

포유류 초기 배아의 동결 시 생존율에 미치는 Ethylene Glycol(EG)의 영향

김 현^{1,2} · 조영무² · 고응규² · 김성우² · 성환후^{2†} · 야마노우치 케이타로^{1†}

¹일본동경대학교 수의과학대학 수의생리학교실, ²농촌진흥청 국립축산과학원 가축유전자원시험장

Effect of Ethylene Glycol (EG) on the Viability of Mammalian Embryo during Cryopreservation

Hyun Kim^{1,2}, Young Moo Cho², Yeoung-Gyu Ko², Sung Woo Kim², Hwan-Hoo Seong^{2†}
and Keitaro Yamanouchi^{1†}

¹Department of Veterinary Physiology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 113-8657, Japan

²Animal Genetic Resources Station, National Institute of Animal Science, RDA, Namwon 590-832, Korea

ABSTRACT

Ethylene glycol (EG) has been successfully used as a cryoprotectant for vitrification of mammalian embryos (including human embryos) due to its low formula weight and high permeation into cells compared with other cryoprotectants, including propylene glycol (PROH). Cryopreservation is able to store the surplus pre-embryos for freezing and furthermore thawing and transfer in a subsequent cycle. This study was carried out to evaluate the effects of embryonic stage, cryoprotectant, and freezing-thawing method on the rates of survival and development of the cryopreserved mouse early embryo and finally to establish the cryopreservation method of surplus embryos obtained during assisted reproductive technology (ART). Female ICR mice (6~8 weeks old) were induced to superovulate by sequential intraperitoneal injection of 5 IU PMSG and 5 IU hCG 48 h apart. Mouse embryos were collected according to its developmental stage after the injection of hCG. Embryos were cryopreserved not only during cryoprotectant step (1~4 step) but also in a variety of media (HTF, IVF medium, D-PBS) and cell stage. The results were as follows : There is no clear advantage in these freezing media of rapid method, but 4 cell and 8 cell of slow method (2, 3 and 4 step) have advantage in D-PBS. The development of embryos according to cell stage become greater in 8 cell stage. In the treatment steps of cryopreservation, the development of embryo to blastocyst was similar among rapid method, but the development of 4 cell and 8 cell embryos to blastocyst according to slow method was better than rapid method.

(Key words : ethylene glycol (EG), cryopreservation, slow and rapid methods)

서 론

체의 수정(IVF)을 위한 과배란 유도제는 많은 수의 난자 채취를 가능하게 하였으며, 많은 전배아의 이식으로 임신 가능성을 증가시켰다. 그러나 많은 전배아 이식은 다태 임신을 야기하며, 또한 이식하고 남은 잉여분의 전배아 보존에 대한 문제가 제기되었는데, 동결 보존의 발달에 의하여 잉여 난자 및 잉여 배아의 처리 문제가 해결되었으며, 모든 IVF 과정에 중

요한 가치를 가지게 되었다. 또한 동결 보존은 이식 전에 발생될 수 있는 모체 축의 불리한 조건을 극복하는데 진전을 이룰 수 있도록 IVF 과정의 유연성을 증가시켰으며, 동결 보존의 사용에 의해 각 과배란 유도 방법들이 난자 회수를 위한 난소의 최적 자극의 발달로 또한 이식과 착상을 위한 자궁의 준비로 발달될 수 있게 하였다. 또한 동결 보존은 난소 자극이나 난자 회수의 반복되는 필요성을 제거하게 하여 보존된 전배아의 이식으로 비용의 경감과 함께 성공이 예견되는 주

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

* This work was carried out with the support from the Agenda Program (No. PJ009418)" Rural Development Administration, Republic of Korea.

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

† Correspondence : seonghh@korea.kr, kim7268@korea.kr

기에서 선택적인 시술이 가능할 수 있게 되었으며, 난소과자 극증후군의 위험이 있는 환자에게 난소 과자극의 억제를 유도할 필요 없이 배아 이식의 지연을 고려할 수 있게 하였다.

