

Analysis of Oocyte and Embryo in Human IVF-ET Program

한나여성의원 불임연구실

지 희 준

Introduction

성공적인 IVF-ET를 수행하고 일정 수준의 임신률을 유지하기 위해서는 여러 가지 요소들의 만족할 만한 뒷받침이 되어야 하지만 보다 양질의 수정란을 선별하여 이식함으로써 임신의 기회를 향상시킬 수 있는 점도 간과되어서는 안되겠다. 난자 및 수정란의 발달능이라고 할 수 있는 quality를 측정하는데 있어서 형태학적, 생화학적, 세포유전학적 접근 등 여러 가지 방법이 제시되고 있다. 그러나 실제적으로 보다 쉽게, 안정적으로 판별된 수정란을 이식에까지 사용할 수 있는 것은 형태학적인 측정방법이라 하겠다. 이에 채취된 난자에서부터 blastocyst 단계의 수정란까지 이들의 형태학적 특징을 이용한 quality 판별요령에 대하여 요약하여 서술하였다.

A. Oocyte grading

1. 위란강 (perivitelline space; PVS) 과립상 (granularity)

채취된 난자들을 ICSI를 하기 위해서 cumulus mass와 corona radiata cell을 제거하면 몇몇 난자의 위란강 내에 작은 과립형태의 particle (perivitelline space granularity)들이 투명대의 안쪽 벽에 붙어 있는 것을 관찰할 수 있다. 이러한 PVS granularity는 난자의 성숙단계 (maturation stage)에 따라 발현빈도를 다르게 나타내는데 GV단계에서는 0%, MI는 4.4%, MII단계의 난자에서는 34.3%의 빈도를 나타내었다. 이러한 PVS granularity를 나타내는 난자의 비율은 호르몬에 대해 낮은 반응도나 과민반응을 나타내는 환자들에서, 그리고 난포성장을 위한 stimulation 기간이 길고 hMG의 사용량이 많았던 환자들에게서 높게 나타나는 경향을 나타냈다. 그러나 이러한 granularity를 나타내는 난자를 ICSI를 이용하였을 때 granularity를 나타내지 않는 난자에 비해 수정률, 착상률 그리고 임신률에 있어서 차이를 나타내지 않았다 (Hassan-Ali et al, 1998). 그러나 ICSI가 아닌 일반적인 체외수정 (conventional IVF)방법을 이용하였다면 이러한 PVS granularity를 나타내는 난자의 수정률은 다르게 나타났을 가능성은 매우 크다.

이러한 PVS granularity가 어디서 유래한 것인지, 어떤 성격을 갖고 있는지 명확하게 규명되지는 않았지만 다각도에서 연구가 진행되어 왔다. 먼저 PVS granularity와 같은 위란강내 존재하는 함유물들 (inclusions)은 corona radiata cell의 잔유물 (remnants)이라는 주장이 여러 학자들에 의해 제시되었다. 일반적으로 난자가 감수분열을 재개 (meiotic resumption)하는 과정에서 coronal cell과 난자사이의 gap junction을 형성하는 역할을 하는 coronal cell의 돌기 (projections)들이 단절되면서 이러한 물질들이 사라지게 되는데 이와 같이 성숙과정 이후에도 마치 쓰레기 (scrap)처럼 남아 있는 경우가 있다는 주장이다 (Gilula et al, 1978; Sathananthan, 1997). 또한 전자현미경과 세

포화학 (cytochemical)을 이용한 연구를 통해서 배란 전 사람 난자의 피질 세포질 (cortical cytoplasm)내에 분비낭 (secretory vesicle)의 존재가 확인되었으며 이들의 수가 감수분열 재개 시 급격하게 증가하며 PVS내로 그들의 내용물인 glycoprotein을 분출하는데 이러한 현상이 시간적으로 난자와 난포 세포간 접촉의 단절과 관련이 있다고 제안되었다 (Stastana et al, 1983). 이러한 glycoprotein이 직접, 간접으로 PVS granularity의 형성에 관여할 가능성 역시 배제할 수는 없다. 한편 수정에 실패한 사람 난자의 초미세구조 (ultrastucture)적 연구를 통해서 이들 난자의 위란강내에 granules과 filaments로 구성된 extracellular matrix가 존재한다는 것이 보고되었다 (Dandekar et al, 1992). 이와 같은 granular/filament matrix 구조물은 cumulus cell과 corona radiata cell 사이에 존재하며 이들은 protein과 hyaluronic acid를 포함하고 있다고 보고되었다.

