

# 제주마의 동결정액 제조에 있어 Glycerol과 Ethylene Glycol이 동결 용해 후 정자의 기능에 미치는 영향

오신애<sup>1</sup> · 고민희<sup>1</sup> · 고문석<sup>1</sup> · 이종언<sup>1</sup> · 박용상<sup>1</sup> · 강태영<sup>2</sup> · 고재형<sup>3</sup> · 조원모<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립축산과학원 난지축산시험장, <sup>2</sup>제주대학교 수의과대학, <sup>3</sup>우리동물병원

## Effect of Glycerol and Ethylene Glycol on Post-Thawed Sperm Function in Jeju Horse

Shin-Ae Oh<sup>1</sup>, Min-Hee Ko<sup>1</sup>, Moon-Suck Ko<sup>1</sup>, Chong-Eon Lee<sup>1</sup>, Yong-Sang Park<sup>1</sup>,  
Tae-Young Kang<sup>2</sup>, Jae-Hyoung Ko<sup>3</sup> and Won-Mo Cho<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>National Institute of Animal Science, RDA, Jeju 690-150, Korea

<sup>2</sup>Department of Veterinary Medicine, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

<sup>3</sup>Woori Equine Hospital, Juj 690-042, Korea

### ABSTRACT

Cryopreservation induces sublethal damage to the spermatozoa, which leads to their reduced fertile life. This study was designed to determine effect of glycerol and ethylene glycol as cryoprotectant in extender on improve the freezability of Jeju horse semen. The semen was cryopreserved with glucose-EDTA extender containing each 5% glycerol, 5% ethylene glycol, 8% glycerol or 8% ethylene glycol, respectively. Post-thawed sperm were evaluated motility, viability, Membrane integrity and acrosome integrity. Post-thawed sperm motility were not significantly differences among treatments. However, sperm viability were significantly higher ( $p < 0.05$ ) in 8% glycerol ( $39.85\% \pm 11.41$ ) than in 5% glycerol treatment ( $18.08\% \pm 1.61$ ). In membrane integrity, swelling sperm ratio was significantly higher ( $p < 0.05$ ) in 8% glycerol ( $34.12\% \pm 11.02$ ) than other treatments. In the percentage of capacitated sperm assessed by CTC staining, F pattern was significantly higher in 8% ethylene glycol than 5% glycerol and 5% ethylene glycol ( $p < 0.05$ ). B pattern ratio was significantly increased in 5% ethylene glycol compared with 8% glycerol and 8% ethylene glycol ( $p < 0.05$ ). Moreover, 8% ethylene glycol treatment was significantly decreased AR pattern ratio compared with other treatments ( $p < 0.05$ ). It is concluded that treatment of 8% glycerol was improved the sperm viability and 8% ethylene glycol was improved the sperm acrosome integrity after thawing. However, they were not significantly difference between 8% glycerol and 8% ethylene glycol on post-thawed sperm viability. Therefore, 8% ethylene glycol was more effective sperm cryoprotectant than 8% glycerol in Jeju Horse.

(Key words : Glycerol, Ethylene glycol, Semen freezing, Jeju horse)

### 서 론

국제적으로 살펴보면, 말 번식협회는 지난 10여년 사이에 동결정액을 이용하는 것을 허용하여 왔다. Arabian, Quarter 그리고 American Paint 종의 말에 대한 말 번식협회 등의 주요한 협회에서 이러한 동결기술을 부분적으로 허용함에 따라 말 동결정액 제조법에 대한 연구가 활성화되며, 기존의 방법을 개선하거나 새로운 방법을 모색하게 되었다 (Alvarenga 등, 2005). 그러나, 현재 종마가

생산하는 정액의 30~40%만이 일관된 변이를 가지는 등의 동결에 적합하다고 보고된 바 있다 (Alvarenga 등, 2003). 뿐만 아니라, 말 정액의 희석액에 있어서도 희석액의 성분에 따라 EDTA (Martin 등, 1979), 우유 (Kenny 등, 1975), skim-milk (Backman 등, 2004), 유단백 (Pierre 등, 1992) 그리고 casein (Masuda 등, 2004)의 첨가에 따라 동결방법도 많은 차이를 보이고 있다. 또한, 말 정액의 동결 과정은 동일 개체의 사정 정액 사이에서도 결과 변이가 크다는 점에서 여전히 연구가 필요한 상황이다 (Alvarenga 등, 2003). 동결 과정에 영향을 주는 요소로는 동

\* 본 연구는 2012년도 농촌진흥청 국립축산과학원 박사후연수과정 지원사업에 의해 이루어진 것임.

† Corresponding author : Phone: +82-64-754-5716, E-mail: cwmo3451@rda.go.kr

결보호제의 종류, 냉각속도, 희석제의 구성성분, 삼투압 스트레스에 대한 정자의 저항성과 이 요소들 간의 상호 영향을 들 수 있다 (Squires 등, 1999). 이러한 사실은 말 산업에 있어 동결정액을 사용하는 것이 쉽지 않음을 뜻하지만, 반면에 동결정액의 기능이 개선될 때보다 거대한 규모의 동결정액 정자의 사용 가능성을 시사한다.

