

## Human Sperm DNA Integrity

박 용 석

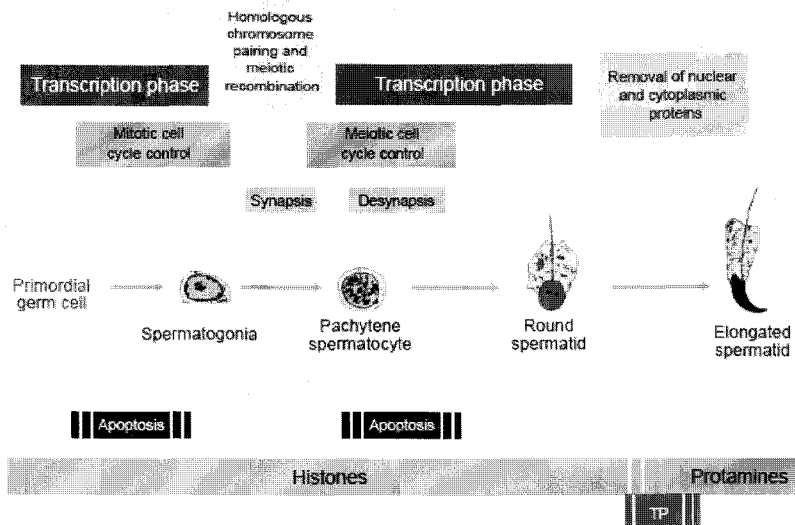
성균관대학교 의과대학 삼성제일병원 생식생물학 및 불임연구소

### I. 서 론

불임부부에서 약 50%는 남성 원인의 불임이다.<sup>1</sup> 최근 남성 불임의 원인에 대한 주된 연구 중의 하나는 성숙한 사정 정자의 핵내 DNA 완전성 (sperm DNA integrity)에 관한 것으로, 이는 건강한 후손을 얻기 위한 주요한 인자 중 하나이다.<sup>2</sup>

정자 형성 과정 (spermatogenesis)은 증식 (proliferation)과 분화 (differentiation) 과정을 통해 정원세포 (spermatogonia)로부터 정자 (spermatozoa)로 성숙되어 가는 복합 과정으로 이러한 증식 및 분화 과정과 함께 세포자연사 (apoptosis) 과정이 자연스럽게 지속적으로 진행되어 정자 형성 과정을 조절한다 (Figure 1).

자연 상태에서 정자의 핵은 응축되어 있고 비용해 상태로 되어 부계 유전자가 자성 생식기도를 통과하기 용이하도록 한다.<sup>3</sup> 그러나, 불임 남성의 정자에서는 비정상 chromatin 구조, 염색체의 미세결실 (microdeletion), aneuploidy, DNA 사슬 파손 등 여러 형태의 핵 변이를 나타내어 비정상적인 수정과



**Figure 1.** Spermatogenesis is a cyclic developmental process by which spermatogonia cells generate the mature spermatozoon.<sup>5</sup>

유산 등의 결과를 유발한다.<sup>4</sup>

정상 정액에서 apoptosis는 사정 정자에서 극히 적은 빈도로 나타나지만 비정상 정액은 apoptosis의 징후인 핵 DNA 파손이 높은 빈도로 나타난다.

여러 연구 보고에 의하면, 정자 핵내 유전물질의 구성이 완전치 못하면 정자의 수정 능력과 부정적인 상관관계를 나타내며,<sup>6,7</sup> 정자 DNA가 30% 이상 손상되었을 경우 자연 임신이 불가능하다고 보고하였다.<sup>8,9</sup> 웅성생식세포는 자성생식세포와 비교해서 재조합 복구 과정 (recombination repair process) 이 없기 때문에 Y 염색체의 핵 DNA가 손상받을 위험이 매우 높다.<sup>10</sup>

사정 정자나 고환 정자는 정자 완성 단계 (spermiogenesis)를 지난 정자로 전사 과정이 종료되었으므로 DNA 복구를 수행할 수 없다. 이러한 이유로 DNA 복구와 재조합이 원활한 체세포와 달리 DNA 손상시 정자 DNA 손상은 피할 수 없는 결과를 가져온다. 따라서 spermiogenesis 단계 이후에 발생하는 손상은 수정 이전까지 복구되지 않는다. 그러나 일부 DNA 손상이 난자에 의해 회복될 수 있다는 보고도 있다.<sup>11</sup>

이와 같이 정자 DNA integrity는 정자 기능의 주요한 객관적 지표이며 수정, 배발달 및 임신에 중요한 영향을 미치므로 남성 불임에 있어서 정자 DNA 손상에 대한 역할과 영향에 대해 검토할 필요가 있다.

이에 인간 정자 chromatin의 특징과 이들의 변이에 대한 검사법 그리고 손상에 따른 영향과 보조생식술 (assisted reproductive technology; ART) 결과와의 관련성에 대해 알아보려고 한다.

## II. Sperm DNA integrity

### 1) 정자 염색질 구조

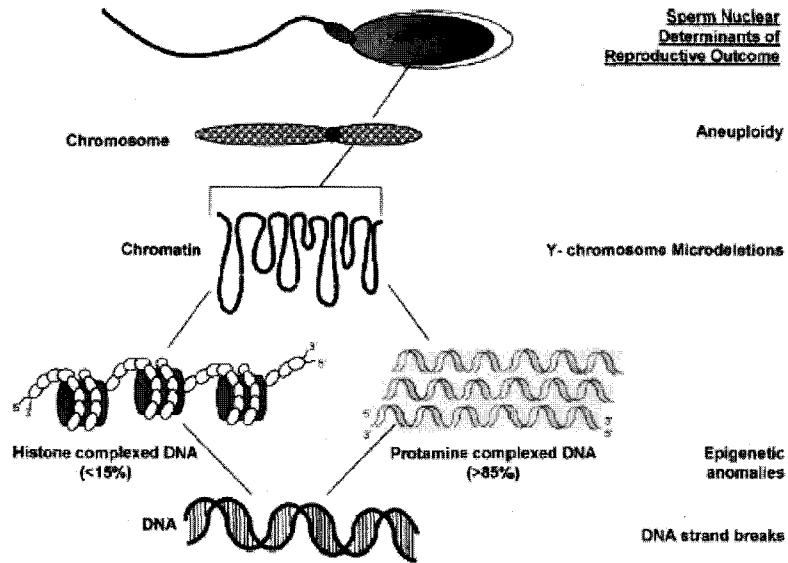
포유동물 정자내 DNA는 체세포 염색체 DNA보다 6배 이상 단단하게 응축되어 있다. 예로, 생쥐 정자 핵은 생쥐 간 (liver) 핵보다 크기가 40배나 작지만 체세포 핵 DNA보다 정자 DNA가 6배 더 응축되어 있다.<sup>12</sup>

정자의 chromatin은 DNA packaging을 고려하면 체세포 chromatin과 구별된다. 대부분의 체세포 핵내 DNA는 histone 팔랑체 주위에 DNA 사슬이 감겨 supercoil을 형성하지만 포유동물 정자 핵의 경우 핵내 DNA 나선이 직선 배열로 나란히 결합하게 된다. Chromatin은 이러한 응축을 위해서 DNA와 protamine 사이의 disulfide bonding에 의해 안정화된다. Spermatogenesis 단계 동안 spermatocyte에서 histone이 DNA와 결합한 후에 transition protein으로 대체되고 spermiogenesis 단계 동안 spermatid에서 protamine으로 대체된다 (Figure 2).<sup>13</sup> 약 85%의 protamine과 약 15%의 histone 단백질이 인간 정자의 핵 내부를 구성하고 있다.

