국문제목 : 인간 체외수정 및 배아이식에 있어서 과배란 유도 과정에 사용한 GnRH agonist가 배란 전 난포내 과립 세포의 세포자연사에 미치는 영향

국문저자 : 양현원, 권혁찬, 황경주, 박종민[1], 오기석, 윤용달[2]

국문소속 : 아주대학교 의과대학 산부인과, 피엘 산부인과[1], 한양대학교 생물학과[2]

영문제목 : Effects of GnRH agonist used for ovarian hyperstimulation in human IVF-ET on the apoptosis of preovulatory follicular cells

영문저자 : Hyun Won Yang, Hyuck Chan Kwon, Kyung Joo Hwang, Jong Min Park[1], Kie Suk Oh, Yong Dal Yoon[2]

영문소속 : Department of Obstetrics and Gynecology, Ajou University School of Medicine, PL Infertility Clinic[1], Department of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University[2]

교신저자 : 윤용달
서울특별시 성동구 행당동 한양대학교 자연과학대학 생물학과 (우) 133-791,
전화: 02-290-0955, 팩스: 02-299-3495, e-mail: ydyoon@email.hanyang.ac.kr

연구비 지원 : 본 연구는 1997년도 교육부 기초과학육성연구비(BSRI-97-4437)의 일부로 이루어졌슴

Abstract

There have been many reports to date regarding the role of GnRH as a local regulatory factor of ovarian function as studies of human and rat ovaries revealed GnRH and its receptor. In recent studies it has been shown that GnRH directly causes apoptosis in the granulosa cells of the rat ovary, and such results leads to the suggestion that the use of GnRH agonist for more stable long term ovarian hyperstimulation in human IVF-ET programs causes granulosa cell apoptosis which may lead to follicular atresia. Therefore this study attempts to determine if granulosa-luteal cell apoptosis occurs in patients during IVF-ET programs in which GnRH agonist is employed for ovarian hyperstimulation. The quality of oocyte-cumulus complexes obtained during ovum pickup procedures were assessed morphologically and then the fertilization rate and developmental rate was determined. Apoptotic cells among the granulosa-luteal cells obtained during the same procedure were observed after staining with Hematoxylin-eosin. The fragmentation degree of DNA extracted from granulosa-luteal cells was determined and comparatively analyzed. There was no difference in the average age of the patients, the number of oocytes retrieved, and fertilization and developmental rates between the FSH/hMG group and GnRH-long group. There was also no difference in the apoptosis rate and pyknosis rate in the granulosa-luteal cells between the two groups. However, when the oocyte-cumulus complexes were morphoogically divided into the healthy group and atretic group without regard for the method of hyperstimulation, the results showed that the number of oocytes obtained averaged 11.09 $\pm$ 8.75 and 10.33 $\pm$ 4.53 per cycle, respectively, showing no significant difference, but the fertilization rate (77.05%, 56.99%, respectively, $p<0.01$) and developmental rate (65.96%, 41.51%, respectively, $p<0.01$) was significantly increased in the healthy group when compared to the atretic group. The degree of apoptosis in the granulosa-luteal cells showed that in the healthy group it was 2.25% which was not significantly different from the atretic group (2.77%), but the pyknosis rate in the atretic group (27.81%) was significantly higher compared to the healthy group (11.35%, $p<0.01$). The quantity of DNA fragmentation in the FSH/hMG group was 32.22%, while in the GnRH-long group it was 34.27%, showing no significant difference. On the other hand the degree of DNA fragmentation was 39.05% and 11.83% in the healthy group and atretic group, respectively, showing significantly higher increase in the atretic group ($p<0.01$).

The above results suggest that death of granulosa-luteal cells according to the state of the oocyte-cumulus complex is more related to pyknosis rather than apoptosis. Also, the GnRH agonist used in ovarian hyperstimulation does not seem to directly affect the apoptosis of retrieved oocytes and granulosa-luteal cells, and which is thought to be due to the suppression of the apoptogenic effect of GnRH agonist as a result of the high doses of FSH administered.

