

개 정자의 동결융해 후 생존성 및 첨체의 변화

이영락 · 이성림 · 강태영¹ · 최상용[†]
경상대학교 수의과대학

Viability and Acrosomal Status Changes Following Post-thawing Canine Spermatozoa

Y. R. Lee, S. L. Lee, T. Y. Kang¹ and S. Y. Choe[†]
College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

SUMMARY

This study was carried out to evaluate the effect of different freezing and thawing rates on the viability, motility and acrosomal changes of frozen canine spermatozoa. The ejaculated semen was extended with Tris-egg yolk buffer containing 8% glycerol and equilibrated for 60 min after cooled to 4°C for 58 min. The straws were cryopreserved gradually by slow-cooling at different distance(6, 10 and 17 cm, respectively) from the liquid nitrogen (LN₂) to achieve temperature rate of 3, 8.9 and 19°C/min. Thawing of the straws was performed in a water bath for 2 min at 37°C and 55°C, respectively. The motility of frozen-thawed spermatozoa was assessed by phase-contrast microscopy. To assess their viability and acrosome content, spermatozoa were stained with a vital stain and Fluorescence conjugated lectin *Pisum Sativum Agglutinin* (FITC/PAS), respectively. Concentration of the ejaculated fresh semen was normal range of 3.44×10^8 /ml. Freezing temperature were reduced to -110, -70 and -35°C, as higher distance from liquid nitrogen, 6, 10 and 17 cm, respectively. Freezing at 3°C/min in distance of 17 cm from liquid nitrogen yielded better motility, viability and rate of intact acrosome than 8.9 or 19°C/min and the optimal thawing was 37°C for 2 min.

(Key words : canine sperm, motility, viability, acrosome)

서 론

개의 인공수정에 대한 연구는 사람이나 소에 비하여 활발하게 진행되지 못했으나, 최근 반려동물로서 애완견의 사육이 널리 보급되고, 우수한 종건의 유전 형질과 멸종위기의 품종을 영구적으로 보존하기 위하여 동결정액을 이용한 인공수정의 필요성이 요구되었다.

개의 인공수정은 여러 연구자들에 의하여 신선정액(Farstad 등, 2000; Pinto 등, 1998; Linde-

Forsberg, 1991; Farstad 등, 1984; Seager, 1972; Gill 등, 1970), 저온보존정액(Seager 등, 1973), 동결정액(Gill 등, 1970; Jeffcoate 등, 1989; England 등, 1993; Szasz 등, 2000)으로 연구되어 왔으며 동결정액을 이용한 인공수정은 현재까지 수태율이 높지 않음에도 불구하고 장기간 보존할 수 있고 전염성 질병의 예방 및 우수 종모건의 활용도를 높일 수 있다는 많은 장점으로 인하여 선진 외국에서는 많은 연구가 수행되고 있다.

인공수정에 이용되는 정액의 동결보존은 Spall-

¹ Department of Veterinary Medicine, Cheju National University.

[†] Correspondence : E-mail: sychoe@nongae.gsnu.ac.kr

anzani (1776)에 의해 처음으로 눈 속에 개구리, 말, 사람 등의 정액을 묻어 놓고 저온보존(cooling)을 시작한 것이 동결보존의 시초가 되었다. 개 정액을 이용한 최초의 저온보존에 관한 보고는 solid carbon dioxide (dry ice) block위에 정자 pellet을 놓아둠으로써 급속 동결하였다는 보고(Platz과 Seager, 1977)가 있었다. 개 정자의 보존시 정자의 생존성에 영향을 주는 인자는 희석액의 종류, 희석농도, 동결보호제, 평형시간, 동결보관, 용해온도 등이 있으며 동결보호제로는 Tris-egg yolk-extender와 8% glycerol을 첨가한 Tris-egg yolk-glycerol (TEG) buffer를 사용하여 정자의 생존성을 향상시킨다고 보고(Morton & Bruce 등, 1989; Olar 등, 1989; Ferguson 등, 1989; Yubi 등, 1987; Foote 등, 1964)하였다. 돼지(Eriksson, 2000)와 마우스(Tao, 1995)에서도 정액채취 시의 온도, cooling rate, 용해온도 등은 정자의 생존성과 운동성에 많은 영향을 미친다는 연구 결과가 보고되었다.

