

일반 광학 현미경을 사용한 정자의 운동 특성 분석에 관한 연구

이 원진, 박 광석, *백 재승

서울대학교 의과대학 의공학교실

*서울대학교 의과대학 비뇨기과학교실

A Study on the Motional Characteristics of Sperms using Optical Microscope

Wonjin Yi, Kwangsuk Park, Jaeseung Baek

Department of Biomedical Engineering, Seoul National University

*Department of Urology, College of Medicine, Seoul National University

I. 서론

불임 연구에 있어서 정자의 운동 특성 분석은 필요불가결하다. 종래에는 현미경을 통해 보이는 정자 영상을 육안으로 판단해서 간단한 특성을 측정했었다. 그런데 최근에는 컴퓨터의 성능 향상과 영상처리 기술의 발달에 힘입어 분석 방법이 자동화되어 가고 있다. 지금까지 개발된 정자 분석 방법은 영상 획득 시 위상차 현미경을 사용하여 왔다. 위상차 현미경은, 광학 현미경이 조직의 빛 흡수량 차이에 의한 빛의 조직 투과력의 차이를 이용하는 반면에, 빛의 매질에 따른 굴절율의 차이에 의한 위상차를 이용하여 조직내의 차이를 관찰하는 방법이다. 이것은 특히 빛의 투과 특성이 동일한 조직의 구분에 효과적으로 사용되어 왔다. 정자의 운동 특성 분석에도 위상차 현미경이 일반적인 광학 현미경보다 정자의 구별력이 뛰어나기 때문에 지금까지 이용되어 왔다. 그러나 정자의 운동 특성을 육안으로 분석하는 대신에 컴퓨터를 이용하여 자동적으로 분석하는 만큼, 영상의 선명도가 충분하지 않더라도 기존의 영상 처리 기법을 잘 활용한다면 정자의 운동 특성을 분석하는 데 큰 차이가 없을 것으로 예상된다. 광학 현미경에 의한 정자의 영상은 보여지는 영상의 기전은 위상차 현미경과 다르다고 할 수 있으나, 정자의 운동 특성을 분석하는 관점에서는 근본적으로 같은 정보를 제공하여 주고 있다. 특히 위상차 현미경의 높은 가격을 정액 분석 시스템의 광범위한 응용에 장애가 되고 있는 점을 고려하면, 광학 현미경을 이용하여 정자의 운동 특성 분석 시스템을 개발하는 경우 보다 광범위한 시스템의 보급이 가능하리라고 예상된다. 이러한 관점에서 본 연구에서는 광학 현미경을 이용한 정자의 운동 특성 방법을 개발하였다. 전체적인 시스템의 구성은 크게 영상 수집부와 영상처리부, 영상 분석과 특성 파라미터 계산부로 구성된다. 분석한 결과를 위상차 현미경을 사용한 방법과 비교해서 운동 특성 파라미터들 간에 차이가 거의 없었다.

II. 영상 수집부

전체적인 시스템 구성도를 그림1에 나타내었다. 영상 수집부는 광학 현미경과 CCD 카메라, 외부 모니터, 영상 수집 보드로 이루어진다. CCD 카메라는 현미경에서 나오는 영상을 전기적 신호로 바꾸어 주며 영상 수집 보드는 영상을 AD변환을 한 다음 자신의 메모리 영역에 저장한다. 외부 모니터는 현미경 영상을

직접 보면서 분석 작업을 하게 한다. 이때 영상은 512*480(byte)의 크기와 초당 30장의 속도로 수집된다. 신뢰할 만한 파라미터 추출과 정자운동 영상의 왜곡을 막기 위해 이 정도의 기능은 필수적이다.

