

## 반응성 산소종이 사람 정자의 수정능력 획득과 첨체반응에 미치는 영향

강희규<sup>1,4†</sup> · 김동훈<sup>1</sup> · 한성원<sup>1</sup> · 김묘경<sup>1</sup> · 권혁찬<sup>3</sup> · 이호준<sup>1,2</sup> · 윤용달<sup>4</sup> · 김문규<sup>4</sup>

을지의과대학, 을지병원 <sup>1</sup>의과학연구소, <sup>2</sup>생리학교실  
<sup>3</sup>을지대학병원 산부인과, <sup>4</sup>한양대학교 자연과학대학 생명과학과

### Effects of Reactive Oxygen Species (ROS) on Capacitation and Acrosome Reaction in Human Spermatozoa

Hee Gyo Kang<sup>1,4†</sup>, Dong Hoon Kim<sup>1</sup>, Sung Won Han<sup>1</sup>, Myo Kyung Kim<sup>1</sup>,  
Hyuck Chan Kwon<sup>3</sup>, Ho Joon Lee<sup>1,2</sup>, Yong-Dal Yoon<sup>4</sup> and Moon Kyoo Kim<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Eulji Medical Science Institute, Eulji Medical Center, Dept. of <sup>2</sup>Physiology and

<sup>3</sup>OB/GYN, Eulji University, School of Medicine, Seoul 139-711,

<sup>4</sup>Dept. of Life Science, College of Natural Science, Hanyang University, Seoul 133-791

**요약:** 본 연구에서는 반응성 산소종이 수정능력획득, 첨체반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 반응성 산소종으로 superoxide anion은 xanthine (X) -xanthine oxidase (XO) system을, hydroperoxide는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 농도별로 처리하였으며, nitric oxide (NO)는 NO donor인 sodium nitroprusside (SNP)를 처리하였다. 또한 남성불임요인의 하나로 알려진 leukocytospermia에 대한 영향을 알아보기 위해 lymphocyte를 농도별로 처리하였고, 일반적인 배양기내 산소농도인 20% O<sub>2</sub>농도를 생체내 농도와 유사한 5% O<sub>2</sub> 농도로 낮추었을 때의 결과를 알아보려고 하였다. 수정능력획득 정도와 첨체반응률을 알아보기 위해 chlortetracycline (CTC) 염색방법을 이용하였다. 지질과산화 정도는 정자내 malondialdehyde (MDA)의 생성량을 흡광기를 이용하여 정량하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, X-XO, SNP와 lymphocyte 처리군은 1시간 배양시에 수정능력획득률이 유의하게 증가하였으나, 저산소처리군에서는 차이가 없었다. 저 농도의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 경우에는 지질과산화 정도가 감소하였으나, 고 농도에서는 대조군에 비해 유의하게 증가하였다. 고 농도의 lymphocyte를 처리한 경우에는 1시간 처리시에 지질과산화가 유의하게 증가하였으나, 처리된 산소농도에 따른 지질과산화의 차이는 없었다. 첨체반응률의 경우, 처리한 모든 반응성 산소종에서 대조군에 비해 높은 첨체반응률을 확인하였다. X(100 μM)-XO(100mIU)의 경우가 가장 높은 첨체반응률을 나타내었다. 이러한 결과들은 반응성 산소종이 수정능력획득, 지질과산화 그리고 첨체반응에 영향을 미치는 것을 확인하여 주었다. 또한 반응성 산소종이 생성된 경우에 수정능력획득이 보다 빠르게 진행되어지는 것은 반응성 산소종이 정자의 과운동성과 수정능력획득의 중요한 조절자임을 시사한다고 사료된다.

**ABSTRACT:** To investigate the effects of reactive oxygen species (ROS) on capacitation, acrosome reaction in human spermatozoa. Human spermatozoa were incubated with xanthine-xanthine oxidase (X-XO), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sodium nitroprusside (SNP) or lymphocyte. Otherwise, spermatozoa were incubated under low O<sub>2</sub> (5 %) condition. Chlortetracycline (CTC) staining was conducted to assess capacitation and acrosome reaction. Analysis of lipid peroxidation was done by spectrophotometric determination of malondialdehyde (MDA) production in spermatozoa. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, X-XO, SNP and lymphocyte treatment significantly increased capacitated spermatozoa within 1 h of incubation. There was no significant difference in capacitation between low- and high O<sub>2</sub> groups. In the presence of low concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lipid peroxidation decreased significantly. However, under the high concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lipid peroxidation significantly increased at the end of incubation compared to control. In the presence of high concentration of lymphocytes, lipid peroxidation significantly increased compared to control at 1hr of incubation. There was no significant difference in lipid peroxidation according to O<sub>2</sub> concentration examined. Acrosome reaction (AR) was evaluated by CTC staining after the progesterone challenge. In all ROS groups, AR increased compared to control. The X(100 μM) - XO (100mIU) system was the most potent to induce AR. Taken together, it suggested positive control of AR by ROS and the positive relationship between the lipid peroxidation and AR. The early onset of capacitation in the presence of ROS suggest that ROS might be a positive regulator of sperm capacitation and hyperactivation.

**Key words:** Reactive oxygen species, Acrosome reaction, Capacitation, Lipid peroxidation, Chlortetracycline staining.

## 서론

포유류에 있어서 정자의 수정능력획득 (capacitation)과 첨체반응 (acrosome reaction)은 수정을 위해 반드시 필요한 것으로 알려져 있다. 사람의 경우, 여성의 자궁 속으로 들어온 정자가 난자와 수정을 하기 위해서는 자궁경부 내 점액을 통과하면서 hyperactivation되어짐으로써 수정능력을 획득하게 된다. 정자는 수정능력획득과정을 거치면서 또는 퇴화되면서 superoxide anion, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 같은 반응성 산소종 (reactive oxygen species, ROS)을 자체적으로 생성하게 된다 (Aitken and Clarkson 1987; De Lamirande et al., 1995a,b; Mckinney et al., 1996).

반응성 산소종은 불안정한 전자쌍을 공유하는 활성화된 free radical의 일종이다. 정자의 원형질막은 많은 양의 불포화 지방산을 함유하고 있어 반응성 산소종과 같은 free radical에 의해 지질과산화 (lipid peroxidation) 되어짐으로써 민감하게 반응한다 (Jones et al., 1979; Aitken et al., 1991, 1993). 실제로 생성되는 반응성 산소종의 농도에 따라 정자의 운동성이나 첨체반응 등에 영향을 미쳐 정자의 수정기능을 조절하는 것으로 알려져 있다 (Brize et al., 1991; De Lamirande and Gagnon, 1993; Griveau et al., 1994, 1995a,b). 또한 최근에 보고들에 의하면, 반응성 산소종은 정자의 기능에 유해한 영향뿐만 아니라 유익한 효과들도 있다고 보고되고 있다 (Aitken and Clarkson, 1987; Alvares et al, 1987; Iwasaki and Gagnon, 1992). 즉 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 정자의 수정능력에 안 좋은 영향을 주지만 (De Lamirande and Gagnon, 1993), superoxide anion은 정자가 난자와 수정을 하기 위해서 반드시 거쳐야 하는 hyperactivation과 수정능력획득이라는 현상에 도움을 주는 것으로 보고되고 있다 (De Lamirande and Gagnon, 1993, 1995b).

