

배 인 하 교수지도
석사학위 청구논문

생쥐 배아의 완만동결과
초자화동결의 비교 연구

2004

성신여자대학교 대학원
생물학과
김 성 아

생쥐 배아의 완만동결과
초자화동결의 비교 연구

배 인 하 교수지도

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2004년 5월

성신여자대학교 대학원

생물학과

김 성 아

논문개요

배아의 동결보존에 관한 연구는 1972년 Whittingham이 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 사용하여 완만동결과 완만용해로 생쥐 배아를 빙결점 이하의 온도에서 장기간 동결보존에 성공하여 산자를 탄생시킨 이후 급속히 가속화되었다. 이와 같은 생식세포 또는 배아 동결보존 기술은 과도하게 얻어지는 잉여난자의 문제를 해결할 수 있을 뿐만 아니라 일반 체외 수정술의 보조적 장치, 치료 방법의 선택, 난자 공여 시술시 공여자-수혜자의 주기 일치의 편리성, 생식기관에 치명적 영향을 주는 질환 치료 전 생식세포의 보관, 착상 전 유전 진단 시 시간적 여유의 획득, 지연적 가족계획 등에 이용할 수 있는 장점을 가지고 있다. 그러나 동결보존된 배아의 생존율 및 발달율은 동결시 배아의 발달단계, 항동해제의 종류, 동결 방법에 따라 서로 다른 결과를 보임으로서 발달시기와 이에 따른 최적의 동결보존 방법을 결정하는데 많은 어려움이 따른다.

본 연구에서는 체외배양에 의해 얻어진 발달단계별 생쥐 배아를 배아의 동결에 이용되고 있는 완만동결 방법과 초자화동결 방법으로 동결하고 용해한 후 각각의 동결 방법에 따른 배아의 생존율과 발달율을 비교하여 인간 배아 동결보존의 기초 자료로 활용하고자 하였다.

생후 5~8주된 F1 hybrid 생쥐 (C57BL♀ × CBA♂) 암컷과 12주 이상된 생식능력이 있는 수컷을 사용하였다. 암컷의 복강에 각각 5 I.U의 pregnant mare's serum gonadotropin과 human chorionic gonadotropin을 48시간 간격으로 주사하여 과배란을 유도한 후 수란

관으로부터 배란된 난자를 얻어 체외수정을 하였다. 수정 후 9시간 후에 전핵배아, 24시간 후 2세포기, 48시간 후 4세포기, 63시간 후 8세포기, 72시간 후 상실배, 96시간 후 포배기의 배아를 얻어 각 발달 단계별 배아를 완만동결과 초자화동결 I, II 방법으로 동결하였다가 융해한 후 각각의 방법에 따른 생존율과 발달율을 비교 조사하였다.

생존율을 조사한 실험결과 2세포기 배아를 대상으로 한 경우 초자화동결 I 과 II의 방법이 완만동결 방법 보다 높게 나타났다 (각각 100%; 100%; 91.4%). 발달율의 경우 전핵배아의 2세포기로의 발달율과 부화율에서는 완만동결과 초자화동결 I, II 모두가 유사한 발달율을 나타냈으나 전핵배아의 포배로의 발달율에선 초자화동결 II의 방법이 76.6%로 66.0%의 완만동결 방법보다 높은 발달율을 보였다. 2세포기 배아의 포배로의 발달율에서는 초자화동결 I의 방법이 88.8%로 완만동결의 72.6%보다 현저히 높았으나 부화율에서는 세 방법간에 차이가 없었다. 4세포기 배아의 포배로의 발달율은 초자화동결 I, II 방법 모두 완만동결 방법 보다 낮은 결과를 나타냈으며 (각각 69%; 69.4%; 80.5%) 부화율에 있어서는 초자화동결 I의 방법이 완만동결 방법보다 낮은 결과를 보였다 (각각 34.9%; 57.4%). 8세포기 배아의 포배로의 발달율과 부화율은 초자화동결 I의 방법 (84.5%)이 완만동결 (62.9%)보다 현저히 높았으며 초자화동결 II 방법 (74.2%)도 부화율에서 완만동결 (57.1%)보다 높았다. 상실기배아의 포배로의 발달율은 초자화동결 I의 방법이 84.4%로 69.8%의 완만동결 보다 높았다. 포배기에서는 완만동결과 비교하여 초자화동결 I의 방법이 확장율과 부화율에서 각각 31.2% 대 57.3% 및 13.2% 대 36.0%로 유의하게 낮은 결과를 나타냈으며 초자화동결 II의 방법에서는 41.8%로 완만동결의 36.0%와 유사한 발달율을 나타냈다.

위의 결과를 요약하면 먼저 냉동 보존된 각 시기의 배아들의 용해 후 생존율은 발달단계와 방법에 상관없이 거의 대부분 유사하였다. 그러나 4세포기 배아의 용해 후 포배로의 발달율과 부화율은 초자화동결 I 과 II의 방법이 완만동결 방법보다 낮았으며 포배의 용해 후 부화율도 같은 결과를 보였다. 또한 전핵기, 2세포기, 8세포기 배아와 상실배의 경우에는 발달율과 부화율에서 오히려 초자화동결 I 과II의 방법이 완만동결 방법보다 높았다. 이상의 결과로 보아 생쥐 배아의 동결보존 후의 발달율, 부화율은 발달단계에 따라 그리고 동결방법에 따라 서로 다르다. 그러므로 생쥐 배아의 경우 발달단계에 따라 항동해제 뿐만 아니라 최적의 동결보존 방법의 선택이 고려되어야 할 것이다.

목 차

논문개요

목차

그림목록(List of Figures)

서론 ----- 1

재료 및 방법 ----- 4

결과 ----- 10

고찰 ----- 23

참고문헌

ABSTRACT

감사의 글

그림 목록 (List of Figures)

- Figure 1. A comparison between slow freezing and vitrification methods for the cryopreservation of mouse pronuclear embryos. ----- 15
- Figure 2. A comparison between slow freezing and vitrification methods for the cryopreservation of mouse 2-cell embryos. ----- 16
- Figure 3. A comparison between slow freezing and vitrification methods for the cryopreservation of mouse 4-cell embryos. ----- 17
- Figure 4. A comparison between slow freezing and vitrification methods for the cryopreservation of mouse 8-cell embryos. ----- 18
- Figure 5. A comparison between slow freezing and vitrification methods for the cryopreservation of mouse morulae. ----- 19
- Figure 6. A comparison between slow freezing and vitrification methods for the cryopreservation of mouse blastocysts. ----- 20

Figure 7. Light micrographs of embryos. ----- 21

**Figure 8. Light micrographs of re-expanded blastocysts
after cryo-thawing. ----- 22**

I. 서론

최근 체외수정 및 이식술은 배란유도 약제, 방법 및 배양기술의 향상으로 다수의 난자와 배아를 얻을 수 있게 되었고, 양질의 배아를 이식함으로써 보다 향상된 임신율과 착상률이 가능하게 되었다. 한편, 다수의 난포 성장에 따른 과배란 유도 증후군과, 여러 개의 수정란 이식에 의한 다태 임신 등의 임상적 문제점도 동반되었다. 따라서 과배란 증후군의 환자에서 당 주기 이식을 포기하거나, 이식 배아의 수를 줄임으로써 잉여의 배아에 대한 동결보존의 필요성은 매우 증가하였다.

동결보존은 일반 체외 수정술의 잉여배아 보존 및 자연적 자궁내막을 선택하기 위한 배아 보존, 착상 전 유전진단 시 시간적 여유의 획득, 지연적 가족계획에서의 활용, 생식기관에 치명적 영향을 주는 질환 치료 전에 생식세포의 보관 등의 잇점을 가지고 있으며, 또한 한번의 난자 채취로 배란유도와 난자채취의 기술을 생략하고 여러 번의 이식을 시행함으로써 체외 수정술에 필요한 시간과 경비를 줄이고, 높은 누적 임신율을 기대할 수 있는 장점도 있다.

초기 배아의 냉동에 관한 연구는 1972년 Whittingham 등이 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 사용하여 완만동결과 완만융해로 생쥐 배아를 빙결점 이하의 온도에서 장기간 동결보존에 성공하여 산자를 탄생시킨 이후 활발하게 연구되어져 왔다.

배아 동결은 세포 혹은 할구의 크기에 따라 전핵시기 배아 (pronuclear stage embryo), 2 - 8 세포기의 분할 배아 및 포배 배아 (blastocyst)를 동결보존하는 방법 등으로 나눌 수 있는데, 이는 배아

의 발달단계에 따른 할구의 크기에 따라 적용하는 항동해제를 달리 하는 최적의 동결방법을 적용하고자 하였다. 동결방법에는 지금까지 완만동결법 (slow freezing), 급속동결법(rapid freezing), 초급속동결법(ultra-rapid freezing) 및 초자화동결법(vitrification) 등이 개발되어 이용되고 있다.

배아 동결법에는 동해에 대해 세포를 보호하기 위한 항동해제가 사용되고 있는데 발생 단계에 따른 할구의 크기에 따라 다른 종류의 항동해제가 사용되고 있으며, 또한 다양한 동결 및 융해방법도 보고되고 있다 (Fehilly et al., 1985; Lassalle et al., 1985). 동결보존에서 일반적으로 사용되는 항동해제에는 DMSO (dimethyl sulfoxide), PROH (propanediol), EG (ethylene glycol) 및 glycerol과 같은 투과성 항동해제 (cryoprotective agent)와 비투과성 보호제로 sucrose 또는 glucose를 사용하고 있다.

