大韓不妊學會誌: 第31卷 第1號 2004
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 31, No. 1, 2004, 3

생쥐와 인간배아의 완만동결－급속융해 후 생존률과 배아발생에 미치는 Ethylene Glycol (EG)과 1,2-Propanediol (PROH)의 영향*

포천중문의과대학교 차병원 여성의학연구소

김태형 · 차수경 · 이동률 · 한지은 · 이우식 · 윤태기 · 차광렬 · 정형민

Effect of Ethylene Glycol (EG) and 1,2-Propanediol (PROH) on the Survival and the Development of Mouse and Human Embryos after Slow Freezing/Rapid Thawing Protocol

Tae Hyung Kim, Soo Kyung Cha, Dong Ryul Lee, Jee Eun Han, Woo Sik Lee, Tai Ki Yoon, Kwang Yul Cha, Hyung Min Chung

Infertility Medical Center of CHA General Hospital, Pochon CHA University College of Medicine, Seoul, Korea

Objective: The aim of this study were to compare the effects of EG and PROH on cryopreservation of mouse and human embryos, and to find the optimal protocol for embryo freezing.

Methods: Human embryos derived from fertilized eggs showing 3 pronuclei (PN) and mouse embryos were divided into two groups respectively: dehydrated with 1.5 M EG + 0.2 M sucrose or 1.5 M PROH + 0.2 M sucrose using the slow freezing method. Moreover mouse embryos were controlled the exposure time of cryoprotectant during dehydration or rehydration steps.

Results: The survival rates of human embryos were 79.2% (84/106) in EG group and 77.9% (88/113) in PROH group. In mouse embryos, the survival and development rates up to blastocyst were 70.6% (245/347), 44.1% (123/279) in EG group and 62.1% (198/319), 45.1% (123/279) in PROH group, respectively. However, in EG group, partially damaged embryos after thawing were decreased compared to PROH group. In combination group, when the exposure time during dehydration and rehydration were reduced, the survival and embryonic developments were increased slightly, but not significant.

Conclusion: Cryopreservation of mouse and human embryos at cleavage stage by using EG or PROH exhibited no statistical difference in the survival rate and/or developmental rate to blastocyst. However, the use of EG for cryopreservation of embryos might reduce the exposure time of the cryoprotectant because of a high permeation of EG and result in lessen its toxic effects.

Key Words: Ethylene glycol, Slow freezing, Human embryos, Mouse embryos

연 락 저 자: 김태형, 우) 135-081 서울특별시 강남구 역삼1동 606-5, 포천중문의과대학교 차병원 여성의학연구소
Tel: (02) 3468-3423, Fax: (02) 501-8704, e-mail: biodrug@hanmail.net
주관책임자: 이동률, 우) 135-081 서울특별시 강남구 역삼1동 606-5, 포천중문의과대학교 차병원 여성의학연구소
Tel: (02) 3468-3421, Fax: (02) 501-8704, e-mail: drleedr@cha.ac.kr
*본 연구는 한국과학재단 목적기초연구 (1999-2-205-002-5)에 의거 수행되었음.

시험관 아기 시술 프로그램에 과배란 유도 프로그램의 발전으로 난자의 채취 개수와 배아의 생산은 증가하였다. 또한 다태아 임신의 방지를 위한 배아 이식 개수의 제한으로 잉여배아가 증가하였고, 이의 처리를 위한 배아의 동결보존 프로그램은 시험관 아기 시술 프로그램에 가장 중요한 업무 중 하나가 되었다. 또한 난소 과자극 증후군 (OHSS)이 심할 경우, 난자채취 후 체외수정이 불가능한 경우, 그리고 난자 공여자와 수여자간의 착상시기 불일치한 경우에도 동결보존은 대안으로 제시된다.

1983년에 Trounson과 Mohr는 완만동결방법으로 인간 4-8세포기 배아를 동결보호제인 1.5 M dimethylsulphoxide (DMSO)을 사용하여 -80℃까지 냉동시킨 뒤 액체질소에 보관하였고, 융해 후 이식하여 최초의 임신성공을 보고한 바 있다.[1] 그 후 Zeilmaker 등 (1984)은 1.45 M DMSO를 사용하여 -40℃까지 완만동결하여 일란성 쌍생아의 탄생을 보고하였다.[2] Lassalle 등 (1985)은 완만동결방법을 보다 간편화시켜, 배아를 1.5 M 1,2-propanediol (PROH) + 0.1 M sucrose을 사용하여 평형을 시킨 후 -30℃까지 완만동결을 시도하였다.[3] 이와 같이 동결배아를 이용한 임신에 성공한 1983년 이후 주로 DMSO와 PROH가 인간배아의 동결보호제로 널리 이용되어 왔고, 최근에는 ethylene glycol (EG)이 세포 내 투과성이 높고 독성이 낮은 장점 때문에 동물과 인간 난자와 배아의 동결에 이용되어 지고 있다.

