

개 精液의 錠劑化凍結法과 Straw 凍結法에 관한 比較實驗

李正遠·金熙垠·金南洙·崔仁赫

全北大學校 獸醫科大學

서 론

1780년에 개에 대한 인공수정이 최초로 이루어졌으나 개의 인공수정은 사람이나 소에 비하여 필요성의 한계 때문에 이에 대한 연구가 산발적이거나 거의 이루어지지 않았다. 그후 생활수준의 향상과 개에 대한 애완동물로서의 관심도가 증가되면서 인공수정에 대한 필요성이 증가되었으며 1960년대에 이르러 개 정액의 기초연구와 동결정액의 인공수정이 이루어지기 시작하였다.

인공수정의 요건은 저장성이 좋고 원거리수송이 간편해야 하며 어느 경우에 있어서도 자연교배에 비하여 수태율이 크게 뒤떨어지지 않아야 한다는 것은 주지의 사실이며 이러한 문제점들에 대하여 지금까지는 정액의 동결처리와 동결저장으로 이루어지고 있다. 따라서 정액의 동결은 인공수정에 있어서 중요한 부분의 하나이다. 근래에 이르러 개의 인공수정에 대한 관심이 높아지고 이에 대한 많은 연구가^{5, 8-10, 12, 20, 27, 28)} 수행되고 있음에도 불구하고 아직도 개의 동결정액을 이용한 인공수정의 수태율은 저조한 실정에 있는것 같다.⁸⁾ 개의 인공수정에 있어서 최초의 동결방법의 이용은 1957년에 Gutierrez Nales¹⁴⁾가 드라이 아이스를 이용한 정제화 동결법으로 수태를 시킨이래 1972년에는 Andersen²⁾에 의해서 straw동결법이 이용되었으나 아직도 개의 인공수정에 있어서 어느 동결법이 효과적인가에 대해서는 연구자에 따라 다르다. Concannon⁸⁾은 비록 정제화 동결법에서 많은 수태율과 성공률을 보고하고 있으나 근래에는 straw동결법을 이용하는 경향이 많으며 아직까지 정제화 동결법과 straw동결법에 대한 체계적인 실험이 보고되어 있지 않다고 말한 반면에 Seager 등²⁰⁾은

두 동결방법의 융해후 정자의 활력은 같았다고 보고하고 있다. 동결방법을 중심으로 한 근래의 보고서에서 11%의 lactose희석액을 이용한 정제화 동결법으로 Platz 등¹⁹⁾은 92%의 수태율을, Lees 등¹⁶⁾은 57%의 수태율을 보고 하였고, Andersen³⁾은 0.2M의 Tris fructose 희석액을 이용한 straw동결법으로 80%에서 91%까지의 수태율을 얻었다고 보고한 한편 Bowen 등⁶⁾은 같은 방법으로 15%의 수태율을 얻었다고 보고하고 있으나 이와같은 주장들은 각각 희석액이나 처리과정, 융해방법 및 수정방법 등에 차이가 있기 때문에 비록 동결정액에 대한 평가는 궁극적으로 수태율로 평가될지라도 수태율만으로 두 동결법이 정자에 미치는 영향을 평가하는데는 무리가 있을 것으로 생각된다. 즉, 인공수정에 있어서의 수태율은 정액의 채취로부터 희석액, 저온화, 평형, 동결, 저장, 융해 및 수정부위와 기술 등 복합적인 요인들이 영향을 미칠수 있기 때문에 수태율로서 한 두가지 요인을 평가하는데는 많은 어려움이 있으며⁸⁾ 한편으로는 동결법에 따른 희석액의 특성이나 여러가지 요인들이 상호간에 밀접한 관계를 가지고 있을지도 모른다. 따라서 동결정액의 수정전까지의 요인들은 일반적으로 융해후의 정자활력을 정액평가의 지표로 하는 연구자^{10, 12, 17, 18, 25)}가 많으며 근래에는 동결과정에서 가장 많은 변화를 일으키는 정자의 참모형태변화를 동결과정의 평가지표로 하고 있다.^{8, 22, 25)} 또한 동일한 희석액의 조건하에서 두 동결법이 정자에 미치는 영향에 관한 실험보고를 접한바 없어 본 실험은 수태율에 영향을 미칠수 있는 여러 요인중 개의 인공수정에서 일반적으로 통용되고 있는 드라이 아이스를 이용한 정제화 동결법과 액체절소 증기를 이용한 straw동결법에 대하여 그리고 동결전 처리과정

과 동결-융해과정에서의 정자에 미치는 영향을 비교 검토하기 위하여 수행하였으며 이들에 대한 평가기준은 정자의 활력과 생존률 그리고 침체형태의 변화를 중심으로 평가하였다.

