

Original Article

개 정액의 냉동보존 시 κ -Carrageenan이 정자 성상에 미치는 영향

김은지, Nabeel A. H. Talha, 전유별*, 유일정

전북대학교 수의과대학 수의산과학·번식공학교실, 생체안전성연구소

Effect of κ -Carrageenan on Sperm Quality in Cryopreservation of Canine Semen

Eun-Ji Kim, Nabeel A. H. Talha, Yu-Byeol Jeon* and Il-Jeoung Yu

Laboratory of Theriogenology and Reproductive Biotechnology, College of Veterinary Medicine and Bio-Safety Research Institute, Chonbuk National University, Iksan 54596, Korea

Received December 14, 2018

Revised February 7, 2019

Accepted March 4, 2019

*Correspondence

Yu-Byeol Jeon

202 Animal Medical Center, Chonbuk National University, 79 Gobong-ro, Iksan 54596, Korea

Tel: +82-63-850-0934

Fax: +82-63-850-0910

E-mail: ybjeon@jbnu.ac.kr

ORCID

<https://orcid.org/0000-0003-0328-2974>

ABSTRACT This study was conducted to find out the effect that κ -Carrageenan has on the properties of dog sperm when it was added to the cryoprotectant. Extender basically was contained 1.21 g Trizma base, 0.67 g citric acid, 0.4 g glucose, 0.03 g penicillin G, 0.05 g streptomycin sulfate. Extender1 was added with 0.1%, 0.2%, 0.3%, and 0.5% carrageenan, while extender2 was supplemented with glycerol. After freezing-thawing, the motility, viability, acrosome integrity, apoptosis, and ROS (reactive oxygen specifications) of sperm were measured to analyze the effects of the supplementation of carrageenan. Total Motile (TM), Rapid Progressive Motile (RPM), Medium Progressive Motile (MPM), and Immotile were measured through the CASA system after thawing in 37 degree water. Extender with 0.2% κ -carrageenan (64.26 ± 0.49) was significantly higher than control (40.24 ± 8.27) ($p < 0.05$). RPMs of extender with 0.1%, 0.2% κ -carrageenan (57.64 ± 6.34 , 56.47 ± 1.35) were significantly higher than the other groups ($p < 0.05$). Acrosome integrity was measured by dyeing to PSA-FITC with an epifluorescence microscope. Normal acrosome ratio of extender with 0.5% κ -carrageenan (61 ± 8.03) was higher than the other groups ($p < 0.05$). Apoptosis was measured with a FACSCalibur flow cytometer using FITC (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit). Treated groups of κ -carrageenan of 0.1% (0.81 ± 0.05), 0.2% (0.85 ± 0.05) were significantly higher ($p < 0.05$) than control. Modified SYBR/PI staining was used for determination of viability and DCF staining was used for evaluation of ROS. Viability and ROS were not significantly different from other groups. In conclusion, adding a certain concentration of carrageenan to the extender of cryopreservation, carrageenan contributes to the improvement of the sperm motility, acrosome integrity and prevention of apoptosis.

Keywords: apoptosis, canine sperm, cryopreservation, κ -carrageenan, motility

서론

장기간 정자를 동결보존하는 것은 매우 흥미로운 연구분야 중 하나이다. 정자의 냉동 보존은 농업, 동물과 인간의 생식, 육종환경, 실험동물의 생산, 의학에 많은 영향을 미친다. 특히 정자를 얼리는 것은 인공수정 시에 정액을 간편히 사용할 수 있게 해주고, 양질의 정자이용이 가능하게 해주기에 각광받는 실험기술이다. 동결 정자를 이용한 인공수정은 종의 번식에 유용하며, 수정의 효율을 향상시킨다는 점에서 이점을 가진다(Foote, 1999).

1950년대 이전에는 체외수정에 신선한 정액이 사용되었다. 하지만 신선한 정액을 사용하는 것은 비용과 노동력을 요구한다. 따라서 정액을 보관하여 사용하는 방법에 관한 연구가 진행되고 있다. 정액이 낮은 온도에 노출이 될수록 정자의 운동성, 생존성, 골격 등의 변화가 수정의 효율에 영향을 미친다. 낮은 온도에서의 반응경로, 분자학적 기작과 같은 여러 방면으로 연구가 진행되고 있으며, 냉동을 시키고 유지하는 동안 외부환경으로부터 다양한 요인에 의해 영향을 받기 때문에 동결보존액을 개발하여 정자의 생물학적, 형태학적 손상을 줄이는 연구가 중요하다(Harald Trummer 등, 1998; Rahman, 2018). 침투성을 가진 동결보존액은 정자의 동결보존이 성공적으로 이루어질 수 있게 한다. 그 예로 glycerol을 동결보존액에 첨가 시 정자가 보존액에 노출될 경우, 정자내의 수용액은 보존액으로 방출되고, glycerol은 정자내로 침투함으로써 동결이 되었을 때 물의 결정으로부터 보호를 해준다. 동결보존방법은 비용을 절감하고, 인공수정을 간단하게 하는 장점을 가진다(Sieme H와 Oldenhof H, 2015).

