

# 정자와 수정란의 동결이 ICSI 시술에서 수정, 발생 및 임신에 미치는 영향

민성훈 · 박용수<sup>1</sup> · 박영식<sup>†</sup>

경북대학교 농업생명과학대학 동물공학과

## 초 록

인간의 불임을 극복하기 위한 번식공학 기술의 효율성을 증가시키기 위해 성세포의 동결이 널리 수행되고 있으나 동결 기술의 효율성에 있어서 논란의 여지가 있다. 본 연구에서는 체외수정란을 생산하기 위한 난자세포질내 정자미세주입(ICSI) 시술에 사용되는 정자와 이들 기술을 이용 생산한 체외수정란의 동결이 배 발생 및 임신에 미치는 효과를 조사하였다. ICSI 방법으로 체외수정란을 생산하는 경우 정자의 동결이 체외수정, 발생 및 임신에 영향을 미치지 않았으며, 특히 동결용해한 사출 및 정소정자에 의한 체외수정율과 발생율 및 임신율도 차이가 없었다. 한편 체외수정란을 동결하는 경우 완만동결과 초자화동결에 의한 체외수정란의 생존율과 임신율은 차이가 없었으나, 동결수정란은 신선수정란에 비하여 임신율이 유의하게 낮았다( $p < 0.05$ ). 결론적으로 ICSI에 사용되는 정자와 달리 ICSI에 의해 생산된 수정란을 동결하는 경우 임신율을 저하시킬 수 있다.

(주제어 : Cryopreservation, Sperm, Embryo, ICSI, Pregnancy)

## 서 론

체외수정시술이 1978년 영국에서 처음으로 성공한 이후, 80년대 후반까지는 윤리적인 문제와 낮은 임신율 때문에 사회적으로 주목을 받지 못했으나, 최근 과배란유도, 초음파진단 및 체외배양 기술과 같은 번식공학 기술이 발달하면서 불임치료 기술로 확고히 자리 잡게 되었다. 이러한 체외수정 기술은 임신율이 높고 시술도 간편해지면서 난관이상에 의한 불임 외에도 남성불임, 원인불명불임 및 면역학적 불임의 치료에까지 그 적용이 확대되고 있다. 특히 1992년 Palermo 등이 난자세포질내 정자주입(introcytoplasmic sperm injection, ICSI) 기술을 이용 무정자증 환자로부터 첫 임신을 보고한 이후 불임환자의 시술에서 임신율이 획기적으로 향상되었다.

불임의 치료수단이 발달하면서 그 효율성을 향상시키기 위해 잉여 정자와 수정란의 동결보존 기술이 발달하게 되었다. 특히 성세포의 동결은 Polge(1951, 1952)가 glycerol을 동해방지제로 사용하면서 급속하게 발전하게 되었다.

Bunge와 Sherman(1953)이 동결정액을 인공수정하여 임신을 성공한 이래 정자의 동결은 chemotherapy 또는 radiotherapy가 필요한 환자나 정자감소증 또는 정자무력증인 환자의 정액을 보존하기 위하여 이용되고 있다.

시험관아기 시술이 처음 성공(Stephoe와 Edwards, 1978)한 이후 다양한 과배란 유도방법이 개발되면서 잉여 수정란의 동결보존 필요성이 대두하였다. Trounson과 Mohr(1983)가 인간의 동결수정란으로 임신에 성공하였으며,

Zeilmaker 등(1984)에 의해 첫 쌍태아가 태어났고, Cohen 등(1985)도 배반포기 난자를 동결보존한 후 이식하여 분만에 성공하였다.

오늘날 수정란을 동결보존하기 위하여 주로 완만동결과 유리화 동결방법이 주로 이용되고 있다. Trounson과 Mohr(1983)가 처음 완만동결법으로 수정란을 동결하였는데, 완만동결법은 동해로부터 수정란을 보호하기 위해 저농도의 dimethylsulfoxide(Freeman 등, 1986; Mandelbaum 등, 1987), 1-2 propanediol(Van den Abbee 등, 1994) 및 glycerol(Bongso, 1995; Hartshorne 등, 1991; Kaufmann 등, 1995)을 사용한다. 이러한 완만동결법은 고가의 자동동결기를 사용하고 동결이 진행되는 동안 세포내 빙정 형성으로 세포 손상이 유발되는 단점이 있다. 한편 동해의 가장 큰 원인인 세포내 빙정의 형성을 억제하는 유리화 동결법이 개발되었는데, 초기에 Trounson 등(1987)은 유리화 동결법을 이용하여 생쥐 수정란에서 완만동결과 동일한 생존율을 얻었다. 유리화 동결에는 glycerol, ethylene glycol (Kaidi 등, 1999; Kasai 등, 1992; Zhu 등, 1993), dimethylsulfoxide (Lai 등, 1996) 및 1~2 propanediol(Mukaida 등, 1998) 등 세포내 침투성인 저분자량의 물질, 세포내 수분을 강하게 제거하는 sucrose(Rall과 Wood, 1994) 및 trehalose(Saha 등, 1996) 등 세포내 비침투성 고분자 물질 및 Ficoll, polyvinylpyrrolidone, polyethylene glycol 등과 같은 거대분자 물질(Leibo와 Oda, 1993)이 동해방지제로 사용된다. 이러한 유리화 동결법은 고가의 장비가 필요 없이 액체질소 탱크만 있으며 가능하며 조작이 간단하고 동결 소요시간이 대단히 짧고, 특히 세포내 빙정이 없어 용해 후 수정란의 생존율이 높기

