

고환 내 정자의 체외배양 중 운동성에 미치는 인간 난포액과 온도의 영향

신지수 · 손지은 · 이동률[†] · 김계성¹ · 정태규 · 김낙근 · 한지은 · 이우식 · 윤태기
포천중문의과대학교 차병원 여성의학연구소

Effect of Human Follicular Fluid (hFF) and Temperatures on the Motility of Testicular Sperm Cultured *In Vitro*

J. S. Shin, J. O. Sohn, D. R. Lee[†], K. S. Kim¹, T. G. Chung, N. K. Kim, J. E. Han, W. S. Lee and T. K. Yoon

Infertility Medical Center, CHA General Hospital,
College of Medicine, Pochon CHA University, Seoul, Korea

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the improvement of testicular sperm motility following different culture conditions such as human follicular fluid (hFF) and temperature. Testicular tissues obtained from azoospermia (n=21) were minced into small pieces by blade and recovered sperm suspension were cultured in Ham's F10 with or without 40% hFF at different temperatures (Group I: 37°C/with hFF, Group II: 32°C/with, Group III: 37°C/without, Group IV: 32°C /without). The motility and viability of sperm were monitored during culture for 48 hours. Initial motility of testicular sperm was 10.9±1.9%. After 24 hours culture, sperm motility was 23.5±2.1% (Group I), 8.1±1.1% (Group II), 10.4±1.4% (Group III) and 4.0±0.8% (Group IV), respectively. After 48 hours, the motility had been changed as 32±2.3% (Group I), 14.3±1.7% (Group II), 5.3±1.4% (Group III) and 4.3±0.9% (Group IV). In hFF group (I and II), sperm motility of group I cultured at 37°C was higher than those of group II at 32°C. But, sperm viability of group I cultured at 37°C was lower than those of group II at 32°C (54.4±4.1% vs. 59.4±3.7%) after cultured for 48 hours. We acquired the best motility of testicular sperm when performed *in vitro* culture for 48 hours in hFF supplemented medium at 37°C. Increase of sperm motility by *in vitro* culture could be useful tool for human TESE-ICSI program.

(Key words : testicular sperm, motility, *in vitro* culture, temperature, human follicular fluid (hFF))

서 론

세포질 내 정자 주입술(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)은 사정된 정자의 수적, 질적 결함

* 본 연구는 한국과학재단 목적기초연구사업 특정기초연구 (R01-2001-000-00144-0)의 지원을 받아 이루어졌음.

¹ 포천중문의과대학교 세포유전자치료연구소 (Cell and Gene Therapy Institute, College of Medicine, Pochon CHA University)

[†] Correspondence : E-mail : drleedr@cha.ac.kr

등에 의해 야기되는 남성원인의 불임치료에 성공적으로 도입되었고(Palermo 등, 1992; Steirtegem 등; 1993), 정관 또는 부정소의 폐색에 인한 무정자증 환자의 치료에 까지 그 적용을 넓히고 있다(Tournaye 등, 1995). 특히 최근에 부고환 내 정자의 채취가 불가능한 경우 고환의 일부를 절개한 후 조직의 일부를 채취하여 수정에 필요한 정자를 분리하는 고환 내 정자추출법 (testicular sperm extraction, TESE)이 ICSI와 함께 무정자증의 치료를 위해 많은 불임클리닉에 도입되고 있다.

정자의 운동성은 일반적인 시험관아기기술 프로그램에서만 아니라 ICSI 프로그램에서도 수정률과 밀접한 연관을 가지고 있다. ICSI 과정에서 주입 직전에 인위적으로 정자의 운동성을 없앤 후에 난자 내에 주입하여 수정을 시키나, 사정된 정자가 운동성을 가지고 있지 않은 경우는 그 수정은 일반적으로 불가능한 것으로 여겨진다(Liu 등, 1995). 그리고 고환에서 회수한 정자도 운동성이 없는 경우에는 그들의 생존성 여부를 확인할 수 없기 때문에 높은 수정률을 기대하기 어렵다고 보고된 바 있다(Schoysman 등, 1993; Nagy, 1995). 고환 내에서 채취한 정자의 운동성은 일반적으로 매우 저조하며, 또한 정자의 생존율 및 활력 회복율은 낮은 실정이다(Verheyen 등, 1997). 따라서 효율적인 체외 배양법을 이용하여 운동성과 좋은 형태를 가진 정자를 획득하여 보다 나은 임상결과를 얻으려 하는 연구가 최근에 진행되고 있다(Craft 등, 1995; Zhu 등, 1996; Liu 등, 1997).

