

B-5

핵치환 기술을 이용한 난자 배발달 향상에 관한 연구

대구마리아 불임클리닉¹, 서울마리아병원²

이상민¹ · 강상민¹ · 이상원¹ · 윤산현² · 이성구¹ · 임진호²

목 적: 최근 난자의 질을 향상시키기 위하여 GV 치환이나 세포질이식 등으로 그 가능성을 제시하고 있다. 본 연구는 핵치환 기술을 이용하여 전핵을 이미 탈핵된 세포질로 치환하였을 때 그 재구성된 수정란의 체외 발달율과 난자의 질이 떨어지는 환자의 시술에서 그 적용 가능성을 조사하였다.

대상 및 방법: 체외수정 시술후 수정확인시 생산된 비정상적인 수정란 (1PN, 3PN, 미수정란)을 이용하였다. 공여핵은 3PN 수정란으로부터 두 개의 전핵을 적출하였으며, 수핵 세포질은 이미 핵이 완전히 적출된 비정상 수정란의 위관강으로 주입 후 전기자극 (0.3 M mannitol 용액, DC 1.0 kV/cm, 50 μ sec, single pulse)으로 융합을 유도하였다. 융합이 확인된 수정란은 20%의 인간난포액이 첨가된 YS배양액에서 난구세포와 공동배양을 실시하면서 형태학적인 발달율, 수정란의 질과 정상성을 조사하였다.

결 과: 재구성된 수정란의 배반포까지의 발달율은 수핵 세포질로서 탈핵된 1PN난자를 사용하였을 경우가 52.9%로서 3PN의 25.6%에 비해 유의하게 높은 발달율을 나타내었지만, 탈핵된 미수정란의 세포질을 이용한 결과 모두 2세포기에서 6세포기단계에서 배발달이 정지하는 현상을 나타내었다. 한편 이전 시술에서 상당히 저조한 배발생율과 형태를 보여준 환자군에서는 다음 시술과정에서 생산된 비정상 수정란의 핵을 동일한 방법으로 치환한 결과 역시 1PN군이 3PN군에 비해 상당히 양호한 발달율 (각각 54.5, 18.2%)을 나타내었을 뿐만 아니라 핵치환 후 그 형태학적인 면에서 상당히 양호한 수정란의 분할 모양을 얻을 수 있었다. 재구성된 수정란으로부터 생산된 배반포를 염색체 분석한 결과 46개의 정상적인 염색체 양상을 볼 수 있었다.

결 론: 전핵을 난자의 세포질로 치환해줌으로서 배반포 단계까지 발달이 가능하였고, 반복적인 시술에서 현저히 저조한 배발달을 보이는 환자군에서 핵치환 기술을 이용하여 양질의 세포질과 치환함으로써 배발달이 양호한 수정란을 얻을 수 있는 유용한 기술로 이용될 수 있으리라 사료된다.

B-6 Alpha(α)- and Gamma(γ)-tubulin Assembly in Bovine Oocytes During Fertilization, Activation and Nuclear Transfer

Shin MR¹, Park SW¹, Cui HS¹, Choi JW², Kim NH¹

*Department of Animal Sciences, Chungbuk National University¹, Chungchongbuk-do
Institute of Livestock & Veterinary Reaserch² Cheong Ju, Chungbuk, Korea*

Objective: Despite of importance of centrosome inheritance in bovine oocytes during fertilization, parthenogenesis and nuclear transfer, little information is available. In this study we compared α - and γ -tubulin assembly in bovine oocytes during fertilization, activation and nuclear transfer in order to get insights into centrosome inheritance during nuclear transfer.

Methods: Bovine oocytes were matured for 24 h in TCM-199 supplemented with 10% FBS, 1 μ g/ml

β -estradiol, 50 ng/ml FSH. The oocytes were fertilized with frozen thawed sperm in FertTALP medium. Matured oocytes were activated with both electrical stimulation and 6-dimethylaminopurin. Nuclear transfer of bovine ear fibroblast cells into enucleated oocytes was accomplished by fusion method. Chromatin, α - and γ -tubulin assembly were determined by indirect immunocytochemistry and laser scanning confocal microscopy.

Results: During fertilization, a microtubule aster was observed near sperm chromatin, but γ -tubulin spot was not observed near the sperm chromatin. The maternal origin γ -tubulin spot was seen in late pronuclear stage and splits and form the poles for the first mitotic spindle. During parthenogenesis, disarranged microtubules were observed, and anastral, barral-shaped bipolar mitotic spindle was seen in first mitotic metaphase. γ -tubulin spots were not observed in parthenotes until 8-cell stage. Immediately after nuclear transfer, a microtubule aster containing a γ -tubulin spot was seen near the transferred nucleus. The γ -tubulin spot was split into two and forms the poles for the mitotic spindle.

Conclusions: These results suggest introduction of somatic cell centrosome during nuclear transfer, which is different manner with those during fertilization and parthenogenesis in cattle.

B-7 무정자증 사람 정소에서의 Transforming Growth Factor- β s와 수용체 mRNA 발현

¹포천중문의과대학교 차병원 여성의학연구소,

²고려대학교 자연자원대학 응용동물과학과

김현규^{1,2} · 엄기봉¹ · 김현주¹ · 서동삼² · 이동률¹ · 고정재¹ · 차광열¹ · 고 용²

Transforming growth factor- β (TGF- β) family exert inhibitory actions on testicular cell proliferation and differentiation. This study was carried out to screen the mRNA expression of TGF- β s and their cognate receptors in the 17 human testis samples with obstructive azoospermia (OA, n=7) or non-obstructive azoospermia (NOA, n=10) using the reverse transcription polymerase chain reaction approach. We observed a higher expression of TGF- β mRNA in the testes in the NOA group than in the OA group. In the NOA group, in all cases of hypospermatogenesis (n=4) and Sertoli cell only syndrome (n=6), TGF- β 1 mRNA was expressed. In the OA group, TGF- β 1 mRNA was not detectable in 42.9% (3/7) of the cases. In both the OA and NOA groups, TGF- β 2 mRNA expression was very rare. Only 29.4% (5/17, two cases in the OA group and three cases in the NOA group) of the cases showed a weak TGF- β 2 mRNA expression. TGF- β 3 mRNA was not expressed in 42.9% (3/7) of the cases in the OA group, but all cases in the NOA group expressed it. However, the intensity of the mRNA expression was weaker than that of TGF- β 1 mRNA. In the study of receptor mRNA, 82.4% (n=14) expressed TGF- β RI mRNA. However, we could not find a TGF- β RII mRNA expression when the positive control showed a mRNA expression. In conclusion, TGF- β 1 may be more prevalent in human spermatogenesis than TGF- β 2 and - β 3 at least in the cases of azoospermia.