

인간 정자의 완만·급속 동결보존 방법이 융해 후 정자 운동성 지수와 생존율 및 정자 형태에 미치는 영향

김은국[†] · 김정욱 · 김형우
호 산부인과 불임연구실

Effect of Cryopreservation by Slow and Rapid Freezing on the Sperm Motility Index, Viability and Morphology of Post-thaw Human Spermatozoa

E. K. Kim[†], J. W. Kim and H. W. Kim

Ho Obstetrics & Gynecology

SUMMARY

The objective of this study was to investigate the effect of cryopreservation by slow and rapid freezing on the sperm motility index, viability and morphology of post-thaw human spermatozoa. After rapid freezing and thawing, sperm motility index was significantly higher (MOT: $47.40 \pm 20.06\%$, VCL: $38.12 \pm 15.58 \mu\text{m/s}$, VSL: $28.19 \pm 14.10 \mu\text{m/s}$, VAP: $33.64 \pm 15.15 \mu\text{m/s}$, and HYP: $2.77 \pm 2.71\%$) than slow freezing and thawing (MOT: $43.39 \pm 18.79\%$, VCL: $33.91 \pm 13.50 \mu\text{m/s}$, VSL: $19.98 \pm 10.88 \mu\text{m/s}$, VAP: $24.60 \pm 11.72 \mu\text{m/s}$, and HYP: $1.33 \pm 1.57\%$; $P < 0.05$). But sperm Linearity(LIN) was significantly lower (28.83 ± 10.35) comparing to the slow freezing method (34.64 ± 11.36 ; $P < 0.05$).

On the other hand, significant difference were not observed MAD, WOB, DNC and DNM by slow and rapid frozen-thawed methods.

After rapid freezing and thawing, sperm viability was lower ($60 \pm 2.2\%$) than slow freezing method ($62 \pm 2.1\%$) and sperm morphology was higher ($46 \pm 7.7\%$) than that (44 ± 8.3). But there was no significantly.

These results indicate that rapid freezing method was positive effect of sperm cryopreservation in human.

(Key words : cryopreservation, motility, viability, morphology)

서 론

1776년 Spallanzani가 사람의 정액을 동결하려는 첫 번째 시도 이후, 사람 정자의 동결 방법에 많은 진보가 있었다. Glycerol을 항동해제로 사용 (Polge 등, 1949)한 이후에는 사람 정자의 동결보

존이 훨씬 쉬워졌고, 정상정자의 경우 동결·융해 후 인공수정으로 임신이 가능하게 되었으나(Bunge와 Sherman, 1953), 일반적으로 동결을 시행했던 정액은 신선정액보다 임신율이 떨어지는 것으로 알려지고 있다(Sherman, 1973; Beck, 1978). 온도가 낮으면 정자의 대사활동이 가역적으로 감소한

[†]Correspondence : E-mail: cruz3876@hanmail.net

다는 사실(Spallanzani, 1776)에 근거하여 정자의 동결보존에 관한 연구가 시작되었는데, 1936년 Watson과 Prawochenski가 저온충격(cold shock)이 정자의 생존성에 가장 많은 영향을 미친다고 보고한 후 정자를 단계적으로 냉각시키거나 희석액에 지방성분을 첨가(Milovano, 1951)하여 cold shock을 완화하고자 하였다.

정액의 동결보존은 체외수정 및 수정란 이식에 있어서 배우자가 적정한 시간에 정액을 채취하기 곤란할 경우나, 생식기관의 수술 전 또는 암으로 인해서 화학적, 방사능적 처리 시 불임의 가능성이 있는 환자 및 subfertile한 정액을 가진 환자, 그리고 정자 은행을 위한 정자 공여자의 정액을 보존하기 위해서 필요한데, 정액을 동결보존하게 되면 반영구적으로 보존할 수 있고, 시간과 장소에 제한 없이 이용 가능하여 불임극복에 큰 기여를 할 수 있게 된다(Mahadevan과 Trounson, 1981). 정자의 동결보존 방법은 수정란을 동결보존하는 것처럼 정교하게 시행되지는 않지만, 정자 동결시 동결 보호제, 냉각속도 및 시간 등이 정자의 생존성에 영향을 끼치고, 동결정액의 질은 인공수정이나 체외수정의 성공률에 큰 영향을 주므로 정자를 동결상태로부터 최대한 보호해야 한다.

