

Efficacy of Intracytoplasmic Sperm Injection for Leukocytospermia

Hyang Heun Lee², Hoi-Chang Lee², Duck-Sung Ko², Won-Il Park², Seung Samuel Kim²,
Hee-Joung Lim¹, Hyung Joon Bae¹, Hi Joo Moon¹ and Hee-Gyoo Kang^{1,2†}

¹Department of Biomedical Laboratory Science, Seoul Health College, Seongnam 461-713,

²Life Science Institute, Eulji University School of Medicine, Seoul 139-711, Korea

White blood cells (WBCs) are present in most human ejaculates, but abnormally high concentration of seminal leukocytes may reflect an underlying pathological condition. The World Health Organization (WHO) has defined leukocytospermia as status of more than 10^6 WBC/mL of semen. The purpose of this study was firstly, to compare the outcomes between conventional IVF and ICSI in leukocytospermia, and secondly, to investigate whether ICSI may be an alternation treatment for patients with leukocytospermia. Total 346 cycles of conventional IVF and ICSI candidates underwent IVF cycles at Eulji Hospital Infertility Clinic. Semen Parameters including concentration, motility, morphology of spermatozoa and concentration of leukocytes were assessed from the raw ejaculates. There was no difference in sperm concentration, motility and morphology. The rates of fertilization and good embryo development from ICSI were significantly higher than those from conventional IVF in leukocytospermia (60.4% & 32.5%, respectively for ICSI group and 44.4% & 28.5%, respectively for IVF group, $P < 0.001$). The pregnancy rate after ICSI was also higher than that from conventional IVF (34.0% vs 29.1%, $P < 0.05$). These results indicate that the presence of seminal leukocytes ($> 1 \times 10^6$ WBC/mL of semen) is adversely related with fertilization, embryo development and pregnancy rate. Therefore the measurement of seminal leukocytes in routine semen analysis appears to be of prognostic value with regard to male fertilizing potential. In conclusion, it is suggested that ICSI is an alternative choice of treatment for patients with leukocytospermia.

Key Words: Sperm, Leukocytospermia, Infertility, ICSI, IVF-ET

서 론

WHO의 정의에 따르면 정액 내에 1×10^6 /mL 이상의 WBC가 존재할 때를 Leukocytospermia라 말하며 비정상적으로 간주하였다¹⁷⁾. Leukocytospermia의 원인은 명백히 알려져 있지 않지만, 세균 또는 바이러스에 의한 감염뿐만 아니라 비정상적 spermatogenesis 또는 장기간 금욕 생활과 같은 환경적 요인과 정맥류와 같은 병리적 상태로부터 기인하는 것으로 알려져 있다⁹⁾.

Leukocytospermia의 빈도는 남성 불임환자 중에 10~20% 정도로 관찰된다고 Wolff 등¹⁶⁾은 보고하였고, 임신군에 비하여 불임군에서 정액 내에 WBC가 유의하게 높았다고 보고

하였다. 남성 생식기 내의 WBC는 interferon- γ , TNF- α 와 같은 cytokines를 분비하거나, 반응성 산소종 (reactive oxygen specie: ROS)를 발생시켜 정자 형성 및 성숙에 영향을 미쳐, 결과적으로 정자 수의 감소, 운동성 감소, 비정상적 형태의 증가 등의 원인으로 알려져 있다⁴⁾.

Berger³⁾ 등은 정액 내에 과립구가 정자의 수정 능력의 지표인 햄스터 난자 penetration test에서 정자의 침투율을 감소시켰다고 보고하였다. 이것은 정액 내의 과립구가 정자의 수정 획득 과정인 정자의 과활성화 (hyperactivation)와 침체반응을 방해했기 때문이라고 한다. Leukocytospermia는 체외수정 시술시 여러 가지 수정 실패의 원인 중 한가지로, 정액 내 WBC 농도가 10^6 WBC/mL 이상을 병리적인 역치로 규정하고 있다. 많은 보고자들은 체외수정시 정자의 기능에 대한 WBC의 악영향에 대해 보고하고 있지만¹²⁾, 다른 몇몇 연구에서의 남성의 수정 요인에서 WBC의 악영향을 확인하지 못했다고 보고하였다¹⁶⁾.

