

에틸렌 글리콜 동결 보호제를 이용한 생쥐 배아의 유리화 동결 보존

전남대학교 의과대학 산부인과학교실
김미영 · 이은숙 · 이석원 · 이여일

Vitrification of Mouse Embryos in Ethylene Glycol-based Solutions

Mi-Young Kim, Eun-Suk Lee, Seok-Won Lee, Yu-Il Lee

*Department of Obstetrics and Gynecology, Chonnam National University
Medical School, Gwangju, Korea*

Objective: This study was conducted to find an optimal condition for the vitrification of mouse morulae and expanded blastocysts.

Materials and Methods: Mouse embryos were obtained at 2-cell stage and cultured to morula and expanded blastocyst stage in Human Tubal Fluid (HTF) medium supplemented with 10% Serum Substitute Supplement (SSS). The vitrification solutions used were EFS30, EFS35 and EFS40 that contains 30%, 35% and 40% ethylene glycol, respectively, with 18% ficoll and 0.5 M sucrose diluted in Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) medium supplemented with 10% SSS. The vitrification procedure was performed in EFS solution with three steps, followed by thawing in 6 steps with 0.5 M sucrose, and then survival and hatching-hatched rate per embryos recovered were compared among six groups.

Results: After 24 h culture in different vitrification and thawing solution, the survival rate of morula embryos was 94.1%, 85.4% and 59.7% for EFS30, EFS35 and EFS40 group, respectively. Hatching rate of morula embryos after 72 h culture was 30.6%, 25% and 11.3% for EFS30, EFS35 and EFS40 group, respectively. The survival rate of expanded blastocyst embryos after 24 h culture was 90.4%, 98.5% and 100% for EFS30, EFS35 and EFS40 group, respectively. Hatching rate of expanded blastocyst embryos after 48 h culture was 46.2%, 57.6% and 64.3% for EFS30, EFS35 and EFS40 group, respectively.

Conclusion: The EFS30 solution was the best for vitrification of mouse morulae. The EFS40 solution was the best for vitrification of mouse expanded blastocysts. The mouse expanded blastocyst was better than mouse morula for vitrification of mouse embryos.

Key Words: Morula, Blastocyst, EFS solution, Vitrification

배아를 적당한 전처치를 통하여 냉동 보존한 후
필요한 시기에 해동하여 계속적인 발달을 하도록

하는 배아의 냉동 보존 기술은 보조생식술의 과배
란 주기를 줄일 수 있고 많은 배아를 이식한 후 발

생할 수 있는 다태아 임신과 추가 자극에 의한 난소 과자극증후군의 발생을 감소시키며 누적임신율의 향상에도 기여할 수 있다.¹

배아의 냉동 보존은 다양한 세포의 손상을 야기할 수 있으며, 이는 삼투압, 세포 내 외의 얼음결정 형성 및 동결 보호제의 독성에 의한 영향 등에 의한다. 완만 동결법은 낮은 농도의 동결보호용액을 사용하기 때문에 삼투압과 동결 보호제의 독성에 의한 영향이 적지만 세포내의 얼음형성에 의한 손상이 심각하고² 많은 시간을 소요하며 고가의 동결기기를 필요로 하는 단점을 가지고 있다. 이러한 완만 동결법을 보완하기 위해 개발된 방법이 유리화 동결법이다.³ 유리화 동결법은 자동 전산화된 세포 동결기를 이용하지 않고 초고속냉동을 위해 배아를 동결보호용액에 직접 넣은 후 액화질소에 바로 침지시키므로 매우 단순하고 비용이 적게 들며 세포 내 외의 얼음형성을 극적으로 감소시킬 수 있는 장점을 가지고 있다. 그러나 고농도의 동결보호용액을 사용해야 하므로 동결보호용액의 독성을 고려해야 한다.⁴ 따라서, 높은 생존율을 위해서는 독성이 보다 적은 동결 보호제의 선택이 중요하다. 최근 유리화 동결을 위해 가장 많이 사용되고 있는 동결 보호제인 ethylene glycol (EG)은 낮은 분자량과 높은 침투능력⁵ 그리고 비교적 독성이 적은 특징이 있다.⁶ 이런 장점으로 인간⁷을 비롯한 생쥐,⁸ 백서,⁹ 토끼,¹⁰ 양¹¹ 및 소¹² 등 포유류 배아의 냉동 보존을 위한 유리화 동결의 동결 보호제로 많이 이용된다. 또한, 고농도로 사용되는 동결 보호제의 독성을 줄이기 위해 두 가지 이상의 동결 보호제를 조합하거나 동결 보호제에 배아를 단계별로 노출시키는 방법도 사용되고 있다. 초기에는 침투성 동결 보호제인 DMSO, acetamide, propylene glycol과 비침투성 동결 보호제인 polyethylene glycol을 함께 사용하였지만 이 용액은 4°C의 낮은 온도에서 작업을 해야 하는 불편함과 동결 보호제의 독성이 심해 그 후 널리 이용되지 않았다.³ 그 후 Scheffen 등¹³은 침투성 동결 보호제인 glycerol과 propylene glycol을 포함한 복합용액을 이용하여 소의 상실배를 유리화 동결한 후 출산에 성공하였고, Rall¹⁴은 polyethylene glycol, glycerol, propylene glycol을 써서 생쥐 상실배의 유리화 동결에 성공하였으며, Kasai 등¹⁵은 EG,

