

정자형태 및 정자농도의 검사를 위한 Unopette의 사용

金 明 哲

충남대학교 농과대학 수의학과

緒 論

精자의 形態學的 檢査는 雄性受胎能力을 평가하기 위한 方法의 하나로서 소,^{11,14~17,20} 말^{1,19} 및 사람⁹에서 보고된바 있으며 受胎의 저하는 精자의 形態學적 結核과 關連이 있을 것이라는 研究가 報告된 바 있다.^{4,5,12}

精자의 形態學적 特性은 염색된 精액도말표본에 의하여 평가되어 왔다. 그러나 염색액 또는 염색처리 方法이 精자형태에 影響을 주는 것으로 밝혀졌다.⁶

한편 phase contrast 및 differential interference contrast microscopy는 精액의 wet preparations에서의 精자의 形態學적 特性을 평가하는 것을 가능하게 한다.⁷

또한 0.2g의 glutaraldehyde가 들어 있는 phosphate-buffered saline solution 100ml 용액이나 buffered-formol saline 용액¹⁷은 精자의 形態學적 特性을 보존한다.

Unopette는 全血에서의 적혈구 計算을 위하여 사용되는 microcollection system으로서 사용하기에 方便하게 되어 있다.

본 研究는 Unopette가 精자의 形態學적 檢査 및 농도檢査를 위하여 사용될 수 있는 가를 알아보기 위하여 수행되었으며 실험결과 의의 있는 知見을 얻었기에 보고한다.

재료 및 方法

供試精液은 人工陰法에 의해 채취한 토끼의 原精液과 홀스타인 냉동精액(Iwa State Univ., IA)을 사용하였다.

精자의 形態學적 檢査 및 精자농도의 檢査는 Unopette(Becton-Dickinson, NJ)에 10 μ l의 토끼의 원精액 또는 용해된 우정액을 주입하여 200배로 희석되게 한후 3~5 $^{\circ}$ C에 보존하면서 24시간마다 위상차현미경으로 관찰하였으며 대조군은 Unopette에 희석하지 않은 정액을 hematoxylin-eosin으로 複染色하여 1000배로 鏡檢하였으며 기형精자의 구분은 Hafez³에 준하였다.

結 果

Unopette를 사용하여 토끼精액을 위상차현미경하에서 形態學적으로 관찰한 결과는 Table 1과 같다.

정상精자율은 Unopette에 주입직후인 0시간에서는 83.2 \pm 2.94%로서 가장 높았으며($p < 0.05$), 시간이 경과할수록 낮은 정상精자율을 나타내었다. 한편 Unopette를 사용하지 않고 hematoxylin-eosin 염색한 대조군은 77.6 \pm 3.97%의 정상精자율을 나타내었다. 기형精자율은 시간이 경과할수록 높아졌는데($p < 0.05$), 특히 기형두부는 0시간에서는 9.2 \pm 9.72%이었으나 144시간에서는 19.8 \pm 1.86%를 나타내었다. 精자수는 0시간에서는 151.1 \pm 17.47($\times 10^6$ /ml)을 나타내었으나 시간이 경과할수록 낮아졌으며 144시간에서는 106.4 \pm 16.36($\times 10^6$ /ml)을 나타내었다.

Unopette를 사용하여 냉동용해된 우정액을 위상차현미경하에서 形態學적으로 관찰한 결과는 Table 2와 같다. 정상精자율은 0시간에서 79.5 \pm 3.32%로서 대조군의 성적인 75.5 \pm 4.43%보다 높았으며 시간이 경과할수록 낮은 정상精자율을 나타내었다($p < 0.05$). 기형精자율은 시간이 경과할수록 높아졌는데($p < 0.05$), 기형두부의 경우 0시간에서는 11.3

Table 1. Sperm Morphology and Concentration of Rabbit Sperm Using Unopette

(n=8; mean±S.D.)

