大韓不妊學會誌: 第28卷 第4號 2001
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 28, No. 4, 2001, 12

인간 배아 동결 해빙시 액체질소의 분사속도가 배아 발달 및 임신에 미치는 영향

아주대학교 의과대학 산부인과학교실, 대학원 분자과학기술과[1]

김영아 · 서성석 · 김미란 · 황경주 · 박동욱[1] · 조미영 · 유희석

Effects of Different Infusion Frequency of Liquid Nitrogen on Human Embryo Development and Pregnancy Rates after Freezing and Thawing

Young Ah Kim, Seong Seog Seo, Mi Ran Kim, Kyung Joo Hwang, Dong Wook Park[1], Mi Yeong Jo, Hee Suk Ryu

Department of Obstetrics and Gynecology, Ajou University School of Medicine, Department of Molecular Science and Technology, Graduate School of Medicine[1], Ajou University, Suwon, Korea

Objective: To investigate the efficacy of high infusion frequency of liquid nitrogen on pregnancy in human embryo after freezing and thawing.

Materials and Methods: 150 infertile patients underwent 162 consecutive thawing-ET cycles. In the high infusion frequency group (Group A), 47 patients (50 cycles) underwent cryopreservation with high infusion frequency of liquid nitrogen. In the low infusion frequency group (Group B), 103 patients (112 cycles) underwent cryopreservation with low infusion frequency of liquid nitrogen. We analyzed the clinical characteristics, fertilization rates, development of embryo, good quality embryo ratio, implantation rates, and pregnancy rates between these two groups.

Results: There was no difference between the groups with regard to clinical characteristics (mean age, infertility duration, infertility factors, hormone profile), mean number of oocyte retrieval, fertilization rates, and mean embryo number of transfers. The survival rates in group A was 64.9% (228 of 350 embryos), and among the 228 embryos 190 embryos (83.3%) which progressed to the two- to eight-cell stage. After thawing, the embryo numbers were 65 (34.2%), 29 (15.3%), 35 (18.4%), and 37 (19.5%) of grades 1, 2, 3, and above 4, respectively. The survival rates in group B was 63.8% (482 of 755 embryos), and among the 482 embryos 465 embryos (96.5%) which progressed to the two- to eight-cell stage. After thawing, the embryo numbers were 106 (22.8%), 94 (20.2%), 89 (19.1%), and 112 (24.1%) of grades 1, 2, 3, and above 4, respectively. There was no difference in embryo quality change after the freezing-thawing procedure between the groups. Implantation rates (31.1% vs. 34.3%) were not significant. However hCG positive rates in group A (40%) were higher than group B, but not statistically significant. Clinical pregnancy rate (26% vs. 25.9%), on going pregnancy rates (>20 weeks) were not significant (26% vs. 25%).

Conclusion: We compared embryo quality change, survival rates, and pregnancy rates between high

교신저자: 황경주, 경기도 수원시 팔달구 원천동 산5번지, 아주대학교 의과대학 산부인과학교실
Tel: (031) 219-5249, Fax: (031) 219-5245, e-mail: kjhwang@madang.ajou.ac.kr

infusion frequency group and low infusion frequency group and the results were similar between the two groups. Therefore, high infusion frequency of liquid nitrogen for cryopreservation is a worthy method to preserve in human embryos.

Key Words: Human embryos, Cryopreservation, High infusion frequency of liquid nitrogen

