

침투성 동결보호제가 포유류 초기배자의 생존성에 미치는 영향

김 현^{1,2} · 조상래³ · 김동교¹ · 최창용¹ · 성환후^{1*}

¹농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원센터, ²Tokyo 대학 수의생리학 교실,
³농촌진흥청 국립축산과학원 한우연구소

Effects of Permeable Cryoprotectants on Viability of Mammalian Embryo Model

Hyun Kim^{1,2}, Sang-Rae Cho³, Dong Kyo Kim¹, Changyong Choe¹ and Hwan-Hoo Seong^{1*}

¹Animal Genetic Resources Research Center, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, Korea

²Dept. of Veterinary Physiology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences,
The University of Tokyo, Tokyo 113-8657, Japan

³Hanwoo Research Station, National Institute of Animal Science, RDA, Pyeongchang 25340, Korea

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the toxicities of permeable cryoprotectants and finally to establish the cryopreservation method of surplus embryos obtained during assisted reproductive technology (ART). Toxicities of permeable cryoprotectants, dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG), Glycerol, and 1,2-PROH were investigated using a murine embryo model. Female F₁ mice were stimulated with gonadotropin, induced ovulation with hCG and mated. Two cell embryos were collected and cultured after exposure to among DMSO, EG, Glycerol, and 1,2-PROH. Embryo development was evaluated up to the blastocyst stage. The total cell count of blastocysts that were treated with DMSO and Glycerol at the 2-cell stage was significantly lower than that were treated with EG (81.1±15.1), 1,2-PROH (88.0±21.1) or the control (99.9±21.3) ($p<0.001$). On comparison of four cryoprotectant treated groups, the DMSO and Glycerol treated group showed a decreased cell count compared with the EG and 1,2-PROH treated group ($p<0.05$). Both DMSO (14.7±1.3), EG (12.1±1.1), Glycerol (15.2±1.8), and 1,2-PROH (11.5±1.3) treated groups showed higher apoptosis rates of cells in the blastocyst compared with the control (6.5±0.7, $p<0.0001$). In addition, the DMSO or Glycerol treated group showed more apoptotic cells than the EG or 1,2-PROH treated group ($p<0.001$). The potential toxicity of cryoprotectants was uncovered by prolonged exposure of murine embryos to among DMSO, EG, Glycerol, and 1,2-PROH at room temperature. When comparing four permeable cryoprotective agents, EG and 1,2-PROH appeared to be less toxic than DMSO and Glycerol at least in a murine embryo model.

(Key words: cryoprotectant, DMSO, EG, toxicity, embryo, apoptosis)

서론

초기배아를 비롯하여 세포나 조직, 개체 등과 같은 생물학적 재료를 형태와 기능적인 변화가 일어나지 않은 상태로 저온에서 장기간 보관하고, 필요한 시기에 용해하여 동결보호제(cryoprotective agents: CPAs)를 제거한 후, 세포의 발달이 계속 이뤄질 수 있는 생리적 환경상태로 되돌리는 과정을 동결보

존(cryopreservation)이라 한다(Yoon *et al.*, 2007). 초기배아의 냉동에 관한 연구는 Whittingham 등(1972)은 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 사용하여 완만 동결과 완만 용해의 방법으로 생쥐 배아를 빙결점 이하의 온도에서 장기간 동결보존에 성공하여 산자를 탄생시킨 이후, 토끼(Siebzehnuebl *et al.*, 1989), 햄스터(Todorow *et al.*, 1989), 양(Szell *et al.*, 1990) 등에서도 잇달아 보고되었다. 인간에서는 Trounson과 More(1983)가 동결보

* 본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호 PJ009418)에서 연구비를 지원 받았습니다.

* This work was carried out with the support from the Agenda Program (No. PJ009418022014) Rural Development Administration, Republic of Korea.

* This work was supported by 2014 PostDoctoral Fellowship Program of National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Republic of Korea.

