

컴퓨터 정액자동분석에 의한 동결융해 한우 정액의 운동특성 연구

이강남 · 이병천* · 김정태* · 박종임* · 신태영* · 황우석*

아산동물병원
서울대학교 수의과대학*
(1998년 7월 21일 접수)

Motional kinematics of Frozen-thawed Korean native cattle semen use of computer aided semen analysis(CASA) system

Kang-nam Lee, Byeong-chun Lee*, Jung-tae Kim*, Jong-im Park,
Tae-young Shin, Woo-suk Hwang*

A-san animal hospital
College of Veterinary Medicine, Seoul National University*
(Received Jul 21, 1998)

Abstract : The aim of this experiments were to assess the time-interval change of motional characteristics in frozen-thawed semen of Korean native cattle (KNC) by using computer aided semen analysis (CASA) technology.

Twenty-six KNC frozen semen straws were obtained from Korean KNC improvement department, livestock improvement main division, national livestock cooperatives federation in Korea. Specimens were allowed to thaw at 37°C for 30 sec in water bath. Semen analysis was performed on semen image analysis system (SIAS, Medical supply, Korea) adjusted to the gate settings and used the semen droplet (5µl) placed on Makler counting chamber (Sefi medical instrument, Israel) prewarmed at 37°C. The same person used the same micropipette to fill the Makler counting chamber. A total of 150 or more of sperms were analysed in each specimen by a single trained person by scanning at least 5 to 10 fields. The measurement parameters in SIAS were as follows ; frame rate = 30 frames per sec, image capture = 1 sec, minimum motile speed = 10µm/s, maximum countable sperm number = 400. Statistical analysis was done by Student *t*-test with use of the Sigma plot program on a IBM personal computer.

The dancemean(DNM) and hyperactivated sperm(HYP) of frozen-thawed KNC semen kinematics were significantly decreased($p < 0.05$) after 10 min of incubation at 37°C water bath. But, wobble(WOB) of same sample semen was significantly increased($p < 0.05$) after 10 min of incubation and significantly decrease($p < 0.05$) after 60 min of same incubation.

And, after 30 mim of incubation, significantly differences were found most of motion

Address reprint request to Dr. Byeong-chun Lee, Veterinary Medical Teaching Hospital, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, 56-1 Shinlim-dong Kwanak-ku Seoul 151-742, Republic of Korea.

kinematics, motility(MOT), curvilinear velocity(VCL), straight line velocity(VSL), average path velocity(VAP), amplitude of lateral head displacement(ALH), beat cross frequency(BCF), mean angular displacement(MAD), dance(DNC), on same sample semen. The DNM of KNC semen sample was variable kinematics after 30 min of incubation.

Also, the linearity(LIN) and straightness(STR) was significantly decreased($p < 0.05$) from 60 min of incubation.

In conclusion, the AI within 30 min after thawing of frozen semen can be an effective method for obtaining high fertility rate in KNC reproductive program.

Key words : Korean native cattle, semen, CASA, motional kinematics.

서 론

불임의 원인을 진단하기 위한 수컷 측면의 방법으로는 정액검사가 가장 바람직한 것으로 인정되어 왔으며 특히 정액의 질적 평가는 정자 운동성의 측정이 일반적인 실험실적 검사로 알려져 왔다^{7,53}.

인간 및 동물에서 개체에 따른 정액성상은 다양하며 가장 중요한 요인인 운동성을 중심으로 한 객관적인 정액검사를 실시하여 정자의 기능을 평가하려는 연구들이 있었다^{15,49,51,53}.

일반적인 정액검사는 정액의 양, 냄새 및 색조 등을 조사하는 육안적 검사와 현미경적 및 화학적으로 운동성, 생존율, 형태학적 분석, 산도, 세포학적 분석 및 정장의 내분비 성분의 동정이 포함되어 왔다^{2,18,51}. 육안적 및 현미경적 검사는 실험실 및 검사자의 주관적 여건이 개입되므로 정액검사의 표준화에 어려움이 있다.

현미경적 검사시 정자생존을 측정은 동일한 시료 내에서도 검사자간의 변이계수의 범위는 30~80% 이었다^{17,31}. 그러므로 기존의 방법으로는 객관성 및 재현성 있는 정자분석에 한계가 있으므로 보완된 방법이 필요함이 제기되었다.

비록 정액자동분석기가 개발되기 이전에도 정자의 수, 평균속도 및 생존시간(life-time) 등이 수태율과 관련이 있을 것이라는 이론적 개념은 수립되었지만 정확하게 정자의 운동특성을 측정할 수 없었기에 공인되지 못하였다⁷. 이미 1950년대에 정자의 궤도운동(track motil-

ity) 개념이 제안되었으나 1970년대에 이르러서야 소와 사람을 중심으로 이러한 이론이 이용되었다⁷. 즉, 정액검사를 보다 객관적으로 실시하기 위해 laser light scattering법, multiple exposure photograph 기법, video micrograph 사용법 및 flow cytometric sorting 법^{5,36,48} 등을 활용한 분석기법이 소개되었으나 근본적으로 기존의 육안적·현미경적 방법의 한계를 벗어나지 못하였다.

정액자동분석기로 CellSoft(Cryo Resources, USA)와 Expert vision(Motion Analysis corporation, USA)가 처음으로 소개되었으며, 이어 HTM-2000(Hamilton-Thorn Research, USA), SM-CMA(Stromberg-Mika, Germany)가 있었으며, 국내에서도 SIAS(sperm image analysis system, Medical supply) 기종이 개발되었다.

정액분석기를 사용하면 정자의 농도(concentration ; CON), 운동성(percent motile ; MOT), 선형운동속도(straight-line velocity ; VSL), 곡선운동속도(curvilinear velocity ; VCL), 평균경로속도(average-path velocity ; VAP), 곡선경로 선형도(linearity ; LIN), 측두거리(amplitude of lateral head displacement ; ALH), 평균경로 선형도(straightness ; STR), 총정자수(total concentration) 및 고활력정자(hyperactivated sperm percent ; HYP)의 운동특성을 정확히 분석할 뿐만 아니라 정자의 운동양태(wobble ; WOB, beat-cross frequency ; BCF, mean angular displacement ; MAD, dance ; DNC, dancemean ; DNM)를 상세히 계산 할 수 있다^{15,53}.

