

## 犬精液 凍結時 seeding處理가 融解後 精子的 活力 및 生存率에 미치는 效果

김종호·이필돈·유일정\*·김용준\*

대전광역시 보건환경연구원 가축위생연구부·전북대학교 수의과대학\*

### Effect of seeding on post-thaw motility and viability of canine frozen sperm

Jong-Ho Kim, Pil-Don Lee, Il-Jeoung Yu,\* , Yong-Jun Kim\*

*Institute of Health & Environment, Taejon Metropolitan City,*

*College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University\**

#### Abstract

To investigate effect of seeding on post-thaw motility and viability of canine spermatozoa, the semen from male dogs which had been proved to be fertile in the past were frozen and seeded during freezing process.

Post-thaw motility and viability of canine sperm which were frozen and seeded were investigated according to different seeding temperatures of  $-5^{\circ}\text{C}$ ,  $-10^{\circ}\text{C}$ , or  $-15^{\circ}\text{C}$  and also according to different concentration of glycerol of 2%, 5% and 10%.

In addition, post-thaw motility of canine sperm frozen by direct freezing in a deep freezer or programmed freezing in a programmed cell freezer was investigated.

Post-thaw motility of canine sperm was compared according to different seeding temperatures:

The sperm seeded at  $-5^{\circ}\text{C}$  showed considerably higher post-thaw motility than that of non-seeding, and that seeded at  $-10^{\circ}\text{C}$  or  $-15^{\circ}\text{C}$ , respectively, in 2% and 5% glycerol groups on both 2 and 7day after freezing( $p<0.05$ ).

In 10% concentration of glycerol, the sperm seeded at each seeding temperature showed considerably higher post-thaw motility than that of non-seeding group on day 7 after freezing( $p<0.01$ ).

Post-thaw viability of canine sperm was compared according to different seeding temper-

atures : The sperm seeded at  $-5^{\circ}\text{C}$  showed significantly higher post-thaw motility than that of non-seeding, and that seeded at  $-10^{\circ}\text{C}$  or  $-15^{\circ}\text{C}$ , in 5% and 10% glycerol groups on day 7 after freezing( $p<0.05$ ).

In comparison of post-thaw motility of canine sperm seeded according to different concentration of glycerol, 5% glycerol group and 10% glycerol group showed considerably higher post-thaw motility than 2% glycerol group without difference between those two groups in all seeding temperatures( $-5^{\circ}\text{C}$ ,  $-10^{\circ}\text{C}$  and  $-15^{\circ}\text{C}$ ) on day 2 and 7 after freezing( $p<0.01$ ).

In comparison of post-thaw viability of canine sperm seeded according to different concentration of glycerol, 5% glycerol group and 10% glycerol group showed the same considerably higher post-thaw viability than 2% glycerol group on each thawing day( $p<0.01$ ).

The canine sperm frozen and seeded by programmed freezing method showed considerably higher post-thaw motility than that frozen by direct freezing method in all different seeding temperatures( $-5^{\circ}\text{C}$ ,  $-10^{\circ}\text{C}$  and  $-15^{\circ}\text{C}$ ).

These results indicated that the higher post-thaw motility and viability was obtained in the spermatozoa seeded than that of non-seeding, that among different seeding temperatures of  $-5^{\circ}\text{C}$ ,  $-10^{\circ}\text{C}$  and  $-15^{\circ}\text{C}$ , the sperm seeded at  $-5^{\circ}\text{C}$  showed higher post-thaw motility and viability than the other temperatures, also among different concentrations of glycerol of 2%, 5% and 10%, the sperm frozen and seeded in 5% and 10% concentration of glycerol showed higher post-thaw motility and viability than that in 2% of glycerol, and that the sperm frozen and seeded by programmed freezing method showed higher motility than that by direct freezing method.

---

Key word : canine frozen sperm, seeding.

## 서 론

개는 인간의 생활속에 매우 친숙한 동물로서 최근 애완동물산업이 날로 확대되는 한편, 실험동물로서 그 중요성이 높아짐에 따라 언제 어느곳에서나 번식을 가능하게 할 수 있는 인공수정에 대한 관심이 높아지고 있다.<sup>1~7)</sup>

동결정액을 이용한 인공수정의 수태율은 신선정액과 비교하여 낮은 성적을 나타내며, 융해후

정자의 생존율도 동결전 정자생존율과 비교하여 감소된다고 하는 여러 보고들이 있다.<sup>8~15)</sup>

또한 Leibo<sup>16)</sup> 및 다른 연구자<sup>9,17~20)</sup>들은 동결시 정자 생존율의 감소는 동결과정중 정자에 대한 온도충격이 융해후 정자의 활력과 생존율에 상해를 입히기 때문이며 동결과정중 급속한 latent heat(잠열온도) 상승과 결빙형성에 기인된다고 하였다.

