

# THE EFFECT OF UDENAFIL (ZYDENA) ON THE FERTILIZATION AND EARLY EMBRYO DEVELOPMENT IN MICE

Keun Soo Cheon, MD, Jae Chul Sim, MD, Hoe Saeng Yang, MD

Department of Obstetrics and Gynecology, Dongguk University College of Medicine, Gyeongju, Korea

## Objective

To determine the effect of udenafil, a cyclic monophosphate-specific type 5 phosphodiesterase inhibitor, on fertilization and early embryo cleavage of mice.

## Methods

This mammal study included randomly assigned male and female mice. The females were sacrificed after mating to evaluate their oocytes and embryos in four different time intervals following the treatment. Female mice were injected intraperitoneally with 5 IU of gonadotropin and human chorionic gonadotropin to stimulate follicular growth and induce ovulation. They were separately caged with males that had been gavaged with udenafil (0.06 mg/0.05 mL) and allowed to mate. After 24, 48, 72, and 96 hours of time intervals, females were killed, their oviducts were dissected out, and retrieved embryos were assessed for blastomere number and quality. Fertilization rates and numbers of embryos were evaluated after treatment.

## Results

Fertilization rates were reduced in females that were mated with udenafil gavaged males. Over days 2-4, the numbers of embryo that of the treated group were significantly fewer than in the control group. There was also a tendency of impaired cleavage rates with those embryos.

## Conclusion

The impairments of fertility caused by udenafil have important implications for infertility centers and couples who are using this drug precoitally while attempting to conceive.

**Keywords:** Udenafil; Fertilization; Embryo cleavage

1990년대 후반에 발기부전 치료제의 도입 이후로 수많은 의사들이 1,600만 명 이상의 남성들에게 발기부전 치료제를 처방해 왔다. 이 약의 뛰어난 효과로 인해 젊은 남성들까지 포함시키는 넓은 판매 전략으로 가임기 젊은 남성들의 발기부전 치료제 사용이 점점 증가하였다[1]. 또한 이 약이 인터넷에서도 널리 구입 가능해지면서 유희 용도의 목적으로 사용이 두드러지게 증가하였고[1,2] 나이든 남성들이 발기부전을 치료하기 위해 이 약을 찾는 것처럼 젊은 건강한 남성들도 성적 흥분제로 이 약을 찾게 되었다[2]. Ketamine 등의 불법적인 약물과 함께 이 약이 판매되기도 하고 이 약을 전자우편(E-mail)을 통해서 구입할 수 있게 되면서 발기부전 치료제를 구매하고자 하는 소비자들에게 의사의 처방전 없이 약을 쉽게 얻을 수 있는 기회를 제공함으로써 사회적 문제가 되고 있다.

한편, 당뇨병이나 척수 손상 등으로 인한 발기부전으로 고통 받는 젊은 남성이 빠르게 증가하고 있다[3]. 이런 남성들의 배우자들이 임신을 원하는 경우가 있으므로 발기부전 치료제가 정자 기능에 미치는 영향을

효과적으로 측정하는 것은 매우 중요하다.

하지만, 임신보조 수단으로 이 약을 광범위하게 사용하는 것에 대

Received: 2011. 1.25. Revised: 2011. 4.27. Accepted: 2011. 7.18.  
Corresponding author: Hoe Saeng Yang, MD  
Department of Obstetrics and Gynecology, Dongguk University  
College of Medicine, 1090-1 Seokjang-dong, Gyeongju  
780-350, Korea  
Tel: +82-54-770-8348 Fax: +82-54-770-8378  
E-mail: y31354@hotmail.com

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2011. Korean Society of Obstetrics and Gynecology

해서는 논란이 있다. 영국의 Human Fertilization and Embryology Authority에서 치료 받는 불임환자의 약 42%에서 필요한 만큼의 정액을 채취하기 어려운 경우가 있었다. 이러한 환자에게 충분한 양의 정액을 채취하기 위하여 발기부전 치료제를 처방하였다. 발기부전 치료제가 선택적 type 5-phosphodiesterase (PDE) 억제제이기 때문에 발기부전 치료제의 광범위한 사용이 문제가 될 수 있다[3]. 예전에, 비록 비선택적 억제제이긴 하나 pentoxifylline 같은 다른 PDE 억제제들이 정자 기능에 영향을 끼친다는 보고들이 있다[4]. Pentoxifylline에 노출된 정자는 정자 운동성이 증가한다고 보고 되었고[5-7], sildenafil citrate [8,9]과 PDE type 5 억제제에 노출된 정자를 연구한 Lefievre 등[10]과 Cuadra 등[11]의 연구에서도 비슷한 결과가 나타났는데, 이것은 이 약물 전체군의 공통적인 현상이라는 것을 의미한다. 다른 체외 실험들을 보면 이미 약에 노출된 정자에서 이 약의 노출을 중단한 이후에도 그 영향들이 지속되었는데 이는 정자에 대한 약의 작용이 상당기간 오래 작용한다는 것을 의미한다[10,11].

하지만 정자 기능에 영향을 주는 것보다도 더 큰 문제점은 비록 짧은 기간이라도 pentoxifylline에 노출된 쥐 배아내 세포수가 감소된다는 보고이다[12]. 정자 활동성 항진제의 태아발달억제 효과는 Scott와 Smith [13]에 의해 발표되었다. 그러므로 이 약이 불임치료 목적으로 임상 처방으로 되기 전에, 배아 발달에 있어 발기부전 치료제의 영향을 연구하는 것은 매우 중요하다.