정자에 있어서 반응성 산소종에 의한 두번째 영향은 첨체반응단계이다. 첨체반응 단계에서 영향을 미치게 되는 기전은 지질과산화라고 보고되고 있다 (Jones and Mann, 1973; Jones et al., 1978). 이러한 지질과산화 과정의 반응성 산소종에 의한 주된 목표물은 세포막 구조로, 세포막을 구성하고 있는 인지질 내에 높은 비율로 존재하는 불포화지방산이 그 원인물질로 알려져 있다 (Jones and Mann, 1973). 반응성 산소종에 의한 세포막 구조의 붕괴는 지질과산화 과정을 통해서 일어나게 된다. 이러한 지질과산화 과정은 불포화 지방산내에 존재하는 탄소고리를 반응성 산소종이 공격함으로써 두 개의 지질층으로 구성된 세포막내 불포화 지방산의 맨 끝부

분에 유연한 상태로 존재하는 탄소를 반응성 산소종이 공격하여 탄소고리가 단단해짐으로써 세포막의 원활한 이동을 제한하게 되는 현상 "tic"이 연속적으로 일어난다. 이때 산소와의 반응으로 생성된 peroxy radical (LOO-)이 남아있는 불포화지방산을 계속적으로 과산화시키며, 주변에 존재한 금속이온 (metal ion; Zn, Cu, Fe 등)과 연속 반응을 생성하기 때문에 더 이상의 과산화시킬 물질이 없어지거나 ROS 방어물질과 만나기 전까지는 계속된다. Aitken과 Clarkson(1987)에 의하면 이중간의 배우자를 이용하여 Fe<sup>2+</sup>/Asc로 지질과산화를 유도한 실험에서 정자의 운동성에는 영향을 주지는 않지만, 정자와 난자간의 결합능력을 저하시키는 것으로 보고하였다.

본 연구는 반응성 산소종에 의한 수정능력획득 및 첨체반응 양상을 조사함으로써 반응성 산소종에 의한 수정과정 중에 필수적인 단계에서의 반응성 산소종의 영향을 알아보고자 대표적인 반응성 산소종 발생물질인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, xanthine-xanthine oxidase와 nitro oxide 발생인자인 sodium nitroprusside, leukocyte와 같은 반응성 산소종 발생인자들을 처리하였고, 또한 반응성 산소종 발생이 자연적으로 감소하리라 예측되어지는 저산소농도 (5% O<sub>2</sub>) 상태에서의 결과를 수정능력획득과 첨체반응 및 정자 세포막의 지질과산화 유발정도를 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약 및 배양액

실험에 사용된 배양액은 Ham's F-10에 0.4% BSA를 첨가하여 사용하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, xanthine-xanthine oxidase, sodium nitroprusside, progesterone등과 spectrophotometry에 사용된 trichloroacetic acid (TCA), thiobarbituric acid (TBA), malondialdehyde (MDA), chlortetracycline (CTC)등의 시약은 Sigma (St Louis, USA)사 제품을 구매하여 사용하였다.

### 2. 반응성 산소종 및 progesterone의 처리

반응성 산소종이 수정능력획득, 첨체반응에 미치는 영향을 알아보기 위해서 반응성 산소종으로 superoxide anion은 xanthine (X)-xanthine oxidase (XO) system을 X (100 μM), XO (50 mIU~400mIU) 처리하였고, hydroperoxide는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 125 μM~1mM까지 처리하였으며, nitric oxide는 NO donor인 sodium nitroprusside를 0.1 μM~100 μM 처리하였다. 또한 남성불임요인의 하나로 알려진 leukocytospermia에 대한 영향을 알아보기 위해 lymphocyte를 농도별로 1×10<sup>6</sup>/ml~4×10<sup>6</sup>/ml

까지 처리하였다. 일반적인 배양기내 산소농도인 20% O<sub>2</sub> 농도를 생체내 농도와 유사한 5% O<sub>2</sub> 농도로 낮추어서 배양한 후 결과를 분석하였다. 첨체반응률을 알아보기 위해서 각 실험군과 대조군에 progesterone을 10 μM를 첨가하였다.

정액은 비뇨기과로 불임을 주소로 내원한 환자에게서 동의서를 받고 정액검사 후 남은 정액을 냉동보관 하여 보관한 뒤 해빙하여 실험에 사용하였다. 해빙 후 정자를 얻기 위해 3개층 (50-90-100%)으로 구성된 percoll방법으로 2회 원심분리하여 움직이는 정자를 획득하였다. 원심분리는 1,000 rpm에서 20분간 1회, 1,200 rpm에서 5분간 1회씩 시행하였다. 각각의 실험군에 10×10<sup>6</sup>개의 정자를 분주하여 실험에 사용하였다. 정자를 각각의 실험군에 분주한 후 5% CO<sub>2</sub>, 37°C의 배양기와 5% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C chamber에 넣어 0, 30분, 1시간, 3시간, 6시간동안 배양하였다.

### 3. 수정능력 획득률 조사

준비된 정자를 chlortetracycline (CTC) 염색하기 전에 정자의 생존성을 확인하기 위해서 100mg/mL의 Hoechst 33258를 단백질이 제거된 배양액으로 1:1,000비율로 희석한 후 정자와 1:100으로 섞은 후 약 2분간 실온에서 염색하였다. 염색되어진 정자를 2% PVP가 들어있는 배양액으로 세척하여 남아 있는 염색성분을 제거한 후 CTC염색방법에 의해 아래와 같이 수행하였다. 정자와 CTC용액을 1:1 (50 μl)로 알루미늄호일로 빛을 차단한 tube에서 혼합한 후 완전하게 교반기를 이용하여 섞어 준 후 0.5M Tris-HCl내 2.5% (w/v)의 glutaraldehyde를 10 μl를 첨가하여 고정하였다. 고정된 정자를 슬라이드위에 정지한 후 antifade 용액을 한방울 떨균 후 잘 섞어준 뒤 cover slip를 덮는다. Cover slip 주위의 여분의 용액을 닦아내고, slide 위의 정자가 최대한 편평해지도록 압력을 가한 후 투명한 매니큐어로 mounting하였다. 형광현미경 (Nikon TE-600, Japan)하에서 수정능력획득 여부를 조사하였다. 결과판독은 2가지로 구분하였다. 정자 두부 전체가 골고루 형광을 띠는 것을 uncapacitated군으로, post-equatorial region에 형광띠가 관찰되지 않거나 정자의 두부 전체에 형광을 띠지 않는 것을 capacitated군으로 구분하여 각각의 slide에서 100개의 정자를 조사하였다.

### 4. 지질과산화 유발 정도 조사

5% O<sub>2</sub> 군을 제외한 각각의 처리군과 대조군들을 0분, 30분, 1시간, 3시간 6시간 동안 CO<sub>2</sub> 배양기안에서 배양하였고, 5% O<sub>2</sub> 처리군은 5% O<sub>2</sub>로 고정시킨 chamber내에서 배양한 후 냉장 보관되어진 40% TCA (trichloroacetic acid) 200 μl를 첨

가하여 단백질 침전을 유기하였다. 40% TCA를 첨가한 후 14,000rpm에서 25분간 원심분리하고, 상등액을 분리하였다. 분리된 상등액 200 μl에 0.05% NaOH용액 내 2% thiobarbituric acid를 800 μl 첨가한 후 10분간 끓인 후, 실온까지 식히고, spectrophotometer (Amershampharmacia, USA)를 이용하여 534nm파장에서 흡광도를 측정하여 malondialdehyde (malondialdehyde-thiobarbituric reactivity)를 정량하였다. malondialdehyde를 순차적으로 희석한 농도를 흡광기준으로 이용하였다 (Mammto et al., 1996).

