

개 희석 정액의 다양한 filtration 처리 후 정자평가

김용준¹ · 김진영 · 김수희 · 이영준

전북대학교 수의과대학

(게재승인: 2007년 11월 8일)

Evaluation of Extended Canine Semen after Different Filtration Treatment

Yong-Jun Kim¹, Jin-Young Kim, Sue-Hee Kim and Young-Jun Lee

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

Abstract : It is important to obtain semen with good quality for efficient fertilization and pregnancy. To obtain these semen, various methods have been developed but most of these methods are time consuming and require costly equipment. Therefore, the objective of this research is to investigate the usability of column filtration system as quick and simple method to get sperm with better quality. Ejaculates were obtained from 5 dogs and analyzed with basic quality parameters before each filtration. Sperm concentration was adjusted to 5×10^7 /ml after dilution. The experimental groups were divided into non-filtered group (control) and filtered groups (glass wool, Sephadex 5% and Sephadex 20%). Ejaculates were filtered through each filter system and assessed by recovery rate of sperm, motility, normal morphology, CFDA/PI stain and plasma membrane integrity (hypo-osmotic swelling test, HOST). The lowest recovery rate of spermatozoa was recorded in glass wool filtration group, followed by 20% Sephadex filtration group ($p < 0.05$). There was no significant difference between control (non-filtered) and 5% Sephadex filtration group. Also, there was no significant difference of sperm motility assessed under light microscope among experimental groups. Morphological normality of canine spermatozoa was the highest in the glass wool filtration group and the lowest in the 5% Sephadex filtration group with no significant differences versus 20% Sephadex filtration and control group, respectively ($p < 0.05$). Viability of canine sperm assessed by CFCA/PI staining was the highest in the glass wool filtration group with no significant difference versus the control group, and the lowest in the 20% Sephadex filtration group with no significant difference versus 5% Sephadex filtration group, respectively ($p < 0.05$). HOS values of canine sperm was the highest in the 20% Sephadex filtration group with no significant difference versus 5% Sephadex filtration group, and the lowest in the control group with no significant difference versus glass wool filtration group, respectively ($p < 0.05$). Therefore, these results indicated that filtration treatment for extended canine sperm would be useful method to get sperm with better quality by trapping the damaged sperm, consequently filter would be physical barrier against injured or immotile sperm.

Key words : Extended canine semen, Sephadex filtration, Glass wool filtration, HOS, CFDA/PI

서 론

수정능력이 있는 양질의 정자를 선택하는 것은 정액의 동결보전, 인공수정, 체내 및 체외수정란 생산에 매우 필수적인 요소이며, 최상의 유전적 가치를 가진 동물의 정액은 동물의 인공수정에서 항상 가장 관심있는 점이 되고 있다.

따라서 채취된 정액으로부터 우수한 수정능력을 가진 정자들을 획득하기 위해 많은 방법들이 연구되어져 왔으며 이중 최근 이용되는 방법들로서 swim-up 방법(29), glass wool (12,30,34) 및 Sephadex 여과법(4,5,9,18,23,40)을 포함한 정

자 여과법, Percoll과 같은 density gradient centrifugation 기법(15) 등이 알려져 왔다.

Huszar과 Vigue(22)는 Percoll의 경우 Percoll에 포함되어 있는 철로 인해 정자에서 lipid peroxidation과 같은 산화과정이 유발된다고 하였으며, Januskauskas 등(23), Lindemann 등(27), Shannon 등(45)은 생존성이 감소되거나 비정상적인 정자가 수정능력을 지닌 정자에 악영향을 끼치는 것으로 보고한 바 있다. 따라서 간이한 정자 여과법들을 통해 운동성이 없거나 죽은 정자를 제거함으로써 효과적으로 정액의 질을 향상시킬 수 있으며 또한 이러한 여과법은 Percoll에서 제시된 단점을 보완하기 위한 방법으로 사용될 수 있을 것으로 여겨진다.

이 외에도 Rhemrev 등(35), Van der Ven 등(46), Coetzee

¹Corresponding author.
E-mail : yjk@chonbuk.ac.kr

등(10)은 높은 점도의 정액, 질이 낮은 정액 또는 동결 보존된 정액인 경우 정자 여과법이 효과적으로 활용될 수 있음을 제시하였고, Sanchez 등(44)은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 근원으로 알려져 있는 백혈구의 제거를 위해 정자 여과법이 큰 장점을 가지는 것으로 보고하였다.

또한 정자 여과법을 동물 정자 검정에 사용한 보고로서 Graham과 Graham(18)은 소와 산양 정자 검정에, Fayemi 등(14)은 동결 돼지 정자 검정에, Heuer 등(21)은 물소 정자의 검정에, Samper 등(37-39,41)은 말 정자 검정에 정자 여과법을 이용한다. 이와 유사한 적지 않은 연구들(11, 26,43)에서 제시된 결론은 손상된 침체나 정자막을 가진 정자는 glass wool 및 Sephadex와 같은 filter에 걸리진다는 것이었으며 이는 객관적이면서 신속한 검정법으로 간주되었다.

