

Preservation of Germ Cells in ART Program

미즈메디 병원

도 병 록

I. 서 론

1776년 Lazzaro Spallanzani에 의해 처음으로 사람 정액의 동결보존의 가능성이 알려진 이래 생식세포를 포함한 세포 및 조직의 장기보존 필요성이 의학, 축산분야를 포함한 생물학 전반에 걸쳐서 대두되었다. Banking 또는 preservation 이라고 표현하는 '보존'의 정의는 세포 또는 조직이 필요할 때에 유용하게 사용할 수 있도록 안전하게 저장하는 것을 의미하며, 농업, 축산 및 임상에서 필요로 하는 생식세포 및 장기의 저장 뿐 아니라 멸종위기에 처한 동물의 보존과 특정 유전자의 보존 등의 목적으로 널리 쓰이고 있다.

세포 및 조직의 저장은 조직의 종류에 따라, 저장을 원하는 기간에 따라 다양한 방법이 존재하며, 단순히 특정 배양액에 노출시키는 것에 의한 수일간 보관할 수 있는 간단한 저장법을 비롯하여 항동해제를 처리한 후 초저온의 액체질소에 보관하는 반영구적인 보관방법까지 다양한 저장 방법들이 알려져 있다. 현재 세포 및 조직의 장기보존에는 항동해제를 처리하여 탈수한 조직을 -196°C 의 액체질소에 보관하는 초저온 동결보존방법이 가장 널리 사용되고 있으나 초저온 동결보존방법은 동결보존과정에서 탈수와 결빙에 의한 세포막 및 세포 내 소기관의 물리적 손상 및 항동해제와 고농도의 염에 의한 막성분의 화학적 손상 등 세포의 생존에 심각한 영향을 줄 수 있는 세포의 손상을 초래한다. 이러한 손상을 최소화하기 위하여 종의 조직 및 기관에 따라 각각 적절한 동결보존방법을 사용한다. 그러나 아직도 동결보존한 조직이나 세포들은 동결보존하지 않은 조직이나 세포에 비해 그 발생능력이 떨어지는 것이 일반적이다.

따라서 본 원고에서는 생식세포의 동결보존 및 용해에 영향을 미칠 수 있는 원인들의 고찰을 통해 동결보존법이 가진 문제를 확인하고, 생식세포를 보관할 수 있는 방법을 이미 보고된 이론과 방법을 바탕으로 비교하여, 각종 생식세포를 효율적인 방법으로 보관할 수 있는 이론적 기반을 찾아보고자 한다.

II. 동결보존의 개요와 문제점

1. 동결보존의 기본원리

자연계에서는 식물의 경우 다량의 물을 배출한 결과 체내 세포 내 물질의 농도를 높여 영하의 온도에 노출되었을 때에 세포가 얼지 않게 하여 겨울을 나는 것이 알려져 있으며, 극지방의 일부 식물은 -80°C 정도의 기온에서도 견디는 것으로 알려져 있다. 그러나 대부분의 포유동물의 세포나 조직은 일정 이상의 온도변화에 견디지 못하고 죽게 된다.

약 60여년 전 최초의 포유동물 세포의 효율적인 동결보존방법이 보고된 이래 동결보존의 방법은 많은 발달을 해 왔고, 많은 종류의 세포와 조직들을 대상으로 실험한 결과 정립된 초저온 동결보존방법의 기본원리는 다음과 같다.

살아있는 세포에서 일어나는 모든 생화학적 반응은 물에 의해 매개되며, 물의 유리화 변환점인 -130°C 이하가 되면 세포 내 모든 생화학적 반응은 이론적으로 정지하게 된다. 따라서 일반적으로 세포나 조직의 장기보관은 유리화 변환점 이하인 -196°C 의 액체질소 속에 보관하게 된다. 그러나 -80°C 정도의 온도에서도 수개월간은 보관이 가능한 것으로 알려져 있어, 온도를 낮추어 세포 내 모든 생리 및 생화학적인 반응의 속도를 느리게 하거나 또는 차단함으로써 장기간의 보존이 가능하게 하는 것이 동결보존의 가장 기본적인 원리이다.

이러한 동결보존을 위해서는 물의 제거가 필수적이다. 일반적으로 세포는 대부분이 물로 이루어져 있으며, 동결보존을 위한 저온처리 시 0°C 이하에서 물이 결정화되고 또한 부피가 늘어남에 따라 세포막을 비롯한 세포 내 소기관들이 치명적인 물리적 손상을 입게 되며 그 결과 세포는 괴사하게 된다. 따라서 세포에 손상을 적게 주면서도 효과적으로 세포 내의 물을 제거하는 방법이 연구되었고, 물 대신 세포 내로 치환되어 들어가면서 결정을 형성하지 않으며, 빙점이 매우 낮은 물질을 사용하는 방법이 개발되었다. 이와 같이 상온에서는 막투과성이 활발하고 삼투압이 높으며, 동결 시에는 결정을 형성하지 않으며, 쉽게 과냉각되며, 빙점이 매우 낮아 결과적으로 동결에 의한 손상을 억제하는 물질을 항동해제라 하며 ethanediol (EG), propanediol (PROH), dimethyl sulfoxide (DMSO), glycerol, di- and triethylen glycol 등을 포함한 다양한 종류의 항동해제가 알려져 있다. 상기와 같은 이유에서 세포 내 물의 제거 정도는 세포의 사멸에 매우 중요한 요인이 되며, 식빙 시 온도에 크게 좌우되는 것으로 알려져 있다.

