

미세술기를 이용한 정계정맥류절제술이 정자 핵 내 DNA Integrity에 미치는 효과

미즈메디병원 비뇨기과¹, 미즈메디병원 불임의과학연구소²

김기영¹ · 이재석¹ · 지희준² · 김종현^{1*}

Effect of Microsurgical Varicocelectomy on Human Sperm Nucleus DNA Integrity

Gi Young Kim¹, Jae Seok Lee¹, Hee Jun Chi², Jong Hyun Kim^{1*}

¹Department of Urology, ²ART Research Center, Mizmedi Hospital, Seoul, Korea

Objective: Human sperm nucleus DNA damage may negatively affect pregnancy outcome, and the spermatozoa of infertile men have more DNA damage than that of fertile men. The aim of this study was to evaluate the effect of microsurgical varicocelectomy on human sperm nucleus DNA integrity.

Methods: We reviewed the medical records of 18 subfertile male patients who underwent microsurgical varicocelectomy at our hospital from April 2006 to April 2007. Varicocele was diagnosed by physical examination and Doppler ultrasound. Standard semen analysis was performed in 18 patients before and 4 months after microsurgical varicocelectomy using a computer assisted semen analyzer. Sperm nucleus DNA integrity was assessed by a single-cell gel electrophoresis (comet assay).

Results: No recurrence of varicocele was observed after 4 months later. The DNA fragmentation index improved after varicocelectomy compared with pre-operatively (19.3 versus 13.7%, respectively, $p < 0.05$). Semen analysis parameters (total count, concentration, motile sperm, viability, strict morphology) increased after varicocelectomy, but the difference did not reach statistical significance.

Conclusion: Our data suggest that microsurgical varicocelectomy can improve semen analysis parameters and human sperm nucleus DNA integrity in infertile men with varicocele. [Korean. J. Reprod. Med. 2010; 37(3): 245-251.]

Key Words: Varicocele, Infertility, DNA fragmentation, Comet assay

인간 정자 핵 내의 DNA integrity는 배아발달 및 임신유지에 중요한 역할을 하여 DNA integrity가 손상된 경우 불임과 유산의 원인이 된다고 하며, 정계정맥류는 DNA 손상을 일으키는 대표적인 원인 중 하나이다.

정계정맥류는 고환으로 가는 정계의 정맥총이 확장된 상태를 말하여 정맥 판막의 기능부전으로

혈액의 역류가 일어나는 질환이다.¹ 전체 남성 인구의 약 10~15%에서 발견되고 불임 남성에서는 일차성 불임의 경우 30~35%, 이차성 불임의 경우 70~80%에서 발견되며,² 수술로 치료될 수 있는 가장 흔한 남성 불임의 원인이다.

정계정맥류가 불임을 일으키는 원인에 대해서 명확하게 알려진 바는 없다.

정계정맥류는 호르몬의 기능장애, 고환온도증가, 부신 또는 신장의 독성 대사물질의 역류 및 고환의 저산소증을 유발하여 남성 불임을 유발할 수 있으며,³ 최근 여러 연구에서 보면 정맥류는 활성화 산

접 수 일: 2010년 8월 26일, 수정일: 2010년 9월 10일
게재확정일: 2010년 9월 15일
주관책임자: 김종현, 우) 157-723 서울특별시 강서구 내발산동 701-4, 미즈메디병원 비뇨기과
Tel: (02) 2007-1000, Fax: (02) 2007-1888
e-mail: jhandro@mizmedi.net

소의 증가 및 항산화기능의 감소로 정자 핵 내 DNA 손상을 유발하여 불임을 유발한다고 밝혀지고 있다.

정계정맥류절제술은 수정능력이 감소되어 있는 환자의 치료를 위해 널리 사용되는 방법이다. Perimenis 등⁴은 정계정맥류절제술을 받은 환자의 83.2%에서 정액검사결과와 향상 및 성공적인 임신율의 증가를 보고하였다.

