大韓不妊學會誌: 第28卷 第4號 2001
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 28, No. 4, 2001, 12

# Progesterone 및 Acetyl-L-Carnitine이 정자의 동결-융해에 미치는 영향

인제대학교 의과대학 일산 백병원 산부인과교실 · 김포 중앙 라산부인과*

정병준 · 김윤진 · 최형민 · 전명권 · 이응수 · 나오순*

# The Effects on Sperm Parameters and Membrane after Treatment with Progesterone and/or Acetyl-L-Carnitine; Cryopreservation-Thawing

**Byeong Jun Jung, Yun Jin Kim, Hyung Min Choi, Myung Kwon Jun, Eung Soo Lee, O Soon Nah***

*Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Inje University, Ilsan Paik Hospital, Joong-Ang Ra Obstetrics and Gynecology, Kimpo**

**Objective:** To assess the effects of progesterone and acetyl-L-carnitine used after treated with Isolate® gradient before semen cryopreservation-thawing on sperm parameters and membrane integrity.

**Material and Methods:** From April 2001 to July 2001, ten normal male partner of couples who were visited in vitro fertilization (IVF) clinics. the semens were treated with Isolate® gradient before cryopreservation, spermatozoa was incubated with progesterone (1, 5 and 10 μM), acetyl-L-carnitine (2.5, 5 and 10 μM), or both (progesterone, 1 μM; and acetyl-L-carnitine, 5 μM) for 30 min.

**Results:** There were no differences in sperm parameters and vital stain among isolate only treated group, progesterone (1, 5 and 10 μM), acetyl-L-carnitine (2.5, 5 and 10 μM) and both (progesterone, 1 μM; and acetyl-L-carnitine, 5 μM). But, in high concentration of acetyl-L-carnitine (10 μM) treated group, sperm parameters and vital stain were decreased. The statistical method was used ANOVA (Kruskal-Wallis test) and p value was $<0.01$.

**Conclusions:** Neither progesterone nor acetyl-L-carnitine show to be protective effect on the cryodamage assessed by sperm parameters and vital stain (eosin-Y stain) in normal sperm. High concentration of acetyl-L-carnitine (10 μM), however, was harmful effect on cryoprevention.

**Key Words:** Progesterone, Acetyl-L-carnitine, Sperm parameters, Cyropreservation

정자를 동결 보존시키는 방법은 시간적인 제약이나 공간적인 제약을 극복하여 필요한 시기에 인공수정이나 체외 수정을 시행할 수 있게 한다. 그러나 동결 보존된 정자는 수정 능력이 떨어지는데 이는 동결 후 정자의 운동성과 생존 능력이 신선한 정자보다 감소된다고 생각된다. 원인으로는 정자의 동결융해 과정이 정자의 첨체막의 여러 가지 변화에 의해 야기된다고 본다.[1] 이러한 동결 정자의 약점을 극복하기 위한 연구들이 진행되고 있으나, 아직 가장 이상적인 방법은 없는 실정이다.

정액에 있는 acetyl-L-carnitine은 부고환의 기능을 진단하는 지표로 최근 제시되고 있다. 이는 지방산의

주관책임자: 정병준, 우) 402-859 인천광역시 남구 주안4동 1534-4, 서울여성병원 불임클리닉
Tel: (032) 230-3630, Fax: (032) 247-2001, e-mail: byeongjj@orgio.net

수송과 미토콘드리아의 산화 반응에 작용한다. 또한 Sertoli cell의 지방산과 Leydieg cell의 지질 대사에 관여함으로써, acetyl-L-carnitine은 에너지원으로써 정자의 대사에 중요한 작용을 한다.[2,3] Acetyl-carnitine이 여러 가지 생리적인 충격으로부터 세포막을 보호하는데, 특히 세포 골격에 가장 중요한 요소인 spectrin과 actin의 상호 작용을 강화한다.[1,4]