ficoll, sucrose를 조합하여 생쥐 상실배의 유리화 동결에 성공하였다. 최근 EG에 거대분자인 ficoll, 그리고 EG의 농도를 감소시키기 위해 sucrose가 혼합된 동결보호용액이 주로 사용되고 있다.⁷ 생쥐 배아의 유리화 동결을 위한 본 실험실의 선행 연구에서도 EG가 기본으로 구성된 EFS40 동결보호용액을 사용하였을 때가 VS 동결보호용액을 사용한 유리화 동결보다 더 나은 성적을 얻었다.¹⁶ 또한, 배아의 발달단계에 따라서 적절한 농도의 동결보호용액의 선택이 제시된 바 있다.¹⁷ Zhu 등¹⁸은 EFS20, 30, 40용액을 이용한 생쥐 배포기 배아의 유리화 동결 실험에서 EFS40이 가장 좋은 성적을 보고하였고, Kim 등¹⁹은 생쥐 미수정란에서는 EFS30, 40보다는 EFS35용액이 더 낫다고 보고한 바 있다.

유리화 동결시 배아의 보관 방법과 용기의 선택에 따라서도 회수율 및 생존율이 달라질 수 있다. 이를 위해 open pulled straw,²⁰ flexipet-denuding pipette,²¹ microdrops,²² electron microscope (EM) grid,²³ hemistraw system,²⁴ nylon mesh,²⁵ cryoloop²⁶ 등이 개발되어 왔다. 그 중, 구리 재질로 된 EM grid는 열전도율이 높고 매우 작은 양의 동결보호용액만이 액화질소에 직접 담구어 짐으로써 빠르게 온도를 낮출 수 있으며, 보관이 용이한 장점을 가지고 있다. 최근 Park 등²³은 EG, ficoll, sucrose를 조합한 용액에서 EM grid를 이용한 소의 배포기 배아의 유리화 동결로 좋은 성적을 보고하였고, Cho 등²⁷도 EM grid를 이용한 인간의 배포기 배아의 유리화 동결에서 좋은 성적을 보고한 바 있다.

유리화 동결은 배포기의 배아를 포함한 여러 발달단계에서 인간²⁷을 비롯한 양,¹¹ 소,²⁸ 토끼,¹⁰ 생쥐^{16,18} 등 많은 포유류 배아의 동결을 위해 시도되고 있다. 최근에는 인간에서도 실험실에서 배양액과 배양조건의 발달로 상실배 및 배포기까지의 배아 발생이 가능하게 되었다. 후기단계의 배아는 초기 분열단계의 배아보다 생리학적으로 자궁의 착상 환경에 적합하기 때문에 보조생식술의 착상율과 임신율을 향상시킬 수 있으며,²⁹ 다태아 임신을 감소시킬 수 있는 장점이 있다.³⁰ 그러나 배포기 배아는 초기 배아와는 달리 커다란 내강을 지니므로 냉동 보존을 위해서는 이를 효과적으로 제거해 주는 탈수 과정이 필수적으로 반드시 필요하다. 이에 후기

단계 배아의 냉동 보존조건의 확립이 시급하여 연구가 계속 진행된 바 있으나,³¹ 최적 조건의 확립이 아직은 미흡한 실정이다. 그러므로, 인간의 상실배와 배포기 배아의 유리화 동결을 위한 최적조건을 확립하기 위해 동물 배아를 이용한 실험적 연구가 필요하다. 따라서 본 연구는 유리화 동결시 생쥐 배아의 후기 발달단계에 따른 동결 보호제의 영향을 알아보고자 EG를 기본으로 한 EFS30, 35 및 40용액을 이용하여 실험을 실시하였고, 냉동 보존을 위한 최적의 단계를 찾고자 상실배와 배포기의 배아를 EM grid를 이용하여 유리화 동결을 실시하고 해동한 후 생존율과 부화배포까지의 발달률을 비교해 보았다.

