

Rebamipide의 생식기관 내 흡수, 배설 및 항산화제로서 불임치료 효과

부산의료원 비뇨기과¹, 부산대학교 의과대학 비뇨기과학교실²

김종일¹ · 박현준² · 박남철²

Absorption, Excretion and Antioxidative Effect of Rebamipide on Reproductive Organ

Jong Il Kim¹, Hyun Jun Park², Nam Cheol Park²

¹Busan Medical Center, ²Department of Urology, College of Medicine,
Pusan National University, Busan, Korea

Objective: Rebamipide is a propionic acid derivative that has an action of the inhibition of superoxide production and removal of hydroxyl radical with the sperm incubation and cryopreservation. In the present study, to investigate whether rebamipide is useful to treat male infertility and sterility, the author observed the antioxidative effects in patient with male infertility and also examined its absorption and distribution in rat genital organ.

Methods: To measure the distribution of rebamipide in reproductive organ in the rat, carbon indicated rebamipide, ¹⁴C-OPC-12759, was orally administered to 10 Sprague-Dawley rats and its organ concentration in serum, liver, kidney, stomach, duodenum, colon, urinary bladder, seminal vesicle, epididymis and testicle were measured each time after 0.5, 1, 2, 4, 8 and 24 hours by using HPLC fluorescent method. The concentrations in semen were measured by HPLC fluorescent method in a sample of 50 infertile males who took 900 mg of rebamipide daily for 3 months. To measure the antioxidative effect and fertility rate for 3 months, each month before and after the treatment, sperm motility, vitality, the oxygen free radical formation, level of peroxidation, fertilizing capacity of semen sample which were obtained from infertile male patients by masturbation after at least 48 hours abstinence were analyzed by computer assisted semen analyzer, eosin-nigrosin stain, chemiluminescence, thiobarbituric acid method and hypo-osmotic swelling test. Simultaneously in a sample that wanted baby, both pregnancy and delivery were researched.

Results: The ¹⁴C-OPC-12759 concentration in the body of white rats was highest in gastrointestinal organ like stomach, small intestine and duodenum and followed by genital organ like seminal vesicle, testis and epididymis. The rebamipide concentration in semen of infertile males was 220.77±327.84 ng/mL (SD) which showed a large deviation but it was higher than serum which was 126±76 ng/mL (SD). In the infertile males, after the treatment with rebamipide, the level of seminal reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation have significantly decreased in duration of the treatment (p<0.05) and sperm vitality and fertilizing capacity except sperm motility significantly improved on post treatment of 2~3 months (p<0.05). Out of the 41 cases who hoped for pregnancy, 15 cases (36.6%)

became pregnant and 12 cases had childbrith, 2 cases had miscarriage and one case is ongoing. The side effect was observed in 1 case (2%) which experienced diarrhea but it was lost spontaneously.

Conclusions: We conclude from this study that rebamipide showed relatively high tendency of absorption and excretion in the genital organ. In infertile males who had elevated ROS in semen, by specifically inhibiting the cell damage from the antioxidation, a way to preserve sperm motility, vitality and fertilizing capacity was confirmed.

Key Words: Male infertility, Reactive oxygen species, Antioxidant

정자는 사정된 후 수정을 위해 여성의 생식기 내에서 자신의 크기 (60 μm)의 약 3000배의 거리를 이동하여야 하므로 충분한 에너지 생산이 필요하다. 이를 위해 세포질은 농축되고 미토콘드리아는 세포질 밖으로 나와 위치하는 독특한 구조를 가짐으로써 인체 내 다른 세포 보다 쉽게 산소 독성에 노출될 수 있는 구조를 가지고 있다.^{1,2} 임상적으로 정액 내 활성산소 (reactive oxygen species; ROS)가 과다하게 증가되어 있다는 사실은 일반적으로 비정상이거나 미성숙한 정자의 존재를 나타내든지 정로나 요로계 감염으로 사정액 내에 백혈구가 존재함을 의미한다.¹ 최근 난치성 불임 환자에서 보조생식술이 흔히 시행되면서 정자처리나 동결보존과 같은 외부적 자극이나 정자 손상이 유발될 수 있는 조건에 의해서도 활성산소가 생성될 수 있다.² 그럼에도 불구하고 대부분의 정상 세포는 세포 내 혹은 정장액과 같은 체액 내에 존재하는 내인성 항산화제에 의해 활성산소로부터 세포나 정자 손상이 보호되는 생리적인 방어기전을 가진다. 그러나 내인성 항산화제에 의한 세포 고유의 방어기능을 넘을 정도로 활성산소가 과다하게 존재하면 세포막 지질, 단백질과 핵 DNA에 산화적 손상이 발생하여 세포 고유의 기능이 영향을 받거나 병적 반응을 일으키게 된다.¹ 실제로 활성산소는 남성불임 환자 정액의 25~40%, 척수 손상 환자 정액의 90% 이상에서 발견되며, 정자의 운동성, 난자와의 결합능 및 수정능을 감소시킴으로써 불임의 주요 원인 인자로 작용하는 것으로 알려져 있다.²⁻⁶ 따라서 정장액 내 활성산소 유무는 정자 고유의 기능유지나 생존에 상당한 영향을 미치는 인자가 되므로 세계보건기구의 인간 정자검사 지침에서도 불임의 원인을 진단하기 위한 정자 기능검사의 하나로서 정액 내 활성산소의 측정이 권유되고 있다.⁷ 임상학적 측면에서는 정장

액 내 활성산소 증가로 인한 남성불임 환자에서 효과적이고 안전한 경구용 항산화제의 개발 필요성이 대두되고 있다.

Rebamipide는 프로피온산의 일종으로서 현재 *Helicobacter pylori* 감염에 의하여 이차적으로 발생한 활성산소에 의한 위염 및 위궤양의 치료제 (Mucosta®, 한국오츠카, 1994)로 개발되어 이용되고 있는 약물이다.⁸ Rebamipide의 항산화제로서의 작용기전은 이차적으로 NADPH나 NADH의 산화 혹은 환원에 관여하는 효소의 작용을 억제하여 superoxide ($\cdot\text{O}_2$)의 생성을 억제할 뿐만 아니라 (Figure 1), 세포막내 지질량을 저하시키고 중성구의 활성과 접착인자의 발현을 억제하는 간접적인 항산화 작용을 가진다.⁹ 최근 박 등¹⁰은 rebamipide가 hydroxyradical ($\cdot\text{OH}$)을 소거하는 작용과 함께, 정자처리와 동결 해동과정에서 정자에 의해 생성되는 내인성 활성산소의 증가와 배양액이나 동결보존제 내 rebamipide의 첨가에 의한 항산화 효과를 확인한 바 있다.

저자들은 흰쥐에서 rebamipide를 경구 투여 후 조직 흡수율을 측정하여 타 장기에 비하여 생식기관에서 고농도로 분포됨을 관찰하고, 정액 내 활성산소 증가 소견이 확인된 남성불임 환자를 대상으로 rebamipide 투여 후 정액 내 배설농도, 항산화 효과, 정액지표 개선 및 임신율 등을 조사하여 남성불임 환자에서 항불임제로서의 유용성을 항산화 효과와 관련하여 검토하였다.