일반적으로 정자 chromatin은 특별한 과정을 거쳐 핵내 chromatin을 치밀하고 안정된 구조로 유지하고 있다. 정자의 packaging이 필요한 이유는 몇 가지가 있다.

- (1) 정자가 생식도관을 통과하는 동안에 그 양을 줄일 수 있으며,
- (2) 수정 과정 전 외인적 요인에 의한 위험을 줄이고,
- (3) 전사가 불활성화된 유전체를 유지되도록 한다.

이와 같은 보호 작용을 통해 정자가 체액내 과도한 산화물질에 노출되는 위험에서 보호될 수 있으



**Figure 2.** A putative model attempting to depict different levels of genomic organization that may be associated with specific acquired spermatozoal defects.<sup>14</sup>

나 이러한 적극적인 방어작용에도 불구하고 정자 발달이나 성숙 과정에서의 DNA 손상은 불가피하다.

Ward와 Coffey<sup>12</sup>는 arginine-rich protamine은 DNA 사슬의 minor groove에 부착되고 이 protamine-DNA complex는 인접한 사슬의 major groove 안에 위치함으로써 조밀하게 결합된 배열 방식을 형성한다고 설명하였다.

이러한 정자 DNA packaging 과정을 요약하면,

- (1) nuclear annulus에 대해 DNA가 부착되는 chromosomal anchoring 과정
- (2) 새롭게 형성된 nuclear matrix에 DNA가 부착되는 DNA loop domain의 형성 과정
- (3) DNA가 치밀한 도우넛 형태로 응축되어 histone이 protamine으로 대체되는 과정
- (4) chromosomal positioning 과정으로 나눌 수 있다.

이러한 DNA 구조로 인해 정자 핵내 전체 DNA가 작은 규모로 단단하게 응축될 수 있다. 이렇게 단단하게 구성된 핵내의 유전정보를 난자 내로 전달할 뿐만 아니라 이렇게 전달된 유전정보가 정상적인 배아로 발달되도록 유도한다 (Figure 3).

## 2) Sperm DNA 손상의 원인

환경적 영향, 유전적 변이, 염색체 이상은 spermatogenesis 과정 동안의 매우 복잡한 생화학적 현상을 방해하며 비정상적인 chromatin structure를 형성하여 결국에는 임신에 영향을 미친다.<sup>9</sup>

인간 정자 chromatin abnormality와 DNA 손상이 일어나는 정확한 기전은 밝혀지지 않았으나 sperm chromatin packaging 결합, apoptosis, oxidative stress 등의 3가지 주된 요인이 보고되고 있다. 즉, 정자 핵 chromatin 이상이나 DNA 손상은 spermiogenesis 단계의 DNA packaging 동안 혹은 후에 일어나거나,<sup>15</sup> free radical로 인한 손상의 결과이거나,<sup>16</sup> apoptosis의 영향으로 발생한다.<sup>17</sup>

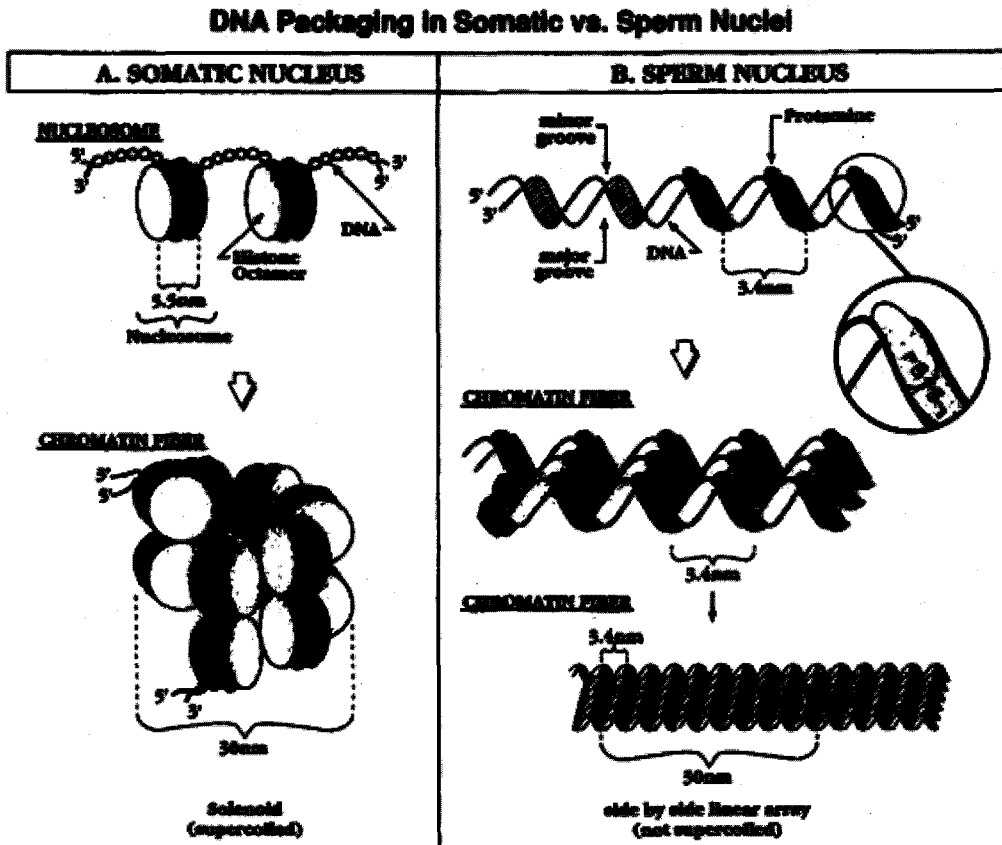


Figure 3. DNA packaging structures in somatic vs. sperm nuclei.<sup>12</sup>

### III. Sperm DNA integrity analysis techniques

인간 정자의 DNA 결함을 측정하는 방법은 다양하게 시도되었다. 성숙 정자의 chromatin 특성은 염색 시약과 방법에 따라 다양한 부착 및 반응 형태를 나타낸다. 이런 부착 및 반응성은 spermiogenesis 동안 일어나는 nucleoprotein 성분의 변화에 따른 결함 정도의 비정상 여부를 나타내는 특성을 이용한 것이다.

