

개에서 Pentoxifylline 첨가에 따른 동결정액 성상과 인공수정에 관한 연구

지달영*.김창근*.이장희**.박상재**.류일선**.류재원*.이주형*.정영채*.방명걸*

중앙대학교 동물자원학과, 중앙대학교 생명환경연구원*, 농촌진흥청 축산연구소**

Studies on Frozen Semen Characteristics Following Pentoxifylline Treatment and Artificial Insemination in Dog

Ji, D. Y.*, C. K. Kim*, J. H. Lee**, S. J. Park**, L. S. Ryu**, J. W. Ryu*, J. H. Lee*, Y. C. Chung* and M. G. Pang*

Department of Animal Science & Technology and BET Research Institute, Chung-Ang University*, National Livestock Research Institute, R.D.A, Korea**

ABSTRACT

The present study evaluated whether pentoxifylline added to the freezing extender could improve the sperm characteristics and function in canine frozen semen. Also the conception rate following AI with frozen-thawed semen was investigated. The beneficial effects of pentoxifylline supplementation were visible in motility, viability, acrosome reaction, and tail swelling patterns. Especially, highest sperm viability and function were obtained in the frozen semen supplemented with 1mM pentoxifylline. The follicle size measured by ultrasonography was 6.48 mm, 11.52 mm and 8.9 mm on 11, 13 and 15 days after the onset of natural estrus, respectively and ovulation occurred on 13 and 15 days. The pregnancy rates in bitches inseminated with frozen semen on natural and induced estrus were 71.4% and 75.0%, respectively. There was no significant difference between the pregnancy rates in bitches inseminated with frozen semen following natural and induced estrus, but the litter size was slightly increased in natural cycle.

(Key words : Pentoxifylline, Dog, CASA, Frozen Semen, AI)

I. 서 론

최근 애완견의 사육은 기하급수적으로 증가하고 있으나, 인공수정의 번식기술에 대한 연구는 다른 가축에 비하여 활발하게 진행되지 못하였다. 우수한 종건의 유전자원 보존 및 이용에 관한 수요가 급속히 증가되고 있으며, 이러한 수요의 증가에 따라 생식세포를 영구적으로 보존하기 위한 정액의 동결과 이를 이용한

인공수정기술의 개발 필요성이 더욱 강조되고 있다. 인공수정은 우수한 유전자원을 효율적으로 이용할 수 있는 방법으로 인식되어 왔으며, 동결정액의 이용은 시간과 장소의 구속 없이 번식이 가능하며 애견산업 발전에 크게 기여할 것으로 기대되고 있다.

개의 인공수정은 여러 연구자들에 의하여 신선정액(Farstad, 2000; Pinto 등, 1998), 저온보존정액(Seager와 Fletcher, 1973), 동결정액(Gill 등,

*이 논문은 2000학년도 중앙대학교 학술연구비(일반연구비) 지원에 의한 것임.

Corresponding author : C. K. Kim, Dept. of Animal Sciences & Technology, College of Industrial Sciences, Chung-Ang University, Ansong-Si, Kyunggi-Do 456-756, Korea.
Tel : (031)670-3026, Fax : (031) 676-0062, E-mail : cckim7503@cau.ac.kr

1970)으로 연구되어 왔으며 동결정액을 이용한 인공수정은 현재까지 수태율이 낮음에도 불구하고 장기간 보존할 수 있고 우수 종견의 활용도를 높일 수 있다는 장점 때문에 더욱 많은 연구가 필요하다. 그러나 다양한 연구에도 불구하고 애완견의 동결정액은 용해 후 활력, 생존율, 정자 원형질막 기능, 침체막 온전성 등의 동결용해로 인한 정액품질의 저하와 인공수정 수태율의 저하 등이 개선하여야 할 문제점으로 대두되고 있다.

Pentoxifylline은 free radicals로부터 형성된 산화물을 제거하는 항산화제제의 작용이 있다고 보고되었다(Gavella 등, 1991). Brennan 등(1995)은 동결정액에 pentoxifylline의 첨가로 운동성이 향상된다고 보고하였다. Methylxanthine에서 유래된 pentoxifylline은 cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 인산에테르가수분해효소(phosphodiesterase)의 억제인자이다. Pentoxifylline의 작용이 세포 내 cAMP를 높게 유지 시켜준다는 근거 하에 정자의 운동에 미치는 영향에 관하여 연구의 초점이 되어 왔다(Stefanovich, 1973). cAMP는 정자의 운동을 촉진시키며, hyperactivation 인자로서, ROS의 억제인자, 그리고 침체 반응을 활발히 하는 것으로 알려졌다.

인공수정은 자연 발정상태의 암컷을 사용할 수도 있지만 시간적 공간적 제약을 해결하고 보다 많은 번식기회를 갖고 번식효율을 더욱 개선하기 위해서 암컷을 원하는 시기에 발정 및 배란을 유도할 필요가 있다. 발정유기 방법에서 Arnold 등(1989)은 암컷에 5~10일간 PMSG (20 IU/kg/day)와 hCG(500 IU)를 처리하여 50%로의 임신율을 보고하였고, Shille 등(1989)은 발정유기실험 처리 4일전에 testosterone을 주사하고 diethylstilboestrol가 5 mg 함유된 tablet을 자궁경관 입구에 장착 후 7일째 제거하고 발정전기에 LH(5 mg, i.m.) 또는 FSH 10 mg, i.m.)를 투여하여 효과적으로 발정이 유기됨을 보고하였다. Olson 등(1984)은 FSH 또는 PMSG의 병용 투여와 Cain 등(1988, 1989)은 GnRH 투여방법을 보고하였다. 이 등(2003)은 Clomofene, dromocriptine 단독 투여 그리고 GnRH + bromocriptine /GnRH 혼합투여에 따른 발정유도방법은 임신율과 산

자 수에 영향을 미치지 않는 것으로 보고하였으며, 신선정액을 이용한 인공수정방법은 자연 교미방법과 유사한 임신율과 산자수를 보였으나, 동결정액을 이용한 인공수정 시에는 비교적 낮게 나타났다고 보고하였다.