연구 대상 및 방법

1. 흰쥐에서 rebamipide의 혈장 및 조직농도

1) 실험동물

Rebamipide의 경구 투여 후 체내 분포를 측정하

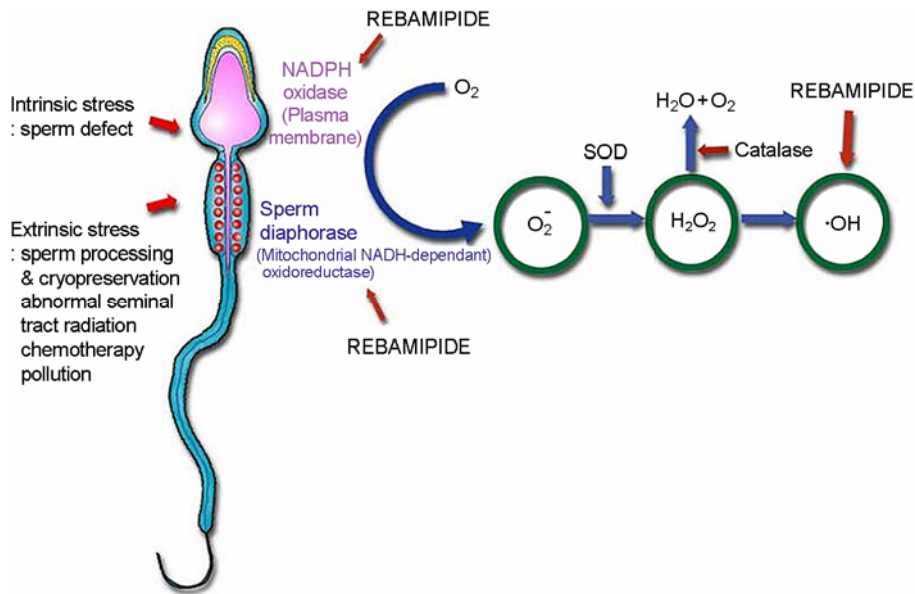


Figure 1. Endogenous ROS formation and direct scavenging effect of rebamipide in sperm cell.

기 위한 실험동물로서 6~7주된 체중 150~300 gm의 수컷 Sprague-Dawley계 흰쥐 (Charles River, Japan)를 이용하였다. 모든 동물은 분양 후 23±2℃, 50±10%의 항온항습 환경 하에서 5~8일간 흰쥐용 고형사료와 물을 자유로이 주면서 예비사육 후 실험에 이용하였다.

2) Rebamipide 농도 측정

흰쥐에서 rebamipide의 혈장 및 조직 내 농도는 Otsuka Pharmaceutical Japan Co. Ltd의 도쿠시마 연구소에서 수행되었다.

(1) 표식화합물

¹⁴C-OPC-12759는 OPC-12759의 1,2-dihydro-2(1H)-quinolinone 골격의 4위 탄소에 ¹⁴C를 표식한 rebamipide로서 Amersham International plc. (United Kingdom)에 합성 의뢰하여 구입하였다. 표식화합물의 비방사능은 46 μCi/mg이며, 방사 화학적 순도는 silica gel plate 60F 254 (Merck Co.)를 이용하여, tetrahydrofuran:물:초산 88:10:2 및 chloroform:ethanol:빙초산 12:5:1의 2중 용매계로 측정하여 96.9% 이상의 순도를 나타내었다.

(2) 흰쥐에서의 rebamipide 투여

¹⁴C-OPC-12759 및 4배량의 비표식 OPC-12759에 0.5% carboxymethylcellulose sodium 용액을 체중 kg

당 4 mL가 되도록 가해, 30초간 초음파 처리하여 균일한 현탁액으로 만들어, 체중 kg당 10 mg/92 μCi/4 mL의 용량으로 빨대를 사용하여 강제로 경구 투여하였다. 이 때 흰쥐는 ¹⁴C-OPC-12759 투여 전 16~18시간 동안 금식시켰으며, 투여 후 4시간부터 다시 먹이를 주었다. 시험기간 중 물은 자유로이 투여하였다.

(3) 혈액 및 조직의 채취

흰쥐에 ¹⁴C-OPC-12759를 경구 투여 후, 0.5, 1, 2, 4, 8 및 24시간에 ether 마취하에 하대정맥에서 5~6 mL 혹은 꼬리정맥으로부터 24 gauge tuberculin 주사기로 1 mL를 채혈한 후, 뇌, 소장, 대장, 간, 신장, 정낭, 부고환 및 고환을 적출하였다.

(4) Internal standard (IS)의 준비

IS로 Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd.에서 제공된 OPC-12823 (Lot No. 00D26Z)를 이용하였다. 표준용액을 만들기 위하여 OPC-12823 10 mg을 HPLC용 methanol (Wako Pure Chemical, Japan)에 용해시켜 100 μg/mL 농도의 용액 100 mL를 만든 다음, methanol로 10배 희석하여 10 μg/mL의 시초용액을 만들었다. 다음은 생리식염수를 100 μL씩 시험관에 분주한 다음, 0.1, 0.4, 1, 2, 4 및 10 μg/mL 농도의 표준용액 10 μL를 가하여 10, 40, 100, 200, 400 및

1000 ng/mL 표준농도의 IS를 준비하였다. 동시에 quality control (QC)을 위해 blank 생리식염수 100 μ L에 0.3, 2 및 8 μ g/mL의 표준용액 10 μ L를 가하여 30, 200 및 800 ng/mL의 저, 중 및 고농도 시료를 각각 2개씩 준비하였다.

(5) 혈장농도 측정

원심분리 후 채취된 혈장 0.5 mL에 10% metaphosphoric acid 0.1 mL와 toluene 3 mL를 첨가한 후 5분간 진탕하고 1800 rpm으로 10분간 원심분리를 하였다. 그 후 pellet를 제거한 다음 IS OPC-12833 0.4 μ g/20 μ L와 50% metaphosphoric acid 0.1 mL와 ethyl acetate 5 mL를 첨가하고 10분간 진탕한 후 다시 1800 rpm으로 10분간 원심분리를 하였다. 원심분리 후 pellet에서 3 mL ethyl acetate를 증발시키고 methanol 1 mL를 첨가하여 5분간 고주파 주사한 다음 fluorophotometer 검출기가 있는 autosampler를 이용하여 HPLC (Alliance system SOP/OME/541, Waters Co. Ltd., U.S.A.)에 20 μ L를 주입하여 측정하였다.

(6) 조직 내 농도 측정

절제된 흰쥐 조직 100 mg에 생리식염수 1 mL를 첨가한 후 조직분쇄기 (Polytron)로 균질화시키고 IS OPC-12833 0.4 μ g/20 μ L와 2N NaOH 0.5 mL와 ethyl acetate 5 mL를 첨가한 후 5분간 진탕시키고 1800 rpm로 5분간 원심분리를 하였다. Pellet을 제거한 후 2N HCl 0.75 mL와 ethyl acetate 5 mL를 첨가한 후 10분간 진탕하고 다시 1800 rpm로 10분간 원심분리를 하였다. 원심분리 후 pellet을 40°C에서 건조시키고 methanol 1 mL를 첨가한 후 5분간 고주파 주사를 하고 1800 rpm로 10분간 원심분리한 다음 fluorophotometer 검출기가 있는 autosampler를 이용하여 HPLC 20 μ L에 주입 측정하였다.

2. 남성불임 환자에서의 rebamipide의 정액 내 농도 및 항산화 효과

1) 실험 대상

2001년 2월부터 2003년 3월까지 정액검사상 감정액증 혹은 약정액증 소견과 정액 내 활성산소의 증가 소견이 확인된 남성불임 환자 50례를 대상으로 하였다. 정액검사상에서 액화 장애, 항정자 항체 양성, 백혈구 및 적혈구가 있는 경우 등 비정상적인 검사

소견을 나타낸 정액은 연구 대상에서 제외하였다.