재료 및 방법

실험동물 : 실험동물은 체중이 7~22kg이고 연령은 15~20개월령의 잡종견으로서 임상검사상 건강하다고 인정되는 5두를 무작위 착출하여 공시견으로 사용하였다. 공시견에 대한 정액채취는 수지법으로 채취하였으며 한 개체에 대한 채취간격은 3일이상으로 하였고 정액은 제2분획만을 취하였다.

실험방법 :

희석액의 제조 : 정제화 동결법과 straw동결법에 대한 희석액은 모두 tris-egg-yolk희석액을 사용하였으며 tris-egg-yolk 희석액은 증류수 100ml에 희석액의 완충제로서 trisaminomethane 2.442 g 과 citric acid monohydrate 1.261 g 을, 정자의 영양제로서 glucose 0.901 g 을 용해한 다음 이 용액 80ml를 취하여 저온충격 완화제인 egg-yolk 20ml과 항생제로서는 penicillin 500U/ml와 streptomycin 100 μg /ml를 첨가하고 냉장보관하였다.

정액희석 및 냉각 : 일반성상검사가 완료된 원정액은 시험관안에서 37°C로 가온된 희석액으로 200×10⁶/ml가 되도록 1차에 희석하고 이 시험관을 37°C로 가온된 물 100ml가 들어있는 200ml 용량의 비이커에 넣어 정치한 다음 5°C 냉장고에 넣어 2시간에 걸쳐서 5°C로 냉각시킨후 여기에 냉동제인 글리세롤 농도가 8%인 5°C의 희석액을 정자수가 100×10⁶/ml이 되도록 1시간동안에 걸쳐 4회분할 혼합하여 글리세롤 농도가 4%가 되게 하였다.

글리세롤 평형은 straw 동결법과 정제화 동결법에서 동일하게 5°C에서 2시간동안 평형하였다.

동결방법과 저장 : 정제화 동결법은 드라이 아이스에 정액이 0.3ml정도 들어갈 수 있도록 흡을 판다음 평형된 희석정액을 0.2~0.3ml씩 떨어뜨려 3~4분동안 동결시켜 정제화하였으며 정제화된 동결액은 액체질소통안(-196°C)에서 10일간 저장하였다. Straw 동결법에서는 스티로폼과 소금으로 보온된 stainless steel 상자안(25cm×25cm×30cm)에 약 10cm 깊이로 액체질소를 넣은 다음 질소표면으로부터 10cm 위에 설

치된 rack에 평형된 희석정액을 넣은 0.5ml용 straw를 10분간 수평으로 정치하여 동결하였으며 이때 straw가 동결되는 위치의 온도는 -160°C이었다. 동결된 straw는 액체질소통안(-196°C)에서 10일간 저장하였다.

융해방법 : 정제화된 동결정액은 37°C의 수조안에서 9% saline sol. 3ml가 들어있는 시험관안에 5정을 넣은후 30초동안 융해하였다. straw 동결정액은 37°C의 수조안에서 30초동안 융해하였다.

검사항목 : 정액의 일반성상검사는 정액채취후 즉시 정액량, 정자수, 기형률, 생사율 및 활력을 검사하였으며 원정액을 희석하고 저온화(5°C) 한후에 동결직전과 정액을 동결하고 액체질소통안에서 10일간 저장한 정제화된 동결정액과 straw를 각각 융해한 다음에는 각각 기형률, 생사율, 활력, 침체의 형태변화에 대하여 개체별로 각각 10회 검사하였다.

검사방법 :

(1) 활력검사 : 37°C의 정은 슬라이드에 정액을 떨어뜨려 400배에서 검경하여 살아서 움직이는 정자를 백분률로 환산하였다.

(2) 생사검사 : 가검정액에 Mayer염색액을 희석도말하여 즉시 가열 건조시킨후 검경하여 염색되지 않은 생존정자를 백분률로 환산하였다.

(3) 기형검사 : 가검정액을 도말한후 Carborfuch-sine 염색하여 검경하였으며 기형정자의 수를 백분률로 표시하였고 침체의 형태에 이상이 있는 것도 기형률에 포함시켰다.

(4) 침체의 형태변화 : 정자를 Mayer염색하여 검경하였으며 침체의 형태변화 정도는 Watson's분류방법에 따라 두부가 정상인 것은 0으로, 부정형인 것은 1, 첨모가 일부만 탈락한 것은 2, 첨모가 완전탈락한 것은 3으로 등급을 정하고 침체평점은 다음과 같이 환산하였다.

침체평점 = 등급별 정자의 백분율 × 등급에 지정된 수 + ÷ 100

(5) 정자수 : 적혈구용 피펫과 3% saline sol.을 희석액으로 하여 혈구계산판으로 정자수를 계산하였다.