현재까지 많은 연구자들은 성공적인 동결보존을 위해 여러 가지 물질을 첨가하거나 제거하는 시도를 하고 있다. 그 예로 계란 노른자나 다당류와 같은 물질들이 있다. 계란 노른자는 지질성분을 함유하고 있어, 이 성분이 ram의 정자를 얼렸을 때 운동성의 손실을 막아주는 역할을 한다고 밝혀져 있다(Watson PF, 1981). Lycium barbarum, ginseng, zizyphus jujube, astragalus lentiginosus, ginkgo biloba와 같은 식물로부터 추출한 다당류는 산화를 방지하는 큰 잠재력을 가지고 있다(Jiao 등, 2016).

식물에서 추출한 다당류 중 carrageenan은 홍조류로부터 열추출에 의해 얻어지는 다당류이다(Vipul D, 2014). Carrageenan은 식품에 첨가되어 안정성을 높이거나(Weiner ML, 2014), 관절염과 같은 질병의 치료제로 사용되어 식품, 의학, 연구 등 많은 분야에서 사용되는 물질이다(McCarson KE, 2015). Carrageenan을 수용액에 용해시키면 점성이 높아지는 성질을 가지고 있어 외부환경으로부터 점진적으로 영향을 받게 된다. 본 연구는 개의 정액을 동결-용해 시 동결보존액에 κ -carrageenan을 첨가하여 동결 보존 효율을 향상하고자 하였다. 이를 위해 다양한 농도로 carrageenan을 동결보존액에 첨가하였으며, 평가를 위해 정자의 운동성, 생존율, 침단체 손상률, 활성산소 함유율, 세포자살률을 비교 및 분석을 실시하였다.

재료 및 방법

공시축

본 연구의 공시견은 전북대학교(CBNU, 2013-0055)에서 사육, 보유하고 있는 믹스견 2마리, 진돗개 1마리, 푸들 1마리, 닥스훈트 1마리에 대해 2018년 3월부터 2018년 12월까지 공시하였다. 공시견의 연령은 2-4세 사이로 정액채취에 다경험이 있는 개체를 공시하였다. 각 공시견 별 거주공간은 독립적으로 구분되어있으며 사료(진도, 퓨리나)와 물은 자유 채식이 가능하도록 2일에 1번 충분히 공급하였다.

정액채취

5마리의 실험견은 오전 9시-오후 3시 사이에 정액채취가 이루어졌으며, 1번 채취 시 5마리의 정액을 모두 채취하였다. 채취주는 2일에 1번 실시하였다. 실험견의 생식기를 마사지하여 흥분을 유도한 후, 38°C를 유지한 깔때기와 15 mL 플라스틱 일회용 튜브(SPL, Pocheon, Korea)를 이용하여 노를 제외한 정액을 채취하였다. 채취 후 38도의 온수에 넣어 정액의 온도가 유지될 수 있도록 하였다.

동결정액 제조

모든 실험견의 정액채취 직후 5분 이내 실험실로 운반하여 각각의 정액을 100x의 배율로 광학현미경을 이용하여 정자의 운동성을 평가하였다. 운동성이 80% 이상이 되는 정액만 골라 300×g에서 12분 원심분리하여 seminal plasma 및 부유액을 제거하고 하층의 펠렛을 회수하였다. 회수한 모든 정자 펠렛을 한 튜브에 모아 최종 농도가 1×10^8 /mL이 될 수 있게 희석하여 500 μ L 동결보존액1과 혼합하였다. 혼합액과 동결보존액2, 0.5 mL 스트로우(FHK, Japan)를 4°C냉장고에 1시간 동안 배양하였다. 배양 후, 동결보존액2를 넣어 혼합하여 스트로우에 주입한 뒤, 입구를 전기접착기(HANATO, Korea)로 밀봉해주었다. 스트로우의 입구가 열에 영향을 받았기 때문에 4°C냉장고에서 20분 더 배양하였다. 온도가 떨어진 스트로우들을 액체질소가 담긴 스티로폼박스에 액체질소 표면으로부터 1-2 cm 떨어진 곳에 설치된 렉에 걸쳐 증기로 20분간 예비 동결하였다. 액체질소 내로 스트로우를 급격히 떨어트려 급격히 동결시켰다. 냉각률은 5.5°C로부터 -15°C까지 42.3°C/분, -15°C로부터 -60도까지 130.7°C/분 그리고 -60°C로부터 -116°C까지 19.6°C/분으로 나타났다. 그 후 각농도별 스트로우를 하나씩 모아 하나의 고블릿에 넣어 액체질소에서 보관하였고, 용해 시 37°C의 물에서 25초간 침지 후 정자의 성상을 분석하였다.