동결보존방법의 성공에 필요한 주요한 요소 중의 하나는 동결보호제의 선택이다. 동결보호제는 배아 내로 투과되어 배아 내의 물을 탈수시키고, 빙 결정 (ice crystal)의 형성을 막음으로써 배아 내의 물질들을 보호하는 역할을 한다. 동결보호제의 투과 정도는 세포막의 투과능, 세포내부와 외부 농도차, 온도, 세포표면적, 생물종과 발생시기에 따라 다르며, 동결방법과 동결평형용액에 따라 융해 후의 생존에 영향을 주게 된다. 그리고 동결보호제의 독성은 일반적으로 농도, 노출시간과 온도에 좌우된다.[4] 대부분의 동결보호제는 배아의 발생에 해로운 결과를 가져오게 되는데 EG의 경우 상실기와 포배기의 동결보존 시 동결에 의한 배아 세포막과 세포질 구조의 손상이 다른 동결보호제에 비해 적어 배아의 동결보존에 보다 유리한 것으로 보고된 바 있다.[5,6] 또한 전핵 시기, 4세포기 시기의 동결과 융해 후 발생 결과에서는 두 시기의 배아 모두에서 PROH보다 EG를 사용하였을 때 보다 좋은 결과가 얻어 진 바 있으나 상이한 결과도 보고된 바 있다.[7~9] EG는 소, 쥐 등의 배아, 인간의 난소조직과 난자 및 포배기단계의 유리화 동결에 사용되었고, 보다 향상된 방법이 개발되면서 임신 또한 보고 되었는데,[10~13] 이는 EG의 저분자량과 높은 투과력으로 배아의 동결보호제 노출시간을 감소시킬 수 있게 되면서 화학적인 독성에 의한 상해를 줄일 수 있었다.[11] 그리고 동결보호제가 세포 내외로 빠르게 이동함으로 삼투압 충격이 일어나지 않게 되고 융해 후 생존율에 따른 발생률에 좋은 결과를 가져왔다. 이런 장점으로 유사 동결보호제인 PROH나 Glycerol보다 배아에 더 빨리 투과되고 안정적이며 생쥐의 배아의 경우 독성이 낮은 것으로 나타났다.[14,15] 또한 EG는 전핵시기에는 별다른 차이가 나타나지 않았지만 4세포기 배아의 동결보존 생존율과 포배기 발달의 향상을 가져왔다.[7,9]

따라서 본 연구에서는 인간과 생쥐배아를 이용하여 EG와 PROH를 비교하여 난할기의 동결에 적절한 동결보호제를 찾고, 동결보호제의 독성 및 삼투압에 의한 상해를 최소화하는 효과적인 평형과정을 찾아보고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

1) 생쥐배아의 획득

3~4주령된 ICR 암컷 생쥐에 pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG, Intervet international B.V) 5 IU를 복강주사하고, 48시간 후에 human chorionic gonadotropin (hCG, Intervet) 5 IU를 복강주사 한 뒤 수컷과 교미시켰다. 42~44 h 후에 경추 탈골로 도살한 후 수란관으로부터 2세포기 배아를 회수하여 10% synthetic serum substitute (SSS, Irvine Scientific Co.)가 첨가된 preimplantation I (P-I, Irvine) 배양액에서 6-8세포기까지 배양한 후 실험에 사용하였다. 2세포기 배아 회수된 날을 day2로 하였다. 또한 포배기까지의 발생을 관찰하기 위하여 day6까지 10% SSS가 첨가된 blastocyst (Irvine) 배양액에

서 배양하였다.

2) 인간 3PN 배아의 획득

GnRH agonist와 follicle stimulating hormone (FSH)/human menopausal gonadotrophin (hMG)를 병용한 과배란 프로그램에서 18 mm 이상의 난포가 2개 이상 존재할 경우 10,000 IU의 hCG (propasi, Serono)를 주사하였고 질식 초음파를 이용하여 hCG 주사 후 36~38 h에 난자를 채취하였다. 채취된 난자는 4~6시간 배양 후 정자를 이용하여 시험관 아기 시술을 하거나 난자내 정자직접주입술 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI)방법으로 수정시킨 뒤 10% SSS가 첨가된 P-I 배양액에서 배양하였다. 수정 후 14~18 h 경과 뒤에 전핵 (pronuclei, PN)의 여부를 확인한 뒤, 3개의 전핵을 보이는 비정상 배아를 분리하여 4-8세포기까지 배양한 후 실험에 사용하였다.

