

생쥐 배아의 유리화 동결에 동결액의 조성과 냉각속도의 영향

차의과학대학교 강남차병원 여성의학연구소¹, 차의과학대학교 의생명과학과²
박재균¹ · 고영은² · 엄진희¹ · 원형재¹ · 이우식¹ · 윤태기¹ · 이동률^{1,2*}

Effect on Survival and Developmental Competence of Vitrified Mouse Embryos Using Various Cryoprotectants and Cooling Speeds

Jae Kyun Park¹, Young Eun Go², Jin Hee Eum¹, Hyung Jae Won¹, Woo Sik Lee¹,
Tae Ki Yoon¹, Dong Ryul Lee^{1,2*}

¹Fertility Center of CHA Gangnam Medical Center, CHA University College of Medicine,

²Department of Biomedical Science, College of Life Science, CHA University, Seoul, Korea

Objective: Vitrification requires a high concentration of cyroprotectant (CPA) and an elevated cooling speed to avoid ice crystal formation. We have evaluated the effect of different combinations of cooling rate and CPA on embryonic integrity (developmental competence) in order to increase the efficiency of vitrification without impairing embryo viability. We hypothesized that the combination of CPA or the increase of cooling rates can reduce the concentration of toxic CPA for vitrification. As consequently, we performed experiments to evaluate the effect of various composition of CPA or slush nitrogen (SN₂) on the mouse embryonic development following vitrification using low CPA concentration.

Methods: Vitrification of mouse embryos was performed with EM grid using liquid nitrogen (LN₂) or SN₂ and different composition of CPAs, ethylene glycol (EG) and dimethylsulfoxide (DMSO). After vitrification-warming process, their survival and blastocyst formation rates were examined. For analyzing long-term effect, these blastocysts were transferred into the uterus of foster mothers.

Results: Survival and blastocyst formation rates of vitrified embryos were higher in EG+DMSO group than those in EG only. Furthermore, the group using SN₂ with a lower CPA concentration showed a higher survival of embryos and developmental rates than group using LN₂.

Conclusion: The combination of EG and DMSO as CPAs may enhance the survival of mouse embryos and further embryonic development after vitrification. SN₂ can generate high survival and developmental rate of vitrified/warmed mouse embryos when a lower concentration of CPA was applied. Therefore, these systems may contribute in the improvement of cryopreservation for fertility preservation.

[Korean. J. Reprod. Med. 2010; 37(4): 307-319.]

Key Words: Vitrification, Etylene glycol, Dimethylsulphoxide, Cooling rate, Slush nitrogen

접수일: 2010년 11월 16일, 수정일: 2010년 11월 29일, 게재확정일: 2010년 11월 29일

주관책임자: 이동률, 우) 135-081 서울특별시 강남구 역삼1동 606-5, 차의과학대학교 강남차병원 여성의학연구소

Tel: (02) 3468-3421, Fax: (02) 3468-2610, e-mail: drleedr@cha.ac.kr

†Park JK and Go YE contributed equally to this work.

*이 논문은 보건복지가족부 보건의료기술연구개발사업의 지원 (과제고유번호: A084923)과 2009년도 정부 (교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 대학중점연구소 지원사업 (2009-0093821)에 의하여 이루어진 것임.

지난 30년간의 보조생식술의 발전을 통해 양질의 난자와 배아의 생산이 늘어나게 되었고, 이에 더불어 생식세포와 잉여 배아의 동결보존 (cryopreservation) 필요성은 점점 커지고 있다. 따라서 많은 연구자들에 의해 다양한 생식세포와 배아의 동결 기술이 도입되고 발전되어 왔으며, 결국에는 임신에 실패한 환자들에게 그 기회를 다시 제공하는 꼭 필요한 보조생식술로 자리매김하고 있다.^{1,2} 특히 최근 들어 다태아 임신을 줄이기 위해 도입된 배아 이식수의 제한에 의해서 잉여 배아의 수는 점점 늘어나게 되었고, 보다 효과적인 배아 동결방법의 개발이 절실하게 되었다.

동결대상이 되는 세포나 조직의 대부분을 수분이 차지하고 있기 때문에, 이들의 제거 없이 동결하게 되면 세포 내의 수분이 날카로운 얼음결정 (ice crystal)을 형성하고 팽창하여 세포막과 내부 소기관에 상해를 일으키게 된다. 결국 해동이나 용해 이후에 세포나 조직의 생존성을 해치게 된다.³ 따라서 동결보존의 기본 원리는 세포의 고유한 형태를 유지하면서 내부의 수분을 고농도의 동결억제제 (cryoprotectant)의 삼투압 원리를 이용하여 점진적으로 제거하고, 이로 인해 얼음결정을 최소화하여 세포를 보호하는 것이다. 또한 동결을 통해 세포 내 모든 생리 및 생화학적 반응의 속도를 느리게 하거나 차단함으로써 장기간의 보존이 가능하다. 동결 방법으로는 낮은 동결억제제의 농도와 완만한 냉각속도 (cooling speed)를 이용하여 세포 내의 수분을 서서히 탈수시키면서 동결하는 완만 동결 (slow cooling method)과 고농도의 동결억제제와 초고속 냉각속도를 사용하는 유리화 동결 (vitrification)이 널리 사용되고 있다. 하지만 두 방법 모두에서 사용되는 동결억제제의 농도는 상대적으로 적거나 높을 뿐, 실제적으로는 그 농도는 세포에게 매우 해로운 독성을 가지고 있기 때문에, 동결과정에서는 세심한 처리과정이 필요한 것으로 알려져 있다.

난자 및 배아는 일반 세포에 비해 부피가 크고 더불어 수분함유량이 매우 많아 이를 효과적으로 동결보존하기 위해서는 특히 얼음결정을 최소화하

는 동결보존 기술이 필요한데, 이런 관점에서 도입되어진 방법이 유리화 동결법이다.⁴ 유리화 동결은 세포를 -196°C 의 액체질소 (liquid nitrogen, LN₂)에 직접 노출시켜 동결보존을 유도하지만, 실제로는 동결과정에서 세포 내에 얼음결정이 형성되지 않고 수분이 액체와 고체의 중간인 비결정질과 같은 상태를 유지하도록 하는 기술이다.^{5,6} 이러한 상태를 "유리화"라고 하며, 이를 얻기 위해서는 세포 내 수분이 고농도의 동결억제제로 치환되는 것이 필요하며, 이에 더불어 매우 높은 냉각속도 (분당 $3,000^{\circ}\text{C}$ 이상)가 필요하다.⁷ 유리화 동결의 장점은 조작이 간단하며 고가의 장비가 필요 없다는 점이며, 무엇보다도 얼음결정이 원천적으로 형성되지 않아 상해를 최소화할 수 있다는 것이 대표적이다. 하지만 방법의 특성상 고농도의 동결보호제 처리로 인한 독성과 삼투압으로 인한 세포의 손상을 초래할 수 있다는 단점도 있다. 이러한 고농도의 동결억제제에 의한 독성문제는 유리화 동결법이 개발된 이후에 수 백년 동안 생물학적 샘플의 동결에의 도입을 막는 가장 큰 원인이 되어 왔다. 하지만 세포 동결억제제의 종류와 처리시간을 조절하여 세포독성을 줄일 수 있는 방법이 개발되고, 이를 통해 세포 내 투과 속도가 높고 독성이 적은 동결억제제를 도입하거나, 투과성과 비 투과성 동결억제제를 조합하여 상대적 농도의 변화 없이 절대적인 농도를 낮추는 방법을 통해 세포에 미치는 독성을 감소시켜 유리화 동결-용해 후 효율을 증진키는 방법이 개발됨에 따라 유리화 동결법은 그 적응범위를 점점 넓히고 있다.^{8,9} 이외에도 용액이 노출되는 온도 및 보관용기의 열전도율, 동결용액의 양, 연구자의 숙련도와 배아 발달시기 및 질 등이 유리화 동결의 결과에 미치는 영향이 많이 연구되고 있다.¹⁰ 실제로 반고체 상태인 슬러시 상태의 질소 (slush nitrogen, SN₂)를 사용하여 열전도율을 증진시키는 방법으로 난자와 배아의 유리화 동결 후 생존율과 배아 발생의 증진을 보고한 연구도 있다.¹¹⁻¹³