체외수정을 위한 과배란 유도에 따라 많은 수의 난자채취가 가능하게 되었으며 많은 배아의 이식으로 임신율을 증가시켰으나, 이에 따라 부가적으로 다태 임신에 따른 선택적 배아 감소술을 시행함에 따라 사회적, 육체적, 심리적인 부담을 수반하게 된다. 따라서 이식할 배아 수를 제한하게 되었고 이에 따라 당 주기에 이식하고 남는 잉여 배아의 보존의 필요성이 대두되었다. 그 외에도 난자 공여에 의한 체외수정 및 배아 이식술에 있어서도 수정된 배아를 냉동보존한 후 적절한 시기에 배아를 해빙 이식함으로 임신율의 향상을 기대할 수 있게 되었으며 현재는 보조생식술 과정에서 배아 동결 해빙이 매우 중요한 비중을 차지하고 있다. 따라서 냉동보존은 이식 전에 발생될 수 있는 모체측의 불리한 조건을 극복케 하여 체외수정 과정의 유연성을 증가시켰으며, 과배란 유도시 난자회수를 위한 난소 최적자극의 발달을 가능케 하여 이식과 착상을 위한 자궁의 준비를 용이하게 하였다.

배아의 동결보존은 냉각과정과 결빙 및 탈수과정으로 진행된 후 -196℃의 액체질소에서 보존하는 과정으로 진행된다. 배아 동결시 다양한 항동해제의 사용과 컴퓨터 세포동결기의 이용은 이러한 배아의 손상을 효과적으로 감소시키고 있다고는 하나,[1] 해빙 이후의 배아의 생존율, 양질 배아의 발생율과 임신율은 비동결군에 비해 현저하게 저하되는 것으로 알려지고 있어 개선이 요구된다.[2-5] 동결 배아에서 임신율이 떨어지는 원인으로는 균질하지 않은 세포질내의 얼음 결정과 과립 (granules) 형성 및 runaway 효과로 인한 ATP의 감소 및 반응성 산소족의 증가 등이 중요한 요인이라고 유추되고 있으나 아직 확실한 결론을 내리지 못하고 있는 실정이다. 최근에는 세포자멸사 (apoptosis)와 관련된 세포내 소기관 중의 하나인 미토콘드리아의 기능 손상에 관한 보고가 증가하고 있다.[6]

현재 사용되고 있는 세포동결기는 일정한 속도로 분사되는 액체질소의 가스 압력에 의하여 동결속도가 조절된다. 이러한 분사 방법은 비록 예정된 목표 온도에 도달하기까지 우수한 결빙곡선을 보이지만 비연속적인 분사로 인한 미세한 온도의 변화를 유발하여 얼음 결정 입자의 상태에 영향을 줄 수 있다. 따라서 동결과정에서 액체질소의 분사속도를 증가시키면 동결시 발생되는 열에 의한 온도 변화를 감소시켜 일정한 결빙곡선을 유지할 것으로 추측할 수 있다. 이러한 이론을 바탕으로 생쥐 배아 동결시 고속분사 방법이 미토콘드리아의 기능 유지를 효과적으로 유지하게 하며, H_2O_2의 발생 및 DNA 분절화가 감소하여 배아 발생이 호전된다는 사실이 보고되었다.[7]

이에 본 연구진은 인간 배아 동결시 액체질소 분사속도가 배아의 발달, 착상율, 및 임신율에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

1997년 1월부터 2000년 12월까지 아주대학교 병원 산부인과 불임클리닉에서 과배란 유도를 시행한 150명의 환자들을 대상으로 하였다. 배란 유도는 gonadotropin (FSH, Metrodin; Serono, Rome, Italy; hMG, Pergonal; Serono, Rome, Italy)과 GnRH analogue (Gn-RH-a, leuprolide acetate depot, 1.875 mg SC single dosage; Takeda Chemical Industries, Ltd., Japan; Leuprolide acetate, 1 mg/d; Abbott laboratories, Chicago, IL; Supermon, 0.5 mg three times per day; Hoechst, Frankfurt, Germany)를 이용한 long protocol을 사용하였다.

2. 실험군의 분류

A군은 배아 동결시 액체질소의 고속분사를 시행한 47명으로 B군은 기존에 시행하던 저속분사를 시행한 103명으로 정의하였다. 난자채취는 직경이 17~18 mm 이상인 난포가 2개 이상 확인될 경우에 10,000 IU의 hCG를 투여하여 성숙을 유도하였다. 난

자는 hCG 투여 후 34~36시간 후에 질식초음파를 이용하여 난포를 흡입 채취하였다.

