

P-20

Sister Chromatid Exchange (SCE) Frequency and *In Vitro* Development of Mouse Zygote Cryopreserved by Vitrification

Maria Infertility Medical Institute, Seoul
College of Animal Husbandry¹, Kon-Kuk
University, Maria OB/GYN², Seoul

Kim Myo Kyung, Baik Chung Soon¹,
Uhm Sang Jun, Kim Eun Young,
Yoon San Hyun², Park Sepill, Chung Kil
Saeng¹ and Lim Jin Ho²

The cryopreservation of embryos has been shown to induce an increase of aneuploidy and malformed fetuses. This study was undertaken to investigate the effect of vitrification on embryonic development using the sister chromatid exchange (SCE) frequency after exposure to cryoprotectant and vitrification of mouse zygotes. Mouse IVF zygotes were vitrified by EFS40 (40% ethylene glycol, 30% Ficoll and 0.3 M sucrose in phosphate buffered saline containing 10% FBS). After mouse zygotes were exposed to EFS40 for 30 sec. at 25°C, they were immediately plunged into LN₂ or cultured for test of cryoprotectant toxicity without freezing. After thawing, survival rates to the 2-cell stage of zygotes exposed to or vitrified in EFS40 (98.5%, 95.2%) were not significantly different compared with that of control (100%). However, the developmental rates upto blastocyst and hatching blastocyst in vitrified groups (66.7, 50.0%) were lower than those of control (93.9, 81.8%) or exposed group (94.0, 78.8%). The influence of vitrification and exposure to cryoprotectant on the *in vitro* development of mouse zygotes was assessed by the SCE frequency. The SCE frequency in exposed (20.2 ± 2.1) or vitrified embryos (21.4 ± 3.2) was higher than that in control embryos (16.8 ± 1.5).

These results suggest that the frequency of SCE was increased after cryoprotectant exposure or vitrification although developmental rates of zygotes upto blastocysts and/or hatching blastocysts were not affected by cryoprotectant.

P-21

ICSI에 의한 수정과정에서 유래된 단일전핵의 기원과 생성원인

영동제일병원 불임의학연구소

윤수정, 임유진, 김혜정, 이동률, 윤현수,
노성일

ICSI에 의한 수정과정에서 정자는 첨체막과 원형질막을 가진 채로 난자내에 주입되므로 정상적인 수정과 그 기작이 다르며, 수정시 난자의 활성화와 주입된 정자의 탈응축, 전핵형성은 아직 정확히 알려지지 않고 있다. 인간의 IVF 시술과정에서 ICSI를 실시할 경우 높은 수정률을 보이나 비정상적인 수정의 빈도가 비교적 높게 나타나 수정후 단일전핵(1PN)의 형성률은 5-10%로 conventional IVF의 2-5%에 비하여 높다. 또한 환자에 따라 1PN이 높은 비율로 형성되는 경우도 있다. 1PN 생성 원인은 자연적으로 선택되어지는 정상적인 수정 과정과는 달리 ICSI 과정에서 선택되는 정자의 기능이상이나, 난자의 불완전한 성숙으로 수정후 난자의 활성화가 일어나지 않는 것이 그 원인으로 보고되고 있다. 본 연구는 ICSI에 의한 수정과정에서 난자와 정자의 상태에 따라 1PN의 형성률을 분석하고, 1PN의 핵상을 분석하여 1PN의 기원과 생성 원인을 밝혀보고자 시행하였다. 본 연구는 1996년 7월1일부터 9월 30일까지 영동제일병원 불임클리닉에서 시술한 총 123례의 ICSI program을 대상으로 하였다. 남성불임 환자의 정자상태에 따라 정상(n=28), oligoasthenoteratozoospermia(OATS, n=22), severe OATS(SOATS, n=37), MESA(n=6), TESE군(n=30)으로 나누어 ICSI후 형성되는 전핵의 수를 비교하였으며, 여성환자에서 채취되어지는 난자를 정상과 비정상적으로 구분하여 ICSI후 형성되는 전핵의 수를 비교하였다. 또한 ICSI후 형성된 1PN을 48시간동안 배양하여 각각의 할구를 fluorescence

