

정자 운동성 및 수명 보존을 위한 최적 배양에 관한 연구

중앙대학교 산업과학대학 동물자원학과¹, 생명환경연구원²

유영아¹ · EA Mohamed¹ · 오신애¹ · 방명걸^{1,2*}

Optimized Methods to Maintain Motility and Viability in Normozoospermic Males

Young-Ah You¹, E.A. Mohamed¹, Shin-Ae Oh¹, Myung-Geol Pang^{1,2*}

¹Department of Animal Science & Technology and ²BET Research Institute, Chung-Ang University

Objectives: To determinate the optimal culture condition to maintain lifespan in human sperm, we evaluated the effect of different temperature on sperm motility and viability up to 5 days in normal specimens.

Methods: Ejaculated semen samples with normal semen parameters were gently washed in HEPES buffered Tyrod's-Albumin-Lactate-Pyruvate (HTALP) media. Each 5 ml of HTALP + 0.3% albumin with 1×10^6 sperm/ml was incubated for 5 days in 37°C, 22°C, and 4°C. The sperm motility and kinematics were analyzed using computer assisted sperm analysis (CASA), membrane integrity was assessed by hypoosmotic swelling test (HOST), and capacitation status was evaluated by chlorotetracycline (CTC) fluorescence pattern. Each parameter was measured on day 1, 3, and 5, respectively.

Results: The motility, viability and live/un capacitated pattern were demonstrated significantly in temperature- and time-dependent difference ($p < 0.05$). While the sperm cultured for 1 day in each temperature was not significantly different, the sperm cell kept in 22°C after 3 days were preserved sperm motility, viability, membrane integrity, and F pattern better than in other culture temperatures.

Conclusions: HTALP can be used a basic medium for culture and longevity preservation, and sperm cell kept at 22°C is beneficial for assisted reproductive techniques. [Korean. J. Reprod. Med. 2009; 36(1): 45-53.]

Key Words: Optimal sperm culture condition, Longevity, Motility, Preservation

불임치료를 위하여 자궁강 내 정자주입술 (intrauterine insemination, IUI), 체외수정술 (in vitro fertilization, IVF) 및 세포질 내 정자주입술 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) 등 보조생식술 (assisted reproductive technology, ART) 시행 시 채취된 정자의 수송 혹은 일정기간 생존성을 보존하여야 하는 경우가 발생한다. 또한 ART 시술 당일 남편의 스트레스로 정액채취를 실패하거나 출장 등의 이유로 내원하지 못하는 경우가 발생하기도 한

다. 따라서 정액채취에서 시술에 이용하기까지 채취된 정자의 생존성을 일정기간 유지시키는 것은 수정 및 임신에 매우 중요한 요소가 될 수 있다.

정장 내 정자는 삼투압 증가와 산화작용으로 인하여 수 시간 내에 운동성과 생존성을 급격히 잃게 되어 수정능력을 상실하게 된다.^{1,2} 그러므로 채취된 정액은 액화직후 즉시 정장을 제거하여야 한다. 정장을 제거한 상태에서 정자는 생존성을 보존하기 위하여 -196°C에서 동결보존하거나,³ 3~5°C에서 비전해질 배양용액으로 희석한 후 일정시간 보존하는 방법이 이용되고 있다.⁴ 또한 정장 제거 전 정액을 citrate-egg yolk buffer와 혼합하여 상온에서 보존하거나 정장을 제거한 정자를 실온에서 보존

주관책임자: 방명걸, 우) 456-756 경기도 안성시 대덕면 내리 72-1, 중앙대학교 산업과학대학 동물자원학과
Tel: (031) 670-4841, Fax: (031) 670-9001
e-mail: mgpang@cau.ac.kr

*본 연구는 경기도의 경기도지역연구협력센터사업의 일환으로 수행하였음 [20080580].

하여 정자의 생존성을 연장시킨 연구들이 소개되기도 하였다.⁵⁻⁷

그러나 정자를 ART 시술에 사용하기 위하여 단기간 보존할 경우 동결방법은 동결·융해 과정을 시행하여야 하여 환자에게 추가 비용부담을 발생시킬 수 있으며, 동의서를 받아야 하는 등의 번거로움이 발생한다. 또한 액상상태로 정자보존 시 일정기간 정자의 운동성과 생존성을 ART 시술에 적합한 수준으로 유지시키는 적정온도 조건은 아직 확고히 설정되지 못한 실정이다.

한편, 수정능력 혹은 가임능력을 평가하기 위하여 컴퓨터정액분석기를 이용하여 정자의 운동성과 운동역학 변수를 측정하고, 정자의 생존성은 Hochest 33258염색이나⁸ 저장액에서 정자미부의 팽창 패턴을 평가하고 있다.⁹ 그리고 수정능획득 및 철회반응에는 정자 두부 내 칼슘이온이 작용하므로, 정자 두부 특정부위에 있는 칼슘이온과 antibiotic chlorotetracycline 반응시켜 실제 수정에 참여할 수 있는 수정능획득이 야기되지 않은 혹은 야기된 살아있는 정자의 비율을 분석함으로써 정자의 수정능력을 예측할 수 있다.¹⁰⁻¹²

따라서 본 연구에는 정액검사 상 정상 정자를 온도에 따라 일정기간 보존하고, 정자의 운동성, 운동역학, 정자막 온전성 및 수정능획득 상태를 분석하여 일정기간 동안 정자의 생존성과 기능을 최대한 유지할 수 있는 정자의 최적 배양방법을 분석하기 위하여 시행하였다.

