

정자미세주입술에 의하여 동결 용해 부고환 정자와 수정시킨 활성화처리 난자의 체외발생율에 관한 연구

김 상 근[†] · 이 동 수
충남대학교 수의과대학

Studies on *In Vitro* Developmental Rate of Activated Bovine Oocytes by Intracytoplasmic Sperm Injection with Frozen-Thawed Epididymal Spermatozoa

S. K. Kim[†] and D. S. Lee

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University

SUMMARY

The objective of this study is to determine the developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes after intracytoplasmic sperm injection(ICSI) with frozen-thawed epididymal spermatozoa. The ovaries were obtained from slaughtered Korean native cows. Oocytes matured *in vitro* for 24 hrs were fertilized by ICSI with frozen-thawed epididymal spermatozoa. After ICSI, a group of oocytes was activated with 7% ethanol for 5 min, and the other group was not activated. The oocytes were cultured in TCM-199 medium containing hormones and 10% FCS for 24~30 hrs in a incubator with 5% CO₂ in air at 38.5°C. The percentage of oocytes reaching M II after 24 hrs and 30 hrs of incubation were significantly higher(p<0.05) after culture with TCM-199 media(80.0% and 88.3%) than M I(8.3% and 6.7%). The rate of cleaved embryos to blastocyst obtained by ICSI treated activation oocytes was significantly higher(p<0.05) than that of nonactivation oocytes(22/46, 47.8% vs 10/39, 25.6%).

The rates of embryos development to blastocyst obtained by ICSI treated sperm of fresh, epididymal and frozen-thawed epididymal were 24/45(53.3%), 15/40(37.5%), 11/43(25.6%), respectively. and these values of fresh sperm injection were higher than frozen-thawed epididymal sperm. We also concluded that embryos can be produced with ICSI of *in vitro* matured oocytes by ICSI using frozen-thawed epididymal semen.

(Key words : IVM, ICSI, activation, frozen-thawed epididymal sperm)

서 론

세포질내 정자 주입(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)에 관한 연구는 불임증 해결을 위해 인간을 대상으로 주로 연구되어 왔다(Bar Hava 등,

1977; Barros 등, 1997; Gordon 등, 1997; Holden 등, 1977; Hoover 등, 1997; Jimenez 등, 1997; Novero 등, 1997; Turcker 등, 1996). Bogliolo 등 (2001)은 고양이 난자를 이용하여 활성화처리 후 24, 40시간 배양하였을 때 MII로의 체외성숙율은 각각 64.4~82.8%로서 비활성화 처리군에 비해 높

[†]Correspondence : kskkim@hanbat.cnu.ac.kr

은 체외성숙을 나타냈다고 보고하였으며, Catt와 Rhodes(1995)는 양, 소 돼지 난자에 정자 주입전, 후 외인적 활성화 없이 수정시켰을 때 돼지는 배 발생 및 수정시에 온도에 민감하고, 양은 정자 존재 여부에 관계없이 주입후 활성화되는 경향이 있다고 보고하였다. Martin(2000)은 돼지 난자를 대상으로 ICSI법으로 수정후 48시간에 69%가 생존하였고, 38%가 배반포로 발생하였으며, 1두의 수란돈에 이식하여 3마리의 산자가 출산하였다고 하였다. 불임 또는 자연수정 불능의 개체에서 부고환 정자를 이용한 ICSI는 불임의 해결과 많은 수정란의 확보 방안으로 생각된다. 그러나, 소에 있어서 부고환 정자를 이용한 ICSI시 체외발생에 대한 보고는 접할 수 없었다.

본 연구는 소의 ICSI시 동결 용해한 부고환 정자의 이용 가능성을 구명하고자 활성화 처리한 난자에 동결 용해한 부고환 정자로 ICSI를 하였을 때 체외발생율을 조사하기 위하여 수행하였다.