정액분석기를 사용한 연구로는 개발된 기종간 운동특성 수치 및 재현성의 비교^{1,27,35}, 주변장치, 기종과 육안적·현미경적 방법간의 정확성 검토^{9,25,32-34}, 표준화 가능

성 제고 및 운영체계의 개선¹²⁻¹⁴, 측정과정의 정확성 확보 노력⁴, 운동특성과 정자의 수태능력분석, 정자의 처리에 따른 운동특성 분석에 관한 응용연구^{10,25,41}, 정자와 이불을 명확히 구분하기 위해 DNA 특이 형광염료(Hoechst bisbenzimine)로 IDENT 염색후 CASA를 활용하는 기법 등이 있었다.

연구대상으로는 사람^{4,27,42}, 소^{7,20,23,29}, 말⁴⁶, 고양이⁴³, 토끼^{20,21} 및 랙트⁴⁴ 등이었다. 국내에서도 개인용 컴퓨터를 사용한 정액분석기가 개발⁵³되어 현재 사람을 대상으로 임상에서 유용하게 적용되고 있으나⁵⁰⁻⁵⁴ 동물에서는 소에 기존 정액검사시 각 항목의 수치에 대한 단순측정을 시도한 바 있으나 시간경과에 따른 운동특성의 변화의 규명에 관한 연구는 접할 수 없었다.

정액자동분석기는 매우 정확하고 객관적인 자료를 얻을 수 있어 본 연구에서는 한우 동결정액을 용해하여 시간경과에 따른 정자의 운동특성을 조사하여 인공수정과정에서 수태율을 향상시킬 수 있는 방안을 모색하고자 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

정액분석 :

1) 정액의 채취, 동결 및 용해 : 실험에 공여된 한우정액은 축산업협동조합중앙회 한우개량사업본부의 종모우에서 동 사업소의 방법에 의해 채취 및 동결보존된 정액으로서 실험에 공여시까지 액체질소에 보관하였다. 종모우별로 일정량의 정액을 각각 구입하여 정액자동분석기로 용해후 시간경과에 따른 운동특성을 분석하였다.

한우 정액의 용해는 37°C 수조에서 straw를 30초간 진탕 용해시키는 급속용해법을 채택하였으며 급속용해후 straw에 담겨있는 정액은 5ml tube에 옮겨 밀봉한 후 37°C 수조에 배양시키며, 분석하였다. 정액은 희석시키거나 동결보호제를 제거하지 않은 상태로 실험에 공여하였다.

2) 정액의 분석의 기준 : 정액의 분석시 각 운동특성의 정의, 단위, 정액자동분석기의 기준, 측정항목 및 원리는 Davis *et al*¹², Farrell²¹ 및 이 등⁵²의 사항에 준하였다.

정자의 운동성 특성은 위상차 현미경(Olympus BX-50, Japan)과 CCD 카메라(Toshiba, Japan)를 통해 연결된 국내 Medical supply사(sperm image analyse system, SIAS) 장치로 분석하였다. 정액의 운동특성 분석시 대물렌즈의

배율은 10×로 CCD 카메라의 랜즈는 3.3×로 하였으며, Makler counting chamber(Sefi medical, Israel)상의 정 가운데 0.01 mm²의 정사각형을 프로그램상의 크기 기준에 일치시켜 계산되는 모든 수치의 기준으로 설정하였다.

정액자동분석기는 실험전에 일정한 크기와 수가 고정되어 있는 accu-bead[®](Hamilton Thorne research, USA)를 사용하여 측정된 수가 제조자의 오차한계 허용범위내(18M/ml, between 15.5 and 20.5M/ml; 35 M/ml, between 30 and 40M/ml)로 되도록 설정하였다.

본 실험에 사용된 SIAS 기종의 초기설정치는 Table 1과 같다. 분석시 영상처리는 초당 30 frame이였고, 정자의 속도는 두부가 1초에 최소한 10μm 이상을 움직인 경우 운동성이 있는 것으로 정의하였다. 또한 정자의 최대 속도는 250μm/sec로 정의하였다. 한 시야에서 최대 측정 가능한 정자의 수는 400개 였으며, 한 시료를 10개의 시야(field)까지 분석할 수 있었다. 정자의 두부크기는 15~80개의 화소로 정의하고, 정자의 속도는 1초에 최소한 10μm 이상 움직인 정자를 운동성이 있는 정자로 정의하였다. 또한 고활력 정자 이외의 정자 최대속도는 250μm/sec로 정의한 후 운동경로 속도계산에 필요한 원도우를 설정하였다(Table 1).

Table 1. Parameter settings used with semen analysis imaging system

System parameter	Value*
Image sampling frequency(frame/s)	30
Duration of image capture(s)	1
Minimum motile speed(μm/s)	VSL, 10
Maximum motile speed(μm/s)	VSL 250
Maximum countable number(sperm)	400
Maximum countable frame	10

*VSL : straight line velocity.

정액분석시 현미경 stage 위에 장착된 Makler counting chamber 내부의 정액의 온도를 37°C로 유지시키기 위해 주 등⁵⁴의 방법에 준하여 micro-warm plate(Kitazato, Japan)를 설치하거나 현미경의 stage 전체의 온도를 유지해주는 Microscope warm stage(LEC instrument, Australia)를 사용하였으며, 현미경의 광원에 의한 온도상승은 1°C 이하

로 하였다.

3) 운동특성 분석 : 시료의 분석은 이 등⁵³, Davis와 Katz¹¹의 방법에 준하여 실시하였다.

검사정보 입력시 정액량은 0.5ml(0.5ml(straw)으로 debris rate 0%으로 하였다. 분석시 이물질이 정자로 오인되는 것을 방지하기 위해 화면상에서 실제 정자의 영상과 이진영상을 반복하여 비교하며 이진영상의 밝기와 대비를

세밀히 조절하였다.

또한 필요시에는 입력된 자료의 곡선이동경로와 평균 이동경로를 확인하여 실제 정자만이 인식되었는지를 확인하였다.

