

P-15 Gene Expression of Heat-shock Protein (HSP 70.3) from Mouse Blastocysts Vitrified at Different Stages of Development In Vitro

Lee SE¹, Lee JH¹, Jung YJ¹, Lee JH¹, Choi KW¹, Lee YB², Lee SJ²

¹IVF Lab, ²MDplus LSI, Mirae and Heemang Infertility Clinic

Background & Objectives: In vitro development of mammalian embryo is affected from various environmental stresses exposed, such as pH, heat and osmolarity. Freezing and thawing processes of embryos include not only thermal shock but also rapid osmotic change. So the frozen-thawed embryos have lower development in vitro culture to retarded or ceased development. The purpose of this study was to measure the development into blastocysts of mouse embryos vitrified at different stages of development and their expression patterns of major stress-induced gene HSP 70.3 by RT-PCR.

Method: Two-cell embryos were collected from superovulated 6 week-old ICR mice at post hCG 46 hrs. The embryos of every experimental group were vitrified at different time of culture, 2-cell at 48 hr, 8-cell at 72 hr and blastocysts at 95~100 hr post hCG. After thawing, vitrified embryos were cultured upto expanded blastocysts additively. In vivo and in vitro control blastocysts were collected at post hCG 100~105 hr. RT-PCR confirmed by mouse specific β -action expression and HSP 70.3 expression was analyzed by RT-PCR and densitometry.

Results: Developments into blastocysts were 55.3%, 56.9% and 80.7% respectively from the vitrified embryos at 2-cell, 8-cell and blastocyst stages. In vitro development of blastocysts from 2 cell embryos without vitrification was 88.6%. The expression of HSP 70.3 was significantly high in blastocysts vitrified at 8 cell stage compared with in vivo and in vitro control and other experimental groups. All of other groups showed similar expression in amount.

Conclusions: HSP 70.3 is a heat shock protein, a major stress gene, playing an important role for the prevention of cellular damages from external stress. The fact that all stages of embryos except blastocysts vitrified at 8 cell stage showed the similar expressions of HSP70.3 compared with in vivo blastocysts might suggest that they are recovered from stress after the source of stress is removed. Such higher expression from blastocysts vitrified at 8 cell stage is supposed to due to an abnormal control at on set of zygotic gene expressions for development and differentiation.

P-16 생쥐 포배기 배아를 이용한 효과적인 완만동결법의 비교 연구

김지선 · 송상진 · 홍지영 · 김수경 · 최수진 · 천강우 · 변혜경

성균관대학교 의과대학 삼성제일병원 생식생물학 및 불임연구실

Background & Objectives: 생쥐 포배기 배아의 동결, 융해 후 생존률을 높이기 위하여 동결 시작한

도와 동결 속도를 달리한 두개의 완만동결방법을 비교하여 보다 효과적인 완만동결방법을 알아보고자 하였다.

Method: ICR 생쥐 암컷에 PMSG와 HCG를 48시간 간격으로 주사하여 과배란을 유도하여 2-세포기 배아를 채취하였다. 채취된 배아는 초기 포배기 단계까지 GIII sequential media (Vitrolife, Sweden AB, Sweden)에서 48시간 동안 체외배양하였다. 배양된 초기 포배기 배아를 두 군으로 나누어 Group-I은 기존의 완만동결방법으로 동결하였다 (20℃에서 동결 시작하여 -6℃까지 -2℃/분의 속도로 냉각하고 식빙 후 -35℃까지 -0.3℃/분 그리고 -140℃까지 -30℃/분의 속도로 냉각). Group-II는 -6℃에서 동결을 시작하여 2분 후에 식빙하고 -40℃까지 -0.5℃/분의 속도로 냉각하는 변형된 완만동결방법으로 동결하였다. 동결액으로는 두 군에서 모두 Blastocyst slow-freezing kit (Vitrolife, Sweden AB, Sweden)를 사용하였다. 두 군 모두에서 급속 용해 후 24시간 뒤에 두 군간의 부화율을 비교하였고, 용해 후 0시간과 24시간 경과 후에 differential staining을 실시하여 두 군간의 전체 세포수와 내세포괴 (inner cell mass, ICM)와 영양배엽 (trophectoderm, TE)의 비율 차이를 조사해 보았다.

Results: 용해 후 두 군간의 생존률은 차이가 나지 않았으나 24시간 뒤의 부화율은 Group-I에서 44.2%, Group-II에서 67.6%로 변형된 완만동결법에서 통계적으로 유의하게 높게 나타났다 (p=0.0224). 전체 세포수는 동결, 용해 과정을 거치지 않은 대조군이 0시간 때 33.8개, 24시간 때 100.7개이었던 반면 Group-I은 33.5개, 89.0개, Group-II는 28.6개, 88.1개로 동결 용해를 거친 포배기 배아에서 24시간 때의 전체 세포수가 대조군에 비해 적게 나타났다. ICM과 TE의 비율 차이는 대조군은 17.9%, Group-I은 16.9%, Group-II는 19.1%로 통계적 유의성은 없었으나 변형된 완만동결법으로 동결한 포배기 배아에서 ICM의 발달률이 기존의 완만동결법으로 동결한 포배기 배아보다 높게 나타났다.

Conclusions: 저온에서의 동결 시작 온도와 빠른 동결 속도를 사용한 변형된 완만동결법에서 생쥐 포배기 배아의 부화율이 더 높게 나타났다. 그리고 통계적 유의성은 없었으나 두 완만동결법 간의 ICM과 TE의 비율 차이가 변형된 완만동결법에서 더 높게 관찰되었다. 따라서 변형된 완만동결법이 기존의 완만동결법보다 생쥐의 초기 포배기 배아의 동결에 더 효과적임을 알 수 있었다.

P-17 마우스 성숙난자의 유리화 동결 중 Cytoskeleton Stabilizer, Taxol의 처리 후 배발달률과 산자의 생산

박성은^{1,3} · 이숙환^{2,3} · 정혜진^{1,3} · 조정현² · 권 황²
김수희² · 윤태기^{2,3} · 차광열²

¹CHA Research Institute 보건복지부지정 생식의학 및 불임유전체 연구센터,
²포천중문의과대학교 산부인과, ³보건복지부지정 생식의학 및 불임유전체 연구센터

Background & Objectives: 유리화 동결법은 동결 중 ice crystal의 형성이 이루어지지 않으므로 난자의 세포질의 손상을 줄일 수 있는 장점이 있는 것으로 보고되었다. 그러나 여러 연구자들은 성숙난자의 유리화 동결 보존시 염색체와 방추사의 이상성이 증가됨을 보고하였다. 이에 유리화 동결 중 세포골격계를 안정화 시킬 수 있다면 동결 중 성숙난자의 방추사를 보호하여 동결 용해 후의 난자의 생존률과 배발달률을 증진시킬 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 난자의 유리화 동결 시 세포골격계의 stabilizer인 Taxol™을 항동해제에 첨가하여 동결 용해 후 생존률과 배발달률을 증진