국내에서 말의 사육은 주로 제주도가 예로부터 말의 고장이었으나 농경산업의 쇠퇴로 인해 말의 사육두수가 감소하다가 국내 경제성장과 함께 레저 문화의 발달로 승마가 본격적으로 부각되게 되었으며, 이를 위해 수입산 더리브렛이 주종을 이루었으나, 한국인의 체형에 다소 큰 편이므로 한국형 승용마의 개량 및 육성이 시급하게 대두되어 국내에서도 더리브렛 종과 더불어 제주마와 관련된 말 산업이 괄목할만한 성장을 보이고 있다. 이에 따라 말의 인공수정에 관한 연구도 활발히 진행되어 현재 동결정액에 의한 수태율이 평균 약 50%에 달하고 있으나, 1회 발정 당 수태율은 0~70%로 그 변이가 크며, 아직까지 표준화된 방법은 없는 실정이다 (Squires 등, 1999; Leopold 등, 2000). 또한, 국내에서 말의 인공수정에 관한 연구는 제주 재래마 정액의 일반 특성에 관한 조사 (오 등, 1994), 제주 재래마 정액의 동결보존에 관한 연구 (박 등, 1995) 그리고 말 정액 동결시 glycerol의 농도와 동결속도가 동결 용해 후 생존율에 미치는 영향에 관한 연구 (최 등, 2010), 말의 정액 형태에 따른 운동성과 인공수정 임신율에 영향을 미치는 요인 (박 등, 2011) 등을 제외하고는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 제주마의 동결정액 제조에 있어 동결보호제로서 glycerol과 ethylene glycol의 사용이 동결-용해 후 정자의 운동성, 생존율, 정자막 온전성 그리고 정자의 침체막 온전성 등에 미치는 영향을 알아보고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 공시 동물 및 정액의 채취

본 연구에 사용된 공시동물은 국립축산과학원 난지축산시험에서 사육 중인 수컷 1두 (6세)와 제주 삼미 목장에서 사육 중인 수컷 1두 (10세)를 이용하였고, 자연교미를 한 적은 있으나 인공적인 정액 채취의 경험이 전혀 없는 개체를 이용하였다. 각각 단독의 사육장 및 방목으로 충분한 운동, 1일 1회의 사료급여와 무제한 물을 급여하여 사육하였다.

정액의 채취는 주 1회의 간격으로 콘돔법을 실시하여 채취하였으며, 발정 암컷 개체에 증가하도록 하여 사정을 유도하였다. 청결한 채취를 위해 생식기 주위를 세척하고 음경에 콘돔을 씌워 사정을 유도하였다. 사정된 정액은 총 정액량과 정자 수 등의 일반적 성상을 검사하였다.

### 정액의 처리 및 제조

본 실험에 이용된 보존액의 조성은 Table 1과 같이 Martin 등 (1979)의 방법을 이용하였으며, 5%의 glycerol을 처리한 실험구를 대조구로 사용하였다. 채취된 정액은 즉시 실험실로 운반하였다. 원정액을 Tris-Egg yolk extender와 1:1로 희석하여 냉각을 시작하여 최종농도의 2배가 되도록 extender의 양을 측정하여 4°C에서 15분 간격으로 4회 extender를 혼합하여 최종 extender를 혼합한 후 4°C 1시간 동안 냉각을 유지하였다. 냉각 종료 후, 동결보호제가 첨가된 희석액을 혼합하여 4°C에서 2시간 동안 평형을 유도하였으며, 평형이 완료된 정자는  $14 \times 10^7$  cell/ml로 농도를 조절하여 0.5 ml straw에 충전 봉합하였다. 충전된 straw는 액체질소 표면 5 cm 높이에서 10분간 노출

Table 1. Composition of the glucose-EDTA solution and of the lactose-EDTA extender from Martin et al (1979)

Chemicals	Amount
Glucose-EDTA solution	
Glucose monohydrate (g) (Sigma, USA)	59.985
Sodium citrate dihydrate (g) (Sigma, USA)	3.700
Disodium ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA) (g) (Sigma, USA)	3.699
Sodium Bicarbonate (g) (Sigma, USA)	1.200
Polymyxin B sulfate (units) (Sigma, USA)	$1 \times 10^4$
Glass distilled water to make (ml) (Sigma, USA)	1,000
Lactose-EDTA extender (ml)	
11% (v/v) lactose solution	50
Glucose-EDTA solution (see above)	23
Egg yolk	20
Equex STM past (Minitube, German)	0.5
Glycerol/ethylene glycol (Sigma, USA)	8.0
Final pH	7.2

시켜 예비동결을 실시한 후에 액체질소에 침지하여 동결을 완료하였다. 동결된 정액은 LN<sub>2</sub> tank에서 보관하였으며, 필요시 용해하여 사용하였다. 동결정액은 공기 중에서 약 10초간 정치하여 37°C 온수에 20초간 침지시켜 용해한 후 정자의 생존율 및 정자 성상을 조사하였다. 동결 용해 후 시간에 따른 정자의 생존율과 정자막 온전성의 변화는 동결 용해 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 보존하면서 조사하였다.

