

Propofol(2,6-disoprooylphenol)과 Thiopental Sodium이 돼지 난자성숙, 수정 및 발생에 미치는 영향

김주영 · 유정민 · 유성진 · 김주란 · 윤용달¹ · 정철회² · 김현찬³ · 강성구[†]

인제대학교 생물학과, ¹한양대학교 생물학과,
²대구여성차병원 산부인과, ³인제대학교 의과대학 산부인과학교실

Effects of Propofol and Thiopental Sodium on the Maturation, Fertilization and Development of Porcine Oocytes

Ju-Young Kim, Jeong-Min Yu, Seong-Jin Yoo, Ju-Ran Kim, Yong-Dal Yoon¹,
Chul-Hoi Jeong², Hyun-Chan Kim³ and Sung-Goo Kang[†]

Department of Biology, College of Natural Sciences, Inje University, Kimhae, Gyeongnam 621-749, Korea

¹Department of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea.

²Department of Obstetrics and Gynecology, Taegu Cha Women's Hospital, Taegu 705-031, Korea

³Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Inje University, Busan 633-165, Korea

ABSTRACT : In oocyte retrieval, a vein anesthetic drug is commonly used for induction and maintenance of general anesthesia. Propofol and Thiopental sodium are frequently used for ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval. The present study aimed to assess the effects of Propofol and Thiopental on *in vitro* fertilization(IVF). Immature porcine oocytes were exposed to various concentrations of Propofol and Thiopental sodium. The rates of oocyte maturation, fertilization and development were observed. The parthenogenetic effects of the anesthetics were also evaluated. The rate of oocyte maturation after exposure to high concentrations of the anesthetics for long time was significantly higher than that of the control. But the rate of fertilization after long-time exposure to the high concentration of the anesthetic drugs was significantly lower than that of the control. The results support that Propofol serves like other anesthetics described, as a parthenogenetic activator. Oocytes exposed to Thiopental sodium showed decreased rates of maturation and fertilization. These results suggest that usage of optimum concentration of anesthetic drug is important in increasing the rates of oocyte maturation, fertilization and development in IVF.

Key words : Propofol, Thiopental sodium, Parthenogenetic activation, Oocyte maturation, Fertilization rate.

요 약 : 체외수정의 성공률에 있어서 배란되기 직전의 충분히 성숙된 난자를 채취하는 것이 중요하며, 최근에는 질 벽을 통하여 초음파를 이용하는 방법을 많이 사용하고 있다. 난자 채취 시술 시 정맥 마취제를 투여하는데 최근에는 수술회복이 빠르고 오심이나 구토 등의 부작용이 적은 Propofol(2,6-disoprooylphenol)과 Thiopental sodium을 사용한다. 이들 마취제가 마취 투여 시간과 양에 따라 난자의 성숙률과 수정률, 발생률에 어떠한 영향을 미치는지 조사하고자 하였다. 돼지에서 추출한 성숙 전 단계의 난자를 마취제인 Propofol 및 Thiopental sodium의 다양한 농도와 시간에 노출시킨 후 난자 성숙률을 조사하였으며 돼지 정자와 체외수정시킨 후 수정률과 발생률을 관찰하였다. 또한, 수정 단계 없이 단독 발생하는 처녀생식에 대한 영향도 조사하였다. Propofol에 단시간 노출된 난자는 대조군과 큰 차이가 없었으나 고농도에서 장시간 노출 시 성숙률이 현저히 높게 나타났다. 그러나 수정률은 높은 농도에 장시간 노출할 경우 대조군보다 낮아졌는데, 이와 같은 일시적인 난자 성숙은 Propofol이 처녀생식 유발물질이기 때문으로 보여진다. Thiopental sodium은 저농도 단시간 처리 시 난자의 성숙률과 수정률을 모두 감소시켰다. 이상의 결과로 볼 때, 각 마취제의 최적농도와 투여시간을 결정하여 이러한 영향을 최소화시키는 것이 체외수정의 성공률과 밀접한 관계가 있는 것으로 생각된다.

* 본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(2000년) 지원으로 수행되었음.

[†]교신저자: 경남 김해시 어방동 607, 인제대학교 생명공학부.
(우) 621-749, (전) 055-320-3213, (팩) 055-336-7706, E-mail: biosgkan@ijnc.inje.ac.kr

서 론

체외수정을 위한 난자채취는 질벽 초음파 시술을 사용하여 수행하고 있으며 이 시술에는 단시간에 작용하는 마취제가 적합하다(Scott et al., 1985). 체외수정의 높은 실패율 때문에 이러한 과정이 반복되면 마취제의 부작용으로 혈액 내 코티졸, 프로락틴 및 성장호르몬 등의 농도가 증가하면서(Noel et al., 1972; Szalay et al., 1982; Naito et al., 1989) 내분비 변화가 일어난다. 이러한 농도의 증가는 국소마취보다 전신마취에서 더욱 뚜렷하다(Lehtinen et al., 1987). 호르몬의 변화는 배아 발생에 저해요인이 되며(Sopelak, 1989) 마취제에 장시간 노출됨으로써 수정과 세포분할에 영향을 준다고 보고되었다(Hayes et al., 1987).