따라서 seeding(식빙)은 동결시 세포용액이 과냉각되기전 빙정형성을 유도하여 살아있는 세포

에 대한 손상을 방지하기 위한 방법으로 응용되었으며, Whittingham<sup>21)</sup>이 mouse 수정란에서 seeding을 처음 시도한 이래로 여러 연구자들은 dry ice법<sup>22)</sup>, liquid nitrogen을 이용한 blowing 법<sup>23)</sup>, liquid nitrogen으로 냉각시킨 force이용 법<sup>24)</sup> 및 silver iodide이용법<sup>25,26)</sup> 등의 seeding 방법을 포유동물의 수정란 동결시 seeding등을 적용하였다.

정액동결시 seeding 처리로서 Crister 등<sup>27)</sup>은 사람정자 동결시 -5℃에서 10분간 seeding 처리한 군에서 비처리한 대조군 보다 융해후 정자활력이 높게 나타났다고 하였고, Chiravudh 등<sup>28)</sup>은 정자무력증 또는 정자결핍증등의 증상을 가진 poor quality human semen을 동결시 -5℃, 10분간 seeding을 하여 정상정액의 동결성적과 비교시 정자활력이 개선되었다고 보고한 바 있다.

그러나 가축의 정액 동결시 seeding 처리에 관한 연구는 거의 전무한 상태이며 따라서 저자는 개정액을 동결시 seeding 처리가 융해후 정자의 활력 및 생존율에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보고자 본 실험을 시도하였다. 이 실험에서는 개정액 동결시 여러가지 seeding 온도를 비교하여 융해후 정자의 활력 및 생존율을 가장 높일 수 있는 seeding 온도를 알아보고자 하였으며, 또한 일정한 seeding 온도에서 융해후 정자의 활력과 생존율을 높일 수 있는 glycerol 농도를 알아보고자 하였다. 또한 cell freezer를 이용한 programmed freezing에서의 seeding과 -80℃의 deep freezer를 이용한 direct freezing에서의 seeding 효과를 비교하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### ○ 실험동물

실험동물로는 과거 번식력이 증명되었고 임상

검사상 건강한 2.5~5년령의 잡종 숫개 4마리를 사용하였다.

### ○ 정액채취

정액은 수지법(digital manipulation)으로 정자농도가 농후한 2분획을 중심으로 채취하였고, 정자의 온도충격을 방지하기 위하여 37℃로 가온된 물 200ml가 들어있는 삼각플라스크내 정액채취관을 넣어 사용하였다. 채취한 원정액의 일부를 취하여 일반적검사 즉 정자의 활력, 정자수, 기형을 검사를 하였다.

### ○ 동결정액의 희석액제조

동결정액의 희석액은 Foote<sup>29)</sup>의 조성에 준하였다. 즉, 3차 증류수 100ml에 tris(hydroxymethyl)aminomethane 3.03g, citric acid 1.69g, glucose 1.25g, egg yolk 20%(v/v), penicillin (100,000IU), streptomycin 0.1g 등을 첨가하였다.

### ○ 정액희석

1차희석 : 정액일반검사를 한 후 정자수가 판정된 원정액에 37℃로 가온된 희석액을 1대 1~2 이상이 되도록 시험관 안에서 혼합하여 일차희석을 한 후 37℃ 온수가 들어있는 비이커내에 희석된 정액이 들어있는 시험관을 넣고 5℃ 냉장고에서 2시간에 걸쳐 5℃가 되도록 서서히 냉각하였다.

2차희석 : 5℃로 냉각된 1차희석액에 대하여 glycerol 농도가 각각 2%, 5% 및 10%가 되도록 1차희석액과 동량으로하여 10분 간격으로 3회에 걸쳐 분할희석하였다.

희석정액의 명칭 : 2차희석을 한 후 희석정액의 glycerol평형은 5℃ 냉장실내에서 2시간에 걸쳐 실시하였다.

### ○ 회석정액의 동결

Glycerol 평형된 정액은 5℃ 냉장고 안에서 0.25ml plastic straw내 충전한 후 polyvinyl alcohol로 밀봉하여 동결에 사용하였다.

**Programmed freezing** : 정액straw를 자동세포동결기(R-204 cell freezer, planer products, England)내로 옮겨 각각의 seeding처리온도인 -5℃, -10℃ 또는 -15℃까지 1℃/min. 속도로 냉각시킨 후 상기온도에서 10분간 holding 시켰고 그후 -60℃까지 2℃/min. 속도로 동결시켰다. 이때 각 seeding 온도별로 seeding 처리군과 비처리군을 구별하였으며 대조군의 용해후 정자검사는 각 seeding 온도별 대조군의 성적을 합하여 평균을 구하였다.

