

Management (3) - Laboratory Aspects

김 총 현

합춘여성클리닉

일반적인 과배란 유도법에 대하여 반응이 떨어지는 poor responder는 표준화된 분류방식이 없어 정확히 산출하기 어렵지만, 전체 체외수정시술을 시행하는 환자 중 약 9~26% 정도로 상당수의 환자들이 해당된다 (Keay et al., 1997).

이들의 처치를 위하여 고용량의 gonadotrophin, recombinant FSH, 저용량의 GnRH agonist, 혹은 GnRH antagonist 등을 이용한 여러 과배란 유도법, growth hormone 혹은 growth hormone releasing factor, glucocorticosteroids, nitric oxide donor (L-arginine), combined oral contraceptive, testosterone (Balasch et al., 2006), letrozole (Garcia-Velasco et al., 2005) 등의 추가적인 약제 투여법, natural cycle IVF의 시행, 배아이식 시기의 변경 (Bahceci et al., 2006) 등 다양한 방법들이 연구 보고된 바 있다 (Tarlitzis et al., 2003). 몇몇을 제외한 이들 연구의 대부분은 임상주의 입장에서, 보다 많은 수의 난자를 얻어 임신 성공률을 높이는 것을 목표로 하기 때문에 실험실에서 이들 환자의 처치에 관여할 부분이 적은 형편이다.

Poor responder의 경우 적은 수의 난자가 채취되기 때문에 일반 체외수정시술 시처럼 양질의 배아를 선별하여 임신 성공률을 높이는 것은 기대하기는 어려우며, 수정률을 높이고, 배아 자체의 착상능력을 높일 수 있는 방법들이 고려되어야 할 것으로 사료된다. 이들 환자들에게 이미 시행되었던 연구들과 침습적이지만 수정률과 배아의 착상능력을 높일 가능성이 있는 보조생식술의 방법들에 대하여 살펴 보고자 한다.

1. 정자직접주입술 (ICSI)의 상용화

정자직접주입술은 남성요인이 있을 때 주로 시행되지만, 불임의 원인이 남성에 있지 않거나 원인을 알 수 없는 경우에도 수정률을 증가시킬 수 있는 것으로 보고된 바 있다 (Khamisi et al., 2001; Jaroudi et al., 2003). 따라서 채취된 난자의 수가 적은 poor responder에서 정자직접주입술을 시행하면 수정률을 높여 이식시킬 수 있는 배아의 수를 증가시켜 높은 임신율을 얻을 수 있을 것으로 기대되었다.

Moreno 등 (1998)은 채취된 난자가 6개 이하인 poor responder에서 정자직접주입술을 상용한 결과와 일반 체외수정시술에서의 성적을 보고하였는데, 수정률은 77.7%와 70.2%로 정자직접주입술 시행군에서 다소 높았으나 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않은 것으로 보고하였다. 임신율과 착상률에서도 유의한 차이를 보이지 않았다. 최근 1개의 난자만 채취가 가능했던 환자들에서 정자직접주입술과 일반 체외수정시술의 성적을 비교한 보고가 있었는데, 비정상 정자군에서는 정자직접주입술이 유의하게 높은 수정률을 보이지만 정상 정자군에서는 수정률이 유의한 차이를 나타내지 않았다 (Gozlan et al., 2007).

방추체 (meiotic spindle)는 일반적으로 제1극체 아래에 존재하는 것으로 알려져 있으며, 손상되면 염색체의 분열이 정상적으로 이루어지지 않아 이수체 (aneuploidy)가 생길 가능성이 높아진다. 정자직접주입술 수행과정에서 방추체에 손상을 주지 않기 위하여 제1극체를 기준 (6시 혹은 12시 방향)으로 난자를 잡고, 3시 방향에서 정자를 주입하게 된다. Polscope는 난자가 살아있는 상태에서 방추체를 관찰할 수 있는 장비로서 방추체가 관찰된 난자에서 수정률이 높고, 배아의 발달이 더 좋은 것으로 나타나 난자 선택의 한 지표로 사용할 수 있다 (Wang et al., 2001; Cohen et al., 2004; Rama Raju et al., 2007). 일반적으로 생각하는 것과는 달리 방추체가 관찰된 경우에도 약 50%의 난자에서만 제 1극체 아래에 존재하는 것으로 보고되었다 (Moon et al., 2003). 정자직접주입술 주입부로부터 30° 이내 (제 1극체에서 60~120°)에 방추체가 존재할 경우 붕괴될 위험이 있는 것으로 알려져 있는데, 11.2% (Moon et al., 2003)와 17% (Avery & Blayney, 2003)의 난자가 이에 해당하는 것으로 보고된 바 있다. 따라서 Polscope를 이용하여 정자직접주입술을 시행한다면 일반적인 정자직접주입술에 비하여 다소 높은 수정률을 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

