다양한 유리화 동결 방법이 각 시간대별 생쥐 전핵기 배아의 발달에 미치는 영향

김지철[1,2], 서병부[1], 박성백[1], 김재명[3,*]
[1]대구대학교 동물자원학과, [2]ROSA 불임클리닉, [3]대구여성차병원

The Effect of Various Vitrification Methods on Developmental Rate of Mouse Pronuclear Embryos at Different Recovery Times

Ji Chul Kim[1], Byoung Boo Seo[1], Sung Baek Park[1] and Jae Myeoung Kim[2,*]
[1]Department of Animal Resources, Daegu University, Daegu 712-714, Korea
[2]ROSA Infertility Clinics, Daegu 701-845, Korea
[3]Medical Center of CHA Gerneral Hospital, Daegu 705-809, Korea

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the effectiveness of cryopreservation methods for the effect of various vitrification containers, such as EM-grid, OPS, or cryo-loop on the survival and developmental rate of vitrified mouse pronuclear embryos, and mouse cleavage embryo, at 21, 24, 27 and 30 hr after hCG injection. Post-thaw cleavage was similar among treatments, while the developmental rates of mouse blastocyst and hatched blastocyst were higher (p<0.05) in 27 hr and 30 hr than 21 hr. The developmental rate of hatched blastocyst at vitrified cleavage mouse embryos in cryo-loop was significantly higher than vitrified pronuclear embryos of control group as well as EM-grid and OPS (p<0.05). The developmental rate using cryo-loop was higher than EM-grid, but in case of OPS at vitrified cleavage and mouse pronuclear embryos, no significant difference was noticed. These results of our study show that the developmental rates of mouse embryos were unaffected by various vitrification containers, but in case of mouse embryos and hatched blastocysts at late vitrified pronuclear embryos the developmental rates were higher than early vitrified pronuclear embryos. Moreover, the developmental rate of hatched blastocyst at vitrified cleavage mouse embryos was significantly higher than vitrified pronuclear embryos. For better execution of this study, it will be mandatory to include improvement of vitrification containers, cryopreservation methods and conditions, higher survival rate, safe preservation, contamination and embryo loss.

(Key words : EM-grid, OPS, cryo-loop, vitrification, pronuclear embryo)

서 론

생쥐에서 동결배아를 이용한 산자의 생산을 처음으로 성공한 이후 초기 배아의 동결 보존 기술은 가축을 포함한 대동물과 인간에게도 적용되어 그 가치가 증가되고 있으며, 이러한 배아의 동결 보존은 세포의 체외배양 연구에 없어서는 안 되는 중요한 과정으로 인식되고 있다. 근래에는 여러 동물에서 상업적 이용이 가능하게 되었으며, 인간의 체외수정 프로그램 분야에 접목되어 그 중요성이 점점 커지고 있다(Whittngham 등, 1972; Hamberger와 Hazekamp, 2002).

유리화 동결법의 도입은 배아의 동결 보존에 의미있는 발전으로 평가되고, 난자와 초기 배아의 동결 보존 시 동결에 의한 손상을 막기 위해 첨가하는 동결 보호제는 세포가 동결하는 과정에서 생기는 세포 내 전해질의 농축이나 상승 및 세포 내외의 빙 결정 형성 등 생존에 불리한 상태를 완화하거나 조절하는 작용을 하며, 동결 보호제는 완만 동결은 1~2 mol/l의 저 농도로 상대적으로 독성이 낮으나, 유리화 동결은 7~8 mol/l정도의 고농도로 독성이 낮은 물질을 선택하는 것이 중요하며, 작은 당류와 고분자 물질이 침투성 물질로 용액에 많이 첨가된다(Rall과 Fahy, 1985). 모든 세포에서 성공적인 동결 보존을 위한 중요한 요인은 세포 내 빙결정, 동결 보호제의 독성과 삼투압 팽창이다. 동결 보호제에 대한 배아의 세포막 침투성은 이 세가지 형태의 손상과 밀접하게 연관되어 있는 특징이 있으며, 침투성은 동결 보호제 용액 내에서 부피의 변화로 측정할 수 있다. 용액 내에서 배아는 세포외부의 삼투압에 의해 빨리 수축되고, 수분은 손실된 다음 동결 보호제가 침투되고, 세포 내의 삼투압 평형을 유지하기 위해 수분이 세포 속으로 다시 유입되고 천천히 크기가 회복되며, 이러한 침투성은 발

* Correspondence : E-mail : dangi2359@hanmail.net

달 단계와 종에 따라서 다르게 나타난다(Jackowski 등, 1980).