그러나 위에서 제시한 소, 양, 돼지, 물소, 말의 정액에서 정자 여과법의 유용성에 대한 수많은 연구가 이루어진 것과는 달리 개의 정액에서 정자 여과법을 사용하여 수태율의 증진을 보고한 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 개에서 정자 여과법을 이용하여 양호한 정액성상을 가진 정자를 회수할 수 있는지를 알아보려 하였다.

일반적으로 동물 정액의 검정에 사용되고 있는 방법은 광학현미경을 이용한 정자 활력의 검사(32) 또는 기형을 검사(24)에 기초하고 있다. 그러나 이 검사는 간단하지만 주관적이고 정자 운동성만으로는 정자의 실제 수정 능력을 판단하기 어려우며 실제 수정 능력과 일치하지 않는 문제점(17)도 제시되었다.

이러한 주관적인 검정방법을 개선하기 위한 정자 검정의 객관적인 방법으로는 computer-assisted semen analyzer(CASA) 이용검정법(7,33), sperm membrane integrity를 평가하는 방법인 정자의 운동성 및 생존율의 검정을 위한 HOS (hypoosmotic swelling) 검사(1,8,13,36)와 정자의 생존율 검정을 위한 CFDA/PI(6-carboxy fluorescein diacetate/propidium iodide) 염색법(6,20), sperm penetration assay(48) 등이 있다. 본 연구에서는 객관적이면서도 용이하고 신속하게 정자의 수정 능력을 검정하는 방법으로서 제시되고 있는 HOS 검사와 CFDA/PI와 같은 생존율 검사 방법을 사용하고자 하였다.

따라서 이 연구의 목적은 정자여과법을 통해 회수된 정자의 운동성과 생존성을 객관적으로 검정하는 정자검정법을 이용하여 glass wool과 Sephadex 여과법이 개 정액에서 양호한 정자를 회수할 수 있는 방법인지를 알아보려 한다.

재료 및 방법

실험동물

실험에 이용된 개는 과거 번식력이 증명되었고 임상 검사상 건강하다고 판단되는 비글 3두와 슈나우저 1두, 잡종견 1두의 수캐들을 이용하였다. 연령은 2-4세이었고 체중은 잡종견 15 kg을 제외하고 8-10 kg이었다.

정액채취

정액의 채취는 수지법을 이용하였고, 한 수캐에 대해 일주

일에 일회의 정액을 채취하였으며 정자 농도가 높은 2분획을 중심으로 채취하였다. 채취 시기는 9-11 및 3-6월로 오전 중에 채취하였으며 채취하는 동안 낮은 온도로 인한 정자의 변화를 방지하기 위하여 정자를 채취하는 시험관은 약 30-35°C로 유지되도록 하였다.

원정액의 검사

원정액 검사를 위해 정액 채취 후 10분 내로 실험실로 옮겨 채취한 정액 일부를 취하여 일반 광학현미경을 이용하여 정자 활력, 정자 수, 기형율을 조사하였다.

희석액의 조성

본 실험에 사용된 희석액은 Sweden 배지의 조성대로 Tris(hydroxymethyl)-aminomethane 2.4 g, Citric acid(monohydrate) 1.4 g, Glucose 0.8 g를 100 ml의 증류수에 용해하여 만들었으며, 0.45 μm의 pore size를 가진 filter로 여과하였다. 여과 후 희석액은 사용하기 전까지 -20°C에 보관하였으며 사용 직전 37°C에서 녹인 후 실험에 이용하였다.

여과장치의 준비

Glass wool 여과장치의 준비

실험에 사용된 glass wool(microfibre code 112, John Manville)은 무게 25 mg을 1 cm 두께가 되도록 1 ml 일회용 주사기 배럴에 채운 후 EO gas 멸균하여 사용하였다.

정액여과 실험 직전 glass wool 여과장치는 느슨한 glass wool 섬유나 미량입자들을 제거하기 위해 1 ml 희석액으로 2-3회 세척하였다. 1.5 ml Eppendorf tube의 cap을 펀치를 이용하여 뚫은 tube와 세척된 glass wool 여과장치와 조합하였다(Fig 1.).

Sephadex G-15 여과장치의 준비

Sephadex 여과를 위해 Sweden 배지를 사용하여 5%와 20% Sephadex G-15(Sigma) 현탁액을 각각 준비하였으며 그 후 현탁액은 5°C에서 8-12시간 동안 수화(hydration)시킨 후 실험에 사용하였다.

