

수정란에 비하여 발달 속도가 느리다고 보고되고 있으며, 이러한 양상은 IVF 접합자에 의해 생산되는 여러 성장인자의 발현이 낮음에 기인한다는 가능성이 제시되고 있다. 최근, 수정란의 발달에 영향을 미치는 IGF-I, -II, EGF와 같은 성장인자를 배양액에 첨가하여 apoptosis 발현양상이 조절되었다는 보고가 제시되고 있으나, 수정환경에 따른 apoptosis와 성장인자 사이의 상관관계에 대한 연구는 미흡하다. 따라서, 본 연구는 체외와 체내에서 수정된 수정란의 발달율과 apoptosis의 생리학적 연관성을 살펴보고, apoptosis 억제인자로 알려진 IGF-II 유전자의 발현이 apoptosis에 미치는 영향을 조사하고자 실시되었다.

**Method:** 5주령의 B6CBA F1 생쥐에 PMSG 7.5 IU를 주사하고, 48시간 후에 hCG 7.5 IU를 주사하여 과배란을 유도하였다. 체내수정을 유도하기 위하여 동종의 생쥐와 교배하여 2-세포기의 수정란을 회수하였으며, 체외수정을 유도하기 위하여 hCG 주사 후 14시간 후에 IVF를 실시하여 2-세포기의 수정란을 회수하였다. 회수된 두 그룹의 2-세포기 수정란은 0.4% BSA가 첨가된 MTF에서 배반포까지 배양하여, 배반포 발달율과 부화율을 조사하였다. 두 그룹간 세포수의 차이는 배반포를 PI로 염색하여 비교하였으며, TUNEL 방법을 사용하여 형광현미경하에서 apoptosis 정도를 확인하였고, RT-PCR 방법을 사용하여 IGF-II의 발현을 조사하였다.

**Results:** 두 그룹간에 배반포 발달율을 비교한 결과, 체내수정 그룹에서는 98% (482/492), 체외수정 그룹에서는 92% (355/384)의 발달율을 나타내어 두 그룹간에 차이가 없었다. 그러나 부화율은 체내수정 그룹에서 64% (318/492)를 나타내어, 47% (180/384)의 부화율을 나타낸 체외수정 그룹에 비하여 높은 경향을 보였다. 배반포의 세포수에 있어서도 체내수정 그룹 ( $72.1 \pm 5.5$ )이 체외수정 그룹 ( $66.6 \pm 5.1$ )에 비하여 높은 것으로 조사되었다. 또한 배반포의 총 세포수 대비 apoptosis를 나타낸 세포수를 비교한 결과, 체내수정 그룹의 경우 3.6%가 apoptosis를 나타낸 반면 체외수정 그룹에서는 6.9%가 apoptosis를 나타내었다. 배반포 시기에서 apoptosis 억제역할을 가진 IGF-II 유전자는 체내수정 그룹에서 높은 발현 양상을 보였다.

**Conclusions:** 체내수정은 체외수정에 비하여 부화율과 IGF-II 유전자의 발현양상이 증가된 반면, apoptosis 발현은 적게 나타났으며, 이러한 결과는 체내에서 수정되었을 경우 생성되는 IGF-II의 발현이 apoptosis의 억제에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 이 연구는 수정환경의 차이에 의하여 여러가지 생리학적 차이가 존재할 수 있다는 가능성을 제시하고 있으며, 향후 수정란의 apoptosis에 영향을 미치는 다른 성장인자의 발현에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 0-3 Effects of GnRH Agonist and GnRH Antagonist on the Steroidogenesis and Apoptosis of Cultured Rat Granulosa Cells

BJ Jung, MS Kim, JS Kim, HJ Song

*Seoul Wome's Hospital*

**Background & Objectives:** The purpose of this study was to evaluate the effects of GnRH agonist and GnRH antagonist on the Steroidogenesis and Apoptosis of Cultured Rat Granulosa Cells.

**Method:** Granulosa cells were collected from immature rats, and cultured for 24 hours with GnRH

agonist or GnRH antagonist. Production of estradiol and progesterone during culture was determined by EIA. Apoptosis of cultured granulosa cells was examined by DNA laddering.

**Results:** While estradiol production was significantly decreased in only 100 ng/ml of GnRH agonist treatment group compared to control group, progesterone production was significantly decreased in both 10 ng/ml and 100 ng/ml of GnRH agonist groups. However, there was no significant difference in estradiol and progesterone production between the GnRH antagonist groups and control group. Apoptotic DNA laddering was increased by GnRH agonist, but not by GnRH antagonist.

**Conclusions:** The results may indicate that the steroidogenesis is more impaired in GnRH agonist treatment than that in GnRH antagonist treatment. GnRH agonist may more induce apoptosis than GnRH antagonist in rat granulosa cells.

## O-4            Effects of Activation Timing on the Fertilization and in-vitro Development of Porcine Round Spermatid Injected (ROSI) Embryos

JY Choi<sup>1</sup>, EY Lee<sup>1</sup>, HT Cheong<sup>2</sup>, BK Yoon, DS Bae, DS Choi

*Department of OB&GY, IVF Clinic<sup>1</sup>, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University  
School of Medicine; Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University<sup>2</sup>*

**Background & Objectives:** During fertilization, the nuclear envelop breakdown (NEBD) of the male gamete within the oocyte cytoplasm is prerequisite for the decondensation of the male gamete nucleus and subsequently for male pronuclear (PN) formation. In ROSI procedure, but, the cytoplasm of round spermatid impairs or delays the exposure of the round spermatid nuclear membrane to the oocyte cytoplasmic factors that induce NEBD. In addition, the capability of mammalian oocyte to induce NEBD of male gamete disappears within a few hours after oocyte activation. So, prolonged exposure of a round spermatid to a non-activated oocyte till NEBD and oocyte activation at this time of NEBD may be more efficient for successful fertilization and early development of ROSI embryos. On the other hand, if round spermatid nuclei were left in non-activated oocyte for an extended period of time, normal fertilization might be failed due to premature chromosome condensation (PCC) of spermatid chromosomes. Therefore, this study was undertaken to evaluate the optimal exposure time for peak NEBD rate after injection and to investigate the effect of oocyte activation timing on the PN formation and in-vitro development of porcine.

**Method:** ROSI embryos. The round spermatids were injected into matured oocytes at 40~44 h of in-vitro maturation. Injected eggs were fixed at 0.5, 1, 2, 3, 4 h before activation, and NEBD state was examined. The three groups of oocytes were activated before and after injection of spermatid using single direct current pulse (100V/mm, 50 µsec): group 1) at 2 h before injection (pre-AC), group 2) within 0.5 h after injection (immediate-AC), group 3) at 2 hr after injection (post-AC). Activated eggs were cultured in NCSU-23 + 4 mg/ml BSA for 7~8 days for blastocyst development. And, during in-vitro culture, PN formation was evaluated at 15~18 h after injection.