정자의 운동성을 향상시킬 수 있는 방법으로는 혈청(Makler 등, 1984), 난포액(Mendoza 등, 1990), 복강액(Soldati 등, 1989) 등의 생물학적 물질과 caffeine(Aitken 등, 1983), 2-deoxyadenosine(Aitken 등, 1986), pentoxifylline(Moohan 등, 1993) 등과 같은 화학적으로 정제된 물질이 있고, 이들의 첨가에 의한 배양이 정자 운동성 및 침체 반응에 효과적인 것으로 알려져 있다(Lee 등, 1997). 최근에 인간의 고환으로부터 얻은 정자의 저조한 운동성을 증진시키기 위해 pentoxifylline(Tasdemir 등, 1998; Sohn 등, 2002)과 FSH(Balaban 등, 1999) 등의 첨가에 관한 연구가 진행된 바 있다.

Craft 등(1995)과 Zhu 등(1996)은 무정자증 환자

의 고환으로부터 얻은 정자를 37℃에서 수일간 배양하였을 때 운동성을 가진 정자의 수가 증가하였다고 보고한 바 있다. 또한 Emiliani 등(2000)은 냉동-해동 후 정자를 32℃와 37℃에서 20일간 배양하였을 때 운동성의 차이는 관찰할 수 없었으나, 32℃에서 배양하였을 때 좀더 천천히 운동성이 감소하였고, 또한 배양 후 3일째에 가장 높게 운동성이 증진되었다고 보고한 바 있다. 그러나 각 연구자간의 배양조건과 배양액 첨가물에 따라 운동성의 증진 결과가 차이가 나므로 임상적용에 앞서 보다 많은 연구가 필요한 실정이다.

본 연구자들은 정자의 운동성 증진에 미치는 여러 요인들을 비교하고, 폐쇄성 무정자증 환자에서 TESE를 이용해 얻은 정자를 인간난포액 (human follicular fluid, hFF)이 첨가된 배양액 속에서, 고환 내 온도인 32℃와 여성의 생식기관 내의 온도인 37℃에서 배양하여 운동성의 증진과 생존성의 변화를 조사하였다.

연구대상 및 방법

1. 정자 운동성에 미치는 인간 난포액의 농도 결정

1) 정액 채취 및 준비

본 연구의 예비실험에 사용된 남성의 정자는 세계보건기구(WHO) 기준에 의거하여 정상으로 판정된 공여자를 대상으로 하였다. 먼저 수음을 통하여 채취된 정자를 약 30분간 상온에서 액화시킨 후, Ham's F10 (Gibco BRL, USA)을 섞어 1,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 1차 세척을 하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 동일한 방법으로 2차 세척을 하였다. 세척 후 상층액을 버리고 하층의 pellet에 0.3 ml의 Ham's F10을 첨가하여 실험에 이용하였다.

2) 인간 난포액의 준비

시험관아기 기술 중 난자채취 시 난포액을 채취하고, 3000 rpm에서 20분간 원심분리를 시행하여 난포액 외 이물질을 제거하였다. 원심분리 후 상층액을 모아서 0.22µm pore size (Millipore, USA)의 여과기로 여과시킨 후 사용 전까지 -70℃에서 보관하였다.

