발생과 생식 제 2 권 제 1 호, 63~68(1998)
Dev. Reprod. Vol. 2, No. 1, 63~68(1998)

동결보존액의 종류와 동결방법에 따른 해동 후 인간정자 운동성의 비교분석

전윤정[1] · 엄기붕[1,2] · 김현규[1] · 남윤성[1,2] · 고정재[1,2] · 윤태기[1,2] · 차광열[1,2]
차병원 여성의학연구소[1], 포천중문의과대학교[2]

Effect of Cryopreservation Medium and Freezing Method on Post-thaw Motility of Human Sperm : Comparison of Different Type of CASA

Yoon-Jung Jun[1], Ki-Boong Oum[1,2], Hyun-Kyoo Kim[1], Yoon-Sung Nam[1,2], Jung-Jae Ko[1,2], Tae-Ki Yoon[1,2], and Kwang-Yul Cha[1,2]

[1]Infertility Medical Center, Cha General Hospital, Seoul 135-081, Korea
[2]College of Medicine, Pochon Cha University, Pochon 487-800, Korea

요 약 : 본 연구에서는 보다 효율적인 동결보존법을 수립하기 위하여 현재 사용되는 동결보존액과 동결방법을 정자의 운동성 측면에서 비교해 보았다. 즉, 세 종류의 조성이 다른 동결보존액인 TYB, dithiothreitol을 첨가한 TYB+DTT, KSⅡ 등이 동결보존 전후에 있어 운동성에 미치는 영향을 조사하였으며, 또한 vapor freezing방법과 computerized freezer를 사용한 동결방법이 정자 운동성에 미치는 영향을 알아보았다. 정자의 분석은 현미경적 방법과 두 종류의 컴퓨터 정자 자동측정기인 SAIS와 Hamilton Thorn을 사용하여 동결 전 · 후의 정자 운동성과 VCL, VSL, VAP, ALH, LIN 등의 sub-motility 패턴을 측정하였다. 정액성상이 정상인 군에서 동결보존액을 비교한 실험결과는 TYB군과 TYB+DTT군, 그리고 KSⅡ군의 융해 후 운동성이 각각 28.3%, 23.0%, 34.8%로 KSⅡ군이 우수하였고, 동결방법을 비교한 실험에서는 vapor freezing군과 computerized freezing 군의 융해 후 정자 운동성이 각각 27.8%, 33.2%로 유의차는 없었다. 또한 무력정자증을 보인 정액군에서는 TYB군과 TYB+DTT군, 그리고 KSⅡ군에서 융해후 정자 운동성이 각각 13.6%, 10.0%, 18.5%로 역시 KSⅡ군이 우수하였으며, vapor freezing군과 computerized freezing군의 융해 후 정자 운동성은 12.8%, 12.9%로 유의차가 없었다. 이상의 결과로 보아 운동성이 정상인 정액군과 무력정자증을 보이는 정액군에서 KSⅡ를 사용해 동결하는 것이 TYB나 TYB+DTT를 사용하는 것보다 운동성 있는 정자를 회수하는데 더 효율적이며, 동결방법 측면에서는 vapor freezing 방법과 computerized freezing 방법 간에 큰 차이가 없음을 볼 수 있었다.

ABSTRACT : This study was done to find optimal cryopreservation medium and method to improve the post-thaw motility of human sperm. Thirty three semen samples were included in the study. Of these, nineteen samples showing normal semen profile were frozen using three cryoprotectants (TYB, TYB+DTT and KSⅡ) to compare post-thaw motility. Fourteen samples were frozen with vapor freezing and programmable freezing methods to compare post-thaw motility in correlation with freezing method. After 24 hrs of cryostorage, the vials were thawed and the post-thaw sperm motility was assessed by two kinds of computer-aided sperm analysis (CASA; SAIS and Hamilton Thorn). As a result, the post-thaw motility of the KSⅡ group was higher than the TYB or TYB+DTT group in normal semen (34.8%, 28.3% and 23.0%, respectively). In the asthenospermia group, a significantly higher post-thaw motility was observed in the KSⅡ (18.5%) compared to those of TYB or TYB+DTT group (13.6%, 10.0%, respectively). No difference was observed between vapor freezing group and computerized freezing group in normal semen (27.8%, 33.2%, respectively) and semen group showing asthenospermia (12.8%, 12.9%, respectively). In conclusion, our results indicate that KSⅡ medium is reliable for cryopreservation of human sperm and vapor freezing and programmable freezing were equally effective in terms of the recovery of motile spermatozoa.