본 연구에서는 udenafil (Zydena, Dong-A Pharm., Seoul, Korea)이 수정률과 배아 발달에 미치는 영향을 알아보기 위하여 udenafil을 복용한 수컷 쥐들을 과배란시킨 암컷 쥐와 교미시킨 후에 매일 암컷 쥐를 도살하여 수정률과 배아 발달 정도를 측정하였다.

## 연구대상 및 방법

실험 대상으로 4-6주 된 F1 잡종 쥐(CBAB6)를 사용하였다. 2주 동안 하루에 12시간 동안 빛을 비춰주었다. 모든 동물들은 무작위로 치료그룹에 배정하였다. 우세한 수컷이 다른 수컷의 테스토스테론 분비를 억제하기 때문에 수컷은 교미하기 전 3일 동안 각각 다른 우리에 넣어두

었다.

암컷은 6마리씩 짝지어 같은 우리에 넣고 난포의 성장을 돕기 위해 임신한 말의 혈청에서 얻은 성선자극호르몬(pregnant mare's serum gonadotropin, [G4527], Sigma, St. Louis, MO, USA) 5 IU를 복강내에 주사하였다. 48시간 후 난포를 터뜨리기 위해위해 인간-용모성 성선자극호르몬(human chorionic gonadotropin, hCG; [C8554], Sigma) 5 IU를 복강내에 주사하였다. 12시간 후 암컷을 udenafil (사람에서 적용되는 kg당 경구투여 용량을 생쥐에게도 적용하여 수컷 생쥐 한 마리당 udenafil 0.06 mg을 0.05 mL의 생리식염수에 용해시킨 후 1회 경구 투여하였다.), 또는 같은 양의 식염수 처치를 한 수컷과 함께 우리에 넣었다. hCG 주입 24시간, 48시간, 72시간, 96시간 후에 각각 암컷을 경추 탈골법으로 도살하였다. 암컷의 난관을 모두 해부한 후 배아를 herpes를 포함하고 penicillin (M7167, Sigma)은 없는 페트리 접시 M2배지에 고정하였다. 각각의 페트리 접시에는 한 마리의 쥐에서 얻은 배아만을 넣어 두었다.

수정 빈도는 난자의 총 개수와 난자의 전핵의 유무를 보아 결정하였고 수정률과 초기 배아 발달 정도를 살펴보았다[13].

## 1. 통계학적 분석

통계적인 유의성 검증을 위하여 모든 자료는 전산 입력하여 통계분석 프로그램인 SPSS ver. 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 분석하였다. 각 실험 군에서 각각의 수정률과 초기 배아 발달 정도를 알기 위하여 chi-square for trend로 분석하였으며,  $P < 0.05$  경우를 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

## 결 과

### 1. hCG 투여 후 첫째 날의 수정률과 초기 배아 발달 정도

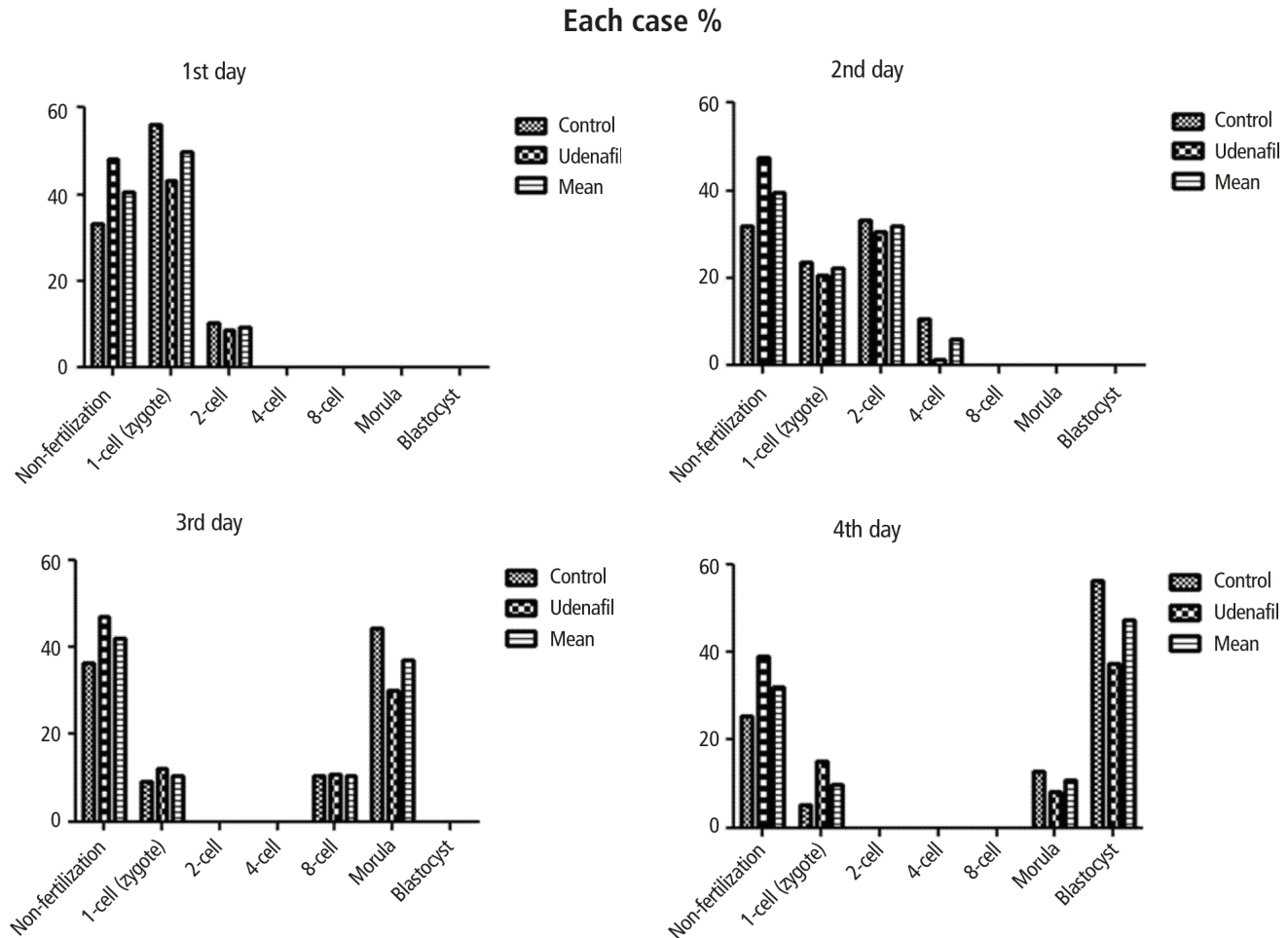
대조군으로 생리식염수만 투여한 경우 수정되지 않은 난자수는 58개(42.6%)였으며 1-cell (zygote)는 98개(58.3%), 2-cell은 18개(56.3%)였다(Table 1).