<sup>1</sup> 경상북도축산기술연구소(Kyoungbuk Livestock Research Institute)

<sup>†</sup> Corresponding author : Dr. Young-Sik Park, Department of Animal Science and Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu, 702-701, Korea. E-mail: yspark@mail.knu.ac.kr

때문에 최근에 많이 사용되고 있다(Barg와 Feichtinger, 1990; Gordts 등, 1990; Lai 등, 1996).

본 연구에서는 현재 주로 사용되고 있는 성세포의 동결보존 기술의 효율성을 규명하고자 ICSI에 사용되는 정자와 ICSI에 의해 생산된 수정란의 동결이 수정란의 발생과 임신에 미치는 효과를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 체외 성숙, 수정 및 발생

#### 1) 배양액

난포란의 체외 성숙, 수정 및 발생에 사용한 기초배양액은 110mM NaCl, 5mM KCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 0.8mM MgSO<sub>4</sub>, 20mM NaHCO<sub>3</sub>, 5mM KHCO<sub>3</sub>, 0.2mM taurine, 1mM glutamine, 0.1mM EDTA, 3mM sodium lactate, 0.4mM sodium pyruvate, 10mL/L antibiotics, 10mL/L MEM-non essential amino acid(Gibco, USA), 10mL/L vitamins(Gibco, USA) 및 5mL/L RPMI1640-amino acid(Sigma, USA)가 각각 첨가되었다. 체외 성숙, 수정 및 난구세포 배양을 위한 A 배양액은 기초배양액에 10% human follicular fluid(hFF)를 첨가하였으며, 체외 발생을 위한 B 배양액은 20% hFF를 첨가하였다. 정자를 처리하기 위해 C 배양액은 Ham's F-10(Gibco, USA)에 10% hFF를 첨가하였고, ICSI용 D 배양액은 phosphate buffered solution(PBS, Gibco, USA)에 10% synthetic serum substitute(SSS)를 첨가하였다. 모든 배양액의 삼투압은 280~290mOsm 및 pH 7.4로 조정된 후 0.22 μm filter (Millipore, USA)로 여과하여 4°C에서 보관하였다. 배양액 제조시 첨가되는 hFF는 환자로부터 난포란을 회수할 때 같이 흡인되는 난포액을 300g에서 5분간 원심분리하여 세포 등 이물질을 제거하고 상층액만을 회수하여 56°C에서 30분간 비동화시킨 다음 0.8 μm 및 0.2 μm filter로 여과하여 준비하였다.

#### 2) 과배란 유도 및 난포란의 채취

과배란을 유도하기 위하여 생리주기 약 10일 전부터 GnRH agonist인 Buserelin(Serono, USA)를 매일 0.6mL 피하주사한 다음 생리주기 2~3일째부터 human chorionic gonadotropin(hCG, Profasi, Serono, Switzerland)을 투여할 때까지 2~3 ampules의 human menopausal gonadotropin(hMG, Pergonal, Serono, USA) 및 0.3mL의 Buserelin을 매일 투여하였다. 생리주기 12~14일째 질 삽입용 초음파 진단기를 이용 직경이 17~18mm 이상인 난포가 2개 이상 확인될 경우 10,000 IU의 hCG를 투여하고 36~38시간 후 난포란을 채취하였다. 채취된 난포란은 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 및 완전 습윤 상태로 조절된 수정란 조작상자(Manipulation chamber, Korea)에서 난구세포의 응집 상태에 따라 성숙 정도를 판정하였다.

