

## 세포질 내 지방구 제거가 돼지 난포란의 유리화 동결에 미치는 영향

최인경<sup>1</sup> · 이승진<sup>2</sup> · 송해범<sup>†</sup>  
대구대학교 자연자원대학

### Study on the Vitrification of Porcine GV and M II Oocytes after Removal of Cytoplasmic Lipid Droplets

I. K. Choi<sup>1</sup>, S. J. Lee<sup>2</sup> and H. B. Song<sup>†</sup>

*College of Natural Resources, Daegu University*

#### SUMMARY

This study was conducted to investigate that the immature and mature oocytes of porcine can be cryopreserved by vitrification. Oocytes were centrifuged to polarize the cytoplasmic lipid droplets. The lipids were removed from cytoplasm by micromanipulation. Delipated oocytes were centrifuged after being preincubated with cytochalasin B(CB) for 10 min, and lipid droplets were removed. Centrifuged oocytes were treated with CB and centrifuged to polarize lipid droplets but not delipated and control oocytes is not-treatment. Oocytes of three types were vitrified in electron microscope(EM) grids. The results of survival, maturation and cleavage rates were as follows.

1. The survival rates of immature oocytes were 15.1%, 0% and 0% in the Delipated, Centrifuged and Control after vitrification, respectively, and its rate of Delipated was significantly higher than Centrifuged and Control(P<.01).
2. The survival rates of mature oocytes were 12.21%, 0% and 0% in the Delipated, Centrifuged and Control after vitrification, respectively, and its rate of Delipated was significantly higher than Centrifuged and Control(P<.01).
3. The maturation rates of immature oocytes were 37.5% and 68.9% for metaphase II in the Delipated after vitrification and Non-vitrification, respectively, and its rate of Non-vitrification was significantly higher than Delipated after vitrification(P<.01).
4. The cleavage rates of immature oocytes were 12.5%, 0%, 0% and 56.1% in the Delipated, Centrifuged, Control after vitrification and Non-vitrification, respectively. Its rate of Delipated was higher than Centrifuged and Control, but there were no significant difference, and its rate of Non-vitrification was significantly higher than Delipated, Centrifuged and Control(P<.05).
5. The cleavage rates of mature oocytes were 25.0%, 0%, 0% and 67.9% in the Delipated, Centrifuged, Control after vitrification and Non-vitrification, respectively. Its rate of

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(2001-1-22200-004-1)의 학술연구비 지원에 의해 수행되었음.

<sup>1</sup> 대구미래여성병원(Daegu Mirae Hospital)

<sup>2</sup> 포항여성아이병원(Pohang Woman-i Hospital)

<sup>†</sup> Correspondence : E-mail: goatsong@daegu.ac.kr

Delipated was higher than Centrifuged and Control, but there were no significant difference, and its rate of Non-vitrification was significantly higher than Delipated, Centrifuged and Control( $P<.05$ ).

(Key words : vitrification, delipated, porcine oocyte, immature, mature)

## 서 론

포유동물 난자의 동결과 융해의 성공은 마우스와 햄스터에서 처음 보고되었다(Whittingham, 1977; Parkening 등, 1976; Tsunoda 등, 1976). 이들이 사용한 방법은 접합체(zygotes)나 후기배아의 동결, 융해 방법(Whittingham 등, 1972)과 유사하였다. 그 후 동결, 융해한 난자의 수정과 차후 계속되는 배 발달을 시작으로 하여, 난자의 동결보존은 마우스(Hotamisligil 등, 1996; Men 등, 1997), 소(Schellander 등, 1994), 사람(Quinn 등, 1986)을 포함한 다양한 포유동물에서 성공하였다. 하지만 이러한 성공에도 불구하고 난자의 동결보존은 후기배아보다 더욱더 어려운 것이 사실이다.

난자의 동결은 성숙(Leibo, 1977; Lim 등, 1991; Schmit 등, 1993) 또는 미성숙 단계(Rubinsky 등, 1991; Suzuki와 Nishikata, 1992; van Blerkom, 1989)에서 행해지고 있으나 이들 난자의 동결성에 대한 연구결과가 보고자 간에 차이가 많다. 일반적으로 난자는 다른 세포와는 달리 큰 세포이기 때문에 동결에 따른 손상이 크며 특히 세포체질(cytoskelton), 방추사, 난황막, 투명대 및 피층과립의 파괴와 분자구조의 변화가 따르게 된다(Parks와 Ruffing, 1992). 성숙 난포란의 동결 시 Hamlett 등(1989)과 Rall(1992)은 동결보호제에 노출되고 냉각되는 동안 metaphase I 또는 II 단계에서 방추사와 피층과립의 파괴에 따른 손상을 보고하였고, 미성숙 난포란의 동결시에는 비정상적인 성상체(aster)의 형성으로 방추사의 수적인 감소가 일어나는 것으로 보고되었다(van Blerkom, 1989). 최근 난자의 발생 단계에 따른 동결성에 대하여 Schroeder 등(1990)은 생쥐에서 난핵포 시기, 체외성숙 및 배란된 난자의 동결, 융해 후 생존성과 발생율이 배란된 난자에서 가장 높았으며, Mandelbaum 등(1987)은 사람에서 미성숙 및 성숙 난자의 동결에서 성숙 난자가 미성숙 난자보다 생존성이 2 배

정도 높다고 하였다.

유리화 동결보존법은 Rall과 Fahy(1985)에 의해 마우스 수정란을 동결 보존하는데 성공한 이후 유리화 동결한 마우스 배아의 이식으로 산자 생산이 보고(Rall 등, 1987)되면서 효과가 증명된 이래 계속적인 연구가 이루어졌으며, 개발 초기에는 고농도의 동결보호제가 갖는 세포독성 등으로 일부의 연구자들에 국한되어 진행되다가 1990년대 초부터 가축의 수정란 동결에 이용되어 최근에는 완만 동결방법보다 유리화 동결방법이 체외에서 생산된 가축 배아의 생존율에 더 효과적이라고 보고되고 있다(Mahmoudzadeh 등, 1994; Pollard와 Leibo, 1994; Leibo와 Loskutoff, 1993).

Martino 등(1996)은 소 미성숙 난자에 대해 electron microscopic grid(EM grid)를 사용한 유리화 동결방법을 실시하여 70% 이상의 생존율을 얻었다는 보고를 하였다. 이 방법은 그 동안 난자의 동결시에 사용되는 동결보존 용기가 갖는 낮은 열전도율과 많은 동결용액으로 인한 동결시간의 지연을 해결하는 방법으로서 유리화 동결보존방법과 같은 초급속 동결방법에서는 매우 효과적인 방법으로 생각된다. 이밖에도 Vajta 등(1997 a, b)은 plastic straw의 내경을 가늘게 하여 유리화 동결하는 open pulled straw 방법을 보고하였는데 이러한 일련의 시도들은 순간적인 동결을 위해 열전도율을 극대화시킬 수 있는 방법으로서 고안되어졌다.

