

## 초사화동결된 생쥐 Preantral Follicle의 체외성장과 배란

경상대학교 의과대학 산부인과학교실<sup>1</sup>, 경상대학교 건강과학연구원<sup>2</sup>

박 지 권<sup>1</sup> · 백 원 영<sup>1,2</sup>

### *In vitro* Follicular Growth and Ovulation of Mouse Preantral Follicles Cryopreserved by Vitrification

Ji Kwon Park<sup>1</sup>, Won Young Paik<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Gyeongsang National University, JinJu, Korea, <sup>2</sup>Gyeongsang Institute of Health Sciences, JinJu, Korea

**Objective:** To define an appropriate vitrification condition of preantral follicle that yields high survival and to evaluate growth and ovulation rate of mouse follicles during *in vitro* culture after vitrification.

**Methods:** Preantral follicles were isolated mechanically from mouse ovaries that were surgically recovered from mice aged 14 days. Retrieved preantral follicles were placed in EG (Ethylene Glycol) for 2, 5, 10 minutes and transferred to EFS-40 (40% EG, 18% Ficoll-70, 0.5 M sucrose) for 0.5, 1, 2 minutes. And then, preantral follicles were placed onto an EM grid and submerged immediately in liquid nitrogen. Thawing was carried out at room temperature. After defining the most appropriate vitrification condition that yields high survival, *in vitro* growth and ovulation rate of follicles were evaluated.

**Results:** Appropriate vitrification condition that yield high survival rate ( $83.2 \pm 2.1\%$ ) of preantral follicle was EG for 5 minutes and EFS-40 for 0.5 minutes. *In vitro* survival rate of the vitrified preantral follicles were  $85.5 \pm 0.5\%$ ,  $67.9 \pm 0.8\%$  and  $40.2 \pm 0.5\%$  on day 2, 6 and 10. And *in vitro* growth of the vitrified preantral follicles were  $107.1 \pm 16.1 \mu\text{m}$ ,  $117.1 \pm 18.4 \mu\text{m}$ ,  $178.4 \pm 45.6 \mu\text{m}$  and  $325.4 \pm 54.4 \mu\text{m}$  on day 0, 2, 6 and 10. Although *in vitro* survival rate and growth of vitrified preantral follicles were lower than that of non-vitrified preantral follicles, the patterns of survival and growth were similar in vitrified and non-vitrified preantral follicles. The ovulation rate of antral follicles that was grown from vitrified preantral follicles was  $32.6 \pm 1.2\%$ .

**Conclusion:** Vitrified preantral follicles could be grown to antral sizes, and mature oocytes that can be used for IVF-ET programs were produced successfully. These data suggest that cryopreservation of preantral follicle by vitrification can be used for the preservation of the fertility.

**Key Words:** Preantral follicle, Vitrification, Preservation of the fertility

배아의 동결보존이 갖는 여러 문제를 극복하기 위하여 근래에 여성의 생식세포인 난자의 동결보존

에 관한 연구가 진행되어 현재는 유전적 결함이나 항암치료의 영향에 의한 조기폐경 환자의 생식능력

보존을 위해 유용하게 사용되고 있다. 그러나 동결 보존 시 난자는 이미 제 2차 감수분열의 중기에 도달하여 투명대 혹은 미세세포 구조들의 분화가 끝난 상태이므로 동결에 따른 손상이 심하고 동결 시 방추사의 손상도 많이 발생하여 염색체 이상을 유발할 수 있다고 생각된다.<sup>1-3</sup> 이러한 문제점으로 최근에는 난자에 비하여 분화가 덜 된 preantral follicle을 동결보존하려는 시도가 이루어지고 이를 체외배양 후 수정 및 포배기까지 성장을 유도하고자 하는 많은 연구들이 있다. 이러한 노력에도 불구하고 아직 preantral follicle의 동결보존 성적은 좋지 않은데, 그 이유는 preantral follicle은 granulosa cell, theca cell, basal lamina 및 난자로 구성된 비교적 복잡한 구조로서 난자에 비하여 동결보존액의 흡수 및 배출이 어렵고, 다른 이유로는 난포의 성장에 따라 동결보존액의 흡수와 배출에 많은 차이가 있어 동결보존액의 적절한 조건을 찾는 데 어려움이 있기 때문으로 알려져 있다.<sup>4</sup>

최근에는 preantral follicle의 동결보존 시 삼투압에 의한 손상을 줄일 수 있고 동결보존액의 화학적 독성을 줄일 수 있는 초자화동결법이 시도되고 있으나 아직까지는 preantral follicle의 초자화동결을 위한 적절한 protocol이 제시되어 있지 않은 실정이다.

이에 본 연구에서는 생쥐 preantral follicle 초자화동결의 최적 환경을 확립하고자 Ethylene glycol과 EFS-40의 가장 적절한 조건을 알아보고, 이 조건하에서 생존한 preantral follicle을 체외에서 배양하여 체외생존율을 조사하였고, 난포의 직경을 측정하여 체외발달을 관찰한 후 배란유도를 시도하여 배란율을 조사하였다.