3. 동결 방법과 해동 방법

채취된 난자는 37℃, 5% CO_2 incubator에 전날 준비된 B3 media (BMIkorea, Suwon, Korea)에 넣고, 4~8시간 배양하여 percoll gradient로 300 G에서 15분간 원심분리하고 배양액으로 2회 씻어 준비한 정자로 ICSI (intracytoplasmic sperm injection) 혹은 정액주입 (insemination)을 시행하였다. 24시간 후에 2 전핵 (2 pronucleus, 2 PN) 상태를 확인하여 수정된 난자를동결보존 하였다. 배아의 동결은 수정 후 전핵 단계에서 시행하였다. 액체질소의 분사속도가 다른 두 종류의 컴퓨터 세포동결기 (high-frequency infusion (HFI; 120 infusion/min): CryoMagic, Booil Industry, Seoul, Korea; low-frequency infusion (LFI; 50 infusion/min): Kryo-10, Planar, UK)를 이용하여 양군 모두 동일한 program을 이용한 저속 동결 방법으로 동결하였다. 동해 억제제로 1,2-propranediol (PROH; Sigma, St. Louis, MO, USA)을 20% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL, N.Y., USA)이 포함된 배양액에 첨가하여 사용하였다. 동결 배양액 처리과정은 배양액 내 삼투압의 변화를 고려하여 2단계로 시행하였다. 첫 단계로 동결은 동결 배양액 Sol. A (1.5 M PROH)에서 배아를 15분간 방치한 후 동결 배양액 Sol. B (1.5 M PROH + 0.2 M sucrose)에 옮겨 15분 경과 후 동결을 시행하였다. 이때 동결 배양액 Sol. B로 처리된 배아는 0.25 ml straw 1개 당 10개씩 동결 배양액과 함께 넣은 후 동결을 시행하였다. 동결은 세포동결기를 이용하여 -2℃/min 속도로 -7℃까지 냉각하고, -7℃에서 미리 액체질소에 담가 두었던 forcep을 straw 내 동결액의 표면 수준에 접촉함으로써 식빙한 후 10분간 정치시켰다. -7℃에서부터 -35℃까지 -0.3℃/min 속도로 동결한 후 straw를 액체질소에 첨지하고 해빙할 때까지 -196℃ 액체질소 통에서 보관하였다.

해빙은 양군 모두 동일한 방법으로 급속 해빙 (500℃/min) 하였다. 즉, 액체질소 통에서 꺼낸 straw를 공기 중에서 30초 동안 노출시킨 후 실온의 증류수에 10초 동안 노출시켜 시행하였다. 해빙 배양액 처리과정은 4단계로 시행하였다. 해빙 배양액 Sol. 1 (1.0 M PROH + 0.2 M sucrose), Sol. 2 (0.5 M PROH + 0.2 M sucrose), Sol. 3 (0.2 M sucrose), Sol. 4 (PBS + 20% FBS)를 각각 30 μl 씩 배양접시 위에 떨어뜨리고 배양액 증발로 인한 배양액 내 삼투압의 변화를 막아 주기 위하여 oil을 덮은 상태에서 배아를 각각 5분씩 방치시킨 후 0.4% bovine serum albumin (BSA, Sigma, MO, USA)이 포함된 mHTF 배양액에 옮겨 배양기에서 배양하였다.