최근 체외수정 시술 시 일반적으로 사용되는 Propofol은 투여 후 체내대사가 빨리 일어나므로 단시간의 마취가 필요한 경우에 적합한 약물이다(Huang et al., 2000). 또한 빠른 대사속도로 인해 체내에 거의 축적되지 않으므로 지속적인 장시간 마취 유지용으로도 사용될 수 있으며, 마취로부터의 회복도 빠르고, 회복 시에는 오심이나 구토 등의 부작용이 적다(Sherry, 1992).

Propofol은 GABA(γ -aminobutyric acid) receptor inhibitor로서의 약리 효과를 보인다(Lerche et al., 2000). 한편 Thiopental sodium은 초단시간에 작용하는 수면약에 속하며 정맥주사에 의하여 전신마취를 일으킨다. 흡입 마취약과 같이 기도나 위 점막에 대한 국소 자극이 없고 마취 각성 후의 장애가 비교적 적은 점에서 우수하다(Sterzik et al., 1994). 정맥 내로 주입된 Thiopental sodium은 재 분포와 생체전환에 의해서 소실된다. 또한 급성내성의 특성을 가지고 있으며 신경전달억제(neurotransmitter inhibition-GABA)의 작용을 강화시킨다. 그러나 태반관문을 쉽게 통과하므로 모체에 주사하면 태아의 혈중농도가 최고치에 도달한다. 초기에 한번에 많이 주입하면 약물의 수준은 독성을 나타내는 수준에 도달할 수 있으며 필요 이상으로 오래 약물의 효과가 지속되는 약물 축적이 일어나게 된다.

Propofol의 경우 난포액 내의 Propofol 축적량은 투여량과 비례하며(Coetsier et al., 1992) 난자채취 30분 경과 시 난포액 내에서 발견되는 농도는 $0.4 \mu\text{g/ml}$ 이라고 보고된 바 있다(Cecile et al., 1997; Christiaens et al., 1999). 이 농도는 수정과 임신률에 심각한 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Kazama et al., 2001). 이와 같이 최근에 Propofol의 투여량에 따른 연구(Sakamoto et al., 2001; Kazama et al., 2000; Telfer, 1998)와 노

출되는 시간에 따른 연구도 계속되고 있다. Cecile 등(1997)과 Christaens 등(1999)은 마취제에 의해서 생쥐의 초기 발생, 수정률 감소와 처녀생식이 나타난다고 발표하였다. 본 연구에서는 돼지 난자를 이용하여 마취제에 의한 난자성숙, 수정률 및 초기발생에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 돼지난자의 배양액 준비

배양액은 TCM-199 기본배양액에 $50 \mu\text{g/ml}$ streptomycin sulfate, $75 \mu\text{g/ml}$ potassium penicillin G, 0.2 mM Na-pyruvate, 0.32 mM Ca-lactate, 2.2 g/L sodium bicarbonate을 넣어 혼합한 후 $0.22 \mu\text{m}$ filter(Millipore, USA)로 여과하여 사용하였다. 이 배양액을 기본으로 하여 체외성숙 배양액은 0.4% BSA, 10 IU/ml PMSG, 10 IU/ml hCG, $1 \mu\text{g/ml}$ estradiol- 17β , 10% (v/v) 돼지 난포액(porcine follicular fluid, pFF)을 첨가하여 사용하였으며 수정용 배양액은 0.4% BSA를 첨가한 TCM-199을 사용하였다. 사용하기 전 $0.22 \mu\text{m}$ filter로 여과하여 12시간 39°C , 5% CO_2 배양기에서 평형을 유도하였다. 사용된 돼지의 난포액은 1 ml 주사기로 여포에서 난포액을 흡입하여 1.5 ml tube에 넣고 $12,000 \text{ rpm}$, 15분 동안 원심분리한 후 상층액을 다시 원심분리하였다. 원심분리 후 얻은 상층액을 $0.22 \mu\text{m}$ filter로 여과하여 -20°C 에 보관하여 사용하였다.

