

Trehalose와 당첨가가 우 체외 수정란의 초자화 동결에 미치는 영향

양부근 · 김준국 · 정희태 · 박춘근 · 김종복 · 김정익

강원대학교 축산대학

Effect of Trehalose and Sugar-addition on the Survival Rates of Bovine IVM/IVF Embryos after Vitrification

Yang, B. K., J. K. Kim, H. T. Choung, C. K. Park, J. B. Kim and C. I. Kim

College of Animal Agriculture, Kangwon National University

SUMMARY

This study was to investigate the vitrification method for cryopreservation technique of bovine *in vitro* fertilization(IVF) embryos. The morphological appearance and viability following vitrification of IVF bovine blastocysts and expanded blastocysts were examined.

Embryos obtained 6, 7, 8 or 9 days after IVF were vitrified in both 40% ethylene glycol(EG) plus 0.3M trehalose and 20% polyvinylpyrrolidone(PVP) in DPBS(ETP, Exp. 1) and ETP solution added 0.375M dextrose(ETPD, Exp. 2). The viability of Days 6, 7, 8 and 9 vitrified /thawed embryos at 24~48 h culture after thawing was 11.9%, 19.8%, 23.4% and 15.3% in ETP(Exp. 1), and 34.6%, 54.5%, 37.9% and 13.0% in ETPD(Exp. 2), respectively. The viability of vitrified embryos produced from the culture days after IVF did not differ in Exp. 1, but significantly differ in Exp. 2($P < 0.05$). The viability of blastocysts and expanded blastocysts significantly differed($P < 0.05$) in 15.2% and 23.3%(Exp. 1), and 25.0% and 45.8%(Exp. 2). The result of Exp. 1 was similar to that of Exp. 2 on the viability of embryo according to developmental stages, but ETP solution plus sugar(dextrose) was increased the viability of vitrified embryos.

In Experiment 3, The viability of vitrified embryos was not different between 12% and 20% PVP concentrations in ETP solution according to culture days or developmental stages.

To investigate the effect of addition of sugar, two type of carbohydrates and a mixture of cryoprotectants for vitrification on the survival of bovine IVF embryos, bovine Days 7 to 9 blastocysts and expanded blastocysts were cryopreserved in either 20% glycerol plus 20% EG, 0.375M sucrose and 0.375M dextrose(GESD, Exp. 4) or 20% glycerol plus 20% EG, 0.3M trehalose and 20% PVP(GETP, Exp. 5) in DPBS. Survival rates of Day 7, 8 and 9 embryos at 24~48 h culture after thawing were 71.4%, 94.6% and 40.5% in GESD, and 59.5%, 81.5% and 62.5% in GETP, respectively. Hatching rates of Day 7, 8 and 9 embryos after thawing were 28.6%, 35.1% and 16.2% in GESD, and 27.0%, 33.3% and 18.8% in GETP, respectively.

These results indicates that a mixture of cryoprotectants(glycerol and EG) and addition of sugar can improve the survival rates of the bovine IVF embryos(Day 7 or 8) vitrified, and the

* 이 논문은 1997년 한국학술진흥재단의 공모과제, 연구비에 의하여 연구되었음.

expanded blastocyst embryos are more suitable for vitrification than early blastocysts stage.

(Key words : Bovine, IVF embryo, Vitrification, Trehalose, Sugar)

I. 서 론

수정란을 이용한 가축의 생산성 향상을 위한 기술은 체내 또는 체외에서 생산된 수정란을 빠르고 손쉽게 동결 용해하고, 용해후 수정란의 생존성이 높은 수정란을 다수 얻을 수 있는 동결 보존에 대한 기술확립이 선결되어야 할 중요한 과제이다. 그러나 아직까지 손쉬운 동결 보존체계는 정립되지 못한 실정이며, 이에 대한 연구가 국내·외에서 활발히 진행되고 있다.

체내 또는 체외에서 생산된 수정란의 동결 보존 방법에는 동결 속도와 동해보호제의 농도와 첨가방법 등에 따라 완만 동결법, 초고속 동결법 및 초자화 동결법(vitrification)등이 있다(Franks 등, 1986; Leibo, 1984; Massip 등, 1987; Nieman, 1991). 수정란을 동결보존한 후 용해후 생존성에 영향을 미치는 요인은 동해보호제의 종류와 농도, 첨가와 제거 방법, 생산된 수정란의 발육단계, 동결과 용해 속도 및 동결보존액에 동해보호제와 함께 첨가되는 macromolecule의 특성등을 들 수 있다(Kasai 등, 1991; Saha 등, 1996).

