논문종류: 동물실험연구

제목: 생쥐배아의 냉동보존에 있어서 여러 조건의 평가

- 저속 처리단계와 급속 처리단계, 배양액, 세포기

저자: 이승연, 권주택, 송희원, 조윤희, 이기숙, 김종덕

소속: 전북대학교병원 산부인과 교실.

The evaluation of various conditions in the cryopreservation of mouse embryos

- Rapid and slow method of cryopreservation, culture media and cell stages

Seung-Yeon Yi, M.D., Ju-Taek Kwwon, M.D., Hee-Won Song, M.D., Yun-Hee Cho, M.D., Ky-Sook Lee, M.D., Jong-Duk Kim, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, Chonbuk National University Hospital Chonju, Chonbuk, Korea.

책임저자: 조 윤 희

주관책임자: 김 종 덕

주 소: 전주시 덕진구 금암동 산 2-10 전북대학교병원 산부인과 교실

전화번호: 0652-250-1360

팩스번호: 0652-254-4833

난외표제: 생쥐배아의 냉동보존에 있어서 여러 조건의 평가.

생쥐배아의 냉동보존에 있어서 여러 조건의 평가

- 저속 처리단계와 급속 처리단계, 배양액, 세포기

The evaluation of various conditions in the cryopreservation of mouse embryos - Rapid and slow method of cryopreservation, culture media and cell stages

= Abstract =

Cryopreservation is able to store the surplus pre-embryos for freezing and furthermore thawing and transfer in a subsequent cycle. Cryopreserving cells which are maintaining their viability are the very complex process.

This study has been carried out in order to find the effects of cryopreservation steps, freezing media and embryonic stages on the rates of viability and development of cryopreserved mouse embryos. Female ICR mice(6 8 weeks old) were induced to superovulate by sequential intraperitoneal injection of 5 IU PMSG and 5 IU hCG 48h apart. Mouse embryos were collected according to its developmental stage after the injection of hCG. Embryos were cryopreserved not only by cryoprotectant step (1 step 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, 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 : Cryopreservation, Slow and rapid methods.

서 론

세포의 활성에 있어서 냉동(cooling)의 영향은 200여년 전부터 알려져 왔다. 즉 1776년 이탈리아의 생리학자이며 수사인 Spallanzani는 말 정자가 겨울 추위로 인하여 무활동 상태에 있다가 따뜻하여졌을 때 운동성을 회복하는 것에 주목하였다. 1866년 Mantegazza는 냉동보존된 인간정액의 보존(banking)을 제안하였다. 그러나 이 생각에 대한 실제적인 가치의 인식은 훨씬 후에 이루어져 금세기초에 들어와 상업적인 관심이 가축의 정액 냉동보존을 위한 과정의 발달로 관심의 대상이 되어졌다. 인간에 대한 시도는 냉동-해빙 정액으로 임신되어진 아이가 1963년 출생함으로써 비로서 성공하였다. 그러나 난자에 있어서는 1972년 처음 생쥐배아의 동결보존 및 이의 융해에 성공한 이후 mouse, rat, hamster와 mongolian gerbil로 부터 배란된 난자들의 냉동이 이루어졌으며, 마침내 Trounson과 Mohr는 인간의 동결보존된 8세포기 배아를 해빙시켜 자궁내 이식하여 최초로 임신에 성공하였다.

체외수정을 위한 과배란 유도제는 많은 수의 난자채취를 가능하게 하였으며 그러므로서 많은 전배아의 이식으로 임신가능성을 증가시켰다. 그러나 많은 전배아 이식은 다태임신을 야기하며 또한 이식하고 남는 잉여분의 전배아 보존에 대한 문제가 제기되었는데, 냉동보존의 발달에 의하여 잉여난자 및 잉여배아의 처리문제가 해결되었으며 모든 IVF과정에 중요한 가치를 가지게 되었다. 또한 냉동보존은 이식전에 발생될 수 있는 모체측의 불리한 조건을 극복하는데 진전을 이룰 수 있도록 IVF 과정의 유연성을 증가시켰으며, 냉동보존의 사용에 의해 각 과배란유도 방법들이 난자회수를 위한 난소의 최적자극의 발달로 또한 이식과 착상을 위한 자궁의 준비로 발달되어질 수 있게 하였다.