2) 불임 환자에서의 rebamipide 투여

Otsuka Pharmaceutial Japan Co. Ltd에서 무상공급 받은 rebamipide (Mucosta[®]) 300 mg을 하루 3회 3개월간 경구 투여하였다.

3) 정액 채취

Rebamipide를 처방에 따라 반복 복용하게 한 뒤 2~3일간 금욕 후 내원 당일 아침에 내원하여 비뇨기과 외래 정액 채취실에서 자위행위에 의해 최대량의 정액을 채취하였다. 필요한 경우 성적 흥분을 증대시키기 위해 보조적으로 시청각 자극을 주었다. 채취된 정액은 액화된 뒤 정액검사 및 항산화 관련 지표 검사 후 남은 것은 정액 내 rebamipide 농도 측정 시 까지 -72°C 냉동고에 보존하였다.

4) 정액 내 rebamipide의 농도

정액 내 rebamipide의 농도 측정은 Japan Clinical Laboratories, Inc (Osaka Laboratory, Bioassay, Japan)에 의뢰하였으며 측정 방법은 다음과 같다. IS는 Otsuka Pharmaceutical Co. Ltd.에서 제공된 OPC-12823 (Lot No. 00D26Z)을 이용하여 흰쥐에서 조직 내 rebamipide 측정 시와 동일한 방법으로 만들었다. 동시에 QC를 위해 blank 정액 100 μ L에 0.3, 2 및 8 μ g/mL의 표준용액 10 μ L를 가하여 30, 200 및 800 ng/mL의 저, 중 및 고농도 시료를 각각 2개씩 준비하였다.

정액 내 rebamipide 농도의 측정을 위해 IS 용액, blank 정액, QC용 정액 및 불임 환자의 정액을 시험관에 100 μ L씩 분주하였다. 이때 -72°C에서 동결 보존된 불임 환자의 정액은 실온에서 충분히 해동시킨 다음 시료로 이용했다. 분주된 각각의 시료에 0.5 mol/L sodium hydroxide (Wako Pure Chemical) 0.5 mL를 가하여 진탕기 (vortex mixer)로 강하게 혼합한 다음 toluene (Wako Pure Chemical) 3 mL를 가하여 역시 진탕기로 강하게 혼합한 다음 시험관을 밀봉하고 평형진탕기 (Taitec SR-2s, Japan)에서 5분간 진탕시켰다. 이어서 Desk-top cryo-centrifuge (Kokusen H-103NR, Japan)를 이용하여 2500 rpm에서 5분간 원심분리한 다음 pellet을 제거하였다. 다음 시료 10 μ L당 10 w/v% metaphosphoric acid 용액 (Kanto Chemical, Japan) 1 mL를 가하고 진탕기로 강하게 혼합하여 다시 시험관을 밀봉한 다음 평형진탕기에

서 15분간 진탕시켰다. 시험관은 다시 2500 rpm에서 5분간 원심분리한 다음 다시 pellet을 제거하고 질소가스 하에서 용매를 증발시켰다. 남은 용액에 methanol을 100 μ L 가한 다음 20 μ L씩 나누어 reversed-phase column에 주사한 뒤 형광 HPLC법으로 여기파장 330 nm 방사파장 375 nm에서 측정하였다. 측정 곡선은 10~1000 ng/mL의 범위로 하였고, 100 μ L의 정액 내에서 10 ng/mL를 하한선으로 하였다. 단 측정된 농도가 10 ng/mL 이하인 경우 blank로 표시하였다.

5) 항산화 및 정액지표의 평가

Rebamipide의 항산화 효과에 의한 투여 전후의 활성산소, 지질과산화, 정자의 농도, 운동성, 생존성 및 수정능을 측정하고, 임신률 및 출산률을 조사하였다.

(1) 정액검사

자위행위에 의해 멸균시험관에 채취된 정액을 27°C 실온에서 20~30분 액화 후 1시간 이내에 Makler chamber (Fertility-Tech, U.S.A.)를 이용한 수동 정액검사 혹은 컴퓨터보조정액분석기 (SAIS, Medical Supply Co. Ltd., Korea)를 이용한 자동 정액검사를 시행하였으며, WHO 기준⁷에 따라 양 2 mL, 농도 20×10^6 /mL, 운동성 50%, 형태 30% 이상을 정상으로 판정하였다. 정자 운동성은 운동속도의 분포 (velocity distribution)에 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) Rebamipide의 항산화 효과 평가

불임 환자에서 rebamipide의 항산화 효과를 평가하기 위해 정자에 의한 내인성 활성산소 생성을 측정하고, 정자 운동성, 생존성, 수정능 그리고 세포막 지질과산화 정도를 조사하였다. 정자 생존성은 eosin-nigrosin (E-N)염색, 정자 수정능은 hypo-osmotic swelling (HOS) test, 정장액 내 활성산소는 chemiluminescence법, 세포막 지질과산화는 thiobarbituric acid (TBA)법을 이용하였으며 각각의 검사 방법과 판정 기준은 다음과 같다.

(가) 정자 생존성

20×10^6 /mL의 균질한 농도로 액화 희석된 정액과 E-N염색액을 각각 50 μ L을 1 mL Eppendorf tube에

넣어 진탕기로 수초간 혼합한 다음, 슬라이드에 약 50 μ L를 도포하고 실온에서 하룻밤 건조시켰다. 건조된 슬라이드는 malinol과 xylene 2:1 혼합액을 이용하여 mounting한 다음 검사하였다. 판정은 100배 시야에서 100개의 정자 중 E-N염색액이 흡수 염색이 되어 분홍색으로 보이는 생존성이 없는 정자와 염색액 흡수 없이 흰색으로 보이는 생존 정자수를 세어 각각을 백분율로 구하였다.

(나) Chemiluminescence법

활성산소는 lumiphotometer (TD4000, Laboscience, Japan)를 사용하여 측정하였으며 발광도는 Hepes balanced salt solution/bovine serum albumin buffer (130 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 14 mM fructose, 10 mM Hepes, pH 8.0 and 1 mg/mL BSA)로 두 배로 희석된 정자 500 μ L에 4 mM luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione, Wako Pure Chemical) 25 μ L를 첨가한 후 측정되어 졌다. 최대 발광도는 luminol을 첨가한 후 10분간 관찰하여 측정하였다. 활성산소의 활성도를 나타내는 발광도는 10초간 1000배의 감수성을 가진 아날로그 모드로 측정하였다.

(다) TBA법

세포막 지질과산화에 의한 산생물인 malondialdehyde (MDA) 측정을 위해 항온 배양 혹은 동결보존 후 해동된 정액표본을 각각 2000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층을 제거하고 sperm pellet에 1% phosphoric acid (Kanto Chemicals Co.) 750 μ L, 0.6% TBA (Sigma., U.S.A.) 250 μ L를 첨가한 후 진탕기로 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., Japan) 1 mL을 첨가시킨 후 진탕기로 다시 혼합시키고, 다시 3000 rpm에서 25분간 원심분리 후 상층을 회수하여 diode array spectrophotometer (Hewlett Packard, U.S.A.)를 이용하여 510 nm와 534 nm에서의 흡광도 (nmol/Makler)를 측정하였다.