정액(5μl)은 미리 가온되어 37℃로 유지된 Makler counting chamber에 넣은 후 시야당 1초씩 5~10개의 시야를 선택하여 시스템에 입력시켜 1시야가 1초 노출되는 동안

Table 2. The definition of CASA parameters

Parameters	Definition	Units
No. of fields analyzed	Number of fields analysed same sample	Field(s)
No. of sperm analyzed	Number of sperm analysed total fields	Cell(s)
Total concentration	Total concentration of sperm cells in a sample(concentration X volume)	Million
Concentration	Concentration(CON) of sperm cells in a sample in million of sperm per milliliter of seminal plasma.	Million/ml
Percent motility	The percent motility(MOT) is derived from the number of cells with a straight line velocity of greater than 10 microns/sec divided by the total number of cells.	%
Curvilinear velocity	The curvilinear velocity(VCL) is derived from the total distance that a cell travels along its curvilinear path divided by the line interval of measurement.	μm/s
Straight line velocity	The straight line velocity(VSL) is calculated by the distance covered by a cell travelling in a straight line divided by the time interval of measurement.	μm/s
Average path velocity	The average path velocity(VAP) is the average velocity of detected moving points. The VAP is the average of 5 points value.	μm/s
Amplitude of lateral head displacement	The amplitude of lateral head displacement(ALH) value is doubled for each path and the average of the values obtained for all the paths gives the value of the amplitude lateral head displacement.	μm
Linearity	The linearity(LIN ; VSL/VCL) is calculated from the ratio of the straight line distance that the cell actually covers to the distance that a cell travels along its curvilinear path multiplied by 100. The average value for all the cells computed is used.	%
Hyperactivated sperm	The hyperactivated sperm percent(HYP) sperm is VCL > 80μm/s, LIN≤65% and ALH > 6.5μm.	%
Straightness	The straightness(STR ; VSL/VAP) is calculated from the ration of straight line distance that the cell travels along its average path multiplied by 100. The average values for all the cells computered used.	%
Beat-cross frequency	The beat-cross frequency(BCF) is average rates of cross point between VCL and VAP.	Hz
Mean angular displacement	The mean angular displacement(MAD) is the angle of turing point in VCL curve.	Degree
Wobble	The wobble(WOB ; VAP/VCL) is curvilinear progressiveness ratio.	%
Dance	The dance(DNC ; VCL X ALH) is appearance of motion.	μm ² /s
Dancemean	The dancemean(DNM ; ALH/LIN) is appearance of motion.	μm

30 frame을 분석하여 평균치를 계산하였다. 측정시 사용된 Makler counting chamber는 시료의 깊이가 10 μm 로 고정된 것이었다. 시료는 운동특성의 측정시 vortex mixer로 충분히 섞었다. 모든 시료의 분석은 동일한 조건과 숙련된 2인의 실험자가 실시하였다. 한우동결정액을 용해 0, 10, 30, 60, 120 및 180분후 각각의 운동특성을 측정하여 컴퓨터에 저장하였으며 일련의 분석이 끝나면 저장된 자료를 분석하였다.

정액자동분석기에 의해 분석되는 정자 각각의 운동특성은 정자의 실제이동경로인 곡선경로속도(curvilinear velocity ; VCL, $\mu\text{m}/\text{s}$), 곡선이동경로에 대한 평균 이동을 나타내는 평균경로속도(average-path velocity ; VAP, $\mu\text{m}/\text{s}$), 단위시간당 시점에서 종점까지의 속도를 나타내는 직선경로속도(straight line velocity ; VSL, $\mu\text{m}/\text{s}$), 평균이동경로와 실제이동경로와의 측방거리차인 측두거리(amplitude of lateral head displacement ; ALH, μm), 정자 두부의 이동시 회전각의 절대값(mean angular degree ; MAD, degree) 및 실제이동경로가 평균이동경로와 만나는 횟수의 시간당 비율(beat-cross frequency ; BCF, Hz)을 측정하였으며, 정자의 이동궤도에 따른 이들의 정의를 정하였다.

또한 자동정액분석기는 상기에 언급한 운동특성들을 바탕으로 곡선경로 선형도(linearity ; LIN, %), 평균경로 선형도(straightness ; STR, %), 곡선전진을 값으로 wobble (WOB, %), 정자운동 모양의 값으로 dance(DNC) 및 dance-mean(DNM, μm)를 그리고 80 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 이상의 VCL, 6.5 μm 이상의 ALH 및 65% 이하의 LIN로 정의되는 고활력정자(hyperactivated sperm ; HYP, %)의 요소를 계산하였을 뿐만 아니라 정자의 농도(concentration ; CON, million/ml) 및 운동성(motility ; MOT, %)을 측정하였다. 이들의 정의는 Table 2와 같다.

통계학적 분석 : 한우정액의 동결용해후 배양시간에 따른 운동특성의 유의성 검정은 Student *t*-test에 의하여 실시하였다.

결 과

동결용해한 한우정액을 배양하며 시간에 따른 운동특성을 조사한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다.

초당 10 μm 이상 운동한 정자의 비율인 MOT는 용해직후 50.98 \pm 19.18%로 측정되었으며, 30분후에는 42.40 \pm 20.06%로 유의적으로 감소하였고($p < 0.05$), 배양시간이

경과함에 따라 유의적으로 감소하여($p < 0.05$), 배양 180분 후에는 9.46 \pm 12.66%로 나타났다.

운동특성 중 VCL은 용해직후 63.24 \pm 18.97 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 을 보였으며, 용해후 30분부터는 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 배양 180분 후에는 17.77 \pm 14.44 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 로 유의적인 감소를 보였다($p < 0.05$).

동결용해 한우정자의 VSL은 용해직후 34.78 \pm 13.47 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 을, 배양 10분 후에는 35.48 \pm 14.89 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 를 보여 유의적인 차이를 보이지 않았으나 배양 30분 후에는 28.19 \pm 14.10%로 유의적인 감소($p < 0.05$)를 나타내었다. 또한 배양시간이 경과함에 따라 유의적으로 감소하는 경향을 보였다($p < 0.05$).

한우정자의 VAP는 용해직후 41.21 \pm 13.97 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 을 나타내었고 10분 배양시에는 40.88 \pm 14.93 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 을 보여 유의적인 차이는 인정되지 않았으나 용해후 30분(33.64 \pm 15.15 $\mu\text{m}/\text{sec}$)부터는 배양시간이 경과함에 따라 유의적으로 감소하여 180분 후에는 8.85 \pm 8.45 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 에 이르렀다($p < 0.05$).

