

동결보존액에 Zardaverine의 첨가가 동결-융해 후 돼지 정자의 운동학적 특성에 미치는 영향

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

Effects of Zardaverine in Freezing Extender on Kinetic Characteristics of Post-Thawed Boar Sperm

Jeong A Kim, Eun Seok Cho, 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 본 연구에서는 동결보존액에 대한 Zardaverine (phosphodiesterase inhibitor) 첨가가 돼지 동결-융해 정자의 운동학적 특성에 미치는 효과를 조사하였다. 돼지정액의 동결보존은 보조 번식기술 및 유전자원 장기보존을 위해 유용하게 이용되는 중요한 기술이다. 하지만 정자세포를 동결-융해하는 과정에서 발생하는 온도충격은 정자의 수정능력을 급격히 저하시킨다. 정액샘플은 성숙한 Duroc종 수퇘지로부터 채취했으며, lactose-egg yolk 동결보존액에 다양한 농도로 Zardaverine (0, 20, 50, 75 및 100 μM)을 첨가하여 정액을 동결하였다. 융해 후 정자세포의 운동학적 특성 분석은 정자운동성자동분석기(CASA: computer-assisted sperm analysis)를 이용하였다. 그 결과, 융해 직후 정자의 운동성(MOT)은 타처리구에 비해 20 μM 처리구에서 가장 높았다($p < 0.05$). Curvilinear velocity (VCL)은 0 μM 과 20 μM 처리구가 75 μM 처리구를 제외한 다른 처리구들에 비해 유의적으로 높은 값을 보였다($p < 0.05$). Average path velocity (VAP)는 20 μM 처리구가 100 μM 처리구에 비해 유의적으로 높았으며($p < 0.05$) Amplitude of head lateral displacement (ALH)는 20 μM 처리구가 50 μM 과 100 μM 처리구에 비해 유의적으로 높았다($p < 0.05$). 이상의 결과를 종합하면, 동결용 보존액에 대한 Zardaverine 첨가가 동결-융해된 돼지 정자의 운동학적 특성에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 사료된다.

Abstract This study investigated the effect of Zardaverine supplementation in freezing extender, on kinetic characteristics of post-thawed boar sperm. Cryopreservation of boar sperm is an important technique of assisted reproductive technology and genetic resource banking. Although this technique is particularly useful, freeze-thaw cycles associated with sperm cryopreservation significantly reduce sperm quality. Semen from mature Duroc boars were collected and cryopreserved in freezing extenders (LEY) treated with varying concentrations of Zardaverine (0, 20, 50, 75, 100 μM). The time-dependent kinetic characteristics of post-thawed spermatozoa were determined after thawing by applying computer-assisted sperm analysis (CASA). We observed that the motility immediately after thawing was significantly higher in 20 μM stocks than in control (0 μM) and the other treatments ($p < 0.05$). Curvilinear velocity (VCL) in 0 μM and 20 μM stocks were significantly higher than the other treatment groups, except 75 μM ($p < 0.05$). Higher average path velocity (VAP) was obtained at 20 μM as compared to 100 μM , whereas amplitude of head lateral displacement (ALH) was significantly higher at 20 μM than 50 μM and 100 μM ($p < 0.05$). No differences were obtained for Straight-line velocity (VSL) and Linearity (LIN). In conclusion, our results indicate that Zardaverine improves the motility, VCL, VAP, and ALH of post-thawed boar sperm.

Keywords : Boar, Spermatozoa, Frozen semen, Phosphodiesterase inhibitor, Zardaverine