이상의 자료들을 살펴볼 때 위란강내 과립상은 비정상적인 호르몬 반응에 의한 난포성장과 깊은 관련이 있으며 배란 전 마지막 성숙과정단계에서 생성되며 위란강내 특히 투명대 안쪽에 새로운 과립층을 형성함으로써 정상적인 정자의 침투를 방해할 수 있는 요인이 될 수 있으리라 생각된다.

2. Morphology of the 1st polar body

난자의 채취시 MII단계의 난자의 제 1 극체가 비정상적인 형태 (fragmented, very small, overly large)를 나타냈을 때 이들의 난자의 정상적인 수정률은 감소한 반면 비정상적인 수정은 증가하는 현상을 나타내었다 (Veek, 1988). 또한 제 1 극체의 퇴행 (degeneration)은 난자의 과성숙 (ageing)과 깊은 관련이 있으며 이러한 극체를 지닌 난자는 수정단계에서 장애를 만나게 된다 (Eichenlaub-Ritter et al, 1995). 한편 난자의 제 1극체의 상태, 위란강의 크기와 세포질내 함유물 (cytoplasmic inclusions)의 존재 등을 기초로 난자의 등급을 정하였을 때 이들 난자의 등급이 수정률과 ICSI 후 수정란의 quality와 유의한 관련성을 나타내었다 (Xia, 1997). 비록 감수분열을 통해 제 1극체가 방출되나 핵과 세포질 분열이라는 점에서 난자에서의 감수분열은 유사분열과 흡사하다. 따라서 수정 이후 수정란의 성공적인 유사분열의 잠재력 (potential)은 난자의 제 1 감수분열의 결정체인 제 1 극체의 방출의 결과로서 가늠할 수 있다고 하겠다.

3. Morphology of cytoplasm

한편 난자의 quality를 측정하는데 있어서 세포질의 비정상적 형태 역시 그 척도의 기준이 될 수 있다. 대표적인 비정상적인 세포질의 형태는 ooplasmic granularity, ooplasmic vacuoles, 그리고 refractile body (굴절체) 등을 들 수 있다.

Ooplasmic granularity는 난자의 세포질 중심부를 어둡고 과립성의 형태를 취하게 하는데 이러한 형태의 난자는 퇴행성 (atretic) 미성숙 난자나 과성숙 난자에서 자주 볼 수 있는 현상으로서 난자퇴행의 척도로 이용된다. Ooplasmic vacuoles은 세포질내에 존재하고 있는 미소한 vacuoles들의 융합에 의한 smooth endoplasmic reticulum의 낭포성 (vesicular) 요소 (elements)들의 팽창과 합병으로 형성되거나 불안정한 세포질로 인해 비정상적인 endocytosis (세포막의 함입에 의한 외부물질의 흡수작용)의 결과로서 발생한다고 알려져 있다. 한편 refractile body는 지방성 물질과 농후한 과립의 조성에 의해 생성되며 난자의 퇴행과 관련이 있다. 따라서 이러한 세포질내 함유물의 존재는 난자의 낮은 수정률과 수정란의 낮은 quality와도 높은 연관성을 갖는다. 이러한 refractile body를 함유한 난자는 35세 이상의 환자 또는 불임의 원인이 여성에 있는 환자에

게서 높은 발생빈도를 나타낸다.

