

다양한 유리화 용액과 동결기구에서 유리 동결 생쥐 포배기 배아의 생존율 비교

조동휴 · 이기숙 · 류철희 · 권중기* · 이정현¹

전북대학교 의학전문대학원 산부인과학교실, *전북대학교 수의과대학 실험동물의학교실

(게재승인: 2012년 2월 20일)

The Comparison of Survival Rates of Vitrified Mouse Blastocysts in Various Vitrification Solutions and Apparatuses

Dong-Hyu Cho, Ky-Sook Lee, Chul-Hee Rheu, Jungkee Kwon* and Jeong-Heon Lee¹

Department of Obstetrics and Gynecology, Chonbuk National University Medical School, Jeonju 561-180, Korea

*Laboratory Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

Abstract : The purpose of this study was to evaluate survival rates of vitrified mouse blastocysts in various vitrification solutions (cryoprotectants) and apparatuses. The mouse blastocysts were harvested from culture of mouse 2 cell embryo and were divided into three group (i) untreated (control); (ii) exposed to cryoprotectant agents; or (iii) cryopreserved by various vitrification apparatuses. Vitrification solutions are 40% ethylene glycol (EG) + 5.8 mg/mL ficoll + 0.5M sucrose (EFS solution), 3M glycerol + 3M EG (ES solution), 20% EG + 20% dimethyl sulfoxide (ED solution), 3M EG + 1.0 m sucrose (ES solution). Vitrification apparatuses consisted of 5 groups ; closed plastic straw (CPS), electron microscope (EM) grid, cryoloop, open pulled straw (OPS), and glass micropipette in plastic straw (GPS). The survival rates of control were 88.0%. The survival rates of exposed blastocysts in EFS, GE, ED, and ES solutions were 70.8%, 43.5% ($P < 0.01$), 83.3% and 65.2%, respectively. The survival rates of vitrified blastocysts in CPS, EM grid, cryoloop, OPS and GPS were 56.5% ($P < 0.01$), 72.7%, 83.3%, 60.9% ($P < 0.05$) and 54.2% ($P < 0.01$), respectively. Among the vitrification solutions, the highest survival rate was seen in blastocysts vitrified in EG + DMSO (83.3%). The survival rate was not significantly different from that of the control (88%). Blastocysts cryopreserved with glycerol in all groups had an overall low survival rate of 43.5%. Survival rate of mouse blastocysts between vitrification apparatuses showed higher in cryoloop.

Key words : cryoprotectants, blastocysts, vitrification.

서 론

1972년 Whittingham 등(25)이 완전 동결법으로 생쥐 배아를 장기간 동결 보존한 후 첫 산자(first sibling)를 생산한 이래 배아의 동결 보존에 대한 연구는 꾸준히 수행되어져 왔으며 최근 냉동생물학(cryobiology)의 발달과 이와 관련된 기술의 개발로 효과적인 인간 배아의 보존이 가능하게 되었고 다양한 인간 배아를 위한 냉동보존 방법들이 연구되어지고 있으며, 인간생식의학에 여러 보조생식 기술을 지원하기 위해 사용되고 있다. 1983년 Trounson 등(23)이 완전 동결법으로 인간배아의 동결보존을 시행하였고, 그 후 성공적인 임신이 보고되었지만 임신율은 극히 저조한 실정으로 이는 인간 배아에 해가 적은 냉동보존에 대한 확실한 방법이 아직

확립되어 있지 않기 때문에 이에 대한 연구와 함께 냉동 보존된 배아의 생존능력을 증진시키기 위한 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 보인다.

난소의 과배란을 유도하는 IVF-ET (*in vitro* fertilization and embryo transfer) 기술의 발전으로 많은 수의 난자를 얻게 되었고, 다태 임신을 막기 위해 자궁내에 적정 수의 배아 이식 후 남은 잉여 배아의 보존 문제가 대두되고 있으며, 이의 해결책으로 배아 냉동보존이 이용되고 있다. 또한 냉동보존은 IVF-ET 과정에서 난소과자극증후군이 심할 경우 배아 이식을 취소하고 이를 보관할 때 이용하고 있으며, 암 치료를 위한 방사선 조사 및 유전자 이상 등으로 난소기능이 상실될 위기에 있거나, 치료 후 자신의 난자나 정자를 이용할 수 없는 여성 환자나 남성 환자의 난자와 정자의 치료 전 보관을 위해 이용된다.

