



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

제주흑우 동결정액 제조에 있어
Ethylene glycol과 항산화제의 조합이
동결 용해 후 정자의 성상에 미치는 영향

濟州大學校 大學院

獸醫學科

高 旻 熹

2014年 12月

제주흑우 동결정액 제조에 있어
Ethylene glycol과 항산화제의 조합이
동결 용해 후 정자의 성상에 미치는 영향

指導教授 姜 泰 榮

高 旻 熹

이 論文을 獸醫學 碩士學位 論文으로 提出함

2014年 12月

高旻熹의 獸醫學 碩士論文을 認准함

審査委員長 _____ (印)

委 員 _____ (印)

委 員 _____ (印)

濟州大學校 大學院

2014年 12月

제주흑우 동결정액 제조에 있어 Ethylene glycol과 항산화제의 조합이 동결 용해 후 정자의 성상에 미치는 영향

지도교수 : 강 태 영

고 민 희

제주대학교 수의학과

초 록

본 연구에서는 제주흑우의 동결정액 성상을 개선하기 위하여 ethylene glycol과 항산화제로서 taurine, hypotaurine, trehalose의 조합이 동결 용해 후 정자의 운동성, 생존율, 정자막 integrity, 침체막 integrity 및 정자의 난자 내 침투 능력에 미치는 영향에 대하여 연구하고자 수행하였다. 제주흑우의 동결정액 제조 시 동결보호제로서 5% ethylene glycol을 포함한 희석제를 사용하여 각각 20mM의 taurine, hypotaurine, trehalose를 첨가하여 실험에 공시한 결과 동결 용해한 후 정자의 운동성은 실험군 간의 유의적 차이는 없었다. 정자의 생존성에 있어 taurine, hypotaurine, trehalose의 첨가가 68.10% ± 4.39, 69.20% ± 6.65, 67.95% ± 4.44로서 대조군 63.35% ± 5.58에 비하여 유의적으로 높은 생존성을 나타냈다 (p<0.05). 정자막 integrity에 있어서는 taurine, hypotaurine, trehalose 모두 64.10% ± 5.42, 61.50% ± 3.66, 59.00% ± 3.95로 swelled sperm의 비율이 대조군 53.65% ± 9.72에 비하여 유의적으로 높았다(p<0.05). 정자의 침체막 양상 변화는 동결 용해 후 taurine과 hypotaurine의 첨가군이 대조군에 비하여 F pattern이 유

의적으로 높았으며($p < 0.05$), taurine과 hypotaurine 첨가군은 대조군에 비해 B pattern이은 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. 정자의 난자 내 침투능력에 있어 응성전핵 형성율은 taurine, hypotaurine, trehalose의 첨가 (1.60 ± 0.55 , 1.80 ± 0.45 , 1.20 ± 0.45)가 대조군 (0.60 ± 0.55) 보다 유의적으로 높게 나타났으며 SFI 점수 역시 taurine, hypotaurine, trehalose의 첨가 (0.70 ± 0.17 , 0.80 ± 0.14 , 0.58 ± 0.04)가 대조군 (0.40 ± 0.10)에 비하여 유의적으로 높은 결과를 보였다.

이와 같은 연구의 결과는 제주흑우의 동결정액 제조에 있어 ethylene glycol과 향산화제로서 taurine, hypotaurine, trehalose의 조합이 정자를 동결 용해 후 운동성, 생존율, 정자막 integrity, 침체막 integrity 및 정자의 난자 내 침투능력을 개선시킴을 알 수 있으며, 제주흑우 정자의 동결정액 생산에 본 연구의 결과를 활용함으로써 동결 용해 후 정자의 수정능력을 향상시킬 수 있을 것으로 판단된다.