또한 냉동보존은 난소자극이나 난자회수의 반복되는 필요성을 제거하게하여 보존된 전배아의 이식으로 비용의 경감과 함께 성공이 예견되는 주기에서 선택적인 시술이 가능할 수 있게 되었으며, 난소과자극증후군의 위험이 있는 환자에게 난소과자극의 억제를 유도할 필요없이 배아이식의 지연을 고려할 수 있게 하였다.

하나 혹은 여러세포로 이루어진 조직들의 냉동보존에는 투과성이 있거나 또는 투과성이 없는 냉동보호제가 사용되어져야하며, 이들 냉동보호제를 첨가한 후 냉동보호제와 세포내부 및 외부사이에 평형이 요구되어진다. 이러한 평형이 이루어짐과 동시에 느리고 빠른 온도하강이 요구되며 일정기간동안 냉동보존된 배아들은 정상적인 생리학적 환경으로 되기 위해 역순의 냉동보호과정을 거쳐야만 한다. 냉동과 해빙의 가장 어려운 기간은 낮은 온도로 진입하기 위하여 식빙(seeding)을 통한 초기 저온단계와 그후 정상적인 생리적 환경으로 전환하는 부분이다. 대부분의 세포계와 단독세포들은 -196℃의 액체질소에서 저장되어질 수 있으며, 빙점이하의 상태에서 세포는 저온처리과정과 냉동보호제사이에 상호작용이 이루어지는 동안 얼려지고 건조되는데 투과성이 있는 냉동보호제가 사용되면 냉동보호제가 세포막을 투과하여 세포내부의 물을 제거하게 되며 제거된 양 만큼 냉동보호제가 세포질 내로 유입되게 된다. 저온처리가 시작되므로써 세포는 탈수가 일어나게 되고 빙결정(ice crystal) 형성의 시기에 세포외부의 환경들은 세포의 전체적인 탈수와 더불어 결정화 되어지나 세포내부에서는 얼음형성이 이루어지지 않아 세포내부의 물질들을 보호할 수 있게 된다. 배아의 해빙은 해빙액에 배아를 노출시켜(재수화, rehydration) 세포내의 냉동보호제가 세포밖으로 빠져 나가면서 물이 세포내로 침투하여 응축되었던 할구가 정상적인 형태로 복귀하게 된다.

냉동보호제는 2개의 범주로 분류되어져 투과성의 냉동보호제와 비투과성의 냉동보호제로 되어 있다. 투과성 보호제는 dimethyl sulfoxide(DMSO) 와 1・2-propanediol(PROH)와 glycerol이며 비투과성보호제는 glucose와 sucrose같은 monosaccharides disaccharides가 사용된다. 그러나 냉동보존으로 세포 및 조직이 냉동 및 해빙의 과정을 거치는 동안에 손상을 받게된다. 즉 세포막의 투과성, 표면적과 부피등 세포에 물리적인 손상을 주게되며 또한 동결과 해빙의 방법과 처리액에 따라 그리고 배아의 발생시기와 배아의 질에 따라 생존율이 영향을 받게된다. 그러므로 여러 동물모형을 이용하여 인간난자와 배아를 냉동보존하는 기초지식과 기술을 얻고 있는 바 저자는 생쥐배아를 각 배양액 별로, 배아의 각 발달단계 별로, 또한 냉동보호제인 PROH를 단계별로 처리하여 냉동보호액으로는 어느 기본배양액이 적절한지 그리고 어느 단계의 배아가 냉동보호에 가장 적절한

지 더 나아가 어느 단계의 냉동보호제로 냉동할 때에 가장 효과가 있는지를 확인하여 이를 인간 배아의 냉동보존에 이용하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

실험동물은 물과 먹이를 자유롭게 섭식시켜 사육한 ICR계 흰 생쥐를 사용하였다. 암컷은 생후 6 8주령을 사용하였고 수컷은 12주령의 생식능력이 확인된 것을 사용하였다.