결 과

공시견의 정액성상 : 본 실험에 공시된 5두의 정액성상은 Table 1에 나타난 바와 같이 제2분획으로

채취된 양은 0.95ml에서 1.89ml의 범위에서 평균 1.33±0.41ml이었으며 정자수는 3.11억/ml에서 4.66억/ml의 범위로 평균 374.7±59.38×10⁶/ml로 나타났으며 정액량과 정자농도에 있어서 모두 체중이 증가함에 따라 증가되는 경향을 보이고 있었다.

정자의 활력에 있어서는 평균 93.23±0.48%, 기형율은 평균 7.57±0.45%, 생사검사에서 생존율은 평균 94.56±1.26%로 나타나 있었다.

정자의 활력: 정액을 채취한 직후의 원정액의 활력과 희석액으로 희석을 하여 5℃로 냉각시킨후 즉, 동결을 하기 직전의 활력 그리고 10일간의 동결보존후 융해하여 검사한 정자의 활력을 정제화 동결법과 straw 동결법에 대하여 각각 검사한 결과는 Table 2에 나타난 바와 같다. 원정액을 희석한 동결직전의 활력은 평균 80.56±1.80%로 원정액의 활력인 평균 93.23±0.48%에 비하여 평균 12.67%의 감소율을 나타내고 있었다. 희석정액을 동결융해한 후의 정자의 활력에 있어서는 정제화 동결에서 평균 31.19±0.

18%로 동결전에 비해서는 평균 49.37%의 감소율을 나타내고 있었고, straw 동결융해후에는 평균 42.72±3.67%로서 동결전에 비해서 평균 37.84%의 감소율을 나타내고 있었다. 이것은 동결전 12.67%의 감소율에 비하여 straw 동결융해후에는 2.99배, 정제화 동결융해후에서는 3.89배의 감소를 나타내므로서 동결과 융해과정에서 평균 3.44배의 감소율을 나타냈다. 또한 straw 동결법이 정제화 동결법에 비하여 동결융해후에 11.53%가 높은 정자의 활력을 유지하고 있는 것으로 나타나 있었으며 각 개체간에 있어서 모두가 straw 동결법에서 높은 활력을 유지하고 있었다.

정자의 생존률: 원정액과 희석정액의 동결직전 그리고 동결저장한후 각 동결법에 대한 정자의 생존율 변화는 Table 2에 나타난바와 같이 원정액의 생존율은 평균 94.56±1.26%에서 희석정액의 동결전에는 평균 71.20±1.65%로 평균 23.36%의 감소율을 나타내고 있었다. 정제화 동결법으로 동결저장한 후의

Table 1. Characteristics of Canine Fresh Semen

	Age (M)	B.W** (kg)	Volume (ml)	Sperm No./ ml (×10 ⁶)	Total sperm No. (×10 ⁶)	Motility (%)	Abnormal sperm(%)	Viability (%)
			0.95	311.14	300.01	93.47	7.09	94.80
Dog 1	18	7	±0.18	±70.36	±94.02	±2.36	±1.88	±3.12
			1.14	359.98	417.09	93.68	7.64	93.75
Dog 2	20	9	±0.20	±90.12	±96.23	±1.69	±1.93	±4.25
			1.02	318.67	343.51	92.97	7.54	96.50
Dog 3	15	13	±0.20	±71.87	±94.00	±1.34	±1.39	±3.66
			1.65	417.25	686.95	92.52	7.33	95.00
Dog 4	16	20	±0.33	±64.17	±169.01	±1.61	±1.78	±3.47
			1.89	466.48	824.82	93.53	8.29	92.75
Dog 5	16	22	±0.43	±85.87	±219.10	±2.92	±0.52	±3.58
Mean	17	14.2	1.33	374.70	514.47	93.23	7.57	94.56
±SD	±20	±6.6	±0.41	±59.38	±205.30	±0.48	±0.45	±1.26

* : Months, ** : Body weight

Table 2. The Variation of Canine Sperm Prior to Freezing and after Thawing

	Fresh semen	Before freezing	After thawing	
			Pellet method	Straw method
Motility	93.23±0.48	80.56±1.80	31.19±0.18	42.72±3.67
Viability	94.56±1.26	71.20±1.65	34.48±2.28	49.22±6.48
Abnormality	7.57±0.45	9.73±0.86	19.34±2.09	15.56±1.05

Mean ± standard deviation(%), n=5

생존율은 평균 $34.48 \pm 2.28\%$ 를 나타내고 있어 동결 전 희석정액에 대해서는 평균 36.72% 의 감소율을 나타내고 있었으며 straw 동결법으로 동결저장한 후의 생존율은 평균 $49.22 \pm 6.48\%$ 로써 동결전 희석정액에 대하여는 21.98% 의 감소율을 나타내고 있었다. 이와 같이 동결전 23.36% 의 감소율에 대하여 정제화동결과 용해후에는 1.57 배의 감소율을 나타냈으나 straw 동결용해후에는 1.38% 의 감소율을 보여 전반적으로 동결전과 후에 유사한 감소율을 나타내고 있었다.