4. 해동 후 배아의 체외배양

해빙된 배아는 37℃, 5% CO2 incubator에 48시간 배양 후 난할 (cleavage of oocyte)과 분절 (fragmentation)을 관찰하여 배아를 분류한 뒤 TDT관 (SET T.D.T.: Laboratoire CCD, France)으로 이식하였다.[8]

5. 배아 이식을 위한 환자 준비

동결보존된 배아를 이식 받는 환자들의 자궁내막의 준비는 Serhal과 Craft의 단순화 투여법을 기본으로 하였다.[9] 즉, 생리 제3일째부터 estradiol valerate (Progynova, Schering AG, Germany) 6 mg/day을 경구 투여하기 시작하여 생리 10일째부터 질식초음파에 의한 내막 두께를 관찰하여 내막의 두께가 7 mm 이상이 되면 progesterone in oil (Progest, 삼일제약, Korea)을 50~100 mg/day 근주를 시작하고 이로부터 4일 후에 이식하였다.

6. 황체기 보완 및 임신의 확인

황체기 보완은 progesterone in oil을 배아 이식 후부터 100 mg 씩 매일 근주하거나, micronized progesterone (Utrogestan, Besins, France)을 배아 이식한 날부터 매일 600 mg을 2회로 나누어 질정으로 사용하였다. 임신 반응 검사는 배아 이식 후 약 10~12일 후에 혈장 β-hCG로써 확인하였고, 임신이 확인되면 황체기 보완을 같은 방법으로 12주까지 계속하면서 초음파로 추적 검사를 실시하였다.

7. 통계학적인 분석

통계처리는 SPSS for Windows release 7.5 프로그램의 Independent Sample Test와 Chi-Square Test 등을 이용하여 $p<0.05$인 경우에 통계학적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

Table 1. Comparision of clinical characteristics between HFI and LFI groups

	HFI Group	LFI Group
No. of cycles/cases	50/47	112/103
Age	31.32±3.08	31.23±4.05
Gravida	1.24±1.09	1.62±1.37
Parity	0.36±0.85	0.28±0.62
Infertility duration (m)	39.4±27.60	43.88±38.89
LH (mIU/mL)	7.88±6.21	6.05±3.47
FSH (mIU/mL)	10.47±20.71	7.07±4.86
E2 (pg/mL)	34.32±30.26	54.58±78.45
P4 (pg/mL)	0.96±2.01	1.98±4.54

Values are means±SD. p>0.05
HFI: High frequency infusion, LFI: Low frequency infusion

Table 2. The survival rate and embryo development between groups

	HFI Group (cycles=50)	LFI Group (cycles=112)
Mean no. of oocytes retrieval	19.97±6.21	18.99±9.24
Mean no. of 2 PN	14.56±7.41	14.93±7.72
Fertilization rates (%)	77.0	83.2
Survival rates (%) of thawed embryos	64.9	63.8
Mean no. of embryo per transfer	4.54±2.10	4.30±1.84
Embryo development (2~8 cells)	190/228	465/482
Grade I	65 (34.2%)	106 (22.8%)
Grade II	29 (15.3%)	94 (20.2%)
Grade III	35 (18.4%)	89 (19.1%)
Grade IV	37 (19.5%)	112 (24.1%)

p>0.05

결 과

총 150명의 환자로 이중 배아 동결시 액체질소의 고속분사를 시행한 군은 47명 (50주기), 기존에 시행하던 저속분사 시행한 군은 103명 (112주기)이었다. 두 군간의 임상양상은 연령, 임신력, 불임인자, hormone assay, 주기 당 난자 획득 수, 주기 당 동결보존 배아 수 등에서 유의한 차이가 없었다 (Table 1, 2).

해빙 후 배아의 생존율은 고속분사를 시행한 A군이 64.9%와 저속분사를 시행한 B군이 63.8%로 유의한 차이는 없었다. A군에서의 해빙 후 생존 배아는 총 228배아로, 2세포에서 8세포의 배아로의 발달은 총 190배아에서 보였다. 각 grade별 배아는 grade 1이 65개 (34.2%), grade 2는 29개 (15.3%), grade 3은 35개 (18.4%), 그리고 grade 4 이상은 37개 (19.5%)로 보였다.