## 연구 재료 및 방법

### 1. 실험동물

본 연구에서는 광량 (명:암=12:12) 및 온도 (22°C) 조절과 환풍 시설이 갖추어진 사육실에서 사육된 제 1대 잡종 (C57BL/6<sup>+</sup> × BA/6<sup>+</sup>)의 암컷 2주령의 생쥐를 사용하였다.

### 2. 배양액의 준비

난소조직에서 분리한 preantral follicle을 Ham's

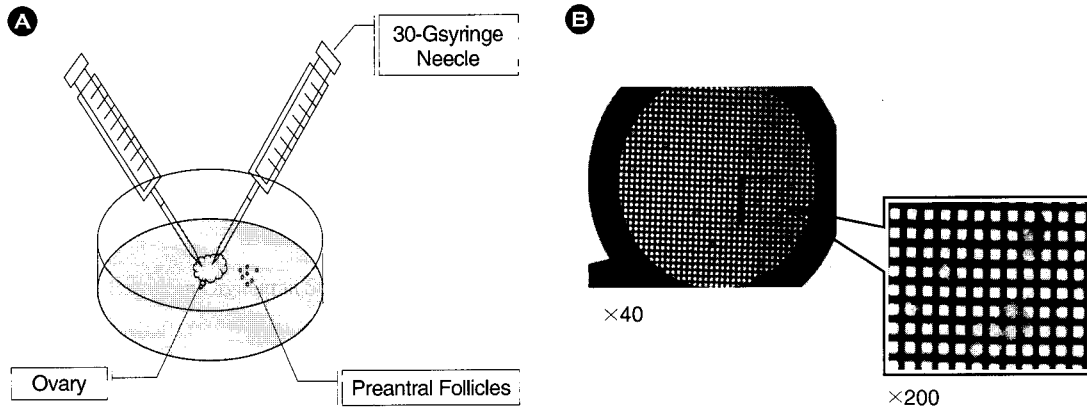
F-10에 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA)을 첨가한 배양액에서 세척하였다. 난포는  $\alpha$ -MEM 배양액에 10% FBS이 첨가된 배양액에서 체외배양하였다. 이 배양액에는 50 IU penicillin-streptomycin, 5.5  $\mu$ g/ml sodium pyruvate, 3 ml L-glutamine, ITS (5  $\mu$ g/ml insulin, 5  $\mu$ g/ml transferrin, 5 ng/ml selenium), 1 mg/ml fetuin, 100 IU/ml recombinant FSH, 5 ng/ml hEGF, 2.5 IU/ml hCG를 첨가하였다. 모든 배양액은 삼투압 측정기를 이용하여 삼투압을 280 mOsm/kg으로 보정하고, 0.2  $\mu$ m의 여과기로 제균하면서 14 ml tube에 분주한 다음 냉장고에서 보관하다가 사용하였다. 배양액은 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 최소한 6시간 이상 전 배양한 다음 실험에 사용하였다.

### 3. 난소조직으로부터 preantral 난포의 분리

생쥐를 경추탈골법으로 도살한 후 복부를 개방하여 나팔관과 지방이 따라오지 않도록 주의하면서 난소조직을 적출하였다. 적출된 난소조직은 배양액이 담긴 직경 35 mm의 petri dish에서 3회 세척하여 난소조직 표면에 묻어 있는 이물질과 혈액을 깨끗이 제거하였다. 약간의 배양액이 들어 있는 petri dish에서 forceps와 30G syringe needle을 사용하여 여분의 지방조직을 제거하고 기계적인 방법 (mechanical method)으로 난소조직에서 preantral 난포를 분리하였다 (Figure 1A). 분리된 preantral follicle은 pasteur pipette로 회수한 후 Ham's F-10 배양액에서 세척하여  $\alpha$ -MEM 배양액으로 옮겼다.

### 4. Preantral 난포의 초자화동결 및 용해

Modified Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS)에 10% fetal bovine serum (FBS)을 첨가하여 기본용액으로 사용하였으며, 동결보존액인 EFS-40은 기본용액에 ethylene glycol 30% (v/v) (EG, Sigma, E-9129)와 Ficoll-70 18% (w/v) (average molecular weight 70,000, Sigma, F-2878), 0.5 M sucrose (Sigma, S-1888)를 첨가하여 제조하였다. Preantral follicle을 초자화동결하기 전에 20% EG가 첨가된 D-PBS (+ 10% FBS)에 각각 2분, 5분, 10분 동안 노출시켜 탈수화 평형 (dehydration equilibration)을 유도한 후 pasteur pipette를 사용하여 EFS에 각각 0.5분, 1분, 2분간 침지하였다. 이후 즉시 멸균 여과지 위에 있



**Figure 1. A:** Isolation of preantral follicles from ovarian tissue by mechanical method. **B:** Photograph of preantral follicles on the EM grid.