동결 보존의 기본 원리는 초기 배아를 비롯하여 세포나 조직, 개체 등의 고유한 형태를 유지하면서 내부의 수분을 고농도의 동결 억제제(cryoprotectant)의 삼투압 원리를 이용하여 점진적으로 제거하고, 이로 인해 얼음 결정(icecrystal)을 최소화하여 세포를 보호하는 것이다(Yoon *et al.*, 2007). 배아 및 세포의 동결 보존은 삼투압, 세포 내외의 얼음 결정 형성 및 동결 보호제의 독성 등에 의해서 다양한 세포의 손상을 일으킬 수가 있다. 저 농도의 동결 보호제를 사용하는 완만 동결법(slow cooling method)은 삼투압과 동결 보호제의 독성에 의한 영향이 적지만, 세포 내의 얼음 결정 형성에 의한 손상이 심각하고(Bryant, 1995), 많은 시간을 요하고, 고가의 동결 기기를 필요로 하는 단점을 가지고 있다. 이러한 완만 동결법의 단점을 보완하기 위해서 개발된 방법이 유리화 동결법(vitrification)이다(Bernard *et al.*, 1996; Rall *et al.*, 1985; 1987). 유리화 동결법은 자동 전산화된 고가의 세포 동결기를 이용하지 않고, 초 급속 동결을 위해 배아 혹은 세포를 동결 보호 용액에 직접 넣은 후, -196°C 의 액체 질소(liquid nitrogen, LN₂)에 곧 바로 침지시키므로 매우 간단하고, 특히 비용이 적게 들며, 세포 내외의 얼음 결정 형성을 막아 난자의 세포질 소상을 방지할 수 있는 장점을 가지고 있다(Hotamisligil *et al.*, 1996; Martino *et al.*, 1996). 그러나 유리화 동결의 특성상 고농도의 동결 보호제가 필요함에 따라 세포 독성과 삼투압으로 인한 세포의 손상이 나타난다는 단점이 있다.

동결 보존 후 초기 배아의 생존율에 있어서 동결 방법만큼이나 중요한 것은 동결 - 용해 과정 중 사용되는 동결 보호제(cryoprotective agents : CPAs)의 종류, 농도 및 처리 시간이다(Friedler *et al.*, 1988; Mandelbaum *et al.*, 1988). 기존에는 독성이 강하고, 점성이 높은 침투성의 동결 보호제로서 dimethyl sulfoxide(DMSO), glycerol 그리고 1,2-propandiol(PROH)를 사용하였다. 그러나 최근에는 Martino 등(1996)은 소 성숙 난자를 ethylene glycol(EG)을 사용하여 높은 배반포율을 보고한 것과 같이 낮은 분자량과 높은 침투 능력(Gilmore *et al.*, 1995) 그리고 비교적 독성이 적은 특징이 있는 ethylene glycol(EG)을 사용하는 빈도가 점차 높아지고 있으며, 비침투성 동결 보호제로는 dextran, raffinose, 난황, 혈청 알부민이 있으나, glucose와 sucrose 등과 같은 monosaccharides disaccharides가 가장 많이 사용하고 있다(Kim *et al.*, 1996; Rayos *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1993). 그러나 동결 보존으로 세포 및 조직이 동결 및 용해의 과정을 거치는 동안에 손상을 받게 된다. 즉, 세포막의 투과성, 표면적과 부피 등 세포에 물리적인 손상을 주게 되며, 또한 동결과 용해의 방법과 처리액에 따라 그

리고 배아의 발생 시기와 배아의 질에 따라 생존율이 영향을 받게 된다. 그러므로 여러 동물 모형을 이용하여 인간 난자와 배아를 동결 보존하는 기초 지식과 기술을 얻고 있는 바 본 연구팀은 생쥐 초기 배아를 각 배양액 별로, 배아의 각 발달 단계 별로, 또한 동결 보호제인 EG를 단계별로 처리하여 동결 보호액으로는 어느 기본 배양액이 적절한지, 그리고 어느 단계의 배아가 동결 보호에 가장 적절한지, 더 나아가 어느 단계의 동결 보호제로 동결할 때에 가장 효과가 있는지를 확인하여 이를 인간 배아의 동결 보존에 이용하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물의 사양 관리

본 연구에 사용된 실험 동물은 일본 도쿄대학교 수의과학 대학 동물실험 윤리위원회의 승인 하에 진행하였으며, 항온 및 항습이 유지되면서 낮 12시간, 밤 12시간이 조절되는 실험 동물 사육실에서 물과 먹이를 자유롭게 섭취시켜 사육한 ICR 계 흰 생쥐를 사용하였다. 암컷은 생후 6~8주령을 사용하였고, 수컷은 12주령의 생식 능력이 확인된 것을 사용하였다.