연구대상 및 방법

1. 배양액

정액에서 정장을 제거하기 위한 기본 배양액은 HEPES가 첨가된 Tyrod's-Albumin-Lactate-Pyruvate (HTALP) 배양액을 사용하였으며, 성분은 114 mM NaCl, 0.3 mM NaH₂PO₄, 3.1 mM KCl, 2.1 mM CaCl₂, 0.4 mM MgCl₂, 10 mM sodium lactate, 2 mM NaHCO₃, 0.2 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES, 및 10 µg/mL gentamycin을 첨가하였다. 정자 배양을 위하여

Table 1. Semen characteristics of 11 normozoospermic men

Characteristic	Mean ± SE	Range
Concentration	94.61±11.62	40.0~164.0
Motility	72.57±5.08	53.7~97.4
VCL	98.76±3.38	84.0~121.2
VSL	60.89±2.64	47.7~78.7
VAP	63.82±2.45	52.7~78.3
LIN	61.80±2.16	50.7~71.6

Data are presented as mean ± SE.

Young-Ah You. Optimized Methods to Maintain Motility and Viability in Normozoospermic Males. Korean J Reprod Med 2009.

사용된 배양액은 HTALP에 0.3% BSA를 첨가하여 사용하였다.

2. 정액채취

정액채취는 3일간 금욕한 남성에게서 수음을 통하여 이루어졌고, 세계보건기구 기준에 따라 정상 소견을 보이는 11명의 정액을 사용하였다. 채취된 정액은 30분간 액화시키고 컴퓨터정액분석기 (SAIS version 10.1, Medical Supply, Korea)를 이용하여 정자의 수, 운동성 및 운동역학 즉, Curvilinear Velocity (VCL), Straight-Line Velocity (VSL), Average-Path Velocity (VAP), Linearity (LIN)을 분석하였다. Table 1에 본 실험에 공시한 11명의 정액검사결과를 요약하였다.

3. 정자 처리와 배양

개인차이를 최대한 배제하기 위하여 일회의 실험을 수행하기 위하여 4명의 정액을 섞어 사용하였고, 정장액을 제거하기 위하여 HTALP로 희석하여 400×g에서 5분간 3회 세척하였다. 정자의 최종 농도는 0.3% BSA가 첨가된 배양액으로 1×10⁶/ml로 조정하였으며, 4°C, 22°C, 및 37°C에서 5일간 배양하였다.

4. 정자의 생존성 평가

배양 후 1, 3 및 5일에 컴퓨터정액분석기를 이

Table 2. Initial characteristics in mixed semen samples before starting experiment

Characteristic	Mean ± SE	Range
Motility	63.58±1.26	61.10~65.20
Viability	62.00±2.60	57.50~66.50
Membrane integrity	67.14±2.50	64.64~69.63
CTC		
F pattern	37.13±0.88	36.25~38.00
B pattern	11.38±0.63	10.75~12.00
AR pattern	13.50±3.00	10.50~16.50

Data are presented as mean ± SE.

Young-Ah You. Optimized Methods to Maintain Motility and Viability in Normozoospermic Males. Korean J Reprod Med 2009.

용하여 정자의 운동성 및 운동역학을 분석하였으며, 정자막 온전성을 측정하기 위하여 Jeyendran 등 (1984)의 방법을 변형하여 정자미부의 팽창형태를 분석하였다 (hypoosmotic swelling test, HOST).¹³ 즉 37°C의 저장액 (150 mOsm/kg, 50% HTALP: 50% distilled water) 1 ml에 정자샘플 100 µl을 혼합하고 37°C에서 5분간 정치시킨 후 원심분리하여 슬라이드를 제작하였고 슬라이드당 1,000 마리의 정자를 분석하였다.

수정능획득을 평가하기 위해서 Perez 등 (1996)이 보고한 Hoechst 33258 (H258)/chlorotetracycline (CTC) 형광 염색법을 이용하였다.¹² UV BP 340-380/LP 425 와 BP 450-490/LP 515 filters 하에 NiKon microphot-FXA 현미경을 이용하여 슬라이드당 600마리의 정자를 Fraser 등 (1995)의 방법 즉, 살아 있는 정자 중 수정능획득이 야기되지 않은 정자 (F pattern), 수정능획득이 야기된 정자 (B pattern), 침체반응이 일어난 정자 (AR pattern)로 분류하였다.¹¹

5. 통계분석

통계분석은 SPSS 프로그램 (version 12.0, SPSS Inc, USA)을 이용하였다. 5일간 각각의 온도에서 배양한 정자의 특성 비교는 일원배치법을 사용하였다. 배양일에 따라 변화하는 정자의 특성은 반복 측정 자료

의 분산분석법을 사용하였으며, 사후분석은 Turkey test를 이용하였다. 모든 검정은 p<0.05 미만인 경우 통계학적인 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 정액 성상

네 명의 남성으로부터 채취된 정액을 혼합한 후 혼합정액의 검사결과는 Table 2에 요약하였다. 즉 정자의 운동성은 63.58%, 생존성은 62.00%, 정자막의 온전성은 67.14%였으며, CTC에 의한 F pattern은 37.13%, B pattern은 11.38% 및 AR은 13.50%였다.

