

17
527.44
7414C
=2

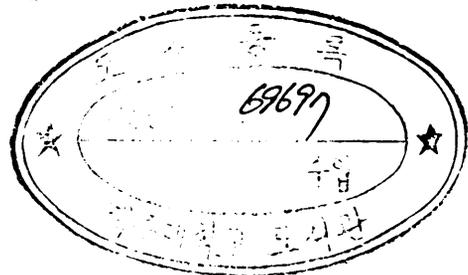
碩士學位論文

돼지 未成熟 卵胞卵의 琉璃化 凍結
· 融解時 諸要因이 體外成熟에
미치는 影響



濟州大學校 大學院
畜産學科

高 赫 辰



1996 年 12月

碩士學位論文

돼지 未成熟 卵胞卵의 琉璃化 凍結
· 融解時 諸要因이 體外成熟에
미치는 影響

指導教授 金重桂

高 赫 辰

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함

1996年 12月

高赫辰의 農學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長
委 員
委 員

康 太叔
康 珉杏
金 重桂



濟州大學校 大學院

1996年 12月

Effects of Various Factors on In Vitro Maturation
of Immature Porcine Follicle Oocytes after
Freezing - Thawing by Vitrification

Hyuk-Jin, Ko

(Under the Supervision of Professor Jung-Kye, Kim)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER
OF AGRICULTURE

DEPARTMENT OF ANIMAL SCIENCE
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1996. 12.

SUMMARY

This study was carried out to examine the factors(cryoprotectants, equilibration time, exposure methods, Time in dilution solution and method) affecting the viability of vitrified immature porcine follicle oocytes. The results are summarized as follows:

1. In an experiment done to determine optimum sucrose concentration in freezing medium, It was found that in vitro maturation(IVM) rates of immature porcine follicle oocytes were higher($p < 0.01$) in 0, .1, .25 and .5M than in 1.0M sucrose(57.8, 51.7, 49.1, 50.0% vs 22.9 respectively).
2. In an experiment done to find out a proper permeable cryoprotectant(10, 20, 30, 40%(v/v) glycerol, dimethylsulfoxide(DMSO), ethyleneglycol, propyleneglycol (PROH), It was found that IVM - rates of 10, 20, 30% DMSO(59.0, 60.8 and 52.9% respectively) and 10, 20, 30% PROH(54.9, 56.4 and 55.6% respectively) were similar and those values were higher than those in 40%(v/v)(DMSO:28.2%: PROH:28.6%). IVM - rates of other cryoprotectants(glycerol, ethyleneglycol) in all concentrations were very low than control(no cryoprotectant). However, there were no significant differences between control (no cryoprotectant) and 20%(v/v) of DMSO and PROH.
3. In an experiment done to find out a non-crystallization freezing medium, it was found that crystallization occurred in 20% DMSO+ 20% PROH with or without ficoll or PVP. However, the crystallization did not occur in 25% DMSO+ 25% DMSO(D25P25) without ficoll or PVP.
4. An experiment done to find out optimum time for oocytes in vitrification solution (VS) showed that IVM - rates of immature porcine follicle oocytes equilibrated in VS (D25P25) for 1 min, 3 min and 5 min were 43.4%, 33.3% and

23.2%, respectively. When equilibrated in VS containing 10% Ficoll, the respective rates were 58.7, 50.8 and 29.5%. In both VS, the IVM - rates of immature follicle oocytes equilibrated for 5 min were lower than those found in oocytes equilibrated for 1 or 3 min.

5. An experiment conducted to find out optimum time in dilution medium(0.5M sucrose) showed that IVM-rate (53.4%) of immature porcine follicle oocytes exposed in dilution medium for 5min was higher ($p < 0.01$) than the rates of oocytes cultured for 1 min (34.5%) or for 3 min (22.2%)

6. IVM - rate of vitrified immature follicle oocytes was significantly lower ($> 9\%$) than that of non-frozen immature follicle oocytes(56.1%).

7. An experiment done to determine the effect of cytoskeletal stabilizer for immature follicle oocytes during freezing showed that IVM-rate of the vitrified immature porcine follicle oocytes after treatment in cytoskeletal stabilizer for 15min was 10.0%. but, lower than non-frozen immature follicle oocytes (51.4%). However, viability of matured oocytes(35.2%) was higher than immature porcine follicle oocytes (22.4%).

목 차

SUMMARY

I. 序 論	1
II. 研 究 史	2
1. 成熟卵자의 동결보존	2
2. 未成熟 卵胞卵의 동결보존	4
3. 유리화 동결	5
4. 體外成熟과 受精	6
III. 材 料 및 方 法	8
1. 실험기간 및 장소	8
2. 公試動物 및 卵巢의 회수	8
3. 실험방법	8
1) 卵胞卵의 회수	8
2) 凍結 및 融解	10
3) 體外成熟	11
4) 體外受精	11
5) 생존율 평가	12
4. 통계분석	13
IV. 結 果 및 考 察	14
V. 摘 要	29
參 考 文 獻	31

I. 서론

미성숙 난포난 및 수정란의 동결보존 기술은 가축의 증식을 위한 체외수정과 이식 후 잉여난자를 동결보존하여 배아이식 성공율을 높이는 수단으로 매우 중요한 위치에 놓여 있다고 사료된다. 지금까지 가축의 능력을 개선하기 위해 우수한 종모축과의 자연교배 및 인공수정 등에 의해 이루어져 왔으나 새로운 육종기술로써 유전공학기법 또는 미세조작기법에 의해 생산된 수정란의 이용이 가능해지면서 정자와 난자 같은 생식세포에 대한 생명유전공학적 연구들이 매우 활발하게 이루어지고 있다. 이미 인간을 포함한 일부 가축의 정자 및 수정란 동결보존을 위한 기술로서 완만동결기법은 상당한 수준까지 도달해 있으며 특히 가축에서의 동결정자를 이용한 인공수정과 동결보존된 수정란을 이식하여 성공적으로 산자를 유도해낼 수 있게 되었다.

최초의 성공적인 포유동물 난자의 동결보존은 Parkening 등(1976)과 Whittingham (1977)이 완만동결법으로 mouse 난자를 동결 용해한 후 체외수정을 통해 수정란을 유도해내고, 이식후 정상적인 산자를 생산한 연구보고에서 찾아볼 수 있다. 그러나 포유동물 난자의 동결용해 후 생존율에 있어서 수정란에서 보여주었던 것처럼 만족스러운 결과는 보여주지 못하고 있으며 제한적이거나 성공을 거두고 있는 실정이다. 포유동물 난자의(M-II) 부적합한 동결보존에 의해 microtubles depolymerization(Sathananthan 등., 1988), 수정후 다배체 발생(Al Hasani 등., 1987; Glenister 등., 1987; Carroll 등., 1989), 수정을 저하(Wood 등., 1992) 등의 문제점들이 발생하고 있다. 한편 성숙난자에 비해 미성숙 난포난의 동결보존 연구는 드물게 연구되고 있는 실정이다. 더욱이 최근에 들어 포유동물 미성숙 난자의 체외 성숙에 대한 다양한 연구가 활발히 진행됨에 따라 동결보존된 난포난의 이용가치가 증대되고 있다. 1989년 Nakagata는 Rall 과 Fahy는 유리화 동결법으로 mouse 난자에서 산자생산에 성공하였다.

본 실험은 돼지 미성숙 난포난의 효과적인 유리화동결을 위한 동결액 개발을 위하여 내동제의 독성과 농도, 평형시간, 노출방법, 희석시간과 방법 등이 돼지 미성숙 난포난의 생존율에 미치는 영향을 조사하여 동결용해후 생존율을 높일 수 있는 방법을 모색하기 위해 실시하였다.

II. 연구 사

1. 성숙 난자의 동결보존

최초의 포유동물 난자의 동결보존에 관한 연구는 1958년 Sherman과 Lin이 mouse 난자를 -10°C 에 보존시킨 연구에서 찾아볼 수 있다(Parkening 등 1976).

1970년대 Whittingham에 의해 본격적으로 이루어진 완만동결법을 통한 수정란의 동결보존 연구를 계기로 Tsunoda 등(1976)은 mouse 난자에서 동결융해후 4 ~ 13%의 체외수정율과 hamster에서는 89 ~ 98%의 높은 체외수정율을 보고한 바 있다. Parkening 등(1976)과 Whittingham (1977)은 의해 mouse 난자를 완만동결기법에 의해 동결융해한 후 체외수정을 통해 수정란을 유도해내고 이식후 정상적인 산자를 생산해냄으로써 포유동물 난자의 동결보존 연구가 활기를 띠기 시작했다.

포유동물의 난자와 수정란의 동결보존시 동결에 의한 손상을 막기 위해 보존액에 첨가하는 물질을 동결보호제라 한다(Elliot & Whealan, 1977). 이들 물질은 세포내부를 보호하는 침투성 동결보호제와 비교적 분자량이 크며 세포 외부를 보호하는 비침투성 동결보호제등의 두 종류로 구분한다(Freidler 등., 1988). 침투성 동결보호제에는 glycerol, 1,2-propanediol(PROH), ethylene glycol 및 dimethylsulfoxide (DMSO) 등이 사용되어져 오고있으며 분자량이 100 이하로 극성(polarity)을 지니고 있는 것으로 알려져 있다(Niemann, 1991). 또한 이들은 수화성이 강하며 물분자의 hydrogen bond를 분리시키며 세포내 탈수후 세포 주위의 강한 염분에 대한 완충작용을 한다고 알려져있다(Fridler 등., 1988; Trounson & Gardner, 1993).

비침투성 동결보호제에는 polyvinyl pyrrolidone(PVP), sucrose, glucose, ficoll 또는 기타 당류 등이 사용되어져 오고있으며 이외에 난황, 혈청 알부민 등이 혼합되어 쓰여지고 있다(Niemann, 1991; Kasai, 1981). 이들은 탈수를 촉진시키고 수분유입시 삼투압 변화를 완화시켜주고 융해시 세포의 증수(swelling)를 억제하는 것으로 알려져 있다(Trounson & Gardner, 1993).

Sucrose를 동결액에 첨가할 경우에는 동결시 세포내의 자유수를 탈수시키므로서 초급속 동결이 가능하고 외부 세포막을 보호한다고 알려져 있으며(Szell 과 Shelton, 1986), 또한 sucrose를 내동제 제거에 이용하면 삼투압의 차이에 의하여 수정란으

로부터 내동제를 외부의 변화없이 순간적으로 제거할 수 있으므로 내동제의 one-step 제거가 가능하다고 하였다(Leibo, 1983, 1984; Renard 등., 1983).

Glycerol의 동결보호제 효과는 Polge 등(1949)의 사출정자에 대한 동결보존에서 처음으로 보고되었다. 이후 glycerol은 포유동물의 수정란 동결보존에 널리 사용되었지만(Mazur, 1970; Willadsen, 1977; Kasai 등., 1981; Bilton 과 Moore, 1979) 포유동물 난자의 동결보존연구에는 드물게 사용되어져 왔다. Fuller 와 Bernard(1984)는 glycerol를 이용한 mouse 난자의 완만동결후 54%의 체외수정율을 보여주었다.