Key words : Cryopreservation medium, Motility, Human sperm.

서 론

정자의 동결은 1776년 Spallanzani가 눈 (snow)을 이용하여 정자를 동결 보존한 뒤 활동성 있는 정자의 회수에 성공한 이후, Mantegazza 등 (1866)이 빙점하인 −17℃에서 동결한 정자의 생존을 확인함으로써 본격적인 정자의 동결보존이 가능하게 되었다 (Trina, 1980). 그 후 Polge 등 (1949)이 glycerol의 동해방지 효과를 발견함으로써 보다 효율적인 정자의 동결보존이 가능하게 되었으며, Ackerman 등 (1967)에

의해 glycerol-egg yolk-citrate가 효율적인 정자의 동결보존액으로 제시되었다. 이 보존액은 citrate와 glycerol을 완충물로 사용하는데, 최근에는 TES ($C_6H_{15}NO_6S$)와 Tris (hydroxymethyl amino methane, $C_4H_{11}NO_3$)를 사용한 zwitterion buffer (TEST buffer)를 첨가하여 정자의 동결보존에 사용하는 것이 일반적이다 (Jeyendran et al., 1984; Weidel et al., 1987).

동결방법의 측면에서 살펴보면 드라이 아이스 (−78℃)를 이용한 방법으로 동결, 융해한 정자를 이용하여 첫 임신에 성공한 (Bunge et al., 1953) 이후, 1963년에는 Sherman에 의해 nitrogen vapor 방법이 소개되었고 최근에는 computerized freezer를 이용한 동결방법이 개발되어 사용되고 있다.

본 연구에서는 조성이 다소 다른 세 가지의 정자동결보존액, 즉 TEST-yolk buffer (TYB), TYB에 dithiothreitol (DTT)를 첨가한 것 (TYB+DTT)과 KSⅡ buffer를 사용하여 동일한 정액을 세 부분으로 나누어 동결을 시도하였으며, 동결보존액이 정자의 동결보존에 있어서 운동성 등에 미치는 영향을 조사하였다. 이 세 가지 동결보존액에는 공통적으로 glycerol과 egg yolk가 들어가며 나머지 조성은 조금씩 다르다. TYB는 정액 성상이 정상인 정자의 동결에 가장 적당하다고 Weidel 등 (1986)이 보고한 바 있고, 이 보존액에 DTT를 첨가한 보존액은 정액 성상이 비정상인 정자의 동결에 효율적이라고 보고된 바 있다 (Sawetawan et al., 1993). 그리고 KSⅡ는 glycerol 외에 glycine, sucrose 등이 첨가된 보존액으로서 해동 후의 정자 생존율이 높다고 보고된 바 있다 (Kaneko et al., 1990). 본 연구에서는 또한 vapor freezing 방법과 computerized freezer를 사용하는 두 가지의 동결방법으로 정자를 동결하면서 동결보존액의 종류 와 더불어 동결방법이 정자운동성 등에 미치는 영향도 검토하였다. 정자운동성의 검사는 현미경적 검사와 Hamilton Thorn사 (미국)와 SAIS사 (한국)에서 생산된 두 가지 종류의 컴퓨터정자자동측정기 (computer-aided sperm analysis : CASA)를 사용하여 비교 분석함으로서 정확도를 높였다.