정액검사는 남성 생식계에 대한 일차 정보를 제공해 주는 가장 기본적이면서도 중요한 검사이다. 그러나, 남성 불임 환자의 약 15%에서는 정액 검사에서 정상 소견을 보이며, 정액검사만으로는 정자의 기능을 포함한 모든 부분을 알려주지는 못한다. 최근 들어 인간 정자 핵 내의 DNA 손상과 남성 불임과의 연관성을 찾기 위해 많은 연구가 진행 중이다. 정계정맥류절제술이 정계정맥류를 가진 불임 환자들에서 정자 핵 내 DNA integrity를 호전시키며,⁵ 정계정맥류수술은 정자 핵 내 DNA의 산화 손상을 줄이고 정액 내의 항산화능력을 증가시킨다고 한다.⁶

본 연구에서는 미세술기를 이용한 정계정맥류절제술로 교정을 하였을 때 정자 핵 내 DNA integrity가 어떠한 영향을 받는지에 대하여 알아보려고 하였다.

연구대상 및 방법

1. 대상

2006년 4월부터 2007년 4월까지 불임을 주소로 내원하여 신체검사 또는 초음파 검사상 정계정맥류로 진단받고 미세술기를 이용한 정계정맥류절제술을 받았던 18명의 환자를 대상으로 하였다. 정계정맥류는 환자들이 서있는 자세에서 신체검사 후 세 단계로 나누었는데 Grade I은 Valsalva법 시행 시 만져지는 경우, Grade II는 Valsalva법을 시행하지 않고도 만져지는 경우, Grade III은 눈으로도 보이는 경우로 분류하였다. 정액검사는 3~4일의 금욕 기간을 거친 후에 자위를 통해 수술 전 최소 2회

이상, 수술 후 4개월에 채취하였으며 컴퓨터 정액 분석 (computer-assisted semen analysis)를 이용하여 분석하였다.

수술 전후에 정액검사의 다른 지표들과 함께 정자 핵 내 DNA integrity의 변화를 같이 조사하였다. 정자 핵 내 DNA integrity를 측정하는 방법으로 comet assay를 시행하였고, comet assay를 통한 DNA 손상 정도는 DNA fragmentation index (DFI)로 나타내었다. DFI 수치가 높다는 것은 정자 핵 내 DNA 손상 빈도가 많다는 것을 의미하며, DFI가 10 이상을 비정상적으로 간주하였다.

2. 미세술기를 이용한 정계정맥류절제술

Marmar와 Kim⁷에 의해 변형된 외서혜륜 직하방에서 정삭을 들어 올려 정맥을 결찰하는 수술방법으로 수술현미경을 이용하였다. 즉, 저위서혜부로 접근하여 수술현미경하에 하나 또는 그 이상의 고환동맥, 정관 및 정관동맥, 하나의 정관정맥과 림프관을 보존하고 확장되어 있는 모든 내정계정맥을 비롯한 외정계정맥, 고환도대정맥을 제거하였다.

3. Comet assay

채취된 정액을 세척한 후 정액 5 μ L를 45 μ L의 low melting agarose와 혼합하고 샘플을 comet용 slide glass (Trevigen, Gaithersburg, MD, USA)에 올려놓고 cover glass로 덮은 후 4°C 냉장고에서 10분간 보관한다. Cover glass를 조심스럽게 제거한 후 slide를 4°C 냉장고에서 미리 cooling된 lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10 mM DL-dithyothreitol; Sigma, St. Louis, MO, USA)에 2시간 동안 침지시킨다. 수평형 전기영동기 (horizontal electrophoretic unit, BioRad, Hercules, CA, USA)에 slide를 올려 놓고 electrophoresis buffer (500 mM NaCl, 100 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.2% DMSO, Sigma)을 채운 후 20분 동안 침지시키고 전기영동을 10 V, 250 mA에서 60분 동안 running 시킨다. 전기영동 후 slide를 세척하여 neutralizing solution (50% ethanol, 20 mM Tris, 1 mg/mL spermine, Sigma)에

