

인간 수정란의 완만 동결과 유리화 동결의 비교

김은국*, 김미연, 손선미, 김동원
광주 미래와희망산부인과

Comparison of the Efficiency between Slow Freezing and Vitrification Method for Cryopreservation of Human Embryos

Eun-Kuk Kim*, Mi-Yeon Kim, Sun-Mi Son and Dong-Won Kim
Gwangju Mirae & Heemang Ob./Gyn.

ABSTRACT

The purpose of this study was to compare the efficiency of slow freezing with that of vitrification method for the cryopreservation of human embryos. Human embryos were derived from *in vitro* fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and the mixed solution of propanedial (1.5, 1.0, 0.5M PROH) and sucrose (0.1M), ethylene glycol (7.5, 15%), dimethyl sulfoxide (7.5, 15% DMSO), sucrose (0.5, 1.0M) and SPS (Serum Protein Substitute) was used for a cryoprotectant for slow freezing and vitrification solution, respectively. Rates of recovery after thawing, morphological normality, post-thaw viability, arrest, morphological abnormality and preimplantation development were compared between two protocols. After freezing-thawing, recovery and survival rate of slow freezing was (88.6% and 73.4%), whereas vitrification was (99.2% and 96.2%) ($p<0.05$). The arrest rate of slow freezing was significantly lower compared with those of vitrification(8.7% vs 29.9%) ($p<0.05$). Preimplantation development to the 2-cell (83.8% vs 67.7%), 4-cell (69.0% vs 47.2%) and 8-cell (62.4% vs 37.8%) stages 24, 48 and 72 h after thawing, respectively, were higher in the slow freezing than the vitrification. After slow freezing and vitrification of human embryo at 2-8cell stage, the rate of recovery rate, survival rate and partial damage rate were 92.0% vs 100%, 80.4% vs 96.2% and 52.2% vs 19.0%, respectively. And partial damage rate was significantly lower than those of slow freezing method ($p<0.05$). These results demonstrate that a slow freezing using PROH is more efficient than a vitrification for cryopreserving the human zygotes, although the vitrification yielded better recovery, survival and partial damage of frozen-thawed 2-8 cell stage embryos than slow freezing method.

(Key words : zygote, slow freezing, vitrification, embryo, frozen-thawed)

서 론

인간의 불임증 치료에 체외수정 및 수정란 이식 기법 등의 보조 생식술이 적용된 이후 불임으로 고통받는 많은 사람들에게 희망을 주고 있다. 시험관아기 시술시 과배란 유도 방법을 이용하여 다수의 난자를 얻을 수 있는 이점이 있는 반면 3~4 개 정도의 배아를 이식 후 남은 잉여 배아를 효과적으로 동결 보존하는 문제도 함께 제기가 되었다.

1983년 동결-융해된 잉여배아의 이식에 의한 인간의 임신이 처음으로 보고(Trounson과 Mohr, 1983)된 이후 배아의 생존율과 임신율을 높이기 위한 여러 가지 동결 보존 방법이 지속적으로 연구되고 있다(Cohen 등, 1985; Menezo 등, 1992; Kauffmann 등, 1995). 배아의 동결 보존시 세포내의 지방구 방출에 따른 세포 상해와 동결 보호제의 삼투 현상에 의한 세포질의 응축, 저온 상태에서 세포질 내 미세소관들의 민감한 반응때문

에 많은 어려움이 있을 뿐만 아니라(Kaidi 등, 2000; Park과 Ruffing, 1992) 동결 과정 중독성이 있는 동결 보호제에 노출이 되고, 세포 내·외의 빙정 형성에 의해 손상을 받기도 하기 때문에 효과적인 동결 보존을 위해서는 이러한 요소들을 최소화 해야 한다(Kasai 등, 2002).