기존에 널리 연구되고 있는 보관용기, 동결용액의 양, 냉매의 개발 등 열전도율을 극대화 시킬 수

있는 방법은 유리화 동결 시 냉각속도의 개선을 통해 그 효율증진에 많은 기여를 하고 있으나, 모든 시술자에게 표준화하기에는 여러 가지 어려움을 갖고 있다. 따라서 유리화 동결법이 더욱 효과적으로 널리 이용할 수 있게 하기 위해서는 각 유리화 동결대상인 세포를 위한 유리화 동결액 성분의 조합을 통한 독성감소의 전략이 더욱 절실하다. 또한 이에 더불어 기존에 개선된 냉각속도에 따른 동결 억제제의 농도조정의 가능성도 대두되고 있다. 따라서 본 연구에서는 유리화 동결을 위한 동결억제제의 조성조절과 동결속도의 조절에 의한 동결억제제의 농도조절이 배아의 유리화 동결-융해 후 생존율 또는 발생률에 미치는 영향을 비교하였다. 이러한 연구 결과를 통해 유리화 동결 시 동결억제제 조성의 개선과 냉각속도의 개선을 통한 동결억제제의 농도감소를 통한 효율증진의 가능성을 확인할 수 있었다.

연구대상 및 방법

1. 대상

본 연구에 사용된 실험동물은 차의과학대학교 동물실험 윤리위원회의 승인하에 진행하였으며 항온 및 항습이 유지되면서 낮 12시간, 밤 12시간이 조절되는 사육실에서 충분한 먹이와 물, 공간을 제공하면서 사육하였다. 실험을 위한 배아의 회수는 3~4주령된 암컷 생쥐 (ICR strain, Samtako Inc., Osan, Korea)에 5 IU pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 복강주사하고, 48시간 후에 5 IU human chorionic gonadotropin (hCG, Sigma-Aldrich)을 복강주사한 뒤 8주령 수컷과 교미시켰다. 13~15시간 후 질전이 확인된 암컷만을 선별해 분리하였고, hCG 주사 후 44~48시간 후에 경추 탈골로 도살한 후 난관을 채취하여 modified human tubal medium (HTF, Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) 내에서 난관의 팽대부를 통한 관류법으로 2-세포기 배아를 회수하였다. 회수된 배아는 10% synthetic serum substitute (SSS, Irvine

Scientific)가 첨가된 preimplantation-1 (P-1, Irvine Scientific) 배양액에서 6~8-세포기까지 배양한 후 실험에 사용하였다. 2-세포기 배아가 회수된 날을 Day-2로 하였다. 또한 동결 융해 후 포배기까지의 발생을 관찰하기 위하여 Day-6까지 10% SSS가 첨가된 blastocyst (Irvine Scientific) 배양액에서 배양하였다.

2. 유리화 동결액의 제조

유리화 동결액은 20% human serum albumin (HAS, SAGE, Trumbull, CT, USA)이 첨가된 Quinn's advantage medium (with HEPES buffer solution, SAGE)을 기본 배양액으로 사용하였고 각 실험에 따라 Table 1에 제시된 농도로 배양액을 제조하여 사용하였다. 동결억제제로는 침투성 동결억제제인 ethylene glycol (EG, Sigma-Aldrich)이 단독으로 또는 침투성 동결억제제인 dimethylsulphoxide (DMSO, Sigma-Aldrich)와 비침투성 동결억제제인 sucrose (Sigma-Aldrich)와 혼합하여 사용하였다. 모든 용액은 제조 후 0.22 μ m 필터로 여과하여 4°C에서 보관하였고, 동결하기 30분 전에 실온에서 평형시킨 후 사용하였다. 또한 동결액은 제조 후 일주일 동안만 사용하였다.

3. 유리화 동결

배아 동결에는 electron microscopic grid (EM grid IGC 400, Pelco Internationals, Westchester, PA, USA)를 이용한 유리화 동결법을 이용하였다.¹² 먼저 배아를 37°C의 전평형액 (pre-equilibration solution)에서 2.5분간 전처리하고 유리화용액 (equilibration solution)에서 20초간 처리하여 LN₂에 침지하였다. LN₂에 침지하기 전 20초 이내에 유리 피펫을 이용해 배아를 EM grid 위에 올려놓고 Fine Forceps으로 밑에 놓아둔 멸균 여과지 (Kimwipes, Yuhan-Kimberly, Gunpo, Korea) 쪽으로 눌러 남은 동결액을 제거하였다. 이후 미리 준비되어 LN₂에 침지함으로써 유리화 동결을 완료하였다. 또한 모든 실험은 3회 이상의 반복실험을 하였다.

Table 1. Composition of cryoprotectant solutions used in this study

	Pre-equilibration solution	Equilibration solution	Concentration	Warming solution (sucrose only)
Exp. 1	1.5 M EG	5.5 M EG+1.0 M Su	5.5 M	1.0 M, 0.5 M, 0.25 M, 0.125 M, 0 M
	1.3 M (7.5%) EG + 7.5% DMSO	2.7 M (15%) EG+15% DMSO+0.5 M Su	4.8 M	0.5 M, 0.25 M, 0.125 M, 0 M
Exp. 2	1.5 M EG	5.5 M EG+1.0 M Su	5.5 M	1.0 M, 0.5 M, 0.25 M, 0.125 M, 0 M
	1.3 M EG + 7.5% DMSO	5.5 M EG+15% DMSO+0.5 M Su	7.6 M	0.5 M, 0.25 M, 0.125 M, 0 M
		3.5 M EG+15% DMSO+0.5 M Su	5.6 M	
		1.5 M EG+15% DMSO+0.5 M Su	3.6 M	
		2.7 M EG+15% DMSO+0.5 M Su	4.8 M	
Exp. 3	1.3 M EG + 7.5% DMSO	3.5 M EG+15% DMSO+1.0 M Su	5.6 M	1.0 M, 0.5 M, 0.25 M, 0.125 M, 0 M
		2.5 M EG+15% DMSO+1.0 M Su	4.6 M	
		3.5 M EG+15% DMSO+0.5 M Su	5.6 M	0.5 M, 0.25 M, 0.125 M, 0 M
		2.5 M EG+15% DMSO+0.5 M Su	4.6 M	
Exp. 4	1.3 M EG + 7.5% DMSO	1.3 M EG+7.5% DMSO+0.5 M Su	2.4 M	0.5 M, 0.25 M, 0.125 M, 0 M
		1.8 M (10%) EG+10% DMSO+0.5 M Su	3.2 M	
		2.7 M EG+15% DMSO+0.5 M Su	4.8 M	

Su, sucrose; EG, ethylene glycol; DMSO, dimethylsulphoxide.