2. 난자 채취

난포 성장을 촉진시키기 위해 6~8주된 흰 생쥐 암컷에 PMSG(pregnant mare's serum gonadotropin, Sigma) 5 IU를 복강주사하고(제1일), 48시간 후에 hCG(human chorionic gonadotropin, Sigma) 5 IU를 복강주사 하였다(제3일). 후기 2세포기 배아를 얻기 위해 hCG 주사하고, 48~50시간 후에, 4세포기 배아를 얻기 위해 60시간 후에, 8세포기 배아를 얻기 위해 70~72시간 후에 난관을 무균적으로 절취하여 기본 배양액(Ham's F-10)이 든 배양 접시에 옮긴 후 해부 현미경 하에서 30 gauge 주사바늘을 이용하여 양 난관을 씻어내는 방법으로 배아를 채취하였다.

3. 배아 동결 및 용해

채취한 배아들은 0.4% BSA(bovine serum albumin)를 포함한 기본 배양액에서 씻은 후, HTF(human tubal fluid, Irvine Scientific Co.), D-PBS(modified Dulbecco's phosphate-buffered saline), IVF medium(Medicult Co.)에 각각 옮겼다. 또한 이들 배양액에 동결 보호제인 ethylene glycol(EG)을 처리하였다.

1) 급속 처리 방법

1단계 방법으로, 기본 배양액(Ham's F-10)에 담겨있는 배아들을 각 실험군의 배양액(HTF, D-PBS, IVF medium)에 옮겨 평형을 시켰으며(5분), 1.5 M의 EG에 옮겨 8분 정제한 후, 0.1

M sucrose가 첨가된 1.5 M EG에 다시 8분 정제하였다.

2) 저속 처리 방법

단계적으로 서서히 동결 보호제인 EG를 첨가하는 방법으로 점진적인 몰(mol)의 증가가 있으며, 각 단계별로는 5분씩 두었고, 1.5 M의 용액에서만 10분 정제하였다. 2단계는 기본 배양액으로부터 각 실험군의 배양액에 옮겨 평형을 시킨 후, 0.75 M과 1.5 M의 EG에 각기 넣었다. 3단계는 0.5 M, 1.0 M, 1.5 M EG를, 4단계는 0.25 M, 0.5 M, 1.0 M, 1.5 M EG를 거쳐 탈수화를 유도하였다. 위와 같은 단계를 거친 후, 1개의 플라스틱 스트로우(A-201, IMV, France)에 약 5~20개 배아들을 넣어 자동 세포 동결기(KRYO 10-III programmable freezer, Planer, U.K.)에서 동결하였다. -7°C 까지 분(minutes)당 2°C 씩 냉각시키고, -7°C 에서 10분간 정제하였다. 정제 1분 후, 과냉각을 방지하기 위하여 냉각된 핀셋으로 식빙(seeding)하였다. -7°C 에서 -30°C 까지는 분당 0.3°C 씩 냉각하였으며, 냉각된 스트로우는 스트로우 보관 용기에 넣어 -196°C 의 액체 질소 통에 넣어 보관하였다.

3) 배아의 응해

응해는 스토로우를 대기 중으로 옮겨 실온에서 2분간 노출시킨 후, $30\sim 37^{\circ}\text{C}$ 항온 수조에서 3분간 방치하였다. 공기방울이 맺히면, $70\sim 75\%$ 알코올 거즈로 스트로우를 소독한 후, 스트로우 내의 배아와 동결 보호제를 배양 접시에 담아 현미경 하에서 배아를 회수하였다. 급속 처리 방법을 택한 배아의 재수화 과정은 1.0 M의 EG 용액과 0.2 M의 sucrose 용액에서 5분, 0.5 M EG에서 5분, 0.2 M의 sucrose 용액에서 5분 둔 후, 각 배양액에서 5분 재수화하여 배아용 배양액(0.4% BSA가 첨가된 HTF)에서 배양하였다. 저속 처리 방법을 택한 배아의 재수화 과정은 단계적으로 몰(mol)이 감소하는 재수화 용액으로 옮겼다. 재수화 용액에서 5분씩 지난 후, 배아용 배양액에 넣어 배양기 내에서 배양하였다.