재료 및 방법

1. 대상 정액

본 연구은 세계보건기구 (WHO)의 기준에 의하여, 정액양 2.0 ml 이상, 정자수 20×10^6/ml 이상, 운동성 50% 이상의 정상적인 정액분석 결과를 보이는 19명의 환자의 정액과 정액양, 정자수는 정상이며 운동성이 50% 미만인 무력정자증 (asthenospermia)을 보이는 14명의 환자로부터 정액을 채취하여 시행하였다.

2. 동결보존액

TYB, TYB+DTT, KSⅡ 등 세 종류의 동결보존액을 사용하였으며, 제조 방법은 아래와 같다.

1) TYB

Milli-Q (Millipore Co. , USA)장치에서 준비한 물 825 ml에 TES 33.8 g, Tris 8.1 g, sodium citrate 4.45 g를 혼합한 용액에 egg yolk 175 ml을 혼합한다. 그리고 혼합액을 10,000 g로 60분 동안 원심분리하여 침전물을 제거하고 상층액만을 0.22 ㎛ 필터로 여과하여 제균한 뒤 glycerol 120 ml (12%, V/V)를 첨가한다.

2) TYB+DTT

1)항의 TYB에 10 mM dithiothreitol을 첨가한다.

3) KSⅡ

Milli-Q장치에서 준비한 물 1 L에 NaCl 5.8 g, KCl 0.4 g, $MgSO_4$ 0.098 g, calcium lactate 0.76 g, NaH_3PO_4 0.05 g, $NaHCO_3$ 2.6 g, Tris 2.4 g, Sucrose 17.8 g, Glycine 10.0 g, Pluronic F-68 1.0 g를 첨가한 용액에 egg yolk 250 ml을 혼합한다. 원심분리와 제균의 과정은 TYB 제조 때와 동일하며 glycerol은 150 ml (15%, V/V)을 첨가한다.

3. 동결 및 융해방법

정자동결시에는 동결보존액과 정액을 1 : 1의 비율로 보존액을 약 5 분간에 걸쳐 한 방울씩 섞은 뒤, vial에 분주하였다. Vapor freezing의 경우, 동결보존액과 정액이 들어있는 vial을 LN_2 표면 위 15 cm에서 약 50 분간 방치한 뒤 액체질소에 직접 넣는 Mahadevan 등 (1983)의 방법을 따라 실시하였다. Computerized freezer (Cryo10 seriesⅡ, Planer Biomed Co., USA)를 사용하는 경우에는 실온부터 −4℃까지는 분당 −0.5℃씩 하강시키고 −4℃부터 −90℃까지는 분당 −10℃씩 하강시킨 다음 액체질소에 넣어 보존하였다. 동결보존된 정액의 융해 시에는 동결방법에 관계없이 동결한 후 24 시간이 지난 후에 vial을 꺼내서 37~39℃의 온수에서 얼음결정이 사라질 때까지 vial을 흔들면서 융해시켰다.

4. 정자운동성 분석

정자운동성의 측정은 동결 전과 융해 후에 실시하였다. 동일한 정액표본을 현미경적 방법으로 두 사람의 생물학자

(biologist)가 Markler chamber를 이용하여 육안으로 검경하여 평균치를 내었고, CASA를 사용하는 경우에는, SAIS (Sais351, Medical Supply Co., Korea; 이하 SAIS로 약함.)와 Hamilton Thorn (HTM-IVOS Version10.6, Hamilton thorn research Co., USA; 이하 HTM으로 약함.)의 두 가지 기계를 사용하여 동일한 표본을 대상으로 동결 전후의 정자 운동성과 VCL (curvilinear velocity), VSL (straight-line velocity), VAP (velocity of average path), ALH (lateral head amplitude), LIN (linearity)등의 sub-motility 패턴을 측정하였다.

5. 결과의 유의성 검정

본 연구의 결과는 student's T-test와 ANOVA로 유의성을 검정하였다.

결 과

본 연구에 사용된 총 33개의 검체를 살펴보면, 동결 전의 정액 소견은 정상 정액군의 검체 수는 19개로서 정자수는 평균 72.0×10^6/ml이고 운동성은 65.4%이었고, 무력정자증을 보이는 정액군의 검체 수는 14개로 평균 정자수는 87.7×10^6/ml, 운동성은 36.5%이었다.