재료 및 방법

1. 배양액의 준비

생쥐 배아의 배양을 위해 Human Tubal Fluid (HTF) 배양액을 사용하였으며 이 배양액은 101 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 0.37 mM KH_2PO_4 , 0.2 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 25 mM NaHCO_3 , 2 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 에 21.4 mM Sodium lactate, 0.33 mM Sodium pyruvate, 2.8 mM Glucose, 1 mM Glutamine, 0.1 mM EDTA, 0.025 g Streptomycin sulfate 및 0.025 g Penicillin-G를 첨가하여 제조하였다. Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS; Gibco, USA)에는 0.1 g CaCl_2 (Gibco, USA)를 첨가하여 사용하였다. 각각의 삼투압은 280 mOsm/kg으로 조절하였고, 4°C에 냉장 보관하고 4주 이내에 사용하였다.

2. 생쥐 2세포기 배아의 획득

본 실험실에서는 명 14시간과 암 10시간으로 광주기를 조절하고, 물과 먹이가 충분히 공급되는 상태에서 사육한 4~5주령 ICR계 암컷 생쥐와 8~12주령으로 생식능력이 확인된 동종의 수컷 생쥐를 사용하였다. 난포의 성장을 촉진하기 위해 pregnant mares' serum gonadotropin (PMSG; Sigma, USA) 5 IU를 복강내에 주사하고, 48시간 후에 5 IU human chorionic gonadotropin (hCG; Sigma, USA)를 주입하여 과배란을 유도하였다. HCG 주사 후 수컷과 1:1로 합사시켜 자연교미를 유도하고, 48시간 후에 경

추탈골법으로 도살한 후 난관에서 2세포기 배아를 회수하고 형태학적으로 정상적인 것만을 선별하여 실험에 이용하였다.

3. 수정란의 배양 및 관찰

2세포기 배아를 DPBS를 사용하여 3회 세척한 뒤, 10% Serum Substitute Supplement (SSS; Irvine Scientific, USA)가 첨가된 HTF 배양액에서 2회 세척하였다. 무작위로 두 군으로 나눈 뒤 한 군은 상실배까지, 다른 군은 배포까지 HTF 배양액에서 배양하였다. 배양액은 하루 전에 37°C, 5% CO_2 의 조건하에서 안정화시킨 후 사용하였다.

4. 유리화 동결 방법

1) 배아의 동결

상실배와 배포까지 성장한 배아를 각각 무작위로 세군으로 분류하여 실험에 사용하였다. 유리화 동결은 10% SSS가 함유된 DPBS를 기본용액으로 하여 5분간 평형을 유지한 다음, 15%, 17.5%, 20% ethylene glycol (Sigma, USA)이 첨가된 용액에 옮겨 1분 30초 동안 배아를 냉동 전처리하였다. 이후 30%, 35% 또는 40% ethylene glycol, 18% ficoll (Sigma, USA), 0.5 M sucrose가 혼합된 EFS30, 35 또는 40 동결보호용액에 옮긴 후 바로 EM grid (IGC 400; Pelco International, USA)에 적재하고 가능한 빨리 액체질소에 침지하였으며 40초가 넘지 않도록 신속히 수행하였다.

2) 융해 및 배양

하루 이상 액체질소 안에 보관되어 있던 상실배와 배포를 꺼낸 뒤 즉시 0.5 M sucrose가 첨가된 용액으로 옮기고 grid위의 배아를 0.4 M sucrose가 첨가된 기본용액으로 옮겨 1분 30초 동안 유지시켰다. 그 후 0.3 M, 0.2 M, 0.1 M, 0 M의 sucrose가 첨가된 기본용액에 단계별로 옮겨주고, 각 단계는 1분 30초씩 유지시켰다. 하루 전 평형시킨 10% SSS가 첨가된 HTF배양액으로 수회 세척한 후에 37°C, 5% CO_2 가 유지되는 부화기에서 배양하였다.

5. 해동 후의 생존율과 부화율의 판정

동결 후 해동된 상실배와 배포는 24시간 후 생존율을 생존 배아의 백분율로 판정하였고, 상실배는

48시간, 배포는 24시간 동안 추가 배양하여 부화배포까지의 발달률인 부화율 역시 백분율로 검색하였다. 광학 역반사 현미경으로 24시간 단위로 형태를 관찰하였으며, 세포질과 투명대가 밝고 온전한 배아를 생존한 것으로 판정하였다.