2. 난자와 난구세포 복합체의 마취액 처리

마취액은 Propofol, Thiopental sodium을 0.85% (w/v) saline으로 녹여 사용하였다. 각 마취액의 실험에 사용한 농도는 Propofol은 0(control), $0.45 \mu\text{g/ml}$, $2.3 \mu\text{g/ml}$, $4.5 \mu\text{g/ml}$, Thiopental sodium은 0(control), $0.2 \mu\text{g/ml}$, $1 \mu\text{g/ml}$, $5 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 실험하였다. Propofol stock 0.45 mg/ml 을 TCM-199 기본배양액에 각각 $0.45 \mu\text{g/ml}$, $2.3 \mu\text{g/ml}$, $4.5 \mu\text{g/ml}$ 이 되도록 희석시켰고, Thiopental sodium stock 0.5 mg/ml 을 TCM-199 기본배양액에 각각 $0.2 \mu\text{g/ml}$, $1 \mu\text{g/ml}$, $5 \mu\text{g/ml}$ 이 되도록 희석시켰다. 마취액이 들어간 배양액에 난자를 옮긴 후 각 농도에 10분, 60분, 48시간을 노출시켰다. 마취액에 노출시킨 난자를 TCM-199 기본 배양액에서 10회 이상 세척한 후 성숙 배양액에 넣어 주었다. 48시간 노출시킨 실험군을 다시 두 개의 실험군으로 나누었는데 첫 번째 실험군은 수정을 시켰고 두 번째 실험군은 수정을 시키지 않고 처녀생식을 관찰하였다. 48시간 노출시킨 실험군 역시 같은 방법으로 세척하여 수정 배양액에서 수정시켰다.

3. 난포란의 배양 및 인공수정

본 실험에 사용된 난소는 경남 김해 도축장에서 획득하였다. 0.85% 생리식염수(37°C)에 100 µg/ml penicillin G와 100 µg/ml streptomycin sulfate를 첨가하여 적출된 난소를 침지하여 실험실로 운반하였다. 난소를 꺼내어 생리식염수를 제거한 후 난자와 난구세포 복합체(oocyte-cumulus complexes, OCCs)를 취하였다. 난자와 난구세포 복합체를 3~4회 세척한 후 마취액이 들어 있는 배양액에서 각각 10분, 60분, 48시간 동안 노출한 후 성숙용 배양액으로 옮겨 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 체외성숙을 유도하였다. 체외성숙이 유도된 난포란을 0.1% hyaluronidase를 이용하여 난구세포를 제거하고 제1극체 유무를 확인하였다.

인공수정에 사용할 정자는 경남 A.I. 센터(Artificial Insemination Center)에서 사육되는 종모돈의 정액을 수압법으로 채취한 후 희석액(VMD-Mulberry III, Germany)과 원정액을 1차 희석(1:1)하고 37°C를 유지하여 1시간 이내에 실험실로 운반하였다. 실험실로 운반된 정자는 다시 희석액과 2차 희석(1:1)하여 정자의 운동성을 확인하였다. 2차 희석한 정액 2 ml을 2.5배의 90% percoll의 상층부에 놓은 후 1,200 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 침전된 정자괴를 1 ml의 0.4% BSA를 첨가한 TCM-199 배양액으로 잘 혼합한 후 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 동안 swim-up을 시킨 후 상층의 정자를 취하였다. 10 mM caffeine sodium benzoate가 첨가된 TCM-199에서 15분 동안 수정능력 획득을 시킨 정자(1~5×10⁶ sperms/ml)를 성숙된 난자와 수정시켰다.

4. 수정 및 체외 발생률의 검사

수정시킨 난자는 39°C, 5% CO₂ 배양기에서 2-세포기로 분할되는 것을 관찰하여 수정률을 계산하였다. 대조군의 수정률과 처리군의 수정률을 비교하여 마취액이 난자의 성숙률, 수정률 및 배아 발생률에 영향을 미치는 것을 도표화하였다. 배아의 발생관찰은 24시간을 기준으로 하였으며 체외수정시 8-세포기까지 발생된 것을 관찰하였다. 배양액은 동일한 조성을 가진 TCM-199으로 매일 교환해 주었으며 모든 실험은 10회 반복실험을 하였다. 각 실험에 대한 통계는 t-test 방법을 사용하였다.

결 과

1. Propofol과 Thiopental sodium에 노출된 돼지난자의 성숙률과 수정률

Propofol 0.45 µg/ml, 2.3 µg/ml, 4.5 µg/ml의 농도에서 각각 10분, 60분간 노출시킨 돼지난자의 성숙률은 10분 노출된 난자의 경우, 0.45 µg/ml 이상의 농도에서 대조군에 비해 성숙률이 감소하는 경향이 있었으며 60분간 노출된 난자의 경우는 0.45 µg/ml 이상의 농도에서 농도가 높아질수록 성숙율이 증가함을 확인하였다(Fig. 1A). 수정률은 Propofol에 10분간 노출한 난자의 경우 0.45 µg/ml에서 대조군과 차이가 없었으나 2.3 µg/ml 농도에서부터 4.5 µg/ml의 고농도에 이르면서 수정률이 현저히 감소하였다. 60분 노출 후 대조군에 비해 모두 낮은 수정률이 관찰되었다(Fig. 1B).