동결보존액에 따른 융해 후의 운동성을 보면 각 군간에서 현저한 차이가 나타났는데, 정상 정액군에서는 (Table 1) TYB군과 TYB+DTT군의 융해 후 운동성이 각각 28.3%, 23.0%이고 KSII군은 34.8%로서 다른 두 군에 비해 KSII로 동결한 군의 융해 후 운동성이 유의하게 높았다. 무력정자증을 보이는 정액군에서는 (Table 3) TYB로 동결한 군의 융해 후 운동성이 13.6%, TYB+DTT군은 10.0%, KSII군이 18.5%로 정상정액군에서와 마찬가지로 KSII를 사용하였을 때 높은 정자운동성이 관찰되었다. 또한 VCL, VSL, VAP, ALH, LIN 등의 운동성 패턴의 비교에서도 TYB군과 TYB+DTT군에 비해 KSII군에서 다소 높은 성적을 보이기는 하나 유의할 수준의 큰 차이를 보이지는 않았다 (Table 2, 4).

Table 1. Effect of different cryoprotective media on motility using vapor method with human semen : normal semen (n=10)

	Motility (%, ±SD[1])			
	Biologist	SAIS[2]	HTM[3]	Mean
Fresh	66.9±13.5	67.3±12.9	69.8±13.5	68.0±12.9
After thawing				
TYB	27.5±10.5	28.8±11.3	28.8±13.2	28.3±11.3[a]
TYB+DTT	23.1±13.5	23.5±13.7	22.5±13.1	23.0±13.0[b]
KS II	34.7±12.7	35.5±12.7	34.3±13.7	34.8±12.6[c]

[1] standard deviation
[2] SAIS (Sais351, Medical Supply Co., Korea)
[3] Hamilton Thorn Motility Analyzer (HTM-IVOS Version 10.6, Hamilton Thorn Research Co., USA)
[ab, bc] $P<0.0001$, [ac] $P<0.001$

동결방법에 따른 동결 전, 후의 운동성을 살펴보면 정상정액군에서 vapor freezing 방법을 사용하였을 때의 융해 후 운동성이 27.8%, computerized freezer를 사용한 군이 33.2%로서 computerized freezer를 사용하였을 때 다소 높은 융해 후 운동성이 관찰되었으나 통계적 유의차는 없었다 (Table 5). 무력정자증을 보이는 정액군에서는 두 군간에 융해 후 운동성이 거의 차이가 없었다 (Table 6).

두 가지 다른 CASA로 측정함에 있어서 기본적인 운동성과 정자수에 있어서는 biologist, SAIS, HTM의 측정치가 거의 유사하게 나타났다 (Table 1, 3, 5, 6). Sub-motility의 경향을 보면 (Table 2, 4), HTM의 측정치가 높은 것이 있는 반면, SAIS의 측정치가 높은 경우도 관찰되었다. 또한 동결 전에 비해 융해 후에 운동성은 감소하는 반면에 sub-motility의 측정치간에서는 큰 차이가 관찰되지 않았다.

고 찰

정자의 동결보존은 시간적인 제약이나 공간적인 제약을 극복하여 필요한 시기에 인공수정이나 체외수정을 시킬 수 있는 장점을 가지고 있으며, 또한 피임의 목적으로 정관결찰술 (vasectomy)을 하려는 환자나 질병의 치료를 목적으로 방사선치료 및 화학치료를 받게되는 남성환자의 정액을 시술이나 치료 전에 미리 동결보존함으로써 차후에 임신을 가능하게 할 수 있는 유용한 방법이다.