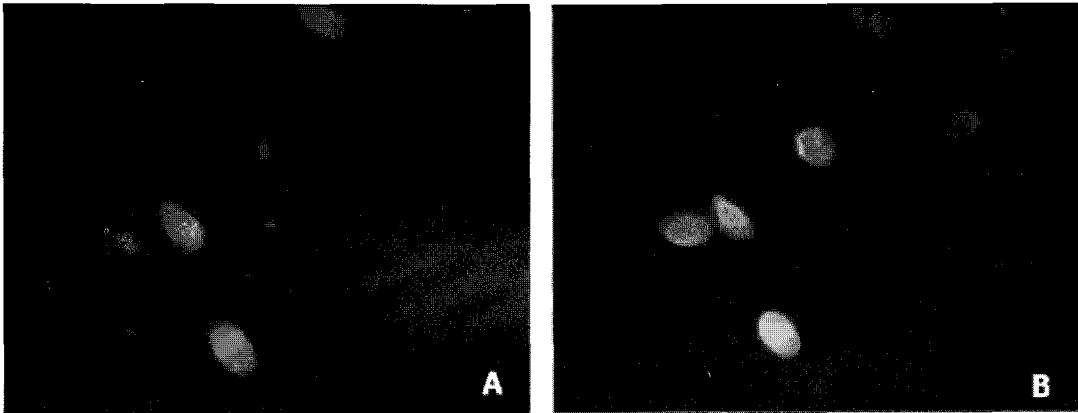
현재 주로 사용하는 검사법으로 정자 DNA의 integrity를 평가하는 방법과 정자 chromatin의 packaging 결함을 확인하는 방법으로 구분할 수 있다.

정자 DNA integrity 평가법으로는 terminal deoxynucleotidyl transferase mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling (TUNEL), sperm chromatin structure assay (SCSA), comet assay, in situ nick translation 등이 있고, 정자 chromatin integrity (chromatin packaging) 평가법으로는 methyl green, Giemsa stain, ethidium bromide, aniline blue, toluidine blue, acridine orange, chromomycin A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) 염색법 등 다양한 방법이 있다 (Table 1).

**Table 1.** Studies from the literature using different tests of sperm DNA damage analysis in assisted reproduction<sup>18</sup>

Technique	IVF	ICSI
Chromomycin A <sub>3</sub>	Bianchi et al., 1996	Sakkas et al., 1996
	Tomlinson et al., 2001	Sakkas et al., 1998
	Esterhuizen et al., 2000	Razavi et al., 2003
Aniline blue	Haidl et al., 1994	Hammadeh et al., 1999
	Liu et al., 192	Hammadeh et al., 1996
	Hammadeh et al., 1998	Varian-Klun et al., 2002
TUNEL	Sun et al., 1997	Lopes et al., 1998
	Duran et al., 2002	Benchaib et al., 2003
	Marchetti et al., 2002	Henkel et al., 2003
	Henkel et al., 2004	Henkel et al., 2004 (14)
	Seli et al., 2004	Seli et al., 2004
	Henkel et al., 2003	Greco et al., 2005
SCSA	Larson et al., 2000	Larson et al., 2000
	Larson-Cook et al., 2003	Larson-Cook et al., 2003
	Saleh et al., 2003	Saleh et al., 2003
	Bungum et al., 2004	Bungum et al., 2004
	Gandini et al., 2004	Gandini et al., 2004
	Virro et al., 2004	
In situ nick translation	Sakkas et al., 1996	Sakkas et al., 1996
	Tomlinson et al., 2001	Sakkas et al., 1998
Comet	Tomsu et al., 2002 (16)	Chan et al., 2001
		Morris et al., 2002
Acridine orange	Claassens et al., 1992	Variant-Klun et al., 2002
	Duran et al., 1998	Angelopoulos et al., 1998
	Duran et al., 2002	Hammadeh et al., 2001
	Katayose et al., 2003	
	Hoshi et al., 1996	
Miscellaneous	Host et al., 2000	Host et al., 2000
	Filatov et al., 1999	

Note: IVF = In vitro fertilization; ICSI = intracytoplasmic sperm injection; TUNEL = terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-nick end labeling; SCSA = Sperm Chromatin Structure Assay



**Figure 4.** Results of the TUNEL assay. (A) Spermatozoa with DNA fragmentation showing intense green fluorescence in the nuclear region, in contrast to the negative results without green fluorescence; (B) The spermatozoa (at same field as A) with combined green fluorescence and DAPI, showing the same TUNEL-positive signals (with abnormal morphology) and several TUNEL-negative spermatozoa with only DAPI as counterstain.<sup>20</sup>

## 1) DNA integrity 평가법

### (1) Terminal Deoxynucleotidyl Transferases (TdT) dUTP End Labeling (TUNEL) technique

TUNEL 방법은 apoptosis의 지표인 DNA 손상을 측정하는 방법이다. dUTP는 손상된 DNA 말단에 부착되어 DNA 손상을 나타내며, 형광도는 부착된 dUTP의 수에 따른 DNA의 nick 수를 나타낸다 (Figure 4).

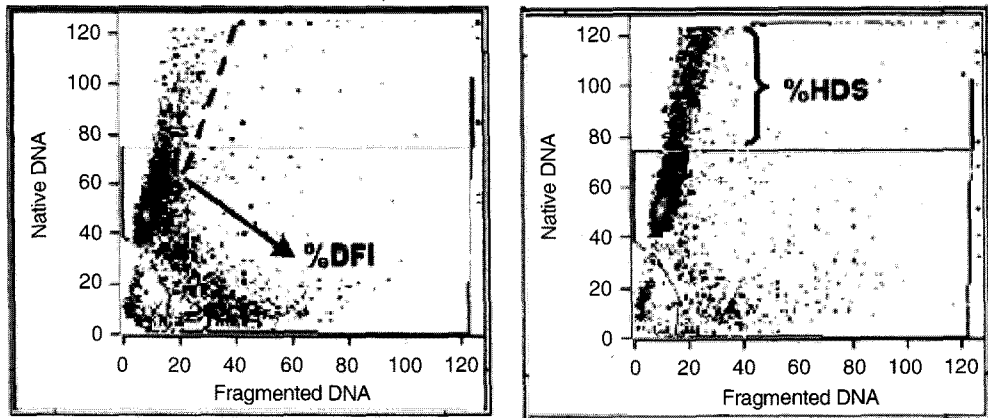
TUNEL 방법은 다양한 형태의 DNA 손상을 나타내는 necrotic cell이나 DNA 손상을 가진 사멸 직전의 세포들에도 적용한다. 따라서 TUNEL로 DNA 손상이 확인되었더라도, apoptosis가 진행되고 있다는 것을 항상 반영하는 것은 아니다. 그러므로 이러한 세포들에서 DNA 손상은 복구될 수 없으며 실제로 이러한 세포들은 apoptotic cell과는 구별되어야 한다.<sup>19</sup>

TUNEL 방법의 장점으로서는 적은 숫자의 정자라도 분석이 가능하다는 것이며 수행하는데 그리 많은 시간을 필요로 하지 않는다는 것이다. 실제로 각각의 세포들이 구별 가능하므로 극히 적은 수의 정자에서도 평가할 수 있는 방법이다.

