

개 정자의 보존방법에 따른 침체 및 생존성의 변화

II. 동결보존에 따른 효과

정정란 · 유재규 · 양성열 · 여현진 · 박종식 · 예은하 · 노규진[†] · 최상용
경상대학교 수의과대학, 동물의학연구소

Acrosomal Changes and Survival of Following Preservation of Dog Spermatozoa

II. Effect of Different Freezing Ramp Rates

J. R. Cheong, J. G. Yoo, S. R. Yang, H. J. Yeo, J. S. Bhak, E. H. Yea,
G. J. Rho[†] and S. Y. Choe

Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

SUMMARY

The aim of this study was to identify the method on extended canine semen exposed to freezing as assessed by motility, survival and acrosomal changes following different freezing ramp rates. Five ejaculates collected by digital manipulation twice weekly from three dogs (Shih-Tzu) were added Tris-Egg Yolk (TE) buffer and divided into 4 aliquots according to formulation of our laboratory. After cooling to 4°C by ramp rate of 0.6°C/min, the samples frozen by ramp rates of 1.6°C/min to -25°C, 3°C/min to -35°C, 8.9°C/min to -70°C and 19°C/min to -110°C, respectively, and then stored in LN₂ for 2 days. Each sample was evaluated on their motility, survivability and acrosome integrity at different thawing temperature.

The ramp rate of 3°C/min to -35°C/h for freezing and thawing temperature of 37°C obtained the highest results to improve survivability, motile spermatozoa and intact acrosome appearance than other conditions. In conclusion, we may suggest freezing semen for canine artificial insemination is more efficient with freezing at a ramp rate of -3°C/min to -35°C and thawing with a water bath adjusted to 37°C.

(Key words: survivability, acrosome, freezing rate, cryopreservation, sperm, dog)

서론

개의 동결정액을 이용한 인공수정은 신선정액과 저온보존정액에 비해 수태율이 낮기 때문에 동결정액을 이용한 인공수정은 극히 제한적으로 이용되어 왔다. 최근 개 정자 동결에 관한 많은 연구가 진행됨에 따라 북미, 유럽 등지의 국가에서는

개 인공수정이 산업화 되어가고 있으나, 아직까지도 개 정자동결보존에 대한 더 많은 연구가 요구되고 있다. 개 동결정액의 수태율에 영향을 미치는 요인으로는 희석액의 종류, 희석농도, 동결보호제의 종류, 동결보호제의 평형시간, 정자 냉각 속도 (cooling rate), 동결속도 (freezing rate), 동결 후 용해온도 등이 수태율에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다 (Martin, 1963; Foote, 1964; Rathore 등.

[†]Correspondence : jinrho@nongae.gsnu.ac.kr

1966).

1936년 Watson이 저온충격 (cold shock)은 정자의 생존성에 가장 많은 영향을 미친다고 보고한 이래 정자를 단계적으로 cooling시키거나 희석액에 지방성분을 첨가시키는 방법 (Milovano, 1951)을 이용하여 저온 보존 시 cold shock을 완화하고자 하였다.

1985년에 Mazur는 다양한 발달단계의 정자세포를 동결보존 때는 제일 중요한 것이 동결속도라고 보고하였다. 개 정액의 일반적인 동결보존 방법으로는 solid carbon dioxide (dry ice) block위에 정자의 pellet을 놓아두는 급속동결방법 (Seager, 1969; van Gemert, 1970; Seager, 1976; Lees and Castleberry, 1977; Platz and Seager, 1977)과 ample 및 straws를 이용한 액체질소 침지방법 (Andersen, 1972a, b, 1976; Takeishi 등., 1976; Morton, 1988) 등이 있다. 적절한 동결속도를 결정하기 위하여 액체질소 (Oettle, 1982; Christiansen, 1984; Smith, 1984; Battista 등, 1988) 또는 dry ice (Yubi, 1984; Yubi 등, 1987)의 표면으로부터 동결하고자 하는 정자의 높이를 달리하기도 하였으며, 희석액과 포장방법 및 다양한 동결보호제의 농도에 따라 동결융해 후 정자의 생존성을 조사하고자 많은 연구가 진행되어 왔다 (Watson, 1990).

본 실험은 개 인공수정에 사용할 정액을 동결보존하기 위해서, 자동 동결방법이 아닌 간이적인 방법으로 freezing rate를 결정하였고, freezing rate와 융해온도에 따른 정자의 성상변화를 비교하여 보다 적합한 동결보존 방법을 규명하고자 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 동물

공시동물은 2~4년 생의 Shih-Tzu견 3마리를 공시하였으며 사료는 자유급식시켰고 운동은 자유롭게 할 수 있게 사육하였다.