2. 난자채취

난포성장을 촉진시키기위해 6 8주된 흰생쥐 암컷에 PMSG (pregnant mare's serum gonadotropin, Sigma Co.) 5 IU를 복강주사하고(제 1일), 48시간후에 hCG(human chorionic gonadotropin, Sigma Co.) 5 IU를 복강주사 하였다(제 3일). 후기 2세포기 배아를 얻기 위하여는 hCG 주사 후 48 50시간후에, 4세포기 배아를 얻기 위하여는 60시간후에, 8세포기 배아를 얻기 위하여는 70 72시간 후에 난관을 무균적으로 절취하여 기본 배양액(Ham's F-10)이 든 배양접시에 옮긴 후 해부현미경하에서 30 gauge 주사바늘을 이용하여 양난관을 씻어냄으로써 배아를 채취하였다.

3. 배아의 냉동

채취한 배아들은 0.4% BSA(bovine serum albumin)를 포함한 기본배양액에서 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 냉동보호제인 1.2-propanediol(PROH)을 처리하였다.

급속 처리방법

1단계 방법으로, 기본배양액(Ham's F-10)에 담겨있는 배아들을 각 실험군의 배양액(HTF, D-PBS, IVF medium)에 옮겨 평형을 시켰으며(5분) 1.5M의 PROH에 옮겨 8분 정체한 후 0.1M sucrose가 첨가된 1.5M PROH에 다시 8분 정체하였다.

저속 처리방법

단계적으로 서서히 냉동보호제인 PROH를 첨가하는 방법으로 점진적인 몰(mol)의 증가가 있으며 각 단계별로는 5분씩 두었고 1.5M의 용액에서만 10분 정체하였다.

2단계는 기본배양액으로부터 각 실험군의 배양액에 옮겨 평형을 시킨 후 0.75M과 1.5M의 PROH에 각기 넣었다.

3단계는 0.5M, 1.0M, 1.5M PROH를, 4단계는 0.25M, 0.5M, 1.0M, 1.5M PROH를 거쳐 탈수화를 유도하였다.

위와 같은 단계를 거친 후 1개의 plastic straw에 약 5 20개 배아들을 넣어 자동세포냉동기(Kryo 10-Ⅲ programmable freezer, Planer Biomed)에서 동결하였다. -7℃까지 분(minutes)당 2℃씩 냉각시키고 -7℃에서 10분간 정체하였다. 정체 1분후 과냉각을 방지하기 위하여 냉각된 핀셋으로 식빙(seeding)하였다. -7℃에서 -30℃까지는 분당 0.3℃씩 냉각하였으며 냉각된 straw는 straw 보관용기에 넣어 -196℃의 액체질소 통에 넣어 보관하였다.

3. **배아의 해빙**

해빙은 straw를 대기 중으로 옮겨 실온에서 2분 노출시킨 후 30 37℃ water bath에서 3분간 방치하였다. 공기방울이 맺히면 알코올 거즈로 straw를 소독한 후 straw내의 배아와 냉동보호제를 배양접시에 담아 현미경하에서 배아를 회수하였다. 급속처리 방법을 택한 배아의 재수화과정은 1.0M의 PROH 용액과 0.2M의 sucrose 용액에서 5분, 0.5M PROH에서 5분, 0.2M의 sucrose용액

에서 5분 둔 후 각 배양액에서 5분 재수화하여 배아용 배양액(0.4% BSA가 첨가된 HTF)에서 배양하였다. 저속 처리방법을 택한 배아의 재수화 과정은 단계적으로 몰(mol)이 감소하는 재수화용액으로 옮겼다. 재수화용액에서 5분씩 지난 후 배아용 배양액에 넣어 배양기 내에서 배양하였다.

4. 배아의 배양

냉동 후 해빙된 배아들은 Brinster의 pataffin oil drop method 즉 60×15㎜의 1회용 배양접시에 멸균한 paraffin oil을 넣고 이 속에 배아용 배양액을 정착시켜 1일간 배양기에서 충분히 평형을 시킨 다음 이 속에 배아들을 넣어 5% CO_2, 100% 습도를 유지하는 배양기(Forma Scientific Co. model 3037)에서 배양하였다. 48 72시간 후 배포까지 난할된 정도를 도립현미경(Olympus, model IMT-2)하에서 관찰하였다.