많은 불임 전문병원에서는 과배란 유도 및 난자 채취 횟수를 줄임과 동시에 채취당 임신율 향상을 위해 완만 또는 유리화 동결 방법을 이용하여 이식 후 잉여 배아를 동결보존하고 있는데, 완만 동결 방법은 세포내 빙정 형성에 의한 손상이 일어날 수 있고, 동결 시간이 2~3시간 소요되며, 다량의 액체 질소 소모와 동결 과정 중 연구원의 지속적인 주의를 필요함과 동시에 고가의 세포 동결기기가 필요하다는 단점이 있다(Gardner 등, 2004). 이러한 단점을 보완하기 위해 개발된 방법이 유리화 동결 방법인데, Rall과 Fahy(1985)가 생쥐 배아를 이용하여 유리화 동결 성공을 보고한 후 많은 연구자들이 빙결정 형

* Correspondence : E-mail : cruz108@naver.com

성이 없이 용해 후 세포의 생존성 및 발달에 효과적이고 간편하며 경제적인 방법에 대해 연구(Kasai 등, 1990; Ohta 등, 1996; Vanderzwalmen 등, 1997)하고 있으며, 빙결정 형성을 방지하기 위해서는 고농도의 동결보호제 첨가가 필수적이어서 동결 보호제의 독성을 줄이기 위해 빠른 속도로 동결을 해야 한다(Fahy 등, 1984).

일반적으로 동결 보존은 전핵 상태의 배아가 적합하다고 보고되는데(Damario 등, 1999; Veeck 등, 1993), 이때가 단일세포인 점과 방추사의 결여로 동결 및 용해 후 높은 생존율과 착상율을 얻을 수 있고(Cohen 등, 1988; Fugger 등, 1988; Testart 등, 1986), 용해 후 분열이 일어나는 것으로 배아의 생존 여부를 정확히 판단할 수 있기 때문에 많은 불임 전문 병원에서 시험관 아기 시술시 zygote 상태에서 완만 동결법을 이용하여 잉여 배아를 동결 보존하는 방법이 광범위하게 이용되어지고 있다(Bafrahi 등, 2003).

최근 들어 완만 동결법의 단점을 보완하기 위해 유리화 동결법의 효용성에 대해 보고되고 있는데(Isachenko V, 2003), 본 연구는 인간의 전핵기 단계의 배아 및 발달 단계의 배아를 완만 동결법과 유리화 동결 방법으로 동결 보존 후 용해하여 회수율, 생존율, 배 발달율을 비교, 각각의 동결법의 효용성을 알아보기 위해 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시배아

완만 또는 유리화 동결 실험에 공시한 배아는 2007년 3월부터 2007년 12월까지 광주 미래와희망 산부인과의원에서 성선자극 호르몬(gonadotropin)으로 과배란 유도를 하고, 체외수정 또는 미세 조작 시술을 실시하여 정상적인 수정이 이루어진 배아 중 이식 후 남은 잉여 배아를 대상으로 하였고, 이때 환자의 연령은 고려하지 않았다.

2. 과배란 유도 및 난자 채취

단기 요법은 월경 주기 제 21일째부터 GnRH agonist(Lucrin, Laboratories Abbott, France)를 이용하여 뇌하수체를 억제하고 제 3일부터 성선자극 호르몬(Follitroph, LG생명과학, Korea)을 환자에 따라 적절한 용량을 주사하면서 초음파 및 혈중 E2 농도를 지속적으로 측정하여 우성 난포의 평균 직경이 18 mm 이상이거나 16 mm 이상인 난포가 3개 이상 관찰되면서 혈중 E2 농도가 계속 상승하거나, 직경 10 mm 이상인 난포당 혈중 E2 농도가 200 pg/mL 이상이면 hCG(ovidrel, Serono, Switzerland) 250 mcg를 페하주사하여 배란 촉발을 유도한 후 35~36시간 뒤에 질식 초음파 유도하에 난자 채취를 시행하였다. 장기 요법의 경우, 월경주기 일주일 전부터 GnRH agonist를 이용하여 뇌하수체를 억제하고, 월경이 시작되면 월경 주기 제 3일에 뇌