돼지 배아의 동결에 대한 연구가 상당히 진전된 것과는 대조적으로 수정되지 않은 돼지 난포란의 동결에 관한 정보는 거의 없고 동결, 융해한 난포란의 발달율은 여전히 매우 낮다. 많은 연구에서 돼지 배아가 낮은 온도에 민감한 것은 높은 지방함량(lipid content)과 지방 성분(lipid composition)과 관계가 있다고 하였다(Toner 등, 1986; Mohr과 Trounson, 1981; Edidin과 Petit, 1977; Polge, 1977). 돼지 배아는 세포질 내에 많은 양의 지방을 함유하고 있는데(Norberg, 1973), 이런 수단친화성 지

방구(sudanophilic lipid droplets)는 1~8 세포기에 가장 풍부하고 배반포기에는 현저히 감소하며(Nii-mura와 Ishida, 1980), 탈출(hatching) 배반포기에는 지방함량이 더욱 감소하므로 이 단계에서는 동결 능력이 생긴다고 하였다(Nagashima 등, 1989; 1992). 소 배아에서도 초기 배아에는 많은 양의 지방구를 함유하고 있으나(Mohr과 Trounson, 1981), 배반포기에는 이 양이 감소하므로 저온에 대한 민감성이 적어진다고 하였으며(Trounson 등, 1976), 세포질 내 지방을 전혀 함유하지 않은 마우스 배아는 모든 발달단계에서 동결보존이 가능하다(Wood 등, 1987; Mohr과 Trounson, 1981).

이러한 관찰들로 보아 돼지 배아는 낮은 온도에 대한 민감성의 변화가 지방의 함량과 관련이 된 듯 하므로 돼지 배아내의 지방을 제거함으로써 동결에 대한 능력이 향상될 수 있을 것이다.

최근 수의축산분야에서는 생식세포의 체외조작 기술을 이용한 가축의 번식성 향상이 활발히 도모되고 있다. 그 결과, 우수품종의 혈통보존 및 우량 개체의 복제동물 생산이 이루어질 수 있게 되었으며, 관련학문의 유기적 발전이 계속적으로 진행되고 있다. 특히 인공장기 생산용 형질전환동물 개발은 주로 돼지를 대상으로 수행되어 오고 있다. 따라서 돼지 난포란의 동결보존 기술의 개발은 체외 수정, 복제동물 및 형질전환동물 생산에 필요로 하는 난포란을 시간과 공간의 제약 없이 공급이 가능해지기 때문에 그 효용가치가 많으나 많은 연구가 이루어지지 않고 있는 실정이다.

본 연구는 돼지 난포란의 이용효율을 극대화하기 위해 미성숙과 성숙 단계의 난포란을 미세조작으로 지방함량을 조절하고 유리화 동결을 실시하여 돼지 난포란의 동결보존 가능성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시난자

본 실험에 사용된 난포란은 도축장에서 도축된 돼지의 난소로부터 회수하였다. 난소는 100 IU/ml penicillin G와 100  $\mu$ g/ml streptomycin sulfate를 첨가한 39°C의 생리식염수가 담긴 보온병에 침지하여 1~2 시간 내에 실험실로 운반하였다. 생리식

염수로 난소 주위의 이물질과 혈액을 세척한 다음 70% 알콜 가아제를 이용하여 난소의 표면을 소독하였고, 18 G의 주사침이 부착된 10 ml 주사기로 2~6 mm 크기의 난포로부터 난포액을 흡입한 후 15 ml 원심분리관에 분주하여 10 분간 정치시켰다. 원심분리관 하단의 침전물을 채취하여 4 mg/ml BSA가 첨가된 Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS)에서 난포란을 회수하였다. 회수된 난포란 중 난구세포가 치밀하게 부착되고 난포란의 세포질이 균일한 것만 선별하여 실험에 공시하였다.

### 2. 공시정자

본 실험에 사용된 정액은 동부 A·I CENTER (경북 진량면 평사리 소재)에서 제작된 희석정액으로, 수음법과 기계로 채취된 정액은 정액 희석액인 EDTA diluent concentrate(Art. NO. 9000; UNTRON, 덴마크)로 희석하여 실험실까지 운반되었다. 이들의 품종은 Landrace, Duroc, Yorkshire, Hampshire 종이였다. 실험에 사용된 정액은 운동성이 80% 이상인 것만을 사용하였으며 희석정액은 채취 당일 사용하고 남은 것은 폐기하였다.

### 3. 체외성숙

#### 1) 배양액

난포란의 체외성숙 배양액은 NCSU23(North Caroline State University 23)에 10%(v/v) porcine follicular fluid(pFF)를 첨가하여 여과, 제균한 후 최와 송(1998)의 방법에 따라 0.57 mM cysteine, 10 ng/ml epidermal growth factor(EGF), 10 IU/ml pregnant mare's serum gonadotrophin(PMSG)와 10 IU/ml human chorionic gonadotrophin(hCG)을 첨가하고 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 12~16시간 평형시킨 후 사용하였다.

#### 2) 체외성숙

선별된 난포란은 4 mg/ml BSA가 첨가된 D-PBS액으로 3회 세척하고 성숙배양액으로 2회 세척한 후 미성숙과 성숙 단계로 나누어 CO<sub>2</sub> 배양기에서 평형된 성숙배양액 100  $\mu$ l 소적에 각각 약

20 개씩의 난포란을 넣어 체외성숙을 실시하였다. 미성숙(germinal vesicle) 단계의 난포란은 채취 후 1 시간 이내에 실험에 사용하였고, 성숙(metaphase II) 단계의 난포란은 42~44 시간 성숙시킨 후 실험에 사용하였다.

#### 4. 난포란의 미세조작

난포란의 세포질 내에 있는 지방구(lipid droplets)제거는 Nagashima 등(1999)의 방법에 준하여 실시하였다.

##### 1) Cytochalasin B 처리

각 성숙 단계의 난포란은 7.5  $\mu\text{g/ml}$  cytochalasin B(CB)가 포함된 D-PBS + 10% FBS에서 10 분간 배양한 후 1.5 ml effendorf tube에 7.5  $\mu\text{g/ml}$  CB 용액과 CB처리를 한 난포란을 넣어 12500  $\times$  g에서 15 분간 원심분리하여 세포질 내의 지방구를 분극(polarize)시켰다.

##### 2) 세포질 내의 지방구 제거

난포란의 세포질 내에 있는 지방구 제거는 도립 현미경(inverted microscope; Olympus IX70, Japan)에 장착된 1 쌍의 미세조작기(micromanipulator; MM-188, Narishige, Japan)를 이용하였다. 지방구 제거를 위해 사용된 난포란의 고정용 pipette은 외경 100~120  $\mu\text{m}$ , 내경 15~20  $\mu\text{m}$ 이고, 지방구를 제거하기 위한 흡인 pipette은 외경 7~8  $\mu\text{m}$ , 내경 5~6  $\mu\text{m}$ 인 정자주입용 injection pipette을 사용하였다.

Cytochalasin B 처리를 한 난포란은 0.1% hyaluronidase가 포함된 D-PBS에서 처리하여 난구세포를 제거한 후 각 성숙 단계에 따라 미성숙 난포란에서는 미성숙 핵, 성숙 난포란에서는 제1극체가 관찰되는 난자만을 선별하여 10  $\mu\text{l}$  cytochalasin B 소액에서 미세조작을 실시하였다.