배아의 동결법은 세포내의 자유수를 서서히 탈수시키는 완전 동결법(slow freezing)과 고농도의 동결액을 사용하여 실

¹Corresponding author.
E-mail : obgyn2001@hanmail.net

온에서 직접 액체질소에 침지하는 유리화 동결법(vitrification)으로 구분할 수 있다. 유리화 동결방법은 완만 동결 시에 필요한 고가의 복잡한 장비가 필요치 않고 다량의 액체질소를 절약할 수 있으며 얼음 결정형성을 방지할 수 있는 빠르고 간편한 동결방법이다(16). 많은 포유동물 실험을 통하여 유리화 동결은 얼음 결정의 형성이 이루어지지 않으므로 난자의 세포질 손상을 줄일 수 있는 장점이 있다고 보고되었다(5,17,19,26). Rall 등(25,16)이 유리화 동결로 배아보존을 시행한 이래 많은 연구가 시도 되었고, Otoi 등(11)은 소의 난자를 straw를 이용하여 유리화 동결함으로써 완만 동결법을 이용했을 때보다 좋은 결과를 보고하였다. 그러나 고농도의 동결보존액(cryoprotectant)을 사용함으로써 발생하는 화학적 독성과 삼투압에 의한 충격이 배아의 생존을 위협하는 요인으로 작용할 수 있어 유리화 동결 시 난자의 생존율은 비교적 좋으나 포배기이후 부화까지의 발생률은 높지 않은 상태이다(26).

현재까지 융해 후 생존율과 동결배아의 발생률 및 발달의 최적 조건을 찾기 위한 연구가 더 필요한 형편이다. 이에 저자들은 배아의 생존율을 증진하기 위한 방편으로 여러 유리화 동결용액과 유리화 동결기구를 적용하여 생쥐 포배기 배아를 동결 융해하여 생존율을 비교 연구하고 이 중 성적이 좋은 것을 임상에 적용하고자 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

배아채취

실험동물은 물과 사료를 자유롭게 섭취시켜 사육한 ICR계 흰 생쥐를 사용하였다. 제 1일에 생쥐 암컷의 난포성장을 촉진시키기 위해 6~8주 된 흰 생쥐의 복강 내에 PMSG (pregnant mare's serum gonadotropin; Sigma, St. Louis, MO, USA) 5 IU를 주사 후 48시간 뒤에 hCG (human chorionic gonadotropin; Sigma, St. Louis, MO, USA) 5 IU를 다시 복강 내 주사하여 암수를 합사시켰으며, 제 4일에 질 점액전(vaginal plug)이 확인되면 교미가 이루어진 것으로 간주하였다. 제 5일에 교미가 일어난 암컷으로부터 난관을 무균적으로 절취하여 기본배양액인 Ham's F-10 배양액(Sigma, St. Louis, MO, USA)이 들어있는 배양접시에 옮긴 후 해부현미경하에서 30-gauge 주사바늘을 이용하여 배양액을 주입하여 난관을 씻어 냄으로써 배아를 채취하였다. 난환이 일어난 정상적이고 건강한 2 세포기 배아만을 골라 72시간 배양하여 포배기에 도달한 배아를 동결에 사용하였다.

배양

배아채취 배양액인 Ham's F-10 배양액에 0.4% BSA (bovine serum albumin, Sigma)를 첨가하여 배아채취에 필요한 배양액으로 사용하였다. 배아 배양액은 G2,2 (Vitrolife, Gothenburg, Sweden)에 HSA 용액 (human serum albumin solution, Vitrolife)를 5% 섞어서 사용하였다.

대조군의 배양

포배기 배아를 동결하지 않고 G2,2 배양액에서 계속 배양하여 부화(hatching)에 도달한 배아를 대조군으로 삼아 발달율을 구하였다.

유리화 용액을 이용한 동결

유리화 동결은 20% SSS (serum substitute supplement, Irvine Scientific)가 함유된 D-PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, GIBCO)를 기본배양액으로 사용하여 4종류의 유리화 동결보존액을 아래와 같이 만들었다. 제조 후 모든 동결 보존액은 0.2 µm filter (Millipore Co.)로 여과하고 냉장 보관하여 사용하였다.

