

생쥐 전핵기 배아 냉동보존에서 완만동결과 유리화동결의 비교

전남대학교 의과대학 산부인과학교실

김 미 영 · 이 여 일

Comparison of Vitrification and Slow Freezing for the Cryopreservation of Mouse Pronuclear Stage Embryos

Mi-Young Kim, Yu-Il Lee

Department of Obstetrics and Gynecology, Chonnam National University Medical School, Gwangju, Korea

Objective: The aim of this study was to compare the efficacy of slow freezing with vitrification method for cryopreservation of mouse pronuclear stage embryos.

Methods: Mouse pronuclear embryos obtained from superovulated mice and classified into 2 groups of slow freezing and vitrification. Slow freezing solution consisted of 1.5 M PROH, 0.1 M sucrose, while vitrification solution consisted of 40% ethylene glycol, 18% Ficoll and 0.5 M sucrose diluted in Dulbecco's phosphate-buffered saline supplemented with 10% SSS. Recovery and survival rates after thawing and development rates to hatching blastocyst stage were compared between two groups.

Results: After freezing and thawing, recovery rate of slow freezing group was 93.8%, whereas vitrification group was 66.5% ($p < 0.01$). Survival rate of recovered embryos were similar between two groups as 83.2% in slow freezing and 87.6% in vitrification. Embryo development rates to 2-cell stage after 24 hrs (77.0% vs 59.1%), 4-cell after 48 hrs (72.6% vs 53.3%), blastocyst after 96 hrs (53.1% vs 40.1%) of thawing were significantly higher in vitrification group than those of slow freezing group, respectively.

Conclusion: The vitrification method may provide better developmental competence of frozen-thawed embryos than that of slow freezing method for cryopreservation of mouse pronuclear stage embryos. [Korean. J. Reprod. Med. 2007; 34(2): 117-124.]

Key Words: Mouse pronuclear embryo, Vitrification, Slow freezing, Embryo development, Blastocyst

근래에 발전된 보조생식술과 관련된 기술은 불임 환자들에게 효과적으로 이용되고 있다. 그 중 보조생식술에서 효과적인 과배란유도 방법으로 많은 수의 난자와 양질의 배아를 얻을 수 있게 되어, 과다한 수의 배아이식으로 인해 다태아임신율이 높게 나타나고,¹ 누적되는 잉여 배아를 효과적으로

동결보존할 수 있는 방법의 개발이 요구되고 있다. 따라서 잉여의 배아를 적절한 시기에 동결보존한 후 필요한 시기에 용해하여 배아의 발달능력을 확인하고 임신을 유도하기 위한 연구들이 진행되어 왔고,²⁻⁵ 현재 배아의 동결보존술은 환자로 하여금 고통스럽고 번거로운 과배란유도 및 난자채취 시술횟수를 줄여주는 동시에 누적임신율의 향상에도 크게 기여하고 있다.^{6,7}

동결보존 및 용해과정에서 배아는 동결용액에 노출되고 액화질소에서 얼려 저장되며 용해과정

주관책임자: 이여일, 우) 501-757 광주광역시 동구 학1동 8번지,

전남대병원 산부인과학교실

Tel: (062) 220-6371, Fax: (062) 227-1637

e-mail: leeyi@chonnam.ac.kr

*이 논문은 전남대학교 병원 임상연구소 학술연구비 (CUHRICM-U-200530)에 의해 연구되었음.