하수체의 기능 억제 유무를 확인하기 위하여 혈중 LH, estradiol, progesterone(P4)을 측정하고 LH < 5 mIU/mL, E2 < 50 pg/mL, P4 < 1ng/ml인 경우 과배란 유도를 시작하였고, 그 후 과배란 과정은 단기 요법과 같았다. 길항 요법은 월경 시작 3일째에 초음파 검사 및 위에서 언급한 호르몬 검사를 실시하여 난소낭종이 없고, 호르몬 검사상 월경주기 3일째에 합당한 수치의 결과가 보이면 단기 요법에서 언급한 성선자극호르몬을 투여하기 시작하고, 생리 주기 6~8일째 다시 초음파 검사를 실시하여 난포의 크기가 14 mm에 도달하면 초기 LH surge를 예방하기 위해 GnRH antagonist(Cetrotide, Serono, Switzerland) 0.25 mg를 매일 투여하였으며, 그 후 난자 채취를 위한 hCG 등의 주사는 위에서 언급한 바와 같이 시행하였다.

3. 수정 및 수정란의 배양

모든 배양액에는 10% Serum Protein Substitute(SPS; Sage BioPharma, USA)를 첨가하여 사용하였다. 난자 채취시 PBS(Sage BioPharma, USA)를 이용하여 2~3회 세척 후 수정 전까지 Q-Fert(HTF)(Sage BioPharma, USA)에서 배양하였다. 0.1% hyaluronidase(Sage BioPharma, USA) 농도의 Q-HEPES(Sage BioPharma, USA) 용액에서 피펫을 이용하여 난구세포를 제거하고 실체 현미경(stereomicroscope)하에서 MII 단계에 나타나는 제 1극체(polar body)의 유무로 난자의 성숙을 판단하였다. 성숙된 난자는 3~4시간 배양 후 체외 수정 또는 미세 조작술을 실시하여 Q-Fert(HTF)에 넣은 다음 37°C, 5% CO₂로 조절된 배양기에서 배양하였다. 배양 16~18시간 후 실체 현미경 하에서 2개의 전핵이 보이는 정상 수정된 수정란을 선별하여 Q-Cleavage(Sage BioPharma, USA)에 배양 또는 동결 보존을 실시하였다.

4. 완만 동결 및 용해

완만 동결액은 10% SPS가 첨가된 DPBS(Gibco BRL, USA)를 기본으로 하여 기본 용액 + 0.5M PROH(Sigma, USA)용액(A)에서 5분, 기본 용액 + 1.0M PROH 용액(B)에서 5분, 기본 용액 + 1.5M PROH 용액(C)에서 10분, 기본 용액 + 1.5M PROH + 0.1M Sucrose(Sigma, USA)용액(D)에서 10분간 털수한 뒤 Fig. 1(上)과 같이 0.25 ml plastic straw에 2~3개의 배아를 넣고 밀봉하여 자동세포 동결기(Cryo Magic, 맥코이 교역(주), Korea)를 이용하여 동결하였다. 실온에서 -7°C까지는 분당 2°C씩 냉각하였고 -7°C에서 10분간 평형하는 동안 과냉각 방지를 위해 액체질소로 냉각시킨 펀셋을 이용하여 식빙하였으며, -7°C에서 -80°C까지 분당 0.3°C씩 냉각 후 동결된 straw는 cane에 장착된 goblet에 넣어 -196°C의 액체 질소 통에 침지하여 보관하였다.

용해는 한 달 이상 액체질소 안에 보관되었던 동결된 straw를 대기 중에 10여초 노출 후 37°C 항온수조에서 1분동안 용해 후 거즈로 straw 표면의 물기를 제거한 다음 양 끝을 절단

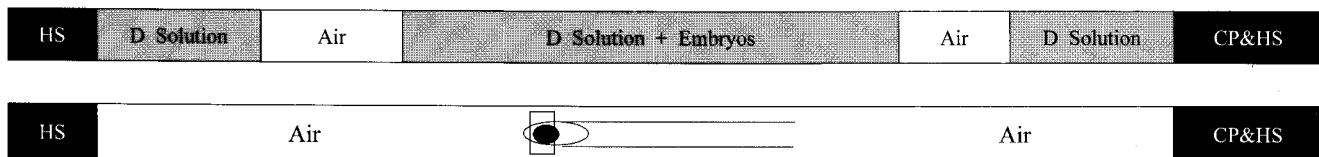


Fig. 1. Configuration of 0.25 ml straw loaded embryos before slow freezing and vitrification.