개 정액의 보존 방법에 관한 연구는 Milovano (1951)가 cold shock의 영향을 극복하기 위하여 실온에서 정액의 단계적인 cooling과 희석액에 지방성분을 첨가시켰으며, 또한 cold shock에 대한 정자의 보호물질을 사용한 효과를 처음으로 보고하였다. 정자 동결시 온도 변화를 주었을 때 손상이 크다는 것을 발견하였고(Strom 등, 1998), 처음으로 온도에 의한 정자의 손상을 temperature shock 이라고 명명하였다. Sirivaidyapong 등(2000, 2001)은 이러한 온도에 의한 정자의 손상을 최소화하기 위해 prostatic fluid를 동결시 첨가하여 동결용해 후 정자의 운동성, 생존성, 침체의 상태에 미치는 효과에 대하여 보고한 바 있으며, Rota 등(2001)은 skimmed milk를 동결보존액에 첨가하였다.

Mazur 등(1985)은 각 정자세포를 종류별로 구분하여 동결보존을 한 결과, 동결정액의 생존율을 높이기 위해서는 적절한 동결속도가 중요하다고 하였고, Dobrinski 등(1993)은 정자의 동결보존시 동결속도를 slow freezing rate로 하는 것이 높은 정자의 생존율을 보였다고 보고하였다. 적절한 동결속도의 기준을 설정하기 위하여 간이적인 방법으로 액체질소의 표면 위에서 동결 straw의 높이를 다르게 하여 실험을 실시한 보고(Smith, 1994;

Battista 등, 1988)가 있으며, Yubi 등(1984)은 dry ice 위에서 동결을 시도하였다.

정 등(2001)은 동결후 정액의 용해시 용해온도에 따라 정자의 생존성, 운동성, 침체상태 등에 크게 영향을 미친다고 보고하였다.

본 실험에서는 개 정액 동결보존을 향상시키기 위하여 서로 다른 freezing rate를 설정하여 정액동결을 실시한 후 freezing rate에 따른 정자의 성상변화를 비교 관찰하여 보다 적합한 개 정액동결방법을 제시하고 본 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물

본 실험에 공시한 개는 2~3세의 3~8 kg의 소형 애완견(Shih-Tzu, Schnauzer)을 이용하였고, 공시동물의 사육은 충분한 운동을 할 수 있는 쾌적한 환경의 사육장내의 독립된 케이지에 애견용 사료 Purina[®] (Purina, USA)와 물을 자유급식하여 사육하였다.

2. 정액 채취

정액 채취를 위해 수개의 생식기 주위의 털을 깎고 생리식염수에 항생제를 넣어 멸균거즈로 생식기 외부의 이물을 깨끗이 제거하여 청결한 상태에서 정액을 채취하였다. 정액 채취에 사용되는 기구류는 멸균하여 사용하였으며, 정액 채취방법은 음경 맞사지법으로 음경의 발기를 유도한 후, 구선(bulbus glandis) 부위를 잡고 압력을 가하여 3단계로 분획하여 정액을 채취하였다. 본 실험에서는 정자의 농도가 가장 높은 2단계에서 채취한 정액을 실험에 사용하였다.

3. 정액 검사

1) 정자의 농도

정자의 농도 측정에는 원액 정액을 증류수로 100배 희석하여 warm plate 위에서 혈구 계산판(Makler counting chamber, Sefi medical Instruments, USA)에 희석정액을 한 방울 떨어뜨려 정자 농도를 계산하였다. 계산방법은 총 정자수 = 정

자수(chamber 5칸) × 5 × 100(회석배수) × 10(높이) × 1,000 (ml로 단위환산)을 적용한다.

2) 정자의 운동성

정자의 운동성 검사는 검사 시 저온에 대한 정자의 민감성을 줄이기 위해서 37°C의 온도를 유지하는 warm plate를 이용하였다. 정자의 운동성은 Seager 등(1975)의 방법에 따라 Table 1에서와 같이 6등급으로 나누어 정자 200마리의 운동성을 확인하였다.

3) 정자의 생사 염색

정자의 생사 판정을 위한 생사 염색은 Fert/Light™ (Molecular Probes Inc., Eugene, OR) 염색액을 이용하였다. 회석시킨 정자 2.5×10^6 마리/ml

Table 1. Classification on motility of canine spermatozoa by its motility

Ranges	Characteristic
5	Very rapid and vigorous forward motion
4	Rapid progressive motion
3	Steady progressive motion
2	Slow progression, including stop and start motion
1	Weak undulation or oscillatory motion
0	No discernable motility



Fig. 1. Live and dead staining of dog spermatozoa by using Fert/Light kit (100X).

