

개 凍結精液을 위한 稀釋液의 比較研究

金熙垠·李正遠·金南洙·崔仁赫
전북대학교 수의과대학

緒 論

人工授精에 있어서 受胎가 이루어질 수 있도록 정자의 活力과 生存力을 장기간 보존하는 기능은 稀釋과 凍結에 의해 이루어지고 있으며 특히 稀釋液은 정액동결시의 溫度衝擊에 대한 보호물질까지도 함유하고 있어야 되기 때문에 인공수정에서 희석액은 매우 중요한 요인중의 하나이다. 개의 인공수정에 이용되는 희석액에 관여하는 많은 연구자들의 보고^{1), 2), 3), 4), 5)}가 있으나 개 정액의 희석액은 주로 소의 인공수정에서 사용되는 것¹²⁾과 유사한 희석액 및 희석방법이 이용되고 있다. 그러나 개 인공수정에서의 受胎率은 아직도 저조한 실정인 것으로 알려져 있으며 이러한 차이는 개 정액의 특성^{6), 9), 27), 28)}이나 精子的 耐凍性의 차이 때문인 것으로 생각된다.

희석액의 기본구성은 에너지원으로서 營養劑, pH의 변화나 滲透壓 및 전해질 농도로 부터의 보호를 위한 緩衝液, 저온과 동결로 부터의 정자의 損傷을 방지하기 위한 保護劑 및 抗生劑로 이루어지고 있다.³⁾ 개 정액의 동결목적으로 일반화된 희석액은 저온충격의 보호를 위하여는 난황이, 耐凍劑는 glycerol이, 항생제로는 penicillin과 streptomycin이 쓰여지고 있으며 영양제와 緩衝劑로는 tris-glucose-citric acid^{11), 14), 21)}, tris-fructose-citric acid^{11), 12), 14), 16), 21)}, lactose^{4), 12), 21), 24)} 및 PIPES-glucose-citrate^{9), 25)}가 잘 알려져 있고 특히 straw 동결을 위해서는 tris base, citric acid, 난황, glycerol, penicillin과 streptomycin을 기본으로 하여 fructose와 glucose가 사용되고 있으며, 정제화동결을 위해서는 lactose가 많이 활용되고 있는 것으로 알려져 있다.^{4), 9), 21)} 그러나 어느 희석액이 높은 수태율을 갖는가에 대해서는 연구자간의 실험방법이 다르며 수태가 이루어지는데까지는 여

러가지 요소들이 影響을 미치고 있고 동결방법에 따라 희석액의 특성이 다르기 때문에 수태율만으로 희석액을 평가하는데는 다소의 문제점이 있을 것으로 생각된다. 또한 개 정액의 동결법에 있어서도 드라이아이스를 이용한 정제화 동결법과 액체窒素蒸氣를 이용한 straw 동결법이 일반적인 것으로 알려져 있으나 어느 동결법이 우수한가에 대해서는 연구자마다 주장이 다르다. 그러나 정제화 동결법을 이용한 실험에서 수태율이 우수했다는 보고에도 불구하고 일반적으로는 straw 동결법^{15), 21), 24), 30)-31)}을 선호하고 있는 것으로 알려져 있다.

따라서 본 실험은 개의 인공수정에서 일반적으로 많이 쓰여지고 있는 4개의 희석액을 選擇하여 각각 同一한 방법과 조건으로 동결전처리와 凍結-貯藏-融解 하였을 때 각 희석액이 정자에 미치는 영향을 檢討하기 위하여 각 과정에서 정자의 活力과 生存率 및 尖體형태의 변화를 검사하여 각 희석액을 比較評價하였다.^{9), 26)}

재료 및 방법

실험동물 : 체중이 평균 15.3kg(8kg~24kg)이고, 2~4세인 잠중견으로서 임상적으로 건강하다고 인정되며, 정액검사서 정자의 활력이 80% 이상이고 기형률이 20% 미만인 5두를 실험견으로 하였다. 정액의 채취는 수지법을 이용하였고, 채취간격은 3일에 1회(주 2회)로 하였으며 사출되는 정액은 2분획만을 취하여 공시하였다.

실험방법 :

희석액 : Table 1에서와 같은 4개의 완충액에 각각 난황이 20%(v/v)가 되도록 하였으며, streptomycin sulfate 1,000 μ g/ml과 penicillin G 1,000 IU/ml를 각

각 첨가하였고, 1차희석액에는 글리세롤이 포함되지 않게 하였으며 2차 희석액의 글리세롤 농도는 8%가 되게 하였다.

