: 30 3 2003
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 30, No. 3, 2003, 9

인간포배기 배아의 효과적인 유리화 동결법의 개발을 위한 연구

대구 마리아 산부인과[1], 서울 마리아 병원[2], 대구대학교 식품 생명 화학공학부[3]

이상민[1] · 이주희[1] · 이상원[1] · 이승민[1] · 윤산현[2] · 임진호[2] · 박흠대[3] · 이성구[1]

Study on the Development of Efficient Vitrification of Human Blastocysts

Sang Min Lee[1], Ju Hee Lee[1], Sang Won Lee[1], Seoung Min Lee[1], San Hyun Yoon[2], Jin Ho Lim[2], Huem Dai Park[3], Seong Goo Lee[1]

[1]Daegu Maria Infertility Clinic, [2]Seoul Maria Hospital,
[3]Division of Food, Biological and Chemical Engineering, Daegu University

Objective: The purpose of this study was to evaluate the survival rate of vitrified blastocyst according to the freezing vessels, equilibration time in cryoprotectant and artificial dehydration method.

Methods: Human blastocysts were vitrified after loading onto the plastic straw, open-pulled straw (OPS), electron microscopy grid (EM grid) for 1.5 min or 3 min. They also were directly plunged into LN_2 within 30sec. For artificial shrinkage of blastocysts, 36 gauge fine needle was pushed at the cellular junction of the trophectoderm into the blstocoele cavity until it shrank without damage of inner cell mass.

Results: The survival rate of vitrified blastocysts on plastic straw, OPS, EM grid as freezing vessels were 26.7, 13.0 and 60.5%, respectively. The survival rate of EM grid was significantly higher than that of plastic straw and OPS ($p<0.05$). For 1.5 min equilibrium, the survival rates of early blastocyst (EB), middle blastocyst (MB) and late blastocyst (LB) were 64.4, 81.0, and 20.0% respectively. For 3 min equilibrium, the survival rates of EB, MB, and LB were 69.9, 50.0 and 57.5% respectively. The survival rates of EB and MB were significantly higher than that of LB in 1.5 min equilibrium group ($p<0.05$), however, the significance was not observed in 3 min equilibrium groups. In cytoplasmic shrinkage before vitrification, the survival rates of EB, MB and LB were 92.9, 100 and 75.9% respectively. The survival rate of MB was significantly higher than that of LB ($p<0.05$). The survival rates of vitrified blastocysts by artificial dehydration and slow-frozen blastocysts were not significantly different as 88.9 and 66.7%, respectively.

Conclusion: This study showed that the vitrification of human blastocysts using EM grid and artificial dehydration is an effective method. Therefore, these methods would be an useful techniques for blastocyst cryopreservation.

Key Words: Cryopreservation, Artificial dehydration, Human blastocysts

연 락 저 자: 이상민, 우) 706-012 대구광역시 수성구 범어3동 2-1 삼성화재빌딩 9층, 마리아산부인과
Tel: (053) 943-6555, Fax: (053) 743-5519, e-mail: smlee@mariababy.com
주관책임자: 이성구, 우) 706-012 대구광역시 수성구 범어3동 2-1 삼성화재빌딩 9층, 마리아산부인과
Tel: (053) 943-6555, Fax: (053) 476-7331, e-mail: koo9406@unitel.co.kr

난구세포 혹은 체세포와의 공동배양과 배양액의 개발 등 배양조건이 개선됨에 따라 배반포까지 높은 체외 배발달률을 얻을 수 있다. 시험관 아기 시술에 있어서 생산되는 배반포는 수정 후 5일째 이식을 시행하므로 시기적으로 자연적인 수정란 발생과 착상에 적합하고, 또한 배반포까지의 배양을 통하여 양질 배아의 선별이 가능하기 때문에 착상률 및 임신율을 향상시킬 수 있으며, 특히 이식하는 배아의 수를 줄임으로써 다태임신을 줄일 수 있어 오늘날에는 주로 포배기 이식에 관한 연구가 활발하다. 한편 이식 후의 잉여 배반포는 동결보존하여 환자의 정신적, 경제적 부담을 줄이는 등 이용효율을 높이고 있다. 인간을 포함한 포유동물 배의 동결 및 융해 후 생존율에 영향을 미치는 요인으로는 동결방법, 배발생 단계, 세포내 탈수와 관련하여 동결보호제의 종류, 동결보존용기 등 다양한 인자들이 존재한다.[1,2]

