

## 항산화 효소가 첨가된 Percoll에 의해 분리한 돼지 정액의 동결-융해 능력

이경진<sup>1,2</sup> · 이상희<sup>1</sup> · 주선호<sup>1</sup> · 김유진<sup>1</sup> · 양진우<sup>1</sup> · 이연주<sup>1</sup> · 황보 용<sup>1</sup> · 이승형<sup>1</sup> · 이승태<sup>1</sup> · 이은송<sup>3</sup> · 박춘근<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>강원대학교 동물생명과학대학, <sup>2</sup>정선군청 농업축산과, <sup>3</sup>강원대학교 수의과대학

### Cryo-Ability of Boar Sperm sorted by Percoll Containing of Antioxidative Enzyme

Kyung-Jin Lee<sup>1,2</sup>, Sang-Hee Lee<sup>1</sup>, Seon-Ho Joo<sup>1</sup>, Yu-Jin Kim<sup>1</sup>, Jin-Woo Yang<sup>1</sup>, Yeon-Ju Lee<sup>1</sup>, Yong Hwangbo<sup>1</sup>, Seunghyung Lee<sup>1</sup>, Seung Tae Lee<sup>1</sup>, Eunsong Lee<sup>3</sup> and Choon-Keun Park<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Animal Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

<sup>2</sup>Department of Agriculture and Livestock Division, Jeongseon 233-701, Korea

<sup>3</sup>College of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

#### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the efficiency of sperm cryosurvival in boar sperm separated by Percoll containing antioxidant enzymes. The boar semen was collected into a pre-warmed (37°C) thermos bottle by gloved-hand method and was separated by 65% Percoll with superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione (GSH) before freezing. The frozen sperm was thawed at 38.5°C for 45 sec in water-bath for sperm characteristic analysis. The sperm were estimated with SYBR14/PI double staining for viability, FITC-PNA/PI double staining for acrosome reaction, Rhodamine123/PI double staining for mitochondrial integrity and were analyzed using flow cytometry. In results, sperm viability, acrosome reaction and mitochondrial integrity were improved in separated sperm groups compared with unseparated sperm by Percoll (UP) group. Especially, viability was significantly higher in sperm separated by Percoll containing 400 IU CAT group compared with other groups ( $P<0.05$ ). And acrosome reaction was decreased in sperm separated by Percoll with 300 IU SOD, 400 IU CAT and 0.5 mM GSH groups compared with other groups, however, there were no significantly difference mitochondrial integrity among sperm separated by Percoll with antioxidant enzymes. In conclusion, we suggest that use of Percoll containing antioxidant enzymes for sperm separation will be beneficial for sperm cryopreservation in pigs.

(Key word: Percoll, antioxidative enzymes, sorting, cryopreservation, boar sperm)

#### 서 론

정액의 동결 보존은 정자를 초저온에서 보관하는 기술로, 반영구적인 보관이 가능하여 우수한 형질의 유전자원을 보존할 수 있는 특징을 가지고 있다. 이러한 장점으로 멸종위기 동물의 유전자원 보존과 가축의 개량 및 생산성 향상에 크게 영향을 미쳤다(Sieme와 Oldenhof, 2015). 동결과정 중 다양한 물리적, 화학적 스트레스에 노출되어 세포에서 생성되는 과도한 활성 산소 종에 의해 정자가 손상을 받게 된다(Santiani 등, 2014). 특히 돼지 정자는 다른 종에 비해 세포막 내 다중불포화지방산의 농도가 높기 때문에 산화적 충격에 더 민감하다

(Strzezek 등, 2004). 이러한 활성 산소는 정자의 생존율과 운동성의 감소, 세포막 손상 및 DNA 손상에 영향을 미치게 되어, 최종적으로 정자의 수정능력을 감소시키게 된다(Knox 등, 2015).

정자 내에서 발생하는 활성 산소의 종류로는  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  및  $OH^-$  등이 있으며, 이러한 물질들은 정자의 세포 내 산화 충격에 영향을 미친다(Bansal, 2015). 이러한 활성 산소는 세포의 항산화 효소들에 의하여  $O_2$ 와  $H_2O$ 로 분해되는데, 이 중 superoxide dismutase(SOD)는  $O_2^-$ 를 안정한 형태인  $H_2O_2$ 로 전환시켜 주며(Buffone 등, 2012), catalase(CAT)는 전환된  $H_2O_2$ 를  $H_2O$ 와  $O_2$ 로 전환시켜 활성 산소를 제거하는 역할을 한다(Moubasher 등, 2013). 또한 SOD와 CAT에 의해 제거되지 못한  $H_2O_2$ 는

glutathione(GSH)에 의해 H<sub>2</sub>O로 전환되어 제거된다(Yeste 등, 2014). 이러한 항산화 효소들은 정원세포의 세포질에 존재하지만, 정자형성과정 중 세포질이 대부분 소실되기 때문에 정액액 내에 존재하는 항산화 효소에 의해 정자의 활성 산소가 조절된다(Mostafa 등, 2012). 이렇듯 정자는 세포 내 항산화 효소가 다른 세포에 비하여 부족하기 때문에, 동결 시 발생하는 과도한 활성 산소를 조절하기 위하여 항산화 효소인 SOD, CAT 및 GSH를 비롯한 다양한 항산화제를 동결 보존액에 첨가하는 실험이 많이 이루어지고 있다.

