

체외수정 실패 정자에 대한 전자현미경적 연구

전남대학교 의과대학 산부인과학교실, 병리학교실*

이여일 · 나재형 · 이재혁* · 정상우*

Ultrastructural Study on Spermatozoa of Failed In Vitro Fertilization

Yu-Il Lee, M.D., Jae-Hyung Na, M.D., Jae-Hyuk Lee, M.D.* and Sang-Woo Juhng, M.D.*

Department of Obstetrics and Gynecology, Department of Pathology* Chonnam University Medical School, Kwangju, Korea

= Abstract =

Failure of in vitro fertilization may occur even though oocyte and semen parameters seem satisfactory. Quantified ultrastructural study of spermatozoa was performed in three cases of failed in vitro fertilization. The results were compared to those of four fertile men. Quantification was achieved by cataloguing cell defects of the spermatozoon heads and mid/principal pieces of the flagella. Using the data from each specimen, the percentages of total cellular abnormalities in the head/mid/principal pieces were established. The percentages of anomalies of the midpiece and of the principal piece were not significantly different between failed cases and controls. The percentage of cell alterations of the head (96-100 vs $75 \pm 3.4\%$), the percentage of combined anomalies of the head (80-86 vs $52.5 \pm 1.9\%$), and the percentages of nuclear shape deformation (68-86 vs $47.5 \pm 6.3\%$), acrosomal defects (86-96 vs $50 \pm 4.3\%$), and postacrosomal sheath defects (78-88 vs $44.5 \pm 7.2\%$) of the head were significantly different between failed cases and controls.

Due to the cost and time involved in processing semen samples for electron microscopy, the widespread application of this technique to all couples presenting for IVF certainly is not warranted. However, in selected instances electron microscopy may play a crucial role in identifying an occult male factor.

서 론

불임 남성의 정액 검사상 형태적 이상 유무가 정자의 수나 운동성 못지 않게 불임의 원인 규명에 중요한 요소가 되며, 정자가 왕성한 생식능력을 가지려면 정상적인 편모축사(flagellum axoneme), 선단체(acrosome), 후선단체부위(postacrosomal region), 그리고 핵(nucleus)등을 지녀야만 하는데 이러한 세포내 구조물들에 이상이 생길 때 정자의 수정능에 부분적 또는 전체적 장애를 초래할 수 있다. 그러나 상당수의 두부(head)나 미부 편모(fl-

gellum)의 구조적 이상들은 일반적으로 사용되고 있는 광학현미경하에서는 관찰되지 않을 수 있어, 최근 20년동안 인간 정자를 포함한 포유류 정자의 미세구조에 대한 전자현미경적 연구들이 시행되어 왔고(Bisson & David, 1975; Fawcett, 1975; Baccetti, 1984; Zamboni, 1987; Von Bernhardt et al., 1990; Zamboni, 1991) 이를 남성 불임의 진단에 이용하고자 시도되고 있으나(Bartoov et al., 1982; Escalier, 1983; Jouannet et al., 1983; Serres et al., 1983; Escalier & David, 1984; Escalier & Serres, 1985; Serres et al., 1986; Carlon et al., 1991), 아직까지 불임 남성의 검사로 전자현미경이

보편적으로 사용되지는 않고 있는 실정이다. 실제로, 실험실에서 체외수정을 시행하다 보면 난자와 정자가 질과 양적으로 만족스러운데도 수정에 실패하거나 배 발달이 저조한 경우가 종종있다. 이에 저자는 원인 불명성 체외수정 실패 정자에 대한 전자현미경 검사의 유용성을 파악할 목적으로 정자의 세포내 미세구조의 이상 유무를 관찰하고 정상 생식능력이 확인된 대조군의 정자와 비교 분석하고자 본 연구를 시도하였다.