동결방법으로는 완만동결법, 급속동결법, 그리고 고농도의 동결보호제와 세포내 초급속 탈수의 초급속 동결인 유리화 동결법 등이 있다. 완만동결법에서 단점은 고가의 동결장비와 동결시간이 길며 동결시 빙결정의 형성으로 세포장해의 가장 큰 원인이 된다. 이런 단점을 보완한 것이 초급속 동결법인 유리화 동결법이다. 이 방법은 고가의 장비가 필요없고 조작이 간단하며 동결시간도 대단히 짧다. 또 고삼투압의 동결보호제를 사용해서 배아를 액체와 고체의 중간인 겔 (gel) 상태로 초급속 동결보존하는 기술로서, 특히 세포내 빙결정이 생성되지 않아 융해 후 배아의 생존율이 높아졌기 때문에, 최근에 활발히 연구되고 있다. 유리화 동결의 효율성을 높이기 위해서는 동결보호제의 종류 및 냉각률을 고려한 보존용기의 선택이 중요하다. 동결보호제로는 저분자 물질로서, 세포골격유지를 담당하는 역할을 가진 glycerol, ethylene glycol, dimethyl sulphoxide, propylene glycol인 세포내 침투성 물질과, 고분자 물질로서 세포내 탈수를 강하게 유도하는 sucrose, trehalose 등인 세포내 비침투성 물질을 함께 사용한다. 또한 ficoll, polyvinylpyrrolidone (PVP), polyethylene glycol (PEG) 등과 같은 거대분자는 동결시 초급속 냉각속도로부터 세포내 환경을 안정화시켜 주는 물질로서 첨가하기도 한다. 따라서 동결보호제의 선택은 동결 · 융해 후 배아의 생존율에 중요한 영향을 미친다. 단일용액의 사용보다는 침투성과 비침투성 물질을 혼합하면 더욱 효과적이다.[3] 최근에는 ethylene glycol, ficoll 및 sucrose를 혼합한 용액 (EFS)을 많이 이용하며, 특히 EFS 용액을 이용하여 토끼, 생쥐, 소, 인간 등에서 성공적인 동결이 보고되었다.[4~8]

고농도의 동결보호제 사용은 세포내 과탈수에 의한 세포 기능의 장해가 우려되기 때문에 동결보호제에 대한 배아의 노출시간은 대단히 중요하다. 특히 큰 배반포강을 가진 배반포는 동결보호제가 충분히 침투하기 전에 독성에 의해 손상을 입기 때문에 배의 노출시간과 더불어 2단계 동결법이 효과적이라고 보고된 바 있다.[6] 따라서 배반포의 충분한 탈수를 위해 적당한 동결보호제 선택 및 처리시간과 효과적인 탈수유도방법이 필요하다.

유리화 동결성공의 또 다른 요인은 동결보존용기이며, 일반적으로 동결보존용기로는 plastic straw, EM grid, cryoloop 등 여러 종류들이 사용되고 있다. 그러나 동결보존용기를 곧바로 액체질소에 침지하였을 경우 동결보존용기에 따라 냉각속도에서 많은 차이를 나타내었다. 그 중 냉각속도율이 가장 높은 electron microscopy grid (EM grid)의 사용은 소의 미수정란에 한정되어져 왔지만,[9,10] Park 등은 소 배반포에서도 동결에 성공하였으며, 인간의 배반포에서도 이 방법의 적용이 가능할 것으로 생각된다.[7]

따라서 본 연구는 인간 체외수정-배아이식의 프로그램에서 생산된 배반포를 이용하여 동결보존시 유리화 동결법에 있어서 동결 · 융해 후 생존율에 미치는 세포내 효과적인 탈수방법과 더불어 노출시간 및 동결보존용기로서 EM grid의 사용효과를 검토하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

본 연구는 본원의 IVF-ET 프로그램에 참여한 환자 중 배아이식 후 남은 배반포를 유리화 동결을 실시한 83주기를 대상으로 하였다. 실험적인 결과는 같은 기간 동안 생산된 비정상적인 수정란 유래의 배반포를 이용하여 동결융해 후의 생존율을 조사하였다.

