

유리화동결 전 인공수축과 보조부화술이 융해 후 생쥐 포배아의 발달에 미치는 영향

부산대학교 의과대학 산부인과학교실¹, 부산대학교병원 불임클리닉²

조덕현¹ · 고경래² · 정지혜² · 최종렬¹ · 주종길¹ · 이규섭^{1*}

Effects of the Artificial Shrinkage and Assisted Hatching Before Vitrification on the Development of the Vitrified Mouse Expanding Blastocysts

Deok-Hyeon Jo¹, Gyoung-Rae Ko², Ji-Hye Jung², Jong-Ryeol Choi¹, Jong-Kil Joo¹, Kyu-Sup Lee^{1*}

¹Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Pusan National University, Busan, Korea, ²Clinic of Infertility, Pusan National University Hospital, Busan, Korea

Objective: This study was conducted to investigate the effects of the artificial shrinkage and assisted hatching (PZD; partial zona dissection) before vitrification on the development of vitrified mouse expanding blastocyst.

Methods: Mouse 2-cell embryos were collected and cultured in G1.1 and G2.2 to expanding blastocyst. For artificial shrinkage (AS) the micro injection pipette was inserted into blastocoele cavity and blastocoele fluid was aspirated. For assisted hatching (AH) PZD method was used. Control group was -AS/-AH and treatment groups were -AS/+AH, +AS/-AH and +AS/+AH. After AS and AH mouse blastocysts were equilibrated in G10 and G10E20 for 3 mins, respectively, and vitrified in G25E25 after loading on capped pulled-straw. Vitrified mouse blastocysts were thawed and cultured for 24 hrs. The survival and hatching rate was compared among one control and three treatment groups.

Results: The survival rates were 99%, 92% in +AS/+AH and +AS/-AH groups and 54%, 58% in -AS/-AH and -AS/+AH group, respectively. The survival rate was significantly higher in +AS group than in -AS group ($p < 0.01$). Hatching rates were 34%, 96% in -AS/-AH and -AS/+AH groups and 41%, 100% in +AS/-AH and +AS/+AH, respectively. The hatching rates was higher in +AH group than in -AH group ($p < 0.01$). After thawing recovery rates were 100%. Loading on capped pulled-straw, that is effective and useful method on vitrification.

Conclusion: This study showed that artificial shrinkage of blastocoele cavity and assisted hatching (PZD) significantly improved the development of the vitrified mouse expanding blastocysts. [Korean. J. Reprod. Med. 2008; 35(4): 275-283.]

Key Words: Vitrification, Artificial shrinkage, Assisted hatching, Blastocoele cavity, Capped pulled-straw

배아 발달률이 증가함에 따라 난자 채취 후 3일째에 시행하던 기존 8세포기 배아 이식에 비해 5일째에 시행하는 포배기 배아 이식이 늘어나고 있는 추세이다.^{1,2}

이러한 이유는 8-세포기에서 세포 발달이 정지된

배아를 선별할 수 있고, 영양막세포 (trophectoderm) 와 내세포괴 (ICM; inner cell mass)가 충실한 1~2개의 포배아를 이식함으로써 임신율과 착상율의 증가와 다태 임신을 줄일 수 있기 때문이다.³⁻⁵ 또한, 이식하고 남은 포배아의 동결보존은 불임환자의 시간적, 경제적 부담을 덜어주면서 임신의 기회를 더 제공할 수 있기 때문에 포배아의 동결보존 후 생존율을 높이기 위한 다양한 연구가 이루어지고

주관책임자: 이규섭, 우) 602-739 부산광역시 서구 아미동1가 10, 부산대학교 의과대학 산부인과학교실
Tel: (051) 240-2788, Fax: (051) 248-2384
e-mail: kslee@pusan.ac.kr

있다.^{3,4,6,7} 초기에는 완만동결법 (slow freezing)으로 포배아를 동결보존 하였으나,⁸ 빙정형성에 의한 낮은 생존율 때문에 유리화동결 (vitrification)을 이용한 포배아 동결이 시도되었다.⁹⁻¹⁵

유리화동결은 Rall과 Fahy¹⁶가 보고한 방법으로 고농도의 동결액을 이용하여 세포 내 수분을 탈수시키면 저온에서 강한 점성을 띠게 되어 빙정형성 (ice crystal formation) 없이 투명한 상태로 고체화되는 과정을 말하며 실온에서 바로 -196°C의 액체질소에 냉동 보관할 수 있는 간편한 방법이다. 그러나 유리화동결을 이용한 포배아 동결에서도 포배강 (blastocoele cavity) 내의 수분이 많기 때문에 수분이 완전히 탈수되지 않아 생기는 세포 내 빙정형성과 수분이 탈수되면서 동결액과 혼합되어 생성되는 세포외 빙정형성 때문에 융해 후 생존율이 낮은 것으로 보고되고 있으며,^{12,17,18} 체외배양과 동결로 인한 투명대경화 (zona hardening) 때문에 부화율을 또한 낮다.^{19,20} 최근에는 이러한 점을 극복하기 위해 유리 미세 피펫,²¹ 29-게이지 침,²² hand-drawn 파스퇴르 피펫,²³ 미세침²⁴을 이용하여 포배강 내의 수분을 인위적으로 제거하는 인공수축 (artificial shrinkage) 후 유리화동결을 시행한 결과 융해 후 높은 생존율과 임신율이 보고되고 있다. 그러나 이러한 방법은 숙련된 기술이 필요하고 과정이 어려워 실험자에 따른 변이가 많을 것으로 생각된다.

