

Cysteine 및 Glutathione이 사람정자의 운동성지수와 정자형태에 미치는 영향

윤정임 · 한만희 · 전은숙* · 허영문* · 이종인* · 이규승[†]
충남대학교 축산학과

Effect of Cysteine and Glutathione on Motility Index and Morphology in Human Spermatozoa

J. I. Yun, M. H. Han, E. S. Jeon*, Y. M. Hur*, J. I. Lee* and K. S. Lee[†]

Dept. of Animal Science, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Republic of Korea

SUMMARY

This experiment was conducted to investigate the effect of the cysteine and glutathione on the motility index and morphology of human spermatozoa at the sperm processing *in vitro*. After treating the sperm with medium containing cysteine and glutathione, we measured the motility index and morphology at 0.5 h and 24 h.

1. Following the sperm culture for 0.5 h after treating the sperm with the medium containing 0, 1, 5, 10 mM cysteine, curvilinear velocity (VCL) was significantly ($p < 0.05$) higher in control than that in all treatments. And straight-line velocity (VSL) was high at 1 mM and average path velocity (VAP) was low at 5 mM and 10 mM. But the motility (MOT) and morphology (NOM) were not different between control and all treatments. Following the sperm culture for 24 h, the MOT was significantly high in treatment groups (58.9, 74.4 and 62.3%), compared with that in control (28.7%) and the VCL was also high in treatment groups (31.4, 37.9, and 34.0 $\mu\text{m/s}$), compared with that in control (21.3 $\mu\text{m/s}$). The VSL (18.4, 21.7, and 18.9 $\mu\text{m/s}$) was significantly higher than control (10.7 $\mu\text{m/s}$) and the VAP (20.3, 24.7, and 21.4 $\mu\text{m/s}$) in treatments was also compared with that in control (12.6 $\mu\text{m/s}$). The NOM was not difference between control and treatments.
2. Following the sperm culture for 0.5 after treating the sperm with the medium containing 0, 1, 5, 10 mM glutathione, the MOT, VCL, VSL, VAP, and NOM were not different between control and treatments. Following the sperm culture for 24 h, the MOT was higher in treatment groups (82.9, 83.6, 83.4%) than in control (51.1%) and the VCL was higher in treatment groups (50.9, 51.3, and 49.4 $\mu\text{m/s}$) than control (34.1 $\mu\text{m/s}$). The VSL was also higher in treatment (17.1 $\mu\text{m/s}$) and the VAP was also higher in treatment groups (30.1, 32.5, and 29.7 $\mu\text{m/s}$) than in control (19.8 $\mu\text{m/s}$). The NOM was not different between control and treatments.

(Key words : cysteine, glutathione, antioxidants, motility, human sperm)

*신아산부인과 불임클리닉 (Shin-a Obstetrics & Gynecology, Taejeon)

[†]Correspondence

서 론

최근 활성산소(reactive oxygen species, ROS)가 정자기능에 중요한 영향을 미치며, 비정상적 활성산소발생은 지방과산화는 정자의 원형질막 기능을 변화시키고 정자의 형태변화, 운동성 및 수정능력 등의 저하를 초래하여 남성불임을 유발하는 한 요인으로 보고되고 있다(Cummins 등, 1994; Aitken, 1995; Zalata 등, 1995; Mammoto 등, 1996; Parinaud 등, 1997).