Key words : GnRH, Apoptosis, Granulosa-luteal cell, Atresia, IVF-ET

서 론

1978년 영국에서 Steptoe와 Edwards에 의해 체외 수정 및 배아 이식(In Vitro Fertilization and Embryo Transfer; IVF-ET) 시술에 의한 세계 최초의 시험관 아기가 출생한 이래 불임을 치료하기 위한 보조 생식술(Assisted Reproductive Technologies; ART)은 빠른 속도로 발전되어 왔다. 이러한 보조 생식술에 있어서 과배란 유도는 필수적으로 시행해야 하는 과정으로 성숙된 양질의 난자를 많이 얻는데 그 목적이 있다. 과배란 유도 방법은 환자에게 투여하는 human menopausal gonadotropin (hMG)와 follicle-stimulating hormone (FSH) 또는 gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa)의 양과 기간에 따라 여러 방법으로 구분되어지며(Trounson and Gardner, 1993), 90년대 이후에는 대부분 GnRHa를 병용하는 방법을 널리 사용하고 있다 (Maclachlan et al., 1989; Martin, 1989; Herman et al., 1990; Kim SH et al., 1991; Smitz et al., 1992). 이러한 GnRHa 사용은 과배란 유도 과정 중 일어날 수 있는 premature luteinizing hormone (LH) surge를 막을 수 있어 채취된 난자의 수를 증가시키고(Neveu et al., 1987; Serafini et al., 1988; Palermo et al., 1988), 따라서 더 많은 배아를 이식할 수 있는 기회를 제공함으로써 임신율을 향상시켰다(Meldrum, 1989). 그러나 다량의 GnRHa를 지속적이고 반복적으로 사용할 경우 난소에 대한 antigonadal 효과를 보일 수 있으며(Hsueh and Jones, 1981), 또한 난소에 직접적으로 작용하여 난소내 과립 세포의 생리적 변화와 난자의 성장과 배란에 영향을 미칠 수 있는 것으로 알려져 왔다(Hillensjo and Lemaire, 1980; Corbin and Bex, 1981; Clark 1982; Naor and Yavin, 1982; Dekel et al., 1983, 1985; Ma and Leung, 1985; Pellicer et al., 1992).

특히 GnRH 수용체가 동물 및 인간의 난소내에서 발견되면서 난소에 대한 GnRH의 직접적인 작용에 대하여 많은 연구가 이루어지고 있으며(Hsueh and Jones, 1981; Clayton and Catt, 1981; Leung et al., 1989; Peng et al., 1994; Paik et al., 1994; Choi et al., 1994), 최근 연구 결과에 의하면 뇌하수체가 절제된 미성숙 흰쥐에 GnRH를 투여한 결과 난포 세포의 세포자연사를 직접 유발시키며, FSH를 함께 투여하면 억제되는 것으로 보고하고 있다(Billig et al., 1994; 1996). 이러한 실험 결과들은 인간 체외 수정 및 배아 이식 시술에 있어서 과배란 유도시에 사용되는 GnRHa가 난소에 직접적인 영향을 미칠 수 있다는 가능성을 시사하고 있으며, 특히 GnRHa와 FSH의 병용이 인간 난포 세포의 세포자연사 및 난포의 발달에 어떤 영향을 미칠 수 있는지 알려진 바가 없다.

따라서 본 연구는 과배란 유도를 위하여 사용한 GnRHa 여부에 따라 실험군을 구분한 후 각 실험군에서 얻어진 난자의 질과 수정률 및 발달률을 조사하고, 과립-황체화 세포의 세포자연사 정도를 비교함으로써 과배란 유도시 투여한 GnRHa가 채취된 난자의 질과 과립-황체화 세포의 세포자연사에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 과립-황체화 세포의 획득

과립-황체화 세포는 체외 수정 및 배아 이식 시술을 시행하는 환자 20명으로부터 난자를 채취하는 과정에서 얻어 사용하였다. 획득된 세포들은 과배란 유도 방법에 따라 FSH/hMG 투여군 (FSH/hMG 군)과 GnRHa 장기 투여군 (GnRH-long 군)으로 나누어 실험을 진행하였다. 먼저 FSH/hMG 군은 FSH (Metrodin, Serono) 와 hMG (IVF-M, LG Chem. Co.)만을 투여하는 방법으로 생리 3 일과 4 일째에 FSH 150 IU와 hMG 150 IU를 근육 주사하고 5일째부터는 hMG만을 투여한 후 얻은 과립-황체화 세포들을 이용하였다. GnRHa-long 군은 다량의 GnRHa (Buserelin acetate; Suprefact, Hoechest)를 장기간 투여하여 뇌하수체를 탈감각시킨 후 실험군 1과 동일한 방법으로 FSH/hMG를 투여하여 얻은 과립-황체화 세포들을 이용하였다.

난포의 성장은 초음파와 호르몬 측정으로 확인하였으며, 난포의 크기가 18 mm 이상이거나, 질식 초음파로 확인된 난포 한 개 당 estradiol (E_2)의 수준이 300 - 400 pg/ml 이상인 경우 hCG (Pergonal, Serono) 10,000 IU를 주사하여 배란을 유도하였다. 주사 후 35 - 36 시간에 정맥마취를 시행한 후 질식 초음파를 이용하여 질벽을 통해 난소를 확인하고 17 G 난자 채취용 바늘로 난포액을 추출하였다. 각각의 난포에서 추출된 난포액은 배양 접시에 옮기고 해부 현미경하에서 난자를 수집하였다. 난자 상태를 판정한 후 배양액에 옮겨 배양하면서 수정률과 배아 이식 전까지 발달률을 조사하였다.