따라서 본 연구는 생쥐 포배아의 유리화동결 전 ICSI 피펫을 이용하여 포배아의 난포강액을 흡입하여 인공수축을 시행하고 이와 동시에 부분투명대 절개법 (PZD; partial zona dissection)으로 보조부화술 (assisted hatching)을 시행한 후 포배아의 발달을 조사하여 체외수정기술에의 이용 가능성을 확인하기 위해 실행되었다. 가늘게 뽑은 플라스틱 스트로우에 부하하여 유리화동결하는 방법을 이용하였는데, 이것은 생쥐 포배아의 동결에 매우 유효한 방법이며 인간 포배아의 동결에도 매우 유용할 것으로 생각된다.

연구대상 및 방법

1. 실험동물

6주령의 F1 잡종 (C57BL/CBA) 암컷 생쥐에게 pregnant mare serum gonadotropin (PMSG; Sigma, USA) 5 IU를 복강 내 주사하고 48시간 후 human chorionic gonadotropin (hCG; Sigma, USA) 5 IU를 복강 내 주사한 후 수컷 생쥐와 1:1로 합사하여 교배를 유도하였다. 다음날 질전 (vaginal plug)을 확인하고 48시간 쯤 경추 과열법으로 생쥐를 희생시키고 양측 난관을 적출한 후 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)으로 3회 세척하여 해부현미경 하에서 미세 유리관으로 난관을 관류하는 방법으로 2-세포기의 배아를 채취하였다.

채취된 배아는 G1.1 (Vitrolife Inc., Sweden) 배양액에서 8-세포기까지 배양한 후 G2.2 (Vitrolife Inc., Sweden) 배양액에서 포배아까지 배양하였다.

2. 평형액, 유리화용액과 융해액 제조

1) 평형액

G10 : Glycerol 1 ml + SSS 2 ml + DPBS 7 ml
G10E20: Glycerol 1 ml + Ethylene glycerol 2 ml + SSS 2 ml + DPBS 5 ml

2) 유리화용액

G25E25: Glycerol 2.5 ml + Ethylene glycerol 2.5 ml + SSS 2 ml + DPBS 3 ml

3) 융해액

0.5 M Sucrose : 1.72 g sucrose + 2 ml SSS + 8 ml DPBS
0.25 M Sucrose: 0.855 g sucrose + 2 ml SSS + 8 ml DPBS

3. Capped pulled-straw 제작

0.25 ml 플라스틱 스트로우 양 끝을 잡고 알코올 램프 5~7 cm 위에서 2~5초간 있다가 위로 올리면서 부드럽게 양 끝을 당겨 스트로우가 가늘게 되도록 한다. 가늘게 뽑아진 중간 부분을 날카로운

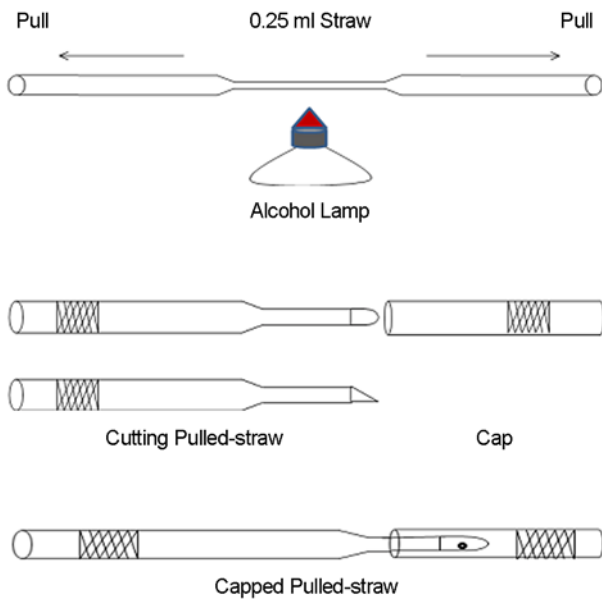


Figure 1. Schematic drawing of capped pulled-straw

칼로 비스듬히 자른다. 잘라진 반대편에는 17 게이지 침 중간 부분을 눌린 후 스트로우에 끼워 넣어 액체질소에서 스트로우가 위로 뜨지 않도록 하였다. 뚜껑은 새 스트로우를 3등분 하였을 때 코튼 마개가 있는 쪽에서 잘라 사용하였다. 이렇게 제작된 스트로우를 "capped pulled-straw"라 명명하였다 (Figure 1).