대상 및 방법

1. 연구대상

최근 2년동안 자녀를 획득한 적이 있고 David등(1985)의 기준으로 정액 검사상 정상 소견을 보였던, 즉 정자의 수가 1ml당 2천 5백만 내지 1억 5천만이고 운동성 정자와 정상

Table 1. Quality of aspirated oocytes

Case no.	COH regimen	Aspirated oocytes	Oocyte maturity		
			PO	Inter.	Imm.
1	HMG/HCG	3	3	0	0
2	GnRH Ago/ FSH/HMG	6	3	1	2
3	GnRH Ago/ FSH/HMG	2	2	0	0

COH: controlled ovarian hyperstimulation, PO: preovulatory, Inter.: intermediate, Imm.: immature.

형 정자가 모두 50% 이상인 4명의 정자를 정상 대조군으로 하고, 표 1, 2에서와 같이 본 병원의 체외 수정 시술시 과배란유도 및 수정 전 배양(이여일 등, 1990)으로 난자와 정자가 질과 양적으로 만족스러운데도 불구하고 수정에 실패하였던 3예의 정자를 수정실패 군으로 하였다.

2. 방법

수음으로 채취된 정액을 30-40분간 37°C에서 액화시킨 후, 일부를 통상적인 정액 검사에 이용하고 나머지를 전자현미경 검사를 위하여 2.5% Karnovsky 용액에서 90분 동안 4°C에서 전고정한 후 600×g으로 10분간 원심분리하고 상층액을 제거한 후, 0.1M cacodylate 완충액으로 수세하였다. 2% osmium tetroxide로 1시간 동안 4°C에서 후고정한 후 통상적인 방법에 의하여 계열 알코올로 탈수하고 propylene oxide로 치환하여 Luft법(1961)에 따라 Epon혼합물에 포매하였다. Epon 포매괴를 NOVA-ultramicrotome으로 약

Table 2. Results of semen analysis in the failed cases

Case no.	Concentration (10 ⁶ /ml)	Sperm parameter	
		Progressive motility (%)	Normal morphology (%)
1	95	83	81
2	82	63	71
3	100	74	76

Table 3. Results of ultrastructural analysis of spermatozoa in semen of failed cases(n=3) and controls(n=4)

Ultrastructural analysis(%)	Case no.			Controls (mean±SD)
	1	2	3	
Head cellular abnormalities*	98	96	100	75.0±3.4
Nucleus shape deformations*	68	86	84	47.5±6.3
Chromatin defects	20	28	32	22.5±5.3
Intranuclear vacuole defects	10	18	20	11.5±9.0
Acrosomal defects*	86	88	96	50.0±4.3
Postacrosomal sheath defects*	78	78	88	44.5±7.2
Unreduced cytoplasm	36	42	44	23.0±5.3
Combined head abnormalities*	80	82	86	52.5±1.9
Midpiece abnormalities	54	52	58	50.5±5.0
Principal piece abnormalities	58	54	62	53.5±5.0

*Significantly different from controls(Mann-Whitney U test, p≤0.05).

50-80nm 두께로 초박절한 후 Reynold법 (1963)에 따라 uranyl acetate 및 lead citrate 로 이중염색하여 Jeol JEM-100 CXII 전자현미경으로 관찰하였다. 대상 정자의 다양한 미세 구조적 세포 결합과 이상 소견들을 수량화(quantification)하기 위하여 정자를 두부(head), 중간부(mid-piece), 및 주부(principal piece)로 나누어, 두부에서는 종절편, 중간부와 주부에서는 횡절편을 각각 50개씩 관찰하고 세포적 이상 소견들을 조사하여 백분율을 산정하였다. 또한 두부의 이상 소견은 다음과 같이 6개 군으로 세분하여 각각 그 백분율을 구하였다.

- 1) 불규칙한 핵의 모양
- 2) 미성숙 결합을 포함한 염색질 이상
- 3) 병적으로 보이는 봉입체 및 거대 핵 공포
- 4) 선단체 결합
- 5) 후선단체 피막 결합
- 6) 후선단체 부위나 전체 두부를 둘러싸는 잔존 세포질

또한 상기한 6가지 소견 중 적어도 3개 이상 존재하는 경우를 복합 두부이상이라고 정의하고 그 백분율도 함께 산출하였다. 각각의 수정 실패군 정자의 형태적 부위에 따른 미세 구조적 세포내 이상 소견들이 발현되는 백분율들을 정상 대조군의 것들과 비교 분석하였고, 양군간의 차이는 Mann-Whitney U test를 이용하여 통계적 유의성 여부를 검증하였다(표 3).

