

대상 및 방법 : 정상군 15명에서 정액내 GOT를 측정하였으며 Eosin yellow 정자염색을 시행하였다. 냉동방지액으로 human sperm preservation media(HSPM)를 사용하였으며 한개의 plastic straw는 바로 액화질소에 넣어 급속냉각을 시키고 다른 한개의 plastic straw는 단계적으로 자동냉동기구인 KRYO 10 Freezer(Panner Co., Middle sex, England)에 넣어 분당 -0.5°C 의 속도로 4°C 까지 저속 냉각한 후 다시 분당 -10°C 의 속도로 -80°C 까지 급속동결하였으며 -80°C 까지 동결된 plastic straw는 재빨리 -196°C 의 액화질소에 침강시켜 보존하였다. 이후 냉동 보존된 각각의 정액을 실온에서 해빙하여 정액내 GOT를 측정하였으며 Eosin yellow 정자염색을 시행하였다.

결과 : 정상군, 단계저속냉동보존군, 급속 냉동보존군에서의 정액내 GOT값은 $315 \pm 100(\text{IU/L})$, $338 \pm 142(\text{IU/L})$, $364 \pm 84(\text{IU/L})$ 로 정상군과 단계저속냉동보존군, 정상군과 급속 냉동보존군 및 단계저속냉동보존군과 급속 냉동보존군에서 정액내 GOT값은 유의한 차이가 없었으나 정자 Eosin yellow 염색율은 정상군과 단계저속냉동보존군, 정상군과 급속 냉동보존군 및 단계저속 냉동보존군과 급속 냉동보존군에서 $10 \pm 5(\%)$, $58 \pm 13(\%)$, $76 \pm 8(\%)$ 로 모두 유의한 차이를 나타내었다.

결론 : 냉동보존 방법에 따라 정자 세포막의 손상을 나타내는 정자 Eosin yellow 염색율은 차이가 있었으나 정자 세포막의 손상 정도에 따른 세포내 효소인 GOT의 정장액으로의 유리는 차이가 없었다. 그러므로 정자액내 GOT 농도 측정만으로는 정자의 손상정도를 완전하게 평가하는데에 미흡하여 다른 보완되는 검사방법이 필요할 것으로 사료된다.

P-4

과배란 유도 과정에 있어서 배란 전 난포 세포의 apoptosis에 대한 GnRH-agonist의 영향

피엘 산부인과, 한양대학교 생물학과*

양현원 · 최규완 · 이승재 · 박종민 · 윤용달*

지난 여러 해 동안 GnRH가 난포의 atresia를 직접 유도를 하는 것으로 알려지면서 난소에 대한 GnRH의 직접적인 영향에 대하여 많은 연구가 있어 왔다. 최근 Hsueh등은 rat의 난소를 가지고 실험한 결과 GnRH가 난포 세포의 apoptosis를 직접 유발시키며, FSH를 함께 처리하면 50% 이상이 정상적인 세포로 회복된다는 사실을 보고하고 있다. 이러한 실험 결과는 체외 수정 및 이식 시술에 있어서 사용하고 있는 과배란 유도 방법에 따라 난소에 다른 영향을 미칠 수 있다는 것을 보여주고 있으며, 특히 장기간 GnRH를 병용하는 과배란 유도 방법은 난포 세포의 apoptosis를 유발시켜 난포의 atresia를 유도할 수 있다는 것을 시사하고 있다. 따라서 본 실험은 과배란 유도 방법에 따라 실험군을 구분하여 채취시 얻은 난포 세포를 염색하여 핵의 상태를 확인하고, DNA를 추출하여 apoptosis의 지표가 되는 DNA fragmentation 현상을 조사하였다.

실험군은 hMG와 FSH만으로 과배란 유도를 시행한 군을 Combo군으로, hMG와 FSH와 함께 GnRH를 병용하여 사용한 군을 GnRH군으로 구분하였다. 난자 채취시 얻은 다량의 난포 세포는 40% percoll로 혈구 세포를 제거한 후 냉동 보관하고 일부는 acridin orange로 염색하여 현광 현미경하에서 관찰하였다. 세포질과 핵이 심하게 응축된 세포를 apoptotic 세포로 판정하였다. 냉동 보관된 난포 세포로부터 DNA를 추출은 Zeleznik등이 이용한 방법으로 시행하였다. 준비된 DNA는 1% agarose gel에서 전기 영동

을 시행하고 ethidium bromide로 염색한 후 DNA fragmentation 양상을 확인하였으며, densitometer를 이용하여 fragmentation된 DNA의 상대적인 양을 계산하였다.

