

-1-

**동결·융해 미성숙 생쥐난자의
체외수정에 의한 초기발생**

안양중앙병원 체외수정연구실, 안양중앙병원
산부인과, 고려대학교 응용동물학과

이중한¹ · 민병혁¹ · 이상호²

생쥐 미성숙 난포란의 동결·융해 후 체외 성숙, 체외수정의 가능성은 이미 보고한 바 있다. 본 실험은 동결·융해 후 미성숙 난포란의 체외수정, CZB 배양액내에서 정상적인 초기 배의 발생이 체외에서 진행될 수 있는가를 조사하기 위하여 수행하였다. ICR 생쥐로부터 미성숙 난포란을 회수하기 위하여 7.5 IU PMS 처리 후 48시간에 정상난포란만을 선별하여 propanediol를 기본 항동해제로 이용하여 동결·융해 과정을 거쳐 생존율을 판정하고, 이를 체외성숙, 체외수정을 실시하여 CZB 배양액에서 2세포, 8세포, 배반포시기까지의 발생 능력을 조사하였다. 동결·융해 후 평균 38.8%의 생존율을 나타냈으며 그 중 중기 II 시기까지 대조군 87.7%, 실험군 68.1%의 평균 성숙율을 보였다. 이를 체외수정을 실시하여 배반포시기까지의 발생율을 조사한 결과, 대조군 63.6%, 실험군 46.8%의 성적을 나타내었다. 이같은 결과는 미성숙 난포란의 동결·융해 후 체외수정 및 배반포로의 체외 발생이 가능함을 보여준 것이며 이를 기초로 하여 인간을 비롯한 포유류 미성숙난자의 정상적인 동결방법을 확립하는 기초자료로 적절하게 이용될 수 있을 것이다.

-2-

**Human Multi-pronuclei
Zygote의 체외배양시
Non fragmented Embryo와
Fragmented Embryo에서의
Methionine 유입량과
Mitochondria 분포
양상의 비교**

차병원 여성의학연구소

도병록 · 정미경 · 장미경 · 이경아
고정재 · 윤태기 · 차광열

Human *In Vitro* Fertilization(IVF)과 Embryo Transfer시 많은 초기배에서 fragmentation이 나타나나, 이러한 embryo fragmentation의 발생 원인에 관한 보고는 극소에 불과하다. 이에 본 실험에서는 그 원인을 알아보고자 생리학적인 측면에서 세포내 대사변화의 하나인 단백질 합성의 양적 변화를 관찰하였으며, 조직학적 측면에서 세포질내 mitochondria의 분포 양상을 관찰하였다.

실험에 공시된 수정난을 human IVF시 나타난 multi-pronuclei zygote(MPZ)로서 다음과 같이 두 가지 실험에 사용하였다. 1) 단백질 합성의 양적 변화; MPZ의 배양은 human fetal cord serum(hFCS)이 20% 첨가된 TC-199 배양액에 250 μ Ci/ml의 ³⁵S-methionine을 첨가하여 5% CO₂, 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 실험의 오차를 줄이기 위하여 2개 이상의 MPZ를 동일배지에서 동시에 배양하였으며, 이들 난자 중 non fragmented(NFR) 및 fragmented(FR) embryo의 methionine 유입 양을 각각 liquid scintillation counter로 측정하여 비교하였다. 2) Mitochondria의 분포 양상; TC-199 media에 20% hFCS가 첨가된 배양액에서 24시간 배양된 2-4세포 난자를 Rhodamine 123를 이용한 형광 염색을 실시하여 mitochondria의 분포양상을 관찰하였으며 (n=38), 투과전자현미경을 이용하여 세포질내 미세조직의 분포 양상을 관찰하여, 그것이 mitochondria임을 확인하였다. Methionine의

유입 정도는 NFR:FR=1:1.25로 차이가 나타나지 않았다. 그러나 체외배양하여 얻은 NFR과 FR을 Rhodamine 123 형광염색 및 투과전자현미경으로 관찰한 결과 세포질내 mitochondria의 분포는 상이한 양상을 나타내었다. 즉, NFR에서는 mitochondria의 분포가 균일한데 비해 FR에서는 할구에 따라 심하게 편중된 분포가 관찰되었다.