난자와 배아같이 세포의 크기가 크고 수분 함량이 높은 세포의 유리화 동결은 유리화 동결-융해 후 효율을 증진시키기 위해 일반적인 체세포에 비해 고농도의 동결 보호제에 의한 노출시간을 줄이거나 냉각속도를 올리는 것이 필수적이며, 투과율이 높고 독성이 적은 동결 보호제를 도입하거나 단일 용액의 사용보다는 투과성과 비 투과성 동결 보호제를 조합하여 상대적 농도의 변화 없이 절대적인 농도를 낮추는 방법을 통해 세포에 미치는 독성을 감소시키고, ficoll, polyvinyl pyrrolidone(PVP), polyethylene glycol(PEG) 등과 같은 거대 분자는 동결 시 초 급속 냉각속도로부터 세포 내 환경의 안정화와 세포막의 손상을 최소화 시켜 주는 물질로서 첨가하기도 한다(Andre와 Reuben, 1996; Hotamisligil 등, 1996).

유리화 동결에 이용되는 동결 보호제는 ethylene glycol(EG)+DMSO+1,3-butanediol을 혼합한 VS 용액(Valdez 등, 1992), EG+ficoll+sucrose를 혼합한 EFS 용액(Tachikawa 등, 1993), EG+DMSO+sucrose를 혼합한 EDS 용액(Vajta 등, 1998), glycerol+1,2-propanediol(PROH)을 혼합한 용액(Kuwayama 등, 1992), glycerol+EG를 혼합한 GE 용액(Yang 등, 1992), EG+PVP를 혼합한 용액(Leibo와 Oda, 1993) 등이 있으며, 이러한 용액은 배아의 유리화 동결 시 고농도의 동결 보호제 처리로 빙 결정 형성을 막을 수 있고 높은 생존율을 보고하였다(Mahmoudadeh 등, 1995). Damario 등(1999)과 Veeck 등(1993)은 배아의 동결 보존에는 전핵 시기가 적합하다고 보고하였으며, 미세소관의 변화가 큰 전핵 시기에서 전핵의 이동이 완료된 후기 전핵 시기의 동결이 안정적인 것으로 알려졌으며, 초기 배아는 할구 수가 증가할수록 배아의 생존율이 높은 것으로 보고되었다(Dobrinsky 등, 2000). 또한 유리화 동결은 동결 보존 용기를 곧바로 액체질소에 침지하였을 경우, 용기에 따라 냉각 속도에서 많은 차이를 나타내기 때문에 배아의 회수율과 생존율이 달라질 수 있으며(Vajta 등, 1998; Yokota 등, 2000), 용기의 선택은 세포의 크기와 동결 보호제의 양, 동결-융해 속도, 세포의 손실 가능성, 오염의 위험성 등이 고려되어야 한다(Kuleshova와 Shaw, 2000).

이러한 유리화 동결은 세포 손상의 방지를 위해 빠른 처리가 필요하며, 유실되는 난자와 배아를 최소화시켜야 하고, 동결 보존에 알맞은 발달 단계와 그에 따른 동결 보호제의 종류, 첨가 농도와 첨가 방법, 평형 시간 등 영향을 미치는 요인이 많아 보고자의 결과에 차이가 있을 수 있으므로 동결 기술에 유용한 동결 시기, 동결 보호제와 동결 보존 방법이 중요하다. 이에 본 연구는 생쥐의 전핵기 배아의 효과적인 동결 시기와 방법을 확립하기 위해서 생쥐 전핵기 배아는 hCG 주사 후 21, 24, 27 및 30 시간째에 회수하여 전핵기 배아를 여러 가지 동결 보존 방법(EM-grid, OPS및Cryo-loop)에 따라 유리화 동결-융해 후 생존율과 발달률을 비교하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물의 준비

생쥐 제 1세대 잡종 B6CBAF1(C57BL/CBA)의 5주령의 암컷과 10～12주령의 생식 능력이 확인된 동종의 수컷 생쥐를 명 10시간과 암 14시간으로 광주기를 조절하고 40～60%의 습도와 22～25℃의 온도를 유지하며, 물과 먹이가 충분히 공급되는 상태에서 사육하였다. 전핵기 배아의 채취는 5 IU의 pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG, Sigma, USA)과 human chorionic gonadotropin(hCG, Sigma, USA)을 각각 48시간 간격으로 주사하여 과배란을 유도하고, hCG주사 후 수컷과 합사시켜 자연 교미를 유도하였으며, 다음 날 질전이 확인된 개체만을 이용하였다. 전핵기 배아는 hCG주사 후 21, 24, 27, 30시간째에, 난할기 배아는 48시간째에 경추탈골로 생쥐를 도살하고 난관 팽대부에서 19G 주사침이 부착된 일회용 주사기를 이용하여 4 mg/ml의 BSA가 첨가된 PBS로 난관을 관류시켜서 각 시간대 별로 회수하였다. 회수된 전핵기와 난할기 배아는 배아 발달 배양액인 G1(G1-5, Vitrolife, Sweden) 배양액에 3회 세척 후 배양하였으며, 배양 후 48시간째에 G2 (G2-5, Vitrolife, Sweden)배양액으로 교체하여 배양하였다. 난자와 배아는 10㎕당 5개씩 배아를 mineral oil(Sage, USA)을 덮은 배양접시에서 배양하는 drop culture를 실시하였으며, 대조구의 전핵기와 난할기 배아는 유리화 동결하지 않고 체외 배양하여 발달률을 관찰하였다.