### 5. 첨체반응률 조사

CTC염색방법을 이용하여 첨체반응을 조사하였다. 첨체반응을 유기하기 위해서 최종농도 10 μM/ml의 progesterone을 정자 현탁액에 섞어 주었다. 처리 농도 및 시간에 따라 준비된 정자를 CTC염색하기 전에 정자의 생존성을 확인하기 위해서 100mg/ml의 Hoechst 33258를 단백질이 제거된 배양액으로 1:1,000 비율로 희석한 후 정자와 1:100으로 섞은 후 약 2분간 실온에서 염색하였다. 염색되어진 정자를 2% PVP가 들어있는 배양액으로 세척하여 남아 있는 염색성분을 제거한 후 CTC 염색과정을 아래와 같이 수행하였다. 정자와 CTC 용액을 1:1 (50 μl)로 알루미늄호일로 빛을 차단한 tube에서 혼합한 후 완전하게 교반기를 이용하여 섞어 준 후 0.5M Tris-HCl내 2.5% (w/v)의 glutaraldehyde를 10 μl를 첨가하여 고정하였다. 고정된 정자를 슬라이드위에 정지한 후 antifade 용액을 한방울 떨구고 cover slip를 덮는다. Cover slip주위의 여분의 용액을 닦아내고, slide 위의 정자가 최대한 편평해지도록 압력을 가한 후 투명한 매니큐어로 mounting하였다. 형광현미경 (Nikon TE-600, Japan)하에서 첨체반응을 조사하였다. 결과판독은 2가지로 구분하였다. 정자 두부 전체가 골고루 형광을 띠거나, post-equatorial region에 형광띠가 관찰되지 않는 것을 intact acrosome으로 구분하였고, 정자의 두부 전체에 형광을 띠지 않는 것을 acrosome reacted군으로 구분하여 각각의 slide에서 100개의 정자를 조사하였다.

### 7. 통계적 분석

통계적 유의성은 Chi-square test를 사용하였으며, 유의수준을 5%로 하여 p값이 0.01보다 낮은 경우를 유의하다고 정의하였다.

## 결 과

### 1. 수정능력 획득률 변화 양상

1) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리군

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (125 μM~1mM)를 1시간에서 6시간까지 처리하여 수정능력획득 (capacitation)률을 알아본 결과는 다음과 같다. 1시간 처리군에서 수정능력획득 정도는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서 125 μM~1mM 처리군 (95.3±1.2, 95.0±3.0, 95.7±1.5, 87.3±0.6%)까지 모든 처리군에서 대조군 (24.8±11.8%)에 비해 유의하게 높게 나타났다 (p<0.001). 처리농도간에는 차이가 없는 것으로 나타났다. 3시간 처리군과 6시간 처리군에서는 수정능력획득 정도가 97.5±2.3 ~ 100±0.0%으로 대조군의 88.0±2.0 ~ 97.5±2.3%와 차이가 없었다. 실험군이 처리농도에 관계없이 대조군에 비해 수정능력획득 정도가 빠르게 진행됨을 보여주고 있다 (p<0.001) (Fig. 1).

2) Xanthine (X) -Xanthine oxidase (XO) 처리군

X (100 μM) -XO (50mIU~400mIU)를 1시간에서 6시간까지 처리하여 수정능력획득률을 알아본 결과는 다음과 같다. 1시간 처리군에서 수정능력획득률은 모든 실험군이 (56.0±5.2, 58.0±8.9, 85.0±5.0, 83.3±5.0%) 대조군 (24.8±11.8%)에 비해 유의하게 높게 나타났다 (p<0.001). 처리농도간에는 저농도 처리군 (50mIU, 100mIU)보다 고농도 처리군 (200 mIU, 400mIU)에서 보다 높은 수정능력획득률을 보여주고 있다. 3시간 처리군과 6시간 처리군에서는 수정능력획득 정도가 83.0±3.2 ~ 100±0.0%으로 대조군의 88.0±2.0~97.5±2.3%와 차이가 없었다. 실험군이 처리농도에 관계없이 대조군에 비해 수정능력획득 정도가 빠르게 진행됨을 보여주고 있다 (Fig. 2).

3) Sodium nitroprusside (NO donor) 처리군

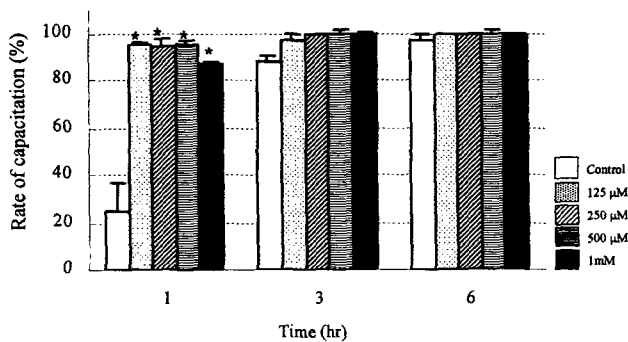


Fig. 1. Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on capacitation of human sperm. Capacitation was evaluated by chlortetracycline (CTC) staining. Sperm suspensions were incubated with 10 μM progesterone at 37°C for 1, 3, 6 hr. Data represent means±SEM; n=3; \*p<0.001, versus control.

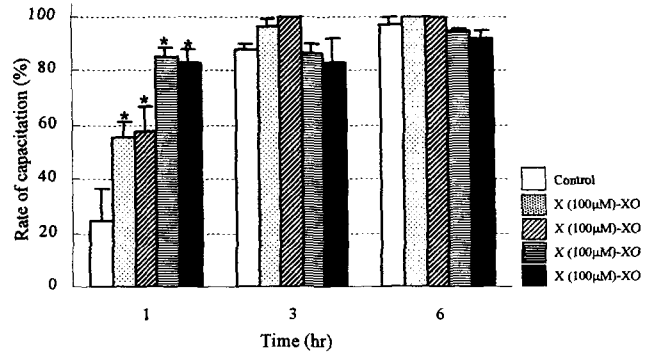


Fig. 2. Effect of xanthine~xanthine oxidase on capacitation of human sperm. Capacitation was evaluated by chlortetracycline (CTC) staining. Sperm suspensions were incubated with 10 μM progesterone at 37°C for 1, 3, 6 hr. Data represent means±SEM; n=3; \*p<0.001, versus control.

NO (0.1 μM~100 μM)를 1시간에서 6시간까지 처리하여 수정능력획득률을 알아본 결과는 다음과 같다. 1시간 처리군에서 수정능력획득률은 모든 실험군이 (88.0±1.0 85.0±7.5, 77.3±6.7, 74.7±3.2) 대조군 (24.8±11.8)에 비해 유의하게 높게 나타났다 (p<0.001). 처리농도간에는 저농도 처리군 (0.1 μM, 1 μM)이 고농도 처리군 (10 μM, 100 μM) 보다 높은 수정능력획득률을 보여주고 있으나 통계적인 차이는 없었다. 3시간 처리군과 6시간 처리군에서는 수정능력획득 정도가 83.0±3.2~100±0.0%으로 대조군의 88.0±2.0~97.5±2.3%와 차이가 없었다. 실험군이 처리농도에 관계없이 대조군에 비해 수정능력획득 정도가 빠르게 진행됨을 보여주고 있다 (Fig. 3).