(라) Hypo-osmotic swelling (HOS) test

정상 정자는 저장성 매체의 영향을 받기 때문에 투과성이 있는 세포막은 세포밖에 있는 수분이 유입되어 세포 팽창이 일어난다. HOS test의 결과는

Table 1. Plasma and tissue distribution of the radioactivity after single oral administration of ¹⁴C-OPC-12759 to rats

Tissue	0.5 hr	2 hr	8 hr	24 hr
Plasma	126 (76)	86 (25)	44 (26)	N.D.
Reproductive organs				
Seminal vesicle	1048 (1385)	135 (132)	12 (21)	N.D.
Testis	855 (1452)	213 (314)	30 (53)	N.D.
Epididymis	24 (12)	138 (75)	35 (17)	N.D.
Gastrointestinal organs				
Gastric mucosa	77470 (44999)	54966 (43152)	186 (169)	28 (31)
Gastric corpus	12741 (5752)	6404 (4777)	245 (239)	5 (9)
Duodenum	11453 (4241)	5054 (4887)	264 (412)	11 (19)
Small intestine	27027 (18178)	25450 (1162)	252 (292)	6 (10)
Large intestine	613 (105)	1882 (2358)	9549 (6699)	96 (167)
Other organs				
Liver	177 (81)	137 (36)	67 (33)	N.D.
Kidney	526 (143)	419 (125)	209 (131)	8 (13)
Urinary bladder	163 (105)	695 (874)	68 (59)	N.D.

N.D.: Not detectable, n=3 (ng/g or ng/mL, mean(S.D))

정자의 생존능 뿐만 아니라 세포막의 안정성 즉 정자의 수정능을 평가하기 위한 지표로서 이용된다. Fructose (분자량 180.16) 150 mM와 sodium citrate H₂O₂ (분자량 294.11) 50 mM가 혼합된 HOS 용액 1 mL를 37°C에서 10분간 방치한 후 액화된 정액 100 µL 넣고 섞은 후 30분간 배양을 한 뒤 방울을 슬라이드에 점적하고 cover glass를 덮은 다음 ×400에서 관찰한 후 전체 정자 수에서 팽창된 정자 수의 비율을 구하여 측정하였다. 전체 정자의 swelling rate는 WHO 기준⁷에 따라 비정상적인 형태 정자의 백분율로서 52% 이상을 정상치로 하였고 보정이 필요한 경우에 g형 팽창 정자의 백분율 30% 이상을 정상치로 참조하였다.

3. 통계 분석

관찰기간 동안의 활성산소 농도, 세포 지질과산화, 정자 운동성, 정자 생존성과 HOS의 변화 양상을 분석하기 위하여 랜덤화 블록 계획 자료의 분산 분석 (ANOVA for randomized blocks)을 이용하였으

Table 2. Underlying causes in 50 male infertile patients

Underlying cause	No. cases (%)
Varicocele	21 (47.7)
Post-vasectomy reversal	8 (18.2)
Immunologic	1 (2.3)
Hypogonadism	1 (2.3)
Testicular trauma	1 (2.3)
Cryptorchidism	1 (2.3)
Spinal arteriovenous malformation	1 (2.3)
Idiopathic	10 (22.7)

며 치료 전과 치료 후 1개월, 2개월 및 3개월에서의 반응을 각각 비교하기 위하여 Dunnett 검정을 하였다. 조사된 모든 결과는 평균±표준 편차로 표시하였으며 p-value가 0.05 미만을 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 흰쥐의 혈장 및 조직 내 ^{14}C -OPC-12759의 농도

^{14}C -OPC-12759 강제 복용 30분 후 정낭과 고환 내 농도는 각각 1048 및 855 ng/g tissue로 최대로

증가된 뒤 서서히 감소하여 24시간 후에는 검출되지 않았다. 그러나 부고환 내 농도는 정낭이나 고환보다 1/7~1/8 수준으로 낮았지만, 강제 복용 2시간에 혈장농도 보다 높은 최고치에 도달한 뒤 정낭이나 고환과 같이 24시간 후에는 검출되지 않았다. 정낭, 고환 및 부고환 내 농도는 복용 후 혈장, 간, 신장, 대장 및 방광 조직 내 농도보다 높았지만 위

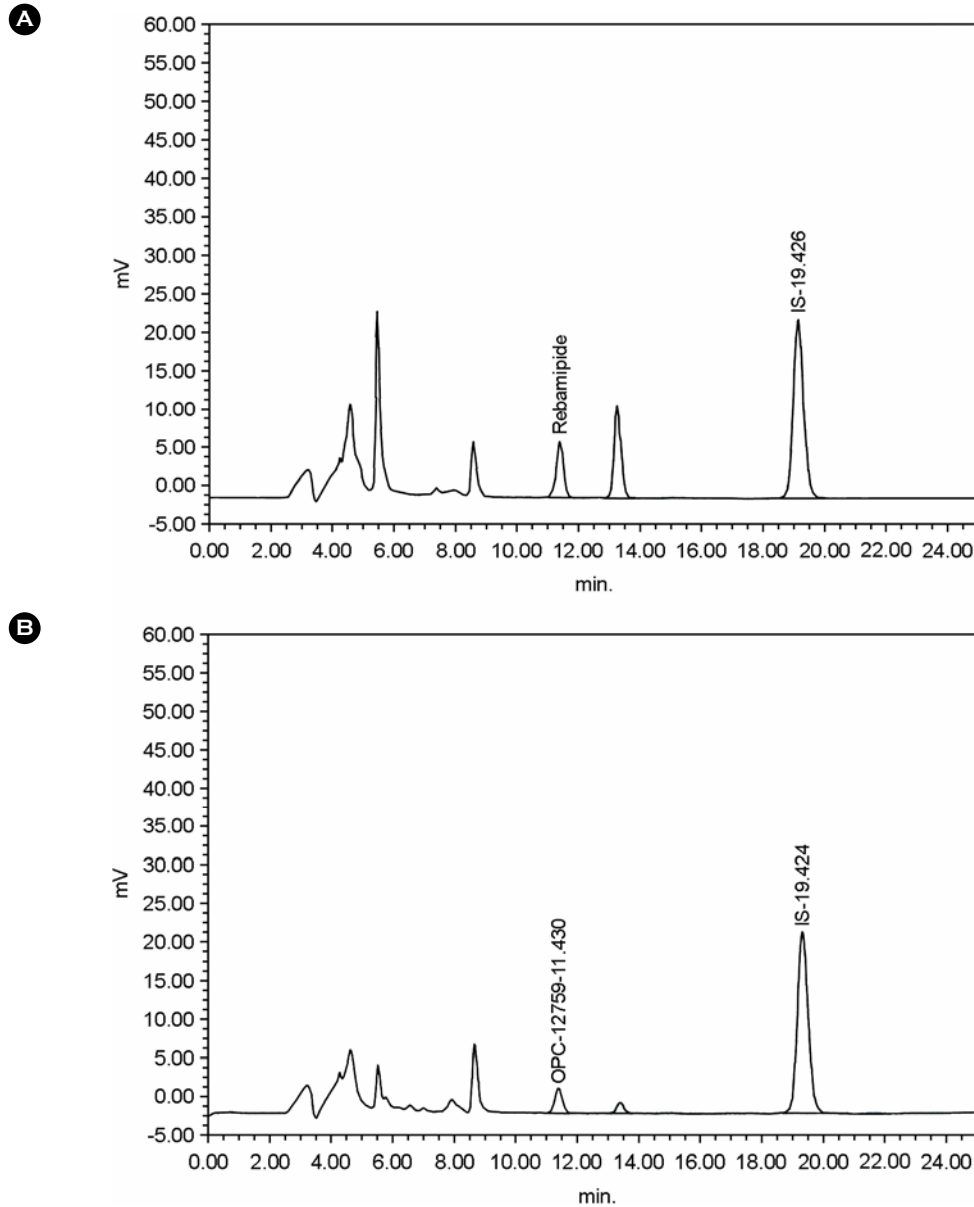


Figure 2. Chromatograms from semen of patients with male infertility. **A.** 142.9 ng/mL of rebamipide concentration in case No. 1, **B.** 64.0 ng/mL of rebamipide concentration in case No. 2.

