg magasabb HOS-teszt pozitivitásnál a motilitás lehet jó vagy rossz is, hiszen a motilitást metabolikus és egyéb szerkezeti tényezők (mikrotubulusok) is befolyásolják).

A szakirodalomban több cikk is foglalkozik a módszer ló sperma-vizsgálathoz való adaptációjával, és a fertilitáshoz való viszonyulásával (*Neild és mtsai* 1999, *Nie és Wenzel*, 2001).

A mesterséges termékenyítés gyakorlata szerint a levett spermát hígítják, amely lehetővé teszi a mikroszkópos vizsgálat pontosabb elvégzését is. A hígító természetesen jellemzően izoozmotikus oldat, de fagyasztott sperma esetében a mélyhűtési/felolvasztási folyamat során számos ozmotikus változás éri a sejteket. Joggal merül fel a kérdés, hogy a fagyaszthatóság előrejelzésére mennyire használható a HOS-teszt. *Vidament és mtsai* (1998) szerint a fagyaszthatóság egyik legjobb előrejelzője a teszt. A csikózási arány és a HOS-teszt eredményei között szignifikáns korrelációt találtak (*Katila és mtsai*, 2000). Hipoozmotikus környezetben (150 és 100 mOsm/l) a ló spermiumok duzzadása (spermatocrit meghatározás haematocrit centrifugával) és ún. vitális (élő/elhalt) festési módszer alapján élőnek nevezett sejtek (eozinnal nem festődők) aránya között szoros pozitív korrelációt találtak (*Lagares és mtsai*, 2000). A kombinált módszert a plazmamembrán kettős (biokémiai és fizikális) integritásának értékelésére ajánlják hipoozmotikus környezetben. Felhívják a figyelmet ugyanakkor, hogy az eozinos festődés hiánya csak a membrán fizikális épségét jelenti, a funkcionálisát nem.

Hasonló tesztet alkalmazott humán asthenozoospermia esetén *Buckett* (2003) a nem mozgó, de funkcionálisan ép membránnal bíró spermiumok arányának meghatározására, amelyek még felhasználhatók ICSI (*intracitoplazmatikus spermium injektálás*) segítségével a megtermékenyítésben. Ebben az esetben az eozin-nigrozin teszt mellett az egyszerűnek, megbízhatónak és ismételhetőnek

bizonyult HOS-teszt értékelése morfológiai vizsgálattal történt (fázis-kontraszt mikroszkóp). *Martini és mtsai.* (2006) szerint a hagyományos HOS-tesztnél megbízhatóbb eredményt ad az eozin-festéssel való kombinációja. Humán mintákon végzett kísérleteik során megállapították, hogy kis számban ugyan, de a Hoechst 33258 fluoreszcens festéssel elhaltnak bizonyuló spermiumok egy része megduzzadhat hipoozmotikus környezetben, ennek oka a feji és farki membrán eltérő szerkezete lehet. Harminc perces inkubációs idő esetén (a tíz perceshez képest) megnövekszik a téves pozitív reakciók aránya (Hoechst- pozitív és HOS- pozitív is egyben). Nem változott viszont a Hoechst negatív és ugyanakkor HOS pozitív (vHOS) sejtek aránya még 30 perc után sem.

Humán viszonylatban gyakran használnak ICSI céljára HOS- teszttel önmagában, vagy vitális festéssel (eozin) kombinációban vizsgált, nem mozgó, de megtermékenyítésre alkalmas spermiumokat. *Hossain és mtsai* (2010) szerint friss sperma esetén a vitális festés és a HOS-teszt hasonló eredményt ad. Az eozinos festés inkább a feji-, míg a HOS-teszt inkább a farki membrán épségét tükrözi. Az eltelt idő függvényében egyre nőtt a humán mintákban a különbség a festés (eozin-nigrozin), illetve a HOS- teszt alapján élőnek talált sejtek aránya között (több a HOS-pozitív sejt), amelyet módosít még a spontán kialakult farkduzzanatok (SDTS) aránya is. A spontán kialakult farkduzzanatok élettani ozmotikus környezetben alakulnak ki, a HOS-pozitív sejtekkel ellentétben. *Nagy és mtsai* (1999) megállapítják, hogy tripánkéssel, izoozmotikus festékoldatban inkubált spermaminták (bika, kos, sertés) motilitás-vizsgálata során festett farkú, aktívan mozgó sejtet nem találtak, ugyanakkor *Kovács és Foote* (1992) alapján, de hipoozmotikus tripánkéssel oldat felhasználásával festett kenetekben a festett farkú és a HOS-negatív (egyenes fark) sejtek között szoros, szignifikáns kapcsolatot találtak. Az ilyen sejtek a rutin értékelés során „elhaltnak” tekintendők ép akroszóma-, és feji plazmamembrán esetén is.