동안에 다양한 형태의 손상을 받을 수 있다. 첫째는 동결-융해과정에서 세포 내·외의 얼음결정형성에 의한 손상이다. 이를 방지하기 위해서 동결보호제의 첨가가 일반 체세포에 비해 그 크기가 큰 포유동물의 배아를 위해 필수적이다. 그러나 이 동결보호제는 자체의 화학적 독성을 가지고 있으며, 침투성 동결보호제의 제거과정에서 삼투압의 변화에 따른 위해를 가져올 수 있다. 따라서 성공적인 동결을 위해서는 이러한 위해 요소들을 최소화시켜야 한다.⁸ 배아의 동결을 위해 가장 보편적으로 사용되고 있는 방법은 완만동결법이다. 이는 낮은 농도의 동결보호제가 첨가된 동결액을 사용하기 때문에 삼투압과 동결보호제의 독성에 의한 영향은 적지만 세포내의 얼음결정형성에 의한 손상이 심각하고 많은 시간을 소요되며 고가의 동결기기를 필요로 하는 단점을 가지고 있다. 이러한 완만동결법을 보완하기 위해 개발된 방법이 1985년 Rall과 Fahy⁹에 의해 그 효용성이 입증된 유리화동결법이다. 이 유리화동결법은 고가의 동결기기를 이용하지 않고 급속 냉동을 위해 배아를 고농도의 동결보호제가 첨가된 동결액에 직접 넣은 후 액화질소에 바로 침지시키므로 매우 단순하고 비용이 적게 들며 세포 내·외의 얼음결정형성을 최소화시킬 수 있는 장점을 가지고 있다. 그러나, 고농도의 동결보호제를 사용해야 하므로 동결보호제의 독성에 의한 영향을 고려하지 않을 수 없다. 유리화동결과정에 배아는 높은 농도의 침투성/비침투성 동결보호제가 첨가된 동결액에서 동결되며 융해하는 동안에 동결보호제는 단계적인 재수화를 통해 제거된다. 이때 동결보호제의 독성이나 융해과정에서의 삼투압의 변화로 인해 배아의 세포골격 구조에 손상을 야기할 수 있다.¹⁰

이러한 장·단점을 가지고 있는 두 가지 동결방법은 동결 시 배아의 성장시기에 따른 유용성에 대한 이견이 있으며, 배아의 성장시기에 따라 다양한 생존율과 발달률이 보고되고 있고,¹¹ 일반적으로 동결보존에는 전핵시기의 배아가 가장 적합하다고 주장되고 있다.^{12,13} 이 시기는 단일세포인 점과 방

추사의 결여로 동결 및 융해 후 높은 생존율과 착상률을 얻을 수 있고,¹⁴⁻¹⁶ 융해 후 생존 시 배아의 분열이 필수적으로 진행되므로 융해 후 배아의 생존여부를 보다 정확히 확인할 수 있다. 그러나, 전핵시기는 전핵의 이동 및 융합 등 세포가 불안정한 시기이며 세포질 내 세포골격의 재배열이 왕성하게 일어나는 것으로 알려져 있다.^{17,18} 유럽에서는 전핵시기 배아 이후의 난할단계의 배아를 냉동하는 것이 윤리에 어긋남으로 인간의 전핵시기 배아의 냉동방법이 선호되고 있다.

인간 전핵시기 배아의 완만동결법을 이용한 동결이 현재 가장 광범위하게 사용되고 있다.¹⁹ 그러나, 최근에는 전핵시기 배아에서 유리화동결법의 효용성이 보고되고 있다.^{20,21} 따라서, 본 연구에서는 인간 전핵시기 배아의 동결 시에 효과적인 방법을 확립하기 위해 생쥐 전핵시기 배아를 이용하여 PROH 동결보호제와 straw를 이용한 완만동결법과 EFS40 동결보호제와 EM grid를 이용한 유리화동결법을 시행하여 동결-융해 후 생존율 및 배아발달률을 비교하여 각각의 동결법의 효용성을 알아보고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 실험동물과 배양액의 준비

본 실험에서는 명 10시간과 암 14시간으로 광주기를 조절하고, 물과 먹이가 충분히 공급되는 상태에서 사육한 생쥐 제 1세대 잡종 B6CBAF1 (C57BL/CBA)의 5~6주령의 암컷과 10~13주령의 생식능력이 확인된 동종의 수컷 생쥐를 사용하였다. 난포의 성장을 촉진하기 위해서는 pregnant mares' serum gonadotropin (PMSG; Sigma, USA) 5 IU를 복강내에 주사하고, 48시간 후에 5 IU human chorionic gonadotropin (hCG; Sigma, USA)를 주입하여 과배란을 유도하였다. HCG 주사 후 즉시 수컷과 1:1로 합사시켜 교미를 유도하였으며, 다음날 질전이 확인된 개체만을 실험에 사용하였다. 생쥐 배아의 체외배양에는 직접 제조한 Human Tubal Fluid (HTF) 배양액

을 사용하였으며, 삼투압은 280 mOsm/kg으로 조절하였고, 4°C에 냉장보관하고 4주 이내에 사용하였다.