따라서 본 연구의 목적인 첫째, 정액에서 WBC의 존재와 체외수정 시술의 결과 사이의 연관성을 확인하는 것이고 둘

* 논 문 접 수: 2004년 1월 15일

수정재접수: 2004년 2월 26일

† 별책 요청 저자: 강희규, (우) 461-713 경기도 성남시 수정구 양지동 서울보건대학 임상병리과

Tel: 031-740-7315, Fax: 031-740-7315

e-mail: kanghg@shjc.ac.kr

제, 만일 연관성이 있다면 Leukocytospermia에서의 감소된 정자의 수정 능력을 ICSI에 의해 극복될 수 있는지를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구 대상

본 연구는 2002년 1월부터 2003년 12월까지 본원에서 체외수정 시술을 시행한 환자를 대상으로 하였다. 정자 수, 운동성, 형태 등은 정상이지만 정액 내 백혈구가 존재하는 환자 346예, 즉 IVF 173례와 ICSI 173례를 분석하였고, 그 중 면역학적 요인, 남성 불임 요인, 자궁의 요인을 가진 환자와 회수된 난자 수가 3개 미만인 주기는 본 연구에서 제외하였다.

2. 정액의 분석

난자 채취 당일 환자로부터 채취한 정액을 30분간 액화한 후 Markler counting chamber (Sefi-Medical Instruments, Israel)로 정자의 수, 운동성, 정액 내 백혈구를 분석하였고 Diff-Quick염색법⁹⁾을 통하여 정자의 형태를 관찰하였다. 이때 정자의 수가 $20 \times 10^6/\text{mL}$ 이상, 정자의 운동성이 30% 이상이면

서 WBC가 존재하는 경우를 통상적인 IVF와 ICSI를 수행하여 수정율, 배아 발달율, 임신율을 비교, 분석하였다.

3. WBC의 확인

정액 분석 결과 WBC가 있는 정액은 비성숙 성세포와 구별하기 위하여 Wright염색 방법을 통하여 WBC임을 확인하였다. 방법을 약술하면, 정액을 슬라이드 위에 도말하고 상온에서 건조시킨 후, Wright액으로 3분간 고정염색하고 완충액을 동적수 넣어 빨리 혼합시켜 7분 동안 염색, 수세 건조한 후 현미경으로 1,000배의 배율에서 WBC를 관찰하였다.

4. 통계 방법

결과에 대한 통계 분석은 student *t*-test와 χ^2 -test를 이용하였고, *P*값이 0.05 이하인 경우를 통계적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

IVF군과 ICSI군에서 환자의 평균 연령, 정자의 수, 운동성, 형태 등은 두 군간 유의한 차이를 보이지 않았다 (Table 1). 정상적인 IVF를 시행한 군에서 정액 내의 WBC가 $1 \times 10^6/\text{mL}$

Table 1. Patient profile

	IVF	ICSI	Total
No. of cycles	173	173	346
Mean age	34.3±3.8	36.0±4.8	35.2±4.3
Semen parameters			
Volume (mL)	2.9±1.2	3.1±3.0	3.0±2.1
Concentration ($\times 10^6/\text{mL}$)	106.0±52.8	83.9±55.2	95.0±54.0
Motility (%)	71.3±34.7	52.3±36.9	61.8±35.8
Morphology (%)	14.2±2.7	10.5±5.3	12.4±4.0

Values are means ± SD, *Morphological evaluation based on Kruger's strict criteria

Table 2. Comparison of the outcomes of IVF in patients with or without leukocytospermia

	Leukocyte conc. (x mil./ml)		Significance
	< 1	≥ 1	
No. of cycles	126	48	
No. of retrieved oocytes	13.9±9.7	12.7±7.6	-
No. of fertilized oocytes (%)	9.0±6.2 (64.2)	6.0±4.4 (44.4)	<i>P</i> <0.001
No. of good embryos (%)	3.0±1.9 (40.2)	1.8±1.4 (28.5)	<i>P</i> <0.001
No. of pregnancy (%)	49 (38.8)	14 (29.1)	<i>P</i> <0.001

Values are means ± SD

Table 3. Comparison of the outcomes of ICSI in patients with or without leukocytospermia

	Leukocyte conc. (x mil./ml)		Significance
	<1	≥1	
No. of cycles	112	50	
No. of retrieved oocytes	11.7±7.9	14.3±9.4	-
No. of fertilized oocytes (%)	6.8±4.9 (62.4)	8.4±6.3 (60.4)	-
No. of good embryos (%)	1.9±1.8 (33.6)	2.3±1.9 (32.5)	-
No. of pregnancy (%)	32 (28.6)	17 (34.0)	-

Values are means ± SD

Table 4. Comparison of results from ICSI in patients with leukocytospermia

	IVF	ICSI	Significance
Fertilization Rate (%)	44.4	60.4	<i>P</i> <0.001
Good Embryo Rate (%)	28.5	32.5	<i>P</i> <0.001
Pregnancy Rate (%)	29.1	34.0	<i>P</i> <0.05

이상 존재하는 leukocytospermia 환자군과 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 미만으로 존재하는 대조군과의 결과에서 수정율은 leukocytospermia 군이 44.4%, 대조군은 64.2%로 leukocytospermia 군이 통계적으로 유의하게 낮은 결과를 보여주었고 (*P*<0.05), 양질의 발달율에서도 leukocytospermia 군이 28.5%, 대조군이 40.2%로 leukocytospermia 군이 통계적으로 유의하게 낮은 결과를 나타내었으며 임신율에서는 leukocytospermia 군이 29.1%, 대조군이 38.8%로 leukocytospermia 군이 낮은 경향을 나타내었다 (Table 2). ICSI를 시행한 환자군에서의 결과는 Leukocytospermia 군과 대조군에서 수정율은 60.2%, 62.4%, 양질의 배발달율은 32.5%, 33.6%, 임신율은 34.0%, 28.6%로 양 군간 유의한 차이를 보이지 않았다 (Table 3).