Mind a hipotóniás, mind a hipertóniás változások érintik az életképességet, a mitokondriális membránpotenciált és a motilitást. Bár az ozmotikus stresszt követően (bizonyos határok közt) a legtöbb spermium képes visszanyerni kezdeti sejtterefogatát, hipotóniás hatást követően az életképesség és a motilitás is szignifikánsan csökkent (*Pommer és mtsai*, 2002).

Lóspémánál a HOS-tesztet (laktóz oldat-50 mOsm/l) a progresszív motilitás vizsgálatával összevetve szoros korrelációt találtak. A hideg-sokknak kitett minták esetében a motilitás változott először, a plazmamembrán jellemzésére általuk használt tesztek (CFDA/PI fluoreszcens festés és a HOS-teszt) kisebb érzékenységet mutattak (*Neild és mtsai*,1999).

Saját vizsgálatunk arra irányult, hogy gyakorlati körülmények között hogyan egészíthetjük ki a szokásos fénymikroszkópos motilitás-vizsgálatot egy egyszerűsített HOS-teszttel, van-e jelentősége a kombinált vizsgálatnak az általunk végzett módszerrel.

## ANYAG ÉS MÓDSZER

A kísérlethez 3 mén (1.,2.,3.) korábban mélyhűtött spermáját használtuk. Mind-egyik méntől 5-5 mintát (1-15) olvastottunk fel (0,5 ml-es műszalma, 37 °C-on,

30 másodpercig). A felolvasztott mintákból 100-100  $\mu\text{l}$ -t elkülönítettünk a HOS-tesztekhez, a maradékot 10 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd szubjektív motilitás-vizsgálatot végeztünk fénymikroszkóppal. A motilitás-vizsgálat során 6  $\mu\text{l}$  felolvasztott spermát cseppentettünk tárgylemezre, lefedés után fénymikroszkóppal becsültük meg a progresszív motilitás mértékét (%).

A HOS-teszthez kétféle hipoozmotikus oldatot készítettünk, az egyik *Neild és mtsai* (1999) leírása szerinti laktózoldat (L), a másik a spermahígításhoz széles körben, és általunk is használt módosított INRA82 spermahígító (*Vidament és mtsai*, 2000) desztillált vizes, 1:5 arányú hígításával készült (D). Mindkét oldat számításaink szerinti ozmolaritása 50 mOsm/l volt. A felolvasztott spermamintákhoz (100  $\mu\text{l}$ ) adtunk a hipoozmotikus oldatokból 1-1 ml-t párhuzamosan (L, D). Az így nyert mintákat 30 percig inkubáltuk 37°C-on. Az inkubációs idő leteltével a feltekeredett v. görbült farkú (duzzadt) spermiumok arányát vizsgáltuk. A kiértékeléshez minden tárgylemezről összesen 200 hímivarsejt értékelését végeztük el, rögzítve a leszámoltak közül a jellegzetesen görbült, ill. feltekeredett farkúakat (HOS-pozitív sejtek). A sejtek számlálásához fénymikroszkópot (400x nagyítással) és a számolást segítő számítógépes programot (*Microscopy and Flow Cytometry Software*, [-http://software.ronhoebe.com/free/CellCounter.asp](http://software.ronhoebe.com/free/CellCounter.asp)) használtunk. A tárgylemezre egységesen 6  $\mu\text{l}$  mintát cseppentettünk, majd 18x18 mm-es fedőlemezzel fedtük le a cseppet. Ezt követően a számolást minden egyes minta (1-15) esetében megismételtük (L1-L2; D1-D2).

#### *Alkalmazott statisztikai módszerek*

A laktóz-oldatos és a desztillált vízzel készült spermahígító HOS-tesztek ismételhetőségét és a módszerek egyezőségét párosított t-próbával ellenőriztük. Az ismétlések illetve a módszer-egyezőség vizuális megjelenítésére a *Bland-Altman*-féle pontdiagramokat használtuk.