**Direct freezing** : Methanol을 이용한 동결을 위하여 plastic상자(15×10×5cm)안에 100% methanol 200ml를 넣고 5℃에서 냉장보관 한 다음 glycerol 평형된 회석정액을 0.5ml용 straw에 충전하여 methanol이 들어 있는 plastic상자에 넣은 다음 각각의 seeding 처리온도인 -5℃, -10℃ 및 -15℃ 온도가 될 때까지 냉동실에 냉각시켰고 상기온도에서 각각 seeding 처리한 후 즉시 -80℃의 deep freezer로 옮겨 3시간에 걸쳐 동결하였다. 이때 각 seeding 온도별로 seeding처리군과 비처리군을 구별하였다.

### ○ Seeding

**Programmed freezing** : 세포동결기를 이용하여 각각 -5℃, -10℃ 또는 -15℃ seeding 온도까지 냉각시킨 후 액체질소로 냉각된 forcep으로 정액 straw 상단부를 접촉시켜 빙정형성이 되도록 seeding 하였으며 그후 각 seeding 온도에서 10분간 정치하였다.

**Direct freezing** : 냉동실 내에서 methanol을 이용하여 각각 -5℃, -10℃ 또는 -15℃ seed-

ing 온도로 냉각된 후 programmed freezing시와 동일한 방법으로 액체질소로 냉각된 forcep을 이용하여 seeding을 하였다.

### ○ 동결정액의 보존

**Programmed freezing** 방법은 세포동결기를 이용하여 seeding을 실시한 정액 straw를 -60℃까지 냉각시킨 후 즉시 -196℃ 액체질소탱크내로 옮겨 사용시까지 보존하였다.

**Direct freezing**의 경우 냉동실내에서 각각 seeding을 실시한 다음 즉시 -80℃ deep freezer내로 옮겨 동결한 후 다시 액체질소탱크내로 옮겨 사용시까지 보존하였다.

### ○ 동결정액의 용해

37℃ 온수가 들어있는 비이커에 동결된 straw를 넣어 30초간 용해하였다.

### ○ 실험처리

**실험 I** : 개정액 동결과정중 seeding처리가 용해후 정자의 활력과 생존율에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보려고 과거 번식력이 증명된 4두의 숫개 정액을 이용하였으며 각각 -5℃, -10℃ 또는 -15℃에서 seeding하여 개정액 동결시 최적의 seeding 온도를 알아보려고 하였다. 또한 glycerol 농도에 따른 seeding효과를 알아보기 위하여 각각 2%, 5% 또는 10% glycerol농도를 조성하였으며 일정한 온도에서 seeding을 하여 동결보존한 후 2일 및 7일째에 용해하여 정자의 활력 및 생존율을 조사하였다.

**실험 II** : 프로그램 동결법과 직접동결법에 따른 동결 및 seeding 처리시 용해후 정자활력을 비교하고자 같은 개체의 정액의 자동세포동결기를 이용한 프로그램 동결법과 deep freezer를 이용한 직접 동결법에 의해 동결하였고 각각 -5℃,

-10℃ 또는 -15℃ 온도별로 seeding한 다음 동결보존 후 2일 및 7일째에 용해하여 정자의 활력을 조사하였다. 이때 glycerol 농도는 모든 실험군 모두 5%로 조성하였다.

◦정자의 활력 및 생존율 평가

정자의 활력 및 생존율은 광학현미경하에서 400배로 경검하여 한 슬라이드에서 5개 시야의 평균을 구하였다. 활력은 정자의 전진운동의 최상치를 100%로 하였을때 이와 비교된 정자의 전진운동의 평균 백분율을 구하였으며, 생존율은 살아서 움직이는 정자의 평균 백분율을 구하였다.

◦통계처리

본 실험에서 얻어진 결과를 실험에 따라 T-test 및 ANOVA로 통계처리하였으며 ANOVA 통계처리시 DUNCAN다중 검정에 의해 실험군 간 유의차를 구하였다.

결 과

개정액 동결시 서로 다른 온도에서 seeding 처리한 군과 비처리군간의 용해후 정자의 활력은 표 1과 같다.

2% glycerol의 경우 용해 2일에는 -5℃ seeding된 군은 대조군 및 다른 seeding군들보다 현저히 높은 정자활력을 나타내었다.(p<0.01) 또한 -10℃ seeding군은 대조군보다 현저히 높은 정자활력을 나타내었고,(p<0.01) -15℃ seeding군은 대조군보다 더 높은 정자활력 수치를 나타내었으나 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다.

용해 7일에서는 -5℃ seeding군이 대조군 및 다른 seeding군들보다 현저히 높은 정자활력을 나타내었다.(p<0.01) -10℃ 및 -15℃ seeding군은 대조군보다 더 높은 수치의 정자활력을 나타내었으나 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다.