중심어; Ethylene glycol, 향산화제, 동결 정액, 제주흑우

목 차

I. 서	론	-----	1
II. 재료 및 방법		-----	3
III. 결	과	-----	8
IV. 고	찰	-----	13
V. 참 고 문 헌		-----	17

I. 서론

Glycerol은 오랫동안 소의 동결정액 제조 시 동결보호제로서 사용되어왔다. 동결보호제로서 glycerol을 사용한 이후 (Polge 등, 1949), 포유류를 포함한 다양한 세포의 동해방지제로서도 glycerol을 사용하게 되었다 (McGonagle 등, 2002). 그러나 glycerol은 동결된 세포의 세포막 대사 작용에 삼투압 stress와 toxic한 영향을 주는데 (Hammerstedt 등, 1990), 이러한 영향은 정자 세포막의 탈락 (Hammerstedt과 Graham, 1992; Buhr 등 2001), 정자의 활력과 수정 능력을 감소시킨다(Jeyendran 등, 1984). 이에 따라 glycerol을 대신할 수 있는 다양한 세포막 침윤성 동결보호제의 검사가 이루어져 왔다. 그 중 ethylene glycol은 독성이 적으며 glycerol과 비교하였을 때 비슷한 수준의 동결보존 효과를 나타내고, 동결정액 제조 시 동결보호제로 사용하였을 때 용해 후 정자의 운동성이나 membrane integrity를 개선하는 효과가 있다 (Chenier 등, 1998; Vidament 등, 2002; Squires 등, 2004; Alvarenga 등, 2005). 또한 ethylene glycol은 사람 (Gilmore 등, 2000)과 소 (Guthrie 등, 2002)의 정자에서 세포막의 침투 속도가 glycerol보다 빠르고 효과적인 동결보호제로 알려져 있다. Gilmore 등 (1995)은 ethylene glycol이 낮은 수리전도도를 가지기 때문에 정자 세포가 냉각, 동결되는 동안 삼투압 stress를 감소시킬 수 있다고 하였다. 정자의 생존율과 활력에 있어 ethylene glycol은 glycerol에 비하여 해로운 영향이 적기 때문에 (Ball 등, 2001), 정자의 침체 보존에 있어 보다 효과적인 보호능력을 제공할 수 있다. 현재 ethylene glycol은 glycerol을 대체하는 동결보호제로 개 (Pereira 등, 2002)와 말 (Mantovani 등, 2002)의 동결정액 제조에 사용되고 있다. 특히 ethylene glycol을 이용하여 제주흑우의 정액을 동결하였을 때 glycerol에 비교하여 좋은 결과를 나타내는 것이 최 등 (2011)에 의해 보고되었다.

정액을 동결하였다 용해하는 과정은 활성산소 (reactive oxygen species; ROS)의 발생을 증가시키며, 동결 과정동안 발생한 ROS는 동결 용해 후 정자의 운동성, 생존성, 정자막 integrity, 수정능력 및 정자의 기능을 감소시킨다 (Aitken 등, 1998; Bilodeau 등, 2000). 정자의 세포막은 농축 불포화지방산을 함유하고 있으

며, O_2^- 또는 OH^- 에 의하여 과산화지방으로 변할 수 있다 (Alvarez와 Storey, 1989; Storey, 1997). 정자의 동결과정에서 발생하는 O_2^- 와 OH^- 는 활성산소 (reactive oxygen species, ROS)로서, 정자막을 과산화지방화 시켜 손상을 주게 된다. ROS에 의해 손상된 정자는 용해 후 운동성 및 생존율이 감소하게 된다 (Maxwell과 Watson, 1996). 최근 소 (Uysal 등, 2007; Sariozkan 등, 2009), 돼지 (Funahashi와 Sano, 2005; Hu 등, 2009), 양 (Bucak 등, 2007), 개 (Martins-Bessa 등, 2009; Michael 등, 2007)의 동결정액 제조에 있어 taurine, hypotaurine, trehalose와 같은 항산화물질을 동결보호제와 함께 첨가하여 동결 용해 후 정자의 성상이 개선되었다고 보고하였다.

따라서, 본 연구에서는 제주흑우의 동결정액 성상을 개선하기 위하여 ethylene glycol과 항산화제로서 taurine, hypotaurine, trehalose의 조합이 정자 동결 용해 후 정자의 생존율, 운동성, 정자막 integrity, 첨체막 integrity 및 정자의 난자 내 침투 능력에 대하여 조사하고자 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 제주흑우 정액 채취

정액을 채취하기 위해 3세 이상의 제주흑우 수컷 6두를 선별하여 종모사에서 별도로 사육하였으며, 월 평균 4~5회 정액을 채취하였다. 정액 채취는 제주흑우 암컷을 안정적으로 고정시키고 제주흑우 수컷을 데리고 흥분을 유도하여 승가를 하면 인공질(Model 66000-D, Nasco, FHK, Japan)을 이용하여 채취하였다. 인공질은 두꺼운 고무로 이루어진 외피에 원통형 얇은 고무재질의 내피를 넣어 고정시킨 후 고깔형 정액 채취 비닐을 장착하였다. 인공질을 조립한 후 내부에 40℃의 온수를 부어 성기가 닿는 인공질 부위의 온도가 36~38℃를 유지하도록 하였으며, 비닐의 끝 부분에 15 ml 튜브를 장착하여 사출된 정액이 인공질에서 튜브로 흘러 들어가게 하였다. 이렇게 얻어진 정액은 온장고에 넣어 온도의 변화가 일어나지 않도록 하여 실험실로 이동하였다.

2. 정액 동결

채취한 정액은 정액의 양을 확인하고 SpermaCue (Fotometro SpermaCue,, Minitüb, Germany)를 이용하여 정자의 농도를 측정한 후 미리 제조된 희석액을 이용하여 점진적으로 희석하였다.