나 십이지장 등의 상부위장장관 보다는 낮았으며, 복용 후 8시간 이내에 생식기관 내로의 비교적 높은 조직 흡수율이 확인되었다 (Table 1).

2. 불임남성에서의 정액 내 농도 및 항산화 효과

1) 불임군의 임상적 특성

불임군 50례의 연령은 평균 34.2세 (20~53세), 불임기간은 평균 48.5개월 (1~192개월)이었다. 불임의 원인은 정계정맥류가 25례 (50%)로 가장 많았고, 정관복원술 9례 (18%), 특발성 8례 (16%), 면역성 3례 (6%), 만성부고환염 2례 (4%), 잠복고환 2례 (4%), 그리고 척수동정맥기형 1례 (2%) 순이었다 (Table 2).

2) 정액 내 rebamipide 농도

Millennium 32J software (Waters Co. Ltd., U.S.A.)를 이용한 IS 용액에 대한 측정 곡선의 상관오차는 -10.3%~3.9%, 상관계수는 0.997820 및 0.998912로 측정 곡선은 신뢰구간 내에 있었고, IS 용액에 대한

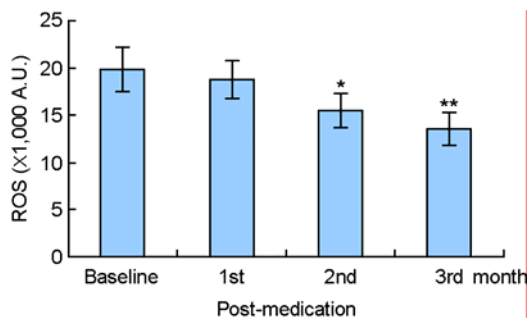


Figure 3. Effect of rebamipide on ROS level in male infertile patients. *, p<0.05, **, p<0.05 vs baseline.

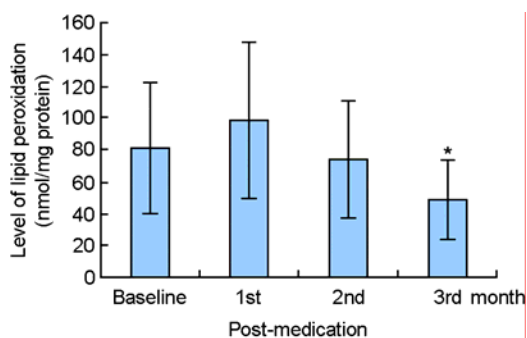


Figure 4. Effect of rebamipide on lipid peroxidation level in male infertile patients. *, p<0.05 vs baseline.

측정 결과의 정확도는 각각 91.0% 및 105.3%였다.

불임 환자의 정액 내 rebamipide 농도는 220.77 ± 327.84 (SD)였으며, 10 ng/mL 이하의 blank 수준 13례를 포함하여 30 이하, 31~200, 201~800 및 800 ng/mL 이상이 각각 16 (32%), 20 (40%), 11 (22%) 및 3례 (6%)였다 (Figure 2A, B).

3) 정액 및 항산화 지표의 변화

(1) 활성산소의 농도

정액 내 활성산소는 치료 전, 치료 후 1, 2 및 3개월에 각각 $19.9 \pm 7.9 \times 10^3$, $18.6 \pm 8.9 \times 10^3$, $15.5 \pm 7.6 \times 10^3$ 및 $13.6 \pm 6.1 \times 10^3$ A.U.로 치료기간에 비례하여 감소하였으며, 치료 후 2, 3개월에 통계학적으로 유의하게 낮은 소견을 나타내었다 (p<0.05, p<0.01, Figure 3).

(2) 세포막 지질과산화

지질과산화는 치료 전, 치료 후 1, 2 및 3개월에 각각 81.4 ± 53.2 , 98.0 ± 53.2 , 74.0 ± 46.4 및 48.6 ± 26.8 nmol/mg protein으로 치료 후 3개월에서 유의하게 낮은 소견을 나타내었다 (p<0.05, Figure 4).

(3) 정자 운동성

정자 운동성은 치료 전, 치료 후 1, 2 및 3개월에 각각 14.4 ± 16.6 , 14.1 ± 17.4 , 15.6 ± 15.2 및 20.3 ± 26.8 %로 정자 운동성은 치료 후 2개월 이후에 개선되었지만 유의성은 없었다.

(4) 정자 생존성

정자 생존성은 치료 전, 치료 후 1, 2 및 3개월에 생존 정자의 비가 58.9 ± 22.8 , 64.3 ± 21.9 , 68.3 ± 18.0

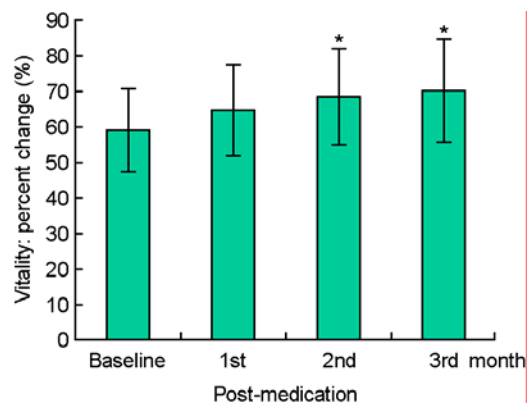


Figure 5. Effect of rebamipide on sperm vitality in male infertile patients. *, p<0.05 vs baseline.

및 $70.2 \pm 14.8\%$ 로 치료기간에 비례하여 증가되었으며, 특히, 치료 후 2 및 3개월에 통계학적으로 유의한 개선을 나타내었다 ($p < 0.05$) (Figure 5).

(5) HOS test

수정능의 보존을 나타내는 팽창된 정자의 비는 치료 전, 치료 후 1, 2 및 3개월에 각각 21.6 ± 10.3 , 22.9 ± 8.4 , 24.4 ± 8.6 및 $27.8 \pm 10.0\%$ 로 치료 1, 2개월에는 치료 전에 비하여 유의한 차이가 없었으나, 치료 3개월 후에는 증가되는 소견을 나타내었다 ($p < 0.05$). 치료 전부터 치료 후 3개월까지의 관찰기간을 통하여 HOS는 통계학적으로 유의하게 증가하는 양상을 보였다 ($p < 0.05$). 그러나 치료 전과 비교하였을 때 통계학적으로 유의한 차이를 보인 시점은 없었다.

4) 임신 및 분만

전체 50례 중 가임을 위한 환자는 41례 (82%)였으며 나머지 9례에서는 미혼 (44.4%)과 노령 (55.6%) 등으로 인해 가임을 원하지 않았다. 관찰기간 2~25개월 (평균 13.8개월) 중 가임을 위한 41례 중 15례 (36.6%)에서 임신되었다. 이 중 12례 (80%)는 만삭에 분만하였으며, 2례 (13.3%)는 각각 2 및 24주에 유산하였고, 1례 (6.9%)는 36주의 임신진행 중에 있다. 임신 방법으로는 자연임신과 체외수정이 각각 11례 (73.3%) 및 4례 (26.7%)였다.