2. 유리화동결과 융해

동결액은 20% serum substitude supplement(SSS: Irvine Scientific, USA)를 첨가한 PBS 기본 용액에 7.5% EG(E-9129, Sigma, USA)+7.5% DMSO(D-2650, Sigma, USA)와 15.0% EG+15.0% DMSO+0.5 M sucrose이며, 융해액은 기본 용액에 0.5 M sucrose와 1.0 M sucrose를 각각 첨가하여 이용하였다. 배아는 7.5% EG+7.5% DMSO이 첨가된 용액에 옮겨서 10분간 전 처리하였고, 15.0% EG+15.0% DMSO+0.5 M sucrose에 옮긴 후 바로 동결 보존 용기에 적재하고 가능한 빨리 액체질소에 침지하였다. 2주 이상 액체질소에 보관되어 있던 배아는 꺼낸 뒤 바로 37℃, 1.0 M sucrose 용액에 1분간 옮기고, 실온에서 0.5 M sucrose 용액에 3분간 침지하고, 기본 용액에 5분간, 37℃의 기본 용액에 5분간 침지한 후에 융해가 완료된 배아는 37℃, 5% CO_2 배양기에서 16～18시간 평형시킨 G1 배양액에서 세척한 후 배양하였다.

3. EM-grid를 이용한 유리화 동결

동결할 배아는 마지막 단계의 동결 용액에 옮긴 후 바로 1～3개씩 electron microscope grid(EM-grid: Gilder Co., West Chester, PA)에 유리 pipette을 이용하여 올려놓고, 여분의 동결 보

호제는 EM-grid 밑에 사전에 멸균한 filter paper를 깔아서 제거하였다. 배아가 놓인 EM-grid는 액체질소에 침지하기 전까지의 모든 과정을 37℃에서 시행하였고, 15.0% EG+15.0% DMSO+ 0.5 M sucrose에 노출시켰을 때부터 30초 이내에 EM-grid를 액체질소에 침지하여 보관하였다.

4. OPS를 이용한 유리화 동결

Open pulled straw(OPS)의 제작 방법은 0.25 ml plastic straw 양쪽을 잡고 알코올 램프 5～7 cm 위에서 2～5초간 있다가 위로 올리면서 부드럽게 하여 내경과 가운데 부분의 벽 두께가 각각 0.8～1.7 mm와 0.07～0.15 mm까지 감소되도록 양끝을 당겨 straw가 가늘게 되도록 한다. 가늘게 뽑아진 중간부분은 날카로운 mass로 비스듬히 자른다. 이렇게 잘린 부분은 배아와 동결 용액이 포함된 1 μl의 drop에 넣으면, 모세현상에 의해 2～3 cm 길이의 원주 모양의 용액과 함께 배아가 흡입되면 바로 액체질소에 침지시킨다. 융해는 융해액에 OPS를 담그고 반대편 끝부분을 손가락으로 막아 OPS 내 용적의 팽창에 의해 배아를 회수하였다.

5. Cryo-loop를 이용한 유리화 동결

Cryo-loop(HR4-963, Hampton research, USA)의 구조는 미세한 nylon loop(넓이: 20 μm, 지름: 0.5～0.7 mm)에 스테인리스 파이프(stainless steel pipe)를 cryovial 뚜껑 속에 설치된 구조이며, 배아는 1 μl 미만의 동결 용액의 얇은 막에 loading 되어 cryovial의 loop에 올린 후, cryovial을 액체질소에 침지시켜 봉합하는 방법으로 이러한 단계를 거쳐 액체질소 내로 침지하기까지 걸리는 시간은 30초를 넘기지 않아야 한다.

