

인간정자의 처리에 있어서 Percoll과 Sil-Select 방법의 비교

서울대학교 의과대학 산부인과학교실¹, 서울대학교·의학연구원·인구의학연구소²,
성균관대학교 의과대학 삼성제일병원 산부인과³

문신용^{1,2} · 류범용² · 신현아² · 오선경² · 서창석^{1,2} · 김석현^{1,2}
최영민^{1,2} · 김정구¹ · 최규홍^{2,3} · 이진용¹

Comparison between Percoll and Sil-Select Methods on the Human Spermatozoa Treatment

Shin Yong Moon^{1,2}, Buom Yong Ryu², Hyun Ah Shin², Sun Kyung Oh², Chang Suk Suh^{1,2},
Seok Hyun Kim^{1,2}, Young Min Choi^{1,2}, Jung Gu Kim¹, Kyu Hong Choi^{2,3}, Jin Yong Lee¹

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine¹, Institute of Reproductive Medicine and Population, Medical Research Center², Seoul National University, Department of Obstetrics and Gynecology, Samsung Cheil Hospital, Sungkyunkwan University, School of Medicine³, Seoul, Korea

Objective: To evaluate silane-coated silica particles (Sil-select) as an alternative to polyvinylpyrrolidone-coated particles (Percoll) for gradient separation of spermatozoa, for use in assisted reproduction.

Methods: 20 normal semen based on WHO criteria were included in this study. Recovery of motile and morphologically normal spermatozoa after using two-layer Percoll and Sil-select gradient respectively was recorded. Motility, HOST (hypoosmotic swelling test) and the detection of malondialdehyde for LPO (lipid peroxidation) after 24 h of incubation at 37 °C in a 5% CO₂ incubator were compared.

Results: Percoll (78.5%) and Sil-select (79.1%) showed a significant increase in the motility compared to ejaculate (60.9%) but no difference between Percoll and Sil-select. Normal sperm morphology significantly increased after Percoll (57.6%) and Sil-select (53.7%) compared to ejaculate (35.8%) but no difference between Percoll and Sil-select. No differences in the recovery of motile spermatozoa and motility, HOST and the production of malondialdehyde after 24 h incubation were found when comparing the use of Percoll and Sil-select.

Conclusion: Sil-select seems to be an attractive alternative to Percoll for sperm separation in assisted reproduction.

Key Words: Sil-select, Percoll, Gradient separation, Assisted reproduction, Motility

정액으로부터 정장성분을 제거하고 운동성 정자를 분리하는 것은 보조생식술 (Assisted Reproductive Technology, ART)의 중요 단계이다. 그 이유는 정장성분이 수정에 유해한 영향을 끼치기 때문이며^{1,2}, 죽은 정자, 백혈구 및 정액내 존재하는 정자이외의 세포는 수정에 필요한 운동성 정자의 기능을 감소시키는 원인이 될 수 있기 때문이다³. 따라서 보조생

식술을 위한 정액은 액화가 되자마자 가능한 빨리 처리를 하여야 한다.

인간에서 운동성 정자를 회수하는 많은 방법들이 개발되어 왔다. 정자 처리 방법으로는 손쉽게 시행할 수 있는 swim-up 방법에서부터, Percoll을 이용한 중층분리법⁴, albumin gradients 방법⁵, glass-wool filtration 방법⁶과 glass beads 법⁷ 등과 같은 다양한 방법

이 개발되었다. 이들 중 swim-up 방법과 중층분리법은 최근까지 널리 사용되는 대표적인 정자처리법으로 알려져 있다.

여러 연구결과에서 Percoll을 이용한 중층분리법은 swim-up 방법과 비교하여 수정능력이 좋은 운동성 정자의 회수율이 높은 것으로 보고되고 있다⁸⁹. 또한 Percoll은 정액내 박테리아의 제거에 효과가 있으며¹⁰, 정액내에서 생성된 활성산소계 (reactive oxygen species, ROS)로부터 정자를 보호하는 작용도 알려져 있다¹¹. 그러나 Percoll에서는 인간에게 주입되는 제재에 대한 미국 FDA (Food and Drug Administration)의 허용기준보다 10~100배 가량 높은 endotoxin이 검출되는 것으로 보고되었다¹². 이와 같은 문제로 인하여 Percoll의 임상적 이용시 인간배아의 질이 떨어지고 임신율 저하에 주요한 원인이 될 수 있다는 의견이 제시되었다¹³. 또한 최근에는 세계보건기구 (WHO)에서도 Percoll의 연구목적이 아닌 임상적 사용을 제한하고 있는 실정이다¹⁴. 따라서 중층분리법의 장점을 지니면서 endotoxin 등의 문제점을 보완한 제재에 대한 필요성이 증대되고 있다.