Jae Kyun Park. Effect on Survival and Developmental Competence of Vitrified Mouse Embryos Using Various Cryoprotectants and Cooling Speeds. Korean J Reprod Med 2010.

4. 슬러시 상태의 질소 (SN₂)를 사용한 유리화 동결

냉각속도를 증가시키기 위한 슬러시 상태의 질소를 이용하기 위한 방법의 경우는 유리화 동결 방법은 같은 방법으로 진행되었고 마지막 침지 시 Vit-Master (IMT, Ness Ziona, Israel)를 이용해 만들어진 슬러시 상태의 질소에 침지하였다.

5. 융해 (Warming)

유리화 동결된 배아가 부착된 EM grid는 액체질소 보관용기에서 최소 2주 이상 보관하였으며 융해는 EM grid를 1.0 M, 0.5 M, 0.25 M, 0.125 M, 0 M sucrose 용액에 연속적으로 각각 2.5분씩 침지함으로써 융해하면서 세포질 내의 동결억제제를 제거하였다. 마지막으로 배양액으로 2~3회 세척한 다

음 배양액이 들어있는 배양접시로 옮겨 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 그리고 유리화 동결 시 0.5 M의 sucrose를 이용했을 경우는 용해과정은 0.5 M, 0.25 M, 0.125 M, 0 M sucrose 용액에 2.5분씩 순차적으로 진행하였다. 용해 후 48~72시간 동안 배양을 실시하여 24시간 단위로 해부현미경 관찰을 통해 배아의 생존율, 발달률 및 부화율을 관찰하였고, 생존율, 발달률 및 부화율은 백분율로 평가하였다.

6. 수정란 이식

37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하면서 상태를 관찰 건강한 상태의 배아만을 선별하여 이식하였다. 대리모로 사용될 생쥐는 사육하고 있는 발정 전기의 ICR 마우스 암컷을 선별 후 이를 정관 결찰한 생쥐와 교배시켜 그 다음날 질전을 확인하였다. 2.5 dpc (days of post coital)의 준비된 대리모 생쥐에 해리성 마취제인 케타민 (Ketamine, Huons, Seoul, Korea)과 근육 이완 작용 및 진정에 좋은 약제인

럼폰 (Rompun, Bayer Animal Health Co., Ansan, Korea)을 1:2의 비율로 섞은 마취제를 생쥐 체중을 기준으로 0.002 mg/g의 농도로 복강 내에 주사하여 전신마취를 실시하였다. 마취된 생쥐의 등 쪽에 털을 제거한 후 약 1 cm 정도 절개한 다음 절개 부위를 통해 좌측 난소의 방향으로 피부와 근육층을 분리하였다. 혈관을 피해 근육층을 절개한 다음, 난소, 난관, 자궁을 노출시킨 후 고정하고 해부현미경 아래에서 이식을 시행하였다. 우선 자궁을 찾아 놓고, 여기에 29 G 주사기로 자궁에 구멍을 뚫은 다음 준비된 이식용 파이펫의 끝을 삽입하여 극미량의 배양액과 함께 발달된 배아를 붙여 넣은 후, 근육층과 피부를 차례로 봉합하였다. 이때 이식할 수정란은 배양액으로 2~3회 세척한 다음 한 개의 난관에 10~15개를 넣어 주었다.

7. 통계분석

배아의 발달률과 부화율 조사에 대한 결과에 통계적인 분석은 one-way ANOVA (Duncan test)를, 분

Table 2. Survival and developmental rates of mouse embryos treated with various vitrification solutions and cooling speed

Embryo stage	Treatment (solution)			No. (%) of embryos				
	Pre-equilibration	Equilibration	LN ₂ /SN ₂	Concentration	Vitrified	Survival (%)	Blastocyst (%)	Expanded/Hatching blastocyst (%)
6~8 cell embryo	Control				107	106 (99.1±3.0)*	105 (98.1±3.0)*	104 (97.2±3.0)*
	1.5 M EG	5.5 M EG+1.0M Su	LN ₂	5.5 M	104	95 (91.3±2.7)†	77 (74.0±2.2)†	74 (71.2±2.1)†
	1.5 M EG	5.5 M EG+1.0M Su	SN ₂	5.5 M	105	97 (92.4±2.8)†	89 (84.9±2.6)‡	84 (80.0±2.4)‡
	1.3 M EG + 7.5% DMSO	2.7 M EG+15% DMSO+0.5 M Su	LN ₂	4.8 M	111	109 (98.2±3.0)*	107 (96.4±2.9)*	105 (94.6±2.8)*
	1.3 M EG + 7.5% DMSO	2.7 M EG+15% DMSO+0.5 M Su	SN ₂	4.8 M	113	111 (98.2±3.0)*	110 (97.3±2.9)*	108 (95.6±2.9)*

Su, sucrose; EG, ethylene glycol; DMSO, dimethylsulphoxide; LN₂, liquid nitrogen; SN₂, slush nitrogen. *, †, ‡, Different superscripts within the same column indicate significant differences (p<0.05).

Jae Kyun Park. Effect on Survival and Developmental Competence of Vitrified Mouse Embryos Using Various Cryoprotectants and Cooling Speeds. Korean J Reprod Med 2010.

만율의 분석에는 Chi-square test를 이용하였고, p 값이 0.05 이하인 경우를 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 동결액의 조성 및 냉각속도에 따른 유리화 동결-융해 후 생쥐 배아의 생존율과 발달률

생쥐 배아의 유리화 동결 시 가장 효과적인 유리화 동결액을 선정하기 위하여 전 평형된 6~8-세포기 배아를 5.5 M EG만을 이용해 평형 후 LN₂에 침지, 5.5 M EG만을 이용해 평형 후 SN₂에 침지, 2.7 M EG+15% DMSO의 혼합액을 이용한 평형 후 LN₂에 침지, 2.7 M EG+15% DMSO의 혼합액을 이용한 평형 후 SN₂에 각각 침지하였다. 결과는 Table 2에 기술한 바와 같다. 각 유리화 동결액에 따른 유리화 동결 및 융해 후에 생존율은 아무 처리를 하지 않은 대조군의 경우 99.1%를 보였고, 실험군

의 경우는 각각 91.3%, 92.4%, 98.2%, 98.2%를 보여 EG+DMSO 혼합군에서 보다 나은 생존율을 관찰할 수 있었다 ($p<0.05$). 또한 각각에 처리군을 포배기까지의 발달률을 살펴 보았을 때 대조군은 98.1%를 보였고 반면 실험군은 74%, 84.4%, 96.4%, 97.3%를 각각 보였다. 그리고 부화 포배기까지 발달률도 대조군은 97.2%, 실험군은 71.2%, 80%, 94.6%, 95.6%를 보였다. 이상과 같이 발달률도 생존율과 유사한 경향을 관찰할 수 있었다. 이와 같은 결과로 볼 때 생쥐 배아의 생존율과 발생률에 있어서 적절한 농도의 EG와 DMSO의 혼합이 EG 단독의 동결억제제 보다 동결보존에 유리함을 보였다. 한편 냉각속도의 증진을 위해 슬러시 상태의 질소의 사용은 EG를 단독으로 사용한 군에서 LN₂에의 침지보다 유의성 있게 배아의 발달률을 증진시켰으나, EG와 DMSO의 혼합군에서는 차이를 관찰할 수 없었다 (Table 2).

