

ificantly higher ($p<0.05$) in group I ($74.7\pm 32.2\%$) than in group II and III ($54.7\pm 28.3\%$ and $60.3\pm 38.1\%$). Blastulation rate was higher in group I ($59.5\pm 25.3\%$, $p<0.05$) and II ($58.6\pm 35.0\%$, NS) than in group III ($40.4\pm 36.5\%$). BG1 rate was higher in group I ($36.9\pm 32.2\%$) than in group II and III ($23.5\pm 38.9\%$ and $26.3\pm 22.7\%$) but statistically not significant. Clinical pregnancy rate (/cycle) was significantly higher ($p<0.05$) in group I and II ($40.7\pm 49.3\%$ and $41.7\pm 51.5\%$) than in group III ($12.5\pm 33.6\%$). No differences were found in the rates of multiple pregnancy and abortion among these three groups. Ongoing pregnancy rate (/cycle) was higher in group I ($34.5\pm 47.8\%$, $p<0.05$) and II ($33.3\pm 49.2\%$, NS) than in group III ($12.5\pm 33.6\%$). Embryonic implantation rate was higher in group I ($15.1\pm 20.2\%$, $p<0.05$) and II ($14.7\pm 20.6\%$, NS) than in group III ($5.1\pm 15.6\%$). However, embryonic implantation rate was increased in ET including blastocyst(s) among three groups.

Conclusions: Fertilized oocytes obtained from TESE-ICSI cycle were harder to be successfully cultured to blastocyst stage for 5~7 days than those from IVF and ICSI cycles. However, all blastocyst(s) ET increased the embryonic implantation rate equally in IVF, ICSI and TESE-ICSI cycles.

P-21 Ultrastructure of Human Embryonic Stem (hES) Cells and Spontaneous and Retinoic Acid Induced Differentiating hES Cells

Eun Young Kim, Sung Hye Park¹, Kil Saeng Chung², Won Don Lee³,
Sepill Park, Jin Ho Lim³

*Maria Infertility Hospital Medical Institute/Maria Biotech, ¹Seoul National University,
College of Medicine, ²Kon-Kuk University, ³Maria Infertility Hospital*

Background & Objectives: Ultrastructural and immunohistochemical studies of the four groups of cells, i.e., hES, embryoid bodies (EBs) and spontaneously and retinoic acid (RA) induced differentiating cells were carried out to investigate the detailed phenotype of these cells.

Method: Undifferentiated hES cells (NIH Code: MB01) and day 4 EBs were prepared. To initiate neuronal differentiation, EBs were further treated with $1\ \mu\text{M}$ RA for 4 days. And then RA treated EBs were dissociated and plated onto a 0.1% gelatin-coated dish in a neuron differentiation medium (N2) for 14 days. Also, to examine the spontaneous differentiation characteristics, RA treated EBs were further cultured in EB culture medium for 14 days as an EB state. For immunohistochemical study, cells were fixed with 4% paraformaldehyde, and paraffin-embedded tissues were cut to 2~3 μm thickness. The expression was detected using the peroxidase labeled streptavidin biotin complex technique and also hematoxylin counter staining was performed. For transmission electron microscopy of various cell type, the hES cells, EB cells and differentiating cell-colonies were fixed in 2.0% glutaraldehyde, embedded in epoxy resin and stained with uranyl acetate and lead citrate.

Results: Immunohistochemically, the EB cells showed strong immunoreactivity for CD34, CD117, nestin and CD56. Differentiating hES cells were composed of different kinds of cells expressing pancyto-

kertin, vimentin, Nestin, and NeuN in addition to CD34, and c-Kit. On TEM, the hES and EB cells were very similar to the germ cells. The spontaneously and RA induced differentiating hES cells showed epithelial, mesenchymal and neuronal phenotypes.

Conclusions: From this study, RA induced differentiating hES cells indicated pluripotential differentiation into the three germ layers in addition to neuronal differentiation. However, two weeks culture was not enough to full neuronal differentiation due to no synaptic junctions and synaptic vesicles developed.

P-22 동결-융해된 배아에서의 착상전 유전진단의 결과

김진영¹ · 임천규² · 전진현² · 이형송² · 민동미² · 궁미경¹ · 강인수¹

성균관대학교 의과대학 삼성제일병원 산부인과¹, 불임연구소²

Background & Objectives: 배아의 동결보존은 보조생식술에 있어서 널리 이용되고 있으며, 이는 또한 이식할 수 있는 정상적인 배아의 수가 제한적인 착상전 유전진단에서도 유용하다. 잉여배아를 동결하거나 저반응군에서 여러 주기에 걸쳐 배아를 동결하여 모은 후에 착상전 유전진단을 시행할 수 있다. 착상전 유전진단에서 배아의 할구 세포 생검 전후의 배아동결-융해의 결과에 대해서는 보고가 많지 않은데, 특히 할구 생검 후의 동결-융해는 그 결과가 양호하지 않은 것으로 알려져 있고, 생검 전 동결-융해의 경우에도 일반 착상전 유전진단에서보다 임신율이 낮다고 보고된 바 있다. 따라서 본 연구에서는 동결-융해된 배아로부터 생검된 할구세포에서 FISH나 PCR의 실효성과 동결-융해과정이 할구세포 생검 후의 배아발달에 영향을 주는지 알아보고, 착상전 유전진단의 결과를 알아보려고 하였다.

Method: 2000년 1월부터 2003년 12월까지 착상전 유전진단을 시행한 총 86예의 환자, 319주기를 대상으로 하였다. 환자군을 2군으로 나누어 동결-융해된 배아에서의 착상전 유전진단 군 (33예, 40주기, 평균나이 = 34.2 ± 4.7 세 (mean \pm SD))과 신선한 배아를 이용한 일반 착상전 유전진단 군 (patients = 53, cycles = 279, mean age = 31.8 ± 4.3 yrs.)에서의 결과를 비교하였다. 20주기에서는 잉여배아를 동결하였다가 융해한 후 착상전 유전진단을 시행한 경우였으며, 19주기에서는 과배란의 저반응군으로 몇 주기에 걸쳐 배아를 동결하여 모은 후에 함께 융해하여 착상전 유전진단을 시행한 경우였다. 환자들은 대부분 염색체 진좌나 염색체 이수성의 스크리닝을 위해 착상전 유전진단을 시행하였으며 몇몇 단일 유전자질환으로 인한 경우가 포함되었다. 배란유도는 GnRH agonist와 recombinant FSH를 이용한 황체기 중간 장기요법을 이용하였으며, 저반응군에서는 클로미펜과 gonadotropin 및 GnRH antagonist를 이용하여 시행하였다. 채취된 난자는 미세조작술을 이용하여 수정시켰고, 수정란의 동결은 2PN stage 또는 발달중인 배아단계에서 시행되었다. 동결-융해된 배아 이식에서는 생리주기 2일째부터 estradiol을 투여하고 2PN을 융해하기 1일전부터 progesterone 50 mg씩을 근주하였다. 융해 후 생존한 배아가 6~10세 포기로 발달된 후 1~2개의 할구세포를 채취하여 FISH나 PCR을 이용하여 착상전 유전진단을 시행하였다. 염색체나 유전자적으로 정상으로 진단된 배아는 동결-융해 주기에서는 2PN 융해 후 3일째, 일반주기에서는 난자채취 후 4일째 자궁에 이식되었다. 동결-융해된 배아의 생존율을 알아보고, FISH/PCR를 이용한 진단율, 할구세포 생검 후 배아의 발달 및 착상전 유전진단 후의 임신율 등을 두 군간에 비교하였다.