용해직후 ALH는 4.51 \pm 0.85 μm 였으며, 10분 후까지는 4.30 \pm 0.75 μm 로 유의적인 변화는 없었으나 배양 30분 후에는 3.98 \pm 0.84 μm 로 유의적인 감소를 보였다($p < 0.05$). 또한 ALH는 배양시 지속적으로 감소하여 60, 120 및 180분에는 각각 3.57 \pm 0.72, 2.93 \pm 0.68 및 2.46 \pm 0.65 μm 로 유의적인 감소를 보였다($p < 0.05$).

동결용해 한우정자의 BCF는 용해직후 13.65 \pm 2.97Hz를 보였고 10분 후에는 13.03 \pm 3.14Hz로 변화상은 없었으나 배양 30분후(11.76 \pm 3.38Hz)부터는 경과시간에 따라 지속적으로 감소하여 배양 180분 후에는 6.25 \pm 2.41Hz로 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$).

배양시간에 따른 MAD는 용해직후 12.12 \pm 4.62 μm 였고, 10분 배양시에는 12.02 \pm 5.20 μm 로 유의적인 감소는 보이지 않았으나 배양 30분 후에는 9.42 \pm 5.63 μm 로 유의적인 변화가 관찰되었다($p < 0.05$). 이후 MAD는 180분까지 지속적으로 유의적 감소가 보였다($p < 0.05$).

용해직후 DNC는 300.33 \pm 129.83 였으며, 10분후 까지는 268.30 \pm 121.33를 유지하였다. 그러나 배양 30분 후에는 218.28 \pm 124.11로 유의적인 감소를 보였으며($p < 0.05$), 배양 60, 120 및 180분 후에 각각 140.24 \pm 83.94, 87.37 \pm 67.46 및 43.80 \pm 38.65로 유의적인 변화가 관찰되었다($p < 0.05$).

운동특성 중 WOB는 용해직후 및 10분후에 각각 65.97

±5.7% 및 $68.44 \pm 9.49\%$ 로 유의적인 증가가 보였으나($p < 0.05$) 30분 후에는 $65.33 \pm 7.78\%$ 로 10분 후에 비해 유의적인 감소를 보였고($p < 0.05$) 이는 융해직후와 유사한 수치였다. 배양시간이 60, 120 및 180분으로 경과함에 따라 WOB는 유의적인 감소를 나타냈다($p < 0.05$).

융해직후 HYP는 $6.45 \pm 3.91\%$ 를 나타내었으나 10분 후에는 $3.94 \pm 2.61\%$ 로 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 또한 30분 후에는 $2.77 \pm 2.71\%$, 60분 후에는 $1.33 \pm 1.57\%$, 120분 후에는 $0.87 \pm 1.15\%$ 를 보였으며, 180분 후에는 $0.39 \pm 0.77\%$ 로 배양시간이 경과함에 따라 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$).

운동특성중 DNM은 배양 0분에 $8.54 \pm 1.6\mu\text{m}$ 을 보였으며 10분 후에는 $7.55 \pm 1.49\mu\text{m}$ 로 유의적인 감소를 보였다($p < 0.05$). 그러나 DNM은 30분 및 60분 후까지는 각각 7.55 ± 1.35 및 $7.73 \pm 2.49\mu\text{m}$ 로 유의적인 변화상이 없었다.

으며, 배양 120분 후에는 $0.84 \pm 3.49\mu\text{m}$ 로 배양직후와도 유사한 양상을 보였다. 그러나 배양 180분 후에는 $10.7 \pm 4.22\mu\text{m}$ 로 다른 시간대에 비해 유의적으로 높은 수치를 나타내었다($p < 0.05$).

배양직후 LIN은 $55.87 \pm 7.40\%$ 였으며, 10분 후에는 $58.60 \pm 13.15\%$ 로 유의적으로 증가하였으나($p < 0.05$) 30분 후에는 $53.40 \pm 10.35\%$ 를 유지하여 배양직후와 배양 10분 후에 비해 유의적인 변동이 없었으며, 배양 60분 후부터는 $49.50 \pm 11.36\%$ 로 유의적인 감소를 보였다($p < 0.05$).

또한 STR은 융해직후, 10분 및 30분에 각각 $84.97 \pm 3.87\%$, $84.79 \pm 6.96\%$ 및 $80.65 \pm 8.13\%$ 로 유의적인 변화가 없었으나 융해 60분 후부터는 $77.16 \pm 10.6\%$ 를 보여 유의적 감소를 볼 수 있었으며($p < 0.05$), 배양 120 및 180분 후에는 각각 66.92 ± 13.1 및 $53.92 \pm 10.45\%$ 로 유의적인 감소를 보였다($p < 0.05$).

Table 3. Time interval comparison of the sperm kinematic characteristics of the post-thawed Korean native cattle semen($n = 50$)

Parameters*	Kinematics characteristics after incubation					
	0 min	10 min	30 min	60 min	120 min	180 min
MOT	50.89 ± 19.18^a	49.13 ± 18.75^a	42.40 ± 20.06^b	33.39 ± 18.79^c	19.46 ± 16.2^d	9.46 ± 12.66^c
VCL	63.24 ± 18.97^a	59.00 ± 18.95^a	50.03 ± 20.09^b	38.12 ± 15.58^c	25.91 ± 13.5^d	17.77 ± 14.43^c
VSL	34.78 ± 13.47^a	35.48 ± 14.89^a	28.19 ± 14.10^b	19.98 ± 10.88^c	11.44 ± 8.71^d	5.29 ± 6.32^c
VAP	41.21 ± 13.97^a	40.88 ± 14.93^a	33.64 ± 15.15^b	24.60 ± 11.72^c	15.49 ± 9.89^d	8.85 ± 8.45^c
ALH	4.51 ± 0.85^a	4.30 ± 0.75^a	3.98 ± 0.84^b	3.57 ± 0.72^c	2.93 ± 0.68^d	2.46 ± 0.65^c
BCF	13.65 ± 2.97^a	13.03 ± 3.14^a	11.76 ± 3.38^b	9.90 ± 2.66^c	7.63 ± 2.36^d	6.25 ± 2.41^c
MAD	12.12 ± 4.62^a	12.02 ± 5.20^a	9.42 ± 5.63^b	7.09 ± 4.41^c	3.22 ± 3.12^d	1.22 ± 1.48^c
DNC	300.33 ± 129.83^a	268.30 ± 121.33^a	218.28 ± 124.11^b	140.24 ± 83.94^c	87.37 ± 67.46^d	43.80 ± 38.65^c
WOB	65.97 ± 5.7^a	68.44 ± 9.49^b	65.33 ± 7.78^a	62.33 ± 8.59^c	56.21 ± 10.1^d	47.65 ± 7.30^c
HYP	6.45 ± 3.91^a	3.94 ± 2.61^b	2.77 ± 2.71^b	1.33 ± 1.57^c	0.87 ± 1.15^c	0.39 ± 0.77^d
DNM	8.54 ± 1.6^a	7.55 ± 1.49^b	7.55 ± 1.35^b	7.73 ± 2.49^b	8.41 ± 3.49^{ab}	10.7 ± 4.22^c
LIN	55.87 ± 7.40^a	58.60 ± 13.15^b	53.40 ± 10.35^a	49.50 ± 11.36^c	39.20 ± 13.9^d	26.55 ± 9.07^c
STR	84.97 ± 3.87^a	84.79 ± 6.96^a	80.65 ± 8.13^a	77.16 ± 10.6^b	66.92 ± 13.1^c	53.92 ± 10.45^c

