

## 생체의 L-carnitine과 Acetylcarnitine의 정자지표 개선 효과

부산대학교 의과대학 비뇨기과학교실

이 완 · 박 남 철

### The Effect of L-carnitine and Acetylcarnitine on Sperm Parameters *in vitro*

Wan Lee, Nam Cheol Park

*The Department of Urology, College of Medicine, Pusan National University, Busan, Korea*

**Objectives:** To assess the scavenging effect of carnitine derivatives on oxidative damage to sperm during sperm processing, cryopreservation and thawing.

**Materials and Methods:** Fresh semen samples from 20 normal healthy volunteers were collected by masturbation after at least 48 hours abstinence. After liquefaction of semen samples at room temperature, the specimens were diluted with sperm wash media (Ham's F-10, Life technologies) to a uniform density of  $20 \times 10^6$ /ml. L-carnitine or acetylcarnitine were added with various concentration of 0  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M in semen sample or cryoprotectant. All specimens were cryopreserved at  $-196^\circ\text{C}$  LN<sub>2</sub> for 3 days. Sperm motility, vitality, fertilizing capacity, reactive oxygen species formation and the level of lipid peroxidation were analyzed by computer assisted semen analyzer, eosin-nigrosin stain, hypo-osmotic swelling test, chemiluminescence and thiobarbituric acid method, respectively, during sperm processing, cryopreservation and thawing.

**Results:** The sperm motility was only increased in proportion to the concentration of acetylcarnitine with no statistical significance ( $p > 0.05$ ). The sperm vitality was also significantly improved in proportion to the concentration of acetylcarnitine with statistical significance ( $p < 0.05$ ). The sperm fertilizing capacity was significantly increased in proportion to the concentration of L-carnitine and acetylcarnitine and reactive oxygen species generation and lipid peroxidation were significantly decreased with same fashion ( $p < 0.05$ ). On comparison of effects between L-carnitine and acetylcarnitine, acetylcarnitine was superior to L-carnitine on the improvement of sperm motility and vitality as well as the suppression of reactive oxygen species generation and lipid peroxidation.

**Conclusions:** These results suggest that carnitine derivatives have a scavenging effect against oxidative damages during sperm processing, cryopreservation and thawing. Therefore, carnitine derivatives may be useful as an oral antioxidant in patients with male infertility due to increased ROS generation.

**Key Words:** L-carnitine, Acetylcarnitine, Cryopreservation, Sperm

보조생식술의 발달은 정자처리나 동결보존의 기회를 증대시키고 있으며, 이러한 인위적인 정자조작과정

에 정자 고유의 형태와 기능을 보존하거나 변화된 환경으로부터 정자손상을 극소화하기 위한 양질의

주관책임자: 박남철, 우) 602-730 부산광역시 서구 아미동 1가 10번지 부산대학교병원 비뇨기과  
Tel: (051) 240-7349, Fax: (051) 255-7133, e-mail: pnc@pusan.ac.kr

This Experimental Study was Supported by Medical Research Institute Grant (MRI-2001-01-09), Pusan National University Hospital

정자배양액이나 동결보존제의 개발 필요성이 제기되고 있다. 이를 위해 정자배양액 또는 동결보존제의 주요성분이나 첨가물로서 분비액 내 포함되어 정자의 기능유지에 필수성분으로 알려져 있는 화학성분들에 관심이 모아지고 있다.<sup>1-4</sup> 여기에는 sorbitol, 알부민, 난황, 포도당, 과당, 구연산, 인, kallikrein, carnitine, EDTA나 verapamil 등의 칼슘치환제, pentoxifylline 등의 methylxantine 유도체 등이 있으며, 이중 부고환에서 분비되는 carnitine도 정자의 농도나 운동성 유지에 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.<sup>5</sup>

Carnitine은 미토콘드리아 내에서 acyl기의 이동에 관여하여 정자의 에너지 대사에 중요한 인자로 작용할 뿐만 아니라,<sup>6,7</sup> 고환내에서는 Sertoli cell의 지방산과 Leydig cell의 지질 대사에도 관여한다.<sup>8</sup> 그 외에도 L-carnitine은 long chain acyl기를 미토콘드리아로부터 세포질이나 세포 밖으로 유출시켜 탄수화물 산화를 증진시키며, acetylcarnitine은 acetyl기를 공급하므로써 정자에너지 생산을 위한 기질로 이용되거나, 세포질에서 구조성 지방 (structural lipid)합성의 전구체가 됨으로써 원형질막의 유지와 세포의 생존에 필수인자가 된다.<sup>8-11</sup> 이러한 carnitine의 세포내 고유기능 외에도 항산화작용을 통한 정자보호 효과가 간헐적으로 보고되고 있다.<sup>12,13</sup>

