

유리화 동결액 노출이 돼지 미성숙 난포란의 성숙율, 수정을 및 배발달율에 미치는 영향

최인경^{1,†} · 석상현 · 김광식² · 송해범

대구대학교 자연자원대학

초 록

본 연구는 돼지 미성숙 난포란의 유리화 동결액에 노출시 독성과 삼투압 스트레스가 가장 적은 유리화 동결액을 조사하기 위하여 실시하였으며, 그 결과를 요약하면 다음과 같다. 미성숙 난포란을 EFS(40% ethylene glycol + 18% ficoll + 0.3 M sucrose) 용액, ES(5.5 M ethylene glycol + 1.0 M sucrose) 용액, GE(10% glycerol + 20% ethylene glycol) 용액에 각각 노출하고 대조구로 아무 처리하지 않은 난포란을 체외성숙하여 관찰한 체외성숙율은 ES 용액과 대조구에서 EFS 용액과 GE 용액보다 유의적으로 높았으며($P < 0.05$), 유리화 동결액의 독성에 의한 난포란의 퇴화율은 대조구, ES 용액, EFS 용액, GE 용액 순으로 유의적으로 낮은 퇴화율을 나타내었다($P < 0.05$). 미성숙 난포란을 EFS 용액, ES 용액, GE 용액에 각각 노출하고 대조구로 아무 처리하지 않은 난포란을 체외성숙, 체외수정하여 관찰한 정상 수정율은 대조구가 세 종류의 유리화 동결액보다 유의적으로 높았고($P < 0.05$), 유리화 동결액 간에는 유의적인 차이가 없었다. 다정자 침입율과 난자당 침입한 평균 정자수는 모든 처리구간에 유의적인 차이가 없었다. 미성숙 난포란을 EFS 용액, ES 용액, GE 용액에 각각 노출하고 대조구로 아무 처리하지 않은 난포란을 체외성숙, 체외수정, 체외배양하여 관찰한 수정 3 일째의 분할율은 ES 용액과 대조구가 EFS 용액과 GE 용액보다 유의적으로 높았으며($P < 0.05$), 수정 7일째의 배반포 형성율은 모든 처리구간에 유의적인 차이가 없었다. 배양기간 동안 나타난 퇴화율은 대조구가 세 가지 유리화 동결액에 비해 유의적으로 낮았고($P < 0.05$), ES 용액은 EFS 용액과 GE 용액보다 유의적으로 낮은 퇴화율을 나타내었다($P < 0.05$).

(주제어 : Vitrification solution, Immature porcine oocyte, EFS, ES, GE)

서 론

사람과 소의 생식 보조술에서 동결 보존되는 배아의 수는 해마다 증가되고 있으며 이것은 배아의 생존율이 상대적으로 일관되고 여러 종에서 상업적 이용이 가능하기 때문이다. 이러한 수정란 동결보존의 성공적인 성과에 비하면 미수정란의 동결보존은 아직 미미한 수준에 있다. 포유동물의 미성숙 난포란의 동결보존은 유기적인 체외수정란 생산 시스템 및 다양한 수정란 연구에 대량의 난자를 공급하며, 시간에 구애받지 않고 여러 가지 실험을 할 수 있다는 장점을 가지고 있으나(Pieterse 등, 1991) 아직 접합체나 배아에 비해 어려움이 많다(Hochi 등, 1997).

동결에 의한 손상은 동결, 용해 시 발생하는 빙 결정의 형성, 삼투압, 동결액의 독성, 세포 내 전해질 농도의 변화, 냉각에 의한 손상 그리고 다른 여러 가지 요인들이 작용하여 투명대와 세포질의 파괴를 가져온다(Kasai, 1996 ; Martino 등, 1996). 또한 고농도의 동해방지제는 그 자체의 독성으

로도 난자에 손상을 준다. 더욱이 난자는 동해방지제에 노출되는 동안 높은 용적으로 인해 삼투압의 영향을 받아 형태적으로 큰 변화가 생기며 그 결과로 세포막과 세포 골격 및 세포 내 미세구조들이 손상을 입게 된다(Massip 등, 1995 ; Dobrinsky, 1996 ; Saha 등, 1996). 따라서 난자의 동결보존을 위해 동결보호제를 세포 속으로 침투할 수 있도록 하는 것은 필수적이다. 완만동결에서 사용하는 동결보호제의 농도는 1~2 mol/ℓ로 상대적으로 독성이 낮으나, 유리화 동결에서는 비교적 높은 농도인 8 mol/ℓ을 사용하므로 낮은 독성을 가진 물질을 선택하는 것이 중요하다(Kasai와 Song, 2003).

일반적으로 완만동결에 사용되는 동해방지제가 유리화 동결에서도 대부분 사용되며 독성을 줄이기 위하여 두 가지 또는 그 이상의 동해방지제를 혼합하여 사용하고 있다. Glycerol, dimethyl sulfoxide(DMSO) 및 sucrose를 혼합한 동결방법이 보고되었고(김 등, 1991), EG + ficoll + sucrose를 혼합한 EFS법(Kasai 등, 1990 ; Tachikawa 등, 1993), EG + DMSO + sucrose를 혼합한 EDS법(Lane 등, 1999 ; Vajta

¹ 대구미래여성병원(Daegu Mirae Women's Hospital).

² 천안연암대학(Cheonan Yonam College).