전기 영동 결과 전체 DNA양에 fragmentation이 일어난 상대적인 양은 Combo군에서 32.22%, GnRH군에서 24.27%를 보여 통계학적으로 유의한 차이가 없었다. 반면 과배란 유도 방법에 구분 없이 채취된 난자의 질에 따라 DNA fragmentation의 양상을 조사한 결과 난자 세포질과 cumulus cell의 색깔이 어둡고 세포질 내 granulation이 심한 군에서 fragmentation된 DNA의 상대적인 양이 39.05%로 양질의 난자가 채취된 군 19.83%보다 통계학적으로 유의하게 증가된 양상을 보여 주었다. 이상의 결과에서 과배란 유도 과정 중에 사용된 GnRH agonist가 배란 전 난포 세포의 apoptosis에는 직접적인 영향을 미치지 못하며, 난자 채취시 현미경하에서 관찰된 난자의 질과 난포 세포의 apoptosis와는 상관 관계가 있는 것으로 판단된다. 따라서 난포 세포를 이용한 공동 배양이나 실험에 양질의 난포 세포만을 선택하여 사용하는데 필요한 좋은 지표가 될 것으로 사료된다.

P-5

Effects of Protein Kinase Inhibitors on the Maturation of Mouse Oocytes *In Vitro*

피엘 산부인과, *한양대학교 생물학과

최규완 · 김수경 · 강희규 · 양현원
이승재 · 박종민 · *계명찬 · *김문규

포유동물의 난자의 성숙은 핵성숙과 세포질 성숙으로 구분된다. 난자의 성숙 과정 동안 진행되는 단백질의 인산화는 난자의 성숙 뿐만 아니라 이후의 수정 및 발생에 중요한 조절 요인으로 작용한다. 그러나 난자 내 단백질의 인산화에 관여하는 protein kinase system에 관한 구

체적인 내용은 잘 알려져 있지 않다. 본 실험에서는 난자의 성숙에 미치는 인산화 효소의 작용을 규명하기 위해 난자의 성숙 과정을 미성숙 (GV-intact) - 핵막 붕괴 (GVBD) 와 GVBD - MII 전이 두 단계로 나누어 각 단계에서 PKA, PKC, 그리고 tyrosine kinase의 역할을 조사하고자 하였다.

생후 6주된 ICR계 생쥐에 5IU의 PMSG를 주사 후 48시간에 난소로부터 난자-난구 세포 복합체를 채취하였다. 100 μ M dbcAMP를 함유한 human tubal fluid (HTF)내에서 난구 세포를 물리적으로 제거하고 핵막(germinal vesicle; GV)을 가진 미성숙 난자를 준비하였다. 일부의 난자는 dbcAMP-free HTF에서 3시간 배양하여 핵막 붕괴를 유도하였다. 각각의 난자에 DMAP (100 μ M), genistein (75 μ M), H-8 (100 μ M), H-7 (50 μ M)을 처리하여 20시간 동안 배양한 후 MII상태로의 전이를 관찰하였다.

미성숙 난자의 핵막 붕괴는 모든 protein kinase inhibitor처리군에서 억제되었으며, 특히 DMAP처리군에서는 완전히 억제되었다. 한편, 핵막 붕괴 난자의 MII transition은 genistein처리군에서만 유의하게 억제되었다. 이상의 결과에서 미성숙 난자의 핵막 붕괴는 PKA 이외의 protein kinase들이 관여하지만, 핵막 붕괴 난자의 MII transition에는 tyrosine kinase의 역할이 중요한 것으로 사료된다.

P-6

Enhanced results in Human Embryo Culture Using a Modified Human Tubal Fluid Medium Lacking Glucose and Phosphate

피엘 산부인과

강희규 · 최규완 · 양현원 · 김수경 ·
이승재 · 박종민

체외수정에 사용되는 배양액은 Ham's F-10 과 같은 synthetic media 였으나, 최근에는 정도