2. 연구 방법

1) 인간배아의 PROH와 EG를 사용한 동결

동결보존을 위한 기본 용액은 20% fetal bovine serum (FBS, GIBCO BRL)가 첨가된 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS, GIBCO)을 사용하였고, 동결보호제로는 1.5 M ethylene glycol (EG, Sigma Chemical Co.)와 1,2-propanediol (PROH, Sigma), 그리고 0.2 M sucrose (Sigma)를 이용하였다. 배아를 20% FBS - DPBS, 0.5 M EG, 1.0 M EG, 1.5 M EG, 그리고 1.5 M EG + 0.2 M sucrose에 각각 5, 5, 5, 10, 그리고 5분씩 처리하여 탈수하였으며, PROH도 같은 농도와 시간으로 처리하였다. 이 후 0.25 ml plastic-straw에 loading한 뒤 24℃로 준비된 세포동결기 (Kryo 10 serise III, Planer)를 이용하여 완만동결 하였다. 24℃에서 -7℃까지는 2℃/min의 비율로 온도를 내린 뒤, 5분간 유지 뒤에 식빙 (seeding)을 시행하였다. 그리고 -39℃까지는 0.3/min의 비율로 온도를 내린 뒤 액체질소에 침지 보관하였다.

보관된 straw를 액체질소에서 꺼내 대기 중에서 40초 동안 방치 후 37℃ water bath에서 40초 동안 융해했다. 재수화는 4단계의 평형 (equilibration)용액을 사용하였다. 즉, 1 M EG + 0.2 M sucrose, 0.5 M EG + 0.2 M sucrose, 0.2 M sucrose, 그리고 20% FBS-DPBS에 각각 5, 5, 5, 그리고 5분씩 처리하였으며, PROH도 같은 농도와 시간으로 처리하였다. 동결과 융해과정은 실온에서 각 단계별 과정을 처리하였다.

2) 생쥐배아의 PROH와 EG를 사용한 동결

동결보존을 위한 기본용액과 동결보호제, 그리고 동결은 실험 1의 인간배아방법과 동일하게 처리하였다.

3) EG를 사용하여 평형시간의 변경에 따른 생쥐배아의 동결

생쥐배아를 대상으로 동결과 융해과정은 EG를 동결보호제로 사용하였다. 각각의 동결과 융해시의 평형시간에만 변형을 주었고 나머지 처리과정은 실험 1, 2와 같은 방법을 사용했다. 첫 번째 실험은 동결과정 단계별로 시간(분)처리를 EGF1 (5-5-5-10-5), EGF2 (3-3-3-6-1), EGF3 (1-1-1-2-1)으로 감소시키고 융해과정에는 기존의 단계별 시간을 그대로 사용하였다. 두 번째 실험은 동결과정의 시간은 EGF1을 적용하고 융해과정에서의 시간(분)을 EGT1 (5-5-5-5), EGT2 (3-3-3-3), EGT3 (1-1-1-1)로 단축시켰다. 그리고 세 번째 실험은 앞의 두 실험에서 우수한 수치를 보인 그룹을 조합하여 새로운 단계별 시간을 적용하여 평형시간에 변형을 주었다.

3. 통계분석

통계적인 분석은 Chi-square test를 이용하였고, p값이 0.05 이하인 경우를 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

인간 3PN에서 유래된 배아를 사용하여 동결보존 방법에 EG (n=106)와 PROH (n=113)의 효용성을 비교하였다 (Figure 1). 동결과정을 거친 배아의 생존율은 각 할구의 형태를 기준으로 하였다. PROH를 사용한 경우, lysis는 6.2%, 부분적으로 lysis가 나타난 것은 44.2%, lysis가 전혀 일어나지 않은 것은 49.6%로 나타났고, EG의 경우, 3.8%, 29.2%, 그리고 67.0%로 나타났다. 부분적으로 lysis가 나타난 경우 PROH를 사용하였을 때 높았으며 ($p<0.05$), lysis가 전혀 일어나지 않은 경우는 EG를 사용하였