그러나 동결-융해 후 배아의 생존율은 동결, 융해과정 중에 사용되는 항동해제의 종류와 농도, 동결방법과 융해속도 등에 많은 영향을 받을 뿐만 아니라 동결되는 배아의 세포주기, 발달시기, 동결되는 배아의 종 (species)등도 깊은 관계를 갖는다고 한다. 또한 과냉각 (supercooled) 상태에서 급격한 결빙은 세포질 내 얼음결정화 (ice crystalization)에 의한 세포질 손상으로 동결보존 후 융해 시 생존율에 큰 영향을 미친다고 알려져 있다 (Friedler et al., 1988; Mandelbaum et al., 1988; Trounson et al., 1988; Wilson et al., 1989; Macas et al., 1991).

여러 동결 방법 중 1985년 Rall & Fahy에 의해 보고된 초자화동결 방법은 높은 동도의 투과성 있는 항동해제를 사용함으로써 세포가 동결되는 동안 동결 용액의 점성을 증가시킴으로써 세포내외의 결빙

형성이 이루어지지 않는 동결 방법이다. 이 방법은 완만동결에 비해 결빙형성이 적고 액체 질소에 바로 침지함으로써 시간적, 경제적 잇점을 가질 수 있다. 그러나 항동해제가 갖는 독성과 항동해제가 세포 내외를 이동하면서 생기는 삼투압 변화에 의한 세포 손상 등으로 항동해제의 종류, 농도, 평형시간, 용해방법 등에 대해 많은 연구가 보고 되어지고 있다 (Ali et al., 1993; Rall et al., 1987; Zhu et al., 1993; Kim et al., 1996).

본 연구에서는 배아의 동결보존에서 시기적 문제와 배아의 발달단계에 따른 항동해제의 사용, 완만동결 방법과 초자화동결 방법 간의 차이를 비교해 보기 위해 체외배양에 의해 생산된 발달단계별 생쥐 배아를 완만동결-초급속 용해 방법과 항동해제의 조성에 차이를 가지는 두 가지의 초자화동결 방법으로 동결보존하여 각각의 용해 후 생존율 및 발달율을 관찰, 비교해 봄으로써 인간 배아 동결 방법의 선택에 대한 기초 자료로 활용하기 위하여 시행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 동물

본 실험에서는 광주기가 명기 14시간, 암기 10시간이 유지되는 semi SPF zone (specific pathogene free zone)에서 물과 먹이가 충분히 공급된 상태를 통하여 사육된 생후 5~8주된 F1 hybrid 생쥐 (C57BL/6 × CBA/J) 암컷과 12주 이상 되어 생식력이 있는 수컷을 사용하였다

생쥐 암컷의 복강에 각각 5 I.U.(international unit)의 pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG, Sigma)과 human chorionic gonadotropin (hCG, Sigma)을 0.85%의 생리 식염수에 녹여 48시간 간격으로 주사하여 과배란 (superovulation)을 유도하였다.

2. 배양액의 준비

모든 실험에 사용된 기본 배양액은 M16 배양액 (Hogan et al., 1986)으로 하였으며 Na-lactate, CaCl₂는 100배로 농축된 stock solution을 만들었고, 이를 제외한 나머지 배양액 성분은 Highly purified solvent (Burdick & Jacson #365-4)에 녹여 10배로 농축된 stock solution을 만들어 냉장 보관하였으며 1주일마다 새로 만들어 사용하였다. Na-pyruvate, NaHCO₃와 0.4% bovine serum albumin (BSA)은 사용 직전에 녹여서 사용하였다. 배양액의 최종 pH는 7.3~

7.4로 하고 삼투압은 280~290mOsm (Bae & Foot, 1980)이 되도록 하여 사용하였다.

모든 배양액의 조성성분과 처리물질은 특별한 언급이 없는 한 Sigma 제품 (Sigma, USA)을 사용하였다.

3. 배아의 수집 및 배양방법

배아는 체외수정과정을 통해 획득하였다. 정자의 준비는 수정 능력이 확인된 12주령의 수컷생쥐를 경추탈골법으로 희생시키고, 부정소미부를 분리하여 Ham's F-12 배양액에 넣은 후 26G 주사침으로 정자괴를 유리시켜 이를 5% CO₂가 공급되고 37°C가 유지되는 배양기에서 10분간 배양하였다. 상층액 부분 0.5ml을 0.4% BSA가 첨가된 M16 배양액에 옮긴 후에 10분간 배양하여 수정능 획득을 유도하였다.

난자의 준비는 hCG 주사 후 14시간에 암컷생쥐를 경추 탈골법으로 희생시키고 양쪽 난관을 분리하여 0.4% BSA가 첨가된 M16 배양액(기본 배양액)이 담긴 배양접시로 옮겼다. 해부현미경하에서 난관의 팽대부 (ampulla)를 26G 주사침으로 찢어 난자-난구복합체 (oocyte cumulus complex)를 얻었다. 이들을 세 번의 세척 후에 기본 배양액 2ml가 들어있는 수정용 배양접시 (Falcon #3037)에 모았다.

위에서 기술한 방법으로 수정능 획득을 위해 전 배양된 정자를 30~40개의 난자가 들어있는 배양접시에 정자의 농도가 2×10^6 /ml이 되도록 주입한 후 9시간 배양하여 수정시켰다. 수정 후 난자에서 전

핵 (pronucleus) 형성 여부를 관찰하여 난자의 형태나 세포질에 이상이 없고 두 개의 전핵이 뚜렷하게 관찰되는 전핵기 배아를 선별, 수집하였다. 이를 기본 배양액으로 옮겨 사용 시까지 37°C, 5% CO₂ 배양기 내에서 각각 24, 48, 63시간 배양하여 2세포기, 4세포기, 8세포기의 배아를 얻은 후 할구의 크기가 완전히 균등하고 무핵분절편 (anucleated fragmentation)이 없는 배아만을 선별하여 사용하였다. 또한 전핵기 배아를 72, 96시간 배양하여 밀집화 (compaction) 현상이 일어난 상실배와 포배강을 형성한 포배를 얻어 동결에 사용하였다.

5. 배아의 동결 및 융해

1) 완만동결과 초급속 융해 방법

액체질소를 동결기의 질소탱크에 채운 후 자동세포동결기 (Cryo Magic, Booil)에 전원을 연결하여 압력이 올라가기를 기다리면서 동결보존액을 제조하였다. 냉장 보관하였던 SSS (serum substitute supplement) 2ml를 D-PBS 8ml에 희석하고(단, 포배기 동결시에는 BL medium; Irvine scientific #99292를 사용하였다.) 여기에 PROH (Sigma, USA)를 넣어 최종농도가 SSS는 20%, PROH는 1.5M이 되게 하고 여기에 sucrose (Sigma, USA)를 넣어 최종농도가 0.1M이 되도록 하였다.

동결보존 container (CryoMagic, Booil)의 압력이 올라가면 일단 정지시키고 동결보존액을 분주하였다. 유리모세관을 이용하여 현미경

하에서 배양기에 들어 있던 각 발달단계의 배아를 10~15개씩 동결 보존액이 들어있는 배양접시로 옮긴 후 다시 동결 plastic straw 내로 음압을 이용하여 옮겼다. 이때 straw 내에 배열 순서는 동결보존액-공기-배아-공기-동결보존액으로 하고 마지막으로 straw 끝은 sealing powder로 봉하였으며 배아를 동결보존액에 옮겨 자동세포동결기내에 straw를 옮기기 전까지는 10분으로 하였다.

straw는 자동세포동결기의 온도가 10℃에 도달했을 때 기계 내로 옮겨주었으며 10℃에서 -7℃까지는 분당 -2℃씩 냉각시켰으며, -7℃에서 일단 5분 동안 정지시키고 1분 후 과냉각을 방지하기 위하여 액체질소에 담긴 핀셋을 이용하여 배아의 위치에서 먼 쪽에서 식빙 (seeding)을 하였다. -7℃에서 -30℃까지는 분당 -0.3℃씩 냉각시켰으며 -30℃에 이르면 straw를 다시 꺼내어 보관용 container에 넣은 채로 액체 질소통에 서서히 침지하였다. 그런 후 straw를 담은 보관용 container가 액체 질소통 바닥에 닿으면 다시 영구보관용 액체 질소통으로 옮겨 보관하였다.

배아의 용해를 위하여 동결보존된 straw를 액체 질소통에서 대기중으로 옮겨 20초간 노출시킨 후 straw 표면의 물기를 제거하고, 알코올을 문힌 거즈로 닦아 소독하였다. straw 내의 배아와 동결보존액을 배양접시에 부어 해부현미경하에서 배아의 수를 확인한 후 용해액으로 옮겼다. 기본 용해액은 20% SSS가 포함된 D-PBS로 하되 포배기 용해시에는 20% SSS가 포함된 BL medium을 기본 용해액으로 사용하였다. 1단계로 1M PROH 와 0.2M sucrose가 첨가된 용해액에서 5분, 2단계로 0.5M PROH + 0.2M sucrose가 첨가된 용해액에서 5분, 3단계로 0.2M sucrose가 첨가된 용해액에서 5분, 4단계로 기본 용해액에서 5분간 처리하였다. 세포질이 투명한 배아만을 생존

한 것으로 판정하였으며 배양 24시간 후 포배강이 정상으로 보이는 포배를 확장한 포배로 간주하였으며 생존 배아는 기본 배양액에서 배양하였다.

