P-17 Polyvinylpyrrolidone (PVP) 농도가 ICSI후 인간정자두부의 Decondensation 및 Pronucleus 형성에 미치는 영향

성균관대학교 의과대학 산부인과, 불임클리닉*

황성수* · 이은영* · 윤병구 · 이제호 · 최두석

세포질내 정자주입술 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI)에 의해 수정 및 임신이 성공된 이후, ICSI 시술시 정자의 immobilization에 거의 필수적으로 사용되어 왔던 PVP가 tail touch후 생긴 sperm plasma membrane의 상처를 안정화시킴으로써 정자두부의 decondensation에 장애가 될 수 있다고 보고된 이후, 최근 PVP를 사용하지 않거나 또는 농도를 낮추어 사용하려는 시도가 있었으나 아직 뚜렷한 결론은 얻지 못하였다. 따라서 정자의 immobilization에 사용되는 PVP 농도가 hamster 난자에 주입된 인간정자두부의 decondensation 또는 pronucleus (PN) 형성에 어떠한 영향을 미치는지를 규명하고자 본 연구를 시행하였다.

***방 법:** 인간정자는 WHO 기준 (1992)에 의해 정상범주에 들어가는 정액을 신선 또는 동결융해시킨 후 사용하였다. 난자는 8~12주령된 female hamster를 과배란유도후 채취하였으며 구체적인 방법은 다음과 같다. PMSG 30IU를 복강주사후 52~26시간에 hCG 30IU를 주사하여 과배란을 유도하였고, 17시간 후 난관으로부터 난자를 회수하여 사용하였다. PVP 농도는 2.5%, 5%, 10%를 사용하였고, 각각의 농도에서 immobilization시킨 정자를 hamster난자에 주입 후 medicult media에서 15~17시간 배양시켜 slide에 도말후 고정액 (acetic acid: methanol = 1:3)에서 24시간이상 고정시킨 다음 0.25% acetic lacmoid로 염색하여 위상차 현미경으로 정자두부의 변화상태를 관찰하였다.

***결 과:** 신선정액을 사용한 경우 PN 형성율은 2.5%에서 16/31 (51.6%), 5%에서 16/28 (57.1%), 10%에서 20/35 (57.1%)였고, decondensation 비율은 각각 11/31 (35.5%), 6/28 (21.4%), 8/35 (22.8%)로서 2.5%에서 다소 높은 결과를 보였으나 통계적 유의차는 없었다. 한편 동결융해한 정자의 경우 PN 형성율은 22/45 (48.9%), 24/51 (47.1%), 28/55 (50.9%)였고, decondensation비율은 12/45 (26.7%), 14/51 (27.5%), 16/55 (29.1%)로서 유의한 차이가 없었다.

***결 론:** 본 연구결과에 의하면 ICSI 후 정자두부의 decondensation 및 PN 형성은 신선 또는 동결융해시킨 정액 양군에서 차이가 없었고, 또한 PVP의 농도에도 큰 영향을 받지 않음을 알 수 있었다. 따라서 ICSI 시술시 정자의 immobilization에 사용되는 PVP 농도보다는 정자와 함께 주입되는 PVP양을 최소화하는 것이 수정율 향상에 더 효과적이라 사료된다.

P-18 생쥐 미성숙난자의 핵성숙에 미치는 epidermal growth factor (EGF)와 gonadotropin의 효과

차병원 여성의학연구소, 포천중문의과대학교

차수경 · 손원영 · 박성은 · 정형민 · 홍승욱 · 정미경 · 이우식
고정재 · 윤태기 · 차광열

Gonadotropin과 EGF는 포유동물 난자의 핵성숙를 유도한다고 알려져왔으며. 이들은 서로의 상호작용에의해 난자의 성숙에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다. 그러나, 이들

의 난자의 성숙에 미치는 정확한 작용에 대해서는 알려져있지 않으므로, 따라서 본연구는 mouse 미성숙난자의 체외배양시 EGF와 gonadotropin의 핵성숙에 미치는 효과를 알아보고 이들의 핵성숙과정시 서로의 상호작용을 알아보는데 그 목적이 있다.