A mének közötti különbségek kimutatására egytényezős variancia-analízist végeztünk. A különböző módszerek, az ismétlés és a ménhatás egyidejű elemzésére a többszempontú variancia-analízist alkalmaztuk.

A szubjektív motilitás vizsgálat, valamint a HOS- tesztek közötti egyezőség kimutatását páronként kétmintás t-próbával is igazoltuk. Az elemzéseket az SPSS programmal (18-as verzió) végeztük.

## EREDMÉNYEK

Minden egyes mén, minden felolvasztott spermamintáját, még a HOS-oldatokkal (L, D) történő kezeléssel párhuzamosan, szubjektív motilitási vizsgálatnak vetettük alá, hogy a későbbiekben összevethessük a HOS-tesztek eredményeivel (1. táblázat).

#### *A laktózos és desztillált vizes HOS- tesztek ismételhetősége*

A párosított minták korrelációja a laktózos HOS- teszt (L) esetében  $r=0,55$ , közepes, de szignifikáns kapcsolat ( $p=0,035$ ).

1. táblázat

**A HOS(+) spermiumok aránya és a minták motilitása (%)**

Minta (1)	Laktóz 1 (2)	Laktóz 2 (3)	D 1 (4)	D 2 (5)	motilitás(%) (6)
1	30,0	30,0	36,0	38,0	40
2	40,0	32,5	30,0	29,0	45
3	31,0	30,0	34,5	35,5	60
4	26,5	29,5	34,0	23,5	60
5	32,0	36,0	36,0	38,0	55
6	37,0	38,5	44,0	35,0	35
7	42,5	34,0	42,0	36,5	40
8	23,0	32,5	36,0	27,5	30
9	27,0	31,0	36,0	33,0	35
10	32,0	34,5	33,5	27,5	30
11	42,0	33,5	40,5	40,5	10
12	36,5	44,0	41,0	39,5	15
13	34,0	42,0	41,5	47,0	15
14	42,5	45,5	38,5	40,5	20
15	42,5	42,0	43,5	42,0	15
1. mén átlag (7)	31,9	31,6	34,1	32,8	52
2. mén átlag (8)	32,3	34,1	38,3	31,9	34
3. mén átlag (9)	39,5	41,4	41,0	41,9	15
Átlag (10)	34,6	35,7	37,8	35,5	34,0
Szórás (11)	6,47	5,39	4,12	6,41	16,0

Adatok forrása: saját adatfelvétel

*Laktóz 2: Laktózos HOS-teszt ismétlése*

*D2: desztillált vizes, hígítós HOS-teszt ismétlése*

Table 1. Proportion of HOS positive spermatozoa and motility (%)

sample(1); lactose1 (2); lactose 2-repetition (3); D(diluted) 1 (4); D(diluted )2-repetition (5) ; motility (%) (6) ; mean (1. stallion) (7) ; mean (2. stallion) (8) ; mean (3. stallion) (9) ; mean (10) ; standard deviation (11)

A desztillált vízzel hígított spermahígítós oldattal készült HOS- tesztben (D) a párosított minták korrelációja  $r=0,679$ , közepesen erős, de szignifikáns kapcsolat ( $p=0,005$ ).

Az ismétlések közötti eltérés tesztelésére a párosított t próbát alkalmaztuk. A próba eredményeit az 2. táblázat tartalmazza.

Az ismétlések között nem mutatható ki statisztikailag igazolható eltérés ( $p>0,05$ ), vagyis az ismétlések eredményei megegyeznek.

A laktózos oldattal (L) végzett HOS- teszt ismételhetségét az 1., míg a desztillált vizes, hígítós (D) HOS-teszt ismételhetségét a 2. ábra szemlélteti.

A méréspárok különbsége a mérésátlagok függvényében ábrázolva nem lépnek ki az átlag $\pm$ 2 szórás intervallumból, így az ismételhetséget bizonyítottnak tekintjük. Az ismétlések között nem mutatható ki statisztikailag igazolható eltérés ( $p>0,05$ ), vagyis az ismétlések eredményei megegyeznek.