4. Chromosomal abnormality

일반적으로 비정상적 염색체상을 나타내는 난자의 비율은 전체 난자 중 약 26.5%를 차지하며 hypo-haploidy 13.3%, Hyper-haploidy 8.1%, diploidy 3.5% 등을 나타낸다. 특히 형태학적으로 비정상적인 난자의 경우 이들의 약 50% 이상이 이수성 (aneuploidy)의 비정상적 염색체를 갖고 있다. 한편 사람 난자의 경우 난포내 환경이 이들 난자의 염색체상에 커다란 영향을 미치는데 난포액내 pH가 6.6 이하의 산성일 때 난자의 60% 이상이 비정상적 염색체를 갖게 되나 pH가 7.2로 적정 수준일 때는 이러한 비정상적 난자의 비율이 8%로 급격하게 저하되는 현상을 나타낸다.

B. Zygote grading

1. Pronucleus size

일반적으로 포유동물의 접합체 (zygote)의 2개의 pronucleus 중 male pronucleus가 female pronucleus 보다 다소 크다고 알려져 있다. 그러나 사람의 zygote에서는 이 두 pronucleus의 크기로서 male과 female pronucleus를 구별하기란 쉽지 않을 정도로 그 크기가 비슷하다. 그러나 우리는 종종 그 크기의 차이가 뚜렷한 zygote를 발견할 수 있다. 이러한 zygote는 특히 과성숙된 난자를 수정시켰을 경우 빈번히 발생한다 (Goud et al, 1999). 이러한 경우 대부분 보다 작은 크기의 pronucleus가 female이 아닌 male pronucleus이다. 이러한 비정상적 크기의 male pronucleus는 비정상적인 chromatin decondensation의 진행에 따른 작은 크기의 웅성전핵의 형성이나 전핵형성 실패로 초래된다. 그리고 이러한 현상은 난자의 sperm chromatin decondensing factor의 비정상적 activity와 연관이 있는 것 같다. 난자의 불충분한 glutathione의 흡수 또는 이들 물질의 고갈 등은 웅성전핵의 형성을 방해하게 되는데 이러한 현상은 체외성숙과정이나 과성숙되어 ageing 된 난자에게서 나타난다.

2. Pronucleus Polarity

웅성, 자성 2개의 전핵은 난자의 중심에 위치하고 서로 나란히 부착된 상태로 제 1, 2 극체들과 각도를 이루고 있다. 이러한 전핵과 극체와의 각도에 의해 zygote의 quality를 측정하는 것이 가능하다는 보고가 제시되었다 (Garello et al, 1999). 두 전핵의 중심을 통과하는 일직선을 중심 축으로 하고 이 중심 축과 가까운 극체와의 각도를 a, 먼 극체와의 각도를 b, 그리고 두 극체 사이의 거리가 난자의 중심과 이루는 각도를 c라고 하였을 때, a의 각도가 커질수록 이후 난할이 일어난 수정란의 quality가 다소 감소하는 경향을 나타냈으나 b의 각도가 커질 경우 유의하게 수정란의 quality가 감소하는 결과를 나타냈다. 이러한 결과는 두 극체의 중심선과 전핵의 중심 축이 교차를 이루어 a와 b의 각도가 최소화되는 형태의 zygote가 바람직한 전핵의 polarity를 갖는다고 할 수 있다.

3. Nucleoli arrangement

웅성, 자성의 각 전핵 내에는 적게는 1개로부터 많게는 12개까지의 핵인 (nucleoli)이 다양한

수적인 조합을 이루며 존재한다. 이러한 nucleoli의 존재는 vacuoles과 전핵을 구별하는 marker로서도 이용되며 최근에는 이들의 배열상태로서 수정란의 quality를 측정하는 기준으로 사용되고 있다 (Taesarik & Greco, 1999).

측정 기준이 될 수 있는 대표적인 핵인의 구성조합 pattern은 다음과 같다.