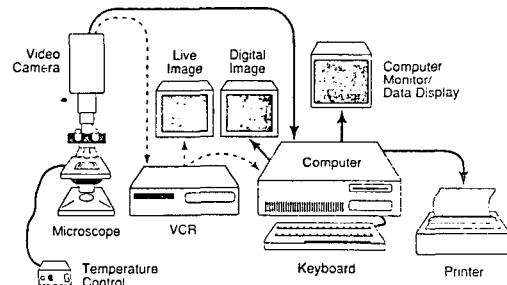


그림1. 시스템 구성

II. 영상 처리부

영상 수집 보드에 수집되기 전에 영상은 이진화된다. 영상을 이진화시키면 한 화소는 1비트로 표시될 수 있기 때문에 영상 수집 보드에서 PC의 메모리로 옮길 때 속도면에서 유리하다. 또 영상 수집 보드의 이진화된 영상은 수집의 속도를 최대한으로 하기 위해 영상의 짝수 줄에 해당하는 부분만이 PC로 옮겨진다.

위상차 현미경을 사용할 경우 영상이 이진화되면 정자의 머리 부분은 1로 나타나고 배경은 0으로 나타나지만 광학 현미경을 사용하게 되면 영상이 반대로 나타나게 된다. 배경 추출보다는 정자의 머리 추출이 쉽기 때문에 PC에서 먼저 영상을 반전시킨다. 반전된 영상에 대해 영상 삼입을 한다. 즉 수집시 짝수 줄만 수집하기 때문에 홀수 줄에 해당하는 부분을 바로 위의 짝수 줄과 똑같이 만들어 준다.

최종적으로 영상에 대해 미디안 필터링을 한다. 미디안 필터링은 분석시 정자의 판별이 용이하도록 정자 영상의 경계를 완만하게 해주며 이물질에 해당하는 작은 점들을 삭제한다. 커널의 크기는 가로 3화소, 세로 3화소이다. 영상 처리 알고리즘의 흐름을 그림2에 나타내었다.

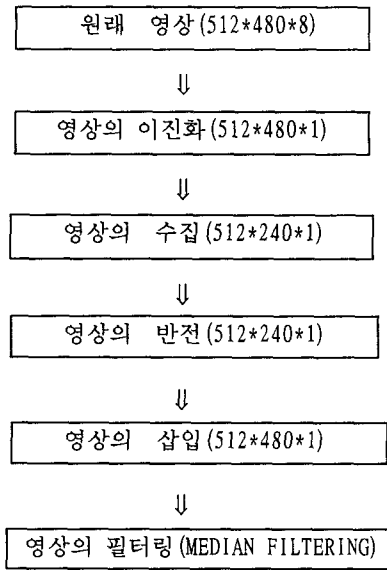


그림2. 영상 처리 과정 흐름도

호를 할당하고 자신의 '뒤 고유번호'에는 이 정자의 고유번호를 할당한다. 첫 번째 장에서 부터 마지막 바로 앞 장까지 이런 방법으로 고유번호를 등록한다. 따라서 어떤 장의 정자의 '앞 고유번호'가 0이었다면 이 정자는 이 장에서 부터 새로 나타난 정자로 인식할 수 있다. 이렇게 추적된 정자의 경로를 그림4에 나타내었다.

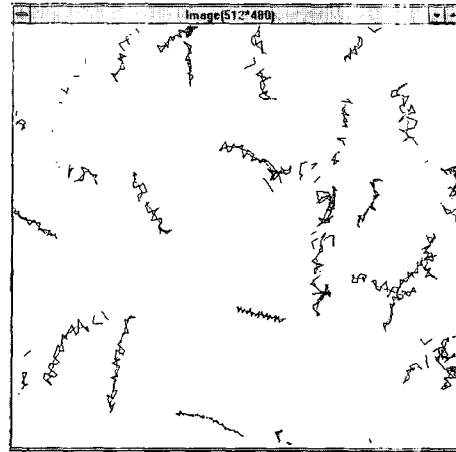


그림4. 추적된 정자의 경로

III. 영상 분석과 특성 파라미터 계산부

1. 영상의 분석

초당 30장의 속도로 수집된 영상 각각에 대해 정자의 머리 부분을 추출한 다음 중심 좌표를 계산한다. 검출된 중심 좌표는 각각 고유번호를 부여받는다. 검출 중인 화면을 그림3에 나타내었다.