와 50 μ l의 1st antibody를 혼합하여 37°C에서 5분간 incubation시킨다. 그리고 5 μ l의 2nd antibody와 10 μ g/ml propidium iodide(Sigma, PI)로 37°C에서 5분간 incubation시키고 slide 위에 sample을 얹어 Zeiss 형광현미경(excitation filter, 365 nm; barrier filter, 397 nm)하에서 관찰하였다. Fig. 1에서 정자의 두부가 초록색으로 염색된 것을 생존 정자로, 붉은색으로 염색된 것을 죽은 정자로 판정하였다. 정자의 생존을 판정은 염색된 정자에서 생존한 정자와 죽은 정자의 수를 헤아려 전체 염색된 정자 200개의 정자에 대한 생존정자를 백분율로 표기하였다.

4) 정자의 침체검사

정자의 침체검사는 Cross 등 (1996)의 방법을 변형하여 실시하였다. Fluorescein conjugated lectin *Pisum sativum* agglutinin (FITC/PAS, Sigma) 염색액을 이용하였으며, 슬라이드 위에 10 μ l의 정액을 도말하고 건조시킨 후, -20°C의 methanol에 2분간 고정하였다. 고정된 슬라이드를 건조시킨 후, FITC/PAS와 대조염색액인 10 μ g/ml의 propidium iodide(PI)로 20분간 염색하였다. Zeiss 형광현미경 (excitation filter, 365 nm; barrier filter, 397 nm)하에서 침체의 손상 여부를 조사하여, Fig. 2에 나타난 바와 같이 intact acrosome, reacting acrosome, reacted acrosome으로 분류하였으며, 이를 관찰된 정자에 대한 백분율로 각각 표기하였다.

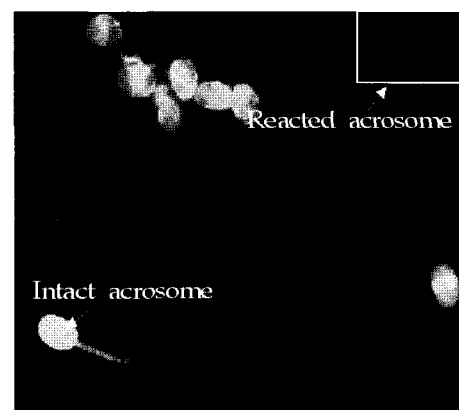


Fig. 2. Acrosome staining of dog spermatozoa by using FITC/PAS (400X).

4. 동결속도의 결정

개 정액을 동결보존하는데 많은 영향을 미치는 것은 정액의 동결속도로서 정액동결 속도의 결정 방법 straw안에 Tris-egg yolk-glycerol (Trisma, 81 mM; TES, 209 mM; citric acid, 6 mM; glucose, 5 mM; glycerol 8%) buffer를 넣고 디지털 온도계를 넣어서 5 cm의 액체질소가 채워진 뚜껑이 없는 ice-box 안에 액체질소의 표면으로부터 각각 6 cm, 10 cm 그리고 17 cm 높이에 두고 온도의 변화를 매 10초 간격으로 조사하였다.

5. 정액 동결 및 용해

정액의 동결은 채취한 정액을 37°C의 Tris-egg yolk buffer로 정자의 농도가 1.6×10^8 /ml가 되게 희석하고 37°C의 정액이 4°C까지 하강하는데 소요 되는 시간인 58분에 1시간의 평형을 위해서 4°C 저온에서 1시간 58분 동안 저온평형을 실시하였다. 저온 평형 후 Tris-egg yolk-glycerol buffer를 동량으로 첨가하여 정자의 최종 농도가 8×10^7 /ml가 되도록 희석한다. 희석된 정액은 0.5 ml straw에 장착하고 밀봉하여 액체질소 표면 위 6 cm, 10 cm 및 17 cm 에서 각각 13분 50초, 17분 20초, 23분 동안 평형을 시키고, 시간이 되면 액체 질소 안으로 넣어 동결을 완료하였다.

동결정액의 용해는 각각 37°C, 55°C로 가온된 항온수조에서 2분 동안 흔들어 용해한 후 현미경 하에서 용해온도와 동결속도에 따른 정자의 운동성, 생존율, 침체의 상태를 판정하였다.

6. 통계학적 분석

본 실험에서는 자기 다른 동결조건의 실험은 각각 5회 반복 실시하였다. 각 실험값의 백분율은 arcsine을 이용하여 전환한 후 통계 프로그램인 Analysis of Variance(ANOVA)로 분석하였으며, $P < 0.05$ 일 때 유의적 차이를 인정하였다.