6. 통계처리

실험을 통해 얻은 모든 결과들은 χ^2 -test를 시행하여 통계적 유의성을 조사하였고, p값이 0.05 미만일 때를 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 상실배의 유리화 동결 및 해동 후 생존율과 부화율

30%, 35%, 40% EG를 기본으로 한 EFS30, 35, 40 용액간의 생쥐의 상실배 배아의 유리화 동결 및 해동 후 그 회수율과 생존율 및 부화율을 비교해 본 결과, 먼저 회수율에서는 EFS30군이 86.7%, EFS35군이 69.6%, EFS40군이 83.8%로 세 군간에 유의한 차이를 보였으며 ($p<0.05$), 해동 24시간 후의 생존율

은 EFS30군이 94.1%, EFS35군이 85.4%, EFS40군이 59.6%로 통계적으로 유의한 차이를 보이며, 그 중 EFS30군이 가장 높은 생존율을 보였다 ($p<0.001$). 생존율 관찰 후 24시간과 48시간 추가 배양 후 부화율을 살펴본 결과, 24시간 추가 배양시 EFS30군의 16.5%와 EFS35군의 16.7%가 EFS40군의 3.2%에 비해 현저한 부화율 상승을 보이고, 48시간 추가 배양시는 EFS30군이 30.6%, EFS35군이 25%, EFS40군이 11.3%로 통계학적으로 유의한 차이를 보이며 그 중 EFS30군이 가장 높은 부화율을 나타냈다 ($p<0.05$) (Table 1).

2. 배포의 유리화 동결 및 해동 후 생존율과 부화율

생쥐의 배포기 배아를 유리화 동결 및 해동 후 EFS30, 35, 40용액간의 회수율과 생존율 및 부화율을 비교 관찰하였다. 먼저 회수율에서는 EFS30군이 76.5%, EFS35군이 85.7%, EFS40군이 76.7%로 EFS35군이 다소 높은 회수율을 보였으나 통계적 유의성은 없었다. 24시간 후 생존율을 관찰한 결과 EFS30군 90.4%, EFS35군 98.5%, EFS40군 100%의 생

Table 1. Survival and hatching rates of morula embryos after thawing

| No. of morulae | No. of developed morulae (%) | | | | | |
|----------------|------------------------------|------------------------|------------------------|---------|------------------------|------------------------|
| | Recovery | Survival | Hatching | | | |
| | | | 24 h | 48 h | 72 h | |
| EFS30 | 98 | 85 (86.7) ^a | 80 (94.1) ^b | 3 (3.5) | 14 (16.5) ^c | 26 (30.6) ^d |
| EFS35 | 69 | 48 (69.6) ^a | 41 (85.4) ^b | 0 (0) | 8 (16.7) ^c | 12 (25) ^d |
| EFS40 | 74 | 62 (83.8) ^a | 37 (59.7) ^b | 0 (0) | 2 (3.2) ^c | 7 (11.3) ^d |

^{a, c, d} $p<0.05$, ^b $p<0.001$

Table 2. Survival and hatching rates of blastocyst embryos after thawing

| No. of blastocyst | No. of developed blastocyst (%) | | | | |
|-------------------|---------------------------------|-----------|------------------------|------------------------|-----------|
| | Recovery | Survival | Hatching | | |
| | | | 24 h | 48 h | |
| EFS30 | 68 | 52 (76.5) | 47 (90.4) ^a | 8 (15.4) ^b | 24 (46.2) |
| EFS35 | 77 | 66 (85.7) | 65 (98.5) ^a | 21 (31.8) ^b | 38 (57.6) |
| EFS40 | 73 | 56 (76.7) | 56 (100) ^a | 21 (37.5) ^b | 36 (64.3) |

^{a, b} $p<0.05$

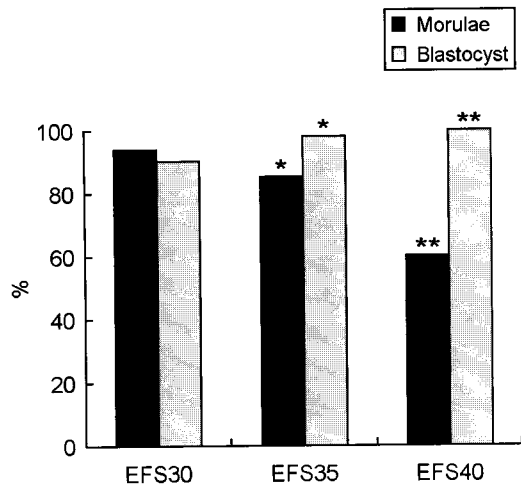


Figure 1. Comparison of survival rates of thawed morula and blastocyst embryos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$

존율로 통계학적으로 유의한 차이를 보이며 그 중 EFS40군이 가장 높은 생존율을 보였다 ($p < 0.05$). 부화배포까지의 발달을 보기 위해 24시간 추가 배양 후 부화율을 관찰한 결과, EFS30군은 46.2%, EFS35군은 57.6%, EFS40군은 64.3%로 유의성은 없었으나 EFS40군이 가장 높은 부화율의 경향을 보였다 (Table 2).