TCM 199배양액에 0.4% PVP를 넣어 기본배양액을 사용하였으며 기본배양액에 EGF (1 ng/ml) 또는/그리고 FSH (1 μg/ml)를 첨가하여 핵성숙를 유도하였으며, 위의 군에 EGF-receptor specific inhibitor (Tryphostin AG1478)를 처리하여 배양한 후 핵성숙에 미치는 결과를 관찰하였다.

1. 대조군 (58.1%)에 비해 EGF (82.5%), FSH (87.8%), 그리고 EGF+ FSH (96.3%)를 첨가한군에서 핵성숙이 증가함을 나타났다.

2. 배양액에 EGF와 EGFR-specific inhibitor를 처리했을 때 EGF의 핵성숙율은 떨어졌으나, 배양액에 FSH와 EGF처리시와 동알한 EGFR inhibitor를 처리하여 배양했을때 inhibition의 효과는 없었다. 즉 EGFR-specific inhibitor는 EGF에 작용에 관여하지만, FSH의 작용에는 영향을 주지않는 것으로 관찰되었다.

따라서 본 실험을 통하여 EGF와 FSH는 서로 다른 경로를 통하여 난자의 성숙에 관여하는 것으로 사료된다.

P-19 여러 가지 초자화동결보존액을 이용한 제3일째 생쥐 배아의 초자화동결에 대한 연구

대학산부인과[1], 불임연구실 성신여자대학교 생물학과[2]

윤숙영[1,2] · 배인하[2] · 손 철[1]

최근 시험관 아기시술이 발달하면서, 과배란 유도로 얻어진 많은 수의 배아는 배아 이식에 필요한 적정수를 초과하고 있어 그에 따른 잉여 배아에 대한 해결책으로 동결보존방법이 활발하게 연구되고 있다. 동결보존방법의 하나인 초자화동결 (vitrification)은 기존의 automatic freezer를 이용한 완만 동결방법과는 달리 세포내 ice crystal 형성이 없으므로 해빙 후 세포의 생존 및 발달에 매우 효과적이며 그 과정이 매우 간단하고 경제적인 것으로 최근에 활발히 보고되고 있다.

본 연구에서는 지금까지 보고되어 온 여러 가지 초자화 동결보존액을 사용하면서 그 과정을 단순화하거나 보완하여 제3일째 생쥐 배아를 동결, 해빙한 후 생존율과 발생율을 조사함으로써 가장 효과적인 초자화동결 보존법을 알아보고자 하였다.

ICR계 생쥐 6-8주령 암컷을 과배란유도 후 vaginal plug가 확인된 날을 제1일로하여 제3일째 (hCG 주사 후 72~74시간)에 8세포배와 상실배를 회수하였다. 초자화 동결 보존액은 1) EFS40 (Ethylene glycol 40% (v/v), Ficoll 70 30% (W/V), sucrose 0.5M), 2) VS11 (Ethylene glycol 6.0M, glycerol 1.8M), 3) VS3a (glycerol 6.5M, BSA 6% (w/v)를 10% FBS가 함유된 dPBS로 사용 직전에 제조하였다. 동결 방법은 각 동결액에 10~15개의 배아를 넣고 다시 0.25 ml straw에 넣어 2분간 상온에서 평형시킨 후 액체 질소 (LN_2)에 넣었다. 대조군으로는 회수 직후 그대로 배양한 군과 1.5M PrOH와 0.1M sucrose를 이용한 완만 동결한 군으로 하였다. 동결된 배아를 이틀 후에 0.5M sucrose로 5분간 해빙하여 충분한 세척을 거친 후, 2일 동안 배양하고 포배강이 형성된 포배기와 부화중이거나 부화가 완전히 끝난 배아 수를 조사하였다. 또 각 동결보존액의 독성을 조사하기 위해 배아를 각 동결보존액에