4. 인공수축과 보조부화술

동결 전 용해된 포배아의 내세포외 부분을 6시 혹은 12시 방향으로 한 뒤 ICSI와 같은 방법으로 고정 피펫으로 잡고 주입 피펫으로 부드럽게 포배강으로 찢어 포배강액을 흡입하였다. 거의 포배아가 수축되었을 때 주입 피펫을 수축된 포배아와 투명대 사이의 위란강 (perivitelline space)으로 뽑아낸 다음 주입 피펫을 y축으로 약간 올리면서 포배아를 잡고 있던 고정 피펫의 흡입력을 줄이면서 고정 피펫의 내경 속으로 찢어 투명대를 관통시켰다. 이후 투명대를 관통시킨 주입 피펫과 고정 피펫을 서로 텅기듯이 비벼 부분투명대절개를 함으로써 보조부화술을 시행하였다. 인공수축과 보조부화술은 동일인이 시행하였고 배아 당 약 30초가 소요되었

다 (Figure 2).

5. 유리화동결 및 융해과정

1) 유리화동결

인공수축과 보조부화술이 끝난 포배아를 실온의 G10과 G10E20 용액에서 각각 3분간 평형 (equilibration)시킨 후 실온의 G25E25 용액으로 옮기고 즉시 최소량의 용액과 포배아를 제조된 스트로우 끝 부분에 mouth 피펫으로 부하하였고 액체질소 증기에서 약 3~5초간 고정한 후 뚜껑을 씌워 삽입관에 장착하여 곧바로 액체질소 속으로 침지하였다 (Figure 3).

2) 융해

실온의 0.5 M sucrose와 0.25 M sucrose 용액을 각각 2개씩의 2-well dish에 1 ml 씩 분주하여 준비한 뒤 액체질소에 보관된 스트로우를 곧바로 0.5 M sucrose 용액에 옮겨 스트로우 끝부분에 붙어있던 배아가 흘러내리는 것을 실체 현미경으로 확인하였다. 그 다음, 배아를 0.5 M sucrose 용액으로 옮기고 3분, 다시 0.25 M sucrose 용액에서 3분간 각각 재탈수시켰다. 그 후 실온의 10% SSS-PBS에서 3회 세척하고 G2.2 배양액으로 옮겨 배양하면서 생존율과 부화율을 확인하였다.

6. 실험설계

실험은 대조군과 3개의 처리군으로 나누어 시행하였다. 인공수축과 보조부화술 없이 동결한 군 (-AS/-AH)을 대조군으로 하였고, 인공수축 없이 보조부화술만 시행한 군 (-AS/+AH), 인공수축만 시행한 군 (+AS/-AH), 인공수축과 보조부화술을 동시에 시행한 군 (+AS/+AH)을 처리군으로 하였다.

7. 통계처리

통계처리는 SPSS PC version 10 프로그램을 이용한 Chi-square test 및 Fisher's exact test를 사용하였으며, p값은 0.05 이하인 경우를 통계학적 의의가 있는 것으로 판정하였다.