Means \pm SD in row rich with different superscripts differ($p < 0.05$).

* MOT : % motility, VCL : curvilinear velocity($\mu\text{m/sec}$), VSL : straightline velocity($\mu\text{m/sec}$), VAP : average-path velocity($\mu\text{m/sec}$), ALH : amplitude of lateral head displacement, BCF : beat-cross frequency, MAD : mean angular displacement, DNC : dance, WOB : wobble, HYP : hyperactivated sperm, DNM : dancemean, LIN : linearity, STR : straightness.

고 칠

정액검사는 불임을 판정하기 위한 동물 및 남성 측면에서 유용하게 활용되어온 가장 오래된 분석법이다^{10,16,18,23,28,48,51}.

정액자동분석기의 개발은 정액검사에 있어 기준의 방법보다 객관성 및 재현성을 높일 뿐만 아니라 신속히 운동특성 및 형태학적 검사를 가능하게 하였다^{8,23,51}. 또한 육안적·현미경적 방법을 통한 정액검사에서는 불임에 대한 제한된 정보밖에 얻을 수 없었으나 정액자동분석기의 활용으로 다양한 정자의 기능과 밀접한 정자생상 및 운동에 대한 특성을 정확하고 신속히 알 수 있게 되었다^{3,22,26,38,47}.

본 연구는 정액자동분석기를 이용하여 동결융해후 시간경과에 따른 한우정액의 운동특성을 분석한 결과 동결융해 한우 정자의 운동특성 DNM은 배양 10분 후부터 감소하였으나 180분후에 증가양상을 보였다. 운동특성 중 DNM은 ALH와 LIN의 비를 의미하는 값으로 융해 10분까지는 ALH의 감소정도가 LIN 보다 높았다는 것을 의미하며, 10분 후부터 120분까지는 ALH와 LIN의 감소폭이 유사하므로 DNM의 변화폭은 유의성이 인정되지 않았고 180분 후에는 ALH 보다 LIN의 감소폭이 높아서 DNM의 증가양상을 보인 것으로 판단된다.

배양 10분 후부터 HYP 유의적인 감소를 보였으며, 이후 배양시간이 경과함에 따라 감소는 지속되었다($p < 0.05$). 또한 HYP은 VCL(> 80 $\mu\text{m}/\text{s}$), LIN($\leq 65\%$) 및 ALH ($> 6.5\mu\text{m}$)를 기준으로 측정된 고활력 정자의 비율로서 융해 10분 후부터는 고활력 정자의 범주에 드는 수가 유의적으로 감소함을 의미한다. 이는 직접 비교할 수 있는 보문을 접할 수 없었으나 한우 동결융해 정액을 배양시 10분 후부터 운동양상의 변화가 시작되었음을 추정할 수 있었다.

동결융해 한우 정자의 MOT, VCL, VSL, VAP, ALH, 및 BCF의 운동특성은 직접 측정되는 정자운동 궤도의 속도 또는 진폭의 값들로서 한우정액의 융해 30분 후부터 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 이는 동결융해후 전반적인 정자의 진진성운동이 감소했음을 의미하며, 현미경적 검사시에 정자의 유영속도가 감소한 남성의 정자를 자궁내 주입에 의한 인공수정에 공여할 때 수태율이 감소한다는 Holt *et al*²⁵의 보고와 같이 융해후 30분부

터는 수태율에 직접적인 영향을 미칠 것으로 사려된다.

현미경적 정액검사법에서는 꼬리부분이 조금이라도 움직이면 운동성이 있는 정자로 판정하지만 정액자동분석기법에서는 MOT의 의미는 정자의 두부 VCL이 10 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 이상인 것을 운동성 있는 것으로 판정하기 때문에 정액자동분석기에 의해 측정된 값의 절대치는 현미경적 방법과 차이가 있을 수 있지만 상대적인 증가 또는 감소 경향은 유사하다. 본 실험에서 한우 정자의 MOT는 융해 후 10분까지 유의적 변화가 없었으나 배양 30분 후에는 융해직후 보다 약 16%가 감소($p < 0.05$)하는 경향을 보였으며, 이는 수태율의 감소를 의미한다고 추정된다. 즉, 정자의 MOT는 정액의 성상을 검사하는 고전적인 방법의 하나로 정자의 질과 동일시하여 왔다²¹.

한우동결정액의 융해후 배양시간의 설정에 차이가 있어 직접적으로 비교할 수 없었으나 Iqbal과 Hunter²⁹는 동일한 종모우 유래 정액을 서로 다른 네 가지 배양액에서 배양시키며 0, 4, 8 및 12시간에 정액자동분석기 및 일반적인 정액검사법으로 MOT, 전진운동성(progressive motility), LIN, VCL, 전진속도(progressive velocity), VAP, ALH 및 첨체반응을 조사하였을 때 조사된 모든 요소에서 각 시간대별로 유의적인 감소결과를 보여, 본 실험결과와 유사한 추이임을 알 수 있었다.

사람에서 VSL은 배양시간에 따라 감소한다고 알려져 있다^{24,39,41}. 본 실험에서 한우 동결융해 정액의 VSL이 융해직후에 $34.78 \pm 13.47 \mu\text{m}/\text{s}$ 를 보였고 60분 후에는 $19.98 \pm 10.88 \mu\text{m}/\text{s}$ 로 감소하여, 소의 동결융해 정액을 배양시 VSL이 융해직후에는 $42 \mu\text{m}/\text{s}$ 를 보였으나 1.5h 일때 $26 \mu\text{m}/\text{s}$ 로 떨어졌다는 보고^{7,29}와 비교해볼 때 결과치는 낮았으나 감소하는 경향은 유사하였다. 또한 전진운동의 비율도 시간이 지남에 따라 일정하게 감소하였다는 보고²⁹와도 유사하였다.