3) 인간 난포액의 농도에 따른 체외배양 중 정자의 운동성의 변화

인간난포액의 농도에 따른 체외배양 중 정자의 운동성의 변화를 연구하기 위해 20%, 40%, 100% 농도로 준비하였다. 그 배양액에 20 μ 씩의 준비된 정자를 10 \times 10⁶마리/ml의 농도로 분주한 후 상온에서 0, 3, 6, 10, 24시간 배양하여 정자의 운동성을 평가하였다. 기본 배양액으로 Ham's F10을 사용하였으며 난포액이 들어있지 않은 상태에서 배양한 균을 대조군으로 운동성을 비교하였다.

4) 체외배양 중 정자의 운동성에 영향을 주는 요인의 비교

인간난포액의 적정 농도를 결정한 후, 체외배양 중 정자의 운동성에 미치는 효과를 조사하기 위해 정자의 운동성에 영향을 주는 것으로 알려진 다른 요인들과 비교하였다. 기본배양액인 Ham's F10배양액, Ham's F10배양액에 0.8% human Serum Albumin (HSA)의 첨가군, 3.6 mM progesterone 첨가군, 그리고 HSA와 progesterone이 함께 첨가된 군과 40% 농도의 인간난포액을 첨가한 군에서 체외배양을 통해 정자의 운동성의 변화를 관찰하였다.

5) 운동성의 평가

정자의 운동성은 Hamilton Thorne (Version 10.6 HTM-IVOS, USA)을 통하여 평가하였으며, 기계적 오차를 줄이기 위해 두 명의 숙련된 임상 연구원이 Counting Chamber를 (Markler, USA) 이용하여 200배율의 현미경 (Olympus, Japan) 하에서 정자의 운동성을 각각 2회 이상 평가하였다. 정자의 운동성 측정은 배양액과 첨가물의 분획들이 포함된 시험관에 정자를 적하하는 것을 0시간으로 하여 그때부터 3, 6, 10, 24시간으로 나누어서 각각의 시간마다 시행하였다.

2. 무정자증환자의 고환조직에서 채취한 정자의 난포액과 온도에 따른 배양

1) 고환조직의 채취 및 준비

폐쇄성 무정자증 환자 21명을 대상으로 고환조직의 일부를 생검하여 조직을 채취하였다. 채취된

조직은 1.0 ml의 Ham's F10 배양액이 첨가된 organ culture dish (3002, Falcon, USA)내에서. 외과수술용 칼을 이용하여 세절하였다. 정자와 조직의 부유물은 1,500 rpm에서 5분씩 2회 원심분리를 통해 세척하여 상층액은 버리고 하층의 pellet을 재부유하여 체외배양을 위해 준비하였다.

2) 난포액과 온도에 따른 배양

난포액은 정상인의 정자를 사용해 실험하여 얻은 결과를 토대로 결정된 적정농도를 사용하였다. 고환조직에서 위의 방법으로 채취된 정자와 조직의 부유물은 37 $^{\circ}$ C 또는 32 $^{\circ}$ C에서 24시간과 48시간 동안 배양한 후 운동성과 생존성을 검사하였으며 대조군으로 난포액이 첨가되지 않은 기초배양액을 이용해 37 $^{\circ}$ C와 32 $^{\circ}$ C에서 같은 실험을 실시하였다.

3) 운동성의 평가

체외배양 전후의 고환조직 내 정자의 운동성은 두 명의 숙련된 임상 연구원이 Counting Chamber를 이용하여 관찰하였다. 세포덩어리로부터 분리된 성숙된 형태의 정자를 100마리 이상씩 현미경 하에서 계수하였고, 꼬리를 조금이라도 움직이는 경우를 정자의 운동성이 있는 것으로 간주하였다.

4) 고환조직 정자의 배양후의 생존성 평가

정자의 생존성은 Eosin Y 염색법(0.5% wt/vol) (Jeyendran 등, 1984)을 사용하여 평가하였다. 0.5% Eosin Y 염색용액을 1:1의 비율로 정자와 30초 동안 섞어준 후 슬라이드에 도말하여 실온에서 건조시킨 후 현미경을 통해 관찰하였고, 염색되지 않은 정자를 생존력을 가진 정자로서 평가하였다.