정제화 동결법과 straw동결법에 있어서의 용해후 정자의 생존율은 straw 동결법이 정제화 동결법에 비하여 14.74% 의 높은 생존률을 유지하고 있었으며 각 개체간에도 유사한 차이를 나타내고 있었다.

기형율 : 원정액과 희석정액의 동결직전 그리고 동결저장한후 각 동결법에 대한 정자의 기형율변화는 Table 2에 나타난바와 같이 원정액의 기형율은 평균 $7.57 \pm 0.45\%$ 에서 희석정액의 동결전에는 평균 $9.73 \pm 0.86\%$ 로 평균 2.16% 의 증가율을 나타내고 있었다. 정제화 동결법으로 동결용해한 후의 기형율은 평균 $19.34 \pm 2.09\%$ 를 나타내고 있어 동결전 희석정액에 대해서는 평균 9.61% 의 증가율을 나타내고 있었으며 straw 동결법으로 동결용해한 후의 기형율은 평균 $15.56 \pm 1.05\%$ 로써 동결전 희석정액에 대하여는 5.83% 의 증가율을 나타내고 있어 동결전과정의 2.16% 에 대하여 정제화동결과 용해후에는 4.51 배가, straw 동결용해후에는 2.74 배로 증가하여 평균 3.63 배의 증가를 보이고 있었다.

정제화 동결법과 straw 동결법에 있어서 용해후 정자의 기형율은 정제화 동결법이 straw 동결법에 비하여 3.78% 의 높은 기형율을 나타내고 있었으며 각 개체간에 있어서도 유사한 차이를 나타내고 있었다.

침체의 형태변화 : 동결에 의한 정자의 손상정도를 관찰하기 위하여 각 동결법에 대한 동결전과 동결후에 각각 정자의 침체에 대한 형태의 변화를 관찰한 결과는 Table 3에 나타난바와 같이 원정액에 있어서 정상적인 침체를 가진 정자는 $95.2 \pm 0.8\%$ 이었으며 이것을 희석액으로 희석하고 5°C 로 저온화 시켰을 때 정상적인 침체를 가지고 있는 정자는 $93.9 \pm 0.9\%$ 로써 1.3% 의 낮은 증가율을 나타내고 있었으며 정자의 침체평점도 0.087 에서 0.107 의 증가를 나타내고 있었다. 그러나 정제화 동결과 저장을 하였을 경우에는 정상적인 침체를 가진 정자는 $84.3 \pm 2.8\%$ 로 동결전에 비하여 9.6% 가 감소되었으며 침체평점도 0.207 로 높은 증가를 나타내고 있었다. 또한 straw로 동결 저장한 경우에 있어서도 정상적인 침체를 갖는 정자가 $89.7 \pm 0.8\%$ 로 동결전에 비하여 4.2% 의 감소율을 나타냈으며 침체평점도 0.079 의 지수를 나타내므로써 정제화 동결법에 비하여 정상적인 침체를 갖는 정자의 수는 5.4% 가 감소되었으며 침체평점도 0.128 이 낮은 것으로 나타났다. 또한 동결전 과정에서 침체평점 0.02 의 증가에 대하여 정제화 동결용해후에는 10.35 배가, straw 동결용해후에는 3.95 배의 침체평점이 증가되어 동결과 용해과정에서 평균 7.15 배의 증가를 보이고 있었다.

고 찰

동결전 처리과정과 동결과정이 정자에 미치는 영향 : 원정액을 채취하여 수정이 이루어 질때까지 모든 처리과정은 정자에 해로운 영향을 미친다. 따라서 정자에 대하여 어느 처리과정에서 어느정도의 해를 미치는가를 알고 이에 대한 원인을 분석하여 대

Table 3. The Variation of Acrosome of Canine Sperm before Freezing and after Thawing

Degree*	Fresh semen				Before freezing				After thawing							
	NAR	DAR	MAR	LAC	NAR	DAR	MAR	LAC	pellet method				straw method			
Percentage of sperm included**	95.2	2.2	1.3	1.3	93.9	3.2	1.1	1.8	84.3	6.2	3.4	6.1	89.7	4.9	2.3	3.1
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
Score***	0.8	0.4	0.5	0.2	0.9	0.8	0.1	0.4	2.8	2.2	0.8	1.1	0.8	1.7	1.1	0.1
	0.087				0.107				0.314				0.816			

*: NAR: Normal Apical Ridge(0), MAR: Missing Apical Ridge(1), DAR: Damaged Apical Ridge(2), LAC: Loose Acrosomal Cap(3)