남성의 정액을 동결전후 정액자동분석기로 분석 비교하였을 때 VSL, VCL 및 ALH는 현저한 감소가 나타나 이들 요인은 미리 감소를 예측할 수 있다고 보고된 바 있다¹⁵. 본 실험에서도 VSL, VCL 및 ALH의 30분후 유의적 감소시는 수태율에 영향을 미칠 것으로 판정되며 이들 운동특성의 감소이전에 인공수정시키는 것이 필요할 것으로 사료된다.

융해후 30분부터 감소한 MAD는 정자 두부가 실체이동경로를 따라서 이동할 때 회전각의 절대값으로 이 값의 감소는 정자 두부의 회전폭이 좁아짐을 의미하며 운

동양상의 약화가 초래되었다고 추정할 수 있다.

배양 30분 후부터 유의적인 감소를 보인 DNC 또한 VCL×ALH에 의해 계산되며, 정자운동 모양의 값으로 운동양상이 감소했음을 알 수 있다. 즉, 배양 30분 후부터는 유의적으로 감소된 MAD와 DNC로 미루어 운동양상의 현저한 감소를 알 수 있었다. 본 실험결과에서 DNC는 동결용해 한우정자의 기능과 직접적인 관련성을 발견할 수 없었다.

융해 60분 후부터 LIN, STR 및 WOB의 유의적인 감소($p < 0.05$)를 보였으며, LIN은 VSL/VCL로 계산되는 실제 이동경로의 직선비이며, STR은 VSL/VAP로 평균이동경로의 직선비로서 LIN과 STR은 모두 정자의 운동시 선형도를 의미한다. 또한 Table 3에서와 같이 LIN과 STR은 동결용해 정액을 배양시에도 60분 후까지도 유의적인 감소없이 일정비율을 유지하는 것으로 나타났다. 운동특성중 LIN은 사람의 IVF의 성공을 위한 중요한 요소로 알려져 있다³⁷. 본 실험에서 LIN은 융해후 60분까지도 49.50 ± 11.36 을 유지하여 신선 소 정액을 modified Tyrode's + heparin으로 배양시 52~80% 였다는 Iqbal과 Hunter²⁹의 결과치 보다는 낮았으나 소에서 동결용해 정액은 4.2~6.8% 및 사람의 8.9~28.9%⁴⁵이었다는 결과치 보다는 높았다.

또한 WOB는 VAP/VCL의 비율로 곡선전진율을 의미하며 배양후 30분까지는 증가와 감소의 변화상을 보였으나 융해 60분 후부터는 유의적으로 감소($p < 0.05$)하는 것으로 나타났다.

본 실험의 결과에서 나타난 바와 같이 한우의 동결정액은 융해 10분 후부터 그 성상에 유의적인 변화가 시작되어 30분 이후에는 수태율에 영향을 미칠 수 있는 주요한 운동특성들이 유의적으로 감소하였다. 한우의 수태율을 높이기 위하여 동결정액은 융해후 최소한 30분 이내에 인공수정을 실시하여야 할 당위성이 입증되었다.

결 론

정액자동분석기를 활용하여 한우동결정액의 융해후 배양시간에 따른 정자 운동특성의 변화를 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

동결용해 한우정액은 배양 10분 후부터 HYP와 DNM의 유의적인 변화($p < 0.05$)를 보였다. 융해직후 HYP는 $6.45 \pm 3.91\%$ 를 나타냈으나 10분 후에는 $3.94 \pm 2.61\%$ 로 유

의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 또한 DNM은 융해직후 $8.54 \pm 1.6\mu\text{m}$ 을 보였으며 10분 후에는 $7.55 \pm 1.49\mu\text{m}$ 로 유의적인 감소를 보였으나($p < 0.05$), 30, 60 및 120분까지는 감소된 양상을 그리고 배양 180분 후에는 $10.7 \pm 4.22\mu\text{m}$ 로 이전 시간대에 비해 유의적으로 증가된 계산치를 보였다($p < 0.05$).

배양 30분 후부터 유의적인 변화($p < 0.05$)를 보인 운동특성으로는 MOT, VCL, VSL, VAP, ALH, BCF, MAD 및 DNC 였다. 이중 MOT는 융해직후 $50.98 \pm 19.18\%$ 로 측정되었으며, 30분후($42.40 \pm 20.06\%$) 부터는 배양시간이 경과함에 따라 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 또한 VCL도 융해직후 $63.24 \pm 18.97\mu\text{m/sec}$ 을 보였으며, 융해후 30분(50.03 ± 20.09)부터는 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 동결용해 한우정자의 VSL은 융해직후 및 10분 후에 각각 34.78 ± 13.47 과 $35.48 \pm 14.89\mu\text{m/sec}$ 로 유사한 양상을 보였으나 배양 30분 후에는 $28.19 \pm 14.10\mu\text{m/sec}$ 로 유의적인 감소($p < 0.05$)를 나타냈다. 한우정자의 VAP는 융해직후 $41.21 \pm 13.97\mu\text{m/sec}$ 을 나타냈고 10분 배양시에 $40.88 \pm 14.93\mu\text{m/sec}$ 을 보였으나 30분후($33.64 \pm 15.15\mu\text{m/sec}$)부터는 배양시간이 경과함에 따라 유의적인 감소를 보였다($p < 0.05$). 융해직후 ALH는 $4.51 \pm 0.85\mu\text{m}$ 였으며, 10분 후까지는 $4.30 \pm 0.75\mu\text{m}$ 로 유의적인 변화는 없었으나 배양 30분 후에는 $3.98 \pm 0.84\mu\text{m}$ 로 유의적인 감소를 보였다($p < 0.05$). 동결용해 한우정자의 BCF는 융해직후 $13.65 \pm 2.97\text{Hz}$ 를 보였고, 10분 후에는 $13.03 \pm 3.14\text{Hz}$ 로 변화상은 없었으나 배양 30분 후($11.76 \pm 3.38\text{Hz}$)부터는 유의적인 감소가 관찰되었으며($p < 0.05$), 경과시간에 따라 지속적으로 감소를 보였다. 배양시간에 따른 MAD는 융해직후 $12.12 \pm 4.62\mu\text{m}$ 였고, 10분 배양시에는 $12.02 \pm 5.20\mu\text{m}$ 로 유의적인 감소는 보이지 않았다. 그러나 배양 30분 후에는 $9.42 \pm 5.63\mu\text{m}$ 로 유의적인 변화가 관찰되었다($p < 0.05$). 융해직후 DNC는 300.33 ± 129.83 였으며, 10분 후까지는 268.30 ± 121.33 을 유지하였다. 그러나 배양 30분 후에는 218.28 ± 124.11 로 유의적인 감소를 보였다($p < 0.05$).