#### 3) 난구세포의 채취 및 배양

성숙 난포란은 방사관 근처에 있는 난구세포피를 30

gauge 바늘로 분리하고 주변에 남아 있는 혈막세포를 제거한 후 A 배양액으로 각각 3회 세척한 후 수정에 사용하였다. 분리된 난구세포피는 0.0001%의 hyaluronidase(Sigma, USA)가 함유된 A 배양액에 옮긴 후 흡입과 배출을 반복하여 단일 세포 부유액을 만들고 세포농도가 mL 당 1×10<sup>6</sup> cells이 되도록 조절하였다. 단일세포 부유액을 미리 준비된 A 배양액 미세소적(3 μL)에 접종한 후 3~4 시간 동안 배양하여 단일층으로 부착된 것을 확인한 다음 부착되지 않은 세포와 hyaluronidase 및 잔여 세포 파편을 제거하기 위하여 새로운 A 배양액으로 2회 세척하였다. 등량의 신선한 A 배양액으로 교환한 다음 수정란과 공배양할 때까지 난구세포 단일세포층을 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 약 18시간 동안 배양하였다.

#### 4) 체외성숙

ICSI 시술에 이용할 난자-난구세포 복합체는 0.0001% hyaluronidase가 첨가된 A 배양액에서 난구세포를 완전히 제거한 후 신선한 A 배양액으로 3회 세척하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 3~5시간 동안 배양함으로써 난자의 체외성숙을 유도하였다.

#### 5) 정자의 준비

ICSI에 사용할 사출정자는 Ham's F-10 배양액으로 3배 희석한 다음 300g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 다시 신선한 배양액으로 동량 희석한 후 300g에서 30초간 원심분리하여 상층액만을 회수하였다. 회수한 상층액을 100%의 percoll(Pharmacia, USA) 용액 위에 천천히 올려놓고 300g에서 20분 동안 원심분리한 후 상층액을 제거하고 percoll 용액 속에 있는 정자 펠렛을 회수하였다. 정자 펠렛을 다시 4mL C 배양액으로 2회 세척한 다음, 약 1시간 동안 swim up을 실시하여 양호한 운동성을 가진 정자만을 회수하였다. 한편 폐쇄성 무정자증의 경우 국소마취 후 간단한 외과적 수술인 정소정자추출법(testicular sperm extraction: TESE)을 통해 정자를 직접 회수하여 C 배양액으로 2번 세척 후 ICSI 시술에 이용하였다.

#### 6) ICSI

ICSI 시술은 Palermo 등(1996)의 방법에 준하여 실시하였는데, 먼저 petri dish(Falcon, USA) 주변에 5 μL D 배양액 소적을 여러 개 만들고 여기에 MII 단계의 성숙 난포란을 옮겼다. Petri dish 가운데에는 정자의 운동성을 억제시키기 위해 7% polyvinylpyrrolidone(PVP, MW 360,000, Sigma, USA) 용액과 정자 부유액을 동량 혼합한 용액의 소적을 준비하였다. 그리고 도립현미경(Olympus, Japan)에 장착된 1쌍의 미세조작기(Narishige, Japan)를 이용하여 성숙 난포란에 정자를 주입하였다. 정자가 주입된 난자는 즉시 D 배양액으로 세척한 후 B 배양액에 옮겨 배양하였다.

#### 7) 체외발생과 수정란이식

ICSI 시술한 난자는 14~18시간 경과 후에 형태적으로 자성전핵, 응성전핵 및 제2극체를 지닌 수정란만을 선발하여 체외발생에 공시하였다. 미리 준비한 난구세포 단일세포층 위에 선발한 수정란을 옮기고 B 배양액으로 교환

하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 특히 B 배양액을 매일 교환하면서 할구의 균등성과 할구 파편화 상태에 따라 수정란 발달 등급을 평가하였으며, 수정후 발생 시기에 맞는 할구수와 할구 크기가 일정한 수정란을 선별하여 이식에 사용하였다.

**생식세포의 동결**

**1) 정자의 동결**

정자의 동결용액은 20% hFF 첨가 Ham's F-10 배양액에 human semen preservation medium(Irvine, cat.90128)을 동량 첨가하여 제조하였으며, 용해용액은 Ham's F-10 배양액에 20% hFF 첨가하여 제조하였다. 채취된 사출 및 정소 정자를 동결용액과 동량 섞어 2mL 동결용 ampule에 넣었다. 동결용 ampule은 세포자동동결기(Planner, Kryo-10 series III)에서 0.5°C/min의 속도로 4°C까지, 4°C에서 -90°C까지는 10°C/min로 냉각시킨 후 -196°C의 액체질소에 침지하였다. 동결정자를 수정에 사용하기 위해 액체질소에서 ampule을 꺼내 실온에서 10분간 정치시킨 후 37°C 항온수조에서 10분간 정치시켜 동결정액을 용해하였다.

