

소 동결-용해 정자에 있어서 체외수정능력과 정자 기능 및 성상 분석법간의 상관관계

류범용¹ · 정영채 · 김창근 · 신현아 · 한정호¹ · 김석현^{1,2} ·
문신용^{1,2} · 김홍률³ · 최한³

¹중앙대학교 동물자원과학과

Correlations between the Capacity of *In Vitro* Fertilization and the Assays of Sperm Function and Characteristics in Frozen-thawed Bovine Spermatozoa

Ryu, B. Y.¹, Y. C. Chung, C. K. Kim, H. A. Shin, J. H. Han¹,
S. H. Kim^{1,2}, S. Y. Moon^{1,2}, H. R. Kim³ and H. Choi³

Department of Animal Science and Technology, Chung-Ang University, Ansung 456-756, Korea

ABSTRACT

The objective of this study was to develop an *in vitro* assessment of sperm fertilizing capacity of bulls and investigate the factors influencing sperm function and characteristics of frozen-thawed bovine spermatozoa.

In vitro fertilization (IVF), the evaluation of motility and normal morphology, HOST (hypoosmotic swelling test), Ca-ionophore induced acrosome reaction, luminol and lucigenin-dependent chemiluminescence for the measurement of reactive oxygen species (ROS), the measurement of malondialdehyde formation for the analysis of lipid peroxidation (LPO), and the evaluation of DNA fragmentation using the method of TdT-mediated nick end labelling (TUNEL) by flow cytometry were performed in frozen-thawed bovine spermatozoa. Correlations between the rates of fertilization, blastocyst formation after IVF and the values of respective assays were investigated.

1. IVF rate and blastocyst formation rate averaged 64.4% and 34.3% for spermatozoa from high-fertility bull group and averaged 18.5% and 6.2% for spermatozoa from low-fertility bull group, respectively. There were significantly different between two bull groups. Sperm motility and percentage acrosome reaction averaged 79.0% and 66.2% for spermatozoa from high-fertility bull

[†] Corresponding author : Department of Animal Science and Technology, Chung-Ang University, Ansung 456-756, Korea. E-mail : ycchung2@post.cau.ac.kr

¹ 서울대학교 의학연구원 인구의학연구소 (Institute of Reproductive Medicine and Population, Medical Research Center, Seoul National University, Seoul, Korea)

² 서울대학교 의과대학 산부인과학교실 (Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea)

³ 농협중앙회 젖소개량부 (National Agriculture Cooperation Federation, Dairy Cattle Improvement Center, Koyang, Korea)

group and averaged 40.7% and 22.9% for spermatozoa from low-fertility bull group, respectively. There were not different between two bull groups.

2. Luminol dependent chemiluminescence, LPO and DNA fragmentation averaged 6.4, 2.0 nmol and 2.6% from spermatozoa from high-fertility bull group and averaged 6.5, 3.1 nmol and 7.4% for spermatozoa from low-fertility bull group, respectively. There were significantly different between two bull groups. There was no significant difference in lucigenin dependent chemiluminescence between two bull groups.
3. Fertilization rate was positively correlated with motility and the rate of Ca-ionophore induced acrosome reaction, but negatively correlated with the frequency of luminol-dependent chemiluminescence, the rate of LPO, and the percentage of sperm with DNA fragmentation. There was no correlation between fertilization rate and the percentage of swollen spermatozoa, normal morphology, and the frequency of lucigenin-dependent chemiluminescence.
4. Blastocyst formation rate was positively correlated with the rate of Ca-ionophore induced acrosome reaction, but negatively correlated with the frequency of luminol-dependent chemiluminescence, the rate of LPO, and the percentage of sperm with DNA fragmentation. There was no correlation between blastocyst formation rate and motility, the percentage of swollen spermatozoa, normal morphology, and the frequency of lucigenin-dependent chemiluminescence.

In conclusion, these data suggest that ROS significantly impact semen quality. The assays of this study may provide a basis for improving *in vitro* assessment of sperm fertilizing capacity.

(Key words: Bovine sperm, Blastocyst formation, DNA fragmentation, *In vitro* fertilization, Lipid peroxidation, Reactive oxygen species)

I. 서 론

종축의 수정능력은 인공수정을 통한 가축 번식에 있어서 경제적으로 중요한 의미를 지니고 있다. 정자의 농도와 운동성 및 생존성에 주안점을 둔 정액검사는 종축의 수정능력을 평가하는 기본적인 검사로서 널리 사용되고 있지만 일반적인 수정에 필요한 정자의 기능적 측면들은 충실히 반영하지 못하는 것으로 알려지고 있다(Woelders, 1991).

종축의 수정능력은 자연 교미나 인공수정을 통한 정상적인 임신과 정상 산자의 생산 능력을 측정하는 것이 바람직한 방법으로 알려져 있으며, 정확한 분석을 위해서는 적어도 300회 이상의 수정 결과에 대한 분석이 제안되고 있다(Howard와 Pace, 1988). 그러나 이와 같은 수태율에 대한 분석은 시술자나 임신진단 시기 및 방법에 따라 오차가 발생할 수 있는 여러 가지 변이 요소를 포함함과 동

시에 수행에 있어서 소요시간과 경비가 상당히 요구된다. 따라서 종축의 수정능력을 정확하고 간편하게 평가할 수 있는 정자의 기능 검사법이나 성상변화에 영향을 미치는 요인 분석에 관한 연구가 절실한 실정이다.

정액검사를 통하여 사출당 정자의 농도와 운동성 및 정자형태의 분석은 종축의 정소나 생식기관의 이상과 같은 병리학(pathology)적인 진단과 인공수정시 형태학적으로 이상이 없으면서 운동성이 좋은 정액을 선별하는 측면에서는 유용한 정보를 제공할 수 있다. 그러나 정액검사상 정상인 개체에서도 인공수정시 수정율 저하 현상이 보고되고 있기 때문에 수정능력을 정확히 반영하기에는 미흡하다(Hammitt 등, 1989). 또한 인공수정의 시행에 있어서는 채취된 정액의 적절한 처리와 보관이 필요하게 되며, 정액처리 과정이나 보관 방법이 적절치 못할 경우 정자의 기능에 이상이 초래된다(Howard와 Pace, 1988). 따라서 정액처리와 보관시

정액의 손상을 최소화할 수 있는 기술 개발과 번식능력이 우수한 종모우의 선발을 위하여 정액의 질을 보다 정확하고 빠르게 평가할 수 있는 방법이 개발된다면 이는 가축 개량 산업에 있어서 경제적인 측면에 상당한 기여를 할 수 있을 것으로 기대된다.

정자의 수정능력을 평가하는 방법에 대한 많은 연구가 진행되어 왔으며, 정자의 기능적 활성도를 검사하는 방법으로 sperm zona-free hamster ova penetration assay(Yanagimachi 등, 1976), 정자의 저장액 팽창검사(hypoosmotic swelling test; HOST)(Jeyendran 등, 1984), hemizona assay(Oehninger 등, 1989), acrosin activity(Koukoulis 등, 1989) 및 정자의 침체반응 분석법(De Leeuw 등, 1991) 등이 개발되어 일반적인 정액검사와 비교하여 수정율에 대한 예측도가 높은 검사법으로 보고되고 있다. 그러나 이들 각각의 검사법들은 수정에 필요한 정자의 수정능획득 (capacitation), 난자 투명대 (zona pellucida)와의 접촉에 따른 침체반응 (acrosome reaction) 및 투명대와 난황막 (oolemma) 침입 후 응성전핵 (male pronucleus) 형성과 같은 일련의 수정과정중 일부만을 반영할 수 있는 방법으로 어느 한 검사법만으로 정자의 수정능에 대한 모든 정보를 얻는 것은 사실상 불가능하다. 이러한 관점에서 최적화된 체외수정 기법을 이용한 정자의 수정능 검사법은 체내에서 이루어지는 복합적인 수정과정 중 여러 단계를 반영할 수 있는 아주 유용한 방법으로 생각될 수 있다.