4) Lymphocyte 처리군

Lymphocyte를 농도별로 1시간에서 6시간까지 처리하여 수

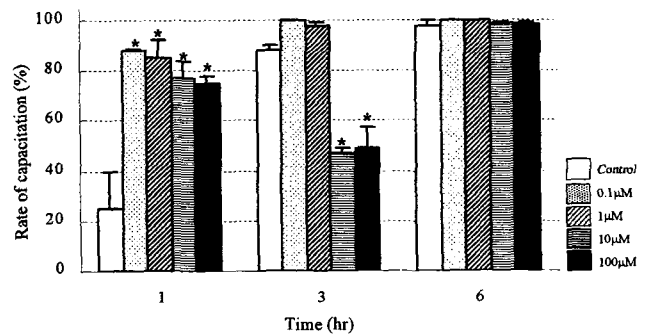
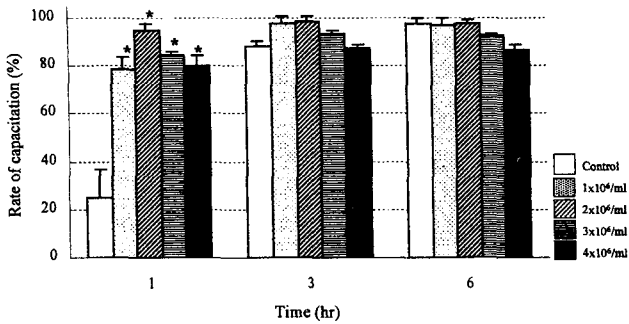
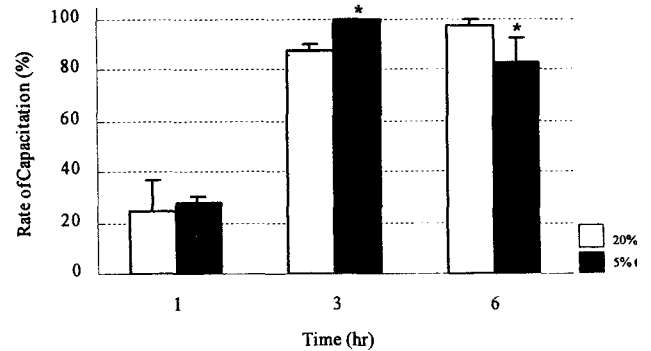


Fig. 3. Effect of sodium nitroprusside on capacitation of human sperm. Capacitation was evaluated by chlortetracycline (CTC) staining. Sperm suspensions were incubated with 10 μM progesterone at 37°C for 1, 3, 6hr. Data represent mean±SEM; n=3; \*p<0.001, versus control.



**Fig. 4. Effect of lymphocytes on capacitation of human sperm.** Capacitation was evaluated by chlortetracycline (CTC) staining. Sperm suspensions were incubated with 10 μM progesterone at 37°C for 1, 3, 6 hr. Data represent means ± SEM; n=3; \*p<0.001, versus control.



**Fig. 5. Effect of low(5%) or ambient (20%) oxygen tension on capacitation of human sperm.** Capacitation was evaluated by chlortetracycline (CTC) staining. Sperm suspensions were incubated with 10 μM progesterone at 37°C for 1, 3, 6 hr. Data represent means ± SEM; n=3; \*p<0.001, versus control.

정능력획득율을 알아본 결과는 다음과 같다. 1시간 처리군에서 수정능력획득률은 모든 실험군이 (78.7±4.7, 94.7±3.1, 84.7±1.5, 80.3±3.8%) 대조군 (24.8±11.8%)에 비해 유의하게 높게 나타났다 (p<0.001). 처리농도간에 차이는 없었다. 3시간 처리군과 6시간 처리군에서는 차이가 없었다. 실험군이 처리농도에 관계없이 대조군에 비해 수정능력획득 정도가 빠르게 진행됨을 보여주고 있다 (Fig. 4).

5) Low (5%) O<sub>2</sub> 처리군

5% O<sub>2</sub>를 시간별로 처리하여 대조군 (20% O<sub>2</sub>)과 수정능력획득률을 알아본 결과는 다음과 같다. 1시간 처리군에서 수정능력획득률은 5% O<sub>2</sub>군 (28.0±2.6%)이 대조군 (24.8±11.8%)에 비해 유의하게 높게 나타났다 (p<0.01). 3시간 처리시에도 대조군에 비해 유의하게 높게 나타났다 (p<0.001). 6시간 처리군에서는 5% O<sub>2</sub>군 (83.0±9.5%)이 대조군 (97.5±2.3%)에 비해 유의하게 낮은 수정능력획득율을 보여주고 있다 (p<0.001). 실험군이 처리농도에 관계없이 대조군에 비해 수정능력획득 정도가 빠르게 진행됨을 보여주고 있다 (Fig. 5).

2. 정자 세포막의 지질과산화 유발 정도

1) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리군

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (125 μM ~ 1mM)를 처리한 후 30분부터 1, 3, 6시간까지 지질 과산화 유발 정도를 측정된 결과는 다음과 같다. 0시간에서의 대조군의 지질 과산화는 3.9±0.9 pmol/10<sup>8</sup>sperm으로 나타났다. 30분에서 3시간까지의 지질 과산화 유발 정도는 대조군이 5.2±1.6~14.3±2.7였고, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>처리군에서는

1.5±0.1~ 6.5±0.5으로 처리농도에 상관없이 대조군에 비해 유의하게 낮은 것으로 나타났다 (p<0.01). 6시간 처리시에는 저농도군 (125, 250 μM)에서는 약간의 증가는 있었으나, 대조군보다 낮은 수준을 유지하는 반면에, 500 μM에서는 대조군과 유사한 정도의 지질 과산화가 유발되었으며, 1mM 처리군은 대조군보다 지질 과산화 유발 정도가 높게 나타났으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다 (Table 1).

2) Xanthine (X) -Xanthine oxidase (XO) 처리군

X (100 μM)-XO (50~400mIU)를 XO의 농도별로 처리한 후 30분부터 1, 3, 6시간까지 지질 과산화 유발 정도를 측정된 결과는 다음과 같다. 30분에서 6시간까지의 지질 과산화 유발 정도는 대조군이 5.2±1.5~18.5±5.7였고, X-XO처리군에서는 5.4±1.2~20.2±0.8으로 처리농도에 상관없이 대조군과 차이가 없는 것으로 나타났다. 또한 처리시간이 늘어남에 따른 대조군의 지질 과산화 유발 정도와 같은 양상의 증가를 나타내었다 (Table 1).

3) Sodium nitroprusside (NO donor) 처리군

NO 처리군 (0.1 μM ~ 100 μM)에서 처리시간에 따라 지질 과산화 유발 정도를 측정된 결과는 다음과 같다. 1시간 처리시에는 저농도군 (0.1 μM)을 제외하고는 대조군 (5.2±1.5)에 비해 통계적으로 유의하게 높은 지질과산화 (11.3±1.7, 11.4±0.7, 26.0±2.0)가 유발되었다 (p<0.01). 처리농도간에는 100 μM 처리군에서 가장 높은 지질 과산화 유발 정도를 나타내었다. 3시간과 6시간 처리시에는 대조군과 차이가 없는 것으로 나타났으며, 처리농도간에서도 농도 증가에 따른 증가양상은 보이지 않았다 (Table 1).

