

동결-융해 정자의 운동학적 특성에 대한 MitoTEMPO의 영향

조은석, 김정아, 정용대, 최요한, 홍준기, 김영신, 정학재, 백선영, 사수진*
농촌진흥청 국립축산과학원 양돈과

Effects of Mitochondria-targeted Antioxidant MitoTEMPO on the Kinetic Characteristics of Frozen-Thawed Boar Sperm

Eun Seok Cho, Jeong A Kim, Yong Dae Jeong, Yo Han Choi, Jun Ki Hong,
Young Sin Kim, Hak Jae Chung, Sun Young Baek, Soo Jin Sa*
Swine Science Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration

요약 정액의 동결보존은 인공수정을 통한 동물 번식에 유용한 것으로 알려져 있지만 동결-융해된 돼지 정액의 사용은 저온손상 때문에 제한된다. 최근에는 이를 보완하기 위해 다양한 첨가제 연구가 진행되고 있다. 그 중 항산화제는 정자의 동결-융해과정에서 정자 세포막의 지질과산화물을 억제시켜 정자의 생존성과 운동성을 개선시킨다고 알려져 있다. 본 연구의 목적은 동결보존액에 대한 MitoTEMPO(미토콘드리아 표적 항산화제) 첨가가 돼지 동결-융해 정자의 운동학적 특성에 미치는 영향을 평가하는 것이다. 성숙한 Duroc종 수퇘지로부터 정액샘플을 채취하였으며, 다양한 농도의 MitoTEMPO (0, 0.5, 5, 50 및 500 μM)를 lactose-egg yolk 동결보존액에 첨가하여 정액을 동결하였다. 동결-융해 후 정자의 운동학적 특성들은 정자자동분석기 (CASA; computer-assisted sperm analysis)를 이용하여 분석하였다. 그 결과, 동결용 보존액에 5 및 50 μM ($50.46 \pm 2.71\%$, $46.96 \pm 2.66\%$) MitoTEMPO 첨가 시 500 μM 처리구 ($35.40 \pm 2.95\%$)에 비해 유의적으로 높은 정자 운동성을 나타냈다($P < 0.05$). 그렇지만, 운동성을 제외한 다른 운동학적 특성에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 결론적으로 동결용 보존액에 대한 MitoTEMPO 첨가는 동결-융해 돼지 정자의 운동성에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료된다.

Abstract Cryopreservation of semen is useful for animal breeding via artificial insemination (AI). However, the use of frozen-thawed boar semen is limited due to cryodamage. The aim of this study was to investigate the effects of different concentrations of MitoTEMPO (a mitochondria-targeted antioxidant) in lactose-egg yolk (LEY) extenders on kinetic characteristics of frozen-thawed boar sperms. Semen samples were collected from mature Duroc boars (2~3 years old) and cryopreserved in LEY extenders containing 0, 0.5, 5, 50, and 500 μM MitoTEMPO. The kinetic characteristics of frozen-thawed sperms were determined 0 and 30 min after thawing using computer-assisted sperm analysis (CASA). Results indicated that sperm motility immediately after thawing was significantly higher with 5 and 50 μM ($50.46 \pm 2.71\%$ and $46.96 \pm 2.66\%$, respectively) than with 500 μM MitoTEMPO ($35.40 \pm 2.95\%$) ($P < 0.05$). However, there were no significant differences in other kinetic characteristics except motility. In conclusion, the addition of MitoTEMPO to the sperm freezing extender may have a beneficial effect on motility of post-thawed boar semen.

Keywords : Boar, Cryopreservation, Kinetic characteristics, MitoTEMPO, Spermatozoa

