

Equex-STM paste 첨가 희석액이 개 정액의 동결·융해 후 정자활력 및 생존율에 미치는 영향

김용준¹ · 한종현 · 유일정* · 지동범**

전북대학교 수의학과

*ACRES 연구소, **지동범 동물병원

Effects of Semen Extender Containing Equex-STM Paste on Post-thaw Motility and Viability of Canine Sperm

Yong-Jun Kim¹, Jong-Hyun Han, Il-Jeong Yu and Dong-Beom Ji

College of Vet. Medicine, Chonbuk National University, Chonju, Chonbuk 561-756, Korea

*University of New Orleans and ACRES, Louisiana, American

**Ji Dong-Beom Animal clinic, Busan, Korea

Abstract : This study was performed to investigate the freezing condition especially focused on extender composition to achieve good post-thaw viability and motility of canine sperm. Semen were collected from 6 male dogs which had been proved to be fertile in the past and were treated for freezing. Equex-STM paste was contained in both the 1st(3%) and the 2nd(7%) diluent and the 2nd diluent was added to the 1st diluent following glycerol equilibration for an hour and a half. To investigate the effect of Equex-STM paste in the extender on post-thaw canine sperm characteristics, the post-thaw viability, motility, and HOS(Hypoosmotic swelling) values were evaluated according to the different composition of extender with or without Equex-STM paste, thawing conditions, and different thawing media added to thawed semen.

1. Canine sperm removed from seminal plasma and frozen in Sweden extender containing Equex showed higher post-thaw viability, motility, and HOS values than those frozen in the extender containing Equex-STM paste with seminal plasma and those frozen in the extender without Equex and seminal plasma.
2. Canine sperm frozen in Sweden extender containing Equex-STM paste with 5% glycerol showed higher post-thaw viability, motility, and HOS values than those frozen with 3%, 8% glycerol or 5% DMSO.
3. The canine semen frozen in Sweden extender with 5% glycerol and Equex-STM paste showed higher viability, motility, and HOS values when thawed at 70°C for 8 seconds than when thawed at 37.5°C for 1 min and at 18-20°C for 5 min.
4. TFC(tris-fructose-citrate) and PBS(phosphate buffered saline) medium added immediately to thawed canine semen brought better viability, motility, and HOS values for the sperm than those semen added with TGC(tris-glucose-citrate) and no medium. These results indicated that Equex-STM paste in Sweden extender for freezing the canine sperm which were removed from seminal plasma brought good post-thaw viability and motility of canine sperm. Also of the freezing conditions of canine sperm with the same extender containing Equex, the concentration of 5% glycerol, the thawing condition at 70°C for 8 sec, and TFC and PBS medium added to the thawed semen brought better post-thaw viability and motility of canine sperm than the other conditions used in this study.

Key words : Equex STM paste, Sweden extender, frozen canine semen, thawing viability, motility

서 론

개에서 인공수정은 자연교배가 어려운 개체에서 번식을 가능하게 하는 점, 교배를 위해 이동시키지 않아도 되는 점, 그 밖에 미관상 좋지 않은 상황을 피할 수 있다는 점 등으로 높은 관심의 대상이 되고 있다. 특히 동결정액의 이용은 순수 혈통인자 및 우수한 유전인자를 영구적으로 보존할 수 있다는 점, 장소와 시간의 제한을 받지 않고 번식에 이용할 수 있다는 점에서 애견산업 뿐만 아니라 전문적인 번식 농

장에서도 높은 관심을 가지고 있다. 개 동결정액을 이용한 산자 생산은 세계 최초로 1969년 Seager²⁵에 의하여 이루어 졌으며, 국내에서는 김 등³⁰에 의해 1993년에 최초로 산자가 생산되었고 적지않은 연구들³¹⁻³³이 수행되어왔다. 동결정액을 이용한 인공수정 수태율은 연구자에 따라 25-75%로 매우 다양하나, Linde-Forsberg 등^{13,15,19}은 동결정액을 이용하여 75% 이상의 높은 수태율을 보고하였다. 그러나 아직 까지 동결정액을 이용한 인공수정은 동결 희석액, 교배적기의 판정, 정액의 주입방법 등 여러 가지 동결조건에 따라 수태율에서 차이가 있어 실용화 단계에 미치지 못하고 있는 실정이다.

상기 여건 중 가장 급선적으로 해결되어야 할 사항은 정액의 동결 및 융해 후 정자의 생존율 및 운동성을 높이는 것이다. 이를 위해 Rota 등²¹과 Pena 및 Linde-Forsberg¹⁹은

¹Corresponding author.