**Table 1. Effect of various reactive oxygen species on the lipid peroxidation of human sperm membrane incubated for 1, 3 and 6 hr**

Treatment	Time (hr)		
	1	3	6
Control	5.2±1.6	14.3±2.7	18.5±5.7
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> conc.			
125 μM	3.2±0.3	3.1±0.2*	5.3±0.3*
250 μM	3.0±0.4	3.0±0.3*	13.6±1.2*
500 μM	3.8±0.5	3.7±0.3*	19.6±2.5
1mM	3.3±0.2	6.5±0.5*	26.5±9.9*
X(μM) / XO (mIU)			
100 50	6.3±1.1	17.6±0.6	19.3±0.7
100 100	7.0±1.2	16.2±1.1	19.3±1.1
100 200	5.8±0.8	18.3±0.8	20.0±1.5
100 400	5.8±1.1	18.9±1.0	20.2±0.8
Sodium nitroprusside			
0.1 μM	5.1±1.8	16.0±1.5	18.1±0.7
1 μM	11.3±1.7	16.1±1.6	18.9±1.0
10 μM	11.4±0.7	15.5±1.0	21.1±0.8
100 μM	26.0±2.0	16.7±0.7	16.7±2.5
Lymphocyte			
1×10 <sup>6</sup> /ml	3.4±0.5	15.5±0.5	18.0±0.6
2×10 <sup>6</sup> /ml	12.3±1.2*	15.5±0.7	19.6±1.4
3×10 <sup>6</sup> /ml	12.9±1.0*	15.6±1.2	20.4±1.1
4×10 <sup>6</sup> /ml	17.5±1.0*	17.3±1.0	22.9±0.8
5% oxygen	4.6±1.4	10.3±2.1	14.8±2.2

†Data are presented as means±SEM(n=5)

‡Different superscripts indicate a significant difference(p<0.01) (Chi-square test) between data in the same row.

#### 4) Lymphocyte 처리군

Lymphocyte를 1×10<sup>6</sup>/ml~4×10<sup>6</sup>/ml까지 처리한 군에서의 처리농도 및 처리시간에 따른 지질 과산화 유발 정도는 다음과 같다. 처리농도와 시간에 따른 증가 양상을 보여 주었으나 유의한 차이는 없었다. 그러나 1시간 처리시에는 저농도(1×10<sup>6</sup>/ml)군을 제외한 lymphocyte 처리군(12.3±1.2, 12.9±1.0, 17.5±1.0)에서 대조군(5.2±1.6) 보다 통계적으로 유의한 증가가 나타났다(p<0.01) (Table 1).

#### 5) Low (5%) O<sub>2</sub> 처리군

5% O<sub>2</sub> 처리한 군에서의 처리시간(4.6±1.4, 10.3±2.1, 14.8±2.2)에 따른 지질 과산화 유발 정도 및 증가양상이 대조군(5.2±1.6, 14.3±2.8, 18.5±5.7)과 차이가 없는 것으로 나타났으나, 전반적으로 대조군보다 낮은 지질 과산화 유발

정도를 나타냈다 (Table 1).

### 3. 반응성 산소종 처리와 저산소 환경에서의 침체반응률

#### 1) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리군

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (125 μM~1mM)를 1시간에서 6시간까지 처리하여 침체반응(acrosome reaction)률을 알아본 결과는 다음과 같다. 1시간 처리군에서 침체반응률은 모든 농도처리군이 대조군(9.0±7.5%)에 비해 유의하게 높게 나타났다(p<0.001). 처리농도간에는 차이가 없는 것으로 나타났다. 3시간 처리군과 6시간 처리군에서도 침체반응률이 37.3±5.8~100±0.0%으로 대조군(22.3±1.5~81.3±5.0%)보다 통계적으로 높은 침체반응률을 나타냈다(p<0.001). 실험군이 처리농도에 관계없이 대조군에 비해 침체반응이 빠르게 진행됨을 보여주고 있다 (Table 2).

#### 2) Xanthine (X) -Xanthine oxidase (XO) 처리군

X-XO system에서 XO를 50mIU ~ 400mIU를 1시간에서 6시간까지 처리하여 침체반응률을 알아본 결과는 다음과 같다. 1시간 처리군에서는 대조군과 차이가 없었다. 3시간 처리군과 6시간 처리군에서도 침체반응률이 69.7±5.5~100±0.0%으로 대조군(22.3±1.5~81.3±5.0%)보다 통계적으로 높은 침체반응률을 나타냈으며(p<0.001), 고농도 처리군(200 mIU, 400mIU)이 저농도군들에 비해 침체반응률이 낮게 나타났다. 실험군이 처리농도에 관계없이 대조군에 비해 침체반응이 빠르게 진행됨을 보여주고 있다 (Table 2).

#### 3) Sodium nitroprusside (NO donor) 처리군

NO를 0.1 μM~100 μM까지 1시간에서 6시간까지 처리하여 침체반응률을 알아본 결과는 다음과 같다. 1시간 처리군에서 수정능력획득률은 0.1, 1 μM군을 제외한 모든 처리농도에서(29.7±4.5, 71.3±6.0, 85.7±3.5%) 대조군(9.7±7.5%)에 비해 유의하게 높게 나타났다(p<0.001). 3시간 처리시에는 모든 처리군(95.0±3.0, 97.7±1.5, 87.7±2.5, 86.0±2.6%)에서 대조군(22.3±1.5%)에 비해 높은 침체반응률을 나타냈다. 6시간 처리시에는 대조군과 차이가 없는 것으로 나타났다 (Table 2).

#### 4) Lymphocyte 처리군

Lymphocyte를 농도별로 1시간에서 6시간까지 처리하여 침체반응률을 알아본 결과는 다음과 같다. 1시간 처리군에서 침체반응률은 저농도군(1×10<sup>6</sup>/ml, 2×10<sup>6</sup>/ml; 3.0±1.0, 2.0±

**Table 2. Effect of various reactive oxygen species on the actosome reaction of human sperm membrane incubated for 1, 3 and 6hr**

Treatment	Time (hr)		
	1	3	6
Control	9.0±7.5	14.3±2.7	18.5±5.7
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> conc.			
125 μM	53.7±15.1**	72.7±21.0**	100.0±0.0**
250 μM	58.7±11.0**	51.7±10.4**	100.0±0.0**
500 μM	62.7±9.3**	44.3±4.0**	99.0±1.7**
1mM	45.3±10.4	37.3±5.8**	100.0±0.0**
X(μM) / XO(mIU)			
100 50	14.3±7.8	79.7±4.5**	100.0±0.0
100 100	10.3±7.8	95.3±3.5**	95.7±1.5
100 200	15.3±4.2	78.0±8.7**	91.3±3.1
100 400	10.3±7.8	69.7±5.5**	80.3±8.6
Sodium nitroprusside			
0.1 μM	3.0±1.0	21.7±4.5	100.0±0.0**
1 μM	2.0±1.0	15.0±1.0**	99.7±0.6**
10 μM	50.3±2.1**	17.3±4.5	95.0±6.2
100 μM	40.3±1.7**	20.3±1.2	75.7±3.1
Lymphocyte			
1×10 <sup>6</sup> /ml	12.0±2.0	95.0±3.0**	96.7±1.5
2×10 <sup>6</sup> /ml	29.7±4.5**	97.7±1.5**	97.0±1.0
3×10 <sup>6</sup> /ml	71.3±6.0**	87.7±2.5**	84.3±2.1
4×10 <sup>6</sup> /ml	85.7±3.5**	86.03±2.6**	83.0±5.0
5% oxygen	14.0±7.2	80.7±3.1**	94.3±1.5**

† Data are presented as means±SEM(n=5)

† Different superscripts indicate a significant difference(p<0.01) (Chi-square test) between data in the same raw.