2. 정자 운동성 및 운동역학의 변화

5일 동안 배양된 정자는 대조구 (37°C, 5% CO₂)와 모든 배양온도 (4°C, 22°C, 및 37°C in air)에서 배양일이 경과함에 따라 운동성이 유의하게 감소하였다. 1일 후의 정자 운동성은 대조구, 22°C 및 37°C in air에서 각 31.8%, 28.3%, 30.5%로 유의한 차이가 없었으나, 4°C에서는 13.1%로 다른 온도조건보다 운동성이 유의하게 낮았다. 그러나 3일과 5일 후에는 22°C에서 배양된 정자의 운동성이 대조구와 다른 온도조건에서 배양된 정자의 운동성보다 유의하게 높게 나타났다.

정자의 운동역학 변수 중 VCL, VSL, VAP도 1일 후에 각 배양온도간의 유의한 차이는 없었으나, 3일과 5일 후에는 22°C에서 배양된 정자에서 유의하게 높게 나타났다. 그러나 정자의 LIN는 5일 동안 각 온도조건에서 배양된 정자간에 유의한 차이는 보이지 않았다 (Figure 1).

3. 정자의 생존성과 정자막의 온전성 변화

Figure 2에 정자의 생존성과 정자막의 온전성 변화에 대한 결과를 요약하였다. 정자의 생존성은 대조구, 4°C 및 37°C에서 배양일이 경과함에 따라 유의하게 감소하였으나, 22°C에서는 배양일이 경과함에 따라 생존성의 변화가 유의하게 나타나지 않았다. 정자막의 온전성은 대조구와 37°C에서 배양일