稀釋方法 :

1차 희석과 냉각 : 채취된 원정액은 2,500rpm으로 5분간 원심분리한 후 정청을 버리고 37°C로 유지된 각각의 희석액으로 정자의 농도가 $200 \times 10^6/ml$ 이 되도록 희석하여 37°C의 온수가 100ml 들어있는 200ml 들이 비이커 안에 정치시켜 5°C의 냉장실에서 2시간 동안 냉각하여 5°C가 되도록 하였다.

2차 희석과 glycerol 평형 : 1차희석과 냉각이 끝난 희석정액을 8%의 glycerol이 함유되고 5°C로 유지된 2차 희석액으로 동량희석하여 최종적으로 정자의 농도는 $100 \times 10^6/ml$, glycerol 농도는 4% 되도록 한후 이 희석정액을 0.5ml의 straw에 충전·밀봉하여 5°C의 냉장실에서 2시간동안 평형하였다.

동결과 융해 :

스치로폴과 소금으로 보온된 stainless steel 상자 (25cm×25cm×30cm)에 높이 10cm정도의 액체질소를 넣고 액체질소의 표면으로부터 10cm의 높이에 설치된 rack 위에 glycerol평형이 끝난 straw를 10분간 정치하여 급속동결하였다. 이때 straw가 위치한 곳의 온도는 -160°C이었다.

동결이 완료된 straw는 액체질소통 안에서(-196°C) 10일간 저장한 후에 37°C의 항온수조안에서 30초동안 융해하였다.

정액의 검사 및 평가 : 각 희석액에 대한 정액의 평가는 원정액의 일반성상에 관하여는 정액량, 정자 농도, 활력, 생존률, 기형을 및 침체형태의 변화를 검사하여 평가하였고 희석정액의 glycerol 평형이 끝난 동결직전과 동결-저장-융해 후에는 정자의 활력, 생존률 및 침체형태의 변화를 각각 검사하여 평가하였다. 검사방법 및 평가기준은 다음과 같다.

활력검사 : 37°C의 정온 슬라이드그라스 위에 가검정액을 떨어뜨린 후 400배율에서 검경하였으며, 움직이는 정자를 기준으로 하여 백분율을 구하였다.

생사검사 : 가검정액에 Mayer 염색액^{18,19)}을 혼합하여 도말한 후 즉시 가열건조시켜 400배율로 검경하였으며 염색이 되지 않은 생존정자의 백분율을 구하였다.

침체형태의 변화 : 희석정액의 가검물을 도말하고 Mayer염색한 후 400배율로 검경하였으며 침체형태

의 변화정도는 Watson²⁰⁾의 분류방법에 따라 두부가 정상인 것은 0으로, 부정형인 것은 1, 첨모가 일부만 탈락한 것은 2, 첨모가 완전히 탈락한 것은 3으로 등급을 정하고 침체의 평점은 다음과 같이 환산하였다.

침체평점=(등급별 정자의 백분율×등급에 지정된수+...)÷100

濃度 : 정자의 농도는 spectrophotometer(CECIL, CE2343)를 이용하였으며 2.9% sodium citrate 5ml에 50 μl 의 정액을 혼합한 후 625nm에서 흡광도를 구하고 미리 혈구계산기로 calibration된 대조표를 이용해 환산하여 농도를 구하였다.²¹⁾

결 과

개의 인공수정을 위한 동결정액 제조에 사용되는 4개의 희석액을 선택하여 희석방법, 동결, 저장, 융해과정을 동일한 조건으로한 상태에서 각 희석액에 대한 정자의 활력, 생존율 및 침체형태의 변화를 동결 전까지의 과정과 동결-저장-융해까지의 과정을 각각 검사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