Table 1. Components of extender used for freezing of Jeju Black Bull semen

Component	Concentration
Tris	121.1 mM
Citric acid	294.1 mM
Fructose	180.2 mM
Ethylene glycol	5%
Egg yolk	10%
Streptomycin sulfate	10 mg/ml

Table 1의 조성으로 희석제를 만들었으며, 5%의 ethylene glycol이 포함된 희석제를 대조군으로 사용하였다. 5%의 ethylene glycol이 포함된 희석제에 taurine, hypotaurine, trehalose을 각각 20 mM 씩 첨가하여 실험군으로 사용하였다. 실험실로 가져온 사출 정액을 Tris-Egg yolk extender와 같은 비율로 희석하여 4°C 까지 두 시간 동안에 걸쳐 온도를 낮추었다. 동결보호제와 항산화제가 첨가된 희석액으로 최종 농도 $50 \times 10^6/\text{ml}$ 으로 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.

3. 정자의 운동성 평가

정자의 운동성 평가는 MicroLux 현미경 (X 70, Olympus, Japan)을 이용하였다. 혈구계산판에 커버 글라스를 덮고 5 μl 의 정액을 주입 한 후 100배율에서 정자의 운동성을 관찰하였다. 혈구계산판 두 개의 구획 내 정자 100개를 여러 번 세

어 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.

4. 정자의 생존율

정자의 생존율 평가는 0.5% Eosin-Y 염색을 사용하였다. 10 μ l의 정액과 동량의 염색액을 섞어 슬라이드 글라스에 도말한 다음 커버를 덮고 MicroLux 현미경 (X 70, 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.

5. 정자막 integrity 평가

정자막 integrity는 Jeyendran 등 (1984)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 μ l를 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.

6. 침체막 변화 측정

Chlortetracyclin (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 μ M CTC, in 20 mM Tris buffer; pH 7.8) 500 μ l와 섞어 20초간 호일로 감싸 암실 상온에서 배양하였다. CTC 반응을 고정하기 위해 10 μ l의 12.5% glutaraldehyde를 넣어 4°C에

보관하였다. 염색 후 24시간 내에 평가를 실시하였으며, Fraser (1995)의 분류를 이용하여 정자 침체막 변화의 관독 기준으로 이용하였다.

Table 2. Definition of sperm membrane pattern by CTC staining by Fraser (1995)

Pattern	Description
F	Full fluorescence characteristic of ejaculated spermatozoa: Characteristic of uncapacitated sperm
B	Banded-indicative on capacitated spermatozoa and fluorescence only in the post acrosomal region: Characteristic of capacitated sperm
AR	Sperm showing a mottled green fluorescence over head or no fluorescence on the head: Characteristic of typical acrosome related spermatozoa

7. 정자의 난자 내 침투 능력 평가

정자의 난자 내 침투 능력 평가는 햄스터 난자를 이용하였다. 먼저 난자 배란 유도를 위하여 약 15주령의 햄스터 복강에 PMSG 30 IU와 48시간 후 hCG 30 IU를 주사하였다. 난자회수는 hCG 주사 15시간 후 개복하여 난관으로부터 회수하였다. 난자의 난구세포 제거는 0.1% hyaluronidase를 이용하였고, 투명대는 trypsin으로 제거하였다.

동결된 정자를 용해하고 400 g에서 2회 원심분리하여 동결보호제를 제거한 후, heparin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 포함된 TALP 배양액에서 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 10분 간 정자의 수정능 획득을 유도하였다. 수정능이 획득된 정자를 2×10^5 live sperm/ml 농도로 조절하여 햄스터 난자와 4시간 배양하였다. 정자의 침투능을 알아보기 위해 배양 후 난자를 PBS로 2-3회 세척하고 슬라이드에 고정하기 위하여 methanol : acetic acid 용액을 사용하였다. 슬라이드에 고정된 난자는 lacmoid (1%)로 염색하고 현미경으로 난자내 정자의 변화를 관찰하였다. 난자내 정자의 변화는 Oh 등 (2010)의 방법으로 평가하였다.

8. 통계 분석

제주흑우 정자동결에서 향산화제의 첨가 여부가 정자의 운동성, 생사율, 정자막 및 첨체막의 변화와 난자 침투능의 유의성을 통계분석프로그램 (SPSS version 18.0)의 ANOVA를 이용하여 분석하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 동결 용해 후 정자의 생존율과 운동성

Ethylene glycol과 taurine, hypotaurine 그리고 trehalose를 첨가하여 제주흑우 정액의 동결 용해 후 이들이 정자의 운동성과 생존율은 Table 3에 나타난 바와 같다.

Taurine과 hypotaurine을 처리한 실험군은 대조군보다 비교적 높은 운동성을 보였으나, 이들 사이의 유의적 차이는 없었다. 그러나 생존율은 taurine, hypotaurine, trehalose를 처리한 실험군이 대조군에 비해 유의적으로 높은 생존율을 보였다 ($p<0.05$).