는 electron microscope grid (EM grid, 400 mesh; Gilder, USA) 상에 preantral follicle을 올려놓고 pincette를 사용하여 EM grid상에 부착시키고 남아 있는 EFS 용액이 제거되도록 하였다. 이어 난소조직이 부착된 EM grid를  $-196^{\circ}\text{C}$ 의  $\text{LN}_2$ 에 침지하여 초자화동결을 하였다 (Figure 1B). 이 때 EFF-40 동결보존액에 처치한 후  $\text{LN}_2$ 에 침지할 때 까지 걸리는 처리시간은 30초를 넘기지 않도록 하였다. 초자화동결된 preantral follicle은 최소 7일에서 최장 31일간 보관하였다.

초자화동결된 난소조직의 용해는  $37^{\circ}\text{C}$ 의 0.75 M, 0.5 M, 0.25 M sucrose가 첨가된 각각의 D-PBS 용액에 난소조직이 부착된 EM grid를 pincette를 사용하여 단계적으로 3분간 침지하여 난자의 재수화 (rehydration)를 하였다. 용해된 preantral follicle은  $\alpha$ -MEM 배양액이 담긴 petri dish로 옮겼다.

#### 5. 난포의 체외배양 생존율과 체외성장의 관찰

분리된 preantral follicle의 배양을 위해 60 mm culture petri dish의 바닥에 20  $\mu\text{l}$  소적을 만들고 mineral oil을 덮은 후 한 개의 소적에 한 개의 난포만을 개별적으로 옮겨 배양하였다. 난포 생존의 관찰은 난포 basement membrane의 손상이 없고 난소조직의 세포막이 완전하고 세포질의 응축이 없는 것으로 하였고, 2일, 4일, 6일, 8일, 10일째에 관찰하여 생존율을 조사하였다.

체외발달은 난포의 크기로 관찰하였으며 난포의 크기는 난포의 theca cell의 경계부위에서부터 반대

편 경계까지의 거리를 두 번 재어 평균값으로 표시하였다. 난포의 직경은 배양 시작일, 2일, 4일, 6일, 8일, 10일째에 측정하여 체외성장을 관찰하였다.

#### 6. 체외성장된 난포의 배란유도

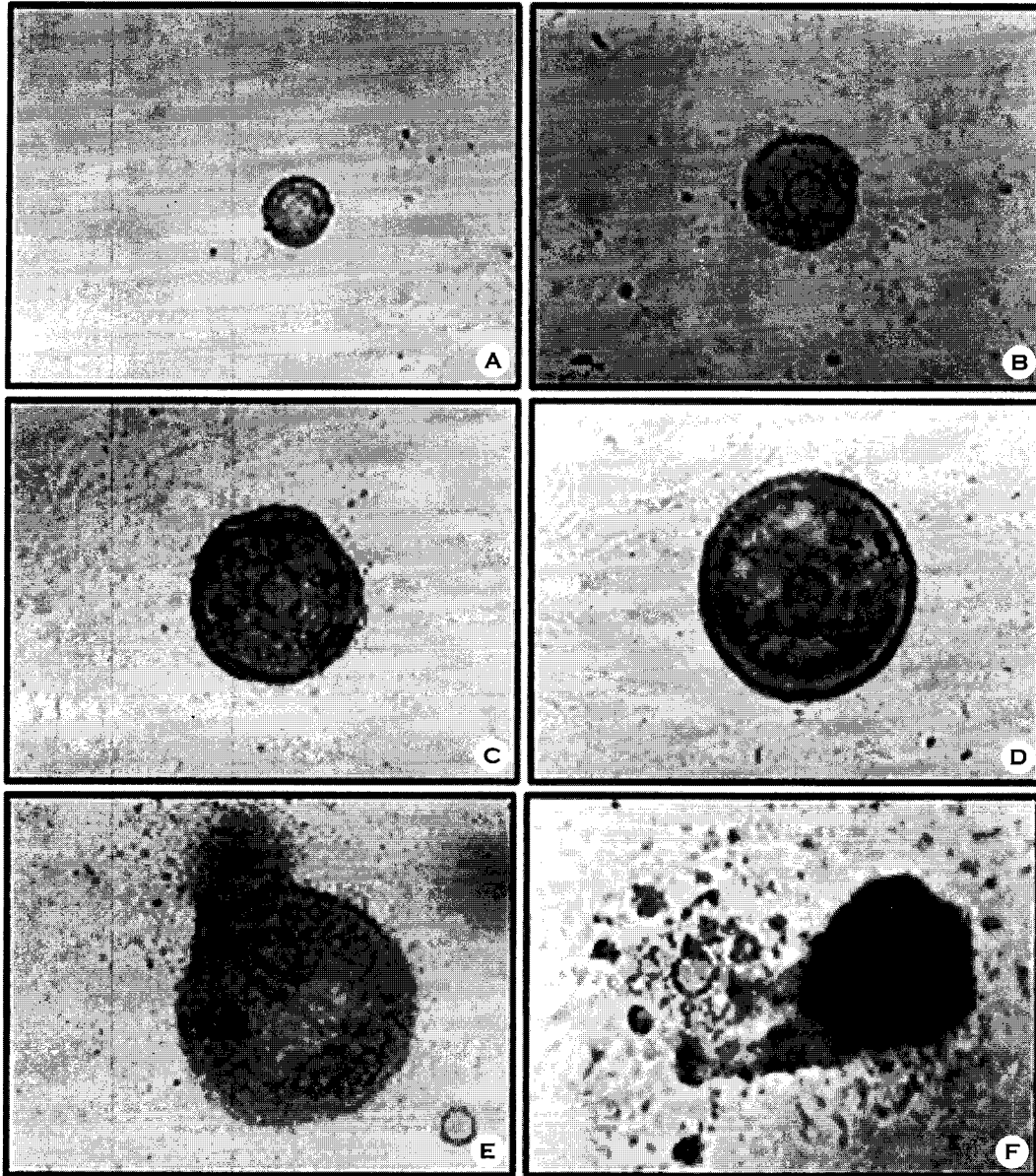
난포의 직경이 약 350  $\mu\text{m}$ 에 이르렀을 때 hCG를 투여하여 배란을 유도하였다. hCG 투여 후 약 24시간 후 현미경으로 관찰하였을 때 antral 난포의 stigma로 배출되는 난자가 확인되면 배란이 성공적으로 이루어진 것으로 판정하였다.