본 연구는 개에서 품종과 정액채취 방법에 따른 정액성상의 차이를 조사하고, 동결정액 제조시 pentoxifylline의 첨가가 용해 후 정액성상에 미치는 영향을 조사하여 동결정액의 품질을 향상시키고자 하였으며, 무발정기의 암컷을 발정 및 배란을 유도하여 효율적인 인공수정 방법과 수태율 향상방안을 찾음과 동시에 초음파를 이용한 조기 임신진단방법을 제시코자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물

본 실험의 공시동물은 좋은 유전자 부속농장에서 사육되고 있는 2~3세의 Beagle, English cockers spanie, Collie, Greyhound, Shihtzu 품종의 수컷 각각 1두를 공시하였으며, 암컷으로는 Beagle, English cockers spanie, Greyhound, Shihtzu 및 잡견을 각각 2, 4, 1, 2 및 1두씩 공시하였다. 공시동물의 사육은 충분히 운동을 할 수 있는 쾌적한 환경의 사육장에서 사료는 제한급여 하였으며 물은 자유급수 하였다.

2. 정액채취

정액채취는 1주일에 1~2씩 수압법 및 인공질법으로 채취하였고, 개의 심리적으로 안정을 취할 수 있는 정액채취실내에서 실시하였다. 정액 채취 전에 음경 포피 부위의 털을 제거하여 정액 채취 시 이 물질의 혼입을 방지하였으며, 음경포피 부위에 잔존되어 있는 이 물질은 70% 에틸알콜 솜으로 제거 소독하였다. 음경은 생리식염수로 세척 후 발기와 돌출을 유도하여 돌출된 음경의 구선부위(bulbus glandis)를 잡고 압력을 가하면서 수압으로 인한 혈관의 파열을 피하면서 종견의 성적 자극을 유도한 조건에서

정액채취를 실시하였다. 인공질법은 음경을 마사지하여 발기와 돌출된 음경을 인공질에 삽입한 후 음압을 걸어 정액을 채취하였다.

3. 정액성상 검사

수압법 또는 인공질법으로 채취된 개의 정액은 육안적 검사와 현미경적 검사로 정액 성상을 조사하였다. 정액량, 색깔, 투명도, 점조 등을 육안적 검사로 실시하였고, hemocytometer(Hausser Scientific, USA)를 이용한 정자의 농도, 정자의 형태 등을 현미경적 검사로 실시하였다.

4. 동결정액의 제조 및 용해

(1) 동결희석액의 조성

동결보존액인 EYT(Egg-yolk tris extender)는 Rota(1997) 방법에 따라 tris(hydroxymethyl) aminomethane 2.4 g, citric acid 1.4g, glucose 0.8 g, Na-benylpenicillin 0.06 g, streptomycin sulphate 0.1 g로 제조하였고, 난황은 당일 생산된 신선난에서 난황을 분리하여 동결희석액에 20%(v/v) 농도로 첨가하였다. 교반이 끝난 EYT 동결희석액은 1200 × g에서 30분간 원심 분리하여 표면의 지질층을 제거하고 난황괴를 제외한 상층액을 취하여 사용하였다.

(2) Pentoxifylline의 첨가

2차 동결희석액은 EYT에 glycerol 5%, OEP (Equex STM, NOVA Chemical, USA) 0.5%를 첨가하여 교반 후 사용하였고, pentoxifylline(Sigma, USA)은 최종농도가 각각 0 mM, 1 mM, 3 mM이 되도록 첨가하였다.

(3) 정액 동결과 용해

채취된 정액의 성상을 조사한 후 700 × g에서 3분간 원심분리를 실시하여 상층액을 제거하고 미리 준비한 1차 희석액으로 희석하여 5℃까지 냉각시킨 후 동일온도의 2차 희석액으로 30분 동안 3회로 분할 첨가하였고, 2차 희석 후 20분간 glycerol 평형을 유도 후 straw당 총 정자수가 50×10^6 되게 포장하여 액체질소 표면 7

cm (-80℃) 위에서 10분간 예비동결 후 액체질소에 침지하여 동결정액 제조를 완료하였다. 동결정액의 용해는 37℃의 온수에서 20초간 동안 실시하였다.

5. 동결용해 정자의 검사

(1) 정액의 전처리

동결정액을 37℃의 온수에서 20초간 용해 후 washing media로 600 × g에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 정자 펠렛을 각 검사방법에 적합한 농도로 재부유하여 사용하였다.

(2) 정자의 운동양상 검사

정자의 운동양상 분석은 CASA(Computer assisted sperm analysis)로 실시하였다. 원정액은 동결 전 일부를 이용하여 동결전의 운동성을 검사하고, 동결 후 용해한 정자는 washing media로 처리 후 정액 10 μ l를 미리 37℃로 가온된 Markler counting chamber (Sefi medical instrument, Israel) 위에 떨어뜨린 후 CCD 카메라(Toshiba, Japan)가 장착된 광학현미경(Olympus, Japan)에 연결된 CASA(SAIS system, Sais plus version 10.1, Medical Supply, Korea)를 이용하여 검사하였다. 측정 방법은 Takagi 등(2001)의 방법에 준하여 실시하였고, 정자 운동양상의 항목으로서 운동성(motility), 직선운동속도(staight line velocity: VLS), 곡선운동속도(curve linear velocity: VCL), 곡선경로 선형도(linearity: LIN), 측두이동거리(amplitude of lateral head displacement: ALH), 평균경로속도(average-path velocity: VAP)을 검사하였다.