† Correspondence : seonghh@korea.kr

호제로 DMSO를 냉동방식으로 -80°C 까지 매 분당 -0.3°C 씩 하강시키는 완만동결방법(AI-Hasani *et al.*, 1987; Fehill *et al.*, 1985; Siebzehnuebl *et al.*, 1989; Todorow *et al.*, 1989; Whittingham *et al.*, 1972)을 2세포기 배아에 사용하여 첫 번째 임신 을 보고하였으며, 뒤이어 1984년에는 Zeilmarker *et al.*(1984)이 동일한 동결보호제로 -40°C 까지 완만동결하는 방법을 8세포 기 배아에 적용함으로써 임신 및 분만에 성공하였다. 그 이후 Lassalle *et al.*(1985)은 동결보호제로 propandiol(1,2-PROH)에 sucrose를 첨가하여 사용함으로써 동결온도를 -30°C 까지만 감소시키고, 시간도 줄일 수 있었다. 또한 Cohen *et al.*(1985)은 glycerol로 배반포를 동결보존한 후 임신에 성공하였다. 이와 같은 초기 배아의 동결보존 기술은 가축을 포함한 대동물과 인간에게도 적용되어 그 가치가 증가되고 있으며, 이러한 초기배아의 동결보존은 세포의 체외배양(*in vitro*) 연구에 없어서는 안 될 중요한 과정으로 인식되고 있다. 최근에는 여러 동물에서 상업적 이용이 가능하게 되었으며, 인간의 체외수정(IVF) 프로그램 분야에 적용되어 그 중요성이 점점 커지고 있다(Whittingham *et al.*, 1972; Hamberger and Hazekamp, 2002).

동결 보존 후, 초기배아의 생존율에 있어 동결 방법만큼이나 중요한 것은 동결 및 융해 과정 중에 사용되는 동결보호제의 종류, 농도 및 처리 시간이다(Friedler *et al.*, 1988; Mandelbaum *et al.*, 1988; Nowshari *et al.*, 1995). 기존에는 독성이 강하고 점성이 높은 침투성의 동결보호제로서 DMSO, glycerol 그리고 1,2-PROH를 사용하였다. 그러나 최근에는 Martino 등 (1996)은 소 성숙난자를 ethylene glycol(EG)을 사용하여 높은 배반포율을 보고한 것과 같이 낮은 분자량과 높은 침투능력(Gilmore *et al.*, 1995) 그리고 비교적 독성이 적은 특징이 있는 EG을 사용하는 빈도가 점차 높아지고 있으며, 비침투성 동결보호제로는 dextran, raffinose, 난황, 혈청 알부민이 있으나, glucose와 sucrose를 가장 많이 사용하고 있다(Kim *et al.*, 1996; Rayos *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1993). 그러나 동결보호제의 독성 또한 세포에 손상을 줄 수 있기 때문에 신중히 사용해야 한다. 동결보호제의 독성은 크게 화학적 독성과 삼투압적 상해로 나눌 수 있다(Newton *et al.*, 1999). 생식 세포에 미치는 동결보호제 독성은 아직까지도 밝혀지지 않은 것들이 많다. 세포막의 투과성, 표면적과 부피 등 세포에 물리적인 손상을 주게 되며, 또한 동결 및 융해의 방법과 처리액에 따라 그리고 배아의 발생시기와 배아의 질에 따라 생존율이 영향을 받게 된다. 그러므로 본 연구에서는 생식세포 동결에 가장 흔히 쓰이고 있는 침투성 동결보호제(DMSO, EG, Glycerol 그리고 1,2-PROH)의 독성을 서로 비교하고자 생쥐 수정란 모델을 이용한 실험을 하였다. 네 개의 동결보호제 간의 독성의 확립을 위해 생쥐 2-세포기 배아를 장기간(60분) 동결보호제에 노출시킨 후, 포배기까지 배 발생을 시키면서 나타나는 세포사멸의 정도와 배 발

달 지연현상을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 시약 및 배양액

배양액은 glutamine(0.1 mM/ml)이 포함된 KSOM(Lawitts and Biggers, 1993)을 사용하였고, 침투성 동결보호제의 비교 대상인 DMSO, EG, 1,2-PROH 그리고 Glycerol은 1.5 M Leibovitz-L15(Gibco BRL, UK)를 기본배양액으로 사용하였다. 모든 배양액은 0.5% antibiotics(Streptomycine sulfate, S-9137; Penicillin-G, P-3032, Sigma, USA)를 첨가한 다음, 삼투압 측정기(Osmomat 030, Gonatec, German)를 이용하여 삼투압을 280 mOsmol/kg으로 보정하였다. 삼투압을 보정하고 나서 $0.2\ \mu\text{m}$ 의 여과기(Minisant 17597, Sartorius, Germany)로 제균하면서 14 ml tube (2001, Falcon, USA)에 분주한 다음 4°C 에서 보관하였다. 배양액은 95% 이상의 습도, 37°C 및 5% CO_2 를 유지하고 있는 배양기(3154, Foma, USA)에서 6시간 이상 평형시킨 다음 이용하였다. 본 실험에 이용된 그 외 시약들은 Sigma(St Louis, Mo, USA)사 제품을 구매하여 사용하였다.