세포가 동결되는 기본원리를 살펴보면, 세포는 빙점온도에서 세포막 밖에서 먼저 빙결정이 형성되며 이로 인한 삼투압 차에 의해 세포 내에 탈수현상이 일어나고 세포는 수분이 빠져나간 채로 동결되며 따라서 세포 내에 생기는 빙결정으로 인한 해를 막을 수 있다 (Mazur, 1977). 하지만 빙점온도에서 빙결정이 형성될 때 교질물질로부터 수분과 전해질이 분리되어 장해를 유발하며 탈수현상으로 인한 세포막에 손상이 가게 되는데 (Farrent, 1965) 이러한 냉해를 최소한 줄이기 위해 동해방지제를 첨가하게 된다. 동해방지제로는 glycerol, DMSO (dimethyl sulfoxide), PROH (1, 2 propanediol)등이 사용되며, 이 중 정자의 동결에 있어서 가장 효율적인 동해방지제는 glycerol로 알려져 있다 (Polge et al., 1949). Glycerol은 동결보존액 빙점온도를 낮춰 주며 전해질의 농도를 줄여 주고 온도의 변화나 pH를 유지시킴으로써

Table 2. Effect of different cryoprotective media on sub-motility using vapor method with human semen : normal semen (n=10)

	Machine	VCL (μm/s, ±SD[1])	VAP (μm/s, ±SD)	VSL (μm/s, ±SD)	ALH (μm, ±SD)	LIN (%, ±SD)
Fresh						
	SAIS[2]	63.5± 7.6	48.0±5.0	37.3±4.4	4.3±0.6	59.1±3.1
	HTM[3]	84.2±12.2	60.7±8.4	51.0±7.4	3.6±0.4	61.4±3.2
After thawing						
TYB	SAIS	53.1± 5.9	35.7±3.5	25.8±3.9	2.6±0.5	50.6±7.3
	HTM	59.6± 8.4	40.6±5.2	34.3±4.7	2.9±0.5	58.6±6.6
TYB+DTT	SAIS	58.3± 5.5	45.4±5.5	28.9±4.8	2.4±0.5	51.3±8.2
	HTM	58.8± 8.4	40.2±8.4	34.3±5.1	3.1±0.7	59.0±4.6
KS Ⅱ	SAIS	60.9± 7.2	43.7±4.3	30.4±3.5	3.3±0.4	51.5±7.1
	HTM	72.8± 7.0	49.7±4.7	41.7±4.8	3.5±0.6	58.9±4.7

[1] standard deviation
[2] SAIS(Sais351, Medical Supply Co., Korea)
[3] Hamilton Thorn Motility Analyzer(HTM-IVOS Version 10.6, Hamilton Thorn Research Co., USA)

Table 3. Effect of different cryoprotective media on sperm motility using vapor method with human semen : abnormal semen (n=7)

	Motility(%, ±SD[1])			
	Biologist	SAIS[2]	HTM[3]	Mean
Fresh	40.4±5.2	40.2±5.5	40.9±6.0	40.5±5.3
After thawing				
TYB	13.0±8.2	13.9±8.6	13.7±7.6	13.6±7.7[a]
TYB+DTT	9.6±5.7	10.4±5.1	9.9±5.1	10.0±5.0[b]
KS Ⅱ	18.4±7.5	18.9±6.9	18.3±8.7	18.5±7.3[c]

[1] standard deviation
[2] SAIS(Sais351, Medical Supply Co., Korea)
[3] Hamilton Thorn Motility Analyzer(HTM-IVOS Version 10.6, Hamilton Thorn Research Co., USA)
[ab] NS, [ac] $P<0.01$, [bc] $P<0.001$

Table 5. Effect of different sperm freezing methods on sperm motility using KS Ⅱ medium with human semen : normal semen (n=9)

	Motility(%, ±SD[1])			
	Biologist	SAIS[2]	HTM[3]	Mean
Fresh	63.4±8.2	61.9±7.4	62.2± 9.9	62.5±8.3
After thawing				
Vapor	27.7±7.7	28.6±7.4	27.2± 8.9	27.8±7.7[a]
Automatic freezer	32.9±9.1	33.6±9.3	33.1±10.3	33.2±9.2[b]

[1] standard deviation
[2] SAIS(Sais351, Medical Supply Co. , Korea)
[3] Hamilton Thorn Motility Analyzer(HTM-IVOS Version 10.6, Hamilton Thorn Research Co., USA)
[ab] NS