6. 통계 처리

실험결과에 대한 통계학적 유의성 검정은 SPSS program을 이용한 Chi-square test에 의해 분석하였고, $p<0.05$일 때 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 각 시간대별 전핵기 배아의 유리화 동결에서 동결 보존 방법이 배아의 생존과 발달에 미치는 영향

생쥐 전핵기 배아는 hCG를 주사한 후 21, 24, 27, 30시간째에 회수하여 각각 EM-grid, OPS, cryo-loop에 유리화 동결-융해한 후 생존율과 발달률 및 부화율을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 유리화 동결한 후 각 시간대별 전핵기 배아의 생존율은 대조구에서 98.3%로 가장 높게 나타났으며, EM-grid를 이용한

Table 1. The effects of various vitrification methods on survival and subsequent development of vitrified mouse pronuclear embryos at different recovery times

Time	Method	No. of zygotes	No. of zygotes survived (%)	No. (%) of embryo developed to		
				≥2-cell	BL	H-BL
Control		60	59 (98.3)[a]	58 (96.7)[a]	48 (80.0)[a]	36 (60.0)[a]
21 hr	Grid	58	52 (89.7)[b]	49 (84.5)[b]	30 (51.7)[b,c]	21 (36.2)[b]
	OPS	56	53 (94.6)[a,b]	51 (91.1)[a,b]	31 (55.4)[b,c]	19 (33.9)[b]
	CL	60	55 (91.7)[b]	54 (90.0)[a,b]	35 (58.3)[b,c]	21 (35.0)[b]
24 hr	Grid	61	53 (86.9)[b]	50 (82.0)[b]	28 (45.9)[c]	22 (36.1)[b]
	OPS	57	52 (91.2)[b]	49 (86.0)[b]	26 (45.6)[c]	20 (35.1)[b]
	CL	57	54 (94.7)[a,b]	50 (87.7)[b]	31 (54.4)[bc]	24 (42.1)[a,b]
27 hr	Grid	60	55 (91.7)[b]	52 (86.7)[b]	36 (60.0)[b,c]	26 (43.3)[a,b]
	OPS	58	54 (93.1)[a,b]	52 (89.7)[a,b]	35 (60.3)[b,c]	26 (44.8)[a,b]
	CL	56	52 (92.9)[a,b]	51 (91.1)[a,b]	34 (60.7)[b,c]	28 (50.0)[a,b]
30 hr	Grid	48	43 (89.6)[b]	40 (83.3)[b]	30 (62.5)[b,c]	25 (52.1)[a,b]
	OPS	54	49 (90.7)[b]	47 (87.0)[b]	35 (64.8)[a,b]	29 (53.7)[a]
	CL	60	57 (95.0)[a,b]	54 (90.0)[a,b]	40 (66.7)[a,b]	33 (55.0)[a]

[a～c] With the same columns, values with different superscripts differ significantly ($p<0.05$).
BL, blastocyst; H-BL, hatched blastocyst; Control, at 30hr post hCG; Grid, EM-grid; CL, Cryo-loop.

시간대별 처리구는 대조구 89.7%, 21시간 처리구 86.9%, 24시간 처리구 91.7%와 27시간 처리구 89.6%, OPS의 24시간 처리구 91.2%, 30시간 처리구 90.7%와 cryo-loop의 21시간 처리구 91.7%가 대조구와 유의적인 차이가 있었다($p<0.05$). 2-세포기 배아의 발달률은 대조구 96.7%가 EM-grid를 이용한 21, 24, 27, 30시간대별 모든 처리구 84.5, 82.0, 86.7와 83.3%, OPS의 24시간 처리구 86.0%, 30시간 처리구 87.0%와 cryo-loop의 24시간 처리구 87.7%보다 유의하게 높았다($p<0.05$). 포배기 배아의 발달률은 대조구가 80.0%로 가장 높게 나타났으며, OPS와 cryo-loop의 30시간 처리구 64.8%와 66.7%를 제외한 모든 처리구 45.6～62.5%에서 유의하게 높았다($p<0.05$). 그리고 OPS와 cryo-loop의 30시간 처리구 64.8%와 66.7%가 EM-grid와 OPS의 24시간 처리구 45.9%와 45.6%보다 유의하게 높았으나($p<0.05$), 다른 처리구간에는 유의 차가 없었다. 배아의 부화율은 대조구, OPS와 cryo-loop의 30시간 처리구 60.0% 및 53.7%와 55.0%가 EM-grid와 OPS의 21시간 처리구 36.2% 및 33.9%와 24시간 처리구 36.1% 및 35.1%와 cryo-loop의 21시간 처리구 35.0%보다 유의하게 높았고($p<0.05$), OPS와 cryo-loop의 30시간 처리구를 제외한 모든 처리구 33.9～52.1%에서 유의적인 차이는 없었다.