(3) 정자의 원형질막 검사

HOST(hypoosmotic swelling test)는 Kumi-Diaka (1993)의 방법에 준하여 실시하였다. Fructose 13.50 g, sodium citrate 7.35 g을 증류수 1000 ml에 녹여 최종삼투압이 60 mOsm/Kg 되게 제조하여 실험에 이용하였다. 각 처리 구의 정액을 washing media와 혼합한 후 500 × g에서 5분간 원심분리 한 다음 농도를 20×10^6 /ml로 조절 한 후 정액 100 μ l를 1.5 ml endendorf tube에 넣

고 미리 준비한 저삼투압 용액 900 μ l를 첨가하여 교반 후 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하였다. 배양 후 10 μ l정도를 취하여 swelling을 위상차 현미경하에서 조사하였다.

(4) 정자의 생존율

생존율 조사를 위한 염색방법은 Garner 등 (1994)의 방법에 준하여 실시하였다. SYBR-14 sperm live/dead Kit(FertilightTM Kit, Molecular Probes, USA)는 SYBR-14는 anhydrous dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma, USA)에 1 mg/ml을 함량 함유한 stock solution 이었고 PI(propidium iodide)는 Tyrodes salt solution에 2 mg/ml가 함유되었다. 생사염색은 SYBR-14 stock solution을 DMSO를 100배 희석하여 만든 working solution 2.7 μ l, 미리 제조한 PI 2 μ l의 washing media를 전 처리된 정액에 넣고 37 $^{\circ}$ C의 heating-block에서 30분간 배양 후 형광현미경(Hund Wetzlar H600, Germany)에서 관찰하였다. 광선은 405 nm-dand filter를 통과하고 SYBR-14형광의 발광을 455 nm-dicrmic 반사경과 475 nm barrier filter 현미경위에서 200개의 정자를 3회 반복 관찰하였다.

(5) 정자의 침체막 온전성

정자의 염색은 Spermac kit(Stain Enterprises, Onderstepoort, South Africa)를 이용하여 수행하였으며, washing media로 전 처리된 각 처리 구의 정액을 슬라이드에 도말하여 공기 중에서 건조한 후 fixative I로 고정하고 슬라이드를 증류수로 세척 후 stain solution A 5분, stain solution B에 1분, stain solution C에 1분씩 3단계로 염색하였다. 각 염색 단계마다 증류수로 세척하였고 공기 중에서 건조시켰다. 염색된 슬라이드는 광학현미경에서 1000배의 배율로 슬라이드당 200개 이상 정자의 침체를 판독하였다.

6. 발정유기 및 인공수정

Ring-CIDR은 기존 Shille 등(1989)의 tablet 대신 링모양의 약물방출링으로 Diethylstilbestrol를

방출하는 기구이다. 이 Ring-CIDR를 이용하기 위해 4개월 이전에 발정한 경험이 없는 암캐에게 Ring-CIDR/DES(Controlled intravaginal drug release/Diethylstilbestrol, 좋은 유전자, 한국)를 질 내에 7~10일간 장치하는 동안에 외음부가 종창되고 출혈이 확인되면 이 날을 Day 0(proestrus)으로 정하고 Day 3일째에 Ring-CIDR/DES를 제거하였다. Day 5일째에 hCG 1000 IU 또는 FSH 50 mg을 1회 근육주사하고 필요시 Day 8일째에 GnRH(30~50 μ g)를 주사하였다. 교배적기는 외음부 종창이 작아지고 출혈분비액이 암갈색으로 바뀌는 시기에 질점막상피세포 도말검사와 초음파진단기를 이용한 난포크기의 변화로 인공수정 적기로 판단하였다. 자연발정군과 Ring-CIDR 처리군의 인공수정 적기를 규명하기 위하여 초음파진단기를 이용하여 난소내 난포 발달 상태를 측정하였다. 자연적으로 발정이 개시된 Beagle 2두, Shihzu 1두, Grey hound 1두, English cockers spanie 1두 및 잡견 2두와 Ring-CIDR 처리한 Beagle 1두 및 English cockers spanie 3두에 대해서 초음파진단기(3.5MHz probe, SA 600S, Medison, Korea)를 이용하여 발정개시 후 11일째부터 15일까지 초음파 화상으로 난소내 난포크기 변화를 조사하였고, 난포 상태를 확인한 다음 용해한 정액으로 인공수정을 실시하였다. 인공수정방법 암컷을 보정 후 양쪽 음순사이로 질경을 밀어 넣고 수직방향으로 자궁경관 입구까지 유도 후 주입기를 이용하여 자궁경관 심부에 주입하였다.

7. 조기 임신진단

발정유기한 개체에 대하여 첫 교배 후 20일 전후에 임신진단은 3.5 MHz probe가 장착된 초음파기를 이용하여 실시하였으며, 태양의 크기 변화를 5일 간격으로 3회 측정하였다.