HS : Heat sealing, D Solution : DPBS + 10% SPS+1.5M PROH+0.1M sucrose, CP : Cotton plug, A : DPBS+10% SPS+15% EG+15% DMSO+0.5M sucrose+embryos.

하여 배아와 동결 보존액을 배양 접시에 흘려내리고 실체 현미경 하에서 배아의 수를 확인하였다. 기본 용해액 역시 10% SPS가 첨가된 DPBS를 사용하였는데, 1.5M PROH 용액에서 5분, 1.0M PROH 용액에서 5분, 0.5M PROH 용액에서 10분, 기본 용해액에서 10분간 평형한 후 10% SPS가 첨가된 Q-cleavage 배양액으로 2~3회 세척 후 37°C, 5% CO₂로 조절된 배양기에서 배양하였다.

5. 유리화 동결 및 융해

유리화 동결액도 10% SPS가 첨가된 DPBS(Gibco BRL, USA)를 기본으로 하여 ES(Equilibrium Solution)와 VS(Vitrification Solution) 용액을 제조하여 사용하였다. ES 용액은 7.5% Ethylene glycol(EG, Sigma, USA) + 7.5% Dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma, USA)로 조성하였고, VS 용액은 15% EG + 15% DMSO + 0.5M Sucrose(Sigma, USA)로 만들어 사용하였다. 동결시 ES 용액에서 15분 평형 후 VS 용액에서 1분간 탈수시킨 다음 Fig. 1(下)와 같이 가늘게 뽑은 0.25 straw에 5개 이하의 수정란을 0.1 μl 정도의 VS 용액과 함께 충진한 다음 straw의 일부분을 뚜껑처럼 이용하여 결합 후 양 끝을 봉하여 액체질소에 침지하였다.

융해액은 10% SPS가 첨가된 DPBS에 0.5M sucrose와 1.0M sucrose를 용해하여 단계별로 사용을 하였다. 액체질소에 보관된 수정란이 들어있는 straw를 꺼낸 다음 손바닥의 체온을 이용하여 용해하고 1.0M의 sucrose 용액에서 1분, 0.5M sucrose 용액에서 3분간 평형시킨 후 10% SPS가 첨가된 Q-Cleavage media에서 2회 세척하여 배양을 하였다.

모든 용액은 제조 후 0.2 μm syringe filter(Sartorius, Germany)로 여과하여 4°C에서 보관하였고, 사용하기 30분 전에 실온에서 평형시킨 후 사용하였다.

6. 융해 후 배아의 회수율, 생존율 및 난할율 비교

융해한 배아의 회수율은 동결 배아에 대한 백분율로, 생존율은 회수된 배아에 대한 백분율로 계산하였고, 융해 후 72시간동안 24시간 단위로 배아의 난할율을 관찰하였으며, 난할율은 융해 후 살아있는 배아에 대한 백분율로 평가하였는데, 실체현미경으로 관찰시 투명대가 온전하고 세포질이 밝고 투명

한 형태의 배아를 생존한 것으로 판정하였다.

7. 통계적 분석

통계적 유의성 검정은 SAS(statistical analysis system)를 이용한 χ²-text를 실시하여 유의성 검정을 하였고, p<0.05 일 때 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 동결 방법에 따른 인간 전핵기 배아의 동결-융해 후 회수율, 생존율 및 발달 정지율

완만 동결법과 유리화 동결법을 이용하여 사람의 전핵시기 배아를 동결-융해한 후 회수율과 생존율, 발달 정지율은 Table 1과 같다.

회수율은 완만 동결 방법이 352개의 배아 중 312개를 회수하여 88.6%의 회수율을, 유리화 동결 방법은 133개 중 132개를 회수하여 99.2%의 회수율을 보였고, 생존율은 완만 동결 방법이 312개 중 229개가 살아 73.4%의 생존율을, 유리화 동결 방법이 132개 중 127개가 살아 96.2%의 생존율을 보여 유리화 동결 방법이 완만 동결 방법보다 유의적으로 높은 회수율과 생존율을 보였다(p<0.05). 그러나 동결-융해 후 발달 정지율을 살펴보면 완만 동결 방법은 229개 중 20개(8.7%)로 매우 낮은 반면 유리화 동결은 127개 중 38개(29.9%)로 30%에 가까운 발달 정지 현상을 보였다(p<0.05).