수정란의 초자화 동결방법에 대한 연구는 Rall과 Fay(1985)가 최초로 보고한 이후 많은 연구가 진행되어 좋은 결과를 얻고 있으나, 초자화 동결 보존액의 성분 에 따라 용해 후 수정란의 생존성에 커다란 차이가 있다. 수정란의 초자화 동결에 이용되는 동해보호제로는 glycerol(Iwasaki, 1994; Saito 등, 1994), EG(Ishimori 등, 1991; Saha 등, 1994; Voelkel과 Hu, 1992)와 propylene glycol(Kasai 등, 1991)등이 많이 이용되고 있으나, propylene glycol은 수정란에 침투력은 좋으나 수정란에 독성이 있어 많이 이용되지 않는다. 비침투성 동해보호물질인 sucrose와 trehalose 등을 침투성 동해보호제(glycerol, DMSO 및 EG 등)와 혼합하여 수정란을 동결 보존할 경우 동해보호제의 평형과 용해시에 일어나는 세포의 손상을 줄일 수 있다(Massip 등, 1993; Saha 등, 1996; Saito 등, 1994). 비침투성 동해보호 물질인 sucrose와 trehalose는 동결시 낮은 수분활동시에 세포막의 기능적, 구조적 변화없이 보존시킬 수 있는 가장 효과적인 거대분

자의 탄수화물 물질로서 수정란 동결보존시에 널리 이용되는 osmotic buffer이다.

본 연구는 체외에서 성숙, 수정시킨 소의 체외수정란의 초자화 동결 방법을 검토하기 위하여, 초자화 동결보존액의 구성 성분중 침투성(EG와 glycerol)과 비침투성 동해보호제(sucrose와 dextrose)와 그의 첨가 물질(dextrose, PVP)이 소 체외수정란의 초자화동결 용해후 생존성에 미치는 영향을 검토하였다

II. 재료 및 방법

1. 난포란의 채취, 성숙 배양, 체외수정 및 체외배양

난포란의 채취, 성숙 배양 및 체외 수정은 양등(1996)의 방법에 준하여 실시하였다. 간략하게 요약하면, 도살장에서 회수한 소의 난소를 멸균 식염수(30~35℃)에 침지하여 2시간 이내에 실험실로 운반한후 직경이 2~7mm의 난포로부터 18gauge 바늘이 부착된 주사기로 난포액을 흡입하여 미성숙난자를 채취하였다. 미성숙난자의 성숙 배양을 위하여 TCM-199에 10%의 fetal bovine serum(FBS, Sigma), 0.5µg/ml의 FSH, 0.5µg/ml의 LH 및 1µg/ml의 estradiol을 첨가하여 성숙배양액을 만든 후 100µl의 소적을 만들어 멸균한 mineral oil(Sigma)로 피복하여 각각의 소적에 15개의 난포란을 넣어 39℃, 5% CO₂와 고습도의 조건에서 20~22시간 배양하여 성숙 배양을 실시하였다.

체외수정은 동결정액을 37℃의 항온수조에서 1분간 용해한 후 Brackett와 Oliphant배양액(BO 배양액, 1975)에 10mM caffeine이 함유된 배양액과 혼합, 원심분리(1,500rpm, 10분)로 2회 세척후 정자의 농도가 2.5×10⁶정자/ml가 되도록 준비하였다. 체외수정액은 BO배양액에 20µg/ml의 heparin과 20mg/ml bovine serum albumin(BSA)을 첨가해 50µl의 소적을 만들어 2~3시간 평형시킨 후 체외수정에 이용하였다. 난구세포가 확장된 난포란을 선별하여 체외수정 배양액으로 2회 세척후 10개씩의 난포란을 체외배양 소적으로 옮긴 후 상기 방법으로 준비한 정액 50µl를 수정배양액에 첨가하여 체외수정을 실시하였다.

Table 1. Composition of vitrification solution

Type of vitrification solution	Glycerol (%)	Ethylene glycol (%)	Trehalose (M)	Sucrose (M)	Dextrose (M)	PVP ¹⁾ (%)
ETP ²⁾		10				
		10	0.3			
		40	0.3			20
ETPD ³⁾		10			0.125	
		10	0.3		0.25	
		40	0.3		0.375	
GESD ⁴⁾	10			0.125	0.125	
	10	10		0.25	0.25	
	20	20		0.375	0.375	
GETP ⁵⁾	10					
	10	10	0.3			
	20	20	0.3			20

¹⁾ Polyvinylpyrrolidone.

²⁾ ETP : 40% EG + 0.3M trehalose + 20% PVP.

³⁾ ETPD : 40% EG + 0.3M trehalose + 20% PVP + 0.375M dextrose.

⁴⁾ GESD : 20% glycerol + 20% EG + 0.375M sucrose + 0.375M dextrose.

⁵⁾ GETP : 20% glycerol + 20% EG + 0.3M trehalose + 20% PVP.

체의 배양은 CR1aa에 10% FBS, 2.5mM taurine (Sigma) 및 1ng/ml PDGF를 첨가한 체외 배양액을 이용하였으며, 39℃, 5% CO₂와 고습도의 조건에서 실시하였으며, 체외 수정후 6~9일 사이에 생산된 배반포 및 확장 배반포기 수정란을 실험에 공용하였다.

2. 체외 수정란의 초자화 동결

본 실험에 이용한 초자화 동결용액의 구성성분은 Table 1과 같으며, 이때 이용된 기본배양액은 Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS)에 20% FBS가 첨가된 배양액을 사용하였다. 체외 발육된 배반포기와 확장 배반포기 수정란을 각각 5분, 5분 및 1분간씩 동해보호제의 평형을 실시한 후 straw내에 1~5개의 수정란을 straw에 봉입한 후 즉시, 액체질소 내로 옮겨 보존하였다. 동해보호제의 평형을 실시할 때 ETP, ETPD 및 GETP의 경우 마지막 단계는 4℃의 조건에서 실시하였고, GESD는 실온에서 실시하였다.