저속분사를 시행한 B군에서의 해빙 후 생존 배아는 총 482배아로, 2세포에서 8세포의 배아로의 발달은 총 465배아에서 보였다. 각 grade별 배아는 grade 1이 106개 (22.8%), grade 2는 94개 (20.2%), grade 3은 89개 (19.1%), 그리고 garde 4 이상은 112개 (24.1%)로 두 군간의 유의한 차이는 없었다 (Table 2).

Table 3. Clinical results between HFI group and LFI group

	HFI Group (cycles=50)	LFI Group (cycles=112)
Implantation rates (%)	31.1%	34.3%
No. (%) of positive hCG	20 (40%)	39 (34.8%)
No. (%) of clinical pregnancy	13 (26%)	29 (25.9%)
No. (%) of ongoing pregnancy (>20 weeks)	13 (26%)	28 (25%)

p>0.05

배아 동결시 A군과 B군의 착상율은 31.1%와 34.3%이나, 혈액 검사상 hCG 양성율은 각각 40%와 34.8%로 고속분사를 시행한 군이 다소 높게 나왔다. 그러나 양군간의 통계학적으로 유의한 차이는 없었다. 임상 임신율도 각각 26%와 25.9%, 진행 임신율은 26%와 25%로 각 군간의 유의한 차이가 없었다 (Table 3).

고 찰

체외수정 및 배아 이식술에서 많은 수의 난포를 자극하는 능력과 함께 난자와 배아의 안전한 저장에 대한 요구 또한 매우 중요하게 여겨지는 부분이

다. 그러나 생존능력을 유지한 채로 동결보존을 해야 하기 때문에 동결과 해빙과정 동안에 세포들은 매우 복잡한 과정을 거치며 쉽게 손상될 수 있다. 세포내에 얼음 형성 (ice formation), 용액의 영향 (solution effects)과 삼투성 세포의 응축 (osmotic cell shrink) 등 동결과정 동안 세포들에게 손상을 주는 요소들 이외에 세포들은 얼음 결정체 (ice crystals)에 의해 물리적인 손상을 받을 수 있다. 특히 기계적인 요인에 의한 손상은 포유류의 난자나 배아처럼 세포가 클수록 그 손상도 크다고 할 수 있다. 따라서 어느 시기의 배아가 어떤 종류의 동결액과 동결 방법을 사용해야 좋은 생존율을 가질 수 있는지에 대해서는 논란이 많고 동결보존에 대한 체계가 아직 확립되어지지 않아 이에 대한 많은 연구들이 진행되고 있다.

인간 배아 동결의 방법으로는 완만 동결 (slow freezing), 초급속 동결 (ultrarapid freezing) 및 초자화 동결 (vitrification) 등이 연구되고 있으나 완만 동결 외에는 아직 일반화 되지 않았다.

초급성 동결법은 세포 내·외를 각각 보호하는 두 가지 동결 보호제를 이용하여 동결하기 전에 세포 내부의 수분을 탈수시키는 방법으로 Trounson 등에 의해 생쥐 배아와 인간 배아를 이용한 동결법이 처음으로 소개되었다.[10] 초급속 동결에 의한 임신율은 Gordts 등이 70%의 생존율과 20%의 임신율을 보고하였으나,[11] Hsieh 등은 임상 임신율과 분만율이 11.4%와 9.0%로 완만 동결법의 15.5%와 11.4%에 비해 낮음을 보고하였다.[12]

초자화 동결은 각종 동결 보호제를 혼합하여 세포 내·외에 빙결정을 방지하면서 동결하는 방법으로 Rall과 Fahy 등이 생쥐 배아를 이용하여 초자화 동결을 처음으로 보고하였다.[13] 동물에서는 초자화 동결이 흔히 사용되는 동결법이나, 인간 배아의 초자화 동결은 아직 일반화 되지 않은 실정이다.