정자의 활력 : 4개의 희석액에 대한 정액의 처리과정에서 정자의 활력변화를 검사한 결과는 Table 2에 나타난 바와 같이 원정액을 희석하여 glycerol평형이 완료된 동결전 과정까지에서는 B액에서 12.2%로 가장 많은 감소를 나타냈으며 C액에서 5.4%로 가장 적은 감소를 그리고 A액과 D액에서는 각각 5.8%, 11.2%의 감소를 나타내고 있어 평균 8.65%의 감소를 나타내고 있었다. 또한 동결과정과 저장 및 융해과정에서의 정자활력에 대한 감소는 D액에서 76.7%로 가장 많았고, A액에서 35.2%로 가장 적었으며, B액과 C액에서는 각각 63.5%와 52.0%의 감소를 보여 평균 56.85%의 많은 감소를 나타내어 동결 전까지의 처리과정에서보다 평균 6.6배의 감소를 보이고 있었다. 따라서 全過程 즉, 원정액으로부터 융해 후까지의 처리과정에서 정자의 활력은 A액에서 53.2%의 가장 높은 回復율을 보이고 있었고, D액에서 8.4%의 가장 낮은 회복률을 보이고 있었으며, B액과 C액에서는 각각 16.8%와 36.2%의 회복률을 보이고 있었다.

정자의 생존률 : 원정액을 희석하여 동결전의 處理過程에서 정자의 생존률의 감소는 B액에서 11.4%로 가장 많았고, D액에서 4.6%의 가장 적은 감소를 보

Table 1. Composition of Seminal Extenders

Component	[unit : mol]			
	A	B	C	D
Tris(hydroxymethyl) aminomethan	0.20	0.20	-	-
Citric acid monohydrate	0.06	0.06	-	-
Fructose	0.06	-	-	-
Glucose	-	0.05	0.07	-
Sodium citrate dihydrate	-	-	0.05	-
Glycine	-	-	0.12	-
Lactose	-	-	-	0.21

Table 2. Motility of Canine sperm before and after Freezing

Extender	Fresh	Before	After	Recovery*
	semen	freezing	thawing	rate
A	87.5±7.12	81.8±7.63	46.6±13.68	53.2
B	91.0±5.87	78.8±4.17	15.3± 4.86	16.8
C	90.0±5.62	84.6±4.72	32.6±18.47	36.2
D	96.0±0.89	84.8±1.17	81. ± 4.46	8.4

mean±SD(%)

* : recovery rate = $\frac{\text{motility of after thawing}}{\text{motility of fresh semen}} \times 100(\%)$

Table 3. Viability of Canine Sperm before and after Freezing

Extender	Fresh	Before	After	Recovery*
	semen	freezing	thawing	rate
A	83.4±7.45	76.4±5.95	45.7±10.59	54.8
B	88.6±3.14	77.2±2.79	15.8± 4.75	17.8
C	8.72±5.98	81.6±2.73	32.6±18.17	37.2
D	8.76±8.64	83.0±2.76	7.3± 4.36	8.3

mean±SD(%)

* : recovery rate = $\frac{\text{Viability of after thawing}}{\text{viability of fresh semen}} \times 100(\%)$

Table 4. Grade of Variation of Acrosome Morphology before and after Thawing

Extender	Fresh	Before	After
	semen	freezing	thawing
A	0.076±0.013	0.118±0.013	0.194±0.045
B	0.088±0.011	0.128±0.017	0.184±0.039
C	0.086±0.013	0.120±0.014	0.119±0.029
D	0.088±0.024	0.128±0.014	0.176±0.035

mean±SD(acrosomal score)

였으며, A액과 C액에서는 각각 7%와 5.6%의 감소를 나타내어 전 희석액의 평균생존률의 감소는 7.15%를 보이고 있었다. 동결과정에서 용해과정에 이르기까지는 D액이 75.7%로 가장 많은 감소를 보였

고, A액에서 30.7%로 가장 적은 감소를 나타내고 있으며, B액과 C액에서는 각각 61.4%, 49.0%의 감소를 보여 전 희석액에서는 생존률은 평균 54.2%의 감소를 나타내고 있었다. 따라서 생존률에 있어서는

동결 전까지의 처리과정에서 보다 동결·융해 후의 과정에서 7.6배의 감소를 보이고 있었다.

원정액의 회석으로부터 융해과정까지의 전과정을 거치는 동안 정자의 생사에 미치는 영향은 A액에서 54.8%의 가장 높은 회복률을 보였고, D액에서 8.3%의 가장 낮은 회복률을 나타내고 있었으며, B액에서는 17.8%, C액에서는 37.4%의 회복률을 각각 나타내고 있었다(Table 3).