활성산소란 산소라디칼(oxygen free radical) 및 이것으로부터 파생된 여러가지 산소화합물을 총칭하는 것으로 H_2O_2 , OH^- , O_2^- , lipid peroxide 및 NO 등이 있으며, 세포의 대사과정에서 생산되는 독성이 강한 부산물이다(Fred 등, Fredovich, 1989). 산소는 활성화 과정에서 비유리기 산소와 유리기 산소로 변화되고, 비유리기 산소는 호기성 세포에서 미토콘드리아(mitochondria) 전자전달계의 최종 전자 수용체로 작용하므로 세포의 생존에 매우 유용한 반면, 유리기 산소는 산소가 불완전하게 환원되어 O_2^- 나 OH^- 와 같은 유리기로 전환되면 반응성이 매우 강하여(Fredovich, 1989; Fred 등, 1989; Borg와 Sehaunch, 1989; Miquel, 1989; Proctor, 1989; Halliwall과 Gutteridge, 1990) 지질, 단백질, 핵산 등의 구조적 손상을 일으키며, 정자에 있어서는 원형질막의 지방과산화(lipid peroxidation)를 초래하여 정자의 운동성, 수정능 획득 및 침체반응 등을 억제시키며, 또한 수정시 원형질막에 결합하는 sulfhydryl기를 갖는 단백질을 감소시킴으로써 결합 자체를 방해한다고 보고되고 있다(Mammoto 등, 1996; Cummins 등, 1994).

체외(*in vitro*)에서 정자를 처리할 경우 활성산소의 발생은 사정시 백혈구의 오염(Zalata 등, 1995; Parinaud 등, 1997) 및 정자처리시 반복되는 원심분리와 재부유에 의해 20~40배까지 반응성 산소라디칼의 농도수준이 높아진다고 보고되고 있으며(Warren 등, 1987), 또한 정자처리과정에서 정장제거는 활성산소에 대한 정장의 방어기구체계(scavenging system)자체를 파괴함으로써 정자에 좋지 않은 영향을 미칠 수 있음을 보고하였다. Warren

등(1987)은 체외에서 정자처리시 이용되는 원심분리는 활성산소를 발생시켜 정자에 해로운 영향을 미친다고 보고하였으며, Parinaud 등(1997)은 항산화제(antioxidants)를 포함한 배양액을 사용함으로써 원심분리에 의해 발생하는 해로운 영향을 감소시킬 수 있었다고 보고하였다.

따라서 본 연구는 체외에서의 정자처리과정에서 Ham's F-10에 황화합물(thiol compounds)의 일종인 cysteine, taurine 및 glutathione을 첨가함으로써 정자의 운동성지수(motility index)와 정자형태(normal morphology)에 미치는 영향을 규명하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 정자의 준비

가임 능력이 있는 정자 공여자로부터 3일간의 금욕기간을 거친 후 수음법에 의해 정자를 제공받아 실험에 공시하였으며, 이들의 정액검사 소견은 WHO(world health organization)기준의 정상 범위에 해당하였다(Table 1).

2. 정자의 운동성 분석

정자의 운동성지수 및 정상 정자형태는 정자자동분석기(sperm analysis imaging system, SAIS, Korea)를 이용하여 측정하였으며, 추적된 경로에 따라 이동한 거리를 경과한 시간으로 나누어준 값인 곡선속도(curvilinear velocity, VCL), 추적된 경로의 처음 위치와 마지막 위치 사이의 직선거리를 전체 경과시간으로 나누어준 값인 선형속도(straight-line velocity, VSL) 및 추적된 경로를 평균한 경로(average path)를 따라 이동한 전체 거리를 경과시간으로 나누어준 값인 평균속도(average path velocity, VAP) 등의 운동성지수(motility index)를 측정하였다. 실험은 총 3반복 실시하였으며, 반복당 reading은 3회 하였다.

3. 정자의 처리

정자의 처리는 Parinaud (1997)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 채취된 정액은 기본배양액인 Ham's F-10에 실험목적에 맞게 각각의 황화합물