2) 초자화동결 방법 I

기본 동결-용해액은 10% SSS가 포함된 D-PBS로 하되 포배기 용해시에는 10% SSS가 포함된 BL medium을 기본 동결-용해액으로 사용하였다. 배아를 1.5M EG (Sigma, USA)가 첨가된 동결보존액에서 2분 30초간 평형시키고 5.5M EG와 1.0M sucrose가 첨가된 동결보존액에 넣어 30초 내로 EM grid (Pelco, 3HGC400)에 5개씩 난자를 얹어 곧바로 액체 질소에 침지시켜 동결하였다. 용해 시에는 질소에서 꺼낸 EM grid를 1.0M, 0.5M, 0.25M, 0.125M sucrose가 첨가된 용해액에 순서대로 각각 2분 30초씩 노출시킨 후 M16 배양액으로 수세하였다. 해부현미경하에서 세포질이 투명한 배아만을 생존한 것으로 판정하고 포배시기의 배아는 24시간 후 포배강이 정상으로 보이는 포배를 확장한 포배로 간주하였으며 생존 배아는 기본 배양액에서 배양하였다.

3) 초자화동결 방법 II

기본 동결-용해액은 20% SSS가 포함된 D-PBS로 하되 포배기 용해시에는 20% SSS가 포함된 BL medium을 기본 동결-용해액으로 사용하였다. 배아를 10% DMSO (MERCK, USA)와 10% EG를 넣은 동결보존액에서 1분간 평형시키고 20% SSS를 포함한 D-PBS에 20% DMSO + 20% EG와 0.5M sucrose 용액에 넣어 30초 내로 EM grid에 5개씩 난자를 얹어 곧바로 질소에 침지시켜 동결하였다. 용해

시에는 질소에서 꺼낸 EM grid를 1단계 0.2M sucrose 용액에 1분, 2단계 0.1M sucrose가 첨가된 용해액에 5분, 마지막단계로 기본 용해액에서 5분간 2회 노출시킨 후 M16 배양액으로 수세하였다. 해부현미경하에서 세포질이 투명한 배아만을 생존한 것으로 판정하고 포배시기의 배아는 24시간 후 포배강이 정상으로 보이는 포배를 확장한 포배로 간주하였으며 생존 배아는 기본배양액에서 배양하였다.

6. 배의 관찰

배아의 상태를 용해 후 24시간마다 관찰하였다. 포배강이 2/3 이상 형성된 배를 포배 (blastocyst)라 하였고 투명대 (zona pellucida)가 터진 초기 부화 (early hatching) 과정에서 말기 부화 (hatched) 과정까지를 부화 (hatching)라 하였다. 또한 세포질이 응축되었거나 액포가 형성된 것 또는 세포막이 터지는 등의 비정상적인 배를 퇴화 (degeneration)한 것으로 분류하였다.

7. 통계 처리

본 실험의 통계적 유의성 검정은 Sigma Plot 4.0의 student's t-test 방법으로 실시하였으며, P값이 0.05보다 작은 경우 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 생쥐 배아의 각 발달단계에서 동결방법에 따른 회수율, 생존율 및 발달율의 비교

배아의 각 발달단계에서 완만동결과 초자화동결 I, II의 방법에 따른 회수율, 생존율 및 발달율의 양상을 알아보기 위해 전핵시기(2PN), 2세포기, 4세포기, 8세포기, 상실기, 포배기의 각 단계에서 동결을 시행하였으며 1일 후에 각 방법별로 용해한 후 생존율을 측정하고 전핵시기에서는 2세포기, 포배기로의 발달율과 부화율을 관찰하였고 나머지 발달단계에서는 포배기로의 발달율과 부화율을 관찰하였다.

1) 전핵시기(2PN)

전핵시기에서 완만동결과 초자화동결 I, II을 시행했을 시 생존율 및 발달율을 관찰한 결과는 Figure 1과 같다.

수정 후 9시간 후 2개의 전핵이 분명히 확인되는 배아를 수집하여 이들을 각 방법별로 동결한 후 용해하여 회수율과 생존율을 측정하였으며 생존한 배아는 배양 후 15시간째에 2세포, 87시간째에 포배, 그리고 135시간째에 부화율을 관찰하였다.

Figure 1에서 보는 바와 같이 각 동결방법에서 생존율은 각기 방법간에 유의한 차가 없었다. 예비실험 결과 전핵시기에서 동결 후 2세포기로 진행되지 못하는 배아의 수가 유의하게 측정되어 전핵 세포기에서는 2세포기로의 발달율을 관찰하였다. 먼저 2세포기에서는 초자화동

결 I, II 방법에서는 96.6%, 97.1%로 나타났으나 완만동결에서는 85.8%의 발달율을 나타내었다. 포배로의 발달율에서는 초자화동결 II의 방법이 76.6%로 66%의 완만동결과 비교하여 유의하게 높게 나타났다 ($P < 0.05$). 부화율은 완만동결과 초자화동결 I, II 방법 모두 51.7%, 50.1%, 47.8%로 유사하게 나타났다.

2) 2세포기

2세포기시기에서 완만동결과 초자화동결 I, II를 시행했을 시 생존율 및 발달율을 관찰한 결과는 Figure 2와 같다.

수정 후 24시간 후 2개의 할구가 균등히 분할된 배아를 수집하여 이들을 각 방법별로 동결한 후 융해하여 회수율과 생존율을 측정하였으며 생존한 배아는 배양 후 72시간째에 포배로의 발달율, 그리고 120시간째에 부화율을 측정하였다.

Figure 2에서 보는 바와 같이 각 동결방법에서 생존율에 있어서는 91.4%인 완만동결과 비교 시 초자화동결 I, II의 방법에서는 모두 100%로 유의하게 높게 나타났다 ($P < 0.05$). 포배로의 발달율은 72.6%의 완만동결과 비교 시 초자화동결 I의 방법이 88.8%로 유의하게 높게 나타났다 ($P < 0.05$). 120시간 후 부화율에서는 3가지 방법 모두 68.5%, 72.4%, 67.2%로 유의한 차이가 없었다.

3) 4세포기

4세포기시기에서 완만동결과 초자화동결 I, II를 시행했을 시 생존율 및 발달율을 관찰한 결과는 Figure 3과 같다.

수정 후 48시간 후 4개의 할구가 균등히 분할된 배아를 수집하여 이들을 각 방법별로 동결한 후 융해하여 회수율과 생존율을 측정하였으며 생존한 배아는 배양 후 48시간째에 포배로의 발달율, 그리고 96시간째에 부화율을 측정하였다.

Figure 3에서 보는 바와 같이 각 동결방법에서 생존율은 유의한 차이가 없었다. 포배로의 발달율은 초자화동결 I, II 방법에서 69.0%, 69.4%로 80.5%의 완만동결 보다 유의하게 낮은 발달율을 보였다 ($P < 0.05$). 부화율에서는 57.4%의 완만동결방법과 45%의 초자화동결 II 방법에서는 유의한 차이가 없었으나 초자화동결 I 방법에서는 34.9%로 유의하게 낮은 부화율을 나타냈다 ($P < 0.01$).

4) 8세포기

8세포기시기에서 완만동결과 초자화동결 I, II를 시행했을 시 생존율 및 발달율을 관찰한 결과는 Figure 4와 같다.

수정 후 63시간 후 8개의 할구가 균등히 분할된 배아를 수집하여 이들을 각 방법별로 동결한 후 융해하여 생존율을 측정하였으며 생존한 배아는 배양 후 33시간째에 포배로의 발달율, 그리고 81시간째에 부화율을 측정하였다.

Figure 4 에서 보는 바와 같이 각 동결방법에서 생존율은 모두 100%로 나타났다. 그러나 포배로의 발달율에서는 84.5%의 초자화동결 I의 방법이 62.9%의 완만동결방법보다 유의하게 높은 발달율을 나타냈다 ($P < 0.05$). 부화율에서는 57.1%의 완만동결방법과 비교 시 초자화동결 I, II의 방법이 63.3%와 74.2%로 유의하게 높은 결과를 얻었다 ($P < 0.05$).

5) 상실기

상실기에서 완만동결과 초자화동결 I, II를 시행했을 시 생존율 및 발달율을 관찰한 결과는 Figure 5와 같다.

수정 후 72시간 후 할구 사이의 경계가 뚜렷해 보이지 않고 들러붙은 모양을 한 밀집화현상 (compaction)이 일어난 배아를 수집하여 이들을 각 방법별로 동결한 후 융해하여 회수율과 생존율을 측정하였으며 생존한 배아는 배양 후 24시간째에 포배로의 발달율, 그리고 72시간째에 부화율을 측정하였다.

Figure 5에서 보는 바와 같이 각 동결방법에서 생존율에서는 유의한 차이가 없었다. 포배로의 발달율은 초자화동결 I의 방법이 69.8%의 완만동결 방법보다 84.4%로 유의하게 높은 발달율을 나타냈다 ($P < 0.05$). 부화율에서는 초자화동결 II의 방법에서 66.6%로 42.6%의 완만동결방법 보다 유의하게 높은 발달율을 나타내었다 ($P < 0.01$).

6) 포배기

포배시기에서 완만동결방법과 초자화동결 I, II방법을 시행했을 시 생존율 및 발달율을 관찰한 결과는 Figure 6과 같다.

수정 후 96시간 후 포배강이 2/3이상 형성된 배아를 수집하여 이들을 각기 방법별로 동결한 후 융해하여 회수율과 생존율을 측정하였으며 생존한 배아는 배양 후 24시간째에 확장된 포배의 비율을 그리고 24시간 후에 부화율을 측정하였다.