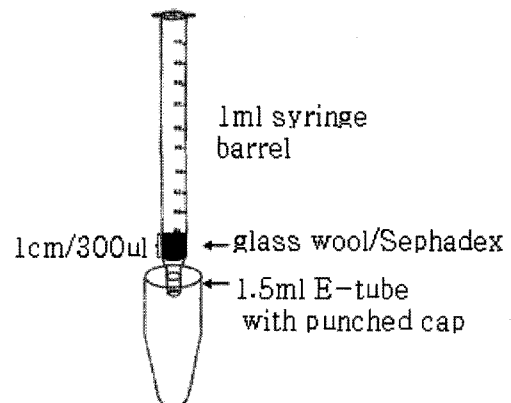


Fig 1. Glass wool column and 1.5 ml Eppendorf tube ready for semen filtration.

Sephadex 여과장치는 Sephadex의 손실을 방지하기 위해 1 ml 일회용 주사기 배럴에 적은 양의 glass wool을 두께 1-1.5 mm가 되도록 피스톤으로 눌러 채웠으며 길이 5 cm, 직경 1.5 mm의 고무관을 주사기 끝에 연결한 후 고무관을 겹자로 집은 상태로 유지하였다.

미리 수화시킨 5%와 20% Sephadex 현탁액 300 μ l 씩을 각각의 여과장치에 조심스럽게 흘려보낸 후 3-4분간 정치시켜 현탁액의 resin과 buffer 부분이 분리되도록 하였다. 그 후 겹자를 풀어 buffer 부분을 흘려보내고 시험관을 제거 후 glass wool과 마찬가지로 1.5 ml Eppendorf tube와 조합하여 정액여과에 사용하였다.

정액의 처리 및 여과법

개 정액의 처리 및 여과는 37°C로 유지되는 항온수조에서 실시하였으며, 원정액을 회색액으로 회색하여 정자수가 5×10^7 /ml이 되도록 조정하였다.

본 실험에 사용된 실험군은 총 4군으로서 대조군(여과하지 않고 정액을 1 ml syringe에 흘려 회수한 군), glass wool 여과군, 5% Sephadex 여과군, 그리고 20% Sephadex 여과군으로 구분하였다.

정액의 여과는 미리 준비된 각 여과장치에 회색정액을 400 μ l 씩 천천히 흘려보낸 후 5-10 분간 여과되도록 하였으며 그 후 각 여과장치에 회색액 500 μ l 씩을 첨가하여 정액을 회수하였다. 회수된 각 실험군의 정액에 대하여 정액평가를 실시하였다.

정액의 평가

이 실험에서 사용된 개 정액의 평가로서 정자회수율 검사, 정자 활력검사, 정상 형태 정자율 검사, CFDA/PI 형광 염색법 및 HOS 검사법을 이용하였다.

정자회수율 검사

여과 후 정자회수율 검사는 혈구계산판을 이용하였다. 여과된 정액의 20 μ l를 혈구계산판에 떨어뜨린 후 커버글라스로 덮어 일반 광학현미경 하에서 정자수를 계산하였으며 이 후 여과되기 전과 비교하여 회수된 정자수의 백분율을 구하였다.

정자의 활력검사

여과 후 정액의 활력검사는 일반 광학현미경을 이용하였으며 여과된 정액의 10 μ l를 슬라이드에 떨어뜨린 후 200배에서 정자의 전진 운동성을 검사하였다.

정상 형태 정자율 검사

여과된 정액의 20 μ l를 슬라이드에 떨어뜨려 도말하였으며 공기 중에 빠르게 말린 후 즉시 100% methanol에 2분 이상 고정시켰다. 고정된 슬라이드는 Diff-quick 염색시약을 이용하여 각 염색약에 2분씩 염색한 후 일반 광학현미경으로 400배에서 200개의 정자를 검사하여 정상적인 형태를 지닌 정자의 백분율을 구하였다.

CFDA/PI 형광 염색법

CFDA/PI의 형광염색을 이용한 정자 생존율 검사를 위해 2.5 mg formaldehyde/ml, 0.5 mg 6-CFDA/ml, 0.5 mg PI/

ml를 준비하였으며 CFDA는 DMSO에 녹인 후 -20°C에서 냉동보관, PI는 증류수에 녹인 후 -4°C에서 냉장보관 하였다. 준비된 형광 염색시약은 실험 직전 암실내 실온에서 녹여 사용하였다. CFDA/PI 용액의 조성은 20 μ l formaldehyde, 40 μ l CFDA와 40 μ l PI를 혼합한 후 회색액(Sweden 배지)을 첨가하여 총 1 ml가 되도록 만들었으며 1시간 이내에 실험에 사용하였다.

형광 염색을 위해 여과된 정액을 CFDA/PI 용액과 1:3으로 혼합하여 37°C에서 15분간 배양하였으며 이 중 5 μ l를 슬라이드에 올려놓아 커버글라스로 덮은 후 형광현미경(Nikon) 하에서 Nikon B-2A(Blue exciter, 450-490 nm)와 G-2A(Red exciter, 510-560 nm) filter를 이용하여 관찰하였다. 400배에서 200개의 정자를 검사하였으며 이 중 초록색으로 염색되는, 즉 살아 있는 정자의 백분율을 구하였다.