일반적으로 세포나 조직의 배양에 사용되는 배양액 또는 완충용액은 염을 이용하여 삼투압을 세포와 유사하게 맞추게 된다. 이들 배양액 또는 완충용액은 빙점강하의 물리적 법칙을 따르며, 따라서 물보다 낮은 온도인 약 -5°C 이하에서 얼게 된다. 특히 배양액 또는 완충용액의 많은 부분을 차지하는 염의 경우는 더 낮은 온도에서 얼게 된다. 따라서 이들 배양액 또는 완충용액은 약 -5°C 정도에서 얼음의 결정이 생기기 시작하며, 물이 얼음으로 점차적으로 변하면서 염과의 분리현상이 일어난 결과 완충용액 내 물이 감소하게 되며, 따라서 염의 농도는 상대적으로 증가하게 되어 빙점은 더욱 낮아지게 된다.

현재 동결보존에 사용되는 용액은 세포배양 시 사용되는 완충용액 또는 배양액에 항동해제를 적절한 농도로 배합하여 사용되며, 여기에 설탕이나 raffinose 등과 같은 탈수보호제를 첨가하여 사용하고 있으며 용액의 어는 온도는 -14°C 정도로 알려져 있다. 탈수보호제는 막투과성이 거의 없으며, 얼음 결정이 생길 시에 염과 같은 방법에 의해 상대적인 농도가 증가하게 되어, 그 결과적으로 세포 내에 남아있던 여분의 물까지도 세포 외부로 제거할 수 있게 하는 기능을 가진다.

또한 일반적으로 적절한 동결의 속도는 종에 따라, 조직에 따라 다르며, chilling sensitivity에 따라 결정된다. 예를 들면, 생쥐의 난자는 chilling sensitivity가 둔하여 비교적 빠른 온도의 변화에도 큰 영향을 받지 않는 반면, 돼지나 소의 난자의 경우에는 민감하여, 빠른 온도변화에 치명적인 손상을 받음이 알려져 있다. 사람의 경우는 둘의 중간 정도인 것이 실험을 통해 알려져 있으며, 이는 세포 내 지방과립의 량과 관계가 있는 것으로 추측되고 있다.

2. 일반적인 동결 (slow freezing)의 과정

현재 일반적으로 사용되는 동결보존과정과 그 동안 일어나는 현상을 요약하면 다음과 같다.

동결보존액에 조직이나 세포를 일정 시간 처리하여 세포 내부의 물을 세포 외로 제거한다. 이때 물과 항동해제의 움직임을 나타낸 Vant's Hoff 곡선을 보면, 항동해제와 탈수보조제의 처리에 의해 다량의 물이 세포 외로 빠져 세포의 용적이 일시적으로 줄어들었다가 일정 시간이 지나면서 항동해제가 세포 내부로 침투하여 원래의 약 95% 이상의 용적으로 회복된다. 일정 시간 후 삼투압의 평형이 이루어지면, 온도를 일정 비율로 약 -7°C 까지 낮추고 식빙을 실시한다. 이때 체적이 회복되는 시간은 항동해제의 막투과도의 정도에 비례하게 된다. 식빙의 온도는 항동해제의 농도에 의해 결정되며, 반드시 동결보존액의 자연 빙점 보다 낮아야 한다. 즉, 자연 빙점 보다 낮은 상태에서 식빙을 함으로 세포 외부와 평형을 이룬 세포 내부의 동결보존액이 얼지 않아 세포의 손상을 최소화 할 수 있으며, 식빙 결과 세포 외부의 물이 결정화되면서 염과 탈수보조제의 상대농도가 더욱 올라가게 되고, 따라서 세포 내, 외부의 삼투압 평형이 깨어지게 되어 더 많은 물이 세포의 외부로 흘러나오게 된다. 이후 더 많은 고농도의 염이 세포 내로 침투하게 되고 세포가 응축되게 된다. 점진적으로 온도가 내려갈수록 외부의 물의 결정화가 지속적으로 이루어진 결과 다시 세포 내, 외부의 삼투압 차이가 생기고, 동결되지 않은 물이 세포 외부로 빠져 나오게 되며, 약 -130°C 정도의 물의 유리화 온도에서 세포는 화학적, 생리적 활동을 멈추고 안정된 동결상태에 이르게 된다.