침체형태의 변화: 각 회석액에 대하여 원정액과 동결 전과정 그리고 동결·융해 후의 정자침체형태의 변화를 조사한 결과는 Table 4에 나타난 바와 같이 동결 전까지에는 C액에서 0.034의 침체평점증가로 가장 낮은 損傷 정도를 보였으나 A액에서는 0.042로 가장 높은 손상 정도를 나타냈고, B액과 D액에서는 공히 0.040의 손상 정도를 나타내고 있었으며, 전 회석액의 원정액에서 동결전까지의 침체평점의 증가는 평균 0.039로서 비교적 낮은 증가를 나타내고 있었다. 또한 동결·융해 후까지의 과정에서도 역시 C액에서 0.001로 가장 낮은 손상 정도를 나타냈으며 A액에서 0.76으로 가장 높은 손상 정도를 나타냈다. B액과 D액에서는 각각 0.056, 0.048의 침체평점을 나타내고 있었으며, 전 회석액의 동결에서 융해 후까지의 침체평점은 평균 0.045로서 동결전까지의 처리과정에서 보다 0.006의 증가를 보이고 있었다. 원정액의 회석에서 융해 후까지의 침체평점의 증가는 A액에서 0.118로 가장 높았고, C액에서 0.033으로 가장 낮았으며, B액과 D액에서는 각각 0.096과 0.088을 나타내고 있었다. 전 회석액에서 융해 후의 평균 침체평점은 0.168로 나타났다.

考 察

개의 人工受精에 있어서는 근래의 상당한 연구에도 불구하고 아직도 저조한 受胎率을 보이고 있는 실정이며 이러한 원인은 개 정액의 특성에 따른 凍結方法이나 稀釋液 그리고 受精方法 등의 多因性에 의한 것으로 생각된다.

인공수정에 있어서 중요한 부분으로 생각되는 동결방법과 회석액에 있어서도 연구자들 간에 상당한 차이를 보이고 있어 인공수정을 실제로 응용하려는 사람들에게 상당한 혼란을 주고 있는 것 같다. 즉, Concannon⁹⁾에 의하면 개 정액의 동결법에 있어서도

드라이아이스를 이용한 정제화동결법의 우수한 수태율의 보고⁹⁾에도 불구하고 아직도 많은 사람들은 액체질소를 이용한 straw 동결법^{15, 21, 24, 30, 31)}을 선호하고 있는 것으로 알려져 있으며, 회석액도 정제화동결법에서 주로 이용되고 있는 11%의 lactose^{4, 12, 14, 21, 24)} 외에 straw 동결법에서 이용되는 tris base buffer에 glucose^{11, 14, 21)}와 fructose^{4, 11-12, 14, 16, 27)} 또는 PIPES-glucose-citrate 회석액^{9, 25)}이 가장 일반적으로 이용하고 있는 것으로 알려져 있다. 이와같은 회석액외에도 glycine-glucose-citrate buffer^{12-13, 17, 27)}나 skim-milk^{9, 12, 13)} 등의 다른 회석액에 관한 연구도 보고되어 있다. 한편으로 회석액 중에 添加되는 低温衝擊防止劑로서의 난황이나, 耐凍劑로서의 glycerol의 첨가 및 농도에 있어서는 별다른 異見이 없는 것으로 보고^{10-11, 21)}되고 있으며 항생제의 첨가나 融解方法도 소에서와 유사하며 별다른 이견이 없는 것으로 보인다.

인공수정에 있어서 회석액의 성분이나 동결방법 또는 정액의 처리과정 등에 대한 평가방법은 수태율의 정도로 평가되어야 하나 수태율로서의 평가는 장기간을 요하며 복합적인 요소들이 포함되어 있기 때문에 통상적으로 정자의 활력이나 침체형태의 변화로 평가하는 것으로 알려져 있다.^{9, 26)}