최근에는 정자의 기능과 성상 변화에 영향을 미치는 주요 요소로서 활성산소계(reactive oxygen species; ROS)에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 정액 내에는 세포들의 산소대사 과정 중 생성된 ROS가 존재하게 되는데 적절한 농도의 ROS는 정자의 고회력 운동(hyperactivation)을 조절하고 수정능획득이나 침체반응과 같은 수정을 위한 정자 기능을 활성화하는 것으로 알려져 있다(Bennet 등, 1987; Goldman 등, 1992; De Lamirande와 Gagnon, 1995). 반면 어떤 이상으로 인하여 정액 내에 ROS의 농도가 증가할 경우에는 정자의 운동성과 생존성 나아가 정자 기능 전반에 악영향이 나타나

는 것으로 보고되고 있다(Aitken 등, 1989, De Lamirande와 Gagnon, 1992, Comporti, 1989).

따라서 체내 수정과정의 상당부분을 반영할 수 있는 체외수정 결과와 정자의 기능 및 성상 분석법간의 상관관계가 조사될 경우 종모우의 수정능 평가와 인공수정을 위한 정액의 처리와 보관시 손상을 최소화할 수 있는 방법의 개발을 위한 많은 정보를 얻을 수 있을 것이다.

본 연구는 종모우의 수태율 향상에 기여할 수 있는 수정능력 평가방법과 정자 기능 및 성상 변화에 영향을 미치는 요인을 알아보기 위하여 Holstein 종모우의 정액을 대상으로 정자 기능 검사 항목으로서 정자 막의 안정성과 Ca-ionophore 에 반응하여 유발되는 침체반응을 조사하였고, 정자의 ROS 발생 정도와 lipid peroxidation 및 DNA fragmentation을 조사하여 이들 각각의 조사 항목들의 분석치들과 체외수정 후 수정율 및 배발생율과의 상관관계를 구명하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

본 연구에서는 축협중앙회 개량사업본부 젖소 개량부에서 Holstein 종모우로부터 제조된 0.5 ml straw의 동결정액을 사용하였다.

2. 방 법

1) 체외수정과 수정란의 배양

총 14개체에서 생산된 동결-융해 정액을 대상으로 체외수정과 수정란 배양 실험을 실시하였다.

(I) 난포란의 회수 및 체외성숙

도축된 암소로부터 채취한 난소를 멸균된 생리식염수(25~30℃)가 들어 있는 보온병에 담아 3시간 이내에 실험실로 운반하였다. 난소를 멸균된 생리식염수로 2~3회 세척하고 18 gauge 주사침이 부착된 10 ml 주사기를 이용하여 직경이 2~8 mm 인 난포로부터 난포란을 흡입·채란하여 실체현미경으로 난구세포층이 충실하게 부착되고 세포질이

응축되지 않은 난포란만을 선별하여 체외성숙에 이용하였다. 난포란의 체외성숙은 TCM199(GibcoBRL, USA)에 10%의 FBS(GibcoBRL, USA), 10 IU/ml HCG(유한양행, 한국), 1 μ g/ml estradiol-17 β (Sigma, USA), 10 μ g/ml FSH(Sigma, USA), 52 μ g/ml gentamycin sulfate(동신제약, 한국)가 함유된 성숙배양액에 넣어 1×10^6 /ml의 농도로 조정된 과립막세포와 함께 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기내에서 22~24시간 동안 성숙시켰다.

(2) 정자처리 및 체외수정

개체당 동결정액 straw 2개를 37 $^{\circ}$ C 수조에서 20초간 용해시킨 후 caffeine sodium benzonate(Sigma, USA) 10 mM이 첨가된 5 ml의 정자세척용 BO액(Brackett와 Olipant, 1975)으로 희석한 후 원심분리(500 \times g, 5 min)하였다. 상층액을 제거하고 정자괴를 1 mg/ml BSA(Sigma, USA), 5%(v/w) heparin(Sigma, USA), 5 mM caffeine(Sigma, USA)이 첨가된 2 ml의 체외수정용 BO액으로 희석한 후 300 \times g로 1분간 원심 분리하였다. 운동성 정자가 포함된 상층액을 회수하여 300 \times g로 5분간 원심 분리한 후 체외수정용 BO액으로 정자괴를 희석하여 정자농도가 1×10^6 /ml 되도록 조정하였다. 농도가 조정된 정자 희석액으로 100 μ l의 수정용 소적액을 만든 후 각 소적당 체외성숙 난자를 10~15개씩 넣어 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기내에서 24시간 체외 수정시켰다.

(3) 체외수정란의 배양

체외수정 후 난구세포(cumulus cell)가 덮여 있는 1세포기 수정란을 배양접시 바닥에 난관상피세포의 단층이 형성된 TCM 199(+10% FBS) 100 μ l 소적에 옮겨 39 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기내에서 체외배양하였다. 소적당 수정란의 수는 10~15개로 제한하였고 배양액은 48시간 간격으로 신선한 배양액으로 교체하였다. 체외수정율은 수정된 난자 중 2세포기 이상으로 발생된 수정란의 비율로 구하였으며, 배발생율은 체외배양후 8일째에 배반포기 이상으로 발생된 배아의 비율로 구하였다.

2) 정자의 기능과 성상분석

정자의 기능과 성상분석을 위하여 체외수정 실험을 실시했던 14개체중 수정율을 기준으로 상위 4개체를 고수정군(high fertilization group)으로 하위 4개체를 저수정군(low fertilization group)으로 선별하여 추후 실험을 시행하였다.

(1) 기본 배양액

본 연구에서는 20 mM N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N'-2-ethane sulphonic acid(HEPES; Sigma, USA), 20 mM NaHCO₃(Sigma, USA)와 0.1% polyvinyl alcohol(PVA; Sigma, USA)이 첨가된 Biggers Witten Whittingham(BWW) 배양액(Biggers 등, 1971)을 정액처리를 위한 기본 배양액으로 사용하였다.

(2) 정액 처리

본 연구 전반에 걸친 기본적인 정액 처리 방법은 다음과 같다.

소 동결정액의 용해는 37 $^{\circ}$ C 수조에서 20초간 실시하였으며, 용해 후 Percoll gradients 방법을 사용하여 운동성 정자를 회수하였다.

Percoll gradients 방법을 시행하기 위하여 우선 10배로 농축된 modified Tyrode's medium(TALF)과 Percoll용액을 1:9 (v/v)로 혼합하여 등장의 Percoll 용액을 제조하였다. 이 Percoll용액에 BSA를 1.0% (w/v) 첨가한 후 TALF를 혼합하여 45%, 90%의 농도별 Percoll 용액을 제조하였다. 15 ml의 conical tube에 밑바닥부터 1.5 ml씩의 90%와 45%의 Percoll 용액을 넣어 두 층을 만들었다. Percoll층의 윗부분에 용해된 정액을 올려놓은 뒤 600 \times g로 15분간 원심 분리한 후 정자괴를 제외한 상층액을 제거하였다. 5 ml의 기본 배양액으로 정자괴를 희석한 후 원심분리(500 \times g, 5 min) 하였다. 동일한 방법으로 2차 세척후 기본 배양액으로 각각의 실험에 맞는 적절한 정자농도로 희석하여 추후 실험을 진행하였다. 희석후 정자의 운동성이 80% 미만이었다는 경우는 실험에서 제외하였다.