일반적인 방법으로 동결한 세포나 조직의 융해 시에는 일반적인 동결 시 점자로 세포 내 축적된 고농도의 염의 작용으로 다량의 물이 급속히 세포 내로 침투하기 때문에 세포막에 손상을 주어 세포를 죽일 수 있음이 알려져 왔다. 그러나 많은 보고자들에 의해 급속 융해한 세포에서 생존율이 더 높음이 밝혀져서 현재에는 일반적인 동결보존에 의한 세포나 조직은 느리고 지속적인 융해과정보다 급속 융해 방법을 사용하고 있다. 이러한 이론적 예견이 실제와 다른 이유는 세포막의 투과성을 단순화한 몇 가지 물리적 결과의 수치화에 의한 결과로 보이며, 실제 동결과 융해 시에 나타나는 세포막의 특성 변화는 다양하고 복잡한 기타의 기전이 관여할 것으로 보고되고 있어, 앞으로의 많은 연구가 필요하다.

3. 동결 (slow freezing)과 융해과정에서 나타나는 세포의 손상

수많은 연구자들에 의해 개량되어진 현재의 동결보존의 방법들도 동결보존과 융해과정에서 세포에 물리적, 화학적인 손상을 입힌다.

항동해제들은 양쪽성의 특징을 지녀 물분자와 결합할 수 있고 세포막에 대한 투과성이 있으며, 막성지질과 반응하여 세포막의 지질구조를 일부 변화시키며, 세포 내의 지방성분의 제거 또는 극성화 시킬 뿐 아니라 DMSO와 PROH의 경우는 세포를 상온에서 10~30분 노출시킬 경우 세포 내 골격인 microfilament와 microtubule의 구조를 분해시켜 세포분열 시 염색체의 이수성을 유발하는 돌연변이의 요인으로 작용할 수 있을 뿐 아니라 세포 내 막성소기관들인 소포체, 골지체, 미토콘드리아 및 세포질에 역시 나쁜 영향을 미침이 알려져 있다. 그러나 4°C 상태에서나 또는 항동해제를 제거한 경우에는 막성 세포 내 소기관의 변화에 영향을 미치지 않는다.

온도의 하강은 막성지질 물질의 투과성을 변화시켜 물을 포함한 물질의 이동속도에 영향을 주

Table 1. Factors associated with cooling and cryopreservation that contribute to cellular injury and death in biological system

System	Type / cause of damage
All	Intracellular ice formation, extracellular ice formation, apoptosis, toxicity, calcium imbalance, free radicals, ATP levels, general metabolism, fertilization failure, cleavage failure, pHi, pathenogenetic activation, cleavage
Membrane	Rupture, leakage, fusion, microvilli, phase transition
Chromosomes	Loss/gain, polyspermy, polygyny (failure to extrude polar body), tetraploidy
DNA	Apoptosis, fusion, rearrangements
Cytoskeleton	Microtubules dissolve, actin
Proteins/enzymes	Dehydration, loss of function
Ultrastructure	Microvilli, mitochondria, vesicles, cortical granules, zona pellucida
Zona Pellucida	Hardening, fracture
Lipids	Free radicals

어 결과적으로 세포 내에 얼음 결정이 생기면서 세포를 파괴하는 등 세포에 손상을 초래할 수 있다. 또한 정상 체온에 비해 7°C만 온도가 하강하여도 microtubule에 비가역적인 심각한 손상이 오는 것도 알려져 있다. 온도에 의한 세포의 손상은 통상적으로 15°C에서 -90°C 사이에서 나타날 수 있는 것으로 알려져 있으나, 상온에서 0°C에 이르는 시기에는 세포막의 기능이 남아있고, 세포대사작용이 있으며, 반응성 산소종 등에 의해 세포 내 골격과 세포능력의 손상이 되어도 재활성화시킬 능력이 있는 반면, 식빙 시 온도인 -7°C 정도에서는 전체 동결기간을 통해 가장 위험이 큰 것으로 알려져 있다. 식빙에 의해 세포 외부의 과냉각된 물들이 얼음의 결정으로 변하면서 액화열을 발생하므로 온도의 순간적인 상승이 동반되며, 세포 외부 물의 결정화에 의해 생긴 염 농도의 상대적인 상승은 삼투압에 영향을 주어 세포 내부의 여분의 물을 세포 외부로 배출시키게 되는데, 이 시기에 세포의 순간적인 형태적 변형이 초래되어 물리적 손상을 받을 수 있다.

온도가 하강함에 따라 물이 얼어 결정화되면서 생기는 염 농도의 상대적 상승은 마치 염에 의한 단백질의 추출과정에서와 같이 다양한 효소를 포함하는 막성단백질에 영향을 주어 용해 후 세포막의 중요 역할인 막특이성을 변화시키게 되어 세포 손상의 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 따라서 최근 일부 연구자들은 이러한 염의 주성분인 sodium chloride 대신 choline chloride를 사용하고, EGTA나 PEG를 같이 사용하는 새로운 방법을 보고하고 있다.