동결-융해된 정자의 경우, 생존율이 신선정액에 비해 낮아지기 때문에 생존율이 높은 정자를 선별하기 위한 방법으로 Percoll을 이용한 정액 분리법을 이용하고 있다(Noguchi 등, 2015). 이러한 Percoll 분리법은 활력이 좋은 정자를 선별할 수 있는 기술 중 하나이기 때문에, 고품질의 정자만을 분리한 후 동결 보존에 이용하는데 사용된다(Am-In 등, 2013). 하지만 Percoll 분리는 고품질의 정자를 선별할 수 있지만, 분리과정 중 정액액이 분리되어 정자가 활성 산소에 쉽게 노출된다는 단점(Ahmad 등, 2010)이 있기 때문에 Percoll에 의해 분리된 고품질 정자가 동결되는 동안 발생하는 활성 산소를 감소시켜, 융해 후 성상을 증진시킬 수 있는 항산화제를 첨가하여 고품질의 동결 정액을 생산하는 기술이 필요하다고 판단된다. 따라서 본 연구에서는 고품질 정자의 동결 효율을 높이기 위해 SOD, CAT 및 GSH와 같은 항산화 효소가 첨가된 Percoll을 이용하여 돼지 정액을 분리한 후, 동결-융해 후 돼지 정자의 성상을 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 정액의 채취

동물실험은 강원대학교 동물실험윤리위원회의 승인(No: KI-ACUC-09-0139)을 얻어 지침에 따라 수행하였으며, 본 연구에 이용된 정액은 음경수압법을 이용하여 돼지에서 채취하였고, 38°C로 가온된 modified modena B(30.0 g/l glucose, 2.25 g/l EDTA, 2.50 g/l sodium citrate, 1.00 g/l sodium bicarbonate, 5.00 g/l tris, 2.50 g/l citric acid, 0.05 g/l cysteine 및 0.30 g/l gentamicin sulfate)와 1:1(v/v)로 희석하여 1시간 이내로 실험실로 운반하여 18°C 냉장고에서 24시간동안 보관하였다. 본 실험에는 Lee와 Park (2015)의 방법에 따라 70% 이상의 정상 움직임과 80% 이상의 생존율을 나타내는 정액을 선별하여 실험에 사용하였다.

### 2. Percoll 분리 전처리 및 분리과정

돼지 정액을 분리하기 위해 사용된 Percoll 제조방법은 이전 연구에 따라 진행하였다(Lee 등, 2010). 정액 분리 전 65% Percoll에는 0, 100, 300 및 500 IU SOD(Sigma, St. Louis, MO,

USA), 0, 200, 400 및 800 IU CAT(Sigma) 및 0, 0.5, 1.0 및 2.0 mM GSH(Sigma)를 첨가하여 2시간 동안 교반한 뒤 실험에 이용하였다. 효율적인 정자 분리를 위해 채취 후 희석된 정액은 원심분리(1,500 rpm, 5분)하여 정장 물질 제거 후 Modena B를 이용하여 1.0×10<sup>9</sup>개/ml 농도로 재분주하였다. 이 후 정액과 항산화제가 함유된 65% Percoll의 비율을 1:2(v/v)가 되도록 정액을 65% Percoll 위에 섞이지 않도록 분주한 후, 원심분리(2,000 rpm, 20분, 18°C)하여 하단의 분리된 정자만을 회수하였고, 회수한 정자는 동결 보존액을 사용하여 2회 세척(1,500 rpm, 5분)하였으며, Percoll에 의해 분리되지 않은 정자(Unseparated Percoll; UP)는 대조구로 사용하였다.

### 3. 정자 동결 및 융해

Percoll에 의해 분리된 돼지 정자는 Triladyl(Minitube, Tiefenbach, Germany) 동결 보존액을 이용하여 동결하였다(Lee 등, 2010). Triladyl 1차 동결 보존액은 Triladyl에 20% 난황만을 첨가하여 각각 원심분리(3,000 rpm, 30분, 4°C) 후 상층액만을 사용하였다. 동결 시 Glycerol(Sigma)과 Orvus Es Paste(OEP, Equex<sup>®</sup> STM paste, Nova Chemical Sales, USA)의 최종 농도를 각각 3%와 0.5%로 맞추기 위하여 2차 동결 보존액은 1차 동결 보존액에 9% Glycerol과 1.5% OEP를 첨가하여 4°C 냉장고에 보관하였다. Percoll로 분리된 정액은 Triladyl의 1차 및 2차 동결 보존액으로 2회 세척 후, 정자의 농도를 1.5×10<sup>9</sup>개/ml가 되도록 1차 동결 보존액을 첨가한 후 2시간 동안 4°C로 냉각하였다. 그 후 4°C의 2차 동결 보존액으로 정자의 농도가 1.0×10<sup>9</sup>개/ml가 되도록 희석한 후, 0.5 ml straw에 담아 -120°C에서 10분 동안 예비동결 후 -196°C의 액체 질소에 침지하여 동결 보존하였다. 동결 보존된 straw는 38°C로 가온된 항온수조에 45초 동안 융해하였으며, 융해된 정자는 Beltsville thawing solution(BTS)로 희석하여 원심분리(1,500 rpm, 5분, 18°C) 후 분석에 사용하였다.

### 4. 생존율, 침체 반응을 및 미토콘드리아 온전성 검사

정액의 성상을 검사하기 위해 사용된 돼지 정자는 Modena B를 이용해 1.0×10<sup>6</sup>개/ml의 농도로 희석한 후 염색을 실시하였다. 정자의 생존율 검사를 위해 40 nM의 SYBR-14(Live/Dead sperm viability kit, Molecular probes, USA), 침체 반응을 검사를 위해 2 μM의 Lectin from *Arachis hypogaea*(FITC-PNA; Sigma), 미토콘드리아 온전성 측정을 위해 2 μM의 Rhodamine123 (Sigma)를 희석된 정자에 첨가하여 38°C에서 5분 동안 배양하고, 2 μM의 Propidium iodide(PI; Sigma)와 이중염색한 후 38°C에서 5분 동안 배양하였다.