(3) 정자의 운동성 측정

용해후 전처리를 실시하지 않은 정액 10 μ l를 취하여 37 $^{\circ}$ C로 미리 예열된 Makler counting cham-

ber(Sefi medical instrument, Israel)를 이용하여 정자농도와 운동성을 측정하였다.

(4) 정자의 형태 분석

용해후 전처리를 실시하지 않은 정액 10 μ l를 취하여 70% ethyl alcohol로 세척, 건조한 슬라이드 위에 떨어뜨린 후 도말하고 실온에서 건조시켰다. 정자 형태의 분석은 위상차현미경 1,000 배율하에서 각각의 슬라이드마다 200개 이상의 정자를 관찰하여 Blom(1973)의 기준에 따라 관찰된 총수에서 두부나 증편부, 미부에 이상이 없는 정상형태 정자의 비율을 구하여 분석하였다.

(5) 정자의 저장액 처리(Hypo-Osmotic Swelling Test; HOST)

HOST는 Jeyendran 등(1984)의 방법에 준하여 시행하였다.

개체당 전 처리된 정액 300 μ l(20×10^6 spermatozoa/ml)를 fructose(Sigma, USA) 13.51 gm과 sodium citrate(Shinyo, Japan) 7.35gm을 3차 증류수 1,000 ml에 녹여 최종 삼투압 150mOsm/Kg으로 제조된 저장성 용액 5 ml과 혼합한 후 37 $^{\circ}$ C의 수조 내에서 30분간 배양하였다. 이 후 500 \times g에서 5분간 원심 분리하였으며, 상층액을 제거한 후 정자괴에서 10 μ l를 취하여 깨끗한 슬라이드에 도말하고 실온에서 건조시켰다.

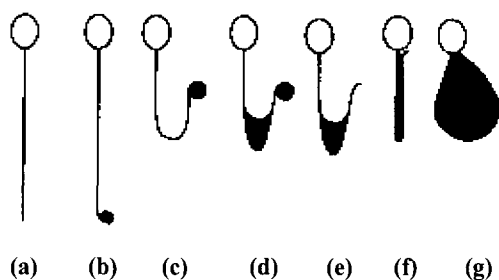


Fig. 1. Diagrammatic representation of hypo-osmotic swelling patterns. Shaded area denote regions of tail swollen. a, no swelling; b-d, tail-tip patterns; e-g, various types of swelling (Jeyendran et. al., 1984).

결과의 분석을 위하여 위상차 현미경에서 슬라이드당 최소 200개 이상의 정자를 판독하였다. 정자팽창의 유형은 Fig. 1과 같이 분류하였다. 미부가 전혀 팽창되지 않은 경우는 a, 미부 말단만 팽창된 경우로 미부의 굴곡이 없으면 b, 굴곡이 있으면 c로 판독하였으며, 미부 중간 부위와 말단이 동시에 팽창된 경우는 d, 미부 중간 부위만 팽창된 경우는 e, 미부가 전반적으로 팽창된 막대모양은 f, 미부가 전반적으로 팽창된 눈사람 형태는 g로 구분하였다. HOST후 정자 미부가 변화된 정자의 비율은 판독한 정자의 총수에서 미부가 변화된 b~g 유형의 비율로 계산하였다.

(6) 정자의 침체반응 분석

가. Stock solution의 제조

Calcium ionophore A23187(A23187; Sigma, USA) 1.0 mg을 382 μ l의 dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma, USA)에 녹여 최종 농도 5 mM/L stock solution을 제조한 후 알루미늄호일에 싸인 Eppendorf tube에 20 μ l씩 분주하여 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 사용 당일 분주된 20 μ l의 stock solution에 4.98 ml의 기본 배양액을 첨가하여 최종 농도 20 μ M/L의 A23187 용액과 대조군으로는 4.98 ml의 기본 배양액에 DMSO 20 μ l를 첨가한 용액을 제조하여 사용하였다.

Hoechst 33258(H33258; Sigma, USA)을 기본 배양액으로 1 mg/ml의 농도로 조정후 알루미늄호일에 싸인 Eppendorf tube에 20 μ l씩 분주하여 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 사용 당일 분주된 stock solution을 기본 배양액으로 희석하여 최종농도 1 μ g/ml로 조정후 사용하였다.

Fluorescein isothiocyanate conjugated pisum sativum agglutinin (FITC-PSA; Sigma, USA)을 증류수로 1 mg/ml의 농도로 조정후 알루미늄호일에 싸인 Eppendorf tube에 100 μ l씩 분주하여 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 사용 당일 분주된 FITC-PSA 용액을 증류수로 희석(1:9)하여 최종농도 100 μ g/ml로 조정후 사용하였다.

나. 침체반응

침체반응 분석은 Cummins 등(1991)의 방법에 준하여 시행하였다.

전 처리된 정자부유액(20×10^6 spermatozoa/ml)을 반분하여 각각을 동량의 $20 \mu\text{M/L}$ A23187 용액(최종 농도 $10 \mu\text{M/L}$)과 DMSO 용액으로 희석하여 30분간 37°C , 5% CO_2 배양기 내에서 배양하였다.

다. 정자염색 및 침체반응 분석

배양 후 정자 부유액에 동량의 H33258 용액을 첨가하여 상온에서 어두운 상태를 유지하면서 7분간 염색하였다. 이 후 1.5 ml의 정자부유액을 phosphate buffered saline(PBS; GibcoBRL, USA)으로 희석된 4 ml의 2% polyvinyl pyrrolidone(Sigma, USA) column위에 올려놓고 $500 \times \text{g}$ 로 5분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 정자괴를 잘 섞어 준 후 $20 \mu\text{l}$ 를 취하여 슬라이드 위에 도말, 건조시킨 후 95% ethanol에서 5분간 고정하였다. 고정, 건조된 슬라이드 위에 FITC-PSA($100 \mu\text{g/ml}$) $100 \mu\text{l}$ 를 떨어뜨린 후 4°C moist chamber에서 15분간 정치시켰다. 증류수로 염색액을 세척하고 건조시킨 후 정자에 염색된 형광이 사라지는 것을 방지하기 위하여 propyl gallate mountant로 봉입하였다. 슬라이드의 관찰은 mercury burner와 epi-illumination module이 장착된 형광 현미경(Olympus, Japan)하에서 1000의 배율로 H33258 염색에 의한 정자의 생사 여부 관찰을 위하여 filter cube U를 사용하였고, FITC-PSA 염색에 의한 정자침체 부위의 관찰을 위하여 filter cube B를 사용하였다.

두 장의 슬라이드에서 각각 200개 이상의 정자를 관찰하여 H33258이 염색되어 밝은 청색을 나타내는 죽은 정자와 정자 두부 전체가 염색되지 않았거나, 비정상적인 침체형태를 지닌 정자는 제외하고 침체부위가 완전히 염색된 것, 적도대(equatorial segment)가 염색되고 침체부위가 부분적으로 염색된 것, 적도대만이 염색된 정자의 총수에서 정상적인 투명대 통과 및 난막(oolemma)과의 융합이 가능한 침체내막이 노출되고 온전한 적도대를 지닌 적도대 부위만이 염색된 정자의 비율

로 대조군과 A23187 처리군 각각에서 침체반응율(%)을 조사하였다.