DMSO는 mouse 수정란 뿐만 아니라 난자에서도 성공적인 결과(Whittingham, 1977)를 보여주므로써 포유동물 난자의 동결보호제로 널리 사용되어왔으나, Johnson 과 Pickerning(1987)은 mouse 난자의 완만동결시 DMSO에서의 장기간 노출 또는 저온충격에 의해 meiotic-spindle의 비분리로 인한 염색체 분산을 관찰할 수 있었다고 보고하였다. Carroll 등(1990)은 DMSO에 의해 완만동결음해된 mouse 난자에서 투명대변화에 의한 낮은 체외수정율을 보고하였다. 또한 Carroll 등(1993)은 mouse 난자에서 1.5M DMSO의 동결액에 FCS를 첨가하였을때 BSA 또는 polyvinyl alcohol(PVA)의 첨가에 비해 체외수정율과 체외발달율을 높였다고 보고하였다.

Chen(1986, 1987) 과 Van Uem(1987)은 DMSO를 이용하여 완만동결보존된 인간의 난자에서 체외수정 후 임신을 성공시켰다.

PROH 수용액의 비결정상태는 0℃이하에서 더 안정적이며, 이러한 특징은 동결음해시 빙정형성을 억제시키며 glycerol 과 DMSO 보다 유리화 경향이 더 높다고 보고된 바 있다(Boutron 등, 1979). Viencnt 등(1989)은 PROH를 이용한 rabbit 난자의 완만동결후 38%의 체외수정율과 9%의 체외산자율을 보고하였으며, Al Hasani 등(1989)도 PROH를 이용하여 동결음해된 rabbit 난자로부터 성공적인 산자생산을 보고한 바 있다. Hernandez-Ledezma(1989)는 Mouse 난자의 완만동결연구에서 PROH가 glycerol이나 DMSO보다 효과적인 동결보호제라 하였다. 소 성숙난자의 완만동결에 PROH가 널리 사용되었으며, Fuku 등(1992)은 PROH를 이용한 완만동결된 소 난자에서 산자생산에 최초로 성공하였다고 보고하였다. Quinn 등(1986)은 인간에서 PROH 와 sucrose를 사용하여 체외수정에 실패한 난자와 배란전 난자를 동결보존하여 성공적인 임신을 얻어낼 수 있었다고 하였다. PROH를 이용한 인간의 동결보존된 수정란으로부터 이식후 산자까지의 성공을 거둔 사례가 있으며(Chen

등, 1988), Trouson (1986)은 동결보존된 난자에서부터 66%의 체외수정율을 보고하였으며 Mandelbaum 등(1987)도 20%이상의 체외수정율을 보고하였다.

2. 미성숙 난포난의 동결보존

많은 연구자들에 의해 동결보존된 난자에서 polyploidy 발생(Al Hasani 등., 1987; Glenister 등., 1987; Carroll 등., 1989)이 보고된 바 있으며, Freidler 등(1988)은 GVBD 단계 이전의 난포난의 동결보존은 spindle의 저온충격을 피할 수 있는 길이 될지도 모른다고 보고하였다. 미성숙 난포난의 동결보존은 수정란의 동결보존에 비해 조금씩 이루어지고 있으며, 일부의 성공적인 연구를 제외하고는 대부분 미성숙 난포난의 동결음해후 생존율은 성숙난자보다 낮게 보고되고 있다(Whittingham, 1977; Heyman 등., 1986; Mandelbaum 등., 1987; Pellicer 등., 1988).

Didion 등(1988)은 1.5M glycerol과 0.5M sucrose로 완만동결된 GV 단계의 돼지 미성숙 난포난에서 음해후 생존한 난자는 없었으며 15℃ 이하에서는 생존이 불가능하다고 하였다. 그리고 동결보존된 난포난의 생존을 판정에 있어서 FDA-test의 이용은 중요하다고 보고하였다. Mouse에서는 Schroeder 등 (1990)은 2.0M DMSO를 이용한 미성숙 난포난의 동결음해후 체외성숙율은 95% 이상이 GVBD 전단계였고 수정율은 9%였으며 blastocysts로 발달된 것은 없었다고 보고하였다. 한편 Carroll 등 (1990)은 1.5M 의 DMSO를 이용하여 완만동결된 난포에서 유래된 난포난을 성공적으로 체외성숙-수정시켜 이식후 산자까지 얻는데 성공하였다. 소 미성숙 난포난의 동결보존에는 PROH가 동결보호제로서 널리 사용되었다. Heyman 등(1986)은 2.0M PROH 와 trehalose를 사용한 소 미성숙 난포난의 동결음해후 6%의 체외성숙율을 보고하였다. 한편 Otoi 등(1995)은 1.6M PROH와 0.2M sucrose 사용한 소 미성숙난포난에서 체외수정후 2.2%의 상실배 형성과 이식후 임신까지 이루어진 결과를 보고하였다.

3. 유리화 동결(Vitrification)

유리화 동결은 높은 농도의 동결액이 저온에서 점성이 강하게 되어 빙정이 형성되지 않는 것으로 보고되었다(김 등., 1992). Friedler 등(1988)은 성숙난자의 meiotic spindle은 완만동결되는 동안 동결보호제와 저온에 오랜기간 동안 노출되기 때문에 spindle organization 파괴위험이 증가하며, 유리화 동결은 그러한 단점을 보완해 준다고 보고하였다.

Trounson 등(1986)은 인간의 난자를 최초로 유리화 방법에 의한 동결을 시도하여 32%의 체외수정율과 14%의 발달율을 얻어 낸 바 있다. 또한 Feichtinger(1986)와 Feichtinger 등(1986)이 인간 난자의 동결보존 기술에서 DMSO를 이용한 완만동결 방법보다는 vitrification 방법이 유용하다고 하였다. Nagakata (1989)는 Rall과 Fahy의 유리화동결액(VSI)을 사용하여 mouse 난자의 유리화 동결음해 후 81.6%의 체외수정율, 45.8%의 높은 산자율을 보고하였다. 소에서는 Hamano 등(1992)이 DMSO, acetamide 그리고 PROH(DAP 213)로 이루어진 동결액을 이용하여 유리화 동결된 GV단계의 난자에서 체외수정후 9%의 상실배까지의 발달을 보고하였으며 이식후 임신유도에 성공하였다. 한편 Nagakata(1993)도 DAP 213 동결액을 이용하여 mouse 난자의 유리화 동결에서 체외수정후 22 - 45%의 2-cell 발달율과 23 - 35%의 산자율을 보고하였다. Rayos 등(1993)은 3M의 ethylene glycol과 0.25M sucrose 또는 trehalose 를 사용하여 mouse 난자를 급속동결음해후 각각 20.3%와 22.5%의 산자율을 보고하였다. Otoi 등(1995)은 ethylene glycol를 이용한 유리화 동결보존된 소 미성숙 난포난에서 16~27%의 체외 수정율과 이식후 임신에 성공하였다.

최근 Bos-Mikich 와 Whittingham (1995)은 단계적 평형방법을 이용하여 유리화 동결보존시킨 mouse 난자에서 체외수정 후 대조구(92%)과 유사한 85%의 수정율과 68 ~ 80%의 착상율, 그리고 38 ~ 49%의 정상적인 산자생산율을 보여주므로써 완만동결과 대등하게 유리화 동결보존의 효율성을 제시하였다.

4. 체외성숙과 수정

생쥐(Schroeder 등, 1984), 쥐(Vanderhyden, 1989), 면양 (Staigmiller 등, 1984), 소 (Goto 등, 1988) 그리고 돼지 (Mattioli 등., 1989)에서 채취된 난포난을 체외에서 성숙, 수정 그리고 산자까지 생산해낼 수 있는 성공적인 연구결과들이 보고되었다.

포유동물 난포난의 체외성숙 유도에는 호르몬, 난포액, 혈청, growth factors 등이 효과적으로 첨가되어 사용되어지고 있으며 아울러 난자의 체외성숙과 관련된 생화학적, 분자생물학적 연구들이 보고되고 있다. Dekel(1988)에 의하면 LH 급증은 난자의 성숙을 촉진시키고 난자와 granulosa cell 사이의 결합을 분리시키므로서 meiotic arrest를 유지하는 cAMP의 이동을 억제되어 난자의 감수분열이 재개된다고 보고하였다. 반면에 Eppig 등(1988)은 난자와 생식세포의 결합의 감소에도 불구하고 GVBD단계의 난자에서 cAMP의 수준의 증가가 있었다고 보고하였다. Prochazka 등(1991)은 FSH는 cAMP의 수준을 증가시키며 cumulus cell 확장을 유도한다고 하였으며, Mattioli 등(1991)은 LH, FSH 모두 감수분열을 촉진시키며, LH는 응성전핵 형성에 효과적인 반면, FSH는 metaphase II 발생율을 높여준다고 보고하였다. 한편, Kang 등(1996)은 PMSG, HCG 와 estradiol은 난구세포를 통해 감수분열을 촉진시킨다고 보고하였으며, pFF + FBS 또는 pFF 와 estradiol 은 제 1 극체 방출에 중요한 역할을 한다고 보고하였다. pFF가 난포난의 성숙을 억제한다는 연구결과도 있었지만(Stone 등., 1978; Tasafrifi 등., 1982), Wastergarrd 등(1984)은 인간에서 난포액 첨가는 난포난의 체외성숙을 유도시키며, mouse 와 돼지에서도 체외성숙과 수정을 증진시킨다고 보고하였다(Naito 등., 1988; Yoshida 등., 1992). Funahashi 등(1993)은 FCS 와 new born piglet serum(NPS)을 첨가한 배양액에서 돼지 난포난의 체외성숙 후 GVBD 발생이 유의성있게 증가하였다고 하였다. Lorenzo 등(1994)은 EGF 또는 EGF + IGF-1은 bovine, rat 난자에서 난구세포의 확장을 유도하고 핵 성숙을 유도시킨다고 보고하였다. 그러나 돼지에서는 EGF또는 IGF-I에 의한 난구세포의 확장은 없었다고 하였다.(Deen, 1993).

체외수정을 위한 정자의 처리방법에는 크게 swim-up 과 percoll gradient 방법 등이 사용되어지고 있다. Swim-up 방법은 1980년대부터 가장 널리 사용되어지고 있는 방법이다(Duhadevan 등, 1984). 그러나 Trounson 등(1993)과 Parrish 등(1995)은 체외수

정시 정자를 준비하기 위해 percoll 방법이 swim-up 방법보다 쉽고 간편하게 활력이 높은 정자를 얻을수 있다고 보고하였다.

Parrish 등(1988)은 heparin 처리에 의한 정자의 수정능 획득 방법이 매우 효과적이라 하였으며, Niwa 와 Ohgoda(1988)은 caffeine 또는 heparin 단독처리 보다는 병용처리에 의해 정자의 침투율이 증가하였다고 보고하였다. 돼지의 체외수정에서 정자의 농도는 다정자 침입과 밀접한 관련이 있다고 강조되어 왔으며(Hunter, 1991; Shamsuddin 등, 1993), Duhac 과 Sirard(1996)는 난관상피세포와 estradiol의 첨가는 단일정자 수정을 증가시킨다고 보고하였다. Zheng 등(1992)은 FCS-BSA 처리는 체외 성숙율과 수정율을 감소시키지 않으면서 다정자수정 발생빈도를 줄여준다고 보고하였다. 최근에 난관상피 세포(Nagai & Moor, 1990) 와 pFF(Funahshi & Day, 1993b)의 첨가는 돼지 난자의 polyspermy 발생을 감소시켜 준다고 보고된 바 있다. Kikuchi 등(1993)은 난구세포가 존재할 때 응성전핵 형성능력이 증가하며, Naito 등(1980)은 난포액을 체외수정 배양액에 첨가했을 때 응성전핵 형성능력이 두드러지게 증가한다고 보고하였다.