**정자의 운동성 평가**

정액의 운동성 평가는 MicroLux 현미경 (× 70, Olympus, Japan) 하에서 정자의 활력을 평가하였다. 혈구계산판에 5 µl의 정액을 넣고 cover glass로 덮은 후 100배율에서 정자의 운동성을 평가하였다. 혈구계산판의 격자 2군데를 반복적으로 관찰하여 거의 모든 정자들이 소용돌이 치며 활발하게 움직이는 것을 90% 이상으로, 생존 정자들을 격자 별로 100개 가량을 관찰하여 활발하게 움직이는 정자들이 80개 이상일 때 80%로, 70개 이상일 때 70%로 판단하고 움직이는 정도가 전진 운동 또는 느리게 전진 운동하는 수준일 때 50%, 느리게 전진운동 하거나 전진 운동 혹은 미동하는 수준일 때 30%로 평가하였다 (조 등, 2009).

**정자의 생존율 평가**

정자의 생존율을 eosin-Y 염색법을 이용하여 평가하였다. 염색액은 0.9% NaCl 용액에 0.5% eosin-Y를 용해하여 제조하였으며, 10 µl의 정액을 slide glass 위에 올린 다음 동량의 염색액을 섞어 도말하여 cover glass를 덮고 MicroLux 현미경 (× 70, Olympus, Japan)하에서 관찰하였다. 개체 당 2개의 표본을 만들어 표본 1개당 200개씩 총 400개의 정자를 100배율 현미경에서 관찰하여, 붉게 염색된 정자는 죽은 정자로 판단하여 생존율을 평가하였다.

**정자막 온전성 평가**

정자막 온전성을 측정하기 위하여 Jeyendran 등 (1984)의 방법을 변형하여 150 mOsm/kg NaCl의 저삼투압 용액을 제조하여 정자 미부의 팽창형태를 분석하였다 (Hypo-Osmotic Swelling Test: HOST). 37°C의 저장액 1 ml에 정자 샘플 100 µl를 혼합하여 37°C에서 5분간 정치시킨 후 slide glass에 도말하였다. 도말한 표본 1개당 200개씩 총 400개의 정자를 100배율 현미경에서 관찰하여 정자 미부의 팽창여부를 확인하여 정자막의 온전성을 평가하였다.

**침체막 변화 양상의 측정**

침체막의 변화 양상을 측정하기 위하여 Chlortetracyclin (CTC) 염색법을 사용하였다. 정액을 400 µg 용액 (750 µM CTC (Sigma, USA) 130 mM NaCl (Sigma, USA), 5 mM cystein (Sigma, USA), 20 mM Tris (Sigma, USA) buffer; pH 7.8)을 혼합하여 20초간 암실에서 상온배양하였다. CTC 반응을 고정시키기 위하여 10 µl의 12.5% glutaraldehyde를 혼합하여 4°C에서 보관하였다. 염색후 24시간 이내에 판독하였으며, 정자 침체막 양상의 판독 기준

은 Fraser (1995)의 분류를 따라 정자 두부가 전체적으로 형광 발광을 할 경우 수정능획득이 일어나지 않은 F pattern으로, 적도면 부분에 띠가 형성되어 침체 아랫부분에서 형광 발광을 할 경우 수정능획득이 일어난 B pattern으로 구분하였으며, 마지막으로 정자 두부가 형광 발광을 하지 않거나, 얼룩덜룩한 발광을 할 경우 침체반응이 일어난 AR pattern으로 구분하였다.

**통계 분석**

통계 분석은 통계분석프로그램 (SPSS version 18.0)을 이용하였으며, 동결 용해 후 glycerol이 정자의 성상에 미치는 영향에 대한 결과는 ANOVA를 이용하여 처리구간의 유의성을 검증하였다.

**결 과**

**동결보호제에 따른 동결 용해 후 정자의 운동성 및 생존율의 변화**

Table 2는 5%와 8%의 glycerol과 ethylene glycol을 동결보호제로 사용하여 제주마의 정액을 동결 용해하였을 때 변화된 운동성과 생존율을 나타낸 결과이다. 본 실험의 결과, 동결 용해 후 정자의 운동성은 처리구 간의 유의적 차이는 없었다. 그러나 생존율에 있어 8%의 glycerol을 처리하였을 때 가장 높은 생존율을 보였으며, 5% glycerol 처리구에 비해 유의적으로 높은 생존율을 나타내었다 ( $p<0.05$ ). 그러나 5% glycerol 처리구를 제외한 다른 처리구와의 유의적 차이는 나타나지 않았다.

**동결보호제가 동결 용해 후 정자막 온전성에 미치는 영향**

동결보호제에 따른 동결정액의 용해 후 정자막 온전성의 변화에 대한 결과는 Table 3과 같다. Swollen sperm의 비율에 있어 8%의 glycerol을 처리하였을 때 다른 처리구에 비하여 유의적으로 높은 swollen sperm의 비율을 나타냈으며 ( $p<0.05$ ), 8% ethylene glycol, 5% ethylene glycol의 순서로 swollen sperm의 비율을 나타냈으나, 이들 사이의 유의적 차이는 나타나지 않았다. 마지막으로 5% glycerol의 처리구는 유의적으로 낮은 비율의 swollen sperm의 비율을 나타냈다 ( $p<0.05$ ).