4. 배아의 배양

동결 후 응해된 배아들은 Brinster의 paraffin oil drop method 즉, $60 \times 15 \text{ mm}$ 의 1회용 배양 접시에 멸균한 paraffin oil을 넣고, 이 속에 배아용 배양액을 정착시켜 1일간 배양기에서 충분히 평형을 시킨 다음, 이 속에 배아들을 넣어 $5\% \text{ CO}_2$, 100% 습도를 유지하는 배양기(Forma Scientific Co. model 3037)에서 배양하였다. 48~72시간 후, 배반포까지 난할된 정도를 도립 현미경(Olympus, model IMT-2) 하에서 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) procedur를 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 활용하였다.

결 과

1. 동결 보호제 처리 배양액에 따른 배아의 동결 보존 후 발생

1) HTF를 이용한 동결 보호제의 처리

Table 1과 같이 HTF 배양액에 냉동 보호제로 EG를 사용하여 2세포기 배아를 동결 - 응해 후, 포배기까지의 발생율은 1단계(rapid method)에서 35.7% , 2단계(slow method)에서 30.8% , 3단계(slow method)에서 30.0% , 4단계(slow method)에서 35.7% 를 보여 비슷한 양상을 보였다. 4세포기 배아는 1단계에서 43.8% , 2단계에서 38.1% , 3단계에서 30.8% , 4단계에서 38.0% 를 보여 역시 비슷한 발생율을 보였다. 그러나 8세포기 배아는 4단계(58.1%)가 1단계(43.8%)와 2단계(40.9%)에 비해 유의하게 높은 발생율을 보였다.

2) D-PBS를 이용한 동결 보호제의 처리

Table 2와 같이 D-PBS 내에 동결 보호제로 EG를 사용하여 2세포기 배아를 동결 - 응해한 후, 포배기까지의 발생율은 1단계에서 23.8% , 2단계에서 35.0% , 3단계에서 31.6% , 4단계에서 33.3% 를 보여 유의한 차이는 없으나, 1단계에서 발생율이 약간 낮았다. 4세포기 배아를 동결한 후에는 1단계에서

Table 1. The development of frozen-thawed embryos to blastocyst in HIF + EG

| Treatment step | Cell stage | | |
|----------------|-------------|-------------|--------------|
| | 2 cell | 4 cell | 8 cell |
| 1 step | 10/28(35.7) | 7/16(43.8)* | 7/16(43.8)* |
| 2 step | 8/26(30.8) | 8/21(38.1) | 9/22(40.9) |
| 3 step | 6/20(30.0) | 7/25(30.8) | 10/23(43.5) |
| 4 step | 10/22(45.4) | 11/29(38.0) | 18/31(58.1)* |

No. of blastocysts/ No. of embryo cultured(%).

HTF : human tubal fluid.

EG : ethylene glycol.

* $p < 0.001$.

Table 2. The development of frozen-thawed embryos to blastocyst in D-PBS + EG

| Treatment step | Cell stage | | |
|----------------|-------------|--------------|--------------|
| | 2 cell | 4 cell | 8 cell |
| 1 step | 5/21(23.8)* | 9/22(40.9) | 8/20(40.0) |
| 2 step | 7/20(35.0) | 10/17(58.8) | 13/20(65.0) |
| 3 step | 6/19(31.6) | 10/21(47.6) | 19/26(73.1) |
| 4 step | 7/21(33.3) | 14/21(66.7)* | 25/29(86.2)* |

No. of blastocysts/ No. of embryo cultured(%).

D-PBS : Dulbecco's phosphate-buffered saline.

* $p < 0.001$.

40.9%, 2단계에서 58.8%, 3단계에서 47.6%, 4단계에서 66.7%를 보여 2단계와 4단계에서 유의하게 높은 발생율을 보였다. 8세포기 배아를 동결한 후 포배기까지의 발생율은 1단계에서 40.0%, 2단계에서 65.0%, 3단계에서 73.1%, 4단계에서 86.2%로 2, 3, 4단계에서 발생율이 유의하게 높았다.

3) IVF medium을 이용한 동결 보호제의 처리

Table 3과 같이 IVF medium에 동결 보호제로 EG를 사용하여 2세포기 배아를 동결 보존한 후 포배기까지의 발생율은 유의한 차이는 없으나, 1단계(23.8%)가 가장 낮은 발생율을 보였다. 4세포기 배아는 유의한 차이는 없으나, 4단계(47.6%)에서 발생율이 높았으며, 8세포기 배아는 4단계(60.9%)가 가장 유의하게 높았다.