Ⅲ. 재료 및 방법

1. 실험기간 및 장소

본 실험은 1994년 9월부터 1996년 6월까지 제주대학교 농과대학 축산학과 동물번식학 실험실에서 수행되었다.

2. 공시동물

공시동물은 제주도 북제주군 애월읍에 소재하는 제주시 축산물 공판장에서 도살되는 돼지를 사용하였다. 난소의 회수는 도살직후 부산물 처리장으로 보내지는 암 생식기에서 채취하였다.



3. 실험방법

1) 난포난의 회수

도살장에서 도살된 돼지로 부터 얻어진 난소를 생리식염수(0.9% NaCl + penicillin G 0.075g/l + streptomycin sulfate 0.05g/l)가 들어 는 보온병(37℃ ~ 39℃)에 넣어 1 시간 이내 실험실로 운반하였다. 운반된 난소를 항생제가 첨가된 신선한 생리식염수로 난소표면의 이물질과 혈액등을 제거하기 위해 2 ~ 3 회 세척한 후 18 gauge needle 이 부착된 10ml syringe로 2 ~ 6 mm 크기의 난포에서 난포액과 난포난을 흡인하였다. 50ml 원심분리 시험관에 수집된 난포액은 37℃의 배양기내에서 4 ~ 5분간 정치시킨 후 상층액을 제거하고 하부 침전물을 배양접시에 옮겨 0.1 % BSA가 들어 있는 TALP-HEPES 배양액으로 3회 세척하면서 inverted microscope(Nickon SZ40, Japan) 하에서 난구세포가 치밀하게 부착된 난자들을 선

별하여 실험에 공시하였다. 한편 수집된 난포액중 하부 침전물을 제외한 나머지 부분은 500 x g에서 5분간 원심분리하여 3 ~ 4ml의 상층부를 0.25 μ l syringe membrane filter 로 여과시킨 후 - 20°C 에 보관하면서 사용하였다.

(1) 동결보호제

기본 동결보호액은 Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS)에 10% (v/v) fetal bovine serume(:10% FBS + D-PBS)를 첨가시켜 제조하였으며 0.2 μ m syringe membrane filter로 멸균하여 4°C에 보관하면서 사용하였다.

비침투성 동결보호제의 일종인 sucrose 가 돼지 미성숙 난자의 체외성숙에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각각 0.1M, 0.25M, 0.5M, 1.0M을 희석시킨 10% FCS + D-PBS에 실온에서 3분동안 난포난을 노출시켰다. 침투성 동결보호제가 미성숙 난자의 체외성숙에 미치는 영향을 알아보기 위하여 난포난을 10%, 20%, 30%, 40% (v/v) glycerol(Sigma, USA), dimethylsulfoxide(DMSO; Sigma, USA), ethylene glycol(EG; Sigma, USA) 그리고 propylene glycol(PROH; Sigma, USA)을 각각 0.5M sucrose와 10% FBS가 첨가된 D-PBS에 희석시켜 제조한 용액에 상온에서 3분 동안 노출시켰다.

한편 돼지 미성숙 난포난의 유리화 동결을 위한 동결액 구성에 있어서 FBS 와 porcine folliculat fluid(pFF)를 각각 10 ~ 20% 첨가하였으며, cytoskeletal stabilizer(CS: 7.5 μ g/ml cytochalasin-B: MIF, 0.5 μ g/ml demecolcin: MT)가 첨가 되어있는 D-PBS에 15분간 전처리, 무처리하여 CS 처리효과를 조사하였다.

(2) 유리화 검정

동결시 빙정형성없이(유리화) 동결하기 위한 동결액의 조성 농도를 조사하기 위해 침투성 동결보호제(DMSO, PROH) 또는 비침투성 동결보호제(ficoll, PVP)를 농도 별로 첨가하여 제조한 후 액체질소에 동결되는 동안 혹은 38 \pm 1°C의 항온수조에 융해되는 동안에 straw내의 동결액이 투명하게 된 것은 유리화로, 불투명하게 되는 것은 빙정형성으로 간주하였다.

(3) 평형시간

평형시간이 돼지 난포난의 체외성숙에 미치는 영향을 알아 보기 위하여 동결액에서

각각 1분, 3분, 5분동안 노출시켰다. 한편 비침투성 동결보호제인 ficoll을 유리화 동결액에 첨가시켜 동결전 난포난의 평형시간이 체외 성숙에 미치는 영향을 조사하였다. 동결액의 온도에 따른 돼지 난포난의 체외성숙율을 조사하기 위하여 사용 5 ~ 7 시간전 $0 \pm 2^\circ\text{C}$ 에 놓아 둔 동결액에 노출시키거나 또는 실온의 동결액에 노출시켰다. 동결전 유리화 동결액이 난포난에 미치는 독성을 조사하기 위해 25% VS(vitrification solution), 50% VS, 100% VS로 희석된 동결액에 차례로 단계적으로 노출(3-step)시키거나 20% VS에서 100% VS로(2-step), 또는 곧바로 100% VS(1-step)에 노출시키는 방법을 비교 하였다.

(4) 희석시간

동결보호제 제거를 위한 용해시간이 돼지 난포난의 체외성숙에 미치는 영향을 알아보기 위하여 동결액에 노출시킨 후 세포내 침투해 있는 동결보호제를 제거 및 희석시키기 위한 0.5 M PS에서의 노출시간을 1, 3, 5분동안 달리하였다.

2) 동결 및 용해

유리화 동결액은 1ml 주사기가 연결된 0.25ml 플라스틱 straw PS (PBS+sucrose 40 μl), air bubble(20 μl), 동결액(30 μl), air bubble(20 μl), 동결액(30 μl)순으로 주입하여 준비하였다(Fig.1.A).

미수정 난자(7~10개/straw)는 동결액 drop에 침지한 후 같은 동결액으로 한번 옮겨졌다. 이 때 미성숙 난포난은 미리 준비한 straw의 동결액에 mouth pipette으로 옮겨 장착하고 straw powder로 straw 끝부분을 봉인한 후 LN₂ container(-196 $^\circ\text{C}$)에 침지시켰다(Fig.1.B). 미성숙 난포난의 cumulus cell 층의 부착정도에 따른 동결보존 후 체외성숙 후 생존율을 조사하기 위해 2 group, 1~3 cumulus cell 층으로 둘러싸인 group과 3 이상의 cumulus cell 층으로 둘러싸인 group으로 분류하여 동결에 공시하였다. 한편, 성숙난포난의 유리화동결에는 준비는 TCM-199으로 제조된 체외성숙배지에서 $39 \pm 0.5^\circ\text{C}$, 5% CO₂, 95% air 조건의 배양기에서 42 ~ 43 시간동안 배양되어 체외성숙 과정을 마친 난자들을 사용하였으며 난구세포가 확장된 난자를 37~38 $^\circ\text{C}$ 의 0.1% hyaluronidase 용액에서 2 ~ 3분동안 가볍게 노출시키므로서 난자주위의 난구세포를 제거시켜 유리화동결시켰다.

용해는 2~3일 동안 LN₂ container에 저장하였던 straw를 꺼내어 37~38 $^\circ\text{C}$ 항온수

조에서 10초간 음해하였으며, straw 양쪽끝을 절단하여 내용물을 petri dish에 방출시킨 후 0.5M sucrose 가 첨가된 PBS(S-PBS)에 5분동안 희석시킨 후 신선한 PBS액에 30초 간격으로 2~3회 충분히 세척하여 내용물을 제거하였다.

CP		PS	Air	VS	Air	VS			
----	--	----	-----	----	-----	----	--	--	--

(A)

CP	PS	Air	VS	Air	VS + oocytes	Air	PS	SP
----	----	-----	----	-----	--------------	-----	----	----

(B)

Fig.1. Configuration of 0.25 ml straw, just before(a) and after(b) loading oocytes with straw powder. SP; straw powder, PS; 0.5M PS, VS; vitrification solution, CP; cotton plug

3) 체외성숙

돼지 미성숙 난포난의 체외성숙은 박 등(1993)의 방법을 인용하여 실시하였다. 신선 혹은 회수된 미성숙 난포난의 체외성숙을 유도하기 위한 배양액은 Earle's salts(Gibuco, USA)가 첨가된 TCM-199 에 25mM NaHCO₃(Sigma, USA), 0.2 mM pyruvate(Sigma, USA), 1 µg/ml estradiol-17 β(sigma, USA), 25ug/ml gentamycin(Sigma, USA), FSH(Schering-plough Animal Health, USA)와 fetal bovine serum(FBS; Sigma, USA) 을 첨가하였다. 준비된 배양액은 0.22 µm membrane filter(Cat. No. SLG V025LS, Millipore)로 여과하였으며 배양접시에 50 µl의 배양소적을 만들고 그위에 멸균된 mineral oil(Sigma, USA) 을 피복하여 3 ~ 4 시간정도 5% CO₂ 배양기에서 전배양시켰다. 난포난(7~8)은 전배양 되어있는 체외성숙 소적(50µl)에 옮겨 39±0.5°C, 5% CO₂ 와 95% 공기조건의 배양기에서 42 ~ 43 시간동안 배양 시키므로써 체외성숙을 유도하였다.

4) 체외수정

체외수정시 사용된 정액은 남제주군 대정 양돈단지내 AI 센터에서 사육되어지는 돼지에서 수음법으로 채취된 정액(운동성 85% 이상, 기형율 20% 이하) 을 액상정

액화하여 17℃의 저장고에 3~4일 저장시키면서 사용하였다. 동결음해된 난포난의 체외수정을 위한 희석된 액상정액의 수정능획득과 체외수정은 박 등(1993)의 방법을 사용하였다. 90%와 45%의 percoll (Sigma, USA)이 함유된 정자세척용 m-TALP배양액을 제조한 다음 15ml의 원심분리관(Fallcon)에 90% percoll용액 2ml을 하단에, 45% percoll용액을 상단에 혼합되지 않게 조심스럽게 중층의 gradient을 준비하였다. 이후 원심분리관 상층에 액상정액 0.5 ~ 1ml를 분주한 다음 700 xg에서 12~13분간 원심분리를 실시하며 수정능획득을 유도하였다.

원심분리 후 수정능획득된 정자(95%의 운동정자)를 함유한 펠렛부분만을 회수하여 Sp-TALP 배양액으로 2.5×10^7 cells/ml의 농도로 조정하여 준비하였다.

체외수정은 42 ~ 43시간동안 체외성숙시킨 난자를 Sp-TALP 배양액으로 3회 세척하고 2 μ l의 heparin(2 μ g/ml)과 2 μ l의 PHE (Rosencrans 등., 1993)가 첨가된 수정용 소적(Fert-TALP: 44 μ l/drop)에 옮겨 2 μ l의 농축정액을 첨가하여 최종정자농도를 5×10^4 cells/ml로 조정하였다. 39℃, 5% CO₂ 의 배양기에서 체외수정을 유도하였으며 체외수정후 12 ~ 15 시간째에 0.1% hyaluronidase에 3분가량 노출시킨 후 cumulus cell를 제거시켰으며 수정란 배양용액(CR1 aa)에 옮겨 수정란의 발달을 관찰하였다.



