



Jeju Crossbred Horses 정액 생산 시 Pentoxifylline 농도가 정자 성상에 미치는 영향

박설화, 신상민, 양병철, 김남영, 우제훈, 신문철, 유지현, 손준규[†]
농촌진흥청 국립축산과학원

Effect of Pentoxifylline Concentration on Sperm Quality in Jeju Crossbred Horses

Seol-Hwa Park, Sang-Min Shin, Byoung-Chul Yang, Nam-Young Kim, Jae-Hoon Woo, Moon-Cheol Shin, Ji-Hyun Yoo and Jun-Kyu Son[†]

National Institute of Animal Science, RDA, 175-6 O-deung Dong, Jeju 690-150, Korea.

Abstract

This study was conducted to determine the effect of pentoxifylline levels on sperm motility, survival rate, sperm membrane integrity of frozen semen and fresh-extended equine semen in Jeju cross-bred horses. As a result of sperm characteristic comparison depending on pentoxifylline levels at 30 minutes post-thaw, the progressive motilities were 53.25 ± 2.87 (4mM pentoxifylline) and 50.28 ± 2.14 (8mM pentoxifylline) and significantly higher compared to the control group (40.09 ± 5.15) and other treatment group (16mM pentoxifylline, 41.27 ± 2.82). The progressive fast motility were 22.44 ± 1.62 (4mM pentoxifylline,) and 22.74 ± 3.07 (8mM pentoxifylline) and significantly higher compared to the control group (13.47 ± 1.48) and other treatment group (16mM pentoxifylline, 14.66 ± 3.68) ($p < 0.05$). As a result of sperm characteristic comparison depending on pentoxifylline levels at 30 minutes post-thaw were 68.96 ± 1.64 (4mM pentoxifylline) and 67.90 ± 6.72 (8mM pentoxifylline) and significantly higher compared to the control group (53.48 ± 4.84) and other treatment group (16mM pentoxifylline, 58.14 ± 2.65) ($p < 0.05$). In conclusion, these results suggest that treatment groups with 4mM and 8mM pentoxifylline were higher compared to equine sperm motility and the control group and treatment groups with more than 16mM pentoxifylline has a negative effect on sperm characteristics. After thawing, the total motility in post-thawed equine sperm has increased by 10 percent for 1 hour. these results suggest that pentoxifylline contributes to the improvement of the equine sperm motility and characteristics in post-thawed semen.

Received : 09 March 2018
Revised : 20 March 2018
Accepted : 26 March 2018

Key Words : Jeju crossbred horse, Pentoxifylline, Sperm

서론

2018년 제2차 말산업 육성법(2017~2021) 발표를 하는 등 최근 말 산업의 부가가치는 매우 높은 복합산업으로 각광받고 있으며, 말 산업 규모는 2016년 기준 약 4,120억원으로 2015년 대비 5.6% 증가하였고, 산업체 수도 약 2,278개소에 이르고 있다. 한국마사회 2016년 말산업 실태조사에 따르면 승마인구 또한 2015년 대비 10.5% 증가한 47,471명이고, 체협 승마 인구는 2015년 대비 7.3% 증가

[†] Correspondence: Jun-Kyu Son (0000-0002-6266-3606)
Phone: +82-64-754-5708
E-mail: junkyuson@korea.kr

한 890,951명에 달하고 있다.

인공수정 기술은 승용마의 개량과 육종을 위해 활용하고 있다. 인공수정 시 수정 능력을 높이기 위해서는 양질의 정액이 생산되어야 하며, 또한 수정 시 까지 냉장정액을 최적의 상태로 보존하여야 한다. 말 인공수정을 위한 정액 생산은 냉장 또는 동결 정액의 형태로 생산되고 있으나 말의 경우 동결정액 생산 연구는 타 축종에 비해 활발하게 진행되고 있지 않은 실정이다. 승마 선진국의 경우 승용마의 90% 이상을 인공수정으로 생산하고 있지만 국내의 경우 인공수정으로 생산된 승용마 두수가 2014년 62두에서 2015년 140두로 매년 증가하는 추세(2016년 말산업 실태조사)로 국내에서도 승용마 인공수정을 원하는 농가가 증가하고 있으나, 말의 경우 신선, 냉장 정액 사용 시 인공수정 적기를 맞추기가 어렵기 때문에 동결정액의 중요성이 대두되고 있다. 하지만 국내의 말 동결정액 연구는 미미한 수준이며, 인공수정을 위한 말 동결정액은 전량 수입하여 사용하고 있는 실정이다.