결 과

1. 냉동보호제 처리 배양액에 따른 배아의 냉동보존 후 발생율

1) HTF를 이용한 냉동보호제의 처리

표 1, 그림 1과 같이 HTF 배양액에 냉동보호제로 PROH를 사용하여 2세포기 배아를 냉동해빙한 후 포배기까지의 발생율은 1단계(rapid method)에서 33.3%, 2단계(slow method)에서 28.0%, 3단계(slow method)에서 30.0%, 4단계(slow method)에서 33.3%를 보여 비슷한 양상을 보였다.

4세포기 배아는 1단계에서 40.0%, 2단계에서 35.0%, 3단계에서 32.0%, 4단계에서 38.0%를 보여 역시 비슷한 발생율을 보였다.

그러나 8세포기 배아는 4단계(58.1%)가 1단계(40.0%)와 2단계(38.1%)에 비해 유의하게 높은 발생율을 보였다.

2) D-PBS를 이용한 냉동보호제의 처리

표 2, 그림 1과 같이 D-PBS내에 냉동보호제로 PROH를 사용하여 2세포기 배아를 냉동해빙한 후 포배기까지의 발생율은 1단계에서 23.8%, 2단계에서 30.0%, 3단계에서 31.6%, 4단계에서 33.3%를 보여 유의한 차이는 없으나 1단계에서 발생율이 약간 낮았다. 4세포기 배아를 냉동한 후에는 1단계에서 40.9%, 2단계에서 58.8%, 3단계에서 47.6%, 4단계에서 66.7%를 보여 2단계와 4단계에서 유의하게 높은 발생율을 보였다.

8세포기 배아를 냉동한 후 포배기까지의 발생율은 1단계에서 40.0%, 2단계에서 60.0%, 3단계에서 69.2%, 4단계에서 86.2%로 2, 3, 4단계에서 발생율이 유의하게 높았다.

3) IVF medium을 이용한 냉동보호제의 처리

표 3, 그림 1과 같이 IVF medium에 냉동보호제로 PROH를 사용하여 2세포기 배아를 냉동 보

존한 후 포배기까지의 발생율은 유의한 차이는 없으나 1단계(29.4%)가 가장 낮은 발생율을 보였다. 4세포기 배아는 유의한 차이는 없으나 4단계(47.6%)에서 발생율이 높았으며, 8세포기 배아는 4단계(56.5%)가 가장 유의하게 높았다.

2. 배아의 발생시기에 따른 냉동보존 후의 발생률

1) HTF를 이용한 냉동보호제의 처리

급속단계인 1단계에서 2세포기(33.3%), 4세포기(40.0%)와 8세포기(40.0%)에서 비슷한 발생율을 보였다. 2단계에서는 2세포기(28.0%)가 유의한 차이는 없으나 4세포기(35.0%)와 8세포(38.1%)보다 발생율이 낮았다. 3단계에서는 유의한 차이는 없으나 8세포기(43.5%)가 2세포기(30.5%), 4세포기(32.0%)보다 발생율이 높았고 4단계에서는 8세포기(58.1%)가 2세포기(33.3%), 4세포기(38.0%)보다 발생율이 유의하게 높았다(그림 2).

2) D-PBS를 이용한 냉동보호제의 처리

급속단계인 1단계에서는 2세포기(23.8%)가 4세포기(40.9%), 8세포기(40.5%)에 비해 발생율이 유의하게 낮았다. 2단계에서는 2세포기(30.0%)가 4세포기(58.8%)와 8세포기(60.0%)에 비해 발생율이 낮았으며, 3단계에서는 8세포기(69.2%)에서 유의하게 높은 발생율을 보였다. 4단계에서는 4세포기(66.7%), 8세포기(86.2%)가 유의하게 발생율이 높았다(그림 3).

3) IVF medium을 이용한 냉동보호제의 처리

급속단계인 1단계에서는 유의한 차이는 없으나 8세포기(41.2%)가 발생율이 높았고 2단계에서는 2세포기, 4세포기, 8세포기에서 비슷한 발생율을 보였다. 3단계에서는 8세포기(50.0%)가 2세포기(30.4%)에 비해 발생율이 유의하게 높았고 4단계에서도 8세포기(56.6%)가 유의하게 발생율이 높았다(그림 4).

