

라 각각 3군으로 분류하였다. 1군; 대조군, 2군; Grid를 이용하여 유리화동결 시킨군, 3군; pulled straw를 이용하여 동결시킨 군으로 이들 3군의 염색체와 방추사의 이상성을 핵형분석방법과 면역세포염색법으로 비교하였다. 동결군은 난자를 D-PBS에 EG가 첨가된 항동해제에 2분 30초간 노출시켰으며 그 후 5.5 M EG에 1.0 M sucrose가 첨가된 항동해제에 20초간 노출시킨 후 Grid에 난자를 부착시켰다. 핀셋을 이용하여 난자가 부착된 Grid를 직접 액체 질소에 침지한 후 제작한 Grid carrier에 넣어 동결시켰다. Pulled straw를 사용한 방법은 0.25 ml의 straw를 열판을 이용하여 pulled straw를 만든 후 난자를 앞에 서술한 2단계로 처리한 후 5 µl 항동해제, 공기, 중간에 1~2 µl 항동해제와 난자, 공기, 끝으로 5 µl 항동해제 순서로 pulled straw에 채워 넣은 후 직접 액체 질소에 침지하였다. 용해 방법은 Grid에 동결한 군은 1.0 M, 0.5 M, 0.25 M, 0.125 M sucrose에서 단계적으로 2분 30초간 노출시키고 PBS로 세척하였으며, pulled straw에 동결한 군은 액체 질소에서 꺼낸 후 10초간 공기 중에 노출시켰으며 물속에서 10초간 해동한 후 Grid와 동일한 방법으로 용해하였다.

Results: 2군과 3군의 생존율은 각각 83.8%와 87%로 두군 사이에 유의적 차이가 나타나지 않았다. 염색체 이상성은 두군이 각각 35.7%와 33.3%로 유의적 차이가 없었으며, 방추사의 이상성도 2군 38%, 3군 38.5% 유의적 차이가 없었다.

Conclusions: 본 연구 결과 Grid와 straw를 이용한 유리화동결법은 생존율, 염색체 이상성, 방추사의 이상성에 유의적 차이가 없었으므로, pulled straw를 이용한 유리화동결법이 액체 질소로부터의 virus 감염을 막을 수 있는 대체 방안으로 사용될 수 있는 것으로 사료된다.

This work was supported by a grant from the INTERDISCIPLINARY RESEARCH PROGRAM of the KOSEF (1999-2-205-002-5).

P-15 Artificial shrinking하여 Vitrification법으로 냉동 보존되었던 인간 포배기배아의 생존률, 착상률 및 임신율에 관한 연구

프라우메디병원 불임연구실

정재돈 · 정범식¹ · 이문희²

Background & Objectives: 생쥐 포배기배아의 동결에서 artificial shrinking이 효과가 있음을 확인한 후 본 연구에서는 인간 포배기배아의 동결에 적용하였다. 과배란유도에 의해 획득된 배아 중 이식 후 남은 잉여배아를 artificial shrinking시켜 냉동보존 하였다가 용해 후 배아의 생존율, 이식 후 착상률 및 임신율을 조사하고자 실시하였다.

Method: 2002년 5월부터 2003년 5월까지 artificial shrinking하여 vitrification method로 동결하였다가 용해하여 배아 이식한 환자 20명 중 21 case를 대상으로 조사되었으며, 최소 1개 이상의 양질배아를 가지는 환자들이었다. 또한 배아이식이 여유치 않았던 1명을 제외하면 모두 1~2번의 시험관아기 시술에서 실패했었던 환자들이었다. 동결은 micromanipulator를 이용하여 인위적으로 shrinking을 유도한 다음 PBS + 10% glycerol + 20% hFF, PBS + 10% glycerol + 20% hFF + 20% ethylene glycol, PBS + 25% glycerol + 25% ethylene glycol + 20% hFF에 각각 5분씩 침지시킨 후 0.25 ml straw에 장착한 다음 액체

질소에 침지하여 동결보관을 실시하였다. 용해는 PBS + 20% hFF + 0.5M sucrose, PBS + 20% hFF + 0.25M sucrose에 각각 5분간 침지하였다가 G2.2에 6시간 동안 추가배양을 실시한 다음 Re-expansion 유무를 확인하고 이식하였다. 배아이식을 위한 환자의 준비는 생리가 규칙적인 경우 luteal support를 하지 않고 배란 확인 후 5일째에 배아이식을 하였고, 불규칙적인 여성의 경우 Estradiol valerate를 경구 투여하여 자궁내막을 준비하고 luteal support는 progesterone in oil (50 mg/day)을 투여하거나 gel type의 progesterone (90 mg)을 질강내에 투여하여 5일째에 배아이식을 시행하였다.

Results: 총 21 case에서 배아생존율은 89.9% (71/79)였으며, 이중 Re-expansion rate는 69.0% (49/71), case당 이식되는 난자의 수는 2.9 (61/21)개, 착상율은 29.5% (8/61), Fertilization rate는 61.9% (13/21)이었으며, 이중 2 case에서 유산되어 ongoing rate는 84.61% (11/13)이었다. Case 별로 2~4개의 배아가 이식되었으며, 2 case에서 3태가 관찰되었다.

Conclusions: 이상의 결과로 미루어볼 때 임신률과 착상율 및 ongoing rate는 일반적인 시험관아기시술에 비해 떨어지지 않으며, 본 연구에 공시된 환자들이 시험관아기시술에서 이미 1~2회의 실패한 경험을 가진 환자임을 고려해볼 때 배아의 효율적 이용뿐만 아니라 환자들의 경비절감 및 정신적 부담을 덜어주는 데 크게 기여할 것으로 사료되어진다.

P-16 Improved Hatching of Blastocyst in Korean Native Cattle after Addition of Hypoxanthine, Aminopterin and Thymidine (HAT) in Media at Day 5

JC Han^{1,2}, HS Lee², HD Park¹

¹Department of Biotechnology, Daegu University, Kyoungbuk, ²ELLE OB/GYN, Daegu, Korea

Objective: The blastocyst stage has been associated with exceptionally high implantation rates. Good quality blastocyst is a fundamental requirement for the accurate implantation. The hatching of blastocyst of the zona pellucida for the accurate implantation is an essential step, which has to occur prior to uterine implantation. The aim of this study was to evaluate the effect of HAT on hatching of blastocyst in Korean native cattle.

Materials and methods: Cumulus oocyte complexes were matured in TCM-199 with pyruvate 0.2 mM, FSH 0.01 IU/ml and 10% FBS for 24 hr. Matured oocytes (not observed) were inseminated with frozen-thawed sperm in Fer-TALP supplemented with BSA 6 mg/ml for 24hr. Fertilized oocytes (not observed) were cultured in YS medium (Heo et al., 1996) with NEAA 10 ml/l and 20 % hFF for 24 hr. Two cell embryos were cultured to blastocyst stage in YS medium with NEAA 10 ml/l, EAA 5 ml/l, 20% hFF and 10% FBS (IVC medium) for 24 hr. On day 5, 369 embryos were divided among one of five media: i) control (IVC medium); ii) H (IVC medium with H 400 μ M); iii) A (IVC medium with A 1.6 μ M); iv) T (IVC medium with T 64 μ M) and v) HAT (IVC medium with HAT). Results (BL, HBL and HBL/BL) were compared between the groups using Chi-square.

Results: The BL and HBL rates were higher ($p < 0.05$) in control (43.8%, 15.6%) and HAT (33.3%, 24.0%) than in H (14.7%, 2.7%), A (15.1%, 3.8%) and T (14.3%, 0%). The rate of HBL per BL was