5) 생존율 평가

신선 혹은 유리화동결된 미성숙 난포난은 체외성숙 42 ~ 43 시간에, 혹은 체외수정 개시후 2-3 day에 FDA-test, hoechst 33342(Sigma, B2261), orcein staining에 의해 생존율을 조사하였다. FDA용액은 fluorescein diacetate(Sigma, F-7378) 5 mg/ml acetone의 stock solution(Linda & Trounson., 1980)을 1:400,000 의 비율로 PBS와 희석한 후 사용하였다. 준비된 난자들은 37℃ ± 1℃에서 2~3분동안 FDA용액에서 배양된 후 PBS로 3회 세척하여 B460, G520 filter와 Mercury lamp가 부착된 fluorescence microscope(Olympus)를 이용하여 김 등(1992)의 방법을 기초로하여 난포난의 형광밝기에 따라 positive, partial, negative 등으로 판정한 후 생존율을 분석하였다. Hoechst 33342 염색에 의한 체외성숙 후 핵 성숙 판정방법은 박 등(1993)의 방법을 인용하였으며, Hoechst 2.5 μ g/ml를 제조하여 -20℃ 보존하면서 사용하였다. 난구세포를 제거(0.5% hyaluronidase)한 난자는 2% formalin으로 고정시킨 후 hoechst 용액으로 염색시킨 후 형광현미경하에서 핵성숙을 관찰하였다.

Orcein staining 방법에 의한 체외성숙 후 핵 성숙 판정방법은 김 등()의 방법을 이용하여 실시하였다. cumulus cell을 제거한 후 난자의 표본제작을 한후 고정액(1:3 ethanol:acetic acid)에 침지하여 24 - 48시간동안 고정시켰다. 고정후 1% aceto-orcein 으로 염색하여 핵성숙을 판정하였다.

4. 통계분석

실험자료의 분석은 PC-SAS package를 이용한 완전 임의 배치법의 ANOVA로 통계분석하였고 유의성이 인정된 경우 각 처리평균간 비교는 Duncan 검정으로 비교하여 유의차를 검정하였다.



IV. 결과 및 고찰

I. 동결보호제, 노출방법, 희석방법 등이 돼지 미성숙 난포난의 체외성숙에 미치는 영향

Sucrose 가 돼지 미성숙 난자의 체외성숙에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각각 0.1M, 0.25M, 0.5M, 1.0M을 희석시킨 10% FCS + D-PBS에 실온에서 3분동안 노출시킨 난포난의 체외성숙 후 생존율을 조사한 결과는 Table 1과 같다.

Table 1. Effect of sucrose concentration on In Vitro maturation of immature porcine follicle oocytes.

Sucrose concentration(M)	No. of oocytes	Nucleic stages after In Vitro maturation				
		Deg	GV	GVBD	M I	M II(%)
Control	62	-	6	2	5	57.8±3.0 ^a
0.1	62	-	7	3	6	51.7±4.9 ^a
0.25	63	-	10	2	4	49.1±6.1 ^a
0.5	58	1	9	3	4	50.2±3.9 ^a
1.0	60	6	19	2	3	17.2±4.9 ^b

Deg; degenerattion, GV; germinal vescke, GVBD; GV breakdown, MI; metaphase I , MII; metaphase II

Exposure time; 3 min. Dilution time; 3 min.

*Values with different superscripts are significantly different (p < 0.01)

Table 1 에 제시된 바와같이 각각 다른 농도의 sucrose 용액에서 노출, 세척되어진 돼지 미성숙 난포난의 M II 까지의 체외성숙율은 각각 51.7, 49.1, 50.2, 17.2 % 로서 1.0 M sucrose에서 가장 저조한 생존율을 보여주었다(p < 0.01). 한편 sucrose에 노출되지 않은 신선한 돼지 미성숙 난포난의 체외성숙율은 57.8%를 나타냈으며, 0.1, 0.25, 0.5M sucrose 처리구와 유의차는 없었으나 1.0M sucrose 에서 유의성있게 낮은 생존율을 보여주었다(p < 0.01).

Sucrose는 비침투성 동결보호제로서 탈수를 촉진시키고 동결 전후의 삼투압 변화에

대한 세포막을 보호하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Chupin 과 Reviere, 1986; Szell 과 Shelton, 1986; 김 등, 1988). 김 등(1992)은 mouse 수정란을 10% sucrose 를 첨가한 유리화 동결액을 사용하여 동결음해 후 92%의 우수한 생존율을 보고하였으며 20% sucrose 처리(86%)와도 유의차는 없었다고 보고하였다. 본 실험에서도 0.5M(≒ 17%)sucrose에서도 대조구와 비슷한 성적(50.2% vs 57.8%)을 보여주었다. Miyamoto 와 Ishibashi(1983, 1986)는 내동제만 존재할 때 보다는 sucrose와 내동제가 같이 있을 때 생존율이 양호하였으며 강 등(1989)은 sucrose가 동결액에 첨가되었을 때 적은 농도보다는 높은 농도에서 양호한 성적을 얻었다고 보고하였다. 이는 sucrose의 삼투압적 보호능력은 충분한 침투성내동제의 존재시 상호작용을 하는 것으로 추정된다.

침투성동결보호제인 glycerol(G), dimethyl sulfoxide(DMSO), ethylene glycol(E), propylene glycol(PROH)이 각각 10, 20, 30, 40%(v/v) 로 D-PBS에 희석되어진 동결액에 돼지 미성숙 난포난을 실온에서 3분동안 노출시킨후 체외성숙 개시후 42~43 시간에 FDA-test 혹은 핵 성숙율을 조사한 결과는 Table 2에 나타나 있다.

돼지 미성숙 난포난을 10%, 20%, 30%, 40%(v/v) glycerol 용액에 3분동안 노출 - 세척한후 체외성숙율은 각각 14.4, 7.5, 3.6, 4.2%를 나타내어 다른 침투성 동결보호제보다 전체적으로 가장 낮은 생존율을 보여주었다.

각 농도별 DMSO 처리에 의한 돼지 미성숙난포난의 체외성숙율은 각각 59.0, 60.8, 52.9, 28.2% 였으며 10%, 20% 와 30%(v/v) 에서 대조구(56.7%)와 비슷한 생존율을 보여주었다. Ethylene glycol 은 10, 20, 30, 40%(v/v)에서 각각 50.3, 43.6, 35.1, 11.1%로 10%를 제외하고는 농도가 높아지면서 체외성숙율은 감소하는 경향을 볼 수 있었다. PROH 에서는 농도별로 각각 54.9, 56.4, 55.6, 28.6% 의 체외성숙율을 보여주었으며 0 ~ 30%(v/v) 에서 대조구와 비슷한 생존율을 보여주었지만 40%(v/v) PROH 처리에서 대조구보다 유의차있게 낮은 생존율을 나타내었다.

본 실험의 결과 glycerol 에 노출된 돼지 미성숙 난포난의 체외성숙은 매우 저조하게 나타났다. 특히 glycerol에 의해 해를 입은 난포난들은 침투성 동결보호제의 세척시 외형적인 관찰에서는 정상인것처럼 보여졌으나 체외성숙후 현미경하에서 살펴보면 난포난들의 세포질내부가 탈색된듯한 황토색을 띄는 경향이 있었으며 농도가 높아지면서 그런 현상은 두드러지게 나타났다. glycerol은 일반적으로 세포내 침투에 있어서 매우 완만(60분 이상)하게 이루어진다고 보고되고 있다(Jackowski 등.,

1980: Renard & Babinet, 1984). 이로 인해 세포내 glycerol 농도가 낮게 존재하게 될 것이라 생각되며 독성에 대한 해라기 보다는 난포난의 체외성숙에 영향을 준 것은 급속한 탈수에 비해 내동제의 완만한 침투로 삼투압적 균형이 지연됨에 따라 생존율에 영향을 미쳤다고 사료된다.

Table 2. Effect of permeable cryoprotectants on In Vitro maturation of immature porcine follicle oocytes.

CPA* % (v/v)	No. of oocytes examined	Nucleic stages after In Vitro maturation					% of M II
		Deg	GV	GVBD	M I		
Control	58	-	6	5	4	56.7±2.7 ^a	
G 10	55	5	21	5	5	14.4±2.8 ^e	
G 20	55	7	28	1	3	7.5±3.2 ^{ef}	
G 30	55	6	28	5	2	3.6±3.6 ^{ef}	
G 40	53	14	26	-	-	4.2±2.4 ^{ef}	
D 10	57	-	8	3	3	59.0±2.1 ^a	
D 20	57	1	5	2	6	60.8±5.2 ^a	
D 30	57	4	9	2	4	52.9±5.0 ^{ab}	
D 40	58	6	16	4	4	28.2±6.8 ^d	
E 10	58	2	5	7	5	50.3±2.1 ^{ab}	
E 20	56	-	8	3	14	43.6±4.4 ^{bc}	
E 30	58	4	19	4	6	35.1±3.2 ^{cd}	
E 40	56	12	27	4	-	11.1±2.6 ^e	
P 10	58	-	4	6	5	54.9±3.0 ^a	
P 20	55	-	6	5	5	56.4±2.4 ^a	
P 30	56	4	8	2	3	55.6±3.4 ^a	
P 40	58	7	17	5	6	28.6±2.5 ^d	

*CPA: cryoprotectants, G: glycerol, D: dimethyl sulfoxide, E: ethylene glycol, P: propylene glycol

Exposure time: 3 min. Dilution time: 3 min.

*Values with different superscripts are significantly different (p < 0.01)

Abas 등(1990)과 Rayos 등(1992a, b)은 mouse에서 3.0 M ethylene glycol과 0.25 M sucrose 또는 trehalose에서 평형은 mourulae에서 5분, 1-, 2-, 4-, 8-cell에서는 10분 정도가 소요된다고 보고한 바 있다. 한편 Rayos 등(1994)은 3.0 M ethylene

glycol과 0.25 M sucrose를 이용한 mouse 난자의 동결보존에서 평형시간 5분 보다는 20분 또는 40분에서 가장 좋은 생존율을 얻었다고 보고하였다. 본 실험의 결과 ethylene glycol 처리에 의한 난포난의 낮은 체외성숙율은 glycerol과 마찬가지로 완만한 침투에서 비롯된 삼투압적 불균형에서 기인한 것으로 사료된다. 본 실험의 결과 돼지 미성숙 난포난의 유리화 동결을 위한 동결액 조성에 있어서 DMSO와 PROH가 독성이 적은 내동제라고 사료되었다. DMSO는 mouse에서 수정란, 성숙난자의 완만동결 뿐만 아니라 유리화 동결에도 성공적으로 쓰인 동결보호제로 알려져 있다(Whittingham, 1977; Carroll, 1993). 한편 Hernandez-Ledezma와 Wright(1989)은 mouse 난자와 1-cell 수정란의 동결보존에 있어 PROH는 glycerol, DMOS 또는 이들을 혼합한 동결액보다 더 나은 생존율을 가져다 주는 동결보호제라 하였다. 이외에 Otoi 등(1993)도 bovine 난자에서 그와 유사한 경향을 얻을 수 있었다고 하였다. 그러나 PROH와 DMSO에서도 농도가 증가함에 따라 생존율이 감소하였는데, 이는 높은 농도에 의한 삼투압적 스트레스로 난포난의 체외성숙에 영향을 미친 것으로 사료된다.

Table 3은 각기 다양한 농도의 침투성 동결보호제에 노출된 미성숙 난포난의 체외수정 후 2~3 일 후 2~4 cell 수정란의 발생을 조사한 결과이다.