Leukocytospermia 군에서 IVF 군과 ICSI 군 간의 결과를 비교해 보면 ICSI를 시행한 군의 수정율, 양질의 배 발달율, 임신율 (60.4%, 32.5%, 34.0%)이 IVF를 시행한 군 (44.4%, 28.5%, 29.1%) 보다 모두 통계적으로 유의하게 높은 결과를 보여 주었다 (*P*<0.05, Table 4).

고 찰

정액 내에 존재하는 백혈구는 감염 또는 비정상적 정자 형성 및 정액류 등의 병리현상으로부터 유래한다⁶⁾. 정액 내의 백혈구가 정자의 수정 능력에 미치는 영향에 대해서는 다소 이견들이 존재해 왔다. 근래에는 정자의 생식 능력과 연관이 있다는 결과²⁾들에 대하여 WHO¹⁷⁾에서는 정액 내 WBC가 존재하는 경우를 leukocytospermia라 병리적 현상으로 정

의했다. 본 연구는 정액 내 존재하는 백혈구가 체외수정에서 정자의 수정 능력 및 수정 후 배아 발생 및 이식 후 임신율에 어떠한 영향을 미치는지와 혹시 이러한 영향을 ICSI에 의해서 극복이 가능한지를 알아보았다. 본 연구 결과 정액 내에 존재하는 백혈구가 mL당 백만 이상 존재하는 경우에 수정율, 양질의 배 발생율 및 임신율이 유의하게 감소했으나, ICSI를 시행하는 경우 정상적으로 극복되었다.

백혈구 세포와 정자의 수정 능력과의 관계는 완전히 알려져 있지 않지만, 활성화된 과립구는 다량의 ROS를 방출하는 것으로 알려져 있다¹⁵⁾. 이것은 정자의 세포막에 peroxidative damage를 유도하고 정자 세포막의 유동성을 감소시켜, 결과적으로 정자의 침체반응을 저해한다¹⁾. 또한 정자의 운동성과 생존율에도 영향을 준다¹⁴⁾. 따라서 다량의 ROS를 생성하는 과립구는 정자의 수정 능력을 유의하게 감소시킨다. 본 연구에서 체외수정시 수정율의 감소는 이러한 ROS의 영향에 의한 것으로 사료된다. 또한, Kovalski⁷⁾ 등의 활성화된 과립구가 소량 ($0.6 \times 10^6 \text{ PMN/mL}$)으로 존재하더라도 정자의 운동성이 35%까지 줄일 수 있다는 보고는 ROS에 대한 정자의 민감성을 나타내는 하나의 단적인 보고이다. 정자는 교환에서의 형성 과정 (74일)과 부고환에서의 성숙 과정 (7~14일) 중 WBC와 오랫동안 접촉이 유지되므로 이들의 영향은 클 것으로 사료된다¹⁶⁾. 하지만 정장액 내에는 항산화 물질이 존재한다. 이들의 활성도는 개개인 차이를 나타낼 수 있는 것으로 보고되었으며¹⁰⁾, 부족할 경우에는 ROS에 대한 악영향으로 정자의 수정 능력은 크게 감소할 것이다.

초기 배아의 발생은 남자 성숙시 축적된 모계적 요인에 주로 영향을 좌우되지만 발생 과정 중 할구의 절편 현상과 발생 중지는 외부적 요인, 즉 발생기 산소의 존재량에 민감하다¹¹⁾. 본 연구에서 체외수정 결과 양질의 배아 발생율이 leukocytospermia에서 유의하게 낮은 이유는 수정률이 떨어진 이유와 상응한다고 생각된다. 정자와의 수정과정은 일종의 정자와의 공배양 체계이다. 따라서 leukocytospermia 환자의 정자와 공배양 체계에서는 대조군 환자의 정자와의 공배양 체계보다 많은 양의 ROS가 존재하여 남자의 막구조 등에

영향을 주었을 것으로 생각된다. 이는 저자들¹⁸⁾의 정자형태가 좋지 못한 정자로부터 얻은 수정란은 양질의 배아로의 발생이 크게 감소한다는 보고와도 상응하는 것으로 사료된다.