본 연구는 보조생식술을 위한 정액 처리시 주로 사용되고 있는 Percoll의 대체제로서 endotoxin 수준이 낮게 조정된 상용 제품인 Sil-Select (FertiPro, Belgium)의 유용성을 검증하고자 동일한 정액표본을 대상으로 Percoll과 Sil-Select를 이용하여 운동성 정자와 정상 형태 정자의 회수율을 비교하였고, 처리 후 정자의 기능과 특성변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 저장액내 정자 미부의 팽창 (hyposmotic swelling test, HOST)과 정자막 지방의 산화 (lipid peroxidation) 정도를 분석하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

서울대학교 병원 불임클리닉에 내원한 환자 중에서 세계보건기구 (WHO)의 기준에 의거하여 정상적인 정액성상을 보이는 환자 20명을 대상으로 시행하였다.

2. 연구방법

1) 정자 처리

정액은 2-5일간 금욕기간을 가진 후 수음에 의하여 무균적으로 채취하였으며, 상온에서 30분간 방치하여 액화시켰다. 액화된 정액을 2등분 하여 Percoll과 Sil-Select 방법으로 처리하였다.

(1) Percoll gradients 방법

10배로 농축된 Ham's F-10과 Percoll용액을 1:9 (v/v)로 혼합하여 등장의 Percoll용액을 제조하였다. 이 Percoll용액에 BSA를 1.0% (w/v) 첨가한 후 1배의 Ham's F-10을 혼합하여 45%, 90%의 농도별 Percoll용액을 제조하였다. 각 농도의 Percoll용액을 15 ml의 conical tube에 밑바닥부터 90%, 45% Percoll용액 1 ml씩을 넣어 두 층을 만들었다. Percoll층의 윗부분에 액화된 정액을 올려놓은 뒤 300×g로 30분간 원심분리한 후 정자괴를 제외한 상층액을 제거하였다. 정자괴를 0.3% BSA가 첨가된 Ham's F-10으로 희석한 후 300×g에서 10분간 원심분리하여 운동성 정자를 회수하였다.

(2) Sil-Select 방법

Sil-Select kit (FertiPro, Belgium)의 상층용액과 하층용액을 각각 1 ml씩 15 ml conical tube에 넣어 두 층을 만들었다. 윗부분에 액화된 정액을 올려놓은 뒤 250×g에서 30분간 원심분리를 하였다. 이후의 과정은 Percoll 처리와 동일하게 시행하였다.

2) 정액분석

액화직후 및 정액 처리 후 정액분석을 시행하였다. 정자의 농도 및 운동성은 CTS-60/200 system (Motion Analysis Co., USA)을 이용하여 측정하였으며, 정상 형태 정자의 비율은 Diff Quik (국제시약 주식회사, 일본)으로 염색 후 Kruger 등¹⁵ (1986)의 strict criteria에 의거하여 분석하였다. 각각의 처리별 운동성 정자의 회수율 (motile sperm recovery rate)과 37°C 5% CO₂ 배양기 내에서 24시간 배양 후 정자의 운동성 (sperm survival test, SST)은 아래의 공식에 근거하여 산출하였다.

$$\text{Motile sperm recovery rate (\%)} = \frac{\text{final concentration} \times \text{volume} \times \text{motility} \times 100}{\text{initial concentration} \times \text{volume} \times \text{motility}}$$

$$\text{ST (\%)} = \frac{\text{final concentration of progressive spermatozoa after 24 h} \times 100}{\text{initial concentration of progressive spermatozoa}}$$

3) 정자의 저장액 처리 (Hypo-osmotic swelling test; HOST)

HOST는 Jeyendran 등¹⁶ (1984)의 방법에 준하여 시행하였다.

Table 1. Effects of different sperm preparation method on sperm characteristics (n=20)

Variable	Ejaculate	Percoll	Sil-select
Motility (%)	60.9±3.0	78.5±2.5*	79.1±2.5*
Normal morphology (strict criteria) (%)	35.8±4.1	57.6±4.5*	53.7±4.9*
Motile recovery rate (%)		56.5±5.1	61.9±5.4
Sperm survival test (%) (at 24 h after treatment)		53.8±5.3	49.2±4.5

Values are means ± S.E.M, *p<0.01 compared with Ejaculate values.