EFS 용액: 40% EG + 5.8 mg/mL ficoll + 0.5M sucrose

전평형 용액(equilibrium solution, ES)는 20% EG에서 1분 동안 처리했으며, 유리화 동결 용액(vitrification solution, VS)는 40% EG + 5.8%mg/mL ficoll + 0.5M sucrose로 구성되며 30초 이내에 각 동결보존기구에 담아 액체질소에 침지하여 보관하였다.

GE 용액: 3M glycerol + 3M EG

전평형 용액은 1.5M glycerol + 1.5M EG에서 1분 동안 처리했으며, 유리화 동결 용액은 3M glycerol + 3M EG 용액에서 30초 이내에 처리하여 동결보존기구에 담아 액체질소에 침지하여 보관하였다.

ED 용액: 20% EG + 20% DMSO (dimethylsulfoxide)

전평형 용액은 10% EG + 10% DMSO에서 1분 동안 처리했으며, 유리화 동결 용액은 20% EG + 20% DMSO 에서 20초 이내에 동결기구에 담아 액체질소에 침지하여 보관하였다.

ES 용액: 5.5 M EG + 1.0 M sucrose

전평형 용액은 1.5M EG로 구성되고 1분 동안 처리했으며, 유리화 동결 용액은 3M EG + 1.0M sucrose에서 30초 이내에 액체질소에 침지하여 보관하였다.

동결보존용기(vitrification apparatuses)

1) Closed pulled straw (CPS): 0.25 mL plastic straw (I.V.M., l'Aigle, France)를 이용하여 유리화 동결 및 융해하였다. 2) Electron microscope (EM) grid: EM grid (400 mesh copper, IGC 400; Pelco International, CA, USA)를 이용하여 유리화 동결 및 융해하였다. 3) Cryoloop: Cryoloop (Hampton Research Laguna Niguel, CA, USA)의 stainless steel tube는 한쪽이 1.8 mL cryovial 뚜껑에 고정되어 있고, 다른 한 쪽 끝에는 20 µm nylon filament가 0.7~1.0 mm 직경으로 달려있다. Cryoloop에 유리화 용액으로 가능한 얇은 막을 만들고 이 위에 포배기 배아를 얹어 유리화 동결하였으며, 액체질소에서 꺼낸 후 액체상태로 변하는 즉시 융해액에 넣어 융해하였다. 이 도구는 여러 유리화 동결 보존액

에서 배아 용해 후 생존율을 알아보는 실험에서 기본 도구로 사용하였다. 4) Open pulled straw (OPS): 0.25 mL plastic straw (I.V.M., l'Aigle, France)를 뜨거운 열판 위에서 열을 가하여 부드럽게 한 후 직경이 1/2로 감소될 때 까지 인위적으로 잡아 늘려 유리화 동결 및 용해에 사용하였다. 5) Glass micropipette in plastic straw (GPS): capillary glass micropipette (outer/inner diameter: 1.0/0.8 mm; Drummond Science Co, USA)을 plastic straw에 넣어 사용하는 방법으로 유리피펫을 직경이 1/2 정도로 감소될 때 까지 알코올램프에서 열을 가하여 뽑은 후 배아를 넣고 다시 0.25 mL plastic straw에 넣어 밀봉하는 방법으로 유리화 동결 및 용해하였다.

유리화 동결의 용해 및 배양

유리화 동결의 용해는 배아가 담긴 용기를 0.25 M sucrose에 넣고 5분 둔 후 가라앉은 포배기 배아만을 회수하여 0.125 M sucrose에서 5분 처리한 후, 기본배양액인 20% SSS가 함유된 D-PBS에 3-4분 둔 후 G2,2로 옮겨 배양하였고 동결과 용해 모두 실온(25°C)에서 실행하였으며, 동결시에는 현미경위의 온열판을 끄고 동결하였고 용해시에는 온열판을 37°C로 켜고 용해하였다.