2. 수정란 준비

1) F₁ 생쥐의 준비

본 연구에 사용된 실험동물은 일본 도쿄대학교 농업생명과학연구소와 수의학대학 동물실험 윤리위원회의 A-10-1214 승인 하에 진행하였으며, 항온 및 항습이 유지되면서 낮 12시간, 밤 12시간이 조절되는 실험동물 사육실에서 물과 먹이를 자유롭게 섭취시켜 사육한 ICR계 흰 생쥐를 사용하였다. 암컷은 생후 5~9주령을 사용하였고, 수컷은 11~12주령의 생식능력이 확인된 것을 사용하였다. 난포 성장을 촉진시키기 위해 생후 6주령의 암컷 F₁ hybrid mice(C57BL ♀/6×CBA ♂) 생쥐에 10 IU의 PMSG(pregnant mare's serum gonadotropin, Sigma)를 복강 주사하여 과배란을 유도하였다. PMSG 주사 후, 48시간 때 10 IU의 hCG(human chorionic gonadotropin, Sigma)를 복강에 주사한 후, 수컷과 합사하여 교배를 유도하였다. 이튿날 아침 암컷의 질전을 통하여 교배 여부를 확인하고, 질전이 확인된 개체만을 분리 사육하였다. hCG 주사 후, 48시간째에 교배가 확인된 개체만을 경추탈골 방법으로 죽인 후, 외과적 수술 방법으로 난관을 떼어내었다. 그리고 인슐린 주사기를 이용하여 난관 관류법으로 2-세포기의 배아를 획득하였다.

2) 배양액 제조

배 발달을 위한 기본 배양액은 KSOM을 제조하여 사용하였으며, 단백질원은 0.3% Bovine Serum Albumin(이하: BSA)를

첨가하여 사용하였다. 동결보호제의 독성 평가를 위한 배양액은 Leibovitz-L15에 1% BSA를 포함한 기본 배양액에 각각의 1.5 M DMSO, 1.5 M EG, 1.5 M 1,2-PROH 그리고 1.5 M Glycerol를 각각 첨가하여 사용하였다.

3) 수정란의 동결보호제 처리

실험 30분전에 1.5 M DMSO, 1.5 M EG, 1.5 M 1,2-PROH 와 1.5 M Glycerol의 배양액을 실온도로 보정하였다. 획득한 2-세포기 수정란을 실온에서 60분 동안 각각의 동결보호제가 포함된 배양액에 넣어 처리하였다. 처리가 끝난 수정란은 배 발달 배양접시(Tissue culture dish, 60×15 mm, Corning 25010)로 옮기기 전에 배 발달 배양액에 3회 세척을 실시하여 수정란에 남아있는 동결보호제를 깨끗이 제거한 후, KSOM 배양액 20 µl 소적을 만들고, oil을 피복한 배양접시로 옮긴 후 37 °C, 5% CO₂ 배양기 내에서 5일간 체외배양을 통해 배 발달을 유도하였다. 대조군은 동결보호제를 처리하지 않은 수정란을 이용하여 검토하였다.

3. 배 발달을 분석

2-세포기에서 얻은 수정란을 실온에서 60분 동안 동결보호제에 노출한 후, 배양기로 옮겨 24시간 주기로 배반포 발생시 까지 배 발달을 관찰하였다. 96시간 동안 배양하여 형성된 배반포는 bis-benzimide(Hoechst 33342)로 염색하여 세포수를 계수하여 배 발달을 조사하였다. 동결보호제에 노출시킴으로써 나타나는 배 발달에 미치는 영향을 알아보려고 PMSG 주사 후 96시간을 기준으로 세포수가 50개 미만은 A군, 50~80개 미만은 B군으로, 80개 이상인 C군으로 나누어서 분석하였다.