5) 부작용

Rebamipide 복용에 의한 약물 부작용은 단지 1례에서 경도의 설사가 발생하였으나 특별한 치료 없이 증상이 자연 소실되었다.

고 찰

인체는 에너지를 얻기 위하여 많은 양의 산소를 소비하면서 그 일부는 독성이 강한 활성산소로 변환되어 생명기구를 위협하기도 하지만, 백혈구의 살균작용이나 항암작용처럼 활성산소를 생리적 대사기구에 흡수하여 그 자신의 적응생존 능력을 크게 강화시키기도 한다. 활성산소는 산소의 대사물로서 과산화 음이온, 과산화수소, 수화기, 과산화수화기 및 아질소기 등의 다양한 산화물들이 있다.¹¹ 따라서 필요한 경우 활성산소를 생산하여야 하지만, 필요하지 않는 부위에서는 활성산소를 제거하고 무

독화하는 구획억제 기구가 생명유지에 불가결하다. 실제 인체에 해를 줄 정도의 내인성 활성산소는 체내에 존재하는 정상적인 활성산소 제거기능이나 항산화 작용에 의해 대부분이 소거된다. 그러나 세포 기능 장애로 유발되는 각종 질환에서 이러한 항산화 방어기능을 능가하는 속도나 양으로 활성산소가 발생하면 암을 포함한 다양한 질병이나 노화와 같은 중대한 병태를 유발할 수 있다.¹²

활성산소에 대한 연구는 약 1세기 전부터 시작되었으나 남성불임 분야에서 역할이 주목되기 시작된 것은 최근 10여 년 전부터이다. Iwasaki와 Gagnon³은 불임남성의 40%에서 정액 내에 활성산소를 검출할 수 있었다고 하였고, Park 등⁴은 정장액내 활성산소가 불임남성에서 가임능을 가진 정상남성에 비해 약 60% 정도 증가되어 있다고 하였다. Agarwal 등²은 불임남성에서 채취된 25% 이상의 정액 내에 활성산소가 정상보다 훨씬 높았으며, 특히 감정자증 환자의 사정액이 정상 수정능을 가진 환자 보다 높은 농도의 활성산소를 포함하고 있다고 하였다. Mazzili 등¹³도 불임남성의 정장액에서 활성산소가 87%, 정상남성에서는 55%로 유의한 차이가 난다고 보고하였다. 나이가 정계정맥류나 척수 손상 환자에서 채취된 정자는 세척 후에도 활성산소의 생성이 계속되며 활성산소의 양은 운동성을 가진 정자의 비와 반비례하는 것으로 보고된 바 있다.¹¹ 따라서 불임남성에서 활성산소는 정상인에 비해서 높게 나타나며, 이것은 일차적으로 감정자증, 약정자증, 기형정자증 나이가 정자의 수정능 저하와도 관련이 있다. 정자는 특히 산화성 손상에 민감하여 호기성 환경에서 동결보존 시 급격히 변화된 온도나 동결보존제 내의 화학 성분에 의한 자극에 의하여 정자에서 활성산소가 직접 발생되거나 정액 내의 소량 존재하는 백혈구로부터 생성되고, 활성산소에 의한 세포막 인지질의 파괴로 생성된 지방산 과산화물은 직접적으로 정자기능에 장애를 초래하거나 수정률을 떨어뜨리기도 한다.¹⁴⁻¹⁷ 그 외에도 정자 세척이나 분리와 같은 보조생식술 시술시에도 결손 정자나 소량 존재하는 백혈구에서 생성된 활성산소에 의해 정상 정자의 산화적 손상을 방지하는 것이 중요하다. 때로는 운동성이 좋은 정자의 분리 목적으로 정장액을 제거할 경우에도 정장액 내에 포함되

어 있는 transferrin, ceruloplasmin, albumin, haptoglobin 및 vitamin E와 같은 항산화제들이 제거되어 정자는 활성산소에 의한 산화적 손상에 노출될 수 있다. 이와 같이 사정액 내에 존재하는 높은 수준의 활성산소는 정자의 운동성, 난자와의 결합능 및 수정능을 감소시키지만, 반대로 활성산소의 적절한 생성은 정자고유의 생리적 기능인 hyperactivation, capacitation과 acrosomal reaction을 유발하는 데 필요한 것으로 알려져 있다.¹⁷ 불임에 미치는 활성산소의 역할은 최근 문제시 되고 있는 대기오염, 오존층 파괴, 산성비, 그리고 환경호르몬 등과도 직간접적으로 관련이 있으므로 불임의 병태생리학적 근거로서 많은 관심이 집중되고 있는 실정이다.
14,15,18-20

정상적인 생리 조건에서는 활성산소가 새롭게 생성되지 않거나 정장액 내에도 처음부터 활성산소가 거의 포함되어 있지 않다. 따라서 정상 지원자뿐만 아니라 무정자증 환자의 정액 내에도 활성산소는 측정되지 않는다. 박 등¹⁰은 정상인에서 채취한 정액에 ferrous sulfate와 sodium ascorbate를 첨가하여 실험적으로 Fenton 반응을 유발하거나 동결과 해동 과정을 통하여 손상된 정자로부터 활성산소가 생성되고 이차적으로 세포막 지질이 과산화되는 현상을 확인하였다. 반면 미성숙 혹은 손상된 정자와 같이 형태학적 이상이나 정자 자체의 내부적 결함이 있거나 정로이상, 방사선조사, 항암요법 및 오염 등의 외부적 자극은 정자로부터 활성산소를 생성되게 한다.^{4,16,17,21,22} 그러나 정자 혹은 정로에 위치한 여러 생식기관에서 만들어져 분비되는 내인성 활성산소가 정상 정자나 정액 내에서 이미 존재하거나 새롭게 만들어진 항산화제에 의해 소거됨으로써 정자의 산화적 손상이 방지되는 고유의 생리적 현상이 나타난다.

정장액 내 산화적 손상이 진단되면, 치료계획은 정액 내 활성산소 생성을 촉진시키는 원인을 찾아 제거하는 데 초점을 맞추어야 한다. 산화적 손상이 불임의 원인인 경우, 활성산소가 정자에서 생성되는지, 백혈구에서 생성되는지의 차이가 치료 방법에 의미 있는 영향을 미칠 수 있다. 정장액 내 비정상적인 백혈구 침윤인 백혈구정액증의 원인 인자로는 염증, 감염, 흡연 등이 있으며, 원인을 찾아서

적절히 치료해야 한다. 밀도차 및 swim-up법과 같은 보조생식술을 위한 정자처리기술은 임신을 위해 양질의 정자를 분리하는 데 사용할 수 있다. 이러한 기술에서 일상적으로 시행하는 반복적인 원심분리는 정자에 의한 활성산소 생성을 유발할 수 있다. 정장액의 제거로 인한 항산화적 보호의 결핍에 동반된 활성산소의 증가는 산화적 손상의 위험에 정자를 노출시킨다. 원심분리시간을 단축시킨 정자처리기술은 정자에 대한 산화적 손상의 위험을 감소시킬 수 있다.²³