Figure 6에서 보는 바와 같이 각 동결방법에서 회수율과 생존율은 모두 100%였다. 24시간 후 확장율과 부화율에서는 Figure 6에서 보는 바와 같이 초자화동결 I의 방법이 완만동결보다 유의하게 낮은 발달율

을 나타냈다 ($P < 0.05$). 초자화동결 II의 방법은 확장율과 부화율 모두 67.2%, 41.8%로 57.3%, 36%인 완만동결과 유사하게 나타났다.

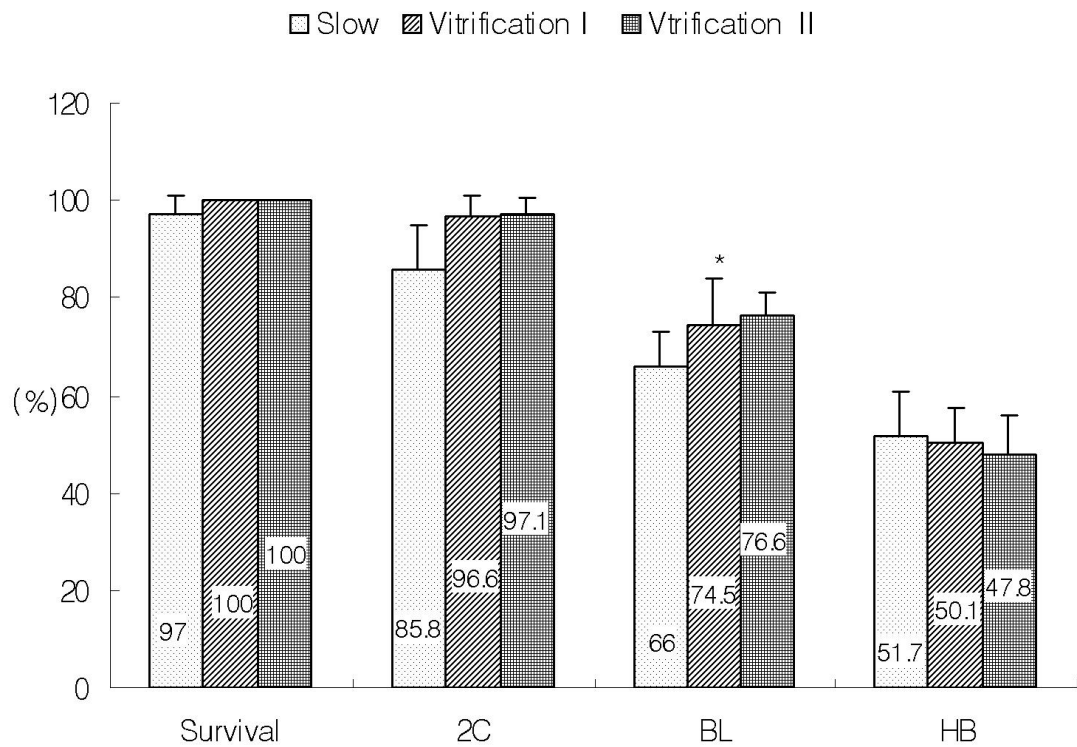


Figure 1. Comparison of the cryopreservation efficiency between slow freezing and vitrification methods using mouse pronuclear stage embryos.

Mouse pronuclear stage embryos were collected at 9hr post inseminated and cultured for 15hr, 87hr or 135hr, respectively. The above results were obtained by pooling of five replicates. Abbreviations : 2C, 2-cell embryo; BL, blastocyst; HB, hatching blastcyst. * significantly different from the slow freezing. *P<0.05.

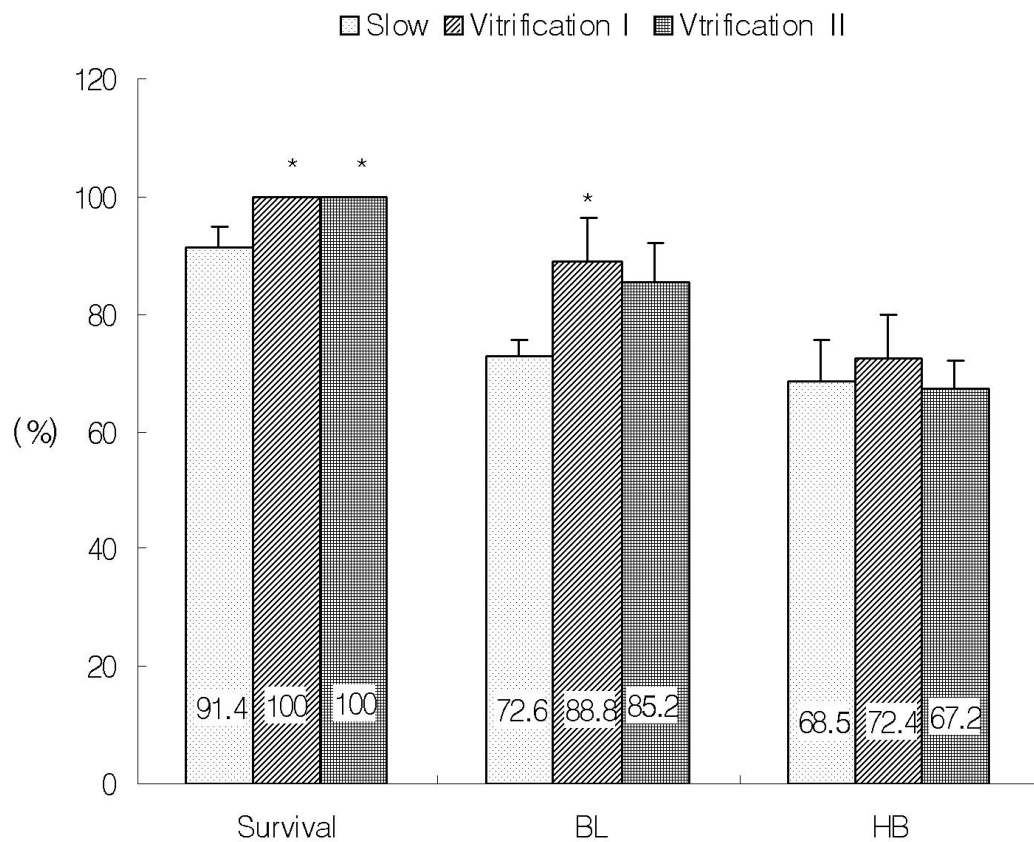


Figure 2. Comparison of the cryopreservation efficiency between slow freezing and vitrification methods using mouse 2-cell stage embryos.

Mouse 2-cell stage embryos were collected at 24hr post inseminated and cultured for 72hr or 120hr, respectively. The above results were obtained by pooling of five replicates. Abbreviations : BL, blastocyst ; HB, hatching blastocyst. * significantly different from the slow freezing. *P<0.05

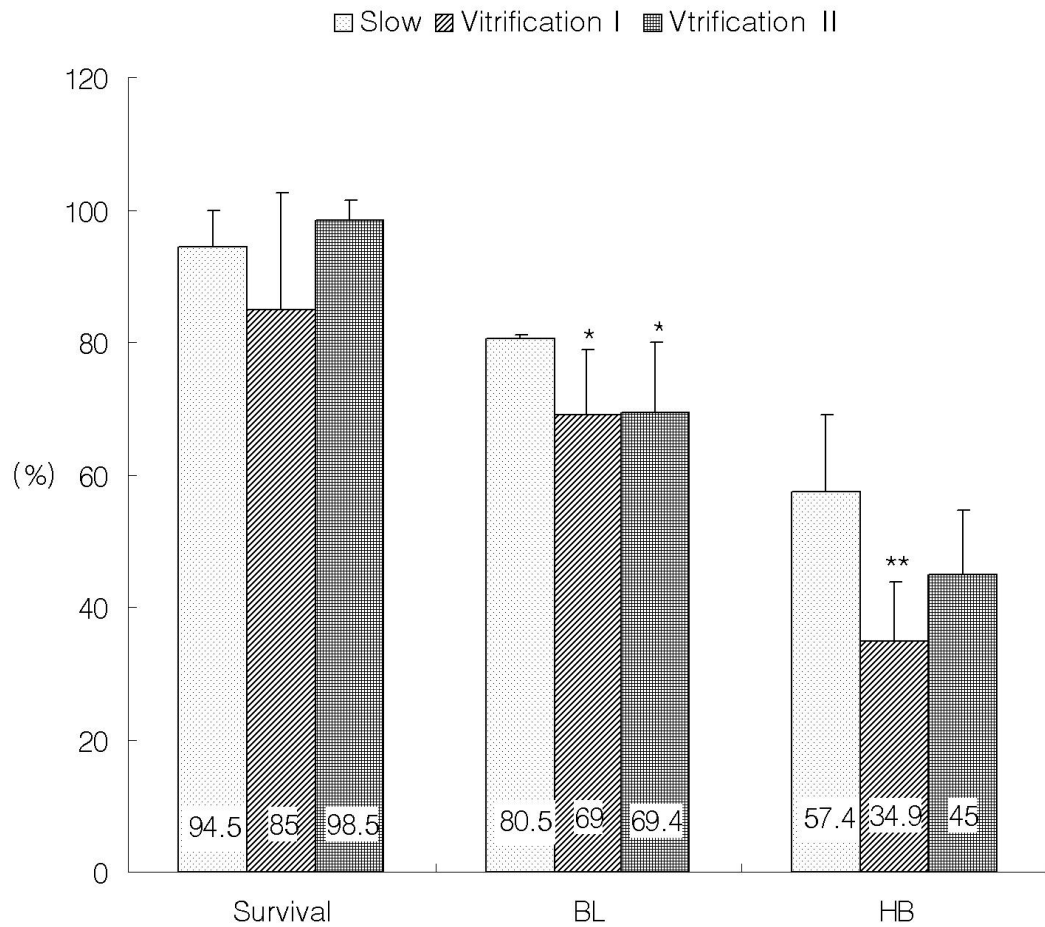


Figure 3. Comparison of the cryopreservation efficiency between slow freezing and vitrification methods using mouse 4-cell stage embryos.