이외에도 탈수과정에서의 세포 내 소기관의 손상, 심한 삼투압 차에 의한 물의 순간이동에 의한 세포막의 손상, 동결보존 시 전리방사선에 의한 세포 내 유전물질의 손상, 용해 시 순간적인 온도상승에 의한 용존가스의 기화에 의해 생긴 미세공기방울에 의한 세포막 및 투명대의 손상, 반응성 산소종의 증가, 미토콘드리아 내부의 과립 형성 및 이에 의한 ATP 합성능력의 감소, 동결 시의 물리적, 화학적 손상에 의한 cortical granule의 분비에 의한 투명대 경화현상 등 매우 복잡하고 다양한 원인에 의해 세포가 손상되게 된다 (Table 1).

일반적인 동결보존에 의한 세포나 조직은 느리고 지속적인 용해과정보다 급속 용해 시에 세포의 손상이 적은 것으로 알려져 있으며, 이러한 세포의 손상은 동물의 종에 따라, 세포의 종류에

따라 또다시 다양한 형태로 분류된다.

4. 급속 동결법 (rapid freezing)

급속 동결법에는 크게 두 종류가 존재한다. 하나는 초급속 동결법 (ultra-rapid freezing)이며, 다른 하나는 유리화 동결법 (vitrification)이다. 급속 동결법에서는 일반적인 동결법에서 약 10~11% 정도의 항동해제를 쓰는데 반해, 약 40%에 달하는 고농도의 항동해제를 사용하며 얼음 결정이 생기지 않는 경우를 유리화 동결이라 칭하며, 동결과정이나 용해과정에서 얼음 결정이 생기는 경우를 초급속 동결법이라 한다. 초급속 동결의 경우 용해과정에서 생기는 얼음 결정 보다 동결과정에서 생기는 얼음의 결정이 세포의 생존에 더 좋지 않은 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, 4.5 M의 DMSO를 사용하여 동결한 경우 해동 시에 생기는 얼음의 결정이 배아의 생존율에 영향을 미치지 않음을 보고하고 있으나, 1.5 M과 3.5 M의 DMSO를 사용한 초급속 동결 후 용해 시 많은 배아들에서 비정상적인 발달 (7~77%)을 보여 차후의 연구가 더 필요할 것으로 보인다.

유리화 동결법의 경우에는 일반적으로 다양한 종류의 항동해제를 섞어 만든 약 40%에 달하는 고농도의 항동해제를 사용하며 탈수보조제로서 설탕, polymer (Ficoll, dextran)들, polyvinylpyrrolidone, EGTA 또는 염을 사용한다. 따라서 세포나 조직의 침지 시 매우 큰 삼투압의 차이에 의해 급속한 물질의 이동이 있고, 곧이어 삼투압의 평형상태에 도달하게 된다. 또한 EG의 경우는 분자량이 작고 세포막의 투과성이 다른 항동해제에 비해 뛰어난 특성이 있어 EG를 기본으로 만든 항동해제를 사용하는 경우는 매우 빠른 삼투압의 평형에 도달하여 삼투압의 충격 (osmotic shock)이 거의 없다는 이점이 있고 또한 처리시간이 짧아짐으로 해서 EG가 막성지질에 미치는 영향을 극소화할 수 있는 장점이 있다. 평형상태에 도달하는 시간을 줄이기 위하여 저농도의 항동해제를 미리 처리하는 경우에는 실제 항동해제의 처리가 수초에서 1분 안에 이루어지며, 평형상태에 도달한 조직이나 세포는 즉시 액체질소나 또는 액체질소의 증기 속에 침지하는 것으로 동결과정을 마치게 된다. 유리화 동결에 사용되는 용기로는 전자현미경용 구리 격자, 가늘게 뽑은 대롱, wire loops, microdrop, 호일 등이 흔히 쓰인다.

이 과정은 일반적인 동결과정과는 달리 동결 시 여분의 물이 세포 외로 배출되는 과정 (농도평형과정)이 일어날 틈이 없이 바로 유리화 상태에 도달하므로 세포 내부에 물이 남아있게 되나, 이 물의 상태도 양쪽성을 띤 항동해제와 결합한 채 유리화 되었으므로 (물의 유리화 온도는 -130℃) 얼음의 결정이 생기지 않아 세포에 물리적 손상을 주지 않으면서도 시간이 짧게 걸리며, 프로그래밍된 복잡한 동결장치가 필요하지 않다는 다양한 이점이 있는 반면 용해에 시간이 걸릴 때에는 용해과정에서 얼음의 결정이 생길 수 있어 급속한 용해가 필수적이며, 용해 후 유전적 안정성의 검증이 아직은 미흡한 단점이 있다.

III. 동결보존의 활용

동결보존의 방법은 농업, 축산 및 임상 등 생물학 전반에서 필요로 하는 생식세포, 세포주 및 장기의 저장 뿐 아니라 멸종위기에 처한 동물의 보존과 특정 유전자의 보존 등의 목적으로 널리 쓰이고 있으며, 보조생식술 분야에서도 시험관야기 시술 시 잉여 배아의 보존 뿐 아니라, 화학 및 방사선 요법을 필요로 하는 사람에게서의 생식세포의 유지를 위한 생식소 조직, 정자 및 난자의

보존 등에 사용되고 있다. 임상의학에서 가지는 각각의 동결보존의 의의를 간단히 살펴보면 다음과 같다.