**2) 수정란의 완만동결**

완만동결은 Menezo 등(1992)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 20% hFF를 함유한 Dulbecco's PBS(D-PBS: Gibco, USA)을 기초 용액(hD-PBS)으로 준비하였다. hD-PBS에 glycerol(Sigma, USA)과 sucrose(Sigma, USA)를 첨가하여 동결/용해용액을 제조하였다. 모든 용액은 제조 후 0.22 μm filter로 여과하여 4°C에서 보관하였으며, 동결 전 20~30분간 실온에 정치하여 평형을 유도하였다. 수정란을 동결하기 위해 5% glycerol 함유 hD-PBS 및 9% glycerol과 0.2M sucrose 함유 hD-PBS 동결용액에서 각각 10분씩 순차적으로 처리한 후 0.25 mL plastic straw (IMV, 4364)에 충전한 다음 자동동결기(Planner, Kryo-10 series III)를 사용 동결하였다. 실온에서 -7°C까지는 2°C/min의 속도로 냉각하였으며, -7°C에서 3분간 정체한 후 액체질소로 냉각시킨 핀셋으로 seeding 하였고, -7°C에서 -38°C까지는 0.3/min의 속도로 냉각하였으며, -38°C에서 10분간 정체시킨 후 곧바로 액체질소에 침지하였다. 수정란 이식 18시간 전에 동결 straw를 37°C의 물에 10초간 침지하여 용해하였다. 용해된 수정란은 5% glycerol과 0.4 M sucrose 함유 hD-PBS에서 5분, 4%, 3%, 2% 및 1% glycerol과 0.2 M sucrose 함유 hD-PBS에서 각각 6분, 7분, 7분 및 6분, 0.2 M sucrose 함유 hD-PBS에서 2분, 그리고 hD-PBS에서 5분간 순차적으로 배양하여 동해방지제를 제거하였다.

**3) 수정란의 유리화 동결**

유리화 동결을 위해 hD-PBS에 ethylene glycol(Sigma, USA), Ficoll(MW 70,000; Sigma, USA) 및 sucrose를 첨가하여 동결/용해용액을 제조하였다. 모든 용액은 제조 후 0.22 μm filter로 여과하여 4°C에서 보관하였으며, 동결 전 20~30분간 실온에서 평형시켰다. 준비된 수정란을 20% (v/v) ethylene glycol 함유 hD-PBS에서 1.5~3분간

처리한 후, 40% (v/v) ethylene glycol, 18% (w/v) Ficoll 및 0.3 M sucrose를 함유한 hD-PBS에 옮겨 30초~1분간 정치한 다음 보존 용기에 1~5개의 수정란을 장착하여 액체질소에 바로 옮겨 보관하였다. 동결된 수정란은 0.5 M sucrose 함유 hD-PBS에서 5분, 0.25 M sucrose 함유 hD-PBS에서 5분, sucrose 비첨가 hD-PBS에서 5분간을 순차적으로 처리하여 동해방지제를 제거하였다.

**수정란의 이식과 임신진단**

신선 또는 동결 4~8세포기 수정란을 동기화된 환자의 자궁에 이식하였다. 난포란을 채취한 날로부터 2주 후에 환자의 혈중 β-hCG를 값을 측정하여 그 수치가 100 이상이면 화학적 임신으로 판정하였고, 다시 11일 후 2차 β-hCG를 측정하여 임신 추적검사를 실시하였다. 이때 그 수치가 계속적인 상승을 보이면 4~6주후 질 삽입용 초음파기를 이용 임신낭이나 태아 심장 박동을 관찰하여 임상적인 임신으로 판정하였다.

**통계처리**

실험 결과는 χ<sup>2</sup>-test(ETI information, version 5, 1990)를 이용 분석하여 p<0.05 수준에서 결과간 차이의 유의성을 검정하였다.

**결 과**

남성불임환자 111명에서 회수한 사출정자를 신선 및 동결정자군에 각각 91명 및 20명을 공시하여 사출정자의 동결이 ICSI에 의해 생산된 난자의 수정, 발생 및 임신에 미치는 영향을 조사한 결과(Fig. 1), 신선정자군 및 동결정자군에서 수정율, 4~8세포기 발생율 및 임신율이 각각 87.9 및 72.0%, 81.5 및 60.0% 그리고 27.5 및 25.0%로서 신선정자군이 동결정자군에 비해 모든 조사 항목에서 높은 수준이었으나 이들 간에 유의차는 인정되지 않았다.

