

particularly interval 6, are believed to play a critical role in human spermatogenesis. The objective of this study was to validate a sequenced-tagged site(STS)-mapping strategy for the detection of Yq microdeletion and to use this method to determine the proportion of men with Yq microdeletions in idiopathic, obstructive, nonobstructive azoospermia, severe OATS and in normal males. We analyzed three STS markers mapped to interval 6 within long arm of the Y chromosome from 106 nonobstructive, 30 obstructive azoospermia, 15 severe OATS patients, and normal 42 males in Korean men. By PCR, we tested leukocyte DNA, for the presences of STS markers(DAZ, sY129 and sY134) and SRY gene as internal control. And PCR results were confirmed by southern hybridization, and were investigated by SSCP analysis for DAZ gene mutation. None of 42 normal males and 30 obstructive azoospermia had microdeletions. Of the 15 severe OATS typed with DAZ, sY129 and sY134, 3(20.0%) patients failed to amplify 1 or more STS markers, and of the 106 nonobstructive azoospermia typed with DAZ, sY129 and sY134, 12(11.3%) patients failed to amplify 1 or more STS markers. From these results, high prevalence(12.4%) of Yq deletion(DAZ, sY129, sY134) in men with nonobstructive idiopathic azoospermia and severe OATS were observed in Korean infertility patients. To avoid the infertile offspring by assisted reproductive technique using ICSI or ROSI, preimplantation genetic diagnosis will be needed in IVF-ET program.

- 19 -

IVF시술시 회수한 과립세포에서의 Apoptosis

차병원 여성의학연구소

손원영, 박은희, 이경아, 고정재, 최동희,
이숙환, 윤태기, 차광열

본 실험의 목적은 IVF시술시 과배란을 유도한 환자로부터 난자를 회수할 때 함께 얻어지는 인간

과립세포에서 일어나는 apoptosis와 여러 임상적인 관련성을 연구하는 데 있다. IVF환자들은 FSH/hMG/hCG (CB) 또는 GnRHa/FSH/hMG/hCG (LA) 에 의해 과배란을 유도 하였다. 51명의 IVF환자에서 난자 회수시 나온 과립세포를 PBS로 세척하고 즉시 액체 질소에서 동결 후 DNA를 추출할 때까지 -70℃ 에서 냉동보존하였다. 저장한 과립세포에서 DNA를 추출하여 1.5% agarose gel에서 전기영동한 후 EtBr로 염색하여 DNA laddering을 분석하여 apoptosis 여부를 결정하였다. Apoptosis의 여부를 더욱 확인하기 위해서 3'-end labeling방법을 사용하였다. Apoptosis의 positive control로는 bovine의 atretic follicles에서 회수한 과립세포를 사용하였다. 51명 중 17명 (33%)의 환자의 과립세포에서 apoptosis가 관찰되었다. 그 중 7명은 CB에 의해 10명의 환자는 LA에 의해 과배란이 유도된 환자였다. Apoptosis가 관찰된 양성인 군과 일어나지 않은 음성인 군의 환자에서의 평균 연령에서는 차이가 없었다 (32.6± 0.8과 33.6 ±0.7). 과배란후 과립세포에서 일어나는 apoptosis와 환자의 나이와는 관계가 없었다. 이때에 사용한 FSH와 hMG의 양은 차이가 없었다. 그러나, 양성인 군에서 과배란 후 더 많은 난포들 (>15 mm)이 발달하였고 또한 더 많은 난자들을 회수하였다. 그러나 결론적으로 인간의 IVF시술시 사용하는 과배란 약제들에 의해서 apoptosis가 유도되지는 않으며 난자가 많이 회수된 경우 apoptosis가 유의성있게 높게 일어나는 결과로 보아 정상적인 생리환경에서 atresia로 빠질 난포가 과배란 유도로 인하여 같이 회수되기 때문이라고 생각된다.