[†] Corresponding author : Daegu Mirae Women's Hospital, Daegu 704-932, Korea. E-mail: 4ever-ink@hanmail.net

등, 1998), EG + PVP(Leibo와 Oda, 1993) 등으로 수정란의 유리화 동결시 고농도의 동결보호제 처리는 빙 결정 형성을 막을 수 있으며 높은 생존율을 얻을 수 있다고 하였다. 마우스와 소 난자의 유리화 동결은 DMSO + acetamide + propylene glycol(Schellander 등, 1994), EG + DMSO(Vajta 등, 1997), DMSO + glycerol + 1,2-propanediol(PROH ; Otoi 등, 1995) 등 다양한 동결보호제가 다양한 농도와 평형시간에 따라 사용되어졌다. 하지만 난포란의 동결에는 동결보호제의 종류, 첨가농도와 첨가방법, 평형시간 등 영향을 미치는 요인이 매우 많아서 보고자들 간에 결과에 있어 큰 차이가 있을 뿐만 아니라 단편적인 연구가 대부분을 이루고 있는 실정으로 아직까지도 생존율이 높은 동결방법이 확립되지 않은 실정이다.

최근 핵이식에 의한 복제동물 생산, 유전자 이식에 의한 유용한 생리활성물질의 생산, 사람에서 외부장기이식을 위한 생물의학 발전 등과 같은 가축 번식학 분야의 첨단기술에 대한 연구가 진행되고 있으며, 이로 인해 돼지 난자의 동결보존에 대한 중요성 또한 증가되고 있다(Wall, 1996 ; Prather, 2000). 돼지의 장기조직은 해부학적 그리고 생리학적으로 사람과 유사하기 때문에, 돼지는 외부장기이식의 제공자 또는 실험동물로서 매우 가치가 있다.

대부분 복제동물을 생산할 때마다 공여하는 동물에 외과적인 수술로 난자를 회수하고 있으나 이 외과적인 방법은 매우 비용이 많이 들고 고도의 기술을 요구한다(Kashiwazaki와 Shino, 2001). 따라서 이를 해결하는 하나의 수단으로 가축 난소에 다량으로 존재하는 미성숙 난포란을 채취하여 동결보존하고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 만약 돼지 난자의 동결보존 기술이 확립된다면 비용과 시간의 절감 등 매우 효과적일 것이다. 이에, 본 연구는 돼지 미성숙 난포란의 유리화 동결시 적합한 유리화 동결액을 찾기 위해, 미성숙 난포란을 여러 가지 유리화 동결액에 노출한 후 발생능력을 비교, 조사하였다.

재료 및 방법

난포란의 채란

본 실험에 사용된 난포란은 도축장에서 도살직후 적출된 돼지의 난소로부터 회수하였다. 난소는 100 IU/ml penicillin G와 100 µg/ml streptomycin sulfate를 첨가한 생리식염수가 담긴 보온병(39°C)에 침지하여 1~2시간 내에 실험실로 운반하였다. 생리식염수로 난소 주위의 이물질과 혈액을 세척한 다음 70% 알콜 가아제를 이용하여 난소의 표면을 소독하고, 18G의 주사침이 부착된 10 ml 주사기로 2~6 mm 크기의 난포로부터 난포액을 흡입한 후 15 ml 원심분리관에 분주하여 10 분간 정지시켰다. 원심분리관 하단의 침전물은 4 mg/ml BSA가 첨가된 D-PBS와 희석하여서 IVF chamber(37°C, 5% CO₂)에서 난포란을 회수하였다. 난포란은 난구세포의 부착 정도와 세포질의 충실도에 따라 선별하였으며, 최소한 2층 이상의 난구세포층이 부착되어 있고, 세포질이 균일하고 충실한 것만을 실험에 공시하였다.

유리화 동결액

유리화 동결액과 용해액의 제조 : 미성숙 난포란의 유리화 동결을 위해 사용한 동결액은 다음과 같은 유리화 동결액과 용해액을 제조하고, 모든 용액은 제조 후 0.22 µm filter로 여과하여 4°C에서 보관하였고, 동결하기 30 분전 실온에서 평형시킨 후 사용하였다.

EFS 용액 : EFS 유리화 동결액은 EG, ficoll, sucrose가 조합된 동결액(Mahmoudzadeh 등, 1995)으로, 10% FBS가 포함된 D-PBS를 기본용액으로 하여 1 단계 20%(v/v) EG, 2 단계 40% EG(v/v) + 18%(w/v) ficoll(MW70,000) + 0.3M sucrose를 각각 첨가하여 제조하였다.

ES 용액 : ES 유리화 동결액은 EG와 sucrose이 조합된 동결액(Martino 등, 1996)으로, 10% FBS가 포함된 D-PBS를 기본용액으로 하여 1 단계 1.5 M EG, 2 단계 5.5 M EG + 1.0 M sucrose를 각각 첨가하여 제조하였다.

GE 용액 : GE 유리화 동결액은 glycerol(G)과 EG이 조합된 동결액(Yang 등, 1992)으로, 10% FBS가 포함된 D-PBS를 기본용액으로 하여 1 단계 10%(v/v) G, 2 단계 10%(v/v) G + 20%(v/v) EG, 3 단계 25%(v/v) G + 25%(v/v) EG를 각각 첨가하여 제조하였다.

용해액 : 모든 유리화 동결액에서 탈수된 난포란은 동결보호제를 제거하고 재수화 시키기 위해 사용된 용해액은 기본용액에 1.0 M, 0.5 M, 0.25 M, 0.125 M, 0M sucrose를 각각 첨가하여 제조하였다.