본 연구는 정상 정자에서 정자처리 및 동결시 carnitine계 화합물의 항산화작용을 통한 정액지표 개선 효과를 보기 위해 L-carnitine 혹은 acetylcarnitine이 첨가된 동결보존제를 이용하여 정자의 운동성, 생존성 및 수정능 등의 정액지표, 활성산소의 생성과 세포막 지질과산화에 대한 영향을 관찰하였다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. 실험재료 및 실험군의 분류

정상적인 임신능 혹은 수태능을 가진 20~30대의 남자 지원자 20명으로부터 5회 이상의 반복적으로 채취된 정액을 실험재료로 이용하였다. 단 정액검사상 비정상적인 정액지표, 액화 장애나 백혈구 및 적혈구가 있는 경우와 같이 비정상적인 소견을 나타낸 정액은 실험재료에서 제외하였다.

실험군은 L-carnitine을 0  $\mu$ M, 10  $\mu$ M 및 30  $\mu$ M 첨

가하여 각각 대조군 A, 실험군 I 및 II로, acetylcarnitine을 0  $\mu$ M, 10  $\mu$ M 및 30  $\mu$ M 첨가하여 각각 대조군 B, 실험군 III 및 IV로 하였다 (Figure 1). 본 실험은 제한된 정액량으로 인해 실험군 I, II 및 III, IV를 각각 다른 정액을 실험재료로 이용하였다.

### 2. 실험 방법

실험군 및 대조군에서 정자처리 후 동결 해동과정에서 동결보존제 내에 첨가된 L-carnitine과 acetylcarnitine농도에 따른 정자의 운동성, 생존성 및 수정능 등의 정액지표, 활성산소의 생성과 세포막 지질과산화의 변화를 관찰하였다 (Figure 1).

#### 1) 정액검사 및 회석

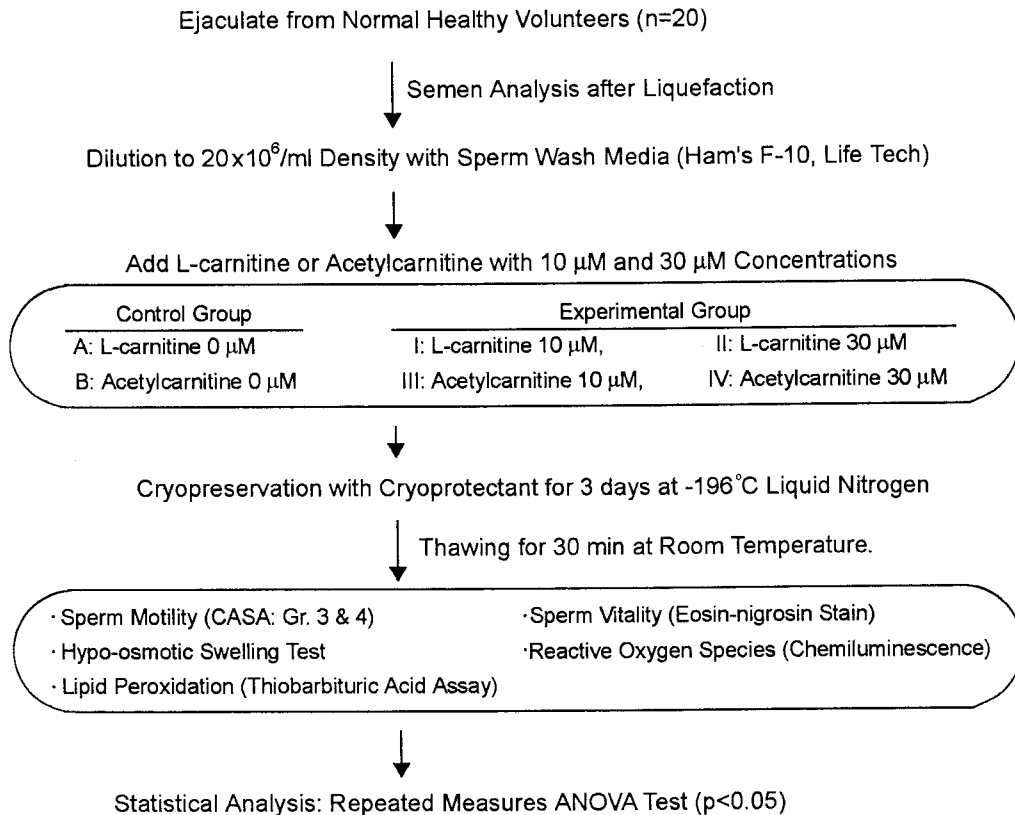
2~3일간의 금욕 후 자위행위에 의해 멸균시험관에 채취된 정액은 27°C 실온에서 20~30분 액화 후 1시간 이내에 Makler chamber (Fertility-Tech, USA)를 이용한 수동 정액검사 혹은 컴퓨터보조정액분석기 (SAIS, Medical Supply Co. Ltd., Korea)를 이용하여 자동 정액검사를 시행하였으며, WHO 기준<sup>14</sup>에 따라 양 2 ml, 농도  $20 \times 10^6$ /ml, 운동성 50%, 형태 30% 이상을 정상으로 판정하였다. 정액검사 후 정액은 정자세척액 (Ham's F-10, Life technologies)으로  $20 \times 10^6$ /ml의 균질한 농도로 회석하였다.