3. 냉동보호제의 급속단계(1단계)와 저속단계(2, 3, 4단계)에 따른 배아의 발생률

1) HTF를 이용한 냉동보호제의 처리

그림 5와 같이 2세포기에서는 급속단계(1단계)와 저속단계(2, 3, 4단계) 사이에 큰 차이가 없었다. 4세포기에서도 급속단계(1단계)와 저속단계(2, 3, 4단계) 사이에 차이를 보이지 않았다. 그러나 8세포기에서는 4단계(58.1%)가 1, 2단계(40.0%, 38.1%)보다 유의하게 발생률이 높았다(그림 5).

2) D-PBS를 이용한 냉동보호제의 처리

2세포기에서는 급속단계(1단계)와 저속단계 처리에서 발생률이 비슷하였다. 4세포기에서는 급속단계(40.9%)에 비해 2단계(58.8%), 4단계(66.7%)에서 발생율이 유의하게 높았다. 8세포기에서는 저속단계(60.0 86.6%)에서 급속단계에 비해 발생률이 유의하게 높았다(그림 6).

3) IVF medium을 이용한 냉동보호제의 처리

2세포기와 4세포기 모두에서 1, 2, 3, 4단계의 발생률이 비슷하였다. 그러나 8세포기에서는 유의성은 없으나 4단계(56.5%)가 급속 1단계(41.2%)보다 발생율이 증가하는 경향을 보였다(그림 7).

고 찰

보조생식술의 주요한 목표의 하나는 난소의 과배란을 달성하여 많은 수의 난자를 획득하는 것으로 이들 난자는 체외 상태에서 수정되고 난할 되어져 자궁내에 이식되게 된다. 그러나 너무 심한 과배란 반응은 OHSS로 인해 병적인 반응을 보이거나 생명에 위험을 줄 수도 있다. 이런 환자에게 내부적 혹은 외부적인 황체호르몬의 공급(luteal support)은 위험을 증가시키게 되며 가장 효과적인 방법은 그 주기를 취소하는 것이 된다. 그러나 이러한 취소는 불임 환자에게 실망과 희생을 크게하므로, 감소된 양의 hCG나 GnRH로 배란을 유도하여 모든 난자를 회수하여 보존하였다가 다른 주기에 이식해 주어 임신을 유도하게 된다. 또한 과배란 주기 동안 자궁내막의 발달이 빈약할 때도 배아이식을 다른 주기로 고려할 필요성이 있다. 이렇게 과거 10년동안 보조생식술의 발달과 더불어 획득되어지는 많은 난자와 배아에 대한 냉동보존의 필요성이 더욱 절실하게 요구되어 왔으며 이제 IVF-ET 주기에서 배란기에 많은 수의 난을 자극하는 능력과 함께 난자와 배아의 안전한 저장에 대한 요구는 또한 아주 중요하게 강조되어야만 하는 부분이 되고 있다. 그러나 생존능력을 유지한 채로 냉동보존을 해야하는 세포들은 매우 복잡한 과정을 거칠 뿐만아니라 냉동과 해빙의 과정 동안에 이들 세포들은 쉽게 손상되어질 수 있다. 세포내에 얼음형성 (ice formation), 용액의 영향(solution effects)과 삼투성 세포의 응축(osmotic cell shrink)등 냉동 동안 세포들에게 손상을 주는 요소들 이외에 세포들은 얼음 결정체(ice crystals)에 의해 물리적으로 손상되어 질 수 있다. 특히 기계적인 요인에 의한 손상은 포유류의 난자나 배아처럼 세포가 클수록 그 손상도 크다. 세포생존이 냉동보존 방법의 성공에 있어서 유일한 목표가 되지만 실험과정에서 냉동과 해빙과정이 어떻게 손상을 일으키는가를 구별해 낸다는 것은 가능한 일이 아니다. 손상은 현미경하에서 투명대에 분열 혹은 투명대의 완전한 붕괴 및 세포의 퇴화로써 쉽게 인식되어 진다. 인간배아의 냉동보존에서 냉동과 해빙 후 보고된 생존율은 6 80%의 범위이다. 인간배아는 다양한 배양액내에서 냉동되어져 왔다. 즉 15% 인간혈청과 Earle's 배양액, Hepes buffer T6와 HTF 배양액, 10% 소태아 혈청(fetal bovine serum)과 D-PBS, 20% 인간제대혈청과