2. táblázat

## Párosított minták t próbája

	Eltérés (1)					t	df	Sig.(p) (2-oldali) (7)
	Átlag (2)	SD (3)	SE (4)	95% CI				
				Alsó (5)	Felső (6)			
Laktoz1 - Laktoz2	-1,1	5,68	1,47	-4,28	2,01	-0,773	14	0,453
D1-D2	2,3	4,71	1,22	-0,34	4,87	1,864	14	0,083

Forrás: saját számítás

CI: Konfidencia intervallum

Table 2. Paired Samples t-Test

paired Difference (1); Mean (2); Standard Deviation (3); Standard Error Mean (4); Lower limit of Confidence Interval of Difference (5), Upper Limit of CI of Difference (6), 2-tailed (7)

1. ábra A laktózos oldattal (L) végzett HOS- teszt ismételtetősége

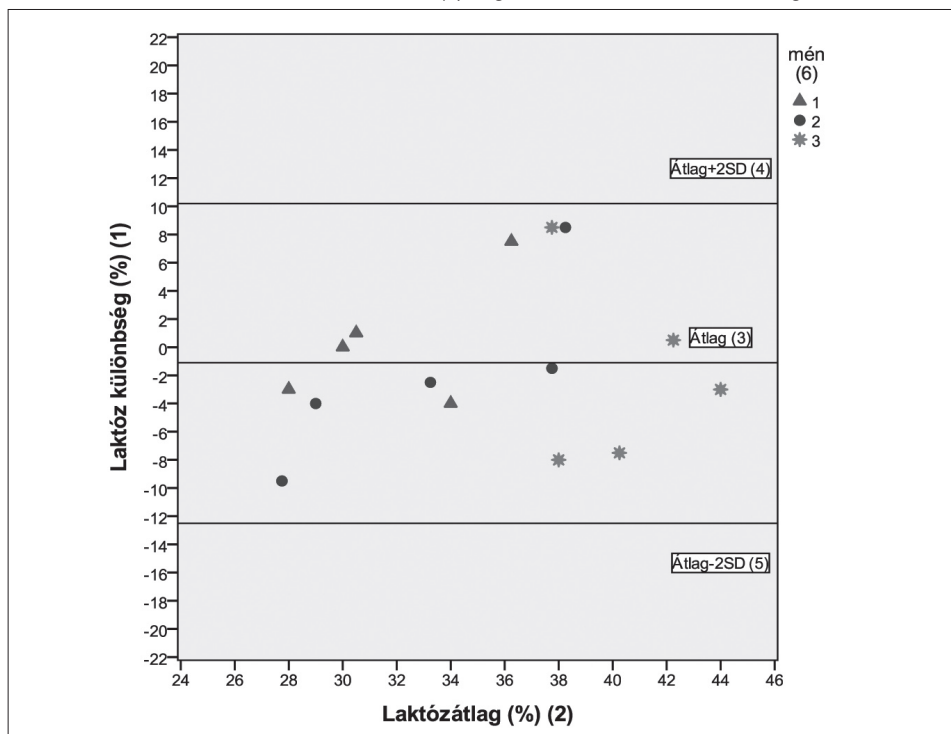


Figure 1. Repeatability of HOS – L test  
lactose,difference (%) (1); lactose,mean(%) (2); mean (3); mean+2times SD (4); mean-2times SD (5); stallion (6)