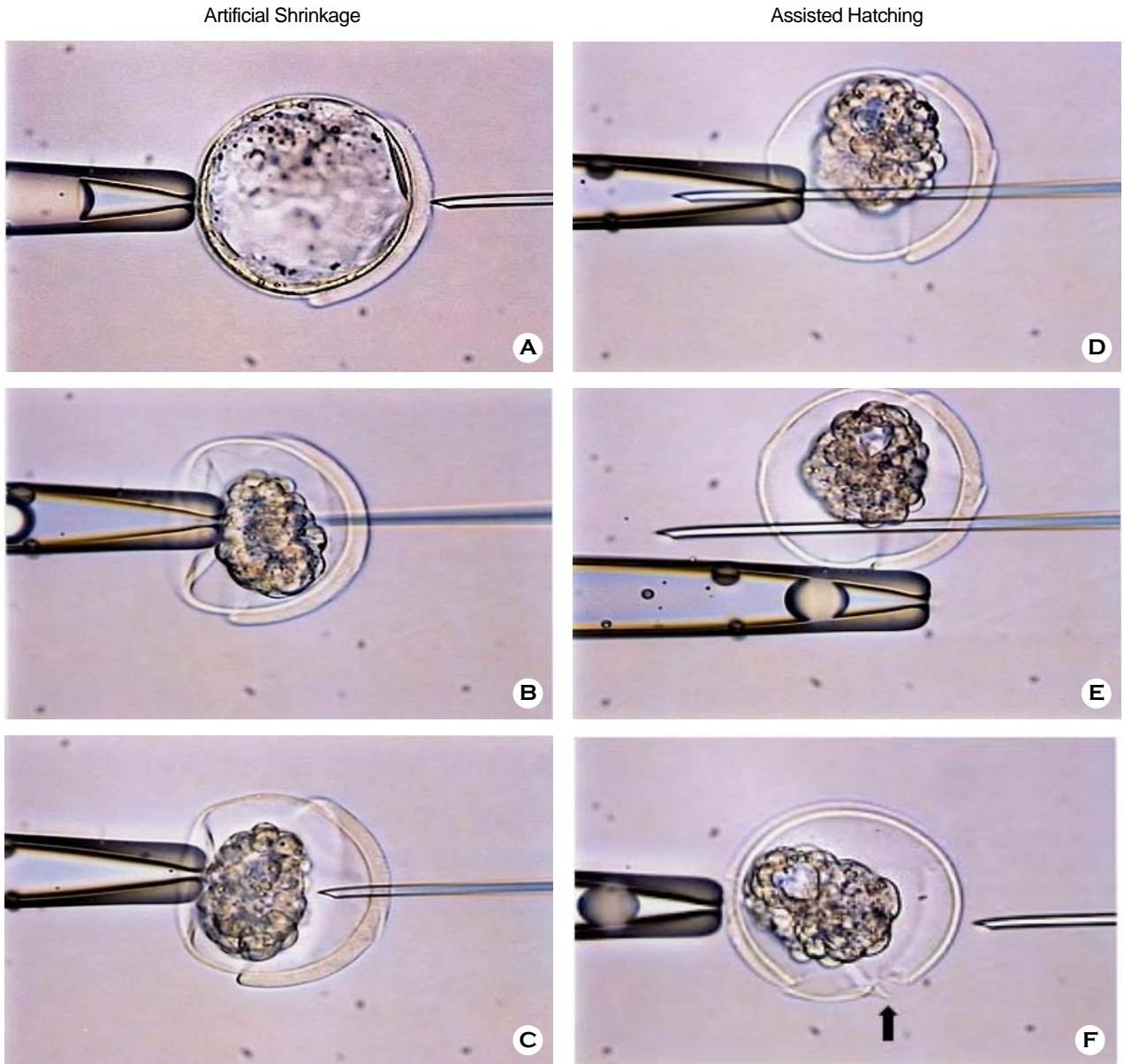


Figure 2. Photographs of artificial and assisted hatching (PZD) of mouse expanding blastocyst with micro injection pipette. (A) holding mouse expanding blastocyst with holding pipette, (B) insertion of the micro injection pipette inside the blastocoele cavity and aspiration of blastocoele fluid for shrinkage, (C) removal of pipette to perivitelline space, (D) penetration of opposite zona pellucida through perivitelline space, (E) split the zona with holding and injection pipette, (F) after partial zona dissection. Arrow indicates the portion of the zona pellucida dissected by PZD method ($\times 200$).

결 과

0.25 ml 스트로우를 가늘게 뽑아 비스듬히 자른 끝부분에 mouth 피펫으로 배아를 부하하여 유리화 동결 후 융해하였을 때 회수율 (recovery rate)은

100%였다. 융해 시 다른 조작 없이 끝부분을 직접 0.5 M sucrose에 침지하여 실체 현미경으로 관찰하면 스트로우에 붙어 있는 배아가 흘러내리는 것을 관찰할 수 있었으며, 또한 뚜껑을 덮기 때문에 액체질소와의 접촉에 의한 오염을 막을 수 있으며

손쉽게 만들 수 있어 배아의 동결보존에 매우 유용한 도구라고 생각된다.

용해 후 0.5 M sucrose, 0.25 M sucrose 용액에서 각각 3분간 재탈수시키고 24시간 배양하면서 생존율과 부화율을 관찰하였다 (Figure 4).

인공수축 후 유리화동결한 포배아의 생존율은 보조부화술을 시행한 군과 시행하지 않은 군에서 각각 98%와 92%였으며, 인공수축을 시행하지 않고 유리화동결한 생쥐 포배아의 생존율은 보조부화술을 시행한 군과 시행하지 않는 군에서 각각 54%와 58%로 보조부화술의 시행여부와 상관없이 나타나어, 인공수축은 생쥐 포배아의 유리화동결 후 생존

율 향상에 효과적인 방법임을 확인하였다 ($p < 0.01$) (Table 1).

보조부화술이 유리화동결 후 부화율에 미치는 영향을 조사한 연구에서 생쥐 포배아 부화율은 인공수축 없이 보조부화술을 시행한 군과 시행하지 않은 군에서 각각 96%와 34%였고, 인공수축 후 보조부화술을 시행한 군과 시행하지 않은 군에서 각각 100%와 41%로 보조부화술을 시행한 군이 시행하지 않은 군보다 유의하게 높은 부화율을 보여 보조부화술이 동결용해된 포배아의 부화율 향상에 매우 효과적인 방법임을 확인하였다 ($p < 0.01$).