Udenafil을 투여한 군에서는 수정되지 않은 난자수는 78개(57.4%)

**Table 1.** Rate of fertilization and early embryo development on day 1

	Control	%	Udenafil	%	Total	%
Unfertilized egg	58	42.6	78	57.4	136	100
1-cell (zygote)	98	58.3	70	41.7	168	100
2-cell	18	56.3	14	43.8	32	100
4-cell	0	0	0	0	0	100
8-cell	0	0	0	0	0	100
Morula	0	0	0	0	0	100
Blastocyst	0	0	0	0	0	100
Total	174	51.8	162	48.2	336	100

$P=0.0175$ .



**Fig. 1.** Fertilization rate and early embryo development on each case ( $P < 0.05$ ).

였으며 1-cell (zygote) 수는 70개(41.7%), 2-cell은 14개(43.8%)였다 (Table 1).

결과적으로 udenafil을 투여한 군에서 대조군에 비해 수정되지 않은 난자수가 더 많았고(57.4% 대 42.6%) 1-cell (zygote)의 경우는 대조군에 비하여 더 적었으며(41.7% 대 58.3%) 2-cell의 경우도 대조군에 비하여 더 적었다(43.8% 대 56.3%) ( $P = 0.0175$ ) (Fig. 1).

## 2. hCG 투여 후 둘째 날의 수정률과 초기 배아 발달 정도

대조군으로 생리식염수만 투여한 경우 수정되지 않은 난자수는 54개(42.2%)였으며 1-cell (zygote)는 40개(55.6%), 2-cell은 56개(56.3%), 4-cell은 18개(90.0%)였다(Table 2).

Udenafil을 투여한 군에서는 수정되지 않은 난자수는 74개(57.8%)였으며 1-cell (zygote) 수는 32개(44.4%), 2-cell은 48개(46.2%), 4-cell은 2개(10.0%)였다(Table 2).

결과적으로 udenafil을 투여한 군에서 대조군에 비해 수정되지 않은 난자수가 더 많았고(57.8% 대 42.2%) 1-cell (zygote)의 경우는 대조군에 비하여 더 적었으며(44.4% 대 55.6%) 2-cell의 경우도 대조군에 비

하여 더 적었으며(46.2% 대 53.8%) 4-cell 역시 대조군에 비하여 더 적었다(10.0% 대 90.0%) ( $P = 0.00077$ ) (Fig. 1).

## 3. hCG 투여 후 셋째 날의 수정률과 초기 배아 발달 정도

대조군으로 생리식염수만 투여한 경우 수정되지 않은 난자수는 56개(41.8%)였으며 1-cell (zygote)는 14개(41.2%), 8-cell은 16개(47.13%), morula는 68개(57.6%)였다(Table 3).

Udenafil을 투여한 군에서는 수정되지 않은 난자수는 78개(58.2%)였으며 1-cell (zygote) 수는 20개(58.8%), 8-cell은 18개(52.9%), morula는 50개(42.4%)였다(Table 3).

결과적으로 udenafil을 투여한 군에서 대조군에 비해 수정되지 않은 난자수가 더 많았고(58.2% 대 41.8%) 1-cell (zygote)의 경우는 대조군에 비하여 더 많았으며(58.8% 대 41.2%) 8-cell의 경우도 대조군에 비하여 더 많았으나(52.9% 대 47.1%) morula는 대조군에 비하여 더 적었다(42.4% 대 57.6%) ( $P = 0.0114$ ) (Fig. 1).

**Table 2.** Rate of fertilization and early embryo development on day 2

	Control	%	Udenafil	%	Total	%
Unfertilized egg	54	42.2	74	57.8	128	100
1-cell (zygote)	40	55.6	32	44.4	72	100
2-cell	56	53.8	48	46.2	104	100
4-cell	18	90.0	2	10.0	20	100
8-cell	0	0	0	0	0	100
Morula	0	0	0	0	0	100
Blastocyst	0	0	0	0	0	100
Total	168	51.9	156	48.1	324	100

$P=0.0007$ .

**Table 3.** Rate of fertilization and early embryo development on day 3

	Control	%	Udenafil	%	Total	%
Unfertilized egg	56	41.8	78	58.2	134	100
1-cell (zygote)	14	41.2	20	58.8	34	100
2-cell	0	0	0	0	0	100
4-cell	0	0	0	0	0	100
8-cell	16	47.1	18	52.9	34	100
Morula	68	57.6	50	42.4	118	100
Blastocyst	0	0	0	0	0	100
Total	154	48.1	166	-	320	100

$P=0.0114$ .