- 20 -

Detection of Reactive Oxygen Species(ROS) and Apoptosis in Human Fragmented Embryos

피엘 산부인과, 아주의대 산부인과¹

양현원, 황경주¹, 박지영¹, 최규완,
권혁찬¹, 이승재, 박종민, 오기석¹

사람의 체외 수정 및 배아 이식에 있어서 수정된 난자는 일반적으로 배양 조건과 채취된 난자 또는 정자의 질에 따라 일부만이 양질의 배아로

발달하고 나머지 배아에서는 불균형적인 분할, 세포질의 fragmentation, 세포의 죽음등 비정상적인 형태를 나타낸다. 이러한 비정상적인 배아의 발달은 유전적인 결함이나 적절하지 못한 배양 조건으로 인하여 유발되는 것으로 보고되고 있다. 특히 체내 환경과는 다른 높은 산소 농도(20%)와 단순 배양액내에서 배양된 배아는 높은 ROS 수준을 보이며, 또한 이렇게 증가된 ROS는 배아의 세포막과 DNA에 상해를 주어 세포질의 fragmentation을 유발시킬 수 있을 것으로 생각된다. 또한 이러한 ROS에 의한 배아의 fragmentation 형태는 apoptosis에 의해 일어난 전형적인 세포의 현상과 일치하는 것으로 보이며, 이를 확인하기 위하여 배양된 배아내에서 ROS 양을 측정하였고 그 배아를 가지고 할구내 apoptosis를 조사하였다. 배아내 ROS의 양은 5(and 6) carboxy-2,7 dichlorodihydrofluorescein diacetate(C-DCDHF-DA)를 이용하여 Quanti cell 500(Applied imaging Co., UK)으로 측정하였으며, fragmented 배아에서 apoptosis의 확인은 in situ apoptosis detection kits (ApopTag, Oncor)와 전자현미경으로 시행하였다.

Fragmentation 정도가 각각 다른 배아에서 apoptosis 정도를 조사한 결과 fragmented 배아에서만 apoptosis를 확인할 수 있었으며, 대조군으로 사용한 정상적인 배아에서는 확인할 수 없었다. 또한 DAPI로 핵을 염색한 결과 fragmented 배아에서 핵이 불규칙한 모양으로 쪼개져서 응축되어 있는 것을 관찰할 수 있었고, 전자 현미경하에서 관찰한 결과 전형적인 apoptotic body 형태를 보이는 할구들을 확인할 수 있었다. ROS의 양은 정상적인 배아에 비하여 fragmented 배아에서 유의하게 높았다. 이러한 결과들은 배아내 ROS의 증가와 배아의 apoptosis가 밀접하게 관련이 있는 것으로 보이며 앞으로 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

- 21 -

The Expression of TGF- β 1 and Its Effects on Collagen I and III Messenger Ribonucleic

Acid Levels in Uterine Fibroids and Myometriums

Department of Obstetrics and Gynecology
College of Medicine, Yonsei University

Byung-Seok. Lee, Chang-Jin. Jung
Sang-Wook. Bae Ki-Hyun. Park,
Dong-Jae. Cho, Chan-Ho. Song

Fibroids, which are the commonest pelvic tumors in women, are originated from myometrial cells. Extracellular matrixes such as, collagen type I, III and fibronectin are rich in Fibroids. Although the exact initial pathophysiologic event of the leiomyoma is not known, recent evidences suggested that the effects of sex steroid hormones in the process of tumor growth are mediated by local production of growth factors including epidermal growth factor (EGF), insulin-like growth factor-I (IGF-I) and transforming growth factor- β (TGF- β). One of the functions of TGF- β is enhancing incorporation of extracellular matrix into tissues. We examined TGF- β 1 expression in myometrium and fibroids with immunohistochemistry and the effect of TGF- β 1 on the collagen I and III mRNA levels in fibroids and myometrium with northern blotting. We found that immunoreactive TGF- β 1 was expressed in myometriums and in fibroids. And, there was no difference at the intensity of immunostaining between two tissues. However increased staining was seen in the fibroids undergoing degenerative changes which suggests that TGF- β 1, may play a role in causing degenerative changes in fibroids. TGF- β 1 increased the mRNA levels of collagen I and III in myometriums and fibroids at 1ng/ml ($p < 0.05$). Therefore, expressed TGF- β 1 may stimulate the incorporation of collagen I and III into the extracellular matrix in myometriums and fibroids and may play a role in causing degenerative changes in fibroids.