재료 및 방법

1. 난포란의 회수와 체외성숙

도살 한우의 난소 난포로부터 난포란을 회수하여 10%(v/v)의 2IU/ml의 hCG (Sigma, U.S.A.), 1 μ g/ml의 β -estradiol(Sigma, U.S.A.), 100IU/ml의 penicillin G 및 100 μ g/ml의 streptomycin sulfate가 첨가된 TCM-199(Whittaker, U.S.A.)으로 배양하였다. 난포란의 체외성숙은 배양액 50 μ l의 소적을 mineral oil(Squibb, U.S.A.)로 피복된 소적내에 5개의 난포란을 주입하여 CO₂ 배양기내(5% CO₂, 95% air, 38.5°C)에서 24~30시간 성숙배양하였다.

2. 난자의 활성화 처리

0.2% hyaluronidase(Sigma, U.S.A.)가 첨가된 PBS 배지에서 난구세포를 제거한 후, 2.0 mM 6-methylaminopurine(Sigma, U.S.A.)과 7% ethanol에서 각각 5분간 활성화 처리후 시험에 이용하였다.

3. 정자의 전처리

액은 신선정액, 부고환 정액을 채취하여 BO액

2 ml에 희석하여 배양기에서 배양하면서 swim-up 된 정자와 부고환 미부로부터 채취한 정액을 Kim (2001)의 방법으로 동결 용해 후 시험에 이용하였다.

4. ICSI

세포질내 정자주입은 micromanipulator(Narishige Co., Japan)가 부착되어 있는 도립현미경 stage위 petri dish내에 사용 전날 전배양한 polyvinylpyrrolidone(Sigma, U.S.A.)액 소적중에 정자를 넣어 운동성을 저하시킨 다음 micropipette에 정자를 장진시켜 보정용 pipette으로 흡인 고정된 체외성숙 난자내에 현미조작에 의해 주입하였다.

5. 체외성숙 및 체외발생율의 판정

난자를 0.2%의 hyaluronidase(Sigma, U.S.A.)를 2분간 처리에 의하여 난구세포를 제거하고 나화된 난자는 acetic acid : ethanol(1 : 3)액에 24시간 고정하고 1% aceto-orcein 또는 10 μ g/ml bisbenzimidazole(Hoechst 33342, Sigma, U.S.A.) 염색액으로 염색한 다음 세포 및 핵 분열상을 관찰하여 난자의 체외성숙율을 판정하였다. ICSI후 초기배를 배양액으로 3회 세척후 10% FCS + TCM-199 배양액으로 배양하면서 현미경하에서 응성전핵의 형성과 배의 발생상태를 관찰하거나, fluorescence diacetate(FDA) test에 체외발생율과 생존율을 판정하였다(Schilling, 1982).

6. 통계학적 분석

반복실험을 통하여 얻어진 결과는 분산분석에 의해 평균치를 구하였으며, 처리간의 차이를 평가하기 위하여 Duncan의 다중검증을 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 배양시간에 따른 체외성숙율

난자회수 후 24 시간 배양하였을 때 배양시간에 따른 GV, MI, MII로의 체외성숙율은 각각 7/60 (11.7%), 5/60(8.3%), 48/60(80.0%)였고, 30시간 배양하였을 때 GV, MI, MII로의 체외성숙율은 각각 3/60(5.0%), 4/60(6.7%), 53/60(88.3%)였다. 한편,

Table 1. Meiotic progression of bovine oocytes after 24, 48 hours of *in vitro* maturation in culture media.

Time of culture	Oocytes	GV(%)	M I(%)	M II(%)	Degenerated(%)
24 h	60	7 (11.7)	5 (8.3) ^b	48 (80.0)	2 (3.3)
30 h	60	3 (5.0)	4 (6.7) ^b	53 (88.3)	1 (1.7)

Table 2. Cleavage rate of activated or nonactivated oocytes obtained by ICSI treated with frozen-thawed epididymal spermatozoa

Treatment of oocytes	Oocytes of examined(%)	Embryos of cleaved(%)	Stage of development(%)			
			2~8 cell(%)	8~16 cell(%)	Morula(%)	Blastocyst(%)
ICSI(A)	50	46 (92.0)	4 (8.7)	8 (17.4)	12 (26.1)	22 (47.8) ^a
ICSI(NA)	50	39 (78.0)	15 (38.5)	9 (23.1)	5 (12.8)	10 (25.6) ^b

* Values with different superscripts within column were significantly different(p<0.05).