2. ábra A desztillált vizes (D) HOS-teszt ismételhetősége

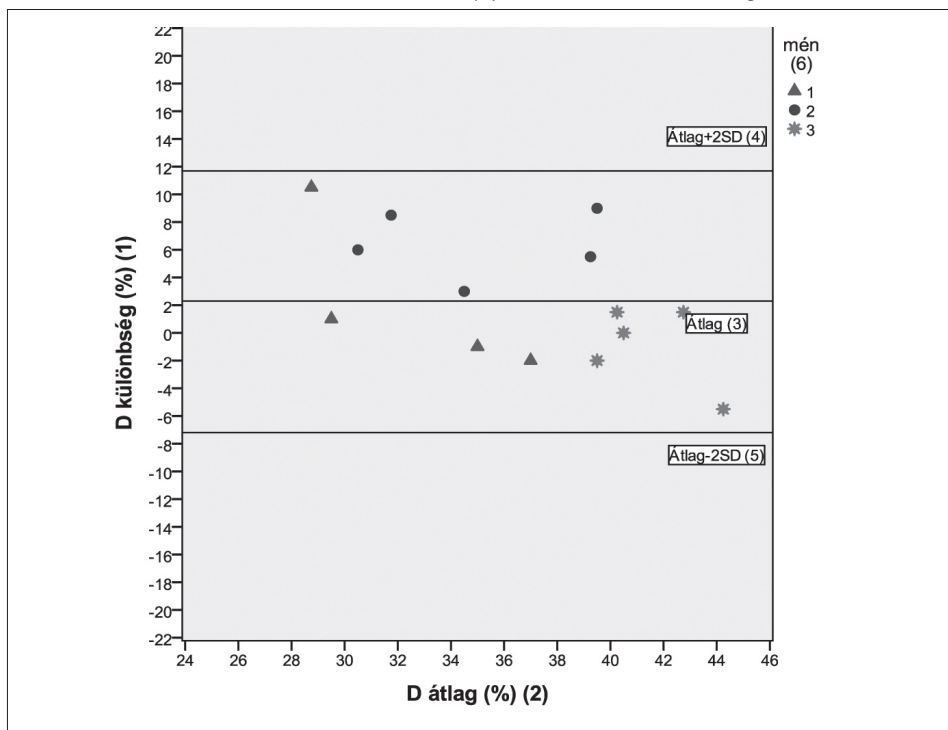


Figure 2. Repeatability of HOS – D test

D (diluted) difference (%) (1); D (diluted) mean (%) (2); mean (3); mean+2times SD (4); mean-2times SD (5); stallion (6)

### A HOS-teszt módszer-egyezőség elemzése

A laktózos és a desztillált vízzel készült spermahígítós oldat HOS- tesztjeinek elemzése során az ismétlések átlagértékeivel számoltunk. A laktózos vizsgálat átlagértéke 35,1%, szórása 5,2%. A desztillált vizes HOS teszt átlagértéke 36,7%, szórása 4,8%.

A párosított adatok között lévő korreláció  $r=0,702$ , közepesen erős, de szignifikáns kapcsolat ( $p=0,004$ ).

A módszer-egyezőség statisztikai igazolására párosított t-próbát alkalmaztunk. A kétféle hígítóval készült teszt között nem mutatható ki szignifikáns eltérés. ( $p>0,05$ )

A kétféle HOS teszt (D-L) összehasonlítását a 3. ábra, az egyezőség vizsgálat Bland-Altman diagramját a 4. ábra szemlélteti.

A vízszintes tengelyen a kétféle HOS- teszt átlaga, a függőleges tengelyen a kétféle mérés közötti eltérést jelenítjük meg.

Az ábrán az átlagtól való +/- két szórásnyira terjedő intervallumon kívül eső pontok tekinthetők hibának. Esetünkben a 15 mérésből egyetlen egy esik kívül a tartományon, így elmondható, hogy a módszerek statisztikailag igazolható módon megegyeznek.

3. ábra A kétféle HOS teszt eredményeinek összevetése (főátló=teljes egyezés)