A23187에 반응하여 침체반응을 나타낼 수 있는 침체반응 정도는 A23187 처리군의 침체반응율에서 대조군의 침체반응율의 차이로서 산정하였다.

(7) ROS의 발생 측정

ROS의 발생은 chemiluminescence 방법으로 측정하였다(Aitken 등, 1992). Chemiluminescence signal은 LB950 luminometer(Berthold, German)를 이용하여 3초간의 integration mode로 기록하였다. ROS 측정을 위한 probe는 luminol(5-amino-2, 3-dihydro-1, 4-phthalazinedione; Sigma, USA)과 lucigenin(10, 10'-dimethyl-9, 9'-biacridinium dinitrate; Sigma, USA)을 사용하였다. Luminol은 중성 pH 상태에서 세포 내로 침투되므로, 세포 내외의 다양한 ROS(H_2O_2 , $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{OH}$)와 반응하여 발색하며, peroxidase 존재 하에 H_2O_2 와 강력한 반응을 나타낸다. 반면, lucigenin은 중성 pH 상태에서 세포 내 비침투적이며, ROS 중 주로 $\cdot\text{O}_2^-$ 와 반응하여 발색한다.

이들 두 probe의 stock solution은 DMSO로 희석하여 25 mM로 제조하였다.

Luminol을 이용한 정자에서 발생된 H_2O_2 의 측정은 전 처리된 $400 \mu\text{l}$ 의 정자 부유액(10×10^6 spermatozoa/ml)에 luminol stock solution $4 \mu\text{l}$ (최종농도 $250 \mu\text{M}$)와 세포외에 존재하는 H_2O_2 의 분석도를 높이기 위하여 PBS로 희석된 $8 \mu\text{l}$ 의 horseradish peroxidase(최종농도 12.4 U ; Sigma, USA)를 첨가한 후 luminometer에서 10분간 signal을 측정하였다. Signal이 안정화되면, ROS의 발생을 증진시키기 위하여 DMSO에 녹아 있는 $4 \mu\text{l}$ (최종농도 100nM)의 phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA; Sigma, USA)를 첨가하여 10분간 signal을 재 측정하였다. H_2O_2 의 발생 양상 분석은 PMA 첨가 후 10 분간 측정된 chemiluminescence counts에서 최고(peak) 값과 최고 값을 포함하는 5분간의 합계 값으로 하였다.

Lucigenin을 이용한 $\cdot\text{O}_2^-$ 측정은 전 처리된 $400 \mu\text{l}$ 의 정자 부유액에 lucigenin stock solution $4 \mu\text{l}$ (최종농도 $250 \mu\text{M}$)를 첨가한 후 luminometer에서

10분간 signal을 측정하였다. Signal이 안정화되면, 4 μ l의 PMA를 첨가하여 10분간 signal을 재 측정하였다. $\cdot O_2^-$ 의 발생 양상 분석은 H_2O_2 의 분석방법과 동일하게 하였다.

(8) 정자막 지방의 산화(Lipid Peroxidation)

Lipid peroxidation은 최종 산물인 malondialdehyde를 측정하는 thiobaburic acid(TBA) 반응법으로 분석하였다(Aitken 등, 1993).

전 처리된 정자를 Ca^{++} , Mg^{++} 이 제거된 Hank's balanced salt solution으로 희석하여 정자농도가 $20 \times 10^6/ml$ 되게 조정하였다. Lipid peroxide의 malondialdehyde로의 전환을 증진시키기 위하여 3차 증류수로 희석된 1mM ferrous sulphate(Sigma, USA)와 5mM sodium ascorbate(Sigma, USA)를 각각 10 μ l씩 상기 정자 부유액 1 ml에 첨가하고 37 $^\circ$ C에서 30분간 배양하였다. 250 μ l의 40% trichloroacetic acid(Sigma, USA)를 첨가하고 0 $^\circ$ C에서 10 분간 정지하여 lipid peroxidation을 중지시킨 후 2500 \times g에서 10분간 원심 분리하였다. 이후 상층 1 ml을 회수하여 250 μ l의 1% TBA와 혼합하여 끓는 물에서 10분간 중탕하였고 상온에서 냉각시켰다. Malondialdehyde의 농도는 spectrophotometer(Kontron instruments, Switzerland)를 이용하여 532 nm 파장에서 반응액의 흡광도(optical density)를 측정하여 분석하였다. 생성된 malondialdehyde의 몰농도는 몰흡광계수($1.49 \times 10^5 l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)를 기준으로 환산하였다(Slater와 Sawyer, 1971).

(9) 유세포 분석기(Flow Cytometry)를 이용한 정자 DNA Fragmentation 분석

정자의 DNA fragmentation 측정은 TUNEL(terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT) dUTP nick end labelling) 기법이 적용된 APO-DIRECTTM kit (Pharmingen, USA)와 유세포분석기(Becton dickinson, USA)를 사용하여 실시하였다. 전 처리된 정자를 0.5 ml의 PBS로 희석하여 정자 농도가 $2 \sim 4 \times 10^6/ml$ 이 되도록 조정하고 5 ml의 1% paraformaldehyde(pH 7.2)를 넣어 얼음 위에서 15분간 고정시켰다. 이후 300 \times g에서 5분간 원심분리하고 정

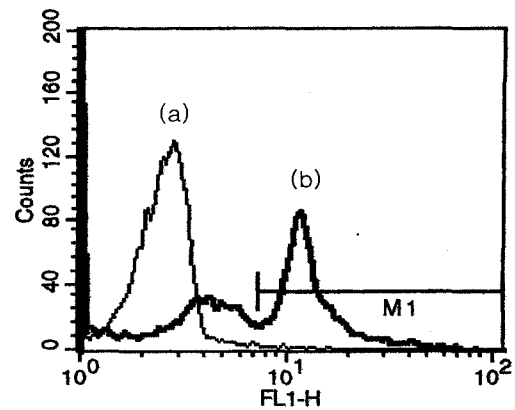


Fig. 2. Histograms of the TUNEL assay in bovine spermatozoa analyzed by flow cytometry. (a) A typical negative control, in which 0.1% of the spermatozoa are labeled. (b) A positive control treated with DNase I, in which 62.8% of the spermatozoa are labeled.

자괴를 5 ml의 PBS로 2회 세척후 70% ice-cold ethanol 5 ml을 넣고 -20 $^\circ$ C에서 최소 30분간 정지하였다. 300 \times g에서 5분간 재원심분리하여 상층의 ethanol을 제거한 후 정자괴를 1.0ml의 wash buffer로 희석하여 300 \times g에서 5분간 원심 분리하는 세척 과정을 2회 반복하였다. 이렇게 얻은 정자괴에 FITC-dUTP와 TdT enzyme이 들어 있는 염색액 50 μ l를 넣고 37 $^\circ$ C에서 60분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 5 ml의 rinse buffer를 넣고 300 \times g에서 5분간 원심 분리하는 세척 과정을 2회 반복하였다. 이후 정자괴에 0.5 ml의 propidium iodide(PI)/RNase A 액을 첨가하여 암실에서 30분간 염색하였다. 염색 후 유세포분석은 3시간 이내에 시행하였다.