본 성과물은 2020년 농촌진흥청 연구사업(PJ01263602)과 농촌진흥청(국립축산과학원) 전문연구원 과정 지원 사업에 의해 이루어진 것임

*Corresponding Authors : Soo Jin Sa(National Institute of Animal Science)

email: segi0486@korea.kr

Received January 28, 2020

Revised March 6, 2020

Accepted March 6, 2020

Published March 31, 2020

1. 서론

정자 동결보존은 가축의 인공수정에 사용하여 동물 번식 프로그램 및 사람의 난임을 치료하기 위해 널리 사용되고 있다. 동결정액 활용의 장점은 우량 유전자원 장기 보존, 장거리 수송, 병원체 확산방지 보증 등을 포함한다[1]. 하지만 돼지의 경우, 다른 축종들과 비교하여 정자 세포막 불포화지방산의 비율이 높아 세포막의 지질과산화 발생하기 쉬우며, 이는 정자의 운동성과 생존성을 급격히 저하 시키는 요인으로 보고되고 있다[2, 3]. 동결과정의 저온충격은 정자의 원형질막과 미토콘드리아 막에 손상을 유발하며[4] 수정 능력을 저해하고 세포사멸의 신호를 조절하는 분자 변화를 일으킨다[5]. 정자 동결과정에서의 온도 변화는 급속한 상전이와 reactive oxygen species (ROS) 의 급격한 증가를 유발하여 동결-용해된 정자의 운동성 저하를 초래한다[6, 7]. 이러한 부작용은 동결 보존된 정자의 25~75 %에서 관찰되며 이는 정자의 세포 손상을 유발하여 분만율과 산자수의 상당한 저하를 초래한다[8]. 이러한 요인들은 상업적 수준에서 돼지 동결정액의 제한된 사용의 주요 요인으로 작용한다[1, 9].

최근에는 동결보존액에 대한 다양한 항산화제 첨가를 통해 동결정액 품질을 향상시키는 방법이 개발되고 있다[10]. 항산화제는 정자의 동결 용해과정에서 생성되는 산화물질을 제거하고, 정자 세포막에서의 지질과산화를 억제시켜 정자의 생존성과 운동성을 개선시킬 수 있다[11]. 따라서 돼지의 동결-용해과정 동안에 생성되는 ROS의 급격한 증가를 조절할 수만 있다면 정자의 운동성과 수정능력 등을 개선할 수 있을 것이다.

미토콘드리아는 ATP 생성, 지방산 산화, 세포사멸 및 피사 조절, 세포질 칼슘 이온 및 ROS 항상성 조절을 포함한 많은 세포 과정에서 중요한 역할을 하는 세포소기관으로 알려져 있다[12]. 돼지의 난모세포 및 배아의 세포질에서 높은 수준의 ATP 생성은 생체 및 시험관 내 난모세포 성숙, 수정 및 초기 배아 발달에 필요하다[13]. 많은 연구에서 ATP가 생산되는 동안, 미토콘드리아에서 산화적 인산화에 의해 hydrogen peroxide, superoxide 및 hydroxyl radicals 같은 ROS들이 생성된다는 것이 보고되었다[14]. 활성산소를 생성하고 제거하는 항산화 반응 간의 불균형으로 야기된 산화 스트레스는 DNA 손상, 단백질 내전 등 많은 부분에서 정자 기능에 이상을 초래한다[15]. MitoTEMPO는 미토콘드리아를 표적으로 하는 세포 투과성 항산화제이다[16]. Trnka et al. (2008)에 의해 처음으로 합성된 합성산화제이며[17] 미

토콘드리아 특이적 superoxide scavenger로 알려져 있다[18]. 이전의 연구는 MitoTEMPO가 세포 내 superoxide 생성에 유용한 분자 탐지기가 된다고 보고했다[19]. 또한 돼지의 배아에서 미토콘드리아의 superoxide를 감소시켜 배반포 발달 능력을 향상하는데 긍정적인 효과를 보였으며[12] 사람에서는 동결-용해 후 정자의 품질 및 원형질막 온전성을 향상시킨다고 보고 되었다. 비록 MitoTEMPO가 사람에서 용해 후 정자의 품질에 관한 효과가 보고된 바 있지만[18], 돼지를 포함한 다른 동물들에서 연구는 매우 미흡한 실정이다. 따라서 우리는 본 연구에서 돼지 동결정액의 수정능력 향상을 위해 동결용 보존액에 대한 미토콘드리아 표적 항산화제인 MitoTEMPO 첨가가 동결-용해 후 정자의 운동학적 특성에 미치는 영향을 평가하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 공시동물 및 정액채취

본 연구에 사용된 정액은 농촌진흥청 국립축산과학원 양돈과에서 사육된 성숙한 두록종(Duroc) 수퇘지 3두를 대상으로 음경 수압법을 이용하여 채취되었다. 채취된 원정액은 여과지를 통해 교양물질 및 불순물을 제거한 후, 채취정액과 등온조건(약 38 °C)으로 가온한 정액희석액(BTS; Beltsville thawing solution)을 1:1 비율로 1차 희석하여 1시간 이내로 실험실로 운반하여 연구에 이용하였다.