2. 보조부화술 (Assisted hatching)

체외에서 배아를 배양할 때 투명대가 두꺼워지거나 단단해지는 현상으로 인하여 배아가 부화되지 못하여 착상률이 떨어진다고 알려져 있는데, 이렇게 단단해진 투명대를 얇게 해주거나 구멍을 내 주는 보조부화술이 착상률을 높일 수 있을 것으로 알려져 왔다. Microneedle을 이용한 partial zona dissection (PZD), acid tyrode를 이용한 zona drilling, 단백질분해 효소를 이용하여 투명대의 두께를 얇게 하는 zona thinning 등의 방법이 이용되어 왔으나 최근에는 레이저나 piezo-electric technique을 이용하는 방법이 소개되고 있다.

24개의 RCT (random controlled clinical trial) 연구를 meta-analysis한 Cocharne Review에 따르면, 보조부화술 시행군과 대조군의 임신율이 35.9%와 30.0% [OR (odds ratio)=1.29 (95% CI=1.10~1.52)]로 보조부화술 시행군에서 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다 (Seif et al., 2006).

따라서 poor responder 환자에서도 생성된 배아의 착상력을 증가시키는 방편의 하나로 보조부화술을 제시할 수 있을 것으로 사료되나, 이들 환자군에서의 직접적인 연구보고는 없었다. 대부분의 연구는 나이가 많거나, basal FSH level이 높은 경우, 이전 체외수정기술에서 여러 번 실패한 경우 등 환자 예후가 나쁜 경우에 그 유용성이 보고되었다 (Schoolcraft et al., 1994; Magli et al., 1998). 이러한 연구들로 보아 poor responder 환자의 처치에 유용할 가능성이 높으나 보다 직접적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

3. Fragment removal

정상크기의 할구보다 작은 세포 파편 (cell fragment)이 배아에 형성되는 fragmentation은 인간배아를 체외에서 배양할 때 자주 나타나는 현상이지만, 배아부피의 10%를 넘는 경우 배아 발달에 악영향을 끼치는 것으로 알려져 있다 (Alikani et al., 1999). Day 2에 직경 45 μm 미만의 세포 중 98%, day 3에 40 μm 미만의 세포 중 97%가 DNA를 가지고 있지 못하므로 (Johansson et al., 2003), 이들 파편이 다른 할구로 재흡수 되지 않는 한 향후 발달에 기여하지 못하여 배아의 입장에서는 세포질이 소실되는 현상을

나타내게 된다.

또한 이들 파편들이 인접한 세포의 *programmed cell death* 혹은 *apoptosis*를 유발하거나 (Jurisicova et al., 1996), 세포 사이에 위치하게 되는 이들 파편들이 할구의 난할면 (*division plane*)을 왜곡하여 비정상적인 *compaction*과 포배형성을 야기하여 (Alikani et al., 1999) 배아에 악영향을 미치는 것으로 추정된다. 따라서 파편을 제거하여 인접 할구에 끼치는 영향을 최소화함으로써 포배발달, 착상능력 등을 증진시킬 수 있을 것으로 사료되나 이에 대한 연구는 그리 많지 않은 편이며, *poor responder* 환자에서의 직접적인 연구는 없었다. 또한 파편들이 있는 배아에서 이수성배아의 비율이 높고, *apoptosis*를 시사하는 *Annexin V*에 염색된다는 점 등으로 미루어 파편의 제거가 이러한 근본적인 문제를 해결하지 못하기 때문에 착상능력 증진에 도움이 되지 못한다는 의견도 있다 (Keltz et al., 2006).