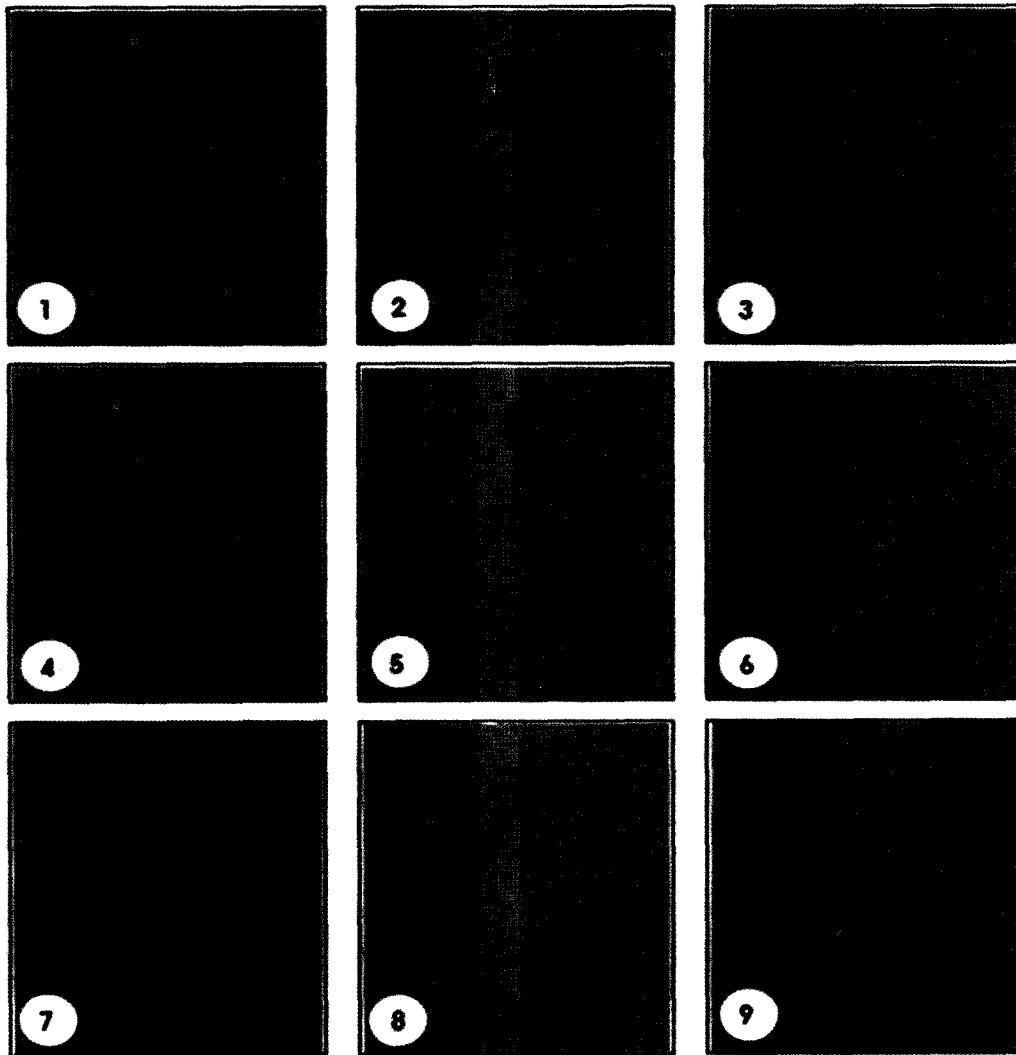


Fig. 1. Photomicrographs of morphologically normal and abnormal human spermatozoa taken from Diff-Quik stained preparations ($\times 1,000$). 1, 2, 3=normal form; 4=macrocephalic or large head; 5=tapering forms; 6=cytoplasmic droplet; 7=abnormal midpiece; 8=double or duplicate tail; 9=terminal droplet on the tail.

(thiol compounds)을 첨가한 후, 희석하여 5% CO₂, 포화습도 및 37°C의 온도 조건하의 탄산가스 배양기(Cellstar, USA)에서 30분 동안 액화한 후, 300×g에서 30분간 원심분리하였다. 원심분리한 후 pellet만 남기고 상층액은 제거한 다음, 그 위에 10% 사람난포액(human follicular fluid, hFF)이 포함된 기본배양액을 천천히 첨가하여 30분간 재부유하였다. 재부유된 정자는 농도가 $30 \times 10^6/\text{ml}$ 이 되도록 보정하여 4-well dish(Nunclon, Denmark)에

0.5 ml 씩 분주하여 탄산가스 배양기에 0.5 시간과 24 시간 배양한 후 정자의 운동성지수 및 정상 정자형태를 측정하였다.