본 성과물은 2020년 농촌진흥청 연구사업(PJ01504401)과 농촌진흥청(국립축산과학원) 전문연구원 과정 지원사업에 의해 이루어진 것임

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

email: segi0486@korea.kr

Received July 3, 2020

Revised August 7, 2020

Accepted September 4, 2020

Published September 30, 2020

1. 서론

정자세포의 동결보존은 1952년 Polge에 의해 처음 소개된 이후로 축산업 분야에서 사용이 급속히 증가되었다[1]. 정자 동결기술은 고가치 유전자원의 장기보존, 원거리 수송, 병원체 사전검역을 통한 안전한 국제교류 등의 장점을 가지고 있다[2-4]. 그러나 정자동결이 우량 씨수탉지의 유전자원을 반영구적으로 보존할 수 있는 최고의 기술임에도 불구하고 전 세계적으로 돼지인공수정에서 동결정액을 활용하는 비중은 1% 가량이다[5]. 동결정액을 산업현장에 적용함에 있어 가장 큰 제약은 정자세포 동결과정에서 발생하는 저온손상에 의하여 수정능력이 저하되어 수태율과 산자수에 악영향을 미친다는 점이다[6, 7]. 이는 여러가지 장점에도 불구하고 양돈산업에서 동결정액이 널리 활용되지 않은 요인이다[8]. 따라서 정자 동결과정 중에 발생하는 저온손상을 최소화하기 위하여 동해방지제, 항산화제 등 다양한 첨가제의 효과에 대한 연구들이 지속적으로 이루어지고 있다[9].

Cyclic adenosine-3', 5'-monophosphate (cAMP)는 다양한 세포과정을 제어하는 중요한 세포 내 2차 메신저 중 하나로 정자생리 부분에서 역시 주요한 역할을 한다[10]. 이것은 adenylyl cyclase (AC)에 의해 합성되어 진다[11]. 세포 내 cAMP 수준은 ATP로부터 cAMP를 합성하는데 adenylyl cyclase와 phosphodiesterase (PDE) 효소 패밀리의 구성원에 의해 합성과 분해 사이의 평형에 의해 조절이 된다[12]. PDE는 기질 친화성, 생화학 특성 조절 및 억제제에 대한 민감성에 기초하여 11개의 Superfamily로 분류되어있다[13]. 이러한 PDE family는 cAMP 및 cGMP (cyclic guanosine-3', 5'-monophosphate)를 특이적으로 가수분해 할 수 있다고 알려져 있다[14]. 이러한 PDE들은 cyclic nucleotide 신호의 활성을 조절하며 특히 cAMP는 정자의 운동성 조절에 영향을 미친다고 보고되었다[15]. 정자의 운동성과 관련하여 PDE3억제제(Trequinsin hydrochloride), PDE4억제제(8-MeO-IBMX, Rolipram), PDE5억제제(Sildenafil, Tadalafil) 및 PDE10억제제(Papaverine) 등이 알려져 있다. PDE3억제제(Trequinsin hydrochloride)는 정자두부의 침체반응과 운동성을 자극할 수 있다고 보고되었으며[16], PDE4억제제(Rolipram)는 소 정자의 운동성을 점진적으로 증가시켰다고 보고되었다[17]. 또한 다량의 PDE10억제제(Papaverine)는 운동성이 좋지 않은 정액 샘플의 운동성 향상에 도움이 될 수 있다고 보고된 바 있으며[18], PDE4억제제(8-MeO-IBMX)와

PDE5억제제(Sildenafil, Tadalafil)는 정자의 운동성을 증가시키고 침체반응을 활성화시킨다고 보고되었다[19-21]. Zardaverine은 선택적 PDE 3/4 억제제로써 1984년에 처음으로 합성되었다[22]. PDE3와 PDE4를 선택적으로 억제할 수 있기 때문에 cAMP 특이적인 조절 작용을 갖고 있다. 우리는 이전의 논문에서 이미 동결보존되었던 정자의 용해과정에서 용해용 배지(BTS)에 Zardaverine을 첨가한 결과, 정자의 운동성이 유의적으로 개선되는 결과를 얻었다[23]. 그러나 돼지정자의 동결과정에서의 Zardaverine의 첨가효과를 검토하지 못했다. 따라서 본 연구는 돼지정자 동결용 배지(LEY; Lactose-Egg yolk extender)에 대한 Zardaverine의 첨가가 용해 후 정자의 운동학적 특성에 미치는 영향을 평가하기 위해 수행되었다.