유세포분석은 488 nm argon laser(15mW)를 장착한 유세포 분석기를 이용하였다. DNA histogram의 분석은 CELLQuest program(ver. 3.1)을 이용하였다.

DNA fragmentation이 야기된 정자의 형광강도에 대한 기준을 설정하기 위하여 TdT 효소를 제거한 반응액으로 처리한 정자를 DNA fragmentation 발생되지 않은 negative control로 간주하였고, PBS로 희석된 0.1 IU DNase I(Sigma, USA)을 처리하

여 인위적으로 DNA fragmentation을 유도한 정자를 positive control로 이용하여 Fig. 2에서와 같이 DNA fragmentation이 야기된 정자의 형광강도에 대한 기준을 설정하였다. 이후 분석은 Fig. 2의 설정치를 기준으로 분석되는 정자의 DNA fragmentation 정도를 측정하였다.

3) 통계분석

ROS에 발생에 따른 chemiluminescence counts는 수치를 정규분포화 하기 위하여 log로 변환하였다. 결과에 대한 통계학적 분석은 통계 패키지 프로그램인 SPSS(ver. 7.5)를 이용하였으며, 각 항목간의 상관분석은 Spearman rank order correlation test를, 두 군간의 평균치 비교에는 Mann-Whitney U test를 이용하였다. 이때 $p < 0.05$ 인 경우를 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 결 과

고수정군과 저수정군에 있어서 본 연구에서 적

용한 실험법들의 결과는 Table 1에 요약된 것과 같다.

고수정군과 저수정군의 체외수정율과 배발생율의 평균값은 각각 $64.4 \pm 1.8\%$ 와 $34.3 \pm 5.3\%$, $18.5 \pm 3.0\%$ 와 $6.2 \pm 0.9\%$ 로 통계학적으로 유의한 차이를 보였다($P < 0.05$).

고수정군과 저수정군의 운동성과 침체반응률은 각각 평균 $79.0 \pm 4.2\%$ 와 $66.2 \pm 4.6\%$, $40.7 \pm 4.7\%$ 와 $22.9 \pm 2.1\%$ 로 통계학적으로 유의한 차이를 보였다($P < 0.05$), 정상형태 정자의 비율과 HOST는 각각 평균 $94.6 \pm 1.2\%$ 와 $92.7 \pm 1.5\%$, $69.4 \pm 8.8\%$ 와 $59.8 \pm 4.9\%$ 로 두 군간 유의한 차이를 보이지 않았다.

Luminol dependent chemiluminescence, lipid peroxidation 및 DNA fragmentation의 평균값은 고수정군과 저수정군에 있어서 각각 6.4 ± 0.0 와 6.5 ± 0.0 , 2.0 ± 0.0 nmol와 3.1 ± 0.4 nmol 및 $2.6 \pm 0.8\%$ 와 $7.4 \pm 1.2\%$ 로 두 군간 통계학적으로 유의한 차이를 보였다($P < 0.05$), lucigenin dependent chemiluminescence는 4.7 ± 0.0 와 4.6 ± 0.0 로 두 군간 유의한 차이를 보이지 않았다.

Table 1. Seminal measurements for low fertility and high fertility groups

Parameter	High fertility group (n=4)	Low fertility group (n=4)	Significance of any difference
Fertilization rate (FR)	64.4 ± 1.8	34.3 ± 5.3	$P < 0.05$
Blastocyst formation rate (BFR)	18.5 ± 3.0	6.2 ± 0.9	$P < 0.05$
Motility (%)	79.0 ± 4.2	66.2 ± 4.6	$P < 0.05$
Morphology (MOR)	94.6 ± 1.2	92.7 ± 1.5	Not significant
HOST	69.4 ± 8.8	59.8 ± 4.9	Not significant
Acrosome reaction (AR)	40.7 ± 4.7	22.9 ± 2.1	$P < 0.05$
Luminol (LM)	6.4 ± 0.0	6.5 ± 0.0	$P < 0.05$
Lucigenin (LC)	4.7 ± 0.0	4.6 ± 0.0	Not significant
Lipid peroxidation (LPO)	2.0 ± 0.0	3.1 ± 0.4	$P < 0.05$
DNA fragmentation (DNA frag)	2.6 ± 0.8	7.4 ± 1.2	$P < 0.05$

Values are mean \pm SEM.

FR: ova cleaved/ova inseminated (%); BFR: embryos developed beyond blastocyst stage/ova cleaved (%); MOR: normal morphology (%); HOST: spermatozoa swollen under hypo-osmotic condition (%); AR: the difference between spontaneous and ionophore induced acrosome reaction rates (%); LM: luminol-dependent chemiluminescence counts (log transformed 5-min integration covering the period of peak response); LC: lucigenin-dependent chemiluminescence counts (log transformed 5-min integration covering the period of peak response); LPO: malondialdehyde generated by 1×10^8 spermatozoa (nmol); DNA frag: sperm with fragmented DNA (%) assessed by TUNEL and flow cytometry.

체의 수정율과 정자의 기능 및 정상 분석 값간의 상관관계에 있어서 정자의 운동성, 침체반응율은 통계학적으로 유의한 정(positive)의 상관관계($r = 0.87, P < 0.01$; $r = 0.81, P < 0.05$)를 나타내었으며, luminol dependent chemiluminescence, lipid peroxidation, DNA fragmentation은 통계학적으로 유의한 부(negative)의 상관관계($r = -0.81, P < 0.05$; $r = -0.74, P < 0.05$; $r = -0.81, P < 0.05$)를 나타내었다. 그러나 정상형태 정자의 비율과 HOST 및 lucigenin dependent chemiluminescence는 유의한 상관관계를 나타내지 않았다(Table 1).

배발생율과의 상관관계에 있어서는 침체반응율은 통계학적으로 유의한 정(positive)의 상관관계($r = 0.71, P < 0.05$)를 나타내었으며, luminol dependent chemiluminescence, lipid peroxidation, DNA fragmentation과는 통계학적으로 유의한 부(negative)의 상관관계($r = -0.71, P < 0.05$; $r = -0.89, P < 0.01$; $r = -0.71, P < 0.05$)를 나타내었다. 그 외 정자의 운동성, 정상형태 정자의 비율, HOST, lucigenin dependent chemiluminescence는 유의한 상관관계를 나타내지 않았다(Table 2).

IV. 고 찰

본 연구의 목적은 종모우의 수태율 향상에 기여할 수 있는 수정능력 평가방법과 정자 기능 및 정상 변화에 영향을 미치는 요인을 알아보고자 하는 것이다. 이러한 목적으로 우선적으로 체내의 수정 과정을 복합적으로 반영할 수 있는 체외수정법을 실시하여 종모우간에 수정율의 차이를 조사한 결과 종모우간 체외수정율의 차이가 관찰되었으며, 그 개체간의 차이가 체외 배발생율에도 영향을 미치는 것으로 나타났다. 최적화된 체외수정 기법은 이미 사람에서 불임치료를 위한 중요한 임상적 방법으로 정착되어 활발히 이용되고 있으며, 남성의 수태율을 사전에 평가하기 위한 여러 방법들이 체외수정 결과와의 연관성을 구명하는 접근법으로 개발되고 있다. 이와 같은 연구방법에서 연구 대상군의 설정 기준은 중요한 의미를 가지는데 인간의 연구에서는 체외수정율 50%를 기준으로 이상일 경우 정상군으로 미만일 경우 저수정군으로 정의하고 있다(Cummins 등, 1991; Calamera 등, 1998).

