

Subfertile 정자처리에 Modified Mini-Percoll 방법의 효용성에 관한 연구

중앙대학교 의과대학 산부인과학교실

김희선 · 장현정 · 이희옥 · 이숙현 · 이상훈

Study on the Effectiveness of Modified Mini-Percoll Method in Subfertile Sperm

Hee-Sun Kim, Hyun Jung Chang, Hee-Ok Lee, Sook Hyun Lee and Sang Hoon Lee

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul, Korea

= Abstract =

Semen preparation for Assisted Reproductive Technology(ART) involves the separation of the motile sperm from non-motile, dead sperm, cellular debris and seminal fluid. The aim of this study is to compare the motile sperm recovery rate and motility index of different sperm preparation method(swim-up method, 80% isotonic continuous percoll method, two-layer discontinuous percoll method, mini-percoll method). In Mini-Percoll method, pellets from patients were suspended in 0.3ml of medium and layered on a discontinuous percoll gradient consisting of 0.3ml each of 50, 70, 95% isotonic percoll. All semen samples are divided into normal and subnormal sperm group(oligo-, astheno-, oligoasthenozoospermia). Especially, we evaluated the effect of mini-percoll method in subnormal sperm group.

In normal sperm group, mini-percoll method and two layer discontinuous percoll method(40%/80%) allowed increasing of motile sperm recovery rate. But motility index was higher in swim-up method than the other methods. In subnormal sperm group, mini-percoll method has advantages as compare with the other methods in motile sperm recovery rate and motility index.

These results suggest that modified mini-percoll method could be certainly a valuable tool in some cases of severe male factor sperm.

서 론

운동성이 활발한 정자의 선택분리는 체외수정이나 인공수정시술시 그 성공률을 높이는 데 중요한 요인의 하나이기 때문에 많은 연구가 들은 정자의 선택분리방법에 대한 연구를 계속하였다. 특히, 희소정자증(oligospermia)이나 정자무력증(asthenospermia)과 같은 남성불임이 요인인 경우 정자의 손상이 쉬울뿐 아니라 운동성 정자의 회수율이 낮기 때문에 이를 향진시키기 위한 정자처리법이 최근 많이 소개되고 있다.

정자의 선택분리의 기본적인 원리는 정자의 운동성과 생존력 그리고 형태학적인 변형을 초래하지 않고 정액내의 죽은 정자, 미성숙 정자, 백혈구 및 세균과 같은 오염물질을 효과적으로 제거하고, 정자의 운동성을 향진시킬 뿐만 아니라 많은 운동성 정자를 분리하는데 있다. 즉, 정상성분은 정자의 운동성 뿐만 아니라 수정자체에도 유해한 영향을 끼치지 때문에 정상성분으로부터 적절하게 정자를 선택 분리하는 것은 중요하다(Kanwar et al., 1979).

이러한 목적을 위해 정자를 선택 분리하는 방법으로 Swim-Up 방법이 보편적으로 사용되고 있다(Harris et al., 1981). 이러한 Swim-Up

방법은 정자에 해를 거의 가하지 않고 운동성 정자를 많이 회수할 수 있어 정상 정자군에서는 효과적이거나 비정상 정자군의 경우에는 그 회수율이 현저히 감소하기 때문에 남성불임이 요인인 환자의 경우에는 부적합하다(Ohashi et al., 1992). 최근 비중차를 통해 운동성 정자를 회수할 수 있는 gradient media인 percoll을 이용하는 방법이 소개되었다. Percoll을 이용하는 방법에는 Continuous방법(Iizuka et al., 1988)과 Discontinuous방법(Pardo et al., 1988)이 이용되어지고 있다. Continuous Percoll방법은 percoll을 제조하고 사용하는데 있어서 간편하지만 운동성 정자뿐만 아니라 세포 찌꺼기(cellular debris)등도 함께 많이 회수된다는 단점이 있는 반면 Discontinuous Percoll방법을 이용하였을 경우에는 오염물질이 거의 없이 운동성 정자를 회수할 수 있다. 최근에는 Ord등(1990, 1993)이 제안한 Mini-Percoll방법이 소개되었다. Mini-Percoll방법은 기존의 discontinuous percoll gradient방법과 동일하지만 각각의 다른 비중인 percoll층의 부피를 0.3ml씩 이용함으로써 전체적인 percoll의 부피를 줄여주는 방법으로 Ord등(1990, 1993)은 Mini-Percoll을 이용하였을 때 회소정자증 환자에서 운동성 정자의 회수율이 높아짐을 보고하였다.