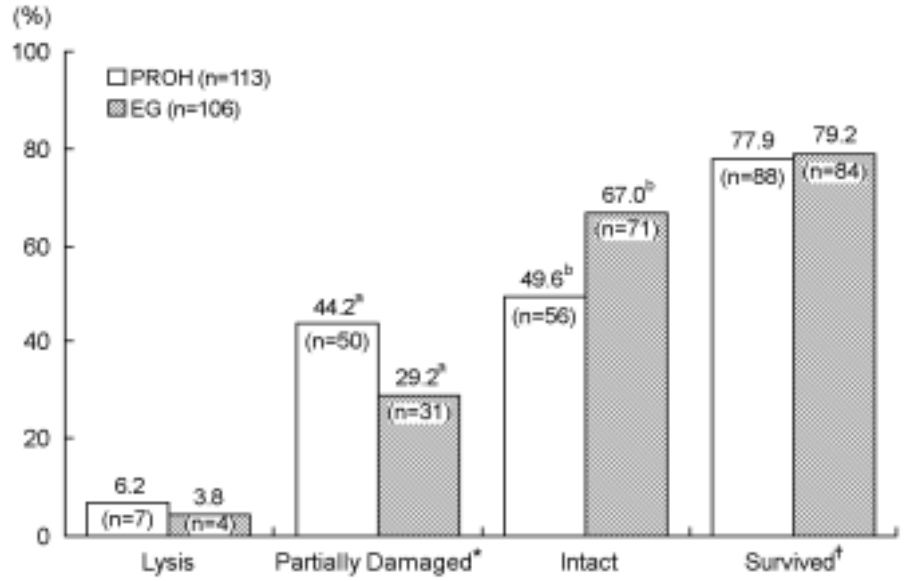


Figure 1. Survival rate of human embryos frozen-thawed with 1.5 M PROH or 1.5 M EG. The human embryos Were derived from 3PN . The values with same superscripts are significantly different ($p<0.05$).
*The Partially damaged embryos include the embryos having more than 1 intact blastomere.
†The survived embryos include the embryos showing more than half intact blastomeres.

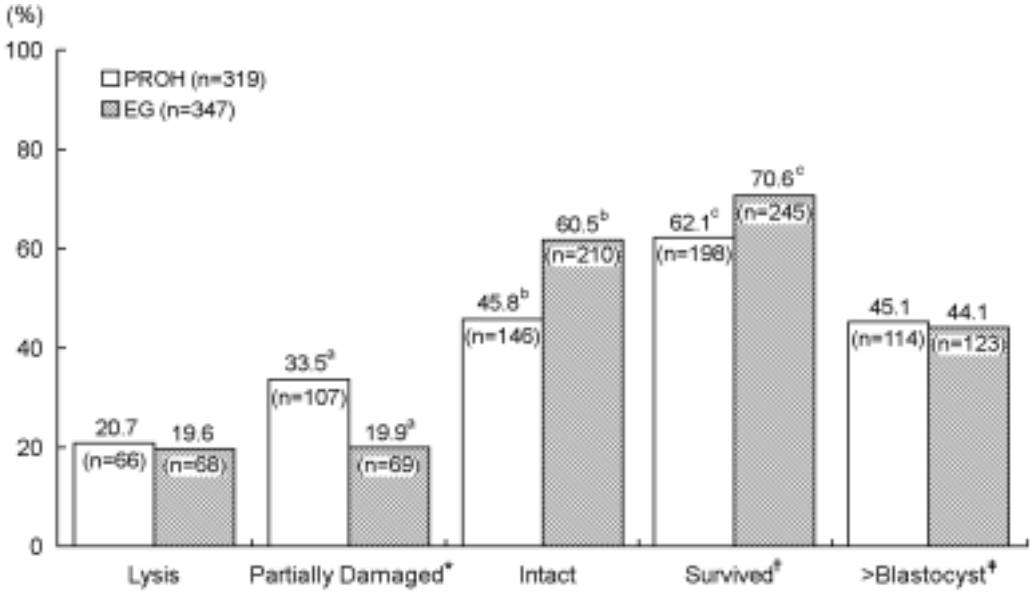


Figure 2. Survival and developmental rates of mouse embryos frozen-thawed with 1.5 M PROH or 1.5 M EG. The values with same superscripts are significantly different ($p<0.05$).
*The Partially damaged embryos include the embryos having more than 1 intact blastomere.
†The survived embryos include the embryos showing more than half intact blastomeres.
‡>Blastocyst include the embryos developed to blastocyst, hatching, and hatched blastocyst.

Table 1. Effects of exposure time during freezing and thawing on development of mouse embryos frozen with 1.5 M EG + 0.5 M sucrose

	Group	No. of embryos frozen-thawed	No. of embryos survived (%)	No. of embryos developed to blastocyst (%)
Freezing step	Control‡	138	135 (97.8)	114 (82.6)[a]
	EGF1*	123	121 (98.4)	94 (76.4)[ab]
	EGF2*	96	92 (95.8)	69 (71.9)[b]
	EGF3*	101	94 (93.1)	62 (61.4)[c]
Thawing step	Control‡	98	95 (96.9)	75 (76.5)[a]
	EGT1†	79	76 (96.2)	41 (51.9)[b]
	EGT2†	74	68 (91.9)	48 (64.9)[ab]
	EGT3†	76	75 (98.7)	48 (63.2)[ab]