5% glycerol의 경우 용해 2일 및 7일 모두에서 -5℃ seeding군은 대조군 및 다른 seeding군들보다 더 높은 정자활력을 나타내었다.(p<0.01) 또한 -10℃군 및 -15℃군의 상호간에는 차이없이 대조군보다 각각 현저히 더 높은 정자활력을 나타내었다.(p<0.01)

10% glycerol의 경우 용해 2일 및 7일 모든 seeding처리군들은 대조군보다 각각 현저히 더 높은 정자의 활력을 나타내었으며,(p<0.01) 상호간에 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다.

**Table 1.** Effect of seeding on post-thaw motility of canine sperm frozen by programmed freezing method

Seeding temperature	Post-thaw motility(Mean±SD %, n=6)					
	2% glycerol		5% glycerol		10% glycerol	
	2nd*	7th	2nd	7th	2nd	7th
non-seeding	45.00±5.77 <sup>C</sup>	35.00±7.07 <sup>B</sup>	75.00±5.77 <sup>C</sup>	67.50±5.00 <sup>C</sup>	77.50±5.00 <sup>B</sup>	65.00±4.08 <sup>B</sup>
-5℃	70.00±0.00 <sup>A</sup>	67.53±5.00 <sup>A</sup>	85.00±5.00 <sup>A</sup>	85.00±5.00 <sup>A</sup>	83.75±2.50 <sup>A</sup>	82.50±2.50 <sup>A</sup>
-10℃	55.00±5.77 <sup>B</sup>	43.75±11.09 <sup>B</sup>	80.00±0.00 <sup>B</sup>	80.00±0.00 <sup>B</sup>	85.00±0.00 <sup>A</sup>	85.00±0.00 <sup>A</sup>
-15℃	50.00±0.00 <sup>C,B</sup>	38.75±6.29 <sup>B</sup>	80.00±8.16 <sup>B</sup>	75.00±5.77 <sup>B</sup>	80.00±0.00 <sup>A</sup>	80.00±8.17 <sup>A</sup>

A,B,C : Different superscripts denote significant differences within columns(p<0.01).

\* Days passed after freezing.

개정액 동결시 서로 다른 온도에서 seeding 처리한 군과 비처리군 정자의 생존율은 표 2와 같다.

2% glycerol의 경우 용해 2일 6일에서 -5℃ seeding군은 -15℃ seeding군보다 유의성 있게 높은 정자 생존율을 나타내었고, (p<0.05) -10℃ seeding군 및 대조군보다 더 높은 수치를 나타내었으나 유의성 있는 차이는 인정되지 않았다. -10℃ seeding군 및 대조군의 상호간에는 차이 없이 -15℃군보다 더 높은 수치를 나타내었으나 유의성 있는 차이는 없었다. 용해 7일에서 대조군, -5℃ seeding군 및 -10℃ seeding군은 -15℃ seeding군보다 각각 유의성 있게 높은 정자생존율을 나타내었고, (p<0.05) 상호간에 유의성 있는 차이는 없었으나 -5℃ seeding군이 가장 높은 수치를 나타내었다. 5% glycerol의 경우 용해

2일에서 -5℃ seeding군은 대조군 및 -15℃ seeding군보다 유의성 있게 높은 정자생존율을 나타내었고, (p<0.05) -10℃ seeding군보다 수치는 높았으나 유의성 있는 차이는 없었다. -10℃ seeding군, 대조군 및 -15℃ seeding군은 상호간에 차이가 인정되지 않았다. 용해 7일에서 -5℃ seeding군은 대조군 및 다른 모든 seeding군보다 유의성 있게 높은 정자생존율을 나타내었고, (p<0.05) -5℃ seeding군을 제외한 3군간에는 유의성 있는 차이가 없었다.

10% glycerol의 경우 용해 2일 및 7일 모두에서 -5℃군은 대조군 및 다른 모든 seeding군보다 유의성 있게 높은 정자생존율을 나타내었고, (p<0.05) -5℃ seeding군을 제외한 3군간에는 유의성 있는 차이가 없었다.

**Table 2.** Effect of seeding on post-thaw motility of canine sperm frozen by programmed freezing method

Seeding temperature	Post-thaw motility (Mean±SD %, n=6)					
	2% glycerol		5% glycerol		10% glycerol	
	2nd*	7th	2nd	7th	2nd	7th
non-seeding	11.25±2.50 <sup>A,B</sup>	9.50±0.58 <sup>A</sup>	37.50±5.00 <sup>B</sup>	33.75± 4.79 <sup>B</sup>	35.00±5.77 <sup>B</sup>	32.50±6.45 <sup>B</sup>
-5℃	16.25±4.79 <sup>A</sup>	11.25±2.50 <sup>A</sup>	52.50±12.58 <sup>A</sup>	50.00±10.00 <sup>A</sup>	50.00±8.16 <sup>A</sup>	47.50±9.57 <sup>A</sup>
-10℃	11.25±2.50 <sup>A,B</sup>	10.00±0.00 <sup>A</sup>	42.50±5.00 <sup>A,B</sup>	37.50± 5.00 <sup>B</sup>	40.00±0.00 <sup>B</sup>	35.00±5.77 <sup>B</sup>
-15℃	8.75±2.50 <sup>B</sup>	7.25±4.86 <sup>B</sup>	36.25±4.79 <sup>B</sup>	32.50±2.89 <sup>B</sup>	35.00±4.08 <sup>B</sup>	31.25±4.79 <sup>B</sup>

A,B : Different superscripts denote significant differences within columns (p<0.05).

