

## Cryopreservation and Culture of Preantral Follicles Within Ovary

### Preantral Follicle의 냉동보존과 체외배양

축산기술연구소 응용생명공학과

김 동 훈

#### I. 서론

성숙 및 미성숙 난자의 동결보존에 있어서 가장 큰 한계는 이러한 발달단계까지 성장하는 난자의 수가 제한되어 있다는 것이다. 따라서 이러한 문제점을 해결할 수 있는 대안은 보다 풍부한 초기단계의 난포를 동결보존하는 것이다. 그리고 preantral follicle 내에 존재하는 난자는 성숙 혹은 미성숙 난자에 비하여 외부환경에 민감한 organell의 수가 적으며, 대사적 활성이 작으며, 저온에 대한 민감성이 작다는 생리적 장점이 있다.

최근에 난소조직 및 preantral follicles의 동결보존은 경제적 가치가 높은 실험동물 및 가축 그리고 멸종위기동물의 유전자원 보존이라는 측면에서 유용한 방법으로 인식되어지고 있다. 또한 의료분야에서는 조기폐경의 위험을 가진 여성, 암치료를 위해 방사선치료나 화학치료를 받아야 하는 여성에 있어서 차후에 생식능력을 회복시켜 줄 수 있는 방법으로의 이용가능성이 제시되고 있다.

따라서 본 고에서는 preantral follicles의 동결보존과 그 이용 방법에 대하여 살펴보고자 한다.

#### II. Preantral Follicles의 동결보존

Preantral follicles의 동결 방법은 크게 두 가지로 대별할 수 있다. 첫 번째는 난소조직 자체를 동결보존하는 방법이며, 두 번째는 난소조직으로부터 분리된 preantral follicles을 동결보존하는 방법이다.

##### 1. 난소조직의 동결보존

일반적으로 난소조직이 단단하고 치밀한 사람, 소 그리고 양은 난소조직을 작은 조각으로 만들어서 동결을 한다 (Newton 등, 1999). 따라서 동결보존을 위하여 난소피질 부분만을  $\sim 0.2 \text{ mm}^3$  크기의 조각으로 만들어서 동결을 하게 된다. 생쥐와 같이 난소조직이 단단하지 않은 경우에는 항동해제의 투과가 용이하기 때문에 난소 전체의 동결보존이 가능하다 (Candy 등, 1997; Kim 등, 2002).

동결보존을 위하여 사용된 항동해제에 있어서는, 많은 연구자들이 1.0~1.5 M의 DMSO를 주로 이용하고 있다 (Newton 등, 1998, Kim 등, 2002). 그러나, 일부 연구자들은 PROH (Demirci 등, 2001), Ethylene glycol (EG) (Aubard 등, 1998) 그리고 Glycerol (Candy 등, 1997)의 이용을 보고하고 있다. 그러나 연구자들의 결과를 종합해 보면, 난소조직의 동결보존에는 DMSO, EG, 그리고 PROH가 적합한 항동해제인 것으로 사료된다.

난소조직을 의한 동결 방법은 주로 완만동결법 (Aubard 등, 1998)이 이용되고 있으며, 몇몇 연구자들에 의하여 vitrification 방법 (Sugimoto 등, 2000)이 시도되고 있다. 완만동결을 위한 protocol은 oocyte와 embryo에서 이용되는 방법과 동일하게 시행을 하고 있다. 그러나 난소조직의 경우에는 여러 종류의 세포가 존재하고 또한 구조 자체가 복잡하기 때문에 보다 향상된 결과를 얻기 위해서는 난소조직의 동결만을 위한 protocol이 개발되어야 할 것이다.