Table 3. Effect of taurine, hypotaurine and trehalose with ethylene glycol on motility and viability of frozen-thawed sperm

Treatment	Motility (%)	Viability (%)
Control	67.00 ± 8.37	63.35 ± 5.58 ^b
Taurine	68.00 ± 5.70	68.10 ± 4.39 ^a
Hypotaurine	69.00 ± 8.22	69.20 ± 6.65 ^a
Trehalose	64.00 ± 4.18	67.95 ± 4.44 ^a

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

2. 동결 용해 후 정자막 integrity의 변화

제주흑우의 동결 용해후 HOST를 통해 정자 막 integrity을 검사한 결과는 Table 4와 같다.

본 연구의 결과 taurine, hypotaurine, trehalose를 처리한 실험구는 전부 대조구에 비하여 유의적으로 보다 높은 정자막 integrity을 나타냈다 ($p < 0.05$).

Table 4. Changes of sperm membrane integrity for frozen-thawed sperm with extenders added taurine, hypotaurine and trehalose

Treatment	Swelled sperm(%)
Control	53.65 ± 9.72 ^c
Taurine	64.10 ± 5.42 ^a
Hypotaurine	61.50 ± 3.66 ^a
Trehalose	59.00 ± 3.95 ^b

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

3. 동결 용해 후 정자 침체막의 변화

Figure 1은 ethylene glycol과 taurine, hypotaurine 그리고 trehalose가 제주흑우의 동결 용해 정자에 있어 침체막 변화에 미치는 영향에 대한 결과이다.

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

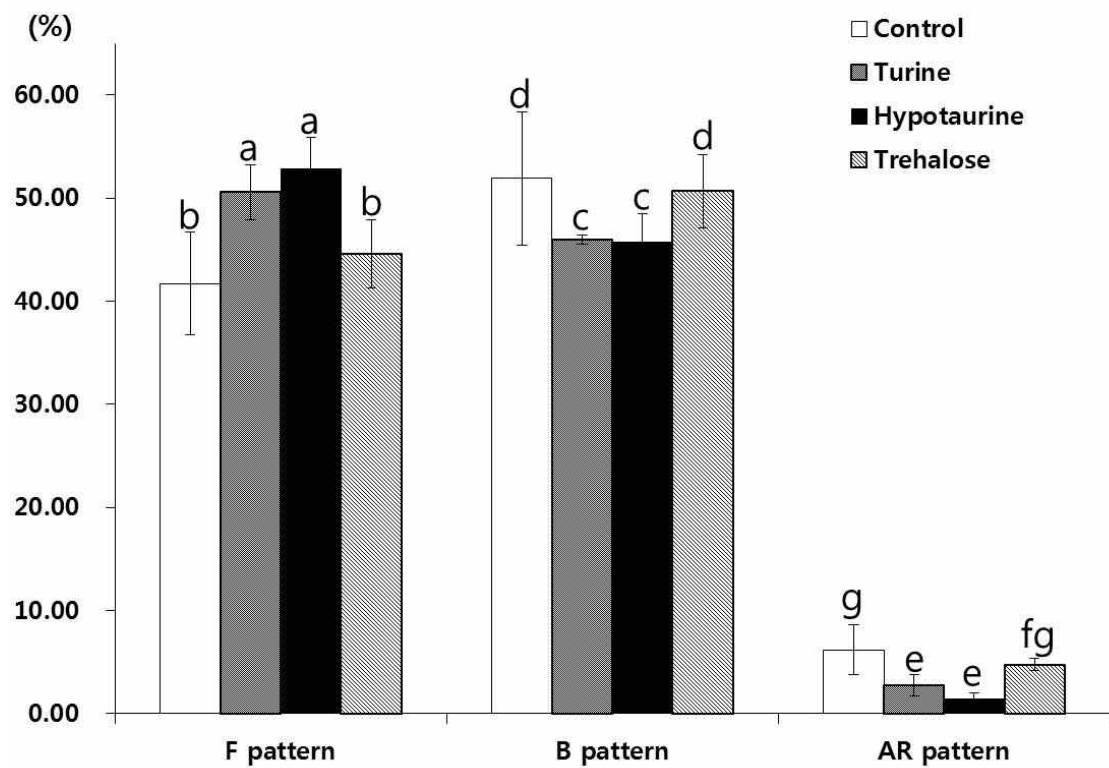


Figure 1. Changes of acrosomal membrane integrity for frozen-thawed sperm with extenders added taurine, hypotaurine and trehalose.