Table 4. Effect of different cryoprotective media on sperm motility using vapor method with human semen : abnormal semen (n=7)

	Machine	VCL (μm/s, ±SD[1])	VAP (μm/s, ±SD)	VSL (μm/s, ±SD)	ALH (μm, ±SD)	LIN (%, ±SD)
Fresh						
	SAIS[2]	53.3± 4.8	43.3± 3.7	32.0±3.8	3.1±0.2	60.1± 3.1
	HTM[3]	66.7± 6.6	49.6± 3.7	41.8±7.3	3.1±0.4	60.9± 5.8
After thawing						
TYB	SAIS	53.1± 7.4	40.5± 8.0	20.2±6.3	1.9±0.2	38.8± 9.4
	HTM	46.5± 8.0	33.4± 7.3	27.7±8.3	2.8±0.5	58.7± 7.8
TYB+DTT	SAIS	55.5±10.7	50.3±10.8	22.4±6.6	1.8±0.2	44.0±11.3
	HTM	48.7± 4.5	33.9± 3.7	26.4±3.7	2.2±0.4	57.1± 5.6
KS Ⅱ	SAIS	59.7± 8.4	45.1± 5.8	25.7±4.4	2.2±0.4	45.5± 7.1
	HTM	49.8± 7.3	36.7± 6.4	30.5±5.8	2.0±0.3	61.7± 3.4

[1] standard deviation
[2] SAIS(Sais351, Medical Supply Co., Korea)
[3] Hamilton Thorn Motility Analyzer(HTM-IVOS Version 10.6, Hamilton Thorn Research Co., USA)

Table 6. Effect of different sperm freezing methods on sperm motility using KSⅡ medium with human semen : abnormal semen (n=7)

	Motility(%, ±SD[1])			
	Biologist	SAIS[2]	HTM[3]	Mean
Fresh	32.7±8.8	32.2±8.9	32.4±8.9	32.4±8.4
After thawing				
Vapor	12.8±6.8	13.3±6.8	12.5±7.4	12.8±6.7[a]
Automatic freezer	12.6±5.0	13.7±5.4	12.6±5.7	12.9±5.1[b]

[1] standard deviation
[2] SAIS (Sais351, Medical Supply Co., Korea)
[3] Hamilton Thorn Motility Analyzer (HTM-IVOS Version 10.6, Hamilton Thorn Research Co., USA)
[ab] NS

냉해를 방지하는 효과를 유발한다고 추측되고 있으며 (Polge et al., 1954), 현재 사람과 가축의 정자동결보존을 위하여 보편적으로 사용되고 있다. DMSO는 쥐나 인간의 배아를 동결하는데 있어서는 glycerol보다 더 우수하지만 정자에 대해 독성을 가지고 있기 때문에 정자의 동결에는 적절치 못하며 (Sherman, 1964), 실제로 DMSO와 glycerol로 정자를 동결, 융해한 후 sperm penetration assay를 통하여 비교해 본 결과 glycerol에 비해 DMSO에서 성적이 좋지 않고 또한 정자두부가 손상되는 비율도 더 높은 것으로 밝혀졌다 (Serafini et al., 1986). 한편 PROH는 정자의 동결보다는 초기단계의 배아나 난자의 동결보존에 많이 사용되고 있다 (Friedler et al., 1988). 물론 동결보존액에는 glycerol외에 여러 가지 물질들이 첨가되는데 완충액으로 citrate, HEPES, zwitterion buffer 등이 쓰이며 이러한 물질은 pH유지나 양분 제공, 삼투압에 의한 충격을 완화시켜 주는 역할을 하며, 첨가되는 물질에 따라 다양한 동결보존액이 현재 개발되어 있다.