2. 과배란 유도 및 체외수정과 배양

대상 환자에서 GnRH-agonist (Buserelin, Suprefact, Hoechst)와 FSH/hMG를 병용한 황체기 장기투여법으로 과배란을 유도하였으며, 난포의 직경이 17~18 mm 이상인 것이 2개 이상 확인될 경우 hCG (profasi, Serono)을 투여하였고, 36~38시간 후 질식 초음파를 이용하여 난포란을 채취하였다.

채취된 난자는 성숙을 확인한 후 10%의 인간난포액이 함유된 YS배양액에서 정자의 최종농도를 1×10^5 cells/ml로 조정하여 37℃, 5% CO_2 배양기에서 체외수정을 유도하였다. 체외수정 유도 후 14~18시간째에 정상 수정난자는 미리 준비한 난구세포와 37℃, 5% CO_2 배양기에서 공동배양하였다. 배양 후 24시간마다 20% hFF 첨가된 신선 YS배양액으로 교환하면서 5일 동안 배양하여 배반포로의 발달을 관찰하고, 형태적으로 양질의 배아를 이식하였으며, 잉여의 배반포는 동결하였다. 한편, 제2극체가 존재하면서 비정상적인 수정난자 (1개의 전핵 또는 3개 이상)를 구분하여 상기의 방법대로 별도로 5~6일 배양하여 발생한 배반포도 동결하였다. 생산된 배반포는 배반포강의 형성시기 및 크기에 따라 EB (초기배반포), MB (중기배반포), LB (후기배반포)로 구분하여 실험에 공시하였다.[11]

3. 포배란의 유리화 동결

1) 동결액 및 융해액 제조

유리화 동결액은 기초동결액 (PBS)에 20% (v/v) ethylene glycol (EG: Sigma, E-9129)을 첨가한 용액 (EG20)과, 기초동결액에 40% (v/v) EG, 18% (w/v) Ficoll (MW 70,000; Sigma, F-2878), 0.3 M Sucrose를 첨가한 용액 (EFS40)이다. 동결보존 후의 융해액은 기초동결액에 각각 0.5 M과 0.25 M의 Sucrose를 첨가한 용액이다.

2) 동결 및 융해방법

유리화 동결은 실온에서 2단계로 실시하였다. 먼저 EG20에서 1.5~3분간 처리한 후, EFS40에 옮겨 30초~1분 이내에 각각의 보존용기에 1~5개의 배반포를 장진하여 액체질소에 바로 침지하였다. 동결된 배아의 융해는 실온에서 0.5 M, 0.25 M Sucrose 용액에서 각각 5분, Sucrose 무첨가 기초동결액에서 5분간을 순차적으로 처리하여 동결액을 제거하였다.

3) 동결보존용기

(1) Plastic straw를 이용한 유리화 동결

0.25 ml plastic straw를 이용한 유리화 동결은 EG-20에서 1.5분간 처리하고 EFS40으로 옮긴 후 1분 이내에 액체질소에 침지하였다. 융해는 straw를 공기중에 5초간 노출시킨 뒤 실온의 물에서 10초간 침지하여 행하였으며, 동결액의 제거는 상기의 방법에 준하였다.

(2) Open pulled straw (OPS)를 이용한 유리화 동결

OPS를 이용한 유리화 동결은 EG20에서 1.5분간 처리하고 EFS40으로 옮긴 후, 배반포만 함유할 수 있을 정도의 1 μl 용액을 이용하여 배아를 장진하여 곧바로 액체질소에 침지하였다. 융해는 0.5 M Sucrose 용액에 OPS를 담그고 반대편 끝부분을 손가락으로 막아 OPS내 용적의 팽창에 의해 배아를 회수한 다음 동결액의 제거는 상기의 방법에 준하였다.

(3) EM grid를 이용한 유리화 동결

400 mesh copper EM grid (IGC 400; Pelco International)를 이용한 유리화 동결은 EG20에서 1.5~3분간 처리하고 EFS40으로 옮겨 EM grid 위에 배아를 놓고 액체질소에 침지하기까지 30초를 초과하지 않도록 하였다. 융해 및 동결액의 제거는 상기의 방법에 준하였다.