고 찰

Table 3. The development of frozen-thawed embryos to blastocyst in IVF medium + EG

| Treatment step | Cell stage | | |
|----------------|-------------|-------------|--------------|
| | 2 cell | 4 cell | 8 cell |
| 1 step | 5/17(29.4)* | 7/19(36.8) | 7/18(38.9) |
| 2 step | 5/15(33.3) | 8/20(40.0) | 9/20(45.0) |
| 3 step | 7/23(30.4) | 8/23(34.8) | 12/22(54.5) |
| 4 step | 11/26(42.3) | 10/21(47.6) | 14/23(60.9)* |

No. of blastocysts/ No. of embryo cultured(%).

* $p < 0.001$.

인간 배아의 냉동 보존에서 냉동과 해빙 후 보고된 생존율은 6~80%의 범위이다. 인간 배아는 다양한 배양액내에서 냉동되어 왔다. 즉, 15% 인간 혈청과 Earle's 배양액, HEPES buffer T6와 HTF 배양액, 10% 소태아 혈청(fetal bovine serum)과 D-PBS, 20% 인간제대 혈청과 phosphate - buffered saline 등에서 냉동되었다. 냉동과 해빙의 방법도 급속 동결과 해빙, 저속 동결과 해빙 등 다양한 방법이 시도되고 있다. 또한 서로 다른 동결 보호제들이 사용되어 8~10% glycerol, 1.5 M DMSO, 1.5 M 1,2 PROH가 사용되었고, 그 중에서 확산된 포배기(expanded blastocysts)의 생존율은 1.5 M DMSO에서 보다 glycerol의 첨가에서 높게 보고되었다. DMSO는 난할 단계의 배아를 냉동하기 위한 선택적인 동결 보호제로써 유전적인 손상을 유도하지 않는다고 알려져 왔으나, 유전자 분화(gene differentiation) 과정에서 세포 융합(cell fusion)을 유도하는데 있어서는 DMSO의 사용에 신중을 요구한다. 더욱이 1.5 M 1,2 EG 및 PROH는 난할 단계 배아에서 높은 생존율을 발현하는 것으로 보고되어 왔으며, 인간과 동물의 투명대의 붕괴를 최소화하는 것으로 보고되어 왔다. DMSO가 초기 연구에는 가장 널리 사용된 동결 보호제였으나, PROH는 독성이 감소되기 때문에 냉동에 그 이용이 증가되고 있다. 또한 세포 냉동기에서는 냉동하는 최저 온도가 -35°C 일 때 다단계에서 더 높게 발달하였고, -110°C 일 때에는 1단계에서 더 높은 난자 발달율을 보였다. 배아들은 발달의 모든 시기에 냉동되어질 수 있으나, 냉동 저항의 항진과 높은 임신율은 확산된 포배기를 냉동함으로써 얻어질 수 있다. 그러나 장기간에 걸친 배양 시간으로 배아의 소실이 증가되어 적은 수의 포배기 만을 냉동할 수 있게 된다. 잠재 가능성이 있는 난할 단계의 배아(1, 2, 4 그리고 8세포기)는 중간 난할 단계(3, 5, 6세포기) 배아들보다도 생존율이 더 좋다. 이것은 간기 할구(interphase blastomeres)에 냉동 저항이 증가하기 때문인지도 모른다. 어느 시기의 배아를 사용하여, 어느 종류의 동결액과 동결 방법으로 냉동할 때에 좋은 생존율을 가질 수 있는지에 대해서는 논란이 많으며, 냉동 보존에 대한 체계가 아직 확립되지 않아 이에 대한 많은 연구들이 진행되어지고 있다.

본 실험에서는 동결 보호제 처리 배양액에 따른 배아의 냉동 보존 후 발생율에서 HTF에 동결 보호제를 처리한 실험은 2세포기, 4세포기에서는 비슷한 발생율을 보였으며, 8세포기만이 높은 발생율을 보였다. D-PBS에서 2세포기 배아는 각 단계에서 비슷한 발생율을 보였고, 4세포기 배아는 2단계와 4단계에서 높은 발생율을 보였으며, 또한 8세포기 배아는 2, 3, 4단계에서 높은 발생율을 보였다. 또한 IVF medium에서는 2세포기의 각 단계별로 비슷한 발생율을 보였고, 4세포기, 8세포기는 4단계에서 발생율이 높았다. 이것은 배아를 냉동 보호하기 위한 각 배양액 즉 modified phosphate buffered saline (D-