**Table 4.** Rate of fertilization and early embryo development on day 4

	Control	%	Udenafil	%	Total	%
Unfertilized egg	40	41.7	56	58.3	96	100
1-cell (zygote)	8	26.7	22	73.3	30	100
2-cell	0	0	0	0	0	100
4-cell	0	0	0	0	0	100
8-cell	0	0	0	0	0	100
Morula	20	62.5	12	37.5	32	100
Blastocyst	88	62.0	54	38.0	142	100
Total	156	52.0	144	48.0	300	100

$P=0.0003$ .

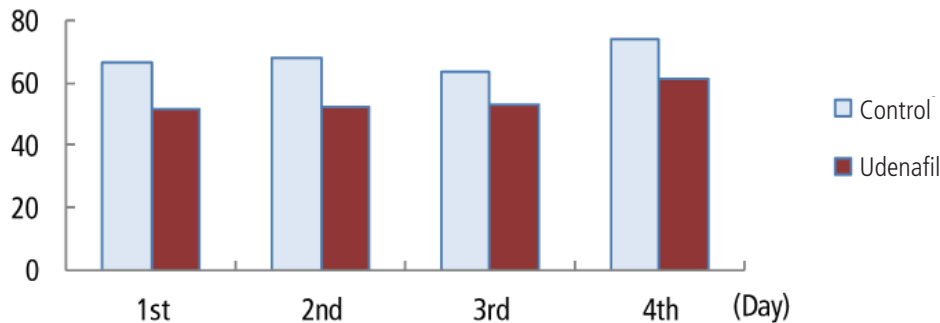
#### 4. hCG 투여 후 넷째 날의 수정률과 초기 배아 발달 정도

대조군으로 생리식염수만 투여한 경우 수정되지 않은 난자수는 40개(41.7%)였으며 1-cell (zygote)는 8개(26.7%), morula는 20개(62.5%), blastocyst는 88개(62.0%)였다(Table 4).

Udenafil을 투여한 군에서는 수정되지 않은 난자수는 56개(58.3%)였으며 1-cell (zygote)는 22개(73.3%), morula는 20개(62.5%), blastocyst

는 88개(62.0%)였다(Table 4).

결과적으로 udenafil을 투여한 군에서 대조군에 비해 수정되지 않은 난자수가 더 많았고(58.3% 대 41.7%) 1-cell (zygote)의 경우는 대조군에 비하여 더 많았으며(58.84% 대 41.2%) morula의 경우는 대조군에 비하여 더 적었으며(37.5% 대 62.5%), blastocyst 역시 대조군에 비하여 더 적었다(38.0% 대 52.0%) ( $P=0.00032$ ) (Fig. 1).



**Fig. 2.** Accumulated fertilization rate ( $P < 0.05$ ).

### 5. 누적 수정률

Udenafil로 전처리 한 군의 누적 수정률이 생리 식염수로 전처리한 대조군에 비해 누적 수정률이 유의하게 낮았다( $P < 0.05$ ) (Fig. 2).

### 고 찰

본 연구에서 정자 대한 udenafil의 작용을 통해 udenafil이 수정률과 초기 배아 발달 모두에 영향을 줄 수 있다는 사실을 알 수 있었다.

Sildenafil citrate의 연구에서 이 약제가 정자의 운동성과 침체 반응에 미치는 영향을 보고한 바에 의하면 sildenafil citrate는 정자의 두 작용을 모두 강화했다. 운동성이 점점 증가하는 정자 수와 속도에 있어서 정자 운동성이 증가하는 것은 수정에 유리하게 보였는데 이것은 더 많은 정자들이 난자로 도달해 수정할 기회를 가질 수 있기 때문이다. 하지만 미성숙한 침체 반응은 좋지 않은 효과를 보이는데 침체 반응이 일어난 정자는 난자에 접근했을 때 난자의 투명대 속으로 침투할 수 없기 때문이다[8].

최근 연구에서는 암컷 쥐가 약제에 접촉한 적이 없으므로 관찰된 모든 효과들은 수정 전의 수컷 정자들에 대해 약제가 작용한 때문이라고 보고하고 있다. 수정률의 현격한 감소는 적어도 어떠한 부분에 있어서는 이러한 미성숙한 침체 반응에 의한 것이라고 할 수 있다. 더 많은 정자가 난자에 도달할 수 있을지라도 수정되는 장소에 도달하기 전 이러한 침체 반응이 일어난다면 정자들은 난자내로 침투할 수 없을 것이고 수정도 일어날 수 없을 것이다. 현재 sildenafil citrate가 실제 사람의 생식에 어떤 영향을 주는 지에 대한 보고는 정자의 난소 세포질내 주입으로도 수정이 일어나지 않는다고 하였다[6,14]. 하지만 다른 여러 실험에서 나타났듯이 sildenafil citrate에 노출된 대다수 인간 정자의 침체 반응을 생각해본다면 udenafil이 이러한 작용은 이번에 관찰되었던 유의한 수정능력 장애의 주요한 원인이라고 할 수 있다.

