

B-10 초급속 유리화 동결-융해한 인간 포배기 배아의 생존율을 높이기 위한 항동해제 제거방법에 관한 연구

마리아 병원

조현진 · 윤혜진 · 박성진 · 이석원 · 손원영 · 윤산현 · 이원돈 · 임진호

목 적: 포배기 배아의 초급속 유리화 동결법은 비용절감은 물론 시간절약의 효과가 크다고 보고되어 왔다. 이에 본 연구는 초급속 유리화 동결했던 인간 포배기 배아를 융해한 후 6-단계로 항동해제를 제거했을 때 기존의 2-단계로 항동해제를 제거했을 때와 그 생존율에 있어서 어떠한 차이가 있는지를 비교 조사한 것이다.

대상 및 방법: 본원의 배양시스템을 통하여 3PN-zygotes로부터 생산된 인간 포배기 배아와 정상적인 2PN-zygotes로부터 생산되어 환자의 자궁에 이식하고 남은 인간 포배기 배아를 한시적으로 EM-grid (electron microscopic grid)를 이용하여 초급속 유리화 동결하였다. 3PN-zygotes로부터 생산된 포배기 배아를 융해한 다음 일반적으로 알려진 방법으로 항동해제를 제거했을 때 그 생존율이 포배기 배아의 발달단계에 따라 차이가 있었고, 냉동기계를 이용하여 느리게 동결했던 포배기 배아의 생존율보다 유의하게 낮았다. 이에 항동해제의 제거방법을 일반적인 방법에서 6-단계로 완만하게 제거하는 방법으로 바꾸기로 하였다. 본 연구에서 초급속 유리화 동결한 인간 포배기 배아는 전핵기에 있는 수정란을 난구세포와 함께 난포액이 첨가된 배양액 (YS+10% hFF) 10 μ l에서 4~5일 동안 공배양하므로써 생산되었던 것들이며, 환자의 자궁에 이식하고 남은 것들이었다. 이들은 발달단계에 따라 초기, 초기팽윤, 중기팽윤, 말기팽윤 포배기 배아 (각각, ErB: early blastocyst; EEB: early expanding blastocyst; MEB: middle expanding blastocyst; EdB: expanded blastocyst)로 나누었다. 초급속 유리화 동결하기 위한 평형용액은 20% ethylene glycol (EG)과 20%의 난포액이 첨가된 m-DPBS 용액 (m-DPBS containing 20% hFF)이었으며, 동결용액은 20%의 난포액이 첨가된 m-DPBS 용액에 40% EG, 18% Ficoll 및 0.3 M sucrose를 첨가한 것이었다. 동결된 포배기 배아는 해당 환자가 배란한 후 3~4일째에 융해하여 이식할 때까지 난구세포와 공동 배양하였다. 일반적으로 알려진 항동해제의 제거방법은 0.3 M sucrose 용액으로 포배기 배아를 옮겼다가 1.5분 후에 배양하는 방법이었고, 본 연구자들이 고안한 방법은 6-단계로서 0.5 M sucrose 용액에서 3분, 0.4 M sucrose 용액에서 1.5분, 0.3 M sucrose 용액에서 1.5분, 0.2 M sucrose 용액에서 1.5분, 0.1 M sucrose 용액에서 1.5분 옮겼다가 배양하는 방법이었다. 동결-융해한 후 생존율은 18시간 동안 배양하여 포배기 배아가 정상적으로 회복되는지의 여부에 따라 판단하였으며 그에 따른 임신율과 출산율도 조사하였다.

결 과: 3PN-zygotes로부터 생산된 포배기 배아들을 초급속 유리화 동결 및 융해하여 6-단계를 거쳐 항동해제를 완만하게 제거하였을 때 생존율은 82.6% (100/121)로 나타났다. 이는 일반적인 2-단계 방법의 50.6% (87/172) 보다 유의하게 개선되었다. 한편 이와 같은 근거를 토대로 39명의 환자를 대상으로 초급속 유리화 동결을 실시하였다가 융해한 후 6-단계로 항동해제를 완만하게 제거하였을 때, 그 생존율은 84.1%였고 임신율은 33.3%로 나타났다. 현재까지 건강한 남아 6명과 여아 3명이 출생하였다.

결 론: 본 연구의 결과는 6-단계로 항동해제를 완만하게 제거하는 방법이 rehydration 동안에 항동해제의 해가 부분적으로 있으리라 생각되지만 삼투압의 손상을 최소화 할 수 있기 때문에 초급속 유리화 동결-보존된 포배기 배아의 생존율을 높일 수 있다는 것을 제시하고 있다.