정액을 동결보존하는 방법에는 액체질소의 vapor를 사용하는 rapid method(Thatchill과 Jewett, 1981)와 semi-programmable freezer를 사용하는 slow method(Serafini와 Marrs, 1986)가 있다. Rapid method는 액체질소에 정액을 침지하기 전에 8~30분 동안 액체질소 vapor에 정액을 노출시키는 방법이고, slow method는 computer를 이용하여 냉각 온도를 2~3단계별로 감소시키는 방법인데, 첫 단계는 5°C ~ -9°C 사이의 온도까지는 느린 속도로, 두 번째 단계는 -40°C ~ -80°C 사이의 온도까지 빠른 속도로 감소시킨 다음 액체질소에 보관하는 방법으로 Verheyen 등(1993)은 slow method가 low quality sperm에 대한 손상을 줄일 수 있다고 보고하였다.

그러나 semi-programmable freezer를 이용한 slow method 방법은 고가의 장비가 필요하고, 동결과정에 많은 시간이 소요되며, 번거로운 점이 단점으로 지적되고 있는 반면, 액체질소의 vapor를

이용한 급속동결 방법은 특별한 장비가 필요없고, 동결에 소요되는 시간도 총 20여분 정도로 매우 간단하여 임상실험에서 유용할 것으로 기대된다.

한편, 정액의 육안적 및 현미경적 검사는 실험실 및 검사자의 주관적인 여건이 개입되므로 정액 검사의 표준화에 어려움이 있어 동일한 시료 내에서 검사자간의 변이계수의 범위는 30~80%로 매우 크다(Dunphy 등, 1989; Jequier와 Ukome, 1983). 그러나 정액 자동분석기는 높은 정확성과 객관적인 자료를 얻을 수 있을 뿐만 아니라 정자의 직진속도, 곡선속도 등 육안적 검사로 측정 불가능한 정자의 운동성에 관한 새로운 지표들을 측정할 수 있어 현재 임상에서 유용하게 적용되고 있다(Hurowitz 등, 1995; 백 등, 1997).

따라서 본 실험은 semi-programmable freezer를 이용한 완만동결 방법과, 액체질소의 vapor를 이용한 급속동결 방법이 동결·융해 후 사람 정자의 운동양상(motility)과 생존율(viability) 및 형태(morphology)에 미치는 영향을 정액 자동분석기(SAIS)를 이용하여 비교하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 정자의 준비

금욕기간이 3일 이상인 정액 공여자로부터 수음법에 의해 정액을 채취 후 실험에 공시하였으며, Table 1의 WHO(World Health Organization)기준에 준하여 원정액을 검사하였다.

2. 정자의 운동성 분석

정액의 분석시 각 운동특성의 정의(Table 2), 단위, 정액자동분석기의 기준, 측정항목 및 원리는 Davis 등(1992), Farrell 등(1996), 이 등(1997) 및 이 등(1995)의 사항에 준하여 실시하였다.