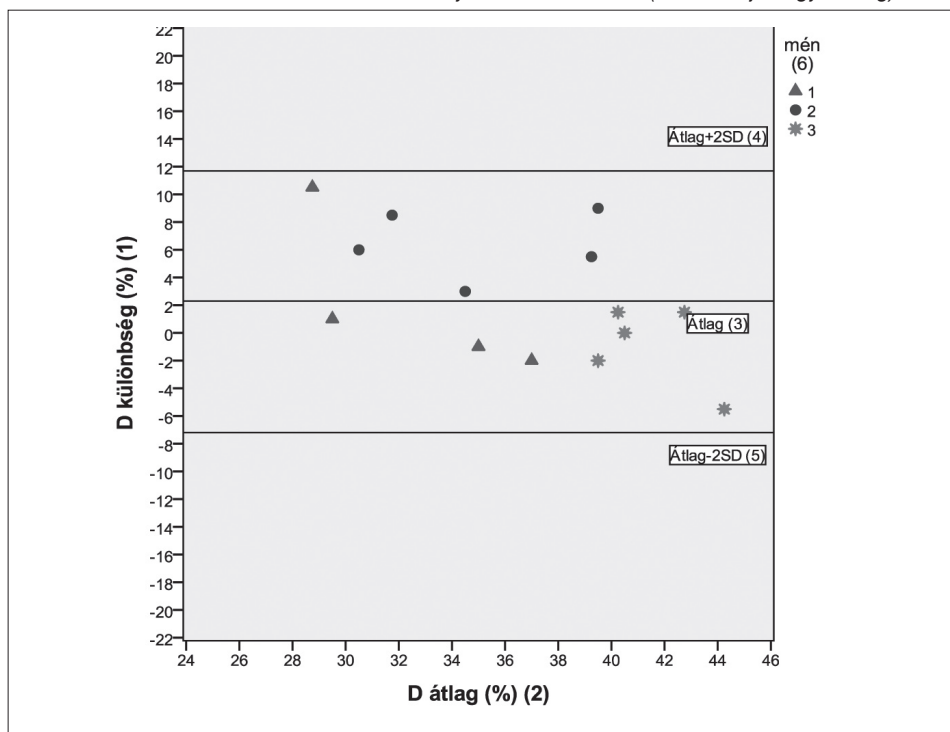


Figure 3. Scatter plot with identity (agreement) line  
mean of lactose (%) (1); mean of D (diluted) (%) (2); stallion (3)

### A kétféle HOS- teszt és a motilitás-vizsgálat összehasonlítása

A motilitás vizsgálata ménenként igen eltérő eredményt adott, így a háromféle vizsgálat összevetése statisztikai szempontból gyakorlatilag értelmetlen. Az első mén (1) esetében a motilitás- vizsgálat eredménye jelentősen felülmúlja a HOS tesztek eredményét, míg a harmadik (3) mén esetében a motilitás-vizsgálat eredménye messze alulmarad az első két mén (1,2) eredményétől a HOS-teszthez viszonyítva (5. ábra).

A mének közötti különbségek feltárására egytényezős variancia-analízist alkalmaztunk. Mind a laktózos (L), mind az alaphígítós, desztillált vizes (D) HOS-teszt esetén a harmadik mén (3) eredménye szignifikánsan magasabb értéket mutat az első két mén (1,2) eredményeihez képest.

A motilitás- vizsgálat eredményét a három ménre egytényezős variancia-analízissel elemezve szignifikáns különbséget kaptunk, az első mén (1) szignifikánsan magasabb motilitás arányértékkel, a harmadik mén (3) szignifikánsan alacsonyabb motilitás arányértékkel rendelkezik a másik két mén értékénél.



4. ábra Módszer-egyezőség vizsgálat Bland-Altman pontdiagrammal

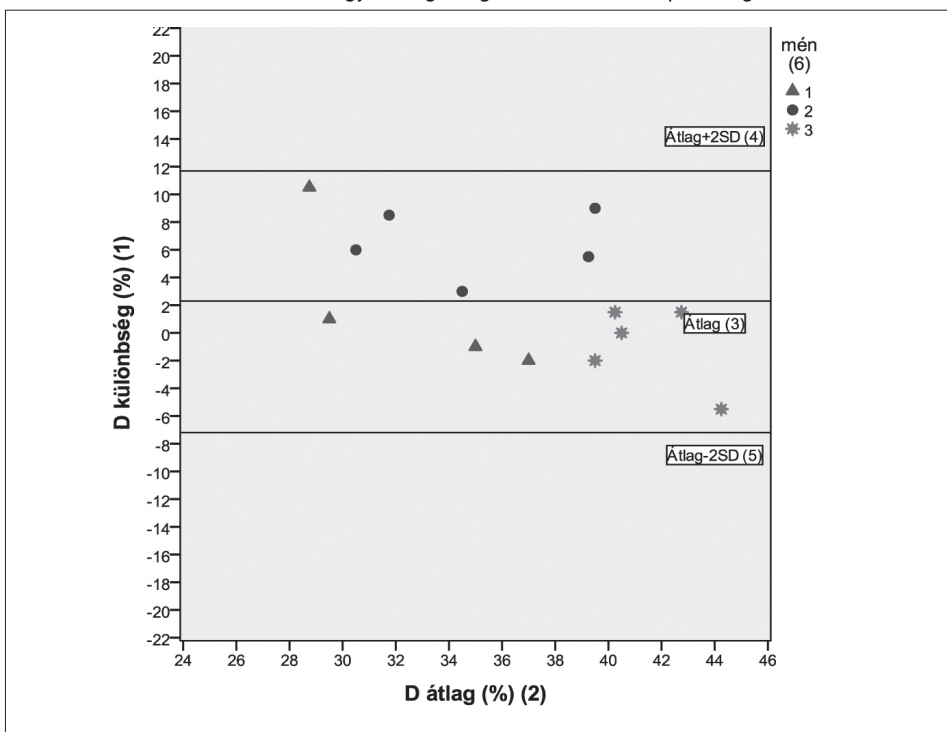


Figure 4. Method-agreement with Bland-Altman scatter plot difference of HOS tests (1); mean of HOS tests (2) mean (3); mean+2times SD (4); mean-2times SD (5); stallion (6)