DMSO 10%(v/v)를 제외하고는 모든 동결보호제 노출된 돼지 난포난의 체외성숙 후 체외수정에 있어서 대조구보다 유의차있게 낮은 성적을 보여주었다($p < 0.01$). 각각의 동결보호제에 처리된 돼지 미성숙 난포난의 체외수정율은 glycerol 10, 20, 30, 40%(v/v) 농도별로 각각 13.9, 9.4, 6.3, 0%로 대조구에 비해 저조한 생존율을 보여주었으며 농도가 증가하면서 glycerol 처리간에는 유의차는 없었으나 10%에 비해 40%에서 유의차있게 낮은 생존율을 보여주었다($p < 0.01$). DMSO 처리에 의한 체외수정율은 각각 25.5, 25.6, 12.5, 6.3%로 10%(v/v)를 제외하고는 모든 처리에서 대조구에 비해 낮은 성적을 보여주었다. 침투성동결보호제 노출된 돼지 난포난의 체외수정율은 ethylene glycol에서 농도별로 각각 12.5, 6.3, 3.6, 3.1% 였으며, propylene glycol 에서는 각각 15.6, 16.5, 6.3, 0% 였다.

Carroll 등(1990)은 동결음해된 난자에서 투명대변화로 인한 체외수정율의 감소를 보고하였으며, Wood 등(1989)은 동결음해된 mouse 난자에서 투명대가 없는 것이 있는 것 보다 수정율이 높았다고 하였다.

Table 3. The fertilization In Vitro of immature porcine follicle oocytes exposed various cryoprotectants after maturation In Vitro.

CPA* % (v/v)	No. of oocytes		No. of eggs		No. of embryos	
	examined		fluorescenced(%)		2 - 4 cell(%)	
Control	35		88.5±0.4		32.2±3.2 ^a	
G 10	30		31.1±2.7		13.9±5.9 ^{bcdk}	
G 20	30		29.0±7.8		9.4±3.1 ^{cdef}	
G 30	30		7.3±4.3		6.3±3.6 ^{cdef}	
G 40	35		8.3±2.8		0 ^f	
D 10	35		43.0±3.5		25.5±6.0 ^{bn}	
D 20	35		48.6±2.7		15.6±5.1 ^{bcd}	
D 30	35		23.3±5.4		12.5±3.6 ^{ab}	
D 40	35		34.0±4.0		6.3±5.1 ^{cdef}	
E 10	35		34.7±5.7		12.5±3.6 ^{cde}	
E 20	35		28.8±3.9		6.3±3.6 ^{cdef}	
E 30	35		28.5±5.4		3.6±3.1 ^{def}	
E 40	35		22.6±4.3		3.1±3.1 ^{ef}	
P 10	30		65.3±3.8		15.6±6.0 ^{bcd}	
P 20	30		72.6±7.5		16.5±6.5 ^{bc}	
P 30	30		56.4±7.8		6.3±3.6 ^{cdef}	
P 40	30		42.6±8.3		0 ^f	

*CPA: cryoprotectants, G: glycerol, D: dimethyl sulfoxide, E: ethylene glycol, P: propylene glycol

*Values with different superscripts are significantly different (p < 0.01)

또한 이들은 성숙전 cortical granules 방출로 인한 ZP2 glycoproteins의 변성으로 인한 투명대의 변화가 수정율의 감소를 가져온다고 보고하였다. 그러나 본 실험에서는 체외수정 방법에 의해 수정율이 감소 되었다고 사료된다.

FDA-test는 본 연구실에서 김 등(1988)이 난자 및 수정란의 동결융해후 생존율의 판정에 있어 기존의 판정방법에 비해 효과적인 판정법으로 사용되어 왔다. 본 실험에서 체외수정후 FDA-test에 의한 생존율 판정에서 내동제의 농도가 증가따른 해를 입은 난자에서 수정후 2-4cell 발생이 감소하였는데 이와 유사하게 FDA에 의한 생존율이 감소추세를 보여주었다. 그러나 FDA - test에 의한 판정에서 염색방법보

다 높게 나타났는데(Table 3 참조) 이는 1-cell 또는 다정자 침입 난자에서도 형광을 보여 주었기 때문이었다. 한편 체외수정 후 2-cell이상인 경우 쉽게 구분이 안되는 불규칙적인 난할상태 등을 FDA-test 통해 쉽게 관찰할 수 있었다. Orcein 또는 hoechst 염색방법에 의한 생존을 판정 방법에는 시간, 숙련 그리고 난자를 죽여야 가능하므로, 난자를 죽이지 않으면서 쉽고 빠르게 판정할 수 있는 FDA-test는 이용은 매우 중요한 방법이 된다고 사료된다.

동결융해시 동결액 조성에 따른 빙정형성 여부를 조사한 결과는 Table 4에 나타나 있다.

Table 4. Occurrence of crystallization in freezing media during rapid freezing and thawing

Freezing media	Occurrence of crystallization	
	Freezing	Warming
D20 P20	-	+
D20 P20 + Ficoll 10%	-	+
D20 P20 + Ficoll 20%	-	+
D20 P20 + Ficoll 30%	-	+
D20 P20 + PVP 10%	-	+
D20 P20 + PVP 20%	-	+
D20 P20 + PVP 30%	-	+
D25 P25	-	-

* Transparent samples were considered vitrified and were scored (-) and opaque samples were crystallized were scored (+).

*D: dimethyl sulfoxide, P: propylene glycol, PVP: polyvinylpropyleneglycol

침투성 동결보호제는 DMSO 와 PROH를 각각 20% 또는 25%(v/v)씩 혼합하였으며 여기에 Ficoll 10, 20, 30%(w/v) PVP 10, 20, 30%(w/v) 를 첨가하여 제조된 동결액의 유리화 능력을 조사하였다. 본 예비 실험에서 G, D, E, P 10, 20, 30, 40% 의 빙정형성 방지 능력을 조사하기 위한 유리화 검정에서 PROH 40%를 제외하고는 모든 동결보호제에서 빙정이 형성됨을 알 수 있었다. 하지만 40%의 PROH는 독성이 높기 때문에(Table 2 참조) 독성이 적은 두 가지 이상의 동결보호제의 혼합사용을 제고하지 않을 수 없었다. 본 실험의 결과 모든 동결액에서 동결시에는 모두 빙정

이 형성되지 않았다. 한편 DMSO 20% 와 PROH 20%를 혼합한 동결액에서 동결시에는 유리화가 되었지만 융해할 때 빙정이 형성되는 것을 관찰할 수 있었다. Boutron 등(1979)이 DMSO가 PROH 보다 빙결정 형성 방지능력이 떨어진다고 보고한 연구보고와 마찬가지로 본 실험에서도 비슷한 결과를 관찰할 수 있었다. 그러나 D20 P20에 ficoll, PVP와 같은 고분자 화합물을 첨가시켜 보았지만 결과는 마찬가지로 융해할 때 빙정이 형성되는 것을 볼 수 있었다. 그러나 Kasai 등(1990)은 glycerol 또는 ethylene glycol 30%(v/v)에 30% ficoll 과 0.5 sucrose를 첨가하였지만 융해시 빙정이 형성되었으며 40% ethylene glycol 에 ficoll 과 sucrose를 첨가했을 때 융해시 빙정형성을 방지하여 유리화에 기여하였다고 보고한 바 있다. Trounson과 Gardner(1993)는 동결액의 유리화를 위해서는 하나 또는 둘 이상의 동결보호제가 40%(v/v) 이상 존재해야한다고 보고하였으며 본 실험에서도 이와 유사한 경향을 보여주었다. 결과적으로 동결액의 유리화를 위해서는 비침투성 동결보호제 보다는 물분자와 더 쉽게 결합하여 세포내의 빙정형성을 방지하는 침투성동결보호제가 더 효과적이며, 그러나 동결보호제의 독성을 감안한다면 하나 이상의 침투 또는 비침투성 내동제의 혼합사용도 고려해야 된다고 사료된다.

Table 5에는 돼지 난포난의 유리화 동결을 위해 제조된 유리화 동결액(VS: DMSO 25% + PROH 25% + 0.5M sucrose + 10% FBS)에서 노출시킨 후 체외성숙율을 조사한 것이다.

Table 5. Effect of equilibration period in vitrification solution on In Vitro maturation of immature porcine follicle oocytes.

Equilibration periods(min)	No. of oocytes		
	Examined	Fluorescened	Matured(%) [*]
Control	74	77.7±3.2	58.7±3.5 ^a
1	74	65.9±1.7	49.4±0.3 ^b
3	66	50.1±3.4	33.3±1.7 ^c
5	56	33.9±1.8	23.2±1.8 ^d

VS: DMSO 25% + PROH 25% + 0.5M sucrose + 10% FBS

Dilution time: 3 min.

^{*}Values with different superscripts are significantly different (p < 0.01)

평형시간, 1, 3, 분에 따른 FDA-test에 의한 생존율은 각각 65.9, 50.1, 33.9%로 나타났다으며, 체외성숙율은 각각 49.4, 33.3, 23.2%로 평형시간이 증가함에 따라 생존율이 감소하였으며 평형시간 1분에서 가장 우수한 성적을 보여주었다($p < 0.01$). 그러나 대조구의 58.7%의 체외성숙율에 비하면 유의성있게 낮은 생존율이었다.

본 실험의 결과 가장 독성이 적은 동결보호제와 3분의 짧은 노출에도 불구하고 생존율이 감소하는 것으로 보아 삼투압적 스트레스에 원인이 있는 것으로 사료된다. 그러나 5분의 평형시간에 따른 희석과정에 난포난들의 난구세포가 분산되는 경향을 볼 수 있었다. 이는 연장된 평형시간에서 세포내 내동제의 농도가 증가하여 부적당한 희석기간 이후 계속되는 수분의 유입으로 인해 세포의 생존율을 감소시켰다고 보아진다. 강 등(1990)은 수정란 내부의 내동제를 완전히 제거하지 않고 PBS로 옮기면 수분의 급속한 유입으로 생존율에 영향을 미친다고 보고하였으며, 본 실험에서도 그와 같은 현상을 볼 수 있었다.

체외성숙후 생존율판정에서 FDA-test에 의한 생존율이 염색판정법보다 대체적으로 높게 나타났다. 이는 염색방법에서는 anaphase 또는 telophase 단계의 난자는 성숙된 난자판정에 제외를 시켰으며, 반면 FDA-test시 ana., telo 또는 그 이하의 난자에서도 형광을 보여주었기 때문이었다. 또한 동결보호제의 농도가 증가한 경우 난포난의 체외성숙율은 저조하였으며 FDA-test에 의한 생존율 판정에서도 낮은 체외성숙율에 근접하는 경향을 보여주었다.

분자량이 70,000이면서 동결액 첨가시 강한 점조성을 띄는 비침투성 동결보호제인 ficoll 10%를 DMSO 25% + PROH 25% + 0.5M sucrose + 10% FBS 에 첨가시켜 제조한 유리화 동결액에 노출된 돼지 난포난의 체외성숙후 생존율을 조사한 결과는 Table 6에 제시되어 있다.

평형시간 1, 3, 5분에 따른 FDA-test에 의한 생존율에서 평형시간 1, 3 분에서 69.1, 66.2%로 5분에서 40.5% 보다 높게 나타났다. 체외성숙후 핵성숙율도 각각 58.7, 50.8, 29.5%로 평형시간 1분과 3분에서 5분에 비해 높은 생존율을 보여주었다($p < 0.01$). 본 실험에서 ficoll을 첨가한 동결액에서 비첨가보다 난포난의 수축진행이 급격히 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며 Kasai 등(1990)은 ficoll은 sucrose와 상호관계적으로 수정란의 탈수를 촉진시키며 내동제의 침투를 억제시킨다는 보고와 유사한 경향을 보였다. 하지만 5분의 노출처리에서 난포난의 체외성숙율이 감소하므로서 이는 수분의 탈수가 빨라진 만큼 노출시간이 길어짐에 따라 독성이

돼지 난포난의 체외성숙에 영향을 미쳤다고 사료된다.