분극이 된 지방구는 6 시 방향으로 향하도록 하면서 되도록 미성숙 핵이나 제1극체가 현미경 하에서 확인되도록 난포란을 고정하고 미성숙 핵과 제1극체에 물리적 손상을 주지 않고 세포질이 너무 많이 흡인되지 않도록 주의하면서 최대한의 지방구를 제거하였다. 지방구가 제거된 각 성숙 단계

의 난포란은 10% FBS가 포함된 D-PBS에서 충분히 세척하고 1 시간 후 퇴화되지 않고 세포질이 본래의 형태를 갖고 있는 난포란만을 동결하였다.

#### 5. 난포란의 동결과 융해

##### 1) 동결액 및 융해액의 제조

유리화 동결을 위한 동결액과 융해액은 Martino 등 (1996)과 Hong 등(1999)의 방법에 준하여 10% FBS가 포함된 PBS를 기본용액으로 사용하였다.

1단계 동결액은 기본용액에 1.5 M ethylene glycol(EG)을 첨가하고, 2단계 동결액은 기본용액에 5.5 M EG + 1.0 M sucrose를 첨가하여 제조하였으며, 유리화동결 후 동결보호제의 제거를 위해 사용한 융해액은 기본용액에 1.0 M, 0.5 M, 0.25 M, 0.125 M sucrose를 첨가하여 제조하였다. 모든 용액은 제조 후 0.22  $\mu\text{m}$  filter로 여과하여 사용하였으며, 제조한 후 하루가 지난 동결액은 사용하지 않았다.

##### 2) 동결 및 융해

각 처리를 한 난포란의 유리화 동결은 10% FBS + D-PBS 용액(vitrification solution 1 : VS1)과 1.5 M EG 용액(VS2)에 각각 2.5 분 침지한 후 5.5 M EG + 1.0 M sucrose 용액(VS3)에 20 초간 침지하고 약 10개의 난포란을 electron microscopic grid (EM grid, 300mesh) 상에 올려놓고 fine fincet으로 EM grid 밑에 놓아둔 멸균 여과지 쪽으로 눌러 남은 동결용액을 제거하였다. 이후 LN<sub>2</sub>에 담겨진 cryo vial에 난포란이 부착된 grid를 즉시 침지함으로써 유리화 동결을 완료하였다. 이때 유리화 동결 용액(VS3)의 처리부터 LN<sub>2</sub>에 침지까지 30 초가 초과되지 않도록 주의하였다.

유리화 동결된 난포란이 부착된 EM grid는 LN<sub>2</sub>에서 최소 2 주 이상 보관하였으며, 융해는 cryo vial을 LN<sub>2</sub>로부터 dish에 쏟아부어 찾은 EM grid를 1.0 M, 0.5 M, 0.25 M, 0.125 M, 0 M sucrose 용액에 연속적으로 각각 2.5 분씩 침지함으로써 난포란의 세포질 내의 동결보호제를 제거하여 융해하였다. 마지막으로 신선한 기본용액에 침지한 다음 pasteur pipette을 사용하여 EM grid상에 부착된 난포

란을 분리하고 신선 배양액으로 3~4회 세척한 다음 추가 성숙이 필요한 난포란은 체외성숙 배양액에서 성숙을 완료한 다음 체외수정에 이용하고, 일부는 성숙 단계의 판단을 위해 orcein으로 염색하였다.

융해 후의 생존에 대한 판정은 미성숙 난포란은 융해 후 추가 성숙기간을, 성숙 난포란은 융해 후 1시간의 배양시간과 수정시간을 경과한 후에도 퇴화되지 않고 형태적으로 정상적인 난포란을 생존으로 판단하였으며, 일부 난포란은 핵 염색을 실시하여 판단하였다.

### 3) 미성숙, 성숙 단계에서 동결, 융해한 돼지 난포란의 생존율

미성숙, 성숙 단계의 난포란에 지방구의 존재 유무와 존재 형태가 동결한 후 난포란의 생존율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 성숙 단계의 돼지 난포란을 7.5  $\mu\text{g/ml}$  CB에서 10 분간 처리한 후 12,500  $\times$  g에서 15 분간 원심분리를 실시하여 세포질 내 지방구를 분극시킨 후 미세조작기를 이용하여 지방을 제거한 지방제거구(Delipated)와 같은 CB처리를 한 후 원심분리를 하여 지방구 분극만을 하고 지방구 제거는 하지 않은 원심분리구(Centrifuged), 아무런 처리를 하지 않은 대조구(Control)로 나누어 동결, 융해한 후 생존율을 비교, 관찰하였다.

## 6. 체외수정과 체외배양

### 1) 배양액

수정용 배양액은 4 mg/ml BSA와 1 mM caffeine sodium benzonate를 첨가한 modified tris-buffered medium(mTBM; Abeydeera와 Day, 1997)을 사용하였다.

### 2) 체외수정

운반된 회색정액은 미리 가온된 3 ml의 90% percoll 위에 조심스럽게 올려놓고 500  $\times$  g에서 20 분간 원심분리한 후 상층부의 percoll 용액을 제거하여 하층부의 정자괴를 회수하였다. 회수한 정자괴를 수정용 배양액으로 500  $\times$  g에서 5 분간 2 회

원심분리한 후 상층액을 제거하고 정자의 최종농도가  $5 \times 10^5/\text{ml}$ 이 되도록 조정하였다. 세척한 정자는 배양접시에 100  $\mu\text{l}$ 의 정자 drop을 제작한 후 CO<sub>2</sub> 배양기에서 평형시킨 mineral oil을 덮어 30 분간 전배양을 실시하고 체외수정에 이용하였다. 성숙 배양한 난포란은 4 mg/ml BSA가 첨가된 mTBM에서 3 회 세척한 후 정자 drop에 약 30 개씩 넣어 6 시간 동안 수정을 유도하였다. 수정의 확인은 체외배양에서 할구의 분할이 일어나는 것으로 판단하였다.

### 3) 수정란의 체외배양

6 시간 동안 수정이 유도된 난자는 10% FBS가 첨가된 NCSU23 배양액으로 세척하면서 pipette으로 난구세포를 완전히 제거한 후 실체현미경 하에서 형태적으로 정상이라고 판단되는 난자를 회수하여 체외배양에 공시하였다. 체외배양액 150  $\mu\text{l}$ 가 함유된 4well dish에 각 well 당 약 30 개의 수정란을 넣고 39°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하면서 48 시간 간격으로 배양액을 교환하며 배 발달을 관찰하였다.

### 4) 미성숙, 성숙 단계에서 동결, 융해한 돼지 난포란의 배 발달

미성숙, 성숙 단계의 난포란에 지방구의 존재 유무와 존재 형태가 동결한 후 배 발달에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 성숙 단계의 돼지 난포란을 7.5  $\mu\text{g/ml}$  CB에서 10 분간 처리한 후 12,500  $\times$  g에서 15 분간 원심분리를 실시하여 세포질 내 지방구를 분극시킨 후 미세조작기를 이용하여 지방을 제거한 지방제거구(Delipated)와 동일한 CB처리를 한 후 원심분리를 하여 지방구 분극만을 하고 지방구제거는 하지 않은 원심분리구(Centrifuged), 아무런 처리를 하지 않은 대조구(Control)로 나누어 동결, 융해한 후 추가성숙을 실시한 다음 체외 수정한 난포란의 배 발달율과 동결하지 않고 체외 수정한 난포란(Non-vitrification)의 배 발달율을 비교, 관찰하였다.