Progesterone은 배란기 동안 난포액에 다량 존재하며 이것은 $Na^{2+}$과 $Ca^{2+}$의 이온 채널을 열어 세포막의 탈분극을 일으킨다. 정자의 머리에는 특정한 수용체가 있어 progesterone과 반응하며 이것은 정자의 과운동성과 첨체 반응, zona pellucida 결합, 난자의 관통 및 수정에 중요한 작용을 한다.[1,5,6]

생사 염색으로서의 eosin-Y는 정자 두부의 세포막의 보존성 (integrity)이 유지된 경우는 염색이 되지 않고, 세포안과 밖의 삼투압의 차이가 소실된 정자에서는 붉은 색으로 염색이 된다.[1,7]

본 연구는 정상 정자에서 정자를 동결하기 전에 Isolate® gradient를 처리한 후 progesterone과 acetyl-carnitine이 정자의 동결-융해로부터 일어날 수 있는 정자의 운동성과 정자막의 변화에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 하였다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. 연구 대상

2001년 4월부터 2001년 6월까지 본원 불임클리닉을 방문한 정상 성인 남자 10명을 대상으로 하였다. 이들은 1992년 WHO에서 정한 정상적인 정액상을 가지고 있었고 임신을 한 경험이 있는 환자들이었다.

### 2. 방 법

#### 1) 정액 처리

Isolate® gradient 방법[8] -수집된 정자는 30분간 액화한 다음 자동 정자 분석기로 분석하였다. 그 후 소독된 pipette을 사용하여, 하층액 1.5 ml을 소독된 고깔 모양의 튜브에 담고 새 pipette을 사용하여, 동량의 상층액을 하층액의 위에 옮겼다. 가능한 한 부유물은 제거하였고, 마지막 농도는 $30\sim50\times10^6$/ml이 되게 하였다. 희석된 샘플은 8개의 튜브에 나누어 졌다.

#### 2) Progesterone 과/이나 acetyl-L-carnitine 첨가

준비된 튜브는 Isolate®만 처리한 군과 progesterone을 1 μM, 5 μM, 10 μM을 각각 첨가한 군 그리고 acetyl-L-carnitine을 2.5 μM, 5 μM, 10 μM을 각각 첨가한 군으로 나누었다. 또 다른 튜브는 progesterone 1 μM과 acetyl-L-carnitine 5 μM을 첨가하였다. 30분간 배양한 후 정자의 농도, 운동성, curvilinear velocity (VCL; the velocity derived from all 20head position), straight-line velocity (VSL; the velocity based on the first and last head positions only)와 linearity (LIN; VSL/VCL, a measure of the straightness of the trajectory)들을 측정하고, 생사 염색을 실시한 후 동결 과정이 행해졌다.

#### 3) 정액 동결 및 융해

정액 동결 용매는 TYB (the cryoprotectant)을 사용하였고, 준비된 샘플과 1;1로 섞은 후, programmable freezer (cryo-magic)를 이용하여 -196℃ 질소 탱크에서 서서히 동결하였다. 24시간 이후 37℃ 물에서 40~50초 간 담궈 둔 후 위에 언급한 여러 가지 정자의 지표들을 측정하고 생사 염색을 실시하였다.

### 3. 통계 방법

SPSS+ version70 package을 이용한 ANOVA: Kruskal-Wallis test로 통계 처리하였고, $p<0.01$ 인 것을 통계적으로 유의한 것으로 하였다.

## 결 과

Isolate®만 처리 후 동결-융해한 군을 대조군으로 하였을 때, 대조군의 정자의 농도는 $53.8\pm36.4\times10^6$/ml, 운동성은 33.2±16.6%였고, VCL (μM/s), VSL (μM/s), LIN (μM/s)은 각각 28.9±6.0, 12.9±4.8, 43.0±8.7 이였다. 대조군의 생사 염색 후 결과는 38.2±12.9%로 나타났다 (Table 1).