고 찰

포유류 배아의 동결은 Whittingham 등²⁵이 완만 동결법으로 생쥐 배아의 동결 성공을 최초로 보고하였으며, 인간에서는 Trounson과 Mohr 등²⁶이 체외수정기술에서 이식하고 남은 4~8 세포기 배아를 동결보존 후 이식하여 임신에 성공하였음을 보고한 이후 많은 체외수정기술 기관에서는 주로 완만 동결법으로 잉여 배아를 동결보존 하였다. 이후 동결과정의 간편화, 동결용해후의 생존율 향상에 대한 연구가 집중되어 Szell과 Shelton²⁷이 세포 내 수분을 탈수시키는 sucrose를 동결액에 첨가함으로써

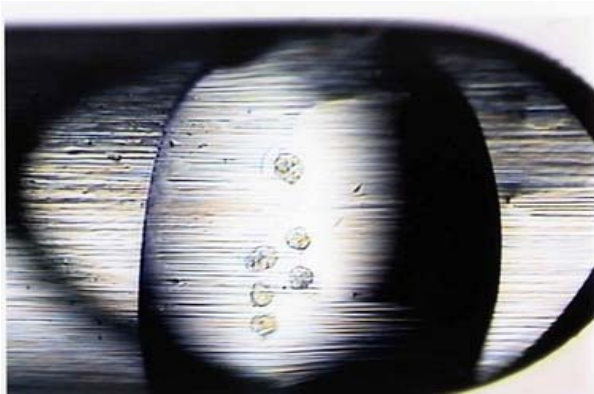


Figure 3. Photograph of the mouse blastocyst loaded on the tip of pulled-straw ($\times 40$). Scale bar = 100 μ m.

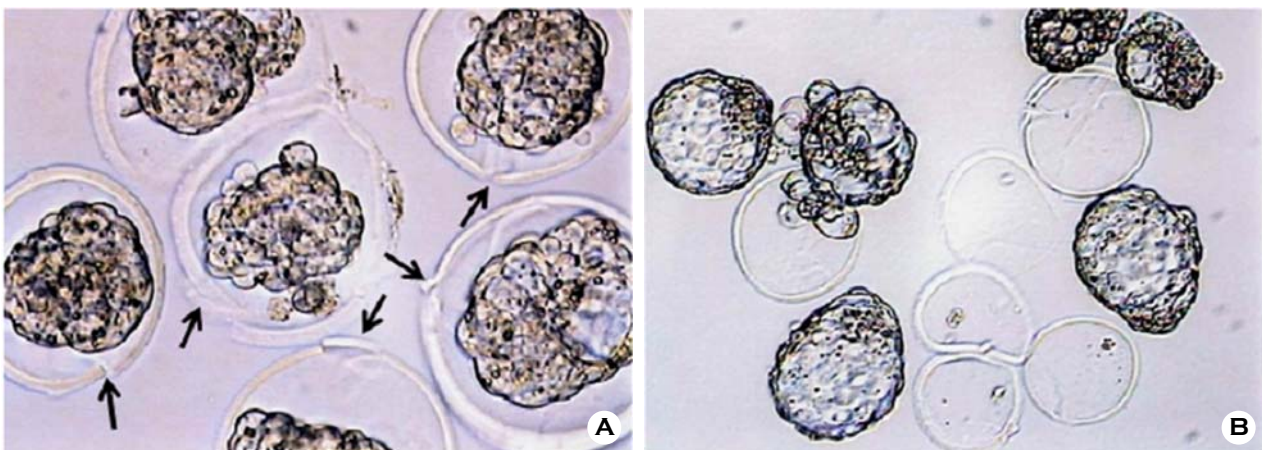


Figure 4. Photographs of thawed and hatched mouse blastocysts (A) after rehydration in 0.5 M and 0.25 M sucrose solution for 3 min, respectively. (B) hatched blastocysts after 6 hrs culture. Arrows indicate the portion of the zona pellucida dissected by PZD method before vitrification.

Table 1. The survival and hatching rate of the vitrified mouse blastocyst after artificial shrinkage and assisted hatching

Treatments	Number (%) of blastocyst			Hatching rate of re-expanding blastocysts
	Vitrified	Recovered	Re-expansion	
-AS/-AH (control)	50	50	29 (58) ^a	10 (34) ^c
-AS/+AH	50	50	27 (54) ^a	26 (96) ^d
+AS/-AH	50	50	46 (92) ^b	19 (41) ^c
+AS/+AH	50	50	49 (98) ^b	49 (100) ^d

-AS : without performing artificial shrinkage by aspirating blastocoele fluid, +AS : performing artificial shrinkage
 -AH: without performing assisted hatching (PZD), +AH: performing assisted hatching
 Different superscripts are significantly different (p<0.01) by 400 tests

빙정형성을 감소시켜 급속동결이 가능하게 되었다.

