

Cryopreservation of Sperm and Testicular Tissues in Male Infertility

분당재생병원 불임 및 생식의학 연구소

손 원 영

서 론

최근 10년간 생식의학 분야의 연구가 급속히 진전되어 보조생식술이 괄목할만한 발전을 하면서 불임부부에게 많은 도움을 주어왔다. 그 중 가장 뚜렷한 영역은 남성불임의 치료술이다. 인공수정과 체외수정 시술이 보편적인 시술이었으나 여러 가지 요인들에 의한 수정 실패를 완전히 극복하기는 힘들었고 다양한 미세수정방법을 거쳐 ICSI (Palermo 등, 1992)의 등장은 남성불임의 많은 장벽을 극복할 수 있는 계기가 마련되었다. 인간 정자의 동결 부분에서도 인간의 정액을 동결하려는 첫 번째 시도 (Spallanzani, 1776) 이래, 자신의 정자를 보관하거나 타인에게 공여를 위하여 인간 정자를 동결하는 방법에서 많은 진보가 있었으나 항동해제로 glycerol 이 사용 (Polge 등, 1949) 된 이후에는 인간 정자의 동결보존이 쉬워졌고 정상정자의 경우는 동결 용해 후 인공 수정으로 임신할 수 있어 (Bunge와 Sherman, 1953)서 인간 정자의 동결에 대한 연구들이 미진하였다. 그러나 동결 연구는 chemotherapy 또는 radiotherapy를 받아야 되는 환자나 감정자 증 또는 무력정자증인 환자의 subfertile한 정자, 그리고 부고환 또는 고환정자 등 미세수술 후 회수한 정자 등의 동결의 중요성이 강조되면서 최근 10여년 동안 연구가 많이 이루어지고 있다. 이에 저자는 정자 및 고환정자의 동결보존에 대한 최근의 연구와 임상적인 성과들을 중심으로 살펴보고자 한다.

본 론

1. 정자 동결보존의 필요성

정자의 동결보존은 생식기관의 수술전이나 암으로 인해서 화학적, 방사능적 처리 시 불임의 가능성이 있는 환자, 체외수정 시 정액의 회수시기에 심리적인 스트레스로 인해 정액을 받지 못하는 환자, 여러 가지 이유로 적절한 시간을 맞출 수 없는 환자, subfertile한 정액을 가진 환자, 그리고 정자 은행을 위한 정자 공여자의 정액에 대해서 시행되어왔다. ICSI는 감정자증, 무력정자증을 포함한 다양한 원인을 가진 환자 뿐만 아니라 무정자증 환자의 수정 시 미세수술과 관련하여 넓게 응용되고 있다. 부고환 (Silber 등, 1994)과 고환으로부터 회수한 정자 (Schoysman 등, 1993)를 사용하여 성공적인 임신과 분만이 보고되었다. 그러나 임신의 실패 시 미세수술을 다시 해야 하는 반복적인 시술의 불편함을 피하기 위해서 회수된 정자의 동결보존이 필요하다. PESA와 MESA의 경우도 정자를 회수하는데 실패할 수 있으며 특히 primary testicular dysfunction을 가진 환자의 경우는 더욱 그렇다. TESA는 정자형성에 문제가 없는 고

환에서는 믿을 수 있는 정자 회수 방법이기도 하지만 정자성숙에 문제가 있는 고환의 경우 고환조직 생검으로 정자를 추출하는 TESE가 가장 최선의 선택이다. 비폐쇄성 무정자증 남성의 약 30~50% 경우 고환조직에서 정자를 발견할 수 없고 고환정자의 회수 여부를 예측할 수 있는 인자들도 아직까지 없다. 또한 모든 세정 관에서 정자의 분포가 같지 않기 때문에 이전에 생검한 결과로 앞으로의 결과를 장담하기도 어렵다. 그러므로 고환조직 정자로 ICSI를 시행할 때 정자를 얻을 수 있는지가 중요한 문제이다. 따라서 ICSI 시술 전에 진단을 위해서 시행하는 고환생검 시 정자가 있다면 그 고환조직을 동결보존하는 것이 중요하다. 고환 생검된 조직들을 나누어서, 한 부분은 병리학적인 평가를 위해서 사용하고 한 부분은 실험실에서 정자의 존재를 확인하기 위해서, 그리고 나머지 부분들은 동결보존하여 두었다가 나중에 사용할 수 있다. 고환정자를 동결보존 하여서 기대되는 장점은 (1) 반복된 미세수술을 피할 수 있고 (2) ICSI를 할 시기에 정자가 없을 위험성을 최소화시킬 수 있고 (3) 배란 유도 시기를 편하게 결정할 수 있다는 점이다.