정자의 운동성 특성은 위상차 현미경(Olympus CH-2, Japan)과 CCD Camera(Toshiba, Japan)를 통해 연결된 sperm analysis imaging system(SAIS, Medical supply Co, Korea)를 이용하여 실시하였다. 정자의 운동특성 분석시 대물렌즈 배율은 10X, CCD Camera의 렌즈는 3.3X로 하였고, Makler counting chamber(Sefi medical, Israel)상의 0.01 mm²

Table 1. Normal(WHO) and pathologic ranges in semen analysis

Semen characteristics	Normal	Pathological
Volume(ml)	2.0~5.0	< 1.5
pH	7.2~8.0	
Sperm concentration(M/ml)	20~250	< 10
Total sperm count(M/ejaculate)	> 40	< 20
Motility(0.5~2 h after ejaculate)	> 50	< 35
Progression at 37°C(0~4)	3 or 4	< 2
Morphology(/100 sperm)	> 30	> 60
White blood cell	< 1 mil/ml	> 1 mil/ml

Adapted from World Health Organization.

Laboratory manual for the examination of human semen and semen cervical mucus interaction. Cambridge, Cambridge University press, 1992.

Table 2. Traditional and new measures of sperm swimming pattern and vigor

Symbol	Name	Definition
MOT	Percent motility	Percentage of sperm cells in a suspension that are motile
VSL	Straight-line velocity	Time-average velocity of the sperm head along a straight line from its first position to its last position
VCL	Curvilinear velocity	Time-average velocity of the sperm head along its actual trajectory
VAP	Average path velocity	Time-average velocity of the sperm head along its average trajectory
LIN	Linearity	Linearity of the curvilinear trajectory(VSL/VCL)
ALH	Amplitude of lateral head displacement	Amplitude of variations of the actual sperm-head trajectory about its average trajectory

의 정사각형을 프로그램상의 크기 기준에 일치시켜 계산되는 모든 수치의 기준으로 설정하였다.

본 실험에 사용된 SAIS 기종의 초기 설정치는

Table 3. Parameter setting used with semen analysis imaging system

System parameter	Value
Image sampling frequency(frame/s)	30
Duration of image capture(s)	1
Minimum motile speed($\mu\text{m/s}$)	VSL* 10
Maximum motile speed($\mu\text{m/s}$)	VSL* 250
Maximum countable number(sperm)	400
Maximum countable frame	10

* VSL : straight-line velocity.

Table 3과 같으며, 분석 전 Markler counting chamber를 heat block(VWR Scientific, USA)위에 올려 놓아 온도를 37°C로 유지하였다. 37°C로 가온된 Markler counting chamber에 정액 5 μl 를 분주 후 시야당 1초씩 5개의 시야를 선택하였고, 이물질이 정자로 오인되는 것을 방지하기 위해 화면상에서 실제 정자의 영상과 이진영상을 반복 비교하여 이진영상의 밝기와 대비를 조절하여 영상을 시스템에 입력하여 1시야가 1초 노출되는 동안 30 frame을 분석하여 평균치를 측정하였다.

SAIS에 의해 분석되는 각 정자의 운동특성은 Fig. 1과 같은데, 정자의 실제 이동경로에 따른 이동속도인 곡선경로 속도(VCL, $\mu\text{m/s}$), 단위시간당 시점에서 종점까지의 속도를 나타내는 직선경로

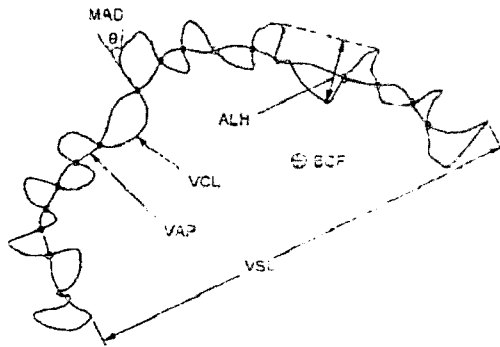


Fig. 1. Traditional measures of sperm-head swimming trajectory pattern and vigor.