Sperm morphology	Control ^a	Duration of preservation						
		0	24	48	72	96	120	144
Normal sperm(%)	77.6 ±3.97	83.2 [*] ±2.94	81.5 ±6.81	79.7 ±5.73	77.4 ±7.26	75.3 ±6.37	73.8 ±8.79	72.1 ±9.83
Abnormal sperm(%)	22.4 ±3.97	16.8 ±2.94	18.5 ±6.81	20.3 ±5.73	22.6 ±7.26	24.7 ±6.37	26.2 ±8.79	27.9 ±9.83
Abnormal heads(%)	5.9 ±5.64	9.2 ±1.86	10.7 ±7.53	12.3 ±8.41	13.7 ±6.80	16.0 ±4.79	18.4 ±8.75	19.8 ±9.72
Detached heads(%)	3.3 ±2.69	2.6 ±1.35	3.1 ±3.62	1.7 ±2.13	1.6 ±2.04	1.9 ±2.27	2.3 ±1.88	1.7 ±1.92
Proximal droplets(%)	0.8 ±0.92	0.3 ±0.35	0.3 ±0.34	0.2 ±0.27				
Distal droplets(%)	0.3 ±0.50	0.2 ±0.42	0.2 ±0.40	0.2 ±0.35				
Bent/Coiled midpieces and tails(%)	12.1 ±7.39	4.5 ±2.87	4.2 ±2.70	5.9 ±3.82	7.3 ±4.39	6.8 ±4.24	5.5 ±3.62	6.4 ±4.01
Sperm concentration(×10 ⁶ /ml)	152.4 ±17.03	151.1 ±17.47	150.1 ±23.06	136.8 ±21.38	129.3 ±29.74	121.6 ±23.51	115.5 ±18.14	106.4 ±16.36

a : Hematoxylin-eosin staining

* : p<0.05

Table 2. Sperm Morphology and Concentration of Frozen-thawed Bovine Sperm Unopette

(n=8; mean±S.D.)

Sperm morphology	Control ^a	Duration of preservation						
		0	24	48	72	96	120	144
Normal sperm(%)	75.5 ±4.43	79.5 [*] ±3.32	77.3 ±7.93	77.3 ±4.92	74.5 ±7.00	74.1 ±6.43	72.8 ±10.14	68.8 ±9.78
Abnormal sperm(%)	24.5 ±4.43	20.5 ±3.32	22.7 ±7.93	22.7 ±4.92	25.5 ±7.00	25.9 ±6.43	27.2 ±10.14	31.2 [*] ±9.78
Abnormal heads(%)	7.0 ±7.57	11.3 ±1.71	12.0 ±8.72	13.0 ±5.60	17.8 ±3.40	18.8 ±5.27	19.8 ±7.89	20.5 ±9.68
Detached heads(%)	3.0 ±2.00	2.5 ±1.29	3.3 ±3.95	1.8 ±2.22	1.8 ±2.22	1.6 ±2.04	1.0 ±1.15	2.0 ±1.83
Proximal droplets(%)	1.0 ±1.15	0.5 ±0.58		0.5 ±0.58				
Distal droplets(%)		0.3 ±0.50	0.3 ±0.50					
Bent/Coiled midpieces and tails(%)	13.5 ±6.61	6.0 ±3.92	7.3 ±4.19	7.5 ±4.51	6.0 ±3.65	5.5 ±3.41	6.5 ±4.04	8.8 ±4.35
Sperm concentration(×10 ⁶ /ml)	51.8 ±5.63	51.6 ±6.09	51.5 ±9.53	47.7 ±7.66	46.4 ±11.68	43.6 ±8.46	41.8 ±6.52	38.0 ±4.88

a : Hematoxylin-eosin staining

* : p<0.05

±1.71%이었으나 144시간에서는 20.6±9.68%를 나타내었다. 정자수는 0시간에서는 51.6±6.09(×10⁶/ml)로서 대조군의 성적인 51.8±5.63(×10⁶/ml)와 유사한 성적을 나타내었으며 시간경과에 따라서 관찰한 결과 24시간에서는 51.5±9.53(×10⁶/ml)로서 정자농도의 감소가 거의 없었으나 그후 시간이

경과함에 따라서 정자농도의 감소를 나타내었다.