이러한 급속동결법을 이용하여 Trounson과 Sjoblom 등²⁸이 인간에서 임신에 성공하였음을 보고하였으나 빙정형성을 완전히 배제하지 못해 생존율과 임신율에서 낮은 수준에 머물러 있었다. 1985년 Rall과 Fahy¹⁶가 -196℃에서도 빙정형성이 되지 않는 유리화동결법으로 생쥐 8-세포기 배아를 동결융해한 후 양호한 성적을 보고하였지만 이것도 동결보호제의 고농도에 의한 삼투압의 해와 4℃에서 수행해야 한다는 단점이 보고됨에 따라 Kasai 등²⁹은 비교적 독성이 적은 ethylene glycol과 저온에서 점성을 강하게 띠며 빙정형성을 막아주는 고분자 물질인 Ficoll을 사용하여 실온에서 곧바로 -196℃의 액체질소에 동결이 가능한 유리화동결법을 보고하였다. 이후 배아의 발달단계별로 여러 가지 동결보호제를 이용한 유리화용액을 만들어 동결융해 후 생존율과 임신율 향상에 대한 연구가 진행되어 왔으나 이 방법 역시 분열중인 단계의 세포에서는 할구가 커서 동해방지제의 독성과 삼투압의 해를 극복하지 못해 만족할만한 결과를 얻지 못하고 있는 실정이었다.

그러나 1990년대 중반부터 배아 대사에 대한 연구 결과 공배양과 혈청 없이 포배아 단계까지 배양이 가능해짐에 따라 난자 채취 후 3일째 8-세포기 배아 이식에서 5일째 포배아 이식으로 바뀌고 있으며,¹ 이는 발생이 정지 (cell-block)되는 8-세포기 배아를 선별할 수 있고 양질의 포배아를 선별하여

1~2개의 배아를 이식함으로써 임신율 향상과 다태 임신을 막을 수 있어 현재 많은 시술기관에서 포배아 이식을 시행하고 있다.^{1,2} 또한 과배란유도법과 배양기술의 발달로 이식하고 남은 양질의 포배아가 남게 되고 이것을 동결보존하게 되면 환자에게 부담 없이 임신의 기회를 더 줄 수 있어 포배아의 동결보존이 체외수정시술 분야에서 중요한 부분을 차지하게 됨에 따라 현재 포배아의 동결보존에 대한 연구가 집중되고 있다.⁹⁻¹⁵

인간 포배아의 동결은 Cohen 등⁸이 완만동결법을 이용하여 처음으로 시행하였으며, 유리화동결은 Vanderzwalmen 등¹³이 최초로 보고하였으나, 포배강의 용적이 커서 고농도의 유리화용액과 탈수에 필요한 평형시간이 길어짐에 따라 발생하는 삼투압의 해와 불완전한 탈수로 인한 세포내외부에 생성되는 빙정에 의해 생존율과 임신율이 극히 저조하였다. 이 점을 극복하기 위해 포배강 내의 수분을 인위적으로 탈수시키는 인공수축과 냉각속도를 빠르게 하기 위한 다양한 도구에 대한 연구가 집중적으로 진행되었다. Vanderzwalmen 등^{21,22}은 포배아보다 직경이 작은 크기의 유리 피펫을 이용하여 포배강의 수분을 탈수시키는 방법으로 인공수축을 하여 20% ethylene glycol (EG) 용액에서 3분간 평형 (equilibration) 후 40% EG, 18% Ficoll, 0.3 M sucrose 유리화용액과 0.25 ml 플라스틱 스트로우를 사용하여 동결보존 후 20%의 임신율을 보고하였다. 이후 유리 미세침으로 포배강을 관통하여 인공수축을 시

킨 후 부분투명대절개법으로 보조부화술을 시행하여 10% DMSO와 10% EG 용액에서 3분간 평형 후 20% DMSO, 20% EG, 10% Ficoll, 0.75 M sucrose로 된 유리화용액과 Hemi-straw를 사용하여 동결한 결과 보조부화술을 시행한 군에서 38%, 보조부화술을 시행하지 않은 군에서 19%의 임신율을 보고하여 동결로 인한 투명대경화를 극복할 수 있음을 시사하였다. 또한 Son 등²³은 29 개이지 침을 사용하여 포배의 일부분을 절개하는 방법으로 인공수축과 보조부화술을 동시에 시행하여 20% EG 용액에서 2분간 평형 후 40% EG, 18% Ficoll, 0.3 M sucrose 유리화용액과 열전도율이 빠른 electron microscopy grid를 사용하여 동결, 융해한 결과 90%의 생존율과 50%의 임신율을 보고하여 인공수축과 보조부화술이 포배아의 동결보존 후 임신율에 매우 효과적임을 증명하였다. Mukaida 등²⁴도 미세 유리침으로 포배강을 관통하거나 레이저로 영양막에 작은 구멍을 내는 방법으로 인공수축을 시행하여 7.5% DMSO, 7.5% EG 용액에서 2분 평형 후 15% DMSO, 15% EG, 10% Ficoll, 0.65 M sucrose 유리화용액과 cryoloop를 사용하여 동결보존 후 융해 시에 acid tyrode 용액으로 보조부화술을 시행한 결과 인공수축을 시행한 군에서 97%의 생존율과 60%의 임신율을, 인공수축을 시행하지 않은 군에서는 85%의 생존율과 34%의 임신율을 보고하여 인공수축과 보조부화술이 인간 포배아의 동결보존에 매우 효과적임을 다시 한번 증명하였다.