## 7. 통계분석

본 실험의 결과는 SAS package program에 의하

여 통계분석하였고, 각 처리 평균간의 유의성 검정은  $\chi^2$ -test(5% 수준, 1% 수준)에 의하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 미성숙, 성숙 단계에서 동결, 융해한 돼지 난포란의 생존율

미성숙 난포란의 동결 가능성을 알아보기 위하여 미성숙, 성숙 단계의 난포란을 CB 처리하여 원심분리한 후 지방구를 제거한 지방제거구(Delipated), CB 처리한 후 원심분리를 하여 지방구만 분극시킨 원심분리구(Centrifuged), 아무 처리도 하지 않은 대조구(Control)를 동결, 융해한 후 생존율을 비교, 관찰한 결과는 Table 1과 같다.

미성숙 단계에서 지방제거, 원심분리, 무처리 후 EM grid를 이용하여 동결, 융해한 난포란의 생존율은 지방제거구 15.1%, 원심분리구 0.0% 및 대조구 0.0%로 지방제거구에서 유의적으로 높은 생존율이 나타났고( $P<.01$ ), 성숙 단계에서 처리한 난포란의 생존율은 지방제거구 12.2%, 원심분리구 0.0% 및 대조구 0.0%로 역시 지방제거구에서 유의적으로 높은 생존율이 나타났다. 두 성숙단계 모두 지방구를 제거한 난포란에서만 다른 두 처리에 비해 높은 생존율을 보였고 난포란 내에 지방구가

그대로 존재하는 다른 두 그룹에서는 유리화 동결 후 생존하지 못하였다. EM grid를 이용하여 동결, 융해한 후 난포란의 회수율은 지방제거구, 원심분리구, 대조구에서 대부분 회수가 가능하였으며 이들 사이의 유의차는 없었다.

위의 결과는 Nagashima 등(1999)이 지방제거 후 40% EG와 1 M sucrose를 이용하여 유리화 동결 후 56.3%(27/48)의 생존율을 얻었다는 결과에 비하면 아주 저조하지만 그들이 사용한 난자는 외과적으로 난관에서 관류한 난자를 재료로 사용하였고 본 실험은 도축장 유래 난포에서 채취한 미성숙, 성숙 난포란을 사용한 결과이므로 큰 차이를 보이는 것으로 보인다.

Nagashima 등(1994)은 과배란 후 교배시켜 체내에서 수정을 유도, 관류하여 얻은 1 세포기와 2~4 세포기를 이용하여 지방제거 후 4°C로 냉각(chilling) 후 생존율을 살펴 본 연구에서 아무 처리도 하지 않은 대조구에서는 생존하는 배아가 없었으며 원심분리만 한 배아에서는 2~4 세포기(22.2%)가 1 세포기(5.3%)보다 높은 생존율을 얻었으며 지방구를 제거한 구에서는 1 세포기가 65.3%, 2~4 세포기에서 62.2%의 생존율을 얻었다고 하였다. 또 같은 실험에서 지방을 제거하는 정도에 따른 차이에 대한 결과로 배아에서 완전히 지방구가 제

Table 1. The survival rates of the delipated GV and M II oocytes after vitrification by EM grid

Maturation stage	Treatment	No.(%) of oocytes		
		Vitrified	Recovered (/vitrified)	Survived after vitrification (/recovered)
GV	Delipated <sup>1</sup>	163	159(97.5)	24(15.1) <sup>a</sup>
	Centrifuged <sup>2</sup>	100	96(96.0)	0( 0.0) <sup>b</sup>
	Control <sup>3</sup>	100	98(98.0)	0( 0.0) <sup>b</sup>
M II	Delipated <sup>1</sup>	98	98(100)	12(12.2) <sup>a</sup>
	Centrifuged <sup>2</sup>	100	96(96.0)	0( 0.0) <sup>b</sup>
	Control <sup>3</sup>	100	98(98.0)	0( 0.0) <sup>b</sup>

<sup>1</sup> Delipated oocytes were centrifuged after being preincubation CB, followed by lipid removal.

<sup>2</sup> Centrifuged oocytes were treated with CB and centrifuged to polarize lipid droplets but not delipated.

<sup>3</sup> Control oocytes were non-treatment.

<sup>a,b</sup> The values with different superscripts within columns differ significantly ( $P<.01$ ).

거된 배아가 부분적으로 제거된 배아보다 유의차는 나타나지 않았지만 4°C 냉각 후 높은 생존율을 나타내었고(90.4% vs 77.5) 8 세포기(73.1% vs 32.5%)와 배반포 형성(26.9% vs 7.5%)에서는 완전히 지방구를 제거한 배아가 유의적으로 높았다고 하였다. 또, Nagashima 등(1996)은 체내 관류한 배아와 난자로서 원심분리만한 돼지 배아나 난자도 지방구를 제거한 난자보다 생존율은 낮았지만 유리화 동결을 이용한 동결보존이 가능하다고 하였으나 본 실험에서는 세포질 내 지방구를 분극시키기 위해 원심분리만한 구에서는 생존율을 얻을 수 없었다.

소에서도 체외성숙/체외수정을 한 배아에서 지방제거후의 동결은 원심분리구나 대조구보다 유의적으로 높은 생존성과 배반포 형성율을 보고하였다(Ushijima 등, 1996). 본 실험에서 낮은 비율이긴 하지만 돼지 난자 내 지방구가 제거되었을 때 동결에 대한 내성이 있음을 알 수 있었다.

동결보존 후 난자의 생존성이 손실되거나 감소되는 주요 원인은 미세소관(microtubule)과 미세필라멘트(microfilament)의 손상이며 이들에 대한 손상은 동결방법과 사용한 동결시약에 영향을 받으므로(Vincent 등, 1990; Aigner 등, 1992; Baka 등, 1995) 지방을 제거한 난자의 용해 후 생존율을 높이기 위해서는 이에 맞는 적합한 유리화 동결방법이 필요할 지도 모른다. 최근 Vajta 등(1997a, b)은 소 난자와 돼지 pre-morula 단계에서 냉각속도를 증가시킨 것으로 추정되는 open straw method라는 유리화 동결방법으로 생존할 수 있으며 이전의 방법에 비교해 우수하다고 보고하였다. 이런 새로운 방법은 지방구를 제거한 돼지 난자의 동결보존의 어려움을 극복할 수 있는 방법으로 제안하였다.

돼지 난포란의 동결시의 적당한 성숙시기를 알아보기 위하여 미성숙, 성숙 단계에서 지방제거, 원심분리 그리고 무처리를 한 난포란의 동결, 용해 후 생존율은 지방을 제거한 난포란에서만 생존하였으며 미성숙 15.1%(8/53), 성숙 12.2%(6/49)로 성숙시기에 따른 생존율의 차이는 볼 수 없었다.