### (2) Sperm chromatin structure assay (SCSA)

Sperm chromatin structure assay (SCSA)는 1970년대 개발된 이래 몇 차례의 방법적 개선을 거친 후 최근에는 flow cytometry를 이용하여 시행하고 있다. 이 방법은 DNA 변성에 대한 반응도를 측정하는 것으로 매우 정확하고 반복성을 갖고 있는 비침습적 방법으로 정자내 DNA 사슬 손상 정도를 측정하는데 적용하며 낮은 배반포율과 임신 결과의 위험을 예측할 수 있다.<sup>21</sup>

반응 결과는 DNA fragmentation index (% DFI)로 표기하며 DFI를 이용하여 DNA 사슬 손상을 정량 분석하여 미성숙 핵의 비율을 측정한다. 미성숙 정자에서 nuclear chromatin의 구조가 비정상이면 높은 DNA 염색율 (% HDS)이 나타난다 (Figure 5).



**Figure 5.** Fragmented DNA (red fluorescence) cytograms showing the two SCSA parameters of interest. Left: semen sample with a high percentage of sperm with high levels of DNA fragmentation (%DFI). Right: semen sample with a high percentage of sperm with HDS (%HDS).<sup>21</sup>

SCSA의 장점으로는 단시간에 많은 수의 정자를 평가할 수 있고, 여러 sample을 빨리 검사할 수 있다. 문제점으로는 장비가 고가이며 높은 농도의 정자가 필요하다는 점, sample에 대한 기준 범위를 보정해야 한다는 점, 검사자에 따라 조작성이 달라질 수 있으므로 정자에 역으로 영향을 줄 수 있는 가능성 등이 있다.<sup>22</sup> 그러나, DNA 손상에 대한 효용성을 본다면 TUNEL 방법이나 comet assay보다 SCSA가 더 효율적이라고 한다.<sup>21-23</sup>

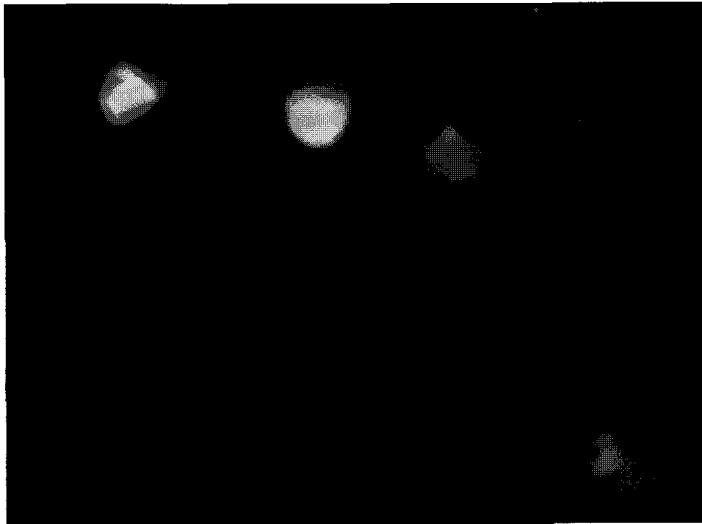
### (3) Acridine Orange test

Acridine Orange (AO) test는 오랫동안 체세포와 인간 정자의 nucleic acid를 염색하는데 사용되었다.<sup>24</sup> AO 염색법은 epifluorescent 현미경하에서 sperm nuclear chromatin의 구조를 분석하는 방법으로 인간 사정 정자의 성숙 정도와 수정 능력을 예측할 수 있는 유용한 방법이다.<sup>25,26</sup> 성숙된 정자의 disulfide bond는 AO 염색 과정 동안 DNA 변성을 막는다. 성숙 정자 핵인 경우, AO 염색을 시행하면 AO 분자들이 정상 DNA (이중나선)내로 삽입되어 녹색으로 형광 발현되고, 미성숙 정자 핵의 경우, 핵내에서 변성된 DNA (단일나선)와 AO 분자가 응집되어 결합하게 되면 적색 형광을 발현한다 (Figure 6). 그러나 수정을 예측하는 AO test로 불임 여부를 가진 환자의 정자에서 적색형광 발현이 높게 나타나지만,<sup>27,28</sup> 이러한 결과가 항상 일치하는 것은 아니다.<sup>25,29</sup>

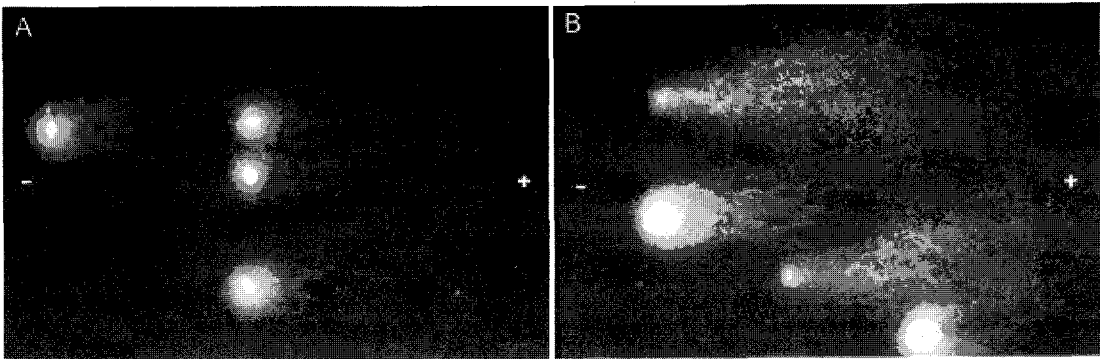
정자 성숙을 판정하는 방법으로 aniline blue 용액을 이용하여 핵을 염색하면 미성숙 정자에서는 lysine-rich nucleus protein이 염색되어 성숙 정도를 판단할 수 있다. 이러한 AO 염색법과 aniline blue 염색법 간에 상관관계가 있지만 발현 결과에서 AO 형광염색법보다 aniline blue 염색법의 결과가 덜 명확하게 나타난다.<sup>26,31,32</sup>

### (4) Comet assay

Comet assay (single-cell gel electrophoresis (SCGE))는 각 세포내 DNA fragmentation과 관련된 단일 또는 이중 사슬의 파손 양을 측정하므로 인간 정자의 미세한 DNA 손상도 확인할 수 있는 매우 민감한



**Figure 6.** Acridine orange staining of spermatozoa. Immature spermatozoa displaying red or orange fluorescence and mature spermatozoa displaying green fluorescence are observed.<sup>30</sup>