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

4. 동결 용해 후 정자의 난자 내 침투 능력

제주흑우 정액의 동결에 있어 taurine, hypotaurine 그리고 trehalose의 처리가 동결 용해 후 정자의 난자 내 침투능력은 Table 5에 나타난 바와 같다. 항산화제 처리군 중 hypotaurine과 taurine 첨가에서 응성전핵 형성율, decondensed sperm, enlarged sperm 그리고 SFI index가 대조군에 비하여 난자 내 침투능이 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). Trehalose 첨가군은 대조군에 비해 응성전핵 형성율, SFI index 그리고 enlarged sperm의 비율은 유의적으로 높게 나타났으나($p < 0.05$), decondensed sperm의 비율은 대조군과 유의적 차이는 없었다.

Table 5. Evaluation of sperm penetration ability for frozen-thawed sperm with extenders added taurine, hypotaurine and trehalose

Treatment	PN	DC	EN	SFI
Control	0.60 ± 0.55 ^b	1.40 ± 0.55 ^c	1.40 ± 0.55 ^b	0.40 ± 0.10 ^c
Taurine	1.60 ± 0.55 ^a	2.00 ± 0.71 ^b	1.80 ± 0.45 ^a	0.70 ± 0.17 ^{ab}
Hypotaurine	1.80 ± 0.45 ^a	2.60 ± 0.55 ^a	2.20 ± 0.45 ^a	0.80 ± 0.14 ^a
Trehalose	1.20 ± 0.45 ^a	1.80 ± 0.45 ^{bc}	1.60 ± 0.55 ^a	0.58 ± 0.04 ^b

PN: Pronucleus , DC: Decondensed sperm, EN: Enlarged sperm and SFI: Sperm fertility index. SFI= (PN × 2 + DC + EN)/No. of oocytes.

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

IV. 고 찰

침투성 동결보호제인 glycerol은 소와 개 등 다양한 포유동물의 정자 동결과정에서 많이 이용되고 있다 (Baren 등, 2004; Li 등, 2006; Silva 등, 2002). Glycerol은 동결 용해 과정에서 세포의 손상을 경감하는 역할을 하지만 정자 동결에 있어 사용 농도와 화학적 독성, 삼투압 스트레스와 관련하여 glycerol이 정자의 세포막과 대사작용에 영향을 주어 정자의 운동성 및 수정능력을 감소시킨다고 한다 (Hammerstedt 등, 1990). 고농도의 glycerol은 세포의 사멸을 일으키며(Wundrich 등, 2006), 세포막을 통과하여 세포내로 침투할 때 glycerol의 속도가 물의 속도보다 느리게 되고 동결보호제를 제거할 때 역시 물이 제거되는 속도보다 glycerol이 제거되는 속도가 느리므로 세포의 용적이 급격하게 팽창됨으로 인해 정자의 막이 손상을 입게 되어 glycerol을 포함한 동결보호제의 삼투압 손상이 발생한다고 밝혀졌다 (Gao 등, 1995). 동결보호제가 세포막을 통하여 세포내로 침투하여 세포의 내외가 평형이 이루어지면 그대화된 효과를 나타낸다 (Gilmore 등, 1995). 최적의 동결보호제는 낮은 온도에서 세포 내로 빠르게 침투하면서도 독성이 되도록 낮아야 한다 (Harrison 등, 1996). 동결보호제에 따라 세포내 침투 능력이 다른데, ethylene glycol은 사람 (Gilmore 등, 2000)과 소 (Guthrie 등, 2002)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 (Gilmore 등, 1995). 정자의 생존율과 활력에 있어 glycerol 보다 해로운 부분이 비교적 낮기 때문에 (Ball 등, 2001), ethylene glycol은 정자의 침체 보존면에 있어 효과적인 보호능력을 나타낼 수 있다. 더불어 최 등 (2011)은 제주흑우 정자의 동결정액 제조에 있어 동결보호제로서 ethylene glycol을 이용하여 glycerol에 비하여 좋은 동결효과를 얻어내었다.

동결 용해 과정은 활성산소 즉 ROS (reactive oxygen species)를 증가시킨다. 동결과정 동안 발생하는 ROS는 정자의 동결 용해 후 기능을 저하시켜 정자의 운동성, 생존성, 정자막 integrity 및 수정능력에 영향을 미친다 (Aitken 등, 1998;

