

Ethylene glycol과 항산화제가 제주흑우 동결정액에 미치는 영향

고민희 · 서종필 · 강태영¹
제주대학교 수의과대학

(Received: January 09, 2017 / Accepted: February 21, 2017)

Effect of Ethylene Glycol and Antioxidant Combination on Function of Frozen-thawed Spermatozoa in Korean Jeju Black Bull

Min-Hee Ko, Jong-Pil Seo and Tae-Young Kang¹

College of Veterinary Medicine, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

Abstract : We investigated the effect of ethylene glycol and antioxidants such as taurine, hypotaurine and trehalose with extenders during cryopreservation of Korean Jeju Black Bull spermatozoa. The cryopreservation of freshly collected spermatozoa was conducted with four different conditions. As a control, spermatozoa were cryopreserved with Tris egg-yolk extenders added 5% ethylene glycol (EG). Taurine (20 mM), hypotaurine (20 mM) and trehalose (20 mM) were individually added into tris egg-yolk extenders with 5% EG. After thawing of frozen spermatozoa with four different conditions, sperm viability, motility, acrosomal integrity, and membrane integrity were investigated. The significant ($p < 0.05$) improvement of sperm viability showed in all antioxidant treated thawed spermatozoa (taurine; $68.1\% \pm 4.4$, hypotaurine; $69.2\% \pm 6.7$ and trehalose; $68.0\% \pm 4.4$) when compared to control ($63.4\% \pm 5.6$). Neither positive nor detrimental effects of three antioxidants were shown sperm motility after thawing. The results of hypo-osmotic swelling test showed that the membrane integrity of taurine, hypotaurine or trehalose treated thawed spermatozoa ($64.1\% \pm 5.4$, $61.5\% \pm 3.7$ and $59.0\% \pm 4.0$, respectively) had significantly ($p < 0.05$) higher rate of the swollen sperm compared to control ($53.7\% \pm 9.7$). Hypotaurine treated frozen-thawed spermatozoa had significantly higher ($p < 0.05$) F pattern ratio than taurine, trehalose and control treated frozen-thawed spermatozoa. Trehalose added frozen-thawed spermatozoa had significantly higher ($p < 0.05$) acrosome reaction pattern ratio than taurine and hypotaurine added frozen-thawed spermatozoa. In this study, we found that antioxidants such taurine, hypotaurine and trehalose treatments during cryopreservation process could reduce damage of spermatozoa of Korean Jeju Black Bull and improved sperm capability of fertilization.

Key words : ethylene glycol, antioxidant, semen cryopreservation, Jeju Black Bull.

서 론

Glycerol은 동물의 정자와 난자 그리고 다양한 세포를 동결하는 과정에 동결보호제로 사용되어 왔다(21). 그러나 glycerol은 동결된 세포의 세포막 대사에 삼투압 스트레스와 독성으로 정자의 세포막 탈락을 유도하고 정자 활력과 수정 능력을 감소시킨다(8). 이에 따라 glycerol을 대신할 수 있는 다양한 세포막 침윤성 동결보호제의 검사가 이루어져 왔다. 그 중 ethylene glycol은 독성이 적으며, glycerol과 비교하여 비슷한 수준의 동결보존 효과를 나타내고, 동결융해 후 정자의 운동성이나 membrane integrity를 개선하는 효과가 있었다(9,29). 사람(11)과 소(13)의 정자동결에서 ethylene glycol은 glycerol 보다 세포막의 침투가 빨라 더 효과적인 동결 결과를 보여주었다. 그리고 개(25)와 말(19)에서도 ethylene glycol을 사용하여 동결을 시도하였다. 최 등(2)은 제주흑우에서 ethylene glycol을 동결보호제로 사용하여 적절한 동결

조건을 확립하였다.

정자는 동결 융해과정 중 활성산소인 O_2^- 또는 OH가 발생하여 정자막을 지방과산화시켜 정자의 운동성, 생존성, 정자막 integrity, 수정능력 및 정자의 기능을 감소시킨다(6,30). 최근 cysteine, taurine, hyaluronan 등과 같은 항산화물질을 동물의 정자동결에 첨가하여 동결 융해 후 정자의 항산화 효소 활성도를 측정된 결과, 산화스트레스의 감소, 정자 운동성 증가 및 번식능력의 향상을 보고하였다(7,15,20,26).