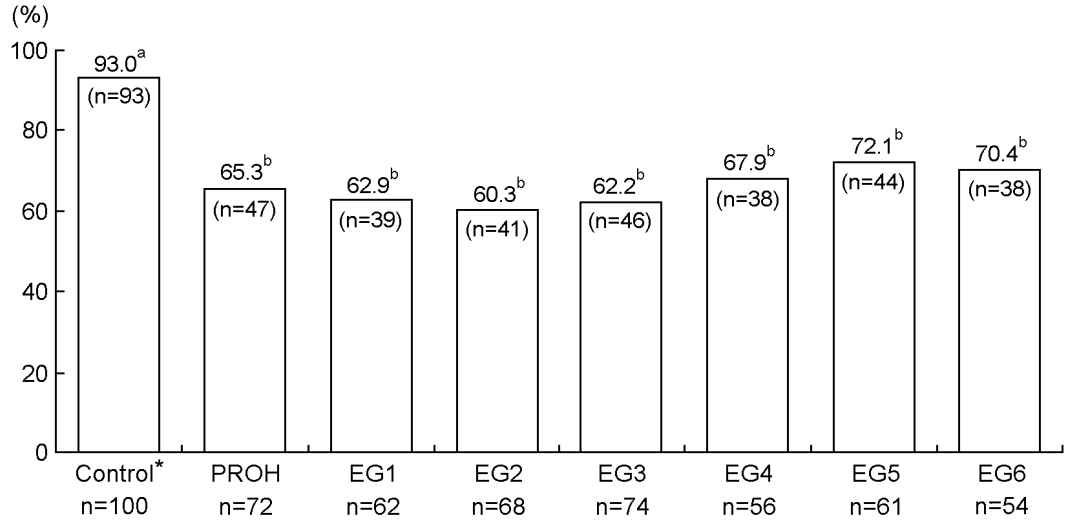
*The exposure time during freezing step of EGF1 is 5-5-5-10-5, EGF2 is 3-3-3-6-3, and EGF3 is 1-1-1-2-1 (minute)
The exposure time during thawing step is 5-5-5-5 (minute)
†The exposure time during freezing step is 5-5-5-10-5 (minute)
The exposure time during thawing step of EGT1 is 5-5-5-5, EGT2 is 3-3-3-3, and EGT3 is 1-1-1-1 (minute)
‡A control group was cultured for 5 days without being exposed to the cryoprotectant solution or frozen
The values with different superscripts in the column are significantly different ($p<0.05$)

을 때 높았다 ($p<0.01$). 또한 50% 이하로 lysis가 발생한 배아와 lysis가 일어나지 않은 배아의 합한 결과는 전체 배아 중 PROH가 77.9%, EG가 79.2%로 유사하였다.

동결보존시 EG (n=347)와 PROH (n=319)를 사용하였을 때 ICR 생쥐배아를 사용하여 생존율을 비교하였다 (Figure 2). 동결과정을 거친 배아의 생존율은 인간배아와 같은 방법을 사용하였다. PROH와 EG를 사용한 결과 각각 lysis는 20.7%와 19.6%로 유사하였고, 부분적으로 lysis가 나타난 것은 33.5%와 19.9%로 PROH가 높았고 ($p<0.001$), lysis가 전혀 일어나지 않은 것은 45.8%와 60.5%로 EG가 높았으며 ($p<0.001$), 전체적으로 인간 3PN 배아의 비교 수치와 유사한 경향을 보였다. 또한 50% 이하로 lysis가 발생한 배아와 lysis가 발생하지 않은 배아의 합한 결과는 전체 배아 중 PROH가 62.1%, EG가 70.6%의 결과를 얻었다 ($p<0.05$). 한편 동결과정을 거친 배아의 발생률을 동결융해 후 3일간 추가 배양하여 발생율을 관찰하였다. 포배기 발생은 PROH를 사용한 군이 45.1% (114/253), EG를 사용한 군은 44.1% (123/279)로 유사하였다. 배양 후 발생이 정지된 경우는 PROH군은 24.1% (61/253), EG군은 16.5% (46/279)로 PROH군이 높았고 ($p<0.05$), lysis된 배아의 수치는 PROH군은 20.6% (52/253), EG군은 28.0% (78/279)로 EG군이 높았다 ($p<0.05$).

EG를 사용하여 동결 및 융해과정의 단계별 평형시간에 변형을 주어 3일간 배양 후 발생을 비교하였다 (Table 1). EGF1과 EGF2군에서 각각 포배기는 76.4%, 71.9%로 EGF3군보다 높게 나타났으며, control군과 EGF2, 3군, 그리고 EGF1, 2군과 EGF3군은 유의차를 보였다. 한편 융해과정의 단계별 평형시간에 변형을 준 결과 EGT2와 EGT3그룹에서 각각 포배기가 64.9%, 63.2%로 EGT1그룹보다 높게 나타났으나 유의차는 없었으나 EGT1군의 결과가 control군에 비해 유의차가 보였다.