결 과

1. 정액검사

실험견으로부터 채취한 정액을 정액동결 실험에 공시할 수 있는지의 여부를 확인하고자 정액량, 정자수, 정자형태 등을 조사한 결과는 Table 2에서 나타난 바와 같이 8두의 실험견에서 정액을 채취한 신선정액의 정자수는 적은 것은 $2.8 \pm 0.1 \times 10^8$ /ml이었으며, 많은 것은 $4.0 \pm 0.2 \times 10^8$ /ml로서 평균 $3.3 \pm 0.7 \times 10^8$ /ml로 정상 정자의 수와 같았다. 채취한 정액량은 적은 것은 $0.7 \pm 0.4 \times 10^8$ /ml이고 많은 것은 $1.6 \pm 0.2 \times 10^8$ /ml로서 평균 $1.2 \pm 0.3 \times 10^8$ /ml이었다. 정자의 정상적인 형태를 갖는 것이 적은 것은 54.6±1.5%에서 많은 것은 64.6±1.2%로 평균 59.5±3.5%였으며 일반적으로 정자 기형율이 30~40%로 알려져 있다.

2. 동결속도의 결정

정액을 동결하였을 때 가장 효과적인 동결속도를 결정하기 위해서 4°C로 보정된 Tris-egg yolk glycerol buffer 가 담긴 5 ml tube에 디지털 온도계

Table 2. General observations of ejaculated semen in dog

No. of dog	Total volume(ml)	Conc. of sperm($\times 10^8$)/ml	Normal sperm(%)
1	1.6 ± 0.2	2.8 ± 0.1	55.6 ± 1.4
2	1.3 ± 0.2	3.7 ± 0.3	60.1 ± 3.5
3	1.2 ± 0.1	4.0 ± 0.2	64.6 ± 1.2
4	0.7 ± 0.4	2.8 ± 0.1	54.6 ± 1.5
5	1.3 ± 0.2	3.7 ± 0.3	59.1 ± 3.5
6	0.8 ± 0.3	3.0 ± 0.1	62.0 ± 2.0
7	1.3 ± 0.2	3.5 ± 0.2	58.5 ± 2.5
8	1.5 ± 0.4	3.2 ± 0.1	61.1 ± 3.5
Average	1.2 ± 0.3	3.3 ± 0.7	59.5 ± 3.5

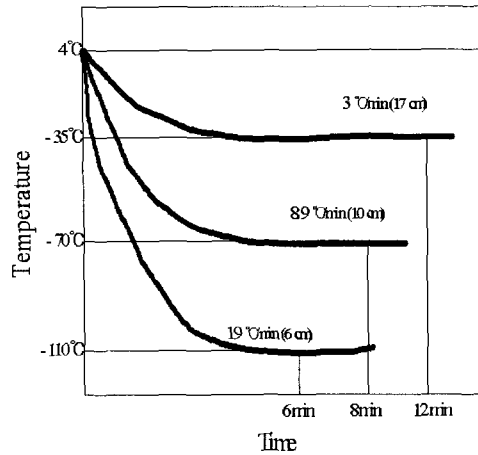


Fig. 3. Curves of freezing ramp rate following different height from the surface of LN₂.

를 장착하여 액체질소 표면에서 6, 10 및 17 cm 높이에 온도 변화를 10초 간격으로 조사한 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같다.

정액을 동결하는 높이가 6, 10 및 17 cm 일 때 각각 최저온도는 -110°C, -70°C, -35°C로 감소하는 경향을 보였다. 그리고 이때 최저온도로 감소하는데 소요되는 시간은 각각 6분, 8분 및 12분으로 나타났다. 결과적으로 이를 분당 ramp rate로 환산하면 그 값이 각각 19°C/min, 8.9°C/min 및 3°C/min 였다.

3. 동결속도에 따른 용해 온도별 정자 생존율

개 동결 정액을 각기 다른 조건의 용해 온도에 생존율을 조사한 결과는 Table 3에서 나타난 바와 같다. 동결 후 37°C, 55°C에서 용해 후 정액의 생존율을 관찰한 결과, 37°C에서는 6, 10 및 17 cm에서 각각 54.0±2.4%, 70.2±3.8% 및 78.2±2.4%로 나타나, 10 및 17 cm 높이가 6 cm 높이 보다 유의적(P<0.05)으로 높은 생존율을 보였다. 그리고, 55°C 용해 후의 생존율 관찰한 결과는 6, 10 및 17 cm에서 각각 48.2±2.5%, 52.3±1.6%, 59.2±2.1% 였는데, 17 cm에서 유의적(P<0.05)으로 높은 생존율을 보였다.

따라서 동결된 정자를 용해하였을 때 생존율은 37°C에서 용해시 55°C에 비해 유의적(P<0.05)으로

높게 나타났고, 동결속도는 17 cm에서 생존율이 유의적(P<0.05)으로 가장 높았다.