동결보존액 제조

동결정액은 50 mL 증류수(Invitrogen, New york, USA)에 1.21 g Trizma base, 0.67 g citric acid, 0.4 g glucose, 0.03 g penicillin G, 0.05 g streptomycin sulfate를 첨가하였다.

동결보존액1에 κ -carrageenan을 0.1, 0.2, 0.3, 0.5%의 농도로 첨가하였고, 동결보존액2에는 glycerol 4.6 mL을 추가적으로 첨가하였다. 용해시킨 후, 0.45 μ M syringe filter (Sartorius, Goettingen, Germany)를 이용하여 여과시켰다. -79°C deep-freezer에서 보관하고 실험 전 37°C heat block에서 열처리하여 해동시켜 사용하였다.

정자 운동성 평가

정자의 운동성 평가는 CASA (Computer-assisted sperm analysis, SCA, Spain)를 사용하여 평가하였다. Chamber slide (Standard count 8 chamber slide, Leja, Netherlands)에 각 농도별로 주입하여 TM (total motility), PRM (Progressive rapid motility), MM (Medium motility), Immobile를 측정하였다.

정자 생존율 평가

정자의 생존율 평가는 LIVE/DEAD sperm viability kit (ThermoFisher)를 이용하였다. 해동시킨 스토로우 내 정자희석액 50 μ L를 1.5 mL tube에 옮겨 5 μ L SYBR-Green을 혼합하여 5분간 염색하였다(Yu와 Leibo, 2002). 5 μ L PI (Propidium iodide)를 추가로 혼합하여 5분간 염색시켰다. 염색된 정자는 현미경을 이용하여 각 κ -carrageenan 농도별로 200개 이상의 정자를 관찰하여 생존율을 평가하였다.

침체 반응도 분석

해동시킨 동결정자희석액을 $400\times$ g으로 4분간 원심분리하여 부유액을 제거한 후, 1x DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, gibco, UK)를 500 μ L 넣어 펠릿을 부유시켰다. 이 과정을 2번 반복한 후, 500 μ L DPBS로 펠릿을 풀어주었다. 원심 분리된 냉동-용해한 개의 정자 펠릿 희석액 30 μ L로 스미어를 만들어 3분간 실온에서 건조시켰다. 100% Alcohol 30 μ L을 3번에 걸쳐 드롭을 만들어준 후, 실온에서 10분간 건조시켰다. 30 μ L PSA-FITC를 3번에 걸쳐 드롭을 만들어준 후, Parafilm (Bemis)으로 덮어 슬라이드글라스에 부착시켜주었다. 20분간 실온에서 기다린 후, 증류수에서 Parafilm을 탈착 시켜주기 위해 15분간 담갔다. 필름이 제거가 된 후 스미어를 건조시켜 형광현미경을 이용하여 침체를 관찰하였다.

세포자가사멸을 평가

정자의 펠릿 희석액은 침체 반응도 평가와 동일하게 준비하였다. 펠릿 희석액 20.9 μ L와 980 μ L 1x Annexin V binding buffer (10 Mm HEPES/NaOH [pH 7.4], 140 Mm NaCl, 2.5Mm CaCl₂)를 혼합한 뒤, 100 μ L를 옮겨서 5 μ L FITC (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit 1, BD Biosciences, San Diego, USA)와 5 μ L PI (Propidium iodide)를 혼합 시켜준 상태로 15분간 실온에서 염색하였다. 염색 후, 400 μ L 1x Annexin

V binding buffer를 넣고 FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, USA)를 이용하여 측정하였다.

활성산소율(ROS) 평가

세포자가사멸을 측정방법과 같이 펠릿희석액을 만들어 17.6 μ L를 따서 980 μ L DPBS, 2 μ L 20mM DCF (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, Invitrogen, Oregon, USA), 1 μ L PI (Propidium iodide)와 혼합시켜 1시간동안 실온에서 염색시켰다. FACSalibur flow cytometer (Becton Dickinson, USA)을 이용하여 활성산소율을 평가하였다.