유리화 동결액의 노출 : 선별된 난포란은 4 mg/ml BSA가 첨가된 D-PBS액으로 3 회 세척한 후 아무 처리도 하지 않고 바로 체외성숙을 실시한 대조구와 세 가지 유리화 동결액에 다음과 같이 각각 노출하였다.

EFS 용액의 노출은 미성숙 난포란을 10% FBS + D-PBS 용액에 5 분, 20% EG 용액에 3 분, 40% EG + 18% ficoll + 0.3 M sucrose 용액에 30초 동안 노출하였고, ES 용액의 노출은 미성숙 난포란을 10% FBS + D-PBS 용액에 5분, 1.5M EG 용액에 2.5 분, 5.5M EG + 1.0 M sucrose 용액에 30초 동안 노출하였으며, ES 용액의 노출은 미성숙 난포란을 10% FBS + D-PBS 용액에 5분, 1.5 M EG 용액에 2.5분, 5.5 M EG + 1.0 M sucrose 용액에 30초 동안 노출하였다. 세 가지 유리화 동결액에 노출된 난포란은 동결과정은 생략하고 바로, 1.0 M, 0.5 M, 0.25 M, 0.125 M, 0M sucrose에 각각 2.5 분씩 노출하여 동결보호제 성분을 제거하였다.

난포란의 체외성숙

배양액 : 난포란의 체외성숙 배양액은 TCM 199에 10% FBS를 첨가하여 여과한 후 1 µg/ml FSH, 0.57 mM cysteine, 10 ng/ml EGF를 각각 첨가하여, 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 16~18시간 평형시킨 후 사용하였다.

체외성숙 : 동결액과 용해액에 노출된 세 처리군의 미성숙 난포란은 체외성숙 배양액에 3 회 세척 후 체외성숙을 계속 실시하였고, 대조구는 아무 처리도 하지 않고 채란 후 바로 체외성숙을 실시하였다. CO₂ 배양기에서 평형된 50 µl의 성숙배양액에 난포란을 각각 30 개씩 넣어 42~44 시간 동안 체외배양을 실시한 후, 체외성숙된 전체 난포란의 1/5은 체외성숙을 조사를 위해 염색을 실시하고, 나머지 4/5은 모두 체외수정에 이용되었다.

체외성숙을 조사 : 미성숙 난포란의 유리화 동결시 가장 효과적인 유리화 동결액을 선정하기 위하여, 각각의 유리화 동결액(EFS 용액, GE 용액, EG 용액)에 노출한 난포란과 대조구의 난포란을 체외성숙한 후 체외성숙율을 조사하였다.

체외성숙을 완료한 난포란의 일부는 0.1% hyaluronidase로 난구세포를 완전히 제거하고 고정액(acetic acid : ethyl alcohol = 1 : 3)에 48~72 시간 이상 고정시킨 후 1% orcein 염색액(orcein : acetic acid = 1 : 45)으로 염색하고 탈염제(acetic acid : distilled water : glycerol = 1 : 3 : 1)로 염색액을 제거한 다음 위상차 현미경하에서 체외성숙율을 관찰하였다.

체외수정

배양액 : 정자의 처리와 체외수정을 위한 배양액은 4 mg/ml BSA와 1 mM caffein sodium benzonate를 첨가한 mTBM(Abeydeera와 Day, 1997)을 사용하였다.

정자의 준비 : 본 실험에 사용된 정액은 경북 AI 센터(경북 영천시 대창면 소재)에서 수음법과 기계로 채취하여 희석한 희석정액이었다.

활력이 높은 정자를 선별하기 위하여 swim-up 방법을 이용하여 정자를 회수하였다. Swim-up의 유도는 희석정액을 배양액으로 2 회 세척한 후, 15 ml conical plastic tube에 농후정자와 체외수정용 배양액이 층을 이루도록 하기 위해 tube 아래층에 정자를 넣고 그 위의 층에 배양액이 섞이지 않도록 조심스럽게 분주한 후 45°각도로 눕혀서 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 30분 동안 활력이 좋은 정자의 부유를 유도하였다.

체외수정 : Swim-up으로 부유된 상층액의 정자는 채취한 후 정자의 최종농도가 5×10⁵/ml이 되도록 조정하였다. 준비된 정자는 배양접시에 50 μl의 정자 drop을 제작한 후 CO₂ 배양기에서 평형시킨 mineral oil을 덮어 30분간 전배양을 실시하고 체외수정에 이용하였다. 성숙성 배양한 난포란은 반복적인 피펫팅으로 주위의 난구세포를 제거한 후 4 mg/ml BSA가 첨가된 mTBM에서 3회 세척하고 정자 drop에 각각 30개씩 넣어 6시간 동안 수정을 유도하였다. 수정완료 후 수정을 실시한 난포란의 1/2을 수정율 조사를 위해 염색을 실시하고, 나머지 1/2의 난포란은 모두 체외배양을 실시하였다.

체외수정을 조사 : 미성숙 난포란의 유리화 동결시 가장 효과적인 유리화 동결액을 선정하기 위하여, 각각의 유리화 동결액(EFS 용액, GE 용액, EG 용액)에 노출한 난포란을 체외성숙, 체외수정한 후 체외수정율을 조사하였다.

체외수정율을 조사하기 위해 6시간 동안 수정이 유도된 난포란과 대조구의 난포란을 체외배양액으로 세척하여 옮기고 6시간 후, orcein으로 염색하여 위상차 현미경하에서 체외수정율을 조사하였다. 하나의 정자 두부와 꼬리가 보이거나 응성전핵이 형성된 것은 정상수정으로 판단하고, 하나 이상의 정자두부와 응성전핵이 형성된 것을 다정자 침입으로 판단하였다.