위의 두 실험의 결과로 동결과 융해과정에서의 각 단계별 시간을 선택하였다. 즉 동결시간으로는 EGF1 (5-5-5-10-5)과 EGF2 (3-3-3-6-3)를 선택하여 적용하였고, 융해과정에는 EGT1 (5-5-5-5)보다 EGT-2 (3-3-3-3)와 EGT3 (1-1-1-1)가 높은 생존율과 발생률을 보였으나, EGT1 그룹의 경우 기존에 사용하던 방법이므로 3그룹을 모두 선택하였다. 새롭게 조합된 방법으로 대조군과 PROH군을 첨가하여 실험한 결과는 다음과 같다 (Figure 3). Day5 배양 후 조합된 결과에 의한 포배기까지의 발생률을 보면 기존의 단계별 시간을 적용한 PROH와 EG1그룹은



Group	Freezing 5 step (minute)	Thawing 4 step (minute)
PROH	5-5-5-10-5	5-5-5-5
EG1	5-5-5-10-5	5-5-5-5
EG2	5-5-5-10-5	3-3-3-3
EG3	5-5-5-10-5	1-1-1-1
EG4	3-3-3-6-3	5-5-5-5
EG5	3-3-3-6-3	3-3-3-3
EG6	3-3-3-6-3	1-1-1-1

Figure 3. Combination of exposure time during freezing and thawing step. Developmental rates to blastocyst of mouse embryos frozen-thawed with 1.5 M PROH or 1.5 M EG were investigated. Blastocyst include the embryos developed to blastocyst, hatching, and hatched blastocyst. The values with different superscripts are significantly different ($p<0.05$).
*A control group was cultured for 5days without being exposed to the cryoprotectant solution or frozen

65.3%와 62.9%로 유사하게 나타났고, EG5와 EG-6가 각각 72.1%, 70.4%로 평형시간에 변형을 준 그룹들 중 PROH와 EG1그룹에 비해 높게 나타났으나 통계상의 유의차는 나타나지 않았다.

고 찰

동결보존시 배아의 생존과 발달은 동결과 융해시의 빙 결정 (ice crystal) 형성에 의한 물리적인 손상, 삼투압의 변화에 따른 충격, 동결보호제의 독성, 융해 시 온도 상승에 따른 기포화 현상, 그리고 동결시의 낮은 온도 등에 의해 결정된다. 또한 배아의 발생단계, 동결보호제의 종류, 동결과 융해시의 평형시간과 온도 등에 따라 영향을 받는다.

배아의 동결보존방법에 의한 상해여부를 가늠할 수 있는 인자로는 각 할구의 생존과 유사분열의 재개가 있다.[11] 기존의 완만동결방법으로 EG와 PROH의 효능을 비교한 결과 생존율은 인간의 3PN에서 유래된 배아는 유사하였으나 생쥐배아의 경우는 EG를 사용하였을 경우 높았다. 융해 후 lysis된 배아의 수치는 EG와 PROH에서 실험 1과 실험 2에서 모두 비슷하였다. 그러나 부분적으로 lysis가 일어난 수치는 생쥐와 인간의 배아에서 PROH가 EG보다 높았다 (Figure 1, Figure 2). 따라서 lysis가 전혀 일어나지 않은 배아는 EG가 PROH보다 높게 나타났으며 융해 후 생존율은 PROH보다 EG가 안

정적이라고 볼 수 있다. 각 할구를 형태학적 판단에 따른 생존여부 결과에 의하여, 동일 조건에서 PROH를 사용하였을 경우 세포내의 빙 형성이나 osmotic swelling에 의한 물리적인 상해를 더 받은 것으로 사료된다.[17] 임상적용 후의 임신율과 착상율 등을 고려해 본다면, 부분적으로 lysis가 일어난 것보다 lysis가 전혀 일어나지 않은 것을 많이 이식하는 것이 임신율 및 착상율을 높일 수 있으므로[16,18] EG로 동결보존을 수행했을 경우 좀더 우수한 임상적 결과를 유도할 수 있을 것이라 사료된다. 또한 실질적으로 임상에서의 동결융해 후 배아이식을 위한 배아의 선택에는 주로 lysis가 50% 이하인 것을 선택하게 되는데, 이식할 수 있는 배아의 개수는 인간배아의 경우 두 동결보호제 간에 차이가 발생하지 않았지만 생쥐배아의 경우 EG의 수치가 높게 나타났으므로 PROH보다 좋은 결과를 예상할 수 있을 것이다. 한편, 생쥐의 배아를 day5까지 배양한 결과에서는 EG로 동결보존한 군에서 lysis가 높게 나타났고, 형태학적으로 정상을 보이지만 발생이 정지된 배아는 EG보다 PROH로 동결한 경우 높게 나타났으므로 화학적인 독성에 의한 상해를 더 받은 것으로 사료된다.[17] 포배기 발생은 생쥐의 난할기 단계의 동결 보존 시 PROH와 EG 두 군 간에 차이가 없었다.