이 결과는 유리화 동결법으로 보존된 사람의 미성숙 및 성숙 난자의 발생능력을 비교하였을 때 완만 동결법에서와 같이 성숙 단계에 따른 난자의

발생능력의 차이를 발견할 수 없었으며, 동결 당시의 성숙 단계에 관계없이 배반포까지의 발생이 가능하였다는 보고(Chung 등, 1999)와 일치하였다. 하지만 포유동물에서 여러 보고에 의하면 미성숙 단계가 metaphase I 에서 metaphase II 단계보다 동결능력이 더 낮다고 하였다(Lim 등, 1992; Schroeder 등, 1990). 또 동결 보존한 GVBD에서 telophase I 의 난자와 metaphase II 난자를 이용하여 분만의 성공을 보고하였고, Lim 등 (1991)도 소 미성숙 난자의 동결에서 미성숙 난자의 생존율과 수정 후 분할율이 성숙 중이거나 성숙 후 난자에 비해 낮았다고 하였다.

Zhao 등(1997)은 동결, 용해한 소 난자의 미세구조 평가에서 transmission electron microscopy (TEM)을 이용한 연구에 의하면 미성숙 단계에서 동결, 용해한 난자는 체외성숙 난자보다 미토콘드리아, smooth endoplasmic reticulum(sER), microvilli 같은 cell organelles에 더 큰 변화가 일어났다고 보고하여 미성숙 난자가 체외성숙 난자에 비해 동결, 보존에 더 민감함을 추정하였고, 이러한 발견은 Fuku 등(1992)의 보고와도 일치하였다. Hochi 등(1997)은 동결, 용해한 난자가 그렇지 않은 난자에 비해 수정율과 배반포의 발달율이 떨어지는 것으로 보아 동결에 의한 손상 메카니즘(damage mechanism)은 소 난자의 핵 성숙 과정을 억제한다고 하였고, 동결에 의한 손상은 미성숙 단계일 때가 성숙 중이거나 성숙을 완료한 단계보다 크다고 하였다.

유리화 동결한 난자의 생존성을 향상시키기 위해서는 동결의 손상에 내성이 있는 특별한 난자의 성숙 단계에서 동결을 실시해야 한다는 다른 포유동물의 여러 보고에서와는 달리 본 실험에서는 돼지의 난포란에서는 지방제거만 성공적으로 이루어진다면 성숙시기에 따른 동결능력에는 큰 차이가 없는 것으로 보인다.

## 2. 미성숙, 성숙 단계에서 동결, 용해한 돼지 난포란의 배 발달율

미성숙 난포란의 동결, 용해 후 계속 핵 성숙이 가능한 지를 알아보기 위해 미성숙 단계의 난포란을 CB 처리하여 원심분리 후 지방구를 제거한 지

방제거구(Delipated)와 유리화 동결을 실시하지 않은 난포란(Non-vitrification)을 비교, 관찰한 결과는 Table 2와 같다.

미성숙 단계에서 지방제거 후 동결, 융해하여 42~44 시간 동안 추가 성숙한 난포란의 핵 성숙율은 37.5%로 동결하지 않은 체외성숙 난포란의 성숙율 68.9%보다 유의적으로 낮았으나(P<.01) 성숙을 완료할 수 있었다.

원심분리구(Centrifuged)와 대조구(Control)는 Table 1의 결과와 같이 생존한 난자는 없었으나 몇 개의 난포란을 핵 성숙 판단을 위해 염색을 실시하였으나 염색과정에서 세포질이 소실되거나 세포질의 형태가 남아 있는 난포란이라도 염색체를 관찰할 수가 없는 것으로 보아 생존하지 않은 난포란의 염색체 관찰을 위한 염색은 불가능한 것으로 보인다.

Table 2. *In vitro* maturation of the delipated GV oocytes after vitrification by EM grid

Treatment	No. of oocytes (%)					
	Examined	Developed at				
		GV	GVBD	M I	A I ~ T I	M II
Delipated	8	0	1	4	0	3(37.5) <sup>b</sup>
Non-vitrification <sup>1</sup>	61	0	1	11	7	42(68.9) <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Non-vitrification is 42~44h maturation without vitrification.

<sup>a,b</sup> The values with different superscripts within columns differ significantly (P<.01).

Table 3. *In vitro* developmental ability of lipid-removed (delipated) GV and M II oocytes

Maturation stage	Treatment	No. of oocytes(%)			
		Inseminated	Developed at		
			2~4 cell	Morula	
GV	Vitrification	Delipated <sup>1</sup>	16	1(12.5) <sup>b</sup>	0( 0.0) <sup>b</sup>
		Centrifuged <sup>2</sup>	44	0( 0.0) <sup>b</sup>	0( 0.0) <sup>b</sup>
		Control <sup>3</sup>	59	0( 0.0) <sup>b</sup>	0( 0.0) <sup>b</sup>
		Non-vitrification <sup>4</sup>	164	92(56.1) <sup>a</sup>	28(17.1) <sup>a</sup>
M II	Vitrification	Delipated <sup>1</sup>	12	3(25.0) <sup>b</sup>	0( 0.0) <sup>b</sup>
		Centrifuged <sup>2</sup>	54	0( 0.0) <sup>b</sup>	0( 0.0) <sup>b</sup>
		Control <sup>3</sup>	67	0( 0.0) <sup>b</sup>	0( 0.0) <sup>b</sup>
		Non-vitrification <sup>4</sup>	190	129(67.9) <sup>a</sup>	43(22.6) <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Delipated oocytes were centrifuged after being preincubation CB, followed by lipid removal.

<sup>2</sup> Centrifuged oocytes were treated with CB and centrifuged to polarize lipid droplets but not delipated.

<sup>3</sup> Control oocytes were non treatment.

<sup>4</sup> Oocytes inseminated without vitrification.

<sup>a,b</sup> The values with different superscripts within columns differ significantly (P<.05).

성숙 단계에서 각 처리 후 동결한 난포란의 핵 성숙을 관찰은 지방제거시 제2극체가 확인된 난포란만을 실험에 사용하였기 때문에 성숙이 완료된 난포란이라고 간주하고 동결, 융해 후 성숙율을 관찰하기 위한 염색을 별도로 실시하지 않았다.

돼지 미성숙, 성숙 난포란의 동결, 융해가 차후 계속되는 난자의 배 발달에 영향을 미치는지 조사하기 위하여 각 성숙 단계의 난포란을 CB 처리하여 원심분리 후 지방구를 제거한 지방제거구(Delipated), CB 처리 후 원심분리를 하여 지방구만 분극시킨 원심분리구(Centrifuged), 아무 처리도 하지 않은 대조구(Control)로 나누어 동결, 융해 후 수정을 하여 동결하지 않은 난포란(Non-vitrification)과 비교한 결과는 Table 3과 같다.