**Table 2. Effect of glycerol and ethylene glycol as cryoprotectant on motility and viability of frozen-thawed spermatozoa**

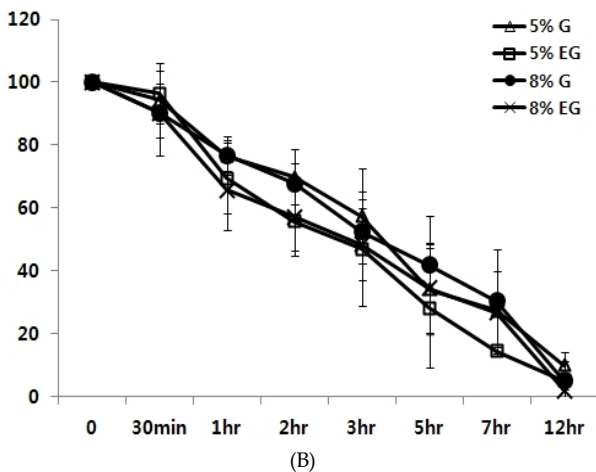
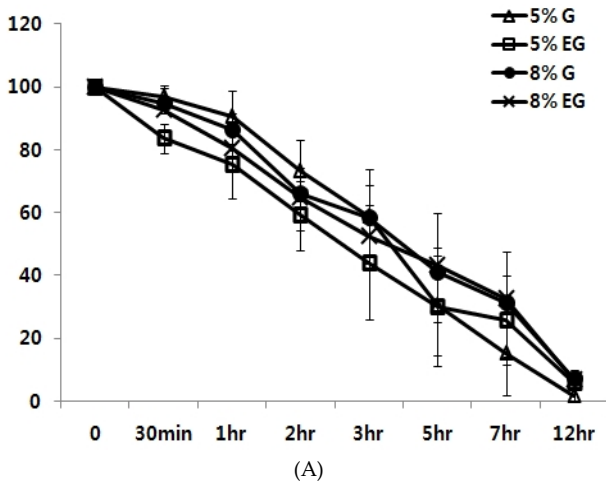
	Motility (%)	Viability (%)
Fresh semen	47.50 ± 12.58	59.69 ± 12.33
5% Glycerol	31.67 ± 2.89	18.08 ± 1.61 <sup>b</sup>
5% Ethylene glycol	35.00 ± 5.00	26.92 ± 6.05 <sup>ab</sup>
8% Glycerol	37.50 ± 9.57	39.85 ± 11.41 <sup>a</sup>
8% Ethylene glycol	37.50 ± 9.57	33.81 ± 11.15 <sup>ab</sup>

<sup>ab</sup> Values with different superscripts within same column except ejaculated semen are significantly different by ANOVA ( $p<0.05$ ). Data are presented as mean±SD.

**Table 3. Effect of cryoprotectants on sperm membrane integrity of post-thawed spermatozoa**

	Swollen sperm (%)
Fresh semen	44.50 ± 9.17
5% Glycerol	13.17 ± 1.66 <sup>c</sup>
5% Ethylene glycol	22.33 ± 8.79 <sup>b</sup>
8% Glycerol	34.13 ± 11.02 <sup>a</sup>
8% Ethylene glycol	26.94 ± 2.61 <sup>b</sup>

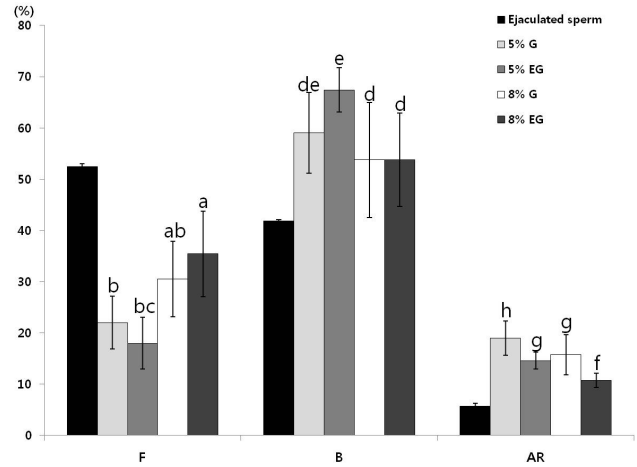
<sup>a-c</sup> Values with different superscripts within column except ejaculated sperm are significantly different by ANOVA ( $p < 0.05$ ). Data are presented as mean ± SD.



**Fig. 1. Effect of various cryoprotectants on changes over time in sperm viability (A) and sperm membrane integrity (B) at 37°C. (5% G; 5% glycerol, 5% EG; 5% ethylene glycol, 8% G; 8% glycerol and 8% EG; 8% ethylene glycol)**

**동결 용해 후 시간에 따른 정자의 생존율과 정자막 온전성 변화**

제주마 정액의 동결 용해 후 시간에 따라 정자의 생존



**Fig. 2. Change of acrosome status post-thawed sperm in Jeju horse. (5% G; 5% glycerol, 5% EG; 5% ethylene glycol, 8% G; 8% glycerol and 8% EG; 8% ethylene glycol). <sup>a-c</sup> F pattern values for various cryoprotectants except ejaculated sperm with different superscripts were significantly different by ANOVA ( $p < 0.05$ ). <sup>d,e</sup> B pattern values for various cryoprotectants except ejaculated sperm with different superscripts were significantly different by ANOVA ( $p < 0.05$ ). <sup>f-h</sup> AR pattern values for various cryoprotectants except ejaculated sperm with different superscripts were significantly different by ANOVA ( $p < 0.05$ ).**

율과 정자막 온전성을 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. 시간이 지남에 따라 ethylene glycol 처리가 glycerol 처리보다 빠른 속도로 생존율과 정자막 온전성 모두 감소되는 것으로 나타났다. 그러나 이들 처리구 사이의 유의적 차이는 볼 수 없었다. 뿐만 아니라, 본 실험의 결과, 용해 후 1시간 사이에 생존율 및 정자막 온전성이 급격히 감소되는 것을 볼 수 있었다.