### 결 과

#### 1. 초자화동결 용해 후 난포의 형태학적 발달

본 실험에서는 초자화동결 용해 후 매일 난포의 형태학적인 관찰을 한 결과 용해 1일째에 basement membrane의 손상이 관찰되지 않은 난포는 계속 발달을 하였지만 (Figure 2A) 손상이 있었던 경우에는 더 이상의 발달을 관찰할 수 없었다. 용해 3~4일째에 난자를 둘러싼 몇 층의 입방형 (cuboid)의 과립막 (granulosa) 세포가 관찰되기 시작하였으며 (Figure 2B) 배양기간에 따라 과립막 세포층이 두꺼워져서 배양 5일째에는 여러 층의 과립막 세포층이 관찰되었다 (Figure 2C). 난포강의 형성은 배양 7~8일째부터 관찰되기 시작하였다 (Figure 2D).

배양 후 10일경 난자 직경이 350  $\mu\text{m}$ 에 이르렀을 때 배란을 유도하였으며, 성숙난포의 난포강의 팽



**Figure 2.** Mouse preantral follicle grown *in vitro*. **A:** 1 day culture, intact basement membrane and a few theca cells attached. **B:** 3 day culture, follicle surrounded by layers of cuboidal granulosa cells. **C:** 5 day culture and **D:** 7 day culture, antrum like cavity appeared. **E:** Preovulatory follicle, acute distension of the antrum create an weakening area and oocyte extrusion, **F:** Ovulated follicle, mature oocyte surrounded by cumulus cells. (Original magnification  $\times 200$ .)

창으로 인한 난포의 파열로 배란을 관찰할 수 있었고 (Figure 2E), cumulus 세포로 둘러싸인 난자를 관찰할 수 있었다 (Figure 2F).

2. 초자화동결 조건에 따른 preantral follicle의 생존

초자화동결 시 가장 좋은 조건을 찾기 위하여 Ethylene Glycol (EG)에는 각각 2분, 5분, 10분간 침

지하였고, 초자화동결보존액 EFS-40에는 각각 0.5 분, 1분, 2분간 침지한 후 초자화동결하였다. 용해 후 preantral follicle을 현미경으로 관찰하여 basement membrane이 완전하며 세포막의 형태가 계속 유지되는 난자를 생존한 것으로 하여 판정하였다. 난포의 생존율은 EG에 5분간 침지 후 EFS-40에 0.5분간 침지한 군에서 평균 83.2±2.1%로 가장 높은 결과를 보였고, 다음으로 EG에 10분간 침지 후 EFS-40에 1분간 침지한 군에서 82.6±24.6%, EG에 5분간

침지 후 EFS-40에 1분간 침지한 군에서 79.3±11.9%였다 (Table 1, Figure 3). 따라서 본 실험에서는 EG에 5분 침지 후 EFS-40에 0.5분간 침지하여 preantral follicle의 초자화동결을 시행하였으며 초자화동결을 하지 않은 preantral follicle과 비교하여 체외생존율 및 체외성장을 조사하였다.