4) 유리화 동결을 위한 인위적 탈수

배반포강내의 탈수를 위해 동결전 모든 배반포의 투명대를 36 gauge needle (Hamilton, 90033)을 이용하여 찔러줌으로써 인위적으로 배반포강내의 수분을 제거하고 배반포강을 수축시킨 후 EM grid로 유리화 동결을 행하였다. 이때 사용된 EG20에서의 전처리시간은 3분 이었으며 EFS40에서는 최대한 빨리 (30초 이내) 처리하여 액체질소내로 침지하였다.

4. 동결-융해한 배반포의 배양과 생존율

동결방법과 상관없이 동결-융해한 배반포는 20% hFF 첨가 YS배양액으로 3~4회 세척한 후 37℃, 5% CO_2 배양기에서 18~20시간 난구세포와 공동배양하여 형태학적으로 다시 팽윤된 배반포만을 생존한 것으로 간주하였다.

Table 1. Comparison of recovery rates and survival rates of vitrified-thawed blastocysts according to the freezing vessel

Freezing vessels*	No.(%) of embryos		
	Examined	Recovered	Survived
Plastic straw	15	15 (100)	4 (26.7)[a]
OPS	23	23 (100)	3 (13.0)[a]
EM grid	83	81 (97.6)	49 (60.5)[b]

[a,b]: Different superscripts within column indicated significant differences ($p<0.05$)
*: OPS: open-pulled straw, EM grid: electron microscopy grid

Table 2. Effect of equilibration time before vitrification on survival rates of vitrified-thawed blastocysts using EM grid

Equilibration time (min)	Developmental stage*	No.(%) of embryos		
		Examined	Recovered	Survived
1.5	EB	46	45 (97.8)	29 (64.4)[a]
	MB	22	21 (95.5)	17 (81.0)[a]
	LB	15	15 (100)	3 (20.0)[b]
	Total	83	81 (97.6)	49 (60.5)
3.0	EB	23	23 (100)	16 (69.6)[a]
	MB	15	14 (93.3)	7 (50.0)[a]
	LB	40	40 (100)	23 (57.5)[a]
	Total	78	77 (98.7)	46 (59.8)

[a,b]: Different superscripts within column indicated significant differences ($p<0.05$)
*: EB: early blastocyst, MB: middle blastocyst, LB: late blastocyst

5. 통계적 분석

실험결과의 통계적 유의성 검정은 SAS (statistical analysis system)를 이용한 chi-square (χ^2) test에 의하여 분석하였다.

결 과

1. 동결보존용기가 배반포의 동결 및 융해 후 생존율에 미치는 영향

동결보존용기로서 plastic straw, OPS 및 EM grid를 이용한 유리화 동결 및 융해한 배반포의 생존율은 Table 1과 같다. 각 실험구간의 생존율은 plastic straw구의 26.7% (4/15), OPS구의 13.0% (3/23), EM grid구의 60.5% (49/81)로서, 융해 후 회수율에서 다른 구에 비해 다소 낮지만 EM grid구에서 유의하게 높은 생존율을 얻을 수 있었다 ($p<0.05$).

2. 포배기 배아의 유리화 동결 및 융해 후 생존율에 미치는 동결보호제 평형시간의 영향

각 발생단계별 배반포를 EG20에서의 평형시간이 EM grid의 유리화 동결 및 융해 후 생존율에 미치는 영향을 검토한 결과는 Table 2와 같다.

EB군의 경우 1.5분의 64.4% (29/45)와 3분의 69.6% (16/23)으로 평형시간에 따른 생존율의 유의차는 인정되지 않았다. 그리고 MB군에 있어서는 1.5분 처리구의 81.0% (17/21)로 3분 처리구의 50.0% (7/14)에 비해 상당히 높은 생존율을 나타내었지만 유의적 차는 인정되지 않았다. 그러나 LB군은 오히려 3분 처리구에 있어서 57.5% (23/40)로서 1.5분 처리구의 20.0% (3/15)에 비해 유의하게 높은 생존율을 나타내었다. 따라서 발생단계별로 보면 MB군은 1.5분 처리에서 LB군은 3분 처리에서 가장 높은 생존율을 보였으며 후기 배반포단계로 발달할수록 동결시

Table 3. Effect of artificial blastocoele shrinkage on survival rate of vitrified-thawed blastocysts using EM grid