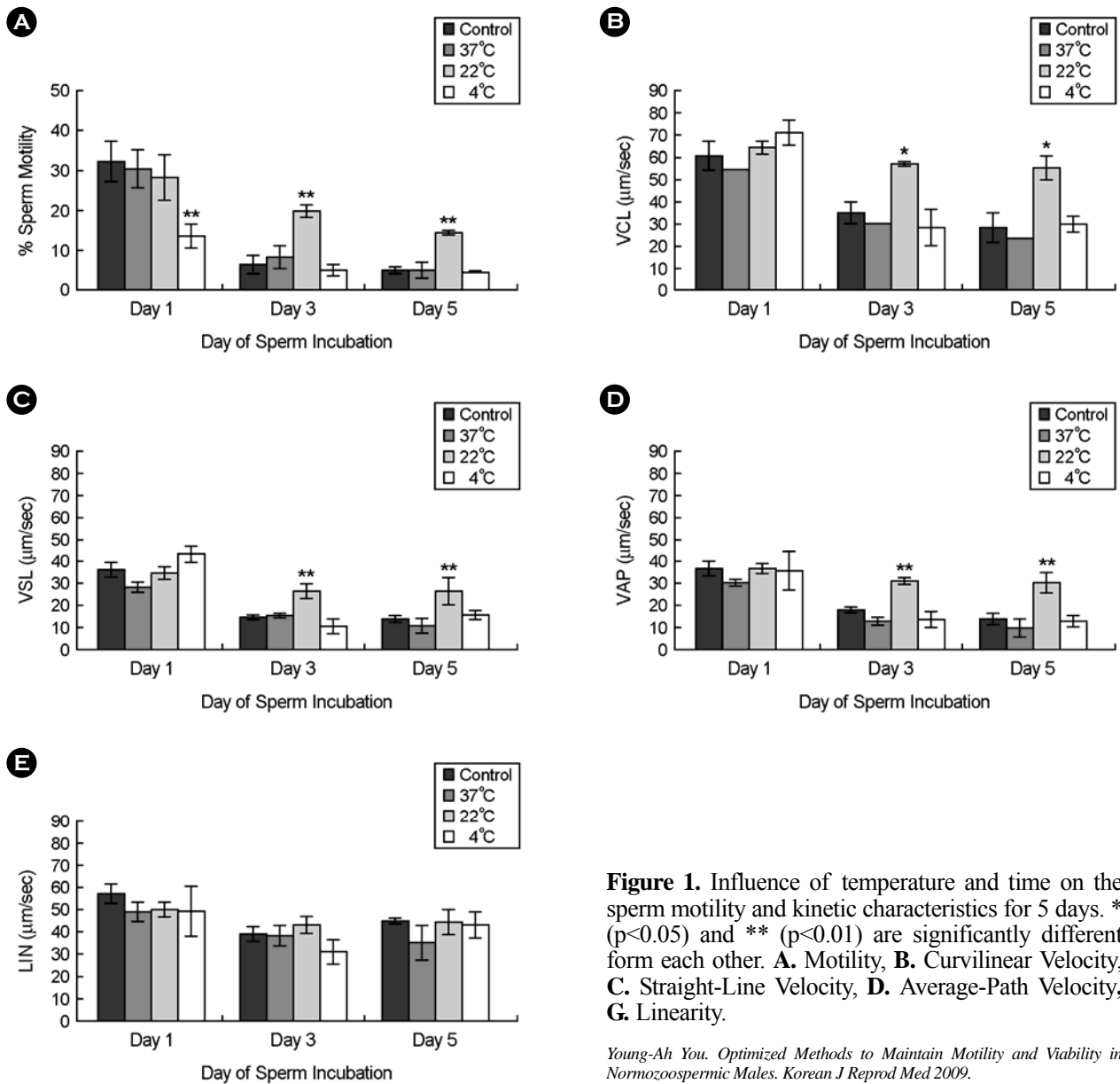


Figure 1. Influence of temperature and time on the sperm motility and kinetic characteristics for 5 days. * ($p < 0.05$) and ** ($p < 0.01$) are significantly different from each other. **A.** Motility, **B.** Curvilinear Velocity, **C.** Straight-Line Velocity, **D.** Average-Path Velocity, **E.** Linearity.

Young-Ah You. Optimized Methods to Maintain Motility and Viability in Normozoospermic Males. Korean J Reprod Med 2009.

이 경과함에 따라 유의하게 감소한 반면, 4°C와 22°C에서는 배양일이 경과함에 따른 변화는 나타나지 않았다.

배양 1일 후, 대조구와 각 온도조건에서 배양된 정자의 생존성과 정자막의 온전성간의 유의한 차이는 없었으나, 3일과 5일 후에는 정자의 생존성과 정자막의 온전성이 다른 온도조건보다 22°C에서 유의하게 높은 것으로 나타났다.

4. 정자의 수정능획득 양상 변화

F pattern 정자의 비율은 대조구, 4°C 및 37°C에서 배양일에 따라 유의하게 감소한 반면, 22°C에서는 정자의 배양기간 동안 F pattern의 유의한 차이가 나타나지 않았다 (Figure 3). 또한 배양 1일 후에 대조구와 각각의 온도조건에서 F pattern은 유의한 차이가 없었으나, 3일과 5일 후에는 22°C에서 유의하게 높았다. 한편 B와 AR pattern을 보이는

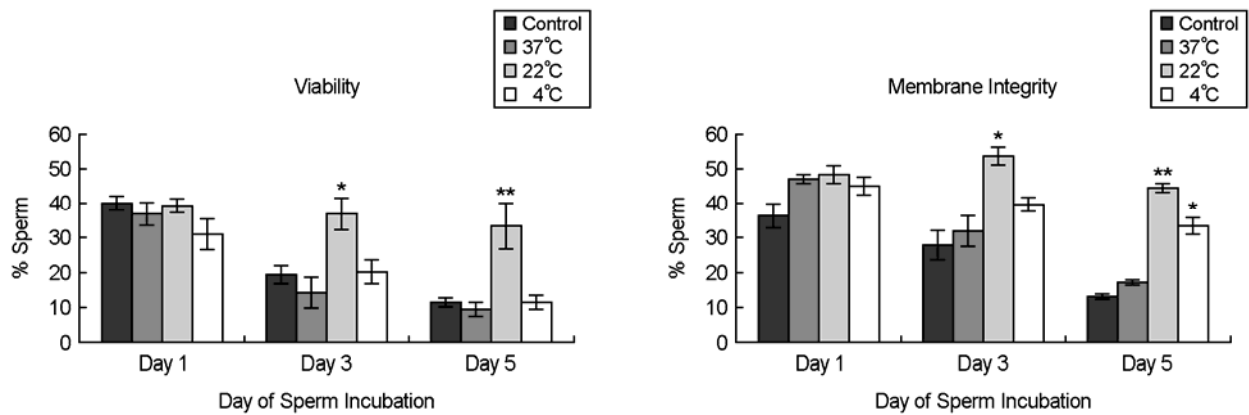


Figure 2. Influence of temperature and time on the sperm viability and membrane integrity for 5 days. * ($p < 0.05$) and ** ($p < 0.01$) are significantly different from each other.