#### (1) 정자 운동성

정액검사 소견에서 운동 속도의 분포 (velocity distribution)는 운동 속도에 따라 static (grade 1), slow (grade 2), medium (grade 3), rapid (grade 4)로 구분하여 전체 정자 중 grade 3과 4의 정자가 차지하는 비율 (%)로 표시하였다.

#### (2) 정자 생존성

정자의 생존성은 eosin-nigrosin (E-N)염색법으로 평가하였다.  $20 \times 10^6$ /ml의 균질한 농도로 액화 회석된 정액과 E-N염색액을 각각 50  $\mu$ l을 1 ml eppendorf tube에 넣어 vortex mixer로 수초간 혼합한 다음, 슬라이드에 약 50  $\mu$ l를 도포하고 실온에서 하루밤 건조시켰다. 건조된 슬라이드는 malinol과 xylene 2:1 혼합액을 이용하여 mounting하였다. 판정은 1000배 시야에서 100개의 정자 중 E-N염색액이 염색이 되지 않아 흰색으로 보이는 생존정자와 흡수 염색이 되어 분홍색으로 보이는 생존성이 없는 정자 수를 세어 각각을 백분율로 구하였다.



**Figure 1.** Study design and experimental flow diagram

## 2) 동결보존 및 해동

이 등<sup>5</sup>의 방법에 따라  $20 \times 10^6$ /ml의 균질한 농도로 희석된 정액을 동결용 바이알에 각각 0.5 ml씩 나누어 분주한 다음 동결보존제 (9971, Irvine Scientific Co., Santa Ana, USA)를 희석된 정액과 1:1로 첨가하였다. 정액 및 동결보존제 혼합액이 담겨진 동결용 바이알을 cryomatic cellevator tray (L.A.O. Enterprises, U.S.A)에 삽입 후 액화질소 탱크 (liquid-nitrogen gas tank, Harsco Co., Hamilton, U.S.A)에 4 시간에 걸쳐 서서히 하강하면서 동결하였다. 동결된 각 검체는  $-196^\circ\text{C}$  액화질소 탱크에서 1주일간 동결 보존 후 실온에서 저속해동하였다.

### (1) 정자의 수정능

정자의 수정능은 Hypo-osmotic swelling test (HOS)로 평가하였다. Fructose (M.W = 180.16) 150 mM와 sodium citrate ·  $\text{H}_2\text{O}_2$  (M.W = 294.11) 50 mM가 혼합된 HOS 용액 1 ml를  $37^\circ\text{C}$ 에서 10분간 방치한 후

액화된 정액 100  $\mu$ l 넣고 섞은 후 30분간 배양을 한 뒤 방울을 슬라이드에 점적하고 cover glass를 덮은 다음 400배에서 관찰한 후 전체 정자수에서 팽창된 정자수의 비율을 구하였다. 전체 정자의 swelling rate는 비정상적인 형태 정자의 백분율로서 52% 이상을 정상치로 하였다.

### (2) 활성산소

활성산소는 chemiluminescence법으로 측정하였으며,<sup>15</sup> 발광도는 Hepes balanced salt solution/bovine serum albumin (BSA) buffer (130 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 14 mM fructose, 10 mM Hepes, pH 8.0 and 1 mg/ml BSA)로 두배로 희석된 정액 500  $\mu$ l에 4 mM luminol (5-amino-2,3-dihydro-1, 4-phthalazinedione, Wako, Japan) 25  $\mu$ l를 첨가한 후 lumiphotometer (TD4000, Laboscience, Tokyo, Japan)를 사용하여 측정되어졌다. 최대 발광도는 luminol을 투여하고 10분 후에 측정하였다. 활성산소의 활성도를 나타내