8. 통계 분석

정자의 동결-용해 후 정자의 기능검사 결과에 대한 유의성 검정은 SAS의 Duncan's multiple range test에 의해 실시하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 품종 및 정액 채취방법간의 정액 성상

품종별 정액성상을 조사한 결과는 Table 1과 같다. Beagle, English cockers spanie, Collie 및 Grey hound의 정액량과 정자 수에서 차이가 없었으나, Shihtzu에서 정액량과 정자수가 다소 적었다. 그러나 품종별 정액성상간에 차이를 알기 위해서는 동일개체의 반복도 필요하고 품종내 개체수가 많아야 하겠다. 개의 체중에 따라 정액량이 차이가 있는 것으로 Gunzel(1986)은 보고한 바 있다.

정액채취방법간의 정액성상은 Table 2에 보는 바와 같다. 수압법과 인공질법을 이용하여 채취된 정액량은 3.9±1.9 ml와 3.6±1.3 ml로 차이가 없었다. 이 결과는 Harrop(1954)이 인공질법이 우수하다고 한 것과 Boucher 등(1958)이 수압법이 우수하다고 한 보고와는 다른 결과였다. 한편 정자농도는 수압법이 인공질법 보다 높았고 그 결과 총 정자수도 수압법에서 높았다. 그러나 정자 운동성과 생존성은 두 방법간에 차이가 없었다.

2. 동결희석액 조성에 따른 동결융해 정자의 운동성

Table 3에서와 같이 동결 전 5℃ 검사 시에는 OEP 첨가로 운동성의 변화 향상이 없었으나 동결 융해 후에는 OEP 첨가한 희석액에서 활발한 운동성 향상이 나타났다. 개 동결정자의 인공수정 효과에 있어서 가장 중요한 요인 중의 하나가 희석액이다. 그러나 아직 최적 희석액의 조성은 보고되어 있지 않다(Olar 등, 1989). 가장 많이 이용되고 있는 기본 희석액으로서 Tris-glucose-citric acid(Foote, 1964), Tris-fructose-citric acid(Gill 등, 1970) 및 3~4% glycerol이 함유된 egg yolk tris buffer (Olar, 1989)이다. 최근 개발된 동결희석액 중 2% glycerol을 함유한 0.1M/Tris buffer는 개 정자에서 융해 후 양호한 운동성을 보여주었다(England와 Allen, 1992). 본 실험의 결과에서 fructose, 5% glucose 및 8% glycerol 첨가보다도 추가로 OEP를 첨가한 군에서 융해 후 운동성이 높았던 것이 이들 보고를 뒷받침해주는 결과라고 볼 수 있겠다. 특히 Rota 등(1997)은 Tris, glucose 및 난황을 첨가한 동결희석액에 OEP 추가 첨가에서 융해

Table 1. Semen characteristics sperm among dog breeds

Breeds*	Volume (ml)	Concentration (×10 ⁶ /ml)	Total sperm (×10 ⁶)	Progressive motility(%)	Viability (%)
A	4.6 ± 3.1	130.0 ± 27.3	598.0 ± 140.5	78.8 ± 7.4	88.1 ± 3.2
B	3.7 ± 1.3	108.2 ± 51.7	399.3 ± 142.3	79.9 ± 6.7	85.8 ± 2.4
C	4.6 ± 3.2	215.4 ± 37.4	349.7 ± 246.7	82.3 ± 3.3	87.2 ± 3.1
D	3.4 ± 0.5	173.7 ± 46.6	384.2 ± 270.8	88.3 ± 4.5	90.4 ± 6.3
E	3.0 ± 1.2	73.0 ± 32.2	216.0 ± 140.5	80.4 ± 4.3	85.6 ± 4.6

Mean ± SD.

* A : Beagle, B : English cockers spanie, C : Collie, D : Grey hound, E : Shihtzu.

Table 2. Semen characteristics between semen collection method

Method	Volume (ml)	Concentration (×10 ⁶ /ml)	Total sperm (×10 ⁶)	Progressive motility(%)	Viability (%)
Digital manipulation	3.9 ± 1.9*	206.7 ± 18.5	441.6 ± 157.5	79.7 ± 7.0	89.1 ± 2.7
Artificial vagina	3.6 ± 1.3	157.2 ± 32.7	387.3 ± 139.3	81.2 ± 5.7	80.7 ± 3.0

* Mean±SD.

후 정자 활력의 향상은 없었으나 용해 후 시간 경과에 따라 활력이 높게 유지되었고 용해 후 침체 온전성을 갖는 정자비율이 높다고 하였다.

Table 3. Sperm motility in frozen semen diluted in 3 different extenders

Extenders	Motility(%)	
	Before freezing	After thawing
EYTG ¹⁾	82.0 ± 3.3	37.0 ± 7.1 ^b
EYTFG ²⁾	84.0 ± 4.1	45.0 ± 5.4 ^b
EYTFGO ³⁾	86.0 ± 3.5	58.0 ± 4.4 ^a

Mean ± SD.

^{a,b} Means with different superscripts differ significantly (P<0.05).

¹⁾ Tris 2.422g, citric acid 1.152g, glucose 0.901g, egg yolk 20%, 8% glycerol in 100 ml

²⁾ Tris 3.025g, citric acid 1.700g, fructose 1.250g, egg yolk 20%, 5% glycerol in 100 ml

³⁾ Tris 3.025g, citric acid 1.700g, fructose 1.250g, egg yolk 20%, 5% glycerol, 0.5% OEP in 100 ml

3. Pentoxifylline 첨가와 정액성상

(1) 정자활력과 운동양상

동결희석액에 pentoxifylline을 첨가전의 액상 정액과 동결용해 후의 정자의 운동양상을 조사한 결과는 Table 4와 같다. 채취 직후, 0 mM, 1 mM과 3 mM이 첨가된 동결정액의 용해 후 정자활력은 각각 70.2, 46.4, 56.4, 47.2%로 1 mM의 처리구가 다른 첨가구에 비해 유의적으로