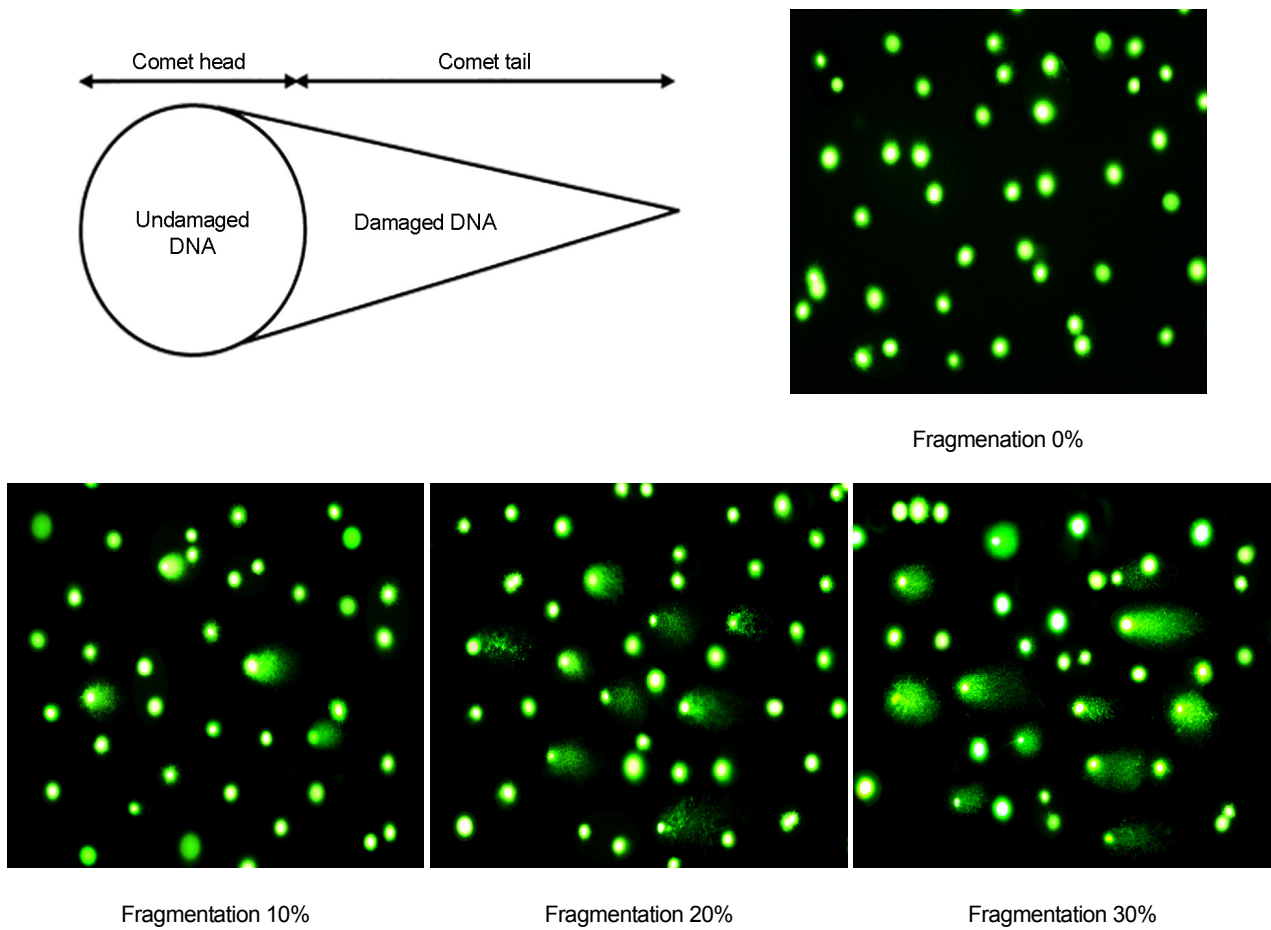


Figure 1. Sperm DNA integrity assessed by neutral comet assay. Intact sperm will not create comets because high-molecular weight DNA dose not mobilize well and high levels of DNA strand breaks show increased comet tail fluorescent intensity and length ($\times 400$).