Thiopental sodium 0.2 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml의 농도에서 10분간 노출된 난자는 0.2 µg/ml 이상의 농도에서 농도가 높

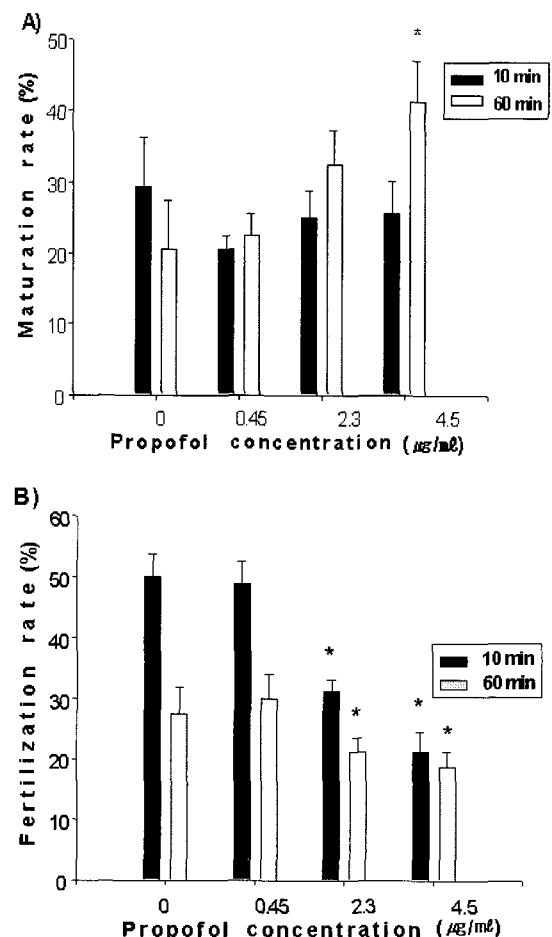


Fig. 1. Maturation(A) and fertilization(B) rates of porcine oocytes exposed for 10 and 60 min to the medium containing Propofol. Porcine oocytes were cultured for 48h after exposure to 0.45, 2.3, 4.5 µg/ml of Propofol and then fertilized. Relative levels of each groups were calculated as % of control value. Experiments were repeated 10 times and individual values are represented as the mean±S.D. (*, P<0.05).

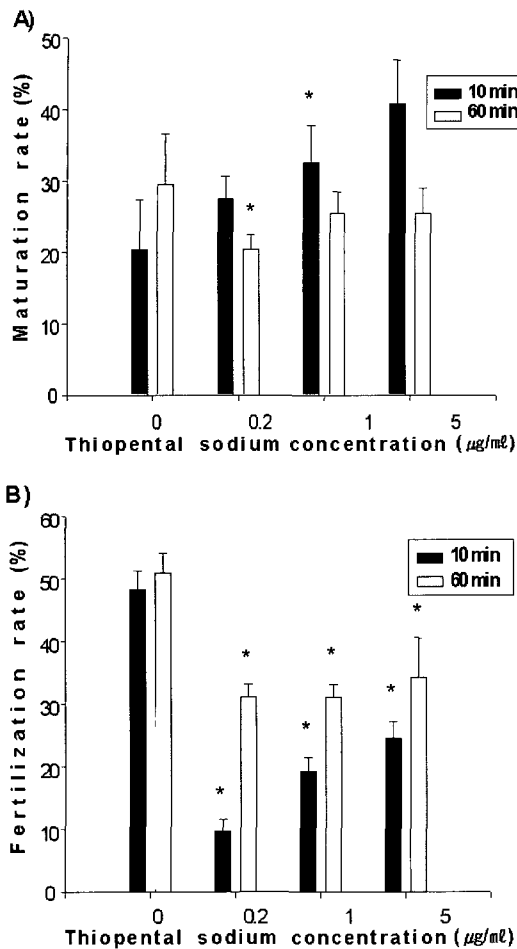


Fig. 2. Maturation(A) and fertilization(B) rates of porcine oocytes exposed for 10 and 60 min to the medium containing Thiopental sodium. Porcine oocytes were cultured for 48h after exposure to 0.2, 1, 5 µg/ml of Thiopental sodium and then fertilized. Relative levels of each groups were calculated as % of control value. Experiments were repeated 10 times and individual values are represented as the mean±S.D.(*, P<0.05).

아질수록 성숙률이 증가하였고, 60분간 노출된 난자에서는 대조군과 비슷한 성숙률을 보였다. Thiopental sodium 마취제에서 10분 노출된 난자의 성숙률이 60분 노출된 난자 성숙률보다 높았다(Fig. 2A). 수정률은 대조군보다 낮은 수정률을 보였지만 10분 노출한 난자의 경우 0.2 µg/ml 농도부터 1 µg/ml, 5 µg/ml의 고농도에 이르기까지 수정률이 약간씩 증가함이 관찰되었다. 60분 노출 후 수정시킨 난자는 10분 노출 시보다 높은 수정률을 보였다(Fig. 2B).