4. 세포수 조사

핵을 염색하기 위하여 bis-benzimide를 10 µg/ml로 희석하여 빛이 차단된 곳에 배아를 5분간 처리한 후, 0.3% BSA가 함유된 PBS로 3회 이상 세척한 후, 배아를 slide glass위에 mounting 한 후, 형광현미경을 이용하여 관찰하였다.

5. 통계적 분석

본 시험에서 얻어진 모든 자료들의 통계 분석은 Statistical Analysis System(SAS release ver. 8.2, 2002)의 General Linear Model(GLM) procedure를 이용하여 분산분석을 실시하였고, 처리구 간에 유의성은 Duncan's multiple range-test(Duncan, 1955)를 이용하여 5% 수준에서 검정하였으며, 각 요인들의 상관관계의 유의성 검정은 Pearson's correlation coefficient를 활용하였고, P값이 0.05보다 낮은 경우를 유의하다고 정의하였다.

1. 동결보호제에 따른 배 발달을 비교 분석

배 발달율은 대조군에서 92.0%가 정상적으로 발달하였으며, DMSO 처리군에서는 A군이 12.3%, B군이 33.8%, C군이 53.9%로, EG 처리군에서는 A군이 7.7%, B군이 29.2%, C군이 63.1%로, Glycerol 처리군에서는 A군이 11.1%, B군이 30.1%, C군이 49.5%로, 1,2-PROH 처리군에서는 8.6%, 31.2%, 65.9%로 각각 나타났다. Fig. 1과 같이 정상 배 발달율은 대조군보다 동결보호제 처리군(DMSO, EG, Glycerol, 1,2-PROH)에서 유의하게 낮게 나타났으나($p<0.001$), 처리군 간에는 통계적인 차이가 없었다. 특히, Glycerol 처리군에서 C군(30.1%)이 다른 군에 비해 가장 낮은 비율을 냈다($p<0.001$). 24시간 주기로 배 발달을 확인해 본 결과, 동결보호제 처리군(DMSO, EG, Glycerol, 1,2-PROH)처리군 모두 대조군에 비해 배 발달의 속도가 늦은 것으로 나타났다(Fig. 2). 특히, 부화시기인 배양 4일째의 경우, 처리군 중 DMSO와 Glycerol의 두 처리군에서 유의하게 낮은 부화율이 관찰되었다($p<0.001$).

2. 동결보호제에 따른 배반포 세포수 비교 분석

배반포 세포 수는 DMSO 처리군(65.0±13.0)과 EG 처리군(81.1±15.1), Glycerol 처리군(62.1±27.0), 1,2-PROH 처리군(88.0±21.1) 모두 대조군(99.9±21.3)에 비해 유의하게 적게 나타났다($p<0.0001$). 처리군 간에는 DMSO와 Glycerol 처리군이 1,2-PROH와 EG 처리군에 비해 유의하게($p<0.05$) 적게 나타났고, EG와 1,2-PROH 처리군 간 그리고 DMSO와 Glycerol 처리군 간에는 유의적인 차이는 없었다(Fig. 3).

3. 동결보호제에 따른 세포사멸 비교 분석

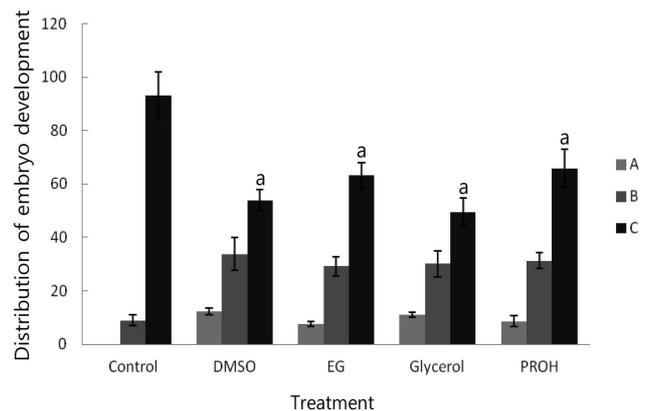


Fig. 1. Comparison of embryo development after 60 minutes exposure of 2-cell murine embryo to 1.5 M DMSO, 1.5 M EG, 1.5 M Glycerol and 1.5 M 1,2-PROH. Data represent mean ± S.D.; a: $p<0.001$ versus control; Cell number A: <50, B: 50~80, C: >80.