Progesterone을 농도 별로 첨가 (각각 1 μM, 5 μM, 10 μM) 하였을 때, 정자의 농도, 운동성 및 VCL, VSL, LIN 등은 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았으며, 생사 염색의 결과도 각각 38.1, 41.9, 38.2%로 대조군과 비슷하였다 (Table 1, Figure 1, 2).

Acetyl-L-carnitine의 경우는 2.5 μM을 첨가하였을

**Table 1.** The Results of Sperm parameters and vital stain

| | Conc ($\times 10^6$/ml) | Motility (%) | VCL (μm/s) | VSL (μm/s) | LIN | Vital stain (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Postthaw (control) | 53.8±36.4 | 33.2±16.6 | 28.9± 6.0 | 12.9± 4.8 | 43.0± 8.7 | 38.2±12.9 |
| $P_4$-1 μM | 56.1±40.2 | 36.9±13.8 | 33.6±11.9 | 17.4±10.2 | 48.4±12.2 | 38.1±13.0 |
| $P_4$-5 μM | 54.0±39.0 | 33.5±18.1 | 29.4± 9.8 | 13.3± 7.0 | 42.7±11.2 | 41.9±16.2 |
| $P_4$-10 μM | 57.7±35.5 | 34.5±17.1 | 30.4± 9.9 | 13.8± 7.7 | 41.9±13.2 | 38.2±14.7 |
| Comb ($P_4$-1+$A_5$) | 50.8±39.2 | 37.3±16.1 | 30.5± 7.0 | 14.8± 6.4 | 46.4±10.5 | 38.4±13.6 |
| acetyl-L-carnitine | | | | | | |
| 2.5 μM | 58.5±36.4 | 39.3±15.7 | 31.8± 8.9 | 15.8± 6.8 | 47.5±11.4 | 43.5±15.4 |
| 5 μM | 52.5±40.2 | 32.8±16.5 | 27.0± 7.9 | 12.5± 6.9 | 43.6±10.6 | 35.5±14.9 |
| 10 μM | 69.0±27.2 | 7.9± 3.9* | 13.7± 3.2* | 2.1± 1.5* | 14.9± 7.9* | 5.1± 9.4* |
| Comb ($P_4$-1+$A_5$) | 50.8±39.2 | 37.3±16.1 | 30.5± 7.0 | 14.8± 6.4 | 46.4±10.5 | 38.4±13.6 |

*p<0.01 (ANOVA: Kruskal-Wallis test)

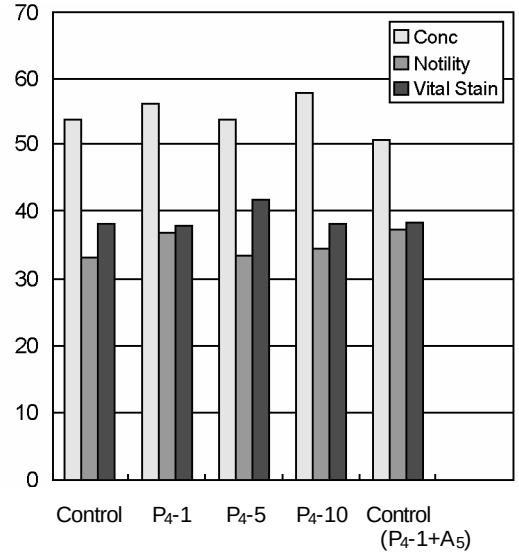


**Figure 1.** Comparison of concentration, motility and vital stain (control vs progesterone treated groups)
*conc. ($\times 10^6$/ml), motility (%), vital stain (%)