Pattern 0: 양 전핵내의 핵인의 수가 3개 이상 차이 나지 않고 한 전핵 내에 핵인의 수가 7개 이하일 경우 이들 핵인이 대칭되는 형태의 극성을 띠는 경우 또는 7개 이상일 경우 이들 핵인이 흩어지는 형태의 극성을 띠지 않는 경우

- 1: 양 전핵내의 핵인의 수가 3개 이상 차이가 나는 경우
- 2: 적어도 한 개의 전핵 내에 7개 이하의 핵인이 극성을 띠지 않는 경우
- 3: 적어도 한 개의 전핵 내에 7개 이상의 핵인이 극성을 띠는 경우
- 4: 적어도 한 개의 전핵 내에 3개 이하의 전핵이 있는 경우
- 5: 한쪽의 전핵의 핵인은 극성을 띠고 나머지 전핵은 극성을 띠지 않는 경우

Pattern 0을 나타내는 zygote의 경우 다른 핵인의 patterns (1-5)을 나타내는 zygote에 비해 현저하게 높은 난할율을 나타내며, 발달정지 (developmental arrest) 현상은 특히 pattern 1 (31.6%)과 3 (30%)에서 높게 나타났다.

C. Embryo grading

1. Embryo grade

Grade 1: 균일한 크기와 대칭을 이루는 할구 (blastomeres)의 수정란

Grade 2: 균일하지 않은 크기의 할구의 수정란

Grade 3: 전체 할구의 25% 이하가 fragmentation된 수정란

Grade 4: 전체 할구의 25% 이상 50% 이하가 fragmentation된 수정란

Grade 5: 전체 할구의 50% 이상이 fragmentation된 수정란

이러한 수정란 grade에 따른 임신률, 착상률, ongoing/delivery rate는 등급이 높을수록 비례적으로 상승되는 결과를 나타낸다. 따라서 가능한 한 이식에는 Grade 1, 또는 2와 3까지의 수정란을 사용하며 Grade 4 또는 5의 수정란은 이식에 공여하지 않는다.

2. Multinucleation

정상적으로 수정된 수정란의 약 17%가 적어도 한 개 이상의 2핵 (binucleated)의 할구를 갖고 있으며 형태학적으로 Grade 2를 나타내는 수정란의 경우에도 15% 정도가 다핵성 (multinucleated) 할구를 갖고 있다 (Hardy et al, 1993). 이러한 다핵성 수정란은 정상적인 수정란에 비해 느린 발달속도를 나타내며 비정상적 염색체 비율 (75%)에 있어서도 정상적인 수정란 (32%)에 비해 2배 이상의 높은 발생 빈도를 나타낸다. 정상적인 수정란만을 이식한 군에 비해 다핵성 수정란을 정상적인 수정란과 함께 이식한 군에서 보다 낮은 임신률과 ongoing/delivery rate를 나타내었다 (Katharine et al, 1998). 다핵성 수정란 발생의 원인에 대해서는 아직 불분명하지만 cytokinesis process에서 일어난 error에 의해 염색체의 불규칙성 분할 또는 세포발달 정지를 초래하는 것 같다. 이러한 비정상적 수정란은 환자의 E2수치가 높거나 많은 수의 난자가 회수되는 경우, 높은 발생 빈도를 나타낸다.

3. Fragmentation

수정란의 quality를 결정하는데 있어서 아직도 가장 보편적으로 사용되는 것이 수정란 할구의 비정상적인 분열에 의해 발생하는 fragmentation의 비율이라 할 수 있다. 이러한 수정란의 fragmentation의 발생원인에 대해서 programmed cell death 또는 apoptosis에 의해 수정란의 fragmentation이 촉진된다는 선천적인 원인론의 주장 (Jurisicova et al, 1996) 뿐 만 아니라, endotoxin과 reactive oxygen species (ROS)도 관여한다는 후천적 원인론의 주장 (Yang et al, 1998)이 제시되었다. 그러나 우리는 IVF cycle에 따라서 수정란의 fragmentation rate가 심한 차이를 나타내는 환자가 있는 반면, 반복적인 cycle에도 늘 유사한 수정란 quality를 나타내는 환자를 경험하고 있다. 따라서 수정란의 fragmentation이 발생하는 것은 앞에서 제시된 것처럼 이미 체내에서 수정란의 운명이 program될 수도 있고, 또한 부적합한 체외배양조건에 의해 수정란의 발달이 손상을 입는 경우도 배제 할 수 없다.