- VCS : curvilinear velocity($\mu\text{m}/\text{sec}$)
- VSL : straightline velocity($\mu\text{m}/\text{sec}$)
- VAP : average pathway velocity($\mu\text{m}/\text{sec}$)
- ALH : amplitude of lateral head displacement
- BCF : beat cross frequency
- MAD : mean angular displacement

속도(VSL, $\mu\text{m}/\text{s}$), 곡선이동경로에 대한 평균 이동을 나타내는 평균경로 속도(VAP, $\mu\text{m}/\text{s}$), 위의 측정된 운동특성들을 바탕으로 곡선경로 선형도(LIN, %), 평균 이동경로와 실제 이동경로와의 측방 거리차인 측두거리(ALH, μm), $80 \mu\text{m}/\text{s}$ 이상의 VCL과 $6.5 \mu\text{m}$ 이상의 ALH 및 65% 이하의 LIN로 정의되는 고효율 정자(HYP, %), 평균경로 선형도(STR, %), 실제 이동경로가 평균 이동경로와 만나는 횟수의 시간당 비율(BCF, Hz), 정자 두부의 이동시 회전각의 절대값(MAD, degree), 곡선 전진을 값으로 WOB(%), 정자운동 모양의 값으로 DNC 및 DNM(μm), 그리고 운동성(MOT, %)을 분석하였다.

3. 정자의 생존을 검사

정자의 생존을 관찰하기 위해서는 eosin Y-nigrosin을 이용한 생사 염색법(Sharma 등, 1997; Barth와 Oko, 1989)을 이용하였다. 먼저 slide glass 위에 raw semen 1 drop을 떨어뜨리고 그 위에 eosin Y 1 drop과 nigrosin 2 drop을 떨어뜨린 후 잘 혼합하여 얇게 도말하여 건조하였다. 그 후 위상차 현미경 하에서 $400 \times$ 로 100개의 정자를 관찰하여 정자의 두부가 보라색으로 염색된 정자는

사멸정자로, 염색이 되지 않은 정자는 생존정자로 판별하였는데, 각각 2회 반복실험을 한 후 평균값을 제시하였다.

정자의 형태를 측정하기 위해서는 Kruger 등(1987)의 Diff-Quik 염색방법을 이용하였는데, 생사염색법과 동일하게 slide glass 위에 raw semen 1 drop을 떨어뜨려 얇게 smear하고 실온에서 건조하여 sample을 만들었다. 건조된 sample을 고정액(Diff-Quik Fixative, Kukje, Japan)에 15초 동안 침지하여 실온에서 건조시킨 다음, 염색액 I(Diff-Quik solution I, Kukje, Japan)에서 10초 동안 염색하고 건조한 후 sample의 염색얼룩을 제거하기 위해 증류수로 washing하여 건조하였다. 건조된 sample을 염색액 II(Diff-Quik solution II, Kukje, Japan)에서 5초간 침지하여 염색하고 건조시킨 다음 잔류염색액을 증류수로 washing하고 실온에서 건조하였으며, 염색이 끝난 sample위에 immersion oil(sigma, USA)을 1 drop 떨어뜨린 후 위상차 현미경 하에서 $1000 \times$ 로 100개의 정자를 관찰하였다.

4. 정자의 형태분석

정자의 형태분석은 Diff-Quik 염색 후, 정자 자동분석기를 이용하여 한 처리구당 각각 100개의 정자를 분석하였다. 정상 정자의 형태(normal morphology, NOM)은 Oettle 등(1991)의 방법에 준하여 측정을 하였는데, 두부의 길이가 $5 \sim 6 \mu\text{m}$, 너비는 $2.5 \sim 3.5 \mu\text{m}$, 정자 두부에서 차지하는 침체의 비율이 $>40\%$ 에 해당하는 정자를 정상형태로, 전체 모양이 부정형(amorphous), 대형(megalo), 소형(small), 선세형(elongated) 등에 해당하는 정자는 비정상적으로 분류하였다.