2. 생쥐 전핵시기 배아의 획득

HCG 주사 후 18~22시간에 난관팽대부로부터 난구세포에 싸여있는 전핵시기 수정란을 회수하였다. 회수된 수정란을 67 IU/ml 농도의 hyaluronidase (Sigma, USA)로 처리하여 난구세포를 제거하고 DPBS 용액에서 두 번 세척하였다. 그 후 37°C, 5% CO₂의 조건으로 조절된 배양기에서 10% Serum Substitute Supplement (SSS; Irvine Scientific, USA)가 첨가된 HTF 배양액에 넣어 약 1시간 동안 배양한 후 정상적인 형태의 두 개의 전핵이 관찰되는 수정란만을 실험에 사용하였다. 회수된 배아를 유리화 동결균과 완만동결균으로 나누어 동결하였고 사용된 배아의 수는 평균 15개였고 동결실험은 각각 12회에 걸쳐 시행하였다.

3. 완만동결균의 동결 및 융해

완만동결액으로는 10% SSS가 함유된 DPBS를 기본용액으로 1.5 M PROH (Sigma, USA)가 첨가된 용액에서 10분간, 1.5 M PROH에 0.1 M sucrose가 함유된 용액에서 10분간 노출시켜 탈수한 뒤 0.25 ml plastic straw에 12~17개씩 배아를 넣어 자동세포 동결기 (Kryo 10-III Programmable freezer, Planer Biomed, UK)에서 동결하였다. -7°C까지는 분당 2°C씩 냉각시키고 -7°C에서 10분간 정지시키고 1분 후 과냉각을 방지하기 위하여 액체질소에서 냉각된 핀셋으로 식빙하였다. -7°C에서 -30°C까지는 분당 0.3°C씩 냉각하였으며 동결된 straw는 straw 보관용기에 넣어 -196°C의 액체질소 통에 침지하여 보관하였다.

하루 이상 액체질소 안에 보관되어 있던 배아의 융해는 동결된 straw를 액체질소 통에서 대기중으로 옮겨 20초간 노출시킨 후 straw 표면의 물기를 제거한 다음 알코올을 묻힌 거즈로 닦아 소독하였다. Straw내의 배아와 동결보존액을 배양접시에 흘려내고 해부현미경하에서 배아의 수를 확인하였다.

기본용액으로는 10% SSS가 첨가된 DPBS를 사용하였으며, 첫 단계에서는 1.0 M PROH와 0.2 M sucrose가 함유된 용액에서 5분간, 두 번째 단계에서는 0.5 M PROH와 0.2 M sucrose 용액에서 5분간, 세 번째 단계에서는 0.2 M sucrose 용액에서 5분간, 마지막 단계에서는 기본용액에서 5분간 처리하였다. 배아는 하루 전에 배양기에서 평형시킨 10% SSS가 함유된 HTF 배양액으로 수회 세척한 후 37°C, 5% CO₂의 조건하에서 배양하였다.

4. 유리화동결균의 동결 및 융해

유리화동결은 10% SSS를 첨가한 DPBS를 기본용액으로 하고 여기에서 5분간 평형을 유지한 다음, 20% ethylene glycol (Sigma, USA)이 첨가된 용액에 옮겨서 1분 30초 동안 배아를 전처리하였다. 이후 40% ethylene glycol, 18% Ficoll (Sigma, USA), 0.5 M sucrose가 혼합된 EFS40 동결용액에 옮긴 후 바로 electron microscopy (EM) grid (1GC 400; Pelco International, USA)에 적재하고 가능한 빨리 액체질소에 침지하였으며 40초가 넘지 않도록 신속히 수행하였다.

하루 이상 액체질소 안에 보관되어 있던 배아를 꺼낸 뒤 즉시 0.5 M sucrose가 첨가된 용액으로 옮기고 EM grid 위의 배아를 0.4 M sucrose가 첨가된 기본용액으로 옮겨 1분 30초 동안 처리하였다. 그 후 0.3 M, 0.2 M, 0.1 M, 0 M의 sucrose가 첨가된 기본용액에 단계별로 옮겨주고, 각 단계는 1분 30초씩 처리하였다. 융해가 끝난 배아는 완만동결균과 동일한 조건에서 배양하였다.

