

결보존은 필수적인 조건이 되고 있다. 과거 배아의 동결보존은 자동세포동결기를 이용한 완만동결법을 주로 사용하였으나, 근래에는 난자 및 배아를 유리화 동결방법을 이용하여 시행하고자 하는 노력이 경주되고 있다. 이에 본 실험은 체외수정 기술 중 얻은 발생중인 배아의 동결보존에서의 유리화 동결법의 효용성을 알아보고자 기존의 완만동결법과 비교하여 보았다.

Method: 본 연구의 대상은 기존의 완만동결방법을 적용한 전핵시기동결군 (S-PN) 122례, 발생배아 동결군 (S-EM) 59례와 발생배아의 유리화동결군 (V-EM) 64례를 대상으로 하였다. S-PN군은 수정 후 20여 시간 후의 전핵시기에 자동세포동결기를 이용한 통상적인 완만동결을 시행하였고, S-EM군은 수정 후 2~3일 후 전핵시기와 동일한 방법으로 완만동결을 시행하였다. V-EM군은 수정 후 3일째에 유리화동결법으로 동결하였다. 유리화동결은 변형된 0.25 ml straw를 이용하는 MDplus 방법을 사용하여 동결하였다. 이식은 S-PN군은 해빙 후 2일, S-EM군은 3~20시간 추가 배양 후 내막이 준비된 환자에 이식하였고, V-EM군도 해빙 3~20시간에 이식하였다. 이 후 추적관찰 결과 태아 심박동을 임신으로 하여 임신율과 착상율을 계산하였다.

Results: 1. 환자의 나이는 완만동결군은 34.2 ± 5.3 세, 유리화군은 36.2 ± 4.0 세로 유리화군에서 유의하게 많았으나 ($p < 0.05$), 불임기간은 반대로 유리화군에서 높았다 ($p < 0.05$). 불임요인의 분포는 각군간 유의한 차이가 없었다. 2. 해빙 후 배아의 생존율은 S-PN군이 82.8%, S-EM군이 80.3%, V-EM군이 94.6%로 완만동결군들보다 유리화군이 유의하게 높았다 ($p < 0.05$). 3. 해빙 전후 배아의 질은 S-PN은 해빙 후 2일 배양에서 양질의 배아는 52.1%를 얻었고, S-EM군에서는 동결시 71.4%에서 해빙 후 51.2%로 유의하게 감소하였으나, V-EM군은 동결시 72.4%에서 해빙 후 71.6%로 거의 감소하지 않았다. 4. 임신율은 각군에서 23.8%, 13.6%, 34.4%로 유리화군이 가장 높았고, S-EM군이 가장 낮았다. 착상율은 13.6%, 8.2%, 13.5%로, V-EM군은 S-PN군과 비슷하였고, 두 군이 S-EM군보다 높았다.

Conclusions: 이상의 결과에서 발생중인 배아의 동결에서 생존율, 양질의 배아 보존율, 임신율 및 착상율은 완만동결법에 비해 유리화동결법이 나은 결과를 얻었고, 임신과 착상은 배아요인과 함께 환자의 나이 등에 영향을 받는 것으로 나타났다. 결론적으로 잉여배아의 동결은 방법이 간단하고 안전하며, 고가 장비가 필요 없을 뿐만 아니라 재료비도 저렴한 MDplus 유리화동결법이 유용한 것으로 사료된다.