Gi Young Kim. Effect of Microsurgical Varicocelectomy on Human Sperm Nucleus DNA Integrity. Korean J Reprod Med 2010.

5분 동안 침지시키고 이러한 과정을 3회 반복한다. Slide를 세척한 후 SYBR staining solution (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.01% SYBR Green, Trevigen)으로 염색하고 증류수로 slide로 세척한 후 vectashield mounting solution (Vector Labs, Burlingame, CA, USA)으로 관찰할 slide 부위를 피복하고 형광이 부착된 inverted microscope로 400배의 배율 하에서 정자의 DNA 손상을 관찰한다.

DNA 손상을 받지 않은 정상 정자의 핵 내 DNA는 고 분자량이므로 DNA가 이동하지 않기 때문에 꼬리가 달린 혜성 모양이 나타나지 않지만, DNA 손상이 있는 정자들은 저 분자량의 DNA를 가지므

로 끌려서 이동하게 되어 혜성모양의 꼬리가 관찰된다 (Figure 1). 즉, 각 세포 내의 DNA fragmentation과 관련된 단일 혹은 이중 사슬의 파손 양을 측정하여 DNA 손상 정도를 알아보는 방법이다.

4. 통계처리

통계학적 비교는 paired T-test와 Wilcoxon signed ranks test를 이용하였으며 p -value가 0.05 미만인 경우에 의미가 있는 것으로 판단하였다.

Table 1. Semen analysis parameters before and after microsurgical varicocelectomy

| | Pre-operative | Post-operative | p-value |
|---|---------------|----------------|---------|
| DFI | 19.3±12.7 | 13.7±10.3 | 0.01 |
| Sperm concentration (×10 ⁶ /mL) | 43.1±40.4 | 49.6±38.7 | 0.31 |
| Motile sperm (%) | 26.5±18.8 | 32.1±18.6 | 0.07 |
| Viability (%) | 77.8±21.7 | 83.8±11.1 | 0.15 |
| Strict morphology (%) | 4.3±2.6 | 4.4±2.2 | 0.69 |
| Total count (×10 ⁶) | 128.6±138.9 | 128.9±97.3 | 0.67 |
| Total motile sperm counts (×10 ⁶) | 40.4±55.9 | 48.5±45.7 | 0.37 |
| Motile sperm concentration (×10 ⁶ /mL) | 13.7±17.5 | 19.5±19.4 | 0.02 |

DFI, DNA fragmentation index.

Gi Young Kim. Effect of Microsurgical Varicocelectomy on Human Sperm Nucleus DNA Integrity. Korean J Reprod Med 2010.

결 과

1. 대상

환자들의 연령은 28~38세로 평균 32.7세였고, 불임기간은 5개월에서 6년으로 평균 2년 6개월이었다. 정계정맥류는 일측성의 경우 모두 좌측에서 관찰되어 12명에서 Grade I은 3명, Grade II는 8명, Grade III는 1명이었고, 양측성 정계정맥류를 가진 6명의 환자들 중 좌측에서 Grade I은 1명, Grade II는 3명, Grade III는 2명이었고 우측에서는 subclinical은 1명, Grade I은 1명, Grade II는 4명이었다.