2. 정액 채취

정액 채취 전 미리 생식기 주위의 털을 깨끗이 깎고, 주위의 이물을 제거한 후 음경마사지법을 이

용하여 정액을 채취하였다. 정액채취에 사용되는 모든 기구는 멸균하여 사용하였으며 채취 시 온도의 변화를 최소화하기 위하여 실험에 사용되는 기구는 37°C로 유지시켰다.

3. 정액검사

채취한 정액은 빛을 차단하기 위해서 호일로 싸서 37°C의 항온 수조에 보관하였다가 정자의 농도, 운동성, 생사율, 침체반응 등을 검사하였다.

정자 농도측정은 warm plate 위에서 정자수 계산판 (Makler counting chamber, Sefi medical Instruments, U.S.A.)을 이용하여 실시하였다.

1) 정자의 운동성

정자의 운동성은 Table 1에서 보는 바와 같이 정자 200마리를 Seager 등 (1969)의 방법에 준하여 정자의 운동성을 조사하였다.

2) 정자의 생사염색

정자의 생사염색은 Fert/Light™ (Molecular Probes Inc., Eugene, OR)방법을 이용하였으며, 10 µg/ml의 propidium iodide (Sigma)로 대조염색을 하여, 형광현미경 (Zeiss, excitation filter, 365 nm; barrier filter, 397 nm) 하에서 정자의 생사를 확인하였다. 정자의 두부가 초록색으로 염색된 것을 생존정자로, 빨갭게 염색된 것을 죽은 정자로 간주하여 확인된 정자 200개에 대한 생존정자의 백분율을 표기하였다.

Table 1. Classification on motility of canine spermatozoa by Seagers method

Ranges	Characteristic
5	Very rapid and vigorous forward motion
4	Rapid progressive motion
3	Steady progressive motion
2	Slow progression, including stop and start motion
1	Weak undulation or oscillatory motion
0	No discernable motility

3) 정자의 침체검사

정자의 침체검사 방법은 Cross 등 (1986)의 방법에 준하여 실시하였으며, 정자의 침체검사는 Fluorescein conjugated lectin Pisum sativum agglutinin (FITC/PAS, Sigma)으로 염색하고, 10 µg/ml의 propidium iodide (PI)을 대조염색으로 실시하였다. 슬라이드 위에 10 µl의 정액을 도말하여 건조시킨 후 -20°C methanol에 2분간 고정된 후 슬라이드를 다시 건조시키고 암실에서 FITC/PAS와 대조염색을 실시하여 Para-film을 덮어둔 후 15분간 방치하였다가 침체검사를 실시하였다. 형광현미경 (Zeiss, excitation filter, 365 nm; barrier filter, 397 nm)을 이용하여 침체의 손상 여부를 조사하였으며, intact acrosome, reacting acrosome, reacted acrosome으로 분류하여 관찰된 정자를 백분율로 각각 표기하였다.

4. 동결속도 결정

동결속도를 결정하기 위해 정자동결의 방법과 동일하게 4°C로 보정된 Tris-egg yolk glycerol (Trisma, 81 mM; glycerol 8%) buffer를 3~5 ml 정도 채운 5 ml tube에 디지털 온도계를 장치하여 4°C의 물을 50 ml tube에 가득 넣어, 액체질소 표면으로부터 6, 10, 17 및 20 cm 높이로 고정하여 온도의 변화를 10초 간격으로 측정하였다.

5. 정액 동결

채취한 정액을 Tris-Egg yolk (Trisma 81mM)을 이용하여 정자농도가 1.6×10^8 /ml 되게 희석한 다음 5ml tube에 넣고 37°C의 물이 담긴 50 ml tube에 넣어 4°C의 냉장고에서 4°C까지 하강하였다. 소요되는 시간인 58분 (정 등, 2001)과 1시간의 평형을 위해서 4°C에서 1시간 58분 동안 cooling을 실시한다.

저온평형 후 4°C에서 보존되어 있던 Tris-Egg yolk glycerol (8%) buffer로 정자의 최종 농도가 8×10^7 /ml이 되도록 희석하여 0.25 ml straw에 장착하고 액체질소 표면으로부터 6, 10, 17, 20 cm에서 각각 11분, 13분 50초, 17분 20초, 23분 동안 평형을 시킨 다음 액체질소에 떨어뜨려 동결을 완료하였다.