Table 3. *In vitro* development (mean±SEM) of mouse embryo vitrified using five vitrification solutions

Embryo stage	Treatment (solution)			No. (%) of embryos				
	Pre-equilibration	Equilibration	LN ₂ /SN ₂	Concentration	Vitrified	Survival (%)	Blastocyst (%)	Expanded/Hatching blastocyst (%)
6~8 cell embryo	Control				105	105 (100±3.0)*	103 (98.1±2.9)*	100 (95.2±2.9)*
	1.5 M EG	5.5 M EG+1.0 M Su	LN ₂	5.5 M	142	134 (94.4±2.8)*	123 (86.6±2.6)†	120 (84.5±2.5)†
	1.3 M EG+7.5% DMSO	5.5 M EG+15% DMSO+0.5 M Su	LN ₂	7.6 M	145	142 (97.9±2.9)*	131 (90.3±2.7)†‡	124 (85.5±2.6)†
	1.3 M EG+7.5% DMSO	3.5 M EG+15% DMSO+0.5 M Su	LN ₂	5.6 M	141	129 (91.5±2.7)*	124 (87.9±2.6)†	122 (86.5±2.6)†
	1.3 M EG+7.5% DMSO	1.5 M EG+15% DMSO+0.5 M Su	LN ₂	3.6 M	123	55 (44.7±1.3)†	28 (22.8±0.7)¶	18 (14.6±0.4)‡
	1.3 M EG+7.5% DMSO	1.3 M EG+15% DMSO+0.5 M Su	LN ₂	4.8 M	112	111 (99.1±3.0)*	109 (97.3±2.9)**	103 (92.0±2.7)*†

SEM, standard error of mean; Su, sucrose; EG, ethylene glycol; DMSO, dimethylsulphoxide; LN₂, liquid nitrogen.

*, †, ‡, ¶, Different superscripts within the same column indicate significant differences ($p<0.05$).

Jae Kyun Park. Effect on Survival and Developmental Competence of Vitrified Mouse Embryos Using Various Cryoprotectants and Cooling Speeds. Korean J Reprod Med 2010.

2. EG+DMSO 혼합 동결액 내 EG 농도 변화에 따른 유리화 동결-융해 후 생쥐 배아의 생존율과 발달률

EG+DMSO 혼합동결액의 개선을 위해 DMSO의 농도를 고정하고 EG의 농도를 조정하였다. 전 평형된 배아를 5.5 M EG만을 이용해 평형 후 LN₂에 침지, 5.5 M EG+15% DMSO의 혼합액을 이용한 평형 후 LN₂에 침지, 3.5 M EG+15% DMSO의 혼합액을 이용한 평형 후 LN₂에 침지, 1.5 M EG+15% DMSO의 혼합액을 이용한 평형 후 LN₂에 침지, 2.7 M (15%) EG+15% DMSO의 혼합액을 이용한 평형 후 LN₂에 침지를 각각 시행하여 유리화 동결하였고, 그 결과를 아무 처리를 하지 않은 대조군과 비교하였다. 그 결과는 Table 3에 정리하였다. 각 유리화 동결액에 따른 유리화 동결 후에 융해 후에 생존율은 대조군의 경우 100%를 보였고 실험군의 경우는 각각 94.4%, 97.9%, 91.5%, 44.7%, 99.1%를 보였다. 또한 각각의 처리군을 포배기까지의 발달률을 살펴보았을 때 대조군은 98.1%를 보였고 반면

실험군은 86.6%, 90.3%, 87.9%, 22.8%, 97.3%를 각각 보였다. 부화 포배기까지 발달률도 살펴보면 대조군은 95.2%, 실험군은 84.5%, 85.5%, 86.5%, 14.6%, 92.0%를 보였다. 이와 같은 결과로 볼 때 동결보호제 혼합액 7.6 M 고농도의 동결억제제 처리군에서 융해된 배아의 생존율은 높지만 발달률은 낮았다. 하지만 통계적 유의성은 없었다. 또한 동결억제제가 1.5 M EG+15% DMSO (3.6 M 농도)의 경우는 통계적으로 유의성 있게 생존 및 발달률이 낮았다. 따라서 이러한 결과를 통해 4.8~5.5 M 사이의 농도가 생존율과 발생률에 가장 좋은 농도임을 알 수 있었다. 또한 2.7 M EG+15% DMSO로 동결억제제를 혼합하여 평형에 이용한 경우가 타군에 비해 유의성 있게 높은 생존율 및 발달률을 보였다.

3. Sucrose 농도 변화에 따른 동결-융해 후 생존율과 발달률

생쥐 배아의 유리화 동결액에서 적절한 sucrose의 농도를 알기 위해 전 평형 처리된 배아를 각각 3.5 M EG+15% DMSO+1.0 M sucrose와 2.5 M

Table 4. The effect of various concentration of sucrose on the development of vitrified-warmed cleaved embryos

Embryo stage	Treatment (solution)			No.(%) of embryos				
	Pre-equilibration	Equilibration	LN ₂ /SN ₂	Concentration	Vitrified	Survival (%)	Blastocyst (%)	Expanded/Hatching blastocyst (%)
	Control				135	134 (99.3±3.0)*	132 (97.8±2.9)*	127 (94.1±2.8)*
	1.3 M EG+7.5% DMSO	3.5 M EG+15% DMSO+1.0 M Su	LN ₂	5.6 M	139	127 (91.4±2.7)†	114 (82.0±2.5)†	111 (79.9±2.4)†
6~8 cell embryo	1.3 M EG+7.5% DMSO	2.5 M EG+15% DMSO+1.0 M Su	LN ₂	4.6 M	150	127 (84.7±2.6)†	121 (80.7±2.4)†	115 (76.7±2.3)†
	1.3 M EG+7.5% DMSO	3.5 M EG+15% DMSO+0.5 M Su	LN ₂	5.6 M	127	126 (99.2±3.0)*	122 (96.1±2.9)*	116 (91.3±2.7)*
	1.3 M EG+7.5% DMSO	2.5 M EG+15% DMSO+0.5 M Su	LN ₂	4.6 M	132	130 (98.5±3.0)*	126 (95.5±2.9)*	120 (90.9±2.7)*

Su, sucrose; EG, ethylene glycol; DMSO, dimethylsulphoxide; LN₂, liquid nitrogen.