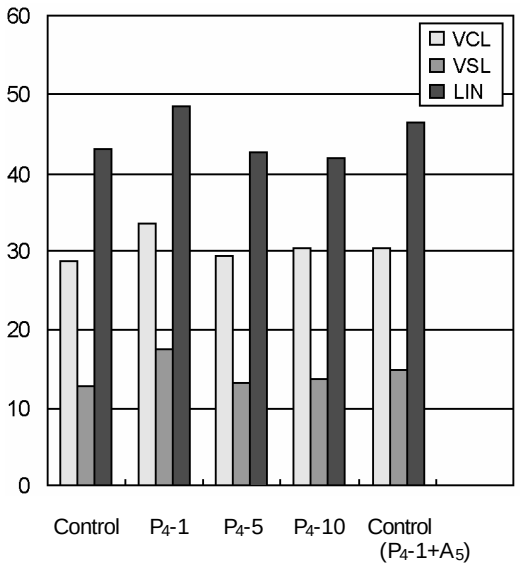


**Figure 2.** Comparison of VCL, VSL and LIN (control vs progesterone treated groups)
*VCL (μM/s), VSL (μM/s), LIN (μM/s)

**때는 생사 염색에서** 43.5% **증가한 양상을 보였으나, 통계학적 유의성은 없었다.** 5 μM **을 첨가하였을 때에도 모든 정자의 양상은 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다** (Table 1, Figure 3, 4).

Acetyl-L-carnitine 10 μM**의 높은 농도에서는 운동성이 대조군의** 33.2±16.6%**에서** 7.9±3.9%**로 감소하였으며,** VCL, VSL, LIN**도 각각** 1.37±3.2, 2.1±1.5, 14.9±7.9**로 대조군보다 유의하게 감소하였다. 또한 생사 염색에서도** 5.1±9.4%**로 감소하였다** (Table 1, Figure 3).

Progesterone**과** acetyl-L-carnitine**의 상승효과를 알아보기 위해서 각각** progesterone 1 μM**과** acetyl-L-

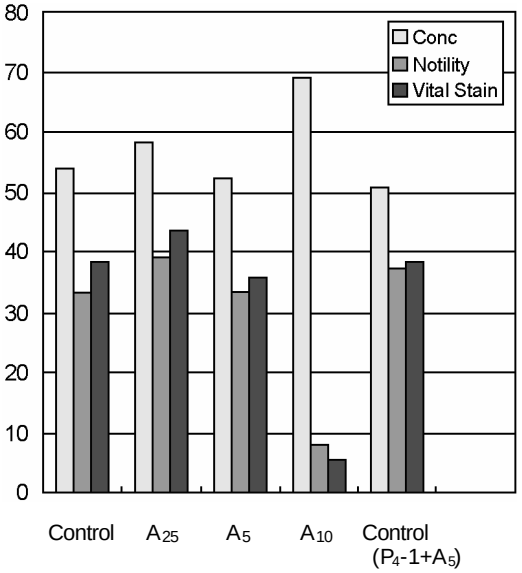


**Figure 3.** Comparison of concentration, motility and vital stain (control vs acetyl-L-carnitine treated groups)

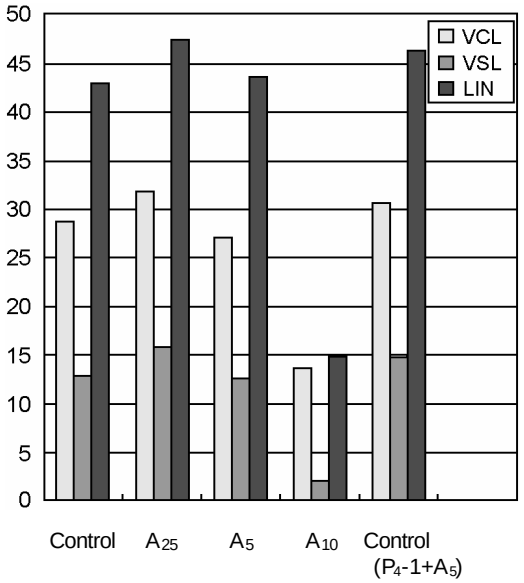


**Figure 4.** Comparison of VCL, VSL and LIN (control vs acetyl-L-carnitine treated groups)
*VCL (μM/s), VSL (μM/s), LIN (μM/s)

carnitine 5 μM을 첨가한 실험에서도 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다 (Table 1, Figure 1, 2, 3).