HOS 검사법

여과 후 정자에 대한 HOS 검사를 위해 60 mOsm fructose 용액을 준비하였다. 0.998 g fructose를 100 ml 증류수로 용해하였고 5 ml씩 분주하여 -20°C에서 냉동보관 하였으며 실험 전 37°C에서 녹인 후 실험에 사용하였다.

정액 0.1 ml를 취하여 미리 준비된 1 ml 60 mOsm fructose 용액에 혼합한 후 37°C에서 45분간 배양하였다. 배양 후 5 μ l를 슬라이드에 떨어뜨리고 커버글라스로 덮은 후 위상차현미경(Olympus)을 이용하여 400배에서 200개의 정자를 검사하여 꼬리부분이 curled-swollen된 정자의 백분율을 계산하였다.

통계 분석

이 실험에서 얻어진 결과는 ANOVA로 통계 처리하였으며 ANOVA 통계 처리 후 유의성이 인정되는 경우($p < 0.05$)는 Tukey-Kramer Multiple Comparison Test로 실험군간 유의차를 구하였다.

결 과

다양한 여과 처리 후 정자회수율을 조사한 결과는 Table 1과 같다.

여과 처리를 위해 회색된 정자의 농도는 5×10^7 /ml이었으며, 각각의 여과 후 회수된 평균 정자의 농도는 glass wool 여과군에서 1.96×10^7 /ml, 5% Sephadex 여과군에서 4.77×10^7 /ml, 20% Sephadex 여과군에서 3.52×10^7 /ml를 나타내었다. 이를 백분율로 환산한 결과 대조군과 비교 시 glass wool 여과군에서 $39.2 \pm 20.29\%$ 로 가장 낮은 회수율을 나타내었다($p < 0.05$). 그러나 대조군과 5% Sephadex 여과군 간에 유의적인 차이를 보이지 않았다.

다양한 여과 처리 후 정자의 활력을 조사한 결과는 Table 2와 같다.

정자의 활력은 대조군에서 가장 높은 수치가 나타났으나 유의적인 차이가 인정되지 않았다($p > 0.05$).

다양한 여과 처리 후 정상 형태 정자율을 조사한 결과는 Table 3과 같다.

Table 1. Recovery rate of canine spermatozoa after different filtration treatment

	Control	Filtration		
		Glass wool	Sephadex 5%	Sephadex 20%
Recovery rate	100.0±0 ^a	39.2±20.29 ^b	95.43±3.41 ^a	70.36±27.78 ^c

a, b, c : Different superscripts denote significant differences within column($p<0.05$).

Table 2. Motility of extended canine spermatozoa after different filtration treatment

	Control	Filtration		
		Glass wool	Sephadex 5%	Sephadex 20%
Motility	84.71±16.03	65.71±18.58	76.43±20.95	64.14±24.16

정상적인 형태를 가진 정자는 glass wool 여과군에서 가장 높았으며(86.83±3.25%), 5% Sephadex 여과군에서 가장 낮은 수치(73.17±9.04)를 나타내었다($p<0.05$). 그러나 대조군, 5% Sephadex 여과군 및 20% Sephadex 여과군 간에는 정상 정자 형태율의 유의적 차이는 인정되지 않았다.

다양한 여과 처리 후 CFDA/PI 염색에 의한 생존율 검사 결과는 Table 4와 같다.

Glass wool 여과군은 대조군과는 상호간에 유의적인 차이 없이 각각 5% Sephadex 여과군과 20% Sephadex 여과군보다 더 높은 생존율을 나타내었다($p<0.05$).

5% Sephadex 여과군은 20% Sephadex 여과군보다 생존율에서 더 높은 수치를 나타내었으나 상호간에 유의적인 차이는 없었다.

다양한 여과 처리 후 정자에 대한 HOS 검사결과는 Table 5와 같다.

20% Sephadex 여과군은 5% Sephadex 여과군과 유의적인 차이 없이 가장 높은 HOS 수치(73.00±5.54%)를 나타내었으며, 대조군은 glass wool 여과군과 유의적인 차이 없이 가장 낮은 수치(63.14±9.79%)를 나타내었다. 또한 Sephadex 여과군들은 대조군보다 각각 높은 HOS 수치를 나타내었으며($p<0.05$), 또한 20% Sephadex 여과군은 glass wool 여과군보다 더 높은 HOS 수치를 나타내었다($p<0.05$).