2. 재료 및 방법

2.1 공시재료

농촌진흥청 국립축산과학원 양돈과에서 사육된 성숙한 두록종(Duroc) 수퇘지 3두로부터 음경수압법을 이용하여 정액샘플을 채취하였다. 채취된 원정액은 여과지를 통해 교양물질 및 불순물을 제거한 후, 채취정액과 등온 조건(약 38℃)으로 가온한 정액희석액(BTS; Beltsville thawing solution)을 1:1 비율로 1차 희석하여 1시간 이내로 실험실로 운반하여 시험에 이용하였다.

2.2 정액준비

실험실로 운반된 1차 희석정액은 BTS로 2차 희석을 실시하여 최종 정자농도를 30×10^6 cell/ μ l로 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 동결액 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℃, 20분)하여 상층액을 회수하였다. 그 후, 1차 동결보존액에 dimethyl sulfoxide (DMSO),

Sigma)에 각각 다양한 농도(0, 20, 50, 75 및 100 μM)의 Zardaverine 첨가하여 1시간 동안 교반을 실시하였다. 2차 동결보존액은 Zardaverine이 첨가되지 않은 1차 동결보존액에 1.5% Orvus Es Paste (OEP; Nova Chem, U.S.A)와 9% Glycerol (Sigma)을 첨가하여 4°C 냉장고 보관하여 실험에 사용하였다. 동결 시 OEP와 Glycerol의 최종 농도는 각각 0.5%와 3%로 하였다.

2.4 동결 및 융해방법

동결보존에 앞서 정액샘플은 24시간 동안 17°C 냉장고에서 보관되었다. 그 후 정액샘플을 17°C 에서 800×g 로 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°C에서 5°C까지 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°C에 1시간 동안 보관하여 글리세롤 평형을 하였다. 정액샘플의 동결은 자동 정액동결기(SY-LAB Gerate GmbH, Austria)를 사용하여 실시하였고 동결인 완료된 샘플들은 -196°C 액체질소에 담가서 분석에 사용될 때까지 보관하였다. 동결된 스트로우는 38°C 항온수조에 20초 동안 담그는 방법으로 융해하여 BTS와 혼합 후 원심분리(400×g, 38°C, 10분)하여 상층액을 제거하고 BTS로 재부유하여 정자의 운동학적 특성을 분석하는데 이용하였다.

개체 간의 변이를 최소화하기 위해서 동결-융해 후 정자의 운동성이 30% 이상인 개체(두룩종 수퇘지)만을 선발한 후 정액샘플을 pooling 하여 본 연구에 이용하였다.

2.5 정자 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°C로 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 경과시간으로 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 이용하여 ANOVA와 GLM(Generalized linear model)를 적용하여 Duncan의 multiple range test방법에 의하여 통계적 유의성을 분석하였으며 처리 평균 간의 유의성 검정은 t-test를 이용하였다. 유의수준은 5%로 검정을 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

돼지 정액의 동결과정 중 동결보존액에 대한 Zardaverine 첨가가 융해 직후 정자의 운동학적 특성에 미치는 영향은 Table 1과 같다. Zardaverine 20 μM 처리구에서의 운동성은 $55.36 \pm 1.12\%$ 로 다른 처리구들에 비해 유의적으로 높은 운동성을 보였다($p < 0.05$). VCL은 0 μM 처리구($65.29 \pm 0.89 \mu\text{m/s}$)와 20 μM 처리구($69.83 \pm 2.71 \mu\text{m/s}$)는 다른 처리구들보다 다소 높은 값을 보였으며 VAP와 ALH는 20 μM 처리구($49.48 \pm 0.66 \mu\text{m/s}$, $2.38 \pm 0.13 \mu\text{m}$)가 다른 처리구들에 비해 다소 높은 값을 보였다. 하지만, VSL과 LIN에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. Table 2는 동결보존액에 Zardaverine 첨가에 대한 돼지 동결정액 융해 후 30분 경과 시점의 정자의 운동학적 특성을 분석한 결과를 나타내었다. 융해 후 30분 배양한 후에 운동성은 0, 20, 50 μM 처리구간($42.13 \pm 2.36\%$, $44.38 \pm 2.00\%$, $38.30 \pm 3.02\%$)의 유의적인 차이를 보이지 않았지만($p > 0.05$) 75 μM 처리구($37.71 \pm 1.47\%$)와 100 μM 처리구($31.61 \pm 1.08\%$)에 비해 다소 높은 운동성을 보였다($p < 0.05$). VCL은 100 μM 처리구를 제외한 다른 처리구들 간의 유의적인 차이가 없었고($p > 0.05$) VSL과 VAP는 무처리구가 다른 처리구들에 비해 다소 높은 값을 보였다($p < 0.05$).