3. 상실배와 배포의 생존율 비교

상실배와 배포기 단계의 배아 사이의 유리화 동결 및 해동 후 (Table 1, 2) 그 생존율을 비교해 본 결과, EFS30군에서는 상실배 배아가 94.1%로 배포기 배아의 90.4%보다 다소 높은 수치를 보였으나 통계적 유의성은 없었다. 그러나 EFS35군과 EFS40군에서는 배포기 배아가 각각 98.5%와 100%로 상실배의 85.4%와 59.7%에 비해 유의하게 높은 생존율을 보였다 ($p < 0.05$, $p < 0.001$) (Figure 1).

4. 상실배와 배포의 부화율 비교

생존율 비교 후 상실배 배아는 48시간, 배포기 배아는 24시간 추가 배양하여 부화율을 비교해 본 결과, EFS30군에서는 상실배 배아가 30.6%, 배포기 배아가 46.2%로 배포기 배아가 더 높은 부화율을 보였으나 통계적 유의성은 없었고, EFS35군과 EFS40군에서는 상실배 배아가 각각 25%와 11.3%, 배포

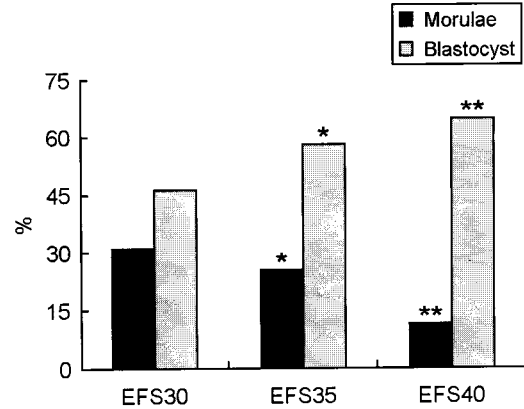


Figure 2. Comparison of hatching rates of thawed morula and blastocyst embryos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$

기 배아가 57.6%와 64.3%로 배포기 배아에서 유의하게 더 높은 부화율을 보였다 ($p < 0.05$, $p < 0.001$) (Figure 2).

고찰

배양액 중 Quinn 등³²에 의해 소개된 Human Tubal Fluid는 보조생식술에 가장 일반적으로 널리 사용되고 있는 배양액이다. 하지만 이는 배양 3일째의 분열단계까지 배아 발달에 적합하여 인간 배아의 이식시기의 자궁 환경에 적합한 배양액을 찾으려는 노력이 계속되어, Gardner 등³³에 의해 G1.2, G2.2의 배양액이, Behr 등³⁴에 의해 P1배양액이 개발되었다. 이에 배양 4일째의 상실배와 배양 5일째의 배포기 단계까지의 배아 배양이 가능하게 되었다. 따라서, 상실배와 배포이식으로는 높은 착상율이 예상되어 다태임신의 우려 때문에 1~2개의 적은수 배아만이 쓰이게 되므로 누적임신율 증진을 위해 이식 후 남은 상실배와 배포기 배아의 동결 보존이 반드시 필요하다.

배아를 냉동 보존시키는 방법으로는 1972년 Whittingham 등³⁵이 생쥐 배아의 동결에 성공한 완만 동결법, Trounson 등³⁶이 생쥐 배아와 인간 배아에 적용하여 소개된 초급속 동결법, 그리고 Rall과 Fahy³에 의해 처음 시도된 유리화 동결법이 있다. 이 중 완만 동결법은 배아의 동결 보존술에 가장 믿을 수 있고, 보편적으로 사용되고 있지만, 동결 및 해동

중 낮은 속도의 온도변화로 인한 세포내의 빙정형성과 동결 보호제 및 세포의 삼투압에 의한 영향 등으로 냉동시 세포에 많은 손상을 주는 단점을 지니고 있다. 이에 배아의 효율적인 냉동 보존 방법에 대한 연구가 계속되어 왔고 유리화 동결법이 소개되었다. 이는 과정이 단순할 뿐만 아니라 세포손상의 가장 큰 원인인 세포 내 외의 얼음결정을 방지하면서 동결할 수 있다. 성공적인 유리화 동결을 수행하기 위해서는 1) 동결보호용액의 농도와 종류 2) 유리화 동결 용액에 배아 노출시의 온도 3) 액화질소에 넣기 직전 마지막 동결보호용액에서의 배아 노출시간 4) 유리화 동결을 위해 사용된 용기 5) 동결에 사용된 배아의 질등이 고려되어야 한다.³⁷