**동결보호제가 동결 용해 후 침체막 변화에 미치는 영향**

Fig. 2는 제주마의 동결 용해 후 정자의 침체막 변화에 대한 결과이다. F pattern의 비율에 있어 8% ethylene glycol을 처리하였을 때 5% glycerol과 5% ethylene glycol을 처리한 경우에 비하여 유의적으로 높은 F pattern 비율을 나타냈으며 ( $p < 0.05$ ), 8% glycerol을 처리하였을 경우 다소 높은 비율의 F pattern 비율을 나타냈으나, 실험구간의 유의적 차이는 나타나지 않았다. B pattern의 비율은 5% ethylene glycol, 5% glycerol, 8% ethylene glycol 그리고 8% glycerol 처리 순으로 B pattern의 비율이 낮았으며, 5% ethylene glycol과 8% glycerol 처리구 간만이 유의적 차이를 나타냈다 ( $p < 0.05$ ). AR pattern의 비율에 있어 8% ethylene glycol 처리구에서 다른 실험구에 비하여 유의적으로 가장 낮은 수준의 AR pattern 비율을 나타냈으며, 그 다음으로 8% glycerol, 5% ethylene glycol이 5% glycerol에 비하여 유의적으로 낮은 수준으로 나타났다 ( $p < 0.05$ ).

**고찰**

인공수정은 소뿐만 아니라 다른 가축에 있어 유전적인

개선과 유전자원의 확보에 크게 공헌하고 있다. 즉, 인공 수정은 유전자의 급속한 보급과 가축 유전자 품질을 향상시키기 위한 가장 주요한 방법이다 (Vishwanath와 Shannon, 2000). 인공수정을 위한 정액의 이용 방법에는 액상정액의 이용과 동결 정액으로 보존하는 방법이 있는데, 채취한 정액을 동결하여  $-196^{\circ}\text{C}$ 에서 보존하면 반영구적으로 보관이 가능하다 (Bolten 등, 2005). 정자는 다양한 동결 조건에 따라 약 50% 정도의 세포 손상을 입게 된다 (Watson, 2000). 이러한 세포 손상은 동결과정 동안에 세포질내의 ice crystal에 의해 기인하는 것으로 (Mazur, 1984), 이러한 손상을 방지하기 위한 희석제의 조성 과 동결보호제는 성공적인 동결정액 제조에 있어 가장 중요한 요인이라고 할 수 있다 (Hammerstedt 등, 1990; Curry 등, 1994). Polge 등 (1949)이 동결보호제로 glycerol을 사용하는 것을 고안한 이후, glycerol은 포유류를 포함한 다양한 type의 세포의 동결보호제로 사용되어 왔으며 (McGonagle 등, 2002), 수년 동안 소의 동결정액 제조 시 동결보호제로 사용되어 왔다. Glycerol은 동결시 세포내 ice crystal을 방지하기 위해, 세포내 물을 탈수하도록 하며, 자신이 세포질내 침투하여 물 대신 세포를 유지함으로서 동해를 방지한다. 그러나 glycerol은 상온에서 세포내에 독성을 나타내므로 저온에서 평형을 유지해야 하는 단점을 가지고 있으나 (Hammerstedt 등, 1990), 보편적으로 glycerol보다 간편하게 이용되는 물질은 아직 명확하지 않다. Ethylene glycol은 사람 (Gilmore 등, 2000)과 소 (Guthrie 등, 2002)의 정자에서 세포막의 침투 속도가 glycerol보다 빠르고 효과적인 동결보호제로 보고된 바 있다. 또한, ethylene glycol은 낮은 수리전도도를 가지기 때문에 정자 세포가 냉각, 동결되는 동안 삼투압 stress를 감소시킬 수 있다고 하였다 (Gilmore 등, 1995). Ethylene glycol은 정자의 생존율과 활력에 있어 그 해로움이 glycerol에 비하여 적기 때문에 (Ball 등, 2001), 정자의 침체 보존에 있어 보다 효과적인 보호능력을 제공할 수 있다. 현재 ethylene glycol은 glycerol을 대체하는 동결보호제로 개 (Pereira 등, 2002)와 말 (Mantovani 등, 2002)의 동결정액 제조에 사용되고 있다. 본 실험에서 5% ethylene glycol을 이용하였을 때 5% glycerol에 비하여 높은 생존율을 나타냈으나 유의적인 차이는 없었다. 또한, 8%의 glycerol을 이용하였을 때 가장 높은 생존율을 나타냈으며, 8% ethylene glycol 처리와의 유의적 차이는 없었다. 이러한 결과는 5%의 ethylene glycol의 처리가 5%의 glycerol보다 높은 운동성과 생존율을 나타냄을 보고한 Rota 등 (2006)의 결과와 부합하나, ethylene glycol과 glycerol의 효과적인 농도에 있어 본 연구의 결과와는 다소 차이가 나타났다. 이는 사출시 정자 성상의 변화가 심한 말의 특성에서 기인한 것으로 판단된다. Squires 등 (2004)의 보고에 따르면 glycerol의 사용이 ethylene glycol의 이용보다 운동성 및 생존율에 높은 결과를 가져왔으며, Hoffmann 등 (2011)은 말의 동결정액 제조에 있어 다양한 glycerol, ethylene glycol, amides 등의 동결보호제가 동결 용해 후 정자의 운동성과 생존율에 미치는 영향은 유의적 차이가 없다고 보고하였다.