Table 1. Recovery, survival and arrest rates of frozen-thawed human pronuclear stage embryos by slow freezing and vitrification method

	Slow freezing (%)	Vitrification (%)
No. of cryo	352	133
Recovered	312 (88.6) ^b	132 (99.2) ^a
Survived	229 (73.4) ^b	127 (96.2) ^a
Arrest	20 (8.7) ^b	38 (29.9) ^a

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

2. 동결 방법에 따른 동결-융해 후 배아 성장을

완만 및 유리화 동결-융해 후 생존된 배아를 매 24시간 단위로 발달율을 살펴본 결과는 Table 2와 같다.

융해 후 24시간 배양시 2세포기로 발달율은 완만 동결군 83.3%, 유리화 동결군 67.7% 였고, 48시간 배양시 3~4세포기로 발달율은 완만 동결군 69.0%, 유리화 동결군 47.2% 였으며, 72시간 배양시 6~8세포기로 발달율은 완만 동결군 62.4%, 유리화 동결군 37.8%로 완만 동결군이 유리화 동결군에 비해 발달율이 유의적으로 좋았다($p<0.05$).

3. 배아 상태에서 동결 방법에 따른 동결-융해 후 회수율, 생존율 및 부분 손상을

배아 상태에서 완만 및 유리화 동결-융해 후 회수율, 생존율 및 부분 손상을 Table 3과 같다.

유리화 동결이 완만 동결에 비해 회수율(100% vs 92.0%)과 생존율(96.2% vs 80.4%)이 높았으며, 부분 손상율은 완만 동결 방법이 52.2%로 유리화 동결 방법인 19.0%보다 유의적으로 높았다($p<0.05$).

Table 2. Development rates of frozen-thawed human pronucleus stage embryos by slow freezing and vitrification method

	Slow freezing (n=229)	Vitrification (n=127)
No. of 2 cell stage embryos at 24 hrs (%)	192 (83.8) ^a	86 (67.7) ^b
No. of 3~4 cell stage embryos at 48 hrs (%)	158 (69.0) ^a	60 (47.2) ^b
No. of 6~8 cell stage embryos at 72 hrs (%)	143 (62.4) ^a	48 (37.8) ^b

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

Table 3. Recovery, survival and partial damage rates of frozen-thawed human embryos by slow freezing and vitrification method

	Slow freezing (%)	Vitrification (%)
No. of cryo	50	79
Recovered	46 (92.0)	79 (100)
Survived	37 (80.4) ^b	76 (96.2) ^a
Partial Damage	24 (52.2) ^a	15 (19.0) ^b

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

고 칠

1972년 완만 동결법을 이용하여 생쥐배아의 동결 보존 실험이 처음 보고(Whittingham, 1972)된 이후 지금까지 다양한 연구가 진행되고 있다. 완만 동결법은 Human IVF-ET programs에서 일반적으로 사용하는 동결 방법이지만 많은 시간과 비용이 소요되는 단점이 있어 동결 과정을 간단히 하려는 연구가 계속되고 있다. 일반적으로 완만 동결은 세포내 탈수를 유도한 후 -7°C까지 천천히 냉각하여 세포질 내 얼음 결정이 생기지 않도록 외부에서 식빙을 하고 냉각하여 -196°C에 도달하면 보관을 하고, 융해 역시 일정한 조건에서 해야만 하는데, 이러한 복잡한 단계를 거치는 동안 세포내 빙정 형성, 동결 보호제의 독성, 세포의 삼투압 변화 등에 의해 세포 및 배아가 손상될 가능성이 매우 높다(Miyake 등, 1993). 그래서 연구된 방법이 유리화 동결 방법이고, 이는 고농도의 동결 보호제를 사용하여 빙결정 형성 없이 빠른시간 내에 배아를 동결하는 방법인데, 최근 들어 Human IVF-ET program에서도 점점 연구가 진행되고 있으나, 일반화되지는 않은 실정이다. 초기에 주로 사용된 동결 보호제는 DMSO, acetamide, propylene glycol, polyethylene glycol의 혼합액(Rall과 Fahy, 1985)과 glycerol, propylene glycol 혼합액(Scheffen 등, 1986)등 이었으나, Kasai 등(1990)에 의해 ethylene glycol, ficoll, sucrose의 혼합에 의한 유리화 동결이 보고된 이후 최근에는 독성이 약한 ethylene glycol을 많이 사용하고 있다(Bautista 등, 1998).