2. 동결보존의 방법

현재 개발된 인간 정자의 동결보존 방법은 인간 배아에서 사용하는 방법에 비해서 정교하게 시행되지는 않는다. 고환정자는 고환조직 상태로 (Gianaroli 등, 1999), 고환조직을 최소한의 처리 후 (Hovatta 등, 1996), 또는 조직으로부터 정자를 추출하고 정제한 후 (Gil-Salom 등, 1996) 동결보존할 수 있다. 심각한 subfertile한 정자는 미세조작술로 인간 또는 햄스터 난자의 투명대에 넣어 보관하는 방법도 있다 (Cohen 등, 1997). 용해 후 고환조직으로부터 기계적인 방법을 사용하거나 효소적인 방법 (collagenase Ia or IV)을 사용하여 정자를 회수한다.

정자의 동결보존을 생화학적인 면과 물리적인 면에서 살펴보면 다음과 같다.

1) 생화학적인 면

(1) 항동해제

Glycerol을 항동해제로 사용 (Polge 등, 1949)한 이후에 침투성 항동해제로서 세포 내 물의 빙점을 낮추는데 가장 효과적인 것으로 확인이 되었고, 7.5% v/v glycerol이 인간 정자의 동결보존에 최적인 농도로 보고 (Hammit 등, 1988)하고 있다. Dimethyl sulphoxide (DMSO) 항동해제는 효율이 못 미친다고 한다 (Serafini와 Morris, 1986). 인간의 초기배아의 동결보존에 사용하는 propanediol (PROH)은 정자에게는 거의 응용되지 않았다. Glycerol이 정자에 독성적인 영향이 전혀 없는 것은 아니나 동결보존의 다른 기전에 의해 정자가 더 영향을 받는다 (MacLaughlin 등, 1992).

(2) 희석용액

희석용액은 항동해제는 아니나 인간 정자의 세포막의 유동성을 증가시키는 역할을 한다. 양이온들, citrate, egg-yolk or milk, fructose, TEST citrate-yolk buffer (Prins와 Weidel, 1986), yolk citrate dextrose glycine (Hammit 등, 1988), egg yolk citrate (MacLaughlin 등, 1992a), 그리고 human sperm preservation medium (Crister 등, 1988) 등이 사용되고 있다.

2) 물리적인 면

(1) 정자의 농도

동결보존 전에 정자를 농축하여 동결을 하면 낮은 quality의 정액에 대한 동결보존의 효율을 증가시킬 수 있다.

(2) 동결보존 방법

두 방법을 사용하는데 액체질소의 vapor를 사용하는 rapid method (Thatchill과 Jewett, 1981)와 semi-programmable freezer를 사용하는 slow method (Serafini와 Marrs, 1986)가 있다. Rapid method는 액체질소에 straw를 넣기 전에 8~30분 동안 액체질소 vapor에 straw를 노출시키는 것이고 Slow method는 computerized 방법으로 온도를 2 또는 3 단계로 감소시키는 것이다. 첫 단계는 5~9℃ 사이의 온도까지 낮은 속도로, 두 번째 단계는 -40℃~-80℃ 사이의 온도로 높은 속도로 감소시킨 후 액체질소에 보관한다. 양 방법 사이에 뚜렷한 장점은 없으나 Verheyen 등 (1993)은 programmed cooling rate가 low quality 정자에 대한 손상을 줄일 수 있다고 보고하였다. 따라서 고환조직 및 고환정자는 대부분 slow method로 동결하고 있다. 양 방법 모두에서 stable한 cooling rate를 유지하기 위해서는 평형하게 straws들을 유지하는 것이 중요하다. 용해 시 Warming method를 최적으로 하는 것도 중요하다. Rapid vapour 동결방법을 사용할 때 37℃에서 용해할 때가 가장 좋고 slow, computer-controlled 동결에서는 22℃에서 용해하는 것이 좋다 (Verheyen등, 1993). Cooling과 warming 속도 사이에서 일어나는 동해 손상은 빙결의 형성에 의한 것보다 오히려 물의 이동에 의해서 발생된다 (Henry 등, 1993).