용해 후 생존과 통계

5% HSA 용액이 포함된 G2,2 배양액에 용해 후 얻은 배아를 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 형태학적으로 다시 팽윤된 후에 부화한 배아만 생존한 것으로 간주하였다. 유의성 검정은 Student *t* test를 이용하였고 *P* < 0.01, *P* < 0.05를 통계적으로 의미 있다고 하였다.

결 과

생쥐 포배기 배아를 각 유리화 동결액에서 동결 및 용해한 후 배양하여 부화율을 비교 조사하여 보았다. 2세포기의 생쥐 배아를 체외에서 72시간 배양하여 얻은 포배기 배아를 다시 24시간 계속 배양하여 부화한 포배기의 부화율을 대조군으로 하였으며 20% EG용액에서 1분 두어 전평형 시킨 후 40%EG + 5.8 mg/ml ficoll + 0.5M sucrose (EFS 용액)에 옮겨 20초 이내에 동결기구에 담아 액체질소에 침지하고 동결한 후 용해하여 배양하였을 때에는 70.8%의 부화율을 보였다. 포배기 배아를 1.5M glycerol + 1.5M EG에 넣어 1분, 3M glycerol + 3M EG (GE용액)에 넣어 20초 이내에 동결기구에 담아 액체질소에 침지하고 동결 보존한 후 용해하였을 때에는 43.5%의 낮은 부화율을 보였다(*P* < 0.01). 10% EG + 10% DMSO에 포배기배아를 1분 전평형 시킨 후 유리화동결보존액인 20%EG + 20%DMSO (ED용액)에 옮겨 20초 이내에 동결기구에 담아 액체질소에 침지하고 동결보존한 후 용해하였을 때에는 83.3%의 높은 부화율을 보였다. 포배기 배아를 1.5M EG에서 1분 전평형 시킨 후 3M EG + 1.0M sucrose (ES용액)에서 20초 이내에 동결기구에

Table 1. Survival of vitrified mouse blastocysts in various vitrification solutions with Cryoloop

Group	Blastocysts (n)	Hatching (n)	Hatching % (Mean ± SD)
Control	25	22	88.0 ± 1.4
EFS	24	17	70.8 ± 1.8
GE	23	10	43.5** ± 2.8
ED	24	20	83.3 ± 1.1
ES	23	15	65.2 ± 2.3

EFS; 40% EG + 5.8 mg/ml Ficoll + 0.5M sucrose, GE; 3M glycerol + 3M EG, ED; 20% EG + 20% DMSO, ES; 3M EG + 1.0M sucrose. Development to the hatching following vitrification within cryoloop was statistically different from control(***P* < 0.01).

Table 2. Survival of vitrified mouse blastocysts in ED vitrification solution with various vitrification apparatuses

Group	Blastocysts (n)	Hatching (n)	Hatching % (Mean ± SD)
Control	25	22	88.0 ± 1.4
EM grid	22	16	72.7 ± 1.1
Cryoloop	24	20	83.3 ± 1.1
OPS	23	14	60.9* ± 1.6
CPS	23	13	56.5** ± 2.6
GPS	24	13	54.2** ± 1.8

CPS; closed plastic straw, EM; electron microscope, OPS; open pulled straw, GPS; glass micropipette in plastic straw. Development to the hatching following vitrification in ED solution with various vitrification apparatuses was statistically different from control(**P* < 0.05, ***P* < 0.01).

담아 액체질소에 침지한 후 동결보존 후 용해하였을 때에는 65.2%의 부화율을 보였다. 각각의 동결보존액에서 유리화 동결·용해 후의 부화율을 비교하여 보면 GE용액에서 통계적으로 유의하게 낮은 부화율(*P* < 0.01)을 보였고 EFS, ED, ES 용액에서는 높은 부화율을 보였다(Table 1). 특히 ED용액에서는 대조군에 비해서는 낮지만 다른 용액보다 상대적으로 높은 부화율을 보였다. 이때 동결기구는 모두 Cryoloop를 사용하였다.