\* Days passed after freezing.

개정액 동결시 일정한 seeding 온도에서 glycerol 농도에 따른 용해후 정자의 활력은 표 3과 같다.

-5℃, -10℃ 또는 -15℃의 각각의 온도에서 seeding 처리 하였을 때 5% glycerol 군과 10% glycerol 군은 용해 2일 및 7일 모두에서 2% gly-

cerol 군보다 현저히 높은 정자의 활력을 나타내었으며, (p<0.01) 5% 및 10 glycerol 군 상호간에는 유의성 있는 차이가 인정되지 않았다.

개정액 동결시 일정한 seeding 온도에서 glycerol 농도에 따른 용해후 정자의 활력은 표 4와 같다.

**Table 3.** Effect of glycerol concentration on post-thaw motility of canine sperm frozen by programmed freezing method

Seeding temperature	% of glycerol	Post-thaw motility(Mean±SD %, n=6)	
		Thawing 2nd	day 7th
-5℃	2%	70.00±0.00 <sup>B</sup>	67.50±5.00 <sup>B</sup>
	5%	85.00±0.00 <sup>A</sup>	85.00±0.00 <sup>A</sup>
	10%	83.75±2.50 <sup>A</sup>	82.50±2.89 <sup>A</sup>
-10℃	2%	55.00±5.77 <sup>B</sup>	43.75±11.09 <sup>B</sup>
	5%	80.00±0.00 <sup>A</sup>	80.00±0.00 <sup>A</sup>
	10%	85.00±0.00 <sup>A</sup>	85.00±0.00 <sup>A</sup>
-15℃	2%	50.00±0.00 <sup>B</sup>	38.75±6.29 <sup>B</sup>
	5%	80.00±0.00 <sup>A</sup>	75.00±5.77 <sup>A</sup>
	10%	80.00±8.16 <sup>A</sup>	80.00±8.17 <sup>A</sup>

A,B : Different superscripts denote significant differences within columns(p<0.01).

**Table 4.** Effect of glycerol concentration on post-thaw motility of canine sperm frozen by programmed freezing method

Seeding temperature	% of glycerol	Post-thaw motility(Mean±SD %, n=6)	
		Thawing 2nd	day 7th
-5℃	2%	16.25± 4.79 <sup>B</sup>	11.25± 2.50 <sup>B</sup>
	5%	52.50±12.58 <sup>A</sup>	50.00±14.40 <sup>A</sup>
	10%	50.00± 8.16 <sup>A</sup>	47.50±9.57 <sup>A</sup>
-10℃	2%	11.25± 2.50 <sup>B</sup>	10.00± 0.00 <sup>B</sup>
	5%	42.50± 5.00 <sup>A</sup>	37.50± 5.00 <sup>A</sup>
	10%	40.00± 0.00 <sup>A</sup>	35.00± 5.77 <sup>A</sup>
-15℃	2%	8.75± 2.50 <sup>B</sup>	9.00± 1.16 <sup>B</sup>
	5%	36.25± 4.79 <sup>A</sup>	32.50± 2.89 <sup>A</sup>
	10%	35.00± 4.08 <sup>A</sup>	31.25±4.79 <sup>A</sup>

A,B : Different superscripts denote significant differences within columns(p<0.01).

-5℃, -10℃ 또는 -15℃의 각각의 온도에서 seeding처리 하였을 때 용해 2일과 7일 모두에서 5% glycerol군과 10% glycerol군은 2% glycerol군보다 현저히 높은 정자생존율을 나타내었

으나, (p<0.01) 상호간에는 유의성 있는 차이가 인정되지 않았다.

개정액 동결시 일정한 seeding 온도에서 직접 동결방법과 프로그램 동결방법에 따른 용해후 정

자의 활력비교는 표 5와 같다.