성 적

1. 전자현미경 소견

정상 정자의 두부는 납작한 배모양으로 선단체막이 핵의 전 2/3, 후선단체 피막이 후 1/3을 둘러싸고 있었다. 두부의 핵은 균일한 과염색상의 염색질로 구성되고, 때로는 핵내에 공포가 출현하기도 하였다(그림 1). 미부편모의 중간부는 축사 복합체를 중심으로 외층의 치밀한 섬유 조직과 나선형 배열의 사립체들이 위치하고 있으며(그림 2), 주부에서는 더욱 뚜렷한 축사 복합체가 섬유성 피막에 의해 둘러싸여 있었다(그림 3). 두부에서 관찰되었던 세포학적 이상 소견들로는 핵의 침부가 과도하게 평탄하거나 선단체가 핵으로부터 박리되고 후선단체 피막이 소실되는 선단체 형성부전 등과 함께 세포질이 감소하지 않고 남아 퇴행성 변화에 따른 내부 구조물들을

함유하고 있기도 하였다(그림 4, 5). 또한, 과립상의 미성숙 염색질을 나타내는 핵상(그림 6)과 비대칭적인 핵후공간(그림 7)등을 보이기도 하였다. 편모 중간부의 이상 소견은 잔존세포질로 둘러싸여 있거나 사립체 피막결합 및 축사 이상이었으며, 주부에서는 섬유성 피막의 이상, 종주(longitudinal columns)결합 및 축사이상을 관찰할 수 있었다.

2. 정상 대조군

정상 대조군에서의 세포 결합은 두부에서 $75.0 \pm 3.4\%$ (평균 \pm 표준편차), 중간부에서 $50.5 \pm 5\%$, 주부에서 $53.5 \pm 5\%$ 로써, 미세구조적 정상 정자는 대략 두부에서 25%, 중간부에서 50%, 주부에서 47% 내외로 관찰되었고, 복합 두부 이상의 백분율은 $52.5 \pm 1.9\%$ 이었다.

3. 수정 실패군

수정 실패군에서 세포 결합을 보인 정자의 백분율은 각각의 환자에서 표 3에서와 같이 관찰되어 이를 정상대조군과 비교하였다. 두부의 세포 이상은 96-100%에서 나타나 정상 대조군의 $75.0 \pm 3.4\%$ 에 비하여 모든 환자에서 유의하게 높은 발현 빈도를 보였고, 이는 유형별로 매 정자마다 다양한 소견을 나타내었는데 그 중에서 핵의 불규칙한 변형이 68-86% (정상 대조군, $47.0 \pm 6.3\%$), 선단체 결합이 86-96% (정상 대조군, $50.0 \pm 4.3\%$), 후선단체 피막 결합이 78-88% (정상 대조군, $44.5 \pm 7.2\%$), 3가지 이상의 복합 두부 결합이 80-86% (정상 대조군, $52.5 \pm 1.9\%$)로 특히 높은 발현율을 나타내었다. 그러나 미부인 중간부와 주부에서는 정상 대조군에 비해 유의한 차이를 관찰할 수 없었는데, 중간부에서의 세포 이상 발현율은 52-58% (정상 대조군, $50.5 \pm 5.0\%$), 그리고 주부에서는 54-62% (정상 대조군, $53.5 \pm 5.0\%$)이었다.