*†, Different superscripts within the same column indicate significant differences (p<0.05).

Jae Kyun Park. Effect on Survival and Developmental Competence of Vitrified Mouse Embryos Using Various Cryoprotectants and Cooling Speeds. Korean J Reprod Med 2010.

EG+15% DMSO+1.0 M sucrose, 3.5 M EG+15% DMSO+0.5 M sucrose, 2.5 M EG+15% DMSO+0.5 M sucrose의 혼합액을 이용하여 평형한 후 각각 LN₂에 침지하였고, 그 결과를 Table 4에 기술하였다. 각 유리화 동결액에 따른 유리화 동결과 융해 후에 생존율은 대조군의 경우 99.3%를 보였고 실험군의 경우는 각각 91.4%, 84.7%, 99.2%, 98.5%를 보였다. 또한 각각의 처리군에서 포배기까지의 발달률을 살펴보면 대조군은 97.8%를 보였고 반면 실험군은 82.0%, 80.7%, 96.1%, 95.5%를 각각 보였다. 부화 포배기까지 발달률도 살펴보면 대조군은 94.1%, 실험군은 79.9%, 76.7%, 91.3%, 90.9%를 보였다. 이와 같은 결과로 볼 때 1.0 M sucrose의 농도 보다는 0.5 M의 sucrose의 농도에서 유의성 있는 생존과 발생률을 관찰할 수 있었다.

4. 냉각속도와 혼합 동결액 조성 변화에 따른 동결-융해 후 생존율과 발달률

생쥐 배아의 유리화 동결 시 동결속도의 변화에 따른 유리화 동결액의 농도조절 가능성을 확인하기 위해서 연구를 진행하였다. 전 평형된 포배기 배아를 각각 1.3 M (7.5%) EG+7.5% DMSO, 1.8 M (10%) EG+10% DMSO, 그리고 2.7 M (15%) EG+15% DMSO의 혼합액에 평형한 후 LN₂와 SN₂에 침지한 결과는 Table 5와 같다. 각 유리화 동결액에 따른 유리화 동결/융해 후 생존율은 대조군의 경우 100%를 보였고 실험군의 경우는 각각 LN₂군에서 92.0%, 96.8%, 98.8%, SN₂군에서 94.1%, 98.1%, 98.9%를 보였다. 또한 재 확장된 포배기의 배아는 대조군이 100%, LN₂군에서 80.7%, 91.4%, 97.6%, SN₂군

Table 5. Survival and developmental rates of mouse embryo vitrified in various composition of vitrification solutions and cooling speed

Embryo stage	Treatment (solution)			LN ₂ /SN ₂	Concentration	Vitrified	No. (%) of embryo		
	Pre-equilibration	Equilibration					Survival (%)	Re-expanded blastocyst (%)	Expanded/Hatching blastocyst (%)
	Control					104	104 (100±3.0)*	104 (100±3.0)*	101 (97.1±2.9)*
	1.3 M EG+7.5% DMSO	1.3 M EG+7.5% DMSO+0.5 M Su	LN ₂	2.4 M	88	81 (92.0±2.8)†	71 (80.7±2.4)†	65 (73.9±2.2)†	
	1.3 M EG+7.5% DMSO	1.8 M EG+10% DMSO+0.5 M Su	LN ₂	3.2 M	93	90 (96.8±2.9)*‡	85 (91.4±2.7)‡	81 (87.1±2.6)‡	
Blastocyst	1.3 M EG+7.5% DMSO	2.7 M EG+15% DMSO+0.5 M Su	LN ₂	4.8 M	85	84 (98.8±3.0)*	83 (97.6±3.0)*	79 (92.9±2.8)*‡,¶	
	1.3 M EG+7.5% DMSO	1.3 M EG+7.5% DMSO+0.5 M Su	SN ₂	2.4 M	102	96 (94.1±2.8)†,‡	84 (82.4±2.5)†	77 (75.5±2.3)†	
	1.3 M EG+7.5% DMSO	1.8 M EG+10% DMSO+0.5 M Su	SN ₂	3.2 M	105	103 (98.1±3.0)*	101 (96.2±2.9)*‡	95 (90.5±2.7)*‡,¶	
	1.3 M EG+7.5% DMSO	2.7 M EG+15% DMSO+0.5 M Su	SN ₂	4.8 M	91	90 (98.9±3.0)*	89 (97.8±2.9)*‡	88 (96.7±2.9)*‡,¶	

Su, sucrose; EG, ethylene glycol; DMSO, dimethylsulphoxide; LN₂, liquid nitrogen; SN₂, slush nitrogen. *, †, ‡, §, ¶, Different superscripts within the same column indicate significant differences (p<0.05).

Jae Kyun Park. Effect on Survival and Developmental Competence of Vitrified Mouse Embryos Using Various Cryoprotectants and Cooling Speeds. Korean J Reprod Med 2010.

에서 82.4%, 96.2%, 97.8%를 보였다. 부화 포배기까지 발달률도 살펴보면 대조군은 97.1%, LN₂군에서 각각 73.9%, 87.1%, 92.9%, SN₂군에서 75.5%, 90.5%, 96.7%를 보였다. 이와 같은 결과로 볼 때 2.7 M (15%) EG+15% DMSO의 혼합액에 평형 후 LN₂와 SN₂에 침지한 경우에는 차이를 발견할 수 없었다. 하지만 1.8 M (10%) EG+10% DMSO의 혼합액에 평형하고 SN₂에 침지한 경우에는 포배기의 재확장률이 LN₂에 침지한 경우에 비해 증가함을 알 수 있었다.

5. 배아 이식 및 산자 생산율

생쥐 배아의 유리화 동결 시 동결속도의 변화에 따른 유리화 동결액의 농도조절 가능성을 재확인하기 위해 유리화 동결 후 용해된 각 그룹의 포배기 배아를 생쥐 대리모에 이식하고, 산자를 확인하였다. 이식 후 산자의 수는 대조군에서 53.3% (24/

45)의 포배기가 산자로 태어났고, LN₂군에서는 각각 0% (0/50), 9.1% (5/55), 18% (9/50)가, SN₂군에서는 18% (9/50), 20% (11/55), 38% (19/50)가 각각 산자로 태어났다. 배아 이식 후 산자의 생산 결과를 살펴보면 SN₂를 사용한 경우가 각각의 농도에서 유의하게 산자의 생산을 증가시켰음을 확인할 수 있었다. 또한 SN₂의 사용은 보다 낮은 유리화 동결액의 농도에서도 다수의 산자의 생산이 가능하게 함을 알 수 있었다.