미성숙 단계에서 지방제거, 원심분리, 무처리후 유리화 동결을 실시한 난포란의 배 발달율은 각각 12.5%, 0%, 0%로 지방제거구에서만 12.5%의 난포란이 2~4 세포기까지 발달을 하였으나 이 세 처리구간의 유의차는 없었다. 성숙 단계에서 지방제거, 원심분리, 무처리후 유리화 동결을 실시한 난포란의 배 발달율은 각각 25.0%, 0%, 0%로 미성숙 단계에서와 같은 경향으로 지방제거구에서만 25.0%의 난포란이 2~4 세포기까지 발달을 하였으나 이 세 처리구간의 유의차는 없었다. 한편 각 성숙 단계에서 모두 유리화 동결을 하지 않고 체외수정한 난포란은 동결을 실시한 세 처리구에 비해 유의적으로 높은 배 발달을 나타내었다( $P<0.05$ ).

Nagashima 등(1999)은 지방구 제거 후 동결한 난자를 Subzonal sperm injection(SUZI)의 방법으로 수정을 하여 25.0%의 수정율을 얻을 수 있었고 그중 6.3%만이 8 세포기와 상실배로 발달을 하였으며 SUZI 40 시간 후 분할이 일어나지 않는 수정란을 염색하여 본 결과 7, 8 및 12 개의 핵을 가진 이상 수정란이라고 보고하였다. 또 이들은 이전의 연구에서 1 세포기나 2~4 세포기에서 지방을 제거한 구에서만 60% 이상의 8 세포기까지 배 발달을 이루었고 이 중 18.4%가 그 이상의 단계로 발달하였으며 1세포기와 2~4 세포기에서 원심분리만 한 구에서는 각각 5.3%, 22.2%가 8세포기까지 발달을 나타내었으나 그 이상의 단계로 배 발달을 하지 못하였고, 본 연구결과와 같이 아무처리도 하

지 않은 대조구에서는 배 발달을 하지 못하였다(Nagashima 등, 1994). 최와 송(1998)은 미성숙, 성숙 중, 성숙 후 단계의 돼지 난포란을 일단계 초산화동결(one-step vitrification), 융해한 후 배 발달율은 4 세포기까지만으로 각각 2.5%, 2.4%, 10.2%로 매우 낮았다고 하였다.

이처럼 생존한 돼지 동결 난포란의 배 발달율이 동결을 하지 않은 대조구에 비해 현저히 낮은 것은 Pellicer 등(1988)과 Schmidt 등(1993)이 밝힌 바와 같이 동결, 융해에 따른 투명대의 파열, 난황막의 균열 및 난구세포와 난자간의 연결구조적 변화, 염색체 이상 증가와 관련이 있는 것으로 여겨지며, 또한 4 세포기 발달중지현상과 다정자 침입이 원인일 것이다. 연구자에 따라 염색체 이상의 비율이 증가되지 않는다는 보고(Gook 등, 1994)도 있지만 염색체의 이수현상이 증가된다는 연구결과는 상당히 신빙성이 있는 것으로 생각된다.

일반적으로 동결, 융해한 난자의 경우 수정방법으로 intracytoplasmic sperm injection(ICSI)가 대부분 이용되고 있는데 이는 동결, 융해시 투명대의 생화학적 변화 또는 경화현상으로 인한 수정율의 감소를 예방하기 위한 것으로 사료되나 아직까지 이에 관한 구체적인 연구보고는 없는 실정이다.

돼지 난포란의 동결에 적당한 성숙시기를 알아보기 위하여 미성숙, 성숙 단계에서 지방제거, 원심분리 그리고 무처리를 한 난포란을 유리화 동결 후 추가성숙을 실시하여 수정한 결과는 미성숙 단계에서 지방을 제거하고 유리화 동결을 실시한 난포란의 배 발달율은 12.5%(1/16), 성숙 단계에서 지방을 제거하고 유리화 동결을 실시한 난포란의 배 발달율은 25.0%(3/12)로 성숙시기에 지방을 제거한 후 동결한 난포란에서 더 높은 배 발달을 나타내었으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 미성숙시기에 동결한 난포란은 생존한 후 42~44 시간의 추가성숙 시간이 필요하므로 이 시간 동안 체내보다 불안정한 환경으로 성숙을 완료하지 못할 수 있으나, 성숙시기에 동결한 난포란은 생존할 수만 있다면 성숙은 완료한 상태이므로 바로 다음 단계인 수정과정을 거칠 수 있는 것일지도 모른다.

미성숙 난자의 동결보존은 성숙 난자에 비해 세포가 구조적으로 비교적 안정적이라는 가설에서

연구되어져 왔다. 즉, 미성숙 난자는 성숙 난자에 비해 동결, 융해과정에서 손상 받기 쉬운 방추사가 존재하지 않는 안전한 구조를 갖고 있으며(Sathanathan 등, 1988; Van der Elst 등, 1988; Pickering 등, 1990), 또한 난핵포(germinal vesicle: GV) 내에 염색질이 응축되어 있는 관계로 염색체의 손상을 극소화할 수 있다(Van Blerkom과 Davis, 1994; Van der Elst 등, 1992).

이러한 이론적 근거에도 불구하고 Park 등 (1997)은 수정란 동결보존에 이용되는 완만동결-급속융해 방법(slow freezing and rapid thawing methods)으로 동결, 융해한 결과 융해 후 생존율(40%)이 매우 낮고 생존된 미성숙 난자의 경우 염색체 이상(78%)과 방추사의 기형율(70%)이 매우 높게 나타났다고 보고하였다. Son 등(1996)은 동결, 융해된 인간 미성숙 난자의 체외성숙율(69%), 수정율(43%) 및 난할율(17%)이 신선 미성숙 난자의 결과에 비해 유의적으로 낮은 것으로 보고하여 미성숙 난자의 동결보존의 효율이 매우 낮은 것으로 보고하였다.

발표자에 따라 미성숙 난자에 비해 성숙 난자는 동결, 융해시 손상에 대해 저항성을 갖는 미세구조를 갖고 있으며(Fuku 등, 1992; Gook 등, 1993, 1994), 동결능력에 결정적인 영향을 미치는 동결보호제에 대한 세포막 투과성(membrane permeability)이 미성숙 난자에 비해 양호하고 현재까지의 보고로는 비교적 생존율과 발생능이 좋은 것으로 보고되고 있다(Lim 등, 1992 ; Al-Hasani 등, 1987).

본 연구에서 지방이 제거된 돼지 난포란에서 유리화 동결이 가능한 것으로 보아 돼지 난포란의 저온에 대한 민감성은 그들이 가지고 있는 지방구에 의한 것으로 보이며, 지방제거만 성공적으로 이루어진다면 난포란의 동결시기(미성숙, 성숙)에 따른 큰 차이는 없는 것으로 사료된다.