3. 통계학적 분석

본 연구결과의 통계학적 분석은 Student's *t*-test를 사용하였고, $P < 0.05$ 인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 보았다.

결 과

고환 내 정자의 체외 배양 중 운동성 증진에 미치는 인간난포액과 온도의 영향을 조사하고자 실

시하였다. 먼저 WHO 기준에 의거한 정상인 정자의 운동성 증진에 가장 좋은 영향을 미치는 인간난포액의 적정농도를 살펴보고자 여러 농도의 난포액을 포함하고 있는 배양액을 이용하여 체외 배양을 실시하였다 (Table 1). 체외 배양을 시작할 때 채취된 정자의 운동성은 평균 $47.9 \pm 2.3\%$ 였다. 인간난포액을 첨가하지 않은 대조군에서 시간이 지남에 따라 정자의 운동성이 점차적으로 감소되는 것을 관찰할 수 있었다. 체외 배양 후 3시간째에 대조군을 제외한 다른 농도의 첨가군들 간의 유의차는 없었지만 6시간과 10시간째는 40%와 100%의 농도에서 배양하였을 때가 20%의 농도에 비해 운동성이 향상되었음을 관찰할 수 있었으며, 24시간째에는 각 군 간의 유의차를 발견할 수 없었다.

따라서 본 실험에서는 40%를 적정 농도로 결정하였다.

체외배양 중 정자의 운동성에 미치는 인간난포액의 효과를 조사하기 위해 정자의 운동성에 영향을 주는 것으로 알려진 다른 요인들과 비교하였다 (Table 2). 체외 배양을 시작할 때 채취된 정자의 평균 운동성은 $24.8 \pm 2.6\%$ 였으며, 40% 농도의 인간난포액을 포함한 군이 다른 대조군에 비해서 높은 정자의 운동성을 보였다. 특히 배양 후 6시간째에 40% 농도의 인간난포액의 경우 운동성이 $42.5 \pm 2.5\%$ 로 나타난 반면 progesterone이 단독으로 첨가된 경우는 운동성이 $21.2 \pm 2.5\%$ ($p < 0.01$), HSA가 단독으로 함유된 경우는 $34.1 \pm 2.8\%$ ($p < 0.05$)로 유의차가 관찰되었다. HSA와 progesterone이 함께

Table 1. Motility of the human sperm following treatment with various concentrations of human follicular fluid (hFF)

	0 hr	3 hrs	6 hrs	10 hrs	24 hrs
Plain [†]	$47.9 \pm 2.3^*$	39.7 ± 2.6	38.2 ± 2.5	35.0 ± 2.5	31.2 ± 3.2
20% hFF		50.8 ± 2.9	46.7 ± 2.6	43.8 ± 2.6	41.2 ± 2.9
40% hFF		52.2 ± 2.5	53.9 ± 2.5	54.8 ± 2.6	42.4 ± 2.9
100% hFF		53.2 ± 2.3	55.6 ± 2.4	50.7 ± 2.6	45.2 ± 2.7

* Mean \pm SEM.

[†] 20%, 40%, 100% hFF vs. plain: $p < 0.01$.

Table 2. Comparison of human sperm motility following treatment with various supplements at various time intervals from 0 to 24hrs

	0 hr	3 hrs	6 hrs	10 hrs	24 hrs
Plain	$24.8 \pm 2.6^*$	21.7 ± 2.3	20.3 ± 2.9	15.9 ± 2.6	10.2 ± 2.4
P4 [†]		22.4 ± 2.7	21.2 ± 2.5	17.4 ± 2.3	12.3 ± 1.9
HSA [‡]		34.8 ± 2.5	34.1 ± 2.8	25.1 ± 2.6	19.4 ± 2.6
hFF [†]		44.3 ± 2.4	42.5 ± 2.5	37.4 ± 2.7	27.1 ± 2.7
HSA+P4 [†]		39.4 ± 2.6	38.2 ± 2.5	32.1 ± 2.5	24.3 ± 2.9

* Mean \pm SEM.

[†] hFF, HSA+P4 vs. plain, HSA, : $p < 0.01$.

