

개 미숙난자의 Vitrification 동결 후 체외수정에 관한 연구

박상훈 · 박종민 · 김상근[†]
충남대학교 수의과대학

Studies on *In Vitro* Fertilization after Vitrification Freezing of Immatured Canine Oocytes

S. H. Park, J. M. Park and S. K. Kim[†]

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University

SUMMARY

This study was carried out to investigate the *in vitro* fertilization rate of canine immature oocytes cryopreserved by vitrification freezing. The vitrification solutions of EPS and EDS were consisted of 40% ethylene glycol, 18% Ficoll and 0.3M sucrose, and 20% ethylene glycol, 16.5% DMSO and 0.5M sucrose in TCM-199 medium supplemented with 10% FCS, respectively. The oocytes were exposed The developmental rate of *in vitro* cultured oocytes recovered from ovaries collected at different stages of the reproductive cycle were 3.8%, 10.7%, 46%, respectively. to EFS or EDS at 25°C and loaded into straw for 30 sec. The straws was slowly immersed into LN₂. Fertilization and survival rate was defined as development rate on *in vitro* culture or FDA-test.

1. The fertilization rate after vitrification freezing of immature oocytes at 1, 6, 12 and 24 hrs after collection from ovaries was very low(5.3%~31.4%) than the unfrozen oocyte(60.0%). And the fertilization rate after vitrification freezing of immature oocytes was very higher than that of mature oocytes.
2. The survival rate after vitrification freezing of immature oocytes at 1, 6, 12 and 24 hrs after collection from ovaries was 55.0%, 40.0%, 28.6% and 17.1%, respectively. And the survival rate after vitrification freezing of immature oocytes was slightly higher than that of mature oocytes.

(Key words : dogs, immature oocytes, vitrification freezing, fertilization, survival rate)

서 론

애완동물의 사육 증가와 더불어 소형 개는 고 단백질 또는 고 지방식으로 사육되면서도 운동이 절대적으로 부족하여 정자수가 감소하고 번식주기가 불규칙하여 불임이 되는 번식장애와 질병으로 이

어지고 있다 (Gunzel, 1986; Kim, 2001).

동결액내에 고 농도의 내동제를 첨가하여 수분을 빙정화시키지 않고 과냉각 상태로 유지하는 vitrification 동결에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다 (Rall과 Fahy, 1985; Kasai 등, 1990; Vajita 등, 1998). Vitrification 동결에 관한 연구는 주로 마우스(Candy 등, 1994; Dinnyes 등, 1995; Kasai

[†] Correspondence : E-mail: kskkim @hanbat.cnu.ac.kr

등, 1990; Rall, 1987)에서 이루어졌고 소(Riha 등, 1991; Tachigawa 등, 1993; Vajita 등, 1998a, b; Kim 등, 2000)에서도 보고되고 있으나 개에 대한 보고는 접할 수 없었다.

그러나 불임개체가 많고 자연수정이 어려운 소형 개의 불임치료를 위해 체외수정과 수정란 생산에 관한 보문은 접할 수 없었다. 현실적으로 난소는 일정한 시기에 한하여 소량으로 수집이 가능하기 때문에 지속적인 연구를 진행할 수 없어 난자를 장기 보존하면서 체외수정이나 불임해결에 가능한 연구가 진행할 수 있을 것으로 판단되어 시도하였다.

이에, 본 연구는 소형 개의 불임 해결을 위해 미숙 난자를 보존 후 이용할 수 있는지의 여부를 판명하기 위하여 미숙 난포란을 시간별로 배양한 뒤 vitrification 동결 용해 후 체외수정율과 생존율을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 회수와 체외성숙

개 난소를 적출하여, 100 IU/ml의 penicillin G와, 100 µg/ml의 streptomycin sulfate를 첨가한 38°C의 생리식염수에 침지하여 실험실로 옮긴 다음 난포란을 회수하였다. 난포란은 2 IU/ml의 hCG (Sigma, U.S.A.)와 1 µg/ml의 β-estradiol(Sigma, U.S.A.)과 10%(v/v)의 FCS(Sigma, U.S.A.)가 첨가된 TCM-199(Sigma, U.S.A.) 배양액으로 배양하였다. 난포란의 체외성숙은 배양액 50 µl의 소적을 mineral oil(Squibb, U.S.A.)로 피복된 소적내에 5개의 난포란을 주입하여 CO₂ 배양기내(5% CO₂, 95% air, 38.5°C)에서 48시간 성숙배양을 실시하였다.

2. Vitrification 동결

난포란을 회수 후 1, 6, 12, 24시간 배양시킨 미숙 난포란을 VS1 용액에서 1분간 배양후 VS2 용액 20 µl 소적내에 옮겨 pipetting에 의해 신속히 EDS(20% ethylene glycol + DMSO 16.5% + 0.5M sucrose + 10% FCS) 용액으로 혼합한 후 각각 노출 1분 후 OPP straw에 충전 봉인한 다음 LN₂에 침지하여 vitrification 동결을 실시하였다. 용해는

straw를 20°C 온수조에서 서서히 흔들면서 10초간 용해한 후 거꾸로 흔들어 2분간 방치한 후 내용물 전체를 petri dish에 옮겨 신선한 배양액으로 3회 세척 후 배양하였다.

