

O-2 Slush 액체질소와 Sodium-Depleted 용액을 이용한 유리화 동결이 마우스와 인간 난자의 동결/융해 후 생존율과 발생률에 미치는 영향

차수경 · 김형구 · 이동률 · 정형민 · 차광열 · 윤태기

포천중문의과대학교 차병원 여성의학연구소

Background & Objectives: 난자의 동결보존 프로그램은 미혼의 항암치료 또는 난소절제술을 받은 환자, 그리고 여러가지 이유로 출산을 미루려는 여성에게 생식능력을 유지해줄 수 있는 보조생식술의 하나로 발전하고 있다. 최근 들어 최근 인간을 포함한 포유동물의 난자와 배아의 동결에 초급속 유리화 동결의 도입으로 증가된 임신성공율이 보고된 바 있으나 그 성공률은 다른 보조생식술에 비해 아직 저조하며, 이는 동결/융해 후 저조한 생존율과 배발달율에 기인한다. 유리화 동결 과정 중 액체 질소에 노출될 때 액체 질소의 기화로 인한 가스 방울들로 인해 열전도 효율이 떨어지게 되어, 결국 유리화 동결 후 배아 발달율이 떨어지는 결과를 가져오게 된다. 또한 모든 배양액의 주요성분인 Sodium 이온이 동결시 고농도의 sodium 이온이 cell 내에 들어오면 "solution effects"로 인해 배아발달에 손상을 입힌다는 보고가 있다. 따라서 본 연구는 이를 극복하기 위해 유리화동결에 sodium-depleted 용액과 슬러시 (slush) 상태의 액체 질소를 도입하여 동결/융해 후 난자의 생존율과 배발달에 미치는 영향을 알아보고자 수행하였다.

Method: 과배란 시킨 암컷 ICR 생쥐에서 난자를 회수하였고 또한 IVF로 환자로부터 수정에 실패한 난자를 회수하여 4군으로 분류하였다 (1군: NaCl-based DPBS용액으로 유리화 동결한 군, 2군: NaCl-based DPBS용액과 Slush 액체질소를 이용하여 유리화 동결한 군, 3군: Choline chloride (ChCl)-based DPBS용액으로 유리화 동결한 군, 4군: ChCl-based DPBS용액과 Slush 액체질소를 이용하여 유리화 동결한 군). 모든 난자를 1.5 M ethylene glycol (EG)가 첨가된 DPBS 또는 ChCl-based DPBS에 2.5 시간 전 처리하였고 5.5 M EG 와 1.0 M sucrose가 첨가된 DPBS 또는 ChCl-based DPBS에 20초간 처리하였다. 난자를 Grid에 올린 후 직접 액체 질소에 또는 슬러시 상태의 액체 질소 (Vit-Master TM, MTG)에 침지하였다. 동결된 난자는 급속융해 한 후 sucrose를 이용한 5단계 방법 (1.0, 0.5, 0.25, 0.125, DPBS 또는 ChCl-based DPBS)으로 동결 억제제를 제거하고, 회수하여 생존율을 분석하였다. 또한 동결/융해 후 생쥐 난자는 수정시킨 다음 5일간 배양하여 배발달율을 확인하였다.

Results: 동결 융해 후 생쥐 난자의 회수율과 생존율에서는 4군에서 모두 차이가 없었다. 또한 수정율 (38.5, 39.7, 41.7, 41.2%)과 배발달율 (11.1, 15.0, 13.6, 12.5%)에서도 모든군에서 차이가 없었다. 그러나 사람 난자에서는 4군 (94.5%)에서 1, 2, 3군 (81.6, 83.0, 84.1%)보다 높은 생존율을 얻었다.

Conclusions: 이상의 결과를 종합했을 때 슬러시 상태의 액체질소와 ChCl-based DPBS를 이용한 유리화 동결은 안전하고 효율적인 인간난자동결방법으로 사용될 수 있는 것으로 사료된다.