따라서, 본 연구에서는 제주흑우의 동결정액 성상을 개선하기 위하여 5% ethylene glycol과 항산화제인 taurine, hypotaurine, trehalose의 조합이 정자 동결 융해 후 정자의 생존율, 운동성, 정자막 integrity, 첨체막 integrity에 미치는 영향에 대하여 조사하고자 수행하였다.

재료 및 방법

정액 채취

실험에 공시한 동물은 제주흑우(3세 이상) 수컷 6두를 사

¹Corresponding author.
E-mail : tykang87@jejunu.ac.kr

용하였으며, 월 평균 4~5회 정액을 채취하였다. 정액 채취는 인공질(Model 66000-D, Nasco, FHK, Japan)을 이용하여 채취한 후 온장고(30°C)에 넣어 온도의 변화를 최소화하여 실험실로 이동하였다.

정액 동결

채취한 정액은 정액의 양을 확인하고 SpermaCue (Fotometro SpermaCue, Minitüb, Germany)를 이용하여 정자의 농도를 측정 후 사용하였다.

Tris-Egg yolk extender (Tris, 121.1 mM; Citric acid, 294.1 mM; Fructose, 180.2 mM; Egg yolk, 10%; Streptomycin sulfate, 10 mg/ml)에 5% ethylene glycol이 포함된 희석제를 대조군으로 사용하였다. 실험군은 대조군의 희석제에 taurine, hypotaurine, trehalose을 각각 20 mM 씩 첨가하여 사용하였다. 실험실로 가져온 사출 정액을 Tris-Egg yolk extender와 같은 비율로 희석하여 4°C 까지 두 시간 동안에 걸쳐 온도를 낮추었다. 동결보호제와 항산화제가 첨가된 희석액을 이용하여 최종 농도 50×10^6 /ml로 만들고 0.5 ml 동결정액 스트로우에 채워 밀봉하고 2시간 동안 온도 평형을 이루게 하였다. 동결은 액체질소가 채워진 스티로폼 박스에서 액체질소 표면 위의 5 cm 높이에 동결정액 스트로우를 10분간 정지시켰다. 동결된 정액 스트로우는 액체질소에 충분히 담겨 동결을 마무리하였다. 동결된 정액은 질소탱크에 보관하였고, 실험 전에 용해하여 사용하였다. 동결정액의 용해는 먼저 상온에 약 10초간 노출하고 37°C 온수에 약 20초간 두어 용해하고 정자의 성상을 조사하였다.

정자의 운동성 평가

정자의 운동성 평가는 MicroLux 현미경(Olympus, Japan)을 이용하였다. 혈구계산관에 커버 글라스를 덮고 5 µl의 정액을 주입 한 후 100배율에서 정자의 운동성을 관찰하였다. 혈구계산관 두 개의 구획 내 정자 100개를 여러 번 세어 활발하게 움직이는 정자가 90개 이상 일 때 90%, 80개 이상 일 때 80%, 70개 이상 일 때 70%로 평가하였고, 전체적인 움직임이 느리거나 전진운동만 하는 수준일 때 50%, 미동 수준일 때 30%로 평가하였다.

정자의 생존율

정자의 생존율 평가는 0.5% Eosin-Y 염색을 사용하였다. 10 µl의 정액과 동량의 염색액을 섞어 슬라이드 글라스에 도말한 다음 커버를 덮고 MicroLux 현미경(Olympus, Japan) 하에서 염색된 정자를 관찰하였다. 100 배율에서 정자의 염색 상태를 관찰하여 샘플 당 200개의 정자를 세어 붉게 염색되어 죽은 정자의 비율을 계산하였다. 개체 당 2개의 샘플을 만들어 생존율을 반복 평가 하였다.

정자막 integrity 평가

정자막 integrity는 Jeyendran 등(16)의 방법을 변형한 Hypo-osmotic swelling test (HOST: 저장액을 이용한 정자 미부 팽창형태 분석)을 이용하였다. 37°C의 0.45% NaCl 저장액 1 ml에 정자 100 µl를 혼합하여 37°C의 수조에서 5분간 배양한 후 슬라이드 글라스에 도말하였다. 결과 분석을

위하여 샘플 당 최소 200개의 정자를 세어 정자막 integrity를 평가하였다. 개체 당 2개의 샘플을 만들어 정자막 integrity를 반복 평가하였다.