## 고 찰

정자의 동결 보존은 한 번 정자를 채취한 후 임신에 실패했을 경우 다음 주기에 다시 채취를 해야 하는 불편을 덜 수 있어 환자에게 유익하다. 비 배우자 간 인공 수정 (Artificial Insemination by Donor semen; AID)시에는 그 특성상 동결 보존된 정자를 사용하게 되며, 무력 정자증 (Asthenozoospermia)처럼 정자의 운동성 (rapid and progressive motility)이 50% 이하인 정액이나, 정자수가 적은 희귀 정자증 (Oligozoospermia)의 경우임에도 불구하고 배우자 간 인공 수정 (Artificial Insemination by Husband semen; AIH)을 시행하게 될 경우 동결 보존으로 인한 정자회수율의 감소를 극복할 수 있다면 한 배란 주기에 수차례 정자를 채취해서 동결 보존 시켜둔 것을 융해시켜 사용할 수 있는 장점이 있다.

동결 손상은 급속 냉동 시는 세포막 내에 생성된 얼음 조각이 세포막을 파괴시킴으로써, 완속 냉동시킬 경우 세포막 바깥에 생성된 얼음 조각의 기계적인 힘이나 삼투압의 영향으로 발생한다.[7] Grizard 등에 의하면 동결 손상은 희석 과정이나 동결-융해 과정 또는 두 가지 과정 모두에서 발생할 수 있다고 하였다.[9] 따라서 동결된 정자는 비동결 정자에 비해 진행성 운동성이 떨어지고 취약하며 동결 정자는 신선 정자에 비해 시술 후 임신율이 낮은 것으로 알려져 있다.[10] 이는 융해 후 생존 능력 (viability)과 운동성 (motility)이 신선 정자 상태보다 감소하기 때문으로 추측하고 있으며[5~13] 동결-융해한 정자는 배양기간이 길수록 생존율이 더욱 저하된다고 알려져 있다.[7,12] 또한 융해 후 정자의 운동성은 동결 전의 운동성과 상관관계가 없다고 한다.[15]

본 연구는 정상 정액상을 가진 환자들을 대상으로 실험을 시행하였다. 현재 일반적인 동결 보존은 TEST-yolk, Glycerol 등을 주성분으로 하는 정자 보존액과 정액을 혼합시켜 직접 액체 질소에 투입하거나 programmed freezer를 이용해 동결 보존시키는 방법이 널리 이용되고 있으며 TEST-yolk가 정자의 진행성 운동성 회복에는 더 좋은 것으로 되어 있다.[15] 본 연구에서는 TYB를 사용하였다.

본 연구에서는 또한 Isolate® gradient 방법을 사용하였는데 이 방법은 swim-up 방법에 비해 정자의 농도가 유의성 있게 높았으며 동결-융해 과정 후 정자

정밀 형태 변화에서 차이를 보이지 않아 swim-up 방법 보다 편리한 Isolate® gradient 방법을 채택하였다.[8]

정자 동결 시 정자 세포막의 어떤 기질적인 변화로 progesterone에 반응하여 세포내 $Ca^{2+}$을 증가시키는 반응이 저하된다고 보고된 바 있다.[16] 정자의 동결보존은 spermatozoa에서 $Ca^{2+}$를 증가시키는 기전을 감소시키고 동결로 인한 세포막의 손상은 progesterone 수용체의 손실을 일으킨다고 한다.[17] 그러나 progesterone은 쥐의 냉동 손상된 신경세포에서 수초화 (myelinization)에 필요한 신호전달물질 (signaling molecule)의 발현을 활성화시키거나, 수초로부터의 인지질 (phospholipid) 전달을 활성화하여 조직의 동결 시 일어나는 세포의 손상을 개선시킨다는 것이 보고된 바 있다.[1,18,19]