3. 초자화 동결란의 응해 및 체외 배양

동결보존한 체외 수정란의 응해는 25℃의 항온 수조 내에서 약 30초간 응해를 실시하였다. ETP와 ETPD의 동해보호제의 제거는 2ml의 mPBS(D-PBS+10% FBS+0.3% BSA)에서 5분간 평형시킨 후, mPBS로 2회, 체외배양액으로 1회 세척을 실시하였고, GESD와 GETP의 동해보호제 제거는 0.5M과 0.25M sucrose solution에서 각각 5분간씩 평형을 시킨 후 20%의 FBS가 첨가된 D-PBS액으로 2회, 체외 배양액으로 1회 세척을 실시한 후 CR1aa에 10% FBS, 2.5mM taurine 및 1ng/ml PDGF가 첨가된 체외 배양액으로 소적을 만들어 일정시간동안 39℃, 5% CO₂와 고습도의 조건에서 일정시간 배양하면서 동결 응해후 형태적인 정상율과 hatching율을 조사하였다.

4. 통계처리

본 실험에 얻어진 결과는 최소 유의차 검정(least significant difference test; LSD test) 및 Tukey 검정을 실시하여 통계처리를 실시하였다.

III. 결 과

체외에서 성숙 수정시킨 후 체외에서 6~9일까지 체외 배양하여 생산된 배반포기와 확장배반포기 수정란을 40% EG와 0.3M trehalose에 20% PVP가 함유된 초자화 동결 보존액으로 동결 보존한 수정란의 융해후 24~48시간 배양후 생존성을 조사한 결과를 Table 2에 요약하였다.

Table 2에서 나타난 바와 같이 체외배양일에 따라 생산된 수정란의 초자화 동결, 융해직후 회수된 수정란의 생존성은 95.5%(274/287)로서 높은 생존율을 나타냈으나, 융해하여 24~48시간 배양시킨 후 생존성은 6일, 7일, 8일 및 9일에 생산된 배반포 및 확장배반포에서 각각 11.9%(5/42), 19.8%(26/131), 23.4%(15/64) 및 13.5%(5/37)로서 7일과 8일째에 생산된 수정란이 융해하여 체외배양시킨 후 생존성이 높은 것으로 나타났으나, 통계적 유의차는 인정되지 않았다. 한편 6~9일 사이에 생산된 수정란의 발육단계별 초자화 동결 융해후 생산성은 확장배반포기 수정란이 23.3%로서 배반포기 수정란의 15.2%보다 통계

적으로 유의하게 높은 성적을 얻었다($P < 0.05$).

6~9일 사이에 생산된 배반포기와 확장배반포기 체외 수정란을 초자화 동결 할때 초자화 동결 보존액(ETP 용액)에 당류(0.375M dextrose)의 첨가가 초자화 동결 융해후 생존성에 미치는 결과를 Table 3에 요약하였다.

Table 3의 결과를 보면, 체외배양일에 따라 생산된 수정란의 동결 융해하여 24~48시간 체외배양후 생존성의 결과는 7일에 생산된 배반포기와 확장배반포기 수정란의 성적이 54.5%로서 6일(34.6%), 8일(37.9%) 및 9일(13.0%)에 생산된 수정란의 성적보다 통계적으로 유의하게 높은 결과를 얻었다($P < 0.05$). 체외배양후 생산된 체외 수정란의 발육단계별 동결 융해후 생존성에서는 배반포기수정란이 25.0%(13/52)로서 확장배반포기 수정란의 45.8%(22/57)보다 유의하게 낮은 성적을 나타냈다($P < 0.05$).

체외배양후 6~9일 사이에 생산된 체외 수정란의 초자화 동결에 있어서 동결보존액(40% EG+0.3M trehalose)에 PVP의 농도가 융해후 생존성에 미치는 효과를 Table 4에 나타냈다.

체외에서 생산된 체외수정란을 40% EG에 0.3M

Table 2. Survival rates of bovine IVF embryos vitrified in a 40% EG, 0.3M trehalose plus 20% PVP (ETP1)

Day in culture	Stage of embryos	No. of frozen embryos	No. of recovered embryos after thawing		No. of normal embryos after 24~48hr. culture (%)
			Normal	Degenerated	
Day 6	B ²⁾	24	22	0	2(9.1)
	EB ³⁾	23	20	1	3(15.0)
Day 7	B	88	84	2	14(16.7)
	EB	51	47	3	12(25.5)
Day 8	B	40	36	2	6(16.7)
	EB	32	28	0	9(32.1)
Day 9	B	22	16	4	2(12.5)
	EB	26	21	1	3(14.3)
Overall means					
	B	174	158	8	24(15.2) ^b
	EB	132	116	5	27(23.3) ^a

¹⁾ 40% EG, 0.3M trehalose plus 20% PVP.

²⁾ Blastocysts.

³⁾ Expanded blastocysts.

^{a,b} Values with different superscripts in the same column are significantly differ ($P < 0.05$).