2. 정액검사

수술 전 정자의 밀도는 평균 43.1×10⁶, 운동성은 평균 26.5%, 정자의 생존성은 평균 77.8%, 엄격한 기준에 의한 정자 모양은 평균 4.3%였고, 수술 후 각각 49.6×10⁶, 32.1%, 83.8%, 4.4%로 호전 양상을 보였으나 통계적으로는 유의한 차이는 없었다 (Table 1).

전체 정자 수, 전체 운동성 정자 수 (total motile sperm counts)와 운동정자밀도에서도 수술 후 호전되었는데 운동성 정자밀도에서 통계적으로 유의한 차이가 있었지만 전체 정자 수와 전체 운동성 정자

Table 2. The change of DFI in the patients with normal versus abnormal DNA integrity

| | Pre-operative | Post-operative | p-value |
|--------|---------------|----------------|---------|
| DFI<10 | 7.7±3.1 | 9.5±2.8 | 0.56 |
| DFI>10 | 22.6±12.4 | 14.9±11.4 | >0.01 |

DFI, DNA fragmentation index.

Gi Young Kim. Effect of Microsurgical Varicocelectomy on Human Sperm Nucleus DNA Integrity. Korean J Reprod Med 2010.

수에서는 유의한 차이가 없었다 (Table 1).

3. Comet assay 결과

정자 핵 내 DNA 손상 정도를 나타내는 평균 DFI는 수술 전에 19.3%, 수술 후에 13.7%로 통계적으로 유의한 차이를 보였다 (Table 1). 수술 전 DFI가 10 이상으로 비정상인 14명의 환자들 중 12명 (85%)에서 개선 소견을 보였으나, 수술 전 DFI가 10 미만인 정상 환자 4명에서는 1명 (25%)만이 개선 소견을 보였다 (Table 2).

고 찰

남성 불임 환자들 중에서 많은 빈도로 정계정맥

류가 관찰이 되지만 현재까지 어떤 기전에 의하여 정액에 나쁜 영향을 미치며 수정 및 배아발달에 어떻게 영향을 주는지에 대한 명확한 기전은 알지 못한다.

세계보건기구에서 시행한 다기관 연구에서 정계정맥류와 고환기능변화의 중요한 상관관계가 관찰되었다. 정액의 변화가 있는 25%의 환자에서 정계정맥류가 관찰되었으나, 정상인 환자들에서는 12%에서만 관찰되었다. 더구나 정계정맥류와 같은 쪽에 위치한 고환 크기의 감소는 강한 연관관계를 보였다.^{3,8}

정계정맥류를 가진 환자들에서 신장 또는 부신에서 발생된 독성 대사물질의 역류, 정맥순환의 정체에 의한 고환의 저산소증, 호르몬의 기능장애 내 정계정맥의 고혈압과 고환온도의 증가 등의 원인으로 정자형성과정의 변화가 일어난다.³ 그리고 이런 환자들의 정액에서 활성화 산소 (reactive oxygen species)의 증가 및 항산화기능의 감소가 관찰이 된다.²⁹ 그리하여 정자는 과다한 활성화 산소에 노출이 되고 충분하지 않는 세포질 및 불충분한 항산화제로 인하여 활성화 산소로부터의 보호작용이 감소되어 결과적으로 정자 DNA 손상이 발생하게 된다.

활성화 산소에 의해 정상 정자가 손상을 받는 정확한 기전에 대해서는 확실하게 밝혀지지는 않았지만 hyperactivation, 정자의 수정능획득 (capacitation), 투명대에 결합 그리고 침체반응의 과정들이 산화 및 환원에 의해 조절되기 때문이라고 생각되어지고 있다.¹⁰ 아울러 활성화 산소가 정자 DNA integrity에 나쁜 영향을 주어서 fragmentation과 denaturation과 같은 손상을 유발시킨다고 한다.