결 과

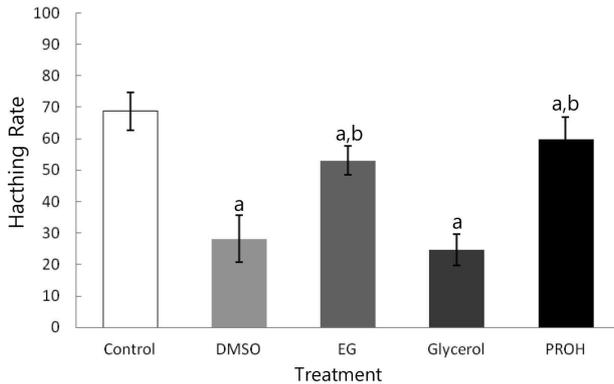


Fig. 2. Comparison of hatching rates of embryos that were exposed to cryoprotectants at the 2-cell embryo stage. Data represent mean \pm S.D.; a: $p < 0.001$ versus control.

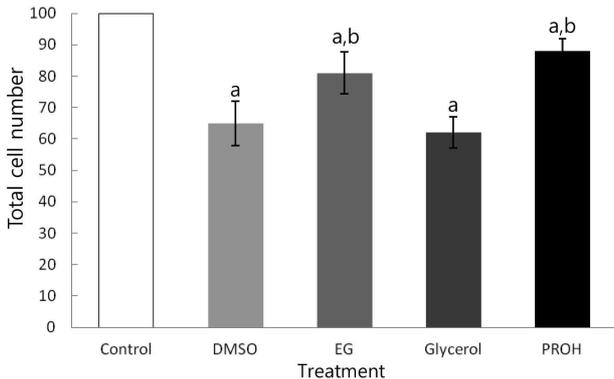


Fig. 3. Comparison of total cell number of murine blastocysts which were treated with 1.5 M DMSO, 1.5 M EG, 1.5 M Glycerol and 1.5 M 1,2-PROH, and Leibovitz solution (control) at the 2-cell embryo stage. Data represent mean \pm SEM; a: $p < 0.001$ versus control, b: $p < 0.05$ versus DMSO.

세포사멸된 세포수를 분석한 결과에서도 DMSO 처리군(14.7 \pm 1.3), EG 처리군(12.1 \pm 1.1), Glycerol 처리군(15.2 \pm 1.8)과 1,2-PROH 처리군(11.5 \pm 1.3) 모두 대조군(6.5 \pm 0.7)에 비해 유의하게 높게 나타났으며($p < 0.001$), 처리군 간에는 DMSO와 Glycerol 처리군이 EG와 PROH 처리군에 비해 유의하게($p < 0.001$) 세포사멸된 세포의 비율이 높은 것으로 나타났다(Fig. 4).

고 찰

포유류 및 인간배아의 동결보존 과정에서 성공률에 영향을 주는 요인으로는 동물의 종, 동결 시 배아의 발달단계와 배아의 형태(Lassalle *et al.*, 1985; Wilmut, 1972), 동결 및 융해 속도(Polge *et al.*, 1949; Wilmut, 1972), 동결보호제의 선택(Polge

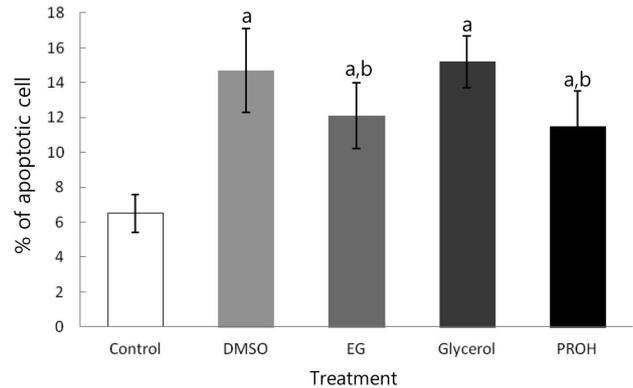


Fig. 4. Comparison of the apoptotic rates of cells in blastocysts which were treated with 1.5 M DMSO, 1.5 M EG, 1.5 M Glycerol and 1.5 M 1,2-PROH for 60 min at the 2-cell embryo stage. Data represent mean \pm SEM; a: $p < 0.001$ versus control, b: $p < 0.01$ versus DMSO.