2.2 정액준비

실험실로 운반된 1차 희석정액은 BTS로 2차 희석을 실시하여 최종 정자농도를 30×10^6 cell/ml로 조정하였다. 희석을 마친 정액샘플들은 자동 정자분석기(Computer-assisted sperm analysis, CASA, ISASv1, PROISER, SPAIN)을 이용하여 정자의 운동성이 80 % 이상이고 정상적인 형태를 가진 정자의 비율이 80 % 이상인 정액샘플만을 연구에 이용하였다.

2.3 동결보존액 준비

1차 동결보존액(LEY; Lactose-Egg Yolk extender) 준비를 위하여 11 % α -Lactose 용액 80 ml와 egg yolk 20 ml를 혼합하여 2시간 동안 교반을 실시하고, 원심분리(3,000 rpm, 5 °C, 20분)하여 상층액을 회수하였다.

그 후, 1차 동결보존액에 다양한 농도(0, 0.5, 5, 50 및 500 μM)의 MitoTEMPO 첨가하여 1시간 동안 교반을 실시하였다. 2차 동결보존액은 MitoTEMPO가 첨가되지 않은 1차 동결액에 1.5 % Orvus Es Paste (OEP; Nova Chem., USA)와 9 % Glycerol(Sigma)을 첨가하여 준비한 후 4 $^{\circ}\text{C}$ 냉장고 보관하여 실험에 사용하였다. 동결 시 OEP와 Glycerol의 최종 농도는 각각 0.5와 3 %였다.

2.4 동결 및 융해방법

동결보존에 앞서 정액샘플은 24시간 동안 17 $^{\circ}\text{C}$ 냉장고에서 보관되었다. 그 후 정액샘플을 17 $^{\circ}\text{C}$ 에서 800 \times g로 10분 동안 원심분리한 후 상층액을 제거하고 최종 정자농도가 1.5×10^9 cells/ml가 되도록 1차 동결보존액을 첨가하였다. 1차 동결보존액으로 희석된 정액샘플을 세포동결기로 옮겨 2시간 동안 17 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5 $^{\circ}\text{C}$ 까지 냉각시킨 후 2차 동결보존액을 1차 동결보존액 용량의 1/2을 첨가하여 최종 정자농도를 1×10^9 cells/ml로 맞추었다. 정액샘플은 0.5 ml 스트로우 (IMV, L'Aigle, France)에 봉입하여 5 $^{\circ}\text{C}$ 에 1시간 동안 보관하여 글리세롤 평형을 하였다. 정액샘플의 동결은 자동 정액동결기 (SY-LAB Gerate GmbH, Austria)를 사용하여 실시하였고 동결된 완료된 샘플들은 -196 $^{\circ}\text{C}$ 액체질소에 담가서 분석에 사용될 때까지 보관하였다. 동결된 스트로우는 38 $^{\circ}\text{C}$ 항온수조에 20초 동안 담그는 방법으로 융해하여 BTS와 혼합 후 원심분리(400 \times g, 38 $^{\circ}\text{C}$, 10분)하여 상층액을 제거하고 BTS로 재부유하여 정자의 운동학적 특성 분석을 하였다. 개체 간의 변이를 최소화하기 위해서 동결-융해 후 정자의 운동성이 30 % 이상인 개체(두록중 수배지)만을 선발한 후 정액샘플을 pooling 하여 본 연구에 이용하였다.