이에 저자는 본 산부인과학교실에 내원한 환자들을 대상으로 정상정자군과 비정상정자군으로 나누어 modified Mini-Percoll방법을 기존에 이용하던 Swim-Up방법, 80% Isotonic Continuous Percoll방법과 Two-Layer Discontinuous Percoll방법과 비교 검토하여 modified Mini-Percoll방법이 비정상정자군에 효용성이 있는지 여부를 보기위해 본 연구를 시행하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

본 연구는 1994년 5월부터 1994년 9월까지 중앙대학교 산부인과 불임클리닉을 방문한 불임환자들을 대상으로 하여 정상적인 정액분석 결과를 보이는 22명의 정상정자군과 정자의 수가 $20 \times 10^6/ml$ 이하이고 생존률이 40% 이하인 9명의 비정상정자군을 대상으로 본 연구를 시행하였다.

2. 정자처리방법

1) Swim-Up 방법

2ml의 Ham's F10 배양액을 끝이 등그런 tube(Falcon 2001)에 넣고 피펫을 이용하여 액화된 정액 0.5ml를 튜브바닥에 배양액과 섞이지 않게 넣는다. 37°C가 유지되는 배양기에서 60분간 배양한 후 상층액 1ml를 조심스럽게 떠내어 한개의 15ml cornical tube(Falcon 2099)에 모아서 원심분리(200×G, 10분)한 후 상층액은 떠내어 버리고 0.3ml의 펠렛층만을 남겨 잘 섞은 후 정자분석에 이용하였다.

2) 80% Isotonic Continuous Percoll 방법

Percoll 원액(Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)에 10배 농도의 Hank's solution I 과 II를 첨가하여 80% percoll 용액을 제조하였다. 제조된 80% percoll 용액을 15ml cornical tube에 5ml씩 분주하였다. 분주된 튜브위에 액화된 정액을 올려 놓은 뒤 피펫을 이용하여 잘 섞어준 후 원심분리(350×G, 30분)하였다. 상층액은 제거하고 0.3ml percoll용액과 펠렛층만을 남긴 후 잘 섞어 정자분석에 이용하였다.

3) Two-Layer Discontinuous Percoll 방법

10배로 농축된 Ham's F10용액(sodiumbicarbonate 2.1g 첨가)과 percoll을 1:9의 비율로 혼합하여 등장의 percoll용액을 제조한 후 Ham's F10에 0.5% BSA를 첨가한 배양액으로 80, 40% percoll용액을 제조하였다. 80, 40% percoll을 15ml cornical tube 바닥에서 부터 섞이지 않게 0.5ml씩 층을 형성시켰다.

액화된 정액을 Ham's F10에 0.5% BSA를 첨가한 배양액과 1:2의 비율로 잘 섞어준 후 준비된 percoll층의 가장 윗부분에 섞이지 않게 살며시 올려 놓는다. 이들을 원심분리(300×G, 30분)한 후 40%층만 조심스럽게 걷어낸 후 80%층 0.3ml과 펠렛층만을 남긴 후 잘 섞어서 정자분석에 이용하였다.

4) Modified Mini-Percoll 방법

10배로 농축된 Ham's F10용액(sodiumbicarbonate 2.1g 첨가)과 percoll을 1:9로 혼합하여 등장의 percoll용액을 제조한 후 Ham's F10에 0.5% BSA를 첨가한 배양액으로 95, 70, 50% percoll용액을 제조하였다. 95, 70, 50% percoll을 15ml cornical tube바닥에서 부터 섞이지 않게 0.3ml씩 층을 형성시켰다.