Table 2. Linear correlations between seminal measurements and fertilization rate, and blastocyst formation rate

Parameter	Fertilization rate (FR)	Blastocyst formation rate (BFR)
Motility(%)	0.87**	0.54
Morphology (MOR)	0.40	0.12
HOST	0.00	0.52
Acrosome reaction (AR)	0.81*	0.71*
Luminol (LM)	-0.81*	-0.71*
Lucigenin (LC)	0.41	0.48
Lipid peroxidation (LPO)	-0.74*	-0.89**
DNA fragmentation (DNA frag)	-0.81*	-0.71*

Spearman rank order correlation test (n=8, *P<0.05, **P<0.01).

FR: ova cleaved/ova inseminated (%); BFR: embryos developed beyond blastocyst stage/ova cleaved (%); MOR: normal morphology (%); HOST: spermatozoa swollen under hypo-osmotic condition (%); AR: the difference between spontaneous and ionophore induced acrosome reaction rates (%); LM: log transformed 5-min integration luminol-dependent chemiluminescence counts generated by 10×10^6 spermatozoa/ml; LC: log transformed 5-min integration lucigenin-dependent chemiluminescence counts generated by 10×10^6 spermatozoa/ml; LPO: nmol malondialdehyde generated by 1×10^8 spermatozoa; DNA frag: sperm with fragmented DNA (%) assessed by TUNEL and flow cytometry.

본 연구에서도 정자 기능과 정상분석을 시행하는데 있어서 대상군의 차이를 명확히 하고자 체외수정을 실시했던 14 개체중 수정율을 기준으로 수정율이 모두 60% 이상이었던 상위 4개체와 수정율이 모두 40% 미만이었던 하위 4개체를 선별하여 실험에 공시하였다.

정자의 수정능력에 대한 보다 정확한 정보를 얻기 위한 노력으로 정자의 기능적 활성도를 측정하는 다양한 분석법들이 보고되고 있다(Yanagimachi 등, 1976; Jeyendran 등, 1984; Oehninger 등, 1989; Koukoulis 등, 1989; de Leeuw 등, 1991). 이들 방법 중 HOST는 정자 세포막의 정상적인 해부학적 구조와 기능적 활성도를 반영하는 시행이 간편한 검사법으로 알려져 있으며, 정상 수정의 선결 요건인 정자의 침체반응 정도를 분석하는 방법은 실험 동물이나 난자와 같은 특별한 재료가 필요 없는 유용한 방법으로 보고되고 있다.

본 연구에서 체외수정율과의 상관관계에서 HOST 결과는 유의한 상관관계를 보이지 않았다.

HOST는 정자막의 기능적 통합성(functional integrity)을 보려는 검사법으로 정자의 수정에는 정자막의 기능도 중요하기 때문에 HOST의 결과로서 정자의 수정능을 예측하려는 많은 노력이 이루어졌으나 인간 정자의 연구에서도 아직까지 체외수정율에 대한 예측력에 대하여 논란이 있는 실정이다(Jeyendran 등, 1992; Mordel 등, 1993; Kiefer 등, 1996).

반면 본 연구에서 Ca ionophore에 반응하여 야기되는 정자의 침체반응 정도는 체외수정율과 배반포 이상으로의 배발생을 모두에서 유의한 정의 상관관계를 나타내었다. 본 연구 결과는 Yovich 등(1994)과 류 등(1998)이 인간정자의 연구에서 ionophore에 반응하는 침체반응 정도와 체외수정율간에 유의한 상관관계가 있었다는 보고와 일치되는 결과였다.

최근까지 정자의 침체반응을 분석하는 방법에 있어서는 주로 특정한 처리제의 용량이나 처리 시간에 따라 나타나는 반응율만을 단순히 비교하였다. 그러나 정자의 수정능력 평가법으로 침체반응 정도를 분석하는 방법에서 고려되어야 할 사항은

정자처리시에 발생될 수 있는 물리적인 요인에 의하여 일어나는 침체반응과 생리적인 자극에 반응하여 일어나는 정상적인 침체반응 정도가 구별되어야 하는 것이며, 정상적인 침체반응 정도가 정자의 수정능력을 반영하는데 밀접한 연관성이 있다고 보고되었다(Tesarik, 1989). 또한 정자의 수정능 평가법에 있어서 위음성(false negative) 결과는 검사법의 신뢰도를 떨어뜨리는 주요한 요인이 될 수 있다. 따라서 정자의 침체반응 분석법을 시행하는데 있어서는 위음성 결과를 최소화하기 위하여 침체반응 유도시 최적의 조건, 즉 강력하게 작용할 수 있는 침체반응 유도제를 사용하는 것이 유용한 것으로 알려지고 있다(Cummins 등, 1991). 본 연구에서 실시했던 Ca ionophore에 반응하여 야기되는 정자의 침체반응 정도를 분석하는 방법은 상기 기술한 수정능력 평가법으로서 침체반응 분석시 유의해야 할 사항들을 충실히 고려했던 방법으로서 향 후 소 정자의 수정능력을 평가하는데 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서 정자의 기능과 성상 변화에 영향을 미치는 요인을 알아보고자 정자에서의 ROS 발생과 lipid peroxidation 정도를 측정된 결과 이 두 측정치 모두에서 체외수정율과 유의한 부의 상관관계가 관찰되었다. 이와 같은 결과는 Alkan 등(1997)이 원인 불명의 남성불임 환자에서 H_2O_2 와 $\cdot O_2^-$ 발생이 정상인에 비하여 높게 나타났다는 보고와 Beorlegui 등(1997)이 동결 용해된 소 정자에서 정자 기능과 lipid peroxidation 정도간에 부의 상관관계가 있었다는 보고와 유사한 결과이었다. 정액질의 저하에 관련된 원인 분석에 있어서 Kelso 등(1997)은 종모우의 정장(seminal plasma)과 정자 막의 지방조성 변화(phosphatidyl ethanolamine의 감소, phosphatidyl choline의 증가)와 정장내 glutathione peroxidase, SOD와 같은 항산화 효소의 감소가 정액질의 저하와 밀접한 연관성이 있다고 보고하였다. 인간의 연구에서도 Alkan 등(1997)은 원인 불명의 남성불임 환자를 대상으로 정액내의 항산화 효소를 측정된 결과 SOD, catalase, glutathione peroxidase의 농도가 정상인과 비교하여 현저히 낮았다고 하였으며, Smith 등(1996)

도 남성불임 환자의 정액이 정상인의 정액과 비교하여 항산화 효소의 활성도가 낮게 나타났다고 보고하였다. 이들 연구자들의 보고들은 정액내 항산화 효소의 활성도가 정자 수정능과 연관성이 있음을 나타내는 것으로서 항산화 효소들의 주요 역할이 발생된 ROS의 작용을 완충시키는 것임을 고려해 볼 때 ROS가 정액질의 저하에 주요한 작용이 있음을 시사하는 것으로 생각할 수 있다. 또한 Blondin 등(1997)은 소 동결 용해정자를 이용한 연구에서 정자를 인위적으로 발생시킨 ROS에 노출시킨 후 성숙난포란과의 체외수정율에 있어서 ROS에 노출되지 않은 정자에 비하여 ROS에 노출된 정자에서 수정율이 유의하게 감소됨을 관찰함에 따라 ROS가 정자의 기능에 직접적으로 유해한 작용을 미친다고 보고하였다.