난자 획득 후 난포액과 함께 나온 과립-황체화 세포들을 채취하여 배양액에 옮긴 후 혈구 세포를 분리하기 위해 과립-황체화 세포가 들어있는 배양액 1ml을 40% percoll 3ml 위에 조심스럽게 올려놓고 300 x*g*로 20 분간 원심분리를 하였다. 원심분리 후 과립-황체화 세포들은 중간에 층을 형성하게 되며 혈구 세포들은 바닥에 가라앉는다. 중간 층으로부터 과립-황체화 세포를 조심스럽게 획득하여 phosphate buffered saline (PBS) 용액으로 3번 세척하였다. 그런 다음 과립-황체화 세포는 DNA 추출을 위한 시료로써 -20℃에서 보관하고, 일부는 조직학적 관찰을 위하여 4% neutral buffered formalin (NBF, pH 7.4) 용액에 담가 4℃에서 보관하였다.

2. Hematoxylin-eosin 염색법에 의한 세포자연사 판정

획득된 과립-황체화 세포는 형태학적 관찰을 위하여 4% NBF에서 고정하고 alcohol series로 탈수시켰으며, xylene으로 투명화시킨 후 paraffin (Paraplast plus)을 침투시켜 포매하였다. 준비된 paraffin block은 박편절단기 (microtome, Lipshaw)를 사용하여 5 - 6 μm로 절편을 만들었다. 그런 다음 xylene으로 paraffin을 제거하고 alcohol에 담근 후 증류수로 세척하였다. Paraffin이 제거된 조직은 핵과 세포질을 각각 hematoxylin-eosin (H-E)으로 대조 염색하였다. 마지막으로 alcohol 과정을 거쳐 xylene에 옮긴 후 canadian balsam (Wako Pure Chemical Co.)으로 봉입하였다. H-E로 염색된 과립-황체화 세포들을 광학현미경 (Axioskop; Zeiss, Germany)하에서 검경하여 핵 응축 (pyknotic nuclei) 또는 apoptotic body로 보이는 세포들을 관찰하였다.

3. DNA 추출과 DNA 분절화 분석에 의한 세포자연사 판정

난포액으로부터 획득된 과립-황체화 세포에 0.2 ml 마쇄 완충액을 첨가하고 26 G 주사기를 사용하여 잘 섞어 주었다. 시료에 12.5 μl의 10% SDS를 넣고 65℃ 에서 30분간 방치하였다. 여기에 35 μl의 8M potassium acetate를 넣고 시료를 잘 섞은 후 60분간 단백질이 가라앉도록 얼음에 방치한 후 시료를 4℃, 5000 x*g*에서 10분간 원심분리하였다. 상층액은 1.5ml 미량원심분리 시험관으로 옮기고 동량의 phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1, V:V:V)를 첨가하여 DNA를 추출하였으며, 다시 동량의 chloroform: isoamyl alcohol (24:1, V:V)로 재추출하였다. 상층액을 1.5 ml 미량원심분리 시험관에 옮기고, 0℃에서 보관한 2.5배 부피의 100% ethanol을 첨가, -70℃

초저온 냉동고에서 1 시간 이상 침전시켰다. 이들 시료를 4°C에서 14,000 x*g*로 30분간 원심분리하여 DNA를 추출하고 침전물은 50μl의 1X TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)에 용해시킨 후 1μl의 DNase-free RNase (500μg/ml; Boehringer-Mannheim, IN)을 첨가하고 60분동안 37°C에서 방치하였다. 시료의 DNA를 동량의 phenol: chloroform: isoamyl alcohol로 추출 후, 동량의 chloroform: isoamyl alcohol로 재 추출하였다. 상층액을 모아서 0.1배 부피의 3M sodium acetate와 0°C 에 보관한 2.5배의 100% ethanol로 DNA를 침전시키고 -70°C 초저온 냉동고에서 적어도 60분 이상 방치시켰다. 이것을 4°C에서 14,000 x*g*로 30분간 원심분리하고, 0°C에 보관된 0.2 ml의 80% ethanol로 세척하고 Speed-Vac Concentrator (Savant Instruments, NY)로 15분간 진공하에서 건조시켰다. 압축 결정물을 25 μl의 증류수에 녹이고, 260 nm의 흡광도에서 DNA 양을 측정한 다음 -20°C에 보관하였다. 이렇게 추출된 DNA를 lane당 5μg의 농도로 1.5% agarose gel에 loading하고, running buffer로는 TBE 용액을 사용하였으며, 50V에서 3시간동안 전기영동을 시행한 후 ethidium bromide로 염색하여 자외선 transilluminator로 확인하였다. 전기영동한 gel의 polaroid 사진을 scanner로 scanning한 후에 Cream program (Kem-En-Tec Software System, Denmark)을 이용하여 분절화 정도를 측정하고 그 결과를 arbitrary unit로 환산하여 비교하였다.