정계정맥류를 가진 불임 환자들에게서 interleukin-6 및 활성화 산소의 증가 및 항산화기능의 감소가 관찰이 되어 정자기능부전에 산화 스트레스가 중심이 되며,¹¹ 정계정맥류 환자에서 고환온도의 증가 및 활성화 산소의 증가로 인해 정자기능 이상 및 DNA 손상을 유발한다.¹²

여러 연구에서 보면 정자 핵 내 DNA 손상은

자연임신에 영향을 미친다고 알려지고 있는데, Evenson 등¹³과 Spano 등¹⁴은 sperm chromatin structure assay (SCSA)로 DNA 손상 정도를 파악하였고 정자 DNA integrity와 남성의 임신 가능성과의 상관관계를 알아보았는데 손상이 30% 이상이면 자연임신이 힘든 것으로 보여 원인불명의 불임부부들에게서 임신성공여부를 예측할 수 있다고 하였고, Zini 등¹⁵은 DNA denaturation과 DNA fragmentation이 정상에서는 10%, 13%인데 반하여 불임 남성에서는 25%, 28%로 증가하였다고 하였다. 그러므로, 정자 DNA 손상은 남성의 가임능력과 연관이 있는 것으로 생각되며 불임의 원인이 명확하지 않는 환자들에게도 유용하게 적용할 수 있다.

Bungum 등¹⁶과 Saleh 등¹⁷은 SCSA 검사에서 DNA 손상이 30% 이상이면 인공수정 시 임신 가능성이 제로에 가깝다고 발표하였고, Duran 등¹⁸은 TUNEL 검사 상 DNA 손상이 12% 이상이면 임신이 어렵다고 하였다. 그러므로, 남성 불임 환자들에서 정자 DNA 손상을 측정하는 것은 자궁강내 정액주입 (intrauterine insemination) 시 그 결과를 예측하는 데 있어 많은 도움이 되고 DNA 손상이 심한 경우 자궁강내 정액주입법을 시행하면 성공 가능성이 적기 때문에 비교적 DNA 손상의 영향을 적게 받는 시험관수정 (*In vitro* fertilization) 또는 세포질내 정자주입법 (Intracytoplasmic sperm injection)를 시행하도록 권할 수 있는 기본 자료로도 활용할 수 있다.

Zini 등⁵은 미세술기를 이용한 정계정맥류절제술 후 정액 지표 및 DNA 손상이 27.7%에서 24.6% 개선되었다고 보고하였는데, 본원의 연구 결과에서도 comet assay 결과 DFI가 19.3%에서 13.7%로 호전되었으며 특히, DFI가 10 이상으로 DNA 손상이 심한 환자들에서 수술 전 22.6%에서 수술 후 14.9%로 개선이 관찰되었다.

이상과 같은 연구 결과로 미세술기를 이용한 정계정맥류절제술을 통한 수술적 교정은 정액검사상의 다른 지표의 개선 뿐 아니라, 정자 핵 내 DNA 손상을 감소시킬 수 있다. 이상에서 정계정맥류의

수술적 교정으로 정자 핵 내 DNA integrity의 개선을 기대할 수 있으며, 이는 보다 양호한 정자를 많이 얻을 수 있어 자연임신이나 보조 생식술의 성공 가능성을 높일 수 있다는 점을 제시한다.