포유류 정자의 원형질막은 구성 성분 중 불포화 지방산이 차지하는 비율(60%)이 높은 특이적인 구조를 지니고 있다. 이런 구조적인 특이성으로 인하여 수정과정중 생리학적인 막의 변화를 원활히 수행할 수 있지만 반면 ROS와 같은 자극제에도 민감한 반응을 나타내는 것으로 알려지고 있다(Alvarez와 Storey, 1992). 정자 막의 lipid peroxidation은 ROS에 의하여 발생되는 정자 손상의 주요한 기전으로 알려져 있으며(Alvarez 등, 1987), lipid peroxidation으로 생성된 malondialdehyde는 공유 결합을 통하여 세포의 DNA 수준에까지 손상을 일으키는 것으로 보고되고 있다(Twigg 등, 1998).

Lopes 등(1998)은 정액상태가 나쁜 남성불임 환자의 정자는 다량의 ROS를 발생시키며, 발생된 ROS의 영향으로 DNA 손상이 보다 쉽게 야기될 수 있다고 보고하였다. 본 연구에서도 DNA fragmentation 정도와 체외 수정율 및 발생율간에 유의한 상관관계가 관찰되었는데, Sun 등(1997)이 인간 정자의 연구에서 DNA fragmentation 정도와 체외 수정시 수정율과 난할율 모두에서 부의 상관관계가 있었다는 보고와 일치되는 결과였다.

정액질과 배아 발생간의 상관관계에 있어서 Janny와 Menezo(1994)는 인간의 체외수정 시술시 정액질이 나쁜 환자에서 생산된 배아는 배반포까지의 발생율이 현저히 저하되는 양상을 보고하였

다. 이들의 결과는 본 연구에서 첨체반응율은 배발생율과 정자의 상관관계를 보인 반면, 정자의 손상 정도를 나타내는 lipid peroxidation과 DNA fragmentation 정도는 부의 상관관계를 나타내었던 것과 유사한 결과로 해석할 수 있다. 정액질의 저하는 옹축의 정소나 생식기도내에서 생화학적인 이상으로 인하여 발생할 수 있다. 이러한 정액질의 이상이 정자 DNA의 미성숙이나 fragmentation 현상까지 포함한다면, 수정직후 세포 주기의 지연과 같은 불일치가 일어날 수 있으며, DNA fragmentation에 따라 착상전 배아 발생에 연관된 옹성 유래 유전자들이 손실되었을 경우 배아의 genomic activation에 이상이 초래됨으로 추후 건강한 배아 발생이 불가능한 것으로 보고되고 있다(Sakkas 등, 1989; Naz, 1992; Munne와 Estop, 1991; Janny와 Menezo, 1994).

이상의 결과를 종합해 보면 정액질의 저하에 ROS의 영향이 밀접히 연관되어 있음을 알 수 있으며, 또한 본 연구에서 적용된 기법들은 향후 정액의 질에 대한 평가 및 향상을 위한 기술개발에 있어서 유용한 평가 방법으로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

V. 적 요

본 연구는 종모우의 정자수정능력 평가방법의 개발과 정자 기능 및 성상 변화에 영향을 미치는 요인을 알아보기 위하여 시행하였다.

동결-용해된 종모우 정액을 대상으로 정자의 운동성과 정자의 형태를 분석하였고, 정자의 기능 검사 항목으로서 체외수정(IVF), HOST, Ca-ionophore에 의한 첨체반응율, 정자의 ROS 측정용을 위한 luminol, lucigenin-dependent chemiluminescence, LPO 분석을 위한 malondialdehyde의 측정 및 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT) dUTP nick end labelling) 기법을 이용한 정자의 DNA fragmentation를 측정하였으며 이들 각각의 조사 항목들의 분석치들과 체외수정율 및 배발생율과의 상관관계를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 고수정군과 저수정군의 체외수정율과 배반포

발생율의 평균은 각각 64.4%와 34.3%, 18.50%와 6.2%였으며 두 군간에 통계학적으로 유의한 차이를 보였다($P<0.05$). 고수정군과 저수정군의 정자운동성과 침체반응률은 각각 평균 79.0%와 66.2%, 40.7%와 22.9%로 두 군간에 통계학적으로 유의한 차이를 보였으나($P<0.05$), 정상형태 정자의 비율과 HOST는 각각 평균 94.6%와 92.7%, 69.4%와 59.8%로 두 군간 유의한 차이를 보이지 않았다.

2. Luminol dependent chemiluminescence, LPO 및 DNA fragmentation의 평균은 고수정군과 저수정군에 있어서 각각 6.4와 6.5, 2.0nmol와 3.1nmol 및 2.6%와 7.4%로 두 군간 통계학적으로 유의한 차이를 보였으나($P<0.05$), lucigenin dependent chemiluminescence는 4.7와 4.6로 두 군간 유의한 차이를 보이지 않았다.
3. 체외 수정율은 정자의 운동성 및 침체반응율과 통계학적으로 유의한 정(positive)의 상관관계($r=0.87, P<0.01; r=0.81, P<0.05$)를 나타내었으며, luminol dependent chemiluminescence, lipid peroxidation 및 DNA fragmentation과는 통계학적으로 유의한 부(negative)의 상관관계($r=-0.81, P<0.05; r=-0.74, P<0.05; r=-0.81, P<0.05$)를 나타내었다. 그러나 체외수정율은 정상형태 정자의 비율, HOST 및 lucigenin dependent chemiluminescence와는 유의한 상관관계를 나타내지 않았다.
4. 배반포 발생율은 침체반응율과 통계학적으로 유의한 정(positive)의 상관관계($r=0.71, P<0.05$)를 나타내었으며, luminol dependent chemiluminescence, lipid peroxidation 및 DNA fragmentation과는 통계학적으로 유의한 부의 상관관계($r=-0.71, P<0.05; r=-0.89, P<0.01; r=-0.71, P<0.05$)를 나타내었다. 배반포 발생율은 정자의 운동성, 정상형태 정자의 비율 및 HOST, lucigenin dependent chemiluminescence와는 유의한 상관관계를 나타내지 않았다.

이상의 결과를 종합해 보면 정액질의 저하에 ROS의 영향이 밀접히 연관되어 있음을 알 수 있으며, 또한 본 연구에서 적용된 기법들은 정액질의

평가 및 정자 수정능력 향상을 위한 기술개발에 있어서 유용한 평가 방법으로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

VI. 인용문헌

1. Aitken, R. J., Clarkson, J. S., Hargreave, T. B., Irvine, D. S. and Wu. F. C. 1989. Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. *J. Androl.*, 10:214-220.
2. Aitken, R. J., Buckingham, D. W. and Katrine, M. W. 1992. Reactive oxygen species and human spermatozoa: Analysis of the cellular mechanism involved in luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence. *J. Cell. Physiol.*, 151:466-477.
3. Aitken, R. J., Harkiss, D. and Buckingham, D. W. 1993. Analysis of lipid peroxidation mechanism in human spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.*, 35:302-315.
4. Alkan, I., Simsek, F., Haklar, G., Kervancioglu, E., Ozveri, H., Yalcin, S. and Akdas, A. 1997. Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants. *J. Urol.*, 157:140-143.
5. Alvarez, J. G., Touchstone, J. C., Blasco, L. and Storey, B. T. 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide in human spermatozoa: superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J. Androl.*, 8:338-348.
6. Alvarez, J. G. and Storey, B. T. 1992. Evidence for increased peroxidative damage and loss of super oxide dismutase activity as a model of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J. Androl.*, 13:232-241.
7. Bennet, P. J., Moatti, J. P., Mansat, A., Ribbes,