考 察

雄性受胎能力을 평가하는데는 정자의 數보다도 정자의 質이 더욱 중요성을 가지며 정확한 정액분

석을 위해서는 정액의 量, 정자의 농도, 운동성, 전진운동성 및 형태학적 특성 등의 5가지 항목을 검사해야 한다.⁸⁾

또한 정자의 수태능력을 검사하기 위하여 체외수정능력의 검사를 이용하기도 한다.^{2,10,18)}

Pedersen과 Koefoed-Johnsen¹³⁾은 Jersey에서 정자의 형태학적 검사를 한 결과 wet unstained preparation의 경우 18.65%, eosin-nigrosin의 경우 15.67% 그리고 Indian ink의 경우 14.81%의 기형율을 나타내었다고 하며, Harasymowycz 등⁶⁾은 솟소에서 정자의 형태학적 검사를 한 결과 Hancock's stain의 경우 20.83%, Blom's stain의 경우 22.20%, Glutaraldehyde fixed preparation의 경우 20.33% 그리고 Formol saline fixed preparation의 경우 20.37%의 기형율을 나타내었다고 한다. 홀스타인 냉동정액을 사용한 본 실험에서는 Table 2에서와 같이 hematoxylin-eosin염색을 한 control의 경우 24.5% 그리고 Unopette를 사용한 실험군의 경우 0시간에서 20.5%의 기형율을 나타내었다. 이러한 기형율의 차이는 품종 및 염색방법의 차이에 기인된다고 사료된다.

본 실험에서의 기형정자율에 있어서(Table 1, 2) hematoxylin-eosin을 사용한 대조군이 Unopette를 사용한 실험군의 0시간에서 보다 높았던 것은($p < 0.05$) 이 두가지 방법이 있어서의 기계적인 손상의 차이에 기인되었을 것으로 사료된다.

본 실험에서 정상정자율과 정자농도에 있어서(Table 1, 2), Unopette를 사용한 실험군에서 0시간의 결과는 hematoxylin-eosin을 사용한 대조군과 비교하여 불매에 정상정자율은 높았으며 정자농도는 유사한 결과를 나타내었고 실험군에 있어서 시간의 경과에 따른 결과를 비교할 때에 48시간까지는 형태학적 검사의 결과에 있어서 큰 변화를 나타내지 않았고, 24시간 까지는 정자농도에 있어서 큰 변화를 나타내지 않았다. 따라서 Unopette는 정자의 형태학적 검사 및 정자농도의 측정을 위해서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

結 論

Unopette가 정자의 형태학적 검사 및 정자농도의 검사를 위하여 사용될 수 있는가를 알아 보기 위하여 본 연구를 수행하였다.