Artificial shrinkage*	Developmental stage**	No.(%) of embryos		
		Examined	Recovered	Survived
+	EB	14	14 (100)	13 (92.9)[a,b]
	MB	17	17 (100)	17 (100)[a]
	LB	54	54 (100)	41 (75.9)[b]
	Total	85	85 (100)	71 (83.5)
-	EB	12	12 (100)	8 (66.7)[a,c]
	MB	21	20 (95.2)	12 (60.0)[a,c]
	LB	39	38 (97.4)	16 (42.1)[d]
	Total	72	70 (97.2)	36 (51.4)

[a,b,c,d]: Different superscripts within column indicated significant differences ($p<0.05$).
*: +: blastocoele artificial puncture, -: not puncture
**: EB: early blastocyst, MB: middle blastocyst, LB: late blastocyst

Table 4. Effect of freezing methods on survival rate after freezing-thawing human blastocysts

Freezing methods	No.(%) of embryos		
	Examined	Recovered	Survived
Slow freezing	15	15 (100)	10 (66.7)[a]
Vitrification	18	18 (100)	16 (88.9)[a]

[a]: Values within columns having same superscripts are not significantly different

더 많은 평형시간을 필요로 할 것으로 사료된다.

3. 포배기 배아의 유리화 동결 및 융해 후 생존율에 미치는 인위적 탈수의 효과

각 발생단계별 배반포를 동결보호제로 처리하기 전 36 gauge needle을 이용하여 투명대를 찔러 세포강내의 수분을 제거하고 세포질을 수축시킴으로써 인위적 탈수를 유도하였다. 그 후 동결보호제를 처리하여 유리화 동결 및 융해 후의 생존율의 결과는 Table 3과 같다.

인위적 탈수유도군에서 MB, MB 및 LB의 생존율은 각각 92.9% (13/14), 100% (17/17) 및 75.9% (41/54)로서, MB구가 가장 높았으며, 특히 LB구보다는 유의하게 높았다 ($p<0.05$). 인위적 탈수를 유도하지 않은 군에서는 각각 66.7% (8/12), 60.0% (12/20) 및 42.1% (16/38)로서, LB구가 가장 낮았으며, 특히 다른 두 구에 비해 유의하게 낮았다. 따라서 인위적 탈수구에서의 EB, MB 및 LB 등 배반포의 발달단계와 관계없이 인위적 탈수를 하지않은 구에 비해 생존율이 상승하였으나 LB구를 제외하고는 유의차는 인정되지 않았다.

그리고 Figure 1은 동결전 배반포 (A)를 바로 동결보호제를 3분 처리 배반포 (B), 동결전 배반포를 36 gauge needle로서 세포질 수축을 유도한 후 (C) 동결보호제를 1.5분 처리한 배반포 (D)이다. 세포질 수축을 유도한 배반포에서 노출시간은 짧지만 더 많은 수축이 일어난 것을 볼 수 있다.

인위적 탈수 후 유리화 동결의 효과를 검증하기 위하여 완만동결과 비교검토한 결과는 Table 4와 같다. 완만동결구의 동결 후 배반포의 생존율은 66.7% (10/15)이며, 인위적 탈수 후의 유리화 동결구는 88.9% (16/18)로서, 완만동결구보다 생존율이 다소 높았지만, 통계적인 유의차는 인정되지 않았다.