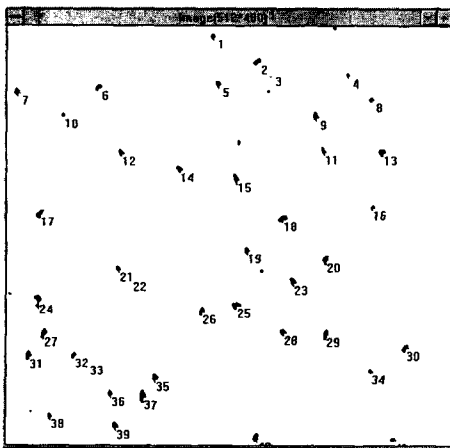


그림3. 정자를 검출중인 화면

경로를 추적하기 위해 각 장의 고유번호를 다음 장의 특정한 고유번호로 연결시킨다. 즉 각 장의 정자의 중심에서 윈도우를 설정한 뒤 윈도우 내에 들어오는 다음 장의 정자의 고유번호를 등록한다. 이때 Match Matrix방법을 쓴다. 이것은 운동 경로를 추적하는 기본적인 방법으로 각 장의 각 정자에 대해 두 개의 고유번호를 할당하는 것이다. 하나는 이전 장의 정자의 고유번호(앞 고유번호)이고 다른 하나는 다음 장의 고유번호(뒤 고유번호)이다. 각 장의 각각의 정자 중심에서 윈도우 설정시 들어오는 다음 장의 정자의 '앞 고유번호'가 0이면, 자신의 고유번호

2. 운동 특성 파라미터의 계산

정자의 운동 특성 파라미터는 크게 운동의 활동성을 나타내는 척도와 운동의 유형을 나타내는 척도로 구분해 볼 수 있다. 활동성의 척도로는 운동력(MOT), 곡선거리(VCL), 평균거리(VAP), 직선거리(VSL) 등이 있고 유형의 척도로는 선형성(LIN), 직진성(STR), 측두거리(ALH), 특활성(HYP) 등이 있다. 또 전체적인 정자의 수를 나타내는 농도(CON)도 있다.

- 1) 농도(CON-Concentration) : 단위 부피(1ml)에 포함되는 전체 정자의 수이다.
- 2) 운동력(MOT-Motility) : 전체 정자 중 운동력이 있는 정자의 비율이다. 직선속도가 경계값 이상일 때 운동력이 있는 정자로 판별된다. 가장 전통적인 활동성 척도이다.
- 3) 곡선 속도(VCL-Velocity of Curvilinear Line) : 추적된 경로를 따라 이동한 거리를 경과한 시간으로 나누어 준 값이다. 활동성에 대한 가장 중요한 척도가 된다. M은 한 경로에서 추적된 정자의 중심 좌표 수이고 N은 전체적인 추적된 경로의 수이다. Δt 는 연속한 두 영상간 시간 간격(보통 1/30초)이다.

$$VCL_i = \frac{\sum_{i=1}^{M-1} \sqrt{(x_{i+1}-x_i)^2 + (y_{i+1}-y_i)^2}}{(M-1)\Delta t} \quad \text{----- (1)}$$

$$VCL = \frac{\sum_{i=1}^N VCL_i}{N} \quad \text{----- (2)}$$

- 4) 직선 속도(VSL-Velocity of Straight Line) : 추적된 경로의 처음 위치와 마지막 위치 사이의 직선 거리를 전체 경과 시간으로 나누어 준 값이다. 주요운동 파라미터로서 선형속도가 20um/s (threshold velocity)보다 작은 정자의 경로에 대해서는 운동력(motility)이 없는 것으로 판단한다.

일반 광학현미경을 사용한 정자의 운동 특성 분석에 관한 연구

$$VSL_j = \frac{\sqrt{(x_M - x_i)^2 + (y_M - y_i)^2}}{(M-1)\Delta t} \quad \text{----- (3)}$$

$$VSL = \frac{\sum_{j=1}^N VSL_j}{N} \quad \text{----- (4)}$$

5) 평균 속도 (VAP-Velocity of Average Path) : 추적된 경로를 평균한 경로 (average path) 를 따라 이동한 전체 거리를 경과 시간으로 나누어 준 값이다. 전체적으로 5 점 이동 평균값 (5 point running average) 을 이용한다. 처음 좌표와 마지막 좌표는 1 점 평균값 (1 point average) 를 이용하고 처음에서 두번째와 마지막에서 두번째는 3 점 평균값 (3 point average) 를 이용한다.

