

알려져 있다. 따라서 생체내 환경과 유사하게 배양시키기 위하여 미성숙 난자를 외인성 성선자극호르몬을 투여하여 배양하거나 생식기관의 상피세포와 공동배양(coculture)하여 체외성숙(In Vitro Maturation)시킴으로써 수정률의 향상과 이식할 수 있는 배아의 수를 늘릴 수 있다. 이러한 공동배양의 이점은 첫째, 배아의 대사적 차단을 방지해 주고, 필요한 대사물 및 특정 성장인자(growth factor)를 공급해 주며 둘째, 배양액에서 발달에 유해한 물질을 제거해주는 것으로 설명하고 있다.

본 연구는 인간 자궁내막 상피세포와 기질세포의 분리 및 배양 후, 생쥐 미성숙 난자와 각각 공동배양을 하여 난구분산도와 핵성속도를 비교 관찰하여 공동배양의 체외성숙에 대한 효과를 비교하였다.

자궁내막조직을 잘게 자르고 Collagenase IV로 분해를 시킨 후 여과시킨다. 기질세포는 매우 작은 덩어리 또는 분리세포 형태로 있으므로 여과막(filter membrane)에 의해 통과되며 이들은 unit gravity에 의한 differential sedimentation으로 더 순수한 기질세포부분을 얻을 수 있다. 여과막위에 남은 상피세포는 선세포(gland cell)구조로서 여과막위에서 얻어서 배양한다. 기질세포의 형태는 거의 섬유아세포화되어 배양시 빠른속도로 성장한다. 이는 초기배양을 시작하여 3 내지 7일 이내에 단일층을 형성하며 3 내지 4주동안 유지한다.

과배란유도후 난포에서 얻은 생쥐의 미성숙 난자를 무작위로 세 군으로 나누어 위와 같이 초기배양한 단일층의 상피세포와 기질세포, 배양액단독에서 함께 배양하고 난자의 난구분산도와 핵성속도를 관찰하였다. 난구분산도는 완전히 분산된 난자의 수를 비교하였고 핵성속도를 제 1극체가 방출된 난자의 수를 비교하였다. 기질세포와 공동배양한 경우 난구분산도는 대조군경우와 유의한 차이가 없었다(45.5% vs 41.5%; $p=0.42$). 또한 난자의 핵성속도의 비교에서도 두 군간에 유의한 차이가 없었다(47.9% vs 35.4%; $p=0.39$). 반면 상피세포와 공동배양한 경우는 대조군에 비하여 난구분산도 및 핵성속이 유의하게 높았다(86% vs 41.5%; $p<0.00001$ /58% vs 35.4%; $p<0.00005$).

결론적으로 인간 자궁내막 상피세포는 미성숙 난자의 체외성숙을 향상시키나 기질세포는 그렇지 않았다. 따라서 자궁내막세포 중에서

상피세포만이 미성숙 난자의 체외성숙에 상승효과를 보이는 것으로 여겨지며 이들의 공동배양으로 체외성숙된 미성숙난자는 향후 수정, 배아발생, 착상까지의 과정도 추적 연구 및 비교연구해야 할 것으로 사료된다.

-13-

배양액 조성이 생쥐 체외수정과 배아 발달에 미치는 영향 -에너지 대사 기질을 중심으로-

함춘 여성 크리닉

김충현 · 장은주 · 정경순 · 박소현
황도영 · 김기철 · 민응기

포유동물 초기배 배양이 상당한 발전을 이룩했음에도 불구하고 일부 종에서만 zygote로부터 배반포까지의 발달이 가능하며, 이러한 종에 있어서도 배아의 발달속도는 생체에 비해 느린 것으로 알려져 있다. 이의 명확한 원인은 아직 완전히 밝혀져 있지 않지만 배양액의 조성, 배양체계의 변화를 통해 이를 극복하고자하고 있으며, 수정과 초기배아의 발달 장소인 난관과 유사한 조건 즉, 난관액 조성 과 동일한 배양액의 이용, 난관상피세포와의 공배양이 대표적인 예이다. 난관액과 기존배양액과의 차이는 energy substrate의 농도로 특히 lactate농도는 현격한 차이를 나타내고 있으나 난관액 조성 과 동일한 배양액을 이용한 배아 발달 결과는 기존 배양액과 큰 차이를 나타내지 않는데 이는 기존의 연구들이 zygote의 미세환경에 많은 영향을 주는 cumulus cell을 배제한 상태로 조사되었기 때문으로 사료된다. 실제 난관액 조성 또한 cumulus cell의 존재 유무에 따라 그 조성이 변화하므로 난구세포와 접한 배아는 많은 영향을 받을 것으로 기대된다. 이에 본 연구자들은 기존배양액(M16), 난구세포가 존재할 때의 난관액(MT1), 난구세포가 없을 때의 난관액(MT2), CZB배양액에 glucose를 첨가한 배양액(CZ1) 및 CZB배양액(CZ2)에서는 pyruvate, lactate 및 glucose농도와 동일하게 조성한 각 배양액에서 난구세포를 가진 생쥐난자를 체외수정시켜 수정과 배아의 발달에 미치는 이들 배양액