흥미로운 결과는 ICSI를 시행한 결과 leukocytospermia의 환자에서도 수정률, 양질의 배 발생률 및 임신율이 통계적으로 유의하게 증가되었다. 이는 ICSI가 정액 내에 존재하는 백혈구 또는 백혈구로부터의 ROS를 제거할 수는 없지만, 적어도 수정되는 동안의 악영향을 최소화 또는 극복할 수 있다고 생각된다. 일부 연구자는 정액 액화 동안 항산화제와 함께 반응시켜 ROS에 의한 산화기전을 중화시키고 WBC를 희석시켜 악영향을 막아주려는 시도도 있었고¹⁰⁾, 정자를 처리하는 동안에 운동성과 침체반응을 위하여 pentoxifylline 및 deoxyadenosine의 첨가도 시도¹³⁾ 되었지만 ICSI 만큼의 효과는 얻지 못하였다.

결론적으로 WBC의 존재는 체외수정에서 정자의 수정 능력에 악영향을 주는 중요한 요인이고, 정자의 형태와 WBC의 존재는 체외수정에서 정자의 수정 잠재 능력을 예측할 수 있는 지표가 될 수 있으며, leukocytospermia에서 ICSI는 체외수정 시술시 효과적인 방법으로 제안한다.

참 고 문 헌

- 1) Aitken RJ and Clarkson JS (1987): Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fert*, **81**: 459-469.
- 2) Aitken RJ and West KM (1990): Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leukocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *Int J Androl*, **13**: 433-443.
- 3) Berger RE, Karp LE, Williamson RA, Koehler J, Moore DE and Holmes KK (1982): The relationship of pyospermia and seminal fluid bacteriology to semen function as reflected in the sperm penetration assay. *Fertil Steril*, **37**: 557-564.
- 4) Buch JP, Kolon TF, Maulik N, Kreutzer DL and Das DK (1994): Cytokines stimulate lipid membrane peroxidation of human sperm. *Fertil Steril*, **62**: 186.
- 5) Close CE, Robersts PL and Berger RE (1990): Cigarettes, alcohol and marijuana are related to pyospermia in infertile men. *J Urol*, **144**: 900-903.
- 6) Cumming JA, Dawes J and Haeharave TB (1990): Granulocyte elastase levels do not correlate with anaerobic and aerobic bacterial growth in seminal plasma from fertile men. *Int J Androl*, **13**: 273-277.
- 7) Kovalski NN, de Lamirande E and Gagon C (1992): Reactive oxygen species generated by human neutrophils inhibit sperm motility: protective effect of seminal plasma and scavengers. *Fertil Steril*, **58**: 800.
- 8) Hill JA, Cohen J and Anderson DJ (1989): The effect of lymphokines and monokines on sperm fertilizing ability in the zona-free hamster egg penetration test. *Am J Obstet Gynecol*, **160**: 1154-1159.
- 9) Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF and Oehninger S (1988): Predictive value of abnormal sperm morphology in vitro fertilization. *Fertil Steril*, **49**: 112-117.
- 10) Parinaud J, Lannou DL, Vieitez G, Griveau JF, Milhet P and Richollry G (1997): Enhancement of motility by treating spermatozoa with an antioxidant solution (Sperm-Fit) following the ejaculation. *Human Reprod*, **12**: 2434-2436.
- 11) Paszkowski T and Clarke RN (1996): Antioxidative capacity of preimplantation embryo culture medium declines following the incubation of poor quality embryo. *Human Reprod*, **11**: 2493-2495.
- 12) Sukchanroen N, Keith J, Irvine DS and Aitken RJ (1995): Predicting the fertilizing potential of human sperm suspensions in vitro: importance of sperm morphology and leukocyte contamination. *Fertil Steril*, **63**: 1293-1300.
- 13) Tournaye H, Jassens S, Verheyen G, Devroey P and Van Steirteghem A (1994): In Vitro fertilization in couples with previous fertilization failure using sperm incubated with penroxifylline and 2-deoxyadenosine. *Fertil Steril*, **62**: 574-579.
- 14) Van der Ven HH, Jeyendran RS, Perez-plaez M, Al-Hasani S, Diedrich K and Kerds D (1987): Leucospermia and the fertilizing capacity of spermatozoa. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **24**: 49-52.
- 15) Weiss SJ (1989): Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med*, 320-365.
- 16) Wolff H (1995): The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril*, **63**: 1143-1157.
- 17) World Health Organization (1993): Laboratory manual for the examination of human semen and semen cervical mucus interaction. New York: *Cambridge University Press*, 8.
- 18) 권윤정, 강희규, 김수경, 양현원, 최규완, 차영범, 이승재, 박종민 (1995): 정자의 형태가 IVF와 ICSI의 결과에 미치는 영향. *대한불임학회지*, **22**: 293.