2.5 동결-융해 정자의 운동학적 특성 분석

동결-융해된 정자의 운동학적 특성들은 CASA를 사용하여 객관적으로 평가되었다. 정자샘플은 BTS 희석을 통해 30×10^6 cells/ml의 농도로 조정하여 분석했다. 38 $^{\circ}\text{C}$ 로 가온된 정자샘플 5 μl 를 markler counting chamber (Sefi-Medical Instruments, Israel)와 CASA를 사용하여 샘플 당 최소 100마리의 정자를 평가하기 위해서 10회 이상 분석을 반복하여 데이터를 수집하였다. 각 정자샘플의 운동학적 특성 지표인 운동성(MOT, percent of motile sperm, %; 운동성이 있는 정자의 비율), 곡선운동 속도(VCL, curvilinear velocity, $\mu\text{m/s}$; 정자의 운동 경로를 따라 형성되는 호를 단위시간 당 이동한 거리), 직선운동 속도(VSL, straight-line velocity, $\mu\text{m/s}$; 정자의 처음 위치와 마지막 위치 사이의 직선거리를 전체 경과시간으로 나눈 값), 평균운동 속도(VAP, average path velocity, $\mu\text{m/s}$; 전체 이동한 거리를 경과한 시간으로 나눈 값), 직진성(LIN, linearity, %; VSL과 VCL의 비[VSL/VCL]), 측두 이동거리(ALH, Amplitude of lateral head displacement, μm ; 이동에 따른 정자두부 좌우 진폭의 평균거리)가 측정되었다.

2.6 통계 분석

본 연구에서의 통계분석은 R 3.6.1 version을 이용하였다. 3가지 이상의 변수의 차이는 ANOVA를 이용하여 분석하였고, 사후검증으로 Duncan의 multiple range test방법을 이용하였다. 집단 간 평균의 차이는 t-test를 이용하였다. 모든 검정은 유의수준 5% 이하로 수행하였다.

Table 1. Effects of different concentration of MitoTEMPO on the kinetic characteristics of frozen-thawed sperm immediately after thawing

MitoTEMPO concentration (μM)	MOT (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	ALH (μm)
0	41.68 \pm 1.31 ^{ab}	55.36 \pm 2.61	34.79 \pm 1.56	38.82 \pm 2.09	65.23 \pm 0.92	1.89 \pm 0.09
0.5	40.28 \pm 0.75 ^{ab}	52.37 \pm 1.72	34.72 \pm 0.22	39.04 \pm 0.27	66.41 \pm 1.79	1.83 \pm 0.07
5	50.46 \pm 2.71 ^a	53.52 \pm 1.38	36.97 \pm 0.89	41.18 \pm 0.84	69.08 \pm 0.11	1.80 \pm 0.06
50	46.96 \pm 2.66 ^a	52.68 \pm 2.78	35.69 \pm 1.54	39.56 \pm 2.00	67.82 \pm 0.75	1.81 \pm 0.06
500	35.40 \pm 2.95 ^b	50.50 \pm 1.03	31.84 \pm 1.16	36.34 \pm 0.77	63.09 \pm 2.43	1.85 \pm 0.07

Mean \pm SEM.

⁽¹⁾MOT: motility (%); VCL: curvilinear velocity ($\mu\text{m/s}$); VSL: straight-line velocity ($\mu\text{m/s}$); VAP: average path velocity ($\mu\text{m/s}$); LIN: linearity (%); ALH: amplitude of lateral head displacement (μm)

^{a,b,c,d} indicate significant differences ($p < 0.05$)

Table 2. Effects of different concentration of MitoTEMPO on the kinetic characteristics of frozen-thawed sperm at 30 min after thawing

MitoTEMPO concentration (μM)	MOT (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	ALH (μm)
0	36.32 \pm 2.04 ^{ab}	55.55 \pm 1.98	38.53 \pm 2.22	40.73 \pm 2.13	76.12 \pm 1.37	1.67 \pm 0.03
0.5	35.09 \pm 2.30 ^{ab}	47.88 \pm 0.88	35.96 \pm 0.90	38.38 \pm 0.86	75.10 \pm 0.77	1.58 \pm 0.01
5	41.42 \pm 2.14 ^a	48.69 \pm 2.02	36.14 \pm 1.69	38.98 \pm 1.67	74.18 \pm 0.38	1.62 \pm 0.07
50	35.91 \pm 0.77 ^{ab}	48.74 \pm 1.03	36.15 \pm 1.04	38.64 \pm 0.87	74.16 \pm 0.59	1.65 \pm 0.01
500	29.88 \pm 1.06 ^b	46.50 \pm 3.03	32.58 \pm 3.43	35.73 \pm 3.48	69.71 \pm 2.84	1.66 \pm 0.01

Mean \pm SEM.