6. 정액용해

정액의 용해는 각각 37°C에서 2분 동안 용해시키거나, 55°C의 항온수조에 straw를 넣어 25초 동안 흔들어서 용해한 후 정자의 운동성, 생사율 및 침체의 상태를 조사하였다.

7. 통계학적 분석

동결속도의 확인은 7회 반복 실시하였으며, 동결보존은 5회 반복 실시하였다. 각 실험값의 백분율은 arcsine을 이용하여 전환한 후 통계프로그램인 Analysis of Variance (ANOVA)로 분석하였으며, $P < 0.05$ 일 때 유의적 차이를 인정하였다.

결 과

1. 정액 동결속도

동결속도를 결정하기 위해 4°C로 보정된 Tris-egg yolk glycerol (Trisma, 81 mM; glycerol 8%) buffer가 담긴 5 ml tube에 디지털 온도계를 장치하여 4°C의 물이 담긴 50 ml tube에 넣어, 액체질소 표면으로부터 6, 10, 17 및 20 cm 높이로 고정하여 온도의 변화를 10초 간격으로 조사한 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 6 cm의 높이에서는 -110°C까지 온도 감소를 보였고, 10 cm의 높이에서는 -70°C, 17 cm의 높이에서는 -35°C 그리고 20 cm의 높이에서는 -25°C의 최저온도로 감소하는 경향을 보였다. 이때 각각 소요되는 시간은 6분, 8분 20초, 12분 50초 및 18분이었다. 이를 분당 ramp

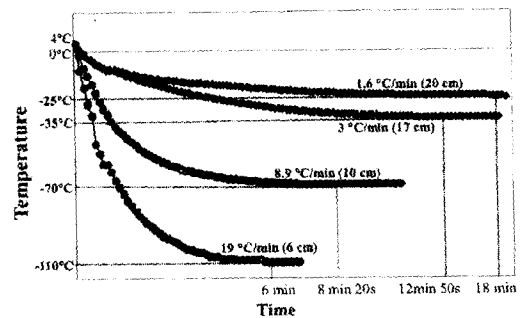


Fig. 1. Curves of freezing ramp rate following different height from the surface of LN₂.

rate로 환산한 값은 각각 19°C/min, 8.9°C/min, 3°C/min 및 1.6°C/min 로 나타내었다.

2. 동결속도 및 용해온도별 정자의 성상

개 정액을 액체질소 표면으로부터 6, 10, 17 및 20 cm의 각기 다른 높이에서 straw를 고정하여 동결한 후 37°C 및 55°C에서 용해하여 정액의 생존율, 운동성 및 첨체의 치밀한 정도를 백분율로 환산한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 정자의 생존율은 37°C에서 용해했을 때 각각 54.0±4.7, 60.1±2.2, 69.8±3.2 및 43.7±5.8%로 나타났다. 10 cm와 17 cm 생존율은 유의적인 차이가 없었으나, 10 cm와 17 cm에서는 6 cm와 20 cm 높이보다도 유의적으로 높은 생존율을 보였다(P<0.05).

55°C 용해후의 생존율은 각각 48.1±3.5, 51.1±1.8, 59.4±1.1 및 39.9±1.4%로 나타났다. 17 cm 높이에서의 동결 후 용해는 다른 군에 비해 유의적(P<0.05)인 차이가 있었으며, 6 cm와 10 cm 높이에서도 20 cm에 비해 정자의 생존율이 유의적(P<0.05)으로 높게 나타났다. 각각 다른 높이와 다른 온도에서 용해한 후 인공수정에 이용 가능하다고 판단되는 3등급 이상의 운동성을 가진 정자의 비율은 10 cm에서 동결하여 37°C에서 용해한 처리가 66.8±5.0%, 17 cm에서는 68.3±4.3%으로서 6 cm와 20 cm 처리군의 47.4±4.9%, 34.9±4.7% 보다 유의적(P<0.05)으로 좋은 결과를 보였으며 55°C용해에서는 처리간 유의적 차이가 인정되지 않는다(P>0.05).

동결속도에 따라 정자를 동결한 후 용해온도를

달리하여 정자의 첨체를 intact, reacting 및 reacted 로 분류하여 intact군의 비율만을 살펴본 결과, 37°C와 55°C의 두 개의 용해 온도에서 첨체의 치밀한 정도는 편차의 폭이 커서 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 온도간에도 수치상의 차이를 볼 수 없었다.