Alikani 등 (1999)은 *fragmentation*의 정도가 6~25%인 배아에서 파편을 제거한 후 이식하여 23.4~28.2%의 착상률을 얻었으며, 0~5%의 파편이 있는 배아와 통계적으로 차이가 없는 것으로 보고하였다. 또한 *fragmentation*이 35%를 초과하여 착상 가능성이 거의 없는 군에서도 6.4%의 착상률을 보였다. 또 다른 연구자는 파편 제거 후 포배 (*blastocyst*)로의 발달을 살펴보았는데, 포배 발달률, 포배의 질 (*quality*), 포배의 세포 수가 대조군에 비하여 유의하게 증가한 것으로 보고하였다 (Eftekhari-Yazdi et al., 2006). Keltz 등 (2006)은 낮은 등급의 배아에서 파편을 제거한 후 이식한 군과 최상위 등급의 배아를 보조화술만 시행한 후 이식한 군의 착상률, 임신율, 출산율 등을 비교하였는데, 착상률은 26.7~27.7%, 임신율은 35.9~51.9%, 출산율은 33.3~39.2%로 유의한 차이를 나타내지 않았다고 보고하였다.

제한된 수의 연구이긴 하나 파편의 제거가 착상률을 증진시키는데 도움이 되는 것으로 나타나고 있다. 그러나 이 기술의 일상화를 위해서는 많은 인적, 시간적 투자가 필요할 것으로 예상된다.

4. 세포질 이식 (Cytoplasmic transfer)

포유류의 난자는 세포질의 비율이 높은 세포 중 하나로 난자에서 세포질은 난자의 성숙, 수정, 초기 발생과정에서 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 배아의 발달이 좋지 못하여 착상에 성공하지 못하는 환자에서 난자의 결점을 회복시키기 위한 방법으로 건강한 공여 난자의 세포질을 이식하는 세포질 이식이 고려되었다 (Cohen et al., 1997).

건강한 *mitochondria*는 ATP 생성, 수정과 난할 시 정확한 염색분체 분리 (*chromatid segregation*)에 필수적인데, 나이가 들거나 손상된 *mitochondria*는 ATP 생성이 감소하고, 비정상적인 염색체 분리현상을 초래하여 배아의 발달이 정지되거나 질이 좋지 못하게 된다 (Wilding et al., 2001; 2003). 배아의 발달과정에서 *apoptosis*와 관련된 *transcript*들이 상당량 발견되는데 (Jurisicova et al., 1998; Kawamura et al., 2003), 이들 *transcript*들의 양과 질이 수정과 배아발달에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, *anti-apoptotic factor*와 *pro-apoptotic factor*의 균형이 깨어져 *apoptosis*가 일어나 난자와 배아의 질을 떨어뜨리게 된다 (Jurisicova et al., 1998). 이식되는 세포질에는 mRNA, 단백질, *mitochondria* 등의 다양한 factor들이 존재하는데, 이들이 깨어진 *anti-apoptotic factor*와 *pro-apoptotic factor*의 균형을 맞추거나, 필요한 *mitochondria*를 공급하여 난자와 배아의 질을 높여 착상 가능성을 높이게 된다. 세포질 이식으로 지금까지 30례 이상의 아이가 태어났으나 (Levy et al., 2004), 기술의 효용성이나 안정성에 대한 충분한 검토 없이 시행되었기 때문에 미국 FDA에서는 인간 난자에서 유전물질의 인위적인 조작이 실제 배아 발생에 어떠한 영향을 주는지 명확하지 않다는 점을 들어 2001년 6월 이후 임상적용을 금지하고 있다.

또한 apoptosis가 정상적인 세포 대사활동이며 이를 교란할 경우 다른 영향이 나타날 수 있고, 공여 세포질에 포함된 mitochondria는 수혜자의 것과 다른 것으로 두 종류의 mitochondria DNA가 한 난자에 있게 되는데, 이는 모계유전으로 발달한 진화의 이유를 거스르게 될 가능성이 있으며, 이식된 외부 세포질이 부계 혹은 모계 유전자에 epigenetic effect를 나타낼 가능성 또한 존재한다 (Levy et al., 2004).

40세 이상 혹은 basal FSH level이 높은 환자 18명을 대상으로 세포질 이식을 시행한 20주기의 결과에 따르면, 45개의 배아를 이식하여 하나의 임상적 임신만이 확인되어 8주까지 진행되었으나 유산되었다. 유산산물의 염색체 검사 결과 47,XY,+15였으며, 저자들은 이들 환자군에서 세포질 이식은 유용성이 없다고 보고하였다 (Opsahl et al., 2002).