의 효과를 관찰하였다.

수정율은 M16 69.5%, MT1 62.0%, MT2 70.0%, CZ1 67.0%, CZ2 46.8%였으며, 수정 후 3일에 상실배 형성에서는 MT2가, 4일에 배반포 형성에서는 M16배양액이 양호한 결과를 나타내었다.

이와같은 결과로 난관환경을 가장 유사하게 조성한 MT2 배양액이 생쥐 초기배의 발생초기에 유익한 것으로 사료되며, 배반포 형성을 기준으로 배아의 대사형태 및 미세환경이 변화하는 것을 고려할 때 이 시기에 적절한 새로운 조성의 배양액이 필요할 것으로 사료된다.

— 14 —

Effects of 1, 2-Propanediol (PROH) and Freezing-Thawing on the *in Vitro* Developmental Capacity of Human Immature Oocytes

**Weon-Young Son, Sung-Eun Park,
Jung-Jae Ko, Woo-Sik Lee,
Jong-Young Park, Tae-Ki Yoon,
Kwang-Yul Cha**

*Infertility Medical Center, CHA General
Hospital, Seoul 135-081, Korea*

Use of human immature oocytes in *in vitro* fertilization(IVF) program is a prospective area in Assisted Reproductive Technologies(ART). Successful cryopreservation of human immature oocytes would be essential to establish ovum bank for the ovum donation program in ART. Aims of the present study were as follows: 1) To find effects of a cryoprotectant, PROH, and freezing-thawing treatment on the maturation of human immature oocytes; 2) To determine the capacity of immature oocytes to fertilize and cleave after freezing-thawing treatment.

Cumulus enclosed human immature oocytes(n=250) were collected from unstimulated ovaries obtained from fifty seven consented patients undergoing tuboplasty or

caesarean section. Collected oocytes were divided into three groups. Group 1(n=82): no treatment as control; Group 2(n=70): PROH treatment in a identical manner to that used for freezing in the next group; and Group 3(n=98): cryopreserved. Oocytes were cryopreserved using one-step freezing method in modified Dulbecco's phosphate buffered saline(PBS) supplemented with 20% fetal bovine serum(FBS). Oocytes in Group 1, 2, and survived oocytes(n=54) from Group 3 were cultured in DMEM supplemented with 20% FBS, 10IU/ml PMSG, and 10 IU/ml hCG for 48 hrs. Maturation of oocyte was assessed by examining the first polar body(PB) under the microscope after 48 hrs. Part of matured oocytes(Group 1: n=21; Group 2; n=21; and Group 3; n=14) were inseminated with normal donor sperm. Fertilization was assessed by the presence of pronuclei at 19 hrs post insemination and cleavage was recorded after 24 hrs then.

Survival rate after freezing-thawing in Group 3 was 55.1%(54/98). Maturation rates were 6.8%(63/82), 67.1%(47/70), and 59.3%(32/54) fro the Group 1, 2, and 3, respectively. Maturation rate in Group 3 was significantly lower than that of Group 1($p<0.05$).

Fertilization rates were 90.0%(19/21), and 42.8%(6/14) for the Group 1, 2, and 3, respectively. Cleavage rates were 94.7%(18/19), 88.2%(15/17), and 16.7%(1/6) for the Group 1, 2, and 3, respectively. Therefore, rates of fertilization and cleavage in survived oocytes in Group 3 was significantly lower than those of Group 1 and Group 2($p<0.01$).

These results suggest that the pretreatment with 1.5M PROH before the freezing itself has no inhibitory effects on the maturation, fertilization and cleavage of