

## P-13 Fluoromicroscopic Assessment of Mitochondria Function in Bovine Spermatozoa

Sae Young Park, Young Chai Chung\*, Chang Keun Kim\*,  
Eun Young Kim, Hwa Kyung Nam, Keum Sil Lee,  
San Hyun Yoon\*\*, Sepill Park and Jin Ho Lim\*\*

*Maria Infertility Medical Institute (마리아기초의학연구소),  
\*Chung Ang University, \*\*Maria Infertility Clinic, Seoul*

This experiment was to investigate the variation on mitochondrial function of frozen-thawed Hanwoo bull semen individually by staining using rhodamine123 (R123) and predict their sperm fertility according to mitochondrial function. R123 fluorescent labelling of spermatozoal midpiece was used as a monitor of sperm mitochondrial function. For frozen-thawed semen, 8 bull numbers were selected by their developmental capacity in previous study (Good-4, Poor-4). Individual sperm were stained for 30 min in Ca<sup>2</sup>-free Sperm-TALP solution containing 5 µg/ml R123 at 0 h, 6 h, 12 h and 24 h after thawing, examined their fluorescent intensity stained at midpiece under an epifluorescence microscope using 495 nm excitation filter (x1000). Through the two replication, fluorescent frequency was variable in different bull number and remarkably reduced as time goes by culture. In the predicted good groups, high fluorescent frequencies (0 h; 57.9~70.3%, 6 h; 27.0~52.6%, 12 h; 14.9~29.0%, 24 h; 6.1~14.5%) were showed while there were against patterns in the poor groups (0 h; 57.1~66.4%, 6 h; 22.6~50.5%, 12 h; 8.7~21.6%, 24 h; 1.5~11.7%). However, one bull number in each of the separated quality groups indicated result which is not coincide with the prediction (Good - 1/4, Poor - 1/4). These results demonstrated that there are correlation between fluorescent frequency of frozen-thawed Hanwoo bull semen and their developmental capacity and that this technique can be used as a criterion to predict the sperm fertility.

## P-14 비폐쇄성 무정자증 환자에서 ROSI를 적용한 68례에 대한 보조생식술의 결과

미즈메디(영동제일)병원 불임의학연구소

전일경 · 임유진 · 이동률 · 전종식 · 심현남 · 조정현 · 노성일 · 윤현수

남성불임환자의 약 10~15%를 차지하는 비폐쇄성 무정자증 불임환자는 여러 원인에 의해 고환내에서 정원세포로부터의 감수분열과정이나 정자로의 분화과정이 정지되어 정자를 형성하지 못한다. 이들 환자의 고환에서도 국부적으로는 정자가 형성되기 때문에 multiple-testicular sperm extraction (m-TESE) 방법으로 정자를 얻거나, 정자를 얻을 수 없는 환자에서는 ROSI (round spermatid injection, 원형 정세포 난자내 주입술)와 ELSI (elongated spermatid injection)를 시행하여 수정시킨 후 정상적인 임신과 출산이 가능하다. 그러나, ICSI program의 경우에 비해서는 그 수정율과 임신율은 현저히 떨어진다. 본 연구에서는 1996년 1월 1일부터 1999년 9월 30일까지 미즈메디(영동제일)병원에서 시술한 총 68례의 ELSI/ROSI

program을 대상으로 수정율과 임신율을 분석하고자 하였다. Spermatogenic cell은 세정관을 forcep으로 squeeze out하여 얻거나 효소를 이용하여 세정관으로부터 분리해 내었다. 68례의 ELSI/ROSI program에서 채취된 총 945개의 난자 중 776개에서 ELSI/ROSI를 시행하였고 그 중 590개 (76%)가 생존하였다. 351개 (59.5%)에서 전핵을 관찰하였는데, 1PN은 163개 (21.0%), 2PN이 176개 (22.7%), 3PN 이상의 polyPN은 12개 (1.5%)로 나타났다. 68례중 5례 (7.4%)에서 hCG 양성반응을 나타내었고, 그 중 2명 (2.9%)이 정상적인 출산을 하였다. 또한 6례에서는 효소를 이용하여 spermatogenic cell을 분리하는 방법을 사용하였으며, 고환조직에서 정자나 정세포를 보다 효과적으로 분리할 수 있었다. 이 방법을 적용하였을 때 2례에서는 sperm을 발견하여 ICSI를 시행하였고, 나머지 4례에서는 ELSI 혹은 ROSI를 시행하였다. 이들 4례중 한 례에서 정상적인 수정과 임신, 분만을 얻을 수 있었다. 결론적으로 난자의 세포질내 정세포 주입에 의한 수정 방법은 임신이 가능하고, 특히 효소를 이용하여 정세포를 분리하는 것이 효과적인 방법이라고 생각된다. 또한 ELSI/ROSI program에서 임신률을 향상시키기 위해서는 정세포를 분리하는 방법이나 체외에서 성숙시키는 방법에 대한 연구가 필요할 것이다.

## **P-15** Effects of Ascorbic Acid and Ferrous Sulfate on Frozen-Thawed Spermatozoa during *In-Vitro* Fertilization in Porcine

**H.S. Nam<sup>1,2</sup>, H.T. Cheong<sup>1</sup>, B.K. Yang<sup>1</sup>, C.I. Kim<sup>1</sup>, H.S. Yoon<sup>2</sup>,  
S.C. Lee<sup>3</sup>, J.H. Kim<sup>3</sup> and C.K. Park<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>College of Animal Resources Sciences, Kangwon National University,

<sup>2</sup>Infertility Research Center, Miz Medi (Young-Dong Jeil)

Hospital, Seoul, <sup>3</sup>Saewha Infertility Clinic, Pusan

Spermatozoa from several mammalian species, including mice and human, are highly susceptible to oxygen-induced damage mediated by lipid peroxidation, because of their relatively high content of polyunsaturated fatty acid and low levels of antioxidants. Exposures of fatty acid peroxides or high concentrations of the combination ascorbic acid (Asc) and ferrous sulfate ( $Fe^{2+}$ ) induce excessive lipid peroxidation in sperm membranes, and at result, rapid loss of motility and viability of spermatozoa. The aim of the this study was to determine whether preincubation of spermatozoa in the presence of ascorbic acid and/or ferrous sulfate can effects the penetration and polyspermy of oocytes by frozen-thawed porcine spermatozoa. Porcine follicular oocytes were matured *in vitro*, and inseminated with frozen-thawed boar spermatozoa which were preincubated for 0, 1, 2, 3, 4 and 5 h with/without Asc and/or  $Fe^{2+}$  supplementation. The sperm penetration rates were not different according to durations of spermatozoa preincubation in medium with 0.1 mM Asc (37~51%) or 1.0 mM  $Fe^{2+}$  (41~56%). However, spermatozoa were preincubated with Asc and  $Fe^{2+}$ , the penetration rates had a tendency to increase according to the time of preincubation, and penetration rate were significantly higher in Asc and  $Fe^{2+}$  supplemented group than control at 5 h preincubation ( $p < 0.05$ ). On the other hand, when spermatozoa were preincubated in medium without Asc and/or  $Fe^{2+}$ , the penetration rates were significantly higher