4. 동결속도에 따른 정자 운동성

동결속도와 용해온도에 따른 정자의 운동성은 Table 4에서 보는 바와 같다. 정액은 Seager 등 (1975)의 방법에 따라 Table 1에서와 같이 6등급으로 분류하며 수정이 가능한 정액은 3등급 이상 운동성을 가진 정자를 사용하였다. 동결한 정액을 37°C에서 용해하여 정자의 운동성을 판정하였을 때, 각 동결속도인 19°C/min에서 동결하였을 때 정자의 운동성은 46.5±4.3%로 8.9°C/min과 3°C/min에서 동결하였을 때의 정자의 운동성의 65.7±4.8%와 67.5±3.9%에 비해 유의적(P<0.05)으로 낮았다.

55°C에서 용해한 정자에서는 동결속도에 따른 용해온도의 영향으로 정자의 운동성에 유의적 (P<0.05)

Table 3. Viability of spermatozoa between different freezing temperature and thawing rates

Height (cm)	Freezing rate (°C/min)	Viability of sperm (%)	
		37°C	55°C
6	19	54.0±2.4	48.2±2.5
10	8.9	70.2±3.8*	52.3±1.6
17	3	78.2±2.4*	59.2±2.1*

Relative percentages as consider to control (89.2±3.2, survivability).

* Different superscripts in a same column differ significantly (P<0.05).

Table 4. Motility of spermatozoa between different freezing temperature and thawing rates

Height (cm)	Freezing rate (°C/min)	Motility of sperm (%)	
		37°C	55°C
6	19	46.5±4.3	36.4±4.9
10	8.9	65.7±4.8*	42.3±4.5
17	3	67.5±3.9*	51.2±5.6

Relative percentages as consider to control (87.6±5.0, Motility).

* Different superscripts in a same column differ significantly (P<0.05).

Table 5. Acrosomal status changes of spermatozoa between different freezing temperature and thawing rates

Height (cm)	Freezing rate (°C/min)	Intact acrosome state (%)	
		37°C	55°C
6	19	12.4±8.9	13.4±5.4
10	8.9	19.6±8.9	17.2±8.9
17	3	46.4±9.2*	23.4±5.2

Relative percentages as consider to control (76.2±9.1%, Intact acrosome).

* Different superscripts in a same column differ significantly (P<0.05).

인 차이를 나타내지 않았다. 따라서 동결된 정자를 용해시 37°C에서 용해한 경우가 55°C에 용해한 것에 비해 운동성이 유의적(P<0.05)으로 높으며, 동결속도는 8.9°C/min와 3°C/min에서 유의적(P<0.05)으로 높았다.

5. 동결속도에 따른 용해 온도별 첨체의 상태 변화

동결속도에 따른 동결정액의 용해온도별 첨체 반응은 Table 5에서 나타난 바와 같다. 이 결과는 각 동결속도별로 Intact, Reacting, Reacted로 분류 Seager 등(1975)의 방법에 따라 Table 1에서와 같이하어, 그 비율을 환산한 것 중 Intact한 비율만을 나타낸 것이다.

37°C에서 용해한 정자에서 acrosome이 intact한 비율은 17 cm(46.4±9.2)로 6, 10 cm의 각각 12.4±8.9%, 19.6±8.9%보다 유의적(P<0.05)으로 높게 나타났다. 그러나 55°C에서 용해한 정자는 6, 10 및 17 cm에서 각각 13.4±5.4%, 17.2±8.9% 및 23.4±5.2%로 유의적(P<0.05)인 차이가 나타나지 않았다. 따라서 정액을 17 cm에서 동결하여 이를 37°C에서 용해하였을 때 정자의 acrosome intact 수치가 가장 높게 나타나서 동결 용해에 따른 정자에 손상을 최소화 할 수 있었다.

고 찰

최근 개 정액의 동결 보존과 동결정액을 이용한

인공수정은 임상분야에서 새로운 영역으로 부각되고 있으며 수태율은 다소 향상되고 있으나 동결정액을 이용한 개의 인공수정은 수태율과 산자 생산율이 저조한 실정이다. 인공수정시 수태율 향상을 위해서는 정자의 동결과정에서 정자의 생존성, 운동성 및 첨체상태가 중요하며 인공수정 시에는 정자의 농도, 수정회수, 수정부위, 수정시기를 고려하여야 한다.