고 찰

이 연구에서 여과 후 회수된 정자농도는 대조군에 비해 glass wool 여과군과 20% Sephadex 여과군에서 유의성있게 감소되었으며($p<0.05$), 이 결과는 여과시 손상되거나 죽은 정자가 여과를 통해 걸러지기 때문인 것으로 사료되며 이는 Lodhi와 Crabo(28), Crabo 등(11), Samper와 Crabo(42)가 정

Table 3. Morphological normality of extended canine sperm after different filtration treatment

	Control	Filtration		
		Glass wool	Sephadex 5%	Sephadex 20%
Normality	78.17±8.84	86.83±3.25 ^a	73.17±9.04 ^b	79.50±9.14

a, b : Different superscripts denote significant differences within column($p<0.05$).

Table 4. Viability of extended canine sperm assessed by CFDA/PI staining after different filtration treatment

	Control	Filtration		
		Glass wool	Sephadex 5%	Sephadex 20%
Viability	82.60±9.78 ^a	84.43±10.45 ^a	62.57±20.31 ^b	58.59±14.90 ^b

a, b : Different superscripts denote significant differences within column($p<0.05$).

Table 5. HOS values of extended canine sperm after different filtration treatment

	Control	Filtration		
		Glass wool	Sephadex 5%	Sephadex 20%
HOS values	63.14±9.79 ^a	67.14±7.65 ^{ab}	71.14±7.97 ^{bc}	73.00±5.54 ^c

a, b, c : Different superscripts denote significant differences within column($p<0.05$).

자를 glass wool과 Sephadex 여과 후 제시한 결론과 일치하는 것으로 보인다. 본 연구에서 정상형태의 정자율과 HOS 검사를 이용한 생존율 검사에서 대조군보다 여과군에서 높은 수치를 보였으며 이러한 결과는 다른 연구(4,5,19, 23,31)에서 보고한 바와 같이 여과 후 비정상적인 정자 형태를 가진 정자의 감소와 함께 정액의 질이 향상된 것과 일치하는 결과라 할 수 있겠다.

또한 Engel 등(12)과, Mogas 등(31)은 정액을 glass wool 및 Sephadex에 여과 후 여과한 glass wool과 Sephadex를 전자현미경으로 관찰하여 glass wool filter의 상단부에 정자 세포들과 비세포성 물질인 찌꺼기들이 걸려져 있는 사진과 Sephadex 입자에 기형정자들이 걸려져 있는 사진을 제시한 바 있는데 이는 이 두가지 여과장치가 손상된 정자를 걸러낸다는 것을 전자현미경적으로 입증한 자료라고 생각된다.

그러나 본 실험에서 glass wool 및 20% Sephadex 여과군의 경우 여과 후 정자농도의 현저한 감소를 나타내었으며, 특히 glass wool 여과군은 38%의 가장 낮은 회수율을 보여 좋은 상태의 정자를 회수할 수 있음에도 불구하고 정자수에서 많은 손실이 있음이 지적되고 있다. Januskauskas 등(23) 및 다른 연구(3)에서도 여과 후 정자의 운동성 증진과 기형을 감소에 있어서 양질의 정액을 얻을 수 있었으나 정자 회수율이 크게 감소했다고 보고하여 우수한 정액을 최대한 회수할 수 있는 방법이 모색되어야 할 것으로 보인다.

본 연구의 Table 2의 결과에서 여과 후 광학현미경을 이용한 정자 활력 평가에서 모든 여과군은 대조군에 비해 유의적인 차이를 나타내지 못하였다. 이는 Januskauskas 등(23)이 소의 신선 및 회석정액에서 여과 후 정자운동성에서 유의적인 차이를 발견하지 못한 결과와 일치하나 다른 연구(2, 4)에서 여과 후 증진된 운동성을 나타낸 결과와는 상반된 결과라 하겠다. 이처럼 여과 후 정자 활력에 있어서 상반되는 결과들이 나타나는 것은 첫째, 채취된 원정액의 질과 처리과정(회석, 냉각, 동결, 용해 등)에서 차이가 존재하기 때문이며 둘째, 정자 활력을 평가하는 검정방법의 차이가 있기 때문인 것으로 추측된다.

이 연구에서 여과 처리 후 정상 형태 정자율은 glass wool 군에서 가장 높은 수치를 나타내었으나 대조군과 20% Sephadex 여과군과는 유의적인 차이가 인정되지 않았다. 또한 기형률에 관한 다른 연구결과(16,17)를 살펴보면 소와 버팔로에서 Sephadex 여과 후 기형 정자를 제거시킴으로써 정액의 질을 향상시켰으며 두부, 중편부, 그리고 꼬리에서 발생한 기형들을 가진 정자를 효과적으로 제거시켰다고 보고하였다. 본 연구에서는 Table 3에서와 같이 기형을 조사에서 비록 glass wool 여과군에서 대조군에 비해 더 높은 수치의 정상 형태 정자율이 나타났으나 유의성있는 차이는 아니었는데 이에 대한 보다 많은 연구가 수행되어야 하리라고 보여진다.