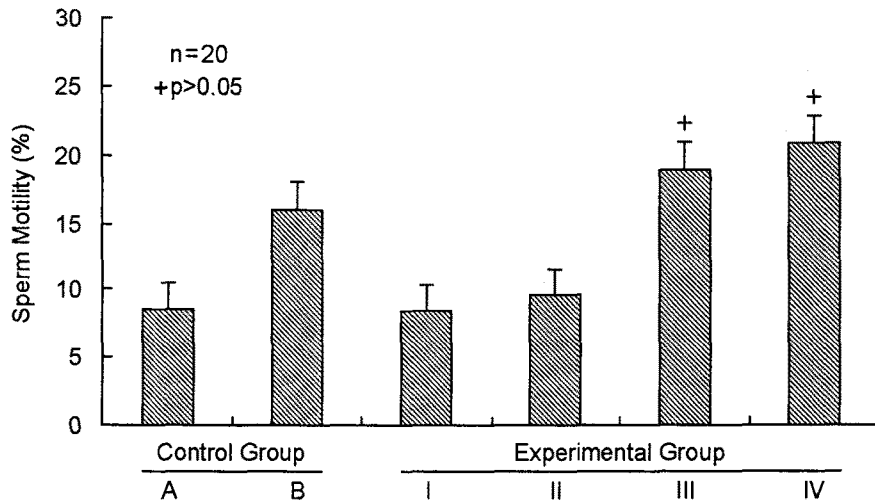


Figure 2. Effect of L-carnitine and acetylcarnitine on sperm motility after cryopreservation and thawing

는 발광도는 10초간 1000배의 감수성을 가진 아날로그 모드로 측정되었으며, 결과는 임의치 arbitrary unit (AU)로 표시하였다.

### (3) 세포막 지질과산화

세포막 지질과산화에 의한 산생물인 malondialdehyde 측정은 thiobarbituric acid (TBA)법을 사용하였다.<sup>5</sup> 항은 배양 혹은 동결보존 후 해동된 정액표본을 각각 2000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층을 제거하고 sperm pellet에 1% phosphoric acid (Kanto Chemicals Co., INC., Tokyo, Japan) 750  $\mu$ l, 0.6% 2-tribarbituric acid (Sigma, St. Louis, MO., U.S.A.) 250  $\mu$ l를 첨가한 후 vortex mixer (Scientific industry, U.S.A.)로 혼합시켰다. 100°C 중탕 (삼화공업사, 한국)에서 60분간 가열 후 vortex mixer로 혼합시키고, 4°C 냉각수에 넣어 30분간 냉각시킨 후 n-butanol (Junsei Chemical CO., Ltd., Tokyo, Japan) 1 ml를 첨가시킨 후 vortex mixer로 다시 혼합시키고, 다시 3000 rpm에서 25분간 원심분리 후 상층을 회수하여 diode array spectrophotometer (Hewlett Packard, U.S.A.)를 이용하여 510 nm와 534 nm에서의 흡광도이며, 결과는 nmole/mg protein로 표시하였다.

### 3. 통계 분석

통계 분석은 SPSS+ version 70 package을 이용한 Repeated measures ANOVA test로 통계 처리하였고,

p-value 0.05 이하를 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다.

## 결 과

### 1. 정자 운동성

동결 및 해동 후 정자 운동성은 실험군 I, II, III 및 IV에서 각각 8.4±3.4%, 9.5±5.0%, 19.0±11.0% 및 20.8±10.0%로 각각 대조군 A와 B의 8.5±4.0%, 16.0±10.5%에 비하여 증가하는 양상을 나타내었으나 통계학적 유의성은 없었다 (p>0.05) (Figure 2).

### 2. 정자 생존성

동결 및 해동 후 생존성은 실험군 I, II에서 생존정자는 각각 33.4±7.5%, 36.6±10.3%로 대조군 A의 34.2±7.6%에 비해 유의한 차이가 없었다 (p>0.05). 그러나 실험군 III, IV에서의 생존정자는 각각 56.8±11.9%, 64.0±14.0%로 대조군 B의 52.1±14.0%에 비해 유의하게 증가 되었다 (p<0.05) (Figure 3).

### 3. 정자 수정능

동결 및 해동 후 정자 수정능은 실험군 I, II, III 및 IV에서 각각 60.6±6.8%, 62.2±5.9%, 66.6±7.3% 및 69.4±6.6%로 대조군 A와 B의 55.8±6.2%, 63.7±6.9%에 비하여 유의하게 높은 소견을 나타내었다

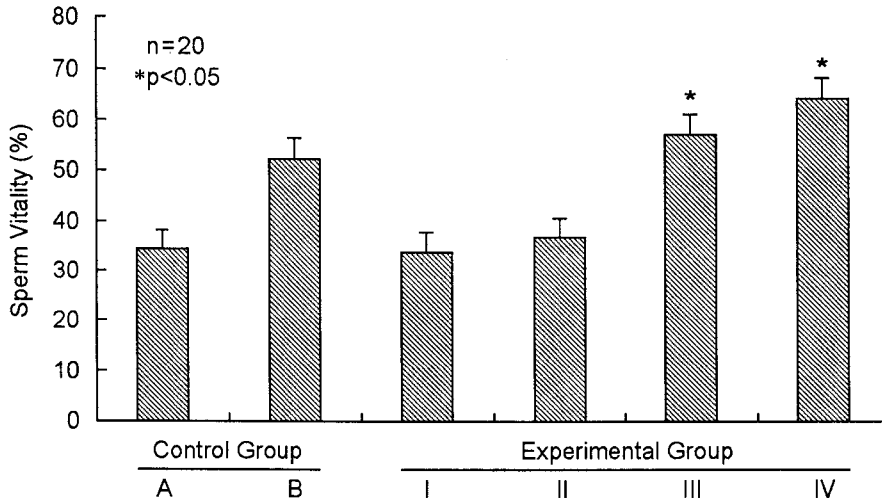


Figure 3. Effect of L-carnitine and acetylcarnitine on sperm vitality after cryopreservation and thawing