Mahadevan 등 (1983)은 human sperm preservation medium (HSPM)과 egg-yolk citrate medium (ECM)을 비교하여 동결융해 후 정자의 운동성이나 활동성은 차이가 없으나 HSPM으로 동결했던 정자로 수정한 환자에 있어서 임신율이 더 높았다고 보고하였고, Weidel 등 (1986)은 TYB가 HSPM이나 ECM에 비해 정자가 더 오래 생존할 수 있다고 보고한 바 있다. 또한 Centrola 등 (1992)은 HSPM이 TYB보다 동결 후 운동성 회수에 있어 우수하다고 보고하는 등 이상적인 동결보존액의 선정은 쉽지 않다고 할 수 있다.

본 연구에서는 TYB와 HSPM을 비교한 예비실험 결과 TYB가 동결, 융해 후 정자의 운동성 회복에 우수하여 HSPM을 사용하지 않았으며 서로 다른 동결보존액인 TYB, TYB+DTT, KSⅡ를 비교하였다. 해동 후의 정자운동성 등에 있어서는 KSⅡ가 우수하였는데 이는 아마도 Pluronic F-68의 역할에 기인하는 것으로 추측된다. Pluronic F-68은 곤충의 배양 등에 쓰이는 인공지질인데 아마도 이것이 정자표면의 막을 보호하는 강한 효과가 있고 결과적으로 동결, 융해 후의 정자운동성을 높여주는 것이 아닌가 사료된다.

TYB에 포함된 DTT는 수황기 (sulfhydryl group)의 산화를 막아주는 환원제이다. Rao와 David (1984) 는 DTT를 첨가한 동결보존액으로 정자를 동결한 결과, 융해 후 운동성이 현저히 증가했다고 보고하였는데, DTT의 보호제로서의 역할은 유리기를 없애주고 지질 과산화 (lipid peroxidation)를 방지하며 세포막 단백질과 효소간에 disulfide bond가 파괴되는 것을 막아주는 것으로 생각된다. Sawetawan 등 (1993)은 정액성상이 좋지 않은 정자군에서 DTT의 좋은 효과를 볼 수 있었다고 보고하였지만, 본 실험의 결과에서는 운동성이 정상인 정액 뿐 아니라 운동성이 50% 미만인 정액군에서도 DTT가 포함된 동결보존액으로 동결했을 때 다른 종류의 보존액에 비해 융해 후 운동성이 낮음이 관찰되었다.

동결방법의 측면에서 살펴보면 Serafini 등 (1986)은 computerized freezing이 manual (vapor freezing)에 비해 간편하며 정자의 수정능력을 유지시키는 면에서도 추천할 만하다고 보고하였으나, 동결되는 정액의 성상이 정상적일 때는 vapor나 computerized freezing 방법간에 차이가 없다는 보고도 있다 (Verheyen et al., 1993). 본 연구의 결과에서는 정액 성상이 정상일 때 두 동결방법 간에 융해 후 정자 운동성에 있어서 큰 차이가 없었던 점은 Verheyen 등의 실험 결과와 일치했으며 무력정자증을 보이는 정액군에서도 두 방법에 따른 융해 후 정자운동성은 차이가 전혀 없었다. 한편 computerized freezing 방법은 vapor freezing 방법에 비해 시간이 많이 걸리고 비용면에서도 부담이 크다는 단점을 감안한다면 정자를 동결하는데는 vapor freezing 방법이 더 효율적이라 사료된다.

두 가지 다른 CASA로 정자의 운동성을 측정함에 있어서 기본적인 운동성과 정자수에 있어서는 biologist, SAIS, HTM의 측정치가 거의 유사하게 나타났고, Sub-motility의 경향을 보면 HTM의 측정치가 높은 것이 있는 반면, SAIS의 측정치가 높은 경우도 관찰되었다. 이는 표본의 수나 성상은 여러 가지 상황에 따라 조금씩 달라질 수 있다고 사료되나 육안적인 검사로는 측정할 수 없는 수치이므로 어느 쪽의 측정치가 정확한지는 판단하기 어려웠다. 다만 두 기종의 정자의 이동거리측정방법의 차이에 원인이 있지 않은가 하는 추측을 하고 있다. 또한 운동성이 차이가 나는 반면에 sub-mo-

tility는 큰 차이가 나지 않았다. 이는 정자가 생존하여 살아서 움직이기만 하면 동결보존액의 종류에 관계없이 큰 차이가 없는 운동성 패턴을 보인다고 생각된다.