2. 마취액에 노출된 돼지난자의 처녀생식

48시간 노출 시 4.5 µg/ml Propofol의 고농도에서 대조군보다 낮은 성숙률을 보였고, 수정시키지 않은 난자에서 처녀생

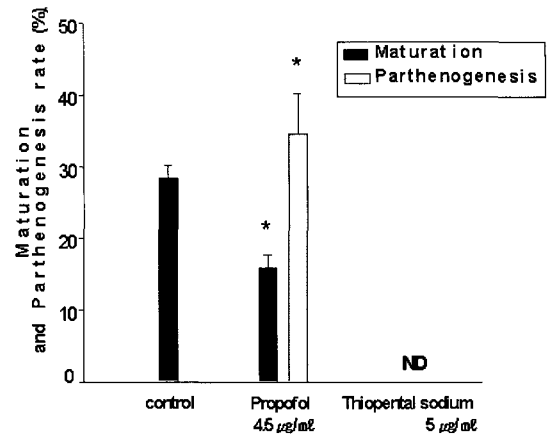


Fig. 3. Parthenogenetic activation of porcine oocytes exposed for 48 hours to medium containing Propofol(4.5 µg/ml) or Thiopental sodium(5 µg/ml). Porcine oocytes were cultured for 48h after exposure to 4.5 µg/ml of Propofol or 5 µg/ml of Thiopental sodium. Relative levels of each groups were calculated as % of control value. Experiments were repeated 10 times and individual values are represented as the mean±S.D.(*, P<0.05).

식이 관찰되었다. 5 µg/ml Thiopental sodium의 고농도에서 48시간 노출 후 수정시킨 난자에서는 수정이 관찰되지 않았다. 고농도에서 장시간 노출시킨 후 수정시킨 난자는 정상적으로 분할이 일어나지 않고 할구과편이 관찰되었으며 퇴화되었다(Fig. 3).

3. Propofol과 Thiopental sodium에 노출된 후 수정된 돼지난자의 발생률

돼지난자의 성숙률과 수정률을 관찰한 후, 24시간 간격으로 매일 새로운 배양액을 갈아주면서 발생률을 확인하였다. Propofol 0.45 µg/ml의 농도에서 2-세포기의 배아는 대조군과 비슷한 발생률을 보였고 60분 노출이 10분 노출보다 약간 감소됨을 관찰하였다. 그러나 0.45 µg/ml 농도에서 3-세포기의 발생률은 대조군보다 40% 감소하였다. 농도가 높은 4.5 µg/ml 농도에서 2-세포기의 발생률은 대조군보다 현저히 감소하였으며 3-세포기 이상은 관찰되지 않았다(Fig. 4).

10분 노출 후 수정시킨 배아 발생은 Thiopental sodium 5 µg/ml의 농도에서 2-세포기의 배아는 대조군과 비슷한 발생률을 보였고 0.2 µg/ml에서는 30% 감소하였으며 3-세포기 이상은 관찰되지 않았다. 60분 노출 후 수정시킨 배아 발생에서도 10분 노출과 같은 양상을 보였으나 60분 노출이 10분 노출보다 Thiopental sodium 5 µg/ml에서 10% 이상 낮은 발생률이 관찰되었다. 발생률은 대체적으로 대조군보다 낮게 나타났고 비슷한 양상이라도 0.2 µg/ml에서는 3-세포기 이상 발