4. 통계학적 분석

통계학적 유의성 검정은 Chi-square test와 Mann-Whitney test 방법을 사용하였으며 p 값이 0.05보다 작은 경우를 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 난자 및 난자-난구 복합체의 특성

FSH/hMG 군와 GnRH-long 군간에 환자의 평균 나이는 33.90 ± 3.25와 35.00 ± 3.23세로 차이가 없었으며, 채취된 난자의 수, 수정률 및 발달률도 과배란 유도법에 따른 차이는 없었다. 획득된 난자-난구 복합체의 상태를 판정하기 위하여 난자내 과립화 (granulation) 정도와 색깔의 어두운 (darkness) 정도가 심할수록 '+' 에서 '+++' 까지 구분하였으며, 또한 난자와 복합체를 이룬 난구 세포도 색깔의 어두운 (darkness) 정도와 퍼짐 (dispersion) 정도에 따라 좋지 않을수록 '+' 에서 '+++' 까지 구분하였다. 획득된 난자-난구 복합체의 전체적인 판정은 각각의 판정에서 '++' 이상이 3 개 이상일 경우 "Atretic"으로 하였고, 미만일 경우에 "Healthy"로 규정하였다. 위와 같은 판정 기준으로 난자의 상태를 평가한 결과 난자내 과립화 정도는 FSH/hMG 군에서 약간 증가하였고, 난자의 어두운 정도는 GnRH-long 군에서 약간 높았으나 전체적으로 과배란 유도방법에 따른 "Healthy"와 "Atretic" 판정 빈도는 차이가 없었다(Table 1). 과배란 유도법에 상관없이 채취된 난자-난구세포 복합체의 상태로 실험군을 "Healthy"군과 "Atretic"군으로 나누어 분석한 결과, "Healthy"군과 "Atretic"군간에 평균 나이는 35.44 ± 3.17와 33.64 ± 3.14세로 차이가 없었으며, 채취된 난자의 수도 각각 주기당 평균 11.09 ± 8.75와 10.33 ± 4.53 개로 차이가 없었다. 그러나 수정률에 있어서는 "Healthy"군에서 77.05%로 "Atretic"군의 56.99%보다 유의하게 높았고($p<0.01$), 양질 배아로 발달한 비율도 "Healthy"군에서 65.96%로 "Atretic"군의 41.51%보다 유의하게 높았다($p<0.01$).

2. H-E 염색에 의한 난자 및 과립-황체화 세포의 세포자연사 관찰

난자 채취 후 난자-난구 복합체의 상태 즉, 난자 세포질의 투명도 및 상태, 난구세포의 퍼짐 정도와 색깔 등과 비교하여 획득한 과립-황체화 세포를 관찰한 결과, 채취된 난자의 질이 안 좋은 군의 과립-황체화 세포들에서 응축된 핵(pyknotic nuclei)을 많이 관찰할 수 있었다. 응축된 핵의 형태는 세포자연사에 의한 핵(apoptotic body)의 양상과는 다르게 절편화 없이 작은 원형으로 응축되어 있었으며, 다른 건강한 세포들과 비교해 볼 때 상대적으로 작고 진하게 염색되어 보였다(Fig. 1).

채취된 과립-황체화 세포에서 세포자연사가 일어난 상대적인 비율은 FSH/hMG 군에서 2.81로 GnRH-long 군의 2.16과 차이를 보이지 않았으며, 응축된 핵의 비율에서도 두 실험군간에 각각 15.53과 21.98로 차이가 없었다(Table 2). 그러나 "Healthy"군과 "Atretic"군으로 나누어 분석한 결과 세포자연사 비율은 "Healthy"군에서 2.25로 "Atretic"군 2.77과 차이를 보이지 않았으나, 응축된 핵의 비율은 "Atretic"군에서 27.81로 "Healthy"군의 11.35에 비하여 유의하게 증가한 것을 알 수 있었다($p<0.01$)(Table 3).

3. DNA 분절화 양상

각각의 실험군 과립-황체화 세포에서 추출한 DNA를 1.5% agarose gel상에서 전기영동을 시행하여 Et-Br로 염색한 결과 300 - 500 bp에서 분절화된 DNA가 다량 검출되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2; A, B). 그러나 과배란 유도법에 따른 분절화된 DNA 양은 FSH/hMG 군에서 평균 29.55%로 GnRH-long 군의 23.56%와 차이가 없었다(Fig. 2; C). 반면, 채취한 난자-난구 복합체의 질에 따라 DNA 분절화 양은 "Atretic"군에서 37.05%로 "Healthy"군의 17.98%보다 유의하게 증가된 양상을 보였다($p<0.01$)(Fig. 2; D).