지금까지 개 정액의 회석액을 중심으로 보고된 자료에 의하면 Foote¹¹⁾는 0.20mol의 tris-buffered-yolk-glucose 회석액에서 동결 후 41%의 생존률을 보고하였고, Takeishi 등³⁰⁾은 12%의 skim milk와 glucose sodium citrate, phosphate 회석액과 straw 동결법으로 융해 후 35~70%의 활력과 75%의 수태율을 보고하였으며, Andersen¹⁾은 0.2mol의 trisfructose citrate 회석액으로 동결융해 후 50~0%의 활력과 80~92%의 수태율을 얻었다고 보고하였으며, Christiansen⁴⁾도 동일한 회석액으로 같은 활력을 보고하고 있다. Olaf²¹⁾는 straw 동결에서 egg-yolk lactose보다 egg-yolk-tris 회석액에서 우수하게 정자의 활력을 유지할 수 있었다고 보고한 바 있다. 그러나 이와같은 결과들만으로 회석액에 대한 평가를 한다는 것은 동결과 융해방법, 저온화과정, 회석처리과정이나 glycerol 농도 등에서 각각 차이가 있기 때문에 다소의 문제점이 있을 것으로 생각되며 또한 이들 회석액들이 정액을 처리하는 어느 과정에서 정자에 유해한 손상을 입히는지에 대한 보고가 드물어 회석액을 평가하는데 더욱 어려움이 있는 것으로 생각되었다.

따라서 본 실험은 근래 일반적으로 많이 활용되고 있는 희석액을 선정하여 각 희석액이 凍結을 前·後로 주로 어느 과정에서 정자에 유해한 영향을 미치는가를 비교 검토하기 위하여 각 희석액에 대하여 동일한 희석처리방법과 동결과정 그리고 같은 용해과정의 조건하에서 특히 희석액 중에서 일반화된 egg yolk나 glycerol 농도 및 항생제의 함량을 동일하게 한 조건하에서 각 희석액을 비교 검토하고자 하였으며 평가의 기준도 정자의 활력뿐만 아니라 생존률과 침체형태의 변화를 추가하여 조사하였다.

본 실험의 결과 동결 전까지의 처리과정에 있어서 정자의 활력은 A액과 C액이 B액과 D액에 비하여 약 절반의 활력감소를 나타내고 있었으나 정자의 생존률에 있어서는 D액에서 가장 우수한 것으로 나타났다. 침체형태의 변화에 있어서는 C액에서 다소 낮은 침체평점을 나타내 각 희석액에 따라 서로다른 특징을 나타내고 있어 희석액의 우열을 판단하기에는 어려운 점이 있으나 활력과 생존률을 종합할 때에는 그 변화정도가 A액은 12.8%, B액은 23.6%, C액은 11.0%, D액은 15.8%로서 C액이 다소 우수한 것으로 나타났고 또 침체평점에서도 C액이 가장 낮은 변화를 보여 3가지를 종합한 평가로는 C액이 가장 정자에 미치는 영향이 적은 것으로 나타났다.

동결과정에서 부터 용해 후까지의 조사에서 정자의 활력은 A액에서 35.2%의 감소로 C액보다는 16.8% 가장 감소정도가 큰 D액보다는 41.5%나 낮은 감소를 나타내고 있었으며 生死檢査에 있어서도 A액이 30.7%로 C액보다는 18.3%가, 가장 감소정도가 큰 D액보다는 40.0%가 낮은 감소를 나타내고 있었다. 정자의 활력과 생존률을 종합검토한 것에 있어서도 A액은 65.9%, B액은 124.9%, C액은 101.0%, D액은 152.4%의 감소로 A액에서 현저히 적은 변화를 보이므로 우수한 것으로 인정할 수 있었다. 그러나 침체형태의 변화에 있어서는 C액에서 현저히 낮은 침체평점을 나타내 우수한 것으로 보였다.

또한 정액의 희석에서부터 용해 후까지의 全過程에서 정자의 활력은 A액에서 53.2%의 가장 높은 회복률을 보였으나 D액에서는 8.4%의 낮은 회복률을 보였다. 이와같은 결과는 생존률에 있어서도 유사하게 나타나 A액은 54.8%, D액은 8.3%의 회복률을 보이고 있었다. 활력과 생존률을 종합한 평가에서는 A액은 평균 54%, B액은 17.3%, C액은 36.8%, D액

은 8.35%의 회복률을 나타냄으로써 A액이 우수한 것으로 인정할 수 있었으나 침체형태의 변화에 있어서는 C액이 우수한 것으로 나타났다.