인간 배아의 냉동보존에서 냉동과 해빙 후 보고된 생존율과 임신율은 보고자에 따라 다양하게 보고되며, 생존율은 9%에서 88%로 임신율은 0%에서 53%를 보인다.[14] 배아의 동결-해동 후 생존율에 영향을 미치는 주요인자로 동결속도를 들 수 있는데 현재 가장 적합한 냉각속도로는 -0.3~0.4℃/min로 보고되고 있으며,[1] -80℃까지 냉각하는 방법과 -30℃까지만 냉각한 후 액체질소 속에 담그는 완만 동결법이 알려져 있다.[15,16] 이런 완만 동결법은 보다 많은 세포를 탈수시킬 수 있고 해동 후에도 세포의 생존성을 증가시킨다.

일반적으로 세포를 동결보존 할 때는 냉각과정 (cooling phase)과 결빙 및 탈수과정 (ice formation and dehydration phase)을 거쳐 -196℃에서 보존되며 이식을 위해서는 급속 해빙과정 (rapid thawing phase)을 거치게 된다. 동결보존 과정에서 일어나는 세포의 손상은 결빙 및 탈수과정에서 세포내 소기관들의 물리적 손상과 이동성 재결정 (migratory recrystallisation), 용존 가스 (dissolved gases)에 의한 손상, 동결 억제제의 독성과 삼투압에 의한 배아의 과다한 수축 등의 물리적 손상 등이 잘 알려져 있으나, 냉각과정에서도 중요한 물리적, 기능적 손상 (cold shock)이 보고되고 있다.[14,17~19] 그러나 최근 포유류 배아의 동결보존 후 이식 프로그램이 점차 보편화되면서 이러한 손상을 최소화 시키기 위해 programmable controlled rate cell freezer와 동결보존체 (cryoprotective agent)를 사용하고 있다.

이러한 노력에도 불구하고 동결보존 후 해빙시 대부분의 포유류 배아의 생존율, 양질 배아의 발생율과 임신율이 비동결 배아에 비해 현저하게 저하되는 것으로 알려지고 있다.[3,4,20] 이는 균질하지 않은 세포질내의 얼음 결정과 이동성 재결정 (migratory recrystallization)에 의한 세포질내의 공동화 현상, 미토콘드리아 내부의 과립 (granules) 형성 (Frederik and Busing, 1980) 및 runaway 효과로 인한 ATP의 감소 및 반응성 산소족의 증가 등이 중요한 요인이라고 유추되고 있으나 아직 확실한 결론을 내리지 못하고 있는 실정이다.[17,21~26] 이에 동결 및 해빙과정이 생쥐 배아에서 발생되는 배아의 생체막 변성 여부를 Floorescent recovery after photobleaching (FRAP) 방법을 이용하여 동결보존 과정에서 생체막의 변성이 일어났음을 관찰되었고, 체세포내의 미토콘드리아 내, 외막의 막전위차와 손상 여부를 확인하였고, 관찰된 세포 손상이 자연세포사의 양상을 보이는 것을 통해 미토콘드리아의 기능적 손상이 세포발달 저해의 중추적인 역할을 한다고 추정되고 있다.[27]

현재 세포동결을 위해 사용되는 컴퓨터 세포동결기는 분당 약 50회로 분사되는 액체질소의 가스 분

압에 의해 예정 온도까지의 동결속도를 조절하는 방법을 채택하고 있다. 그러나 비연속적인 액체질소의 분사는 결빙시에 발열 반응으로 인해 미세한 온도 상승을 유발하게 되며 이로 인해 세포내, 외의 이미 형성된 미세한 얼음 입자를 얼음 결정체로 변형시킬 수 있다. 얼음 결정체가 형성되면 세포막과 세포내의 미세구조 및 세포 소기관에 손상을 주게 된다.[28,29] 그 중 미토콘드리아 막의 손상 및 세포질내 얼음 결정체 형성이 증가함에 따라 미토콘드리아의 내막에 결합하고 있던 효소들의 유리가 증가되어 효소의 활성이 저하되게 된다. 한편 냉각과정에서 runaway 현상에 의해 선택적 투과성 장애가 유발되고 이로 인해 세포 및 미세 소기관의 팽창이 초래되나 이러한 미세 소기관의 팽창은 결빙 및 탈수과정에서 더욱 심각하게 진행된다. 이러한 세포 팽창의 결과 유리 칼슘이온 (Ca^{2+})과 반응성 산소족이 세포질내에 증가됨으로써 미토콘드리아의 내, 외막 소공의 개방을 초래하여 반응성 산소족의 발생을 더욱 증가시키고 막전위차를 감소시킨다. 그 결과 미토콘드리아 내부의 cytochrome c와 AIF (apoptosis inducing factor)가 유리되고 이들에 의해 caspase 족의 효소가 활성화 됨으로써 세포자멸사가 유발된다고 설명할 수 있겠다.