E-mail : yjk@moak.chonbuk.ac.kr

이 논문은 2002년 전북대학교 생체안전성연구소 학술연구비의 일부지원으로 이루어졌음(CNU-BRSI No. 2002-1)

Equex-STM paste를 희석액에 첨가하여 52-73%의 융해 후 정자생존율을 보고하고 있으며 국내에서 과거 지와 김³³은 Equex-STM paste를 사용하지 않은 희석액을 이용하여 개 정액의 동결·융해 후 생존율을 30-55%로 보고한 바 상기 연구자들의 결과에 비하여 다소 낮은 생존율이었다. 최근 정액동결에 관한 연구^{4,14,18-20}에서 동결과정 동안 정자 원형질막의 안정성을 확보함으로써 정자의 생존성을 향상시키고자 하는 많은 연구가 이루어지고 있다. Equex-STM paste는 detergent로서 1978년 Pursel 등²⁰에 의해 이용되기 시작하였는데 여러연구자들¹⁸⁻²¹은 Equex-STM paste가 정자의 동결과정 중 희석액중의 egg-yolk의 활성도를 높여 간접적으로 정자의 생체막의 안정성을 부여함으로써 정자의 생존율이 증가한다고 하였다.

따라서 본 연구에서는 개 정액을 동결하기 위한 희석액에 Equex-STM paste를 첨가하여 개 정자를 동결하여 융해한 후 정자의 생존성에 대한 영향을 알아보고자 하였으며, 융해 후 정자의 생존율 판정에서도 광학현미경을 이용한 기준의 생존율 판정 이외에 HOS(Hypo-osmotic swelling) Test^{5,12,22,33}를 도입하여 판정하고자 하였다.

또한 동결정액 희석액에 Equex-STM paste 첨가시 동해방지제 농도에 따른 정자의 생존성을 비교하고, 양호한 융해조건을 조사하고자 하였으며, 융해 후 여러 가지 배지를 첨가하여 정자의 생존율 향상에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

과거 번식력이 있고 임상검사상 건강하다고 확인된 2-4세의 수개 6두(3-15 kg)를 이용하였다. 품종으로서는 Maltese 2두, Siberian Husky 1두, Shitzu 1두, Yorkshire Terrier 1두 및 Mixed 1두가 이용되었다.

정액의 채취

정액채취는 수지법을 이용해 개체 당 주 1회로 오후 5-6시 사이에 채취하였고 2분획 중심으로 채취하였다.

정장제거

채취한 정액을 700×g 5분 동안 원심분리 하여 정장을 제거하였다. 제거 후 정자 pellet을 1:2의 희석배율로 3% glycerin이 함유된 스웨덴 희석액으로 희석하였다. Equex가 첨가된 스웨덴배지 조성 및 최종 정자 농도는 Rota 등²¹의 방법에 준하였다.

Glycerol 평형

희석이 끝난 정액을 4°C 냉장상태에서 1시간 30분 동안 평형을 유지하였다. 평형이 끝난 후 7% glycerin이 함유된 스웨덴 희석액을 이용하여 2차 희석하였으며 희석 후 즉시 0.5 ml straw에 충전하였다.

정액의 동결 및 보존

충전된 straw를 액화질소가 담긴 polystyrene box로 옮겨 LN₂ 표면 4 cm 위에 15분 동안 동결하였다. 동결정액의 저장은 융해할 때까지 LN₂ tank내에 보존하였다.

동결정액의 융해

융해는 70°C에서 8초간 융해하였으며 융해배지는 TFC(tris 3.025 g, fructose 1.25 g, citrate 1.75 g, 중류수 100 ml)를 융해 정액 용량의 2배로 첨가하여 15분 동안 배양하였다.

융해 후 정액의 검사

정자의 생존율: 융해 후 정액을 슬라이드 상에 옮려놓고 현미경 하에서 5시야를 관찰하여 김등³¹의 방법에 준하여 생존정자의 평균율을 조사하였다.

정자의 운동성: 정자의 운동성 역시 5시야를 관찰하여 김등³¹의 방법에 준하여 정자의 운동성 평균율을 조사하였다.

HOS test: 60 mOsm fructose solution을 이용하여 저 삼투압에서 plasmalemma integrity를 측정하는 방법으로서 37°C 45분 동안 배양시킨 후 위상차현미경으로 200개의 정자를 검사하였으며 curled/swollen된 정자의 백분율을 조사하여 평균율을 구하였다.

실험처리

Equex 또는 정장 유무에 따른 융해 후 정자의 성상 및 HOS 검사: 정액을 Equex 및 정장함유 스웨덴 희석액군(SEP군)과 Equex는 함유, 정장을 제거한 스웨덴 희석액군(SE군) 그리고 Equex 비함유 및 정장제거 스웨덴 희석액군(S군)으로 나누어 상기의 방법으로 동결하였고 융해 후 정자의 생존율, 운동성 및 HOS 수치를 조사하였다.