본 연구에서 사용된 CFDA/PI 형광 염색법과 HOS 검사법은 정자 형질막의 상태를 평가하기 위한 객관적 검정법으로 알려져 있는데, 특히 정자 형질막이 형태학적으로 완전한 지 손상되었는지를 평가하는 CFDA/PI 형광 염색법과는 달

리 HOS 검사법은 정자의 기능적 완전성에 대한 정보를 제공하는 더욱 특수한 방법이라 할 수 있겠다(25,47). 실제 여러 연구자들에 의해 연구된 바와 같이 CFDA/PI와 같은 생사 염색법이 정자 형질막의 생리적 손상을 평가하는 방법으로 사용되는 반면 HOS 검사법은 정자 형질막의 기능적 완전성을 알아보기 위해 사용되는 것으로 보고되었다(6,25). 따라서 이러한 점에서 HOS 검사법은 생존 염색법과는 다르게 정자 기능적 상태에 대한 정보와 함께 정자의 수정능력을 평가하는 중요한 실험적 요소로 여겨졌으며 World Health Organization(47)는 정액의 일반적인 분석에 있어 추가적인 방법으로서 HOS 검사법을 권장해 왔다.

Table 4와 5의 결과에서 여과군, 특히 Sephadex 여과군들의 경우 대조군과 비교시 CFDA/PI 수치는 비록 낮았으나 HOS 수치는 높은 것으로 보아 여과처리가 정자 형질막의 생리적 손상은 증가시킬 수 있으나 정자 형질막의 기능적 손상을 가진 정자들은 제거할 수 있음을 추측할 수 있다. 이는 상기 연구에서와 같이(25,36,47) Sephadex를 통해 여과한 정자의 경우 기능적으로 우수한 수정능력을 가진 정자가 회수될 수 있을 가능성이 높은 것으로 사료되나 실제 HOS와 CFDA/PI 검사법을 이용한 검정법 중 수정률 및 수태율 향상에 어떠한 검정법이 더욱 신뢰성이 있는지는 앞으로 더 많은 연구가 수행되어야 할 것이며 이를 근거로 여과장치의 효율성을 보다 객관적으로 증명할 수 있을 것으로 생각된다.

이상의 결과, 개 정자의 glass wool 여과 및 Sephadex 여과 결과 정자회수율의 감소를 보였으나 glass wool 여과군이 높은 정상 형태 정자율과 생존율 그리고 Sephadex 여과군이 높은 HOS 수치를 나타냄으로써 정액 여과시 손상된 정자 및 죽은 정자가 걸러지는 것으로 보인다. 따라서 개 정자 여과처리는 정자 회수율은 감소되나 보다 높은 생존성과 수태력을 가진 정자가 회수될 가능성이 있다고 판단되어 인공수정 및 체외수정에 사용시 수정율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

인공수정 시 수태율을 높이기 위한 건강한 정자의 선별을 위해 다양한 여과처리 장치를 이용하여 개 정자를 회수하였다.

과거 번식력이 있고 임상검사상 건강하다고 판단되는 수캐 5두로부터 정액을 채취하였으며 Sweden 배지를 이용하여 회석한 후 glass wool과 Sephadex에 여과하였다.

여과 후 정자회수율, 정자 활력, 정상 정자 형태율 및 생존율 검사의 객관성을 위해 CFDA/PI 염색과 HOS 검사를 실시하였다.

1. 각각의 여과 처리 후 회수된 정자회수율은 glass wool 여과군에서 가장 낮은 회수율을 나타내었으며 그 다음으로 20% Sephadex 여과군이 낮은 것으로 확인되었다($p < 0.05$). 그러나 대조군과 5% Sephadex 여과군에서는 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

2. 정자의 활력은 실험군간 유의적인 차이가 인정되지 않

았다($p > 0.05$).

3. 각각의 여과처리 후 정상적인 형태를 가진 정자는 glass wool 여과군에서 가장 높았고 5% Sephadex 여과군에서 가장 낮은 수치를 나타내었으나($p < 0.05$), 대조군과 20% Sephadex 여과군과 각각 유의적인 차이는 인정되지 않았다.

4. 각각의 여과 처리 후 CFDA/PI 염색에 의한 생존을 검사결과, glass wool 여과군은 대조군과는 상호간에 유의적인 차이없이 각각 Sephadex 5% 여과군과 Sephadex 20% 여과군보다 더 높은 생존율을 나타내었다($p < 0.05$).

5. 각각의 여과 처리 후 정자에 대한 HOS 검사결과, 20% Sephadex 여과군이 5% Sephadex 여과군과 유의적인 차이 없이 가장 높은 수치를 나타내었으며 대조군은 glass wool 여과군과 유의적인 차이 없이 가장 낮은 수치를 나타내었다($p < 0.05$).