침체막 변화 측정

Chlorotetracycline (CTC) 염색법은 침체막 변화를 알아보는 방법으로 먼저 정액을 400 g에서 2분간 원심분리하고 동결보호제를 제거한 후 PBS로 세척하였다. 세척한 정액은 CTC 용액(5 mM cystein, 130 mM NaCl, 750 µM CTC, in 20 mM Tris buffer; pH 7.8) 500 µl와 섞어 20초간 호일로 감싸 암실 상온에서 배양하였다. CTC 반응을 고정하기 위해 10 µl의 12.5% glutaraldehyde를 넣어 4°C에 보관하였다. 염색 후 24시간 내에 평가를 실시하였으며, Fraser 등(10)의 분류를 이용하여 정자 침체막 변화의 판독 기준으로 이용하였다.

통계 분석

제주흑우 정자동결에서 항산화제의 첨가 여부가 정자의 운동성, 생사율, 정자막 및 침체막의 변화를 통계분석프로그램 (SPSS version 18.0)의 ANOVA를 이용하여 분석하였다.

결 과

동결 용해 후 정자의 생존율과 운동성

5% ethylene glycol과 taurine, hypotaurine 그리고 trehalose를 각각 20 mM을 Tris egg-yolk extender에 첨가하여 제주흑우 정액의 동결 용해 후 이들이 정자의 운동성과 생존율은 Table 1에 나타난 바와 같았다. Taurine과 hypotaurine을 처리한 실험군은 대조군보다 비교적 높은 운동성을 보였으나, 이들 사이의 유의적 차이는 없었다. 그러나 생존율은

Table 1. Effect of 5% ethylene glycol, taurine, hypotaurine and trehalose with extenders on motility and viability of frozen-thawed sperm

Tris egg-yolk extenders	Motility (%)	Viability (%)
EG (control)	67.0 ± 8.4	63.4 ± 5.6 ^a
EG + Taurine (20 mM)	68.0 ± 5.7	68.1 ± 4.4 ^b
EG + Hypotaurine (20 mM)	69.0 ± 8.2	69.2 ± 6.7 ^b
EG + Trehalose (20 mM)	64.0 ± 4.2	68.0 ± 4.4 ^b

^{a,b}Values with different superscripts within the column are significantly different ($p < 0.05$). Data are shown as mean ± SD.

Table 2. Changes of sperm membrane integrity for frozen-thawed sperm with extenders added 5% ethylene glycol, taurine, hypotaurine and trehalose

Tris Egg-yolk Extenders	Swollen sperm(%)
EG (control)	53.7 ± 9.7 ^a
EG + Taurine (20 mM)	64.1 ± 5.4 ^b
EG + Hypotaurine (20 mM)	61.5 ± 3.7 ^b
EG + Trehalose (20 mM)	59.0 ± 4.0 ^c

^{a,b,c}Values with different superscripts within the column are significantly different ($p < 0.05$). Data are shown as mean ± SD.

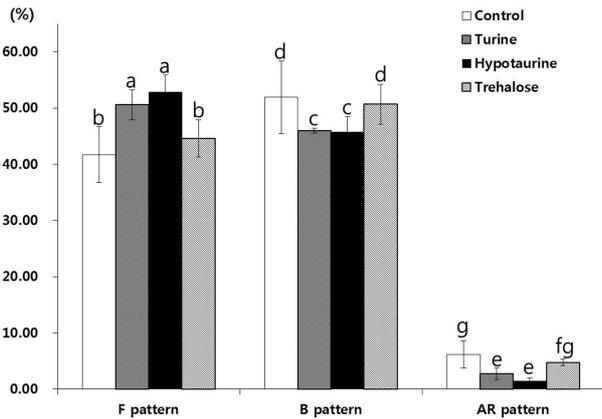


Fig 1. Acrosomal membrane integrity of sperm frozen-thawed in extenders supplemented with ethylene glycol, taurine, hypotaurine and trehalose.

^{a,b}F pattern values were significantly different ($p < 0.05$). ^{c,d}B pattern values were significantly different ($p < 0.05$). ^{e,fg}AR pattern values were significantly different ($p < 0.05$).

taurine, hypotaurine, trehalose를 처리한 실험군이 대조군에 비해 유의적으로 높은 생존율을 보였다($p < 0.05$).