Young-Ah You. *Optimized Methods to Maintain Motility and Viability in Normozoospermic Males. Korean J Reprod Med 2009.*

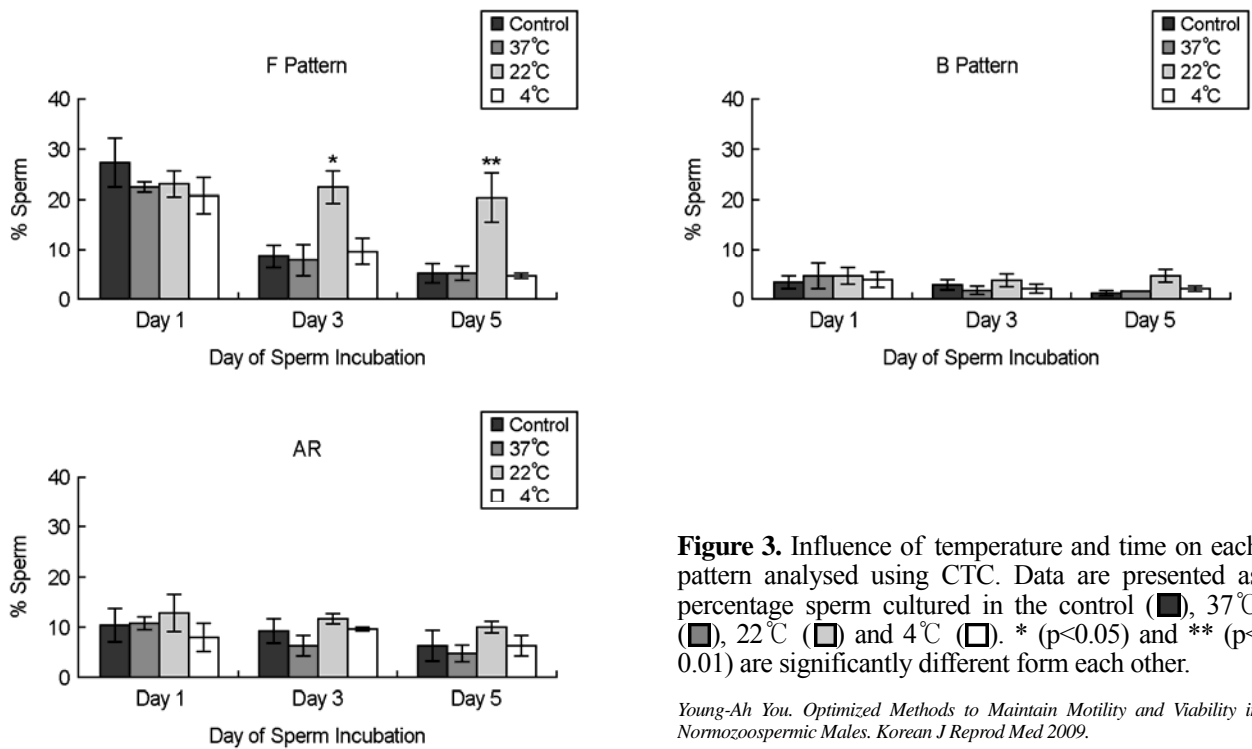


Figure 3. Influence of temperature and time on each pattern analysed using CTC. Data are presented as percentage sperm cultured in the control (■), 37°C (▒), 22°C (▤) and 4°C (□). * ($p < 0.05$) and ** ($p < 0.01$) are significantly different from each other.

Young-Ah You. *Optimized Methods to Maintain Motility and Viability in Normozoospermic Males. Korean J Reprod Med 2009.*

정자의 비율은 모든 온도조건에서 배양일의 경과 함에 따라 유의한 차이가 없었고, 배양 1일, 3일, 5일 후에 B와 AR pattern은 배양온도간 유의적 차이가 나타나지 않았다.

고 찰

ART 시술 시 정자의 생존성 혹은 수정능력을 일정기간 보존시킬 수 있다면 ART의 효용성을 더욱 증진시킬 수 있게 된다. 보존기간 동안 정자의 수정능력 요소인 정자의 농도와 운동성 및 생존성을

ART 시술에 적합한 수준으로 유지하는 것은 중요하다. Esfandiari 등 (2002)은 정자를 액화시킨 후 4°C, 25°C, 및 37°C에서 정장 내에서 1시간 배양한 결과 37°C에서 보존된 정자가 다른 온도조건 보다 운동성이 높게 나타나 1시간 이내의 정자 수송과 처리과정에 유익하다고 보고하였다.¹ 그러나 일반적으로 정장이 제거되지 않는 상태로 정자를 37°C에서 보존할 경우 운동성과 생존성은 단시간 내에 급격히 감소하나, 20°C에서는 18시간까지 보존할 수 있다고 하였다.² 정장을 제거한 정자를 3~5°C에서 비전해질 배양액을 이용하여 일정시간 보존 시 동결보존에 비하여 정자의 운동성은 감소하나 정자막의 온전성은 크게 감소하지 않으므로 정자의 수정능력이 유지되는 것으로 보고하였다.⁴ 그리고 정자를 실온 (23°C)에서 보존하면 운동성과 생존성은 5일 이상 유지시킬 수 있다.⁶ Petrella 등 (2005)은 운동성을 지닌 정자를 최대 3주까지, 살아 있는 정자는 6주까지 관찰할 수 있었으나 정자의 수정능력 유지를 위하여 운동성과 생존성이 실온에서 80%까지 보존되는 기간이 운동성은 6일, 생존성은 14일까지라고 보고하였다.⁷ 또한 Calamera (2001) 등은 정자를 37°C에서 보존하면 48시간 동안 점차적으로 운동성이 감소하나, 정자막의 온전성과 chromatin DNA의 안정성과 연속적으로 일어나는 침체반응이나 침체반응을 유도한 결과가 48시간 동안 유의차가 없다고 보고하였다.²³ 본 연구는 정장을 제거한 후 정자를 HTALP로 세척하고 각각 4°C, 22°C 및 37°C에서 5일간 배양하는 동안 정자의 수정능력에 영향을 미치는 운동성과 운동역학, 생존성, 정자막의 온전성 및 수정능획득과 침체반응의 변화를 분석하였다. 이러한 정자의 요소들은 정자를 5일간 보존하는 동안 온도조건과 관계 없이 시간이 경과함에 따라 모두 유의하게 감소하였다. 한편, 정자의 운동성과 운동역학들은 정자 배양 1일 후 유의적인 차이가 없었으나, 3일경과 후부터는 LIN를 제외한 정자의 운동성, VCL, VSL, VAP가 22°C에서 배양된 정자에서 유의하게 높게 나타났다. Hirano 등 (2001)은 IVF 시술 시 정자의 운동