** A : activated, NA : nonactivated.

퇴화된 난자는 2/60(3.3%)와 1/60(1.7%)였다. 이러한 결과는 대상동물은 다르지만 고양이 난자를 이용하여 24, 40시간 배양하였을 때 MII로의 체외성숙율은 각각 64.4~82.8%였다고 한 Bogliolo 등(2001)의 보고에 비하여 약간 높은 수치였다.

2. ICSI시 난자의 활성화처리에 따른 체외발생을 활성화처리를 한 난자에 동결 용해한 정자로 ICSI를 하였을 때 상실배와 배반포로의 체외발생율은 각각 12/46(26.1%), 22/46(47.8%)였고 활성화처리를 하지 않은 난자군의 체외발생율은 각각 5/39(12.8%), 10/39(25.6%)로서 활성화 처리 난자군이 비활성화 처리 난자군에 비해 높은 체외발생율을 나타냈다. 이러한 결과는 고양이 난자를 활성화 처리하여 ICSI후 배양하였을 배반포로의 체외

발생율은 6.6%였다고 한 Bogliolo 등(2001)의 보고에 비하여 높은 수치였다. 한편, Catt와 Rhodes(1995)는 양, 소, 돼지 난자에 정자 주입 전, 후에 외인적으로 활성화시키지 않은채 수정시켰을 때 돼지는 배 발생 및 수정시에 온도에 민감하고, 양은 정자 존재 여부에 관계없이 주입후 활성화되는 경향이 있다고 하였다.

3. 동결 용해한 부고환 정자로 ICSI시 체외발생을 활성화 난자에 신선정자, 부고환 정자, 동결 용해한 부고환 정자로 ICSI후 배양하였을 때 배반포로의 체외발생율은 각각 24/45(53.3%), 15/40(37.5%), 11/43(25.6%)로서 동결 부고환 정자로 ICSI를 하였을 때 신선정자에 비해 낮은 체외발생율을 나타냈지만 이용 가능성이 있음을 확인하였다. 이러

Table 3. Cleavage rate of activated oocytes obtained by ICSI treated with fresh, epididymal sperm and frozen-thawed epididymal spermatozoa.

Type of sperm	Oocytes of examined(%)	Embryos of cleaved(%)	Stage of development			
			2~8 cell(%)	8~16 cell(%)	Morula (%)	Blastocyst (%)
Fresh	50	45 (90.0)	3 (6.7)	6 (13.3)	12 (26.7)	24 (53.3) ^a
SE*	50	40 (80.0)	9 (22.5)	10 (25.0)	6 (15.0)	15 (37.5) ^b
FSE**	50	43 (70.0)	14 (32.6)	11 (25.6)	7 (16.3)	11 (25.6) ^b

* Values with different superscripts within column were significantly different(p<0.05).

* SE : Sperm in epididymis, ** FSE : frozen-thawed sperm in epididymis.

한 결과는 동일한 연구보고를 접할 수 없어 정확한 비교는 할 수 는 없지만, 소 난자에 신선정자와 동결정자를 이용하여 ICSI를 하였을 때 체외발생율이 56.0%와 42.0%였다고 한 Kim과 Cheong (2001)의 결과에 비하여 약간 낮은 체외발생율을 나타냈다.

적 요

ICSI시 동결 용해한 부고환 정자의 이용 가능성을 알아보고자 난자의 배양시 체외성숙율과 활성화 처리를 한 난자와 동결 용해한 부고환 정자로 ICSI시 체외발생율을 조사하였으며, 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 난포란을 회수 후 24 시간 배양하였을 때 배양 시간에 따른 GV, MI, MII로의 체외성숙율은 각각 7/60(11.7%), 5/60(8.3%), 48/60(80.0%)였고 30시간 배양 시간에 따른 GV, MI, MII로의 체외성숙율은 각각 3/60(5.0%), 4/60(6.7%), 53/60(88.3%)였고 퇴화란은 각각 2/60(3.3%)와 1/60(1.7%)였다.
2. 동결 용해한 부고환 정자를 이용하여 활성화 처리를 한 난자에 ICSI를 하였을 때 상실배와 배반포로의 체외발생율은 각각 12/46(26.1%), 22/46 (47.8%)로서 비활성화처리 난자군 5/39 (12.8%), 10/39(25.6%)에 비해 높은 체외발생율을 나타냈다.
3. 활성화 처리를 한 난자에 신선정자, 부고환 정자 및 동결 용해한 부고환 정자로 ICSI시 체외발생율은 각각 24/45(53.3%), 15/40(37.50%), 11/43 (25.6%)로서 신선정자에 비해 동결 용해한 부고환 정자처리군은 체외발생율은 약간 낮았지만 이용 가능성이 있음을 확인하였다.