이러한 fragmented 수정란은 fragmentation rate에 따라 정도의 차이가 있으나 정상적인 non-fragmented 수정란에 비해 낮은 발달률과 착상률을 나타낸다 (Alikani et al, 1999). 이러한 발달 장애는 초기 수정란 단계에서의 비교적 커다란 fragments의 방출은 수정란의 지속적인 발달에 필요한 mitochondria나 외래 protein의 흡수에 관여하는 pinocytotic cavity 등과 같은 organelle들의 손실을 초래하게 되고 이러한 손실을 경험한 수정란은 결국 발달이 정지된다 (Santhanathan et al, 1982). 이러한 fragmented 수정란의 염색체 분석을 한 결과 약 40% 이상의 수정란이 염색체 이상을 나타냈다 (Munne & Cohen, 1999). 따라서 이러한 fragmented 수정란을 이식에 이용하였을 때 6% 정도의 매우 낮은 착상률을 나타낸다는 것은 당연한 결과라 하겠다.

한편 이러한 fragmented 수정란의 fragment를 보조부화술 (assisted hatching)을 이용하여 제거한 후 이들 수정란을 이식할 경우 착상률에 있어서 약 4%의 향상을 나타낸다 (Cohen et al, 1994). 이와 같이 수정란의 fragments를 제거하였을 때 나타나는 유의한 효과는 수정란 할구들의 공간적인 관계를 다시 회복시킨다. 수정란의 한정된 투명대 안쪽의 공간을 차지한 fragment는 할구의 분할 면을 뒤틀리게 하고 정상적인 할구와 할구 사이의 접촉을 방해함으로써 비정상적인 compaction, cavitation, 그리고 blastocyst 형성을 초래한다. 또한 fragments에 인접한 할구는 낭포성 퇴행 (vacuolar degeneration)의 초기현상을 나타내는데 fragment의 제거는 남아 있는 할구의 이러한 퇴행을 정지시킴으로써 수정란의 2차적인 퇴행을 억제한다 (Santhanathan et al, 1990).

본원에서도 반복적인 IVF-ET program 시술을 하였어도 수정란의 quality가 낮아서 임신이 되지 않는 환자들을 수정란을 AH를 통한 fragments를 제거한 후 이식하여 임신 및 분만에 성공한 사례들이 있다.

D. Blastocyst grading

Blastocyst의 grade를 판별하는데 있어서 첫째로 가장 중요시되어야 할 것은 장차 태아로 발달 할 ICM이다. 정상적인 expanded blastocyst의 ICM의 적정크기는 inner cell 15~20개가 융합된 mass로서, 작은 크기의 ICM 또는 ICM이 거의 없는 blastocyst를 이식하였을 경우 임신에 성공하였다 하더라도 태아가 없는 sac (empty sac)의 결과가 초래될 수 있다. ICM의 크기와 더불어 blastocyst의 전체 세포수 역시 중요한데 일반적으로 130~200개 정도면 quality가 좋은 blasto-

cyst라 할 수 있다. 그 다음으로 blastocyst의 형태상 tropoblast cell의 모양이 마치 낫 (sickle)의 형태를 취하고 일정한 형태로 고루 blastocyst를 둘러싸고 있는 것이 바람직하다. 또한 투명대 역시 expanded blastocyst가 되면서 세포 volume의 증가에 따라 충분히 얇아져야 한다. 투명대의 탄력에 문제점이 있을 때 수정란의 blastocyst로의 발달이 저해될 뿐만 아니라 비정상적인 부화로 인해 착상에 방해 요인이 되는 경우가 있다. 한편 blastocyst의 quality를 판별하는데 보다 객관성을 부여하고자 한다면 앞에서 언급한 oocyte, zygote, embryo 단계에서의 철저한 관찰 기록을 수행하여 blastocyst quality를 최종 판별하는데 사용한다면 도움이 될 것이다.