통계처리

통계 분석은 SPSS 20.0 (IBM, NY, USA)을 이용하여 실시하였다. 실험 데이터는 일원분산분석(one-way ANOVA)검정과 Duncan의 다중범위사후검정(Duncan's multiple range tests)를 통하여 검정하였다. 모든 결과는 평균값 \pm 표준오차(SEM)으로 나타내었다. 유의확률이 0.05보다 작을 경우($p < 0.05$) 통계적으로 유의하다고 해석하였다.

결 과

정자의 운동성 평가

개의 정자를 동결-용해 직후 CASA system을 이용하여 정자의 운동성을 비교하였으며 결과는 Fig. 1의 그래프와 같다. 농도별로 carrageenan을 첨가한 냉동정액을 용해 직후 직진운동성의 이동속도에 따라 구별하여 측정을 한 경우, Total motile (TM)이 0.2% carrageenan처리군에서 $64.7 \pm 0.45\%$ 로 대조군인 $40.2 \pm 8.3\%$ 보다 유의적으로 높게 나타났으며 ($p < 0.05$), carrageenan 0.1% 처리군과 0.2% 처리군에서 Progressive rapid motile (PRM)이 $57.6 \pm 6.3\%$ 와 $56.5 \pm 1.4\%$ 로 대조

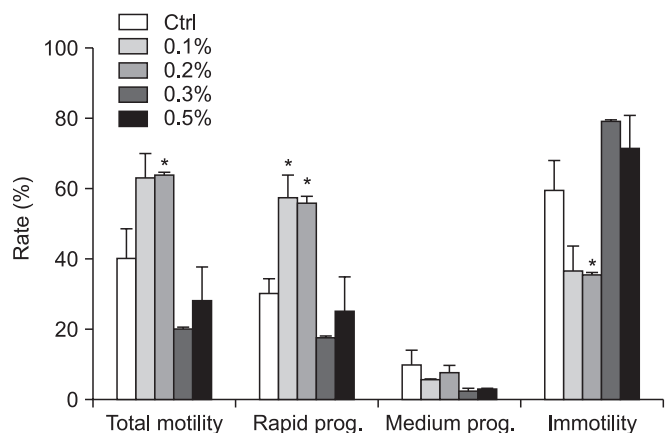


Fig. 1. Effect of different κ -carrageenan concentration in extender on the motility of canine sperm following freezing-thawing. *indicate significantly different with control ($p < 0.05$).

군인 $30.3 \pm 4.1\%$ 보다 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). 본 연구에서 carrageenan을 0.2%까지 첨가하였을 때 활발한 정자의 운동성을 향상시킬 수 있을 것으로 사료되며, 그 이상의 carrageenan을 처리하였을 경우에 정자의 운동성을 오히려 저하시키는 것으로 확인된다. 또한 정자의 Immotile를 측정하였을 때 0.2% 처리군에서 $35.7 \pm 0.5\%$ 로 대조군 $59.8 \pm 8.3\%$ 과 비교하였을 때, 가장 낮은 Immotile 비율을 나타내고 있다($p < 0.05$).

정자의 생존율 평가

Fig. 2에서는 개의 동결-융해 직후 정자의 생존율을 비교하여 나타내었다. Carrageenan 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.5% 처리군과 대조군을 비교하였을 때 정자의 생존율에 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

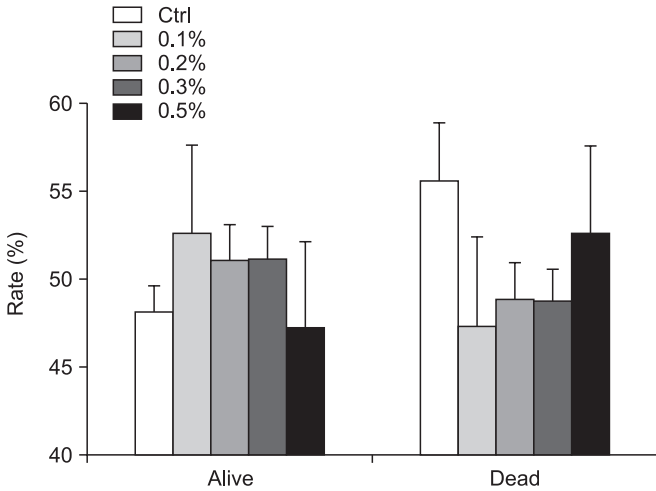


Fig. 2. Effect of different κ-carrageenan concentration in extender on the viability of canine sperm following freezing-thawing.