말 정액 채취 시 원정액의 품질과 정액채취 방법, 원심분리 방법, 동결 속도 등 정자의 성상에 많은 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다(Amann와 Pickett 1987, Ecot 등, 2000). 이처럼 말에서 정자의 이용 기술은 냉장 및 동결체계에 관한 여러 연구가 진행되고 있으며, 결과 또한 안정적으로 보고되고 있으나(Loomis and Graham, 2008, Backman 등, 2004), 국내의 경우 경주용(더러브렛종) 말은 자연종후에 의존하고 있어 인공번식에 필요한 정액 채취, 정자의 냉장 및 동결 기술 등 인공수정에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

말 동결정액의 경우 신선정액이나 액상정액에 비해 활력 및 수태율이 현저히 떨어지는 문제점이 있다(Vidament 등, 2005). 냉장정액은 48시간 이후 세포막 손상 등으로 수정률이 현저하게 감소하고(Aurich 등, 2008), 동결-융해정액은 동결과 융해과정에서 활성산소(Reactive Oxygen Species; ROS)와 삼투압 스트레스 등으로 인해 세포막 손상이 나타난다(Waston 등, 2000). Kadirvel 등(2009)은 버팔로에서 활성산소는 정자의 운동성, 지방 과산화, 미토콘드리아 세포막 기능, DNA 온전성에 악영향을 준다고 보고하였으며, 동결과정 동안 얼음결정 생성과 세포 탈수 등으로 인해 세포막 기능이 손상되고 구조적으로 변화가 일어나 정자에 손상을 준다고 보고(Ahmad 등, 2012) 되고 있다.

Phosphodiesterase(PDE)는 정자 내 효소로써의 인산이에스테르 결합을 깨뜨리며 cAMP(cyclic Adenosine monophosphate)를 AMP로 변화시킨다. cAMP는 정자의 침체반응과 정자 운동에 메신저 역할을 하며, PDE 억제제인 펜톡시필린 첨가시 cAMP의 인산화를 방지하여 세포막 사이의 cAMP농도가 높아지는 효과가 있다. 또한 펜톡시필린 첨가는 조기 침체반응을 방지하고 수정률을 높이며(Henkel 등, 2003) 활성산소를 억제하는 효과가 있다(Zhang 등, 2005). 펜톡시필린 첨가가 사람, 말, 개 등의 액상정액과 동결정액에서 정자 운동성을 개선한 연구가 보고되어 있으며(Ortgeics 등, 2012; Marques 등 2002), 동결-융해정액의 경우 사람에서는 낮은 펜톡시필린 농도(0.01mM)처리가 정자성상을 개선시키며, 개에서는 높은 펜톡시필린 농도(100mM)처리가 정자성상을 개선시키는 것으로 보고된바 있다(Hassanpour 등, 2010). 말의 경우 동결-융해시 펜톡시필린 3.5mM 첨가 시 정자운동성과 침체반응을 개선한다고 보고되었다(Gradil 등, 2000; Taylor 등, 2013). 하지만 Stanic 등(2002)의 연구에서는 동결 전 펜톡시필린 처리가 처리하지 않은 구에 비해 운동성 저하와 LIN의 감소를 일으킨다고 보고하였다. 본 연구는 동결정액의 생존율 향상을 위한 기초 연구로서 국립축산과학원 난지축산연구소에서 한라마의 액상정액 및 동결정액의 성상 개선을 위하여 펜톡시필린처리 수준에 따른 정자의 운동성, 생존율, 정자막 온전성을 평가·분석하기 위해 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시축

본 연구의 공시마는 국립축산과학원 난지축산연구소에서 사육·보유하고 있는 Jeju crossbred (더러브렛×제주마) 수말(씨수마) 5두에 대해 2016년 4월부터 2017년 8월까지 공시하였다. 공시축의 연령은 3세에서 8세 사이로 말의 번식계절동안 최소 5회 이상 정액채취 경험이 있는 개체를 공시하였다. 사료급여는 농후사료(열량 3,825kcal/kg, CP 16.5%)를 체중의 2.0% 공급하였으며, 조사료(톨페스큐, 오차드그라스, 이탈리안라이그라스)는 자유채식토록 하였다.