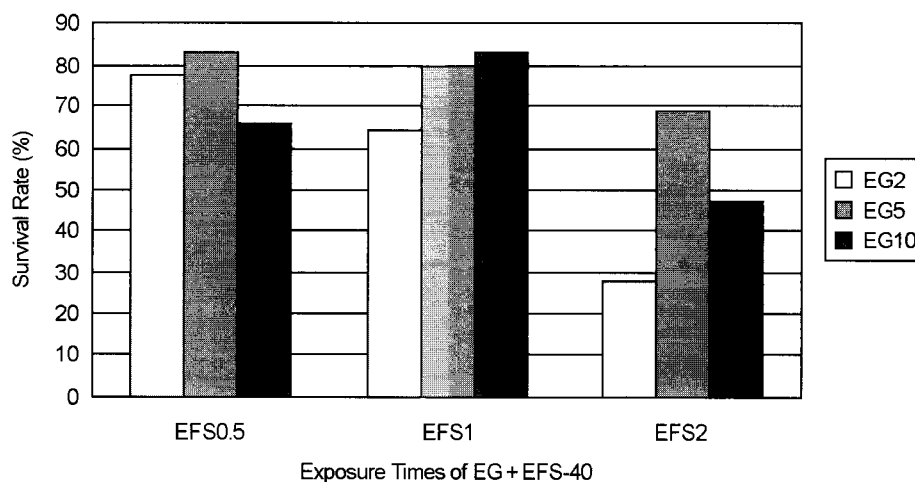
### 3. 초자화동결 용해된 난포의 체외생존율

초자화동결한 난포를 체외에서 배양하였을 때의

**Table 1.** Survival rate of vitrified preantral follicles under various conditions of EG and EFS-40

Exposed time (mins)		No. of ovary	No. of follicle		Survival rate (%) <sup>*</sup>
EG	EFS-40		Initiated	Survived	
2	0.5	10	55	42	77.3± 9.3
	1	12	95	61	64.4± 5.5
	2	6	18	5	27.7± 4.8
5	0.5	12	111	98	83.2± 2.1
	1	12	71	56	79.3±11.9
	2	12	70	48	68.7± 8.3
10	0.5	12	83	55	65.7± 3.8
	1	12	73	61	82.6±24.6
	2	12	72	35	47.0± 3.7

\*Three replicated, EG: Etylene Glycol, EFS-40: EG 30% + Ficoll-70 18% + 0.5 M Sucrose



**Figure 3.** Survival rate of vitrified preantral follicles under various conditions of EG and EFS-40. EG: Etylene Glycol, EFS-40: EG 30% + Ficoll-70 18% + 0.5 M Sucrose. EG2: EG for 2 min, EG5: for 5 min, EG10: for 10 min, EFS0.5: EFS-40 for 0.5 min, EFS1: for 1 min, EFS2: for 2 min.

**Table 2.** Survival rate of vitrified and non-vitrified preantral follicles

Group	Survival rate (%) <sup>*</sup>				
	day 2	day 4	day 6	day 8	day 10
Non-vitrified	94.1±2.7	91.3±1.3	80.5±2.1	53.6±1.5	49.4±1.3
Vitrified	85.5±0.5	80.8±0.8	67.9±0.8	47.1±0.7	40.2±0.5

\*Three replicated

**Table 3.** Growth rate of vitrified and non-vitrified preantral follicles

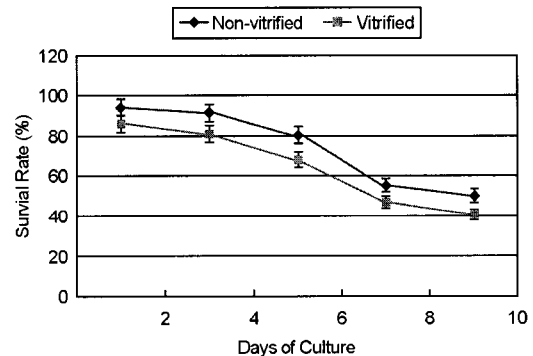
Group	Diameter of follicle (μm) <sup>*</sup>					
	day 0	day 2	day 4	day 6	day 8	day 10
Non-vitrified	110.5±20.7	118.1±32.7	165.7±41.3	245.5±42.1	350.6±51.5	400.4±51.3
Vitrified	107.1±16.1	117.1±18.4	125.1±32.1	178.4±45.6	238.4±47.2	325.4±54.4

\*Three replicated

생존율을 관찰하였다. 난포의 생존은 난자의 세포막과 난포를 둘러싼 과립막 세포층이 완전하고, 세포질이 응축되지 않은 경우로 판정하였다 (Figure 2). 초자화동결을 하지 않았던 preantral follicle을 체외에서 배양하였을 때의 생존율은 2일째에 94.1±2.7%, 4일째에 91.3±1.3%, 6일째에 80.5±2.1%, 8일째에 53.6±1.5%, 10일째에 49.4±1.3%이었고, 초자화동결을 용해한 preantral follicle의 체외생존율은 2일째에 85.5±0.5%, 4일째에 80.8±0.8%, 6일째에 67.9±0.8%, 8일째에 47.1±0.7%, 10일째에는 40.2±0.5%이었다. 초자화동결을 하였던 난포의 체외생존율은 초자화동결을 하지 않았던 경우에 비하여 약간의 감소는 있었지만 그 변화는 비슷한 경향을 나타내었다 (Table 2, Figure 4).