** : Percentage of sperm numbers : mean ± standard deviation

*** : Acrosomal score = percentage of sperm in each degree × degree score + ÷ 100

책을 강구하고 개선하는 것이 인공수정의 수태율을 증가시키는 방법이 되리라고 생각된다. 본 실험은 동일한 조건하에서 동결전까지의 처리과정과 동결로부터 융해시 까지의 과정이 정자에 대하여 어느 정도의 영향을 미치는가를 검토하기 위하여 수행되었다. 동결전까지의 과정에서는 주로 희석액이나 저온화과정에서 그리고 동결과정에서는 저온충격과 내동성이 정자에 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.^{3,10,26)} 일반적으로 정자에 미치는 영향은 정자의 활력상태로 평가되고 있으나 동결과정에서의 영향은 아크로솜 형태의 변화정도를 측정하는 것으로 알려져 있다.^{8,24)}

Concannon⁸⁾에 의하면 개의 정액에서 아크로솜 형태의 변화는 32°C에서 처음 희석했을 때 11%, 5°C로 저온화 하였을 때 17% 그리고 액체질소 증기에서 straw 동결과 융해과정에서 35%가 증가되었다고 보고하였으며 소의 정액에서 Watson²⁴⁾이 보고한 동결전 처리에서 침체평점이 0.67에서 동결과 희석후 1.03으로 동결과 융해과정에서 0.36의 침체평점 증가를 보고했고, Foote¹⁰⁾는 1.45%의 sodium citrate를 첨가한 bufferyolk의 희석액으로 동결전 53%의 활력이 동결과 융해후 22%로 나타나 동결과 융해과정에서 31%의 활력감소율을 보고하고 있다. 또한 Olar 등¹⁸⁾은 4%의 Glycerol이 첨가된 trisegg yolk희석액으로 정액의 동결전 희석과 저온화 과정이 정자의 활력에 미치는 영향은 적었으나 1시간 저온화에서 70%의 활력이 동결과 융해후 44%로 동결과 융해과정에서 26%의 활력감소율을 보고하였다.

본 실험에 드러난 원정액의 활력은 93.23±0.48%이었으나 원정액의 희석과 5°C까지 저온화 처리를 한 과정에서는 80.56±1.80%로서 12.67%의 활력감소율을 나타냈으며 정제화 동결법과 straw 동결법에서 각각 융해후 얻어진 활력검사의 결과는 정제화 동결과 straw 동결과정에서 31.19±0.18%, 42.72±3.67%로서 각각 49.37%와 37.84%의 활력감소율을 나타내어 동결시의 활력감소율이 희석처리와 저온화에서 보다 정제화 동결융해후에는 3.89배, straw 동결 융해후에는 2.99배로 평균 3.44배의 활력감소율을 보이고 있었다. 또한 동결후 정자의 침체에 대한 형태 변화 검사에서도 원정액의 희석과 저온화 과정에서 정상적인 정자율은 원정액의 95.2±0.8%에서 93.9±0.9%로 1.3%의 낮은 변화율을 나타내고 있으나 정제화 동결과 straw 동결후에는 84.3±2.8%와 89.7±

0.8%로 각각 9.6%와 4.2%의 정상정자수 감소율을 나타낸 것과 정자의 침체평점에서도 동결전 처리에서는 원정액의 0.087에서 0.107로 0.02의 낮은 평점에 비하여 동결후에는 정제화 동결과 straw 동결에서 0.314와 0.186으로 각각 0.277과 0.079의 높은 침체평점을 나타내어 이 경우에도 동결과 융해과정에서 동결전 처리보다 평균 7.15배의 침체평점이 나타나 있었다.

이와같은 결과는 많은 연구자들이 보고한 바와 같이^{11,18)} 개의 인공수정에서 저수태율의 문제점이 동결과 융해과정에 있음을 시사해 주고 있는 것으로 나타났다. 그러나 정자의 생존율에 있어서는 원정액의 94.56±1.26%에서 원정액을 희석하고 저온화하는 과정에서 71.2±1.65%로서 23.36%의 생존정자 감소율을 나타내고 있었으나 동결후에는 정제화 동결과 straw 동결에서 34.48±2.28%, 49.22±6.48%로 각각 36.72%와 21.98%의 생존율 감소를 나타내므로서 정제화 동결에서는 희석과 저온화과정보다 13.36%의 높은 감소율을 나타내고 있었으나 straw 동결에서는 오히려 1.38%의 낮은 감소율을 나타내고 있어 정자의 생존율에 있어서 straw 동결은 다소의 차이가 있었다.