Table 6. Effect of equilibration period in vitrification solution added 10%(w/v) ficoll on In Vitro maturation of immature porcine follicle oocytes.

Equilibration periods(min)	No. of oocytes		
	Examined	Fluorescened	Matured(%) [*]
1	53	69.1 ± 6.4	58.7 ± 2.8 ^a
3	55	66.2 ± 3.4	50.8 ± 3.7 ^a
5	54	40.5 ± 3.8	29.5 ± 3.7 ^b

VS: DMSO 25% + PROH 25% + 0.5M sucrose + 10% FBS + 10% ficoll

Exposure time: 3 min. Dilution time: 3 min.

^{*}Values with different superscripts are significantly different (p < 0.01)

Nakagata (1989)는 Rall 과 Fahy (1985)의 유리화 동결에 5 ~ 10 초의 평형시간에서 가장 좋은 성적을 얻었다고 보고한 바 있다. 그러나 wood 등(1993)은 6.0 M의 DMSO를 이용한 mouse 미수정난의 유리화 동결보존에서 3-5 분의 평형시간으로 가장 좋은 성적을 얻어 본 실험도 이와 유사한 경향을 보이는 것 같았다.

동결전 동결액에서의 노출온도가 돼지 미성숙 난포난의 체외성숙에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 7에 나타나 있다.

0±2℃ 의 동결액에 노출된 돼지 난포난의 FDA-test에 의한 생존율을 보면 52.8% 이고 실온에서 노출된 난자는 68.6%의 생존율을 보여주었다. 다른 온도의 유리화동결액에서 노출되어진 돼지 미성숙 난포난의 체외성숙후 핵 성숙율은 0±2 ℃에서 46.6%, 실온에서 54.7%로서 이들간의 유의차는 없었다. 그러나 대조구의 체외성숙율은 61.8%로서 모든 처리에 비해 유의차있게 높은 성적을 보여주었다(p < 0.01).

Rall 과 Fahy(1985)는 mouse 수정란에서 VS1은 실온에서 독성이 강하기 때문에 저온(4℃)에서 노출시키는 방법을 통해 우수한 성적을 보고한 바 있다. 하지만 본 실험에서 저온에서의 동결액 노출에 따른 난포난의 체외성숙율은 실온처리에 비해 유의차는 없었지만 낮아지는 경향을 보였다. 이는 Rall과 Fahy(1985)는 실온에서 4℃의 동결액에 노출시켰지만 본 실험에서는 34 ~ 37℃에서 0±2℃의 동결액에 노출되었기 때문에 온도변화의 충격이 난포난의 생존에 해를 준 것으로 사료되었다.

Table 7. Effect of exposure temperature in vitrification solution on In Vitro maturation of immature porcine follicle oocytes.

Exposure temperature	No. of oocytes		
	Examined	Fluorescened	Matured(%) [*]
Control	60	78.6±2.0	61.8±2.3 ^a
0±2 °C	60	52.8±4.5	46.6±3.1 ^b
Room temp	60	68.6±3.0	54.7±1.0 ^b

VS: DMSO 25% + PROH 25% + ficoll 10% + 0.5M sucrose + 10% FBS

Exposure time: 3 min. Dilution time: 3 min.

*Values with different superscripts are significantly different (p < 0.01)

Trounson 등(1987)과 Didion 등(1988)이 저온변화에 대한 민감성(chilling sensitivity)이 특히 돼지 수정란에서 높게 나타난다고 하였으며 본 실험도 이와 비슷한 경향을 나타내 주었다. 그러나 실온처리에서도 대조구보다 낮은 생존율을 보여주므로써 여기에 정확한 규명은 앞으로의 연구에 조사되어야 할 것으로 사료되었다.

돼지 미성숙 난포난을 25%, 50% 와 100%(v/v) 로 희석한 유리화 동결액(VS)에서 낮은 농도에서 높은 농도 순으로 노출시킨 후 체외성숙율을 조사한 결과는 Table 8 과 같다.

Table 8. Effect of equilibration methods in vitrification solution on In Vitro maturation of immature porcine follicle oocytes.

Equilibration method	No. of oocytes		
	Examined	Fluorescened	Matured(%)
Control	72	73.6±2.5	48.6±1.8
1-step	72	64.0±7.1	43.1±2.5
2-step	57	75.4±2.3	51.6±5.2
3-step	72	69.6±4.4	48.5±2.4

VS: DMSO 25% + PROH 25% + 10% ficoll + 0.5M sucrose + 10% FBS

1-step: directly exposure to VS for 3 min at room temp.

2-step: 25% VS (1 min) / 100% VS (30-40 sec)

3-step: 25% VS (1 min) / 50% VS (30 - 40 sec) / 100% VS (30 - 40 sec)

Dilution time: 3min

FDA-test에 의한 생존율을 step 방법순으로 보면 각각 64.0, 75.4, 69.6% 로 2-step에 의해 노출되어진 난포난이 가장 좋은 생존율을 보여주었으며 대조구(73.6%)와도 비슷한 결과를 보여주었다.

돼지 미성숙 난포난의 유리화 동결액에서의 노출방법에 따른 체외성숙율은 각각 43.1, 51.6, 48.5%로서 대조구(48.6%)와 비슷한 수준을 보여주었다. Rayos 등(1993)은 mouse 미수정난의 유리화 동결에서 1.5M(25% VS)의 DMSO에서 1 ~ 3분 노출시킨 후 100% VS에 노출시키는 2-step 방법이 직법 노출시키는 방법보다 높은 성적을 얻을수 있다고 하였다. 그러나 유의차는 없었으며 본 실험도 그와 유사한 경향을 보여 주었다. 그리고 Hochi 등(1996)은 equine 난포난의 유리화 동결에서 2-step에 의한 단계적인 방법으로 난포난을 동결액에 노출시키므로써 급격한 삼투압 변화에 대한 부담을 덜어 줄 수 있다고 보고한 바 있다. 본 실험에서도 2, 3-step에 의한 방법이 생존율이 다소 높게 나타났으나 유의차는 없었다.

유리화 동결액에 노출된 돼지 미성숙 난포난을 0.5M sucrose가 첨가된 D-PBS 용액에서 1, 3, 5 동안 희석시킨 후 체외성숙을 유도한 결과는 Table 9에 나타나 있다.

희석기간에 따른 FDA-test에 의한 생존율을 보면 각각 43.1, 48.9, 66.8%로서 5분에서 가장 좋은 성적을 볼 수 있었다. 핵 성숙율에서 5분 처리구가 1분과 3분에 비해 가장 높은 생존율(53.4% vs 22.2%, 34.%)을 보여주었으며 대조구(55.1%)와 비슷한 생존율을 보여주었다.

Table 9. Effect of dilution periods in dilution medium(PS) on In Vitro maturation of immature porcine follicle oocytes exposed VS.

Dilution period(min)	No. of oocytes		
	Examined	Fluorescened	Matured(%) [*]
Control	58	71.9±3.3	55.1±2.2 ^a
1	58	43.1±3.2	22.2±3.5 ^b
3	58	48.9±3.5	34.5±2.8 ^c
5	58	66.8±3.2	53.4±1.5 ^a

PS: 0.5M sucrose with D-PBS + 10% FBS.

^{*}Values with different superscripts are significantly different (p<0.01)

본 실험에서 난포난이 유리화 동결액에 3분 동안 노출된 이후 1분과 3분의 회석후 D-PBS와 체외성숙 배양액에서 회석시 난구세포의 이탈현상을 볼 수 있었으며, 또는 체외성숙 후 본래의 크기보다 커진 난자를 관찰할 수 있었다. 본 실험에서 사용된 유리화 동결액에서 3분의 노출에 따른 회석(0.5 M 의 sucrose)은 5분정도 충분히 부여하는 것이 양호한 생존율을 가져다 줄 것이라고 사료되었다.

II. 돼지 미성숙 난포난의 유리화 동결음해후 체외성숙

Table 10 은 FBS 와 pFF를 추가적으로 첨가한 유리화 동결액을 이용하여 돼지 미성숙 난포난의 유리화 동결음해 후 체외성숙율을 나타낸 것이다.

Table 10. Effect of addition FBS or pFF to vitrification solution on In Vitro maturation of vitrified immature porcine oocytes.

Treatment	No. of oocytes		
	Examined	Fluorescened	Matured(%)*
Control	57	66.7±1.7	56.1±2.1 ^a
FBS 10%	57	8.8±3.4	3.6±2.1 ^b
FBS 20%	57	12.4±3.5	8.8±3.4 ^b
pFF 10%	59	8.6±3.3	3.5±2.0 ^b
pFF 20%	56	7.1±2.9	3.6±2.1 ^b
FBS 10%+pFF10%	56	13.9±2.6	8.7±3.3 ^b

VS; DMSO 25% + PROH 25% + ficoll 10% + 0.5M sucrose

Exposure time; 3 min. Dilution time; 5 min.

*Values with different superscripts are significantly different (p<0.01)

돼지 미성숙 난포난의 유리화 동결후 FDA-test에 의한 생존율은 FBS 20% 와 10% FBS + 10% pFF에서 각각 12.4%, 13.9%로서 다른 처리에서 보다 높은 생존율을 보여주었다. 그러나 대조구의 난자는 66.7%로 가장 높은 생존율을 보여주었다. 유리화 동결음해된 돼지 미성숙 난포난의 체외성숙율은 FBS 20% 와 10% FBS + 10% pFF FBS에서 각각 8.8%, 8.7%로 나타났지만 대조구의 56.1%와 유의차 있게

저조한 성적이었다. Carroll 등(1993)은 mouse 난자의 완만동결에서 1.5M DMSO에 10% FCS를 첨가한 동결액이 BSA(4mg/ml) 또는 polyvinyl alcohol(1mg/ml)를 첨가한 경우보다 가장 높은 생존율을 나타냈다고 보고하였다. 또한 Wood 등(1993)은 hamster 미수정난의 완만동결보존에서 1.5M DMSO에 15% FBS를 첨가하여 사용한 바 있다. 하지만 본 실험에서는 pFF와 FBS의 동결액 첨가수준에 따른 효과는 볼 수 없었다. FDA-test에 의한 활력검사에서 동결음해된 난포난의 체외성숙후 활력은 매우 저조하였다(Table 10 참조). 그러나 동결음해 후 체외성숙을 유도하기전 cumulus cell 의 활력정도는 난자보다 높게 나타나는 경향이 있었다. 그리고 동결음해된 난포난의 체외성숙 후 난구세포의 확장은 일어났지만 핵성숙은(9% 이하) 매우 저조하게 나타났다. 핵 염색에 의하여 전핵단계의 난포난 또는 염색이 안되는 난포난이 대부분이었고, 염색체의 비정상 분산 등을 관찰할 수 있었다.

DeKel 등(1988)은 LH급중에 이은 granulosa cell과 난자사이의 결합관계가 분리되므로서 cAMP의 이동이 억제당하므로서 감수분열 재개가 일어난다고 하였다. 하지만 본 실험에서는 동결음해된 난포난의 체외성숙율이 granulosa 세포의 팽창에도 불구하고 저조하게 나타났다. 한편 Eppig 등(1988)은 난자와 granulosa 결합의 감소가 있었는데 불구하고 GVBD단계의 난자에서 cAMP의 수준의 증가가 있었다고 보고한 바 있다.

cytoskelatal stabilizer가 첨가되어 있는 D-PBS에서 15분간 전처리한 후 유리화 동결시킨 난포난의 동결음해 후 체외성숙은 Table 11에 제시되었다.