phosphate-buffered saline 등에서 냉동되어졌다. 냉동과 해빙의 방법도 급속동결과 해빙, 저속동결과 해빙등 다양한 방법이 시도되고 있다. 또한 서로 다른 냉동보호제들이 사용되어져 8% 10% glycerol, 1.5M DMSO, 1.5M 1.2 PROH가 사용되었고, 그중에서 확산된 포배기(expanded blastocysts)의 생존율은 1.5M DMSO에서 보다 glycerol의 첨가에서 높게 보고되어졌다. DMSO는 난할단계의 배아를 냉동하기 위한 선택적인 냉동보호제로써 유전적인 손상을 유도하지 않는다고 알려져왔으나 유전인자 분화(gene differentiation)과정에서 세포융합(cell fusion)을 유도하는데 있어서는 DMSO의 사용에 신중을 요구한다. 더우기 1.5M 1.2 PROH는 난할단계 배아에서 높은 생존율을 발현하는 것으로 보고되어 왔으며, 인간과 동물의 투명대의 붕괴를 최소화하는 것으로 보고되어 왔다. DMSO가 초기 연구에는 가장 널리 사용된 냉동보호제였으나 PROH는 독성이 감소되기 때문에 냉동에 그 이용이 증가되고 있다. 또한 세포냉동기에서는 냉동하는 최저온도가 -35℃일 때 다단계에서 더 높게 발달하였고 -110℃일 때에는 1단계에서 더 높은 난자 발달율을 보였다. 배아들은 발달의 모든 시기에 냉동되어 질수 있으나 냉동저항의 항진과 높은 임신율은 확산된 포배기를 냉동하므로써 얻어질 수 있다. 그러나 장기간에 걸친 배양시간으로 배아의 소실이 증가되어 적은수의 포배기만을 냉동할 수 있게 된다. 잠재 가능성이 있는 난할단계의 배아(1, 2, 4 그리고 8세포기)는 중간의 난할단계(3, 5, 6세포기) 배아들보다도 생존율이 더 좋다. 이것은 간기 할구(interphase blastomeres)에 냉동저항이 증가하기 때문인지도 모른다. 이식에 있어서는 자궁내막의 age와 냉동-해빙된 배아의 age에는 약간의 변이가 있다. 즉 자궁내막과 근접한 동시성(synchrony) 이거나 자궁내막보다 1일 더 발달된 배아의 이식이 임신을 초래하였다. 냉동-해빙된 포배기는 배란 후 자궁내막 4일째에 이식하였을 때에만 임신을 하였다.

어느 시기의 배아를 사용하여, 어느 종류의 동결액과 동결방법으로 냉동할 때에 좋은 생존율을 가질 수 있는지에 대해서는 논란이 많으며 냉동보존에 대한 체계가 아직 확립되어지지 않아 이에 대한 많은 연구들이 진행되어 지고 있다.

본 실험에서는 냉동보호제 처리 배양액에 따른 배아의 냉동보존 후 발생율에서 HTF에 냉동보호제를 처리한 실험은 2세포기, 4세포기에서는 비슷한 발생율을 보였으며, 8세포기만이 높은 발생

율을 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 냉동보호하기 위한 각 배양액 즉 modified phophate buffered saline (D-PBS)과 phosphate(-), glucose(-), $NaHCO_3$(+)인 HTF medium과 phosphate(+), glucose(+), $NaHCO_3$(+)인 IVF medium 사이의 buffer system 차이에 기인될 수 있는 것으로 추측되어진다.