2. 전핵기 배아의 유리화 동결에서 동결 보존 방법이 배아의 생존과 발달에 미치는 영향

생쥐 전핵기 배아는 EM-grid구, OPS구, cryo-loop구에 각각 유리화 동결-융해한 후 생존율과 발달률 및 부화율을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 배아의 생존율은 대조구 99.6%가 EM-grid, OPS, cryo-loop 처리구 89.4% 및 92.4%와 93.6%에 비해서 유의하게 높았으며($p<0.05$), 포배기 배아의 발달률은 대조구 75.8%가 각각의 처리구 발달률 54.6% 및 56.4%와 60.1%, 부화율은 대조구 56.5%가 각각의 처리구 부화율 41.4% 및 41.8%와 45.5%보다 유의하게 높았다($p<0.05$). 그리고 배아의 생존율, 2-세포기, 포배기 배아의 발달률 및 부화율은 cryo-loop구 93.6, 89.7, 60.1 및 45.5%가 EM-grid구 89.4, 84.1, 54.6 및 41.4%와 OPS구 92.4, 87.6, 56.4 및 41.8%보다 높은 결과를 나타내었지만 유의적인 차이는 없었다.

3. 배아의 유리화 동결에서 동결 보존 방법이 전핵기와 난할기 배아의 부화에 미치는 영향

생쥐 전핵기와 난할기 배아는 각각 EM-grid, OPS, cryo-loop로 유리화 동결-융해한 후 체외 발달된 포배기 배아의 부화율을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 포배기 배아의 부화율은 대

Table 2. The effects of various vitrification methods on survival and subsequent development of vitrified mouse pronuclear embryos

Method	No. of zygotes	No. of zygotes survived (%)	No. (%) of embryo developed to		
			≥2-cell	BL	Hatched BL
Control	260	259 (99.6)[a]	251 (96.5)[a]	197 (75.8)[a]	147 (56.5)[a]
EM-grid	227	203 (89.4)[b]	191 (84.1)[b]	124 (54.6)[b]	94 (41.4)[b]
OPS	225	208 (92.4)[b]	197 (87.6)[b]	127 (56.4)[b]	94 (41.8)[b]
Cryo-loop	233	218 (93.6)[b]	209 (89.7)[b]	140 (60.1)[b]	106 (45.5)[b]

[a,b] With the same columns, values with different superscripts differ significantly ($p<0.05$).
BL, blastocyst; Control, at 30hr post hCG.

Table 3. The effects of various vitrification methods on subsequent development of vitrified mouse pronuclear embryos and cleaved embryos

Stage	Control		EM-Grid		OPS		Cryo-loop	
	No. of BL	No. (%) of BL/HBL	No. of BL	No. (%) of BL/HBL	No. of BL	No. (%) of BL/HBL	No. of BL	No. (%) of BL/HBL
Embryo	121	116 (95.9)[a]	98	85 (86.7)[a]	97	85 (87.6)[a]	111	100 (90.1)[a]
Pronuclear	197	147 (74.6)[b]	131	94 (71.8)[b]	135	97 (71.9)[b]	151	111 (73.5)[b]

[a,b] With the same columns, values with different superscripts differ significantly ($p<0.05$).
BL, blastocyst; HBL, hatched blastocyst; Control, at 30hr post hCG; Embryo, 2～8 cells stage-embryos.

조구, EM-grid구, OPS구와 cryo-loop구에서 전핵기 배아구 74.6, 71.8, 71.9와 73.5%보다 난할기 배아구 95.9, 86.7, 87.6와 90.1%가 유의하게 높았으며($p<0.05$), 전핵기와 난할기 배아에서 cryo-loop구 73.5%와 90.1%가 EM-grid구 71.8와 86.7%, OPS구 71.9와 87.6%보다 높았지만 유의적인 차이는 없었다.

고 찰

Damario 등(1999)과 Veeck 등(1993)은 전핵시기의 배아가 동결 보존에 적합하다고 보고했는 데, 이는 단일세포인 전핵 시기는 방추사의 결여로 동결 및 융해 후 보다 높은 배아의 생존율과 착상률을 얻을 수 있고, 융해 후 생존 시 배아의 분열이 진행되므로 융해 후 배아의 생존 여부를 보다 정확히 확인할 수 있다. 그리고 미세소관(microtubule)의 변화가 심한 전핵시기에서도 전핵의 이동이 완료된 후기 전핵시기의 동결이 안정적이라고 보고하였다. 이는 본 연구에서도 같은 결과를 나타내었는데, 전핵기 배아의 생존율과 2-세포기인 초기 배아의 발달률에서는 동결에 대한 처리구간에 거의 차이를 보이지 않았지만 포배기 배아의 발달률에서 21시간 처리구에서 30시간 처리구로 시간이 경과되는 후기 전핵기에서 배아의 발달률이 점점 높게 나타났고, 배아의 부화율도 21시간과 24시간 처리구보다 30시간 처리구가 유의하게 높았으며, 대조구와 비교해도 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