5. 융해 후 배아의 회수율, 생존율 및 성장률의 판정

융해한 전핵시기 배아의 회수율과 생존율은 동결 배아에 대한 백분율로 계산하였고, 융해 후 144시간 동안 24시간 단위로 배아의 성장률 및 부화율을 관찰하였으며, 성장률 및 부화율은 회수된 배아에 대한 백분율로 평가하였다. 융해 후 200배의 독립현미경으로 관찰 시, 세포질에 응집된 현상이 나

타나지 않고 깨끗하며, 위란강이 비정상적으로 넓어지지 않고, 투명대가 밝고 온전한 형태의 배아를 생존한 것으로 판정하였다.

6. 통계처리

실험을 통해 얻은 모든 결과들은 SPSS 프로그램을 이용한 χ^2 -test를 시행하여 통계적 유의성을 조사하였고, p값이 0.05 미만인 경우를 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 완만동결법과 유리화동결법의 동결-융해 후 회수율과 생존율 (Figure 1)

1.5 M PROH를 기본으로한 완만동결법과 40%의 ethylene glycol을 기본으로 한 EFS40 용액을 이용한 유리화동결법을 이용하여 생쥐 전핵시기 배아를 동결 및 융해 후 그 회수율과 생존율을 비교해본 결과, 회수율은 완만동결군이 동결된 147개의 배아 중 137개 배아를 회수하여 93.1%이었고 유리화동결군은 동결된 169개의 배아 중 113개의 배아를 회수하여 66.9%로 완만동결군이 유리화동결군에 비해 유의하게 높은 회수율을 보였으며 ($p < 0.001$), 회수 배아의 생존율은 완만동결군이 회수된 137개의 배아 중 114개 배아의 생존으로 83.2%이고 유리화동결군은 회수된 113개 배아 중 99개의 배아가 생존하여 87.6%로 유리화동결군이 약간 높

았으나 두 군간에 유의한 차이는 없었다.

2. 완만동결법과 유리화동결법의 동결-융해 후 배아성장률 (Table 1)

동결-융해 후 생존된 배아를 매 24시간 단위로 그 성장률을 살펴본 결과, 융해 후 24시간 배양 시 2-세포기까지의 성장률은 완만동결군이 59.1% (81/137)이었고 유리화동결군이 77.0% (87/113)로 두 군간에 유의한 차이를 보였으며 ($p < 0.003$), 48시간 동안의 배양에서도 완만동결군이 53.3% (73/137)이고 유리화동결군이 72.6% (82/113)로 유의하게 유리화동결군에서 높은 4-세포기까지의 성장률을 보였으

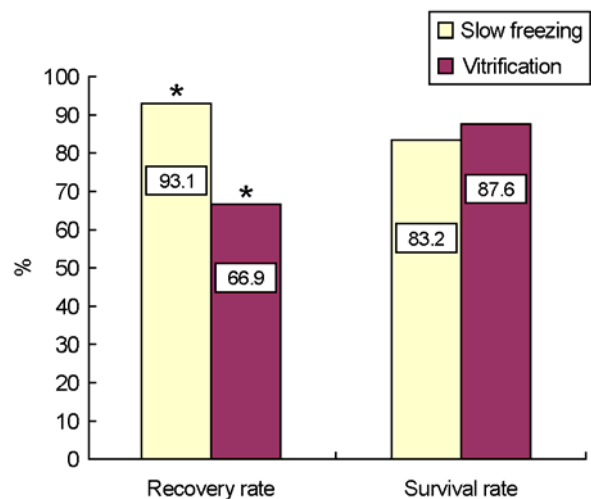


Figure 1. Recovery and survival rates of frozen-thawed mouse pronuclear stage embryos by slow freezing and vitrification method (*: $p < 0.001$).