이상과 같이 활성산소 생성을 억제 혹은 제거하는 방법 외에도 항산화제와 같은 활성산소에 대한 방어약제가 남성불임의 치료약물로 유용할 것으로 예측되어 왔다.²³ 남성불임에서 항산화제의 임상적 유용성과 관련된 연구로는 Suleiman 등²⁴은 정자 운동성이 15% 이상인 환자에서 6개월간의 비타민 E 보충요법으로 정자 운동성이 개선되었다고 하였으며, Kodama 등²⁵은 비타민 E와 C를 2개월간 경구적으로 복용하는 복합요법도 정자농도를 향상시킨다고 하였다. 그러나 Comhaire 등²⁶은 불임남성에 대한 비타민 A와 E 및 필수지방산의 복합투여 후 감정자증 남성에서 정자농도가 향상되었지만 정자 운동성과 형태는 변화가 없었다고 하였다. Lenzi 등²⁷은 glutathione을 2개월간 근주한 후 정자농도 및 정자형태가 향상되었다고 하였으며, Baker 등²⁸은 glutathione, hypotaurine 및 catalase가 백혈구에서 생성된 활성산소에 의해 야기된 정자 운동성 감소를 줄일 수 있다고 하였다. Glutathione은 단독 또는 hypotaurine과 투여 시에 지질과산화의 최종산물로 세포에 유독한 aldehyde와 결합하여 막지질의 산화성 손상을 방지하며 다양한 활성산소를 억제할 수 있는 것으로 알려져 있다.¹¹ 다른 연구에서는 superoxide dismutase 보충요법이 정자 운동성 보존 및 정자 침단부 반응의 증가와 연관된다고 하였으나,¹ 일부 연구에서는 비타민 C 혹은 E 치료 후 정자지표에 변화가 없었다고 하였다.²⁹⁻³¹ 이상과 같이 남성불임 환자에서 이들 항산화제의 효과와 안전성을 단기적으로 관찰한 연구가 대부분이며, 장기적인 연구 결과는 거의 없다. 이들 항산화제는 단독 또는 복합적으로 작용하며 여러 중합 반응을 거쳐서 생체에서 항산화물질의 재생도 일으킨다.³² 실제 체내

로 투여된 항산화제의 작용기전은 생성된 활성산소를 직접 항산화제가 결합하여 처리하는 예방, 이미 활성산소에 의해 발생된 병적과정을 억제하는 방해, 세포를 재생시키는 재생 과정으로 규정할 수 있으며 정자에서는 앞의 두 과정만 해당이 된다.

항산화제는 체외 투여로도 정액 내 활성산소를 소거하는데 도움이 된다. 보조생식술을 위한 정자처리 과정 동안, 정장액이 세척된 정자는 항산화방어의 결핍으로 산화성 손상에 취약하게 된다. 항산화제로 정자처리 배지를 보충하는 것이 정자의 산화적 손상에 대한 어느 정도의 방어를 제공할 수 있다고 하였다.³³ 이러한 기초 하에 항산화제 역할에 대한 몇몇 실험실 연구가 있었다. 비타민 E는 실험실 환경에서 정자의 지질과산화물을 저해하는 것으로 나타났고, 투명대가 제거된 햄스터의 난자에 정자의 결합력을 증강시켰을 뿐만 아니라, 투명대에 대한 부착력 또한 향상시켰다. 비타민 C와 E의 복합 정자처리 배지 보충요법은 정자의 활성산소 생성 감소와 연관성이 있다.³⁴ Lewis 등³⁵은 특히 ascorbate치가 저하된 무력정자증 환자의 정자처리 시 ascorbate와 같은 저분자 항산화제를 추가하는 것을 권유하였다. 이들은 정낭기능의 결함이 이 같은 환자에서 ascorbate 수치를 감소시키는 원인 중 하나일 수 있기 때문에 이러한 항산화제를 경구 투여하는 것 보다는 정자에 직접 첨가하는 것이 임상적으로 훨씬 효과적일 것이라고 하였다. Twigg 등³⁶은 지질과산화에 매개된 정자 원형질막 및 DNA 손상을 중화시키는 데 알부민도 중요한 역할을 한다고 하였다. 비타민 E는 철이온에 의한 자유라디칼의 연속 반응을 억제하는 효과 (chain breaking effect)를 지니고 있어 체외수정을 위한 배지에 많이 첨가되며 경구복용으로 정액지표의 호전을 보이는 것으로 나타났다.³⁷ 비타민 C는 정자에 대해 가장 파괴적인 활성산소인 H₂O₂를 억제 또는 환원하며 비타민 C와 정상 정자의 비율 간에 상관관계가 있는 것으로 나타나 항산화제로서의 역할이 있는 것으로 추측된다. 또한 산화된 alpha tocopherol을 환원시켜 다시 활성을 갖게 하는 역할을 한다.¹¹ Percoll을 이용한 밀도차분리 동안 정자처리 배지에 비타민 E 혹은 C를 첨가하면, 정자는 DNA 손상으로부터 보호된다. 그러나 두 종류의 비타민을 함께 사용한

경우에는 DNA 손상이 오히려 증가되었다고 하였다.³³

이상과 같이 정액 내 활성산소를 소거하기 위한 다양한 항산화제의 효과가 실험적으로 확인되어 왔지만^{20,23,38,39} 실제 임상적 유용성은 제한되어 있는 실정이다. 항산화제 중에서도 superoxide dismutase, glutathione peroxidase 및 catalase 등의 효소계 항산화제는 활성산소 발생의 화학적 단계별로 작용하는 특이성은 있지만 상업적인 효용성이 떨어지며, 요산, 비타민 A, B, C, D 및 E, tocopherol 등의 비효소계 항산화제는 약물이나 건강보조식품으로 널리 이용되고 있지만 작용기전이 비특이적인 단점이 있다.

본 연구에 이용된 rebamipide는 분자식 C₁₉H₁₅-ClN₂O₄, 분자량 370.79, 용해점 288~294℃의 (±)-20(4-chlorobenzoylamino)-3-[2(1H)-quinolinon-4-yl]기를 가진 프로피온산 화합물로서 흰쥐에서 rebamipide의 방사능 표식화합물인 ¹⁴C-OPC-12759의 농도가 이미 위나 십이지장 등의 상부위장장관의 조직에서 높은 것으로 밝혀 진 바 있다.⁸ 본 연구에서도 흰쥐에서 ¹⁴C-OPC-12759 농도가 정낭과 고환조직에서 강제 복용 후 30분에 각각 1048 및 855 ng/g tissue, 부고환조직에서는 좀 늦은 강제 복용 2시간 후에 138 ng/g tissue로 최고로 증가하였으며, 이는 혈장 최고 농도인 126 ng/g tissue 보다 높은 소견을 나타내었다. 이는 rebamipide가 정낭, 고환 및 부고환 등의 생식기관에서의 조직 친화력이나 흡수율이 높은 것을 의미한다. 실제 50례의 rebamipide를 복용한 불임 환자의 정액에서 측정된 rebamipide 농도가 다소 편차가 크지만 평균 220.77 ng/mL의 비교적 높은 농도로 배설되는 소견이 이를 뒷받침한다.