5. 정자의 동결

정자의 동결 보호제로는 egg yolk에 glycerol이 첨가된 test yolk buffer(TYB, Irvine Scientific, USA)를 사용하였는데, 먼저 raw semen을 37°C incubator에서 liquefaction 후 원심분리기(Kubota 2000, Japan)를 이용하여 1000 g에서 5분동안 원심 분리하여 정장을 제거하였다. 그 다음 정자 pellet과 동결 보호제인 TYB를 1:1 비율로 혼합하여 cryogenic vial(corning, Canada)에 양분 후, 하나는

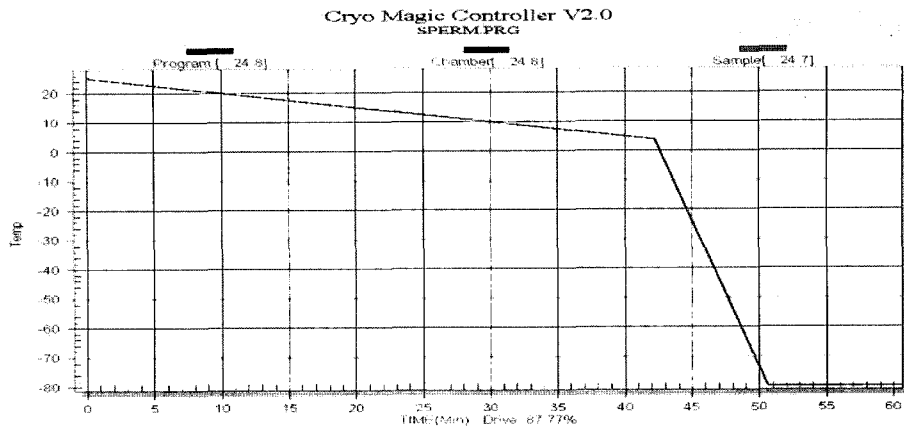


Fig. 2. Freezing procedure by programing cell freezer method.

액체질소 표면에서 10분간 정지하여 액체질소 탱크에 곧바로 침지하는 급속동결 방법으로, 다른 하나는 액체질소를 이용한 program 세포 동결기 (Cryo Magic, 맥코이 교역(주), Korea)를 이용하여 완만동결을 실시하였는데, 완만동결은 Fig. 2와 같이 25°C에서 4°C 까지는 분당 -0.5°C 속도로 냉각하여 30초간 정지시킨 후, 4°C에서 -80°C 까지는 분당 -10°C 속도로 냉각하고 10분간 정지시키는 동안에 액체질소 탱크에 보관하였다.

6. 동결정액 용해

액체질소에서 보관중인 동결정액을 꺼내어 물이 채워진 37°C heat block에서 5분간 용해하였는데, 동결정액을 희석하거나 동해방지제를 제거하지 않은 상태에서 raw semen 분석 방법과 동일하게 정자의 운동성 분석 및 염색을 실시하였다.

7. 통계학적 분석

본 연구에서 얻어진 실험결과와 통계처리는 Student's T-test를 이용하여 실시하였다.

결과 및 고찰

동결방법이 사람 정자의 동결-용해 후 운동특성에 미치는 영향은 Table 4와 같다. 초당 $10\ \mu\text{m}$ 이상 운동한 정자 비율인 MOT는 급속 동결방법이 $47.40 \pm 20.06\%$ 로 완만 동결방법보다 높았고, 곡선

운동속도(VCL) 역시 급속 동결방법이 $38.12 \pm 15.58\ \mu\text{m/s}$ 로 완만동결 방법보다 유의적으로 높았다($p < 0.05$). 선형운동속도(VSL) 및 평균경로속도(VAP)도 각각 $28.19 \pm 14.10\ \mu\text{m/s}$, $33.64 \pm 15.15\ \mu\text{m/s}$ 로 완만동결 방법보다 유의적으로 높았으나, 곡선경로 선형도(LIN)는 완만동결 방법이 34.64 ± 11.36 으로 더 좋은 성적을 나타내었다($p < 0.05$).