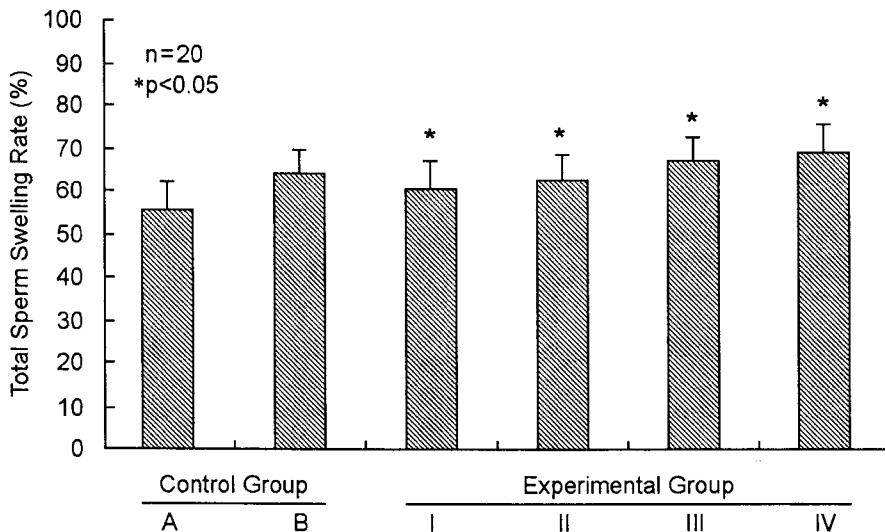


Figure 4. Effect of L-carnitine and acetylcarnitine on total sperm swelling rate after cryopreservation and thawing

( $p < 0.05$ ) (Figure 4).

#### 4. 활성산소

동결 및 해동 후 생성된 활성산소는 실험군 I, II, III 및 IV에서 각각  $12.2 \pm 2.3 \times 10^3$  AU,  $10.2 \pm 1.7 \times 10^3$  AU,  $11.7 \pm 2.0 \times 10^3$  AU 및  $10.5 \pm 2.0 \times 10^3$  AU로 각각 대조군 A와 B의  $12.6 \pm 2.4 \times 10^3$  AU,  $13.1 \pm 2.3 \times 10^3$  AU에 비해 유의하게 낮은 소견을 나타내었다 ( $p < 0.05$ ) (Figure 5).

#### 5. 정자 세포막 지질과산화

동결 및 해동 후 생성된 세포막 지질과산화는 실험군 I, II, III 및 IV에서 각각  $91.3 \pm 37.7$  nM/mg protein,  $68.2 \pm 32.0$  nM/mg protein,  $75.3 \pm 33.4$  nM/mg protein 및  $54.8 \pm 30.4$  nM/mg protein으로 대조군 A와 B의  $121.2 \pm 50.8$  nM/mg protein,  $109.9 \pm 27.2$  nM/mg protein에 비하여 유의하게 낮은 소견을 나타내었다 ( $p < 0.05$ ) (Figure 6).

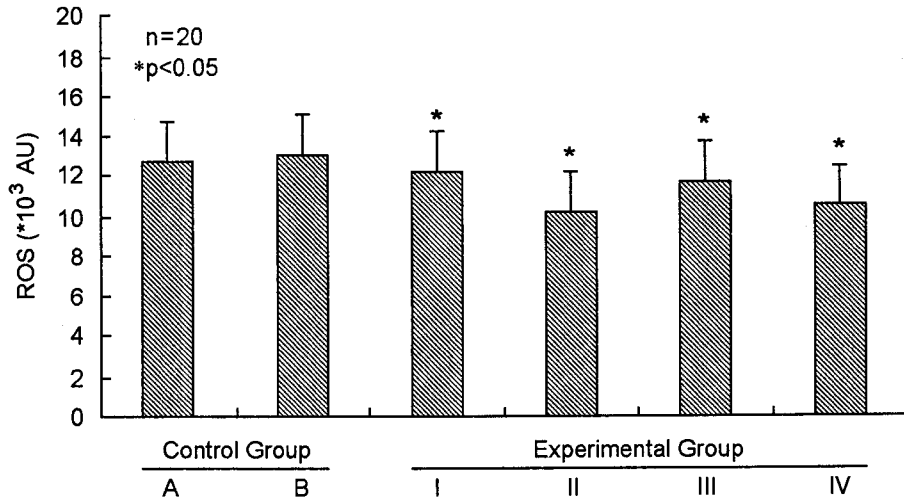


Figure 5. Effect of L-carnitine and acetylcarnitine on level of reactive oxygen species after cryopreservation and thawing