1. 배아의 동결보존

시험관아기 시술 시 일반적으로 시행되는 과배란의 유도 결과 많은 환자들에게서 잉여의 수정란이 생기게 되었고, 채취된 난자의 효율성을 올리기 위한 방법으로 대다수의 불임시술병원에서 배아의 동결보존이 일반적으로 이루어지고 있다.

배아의 동결보존은 과배란유도 시 잉여의 수정란을 사용한 누적 임신율의 극대화를 위한 목적이외에도 과배란유도에 따르는 부작용인 난소과자극증후군 또는 특정 이유로 인한 배아의 이식이 불가능해진 경우 및 난자공여 시 공여자와 수여자의 생식주기가 다른 경우, 기타 질병 등의 이유로 차후 임신을 원하는 경우 등 그 용도가 다양하다.

사람 배아의 동결 후 임신 및 출산은 1980년대 중반에 그 가능성이 확인되었으며, 현재에는 일반적인 동결법 이외에 급속 동결법, 초급속 동결법, 유리화 동결법 등이 개발되었으나 대부분의 불임시술병원에서는 그 결과 및 효용성이 잘 알려져 있고, 융해 후 이식 시에 임상적으로 안전한 시술방법으로 인정받은 일반적인 동결법을 사용하고 있다.

배아의 동결보존의 시기는 크게 전핵시기, 난할시기, 포배시기로 나누어진다. 과거 건강한 배아를 선택해서 임신의 성공률을 올리려는 시도에 의해 배아의 발생과정을 확인하고자 하는 연구자들이 난할시기의 동결을 선호하였다. 즉, 전핵시기는 자성과 응성의 유전자가 합쳐지고, 이어지는 첫 번째 난할을 위해 유전자가 증폭되는 시기이므로 동결에 부적절한 시기로 알려져 왔으나, 자성과 응성의 유전자가 합쳐지고 유전자의 증폭이 끝난, 수정 후 20~22시간 정도에는 다시 안정성을 찾는 시기로 알려졌고, 전핵기에 배아의 발생상태를 예견할 수 있는 지표들이 발견되어 보고됨에 따라, 현재에는 일반적인 잉여 배아의 동결 시기로 사용되고 있다. 이 시기에는 PROH와 설탕의 사용을 기본으로 하는 동결제를 사용하는 방법이 잘 알려져 있고, 그 안정성이 검증된 상태이며, 융해 후 난할기 동결배아에서의 결과보다 더 높은 임신율을 나타내고 있다.

최근 다태임신의 위험 등에 의해 다수의 국가들이 수정란의 이식 수를 제한하고 있고, 사람 수정란의 배양방법이 발달함에 의해 발달능력이 확인된 배아만을 선택하여 이식하고자 하게 되었다. 수정 후 5~6일간의 배양에 의해 사람의 난포는 포배시기가 되며, 이 시기까지 건강하게 자란 경우만을 이식함으로 자연선택적으로 우성 배아를 선택할 수 있게 되었고, 다태임신율의 감소를 기대할 수 있게 되었다. 이 시기에는 glycerol을 동결제로 사용하는 사용하는 방법이 확립되어 있다.

2. 난자의 동결보존

수정란의 동결과는 달리 난자의 동결보존은 윤리적 문제가 배아에 비해 상대적으로 적고, 그 활용성이 배아에 비해 넓은 이점이 있다. 즉, 조기폐경이 의심되거나, 암 또는 기타 질병에 의해 생식능력을 상실할 위험이 있는 미혼여성의 포함한 여성의 경우 난자의 동결보존에 의해 차후 아기를 가질 수 있는 난소은행을 확립할 수 있다는 대표적인 장점이 있다.

난자의 동결에는 기존의 배아 동결방법의 연구에서 알려진 몇 가지의 문제가 존재한다. 잘 알려진 바와 같이 난자의 동결 시에는 융해 후 방추사의 손상에 의한 염색체 이상의 확률이 높고,

극체 방출, 전핵의 이동, cytokinesis에 관여하는 microfilament의 손상 가능성이 있으며, cortical granule의 방출에 의한 투명대의 경화현상 또는 손상 등의 현상이 관찰되며, 생존율과 임신율이 배아의 경우에 비해 저조하다. 난자의 동결-융해 후 임신과 출산이 1980년대 후반에 보고되었고, 비교적 양호한 수정 및 발생율을 나타내지만 보고자들에 따라 다양한 임신의 성공율을 보고하거나 또는 높은 조기유산율을 보고하여 아직은 많은 연구가 진행되어야 할 분야이다. 현재까지 DMSO, PROH 등을 사용하는 일반적인 동결법에 의해 연구가 진행되었으나, 최근 유리화 동결법 또는 PROH를 사용하는 기존의 동결방법에 처리시간과 탈수보조제의 농도를 변화시킨 새로운 방법을 사용하여 난자의 생존율을 획기적으로 증가시켰다는 보고가 있다.