고 찰

동결보존은 보조생식술 (assisted reproduction technology, ART) 분야에서 가장 기본적인 시술방법이며 최근 들어 생식력의 보존방법으로서 그 중요성이 더욱더 강조되고 있는 부분이다.^{14,15} 따라서 난자를 포함한 생식세포와 배아 동결 부분에서 그

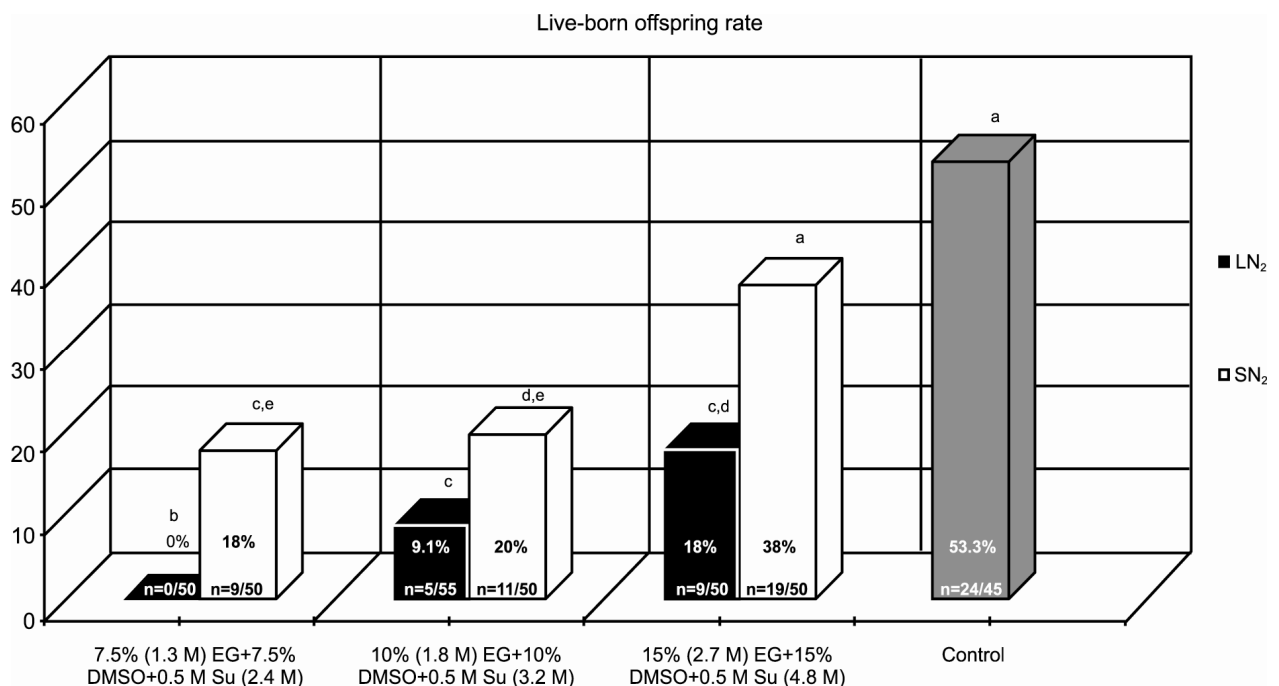


Figure 1. Comparisons of full-term development of blastocysts vitrified in various composition of vitrification solution and cooling speed. Different superscripts (a, b, c, d, and e) within the same column indicate significant differences ($p < 0.05$). Su, sucrose; EG, ethylene glycol; DMSO, dimethylsulphoxide; LN₂, liquid nitrogen; SN₂, slush nitrogen.

Jae Kyun Park. Effect on Survival and Developmental Competence of Vitrified Mouse Embryos Using Various Cryoprotectants and Cooling Speeds. Korean J Reprod Med 2010.

필요성이 증대되어, 동결과 해동-융해 시 발생할 수 있는 여러 가지 손상을 최소화 시키려는 연구가 매우 활발하게 진행되고 있다.¹⁶⁻¹⁸ 특히 얼음결정의 형성을 원천적으로 피할 수 있는 유리화 동결법에 관한 연구가 급속도로 진행되면서 동결방법의 효율성 증대뿐만 아니라 동결억제제와 보관용기의 안정성 확보에 관한 연구의 중요성이 차츰 대두되고 있다.¹⁹⁻²²

일반적으로 막 투과성이 활발하고 삼투압이 높으며 동결시킬 때 결정을 형성하지 않으며 빙점이 매우 낮아 결과적으로 동결에 의한 손상을 억제하는 물질을 동결억제제라 한다. 이것은 세포가 동결하는 과정에서 생기는 세포 내 전해질의 농축이나 상승과 세포내외의 빙 결정 형성 등 생존에 불리한 상태를 완화하거나 조절하는 작용을 하므로, 동결을 시행할 때에는 반드시 일정농도의 동결억제제의 처리가 필수적이다. 일반적으로 동결억제제는 저분자 물질이며 세포에의 독성이 낮아야 하고 세포 내에 쉽게 투과되어야 하는 특성을 가져야 한다. 그 이유는 동결억제제가 세포 내에서 얼음결정의 형성을 방지해야 하고, 빠른 투과성을 이용해 노출시간을 짧게 해야 하며, 또 그로 인해서 독성에 의한 손상을 줄여야 하기 때문이다. 실제로 빠른 확산은 동결억제제의 제거 동안 삼투압의 팽창을 최소화 할 수 있다. 동결억제제의 투과성은 또한 온도에 크게 영향을 받는다. 실제로 높은 온도일수록 동결억제제는 더 빠르게 투과된다. 한편 동결보존을 시행할 때에 이러한 저분자의 동결억제제 뿐만 아니라 당 (sugars) 또는 혈청알부민 (serum albumin), 혈청 (serum), polyethylene glycol (PEG), polyvinylpyrrolidone (PVP), ficoll 등과 같은 거대분자물질을 첨가하여 사용하기도 한다. 이러한 당이나 거대분자는 분자량이 크기 때문에 세포 내로 유입되지 못하고 동결 시 배아 내의 수분의 탈수를 용이하게 하거나 해동 시에 급격한 삼투압의 변화에 따른 세포질의 팽윤을 막아주는 역할을 수행한다. 따라서 동결억제제는 EG, propylene glycol (PROH), DMSO, glycerol 등과 같이 세포 내에 투과성이 있는 투과성 동결