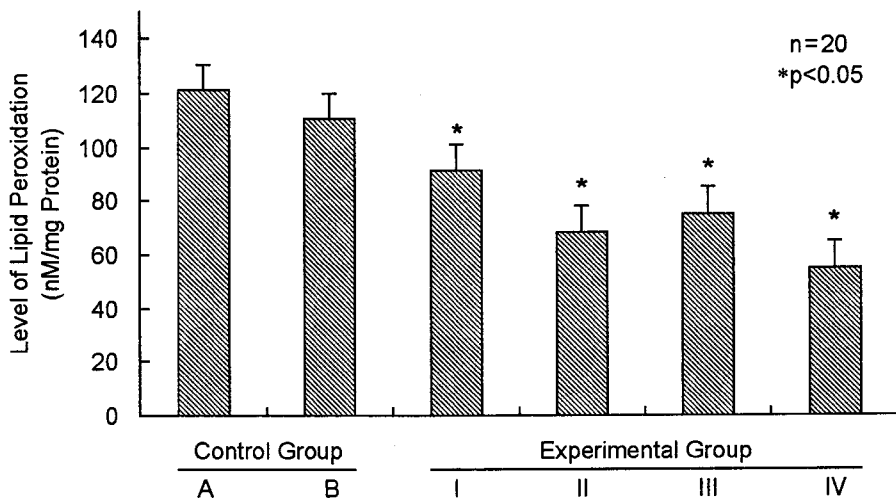


Figure 6. Effect of L-carnitine and acetylcarnitine on level of lipid peroxidation after cryopreservation and thawing

#### 6. L-carnitine과 acetylcarnitine의 정액지표 및 항산화 효과 비교

정자의 운동성과 생존성은 실험군 IV에서 가장 높아 고농도의 acetylcarnitine에서 유의한 개선 소견을 나타내었으며, 반면 hypo-osmotic swelling 검사는 실험군 II에서 가장 높아 고농도의 L-carnitine에서 수정능의 유의한 개선 소견을 나타내었다. 정액내 활성산소와 세포막 지질과산화는 실험군 II와 IV에서 가장 높아 고농도의 L-carnitine과 acetylcarnitine

에서 유의하게 감소된 소견을 나타내었다 (Table).

#### 고 찰

L-carnitine은 간, 신장, 고환 및 뇌 등의 인체내 다양한 장기에서 lysine이나 methionine으로부터 합성된다.<sup>16</sup> 그러나 인체 조직내에 존재하는 대부분의 L-carnitine은 음식을 통해 체외에서 들어온 천연 물질로서, 수용성 비타민과 같이 장에서 쉽게, 완전히 흡수된다. 98%가 골격근이나 심근에 축적되고,

**Table.** Percent changes of sperm parameters according to the concentration of L-carnitine and acetylcarnitine after cryopreservation and thawing

Experimental group	Sperm motility	Sperm vitality	HOS	ROS	LPO
I	-1.2	-2.3	+8.6	-3.9	-24.7
II	+11.8	+7.0	+11.5	-19.7	-43.7
III	+18.8	+9.0	+4.6	-10.7	-31.5
IV	+30.0	+22.8	+8.9	-19.8	-50.1

\*HOS; Hypo-osmotic swelling test, ROS; Reactive oxygen species, LPO; Lipid peroxidation

간에는 1~6%, 세포의 체액에는 0~6%의 소량이, 일부는 부고환 조직에도 축적된다. 인체내 유리 L-carnitine의 농도는 혈장 10~50  $\mu\text{mol/L}$ , 정장액 600 nm/mL 이상으로 정장액이 혈장보다 약 2000배 높다. 인체내 총 carnitine은 주로 유리 L-carnitine, acetylcarnitine 그리고 acyl-L-carnitine으로 구성되며, 본 연구에 이용된 L-carnitine은 4급의 작은 amine기를 가진 3-hydroxyaminobutyrate의 생물학적 활성 입체 이성체이며, acetylcarnitine은 에스테르화된 carnitine이다.