정제화동결과 Straw 동결이 정자에 미치는 영향 :

개의 인공수정에서 지금까지 주로 이용되고 있는 정액의 동결방법은 드라이 아이스를 이용한 정제화 동결법과 액체질소 증기를 이용한 straw 동결법이 알려져 있으며⁸⁾ 정제화 동결법과 straw 동결법의 차이는 동결온도에서 정제화는 -79°C의 드라이 아이스중에서 희석정액을 3분간 직접 순간급속동결을, straw 동결은 희석정액을 straw에 넣어 -160°C의 액체질소 증기중에서 10분간 순간 급속동결을 하기 때문에¹⁸⁾ 정자가 받는 저온충격의 차이가 있으며 원정액을 희석시키는 희석액에서의 완충제를 정제화 동결법은 주로 11%의 lactose를 이용하고 straw 동결법에서는 주로 tris-fructose를 이용하고 있어⁴⁾ 어떤 동결방법이 효과적인가에 대해서는 연구자간에 많은 의견의 차이를 보이고 있다. Seager 등^{20,21)}은 정제화 동결법에서 92%까지의 수태율을 얻었다고 보고한 한편 Andersen 등³⁾은 straw 동결법에서 91%의 수태율을 얻었다고 보고하고 있다. 그러나 Seager 등²⁰⁾은 희석액으로 11%의 lactose를 이용하였고 Andersen 등³⁾은 tris-fructose citrate 희석액을 이용하였기 때문에 이들 연구자들이 주장하는 높은 수태율이 희석액의 차이

인지 또는 동결방법의 차이인지 아니면 희석액과 동결방법의 복합적인 원인인지에 대하여는 알려지지 않고 있다. 따라서 본 실험에서는 두 동결법의 동결 전 처리과정을 동일하게 한 조건하에서 정제화 동결법과 straw 동결법으로 각각 동결한 후 동일한 저장 상태와 용해방법으로 용해하여 두 동결법이 정자에 미치는 영향을 검토하였다.

본 실험에 있어서 5°C로 저온화된 희석정액을 동결하기 직전에 검사한 정자의 활력은 $80.56 \pm 1.80\%$ 이었으나 이것을 정제화동결과 저장 및 용해후의 정자활력은 $31.19 \pm 0.18\%$ 이었으며, straw 동결과 저장 및 용해후의 정자활력은 $42.72 \pm 3.67\%$ 로 나타나 동결에 의한 정자의 활력은 각각 49.37%와 37.84%의 감소율을 나타내므로 straw동결이 정제화 동결보다 11.53%가 우수한 정자의 활력을 유지하고 있었다. 이와같은 결과는 Seager 등²⁰⁾이 개의 동결정액의 이용에 관한 고찰에서 정제화 동결함으로써 straw 동결이 정제화 동결보다 11.53%가 우수한 정자의 활력을 유지하고 있었다. 이와같은 결과는 Seager 등²⁰⁾이 개의 동결정액의 이용에 관한 고찰에서 정제화 동결과 straw동결에서 용해후의 정자활력은 차이가 없다는 견해와는 상당한 차이를 나타내고 있다. 본 실험에서 정제화 동결후의 $31.19 \pm 0.18\%$ 의 정자활력은 11%의 lactose 희석액과 정제화 동결후의 정자활력에서 Platz¹⁹⁾이 보고한 48.7%나, Lees¹⁶⁾가 보고한 50%에 비하여 저조하며 Ven Gemet²³⁾가 보고한 25%보다는 높았다. 또한 본 실험에서 straw 동결후의 $42.72 \pm 3.67\%$ 의 정자활력은 tris-fructose citrate 희석액을 이용한 straw동결후의 정자활력에서 Andersen 등³⁾이나 Christiansen⁷⁾이 보고한 50~70%, Bowen 등⁶⁾이 보고한 40~60% 수준에 미흡하다.

동결과정이 정자의 생존율에 미치는 영향에 관한 문헌은 아직 접하지 못했으나 동결후의 정자의 생존을 검사에서 동결전 $71.20 \pm 1.65\%$ 의 생존율은 straw 동결후에 $49.22 \pm 6.48\%$, 정제화 동결후에는 $34.48 \pm 2.28\%$ 의 생존율을 나타내므로 각각 36.72%와 21.98%의 감소율을 보였고, 이것은 straw 동결법이 정제화 동결법에 비하여 14.74%의 높은 생존율을 나타냈을 뿐만 아니라 straw 동결법은 동결전 처리과정에서의 23.36%보다 1.38%가 낮은 것으로 나타나 straw 동결법이 정자의 생사에는 영향을 적게 미치는 것으로 나타났다. 또한 동결후 정자의 침체형태의 변화에서는 동결전 $93.9 \pm 0.9\%$ 의 정상적인 정자율에 대

해서 정제화 동결후의 정상적인 정자가 $84.3 \pm 2.8\%$ 인 것에 비하여 straw동결후의 정상적인 정자율은 $89.7 \pm 0.8\%$ 로 동결로 인한 정상적인 정자의 감소율은 각각 9.6%와 4.2%로 나타나 straw 동결법에서 정상적인 정자율이 5.4%가 높게 나타난 것이나 동결후 침체평점에서 동결전 0.107에서 정제화 동결후의 0.314와 straw 동결후의 0.186으로, 동결로 인한 침체평점은 각각 0.207과 0.079의 증가를 나타내므로서 정제화 동결법이 straw동결법보다 동결과정에서 침체평점이 0.128이 높게 나타나 있었다.