액화된 정액을 Ham's F10에 0.5% BSA를

Table 1. Comparison of semen analysis results in normal sperm group

	Semen	Continuous percoll	Mini-Percoll	Two-layer Discontinuous percoll	Swim-Up
MSRR(%)	-	37.25 ± 12.19 ^a	52.04 ± 20.75 ^a	53.53 ± 19.06 ^a	33.15 ± 20.65 ^a
MI	189.8 ± 39.66	283.95 ± 47.33	297.5 ± 61.63	264.25 ± 52.23	378.39 ± 48.46

MSRR(%); Motile Sperm Recovery Rate(%), MI; Motility Index, a; p<0.05.

Table 2. Comparison of semen analysis results in subnormal sperm group

	Semen	Continuous percoll	Mini-percoll	Swim-Up
MSRR(%)	-	39.75 ± 22.17 ^a	59.63 ± 29.09 ^a	6.14 ± 2.92 ^a
MI	108.75 ± 40.21	155 ± 86.89	208.75 ± 64.65	212.3 ± 57

MSRR(%); Motile Sperm Recovery Rate(%), MI; Motility Index, a; p<0.05.

첨가한 배양액과 1:2의 비율로 잘 섞어준 후 원심분리(200×G, 10분)하여 0.3ml의 펠렛층만 모아 잘 섞은 후 준비된 percoll층의 가장 윗부분에 섞이지 않게 살며시 올려 놓는다. 이들을 원심분리(300×G, 30-40분)한 후 70, 50%층은 건어내고 95%층 0.3ml만 남긴 후 잘 섞어서 정자분석에 이용하였다.

3. 정자분석

운동성 정자의 회수율과 정자 운동성은 아래의 공식에 근거하여 산출하였다.

* Motile Sperm Recovery Rate(%, MSRR) concentration(a)

$$= \frac{\text{volume(a)} \times \text{motility(a)}}{\text{concentration(f)} \times \text{volume(f)} \times \text{motility(f)}} \times 100$$

(f) 정액 처리전 정액분석 결과.
(a) 정액 처리후 정액분석 결과.

* Motility Index(MI)

$$= \text{motility} \times \text{kinetics(a)}$$

(a) subjective quality of sperm movement.

1. very poor 2. poor 3. fair 4. good 5. very good

4. 통계처리

본 실험의 유의성 검정은 student's t-test 방법으로 실시하였으며, P<0.05인 경우 유의성 있는 것으로 판단하였다.

결 과

정상정자군을 이용한 정자처리법에서 modi-

fied Mini-Percoll법과 Two-Layer Discontinuous Percoll법에서 운동성정자의 회수율이 각각 52.04 ± 20.75%와 53.53 ± 19.06%로 80% Isotonic Continuous Percoll법의 37.25 ± 12.19%와 Swim-Up법의 33.15 ± 20.65%보다 유의하게 높았다(p<0.05)(표 1). 정자운동성을 비교하였을 때 4가지 정자처리법에서 모두 초기 정액상태의 정자운동성보다 처리 후 증가되었음을 알 수 있었다. 특히 Swim-Up법을 이용하였을 때 정자운동성이 378.39 ± 48.46으로 다른 3가지 정자처리법의 결과보다 유의하게 증가하였다(continuous percoll method; 283.95 ± 47.33, two-layer discontinuous percoll method; 264.25 ± 52.23, mini-percoll method; 297.5 ± 61.63, p<0.05)(표 1).

비정상정자군을 이용한 정자처리법에서는 modified Mini-Percoll법이 운동성정자의 회수율에 있어서 59.63 ± 29.09%로 80% Isotonic Continuous Percoll법의 39.75 ± 22.17%와 Swim-Up법의 6.14 ± 2.92%보다 유의하게 높았다(p<0.05)(표 2). Swim-Up법에서는 운동성정자의 회수가 6.14 ± 2.92%로 거의 일어나지 않았다. 정자 운동성은 modified Mini-Percoll법이 208.75 ± 64.65로 80% Isotonic Continuous Percoll법이 155 ± 86.89보다 증가되었으나 유의한 차는 없었다(표 2).