논 의

인간 체외 수정 및 배아 이식술에 있어서 과배란 유도시 사용한 GnRHa가 난소에 직접적인 양향을 미치는지 알아보고자 과배란 유도법에 따라 실험군을 구분한 후 각 실험군에서 얻어진 난자의 질과 수정률 및 발달률을 조사하고, 과립-황체화 세포의 세포자연사 정도를 알아보았다. 먼저 채취된 난자의 수에 있어서 실험군 모두에서 주기당 평균 10 -12개로 차이가 없었다. 이러한 결과는 모든 실험군에서 다량의 FSH를 투여하여 과배란을 유도함으로써 많은 수의 난포가 선택되어 배란된 것으로, GnRHa를 사용한 군에서도 마찬가지로 많은 수에 난자가 회수된 것은 GnRHa가 난포의 선택과 성장에 대한 FSH의 작용을 직접적으로 억제시키지는 못하는 것으로 사료된다. 이미 오래 전부터 GnRHa 사용에 따른 임상적인 결과들이 보고되고 있으며, FSH/hMG만으로 과배란을 유도하는 방법과 비교해 볼 때 난자 회수률과 수정률, 발달률 및 임신율에 있어서 차이가 없는 것으로 보고하고 있다(Maclachlan et al., 1989; Martin, 1989; Herman et al., 1990, Kim SH, et al., 1991; Smitz et al., 1992). 또한 많은 연구자들이 GnRHa가 난소에 직접적으로 작용하여 난자의 성장과 성숙에 영향을 미칠 수 있는 것으로 보고하고 있으나(Hillensjo and Lemaire, 1980; Corbin and Bex, 1981; Clark 1982; Naor and Yavin, 1982; Dekel et al., 1983, 1985; Ma and Leung, 1985; Pellicer et al., 1992), 본 실험 결과 GnRHa의 사용 여부와 관계없이 atretic 군으로 판정되는 비율은 비슷하였으며, 또한 난자의 질을 간접적을 평가할 수 있는 수정률 및 발달률을 조사한 결과에 있어서도 GnRHa 사용에 따른 차이는 없었다. 그러나 채취된 난자-난구세포 복합체의 상태로 실험군을 나누어 분석한 결과 healthy군에서 수정률과 발달률이 유의하게 증가하는 것을 알 수 있었으며, 이러한 결과에서 GnRHa는 채취된 난자의 수뿐만 아니라 질에도 직접적인 영향을 미치지 못하는 것으로 생각된다. 이것 역시 다량으로 투여된 FSH에 의하여 GnRHa의 난소에 대한 직접적인 효과가 억제될 수 있다는 것을 보여준다고 할 수 있겠다.

최근 체외 수정 및 배아 이식 시술 과정에서 난포로부터 획득한 과립-황체화 세포에서 세포자연사가 일어나는 것이 확인되었으며(Heimler et al., 1995; Seifer et al., 1996; Nakahara et al., 1997a,b), 이러한 난포내 과립세포 또는 황체화 세포의 세포자연사는 난포의 폐쇄 또는 황체 퇴화와 연관이 있는 것으로 보고되고 있다(Gilbert et al., 1983; Hirshfield 1989; Zeleznik et al., 1989). Nakahara 등은 과립-황체화 세포의 핵만을 형광으로 염색한 후에 핵 응집체(apoptotic body) 형태를 보이는 것만을 계수하여 세포자연사가 일어나는 비율을 2% 미만으로 보고하였으며, Heimler 등은 TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase and nick end lebeling) 방법을 이용하여 과립-황체화 세포를 염색한 결과 3-12% 정도의 세포자연사 비율을 보고하였다. 본 실험에서도 H-E 염색 결과 과립-황체화 세포의 세포자연사 비율이 모든 실험군에서 2-4% 정도로 극히 적게 일어난다는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 H-E 염색 결과 세포자연사 세포에서 보이는 핵 응축체(apoptotic body)와는 다른 형태의 응축된 핵(pyknosis)을 많이 관찰할 수 있었다. 이러한 응축된 핵을 가진 과립-황체화 세포의 비율은 채취된 난자의 상태 즉, 난자 세포질의 투명도 및 상태, 난구세포의 퍼짐 정도와 색깔 등에 따라 차이를 보였다. 즉, 채취된 난자의 질이 안 좋은 군의 과립-황체화 세포들에서 응축된 핵을 많이 관찰할 수 있었으나, 반대로 건강한 난자를 채취한 군에서는 그 비율이 유의하게 감소하였다. 그러나 과배란 유도에 방법 차이에 따른 응축된 핵의 비율에는 차이가 없었다. 이러한 난포내 응축된 핵은 가진 과립세포의 증가는 난포의 폐쇄와 연관이 있는 것으로 알려져 왔으며(Byskov 1979; 김문규 등, 1987; 이창주 등, 1989; Palumbo and Yeh, 1994), 최근 이러한 핵의 응축 현상을 세포자연사의 한 형태로 보고하고(양현원 등, 1997) 있으나 검증이 필요한 것으로 사료된다.