Table 3. Effect of sugar on the survival rates of bovine IVF embryos vitrified in a 40% EG, 0.3M trehalose, 20% PVP plus 0.375M dextrose(ETPD1)

Day in culture	Stage of embryos	No. of frozen embryos	No. of recovered embryos after thawing		No. of normal embryos after 24~48hr culture(%)
			Normal	Degenerated	
Day 6	B ²⁾	15	13	2	3(23.1) ^{bcd}
	EB ³⁾	15	13	2	6(46.2) ^{ab}
Day 7	B	20	11	3	4(36.4) ^{bc}
	EB	14	11	1	8(72.7) ^a
Day 8	B	19	17	2	5(29.4) ^{bcd}
	EB	14	12	2	6(50.0) ^{ab}
Day 9	B	15	11	2	1(9.1) ^d
	EB	14	12	1	2(16.7) ^{cd}
Overall means					
	B	69	52	9	13(25.0) ^B
	EB	57	48	6	22(45.8) ^A

¹⁾ 40% EG, 0.3M trehalose, 20% PVP plus 0.375M dextrose.

²⁾ Blastocysts.

³⁾ Expanded blastocysts.

A,B,a,b,c,d Values with different superscripts in the same column are significantly differ ($P < 0.05$).

Table 4. Effect of PVP on the survival rates of bovine IVF embryos vitrified in a 40% EG, 0.3M trehalose with different PVP concentration

PVP concentration	Stage of embryos	No. of frozen embryos	No. of recovered embryos after thawing		No. of normal embryos after 24~48 hr. culture(%)
			Normal	Degenerated	
12%	B ¹⁾	21	19	1	3(15.8)
	EB ²⁾	23	21	0	5(23.8)
20%	B	88	84	2	14(16.7)
	EB	51	47	3	12(25.5)
Overall means					
	B	109	103	3	17(16.5)
	EB	74	68	3	17(25.0)

¹⁾ Blastocysts.

²⁾ Expanded blastocysts.

trehalose가 함유된 용액에 12% PVP첨가구와 20% PVP가 첨가된 초자화 동결 보존액을 이용하여 동결 보존한 경우, 12% PVP 첨가구와 20% PVP첨가구에서 융해하여 24~48시간 배양후 생존성은 20.0%와 19.8%로서 처리구간에 차이가 없었다. 배반포기와 확장배반포기 수정란의 동결 융해후 생존성은 각각 16.

5%(17/109)와 25.0%(17/74)로서 커다란 차이가 인정되지 않았다.

체외성숙, 체외수정 시킨후 7~9일 사이에 생산된 배반포기와 확장배반포기 수정란을 glycerol(20%)과 EG(20%)를 혼합한 용액에 sucrose(0.375M)와 dextrose(0.375M)가 첨가된 동결보존액에서 초자화

Table 5. Effect of a mixture of cryoprotectants and sugar on the survival rates of bovine IVF embryos by vitrification method using GESD¹⁾ solution

Day in culture	Stage of embryos	No. of frozen embryos	No. of recovered embryos after thawing		No. of normal embryos after 24~48hr. culture(%)	No. of hatched embryos(%)
			Normal	Degenerated		
Day 7	B ²⁾	25	22	0	15(68.2) ^{bc}	3(13.6) ^b
	EB ³⁾	23	20	1	15(75.0) ^{ab}	9(45.0) ^a
Day 8	B	24	18	5	17(94.4) ^a	5(27.8) ^{ab}
	EB	24	19	2	18(94.7) ^a	8(42.1) ^a
Day 9	B	24	20	2	7(35.0) ^d	1(5.0) ^b
	EB	24	17	4	8(47.1) ^{cd}	5(29.4) ^{ab}
Overall means						
	B	73	60	7	39(65.0)	9(15.0) ^B
	EB	71	56	7	41(73.2)	22(39.3) ^A

¹⁾ 20% glycerol, 20% EG, 0.375M sucrose plus 0.375M dextrose.

²⁾ Blastocysts.

³⁾ Expanded blastocysts.

A,B,a,b,c,d Values with different superscripts in the same column are significantly differ ($P < 0.05$).

동결 용해후 생존성에 대한 결과를 Table 5에 요약하였다.

Table 5에서 보면, 체외배양일에 따라 생산된 배반포기와 확장 배반포기 체외수정란의 초자화 동결 용해후 24~48시간 배양후 생존성은 7일, 8일 및 9일의 성적이 각각 71.4%(30/42), 94.6%(35/37) 및 40.5%(15/37)로서 배양일에 따라 생존성에 통계적 유의성이 인정되었으며 ($P < 0.05$), 8일째에 생산된 체외수정란의 생존성이 가장 높은 것으로 나타났다. 그러나 배반포기와 확장배반포기 수정란의 발육단계별 동결용해하여 체외배양후 생존성은 65.0%와 73.2%로서 커다란 차이가 없었다. 7~9일 사이에 생산된 초자화 동결 수정란을 용해하여 체외배양시킨 후 hatching 배반포기까지 발육된 체외 발육율은 7일과 8일에 생산된 수정란이 각각 28.6%와 35.1%로서 9일째에 생산된 수정란의 성적(16.2%)보다 유의하게 높은 결과를 얻었다 ($P < 0.05$). 초자화 동결수정란을 용해하여 체외 배양시킨 후 hatching 배반기까지 발육된 체외 발육 성적은 7일째에 생산된 확장배반포기 체외수정란이 45.0%(9/20)으로서 다른 처리구보다 높은 성적을 나타냈으며, 발육단계별 동결용해하여 hatching 배반포기까지 발육된 체외발육 성적은 배반포기 수정란(15.