또한 본 실험은 배아의 발생시기 별로 냉동보존을 비교 조사 하였으며 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. 또한 본 실험에서 냉동보호제의 급속단계(1단계)와 저속단계(2, 3, 4단계)에 따른 배아의 발생율은 HTF에서는 2세포기와 4세포기에서 급속단계와 저속단계 사이에 큰 차이가 없었으나 8세포기에서는 4단계가 더 높은 발생율을 보였다. D-PBS에서는 2세포기에서는 급속단계와 저속단계에서 발생율이 비슷하였고, 4세포기에서는 급속단계에 비해 2단계, 4단계에서 발생율이 높았으며 8세포기 역시 저속단계(2, 3, 4단계)에서 발생율이 높았다. IVF medium에서는 2세포기와 4세포기의 저속단계가, 8세포기에서는 4단계가 발생율이 높았다. 이로 보아 급속단계가 시간과 냉동보호제의 절약면에서 우수하지만 저속단계가 비교적 발생율이 좋은 것으로 나타났다.

결 론

생쥐 2세포기, 4세포기, 8세포기를 각 발생단계에서 채취하여 냉동보호제를 첨가한 서로 다른 배양액에서 배양하고, 배아의 냉동보존과 해빙시 급속처리와 저속처리단계로 비교하여 이들 조건이 배아의 생존과 발현에 미치는 영향을 조사하여 다음의 결과를 얻었다.

1. 냉동보호제로 처리하여 배양액을 달리한 경우 급속단계에서는 모든 배양액에서 비슷한 발생율을 보였고, 저속단계의 4세포기와 8세포기는 D-PBS에서 높은 발생율을 보였다($P < 0.05$, $P < 0.01$).
2. 배아의 발생시기에 따른 냉동보존 후 발생율은 2, 4, 8세포기로 넘어갈수록 발생율의 증가를 보여 8세포기에서 발생율이 가장 높았다($P < 0.01$).
3. 냉동보호제의 처리단계에 따른 발생율은 2세포기의 급속단계에서는 유사하였으나 4세포기와 8세포기는 저속단계에서 높은 발생율을 보였으며($P < 0.05$), 특히 8세포기에서 가장 높았다($P < 0.01$).

인용문헌

Ashwood-Smith M. J. : Genetic damage is not produced by normal cryopreservation procedures involving either glycerol or dimethyl sulfoxide. : Cryobiology 1985, 22 : 427.

Ashwood-Smith M. J., Morris G. W., Fowler R., Appleton T. C., Ashorn R. : Physical factors are involved in the destruction of embryos and oocytes during freezing and thawing procedures. Hum Repro 1988, 3 : 795.

Check J. H., O'shaughnessy A., Hoover L., Summers D., Nazari A : The effect of assisted hatching on pregnancy rates after frozen embryo transfer. Fert Steriil 1996, 65 : 254.

Cohen J., Simons R. S., Fehilly C. B., Edwards R. G. : Factors affecting survival and implantation of cryopreserved human embryos. J IVF 1986, 3 : 46.

Dumoulin J. C. M., Enginsu M. E., Bergers-Janssen J. M., Geraedts J. P. M., Pieters M. H. E. C., Evers J. L. H. : The protective effects of polymers in the cryopreservation of human and mouse zonae pellucidae and embryos. Fertil Steril 1994, 62 : 793.

Fehilly C. B., Cohen J., Simons R. F., Fishel S. B., Edwards R. G. : Cryopreservation of cleaving embryos and expanded blastocysts in the human : Comparative study. Fertil Steril 1985, 44 : 638.

Forman R. G., Frydman R., Egan D. : Severe ovarian hyperstimulation syndrome using agonist of gonadotopin-releasing hormone for in vitro fertilization : a European series and a proposal for prevention. Fertil Steril 1990, 53 : 502.

Freeman L., Trounson A., Kirby C. : Cryopreservation of human embryos progress in the clinical use of the technique in human in vitro fertilization. J IVF 1986, 3 : 53.

Friedler S., Giudice L. C., Lamb E. J. : Cryopreservation of embryos and ova. Fertil Steril 1988, 49 : 743.

Gook D. A., Osborn S. M., Johnston W. I. H. : Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1, 2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle. Hum Reprod 1993, 8 : 1101.

Lassalle B., Testart J., Renard J. P. : Human embryo features that influence the success of cryopreservaton with the use of 1.2-propanediol. Fertil Steril 1985, 44 : 645.

Mandel baum J., Junca A. M., Plachot M., Alnot M. O., Salat-Baroux J., Alvarez S. Tibi C., Cohen J., Debache C.,Tesquier L. : Cryopreservation of human embryos and oocytes. Hum Reprod 1988, 3 : 117.