높았다. 또한 1 mM 첨가에서 VCL, VAP, LIN 및 ALH가 대조구에 비해 다소 높아 졌으며 한편 3 mM에서는 VCL, VSL과 LIN이 대조구 보다 크게 낮아졌다. Pentoxifylline은 phosphodiesterase inhibitor로서 알려져 있다 (Yovich, 1993). 정자에 처리시 전진운동 VCL과 ALH를 증진시키며 (Rees 등, 1990), 항산화작용으로서 ROS를 감소시키는 것으로 보고되어 있다. 또한 정액동결 전 처리 시에 용해 후 정자운동성 회복율이 개선됨이 보고되어 있으며(Wang 등, 1993), 사람에선 1 mM에서 전진운동의 증가가 보고되었다 (Brennan과 Holden, 1995). 한편 Esteves 등(1998)은 사람정자에서 5 mM 첨가 시 용해 후 활력의 개선이 있었으나 그 외 다른 운동양상에는 영향이 없었으며 ARIC(Acrosome Reaction to Ionophore Challenge) 검사에 대한 침체반응 개선을 보고하였다. Nassar 등(1999)은 사람에서 1 mM 처리에서 VCL, ALH가 크게 개선되고 LIN은 감소됨을 보고하였다. Mckinney 등(1996)은 7.2 mM 처리에서 ROS의 현저한 감소와 더불어 지질과 산화가 감소됨을 보고하였다. Maxwell 등(1995)은 면양에서 동결전 15 mM 처리에서 운동성개선, 1~2 mM 처리에서 침체 온전성의 향상이 있었으며 15 mM 처리 정액의 자궁내 주입의 임신율은 대조구와 차이가 없다고 하였다.

본 연구에서 1 mM 처리에서 양호한 결과를 얻은 것은 이들과 일부 유사하였다. 그러나 pentoxifylline의 최적수준은 보고자간 다소 차이가 있음을 알 수 있다.

Table 4. Effect of pentoxifylline concentration on sperm motion parameters after thawing

Parameters*	Fresh semen	Pentoxifylline(mM)		
		0	1	3
MOT(%)	70.2 ± 3.7	46.4 ± 5.9 ^b	56.4 ± 7.6 ^a	47.2 ± 9.3 ^b
VCL(μm/sec)	34.1 ± 5.2	22.8 ± 9.9	25.3 ± 8.0	20.4 ± 3.8
VSL(μm/sec)	37.3 ± 4.5	11.1 ± 9.0	12.4 ± 4.6	9.6 ± 3.0
VAP(μm)	36.1 ± 4.0	14.6 ± 8.9	16.1 ± 5.2	13.2 ± 3.5
LIN(%)	49.3 ± 5.7	42.5 ± 11.8	43.7 ± 12.0	40.1 ± 6.4
ALH(μm)	3.6 ± 0.9	3.4 ± 0.4	3.7 ± 0.3	3.5 ± 0.6

Mean ± SD.

^{a,b} Means with different superscripts differ significantly(P<0.05).

* MOT : motility, VCL : curve linear velocity, VSL : straight line velocity, VAP : average path velocity, LIN : linearity, ALH : amplitude of lateral head displacement.

(2) 정자의 HOST

Pentoxifylline 첨가된 동결정액의 정자 HOST에서 나타난 미부팽창정자의 비율은 Table 5와 같다. 동결융해후의 HOST 결과는 1 mM의 처리구가 59.47%로 다른 첨가수준 0 mM, 3 mM 처리구의 53.67, 53.87% 보다 높게 나타났다. 동결융해후 HOST 결과는 동결정액의 67.6%로 감소되었다. 최근 개에서 HOST 정자세포막기능 검사의 유효한 수단이 되고 있으나 최적 HOST의 조건과 정자의 반응정도는 동물종에 따라 차이가 있는 것으로 보고되어 있다. 개에서는 HOST의 최적 조건이 100 ~ 150 mOsm에서 45 ~ 60분 배양이며 HOST가 개 정액 분석에 매우 유효한 것으로 보고되었다 (Rodriguez-Gil 등, 1994). Ponce 등(1999)은 생쥐에서 5 mM의 pentoxifylline 처리의 HOST 결과에서 운동성과 첨체막 온전성 유지가 크게 개선됨을 보고하였다.

Table 5. Effect of pentoxifylline concentration on HOST of sperm after thawing

Pentoxifylline (mM)	Fresh semen (%)	After thawing (%)
0	67.6 ± 6.1	53.7 ± 4.8 ^b
1	—	59.5 ± 4.5 ^a
3	—	53.9 ± 5.4 ^b

Mean ± SD.

^{a,b} Means with different superscripts differ significantly (P<0.05).

(3) 정자생존율과 첨체막 온전성

Pentoxifylline을 0, 1 및 3 mM 첨가 후 동결융해한 정자의 생존율은 Table 6과 같다. 융해

Table 6. Effect of pentoxifylline concentration on sperm viability after thawing

Pentoxifylline (mM)	Fresh semen (%)	After thawing (%)
0	82.3 ± 1.2	40.9 ± 2.7 ^b
1	—	43.3 ± 4.0 ^a
3	—	40.3 ± 3.9 ^b

Mean ± SD.

^{a,b} Means with different superscripts differ significantly (P<0.05).