본 연구는 상실배와 배포기 배아의 높은 생존율과 발달률을 얻기 위한 유리화 동결의 최적조건을 찾기 위해 시도되었으며, 사용된 동결 보호제는 EFS 용액이었다. EFS용액은 EG를 기본으로 하여, sucrose와 ficoll이 혼합된 용액이다. Sucrose는 유리화 동결을 수행하기 위해 요구되는 동결 보호제의 농도를 감소시켜 줌으로써 동결 보호제에 의한 독성을 감소시켜 주는 역할을 한다. 또한, 유리화 동결시 세포자체의 동결보다는 세포밖의 동결을 위해 고농도의 동결 보호제를 필요로 하는데, 이를 위해 polyvinylpyrrolidone (PVP), polyethylene glycol 또는 ficoll 등을 첨가한다. 본 연구에서는 ficoll을 사용하였는데 동결 보존 동안에 일어나는 물리적인 스트레스로 인한 위해로부터 배아를 보호하고 동결 보호제의 농도를 낮춰줌으로써 동결 보호제의 독성을 감소시키고 동결 보호제의 점도를 향상시키며 동결 및 해동 과정에 얼음결정 형성을 방지하는 역할을 한다. 이런 EFS용액은 Kasai 등²²에 의해 생쥐 배아의 유리화 동결을 위한 동결 보호제로서 처음 소개되었으며, Zhu 등¹⁸에 의해 생쥐 배포의 유리화 동결에 사용되어 좋은 성적을 보였고 배아의 발달 단계에 따라 EFS용액의 농도에 따른 침투능력에 차이가 있었다.¹⁷ Zhu 등¹⁸은 40%의 EG를 기본으로 한 EFS40용액으로 생쥐 배포에서 좋은 성적을 보였고, Kasai 등¹⁵은 상실배 배아를 EFS30용액으로 성공적인 유리화 동결을 보고하였으며, Kim 등¹⁹은 생쥐의 미수정란을 EFS35용액으로 유리화 동결하여도 좋은 배발달을 관찰하였다. 따라서, 본 연구에

서는 상실배와 배포기 단계에서 유리화 동결을 위한 최적의 농도를 찾기 위해 30%, 35%, 40%의 EG를 기본으로 한 EFS용액을 이용하여 유리화 동결을 실시하였다.

먼저, 상실배 배아를 유리화 동결 후 해동하여 24시간 배양한 후 생존율을 관찰하였는데, EFS30군에서는 94.1%, EFS35군에서는 85.4%, EFS40군에서는 59.7%로 EFS30과 EFS35군에 비해 EFS40군에서 더 낮은 생존율을 보였다. 또 그 후 48시간 동안 추가 배양하여 24시간 단위로 생존율을 살펴본 결과, 각각 EFS30군이 78.8%와 65.9%, EFS35군이 79.2%와 60.4%, EFS40군이 46.8%와 35.5%로 EFS30군에서 다른 군에 비해 더 높은 생존율을 보였으며 세군 모두 시간이 지남에 따라 생존율이 낮아지는 경향을 보였다. 부화배포로의 발달률인 부화율은 EFS30군이 30.6%, EFS35군이 25%, EFS40군이 11.3%로 생존율의 추세와 유사하게 EFS40군이 가장 낮은 부화율을 보인 반면 EFS30군에서 가장 높은 부화율을 보였다. 이로써, 상실배의 유리화 동결에서는 고농도의 동결 보호제가 생존율과 부화율에 나쁜 영향을 미치는 것으로 사료된다. 배포기 배아의 유리화 동결 및 해동 후 그 생존율과 부화율을 관찰한 결과 생존율에서는 EFS30군이 90.4%, EFS35군이 98.5%, EFS40군이 100%로 EFS35군과 EFS40군이 보다 높은 생존율을 보인 반면 상실배의 유리화 동결에서 좋은 결과를 보인 EFS30군은 더 낮은 생존율을 나타냈다. 그 후 24시간 동안 추가 배양하여 관찰한 생존율에서는 EFS30군이 73.1%, EFS35군이 92.4%, EFS40군이 85.7%로 EFS35군에서 가장 높은 생존율을 보였으며, 모두 시간이 지남에 따라 낮아지는 경향을 나타냈다. 부화율에서는 EFS30군이 46.2%, EFS35군이 57.6%, EFS40군이 64.3%로 EFS40군에서 가장 높은 부화율을 보였고, 세군 모두 상실배 배아와 비교 시 보다 높은 부화율을 나타냈다. 상실배 배아와 배포기 배아의 생존율을 보면 EFS30에서 상실배가 다소 높은 생존율을 보일 뿐, EFS35, EFS40에서는 배포기 배아가 더 높은 생존율을 나타내었다. 또 상실배와 배포 모두 시간이 지남에 따라 생존율이 감소하는 경향을 보였다. 이는, 유리화 동결 및 해동 시 입었을 손상에 의한 것으로 사료되며 상실배는 배포에 비해 부화율이