$$3 \leq k \leq M-2 \quad \bar{x}_k = \frac{1}{5} \sum_{i=k-2}^{k+2} x_i, \quad \bar{y}_k = \frac{1}{5} \sum_{i=k-2}^{k+2} y_i \quad \text{----- (5)}$$

$$VAP_i = \frac{\sum_{i=1}^{M-1} \sqrt{(\bar{x}_{i+1} - \bar{x}_i)^2 + (\bar{y}_{i+1} - \bar{y}_i)^2}}{(M-1)\Delta t} \quad \text{----- (6)}$$

$$VAP = \frac{\sum_{j=1}^N VAP_j}{N} \quad \text{----- (7)}$$

6) 선형성 (LIN-Linearity) : 직선속도와 곡선속도의 비로써 직선성이 강할 수록 1에 가깝다.

$$LIN = \frac{VSL}{VCL} \quad \text{----- (8)}$$

7) 직진성 (STR-Straightness) : 직선속도와 평균속도의 비이다.

$$STR = \frac{VSL}{VAP} \quad \text{----- (9)}$$

8) 측두거리 (LHA-Lateral Head Amplitude) : 원래의 이동 경로에서 평균 이동 경로 (average path) 로의 수직 거리 또는 추적된 중심 좌표와 평균 좌표사이의 거리이다. 보통 이 값을 두배해서 사용한다. 이 값이 클 수록 경로 변화가 심하고 복잡한 운동을 한 정자이다.

$$LHA_i = 2 * MAX_{i'} \left\{ \sqrt{(\bar{x}_i - x_{i'})^2 + (\bar{y}_i - y_{i'})^2} \right\} \quad \text{----- (10)}$$

$$LHA = \frac{\sum_{i=1}^N LHA_i}{N} \quad \text{----- (11)}$$

9) 특활성 (HYP-Percentage of Hyperactivated sperm) : VCL과 LHA가 기준 값보다 크고 동시에 LIN가 기준값보다 작은 정자의 전체 정자에 대한 백분율이다. 이 값이 클수록 복잡한 운동을 한 정자가 많음을 의미한다.

IV. 결과

서울대 병원에서 채취한 18개의 표본에 대해 분석해서 결과를 비교하였다. 표본 추출에는 정상적인 것과 비정상적인 것 (CON과 MOT가 낮은 것) 을 모두 포함시켰다. 한 표본에 대해 각각 위상차 현미경과 광학 현미경으로 3필드씩 총 5분동안 녹화한 다음

다시 재생시키면서 한 표본 당 2필드씩 선택해서 분석했다. 1 필드는 30장 (1초) 의 연속 영상으로 구성되므로 한 표본 당 각 현미경에 대해 총 2초 동안의 영상을 분석한 셈이다. 영상의 질이 떨어지는 것에 대해서는 필드를 바꾸어서 분석한 뒤 평균값을 취했다. 각각의 파라미터들에 대해 추세를 나타냈으며 상관도를 계산했다.

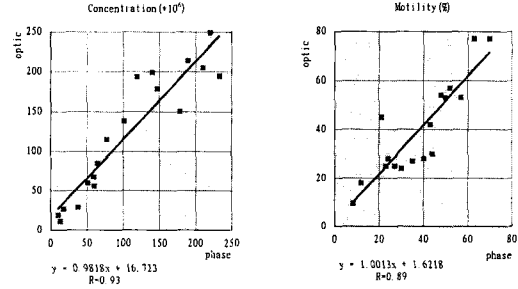


그림5. 농도와 운동력 파라미터 비교

농도와 운동력을 추세선으로 비교한 결과가 그림5에 나타나 있다. 농도는 영상을 이진화 할 때 계값에 따라 바뀔 수 있다. 특히 비정상적인 표본의 경우에는 농도가 작아서 오차가 정상적인 경우보다 크게 나타났다.