후 정자생존율은 각각 40.93, 43.33 및 40.27%로서 1 mM 처리구가 대조구보다 높았다. Table 7은 pentoxifylline 처리수준에 따라 첨체막 온전성 검사를 실시한 결과이다. 신성정액의 첨체 온전성은 80.0%였으며, 동결융해 후에는 pentoxifylline 0, 1, 3 mM 첨가구중 1 mM 다른 처리구보다 높게 나왔다. 정액동결에서 가장 문제가 되고 있는 것은 정자 원형질막의 손상 (Watson, 1990)과 첨체 손상 (McLaughlin 등, 1992)의 증가와 생존성 저하(Alvarez와 Storey, 1993)이다. 또한 정자동결 후 수정능력의 저하원인중에 하나는 동결융해 정자 내에 정자첨체를 갖는 정자의 비율이다(Mock와 Zaneveld, 1987). 늑대에서는 동결융해 후 첨체손상이 아주 심한 편이다(Zalewski와 Andersen, 1983). 사람에서 pentoxifylline 처리로 첨체소실율이 감소되었고 (Esterves 등, 1998) 생쥐정자의 처리에서 정자막의 기능 보호됨이 보고된 바 있다(Ponce 등, 1999). Pentoxifylline 처리농도에 정자 기능에 대한 영향 조사에서 Brennan과 Holden(1995)은 사람에서 5 mM 처리에서 첨체손상율의 증가를 보고하였고, 면양에서 Maxwell 등(1995)은 1 ~ 2 mM과 5 ~ 6 mM 처리에서 첨체온전성의 비율이 30 ~ 43%와 4 ~ 6%였다. 특히 Paul 등(1995)는 사람에서 6 mM의 처리에 대한 반응이 개체 간에 차이가 큰 것으로 보고하였다. 개 정자의 경우 특히 동결과정 중 냉각율이 정자원형질막 손상의 큰 원인이 되며 냉각율에 대한 반응에 상당한 개체차이가 있

Table 7. Effect of pentoxifylline concentration on acrosome integrity of sperm after thawing

Pentoxifylline (mM)	Fresh semen (%)	After thawing (%)
0	80.0 ± 2.1	34.2 ± 5.4 ^b
1	—	39.3 ± 5.8 ^a
3	—	35.1 ± 5.1 ^b

Mean ± SD.

^{a,b} Means with different superscripts in the same row differ significantly(P<0.05).

는 것으로 보고되었다(Yu 등, 2002). 뿐만 아니라 동결감수성에 대해서도 개체차이가 크게 나타나 있다(Platz와 Seager, 1977). 이러한 개체 차이에 대한 원인은 잘 알려져 있지 않다. 본 연구에서 pentoxifylline 첨가효과가 품종별에 차이가 나타난 결과는 앞으로 개의 동결정액기술 개발을 위한 더 많은 연구가 필요할 부분으로 사료되었다.

4. 발정주기중 난포크기와 인공수정

발정후 11~15일간의 난포크기 변화는 Table 8과 같으며 자연발정군과 Ring-CIDR로 발정유기시켜 예정시각에 인공수정한 결과는 Table 9와 같다. 자연발정군에서 수정적기 판단을 위하여 난포발달에 대한 초음파 진단결과 발정개시 후 11일, 13일 및 15일에 난포크기는 Fig. 1과 같이 각각 6.5 mm, 11.5 mm 및 8.0 mm이었으며 평균 좌우측 난소의 난포수는 각각 3.3 및 4.2개였다. 자연발정개시 후 14일과 15일째에 인공수정 하였고, 한편 발정유기군에서는 처리후 10일과 11일째에 인공수정을 실시하였다.

Table 8. Change in follicle size after estrus

Follicle size(mm in dia)	Days after estrus		
	Day 11	Day 13	Day 15
	6.5	11.5	8.0

Table 9. Pregnancy rate and litter size between estrus methods in bitch inseminated with frozen-thawed semen

Estrus	No. of bitch		
	Inseminated	Pregnant(%)	Litter size
Natural	7	5 (71.4)	6.6
Synchronized	4	3 (75.0)	2.6

본 실험에서는 동결 용해 한 정자의 농도는 50×10^6 으로 0.25 ml 주입기를 이용하여 자연발

정군과 발정유기군에 자궁내 2회 수정하였다, 그 결과 자연발정구의 수태율과 평균산자수는 71.4%와 6.6두였으며, 발정유기한 처리구에서 75%와 2.6두였다.

5. 초음파기를 이용한 임신진단

임신일령의 기준일을 첫 교배일로 산정하여 교배 후 20일, 25일 및 30일에 초음파로 진단한 결과는 Table 10 및 Fig. 2과 같이 임신진단에 따라 태낭의 크기가 13.7 mm, 28.5 mm 및 40.5 mm로 증가되었다. 개에서 초음파기에 의한 임신진단은 교배 후 20일 이전은 어려움이 있고 또한 정확도가 낮은 것으로 알려져 있다



Day 11



Day 13



Day 15

Fig. 1. Images of follicular development after estrus.

(Maihac 등, 1980). 일반적으로 개에서 초음파 진단기에 의한 난포 직경측정은 난포직경이 작기 때문에 측정이 어려움이 있는 것으로 나타나 있다(Schmidt 등, 1986). 태낭의 인지시기는 임신 20일령 이후에 인지가 가능하므로 그 이후에 임신진단하는 것이 정확도가 높고 위험도를 줄일 수 있는 것으로 보고되어있다(Yeager 등, 1992).

Table 10. Length of gestational sac in pregnant in bitch

Sac	Days after AI		
	20	25	30
length(mm)	13.7	28.5	40.5



Day 20



Day 25



Day 30

Fig. 2. Images of gestational sac in early pregnant period.