현저히 떨어져 있음을 볼 수 있었다. 이는 상실배와 배포가 갖는 서로 다른 구조적 특징과, 배아의 발달단계에 따라 다르게 나타나는 냉동능력에 그 원인을 찾을 수 있다. 다른 발달단계의 배아와 달리 배포기 배아의 가장 큰 특징은 포배강이라는 커다란 공포를 가지고 있다는 점이다. 상실배는 세포안에 대부분의 물을 포함하고 있지만, 배포는 포배강에 대부분의 물을 함유하고 있다. 배포는 다양한 크기의 포배강을 가지고 있는데, 이 크기가 증가할수록 해동 후의 생존율은 감소한다.³⁸ 동결보호 용액 안에 포함되어 있는 고분자물질들이 냉동력 증진을 용이하게 도와주며 용액의 충분한 침투가 포배강의 유리화 동결을 위해 필수적이다. 불충분한 침투시 포배강에 얼음결정을 만들며 해동후의 생존율 감소를 야기한다. EG는 세포안에 침투한 뒤 포배강에 침투하기 때문에 충분한 시간을 요구하지만, 배아에 대한 동결 보호제의 독성 때문에 노출시간을 줄이고 있다. EFS용액의 독성검사에서 상실패 배아보다 배포기 배아가 더 민감하다고 하였다.¹⁸ 동결보호제의 침투능력은 배아의 발달단계가 지날수록 증가한다고 하였고,³⁹ 두 발달단계의 구조적 차이를 보면 상실배가 갖는 활구의 크기보다 배포가 갖는 활구의 크기는 훨씬 더 작고 세포의 수도 많다. 이는 동결 보호제의 빠르고 충분한 침투를 허용하며 더 작은 크기의 활구는 삼투압의 영향에 덜 민감하므로 동결 보호제를 제거할 때 삼투압에 의한 해가 적어진다는 것을 암시한다.⁴⁰ 또한, 배포에서 EG의 세포내 농도는 상실배보다 빠르게 증가함으로써 독성에 의한 해로부터 보호할 수 있어서 후기단계의 유리화 동결을 위해서는 배포기 배아가 더 나은 것으로 사료된다. 처음 EFS용액 내의 ficoll이 가지고 있는 점도를 증가시키는 성질로 별 무리가 없을 것이라 사료되었지만 상실배 배아의 동결 후 해동시 배포기 배아에 비해 grid에 많이 배아가 부착되어 있음을 관찰할 수 있었다. 이는 배아의 발달단계에 따른 다른 구조적 특징으로 grid에 의한 영향을 서로 다르게 받는 것으로 생각되며, 이로써 생존율은 배포와 비교시 차이가 없었음에도 불구하고, 발달 및 부화율에서 시간이 지남에 따라 큰 차이를 보였을 것으로 사료된다. 따라서, 동결시 배아의 구조적 특성에 맞는 보조기구의 선택도 중요하다 할

수 있겠다.

본 연구에서는 생쥐 후기발달단계인 상실배와 배포의 유리화 동결을 위한 최적의 발달단계선택, 그리고 그 발달단계에 따른 최적의 동결 보호제의 조건을 확립하기 위하여 실시하였다. 그 결과, 상실배 배아의 유리화 동결을 위해서는 EFS30용액이, 그리고 배포기 배아의 동결 보존을 위해서는 EFS40용액이 최적임을 알 수 있었고, 상실배보다는 배포가 유리화 동결을 위해 더 좋을 것으로 사료된다. 그러나, 보조기구에 따라 상이한 결과가 예상될 수 있으므로 상실배 단계에서 보조기구를 달리한 후속연구가 더 필요할 것으로 보인다.