4. 정자의 염색

정자형태를 측정하기 위하여 Mortimer (1985)의 Diff-Quik 염색방법을 이용하여 염색을 실시하였다. 염색은 먼저 제작된 슬라이드를 고정액(Diff-Quik Fixative, Kukje, Japan)에 15초 동안 침지 고

Table 1. Effect of cysteine on the motility index and normal morphology of human sperm after 0.5 and 24 hour incubation*

Cysteine concentration (mM)	MOT(%) ¹		VCL(um/s) ²		VSL(um/s) ³		VAP(um/s) ⁴		NOM(%) ⁵	
	0.5 h	24 h	0.5 h	24 h	0.5 h	24 h	0.5 h	24 h	0.5 h	24 h
0	96.3±2.0	28.7±0.9 ^a	92.0±1.9 ^a	21.5±0.3 ^a	33.8±0.8 ^a	10.7±0.3 ^a	47.3±1.4 ^a	12.6±0.3 ^a	53.1±0.9	48.3±0.6
	99.1±0.2	58.9±1.1 ^b	74.7±1.6 ^b	31.4±0.5 ^b	39.1±1.3 ^b	18.3±0.5 ^b	45.0±0.5 ^a	20.5±0.4 ^b	53.5±1.3	51.7±0.8
5	97.2±0.3	74.4±0.3 ^b	74.8±1.5 ^b	37.9±1.5 ^b	36.5±0.3 ^a	21.7±1.1 ^b	42.7±0.3 ^b	24.7±1.1 ^b	53.2±0.8	51.6±0.8
	97.7±0.1	62.3±0.3 ^b	74.2±0.4 ^b	34.0±1.3 ^b	34.9±0.6 ^a	19.1±0.6 ^b	42.2±0.6 ^b	21.5±0.7 ^b	52.7±0.3	53.1±1.4

¹ MOT: Motility, ² VCL: Curvilinear velocity, ³ VSL: Straight-line velocity, ⁴ VAP: Average path velocity,

⁵ NOM: Normal morphology.

^{ab} Means in the same column with different superscript letters differ significantly(P<0.05).

* Values are means±SEM.

정한 후, 실온에서 건조시킨 다음, 염색액 I(Diff-Quik solution I, Kukje, Japan)에서 30초 동안 침지하여 염색한 후, 불필요한 염색액이 슬라이드에 남아있지 않도록 흡수 용지를 이용하여 염색액 얼룩을 제거하였다. 그런 다음 염색액 II(Diff-Quik solution II, Kukje, Japan)에 20초간 침지하여 염색한 후 증류수를 이용하여 잔류 염색액을 세척하였다. 염색이 끝난 슬라이드는 실온에서 먼지가 묻지 않도록 깨끗이 건조시킨 후 관찰하였다.

5. 정자의 형태분석

정자의 형태분석은 Diff-Quik 염색을 실시한 후, 정자자동분석기(sperm analysis imaging system, SAIS, Korea)를 이용하여 한 처리구당 각각 정자 100마리씩 분석하였다. 정상 정자의 형태(normal morphology, NOM)는 Oettle 등(1991) 및 Mortimer (1994)의 방법을 기준으로 하여 측정하였다. 즉, 전체 모양이 부정형(amorphous), 대형(megalo), 소형(small), 선세형(elongated) 등에 해당되지 않고, 두부의 길이 5~6 μm, 너비 2.5~3.5 μm, 정자두부에서 차지하는 침체의 비율이 40~70%에 해당하는 정자를 정상 형태로 분류하였다.

6. 통계처리

본 연구에서 얻어진 모든 실험결과와 통계처리는 Student's T-test를 이용하여 실시하여 P<0.05 이하의 유의성만을 대조구와 처리구간의 통계학적 차이로 인정하였다.