동결-용해 후 고활력 정자(HYP)도 급속동결 방법에서 $2.77 \pm 2.71\%$ 로 완만동결 방법의 $1.33 \pm 1.57\%$ 보다 유의적으로 높았다($p < 0.05$). 그러나 정자의 운동양태를 나타내는 MAD, WOB, DNC, DNM에 있어서는 완만동결 방법이 급속동결 방법에 비해 조금 더 좋은 성적을 나타냈으나 유의적인 차이는 없었다.

동결방법에 따른 사람 정자의 동결-용해 후 생존율 및 형태학적 특성은 Table 5와 같다. 완만동결 방법을 이용했을 때 용해 후 정자 생존율은 62%로 급속동결 방법 60%보다 약간 높은 수치를 나타냈으나 유의적인 차이는 없었다. 하지만 정상적인 정자형태는 급속동결 방법이 46%로 완만동결 방법 34%보다 유의적으로 높았다($p < 0.05$).

정액의 동결 보존은 정자를 장기간 보존하여 시간과 장소의 제한없이 불임극복에 이용(Mahadevan과 Trounson, 1981)하는데 궁극적인 목적이 있는데, 일반적으로 동결-용해 후 정자의 생존성은 약 50% 수준으로 감소하고(Oettle, 1982), 운동성이 약해지며(Foote, 1964; Yubi 등, 1987), 첨체가

Table 4. Effect of the cryo-preservation method on the sperm motility index of frozen-thawed human spermatozoa

Parameters*	Raw semen	Cryo-preservation	
		Slow method	Rapid method
MOT(%)	60.89±19.18	43.39±18.79 ^b	47.40±20.06 ^a
VCL(μm/s)	50.24±18.97	33.91±13.50 ^b	38.12±15.58 ^a
VSL(μm/s)	35.48±14.89	19.98±10.88 ^b	28.19±14.10 ^a
VAP(μm/s)	41.21±13.97	24.60±11.72 ^b	33.64±15.15 ^a
LIN	52.12±17.40	34.64±11.36 ^a	28.83±10.35 ^b
ALH(μm)	3.60± 0.85	2.86± 0.72	2.48± 0.84
HYP(%)	6.45± 3.91	1.33± 1.57 ^b	2.77± 2.71 ^a
STR	71.45± 3.87	56.26±10.60	52.65± 8.13
BCF(Hz)	8.74± 2.97	4.58± 2.66	4.21± 3.38
MAD(Degree)	12.12± 4.62	8.09± 4.41	9.42± 5.63
WOB	72.96± 5.7	61.28± 8.59	58.63± 7.78
DNC	114.90±83.94	42.87±38.65	39.57±21.33
DNM(μm)	6.91± 1.6	8.34± 2.49	8.66± 1.35

Means±SD in row each with different superscripts differ(p<0.05).

* MOT : motility(%), VCL : curvilinear velocity(μm/sec), VSL : straight-line velocity(μm/sec), VAP : average-path velocity(μm/sec), LIN : linearity, ALH : amplitude of lateral head displacement, HYP : hyperactivated, STR : straightness, BCF : beat-cross frequency, MAD : mean angular displacement, WOB : wobble, DNC : dance, DNM : dancemean.

Table 5. Comparison of viability and morphology of the frozen-thawed human semen

Cryo-preservation	Viability(%)	Morphology(%)
Raw semen	77±4.6	55±9.6.
Slow method	62±2.1	44±8.3
Rapid method	60±2.2	46±7.7

변형되어 수태율이 저하된다고 알려져 있다(Ferguson 등, 1989). 본 실험에 있어서도 완만동결 방법과 급속동결 방법 모두 운동성과 생존율 및 정상형태의 정자수가 원정액에 비해 조금씩 떨어졌으나 50% 수준으로 감소하지는 않았다.