[†] P4: 3.6 μ M progesterone.

[‡] HSA: 0.8% human serum albumin.

첨가된 경우에는 $38.2 \pm 2.5\%$ 로 인간난포액과 유의차는 적었지만 정자의 운동성이 전반적으로 떨어지는 것으로 보아 40% 인간난포액의 첨가가 정자의 운동성 증진에 좋은 영향을 주는 것으로 나타났다.

위의 결과를 토대로 결정된 40% 인간난포액을 사용하여 폐쇄성 무정자증 환자에서 고환 내 정자의 운동성에 미치는 영향을 조사하고, 또한 보다 효과적인 체외 배양을 위한 방법을 모색하기 위하여 실험을 진행하였다. 고환조직에서 채취된 정자와 조직의 부유물을 37°C와 32°C에서 24시간과 48시간동안 배양한 후 운동성과 생존 유무를 검사하였으며 대조군으로 난포액이 없는 배양액을 이용해 같은 실험을 실시하였다 (Fig. 1). 고환조직 내에서 채취된 정자의 운동성은 배양 전에 $10.9 \pm 1.9\%$ 이었다. 체외 배양 후 24시간째에 정자의 운동성을 관찰한 결과 37°C에서 40% 인간난포액을 첨가하여 배양한 군 (1군)에서는 $24.4 \pm 2.1\%$, 32°C에서 인간난포액 40%를 첨가하여 배양한 군 (2군)에서는 $8.1 \pm 1.1\%$, 37°C에서 인간난포액을 첨가하지 않고 배양한 군 (3군)에서는 $10.4 \pm 1.4\%$ 그리고 32°C에서 인간 난포액을 첨가하지 않고 배양한 군 (4군)에서는 $4.0 \pm 0.8\%$ 의 운동성을 관찰하였다. 체외 배양 후 48시간째에선 1군은 $31.4 \pm 2.3\%$, 2군은 $14.2 \pm 1.7\%$, 3군은 $5.3 \pm 1.4\%$ 그리고 4군에서는 $4.3 \pm 0.9\%$ 의 운동성을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과로서 인간의 난포액이 첨가되어 배양한 군 (1과 2군)들에서는 32°C보다 37°C에서 배양했을

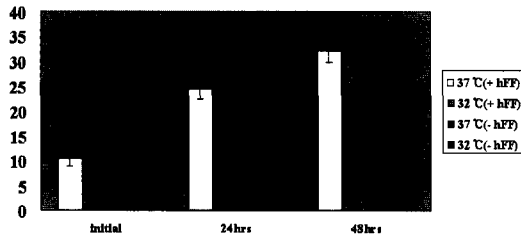


Fig. 1. Motility of the human testicular sperm following treatment with/without human follicular fluid after *in vitro* culture at 32°C or 37°C from initial to 48 hrs.

(* mean±SEM.; a, b, c, d: Different superscripts with in column indicated significant differences ($p < 0.05$)).

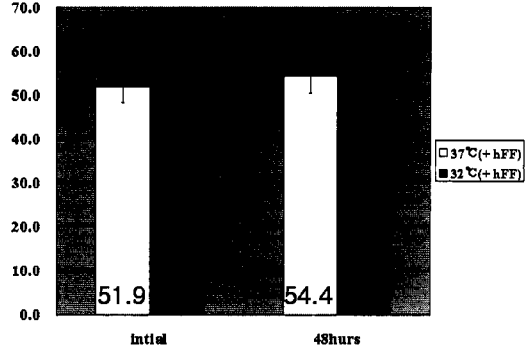


Fig. 2. Viability of the human testicular sperm following treatment with human follicular fluid after *in vitro* culture at 32°C and 37°C from initial to 48 hrs. (* mean±SEM.; a, b: Different superscripts with in column indicated significant differences ($p < 0.05$)).

때 운동성이 더 증가되어 유의적인 차이를 보였고, 또한 인간난포액이 첨가되지 않은 군(3과 4군)들에서는 48시간 배양 후에는 두 군 간의 유의차를 발견할 수 없었다.