결과 및 고찰

1. Cysteine이 사람정자의 운동성지수 및 정상 정자형태에 미치는 영향

정자 처리의 기본배양액인 Ham's F-10에 Cysteine을 첨가하여 정자처리후, 0.5시간 및 24시간 동안 배양한 후, 정자의 운동성지수 및 정상 정자 형태를 측정된 결과는 Table 2와 같다. 즉, cysteine을 0, 1, 5 및 10 mM을 첨가하여 0.5시간 동안 배양하였을 경우, 운동성(motility, MOT)은 대조구와 처리구 모두 높은 결과를 보였으며, 곡선속도(curvilinear velocity, VCL)는 대조구가 처리구보다 유의적으로(P<0.05) 높은 결과를 보였다. 선형속도(straight-line velocity, VSL)는 1 mM에서 처리구가 대조구보다 높게 유의차가 인정되었으며, 평균 속도(average path velocity, VAP)는 5, 10 mM에서

Table 2. Effect of glutathione on the motility index and normal morphology of human sperm after 0.5 and 24 hour incubation*

Glutathione concentration (mM)	MOT(%) ¹		VCL(um/s) ²		VSL(um/s) ³		VAP(um/s) ⁴		NOM(%) ⁵	
	0.5 h	24 h	0.5 h	24 h	0.5 h	24 h	0.5 h	24 h	0.5 h	24 h
0	95.9±1.6	51.1±2.7 ^a	86.3±6.6	34.1±0.7 ^a	36.7±4.6	17.1±0.4 ^a	47.2±4.8	19.8±0.4 ^a	50.8±1.6	49.8±1.8
	97.9±0.8	82.9±1.4 ^b	79.4±2.2	50.9±1.3 ^b	35.0±3.3	26.4±0.5 ^b	42.2±2.5	30.1±0.6 ^b	51.2±1.8	50.8±2.1
5	97.1±0.9	83.6±1.2 ^b	85.1±6.6	51.3±2.2 ^b	33.6±2.7	27.3±1.1 ^b	43.4±3.2	32.5±1.4 ^b	51.2±1.7	51.0±1.9
	97.3±0.6	83.4±1.6 ^b	81.6±4.2	49.4±3.9 ^b	40.3±4.4	26.3±2.2 ^b	47.5±3.2	29.7±2.6 ^b	50.8±1.7	51.0±1.5

¹ MOT: Motility, ² VCL: Curvilinear velocity, ³ VSL: Straight-line velocity, ⁴ VAP: Average path velocity, ⁵ NOM: Normal morphology.

^{ab} Means in the same column with different superscript letters differ significantly(P<0.05).

* Values are means±SEM.

는 대조구가 처리구보다 유의적으로 높은 결과가 나타났고 정상 정자형태율(normal morphology, NOM)은 대조구와 처리구 모두 유의차가 인정되지 않았으나 높은 결과를 나타냈다.

그리고, 24시간 동안 배양하였을 경우, 운동성(motility, MOT)은 대조구(28.7±0.9%)에 비하여 각각 58.9±1.1, 74.4±0.3 및 62.3±0.3%로서 유의적으로 높은 결과를 보였고, 곡선속도(curvilinear velocity, VCL)도 대조구(21.5±0.3 μm/s)에 비하여 각각 31.4±1.6, 37.9±1.5 및 34.0±1.3 μm/s로서 유의적으로 높게 나타났다. 또한, 선형속도(straight-line velocity, VSL)는 대조구(10.7±0.3 μm/s)에 비하여 각각 18.3±0.8, 21.7±1.1 및 19.1±0.6 μm/s로서 유의적으로 높은 결과를 나타냈고, 평균속도(average path velocity, VAP)는 대조구(12.6±0.3 μm/s)보다 각각 20.5±0.4, 24.7±1.1 및 21.5±0.7 μm/s로서 유의성이 인정되었다(P<0.05). 한편, 정상정자 형태율에 있어서는 대조구와 처리구간 유의한 차는 인정되지 않았다.

정자 배양액에 cysteine을 첨가할 경우, 첨가된 cysteine은 배양액내에서 glutathione을 합성하는 전구물질(precursor)로서 작용하여 합성된 glutathione이 cytotoxic aldehydes와 반응하여 지질과산화물

방지하고, 정자의 원형질막(plasma membrane)의 thiol groups의 변형을 방지해 주는 기능을 수행하는 등 'oxidative stress'로부터 정자를 간접적으로 방어하는 기능을 수행하여 결국, 정자의 운동성과 정상 정자형태율을 증가시키는 것으로 사료된다(Selley, 1991 ; Seligman, 1994).