1.0%)에서는 대조군 (9.0±7.5%)에 비해 유의하게 낮게 나타났으나 (p<0.001), 고농도 군에서는 높은 침체반응률을 보여주고 있다. 3시간 처리시의 결과는 2×10<sup>6</sup>/ml, 3×10<sup>6</sup>/ml의 농도를 처리한 군에서는 대조군보다 낮은 침체반응률을 보여 주었으며, 다른 군에서는 차이가 없었다. 6시간 처리군에서는 저농도군 (1×10<sup>6</sup>/ml, 2×10<sup>6</sup>/ml; 3.0±1.0, 2.0±1.0%)에서는 대조군 (9.0±7.5%)에 비해 유의하게 높은 침체반응률을 보여주고 있으나 (p<0.001), 고농도군에서는 낮게 나타났다 (Table 2).

##### 5) Low (5%) O<sub>2</sub> 처리군

5% O<sub>2</sub>를 시간별로 처리하여 대조군 (20% O<sub>2</sub>)과 침체반응률을 알아본 결과는 다음과 같다. 1시간 처리시에는 대조군과 차이가 없었으나 3시간군 (80.7±3.1%)과 6시간 처리군

(94.3±1.5%)에서 침체반응률이 대조군 (22.3±1.5, 81.3±5.0%)에 비해 유의하게 높게 나타났다. 실험군이 처리농도에 관계없이 대조군에 비해 수정능력획득 정도가 빠르게 진행됨을 보여주고 있다 (Table 2).

## 고 찰

정액내에는 정상적인 정자뿐 아니라 운동성이 없는 정자, 비정상적인 정자, 백혈구 그리고 정상적인 형태를 가지고 있으나 기능적인 면에서는 비정상인 세포들이 혼재되어 있으며 이들 모두에게서 반응성 산소종 (reactive oxygen species, ROS)이 생성되고 있는 것으로 보고되고 있다 (Rao et al., 1989; Iwasaki and Gagnon, 1992). Neutrophil이 가장 강력한 반응성 산소종의 방생체로 알려져 있으나 아직까지는 논쟁의 여지가 있다. 이는 leukocytospermia가 남성불임의 하나로 인식되기는 하고 있지만 그 영향에 있어서는 검증되지 않은 부분들이 많이 남아 있기 때문이다.

최근 들어 정교하게 조절되는 낮은 농도의 반응성 산소종은 signal transduction cascade에 관여한다고 보고되고 있으며 (Baeuerle et al., 1996; Suzuki et al., 1997), 이러한 역할이 정자의 수정능 (fertilizability)의 획득에 중요하다고 알려지고 있다 (Yanagimachi, 1994; De Lamirande et al., 1998). 정자가 수정능력획득과 hyperactivated 운동성을 갖게 되는 것은 반응성 산소종에 의해 조절되는 것으로 생각하고 있다 (De Lamirande and Gagnon, 1993; Griveau et al., 1994; Aitken et al., 1995; Leclerc et al., 1998; Kang et al., 1999).

De Lamirande등에 의하면 (1993, 1998) 사람 정자에서의 수정능력획득에 superoxide anion의 역할은 수정능력획득을 촉진하는 것으로 설명하고 있는 데 이는 superoxide dismutase (SOD)와 같은 항산화제를 첨가할 경우에 수정능력획득이 억제되어지는 것으로 확인되고 있으며, 본 연구에서도 xanthine-xanthine oxidase (X-XO)를 농도별로 첨가한 경우의 결과와도 일치한다. 이러한 수정능력획득 양상은 반응성 산소종으로 처리한 직후인 30분부터 1시간까지의 시간에 활발하게 진행되었으며 (Fig. 2), 특히, 자체적인 반응성 산소종에 의존하는 대조군에 비해 처리군에서 1시간 이상 빠른 수정능력획득이 진행되었다. 수정능력획득률은 1시간을 정점으로 해서 점진적으로 감소하는 것으로 나타났으며, 다른 연구자의 결과 (De Lamirande et al., 1995a; De Lamirande and Gagnon, 1995b; De Lamirande et al., 1998)와도 일치하는 것으로 사료된다. 이러한 반응성 산소종의 첨가로 인한 수정능력획득의 조기 성취는 반응성 산소종이 수정능력획득, hyperactivation

과 같은 현상의 시발점 또는 조절자임을 시사하는 것으로 사료된다.

Superoxide 뿐 아니라  $H_2O_2$ 와 같은 산소족에서도 수정능력 획득 야기 양상 (Fig. 1)은 superoxide anion과 같은 것으로 나타났는데, 이는 superoxide의 항산화제인 catalase를 처리한 후 수정능력획득률이 감소했다는 다른 연구자들의 보고 (Griveau et al., 1995a; Aitken et al., 1995; Leclerc et al., 1997)와 같은 결과라고 사료된다. Nitric oxide (NO) 역시, 같은 양상을 보여주고 있지만 NO가 직접적으로 수정능력획득에 관여한다는 증거는 아직까지 확립되어 있지 않다 (Fig. 3). 다만 NO의 경우 정자와의 반응으로  $H_2O_2$ 를 생성해 내는 것으로 알려져 있으며 (Zini et al., 1995), 본 연구에서도 결과가  $H_2O_2$ 처리와 같은 궤적으로 나타내는 것으로 보아 Zini 등(1995)의 추론에 대한 증거라고 사료된다. 아직까지  $H_2O_2$ 와 NO가 정자에게서 직접적으로 생성되어지거나 반응하는 것이라는 증거는 없다 하지만, 배란시 여성의 생식수관내에 산소농도가 잠시 증가한다거나 (Maas et al., 1976), 난포액내 고농도의 NO가 수정시점의 정자에 영향을 미치는 것으로 사료된다 (Joo et al., 1999).

Leukocyte는 생체내에서 가장 강력한 반응성 산소족의 발생체이다. 남성에 있어서 감염 등에 의해 정액내 leukocyte 수가  $1 \times 10^6$ /ml을 초과하는 경우를 불임의 원인으로 정하고 있다. 본 연구에서는  $1 \sim 2 \times 10^6$ /ml의 lymphocyte에서는 수정능력획득을 저해하는 것으로 나타나 지금까지의 결과들과 같은 결과를 얻었으나  $3 \sim 4 \times 10^6$ /ml의 경우에 보다 더 높은 억제효과를 얻지는 못하였다 (Fig. 4). 이러한 결과는 lymphocyte에서 발생하는 반응성 산소족이 정자의 기능에 영향을 미치는 것은 하지만 lymphocyte 중에서 주된 반응성 산소족의 발생체인 polynuclear macrophage (PNM)의 비율이 높고 낮음이 저해 정도를 결정짓는 것으로 사료된다 (Gonzales et al., 1992; Plante et al., 1994; Zalata et al., 1998).