Table 1. Development rates of frozen-thawed mouse pronucleus stage embryos by slow freezing and vitrification method

	Slow freezing n=137	Vitrification n=113	P-value
No. of 2-cell stage embryos at 24 hrs (%)	81 (59.1)	87 (77.0)	0.003
No. of 4-cell stage embryos at 48 hrs (%)	73 (53.3)	82 (72.6)	0.003
No. of morula stage embryos at 72 hrs (%)	64 (46.7)	76 (67.3)	0.001
No. of blastocysts at 96 hrs (%)	55 (40.1)	60 (53.1)	NS
No. of hatching-hatched embryos at 144 hrs (%)	36 (26.3)	49 (43.4)	0.005

NS: non-significant

며 ($p < 0.003$), 72시간 배양하였을 때의 상실배로의 성장률 역시 완만동결군이 46.7% (64/137)이고 유리화동결군이 67.3% (76/113)로 유리화동결군에서 유의하게 높은 성장률을 보였다 ($p < 0.001$).

융해 후 배양 96시간째 포배기 배아로의 성장률은 완만동결군이 40.1% (55/137)이었고 유리화동결군이 53.1% (60/113)로 유리화동결군에서 다소 높은 성장률을 보였으나 유의한 차이는 없었다. 마지막으로, 144시간 배양시 부화포배기로의 성장률은 완만동결군이 26.3% (36/137)이고 유리화동결군이 43.4% (49/113)로 유리화동결군에서 유의하게 높은 성장률을 보였다 ($p < 0.005$).

고 찰

1972년 Whittingham²에 의해 생쥐 배아의 완만동결법에 의한 동결보존 실험 이후 지금까지 동결 및 융해 후의 생존율 향상과 다양한 종의 적용 등 많은 연구가 진행되어 왔다. 그 결과로 생쥐, 토끼, 양 등의 배아 동결보존이 가능하게 되었으며, 인간에서도 동결보존된 배아를 이용한 성공적인 임신과 출산이 보고되었다.^{14,22} 완만동결법은 배아 및 세포내의 탈수를 유도한 다음, 천천히 냉각시켜 일정온도에 도달한 후 세포질 내에 얼음결정이 형성되지 않도록 외부에 식빙을 하고 일정온도에 도달하면 보존을 하는 방법으로, 융해 역시 일정한 온도의 조건에서부터 융해를 시작한다. 하지만 매우 복잡한 단계를 거치는 동결과 융해과정 동안 세포 및 배아가 손상될 가능성이 매우 높다. 즉, 세포내의 얼음결정형성, 용액 자체의 독성과 세포의 삼투압 변화 등 동결 시 세포에 손상을 주는 요인들이 많으며, 얼음결정에 의해 세포가 물리적으로 직접 손상될 수도 있다.²³ 유리화동결은 세포가 동결되는 동안 동결용액의 점성을 점차 증가시켜 세포 내·외의 얼음결정형성을 방지하는 동결법이다. 그러나 유리화동결용액은 낮은 온도에서 과냉각되기 때문에 융동과정 시 얼음결정화가 일어나 세포에 손상을 줄 수 있다. 따라서, 융해되는 동안 결정화가

일어나지 않도록 투과력이 높은 고농도의 동결보호제를 사용하여야 한다.²⁴ 일반적으로 완만동결은 1.5 M에서 2 M 정도의 저농도의 동결보호제를 사용하지만 유리화동결에서는 3.5 M 이상에서 약 7.5 M까지의 고농도의 동결보호제를 사용한다. 동결보호제로는 오랫동안 DMSO, PROH, glycerol을 주로 사용하였으나, 최근에는 가장 독성이 약한 것으로 알려진 ethylene glycol을 많이 사용하고 있다.²⁵