Matson P. L., Graefling J., Junk S. M., Yovich J. L., Edirisinghe W. R. : Cryopreservation of oocytes and embryos : Use of a mouse model to investigate effects upon zona hardness and formulate treatment strategies in an in-vitro fertilization programme. Hum Reprod 1997, 12 : 1550.

Parkening T. A., Chang M. C. : Effect of cooling rates and maturity of the animals on the recovery and fertilization of frozen-thawed rodent eggs. Biol Reprod 1977, 17 : 527.

Parkening T. A., Tsunoda Y. Chang M. C. : Effects various low temperatures, cryoprotective agents and cooling rates on the survival, fertilizability and development of frozen-thawed mouse eggs. J Exp Zool 1976, 197 : 369.

Queenan J. T., Veeck L. L., Toner J. P., Oehninger S., Muasher S. J. : Cryopreservation of all prezygotes in patients at risk of severe hyperstimulation does not eliminate the syndrome, but the chances of pregnancy are excellent with subsequent frozen-thaw transfers. Hum Reprod 1997, 12 : 1573.

Quinn P., Kerin J. F. P. : Experiences with the cryopreservation of human embryos using the mouse as a model to establish successful techinques J IVF 1986, 3 : 40.

Schneider U., Mazur P. : Relative influence of unfrozen fraction and salt concentration on the

survival of slowly frozen eight-cell mouse embryos. Cryobilology. 1987, 24 : 17.

Sherman J. K. : Synopsis of the use of frozen human semen since 1964 : State of the art of human semen banking. Fertil Steril 1973, 24 : 397.

Siebzehnruebl E. R., Todorow S., Uem J. Van., Koch R., Wildt L., Lang N. : Cryopreservation of human and rabbit oocytes and one cell embryos : A comparsion of DMSO and propanediol. Hum Reprod 1989, 4 : 312.

Smitz J., Devroey P., Camus M. : The luteal phase and early pregancy after combined GnRH agonist/hMG treatment for superovulation in IVF and GIFT. Hum Reprod 1988, 3 : 585.

Testart J., Lassalle B., Belaisch-Allart J., Hazout A., Forman R., Rainhorn J. D., Frydman R. : High pregnancy rate after early human embryo freezing. Fert Steril 1986, 46 : 268.

Trounson A., Mohr L. : Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. Nature 1983, 305 : 707.

Veek L. L., Maloney M. M., Amundson C. H., Muasher S. J., Brothman L. J., Jones H. W., Descisciolo C. : Significantly enhanced pregnancy rates per cycle through cryopreservation and thaw of pronuclear stage oocytes. Fert Steril 1993, 59 : 1202.

Zeilmaker G. H., Alberda A. T., Van Gent I., Rijkmans C. M. P. M., Drogendijk A. C. : Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. Fertil Steril 1984, 42 : 293.

Table 1. The development of frozen-thawed embryos to blastocyst in HTF + PROH

cell stage / treatment step	2 cell	4 cell	8cell
1 step	* 9/27(33.3)	6/15(40.0)	6/15(40.0)
2 step	7/25(28.0)	7/20(35.0)	8/21(38.1)
3 step	6/20(30.0)	8/25(32.0)	10/23(43.5)
4 step	9/27(33.3)	11/29(38.0)	18/31(58.1)

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

HTF : Human tubal fluid

PROH : Propanediol

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

cell stage / treatment step	2 cell	4 cell	8cell
1 step	* 5/21(23.8)	9/22(40.9)	8/20(40.0)
2 step	6/20(30.0)	10/17(58.8)	12/20(60.0)
3 step	6/19(31.6)	10/21(47.6)	18/26(69.2)
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 salaine

PROH : Propanediol

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

cell stage / treatment step	2 cell	4 cell	8cell
1 step	* 5/17(29.4)	7/19(36.8)	7/17(41.2)
2 step	5/15(33.3)	8/20(40.0)	9/20(45.0)
3 step	7/23(30.4)	8/23(34.8)	11/22(50.0)
4 step	11/26(42.3)	10/21(47.6)	13/23(56.5)

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

PROH : Propanediol