Bilodeau 등, 2000). Hypotaurine과 taurine은 정자의 형질막세포에 항산화 작용을 하여 정자의 과산화지질화를 억제함으로써 정자세포를 보호한다 (Foote 등, 2002). 그리고 trehalose는 비감소성 이당류(non reduction disaccharide)이며, 세포막의 인지질 내의 상호작용으로 인하여 고장액의 배출과 빙상결정화로 세포 손상 감소와 삼투압 조절로 세포를 보호한다 (Molinia 등, 1994; Storey 등, 1998). 그러나 본 실험의 결과 정자의 운동성에 있어 대조구를 포함한 모든 실험구 사이의 차이는 나타나지 않았으며, taurine, hypotaurine의 처리구가 대조구와 trehalose의 처리구에 비하여 유의적으로 보다 높은 생존율을 나타냈다 ($p < 0.05$). 이러한 결과는 ethylene glycol을 동결보호제로 사용하여 동결된 정액에 있어 항산화제는 동결융해 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 (Jeyendran 등, 1984). 따라서 정자막 integrity 검사는 직접적으로 인공수정이나 체외수정 검사 보다 시간과 비용이 절약되며 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 (최 등, 1993). 양 정자의 동결 융해에 있어 Aisen 등 (2000)은 trehalose가 정자막의 손상을 비교적 감소시킨다고 하였으며, Shiva Shankar Reddy (2010)는 buffalo 정액의 동결 시 taurine의 첨가가 정자막 integrity를 증가시켰다고 하였다. 본 연구에서 항산화제 첨가군 모두가 대조군보다 swelled sperm 비율이 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). 이러한 결과는 taurine, hypotaurine, trehalose와 같은 항산화제가 동결과정에 발생하는 ROS로부터 정자를 안정적으로 보호하는 것으로 본다.

동결 융해 후 정자의 성장 평가에 있어 정자의 운동성, 정자의 생존율 및 정자막 integrity 뿐만 아니라 수정능력 획득 또는 침체반응 또한 매우 중요한 부분이다. Kommisrud 등 (2002)은 정자의 수정능력 획득 및 침체반응이 정자의 수정능력과 매우 밀접한 관련이 있는 것으로 보고하였다. 더불어 Oh 등 (2010)은 CTC 염색법을 이용하여 돼지 정자에서 정자의 수정능력 획득 및 침체 반응의 평가가

번식 성적이 불량한 돼지 개체를 예측하는데 유용함을 보고하였다. 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 (Fraser, 1995). Suzuki 등 (2003)은 인공수정 시 정자의 수정능력을 B pattern의 정자비율로 확인할 수 있다고 보고하였다. 수정능력 획득이 완료된 정자는 투명대에 의하여 침체반응이 일어나지만 (Yanagimach, 1994), 투명대와 결합하기 이전에 침체반응이 이미 일어난 정자는 투명대와 결합하는데 필요한 성분을 잃어버리게 되므로 정상적으로 수정에 참여할 수 없게 된다 (Adeoya-Oshiguwa 와 Fraser, 2004). 그리고 동결과정 중에 세포막은 단백질의 파괴로 인지질이 gel 화가 일어나게 되며, 이로 인해 calcium ion channel의 기능적 손상이 세포내 칼슘의 증가로 수정능력획득과 침체반응을 일으킨다 (Szasz 등, 2000; Pena 등, 2003). 따라서 동결 용해 후 capacitation-like change 과정을 거친 capacitation-like state 정자의 비율이 사출정자 보다도 약 25% 정도 높게 나타났다 (Pena 등, 2003). 이처럼 동결로 인한 capacitation-like state 정자의 증가는 정자의 수정능력을 감소시킴을 알 수 있다 (Parker 등, 2000). 본 연구의 결과 F pattern과 B pattern의 비율에 있어 taurine, hypotaurine 모두 대조구에 비하여 높은 수준을 나타냈지만 trehalose 처리구는 대조구와의 유의적 차이가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 동결과정 동안 taurine과 hypotaurine이 ROS로부터 정자를 성공적으로 보호하여 F pattern의 감소를 막아내고, capacitation-like state 정자의 비율을 최소화하는 것으로 볼 수 있다. 뿐만 아니라, 동결 용해 후 조기 침체반응으로 인해 실질적 수정이 불가능한 AR pattern 비율 역시 taurine과 hypotaurine 처리구에서 유의적으로 비교적 낮게 나타났다(p<0.05), trehalose 또한 대조구에 비하여 다소 낮은 수준의 AR pattern을 나타내었다. 이 또한 이들 항산화제가 동결 용해 과정동안 생기는 정자의 손상을 최소화 시킬 수 있는 것으로 판단된다.

정자 기능을 평가하는 방법 중 최적의 방법은 체외수정으로 정자의 수정능을 확인하는 것이다. 하지만 이 방법은 많은 비용과 시간이 필요하다. 사람의 경우는 햄스터 난자와 체외수정을 시켜 정자의 침투능력을 확인한다 (Yanagimachi 등, 1976). 본 연구의 결과에서는 taurine, hypotaurine, trehalose와 같은 항산화

제 처리군 모두 대조군에 비하여 높은 응성전핵 형성율과 SFI를 보여주었으며, decondensed sperm과 enlarged sperm의 비율에 있어서도 taurine과 hypotaurine의 처리군이 대조군에 비해 유의적으로 높게 나타났다 ($p < 0.05$). 이러한 결과는 앞서 설명한 항산화제가 정자의 동결 과정 중 발생하는 ROS의 손상으로부터 정자를 보호하여 동결 용해 후 정자의 생존성, 운동성, 정자막 integrity, 첨체막 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 ROS로부터 정자를 보호하고 동결 용해 후 정자의 수정능력을 향상시킬 수 있음을 보여주었다.