5. ábra A HOS-tesztek és a motilitás összehasonlítása

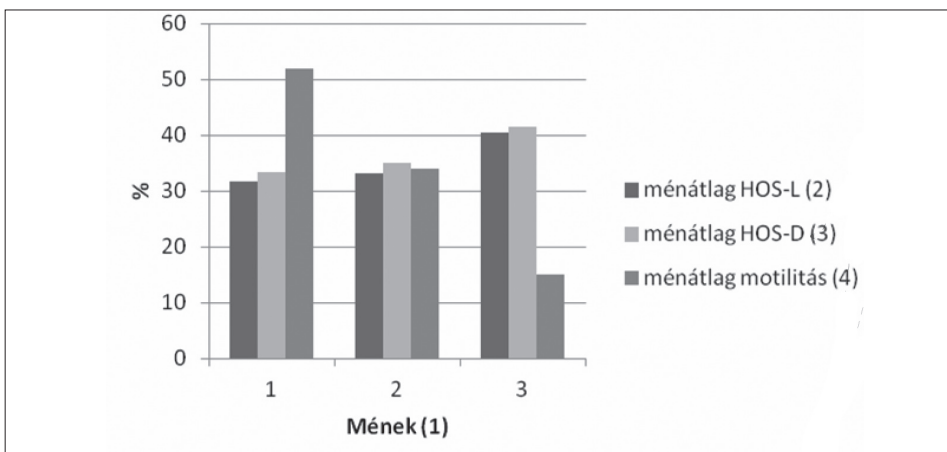


Figure 5. Comparing HOS-tests and motility test stallions (1); mean of stallions, HOS-L (2); mean of stallions, HOS-D (3); stallion's mean motility (4)

## KÖVETKEZTETÉSEK

Az elvégzett statisztikai próbák (páros t-próba, varianciaanalízis) alapján az alábbi megállapításokat tehetjük ( $p=0,05$ ):

A hipoozmotikus tesztek ismételhetőek, az első és a második mérés között nem mutatható ki szignifikáns különbség sem a laktózos (L), sem az alaphígító, desztillált vizes (D) HOS- teszt esetében.

Módszeregyezőség szempontjából a különböző HOS-tesztek (L, D) között nincs statisztikailag kimutatható különbség, azonos eredményt adnak. Így az egyszerűsített, általunk javasolt desztillált vizes spermahígítóval végzett HOS- teszt egyértelműen kiválthatja a laktózos HOS-tesztet.

Az 1. és a 2. mén között egyik HOS-teszt esetén sincs szignifikáns különbség, de a 3. mén mindegyiktől különbözik. A HOS- teszt a harmadik mén esetében magasabb értéket, motilitása viszont szignifikánsan alacsonyabb értéket adott.

Az egyes mének mintáinak motilitása szignifikánsan különbözik egymástól (1·2·3).

Az általunk javasolt egyszerűsített HOS-teszt eredményeinek átlagát a motilitással (%) összehasonlítva érdekes jelenséget figyelhetünk meg az 1. és a 3. mén mintái esetében: Az első méntől származó 5 minta motilitásának átlaga 52%, HOS- teszt (D) átlaga 33,45%; míg a 3. mén motilitás átlaga 15%, HOS- teszt (D) átlaga 41,45% volt (5. ábra).

A vizsgálataink alapján kapott HOS-teszt eredmények az 1,3 mének esetében ellentétesek a motilitás-vizsgálat eredményével, ami arra is felhívja a figyelmet, hogy a motilitás jellemzése önmagában nem elég a termékenyítő képesség meghatározásához, a plazmamembrán funkcionális működése és a motilitás között bizonyos esetekben nem feltétlenül mutatható ki statisztikailag egyirányú kapcsolatot.

Elképzelhető, hogy a 3. mén esetében a spermiumok jelentős része a funkcionálisan még ép sejtmembrán (pozitív HOS-teszt) mellett már nem voltak képesek mozogni, ez a jelenség összevethető *Jeyendran és mtsai* (1984) megállapításaival.