### 5. Flow Cytometry

형광염색이 완료된 정액은 원심분리(1,500 rpm, 5분) 후 상층액을 제거한 뒤 PBS를 이용하여 재분주하였고, Flow cytometry(BD FACSCanto™II, Becton Dickinson, San Diego, USA)를 사용하여 10,000개의 정자를 형광의 발현차를 분석하였으며, 동결-용해된 정자의 생존율, 침체 반응을 및 미토콘드리아 온전성은 CELLQuest version 6.0(Becton Dickinson)을 이용하여 Lee와 Park(2015)의 방법에 따라 분석하였다.

6. 통계처리

FACS분석을 통해 얻어진 결과는 SAS 9.3을 사용하여 최소 유의차 검정(Least Significant Different test; LSD test)과 General linear model(GLM)을 적용하여 Duncan의 multiple range test에 의하여 유의차( $P < 0.05$ )를 검정하였다.

결 과

1. 항산화 효소가 첨가된 Percoll을 이용하여 분리한 돼지정자의 동결-용해 후 생존율 평가

SOD를 첨가 시 살아있는 정자의 생존율(Live)은 Percoll 분리 처리군 사이에 유의적인 차이는 나타나지 않았지만, Percoll을 분리하지 않은 UP와 비교했을 때 300 IU의 농도에서 유의적( $P < 0.05$ )으로 높았다(Fig. 1A). 또한 죽어가는 정자(Dying)의 비율은 UP보다 Percoll 분리된 처리군에서 유의적으로 감소하였지만( $P < 0.05$ ), 항산화 효소 처리군 사이에서는 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Fig. 1A). CAT를 첨가한 실험의 정자의 생존율은 UP에 비해 200, 400 및 800 IU에서 유의적으로 증가하였으며( $P < 0.05$ ), 특히 Percoll 처리군 내에서 400 IU의 농도에서 유의적( $P < 0.05$ )으로 높았으며, 죽어가는 정자의 비율은 Percoll 분리된 그룹에서 유의적( $P < 0.05$ )으로 감소하였다(Fig. 1B). GSH를 첨가하였을 때 0.5 mM 처리군에 비해 2.0 mM에서 정자의 생존율이 유의적( $P < 0.05$ )으로 낮았으나, 죽어가는 정자의 비율은 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Fig. 1C).

2. 항산화 효소가 첨가된 Percoll을 이용하여 분리한 돼지정자의 동결-용해 후 침체 반응을 평가

SOD, CAT 및 GSH가 첨가된 Percoll에 의해 분리된 돼지정자의 동결-용해 후 침체 반응율(Acrosome reaction)에 대한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 그 결과, 살아있는 정자에서의 침체 반응율(Live sperm)은 모든 항산화제 처리군에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 하지만 전체 정자 중 침체 반응이 일어난 정자의 비율(All sperm)을 분석하였을 때, 항산화제를 포함한 Percoll 분리 처리군에서 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. 특히 대조군(UP)와 비교하였을 때, 100 및 300 IU SOD

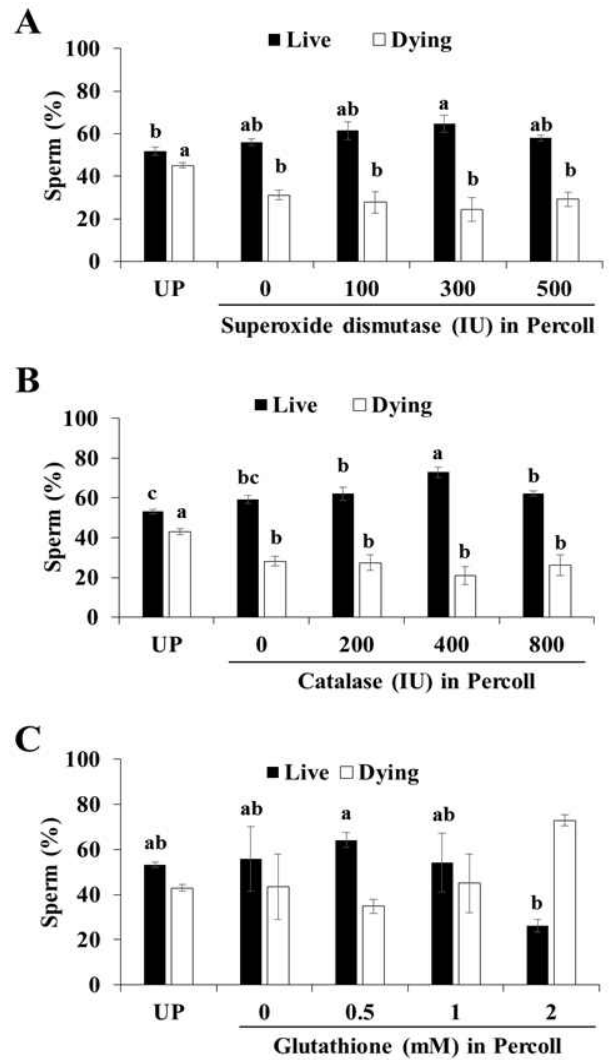


Fig. 1. Viability after frozen-thawing of boar sperm separated by Percoll with antioxidants, superoxide dismutase (A), catalase (B) and glutathione (C). boar sperm was cryopreserved after unseparated by Percoll (UP). ( $P < 0.05$ ,  $n=3$ ).