3. 동결보존 후에 정자에 미치는 영향

정자의 동결보존에 의해 정자의 운동성 (Crister 등, 1987), 생존성 (Alvarez와 Storey, 1993), 정자가 경관점액과 캡스터 난자를 투과하는 능력 (Crister 등, 1987), 그리고 침체 반응 (MacLaughlin 등, 1992b) 등의 손상이 일어나서 정자의 수정 능력이 감소된다. 이것은 정상적이고 완전한 acrosome을 가진 정자 수가 감소하고 그리고 acrosin 활성도가 감소되기 때문이다 (Mack과 Zaneveld, 1987). 전자 현미경적 관찰에서도 동결보존 후에 정자의 flagella의 손상 뿐만 아니라 membrane swelling, acrosome swelling, acrosome loss, mitochondrial sheath 등의 문제가 발생한다 (Mahadevan과 Trounson, 1984; Oettle와 Soley, 1986). 또한 동결 고환조직도 사정 정자와 유사하게 acrosome과 세포막에 손상을 받았음을 확인하였다 (Nogueira 등, 1999). 동결 이후에 인간 정자에서 염색체 이상이나 성비의 빈도에서는 문제가 없는 것으로 보고 (Martin 등, 1991) 하였으며 최근에 Hammadh 등 (1999)은 동결보존이 chromatin의 구조에 중요한 영향을 미침을 보고하였다.

4. 정자 동결보존에 대한 연구 동향

정상적인 소견을 보이는 정자의 동결보존은 최적의 조건에서 동결보존 후 60%~70%의 운동성을 보여준다. 그러나 subfertile한 정자나 사정 정자에 비해서 낮은 농도와 낮은 운동성을 가진 고환정자의 경우는 동결-용해 후 그 상태가 더욱 나빠지기 때문에 문제가 발생한다. ICSI 기술의 발달로 인해서 정자의 동결보존 후 운동성만 있다면 임신율 하는데 거의 문제가 되지 않는다. 고환정자의 경우도 동결보존 후 만족스러운 수정율과 성공적인 임신을 보고하였다 (Fischer 등, 1996). 또한 Ben-Yosef 등 (1999)은 동결 전의 고환정자와 동결한 고환정자를 사용하여 ICSI를 하였을 때 수정율, 배아 발달율, 착상율, 그리고 임신율 등에서 차이가 없다고 하였다. 그러나 비운동성인 정자로 ICSI를 하였을 때 수정율이 현저히 떨어졌다. Scholtes 등 (1999) 비운동성인 정자로 ICSI를 하였을 때 운동성 정자에 비해 착상율도 떨어진다고 하였다. 그러므로 고환정자에서도 동결보존 후 운동성이 있는 정자만 충분히 있다면 사정된 정자에 비해서 임신율이 떨어지지 않는다. 그러나 고환정자 및 subfertile한 정자는 동결보존 후

그 운동성과 생존성이 현저히 떨어진다. Verheyen 등 (1997)은 동결보존된 고환정자의 용해 후에 동결전의 운동성의 24% 그리고 생존성의 32%만이 회복됨을 보고하였다. Bachtell 등 (1999)은 정관, 부고환, 고환정자의 동결보존 후 손상을 비교하였을 때 생존율은 42~56%로 큰 차이가 없었으나 운동성에서는 다른 두 부위에서 회수한 정자보다 고환정자의 경우 4%로 현저히 떨어짐을 보고하였다. 이러한 이유 때문에 낮은 quality의 정자를 동결보존할 수 있는 동결방법과 동결 배양액을 최적화 할 수 있는 비교 연구들이 필요하다. 이러한 맥락에서 최근에 보고된 연구들을 살펴보면 다음과 같다. Walmsley 등 (1998)은 일반적인 동결보존 방법으로 실패할 확률이 높은 아주 심각한 무력정자증, 감무력정자증의 정자를 난자의 투명대에 넣어 동결-용해한 후 정자를 회수하여 임신에 성공하였고 성공적인 회수율과 수정율 (65%)을 보였다. Sawatewan 등 (1993)은 무력정자증이나 감정자증 등 상태가 좋지 않은 정자를 동결 배양액인 TEST yolk citrate에 dithiothreitol (DTT)를 부가하여 동결보존 시 정자의 sulphhydryl group의 oxidation을 막음으로서 동결 용해한 정자의 운동성 회복에 효과가 있음을 보고하였다. 그러한 첨가물로 glutathione, 특정 lipids들, 그리고 최근에 glutamine 등이 보고되었다 (Renard 등, 1996). 또한 phosphodiesterase 억제 물질인 pentoxifylline을 정자의 동결보존 시 첨가하였을 때 비교군에 비해 운동성이 증가하였고 acrosome loss도 적게 일어났다 (Esteves 등, 1998). 고환정자의 배양 효과를 본 연구도 있다 (Edirisinghe 등, 1996). 고환정자를 10% 인간 혈청이 첨가된 배양액들에서 배양한 2일 후에 60~65%의 정자가 운동성이 있었고 3일 배양 후에 직진 운동성이 현저하게 증가되었다. 동결보존된 고환정자를 배양했을 때 단지 15~20%의 정자가 운동성이 있었고 그것이 2~3일 동안 유지되었다. 따라서 동결보존 후 정자가 운동성이 떨어졌을 때 배양액에서 배양하면 운동성을 증가시킬 수 있을 것으로 생각한다. 동결보존 후 완전히 운동성이 없어진 경우는 Liu 등 (1997)의 방법으로 HOS 테스트를 사용해 생존해 있는 정자를 선별하여 수정을 유도하는 것도 좋은 방법이라고 생각된다.