Equex가 함유된 희석액에 동해 방지제 조성에 따른 융해 후 정자의 성상 및 HOS 검사: 개 정액을 동해방지제 조성에 따라 동결 융해 후 정자의 생존율, 정자의 운동성 및 HOS 수치를 비교하기 위하여 glycerol은 3%, 5%, 8%로 서로 다르게 조성하였고 DMSO(dimethyl sulfoxide)는 5%로 조성하여 동결하였다. 동결배지는 Equex가 함유된 스웨덴 희석액을 사용하였다. 융해방법은 상기와 동일하였다. 정자의검사는 융해 후 15분 및 24시간 후에 수행하였다.

Equex가 함유된 희석액에 융해조건에 따른 정자의 성상 및 HOS 검사: Equex가 함유된 Sweden 희석액에 동결하였고 융해조건을 다르게하여 융해한 후 정자의 생존율, 정자의 운동성 및 HOS 수치를 비교하기 위하여 70°C 8초간, 37.5°C 1분간, 18-20°C 5분간으로 구별하여 융해하였다.

Equex가 함유된 희석액에 융해배지에 따른 정자의 성상 및 HOS 검사: Equex가 함유된 스웨덴 희석액에 동결·융해하였고 융해 후 서로 다른 배지를 첨가하여 정자의 생존율, 정자의 운동성 및 HOS 수치를 비교하였다. 융해후 첨가된 배지는 TFC, TGC(Tris 3.025 g, Glucose 1.25 g, Citrate 1.75 g, 중류수 100 ml), PBS이었으며 비첨가군을 대조군으로 설정하였다.

통계분석

이 실험에서의 결과는 ANOVA로 통계 처리하여 유의성을 검정했으며 DUNCAN 다중검정에 의해 실험군간 유의차를 구하였다.

결 과

개 정액을 Equex-STM paste 및 정장이 함유된 스웨덴 희석액군과 Equex-STM paste 함유되고 정장이 제거된 Sweden 희석액군 그리고 Equex-STM paste 및 정장이 제거된 Sweden 희석액군으로 구별하여 동결한 후 용해하여 정자 생존율, 정자운동성 및 HOS 수치를 비교한 결과는 Table 1과 같다.

Table 1에서와 같이 용해 후 정자의 운동성, 생존율 및 HOS 수치 모두 Equex-STM paste를 함유하고 정장이 제거된 군(SE군)은 다른 두 군에 비해 각각 더 높은 용해 후 정자의 운동성, 생존율 및 HOS 수치를 나타내었다($P<0.01$). 또한 Equex-STM paste 및 정장이 모두 함유된 군(SEP군)은 Equex-STM paste가 함유되고 정장이 제거된 군(SE군)보다는 낮은($P<0.01$), 그리고 Equex-STM paste와 정장이 모

Table 1. Assessment of post-thawed canine sperm motility, viability and HOS values for the semen frozen according to different composition in Sweden extender
(Mean \pm D, %, n = 7)

Extender	Motility	Viability	HOS values
SEP	72.33 \pm 2.42 ^a	75.00 \pm 4.86 ^a	74.83 \pm 3.19 ^a
SE	78.67 \pm 2.25 ^b	84.67 \pm 3.20 ^b	81.33 \pm 3.08 ^b
S	60.00 \pm 7.99 ^c	67.50 \pm 3.02 ^c	61.12 \pm 6.31 ^c

a, b, c: Different superscripts denote significant differences within columns($P<0.01$) S : Sweden extender, E : Equex ?STM paste, P : seminal plasma

Table 2. Assessment of post-thawed motility of canine sperm frozen with Sweden extender containing Equex-STM paste according to different percentage of glycerol and 5% DMSO
(Mean \pm D, %, n=7)

Time (after thawing)	Cryoprotectant			
	3% Glycerol	5% Glycerol	8% Glycerol	5% DMSO
15 min	71.17 \pm 3.66 ^a	82.33 \pm 1.86 ^b	78.00 \pm 1.41 ^c	59.29 \pm 3.64 ^d
24 hours	40.33 \pm 2.94 ^a	55.50 \pm 2.95 ^b	53.17 \pm 2.95 ^b	30.50 \pm 3.08 ^c

a, b, c, d: Different superscripts denote significant differences within rows($P<0.01$)

Table 3. Assessment of post-thawed viability of canine sperm frozen with Sweden extender containing Equex-STM paste according to different percentage of glycerol and 5% DMSO
(Mean \pm D, %, n=7)