⁽¹⁾MOT: motility (%); VCL: curvilinear velocity ($\mu\text{m/s}$); VSL: straight-line velocity ($\mu\text{m/s}$); VAP: average path velocity ($\mu\text{m/s}$); LIN: linearity (%); ALH: amplitude of lateral head displacement (μm)

^{a,b,c,d} indicate significant differences ($p < 0.05$)

3. 결과 및 고찰

이유자돈 돼지 정액의 동결과정 중 동결보존액에 대한 MitoTEMPO 첨가가 용해 직후 정자의 운동학적 특성에 미치는 영향을 Table 1에 나타내었다. MitoTEMPO 5 및 50 μM 처리구에서의 운동성은 각각 50.46 \pm 2.71 %, 46.96 \pm 2.66 %로 무처리구(0 μM , 41.68 \pm 1.31 %)와 0.5 μM 처리구(40.28 \pm 0.75 %) 보다 다소 높은 운동성을 보였으나 유의적인 차이를 보이지 않았고 500 μM 처리구(35.40 \pm 2.95 %) 보다는 유의적으로 높은 운동성을 나타냈다 ($p < 0.05$). 이러한 결과는 5 및 50 μM MitoTEMPO 처리가 생존은 하고 있으나 낮은 대사 상태로 움직이지 않는 정자에 운동성을 개선하는 것으로 사료된다. 정자의 운동성(MOT) 이외에 평균운동 속도(VAP)와 직진성(LIN)이 대조구에 비해 0.5, 5 및 50 μM MitoTEMPO 처리구에서 다소 높은 경향을 보였으나, 곡선운동 속도(VCL)와 직선운동 속도(VSL)과 마찬가지로 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. Table 2는 용해 후 30분 경과 후에 정자의 운동학적 특성을 분석한 결과이다.

그 결과 용해 직후의 정자의 운동학적 특성과 유사한 경향치를 보였다. 이는 시간이 경과함에 따라도 MitoTEMPO의 영향은 비슷하다는 것을 추측할 수 있다.

본 연구의 결과는 인간에서 5 및 50 μM 의 MitoTEMPO 처리가 동결-용해 후 정자의 운동성을 개선시켰다는 Lu 등(2018)의 결과와 일치했다[18]. 하지만 돼지에서 500 μM 의 MitoTEMPO를 처리했을 때 무처리구 보다 운동성이 낮았지만 인간에서는 500 μM 처리구보다 무처리구에서 운동성이 높았다. 돼지에서는 고농도의 MitoTEMPO 처리가 세포독성을 나타냈지만 인간에서는 세포독성을 보이지 않았다[18]. 이는 MitoTEMPO의 효과가 좀더 다를 수 있음을 시사한다. 하지만 다른 종들에서 이에 대