Table 11. Effect of cytoskeletal stabilizer on In Ivrtro maturation of vitrified(VS) immature porcine follicle oocytes.

Treatment [#]	No. of oocytes		
	Examined	Recovered(%)	Matured(%) [*]
Control	68	51(75.0)	51.4±1.9 ^a
+ CS	69	49(71.0)	10.0±3.6 ^b
- CS	68	40(73.5)	5.9±2.9 ^b

VS; DMSO 25% + PROH 25% + ficoll 10% + 0.5M sucrose + 10% FBS + 10% pFF

Exposure time: 3 min. Dilution time; 5 min.

[#]+ CS; cytoskelatal stabilizer treated, - CS; not treated

^{*}Values with different superscripts are significantly different (p<0.01)

유리화동결전 cytoskeletal stabilizer 에 처리된 돼지 미성숙 난포난의 체외성숙율은 20.4% 였으며 CS 비처리에 의한 돼지 미성숙 난포난의 체외 성숙율은 12.0%로서 CS 처리에 의한 난포난의 체외성숙율이 양호한 성적을 보여주었지만 유의차는 없었다. CS 처리구에서 CS 비처리에 비해 GVBD 발생이 증가하는 경향을 보였으나 체외성숙율을 증가시키지는 못했다. 앞으로 cytoskeletal stabilizer 처리에 대한 돼지 난포난의 유리화 동결에 대한 보다 더 정확한 연구가 필요하며, 본 실험에서의 사용한 처리방법보다 더 정확한 방법이 필요하다고 사료되었다.

Table 12는 난구세포층이 다르게 부착된 돼지 미성숙 난포난과 체외성숙된 난자를 유리화 동결시킨 후 체외성숙 및 FDA-test에 의한 생존율을 비교한 결과를 나타낸 것이다.

Table 12. In Vitro maturation of vitrified mature or immature porcine follicle oocytes.

Groups	No. of oocytes		
	Examined	Fluorescenced	Matured(%) [*]
Control [#]	25	N.T.	47.7±6.1
P - Control [#]	28	N.T.	27.9±2.9
T	69	18.9±1.9 ^b	10.0±2.9 ^b
P	70	5.7±2.7 ^c	1.4±1.4 ^c
IVM	52	37.2±5.3 ^a	21.4±2.5 ^a

P: cumulus cell 1-3 layer groups, T; cumulus cell > 3 layer groups

IVM: In Vitro matured oocytes.

Exposure time: 3 min. Dilution time: 5 min.

[#] 2 replication

^{*}Values with different superscripts are significantly different (p<0.01)

미성숙 난포난의 난구세포층 형태에 따른 동결융해 후 체외성숙율을 조사한 결과, 난구세포층이 많이 부착된 것이 적은 것보다 높은 체외성숙율(22.4% vs 6.2%)을 보여주었다. Pellicer 등(1988)은 rat 미성숙 난포난의 동결보존에 관한 연구에서 난포난의 난구세포층은 동결에 대한 해를 보호해 주는 것으로 보고한 바 있으며, 본 실험에서도 난구세포층이 더 많은 것이 생존율이 높게 나타났다. 그러나 동결지 않은

난포난(control B)의 체외성숙율도 대조구에 비해 감소하는 추세를 보여주었다. 한편 체외성숙된 난자가 미성숙 난포난보다 동결보존 후 FDA-test에 의해 높은 생존율(35.2% vs 22.4%) 보여주었다. 그러나 성숙난자에서도 동결융해 후 투명대의 파괴 또는 세포질이 절단된 난자들이 빈번하게 나타나는 것을 볼 수 있었다. 이는 미성숙 난포난과 성숙난자에 있어서도 동결방법이 달라질 수 있음을 보여주는 것으로 사료된다. Le Gal 등(1994)은 goat 미성숙 난포난과 성숙난자의 삼투압차에 대한 능력이 다르며, 미성숙 난포난이 성숙난자보다 삼투압 스트레스 더 받는다고 보고하였다.

Toner 등(1986)은 돼지 수정란 내부의 지질에 의해 불규칙적인 빙정형성이 야기된다고 보고하였다. Nagashima 등(1994)은 돼지 1-cell 수정란 내부의 지질 제거가 저온(4℃)에 대한 저항능력을 증가시켜 준다고 하였으며 PROH를 이용한 완만동결융해 후 33%의 난할율과 4%의 상실배까지의 발달율을 보고하였다. 또한 Nagashima 등(1995)은 고속원심분리 후(12500 x g) 세포내 지질을 제거한 난자를 유리화 동결시킨 후 44%의 체외수정율을 보여줘 돼지 난자 및 수정란의 성공적인 동결보존방법을 제시한 바 있다.

본 실험의 결과 돼지 미성숙 난포난의 유리화 동결융해 후 생존율은 매우 저조하게 나타났다. 독성이 적으며, 빙결정형성 방지 능력이 뛰어난 유리화 동결액 그리고 융해 후 충분한 희석과정을 통해 양호한 성적을 기대할 수 있을 것이라고 사료된다. 앞으로 돼지 미성숙 난포난의 유리화 동결을 위한 FBS, pFF와 cytoskeletal stabilizer의 이용과 아울러 세포질내 존재하는 다량의 지질이 동결융해 후 생존율에 미치는 영향에 관한 연구가 필요할 것이라고 사료된다.

V. 적 요

본 실험은 돼지 미성숙 난포난의 효과적인 유리화 동결을 위한 동결액 개발을 위해 동결전 과정에서 동결보호제의 독성, 평형시간, 노출방법, 희석시간과 방법 등이 돼지 미성숙 난포난의 생존율에 미치는 영향과 혈청, 난포액을 동결액에 첨가하거나 cytoskeletal stabilizer 처리 후 동결음해후 난포난의 생존율을 조사하기 위하여 실시하였으며 결과는 다음과 같다.

1. 비침투성 동결보호제인 Sucrose의 독성 실험에서 0.1, 0.25, 0.5M sucrose 처리구가 1M의 처리구에 비해 높은 체외성숙율을 보여주었다(51.7, 49.1, 50.2% vs 17.2%; $p < 0.01$). 그러나 대조구의 체외성숙율(57.8%)과는 유의차가 없었다.
2. 침투성 동결보호제의 독성실험 결과 20% DMSO 와 PROH 에서 다른 내동체에 비해 가장 좋은 체외성숙율(60.8%, 56.4%)을 보여주었나 대조구의 56.7%의 체외성숙율과 유의차가 없었다. 체외수정결과 10% DMSO 와 20% PROH 에서 다른 내동체에 비해 가장 좋은 체외수정율(25.5%, 15.6%)을 보여주었다. 그러나 대조구에서는 32.2%의 체외수정율을 보여주었고 10% DMSO를 제외하고는 모든 처리에서 유의성있게 낮게 나타났다($p < 0.01$).
3. 돼지 난포난의 유리화 동결을 위한 동결액의 유리화검정 결과 ficoll 과 PVP 의 첨가에 관계없이 D20% P20% 에서는 음해시 빙정이 형성되었고 D25% P25%에서는 비침투성 동결보호제 첨가없이(ficoll, PVP) 동결음해시 모두 유리화가 되었다.
4. 돼지난포난의 유리화동결액(VS: D25 P25 + 0.5M sucrose + 10% FBS)에 1, 3, 5분의 평형시간에 따른 체외성숙율은 각각 49.4, 33.3, 23.2% 였으며 대조구 58.7%의 체외성숙율에 비해 유의차있게 낮았다($p < 0.01$). 한편 ficoll 10%가 첨가된 VS에서는 5분 (29.5%)에 비해 1분, 3분에서 각각 58.7%, 50.8%의 높은 체외수정율을 보여주었다($p < 0.01$).
5. 동결액에 노출된 돼지미성숙 난포난의 희석시간에 따른 체외성숙율은 5분(53.4%)

에서 1분과 3분(22.2%, 34.5%)에서 보다 높게 나타났으며($p < 0.01$) 대조구의 체외 수정율(55.1%)과 비슷한 수준이었다.

6. 돼지 미성숙난포난을 FBS 20%와 FBS 10% + pFF 10%가 첨가된 유리화 동결액에서 동결융해 후 각각 8.8%, 8.7%의 체외성숙율을 보여주었지만 대조구(56.1%)에 비해 매우 저조한 성적이었다($p < 0.01$). 동결전 cytoskeletal stabilizer에 처리된 돼지 난포난의 유리화 동결융해 후 체외성숙율은 10.0%로 대조구(51.4%)보다 저조한 성적이었다($p < 0.01$). 한편 성숙난자(37.2%)가 미성숙 난포난(18.9%)보다 동결 보존 후 유의성 있게 높은 생존율을 보였다($p < 0.01$)



VI. 참고 문헌

1. Al-Hasani, S., K. Diedrich, H. Van der ven, A. Reinecke, M. Hartje and D. krebs. 1987. Cryopreservation of human oocytes. *Hum.Reprod.* 2:695~700.
2. Al-Hasani, S., J. Kirsch, K. Dierich, S. Blanke, H. Van der van and D. Krebs. 1989. Succesful embryos transfer of cryopreserved and in vitro fertilized rabbit oocytes. *Hum. Reprod.* 4:77~79.
3. Bernard, A., B. Fuller, O. Djahanbakch, D. Imoedemhe, P. Stevens, R. W. Shaw. 1984. The osmotic response of human oocytes to glycerol and 1, 2 propanediol (Abstr). *Cryobiology* 21:712.
4. Bos-Mikich, A., D. G. Whittingham. 1995. Analysis of the chromosomal abnormalities in frozen~thawed mouse oocytes after parthenogenetic activation. *Mol. Reprod. Dev.*
5. Boutron P, 1979. Stability of amorphous state in the system water 1-2 propanediol. *Cryobiology*. 16:557.
6. Candy, C. J, M. J. Wood, d. G. Whittingham, J. Merriman, N. Choudry. 1994. Cryopreservation of immature mouse oocytes. *Hum. Reprod.* 9:1738~1742.
7. Carroll, J., G. M. Warnes and C. D. Matthws. 1989. Increase in digyny explains polyploidy after in~vitro fertilization of frozen~thawed mouse oocytes. *J. Reprod. Fert.* 85. 489~494.
8. Carroll, J., H. Depypere and C. D. Matthews. 1990. Freeze-thaw-induced changes of zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *J. Reprod. fertil.* 90. 547~553.
9. Carroll, J., M. J. Wood and D. G. Whittingham. 1993. Normal fertilization and development of frozen-thawed mouse oocytes: Protective action macromolecules. *Biology of Reproduction.* 48. 606~612.
10. Chen, C. 1986. Pregnancy after human oocytes cryopreservation, *lancet*, 1. 884.
11. Chen, C. 1987. Pregnancy after human oocytes cryopreservation (Abstr