고 찰

체외 수정이나 인공 수정시술시 운동성이 활발한 정자의 성공적인 분리는 Assisted Reproductive Technology(ART)의 성공률을 크게 증진시킬 수 있는 요인이 된다. 특히, 운동

성 정자의 낮은 회수율은 ART의 낮은 성공율을 나타내게 되므로 운동성 정자의 선택적인 분리방법을 개선시키기 위한 연구가 계속되고 있다.

운동성 정자의 선택분리에 가장 보편적으로 이용되어지는 방법은 Swim-Up방법이다. 그러나, 이 방법은 정상적인 운동성을 가진 정자군에서도 회수율이 percoll방법에 비해 낮아짐을 보고하고 있고(Jaroudi et al., 1993) 특히, Ohashi등(1992)은 비정상 소견을 보이는 정자군에서는 그 회수율이 현저히 낮아짐을 보고하였다. 본 실험의 결과에서도 정상 정자군에서 Swim-Up방법을 이용한 회수율이 가장 낮음을 볼 수 있었으며 특히 비정상 정자군의 경우에는 거의 회수가 되지 않음을 보였다. 그러나 Swim-Up방법으로 회수된 정자들의 정자 운동성은 다른 방법들보다 훨씬 높은 지수를 나타내고 있는데 이것은 Swim-Up방법이 튜브의 바닥에 놓여진 정자들 중에서 배양액의 상층부까지 도달한 운동성이 좋은 정자들만을 회수하여 분석하기 때문으로 사료된다.

이러한 정상정자군에 제한되어 이용되고 있는 Swim-Up방법대신 gradient media인 percoll(Pertoft et al., 1977)을 이용하는 방법이 보고되었다. Percoll을 정자처리에 이용하였을 때 운동성 정자의 회수율이 높고(Hyne et al., 1986; McClure et al., 1989) SPA를 시행시에 정자의 기능을 개선시키고(Serafini et al., 1990) 정자의 기능을 저해하는 것으로 알려진 reactive oxygen species를 감소시키는(Aitken et al., 1989) 것으로 보고되었다.

Percoll을 이용하는 방법에는 percoll을 한가지 농도로 이용하는 continuous방법(Iizuka et al., 1988)과 다양한 농도로 이용하는 discontinuous방법(Lessley et al., 1988; Hyne et al., 1986; McClure et al., 1989)이 있으며 소량의 percoll을 이용한 discontinuous방법인 Mini-Percoll방법(Ord et al., 1990, 1993)이 이용되고 있다.

본 연구에서 Percoll을 이용한 정자처리법을 비교하였을 때 80% Isotonic Continuous Percoll방법은 두개의 다른 Discontinuous Percoll방법에 비해 정상 정자군과 비정상 정자군에서 모두 운동성 정자의 회수율이 낮았다. 그러나 정자 운동성 지수에 있어서는 차이가 없었다. Continuous Percoll방법은 처리 후 펠렛층에 운동성 정자뿐만 아니라 다른 정액내 세

포들도 함께 모이는 것을 볼 수 있었으나 두개의 다른 Discontinuous Percoll방법을 이용하였을 때는 정자를 제외한 다른 세포들은 펠렛층에서 거의 발견할 수 없었다. 이것은 Iizuka등(1988)이 monolayer percoll방법과 4단계의 비중차를 둔 Discontinuous Percoll방법을 비교하였을 때 Discontinuous Percoll방법에서 운동성 정자의 회수율이 높았다고 보고한 결과와 일치한다.

두개의 Discontinuous Percoll방법 중 Two-Layer Discontinuous Percoll방법이 modified Mini-Percoll방법보다 운동성정자의 회수율은 조금 높았지만 정자운동성은 낮은 지수를 보였다. 이것은 두 단계의 비중차보다는 modified Mini-Percoll방법의 세 단계의 비중차가 한번 더 비중차를 이용해 죽은 정자를 걸러낼 수 있기 때문에 정자운동성 지수에 영향을 끼치는 운동성 정자의 %가 높게 측정되기 때문으로 보여진다.