한 연구가 진행된 바 없기 때문에 추후 연구가 필요할 것으로 사료된다. 본 연구에서는 돼지 동결용 보존액에 대한 5 및 50 μM 의 MitoTEMPO 처리가 용해 후 돼지 정자의 운동성에 긍정적인 영향을 미치는 것을 확인했다. 이러한 결과는 다양한 항산화제가 동결-용해 후 정자의 품질을 개선시켰다는 보고들과 일치한다[20, 21]. 하지만 항산화제의 효능과 효율은 완충액 및 동결보존액의 조성 과 배양시간 같은 여러 요인들에 의해 영향을 받는다는 다수의 보고가 있어 다른 결과를 초래할 수 있다는 점에 유의할 필요가 있다. MitoTEMPO는 미토콘드리아를 표적으로 과산화물을 제거하는 항산화 물질이다. 실제로, 정자의 미토콘드리아는 동결보존 후 과도한 과산화물들에 의해 심각하게 손상을 받는다. 이로 인해 ATP의 생산에 부정적인 영향을 미쳐 정자의 운동성이 감소한다고 보고되었다[22]. 또한 정액동결 과정은 활성산소의 과잉생산을 유발할 수 있으며 이는 용해 후 정자의 운동성 및 형태를 손상시킨다[23]. 돼지에서 MitoTEMPO의 효과에 관한 연구는 배아의 발달에 관해 보고된 바 있으나 동결-용해된 정자의 운동학적 특성에 미치는 영향에 관한 연구는 진행된 바 없어 본 연구의 결과와 비교할 수 없었다. 하지만 인간에서 동결보존액에 MitoTEMPO 첨가가 동결-용해 후 정자의 품질을 효과적으로 개선시켰다고 보고된 바 있으며 이러한 결과는 본 연구의 결과와 일치했다. 이것은 MitoTEMPO가 미토콘드리아를 표적으로 과산화물을 제거하기 때문일 수 있다. 실제로, 동결보존 과정에서 다양한 종류의 세포에서 검출된 과산화물 형태의 활성산소는 다양한 항산화제를 첨가함으로써 조절될 수 있다고 보고된 바 있다[24]. 따라서, 본 연구의 결과는 돼지 동결정액 제조과정에 있어 미토콘드리아 타겟 항산화제인 MitoTEMPO를 동결보존액에 첨가함으로써 정자의 운동성을 개선시킬 수도 있음을 확인하였다.

4. 결론

본 연구의 결과를 종합해 보면 동결보존액에 대한 5 및 50 μ M MitoTEMPO의 첨가는 동결-융해 후 돼지 정자의 운동성에 긍정적인 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구의 결과는 우량 씨돼지 유전자원 보존과 번식효율 증진 측면에서 돼지 육종개량과 더불어 양돈산업에 잠재적으로 가치가 높으며, 정자 동결보존과 융해 후 품질개선을 위한 다양한 첨가물 활용 연구에 기초자료를 제공할 것으로 생각된다.