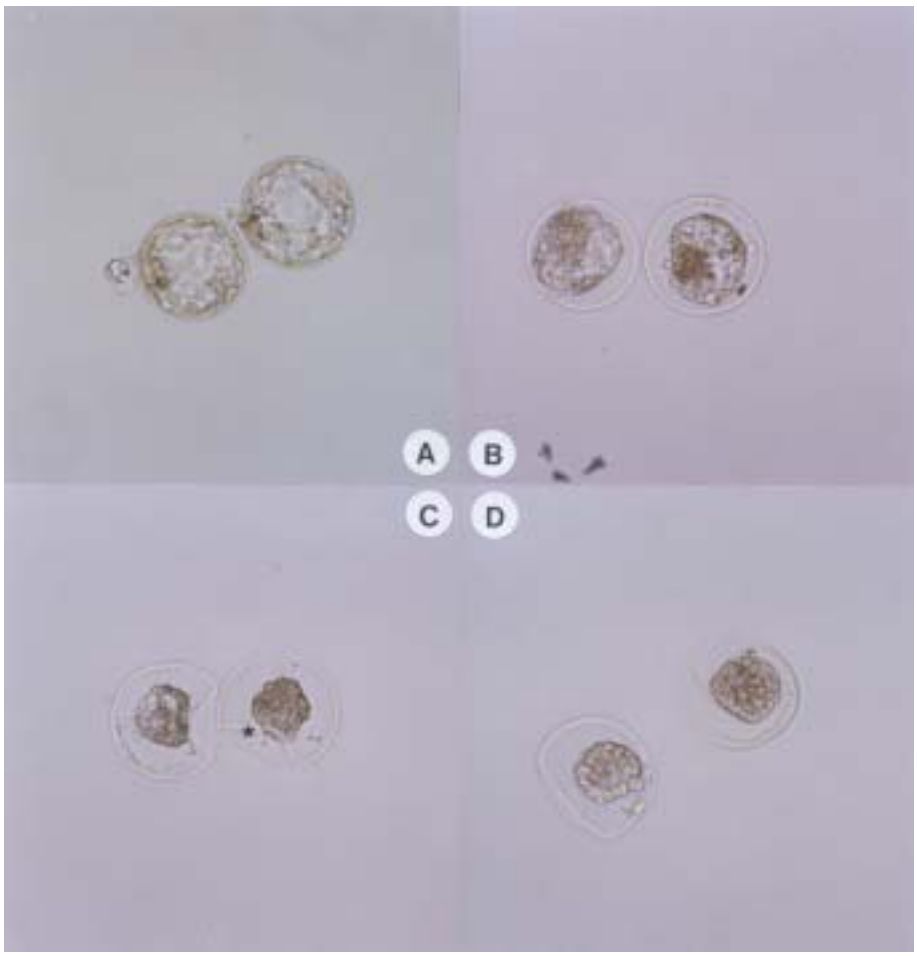

Figure 1. A series course of vitirification of human blastocysts using EM grid (×100). Human expanded blastocyst **(A)** were equilibrated in EG20 for 3 min **(B)**. Shrinked embryos **(C)** after physical puncture using 36G needle (*; C) were equilibrated in EG20 **(D)** for 1.5 min.

고 찰

유리화 동결시 동결보존용기는 냉각속도와 더불어 동결의 주요한 요인이다. 일반적으로 유리화 동결시 사용하는 보존용기는 plastic straw이며, 이것과 EFS 용액을 이용한 소 배아의 유리화 동결성공률은 대략 74~89% 정도이다.[6,12] 그러나 인간 배반포의 경우는 동결액의 종류에 따라 plastic straw의 비효율성을 보고한 예도 있다.[13] 한편, plastic straw의 냉각률이 낮다는 단점으로부터 straw의 단면적을 줄여 냉각률을 높인 것이 OPS법이다. OPS법은 Niemann 에 의해 처음으로 개발되었으며,[14] 그 후 Vajta 등에 의해 더욱 발달하였다. Vajta 등은 적당한 동결방지제와 OPS를 이용한 동결로서 소 포배의 90% 이상의 동결성공률을 보고하였다.[15] 그리고 Chen 등도 plastic straw보다 OPS의 이용효율성을 보고하였으며,[16] 또 Kong 등은 OPS를 더욱 개량한 glass micropipette의 효율성도 증명하였다.[17] 또 다른 동결보존용기로 EM grid는 Martino 등이 소 난자의 유리화 동결에 처음으로 보고한 이래,[9,10] Park 등은 plastic straw와 EM grid의 비교 검토에서 EM grid의 효율성을 입증하였다.[7] 또한 본 연구를 통한 EM grid의 효과가 증명되었기 때문에 앞으로 인간 배아의 동결

보존에 EM grid의 사용을 검토할 필요가 있다.