## 2. 난소조직으로부터 분리된 preantral follicles의 동결보존

Preantral follicles의 동결보존에 관한 연구는 난소조직의 동결에 관한 연구에 비하여 상대적으로 많이 이루어져 있지 않다. 많은 연구가 진행되지 않은 이유는 첫 번째로 preantral follicle의 분리가 쉽지 않다는 것이다. 특히 사람, 소 그리고 면양과 같이 난소조직이 단단한 경우에는 더욱 preantral follicles의 분리가 용이하지 않다. 두 번째로는 preantral follicles을 배양하기 위한 체외배양 방법이 생쥐를 제외하고는 확립되어 있지 않기 때문이다.

난소조직의 동결보존과 비교했을 때, Preantral follicles의 동결보존의 장점은 첫 번째로 동결보존 전에 follicle의 수적, 질적 평가가 가능하며, 두 번째로 정확한 갯수의 follicle의 용해가 가능하며, 세 번째로 follicles의 체외배양과 성숙을 통하여 질병의 전이를 예방할 수 있다는 것이다.

Preantral follicles의 동결보존을 위하여 사용되는 항동해제는 난소조직과 마찬가지로 DMSO를 주로 이용하고 있으며, 그 외에 PROH와 EG를 이용하고 있다. 동결 방법에 있어서는, Carroll 등 (1990)이 최초로 완만동결법을 이용하여 생쥐 preantral follicles의 동결에 성공한 이후 주로 완만동결법을 이용하였다. 그러나 최근에 Dela Peña 등 (2002)이 vitrification 방법을 이용하여 성공적인 생쥐 preantral follicles의 동결을 보고함으로써 vitrification 방법도 preantral follicles의 동결보존에 유용한 방법이 될 수 있음을 제시하였다.

Preantral follicles의 동결보존에 관한 최초의 연구는 생쥐에서 이루어졌으며, 최근에는 고양이 (Jewgenow 등, 1998)와 면양 (Amorim 등, 2003)에서도 연구 결과가 보고되고 있다.

## III. 동결보존된 Preantral Follicles의 이용

동결보존되었던 난소조직 혹은 분리된 preantral follicles을 이용할 수 있는 방법은, 첫 번째로 체내로 이식 (transplantation)을 하는 방법, 두 번째로 preantral follicles을 체외배양하는 방법, 마지막으로 germinal vesicle (GV)을 이식하는 방법이 있다.

### 1. 체내이식 (transplantation)

#### 1) 자가이식 (autotransplantation)

동결보존된 난소조직을 자신의 체내에 이식하기 위한 방법으로서 이것은 다시 동소이식 (orthotopic-transplantation)과 이소이식 (heterotopic-transplantation)으로 구별할 수 있다.

원래 난소의 위치에 이식하는 동소이식은 동물실험에서만 연구 결과가 보고되고 있다. 생쥐에서는 난소조직을 이식한 이후 정상적인 산자의 출생을 보고하고 있으며 (Parrott, 1960; Gunasena 등, 1997; Sztajn 등, 1998), 또한 면양에서도 성공적인 산자 출생을 보고하고 있다 (Gosden 등, 1994; Salle 등, 2002). 원래 난소의 위치가 아닌 다른 부위에 이식하는 이소이식의 경우에는 사람에게서 보고되고 있

으며, 이식 부위는 피하 (Oktay 등, 2001), retus muscle (Callejo 등, 2001) 등을 이용하고 있다.

## 2) 이종간이식 (Xenotransplantation)

동결보존된 난소조직을 이종동물에 이식하기 위한 방법으로서, 일반적으로 면역결핍 생쥐인 SCID (Severe combined immune deficiency) 생쥐에 난소조직을 이식하게 된다.

난소조직의 이종간 이식은 사람에게서 많이 연구되고 있으며, 이식된 난소조직 내 primordial follicle 이 antral stage까지 성장하는 것으로 보고되고 있다 (Oktay 등, 2000; Kim 등, 2002). 그렇지만 이 방법을 이용하여 사람 난소조직을 이식하는 것은 사람의 난자를 다른 동물에서 성장시킨다는 윤리적 문제점을 안고 있다.