참고문헌

Bar Hava I, Ashkenazi J, Shelef M, Schwartz A, Brengauz M, Feldberg D, Orvieto R and Ben Raael Z. 1977. Morphology and clinical outcome of embryos after *in vitro* fertilization are superior to those after intracytoplasmic sperm

injection. Fertil. Steril., 68(4): 653-657.

Barros A, Sousa M, Oliveira C, Silva J, Almeida V and Beires J. 1997. Pregnancy and birth after intracytoplasmic sperm injection with totally immotile sperm recovered from the ejaculate. Fertil. Steril., 67(6):1091-1094.

Bogliolo L, Leoni G, Ledda S, Naitana S, Zedda M, Carluccio A and Pau S. 2001. Intracytoplasmic sperm injection of *in vitro* matured oocytes of domestic cats with frozen-thawed epididymal spermatozoa. Theriogenology, 56: 955-967.

Catt JW and Rhodes SL. 1995. Comparative intracytoplasmic sperm injection(ICSI) in human and domestic species. Reprod. Fertil. Dev., 7(2):161-166.

Gordon AC, Harrison RF, McMahon A and Fawzy M. 1997. Establishing an intracytoplasmic injection(ICSI) programme for the treatment of male factor infertility in Ireland. Ir. J. Med. Sci., 166(2): 65-69.

Holden CA, Fuscaldò GF, Jackson P, Cato A, Southwick GJ, Hauser R, Temple Smith PD and McLachlan RI. 1977. Frozen-thawed epididymal spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection. Fertil. Steril., 67(1):81-87.

Hoover L, Baker A, Check JH, Lurie D and Summers D. 1997. Clinical outcome of cryopreserved human pronuclear stage embryos resulting from intracytoplasmic sperm injection. Fertil. Steril., 67(4):621-624.

Jimenez C, Grizard G, Pouly JL and Boucher D. 1997. Birth after combination of cryopreservation of sperm recovered from urine and intracytoplasmic sperm injection in a case of complete retrograde ejaculation. Fertil. Steril., 68(3):542-544.

Kim SK. 2001. Studies on the viability of frozen removed seminal plasma by saline(RSP-S) and tris-buffer(RSP-T) semen of small species dogs. Korean J. Anim. Reprod., 25(3):269-275.

- Kim SK and Cheong JH. 2001. Effects of individual variance of bull, sperm type and pretreatment of sperm and oocytes on male pronuclear formation and development rates in Korean native cattles. Korean J. Emb. Trans., 16(2): 139-144.
- Martin MJ. 2000. Development of *in vivo*-matured porcine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. Biol. Reprod., 63(1):109-112.
- Novero V, Camus M, Tourmaye H, Smitz J, Verheyen G, Joris H, Derde MP, Van Steirteghem AC and Devroey P. 1997. Relationship between serum follicle stimulating hormone in the male and standard sperm parameters, and the results of intracytoplasmic sperm injection. Hum. Reprod., 12(1):59-63.
- Schilling E, Niemann H and Schmidt D. 1982. Evaluation of fresh and frozen cattle embryos by fluorescence microscopy. Cryobiology, 15: 245-248.
- Turcker MJ, Morton PC, Wright G, Ingargiola PE, Sweitzer CL, Mitchell CW, Leef DE and Massey JB. 1996. Enhancement of outcome from intracytoplasmic sperm injection does co-culture or assisted hatching improve implantation rates. Hum. Reprod., 11(11):2434- 2437.
-
- (접수일: 2002. 2. 3/ 채택일: 2002. 4. 3)