**Figure 7.** DNA migration patterns from four sperm cells of an older subject. Two sperm cells with highly damaged DNA and two sperm cells with significant DNA damage are shown.<sup>33</sup>

검사 방법이다. 전기영동을 시행하는 동안 세포에서 발생하는 혜성 모양의 부분의 꼬리 부분에 해당하는 저분자량의 DNA 양을 측정하는 원리인데, 손상받지 않은 정자의 경우 고분자량의 DNA는 잘 이동하지 않으므로 혜성 모양을 만들지 않는다 (Figure 7). Comet assay는 적은 수의 세포를 측정하기에 적절하지만 매우 많은 노력을 필요로 하는 검사법이다.<sup>33</sup>

## 2) Chromatin integrity (chromatin packaging) 평가법

### (1) Toluidine Blue cytometry

비정상 정자에서는 정상 정자와 다르게 histone이 지속적으로 존재한다. Toluidine blue로 염색하면



정상 정자는 염색되지 않고 손상된 정자는 청색으로 염색된다.<sup>34</sup>

이 방법의 장점으로서는 SCSA보다 DNA-protein을 측정하기 용이하며 적은 수의 정자로도 가능하며 비용이 많이 들지 않고 slide를 광학현미경하에서도 관찰할 수 있다는 점이다.

## (2) Chromomycin A<sub>3</sub> (CMA<sub>3</sub>) fluorochrome

Guanine-cytosine specific fluorochrome chromomycin A<sub>3</sub>은 인간 정자의 chromatin의 단단치 못한 결합 정도를 측정하며 protamine 결합, nick 부분 같은 변성된 DNA를 간접적으로 확인하는 방법이다.<sup>35</sup>

증가된 CMA<sub>3</sub> 수치 (>40%)로 예측한 불완전한 chromatin packaging은 DNA 손상 가능성이 있으며, ICSI 후 정자 탈응축 실패나 수정 실패의 결과를 가져온다.<sup>36-38</sup>

## IV. Sperm Chromatin damage와 ART 결과와의 관계

이상적으로는 건강한 정자 (안정된 DNA 보유)가 난자와의 수정 과정에 참여하지만, 손상된 DNA를 갖고 있는 정자도 수정이 가능하며 이럴 경우 낮은 임신율을 나타내는 결과를 초래한다.<sup>6,39</sup> 많은 연구에서 손상된 DNA 정자 비율이 높은 환자의 경우, 수정이 되었을 경우 배반포로의 발달이 저조하거나 임신이 되더라도 임신 유지율이 현저히 낮음을 보고하였다 (Table 2).<sup>8,9,40,41</sup>

심한 남성 불임 환자의 경우, 난자 내로 정자를 주입시 손상된 DNA가 결합될 확률이 높은 것으로 알려져 있다. 이러한 비정상 chromatin을 함유한 변형된 정자를 난자에 주입하였을 경우 정자의 탈응축, 수정 및 난할율이 저조하게 나타난다. 따라서 운동성과 형태가 정상인 정자일지라도 유전적으로는 비정상 정자를 주입할 위험이 있다.<sup>42</sup>

한편, Seli 등<sup>43</sup>은 DNA 손상을 받은 정자의 경우 apoptotic activity가 크게 활성화되어 IVF나 ICSI 후 배반포로의 발달이 저조하다고 보고하였으며, IVF와 ICSI를 통해서 손상된 DNA를 보유한 정자가 수정될 가능성이 매우 높다고 보고하였다.<sup>39</sup>

그러나, Tomlinson 등<sup>40</sup>은 사정 정자에서의 apoptosis와 수정률과는 상관관계가 없으며 체외배양 2~3일째 평균 embryo score에도 영향을 미치지 않는다고 보고하였다. 이는 인간의 경우, 모계 유래 mRNA에 의해 배아 발달이 조절되는 4세포기 이후에 부계 유전자가 비로소 발현되기 때문이며,<sup>44</sup> embryonic genome activation 이후 부계 유전자가 작용할 것이라는 Sakkas<sup>45</sup>의 발표에서도 증명되었다.

Ahmadi 등<sup>46</sup>은 chromatin 구조가 손상된 인간 정자의 경우 hamster 난자의 oolemma와 융합하지 못하며 임상적 연구에서도 낮은 수정률을 나타낼 것이라고 보고하였다. 이러한 비정상 정자 핵이 초기 수정 과정 및 배반포로의 발달에 어떤 영향을 미치는지는 아직 규명되지 않았다.

그러므로 정자 핵 DNA 손상과 apoptosis를 평가하는 것은 임상적으로 매우 중요하다 하겠다. TUNEL을 이용하여 분석한 결과 양성인 환자의 경우 IVF의 임상적 결과가 현저하게 낮게 나타났다 (Table 3).<sup>43,47,48</sup> 그러나, 비정상 chromatin/DNA 손상된 정자 비율과 보조생식술 결과와의 유해한 관계에서 결합 정자를 이용하여 IVF나 ICSI를 시행하였을 경우 수정률, 우수 배아, 임신율과의 관련성은 명확하지 않다.

정자 원인에 의한 남성 불임은 수정란이 배반포로의 발달 뿐만 아니라 배반포 수와 질에도 현저하게 유해한 영향을 미친다.

그러므로, 이러한 정자가 낮은 배반포 발달율, 분만으로의 도달 실패 등에 어떤 영향을 미치는지

**Table 2.** Correlation between sperm DNA damage and the outcome of various assisted reproductive techniques<sup>4</sup>

Reference	Study population (n) <sup>a</sup>	ART procedure	Technique	Parameter	Outcome <sup>b</sup>		
					Fertilization rate	Embryo cleavage rate	Pregnancy
Sun <i>et al.</i> (1997)	Semen samples (298)	IVF	TUNEL	DF	-0.16 (0.05)	-0.20 (0.02)	-
Lopes <i>et al.</i> (1998b)	150	ICSI	TUNEL	DF	-0.23 (0.0117)	No correlation	-
Larson <i>et al.</i> (2000)	24	ICSI	SCSA	DFI	-	-	15.4±4.6 vs. 31.3±3.2; p=0.001 <sup>c</sup> ; no pregnancies if >27%
Host <i>et al.</i> (2000)	Oligo (50)	IVF	TUNEL	DF	-0.61 (<0.01)	-	-
	Oligo (50)	ICSI			0.06 (>0.05)	-	-
Tomlinson <i>et al.</i> (2001)	140	IVF	NT	DF	-	-0.20 (0.004)	2.0±0.3 vs. 4.0±0.7 <sup>b</sup> ; p=0.02
Raman <i>et al.</i> (2001)	15	IVF	Comet	DF	0.567 (<0.05)	-	-
Duran <i>et al.</i> (2002)	119	IUI	TUNEL	DF			7.3±3.5 vs 13.9±10.8 <sup>b</sup> ; p=0.044, no pregnancies if >12%
Tomsu <i>et al.</i> (2002)	40	IVF	Comet	DF	-	-0.567 (<0.044)	-
Morris <i>et al.</i> (2002)	60	ICSI	Comet	DF	-	-12.77 (0.003) with 100% embryo cleavage rate	-
Saleh <i>et al.</i> (2003)	33	IUI (19); IVF (10); ICSI (4)	SCSA	DFI	-0.70 (0.03)	-0.70 (0.03)	p<0.0001