No significant differences between Percoll and Sil-select treatment

각각의 처리 후 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양된 정액 300 µl를 fructose (Sigma, USA) 13.51 gm과 sodium citrate (Shinyo, JAPAN) 7.35 gm을 3차 증류수 1000 ml에 녹여 최종 삼투압 150 mOsm/Kg로 제조된 5 ml의 저장성 용액과 혼합한 후 37°C의 수조 내에서 30분간 배양하였다. 이 후 500×g에서 5분간 원심분리하였으며, 상층액을 제거한 후 정자괴에서 10 µl를 취하여 깨끗한 슬라이드에 도말하고 실온에서 건조시켰다.

결과의 분석을 위하여 위상차 현미경에서 슬라이드당 최소 200개 이상의 정자를 판독하였다. HOST 결과는 판독한 정자의 총수에서 미부가 변화된 정자의 비율로 계산하였다.

4) 정자막 지방의 산화 (lipid peroxidation)

Lipid peroxidation은 최종 산물인 malondialdehyde를 측정하는 thiobabutaric acid (TBA) 반응법으로 분석하였다¹⁷.

각각의 처리 후 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양된 정액을 Ca⁺⁺, Mg⁺⁺이 제거된 Hank's balance salt solution으로 희석하여 정자농도가 20×10⁶/ml 되게 조정하였다. Lipid peroxide의 malondialdehyde로의 전환을 증진시키기 위하여 3차 증류수로 희석된 4 mM ferrous sulphate (Sigma, USA)와 20 mM sodium ascorbate (Sigma, USA)를 각각 10 µl씩 상기 정자 부유액 1 ml 첨가하고 37°C에서 2시간 배양하였다. 250 µl의 40% trichloroacetic acid (Sigma, USA)를 첨가하고 0°C에서 10분간 정치 후 2500×g에서 10분간 원심분리하였다. 이후 상층 1 ml을 회수하여 250 µl의 1% TBA와 혼합하여 끓는 물에서 10분간 중탕하였고 상온에서 냉각시켰다. Malondialdehyde의 농도는 spectrophotometer (Kontron instruments, Switzerland)를 이용하여 532 nm 파장에서 반응액의 흡광도 (optical density)를 측정하여 분석하였다. 생성된 malondialdehyde의 몰농도는 몰 흡광

계수 (1.49 × 10⁴ l·mol⁻¹·cm⁻¹)를 기준으로 환산하였다¹⁸.

3. 통계처리

Student's t-test 등을 이용하여 자료 분석 및 유의성 검증을 실시하였으며, p<0.05를 통계학적으로 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

결 과

Percoll과 Sil-select 처리 후 정자의 운동성은 정액의 60.9±3.0%에 비교하여 Percoll은 78.5±2.5%, Sil-select는 79.1±2.5%로서 유의하게 높았으며, Percoll과 Sil-select 간에는 유의한 차이가 없었다 (Table 1).

정상 형태 정자의 비율은 정액 및 Percoll과 Sil-select 처리 후 각각 35.8±4.1, 57.6±4.5, 53.7±4.9%이었으며, 정액과 비교하여 Percoll과 Sil-select 처리 후 정상 형태 정자의 비율이 유의하게 증가되었으나, Percoll과 Sil-select 처리간에는 유의한 차이가 없었다 (Table 1).

처리 후 운동성 정자의 회수율은 Percoll군에서 56.5±5.1%, Sil-select군에서 61.9±5.4 %이었으며, 24시간 배양 후 운동성 양상은 각각 53.8±5.3, 49.2±4.5%이었다. 두 군을 비교할 때 처리 후 운동성 정자의 회수율과 24시간 배양 후 운동성 양상 모두에서 유의한 차이가 나타나지 않았다 (Table 1).

24시간 배양 후 Percoll군과 Sil-select군에서 저장액내 팽창검사 (HOST) 결과 정자 미부가 팽창된 정자의 비율은 각각 93.1±1.7, 87.3±4.1%이었으며, malondialdehyde의 생성정도는 각각 11.2±1.4, 13.4±1.8 nmol로서 두 검사 모두에서 두 군간 유의한 차이가 나타나지 않았다 (Figure 1, Figure 2).