3. 난소조직의 동결보존

일반적으로 가임기 여성의 난소표층에는 수많은 원시난포들이 존재한다. 보조생식술의 발달과 더불어 난소 내 다수의 원시난포의 효용성에 관심을 가지게 되었다. 조기폐경이 의심되거나, 암 또는 기타 질병에 의해 생식능력을 상실할 위험이 있는 미혼여성의 포함한 여성의 경우 자신의 난소조직을 동결보존 하였다가 융해하여 체내이식에 성공할 경우에는 별도의 처리없이 임신에 성공하여 아기를 가지고 정상적인 가임여성군으로 환원이 가능하며, 수정난의 동결과는 윤리적 문제가 없는 매우 큰 장점이 있다. 상기 기술이 임상의 응용되기 위해서는 난소조직의 동결보존 뿐 아니라 체내이식의 위치 및 방법 등이 확립되지 않았고, 최근 피하에 이식하여 여성의 생리 주기와 여성호르몬의 분비를 확인한 정도의 결과를 얻고 있다. 그러나 사람 난소조직을 동물에 이식한 결과 체내에서 생식소자극호르몬의 투여에 의해 난포강의 형성에 성공하였다는 보고가 있어 윤리적으로는 매우 큰 문제가 있으나 불임 치료의 한 방법으로 자리할 수 있는 여지를 마련하였다. 차후 사람의 원시난포의 체외성장이 이루어지고, 체외성장 결과 얻은 난자가 체외에서 성숙, 수정, 발생이 가능하다면, 윤리적 문제가 없는 매우 유용한 불임의 치료방법으로 자리매김 할 것으로 보이며, 사람의 난자은행의 성립도 가능할 것으로 생각된다.

현재 난소조직의 동결보존방법은 PROH를 사용하는 일반적인 완만 동결법을 사용하지만, 최근 유리화 동결법에 의한 결과도 완만 동결법을 사용한 결과와 큰 차이가 없는 것으로 보고되고 있다.

4. 정자와 정소조직의 동결보존

정자 또는 정소조직의 동결도 난자의 경우와 마찬가지로 암 또는 기타 질병에 의해 생식능력을 상실할 위험이 있는 남성의 경우, 정자의 수가 매우 적은 경우, 기타 보조생식술 또는 시험관 아기 시술 시 정액의 회수시기를 맞출 수 없는 경우에 주로 사용되어 왔으며, 또한 비 폐쇄성 무정자증의 경우 시험관아기 시술을 위한 정소조직의 생검 시에 여분의 조직을 동결하여 차후 시험관아기 시술 시 사용되어 왔다. 정자와 정소조직의 동결보존에는 정자나 세포막의 유동성을 증가시키는 유동보조제로서 양이온들과 우유 또는 달걀의 노른자위, 과당, 시트르산 등이 첨가되며, 항동해제로는 주로 glycerol 또는 DMSO가 주로 사용된다. 냉동의 방법은 2가지로 대별되며, 액체질소의 증기를 사용하는 급속 동결법은 주로 정자의 동결에 사용하며, 정소조직은 주로 (프로그래밍된 기계를 사용하는) 완만 동결법을 사용한다. 정자의 동결에도 난자에서와 마찬가지로 다양한 세포손상의 요인이 존재하며, 특히 동결액의 첨가 시 삼투압의 급속한 변화가 정자의 생존율

에 영향을 미치며, 동결액 내 항동해제가 정자의 세포막에 영향을 주어 세포막을 손상시킬 수 있음이 알려져 있다.

IV. 결 론

현재 생식의학의 빠른 발달에 의해 배아 및 난자의 동결이 일반화되었고, 정자 및 정소의 동결도 일반화되어 각각 불임시술병원에서 쉽게 임신과 출산의 결과를 얻을 수 있으며, 또한 성인의 동결 후 융해시킨 난소조직의 경우에도 동결-융해 후 생존할 수 있다는 결과를 보이고 있다.

그러나 현재 가장 일반적으로 쓰이고 있는 동결보존의 방법은 매우 복잡하고 고가의 장비가 필요하며, 많은 시간이 걸리는 단점을 내재하고 있다. 따라서 향후 생식세포의 동결은 좀더 간편하고 또한 안전한 방법의 도입이 필요할 것으로 생각된다.

실제로 자연계에서 벌과 개미는 일생 동안 단 한번의 교미를 통하여 얻은 정자를 평생 동안 사용하는 것이 알려져 있으며, 닭의 경우에도 한번의 교미 결과 얻은 정자를 사용하여 수일 이상 수정란을 생산하는 것이 알려져 있다. 따라서 자연계의 곤충과 조류에서와 같이 사람의 생식세포의 보존도 상온에서 간단한 방법으로 실행할 수 있으며, 결과에 있어서도 유전적인 안전성을 나타내는 새로운 세포의 보존방법을 연구해 볼 필요가 있으리라 생각한다.