본 연구에서는 배아 동결보존술에서 가장 보편적으로 사용되고 있는 완만동결법과 새롭게 기대되고 있는 유리화동결법을 비교하여 생쥐 전핵시기 배아의 동결보존을 위해 어느 방법이 최적의 동결방법인지 알고자 시도되었다. 먼저 완만동결과 유리화동결 후 융해한 전핵기 배아의 회수율에서는 완만동결군이 93.1%로 66.9%의 유리화동결군에 비해 유의하게 높은 회수율을 보였지만, 회수 후의 생존율에서는 유리화동결군이 유의하지는 않지만 약간 더 높은 생존율을 나타내는 경향이였다. 유리화동결법에서는 EM grid와 그 위의 배아가 외부에 직접적으로 노출되어 있어 배아의 손실률이 높은 것으로 생각되며, 이를 개선하기 위한 노력이 필요할 것으로 생각된다. 그러나 회수된 배아의 생존율이 유리화동결군에서 다소 높은 원인으로는 완만동결 시 사용된 straw는 0.25 ml로 동결 시 많은 양의 동결보존액을 포함하여 열전도율이 낮은 반면, 유리화동결 시 사용된 EM grid는 열전도율이 높고 동결 시 배아와의 직접적인 접촉으로 최소화한 동결보존액 처리에 시간에 따른 독성 감소 효과에서 기인한 것으로 사료된다. 1990년 Kasai 등²⁷은 실온에서 40% ethylene glycol, 30% Ficoll, 20% sucrose (EFS40)를 혼합하여 straw를 이용한 생쥐 상실배 배아의 유리화동결에서 융해 후 98%의 생존율과 51%의 출산율을 보고하였다. 그 이후 EFS40을 이용하여 생쥐,²⁸⁻³⁰ 소,³¹ 토끼 등에서 유리화동결법에 대한 많은 연구가 이루어졌다. 또한 1996년 Martino 등³¹은 5.5 M과 4.0 M의 ethylene glycol에 1.0 M과 0.5 M sucrose가 혼합된 용액을 동결보존액으로 사용하여 소의 성숙난자를 35°C에서 20초

동안 노출 후 동결을 시행하였으며, 보관용기로는 straw와 EM grid를 사용하였다. 이때 동결-융해 후 생존율은 straw가 34%, EM grid가 51~72%로 나타나 EM grid에서 높은 생존율을 보고하였다. 본 논문에서도 straw를 사용한 완만동결법보다 EM grid를 사용한 유리화동결법이 회수율은 낮았지만 더 높은 생존율을 보였다.

융해 후 매 24시간마다 144시간 동안 배아의 성장률을 비교 관찰한 결과에서도 2-세포기, 4-세포기, 상실배기, 부화 포배기로의 성장률 모두 유리화동결군에서 유의하게 높게 나타났으며, 포배기에서도 유의하지는 않지만 유리화동결군에서 더 높은 성장률을 관찰하였다. 이는 완만동결 시 우려되는 세포 내·외의 얼음결정형성에 따른 손상이 배아의 발달에 유해한 영향을 준 것으로 사료된다. 또한, 배아 동결보존 후 융해 시 동결보호제의 제거를 위해 재수화과정을 거치는데, 완만동결 후 융해 시는 1.0 M에서부터 0.5 M과 0.2 M sucrose의 3단계 재수화과정을 거치는 반면, 유리화동결 후 융해과정에서는 0.5 M로부터 0.4 M, 0.3 M, 0.2 M, 0.1 M의 5단계 재수화과정을 통해 보다 효과적으로 동결보호제를 제거하였다. 2004년 Isachenko 등³²은 3단계과정의 재수화보다 4단계의 재수화과정으로 동결보호제를 제거하는 것이 배아의 삼투압 변화에 따른 손상을 줄이는데 효과적이라고 하였다. 따라서, 완만동결군은 융해과정에서의 3단계 재수화과정의 삼투압 변화가 배아의 발달 양상에 좋지 않은 영향을 준 것으로 보인다.

본 연구에서는 인간 전핵시기 배아의 동결에 최적의 동결방법을 적용하기 위해 생쥐 전핵시기 배아를 이용하여 완만동결법과 유리화동결법의 효용성을 비교하였다. 그 결과 ethylene glycol을 기본 동결보존액으로 사용한 유리화동결법은 완만동결법 보다 시간이 단축되고 비싼 장비가 필요 없어 경제적이고 간단했을 뿐 아니라 동결-융해 후 전반적으로 높은 생존율과 성장률을 나타내었다. 특히 EM grid의 이용은 straw보다 조작성이 간단하면서도 효과적이었다. 그러나 향후 인간 전핵시기 배아