남성불임환자 64명에서 회수한 정소정자를 신선 및 동결정자군에 각각 34명 및 30명을 공시하여, 정소정자의 동결이 ICSI에 의해 생산된 난자의 수정, 발생 및 임신에 미치는 영향을 조사한 결과(Fig. 2), 신선정자군 및 동결정자군에서 수정율, 4~8세포기 발생율 및 임신율이 각각

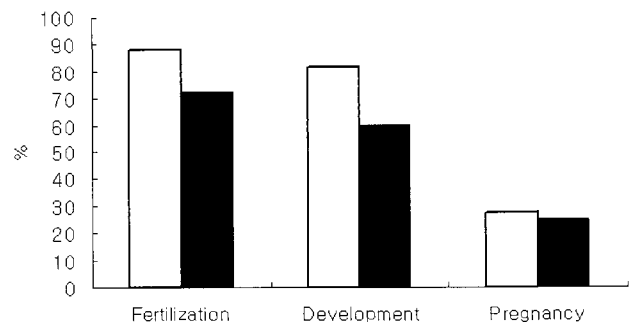


Fig. 1. Fertilization, development and pregnancy of human oocytes after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with fresh (□) and frozen (■) ejaculated-sperm.

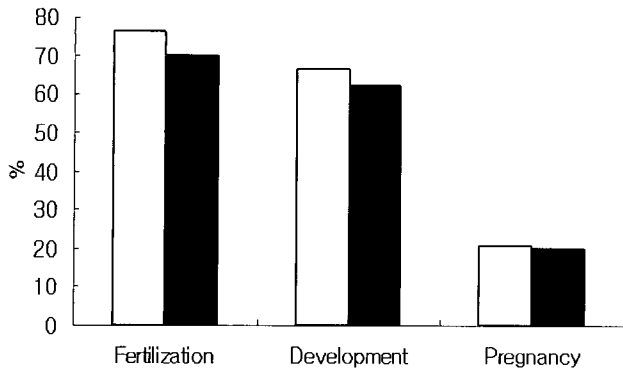


Fig. 2. Fertilization, development and pregnancy of human oocytes after ICSI with fresh (□) or frozen (■) testicular-sperm.

Table 1. Effect of slow freezing and vitrification on viability and pregnancy of human ICSI embryos

Methods	No. of embryos(%)			
	Used	Live after thawed	Transferred	Pregnant after transferred
Slow	153	55(35.9) <sup>NS</sup>	22	4(18.0) <sup>NS</sup>
Vitrification	120	45(37.5)	18	5(27.0)

<sup>NS</sup>: Not Significantly different from each group in the same column( $p>0.05$ ).

76.1 및 70.0%, 66.4 및 62.3% 그리고 20.6 및 20.0%로서 신선정자군이 동결정자군에 비해 모든 조사 항목에서 높은 수준이었으나 이들 간에 유의차는 인정되지 않았다.

수정란의 동결에 주로 사용되는 완만 및 유리화 동결법이 ICSI에 의해 생산된 수정란의 생존 및 임신에 미치는 영향을 조사한 결과(Table 1), 완만동결군과 초자화 동결군의 용해 후 수정란 생존율은 각각 35.9% 및 37.5%로서 이들 간에 유의한 차이는 없었으며, 임신율은 각각 18.0 및 27.0%로서 초자화 동결군에서 다소 높았으나 유의차는 인정되지 않았다.

불임 부부 274쌍을 대상으로 4 및 8 세포단계의 신선수정란과 동결수정란을 각각 229쌍과 45쌍에게 시술하여 ICSI에 의해 생산된 수정란의 동결이 임신에 미치는 영향을 조사한 결과(Table 2), 신선수정란 이식군과 동결수정란 이식군의 임신율은 각각 33.2%와 24.4%로서, 동결수정

Table 2. Effect of embryo freezing on the pregnancy of human ICSI embryos

Embryos	No. of embryos(%)	
	Used	Pregnant after transferred
Fresh	229	76(33.2) <sup>a</sup>
Frozen	45	11(24.4) <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup>: Significantly different from each group in the same column( $p<0.05$ ).

란 이식시 임신율이 유의하게 감소하였다.

### 고찰

인간의 불임을 극복하기 위해 다양한 기술이 개발되어 왔다. 수정란의 이식방법에서 gamete intra-fallopian transfer, zygote intra-fallopian transfer, tubal embryo transfer, peritoneal oocyte and sperm transfer 등이 개발되었고, 수정을 개선을 위해 zona drilling, partial zona dissection, subzonal sperm injection 등의 방법이 제안되었으며, 특히 Palermo 등(1992)이 ICSI 기술을 이용하여 첫 임신을 보고한 이후 수정율과 임신율이 획기적으로 향상되었다. 한편 정자의 회수방법에 있어서 microsurgical epididymal sperm aspiration, testicular sperm exploration and sperm extraction, testicular sperm aspiration 및 percutaneous epididymal sperm aspiration 등 다양한 방법이 개발되어 정자공여 외에는 방법이 없었던 무정자증 환자도 임신이 가능하게 되었다.