(Fig. 2A), 200 및 400 IU CAT(Fig. 2B) 및 0.5 mM GSH(Fig. 2C)를 Percoll에 첨가하여 분리한 정자의 동결-용해 후 침체 반응율이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다( $P < 0.05$ ). 반면, 항산화제가 포함된 Percoll에 의해 분리된 정자의 침체 반응율을 분석하였을 때에는 300 IU SOD 처리군에서는 유의적( $P < 0.05$ )으로 감소하였으나(Fig. 2A), CAT와 GSH 처리군에서는 처리군 간 유의적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 2B 및 2C).

3. 항산화 효소가 첨가된 Percoll을 이용하여 분리한 돼지정자의 동결-용해 후 미토콘드리아 온전성 평가

Fig. 3은 SOD, CAT 및 GSH가 함유된 Percoll에 의해 분리

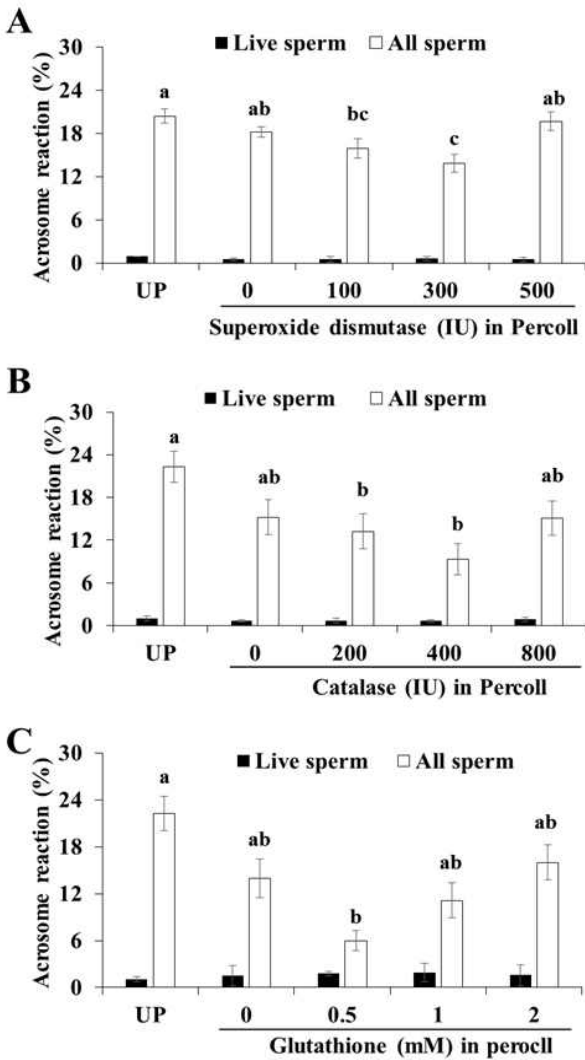


Fig. 2. Acrosomal reaction frozen-thawing of boar sperm separated by Percoll with antioxidants, superoxide dismutase (A), catalase (B) and glutathione (C). boar sperm was cryopreserved after unseparated by Percoll (UP). ( $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ).

된 돼지 정자의 동결-용해 후의 미토콘드리아의 온전성을 평가한 결과이다. 살아있는 정자(Live)에서의 미토콘드리아 온전성은 Percoll에 SOD, CAT 및 GSH를 첨가하여 정자를 분리하였을 때, 분리하지 않은 처리구(UP)에 비해 높아지는 경향을 보였으며, 특히 100 및 300 IU SOD(Fig. 3A), 400 IU CAT (Fig. 3B) 및 GSH(Fig. 3C)를 첨가한 모든 처리구에서 유의적으로 높은 미토콘드리아 온전성을 나타냈다( $P < 0.05$ ). 전체 정자(All sperm) 중 미토콘드리아 온전성은 SOD(Fig. 3A)와 CAT (Fig. 3B)에서는 처리구간 유의적인 차이를 보이지 않았지만, 0.5 mM GSH 첨가군에 비해 2 mM 첨가군이 유의적( $P < 0.05$ )으로 낮은 미토콘드리아 온전성을 나타냈다(Fig. 3C).

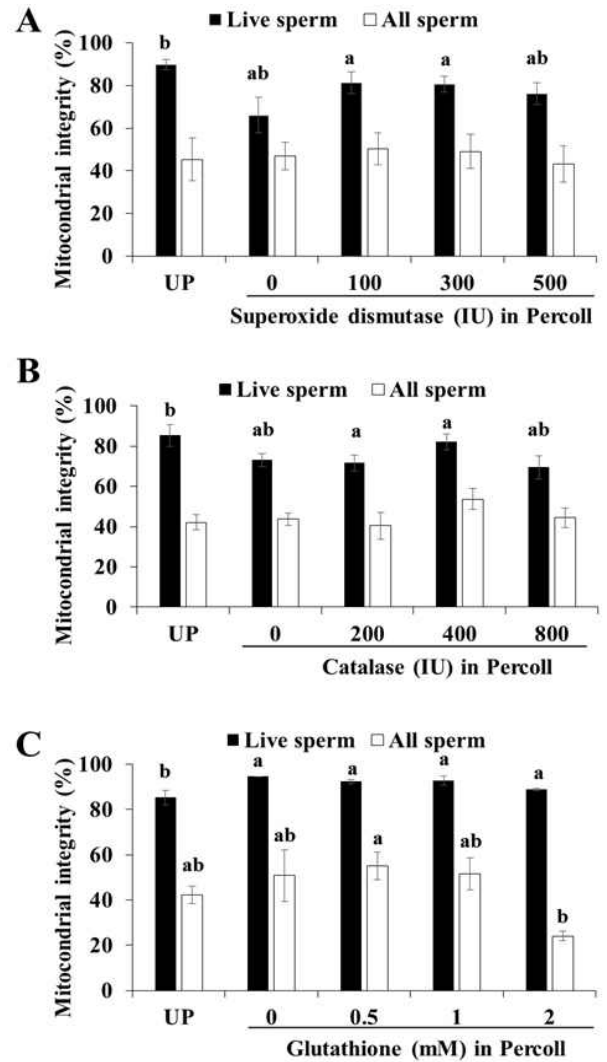


Fig. 3. Mitochondrial activity frozen-thawing of boar sperm separated by Percoll with antioxidants, superoxide dismutase (A), catalase (B) and glutathione (C). boar sperm was cryopreserved after unseparated by Percoll (UP). ( $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ).