고 찰

Bartoov 등(1982)은 전자현미경으로 인간 정자를 관찰하여 생식력이 입증된 정상 정자라 하더라도 정상 두부의 점유율은 15% 정도로 적다고 주장하였고, Escalier와 Bisson (1980) 그리고 David와 Escalier(1986)도 정상 두부, 중간부, 및 주부의 점유율은 각각

25.7±7.6, 51.5±13.9, 31.4±12%에 불과하다고 보고하여 본 연구에서의 정상 대조군에 대한 미세 구조 검경 성적과 유사하였다. 즉 수정 능력이 있는 정자가 광학 현미경상 정상 형태로 보일지라도 전자 현미경으로 검사하면 미세 구조상 많은 비정상 세포를 발견할 수 있었다. 또한 Carlon등(1991)은 정자 두부의 미세 구조적 이상이 수정 실패와 배아 발달장애를 초래할 수 있다고 하였는데 저자의 조사에서도 정상 대조군보다 수정 실패군에서 훨씬 많은 비율의 세포내 미세구조 이상을 정자 두부에서 볼 수 있었다. 그러나 미부 편모인 중간부와 주부에서는 양 군간의 큰 차이는 발견할 수 없고 공히 거의 절반에 가까운 비정상 세포내 구조를 가지고 있었는데 이는 양군 모두에서 편모의 미세 구조적 이상이 정자의 수정능에는 별로 해로운 영향을 주지 않고 있는 것으로 보인다. 이와 같은 소견은 광학현미경으로는 보이지 않는 축사의 미세 구조적 주요 결합들이 정자의 수정능을 방해한다고 보고하고 있는 여러 문헌들(Jouannet et al., 1983; Escalier & David, 1984; Escalier & Serres, 1985; Zamboni, 1987; Carlon et al., 1991; Zamboni, 1991)과는 상반된 성적을 보인다. 정자 두부의 불규칙한 핵형, 핵 염색질내의 거대공포와 봉입체, 선단체 변형, 후선단체 부위의 결합, 또는 큰 잔존 세포질은 정자의 수정능력을 방해할 수 있다고 알려져 있는데(Bisson & David, 1975; Zamboni, 1987; Carlon et al., 1991; Zamboni, 1991), 본 연구에서도 매 정자마다 한두가지 만으로 특이하게 나타나지 않고 유형별로 다양한 소견을 보였으며, 그 중에서도 핵의 불규칙한 변형, 선단체 및 후선단체 피막 결합, 그리고 3가지 이상의 복합 두부 결합이 유의한 차이로 정상 대조군보다 수정 실패군에서 보다 더 높은 발현율을 보였다. 이러한 두부 세포내 이상이 수정을 방해하는 작용기전은 아직까지 명확히 밝혀지지는 않았지만 미세구조적 이상의 유형을 살펴보고 선단체 결합 및 두부 주위의 잔존 세포질등에 의한 정자의 난자 투명대 침투 불능 또는 핵의 염색질 이상등으로 인한 전핵형성부전으로 추정된다. 전술한 많은 연구들에도 불구하고, 비용이 많이 들고 표본제작에 오랜 시간과 노력이 드는 관계로 불임정자에 대한 전자현미경 검사가 현재 거의 사용되지 않고 있는 실정이지만, 최근 Nulsen등(1992)

이 보고한 두부의 미세구조 이상이 80% 이상씩 전자현미경상 확인된, 2예의 원인 불명성 체외수정 실패 불임여성에서 각각 비배우자 인공수정과 정자공여 체외수정으로 임신을 성공시킨 점 등을 감안하면, 모든 불임부부나 체외수정 대상환자에게 일반적으로 적용시킬 필요는 없지만 원인 불명성 체외수정 실패 또는 원인 불명성 불임으로 진단된 불임환자에게만 선택적으로 사용한다면, 두부의 심한 비정상 소견이 확인된 경우에 비배우자 인공수정이나 정자공여 체외수정등과 같은 정자공여 방향으로 치료방법을 바꿀 수 있어 불필요하고 소모성인 반복 치료를 피할 수 있게 되므로 정자의 전자현미경 검사는 매우 유용하고 필수적인 불임 검사로 정착되어 갈 것으로 추정된다.

