

Results: Cytokeratin과 vimentin을 이용한 면역조직화학염색 결과 95% 이상에서 양성반응을 나타내어 상피세포와 기질세포가 성공적으로 분리되었음을 확인하였다. 분리된 상피세포와 기질세포를 각각 단일배양하거나 공배양한 후 progesterone과 estrogen을 처리하여 TGF- β 1과 수용체-1,-2, integrin- β 3, prolactin mRNA 발현을 조사한 결과 단독배양에서는 모든 mRNA가 발현되지 않았다. 공배양에서는 progesterone 우세환경일 경우 TGF-수용체 2를 제외한 모든 mRNA가 발현하였으며, estrogen 우세환경에서는 TGF-수용체2와 prolactin이 발현되지 않아 TGF- β 1의 활성화에 필요한 paracrine factor의 필요성을 알 수 있었다. 기질세포 단일 배양에서 각각 progesterone과 estrogen 우세환경을 만든 후 TGF- β 1을 첨가하여 수용체의 발현을 조사한 결과, 두 환경에서 수용체-1과 -2의 mRNA가 발현하는 것이 관찰되어 상피세포와 기질세포를 공배양하여 progesterone 우세환경에서 TGF- β 1을 첨가할 경우 탈락막화가 이루어짐을 알 수 있었다. 상피세포와 기질세포의 공배양에 progesterone 우세환경 혹은 estrogen 우세환경을 만든 후 48시간 동안 배양하여 배양액내의 HGF농도 (mean \pm SD)를 측정된 결과, 호르몬 무첨가 (157 \pm 32)보다 progesterone (2107 \pm 486)과 estrogen (4126 \pm 407) 우세환경에서 높은 HGF 농도가 나타나 자궁내막증식 촉진인자인 HGF 발현에 성호르몬이 관여함을 알 수 있었다. 생쥐 2세포기 배아를 배양액 단독, 비탈락막화, 탈락막화 유도 자궁내막세포와 공배양한 결과 배발달율에서는 차이가 없었으나, 부화율은 탈락막화된 세포와의 공배양 (92%)이 배양액단독 (58%)과 비탈락막화 세포와의 공배양 (62%)보다 높은 부화율을 나타내었다 ($p < 0.05$). 부착율은 탈락막화 (82%)와 비탈락막화 (78%)사이에 차이를 나타내지 않았지만, 비탈락막화 세포와의 공배양에서 영양막세포가 투명대를 완전히 빠져나오지 않은 상태로 부착한 비정상형태를 관찰할 수 있었다. 배양액단독, 비탈락막화 혹은 탈락막화 자궁내막세포와의 공배양에서 부화된 생쥐포배의 세포수 (mean \pm SD)의 관찰에서 ICM수는 각각 13.83 \pm 0.51, 17.93 \pm 0.4, 17.9 \pm 0.52개로 탈락막화에 관계없이 공배양한 포배의 ICM수가 많았으며 ($p < 0.001$), 영양배엽세포수는 각각 49.23 \pm 0.77, 57.56 \pm 0.67, 72.63 \pm 0.86개로 탈락막화 세포와 공배양된 포배의 영양배엽수가 많은 것으로 나타났다 ($p < 0.001$).

Conclusion: 자궁내막조직에서 상피세포와 기질세포를 분리한 후 다시 공배양하여 progesterone 우세환경에서 TGF- β 1 (10 nM/ml)을 첨가하여 체외에서 인위적으로 탈락막화를 유도할 수 있었으며, 탈락막화를 유도한 자궁내막세포와 생쥐 2세포기를 공배양하였을 때 부화율, 내세포피와 영양막세포수를 가진 양질의 배아생성에 유효한 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

P-22 Ongoing Pregnancy after Vitrification of Human Oocytes

Nae Young Youn, Joon Gyo Lim, Gwang Su Ghil, Kyu Young Lee, Choong Ku Kang

Sanborn Jeil Hospital

Objectives: We report the ongoing pregnancy after vitrification of oocytes which was retrieved from infertile couple failed obtain sperm on day of IVF.

Methods: Oocytes retrieved from a polycystic ovary syndrome patient undergoing ovarian stimulation using GnRH antagonists. Those oocytes were exposed to DPBS supplemented with 1.5 M of ethylene glycol for 5 minutes and DPBS supplemented with 5.5 M of ethylene glycol and 1 M of sucrose for 20 seconds in consecutive order. Oocytes mounted on EM grids were plunged into liquid nitrogen. For thawing of the vitrified oocytes, EM grids were transferred sequentially to DPBS + 10% SSS supplemented with 1 M, 0.5 M, 0.25 M, and 0.125 M of sucrose at intervals of 5 minutes.