이러한 결과는 본 실험에서의 침체가 손상된 정자를 포함한 기형정자율에서 동결전($9.73 \pm 0.86\%$)에 대하여 정제화 동결후의 $19.34 \pm 2.09\%$ 는 straw동결후의 $15.56 \pm 1.05\%$ 보다 기형율이 3.75%가 높게 나타난 것과 관련되는 것으로 여겨진다. Watson 등²⁴⁾이 소의 정액에서 -40°C까지는 3°C/min. 속도로 -196°C까지 급속동결한 시험에서 동결전 0.67의 침체평점이 동결과 용해후 1.03으로서 동결과정에서 0.36의 감소를 보고한 것에 비하면 본 실험의 정제화 동결법보다 0.82가 straw동결법 보다는 0.95가 높은 평점을 나타내고 있었다.

이상과 같은 결과로 보아 동결과정에서의 정자에 대한 손상은 straw동결법에서 보다 정제화 동결법에서 더 큰 손상을 입히고 있는 것으로 나타나 많은 연구자들이 보고한 것⁸⁾ 보다는 상당한 차이를 나타내고 있었으며 소의 정자에서 보다는 낮은 평점을 나타내고 있었다.²⁴⁾ 그러나 본 실험에서 나타난 straw 동결후 42.72%의 활력은 대부분의 연구자들이 주장하는데로 좋은 수태율을 얻기 위해서는 용해후 최소 50%에서 65%의 활력을 가져야 한다는 수준에는 미흡하며 또한 본 실험에서의 straw동결후 정상적인 침체형태의 감소율이 4.2%로 나타난 것은 Concannon⁸⁾이 보고한 37%에 매우 낮은 감소율이나 Concannon이 말한대로 침체의 변화와 정자의 활력에는 유의성 있는 관계를 인정하기 어려우며 정자의 활력만으로 수태율을 평가하는 데는 많은 문제점이 있다는 점을 고려한다면 아직도 개의 동결정액에 있어서 해결되어야 할 여지가 많은 것으로 여겨진다.

결 론

개 정액의 동결에 있어서 정제화법과 Straw 동결법에 대한 동결전 까지와 동결에서 용해후까지의 두

단계의 처리과정에 대하여 정자의 활력과 생존을 그리고 침체의 손상정도를 각각 비교하였다. 두 동결법에서의 회석액은 모두 4%의 glycerol을 함유한 Tris-buffered egg yolk를 사용하였다. 정제화동결은 드라이 아이스의 흡에서, Straw 동결은 액체질소 표면위에서 각각 동결되었다. 동결된 정액은 10일간 액체질소 콘테이너에 보관한 후 37°C의 온수에서 30초 동안 용해하였다.

두 동결법의 비교에서 용해 후에 42.7%의 정자의 활력과 49.2%의 생존을 그리고 0.816의 침체평점을 나타낸 Straw 동결법이 각각 31.2%, 34.5%, 0.314을 나타낸 정제화동결법 보다 우수한 것으로 나타났다. 또한 동결전과 후의 처리과정의 비교에서는 동결전 12.67%의 감소율을 나타낸 정자의 활력이 Straw 동결과 정제화동결후에 각각 33.8%와 49.4% 감소율을 나타냈으며 침체평점에서는 동결전의 0.02의 증가에 대하여 Straw동결과 정제화동결후에는 각각 0.08과 0.21의 증가를 나타냈다.