결 론

전남대학교 병원에서 체외수정 시술 중 정상적인 과배란 유도 및 전배양 후 취득한 난자와 정자가 모두 질과 양적으로 정상 소견이었는데도 수정에 실패한 3예의 정자를 대상으로 전자현미경하에서 미세구조를 관찰하고 최근 2년안에 정상 생식능력이 확인된 4명의 정자와 비교 분석하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. 정상 대조군과 수정 실패군 공히 전 예에서 정자의 두부, 중간부, 및 주부에서 세포내 비정상 미세구조의 높은 점유율을 나타내었다.
2. 두부의 세포내 결합은 수정 실패군이 정상 대조군보다 모든 환자에서 유의하게 높은 백분율을 보였으나, 미부 편모인 중간부와 주부에서는 양 군간에 큰 차이를 발견할 수 없었다.
3. 두부의 세포 이상은 양 군에서 매 정자마다 다양한 소견을 관찰할 수 있었는데, 그 중에서 핵의 변형, 선단체 결합, 및 후선단체 피막 결합은 정상 대조군보다 수정 실패군에서 유의하게 높은 발현율을 보였다. 또한 3가지 이상의 복합 두부이상 백분율 역시 수정 실패군에서 높았다.
4. 정자의 전자현미경적 검사는 비용이 들고 표본 제작에 많은 시간이 소요되므로 모든 불임 남성에게 적용시킬 수는 없지만, 원인 불명성 체외수정실패 등에 선택적으로 사용하면 매우 유용한 불임 검사가 될 수 있을 것

으로 사료된다.

인 용 문 헌

- Baccetti B: The human spermatozoon. In Ultrastructure of Reproduction. J Van Blerkom, PM Motta(eds). Boston, Martinus Nijhoff, 1984. pp 100.
- Bartoov B, Eltes F, Langsam J, Snyder M, Fisher J: Ultrastructural studies in morphological assessment of human spermatozoa. *Int J Androl* 1982, Suppl 5, 18.
- Bisson JP, David G: Anomalies morphologiques du spermatozoïde humain. (2) Etude ultrastructurale. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 1975, 4(SI), 37.
- Carlou N, Navarro A, Pizant J: Etude ultrastructurale quantifiée du sperme dans 72 cas d'infécondité masculine. *Contracept Fertil Sex* 1991, 19, 985.
- David G, Bisson JP, Czyglik K, Jouannet P, Gernigon C: Anomalies morphologiques du spermatozoïde humain. (1) Propositions pour un système de classification. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 1975, 4(SI), 17.
- David G, Escalier D: Apport de la microscopie électronique à l'examen du sperme. In Techniques d'examen du sperme: stage de formation permanente. *Centre Hospitalier de Bicetre* 1986, pp 148.
- Escalier D: Human spermatozoa with large heads and multiple flagella: A quantitative ultrastructural study of 6 cases. *Biol Cell* 1983, 48, 65.
- Escalier D, Bisson JP: Quantitative ultrastructural modifications in human spermatozoa after freezing. In Human Artificial Insemination and Semen Preservation, G David. *WS Price(eds)* 1980, pp 107.
- Escalier D, David G: Pathology of cytoskeleton of the human sperm flagellum: Axonemal and peri-axonemal anomalies. *Biol Cell* 1984, 50, 37.
- Escalier D, Serres C: Aberrant distribution of the peri-axonemal structures in the human spermatozoon: Possible role of the axoneme in the spatial organization of the flagellar components. *Biol Cell* 1985, 53, 239.
- Fawcett DW: The mammalian spermatozoon. *Dev Biol* 1975, 44, 394.
- Jouannet P, Escalier D, Serres C, David G: Motility of human sperm without outer dynein arms. *J Submicrosc Cytol* 1983, 15, 67.
- 이여일, 임영경, 변지수: 인간난자의 체외수정 및 자궁내 배아 이식에 관한 연구: 호남지방 최초의 시험관아기 임신 및 분만. 전남대학교 논문집 1990, 35, 127.
- Luft JH: Improvement in epoxy resin embedding methods. *J Biophysiol Biochem Cytol* 1961, 9, 409.
- Nulsen JC, Metzger DA, Steinhoff MM: Sperm electron microscopy for the evaluation of in vitro fertilization failures. *J ARG* 1992, 9, 491.
- Reynolds ES: The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 1963, 17, 208.
- Serres C, Escalier D, David G: Ultrastructural morphometry of the human sperm flagellum with a stereological analysis of the lengths of the dense fibers. *Biol Cell* 1983, 49, 153.
- Serres C, Feneux D, Jouannet P: Abnormal distribution of the peri-axonemal structures in a human sperm flagellar dyskinesia. *Cell Motil Cytoskel* 1986, 6, 68.
- Von Bernhardt R, de Joannes AE, Blanco LP, Herrera E, Bustos-Obregon E, Vigil P: Round-headed spermatozoa: A model to study the role of acrosome in early events of gamete interaction. *Andrologia* 1990, 22, 12.
- Zamboni L: Physiology and pathophysiology of the human spermatozoon: The role of electron microscopy. *J Electron Microsc Tech* 1991, 17, 412.
- Zamboni L: The ultrastructural pathology of the spermatozoon as a cause of infertility: The role of electron microscopy in the evaluation of semen quality. *Fertil Steril* 1987, 48, 711.