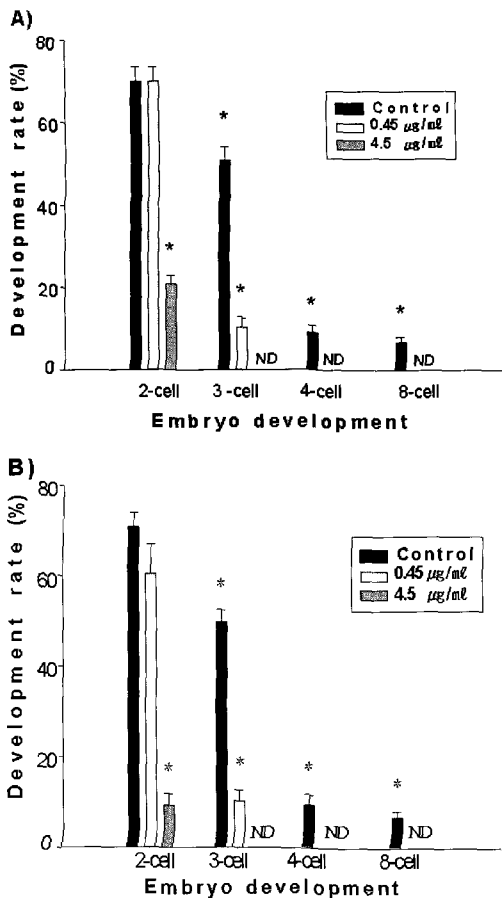


Fig. 4. Development rates of porcine embryos exposed for 10 min (A) and 60 min(B) to the medium containing 0, 0.45 µg/ml, 4.5 µg/ml of Propofol. Porcine embryos were cultured for up to 3 days after exposing to 0.45 µg/ml and 4.5 µg/ml of Propofol. Relative levels of each groups were calculated as % of control value. Experiments were repeated 10 times and individual values are represented as the mean ± S.D. (*, P < 0.05).

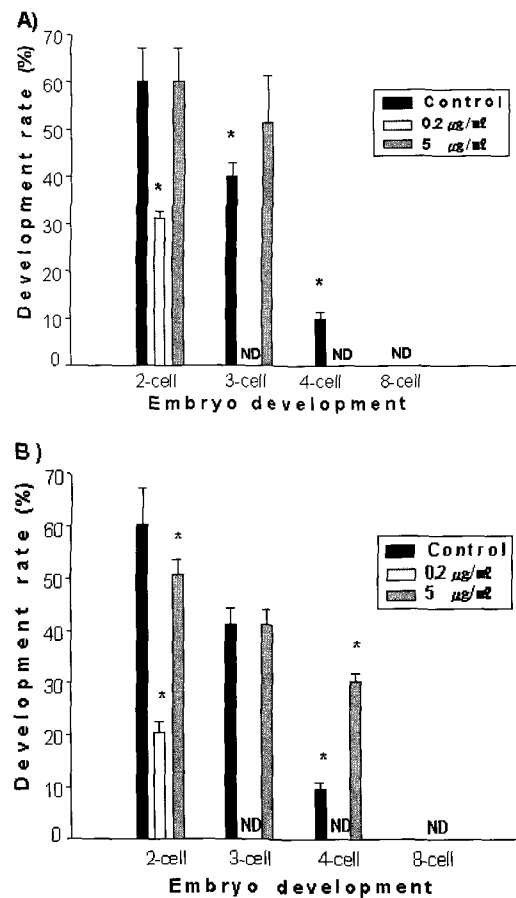


Fig. 5. Development rates of porcine embryos exposed for 10 min(A) and 60 min(B) to the medium containing 0, 0.2 µg/ml, 5 µg/ml of Thiopental sodium. Porcine embryos were cultured for up to 3 days after exposing to 0.2 µg/ml and 5 µg/ml of Thiopental sodium. Relative levels of each groups were calculated as % of control value. Experiments were repeated 10 times and individual values are represented as the mean ± S.D. (*, P < 0.05).

생이 진행되지 않음이 확인되었다.

고찰

체외수정의 높은 성공률을 얻기 위해서는 난자의 성숙과 상태, 배양조건 및 정자의 운동성과 수에 있어서 모두 최적의 조건이 되어야 한다(Telfer, 1998; Coy et al., 1999; Funahashi & Day, 1997; Iwasaki et al., 1999). 특히 배양조건을 포함한 외부환경의 자극도 수정률에 영향을 끼치는데 여러 가지 화학물질이나(Funahashi et al., 1994; Abeydeera et al., 1998a) 성장 요소(Abeydeera et al., 1998b), 단백질(Prather et al., 1991)등 인위적인 처리(Hebbar et al., 1996)를 이용하여 난자의 성숙률과 수정률을 연구한 바 있다. 특히 일반적으로

사용되는 Propofol과 Thiopental sodium의 임상적인 효과에 대해 이미 연구된 바 있으며(Yamakage et al., 1995; Mozrzymas et al., 1994; Petros et al., 1993; Kaufman et al., 1997), 근래에는 모체로부터 영향을 받을 수 있는 미성숙 난자와 수정 및 배아 발생에 이르기까지 연구가 진행 중에 있다. 그러나 지금까지는 돼지의 배양조건이 까다롭고 낮은 성숙률과 수정률 때문에 마취제를 이용한 난자의 성숙과 수정 및 발생이 연구된 바 없다. 따라서 돼지의 정자와 난자를 이용한 체외수정에서 다양한 농도와 시간의 마취액에 노출된 난자의 성숙률, 수정률, 발생률을 연구하기 위해 실험을 하였다.