최근의 연구결과들은 Tournaye 등[12]이 실험한 정자들이 시험관에서 PDE 억제제(pentoxifylline)에 30분 정도 광범위하게 노출되었을 때 쥐의 난소가 수정되는 것이 감소했다는 사실을 뒷받침하고 있다. PDE 억제제에 노출시킨 사람의 정자를 반복적으로 세척하더라도 PDE 억제제가 정자에 지속적으로 작용해 적어도 3시간 동안은 정자들의 운동성에 영향을 준다고 보고하였다[4,15]. 유사하게 pentoxifylline 역시 정자

의 속도, 과행동성 및 정자의 타이로신 인산화 또한 증가시키는 것으로 보고하였다. 만일 정자가 약제에 노출되었으나 성공적으로 세척만 된다면 약제의 효과는 나타나지 않았다[12]. 하지만 불행히도 환자에게 경구로 sildenafil citrate를 투여한 임상 실험에서는 약제가 세포내로 들어가 지속적인 작용이나 손상을 일으키기 전에 정자로부터 제거될 기회가 없다. 이러한 연구결과와는 반대로 Pomeroy 등[16]과 Dodds와 Seidel [17]의 실험에서는 또 다른 5타입 PDE 억제제인 카페인에 수정을 촉진시킨다는 보고가 있다. 이 연구들은 시험관 상에서 시행되었기 때문에 이러한 상반된 결과를 설명될 수 있다. 더욱이 이 연구들은 본 연구와 달리 극체가 돌출되는 것을 수정의 척도로 보았다. 본 연구에서 사용된 전핵이 관찰되는 것을 수정의 척도로 사용하는 것이 정상적인 수정의 더욱 확실한 지표이다.

Udenafil에 노출된 남성과 수정하여 얻어진 배아의 숫자가 그렇지 않은 경우보다 감소한다는 사실은 이 약제가 배아 생존에 유독한 영향을 미친다는 것을 반증한다.

Caffeine 같은 다른 비 선택적 PDE 억제제는 발달과정에 있어 강한 유독성을 지니고 있다고 알려져 있다[16,18]. Scott와 Smith [13]는 pentoxifylline, caffeine, 그리고 2-deoxyadenosine에 노출된 경우 발달 억제와 배아 독성이 나타난다고 보고하였다.

반대로 Kawahara 등[19]에 따르면 caffeine이 돼지 배아에 있어서 배반포 단계로의 성숙을 촉진한다고 하였고, 이는 성숙 촉진 인자에 의한 영향 때문이라고 생각하였다.

이러한 두 연구의 상반된 결과는 농도차이에 의한 것으로 보인다. Caffeine을 0.7 mg/kg 정도의 고농도로 복용을 할 경우에 독물학적인 영향이 나타난다는 것은 자명한 사실이다[20]. 하지만 Kawahara 등[19]의 연구에서는 2.5 mmol/L 정도의 낮은 농도를 사용하였다. 그러나 Scott와 Smith [13]는 용량 의존적 방법으로 0.16–10 mmol/L 범위의 caffeine을 사용한 경우에도 억제적인 영향이 나타나는 것을 보고하였다. Caffeine이 모체 체중과, 태아 체중 및 성장, 태반 무게에 유독한 영향을 미친다는 사실은 분명하다고 알려져 있다[21].

할구들의 초기 난할 속도는 배아의 지속적인 성장과 착상 가능성을 반영한다. 형태학적으로 정상인 세포들의 숫자는 배아의 높은 착상 가능성[22–24]과 임신, 출산[25], 심지어 신생아의 체중[26]을 가능하게 가장 유용하고 널리 통용되는 방법이다.

천천히 성장하는 배아는 착상할 가능성이 현저히 떨어진다[27,28]. 빠



르게 성장하는 배아는 더 많은 상질배와 배반포로 도달할 수 있으며 생명력 있는 태아로 진행하는 비율이 높아진다[29,30].

이런 이유에서 약물이 착상 전 배아 할구 숫자와 난할 속도에 어떠한 영향을 미치는지 규명하고자 하였다. 더욱이 기존 연구들은 특이성이 떨어지는 PDE 억제제인 pentoxifylline에 노출된 난포세포가 저하된 성숙을 보인다고 보고하였다[5]. 본 연구에서 임신 가능성이 있는 배아에 Udenafil이 미치는 영향을 관찰하기 위하여 동등한 할구 숫자를 지닌 배아만을 연구에 포함시켰다[31].

세포내  $Ca^{2+}$  분포의 변화는 PDE 억제제가 수정에 끼치는 영향의 핵심이라 할 수 있다.  $Ca^{2+}$  신호는 수정에 있어서 매우 중요한 역할을 담당하는데[32] 배아 역시 단일 전달자인  $Ca^{2+}$ 를 기본으로 한 다재다능하고 지속적이며, 고도로 변화무쌍한 신호체계에 의존하기에 세포내 자유  $Ca^{2+}$ 는 초기 배아과정에서 세포 분열 또한 조절한다[33].

따라서 PDE의  $Ca^{2+}$  펌프에 대한 길항적 작용으로 인한 세포내  $Ca^{2+}$  농도 변화는 배아 난할을 정제시킬 수 있다. 이런 가설은 쥐 실험에서  $Ca^{2+}$  채널을 막고,  $Ca^{2+}$  방출을 억제하는 칼슘 수정 약물이 수정과 배아 난할 비율을 줄인다는 결과를 통해 입증하였고 정상 임신과 발달에 있어서  $Ca^{2+}$  흐름과 특정한 위치로의 분포가 필요하다고 보고하였다[34].

PDE 억제제로 인한 칼슘 결핍은 Ghalayini [35]가 보고하였다. 칼슘의 흐름과 분포를 가능하게 하는 칼슘 통로는 cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 의존적인 인산화 과정에 의해 긴밀하게 조절되고 cAMP와 cyclic guanosine monophosphate (cGMP) 농도에 아무리 작은 변화가 있어도, 배아 세포 증식에는 커다란 영향을 미치게 되며 [36,37] 이는 sildenafil citrate 작용으로 인한 영향을 설명해 준다.