체외배양

배양액 : 수정란의 배 발달을 위한 배양액은 NCSU23 (Petter와 Wells, 1993)에 0.4% BSA를 첨가하여 여과한 후 사용하였다.

체외배양 : 6 시간 동안 수정이 유도된 난자는 NCSU23 배양액으로 세척하고 체외배양액 30 μl에 각각 20 개의 수정란을 넣어 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 7일간 배양하였다.

배발달을 조사 : 미성숙 난포란의 유리화 동결시 가장 효과적인 유리화 동결액을 선정하기 위하여, 각각의 유리화 동결액(EFS 용액, GE 용액, EG 용액)에 노출한 난포란과 대조구의 난포란을 체외성숙, 체외수정한 후 체외배양하면서 수정한 날을 0일째로 하여, 수정한 후 3일째에는 분할율을 조사하였고, 7일째에는 배반포 형성율을 조사하였다.

통계처리

본 연구에서 얻어진 모든 실험자료의 통계처리는 SAS 프로그램(version 8.1)과 microsoft 프로그램을 이용하여 t-test에 의해 분석하였고, P<0.05의 경우만을 처리구간의 통계학적 차이로 인정하였다.

결과 및 고찰

유리화 동결액이 미성숙 난포란의 체외성숙에 미치는 영향
미성숙 난포란의 유리화 동결시 가장 효과적인 유리화 동결액을 선정하기 위하여, 미성숙 난포란을 EFS 용액, ES 용액, GE 용액에 각각 노출시킨 후, 동결보호제 처리에 따른 독성에 대한 영향과 체외성숙 결과는 Table 1과 같다.

고농도의 동결보호제로 인해 나타나는 독성의 결과로 유리화 동결액에 노출한 후, 44 시간의 성숙기간 동안 퇴화하는 난포란이 관찰되었는데, 대조구, EFS 용액 노출구, ES 용액 노출구 및 GE 용액 노출구에서 각각 6.8%, 64.1%, 29.7% 및 74.4%로, 유리화 동결액에 노출된 난포란이 유리화 동결액에 노출되지 않은 난포란보다 유의적으로 높은 퇴화율이 관찰되었고, GE 용액, EFS 용액, ES 용액 순으로 유의적으로 높은 퇴화율이 관찰되었다(P<0.05).

각 유리화 동결액에 따른 MII까지의 성숙율은 대조구, EFS 용액 노출구, ES 용액 노출구 및 GE 용액 노출구에서 각각 57.6%, 38.8%, 44.5% 및 22.4%로 유리화 동결액에 노출된 난포란은 유리화 동결액에 노출되지 않은 난포란보다 유의적으로 낮은 성숙율을 나타내었다(P<0.05). 유리화 동결액 중에서는 ES 용액에 노출된 난포란이 EFS 용액과 GE 용액에서보다 유의적으로 높은 성숙율을 나타내었다(P<0.05).

EG는 침투성 물질로서 유리화 동결이나 초급속동결에서 동결보호제로 널리 사용되고 있으며(Martino 등, 1996), 포유동물의 난자의 유리화 동결에 적당한 동결보호제로 알려져 있다(Bautista와 Kanagawa, 1998). EG는 말의 미성숙 난자 유리화 동결에서도 동결보호제로 사용되었는데 1,2-propanediol과 glycerol을 이용했을 때보다 더 많은 난자가 성숙을 완료하였다고 보고하였다(Hochi 등, 1994). Papis 등(1995)은 1) DAP(2 M DMSO, 1 M acetamide, 3 M PG), 2) HVM(2.72M PG, 1.36 M glycerol, 1 M sucrose), 3) EFS (40% EG, 18% ficoll, 0.3 M sucrose), 4) VS14(5.5 MEG,

Table 1. Effects of different solutions on *in vitro* maturation of immature porcine oocytes

VS solution	No.(%) of oocytes		No.(%) of oocytes at stage				
	Examined	Degenerated	GV	GVBD	M I	A I ~T I	M II
Control ¹⁾	205	14(6.8) ^d	7(3.4)	1(0.5)	51(24.9)	14(6.8)	118(57.6) ^a
EFS ²⁾	153	98(64.1) ^b	3(2.0)	1(0.7)	7(4.6)	6(3.9)	38(38.8) ^b
ES ³⁾	182	54(29.7) ^c	0(0.0)	2(1.1)	34(18.7)	11(6.0)	81(44.5) ^a
GE ⁴⁾	156	116(74.4) ^a	1(0.6)	0(0.0)	4(2.6)	0(0.0)	35(22.4) ^b

^{a,b,c,d} The values with different superscripts in a same column differ significantly($P < 0.05$).

¹⁾ Control: none-treatment.

²⁾ EFS: 40% ethylene glycol + 18% ficoll + 0.3 M sucrose.

³⁾ ES: 5.5M ethylene glycol + 1.0 M sucrose.

⁴⁾ GE: 10% glycerol + 20% ethylene glycol.

1 M sucrose), 5) EBS(4.5 M EG, 1M 2,3-butanediol, 1 M sucrose)의 다섯 가지 유리화 동결액을 이용하여 체외성숙된 소 난자의 독성을 실험한 결과 VS14 용액에서 가장 좋은 효과를 얻었음을 보고하여, 본 실험과 같은 결과를 나타내었다.