임상에서 여성불임의 치료를 위해 널리 사용되고 있는 ICSI 기술은 정자의 회수뿐만 아니라 보존 방법의 개발이 무엇보다 중요하다. 정자의 보존방법으로 애용되고 있는 동결은 용해 후 정자의 운동성(Crister 등, 1987), 생존성(Alvarez와 Storey, 1993) 및 첨체 형태(MacLaughlin 등, 1992)에서 저해와 손상을 유발하고 수정 능력, 정상첨체 정자비율 및 acrosin 활성을 감소시킨다(Mack과 Zaneveld, 1987). 또한 전자현미경 관찰에서도 동결보존 후에 정자 편모의 이상, 세포막과 첨모의 팽창, 첨모 소실, 미토코드리아초 이상과 같은 손상이 보고되었다(Mahadevan과 Trounson, 1984). 고환조직의 동결에서, 조직 내에 존재하는 정자도 사출정자와 유사하게 첨모와 세포막이 손상되었다(Nogueira 등, 1999).

이와 같이 동결보존은 정자의 활성에 나쁜 영향을 미치는데, 정상 사출정자의 경우 최적의 조건에서 용해 후 60~70%의 운동성을 나타내지만, 정소정자는 동결용해 후 활력이 더욱 저하되기 때문에 수정란의 발생 및 임신에 문제를 유발할 수 있을 것으로 추론하고 ICSI에 사용되는 정자의 동결이 수정, 발생 및 임신에 미치는 영향을 조사한 본 연구에서 정자의 유래(사출 및 정소) 및 동결용해가 수정란의 발생과 임신에는 영향을 미치지 않았다(Fig. 1, 2). 따라서 동결은 정자의 수정관련 기작에 영향을 미치지 않고 나아가 발생과 관련된 염색체에 심각한 손상을 미치지 않는 것으로 사료된다.

한편 수정란을 동결하면 투명대가 손상되고 경화현상이 나타나며 micro-tubule과 micro-filament 등 미세구조가 손상된다(Carroll 등, 1990), 동결과정에서 수정란이 고농도의 동해방지제와 급격한 온도변화에 노출되면 방추사가 변형되고 이로 인해 염색체가 비정상적으로 분리된다(Van der Elst 등, 1998). 이와 같이 난자를 동결용해하면 용해 직후에는 meiotic spindle에 존재하는 micro-tubule에 심각한 손상이 나타나지만 용해된 난자를 일정시간 배양하면 microtubule이 재구성되어 회복된다(Eroglu 등, 1998; Chen 등, 2000). 이렇게 수정란이 동해로부터 회복되는 정도는 수정란의 질은 물론이고 동해방지제 및 동결방법 등의 요인에 의해 주로 영향을 받는다.

수정란을 동결하는 방법으로 완만동결과 유리화 동결이 주로 이용되고 있는데, 완만동결법은 유리화 동결에 비하여 처리시간이 많이 소요되고 고가의 장비가 필요하며 세포내 빙정 형성에 의한 세포 손상이 예상되기 때문에 최근에는 수정란의 동결에 유리화 동결기술을 많이 이용하고 있다. 생쥐(Uechi 등, 1999)에서는 유리화 동결보다 완만동결에 의한 수정란의 착상율을 높지만, 소(Maritznez 등, 1998)와 인간(Kim 등, 2000)의 경우 유리화 동결이 효과적이다. 이러한 동결방법의 효율성을 조사한 본 연구에서는 Kim 등(2000)의 보고와 달리 완만동결과 유리화 동결에 의한 수정란의 생존성과 임신율에는 차이가 없었는데, 이는 동결기술의 발달과 더불어 두 가지 동결방법이 가지는 효율성의 한계까지 도달한 것으로 추론된다. 한편 이러한 동결기술을 이용하여 보존한 수정란의 임신율이 신선수정란의 임신율보다 낮은 결과를 얻음으로서 ICSI에 의해 생산된 수정란의 경우 동결에 의한 손상을 배제할 수 없다. 수정란을 동결하는 경우 용해 후 미세소관의 불완전한 재구성으로 인해 발생이 저하된다는 보고가 있다(Eroglu 등, 1998; Chen 등, 2000).