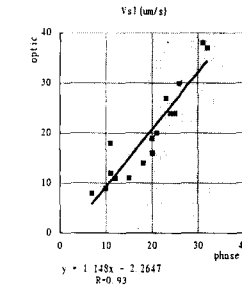
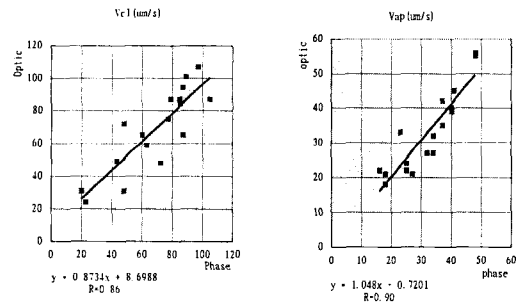


그림6. 속도 특성 파라미터의 비교

속도 파라미터들은 대체로 높은 상관도를 나타냈다. 속도 파라미터들은 연속적으로 일정한 영상 이상 추적되어야 추적된 경로가 계산에 포함되므로 추적실패율이 높으면 오차가 발생하는데, 광학 현미경의 경우에는 위상차 현미경보다 추적에 실패하는 확률이 약간 더 높지만 한번 분석시 30장을 이용할 경우에는 거의 오차가 없었다.

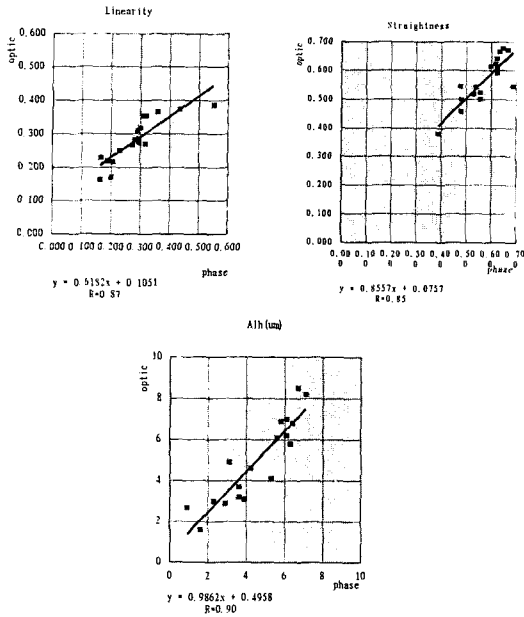


그림7. 운동유형 파라미터의 비교

운동유형 파라미터의 경우에는 대체로 상관도가 낮게 나타났는데 이것은 운동유형 파라미터가 운동 속도 특성 파라미터로부터 유도되는데 이때 오차가 축적되었기 때문인 것 같다.

위에서 분석된 결과를 살펴보면 모든 비교에서 분석 데이터들이 추세선이 어느 한 쪽으로 특별하게 치우침이 없기 때문에 특별히 어떤 현미경에 대해서 더 높게 나오는 파라미터는 없는 것으로 판정된다. 따라서 정자의 운동 특성 분석에 광학 현미경을 사용하여도 신뢰할 만한 결과를 얻을 수 있다.

참고 문헌

- [1] Mahony MC, et al. "Evaluation of semen parameters by means of automated sperm motion analyzers." Fertile Sterile 1988;49:876-880
- [2] Katz DF, et al. "Automatic Analysis of Human Sperm Motion" J Androl 1987;8:170-181
- [3] Serdia O.Mack, et al. "Quantitization of Specific Parameters of Motility in Large Numbers of Human Sperm by Digital Image Processing" Boil Reprod 1988;38:270-281
- [4] Steven Tessler, et al. "Linear and Nonlinear Mouse Spermatozoa Motility Patterns." J Androl 1985;6:35-44
- [5] Davis Russell o. et al. "Standardization and Comparability of CASA Instruments" J Androl 1992;13:81-86
- [6] Katz DF, et al. "Automated Semen Analysis" Curr Probl Obstet Gynecol Fertile 1989;12(5):165-200
- [7] Russel O.Davis, Paul W.N. and Katz DF. "New Measure of Sperm Motion : I. Adaptive Smoothing and Harmonic Analysis" J Androl 1992;13:(2)139-152