유리화 동결시 세포내 빙결정을 방지하기 위해서는 충분한 탈수가 일어나야 하며, 이것은 동결보호제의 평형시간과 평형온도가 중요하다. 평형온도가 낮을수록 평형시간은 길어지고, 평형온도가 높을수록 짧아진다. Tachikawa 등은 실온에서 2분 처리구의 생존율은 높았지만, 3분 이상 처리구에서는 낮았다.[12] 이것은 동결보호제의 평형시간이 길었기 때문에 세포에 대한 동결보호제의 독성이 증가한 것으로 보고하였다. 따라서 동결보호제의 노출시간을 줄이기 위해서는 먼저 낮은 농도에서 평형시킨 후 단계적으로 농도를 높여주는 2단계 동결법이 효과적이라고 많은 연구자가 보고하였다.[5,7] 특히 EB보다 LB는 동결보호제가 충분히 침투하기 전에 세포가 독성에 의해 손상을 많이 입는다. 한편 배반포의 발달단계에 따라 생존율에는 차이가 있으며, 특히 EB의 경우는 낮았다.[5,7] 그러나 동결보호제를 개선함으로써 오늘날에는 발달단계와는 관계없이 높은 생존율을 얻을 수 있다. 본 연구에서는 동결보호제로서 EG20과 EFS40을 사용한 2단계 동결법으로 유리화 동결을 행하였다. 그 결과 EB의 경우는 처리시간에 관계없이 생존율이 안정되었으며, MB의 경우는 처리시간이 길어짐으로써 생존율이 저하하였고, 배반포강이 큰 LB는 1.5분 처리로는 충분한 탈수가 일어나지 않아 생존율이 낮았지만, 처리시간이 길어짐에 따라 생존율도 향상되었다. 따라서 적당한 동결보호제를 선택한다면 평형시간보다는 오히려 세포내 탈수를 유도할 수 있는 방법의 개발이 더욱 필요하다고 사료된다. 일반적으로는 동결보호제의 평형시간과 농도를 이용하여 세포내 탈수를 유도하는 생화학적 방법을 많이 이용하고 있다. 그러나 이 경우는 동결보호제의 세포내 독성이 강하기 때문에 평형시간을 조절하지만, 세포내 미탈수에 의한 동결장해 및 동결보호제의 세포독성 등의 우려성이 있다.[6] 반면 본 연구에서 이용한 인위적 탈수방법은 단지 배반포의 투명대에 물리적 자극을 주어 세포질을 수축시킨다. 그 결과 융해 후의 높은 생존율도 얻었을 뿐만 아니라 투명대에 작은 구멍을 내어줌으로써 보조부화의 효과도 생각할 수 있다.

따라서 물리적 자극 후 세포질 수축 유도 후 유리화 동결을 실시하는 것이 효과적임을 알 수 있다. 인간에 있어서 시험관 아기센터에서 일반적으로 사용하는 방법은 완만동결법이다. 그러나 완만동결법은 많은 시간의 소비 및 고가의 장비가 필요하고, 동결과정 중 빙결정형성으로 세포손상이 생긴다는 단점이 있기 때문에 최근에는 유리화 동결에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다. 생쥐 2세포기에서는 유리화 동결보다 완만동결에서 착상율이 더 높다고 보고한 반면, 18소에서는 완만동결보다 유리화 동결에서 착상율이 높은 것으로 보고하였고,[19~21] 양에서도 유리화 동결에서 착상율이 높은 것으로 보고하였다.[22] 또한 인간에 있어서도 완만동결보다 유리화 동결이 더 효과적임을 보고하였다.[23]

이상과 같이 동물 종에 따라서는 약간의 차이가 있지만, 비교적 유리화 동결 배의 생존율이 높았다. 본 연구에서도 인위적 탈수 후의 유리화 동결이 완만동결보다도 효과적이라는 것을 입증하였다. 따라서 본 연구에서 개발한 인위적 탈수 후의 유리화 동결법을 더욱 개량함으로써 임상적용으로의 응용에도 그 이용 가능성은 매우 높다고 사료된다.