HOST를 이용한 정자막의 온전성은 정자의 대사뿐만 아니라, 난자와의 수정 및 정자의 수정능획득과 침체반응과도 밀접한 관계가 있어 정자의 수정능을 평가하는 데 유용한 지표로 사용되고 있다 (Jeyendran 등, 1984). 본

연구의 결과, 8%의 glycerol이 모든 실험구 사이에서 유의적으로 높은 swollen sperm 비율을 나타냈다. 이러한 검사는 직접적으로 인공수정을 시행하거나, 체외수정방법을 통한 검사를 수행하는 것보다 시간과 비용적인 면에서 절약할 수 있으며, 손쉽게 수정능력을 예측할 수 있다. 특히 사람에서는 수정능력 혹은 가임능력을 평가하기 위하여 정자막의 온전성을 검사하는 저장액에서 정자 미부의 팽창 패턴을 평가하여 그 수정능력을 예측하고 있다 (최 등, 1993). Vidament 등 (1989)은 말에 있어 사정 직후 정액의 HOST 결과, swollen sperm의 비율과 수정능력 과 밀접한 관련이 있음을 보고하였으며, Neild 등(2000)은 동결 용해 후 HOST 결과, swollen sperm의 비율과 수정율이 관련성이 있다고 보고하였다.

동결 용해 후 보존 시간에 따른 정자의 생존율과 정자막 온전성 변화에 있어 용해 후 1시간 이내에 생존율과 정자막 온전성이 급격하게 감소하였다. 이러한 결과는 현재 말의 인공수정시 배란시기에 정확히 맞추어 인공수정이 이루어지지 않으면 임신율이 급격히 감소하는 원인으로 판단된다. 이런 다양한 결과들은 말 정액의 동결에 있어 그 방법이 아직까지 안정화 되지 않았으며, 최적화를 위하여 보다 많은 연구가 필요한 것을 시사한다.

정자가 수정능획득 및 침체 반응 시 칼슘 이온이 작용하는 데, 정자 두부 특정 부위 내에 칼슘 이온의 존재를 antibiotic chlortetracycline 형광물질로 측정하는 방법이 개발되고 (Fraser 등, 1995), Kommisrud 등 (2002)은 이 CTC 방법을 이용하여 수정능획득 및 침체 반응과 수정능력간의 관계를 보고하여 CTC를 이용한 정액 질에 대한 평가 가능성을 제시한 바 있다. 또한, Oh 등 (2010)은 돼지 정자의 수정능 예측을 위해 CTC 방법의 사용은 수정능력이 불량한 개체를 예측하는 데 있어 유용하다고 보고 한 바 있다. 수정 전 정자는 F pattern과 B pattern의 비율이 높아야 하며, 인위적인 수정능획득을 유도하지 않은 경우 F pattern의 비율이 높아야 한다 (Fraser, 1995). Suzuki 등 (2003)은 B pattern 정자와 인공수정시 수정능력 간에 직접적인 관계가 있어 이들의 비율이 정액의 질을 판단하는 척도로 사용될 수 있다고 제시한 바 있다. 수정능이 획득된 정자는 난자의 투명대에 의해 수정되기 전에 침체반응이 일어나지만 (Yanagimach, 1994), 난자의 투명대와 결합하기 전에 침체반응이 일어난 정자는 난자의 투명대와의 결합에 필요한 중요한 요소를 잃어버리기 때문에 정상적인 수정에 참여할 수 없다 (Adeoya-Osiguwa와 Fraser, 2004). 본 실험에서 동결 후 모든 실험구에서 동결 전보다 B pattern의 비율과 AR pattern의 비율이 증가하고, F pattern의 비율이 감소하였다. 말을 포함한 모든 포유동물의 정자는 동결과정동안 세포막의 변성을 겪게 되며, 막 단백질의 파괴가 일어나 세포막의 인지질로부터 탈락하게 되어 인지질은 fluid에서 gel phase로 변화하게 된다. 이러한 막의 변화는 calcium ion channel의 기능적 손상을 초래하며, 결과적으로 세포 내  $\text{Ca}^{2+}$  농도의 상승을 야기하여 수정능획득이나 침체반응과 같은 기작을 보이게 되어 capacitation-like change를 야기하게 된다 (Szasz 등, 2000; Pena 등, 2003). 따라서 동결 용해 후 최소 25% 이상 수정능획득과 같은 B pattern의 비율이 증가하게 된다고 보고된 바 있으며 (Pena 등, 2003), Schembri 등 (2002)은 말의 정자에 있어 capacitation-like change를 야기하는 데 있어 원심분리를 통한 정

장의 제거뿐만 아니라 동결과 용해 과정에서 크게 야기 되어 B pattern과 AR pattern이 크게 증가함을 보고하였다. 흥미로운 것은 glycerol 대 ethylene glycol을 비교하여 보면 5%의 glycerol과 ethylene glycol에 있어 5% ethylene glycol이 높은 B pattern 비율을 증가시킨 반면, AR pattern은 5% glycerol에서 유의적으로 증가하였다. 8% glycerol과 8% ethylene glycol을 비교하면, 8% glycerol의 처리가 8% ethylene glycol보다 AR pattern의 비율을 유의적으로 증가시켰다. 이는 ethylene glycol이 capacitacion-like change의 유도로부터 보다 효과적으로 첨체막을 보호하는 것으로 판단된다.