2. Glutathione이 사람정자의 운동성지수 및 정자형태율에 미치는 영향

정자 처리의 기본배양액인 Ham's F-10에 Glutathione을 첨가하여 정자처리후, 0.5시간 및 24시간 동안 배양한 후, 정자의 운동성지수 및 정상 정자형태를 측정된 결과는 Table 2와 같다. glutathione을 0, 1, 5 및 10 mM을 첨가하여 0.5시간 동안 배양하였을 경우, 운동성(motility, MOT), 곡선속도(curvilinear velocity, VCL), 선형속도(straight-line velocity, VSL) 및 평균속도(average path velocity, VAP)와 정상 정자형태율(normal morphology, NOM) 등의 모든 파라메타에서 대조구와 처리구간 유의성이 인정되지 않았다.

그리고, 24시간 동안 배양하였을 경우, 운동성(motility, MOT)은 대조구(51.1±9.5%)에 비하여 각각 82.9±1.4, 83.6±1.2 및 83.4±1.6%로서 유의

적으로 높은 결과를 나타냈고, 곡선속도(curvilinear velocity, VCL)도 대조구($34.1 \pm 0.7 \mu\text{m/s}$)에 비하여 각각 50.9 ± 1.3 , 51.3 ± 2.2 및 $49.3 \pm 3.9 \mu\text{m/s}$ 로서 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). 또한, 선형속도(straight-line velocity, VSL)는 대조구($17.1 \pm 0.4 \mu\text{m/s}$)에 비하여 각각 26.4 ± 0.5 , 27.3 ± 1.1 및 $26.3 \pm 2.2 \mu\text{m/s}$ 로서 유의적으로 높은 결과를 나타냈고, 평균속도(average path velocity, VAP)는 대조구($19.8 \pm 0.4 \mu\text{m/s}$)보다 각각 30.1 ± 0.6 , 32.5 ± 1.4 및 $29.7 \pm 2.6 \mu\text{m/s}$ 로서 유의성이 인정되었다. 한편, 정상정자 형태율에 있어서는 대조구와 처리구간 유의성이 인정되지 않았다.

이와 같은 결과는 Parinaud 등(1997)이 사람정자를 액화 및 원심분리시에 기본배양액을 Tyroid's solution을 대조구로, glutathione이 첨가된 Sperm-Fit[®]를 처리구로하여 실험한 다음, BM1 배양액으로 24시간 동안 배양한 후, 운동성을 측정하였을 때, 각각 41 ± 6 와 $48 \pm 5\%$ 로서 glutathione을 첨가한 처리구가 유의적으로 운동성이 높다는 보고와 일치하는 결과였다($P < 0.05$).

한편, 사람정자 배양액에 glutathione을 첨가 배양하였을 경우, glutathione은 세포외공간에서 cytotoxic addehydes와 직접 반응하여 지질과산화물 감소시키고, 정자 원형질막의 thiol groups을 방어하며, 또한 환원형 glutathione은 -OH와 O⁻을 중화시키는 기능을 수행하는 등 각종 활성산소로부터 정자를 보호해 주는 기능을 수행하는 것으로 사료된다(Selley, 1991; Lenzi, 1993; Seligman, 1994).