Time (after thawing)	Cryoprotectant			
	3% Glycerol	5% Glycerol	8% Glycerol	5% DMSO
15 min	65.33 \pm 3.27 ^a	83.00 \pm 3.03 ^b	78.17 \pm 3.06 ^c	44.83 \pm 1.94 ^d
24 hours	60.17 \pm 3.87 ^a	71.33 \pm 2.50 ^b	66.50 \pm 3.02 ^c	20.83 \pm 2.99 ^d

a, b, c, d: Different superscripts denote significant differences within rows($P<0.01$)

두 제거된 군(S군) 보다는 높은 ($P<0.01$) 정자의 운동성, 생존율 및 HOS 수치를 나타내었다. Equex-STM paste 및 정장이 제거된 군이 가장 낮은 운동성, 생존율 및 HOS 수치를 나타내었다($P<0.01$).

Equex-STM paste가 함유된 희석액배지에 glycerol 농도를 3%, 5%, 8%로 그리고 DMSO를 5%로 조성하여 동결한 후 용해하여 15분 및 24시간 후 정자의 운동성을 비교한 결과는 Table 2와 같다.

Table 2에서와 같이 정자의 용해 15분 후 운동성에서 5% glycerol로 동결된 정자가 다른 조성의 동해 방지제를 사용한 정자보다 높은 정자 운동성을 나타내었다($P<0.01$). 또한 용해 후 24시간 후 운동성에서 5% 또는 8% glycerol로 동결된 정자가 다른 조성의 동해 방지제를 사용한 정자보다 높은 정자 운동성을 나타내었다($P<0.01$). 한편 5% DMSO로 동결된 정자는 15분 및 24시간 후 모두에서 가장 낮은 운동성을 나타내었다($P<0.01$).

Equex-STM paste가 함유된 희석액배지에 동해 방지제를 서로 다르게 조성하여 동결한 후 용해하여 15분 및 24시간 후 정자의 생존율을 비교한 결과는 Table 3과 같다.

Table 3에서와 같이 정자의 용해 15분 및 24시간 후 모두에서 5% glycerol로 동결된 정자가 다른 조성의 동해방지제를 사용한 정자보다 높은 정자 생존율을 나타내었다($P<0.01$). 5% DMSO로 동결된 정자가 가장 낮은 생존율을 나타내었다($P<0.01$).

Equex가 함유된 희석배지에 동해 방지제 조성을 서로 다르게 조성하여 동결한 후 용해하여 15분 및 24시간 후 정자의 HOS 수치를 비교한 결과는 Table 4와 같다.

Table 4에서와 같이 정자의 용해 15분 및 24시간 후 모두에서 5% glycerol로 동결된 정자가 다른 조성의 동해 방지제를 사용한 정자보다 높은 정자 HOS 수치를 나타내었다($P<0.01$). 5% DMSO로 동결된 정자는 가장 낮은 HOS 수치를 나타내었다($P<0.01$).

Table 4. Assessment of HOS values of the post-thawed canine sperm frozen with Sweden extender containing Equex-STM paste according to different percentage of glycerol and 5% DMSO (Mean \pm D, %, n=7)

Time (after thawing)	Cryoprotectant			
	3% Glycerol	5% Glycerol	8% Glycerol	5% DMSO
15 min	67.50 \pm 3.99 ^a	84.00 \pm 2.10 ^b	80.00 \pm 3.29 ^c	48.00 \pm 2.45 ^d
24 hours	62.17 \pm 3.49 ^a	74.50 \pm 3.02 ^b	68.33 \pm 2.42 ^c	23.17 \pm 2.93 ^d

a, b, c, d : Different superscripts denote significant differences within rows(P<0.01)

Equex-STM paste가 함유된 희석액으로 동결된 정액을 70°C에서 8초간, 37.5°C에서 1분, 실온(18-20°C)에서 5분간 융해하여 정자의 운동성, 생존율 및 HOS 수치를 비교한 결과는 Table 5와 같다.

Table 5에서와 같이 서로 다른 융해온도 및 융해조건에 따라 융해하였을 때 70°C 8초간 군이 가장 높은 융해 후 정자의 운동성, 생존율 및 HOS 수치를 나타내었다(P<0.01). 한편, 18-20°C에서 융해된 정자는 가장 낮은 운동성, 생존율 및 HOS 수치를 나타내었다(P<0.01).

Equex-STM paste가 함유된 희석액에 정액을 동결하여 융해 후 융해배지를 TFC, TGC, PBS로 각각 다르게 첨가하거나 비첨가 후 정자의 운동성, 생존율 및 HOS 수치를 비교한 결과는 Table 6과 같다.