또 Verheyen 등(1993)이 완만 동결법이 정자의 quality에 대한 손상을 줄일 수 있다고 보고한 것과 달리 오히려 용해 후 정자의 운동속도, 고탈력 정자들은 급속 동결방법이 완만동결 방법보다 더 좋았음을 알 수 있었고, 생존율(slow method : 62%, rapid method : 60%)과 정자의 형태학적인 면(slow method : 44%, rapid method : 46%)에서는 유의적

인 차이가 없었다. 이는 Ivanova와 Kicheva 등(1995)이 발표한 동결-용해 후 생존율 및 Strom 등(1997)이 발표한 정상정자 형태(46~50%)와 비슷한 결과를 나타내었다.

적 요

정자의 동결보존을 위한 새로운 기술개발 목적은 동결과정에서 최소한의 손상으로, 용해 후 최대한 높은 활력도의 정자를 얻는 것이다. 정자가 난자와 수정하기 위해서는 적당한 생존성과 운동성을 유지해야 하는데, 가장 일반적인 방법으로는 정자의 전진 운동성과 침체의 정상 여부 및 형태 검사방법 등이 있다. 본 연구는 사람 정액을 동결보존 할 때 semi-programmable freezer를 이용한 완만동결 방법과, 액체질소의 vapor를 이용한 급속동결 방법이 용해 후 정자의 운동양상과 생존율 및 형태에 미치는 영향을 알아보기 위해 실시하였다.

동결-용해 후 정자의 MOT, VCL, VSL, VAP는

각각 급속 동결방법에서 $47.40 \pm 20.06\%$, $38.12 \pm 15.58 \mu\text{m/s}$, $28.19 \pm 14.10 \mu\text{m/s}$, $33.64 \pm 15.15 \mu\text{m/s}$ 로 완만 동결방법인 $43.39 \pm 18.79\%$, $33.91 \pm 13.50 \mu\text{m/s}$, $19.98 \pm 10.88 \mu\text{m/s}$, $24.60 \pm 11.72 \mu\text{m/s}$ 보다 유의적으로 높았으나($p < 0.05$), LIN은 완만동결 방법이 34.64 ± 11.36 으로 급속동결 방법인 28.83 ± 10.35 보다 더 좋은 성적을 나타내었다($p < 0.05$).

고 활력정자를 나타내는 HYP 역시 급속동결 방법에서 $2.77 \pm 2.71\%$ 로 완만동결 방법의 $1.33 \pm 1.57\%$ 보다 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). 그러나 정자의 운동양태를 나타내는 MAD, WOB, DNC, DNM에 있어서는 완만동결 방법이 급속동결 방법에 비해 조금 더 좋은 성적을 보였으나 유의적인 차이는 없었다.

동결-융해 후 정자의 생존율 및 정상형태의 정자는 완만동결 방법이 각각 $62 \pm 2.1\%$, $44 \pm 8.3\%$, 급속동결 방법은 $60 \pm 2.2\%$, $46 \pm 7.7\%$ 로 유의적인 차이가 없이 비슷한 결과를 보였다.

따라서 사람 정액의 동결 보존 시 많은 시간과 고가의 장비가 필요한 완만동결 방법보다는 짧은 시간동안 액체 질소만으로 간단히 시행할 수 있는 급속동결 방법이 더 효과적이라고 사료된다.

참고문헌

Barth AD and Oko RJ. 1989. Preparation of semen for morphological examination. In *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Iowa. Iowa State University Press, pp:8-18.

Beck WW Jr. 1978. Artificial insemination and preservation of semen. *Urol. Clin. N. Am.*, 5: 593.

Bunge RG and Sherman JK. 1953. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature*, 172:767.

Davis RO and Katz DF. 1992. Standardization and comparability of CASA instruments. *J. Androl.*, 13:81-86.

Davis RO, Niswander PW and Katz DF. 1992. New measures of sperm motion. I. Adaptive

smoothing and harmonic analysis. *J. Androl.*, 13:139-152.

Dunphy BC, Kay R, Barratt CLR, et al. 1989. Quality control during the conventional analysis of semen as essential exercise. *J. Androl.*, 10:378.