0%)이 확장배반포기 수정란(39.3%)보다 유의하게 낮은 성적을 나타냈다 ($P < 0.05$).

동해보호제를 혼합시킨 용액(20% glycerol과 20% EG)에 sucrose와 dextrose대신에 trehalose(0.3M)와 PVP(20%)가 첨가된 초자화 동결보존액에 7~9일 사이에 생산된 체외수정란을 동결보존후 용해하여 얻은 생존성의 결과를 Table 6에 요약하였다.

Table 6에서 나타난 바와 같이 체외수정후 체외배양일에 따라 생산된 체외수정란을 동결보존 용해후 24~48시간 체외배양후 생존성은 7일, 8일과 9일이 각각 59.5%, 81.5% 및 62.5%로서 Table 4의 결과와 같이 8일에 생산된 수정란의 생존성이 높은 성적을 얻었으나 통계적 유의차는 인정되지 않았다. 또한 발육 단계별 동결 용해후 24~48시간 체외배양하여 얻은 생존성은 배반포기와 확장배반포기 수정란에서 각각 55.8%(21/52)와 64.8%(35/54)로서 확장배반포기 수정란이 다소 높은 결과를 나타냈으나 통계적 유의성은 인정되지 않았다. 한편 초자화 동결 용해 수정란을 체외배양하여 hatching 배반포기까지의 체외발육율은 7일, 8일 및 9일에 생산된 수정란의 성적은 각각 27.0%, 33.3% 및 18.8%로서 8일째에 생산된 수정란이 hatching 배반포기까지의 체외발육율이 다소 높은 결

Table 6. Effect of a mixture of cryoprotectants with 0.3M trehalose plus 20% PVP(GETP¹⁾) on the survival rates of bovine IVF embryos by vitrification method

Day in culture	Stage of embryos	No. of frozen embryos	No. of recovered embryos after thawing		No. of normal embryos after 24~48hr. culture(%)	No. of hatched embryos(%)
			Normal	Degenerated		
Day 7	B ²⁾	24	19	3	10(52.6)	2(10.5) ^b
	EB ³⁾	22	18	2	12(66.7)	8(44.4) ^a
Day 8	B	23	17	4	10(58.8)	2(11.8) ^b
	EB	25	20	3	12(60.0)	7(35.0) ^a
Day 9	B	21	16	4	9(56.3)	1(6.3) ^b
	EB	20	16	3	11(68.8)	5(31.3) ^{ab}
Overall means						
	B	68	52	11	29(55.8)	5(9.6) ^B
	EB	67	54	8	35(64.8)	20(37.0) ^A

¹⁾ 20% glycerol, 20% EG, 0.3M trehalose plus 20% PVP.

²⁾ Blastocysts.

³⁾ Expanded blastocysts.

^{A,B,a,b} Values with different superscripts in the same column are significantly differ ($P < 0.05$).

과를 나타냈으나, 통계적 유의차는 인정되지 않았다. 한편 체외배양일때 따른 발육단계별 동결 융해후 hatching 배반포기까지의 체외발육율은 7일째에 생산된 확장배반포기 수정란이 44.4%로서(8/18)로서 여타 구보다 높은 성적을 나타냈다. 발육단계에 따른 hatching 배반포기까지의 체외발육율에서는 확장배반포기 수정란(37.0%)이 배반포기 수정란(9.6%)보다 유의하게 높은 성적을 나타냈다($P < 0.05$).

IV. 고 찰

소 수정란의 초자화동결(vitrification)에 많이 이용되는 분자량이 작아 세포내 침투력이 좋은 동해보호제인 EG와 일반적으로 많이 이용되는 탄수화물인 sucrose대신에 trehalose와 거대분자인 PVP가 첨가된 초자화 동결 보존액이 소 수정란의 초자화 동결, 융해 후 생존성에 미치는 영향을 조사하였다.

EG는 그 동안 소 수정란의 동결보존에 사용되었던 glycol 파생물질 중에 가장 효과적이고, 세포에 독성이 적어 동결, 융해란의 생존성이 뛰어난 동해보호제이며(Voekel과 Hu, 1992; Miyamoto와 Ishibashi, 1977), 소 수정란의 동결 보존에 이용되는 동해보호제

인 glycerol, propylene glycol 및 DMSO 보다 분자량이 작아 쉽게 수정란에 침투되고, 융해시 쉽게 제거되는 물질이다(Mahmoudzadeh 등, 1993).