참 고 문 헌

1. Van Voorhis BJ, Syrop CH, Allen BD, Sparks AE, Stovall DW. The efficacy and cost effectiveness of embryo cryopreservation compared with other assisted reproductive techniques. *Fertil Steril* 1995; 64: 647-50.
2. Bryant G. DSC measurement of cell suspensions during successive freezing runs: implications for the mechanisms of intracellular ice formation. *Cryobiology* 1995; 32: 114-28.
3. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 1985; 313: 573-5.
4. Valdez CA, Abas Mazni O, Takahashi Y, Fujikawa S, Kanagawa H. Successful cryopreservation of mouse blastocysts using a new vitrification solution. *J Reprod Fertil* 1992; 96: 793-802.
5. Gilmore JA, McGann LE, Liu J, Gao DY, Peter AT, Kleinhans FW, et al. Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1995; 53: 985-95.
6. Emiliani S, Van den Bergh M, Vannin AS, 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.
7. 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.
8. Shaw JM, Ward C, Trounson AO. Evaluation of propanediol, ethylene glycol, sucrose and antifreeze proteins on the survival of slow cooled mouse pronuclear and 4 cell embryos. *Hum Reprod* 1995; 10: 396-402.
 9. Jiang JY, Umezu M, Sato E. Vitrification of two cell rat embryos derived from immature hypothyroid rdw rats by in vitro fertilization in ethylene glycol-based solutions. *Cryobiology* 1999; 38: 160-4.
 10. 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.
 11. Cocero MJ, Sebastian AL, Barragan ML, Picazo RA. Differences on post thawing survival between ovine morulae and blastocysts cryopreserved with ethylene glycol or glycerol. *Cryobiology* 1996; 33: 502-7.
 12. Donnay I, Anquier P, Kaidi S, Carolan C, Lonergan P, Mermillod P, et al. Vitrification of in vitro produced bovine blastocysts: methodological studies and developmental capacity. *Anim Reprod Sci* 1998; 52: 93-104.
 13. Scheffen B, Vanderzwalmen P, Massip A. A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. *Cryo Letters* 1986; 7: 260-9.
 14. Rall WF. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 1987; 24: 387-402.
 15. Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera T, 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.
 16. Lee YJ, Kim MY, Lee SW, Lee YI. Vitrification of mouse blastocyst. *Kor J Obstet Gynecol* 2004; 47: 1348-54.
 17. Royos AA, Takahashi Y, Hishinuma M, Kanagawa H. Quick freezing of unfertilized mouse oocytes using ethylene glycol with sucrose or trehalose. *J Reprod Fertil* 1994; 100: 123-9.
 18. Zhu SE, Kasai H, Otoge H, Sakurai T, Machida T. Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solution. *J Reprod Fertil* 1993; 98: 139-45.
 19. Kim MK, Kim, YI BK, Yoon SH, Park SP, Chung KS, et al. In vitro/ In vivo development of mouse oocytes vitrified by EFS. *Kor J Fertil Steril* 1998; 25: 87-92.
 20. 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.
 21. Liebermann J, Tucker MJ, Graham JR, Han T, Davis D, Levy MJ. Blastocyst development after vitrification of multipronuclear zygotes using the flexipet denuding pipette (FDP). *Reprod Biomed Online* 2002; 4: 148-50.
 22. Papis K, Shimizu M, Izaikae Y. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology* 2000; 15: 651-8.
 23. 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.
 24. Liebermann J, Tucker MJ. Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification. *Reproduction* 2002; 124: 483-9.
 25. Matsumoto H, Jiang JY, Tanaka T, Sasada H, Sato E. Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology* 2001; 42: 139-44.
 26. Reed ML, Lane M, Gardner DK, Jensen NL, Thompson J. Vitrification of human blastocysts using the cryoloop method: successful clinical application and birth of offspring. *J Assist Reprod Genet* 2002; 19: 304-6.

27. Cho HJ, Son WY, Yoon SH, Lee SW, Lim JH. An improved protocol for dilution of cryoprotectants from vitrified human blastocysts. *Hum Reprod* 2002; 17: 2419-22.
28. Saito N, Imai K, Tomizawa M. Effect of sugars additions on the survival of vitrified bovine blastocysts produced in vitro. *Theriogenology* 1994; 41: 1053-60.
29. Yoon HG, Yoon SH, Son WY, Kim JG, Im KS, Lim JH. Alternative embryo transfer on day 3 or day 5 for reducing the risk of multiple gestations. *J Assist Reprod Genet* 2001; 18: 262-7.
30. Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in vitro fertilization. *Hum Reprod* 1998; 13: 3434-40.
31. Yokota Y, Sato S, Yokota M, Ishikawa Y, Makita M, Asada T, et al. Successful pregnancy following blastocyst vitrification: case report. *Hum Reprod* 2000; 15: 1802-3.
32. Quinn P, Kerin JF, Warnes GM. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril* 1985; 44: 493-8.
33. Gardner DK, Lane M. Embryo culture systems. In: Trounson A, Gardner DK, eds, *Handbook of in vitro fertilization*, 2nd ed, Boca Raton, FL: CRC Press 2000: 195-254.
34. Behr B, Pool TB, Milki AA, Moore D, Gebhardt J, Dasig D. Preliminary clinical experience with human blastocyst development in vitro without co-culture. *Hum Reprod* 1999; 14: 454-7.
35. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -296°C. *Science* 1972; 178: 411-4.
36. Trounson A, Peura A, Freemann L, Kirby C. Ultra-rapid freezing of early cleavage stage human embryos and eight-cell mouse embryos. *Fertil Steril* 1988; 49: 822-6.
37. Kasai M, Ito M, Edashige K. Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury. *Hum Reprod* 2002; 17: 1863-74.
38. Shaw JM, Diotallevi L, Trounson AO. A simple rapid 4.5 M dimethyl-sulfoxide freezing technique for the cryopreservation of one cell to blastocyst stage preimplantation mouse embryos. *Reprod Fertil Dev* 1991; 3: 621-6.
39. Mazur P, Rigopoulos N, Jackowski SC, Leibo SP. Preliminary estimates of the permeability of mouse ova and early embryos to glycerol. *Biophysical J* 1976; 16: 232.
40. 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.