동결용해 정액을 배양시 60분 후부터 유의적인 감소($p < 0.05$)를 보이는 요인으로는 LIN과 STR 이었다. 배양직후 LIN은 $55.87 \pm 7.40\%$ 였으며, 10분 후에는 $58.60 \pm 13.15\%$ 로 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). 그러나 30분 후에는 $53.40 \pm 10.35\%$ 를 유지하여 배양직후와 배양 10분 후에 비해 유의적인 변동이 없었으며, 배양 60분 후부터

는 $49.50 \pm 11.36\%$ 로 유의적인 감소를 보였다($p < 0.05$). 또한 STR은 용해직후, 10분 및 30분에 각각 84.97 ± 3.87 , 84.79 ± 6.96 및 $80.65 \pm 8.13\%$ 로 유의적인 변화가 없었으나 용해 60분후 $77.16 \pm 10.6\%$ 로 감소하였고 이후 유의적 감소를 볼 수 있었다($p < 0.05$). 운동특성중 WOB는 배양 10분 후에 $68.44 \pm 9.49\%$ 로 일시적인 유의적인 증가가 보였으나($p < 0.05$) 배양시간 60분후($65.33 \pm 7.78\%$)부터 120분 ($56.21 \pm 10.18\%$) 및 180분($47.65 \pm 7.30\%$)으로 경과함에 따라 유의적인 감소를 나타냈다($p < 0.05$).

그러므로 한우의 동결정액은 용해 10분 후부터 운동 특성의 유의적 변화가 시작되었으며, 본 실험에서 체외 수정율과 상관관계를 나타내는 모든 운동특성은 용해 30분후에 유의적인 변화가 관찰되었고, LIN과 STR은 용해 60분 후부터 유의적으로 변하였다. 그러므로 임상에서 수태율 향상을 위해서는 동결정액을 용해후 30분 이내에 인공수정에 공여하는 것이 필수적임이 입증되었다.

참 고 문 헌

- Agarwal A, Ozturk E, Loughlin KR. Comparison of semen analysis between the two Hamilton Thorn semen analysers. *Andrologia*, 24:327-329, 1992.
- Aitken RJ, Best FSM, Richardson DW, et al. An analysis of sperm function in cases of unexplained infertility: conventional criteria movement characteristics and fertilizing capacity. *Fertil Steril*, 38:212-221, 1982.
- Aitken RJ, Warner P, Reid C. Factors influencing the success of sperm-cervical mucus interaction in patients exhibiting unexplained infertility. *J Androl*, 7:3-10, 1986.
- Armant DR, Ellis MA. Improved accuracy of sperm motility assessment using a modified Micro-Cell sperm counting chamber. *Fertil Steril*, 63:1128-1130, 1995.
- Auger J, Leonce S, Jouannet P, et al. Flow cytometric sorting of living, highly motile human spermatozoa based on evaluation of their mitochondrial activity. *The journal of histochemistry and cytochemistry*, 41: 1247-1251, 1993.
- Brandeis VT. Importance of total motile oval count in interpreting the hamster ovum sperm penetration assay. *J Androl*, 14:53-59, 1993.
- Budworth PR, Amann RP, Chapman PL. Relationships between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility. *J Androl*, 9: 41, 1988.
- Centola GM, Rauberta RF, Mattox JH. Cryopreservation of human semen: comparison of cryopreservatives, sources of variability and prediction of post-thaw survival. *J Androl*, 13:283-288, 1992.
- Centola GM. Comparison of manual microscopic and computer-assisted methods for analysis of sperm count and motility. *Archives of Andrology*, 36:1-7, 1996.
- Chan SYW, Wang C, Song BL, et al. Computer-assisted image analysis of sperm concentration in human semen before and after swim-up separation: comparison with assessment by haemocytometer. *Int J Androl*, 12:339, 1989a.
- Davis RO, Overstreet JW, Asch RH, et al. Movement characteristics of human epididymal sperm used for fertilization of human oocytes *in vitro*. *Fertil Steril*, 56:1128-1135, 1991.
- Davis RO, Katz DF. Standardization and comparability of CASA instruments. *J Androl*, 13:81-86, 1992.
- Davis RO, Rothmann SA, Overstreet JW. Accuracy and precision of computer, aided sperm analysis in multicenteric studies. *Fertil Steril*, 57:648-653, 1992.
- Davis RO, Katz DF. Operational standards for CASA instrument. *J Androl*, 14:385-394, 1993.
- Davis RO, Drobni EZ, Overstreet JW. Application of multivariate cluster, discriminant function, and stepwise regression analyses to variable selection and predictive modeling of sperm cryosurvival. *Fertil Steril*, 63:1051-1057, 1995.
- Dostal LA, Faber CK, Zandee J. Sperm motion parameters in vas deferens and cauda epididymal rat sperm. *Reprod Toxicol*, 10:231-235, 1996.
- Dunphy BC, Kay R, Barratt CLR, et al. Quality control during the conventional analysis of semen as essential exercise. *J Androl*, 10:378, 1989.