유리화 동결은 보관 방법과 용기 선택에 의해 배아의 회수율과 생존율이 달라질 수 있으며, plastic straws(Yokota 등, 2000), OPS(Vajta 등, 1998), closed pulled straw(CPS)(Chen 등, 2001), cryo-loop(Lane 등, 1999), EM-grid(Park 등, 1999), hemi-straw (Vanderzwalmen 등, 2003), cryo-top(Kuwayama 등, 2005) 등의 다양한 용기가 개발되어 왔다. 그러나 동결 보존 용기를 곧바로 액체질소에 침지하였을 경우 용기의 열전도율에 따라 동결 효율이 많은 차이를 나타내기 때문에, 용기의 선택은 세포의 크기와 동결 보호제의 양, 동결-융해 속도, 세포의 손실 가능성, 오염의 위험성, 사용과 표기의 편리성, 저장과 살균의 용이성, 가격과 유효성의 관계 등이 고려되어야 한다. Martino 등(1996)은 소의 성숙난자를 EM-grid를 이용하여 유리화 동결-융해 후 포배기 배아의 형성이 높았다고 보고하였으며, Park 등(1999)은 plastic straw보다 EM-grid의 효율성을 증명하였고, Vajta 등(1998)은 OPS의 이용이 임신율이 증가되었다고 보고하였다. 또한 EM-grid를 이용한 생쥐의 유리화 동결에서도 배아의 생존율이 높았다고 보고하였다(Park 등, 2001). Liebermann과 Tucker(2002)는 인간 난자와 배아에서 hemi-straw와 cryo-loop를 비교한 결과, 배아의 생존율은 각각 85.4와 80.6%로 차이가 없었으나, 배아의 발달률은 hemi-straw가 cryo-loop보다 성적이 좋았다고 보고하였다. 이와 같이 여러 보고자에 의한 동결 보존 용기에 따른 결과는 서로 다르게 보고되고 있는데, 이러한 결과는 동결 기술의 숙련도에 따라서 동결 보존 용기에 대한 결과가 다르다는 것을 알 수 있다. 본 연구에서도 EM- grid, OPS, cryo-loop를 이용한 유리화 동결에서 각 시간대별 전핵기 배아의 발달률은 동결 보존 방법에 따른 차이가 나타나지 않았다. 이는 현재 이용되고 있는 동결 보존 방법은 발달단계와 동결 보존 용기에 차이가 없이 널리 이용되고 있다는 것을 알 수 있다(Lee 등, 2001).

Bagis 등(2005)과 Isachenko 등(2005)은 OPS 방법이 기존 straw 방법과 비교할 때 배아의 생존율이 개선되었다고 보고하였으며, CPS방법은 액체 질소에 직접 접촉하지 않는 폐쇄적 처리 방법으로 액체 질소나 주변 오염물로부터 안전하며, OPS와 같이 소량의 동결액으로 빠른 온도 변화를 주는 특징이 있으므로, Seok(2006)은 이러한 동결 보존 방법을 이용한 생쥐 전핵기 배아의 유리화 동결에서 배아의 발달률은 CPS구가 straws구와 OPS구보다 유의하게 높았으며, 포배기 배아의 발달률은 CPS구와 straws구가 OPS구보다 높은 유의적인 차이가 있었는데, 이는 본 연구에서 EM-grid, OPS와 Cryo-loop구에서 2-세포기, 포배기 배아의 발달률과 부화율 구간의 유의적인 차이가 없는 결과와는 상반된 결과를 나타내었다. 그리고 유의적인 차이는 없지만 배아의 발달률과 부화율에서 cryo-loop가 EM-grid와 OPS구보다는 약간 높은 결과를 나타내었다. Chen 등(2001)은 동결된 생쥐 난자의 생존율은 CPS, OPS와 EM-grid에서 각각 79, 63와 39%로 EM-grid구에서 가장 낮았고, Choi 등(2004)은 cryo-loop구 67.7%가 EM-grid구 53.5%보다 배아의 생존율이 유의하게 높았다. 그리고, Lane과 Gardner(2001)는 Cryo- loop를 이용한 ED동결액으로 99.3%의 높은 배아의 생존율을 보고하였고, Park 등(2001)은 EM-grid를 이용하여 73.8%의 배아의 생존율을 보고하였다. 동결 보존 방법에 따른 배아의 생존율과 발달률은 동결 보호제의 종류, 농도와 노출 시간, 동결방법과 연구자의 숙련도에 따라 다양하게 보고되고 있으나, 본 연구에서는 동결 보존 방법에 따른 배아의 생존율, 발달률과 부화율에서 차이가 나타나지 않았다는 Lee 등(2001)의 보고와 일치한다.

Dobrinsky 등(2000)은 유리화 동결 시 난할기 배아의 단계에서 동결한 처리구가 전핵기 단계의 처리구보다 높은 배아의 발달률을 보였는데, 이는 배아의 발달 단계가 높을수록 발달 지연 또는 정지되는 배아보다는 정상적으로 배아의 발달이 진행된다고 하였으며, Kasai 등(1990)은 배아의 발달 단계별 유리화 동결-융해한 후 배아의 발달률은 배아의 발달이 진행될수록 점차 증가한다고 보고하였다. 본 연구도 대조구와 처리구에서 난할기 배아 단계의 처리구가 전핵기 배아 단계의 처리구보다 높은 배아의 부화율을 보였는데, 이는 위의 보고와도 일치한다.