2. 정액채취

한라마 씨수마의 정액채취는 채취 시마다 같은 시간인 오전 9시에서 10시 사이에 실시하였으며, 개체별로 월 6회 실시하였다. 씨수말은 충분히 시정한 후 초음파 검사를 통해 발정기를 확인한 씨암말에 승가를 허용하거나 암말의 노를 도포한 의빈대를 사용하여 정액을 채취하였다. 정액채취는 독성이 제거된 50ml 플라스틱 일회용 용기를 인공질(INRA model, IMV, French)에 장착하여 사용하였으며, 자외선 차단용 커버를 용기 주변을 감싸었다. 인공질은 45~50℃의 온수를 이용하여 인공질 내부 온도가 38℃가 되도록 유지하였으며,

삽입을 원활하게 하기 위해 젤을 도포하였다.

3. 액상정액 제조

정액은 채취 직후 10분 이내 실험실로 운반하여 겔(gel) 제거 후 부피, 농도, 운동성 등을 조사하였다. 농도는 SpermaCue (Potometro spermacue, Minitube, Germany)를 이용하여 조사하였으며, ARS의 gel filter 3.5''를 이용하여 겔 성분을 분리 하였다. 정장 물질 제거를 위하여 INRA96 희석제로 1:1희석 후 50 ml 튜브에 40 ml씩 분주한 후 400×g에서 10분 원심분리하여 seminal plasma 및 부유액을 제거하고 하층의 펠렛(정자괴)을 회수하였다(Cochran 등, 1984). 회수한 정자 펠렛은 최종 농도를 50×10⁶/ml로 희석하여 대조구와 펜톡시필린 처리 그룹으로 처리한 후 15 ml 튜브에 보관하였다. 온도가 급속히 떨어지는 것을 방지하기 위해 3차 증류수에 담가 4℃ 냉장고에 보관하며 운동성이 70% 이하가 되는 시점까지 24시간 간격으로 정자 성상을 분석하였다.

4. 동결정액 제조

동결정액 제조를 위하여 원정액을 INRA96 희석제로 1:1희석하여 22℃에 10분간 보관한 후 원심분리 하였다. 정자펠렛은 INRA freeze 희석제를 이용하여 400×10⁶/ml으로 2차 희석한 후 50ml 튜브에 넣어 3차증류수와 함께 냉장고에서 점진적으로 4℃까지 온도를 떨어뜨렸다. 2시간 동안 3차 증류수가 4℃로 떨어진 것을 확인 후 정액을 INRA freeze 희석제를 이용하여 최종 농도가 100×10⁶/ml이 되도록 희석하고 펜톡시필린 처리 그룹과 비처리 그룹으로 나누어 정액주입기를 이용하여 0.5ml 스트로우(FHK, Japan)에 주입하였다. 동결정액 생산을 위해 스티로폼 박스에 액체질소를 붓고 액체질소 수면 5cm 위에서 15분 동안 스트로우를 정치시킨 후 액체질소에 침지하여 동결정액을 생산하였다. 동결된 정액은 고블렛에 넣어 액체질소에 보관하였다. 동결정액의 정자 성상 검사는 액체질소통에서 꺼낸 후 상온에 약 4초간 노출 후 37℃의 물에서 30초간 침지 후 정자 성상을 평가하였다.