따라서 배아의 동결과정 중 액체질소의 분사속도를 증가시키면 결빙시에 발열 반응에 의한 온도 변화를 상쇄시킬 수 있어 더욱 일정하고 온도 변화가 없는 결빙곡선을 유지하게 되며 세포질내의 얼음 결정체를 방지함으로써 미토콘드리아의 손상을 감소시켜 배 발생을 호전시키는 것으로 추정되며 얼음 결정체의 형성에 의한 세포 손상을 방지할 수 있을 것으로 기대된다.

손 등은 컴퓨터 세포동결기를 이용하여 생쥐 배아를 동결할 때 액체질소의 분사속도가 해빙 후 배아의 발달 및 미세 소기관과 세포자연사에 영향을 미치는지 알아보았다.[7] 결과적으로 동결, 해빙 후 배아의 회수율은 차이가 없었으나 2개의 할구가 보존된 2 세포기 배아로 판정한 생존율은 고속분사군 (50.7%)에 비해 저속분사군 (34.6%)에서 현저히 감소하였고, 생존 배아의 포배기 발생율 및 할구 수는 고속분사군에 비해 저속분사군에서 유의하게 낮았다. 미토콘드리아의 막전위차 측정에서 고속분사군에 비해 저속분사군이 낮은 전위차를 보여, 액체질소의 분사속도가 해빙 후 배아 발달에 중요한 요인으로 작용하며, 분사속도의 증가는 동결과정에서 미토콘드리아의 기능 유지에 효과적임을 보고하였다.

이러한 생쥐 배아에서의 결과를 토대로 인간 배아에 적용한 본 연구에서는 액체질소의 분사속도가 영향은 해빙 후 배아 발달 (83.3% vs. 96.5%), 혈장 hCG 양성 임신율 (40% vs. 34.8%), 임상 임신율 (26% vs. 25.9%)에서 유의한 차이를 보이지 않았다. 따라서 인간의 동결 배아 해빙 이식술에서 액체질소의 고속분사가 종전에 사용하던 저속분사와 비교해 큰 문제가 없으리라 사료되며, 생쥐 배아 실험에서 보인 미토콘드리아의 막전위차와 세포자멸사의 차이가 인간 배아에서 어떠한 영향을 미치는지에 대하여 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Whittingham DG, Wood M. Bibliography in low temperature storage of mammalian embryos. Biol Reprod 1984; 43: 1-12.
2. Feichtinger W, Hochfellner C, Ferstl U. Clinical experience with ultra-rapid freezing of embryo. Human Reprod 1991; 6: 735-6.
3. Menezo Y, Nicollet B, Herbaut N, Andre D. Freezing cocultured human blastocysts. Fertil Steril 1992; 58: 977-80.
4. Veeck LL, Amundson CH, Brothman LJ, DeScisciolo C, Maloney MK, Muasher SJ, et al. Significantly enhanced pregnancy rates per cycle through cryopreservation and thaw of pronuclear stage oocytes. Fertil Steril 1993; 59: 1202-7.
5. Shoukir Y, Chardonnens D, Campana A, Bischof P, Sakkas D. The rate of development and time of transfer play different roles in influencing the viability of human blastocysts. Hum Reprod 1998; 13: 676-81.
6. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. Science 1998; 281: 1309-12.
7. 손인표, 안학준, 계명찬, 최규완, 민철기, 강희규. 생쥐 배양 동결시 액체질소의 분사속도가

해빙 후 배아의 발달, 미세 섬유, 미토콘드리아 및 세포자연사에 미치는 영향. 발생과 생식 2000; 4: 161-73.