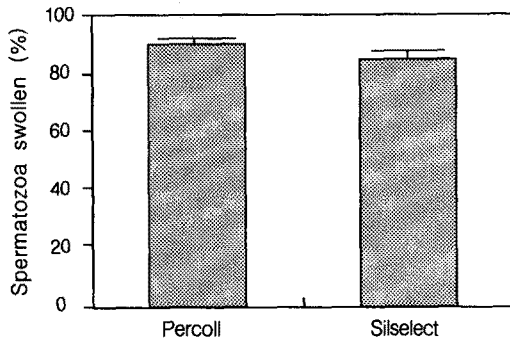


Figure 1. Effect of different sperm preparation method on the swelling of spermatozoa under hypo-osmotic condition after 24 hours incubation. Values are mean \pm S.E.M, n=20. No significant differences between Percoll and Sil-select treatment.

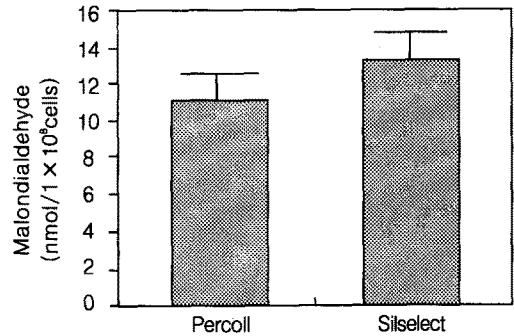


Figure 2. Effect of different sperm preparation method on the induction of lipid peroxidation after 24 hours incubation. Lipid peroxidation expressed as nmol malondialdehyde generated by 1×10^8 spermatozoa. Values are mean \pm S.E.M, n=20. No significant differences between Percoll and Sil-select treatment.

고 찰

보조생식술 (ART)을 위한 정자처리법으로는 여러 방법이 알려져 있으나 그 목적은 모두 많은 수의 운동성 정자를 회수하는 것에 있다. 최근 들어 남성측 원인에 기인한 수정과 임신 실패가 문제시 되고 있어 정자의 기능을 향진시켜 이러한 문제점을 극복하려는 연구가 시도되고 있다. 정자 처리 후의 운동성 정자의 낮은 회수율과 수정능력은 시험관아기 수술시 수정율과 임신을 저하의 원인이 된다. 즉 정자 처리시 운동성 정자의 회수율과 정자의 수정능력을 높일 수 있다면 ART의 성공율은 더욱 증진될 것이다. 남성불임증 환자의 정자는 수, 운동성 (%) 및 수정능력이 정상인 정자에 비해 크게 떨어지므로 ART시술시 손상없이 수정능력이 좋은 운동성 정자의 회수율을 높이는 방법은 ART의 성공여부에 중요한 요건이 된다.

이러한 관점에서 여러 가지 정자처리법이 개발되어 왔는데, 이들 중 Percoll을 이용한 중층분리법은 사용이 간편하면서 운동성 정자의 회수율이 높은 방법으로 ART시행에 있어서 주요한 정자처리법으로 사용되어 왔다. 그러나 최근 보고에 따르면 Percoll에서 높은 수준의 endotoxin이 검출되었으며¹⁹, Percoll을 이용한 정자 처리 과정 중에 정자의 표면에 silica particles이 흡착되는 것으로 알려졌다. 전자현미경하에서 silica particle이 정자막에 흡착되는 것으로 관측되었으며, 이와 같은 정자가 체내 조직에 접촉될 경우 염증을 일으킬 수 있다고 보고되었다²⁰. 따라서 PVP (polyvinylpyrrolidone)가 코팅된

silica particle인 Percoll을 대신하여 세포에 유해성이 없는 물질에 대한 필요성이 대두되게 되었으며, 최근에는 PVP 보다 안정적인 silane이 코팅된 silica particle로 구성된 상품들이 개발되었다.

본 연구에서 silane이 코팅된 silica particle로 구성된 상품 중의 하나인 Sil-select를 이용하여 정자 처리를 한 결과 Percoll과 비교하여 운동성 정자와 정상 형태 정자의 회수율에 있어서 유의한 차이가 없었으며, 운동성 (motility)은 정액의 운동성과 비교하여 유의하게 높은 결과를 나타내었다. 본 연구의 결과는 Söderlund와 Lundin²¹ (2000)이 Sil-select와 유사 제품인 PureSperm (Nidacon, Göteborg, Sweden)을 이용하여 정액 처리 후 Percoll과 차이 없는 운동성과 운동성 정자의 회수율을 얻었다는 보고와 유사하였다. 반면 Chen과 Bongso²² (1999)는 PureSperm과 Percoll 처리의 비교에서 회수된 정상 정자 형태의 비율에서는 차이가 없었지만 운동성은 Percoll 처리에서 높았다고 보고하였다. Claassens 등²³ (1998)의 연구에서는 PureSperm 처리에서 정자 형태가 다소 향상되는 결과였으나, 이와 상반된 결과도 보고되었다²¹. 이와 같은 연구자들간의 결과 차이는 실험에서 적용한 원심분리 기법상의 문제에서 발생한 것으로 생각된다. 정액 처리를 위한 중층분리법에 있어서는 제품간의 밀도 차이를 고려하여 각 제품의 특성에 맞는 최적의 원심분리 시간과 원심력을 설정하는 것이 제품의 특성을 반영하는데 중요한 요인이라 생각된다.