0-12 사람의 미수정란 (Unfertilized Oocytes)과 난할단계 (Cleavage-Stage Embryo) 배아에서 미토콘드리아 ATPase6 유전자의 발현

한지은^{2,3} · 이숙환^{1,2,3} · 조성원^{1,3} · 정혜진^{1,3} · 안소연^{1,3}
조정현² · 곽인평² · 권 황² · 윤태기^{2,3}

¹포천중문의과대학교 산부인과, 보건복지부지정 생식의학 및 불임유전체 연구센터,

CHA Research Institute, ²포천중문의과대학교 산부인과,

³보건복지부지정 생식의학 및 불임유전체 연구센터

Background & Objectives: 미수정 난자는 aneuploidy와 관련된 염색체상의 비정상으로 인해 생기는 것으로 설명되어질 수 있다. 이러한 non-disjunctional error는 염색체 분열시 낮은 에너지량으로 인해

생길 수 있다. 이 단계에서는 spindle apparatus 형성과 같은 에너지를 요구하는 다양한 세포내 구성요소가 존재하게 되므로 이때 에너지 량의 결핍은 불균등한 segregation과 aneuploidy를 일으키게 된다. 본 연구에서는 미수정난자와 3 PN으로부터 얻은 난할단계의 배아에서 산화적 인산화반응을 조절하는 것으로 알려진 미토콘드리아 ATPase6 유전자의 발현양상에 대해 연구하였다.

Method: 미수정란 (n=20)은 수정후 48시간에 얻어진 것을 사용하였다. 3 PN (n=20)은 수정후 18~24시간 후에 얻어진 것을 24~48시간 동안 배양하여 난할단계의 배아를 얻어 사용하였다. 미수정란과 난할단계의 배아는 acid tyroid를 사용하여 투명대를 제거한 후 lysis buffer를 처리하여 실험에 사용하였다. 미토콘드리아 ATPase6 유전자의 발현은 5가지 primer를 사용하여 RT-PCR로 확인하였고 대조군으로 hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT)를 사용하였다.

Results: 미수정란과 초기 난할단계에서의 배아를 이용하여 미토콘드리아 ATPase6 유전자들 가운데 MIT1, MIT2, MIT3, MIT6 및 MIT7의 상대적인 발현정도를 RT-PCR 결과로 확인하였다. 발현정도의 확인을 Imaging Densitometer로 측정한 결과 미수정란에서 보다는 난할단계의 배아에서 약 3배 이상 발현 정도의 차이를 보이는 것으로 관찰되었다.

Conclusions: 미수정란과 난할단계의 배아에서 ATPase6 유전자의 발현양을 분석한 결과, 미수정란에서의 미토콘드리아 ATPase6 유전자 발현양의 감소는 미토콘드리아 에너지 생성에 영향을 미치는 산화적 인산화 기능의 저하를 일으키는 것으로 보여진다. 그러므로 산화적 인산화 기능의 저하는 난자의 난할과 수정에 있어서, 미토콘드리아 에너지 생성에 영향을 미칠것으로 사료된다.

Acknowledgement: 본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임. (과제고유번호: 01-PJ10-PG6-01GN13-0002)

O-13 Three Dimensional Culture of Spermatogenic Cells from Non-Obstructive Azoospermia Patients in Collagen Gel Matrix

Lee JH¹, Lee SE¹, Jung YJ¹, Lee JH¹, Choi KW¹, Hong JY², Lee YB², Lee SJ²

¹IVF Lab, MDplus LIS, ²Mirae and Heemang Infertility Clinic

Background & Objectives: About thirty percent of non-obstructive azoospermic population remain without any help. Successful in vitro differentiation of immature germ cells appears potential method for this population. Spermatogenesis is controlled by a highly complex machinery of paracrine interplay between extracellular matrix and hormonal signals among testicular cells. The objective of this study was to access the effectiveness of three-dimensional culture of spermatogenic cells in collagen gel matrix for the non-obstructive azoospermic patients.

Method: Testicular tissues were obtained from 5 patients with non-obstructive azoospermia. Collagen solution was mixed with 3x concentrated DMEM/F12, cell suspension in modified DMEM/F12, 5% Matrigel. The cells reconstructed in collagen gel matrix were cultured for up to 12 days in modified DMEM/F12 medium at 32°C with 5% CO₂ in air. Before and after culture, haploid cells were identified by immunocytochemistry and Fluorescence-activated cell sorter (FACS).