PDE 억제제가 배아 발달에 있어서 독성 효과를 일으키는 다른 원인은 PDE 억제제가 배아의 DNA 합성과 복구에 영향을 미치기 때문이다. Souness 등[38]이 보고한 바에 따르면 타입3, 타입4 PDE 억제제는 세포내 cAMP를 증가시켜, DNA 합성과 돼지의 대동맥 평활근 증식을 손상시킨다고 한다. 이와 유사한 영향으로, 타입3 PDE가 쥐의 콩팥 토리 세포와 혈관사이세포의 증식을 억제한다[39]. Pentoxifylline (타입4 PDE 억제제) 역시 시험관상에서 난소 세포군의 S와 G2 과정에 작용하여 DNA 복구를 억제시킨다[40,41].

더욱이 milrinone (타입3 PDE 억제제)은 DNA 돌연변이를 증가시킨다고[42] 보고된 바 있는데 이는 PDE 억제제가 여러 경로로 DNA에 작용한다는 것을 설명해준다.

PDE 억제제가 배아낭을 파괴하는 또 다른 작용기전은 '세포자멸사'이다. 기관지 천식에서 PDE억제제의 항염증 작용은 세포자멸사를 유도하여 granulocyte macrophage colony stimulating factor가 매개하는 호산구 생존의 억제를 유발하기 때문이다[43]. 이러한 작용기전은 허파내피 세포에서 역시 이루어졌고, 이는 지속적인 세포내의 cGMP 농도 증가와 연관 있음이 밝혀졌다[44]. 실제로, sildenafil citrate와 유사 약물인 PDE 타입6 억제제(vardenafil)는 caspase 의존성 경로를 통해 B형 만성 림프구성 백혈병 세포의 세포 자멸을 유도한다[45]. 따라서 세포 종류에 따른 다양한 세포자멸 경로는 생명력 상실의 공통적인 종결점이다.

Udenafil은 일산화질소(nitric oxide, NO)를 위한 이차전령으로 작용한

다. 일산화질소는 반응성 질소군에 속한다. 이는 nitric oxide synthase (NOS)에 의해 생산되는데 뇌의 NOS 및 내피세포의 NOS와 유사하게 정자 또한 NOS를 지니고 있음을 처음으로 밝혔다[46]. NOS의 존재는 NO가 정자에 특정한 생리화학적 작용을 하고 있음을 뜻하며 정자의 NO 생성과 NO가 직접적으로 정자 기능에 미치는 영향에 대해 보고하였다 [15]. 이런 연구들을 통해서 NO가 정자 운동성 유지에 핵심 역할을 하고 있음은 자명하지만, 이는 NO가 매우 조심스럽게 조절된 농도 범위 안에서 있을 때만 유용한 것이다. 생리적인 범위내로 NO 레벨을 유지하는 것이 정자 건강에 매우 중요하다[47]. 하지만 udenafil은 NO를 유익한 농도인 nanomolar를 초과하여 millimolar의 고농도까지 증가시키므로 정자 기능에 안 좋은 영향을 미친다[48].

NO는 또한 여성 생식에 있어서도 다각도로 중요한 역할을 한다[49]. 초기 배아는 스스로 NO를 발생시키고[50], 자궁내막 내피 세포를 예정대로 세포 자멸시켜, 세포영양막이 침투하기 용이하게 한다[51]. 상피의 NOS는 자궁내막 감수성에 매우 중요하며, 쥐 실험 결과, NOS 억제제는 배아의 착상을 방해한다[52,53]. 하지만 정자에서는 NO가 신중하게 조절되어야 한다. 만약 NO가 과도하게 발생하면, 위에서 서술했듯이 배아 스스로 손상되기 쉽다. 자궁내막증으로 인한 불임[54]이나, 비정상적인 면역 반응[55] 같이 고농도의 NO를 만드는 병적인 상황은 배아의 발달 저하와도 연관된다.

Udenafil이 생쥐의 수정률과 배아 발달에 미치는 영향에 대한 본 연구는 udenafil이 동물 실험에 있어서 수정률을 낮추고, 배아 발달을 억제한다고 논증하고 있다. 따라서 불임 환자에게 임신을 목적으로 발기부전제를 복용시킬 때는 특별한 주의가 필요하다고 생각된다.

## References

1. Aldridge J, Measham F. Sildenafil (Viagra) is used as a recreational drug in England. *BMJ* 1999;318:669.
2. Smith KM, Romanelli F. Recreational use and misuse of phosphodiesterase 5 inhibitors. *J Am Pharm Assoc* (2003) 2005;45:63-72.
3. Monga M, Bernie J, Rajasekaran M. Male infertility and erectile dysfunction in spinal cord injury: a review. *Arch Phys Med Rehabil* 1999;80:1331-9.
4. McKinney KA, Lewis SE, Thompson W. Persistent effects of pentoxifylline on human sperm motility, after drug removal, in normozoospermic and asthenozoospermic individuals. *Andrologia* 1994;26:235-40.
5. Tournaye H, Van der Linden M, Van den Abbeel E, Devroey P, Van Steirteghem A. Effect of pentoxifylline on implantation and post-implantation development of mouse embryos in vitro. *Hum Reprod* 1993;8:1948-54.
6. Yovich JL. Pentoxifylline: actions and applications in assisted