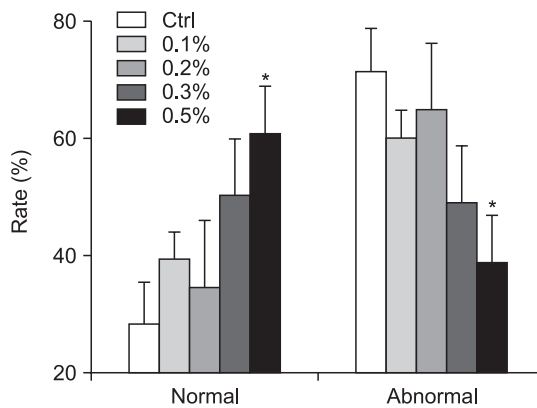
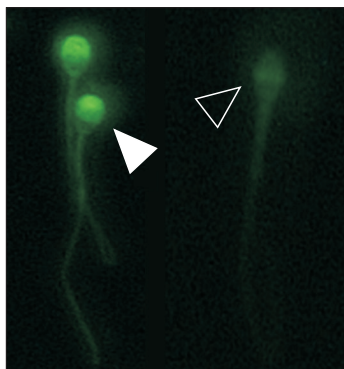


Fig. 3. The presence of stained acrosome of sperms (arrows) indicates that normal acrosome integrity (white arrow) and abnormal acrosome integrity (black arrow). Effect of κ-carrageenan concentration in extender on the acrosome integrity of canine sperm following freezing-thawing. *superscript indicate significantly different ($p < 0.05$).

정자의 침체 온전성 평가

Fig. 3에서는 개의 정자의 동결-융해 직후 침체의 온전성을 측정하여 나타내었다. 정상적인 침체의 유지가 정자의 침체반응과 난자와의 수정, 정자의 대사와 연관성이 있어 중요한 요인이다. carrageenan 0.5% 처리군에서 $61 \pm 8.0\%$ 로 대조군인 $28.3 \pm 7.2\%$ 보다 정상적인 침체를 지닌 정자가 유의적으로 높은 것으로 나타난다($p < 0.05$). 또한 침체가 비정상적인 정자는 0.5% 처리군에서 $39 \pm 8.0\%$ 으로 대조군인 $71.7 \pm 7.2\%$ 보다 유의적으로 나타난다($p < 0.05$).

세포자가사멸을 평가

Fig. 4에서는 개의 정자의 동결-융해 직후 carrageenan 처리 농도에 따른 세포자가사멸율을 측정하여 나타내었다. 세포자가사멸율은 정자의 DNA가 단편화되어 정상적인 수정이 이루어지지 않게 하므로 인공수정 시 냉동 정자의 수정 질에 관여하는 중요한 요인이다. Carrageenan을 0.1%와 0.2%의 농도로 처리하였을 때 $0.8 \pm 0.1\%$ 와 $0.9 \pm 0.1\%$ 로 대조군 $1.0 \pm 0.02\%$ 보다 유의적으로 세포자가사멸율이 낮게 나타났다($p < 0.05$).

정자의 활성산소 측정

Fig. 5에서는 동결-융해 직후 활성산소를 측정하여 나타내었다. 정자가 활성산소로 인해 산화적인 악영향을 받게 되면 정자의 기능과 정자의 원형질막에 이상이 생겨 정상적인 수정이 이루어지기 어려워진다고 보고된 바 있다(John Aitken, 1988). Carrageenan 0.5% 처리군에서 $2.2 \pm 1.0\%$ 로 대조군 $5.7 \pm 1.0\%$ 보다 낮은 활성산소율을 보였으나, 대조군과 carrageenan 처리군의 활성산소수에 대한 유의적인 차이가 보이지 않는다.