V. 참 고 문 헌

- Armitage WJ. Cryopreservation of animal cells. *Symp Soc Exp Biol* 1987; 41: 379-93.
- Bahadur G, Steele SJ. Ovarian tissue cryopreservation for patients. *Hum Reprod* 1996; 11(10): 2215-6.
- Bautista JA, Kanagawa H. Current status of vitrification of embryos and oocytes in domestic animals: ethylene glycol as an emerging cryoprotectant of choice. *Jpn J Vet Res* 1998; 45(4): 183-91.
- Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG. Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. *J Reprod Fertil* 1997; 110(1): 11-9.
- Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG. Restoration of normal reproductive lifespan after grafting of cryopreserved mouse ovaries. *Human Reprod* 2000; 15(6): 1300-4.
- Crowe JH, Carpenter JF, Crowe LM. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 70-103.
- Donnez J, Godin PA, Qu J, Nisolle M. Gonadal cryopreservation in the young patient with gynaecological malignancy. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2000; 12(1): 1-9.
- Eberl T, Salvenmoser W, Rieger G, Gorny I, Heiss V, Kumpitsch B, Gnaiger E, Margreiter R. Ultrastructural analysis of human endothelial cells after hypothermic storage in organ preservation solutions. *J Surg Res* 1999; 82(2): 253-60.
- Emiliani S, Van den Bergh M, Vannin AS, Biramane J, Englert Y. Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. *Human Reprod* 2000; 15(4): 905-10.
- Fabrizi R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, Venturoli S, Flamigni C. Human oocyte cryopreservation:

- new perspectives regarding oocyte survival. *Human Reprod* 2001; 16(3): 411-6.
- Fahning ML, Garcia MA. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. *Cryobiology* 1992; 29(1): 1-18.
- Fuller BJ, Rubinacci A, Geboes K, De Loecker W. The bioenergetics of mitochondria after cryopreservation. *Cryobiology* 1989; 26(4): 333-40.
- Gook DA, Edgar DH. Cryopreservation of the human female gamete: current and future issues. *Hum Reprod* 1999; 14(12): 2938-40.
- Gook DA, Edgar DH, Stern C. Effect of cooling rate and dehydration regimen on the histological appearance of human ovarian cortex following cryopreservation in 1,2-propanediol. *Hum Reprod* 1999; 14(8): 2061-8.
- Gunasena KT, Lakey JR, Villines PM, Bush M, Raath C, Critser ES, McGann LE, Critser JK. Antral follicles develop in xenografted cryopreserved African elephant (*Loxodonta africana*) ovarian tissue. *Anim Reprod Sci* 1998; 53(1-4): 265-75.
- Gunasena KT, Lakey JR, Villines PM, Critser ES, Critser JK. Allogeneic and xenogeneic transplantation of cryopreserved ovarian tissue to athymic mice. *Biol Reprod* 1997; 57(2): 226-31.
- Gunasena KT, Villines PM, Critser ES, Critser JK. Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries. *Hum Reprod* 1997; 12(1): 101-6.
- Henry MA, Noiles EE, Gao D, Mazur P, Critser JK. Cryopreservation of human spermatozoa. IV. The effects of cooling rate and warming rate on the maintenance of motility, plasma membrane integrity, and mitochondrial function. *Fertil Steril* 1993; 60(5): 911-8.
- Holt WV. Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 1997; 9(3): 309-19.
- Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 18 62(1-3): 3-22.
- Holt WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 2000; 1 53(1): 47-58.
- Hovatta O. Cryopreservation and culture of human primordial and primary ovarian follicles. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 27 169(1-2): 95-7.
- Jackowski S, Leibo SP, Mazur P. Glycerol permeabilities of fertilized and unfertilized mouse ova. *J Exp Zool* 1980; 212: 329-41.
- Katkov II, Katkova N, Critser JK, Mazur P. Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. *Cryobiology* 1998; 37(4): 325-38.
- Kim SK, Belzer FO, Southard JH. Loss of mitochondrial respiratory function and its suppression during cold ischemic preservation of rat livers with University of Wisconsin solution. *Hepatology* 1992; 16(3): 742-8.
- Kuleshova LL, MacFarlane DR, Trounson AO, Shaw JM. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology* 1999; 38(2): 119-30.