Table 6에서와 같이 융해된 정자에 TFC와 PBS배지가 첨가된 군은 상호간에는 유의적인 차이 없이 TGC 첨가군 및 비첨가군에 비해서 높은 정자의 운동성, 생존율 및 HOS 수치를 나타내었다(P<0.01).

Table 5. Assessment of post-thawed canine sperm motility, viability and HOS values for the semen frozen with Sweden extender containing Equex-STM paste according to different thawing conditions (Mean \pm D, %, n=7)

Thawing condition	Motility	Viability	HOS values
70°C, 8sec	79.67 \pm 5.24 ^a	80.00 \pm 3.90 ^a	81.17 \pm 4.83 ^a
37.5°C, 1min	70.33 \pm 2.88 ^b	69.33 \pm 4.18 ^b	71.83 \pm 2.64 ^b
18-20°C, 5min	52.50 \pm 1.87 ^c	63.66 \pm 3.14 ^c	53.83 \pm 2.71 ^c

a, b, c: Different superscripts denote significant differences within columns(P<0.01)

Table 6. Assessment of post-thawed canine sperm motility, viability and HOS values following adding different thawing medium (Mean \pm D, %, n=7)

Thawing medium	Motility	Viability	HOS values
TFC	80.33 \pm 3.44 ^a	81.33 \pm 1.63 ^a	82.50 \pm 2.51 ^a
TGC	65.50 \pm 3.62 ^b	70.50 \pm 3.39 ^b	71.83 \pm 3.37 ^b
PBS	81.33 \pm 3.56 ^a	79.50 \pm 0.84 ^a	80.50 \pm 0.84 ^a
NO medium	56.00 \pm 9.32 ^c	60.67 \pm 2.16 ^c	61.67 \pm 3.01 ^c

a, b, c: Different superscripts denote significant differences within columns(P<0.01) TFC: tris-fructose-citric acid monohydrate, TGC: tris-glucose-citric acid monohydrate, PBS: phosphate buffer saline

고 칠

이 연구에서 희석액 조성 실험은 스웨덴 희석액에 개 정장의 첨가여부 및 Equex-STM paste(Equex) 첨가 여부에 따라 희석정액을 동결 및 융해한 후 정자의 생존율, 운동성 및 HOS 수치를 조사하여 융해 후 양호한 정자의 생존성을 얻기 위한 Equex 및 정장의 함유여부의 영향을 알아보기 위하여 실시하였다. 그 결과 Equex가 첨가되고 정장이 제거된 스웨덴 희석액에서 가장 높은 정자의 생존율, 운동성 및 HOS 수치가 조사되었다.

Rota 등²²의 보고에서 정액을 4°C에 4일간 보존시 정장과 함유 희석액에서 정자의 생존성은 71%, 비함유 희석액에서는 84%를 보고하였고, 4일 후 정장이 함유된 군에서 급격히 생존율이 떨어지는 것을 보고하였다. 본 실험에서 정장과 Equex가 함유된 희석액에서 Equex가 첨가되고 정장이 제거된 군보다 개정자의 생존율 및 운동성이 낮게 나타난 것은 Rota 등²²의 보고에서와 마찬가지로 정장이 정자의 희석 및 동해방지제 평형기간동안 정자에 대해 위해한 것으로 생각된다. 그리고 본 실험은 냉장상태가 아닌 동결 정자의 융해 후 정자의 성상을 조사하였기 때문에 융해 후 시간에 따른 정장의 위해성도 있을 것으로 추측된다. 이 실험에서 스웨덴 희석액에 Equex 첨가시 정장의 함유여부에 관계없이 더 높은 정자의 운동성, 생존율 및 HOS 수치가 나타났다. Rota 등²¹이 Equex를 첨가한 정자의 생존율 비교에서 Equex 첨가 희석액의 정자생존율은 63%이고 Equex 비첨가 희석액은 56.5%로 보고되었다. 본 실험에서 정장 제거 후 Equex가 함유된 희석액으로 동결된 정자는 75.0~84.7%의 높은 생존율을 보였는데 이것은 Equex 첨가시 정자 세포막의 안정화가 일어나기 것으로 보이며 정자 세포막의 안정성을 판단하는 HOS test에서 Equex첨가군들이 비첨가군보다 높은 HOS value를 나타낸 것도 이를 증명한다고 하겠다. Equex-STM Paste의 중요한 구성요소는 SDS(sodium dodecyl sulphate)이며 이 물질은 수용성 음이온 세정제이다²⁰. 정자의 세포막에 작용하는 SDS의 기전은 아직까지 정확히 밝혀지지 않았으나 SDS는 세포 외 배지에 변화를 일으켜서 정자에 간접적으로 작용하는 것으로 보이며 특히 SDS는 희석액 중에 포함된 egg yolk의 변화를 일으켜 정자 생체막의 안정화를 일으킴으로써 동결과정중 정자를 보호하여 융해 후 정자의 생존력을 향상시킨다고 보고되었다^{2,20,28}.