PBS)과 phosphate(-), glucose(-), NaHCO₃(+)인 HTF medium 과 phosphate(+), glucose(+), NaHCO₃(+)인 IVF medium 사이의 buffer system 차이에 기인될 수 있는 것으로 추측되어진다. 또한 본 실험은 배아의 발생시기 별로 냉동보존을 비교 조사하였으며, HTF에서는 1, 2, 3단계에서 비슷한 발생율을 보였고, 4단계에서는 8세포기가 2세포기와 4세포기 배아에서보다 높은 발생율을 보였다. D-PBS에서는 1단계의 4세포기와 8세포기 발생율이 높았고, 2단계에서도 4세포기와 8세포기 발생율이 높았으며, 3단계에서는 8세포기가, 4단계에서는 4세포기와 8세포기에서 발생율이 높았다. 또한 IVF medium에서는 1단계, 2단계에서 각 세포기 사이에 비슷한 발생율을 보였고, 3단계와 4단계에서만 8세포기에서 발생율이 높았다. 이렇게 각 단계에 따라 8세포기가 발생율이 비교적 높은 것은 8세포기가 비교적 안정기에 접어든 세포기임을 나타내는 것이기 때문인 것으로 추측되었다. 이로 보아 급속단계가 시간과 냉동보호제의 절약면에서 우수하지만, 저속단계가 비교적 발생율이 좋은 것으로 나타났다. 차후에 배아의 발생 시기에 따른 냉동 보존 후의 발생률에 관해서 HTF, D-PBS, IVF medium 를 각각 사용해서 비교 검토 등이 추가 진행되어야 한다. 아직까지 동결 보존제의 독성에 대해 많은 부분이 밝혀지지 않고 있으므로, 동결 보존제의 독성을 알아보는 연구가 수반되어야 할 것으로 사료된다. 특히, 생식(germ)세포에 대한 성장과 발달에 있어서 저해 효과를 최소화 할 수 있도록 분자 수준에서의 비치사성 동결 보호제 손상을 밝힐 필요가 있다고 사료된다. 또한 동결 보존제의 알려지지 않은 독성을 감소시키기 위해서 가능하면 동결 보호제에 노출되는 시간을 최소화하는 것이 중요하다고 사료된다.

요 약

생쥐 2세포기, 4세포기, 8세포기를 각 발생 단계에서 채취하여 동결 보호제를 첨가한 서로 다른 배양액에서 배양하고, 배아의 동결 보존 및 융해 시 급속 처리와 저속 처리 단계로 비교하여 이들 조건이 배아의 생존과 발현에 미치는 영향을 조사하여 다음의 결과를 얻었다. 동결 보호제로 처리하여 배양액을 달리한 경우, 급속 단계에서는 모든 배양액에서 비슷한 발생율을 보였고, 저속단계의 4세포기와 8세포기는 D-PBS에서 높은 발생율을 보였다($P<0.05$, $P<0.01$).

배아의 발생 시기에 따른 동결 보존 후, 발생율은 2, 4, 8세포기로 넘어갈수록 발생율의 증가를 보여 8세포기에서 발생율이 가장 높았다($P<0.01$). 동결 보호제의 처리단계에 따른 발생율은 2세포기의 급속 단계에서는 유사하였으나, 4세포기와 8세포기는 저속단계에서 높은 발생율을 보였으며($P<0.05$), 특히 8세포기에서 가장 높았다($P<0.01$).

(중심 단어 : 에틸렌글리콜, 동결 보존, 완만 동결, 급속 동결)

참 고 문 헌

- Bernard A and Fuller BJ. 1996. Cryopreservation of human oocytes: a review of current problems and perspectives. Hum. Reprod. Update. 2:193-207.
- Bryant G. 1995. DSC measurement of cell suspensions during successive freezing runs: implications for the mechanisms of intracellular ice formation. Cryobiology, 32:114-128.
- 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.
- Hotamisligil S, Toner M and Powers RD. 1996. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. Biol. Reprod. 55:161-168.
- 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.
- 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.
- Martino AN, Songsasen and Leibo SP. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultrarapid cooling. Biol. Reprod. 54:1059-1069.
- Rall WF and Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. Nature 313:573-575.
- Rall WF. 1987. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. Cryobiology 24:387-402.
- 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.
- 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.
- 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 September 16, 2014, Revised September 18, 2014,
Accepted September 26, 2014