- H., Cayrac, J. C., Pontonnier, F., Chap, H. and Douste-Blazy, L. 1987. Evidence for the activation of phospholipase during acrosome reaction of human sperm elicited by calcium ionophore A23187. *Biochim. Biophys. Acta.*, 919:255-265.
8. Beorlegui, N., Cetica, P., Trincherro, M., Cordoba, M. and Beconi, M. 1997. Comparative study of functional and biochemical parameters in frozen bovine sperm. *Andrologia*, 29:37-42.
 9. Biggers, J. S., Whitten, W. K. and Whittingham, D. G. 1971. The culture of mouse embryos *in vitro*. In: *Method in mammalian embryology*, J.C. Daniel (Ed.), Freeman, San Francisco, pp. 86-116.
 10. Blom, E. 1973. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord. Vet. Med.*, 28:511.
 11. Blondin, P., Coenen, K. and Sirard, M. A. 1997. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. *J. Androl.*, 18:454-460.
 12. Brackett, B. G. and Oliphant, G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 12:260-274.
 13. Calamera, J. C., Doncel, G. F., Olmedo, S. B., Kolm, P. and Acosta, A. A. 1998. Modified sperm stress test: a simple assay that predicts sperm -related abnormal *in-vitro* fertilization. *Reprod.*, 13:2484-2488.
 14. Comporti, M. 1989. Three models of free radical induced cell injury. *Chem. Biol. Interactions*, 72:1-56.
 15. Cummins, J. M., Pember, S. M., Jequier, A. M., and Yovich, J. L. 1991. A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge. *J. Androl.*, 12:98-103.
 16. De Lamirande, E. and Gagnon, C. 1992. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axoneme; and II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J. Androl.*, 13:368-386.
 17. De Lamirande, E. and Gagnon, C. 1995. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa; a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum. Reprod.*, 10(suppl 1):15-21.
 18. De Leeuw, A. M., Den Daas, J. H. and Woelders, H. 1991. The fix vital stain method. Simultaneous determination of viability and acrosomal status of bovine spermatozoa. *J. Androl.*, 12:112-118.
 19. Goldman, R., Ferber, E. and Zort, U. 1992. Reactive oxygen species are involved in the activation of cellular phospholipase A2. *FEBS Lett.*, 309:190-192.
 20. Hammitt, D. G., Martin, P. A. and Callanan, T. 1989. Correlation between heterospermic fertility and assays of porcine seminal quality before and after cryopreservation. *Theriogenology*, 32: 385-399.
 21. Howard, T. H. and Pace, M. M. 1988. Seminal evaluation and artificial insemination. In: *Fertility and infertility in veterinary practice*, J.A. Laing, W. J. B. Morgan, W. C. Wagner (Eds.), 4 th ed., Bailliere Tindall, Philadelphia, USA, pp. 39-51.
 22. Janny, L. and Menezo, Y. 1994. Evidence for a strong paternal effect on human preimplantation embryo development and blastocyst formation. *Mol. Reprod. Dev.*, 38:36-42.
 23. Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G. and 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.
 24. Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H. and

- Zaneveld, L. J. 1992. The hypoosmotic swelling test: an update. *Arch. Androl.*, 29:105-116.
25. Kelso, K. A., Redpath, A., Noble, R. C. and Speake, B. K. 1997. Lipid and antioxidant changes in spermatozoa and seminal plasma throughout the reproductive period of bulls. *J. Reprod. Fertil.*, 109:1-6.
 26. Kiefer, D., Check, J. H. and Katsoff, D. 1996. The value of motile density, strict morphology, and the hypoosmotic swelling test in *in vitro* fertilization and embryo transfer. *Arch. Androl.*, 37:57-60.
 27. Koukoulis, G. N., Vantman, D. J., Dennison, L., Banks, S. M. and Sherins, R. J. 1989. Low acrosin activity in a subgroup of men with idiopathic infertility does not correlate with sperm density, percent motility, curvilinear velocity of linearity. *Fertil. Steril.*, 52:120-127.
 28. Lopes, S., Jurisicova, A., Sun, J. G. and Casper, R. F. 1998. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 13:896-900.
 29. Mordel, N., Dano, I., Epstein-Eldan, M., Shemesh, A., Schenker, J. G. and Laufer, N. 1993. Novel parameters of human sperm hypoosmotic swelling test and their correlation to standard spermatogram, total motile sperm fraction, and sperm penetration assay. *Fertil. Steril.*, 59:1276-1279.
 30. Munne, S. and Estop, A. 1991. The effect of *in-vitro* ageing on mouse sperm chromosomes. *Hum. Reprod.*, 6:703-708.
 31. Naz, R. K. 1992. Effects of antisperm antibodies on early cleavage of fertilized ova. *Biol. Reprod.*, 7(suppl. 1):101-106.
 32. Oehninger, S., Coddington, C. C., Scott, R., Franken, D. A., Burkman, L. J., Acosta, A. A. and Hodgen, G. D. 1989. Hemizona assay: assessment of sperm dysfunction and prediction of *in vitro* fertilization outcome. *Fertil. Steril.*, 51:665-670.
 33. Sakkas, D., Batt, P. A. and Cameron, A. W. N. 1989. Development of preimplantation goat (*Capra hircus*) embryos *in vivo* and *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 87:359-365.
 34. Slater, T. F. and Sawyer, B. C. 1971. The stimulatory effects of carbon tetrachloride and other halogenoalkanes on peroxidative in rat liver fractions *in vitro*. *Biochem. J.*, 123:805-814.
 35. Smith, R., Vantman, D., Ponce, J., Escobar, J. and Lissi, E. 1996. Total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Hum. Reprod.*, 11:1655-1660.
 36. Sun, J. G., Jurisicova, A. and Casper, R. F. 1997. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 56:602-607.
 37. Tesarik, J. 1989. Appropriate timing of the acrosome reaction is a major requirement for the fertilizing spermatozoon. *Hum. Reprod.*, 4:957-961.
 38. Twigg, J., Fulton, N., Gomez, E., Irvine, D. S. and Aitken, R. J. 1998. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum. Reprod.*, 13:1429-1436.
 39. Woelders, P. F. 1991. Overview of *in vitro* methods for evaluation of semen quality. In: Boar semen preservation II, L.A. Johnson, D. Rath (Eds.), Paul Parey Scientific Publishers, Berlin, German, pp. 145-164.
 40. Yanagimachi, R., Yanagimach, H. and Rogers, B. J. 1976. The use of zona-free animal ova as a test system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 15:471-476.
 41. Yovich, J. M., Edirisinghe, W. R. and Yovich,

- J. L. 1994. Use of the acrosome reaction to ionophore challenge test in managing patients in an assisted reproduction program: a prospective, double-blind, randomized controlled study. *Fertil. Steril.*, 61:902-910.
42. 류범용, 김석현, 박서영, 지병철, 정병준, 김희선, 방명걸, 오선경, 서창석, 최영민, 김정구, 문신용, 이진용, 손영수. 1998. 인간 정자의 수정 능력 평가에 있어서 ARIC 검사의 유용성에 관한 연구. *대한산부인과학회잡지*. 41:2562-2570.
(접수일자: 2002. 5. 27. / 채택일자: 2002. 7. 29.)