본 연구에서 동일한 정액표본을 Percoll과 Sil-select로 처리한 후 회수된 정자의 기능과 특성변

화에 미치는 영향을 알아본 결과 두 군간에 24시간 배양 후 정자의 운동성과 HOST 및 LPO 모두에서 유의한 차이가 나타나지 않았다. Percoll이 생체 내에 미치는 유해성 연구에서 Pickering 등²⁰ (1989)은 생쥐 복강 내로 Percoll을 주입했을 때 주입된 자리에 국소적인 육아종성 (granulomatous) 반응이 나타났다고 보고하였으나, 반면 Arora 등²⁴ (1994)은 Percoll을 토끼의 난소와 자궁각에 주사하였을 때 주사 4주 후 조직학적인 소견에 이상이 없었다는 상반된 결과를 발표하였다. 그러나 Strehler 등²⁵ (1998)은 Percoll의 주성분인 PVP 처리 후 정자의 전자현미경적 미세구조의 관찰에서 PVP가 정자의 원형질막 (plasma membrane)과 점체 및 미토콘드리아의 막에 유해한 작용을 하며, 막 손상이 정자 꼬리의 미세 구조와 정자 염색질 (chromatin)에 이상을 초래할 수 있다고 보고하였다.

본 연구결과로서 증충분리법을 이용한 정액 처리 시 적절한 원심분리기법이 적용된다면 Sil-select를 이용한 정자 처리 방법은 Percoll을 대체할 수 있는 유용한 방법이라 생각된다.

결 론

본 연구는 보조생식술을 위한 정액 처리시 주로 사용되고 있는 Percoll의 대체제로서 Sil-Select의 유용성을 검증하고자 동일한 정액표본을 대상으로 Percoll과 Sil-Select를 처리한 후 운동성 정자와 정상 형태 정자의 회수율을 조사하였고 처리 후 정자의 기능과 특성변화에 미치는 영향을 알아 보기 위하여 저장액내 정자 미부의 팽창 (hypoosmotic swelling test, HOST)과 정자막 지방의 산화 (lipid peroxidation) 정도를 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Percoll과 Sil-select 처리 후 정자의 운동성은 정액의 60.9±3.0%에 비교하여 Percoll은 78.5±2.5%, Sil-select는 79.1±2.5%로서 유의하게 높았으며, Percoll과 Sil-select 간에는 유의한 차이가 없었다.

2. 정상 형태 정자의 비율은 정액 및 Percoll과 Sil-select 처리 후 각각 35.8±4.1, 57.6±4.5, 53.7±4.9%이었으며, 정액과 비교하여 Percoll과 Sil-select 처리 후 정상 형태 정자의 비율이 유의하게 증가되었으나, Percoll과 Sil-select 처리간에는 유의한 차이가 없었다.

3. 운동성 정자의 회수율은 Percoll군에서 56.5±5.1%, Sil-select군에서 61.9±5.4 %이었으며, 24시간 배양 후 운동성 양상은 각각 53.8±5.3, 49.2±4.5이

었다. 두 군을 비교할 때 처리 후 운동성 정자의 회수율과 24시간 배양 후 운동성 양상 모두에서 유의한 차이가 나타나지 않았다.

4. 24시간 배양 후 Percoll군과 Sil-select군에서 저장액내 팽창검사 (HOST) 결과 정자 미부가 팽창된 정자의 비율은 각각 93.1±1.7, 87.3±4.1%이었으며, malondialdehyde의 생성정도는 각각 11.2±1.4, 13.4±1.8 nmol로서 두 검사 항목 모두에서 두 군간 유의한 차이가 나타나지 않았다.

