

보고, 배반포에서 배발달과 착상에 관련 유전자로 알려진 IGF-1, IGF-II 그리고 LIF의 발현양상을 조사하고자 수행하였다. 그리고 이러한 결과를 임상에 적용하여 임신율에 대한 향상 효과를 살펴보았다.

**대상 및 방법:** 기본배양액으로는 P-1 배양액을 이용하였으며, 2-세포기 수정란은 6~8주령의 ICR 계통의 생쥐로부터 hCG 주사 후 46~48시간째 회수하였으며, 회수된 수정란은 0, 1, 5 그리고 10 ng/ml 농도의 GM-CSF가 첨가된 배양액 소직에서 배양을 실시하였다. 배반포의 세포수를 측정하기 위하여 hCG 주사 112시간째에 고정시킨 후 Hoechst 33342로 염색하여 형광현미경하에서 관찰하였다. 배발달 관련 유전자인 IGF-1, IGF-II 그리고 착상 관련 유전자인 LIF의 발현양상을 배반포에서 확인하기 위해서 RT-PCR을 이용하였으며, band intensity는 densitometry를 이용하여 발현정도를 비교 분석하였다. 인간 시험관아기 프로그램에 있어서는, 과배란유도에 의하여 난자를 채취하였으며, 정상적인 체외수정과 ICSI에 의하여 수정을 유도한 후, 난자채취 3일째 자궁강 내에 이식을 실시하였다.

**결 과:** 배양액내에 GM-CSF의 첨가에 따른 배반포의 발달율과 부화율은 1 ng/ml (68.6, 36.4%), 5 ng/ml (73.0, 43.2%) 그리고 10 ng/ml (76.1, 53.0%) 첨가군이 대조군 (65.5, 35.2%)에 비하여 농도의존적으로 높은 경향을 나타냈으며, 특히, 10 ng/ml 첨가군에서 가장 높은 발달율과 부화율을 나타냈다. 이러한 결과를 기초로 이후부터는 10 ng/ml GM-CSF 첨가군과 대조군을 비교 실험하였다. 먼저 hCG 주사 112시간째 배반포의 세포수는 GM-CSF 첨가군 ( $52.0 \pm 9.4$ )과 대조군 ( $49.8 \pm 11.1$ )간에 차이가 없는 것으로 나타났다. 그렇지만, hCG 주사 168시간째 완전히 부화된 배반포의 비율은 GM-CSF 첨가군 (75.7%) 이 대조군 (23.5%)에 비하여 유의하게 높은 것으로 조사되었다. 배반포에서 유전자의 발현정도를 비교한 결과는 배발달에 중요한 역할을 하는 IGF-1, IGF-II 유전자의 발현은 두 군간에 차이를 나타내지 않았지만, 착상과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 LIF 유전자의 발현은 GM-CSF 첨가군이 대조군보다 유의하게 높은 발현양상을 보여주었다. 한편, GM-CSF를 임상에 적용한 결과, 임상적 임신율이 47.4% (45/95)로서 대조군의 33.3% (32/96) 보다 유의하게 향상되는 것으로 나타났다.

**결 론:** 배양액내에 GM-CSF의 첨가는 생쥐 수정란의 발달을 증가시키고, 특히 부화율을 증가시키며, 또한 착상 관련 유전자 LIF의 발현을 유의하게 증가시킴으로서 체외배양된 수정란의 발생능력을 향상시키는 것으로 사료된다. 또한 GM-CSF의 임상적 이용은 인간 수정란의 발생능력을 향상시킴으로서 보다 높은 임신율 얻기 위한 배양액 첨가제로서 유용하게 이용될 수 있으리라 사료된다.

## B-13 Chromatin and Microtubule Organization in Maturing and Preactivated Oocytes Following Sperm Injection

Kim BK, Lee YJ, Cui XS and Kim NH

*Department of Animal Science, Chungbuk National University, Cheong Ju, Chungbuk, Korea*

**Objective:** Chromatin and microtubule organization were determined in porcine maturing and activated oocyte following intracytoplasmic sperm injection in order to obtain insights into the nature of decondensation ability of sperm nucleus and nucleation activity of microtubules in mammalian oocytes.