적 요

본 연구는 체외에서의 정자처리과정에 cysteine 및 glutathione이 첨가된 배양액을 사용함으로써, 배양 0.5시간과 24시간 후에 운동성지수 및 정상정자형태율에 미치는 영향을 조사하고자 실시하였다. 본 연구에서 얻은 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 정자 처리의 기본배양액인 Ham's F-10에 cysteine을 0, 1, 5 및 10 mM을 첨가하여 처리한 후, 0.5시간 동안 배양하였을 경우, 운동성(motility, MOT)은 대조구와 처리구 모두 높은 결

과를 보였으며, 곡선속도(curvilinear velocity, VCL)는 대조구가 처리구보다 유의적으로($P < 0.05$) 높은 결과를 보였다. 선형속도(straight-line velocity, VSL)는 대조구 및 처리구간 1 mM에서 유의차가 인정되었으며, 평균속도(average path velocity, VAP)는 5, 10 mM에서 대조구가 처리구보다 유의적으로 높은 결과를 보였으나 정상 정자형태율(normal morphology, NOM)은 대조구와 처리구 모두 높은 결과를 나타냈으나 유의한 차는 인정되지 않았다.

그리고, 24시간 동안 배양하였을 경우, 운동성(motility, MOT)은 대조구(28.7%)에 비하여 각각 58.9, 74.4 및 62.3%로서 유의적으로 높은 결과를 보였고, 곡선속도(curvilinear velocity, VCL)도 대조구($21.5 \mu\text{m/s}$)에 비하여 각각 31.4, 37.9 및 $34.0 \mu\text{m/s}$ 로서 유의적으로 높게 나타났다. 또한, 선형속도(straight-line velocity, VSL)는 대조구($10.7 \mu\text{m/s}$)에 비하여 각각 18.3, 21.7 및 $19.1 \mu\text{m/s}$ 로서 유의적으로 높은 결과를 나타냈고, 평균속도(average path velocity, VAP)는 대조구($12.6 \mu\text{m/s}$)보다 각각 20.5, 24.7 및 $21.5 \mu\text{m/s}$ 로서 유의성이 인정되었다. 한편, 정상정자 형태율에 있어서는 대조구(48.9%)와 처리구간 유의성이 인정되지 않았다.

2. 정자 처리의 기본배양액인 Ham's F-10에 Glutathione을 0, 1, 5 및 10 mM을 첨가하여 처리한 후, 0.5시간 동안 배양하였을 경우, 운동성(motility, MOT), 곡선속도(curvilinear velocity, VCL), 선형속도(straight-line velocity, VSL) 및 평균속도(average path velocity, VAP)와 정상정자형태율(normal morphology, NOM) 등의 모든 매개변수에서 대조구와 처리구간 유의성이 인정되지 않았다.

그리고, 24시간 동안 배양하였을 경우, 운동성(motility, MOT)은 대조구(51.1%)에 비하여 각각 82.9, 83.6 및 83.4%로서 유의적으로 높은 결과를 나타냈고, 곡선속도(curvilinear velocity, VCL)도 대조구($34.1 \mu\text{m/s}$)에 비하여 각각 50.9, 51.3 및 $49.4 \mu\text{m/s}$ 로서 유의적으로 높게 나타났다($P < 0.05$). 또한, 선형속도(straight

-line velocity, VSL)는 대조구(13.0 $\mu\text{m/s}$)에 비하여 각각 20.5, 20.9 및 19.8 $\mu\text{m/s}$ 로서 유의적으로 높은 결과를 나타냈고, 평균속도(average path velocity, VAP)는 대조구(15.9 $\mu\text{m/s}$)보다 각각 26.4, 27.3 및 26.3 $\mu\text{m/s}$ 로서 유의성이 인정되었다. 한편, 정상정자 형태율에 있어서는 대조구 와 처리구간 유의성이 인정되지 않았다.