동결 용해 후 정자막 integrity의 변화

제주흑우의 동결 용해후 HOST를 통해 정자 막 integrity을 검사한 결과는 Table 2와 같았다. 본 연구의 결과 taurine, hypotaurine, trehalose를 처리한 실험군은 전부 대조군에 비하여 유의적으로 보다 높은 정자막 integrity을 나타냈다($p < 0.05$).

동결 용해 후 정자 첨체막의 변화

Fig 1은 5% ethylene glycol과 taurine, hypotaurine 그리고 trehalose가 제주흑우의 동결 용해 정자에 있어 첨체막 변화에 미치는 영향에 대한 결과이다.

F pattern 비율의 변화에 있어 taurine 과 hypotaurine 처리 시 모든 실험군에 있어서 유의적으로 높은 결과를 나타냈다($p < 0.05$). B pattern의 비율 변화 역시 taurine, hypotaurine 실험군에서 유의적으로 낮은 수준의 결과를 나타냈다($p < 0.05$). 이에 비해 AR pattern의 비율 변화는 hypotaurine 처리가 모든 실험군 가운데 유의적으로 가장 낮은 비율을 보였으며($p < 0.05$), taurine 실험군 또한 hypotaurine 실험군 다음으로 낮은 수준을 나타내며 대조군과 유의적 차이를 보였다($p < 0.05$). 그러나 trehalose 실험군은 대조군에 비하여 다소 낮은 수준을 나타냈으나 유의적 차이를 나타내지 않았다.

고 찰

침투성 동결보호제인 glycerol은 소와 개 등 다양한 포유동물의 정자 동결과정에서 많이 이용되고 있다(18,27). Glycerol은 동결 용해 과정에서 세포의 손상을 경감하는 역할을 하지만 정자 동결에 있어 사용 농도와 화학적 독성, 삼투압 스트레스와 관련하여 glycerol이 정자의 세포막과 대사 작용에 영향을 주어 정자의 운동성 및 수정능력을 감소시킨

다(14). 최적의 동결보호제는 낮은 온도에서 세포 내로 빠르게 침투하면서도 독성이 되도록 낮아야 한다. 동결보호제에 따라 세포내 침투 능력이 다른데, ethylene glycol은 사람(11)과 소(13)의 정자에서 세포막의 침투 속도가 glycerol 보다 빠르고 효과적이라고 알려져 있다. 또한 ethylene glycol은 낮은 수리전도도를 가지고 있어 정자가 냉각 및 동결 되는 동안 삼투압 스트레스를 감소시킬 수 있다고 보고되었다(12). 더불어 최 등(2)은 제주흑우 정자의 동결정액 제조에 있어 동결보호제로서 ethylene glycol을 이용하여 glycerol에 비하여 좋은 동결효과를 얻어내었다.

동결 용해 과정은 활성산소를 증가시킨다. 동결과정 동안 발생하는 활성산소는 정자의 동결 용해 후 기능을 저하시켜 정자의 운동성, 생존성, 정자막 integrity 및 수정능력에 영향을 미친다(5,6). Hypotaurine과 taurine은 정자의 형질막세포에 항산화 작용을 하여 정자의 과산화지질화를 억제함으로써 정자세포를 보호한다. 그리고 trehalose는 비환원성 이당류이며, 세포막의 인지질 내의 상호작용으로 인하여 고장액의 배출과 빙상결정화로 세포손상 감소와 삼투압 조절로 세포를 보호한다(30). 그러나 본 실험의 결과 정자의 운동성에 있어 대조군을 포함한 모든 실험군 사이의 차이는 나타나지 않았으며, taurine, hypotaurine의 실험군이 대조군과 trehalose의 실험군에 비하여 유의적으로 보다 높은 생존율을 나타냈다($p < 0.05$). 이러한 결과는 ethylene glycol을 동결보호제로 사용하여 동결된 정액에 있어 항산화제는 동결용해 후 정자의 운동성 보다는 생존율에 영향을 미치는 것으로 보인다.