-5℃, -10℃, -15℃의 모든 seeding 온도군에서 프로그램 동결방법에 의해 동결된 정자는

직접동결방법으로 동결된 정자보다 용해후 현저히 높은 활력을 나타내었다.( $p < 0.01$ )

**Table 5.** Comparison of post-thaw motility between direct freezing and programmed freezing of canine sperm\* at different temperatures

Cooling method	Post-thaw motility(Mean±SD %, n=6)		
	-5℃	-10℃	-15℃
Direct freezing**	68.75±2.50 <sup>B</sup>	67.50±2.89 <sup>B</sup>	11.25±2.50 <sup>B</sup>
Programmed freezing***	85.00±0.00 <sup>A</sup>	80.00±0.00 <sup>A</sup>	75.00±5.77 <sup>A</sup>

\* : Canine sperm was frozen in semen diluent containing 5% glycerol

\*\* : Freezing in cell freezer : the semen were cooled by 1℃/min from 5℃ to -5℃, -10℃ or -15℃ then seeded for 10minutes, and then cooled by 2℃/min to -60℃

\*\*\* : Freezing in deep freezer at -80℃, no holding time.

A,B : Different superscripts denote significant differences within columns( $p < 0.01$ ).

## 고 찰

이 실험에서 개정액 동결시 서로 다른 온도에서 seeding 처리한 결과 2%, 5% 및 10%의 모든 glycerol 조성에서 seeding 처리한 개정자는 용해후 비처리 정자보다 더 높은 활력 및 생존율을 나타내었다.

이 결과는 Leibo<sup>20)</sup>가 seeding처리는 세포의 동결중 빙정형성을 유도하여 과냉각을 짧게함으로써 온도상승을 억제하여 세포가 손상되는 것을 방지한다고 한 보고와 Crister등<sup>6)</sup>이 사람정자 동결시 seeding하여 용해후 정자활력이 seeding하지 않은 군의 활력보다 높게 나타났다고 한 보고, 그리고 Chiravudh등<sup>4)</sup>이 역시 사람에서 poor quality semen으로 동결시 seeding한 결과 정상 정액의 동결성적과 비교시 정자활력이 개선되었다고 한 보고와 미루어 볼 때 정액동결시 seeding처리는 정자의 활력 및 생존능력을 더욱 보호할 수 있는 것으로 판단된다.

또한 이 실험에서 seeding 온도로서는 -5℃ seeding군에서 가장 높은 정자활력 및 생존율을 나타내었다. 이 결과는 Farrand<sup>9)</sup> 및 Whittingham등<sup>31)</sup>이 과냉각상태가 소 수정란에 유해한 영향을 미치는 것을 최소화하기 위하여 일반적으로 -6℃ 또는 -7℃에서 seeding을 하였다고 한 보고와 mouse 수정란 동결시 -7℃에서 seeding 처리한 성적이 -12℃에서 seeding한 것보다 더 높은 생존율을 얻었다는 보고로 미루어 볼 때, 또한 이 실험에서 -10℃ seeding군은 -15℃ seeding군보다 더 높은 용해후 정자활력 및 생존율을 나타낸 것으로 보아 개정액 동결시 seeding 온도는 -5℃ 또는 -5℃에서 -10℃사이를 선택할 수 있을 것으로 보여진다.

이 실험에서 개정자 동결을 위해 동결희석액은 Foote<sup>10)</sup> 조성에 준하였으며 glycerol 농도를 2%, 5% 및 10%로 각각 다르게하여 동결과정중 일정한 온도에서 seeding 처리하였을 때 각 seeding 온도에서 5% 및 10% glycerol군이 2% glycerol군보다 더 높은 정자활력 및 생존율을 나타내었



다. 이 결과는 Coulter등<sup>5)</sup>이 소 동결정액 제조시 대부분 glycerol 농도를 7%로 조정하여 사용한다고 보고한 사실과 Olar등<sup>22)</sup>이 개정액 동결시 glycerol 농도를 3%내지 5%로 첨가한 군이 glycerol을 2%로 첨가하였을 때보다 용해후 정자의 활력이 높게 나타났다고 한 보고로 보아 개정액 동결시 glycerol 2% 농도보다는 glycerol 5% 및 10%농도 사이에서 조정하여 첨가하는 것이 효과적이라 사료된다.

이 실험에서 cell freezer를 이용한 programmed freezing방법에 의해 동결 및 seeding 처리된 개정자는 -80℃의 deep freezer내에서 methanol을 이용해 동결 및 seeding된 정자보다 더 높은 정자활력을 나타내었다.

이 결과는 programmed freezing방법과 직접 동결방법간의 개정자 활력에 관한 이전의 연구보고가 없어 이 실험의 결과와 비교하기는 어려우나, 많은 연구자들이 소수정란,<sup>9)</sup> mouse수정란<sup>31)</sup> 등의 동결시 주로 programmed freezing동결방법을 이용한 연구결과를 보고하였고 cell freezer가 동결속도를 조절함으로써 살아있는 세포의 동결시 생존능력을 더 유지할 수 있을 것으로 추측되며, 따라서 이 실험에서 더 높은 정자활력을 나타낸 결과로 보여진다. 한편 프로그램 동결방법에서는 10분간의 holding time이 주어져 충분히 seeding이 일어날 수 있는 기간이 있었으나 직접 동결법에서는 seeding후 holding time없이 즉시 동결처리 되었으므로 seeding을 위한 충분한 hold time의 부여에 따른 차이도 있을 것으로 보여진다.