V. 참고문헌

1. Adeoya-Osiguwa SA and Fraser LR. 2004 Environmental estrogens and sperm function. *Hum. Reprod.* 19:216-217.
2. Aisen EG, Alvarez HL, Venturino A and Garde JJ. 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 53:1053-1061.
3. Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z and Irvine DS. 1998. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 59:1037-1046.
4. Alvarenga Ma, Papa FO, Landim-Alvarenga FC and Medeiros AS. 2005. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Anim. Reprod. Sc.i* 89:105-113.
5. Ball BA and Vo A. 2001. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. *J. Androl.* 22:1061-1069.
6. Baren A, Bacinoglu S, Evecen M, Sahin BE, Alkan S, Demir K, Ak K and Ileri K. 2004. Freezing of cat semen in straws with different GLY levels containing Tris-extender. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 25:545-552.
7. Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA and Gagnon C. 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol. Reprod. Dev.* 55:282-288.
8. Bucak MN, Tuncer PB, Sariözkan S, Ulutaş PA, Cöyan K, Başpınar N and Ozkalp B. 2009 Effects of hypotaurine, cysteamine and aminoacids solution on post-thaw microscopic and oxidative stress parameters of Angora goat semen. *Res. Vet. Sci.* 87:468-472.
9. Buhr MM, Fiser P, Bailey JL and Curtis EF. 2001. Cryopreservation in

- different concentration of glycerol alters boar sperm and their membranes. *J. Androl.* 22:961–969.
10. Chenier T, Merckies K, Leibo S, Plante C and Johnson W. 1998. 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*, pp 5–6.
 11. Fraser LR, Abeydeera LR and Niwa K. 1995. Ca^{2+} -regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosome alexocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol. Reprod. Dev.* 40:233–241.
 12. Funahashi H and Sano T. 2005. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10°C. *Theriogenology* 63:1605–1616.
 13. Gao DY, Liu J, Liu C, McGann LE, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Critser ES and Critser JK. 1995. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Hum. Reprod.* 10:1109–1022.
 14. Gilmore JA, Liu J, Woods EJ, Peter AT and Critser JK. 2000. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Hum. Reprod.* 15:335–343.
 15. Gilmore JA, McGann LE, Liu J, Gao DY, Peter AT, Kleinhans FW and Critser JK. 1995. Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 53:985–995.
 16. Guthrie HD, Liu J and Critser JK. 2002. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.* 67:1811–1816.
 17. Hammerstedt RH, Graham JK and Nolan JP. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 11: 73–88.
 18. Hammerstedt RH and Graham JK. 1992. Cryopreservation of poultry

- sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology* 29:26-38.
19. Harrison RAP, Ashworth PJC and Miller NGA. 1996. Assessment of sperm function under fertilizing conditions. *Reprod. Dom. Anim.* 31:25-30.
 20. Hu JH, Li QW, Jiang ZL, Yang H, Zhang SS and Zhao HW. 2009. The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality. *Reprod. Dom. Anim.* 44:571-575.
 21. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Prez-Pelaez M, Carbo BG and Zaneveld LJ. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.* 70:219-228.
 22. Kommisrud E, Paulenz H, Sehested E and Greule IS. 2002. Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for 5 days. *Acta. Veterinaria Scandinavia* 43:49-55.
 23. Li G, Saenz J, Godke RA and Devireddy RV. 2006 Effect of GLY and cholesterol-loaded cyclodextrin on freezing-induced water loss in bovine spermatozoa. *Reproduction* 131:875-886.
 24. Mantovani R, Rota A, Falomo ME, Bailoni L and Vincenti L. 2002. 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.* 42:217-226.
 25. Martins-Bessa A, Rocha A and Mayenco-Aguirre A. 2009. Effects of taurine and hypotaurine supplementation and ionophore concentrations on post-thaw acrosome reaction of dog spermatozoa. *Theriogenology* 71:248-253.
 26. Maxwell WMC and Watson PF. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 42:55-65.
 27. McGonagle LS, Goldstein M, Feldschuh J and Foote RH. 2002. The influence of cryoprotective media and processing procedures on motility and migration of frozen-thawed human sperm. *Asian J . Androl.* 4:137 -

141.