in-situ hybridization(FISH)방법으로 분석하였다. 123례의 ICSI program에서 채취된 총 1561개의 난자중 1235개에서 ICSI를 시행하여 963개에서 전핵을 관찰하였으며, 1PN은 52개(5.4%), 2PN이 892개(92.6%), 3PN이 19개(2.0%)로 나타났다. 정자의 상태에 따른 1PN의 형성률은 OATS군에서 3.2%(5/155), SOATS군에서 4.4%(13/296)로 정상군의 1.9%(3/155)에 비해 높은 경향을 보였으며, MESA군에서 8.7%(4/46)와 TESE군에서 8.7%(27/310)로 정상군에 비해 높았다. 정상난자에서 1PN의 형성률은 6.3%(31/490)으로 비정상난자의 4.4%(21/473)와 차이가 없었다. 또한 배양된 28개의 1PN 배아로부터 32개의 할구를 분리하여 FISH방법으로 핵상을 분석하였다. 핵이 관찰된 28개의 할구중 23개에서 FISH signal이 나타났고, 12번 염색체의 probe를 이용한 FISH 결과 10개의 할구에서 haploid(43.5%)가 관찰되었으며, 9개에서 diploid(39.1%), 4개에서 polyploid(17.4%)가 관찰되었다. Y 염색체의 probe를 이용한 FISH 결과 2개(8.7%)의 할구에서 FISH signal이 관찰되었다. 이상의 결과로 보아 ICSI에 의한 수정과정에서 나타나는 대부분의 1PN은 난자의 단위생식적 활성화에 의해 형성되며, 그 원인은 정자의 기능장애에 의한 전핵형성 실패로 사료된다.

P-22

배양된 사람 과립-황체화 세포의 Apoptosis와 FSH에 의한 억제 효과

피엘 산부인과, 한양대학교 생물학과¹

양현원, 최규완, 이승재, 박종민, 윤용달¹

일반적으로 FSH는 뇌하수체에서 분비되어 난소내 과립 세포에 작용하는 단백질 호르몬으로써 난포 성장에 필요한 여러 호르몬과 성장 인자의 생성을 자극하며, 또한 LH 수용체 합성을 자극하여 난자의 성숙을 유도한다. 한편 FSH는 생존 인자로서 이를 제거하면 난포의 폐쇄(atresia) 현상이 일어나고, 다시 체내로 FSH를 투여하면 이러한 난포 폐쇄 현상이 억제되는 것으로 보고하고 있다. 이러한 난포의 폐쇄 현상은 과립 세포의 apoptosis

와 관련이 있으며, 여러 물질에 의한 과립 세포의 apoptosis는 FSH에 의해 억제되는 것으로 보고되고 있다. 따라서 본 실험은 사람의 과립-황체화 세포를 이용하여 배양하면서 자발적으로 일어나는 과립-황체화 세포의 apoptosis를 확인하고 FSH를 처리하여 apoptosis 억제 효과를 알아보았다.

난자 채취시 얻은 과립-황체화 세포를 40% percoll을 처리하여 혈구 세포를 제거한 후 10% FBS를 포함한 dMEM에서 배양하였다. 배양하면서 FSH를 농도별 시간별로 처리하면서 apoptosis 억제 효과를 조사하였다. 배양된 과립-황체화 세포는 in situ apoptosis detection kits(ApopTag, Oncor)을 이용하여 apoptosis 정도를 조사하였고, 또한 과립-황체화 세포에서 DNA를 추출한 후 전기영동을 시행하여 DNA 'laddering'을 확인하였다.

배양된 과립-황체화 세포에서 apoptosis를 확인한 결과 배양 후 3 일째 전체 살아있는 세포의 20 - 30%가 apoptosis를 보였으며, FSH를 처리한 군에서는 1% 이하로 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 FSH를 처리하면서 7 일을 배양한 결과 생존율이 85%로 FSH를 처리하지 않은 군(56%)에 비해 유의하게 증가된 것으로 알 수 있었다. 자발적으로 apoptosis가 일어난 군에서 전기영동으로 DNA 'laddering'을 확인할 수 있었으며, 전자현미경하에서 'apoptotic body'를 가진 세포들을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과로 배양된 사람의 과립-황체화 세포에서 일반 세포와 같은 자발적인 apoptosis를 확인할 수 있었으며, 또한 이러한 apoptosis는 FSH에 의해 억제된다는 것을 확인할 수 있었다.

P-23

생쥐 초기 배아의 Oxygen Free Radicals 농도 및 Superoxide

Dismutase가 배아 발달에 미치는 영향

아주대학 산부인과, 피엘 산부인과¹

박지영, 홍순정, 황경주, 양현원¹, 최규완¹, 권혁찬, 오기석

일반적으로 생쥐 초기 배아를 체외에서 배양할