DMSO의 높은 독성 때문에 1980년대 중반부터 PROH가 사용되어 졌고, 이후 여러 실험을 통해 평형농도, 노출시간, 그리고 온도조건을 설정하여 최적의 조건상태로 적용 및 연구되어 왔다.[19] 이에 반하여 EG의 경우 유리화 동결, 급속 동결에는 많은 연구결과와 임상적용을 하고 있지만 완만동결 시 동결보호제로서의 효능은 많이 알려지지 않은 상태이다. PROH보다 세포 내외로의 투과능이 우수하고 화학적 독성이 적은 EG를 사용함에도 불구하고 비슷한 결과가 나온 것은 EG를 완만동결에 사용할 경우 최적의 효율을 얻기 위한 조건을 맞추지 않고 기존의 PROH에 적합한 방법으로 시행했기 때문이라고 사료된다. 예를 들어 동결보호제 노출시의 온도가 낮은 경우 충분한 투과가 이루어지지 않으므로 각각의 처리과정의 상온에서 실시하던 평형단계를 상온 이상으로 올려 설정하거나, 1.5 M 농도에서의 농도변경, 평형단계에서 각각의 노출시간을 줄이는 등의 연구를 통해 보다 좋은 결과를 얻을 수 있을 것이다. 따라서 투과능이 EG가 우수한 점을 이용, 노출시간에 변형을 주어 실험 3을 수행하였다.

Figure 3에서 EG를 사용하여 동결에 5-5-5-10-5, 융해에 5-5-5-5의 분 단위로 동결보존 (EG1) 결과보다 동결에는 3-3-3-6-3분을 적용하고 융해에는 3-3-3-3분 (EG5) 또는 1-1-1-1 (EG6)을 적용시킨 군에서 발생률이 높게 나타났다. 이 결과를 분석해 보면 기존의 평형시간보다 짧은 시간 내에 EG가 배아 내에 빙 결정 형성을 억제할 수 있는 충분한 탈수화 및 동결보호제의 투과가 가능했고, PROH와 발생률도 비슷한 수치를 보임으로써 EG의 투명대와 세포막을 통한 세포 내로 빠른 확산 (diffusion)과 평형 (equilibration)이 우수함을 관찰할 수 있었다. 평형시간이 감소되면 배아가 화학물질의 독성에 노출되는 것을 줄일 수 있고, 임상적용 시에 동결과 융해과정 시간을 단축시킬 수 있을 것이다. EG2군과 EG3군은 배아 내로 투과된 동결보호제가 융해과정에서 희석하기에 충분한 시간이 주어지지 않아 낮은 발생률이 나타난 것으로 생각되어 진다. 한편 동결 평형시간에 변형을 시켜 1-1-1-2-1분을 적용시킨 군 (EGF3)의 경우 발생률이 낮았는데 (Table 1) 이것은 동결과정 중 온도 하강에 따른 빙 결정 형성을 저해할 수 있는 충분한 양의 동결보호제가 없기 때문으로, 노출시간의 부족으로 인한 세포 내 동결보호제의 농도가 불충분하여 상해를 받은 것으로 사료된다.[17]

생쥐의 배아는 동결 융해 후 생존율과 포배기까지 배양으로 유사분열의 재개여부 결과를 볼 수 있었지만 인간의 비정상적인 3PN에서 유래된 배아의 경우 대부분이 동결 융해 후 발생이 정지 또는 lysis되어 포배기까지의 발생률을 볼 수 없었고 생존율만을 비교하였다. 생쥐의 경우 형태학적으로 배아의 등급이 좋았지만, 인간배아는 모든 등급이 실험에 사용하여 동결보존 전후의 등급 비교가 되지 않았다. 또한 PROH의 경우 난자채취 후 3일 동안 배양한 배아보다 2일 동안 배양한 배아 동결 시, 그리고 중간단계인 3, 5, 그리고 7세포기보다는 2, 4, 6, 그리고 8세포기의 배아 동결에 적합하다는 결과가 보고되었다.[3] 그러나 본 실험의 경우

생쥐의 동결보존에는 6-8세포기만을 대상으로 수행, 2-5세포기 발생단계의 두 동결보호제의 효능을 비교하지 못했고, 인간배아의 동결보존에는 발생단계 및 배양기간 구분 없이 EG와 PROH를 비교하게 되었다.