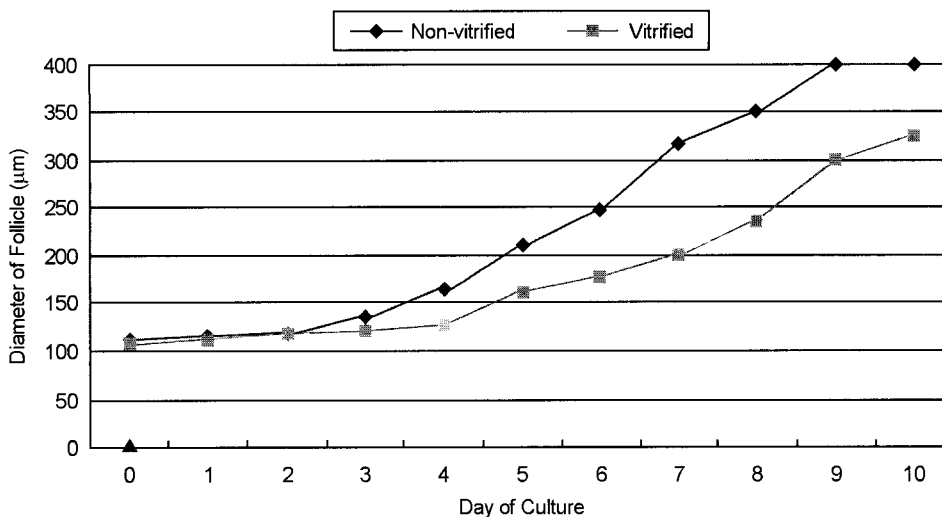
#### 4. 초자화동결 용해된 난포의 체외성장

Preantral follicle을 체외배양하여 난포강이 형성되는 preovulatory follicle의 단계까지 배양하면서 매일 현미경으로 난포의 생존을 확인하였으며, 관찰한 난포 중에 생존한 난포의 직경을 측정하여 체외성장을 조사하였다. 초자화동결을 하지 않았던 preantral follicle의 직경은 처음에 110.5±20.7 μm, 2일째에 118.1±32.7 μm, 4일째에 165.7±41.3 μm, 6일째에 245.5±42.1 μm, 8일째에 350.6±51.5 μm, 10일째에 400.4±51.3 μm이었고, 초자화동결 용해한 preantral



**Figure 4.** Survival rate of vitrified and non-vitrified preantral follicles. Although *in vitro* survival rate of vitrified preantral follicles were slightly lower than that of non-vitrified preantral follicles, the patterns of decline were similar in non-vitrified and vitrified preantral follicles.

follicle의 직경은 처음에 107.1±16.1 μm, 2일째에 117.1±18.4 μm, 4일째에 125.1±32.1 μm, 6일째에 178.4±45.6 μm, 8일째에 238.4±47.2 μm, 10일째에 325.4±54.4 μm이었다. 초자화동결 용해한 preantral follicle의 성장은 초자화동결을 하지 않았던 경우에 비하여 배양 4~5일째부터 차이가 나기 시작하였지만 전체적으로는 비슷한 경향을 나타내었다 (Table 3, Figure 5).



**Figure 5.** Follicular growth in vitrified and non-vitrified preantral follicles. Although growth rate of vitrified preantral follicles were lower than that of non-vitrified preantral follicles, the patterns of *in vitro* growth were similar.

**Table 4.** Ovulation rate of vitrified and non-vitrified preantral follicles

Group	No. of follicle		Ovulation rate (%) <sup>*</sup>
	Initiated	Ovulated	
Non-vitrified	50	23	47.8±0.7
Vitrified	46	15	32.6±1.2

\*Three replicated

#### 5. 체외성장된 난포의 배란

초자화동결 용해 후 체외성장된 난포는 46개 중에서 15개 (32.6±1.2%)가 배란되었으며 초자화동결을 하지 않았던 경우에는 난포의 50개 중에서 23개 (47.8±0.7%)가 배란되었다 (Table 4).

### 고 찰

최근에는 생식력 소실이 예상되는 여성의 난소에서 채취한 preantral follicle을 동결보존하고 필요한 시기에 용해하여 생식력을 보전하기 위한 연구가 진행되고 있다. 현재 preantral follicle을 난소로부터 직접 획득하여 체외에서 배양하는 방법은 비교적 좋은 성과를 보이고 있지만 동결보존법의 가장 적절한 방법과 조건은 확립되어 있지 않은 실정이다.<sup>5,6</sup>

최근에 preantral follicle의 동결보존을 위한 적절한 동결보호제의 개발과 함께 다양한 동결보존법이 시도되고 있다. 본 연구에서는 현재까지 알려진 preantral follicle의 동결보존법 중에서 가장 좋은 성적을 보이고 있는 초자화동결법을 사용하였으며 이때 가장 적절한 동결보존의 조건을 찾고자 하였다. 초자화동결 시 EG와 EFS-40의 노출시간에 따른 생존율을 조사하여 preantral follicle의 초자화동결 조건을 확립하고자 하였으며, 그 후 preantral follicle을 체외에서 약 10일간 배양하여 체외생존율과 체외성장 및 배란에 대하여 조사하였다.