한편 Helenius 등⁹에 의하면 높은 농도의 Equex는 생체막을 변화시키거나 융해시키는 유해한 작용이 있다고 보고한

바 본 실험에서도 Equex는 0.5%의 농도로 첨가되었는데, 농도가 증가될 때 정자의 생존성에 미치는 유해여부를 판정하기 위한 실험이 추가로 수행되어야 할 것으로 보인다.

동해 방지제 조성을 서로 다르게 하여 Equex가 함유된 희석액으로 개 정액을 동결하여 융해 후 15분 및 24시간에 각각 정자의 생존율, 운동성 및 HOS 수치를 비교한 결과 5% glycerol 조성시의 정자는 3%, 8% glycerol 및 DMSO 5%의 경우보다 더 높은 정자 생존율 운동성 및 HOS 수치를 나타내었다.

Equex가 함유되지 않은 상태에서 동결정액 희석액을 사용 시 3%, 5% 및 7%의 glycerol의 농도가 동결 및 융해 후 정자의 생존율 및 운동성이 서로 다르게 나타난 것에 대한 여러 보고가 있다^{1,7,24,26,27,33}. 지와 김³³은 Equex가 함유되지 않은 스웨덴 희석액으로 동결시 융해 후 5% 및 7% glycerol로 동결된 개정자가 상호간에 유의적인 차이없이 3% glycerol로 동결된 정자보다 더 높은 정자의 생존성을 보였다고 보고하였으나 본 연구에서는 Equex가 첨가된 상태에서 3%, 8%의 glycerol로 동결된 정자 보다 5% glycerol로 동결시 더 높은 정자의 생존율, 운동성, HOS 수치를 나타냈다. 이 결과는 Pena와 Linde-Forsberg¹⁹의 보고와 같이 5%의 glycerol 상태에서 Equex가 함유된 스웨덴 희석액이 정자 생체막을 remodeling하여 glycerol의 침투력을 증강시킴으로써 동결보호의 효과를 증강시켜 정자의 생존율 향상을 일으킨다고 보며, 또한 정자 원형질막의 안정화로 융해 후 발생될 수 있는 osmotic shock의 발생가능성을 감소시켜 정자의 생존에 양호한 영향을 주는 것으로 본다^{3,8,19}. 본 실험의 결과와 상기 연구자들의 보고에서 볼 때 3%의 glycerol은 Equex와 상호 작용하는 용량이 적음으로써 약리적 효과를 발휘하지 못하고, 8%의 glycerol은 너무 많은 용량으로 정자에 유해한 작용을 일으킨 것으로 보인다.

Curry MR, Watson PF 등^{3,6,10,11,29}의 여러 학자는 정자의 손상은 동결하는 기간뿐만 아니라 융해하는 동안에도 큰 손상이 일어난다고 보고하였다. 본 실험에서 Equex가 함유된 스웨덴 희석액으로 동결된 정자를 서로 다른 융해조건에 따라 융해하였을 때 융해 후 정자의 생존율, 운동성 및 HOS 수치를 조사한 결과 70°C 8초간 융해한 군이 37.5°C 또는 실온에서 융해한 군보다 양호한 생존력과 운동성, 그리고 HOS 수치를 나타내었다. 한편 다른 연구자들^{4,16,17,23,33}의 연구에서 Equex-STM Paste⁹이 첨가되지 않은 희석배지에서도 70°C 8초간 융해한 경우가 37.5°C 또는 실온에서 융해한 경우 정자의 양호한 생존성과 운동성이 보고되었다. Olar 등¹⁷에 의하면 높은 온도에서의 짧은 융해기간이 정자의 생체막에 미치는 영향이 적다고 하였고 75°C 12초, 35°C 1분 및 1°C 2분에서 정자의 운동성은 각각 35, 32 및 29%이었다고 보고하였다. 본 실험에서는 상기 실험과는 융해조건이 다소 다르지만 양호한 융해조건을 확인할 수 있었다. 즉 70°C 8초간에서 융해시 37.5°C 1분간 또는 실온에서 5분간 융해된 경우보다 양호한 생존력과 운동성을 나타내어 Equex가 함유된 희석액에서 동결 후 융해시 높은 온도에 의한 짧은 융해 시간이 정자의

생존율에 양호한 영향을 미친다는 것을 확인하였다.