18. Eggert-Kruse W, Schwarz H, Rohr G, *et al*. Sperm morphology assessment using strict criteria and male fertility under *in vivo* conditions of conception. *Human Reproduction*, 11:139-146, 1996.
19. Eriksen GV, Malmstrom A, Uldbjerg N, *et al*. A follicular fluid chondroitin sulfate proteoglycan improves the retention of motility and velocity of human spermatozoa. *Fertil Steril*, 62:618-623, 1994.
20. Farrell PB, Trouern-Trend VL, Foote RH, *et al*. Repeatability of measurements on human, rabbit and bull sperm by computer-assisted sperm analysis when comparing individual fields and means of 12 fields. *Fertil Steril*, 64:208-210, 1995.
21. Farrell PB, Foote RH, McArdle MM, *et al*. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit, and bull sperm for computer-assisted sperm analysis(CASA). *J Androl*, 17:293-300, 1996.
22. Fernandes PA, McCoshen JA, Cheang M, *et al*. Quantitative analysis of the effect of freezing on donor sperm motion kinetics. *Fertil Steril*, 54:322-327, 1990.
23. Garner DL. Ancillary tests of bull semen quality. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 13:313-330, 1997.
24. Grunet JH, DeGeyter C, Nieschlag E. Objective identification of hyperactivated human spermatozoa by computerized sperm motion analysis with the Hamilton-Thorn sperm motility analyser. *Human Reproduction*, 5:593, 1990.
25. Holt W, Watson P, Curry M, *et al*. Reproducibility of computer-aided semen analysis: comparison of five different systems used in a practical workshop. *Fertil Steril*, 62:1277-82, 1994.
26. Hong CY, Lee MF, Ou MC, *et al*. Tail beat frequency of human sperm: Evaluated with sperm head fixation method and computer-assisted semen analysis. *Archives of Andrology*, 30:171-176, 1993.
27. Hurowitz EH, Leung A, Wang C. Evaluation of the CellTrak computer, assisted sperm analysis system in comparison to the Cellsoft system to measure human sperm hyperactivation. *Fertil Steril*, 64:427-432, 1995.
28. Ijaz A, hunter AG. Induction of bovine sperm capacitation by TEST-yolk semen extender. *J Dairy Sci*, 72:2683, 1989.
29. Iqbal N, Hunter AG. Effect of various capacitation systems on bovine sperm motion characteristics, acrosome integrity, and induction of hyperactivation. *J Dairy Sci*, 78:91-102, 1995.
30. Irvine DS, Vacleod IC, Templeton AA, *et al*. A prospective clinical study of the relationship between the computer assisted assessment of human semen quality and the achievement of pregnancy *in vitro*. *Human Reproduction*, 9:2324-2334, 1994.
31. Jequier AM, Ukome EB. Errors inherent in the performance of a routine semen analysis. *Br J Urol*, 55: 434, 1983.
32. Johnson JE, Boone WR, Blackhurst DW. Manual versus computer, automated semen analyses. Part I. Comparison of counting chambers. *Fertil Steril*, 65: 150-155, 1996a.
33. Johnson JE, Boone WR, Blackhurst DW. Manual versus computer, automated semen analyses. Part II. Determination of the working range of a computer, automated semen analyzer. *Fertil Steril*, 65:156-159, 1996b.
34. Johnson JE, Boone WR, Blackhurst DW. Manual versus computer, automated semen analyses. Part III. Comparison of old versus new design MicroCell Chambers. *Fertil Steril*, 65:446-447, 1996c.
35. Kolibianakis EM, Tarlatzis BC, Bontis J, *et al*. Evaluation of Hamilton, Thorn automated semen analysis system. *Arch Androl*, 28:2134-22, 1992.
36. Kramer RY, Garner DL, Bruns ES, *et al*. Comparison of motility and flow cytometric assessments of seminal quality in fresh, 24, hour extended and cryopreserved human spermatozoa. *J Androl*, 14:374-84, 1993.
37. Liu DY, Clark GN, Baker hWG. Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton-Thorn motility analyzer and fertilization rates *in vitro*. *J Androl*, 12:231-239, 1991.
38. Macleod IC, Irvine DS. The predictive value of computer-assisted semen analysis in the context of a donor insemination programme. *Human Reproduction*,

- 10:580-586, 1995.
39. Mack SO, Tash JS, Wolf DP. Effect of measurement conditions on quantification of hyperactivated human sperm subpopulations by digital image analysis. *Biol Reprod*, 40:1162, 1989.
40. Matyus L, Szabo G Jr, Resli I, et al. Flow cytometric analysis of viability of bull sperm cells. *Acta Biochim Biophys Acad Sci Hung*, 19:209-214, 1984.
41. Mortimer ST, Mortimer D. Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitation conditions. *J Androl*, 11:195, 1990.
42. Owen DH, Katz DF. Sampling factors influencing accuracy of sperm kinematic analysis. *J Androl*, 14:210-221, 1993.
43. Stachecki JJ, Ginsburg KA, Leach GR, et al. Computer-assisted semen analysis(CASA) of epididymal sperm from the domestic cat. *J Androl*, 14:60-65, 1993.
44. Stilo VL, Suarez JD, Poss PM, et al. Optimization of the Hamilton, Thom computerized sperm motility analysis system for use with rat spermatozoa in toxicological studies. *Fundam Appl Toxicol*, 21:298-307, 1993.
45. Wang C, leung A, Tsoi WL, et al. Computer-assisted assessment of human sperm morphology: usefulness in prediction fertilizing capacity of human spermatozoa. *Fertil Steril*, 55:989-993, 1991.
46. Yung CH, Nieschlag E. Performance and comparison of CASA systems equipped with different phase-contrast optics. *J Androl*, 14:222-228, 1993.
47. Zinaman MJ, Uhler ML, Vertuno E, et al. Evaluation of computer, assisted semen analysis (CASA) with IDENT stain to determine sperm concentration. *J Androl*, 17:288-292, 1996.
48. 박광석, 이원진, 백재승. Hough 변환을 이용한 정자의 형태학적 특성 분석 방법에 관한 연구. 대한의용생체공학회지, 17:24-31, 1996.
49. 백재승, 이진행, 김정미. 동결방법, 해빙온도 및 해빙후 회색/세척이 인간정자의 운동성과 형태변화에 미치는 영향. 대한비뇨기과학회지, 36:1188-1197, 1995.
50. 백재승, 전성수, 김수웅 등. 정자의 형태학적 특성분석에 관한 연구. 대한불임학회지, 24:153-165, 1997.
51. 심훈섭, 이원진, 박광석 등. 영상처리를 이용한 정자의 운동특성 분석. 대한전자공학회논문지, 31:108-114, 1994.
52. 이원진, 전성수, 박광석 등. 개인용 컴퓨터(PC)를 이용한 정액분석기의 개발. 대한불임학회지, 22:62-72, 1995.
53. 주명수, 백재승, 박종완 등. 반응성 산소라디칼이 인체 정자의 과민반응에 미치는 영향. 대한비뇨기과학회지, 37:제7호 별책, 1996.