이 결과를 통해 회색된 개 정액에서 glass wool 또는 Sephadex 여과 시스템을 이용하여 손상된 정자를 걸러낼 수 있으며, 결과적으로 이러한 여과 시스템이 손상된 정자를 제거하는 물리적 장벽으로서 중요한 역할을 하여 보다 양호한 정자를 회수함으로써 인공수정 및 체외수정에 이용할 가능성이 있음을 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Abu-Musa A, Takahashi K, Kitao M. Correlation between post swim-up hypo-osmotic swelling test and in vitro fertilization results. *Int J Fertil* 1993; 38: 113-116.
2. Ahmad Z, Anzar M, Shahab M, Ahmad N, Andrabi SM. Sephadex and sephadex ion-exchange filtration improves the quality and freezability of low-grade buffalo semen ejaculates. *Theriogenology* 2003; 59: 1189-1202.
3. Anzar M, Graham EF. Filtration of bovine semen. II. Factors affecting the recovery rate of spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 1993; 31: 197-204.
4. Anzar M, Graham EF. Effect of filtration on post-thaw quality of bull semen. *Theriogenology* 1995; 43: 439-449.
5. Anzar M, Graham EF. Role of sperm motility and acrosome integrity in the filtration of bovine semen. *Theriogenology* 1996; 45: 513-520.
6. Brito LF, Barth AD, Bilodeau-Goeseels S, Panich PL, Kastelic JP. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology* 2003; 60: 1539-1551.
7. Budworth PR, Amann RP, Chapman PL. Relationships between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility. *J Androl* 1988; 9: 41-54.
8. Check JH, Epstein R, Nowroozi K, Shanis BS, Wu CH, Bollendorf A. The hypo-osmotic swelling test as a useful adjunct to the semen analysis to predict fertility potential. *Fertil Steril* 1989; 52: 159-161.
9. Cisale HO, Fischman ML, Blasi CD, Fernandez HA, Gledhill BL. Enrichment of high quality spermatozoa in bovine semen: relative effectiveness of three filtration matrixes. *Andrologia* 2001; 33: 143-150.
10. Coetzee K, Erasmus EL, Kruger TF, Menkveld R, Lombard CJ. Glass wool filter preparation of cryopreserved spermatozoa. *Andrologia* 1994; 26: 33-34.
11. Crabo BG, Pavelko MK, Kosco MS, Lohdi IA, Loseth KJ. Evaluation of frozen boar semen by surgical insemination, sperm motility, acrosome damage and Sephadex filtration. *Proc 10th Int Congr Anim Reprod AI* 1984; 2: 59.
12. Engel S, Weber H, Petzoldt R, Seidle B, Wiehe W, Sperl J. An improved method of sperm selection by glass wool filtration. *Andrologia* 2001; 33: 223-230.
13. Enginsu ME, Dumoulin JC, Pieters MH, Bergers M, Evers JL, Geraedts JP. Comparison between the hypoosmotic swelling test and morphology evaluation using strict criteria in predicting in vitro fertilization (IVF). *J Assist Reprod Genet* 1992; 9: 259-264.
14. Fayemi EO, Crabo BG, Graham EF. Assay of frozen boar semen with Sephadex filtration. *Theriogenology* 1979; 12: 13-17.
15. Gorus FK, Piper DG. A rapid method for the fractionation of human spermatozoa according to their progressive motility. *Fertil Steril* 1981; 35: 662-665.
16. Goyal RL, Tuli RK, Georgie GC, Ghand D. Comparison of quality and freezability of water buffalo semen after washing of sephadex filtration. *Theriogenology* 1996; 46: 679-686.
17. Graham EF, Schmehl MK, Nelson DS. Problems with laboratory assays. *Proc 8th Tech Conf NAAB Reprod AI* 1980: 59-66.
18. Graham EF, Graham JK. The effect of whole ejaculate filtration on morphology and the fertility of bovine semen. *J Dairy Sci* 1990; 73: 91-97.
19. GÜNAY Ülgen, NUR Sekariya, Kemal SOYLU M. Effect of Glass Wool Filtration Method On frozen-Thawed Dog Semen. *Uludag Univ. J Fac Vet Med* 2004; 23: 9-14.
20. Harrison RAP, Vickers SE. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1990; 88: 343-352.
21. Heuer C, Tahir-Nazir M, Crabo BG, Bader H, Shah M, Saji MA. Simple method for the assay of water buffalo semen by filtration through sephadex. *Pakistan Vet J* 1983; 3: 157-161.
22. Huszar G, Vigue L. Correlation between the rate of lipid peroxidation and cellular maturity as measured by creatinine kinase activity in human spermatozoa. *J Androl* 1994; 15: 71-77.
23. Januskauskas A, Lukoseviciute K, Nagy J, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Assessment of the efficacy of Sephadex G-15 filtration of bovine spermatozoa for cryopreservation. *Theriogenology* 2005; 63: 160-178.
24. Jasko DJ, Lein DL, Foote RH. Determination of the relationship between morphologic classifications and fertility in stallion: 66 cases (1987-1988). *J Am Vet Med Assoc* 1990; 197: 389-394.
25. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Palaez BG, Crabo BG, Zaneveld LJD. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 1984; 70: 219-228.
26. Landa CA, Almquist JO, Amman RP. Factors influencing Sephadex separation of bovine and ovine spermatozoa. *J Dairy Sci* 1980; 63: 277-282.
27. Lindemann CB, Fisher M, Lipton M. A comparative study of the effects of freezing and frozen storage on intact and demembrated bull spermatozoa. *Cryobiology* 1982; 19: 20-28.
28. Lodhi LA, Crabo BG. Filtration of bull spermatozoa through Sephadex, polyacrylamide, silica gel and glass wool in the