한편으로 동결 전까지의 활력이나 생존률의 감소가 평균 8.65%, 7.15%인데 비하여 동결과정에서 용해까지의 과정에서는 각각 평균 56.86%, 54.2%로 나타났고, 동결과 용해과정에서 정자의 활력과 생존률에 미치는 영향이 동결전 처리과정에 비하여 평균 6.6배와 7.6배로 나타나 개의 인공수정에 있어서의 문제점이 동결과 용해과정에 있음을 시사해주고 있다. 그러나 용해과정에 있어서는 정자에 미치는 영향이 근소하였다는 보고^{9,15,21)}를 감안한다면 결국 동결과정이 정자에 가장 큰 영향을 미치고 있다는 것을 인정할 수 있었다.

본 실험결과에서 D액인 lactose는 동결 전까지의 처리과정에서는 정자의 생존률에서 가장 적은 감소를 나타냈고, 활력에서는 다른 희석액에 비하여 다소 많은 감소를 나타냈으나 동결처리과정에서는 활력에서 76.7%, 생존률에서 75.7%의 가장 많은 감소를 보인 것은 lactose 희석액이 straw 동결법에 적합치 못함을 의미하는 것으로 보인다. 이와같은 결과는 Olar²¹⁾가 straw 동결에서 egg-yolk-lactose 보다 e-gg-yolk-tris 희석액에서 우수하게 정자의 활력을 유지할 수 있었다고 보고한 것과 유사한 결과를 가져왔으며 lactose 희석액으로 92%의 수태율을 얻었다고 보고한 Platz 등²¹⁾은 모두가 드라이아이스를 이용한 정제화동결법에 의한 것이라는 사실이 이를 뒷받침 해주고 있다. 그러나 Seager²¹⁾가 말한 정제화동결법과 straw 동결법에서 용해후 정자의 활력은 같았다는 견해와는 많은 차이를 보이고 있다.

동결 전까지의 처리과정에서 정자의 활력과 생존률의 종합평가에서 가장 적은 감소를 나타냈고 용해 후까지 전처리과정을 통해서 가장 적은 침체변화 정도를 나타낸 glycine-glucose-citrate 희석액은 용해후의 활력과 생존률의 회복률에 있어서도 tris-fructose-citrate 다음으로 적은 감소를 나타내고 있었으나 유감스럽게도 이 희석액을 이용한 수태율의 보고를 접하지 못했다. 다만 동결전 84.6±4.72%의 활력은 Foote¹²⁾가 보고한 76%의 활력보다 좋은 활력을 유지하고 있었다.

이상의 평가에서 본 실험에서 공시한 조건하에서는 活力과 生存率에서 A액인 tris-fructose-citrate buf-

fer를 사용했을 때 가장 우수한 것으로 평가할 수 있으나 용해후 46.6±13.68%의 활력은 같은 희석액을 이용했던 Andersen²⁾이나 Christiansen⁸⁾이 보고한 50~70%의 활력에는 이르지 못했고 Gill 등⁶⁾의 28%보다는 높은 활력을 나타냈으며 Bowen 등⁷⁾이 보고한 40~60%와는 유사한 활력을 갖는 것으로 나타났다. Straw 동결에서 tris-fructose-citrate 희석액을 사용했을 때의 수태율은 Bowen⁷⁾의 15%에서 Andersen³⁾의 91%까지 다양하게 보고되어 있다. 그러나 tris-fructose-citrate의 희석액에서 침체형태의 변화평점이 0.194로 가장 높게 나타나고 동결과정에서 가장 높은 0.076의 높은 손상을 나타낸 것은 Concannon⁹⁾이 언급한 바와 같이 정자의 활력과 침체손상은 유의성있는 관계가 없다는 사실과 본 실험에서의 결과는 같은 견해를 보였으며 또한 이러한 이유 때문에 용해후의 정자의 활력을 수태율의 지표로 하는데는 문제점이 있다는 견해를 고려하고 또 동결과정에서 활력과 생존률의 정자에 대한 손상정도가 동결 전까지의 처리과정에서 보다 6~8배 정도가 높은 것으로 보아 동결과정에서 해결되어야할 문제점이 많은 것으로 여겨진다.

結 論

개의 인공수정을 위한 동결정액 제조에 이용되고 있는 tris-fructose-citrate, tris-glucose-citrate, glycine-glucose-citrate 및 lactose 희석액에 20%의 egg yolk, 4%의 glycerol을 첨가하여 동일한 처리과정으로 액체 窒素蒸氣를 이용한 straw 凍結을 한 후 동결 전까지의 처리과정과, 동결에서 融解後까지의 과정에서 정자의 활력, 생존율 및 침체형태에 미치는 영향에 대하여 조사한 결과 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. 전 처리과정을 통한 용해 후의 정자의 활력과 생존률은 tris-fructose-citrate 희석액에서 46.6±13.68%, 45.7±10.59%로 가장 높게 나타났으며 lactose 희석액에서 8.1±4.46%, 7.3±4.36%로 가장 낮게 나타났다.