역학 변수 중 VCL은 수정능력과 밀접한 관계를 가졌다고 보고하였고,¹⁴ Shibahara 등 (2004)은 IUI에서 VAP, VCL, VSL은 임신을 예측하는데 이용될 수 있다고 보고하였다.¹⁵ 본 연구는 22°C에서 정자를 5일간 보존하는 동안 정자의 운동성과 운동역학 변수들이 잘 보존되어 22°C에서 정자의 수정능력이 ART에 적합한 수준으로 유지된다는 사실을 시사한다.

정자막의 온전성은 정자의 대사뿐만 아니라 난자와의 수정 및 정자의 수정능획득과 침체반응과도 밀접한 관계가 있어 정자의 수정능을 평가하는데 유용한 지표가 된다.^{13,16} 본 연구에서 정자의 정자막의 온전성도 온도조건에 상관없이 시간이 경과함에 따라 감소하였다. 정자 배양 후 1일에는 각 온도조건에 대한 유의차가 없었으나, 3일경과 후에는 22°C에서 보존된 정자에서 정자막의 온전성이 높게 나타나 정자 수정능력 보존에 가장 적합한 온도로 평가되었다. 흥미롭게도 정자의 운동성, 생존성 및 정자막의 온전성의 관계를 시간에 따른 변화 그래프로 나타내면 운동성이 가장 급격하게 감소가 일어나고, 그 다음은 생존성, 마지막으로 정자막의 온전성이 시간에 따라 가장 완만한 감소가 일어나는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Hossain 등 (2007)의 결과와 동일하며, 정자를 실온 (24°C)에서 7일간 보존 시 ART 시술 중 ICSI에 적합한 정자를 얻을 수 있다고 하였다.⁶ 그리고 Verheyen 등 (1997)은 정자무력증 (asthenospermia) 환자의 정자에서 HOST를 시행하여 정자미부가 팽창된 정자를 선택하여 ICSI를 시행하였다. ICSI 후 생산된 배아를 이식하여 임신이 정상적으로 성립함을 보고하여 운동성이 없더라도 미부 팽창이 일어나는 정자는 살아있다는 사실을 증명한다.¹⁷

한편, 정자를 1분에 10°C 이상 냉각할 때 정자의 운동성이 감소되거나 정지되는 cold shock은 정자 원형질막에 있는 지방의 물리적인 변화¹⁸와 정자의 원형질막을 통하여 칼슘이온이 소실되는 것¹⁹과 관련이 있다. 4°C에서 장시간 정자를 보존하는 경우 정자막에 있는 지방의 변화와 ATPase-linked sodium-

potassium pump가 온도에 민감하여 정자의 운동성을 감소시킨다고 하였다.²⁰ 이러한 cold shock에 대한 저항은 다른 포유동물에서보다 사람에서 높은 것으로 알려져 있으며 0°C에서 정자를 5분간 방치했다가 다시 37°C로 정자를 보존하면 0°C에서 정자를 5분간 방치하기 전후에 정자의 운동성과 정자막의 온전성의 비율에는 유의차가 없다는 결과를 보고하였다. 이는 짧은 시간 동안 낮은 온도에서 정자를 보존하는 경우 사람은 정자막 내 지방의 변화로 인한 cold shock이 낮은 것으로 보인다.²¹ 본 연구에서 각 온도조건에서 정자를 배양 후 정자의 운동성은 1일에 대조구와 22°C, 37°C간에는 유의차는 없었으나 4°C에서만 유의하게 감소하여 cold shock이 일어난 것으로 보인다. 그러나 정자의 운동역학, 생존성, 정자막의 온전성 및 CTC pattern에서 정자보존 1일 후 온도조건간 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 비록 낮은 온도조건에서 1일간 정자를 보존하는 경우 정자막의 물리적인 변화가 운동성을 저하시켜도 수정능력에 영향을 주지 않는 것으로 사료된다. 그러나 3일 이후 22°C에서 정자의 모든 요소들이 다른 온도조건보다 유의하게 높은 것으로 나타났다. 한편, 3일 이후 4°C에서 보존한 정자와 37°C에서 보존한 정자를 비교하면 운동성, 운동역학, 생존성 및 CTC pattern에서 유의한 차이가 없는 반면 시간이 경과할수록 37°C에서보다 4°C에서 정자막의 온전성이 유의하게 높은 것으로 나타났다. 이는 시간이 경과함에 따라 높은 온도에서 정자를 보존 시 낮은 온도에 비해 정자막이 쉽게 손상받을 수 있음을 시사한다.