또한 저산소 농도에서는 다른 반응성 산소족을 처리한 경우와 같은 급격한 수정능력 획득양상은 나타나지 않았지만 대조군보다 빠른 시간에서 수정능력 획득이 야기되어진 것은 동일한 양상이었다 (Fig. 5). 이는 반응성 산소족을 처리한 실험에서의 낮은 농도에서 수정능력 획득이 빠르게 일어난 것과 같은 결과이며, 정자를 세척하거나 단순히 배양기내에서 배양하는 것과 같은 과정 중에서도 고 농도 ( $20\% O_2$ )산소에 의한 저해요인이 존재함을 나타내는 증거라고 사료된다.

이상의 결과를 종합해 보면, 반응성 산소족은 그 종류에 관계없이 사람 사정 정자의 수정능력획득에 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 특히,  $5\% O_2$ 에서  $20\% O_2$ 보다 빠른 수정

능력 획득을 일으키는 것을 확인한 결과는 보조 생식술을 시행하는 데 있어 정자를 다루는 방법과 과정에 있어 보다 더 세밀하고 정확한 계산이 필요함을 시사한다고 사료된다. 또한 남성불임요인의 하나로 알려진 leukocytospermia와 같은 경우는 백혈구의 숫자의 많고 적음보다 실제 영향을 미칠 수 있는 PNM세포에 대한 검증작업이 더 중요함을 확인할 수 있었다.

반응성 산소족에 대한 방어기작이 세포내에서 중요한 의미를 갖는 것은 반응성 산소족에 의한 주된 표적이 세포막구조라는 것이다 (Halliwell and Gutteridge, 1989). 그 이유는 세포막을 구성하고 있는 주성분인 인지질은 60% 이상이 불포화지방산으로 구성되어져 있으며, 반응성 산소족에 의한 degradation 기작이 지질과산화이기 때문이다. 지질내에 존재하는 불포화 지방산내 탄소간의 이중결합을 반응성 산소족이 공격하여 lipid radical을 형성하게 되면서 일련의 과산화의 연속반응이 일어나게 되는 데 이 과정은 남아 있는 온전한 불포화지방산이 사라질 때까지 계속해서 진행되어지며, 이 과정은 그 자체로서의 세포막에 대한 악영향뿐 아니라 세포막 구조의 재배열 또는 재구성을 저해하게 된다. 즉, 세포막의 가장 큰 특성인 유동성을 저해하게 되는 것이다.

사람 정자의 세포막은 체세포막들보다 더 많은 불포화 지방산을 함유하고 있다고 알려져 있다 (Johns et al., 1978; Alvares and Storey, 1984). 사람 정자에 superoxide anion이나 hydroperoxide등의 산소족을 처리하면 약 20% 정도의 불포화 지방산이 감소되어진다고는 보고 (Alvares and Storey, 1984)처럼, 본 연구에서도 superoxide anion (X-XO), hydroperoxide ( $H_2O_2$ ), nitric oxide (SNP), lymphocyte등과 같은 다양한 반응성 산소족을 처리하였을 때 지질과산화가 유발됨을 알 수 있었다.

본 연구에서 hydroperoxide의 경우, 처리 후 3시간까지는 처리농도에 관계없이 지질 과산화가 덜 일어나는 특징을 보여 주었다 ( $p < 0.01$ ) (Table 1). 이는 Aitken 등 (1995)의 결과와 일치하며, hydroperoxide를 정자자체에서 생성하는 기작이 없기 때문에 다른 반응성 산소군보다 그 일어나는 정도 및 시간이 지연되는 것으로 사료된다. Superoxide anion에 의한 지질 과산화는 대조군에 비해 차이가 없는 것으로 본 연구에서는 밝혀졌는데 ( $p < 0.01$ ) (Table 1) 이는 지금까지의 신선정자를 이용한 결과들과는 배치되는 결과이다. 이러한 결과가 도출된 이유는 냉동보존된 정자의 동결 및 해빙과정에서의 세포막 상해가 그 원인이라 사료된다.

흥미로운 점은 lymphocyte와 저산소 처리군의 결과이다. lymphocyte는 복합적인 반응성 산소족을 유발하는 생체내 세



포이며, 활성화된 경우에는 정자자체에서 생성하는 반응성 산소종의 약 1,000배에 해당하는 반응성 산소종을 방출하는 것으로 보고되어 있다. 본 연구에서는 lymphocyte에 의한 지질 과산화는 처리 1시간에 대조군에 2배 이상의 지질과산화를 유발했으며, 그 이후로는 대조군과 차이가 없었다 ( $p < 0.01$ ) (Table 1). 처리농도에 따른 증가양상은 시사하는 바가 크다 할 수 있겠다. 사정된 정자 내 감염 등으로 인해 lymphocyte의 수가 증가한 경우에 임신률에 안 좋은 영향을 미친다는 보고들 (Tomlinson et al., 1993; De Geyter et al., 1994; Milingo et al., 1996)의 증거라 사료된다. 저산소 (5%) 상태에서 지질 과산화가 낮게 유발되어진 것 ( $p < 0.01$ ) (Table 1)은 배양조건에 따른 차이가 있을 수 있음을 나타내 주는 결과라 사료되며, 많은 항산화제들과의 복합적인 연관 실험을 통해 반응성 산소종에 의한 상해를 예방 혹은 줄일 수 있는 방법으로 활용가치가 있다고 사료된다.

사람 정자에 대한 반응성 산소종의 병리생리학적인 역할에 대해서는 근래 들어서 논의되어지기 시작했다 (Jones et al., 1979; Alvarez et al., 1987; Aitken et al., 1989a,b, 1991, 1993; De Lamirande and Gagnon, 1992a,b). 정자의 기능 중에 수정능력획득과 반응성 산소종과의 관계는 밝혀진 바가 있으나, 아직까지 반응성 산소종과 침체반응과의 관계는 미진한 상태이다. Aitken 등 (1995)에 의하면, 침체반응과 정자-난자간의 결합에 있어 catalase를 처리하면, 위의 반응들이 저해되고, SOD를 처리하는 관계가 없는 것으로 보아  $H_2O_2$ 는 침체반응에 관여한다고 제시하였으나 침체반응동안  $H_2O_2$ 가 정자에게서 생성된다는 증거는 없다. 또한 Griveau (1995b)는 침체반응과정에서 superoxide anion이 정자에게서 4~5배가 증가하며, SOD에 의해서는 침체반응이 방해받지만 catalase는 저해하지 않는다고 보고하면서, superoxide anion의 donor로써 potassium superoxide를 처리하였을 때, 처리자체만으로는 침체반응이 야기되지 않는 것으로 보아 superoxide는 침체반응에 필요조건이긴 하지만 충분조건은 아니라고 보고하였다. 보다 최근에는 침체반응의 trigger로써 LPC (lysophosphatidylcholine) 또는 생체액들을 이용한 결과에서는 침체반응에는 정자에서 발생하는 superoxide anion이 필요하며, SOD나 catalase 모두에 의해 통제되어진다고 보고 (De Lamirande et al., 1998)되었다. 또한 Joo 등 (1998)은 nitric oxide (NO)도 사람 정자의 침체반응을 촉진시킨다고 보고하였다.