위와 같이 세포의 형태만 가지고 세포자연사를 판정한 결과보다 좀더 정확한 분석을 하기 위하여, 본 저자는 세포자연사의 가장 큰 특징이라고 할 수 있는 세포내 DNA 분절화 정도를 조사

하여 실험군간에 과립-황체화 세포의 세포자연사 정도를 분석하였다. 획득된 과립-황체화 세포에서 DNA 분절화 정도를 분석한 결과, 300 - 500 bp에서 분절화된 DNA가 다량 검출되는 것을 확인할 수 있었으며, 과배란 유도 방법에 따른 DNA 분절화 정도는 통계학적으로 유의한 차이는 없었다. 그러나 채취된 난자의 질에 따라 DNA 분절화 양상을 조사한 결과, 난포 폐쇄가 일어났다고 판정되는 atretic 군에서 분절화된 DNA의 양이 유의하게 증가하는 것을 알 수 있었으며, 이러한 결과는 난포내 과립세포의 세포자연사가 난포 폐쇄를 일으키는 주요 원인이라는 기존에 논문들과 일치하고 있다(Tilly et al., 1991; Hughes and Gorospe, 1991; Palumbo an Yeh, 1994; Jolly et al., 1994). 한편, FSH/hMG만으로 과배란을 유도한 군에서도 30% 내외의 높은 DNA 분절화 정도를 보이는 것을 알 수 있었다. 일반적으로 FSH는 난포내 과립세포에 작용하여 스테로이드 호르몬 생성과 함께 세포자연사를 억제시키는 대표적인 생존 인자로 알려져 있으나(Hay et al., 1976; Braw and Tsafriri, 1980b; Billig et al., 1994; Chun et al., 1994), 위와 같이 높은 DNA 분절화 정도를 보이는 이유는 과배란 유도 과정 초기에 다량으로 투여된 FSH가 난포내 과립세포의 세포자연사를 억제시켜 왔으나, 과배란 유도 과정 후기에 FSH 투여 중지로 인한 생존인자의 결핍이 과립-황체화 세포의 세포자연사를 개시시키면서 나타난 현상으로 보인다. 한편으론 FSH에 의해 성장이 끝난 난포가 다량의 hCG 투여와 함께 황체화 과정이 시작되면서 일부 과립-황체화 세포들이 세포자연사로 죽어가면서 일어난 현상으로 사료되며, 이러한 황체화 세포의 죽음은 세포자연사로 인하여 일어난다는 보고들이 있어 왔다(Zelemik et al., 1989). 또한 GnRHa를 다량 투여한 군에서도 FSH/hMG만을 투여한 군과 비교해 볼 때 분절화된 DNA 양에 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 Billig 등(1994; 1996)이 미성숙 흰쥐를 이용한 실험 결과와 일치한다고 할 수 있으며, 즉, GnRH에 의하여 유도된 난포 세포의 세포자연사는 FSH에 의하여 억제될 수 있다는 것이다.

이상의 결과에서 채취된 난자-난구 복합체의 형태학적인 특징은 함께 채취된 과립-황체화 세포의 세포자연사와 연관이 있으며, 이러한 난포내 과립-황체화 세포의 죽음이 난자의 상태를 결정한다고 할 수 있겠다. 그러나 과배란 유도 과정중에 사용하고 있는 GnRHa는 회수된 난자의 수뿐만 아니라 난자의 질에도 영향을 미치지 못하며, 또한 과배란 유도된 난포내 과립-황체화 세포의 세포자연사에도 직접적인 영향을 미치지 못하는 것으로 보인다. 그러한 이유는 함께 투여된 FSH에 의하여 GnRHa의 antigonadal 효과가 억제됐기 때문으로 사료된다.

참고 문헌

Billig H, Furuta I, Hsueh AJW: Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) directly induces apoptotic cell death in the rat ovary: biochemical and *in situ* detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in granulosa cells. Endocrinology 1994, 134, 245-252

Billig H, Chun SY, Eisenhauer K, Hsueh AJW: Gonadal cell apoptosis: Hormone-regulated cell demise. Hum Reprod Update 1996, 2, 103-117

Braw RH, Tsafriri A: Effect of PMSG on follicular atresia in the rat ovary. J Reprod Fertil 1980, 59, 267-272

Choi WS, Lee SH, Shim C, Cho BN, Baik SH, Yoon YD, et al.: Expression and cellular localization of gonadotropin-releasing hormone in the rat. Mol Cells 1994, 4, 267-272.