Harrop 등(1954)은 개의 평균 정자수는 1.25×10^8 마리/ml 라고 보고하였으며, England와 Allen (1989)는 2단계 정자의 숫자가 $0.6 \sim 5.5 \times 10^8$ 마리/ml 이며 평균 정자수는 2.99×10^8 마리/ml라고 하였다. 그러나 본 실험에서는 평균 정자 수가 3.2×10^8 마리/ml로서 실험과정에서 분획간의 분리로 인하여 높은 정자의 농도를 보였다. 채취한 정액에서 정자의 생존성과 운동성 그리고 첨체의 상태를 검사한 결과 각각 약 89.2%, 87.6%, 76.2%로 높게 나타났다. Maxwell (1978), Zlatarev 등(1988)은 정자의 수, 생존율, 운동성, 첨체 상태의 단계적인 감소 등으로 인하여 수정과 임신에 영향을 준다고 보고하였고, Olar (1984)와 Oettle (1986)등은 정자의 생존율, 운동성, 첨체상태가 정자를 평가하는 중요한 parameter라고 보고하였다.

따라서 인공수정시 수태율에 많은 영향을 줄 수 있는 정자의 생존성과 운동성, 첨체상태는 동결 후에 많은 손상을 받게 되어(Zlatarev 등, 1988; Olar 등, 1984; Maxwell 등, 1978), 동결정액을 이용하여 인공수정을 할 경우에는 일련의 요건으로 인하여 수정율을 감소시키는 직접적인 요인이 될 수 있을 것으로 사료된다.

Polge 등(1978)은 동결시 glycerol의 첨가가 정자의 동결에 크게 영향을 미친다고 보고하였다. Sirivaidyapong 등(2001)은 정자의 동결보존시 정자의 생존성 향상을 위해 prostatic fluid를 동결시 첨가하였으며, Rota 등(2001)은 skimmed milk를 동결보존액에 첨가하여 정자의 생존성과 운동성 첨체상태를 개선하였다. 그러나 1985년 Mazur 등은 각 정자세포를 종류별로 구분하여 동결보존을 한 결과 동결정액의 생존율을 높이기 위해서는 적절한 동결속도가 중요하다고 하였다(Foote, 1964). Olar(1984)는 정자 동결율을 분당 75°C라는 빠른

동결속도와 5 ~ -15°C까지의 분당 2°C 감소와 -15 ~ -100°C까지의 분당 10°C의 감소라는 저속동결 이상으로 변화한 속도(5°C에서 -15°C까지는 분당 5°C, -15°C에서 -100°C까지는 분당 20°C라)에 대해 보고하였다. Smith (1994)는 다른 extender를 사용하여 액체질소 표면 위에서 1.5 inch와 4 inch, 8 inch를 비교하였을 때 8 inch 위에서 동결했을 때 -10°C에서 -30°C 사이에서 분당 8.3°C로 떨어지는 동결율에서 용해 후 운동성이 가장 좋음을 발견하였다. 미리 액체질소 위에 둔 rack위에 straws를 두어서 동결하는 급속동결은 개 정액을 이용하여 좋은 결과를 얻었다고 보고 (Fontbonne와 Badinand, 1993; Olar, 1984)하였다.

따라서 본 실험에서도 동결속도를 결정하기 위해 정자의 동결시 정자내 수분팽창 온도를 근거로 하여 설정하였다. 동결과정 중 -35°C 정도에서 수분팽창이 한번 더 일어나는데, 이때는 더 이상의 갑작스런 형태학적 팽창이 불가능한 상태이므로 가능한 완만하게 넘기기 위해 간이적인 방법으로 -35°C를 찾아가 하였으며, 실험을 통해 찾은 동결과정 중 -35°C 지점은 액체질소의 표면 위 17 cm (3°C/min) 높이를 확인할 수 있었다. 이를 근거로 fast (19°C/min), moderate (8.9°C/min), slow (3°C/min) freezing 방법으로 동결을 실시하였을 때 그 결과는 Slow freezing rate, 3°C/min와 8.9°C/min에서 37°C에 용해했을 때 각각 생존율이 78.2±2.4%, 70.2±3.8%로 Fast freezing rate, 19°C/min에서는 54.0±2.4%보다 유의적(P<0.05)으로 높게 나타났으며 정자의 운동성과 첨체의 상태도 Slow freezing rate에서 좋은 결과를 보였다. 정 등(2001)도 개 정자의 보존방법에 따른 동결정액을 37°C로 용해시 생존율은 동결속도를 19°C/min, 8.9°C/min 또는 3°C/min로 설정하였을 때 54.0±4.7%, 60.0±2.2%, 69.8%±3.2%로 나타났으며 이는 본 실험의 결과와 유사하였다.