고찰

정액의 동결보존방법은 인공수정 시 질 좋은 정자를 편리하게

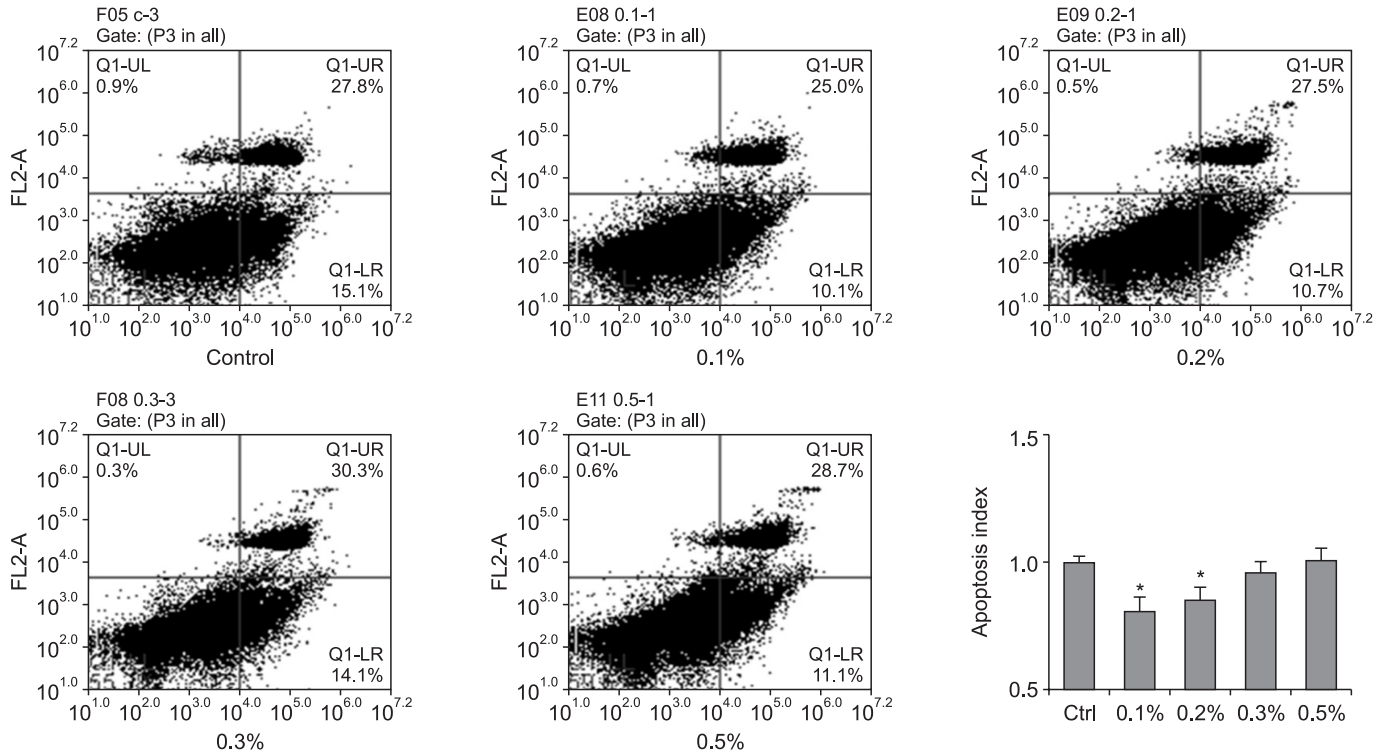


Fig. 4. Effect of κ -carrageenan concentration in extender on the apoptosis of canine sperm following freezing-thawing. The freezing-thawed semen of canine detected by 20mM DCF(2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate) was determined by FACSCalibur flow cytometer equipped with a 15 mW air-cooled 488 nm argon-ion laser. LL: live and non-PS translocated, LR: live and PS translocated, UL: dead and late necrotic, UR: dead and PS translocated. *superscript indicate significantly different ($p < 0.05$).