유리화 동결액에 노출되어진 난포란은 노출되지 않은 난포란과 비교하여 낮은 성숙율과 높은 퇴화율을 나타내어, 미성숙 난포란의 동결보존에서 저온에 의한 손상뿐만 아니라 고농도의 동결보호제에 대한 노출만으로도 손상의 원인이 됨을 알 수 있었다. 또한, 이 실험에서 사용되어진 유리화 동결액 중 ES 용액에서 가장 좋은 성숙율과 낮은 퇴화율이 관찰되었다.

유리화 동결액이 미성숙 난포란의 체외수정에 미치는 영향
미성숙 난포란의 유리화 동결시 가장 효과적인 유리화 동결액을 선정하기 위하여, 미성숙 난포란을 EFS 용액, ES 용액, GE 용액에 각각 노출시킨 후, 체외성숙과 체외수정을 하여 관찰한 체외수정율과 다정자침입율의 결과는 Table 2와 같다.

난포란의 정상 수정율은 대조구, EFS 용액 노출구, ES 용액 노출구 및 GE 용액 노출구에서 각각 56.5%, 38.2%, 39.0% 및 36.7%로, 유리화 동결액에 노출된 난포란의 정상

수정율은 대조구에 비해 유의적으로 낮았으며($P < 0.05$), 세 가지 유리화 동결액에 노출된 난포란의 수정율에서는 유의적인 차이가 없었다. 또한 다정자 침입율과 난자당 침입한 평균 정자수는 대조구를 비롯한 각 노출구에서 유의적인 차이가 없었다.

Zhu 등(1998)은 소 난자를 여러 동결보호제에 노출 후 완만동결하여 관찰한 수정율에서 0.8 M PROH+0.8M DMSO가 다른 처리 그룹(1.6M PROH+0.2 M sucrose, 1.6 M DMSO+0.2 M sucrose)보다 유의적으로 높은 수정율을 나타내었고, 이는 아무 처리하지 않은 대조구와 유의적인 차이가 없는 결과였다고 하여 본 연구와 다른 결과를 보고 하였는데, 이들이 사용한 동결보호제는 0.8 M 또는 1.6 M 로 본 연구에서 사용한 5.5 M 또는 40% 농도에 비하면 아주 저농도의 동결보호제를 사용하였기 때문에 본 연구 결과와는 달리 대조구와 유의적인 차이가 나타나지 않은 것으로 보인다.

Otoi 등(1993)은 1.6 M glycerol + 0.2 M sucrose와 1.6M glycerol에 노출 후 동결된 소 난자의 수정율에서 유의적인 차이가 없었으나, 1.6 M DMSO와 1.6 M DMSO+0.2 M sucrose에서는 sucrose가 첨가된 용액에서 수정율이 낮았

Table 2. Effects of vitrification solutions on *in vitro* fertilization of immature porcine oocytes

VS solution	No.(%) of oocytes					Mean no. of spermatozoa penetrated oocyte (Mean±SD) ¹⁾
	Examined	Degenerated (%)	Unfertilized (%)	Fertilized(%)		
				Normal	Polyspermic [*]	
Control ²⁾	186	11(5.9) ^b	53(28.5)	105(56.5) ^a	17(9.1)	1.24 ± 0.11
EFS ³⁾	68	29(42.6) ^a	10(14.7)	26(38.2) ^b	4(5.9)	1.15 ± 0.12
ES ⁴⁾	82	14(17.1) ^b	31(37.8)	32(39.0) ^b	5(6.1)	1.15 ± 0.09
GE ⁵⁾	79	24(30.4) ^a	20(25.3)	29(36.7) ^b	6(7.6)	1.17 ± 0.03

^{a,b} The values with different superscripts in a same column differ significantly($P < 0.05$).

^{*} No significant differences among groups.

¹⁾ Values are means standard deviation.

²⁾ Control: none-treatment.

³⁾ EFS : 40% ethylene glycol + 18% ficoll + 0.3 M sucrose.

⁴⁾ ES: 5.5 M ethylene glycol + 1.0 M sucrose.

⁵⁾ GE: 10% glycerol + 20% ethylene glycol.

다고 보고하였지만 본 연구에서는 동결과정 없이 유리화 동결액의 노출만으로 sucrose의 첨가 유무에 의한 수정율에 대한 영향은 없는 것으로 사료된다. Carroll 등 (1989)은 고농도의 동결보호제에 노출되어 동결된 마우스 난자는 투명대와 난황(vitellus)의 구조적 변화에 의해 수정율이 감소한다고 하였고, 한편으로 체외수정 후 배수체는 증가한다고 하였다(Glenister 등, 1987).

일반적으로 동결, 용해한 난자는 투명대의 경화현상이 발생하여 용해 후 수정율이 저하되거나 이상수정이 발생하는 것으로 알려져 있으나(Al-Hasani 등, 1987 ; Carroll 등, 1990), 본 실험에서는 고농도의 동결보호제에 의한 수정율의 저하 현상은 나타났지만, 이상수정에 대한 차이는 없는 것으로 보아 이러한 현상은 고농도의 동결보호제에 의한 원인보다 낮은 온도에 대한 손상요인이 더 큰 원인인 것으로 생각된다.

유리화 동결액이 미성숙 난포란의 배 발달에 미치는 영향

미성숙 난포란의 유리화 동결시 가장 효과적인 유리화 동결액을 선정하기 위하여, 미성숙 난포란을 EFS 용액, ES 용액, GE 용액에 각각 노출시킨 후, 체외성숙, 체외수정, 체외배양하여 관찰한 분할율과 배반포 형성율은 Table 3과 같다.