- Mandelbaum J, Belaisch-Allart J, Junca AM, Antoine JM, Plachot M, Alvarez S, Alnot MO, Salat-Baroux J. Cryopreservation in human assisted reproduction is now routine for embryos but remains a research procedure for oocytes. *Hum Reprod* 1998; 13 Suppl 3: 161-74.
- Matsuda H, Yagi T, Matsuoka J, Yamamura H, Tanaka N. Subzero nonfreezing storage of isolated rat hepatocytes in University of Wisconsin solution. *Transplantation* 1999; 15 67(1): 186-91.
- Mazur P, Katkov II, Katkova N, Critser JK. The enhancement of the ability of mouse sperm to survive freezing and thawing by the use of high concentrations of glycerol and the presence of an *Escherichia coli* membrane preparation (Oxyrase) to lower the oxygen concentration. *Cryobiology* 2000; 40(3): 187-209.
- Mazzilli F, Rossi T, Sabatini L, Pulcinelli FM, Rapone S, Dondero F, Gazzaniga PP. Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species (ROS) production. *Acta Eur Fertil* 1995; 26(4): 145-8.
- Mijamoto H, Ishbashi T. Protective action of glycols against freezing damage of mouse and rat embryos. *J Reprod Fert* 1978; 54: 427-32.
- Newton H, Fisher J, Arnold JRP, Pegg DE, Faddy MJ, Gosden RG. Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. *Human Reprod* 1998; 13(2): 376-80.
- Newton H, Illingworth P. In-vitro growth of murine pre-antral follicles after isolation from cryopreserved ovarian tissue. *Human Reprod* 2001; 16(3): 423-9.
- Noto V, Campo R, Roziers P, Swinnen K, Vercruyssen M, Gordts S. Mitochondrial distribution after fast embryo freezing. *Hum Reprod* 1993; 8(12): 2115-8.
- Nugent D, Newton H, Gallivan L, Gosden RG. Protective effect of vitamin E on ischaemia-reperfusion injury in ovarian grafts. *J Reprod Fert* 1998; 114(2): 341-6.
- Oda K, Gibbons WE, Leibo SP. Osmotic shock of fertilized mouse ova. *J Reprod Fert* 1992; 95: 737-47.
- O'Flaherty C, Beconi M, Beorlegui N. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *Andrologia* 1997; 29(5): 269-75.
- O'Flaherty CM, Beorlegui NB, Beconi MT. Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Theriogenology* 1999; 15 52(2): 289-301.
- Ohkohchi N, Endoh T, Oikawa K, Seya K, Satomi S. Fragility of the electron transport chain and superoxide generation in mitochondria of the liver graft after cold ischemia. *Transplantation* 1999; 27 67(8): 1173-7.
- Oktay K, Newton H, Aubard Y, Salha O, Gosden RG. Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology? *Fertil Steril* 1998; 69(1): 1-7.
- Porcu E. Freezing of oocytes. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1999; 11(3): 297-300.
- Ruiz T, Erk I, Lepault J. Electron cryo-microscopy of vitrified biological specimens: towards high spatial and temporal resolution. *Biol Cell* 1994; 80(2-3): 203-10.
- Sammur IA, Burton K, Balogun E, Sarathchandra P, Brooks KJ, Bates TE, Green CJ. Time-dependent impairment of mitochondrial function after storage and transplantation of rabbit kidneys. *Transplantation* 2000; 69(7): 1265-75.
- Sampson EJ, McKneally SS, Whitner VS, Burtis CA, Bayse DD. Relative stabilities of purified human

- mitochondrial and cytoplasmic isoenzymes of aspartate aminotransferase in lyophilized materials. *Clin Chem* 1979; 25(5): 659-64.
- Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology* 2000; 1 53(1): 59-72.
- Shibuya H, Ohkohchi N, Seya K, Satomi S. Kupffer cells generate superoxide anions and modulate reperfusion injury in rat livers after cold preservation. *Hepatology* 1997; 25(2): 356-60.
- Smitz J, Cortvrindt R. Follicle culture after ovarian cryostorage. *Maturitas* 1998; 12 30(2): 171-9.
- Storey KB. Living in the cold: freeze-induced gene responses in freeze-tolerant vertebrates. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999; 26(1): 57-63.
- Tomlinson M, Sakkas D. Is a review of standard procedures for cryopreservation needed?: safe and effective cryopreservation-should sperm banks and fertility centres move toward storage in nitrogen vapour? *Hum Reprod* 2000; 15(12): 2460-3.
- Upreti GC, Jensen K, Oliver JE, Duganzich DM, Munday R, Smith JF. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. *Anim Reprod Sci* 1997; 48(2-4): 269-78.
- Vajta G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animal. *Anim Reprod Sci* 2000; 2 60-61: 357-64.
- Vara E, Arias-Diaz J, Villa N, Hernandez J, Garcia C, Ortiz P, Balibrea JL. Beneficial effect of S-adenosylmethionine during both cold storage and cryopreservation of isolated hepatocytes. *Cryobiology* 1995; 32(5): 422-7.
- Vreugdenhil PK, Belzer FO, Southard JH. Effect of cold storage on tissue and cellular glutathione. *Cryobiology* 1991; 28(2): 143-9.
- Wang AW, Zhang H, Ikemoto I, Anderson DJ, Loughlin KR. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology* 1997; 49(6): 921-5.
- Wolf J, Bryant G. Freezing, drying, and/or vitrification of membranesolute-water systems. *Cryobiology* 1999; 39(2): 103-29.
- Zhang J, Liu J, Xu KP, Liu B, DiMattina M. Extracorporeal development and ultrarapid freezing of human fetal ova. *J Assist Reprod Genet* 1995; 12(6): 361-8.