Wilmut, 1972) 등을 들 수 있다. 이처럼 배아가 동결 및 융해과정에서 가능한 손상을 입지 않도록 하기 위한 연구가 활발히 이루어져오고 있으나, 이에 대한 견해는 연구자들 간에 다양한 실정이다. 동결보호제의 기능에는 속일성의 효과(Whittingham *et al.*, 1980), 세포막의 안정화(Renard *et al.*, 1984) 그리고 반응성 수산기의 제어 등이 있다고 잘 알려져 있다. 한편, 동결보호제의 독성은 세포막 지질의 용해와 단백질 변성 등에 의해서 나타날 가능성이 생각된다. 하지만 정확한 본질에 대해서는 알려지지 않은 점들이 너무 많다.

Mahadevan와 Miller 등(1997)은 37°C에서 1,2-PROH에 노출된 경우는 실온에 비해 배반포의 형성이 상당히 감소하고, 37°C에서 5분 이상 전핵기 수정란을 동결보호제에 노출하면 초기배아의 발달이 감소한다고 보고했다(Mahadevan and Miller, 1997). 이와 같이 동결보호제의 독성은 화학 약품들의 고유 특성들뿐만 아니라, 노출기간과 온도와 상당히 밀접한 관련성이 있다. 또한 Takagi 등(1993)은 소 배아의 동결실험을 통해서 동결보호제의 독성은 노출 시간과 밀접한 관련이 있으며, 비례한다고 보고하였다(Takagi *et al.*, 1993). 실온에서 60분 동안 EG에 노출시키면 원시난포(primordial follicles)의 생존율이 감소되었다는 보고가 있다(Candy *et al.*, 1997; Cohen *et al.*, 1985). 이런 연구결과의 보고들을 종합해 생각해 보면 다양한 세포들로 이루어진 조직들이 온도의 평행에 도달하기 위해서는 더 긴 노출 시간이 필요하고, 결과적으로 조직에 대한 동결보호제 독성의 위험성이 증가될 것으로 사료된다. 본 연구는 생식세포 동결에 가장 흔히 쓰이고 있는 침투성 동결보호제(DMSO, EG, Glycerol, 1,2-PROH)의 독성을 서로 비교하고자 생쥐 수정란 모델을 이용해 포배기까지 배아 발생을 시키면서 나타나는 세

포사멸의 정도와 배아 발달 지연현상을 비교 및 검토하였다. 초기배아세포의 동결보호제 60분 노출 결과, 침투성 동결보호제(DMSO, EG, Glycerol, 1,2-PROH) 처리군과 대조군 사이에는 배아 부화율에 차이가 확인되었으며, 이는 배아에 대한 동결보호제의 잠재적인 독성을 확인한 결과였다. 이번 연구에서 장기간 처리했을 경우 EG와 1,2-PROH 처리군보다 DMSO와 Glycerol 처리군에서 배아발달과 세포수가 각각 저하된 결과들로부터 DMSO와 Glycerol의 독성이 1,2-PROH와 EG보다 독성이 더 높을 것으로 사료되며, 이전의 연구 결과(Mahadevan and Miller, 1997; Demici *et al.*, 2001)와도 일치하는 것을 확인했다.

일반적으로 세포는 세포주기에 따라 체크포인트를 두어 내재적인 결함 등을 치유 및 회복하는 기전(Demici *et al.*, 2001)을 가지고 있는 것으로부터 부화지연 현상은 동결보호제의 독성을 배아 세포가 극복하는 시간 차이를 나타낼 가능성이 사료된다. EG와 1,2-PROH 처리군과 DMSO와 Glycerol 처리군 간의 부화율을 비교해 보면 EG와 1,2-PROH이 유의적으로 높은 것으로 나타나는데, 이는 초기 배아 발달단계에서 DMSO 혹은 Glycerol 처리군에서는 상해를 입은 배아는 포배기까지 상해를 입은 상태로 존재하는 반면에, EG와 1,2-PROH 처리군에서는 시간이 경과함에 따라 발생이 재개되어 부화까지 도달하는 것으로 추정할 수 있다. 또한 전반적인 배아 발달 양상을 보면 DMSO와 Glycerol 처리군에서 부화된 배아보다 팽창포배의 수가 많은 것으로 관찰되었으며, 이는 부화에 관여하는 기전에도 동결보호제가 영향을 미칠 가능성이 사료된다.