정자의 acetyl-L-carnitine 농도는 냉동 매체에 희석되는 동안 또는 동결-융해 후 저하된다. 정액과 정자의 carnitine과 acetyl-L-carnitine의 농도를 동결시키기 전과 후로 비교해 보면, 정액에서는 두 가지 물질 모두 수치상의 변화가 없으나, 정자는 냉동 후 acetyl-L-carnitine의 양이 감소하였다.[3,9] Acetyl-L-carnitine은 또한 progesterone과 마찬가지로 불량한 물리적 조건하에 일어나는 다양한 세포막의 변화를 방지해 준다고 보고된 바 있으며,[20,21] 정자에서 즉각적으로 쓸 수 있는 가용성 에너지를 제공해 주고, 정자의 운동성과 viability를 증가시킨다고 한다.[1]

본 연구에서는 여러 농도의 progesterone과 acetyl-L-carnitine을 첨가한 연구군과 Isolate® gradient만 처리한 대조군을 비교했을 때 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다. Duru 등 (2001)은 정상 범주의 정액상과 중등도의 희귀무력이형성증 (oligoasthenoteratozoospermia)을 가진 환자를 대상으로 progesterone과 acetyl-L-carnitine이 세포막의 동결 손상이나 cryosurvival에 대해 즉각적이거나 지연된 효과를 갖지 못한다는 결과를 얻었다. 또한 고 농도 (20 mM)의 acetyl-L-carnitine에서도 다른 농도의 실험군들과 차이를 보이지 않았다.[1] 그러나 본 연구는 동결 처리 과정 전에 Isolate® gradient를 처리하였으며, 고 농도 (10 μM)의 acetyl-L-carnitine 농도에서는 정자의 성상 및 세포막에 좋지 않는 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이는 Duru 등 (2001)의 연구와는 차이가 있는 결과이다.

희귀무력정자증 (oligoasthenospermia)인 쥐를 가지고 실시한 실험에 의하면 acetyl-L-carnitine이 lactate dehydrogenase와 NADPH-cytochrome P450 reductase를 증가시킨다고 하나,[22] Grizard 등 (1973)의 연구에 의하면 acetyl-L-carnitine의 정상인에서 농도는 210±29 nmol/$10^8$ cells이였다.[9] 본 연구 결과와 Duru 등 (2001)의 연구 결과의 차이는 생리적인 acetyl-L-carnitine의 농도와 연관이 있으며, 이는 정상인을 대상으로 한 본 연구와 subfertile한 환자군을 대상으로 한 연구 방법의 차이에 의한 것으로 여겨진다.

이상과 같은 연구 결과로 정자의 동결 보존 시 progesterone이나 acetyl-L-carnitine을 첨가하는 것은 정자의 동결 융해 시 일어나는 손상을 막지는 못하는 것으로 보인다. 두 약제의 상승효과도 없는 것으로 사료된다. 그러나 고농도의 acetyl-L-carnitine을 첨가하였을 때는 오히려 동결-융해에 의한 손상을 가속화 시킨다고 생각된다. 향후 subfertile한 환자를 대상으로 한 실험 및 임상 결과를 종합적으로 평가하는 연구가 필요하리라 사료된다.