Figure Legends

Fig. 1. Sagittal section through a normal spermatozoon head. The karyoplasm (K) is condensed—it contains a few oval light area, so-called vacuoles (V); the posterior nuclear space (S) is observed; the acrosome (A), in the form of a cap, covers two-thirds of the nucleus; the postacrosomal sheath (PA) is present. $\times 48,000$

Fig. 2. The axonemal complex (AC) as seen in normal flagella transversally sectioned at the level of the midpiece. The nine plus two system is surrounded by the nine outer dense fibers (DF) and the mitochondrial sheath (MS). $\times 56,000$

Fig. 3. The axonemal complex (AC) as seen in normal flagella transversally sectioned at the level of the principal piece. The axonemal complex is encompassed in the fibrous sheath (FS). $\times 102,000$

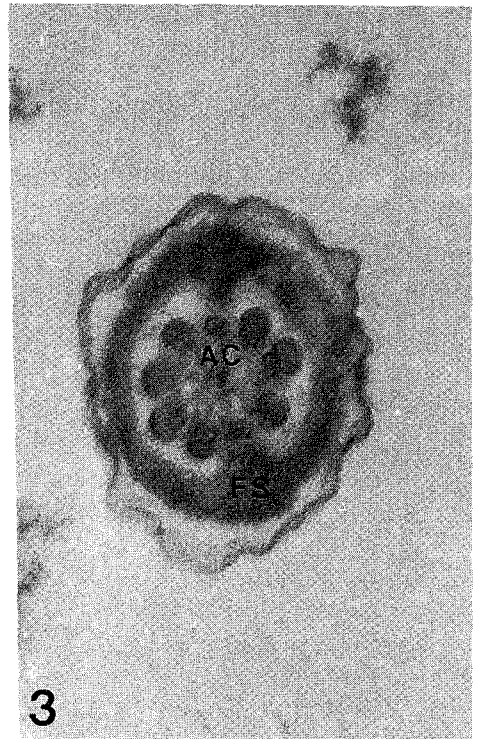
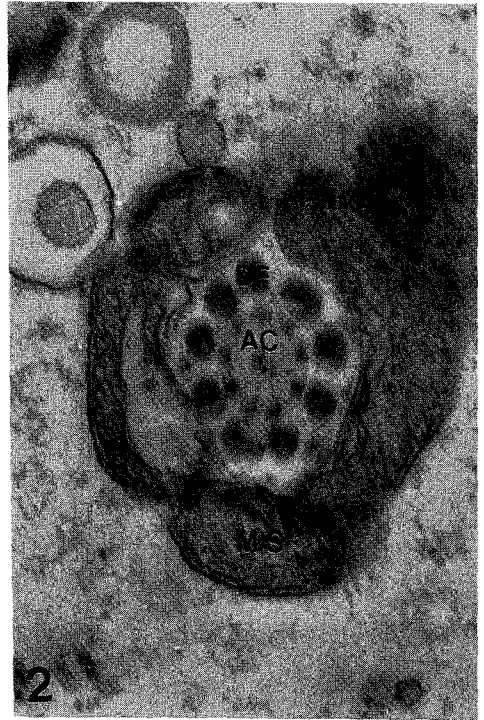
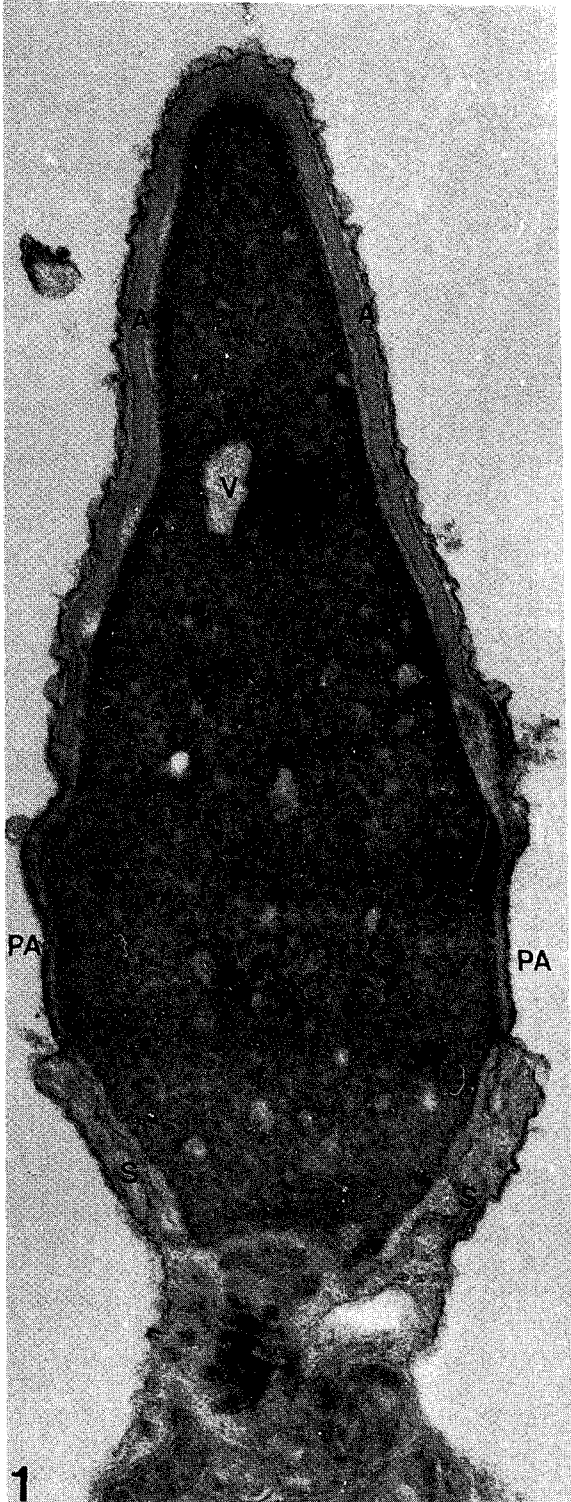
Fig. 4. The apical portion of the nucleus (N) is abnormally flattened and the hypoplastic acrosome (A) is detached from the underlying nucleus (arrow head). The unreduced cytoplasm (C) covering almost all spermatic head and a cytoplasmic intranuclear invagination (arrow) are shown; and the postacrosomal sheath is absent. $\times 23,000$

Fig. 5. The asymmetrically unreduced cytoplasm occupied with dilated vesicles (V) and granules and the acrosomal detachment (arrow head) are shown. The postacrosomal sheath is absent. $\times 33,000$

Fig. 6. The coarsely granular chromatin patterns as immaturity in the nucleus is noted. The unreduced cytoplasm covering spermatic head is shown and the postacrosomal sheath is absent. $\times 23,260$

Fig. 7. The posterior nuclear space (S) in the right side is present, but in the left is absent. The unreduced cytoplasm covering spermatic head is shown and the postacrosomal sheath is absent. $\times 23,200$

>사진 부도<



▷ 사진 부도 ◁