본 연구에서 처리한 4종류의 반응성 산소종과 수정능력획득 및 침체반응과의 관계에서는 수정능력획득 및 침체반응은 모든 반응성 산소종에 저농도군에서는 수정능력획득 및 침체반응을 촉진하나, 고농도에서는 대조군과 유의한 차이

가 없는 것으로 나타났다 (Table 1, 2). 한편, 배양기내 산소농도를 저산소 상태로 유지한 실험에서는 매우 유의한 침체반응의 촉진이 있었다. 따라서 침체반응과 반응성 산소종간의 관계는 처리된 산소종의 종류 및 농도보다는 배양 또는 처리하는 과정에서의 차이가 결과에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

## 인용문헌

- Aitken J, Clarkson JS (1987) Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 81:459-469.
- Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S (1989a) Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol Reprod* 40:183-197.
- Aitken RJ, Clarkson JS, Hargreave TB, Irvine DS, Wu FCW (1989b) Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. *J Androl* 10:214-220.
- Aitken J, Irvine DS, Wu FC (1991) Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am J Obstet Gynecol* 164:542-551.
- Aitken J, Bluckingham D, Harkiss D (1993) Use of a xanthine oxidase oxidant generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 97:441-450.
- Aitken RJ, Buckingham D, Carreras A, Irvine DS (1995) Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in human sperm function. *J Cell Sci* 108:2017-2035.
- Alvarez JG, Storey BT (1984) Lipid peroxidation and the reactions of superoxide and hydrogen peroxide in mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 30:833-841.
- Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT (1987) Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. *J Androl* 8: 338-348.
- Bauerle PA, Rupec RA, Pahl HL (1996) Reactive oxygen intermediates as second messengers of a general pathogen response. *Pathol Biol (Paris)* 44:29-35.

- Brize I, Santander G, Cabello P, Driscoll D, Sharpe C (1991) Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation *in vitro*. *Biol Reprod* 44:398-403.
- De Geyter C, De Geyter M, Behre HM, Schneider HPG, Nieschlag E (1994) Peroxidase-positive round cells and microorgano in human semen together with antibiotic treatment adversely influence the outcome of *in vitro* fertilization and embryo transfer. *Int J Androl* 17:127-134.
- De Lamirande E, Gagnon C (1992a) Reactive oxygen species and human spermatozoa I- Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J Androl* 13:5368-5378.
- De Lamirande E, Gagnon C (1992b) Reactive oxygen species and human spermatozoa II- Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J Androl* 13:5379-5386.
- De Lamirande E, Gagnon C (1993) A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. *Int J Androl* 16:21-25.
- De Lamirande E, Gagnon C (1995b) Capacitation associated production of superoxide anion by human spermatozoa. *Free Radic Biol Med* 18:487-495.
- De Lamirande E, Leduc BE, Iwasaki I, Hassouna M, Gagnon C (1995a) Increased reactive oxygen species formation in semen of patients with spinal cord injury. *Fertil Steril* 63:637-642.
- De Lamirande E, Tsai C, Harakat A, Gagnon C (1998) Involvement of reactive oxygen species in human sperm acrosome reaction induced by A23187, lysophosphatidyl choline, and biological fluid ultrafiltrates. *J Androl* 19: 585-594.
- Gonzales GF, Kortebani G, Mazzolli AM (1992) Leukocytospermia and function of the seminal vesicles on seminal quality. *Fertil Steril* 57:1058-1065.
- Griveau JF, Renard P, Le Lannou D (1994) An *in vitro* promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation. *Int J Androl* 17:300-307.
- Griveau JF, Renard P, Le Lannou D (1995a) Superoxide anion production by human spermatozoa as a part of the ionophore-induced acrosome reaction process. *Int J Androl* 18:67-74.
- Griveau JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP, Lannou DL (1995b) Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defense system in human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 103:17-26.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*. (2nd eds.) Oxford: Clarendon Press, pp 188-276.
- Iwasaki A, Gagnon C (1992) Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril* 57:409-416.
- Jones R, Mann T (1973) Lipid peroxidation in spermatozoa. *Proceeding of the Royal Society of London B*, 184:103-107.
- Jones R, Mann T, Sherins RJ (1978) Adverse effects of peroxidized lipid on human spermatozoa. *Proceeding of the Royal Society of London B*, 201:413-417.
- Joo BS, Moon HS, Park SJ, Moon JY, Cho JD, Kim HD (1998) The effect of Nitric oxide on human sperm function. *Korean J Fertil Steril* 25:59-64.
- Joo BS, Park SH, Park SJ, Kang HS, Moon HS, Kim HD (1999) The effect of nitric oxide on sperm cell function and embryo development. *Am J Reprod Immunol* 42:327-334.
- Jones R, Mann T, Sherins RJ (1979) Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal effects of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* 31:531-537.
- Kang HG, Kim MK, Kim DH, Han SW, Lee HJ, Kim SR, Kim MK (1999) Effect of reactive oxygen species on acrosome reaction, lipid peroxidation and fertilization in mouse spermatozoa. *Dev Reprod* 3:177-184.
- Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C (1997) Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. *Free Radic Biol Med* 22:643-56.
- Maas DH, Storey BT, Mastroianni L Jr (1976) Oxygen tension in the oviduct of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Fertil Steril* 27:1312-1317.
- Mammoto A, Masumoto N, Tahara M, Ikebuchi Y, Ohmichi M, Tasaka K, Miyake A (1996) Reactive oxygen species block sperm-egg fusion via oxidation of sperm sulfhydryl proteins in mice. *Biol Reprod* 55:1063-1068.
- Mckinney KA, Lewis SEM, Thompson W (1996) Reactive oxygen species generation in human sperm: Luminol and lucigenin chemiluminescence probes. *Arch Androl* 36:119-

125.

- Milingos S, Comhaire FH, Laipi A, Aravantos D (1996) The value of semen characteristics and tests of sperm function in selecting couples for intrauterine insemination. *European J OB/GY Reprod Biol* 64:115-118.
- Plante M, de Lamirande E, Gagnon C (1994) Reactive oxygen species related by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa are sufficient to affect normal sperm motility. *Fertil Steril* 62:387-393.
- Rao B, Soufir JC, Martin M, David G (1989) Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. *Gamete Res* 24:127-134.
- Suzuki H, Foote RH, Farrell PB (1997) Computerized imaging and scanning electron microscope (SEM) analysis of co-cultured fresh and frozen bovine sperm. *J Androl* 18:

217-226.

- Tomlinson Mj, Barret CLR, Cooke ID (1993) Prospective study of leukocyte subpopulations in semen suggests they are not a cause of male infertility. *Fertil Steril* 60:1069-1075.
- Yanagimachi R (1994) Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD (eds.), *The physiology of reproduction*. New York; Raven Press Ltd. pp 189-317.
- Zalata AA, Christophe AB, Depuydt CE, Schoonians F, Comhaire FH (1998) White blood cells cause oxidative damages to fatty acid composition of phospholipids of human spermatozoa. *Int J Androl* 21:154-162.
- Zini A, de Lamirande E, Gagnon C (1995) Low levels of nitric oxide promote human sperm capacitation *in vitro*. *J Androl* 16:424-431.