## 참 고 문 헌


1. Duru NK, Morshedi M, Schuffner A, Oehninger S. Semen treatment with progesterone and/or acetyl-L-carnitine does not improve sperm motility or membrane damage after cryopreservation-thawing. Fertil Steril 2000; 74: 715-20.
2. Deana R, Indino M, Rigoni F, Foresta C. Effect of L-carnitine on motility and acrosome reaction of human spermatozoa. J Andrology 1988; 21: 147-53.
3. Kurr JR, Mayberry D, Irby D. Morphometric studies on lipid inclusion in Sertoli cells during the spermatogenic cycle in the rat. Cell Tissue Res 1984; 236: 699-709.
4. Butterfield AD, Ranachari A. Acetyl-carnitine increase membrane cytoskelectal protein-protein interaction. Life Science 2001; 52: 297-303.
5. Oehninger S, Sueldo C, Lanzendor S, Mahony M, Burkman LJ, Alexander N, et al. A sequential analysis of the effect progesterone on specific sperm

functions crucial to fertilization in vitro in infertile patients. Hum Reprod 1994; 9: 7: 1322-27.
6. Carlos E, Alenxander NJ, Oehninger S, Burkman LJ, Subias E, Acosta AA, et al. Effect of progesterone on human zona pellucida sperm binding and oocyte penetrating capacity. Fertil Steril 1993; 60: 137-40.
7. McLaughlin EA, Ford WCL, Hull MGR. Motility characteristics and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. J Reprod Fert 1992; 95: 527-34.
8. Jung BJ. Comparison between Isolate® gradient and swim-up procedures for sperm preparation; Effects on freeze-thawing in normal semen sample. J Korea Fertil Steril 2001; 28: 1: 25-31.
9. Grizard G, Lombard N, Boucher D. Changes in carnitine and acetyl-carnitine in human semen during cryopreservation. Hum Reprod 1992; 9: 1245-48.
10. Sherman JK. Synopsis of the use of frozen human semen since 1964; state of the art of human semen banking. Fertil Steril 1973; 24: 397.
11. Keel BA, Black JB. Reduced motility longevity in thawed human spermatozoa. Arch Androl 1980; 4: 213.
12. Crister JK, Arneson BW, Asker DV. Cryopreservation of human spermatozoa post-thaw chronology of motility and of zona-free hamster ova penetration. Fertil Steril 1987; 47: 980-4.
13. Centola GM, Raubertas RF, Mattox JH. Cryopreservation of human semen. Comparison of cryopreservatives, source of variability and prediction of post-thaw survival. J Androl 1992; 13: 283-8.
14. Binor Z, Sokoloski JE, Wolf DP. Penetration of the zona-free hamster egg by human sperm. Fertil Steril 1980; 33: 321.
15. Centola GM, Raubertas RF, Mattox JH. Comparison of cryopreservatives, sources of variability, and prediction of post-thaw survival. J Andrology 1992; 13: 3: 283-8.
16. Rossato M, Zorzi M, Garolla A. Effects of cryopreservation on progesterone-induced ion fluxes and acrosome reaction in human spermatozoa. Hum Reprod 2000; 15: 1739-43.
17. McLaughin EA, Ford WC. Effects of cryopreservation on the intracelluar calcium concentraion of human spermatozoa and it s response to progesterone. Mol Repord Dev 1994; 37: 2: 241-6.
18. Koenig HL, Schumacher M, Feraz B. Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann cells. Science 1995; 268: 1500-3.
19. Doz B, Di Giamberardino L, Koenig HL. Contribution of axonal transport to the renewal of myelin phosphalipids in peripheral nerves. Brain Res 1981; 219: 57-71.
20. Snyder JW, Kyle ME, Ferraro TN. L-carnitine and acetyl carnitine in human semen during cryopreservation. Hum Reprod 1992; 7: 1245-8.
21. Volz A, Piper HM, Siegmund B. Longevity of adult ventricular rat heart muscle cells in semen free primary culture. J Mol Cell Cardiol 1991; 23: 161-73.
22. Palmero S, Leone M, Prati M, Costa M, Messeni, Leone M, Fugassa E, et al. The effect of L-acetyl-carnitine on some reproductive functions in the oligoasthenospermic rat. Horm Metab Res 1990; 22: 12: 622-6.