5. 정자 운동성 평가

정자의 운동성 평가는 CASA(Computer-assisted sperm analysis, minitube, DE/Androvision, Germany)를 이용하여 수행하였다. 운동성평가는 그림 1의 알고리즘을 통하여 TM(total motility), PM(Progressive motility), RM(Rapid motility), SM(Slow motility), CM(Circular motility), LM(Local motility)를 측정하였다. 냉장정액은 24시간 간격으로 72시간까지 분석하였으며, 동결정액은 용해 후 15분, 30분, 1시간 후의 정액 성상을 분석 하였다.

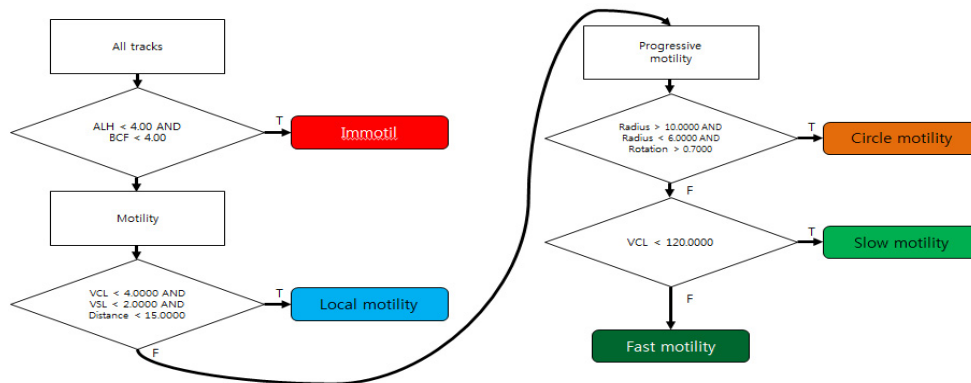


Figure 1. CASA 시스템 운동성 알고리즘

6. 정자 생존율 평가

정자의 생존율 평가는 Eosin-Nigrosin 염색법을 이용하였다. 염색은 2% Eosin G(Minitube), 4% Nigrosin(Minitube)와 정자를 1:2:1로 혼합하여, 피펫팅 후 혼합액 10µl를 슬라이드 글라스에 도말하였다. 염색된 정자는 MicroLux(X 70, Olympus, Japan)를 이용하여 400배율에서 정자의 처리 당 200개의 정자를 관찰하여 생존율을 평가하였다.

7. 정자막 온전성 평가

정자막 온전성 평가는 Nie와 Wenzel 등(2001)의 방법을 변형한 Hypo-Osmotic Swelling Test(Host : 저장액 팽창 검사)를 이용하여 정자 미부의 팽창 형태를 분석하였다. 정자 스트로 샘플을 400×g에서 1분간 원심분리 후 정자 펠렛 10μl를 회수하여 100mOsm(0.25mM Sucrose) 저장액 990μl에 혼합하였다. 혼합된 용액은 37℃ water bath에서 5분 배양한 후 슬라이드 글라스에 도말하여 꼬리가 말린 것과 말리지 않은 정자를 검사하였다. MicroLux 현미경을 이용하여 400배율에서 총 200개의 정자를 카운트하여 정자막의 온전성을 평가하였다.

8. 통계 처리

통계 처리는 R 통계 package(version 3.0.3)를 이용하여 대조구와 처리 구간에 분산분석을 실시하였으며, ANOVA 분석 후 Duncan's 다중 검정을 이용하여 유의성($p < 0.05$)이 있는 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

Table 1에서는 말 동결-융해 정액의 융해 직후 정액의 성상을 비교하였다. CASA system을 이용한 운동성 검사와 정자세포의 생사 검사, 정자막 온전성 검사를 수행하였다. 정자 세포막 온전성은 정자의 대사 뿐만 아니라 난자와의 수정, 정자의 수정능획득 및 침체 반응과도 밀접한 관계가 있어 정자의 수정능 평가에 유용한 지표로 사용되고 있다. 펜톡시필린 첨가는 조기 침체반응을 방지하고 수정률을 높이며(Henkell 등, 2003), Zhang 등(2005)은 활성산소를 억제하는 효과가 있다고 보고하였다. 하지만 Stanic 등(2002)의 보고에서는 동결 전 펜톡시필린 처리가 대조구에 비해 운동성 저하와 LIN의 감소를 일으킨다고 보고하였다. 펜톡시필린 처리 농도별 융해 직후 직진운동성에서는 4mM 처리구와 8mM 처리구인 T1, T2에서 56.93±4.19, 55.86±3.01로 대조구와 8mM 처리구인 47.24±3.27, 42.02±10.31 보다 높은 직진운동성을 보였으나 유의적인 차이를 보이지는 않았다. 이는 펜톡시필린의 4mM~8mM 처리가 생존하고 있으나 낮은 대사상태로 움직이지 않는 정자에 운동성을 개선하는 것으로 판단된다.