정자막의 integrity는 정자의 대사활동뿐만 아니라 수정 및 정자의 수정능력 획득, 침체반응과도 밀접한 관계가 있어 정자의 수정능력을 평가하는데 유용한 지표로 사용된다. 따라서 정자막 integrity 검사는 직접적으로 인공수정이나 체외수정 검사 보다 시간과 비용이 절감되며 보다 쉽게 수정능력을 예측할 수 있다. 특히 사람에서는 수정능력 또는 가임능력을 평가하는데 있어 정자막 integrity 검사 시 정자를 저장액에 넣어 정자 미부가 팽창하는 패턴을 평가하여 정자의 수정능력을 예측하고 있다(1). 양 정자의 동결 용해에 있어 Aisen 등(4)은 trehalose가 정자막의 손상을 비교적 감소시킨다고 하였으며, Shiva 등(28)은 buffalo 정액의 동결 시 taurine의 첨가가 정자막 integrity를 증가시켰다고 하였다. 본 연구에서 항산화제 첨가군 모두가 대조군보다 swollen sperm 비율이 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). 이러한 결과는 taurine, hypotaurine, trehalose와 같은 항산화제가 동결과정에 발생하는 활성산소로부터 정자를 안정적으로 보호하는 것으로 본다.

동결 용해 후 정자의 정상 평가에 있어 정자의 운동성, 정자의 생존율 및 정자막 integrity 뿐만 아니라 수정능력 획득 또는 침체반응 또한 매우 중요한 부분이다. Kommisrud 등(17)과 Oh 등(22)은 정자의 수정능력 획득 및 침체반응이 정자의 수정능력과 매우 밀접한 관련이 있음을 시사하였고, CTC 염색으로 번식 불량 돼지를 예측하는데 활용하였다. 일반적으로 사정 직후에는 수정능을 획득을 하지 않은 F pattern의 정자가 많아야 하며, 수정 직전에는 침체반응이 일어난 AR pattern 보다는 수정능이 획득된 B pattern의 정자가 많아야 한다(10). Suzuki 등(31)은 인공수정 시 정자의

수정능력을 B pattern의 정자비율로 확인할 수 있다고 보고하였다. 수정능력 획득이 완료된 정자는 투명대에 의하여 침체반응이 일어나지만(32), 투명대와 결합하기 이전에 침체반응이 이미 일어난 정자는 투명대와 결합하는데 필요한 성분을 잃어버리게 되므로 정상적으로 수정에 참여할 수 없게 된다(3). 그리고 동결과정 중에 세포막은 단백질의 파괴로 인질질이 gel 화가 일어나게 되며, 이로 인해 calcium ion channel의 기능적 손상이 세포내 칼슘의 증가로 수정능력 획득과 침체반응을 일으킨다. 따라서 동결 용해 후 capacitation-like change 과정을 거친 capacitation-like state 정자의 비율이 사출정자 보다도 약 25% 정도 높게 나타났다(24). 이처럼 동결로 인한 capacitation-like state 정자의 증가는 정자의 수정능력을 감소시킴을 알 수 있다(23). 본 연구의 결과 F pattern과 B pattern의 비율에 있어 taurine, hypotaurine 모두 대조군에 비하여 높은 수준을 나타냈지만 trehalose 실험군은 대조군과의 유의적 차이가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 동결과정 동안 taurine과 hypotaurine이 활성산소로부터 정자를 성공적으로 보호하여 F pattern의 감소를 막아내고, capacitation-like state 정자의 비율을 최소화하는 것으로 볼 수 있다. 뿐만 아니라, 동결 용해 후 초기 침체반응으로 인해 실질적 수정이 불가능한 AR pattern 비율 역시 taurine과 hypotaurine 실험군에서 유의적으로 비교적 낮게 나타났으며 ($p < 0.05$), trehalose 또한 대조군에 비하여 다소 낮은 수준의 AR pattern을 나타내었다. 이 또한 이들 항산화제가 동결 용해 과정동안 생기는 정자의 손상을 최소화 시킬 수 있는 것으로 판단된다.

이러한 결과들을 종합하면 항산화제가 정자의 동결 과정 중 발생하는 활성산소의 손상으로부터 정자를 보호하여 동결 용해 후 정자의 생존성, 운동성, 정자막 integrity, 침체막 integrity를 향상시키고, 결론적으로 정자의 수정능력을 보호한다는 많은 보고들과 일치한다. 제주흑우의 동결 정액 제조에 있어 ethylene glycol과 항산화제인 taurine, hypotaurine, trehalose를 첨가함으로써 동결 용해 과정에서 발생하는 활성산소로부터 정자를 보호하고 동결 용해 후 정자의 수정능력을 향상시킬 수 있음을 보여주었다.