결 론

정상의 소견을 보이는 정자의 경우는 인공 수정 및 체외 수정술에서 현재 사용하고 있는 정자 동결보존 방법이 큰 문제가 되지 않는 것으로 생각된다. 그러나 ICSI의 기술과 미세수술로 정자를 회수하는 기술의 발달로 낮은 수의 정자를 보관할 필요성이 증가되고 있으며 따라서 감정자증이나 무력정자증 등 subfertile한 정자, 그리고 고환정자 등에 대해서 최대한 생존할 수 있는 최적의 동결보존 기술의 개선 및 개발이 중요하다. 이와 같은 동결보존에 최적의 방법을 찾을 수 있다면 ICSI의 적용과 함께 아주 심각한 남성 불임을 가진 불임부부에게 IVF 과정에서 정신적인, 육체적인, 경제적인, 시간낭비의 위험성을 줄일 수 있을 것이다.

REFERENCES

- Alvarez JG and Storey BT. Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: glycerol and other polyols as sole cryoprotectant. *J Androl* 1993; 14: 199-209.
- Ben-Yosef D, Yogev L, Hauser R, et al. Testicular sperm retrieval and cryopreservation prior to ini-

- tiating ovarian stimulation as the first line approach in patients with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1999; 14: 1794-801.
- Bachtell NE, Conaghan J and Turek PJ. The relative viability of human spermatozoa from the vas deferens, epididymis and testis before and after cryopreservation. *Hum Reprod* 1999; 14: 3048-51.
- Bunge RG, Sherman JK. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature* 1953; 172: 767.
- Cohen J, Garrisi GJ, Congedo-Ferrara TA, et al. Cryopreservation of single human spermatozoa. *Hum Reprod* 1997; 12: 994-1001.
- Crister JK, Huse-Benda AR, Aaker DV. Cryopreservation of human spermatozoa. I. Effect of holding procedure and seeding on motility, fertilizability and acrosome reaction. *Fertil Steril* 1987; 47: 656-63.
- Critser JK, Huse Benda AR, Aaker DV, et al. Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of cryoprotectants on motility. *Fertil Steril* 1988; 50: 314-20.
- Edirisinghe WR, Junk SM, Matson PL, et al. Changes in motility patterns during in-vitro culture of fresh and frozen/thawed testicular and epididymal spermatozoa: implications for planning treatment by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996; 11: 2474-6.
- Esteves SC, Sharma RK, Thomas AJ, et al. Cryopreservation of human spermatozoa with pentoxifylline improves the post-thaw agonist-induced acrosome reaction rate. *Hum Reprod* 1998; 13: 3384-9.
- Fisher R, Baukloh V, Naethert OGJ, et al. Case report. Pregnancy after intracytoplasmic sperm injection of spermatozoa extracted from frozenthawed testicular biopsy. *Hum Reprod* 1996; 11: 2197-9.
- Gianaroli L, Magli MC, Selman HA, et al. Diagnostic testicular biopsy and cryopreservation of testicular tissue as an alternative to repeated surgical openings in the treatment of azoospermic men. *Hum Reprod* 1999; 14: 1034-8.
- Gil-Salom M, Romero J, Minguez Y, et al. Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. *Hum Reprod* 1996; 11: 1309-13.
- Hammadeh ME, Askari AS, Georg T. et al. Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men. *Int J Androl* 1999; 22: 155-62.
- Hammit DG, Walker DL and Williamson RA. Concentration of glycerol required for optimal survival and in vitro fertilizing capacity of frozen sperm in dependent on cryopreservation medium. *Fertil Steril* 1988; 49: 680-7.
- Henry MA, Noiles EE, Gao D, et al. Cryopreservation of human spermatozoa. IV The effects of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity and mitochondrial function. *Fertil Steril* 1993; 60: 911-8.
- Hovatta O, Foudila T, Sieberg R, et al. Pregnancy resulting from intracytoplasmic injection of spermatozoa from a frozenthawed testicular biopsy specimen. *Hum Reprod* 1996; 11: 2472-3.
- Liu J, Tsai YL, Katz E, et al. 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.