이러한 결과로 전핵기 배아의 유리화 동결에서는 동결 보존 방법에 의한 배아의 발달률 차이보다는 전기보다 후기 전핵

기 배아에서, 그리고 전핵기보다는 난할기 배아에서의 유리화 동결이 보다 높은 배아의 발달률과 부화율을 얻을 수 있었다. 최근 많은 연구에서 여러 가지 동결 보존 방법에 따른 유리화 동결의 결과가 보고되고 있으며, 세포의 발달 단계, 동결 방법, 동결 보존 용기, 동결 보호제에 따라서 많은 차이가 있지만, 동결 보존 방법은 연구자와 실험 방법 및 숙련도, 보다 높은 생존성, 오염, 손실과 같은 안전한 보존성 유지에 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

결 론

본 연구는 생쥐 배아의 효과적인 동결 보존 방법을 확립하기 위해서 각 시간대별 전핵기 배아의 동결 보존 방법에 따른 배아의 발달률과 전핵기와 난할기 배아의 동결 보존 방법에 따른 유리화 동결-융해 후 배아의 발달률을 조사하였다. 각 시간대별 생쥐 전핵기 배아를 EM-grid, OPS 및 cryo-loop를 이용하여 유리화 동결-융해한 후 배아의 생존율과 2-세포기 배아의 발달률은 시간대별과 동결 보존 용기에 따른 차이는 거의 나타나지 않았으나, 포배기 배아의 발달률과 부화율은 후기 전핵기 배아에서 더 높게 나타났으며, 대조구, OPS와 cryo-loop의 30시간 처리구의 부화율이 EM-grid와 OPS의 21시간과 24시간 처리구와 cryo-loop의 21시간 처리구보다 유의하게 높았다 ($p<0.05$). 생쥐 전핵기 배아를 여러 동결 방법에 각각 유리화 동결-융해한 후 생존율, 포배기 배아의 발달률과 부화율은 대조구가 처리구보다 유의하게 높았으며($p<0.05$), cryo-loop구가 EM-grid구와 OPS구보다 높은 결과를 나타내었지만 유의적인 차이는 없었다. 생쥐 전핵기와 난할기 배아를 여러 동결방법으로 유리화 동결-융해한 후 체외 발달된 포배기 배아의 부화율은 모든 구에서 전핵기 배아구보다 난할기 배아구가 유의하게 높았으며($p<0.05$), cryo-loop구가 EM-grid구와 OPS구보다 높았지만, 유의적인 차이는 없었다.

이상의 결과로 생쥐 전핵기 배아의 유리화 동결에서 동결 보존 방법에 따른 배아의 발달률은 차이가 없었으며, 전기보다 후기 전핵기 배아에서, 그리고 할구가 증가되고 배아의 발달단계가 진행된 배아일수록 보다 높은 배아의 발달률과 부화율을 얻을 수 있었다. 이에 전핵기 배아의 유리화 동결에는 동결시기와 동결 보존 방법의 선택에서는 차이가 없으므로, 앞으로 동결 보호제의 선택과 조합에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

Andre TP and Reuben JM. 1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. Biotech. Advan. 14:127-149.

Bagis H, Mercan HO, Cetin S and Sekmen S. 2005. The effect of equilibration time on survival and development rates of mouse pronuclear-stage embryos vitrified in solid surface (SSV) and conventional straws: *In vitro* and *In vivo* evaluations. Mol. Reprod. Dev. 72:474-501.

Chen SU, Lien YR, Cheng YY, Chen HF, Ho HN and Yang YS. 2001. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straw (CPS) achieves a high survival and preserves good patterms of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. Hum. Reprod. 16:2350-2356.

Choi SJ, Kim SK, Kim JS, Cho JW, Jun JH and Byun HK. 2004. Development of effective cryopreservation method for mouse oocytes. Kor. J. Fertil. Steril. 31:75-81.

Damario MA, Hammit DG, Galantis TM, Session DR and Dumesic, DA. 1999. Pronuclear stage cryopreservation after intracytoplasmic sperm injection and conventional IVF: implications for timing of the freeze. Fertil. Steril. 72:1049-1054.

Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR and Johnson LA. 2000. Brith of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. Biol. Reprod. 62: 564-570.

Hamberger L and Hazekamp J. 2002. Towards singled embryo transfer in IVF. J. Reprod. Immunol. 55:141-148.

Hotamisligil S, Toner M and Powers RD. 1996. Changes in membrane intergrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. Biol. Reprod. 55:161-168.