## 적 요

본 연구는 미성숙, 성숙 단계의 돼지 난포란이 유리화 동결에 의한 동결보존이 가능한지를 조사하고자 실시하였다. 난포란은 세포질 내 지방구를 분극시키기 위해 원심분리를 실시하였고, 미세조

작기를 이용하여 지방구를 제거하였다. 돼지 난포란을 CB 처리하여 원심분리 후 지방구를 제거한 지방제거구(Delipated), CB 처리 후 원심분리만 하여 지방구를 분극시킨 원심분리구(Centrifuged), 아무처리도 하지 않은 대조구(Control)를 EM grid를 이용한 유리화 동결, 융해한 후 생존율과 체외발생율을 조사하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 미성숙 시기에 지방제거, 원심분리, 무처리 후 유리화 동결을 실시한 돼지 난포란의 생존율은 각각 15.1%, 0%, 0%로 지방제거구에서만 유의적으로 높은 생존율을 나타내었다( $P<.01$ ).
2. 성숙 시기에 지방제거, 원심분리, 무처리 후 유리화 동결을 실시한 돼지 난포란의 생존율은 각각 12.2%, 0%, 0%로 지방제거구에서만 유의적으로 높은 생존율을 나타내었다( $P<.01$ ).
3. 미성숙 시기에 지방제거 후 유리화 동결을 실시하여 생존한 난자의 핵 성숙율은 37.5%로 동결하지 않은 난포란의 성숙율 68.9%보다 유의적으로 낮은 것이었다( $P<.01$ ).
4. 미성숙 시기에 지방제거, 원심분리, 무처리 후 유리화 동결을 실시하여 생존한 난자의 수정 후 배 발달율은 12.5%, 0%, 0%로 지방제거구에서만 배 발달을 나타냈으나, 세 처리간의 유의차는 없었고, 이것은 동결하지 않은 난포란의 배 발달율 56.1%보다는 유의적으로 낮은 것이었다( $P<.05$ ).
5. 성숙 시기에 지방제거, 원심분리, 무처리 후 유리화 동결을 실시하여 생존한 난자의 수정 후 배 발달율은 25.0%, 0%, 0%로 지방제거구에서만 배 발달을 나타내었으나 세 처리간의 유의차는 없었고, 이것은 동결하지 않은 난포란의 배 발달율 67.9%보다는 유의적으로 낮은 것이었다( $P<.05$ ).

## 참고문헌

- Abeydeera LR and Day BN. 1997. *In vitro* penetration of pig oocytes in a modified tris-

- buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. *Theriogenology*, 48:537-544.
- Aigner S, Van der Elst J, Siebzehnrubl E, Wildt L and Lang N. 1992. The influence of slow and ultra-rapid freezing on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Human Reprod.*, 7:857-864.
- Al-Hasani S, Diedrich K, Van der Ven H, Reinecke A and Krebs D. 1987. Cryopreservation of human oocytes. *Human Reprod.*, 2:695-700.
- Baka SG, Toth TL, Veeck LL, Jones HWJ, Muasher SJ and Lanzendorf SE. 1995. Evaluation of the spindle apparatus of *in vitro* matured human oocytes following cryopreservation. *Human Reprod.*, 10:1816-1820.
- Chung HM, Hong SW, Lim JM, Lee SH, Cha WT, Ko JJ, Han SY, Choi DH and Cha KY. 2000. *In vitro* blastocyst formation of human oocytes retrieved from unstimulated and stimulated cycles following vitrification at various maturational stages. *Fertil. Steril.*, 73: 545-551.
- Edidin M and Petit VA. 1977. The effect of temperature on the lateral diffusion of plasma membrane protein. In: Elliott K, Whelan J(eds.) *The Freezing of Mammalian Embryos*. Amsterdam: Elsevier, Excerpta Medica. 155-174.
- Fuku E, Kojima T, Shioya Y, Marcus GJ and Downey BR. 1992. *In vitro* fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes. *Cryobiology*, 29:485-492.
- Gook DA, Osborn SM, Bourne H and Johnson WIH. 1994. Fertilization of human oocytes following cryopreservation: normal karyotypes and absence of stray chromosomes. *Human Reprod.*, 9:684-691.
- Gook DA, Osborn SM and Johnson WIH. 1993. Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle. *Humam Reprod.*, 9:1101-1109.
- Hamlett DK, Franken DR, Cronje HS and Luus H. 1989. Murine oocyte cryopreservation: Comparison between fertilization success rates of fresh frozen metaphase I and II oocytes. *Arch. Androl.*, 23:27.
- Hochi S, Akira K, Ken K and Akira H. 1997. *In vitro* fertilizing ability of bovine oocyte frozen-thawed at immature, maturing and mature stage. *J. Mmalian Ova Res.*, 14:61-65.
- Hong SW, Chung HM, Lim JM, Ko JJ, Yoon TK, Yee B and Cha KY. 1999. Improved human oocyte development after vitrification: a comparison of thawing methods. *Fertil. Steril.*, 72:142-146.
- Hotamisligil S, Toner M and Power R. 1996. Change in membrane integrity, cytoskeletal structure and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. *Biol. Reprod.*, 55:161-168.
- Leibo SP. 1977. Fundamental biology of mouse ova and embryos. In: Elliott K., Whelan J. (eds.) *The Freezing of Mammalian Embryos*. Amsterdam: Elsevier, Excerpta Medica. 69-92.
- Leibo SP and Loskutoff NM. 1993. Cryobiology of *in vitro*-derived bovine embryos. *Theriogenology*, 39:81-94.
- Lim JM, Fukui Y and Ono H. 1991. The post-thaw developmental capacity of frozen bovine oocytes following *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology*, 35:1225-1235.
- Lim JM, Fukui Y and Ono H. 1992. Developmental competence of bovine oocytes frozen at various maturation stages followed by *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology*, 37:351-362.
- Mahmoudzadeh AR, van Soom A, Ysebaert MT and De Kruif A. 1994. Comparison of two-step vitrification versus controlled freezing on survival of *in vitro* produced cattle embryos. *Theriogenology*, 42: 1389-1397.
- Mandelbaum J, Junca AM, Placho M and Alnot