본 연구는 IVF-ET program 중 임여 배아 동결시 보편적으로 사용하고 있는 완만 동결법과 점점 새롭게 기대되는 유리화 동결법을 비교하여 인간의 전핵시기 배아와 수정란 상태의 배아를 동결 보존 시 어느 방법이 최적의 방법인지 알아보고자 시행하였다. 전핵기 배아의 완만, 유리화 동결 후 융해시 회수율과 생존율은 각각 88.6% vs 99.2%, 73.4% vs 96.2%로 유리화 동결 방법이 유의적으로 높았지만, 발달 정지율은 29.9%로 완만 동결 방법(8.7%)이 유의적으로 낮았다. 이러한 결과는 유리화 동결보존 후 90~95%(공 등, 1999)의 발생율과 80~85%(Kasai 등, 1990) 발생율을 보인 것에 비해 낮은 발생율을 나타내었는데, 이는 유리화 동결 과정 중 수정 상태의 Zygote가 액체질소의 급격한 온도 변화와 동결 보호제의 농도 차이 및 평형 과정에 의한 직접적인 외부 접촉에 의해서 생존에 negative effect로 나타난 것으로 보인다(Chen 등, 2001).

융해 후 24시간 간격으로 72시간 동안 배아의 발달율을 살펴본 결과, 완만 동결-융해 후 대부분의 배아는 시간에 따라 일반적으로 알고 있는 단계별 발달이 진행되었지만, 유리화 동결-융해 한 배아의 발달 속도는 반나절 정도 늦음을 관찰할 수 있었다. Isachenko(2004) 등은 재수화 과정이 많을수록 배아의 삼투압 변화에 따른 손상을 줄이는데 효과적이라고 하였는데, 유리화 동결-융해 후 배아가 발달 속도가 늦은 것은 융해 과정

중 동결 보호제를 제거하는 2단계의 재수화 과정에서 삼투압의 변화 등에 따른 배아의 손상이 아닐까 추측이 된다.

배아 상태에서의 완만, 유리화 동결-용해 후 회수율은 유의적인 차이가 없었으나(92% vs 100%), 생존율은 유리화 동결 방법이 96.2%로 완만 동결법 80.4%보다 유의적으로 높았고, 부분 손상을도 19.0%로 완만 동결법 52.2% 보다 낮았다. 이는 완만 동결시 세포의 분열이 진행된 상태에서 유리화 동결 방법 보다 많은 동결 보존액을 사용하여 열전도율이 낮고, 외부에서 빙결정 형성시 또는 세포 동결기에서 동결된 straw를 꺼낼 때 외부충격으로 인하여 할구가 부분적으로 손상을 받았을 것으로 생각된다. 유리화 동결시 embryo 단계에서 동결 보존한 수정란이 zygote 단계에서 동결 보존한 것보다 성적이 더 좋았는데, 이는 수정란의 발달 단계가 높을수록 발달 지연 또는 정지되는 수정란보다는 정상적으로 발육이 진행된다는 결과와 일치하였다(Dobrinsky 등, 2000). 또, Kasai(1990)등과 Gong(1999)이 마우스 수정란을 대상으로 유리화 동결보존을 했을 때 발생율 89.7~97.5%와 차이가 있었지만, cell stage별 유리화 동결 보존 후 발생율은 배 발달이 진행될수록 점차 증가한다고 보고한 결과와는 유사하였다.