아직까지 동결보호제의 독성에 대해 많은 부분이 밝혀지지 않고 있으므로 동결보호제의 독성을 알아보는 연구가 추가되어야 할 것으로 생각된다. 특히, 생식 세포(germ cells)에 대한 성장과 발달에 있어서 저해 효과를 최소화 할 수 있도록 분자수준에서의 비치사성 동결보호제 손상을 밝힐 필요가 있다고 생각된다. 또한 동결보호제의 알려지지 않은 독성을 감소시키기 위해서 가능하면 동결보호제에 노출되는 시간을 최소화하는 것이 중요하다고 사료된다.

초 록

본 연구에서 배아의 생식세포 동결에 가장 흔히 쓰이고 있는 침투성 동결보호제(DMSO, EG, Glycerol, 1,2-PROH)의 독성을 비교하고자 생쥐 수정란 모델을 이용한 실험을 하였다. 생후 6주령의 암컷 생쥐 F₁ hybrid mice에 10 IU의 PMSG를 복강 주사하여 과배란을 유도하고, 2-세포기 배아를 획득하고 침투성 동결보호제(DMSO, EG, Glycerol와 1,2-PROH) 각각 실온에서 60분간 노출시킨 후, 배양을 하였다. 배반포의 전체 세포수는 2-세포기 단계에서 DMSO(68.1±24.1), EG(68.1±24.1),

Glycerol(81.2±27.0), 1,2-PROH(68.1±24.1) 침투성 동결보호제 처리군은 대조군에 비해 유의적으로(99.0±18.3)(*p*<0.001) 낮았다. DMSO와 Glycerol 처리구가 EG와 1,2-PROH 처리구에 비해 세포수가 적었다. DMSO(15.4±1.5), EG(10.2±1.4), Glycerol(10.2±1.4), 1,2-PROH(10.2±1.4) 네 처리구는 대조군(6.1±0.9, *p*<0.0001)와 비교해서 배반포에서 세포사 비율이 더 높음을 확인했다. 또한, DMSO와 Glycerol 처리구는 EG와 1,2-PROH 처리구(*p*<0.001)보다 더 많은 세포사멸된 세포가 각각 확인되었다. DMSO, EG, Glycerol과 1,2-PROH 처리군과 대조군 사이에는 배아 부화율에 있어서 차이가 있었으며 이는 배아에 대한 동결보호제의 잠재적인 독성을 확인한 결과였다. 이번 연구에서 장기간 처리했을 때 EG와 1,2-PROH 처리군보다 DMSO와 Glycerol 처리군에서 배아발달과 세포수가 저하된 것은 DMSO와 Glycerol의 독성이 더 높을 것으로 사료된다.

(중심 단어: 동결보존, 생쥐 배자, 독성, 침투성 동결보호제, DMSO, EG, Glycerol, 1,2-PROH)

REFERENCES

Al-Hasani S, Diedrich K, van der Van H, Reinecke A, Hartje M and Krebs D. 1987. Cryopreservation of human oocytes. *Hum. Reprod.* 2:695-700.

Candy CJ, Wood MJ and Whittingham DG. 1997. Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. *J. Reprod. Fertil.* 110:11-19.

Cohen J, Somons FR, Edwards RG, Fehilly CB and Fishel SB. 1985. Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocytes. *J. IVF. ET.* 2:59-64.

Demici B, Lomage J, Salle B, Frappart L, Franck M and Guerin JF. 2001. Follicular viability and morphology of sheep ovaries after exposure to cryoprotectant and cryopreservation with different freezing protocols. *Fertil. Steril.* 75:754-762.

Fehill CB, Cohen J, Simons RF, Fishel SB and Edwards RG. 1985. Cryopreservation of cleaving embryos and expanded blastocysts in the human; A comparative study. *Fertil. Steril.* 44:638-644.