비정상 정자군에 있어서 Swim-Up방법은 Ng등(1992)과 Sakkas등(1993)의 보고와 같이 본 실험의 결과에서도 percoll을 이용한 방법보다 낮은 회수율을 보였다. 그러나 Ng등(1992)이 Continuous Percoll방법과 Mini-Percoll방법에서 유의한 차가 없었다고 보고한 것과는 달리 본 실험에서는 modified Mini-Percoll방법을 이용한 정자군에서 훨씬 높은 운동성 정자의 회수율과 정자운동성을 보였다.

본 실험의 결과에서 modified Mini-Percoll 방법은 처리 후 다른 방법들보다 세포 찌꺼기 등이 거의 보이지 않고 깨끗하게 운동성정자를 회수할 수 있었다. 특히, 희소 정자증 환자의 경우 정자 처리 후 펠렛층까지도 수정에 이용되어지는 경우가 많으므로(Ord et al., 1993) 세포찌꺼기가 없고 운동성 정자의 회수율이 높은 modified Mini-Percoll 방법이 유리하게 이용되어질 수 있다.

최근에는 운동성 정자를 선택 분리하는데 있어서 한가지 방법만을 적용하지 않고 각각의 방법의 장점을 살려 복합적으로 선택분리하는 방법을 적용하고 있다(Wong et al., 1986; Alvarez et al., 1993; Holmgren & Jeyendren, 1993). 또한 미세조작술(micromanipulation) 방법을 이용하여 희소정자증이나 정자 무력증 환자에서 수정률과 임신률을 증가시켰다고 보고하고 있고(Gordts et al., 1993) sperm motility activator인 Pentoxifylline(PTF)을 정자처

리시에 이용하여 임신에 성공한 보고를 하고 있다(Yovich et al., 1988, 1990). 따라서 각 환자의 특이성에 맞는 정자의 선택분리방법을 선택하여 이용하는 것이 좀더 좋은 운동성정자의 회수율을 가져올 것으로 생각되어지며 ART의 성공율을 크게 높일 수 있을 것으로 보인다.

결 론

중앙대학병원 산부인과학교실에서는 불임 클리닉을 방문한 불임환자중 정상정자군 22명과 비정상정자군 9명을 대상으로 하여 두군을 Swim-Up, 80% Isotonic Continuous Percoll, Two-Layer Discontinuous Percoll과 modified Mini-percoll방법에 이용하여 운동성정자의 회수율과 정자운동성을 비교하여 다음의 결과를 얻었다.

1. 정상정자군에서 운동성정자의 회수율은 modified Mini-Percoll방법의 $52.04 \pm 20.75\%$ 와 Two-Layer Discontinuous Percoll방법의 $53.35 \pm 19.06\%$ 에서 Swim-Up방법의 $33.15 \pm 20.65\%$ 와 80% Isotonic Continuous Percoll 방법의 $37.25 \pm 12.19\%$ 보다 높았다. 정자운동성은 Swim-Up 방법에서 378.39 ± 4.46 으로 유의하게 증가하였다($p < 0.05$).

2. 비정상정자군에서 운동성정자의 회수율이 modified Mini-Percoll방법의 $59.63 \pm 29.09\%$ 가 Swim-Up방법의 $6.14 \pm 2.92\%$ 와 80% Isotonic Continuous Percoll방법의 $39.75 \pm 22.17\%$ 보다 유의하게 높았다($p < 0.05$).

이상의 연구결과로 modified Mini-Percoll방법이 남성불임환자의 정자 선택분리 방법으로 유용하게 이용되어질 수 있을 것으로 보인다.