현재까지 제주마의 동결정액 제조에 관한 연구는 매우 미흡하며, 제주마뿐만 아니라 말 정액 제조에 있어 보다 많은 연구가 필요한 실정이다. 따라서 본 연구의 결과는 현재 확립되지 않은 제주마의 동결정액 제조 과정에 있어 보다 유용한 정보를 제공할 것으로 판단된다.

## 적 요

본 연구에서는 제주마 육성 및 산업화에 있어 성공적인 인공수정을 위한 안정적인 제주마의 동결정액 제조법을 수립하는 데 있어 제주마 동결정액의 제조시 동결보호제로서 glycerol과 ethylene glycol의 사용이 동결-용해 후 정자의 운동성, 생존율, 정자막 온전성 그리고 정자의 첨체막 온전성 등에 미치는 영향을 알아보려고 실시하였다. 제주마 정액의 동결 시 5% glycerol, 5% ethylene glycol, 8% glycerol 그리고 8% ethylene glycol을 사용하였으며, 동결 용해 후 정자의 운동성, 생존율, 정자막 온전성 그리고 첨체의 변화를 측정하였다. 동결 용해 후 정자의 운동성에 있어 실험구 사이의 유의적 차이는 나타나지 않았다. 그러나 생존율에 있어 8% glycerol을 처리하였을 때 가장 높은 생존율 (39.85%±11.41)을 나타냈으나, 5% glycerol 처리구 (18.08%±1.61)와의 비교에서만 유의적 차이를 나타냈다 ( $p<0.05$ ). 정자막 온전성에 있어서도 8% glycerol 처리구만이 34.13%±11.02로 모든 처리구에 비하여 유의적으로 높은 정자막 온전성을 나타냈다 ( $p<0.05$ ). 동결 용해 후 정자의 첨체막 변화에 있어 8%의 ethylene glycol을 처리시 5% glycerol과 5%의 ethylene glycol을 처리한 실험구보다 유의적으로 높은 F pattern의 비율을 나타냈다. B pattern의 비율은 5% ethylene glycol 처리시 8% glycerol과 8% ethylene glycol 처리구보다 유의적으로 증가하였다. 8% ethylene glycol 처리구에서 유의적으로 낮은 수준의 AR pattern 비율을 나타냈다 ( $p<0.05$ ). 본 연구의 결과는 현재 확립되지 않은 제주마의 동결정액 제조 과정에 있어 보다 유용한 정보를 제공할 것으로 판단된다.

## 인용문헌

- Adeoya-Osiguwa SA, Fraser LR (2004): Environmental estrogens and sperm function. *Hum Reprod* 19: 216-217; author reply 217.
- Alvarenga MA, Leao, KM, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Medeiros ASL, Gomes GM (2003): The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. In: *Proceedings, Workshop on Transporting Gametes and Embryos*, Havemeyer Foundation, pp 74-76.
- Alvarenga MA, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Medeiros AS (2005): Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Anim Reprod Sci* 89:105-113.
- Backman T, Bruemmer JE, Graham JK, Squire EL (2004): Pregnancy rates of mare inseminated with semen cooled for 18 hours and then frozen. *J Anim Sci* 82:690-694.
- Ball BA, Vo A (2001): Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. *J Androl* 22:1061-1069.
- Bolten M, Weissbach L, Kaden R (2005): Cryopreserved human sperm deposits: Usability after decades of storage. *Urologe A* 44:904-908.
- Curry MR, Millar JD, Watson PF (1990): Calculated optimal cooling rates for ram and human sperm cryopreservation fail to conform with empirical observation. *Biol Reprod* 51:1014-1021.
- Fraser LR, Abeydeera LR, Niwa K (1995):  $Ca^{2+}$ -regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol Reprod Dev* 40: 233-241.
- Gilmore JA, McGann LE, Liu J, Gao DY, Peter AT, Kleinhans FW, Critser JK (1995): Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biol Reprod* 53: 985-995.
- Gilmore JA, Liu J, Woods EJ, Peter AT, Critser JK (2000): Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Hum Reprod* 15: 335-343.
- Guthrie HD, Liu J, Critser JK (2002): Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 67:1811-1816.
- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP (1990): Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 11:73-88.
- Hoffmann N, Oldenhof H, Morandini C, Rohn K, Sieme H (2011): Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified 'goo' or 'poor' for freezing. *Anim Reprod Sci* 125:112-118.
- Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Carbo BG, Zaneveld LJ (1984): Development of an

- assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 70: 219-228.
15. Kenny RM, Bergman RV, Cooper WL, Morse GW (1975): Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. *Proceedings of 12st American Association of Equine Practices* pp 327-336.
  16. Kommisrud E, Paulenz H, Sehested E, Greule IS (2002): Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for 5 days. *Acta Veterinaria Scandinavica* 43:49-55.
  17. Leopold S, Samper JC, Curtis E, Buhr MM (2000): Effect of cryopreservation and oviductal cell conditioned media on  $Ca^{2+}$  flux of equine spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl.* 56:431-45.
  18. Mantovani R, Rota A, Falomo ME, Bailoni L, Vincenti L (2002): Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa: sperm quality assessment with standard analyses and with the hypoosmotic swelling test. *Reprod Nutr Dev* 42:217-226.
  19. Martin JC, Klug E, Gunzel A (1979): Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straw. *J Reprod Fertil Suppl* 27:47.
  20. Masuda H, Nanasaki S, Chiba Y (2004): A new extender for preservation of equine spermatozoa at 5 °C. *J Equine Sci* 15:1-5.
  21. Pierre A, Fauquant J, Le Graet Y, Piot M, Maubois JL (1992): Preparation de phosphocaseinate natif par microfiltrations membrane. *Lait* 72:461-474.
  22. Mazur P (1984): Freezing of living cell: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 247: c125-142.
  23. McGonagle LS, Goldstein M, Feldschuh J, Foote RH (2002): The influence of cryoprotective media and processing procedures on motility and migration of frozen-thawed human sperm. *Asian J Androl* 4:137-141.
  24. Neild DM, Chaves MG, Flores M, Miragaya MH, Gonzalez E, Agüero A (2000): The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. *Andrologia*. 32:351-355.
  25. Oh SA, Park YJ, You YA, Mohamed EA, Pang MG (2010): Capacitation status of stored boar spermatozoa is related litter size of sows. *Anim Reprod Sci* 121:131-138.
  26. Pereira SM, Rigon RM, Mezzalira A, Cecim M (2002): Ethylene glycol on canine semen cryopreservation. *Ciencia Rural* 32:649-655.
  27. Peña AI, López-Lugilde L, Barrio M, Becerra JJ, Quintela LA, Herradón PG (2003): Studies on the intracellular  $Ca^{2+}$  concentration of thawed dog spermatozoa: influence of Equex from different sources, two thawing diluents and post-thaw incubation in capacitating conditions. *Reprod Domest Anim* 38:27-35.
  28. Polge C, Smith AU, Parkes AS (1949): Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164:666.
  29. Rota A, Milani C, Cbianca G, Martini M (2006): Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology* 65: 1848-1858.
  30. Schembri MA, Major DA, Suttie JJ, Maxwell WM, Evans G (2002): Capacitation-like changes in equine spermatozoa throughout the cryopreservation process. *Reprod Fertil* 14:225-233.
  31. Squires EL, McCue PM, Vanderwall D (1999): The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology* 51:91-104.
  32. Squire EL, Keith SL, Graham KJ (2004): Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* 62:1056-1065.
  33. Suzuki K, Geshi M, Yamauchi N, Nagai T (2003): Functional changes and motility characteristics of Japanese Black Bull spermatozoa separated by Percoll. *Anim Reprod Sci* 77:157-172.
  34. Szasz F, Sirivaidyapong S, Cheng FP, Voorhout WF, Marks A, Colenbrander B, Solti L, Gadella BM (2000): Detection of calcium ionophore induced membrane changes in dog sperm as a simple method to predict the cryopreservability of dog semen. *Mol Reprod Dev* 55:289-298.
  35. Vidament M, Cognard E, Yvon JM, Sattler M, Palmer E, Magistrini M (1989): Evaluation of stallion semen before and after freezing. *Reprod Dom Anim* 33:271-277.
  36. Vishwanth R, Shannon P (2000): Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim Reprod Sci* 62:23-53.
  37. Watson PF (2000): The causes of reduces fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60:482-492.
  38. Yanagimachi R (1994): Mammalian fertilization. In Knobil E and Neill JD (eds). *The Physiology of Reproduction* 2nd ed. Raven Press. New York, USA, pp 189-317.
  39. 박남건 (1995): 제주재래마 정액의 동결보존에 관한 연구. *농촌자원과 생활* 37:459-463.
  40. 박용수, 조길재 (2011): 말의 정액 형태에 따른 운동성과 인공수정 임신율에 영향을 미치는 요인. *한국수정란이식학회지* 26:13-17.
  41. 오운용, 박남건, 김영훈, 이성수, 김희석, 김중계 (1994): 제주재래마 정액의 일반성상에 관한 조사 연구. *한국동물자원과학회 심포지움자료집*. p 130.
  42. 조상래, 최선호, 최창용, 손준규, 김재범, 김성재, 손동수, 김현중 (2009): AndroMed를 이용한 흑우 동결 정액으로 체외수정란 생산 효과. *한국수정란이식학회지*

- 24:207-212.
43. 최두석, 문신용, 장윤석 (1993): 남성 불임검사 중 정자 형태와 정자 운동성 검사 및 저장성용액 내 정자 팽창검사의 상관관계 및 가임능력 예측에 관한 연구. 대한산부인과학회잡지 36:2497-2509.
44. 최선호, 김성재, 조상래, 최창용, 손준규, 유용희, 조영재, 최귀철, 문윤영 (2010): 말 정액 동결시 Glycerol 농도와 동결 속도가 생존율에 미치는 영향. 한국동물번식학회지 34:271-274.  
(접수일자: 2012. 9. 10 / 채택일자: 2012. 9. 18)