에 대한 동결보존에 대한 후속 연구와 유리화동결법에서 보다 높은 회수율 획득을 위하여 동결 시 사용하는 보관용기에 대한 지속적인 개발과 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Kerin JF, Wames GM, Quinn PJ, Jeffery R, Kirby C, Matthews CD, et al. Incidence of multiple pregnancy after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Lancet* 1983; 2: 537-40.
2. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -296°C. *Science* 1972; 178: 411-4.
3. Rall WF, Polge C. Effect of warming rate on mouse embryos frozen and thawed in glycerol. *J Reprod Fertil* 1984; 70: 285-92.
4. Rall WF, Reid DS, Polge C. Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physicochemical methods. *Cryobiology* 1984; 21: 106-21.
5. Leibo SP. *Cryobiology: Preservation of mammalian embryos*. Basic Life Sci 1986; 37: 251-72.
6. Kahn JA, von Düring V, Sunde A, Sordal T, Molne K. The efficacy and efficiency of an in-vitro fertilization programme including embryo cryopreservation: a cohort study. *Hum Reprod* 1993; 8: 247-52.
7. Van Voorhis BJ, Syrop CH, Allen BD, Sparks AE, Stovall DW. The efficacy and cost effectiveness of embryo cryopreservation compared with other assisted reproductive techniques. *Fertil Steril* 1995; 64: 647-50.
8. Kasai M, Ito K, Edashige K. Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocysts as a tool to identify the type of cryoinjury. *Hum Reprod* 2002; 17: 1863-74.
9. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 1985; 313: 573-5.
10. Pickering SJ, Braude PR, Johnson M, Cant A, Currie J. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil Steril* 1990; 54: 102-8.
11. Mandelbaum J, Belaisch-Allart J, Junka 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 oocyte. *Hum Reprod* 1998; Suppl 13: 161-74.

12. Damaro MA, Hammit DG, Galantis TM, Session DR, Dumesic DA. Pronuclear stage cryopreservation after intracytoplasmic sperm injection and conventional IVF: implications for timing of the freeze. *Fertil Steril* 1999; 72: 1049-54.
13. Veeck LL, Amundson CH, Brothman LJ, DeScisciolo C, Maloney MK, Muasher SJ, et al. Significantly enhanced pregnancy rates per cycle through cryopreservation and thaw of pronuclear stage oocytes. *Fertil Steril* 1993; 59: 1202-7.
14. Cohen J, DeVane GW, Elsner CW, Fehilly CB, Kort HI, Massey JB, et al. Cryopreservation of zygotes and early cleaved human embryos. *Fertil Steril* 1988; 49: 283-9.
15. Fugger EF, Bustillo M, Katz LP, Dorfman AD, Bender SD, Schulman JD. Embryonic development and pregnancy from fresh and cryopreservation sibling pronucleate human zygotes. *Fertil Steril* 1988; 50: 273-8.
16. Testart J, Lassalle B, Belaisch-Allart J, Hazoult A, Forman R, Rainorn JD, et al. High pregnancy rate after early human embryo freezing. *Fertil Steril* 1986; 46: 268-72.
17. Schatten G, Simerly C, Schatten H. Microtubule configurations during fertilization, mitosis, and early development in the mouse and the requirement for egg microtubule-mediated motility during mammalian fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 4152-6.
18. Wright G, Wiker S, Elsner C, Kort H, Massey J, Mitchell D, et al. Observations on the morphology of pronuclei and nucleoli in human zygote and implications for cryopreservation. *Hum Reprod* 1990; 5: 109-15.
19. Bafrani HH, Salsabili N, Pasbakhsh P, Hassani H, Movahedin M, Al-tarihi T, et al. Comparison of 1,2-propanediol and ethylene glycol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygote and their subsequent development. *J Assist Reprod Genet* 2003; 20: 234-40.
20. Isachenko V. Modified vitrification of human pronuclear oocyte: efficacy and effect on ultrastructure. *Reprod Biomed Online* 2003; 7: 211-6.
21. Kim EY, Yi BK, Nam HK, Lee KS, Yoon SH, Park SP, et al. Cryopreservation of human multi-pronuclear (PN) zygote by ultra-rapid freezing. *Kor J Fertil Steril* 1998; 25: 129-40.
22. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983; 305: 707-9.
23. Miyake T, Kasai M, Zhu SE, Sakurai T, Machida T. Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene-glycol based solution by a simple method. *Theriogenology* 1993; 40: 121-34.
24. Rall WF, Wood MJ, Kirby C, Whittingham DG. Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *J Reprod Fert* 1987; 80: 499-504.
25. Bautista JA, Dela Pena EC, Katagiri S, Takahashi Y, Kanagawa H. In vitro viability of mouse oocytes vitrified in an ethylene glycol-based solution. *Jpn J Vet Res* 1998; 46: 13-8.
26. Zeilmaker GH, Alberda AT, van Getn I, Rijkman CMPM, Drogenkijk AC. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertil Steril* 1984; 42: 293-6.
27. Kasai M, Komi JH, Takamo A, Tsudera HM, Sakurai T, Machida T. A simple methods for mouse embryo cryopreservation in a low toxic vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fertil* 1990; 89: 91-7.
28. Zhu SE, Kasai M, Otake H, Sakurai T, Machida T. Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solutions. *J Reprod Fert* 1993; 98: 139-45.
29. Kim MK, Lee SJ, Uhm EY, Yoon SH, Park SP, Chung KS, et al. Cryopreservation of mouse IVF zygotes by vitrification. *Korean J Animal Re prod* 1996; 20: 119-26.
30. Kim MK, Yi SH, Yoon SH, Park SP, Chung KS, Lim JH. In Vitro/In Vivo Development of mouse oocytes vitrified by EFS. *Korean J Animal Reprod* 1998; 25: 87-92.
31. Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod* 1996; 54: 1059-69.
32. Isachenko V, Montag M, Isachenko E, Nawroth F, Dessole S, van der Ven H. Developmental rate and ultrastructure of vitrified human pronuclear oocyte after step-wise versus direct rehydration. *Hum Reprod* 2004; 19: 660-5.