동결정액 융해 후 정자의 생존율 및 운동성을 증가시킬 수 있는 배지를 첨가하여 정자의 생존율, 운동성 및 HOS 수치를 조사한 결과 TFC와 PBS 첨가군에서 TGC 및 비첨가군 보다 양호한 결과를 나타내었다. 융해 후 배지의 첨가는 융해 후 정자에 영양물질의 공급 및 동해방지제의 위해한 작용을 희석시킬 수 있는 가능성으로 시도되었다³³. 이 실험에서 유사한 조성이면서도 TFC 첨가군이 TGC 첨가군에서 양호한 결과가 나온 것은 개 정액에 대해 fructose가 glucose보다 정자의 생존성에 더 좋은 영향을 미치는 것으로 판단된다. TFC군은 또한 Linde-Forsberg^{14,21}가 보고한 결과와 비슷한 융해 후 생존율, 운동성을 보였으며, PBS에 대하여는 아직 보고된 바 없지만 TFC군과 유의적인 차이없이 양호한 정자의 생존성을 나타낸 것으로 보아 정자의 융해배지로서도 양호하게 사용될 수 있을 것으로 보인다.

이상의 결과 정장이 제거된 개 정자를 스웨덴 희석배지로 희석하고 Equex를 첨가시 동결 및 융해 후 개 정자의 생존율, 운동성 및 HOS 수치에서 양호한 결과가 나타나 개 정액 동결시 Equex 첨가가 권고 된다는 점, 그리고 Equex가 함유된 스웨덴 희석액에서 융해 후 양호한 개 정자의 생존성 및 운동성을 얻기 위해서는 glycerol 조성은 5%가 적당하다는 점, 융해조건은 70°C 8초간이 양호하다는 점 그리고 융해 후 첨가배지로서는 TFC배지 또는 PBS배지가 양호하다는 점을 확인할 수 있었다.

결 론

개 동결정액을 이용한 인공수정에서 융해 후 양호한 정자의 생존율 및 운동성을 얻기 위한 동결조건을 알아보기 위하여 과거 번식능력이 입증된 성견 6두로부터 정액을 채취하여 Sweden 희석액에 Equex STM paste을 첨가하였으며 Equex STM paste의 첨가시 희석액의 조성, 동해방지제 조성, 융해조건 및 융해 후 첨가배지의 조성을 다르게 하여 개 정액의 융해 후 정자의 운동성, 생존율 및 HOS 수치를 조사하였다($P<0.01$).

1. 정장제거 Equex 첨가 희석액으로 동결시 정장함유 Equex 첨가 희석액 및 정장제거 Equex 비함유 희석액으로 동결된 경우보다 융해 후 더 높은 정자의 운동성, 생존율 및 HOS 수치가 나타났다($P<0.01$).

2. Equex가 함유된 희석액에 동해방지제 조성을 다르게 하여 동결할 때 5% glycerol 농도로 동결된 정자는 융해 후 15분 및 24시간에서 모두 가장 높은 정자 운동성, 생존율 및 HOS 수치를 나타내었다($P<0.01$).

3. Equex가 함유된 희석액으로 동결 후 융해시 75°C 8초간 융해된 정자는 37.5°C 1분간 융해 또는 18-20°C 5분간 융해된 정자보다 융해 후 더 높은 정자 운동성, 생존율 및 HOS 수치를 나타내었다($P<0.01$).

4. Equex가 함유된 희석액으로 동결한 정액을 융해 후 서로 다른 배지를 첨가하였을 때 TFC와 PBS 배지가 첨가된

정자는 TGC 배지 첨가 및 비첨가 정자군보다 더 높은 정자 운동성, 생존율 및 HOS 수치를 나타내었다($P<0.01$).

이상의 결과 정장이 제거된 개 정자를 스웨덴 희석배지로 희석하고 Equex를 첨가시 동결 및 융해 후 개 정자의 생존율, 운동성 및 HOS 수치에서 양호한 결과가 나타났고, Equex가 함유된 스웨덴 희석액에서 융해 후 양호한 개 정자의 생존성 및 운동성을 얻기 위해서 glycerol 조성은 5%, 융해조건은 70°C 8초간, 융해 후 첨가배지로서는 TFC 배지 또는 PBS 배지가 선택될 수 있음을 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