Chun SY, Billig H, Tilly J, Furuta I, Tsafriri A, Hsueh AJW: Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogeneous insulin-like growth factor I. Endocrinology 1994, 135, 1845-1853

Clack MR: Stimulation of progesterone and prostaglandin E2 accumulation by luteinizing hormone-releasing hormone(LHRH) and LHRH analogs in rat granulosa cells. Endocrinology 1982, 110, 146-152

Clayton RN, Catt KJ: Gonadotropin-releasing hormone receptors: characterization, physiological regulation and relationship to reproductive function. Endocr Rev 1981, 2, 186-209

Corbin A, Bex FJ: Luteinizing hormone-releasing hormone agonists induce ovulation by hypophysectomized rats: direct ovarian effect. Life Sci 1981, 29, 185-192

Dekel N, Sherizly I, Tsafriri A, Naor Z: A comparative study of the mechanism of action of luteinizing hormone and a gonadotropin releasing hormone analog on the ovary. Biol Reprod 1983, 28, 161-166

Dekel N, Sherizly I, Phillips DM, Nimrod A, Zilberstein M, Naor Z: Characterization in the maturational changes induced by a GnRH analogue in the rat ovarian follicle. J Reprod Fertil 1985, 75, 461-466

Hay MF, Cran DG, Moor RM: Structural changes occurring during atresia in sheep ovarian follicles. Cell Tissue Res 1976, 169, 515-529

Heimler I, Hutz RJ, Attaran M, Mack SR, Chaffin CL, Morrissey WG, et al.: Ovarian follicular granulosa cells from IVF procedures demonstrate a very low incidence of apoptotic cell death post aspiration. Proceedings of IX World congress on in vitro fertilization and assisted reproduction. 1995, 743-746

Herman A, Ron-Ei R, Golan A, Raziel A, Soffer Y, Caspi E: Pregnancy rate and ovarian

hyperstimulation after luteal human chorionic gonadotropin in *in vitro* fertilization stimulated with gonadotropin-releasing hormone analog and menotropins. Fertil Steril 1990, 53, 92-96

Hillensjo T, Lemaire WJ: Gonadotropin-releasing hormone agonists stimulate meiotic maturation of follicle-enclosed rat oocytes*in vitro*. Nature 1980, 287, 145-146

Hsueh AJW, Jones PBC: Extrapituitary actions of gonadotropin-releasing hormone. Endocr Rev 1981, 2, 437-461

Hughes FM, Gorospe WC: Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. Endocrinology 1991, 129, 2415-2422

Jolly PD, Tisdall DJ, Health DA, Lun S, McNatty KP: Apoptosis in granulosa cells in regulation to steroid synthesis, cycle adenosine 3',5'-monophosphate response to follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and follicular atresia. Biol Reprod 1994, 51, 934-944

Kim MK, Lee YH, Kim JH, Yoon YD: A study on the fine structural changes of porcine ovarian follicles during atresia. Kor J Zool 1987, 30, 351-370

Kim SH: GnRH analogue in the superovulation induction for IVF. Kor J Fertil Steril 1991, 18, 1-11

Lee CJ, Yoon YD, Kim JH, Kim MK: The relationship between the pyknosis of granulosa cell and the change of steroid concentration in porcine ovarian follicles. Kor J Fertil Steril 1989, 16, 35-40

Leung PCK, Wang J, Baimbridge KG: Mechanism of action of luteinzing hormone-releasing hormone in rat ovarian cells. Can J Physiol Pharmacol 1989, 67, 962-967

Ma F, Leung PCK: Luteinizing hormone-releasing hormone enhances polyphosphoinositide breakdown in rat granulosa cells. Biochem Biophys Res Commun 1985, 130, 1201-1208

Maclachlan V, Besanko M, O'Shea F, Wade H, Wood C, Trounson A, et al.: A controlled study of luteinizing hormone-releasing hormone agonist (Buserelin) for the induction of folliculogenesis before *in vitro* fertilization. N Engl J Med 1989, 320, 1233-1237

Martin MC: Gonadotropin releasing hormone agonists and the induction or augmentation of ovulation. J Reprod Med 1989, 34, 1034-1038

Meldrum DR, Wisot A, Hamilton F, Gutlay Al, Kempton W, Huynh D: Routine pituitary suppression with leuprolide before ovarian stimulation for oocyte retrieval. Fertil Steril 1989, 51, 455-459

Nakahara K, Ohta N, Saito H, Takahashi T, Saito T, Hiroi M, et al.: The incidence of apoptotic bodies in membrana granulosa can predict prognosis of ova from patients participating in in vitro fertilization programs. Fertil Steril 1997, 68, 312-316