이상의 결과 개정액 동결시 seeding 처리는 비처리경우보다 용해 후 더 높은 정자의 활력 및 생존율을 나타나게 한다는 것 그리고 Foote 조성에 의한 개정액 동결시 seeding 온도는 -5℃가 적합하다는 사실, 또한 glycerol 농도는 5% 또는

10%가 사용될 수 있다는 것, 또한 개정액 동결 및 seeding 처리시 프로그램 동결법이 직접동결보다 용해후 더 높은 정자활력을 나타내는데 있어서 선택될 수 있다고 사료된다.

## 결 론

개정액 동결시 seeding 처리를 하였을 때 용해후 정자활력 및 생존율에 미치는 결과를 알아보고자 과거 번식력이 인정된 숫캐 4마리의 정액을 이용하여 동결하였으며 각각 -5℃, -10℃ 및 -15℃에서 seeding하여 seeding 온도에 따른 용해후 정자의 활력 및 생존율, 또한 일정한 seeding 온도에서 glycerol 농도를 2%, 5% 및 10%로 각각 다르게 하였을 때 seeding 처리가 용해후 정자의 활력 및 생존율에 미치는 영향, 그리고 일정한 seeding 온도에서 직접동결방법과 프로그램 동결방법에 따른 용해후 정자의 활력을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. seeding 온도에 따른 개정자의 용해후 활력 비교시 2% glycerol 조성에서 -5℃ seeding군은 2일, 7일의 용해일 모두에서 -10℃, -15℃ seeding군 및 대조군보다 현저히 높은 정자활력을 나타내었고, (p<0.01) 5% glycerol 조성에서 -5℃ seeding군은 용해 2일, 7일 모두에서 대조군 및 다른 seeding 온도군들보다 현저히 높은 활력을 보였으며, (p<0.01) -10℃, -15℃ seeding군들은 대조군보다 각각 현저히 높은 활력을 나타내었다. (p<0.01) 10% glycerol 조성에서는 용해 7일에서 모든 seeding군이 대조군보다 현저히 높은 정자활력을 보였다. (p<0.01)

2. seeding 온도에 따른 개정자의 용해 후 생존율은 glycerol 5% 조성에서는 용해 7일에, 10% 조성에서는 용해 2일 및 7일에 -5℃ seeding군이 다른 seeding 온도군 및 대조군보다 유

의성 있게 높은 정자생존율을 나타내었다.( $p < 0.05$ )

3. 개정액 동결시 일정한 seeding 온도에서 glycerol 농도에 따른 개정자의 용해후 활력은 용해 2일, 7일 모두에서 5% glycerol군과 10% glycerol군은  $-5^{\circ}\text{C}$ ,  $-10^{\circ}\text{C}$ ,  $-15^{\circ}\text{C}$ 의 각각의 온도에서 seeding 처리시 상호간에는 차이없는 2% glycerol군보다 각각 현저히 높은 용해 후 활력을 나타내었다.( $p < 0.01$ )

4. 개정액 동결시 일정한 seeding 온도에서 glycerol 농도에 따른 개정자의 용해후 생존율에서도 5% glycerol군과 10% glycerol군은 상호간에는 차이없는 각 용해일에서 glycerol 2%군보다 각각 현저히 높은 용해 후 생존율을 나타내었다.( $p < 0.01$ )

5. 프로그램 동결방법에 의해 동결된 정자는  $-5^{\circ}\text{C}$ ,  $-10^{\circ}\text{C}$ ,  $-15^{\circ}\text{C}$ 의 각 seeding 온도군에서 직접동결법에 의해 동결된 정자보다 용해 후 현저히 높은 활력을 나타내었다.( $p < 0.01$ )

이상의 결과 개정액 동결시 seeding 처리는 비처리보다 용해 후 더 높은 정자의 활력 및 생존율을 나타내며, seeding 온도는  $-5^{\circ}\text{C}$ , glycerol 농도는 5% 또는 10%가 용해후 더 높은 정자활력 및 생존율을 나타냄을 알 수 있었다. 또한 프로그램 동결법에 의해 동결 및 seeding 처리된 정자가 직접동결법에 의해 동결 및 seeding 처리된 정자보다 용해 후 더 높은 활력을 나타냄을 알 수 있었다.