불임남성에서는 정자 두부의 원형질막에 존재하는 NADPH-oxidase와 정자 중간부 미토콘드리아에 존재하는 NADH 의존성 산화환원효소인 spermiaphorase가 활성화되어 호기성 대사인 O₂로부터 ·O₂가 생성되고 이어서 superoxide dismutase와 catalase에 의해 각각 H₂O₂와 ·OH이 생성된다. 정자를 포함한 인체 세포에서 생성되는 활성산소 중 중요한 세 가지는 ·O₂, H₂O₂ 및 ·OH로서 이 중 ·O₂는 미토콘드리아 내에서의 자동 산화과정 외에도 xanthine oxidase, cytochrome P-450, 기타의 oxidase와 같은

β -cytochrome enzyme에 의한 효소화 반응에 의해 생성된다.^{38,40} 본 연구에서 남성불임 환자에 rebamipide를 장기 투여 시 정액 내 활성산소의 농도가 현저히 감소되었다. 이는 rebamipide 고유의 작용인 정자 내에 존재하는 NADPH-oxidase나 spermi-diaphorase를 비활성화 시켜 정자 세포 내에 존재하는 가장 강한 항산화제인 NADPH의 양을 급격히 감소시키고 $\cdot O_2$ 의 생산을 억제하거나 $\cdot OH$ 를 소거하는 작용에 의한 것으로 추정되지만 이에 대하여서는 좀 더 연구되어야 할 것으로 생각된다.

박 등¹⁰은 rebamipide의 작용에 의해 화학적 자극이나 동결 해동과정에서 활성산소의 생성과 세포막 지질과산화는 억제되고 동시에 정자의 운동성과 수정능이 유의하게 보존되는 결과에 따라 정자의 산화성 손상이 동반된 남성불임에서 rebamipide가 치료목적으로 이용될 가능성을 제시하였다. 본 연구에서도 rebamipide 투여 후 정액 내 활성산소 및 지질과산화는 치료기간에 비례하여 유의하게 감소되었고 정자 생존성 및 수정능은 치료 2 혹은 3개월 후에 유의하게 개선되어 정자의 산화성 손상이 동반된 남성불임 환자에서 항산화 작용에 의한 rebamipide의 불임치료 효과가 확인되었다.

이상의 성적으로 rebamipide는 생식기관 내 비교적 높은 흡수 배설률 뿐만 아니라 산화성 손상이 동반된 남성불임 환자에서 정액 내 활성산소의 발생과 세포막 손상을 특이적으로 억제하여 세포 손상을 줄이고 정자의 생존능과 수정능 등의 고유기능을 보존하는 작용을 확인하였다.

참 고 문 헌

1. Griveau JF, Le Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl* 1997; 20: 61-9.
2. Agarwal A, Ikemoto I, Loughlin KR. Relationship of sperm parameters with levels of reactive oxygen species in semen specimens. *J Urol* 1994; 152: 107-10.
3. Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa infertile patients. *Fertil Steril* 1992; 57: 409-16.
4. 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.
5. de Lamirande E, Leduc BE, Iwasaki A, Hassouna M, Gagnon C. Increased reactive oxygen species formation in semen of patients with spinal cord injury. *Fertil Steril* 1995; 63: 637-42.
6. Saleh RA, Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl* 2002; 6: 737-52.
7. World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. Cambridge, UK, Cambridge University Press, 1994.
8. (주)한국오츠카제약. Mucosta[®] 신약신청자료집. 서울: 한국오츠카제약출판부; 1994.
9. Arakawa T, Kobayashi K, Yoshikawa T, Tarnawski A. Rebamipide: overview of its mechanism of action and efficacy in mucosal protection and ulcer healing. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 5-13.
10. 박남철, 심상보, 엄박천, 차창석, 하홍구. Rebamipide의 사람 정액 내 항산화 효과. *대한비뇨회지* 2002; 43: 332-8.
11. Agarwal A, Sharma RK. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 1996; 48: 835-50.
12. Borg DC. Oxygen free radicals and tissue injury. In: Tarr M, Samson F, editors. *Oxygen free radicals in tissue damage*. Boston: Birkhauser; 1993; 12-53.
13. Mazzilli F, Rossi T, Marchesini M, Ronconi C, Dondero F. Superoxide anion in human semen related to seminal parameters and clinical aspects. *Fertil Steril* 1994; 62: 862-8.
14. Buch JP, Kolon TF, Maulik N, Kreutzer DL, Das DK. Cytokines stimulate lipid membrane peroxidation of human sperm. *Fertil Steril* 1994; 62: 186-8.
15. Critser JK, Huse-Benda AR, Aaker DV, Arneson BW, Ball GD. Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of cryoprotectants on motility.

- Fertil Steril 1988; 50: 314-20.
16. Jones R, Mann T, Sherins R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* 1979; 31: 531-7.
 17. Check ML, Check JH, Long R. Detrimental effects on cryopreservation on the structural and functional integrity of the sperm membrane. *Arch Androl* 1991; 27: 155-60.
 18. Holland MK, Alvarez JG, Storey BT. Production of superoxide and activity of superoxide dismutase in rabbit epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 1982; 27: 1109-18.
 19. Aitken RJ, West KM. Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leukocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *Int J Androl* 1990; 13: 433-51.
 20. Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl* 1988; 9: 367-76.
 21. Rao B, Soufir JC, Martin M, David G. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to mid-piece abnormalities and motility. *Gamate Res* 1989; 24: 127-34.
 22. Plante M, de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. *Fertil Steril* 1994; 62: 387-93.
 23. Agarwal A, Saleh RA. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urol Clin North Am* 2002; 29: 817-27.
 24. Suleiman SA, Ali ME, Zaki ZM, el-Malik EM, Nasr MA. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *J Androl* 1996; 17: 530-7.
 25. Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril* 1997; 68: 519-24.
 26. Comhaire FH, Christophe AB, Zalata AA, Dhooge WS, Mahmoud AM, Depuydt CE. The effects of combined conventional treatment, oral antioxidants and essential fatty acids on sperm biology in subfertile men. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2000; 63: 159-65.
 27. Lenzi A, Culasso F, Gandini L, Lombardo F, Dondero F. Placebo-controlled, double-blind, cross-over trial of glutathione therapy in male infertility. *Hum Reprod* 1993; 8: 1657-62.
 28. Baker HW, Brindle J, Irvine DS, Aitken RJ. Protective effect of antioxidants on the impairment of sperm motility by activated polymorphonuclear leukocytes. *Fertil Steril* 1996; 65: 411-9.
 29. Abel BJ, Carswell G, Elton R, Hargreave TB, Kyle K, Orr S, et al. Randomised trial of clomiphene citrate treatment and vitamin C for male infertility. *Br J Urol* 1982; 54: 780-4.
 30. Geva E, Bartoov B, Zabludovsky N, Lessing JB, Lerner-Geva L, Amit A. The effect of antioxidant treatment on human spermatozoa and fertilization rate in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1996; 66: 430-4.
 31. Moilanen J, Hovatta O. Excretion of alpha-tocopherol into human seminal plasma after oral administration. *Andrologia* 1995; 27: 133-6.
 32. Freisleben HJ, Packer L. Free-radical scavenging activities, interactions and recycling of antioxidants. *Biochem Soc Trans* 1993; 21: 325-30.
 33. Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. *Hum Reprod* 1998; 13: 1240-7.
 34. Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. *Fertil Steril* 1999; 72: 484-95.
 35. Lewis SE, Sterling ES, Young IS, Thompson W. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 1997; 68: 519-24.

- Steril 1997; 67: 142-7.
36. Twigg J, Irvine DS, Houston P, Fulton N, Michael L, Aitken RJ. Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 439-45.
 37. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 1989; 41: 183-97.
 38. Alton M. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Res* 1994; 54: 1969-75.
 39. 이영진, 박남철. 정자의 동결 및 해동 시 항산화제의 회복률 개선 효과. *대한비뇨학회지* 1999; 40: 917-33.
 40. de Lamirande E, Gagnon C. Human sperm hyperactivation in whole semen and its association with low superoxide scavenging capacity in seminal plasma. *Fertil Steril* 1993; 59: 1291-5.
-