고 찰

정자를 보존하는 궁극적인 목적은 정자를 장기간 보존하여 인공수정에 이용하거나 유전자원을 보존하는데 그 의미가 있고 하겠다. 인공수정 시 수태율 향상은 정자의 생존성, 운동성 및 첨체반응 외에도 수정량, 수정회수, 수정부위, 수정시기 등의 수정기술과도 밀접한 관계가 있다. 일반적으로 동결 용해 후 정자의 생존성은 약 50% 수준으로 감소된다고 알려져 있으며 (Martin, 1963; Foote, 1964; Oettle, 1982), 운동성 (Martin, 1963; Foote, 1964; Olar, 1984; Yubi 등, 1987; Battista 등, 1988) 이 약해지고 첨체가 변형되어 (Ferguson 등, 1989) 이것으로 인하여 수태율이 저하된다고 보고된 바도 있다. 본 실험에서는 정자동결 시 동결속도에 따라 fast freezing ramp rate 및 slow ramp rate로 나누어 실시하였다. 이는 동결보호제의 삼투압, 투과성 및 유리 수분의 형성에 따라 각기 달리 적용하고 있다 (Leibo 등, 1978). 따라서 액체질소를 이용하여 단순한 방법으로 정자를 동결할 경우 동결속도를 판정하는 것이 매우 중요하다. 액체질소 표면으로부터 6, 10, 17 및 20 cm의 높이에서 최저

Table 2. Survivability, motility and acrosome integrity of frozen-thawed sperm following different freezing ramp rates and thawing methods*

Height**	Freezing rate	Survivability		Motility		Intact acrosome	
		37°C	55°C	37°C	55°C	37°C	55°C
6cm	19°C/min	54.0±4.7 ^b	48.1±3.5 ^b	47.4±4.9 ^b	36.9±5.0 ^a	27.5±7.5 ^a	23.1±4.5 ^a
10cm	8.9°C/min	60.1±2.2 ^a	51.1±1.8 ^b	66.8±5.0 ^a	41.9±4.9 ^a	32.8±9.1 ^a	38.4±0.7 ^a
17cm	3°C/min	69.8±3.2 ^a	59.4±1.1 ^a	68.3±4.3 ^a	50.6±5.8 ^a	38.2±8.3 ^a	32.1±1.5 ^a
20cm	1.6°C/min	43.7±5.8 ^c	39.9±1.4 ^c	34.4±3.7 ^c	32.9±4.7 ^a	24.6±7.7 ^a	28.6±4.9 ^a

^{a,b,c} Different superscripts in a column differ significant(p<0.05).

* relative percentages as consider to control(79.2±3.2, survivability; 77.6±5.0, Motility; 76.2±9.1, Intact acrosome)

**Height from the surface of the top of LN₂

온도로 동결될 때까지의 freezing ramp rate는 각각 -19, -8.9, -3 및 -1.6°C/min로 나타났다. Farstad (1996)는 동결속도가 -5°C/min때를 slow freezing ramp rate, -8°C/min은 intermediate freezing ramp rate, -18°C/min은 fast freezing ramp rate 라고 보고하였다. 이러한 연구보고를 근거로 하여 액체질소표면으로부터 6 cm는 fast freezing ramp rate, 10~17 cm는 intermediate freezing ramp rate 그리고 6~10 cm는 slow freezing ramp rate로 인정하여 용해 후 정자의 운동성, 생존성 및 침체의 상태를 조사하여 그에 따른 효율을 관찰하였다.

정자를 동결보존 후 55°C와 37°C의 각기 온도로 정자를 용해한 후 정자의 운동성, 생존율, 침체상태를 관찰한 결과, 생존율에 있어서는 용해 온도 37°C에서 10 cm와 17 cm에서 각각 60%와 70%로 6 cm와 20 cm 처리군에 비해 유의적 ($P<0.05$)으로 높았다. 이는 Ivanova와 Kicheva 등 (1994)의 결과와 유사하다. 또한 용해 후 정자의 운동성에 있어서는 37°C 용해 시 10 cm와 17 cm 처리군에서 각각 67%와 68%로 다른 동결 처리군과 용해온도에 비해서 유의적 ($P<0.05$)으로 높은 운동성을 나타냈다. 이는 37°C 용해조건에서 24~34%의 운동성을 보고한 Dobrinsky 등 (1993)의 결과는 보다 높게 나타내었고, Ivanova-Kicheva 등 (1994)은 37°C 용해에서 29%, 55°C 용해조건에서의 38%라고 보고한 것보다 높은 결과를 나타내었다. 그러나, Strom 등 (1997)의 보고에서는 본 실험의 결과보다 높은 70~75%의 운동성을 나타내어 이들이 이용한 동결방법은 수작업이 아닌 기계를 이용하거나 glycerol 등과 같은 extender의 성분의 차이에 의한 것으로 사료된다. 정자의 침체상태를 확인한 결과로는 intact군에 있어서 Strom 등 (1997)에서의 46~50%보다는 다소 낮은 38%를 보였다. 이 또한 동결 시 사용된 extender와 동결속도의 차이가 그 주원인이라고 사료된다.