Mouse 4-cell stage embryos were collected at 48hr post inseminated and cultured for 48hr or 96hr, respectively. The above results were obtained by pooling of five replicates. Abbreviations : BL, blastocyst; HB, hatching blastocyst. *, ** significantly different from the slow freezing. * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

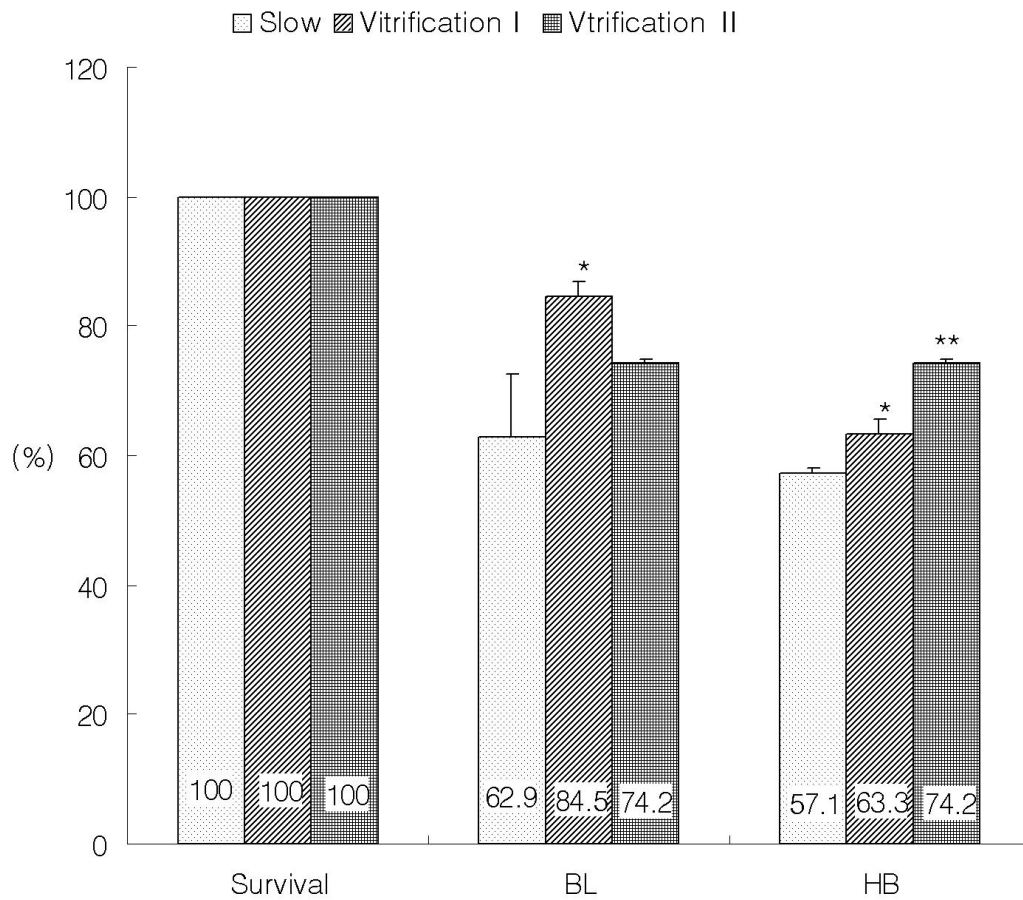


Figure 4. Comparison of the cryopreservation efficiency between slow freezing and vitrification methods using mouse 8-cell stage embryos.

Mouse 8-cell stage embryos were collected at 63hr post inseminated on and cultured for 33hr or 81hr, respectively. The above results were obtained by pooling of five replicates. Abbreviations : BL, blastocyst; HB, hatching blastocyst. *, ** significantly different from the slow freezing. * $P < 0.05$ ** $P < 0.001$

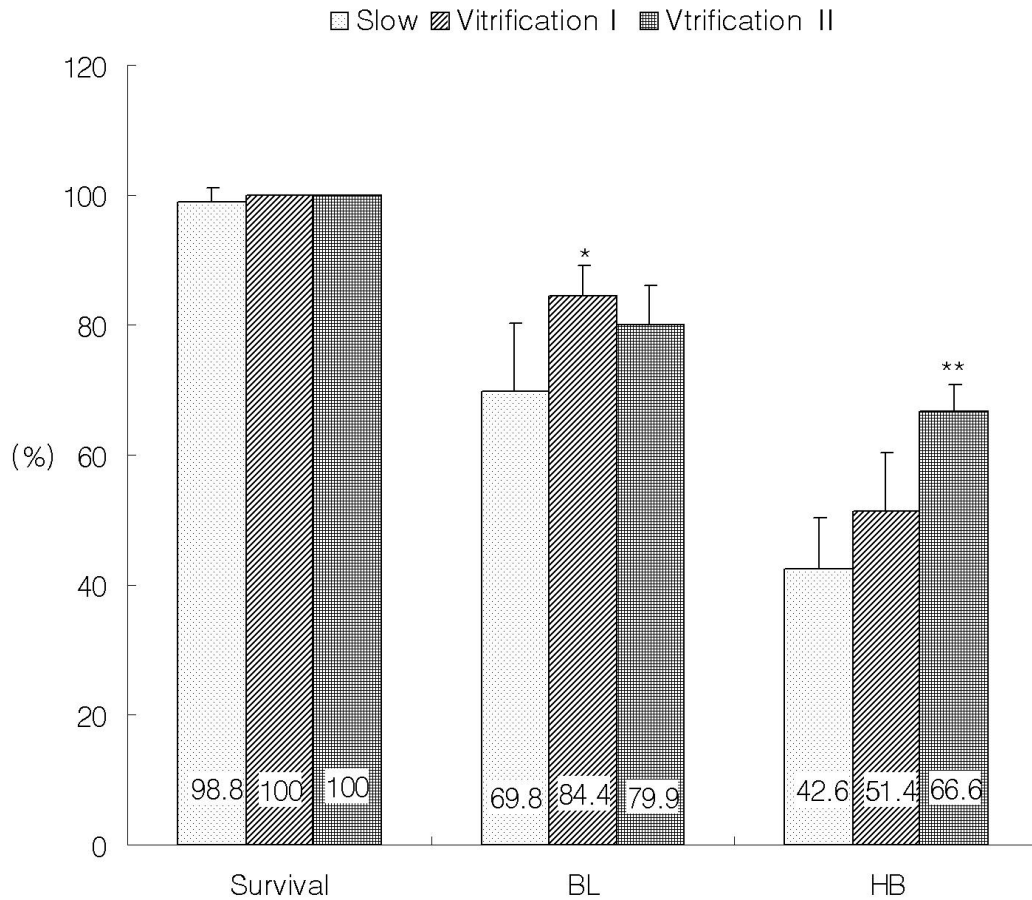


Figure 5. Comparison of the cryopreservation efficiency between slow freezing and vitrification methods using mouse morulae.

Mouse morulae were collected at 72hr post inseminated and cultured for 24hr or 72hr, respectively. The above results were obtained by pooling of five replicates. Abbreviations : BL, blastocyst; HB, hatching blastocyst. *, ** significantly different from the slow freezing. * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

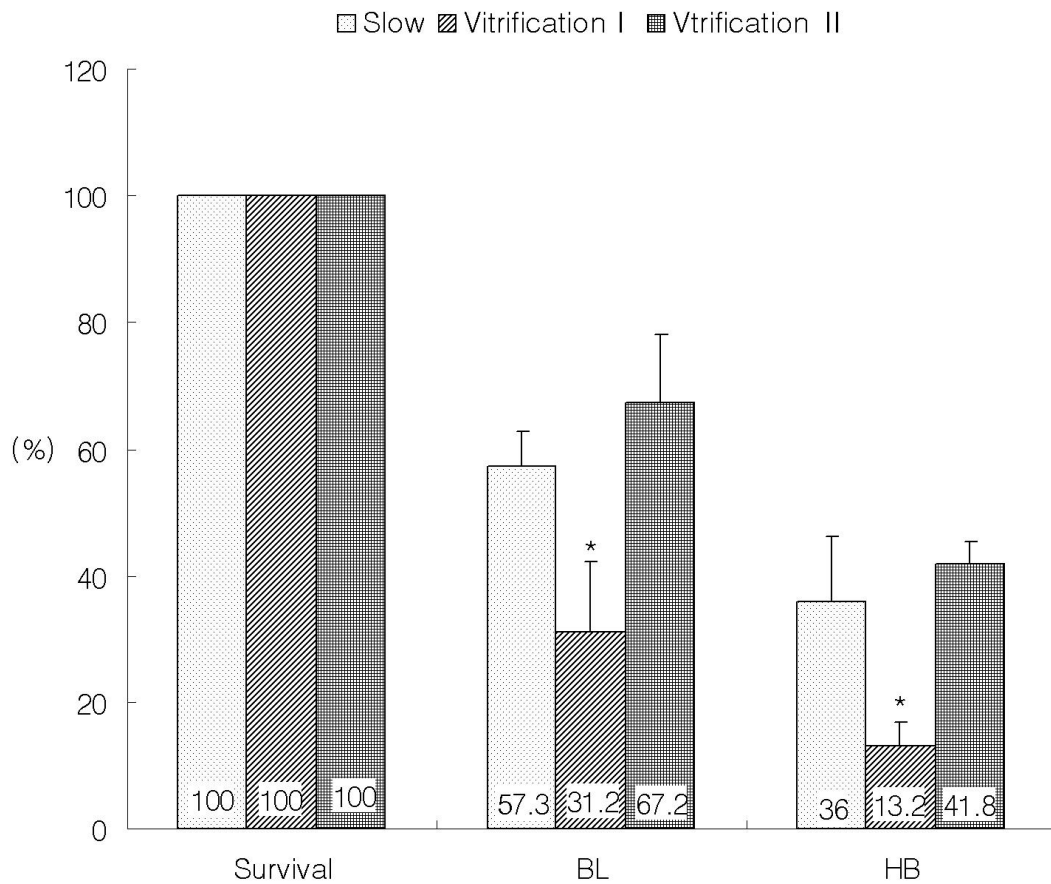


Figure 6. Comparison of the cryopreservation efficiency between slow freezing and vitrification methods using mouse blastocyst.