그러나 체외 배양을 시작할 때 채취된 고환 내 정자의 평균 생존성은 $51.9 \pm 6.3\%$ 였으며 48시간 배양 후 37°C에서 생존률은 $54.4 \pm 4.1\%$ 로 32°C의 $59.4 \pm 3.7\%$ 에 비해 낮았다 (Fig. 2, $p < 0.05$).

고 찰

무정자증을 비롯한 많은 남성요인의 불임은 ICSI의 도입으로 많이 극복되고 있으며, 실제로 ICSI의 임상 적용에 정자의 수나, 운동성, 형태는 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 보고된 바 있다. 또한 대부분의 포유동물의 수정과정에서 정자는 그들의 유전형질과 염색체 분열기구로 발생하는 centriole 만을 공급하고, 그 생존성의 여부가 수정의 결과나 배아 발생에 중요한 영향을 주지 않는 것으로 여겨진다(Goto 등, 1990). 동물실험을 통해 정자의 핵 또는 DNA 만을 주입한 경우에도 정상적인 수정과 배아 발생이 가능하다고 보고(Kuretake 등, 1996; Wakayama 등, 1998) 된 바는 있으나 대부분의 경우 인위적인 활성화가 동반되고, 실제로 인간에서 운동성이 전혀 없는 정자를 주입한 경우 그 수정율은 매우 저조하다(Liu 등, 1995; Nagy 등,

1998). 이는 운동성과 상관없이 정자의 생존성이 인간의 수정과 배아발생에 매우 중요하다는 점을 암시한다. 따라서 생존성이 있는 정자의 구별은 임상결과의 증진에 매우 중요하여 최근에 이를 위해 체외배양 또는 hypo-osmotic swelling test 등 여러 가지 방법이 도입되고 있다(Craft 등, 1995; Zhu 등, 1996; Liu 등, 1997; Sallam 등, 2001).

과거의 수많은 연구를 통해서 생화학적 물질(혈청, 난포액 등)이나 화학물질 (caffeine, 2-deoxyadenosine, creatine phosphate, prostaglandin, pentoxifylline 등)의 처리가 정자의 운동성의 증진에 도움이 되는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서도 난포액은 정상인의 사정된 정자에서 40%의 농도에서 가장 효과적으로 운동성을 증진, 유지하였으며 이 농도의 난포액을 첨가하였을 때 다른 물질들에 비해 효과적임을 알 수 있었다. 다양한 방법으로 체외배양된 정자들의 세포질 내 정자 주입술에 의한 임상예의 적용도 보고(Zhu 등, 1996; Hu 등, 1999)된 바와 같이, 운동성의 증진은 사정된 정자에서와(Sohn 등, 2002) 마찬가지로 고환 내 정자에서도 생존성이 있는 정자의 확인을 도와줄 뿐 아니라 보다 쉽게 건강한 정자를 골라내고 주입의 속도를 촉진시켜 수정율이나 임신율을 증진시킬 수 있을 것으로 여겨진다. 실제로 노화된 정자에서는 DNA strand 상의 nick이 관찰되며(Bedford, 1999), 이러한 정자에 의해 수정된 배아는 배아 발생을 완료할 수 없고, 이것이 심한 남성불임환자에서는 높은 유산율의 원인이 된다. 또한 centriole이 결핍된 비정상 정자의 경우 운동성의 회복은 어렵고 이는 배아에서 비정상적인 spindle formation의 원인이 된다(Asch 등, 1995). 고환 내 정자의 운동성은 저조하며, 부정소를 거치면서 성숙과정을 통해 직진 운동성을 획득하게 된다(Yanagimachi 등, 1988), 건강한 고환 내 정자는 체외배양을 통해 그 운동성을 얻게 되며(Craft 등, 1995) 따라서 고환 조직 내 정자의 운동성을 증진시키는 최적의 조건을 찾는 것이 임상결과의 증진에 도움이 될 것이다.