- Andersen K. Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique Zuchthygiene 1975; 10: 1 abst.
- Arriola J, Foote RH. Glycerolation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. J Dairy Sci 1987; 70: 1664-1670.
- Curry MR, Watson PF. Osmotic effects on ram and human sperm membrane in relation to thawing injury. Cryobiology 1994; 31: 39-46.
- Dobrinsky I, Lulaic, Barth AD, et al. Effects of four different extenders and three different thawing rates on post-thaw viability of dog semen. J Reprod Fert(suppl)1993; 47: 291-296
- England GCW, Plummer JM. Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. J Reprod Pert 1993; 47(suppl): 261-270.
- England GCW. The cryopreservation of canine semen. PhD Thesis. University of London 1992.
- Fontbonne A, Badinand F. Studies on freezing dog spermatozoa: effect of glycerol on motility after thawing. J Reprod Fert 1993; 47(Suppl): 531-532.
- Gao DY, Mazur P, Kleinhans FW, Watson PF, Noiles EF, Critser JK. Glycerol permeability of human spermatozoa and its activation energy. Cryobiology 1992; 29: 657-667.
- Helenius A, McCaslin DR, Fries E, Tandford C. Properties of detergents. Meth Enzymol 1979; 56: 734.
- Holt WV, Head MF, North RD. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observation with experimental cryomicroscopy. Biol Reprod 1992; 46: 1086-1094.
- Holt WV, North RD. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. Biol Reprod 1994; 51: 414-424.
- Kumi-Diaka J, Badtram G. Effects of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa : in vitro bioassay for canine semen. Theriogenology 1994; 41: 1355-1366.
- Linde-Forsberg C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. Vet Clin No Anim Pract 1991; 21: 467-485.
- Linde-Forsberg C, Forsberg M. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. J Reprod Fert 1989; 39(Suppl): 299-310.
- Linde-Forsberg C, Forsberg M. Results of 527 controlled artificial inseminations in dogs. J Reprod Fert 1993; 47(Suppl): 313-323.
- Linde-Forsberg C, Strom Holst B, Govette G. Fertility data from 327 artificial inseminations with frozen-thawed dog semen comparing vaginal and intrauterine deposition: a retrospective study. Theriogenology 1999; 52: 11-23.
- Olar TT, Bowen RA, Pickett BW. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on post thaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. Theriogenology 1989; 31: 451-461.
- Pena AI, Barrio F, Quintela LA, Herradon PG. Effects of sodium dodecyl sulphate on post thaw dog semen quality during in vitro incubation at 39°C and 22°C. Reprod Dom Anim 1998; 33: 393-398.
- Pena AI, Linde-Forsberg C. Effects of Equex, one of two step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. Theriogenology 2000; 54: 859-879.
- Pursel VG, Schulmal LL, Johnson LA. 1978. Effect of Orvus ES Paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. J Anim Sci 1978; 47: 198-202
- Rota A, Strom B, Linde-Forsberg C, Rodriguez-Martinez. Effects of Equex-STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. Theriogenology 1997; 47: 1093-1101.
- Rota A, Strom B, Linde-Forsberg C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. Theriogenology 1995; 44: 885-900.
- Rota A, Linde-Forsberg C, Vannozzi J, Romagnoli S, Rodriguez-Martinez H. Cryosurvival of dog spermatozoa at different glycerol concentrations and freezing/thawing rates. Reprod Dom Anim 1998; 33: 355-361.
- Seager SWJ, Fletcher WS. Progress on the use of frozen semen in the dog. Vet Rec 1973; 92: 6-10.
- Seager SWJ. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. AI Digest 1969; 17: 6.
- Smith FO. Cryopreservation of canine semen, technique and performance. PhD Thesis University of Minnesota, 1984.
- Smith FO. Update on freezing canine semen. Proc Ann Mtg Soc Theriogenology 1984: 61-73.
- Thomas PGA, Surman V, Myer-Wallen VN, Concannon PW, Ball BA. Addition of sodium dodecyl sulphate to the TRIS-citrate extender improves motility and longevity of frozen-thawed canine spermatozoa. Proc 12th Int Congr Anim Reprod(ICAR) 1992; 4: 1823-1825.
- Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. Reprod Fertil Dev 1995; 7: 871-891.
- 김용준, 박영재, 김병진, 유일정. 개에서 동결정액을 이용한 인공수정-Methanol을 이용한 간이 동결방법. 대한 수의 학회지 1994; 34(4): 851-855
- 김용준, 박영재, 김병진, 유일정. Methanol을 이용한 개 정액 동결의 융해후 양호한 활력 및 생존력을 나타내는 정액 처리 조건. 한국임상수의학회지 1994; 11(2): 207-214
- 김종호, 이필돈, 유일정, 김용준. 개 정액 동결시 seeding 처리가 융해 후 정자의 활력 및 생존율에 미치는 효과. 한국가축위생학회지 1995; 19(1): 1-12
- 지동범, 김용준. 개 정액의 융해 후 정자의 생존율 향상을 위한 동결방법과 생존율 및 수정능률에 미치는 영향에 관한 연구. 한국임상수의학회지 2000; 8: 22.