## ÖSSZEGRZÉS

Az általunk kidolgozott, egyszerűsített, az alaphígító egyszerű desztillált-vizes hígításával elvégzett HOS-teszt a *Neild és mtsai*(1999) által leírt módszerhez hasonlóan alkalmazható a lósperma értékelésére. A módszer egyszerűsége miatt a gyakorlatban könnyen alkalmazható, a motilitás becslésével együtt pontosabb értékelést tesz lehetővé.

A vizsgálatok ugyanakkor rávilágítanak arra is, hogy a vizsgálati protokollok nehezen adaptálhatók, ha különböző ménekről van szó. A viszonylag magas motilitás melletti alacsonyabb HOS-teszt pozitívítás (1-es mén) utalhat mérési hibára (szubjektív motilitás-becslés), de az egyes mének spermiumainak eltérő ozmotikus rezisztenciájára is. Ennek ellenőrzése további vizsgálatokat igényel. A 3. mén esetében megfigyelt jelenségre a motilitás többtényezős meghatározottsága adhat még magyarázatot.

## IRODALOMJEGYZÉK

- Buckett, W.M. (2003): Predictive value of hypo-osmotic swelling test to identify viable non-motile sperm. *Asian J. Androl.*, 5. 209-212.
- Hossain, A. - Osumkpe, C. - Hossain, S. - Phelps, J.Y. (2010): Spontaneously developed tail swellings (SDTS) influence the accuracy of the hypo-osmotic swelling test (HOS-test) in determining membrane integrity and viability of human spermatozoa. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 27. 83-86.
- Jequier, A.M. - Ukombe, E.B. (1983): Errors inherent in the performance of a routine semen analysis. *Br. J., Urol.*, 55.434-436.
- Jeyendran, R.S. - Van der Ven, H.H. - Perez-Pelaez, M. - Crabo, B.G. - Zaneveld, L.J. (1984): Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.*, 70. 219-228.
- Katila, T. (2001): In vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen: a review. *Acta Vet. Scand.*, 42.199-217.
- Katila, T. - Koskinen, E. - Andersson, M. (2000): Evaluation of frozen-thawed semen. A Dorothy Russell Havemeyer Foundation Workshop Advanced Current Topics in Stallion Veterinary Practice, 54-56.
- Kovács A. - Foote, R.H. (1992): Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biotech. Histochem.*, 67.119-124.
- Lagares, M.A. - Petzoldt, R. - Sieme, H. - Klug, E. (2000): Assessing equine sperm-membrane integrity. *Andrologia*, 32. 163-167.
- Malmgren, L. (1997): Assessing the quality of raw semen: a review. *Theriogenology*, 48. 523-530.
- Martini, A.C. - Molina, R.I. - Estofn, D. - Tissera, A. - Ruiz, R.D. - de Cuneo, M.F. (2006): Improving the predictive value of the hypoosmotic swelling test in humans. *Fertil. Steril.*, 85. 1840-1842.
- Nagy Sz. - Házás G. - Bali Papp Á. - Iváncsics J. - Szász F. - Szász F. Jr. - Kovács A. - Foote, R.H. (1999): Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy. *Theriogenology*, 52. 1153-1159.
- Neild, D. - Chaves, G. - Flores, M. - Mora, N. - Beconi, M. - Agüero, A. (1999): Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology*, 51. 721-727.
- Nie, G.J. - Wenzel, J.G. (2001): Adaptation of the hypoosmotic swelling test to assess functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. *Theriogenology*, 55. 1005-1018.
- Pommer, A. C. - Rutlant, J. - Meyers, S. A. (2002): The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. *Theriogenology*, 58. 1373-1384.
- Vidament, M. - Cognard, E. - Yvon, J-M. -, Sattler, M. - Palmer, E. - Magistrini, M. (1998): Evaluation of stallion semen before and after freezing. *Reprod. Dom. Anim.*, 33. 271-277.
- Vidament, M. - Ecot, P. - Noue, P. - Bourgeois, C. - Magistrini, M. - Palmer, E. (2000): Centrifugation and addition of glycerol at 22 degrees C instead of 4 degrees C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 54. 907-919.

Érkezett: 2012. május

Szerzők címe: Czimmer Gy.E. - Nemes A. - Obádovics Cs. - Nagy Sz.

Authors' address: H-9200 Mosonmagyaróvár  
Várallyay György u. 31.  
czimbergdr@gmail.com