결 론

본 연구에서는 제주흑우의 동결정액 성상을 개선하기 위하여 ethylene glycol과 항산화제로서 taurine, hypotaurine, trehalose의 조합이 동결 용해 후 정자의 운동성, 생존율, 정자막 integrity, 침체막 integrity에 미치는 영향에 대하여 연구하고자 수행하였다. 제주흑우의 동결정액 제조 시 동결보호제로서 5% ethylene glycol을 포함한 희석제를 사용하여 각각 20 mM의 taurine, hypotaurin, trehalose를 첨가하여 실험에 공시한 결과 동결 용해한 후 정자의 운동성은 실험군 간의 유의적 차이는 없었다. 정자의 생존성에 있어 taurine, hypotaurine, trehalose의 첨가가 $68.10\% \pm 4.39$, $69.20\% \pm 6.65$, $67.95\% \pm 4.44$ 로서 대조군 $63.35\% \pm 5.58$ 에 비하여 유의적으로 높은 생존성을 나타냈다($p < 0.05$). 정자막 integrity에 있어서는 taurine, hypotaurine, trehalose 모두 $64.10\% \pm 5.42$, $61.50\% \pm 3.66$, $59.00\% \pm 3.95$ 로 swollen sperm의 비

율이 대조군 $53.65\% \pm 9.72$ 에 비하여 유의적으로 높았다($p < 0.05$). 정자의 침체막 양상 변화는 동결 용해 후 taurine과 hypotaurine의 첨가군이 대조군에 비하여 F pattern이 유의적으로 높았으며($p < 0.05$), taurine과 hypotaurine 첨가군은 대조군에 비해 B pattern이 유의적으로 낮았다($p < 0.05$). 특히 AR pattern은 taurine과 hypotaurine의 첨가군이 대조군에 비하여 유의적으로 낮았으며($p < 0.05$), trehalose 역시 대조군보다 AR pattern 수준이 낮은 비율을 보였으나 유의적 차이는 없었다. 이와 같은 연구의 결과는 제주흑우의 동결정액 제조에 있어 ethylene glycol과 항산화제로서 taurine, hypotaurine, trehalose의 조합이 정자를 동결 용해 한 후 운동성, 생존율, 정자막 integrity, 침체막 integrity를 개선시킴을 알 수 있으며, 제주흑우 정자의 동결정액 생산에 본 연구의 결과를 활용함으로써 동결 용해 후 정자의 수정능력을 향상시킬 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2016학년도 제주대학교 교원성과지원사업에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. 최두석, 문신용, 장윤석. 남성 불임검사 중 정자 형태와 정자 운동성 검사 및 저장성용액 내 정자 팽창검사의 상관관계 및 가입능력 예측에 관한 연구. 대한산부인과학회지 1993; 36: 2497-2509.
2. 최선호, 고민희, 강태영, 조상래, 박용상, 오신애. 제주흑우 동결정액 제조시 ethylene Glycol의 농도와 예비 동결 조건이 정자의 생존율 및 침체양상에 미치는 영향. 한국동물번식학회지. 2011; 35: 377-383.
3. Adeoya-Osiguwa SA, raser LR. Environmental estrogens and sperm function. Hum Reprod 2004; 19: 216-217.
4. Aisen EG, Alvarez HL, Venturino A, Garde JJ. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. Theriogenology 2000; 53: 1053-1061.
5. Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. Biol Reprod 1998; 59: 1037-1046.
6. Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, agnon C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. Mol Reprod Dev 2000; 55: 282-288.
7. Bucak MN, Tuncer PB, Sariözkan S, Ulutaş PA, Cayan K, Başpınar N, Ozkalp B. Effects of hypotaurine, cysteamine and aminoacids solution on post-thaw microscopic and oxidative stress parameters of Angora goat semen. Res Vet Sci 2009; 87: 468-472.
8. Buhr MM, Fiser P, Bailey JL, Curtis EF. Cryopreservation in different concentration of glycerol alters boar sperm and their membranes. J Androl 2001; 22: 961-969.
9. Chenier T, Merkies K, Leibo S, Plante C, Johnson W. Evaluation of cryoprotective agents for use in the cryopreservation of equine spermatozoa. Proc. 44th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Baltimore, Maryland, USA, 1998: 5-6.
10. Fraser LR, Abeydeera LR, Niwa K. Ca²⁺-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosome

- alexocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol Reprod Dev* 1995; 40: 233-241.
11. Gilmore JA, Liu J, Woods EJ, Peter AT, Critser JK. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Hum Reprod* 2000; 15: 335-343.
 12. Gilmore JA, McGann LE, Liu J, Gao DY, Peter AT, Kleinhans FW, Critser JK. Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1995; 53: 985-995.
 13. Guthrie HD, Liu J, Critser JK. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 2002; 67: 1811-1816.
 14. Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 1990; 11: 73-88.
 15. Hu JH, Li QW, Jiang ZL, Yang H, Zhang SS, Zhao HW. The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality. *Reprod Dom Anim* 2009; 44: 571-575.
 16. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Prez-Pelaez M, Carbo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 1984; 70: 219-228.
 17. Kommisrud E, Paulenz H, Sehested E, Greule IS. Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for 5 days. *Acta Vet Scand* 2002; 43: 49-55.
 18. Li G, Saenz J, Godke RA, Devireddy RV. Effect of GLY and cholesterol-loaded cyclodextrin on freezing-induced water loss in bovine spermatozoa. *Reproduction* 2006; 131: 875-886.
 19. Mantovani R, Rota A, Falomo ME, Bailoni L, Vincenti L. Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa: sperm quality assessment with standard analyses and with the hypoosmotic swelling test. *Reprod Nutr Dev* 2002; 42: 217-226.
 20. Martins-Bessa A, Rocha A, Mayenco-Aguirre A. Effects of taurine and hypotaurine supplementation and ionophore concentrations on post-thaw acrosome reaction of dog spermatozoa. *Theriogenology* 2009; 71: 248-253.
 21. McGonagle LS, Goldstein M, Feldschuh J, Foote RH. The influence of cryoprotective media and processing procedures on motility and migration of frozen-thawed human sperm. *Asian J Androl* 2002; 4: 137-141.
 22. Oh SA, Park YJ, You YA, Mohamed EA, Pang MG. Capacitation status of stored boar spermatozoa is related litter size of sows. *Anim Reprod Sci* 2010; 121: 131-138.
 23. Parker NA, Bailey TL, Bowen JM, Ley WB, Purswell BJ, Dascanio JJ. In vitro and xenogenous capacitation-like changes of fresh, cooled, and cryopreserved stallion sperm as assessed by a chlortetracycline stain. *J Androl* 2000; 21: 45-52.
 24. Pena AI, Lugilde LL, Barrio M, Herradon PG, Quintela LA. Effects of Equex from different sources on post-thaw survival, longevity and intracellular Ca²⁺ concentration of dog spermatozoa. *Theriogenology* 2003; 59: 1725-1739.
 25. Pereira SM, Rigon RM, Mezzalana A, Cecim M. Ethylene glycol on canine semen cryopreservation. *Ciencia Rural* 2002; 32: 649-655.
 26. Sariozkan S, Bucak MN, Tuncer PB, Ulutas PA, Bilgen A. The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. *Cryobiology* 2009; 58: 134-138.
 27. Silva AR, de Cassia Soares Cardoso R, Uchoa DC, MacHado da Silva LD. Effect of Tris-buffer, egg yolk and GLY on canine semen freezing. *Vet J* 2002; 164: 244-246.
 28. Shiva Shankar Reddy N, Jagan Mohanarao G, Atreja SK. Effects of adding taurine and trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm quality following cryopreservation. *Anim Reprod Sci* 2010; 119: 183-190.
 29. Squires EL, Keith SL, Graham JK. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* 2004; 62: 1056-1065.
 30. Storey BT. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 203-213.
 31. Suzuki K, Geshi M, Yamauchi N, Nagai T. Functional changes and motility characteristics of Japanese Black Bull spermatozoa separated by Percoll. *Anim Reprod Sci* 2003; 77: 157-172.
 32. Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers BJ. The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1976; 15: 471-476.