임상에서 치료약물로 쓰이는 carnitine계 화합물로는 L-carnitine, acetylcarnitine 및 propionyl-L-carnitine이 있다. L-carnitine과 acetylcarnitine은 감약정자증 환자에서 정자지표의 개선을 위해, propionyl-L-carnitine은 허혈성 심질환이나 말초혈관질환에 의한 기능 장애를 개선시키기 위한 약물로 이용되고 있다.<sup>17-20</sup> 특히 L-carnitine과 acetylcarnitine은 약정자증과 같이 원인적 치료 약물 투여뿐만 아니라 수술요법이나 인공수정, 체외수정 등의 보조생식술의 보조적 약물요법으로 동시에 시행된다. Campaniello 등<sup>18</sup>은 약정자증 (asthenozoospermia) 환자에서 일정 기간동안 L-carnitine을 투여했을 때, 정자의 운동성이 25%에서 40% 이상 증가된다는 보고를 하였으며, Vitali 등<sup>19</sup>의 연구에서는 정자의 운동성 뿐만 아니라 정자수의 20% 이상 증가되었으며, Costa 등<sup>20</sup>은 17%에서 38%까지 정자의 운동성의 증가와 생존능의 비례적 증가를 보고 하였다. Acetylcarnitine 또한 정자지표 개선 효과를 나타내는 것으로 알려져 있는데, Moncada 등<sup>21</sup>은 감정자증 (oligozoospermia) 환자군에 acetylcarnitine을 투여한 결과 정자의 운동성과 수정능을 향상시키는 것을 보고하였으며, 국내에서도 정 등<sup>7</sup>은 정상 성인을 대상으로 한 정자동결 해동

연구에서 acetylcarnitine이 정자의 운동성이 증가되는 결과를 보고하였다. 그러나 Duru 등<sup>22</sup>은 정상 범주의 정액상과 중등도의 회귀무력이형성증을 가진 환자를 대상으로 한 연구에서 acetylcarnitine이 세포막의 동결손상이나 cryosurvival에 대해 즉각적이거나 지연된 효과가 없다고 하였다. 본 연구에서는 정액지표의 변화에 있어 L-carnitine의 경우 투여 전후 뚜렷한 운동성이나 생존능의 변화를 관찰할 수 없었으나, acetylcarnitine의 경우에는 농도에 따른 운동성의 증가와 생존성의 향상을 관찰할 수 있었으며, L-carnitine과 acetylcarnitine 모두에서 수정능의 유의한 개선 효과가 있었다. 이러한 L-carnitine과 acetylcarnitine의 정자지표의 개선 효과로 인해 최근 두 약물의 복합제제가 정액지표 개선을 위한 남성불임 치료제로 상품화 되어 있다.<sup>19-21,23</sup>

이러한 carnitine계 화합물의 정자지표 개선 효과는 전술한 carnitine 고유의 세포내 기능외에도 항산화작용 효과의 가능성이 제기되고 있다. Carnitine의 항산화 효과는 L-carnitine의 프로피오닐 에스테르인 propionyl-L-carnitine에서 아직 정확한 기전은 아직 알려져 있지 않으나, 과산화기의 형성을 감소시키는 능력에 의해 미토콘드리아내 DNA의 손상을 줄이게 된다.<sup>13</sup> Vanella 등<sup>13</sup>은 L-carnitine의 프로피오닐 에스테르인 propionyl-L-carnitine은 그 농도에 따라 superoxide의 제거율이 비례한다는 보고를 하였다. 본 연구에서도 정자의 동결 해동시 L-carnitine과 acetylcarnitine을 첨가한 실험군에서 활성산소의 발생과 세포막 지질과산화의 유의한 감소를 확인할 수 있었다. 이때 세포막 지질과산화 정도는 활성산소생성 감소보다 뚜렷하게 저하된 소견이 관찰되었다. 이러한 활성산소의 생성과 지질과산화 억제 효과 역시 L-carnitine보다 acetylcarnitine이 정자의 운동성 및 생

존성의 개선 효과가 높은 결과를 나타내었다.

이상의 성적으로 carnitine 화합물이 정액내에서 활성산소의 발생과 지질과산화를 특이적으로 억제함으로써 정자처리 및 동결보존시 정자의 세포손상을 줄이고 고유기능을 보존하게 하는 작용을 가지는 것을 확인하였다. 나아가 carnitine계 화합물은 활성산소가 증가된 특발성 남성불임 환자의 경우용 치료제로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 결 론

저자들은 정자처리와 동결 해동과정에서 정자에 의한 내인성 활성산소 생성 유무와 carnitine 화합물에 의한 정자지표 개선과 항산화 효과를 평가하기 위해 정상인으로부터 채취된 정액을 이용하여 정액 회석, 동결 및 해동시 동결보존제 내에 첨가된 L-carnitine과 acetylcarnitine 농도에 따른 정액지표변화, 활성산소 및 지질과산화 정도를 조사한 결과는 다음과 같다.

1. 정자 운동성과 생존성은 acetylcarnitine군에서 개선 효과를 나타내었으나 유의성은 없었다 ( $p>0.05$ ).

2. 정자의 수정능, 활성산소와 지질과산화의 생성은 L-carnitine군과 acetylcarnitine군 모두에서 유의하게 개선되었다 ( $p<0.05$ ).