## 2. Preantral follicles의 체외배양

체외배양 방법은 동결보존된 preantral follicles 혹은 동결보존된 난소조직으로부터 분리된 preantral follicle로부터 성숙 난자를 생산하기 위하여 이용될 수 있다.

생쥐의 경우에는 동결보존된 preantral follicles을 체외 성장, 성숙, 수정 그리고 수정란 이식을 실시하여 정상적인 산자의 출생을 보고하고 있다 (Carroll 등, 1990; Dela Penã 등, 2000). 그리고 동결보존된 난소조직으로부터 분리한 preantral follicles도 체외배양 및 수정을 시킨 결과 배반포까지 발달하는 것으로 보고되고 있다 (Kim 등, 2002).

다른 동물의 경우에는, 면양에서만 동결보존된 난소조직으로부터 분리된 preantral follicles이 antral stage까지 성장되었다고 보고하고 있다 (Newton 등, 1999). 한편 사람의 경우에는 미동결된 preantral follicles을 배양하여 antral stage까지 성장되었다는 보고만 있을 뿐, 아직까지 동결보존된 preantral follicles을 배양한 결과는 보고되지 않고 있다.

## 3. Germinal Vesicle (GV) 이식

GV 이식 방법은 preantral follicles의 장기간 배양을 생략하고 단기간에 성숙 난자를 생산하기 위한 방법이다. 이것은 동결보존된 난소조직 혹은 preantral follicles 내의 미성장 상태의 미성숙 난자로부터 GV를 분리한 다음에 GV가 제거된 완전 성장된 미성숙 난자의 세포질에 분리된 GV를 주입하고, 이것을 전기융합하여 새로운 난자를 만드는 방법이다.

생쥐의 경우에는, 최근에 Wang 등 (2002)이 동결보존된 난소조직으로부터 primordial follicles을 분리하여 GV 이식을 실시한 결과 성숙 난자로까지 발달하였다고 보고를 하고 있다.

사람의 경우에는 preantral follicles을 이용한 연구는 보고되지 않고 있다. 그러나 동결하지 않은 미성숙 난자간의 GV 이식을 통하여 성숙 난자로 발달이 이루어진다고 몇몇 연구자들이 보고하고 있다 (Zhang 등, 1999).

## IV. 결론

90년대 이후에 연구자들의 노력에 의하여 preantral follicle 동결보존과 그 이용에 있어서 많은 발전이 있어 왔지만, 현실적으로 사람과 대동물에서의 실제적 이용을 위해서는 더 많은 연구가 요구된다. 현재 이용되는 동결 방법은 수정란 혹은 미수정란의 동결 방법을 적용한 것으로서 여러 가지 세포의 복합체인 follicle을 위한 완전한 방법이 될 수가 없으므로 preantral follicle에 적합한 동결 방법이 제시되

어야 할 것이다. 동결보존된 preantral follicle의 이용에 있어서는, 체내이식된 난소조직 내 follicle은 생존과 성장을 향상시킬 수 있는 방법이 모색되어야 하며, 그리고 생쥐에서와 마찬가지로 preantral follicle을 체외에서 성숙 난자로까지 성장시킬 수 있는 체외배양 체계의 확립이 이루어져야 할 것이다.

앞에서 언급한 내용들이 해결되었을 때, Preantral follicles의 동결보존은 여성의 생식능력을 보존하고, 멸종위기동물, 희귀동물 그리고 경제적 가치가 높은 동물의 유전적 자원을 보존하는데 있어서 진정으로 가치있는 분야가 될 수 있을 것이다.