초자화동결 조건에 대한 실험의 결과는 EG에 5분/EFS-40에 0.5분 노출하였던 조건에서 83.2±2.1%로 가장 좋은 생존율을 나타내었다. 따라서 이후의 실험에서는 EG에 5분/EFS-40에 0.5분 노출하여 초자화동결을 시행하였다.

Preantral follicle의 적절한 초자화동결제 노출시간은 난자의 경우에 비하여 긴 것으로 알려져 있다. 그것은 난자에 비하여 preantral follicle은 복잡한 구조로 되어 있어 탈수화 과정 및 동결보호제의 흡수 과정에 소요되는 시간이 더 필요하였기 때문이라고 생각된다. 즉 preantral follicle과 난자의 초자화동결에는 몇 가지 차이점이 있는데 난자는 단일세포인데 반하여 난포는 granulosa와 theca 세포 그리고

난자로 이루어진 복합체이므로 난포는 동결보호제의 침투가 쉽지 않으며 탈수화 과정에서도 영향을 받을 것으로 생각된다.<sup>7</sup> 또한 세포의 permeability도 난포의 성장에 따라 차이가 난다는 연구가 있어 난자에 비하여 preantral follicle의 permeability가 떨어지므로 동결보존 시 동결보호제의 처치가 힘들 것으로 생각된다.<sup>8</sup>

이런 단점에도 불구하고 난자보다 preantral follicle을 동결보존에 사용하려는 이유로는 난자는 이미 제 2차 감수분열의 중기로 발달하였으며 투명대가 생성되고 다양한 종류의 과립, 방추사가 나타나는 시기이므로 preantral follicle보다 동결 시 손상을 더 잘 받게 되는 단점을 가지고 있기 때문이다.

본 연구에서는 EM grid를 이용하여 preantral follicle의 초자화동결을 시도하였으며 실온에서 급속융해를 하였다. 그 결과 초자화동결을 하지 않았던 preantral follicle을 체외에서 배양하였을 때의 생존율은 2일째에 94.1±2.7%, 4일째에 91.3±1.3%, 6일째에 80.5±2.1%, 8일째에 53.6±1.5%, 10일째에 49.4±1.3%이었고, 초자화동결을 하였던 preantral follicle의 체외생존율은 2일째에 85.5±0.5%, 4일째에 80.8±0.8%, 6일째에 67.9±0.8%, 8일째에 47.1±0.7%, 10일째에는 40.2±0.5%로서 초자화동결을 하였던 preantral follicles의 체외생존율은 초자화동결을 하지 않은 경우에 비하여 약간 감소하였지만 비슷한 경향을 나타내었다.

Boland 등<sup>9</sup>은 난소로부터 얻은 미성숙 난포의 성장과 난자를 성숙시키기 위해서는 serum과 FSH를 첨가해야 되고, 체외 배란을 유도하기 위해서는 최종적으로 LH를 첨가해야 된다고 하였으며, Roy 등<sup>10</sup>은 hamster에서 small primary와 secondary 단계의 난포를 체외에서 성장시키기 위해서는 FSH와 LH가 필요하고, Katska 등<sup>11</sup>은 FSH, ITS (insulin/transferrin/selenium), L-glutamine, sodium pyruvate 등이 난포의 발달에 관여한다고 하였다. 본 연구에서도 preantral follicle을 배양하여 성숙난포로 발달시키기 위하여 항생제와 함께 sodium pyruvate, glutamine, ITS, fetuin, FSH, hEGF를 사용하였다.

초자화동결을 하지 않았던 preantral follicle은 난포의 직경에서 배양 시작 일에 110.5±20.7 μm, 2일째에 118.1±32.7 μm, 4일째에 165.7±41.3 μm, 6일째

에 245.5±42.1 μm, 8일째에 350.6±51.5 μm, 10일째에 400.4±51.3 μm이었으며, 초자화동결을 하였던 preantral follicle의 직경은 배양 시작 일에 107.1±16.1 μm, 2일째에 117.1±18.4 μm, 4일째에 125.1±32.1 μm, 6일째에 178.4±45.6 μm, 8일째에 238.4±47.2 μm, 10일째는 325.4±54.4 μm이었다. 초자화동결을 하였던 preantral follicle을 이용하였을 때 난포의 발달은 초자화동결을 하지 않은 경우에 비하여 배양 처음부터 3일째까지는 배양일에 따른 직경의 증가가 비슷하였고 배양 4~5일째부터 난포의 직경에서 차이가 나기 시작하였다. 이러한 차이는 난포를 구성하는 과립막 세포와 난자 등이 동결에 의해 손상을 받아서 발생하였을 것으로 생각할 수 있으며, 실제로 Eppig<sup>12</sup>는 전자현미경으로 동결보존되었던 난포의 주위를 둘러싼 과립막 세포의 gap junction이 손상되었음을 관찰하여 동결보존되었던 preantral follicle의 가장 많은 손상부위는 과립막 세포층이라고 하였다.