적 요

개의 인공수정에 사용할 정자의 보존방법을 확립하기 위하여, 동결속도와 용해온도를 설정하여 적절한 동결방법을 정립하고자 본 실험을 실시하

여 다음과 같은 결과를 얻었다. 동결의 방법에 있어서는 액체질소의 표면으로부터 17 cm 높이에서 동결하는 -3°C/min의 동결속도로 실시하여 37°C에서 2분간 용해하는 방법이 가장 좋은 결과를 보였다. 생존성과 운동성에 있어서는 차이가 없지만 침체의 intact한 비율은 약간 낮은 결과를 보였으며, 이의 보완을 위해, 액체질소 표면으로부터 10 cm와 17 cm의 높이를 세분화하여 동결속도를 설정한 후보다 나은 정액동결방법을 찾는다면 동결정액을 이용한 인공수정의 수태율은 더욱 향상될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- Cross NL. 1996. Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesterone: cholesterol is the major inhibitor. *Biol. Reprod.*, 54:138-145.
- Farstad W. 1996. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Ani. Reprod. Sci.*, 42:251-260.
- Foote RH. 1964. The effects of electrolytes, sugars, glycerol, and catalase on survival of dog sperm in buffered yolk medium. *American J. of Vet. Res.*, 25:32-36.
- Ivanova-Kicheva MG, Subev, MS, Bobodov ND, Dacheva DP and Rouseva IA. 1995. Effect of thawing regimens on the morphofunctional state of canine spermatozoa. *Theriogenology*, 44: 563-569.
- Leibo SP, McGrath JJ and Cravalho EG. 1978. Microscopic observation of intracellular ice formation in unfertilized mouse ova as a function of cooling rate. *Cryobiology*, 15:257-271.
- Martin ICA. 1963. The deep-freezing of dog spermatozoa in diluents containing skim milk. *Res. Vet. Sci.*, 4:315-325.
- Milovanov VK. 1951. Methods of storage of semen of ruminants. In 'News in the Biology of Reproduction of Farm Animals', 139-165.
- Morton DB. 1988. Artificial insemination with

- frozen semen in the dog: principles of DNA fingerprinting. In *Reproductive Clinical Problems in the Dog*, 2nd eds., 169-186.
- Oettle EE. 1982. Preliminary report: a pregnancy from frozen centrifuged dog semen. *South African Vet. Assoc.*, 53:269-270.
- Rathore AK and Mukherjee DP. 1966. Cytomorphological changes in ram spermatozoa due to preservation in egg yolk citrate and egg yolk glycine dilutors. *Indian Vet. J.*, 43:237-241.
- Seager SWJ. 1969. Successful pregnancies using frozen semen in the dog. *A.A. Digest*, 12:6-7.
- Seager SWJ. 1976. Freezing and transportation of dog semen. VIIIth International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, (Krakow), 5:1251-1252.
- Strom B and Linde-Forsberg A. 1995. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4C. *Theriogenology*, 44:885-900.
- Takeishi M, Mikami T, Kodama Y, Tsunekane T and Iwaki T. 1976. Studies on reproduction in the dog. VIII. Artificial insemination using frozen semen. *Japanese J. of Ani. Reprod.*, 22:28-33.
- Watson A and Prawochenski R. 1936. An experiment in eutelegensis. *J. Hered*, 27:341-344.
- Watson PF. 1990. Artificial Insemination and the Preservation of Semen. In *Marshall's Physiology of Reproduction*, 4th eds., Vol. 2, 747-869.
- 정정란, 유재규, 양성열, 여현진, 박종식, 예은하, 노규진, 최상용. 2001. 개 정자의 보존방법에 따른 침체 및 생존성의 변화. I. 저온보존에 따른 효과. *한국 수정란이식학회지*, 16:1:35-40.

(접수일: 2001. 6. 3 / 채택일: 2001. 7. 28)