돼지의 난소에서 난자를 채취한 후 마취제에 일정시간 노출시켜 48시간 성숙시킨 후 대조군과 성숙률을 비교하였다. Propofol에 노출된 난자는 대조군과 비교하여 2.3 µg/ml 이상

의 농도와 60분 이상의 시간에서 성숙률이 현저히 증가하는 것이 보였다. 이는 Propofol이 수정되지 않은 난자의 처녀생식을 유도하는 작용을 하기 때문으로 추측되어진다. 사람과 생쥐를 포함한 대부분의 포유류 난자는 배란 후 제 2감수분열 증기에서 정지되며 일반적인 경우 정핵융합 후에 감수분열이 일어나며 제 2극체가 형성된다. 그러나 정자 없이도 생쥐 난자는 활성화(activation) 된다고 보고되었다(Kaufman et al., 1997). 위의 수정률 증가의 결과는 생쥐에서만 아니라 돼지에서도 확인이 되었으며 고농도의 Propofol에서 장시간 노출되었을 때 처녀생식 유발물질로 작용함을 알 수 있었다. 그러나 성숙률이 증가한 난자를 체외수정시킨 후 수정률을 확인한 결과 대조군과 비교했을 때 0.45 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 10분 이내로 노출시킨 난자의 수정률은 차이가 없었으나 2.3 $\mu\text{g/ml}$ 농도 이상에서는 노출시간이 길어질수록 수정률이 20~30%가 감소됨을 확인하였다. 이러한 결과는 Propofol이 고농도, 장시간에서 일시적인 난자의 성숙을 유도하지만 수정에 까지 이르게는 하지 못하며 수정률을 높이기 위해서는 0.45 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 농도에서 10분 이내로 노출되어야 함을 말해준다. 또한 수정 후에 배아 발생률은 Propofol 0.45 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군과 많은 차이를 보이지 않았지만 대조군이 4세포기~8세포기까지 발생하는데 비해서 2세포기~3세포기까지 발생이 되지 않았다. 4.5 $\mu\text{g/ml}$ 고농도에서는 노출시간에 관계없이 약 50%~60% 감소한 배아 발생을 확인하였다.

Thiopental sodium에 노출된 난자는 대조군과 비교하여 60분 노출 시 많은 차이를 보이지 않았으나, 단시간 10분 노출 시 농도가 높아질수록 높은 성숙률을 보였다. 이러한 결과는 모든 마취액의 고농도, 장시간에서 독성효과를 나타내는 것이 아니라 Thiopental sodium과 같이 저농도, 단시간에서 최대의 toxic effect를 가질 수 있음을 시사한다. 그리고 돼지 정자와 체외수정시킨 후 관찰한 수정률에서도 전체적으로 대조군과 비교 시 감소하였으며 10분 노출에서 수정률도 낮았다. 그러므로 Thiopental sodium의 급성내성의 약리적 특성을 파악하여 사용하는 것이 바람직할 것으로 추측된다. 배아 발생에서도 같은 양상이었으며 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 노출시간과 관계없이 30~40% 감소를 확인하였다.

위의 실험결과로 보아 체외수정 시술 시 사용되는 각 마취제의 특성을 파악하여 최대의 toxic effect를 피하여 난자의 성숙률과 수정률, 배아 발생률을 향상시키는데 더 많은 연구가 필요할 것으로 보여진다.

인용문헌

- Abeydeera LR, Wang WH, Prather RS (1998a) Maturation *in vitro* of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. Biol Reprod 58:1316-1320.
- Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Rieke A, Prather RS, Day BN (1998b) Presence of epidermal growth factor during *in vitro* maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after *in vitro* fertilization. Mol Reprod Dev 51:395-401.
- Cecile J, Frank C, Frederic C, Andre VS (1997) The effect of propofol on parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization and early development of mouse oocytes. Fertil Steril 67:769-774.
- Christiaens F, Janssenswillen C, Verborgh C, Moerman I, Devroey P, Van Steirteghem A, Camu F (1999) Propofol concentrations in follicular fluid during general anaesthesia for transvaginal oocyte retrieval. Hum Reprod 14:345-348.
- Coetsier T, Dhont M, De Sutter P, Merchiers E, Versichelen L, Rosseel MT (1992) Propofol anesthesia for ultrasound guided oocyte retrieval : accumulation of the anaesthetic agent in follicular fluid. Hum Reprod 7:1422-1424.
- Coy P, Ruiz S, Romar R, Campos I, Gadea J (1999) Maturation, fertilization and complete development of porcine oocytes matured under different systems. Theriogenology 51:799-812.
- Funahashi H, Cantley TC, Stumpf TT, Terlouw SL, Day BN (1994) *In vitro* development of *in vitro*-matured porcine oocytes following chemical activation or *in vitro* fertilization. Biol Reprod 50:1072-1077.
- Funahashi H, Day BN (1997) Advances in *in vitro* production of pig embryos. J Reprod Fertil Suppl 52:271-283.
- Hayes MF, Sacco AG, Savoy-Moore RT, Magyar DM, Endler GC, Moghissi KS (1987) Effect of general anesthesia on fertilization and cleavage of human oocytes *in vitro*. Fertil Steril 48:975-981.
- Hebbar L, Dorman BH, Roy RC, Spinale FG (1996) The direct effects of propofol on myocyte contractile function after hypothermic cardioplegic arrest. Anesth Analg 83:949-957.
- Huang HW, Huang FJ, Kung FT, Tsai MY, Lin H, Chang SY, Hsu YH, Chang HW (2000) Effects of induction anesthetic agents on outcome of assisted reproductive technology: a comparison of propofol and thiopental sodium. Changeng