본 연구에서 고환조직내의 정자의 초기 운동성이 약 10% 전후였으나 일부의 환자에서는 운동성을 거의 관찰할 수 없었다. 이들의 생존율은 약

50% 이상이었고, 40%의 난포액을 첨가한 배양액에 37℃에서 48 시간 배양한 결과 약 31%로 그 운동성이 증진되었다. 사출된 정자에서는 단시간 배양이 운동성의 증진에 도움이 되었지만 고환 내 정자에서는 48시간 이상의 장기 배양이 보다 효과적이었다. 이는 고환 내 정자의 경우 부정소에서 일어나는 정자의 성숙과정이 생략되었기 때문에 사출된 정자와 다른 양상을 보여 주는 것으로 여겨지며, 48~72시간의 배양에서 정자의 운동성이 최고에 이르고 10일간의 장기배양에서도 정자의 운동성이 유지된다는 다른 연구자의 결과(21)와도 비슷한 양상을 보여준다.

그리고 고환 내 정자는 고환 내 온도인 32℃에서 배양할 때 보다 37℃에서 배양했을 때 운동성이 좀더 증진되었으나 그 생존율은 약간 감소하였다. 이는 정자가 여성의 생식기관 내에 들어갔을 때 일어나는 capacitation과 hyperactivation과 유사한 영향으로 사료된다. Hyperactivation이 일어난 정자는 침체반응을 유발하고 운동성을 상실한 이후 죽게 된다. 따라서 본 배양조건에서는 난포액을 첨가한 후 24 시간에서 48시간의 배양이 정자의 운동성을 증진하고, 생존율에도 영향을 주지 않는 적절한 조건으로 사료된다. 추후로 기존조건에서 고환 내 정자의 배양과정이 정자의 기능과 수정, 배아 발생, 임신율에 미치는 영향에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다.

참고문헌

- Aitken RJ, Best F, Richardson DW, Schats R and Simm G. 1983. Influence of caffeine on movement characteristics, fertilizing capacity and ability to penetrate cervical mucus of human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 67: 19-27.
- Aitken RJ, Mattei A and Irvine S. 1986. Paradoxical stimulation of human sperm motility by 2-deoxyadenosine. *J. Reprod. Fertil.*, 78: 515-27.
- Asch RH, Simerly C, Ord V and Schattan G. 1995. The stage at which human fertilization arrests: microtubule and chromosome configurations in inseminated oocytes which failed to complete