References

- [1] K. Buranaamnuay, P. Tummaruk, J. Singlor, H. Rodriguez-Martinez, M. Techakumphu, "Effects of Straw Volume and Equex-STM® on Boar Sperm Quality after Cryopreservation", *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 44, no. 1, pp. 69-73, Jan. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00996.x>
- [2] D. Rath, R. Bathgate, H. Rodriguez-Martinez, J. Roca, J. Strzezek, D. Waberski, "Recent advances in boar semen cryopreservation", *Control of Pig Reproduction VIII*, vol. 66, pp. 51-66, Jan. 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.4061/2011/396181>
- [3] M. Techakumphu, K. Buranaamnuay, W. Tantasuparuk, N. Am-In, "Improvement of semen quality by feed supplement and semen cryopreservation in swine", *Success in Artificial Insemination-Quality of Semen And Diagnostics Employed*, LEMMA, Alemayehu, pp. 17-37, Jan. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/51737>
- [4] A. M. Petrumkina, G. Volker, K. F. Weitze, M. Beyerbach, E. Töpfer-Petersen, D. Waberski, "Detection of cooling-induced membrane changes in the response of boar sperm to capacitating conditions", *Theriogenology*, vol. 63, no. 8, pp. 2278-2299, May. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.10.008>
- [5] J. L. Bailey, J. F. Bilodeau, N. Cormier, "Semen cryopreservation in domestic animals: A damaging and capacitating phenomenon minireview", *Journal of Andrology*, vol. 21, no. 1, pp. 1-7, Jan. 2000. DOI: <https://doi/pdf/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03268.x>
- [6] S. Chatterjee, C. Gagnon, "Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing", *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, vol. 59, no. 4, pp. 451-458, Aug. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1002/mrd.1052>
- [7] M. Yeste, J. E. Rodríguez-Gil, S. Bonet, "Artificial insemination with frozen-thawed boar sperm", *Molecular reproduction and development*, vol. 84, no. 9, pp. 802-813, Sept. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/mrd.22840>
- [8] E. Estrada, J. E. Rodríguez-Gil, L. G. Rocha, S. Balasch, M. Yeste, "Supplementing cryopreservation media with reduced glutathione increases fertility and prolificacy of sows inseminated with frozen-thawed boar semen", *Andrology*, vol. 2, no. 1, pp. 88-99, Jan. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00144.x>
- [9] L. A. Johnson, J. G. Aalbers, C. M. T. Willems, W. Sybesma, "Use of boar spermatozoa for artificial insemination. I. Fertilizing capacity of fresh and frozen spermatozoa in sows on 36 farms", *Journal of Animal Science*, vol. 52, no. 5, pp. 1130-1136, May. 1981. DOI: <https://doi.org/10.2527/jas1981.5251130x>
- [10] F. Amidi, A. Pazhohan, M. Shabani Nashtaei, M. Khodarahmian, S. Nekoonam, "The role of antioxidants in sperm freezing: a review", *Cell Tissue Bank*, vol. 17, pp. 745-756, 2016.
- [11] M. Mortazavi, I. Salehi, Z. Alizadeh, M. Vahabian, A. M. Roushandeh, "Protective effects of antioxidants on sperm parameters and seminiferous tubules epithelium in high fat-fed rats", *Journal of Reproduction and Infertility*, vol. 15, pp. 22-28, 2014.
- [12] S. G. Yang, H. J. Park, J. W. Kim, J. M. Jung, M. J. Kim, H. G. Jegal, "Mito-TEMPO improves development competence by reducing superoxide in preimplantation porcine embryos", *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, 10130, July. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28497-5>
- [13] H. Ge, T. L. Tollner, Z. Hu, M. Dai, X. Li, "The importance of mitochondrial metabolic activity and mitochondrial DNA replication during oocyte maturation *in vitro* on oocyte quality and subsequent embryo developmental competence", *Molecular reproduction and development*, vol. 79, no. 6, pp. 392-401, Mar. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1002/mrd.22042>
- [14] A. P. Goud, P. T. Goud, M. P. Diamond, B. Gonik, H. M. Abu-Soud, "Reactive oxygen species and oocyte aging: role of superoxide, hydrogen peroxide, and hypochlorous acid", *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 44, no. 7, pp. 1295-1304, Apr. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.11.014>
- [15] R. J. Aitken, K. T. Jones, S. A. Robertson, "Reactive oxygen species and sperm function—in sickness and in health", *Journal of andrology*, vol. 33, no. 6, pp. 1096-1106, Jan. 2012. DOI: <https://doi.org/10.2164/jandrol.112.016535>
- [16] L. Lu, L. Guo, E. Gauba, J. Tian, L. Wang, "Transient cerebral ischemia promotes brain mitochondrial dysfunction and exacerbates cognitive impairments in young 5xFAD mice", *PLoS one*, vol. 10, no. 12, Dec. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144068>
- [17] J. Trnka, F. H. Blaikie, A. Logan, R. A. Smith, M. P. Murphy, "Antioxidant properties of MitoTEMPO and its hydroxylamine", *Free radical research*, vol. 43, no.

1, pp. 4-12, Aug. 2009.
DOI: <https://doi.org/10.1080/10715760802582183>

[18] X. Lu, Y. Zhang, H. Bai, J. Liu, J. Li, B. Wu, "Mitochondria-targeted antioxidant MitoTEMPO improves the post-thaw sperm quality", *Cryobiology*, vol. 80, pp. 26-29, Feb. 2018.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.12.009>

[19] H. Hu, M. Li, "Mitochondria-targeted antioxidant mitotempo protects mitochondrial function against amyloid beta toxicity in primary cultured mouse neurons", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 478, no. 1, pp. 174-180, Sept. 2016.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.07.071>

[20] M. Yeste, "Recent advances in boar sperm cryopreservation: State of the art and current perspectives", *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 50, no. 52, pp. 71-79, Aug. 2015.
DOI: <https://doi.org/10.1111/rda.12569>

[21] W. Zhang, K. Yi, C. Chen, X. Hou, X. Zhou, "Application of antioxidants and centrifugation for cryopreservation of boar spermatozoa", *Animal Reproduction Science*, vol. 132, no. 3-4, pp. 123-128, Jun. 2012.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.05.009>