이상의 결과로서 Sil-select를 이용한 정자처리법은 보조생식술의 시술에 있어서 Percoll을 대체할 수 있는 유용한 방법으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Kanwar KC, Yanagimachi R, Lopata A. Effects of human seminal plasma on fertilizing capacity of human spermatozoa. *Fertil Steril* 1979; 31: 321-27.
2. Reddy JM, Stark RA, Zaneveld LJD. A higher molecular weight antifertility factor from human seminal plasma. *J Reprod Fertil* 1979; 57: 437-46.
3. Berger RE, Karp LE, Williamson RA, Koehler J, Moor DE, Holmes LK. The relationship of pyro-spermia and seminal fluid bacteriology to sperm function as reflected in the sperm penetration assay. *Fertil Steril* 1982; 37: 557-64.
4. Bolton VN, Braude PR. Preparation of human spermatozoa for in vitro fertilization by isopycnic centrifugation on self-generating density gradients. *Arch Androl* 1984; 13: 167-76.
5. Ericsson RJ, Langevin CN, Nishino M. Isolation of fractions rich in human Y sperm. *Nature* 1973; 246: 421-24.
6. Van der Ven HH, Jeyendran RS, Al-Hasani S, Tunnerhoff A, Hoebbel K, Diedrich K, Krebs D, Perez-Pelaez M. Glass wool column filtration of human semen: relation to swim-up procedure and outcome of IVF. *Hum Reprod* 1988; 3: 85-8.
7. Daya S, Gwatkin RBL, Bissessar H. Separation of motile human spermatozoa by means of a glass bead column. *Gamete Res* 1987; 17: 375-80.
8. McClure RD, Nunes L, Tom R. Semen manipulation: improved sperm recovery and function with a two-layer Percoll gradient. *Fertil Steril* 1989; 51: 874-7.

9. Ng FIH, Liu DY, Baker HW. Comparison of Percoll, mini-Percoll and swim-up methods for sperm preparation from abnormal semen samples. *Hum Reprod* 1992; 7: 261-6.
10. Bolton VN, Warren RE, Braude PR. Removal of bacterial contaminants from semen for in vitro fertilization or artificial insemination by the use of buoyant density centrifugation. *Fertil Steril* 1986; 46: 1128-32.
11. Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and autooxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl* 1988; 9: 367-.
12. Svalander PC, Lundin K, Holmes PV. Endotoxin levels in Percoll® density-gradient media used to prepare sperm for human IVF treatment. *Hum Reprod* 1995; 10 (Abstract book 2): 130.
13. Fishel S, Jackson P, Webster J, Faratian B. Endotoxins in culture medium for human in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1988; 49: 108-11
14. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 4th edn. Cambridge University Press, Cambridge.
15. Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, et al. Sperm morphological features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1986; 46: 1118-23.
16. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 1984; 70: 219-28.
17. Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham DW. Analysis of lipid peroxidation mechanism in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 1993; 35: 302-15.
18. Slater TF, Sawyer BC. The stimulatory effects of carbon tetrachloride and other halogenoalkanes on peroxidative in rat liver fractions in vitro. *Biochem J* 1971; 123: 805-14.
19. Andersen CY, Grinstead J. A new method for the purification of human motile spermatozoa applying density-gradient centrifugation: polysucrose media compared to Percoll media. *J Assist Reprod* 1997; 14: 624-8.
20. Pickering SJ, Fleming TP, Braude PR, Bolton VN, Gresham GAG. Are human spermatozoa separated on a Percoll density gradient safe for therapeutic use? *Fertil Steril* 1994; 61: 979-81.
21. Söderlund B, Lundin K. The use of silane-coated silica particles for density gradient centrifugation in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 2000; 15: 857-60.
22. Chen MJ, Bongso A. Comparative evaluation of two density gradient preparations for sperm separation for medically assisted conception. *Hum Reprod* 1999; 14: 759-64.
23. Claassens OE, Menkveld R, Harrison KL. Evaluation of three substitutes for Percoll in sperm isolation by density gradient centrifugation. *Hum Reprod* 1998; 13: 3139-43.
24. Arora M, Carver-Ward JA, Jaroudi KA, Sieck UV. Is Percoll safe for in vivo use? *Fertil Steril* 1994; 61: 979-81.
25. Strehler E, Baccetti B, Sterzik K, Capitani S, Collovel G, De Santo M, et al. Detrimental effects of polyvinylpyrrolidone on the ultrastructure of spermatozoa (Notulae Seminologicae 13). *Hum Reprod* 1998; 13: 120-3.