비침투성 탄수화물인 sucrose는 일반적으로 동결융해시 수정란이 팽창되는 것을 방지하는 삼투압 조절자로서 많이 이용되는 물질로서 소 수정란의 초자화 동결에 많이 이용된다(Leibo와 Mazur, 1978; Rall과 Wood, 1994). 이와 같은 물질로 최근에 trehalose가 대체물질로 이용되는데 trehalose는 낮은 수분 활동시에 세포막에 기능적, 구조적 변화없이 동결시 이용되는 또 하나의 탄수화물 물질이다. Trehalose는 동결시 이용되는 삼투압 조절자 중에 가장 탈수력이 강하고 두층의 지질층으로 구성되어 있는 세포막에 손상을 주지 않는 가장 안정적 효과를 나타내는 물질로서 동결시 침투되었던 동해보호제를 융해시 세포외배양액의 삼투압을 증진시켜 쉽게 동해보호제를 제거시켜 독성으로부터 수정란의 손상을 줄여준다. 또한 초자화 동결보존액에 PVP, polyethylene glycol 및 ficoll과 같은 macromolecule의 첨가는 초자화 동결 보존의 성공률을 증가시키며, 동결시의 손상으로부터 빠르게 냉각된 세포를 보호해 주고, 세포내 ice crystals의 피해로부터 세포를 보호해 주는 특성을 가지고 있다

(Leibo와 Oda, 1993; Fahy 등, 1984).

PVP는 분자량이 30,000이상인 거대 분자 물질로서 동결 용해시 세포 표면을 둘러싸므로써 삼투압 shock을 방지하고 용액의 효과로부터 수정란을 보호하며, seeding을 하지 않는 급속 동결 또는 초자화 동결에서는 PVP가 용액의 효과와 과냉각의 효과를 최대한 줄일 수 있는 것으로 보고되고 있으나, 아직 정확한 기작은 밝혀지지 않고 있다(Rinfret, 1963; Mazur, 1960; Saha 등, 1996). 또한 trehalose와 PVP를 혼합한 초자화 동결 보존액을 이용하면, 동결시 수정란이 빠르게 움추려 드는 현상을 방지시킬 수 있다(Kasai 등, 1990).

본 실험에서 초자화 동결 용액으로서 40% EG와 0.3M trehalose에 20% PVP가 첨가된 소 체외 수정란을 동결 보존한 후 용해직후 회수한 수정란중 형태적으로 정상인 수정란의 생존률은 95.5%(274/287)로서 높은 결과를 얻었으나, 용해후 체외에서 24~48시간 배양 후 생존율은 18.6%(51/274)로서 매우 낮은 결과를 얻었다.

이상의 성적은 Saha 등(1996)이 본 실험과 동일한 초자화 동결 보존액을 이용하여 소 체외 수정란을 초자화 동결 용해 후 70% 생존률과 43%의 hatching 배반포 성적을 얻어 본 실험의 결과와 상반된 결과를 보였으나, 그 기작에 대하여는 앞으로 보다 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

한편 ETP용액에 당류의 일종인 dextrose의 첨가가 소 체외 수정란의 초자화 동결에 영향을 미치는 결과를 검토한 결과, 초자화 동결 용해직후의 수정란의 생존성은 89.0%(100/115)였으며, 24~48시간 동안 체외에서 배양시킨 후 생존성은 35.0%로서 ETP 용액을 이용한 소 체외 수정란의 초자화 동결 용해후 생존성에 비해 높은 성적을 얻었다. 이와 같은 결과는 dextrose가 세포의 독성 방지제로서 역할을 하며(Clark 등, 1984; Fahy 등, 1984), 초자화 동결시 유해한 온도역을 줄이므로써 세포에 손상을 줄이고(Sutton, 1992), 수정란내 동해보호제의 과잉 침투를 막아 주므로써(Utsumi 등, 1992) 생존력을 증가시켜 준다는 이들의 결과와 일치되는 것으로 생각된다.

한편 ETP 용액을 이용한 초자화 동결시 PVP의 농도의 효과를 검토한 결과 PVP의 농도(12%, 20%)에 따라서는 초자화 동결 용해후 생존성(Table 4)에

커다란 차이를 나타내지 않으므로써 Saha 등(1996)의 결과와 일치하는 경향을 보였다.

높은 농도의 EG만을 동해보호제로 이용하여 소 체외 수정란을 초자화 동결을 할 경우, EG는 침투력이 좋아 세포내로 과잉 침투가 되어 세포에 독성 효과를 나타낼 수 있으므로(Mahandzadah, 1993), glycerol과 혼합한 초자화 동결 보존액을 이용하여 실험한 결과 GESD와 GETP에서 각각 초자화 동결 용해하여 일정시간 동안 체외 배양시킨 후 생존율은 각각 69.0%(80/116)과 60.4%(64/106)로서 처리구간에는 차이를 나타내지 않았으나, EG를 동해보호제로 단독 사용한 ETP와 ETPD 처리구에 비하여 높은 성적을 얻었으며, 또한 hatching 배반포까지 체외발육율이 있어서도 각각 26.7%(31/116)과 23.6%(25/106)로서 EPT와 ETPD 처리구에 비하여 현저히 높은 성적을 얻었다. 이상의 성적은 Saito 등(1994)이 GESD 용액을 이용하여 소 체외 수정란을 초자화 동결 용해후 얻은 생존성의 결과보다는 낮은 성적을 나타냈으나, 용해후 생존성이 좋은 결과는 본 실험의 결과와 일치하는 경향을 보였다.

한편 소 체외 수정란의 동결 용해후 생존성에 영향을 미치는 요인으로는 체외에서 배양되는 배반포까지 발육되는 배양일수에 따라 용해후 생존성과 활력에 커다란 영향을 미치고 있다(Saha 등, 1996).