수정 후 3 일째 2 세포기 이상의 난할을 보인 분할율은 대조구, EFS 용액 노출구, ES 용액 노출구 및 GE 용액 노출구에서 각각 65.9%, 21.9%, 47.1% 및 19.0%로 대조구와 ES 용액이 EFS 용액과 GE 용액보다 유의적으로 높은 분할율을 나타내었고($P < 0.05$), ES 용액은 대조구와 유의적인 차이가 없었다. 수정 후 7 일째 관찰한 배반포 형성율은 대조구, EFS 용액 노출구, ES 용액 노출구 및 GE 용액 노출구에서 각각 11.2%, 3.6%, 10.9% 및 11.5%로, 각 처리구 간에 유의적인 차이는 없었다.

체외배양 중 퇴화하는 배아의 비율은 대조구, EFS 용액 노출구, ES 용액 노출구 및 GE 용액 노출구에서 각각 10.4%, 65.6%, 28.7% 및 71.5%로, ES 용액 노출구가 EFS 용액과 GE 용액 노출구보다 유의적으로 낮았으나, 대조구 보다는 유의적으로 높은 퇴화율이었다($P < 0.05$). 이와 같이, ES 용액은 대조구와 같이 높은 분할율, 배반포율을 나타내었으며, 난포란이 퇴화되는 비율에서도 세 가지 유리화 동결액 중에서 가장 낮은 결과를 나타내었다.

Dochi 등(1998)은 소 미성숙 난자를 1.5 M PG와 1.5M EG에 노출하여 배 발달과 배반포 형성율을 조사한 연구에서 대조구(무처리구)는 PG보다 높은 분할율을 나타내었으나 유의차가 없었고, 배반포 형성율에서는 PG와 EG 노출구가 대조구보다 낮은 형성율을 나타내어 동결보호제의 노출은 배 발달이나 배반포 형성에 나쁜 영향을 준다고 하여 본 연구와 같은 결과를 얻었다. 그러나, Herrier 등 (1991)은 성숙단계가 다른 소 난포란의 수정율과 배 발달에 동결보호제가 미치는 영향에 관한 연구에서 체외에서 성숙된 난포란에 효과적인 동결보호제는 DMSO와 PROH라고 보고하였고, DMSO와 sucrose의 혼합된 동결보호제보다 유의적으로 높은 배 발달율을 나타내었다고 보고하였다. 또한, 이 연구에서 성숙 단계에서 처리한 난포란은 아무 처리도 하지 않은 대조구와 유의적인 차이는 나타나지 않았으나, 미성숙 단계에서 처리한 난포란은 대조구보다 낮은 배 발달율을 나타내는 것으로 보아 미성숙 단계의 난포란은 동결보호제의 처리에 더욱 민감한 것으로 추정된다

Table 3. Effects of vitrification solutions on *in vitro* development of immature porcine oocytes.

VS solution	No.(%) of oocytes			
	Inseminated	Degenerated	Cleaved	Developed to blastocyst (% of embryos cleaved)
Control ¹⁾	135	14(10.4) ^c	89(65.9) ^a	10(11.2)
EFS ²⁾	128	84(65.6) ^a	28(21.9) ^b	1(3.6)
ES ³⁾	136	39(28.7) ^b	64(47.1) ^a	7(10.9)
GE ⁴⁾	137	98(71.5) ^a	26(19.0) ^b	3(11.5)

^{a,b,c} The values with different superscripts in a same column differ significantly($P < 0.05$).

^{*} No significant differences among groups.

¹⁾ Control: none-treatment.

²⁾ EFS: 40% ethylene glycol + 18% ficoll + 0.3 M sucrose.

³⁾ ES: 5.5M ethylene glycol + 1.0 M sucrose.

⁴⁾ GE: 10% glycerol + 20% ethylene glycol.

고 보고하였다. 본 결과 역시 유리화 동결액에 노출되어진 미성숙 난포란이 대조구보다 유의적으로 높은 퇴화율을 나타내었으며 또한, 최와 송(1998)은 미성숙, 성숙중, 성숙후(각각 0시간, 24시간, 44시간 성숙후)의 돼지 난포란을 40% PG + 0.25 M sucrose에 노출 후 관찰한 성숙율에서는 성숙단계에 따른 유의적인 차이가 없었으나, 배발달에서는 성숙후 난포란이 유의적으로 높았다고 하여, 미성숙단계에서 고농도 동결보호제 노출에 의해 입은 손상은 배발달에 영향을 미친다고 보고하였다.