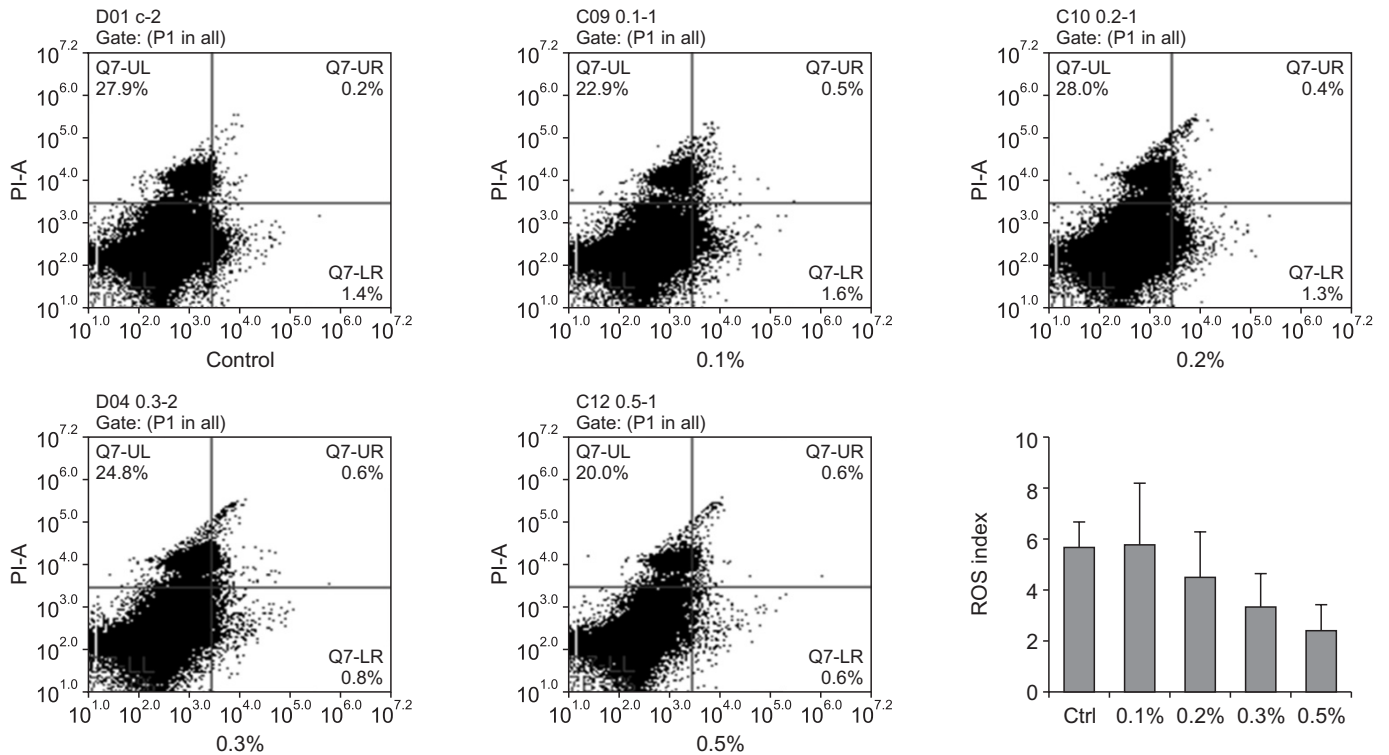


Fig. 5. Effect of κ -carrageenan concentration in extender on the Reactive Oxygen Species(ROS) level of canine sperm following freezing-thawing. The 20 mM DCF assay used for ROS detection. LL: viable sperm with a low intracellular H_2O_2 level, LR: viable sperm with a high intracellular H_2O_2 level, UL: dead sperm with a low intracellular H_2O_2 level, UR: dead sperm with a high intracellular H_2O_2 level.

이용하기 위해 많이 적용되고 있는 방법이다. 하지만 신선한 정액에 비해 동결-융해 후의 정자는 여러 측면에서 저급한 면이 있어 이를 보완하기 위해 현재 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 연구에서 개의 동결정액의 성상 개선을 위하여 carrageenan을 다양한 농도로 처리하였을 때 정자의 운동성, 생존율, 침체반응도, 세포자가사멸율, 활성산소율을 평가하였다. 이번 연구에서 정액을 동결할 때 정액과 동결보존액의 혼합액을 4°C와 액체질소의 증기, 액체질소를 이용하여 3단계로 온도의 차이를 두어 동결정액을 만들었다. 동결정액을 액체질소로 동결하기 전, 4°C에서 50-70분 냉각시킨 후 액체질소를 이용하여 동결하는 것이 정자의 운동성과 생존율을 증가시킨다고 보고되어있다(Ataur Rahman, 2018).

정자의 운동성은 수정 시 난자의 난구세포층과 투명대를 관통할 수 있게 하는 수정능획득과 밀접한 관계가 있어 정자의 성상을 평가하는데 유용한 지표로 사용되고 있다. Jen-Horng Tsen 등 (2007)은 carrageenan의 첨가는 세포의 생물학적 안정성을 높인다는데 기여한다고 보고하였다. 0.2%의 carrageenan을 처리하였을 때 상대적으로 유의적인 변화를 보이는 것으로 미루어보아 일정 농도의 carrageenan이 동결보존액에 첨가되었을 경우 정자의 운동성 유지에 도움이 된다고 보여진다.

냉동보존액에 carrageenan을 첨가하는 것은 점성을 높여 세포를 고정시키는 효과를 유도하여 동결하는 동안 세포를 보호하는 효과가 있다고 보고하였다(Jen-Horng Tsen, 2007). 본 실험에서 0.5%의 carrageenan 처리군에서 가장 높은 침단체의 온전성을 나타내는 것은 가장 높은 농도로 carrageenan을 처리하였기 때문인 것으로 판단되며, 따라서 일정 농도이상의 carrageenan을 첨가하는 것은 침단체의 온전성을 유지하는데 기여한다고 보여진다.