## 참 고 문 헌

1. Buckrell Brian. 1986. The use of frozen semen dogs in canada. *Can Vet J.* 27:161~163.
2. England GCW, Allen WE. 1992. Factors affecting the viability of canine spermatozoa I. Potential influences during processing for artificial insemination. *Theriogenology.* 37(2):364~372.
3. England GCW, Allen WE. 1992. Factors affecting the viability of canine spermatozoa II. Effects of seminal plasma and blood. *Theriogenology.* 37(2):373~381.
4. Foote RH. 1968. Artificial insemination of dogs. In Kirk RW.(ed) *Current Veterinary Therapy, 3rd ed. WB. Saunders Co. Philadelphia* : 686~689.
5. Foote RH. 1986. Artificial insemination. veterinary obstetrics and genital disease. *Theriogenology* : 854~926.
6. Seager SWJ, Fletcher WS. 1973. Progression the use of frozen semen in the dog. *Vet Rec* : 92:6~10.
7. Tsutsui T, Tezuka T, Shimizu T, et al. 1988. Artificial insemination with fresh semen in beagle bitches. *Jpn J Vet Sci.* 50:193~198.
8. Andersen K. 1980. Artificial insemination and storage of canine semen. In Morrow, DA.(ed) *theriogenology. Philadelphia:WB. Saunders Co*:661~665.
9. Chen Y, Foote RH, Tobbacck C, et al. 1993. Survival of bull spermatozoa seeded and frozen at different rates in egg yolk-tris milk extenders. *J Dairy Sci.* 76:1028~1034.
10. Coulter GH. 1992. Bovine spermatozoa in vitro : a review of storage, fertility estimation

- and manipulation. *Theriogenology*. 38:197~207.
11. Bouchar GF, Morris JK, Sikes JD, et al. 1990. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. *Theriogenology*. 34(1):147~155.
  12. Gill HP, Kaufman CF, Foote RH, et al. 1986. artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid stored and frozen semen. *Am J Vet Res*. 31:1807~1813.
  13. Boucher JH, Foote RH, Kirk RW. 1958. The evaluation of semen quality in the dog and the effects of frequently of ejaculation upon semen quality, libido, and depletion of sperm reserves. *Cornell Vet*. 48:67~86.
  14. Kim KS. 1993. Effects of glycerol and seminal plasma in characteristics of preserved canine spermatozoa. *Korean J Vet Res*. 33(2):345~350.
  15. Park Cs, Yang MH, Hwang Ds, et al. 1989. Study on fresh and deep-fresh and deep-frozen storage of korean native goat spermatozoa. *Korean J Anim Sci*. 31(7):412~419.
  16. Leibo SP. The theory and practice of seeding in embryo cryopreservation. *Embryo Transfer Newslett*, 8(1):7.
  17. Kuzan FB, Quinn P. 1988. Cryopreservation of mammalian embryos. In vitro fertilization and embryo transfer *A Manual of Basic Techniques*. 301~347.
  18. Olar TT, Bowen RA, Pickett BW. 1989. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on postthaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology*. 31(2):451~461.
  19. Parkinson TJ, Whitfield CH. 1987. Optimization of freezing conditions for bovine spermatozoa. *Theriogenology*. 27(5):781~797.
  20. Parks JE, Graham JK. 1991. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 32(2):209~222.
  21. Whittingham DG. 1977. The freezing of mammalian embryos. (Eds) *Ciba Foundation symposium 52*, Amsterdam:97~124.
  22. Kasai M, Niwa K, Iritani A. 1981. Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. *J Reprod Fert*. 63:175~180.
  23. Kim HK, Ko MS, Kim IC, et al. 1989. Deep freezing of boar semen in liquid nitrogen container. *Korean J Anim Sci*. 31(3):155~157.
  24. Kim JK, Kim CK, Kang MJ, et al. 1988. studies on simplified procedures for freezing and thawing of bovine embryos IV. Effects of simplified procedures of freezing and seeding using a cryoprotectant containing sucrose on the rabbit embryo survival rate determined with the FAD test. *Korean J Anim Sci*. 30(10):583~589.
  25. Kojima T, Soma T, Oguri N. 1988. Effect of ice nucleation by droplet of immobilized silver

- iodide on freezing of rabbit and bovine embryos. *Theriogenology*. 30(6):1199~1207.
26. Kojima T. 1991. Studies on cryopreservation of mammalian embryos Induction of ice formation with droplets of silver iodide immobilized in alginate gel. *Jpn J Anim Reprod*. 37(5)13~23.
  27. Criser JK, Huse-Benda AR, Aaker DV, et al. 1987. Cryopreservation of human spermatozoa I. Effects of holding procedure and seeding on motility, fertilizability, and acrosome reaction. *Fertil & Steril*. 47(4):656~663.
  28. Chiravuch S, Bruns ES, Prins GS. 1993. Improvement of post-thaw sperm motility in poor quality human semen. *Fertil & Steril*. 60(4):706~710.
  29. Foote RH. 1964. Extenders for freezing dog semen. *Am J Vet Res*. 25:37.
  30. Farrand GD, Elsdon RP, Seidel GE. 1985. Effect of slow cooling end point temperature on survival of frozen bovine embryos. *J Anim Sci*. 61(2):460~465.