**Method:** An porcine oocyte was penetrated by the injecting micropipette, a small amount of cytoplasm was drawn into the micropipette, and then the cytoplasm together with the sperm and a small amount of medium was expelled into the oocyte. Microtubule localization was confirmed using a mouse monoclonal antibody to  $\alpha$ -tubulin and detected using a fluorescent labeled goat anti-mouse secondary antibody. DNA

## B-11 Vitrification of Mouse Blastocyst Using Cryoloop

Youn HW<sup>1</sup>, Kim SK<sup>1</sup>, Song SJ<sup>1</sup>, Park YS<sup>1</sup>, Koong MK<sup>2</sup> and Kang IS<sup>2</sup>

Laboratory of Reproductive Biology & Infertility<sup>1</sup>, Department of OB/GYN<sup>2</sup>,  
Samsung Cheil Hospital and Women's Healthcare Center,  
Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

**Objective:** The aim of this study is to compare the efficiency of a method for the cryopreservation of mouse blastocyst.

**Methods:** 2-cell stage of mouse embryos were obtained and cultured to blastocyst stage in T6 medium supplemented with 10% fetal bovine serum. Morphologically normal blastocysts were collected and randomly divided to one control and three experimental groups. In control, blastocysts were cultured *in vitro* continuously for an additional two days. In experiment 1, blastocysts were exposed to vitrification solution (ethylene glycol) only without cryopreservation (exposure only group). In experiment 2 and experiment 3, blastocysts were cryopreserved by slow-freezing procedure with glycerol (slow-freezing group) or by vitrification procedure using cryoloop (cryoloop group), respectively. Frozen blastocysts were thawed and cultured for additional two days. Twenty four hours after thawing, some blastocysts were fixed and stained with Hoechst 33342 (bisbenzimidazole) and the number of nuclei in each blastocysts were counted to confirm the survival of blastocysts in experimental groups.

**Results:** Survival rate and hatching rate of the blastocysts in slow-freezing group (24h: 72.4% and 66.0%, 48h: 63.2% and 64.6%) was significantly lower ( $\chi^2$ -test  $p < 0.05$ ) than those of control group (24h: 93.4% and 86.0%, 48h: 88.5% and 90.7%). However, the survival rate and hatching rate of the blastocysts in cryoloop group (24h: 84.1% and 84.1%, 48h 79.3% and 87.7%) was well compared with those in the control group. The mean ( $\pm$ SD) cell number of blastocyst in the exposure only group ( $89.2 \pm 11.5$ ) and cryoloop ( $89.0 \pm 11.0$ ) groups, except slow-freezing group ( $79.0 \pm 10.0$ ), were not significantly different from that of control group ( $93.1 \pm 13.9$ ) 24h after thawing (Student's t-test).

**Conclusion:** This study demonstrates that higher survival rate of vitrified-thawed mouse blastocyst can be obtained using cryoloop as the embryo container at freezing rather than slow-freezing procedure. The results of this study suggest that vitrification using cryoloop (with ethylene glycol) may be a preferable procedure for mouse blastocyst cryopreservation and could be applied to the human blastocyst cryopreservation.

## B-12 배양액내 GM-CSF의 첨가가 생쥐 및 인간 수정란의 배발생에 미치는 영향

을지병원 의과학연구소<sup>1</sup>, 을지의대 산부인과<sup>2</sup>, 생리학교실<sup>3</sup>

김동훈<sup>1</sup> · 고덕성<sup>1</sup> · 김묘경<sup>1</sup> · 이회창<sup>1</sup> · 박원일<sup>2</sup> · 권혁찬<sup>2</sup> · 이호준<sup>1,3</sup>

**목 적:** 본 연구는 cytokine의 일종인 GM-CSF를 배양액에 첨가하여 생쥐 수정란의 배발달을 살펴