침투성 동결보호제로서 EG는 8 세포기 마우스 배아를 위해 glycerol를 사용한 초기의 Landa와 Tepla(1990)의 연구를 제외하고, 초급속 유리화 동결에 관한 모든 연구에서 사용되어졌다. EG는 침투성 물질로서 단독(Martino 등, 1996 ; Park 등, 1999 ; Cameron 등, 2000) 또는 DMSO와 혼합하여(Vajta 등, 1997 ; Lane 등, 1999) 사용되어졌다. 대부분의 경우, small saccharide에는 삼투압에 중요한 효과를 미치는 비침투성 물질이 포함되어져 있는데, 이들 중 trehalose(Dinnyes 등, 2000 ; Vajta 등, 1999) 또는 galactose(Le Gal과 Massip, 1999)가 효과적이라고 보고되고 있으나, 0.3~1.0M/l sucrose가 일반적으로 사용된다. 본 연구에서 사용된 glycerol, EG 등은 침투성 동결보호제로서 실험동물 및 가축 배의 동결보존에 관한 초기 연구에서 사용하였던 DMSO보다 독성이 약하며, 이들 동결보호제와 함께 sucrose나 trehalose와 같은 비침투성 동결보호제를 함께 사용한다면 난포란의 동결보존에 효과적인 유리화 동결액이 될 가능성이 있다고 생각한다. 미성숙 난자의 동결과 용해에는 수정란의 동결과 용해에 사용되는 방법이 사용되고 있으며, 미성숙 난자의 유리화 동결액으로는 수정란의 동결에 사용되는 DMSO(Diedrich 등, 1986), PROH(Quinn 등, 1986), EG(Kasai 등, 1990 ; Tachikawa 등, 1993 ; Leibo와 Oda, 1993) 등이 사용되고 있으며, 높은 농도의 동결보호제에 노출되기 전에 비침투성 동결보호제인 sucrose 용액에 먼저 노출시키면 난자의 위험성이 감소된다고 알려져 있다(Eric과 Surry, 1990).

따라서 본 연구의 결과로 미루어 볼 때, 돼지 미성숙 난

포란의 유리화 동결에 노출시 ES 용액이 고농도의 동결보호제로 인한 독성과 삼투압 스트레스가 비교적 낮은 유리화 동결액으로 사료되며, 또한 이 용액이 유리화 동결에 적합한지에 대하여 더욱 자세한 연구가 필요할 것이다.

Effects of Exposure to Vitrification Solution on Maturation, Fertilization and Development of Immature Porcine Oocytes *In Vitro*

Choi, I. K, S. H. Seok, K. S. Kim and H. B. Song
College of Natural Resources, Daegu University

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the toxicological effects of different vitrification solution on development of immature porcine oocytes *in vitro*. Oocytes were exposed to EFS solution [40% ethylene glycol (EG) + 18% Ficoll + 0.3M sucrose], ES solution (5.5M EG + 1.0M sucrose) or GE solution [10% glycol (G) + 20% EG], and these oocytes were transferred to sucrose solution directly. Maturation rates were significantly ($P < 0.05$) higher in the ES solution (44.5%) and control (57.6%) than in the EFS solution (38.8%) and GE solution (22.4%). No differences among three solution were found in fertilization rates. Cleavage rates was significantly ($P < 0.05$) higher in the ES solution (47.1%) and control (65.9%) than in the EFS solution (21.9%) and GE solution (19.0%), but no difference among three solutions was found in the blastocyst formation rates. These results indicate that combination of EG and sucrose solutions had effects on development of immature porcine oocytes.

(Key words : Vitrification solution, Immature porcine oocyte, EFS, ES, GE)

인용문헌

1. Abeydeera LR, Day BN (1997): *In vitro* penetration of pig oocytes in a modified tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology* 48: 537-544.
2. Al-Hasani S, Diedrich K, Van der van H, Reinecke A, Krebs D (1987): Cryopreservation of human oocytes. *Human Reprod* 2:695-700.
3. Bautista JA, Kanagawa H (1998): Current status of vitrification of embryos and oocytes in domestic animals: Ethylene glycol as the emerging cryoprotectant of choice. *Jpn J Vet Res* 45:183-191.
4. Cameron RD, Beebe LF, Blackshaw AW, Higgins A, Nottle MB (2000): Piglets born from vitrified early blastocysts using a simple technique. *Aust Vet J* 78: 195-196.
5. Carroll J, Warnes GM, Matthews CD (1989): Increase in digyny explains polyploidy after *in-vitro* fertilization of frozen-thawed mouse oocytes. *J Reprod Fert* 85:489-494.
6. Carroll J, Warnes GM, Matthews CD (1990): Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *J Reprod Fert* 90:547-553.
7. Diedrich K, Al Hasani S, Van der Ven H, Krebs D (1986): Successful *in vitro* fertilization of frozen-thawed rabbit and human oocytes. *J in vitro Fertil Embryo Transfer* 3:65.
8. Dinnyes A, Dai Y, Jiang S, Yang X (2000): High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod* 63:513-518.
9. Dochi O, Oshima K, Takenouchi N, Komatsu M (1998): Effect of exposure to cryoprotectant solutions in cleavage and subsequent development of immature bovine oocyte *in vitro*. *Theriogenology* 49(1):167 (Abst.).
10. Dorbrinsky JR (1996): Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology* 45:17-26.
11. Eric S, Surry J (1990): Successful ultrarapid freezing of unfertilized oocytes. *J of in vitro Fertil Embryo Transfer* 7(5):262.
12. Glenister PH, Wood MI, Kirby C, Whittingham DG (1987): Incidence of chromosome anomalies in first-cleavage mouse embryos obtained from frozen-thawed fertilized oocytes *in vitro*. *Gamete Res* 16: 205-216.
13. Herrler A, Rath D, Nieman H (1991): Effect of cryoprotectant on fertilization and cleavage of bovine oocytes *in vitro*. *Theriogenology* 35: 212 (Abst.)
14. Hochi S, Akira K, Ken K, Akira H (1987): *In vitro* fertilizing ability of bovine ccoyte frozen-thawed at immature, maturing and maturestage. *J Mamm Ova Res* 14:61-65.
15. Hochi S, Fujimoto T, Choi Y, Braun J, Oguri N (1994): Cryopreservation of equine oocytes. *Biol Reprod* 6:1495-1501.
16. Kasai M (1996): Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Anim Reprod* 42:67-75.
17. Kasai M, Komi JH, Sakurai T, Machida T (1990): A simple methods for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fert* 89:91-97.
18. Kasai M, Song HB (2003): Cryopreservation and cryobiology of mammalian oocytes. *Deage University Life Sci Res* 1(3):265-275.
19. Kashiwazaki N, Shino M (2001): Ability of *in vitro* manipulated porcine embryos to develop to piglets.