2. 동결 전까지의 처리과정에서 정자의 활력은 glycine-glucose-citrate 희석액에서 5.4%의 감소를 보였고, 정자의 생존률은 lactose 희석액에서 4.6%의 감소를 보여 가장 우수한 것으로 나타났으며,

tris-glucose-citrate 희석액은 12.2%와 11.4%로 가장 많은 활력과 생존률의 감소를 나타냈다.

3. 동결에서 融解까지의 처리과정에서 정자의 활력과 생존률은 모두 tris-fructose-citrate 희석액에서 35.2%와 30.7%의 감소로 가장 우수한 것으로 나타났으며 lactose 희석액에서는 76.7%와 75.7%로 가장 많은 감소를 나타냈다.

4. 融解후에 나타난 전처리과정을 통한 침체형태의 변화는 glycine-glucose-citrate 희석액에서 0.119±0.029의 침체평점으로 가장 낮은 손상을 보였으며 tris-fructose-citrate 희석액에서 0.194±0.045의 침체평점으로 가장 높은 손상을 나타냈으나 동결 前·後의 처리과정에 따라서는 큰 차이를 나타내지는 않았다.

參 考 文 獻

1. Alford, J.A. : The occurrence of penicillin and streptomycin-resistant microorganisms in diluted bull semen. Am. J. Vet. Res. 48th annual meeting. p.579.
2. Andersen, K. : Fertility of frozen dog semen. Proc. 7th Int Cong Anim Reprod AI, Munich(1972)1703~1706.
3. Andersen, K. : Artificial uterine insemination in dogs. Proceedings, 8th International Congress of Animal Reproduction and Artificial insemination, Cracow, Poland. (1976) IV : 960.
4. Andersen, K. : Artificial Insemination and storage of canine semen : in Current Therapy in theriogenology. W.B. Saunders. com. Philadelphia.(1980) p.661~665.
5. Bouchard, G.F., Morris, J.K., Sikes, J.D. and Youngquist, R.S. : Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. Theriogenology(1990)34 : 147~157.
6. 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.
7. Bowen, R.A., Amann, R.P., Fromen, D.D.P., et al. : Artificial insemination with frozen semen in the dog. Dog world(1984)69 : 66~67.