본 연구에서는 실험 1(Table 2), 실험 2(Table 3), 실험 4(Table 5) 및 실험 5(Table 6)의 경우, 체외 배양일수가 7일과 8일에 생산된 배반포와 확장 배반포기 수정란을 초자화 동결, 용해하여 24~48시간 배양시킨 후 체외 생존율이 6일과 9일에 생산된 수정란의 체외 생존율보다 우수한 것으로 나타났다. 이상의 성적은 Takagi 등(1994)이 여러 가지 동해보호제를 이용하여 동결용해후 생존성이 7~8일에 생산된 수정란의 용해후 생존성이 9일에 생산된 수정란보다 우수하였다고 보고한 결과와는 일치하였으나, Saha 등(1996)이 ETP용액을 이용한 초자화 동결 실험 결과, 7일에 생산된 수정란이 8일과 9일에 생산된 수정란보다 동결 용해후 생존성이 우수하다고 보고한 결과와는 다소 차이가 있다. 이와 같은 결과는 초자화 동결 용액의 차이에 기인되는 것으로 생각된다.

본 실험의 결과를 종합하여 보면 소 체외 수정란을 초자화 동결을 할 경우, 수정란의 체외배양일에 따라

생산된 배반포기 수정란은 초자화 동결보존액의 구성 성분에 관계없이 7일과 8일에 생산된 수정란이 동결, 융해후 생존성이 우수하며, 발육단계에 있어서는 초기 배반포기 수정란보다는 확장배반포기 수정란이 생존성이 높으며, 초자화 동결보존액의 구성성분은 glycerol과 EG가 혼합된 GESD용액을 이용하는 것이 초자화 동결, 융해후 생존성 및 체외발육율을 증가시킬 수 있다. 한편 EG와 trehalose 및 PVP가 첨가된 초자화 동결 보존액을 이용할 경우, ETP용액에 당류(dextrose)를 첨가하는 것이 효과적인 것으로 생각된다.

V. 적 요

본 연구는 체외수정란을 손쉽고, 간편하게 장기간 동결보존할 수 있는 초자화 동결방법을 검토하기 위하여, 초자화 동결 보존용액의 구성성분과 dextrose가 우 체외수정란의 동결보존 융해후 체외 발육율과 생존성에 미치는 영향에 대하여 조사하였다.

1. ETP용액에서 초자화 동결 시킨후 융해하여 24~48시간 체외배양하여 얻은 생존율에 있어서 체외배양일에 따라 생산된 배반포 및 확장배반포기 수정란의 체외생존율은 6일, 7일, 8일 및 9일에 각각 11.9% 19.8%, 23.4% 및 15.3%로서 처리구간에 커다란 차이는 없었으나, 발육단계별 성적은 배반포기가 15.2%로서 확장배반포기의 23.3%보다 유의하게 낮았다($P < 0.05$).
2. ETP 초자화 동결 보존액에 당의 첨가(0.375M dextrose)가 초자화 동결 융해후 생존성에 미치는 효과를 검토한 결과, 체외배양일에 따른 동결 융해후 생존성은 7일에 생산된 수정란이 54.5%로서 여타구(6일, 34.6%; 8일, 37.9%; 9일, 13.0%)보다 높은 성적을 얻었으며, 발육단계별 동결융해후 생존성에서는 확장배반포기 수정란이 45.8%로서 배반포기 수정란의 25.0%보다 통계적으로 유의하게 높아($P < 0.05$), 실험 1의 결과와 유사한 경향을 보였으며, 당을 첨가할 경우 다소 높은 생존율을 나타냈다.
3. ETP초자화 동결용액에서 PVP농도가 생존성에 미치는 영향을 검토한 결과, 12% PVP 첨가구(20.0%)와 20% PVP첨가구(19.8%)에서 동결 융해하여 24~48시간 체외배양한 후 생존성에는

커다란 차이가 인정되지 않았으며, 발육단계별 성적에서도 차이가 인정되지 않았다.

4. GESD동결용액을 이용한 초자화 동결에 있어서 7일~9일 사이에 생산된 체외수정란을 동결융해하여 24~48시간 체외배양하여 얻은 생존율은 8일째에 생산된 수정란의 동결 융해후 생존성이 94.6%로서 7일(71.4%)와 9일(40.5%)에 생산된 수정란보다 유의하게 높은 성적을 얻었다($P < 0.05$). 한편 초자화 동결 수정란을 융해하여 체외배양시킨 후 hatching까지 배양된 체외 발육율은 8일째에 생산된 수정란이 35.1%로서 7일의 28.6%와 9일의 16.2%보다 우수한 결과를 얻어 24~48시간 체외배양 성적과 동일한 경향을 보였다.
5. GETP동결용액을 이용한 초자화 동결에 있어서 체외배양일(7일~9일)에 따라 생산된 수정란을 동결융해하여 일정시간 동안 체외배양시킨 후 생존성과 hatching 배반포기까지의 체외발육율은 배양일에 따라 생산된 수정란들간에 커다란 차이가 인정되지 않았으나($P > 0.05$), 발육단계별 성적에서는 확장배반포기가 37.0%로서 배반포기 수정란의 9.6%보다 유의하게 높은 성적을 얻었다($P < 0.05$).