이상의 결과에서 ICSI에 이용되는 정자를 동결하는 경우 정자의 유래와 무관하게 발생 및 임신에 영향이 없으나, ICSI에 의해 생산된 수정란의 경우 동결은 임신율을 저하시키는 원인이 될 수 있다. 따라서 남성불임치료를 위한 번식기술의 효율성을 높이기 위해 세포막이나 세포소골격의 물리적 손상을 받게 되는 ICSI 수정란의 동결기술의 개발이 절실히 요구된다.

**Effects of Cryopreservation of Sperm and Embryos on Fertilization, Development and Pregnancy in ICSI Application**

Sung-Hun Min, Yong-Soo Park and Young-Sik Park

Department of Animal Science and Biotechnology,  
Kyungpook National University

**ABSTRACT**

The cryopreservation of germ cells, sperm and embryos, has been largely used to increase the effect of artificial reproductive techniques for human infertility, but the efficiency of germ cell cryopreservation has been controversial till now. Thus, the effect of the cryopreservation of human sperm used for ICSI and the effect of the cryopreservation of embryos produced by ICSI on fertilization, development and pregnancy were investigated.

Sperm freezing did not affect fertilization, development and pregnancy rates. Also, there was no significant difference between ejaculated and testicular sperm in fertilization, development and pregnancy. Embryo freezing methods, slow freezing and vitrification, did not differ each other in viability and pregnancy rates. However, ICSI embryo freezing significantly decreased pregnancy rate compared to fresh embryos freezing ( $p < 0.05$ ).

In conclusion, this result suggested that cryopreservation of sperm for ICSI did not affect on the resulted embryo development and pregnancy, but ICSI embryo cryopreservation would significantly inhibit pregnancy.

(Key words: Cryopreservation, Sperm, Embryo, ICSI, Pregnancy)

**인용문헌**

1. Alvarez JE, Storey BT (1993): Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: Glycerol and other polyols as sole cryoprotectant. *J Androl* 14:199-209.
2. Barg PE, Barad DH, Feichtinger W (1990): Ultra-rapid freezing (URF) of mouse and human preembryos: a modified approach. *J In Vitro Fertil Embryo Transf* 7:355-357.
3. Bongso A (1995): Blastocyst transfer and freezing: Can this help us to improve the success of assisted reproduction? *Singapore J Obstet Gynecol* 26:13-17.
4. Bunge RG, Sherman JK (1953): Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature* 172(4382): 767-768.
5. Carrol J, Matthews CD (1990): Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *J Reprod Fertil* 90:547-553.
6. Chen SU, Lien YL (2000): Open pulled straws for vitrification of mature mouse oocytes preserve patterns of meiotic spindles and chromosomes better than conventional straw. *Hum Reprod* 15:2598-2603.
7. Cohen J, Simons RF, Edwards RG, Fehilly CB, Fishel SB (1985): Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocysts. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 2(2):59-64.
8. Crister JK, Huse-benda AR, Aaker DV (1987): Cryopreservation of human spermatozoa. I. Effect of holding procedure and seeding on motility, fertilizability and acrosome reaction. *Fertil Steril* 47:656-663.
9. Eroglu A, Toner M, Leykin L, Toth TL (1998): Cytoskeleton and polyploidy after maturation and fertilization of cryopreserved germinal vesicle-stage mouse oocytes. *Assist Reprod Genet* 15(7):447-454.
10. Freeman L, Trounson A, Kirby C (1986): Cryopreservation of human embryo: Progress on the clinical use of the technique in human IVF. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 3:53.
11. Gordts S, Roziars P, Campo R, Noto V (1990): Survival and pregnancy outcome after ultrarapid freezing of human embryos. *Fertil Steril* 53:469-472.