- reproduction. *Hum Reprod* 1993;8:1786-91.
7. Lewis SE, Moohan JM, Thompson W. Effects of pentoxifylline on human sperm motility in normospermic individuals using computer-assisted analysis. *Fertil Steril* 1993;59:418-23.
  8. Glenn DR, McVicar CM, McClure N, Lewis SE. Sildenafil citrate improves sperm motility but causes a premature acrosome reaction in vitro. *Fertil Steril* 2007;87:1064-70.
  9. Fisch JD, Behr B, Conti M. Enhancement of motility and acrosome reaction in human spermatozoa: differential activation by type-specific phosphodiesterase inhibitors. *Hum Reprod* 1998;13:1248-54.
  10. Lefièvre L, De Lamirande E, Gagnon C. The cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor, sildenafil, stimulates human sperm motility and capacitation but not acrosome reaction. *J Androl* 2000;21:929-37.
  11. Cuadra DL, Chan PJ, Patton WC, Stewart SC, King A. Type 5 phosphodiesterase regulation of human sperm motility. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:1013-5.
  12. Tournaye H, Van der Linden M, Van den Abbeel E, Devroey P, Van Steirteghem A. Mouse in vitro fertilization using sperm treated with pentoxifylline and 2-deoxyadenosine. *Fertil Steril* 1994;62:644-7.
  13. Scott L, Smith S. Human sperm motility-enhancing agents have detrimental effects on mouse oocytes and embryos. *Fertil Steril* 1995;63:166-75.
  14. Tur-Kaspa I, Segal S, Moffa F, Massobrio M, Meltzer S. Viagra for temporary erectile dysfunction during treatments with assisted reproductive technologies. *Hum Reprod* 1999;14:1783-4.
  15. Donnelly ET, Lewis SE, McNally JA, Thompson W. In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertil Steril* 1998;70:305-14.
  16. Pomeroy KO, Dodds JF, Seidel GE Jr. Caffeine promotes in vitro fertilization of mouse ova within 15 minutes. *J Exp Zool* 1988;248:207-12.
  17. Dodds JW, Seidel GE. Effects of caffeine, Ca<sup>++</sup>, capacitation time, and strain on in vitro fertilization in mice. *Gamate Res* 1984;10:353-60.
  18. Fort DJ, Stover EL, Propst TL, Faulkner BC, Vollmuth TA, Murray FJ. Evaluation of the developmental toxicity of caffeine and caffeine metabolites using the frog embryo teratogenesis assay: *Xenopus* (FETAX). *Food Chem Toxicol* 1998;36:591-600.
  19. Kawahara M, Wakai T, Yamanaka K, Kobayashi J, Sugimura S, Shimizu T, et al. Caffeine promotes premature chromosome condensation formation and in vitro development in porcine reconstructed embryos via a high level of maturation promoting factor activity during nuclear transfer. *Reproduction* 2005;130:351-7.
  20. Jacombs A, Ryan J, Loupis A, Pollard I. Maternal caffeine consumption during pregnancy does not affect preimplantation development but delays early postimplantation growth in rat embryos. *Reprod Fertil Dev* 1999;11:211-8.
  21. Burdan F. Intrauterine growth retardation and lack of teratogenic effects of prenatal exposure to the combination of paracetamol and caffeine in Wistar rats. *Reprod Toxicol* 2003;17:51-8.
  22. Petersen CG, Mauri AL, Ferreira R, Baruffi RL, Franco Júnior JG. Embryo selection by the first cleavage parameter between 25 and 27 hours after ICSI. *J Assist Reprod Genet* 2001;18:209-12.
  23. Boostanfar R, Jain JK, Slater CC, Tourgeman DE, Francis MM, Paulson RJ. The prognostic significance of day 3 embryo cleavage stage on subsequent blastocyst development in a sequential culture system. *J Assist Reprod Genet* 2001;18:548-50.
  24. Borini A, Lagalla C, Cattoli M, Sereni E, Sciajno R, Flamigni C, et al. Predictive factors for embryo implantation potential. *Reprod Biomed Online* 2005;10:653-68.
  25. Lundin K, Bergh C, Hardarson T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod* 2001;16:2652-7.
  26. Lieberman E, Ginsburg ES, Racowsky C. Rate of cell division and weight of neonates following IVF. *Reprod Biomed Online* 2006;12:315-21.
  27. Lewin A, Schenker JG, Safran A, Zigelman N, Avrech O, Abramov Y, et al. Embryo growth rate in vitro as an indicator of embryo quality in IVF cycles. *J Assist Reprod Genet* 1994;11:500-3.
  28. Zhu J, Meniru GI, Craft IL. Embryo developmental stage at transfer influences outcome of treatment with intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet* 1997;14:245-9.
  29. McKiernan SH, Bavister BD. Timing of development is a critical parameter for predicting successful embryogenesis. *Hum Reprod* 1994;9:2123-9.
  30. Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update* 1995;1:91-148.
  31. Hardarson T, Hanson C, Sjogren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod* 2001;16:313-8.
  32. Whitaker M. Calcium at fertilization and in early development. *Physiol Rev* 2006;86:25-88.
  33. Webb SE, Miller AL. Calcium signalling during embryonic de-