- J Reprod Dev 47(suppl):S35-S39.
20. Landa V, Tepla O (1990): Cryopreservation of mouse 8-cell embryos in microdrops. *Folia Biol* 36:153-158.
 21. Lane M, Schoolcraft WB, Gardner, DK (1999): Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil Steril* 72:1073-1078.
 22. Le Gal F, Massip A (1999): Cryopreservation of cattle oocytes : effects of meiotic stage, cycloheximide treatment, and centrifugation procedure. *Cryobiology* 38:290-300.
 23. Leibo SP, Oda K (1993): High survival of mouse zygote and embryos cooled rapidly or slowly in ethylene glycol plus polyvinylpyrrolidone. *Cryo-Letters* 14:133-144.
 24. Mahmoudzadeh AR, Van Soom A, Bols P, Ysebaert MT, De Kruif A (1995): Optimization of a simple vitrification procedure of bovine embryos produced *in vitro*: effect of developmental stage, two-step addition of cryoprotectant and sucrose dilution on embryonic survival. *J Reprod Fert* 103: 33-39.
 25. Martino A, Songsasen N, Leibo SP (1996): Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod* 54: 1059-1069.
 26. Massip A, Mermillod P, Dinnyes A (1995): Morphology and biochemistry of *in vitro* produced bovine embryos : implication for their cryopreservation. *Hum Reprod* 10:3004-3011.
 27. Otoi T, Tachikawa S, Kondo S, Suzuki T (1993): Developmental capacity of bovine oocytes frozen in different cryoprotectants. *Theriogenology* 40: 801-807.
 28. Otoi T, Yamamoto K, Suzuki T (1995): *In vitro* fertilization and development of immature and mature bovine oocytes cryopreserved with ethylene glycol and sucrose. *Cryobiology* 32:455-460.
 29. Papis K, Avery B, Holm P, Callesen H, Greve T (1995): The effect of vitrification solution, equilibration time, and direct dilution method in survivability or vitrified bivine *in vitro* matures oocytes. *Theriogenology* 43:293(Abst.).
 30. Park SP, Kim EY, Kim DI (1999): Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscope grids. *Human Reprod* 14:2838-2843.
 31. Petter RM, Wells KD (1993) Culture of pig embryos. *J Reprod Fertil Suppl* 48:61-73.
 32. Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip ThAM, Wurth YA, Van Benden ThH, Willemse AH, Tanerne MAM (1991): Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocyte. *Theriogenology* 53:19-24.
 33. Prather RS (2000): Pigs if pigs. *Science* 289:1886-1887.
 34. Quirm P, Kerin J, Stone B, Wilson L (1986): Successful cryopreservation of human oocytes. In:42nd Ann Mtg Am Fertil Soc and 18th Ann Mtg Canadian Fertil Androl Soc Abstr 72(Abst).
 35. Saha S, Rajamahendran R, Boediono A, Sumantri C, Suzuki T (1996): Viability of bovine blastocysts obtained after 7, 8 or 9 days of culture *in vitro* following vitrification and one-step dehydration. *Theriogenology* 46:331-343.
 36. Schellander K, Peli J, Schmoll F, Brem G (1994): Effects of cryopreservation and carbohydrates on freezing of matured and unmatured bovine oocytes. *Theriogenology* 23:909-915.
 37. Tachikawa S, Otoi T, Kondo S, Machida T, Kasai M (1993): Successful vitrification of bovine blastocyst, derived by *in vitro* maturation and fertilization. *Mol Reprd Dev* 34:66-271.
 38. Vajta G, Booth PJ, Holm P, Greve T, Callesen H (1997) Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw(OPS) method. *Cryo-Letters* 18:191-195.
 39. Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen A, Greve T, Callesen H (1998): Open pulled straw (OPS) vitrification : a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 51:53-58.
 40. Vajta G, Rindom N, Peura TT, Holm P, Greve T, Callesen H (1999): The effect of media, serum and temperature on *in vitro* survival of bovine blastocysts after open pulled straw(OPS) vitrification. *Theriogenology* 52:939-948.
 41. Wall R (1996): Transgenic livestock ; Progress and prospects for the future. *Theriogenology* 45:57-68.
 42. Yang NS, Lu KH, Gordon I, Polge C (1992): Vitrification of blastocysts produced *in vitro*. *Theriogenology* 37:326.
 43. Zhu S, Yoshizawa M, Muramatsu S (1998): Analysis of fertilizability of bovine oocytes cryopreserved in various cryoprotectants after *in-vitro* maturation and their chromosome at the first cleavage division. *J Mamm Ova Res* 15:37-42.
 44. 김상근, 이봉구, 이규승 (1991): 소 수정란의 초급속동결에 관한 연구. I. 소 수정란의 완만 및 초급속동결후의 생존성에 관한 연구. *한국가축번식학회지* 15(2):133-139.
 45. 최인경, 송해범 (1998): 각 성숙단계에서 동결, 융해한 돼지 난포란의 발달능력에 관한 연구. *한국가축번식학회지* 22(4): 319-329.
- (접수일자: 2004. 5. 8. / 채택일자: 2004. 7. 21.)