최근에는 유전자의 변화에 대한 논란을 배제하기 위하여 recombinant mitochondrial protein (Bcl-x)을 생쥐 난자에 microinjection하는 시도가 있었는데, 포배형성률이 증가하였고, 포배에서의 세포수가 증가하였다고 발표하였다 (Casper, 2005).

세포질 이식이 일반적으로 시행되기 위해서는 난자와 초기 배아의 발생과정에서 apoptosis, mitochondria, epigenetic effect에 대한 보다 많은 연구와 이해가 필요하며, 이러한 연구들을 통하여 논란이 되는 유전자의 변화를 일으키지 않는 각종 factor들을 이용한 처치법이 개발되리라 사료된다.

결 론

체외수정시술을 시행하는데 있어서 실험실에서 수행되는 많은 과정들은 수정률을 높이고, 양질의 배아를 배양하여 착상률을 높이기 위한 것이다. 난소반응이 나쁜 환자에서도 기본적인 과정들은 정상적으로 수행되어야 하며, 앞서 소개한 여러 시술들이 탁월하게 좋은 성적을 보고하고 있지 못하고 일부는 추가적인 연구가 필요하지만, 이들 환자군에서는 채취되는 난자의 수가 적기 때문에 여러 번 시도한 경우라면 보다 적극적인 처치를 고려해 볼 수 있으리라 생각된다.

참 고 문 헌

- Alikani M, Cohen J, Tomkin G, Garrisi GJ, Mack C, Scott RT. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril* 1999; 71(5): 836-42.
- Avery S, Blayney M. Effect of the position of the meiotic spindle on the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Fertil* 2003; 6(1): 19-22.
- Bahceci M, Ulug U, Ciray HN, Akman MA, Erden HF. Efficiency of changing the embryo transfer time from day 3 to day 2 among women with poor ovarian response: A prospective randomized trial. *Fertil Steril* 2006; 86(1): 81-5.
- Balasz J, Fábregues F, Peñarrubia J, Carmona F, Casamitjana R, Creus M, Manau D, Casals G, Vanrell JA. Pretreatment with transdermal testosterone may improve ovarian response to gonadotrophins in poor-responder IVF patients with normal basal concentrations of FSH. *Hum Reprod* 2006; 21(7): 1884-93.
- Casper RF. Molecular determinants of embryo quality. In: "Molecular & Hormonal determinants of embryo quality" ASRM & CFAS 2005, Commercially supported symposium. Montreal, Canada. 2005; 41-58.
- Cohen J, Scott RT, Schimmel T, Levron J, Willadsen S. Birth of infant after transfer of anucleate donor oocyte