Friedler S, Giudice LC and Lamb EJ. 1988. Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil. Steril.* 49:743-764.

Gilmore JA, McGann LE, Liu J, Gao DY, Peter AT and Kleinhans FW. 1995. Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 53:985-995.

Hamberger L, Hazekamp J. 2002. Towards single embryo transfer in IVF. *J. Reprod. Immunol.* 55:141-148.

- Kim MK, Lee SJ, Uhm EU, Yoon SH, Park SP, Chung KS and Lim JH. 1996. Cryopreservation of mouse IVF zygotes by vitrification. *J. Animal Reprod.* 20:119-126.
- Lassalle B, Testart J and Renard JP. 1985. Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2 propanediol. *Fertil. Steril.* 44:645-651.
- Mahadevan MM and Miller MM. 1997. Deleterious effect of equilibration temperature on the toxicity of propanediol during cryopreservation of mouse zygotes. *J. Assist. Reprod. Genet.* 14:51-54.
- Mandelbaum J, Junca AM, Plachot M, Alnot MO, Tibi C, Cohen J and Salat-Baroux J. 1988. Solutions provided by the freezing of embryos and questions posed by the freezing of human oocytes. *Rev. Fr. Gynecol. Obstet.* 83:619-622.
- Newton H, Pegg DE, Barrass R and Gosden RG. 1999. Osmotically inactive volume, hydraulic conductivity, and permeability to dimethyl sulphoxide of human mature oocyte. *J. Reprod. Fertil.* 117:27-33.
- Nowshari MA, Nayudu PL and Hodges JK. 1995. Effect of cryoprotectants and their concentration on post-thaw survival and development of rapid frozen-thawed pronuclear stage mouse embryos. *Hum. Reprod.* 10:3237-3242.
- Polge C, Smith AU and Parkes AS. 1949. Retrieval of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature.* 164:666-676.
- Rayos AA, Takahashi YM, Hishinuma A and Kanagawa H. 1994. Quick freezing of unfertilized mouse oocytes using ethylene glycol with sucrose or trehalose. *J. Reprod. Fertil.* 24:100-123.
- Renard JP, Bui-Xuan Nguyen and Garnier V. 1984. Two-step freezing of two cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. *J. Reprod. Fertil.* 71:573-580.
- Siebzehnuebl ER, Todorow S, van Uem J, Koch R, Wildt L and Lang N. 1989. Cryopreservation of human and rabbit oocytes and one-cell embryos: A comparison of DMSO and propanediol. *Human. Reprod.* 4:312-317.
- Szell A, Zhang J and Hudson R. 1990. Rapid cryopreservation of sheep embryos by direct transfer into liquid nitrogen vapour at -180 degrees C. *Reprod. Fertil. Dev.* 2:613-618.
- Takagi M, Boediono A, Saha S and Suzuki T. 1993. Survival rate of frozen-thawed bovine IVF embryos in relation to exposure time using various cryoprotectants. *Cryobiology.* 30:306-312.
- Todorow SJ, Siebzehnuebl ER, Koch R, Wildt L and Lang N. 1989. Comparative results on survival of human and animal eggs using different cryoprotectants and freeze-thawing regimens. I. Mouse and hamster. *Hum. Reprod.* 4:805-811.
- Whittingham DG and Leibo SP. 1972. Mazur. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . *Science NY.* 187:411-414.
- Whittingham DG. 1980. Principles of embryo preservation. In: Ashwood Smith MJ, Farrant J. editor. *Low Temperature Preservation in Medicine and Biology.* Pitman Medical, Tunbridge Wells. 65-83.
- Wilmut L. 1972. The effect of cooling rate, warming rate cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Sci.* 2:1071-1079.
- Yoon TK, Lee DR, Cha SK, Chung HM, Lee WS and Cha KY. 2007. Survival rate of human oocytes and pregnancy outcome after vitrification using slush nitrogen in assisted reproductive technologies. *Fertil. Steril.* 88:952-956.
- Zeilmaker GH, Alberta AT and Van Gent I. 1984. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertil. Steril.* 42:293-296.
- Zhu SE, Kasai M, Otoge H, Sakurai T and Machida T. 1993. Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solutions. *J. Reprod. Fert.* 98:139-145.

Received January 30, 2015, Revised July 3, 2015, Accepted September 9, 2015