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

Zardaverine concentration (μM)	Motility ^[1] (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	ALH (μm)
0	44.14±2.14 ^b	65.29±0.89 ^a	42.97±1.10	48.07±1.03 ^{ab}	65.84±2.04	2.19±0.09 ^{ab}
20	55.36±1.12 ^a	69.83±2.71 ^a	42.67±0.11	49.48±0.66 ^a	61.28±2.15	2.38±0.13 ^a
50	43.86±1.80 ^{bc}	56.33±0.56 ^b	39.88±1.02	43.70±0.76 ^{ab}	70.81±1.68	1.86±0.05 ^b
75	47.66±0.29 ^b	62.72±1.49 ^{ab}	43.89±1.63	47.93±1.20 ^{ab}	70.05±2.97	2.04±0.08 ^{ab}
100	37.32±0.98 ^c	56.37±2.11 ^b	36.97±3.21	41.70±3.03 ^b	65.34±3.36	1.98±0.04 ^b

Mean±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 Zardaverine on the kinetic characteristics of frozen-thawed sperm at 30 min after thawing

Zardaverine concentration (μM)	Motility ^[1] (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	ALH (μm)
0	42.13±2.36 ^a	56.54±0.64 ^a	44.34±0.82 ^a	46.93±0.73 ^a	78.41±1.12	1.69±0.04
20	44.38±2.00 ^a	54.18±0.23 ^{ab}	41.58±0.63 ^{ab}	44.16±0.79 ^{ab}	76.74±0.86	1.73±0.06
50	38.30±3.02 ^a	51.44±0.72 ^{ab}	38.74±0.53 ^{bc}	41.52±0.85 ^{bc}	75.33±0.83	1.69±0.04
75	37.71±1.47 ^{ab}	54.31±1.43 ^{ab}	40.16±1.23 ^{bc}	43.29±1.06 ^{abc}	73.99±1.88	1.81±0.05
100	31.61±1.08 ^b	50.56±1.75 ^b	36.67±0.59 ^c	39.72±0.67 ^c	72.67±1.43	1.71±0.09

Mean±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 ($p<0.05$)

하지만, LIN과 ALH에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다($p>0.05$). 본 연구의 결과는 20 μM Zardaverine의 첨가가 동결-융해된 돼지 정자의 운동학적 특성에 대한 긍정적인 영향을 미칠 수 있음을 확인하였다. 이러한 연구 결과는 정자 운동성에 긍정적인 영향을 미친다고 알려진 다양한 PDE 억제제에 대한 다른 연구 결과와 일치한다[16, 18, 20]. Figure 1에서는 융해 후 배양시간이 경과함에 따라 Zardaverine이 동결-융해된 돼 정자의 운동학적 특성에 미치는 영향을 나타내었다. Zardaverine의 첨가는 처리구가 무처리구에 비해 정자의 운동학적 특성들을 개선시켰다. 이전에 정자의 품질에 대한 Zardaverine의 효과를 조사한 연구는 하나 밖에

없었다. Jeong 등(2018)은 다양한 농도(0, 20, 50, 75 및 100 μM)의 Zardaverine을 동결정액의 융해보존액에 첨가하여 실험을 수행하였으며 50 μM 의 Zardaverine이 융해 후 가장 높은 정자의 운동성을 나타내었다고 보고하였다[23]. 반면에, 본 연구에서는 동결보존액에 20 μM Zardaverine 첨가가 융해 후 가장 높은 정자의 운동성을 보였다. 따라서 동결-융해 과정에서 동결 전 또는 후의 보존액에 Zardaverine이 첨가될 때, 동결-융해된 정자의 운동성에 미치는 영향이 상이할 수 있다. 또한, 본 연구는 100 μM Zardaverine이 동결 융해된 돼지 정자의 낮은 운동성과 관련이 있음을 확인하였다. 이 결과는 고농도의 Zardaverine이 정자의 운동