Table 2는 말 동결-융해 정액의 30분 보관 후 정액성상 비교를 나타내었다. 직진운동은 수정율과도 높은 연관관계가 있으므로 정자의 품질을 평가할 때 중요한 지표로 사용된다. 정액의 동결-융해 후 30분이 경과하였을 때 정자 성상 분석에서는 펜톡시필린 4mM(T1) 처리구와 8mM(T2) 처리구에서 Progressive Motility(PM)가 53.25±2.87, 50.28±2.14로 40.09±5.15와 41.27±2.82인 대조구와 16mM(T3)에 유의적으로 높게 나타났으며 ($p < 0.05$), Progressive Fast Motility(PFM)도 펜톡시필린 4mM(T1) 처리구와 8mM(T2) 처리구가 각각 22.44±1.62와 22.74±3.07로 대조구와 16mM(T3) 처리구의 13.47±1.48와 14.66±3.68 보다 유의적으로 높게 나타났다 ($p < 0.05$). 본 연구에서는 펜톡시필린 처리 농도별 Progressive Motility(PM)와 Progressive Fast Motility(PFM)에서 결과에서 보는바와 같이 높은 PM과 PFM을 보였다. 펜톡시필린을 처리하지 않은 것 보다는 4mM에서 8mM까지 처리하였을 때 운동성을 향상시킬 수 있을 것으로 사료되며, 그 이상의 펜톡시필린을 처리하였을 경우에는 정자의 운동성을 저하시키는 것을 확인할 수 있었다. 또한 총 운동성에서도 T1, T2가 대조구와 T3 처리구에 비해 높은 운동성을 보였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

Table 3은 동결-융해 정액의 1시간 경과 후 성상을 비교하였다. 융해 후 1시간이 경과하였을 때 정자 성상분석에서는 총 운동성(Total Motility)에서 T1와 T2가 68.96±1.64와 67.90±6.72로 53.48±4.84와 58.14±2.65인 대조구와 T3에 비해 유의적으로 높은 운동성을 보였다($p < 0.05$). 직진운동성에서는 T2 처리구에서 50.30±6.34로 대조구와 다른 처리구에 비해 높게 나타났으나 유의적인 차이를

Table 1. Comparison of characteristics of the post-thawed equine sperm(%)

구분	Total motility	Progressive motility	Progressive fast motility	Progressive slow motility	Local motility	Immotile	Viability	Membrane integrity
C	68.38±2.13	47.24±3.27	20.98±3.06	26.26±5.15	21.14±3.03	31.63±2.13	79.00±6.17	62.34±10.38
T1 ¹⁾	74.51±6.37	56.93±4.19	30.06±7.39	26.87±4.92	17.58±2.99	25.50±6.37	83.00±4.55	67.34±8.22
T2 ²⁾	72.41±4.19	55.86±3.01	26.30±5.54	29.56±2.80	16.56±1.51	27.59±4.19	79.34±1.25	62.34±8.34
T3 ³⁾	57.22±8.89	42.02±10.31	22.25±9.04	19.78±1.30	15.2±6.17	42.79±8.89	74.67±0.48	52.67±10.21

Mean±S.E.