참고문헌

- Aiken RH and Clarkson JS. 1988. Significance of reactive oxygen species and anti-oxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J. Androl.*, 9:367-376.
- Aitken RJ. 1995. Mechanisms and prevention in human spermatozoa. IN:Fenichel P and Parinaud J(eds). Human sperm acrosome reaction. Inst. Natl. Sante Recherche Medicale, Paris, pp. 339-353.
- Baker HWG, Brindle H, Irvine J, et al. 1996. Protective effect of antioxidants on the impairment of sperm motility by activated polymorphonuclear leukocytes. *Fertil. Steril.*, 65:411-419.
- Borg DC and Schaich KM. 1989. Pro-oxidant action of antioxidant. Miquel J, Quintanilha AT, Weber H, et al. CRC handbook of free radical and antioxidants in biomedicine. Vol 1. Florida. CRC Press. 63-80.
- Cummins JM, Jequier AM and Kan R. 1994. Molecular biology of human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics and oxidative stress? *Mol. Reprod. Dev.*, 37:345-362.
- Ford WCL. 1990. The role of oxygen free radicals in the pathology of human spermatozoa: implications for IVF. In Matson R and Lieberman BA (eds). Clinical IVF Forum: Current Trends in Assisted Reproduction. Manchester University Press. Manchester, UK, pp. 123-139.
- Ford WCL, Whittington K and Williams AC. 1997. Reactive oxygen species in human sperm suspensions: production by leukocytes and the generation of MADPH to protect sperm against their effects. *Int. J. Androl.*, 20(Suppl. 3):44-49.
- Fradovich I. 1989. Superoxide Dismutases. *J. Biol. Chem.*, 264:7761-7764.
- Fred J, Yost J and Fradovich I. 1989. Superoxide and hydrogen peroxide in oxygen damage. *Arch. Bio. Chem. Biophys.*, 175:514-519.
- Halliwell B and Gutteridge HMC. 1990. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.*, 280:1-8.
- Halliwell B and Gutteridge JMC. 1990. Roles of free radicals and cataritic metal ions in human disease. Fleischer S, Packer L, et al. An overview. *Methods enzymology*. New york, Academic Press, Inc. 186:1-85.
- Lenzi A, Culasso F, Gandini L, et al. 1993. Placebo-controlled, double blind. cross-over trial of glutathione therapy in male infertility. *Hum. Reprod.*, 8:1657-1662.
- Mahadevan MM, Miller MM and Moutos DM. 1997. Absence of Glucose decreases human fertilization and sperm movement characteristics *in vitro*. *Hum. Reprod.*, 12:119-123.
- Mammoto AN, Masumoto M, Tahara Y, Ikebuchi M, Ohmichi K, Tasaka and Miyake A. 1996. Reactive oxygen species block sperm-egg fusion via oxidation of sperm sulfhydryl proteins in mice. *Biol. Reprod.*, 55:1063-1068.
- Miquel J. 1989. Historical introduction to free radical and antioxidant biomedical reserches. Miquel J, Quintanilha AT, Weber H, et al. CRC handbook of free radical and antioxidants in biomedicine. Vol 1. Florida. CRC press 89: 3-16.
- Oettle EER, Menkveld RJ, Swanson S, Oehninger TF, Kruger and Acosta AA. 1991. Atlas of human sperm morphology; photomicrographs with interpretations. Williams & Wilkins, pp15

-96.

- Parinaud J, Le Lannou D, Vieitez G, et al. 1997. Enhancement of motility by treating spermatozoa with an antioxidant solution (Sperm-Fit[®]) following ejaculation. *Hum. Reprod.*, 12:2434-2436.
- Procter PH. 1989. Free radicals and Human disease. Miquel J, Quintanilha AT, Weber H, et al. *CRC handbook of free radical and antioxidants in biomedicine*. Vol 1. Florida. 209-222.
- Seligman J, Kosower NS and Weisenberg R. 1994. Thiol-disulfide status of human sperm proteins. *J. Reprod. Fertil.*, 101:435-439.
- Selley ML, Lacey MJ, Bartlett MR, Copeland CM and Ardlie NG. 1991. Content of significant amounts of a cytotoxic end-product of lipid peroxidation in human semen. *J. Reprod. Fertil.*, 92:291-298.
- Warren JS, Johnson KJ and Ward PA. 1987. Oxygen radicals in cell injury and cell death. *Pathol. Immunopathol. Res.*, 6:301-315.
- Wolff H. 1995. The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertil. Steril.*, 63:1143-1157.
- Zalata A, Hafez T and Comhaire F. 1995. Evaluation of the role of reactive oxygen species in male infertility. *Hum. Reprod.*, 10: 1444-1451.

(접수일: 2000. 10. 10 / 채택일: 2000. 12. 19)