참 고 문 헌

- Gat Y, Bachar GN, Zukerman Z, Belenky A, Gornish M. Varicocele: a bilateral disease. *Fertil Steril* 2004; 81: 424-9.
- Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Rios R, Morales I, et al. Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum Reprod* 2006; 21: 986-93.
- Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. Pathophysiology of varicoceles in male infertility. *Hum Reprod Update* 2001; 7: 473-81.
- Perimenis P, Markou S, Gyftopoulos K, Athanasopoulos A, Barbalias G. Effect of subinguinal varicocelectomy on sperm parameters and pregnancy rate: a two-group study. *Eur Urol* 2001; 39: 322-5.
- Zini A, Blumenfeld A, Libman J, Willis J. Beneficial effect of microsurgical varicocelectomy on human sperm DNA integrity. *Hum Reprod* 2005; 20: 1018-21.
- Chen SS, Huang WJ, Chang LS, Wei YH. Attenuation of oxidative stress after varicocelectomy in subfertile patients with varicocele. *J Urol* 2008; 179: 639-42.
- Marmar JL, Kim Y. Subinguinal microsurgical varicocelectomy: a technical critique and statistical analysis of semen and pregnancy data. *J Urol* 1994; 152: 1127-32.
- World Health Organization. The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. *Fertil Steril* 1992; 57: 1289-93.
- Hendin BN, Kolettis PN, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. *J Urol* 1999; 161: 1831-4.
- de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reprod* 1997; 2: 48-54.
- Nallella KP, Allamaneni SS, Pasqualotto FF, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Relationship of interleukin-6 with semen characteristics and oxidative stress in patients with varicocele. *Urology* 2004; 64: 1010-3.
- Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Said TM, Sikka SC, Thomas AJ Jr. Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil Steril* 2003; 80: 1431-6.
- Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, et al. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod* 1999; 14: 1039-49.
- Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril* 2000; 73: 43-50.
- Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 2001; 75: 674-7.
- Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L, Giwercman A. The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Hum Reprod* 2004; 19: 1401-8.
- Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, et al. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril* 2003; 79(Suppl 3): 1597-605.
- Duran EH, Morshedi M, Taylor S, Oehninger S. Sperm DNA quality predicts intrauterine insemination outcome: a prospective cohort study. *Hum Reprod* 2002; 17: 3122-8.

= 국문초록 =

목적: 인간 정자 핵 내의 DNA integrity는 배아의 발달 및 임신 유지에 중요한 역할을 하여 DNA integrity가 손상된 경우 불임과 유산의 원인이 된다고 하며, 정계정맥류는 DNA 손상을 일으키는 대표적인 원인 중 하나이다. 본 연구에서는 미세술기를 이용한 정계정맥류절제술로 정계정맥류를 교정을 하였을 때 정자 핵 내 DNA integrity가 어떠한 영향을 받는지에 대하여 알아보았다.

연구방법: 2006년 4월부터 2007년 4월까지 불임을 주소로 미세술기를 이용한 정계정맥류절제술을 받았던 18명의 환자에서 수술 전 후에 정액검사의 다른 지표들과 함께 정자 핵 내 DNA integrity가 어떻게 변화하였는지 조사하였다. 정자 핵 내 DNA integrity를 측정하는 방법으로 comet assay를 시행하였고, comet assay를 통한 DNA 손상 정도는 DNA fragmentation index (DFI)로 나타내었다.

결과: 수술 후 4개월에 모든 환자에서 재발의 소견은 보이지 않았으며, DNA 손상 정도를 나타내는 평균 DFI는 수술 전에 19.3%, 수술 후에 13.7%로 유의한 변화를 보였다. 수술 전 DFI가 10 이상으로 비정상인 14명의 환자들 중 12명 (85%)에서 개선 소견을 보였으나, 수술 전 DFI가 10 미만인 정상 환자 4명에서는 1명 (25%)만이 개선 소견을 보였다. 수술 후 정자의 밀도, 운동성, 생존성에서 호전 양상을 보였으나 유의한 차이는 없었다.

결론: 미세술기를 이용한 정계정맥류절제술을 통한 수술적 교정은 정액검사상의 다른 지표의 개선 뿐 아니라, 정자 핵 내 DNA 손상을 감소시킬 수 있다. 이상에서 정계정맥류의 수술적 교정으로 정자 핵 내 DNA integrity의 개선을 기대할 수 있으며, 이는 보다 양호한 정자를 많이 얻을 수 있어 자연임신이나 보조 생식술의 성공 가능성을 높일 수 있다는 점을 제시한다.

중심단어: 정계정맥류, 불임, DNA 손상, Comet 검사