본 실험의 결과에서 human의 MPZ의 체외 발달 시 NFR 및 FR에서 methionine의 유입 정도에는 유의한 차이가 나타나지 않으나, 세포질내 mitochondria의 분포 양상에서는 상이한 결과를 나타내는 것으로 보아, 단백질 합성보다는 mitochondria와 관련지은 세포생리, 특히 에너지 공급의 심각한 불균형이 embryo의 fragmentation 원인의 한가지의 될 수 있으리라 추측된다. 따라서 이와 관련된 NFR과 FR 사이의 생리학적 변화에 대한 계속적인 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

- 3 -

체외수정에 실패한 인간 난자에서의 염색체수 이상

차병원 여성의학연구소

손원영 · 이경아 · 한세열 · 윤태기
정형민 · 관인평 · 차광열

IVF 시술기 회수되는 난자에 있어서 체외 수정, 난할, 착상 또는 착상을 유지하는데 실패하는 빈도가 높다. 많은 연구자들이 이러한 현상의 원인중의 한가지 요인으로서 염색체수의 이상을 보고하고 있다. 인간에서 여성이 남성보다 감수분열시 염색체 이상이 높은 것으로 보고되고 있으며, 체외수정의 경우 수정되지 않은 인간 난자의 염색체 이상을 16%-63% 다양하게 보고하고 있다. IVF 시술시 염색체의 이상을 유발시키는 요인에 대해서는 아직도 논란의 여지가 많다. 따라서, 본 연구는 IVF 시술 시 성숙된 난자들 중 수정에 실패한 난자에 있어서 염색체의 수적 이상의 빈도가 과배란유도 방법에 따라, 환자의 나이에 따라, 그리고 회수된 난자의 수에 따라 차이가 있는지를 알아보기 위하여 시행하였다. IVF 시술 시 FSH/HMG 또는 GnRH agonists (GnRHa)와 gonadotropin을 병용하여 과배란

이 유도된 환자(23-46세)에서 회수한 난자들 중 성숙이 완료된 난자가 수정 후 42시간에 이르기까지 수정되지 않은 것의 염색체를 분석하였다. 염색체의 분석은 Tarkowski(1966)의 방법을 변형시켜 사용하였다. 염색체는 122명의 환자(평균 연령; 31.7세)로부터 회수한 294개의 난자 중 180개(61.2%)를 분석하였다.

본 실험의 결과, 전체 분석한 난자 중 73.3%(132/180)가 정상적인 염색체수(haploid)를 나타내었고, 염색체수가 감소한 것(hypohaploid)은 12.2%(22/80) 그리고 염색체수가 증가한 것(hyperhaploidy + poliploidy)은 14.4%(26/180)였다. 과배란 유도방법에 의한 염색체수 이상의 발현은 FSH/HMG 그룹에서는 25.5%(22/83)이었으며 GnRH agonists 그룹에서는 26.6%(25/94)로 과배란을 유기한 방법에 따른 염색체수의 이상은 통계적으로 유의차가 인정되지 않았다. 또한, 환자의 나이에 따른 염색체수의 이상으로도 나이가 29세 이하에서는 22.8%(13/57), 30-34세인 경우에는 27.5%(22/80)였으며 35세 이상인 경우에는 32.4%(12/37)로 나이가 증가 함에 따른 염색체수의 이상은 증가하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의차는 없었다. 또한, IVF 시술시 회수된 난자의 수에 따라 분류하여 보았을 때, 회수된 난자가 5개 이하인 환자의 경우에는 염색체 수의 이상이 30.8%(8/26), 5-9개인 경우에는 29.1%(16/55), 10-14개인 경우에는 23.3%(14/60), 그리고 15개 이상인 경우에는 24.3%(9/37)로 나타나서 회수된 난자의 수에 따른 염색체수의 이상도 통계적인 유의차가 없었다.

따라서 IVF 시술시 수정에 실패한 난자에서 나타나는 염색체의 수적이상 현상은 사용하는 과배란 유기방법, 환자의 나이, 그리고 회수된 난자의 수에 의해 영향을 받지 않고 차이없이 나타났다. 그러나 난자의 염색체 이상이 발현되는 정확한 원인을 규명하기 위해서는 체외수정 전에도 염색체 분석이 필요하며, 자연적으로 배란된 난자에서도 정확한 염색체 이상을 평가해 보는 것도 의의가 있으리라 본다. 또한, 염색체 이상과 임신율과의 상호적인 연관관계에 대해서도 조사해야 할 것이다.