Mouse blastocyst were collected at 96hr post inseminated and cultured for 24hr or 48hr, respectively. The above results were obtained by pooling of five replicates. Abbreviations : BL, blastocyst ; HB, hatching blastocyst. *, ** significantly different from the slow freezing. * $P < 0.05$

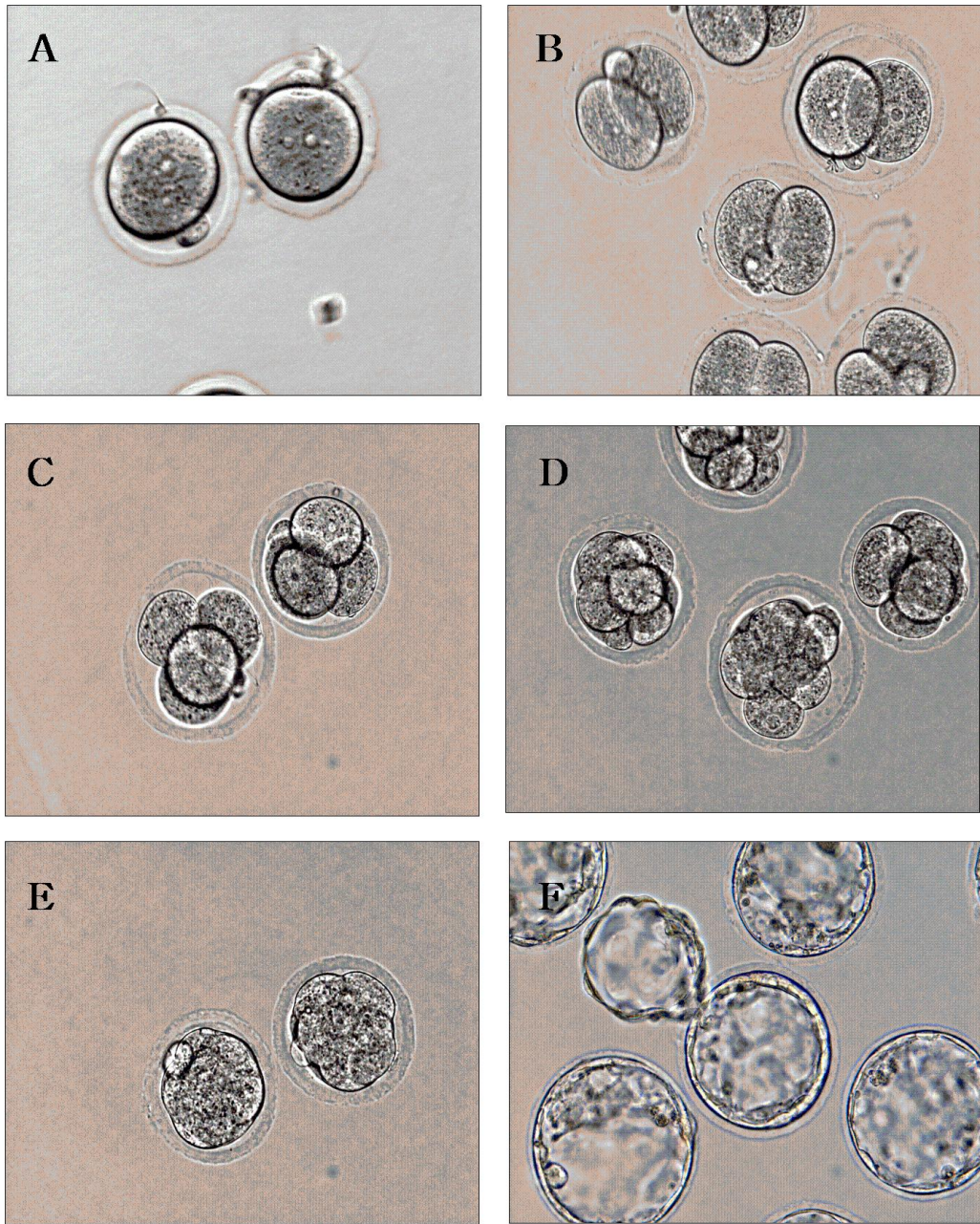


Figure 7. Light micrographs of embryo

A. 9hr after insemination($\times 400$), B. 24hr after insemination($\times 400$),
C. 48hr after insemination($\times 400$), D. 63hr after insemination($\times 400$),
E. 72hr after insemination($\times 400$), F. 96hr after insemination($\times 400$)

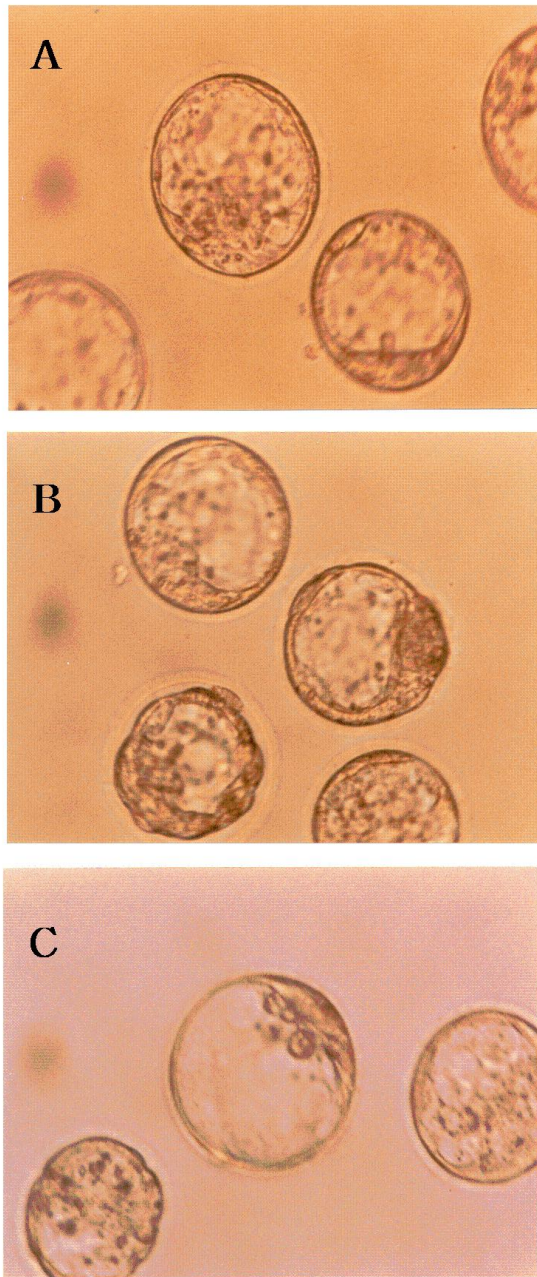


Figure 8. Light micrographs of re-expanded blastocyst after cryo-thawing

A. slow freezing($\times 400$), B. vitrification I ($\times 400$) C. vitrification II ($\times 400$)

IV. 고찰

배아의 동결보존은 보조 생식술에서 과배란 유도 프로그램의 발달과 다태아 임신 방지를 위한 배아 이식 개수의 제한 등으로 잉여배아가 속출되면서 배아의 효율적 이용의 한 방편으로 이용되어지고 있다.

이에 본 실험에서는 인간 배아의 동결에서 사용되어지고 있는 완만 동결 방법과 포유류의 배아동결 시 사용되어지고 있는 초자화동결 방법을 각 발달단계의 생쥐배아에 적용하여 동결-융해 후의 배아의 회수율, 생존율, 발달율을 비교하여 보았다.

동결-융해 후 배아의 생존율과 발달율에 영향을 주는 인자에는 동결-융해의 방법(Mazur, 1984), 종에 따른 배아의 특이성, 배아의 질 및 발달시기(Mandelbaum et al., 1988) 등이 있으며 특히 발달시기에 따른 영향으로는 세포막의 물질 투과성의 차이, 세포의 부피, 세포 골격의 변화, 세포내 소기관들의 항동해제에 대한 민감성 차이와 세포 내 결빙 형성의 차이 등 물리적 냉동보존에 대한 적응 변화의 차이와 할구 크기의 차이, 탈수정도, 삼투압 차이 등에 의한 것을 들 수 있다.(Ashwood-Smith et al., 1988; Trounson et al., 1986; 전 et al., 1994; Kim et al., 1987).