¹⁾T1: pentoxifylline 4mM, ²⁾T2: pentoxifylline 8mM, ³⁾T3: pentoxifylline 16mM

Table 2. Comparison of characteristics of the post-thawed equine sperm after storing the water bath at 37 °C for 30 minutes(%)

구분	Total motility	Progressive motility	Progressive fast motility	Progressive slow motility	Local motility	Immotile	Viability	Membrane integrity
C	58.75±7.88	40.09±5.15 ^b	13.47±1.48 ^c	36.62±6.52	18.66±2.75	41.26±7.88	76.00±4.97	60.67±12.37
T1	69.44±4.66	53.25±2.87 ^a	22.44±1.62 ^a	30.81±2.01	16.20±2.65	30.57±4.66	75.34±1.70	62.67±10.97
T2	68.20±1.82	50.28±2.14 ^a	22.74±3.07 ^a	27.55±3.72	17.92±3.86	31.81±1.82	75.00±3.56	58.34±8.50
T3	57.99±4.77	41.27±2.82 ^b	14.66±3.68 ^d	26.62±0.88	16.72±2.01	42.01±4.77	66.34±4.99	

Mean±S.E.

^{a-d}Means with different superscript letters in the same lines are significantly different ($p<0.05$).¹T1: pentoxifylline 4mM, ²T2: pentoxifylline 8mM, ³T3: pentoxifylline 16mM**Table 3.** Comparison of characteristics of the post-thawed equine sperm after storing the water bath at 37 °C for one hour(%)

구분	Total motility	Progressive motility	Progressive fast motility	Progressive slow motility	Local motility	Immotile	Viability	Membrane integrity
C	53.48±4.84 ^c	38.95±8.13	10.21±7.51	28.75±4.82	14.53±4.04 ^b	46.53±4.84 ^a	77.00±4.25 ^a	57.00±9.21
T1	68.96±1.64 ^a	46.52±1.08	16.99±4.52	29.54±3.46	22.44±0.63 ^a	31.05±1.64 ^c	77.00±0.82 ^a	62.00±10.20
T2	67.90±6.72 ^{ab}	50.30±6.34	23.23±6.35	27.08±2.96	17.61±1.60 ^{ab}	32.11±6.72 ^{bc}	70.67±0.48 ^b	52.67±12.69
T3	58.14±2.65 ^{bc}	44.07±0.92	12.04±4.25	32.04±3.43	14.07±2.97 ^b	41.87±2.65 ^{ab}	66.00±2.83 ^b	43.00±10.68

Mean±S.E.

^{a-d} Means with different superscript letters in the same lines are significantly different ($p<0.05$).¹T1: pentoxifylline 4mM, ²T2: pentoxifylline 8mM, ³T3: pentoxifylline 16mM

보이지는 않았다. 이러한 결과는 펜톡시필린 처리가 동결-용해 후 정자의 운동성을 10% 이상 개선시킨다는 Taylor 등(2013)의 보고와도 비슷한 경향을 보였다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 펜톡시필린 4mM과 8mM를 처리했을 때 대조구보다 정자의 운동성을 증진시키는 효과가 있었으며, 펜톡시필린 16mM 이상의 처리에서는 정자 성상에 좋지 않은 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다.