본 연구에서는 난포의 직경이 350 μm에 이르렀을 때 hCG를 투여하여 배란을 유도하였으며 결과에서 46개의 성숙난포 중에서 15개 (32.6±1.2%)에서 배란이 일어났다. 초자화동결을 하지 않았던 경우에 비하여 배란율이 낮게 되었지만 성공적으로 배란을 유도할 수 있었다. 배란은 난포가 성숙난포로 충분히 성숙한 후 매우 복잡한 과정에 의해 일어나는 과정이므로 초자화동결 융해 후 생존하여 발달하였을지라도 동결 및 융해 시 받은 손상으로 배란이 일어나지 못하였을 가능성이 많을 것으로 생각된다. 앞으로 배란율을 증가시키기 위해서는 동결보존 및 융해 그리고 체외배양 조건을 향상시키려는 노력이 필요하리라 생각된다.

본 연구를 통하여 preantral follicle의 동결보존법으로 초자화동결법이 유용하게 사용될 수 있음을 알 수가 있었고, 향후 초자화동결 융해되었던 preantral follicle이 보조생식술에 필요한 성숙난자를 얻기 위한 방법으로 사용될 수 있는 가능성을 제시하였다.

이상과 같은 연구 결과를 요약해 보면 preantral 난포의 초자화동결 융해 시 가장 높은 생존율을 보이는 Ethylene glycol (EG)과 EFS-40의 가장 적절한 조건을 알아보기 위하여 EG에 각 2분, 5분, 10분간



그리고 EFS-40에 각 0.5분, 1분, 2분간 노출하였고, 체외에서 약 10일간 배양하여 생존율을 조사하였으며, 또한 난포의 직경을 측정하여 체외성장을 조사한 후 배란을 유도하였다.

초자화동결을 하였던 preantral follicles의 생존율은 EG에 5분간 침지 후 EFS-40에 0.5분간 침지한 군에서 평균 83.2±2.1%로 가장 높은 결과를 보였다. 초자화동결을 하였던 난포의 체외생존율과 성장은 초자화동결을 하지 않았던 경우에 비하여 약간의 감소는 있었지만 그 변화는 비슷한 경향을 나타내었다. 초자화동결 용해 후 체외성장된 난포는 32.6±1.2%가 배란되었으며 초자화동결을 하지 않았던 경우에는 47.8±0.7%가 배란되었다.

결론적으로 초자화동결을 하였던 preantral follicle을 성숙난포로 체외발달을 시켰으며 배란을 성공적으로 유도할 수 있었다. 이는 향후 생식보조술에 필요한 성숙난자를 동결보존되었던 preantral follicle로부터 획득하여 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Newton H, Picton H, Gosden RG. *In vitro* growth of oocyte-granulosa cell complexes isolated from cryopreserved ovine tissue. *J Reprod Fertil* 1999; 115: 141-50.
2. Cha KY, Chung HM, Lim JM, Ko JJ, Han SY, Choi DH, et al. Freezing immature oocytes. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 169: 43-7.
3. Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Primavera MR, Rocchetta G, Ciotti PM, et al. Technical aspects of oocyte cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 169: 39-42.
4. dela Pena EC, Takahashi Y, Katagiri S, Atabay EC, Nagano M. Birth of pups after transfer of mouse embryos derived from vitrified preantral follicles. *Reprod* 2002; 123: 593-600.
5. Cortvrintd R, Smitz J, Van Steirteghem AC. *In vitro* maturation, fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepubertal mice in simplified culture system. *Human Reprod* 1996; 11: 2656-66.
6. Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I, Webb R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in-vitro*. *Biol Reprod* 2000; 62: 1322-8.
7. Newton H, Fisher J, Arnold JRP, Pegg DE, Faddy MJ, Gosden RG. Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. *Hum Reprod* 1998; 13: 376-80.
8. Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG. Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. *J Reprod Fertil* 1997; 110: 11-9.
9. Boland NI, Gosden RG. Effects of epidermal growth factor on the growth and differentiation of cultured mouse ovarian follicles. *J Reprod Fertil* 1994; 101: 369-74.
10. Roy SK, Greenwald GS. *In vitro* steroidogenesis by primary to antral follicles in the hamster during the periovulatory period: effects of follicle-stimulating hormone, lutenizing hormone and prolactin. *Biol Reprod* 1987; 37: 39-46.
11. Katska L, Rynska B. The isolation and *in vitro* culture of bovine preantral and early antral follicles of different size classes. *Theriogenology* 1998; 50: 213-22.
12. Eppig JJ. Mouse oocyte development *in vitro* with various culture systems. *Dev Biol* 1977; 60: 371-88.