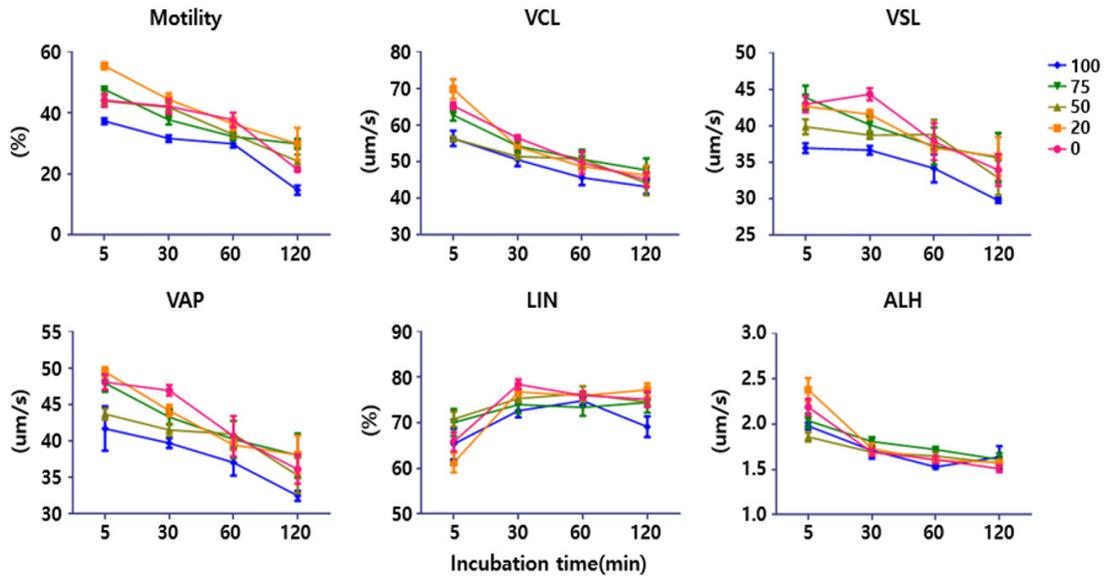


Fig. 1. Effect of different concentrations of Zardaverine (0, 20, 50, 75, and 100 μM) with times on kinetic characteristics of post-thawed boar spermatozoa
 VCL: curvilinear velocity (μm/s); VSL: straight-line velocity (μm/s); VAP: average path velocity (μm/s); LIN: linearity (%); ALH: amplitude of lateral head displacement (μm).

성에 대해 악영향을 주었다.

여러 연구에서 PDE4억제제인 8-MeO-IBMX와 PDE5억제제인 Sildenafil, Tadalafil이 정자의 운동성 증가와 첨체반응 활성화시킨다고 보고되었다[19-21]. 우리는 이전의 연구에서 선택적 PDE 3/4 억제제로 알려진 Zardaverine의 처리가 정자의 생존성, DNA integrity, 미토콘드리아 활성화에 영향을 미치지 않지만 동결 융해된 정자의 운동성과 운동학적 특성들에 긍정적인 영향을 미친다는 것을 보고하였다[23]. 그러나 여러 연구들이 서로 다른 결과들을 보고 했기 때문에 돼지 정자의 운동성과 수정능력의 관계는 여전히 논란의 여지가 있다[24]. 그럼에도 불구하고 정자의 운동성은 임신율, 분만을 및 산자수에 영향을 미치는 수태지의 번식력에 대한 중요한 지표로 간주되어왔다[25]. 따라서 동결정액 융해 후의 정자 운동성을 개선한다면 우량 씨수태지 유전자원의 효율적인 보존과 증식에 큰 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 돼지의 정액을 동결하는 과정에서 발생하는 냉동손상을 최소화하기 위하여 적절한 양의 Zardaverine 사용이 유용할 것으로 사료된다.