### 고찰

본 연구는 동결-용해된 돼지 정액의 질을 향상시키기 위해, 동결 전 SOD, CAT 및 GSH와 같은 항산화제가 첨가된 Percoll로 정액을 분리하여 동결을 실시하였다. 일반적으로 동결은 정액의 이동과 사용에 용이하지만 동결 시 발생하는 산화스트레스에 의해 신선정액에 비해 낮은 생존율을 보이며, 첨체와 미토콘드리아가 손상이 된다는 단점이 있기 때문에, 동결-용해 과정에서 발생하는 정자의 손상을 감소시키기 위해 여러 동물에서 연구가 이루어졌다(Cevdet 등, 2014; Noguchi 등, 2015). 또한 동결 효율을 높이기 위한 방법으로 정자의 농도(Contri

등, 2012)와 선발(Noguchi 등, 2015; Shojaei 등, 2012), 항산화제(Bucak 등, 2012; Câmara 등, 2011) 및 동결 보존액 조성(Tuncer 등, 2013)에 관한 연구가 이루어졌다. 하지만 이런 노력에도 불구하고, 돼지 정자의 동결효율은 낮은 실정이다.

돼지 정액을 65% 이상의 Percoll로 분리하게 되면 정액 내 세균과 미생물이 모두 제거될 뿐만 아니라, 정자의 성장과 수정능력이 증가(Yoo 등, 2009)하게 되며, 이렇게 분리된 돼지 정자는 동결-융해 후 성장과 수정능력이 증가하게 된다(Lee 등, 2010; Lee 등, 2011). 실제로 돼지 정자 동결 시 이미 동결-융해에 의해 손상된 정자를 첨가하였을 때, 첨가된 동결 융해 정자의 비율이 높을수록 동결의 효율이 감소(Martinez-Alborcia 등, 2012)하게 되고, 신선정액의 살아있는 정자의 비율에 따라 동결의 효율과 세포 내 산화스트레스가 차이가 나게 된다(Yeste 등, 2013). 따라서 살아있는 정자만을 분리하여 동결에 이용하는 기술은 선천적으로 정액의 품질이 낮은 품종과 개체의 정자, 멸종위기 동물의 정자 및 야생동물과 같은 동결 방법이 명확하게 확립되지 않은 정자 동결에 이용가치가 높을 것이라 생각된다. 실제로 본 연구에서도 Percoll에 의해 분리된 정자는 그렇지 않은 정자에 비해 동결-융해 후의 정자 성상이 향상된 것을 확인하였으며, 이러한 결과는 살아있는 정자가 동결에 긍정적인 영향을 미쳤다고 판단된다.

세포의 대사과정과 외부의 충격으로 인해 생성되는 활성 산소는 세포질 내에 존재하는 항산화 효소와 이와 관련된 시스템에 의해 제거되지만, 생식세포 중 하나인 정자의 경우, 감수분열과 정자 형성과정을 거치면서 정원세포의 세포질이 droplet으로 변화되어, 정자가 사출되는 과정에서 손실된다(Aitken과 Baker, 2004). 이러한 생리학적 현상으로 정자는 다른 세포에 비하여 세포질의 항산화 효소가 부족하여 산화충격에 매우 취약하기 때문에, 웅성 생식기계에서는 정자에서 발생하는 활성 산소를 억제하기 위하여 사출 시 항산화 효소가 포함된 정장액과 혼합되어 활성 산소를 조절한다고 알려져 있다(Aitken과 Baker, 2004). 이러한 이유로 항산화 효소가 첨가된 동결 보존액을 이용하여 돼지 정자를 동결-융해하였을 때, 그 효율이 증진시키는 연구(Gadea 등, 2004; Roca 등, 2005)는 많이 이루어지고 있다. 본 연구에서 이용한 Percoll 분리방법은 살아있는 정자만을 분리하는 방법이기도 하지만, 항산화 효소들이 함유되어 있는 정장액이 모두 제거되기 때문에 Percoll에 항산화제를 첨가하여 정액을 분리한 후 동결에 이용하였다.

SOD는 세포에 존재하는 대표적인 항산화 효소로써, 세포 내 superoxide 음이온을 제거하는 작용을 수행한다(Alvarez와 Storey, 1992). 따라서 산화충격으로부터 세포나 조직을 보호하거나, 세포의 체외 배양과 동결 과정에서 발생하는 산화 충격을 억제하는데 이용된다(Lortz와 Tiedge, 2003; Scarpa 등, 2014). 또한 정자에서는 동결 전 평형 배양액(Câmara 등, 2011)이나

동결 보존액(Forouzanfar 등, 2013)뿐만 아니라, 융해 배양액(Amini 등, 2015)에 첨가하여 산화 충격을 억제하는데 사용되고 있다. 본 연구에서는 동결 전 정액을 Percoll로 분리하는 과정에서 SOD를 첨가하여, 생존율과 침체 온전성, 미토콘드리아 온전성의 효율을 평가한 결과, 모든 검사항목에서 Percoll 분리 후 동결한 처리군에서 대조군에 비해 높은 생존율과 미토콘드리아 온전성, 낮은 침체 반응율이 나타났다. 이러한 결과는 SOD가 첨가된 동결 보존액을 이용하여 돼지(Noguchi 등, 2015)와 소(Am-In 등, 2013) 정자의 동결-융해 성상이 증진되었다는 결과와 유사하지만, SOD가 첨가된 Percoll을 이용하여 정자를 분리 후 동결한 연구는 본 연구에서 최초로 실시되었다. 이는 Percoll 분리과정에서 정자로 흡수된 SOD가 세포 내의 산소 라디칼에 의한 세포 손상을 억제(Alvarez와 Storey, 1989)시킨다는 연구결과와 더불어 동결 과정으로 인한 산화 충격도 감소시켰다고 사료된다.