Isachenko V, Montag M, Isachenko E, Zaeva V, Krivokharchenko I and Shafei R. 2005. Aseptic technology of vitrification of human pronuclear oocytes using open-pulled straws. Hum. Reprod. 20:492-496.

Jackowski S, Leibo SP and Mazur P. 1980. Glucerol permeablities of fertilized and unfertilized mouse ova. J. Exp. Zool. 212: 329-341.

Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T and Machida, T. 1990. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. J. Reprod. Fertil. 89:91-97.

Kuleshova LL and Shaw JM. 2000. A strategy for rapid cooling of mouse embryos within a double straw to eliminate the risk of contamination during strorage in liquid nitrogen. Hum. Reprod. 15:2604-2609.

Kuwayama M, Hamano S and Nagai T. 1992. Vitrification of

bovine blastocysts obtained by *in vitro* culture of oocytes matured and fertilized *in vitro*. J. Reprod. Fertil. 96: 187-193.

Kuwayama M, Vajta G, Ieda S and Kato O. 2005. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential comtamination. Reprod. Biomed. Online 11:300-308.

Lane M and Gardner DK. 2001. Vitrification of mouse oocytes using a nylon loop. Mol. Reprod. Dev. 58:342-347.

Lane M, Bavister BD, Lyons EA and Forest KT. 1999. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. Nat. Biotechnol. 17:1234-1236.

Lee YJ, Ko DH, Lee TH and Chung KS. 2001. Development of *in vitro* produced bovine embryos after vitrification with various comtainers. Kor. J. Anim. Reprod. 25: 371-379.

Leibo SP and Oda K. 1993. High survival of mouse zygotes and embryos cooled rapidly or slowly in ethylglycol plus polyvinylpyrrolidone. Cryo-Letters 14:133-144.

Liebermann J and Tucker MJ. 2002. Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embroys as assessed by survival and developmental potential after vitrification. Reproduction 124:483-489.

Mahmoudzadeh AR, Van Soom A, Bols P, Ysebaert MT and de Kruif A. 1995. Optimization of a simple vitrification procedure for bovine embryos produced *in vitro*: Effect of developmental stage, two-step addition of cryoprotectant and sucrose dilution on embryonic survival. J. Reprod. Fertil. 103:33-39.

Martino A, Songsasen N and Leibo SP. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. Biol. Reprod. 54:1059-1069.

Park SE, Chung HM, Cha KY, Hwang WS, Lee ES and Lim JM. 2001. Cryopreservation of ICR mouse oocytes: Improved post-thawed preimplantation development after vitrification using taxol, a cytoskeleton stabilizer. Fertil. Steril. 75:1177-1184.

Park SP, Kim EY, Kim DI, Park NH, Won YS and Yoon SH. 1999. Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscope grids. Hum. Reprod. 14:2838-2843.

Rall WF and Fahy GH. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at −196℃ by vitrification. Nature 313:573-575.

Seok HB. 2006. Comparison on vitrification of mouse oocytes and embryod using closed pulled straws (CPS), conventional straws and open pulled straws (OPS). J. Emb. Trans. 21:53-58.

Tachikawa S, Otoi T, Kondo S, Machida T and Kasai M. 1993. Successful vitrification of bovine blastocysts, derived by *in vitro* maturation and fertilization. Mol. Reprod. Dev. 34:266-271.

Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H and Greve T. 1998. Open pulled straw(OPS) vitrification : A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. Mol. Reprod. Dev. 51:53-58.

Valdez CA, Abas Mazni O, Takahashi Y, Fujikawa S and Kanagawa W. 1992. Successful cryopreservation of mouse blastocysts using a new vitrification solution. J. Reprod. Fert. 96:793-802.

Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche CH, Standaert V, Van Roosendaal E and Vandervorst M. 2003. Vitrification of human blastocysts with the hemi-straw carrier: application of artificial assisted hatching after thawing. Hum. Reprod. 18: 1504-1511.

Veeck LL, Amundson CH, Brothman LJ, DeScisciolo C, Maloney MK and Muasher SJ. 1993. Significantly enhanced pregnancy rates per cycle through cryopreservation and thaw of pronuclear stage oocytes. Fertil. Steril. 59:1202-1207.

Whittngham DG, Leibo SP and Mazur P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to −196℃ and -269℃. Science 178: 411-414.

Yang NS, Lu KH, Gordon I and Polge C. 1992. Vitrification of blastocysts produced *in vitro*. Theriogenology 37:326.

Yokota Y, Sato S, Yokota M, Ishikawa Y, Makita M and Asada, T. 2000. Successful pregnancy following blastocyst vitrification: case report. Hum. Reprod. 15:1802-1803.

(접수: 2012. 1. 2 / 심사: 2012. 1. 4 / 채택: 2012. 1. 15)