4. 결론

본 연구의 결과를 종합해 보면 동결보존액에 대한 20 μM Zardaverine의 첨가는 동결-융해 후 돼지 정자의 운동성, VCL, VSL, VAP, LIN에 긍정적인 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. 돼지정액 동결기술은 우량 씨수태지 유전자원의 장기보존과 번식효율 증진 측면에서 돼지 육종개량과 더불어 양돈산업에서 잠재적으로 활용 가치가 매우 높다. 본 연구의 결과는 돼지정자의 동결보존과 융해 후 수정능력 개선을 위한 다양한 첨가물 활용 연구에 기초자료를 제공할 것으로 사료된다.

References

- [1] C. Polge, L. E. A. Rowson, "Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at -79°C", *Nature*, Vol.169, pp.626-627, 1952.
DOI: <https://doi.org/10.1038/169626b0>
- [2] H. Men, E. M. Walters, H. Nagashima, R. S. Prather, "Emerging applications of sperm, embryo and somatic cell cryopreservation in maintenance, relocation and rederivation of swine genetics", *Theriogenology*, Vol.78, No.8, pp.1720-1729, 2012.

- DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.06.003>
- [3] J. L. Bailey, C. Lessard, J. Jacques, C. Brèque, I. Dobrinski, W. Zeng, H. L. Galantino-Homer, "Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry", *Theriogenology*, Vol.70, No.8, pp.1251-1259, 2008.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.014>
- [4] A. Riesenbeek, "Review on international trade with boar semen", *Reproduction in Domestic Animals*, Vol.46, pp.14-17, 2011.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01869.x>
- [5] M. Yeste, "Recent advances in boar sperm cryopreservation: state of the art and current perspectives", *Reproduction in Domestic Animals*, Vol.50, pp.71-79, 2015.
DOI: <https://doi.org/10.1111/rda.12569>
- [6] I. Casas, G. C. Althouse, "The protective effect of a 17 C holding time on boar sperm plasma membrane fluidity after exposure to 5°C", *Cryobiology*, Vol.66, No.1, pp.69-75, 2013.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.11.006>
- [7] R. V. Knox, "The current value of frozen-thawed boar semen for commercial companies", *Reproduction in Domestic Animals*, Vol.46, pp.4-6, 2011.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01822.x>
- [8] R. Grossfeld, B. Sieg, C. Struckmann, A. Frenzel, W. M. C. Maxwell, D. Rath, "New aspects of boar semen freezing strategies", *Theriogenology*, Vol.70, No.8, pp.1225-1233, 2008.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.017>
- [9] M. Yeste, "Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs", *Theriogenology*, Vol.85, No.1, pp.47-64, 2016.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.047>
- [10] M. G. Buffone, E. V. Wertheimer, P. E. Visconti, D. Krapf, "Central role of soluble adenylyl cyclase and cAMP in sperm physiology", *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, Vol.1842, No.12, pp.2610-2620, 2014.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.07.013>
- [11] M. Balbach, V. Beckert, J. N. Hansen D. Wachten, "Shedding light on the role of cAMP in mammalian sperm physiology", *Molecular and Cellular Endocrinology*, Vol.468, pp.111-120, 2018.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.11.008>
- [12] J. G. Hardman, G. A. Robison, E. W. Sutherland, "Cyclic nucleotides", *Annual Review of Physiology*, Vol.33, No.1, pp.311-336, 1971.
DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.33.030171.001523>
- [13] M. Conti, J. Beavo, "Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling", *Annual Review of Biochemistry*, Vol.76, pp.481-511, 2007.
DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.060305.150444>
- [14] A. Bergeron, A. Hébert, C. Guillemette, A. Laroche, M. P. Poulin, J. P. Aragon, P. Leclerc, R. Sullivan, P. Blondin, C. Vigneault, F. J. Richard, "Papaverine-sensitive phosphodiesterase activity is measured in bovine spermatozoa", *Andrology*, Vol.5, No.1, pp.169-179, 2016.
DOI: <https://doi.org/10.1111/andr.12290>
- [15] D. D. Hoskins, M. L. Hall, D. Munsterman, "Induction of motility in immature bovine spermatozoa by cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors and seminal plasma", *Biology of Reproduction*, Vol.13, No.2, pp.168-176, 1975.
DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod13.2.168>
- [16] R. C. McBrinn, J. Fraser, A.G. Hope, D. W. Barratt CLR, S. J. Martins da Silva, S. G. Brown. "Novel pharmacological actions of trequinsin hydrochloride improve human sperm cell motility and function", *British Journal of Pharmacology*, Vol.176, No.23, pp.4521-4536, 2019.
DOI: <https://doi.org/10.1111/bph.14814>
- [17] M. Bajpai, S. E. Fiedler, Z. Huang, S. Vijayarahavan, G. E. Olson, G. Livera, M. Conti, D. W. Carr, "AKAP3 selectively binds PDE4A isoforms in bovine spermatozoa", *Biology of Reproduction*, Vol.74, No.1, pp. 109-118, 2006.
DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.043588>
- [18] S. Tardif, O. A. Madamidola, S. G. Brown, L. Fram, L. Lefièvre, P. G. Wyatt, C. L. R. Barratt, S. J. M. D. Silva, "Clinically relevant enhancement of human sperm motility using compounds with reported phosphodiesterase inhibitor activity", *Human Reproduction*, Vol.29, No.10, pp.2123-2135, 2014.
DOI: <https://doi.org/10.1093/humrep/deu196>
- [19] J. D. Fisch, B. Behr, M. Conti, "Enhancement of motility and acrosome reaction in human spermatozoa: differential activation by type-specific phosphodiesterase inhibitors", *Human Reproduction*, Vol.13, No.13, pp.1248-1254, 1998.
DOI: <https://doi.org/10.1093/humrep/13.5.1248>
- [20] M. I. Sousa, S. Amaral, R. S. Tavares, C. Paiva, J. Ramalho-Santos, "Concentration-dependent Sildenafil citrate (Viagra) effects on ROS production, energy status, and human sperm function", *Systems Biology in Reproductive Medicine*, Vol.60, No.2, pp.72-79, 2014.
DOI: <https://doi.org/10.3109/19396368.2013.867380>
- [21] Y. Yang, Y. Ma, H. Yang, Y. Jin, K. Hu, H. X. Wang, Y. X. Wang, Y. R. Huang, B. Chen, "Effect of acute tadalafil on sperm motility and acrosome reaction: in vitro and in vivo studies", *Andrologia*, Vol.46, No.4, pp.417-422, 2014.
DOI: <https://doi.org/10.1111/and.12097>
- [22] L. Sun, H. Quan, C. Xie, L. Wang, Y. Hu, L. Lou, "Phosphodiesterase 3/4 inhibitor zardaverine exhibits