28. Michael A, Alexopoulos C, Pontiki E, Hadjipavlou-Litina D, Saratsis P and Boscos C. 2007 Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology* 68:204-212.
29. Molina FC, Evans G, Quintana Casares PI and Maxwell WMC. 1994. Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 36:113-122.
30. Oh SA, Park YJ, You YA, Mohamed EA and Pang MG. 2010 Capacitation status of stored boar spermatozoa is related litter size of sows. *Anim. Reprod. Sci.* 121:131-138.
31. Parker NA, Bailey TL, Bowen JM, Ley WB, Purswell BJ and Dascanio JJ. 2000. In vitro and xenogenous capacitation-like changes of fresh, cooled, and cryopreserved stallion sperm as assessed by a chlortetracycline stain. *J. Androl.* 21:45-52.
32. Pereira SM, Rigon RM, Mezzalira A and Cecim M. 2002. Ethylene glycol on canine semen cryopreservation. *Ciencia. Rural.* 32:649-655.
33. Polge C, Smith AU and Parkes AS. 1945. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164:666.
34. Silva AR, de Cassia Soares Cardoso R, Uchoa DC and MacHado da Silva LD. 2002. Effect of Tris-buffer, egg yolk and GLY on canine semen freezing. *Vet. J.* 164:244-246.
35. Shiva Shankar Reddy N, Jagan Mohanarao G and Atreja SK. 2010. Effects of adding taurine and trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm quality following cryopreservation. *Anim. Reprod. Sci.* 119:183-190.
36. Squires EL, Keith SL and Graham JK. 2004. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*

- 62:1056-1065.
37. Storey BT 1997. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 3:203-213.
 38. Storey BT, Noiles EE and Thompson KA. 1998 Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* 37:46-58.
 39. Suzuki K, Geshi M, Yamauchi N and Nagai T. 2003. Functional changes and motility characteristics of Japanese Black Bull spermatozoa separated by Percoll. *Anim. Reprod. Sci.* 77:157-172.
 40. Szasz F, Sirivaidyapong S, Cheng FP, Voorhout WF, Marks A, Colenbrander B, Solti And L and Gadella BM. 2000. Detection of calcium ionophore induced membrane changes in dog sperm as a simple method to predict the cryopreservability of dog semen. *Mol. Reprod. Dev.* 55:289-298.
 41. Uysal O, Bucak MN, Yavas I and Varush O. 2007. Effect of various antioxidants on the quailty of frozen-thawed bull semen. *J. Anim. Vet. Adv.* 6:1362-1366.
 42. Vidament M, Daire C, Yvon JM, Doligez P, Bruneau B and Magistrini M. 2002. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. *Theriogenology* 58:249-251.
 43. Wundrich K, Passch U, Leicht M and Glander HJ. 2006. Activation of caspases in human spermatozoa during cryopreservation—an immunoblot study. *Cell Tissue bank* 7:81-90.
 44. Yanagimachi R, Yanagimachi H and Rogers BJ. 1976. The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 15:471-476.
 45. 최두석, 문신용, 장윤석. 1993. 남성 불임검사 중 정자 형태와 정자 운동성 검사 및 저장성용액 내 정자 팽창검사의 상관관계 및 가임능력 예측에 관한

연구. 대한산부인과학회잡지 36:2497-2509.

46. 최선호, 고민희, 강태영, 조상래, 박용상, 오신애. 2011. 제주흑우 동결정액 제조시 ethylene Glycol의 농도와 예비 동결 조건이 정자의 생존율 및 침체양상에 미치는 영향. 한국동물번식학회지. 35: 377-383.

Effect of ethylene glycol and antioxidant combination on function of frozen-thawed spermatozoa in Korean Jeju Black Bull.

Ko Min Hee

(Supervised by professor Kang Taeyoung)

Department of Veterinary Medicine, Graduate School,
Jeju National University, Korea

Abstract

This study investigated the effect of antioxidants such as taurine, hypotaurine and trehalose with cryopreservation medium 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, membrane integrity and sperm penetration ability to use zona free hamster oocytes were investigated. The significant($p < 0.05$) improvement of sperm viability showed in all antioxidant treated thawed spermatozoa(taurine; $68.10\% \pm 4.39$, hypotaurine; $69.20\% \pm 6.65$ and trehalose; $67.95\% \pm 4.44$) when compared to control($63.35\% \pm 5.58$). 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($64.10\% \pm 5.42$, $61.50\% \pm 3.66$ and $59.00\% \pm$

3.95, respectively) had significantly ($p < 0.05$) higher rate of the swelled sperm compared to control ($53.65\% \pm 9.72$). 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. All taurine, hypotaurine or trehalose added frozen-thawed spermatozoa had significantly ($p < 0.05$) higher pronucleus formation ratio (1.60 ± 0.55 , 1.80 ± 0.45 and 1.20 ± 0.45 vs 0.60 ± 0.55) and sperm penetration index (0.70 ± 0.17 , 0.80 ± 0.14 and 0.58 ± 0.04 vs 0.40 ± 0.10) than control 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.

Keywords; Ethylene glycol, antioxidant, semen cryopreservation, Korean Jeju Black Bull