본 연구의 결과, 정자를 동결, 융해한 후 운동성 있는 정자의 회수율을 좀더 높이기 위한 동결보존액으로 KSII를 사용하는 것이 좋으며, 정자동결방법으로는 computerized freezing방법이나 vapor freezing방법에서 큰 차이가 관찰되지 않았고, 정자측정시 사용된 Hamilton Thorn사 (미국)와 SAIS사 (한국)의 컴퓨터정자자동측정기는 비슷한 성능을 가진 것으로 사료된다.

인용문헌

Ackerman DR, Behrman SJ (1967) The freezing preservation of human sperm. Yale Sci Mag 16:6.

Bunge RG, Sherman JK (1953) Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. Nature 172:767-768.

Centola GM, Raubertas RF, Mattox JH (1992) Cryopreservation of human semen. Comparison of cryopreservatives, sources of variability and prediction of post-thaw survival. J Androl 13:283-288.

Farrant J (1965) Mechanism of cell damage during freezing and thawing and its prevention. Nature 205:1284-1290.

Friedler S, Giudice LC, Lamb EJ (1988) Cryopreservation of embryo and ova. Fertil Steril 49:743-764.

Jeyendran RS, van der Ven HH, Kennedy W, Perez-Pelaez M, Zaneveld LJD (1984) Comparison of glycerol and a zwitterion buffer system as cryoprotective media for human spermatozoa. J Androl 5:1-7.

Kaneko S, Kobayashi T, Lee HK, Won WK, Oda T, Izumi Y, Ohono T, Iizuka R (1990) Cryogenic preservation of low-quality human semen. Arch Androl 24:81-86.

Mahadevan M, Trouson AO, Leeton JF (1983) Successful use of human semen cryobanking for *in vitro* fertilization. Fertil Steril 40:340-343.

Mahadevan M, Trouson AO (1983) Effect of cryoprotective media and dilution methods on the preservation of human spermatozoa. Andrologia 15:355-366.

Mazur P (1977) The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. Cryobiology 14:251-272.

Polge C, Smith AU, Parkes AS (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature 164:666-676.

Polge C, Lovelock JE (1954) The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. Biochem J 58:618-622.

Rao B, David G (1984) Improved recovery of post-thaw motility and vitality of human spermatozoa cryopreserved in the presence of dithiothretol. Cryobiology 21:536-541.

Sawetawan C, Bruns ES, Prins GS (1993) Improvement of post-thaw sperm motility in poor quality human semen. Fertil Steril 60:706-712.

Serafini P, Hauser D, Moyer D. Marrs RP (1986) Cryopreservation of human spermatozoa; correlation of ultrastructural sperm head configuration with sperm motility and ability to penetrate zona-free hamster ova. Fertil Steril 46:691-695.

Sherman JK (1963) Improved methods of preservation of human spermatozoa by freezing and freeze-drying. Fertil Steril 14:49-64.

Sherman JK (1964) Dimethyl sulfoxide as a protective agent during freezing and thawing of human spermatozoa. Proc Soc Exp Biol Med 117:261-264.

Trina V (1980) Artificial insemination and semen banks in Italy. In: David G, Price W (eds.), Human Artificial Insemination and Semen Preservation. Plenum, New York, p51.

Verheyen G, Pletincx I, Van Steirteghem A (1993) Effect of freezing method, thawing temperature and post-thaw dilution/washing on motility (CASA) and morphology characteristics of high-quality human sperm. Hum Reprod 8:1678-1684.

Weidel L, Prins GS (1986) A comparative study of buffer systems as cryoprotectants for human spermatozoa. Fertil Steril 46:147-149.

Weidel L, Prins GS (1987) Cryosurvival of human spermatozoa frozen in eight different buffer systems. J Androl 8:41-47.

WHO (1992) Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge, England. pp3-21.