[22] L. Fang, C. Bai, Y. Chen, J. Dai, Y. Xiang, "Inhibition of ROS production through mitochondria-targeted antioxidant and mitochondrial uncoupling increase post-thaw sperm viability in yellow catfish", vol. 69, no. 3, pp. 386-393, Dec. 2014
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.09.005>

[23] F. Mazzilli, T. Rossi, L. Sabatini, F. M. Pulcinelli, S. Rapone, F. Dondero, P. P. Gazzaniga, "Human sperm cryopreservation and reactive oxygen (ROS) production", *Acta Europaea Fertilitatis*, vol. 24, no. 4, pp. 145-148, Jul. 1995.

[24] J. S. Len, W. S. Darius Koh, S. X. Tan, "The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation", *Bioscience Reports*, vol. 39, no. 8, Aug. 2019.
DOI: <https://doi.org/10.1042/BSR20191601>

조 은 석(Eun-Seok Cho)

[정회원]



- 2007년 3월 : 경남과학기술대학교 동물소재공학과 (농학석사)
- 2011년 8월 : 경상대학교 응용생명공학 (이학박사)
- 2012년 1월 ~ 2015년 6월 : 농촌진흥청 국립축산과학원 박사후 연구원
- 2015년 7월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

<관심분야>

가축육종, 유전체학

김 정 아(Jeong-A Kim)

[정회원]



- 2016년 2월 : 경남과학기술대학교 동물소재공학과 (농학석사)
- 2019년 2월 : 경남과학기술대학교 동물소재공학과 (농학박사)
- 2019년 2월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 박사 후 연구원

<관심분야>

가축육종, 유전체학

정 용 대(Yong-Dae Jeong)

[정회원]



- 2008년 2월 : 전북대학교 축산학 가금영양생리전공 (농학석사)
- 2016년 2월 : 전북대학교 축산학 분자영양생리 (농학박사)
- 2016년 3월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 박사후 연구원

<관심분야>

동물영양생리, 단위동물사양

최요한(Yo-Han Choi)

[정회원]



- 2015년 2월 : 강원대학교 동물생명과학 동물자원학과 (농학석사)
- 2019년 2월 : 강원대학교 동물생명과학 동물생명과학과 (농학박사)
- 2019년 4월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 박사후 연구원

<관심분야>
동물영양, 가축사양

정학재(Hak-Jae Chung)

[정회원]



- 1993년 3월 : 일본 Nagoya University 농생명연구과 동물생명공학전공 (농학석사)
- 1999년 8월 : 일본 Nagoya University 농생명연구과 동물생명공학전공 (농학박사)

- 2000년 5월 ~ 2002년 9월 : University of Pennsylvania(미국) 박사후 연구원
- 2003년 1월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

<관심분야>
동물발생 내분비, 생명공학

홍준기(Joon-Ki Hong)

[정회원]



- 2012년 2월 : 충남대학교 농과대학 축산학과 (농학석사)
- 2017년 2월 : 한경대학교 미래기술대학원 동물자원과 (이학박사)
- 2007년 8월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

<관심분야>
가축육종, 유전체학

백선영(Sun-Young Baek)

[정회원]



- 1900년 2월 : 건국대학교 동물생명공학과 (농학사)
- 2006년 3월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

<관심분야>
생명공학, 동물발생

김영신(Young-Sin Kim)

[정회원]



- 2009년 2월 : 전남대학교 동물공학과 (농학석사)
- 2012년 8월 : 전남대학교 동물공학과 (농학박사)
- 2015년 8월 ~ 2018년 1월 : 농협 종돈개량사업소 연구원
- 2018년 2월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

<관심분야>
가축육종, 유전체학

사수진(Soo-Jin Sa)

[정회원]



- 2002년 2월 : 강원대학교 축산대학 축산학과 (농학석사)
- 2006년 2월 : 강원대학교 축산대학 축산학과 (농학박사)
- 2007년 2월 ~ 2009년 1월 : University of Nottingham(영국) 박사후연구원

- 2009년 2월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

<관심분야>
동물번식, 생명공학