IV. 요약

본 연구는 개 정액 채취방법에 따른 정액성상과 동결전 pentoxifylline의 첨가가 미치는 영향을 조사하였고, CASA를 이용하여 정자의 운동성 측정 및 생존율, 첨체 온전성, 저삼투성 팽창화를 조사하였다. 그리고 자연발정과 발정유기된 암캐에서 동결정액 주입의 임신율을 조사하였다.

1. 품종별 정액성상을 조사한 결과 Beagle, English cockers spanie, Collie 및 Grey hound의 정액량과 정자 수에서 큰 차이가 없었으나, Shihtzu에서 정액량과 정자수가 유의적은 아니나 다소 적었다.
2. 동결희석액에 pentoxifylline 0, 1 및 3mM 첨가에서 용해 후 정자활력은 각각 46.4, 56.4 및 47.2%였으며 1 mM 처리구가 다른 처리구보다 유의적으로 높았다.
3. 동결희석액에 pentoxifylline 첨가는 용해 후 정자의 생존성, 첨체막 온전성 및 원형질막 온전성(HOST) 모두 유리한 결과를 나타냈으며, 1mM의 첨가에서 정자의 생존성과 기능성이 향상되었다.
4. 자연발정에서 발정개시 후 11일, 13일 및 15일째 초음파기로 측정한 난포 크기는 각각 6.5 mm, 11.5 mm 및 8.0 mm이었다. 배란은 13~15일 사이에 일어났다.
5. 발정유기한 개체에서 수정후 임신 20일째 부터 5일 간격으로 3회 측정한 태낭의 크기는 13.7 mm, 28.5 mm 및 40.5 mm 이었다.
6. 자연발정과 발정을 유기한 개체에서 pentoxifylline 1 mM이 첨가된 정액을 동결·용해하여 인공수정 후 임신율은 71.4%와 75%로 두 방법간에 차이가 없었으나, 자연발정군에서 평균산자수는 6.6두였고, 발정유기군의 평균산자수는 2.6두였다.

VI. 인 용 문 헌

1. Alvarez, J. G. and Storey, B. T. 1993. Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryoprotectant. *J. Androl.* 14:199-208.
2. Arnold, P., Arnold, P. W., Concannon, R., Weilenmann, M., Hubler, M., Dobeli, A., Fairburn, E., Eggenbnberger and Usch, P. 1989. Effect of duration of PMSG treatment on induction of oestrus, pregnancy rates and the complications of hyperoestrogenism in dogs. *J. Reprod. Fertil (Suppl.)* 39:115-122.
3. Boucher, J. H., Foote, R. H. and Kirk, R. W. 1958. The evaluation of semen quality in the dog and the effects of frequency of ejaculation upon semen quality libido and depletion of sperm reserves. *Cornell Vet.* 48:67-86.
4. Brennan, A. P. and Holden, C. A. 1995. Pentoxifylline supplement cryoprotectant improves human sperm motility after cryopreservation. *Hum. Reprod.* 10:2308-2312.
5. Cain, J. L., Cain, G. R., Feldman, E. C., Lasley, B. L. and Stabenfeldt, G. H. 1988. Use of pulsatile intravenous administration of gonadotropin-releasing hormone to induce fertile estrus in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 49:1993-1996.
6. Cain, J. L., Lasley, B. L., Cain, G. R., Feldman, E. C. and Stabenfeldt, G. H. 1989. Induction of ovulation in dogs with pulsatile or continuous infusion of GnRH. *J. Reprod. Fertil(Suppl.)* 39: 143-147.
7. England, G. C. W. and Allen, W. E. 1992. Factors affecting the viability of canine spermatozoa. II. Effects of seminal plasma and blood. *Teriogenology* 373-381.
8. Esterve, S. C., Sharma, R. K., Thomas, A. J. Jr. and Agarwal, A. A. 1998. Cryopreservation of human spermatozoa with pentoxifylline improves the post-thaw agonist-induced acrosome reaction rate. *Hum. Reprod.* 13-12:3384-3389.
9. Farstad, W. 2000. Assisted reproductive technology in canine species. *Theriogenology* 53:175-186.
10. Foote, R. H. 1964. Extenders for freezing dog semen. *Am. J. Vet. Res.* 25:37-39.
11. Garner, D. L., Johnson, L. A., Yue, S. T., Both, B. L. and Haugland, R. P. 1994. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *J. Androl.* 15: 620-629.
12. Gavella, M., Lipovac, V. and Marotti, T. 1991. Effect of pentoxifylline on superoxide anion production by human sperm. *Int. J. Androl.* 14: 320-327.
13. Gill, H. P., Kaufman, C. F., Foote, R. H. and Kirk, R. W. 1970. Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid-stored and frozen semen. *Am. J. Vet. Res.* 31:1807-1813.
14. Gunzel, A. R. 1986. Sperm collection, evaluation, preservation and artificial insemination in the dog. *Tierarztl Prax.* 14:275-282.
15. Harrop, A. E. 1954. Artificial insemination of a bitch with preserved semen. *Brit. Vet. J.* 110: 194-195. 424-425.
16. Kumi-Diaka, J. 1993. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology* 39:1279- 1289.
17. Mailhac, J. M., Chaffaux, S., Legrand, J. J., Carlier, B. and Hertz F. 1980. Diagnostic de la gestation chez la chatte: Utilisation de l'echographie. *Recl. Med. Vet. Ec. Alfort.* 156:899-907.
18. Maxwell, W. M. C., Robinson, S. J., Roca, J., Molinia, F. C., Sanchez-Partida, L. G. and Evans, G. 1995. Motility, acrosome integrity and fertility of frozen ram spermatozoa treated with caffeine, pentoxifylline, cAMP, 2-deoxyadenoine and kallikrein. *J. Reprod. Fertil.* 7:1081-1807.
19. McLaughlin, E. A., Ford, W. C. L. and Hull, M. G. R. 1992. Motility characteristics and membrane integrity of preserved human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 95:527-532.
20. Mckinney, K. A., Lewis, S. E. M. and Thompson, W. 1996. The effects of pentoxifylline on the generation of reactive oxygen species and lipid peroxidation in human spermatozoa. *J. Androl.* 28:15-20.