3. IVF

체외성숙 배양한 난포란과 동결 용해한 난포란을 각각 50 µl의 배양액 소적내에 5개의 난포란을 주입한 후, 사출 정액 0.01 ml와 BO액 2.0ml를 잘 혼합하여 배양기에서 30 분간 swim-up시킨 다음 약 0.5 ml의 상층액을 1,000 rpm으로 원심분리하여 침전된 정자 pellets을 20 µl의 heparin(Sigma, USA)과 혼합하여 CO₂ 배양기에서 수정능획득을 유기시킨 정자부유액을 주입하여 7~10시간 배정시켰다.

4. 체외성숙 및 체외발생율의 판정

난자를 0.2%의 hyaluronidase(Sigma, U.S.A.)를 1~5분간 처리에 의하여 난구세포를 제거하고 나화된 난자는 acetic acid : ethanol(1 : 3)액에 24시간 고정하고 1% aceto-orcein 또는 10 µg/ml bis-benzimide(Hoechst 33342, Sigma, U.S.A.) 염색액으로 염색한 다음 세포 및 핵 분열상을 관찰하여 난자의 체외성숙을 판정하거나 배양액내에서 배양하면서 응성전핵 형성과 배의 발생상태를 관찰하거나, FDA(flourescence diacetate)-test법에 생존율을 판정하였다(Schilling 등, 1982).

5. 통계학적 분석

반복실험을 통하여 얻어진 결과는 분산분석에 의해 평균치를 구하였으며, 처리간의 차이를 평가하기 위하여 Duncan의 다중검증을 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 미숙난자의 Vitrification 동결

1) Vitrification 동결 미숙난자의 체외수정율

미숙난포란을 회수후 1, 6, 12, 24시간 체외성숙 배양 후 각각 vitrification 동결 용해 후 각각 배양을 통해 성숙시킨 난포란과 수정능획득 정자와 체

Table 1. Development of oocytes after *in vitro* fertilization of vitrification freezed immature oocytes

Vitrification of immature oocytes	No. of oocytes examined	No. of oocytes matured (%)	No. of oocytes fertilized (%)
Control	30	22 (73.3)	18 (60.0)
1 h	35	15 (42.9)	11 (31.4) ^a
6 h	40	15 (33.3)	9 (22.5) ^b
12 h	42	10 (23.8)	5 (11.9) ^b
24 h	38	5 (13.2)	2 (5.3) ^b

* Values with different subscripts in same column were denoted significantly different(p<0.05).

외수정시켰을 때 체외수정율은 Table 1과 같다.

미숙난포란을 회수 후 1, 6, 12 및 24시간 성숙 배양 후 vitrification 동결 용해한 다음 수정능획득 정자와 수정시켰을 때 체외수정율은 각각 31.4%, 22.5%, 11.9% 및 5.3%로서 대조군의 수정율 60.0%에 비해 낮은 성적이었고, 회수 후 시간이 경과 되지 않은 미성숙 난포란일수록 높은 체외수정율을 나타냈다. 한편, 발정기와 비발정기의 난소로부터 채취한 난자에 대한 체외수정율은 발정주기의 난자가 높았지만 유의차는 인정되지 않았고 분류하기가 어려워 결과로 나타낼 수 없었다. 이러한 결과는 시험동물은 다르지만, 소 수정란을 vitrification 동결 용해하였을 때 생존율이 20.0~27.5%라고 한 김 등(2000)의 결과와 비교할 때 유사한 성적이었다. 한편, Vajta 등(1998)과 Kasai 등(1990)은 소와 마우스 난자를 vitrification 동결 용해시켰을 때 체외발생율이 85.0~95.0% 및 80.0~90.0%라고 하였다.

2) Vitrification 동결 미숙난자의 생존율

난포란을 회수 후 1, 6, 12 및 24시간 체외성숙시킨 난포란을 vitrification 동결 용해한 다음 체외수정 후 배양하면서 EDA-test에 의해 판정한 생존율은 Table 2와 같다.

회수 후 1, 6, 12 및 24시간 배양시킨 난포란의 vitrification 동결 용해 후 생존율은 각각 55.0%, 40.0%, 28.6% 및 17.1%로써 대조군의 76.7%에 비해 낮은 생존율을 나타냈다. 이러한 결과는 대상동물은 다르지만 소 미성숙 난포란을 동결 용해하였을 때 생존율은 88.9%라고 한 Schellander 등(1988)의 결과에 비해 저조한 성적이었다. 한편, Kono 등(1991)은 생쥐 난포란을 고농도 동결액으로 동결 용해하였을 때 83.0%가 정상상태의 유지가 가능하다고 하였으며 Schroeder 등(1990)은 배란난자와 난핵포기의 난자를 동결 용해하였을 때 정상적 형태를 가진 배란 난자에서 생존율이 높았다고 하였다.