본 연구에서도 생쥐 포배아를 이용하여 인공수축이 동결융해 후 생존율에 미치는 영향을 조사한 결과 보조부화술에 관계없이 약 95%의 생존율을 보여주어 인공수축이 포배아의 동결에 매우 유효한 방법임을 확인하였으며, 보조부화술이 동결융해 후 생존한 포배아의 부화율에 미치는 영향을 조사한 결과 97%의 부화율을 나타내어 보조부화술 역시 포배아의 동결보존 후 부화율에 미치는 영향이 매우 효과적임을 확인하였다. 유리화동결 전 포배아의 인공수축과 보조부화술에 대한 보고자들의 연구와 본 연구를 비교하였을 때 이전 연구자들의

보고에서는 15~20%의 투과성 내동제 (permeable cryoprotectant)에서 3분간 평형을 실시하였고 본 연구에서는 10%와 30%의 투과성 내동제에서 각각 3분씩 평형을 실시하였으며, 유리화용액에서도 이전의 연구자들은 40%의 투과성 내동제에 비투과성 내동제 (non-permeable cryoprotectant)인 Ficoll과 sucrose를 사용하였지만 본 연구에서는 50%의 투과성 내동제만을 사용하였으며 Ficoll과 sucrose를 사용하지 않았다. Sucrose를 사용하지 않은 이유는 포배아를 인위적으로 수축시켰기 때문에 탈수역할을 하는 sucrose가 필요 없다고 생각되었으며 Ficoll을 사용하지 않은 이유는 투과성 내동제의 농도가 40%일 경우 유리화가 되지 않기 때문에 Ficoll을 첨가하지만, 투과성 내동제의 농도가 50%일 경우 Ficoll을 첨가하지 않아도 유리화가 되기 때문에 첨가하지 않았으며, 점성이 강한 Ficoll과 탈수제인 sucrose를 첨가하지 않는 것이 융해 시 sucrose의 효과를 극대화할 수 있다는 생각 때문이다.

본 연구에서는 인공수축에 사용된 미세기구도 ICSI 피펫을 사용하였는데 이유는 손에 익숙하고 ICSI하는 방법과 같아 부담이 없기 때문이다. 또한 유리화용액과 함께 부하하는 기구 역시 0.25 ml 플라스틱 스트로우를 알코올램프에서 가늘게 뽑아 가장 가는 부분에서 비스듬히 잘라 그 위에 부하하기 때문에 매우 편리하며 필요 시 언제나 만들어 쓸 수가 있기 때문에 직접 만들어 실험에 사용하였다. 그러나 추후 다른 연구자들과의 방법과 비교연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

이상의 결과에서 알 수 있듯이 ICSI 피펫을 사용하여 포배강액을 흡입하는 방법으로 인공수축을 시행함과 동시에 부분투명대절개법으로 보조부화술을 시행한 후 가늘게 뽑은 플라스틱 스트로우에 부하하여 유리화동결하는 방법이 생쥐 포배아의 동결에 매우 유효한 방법이며 인간 포배아의 동결에도 매우 유용할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1998; 13: 3434-40.
2. Jones GM, Trounson AO, Gardner DK, Kausche A, Lolatgis Wood C. Evolution of a culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy. *Hum Reprod* 1998; 13: 169-77.
3. Cho HJ, Yoon SH, Yoom HG, Lee WD, Lee SW, Lee GU, et al. Viable high pregnancies obtained from frozen-thawed blastocysts: experience of more than 350 transfer cycles. *대한불임학회 제 34차 추계학술대회* 1997; 55-6.
4. Ménéz Y, Nicollet B, Herbau N, Andre D. Freezing cocultured human blastocysts. *Fertil Steril* 1992; 58: 977-80.
5. Bonsi A. Blastocyst transfer and freezing: Can this help us to improve the success of assisted reproduction? *Singapore J of Obstet Gynecol* 1995; 26(1): 13-7.
6. Kaufmann RA, Ménéz Y, Hazout A. Cocultured blastocyst cryopreservation: experience of more than 500 transfer cycles. *Fertil Steril* 1995; 64: 1125-29.
7. Nakayama T, Goto Y, Kanzaki H, Takabatake K, Himeno T, Takakura K, et al. Cryopreservation of human blastocyst. IX world congress on In vitro Fertilization and Alternated Assisted Reproduction; 1995 April 3-7; Vienna, Austria. 451-4.
8. Cohen J, Simens RF, Edwards RG, Fehilly CB, Fishel SB. Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocysts. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1985; 2: 59-64.
9. Saito N, Imai K, Tomizawa M. Effect of sugars-addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced in vitro. *Theriogenology* 1994; 41: 1053-60.
10. Yang NS, Lu KH, Gordon I, Polge C. Vitrification of blastocysts produced in vitro. *Theriogenology* 1992; 37: 326.
11. Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 1984; 21: 407-26.
12. 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.
13. Vanderzwalmen P, Delval A, Chatziparasidou A, Bertin G, Ectors F, Lejeune B, et al. Pregnancies after vitrification of human day 5 embryos. *Hum Reprod* 1997; 12(suppl): 98.
14. Vanderzwalmen P, Gaurois B, Ectors FJ, Touati K, Massip A, Ectors F. Some factors affecting successful vitrification of mouse blastocysts. *Theriogenology* 1988; 30: 1177-83.
15. Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil Steril* 1999b; 72: 1073-8.
16. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 °C by vitrification. *Nature* 1985; 313: 573-5.
17. Scheffen B, Vanderzwalmen P, Massip A. A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. *Cryo-Letters* 1986; 7: 260-9.
18. Miyake T, Kasai M, Zhu SE. Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene glycol-based solution by a simple method. *Theriogenology* 1993; 40: 121-34.
19. Carroll J, Depypere H, Matthews CD. Freeze-thaw induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *J Reprod Fertil* 1990; 90: 547-53.
20. Germond M, Senn A, Rink K, Delacrétas G, De Grandi P. Is assisted hatching of frozen-thawed embryos enhancing pregnancy outcome in patients who had several previous induction failures? *J Reprod Fertil* 1995; 3: 41-2.
21. Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche CH, Standaert V, Van Roosendaal E, Vandervorst M, et al. Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of blastocoelic cavity before vitrification. *Hum Reprod* 2002; 17: 744-51.
22. Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche CH, Standaert V, Van Roosendaal E, Vandervorst M, et al. Vitrification of human blastocysts with the hemi-straw carrier: application of artificial assisted hatching after thawing. *Hum Reprod* 2003; 18: 1504-11.
23. Son WY, Yoon HJ, Lee SM, Lim JH. Pregnancy outcome following transfer of human blastocysts vitrified on electron microscopy grids after induced collapse of the blastocoele. *Hum Reprod* 2003; 18: 137-9.
24. Mukaida T, Oka C, Goto T, Takahashi K. Artificial shrinkage of blastocoele using either a micro-needle or laser pulse improves survival rate and pregnancy outcome of vitrified