- velopment. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:539-51.
34. Blancato JK, Seyler DE. Effect of calcium-modifying drugs on mouse in vitro fertilization and preimplantation development. *Int J Fertil* 1990;35:171-6.
35. Ghalayini IF. Nitric oxide-cyclic GMP pathway with some emphasis on cavernosal contractility. *Int J Impot Res* 2004;16:459-69.
36. Abramczuk JW, Lopata A. Resistance of human follicular oocytes to parthenogenetic activation: DNA distribution and content in oocytes maintained in vitro. *Hum Reprod* 1990;5:578-81.
37. Grealy M, Sreenan JM. Effect of adenylyl cyclase activation on intracellular and extracellular cAMP and cGMP in preimplantation cattle blastocysts. *J Reprod Fertil* 1999;116:355-61.
38. Souness JE, Hassall GA, Parrott DP. Inhibition of pig aortic smooth muscle cell DNA synthesis by selective type III and type IV cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors. *Biochem Pharmacol* 1992;44:857-66.
39. Matousovic K, Tsuboi Y, Walker H, Grande JP, Dousa TP. Inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes block renal tubular cell proliferation induced by folic acid. *J Lab Clin Med* 1997;130:487-95.
40. Friedman DL. Role of cyclic nucleotides in cell growth and differentiation. *Physiol Rev* 1976;56:652-708.
41. Schiano MA, Sevin BU, Perras J, Ramos R, Wolloch EH, Averette HE. In vitro enhancement of cis-platinum antitumor activity by caffeine and pentoxifylline in a human ovarian cell line. *Gynecol Oncol* 1991;43:37-45.
42. Zeitlin PL. Future pharmacological treatment of cystic fibrosis. *Respiration* 2000;67:351-7.
43. Wang W, Masu K, Tamura G, Suzuki K, Ohwada K, Okuyama K, et al. Inhibition of eosinophil survival by a selective inhibitor of phosphodiesterase 4 via the induction of apoptosis. *Biol Pharm Bull* 2005;28:515-9.
44. Zhu B, Strada S, Stevens T. Cyclic GMP-specific phosphodiesterase 5 regulates growth and apoptosis in pulmonary endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;289:L196-206.
45. Sarfati M, Mateo V, Baudet S, Rubio M, Fernandez C, Davi F, et al. Sildenafil and vardenafil, types 5 and 6 phosphodiesterase inhibitors, induce caspase-dependent apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2003;101:265-9.
46. Lewis SE, Donnelly ET, Sterling ES, Kennedy MS, Thompson W, Chakravarthy U. Nitric oxide synthase and nitrite production in human spermatozoa: evidence that endogenous nitric oxide is beneficial to sperm motility. *Mol Hum Reprod* 1996;2:873-8.
47. Lewis SE. Nitric oxide and human sperm. *Assist Reprod Rev* 1998;8:50-64.
48. Donnelly ET, Lewis SE, Thompson W, Chakravarthy U. Sperm nitric oxide and motility: the effects of nitric oxide synthase stimulation and inhibition. *Mol Hum Reprod* 1997;3:755-62.
49. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3:28.
50. Gouge RC, Marshburn P, Gordon BE, Nunley W, Huet-Hudson YM. Nitric oxide as a regulator of embryonic development. *Biol Reprod* 1998;58:875-9.
51. Li HY, Chang SP, Yuan CC, Chao HT, Ng HT, Sung YJ. Nitric oxide induces extensive apoptosis in endometrial epithelial cells in the presence of progesterone: involvement of mitogen-activated protein kinase pathways. *Mol Hum Reprod* 2001;7:755-63.
52. Novaro V, González E, Jawerbaum A, Rettori V, Canteros G, Gimeno MF. Nitric oxide synthase regulation during embryonic implantation. *Reprod Fertil Dev* 1997;9:557-64.
53. Biswas S, Kabir SN, Pal AK. The role of nitric oxide in the process of implantation in rats. *J Reprod Fertil* 1998;114:157-61.
54. Osborn BH, Haney AF, Misukonis MA, Weinberg JB. Inducible nitric oxide synthase expression by peritoneal macrophages in endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril* 2002;77:46-51.
55. Kim KH, Oh DS, Jeong JH, Shin BS, Joo BS, Lee KS. Follicular blood flow is a better predictor of the outcome of in vitro fertilization-embryo transfer than follicular fluid vascular endothelial growth factor and nitric oxide concentrations. *Fertil Steril* 2004;82:586-92.



## Udenafil (Zydena)이 생쥐의 수정과 초기 배아 발달에 미치는 영향

동국대학교 의과대학 산부인과학교실

천근수, 심재철, 양희생

### 목적

Udenafil (Zydena)이 생쥐의 수정률, 그리고 배아 발달에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험을 시행하였다.

### 연구방법

수컷 생쥐에게 udenafil (사람 경구 용량과 같은 0.06 mg/0.05 mL)을 투여한 후 암컷과 교미 시켜서 교미 후 첫째 날, 둘째 날, 셋째 날 그리고 넷째 날 각각 수정률과 초기 배아 발달 정도를 알아보기 위해 대조군과 비교하여 미수정란, 1-cell (zygote), 2-cell, 4-cell, 8-cell, morula 그리고 blastocyst의 개수의 차이를 평가하였다.

### 결과

실험결과 첫째 날은 udenafil을 투여한 군에서 대조군에 비해 수정되지 않은 난자수가 더 많았고 1-cell (zygote)의 경우는 대조군에 비하여 더 적었으며 2-cell의 경우도 대조군에 비하여 더 적었다. 둘째 날은 udenafil을 투여한 군에서 대조군에 비해 수정되지 않은 난자수가 더 많았고 1-cell (zygote)의 경우는 대조군에 비하여 더 적었으며 2-cell의 경우도 대조군에 비하여 더 적었으며 4-cell 역시 대조군에 비하여 더 적었다. 셋째 날은 udenafil을 투여한 군에서 대조군에 비해 수정되지 않은 난자수가 더 많았고 1-cell (zygote)의 경우는 대조군에 비하여 더 많았으며 8-cell의 경우도 대조군에 비하여 더 많았으나 morula는 대조군에 비하여 더 적었다. 넷째 날은 udenafil을 투여한 군에서 대조군에 비해 수정되지 않은 난자수가 더 많았고 1-cell (zygote)의 경우는 대조군에 비하여 더 많았으며 morula의 경우는 대조군에 비하여 더 적었으며 morula 역시 대조군에 비하여 더 적었다.

### 결론

본 연구에서 udenafil이 동물 실험에 있어서 수정률을 낮추고, 배아 발달을 억제한다고 논증하고있다. 이는 불임센터에서 임신을 위해 성교 전에 udenafil을 복용하는 이들에게 udenafil이 수정률과 배아 발달에 좋지 않은 영향을 미친다는 것을 암시를 하고 있다.

**중심단어:** Udenafil, 수정, 배아분할