Farrell PB, Foote RH and McArdle MM. 1996. Media and diluents procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit, and bull sperm for computer-assisted sperm analysis(CASA). *J. Androl.*, 17:293-300.

Foote RH. 1964. The effects of electrolytes, sugars, glycerol, and catalase on survival of dog sperm in buffered yolk medium. *American J. of Vet. Res.*, 25:32-36.

Hurowitz EH, Leung A and Wang C. 1995. Evaluation of the CellTrak computer, assisted sperm analysis system in comparison to the Cellsoft system to measure human sperm hyperactivation. *Fertil Steril.*, 64:427-432.

Ivanova-Kicheva MG, Subev, MS, Bobodov ND, Dacheva DP and Rouseva IA. 1995. Effect of thawing regimens on the morphofunctional state of canine spermatozoa. *Theriogenology*, 44:563-569.

Jequier Am and Ukome EB. 1983. Errors inherent in the performance of a routine semen analyses. *Br. J. Urol.*, 55:434.

Kruger TF, Ackerman SB, Simmons KF, Swanson RJ, Brugo S and Acosta AA. 1987. A quick, reliable staining technique for human sperm morphology. *Arch. Androl.*, 18:275.

Milovanov VK. 1951. Methods of storage of semen of ruminants. In *'News in the Biology of Reproduction of Farm Animals'*, 139-165.

Oettle EE. 1982. Preliminary report : a pregnancy from frozen centrifuged dog semen. *South African Vet. Assoc.*, 53:269-270.

Oettle EE, Menkveld R, Swanson RJ, Oehninger S, Kruger TF and Acosta AA. 1991. Atlas of human sperm morphology ; photomicrographs

- with interpretations. Williams & Wilkins., pp: 15-96.
- Polge C, Smith AU and Parkes AS. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature*, 164:666-676.
- Serafini P and Marrs RP. 1986. Computerized staged freezing technique improves sperm survival and preserves penetration of zona-free hamster ova. *Fertil. Steril.*, 45:854-858.
- Sharma RK, Seifarth K and Agarwal A. 1997. Comparison of single-and two-layer percoll separation for selection of motile spermatozoa. *Int. J. Fertil. Womens. Med.*, 42(6):412-417.
- Sherman JK. 1973. Synopsis of the use of frozen human semen since 1964: state of the art of human semen banking. *Fertil. Steril.*, 24:397.
- Spallanzani L. 1776. *Opuscoli de fisca spermatici, animale e vegetabile, opusculi II. Osservazioni a Sperienze intorno ai Vermicelli dell'Uomo et degli animli.* Modena, Italy.
- Strom B, Rota A and Linde-Forsberg C. 1997. *In vitro* characteristics of canine spermatozoa subjected to two methods of cryopreservation. *Theriogenology*, 48:247-256.
- Thatchill JV and Jewett MAS. 1981. Preservation technique for human semen. *Fertil. Steril.*, 35: 546- 548.
- Watson A and Prawachenski R. 1936. An experiment in euteleogenesis. *J. Hered.*, 27:341-344.
- Yubi AC, Ferguson JM, Renton JP, Harker S, Harvey MJA, Bagyenji B and Douglas TA. 1987. Some observations on the dilution, cooling and freezing of canine semen. *J. Small Anim. Pract.*, 28:753-761.
- 백재승, 전성수, 김수웅 등. 1997. 정자의 형태학적 특성분석에 관한 연구. *대한불임학회지*, 24: 153-165.
- 이강남, 노상호, 윤기영, 용환율, 이강남, 신태영, 이병천, 황우석. 1997. 정액자동분석기를 활용한 동결용해 한우정자의 운동특성. *대한수의학회지*, 37(3)부록:158.
- 이원진, 전성수, 박광석, 백재승. 1995. 개인용 컴퓨터(PC)를 이용한 정액분석기의 개발. *대한불임학회지*, 22(1):63-73.

(접수일 : 2002. 11. 11/ 채택일 : 2003. 2. 20)