12. Hartshorne GM, Elder K, Crow J, Dyson H, Edwards RG (1991): The influence of *in-vitro* development upon post-thaw survival and implantation of cryopreserved human blastocysts. *Hum Reprod* 6:136-141.
13. Kaidi S, Van Langendonck A, Massip A (1999): Cellular alteration after dilution of cryoprotective solutions used for the vitrification of *in vitro*-produced bovine embryos. *Theriogenology* 52:515-525.
14. Kasai M, Nishimori M, Zhu SE, Sakurai T, Machida T (1992): Survival of mouse morulae vitrified in an ethylene glycol-based solution after exposure to the solution at various temperatures. *Biol Reprod* 47:1134-1139.
15. Kaufmann RA, Nicollet B, Menezo Y, DuMont M, Hazout A, Servy EJ (1995): Cocultured blastocyst cryopreservation: Experience of more than 500 transfer cycles. *Fertil Steril* 64:1125-1129.
16. Kim JW, Byun HK, Youn HW, Jun JH, Park YS, Song Io (2000): Analysis of factors affecting survival and pregnancy rate in frozen-thawed embryo transfer. *Kor J Fertil Steril* 27:59-65.
17. Lai AC, Lin BP, Chang CC, Tsai HD, Hwang VW, Lo HY (1996): Pregnancies after transfer of ultrarapidly frozen human embryos. *J Assist Reprod Genet* 13:625-628.
18. Leibo SP, Oda K (1993): High survival of mouse zygotes and embryos cooled rapidly or slowly in ethylene glycol plus polyvinylpyrrolidone. *Cryo-Letters* 14:134-144.
19. Mack SR, Zaneveld LJ (1987): Acrosomal enzymes and ultrastructure of unfrozen and cryotreated human spermatozoa. *Gamete Res* 18:375-383.
20. MacLaughlin EA, Ford WCL, Hull MGR (1992): Effect of cryopreservation on the human sperm acrosome and its response to A23187. *J Reprod Fertil* 99:71-76.
21. Mahadevan MM, Trounson AO (1984): Relationship of fine structure of sperm head to fertility of frozen human sperm. *Fertil Steril* 41:287-293.
22. Mandelbaum J, Junca AM, Plachot M, Alnt MO, Alvarez S, Debache C, Salat-Baroux J, Cohe J (1987): Human embryo cryopreservation extrinsic and intrinsic parameters of success. *Hum Reprod* 2:709-715.
23. Martinez AG, De Matos DG, Furnus CC, Brogliatti GM (1998): *In vitro* evaluation and pregnancy rates after vitrification of *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology* 50(5):757-67.
24. Menezo Y, Hazout A, Dumont M, Herbaut N, Nicollet B (1992): Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in human. *Hum Reprod* 7(Suppl) 1:101-106.
25. Mukaida Y, Wada S, Takahashi K, Pedro PB, An T Z, Jasai M (1998): Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. *Hum Reprod* 13:2847-2879.
26. Nogueira D, Bourgain C, Verheyen G, Van Steirteghem AC (1999): Light and electron microscopic analysis of human testicular spermatozoa and spermatids from frozen and thawed testicular biopsies. *Hum Reprod* 14(8):2041-2049.
27. Palermo GD, Cohen J, Rosenwaks Z (1996): Intracytoplasmic sperm injection: a powerful tool to overcome fertilization failure. *Fertil Steril* 65(5):899-908.
28. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC (1992): Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340(8810):17-18.
29. Polge C (1951): Functional survival of fowl spermatozoa after freezing at  $-79$  degrees C. *Nature* 167(4258):949-950.
30. Polge C (1952): Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at  $-79$  degrees C. *Nature* 169(4302):626-627.
31. Rall WF, Wood M (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 Fertil* 101:681-688.
32. Saha S, Otoi T, Takagi M, Boediono A, Sumantri C, Suzuki T (1996): Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trahalose, and polyvinylpyrrolidone. *Cryobiology* 33:291-299.
33. Steptoe PC, Edwards RG (1978): Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*. 2(8085):366.
34. Trounson A, Mohr L (1983): Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 305: 707-709.
35. Trounson A, Peura A, Kirby C (1987): Ultrarapid freezing: a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertil Steril* 48(5):843-850.
36. Uechi H, Tsutsumi O, Morita Y, Taketani Y (1999): Comparison of the effects of controlled-rate cryopreservation and vitrification on 2-cell mouse embryos and their subsequent development. *Hum Reprod* 14:2827-2832.
37. Van den Abbee IE, Van der Elst J, Van Steirteghem AC (1994): The effect of temperature at which slow cooling is terminated and of thawing rate on the survival of one-cell mouse embryos frozen in dimethyl sulfoxide or 1,2-propanediol solutions. *Cryobiology* 31:423-433.
38. Van der Elst J, Amerijckx Y, Van Steirteghem A (1998): Ultra-rapid freezing of mouse oocytes lowers the cell number in the inner cell mass of 5 day old *in-vitro* cultured blastocysts. *Hum Reprod* 13(6): 1595-1599.
39. Zeilmaker GH, Alberda AT, Van Gent I, Rijkmans CM, Drogendijk AC (1984): Two pregnancies fol-

- owing transfer of intact frozen-thawed embryos. Fertil Steril 42(2):293-296.
40. Zhu SE, Kasai M, Otoge H, Sakura T, Machida T (1993): Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solutions. J Reprod Fertil 98:139-145.  
(접수일자: 2005. 9. 9. / 채택일자: 2005. 9. 25.)