동결후 용해과정의 warming과정이 동결의 cooling만큼이나 정자의 생존성에는 중요하다고 Mazur (1985)는 보고하였다. Olar (1984)은 동결한 정액 straw를 75°C에서 용해하는 방법이 35°C에서 용해하는 방법보다 용해 후 정자의 운동성이 더 높았다고 보고한 바 있으나 Yubi 등(1984)과 Smith 등

(1994)은 37°C에서 용해한 정자가 55°C에서 용해된 정자보다 생존성, 운동성, 첨체의 상태가 유의적(P<0.05)으로 높았다고 보고하였으며 이는 본 실험의 결과와 일치하였다.

Oettle 등(1986)은 정자의 동결과 용해과정에서 많은 첨체의 손상이 생기고, 정자의 운동성과 첨체의 상태와는 상관이 없으나, 정자의 수정능력의 조사에 있어서 첨체의 상태조사 또한 아주 중요한 부분이라고 하였다.

적 요

본 실험은 개의 인공수정에 사용할 정자의 보존에 있어서, 개 정액 동결시 동결속도와 용해온도에 따른 정자의 생존율, 운동성 그리고 intact acrosome의 비율을 조사하였던 바 결과는 다음과 같다.

1. 본 실험에서 실험건의 사출된 평균 신선정액의 농도는 3.44×10^8 /ml로 정상범위에 들었으며, 정자의 형태학적 판정에서 정상적인 정자의 농도는 평균 $59.45 \pm 3.45\%$ 로 상대적인 기형율은 약 30~40% 정도 나타났으며, 이는 정상적인 상태의 개 정액이라 할 수 있다.
2. 개 정액의 동결속도는 동결하는 높이가 6, 10 및 17 cm 일 때 각각 최저온도는 -110°C, -70°C, -35°C로 감소하는 경향을 보였으며 이때 최저온도로 감소하는데 소요되는 시간은 각각 6분, 8분 20초 그리고 12분 50초로 결과적으로 분당 동결속도는 각각 19°C/min, 8.9°C/min 그리고 3°C/min로 나타났다.
3. 정액을 동결속도와 용해온도에 따른 정자의 생존율, 운동성 그리고 intact acrosome의 비율은 동결속도가 3°C/min일 때 가장 높았으며, 용해 온도는 37°C일 때 효율성이 가장 높은 것으로 나타났다.
4. 동결의 방법에 있어서는 액체질소의 표면으로부터 17 cm 높이에서 동결하는 분당 -3°C의 동결속도에서 동결하여 37°C에서 2분간 용해하는 방법이 가장 좋은 결과를 보였으며, 생존성과 운동성은 문제없이 사용할 수 있을 것으로 판단되나, 첨체의 intact한 비율은 저

조한 결과를 나타내었다.

참고문헌

- Badinand F, Fontbonne A, Maurel MC, Siliart B. 1993. Fertilization time in the bitch in relation to plasma concentration of oestradiol, progesterone and luteinizing hormone and vaginal smears. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 47:63-67.
- Battista M, Parks J and Concannon PW. 1988. Canine sperm post thaw survival following freezing in straw or pellets using pipes, lactose, tris or test extenders. *XIth International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*, 3:229.
- Cross NL. 1996. Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesterone: Cholesterol is the major inhibitor. *Biol. Reprod.*, 54:138-145.
- Dobrinski I, Lulai C, Barth AD and Post K. 1993. Effects of four different extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 47: 291-296.
- England GCW and Allen WE. 1989. Seminal characteristics and fertility in dogs. *Veterinary Record.*, 125:399.
- England GCW. 1993. Cryopreservation of dog semen: a review. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 47: 243-55.
- Eriksson BM, Rodriguez-Martinez H. 2000. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in Flat-Packs and Maxi-straws. *Anim. Reprod. Sci.*, 63(3-4):205-20.
- Farstad W. 1984. Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen. *J. Small Animal. Pract.*, 25: 561-565.
- Farstad W. 2000. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology*, 53:175-86.
- Ferguson JM, Renton JP and Farstad W & Dogulas TA. 1989. Insemination of beagle bitches with frozen semen. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 39: 293-298.
- Fontbonne A and Badinand F. 1993. Studies on freezing dog spermatozoa: effect of glycerol on motility after thawing. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 47:531-532.
- Foot RH. 1964. Extenders for freezing dog semen. *American Journal of Veterinary Research*, 25: 37-39.
- Gill HP, Kaufman CF, Foot RH and Kirk RW. 1970. Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid-stored and frozen semen. *Am. J. Vet. Res.*, 31:1807-1813.
- Harrop AE. 1954. Artificial insemination of a bitch with preserved semen. *Br. Vet. J.*, 110:424-425.
- Linde-Forsberg C. 1991. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Vet. Clin. No. Am. Sm. Anim. Prac.*, 21:467-485.
- Mazur P and Cole KW. 1985. Influence of cell concentration on the contribution of unfrozen fraction and salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes. *Cryobiology*, 22:509-536.
- Milovanov VK. 1951. Methods of storage of semen of ruminants. In 'News in the Biol. Reprod. Farm Anim.', 13:9-65.
- Morton DB & Bruce SG. 1989. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 39:311-316.
- Oettle EE and Soley JT. 1986. Ultrastructural changes in the acrosome of human sperm during freezing and thawing: a pilot trial. *Arch. Androl.*, 17:145-150.
- Oettle EE. 1986. Changes in acrosome morphology during cooling and freezing of dog semen.