3. L-carnitine과 acetylcarnitine 양군의 비교시 acetylcarnitine군에서 정자의 수정능을 제외한 정자의 운동성과 생존성, 활성산소의 생성과 지질과산화의 억제 효과가 L-carnitine군보다 높은 결과를 나타내었다.

이상의 성적으로 저자는 carnitine계 화합물이 정액내에서 활성산소 생성뿐 아니라 정자의 세포손상을 억제함으로써 정액지표를 개선시키는 작용이 있으며, 특히 정액지표의 개선은 L-carnitine보다 acetylcarnitine이 보다 우수함을 확인하였다. 향후 carnitine계 화합물은 정액내 활성산소 생성뿐 아니라 세포손상을 억제하기 위한 항산화제로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Urry RL. Pathophysiologic principles of male infer-

tility. *Urol Clin Nor Am* 1981; 9: 3.

2. Wetterauer U, Heite HJ. Carnitine in seminal duct obstruction. *J Urol AUA Abstract* 1988; 139: 225A.
3. Carter AL, Cho SH, Bishop ER, Boldt J. A factor in human seminal plasma which affects carnitine accumulation in bovine epididymal sperm. *Fertil Steril* 1988; 49: 893-9.
4. 심기식, 박준석, 박남철. 정자의 동결보존시 자가 정장액이 정자회복에 미치는 효과. *대한비뇨학회지* 2001; 42(9): 978-83.
5. 이영진, 박남철. 정자의 동결 및 해동 시 항산화제의 회복률 개선 효과. *대한비뇨학회지* 1999; 40(7): 917-24.
6. 성인기, 정우식, 이무상. 남성불임증 진단에 있어서 부고환지표의 의의. *대한비뇨학회지* 1988; 29: 943-9.
7. 정병준, 김윤진, 최형민, 전명권, 이응수, 나오순. Progesterone 및 acetyl-L-carnitine이 정자의 동결-용해에 미치는 영향. *대한불임학회지* 2001; 28: 295-300.
8. 박남철. 남성불임에서 L-carnitine과 acetylcarnitine에 의한 정액지표 개선 효과. *부산지방남성학회지* 2000; 3: 21-31.
9. Carter AL, Stratman FW, Hutson SM, et al. The role of carnitine and its esters in sperm metabolism. In: Frenkel RA, McGarry JD (eds), *Carnitine, Biosynthesis, Metabolism and Functions*. New York: Academic Press; 1980: 251.
10. Lenzi A, Lombardo F, Gandini L, et al. Metabolism and action of L-carnitine: its possible role in sperm tail-function. *Arch Ital Urol Nefrol Androl* 1992; 64: 187-96.
11. Milkowsky AL, Babcock DF, Lardy HA. Activation of bovine epididymal sperm respiration by caffeine. Its transient nature and relationship to the utilization of acetylcarnitine. *Arch Biochem Biophys* 1976; 176: 250-6.
12. Eduardo RP, Enrique A, Jose AE, Manuel J, Lopez P. Association between seminal plasma carnitine and sperm mitochondrial enzymatic activities. *Int J Androl* 2001; 24: 335-40.



13. Vanella A, Russo A, Acquaviva R, Campisi A, Di Giacomo C, Sorrenti V, Barcellona ML. L-propionyl-carnitine as superoxide scavenger, antioxidant, and DNA cleavage protector. *Cell Biol Toxicol* 2000; 16(2): 99-104.
14. Park NC, Namiki M, Takahashi K, Takada S, Kondoh N, Matsumiya K, et al. Relationship between reactive oxygen species and glutathione peroxidase in the seminal plasma of infertile men. *J Assist Reprod Tech Androl* 1995; 8: 71-6.
15. World Health Organization, WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. Cambridge, UK, Cambridge University Press, 1994.
16. Peggy RB. Clinical aspects of human carnitine deficiency. New York: Pergamon press; 1986; 2.
17. Tranphaichir N. *In vitro* stimulation of human sperm motility by acetylcarnitine. *Int J Fertil* 1977; 22(2): 85-91.
18. Campanielle E, Petrarolo N, Meriggiola MC, et al. Carnitine administration in asthenospermia. IVth Intern Cong Androl 1989; May: 14-8.
19. Vitali G, Parente R, Melotti C. Carnitine supplementation in human idiopathic asthenospermia: clinical results. *Drugs Exp Clin Res* 1995; 21(4): 157-9.
20. Costa M, Canale D, Filicori M, Diddio S, Lenzi A. L-carnitine in idiopathic asthenozoospermia: a multicenter study. *Andrologia* 1994; 26(3): 155-9.
21. Moncada ML, Vicari E, Cimino C, et al. Effects of acetylcarnitine treatment in oligoasthenospermic patients. *Acta Europaea Fertilitatis* 1992; 23: 221-4.
22. 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.
23. Jeulin C. Role of free L-carnitine and acetyl-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa. *Human Reprod Update* 1996; 2(2): 87-102.