그 중에서도 항동해제의 종류(Kasai et al., 1982)에 따라서 배아의 생존과 발달에 영향을 미친다는 것이 보고 되면서 전핵시기의 배아와 4세포기 이전의 초기 배아는 PROH를 이용하는 것이 (Lassalle et al., 1985), 4세포기에서 8세포기 배아의 항동해제로는 DMSO (Fehilly et al., 1985), 포배의 항동해제는 glycerol을 이용하는 것이 임신율을 높이는 것으로 알려져 있다(Cohen et al., 1985; Menezo et al., 1992).

본 연구의 결과에서 보면 먼저 4세포기 이전의 단계의 전핵 세포기와 2세포기에서는 포배까지의 발달율이 전핵단계에서는 초자화동결 II의 방법이, 2세포기에서는 초자화동결 I의 방법이 PROH를 항동해제로 사용한 완만동결보다 유의하게 나타났으나 부화율에 있어서는 세 방법 모두 유사한 발달율을 보였으며 전핵시기에서는 완만동결의 수치가 약간 높게 나타났다. 그러나 4세포기에서는 Fehilly 등 (Fehilly et al., 1985)의 결과와는 달리 PROH를 사용한 완만동결의 방법에서 초자화동결 방법 보다 높은 발달율과 부화율이 관찰되었다. 8세포기와 상실기에서는 EG를 사용한 초자화동결 I의 방법과 EG와 DMSO를 함께 사용한 초자화동결 II의 방법이 완만동결 방법보다 유의하게 높은 발달율을 나타내었으며 부화율에 있어서는 EG만을 사용한 초자화동결 I의 방법보다 DMSO를 함께 사용한 초자화동결 II의 방법에서 높은 결과를 보인 것으로 보아 Fehilly 등 (Fehilly et al., 1985)의 결과와 유사하게 8세포기와 상실기 시기에는 PROH 보다는 투과력이 적은 항동해제를 사용하는 것이 바람직한 것으로 보인다. 4세포기 이전의 배아에서도 Lassle 등(Lassle et al., 1985)의 논문에서는 인간 배아의 동결보존에서 PROH의 사용이 적합하다고 보고하였는데 본 실험에서는 인간 배아보다 체적이 적은 생쥐 배아를 재료로 사용했기 때문에 4세포기에서 완만동결이 초자화동결 I, II의 방법보다 높은 발달율을 보인 것으로 생각된다.

또한 포배 시기의 동결보존은 포배의 증가된 할구수가 동결 시 일부 세포가 손상을 받는 경우에도 생존한 할구가 세포 분열 등의 방법으로 보상이 가능하며 (Kaufmann et al., 1995; Menezo et al., 1992), 또한 최근 공동 배양과 같은 배양기법의 향상으로 다수의 건강한 포배의 획득이 가능하여 포배의 동결보존에 관해서도 많은 연구가 진행되어 지

고 있으며. Bilton 등 (Bilton et al., 1979)이 glycerol을 이용하여 소의 포배의 동결보존에 성공하였다. 포배의 동결시기로는 투명대는 짧아져 있으나 부화는 일어나지 않은 시기가 유리한 것으로 알려져 있으며 Menezo 등 (Menezo et al., 1992)이 포배의 동결 전 준비단계의 감소와 sucrose의 사용으로 배아의 질의 향상을 보고한 후 항동해제로는 glycerol을 동결 방법으로는 완만동결 방법에 의하여 동결을 시행하였다. Massip 등 (Massip et al., 1992)은 1.36M glycerol과 0.2M sucrose를 사용한 완만동결 방법으로 78.5%의 생존율과 85.8%의 확장율을 보고하였는데 본 실험에서는 동결-융해 후 생존율은 세 가지 방법에서 100%로 나타났으나 확장율로는 EG를 항동해제로 사용한 초자화동결 I의 방법에서는 31.2%로 낮은 결과를 나타냈으나 완만동결과 초자화동결 II의 방법에서는 57.3%와 67.2%의 발달율로 다른 발달단계와 유사한 결과를 나타냈다. 본 실험의 생존율을 감안했을 때 Massip 등 (Massip et al., 1992)과 유사한 발달율을 얻은 것으로 사료되며 본 실험을 진행하기 전 예비 실험으로 BL medium이 아닌 D-PBS를 기본 동결보존액으로 사용하였을 때는 본 실험만큼의 결과를 얻지 못한 것을 감안하였을 때 BL medium이 D-PBS보다 glucose의 조성 등이 증가되어 항동해제의 투과도에 영향을 주었을 것으로 사료된다. 또한 완만동결 방법과 비교하여 초자화동결 II 방법의 발달율만을 비교했을 시에는 $67.3 \pm 11.9\%$ 로 $57.3 \pm 5.5\%$ 보다는 높은 결과를 보인 것으로 PROH의 사용보다는 투과도가 적은 항동해제의 사용이 적정할 것으로 생각된다.

또한 동결을 위한 배아의 발달시기를 결정하기 위해서도 체외배양 기간 동안 동결 전 배아의 손실과 동결-융해 후 할구나 배아의 손실, 신뢰할 수 있는 배아 생존 확인 방법 등을 고려하여야 하는데 실질적

으로 배아 발육 단계에 대한 생존율은 연구 기관 보고마다 큰 차이를 보이고 있어 어느 시기의 배아를 가지고 동결보존 하는 것이 가장 좋은 방법인지는 아직 논란의 대상이 되고 있다. 본 실험에서는 용해 후 세포질이 맑고 할구가 모두 생존한 배아만을 생존한 것으로 판정하여 실험을 진행하였고 동결-용해 후 각 발달단계별 발달율은 유사한 결과를 나타내었다. 이로 미루어 동결보존에 특히 유리한 특정 발달 시기는 없는 것으로 여겨진다. 그러나 각 발달단계에 따라 적절한 동결보존 방법과 항동해제를 선택하여, 시행한다면 배아의 생존율, 발달율을 높일 수 있을 것이다. 또한 현재 인간배아에서 보편적으로 사용하는 완만동결 방법 대신 초자화동결 방법을 사용할 경우 대부분의 발달단계에서 좋은 결과를 나타내는 것으로 사료된다. 일부에서 초자화동결 방법에서 이용하는 EM grid의 직접 질소 침지에 따른 무균 상태를 보장할 수 없다는 문제가 제기 되기도 하였으나 포배의 동결 시에 타 동결 방법에 비해 높은 결과를 보여 현재 임상에서 많이 이용되고 있는 실정이다.

동결-용해 후 전핵시기와 난할 단계 배아의 생존율과 임신율에 관한 타 연구들을 보면 생존율은 서로 유사했으나 착상율은 난할 단계 배아에서 높음이 보고되고 또한 최근 배아의 배양시에 공배양 개념의 도입과 상품화 배지의 공급으로 포배까지의 배양 및 이식이 널리 이용됨으로 시술기관에서도 배아의 동결보존 방법을 획일적으로 결정하는 것이 아니라 각 기관의 경험과 환자의 상태, 배아의 질, 또한 채취된 난자의 수에 따라 적절한 동결 방법과 동결 시기를 결정함으로써 동결-용해 후 배아의 높은 생존율과 발달율을 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 동결-용해 후 생존율, 발달율, 부화율만을 측정하여 비교하여 보았으나 동결 후 배아의 염색체, 방추사의 손상 등에 대해서

연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 김문규, 이호준, 이승재, 전종영: 냉동·해빙한 생쥐배아의 발달에 미치는 해빙속도와 퇴화할구의 영향. *대한불임학회잡지* 1987; 14: 51-9.
- 김희선, 류범용, 오선경, 서창석, 김석현, 최영민, 김정구, 문신용, 이진용: 동결보존시 생쥐 전핵배아의 시기에 따른 생존율과 발달율의 비교. *대한불임학회잡지* 1998; 25:59-64.
- 양정숙, 손철, 배인하: 제2일째 생쥐 배아의 초자화동결과 초급속동결. *대한불임학회잡지* 2000, 27(3):283-289.
- 오대식, 이규섭: 생쥐 초기 포배의 초자화 동결 방법과 완만동결 방법에 따른 배아 발달에 관한 비교. *대한산부회지* 1998; 41(5):1470-1478
- 윤숙영, 손철, 배인하; 초자화동결을 이용한 제 3일째 생쥐 배아의 동결보존. *대한불임학회잡지* 1997(24); 325-333
- 이정호, 김미정, 김종인: 생쥐 배아 동결보존시 발달 단계에 따른 해동 후 생존율. *대한산부회지* 2001, 44(3):540-545
- 전용필, 이호준, 김문규: 생쥐 초기배아의 발달기시와 냉동보존 방법에 따른 발달율. *대한불임학회잡지* 1994; 21: 325-30.
- Ali J, Shelton J: Vitrification of preimplantation stages of mouse embryos. *J Reprod Fertil.* 1993;98:459-65.

Ashwood-Smith MJ, Morris GW, Fowler R, Appleton TC, Ashorn R: Physical factors are involved in the destruction of embryos and oocytes during freezing and thawing procedures. *Hum Reprod.* 1988;3:795-802.

Bilton RJ, Moore NW: Factors affecting the viability of frozen stored cattle embryos. *Aust J Biol Sci.* 1979;32:101-7.

Cohen J, Simons RF, Edwards RG, Fehilly CB, Fishel SB: Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocysts. *J In Vitro Fert Embryo Transf.* 1985 ;2:59-64.

Cohen J, Simons RS, Fehilly CB, Edwards RG: Factors affecting survival and implantation of cryopreserved human embryos. *J In Vitro Fert Embryo Transf.* 1986 ;3:46-52.