Nakahara K, Sakai N, Saito H, Tezuka N, Saito T, Hiroi M, et al.: Incidence of apoptotic bodies in

membrana granulosa of the patients participating in an in vitro fertilization program. Fertil Steril 1997, 67, 302-308

Naor A, Yavin E: Gonadotropin-releasing hormone stimulates phospholipid labeling in cultured granulosa cells. Endocrinology 1982, 111, 1615-1619

Neveu S, Hedon B, Bringer J, Chinchole JM, Arnal F, Humean S, et al.: Ovarian stimulation by a combination of a gonadotropin-releasing hormone agonist and gonadotropins for *in vitro* fertilization. Fetil Steril 1987, 47, 639-673

Paik WY, Chung PJ, Park SK, Kim WY, Lee JH, Kim JH, et al.: Effect of gonadotropin on the expression of GnRH and GnRH mRNA in rat ovary. Kor J Fertil Steril 1994, 21, 121-129

Palermo R, Amodeo G, Navot D, Rosenwaks Z, Cittaddini E: Concomitant gonadotropin-releasing hormone agonist and menotropin treatment for the synchronized induction of multiple of follicles. Fertil Steril 1988, 49, 290-287

Palumbo A, Yeh J: *in situ* localization of apoptosis in the rat ovary during follicular atresia. Biol Reprod 1994, 51, 888-895

Pellicer A, Tarin JJ, Miro F, Sampaio M, Santos MJ, Remohi J: The use of gonadotropin releasing-hormone analogues (GnRHa), in in-vitro fertilization: some clinical and experimental investigations of a direct effect on the human ovary. Human Reprod 1992, 7, 39-47

Peng C, Fan NC, Ligier M, Vaananen J, Leung PCK: Expression and regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor messenger ribonucleic acids in human granulosa luteal cells. Endocrinology 1994, 135, 1740-1746

Seifer DB, Gardiner AC, Ferreira KA, Peluso JJ: Apoptosis as a function of ovarian reserve in women undergoing in vitro fertilization. Fertil Steril 1996, 66, 593-598

Serafini P, Stone B, Kerin J, Batjofin J, Quinn P, Marrs RP: An alternate approach to controlled ovarian hyperstimulation in "poor responders": Pretreatment with a gonadotropin-releasing hormone analog. Fertil Steril 1988, 49, 90-95

Smitz J, Ron-Ei R, Tarlatzis BC: The use of gonadotropin releasing hormone aganists for *in vitro* fertilization and other assisted procreation techniques: experience from three centres. Human Reprod 1992, 7, 49-66

Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, Hsueh AJW: Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and post ovulatory regression. Endocrinology 1991, 129, 2799-2801

Trounson A, Gardner DK: Stimulation protocols In: Handbook of *in vitro* Fertilization. CRC press, Boca Raton, 1993, pp 2-16

Yang HW, Lee SJ, Yoon YD: Determination of apoptosis in granulosa-luteal cells obtained from

hyperstimulated human ovaries. Del Reprod 1997, 1, 79-89.

Zelemik AJ, Ihrig LL, Bassett SG: Developmental expression of Ca^{2+}/Mg^{2+}-dependent endonuclease activity in rat granulosa and luteal cells. Endocrinology. 1989, 125, 2218-2220

Figure 1. Photomicrographs of human granulosa-luteal cells stained with hematoxylin-eosin and by TUNEL method. Granulosa-luteal cells were fixed in 4% neutral buffered formalin and processed for routine histological observation. Paraffin sections (5μm) of human granulosa-luteal cells were stained with hematoxylin-eosin. The granulosa-luteal cells obtained from the healthy follicles with good quality of oocytes and expansion of cumulus cells during retrieval of oocytes have normal round nuclei in cells and lower percentage of pyknotic cells (A, C). Note that the granulosa-luteal cells obtained from the atretic follicles with poor quality of oocytes and cumulus cells have small round pyknotic nuclei and stained darker(B, D). Arrows indicate pyknotic cells, whereas arrow-head shows apoptotic cell. Magnification : A, B, X200; C, D, X400

Figure 2. DNA fragmentation rates of granulosa-luteal cells obtained from follicles with healthy (H) or atretic (A) oocyte-cumulus complex. Oocyte-cumulus complexes were obtained from 20 patients in IVF-ET program. Extracted DNA were resolved by 1.5% agarose gel electrophoresis at 125 V for 60 min. The agarose gels submerged in PBE buffer containing ethidium bromide (0.5μg/ml) for 90 min. The gels were visualized and photographed on a UV transilluminator (A; FSH/hMG group, B; GnRH-long group). The photograph was analyzed with densitometric scanning (C, D). Values represent mean$\pm$SEM. *, $p < 0.05$ versus healthy group.