= 국문초록 =

목적: 본 연구는 생쥐 전핵시기 배아를 완만동결법과 유리화동결법으로 동결-융해 후 배아의 생존율과 성장률을 비교하고자 시행하였다.

연구방법: 과배란을 유도한 생쥐로부터 전핵시기 배아를 획득하여 10% SSS가 첨가된 HTF 배양액으로 약 1시간 동안 배양한 후 두 개의 전핵이 관찰되는 정상적인 형태의 배아만 선별하여 동결하였다. 동결방법으로는 1.5 M PROH에 0.1 M sucrose가 함유된 완만동결법과 40% ethylene glycol, 18% Ficoll, 0.5 M sucrose가 혼합된 EFS40 용액과 EM grid를 이용하여 이용한 유리화동결법을 실시하였다. 동결-융해 후 전핵시기 배아의 회수율, 생존율 및 부화 포배기로의 성장률과 부화율을 비교하였다.

결과: 각각의 방법으로 동결-융해 후 24시간 동안 배양하였을 때 2-세포기까지의 성장률은 완만동결군이 59.1%이었고 유리화동결군이 77.0%로 두 군간에 유의한 차이를 보였고 ($p<0.003$), 48시간 동안의 배양에서도 완만동결군이 53.3%이고 유리동결군이 72.6%로 유의하게 유리화동결군에서 높은 4-세포기까지의 성장률을 보였으며 ($p<0.003$), 72시간 배양하였을 때의 상실배로의 성장률 역시 완만동결군이 46.7%이고 유리화동결군이 67.3%로 유리화동결군에서 유의하게 높은 성장률을 보였다 ($p<0.001$). 융해 후 144시간 동안 배양하였을 때의 부화포배기로의 성장률은 완만동결군이 26.3%이고 유리화동결군이 43.4%로 유리화동결군에서 유의하게 높은 성장률을 보였다 ($p<0.005$).

결론: 생쥐 전핵시기 배아의 동결보존에서 유리화동결법은 완만동결법 보다 시간이 단축되고 비싼 장비가 필요 없어 경제적이고 간단했을 뿐 아니라 동결-융해 후 전반적으로 높은 생존율과 성장률을 나타내었다.

중심단어: 생쥐 전핵시기 배아, 유리화동결법, 완만동결법, 배아 발생, 포배기