생쥐 포배기 배아를 가장 높은 부화율을 보인 ED용액을 이용하여 각 동결보존용기에서 동결 및 용해한 후 배양하여 부화율을 비교 조사 하였다. EM grid에 동결하고 용해한 후 배양액에서 배양했을 때의 부화율은 72.7% 였다. Cryoloop에 동결하고 용해한 후 배양했을 때의 부화율은 83.3% 였다. OPS를 이용하여 동결하고 용해하여 배양한 후 부화율은 60.9%로 유의하게 낮았다(*P* < 0.05). CPS를 이용하여 유리화 동결 및 용해하고 배양액에서 배양했을 때의 부화율은 56.5%로 유의하게 낮았다(*P* < 0.01). GPS에 배아를 넣어 동결하고 용해하여 배양했을 때의 부화율은 54.2%로 유의하게 낮았다(*P* < 0.01). 각 동결기구에 따른 유리화 동결의 효과를 비교 검토한 결과 OPS, CPS, GPS 군에서 통계적으로 유의하게 낮은 부화율을 보였고, EM grid군과 Cryoloop군에서는

높은 부화율을 보였다(Table 2). 특히 Cryoloop는 대조군에 비해서는 낮지만 다른 군보다 상대적으로 높은 부화율을 보였다.

고 찰

최근 배아의 동결보존은 보조생식술의 일환으로 이용되고 있다. IVF-ET 주기에서 배란기에 많은 수의 난자를 생성하는 능력과 함께 난자와 배아의 안전한 저장에 대한 요구는 이제 아주 중요한 부분이 되고 있다. 특히 IVF-ET 과정에서 자궁 내에 이식하고 남은 잉여배아에 대한 보존으로 동결보존의 필요가 증가함에 따라 과정을 단순화하여 시간을 절약하고 비용을 절감할 수 있으며 생존율을 높일 수 있는 동결보존 방법에 대한 요구가 높아지고 있다.

생존 능력을 유지한 채로 냉동 보존되는 세포들은 매우 복잡한 과정을 거칠 뿐 아니라 동결과 용해의 과정 중에 이들 세포들이 쉽게 손상될 수 있다(6). 세포내의 얼음형성, 동결용액의 영향과 삼투압 증가에 의한 세포의 응축 등 동결동안 세포들에게 손상을 주는 요소들 이외에도 세포들은 얼음이 커지는 얼음 결정체형성에 의해 세포막의 투과성, 표면적과 부피 등 세포가 물리적으로 손상되어질 수 있다(2,7,18). 특히 기계적인 요인에 의한 손상은 포유류의 난자나 배아처럼 세포가 크다면 더 중요한 요인이 될 수 있다. 또한 동결 보존 후 배아의 생존율은 배아의 발생시기와 배아의 질에 따라 생존율에 영향을 받게 되며, 동결과 용해의 방법과 속도 및 동결과 용해과정에 사용되는 동결보호제의 종류와 농도에도 영향을 받는다(4,20,21).

완전 동결법은 매우 복잡한 과정을 거치는 동결과 용해동안 세포 및 배아가 손상될 가능성이 많다. 즉 세포내의 얼음 결정, 동결보존액의 영향, 세포의 삼투압 응축 등 동결동안에 세포에 손상을 주는 요인들이 많다(9).

유리화 동결은 기존의 완전 동결에 비하여 간단하고 비용이 적게 들며, 동결 중 얼음 결정체 형성이 이루어지지 않으므로 난자의 세포질 손상을 줄일 수 있다는 장점과 기계를 사용하지 않는 장점이 있으며 최근에는 생존율과 배아 발달율을 높이는 유리화 동결에 대한 연구가 진행되고 있다. 유리화 동결은 -196°C 로 초 냉각하기 위해 고농도의 동결보존액을 사용하며 동결보호제가 빠르게 세포질내로 침투하여 충분히 낮은 온도에서 이들 용액이 극도로 점성화 되어 세포내외의 얼음 형성 없이 굳어진다. 즉 투명한 액체 상태인 분자배열 상태에서 급격히 냉각되어 미처 고체상태의 분자배열로 변화하지 못하고 액체의 분자 배열 상태에서 분자운동이 멈추어서 얼음형성 없이 고체화되어 유리화 같은 고체상태(glass-like solidification) 및 유리화현상(vitrification)이 나타나게 된다(10,12,13). 이 유리화 현상은 얼음 결정(ice formation)이 없으므로 배아에 얼음결정과 관련된 물리적 손상을 입히지 않으며 또한 얼음이 생기는 삼투압적 손상(osmotic damage)를 피할 수 있다는 이론에 근거한다(14).