참 고 문 헌

- Andersen, K. : Artificial insemination and storage of canine semen. In : Morrow, K. A. ed. Current Therapy in Theriogenology. 1st edition Philadelphia W. B. Saunders Co., (1980) 661~665.
- Andersen, K. : Fertility of frozen dog semen. Proc 7th Int Cong Anim Repro AI, Munich, (1972) 1703~1706.
- Andersen, K. : Artificial uterine insemination in dogs. Proceedings, 8th International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination, Cracow, Poland, (1976) IV : 960.
- Boucher, J. H., Foote, R. H. and Kirk, R. W. : The evaluation of semen quality in the dog and the effects of frequency of ejaculation upon semen quality, libido, and depletion of sperm reserves. Cornell Vet., (1958) 48 : 67~86.
- Bouchard, G. F., Morris, J. K. and Youngquist, R. S. : Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. Theriogenology., (1990) 34 : 147~157.
- Bowen, R. A., Amann, R. P., Fromen, D.P., et al. : Artificial insemination with frozen semen in the dog. Dog World., (1984) 69 : 66~67.
- Christiansen, I. J. and Schmidt, M. : Freezing of dog semen. Preliminary report. Institute for Sterilitatesforskning, Kongelige Veterinaerog Landbohojskole., (1980) 23 : 67.
- Concannon, P. W. and Battista, M. : Canine semen freezing and Artificial insemination. In : Kirk, R. W., Current Veterinary Therapy X. Small Animal Practice. W. B. Saunders Co., (1989) 1247~1259.
- Foote, R. H. : The effects of electrolytes, sugars, glycerol and catalase on survival of dog sperm stored in buffered-yolk mediums. Am. J. Vet. Res., (1964) 25 : 32~36.
- Foote, R. H. : Extender for freezing dog semen. Am. J. Vet. Res., (1964) 25 : 37~40.
- Foote, R. H. : artificial insemination of dogs. In : Current veterinary therapy. ed. by Kirk, R. W. 3rd ed W. B. Saunders Co. Philadelphia, (1968) 686~689.
- Feldman, E. C. and Nelson, R. W. : Artificial insemination. In : Canine and Feline Endocrinology and Reproduction., (1987) 519~524.
- Gill, H. P., Kaufman, C. F. and Foote, R. W. : Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, Liquid-stored and Frozen-stored semen. Am. J. Vet. Res., (1970) 31 : 1807~1813.
- Gutierrez Nales, N. N. : The dilution and storage of canine semen. Reo Patron Biol Anim(Madr), (1957) 3 : 189.
- James, R. W., Heywood, R., et al. : Street biochemical observations on beagle dog semen. Vet. Rec., (1979) 104 : 180~182.
- Lees, G. E. and Castleberry, M. W. : The use of frozen semen for artificial insemination of German Shepherd dogs. JAAHA. (1977) 13 : 382~386.
- Leonard, E. P. : Dogs. In ; Perry, E. J. : The Artificial insemination of farm animals. Fourth revised edition. Oxford & IBH Publishing Co., (1969) 301~313.
- Olar, T. T., Bowen, R. A. and Pickett, B. W. : Influence of extender cryopreservative and seminal processing procedures on post-thaw motility of canine spermatozoa frozen in straws. Theriogenology, (1989) 31 : 451~461.
- Platz, C. C. and Seager, S. W. J. : Successful pregnancies with concentrated frozen canine semen. Lab Anim Sci., (1977) 17 : 1013~1016.
- Seager, S. W. J. and Fletcher, W. S. : Progress on the use of frozen semen in the dog. Vet. Rec., (1973) 92 : 6~10.
- Seager, S. W. J., Platz, C. C. : Artificial insemination and frozen semen in the dog. Vet Clin North Am, (1977) 7 : 757~764.
- Smith, F. O. : Update on freezing canine semen. In : Kirk, R. W. Current Veterinary Therapy IX. Philadelphia : W. B. Saunders Co., (1986) 1243~1248.
- Van Gemert, W. : Deep-frozen pups. Tijdschr Diergeneesk., (1970) 95 : 697.
- Watson, P. F. and Martin, I. C. A. : A comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa. J. Reprod. Fert., (1972) 28 : 99~101.
- 김창근 : 개 인공수정. In : 이용빈, 家畜人工授精要論, 선진문화사, (1986) 297~312.
- 임경순 : 소의 인공수정. In : 이용빈, 家畜人工授精要論 선진문화사, (1986) 80~178.

27. 武石昌敬, 見上孝 等: イヌの繁殖に関する研究. Ⅷ. 凍結
精液授精による受胎例について. 家畜繁殖誌, (1976) 22: 28
~32.

28. 黒田治門: 犬精子の保存と受精. 家畜繁殖誌, (1982) 28: 22
~26.

A Comparison between Pellet and Straw Methods in Canine Semen Freezing

Jung-Won Lee, D.V.M., Heui-Eun Kim, D.V.M., Nam-soo Kim, D.V.M, M.S.
and **In-Hyuk Choi, D.V.M, Ph.D.**

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University

Abstract

Pellet and straw methods in canine semen freezing are compared with respect to motility, viability and acrosome damage of sperm during each of the two major processing steps, to prior-freezing and to frozen-thawing.

Senen was extended with a tris-buffered egg yolk contained 4% glycerol Pellet freezing in the hole of dry ice and straw freezing on the surface of liquid nitrogen were carried out, respectively. The frozen semen 10 days after storage in liquid nitrogen container. was thawed.

In the comparison of two freezing methods, the straw freezing method with 42.7% in motility. 49.2% in viability and 0.186 acrosome score after thawing seems to be superior to the pellet freezing method with 31.2%, 34.5% and 0.314%, respectively.

Sperm motility of processing step to frozen-thawing against decrease rate 12.67% to prior freezing appeared of 33.84% and 49.37% in straw and pellet freezing and increase of 0.02 in acrosomal score to prior freezing appeared of 0.08 and 0.21 in straw and pellet freezing method to frozen-thawing