- cytoplasm into recipient eggs. *Lancet* 1997; 350(9072): 186-7.
- Cohen Y, Malcov M, Schwartz T, Mey-Raz N, Carmon A, Cohen T, Lessing JB, Amit A, Azem F. Spindle imaging: a new marker for optimal timing of ICSI. *Hum Reprod* 2004; 19(3): 649-54.
- Eftekhari-Yazdi P, Valojerdi MR, Ashtiani SK, Eslaminejad MB, Karimian L. Effect of fragment removal on blastocyst formation and quality of human embryos. *Reprod Biomed Online* 2006; 13(6): 823-32.
- Garcia-Velasco JA, Moreno L, Pacheco A, Guillén A, Duque L, Requena A, Pellicer A. The aromatase inhibitor letrozole increases the concentration of intraovarian androgens and improves in vitro fertilization outcome in low responder patients: a pilot study. *Fertil Steril* 2005; 84(1): 82-7.
- Gozlan I, Dor A, Farber B, Meirou D, Feinstein S, Levron J. Comparing intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization in patients with single oocyte retrieval. *Fertil Steril* 2007; 87(3): 515-8.
- Jaroudi K, Al-Hassan S, Al-Sufayan H, Al-Mayman H, Qeba M, Coskun S. Intracytoplasmic Sperm Injection and Conventional In Vitro Fertilization Are Complementary Techniques in Management of Unexplained Infertility. *J Assist Reprod Genet* 2003; 20(9): 377-81.
- Johansson M, Hardarson T, Lundin K. There is a cutoff limit in diameter between a blastomere and a small anucleate fragment. *J Assist Reprod Genet* 2003; 20(8): 309-13.
- Juriscova A, Latham KE, Casper RF, Varmuza SL. Expression and Regulation of Gene Associated With Cell Death During Murine Preimplantation Embryo Development. *Mol Reprod Dev* 1998; 51(3): 243-53.
- Juriscova A, Varmuza S, Casper RF. Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Mol Hum Reprod* 1996; 2(2): 93-8.
- Kawamura K, Sato N, Fukuda J, Kodama H, Kumagai J, Tanikawa H, Shimizu Y, Tanaka T. Survivin acts as an antiapoptotic factor during the development of mouse preimplantation embryos. *Dev Biol* 2003; 256(2): 331-41.
- Keay SD, Liversedge NH, Mathur RS, Jenkins JM. Assisted conception following poor ovarian response to gonadotrophin stimulation. *Br J Obstet Gynecol* 1997; 104(5): 521-7.
- Keltz MD, Skorupski JC, Bradley K, Stein D. Predictors of embryo fragmentation and outcome after fragment removal in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2006; 86(2): 321-4.
- Khamsi F, Yavas Y, Roberge S, Wong JC, Lacanna IC, Endman M. Intracytoplasmic sperm injection increased fertilization and good-quality embryo formation in patients with non-male factor indications for in vitro fertilization: a prospective randomized study. *Fertil Steril* 2001; 75(2): 342-7.
- Levy R, Elder K, Ménéz. Cytoplasmic transfer in oocytes: biochemical aspects. *Hum Reprod Update* 2004; 10(3): 241-50.
- Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Fortini D, Aicardi G, Montanaro N. Rescue of implantation potential in embryos with poor prognosis by assisted zona hatching. *Hum Reprod* 1998; 13(5): 1331-5.
- Moon JH, Hyun CS, Lee SW, Son WY, Yoon SH, Lim JH. Visualization of the metaphase II meiotic spindle in living human oocytes using the Polscope enables the prediction of embryonic developmental competence after ICSI. *Hum Reprod* 2003; 18(4): 817-20.
- Moreno C, Ruiz A, Simón C, Pellicer A, Remohí J. Intracytoplasmic sperm injection as a routine indication in low responder patients. *Hum Reprod* 1998; 13(8): 2126-9.

- Opsahl MS, Thorsell LP, Geltinger ME, Iwaszko MA, Blauer KL, Sherins RJ. Donor Oocyte Cytoplasmic Transfer Did Not Enhance Implantation of Embryos of Women with Poor Ovarian Reserve. *J Assist Reprod Genet* 2002; 19(3): 113-7.
- Rama Raju GA, Prakash GJ, Krishna KM, Madan K. Meiotic spindle and zona pellucida characteristics as predictors of embryonic development: a preliminary study using Polscope imaging. *Reprod BioMed Online* 2007; 14(2): 166-74.
- Schoolcraft WB, Schlenker T, Gee M, Jones GS, Jones HW. Assisted hatching in the treatment of poor prognosis in vitro fertilization candidates. *Fertil Steril* 1994; 62(3): 551-4.
- Seif MMW, Edi-Osagie ECO, Farquhar C, Hooper L, Blake D, McGinlay P. Assisted hatching on assisted conception (IVF & ICSI). *Cochrane Database Syst Rev* 2006;(1): CD001894.
- Tarlatzis BC, Zepiridis L, Grimbizis G, Bontis J. Clinical management of low ovarian response to stimulation for IVF: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2003; 9(1): 61-76.
- Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Keefe DL. Developmental ability of human oocytes with or without birefringent spindles imaged by Polscope before insemination. *Hum Reprod* 2001; 16(7): 1464-8.
- Wilding M, Dale B, Marino M, di Matteo L, Alviggi C, Pisaturo ML, Lombardi L, De Placido G. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Human Reprod* 2001; 16(5): 909-17.
- Wilding M, De Placido G, De Matteo L, Marino M, Alviggi C, Dale B. Chaotic mosaicism in human preimplantation embryos is correlated with a low mitochondrial membrane potential. *Fertil Steril* 2003; 79(2): 340-6.