- PS-051). Date presented at the Fifth World congress on in vitro fertilization and embryo transfer. Norfolk, VA, April 5-10, Published by The American Fertility Society, p19.
12. Didion, B. A., and D. Pomp, M. J. Martin, G. E. Homanics and C. L. Market. 1990. Observation on the cooling and cryopreservation of pig oocytes at the germinal vesicle stage. *J. Anim. Sci.* 68:2803 ~ 2810.
 13. Elliot, K. and J. Whelan. 1977. Eds., CIBA Foundation Symposium 52, The freezing of Mammalian Embryos, Elsevier/North Holland, Amsterdam.
 14. Feichtinger, W. 1986. Freezing human oocytes using ultra rapid techniques. *J. In Vitro Fert. Embryo Transfer.* 3:68(abstr).
 15. Feichtinger, W. and P. Kemeter. 1986. Initial results of a human egg and embryo freezing program. *J. In Vitro Fert. Embryo Transfer.* 3:191(abstr).
 16. Friedler, S., L. C. Giudice and E. J. Lamb. 1988. Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil. Steril.* 49. 743~764.
 17. Fuku, E., T. Kojima, Y. Shioya, G. J. Marcus, and B.R. Downey. 1992. In vitro fertilization and development of frozen-thawed bovine oocytes. *cryobiology.* 29. 485~492.
 18. Fuller, B. J. and A. G. Bernard. 1984. Successful in vitro fertilization of mouse oocytes after cryopreservation using glycerol. *cryo-Lett.* 5. 307~312.
 19. Glenister, P. H., M. J. Wood, C. Kirby and D. G. Whittingham. 1987. The incidence of chromosome anomalies in first~cleavage mouse embryos obtained from frozen~thawed oocytes fertilized in vitro. *Gamate Res.* 16. 205 ~216.
 20. Hamano, S., A. Koikeda, M. Kuwayama and T. Nagai. 1992. Full-term development of in vitro matured, vitrified and fertilized bovine oocytes. *theriogenology* 38:1085 - 1090.
 21. Hernandez-Ledezma, J. J. and R.W. Wright. 1989. Deep freezing of mouse one~cell embryos and oocytes using different cryoprotectants. *Theriogenology.* 32. 735~743
 22. Hochi, S., M. Kozawa, T. Fujimoto, E. Hondo, J. Yamada and N. Oguri.

1996. In Vitro maturation and transmission electron microscopic observation of horse oocytes after vitrification. *Cryobiology* 33. 300 - 310.
23. Heyman, Y., A. Smorag, L. Katska, and C. Vincent. 1986. Influence of carbohydrate, colloids and rapid freezing on viability of bovine non-matured oocytes or 1-cell fertilized eggs. *Cryo Lett* 7, 170 - 183.
 24. Johnson, M. H and S. J. Pickering. 1987. The effect of DMSO on the microtubular system of the mouse oocytes. *Development*. 100:313~324.
 25. Kasai, M., A. Iritani and M. C. Chang. 1979. Fertilization in vitro of rat ovarian oocytes after freezing and thawing. *Biol. Reprod.* 21. 839~844.
 26. Kasai, M., K. Niwa and A. Iritani. 1981. Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. *J. Reprod. Fertil.* 63. 175.
 27. Kasai, M., J. H. Komi, A. Takakamo, H. Tsudera, T. Sakurai and T. Machida. 1990. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J. Reprod. Fert.* 89, 91 - 97.
 28. Leibo, S. P. 1983. A one-step in situ dilution method for frozen-thawed bovine embryos. *Cryo-Letter* 4. 387 - 400.
 29. Leibo, S. P. 1984. A one-step method for direct non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology* 21, 767 - 790.
 30. Mandelbaum, J., A.M. Junca, M. Plachot and M.D. Alnot. 1987. Cryopreservation of human embryos and oocytes. *Human Reprod.*, 3:117.
 31. Mazur, P. 1970. *Cryobiology: the freezing of biological systems*. Science 168:939.
 32. Nakagata, N. 1989. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *J. Reprod. Fertil.* 87:479~483.
 33. Nakagata, N. 1993. Production of normal young following transfer mouse embryos obtained by In Vitro fertilization between cryopreserved gametes. *J. of Reproduction and fertility*. 99, 77 - 80
 34. Niemann, H. 1991. Cryopreservation of ova and embryos from livestock:

Current status and research needs. *Theriogenology*. Vol. 35. 1. 109~124.

35. Otoi, T., K. Yamamoto, N. Koyama and T. Suzuki. 1995. In Vitro fertilization and development of immature and mature bovine oocytes cryopreserved by ethylene glycol with sucrose. *Cryobiology* 32, 455 - 460.
36. Parkening, T. A., Y. Tsunoda and M. C. Chang. 1976. Effects of various low temperatures, cryoprotective agents and cooling rates on the survival, fertilizability and development of frozen-thawed mouse eggs. *J. Exp. Zool.* 369~374.
37. Pellicer, A., A. Lightman, T. G. Parmer, H. R. Behrman and A. H. De Cherney. 1988. Morphologic and functional studies of immature rat oocyte~cumulus complexes after cryopreservation. *Fertility and Sterility*. 50. 5. 805 ~810.
38. Polge C, Smith AU, Parkes AS. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and low temperatures. *Nature* 1164:666.
39. Rayos, A. A., Y. Takahashi, M. Hishinuma and H. Kanagawa. 1994. Quick freezing unfertilized mouse oocytes using ethylene glycol with sucrose or trehalose. *J. of Reproduction and fertility*. 100 123 - 129.
40. Quinn P, Kerin JFP:1986. Experience with the cryopreservation of human embryos using the mouse as a model to establish successful techniques. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 3:40.
41. Rall, W.F. and G.M. Fahy. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 313:573-575.
42. Renard, J.P., N. Bui-Xuan-Nguyen and V. Garnier. 1984. Two-step freezing of two-cell rabbit embryos after partial dehydration at room temperature. *J. Reprod. Fert.*, 70:487-492.
43. Russel JB, Kaltenbacher L, Pellicer A, De la Fuente A, DeCherney AH. 1986. Successful survival and fertilization of mouse oocytes after rapid freezing to -196°C and thaw (Abstr P-368).
44. Sathanathan, A. H., A. O. Trounson, A. Bongso, S. S. Ratnam, J. Ho, H. Mok, and M. N. Lee. 1988. The effects of ultrarapid freezing on meiotic and

- mitotic spindles of mouse oocytes and embryos. *Gamete res.* 21. 385~401.
45. Schroeder, A. C., A. K. Champlin, L. E. Mobraaten and J. J. Eppig. 1990. Developmental capacity of mouse oocytes cryopreserved before and after maturation in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 89: 43~50.
 46. Sherman, J. K., and P. P. Lin. 1958. Survival of unfertilized mouse eggs during freezing and thawing. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 98:902 ~ 905.
 47. Szell, A. and J. N. Shelton. 1986. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 78:699 ~ 703.
 49. Trounson, A. 1986. Preservation of human eggs and embryos. *Fertil. Steril.* 46. 1~12.
 50. Trounson, A. and D. K. Gardner. 1993. *Handbook of In Vitro Fertilization.* CRC. 227.
 51. Tsunoda, Y., T. A. Parkening and M.C. Chang. 1976. In vitro fertilization of mouse and hamster eggs after freezing and thawing. *Experientia* 32. 223~224.
 52. Van Uem, J. F., E. R. Siebzehnrubl, B. Schuh, R. Koch, S. Trotnow and N. Lang. 1987. Birth after cryopreservation of unfertilized oocytes. *Lancet.* 1. 752~753.
 53. Vincent, C., V. Garnier, Y. Heyman and J. P. Renard. 1989. Solvent effects on cytoskeletal organization and in-vivo survival after freezing of rabbit oocytes. *J. Reprod. Fert.* 87. 809~820.
 54. Whittingham, D. G. 1977. Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196°C . *J. Reprod. Fert.* 47:89~94.
 55. Willadsen, S.M., A.O. Trounson, C. Polge, L.E.A. Rowson and R. Newcomb. 1976. Low temperature preservation of eggs. In: *Egg transfer in cattle.* (L.E.A. Rowson, ed.). Commission of the European Community Publications, Luxemburg. pp 117-124.
 56. Willadsen, S. M. 1977. Factors affecting the survival of sheep embryos during deep freezing and thawing. *CIBA Foundation Symposium* 52, The freezing of

Mammalian Embryos, Elsevier/North Holland, Amsterdam.

57. Wood, M. J., J. Carrol and D. G. Whittingham. 1989. The addition of serum to the medium limits zona hardening in frozen oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 3:33(abstr. 56).
58. Wood, M. J., D. G. Whittingham and S. H. Lee. 1992. Fertilization failure of frozen mouse oocytes in not due to premature cortical granule release. *Biol. Reprod.* 46:1187 ~ 1195.
59. Wood, M. J., B. Claudio, J. Christine, J. Candy, J. Carroll, J. Melendez and G. David. 1993. High rates of survival and fertilization of mouse and hamster oocytes after vitrification in Dimethylsulphoxide. *Biology of reproduction.* 49 489 ~ 495.
60. 강만중, 김영훈, 문성호, 김중계. 1989. mouse 수정란의 급속동결에 관한 연구. I. 내동제 농도가 mouse 수정란 급속동결시 생존율에 미치는 영향. *한국가축번식학회지* 13(3):134 ~ 140
61. 강만중, 이철상, 한용만, 유대열, 이경광. 1990. 생쥐 2-세포기 수정란의 초급속 동결. *한국가축번식학회지* 14(1):9 ~ 16.
62. 김중계, 강민수, 고경래, 양병철. 1992. 초급속동결에 있어서 vitrification solution 개발과 FDA 생사판정이 수정란의 배양과 이식후 착상에 미치는 영향. I. vitrification solutionso의 내동제 조합이 초급속 동결후 mouse morulae의 생존율에 미치는 영향. *한국가축번식학회지* 16(3):269 ~ 276
63. 김중계, 강민수, 장덕지, 고경래, 양병철. 1992. 초급속동결에 있어서 vitrification solution 개발과 FDA 생사판정이 수정란의 배양과 이식후 착상에 미치는 영향. II. vitrification solutionso 비투과성물질(ficoll, sucrose)과 평형시간이 초급속동결 용해후 mouse morulae의 생존율에 미치는 영향. *한국가축번식학회지* 16(4):317 ~ 323.
64. 김중계, 양병철, 문성호, 고경래, 강민수, 장덕지. 1994. FDA-test 생사판정법이 초급속 동결된 mouse 수정란의 배양과 이식후 착상에 미치는 영향. I. FDA 첨가 수준이 초급속 동결된 생쥐상실배의 배양과 이식에 미치는 영향. *한국가축번식학회지.* 18(1):55 ~ 62.

감사의 글

본 논문이 있기까지 그동안 부족한 저에게 아낌없는 지도와 사랑을 주신 김 중 계 교수님께 무엇보다도 죄송하옵고 진심으로 감사드립니다. 아울러 강 태 숙 교수님과 강 민 수 교수님을 비롯한 축산학과 여러 교수님들의 정성어린 조언에 감사드립니다. 특히 실험수행에 많은 도움을 주신 박 세 필 선배님과 고 경 래 선배님께 감사드립니다. 또한 문 성 호, 문 봉 춘, 강 승 룡, 강 만 종, 문 성 호, 양 병 철, 오 창 언 선배님께도 감사리며 아울러 여러 대학원 선.후배님들에게도 감사드립니다. 동물번식학 실험실에서 그동안 수고한 이재익 후배님, 이 종 남, 김 덕 훈, 양 성 부, 최 선 실, 이 성 권 후배님에게 감사드립니다.

저를 낳아주시고 길러주시며 고생하신 사랑하는 저희 어머님께 그리고 동생들에게도 진심으로 감사드립니다. 끝으로 제가 어려울때 곁에서 힘이 되준 김 남 희 님에게 저의 부족한 논문으로 보답하고 싶습니다.