8. Veeck L. Preembryo grading. Atlas of the human oocyte and early conceptus. Vol. 2. Baltimore: Williams and Wilkins, 1991: 121-49.
9. Serhal PF, Craft IL. Ovum donation-a simplified approach. Fertil Steril 1987; 48: 265-9.
10. Trounson A, Peura A, Kirby C. Ultrarapid freezing: a new low-cost and effective method of embryo cyropreservation. Fertil Steril 1987; 48: 843-50.
11. Gordts S, Roziers P, Campo R, Noto V. Survival and pregnancy outcome after ultrarapid freezing of human embryos. Fertil Steril 1990; 53: 469-72.
12. Hsieh YY, Tsai HD, Chang CC, Chang CC, Lo HY, Lai AC. Ultrarapid cryopreservation of human embryo: experience with 1582 embryo. Fertil Steril 1999; 72: 253-6.
13. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196℃ by vitrification. Nature 1985; 313: 573-5.
14. Friedler S, Giudice LC, Lamb EJ. Cryopreservation of embryos and ova. Fertil Steril 1988; 49: 743-64.
15. Willadsen S, Polge C, Rowson LE. The viability of deep-frozen cow embryos. J Reprod Fertil 1978; 52: 391-3.
16. Polge C, Willadsen SM. Freezing eggs and embryos of farm animals. Cryobiology 1978; 15: 370-3.
17. 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.
18. Leibo SP, Mazur P, Jackowski SC. Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. Exp Cell Res 1974; 89: 79-88.
19. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implication. Am J Physiol 1984; 247: 125-42.
20. Feichtinger W, Hochfellner C, Ferstl U. Clinical experience with ultrarapid freezing of embryos. Hum Reprod 1991; 6: 735-6.
21. Rall WF, Mazur P, McGrath JJ. Depression of the ice-nucleation temperature of rapidly cooled mouses embryos by glycerol and dimethyl sulfoxide. Biophys J 1983; 41: 1-12.
22. Connor W, Ashwood-Smith MS. Cryoprotection of mammalian cells in tissue culture with polymers; possible mechanism. Cryobiology 1973; 10: 488-96.
23. Cotterill LA, Gower JD, Fuller BJ, Green CJ. Oxidative damage to kidney membranes during cold ischemia. Evidence of a role for calcium. Transplantation 1989; 48: 745-51.
24. Gower JD, Healing G, Fuller BJ, Green CJ. Iron redistribution and lipid peroxidation in the cold ischemia kidney. Adv Exp Med Biol 1990; 264: 393-6.
25. Pulito VL, Miller DL, Sassa S, Yamane T. DNA fragments in Friend erythroleukemia cells induced by DMSO. Proc Natl Acad Sci USA 1983; 80: 5912-5.
26. Tarin JJ, Trounson AO. Effects of stimulation or inhibition of lipid peroxidation on freezing-thawing of mouse embryos. Biol Reprod 1993; 49: 1362-8.
27. **안학준. 동결 보관 과정이 생쥐 배아의 발달에 미치는 영향** [**학위논문**]. **아주대학교**, 2000.
28. Grout BWW. The effects of ice formation during cryopreservation of clinical systems. In: Fuller BJ, Grout BWW, eds. Clinical Applicaiton of Cryobiology. CRC Press, Inc., Florida, 1991: 81-8.
29. Scott LF, Sundaram SG, Smith S. The use of a liquid-phase controlled rate freezing system for the successful cryopreservation of mouse pre-embryos. Fertil Steril 1993; 60: 351-8.