21. Mock, S. R. and Zaneveld, L. J. 1987. Acrosomal enzymes and ultrastructure of unfrozen and cryotreated human spermatozoa. *Gamete Res.* 18: 375-383.
22. Nassar, A., Mahony, M., Srisombut, C., Lin, M. H. and Oehninger, S. 1999. Pentoxifylline stimulates various sperm motion parameters and cervical mucus penetrability in patients with asthenozoospermia. *J. Androl.* 31:9-13.
23. Olar, T. T., Browen, R. A. and Pickett, B. W. 1989. Influence of extender, cryopreservation and seminal processing procedures on post thaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology.* 31:451-461.
24. Olson, S. N., Bowen, R. A., Behrendt, M. D., Olson, J. D. and Nett, T. M. 1984. Coccentration of testosterone in canine serum during late anestrus, proestrus, estrus, and early diestrus. *Am. J. Vet. Res.* 45:145-148.
25. Paul, M., Sumpter, J. P. and Lindsay, K. S. 1995. Action of pentoxifylline directly on semen. *Hum. Reprod.* 10:354-359.
26. Pinto, C. R., Eilts, B. E. and Paccamonti, D. L. 1998. The effect of reducing hindquarter elevation time after artificial insemination in bitches. *Theriogenology.* 50:301-305.
27. Ponce, A. A., Fiolde Cuneo, M., Ruiz, R. D., Vincenti, L. M., Stuij, G. and Lacuara, J. L. 1999. Influence of pentoxifylline on sperm membrane functional integrity. *Arch. Androl.* 43:77-84.
28. Platz, C. C. and Serger, S. W. 1977. Successful pregnancies with concentrated frozen canine semen. *Lab. Anim. Sci.* 27:1013-1016.
29. Rees, J. M., Ford, W. C. L. and Hull, M. G. R. 1990. Effect of caffeine and of pentoxifylline on the motility and metabolism of human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 90:147-156.
30. Rodriguez-Gil, J. E., Montserrat, A. and Rigau, T. 1994. Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology.* 815-829.
31. Rota, A., Strom, B., Linde-Forsberg, C. and Rodriguez-Martinez, H. 1997. Effects of equex STM paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during *in vitro* incubation at 38°C. *Theriogenology.* 47:1093-1101.
32. Schmidt, S., Chrag, D. S. and Giese, E. 1986. *Ultraschallagnostik inder gynakologie beim kleintier.* Tierarztl. Prax. 14:123-141.
33. Seager, S. W. and Fletcher, W. S. 1973. Progress on the use of frozen semen in the dog. *Vet. Rec.* 92:6-10.
34. Shille, V. M., Thatcher, M. J., Lloyd, M. L., Miller, D. D., Seyfert, D. F. and Sherrod, J. D. 1989. Gonadotrophic control of follicular development and the use of exogenous gonadotrophs for induction of oestrus and ovulation in the bitch. *J. Reprod. Fertil(Suppl.).* 39:103-113.
35. Stefanovich, V. 1973. Effect of 3,7-dimethyl-1-(5-oxohexyl)-xanthine and 1-hexyl-3,7-dimethyl-xanthine on cyclic AMP phosphodiesterase of the human umbilical cord vessels. *Res. Com. Chem. Pathol. Pharmacol.* 5:655-662.
36. Takagi, H., Kurihara, A., Inoue, T., Nakamura, I. and Kimura, M. 2001. Investigation of usefulness of sperm analyses in dog for male fertility study. *Toxicological Sci.* 25:313-321.
37. Watson, P. F. 1990. Artificial insemination and the preservation of semen. In: Lamming, G. E. (ed), *Marshalls Physiology of Reproduction, Reproduction in the Male* (4th ed.) Churchill Livingstone, Edinburgh, UK pp. 747-869.
38. Wang, R., Sikka, S. C., Veeraragavan, K., Bell, M. and Hellstrom, M. D. 1993. Platelet activating factor and pentoxifylline as human sperm cryoprotectants. *Fertil. Steril.* 60:711-715.
39. Yeager, A. E., Mohammed, H. O. and Meyers-Wallen, V. 1992. Ultrasonographic appearance of the uterus, placenta, fetus and fetal membranes throughout accurately time pregnancy in Beagles. *Am. J. Vet. Res.* 53:342-351.
40. Yovich, J. L. 1993. Pentoxifylline: action and application in assisted reproduction. *Hum. Reprod.* 8:1786-1791.

41. Yu, I., Songsasen., N., Godke, R. A. and Leibo. 2002. Difference among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using cooling various and warming rats. *Cryobiology* 44:62-78.
42. Zalewski, W. and Andersen, B. K. 1983. Acrosomal damage caused and processing of frozen semen from the silver fox (*Vulpes argentus*) and the blue fox (*Alopex lagppus*). *Zuchthygienw.* 18: 22-26.
43. 이영락, 강태영, 최상웅. 2003. 개에서 발정유도가 인공수정효율에 미치는 영향. *한국수정란이식학회지.* 18:1:61-68.
(접수일자 : 2005. 9. 6. / 채택일자 : 2005. 12. 12.)