- fertilization and development in human. *Mol. Hum. Reprod.*, 1: 1897-906.
- Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R, et al. 1999. *In-vitro* culture of spermatozoa induces motility and increases implantation and pregnancy rates after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 14: 2808-11.
- Bedford J. 1999. Epididymal physiology: its implication for epididymal microsurgery. In Schoyman R. editor. *Fondazione per gli studi sulla riproduzione umana*, Palermo, Italy. 71-100.
- Craft I, Tsigotis M and Zhu J. 1995. *In vitro* culture of testicular sperm (letter). *Lancet*, 346: 1438.
- Emiliani S, Van den Bergh M, Vannin A-S, Bira-mane J, Verdoodt M and Englert Y. 2000. Increased spermatozoa motility after *in-vitro* culture of testicular biopsies from obstructive azoospermic patients results in better post-thaw recovery rate. *Hum. Reprod.*, 15:2371-4.
- Goto K, Kinoshita A, Takuma Y and Ogawa K. 1990. Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilized, killed spermatozoa. *Vet. Rec.*, 127:517-20.
- Hu Y, Maxson WS, Hoffman DI, Ory SJ, Licht MR and Eager S. 1999. Clinical application of intracytoplasmic sperm injection using *in vitro* cultured testicular spermatozoa obtained the day before egg retrieval. *Fertil. Steril.*, 72: 666-9.
- Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG and Zaneveld LJ. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.*, 70(1):219-28.
- Kuretake S, Kimura Y, Hoshi K and Yanagimachi R. 1996. Fertilization and development of mouse oocytes injected with isolated sperm heads. *Biol. Reprod.*, 55:789-95.
- Lee DR, Lee JE, Yoon HS and Roh SI. 1997. Induction of acrosome reaction in human spermatozoa accelerates the time of pronucleus formation of hamster oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 67:315-20.
- Liu J, Nagy Z, Joris H, Tournaye H, Smitz J, Camus M, et al. 1995. Analysis of 76 total fertilization failure cycles out of 2732 intracytoplasmic sperm injection cycles. *Hum. Reprod.*, 10:2630-6.
- Liu J, Tsai Y, Katz E, Compton G, Garcia JE and Baramki TA. 1997. Outcome of *in-vitro* culture of fresh and frozen thawed human testicular spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 12:1667-72.
- Makler A, Fisher M, Murillo O, Laufer N, Decherney A and Naftolin F. 1984. Factors affecting sperm motility. IX. Survival of spermatozoa in various biological media and under different gaseous compositions. *Fertil. Steril.*, 41: 428-32.
- Mendoza C and Tesarik J. 1990. Effect of follicular fluid on sperm movement characteristics. *Fertil. Steril.*, 54:1135-9.
- Moohan JM, Winston RML and Lindsay KS. 1993. Variability of human sperm response to immediate and prolonged exposure to pentoxifylline. *Hum. Reprod.*, 8: 1696-700.
- Nagy ZP, Liu J, Joris H, Verheyen G, Tournaye H, Camus M, et al. 1995. The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum. Reprod.*, 10: 1123-9.
- Nagy ZP, Verheyen G, Tournaye H and Van Steirteghem AC. 1998. Special applications of intracytoplasmic sperm injection: the influence of sperm count, motility, morphology, source and sperm antibody on the outcome of ICSI. *Hum. Reprod.*, 13(suppl 1):143-54.
- Palermo G, Joris H, Devroey P and Steirteghem AV. 1992. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte.

- Lancet, 340:17-18.
- Sallam HN, Farrag A, Agameya AF, Ezzeldin F, Eid A and Sallam A. 2001. The use of a modified hypo-osmotic swelling test for the selection of viable ejaculated and testicular immotile spermatozoa in ICSI. *Hum. Reprod.*, 16:272-6.
- Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M, Segal-Bertin G and van de Casseye M. 1993. Successful fertilization by testicular spermatozoa in an invitro fertilization program. *Hum. Reprod.*, 8:1339-40.
- Sohn JO, Shin JS, Jeong CJ, Cho YS, Oum KB, Choi DH, et al. 2002. Effect of pentoxifylline on the ICSI program undergone in severe asthenozoospermia. *Kor. J. Fertil. Steril.*, 29:97-103.
- Soldati G, Piffaretti-Yanez A, Campana A, Marchini M, Luerti M and Balerna M. 1989. Effect of peritoneal fluid on sperm motility and velocity distribution using objective measurements. *Fertil. Steril.*, 52:113-9.
- Steirtegem AV, Nagy Z, Joris H, Lui J, Staessen C, Smits J, et al. 1993. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 8:1061-6.
- Tasdemir I, Tasdemir M, Tavukcuoglu S. 1998. Effect of pentoxifylline on immotile testicular spermatozoa. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 15:90-2.
- Tournaye H, Camus M, Goossens A, Liu J, Nagy P, Silber S, et al. 1995. Recent concepts in the management of infertility because of non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, 10 (suppl 1):115-9.
- Verheyen G, Joris H, Crits K, Nagy Z, Tournaye H and Van Steirteghem A. 1997. Comparison of different hypo-osmotic swelling solutions to select viable immotile spermatozoa for potential use in intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod. Update*, 3:195-203.
- Wakayama T and Yanagimachi R. 1998. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat. Biotechnol.*, 16:639-41.
- Yanagimachi R. 1988. Mammalian fertilization. In Knobil E, Neill JE, Ewing LL, et al, editor. *The Physiology of Reproduction*, Raven Press, New York: 189-317.
- Zhu J, Tsigotis M, Pelekanos M and Craft I. 1996. *In vitro* maturation of human testicular spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 11:231-32.

(접수일: 2004. 1. 15/ 채택일: 2004. 4. 14)