- presence and absence of two sugars. Proc 10th Int Congr Anim Reprod & AI, Urbana. 1984; 2: 59-61.
29. Lopata A, Patullo MJ, Chang A, James B. A method for collecting motile spermatozoa from human semen. *Fertil Steril* 1976; 27: 677-684.
 30. Maki-Laurila M, Graham EF. Separation of dead and live spermatozoa in bovine semen. *J Dairy Sci.* 1968; 51: 965.
 31. Mogas T, Rigau T, Piedrafito J, Bonet S, Rodriguez-Gil JE. Effect of column filtration upon the quality parameters of fresh dog semen. 1998; 50: 1171-1189.
 32. Müller Z. Practicalities of insemination of mares with deep-frozen semen. *J Reprod Fert Suppl* 1987; 35: 121-125.
 33. O'Connor MT, Amann RP, Saacke RG. Comparisons of computer evaluations of spermatozoal motility with standard laboratory tests and their use for predicting fertility. *J Anim Sci* 1981; 53: 1368-1376.
 34. Paulson JD, Polakoski KL. A glass wool procedure for removing extraneous material from the human ejaculate. *Fertil Steril* 1977; 28: 178-181.
 35. Rhenrev J, Jeyendran RS, Vermeiden JPW, Zanefeld LJD. Human sperm selection by glass wool filtration and two-layer, discontinuous Percoll gradient centrifugation. *Fertil Steril* 1989; 51: 685-691.
 36. Rossato M, Galeazzi C, Ferigo M, Foresta C. Antisperm antibodies modify plasma membrane functional integrity and inhibit osmosensitive calcium influx in human sperm. *Human Reproduction* 2004; 19: 1816-1820.
 37. Samper JC, Crabo BG, Behnke EJ, Byers AP, Hunter AG. *In vitro* capacitation of stallion semen and its filterability through filters containing Sephadex. Proc Conf Res Wor Anim Dis, Chicago. 1986: 236(Abstr).
 38. Samper JC, Behnke EJ, Byers AP, Hunter AG, Brabo BG. *In Vitro* capacitation of stallion spermatozoa in calcium-free medium and penetration of zona free hamster eggs. *Theriogenology* 1989; 31: 875-884.
 39. Samper JC. Evaluation of Membrane Integrity of Preserved Stallion Spermatozoa. PhD Dissertation, University of Minnesota. 1990.
 40. Samper JC, Crabo BG, Hamilton DW. A clusterin-like protein in stallion sperm and reproductive fluids binds to Sephadex. *J Androl Suppl* 1990; 11: 26
 41. Samper JC, Hellander JC, Crabo BG. Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. *J Reprod Fert Suppl* 1991; 44: 107-114.
 42. Samper JC, Crabo BG. Assay of capacitated, freeze-damaged and extended stallion spermatozoa by filtration. *Theriogenology* 1993; 39: 1209-1220.
 43. Samper JC, Hamilton DW, Pryor JL, Loseth KJ, Troedsson MHT, Crabo BG. Mechanism of sephadex trapping of capacitated stallion spermatozoa. *Biol Reprod Mono* 1995; 1: 729-737.
 44. Sanchez R, Concha M, Ichikawa T, Henkel R, Schill WB. Glass wool filtration reduces reactive oxygen species by elimination of leucocytes in oligozoospermic patients with leucocytospermia. *J Assist Reprod Genet* 1997; 13: 489-494.
 45. Shannon P, Curson B. Toxic effect and action of dead sperm on diluted bovine semen. *J Dairy Sci* 1972; 55: 614-620.
 46. Van der Ven HH, Jeyendan RS, Al-Hasani S, Tünnerhoff A, Hoebbel K, Diedrich K, Krebs C, Perez-Palaez M. Glass wool column filtration of human semen; relation to swim-up procedure and outcome of IVF. *Hum reprod* 1988; 3: 85-88.
 47. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge; Cambridge University Press. 1999
 48. Yanagimachi R. Zona-free hamster eggs: Their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. *Gamete Res* 1984; 5: 323-344.