정자의 수정능획득과 침체반응 정도에 따라 수정능력을 평가할 수 있는데, 본 연구에서는 CTC 염색으로 보존기간 동안 수정능획득과 침체반응이 일어난 정자의 비율을 분석하였다. 보존기간 동안 온도에 따라 수정능획득과 침체반응간의 유의한 차이는 보이지 않았고, ART 기술을 위하여 침체반응의 유도가 필요한 것으로 사료된다. 이것은 Calamera 등 (2001)가 37°C에서 정자를 48시간 동

안 보존하는 동안 침체반응이 유의한 차이가 나타나지 않고, ART 기술을 위하여 침체반응을 유도하는 것이 필요하다는 결과와 같다.²² Marin-Briggiler 등 (2002)은 tyrosine-phosphorylated protein의 증가가 수정능획득 과정을 수행하는데 중요하여 체외정자 처리 시 tyrosine-phosphorylation을 유도하는 단백질 성분을 첨가가 필요하다고 하였다.²³ 그들은 이러한 단백질의 활성이 온도와 관련있다고 하였으며 20°C에서 정자를 보존하는 경우 활성을 저해하여 침체가 소실되어 정자의 수정참여율 낮아진다고 하였다. 따라서 난포액을 첨가한 37°C 배양액에서 정자가 수정능획득이 야기되며, 실온에서 정자를 보존한다면 수정능획득을 유도하기 위하여 37°C에서 16시간 이상 배양하여야 한다고 보고하였다. 한편, 본 연구에서 F pattern은 정자의 배양 1일 후 각 온도조건에서 유의한 차이가 없었으나 3일부터 22°C에서 높게 보존되는 것이 확인되어 형광검사에 의한 정자의 생존성도 22°C에서 ART 기술에 적합한 수준으로 유지됨을 알 수 있었다.

본 연구에서 보존 1일까지는 정자의 운동성과 생존성이 22°C와 37°C에서 잘 유지되었다. 또한 1일 이후 정자를 보존하는 경우 22°C에서 HTALP로 보존하는 것이 정자의 운동성을 연장시키며, 침체의 소실을 지연시켜 생존성을 유지하는 것으로 확인되었다. 따라서 이러한 정자 배양 혹은 보존방법은 ART 기술 시 정액채취가 원활히 시행될 수 없는 경우, 시술자로 하여금 난자의 이용에 관한 계획을 수립 및 ART 기술 시 정자를 5일까지 보존하는 경우에 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Esfandiari N, Saleh RA, Blaut AP, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Falcone T, Agarwal A. Effects of temperature on sperm motion characteristics and reactive oxygen species. *Int J Fertil Womens Med* 2002; 47: 227-33.
2. Appell RA, Evans PR. The effect of temperature on sperm motility and viability. 1977; 28: 1329-32.
3. Grizard G, Chevalier V, Griveau JF, Le Lannou D, Boucher D.