세포기관 중 하나인 peroxisome은 보통 미토콘드리아나 엽록체 주변에 존재하며, 식물, 동물 및 원생동물을 포함한 매우 다양한 생물체에서 발견된다. Peroxisome의 주요 효소인 CAT는 생체 내 존재하는 항산화 효소 중 하나로 생체에 독성을 가지는 과산화수소를 물과 산소로 분해하는 효소로 알려져 있다(Bonekamp 등, 2009). 활성 산소는 세포의 성장과 생존에서 항상성을 유지해주는 중요한 역할을 하지만, 활성 산소의 생성과 제거 반응간의 불균형은 세포의 정상기능을 손상시킬 뿐만 아니라, DNA, 지질 및 단백질을 손상시켜 노화와 세포사멸에 주요한 원인이 된다(Cabiscol 등, 2010; Rassool 등, 2007). CAT는 이러한 활성 산소를 감소시키는 역할을 하는 대표적인 물질로써, 세포의 활성 산소 및 산화충격과 같은 스트레스를 줄이거나 손상을 회복시킬 수 있는 능력이 있다(Gill과 Tuteja, 2010). 실제로 동해방지제에 CAT를 첨가하여 보다 줄기세포의 안전한 동결을 시행하였다는 보고(Seo 등, 2011)가 있으며, 정자 동결 시에도 CAT는 유용한 항산화제로 널리 이용되고 있다(Hernández 등, 2007). 실제로 이러한 CAT는 동결-융해과정에서 다양한 물리적, 화학적 충격으로 인해 발생하는 활성 산소를 물과 산소로 분해할 수 있을 뿐만 아니라, 지질과산화의 형성으로 이어지는 반응성 라디칼의 연쇄반응을 제거해주는 특징이 있다(Fernández Santos 등, 2009). 실제로, 돼지 정자 동결 시 CAT를 첨가하였을 때, 생존율과 운동성이 증가하였으며, DNA 손상과 침체막 손상이 감소하였다(Grossfeld 등, 2008). 이러한 결과를 비교하였을 때, 본 연구에서 400IU CAT가 함유된 Percoll에 의해 분리된 고품질의 정자 역시 동결 시 CAT의 긍정적인 영향을 받아 생존율, 침체 반응율 및 미토콘드리아 온전성이 향상되었다고 판단된다.

GSH는 free radical, 과산화 지질 및 중금속과 같은 활성 산소 중으로부터 세포의 손상을 방지하는 산화방지제로써, 세포

배양시 첨가나 세포의 항산화 능력을 판단하는 지표로 이용된다(Jayakumar 등, 2014). 이전 연구들은 세포 내에서의 GSH의 역할(Armstrong 등, 2002; Guha 등, 2011)과 GSH의 고갈이 미치는 영향(Khan 등, 2012)에 대해서 연구되었으며, 항산화제(Chen 등, 2013; Zou 등, 2012), 비타민(Jain과 Micinski, 2013)과 같은 첨가제를 통해 세포 내 GSH 수준을 높이기 위한 연구가 진행되었다. 이러한 특징 때문에 GSH는 정자의 생존율과 운동성을 증가시키며, DNA의 손상과 활성 산소 감소시키는데 이용된다(Yeste 등, 2014). 이와 같은 결과는 정자 내로 흡수된 GSH가 세포에 존재하는 활성 산소와 반응하여 세포 손상을 억제(Atig 등, 2012)할 뿐만 아니라, 지질 과산화 반응이 진행되는 동안 발생하는 세포 독성물질인 aldehyde와 반응함으로써 정자의 세포막을 보호(Sørensen 등, 1999)하기 때문이다. 본 연구에서도 GSH 0.5 mM가 포함된 Percoll로 분리 후 동결-융해된 돼지 정자가 다른 처리군에 비해 생존율이 증가하고, 침체 반응율이 감소하는 것을 확인하였으며, 이는 Percoll 분리 과정에서 흡수된 GSH가 동결-융해 후 정자의 성상에 긍정적인 영향을 주었다고 생각된다.

따라서 정자의 동결 효율을 높이기 위해 SOD, CAT 및 GSH와 같은 항산화 효소를 Percoll에 첨가하여 고품질의 정자를 분리 후 돼지 정액을 동결 보존한다면 그 효율을 향상시킬 수 있다고 판단된다. 이러한 기술은 선천적으로 생존율이 낮은 개체의 정자를 동결 보존할 때 효율적으로 사용할 수 있다고 판단되며, 희귀동물 또는 멸종위기 동물 웅성 생식세포 유전자원 보존에 이로운 영향을 미칠 것이라 기대된다.