<sup>a</sup>Unless stated otherwise, indicates number of male patients included in the ART programme

<sup>b</sup>Unless stated otherwise, results are expressed as  $r$  = correlation coefficient, p-values in parentheses

<sup>c</sup>Pregnant group compared with non-pregnant group

ART = assisted reproduction technique; DF = DNA fragmentation; DFI = DNA fragmentation index; ICSI = intracytoplasmic injection; IUI = intrauterine insemination

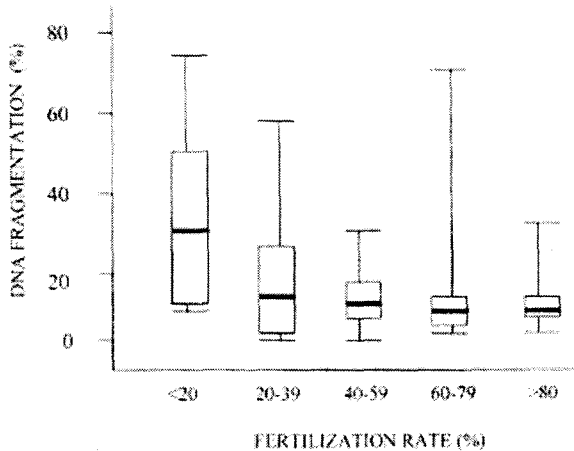
면밀히 검토해야 한다. 특히 ICSI를 이용하여 수정하였을 경우, ICSI를 위해 선별한 정자의 chromatin 비정상 비율이 높을수록 탈용축 개시나 완성이 방해받으므로 수정에 실패하는 명확한 원인이 되며 (Figure 8),<sup>38</sup> 정자가 회복될 수 없는 비정상 부계유전자를 가졌을 경우, 배반포 발달에 영향을 미칠 수 있다.<sup>49</sup>

유산 과정에서 비정상 부계 유전자의 역할에 대해서도 그동안 분석이 제대로 시행되지 않았다. 그 이유로 임상적으로 숫적, 구조적 이상에 대한 분석이 주로 이루어졌지만, 미세한 염색체 손상 (DNA nick, 이중 나선 파손 등)에 대한 규명은 활발하게 시행되지 않았기 때문이다.<sup>21</sup> 불임 남성의 정자에서 이런 미세한 DNA 손상 비율이 증가하여 비정상 배반포 발달, 착상 실패, 습관성 유산 등과 관련

**Table 3.** Development to the blastocyst stage of patients assessed for low (<20%) and high (>20%) TUNEL positivity<sup>43</sup>

Variable	Low TUNEL	High TUNEL	P value
n	28	21	
Age	34.5±1.0	35.0±1.0	.5
No. of oocytes	20.4±1.4	19.2±2.1	.6
No. of embryos	13.6±0.9	12.1±1.2	.3
Percentage blastocyst development (mean ± SEM)	44.1±4.9	29.9±6.3	.06
No. of embryos transferred	2.6±0.2	3.1±0.2	.05
Clinical pregnancy rate (%)	50	43	.45

Note: Data are mean ± SEM unless otherwise noted



**Figure 8.** The percentage of sperm with DNA fragmentation observed in 131 ICSI sperm samples grouped according to the ICSI fertilization rate in the same samples.<sup>38</sup>

되어 있음이 보고되었으므로 부계유전자의 integrity를 평가하는 것은 통상적인 남성 불임평가에서 진단과 예후를 보다 명확하게 나타낼 수 있다.<sup>8,50-52</sup>

De La Rochebrochard 등<sup>53</sup>이 여러 기관의 결과를 취합한 보고에 의하면 남편의 나이가 40세 이상이고 아내의 나이가 35세 이상일 경우 유산의 위험이 현저하게 증가한다고 보고하였다. 이러한 현상에 대한 이유로 나이가 증가할수록 손상된 DNA를 가진 정자가 많아진다는 것이다. 그러나, Singh 등<sup>33</sup>은 나이가 정자 DNA 손상에 영향을 주는 유일한 인자는 아니라고 하였다. 실제로 젊은 남자의 정자에서도 심각한 DNA 손상을 발견할 수 있으며, 정액 표본에 따라서는 DNA 손상 발현 빈도가 많거나 DNA 손상에 대한 각 정자의 반응 정도가 다를 수 있다. 그러므로 보조생식술 영역에서 정자 처리법은 또 다른 중요성을 갖고 있다 할 수 있다.

또 다른 보고에 의하면 swim-up 또는 Percoll 중층분리법을 이용하여 정자를 선별한 후 aniline blue, AO test로 확인한 결과 운동성과 형태가 향상되었을 뿐만 아니라 성숙한 정자의 비율도 높아졌다고 보고되었다 (Table 4).<sup>13,54</sup> 그러나, AO test가 수정률과 임신율을 예측할 수 있는 좋은 지표라는 보고가 있는 반면,<sup>25,28</sup> 정자 기능과 임신과는 상관관계가 없다는 보고도 있는 것처럼<sup>29,30,55</sup> AO test를 이용한

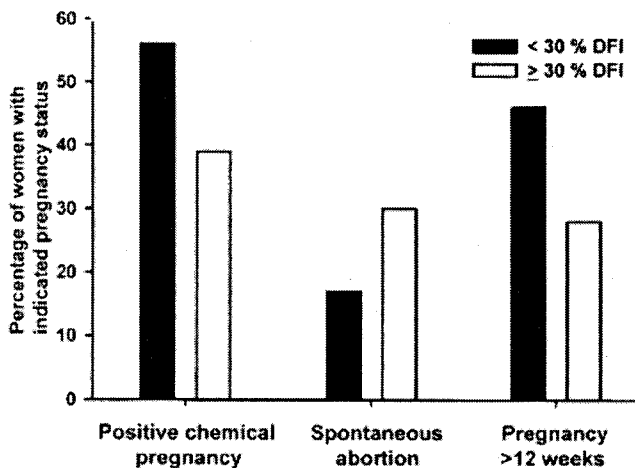
**Table 4.** Acridine orange staining and ART results<sup>30</sup>