인 용 문 헌

- Aitken JR, Clarkson JS, Hargreave TB, Irvine SD, Frederick WCW: Analysis of the relationship between defective sperm function and generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. *J Androl* 1989, 10, 214.
- Alvarez JG, Lasso JL, Blasco L, Nunez RC, Heyner S, Caballero PP, Storey BT: Centrifugation of human spermatozoa induces sublethal damage; separation of human spermatozoa from seminal plasma by a dextran swim-up procedure without centrifugation extends their motile lifetime. *Hum Reprod* 1993, 8(7), 1087.
- Gordts S, Roziars P, Garcia G, Campo R, Vercryssen M, Swinnen K: Subzonal insemination; a prospective randomized study in patients with abnormal sperm morphology. *Fertil Steril* 1993, 60(2), 307.
- Harris SJ, Milligan MP, Masson GM, Dennis KJ: Improved separation of motile sperm in asthenospermia and its application to artificial insemination homologous(AIH). *Fertil Steril* 1981, 36(2), 219.
- Holmgren WJ, Jeyendran RS: Synergistic effect of TEST-yolk buffer treatment and glass wool filtration of spermatozoa on the outcome of the hamster oocyte penetration assay. *Hum Reprod* 1993, 8(3), 425.
- Hyne RV, Stojanoff A, Clarke GN, Lopata A, Johnson WIH: Pregnancy from in Vitro fertilization of human eggs after separation of motile sperm by density gradient centrifugation. *Fertil Steril* 1986, 45, 93.
- Iizuka R, Kaneko S, Kobanawa K, Kobayashi T: Washing and concentration of human semen by percoll density gradients and its application to AIH. *Arch Androl* 1988, 2, 117.
- Jaroudi KA, Carver-Ward JA, Hamilton CJC, Sieck UV, Sheth KV: Percoll semen preparation enhances human oocyte fertilization in male-factor infertility as shown by a randomized cross-over study. *Hum Reprod* 1993, 8(9), 1438.
- Kanwar KC, Yanagimachi R, Lopata A: Effects of human seminal plasma on fertilizing capacity of human spermatozoa. *Fertil Steril* 1979, 31(3), 321.
- Lessley BA, Garner DL: Isolation of motile spermatozoa by density gradient centrifugation in percoll. *Gamete Res* 1983, 7, 49.
- McClure RD, Nunes L, Tom R: Semen manipulation; improved sperm recovery and function with a two-layer percoll gradient. *Fertil Steril* 1989, 51, 874.
- Ng FLH, Liu DY, Baker HMG: Comparison of

- percoll, mini-percoll and swim-up methods for sperm preparation from abnormal semen samples. *Hum Reprod* 1992, 7(2), 261.
- Ohashi K, Kato M, Saji F, Tsutsui T, Wakimoto A, Tanizawa O: Preparation of oligozoospermic and/or asthenozoospermic semen for intrauterine insemination using the Sperm Prep semen filtration column. *Fertil Steril* 1992, 57(4), 866.
- Ord Patrizio P, Mareello E, Balmaceda JP, Asch RH: Mini-Percoll: A new method of semen preparation for IVF in severe male factor infertility. *Hum Reprod* 1990, 5(8), 987.
- Ord T, Patrizio P, Balmaceda JP, Asch RH: Can severe male factor infertility be treated without micromanipulation. *Fertil Steril* 1993, 60(1), 110.
- Pardo M, Buxaderas C, Barri BN, Pomerol JM, Bancells N, Sabater J, Coroleu B: Spermatozoa selection in discontinuous percoll gradients for use in artificial insemination. *Fertil Steril* 1988, 49(3), 505.
- Sakkas D, Gianaroli L, Diotallevi L, Wagner I, Ferraretti AP, Camparison A: IVF treatment of moderate male factor infertility: A comparison of mini-percoll, partial zona dissection and sub-zonal sperm insertion techniques. *Hum Reprod* 1993, 8(4), 587.
- Serafini P, Blanck W, Tran CMT, Mansourian MRMT, Tan T, Batzofin J: Enhanced penetration of zona-free hamster ova by sperm prepared by Nicodenz and Percoll gradient centrifugation. *Fertil Steril* 1990, 53, 551.
- Wong PC, Balmaceda JP, Blanco JD, Gibbs RS, Asch RH: Sperm washing and swim-up technique using antibiotics removes microbes from human semen. *Fertil Steril* 1986, 45(1), 97.
- Yovich JM, Edirisinghe WR, Cummins JM, Yovich JL: Preliminary results using pentoxifylline in a pronuclear stage tubal transfer (PROST) program for severe male factor infertility. *Fertil Steril* 1988, 50(1), 179.
- Yovich JM, Edirisinghe WR, Cummins JM, Yovich JL: Influence of pentoxifylline in severe male factor infertility. *Fertil Steril* 1990, 53(4), 715.