## REFERENCES

- Ahmad MK, Mahdi AA, Shukla KK, Islam N, Rajender S, Madhukar D, Shankhwar SN and Ahmad S. 2010. Withania somnifera improves semen quality by regulating reproductive hormone levels and oxidative stress in seminal plasma of infertile males. *Fertil. Steril.* 94:989-996.
- Aitken RJ and Baker MA 2004. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reprod. Fertil. Dev.* 16:581-588.
- Alvarez JG and Storey. BT 1989. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res.* 23:77-90.
- Alvarez JG and Storey BT. 1992. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J. Androl.* 13:232-241.
- Am-In N, Chankitisakul V and Techakumphu M. 2013. Comparison of motility, morphology, acrosome integrity, membrane integrity and fertilizing ability of frozen-thawed buffalo sperm separated by a Percoll® gradient or Puresperm®. *Buffalo Bulletin. International Buffalo Information Center*, pp 405-408.
- Amini MR, Kohram H, Zare-Shahaneh A, Zhandi M, Sharideh H and Nabi MM. 2015. The effects of different levels of catalase and superoxide dismutase in modified Beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality. *Cryobiology.* 70:226-232.
- Armstrong J, Steinauer K, Hornung B, Irish J, Lecane P, Birrell G, Peehl D and Knox S. 2002. Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line. *Cell Death Differ.* 9:252-263.
- Atig F, Raffa M, Habib B-A, Kerkeni A, Saad A and Ajina M. 2012. Impact of seminal trace element and glutathione levels on semen quality of Tunisian infertile men. *BMC urol.* 12:16.
- Bansal AK. 2015. Antioxidants and Other Potent Strategies to Reduce Oxidative Stress in Semen. *Free Radicals in Human Health and Disease.* Springer, pp 381-395.
- Bonekamp NA, Völkl A, Fahimi HD and Schrader M. 2009. Reactive oxygen species and peroxisomes: Struggling for balance. *Biofactors.* 35:346-355.
- Bucak M, Başpınar N, Tuncer P, Cayan K, Sariözkan S, Akalın P, Büyükleblebici S and Küçükgünay S. 2012. Effects of curcumin and dithioerythritol on frozen thawed bovine semen. *Andrologia.* 44:102-109.
- Buffone MG, Calamera JC, Brugo-Olmedo S, De Vincentiis S, Calamera MM, Storey BT, Doncel GF and Alvarez JG. 2012. Superoxide dismutase content in sperm correlates with motility recovery after thawing of cryopreserved human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 97:293-298.
- Câmara D, Silva S, Almeida F, Nunes J and Guerra M. 2011. Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. *Theriogenology.* 76:342-350.
- Cabiscol E, Tamarit J and Ros J. 2010. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int. Microbiol.* 3:3-8.
- Cevdet U, VARIŞLI Ö, Cansu A and Yüksel A. 2014. Effects of nonylphenol on motion kinetics, velocity, acrosome and mitochondrial membrane potential in frozen-thawed bull

- sperm Dalkas Univ. Vet. Fak. Derg. 20:583-590.
- Chen C, Jiang X, Hu Y and Zhang Z. 2013. The protective role of resveratrol in the sodium arsenite-induced oxidative damage via modulation of intracellular GSH homeostasis. *Biol. Trace Elem. Res.* 155:119-131.
- Contri A, Gloria A, Robbe D, Sfirro MP and Carluccio A. 2012. Effect of sperm concentration on characteristics of frozen-thawed semen in donkeys. *Anim. Reprod. Sci.* 136:74-80.
- Fernández Santos M, Domínguez Rebolledo A, Estesó M, Garde J and Martínez Pastor F. 2009. Catalase supplementation on thawed bull spermatozoa abolishes the detrimental effect of oxidative stress on motility and DNA integrity. *International J. Androl.* 32:353-359.
- Forouzanfar M, Abid A, Hosseini SM, Hajian M and Esfahani MHN. 2013. Supplementation of sperm cryopreservation media with cell permeable superoxide dismutase mimetic agent (MnTE) improves goat blastocyst formation. *Cryobiology.* 67:394-397.
- Gadea J, Sellés E, Marco MA, Coy P, Matás C, Romar R and Ruiz S. 2004. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology.* 62:690-701.
- Gill SS and Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48:909-930.
- Grossfeld R, Sieg B, Struckmann C, Frenzel A, Maxwell W and Rath D 2008. New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology.* 70:1225-1233.
- Guha P, Dey A, Sen R, Chatterjee M, Chattopadhyay S and Bandyopadhyay SK. 2011. Intracellular GSH depletion triggered mitochondrial Bax translocation to accomplish resveratrol-induced apoptosis in the U937 cell line. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 336:206-214.
- Hernández M, Roca J, Calvete JJ, Sanz L, Muiño Blanco T, Cebrián Pérez JA, Vázquez JM and Martínez EA 2007. Cryosurvival and *in vitro* fertilizing capacity postthaw is improved when boar spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars. *J. Androl.* 28: 689-697.
- Jain SK and Micinski D. 2013. Vitamin D upregulates glutamate cysteine ligase and glutathione reductase, and GSH formation, and decreases ROS and MCP-1 and IL-8 secretion in high-glucose exposed U937 monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 437:7-11.
- Jayakumar S, Kunwar A, Sandur SK, Pandey BN and Chaubey RC. 2014. Differential response of DU145 and PC3 prostate cancer cells to ionizing radiation: Role of reactive oxygen species, GSH and Nrf2 in radiosensitivity. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* 1840:485-494.
- Khan M, Yi F, Rasul A, Li T, Wang N, Gao H, Gao R and Ma T. 2012. Alantolactone induces apoptosis in glioblastoma cells via GSH depletion, ROS generation, and mitochondrial dysfunction. *IUBMB life.* 64:783-794.
- Knox R, Ringwelski J, McNamara K, Aardsma M and Bojko M. 2015. The effect of extender, method of thawing, and duration of storage on *in vitro* fertility measures of frozen-thawed boar sperm. *Theriogenology.* 84:407-412.
- Lee S-H and Park C-K. 2015. Effect of magnetized extender on sperm membrane integrity and development of oocytes *in vitro* fertilized with liquid storage boar semen. *Anim. Reprod. Sci.* 154:86-94.
- Lee S, Yoo H, Lee Y, Cheong H, Yang B, Kim D and Park C. 2010. The comparison of triladyl and LEY for cryosurvival improvement of sperm separated by percoll in miniature pig. *Reprod. Dev. Biol.* 34:41-46.
- Lee S, Yoo H, Lee Y, Cheong H, Yang B, Kim D and Park C. 2011. Effects of cryo-extenders for spermatozoa sorted by percoll on *in vitro* fertility of in miniature pigs. *Reprod. Dev. Biol.* 35:85-91.
- Lortz S and Tiedge M. 2003. Sequential inactivation of reactive oxygen species by combined overexpression of SOD isoforms and catalase in insulin-producing cells. *Free Radicals Biol. Med.* 34:683-688.
- Martinez-Alborcia MJ, Valverde A, Parrilla I, Vazquez JM, Martinez EA and Roca J. 2012. Detrimental effects of non-functional spermatozoa on the freezability of functional spermatozoa from boar ejaculate. *PLoS. One.* 7:e36550.
- Mostafa T, Anis T, El Nashar A, Imam H and Osman I. 2012. Seminal plasma reactive oxygen species-antioxidants relationship with varicocele grade. *Andrologia.* 44:66-69.
- Moubasher A, El Din A, Ali M, El Sherif W and Gaber H. 2013. Catalase improves motility, vitality and DNA integrity of cryopreserved human spermatozoa. *Andrologia.* 45:135-139.
- Noguchi M, Yoshioka K, Hikono H, Iwagami G, Suzuki C and Kikuchi K 2015. Centrifugation on Percoll density gradient enhances motility, membrane integrity and *in vitro* fertili-