- Mack SR and Zaneveld LJ. Acrosomal enzymes and ultrastructure of unfrozen and cryotreated human spermatozoa. *Gamete Res* 1987; 18: 375-83.
- MacLaughlin EA, Ford WCL and Hull MGR. The contribution of a glycerol egg yolk citrate cryopreservative to the decline in human sperm motility during cryopreservation. *J Reprod Fertil* 1992a; 95: 749-54.
- MacLaughlin EA, Ford WCL and Hull MGR. Effect of cryopreservation on the human sperm acrosome and its response to A23187. *J Reprod Fertil* 1992b; 99: 71-6.
- Mahadevan MM and Trounson AO. Relationship of fine structure of sperm head to fertility of frozen human sperm. *Fertil Steril* 1984; 41: 287-93.
- Martin RH, Chernos JE and Rademaker AV. Effect of cryopreservation on the frequency of chromosomal abnormalities and sex ratio in human sperm. *Mol Reprod Dev* 1991; 30: 159-63.
- Nogueira D, Bourgain C, Verheyen G, et al. Light and electron microscopic analysis of human testicular spermatozoa and spermatids frozen and thawed testicular biopsies. *Hum Reprod* 1999; 14: 2041-9.
- Oettle EE and Soley JT. Ultrastructural changes in the acrosome of human sperm during freezing and thawing: a pilot trial. *Arch Androl* 1986; 17: 145-50.
- Palermo G, Joris H, Devroey P and Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340: 17-8.
- Polge C, Smith AU and Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature* 1949; 164: 666-76.
- Prins GS and Weidel L. A comparative study of buffer systems as cryoprotectants for human spermatozoa. *Fertil Steril* 1986; 46: 147-9.
- Renard P, Grizard G, Griveau JF, et al. Improvement of motility and fertilization potential of post-thaw human sperm using glutamine. *Cryobiology* 1996; 33: 311-9.
- Sawatewan C, Bruns ES and Prins GS. Improvement of post-thaw sperm motility in poor quality human semen. *Fertil Steril* 1993; 60: 706-10.
- Scholtes MC, van Hoogstraten DG, Schmoutziguer A, et al. Extraction of testicular sperm from previously cryopreserved tissue in couples with or without transport of oocytes and testicular tissue. *Fertil Steril* 1999; 72: 785-91.
- Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M, et al. Pregnancy after fertilisation with human testicular spermatozoa. *Lancet* 1993; 342: 123-7.
- Serafini P and Marrs RP. Computerized staged freezing technique improves sperm survival and preserves penetration of zona-free hamster ova. *Fertil Steril* 1986; 45: 854-8.
- Silber SJ, Nagy Z, Liu J, et al. Conventional IVF versus ICSI (intracytoplasmic sperm injection) for patients undergoing microsurgical sperm aspiration. *Hum Reprod* 1994; 9: 1705-9.
- Spallanzani L. (1776) *Opuscoli di fisca spermantici, animale e vegatable, opuscole II. Osservazioni, a Sperienze intorno ai Vermicelli dell'Uomo et degli animli.* Modena Italy
- Thatchill JV and Jewett MAS. Preservation technique for human semen. *Fertil Steril* 1981; 35: 546-8.

- Verheyen G, Pletincx I And Van Steirteghem A. Effect of freezing method, thawing temperature and post-thaw dilution/washing on motility (CASA) and morphology characteristics of high quality human spermatozoa. Hum Reprod 1993; 8: 1678-84.
- Verheyen G, Joris H, Crits K, et al. 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.
- Walmsley R, Cohen J, Ferrara-Congedo T, et al. The first births and ongoing pregnancies associated with sperm cryopreservation within evacuated egg zonae. Hum Reprod 1998; 13 Suppl 4: 61-70.
-