REFERENCES

- Alikani M, Cohen J, Tomkin G, Garrisi J, Mack C, Scott RT. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy an implantation. *Fertil Steril* 1999; 71: 836-42.
- Cohen J, Alikani M, Ferrara T, Munne S, Reing A, Schatman G. Rescuing abnormally developing embryos by assisted hatching. In: Mori T, Aono T, Tominaga T, Hiroi M, eds. *Frontiers in endocrinology: perspectives on assisted reproduction*. vol. 4. Rome: Ares Serono Symposia, 1994; 536-44.
- Dandekar P, Aggeler J, Talbot P. Structure, distribution and composition of the extracellular matrix of human oocytes and cumulus masses. *Hum Reprod* 1992; 7: 391-8.
- Eichenlaub-Ritter U, Schmiady H, Kentenich H, et al. Recurrent failure in polar body formation and premature chromosome condensation in oocytes from a human patient: indicators of asynchrony in nuclear and cytoplasmic maturation. *Hum Reprod* 1995; 10: 2343-9.
- Garello C, Baker H, Rai J, Montgomery S, Wilson P, Kennedy CR, Hartshorne GM. Pronuclear orientation, polarbody placement, and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization; further evidence for polarity in human oocytes? *Hum Reprod* 1999; 14: 2588-95.
- Gilula NB, Epstein ML, Beers WH. Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. *J Cell Biol* 1978; 78: 58-75.
- Goud P, Goud A, Oostveldt PV, Van der Elst J, Dhont M. Fertilization abnormalities and pronucleus size asynchrony after intracytoplasmic sperm injection are related to oocyte postmaturity. *Fertil Steril* 1999; 72: 245-52.
- Hardy K, Winston RML, Handyside AH. Binucleate blastomeres in preimplantation human embryos in vitro: failure of cytokinesis during early cleavage. *J Reprod Fertil* 1993; 98: 549-58.
- Hassan-Ali H, Hisham-Sal도 A, 띠-Gezeiry D, Baghdady I, Ismaril I, Mandelbaum J. Perivitelline space granularity: a sign of human menopausal gonadotrophin over dose in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13: 3425-30.
- Juriscova A, Varmuza S, Casfer RF. Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Mol Hum Reprod* 1995; 2: 93-8.
- Katharine V, Jackson BS, Elizabeth S, Ginsburg MD, Mark D, Hornstein MD, Mitchell S, Rein MD, Robert NC. Multinucleation in normally fertilized embryos is associated with an accelerated ovu-

- lation induction response and lower implantation and pregnancy rates in in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertil Steril* 1998; 70: 60-6.
- Munne S, Cohen J. Chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod Update* In Press 1999.
- Santhanathan AH, Wood C, Leeton J. Ultrastructural evaluation of 8-16cell human embryos developed in vitro. *Micron* 1982; 13: 193-203.
- Santhanathan, AH, Bongso A, Ng SC, Ho J, Mok H, Ratnam S. Ultrastructure of preimplantation human embryos co-cultured with human ampullary cells. *Hum Reprod* 1990; 5: 309-18.
- Santhanathan AH. Ultrastructure of the human egg. *Hum Cell* 1997; 19: 21-38.
- Stastna J, Dvorak M, Pilka L. Electron microscopic and cytochemical study of the cortical cytoplasm in the preovulatory human oocytes. *Z Mikrosk Anat Forsch* 1983; 97: 675-87.
- Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* 1999; 14: 1318-23.
- Veeck LL. Oocyte assessment and biological performance. *Ann NY Acad Sci* 1988; 541: 259-74.
- Xia P. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Hum Reprod* 1997; 12: 1750-55.
- Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. 1988.
-