	IVF cycles (n=32)		ICSI cycles (n=31)	
	Pregnancy (n=21) (65.6%)	No pregnancy (n=11)	Pregnancy (n=17) (54.8%)	No pregnancy (n=14)
2PN/oocytes inseminated or injected (%)	73.3 ± 3.2 <sup>†</sup>	53.7 ± 11.1 <sup>†</sup>	66.0 ± 4.2	64.2 ± 5.9
Mature nuclei before separation (%)	76.1 ± 3.2	71.2 ± 5.2	67.0 ± 4	68.6 ± 3.1
Mature normal nuclei before separation (%) <sup>*</sup>	91.1 ± 2.2	94.7 ± 2.6	89.2 ± 3.6	96.0 ± 1.6
Mature nuclei after separation (%)	85.9 ± 3.2	89.4 ± 2.3	80.6 ± 4.5	81.6 ± 4.1
Mature normal nuclei after separation (%) <sup>*</sup>	94.0 ± 2.1	96.8 ± 1.5	93.0 ± 2.9	95.3 ± 1.8
ESC (mature nuclei before separation) (1×10 <sup>6</sup> )	69.6 ± 9.8	80.2 ± 17.6	28.1 ± 12.8	21.5 ± 5.9
ESC (mature normal nuclei before separation) (1×10 <sup>6</sup> )	16.3 ± 2.5	14.6 ± 3.0	2.1 ± 0.6	2.5 ± 0.6
ESC (mature nuclei after separation) (1×10 <sup>8</sup> )	30.5 ± 4.1	25.6 ± 4.0	9.8 ± 2.3	8.0 ± 1.3
ESC (mature normal nuclei after separation) (1×10 <sup>8</sup> )	11.8 ± 2.3	8.3 ± 1.8	1.9 ± 0.3	1.9 ± 0.4

Note: Values are mean ± SEM. ESC = effective sperm count (percentage of mature or mature normal nuclei in the specimen × concentration)/100, according to Tejada et al. (8)

<sup>\*</sup> Percentages represent mature normal heads on total number of normal heads

<sup>†</sup> p<0.05 (determined by the paired t-test)



**Figure 9.** Female partners of men within group 2 (>30% DFI) had a lower rate of chemical pregnancy and a higher rate of spontaneous abortion and a significant decrease in pregnancies ongoing at 12 weeks of gestation.<sup>21</sup>

IVF 후 수정과 임신 결과를 예측할 수 있는지에 대해서는 논란이 많다.

Swim-up 방법은 정상 형태를 가진 운동성이 활발한 정자를 선별하므로 SCSA 방법으로 확인된 chromatin 손상 정자를 가려낼 수 있다. 특히, swim-up 후 본래 정액의 약 절반 정도의 수치까지 DFI 결과가 현저히 감소한다. Lopes 등<sup>38</sup>은 swim-up 처리 후 DNA fragmentation율과 ICSI 후 수정률과는 유해한 상관관계가 있으며, 낮은 운동성과 형태는 증가된 정자 DNA fragmentation과 관계가 있다고

**Table 5.** Percentage of couples with low fertilization rates (<25% and <50%) in DNA fragmentation index (DFI) and high DNA stainability (HDS) groups<sup>21</sup>

	Fertilization rate <25%			Fertilization rate <50%		
	IVF	ICSI	IVF and ICSI	IVF	ICSI	IVF and ICSI
<b>DFI</b>						
Group 1, DFI <30%	9 (n = 13/144)	4 (n = 4/114)	2 (n = 4/178)	28 (n = 40/144)	12 (n = 14/114)	18 (n = 32/178)
Group 2, DFI ≥30%	24 (n = 8/34)	7 (n = 4/60)	7 (n = 5/70)	32 (n = 11/34)	23 (n = 14/60)	21 (n = 15/70)
<b>HDS</b>						
Group 1, HDS <15%	8 (n = 13/157)	5 (n = 7/138)	3 (n = 6/206)	25 (n = 40/157)	16 (n = 22/138)	17 (n = 36/206)
Group 2, HDS ≥15%	38 <sup>a</sup> (n = 8/21)	3 (n = 1/36)	7 (n = 3/42)	52 <sup>b</sup> (n = 11/21)	17 (n = 6/36)	26 (n = 11/42)

Note: Values within a column and within sperm chromatin structure assay variable (DFI or HDS) with different superscripts are significantly different. Values are percents.

<sup>a</sup>p<.001, <sup>b</sup>p<.01

보고하였다.

Evenson 등<sup>9</sup>은 DNA 손상 정도에 대해 DNA fragmentation index (DFI)를 정하여 가임 가능성을 예측하였다. DFI는 결과를 각각의 범위를 정하여 10% 미만일 경우 우수, 10~24%는 양호, 25~50%는 보통, 30% 이상일 경우 결함으로 표기한다. SCSA test는 낮은 배반포율과 임신 결과의 위험을 예측할 수 있으므로 분석 결과 정자 DNA fragmentation (DFI)이 30%를 넘으면 배반포 발달과 임신율이 저하되고 유산율이 증가한다.<sup>21</sup> 그러므로 SCSA test를 통해 30% 이상의 DFI를 나타내면 임신 가능성이 현저히 낮을 수 있음을 예측해야 한다 (Figure 9, Table 5).

## V. 결 론

정자 DNA integrity는 매우 정교한 구조로 유전정보를 정확하게 전달하며 건강한 후손을 유지하는데 필수적이다.

따라서 남성 불임에서 통상적인 정액검사 지표보다 진단과 예후 측정의 정확성을 더 높일 수 있는 별도의 방법이 필요하다.

현재까지 많은 연구에서 손상된 DNA를 가진 정자가 임신에 좋지 않은 영향을 미친다는 결과를 보고하였다. 그러나, 불임환자에서 정자 DNA의 손상 여부를 측정하는데 어떤 방법이 사용되어야 하는지에 대해서는 아직 일치된 결론이 없다. 그러므로 정자 DNA 손상을 확인하는 방법을 표준화시켜야 하며 향후 DNA 손상 정도와 상관없이 임신에 영향을 미치는 DNA 결함 상태를 규명하고 보조생식술에 적합한, 손상받지 않은 DNA를 지닌 정자를 선별하는 방법에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다.

또한, 평균 가임군에서의 정상 수치와 기준점 (cut-off point)을 설정하는 문제와 각기 다른 검사방법

을 통하여 임신에 도달하기 위한 최소한의 정자 DNA integrity의 기준을 정하는 문제가 앞으로 해결되어야 할 것으로 생각된다.

#### 감사의 글

논문의 구성과 정리에 많은 조언을 아끼지 않은 본 연구실의 진진현 박사와 이형송 선생에게 감사의 말씀을 드립니다.