적 요

본 연구에서는 제주산마의 액상정액 및 동결정액의 성상 개선을 위하여 펜톡시필린 수준을 설정하여 정자의 운동성, 생존율, 정자막 온전성을 평가하였다. 말 동결-용해 정액의 30분 경과 후 정액성상 비교 결과 펜톡시필린 4mM(T1)처리구와 8mM(T2)처리구에서 Progressive Motility(PM)가 53.25±2.87, 50.28±2.14로 40.09±5.15와 41.27±2.82인 대조구와 16mM(T3)에 유의적으로 높게 나타났으며($p<0.05$), Progressive Fast Motility(PFM)도 펜톡시필린 4mM(T1)처리구와 8mM(T2)처리구가 각각 22.44±1.62와 22.74±3.07로 대조구와 16mM(T3) 처리구의 13.47±1.48와 14.66±3.68 보다 유의적으로 높게 나타났다($p<0.05$). 말 동결-용해 정액의 30분 경과 후 정액성상 비교 결과에서는 총 운동성(Total Motility)에서 T1와 T2가 68.96±1.64와 67.90±6.72로 53.48±4.84와 58.14±2.65인 대조구와 T3에 비해 유의적으로 높은 운동성을 보였다($p<0.05$). 이상의 결과를 종합해 볼 때 펜톡시필린 4mM과 8mM를 처리했을 때 대조구보다 정자의 운동성을 증진시키는 효과가 있었으며, 펜톡시필린 16mM 이상의 처리에서는 정자 성상에 좋지 않은 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 활성산소를 억제하는 효과가 액상정액 보존 과정에서 발생하는 ROS로부터 정자를 안정적으로 보호하는 것으로 판단되며, 동결-용해 정액의 펜톡시필린 처리구 4mM 첨가구에서 다른 처리구보다 용해 후 1시간 동안 총운동성이 약 10%가량 높은 경향을 나타내었다. 펜톡시필린 처리가 동결-용해 후 정자의 운동성을 10% 이상 개선시킨다는 Taylor 등(2013)의 보고와도 비슷한 경향을 보였으며, 펜톡시필린이 동결-용해 후 정자 운동성 향상 등 정자 성상을 개선하는 것으로 판단된다.

사 사

본 성과물은(논문) 농촌진흥청 연구사업(세부과제명 : 국내산 육성 승용마 번식기술 개발 연구, 세부과제번호 : PJ01022202)의 지원에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

- Amann RP and Pickett BW. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.* 7:145-173.
- Aurich C. 2008. Recent advances in cooled semen technology. *Animal Reproduction Science* : 107:268e75.
- Backman T, Bruemmer JE, Graham JK and Squires EL. 2004. Pregnancy rates of mares inseminated with semen cooled for 18 hours and then frozen. *American Society of Animal Science.* 82: 690-694.
- Ecot P, Vidament M, deMornac A, Perigault K, Clement F and Palmer E. 2000. Freezing of stallion semen: interactions among cooling treatments, semen extenders and stallions. *J. Reprod. Fertil.* 56:141-150.
- Gradil CM and Ball BA. 2000. The use of pentoxifylline to improve motility of cryopreserved equine spermatozoa. *Theriogenology* 54: 1041-7.
- Hassanpour H, Mirshokraei P, Tajik P and Haghparast A. 2010. In vitro effects of pentoxifylline on kinematics parameters, capacitation, and acrosome reaction of ram epididymal sperm. *Comparative. Clinical Pathology.* 19: 377 - 81.
- Henkel, R.R, Schill and W.B, 2003. Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1, 108.
- Loomis PR and Graham JK. 2008. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal reproduction science* 105: 119-128.
- Marques A, Arruda RP, Celeghini ECC, Gobesso AAO and Neves Neto JR. 2002. Effects of ascorbic acid and pentoxifylline on equine cryopreserved semen submitted to in vitro incubation. *Theriogenology* 58: 257 - 60.
- Nie GJ and Wenzel JGW. 2001. Adaptation of the hypo-osmotic swelling test to assess functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. *Theriogenology* 55:1005 - 18.
- Ortgies F, Klewitz J, Gorgens A, Martinsson G and Sieme H. 2012. Effect of procaine, pentoxifylline and trolox on capacitation and hyperactivation of stallion spermatozoa. *Andrologia* 44:130 - 8.
- Stanic P, Sonicki Z and Suchanek E. 2002. Effect of pentoxifylline on motility and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. *International Journal of Andrology* 25:186 - 90.
- Taylor D, Ryan M, Julia L, Lulu Cheng, Anne C, Cheryl A and Rebecca K. 2013. Effects of Pentoxifylline, Caffeine, and Taurine on Post-Thaw Motility and Longevity of Equine Frozen Semen. *Journal of Equine Veterinary Science.* 33: 615-621.
- Vidament M. 2005. French field results(1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Anim. Reprod. Sci.* 89:115-136.
- Zhang, X, Sharma, R.K, Agarwal, A and Falcone, T, 2005. Effect of pentoxifylline in reducing oxidative stress-induced embryotoxicity. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 22, 415 - 417.