유리화 동결 시 동결액은 동결과정 동안 뿐 아니라, 동결

보존기간과 용해과정동안 얼음 결정을 형성하지 않아야 하므로 침투속도가 빨라야 하며, 일반적으로 완만 동결 시의 저농도(1.5 M ~ 2 M)에 비해 고농도(3.5 M ~ 7.5 M)의 동결보호제가 사용된다. 동결보존방법의 성공을 위해서는 반드시 일정농도 유지가 필수적이므로 동결보호제와 농도의 선택이 중요하다. 동결보호제는 동결과정동안 배아내로 투과되어 배아내의 물을 탈수시키고, 용해과정동안 물을 재 침투시켜 세포를 정상화시키며 얼음 결정의 형성을 막음으로써 배아내의 물질들을 보호하는 역할을 한다. 동결보호제는 침투성 여부에 따라 투과성이 있는 용액으로 DMSO, 1,2 propanediol (PROH), glycerol methanol, EG, propylene glycol 등이 있으며, 또한 투과성이 없는 용액으로는 glucose, ficoll, sucrose, polyvinyl pyrrolidone, dimethyl formamide, erythritol 등이 사용된다. 투과성이 없는 것은 그 자체만으로도 투과성이 있는 것에 비해 동결보호제로서의 효과가 떨어진다(18). 고농도의 동결보호제에 지나친 노출은 삼투압과 화학적 독성 등의 영향을 받을 수 있으며, 이러한 삼투압 충격과 독성은 일반적으로 동결보호제의 종류와 온도, 동결보호제의 상호조합 온도, 노출시간 및 동결 과 해빙의 속도, 동결과 해빙용액에 첨가되는 혈청의 농도에 영향을 받기 때문에(22), 동결보존액의 선택과 최적 평형시간은 선결되어야만 한다.

대부분의 동결보호제는 용해 후 배아의 발달에 해로운 결과를 가져오게 된다. 동결보호제로는 오랫동안 1,2 PROH, glycerol, DMSO를 주로 사용하였으나 최근에는 가장 독성이 적은 것으로 알려진 EG를 많이 사용한다. EG의 경우 상실기와 포배기의 동결보존 시 동결에 의한 배아 세포막과 세포질 구조의 손상이 다른 동결보호제에 비해 적어 배아의 동결보존에 유리하다는 보고가 있다. 그러나 EG는 쥐의 착상 전 기관형성에 해로운 영향을 줄 수 있다는 보고가 있으므로 충분한 세척이 필요하다(15). 최근에 가장 널리 쓰이는 DMSO, EG, PROH에 대해 CHO세포주(chinese hamster ovary cell line)에서 comet assay와 micronucleus assay를 조사한 보고에서는 DMSO는 유전자 독성물질이 없으며, EG와 PROH는 고농도에서 염색체 손상을 유도할 수 있음을 보였다. 또한, DMSO, EG, PROH는 현재 발달성이 없는 것으로 생각되어지고 있다(3). 현재 가장 보편적이라고 생각되는 유리화 동결액과 과정은 없는 실정으로 적절하게 고안되지 않은 과정들은 배아의 생존율과 발달에 감소와 영향을 초래한다고 한다(8,14).

본 연구는 여러 가지 동결보호제를 혼합 합성하여 만든 동결액을 사용하여 생쥐 포배기 배아를 유리화 동결하였다. 20%EG + 20%DMSO (ED) 용액에서 동결한 결과 부화율이 83.3%로 높았으며, 다른 동결보존액인 40% EG + 5.8 mg/ml Ficoll + 0.5M sucrose (EFS), 3M EG + 1.0M sucrose (ES) 용액에서 동결 용해한 결과 ED 만큼 높은 부화율을 보이지는 못하였으나 각각 70.8%, 65.2%의 부화율을 얻을 수 있었다. 이상의 결과는 포배기에서부터 부화기까지의 비율은 Ali 등(1)의 97.5%의 부화율과는 상당한 차이를 보이는데 이는 실험동물의 종류, 동결과 용해의 방법 및 노출시간, 배아

발생시기 및 발달단계 등의 차이 때문인 것으로 보인다.