결 론

본 연구는 시험관아기 시술 과정에서 발생하는 잉여배아를 동결 보존시, 일반적으로 사용하고 있는 완만 동결법과 새롭게 기대되는 유리화 동결법을 비교하여 전핵시기 배아와 2~8세포기 수정란 상태의 배아를 동결 보존시 어느 방법이 최적의 방법인지 알아보고자 시행하였다. zygote 상태의 배아를 완만-유리화 동결-용해시 회수율과 생존율은 각각 88.6% vs 99.2%와 73.4% vs 96.2%로 유리화 동결 방법이 유의적으로 높았으나, 발달 정지율은 8.7% vs 29.9%로 완만 동결이 유의적으로 높았다($p<0.05$). 용해 후 24, 48, 72시간별 배 발달율은 완만 동결이 각각 83.8%, 69.0%, 62.4%로 유리화 동결 67.7%, 47.2%, 37.8%로 유의적으로 좋은 성적을 보였다($p<0.05$). 2~4세포기 상태의 배아를 완만-유리화 동결 후 용해시 회수율은 각각 92.0% vs 100%로 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 생존율은 유리화 동결 방법이 96.2%로 80.4%의 완만 동결 방법보다 유의적으로 높았다. 또, 할구의 부분 손상을도 유리화 동결이 19.0%로 완만 동결 52.2%보다 유의적으로 낮았다($p<0.05$).

따라서 인간 수정란의 동결 보존 시 전핵시기 배아의 동결은 용해 후 회수율과 생존율이 조금 낮더라도 발달 정지율이 낮은 완만 동결 방법을, 세포 분열이 진행된 2~8 세포기 배아 동결은 용해 후 회수율, 생존율, 할구의 부분 손상을이 적은 유리화 동결 방법이 효과적일거라 사료된다. 더불어 짧은 시간과 비싼 장비가 필요없고, 보다 간편한 유리화 동결 방법을 사용하기 위해서는 용해 후 발달 정지율을 낮추는 추가적인

연구가 지속적으로 이루어져야 할 것이다.

참고문헌

- Bafrani HH, Salsabili N, Pasbakhsh P, Hassani H, Movahedin M and Al-tarihi T. 2003. Comparison of 1,2-propanedial and ethylene glycol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygote and their subsequent development. *J. Assist. Reprod. Genet.* 20: 234-240.
- Bautista JA, Dela Pena EC, Katagiri S, Takahashi Y and Kanagawa H. 1998. *In vitro* viability of mouse oocytes vitrified in an ethylen glycol-based solution. *Jpn. J. Vet. Res.* 46:13-18.
- Chen SU, Lien YR, Chen YY, Chen HF, Ho NH and Yang YS. 2001. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straw (OPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic a spindles, compared with conventional straws, open pulled straw(OPS) and grids. *Hum. Reprod.* 16:2350-2359.
- Cohen J, DeVane GW, Elsner CW, Rehilly CB, Kort HI, Massey JB and Turner TG Jr. 1988. Cryopreservation of zygotes and early cleaved human embryos. *Fertil. Steril.* 49:283-289.
- Cohen J, Simons RF, Edwards RG, Fehilly CB and Fishel SB. 1985. Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocysts. *J. In Vitro Fert. Embryo Transfer.* 2:59-64.
- Damario MA, Hammit DG, Galantis TM, Session DR and Dumescic DA. 1999. Pronuclear stage cryopreservation after intracytoplasmic sperm injection and conventional IVF: implications for timing of the freeze. *Fertil. Sterill.* 72:1049-1054.
- Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR and Johnson LA. 2000. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol. Reprod.* 62:564-570.
- Fahy GM, Macfarlane DR, Angell CA and Meryman HT. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21:407-426.
- Fugger EF, Bustillo M, Katz LP, Dorfinam AD, Bender SD and Schulman JD. 1988. Embryonic development and pregnancy from fresh and cryopreservation sibling pronucleate human zygotes. *Fertil. Steril.* 50:273-278.
- Gardner DK, Weissman A, Howles CM and Shoham Zeev. 2004. *Textbook of Assisted Reproductive Techniques*. 2nd ed, Taylor & Francis, United Kingdom, pp. 257-289.
- Isachenko V, Montag M, Isachenko E, Nawroth F, Dessoile S and van der Ven H. 2004. Developmental rate and ultrastructure of vitrified human pronuclear oocyte after step-wise versus direct rehydration. *Hum. Reprod.* 19:660-665.
- Isachenko V. 2003. Modified vitrification of human pronuclear