억제제 (permeable CPA)와 당과 거대분자와 같이 세포 내에 투과성이 없는 비 투과성 동결억제제 (non-permeable CPA)로 구분되며, 이들 두 종류의 동결억제제를 혼합하여 사용하는 것이 일반적이다. 투과성 동결억제제의 경우 세포 내의 투과 속도가 각각 다르다. PROH의 경우는 세포 내로의 침투속도가 5~7분으로 매우 빠르고, DMSO는 20~30분이며, glycerol은 60분 이상으로 매우 느리다.²³ 따라서 동결보존 하고자 하는 배아의 발달단계에 따라 동결억제제의 선택은 매우 중요하다. 또한 동결억제제로 사용되는 EG는 분자량이 작고 세포막 투과성이 다른 동결억제제에 비해 뛰어난 특성이 있어 EG를 기본으로 만든 동결액은 매우 빠르게 삼투압의 평형에 도달하며 삼투압의 충격이 거의 없다는 이점이 있다. 또한 처리시간이 짧아짐으로 세포에 미치는 영향을 극소화 할 수 있다는 장점이 있다. 이런 이유로 EG는 동결보호제로 가장 널리 사용되고 있으며^{24,25} 포유동물의 난자의 유리화 동결에 적당한 동결보호제로 알려져 있다.²⁶ 또한 EG를 이용하여 동결보존 하였을 경우 다른 보존액을 이용했을 때 보다 더 많은 난자나 배아가 발생이 잘 진행되었다고 보고된 바가 있다.^{27,28} DMSO의 경우에는 다른 동결억제제에 비하여 여러 가지 단점에 관한 연구 결과들이 보고된 바 있다.²⁹ 확산속도가 느리며, 세포의 종류에 따라 세포 내 칼슘의 증가 또는 세포 소기관 분열 및 세포분화 중 DNA methylation 등에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 하지만 최근 확산속도가 느린 DMSO와 EG와의 혼합된 동결억제제를 사용했을 때 동물뿐만 아니라 인간 난자와 배아의 동결보존에서 그 효과가 뛰어나다는 보고가 있다.³⁰⁻³³ 따라서 본 연구에서는 혼합 동결억제제의 이용에서 DMSO의 효용성과 적정농도를 확인하고자 하였다. 본 연구를 통해서 생쥐 배아와 포배기의 유리화 동결에서는 EG 단독의 동결억제제의 사용보다는 EG와 DMSO가 혼합된 동결보존액을 사용할 경우 생존율과 배아 발생률이 보다 높다는 결과를 얻었다 (Tables 2, 3). 또한 이러한 결과는 일부 연구자들의 선행 연구 결과와 동일하였다.

혼합된 동결보호제의 사용은 유리화 동결보존 시 동결억제제의 상대적 농도를 낮추고 동결보호제의 독성도 낮추는 결과를 유도한다고 예상할 수 있다. 실제로 고농도의 EG를 사용한 혼합 동결보존액에서는 생존율은 유사하였으나 발생률이 떨어지는 것을 관찰할 수 있었다 (Table 3). 실제로 DMSO는 세포 내부로 투과되면서 glass-forming으로의 특성을 더욱 촉진하며, 서로 다른 종류의 동결억제제를 만나서 상호보완적으로 투과율을 더 높이는 결과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 이전에 발표된 보고에 의하면 소 (bovine) 배아를 이용해 40% EG 단독의 동결용액의 사용보다 혼합된 동결보호제 사용이 더 높은 배 발달률 결과를 볼 수 있는데 이는 본 연구의 결과의 공통된 결과를 보였다.³²

유리화 동결의 효능을 증진하기 위한 방법으로 당 (sucrose) 농도의 영향을 살펴보기 위하여 농도의 변화를 주어 유리화 동결을 실시하였다. 본 연구를 통해 0.5 M 농도의 당을 첨가한 경우가 더 높은 농도의 당이 첨가된 군에 비해 더 높은 생존과 발생률을 보였다 (Table 4). 실제로 당의 농도를 1.5 M 이상으로 한 예비실험에서 생존 및 발달률은 더욱 좋지 않았다 (data not shown). 따라서 비투과성 동결억제제는 단지 세포 내 물질을 안정화시켜주는 물질로 첨가되기 때문에 적정농도로만 사용되는 것이 적절한 것으로 생각된다.

본 연구에서는 혼합 동결억제제의 이용에서 DMSO의 효용성을 확인할 뿐만 아니라 냉각속도의 증진을 통한 이 혼합 동결억제제의 농도감소의 가능성을 확인하고자 하였다. 본 연구의 선행 연구에서 난할 중 배아는 EG의 경우 4.5 M 이하의 농도에서, 포배기의 경우는 3.5 M 이하에서는 매우 저조한 생존 및 발달률을 보였다 (Data not shown). 이러한 결과는 이전 발표된 논문에서와 같은 양상을 보였고,³⁴ 본 연구에서 5.5 M의 EG 단독군을 기준으로 잡았다. 또한 이 선행 연구에서 포배기의 경우 보다 낮은 농도의 CPA를 사용한 동결액의 개발이 가능할 것으로 여겨져 농도조절 연구에서는 포배기에 우선적으로 적용하여 진행하였다 (Table 5,

Figure 1). 본 연구의 결과를 통해 슬러시 질소에 의한 냉각속도의 증가가 동결보존의 대상에 따라 약간의 차이는 있으나 동결상해를 줄여 유리화 동결의 효율성을 증진시키는 것에 기여를 한다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 인간 난자를 대상으로 하는 연구의 결과를 재확인 시켜주며,¹³ 향후 인간 배아 또는 포배기의 유리화 동결에 슬러시 질소의 도입을 가능케 할 것이다. 또한 슬러시 질소를 이용한 냉각속도의 증가는 3.2 M의 저농도에서도 생쥐 포배기의 생존율을 가능하게 했고, 배아 이식 후 산자의 회수율에도 많은 기여를 하였다. 이상의 결과는 높은 냉각속도가 동결억제제의 농도를 낮출 수 있다는 이론을 확인하는 것으로 추가 연구를 통해 유리화 동결법을 개선하는 방법으로서 사용이 가능할 것이다.

이상의 결과를 종합하면 투과성 동결억제제인 EG와 DMSO를 동량으로 혼합하여 사용하였을 때 유리화 동결-용해 후 생쥐 배아의 생존과 발생률에 있어서 보다 좋은 결과를 얻었고, 슬러시 질소를 이용한 유리화 동결의 도입은 냉각속도의 증가를 통해 기존 유리화 동결방법의 효율을 증진시켜 생존율과 용해 후 발생률, 임신율이 향상되었다. 또한 냉각속도의 증진을 통해 유리화 동결의 필수 조건인 고농도의 동결억제제에 노출을 감소시킬 수 있는 가능성을 확인하였다.

참 고 문 헌

- Bergh C, Werner C, Nilsson L, Hamberger L. Cumulative birth rates following cryopreservation of all embryos in stimulated in vitro fertilization (IVF) cycles. *J Assist Reprod Genet* 1995; 12: 191-4.
- Trounson A. Preservation of human eggs and embryos. *Fertil Steril* 1986; 46: 1-12.
- Acker JP, Larese A, Yang H, Petrenko A, McGann LE. Intracellular ice formation is affected by cell interactions. *Cryobiology* 1999; 38: 363-71.
- Surrey ES, Quinn PJ. Successful ultrarapid freezing of unfertilized oocytes. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1990; 7:

- 262-6.
5. Bernard A, Fuller BJ. Cryopreservation of human oocytes: a review of current problems and perspectives. *Hum Reprod Update* 1996; 2: 193-207.
 6. Fahy GM, MacFarlane DR, Angell CA, Meryman HT. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 1984; 21: 407-26.
 7. Rall WF, Wood MJ, Kirby C, Whittingham DG. Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *J Reprod Fertil* 1987; 80: 499-504.
 8. Kuleshova LL, MacFarlane DR, Trounson AO, Shaw JM. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology* 1999; 38: 119-30.
 9. Saha S, Otoi T, Takagi M, Boediono A, Sumantri C, Suzuki T. Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trehalose, and polyvinylpyrrolidone. *Cryobiology* 1996; 33: 291-9.
 10. Lee DR, Yoon TK. Effect of slush-nitrogen on the cryopreservation of oocytes and embryos using vitrification. *Korean J Reprod Med* 2009; 36: 1-7.
 11. Arav A, Yavin S, Zeron Y, Natan D, Dekel I, Gacitua H. New trends in gamete's cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 187: 77-81.
 12. Yavin S, Aroyo A, Roth Z, Arav A. Embryo cryopreservation in the presence of low concentration of vitrification solution with sealed pulled straws in liquid nitrogen slush. *Hum Reprod* 2009; 24: 797-804.
 13. Yoon TK, Lee DR, Cha SK, Chung HM, Lee WS, Cha KY. Survival rate of human oocytes and pregnancy outcome after vitrification using slush nitrogen in assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 2007; 88: 952-6.
 14. Mandelbaum J, Belaisch-Allart J, Junca AM, Antoine JM, Plachot M, Alvarez S, et al. Cryopreservation in human assisted reproduction is now routine for embryos but remains a research procedure for oocytes. *Hum Reprod* 1998; 13 Suppl 3: 161-74.
 15. Mandelbaum J, Junca AM, Plachot M, Alnot MO, Salat-Baroux J, Alvarez S, et al. Cryopreservation of human embryos and oocytes. *Hum Reprod* 1988; 3: 117-9.
 16. Chen SU, Lien YR, Chao K, Lu HF, Ho HN, Yang YS. Cryopreservation of mature human oocytes by vitrification with ethylene glycol in straws. *Fertil Steril* 2000; 74: 804-8.
 17. Chen SU, Lien YR, Cheng YY, Chen HF, Ho HN, Yang YS. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Hum Reprod* 2001; 16: 2350-6.
 18. Lane M, Gardner DK. Vitrification of mouse oocytes using a nylon loop. *Mol Reprod Dev* 2001; 58: 342-7.
 19. Dhali A, Manik RS, Das SK, Singla SK, Palta P. Post-vitrification survival and in vitro maturation rate of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effect of ethylene glycol concentration and exposure time. *Anim Reprod Sci* 2000; 63: 159-65.
 20. Eum JH, Park JK, Lee WS, Cha KR, Yoon TK, Lee DR. Long-term liquid nitrogen vapor storage of mouse embryos cryopreserved using vitrification or slow cooling. *Fertil Steril* 2009; 91: 1928-32.
 21. Magnusson V, Feitosa WB, Goissis MD, Yamada C, Tavares LM, D'Avila Assumpcao ME, et al. Bovine oocyte vitrification: effect of ethylene glycol concentrations and meiotic stages. *Anim Reprod Sci* 2008; 106: 265-73.
 22. Manjunatha BM, Gupta PS, Ravindra JP, Devaraj M, Nandi S. Effect of vitrification medium composition and exposure time on post-thaw development of buffalo embryos produced in vitro. *Vet J* 2009; 179: 287-91.
 23. Friedler S, Giudice LC, Lamb EJ. Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil Steril* 1988; 49: 743-64.
 24. Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod* 1996; 54: 1059-69.
 25. Sommerfeld V, Niemann H. Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology* 1999; 38: 95-105.
 26. Bautista JA, Kanagawa H. Current status of vitrification of embryos and oocytes in domestic animals: ethylene glycol as an emerging cryoprotectant of choice. *Jpn J Vet Res* 1998; 45: 183-91.
 27. 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.
 28. Kim JT, Lee SH, Lee YJ, Jo DI. Utility of bolus suture and silicone protector in auricular reconstruction of microtia. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg* 2004; 31: 9-16.
 29. Rezazadeh Valojerdi M, Eftekhari-Yazdi P, Karimian L,

- Hassani F, Movaghar B. Vitrification versus slow freezing gives excellent survival, post warming embryo morphology and pregnancy outcomes for human cleaved embryos. *J Assist Reprod Genet* 2009; 26: 347-54.
30. Desai N, Blackmon H, Szeptycki J, Goldfarb J. Cryoloop vitrification of human day 3 cleavage-stage embryos: post-vitrification development, pregnancy outcomes and live births. *Reprod Biomed Online* 2007; 14: 208-13.
31. Lucena E, Bernal DP, Lucena C, Rojas A, Moran A, Lucena A. Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. *Fertil Steril* 2006; 85: 108-11.
32. Pugh PA, Tervit HR, Niemann H. Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine in vitro produced embryos, following in straw-dilution, in vitro and in vivo following transfer. *Anim Reprod Sci* 2000; 58: 9-22.
33. Selman H, Angelini A, Barnocchi N, Brusco GF, Pacchiarotti A, Aragona C. Ongoing pregnancies after vitrification of human oocytes using a combined solution of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. *Fertil Steril* 2006; 86: 997-1000.
34. Lim JM, Ko JJ, Hwang WS, Chung HM, Niwa K. Development of in vitro matured bovine oocytes after cryopreservation with different cryoprotectants. *Theriogenology* 1999; 51: 1303-10.

= 국문초록 =

목 적: 유리화 동결액의 조성조절과 냉각속도 증진을 통한 동결보호제의 농도를 낮추는 전략을 통해 세포에 미치는 독성을 감소시켜 유리화 동결 및 용해 후 생쥐 배아의 생존율 및 발생률을 증진시키고, 궁극적으로 배아의 유리화 동결법을 개선하고자 하였다.

연구방법: 생쥐 배아와 포배기를 그리드를 이용한 유리화 동결법을 이용하여 동결/용해하였다. 동결액 내 ethylene glycol와 dimethylsulphoxide (DMSO)의 농도와 당의 농도를 조절하여 생쥐 배아의 용해 후 생존율과 발생률을 관찰하였고, 냉각속도의 증가와 동결억제제의 농도와의 상관관계를 포배기의 용해 후 생존율과 발생률에 따라 비교하였다. 또한 용해 후 배아를 대리모에 이식하여 산자를 생산함으로써 냉각속도의 효율성을 알아보았다.

결 과: EG를 단독으로 사용한 동결보존액 보다는 DMSO와 혼합된 동결보존액의 사용이 보다 유리하다는 결과를 얻을 수 있었다. 슬러시 질소에 의한 냉각속도의 증가가 동결보존의 대상의 상해를 줄여 유리화 동결의 효율성을 증진시키는 것으로 생각된다.

결 론: 혼합된 동결보호제를 사용하였을 때 생쥐 배아의 유리화 동결 후 생존과 발생률이 증진되었다. 슬러시 질소를 이용한 유리화 동결의 도입은 냉각속도의 증가를 통해 기존 유리화 동결방법의 효율을 증진시켜 생존율과 용해 후 발생률, 임신율 증진에 기여하였다. 또한 냉각속도의 증진은 유리화 동결의 필수요건인 고농도의 동결억제제에 대한 노출을 감소시킬 수 있었다. 이러한 노력은 생식력의 보전을 위한 유리화 동결법의 효율 향상에 기여할 것이다.

중심단어: 유리화 동결법, EG, DMSO, 냉각속도, 슬러시 상태의 질소
