

## B-9                   유리화 동결보존된 생쥐 난소로부터 분리된 Preantral Follicle의 체외성장과 발달

을지병원 의과학연구소<sup>1</sup>, 을지의대 생리학교실<sup>2</sup>, 산부인과교실<sup>3</sup>

김동훈<sup>1</sup> · 김묘경<sup>1</sup> · 고덕성<sup>1</sup> · 이회창<sup>1</sup> · 이호준<sup>2</sup> · 박원일<sup>3</sup> · 권혁찬<sup>3</sup> · 김세웅<sup>3</sup>

**목 적:** 본 연구는 생쥐 난소의 vitrification을 위한 적정 항동해제 처리시간을 살펴보고, vitrification 후 용해된 난소로부터 분리된 preantral follicle내 난자의 체외성장과 수정후 발달을 살펴보는데 목적이 있었다.

**대상 및 방법:** 난소는 생후 12일령 ICR 생쥐로부터 적출하였다. 난소의 동결은 1차적으로 20% FBS가 함유된 Leibovitz L-15배양액에 10% ethylene glycol과 10% DMSO가 첨가된 동결액 (VS-1)에 난소를 침지하여 5분간 실온에서 처리하였으며, 2차적으로 20% ethylene glycol과 20% DMSO 그리고 0.5 M sucrose가 첨가된 동결액 (VS-2)에 5분 또는 10분간 실온에서 처리한 후, 0.25 ml straw에 난소를 흡인한 다음 액체질소에 침지하였다. 난소의 용해는 0.5 M, 0.25 M, 0.125 M, 0 M sucrose가 첨가된 Leibovitz L-15배양액에서 단계적으로 5분씩 처리하여 항동해제를 제거하였다. 동결-용해된 난소로부터 preantral follicle의 분리는 collagenase와 DNase I을 이용한 효소적 처리방법을 사용하였다. 분리된 preantral follicle은 transwell-COL membrane insert에서 10일간 배양하여 체외성장을 유도하였으며, 배양액은 5% FBS, 100 mIU/ml FSH 그리고 10 mIU/ml HMG가 첨가된  $\alpha$ MEM 배양액을 이용하였다. 10일간 체외성장을 시킨 후, 체외성숙을 유도하기 위하여 1.5 IU/ml hCG가 첨가된 배양액에서 16~18시간 배양을 실시하였다. 체외성장 및 성숙된 난자는 수정능획득이 유리된 정자와 수정을 실시하였으며, 수정란은 10% SSS와 amino acids가 첨가된 KSOM 배양액에서 배양을 실시하였다. 난자직경의 측정은 ocular micrometer를 이용하였으며, 배반포의 세포수 관찰을 위해서는 Hoechst 33342를 이용하여 형광염색을 실시하였다.

**결 과:** 체외배양 후 preantral follicle의 생존율은 5분 처리군이 69.8%로서 10분 처리군의 43.2%보다 유의하게 높은 생존율을 나타냈으며, 5분 처리군과 대조군 (62.1%)간에는 차이를 나타내지 않았다. metaphase까지 난자 성숙율에 있어서는 5분 처리군이 38.9%로서 10분 처리군의 26.0%보다 유의하게 높은 것으로 나타났으며, 5분 처리군과 대조군 (37.9%)간에는 차이가 없는 것으로 나타났다. 난자직경을 측정된 결과는 5분, 10분 처리군 모두 대조군에 비하여 유의하게 작은 것으로 조사되었으며, 그리고 처리군 간에는 10분 처리군에서 난자직경이 유의하게 작은 것으로 조사되었다. 수정 후 배반포까지의 발달율은 vitrification군이 8.6%로서 대조군의 12.0%보다 다소 낮은 것으로 나타났으나 통계적인 차이를 나타내지는 않았다. 그러나 세포수에 있어서는 vitrification군이  $41.9 \pm 20.2$ 개로서 대조군의  $55.1 \pm 22.5$ 개 보다 유의하게 작은 것으로 관찰되었다.

**결 론:** 이상의 연구결과는 vitrification방법을 이용하여 동결보존된 생쥐 난소로부터 분리된 preantral follicle내 난자도 정상적인 성장과 발달을 할 수 있음을 확인하였다. 그리고 생쥐 난소의 vitrification을 시행할 경우에는 vitrification용액에서 5분간 처리하는 것이 follicle의 생존, 난자의 발달 그리고 수정 후 배반포의 발달에 보다 효과적인 조건임을 확인할 수 있었다.