- oocyte: efficacy and effect on ultrastructure. *Rerod. Biomed. Online.* 7:211-216.
- Kaidi S, Donnay I, Lambert P, Dessim F and Massip A. 2000. Osmotic behavior of *in vitro* produced bovine blastocyst in cryoprotectant solutions as a potential predictive test of survival. *Cryobiology* 41:106-115.
- Kasai M, Ito K and Edashige K. 2002. Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocysts as a tool to identify the type of cryoinjury. *Hum. Reprod.* 17:1863-1874.
- Kasai M, Komi H, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T and Machida T. 1990. A simple method for mouse embryo cryopreservation in low toxicity vitrification solution without appreciable loss of viability. *J. Reprod. Fert.* 89:91-97.
- Kaufmann RA, Nicollet B, Menezo Y, DuMont M, Hazout A and Servy EJ. 1995. Cocultured blastocyst cryopreservation: experience of more than 500 transfer cycles. *Fertil. Steril.* 64:1125-1129.
- Mandelbaum J, Belaisch-Allart J, Junka AM, Antoine JM, Plachot M, Alvarez S, et al. 1998. Cryopreservation in human assisted reproduction is now routine for embryos but remains a research procedure for oocyte. *Hum Reprod. Suppl.* 13:161-174.
- Menezo Y, Nicollet B, Herbaut N and Andre D. 1992. Freezing cocultured human blastocysts. *Fertil. Steril.* 58:977-980.
- Miyake T, Kasai M, Zhu SE, Sakurai T and Machida T. 1993. Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stage of development in an ethylene-glycol based solution by a simple method. *Theriogenology* 40:121-134.
- Ohta N, Nohara M, Kojimahara T, Ito M, Saito T, Nakahara K, Tezuka N, Saito H and Hiroi M. 1996. Ultrarapid freezing of human embryos by vitrification method: a case of delivery. *Jpn. J. Fertil. Steril.* 41:276-279.
- Park JE and Ruffing H. 1992. Factors affecting low temperature survivals of mammalian oocytes. *Theriogenology* 37:59-73.
- Rall WF and Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 313:573-575.
- Scheffen B, Van Der Zwalm P and Massip A. 1986. A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. *Cryo-Letters* 7:260-269.
- Testart J, Lassalle B, Belaisch-Allart J, Hazoult A, Forman R, Rainborn JD and Frydman R. 1986. High pregnancy rate after early human embryo freezing. *Fertil. Steril.* 46:268-272.
- Trounson A and Mohr L. 1983. Human pregnancy following cryopreservation thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 305:707-709.
- Vanderzwalm P, Delval A, Chatziparasidou A, Bertin G, Ectors F, Lejeune B, Nijis M, Prapas N, Prapas Y, Van Damme B, Zech H and Schoysman R. 1997. Pregnancies after vitrification of human day 5 embryos. *Hum Reprod. Abst.* 12:O-198.
- Veeck LL, Amundson CH, Brothman LJ, DeScisciolo C, Malone MK, Muasher SJ and Jones HW Jr. 1993. Significantly enhanced pregnancy rates per cycle through cryopreservation and thaw of pronuclear stage oocytes. *Fertil. Steril.* 59:1202-1207.
- Whittingham DG, Leibo SP and Mazur P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -296°C. *Science* 178:411-414.
- 공일근, 조성균, 조성근. 1999. 동결보호제의 종류 및 배발달 단계가 OPP vitrification 동결 보존시 생쥐 수정란의 생존성에 미치는 영향. *한국가축번식학회지* 23(1):85-92.

(접수일: 2008. 2. 22 / 채택일: 2008. 3. 13)