## 참 고 문 헌

- Amorim CA, Rodrigues APR, Rondina D, Goncalves PBD, Figueiredo JR, Giorgetti A. Cryopreservation of ovine primordial follicles using dimethyl sulfoxide. *Fertil Steril* 2003; 79: S1-S5.
- Aubard Y, Newton H, Scheffer G, Gosden RG. Conservation of the follicular population in irradiated rats by the cryopreservation and orthotopic autografting of ovarian tissue. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1998; 79: 83-7.
- Callejo J, Salvador C, Miralles A, Vilaseca S, Laila JM, Balasch J. Long-term ovarian function evaluation after autografting by implantation with fresh and frozen-thawed human ovarian tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4489-94.
- Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG. Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. *J Reprod Fertil* 1997; 110: 11-9.
- Carroll J, Whittingham DG, Wood MJ, Telfer E, Gosden RG. Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. *J Reprod Fertil* 1990; 90: 321-7.
- Dela Peña EC, Takahashi Y, Katagiri S, Atabay EC, Nagano M. Birth of pups after transfer of mouse embryos derived from virified pre-antral follicles. *Reproduction* 2002; 123: 593-600.
- Demirci B, Lornage J, Salle B, Frappart L, Franck M, Guerin JF. Follicular viability and morphology of sheep ovaries after exposure to cryoprotectant and cryopreservation with different freezing protocols. *Fertil Steril* 2001; 75: 754-62.
- Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196°C. *Hum Reprod* 1994; 9: 597-603.
- Gunasena KT, Villines PM, Critser ES, Critser JK. Live births after autologoustransplant of cryopreserved mouse ovaries. *Hum Reprod* 1997; 12: 101-6.
- Jewgenow K, Penfold LM, Meyer HHD, Wildt DE. Viability of small pre-antral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. *J Reprod Fertil* 1998; 112: 39-47.
- Kim DH, Lee HC, Ko DS, Lee HJ, Park WI, Kim SS. In vitro growth and maturation of preantral follicles isolated from vitrified mouse ovaries. *Fertil Steril* 2002; 78: S268.
- Kim SS, Soules MR, Battaglia DE. Follicular development, ovulation, and corpus luteum formation in cryopreserved human ovarian tissues after xenotransplantation. *Fertil Steril* 2002; 78: 77-82.
- Newton H, Fisher J, Arnild JRP, Pegg DE, Faddy MJ, Gosden RG. Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. *Hum Reprod* 1998; 13: 376-80.

- Newton H, Picton H, Gosden RG. In vitro growth of oocyte-granulosa cell complex isolated from cryopreserved ovine tissue. *J Reprod Fertil* 1999; 115: 141-50.
- Oktay K, Economos K, Kan M, Rucinski J, Veeck L, Rosenwaks Z. Endocrine function and oocyte retrieval after autologous transplantation of ovarian cortical strips to the forearm. *JAMA* 2001; 286: 1490-3.
- Oktay K, Newton H, Gosden RG. Transplantation of cryopreserved human ovarian tissue results in follicle growth initiation in SCID mice. *Fertil Steril* 2000; 73: 599-603.
- Parrott DMV. The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue. *J Reprod Fertil* 1960; 1: 230-41.
- Salle B, Demirci B, Franck M, Rudigoz RC, Guerin JF, Lornage J. Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemi-ovaries into ewes. *Fertil Steril* 2002; 77: 403-8.
- Sugimoto M, Maeda S, Manabe N, Miyamoto H. Development of infantile rat ovaries autotransplanted after cryopreservation by vitrification. *Theriogenology* 2000; 53: 1093-103.
- Sztejn J, Sweet H, Farley J, Mobraaten L. Cryopreservation and orthotopic transplantation of mouse ovaries: new approach in gamete banking. *Biol Reprod* 1998; 58: 1071-4.
- Wang CW, Lai YM, Chan PR, Horng SG, Chang CL, Chen CK, Wu HM, Huang HY, Wang HS, Soong YK. Resumption of meiosis-I after transfer of mouse primordial oocytes from frozen-thawed ovarian tissue to enucleated preovulatory oocytes: a preliminary report. *J Assist Reprod Genet* 2002; 19: 493-9.
- Zhang J, Wang CW, Krey L, Liu H, Meng L, Blaszczyk A, Adler A, Grifo J. In vitro maturation of human preovulatory oocytes reconstructed by germinal vesicle transfer. *Fertil Steril* 1999; 71: 726-31.
-