potent and selective antitumor activity against hepatocellular carcinoma both in vitro and in vivo independently of phosphodiesterase inhibition”, *PLoS one*, Vol.9, No.3, 2014.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090627>

- [23] J. Jeong, S. J. Sa, H. J. Chung, S. Baek, I. Choi, “A Dual Phosphodiesterase Inhibitor, Zardaverine (type 3/4), Enhances Motility of Frozen-thawed Boar Sperm”, *CryoLetters*, Vol.39, No.3, pp.196-200, 2018.
- [24] A. L. Ruiz-Sánchez, R. O’Donoghue, S. Novak, M. K. Dyck, J. R. Cosgrove, W. T. Dixon, G. R. Foxcroft, “The predictive value of routine semen evaluation and IVF technology for determining relative boar fertility”, *Theriogenology*, Vol.66, No.4, 2006.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.12.012>
- [25] B. L. W. J. Broekhuijse, E. Šošarić, H. Feitsma, B. M. Gadella, “Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility”, *Journal of Animal Science*, Vol.90, No.3, pp.779-789, 2012.
DOI: <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4311>

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

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

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

최 요 한(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

홍 준 기(Jun-Ki Hong) [정회원]



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

<관심분야>
가축육종, 유전체학

김 영 신(Young-Sin Kim)

[정회원]



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

〈관심분야〉

가축육종, 유전체학

사 수 진(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

정 학 재(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

백 선 영(Sun-Young Baek)

[정회원]



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

〈관심분야〉

생명공학, 동물발생