세포자가사멸율은 0.1%와 0.2% carrageenan을 첨가하였을 때 세포자가사멸율이 상대적으로 낮게 나타나는 것으로 보아 정자가 생존할 수 있게 영향을 미친다는 것을 알 수 있다. Glycerol은 침투성을 가진 물질로 동결보존액에 동결 시 정자의 체내로 투과하여 물의 결빙으로부터 정자를 보호할 수 있다. Glycerol은 2-3%의 농도로 동결보존액에 존재할 때 돼지의 동결정액의 세포자가사멸율을 감소시킨다는 Changjun Zeng 등(2014)의 보고에 기초하여 glycerol과 κ-carrageenan의 시너지효과에 의해 세포자가사멸율이 유의적인 결과를 만들어냈다고 생각된다. 이와 같이 carrageenan을 첨가함으로써 대조군과 유의적인 차이를 보이는 세가지 측면을 고려해볼 때 carrageenan이 정자를 동결보존시킬 때 정자의 성상을 개선하는 것으로 판단된다.

정자의 생존율이 carrageenan의 처리와 관계없이 유의적인 차이를 보이지 않는 것은 정액의 채취 주기가 짧아 정자가 외부요인으로부터 영향을 받기에 쉬운 상태였을 것으로 사료된다. 이는 실험견의 충분한 운동과 휴식기간이 주어진다면 개선이 될 것으로 생각된다. 또한 glycerol이 동결보존액2에만 첨가되어 동결 전 총농도가 절반이 되기 때문에 일정농도에 도달하지 못하여 정자의

생존율이 유의적인 차이를 보이지 못한 것으로 판단된다.

활성산소율이 carrageenan의 농도별 처리에 대해 유의적인 차이를 보이지 않는 것은 carrageenan의 농도가 충분히 활성산소로부터 정자를 보호할 수 있는 일정수준에 도달하지 못해 유의적인 결과가 나타나지 않은 것으로 판단된다.

이상 결과를 종합해 볼 때 0.1%와 0.2%의 농도로 carrageenan을 처리하였을 때 대조군과 0.3%, 0.5% 처리군에 비해 유의적으로 운동성이 높게 나타났고 세포자가사멸율은 낮게 나타났다. carrageenan 0.5% 처리군이 유의적으로 침체 반응도를 유지하는데 기여한다는 것으로 나타났다. 따라서 carrageenan을 함유한 동결보존액은 동결-융해 후 정자의 운동성과 세포자가사멸율 등 정자의 성상을 개선한다고 판단된다.

CONFLICTS OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MSIT) (No.NRF-2018R1C1B5043308).

REFERENCES

- Aitken RJ and Clarkson JS. 1988. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *Andrology* 9:No.6.
- Foot RH. 1999. Development of reproductive biotechnologies in domestic animals from artificial insemination to cloning: a perspective. *Cloning* 1:133-142.
- Harald T, Kathleen T, Christine Y, Norbert K, Randall B and Meacham RB. 1998. Effect of storage temperature on sperm cryopreservation. *Fertility and Sterility* 1162-1164.
- McCarson KE. 2015. Models of Inflammation: Carrageenan- or Complete Freund's Adjuvant (CFA)-Induced Edema and Hypersensitivity in the Rat. *Curr Protoc Pharmacol* 70. 4 1-9.
- Rahman A. 2018. Cryopreservation of dog spermatozoa in monosaccharides, disaccharides, and trisaccharides supplemented glycerol-free Tris. Chonbuk National University Ph.D degree thesis.
- Sieme H and Oldenhof H. 2015. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Methods Mol Biol* 1257:277-287.
- Tsen JH, Huang HY, Lin YP and King VA. 2007. Freezing resistance improvement of *Lactobacillus reuteri* by using cell immobilization. *J Microbiol Methods* 70:561-564.
- Watson PF and Martin IC. 1973. The response of ram spermatozoa to preparations of egg yolk in semen diluents during

- storage at 5 or -196 degrees C. *Aust J Biol Sci* 26:927-935.
- Weiner ML. 2014. Food additive carrageenan: Part II: A critical review of carrageenan in vivo safety studies. *Crit Rev Toxicol* 44:244-269.
- Yu I, and Leibo SP. 2002. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. *Theriogenology* 57:1179-1190.
- Zeng C, Tang K, He L, Peng W, Ding L, Fang D, and Zhang Y. 2014. Effects of glycerol on apoptotic signaling pathways during boar spermatozoa cryopreservation. *Cryobiology* 68:395-404.