VI. 인용문헌

1. Brackett, B. G. and G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod. 12:260-274.
2. Clark, P., G. M. Fahy and A. M. Karow Jr. 1984. Factor influencing renal cryopreservation. II. Toxic effects of three cryopreservation in combination with three vehicle solutions in nonfrozen rabbit cortical slices. Cryobiology 21:260-273.
3. Fahy, G. M., D. R. MacFarlane, C. A. Angell and H. T. Meryman. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. Cryobiology 21:407-426.
4. Franks, G. C., S. L. Coley, B. Betterbed and R. D. Page. 1986. The effects of freezer

- type, cryoprotectant and processing methods on viability of frozen embryos. *Theriogenology* 26:135-144.
5. Ishimori, H., K. Saeki, M. Inai, Y. Nagao, J. Itasaka, Y. Miki, N. Seike and H. Kainuma. 1993. Vitrification of bovine embryos in a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. *Theriogenology* 40:427-433.
 6. Iwasaki, S., Y. Yoshikane, S. Watanabe and T. Nakahara. 1994. Effect of freezing of bovine preimplantation embryos derived from oocytes fertilized *in vitro* on survival of their inner cell mass cells. *Mol. Reprod. Dev.* 37:272-275.
 7. Kasai, M., J. H. Komi, A. Takakamo, H. Tsud, T. Sakurai and T. Machida, 1991. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J. Reprod. Fert.* 89:91-97.
 8. Leibo, S. P. 1984. One-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 21:767-790.
 9. Leibo, S. P. and P. Mazur. 1978. Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. In: Daniel, J. C. (ed), *Methods in mammalian Reproduction*. Academic press pp 179-201.
 10. Leibo, S. P. and K. Oda. 1993. High survival of mouse zygotes and embryos cooled rapidly or slowly in ethylene glycol plus polyvinylpyrrolidone. *Cryo-Letters* 14:133-144.
 11. Mahmoudzadeh, A. R., A. Van Soom, I. Van Vlaenderen and A. De Kruif. 1993. A comparative study of the effect of one-step addition of different vitrification solutions on *in vitro* survival of vitrified bovine embryos. *Theriogenology* 39:1291-1302.
 12. Massip, A., P. Mermilod, C. Wils and F. Desy. 1993. Effects of dilution procedure and culture conditions after thawing on survival of frozen bovine blastocysts produced *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 97:65-69.
 13. Massip, A., P. Van der Zwalman and F. Ectors. 1987. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology* 27:69-79.
 14. Mazur, P. 1960. Physical factors implicated in the death of microorganisms at sub-zero temperatures. *Ann. NY Acad. Sci.* 85:610-629.
 15. Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1977. Survival of frozen-thawed mouse and rat embryos to recipient female. *J. Reprod. Fert.* 50:373-375.
 16. Niemann, H. 1991. Cryopreservation of ova and embryos from livestock; current states and research needs. *Theriogenology* 35:109-123.
 17. Rall, W. F. and G. M. Fahy. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C . *Nature* 313:573-575.
 18. Rall, W. F. and M. J. Wood. 1994. High *in vitro* and *in vivo* survival of day 3 mouse embryos vitrified or frozen in a non-toxic solution of glycerol and albumin. *J. Reprod. Fert.* 101:681-688.
 19. Rinfret, A. P. 1963. Some aspects of preservation of blood by rapid freeze-thaw procedures. *Fed. Proc.* 22:94-101.
 20. Saha, S., T. Otoi and T. Suzuki. 1996. The efficiency of ethylene glycol, trehalose and polyvinylpyrrolidone for successful vitrification of IVF bovine embryos. *J. Reprod. Dev.* 42:163-169.
 21. Saha, S., R. Rajamahendran, A. Boediono and C. Sumantri. 1996. Viability of bovine blastocysts obtained after 7, 8 or 9 days of culture *in vitro* following vitrification and one-step rehydration. *Theriogenology* 46:331-343.
 22. Saito, N., K. Imai and M. Tomizawa. 1994.

- Effect of sugar-addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced *in vitro*. *Theriogenology* 41:1053-1063.
23. Sutton, R.L. 1992. Critical cooling rates for aqueous cryoprotectants in the presence of sugars and polysaccharides. *Cryobiology* 29: 585-598.
 24. Tagai, M., T. Otoi, A. Boediono, S. Saha and T. Suzuki. 1994. Viability of frozen-thawed bovine IVM/IVF embryos in relation to aging using various cryoprotectants. *Theriogenology* 41:915-921.
 25. Utsumi, K. S. Hochi and A. Iritani. 1992. Cryoprotective effect of polyols on rat embryos during two-step freezing. *Cryobiology* 29:332-341.
 26. Voelkel, S.A. and Y.X. Hu. 1992. Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. *Theriogenology* 37:687-697.
 27. 양부근, 황환섭, 박동현, 정희태, 박춘근, 김종복, 김정익. 1996. 항산화제 첨가와 체세포 공동배양이 소 체외수정란의 체외발육에 미치는 영향; I. 항산화제 첨가가 소 체외수정란의 체외발육에 미치는 효과
(접수일자 : 1998. 10. 21. / 채택일자 : 1998. 11. 25.)