Cohen J, DeVane GW, Elsner CW, Kort HI, Massey JB, Norbury SE: Cryopreserved zygotes and embryos and endocrinologic factors in the replacement cycle. *Fertil Steril.* 1988 ;50:61-7.

Fehilly CB, Cohen J, Simons RF, Fishel SB, Edwards RG: Cryopreservation of cleaving embryos and expanded blastocysts in the human: a comparative study. *Fertil Steril.* 1985 ;44:638-44.

Friedler S, Giudice LC, Lamb EJ: Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil Steril.* 1988 ;49:743-64.

Karlstrom PO, Bergh T, Forsberg AS, Sandkvist U, Wikland M: Prognostic factors for the success rate of embryo freezing.

Hum Reprod. 1997 ;12:1263-6.

Kasai M, Niwa K, Iritani A: Survival of rat embryos after freezing.
J Reprod Fertil. 1982 ;66:367-70.

Kaufman RA, Menezo Y, Hazout A, Nicollet B, DuMont M, Servy EJ: Cocultured blastocyst cryopreservation: experience of more than 500 transfer cycles. *Fertil Steril.* 1995 ;64:1125-9.

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.

Kondo I, Suganuma N, Ando T, Asada Y, Furuhashi M, Tomoda Y: Clinical factors for successful cryopreserved-thawed embryo transfer. *J Assist Reprod Genet.* 1996 ;13:201-6.

Lassalle B, Testart J, Renard JP: Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2 propanediol. *Fertil Steril.* 1985 ;44:645-51.

Macas E, Xie M, Keller PJ, Imthurn B, Rulicke T: Developmental capacities of two-cell mouse embryos frozen by three methods.
J In Vitro Fert Embryo Transf. 1991 ;8:208-12.

Mandelbaum J, Junca AM, Plachot M, Alnot MO, Salat-Baroux J, Alvarez S, Tibi C, Cohen J, Debache C, Tesquier L: Cryopreservation of human embryos and oocytes. *Hum Reprod.* 1988 ;3:117-9.

Martinez AG, Matkovic M: Cryopreservation of ovine embryos: slow freezing and vitrification. *Theriogenology.* 1998 1;49:1039-49.

- Mazur P: Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol.* 1984 ;247:C125-42.
- Menezo Y, Nicollet B, Herbaut N, Andre D: Freezing cocultured human blastocysts. *Fertil Steril.* 1992;58:977-80.
- Quinn P, Kerin JF: Experience with the cryopreservation of human embryos using the mouse as a model to establish successful techniques. *J In Vitro Fert Embryo Transf.* 1986 ;3:40-5.
- Rall WF, Fahilly GM: Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature.* 1985 ;313:573-5.
- Rall WF: Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology.* 1987;24:387-402.
- Rall WF, Wood MJ, Kirby C, Whittingham DG: Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *J Reprod Fertil.* 1987 ;80:499-504.
- Reubinoff BE, Pera MF, Vajta G, Trounson AO: Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method. *Hum Reprod.* 2001 ;16 :2187-94.
- Testart J, Lassalle B, Belaisch-Allart J, Hazout A, Forman R, Rainhorn JD, Frydman R: High pregnancy rate after early human embryo freezing. *Fertil Steril.* 1986 ;46:268-72.
- Tharnprisarn W, Suwajanakorn S, Sereepapong W, Pruksananonda K, Boonyakasemsanti W, Virutamasen P, Ahnonkitpanit V,

- Chompurat D, Numchaisrika P: Mouse blastocyst vitrification compared with the conventional slow-freezing method. *J Med Assoc Thai.* 2003 ;86:666-71.
- Trounson A, Mohr L: Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature.* 1983 2-26;305:707-9.
- Trounson A.: Preservation of human eggs and embryos. *Fertil Steril.* 1986 ;46:1-12.
- Trounson A, Peura A, Freemann L, Kirby C: Ultrarapid freezing of early cleavage stage human embryos and eight-cell mouse embryos. *Fertil Steril.* 1988 ;49:822-6.
- Van Wagendonk-De Leeuw AM, Den Daas JH, Kruip TA, Rall WF: Comparison of the efficacy of conventional slow freezing and rapid cryopreservation methods for bovine embryos. *Cryobiology.* 1995 ;32:157-67
- Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P: Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science.* 1972 27;178:411-4.
- Wilson L, Quinn P: Development of mouse embryos cryopreserved by an ultra-rapid method of freezing. *Hum Reprod.* 1989 ;4:86-90.
- Zhu SE, Kasai M, Otoge H, Sakurai T, Machida T: Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solutions. *J Reprod Fertil.* 1993 ;98:139-45.

Abstract

A Comparison study between slow freezing and vitrification methods for the cryopreserved of mouse embryos.

Sung-Ah Kim
Department of Biology
Graduate School
sungshin Women's University

Technology for the long term preservation of gamete and embryo has been improved greatly over the past 20 years and currently is used for supporting various assisted reproductive technology. Nevertheless cryopreservation method is not perfect and still needs to be developed.

This study was designed to compare the efficiency of slow freezing method with that of vitrification method for the cryopreservation of mouse embryos.

Embryos were obtained from F1 hybrid mice and collected at designated developmental stages including pronuclear stage, 2-cell stage, 4-cell stage, 8-cell stage, morula stage and blastocyst stage. Embryos of each stage were frozen by three methods; Slow freezing (1.5 M propanediol and 0.1 M sucrose), Vitrification I (1.5 M ethylene glycol followed by 5.5 M ethylene glycol and 1.0 M sucrose), Vitrification II (10% ethylene glycol and 10% dimethyl

sulfoxide followed by 20% ethylene glycol, 20% dimethyl sulfoxide and 0.5 M sucrose). After being thawed, rates of survival, development and hatching of the embryos were morphologically assessed.

Results showed that survival rate of 2-cell stage embryos after cryopreservation using vitrification I or II method was better than that of slow freezing method. However, slow freezing method resulted in a higher rate of development and hatching when 4-cell embryos were examined (80.5%, 57.4%). Although there was no difference in the developmental rate of cryopreserved pronuclear embryos to 2-cell embryos whether they were cryopreserved by slow freezing, vitrification I or II method, development of pronuclear embryos to blastocyst was most pronounced when they were cryopreserved by vitrification II method. Compared to the slow freezing method, 2-cell embryos cryopreserved by vitrification I method showed better development to blastocysts. Development of 4-cell embryos to blastocysts was significantly better when they were cryopreserved by either vitrification I or II compared to slow freezing method. Hatching rate of 4-cell embryos was greater when vitrification I or II method rather than slow freezing method was used. Hatching rate of 8-cell stage embryos cryopreserved by either vitrification I or II method was greater than that of embryos cryopreserved by slow freezing method. However, development of morulae to blastocysts was greatest when vitrification I method was used. Interestingly, both development and hatching rates of blastocysts cryopreserved by vitrification I method were significantly lower than that of blastocysts cryopreserved by slow freezing method, although the efficiency of vitrification II method was comparable to that of slow freezing method.

In summary, results showed that survival rate of mouse embryos after cryopreservation was similar to each other whether they

were cryopreserved by either slow freezing method, vitrification I or II method. However, slow freezing method resulted in the better development to blastocysts and hatching of mouse 4-cell embryos and hatching of blastocyst than vitrification methods. For pronuclear, 2-cell, 8-cell embryos and morulae, vitrification methods showed a better development to blastocysts and hatching than slow freezing method. Based upon these observations, it is suggested that application of cryopreservation method can be varied depending on the developmental stage of embryos while vitrification method appears to be a better choice for the cryopreservation of most cleavage stage mouse embryos.

감사의 글

되돌아보니 정말 많은 분들의 도움으로 논문을 마치게 되었습니다. 모든 분들께 머리 숙여 감사의 마음을 전해 드립니다.

먼저 논문이 완성되기까지 따뜻한 관심과 때로는 따가운 훈계로 지도해 주신 배인하 교수님께 존경과 감사의 마음을 전합니다. 또한 논문 심사를 맡아주시고 바쁘신 와중에도 논문 교정까지 관심있게 지켜봐주신 서울여자대학교 김해권 교수님과 MD PLUS 최규완 연구실장님께도 깊은 감사를 드립니다. 그리고 본 대학교 생물학과 오용자 교수님, 김진일 교수님, 박경숙 교수님, 강혜순 교수님, 윤진호 교수님께 감사드립니다.

배인하 교수님의 정년퇴임으로 마지막 제자가 된 저에게 언제나 따뜻한 말과 관심을 가져주신 발생학 연구실의 모든 선배님들께 감사의 마음을 전하며 또한 부끄럽지 않은 후배가 되도록 열심히 노력하겠습니다.

학교 수업과 논문 실험을 마치기까지 정말 많은 도움과 편의를 봐준 IVF KOREA 노미경 선생님, 이지현 선생님, 김주영 선생님께 감사의 마음을 전합니다.

논문을 쓰는 동안 많은 가르침과 관심 어린 애정으로 지켜봐주신 서울대병원 산부인과 연구실의 문신용 교수님, 오선경 선생님, 김희선 선생님, 성기청 선생님, 강문주 선생님께도 감사드립니다.

그리고, 늘 따뜻한 말을 아끼지 않았던 친구들에게도 감사의 마음을 전합니다.

끝으로 논문을 마치기까지 항상 사랑으로 저를 믿고 지켜봐 주신 부모님과 성주, 성수 그리고 가족들에게 감사와 사랑을 전하며 이 논문을 드립니다.