이 실험의 궁극적인 목적은 인간 난할단계 배아의 동결보존을 보다 효율적으로 대체할 가능성이 있는 동결보호제의 비교이다. 그러므로 주로 유리화 동결보존방법에 사용되고 있는 동결보호제인 EG와 완만동결에 사용되고 있는 PROH를 실험하였다. 이를 위하여 정상적인 2PN에서 유래된 배아를 대체할 대상으로 임상 IVF시술에서 나온 발생학적으로 비정상적인 3PN에 유래된 배아와 정상적인 생쥐의 배아를 사용하였다. 비록 EG가 PROH와 화학적 성질이 동일 계열로 비슷하나 임상적으로 주로 유리화 동결 및 일부 완만동결에 사용되어지고 있다. 그러나 본 연구에서 동일한 실험조건에서 동결보호제인 EG를 사용하였을 경우에 PROH를 사용한 경우보다 동결 후 부분적으로 lysis가 나타난 배아가 줄어든 반면, lysis가 전혀 일어나지 않은 배아를 많이 획득하였다. 또한 동결보존시의 평형시간의 감소에도 불구하고 동일한 효과가 있으므로 배아가 동결보호제의 화학적 독성에 노출되는 시간을 줄일 수 있었다. 따라서 완만동결 사용에 맞는 온도, 노출시간, 그리고 농도 등의 최적조건을 설정하면 PROH와 더불어 완만동결보존 방법에도 효과적으로 사용할 수 있고 보다 우수한 결과를 얻을 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of and eight-cell embryo. Nature 1983; 305: 707-9.
2. Zeilmaker GH, Alberta AT, van Gent I. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. Fertil Steril 1984; 42: 293-26.
3. Lassalle B, Testart J, Renard JP. Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2-propanediol. Feril Steril 1985; 44: 645-51.
4. Kasai M, Nishimori M, Zhu SE, Sakurai T, Machida T. Survival of mouse morulae vitrified in an ethylene glycol-based solution after exposure to the solution at various temperatures. Biol Reprod 1992b; 47: 1134-9.
5. Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T, Machida T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. J Reprod Fertil 1990; 89: 91-7.
6. Cocero MJ, Moreno S, Aguilar B. Ultrastructural characteristics of fresh and frozen-thawed bovine embryos using two cryoprotectants. Biol Reprod 2002; 66: 1244-58.
7. Shaw JM, Ward C, Trounson AO. Evaluation of propanediol, ethylene glycol, sucrose and anti-freeze proteins on the survival of slow-cooled mouse pronuclear and 4-cell embryos. Hum Reprod 1995; 10: 396-402.
8. Chi HJ, Koo JJ, Kim MY, Joo JY, Chang SS, Chung KS. Cryopreservation of human embryos using ethylene glycol in controlled slow freezing. Hum Reprod 2002; 17: 2146-51.
9. Emiliani S, Bergh MV, Vannin A, 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. Hum Reprod 2000; 15: 905-10.
10. Cho HJ. Son WY, Yoon SH, Lee SW, Lim JH. An improved protocol for dilution of cryoprotectant from vitrified human blastocysts. Hum Reprod 2002; 9: 2419-22.
11. Newton H, Fisher J, Arnold JRP, Pegg DE, Faddy MJ, Gosden RG. Permeation of human ovrian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. Hum Reprod 1998; 13: 376-80.
12. Park SP, Kim EY, Kim DI, Park NH, Won YS, Yoon SH, et al. Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocyst using electron microscope grids. Hum Reprod 1999; 14:

2838-43.

13. Yoon TK, Chung HM, Lim JM, Han SY, Ko JJ, Cha KY. Pregnancy and delivery of healthy infants developed from vitrified oocytes in a stimulated in vitro fertiliation-embryo transfer program. Fertil Steril 2000; 74: 180-1.
14. Ali J, Shelton N. Design of vitrification solution for the cryopreservation of embryos. J Reprod Fertil 1993; 99: 471-7.
15. Summerfeld V, Niemann H. Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. Cryobiology 1999; 38: 95-105.
16. Guerif F, Bidault R, Cadoret V, Couet M, Lansac J, Royere D. Parameter guiding selection of best embryos for transfer after cryopreservation: a reappraisal. Hum Reprod 2002; 17: 1321-6.
17. Mukaida T, Wada S, Takahashi K, Pedro PB, An TZ, Kasai M. Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. Hum Reprod 1998; 13: 2874-9.
18. Burns WN, Gaudet TW, Martin MB, Ramiro Leal Y, Schoen H, Eddy CA, et al. Survival of cryopreservation and thawing with all blastomeres intact indentifies multicell embryos with superior frozen embryo transfer outcome. Fertil Steril 1999; 72: 527-32.
19. Paynter SJ, O'Neil L, Fuller BJ, Shaw RW. Membrane permeability of human oocytes in the presence of the cryoprotectant propane-1,2-diol. Fertil Steril 2001; 75: 532-8.