본 연구에서는 특히 Cryoloop를 이용하였을 때 부화율이 가장 높았으며 이는 간편하면서도 사용하기 손쉽기 때문이 아닌가 생각된다.

결론적으로 생쥐 배반포를 동결 및 융해하고 배양한 후 부화율은 ED를 유리화 동결액으로 사용했을 때 좋은 성적을 보였으며, Cryoloop를 동결기구로 사용 시 보다 좋은 성적을 보여, 손이 많이 가고 세심하고 조심스럽게 숙련된 기술로 다루어야 하는 EM grid에 비해 사용이 간편하면서도 효과가 좋은 동결기구로 생각되어 이의 사용이 권장 되며, 또한 아직 감염은 보고되지 않았지만 액체질소에 직접 침지할 때에 비폐쇄성 도구(EM grid, Cryoloop, OPS)는 감염의 위험성이 있기 때문에 액체질소에 직접 침지하지 않는 폐쇄성 동결기구(CPS, GPS)를 만들기 위해 노력해 보았으나 직접 침지하는 것보다 시간이 더 걸리고 아직은 성적이 저조하여 더 많은 노력과 함께 효율적인 기구를 찾아야 할 것으로 보인다. 또한 동결보존액의 조합과 동결농도와 노출시간 및 노출단계, 적절한 세포시기 등의 보완 연구가 이루어질 때 배아 생존율을 증진 할 수 있는 최적의 동결과 융해 조건이 이루어 질 것으로 사료 된다.

결 론

본 연구의 목적은 다양한 유리화 용액과 동결 기구에서 유리화 동결된 쥐의 포배기 배아의 융해 후 생존율을 비교 연구하는 것이다. 2세포기 배아를 채취하여 체외에서 72시간 배양하여 얻은 생쥐 포배기 배아를 (i) 동결처리 하지 않은 군(대조군) (ii) 여러 동결보호제를 처리 한 군 (iii) 여러 동결 기구를 사용한 군으로 각각 나누어 조사하였다. 유리화 동결 보존액은 40% ethylene glycol (EG)+ 5.8 mg/ml ficoll + 0.5M sucrose (EFS 용액), 3M glycerol+3M EG (GE 용액), 20% EG + 20% dimethyl sulfoxide (ED 용액), 3M EG + 1.0M sucrose (ES 용액)에서 동결보존 및 융해 후 배아 생존율을 비교 조사하였으며, 동결기구는 closed plastic straw (CPS), electron microscope (EM) grid, Cryoloop, open pulled straw (OPS), plastic straw내에 든 glass micropipette 를 5군으로 나누어 동결보존 및 융해 후의 배아 생존율을 비교 조사하였다. 대조군의 배아 생존율은 88.0% 였다. EFS, GE, ED, ES 등 유리화 동결보존액에서의 생쥐 포배기 배아의 동결보존 및 융해 후 부화까지의 배아 생존율은 각각 70.8%, 43.5% ($P < 0.01$), 83.3%, 65.2% 이었다. CPS, EM grid, Cryoloop, OPS, GPS 등 동결 기구를 이용한 생쥐 포배기 배아의 동결보존 및 융해 후 배아 생존율은 각각 56.5% ($P < 0.01$), 72.7%, 83.3%, 60.9% ($P < 0.05$), 54.2% ($P < 0.01$) 였다. 동결보존액과 동결 기구를 사용한 유리화 동결 생쥐 포배기 배아의 생존율은 동결보존액으로 ED 유리화 동결보존액에서 동결 및 융해 했을 때, 또한 Cryoloop를 동결 기구로 이용할 때 가장 높았다.