참 고 문 헌

1. Miyamoto H, Ishibashi T. Survival of mouse embryos frozen-thawed slowly or rapidly in the presence of various cryoprotectants. J Exp Zool 1983; 226: 123-7.
2. Rall WF, Wood M. High in vitro and in vivo survival of day 3 mouse embryos vitrified or frozen in an non-toxic solution of glycerol and albumin. J Reprod Fertil 1994; 101: 681-8.
3. Saha S, Otoi T, Takagi M, Boediono A, Sumantri C, Suzuki T. Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trehalose, and polyvinylpyrrolidone. Cryobiology 1996; 33: 291-9.
4. Kasai M, Hamaguchi Y, Zhu SE, Miyake T, Sakurai T, Machida T. High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method. Biol Reprod 1992; 46: 1042-6.
5. Zhu SE, Kasai M, Otoge H, Sakurai T, Machida T. Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by

vitrification in ethylene glycol-based solutions. J Reprod Fertil 1993; 98: 139-45.
6. Mahmoudzadeh AR, Van Soom A, Bols P, Ysebaert MT, de Kruif A. Optimization of a simple vitrification procedure for bovine embryos produced in vitro: effect of developmental stage, two-step addition of cryoprotectant and sucrose dilution on embryonic survival. J Reprod Fertil 1995; 103: 33-9.
7. Park SP, Kim EY, Kim DI, Park NH, Won YS, Yoon SH, et al. Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscope grids. Hum Reprod 1999; 14: 2838-43.
8. Vanderzwalmen P, Delval A, Chatziparasidou A, Bertin G, Ectors F, Lejeune B. Pregnancies after vitrification of human day 5 embryos. Hum Reprod 1997; 12: O-198.
9. Martino A, Pollard JA, Leibo SP. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. Mol Reprod Dev 1996; 45: 503-12.
10. Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. Biol Reprod 1996; 54: 1059-69.
11. 이석원, 윤산현, 윤혜균, 조현진, 허용수, 윤혜진 등. IVF-ET program에서 blastocyst 배아의 발생에 관한 연구: II. 난구세포 공동배양에 의한 blastocyst 배아의 발생. 대한불임학회지 1998; 25: 35-41.
12. Tachikawa S, Otoi T, Kondo S, Machida T, Kasai M. Successful vitrification of bovine blastocysts, derived by in vitro maturation and fertilization. Mol Reprod Dev 1993; 34: 266-71.
13. 김수희, 이상원, 이주희, 강상민, 이승민, 이성구 등. 인간포배기 배아의 초자화 동결에 관한 연구: I. 동결액과 발생단계가 초자화 동결한 포배기 배아의 생존율에 미치는 영향. 한국수정란이식학회지 1999; 14: 145-53.
14. Niemann H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: Current status and research needs. Theriogenology 1991; 35: 199-24.
15. Vajta G, Rindom N, Peura TT, Holm P, Greve T, Callesen H. The effect of media, serum and temperature on in vitro survival of bovine blastocysts after Open Pulled Straw (OPS) vitrification. Theriogenology 1999; 52: 939-48.
16. Chen SU, Lien YR, Chen HF, Chao KH, Ho HN, Yang YS. Open pulled straws for vitrification of mature mouse oocytes preserve patterns of meiotic spindles and chromosomes better than conventional straws. Hum Reprod 2000; 15: 2598-603.
17. Kong IK, Lee SI, Cho SG, Cho SK, Park CS. Comparison of open pulled straw (OPS) vs glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. Theriogenology 2000; 53: 1817-26.
18. Uechi H, Tsutsumi O, Morita Y, Takai Y, Taketani Y. Comparison of the effects of controlled-rate cryopreservation and vitrification on 2-cell mouse embryos and their subsequent development. Hum Reprod 1999; 14: 2827-32.
19. Leibo SP, Oda K. High survival of mouse zygotes and embryos cooled rapidly or slowly in ethylene glycol plus polyvinylpyrrolidone. Cryo-Letters 1993; 14: 133-44.
20. Van Wagtendonk-De Leeuw AM, Den Daas JH, Kruip TA, Rall WF. Comparison of the efficacy of conventional slow freezing and rapid cryopreservation methods for bovine embryos. Cryobiology 1995; 32: 157-67.
21. Martinez AG, Matkovic M. Cryopreservation of ovine embryos: slow freezing and vitrification. Theriogenology 1998; 49: 1039-49.
22. Martinez AG, de Matos DG, Furnus CC, Brogliatti GM. In vitro evaluation and pregnancy rates after vitrification of in vitro produced bovine embryos. Theriogenology 1998; 50: 757-67.
23. 김수희, 이상원, 이주희, 강상민, 오희정, 이승민 등. 인간포배기 배아의 초자화 동결에 관한 연구: II. 초자화 동결이 포배기 배아의 착상 및 임신에 미치는 영향. 대한불임학회지 2000; 27: 67-74.