- Anim. Reprod. Sci., 12:145-150.
- Olar TT. 1984. Cryopreservation of dog spermatozoa. MS Thesis, Colorado University, Fort Collins. 158.
- Olar TT, Browen RA and Pickett BW. 1989. Influence of extender, cryopreservation and seminal processing procedures on post thaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. *Theriogenology*, 31:451-461.
- Pinto CR, Eilts BE, Paccamonti DL. 1998. The effect of reducing hindquarter elevation time after artificial insemination in bitches. *Theriogenology*, 50:301-315.
- Platz CC and Seager SW. 1977. Successful pregnancies with concentrated frozen canine semen. *Lab. Anim. Sci.*, 27:1013-1016.
- Polge C. 1978. Current status of the preservation of semen and embryos. *Proc. R. Soc. Med.*, 69:560-562.
- Rota A, Frishling A, Vannozzi I, Camillo F and Romagnoli S. 2001. Effect of the inclusion of skimmed milk in freezing extenders on the viability of canine spermatozoa after thawing. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 57:377-381.
- Seager SW and Fletcher WS. 1972. Collection, storage, and insemination of canine semen. *Lab. Anim. Sci.*, 22:177-182.
- Seager SW and Fletcher WS. 1973. Progress on the use of frozen semen in the dog. *Vet. Rec.*, 92:6-10.
- Seager SW, Platz CC and Fletcher WS. 1975. Conception rates and related data using frozen dog semen. *J. Reprod. Fertil.*, 45:189-192.
- Sirivaidyaong S, Cheng FP, Marks A, Voorhout WF, Bevers MM and Colenbrander B. 2000. Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. *Theriogenology*, 53: 789-802.
- Sirivaidyaong S, Ursem P, Bevers MM, Colenbrander B. 2001. Effect of prostatic fluid on motility, viability and acrosome integrity of chilled and frozen-thawed dog spermatozoa. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 57:383-386.
- Smith FO. 1994. Cryopreservation of Canine Semen: Technique and Performance. *Proc 10 th Int. Congr. Anim. Reprod.*, 2:216. abstract.
- Spallanzani L. 1766. *Opuscoli di fiscal animale e vegetabile. Opuscolo II. Obsercazioni e sperienze intorno ai vermicelli spermaici dell' homo e degli animal. Modena 1766* (cited by Watson, 1979).
- Strom Holst B, Rota A, Andersen Berg K, Lindforsberg C and Rodrigues-Martinez H. 1998. Canine sperm head damage after freezing-thawing: Ultrastructural evaluation and content of selected elements. *Reprod. Dom. Anim.*, 33:77-82.
- Szasz F, Gabor G and Solti L. 2000. Comparative study of different methods for dog semen cryopreservation and testing under clinical conditions. *Acta. Vet. Hung.*, 48:325-333.
- Tao J, Du J, Kleinhans FW, Critser ES, Mazur P and Critser JK. 1995. The effect of collection temperature, cooling rate and warming rate on chilling injury and cryopreservation of mouse spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, 104:231-236.
- Yubi AC. 1984. Investigations of dog semen with particular reference to freezing techniques. MVM Thesis, Faculty of Veterinary Medicine. University of Glasgow.
- Yubi AC, Ferguson JM, Renton JP, Harker S, Harvey MJA, Bagyjenji B and Douglas TA. 1987. Some observation on the dilution, cooling and freezing of canine semen. *J. Small Anim. Pract.* 28:753-761.
- 정정란, 유재규, 양성열, 여현진, 박종식, 예은하, 노규진, 최상용, 2001. 개 정자의 보존방법에 따른 침체 및 생존성의 변화 II. 동결보존에 따른 효과. *한국수정란이식학회지*, 16:133-138.

(접수일 : 2003. 3. 11/ 채택일 : 2003. 4. 20)