8. Christiansen, I.J. and Schmidt, M. : Freezing of dog semen. Preliminary report. Institute for Sterilitetsforskning, Kongelige Veterinaer-og Landbohøjskole(1908)23 : 67.
9. Concanon, P.W. and Battista, M. : Canine semen freezing and arti-ficial insemination : *in* Current Veterinary Therapy. Xth ed. Small animal practice. W.B. Saunders, Philadelphia(1989) p.1247 ~1259.
10. Foote, R.H. : The Effects of Electrolytes, Sugers, Glycerole and Catalase on Survival of Dog Sperm Stroed in Buffered-Yolk Mediums. Am. J. Vet. Res.(1964)25 : 32~36.
11. Foote, R.H. : Extenders for freezing dog semen. Am. J. Vet. Res.(1964)25 : 37~40.
12. Foot, R.H. : Artificial insemination.*in* Veterinary Obstetrics and Genital Disease. 2nd ed. by Roberts, S.J., Edwards Brothers, Inc. Ithaca New York(1971) p.894~926.
13. Foot, R.H. : Artificial insemination of Dogs. : *in* Current veterinary therapy. ed. by Kirk, R.W. W.B. Saunders, Philadelphia(1968) p.686~689.
14. Foot, R.H. : Artificial insemination:*in* Reproduction in farm animals. 4th ed. ed. by Hafez, ESE. Lea & Febiger. Philadelphia(1980) p.521~545.
15. Gaines, J.D. : Working up the subfertile dairy herd;Assessing estrus detection and semen handling. Vet. Med. Food-Animal Practice. June (1989).
16. Gill, H.P., Kaufman, D.F., Foote, R.W., et al. : Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected liquid stored and frozen stored semen. Am. J. Vet. Res.(1970)31 : 1807~1813.
17. Kirk, R.W. : Dogs;*in* Reproduction and breeding techniques for laboratory animals. ed. by Hafez, ESE. Lea & Febiger. Philadelphia(1970) p.224 ~236.
18. Mayer, D.T., Squiers, C.D. and Bogart, R. : An investigation of the staining principle and the background stain the differentiation of live from dead spermatozoa. (Abstract) J. Ainm. Sci.(1947)6 : 499.
19. Mayer, D.T., Squiers, C.D., Bogart, R. and Oloufa, M.M. : The technique for characterizing mammalian spermatozoa as dead or living by differential staining. J. Anim. Sci.(1951)10 : 226.
20. Olar, T.T., Amann, R.P. and Pikett, B.W. : Relationships among testicular size, daily production and output of spermatozoa, and extragonadal spermatozoal reserves of the dog. Biol. Reprod. (1983) 29 : 1114~1120.
21. Olar, T.T., Bowen, R.A. and Pickett, B.W. : Influence of Extender, cryopreservative and seminal processing procedures on postthaw Motility of Canine spermatozoa frozen in straws. Threio.(1989)31 : 451~461.
22. Platz, C.C. and Seager, S.W.J. : Successful pregnancies with concentrated frozen canine semen. Lab. Anim. Sci.(1977)17 : 1013~1016.
23. Salisbury, G.W., Beck, G.H., Elliot, I. and willett, E.L. : Rapid methods for estimating the number of spermatozoa in Bull semen. Jour. Dairy Sci.(1943)26 : 69.
24. Seager, S.W.J. and Flether, W.S. : Progress on the use of frozen semen in the dog. Vet. Rec. (1973)92 : 6~10.
25. Smith, F.O. : Update on freezing canine semen.*in* Current Veterinary Therapy. IX, Kirk, R.W, ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia(1986) p.1240~1248. [Current veterinary therapy IX. Small animal practice. Kirk(1986).]
26. 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.
27. 김창근 : 가축인공수정요론 : 개의 인공수정. 이 용빈, 선진문화사(1986) p.297~312.
28. 黒田治門, 廣江一正 : イア精子の代謝に関する研究. I. 精液性状および代謝能におよぼ季節の影響. 家畜繁殖誌, (1972)17 : 89~98.
29. 黒田治門, 廣江一正 : イア精子の代謝に関する研究. II. 緩衝液および稀釋液の影響について. 家畜繁殖誌, (1973)19 : 115~119.
30. 武石昌敬, 見上 孝, 現玉辛夫, 常包 正, 岩城隆昌 : イアの繁殖に関する研究. VIII. 凍結精液受精による受胎例について. 家畜繁殖誌, (1976)22 : 28~33.
31. 黒田治門, : 犬精子の保存と受精. 家畜繁殖誌, (1982) 28(別輯 21號) : 22~26.

A Comparative Study on the Extenders for Freezing Canine Semen

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

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University

Abstract

Four extenders such as tris-fructose-citrate, tris-glucose-citrate, glycine-glucose-citrate and lactose that the more frequently utilized types of semen extenders used for freezing dog semen evaluated with sperm motility, viability and acrosomal score in the processing procedures to prior freezing and after frozen-thawing respectively.

Each extender contained 4% glycerol and 20% egg yolk were treated by same methods in dilution, freezing, storage and thawing.

The results were obtained as follows;

1. The sperm motility and viability in procedure from dilution to frozen-thawing appeared superiorly with recovery rate of 53.2%, 54.8% in tris-fructose-citrate but appeared inferiorly with recover rate of 8.4%, 8.3% in lactose to others.
2. In the processing procedure course to prior-freezing, glycine-glucose-citrate appeared superiorly with decrease rate of 5.4% in motility, and lactose with decrease rate of 4.6% in viability, but tris-glucose-citrate appeared inferiorly with decrease rate of 12.2%, 11.4% in the sperm motility and viability.
3. During frozen-thawing, tris-fructose-citrate appeared superiorly with decrease rate of 35.2% in motility and 30.7% in viability but lactose appeared inferiorly with decrease rate of 76.7% in motility and 75.7% in viability.
4. The variation of acrosome morphology in the total processing procedures appeared that glycine-glucose citrate were superior with acrosome score of 0.119 ± 0.029 , that tris-fructose-citrate were inferior with acrosome score of 0.194 ± 0.045 to others.