- Yi Xue Za Zhi. 23:513-519.
- Iwasaki T, Kimura E, Totsukawa K (1999) Studies on a chemically defined medium for *in vitro* culture of *in vitro* matured and fertilized porcine oocytes. *Theriogenology* 51:709-720.
- Kaufman MH, Barton SC, Surani MAH (1977) Normal postimplantation development of mouse parthenogenetic embryos to the forelimb bud stage. *Nature* 265:53-54.
- Kazama T, Ikeda K, Morita K, Kikura M, Ikeda T, Kurita T, Sato S (2000) Investigation of effective anesthesia induction dose using a wide range of infusion rates with and diluted propofol. *Anesthesiology* 92:1017-1028.
- Kazama T, Ikeda K, Morita K, Ikeda T, Kikura M, Sato S (2001) Relation between initial blood distribution volume and propofol induction dose requirement. *Anesthesiology* 94:205-210.
- Lehtinen AM, Laatikainen T, Koskimies AI, Hovorka J (1987) Modifying effects of epidural analgesia or general anesthesia on the stress hormone response to laparoscopy for *in vitro* fertilization. *J In Vitro Fertil Embryo Transf* 4:23-29.
- Lerche P, Nolan AM, Reid J (2000) Comparative study of propofol or propofol and ketamine for the induction of anaesthesia in dogs. *Vet Rec* 146:571-574.
- Mozzrymas JW, Visintin M, Vittur F, Ruzzier F (1994) Potassium channels of pig articular chondrocytes are blocked by propofol. *Biochem Biophys Res Commun* 202:31-37.
- Naito Y, Tamai S, Fukata J, Seo N, Nakai Y, Imura H, Mori K (1989) Comparison of endocrinological stress response associated with transvaginal ultrasound-guided oocyte pick-up under anaesthesia and neuroleptanaesthesia. *Can J Anaesth* 36:633-636.
- Noel GL, Suh HK, Stone JG, Frantz AG (1972) Human prolactin and growth hormone release during surgery and other conditions of stress. *J Clin Endocrinol Metab* 35:840-851.
- Petros AJ, Bogle RG, Pearson JD (1993) Propofol stimulates nitric oxide release from cultured porcine aortic endothelial cell. *Br J Pharmacol* 109:6-7.
- Prather RS, Eichen PA, Nicks DK, Peters MS (1991) Artificial activation of porcine oocytes matured *in vitro*. *Mol Reprod Dev* 28:405-409.
- Sakamoto T, Kawaguchi M, Inoue S, Furuya H (2001) Suppressive effect of nitrous oxide on motor evoked potentials can be reversed by train stimulation in rabbits under ketamine/fentanyl anaesthesia, but not with additional propofol. *Br J Anaesth* 86:395-402.
- Scott JC, Ponganis KV, Stanski DR (1985) EEG quantitation of narcotic effect : the comparative pharmacodynamics of fentanyl and alfentanil. *Anesthesiology* 62:234-241.
- Sherry E (1992) Admixture of propofol and alfentanil. Use for intravenous sedation and analgesia during transvaginal oocyte retrieval. *Anaesthesia* 47:477-479.
- Sopelak VM, Whitworth NS, Norman PF, Cowan BD (1989) Bromocriptine inhibition of anesthesia-induced hyperprolactinemia: effect on serum and follicular fluid hormones, oocyte fertilization and embryo cleavage rates during *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 52:627-632.
- Sterzik K, Nitsch CD, Korda P, Sasse V, Rosenbusch B, Marx T, Traub E (1994) The effect of different anesthetic procedures on hormone levels in women. Studies during an *in vitro* fertilization-embryo transfer (IVF-ET) program. *Anaesthesist* 43:738-742.
- Szalay S, Kemetre P, Feichtinger W, Beck A, Janisch H, Neumark J (1982) The behaviour of LH, FSH, PRI, T, P, estradiol and cortisol under different kinds of general anesthetics during laparoscopic oocyte recovery for *in vitro* fertilization. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 14:37-48.
- Telfer EE (1998) *In vitro* models for oocyte development. *Theriogenology* 49:451-460.
- Yamakage M, Hirshman CA, Croxton TL (1995) Inhibitory effects of thiopental, ketamine, and propofol on voltage-dependent Ca²⁺ channels in porcine tracheal smooth muscle cells. *Anesthesiology* 83:1274-1282.