- zing ability of frozen-thawed boar sperm. *Zygote*. 23:68-75.
- Rassool FV, Gaymes TJ, Omidvar N, Brady N, Beurlet S, Pla M, Reboul M, Lea N, Chomienne C and Thomas NS. 2007. Reactive oxygen species, DNA damage, and error-prone repair: A model for genomic instability with progression in myeloid leukemia? *Cancer Res.* 67:8762-8771.
- Roca J, Rodríguez MJ, Gil MA, Carvajal G, Garcia EM, Cuello C, Vazquez JM and Martinez EA. 2005. Survival and *in vitro* fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *J. Androl.* 26:15-24.
- Sørensen MB, Stoltenberg M, Danscher G and Ernst E. 1999. Chelation of intracellular zinc ions affects human sperm cell motility. *Mol. Hum. Reprod.* 5:338-341.
- Santiani A, Evangelista S, Sepúlveda N, Risopatrón J, Villegas J and Sánchez R. 2014. Addition of superoxide dismutase mimics during cooling process prevents oxidative stress and improves semen quality parameters in frozen/thawed ram spermatozoa. *Theriogenology.* 82:884-889.
- Scarpa S, Fuso A, Damiani R and Rossini M. 2014. Use of S-adenosylmethionine (SAM) and superoxide dismutase (SOD) for the preparation of medicaments for the treatment of alzheimer's disease. U.S. Patent No. 8,778,337.
- Seo JM, Sohn MY, Suh JS, Atala A, Yoo JJ and Shon Y-H. 2011. Cryopreservation of amniotic fluid-derived stem cells using natural cryoprotectants and low concentrations of dimethylsulfoxide. *Cryobiology.* 62:167-173.
- Shojaei H, Kroetsch T, Wilde R, Blondin P, Kastelic J and Thundathil J. 2012. Moribund sperm in frozen-thawed semen, and sperm motion end points post-thaw and post-swim-up, are related to fertility in Holstein AI bulls. *Theriogenology.* 77:940-951.
- Sieme H and Oldenhof H. 2015. Cryopreservation of Semen from Domestic Livestock. *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols.* Springer, pp 277-287
- Strzezek J, Fraser L, Kuklinska M, Dziekonska A and Lecewicz M. 2004. Effects of dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids and antioxidants on biochemical characteristics of boar semen. *Reprod. Biol.* 4:271-287.
- Tuncer PB, Taşdemir U, Büyükleblebici S, Özgürtaş T, Coşkun E, Erol H, Aydın FN and Gürcan İS. 2013. Effects of different doses of trehalose supplementation in egg yolk extender in frozen-thawed Angora buck semen. *Small Ruminant Research.* 113:383-389.
- Yeste M, Estrada E, Casas I, Bonet S and Rodríguez-Gil JE. 2013. Good and bad freezability boar ejaculates differ in the integrity of nucleoprotein structure after freeze-thawing but not in ROS levels. *Theriogenology.* 79:929-939.
- Yeste M, Estrada E, Pinart E, Bonet S, Miró J and Rodríguez-Gil JE. 2014. The improving effect of reduced glutathione on boar sperm cryotolerance is related with the intrinsic ejaculate freezability. *Cryobiology.* 68:251-261.
- Yoo H, Jeon J, Lee Y, Cheong H, Yang B, Kim D and Park C. 2009. Effect of bacteria eliminated sperm by Percoll method on sperm quality and embryo cleavage in miniature pig. *Reprod. Dev. Biol.* 33:35-40.
- Zou X, Feng Z, Li Y, Wang Y, Wertz K, Weber P, Fu Y and Liu J. 2012. Stimulation of GSH synthesis to prevent oxidative stress-induced apoptosis by hydroxytyrosol in human retinal pigment epithelial cells: Activation of Nrf2 and JNK-p62/SQSTM1 pathways. *J. Nutr. Biochem.* 23:994-1006.

---

Received August 13, 2015, Revised September 22, 2015, Accepted September 23, 2015