- MD. 1987. Cryopreservation of human embryos and oocytes. *Human Reprod.*, 3:117.
- Martino A, Songsasen N and Leibo SP. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol. Reprod.*, 54:1059-1069.
- Men H, Chen W, Shang E, Yang S and Zou R. 1997. Cryopreservation of mouse oocytes using slow cooling, ultra-rapid cooling and vitrification protocols. *Theriogenology*, 47: 1423-1431.
- Mohr LR and Trounson AO. 1981. Structural changes associated with freezing of bovine embryos. *Biol. Reprod.*, 25:1009-1025.
- Nagashima H, Cameron RDA, Kuwayama M, Young M, Beebe L, Blackshaw AW and Nottle MB. 1999. Survival of porcine delipidated oocytes and embryos after cryopreservation by freezing or vitrification. *J. Reprod. Dev.*, 45(2):167-176.
- Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG, Seamark RF and Nottle MB. 1994. Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. *Biol. Reprod.*, 51:618-622.
- Nagashima H, Kato Y, Yamakawa H, Matsumoto T and Ogawas S. 1989. Changes in freezing tolerance of pig blastocysts in peri-hatching stage *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 35:130-134.
- Nagashima H, Kuwayama M, Grupen CG, Ashman RJ and Nottle MB. 1996. Vitrification of porcine early cleavage stage embryos and oocytes after removal of cytoplasmic lipid droplets. *Theriogenology*, 45(1):180.
- Nagashima H, Yamakawa H and Niemann H. 1992. Freezability of porcine blastocysts at different peri-hatching stages. *Theriogenology*, 37:839-850.
- Niimura S and Ishida K. 1980. Histochemical observation of lipid droplets in mammalian eggs during the early development. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 26:46-49.
- Norberg HS. 1973. Ultrastructural aspects of the preattached pig embryo : cleavage and early blastocyst stages. *Z Anat. Entwicklungsgesch.*, 143:95-114.
- Park SE, Lee KA, Son WY, Ko JJ, Lee SH and Cha KY. 1997. Chromosome and spindle configuration of human oocytes matured *in vitro* after cryopreservation at the germinal vesicle stage. *Fertil. Steril.*, 68(5):920-926.
- Parkening TA, Tsunoda Y and Chang MC. 1976. Effects of various low temperatures, cryoprotective agents and cooling rates on the survival, fertilizability and development of frozen-thawed mouse egg. *J. Exp. Zool.*, 369-374.
- Parks JE and Ruffing NA. 1992. Factors affecting low temperature survivals of mammalian oocytes. *Theriogenology*, 37:59-73.
- Pellicer A, Lightman A, Parmer TG, Behrman HR and De Cherney AH. 1988. Morphologic and functional studies of immature rat oocyte-cumulus complexes after cryopreservation. *Fertil. Steril.*, 50:805-810.
- Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A and Currie J. 1990. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocytes. *Fertil. Steril.*, 54:102-108.
- Polge C. 1977. The freezing of mammalian embryos: perspectives and possibilities. In: Elliott K, Whelan J(eds.), *The Freezing of Mammalian Embryos*. Amsterdam: Elsevier, *Excerpta Medica*, 3-18.
- Pollard JM and Leibo SP. 1994. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology*, 41: 101-106.
- Quinn P, Kerin J, Stone B and Wilson L. 1986. Successful cryopreservation of human oocytes. In: 42nd Ann Mtg Am Fertil Soc and 18th Ann Mtg Canadian Fertil Androl Soc Abstr,

- 72(Abst).
- Rall WF. 1992. Cryopreservation of oocytes and embryos; Methods and applications. *Animal Reprod. Science*, 28:237-245.
- Rall WF and Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at  $-196^{\circ}\text{C}$  by vitrification. *Nature*, 313:573-575.
- Rall WF, Wood MJ, Kirby C and Whittingham DG. 1987. Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *J. Reprod. Fert.*, 80:499-504.
- Rubinsky B, Arav A and Devires AL. 1991. Cryopreservation of oocytes using directional cooling and antifreeze glycoproteins. *Cryo-Letters*, 12:93-106.
- Sathanathan AH, Ng, SC, Trounson AO, Bongso A, Ratnam SS and Ho J. 1988. The effect of ultrarapid freezing on meiotic spindles of mouse oocytes and embryos. *Gamete Res.*, 21: 385-401.
- Schmidt M, Hyttle P, Greve T and Avery B. 1993. Ultrastructure of frozen thawed bovine *in vitro* matured oocytes. *Theriogenology*, 39: 304.
- Schellander K, Peli J, Schmoll F and Brem G. 1994. Effects of cryopreservation and carbohydrates on freezing of matured and unmatured bovine oocytes. *Theriogenology*, 23:909-915.
- Schroeder AC, Chanplin AK, Mobraaten LE and Eppig JJ. 1990. Developmental capacity of mouse oocytes cryopreserved before and after maturation *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, 89:43-50.
- Son WY, Ko JJ, Park SE, Yoon TK, Lee KA, Cha KY and Lee WS. 1996. Effects of 1,2-propanediol and freezing-thawing on the *in vitro* developmental capacity of human immature oocytes. *Fertil. Steril.*, 66:995-999.
- Suzuki T and Nishikata Y. 1992. Fertilization and cleavage of frozen thawed bovine oocytes by one step dilution method *in vitro*. *Theriogenology*, 37:306.
- Toner M, Cravalho EG, Ebert KM and Overstrom EW. 1986. Cryobiophysical properties of porcine embryos. *Biol. Reprod.*, 34(suppl. 1):98 (abstract).
- Trounson AO, Willadsen SM, Rowson LEA and Newcomb R. 1976. The storage of cow eggs at room temperature. *J. Reprod. Fert.*, 46: 173-178.
- Tsunoda Y, Parkening TA and Chang MC. 1976. *In vitro* fertilization of mouse and hamster egg after freezing and thawing. *Experientia*, 32: 223-224.
- Ushijima H, Yamakawa H and Nagashima H. 1996. Cryopreservation of bovine IVM/IVF embryos at early cleavage stage following removal of cytoplasmic lipid droplets. *Theriogenology*, 45(1):159.
- Vajta G, Booth PJ, Holm P, Greve T and Callesen H. 1997a. Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw(OPS) method. *Cryo-Letters*, 18:191-195.
- Vajta G, Holm P, Greve T and Callesen H. 1997b. Vitrification of porcine embryos using open pulled straw method. *Acta. Vet. Scand.*, 38: 349-352.
- Van Blerkom J. 1989. Maturation at high frequency of germinal vesicle-stage mouse oocyte after cryopreservation: alterations in cytoplasmic, nuclear, nucleolar and chromosomal structure and organization associated with vitrification. *Human Reprod.*, 4:883-893.
- Van Blerkom J and Davis PW. 1994. Cytogenic, cellular and developmental consequences of cryopreservation of immature and mature mouse and human oocytes. *Micro Res. and Tech.*, 27:165-193.
- Van der Elst J, Nerinckx S and Van Steirtghem A. 1992. *In vitro* maturation of mouse germinal vesicle-stage oocytes following cooling, exposure to cryoprotectants and ultrarapid freez-

- ing; limited effect on the morphology of the second meiotic spindle. *Human. Reprod.*, 7: 1140-1446.
- Van der Elst J, Van den Abbeel E, Jacobs R, Wisse E and van Steirtghem A. 1988. Effect of 1,2-propanediol and dimethylsulphoxide on the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Human Reprod.*, 3:960-967.
- Vincent C, Pickering SJ, Johnson MN and Quick SJ. 1990. Dimethylsulfoxide affects the organization of microfilaments in the mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 26:227-235.
- Whittingham DG. 1977. Fertilization *in vitro* and development to term of unfertilized mouse oocyte previously stored at  $-196^{\circ}\text{C}$ . *J. Repr. Fert.*, 7:29(Abst.)
- Whittingham DG, Leibo SP and Mazur P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to  $-196^{\circ}\text{C}$  an  $-269^{\circ}\text{C}$ . *Science*, 178:411-414.
- Wood MJ, Whittingham DG and William FR. 1987. The low temperature preservation of mouse oocytes and embryos. In: Monk M (ed.), *Mammalian Development*. IRL Press, Oxford, England. 255-258.
- Zhao J, Hattori M and Fujihara N. 1997. Ultrastructural comparison between immature and *in vitro* matured bovine oocyte cryopreserved in propanediol. *J. Mamm. Ova Reserch*, 14:84-94.
- 최인경, 송해범. 1998. 각 성숙단계에서 동결, 융해한 돼지 난포란의 발달능력에 관한 연구. *한국가축번식학회지*, 22(4):319-329.

---

(접수일: 2002. 7. 3/ 채택일: 2003. 3. 20)