- human blastocysts. Hum Reprod 2006; 21: 3246-52.
25. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to 195 degrees and 269 degrees C. Science 1972; 178: 411-4.
26. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight cell embryo. Nature 1983; 305: 707-9.
27. Szell A, Shelton JN. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. J Reprod Fertil 1986; 76: 401-8.
28. Trounson A, Sjoblom P. Cleavage and development of human embryos in vitro after ultrarapid freezing and thawing. Fertil Steril 1988; 50: 373-6.
29. Kasai M, Komi H, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T, Machida T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. J Reprod Fertil 1990; 89: 91-7.

= 국문초록 =

목 적: 본 연구는 유리화동결 전 인공수축과 보조부화술 (부분투명대절개)이 유리화동결 후 생쥐 포배아의 생존율과 부화율에 미치는 영향을 알아보기 위해 시행되었다.

연구방법: 생쥐 2-세포기 배아를 획득하여 G1.1과 G2.2 배양액에서 포배아까지 배양하였다. 실험은 대조구군과 3개의 처리군으로 나누었다. 인공수축과 보조부화술 없이 동결한 군 (-AS/-AH)을 대조군으로 하였고, 보조부화술만 시행한 군 (-AS/+AH), 인공수축만 시행한 군 (+AS/-AH), 인공수축과 보조부화술을 동시에 처리한 군 (+AS/+AH)을 처리군으로 하였다. 모든 포배아는 G10과 G10E20 용액에서 각각 3분씩 평형을 실시하였고, G25E25 유리화용액에 노출 직후 capped pulled-straw에 mouth 피펫으로 부하하여 유리화동결하였다. 용해 후 24시간 동안 배양하면서 생존율과 부화율을 조사하였다.

결 과: 인공수축을 시행한 후 보조부화술을 시행한 군 (+AS/+AH)과 보조부화술을 시행하지 않은 군 (+AS/-AH)에서의 생존율과 부화율은 각각 98%와 100%, 92%와 41%였으며, 인공수축을 시행하지 않고 보조부화술을 시행한 군 (-AS/+AH)과 보조부화술을 시행하지 않은 군 (-AS/-AH, 대조군)에서의 생존율과 부화율은 각각 54%와 96%, 58%와 34%를 나타내어 인공수축과 보조부화술 생쥐 포배아의 생존율과 부화율 향상에 매우 효과적인 방법임을 알 수 있었다 ($p < 0.01$). 또한 capped pulled-straw라고 명명한 스트로우를 이용한 유리화동결은 용해 후 회수율이 100%였으며, 동결과 용해과정에 매우 편리하여 배아의 유리화동결에 매우 유용할 것으로 생각된다.

결 론: 인공수축과 보조부화술은 포배아의 유리화동결 후 생존율과 부화율을 유의하게 향상시켜 포배아의 동결 보존에 매우 효과적인 방법으로 생각된다.

중심단어: 유리화동결, 인공수축, 보조부화술, 포배강