Table 2. Survival rate of frozen thawed dog immature oocytes by vitrification freezing

Vitrification of immature oocytes	No. of oocytes examined	Degree of FDA test						Survival rate(%)
		A	B	C	D	E	F	
Control	30	0	1	2	4	8	15	23 (76.7) ^a
1 h	40	1	3	6	8	8	14	22 (55.0) ^b
6 h	40	3	6	9	7	6	10	16 (40.0) ^b
12 h	35	4	5	7	9	4	6	10 (28.6) ^b
24 h	35	5	7	10	7	3	3	6 (17.1) ^b

* Values with different subscripts in same column were denoted significantly different(p<0.05).

적 요

본 연구는 소형견의 불임 해결을 위해 미숙난자를 보존 후 이용할 수 있는지의 여부를 판명하기 위하여 미성숙 난포란을 시간별로 배양한 뒤 vitrification 동결 용해 후 체외수정율과 생존율을 조사하였다.

1. 미숙난포란을 회수 후 1, 6, 12, 24시간 성숙 배양 후 vitrification 동결 용해 후 체외수정 시켰을 때 수정율은 각각 31.4%, 22.5%, 11.9% 및 5.3%로서 대조군의 수정율 60.0%에 비해 낮은 성적이었고, 회수 후 시간이 경과되지 않은 난포란이 높은 체외수정율을 나타냈다.
2. 미숙난포란을 회수 후 1, 6, 12 및 24시간 배양 시킨 난포란을 vitrification 동결 용해 후 체외수정시킨 배의 생존율은 각각 55.0%, 40.0%, 28.6% 및 17.1%로써 대조군의 76.7%에 비해 낮은 생존율을 나타냈다.

참고문헌

- Candy CJ, Wood M, Whittingham DG, Merriman JA and Choudhury N. 1994. Cryopreservation of immature mouse oocytes. Hum. Reprod., 9: 1738-1742.
- Dinnyes A, Wallace GA and Rall WF. 1995. Effect of genotype on the efficiency of mouse embryo cryopreservation by vitrification of slow freezing methods. Mol. Reprod. Dev., 40:429-435.
- Gunzel AR. 1986. Semen collection, evaluation, preservation and artificial insemination in the dog. Tierarzti Prax., 14:275-282.
- Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tssnoda H, Sakurai T and Machida T. 1990. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. J. Reprod. Fert., 89:91-97.
- Kim SK, Park SH and Suk HB. 2000. Studies on the effects of cryoprotectant kinds and cell stages on the viability of bovine embryos cryopreserved by vitrification. Korean J. Anim. Reprod., 24(3):225-230.
- Kim SK. 2001. Studies on the viability of frozen removed seminal plasma by saline(RSP-S) and tris-buffer(RSP-T) semen of small species dogs. Korean J. Anim. Reprod., 25(3):269-275.
- Kono T, Kwon OY and Nakahara T. 1991. Development of vitrified mouse oocytes after *in vitro* fertilization. Cryobiology, 28:50-54.
- Rall WF. 1987. Factor affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. Cryobiol., 24:387-402.
- Rall WF and Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. Nature, 313:573-575.
- Riha J, Landa V, Kneissl J, matus J, Jindra J and Kloucek Z. 1991. vitrification of cattle embryos by direct dropping into liquid nitrogen and embryo survival after non-surgical transfer. Zivoc. Vir., 36:113-120.
- Schilling E, Niemann H and Schmidt D. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. Cryobiology, 15: 245-248.
- Schellander K, Brackett BK, Fuher F and Schleger W 1988. *In vitro* fertilization of frozen-thawed cattle oocytes. Proc 11th Congra. on Anim. Reprod. and June, A.I., Dublin Ireland, 26-30.
- Schroeder AC, Champlin AK, Mobraaten LE and Eppig JJ. 1990. Developmental capacity of mouse oocytes cryopreserved before and after maturation *in vitro*. J. Reprod. Fert., 89:43-50.
- Tachigawa S, Otoi T, Kondo S, Machida T and Kasa M. 1993. Successful vitrification of bovine blastocyst, derived by *in vitro* maturation and fertilization. Mol. Reprod. Dev., 34: 266-271.
- Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen, A., Greve, T. and Callesen, H. 1998 a. Open pulled straw vitrification; a new way

to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. Mol. Reprod. Dev., 51:53-58.

Vajta G, Lewis I. M, Kuwayama M, Greve T and Callesen H. 1998b. Steril application of the

open pulled straw(OPS) vitrification method. Cryo-Letters, 19:389-392.

(접수일: 2002. 7. 15/ 채택일: 2002. 8. 5)