토끼정액 및 냉동용해된 우정액을 Unopette에 희

석한후 3~5℃에 보존하면서 시간경과에 따라서 위상차현미경하에서 관찰하였는데 Unopette를 사용하여 관찰한 정자는 48시간까지는 hematoxylin-eosin을 사용하여 관찰한 정자보다는 높은 정상정자율을 나타내었으며 또한 Unopette를 사용한 정자는 정자농도에 있어서 대조군 정자에 비하여 24시간까지는 큰 차이를 나타내지 않았다. 따라서 Unopette는 정자의 형태학적 검사 및 정자농도의 검사를 위하여 유용하게 사용될 수 있다는 사실을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Baall, L., Piokett, B.W. and Gebauer, M.R.: Staining technique and stallion sperm morphology, J. Anim. Sci. (1971) 33 : 248.
2. Comhaire, F.H., Vermuelen, L., Hinting, A. and Sohoonjans, F.: Aocouraoy of sperm oharacteristios in peredioting the *in vitro* fertilizing oapacity of semen. J. Vitro Fert. Embryo Transfer (1988) 5 : 326~331.
3. Hafez, E.S.E.: Reproduction in farm animals. Lee & Febiger. Philadelphia. (1980) pp. 479~482.
4. Hahn, J., Foote, R.H. and Seidel, G.E., Jr.: Quality and freezability of semen growing and aged dairy bulls. J. Dairy Soi. (1969) 52 : 1843~1848.
5. Hancock, J.L.: The morphologio oharacteristics of spermatozoa and fertility. Int. J. Fert. (1959) 4 : 347~359.
6. Harasymowycz, J., Ball, L. and Seidel, G.E. Jr.: Evaluation of bovine spermatozoal morphologic features after staining or fixation. Am. J. Vet. Res. (1976) 37 : 1053~1057.
7. Johnson, L., Berndtson, W.E. and Piokett, B.W.: An improved method for evaluating arosomes of bovine spermatozoa. J. Anim. Sci. (1976) 42 : 951~954.
8. Lipshultz, L.I.: Beyond the routine semen analysis. Fert. Steril. (1982) 38 : 153~155.
9. Mahadevan, M.M. and Trounson, A.O.: The influence of seminal characteristics on the success rate of human *in vitro* fertilization. Fert. Steril. (1984) 42 : 400~405.
10. Mahadevan, M.M., Trounson, A.O., Wood, C. and Leeton, J.F.: Effect of oocyte quality and sperm characteristics on the number of spermatozoa bound to the zona pelluoida of human oocytes inseminated *in vitro*. J. Vitro Fet. Embryo TRansfer (1988) 4 : 223~227.
11. Marshall, C.E. and Saaokke, R.G.: Acrosomal cap of living bovine spermatozoa. J. Anim. Sci. (1967) 26 : 947.
12. Morrow, D.A.: Current therapy in theriogenology : diagnosis, treatment and prevention of reproductive disease in animals. W. B. Saunders. Philadelphia. (1980) p. 333.
13. Pedersen, H. and Koefoed-Johnsen, H.H.: Occurrence of sperm tail abnormalities among Jersey A I bulls. Arsberetning Institut for Sterillitetsforskning (1979) 22 : 37~46.
14. Peet, R.L. and Mioke, B.: The "Dog" and gwollen abaxial midpiece spermatozoan defect in bulls. Australian Veterinary Journal (1976) 52 : 476~477.

15. Pursel, V.G., Johnson, L.A. and Rampacek, G.B. : Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *J. Anim. Sci.* (1972) 34 : 278~283.
16. Rao, A.R., Bane, A. and Gustafsson, b.K. : Changes in the morphology of spermatozoa during their passage through the genital tract in dairy bulls with normal and impaired spermatogenesis. *Theriogenology* (1980) 14 : 1~12.
17. Salisbury, G.W. and Mercier, E. : The reliability of estimates of the proportion of morphologically abnormal spermatozoa in bull semen. *J. Anim. Sci.* (1945) 4 : 174~178,
18. Tanphaiohit, N., Agulniok, A., Seibel, M. and Taymor, M. : Comparison of the *in vitro* fertilization rate by human sperm capacitated by multiple-tube swim-up and perocll gradient centrifugation. *J. Vitro Fert. Embryo Transfer* (1988) 3 : 119~122.
19. Voss, J.L., Pickett, B.W. and Squires, E.L. : Stallion spermatozoal morphology and motility and their relationship to fertility. *J.A.V.M.A.* (1981) 178 : 287~289.
20. 김명철 : 고탐력 우정자의 선택적 분리에 관한 연구. *대한수의학회지* (1984) 24 : 245~266.

Use of Unopette for the Observation of Sperm Morphology and Sperm Concentration

Myung-Cheol Kim, D.V.M., Ph.D.

Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture, Chungnam National University

Abstract

This study was carried out determine whether Unopette can be used for the observation of sperm morphology and sperm Concentration.

Rabbit sperm and frozen-thawed bovine sperm were observed with phase contrast microscope after dilution with Unopette acoording to duration of preservation at 3~5°C.

Sperm using Unopette showed high normal sperm(%) than sperm using hematoxylin-eosin until 48 hours. Sperm using Unopette revealed no difference in sperm concentration until 24 hours, as compared with control sperm.

As a result, Unopette was assessed as appropriate solution for preservation in terms of morphological observation and sperm concentration.