참 고 문 헌

1. Ali J, Shelton JN. Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. *J Reprod Fertil.* 1993; 99: 471-477.
2. Ashwood-Smith MJ, Morris GW, Fowler R, Appleton TC, Ashorn R. Physical factors are involved in the destruction of embryos and oocytes during freezing and thawing procedures. *Hum Reprod* 1988; 3: 795-802.
3. Aye M, Di Giorgio C, De Mo M, Botta A, Perrin J, Courbiere B. Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. *Food Chem Toxicol.* 2010; 48: 1905-1912.
4. Bernart W, Kamel M, Neulen J, Breckwoldt M. Influence of the developmental stage and the equilibration time on the outcome of ultrarapid cryopreservation of mouse embryos. *Hum Reprod* 1994; 9: 100-102.
5. Cervera RP, Garcia-Ximénez F. Vitrification of zona-free rabbit expanded or hatching blastocysts: a possible model for human blastocysts. *Hum Reprod* 2003; 18: 2151-215.
6. Dumoulin JC, Bergers-Janssem JM, Pieters MH, Enqinsu ME, Geraedts JP, Evers JL. The protective effects of polymers in the cryopreservation of human and mouse zonae pellucidae and embryos. *Fertil Steril* 1994; 62: 793-798.
7. Friedler S, Giudice LC, Lamb EJ. Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil Steril* 1988; 49: 743-764.
8. Mahmoud KG, Scholkamy TH, Ahmed YF, Seidel GE Jr, Nawito MF. Effect of different combinations of cryoprotectants on in vitro maturation of immature buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes vitrified by straw and open-pulled straw methods. *Reprod Domest Anim.* 2010; 45: 565-571.
9. Miyake T, Kasai M, Zhu SE, Sakurai T, Machida T. Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene glycol-based solution by a simple method. *Theriogenology* 1993; 40: 121-134.
10. Mullen GF, Li M, Li Y, Chen ZJ, Crister JK. Human oocyte vitrification the permeability of metaphase II oocytes to water and ethylene glycol and appliance toward vitrification. *Fertil Steril.* 2008; 89: 1812-1825.
11. Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikawa S, Suzuki T. Cryopreservation of mature bovine oocytes by vitrification in straws. *Cryobiology.* 1998; 37: 77-85.
12. Paynter SJ, Cooper A, Gregory L, Fuller BJ, Shaw RW. Permeability characteristics of human oocytes in the presence of the cryoprotectant dimethylsulphoxide. *Hum Reprod* 1999; 14: 2338-2342.
13. Paynter SJ, O'Neil L, Fuller BJ, Shaw RW. Membrane permeability of human oocytes in the presence of the cryoprotectant Propane-1,2-diol. *Fertil Steril.* 2001; 75: 532-538.
14. Pegg DE. Principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol.* 2007; 368: 39-57.
15. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature* 1985; 313: 573-575.
16. Rall W F, Wood M J, Kirby C, Whittingham D G. Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *J. Reprod. Fertil* 1987; 80: 488-504.
17. Reubinoff BE, Pera MF, Vajta G, Trounson AO. Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method. *Hum Reprod* 2001; 16:

- 2187-2194.
18. Schneider U, Mazur P. Relative influence of unfrozen fraction and salt concentration on the survival of slowly frozen eight-cell mouse embryos. *Cryobiology* 1987; 24: 17-41.
 19. Shaw PW, Fuller BJ, Bernard A, Shaw RW. Vitrification of mouse oocytes: improved rates of survival fertilization and development to blastocysts. *Mol Reprod Dev* 1991; 29: 373-378.
 20. Széll A, Shelton JN. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. *J Reprod Fertil* 1986; 76: 401-408.
 21. Takahashi Y, Kanagawa H. Effect of equilibration period on the viability of frozen-thawed mouse morulae after rapid freezing. *Mol Reprod Dev*. 1990; 26: 105-110.
 22. Tan X, Song E, Liu X, You W, Wan F. Factors affecting the survival, fertilization and embryonic development of mouse oocytes after vitrification using glass capillaries. *In Vitro Cell Dev Bio Anim*. 2009; 45: 420-429.
 23. Trounson A, Mohr L. Human Pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983; 305: 707-709.
 24. Wang L, Liu J, Zhou GB, Hou YP, Li JJ, Zhu SE. Quantitative investigations on the Effects of Exposure Durations to the Combined Cryoprotective Agents on Mouse Oocyte Vitrification Procedures. *Bio Reprod* 2011; Jun 22: 1-28.
 25. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science* 1972; 178: 411-414.
 26. Yeoman RR, Gerami-Naini B, Mitalipov S, Nusser KD, Widmann-Browning AA, Wolf DP. Cryoloop vitrification yields superior survival of Rhesus monkey blastocysts. *Hum Reprod* 2001; 16: 1965-1969.