Results: A total of 41 oocytes retrieved from patient were vitrified. For fertilization using intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) technique, sixteen oocytes was thawed. Fourteen oocytes morphologically survived after thawing and

eleven normal zygotes were obtained after ICSI. After culture at 3 days, five embryos of 6 to 8 stage were transferred to original oocyte donors. We've found to 2 gestation-sac at 16 days and 3 gestation-sac at 22 days after embryo transfer with transvaginal ultrasonography. The triplet pregnancy were ongoing.

Conclusion: This case showed that vitrified oocytes were successful ongoing pregnancy. Therefore, these techniques would be useful for patients of male factor infertility especially, failed obtain sperm on day of IVF.

P-23 동결-융해한 포배기 배아 이식에 있어서 동결시기에 따른 영향

한경옥 · 김현정 · 방효정 · 김충현 · 이중엽 · 권재희 · 김건우 · 양순하 · 황도영 · 김기철

함춘 여성 클리닉, 함춘 불임·유전 연구소

Objectives: 배아의 배양 환경과 동결기술이 발전함에 따라 포배기의 배아를 동결-융해하여 이식하는 경우가 크게 증가하였다. 2001년 Shapiro 등의 연구에 의하면 신선 주기의 경우 Day5에 발달된 포배기 배아 이식 주기에서 Day6에 발달된 포배기 배아 이식 주기보다 두 배 가까이 높은 착상율과 임신율을 보인다고 보고한 바 있다. 이러한 차이는 포배기 배아의 발달상태와 함께 이식시기에 따른 자궁내막의 착상환경의 변화와도 관련이 있어 보인다. 그래서 포배기 배아를 동결-융해하여 이식할 경우 이식 시기는 Day5로 동일하므로 착상환경의 변화를 배제한 포배기까지의 배아 발달 속도가 임신율에 미치는 영향을 볼 수 있을 것으로 사료된다. 본 연구는 Day5에 동결한 포배기 배아를 융해-이식한 주기와 Day6에 동결한 포배기 배아를 융해-이식한 주기의 결과를 비교해 보고자 한다.

Methods: 2006년 1월부터 12월까지 함춘 여성 클리닉에서 시험관아기 시술을 받은 환자 중 Day5 또는 Day6에 잉여의 포배기 배아를 동결하여 2007년 6월까지 융해-이식한 환자 87명, 93주기를 대상으로 하였고, Day5 포배기 배아와 Day6 포배기 배아를 같이 이식한 경우는 제외하였다. 포배기 배아의 동결은 Ethylene Glycol과 DMSO를 이용한 유리화 동결법을 사용하였고 팽창된 포배기 배아의 경우 artificial shrinkage를 시행하였다. 포배기 배아의 융해는 이식 하루 전에 실시하여 15~18시간 정도 Quinn's blastocyst media에서 배양한 후 이식 직전에 생존 여부를 평가하였다. 융해한 포배기 배아는 50% 이상의 세포가 살아 있고 재 팽창된 경우에만 생존한 것으로 판단하였다. 결과는 Chi-square test와 Student t-test로 통계 처리하였다.

Results: Day5 포배기 배아의 동결-융해 이식 주기는 52주기, Day6 포배기 배아의 동결-융해 이식 주기는 41주기였다. 이 두 그룹을 비교해 본 결과 환자 나이, 배아 이식 수 등과 같이 임신율에 영향을 미칠 만한 요인들은 유의한 차이가 없었고 배아생존율 (Day5: $80.8 \pm 29.4\%$, Day6: $65.2 \pm 35.8\%$)에서도 유의한 차이가 없었지만 임신율은 Day5 그룹이 38.5%, Day6 그룹이 12.2%로 유의한 차이를 보였다 ($p < 0.05$).

Conclusion: 신선 주기에서와 마찬가지로 동결-융해 이식 주기에서도 동결 전 포배기 배아의 발달 속도가 임신성공 예측에 중요한 지표로 사용될 수 있다. 아울러 신선 주기에서의 Day5와 Day6 포배기 배아의 임신율의 차이는 자궁내막의 착상환경의 변화보다는 배아의 발달상태에 의해 나타난다고 추정된다.