### 참 고 문 헌

1. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interactions, 4th ed. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, 1999.
2. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod* 1999; 4: 31-7.
3. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 331-45.
4. Hofmann N, Hilscher B. Use of aniline blue to assess chromatin condensation in morphologically normal spermatozoa in normal and infertile men. *Hum Reprod* 1991; 6: 979-82.
5. Sassone-Corsi P. Unique chromatin remodelling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science* 2002; 296: 2176-8.
6. Jian-Guo S, Jurisicova A, Casper RF. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod* 1997; 56: 602-7.
7. Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kostad HA, Cordelli E, Leter G. Sperm chromatin damage impairs human fertility. *Fertil Steril* 2000; 73: 43-50.
8. 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.
9. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl* 2002; 23: 25-43.
10. Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effects of age on DNA double strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril* 2003; 80: 1420-30.
11. Ahmadi A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA damaged spermatozoa. *J Exp Zool* 1999; 284: 694-704.
12. Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod* 1991; 44: 569-74.
13. Golan R, Shochat L, Weissenberg R, Soffer Y, Marcus Z, Oschry Y, et al. Evaluation of chromatin condensation in human spermatozoa: a flow cytometric assay using acridine orange staining. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 47-54.
14. Seli E, Sakkas D. Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. *Hum Reprod Update* 2005; 11: 337-49.

15. Sailer BL, Jost LK, Evenson DP. Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *J Androl* 1995; 16: 80-7.
16. Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings E, et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1998; 59: 1037-46.
17. Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res* 1993; 207: 202-5.
18. Agarwal A, Allamaneni SSR. Sperm DNA damage assessment: a test whose time has come. *Fertil Steril* 2005; 84: 850-3.
19. Hornsby PJ, Dienko VV. In situ DNA ligation as a method for labeling apoptotic cells in tissue sections. *Methods Mol Biol* 2002; 203: 133-41.
20. Liu CH, Tsao HM, Cheng TC, Wu HM, Huang CC, Chen CI, et al. DNA fragmentation, mitochondrial dysfunction and chromosomal aneuploidy in the spermatozoa of oligoasthenoteratozoospermic males. *J Assist Reprod Genet* 2004; 21: 119-26.
21. Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 2004; 81: 1289-95.
22. Schmid TE, Kamischke A, Bollwein H, Nieschlag E, Brinkworth MH. Genetic damage in oligozoospermic patients detected by fluorescence in-situ hybridization, inverse restriction site mutation assay, sperm chromatin structure assay and the comet assay. *Hum Reprod* 2003; 18: 1474-80.
23. Potts RJ, Newbury CJ, Smith G, Notarianni LJ, Jefferies TM. Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutat Res* 1999; 423: 103-11.
24. Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science* 1980; 210: 1131-3.
25. Hoshi K, Katayose H, Yanagida K, Kimura Y, Sato A. The relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. *Fertil Steril* 1996; 66: 634-9.
26. Kosower NS, Katayose H, Yanagimachi R. Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *J Androl* 1992; 13: 342-8.
27. Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, Marik JJ, Friedman S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril* 1984; 42: 87-91.
28. Liu DY, Baker HW. Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and fertilization rates in vitro. *Fertil Steril* 1992; 58: 1178-84.
29. Eggert-Kruse W, Rohr G, Kerbel H, Schwalbach B, Demirakca T, Klinga K, et al. The acridine orange test: a clinically relevant screening method for sperm quality during infertility investigation? *Hum Reprod* 1996; 11: 784-9.
30. Angelopoulos T, Moshel YA, Lu L, Macanas E, Grifo JA, Krey LC. Simultaneous assessment of sperm chromatin condensation and morphology before and after separation procedures: effect on the clinical outcome

- after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1998; 69 :740-7.
31. Auger J, Mesbah M, Huber C, Daboune JP. Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *Int J Androl* 1990; 13: 452-62.
  32. Roux C, Dadoune JP. Use of the acridine orange staining on smears of human spermatozoa after heat-treatment: evaluation of the chromatin condensation. *Andrologia* 1989; 21: 275-80.
  33. Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effects of age on DNA double strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril* 2003; 80: 1420-30.
  34. Erenpreiss J, Bars J, Lipatnikova V, Erenpreisa J, Zalkalns J. Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity *J Androl* 2001; 22: 45-53.
  35. Manicardi GC, Bianchi PG, Pantano S, Azzoni P, Bizzaro D, Bianchi U, et al. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin A<sub>3</sub> accessibility. *Biol Reprod* 1995; 52: 864-7.
  36. Sakkas D, Umer F, Bianchi PG, Bizzaro D, Anger I, Jaquenoud N, et al. Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996; 11: 837-43.
  37. Bianchi PG, Manicardi GC, Umer F, Campana A, Sakkas D. Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 139-44.
  38. Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998; 69: 528-32.
  39. Morris ID, Ilott S, Dixon L, Brinson DR. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod* 2002; 17: 990-8.
  40. Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M, Sakkas D. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod* 2001; 16: 2160-5.
  41. Thompson-Cree MEM, McClure N, Donnelly ET, Steele KE, Lewis SEM. Effects of cryopreservation on testicular sperm nuclear DNA fragmentation and its relationship with assisted conception outcome following ICSI with testicular spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2003; 7: 449-55.
  42. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caruso F, Eleuteri P, Leter G, et al. Full term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod* 2004; 19: 1409-17.
  43. Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O, Sakkas D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2004; 82: 378-83.
  44. Tesarik J, Kopečný V, Plachot M, Mandelbaum J. Activation of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and changes in the ribosomal content of human embryos developing in vitro. *J Reprod Fertil* 1986; 78: 463-70.
  45. Sakkas D, Manicardi GC, Tomlinson M, Mandrioli M, Bizzaro D, Bianchi PG, et al. The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and



- nuclear DNA anomalies. *Hum Reprod* 2000; 15: 1112-6.
46. Ahmadi A, Ng SC. Destruction of protamine in human sperm inhibits sperm binding and penetration in the zona-free hamster penetration test but increases sperm head decondensation and male pronuclear formation in the hamster-ICSI assay. *J Assist Reprod Genet* 1999; 16: 128-32.
  47. Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, et al. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique *Hum Reprod* 2003; 18: 1023-8.
  48. Younglai EV, Holt D, Brown P, Jurisicova A, Casper RF. Sperm swim-up techniques and DNA fragmentation. *Hum Reprod* 2001; 16: 1950-3.
  49. Jones GM, Trounson AO, Lolatgis N, Wood C. Factors affecting the success of human blastocyst development and pregnancy following in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1998; 70: 1022-9.
  50. Larson KL, De Jonge CJ, Barnes AM, Jost LK, Evenson DP. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 2000; 15: 1717-22.
  51. 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.
  52. Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aamold ET, Evenson DP. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 2003; 80: 895-902.
  53. de La Rochebrochard E, Thonneau P. Paternal age and maternal age are risk factors for miscarriage; results of a multicentre European study. *Hum Reprod* 2002; 17: 1649-56.
  54. Le Lannou D, Blanchard Y. Nuclear maturity and morphology of human spermatozoa selected by Percoll density gradient centrifugation or swim-up procedure. *J Reprod Fertil* 1988; 84: 551-6.
  55. Claassens DE, Menkveld R, Franken DR, Pretorius E, Swart Y, Lombard CJ, et al. The acridine orange test: determining the relationship between sperm morphology and fertilization in vitro. *Hum Reprod* 1992; 7: 242-7.