- Influence of seminal plasma on cryopreservation of human spermatozoa in a biological material-free medium: study of normal and low-quality semen. *J Androl* 1999; 22: 190-6.
4. Saito K, Kinoshita Y, Kanno H, Iwasaki A, Hosaka M. A new method of the electrolyte-free long-term preservation of human sperm at 4 degree C. *Fertil Steril* 1996; 65: 1210-3.
 5. Cohen J, Fehilly CB, Walters DE. Prolonged storage of human spermatozoa at room temperature or in a refrigerator. *Fertil Steril* 1985; 44: 254-62.
 6. Hossain A, Osumamkpe C, Nagamani, M. Extended culture of human spermatozoa in the laboratory may have practical value in the assisted reproductive procedures. *Fertil Steril* 2008; 89: 237-9.
 7. Petrilla et al. Optimizing incubation conditions for the preservation of sperm motility in processed semen samples. *Fertil Steril* 2005; 84: 513-5.
 8. 문신용, 류범용, 방명걸, 오선경, 이재훈, 서창석, 김석현, 최영민, 김정구, 이진용. 남성 불임의 진단 및 체외수정의 예후인자로서 정자형태의 정밀 분석과 정자 침체 반응 및 햄스터 난자 침투 분석의 비교 연구. *대한불임학회지* 2002; 29: 57-66.
 9. 최두석, 문신용, 장윤석. 남성 불임검사 중 정자형태와 정자 운동성 검사 및 저장성용액 내 정자 팽창검사의 상관관계 및 가임능력 예측에 관한 연구. *대한산부인과학회잡지* 1993; 36: 2497-509.
 10. DasGupta S, Mills CL, Fraser LR. Ca(2+)-regulated changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by a chlorocycline fluorescence assay. *J Reprod Fertil* 1993; 99: 135-43.
 11. Fraser LR, Abeydeera LR, Niwa K. Ca(2+)-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlorotetracycline analysis. *Mol Reprod Dev* 1995; 40: 233-41.
 12. Perez LJ, Valcarcel A, de Las Heras MA, Moses DF, Baldassarre H. In vitro capacitation and induction of acrosomal exocytosis in ram spermatozoa as assessed by the chlorocycline assay. *Theriogenology* 1996; 45: 1037-46.
 13. Jeyendran, RS, Van der Ven HH, Prez-Pelaez M, et al. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membranes and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fert* 1984; 70: 219-28.
 14. Hirano Y, Shibahara H, Obara H, Suzuki T, Takamizawa S, Yamaguchi C, Tsunoda H, Sato I. Relationships between sperm motility characteristics assessed by the computer-aided sperm analysis (CASA) and fertilization rates in vitro. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2001; 18: 213-8.
 15. Shibahara H, Obara H, Ayustawati, Hirano Y, Suzuki T, Ohno A, Takamizawa S, Suzuki M. Prediction of pregnancy by intrauterine insemination using CASA estimates and strict and criteria in patients with male factor infertility. *International Journal of Andrology* 2004; 27: 63-8.
 16. Hatasaka HH, Holmgren WJ, Chatterton RT, et al. The differential hypoosmotic swelling pattern predicts the sperm penetration outcome in an "infertile" population. 46th annual meeting of American Fertility Society, 1990; Abstract 199.
 17. Verheyen G, Joris H, Crits K, Nagy Z, Tournaye H, Van Steirteghem A. Comparison of different hypo-osmotic swelling solutions to select viable immotile spermatozoa for potential use in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod Update* 1997; 3: 195-203.
 18. Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchoroguy TJ, Overstreet JW, Crowe JH. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: A demonstration using sperm as a model. *J Exp Zool* 1993; 265: 432-7.
 19. Ladha, S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. *J Membr Biol* 1998; 165: 1-10.
 20. Saito K, Kinoshita Y, Kanno H, Iwasaki A. The role of potassium ion and extracellular alkalization in reinitiation of human spermatozoa preserved in electrolyte-free solution at 4 degrees C. *Fertil Steril* 1996; 56: 1214-8.
 21. Chantler E, Abraham-Peskir JV, Little S, McCann C, Medenwaldt R. Effect of cooling on the motility and function of human spermatozoa. *Cryobiology* 2000; 41: 125-34.
 22. Calamera JC, Fernandez PJ, Buffone MG, Acosta AA, Doncel GF. Effects of long-term in vitro incubation of human spermatozoa: functional parameters and catalase effect *Andropologia* 2001; 33: 79-86.
 23. Marin-Brigglier C, Tezon JG, Miranda PV, Vazquez-Levin MH. Effect of incubation human sperm at room temperature on capacitation-related events. *Fert Steril* 2002; 77: 252-9.

= 국문초록 =

목 적: 본 연구는 정상 정액을 배양액으로 세척한 후 4℃, 22℃, 37℃에서 5일 동안 보존하면서 정자의 운동성, 생존성을 관찰하여 정자의 운동성과 수명 유지를 위한 적정 배양 환경을 분석하고자 하였다.

연구방법: 정액검사 시 정상으로 판정된 남성의 정자를 HTALP 배양액으로 세척하여 정자의 최종 농도 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 로 각 5 ml을 배양온도 4℃, 22℃, 37℃에서 5일 동안 배양하였다. 1일, 3일 5일째에 CASA에 의해 운동성을 측정하였고, HOST로 정자막의 온전성을 분석하였으며, CTC pattern으로 수정능획득 상태 분석하여 최적의 배양 환경을 분석하였다.

결 과: 정자의 운동성, 생존성 및 수정능획득이 야기되지 않은 정자는 배양일에 따라 유의하게 감소하였다 ($p < 0.05$). 또한 정자 배양 후 1일에는 정자의 운동성, 생존성 및 정자막의 온전성과 CTC pattern은 온도에 따라 차이가 없었으나, 배양 후 3일과 5일에서는 22℃에서 배양된 정자가 다른 배양온도에 비해 가장 잘 보존되었다 ($p < 0.05$).

결 론: HTALP로 세척된 정자를 22℃에서 보존 시 5일까지 정자의 운동성과 수명을 보조생식술에 적합한 수준으로 유지시킬 수 있는 최적 배양 환경으로 제시할 수 있다.

중심단어: 정자의 최적 배양 환경, 생존성, 운동성, 보존
