

Aging and fertility in women

영동제일병원

노성일

1. 서론

최근 사회적 환경의 변화와 여성의 사회 참여도의 증가로 30대 후반에 아기를 가지려는 부부가 많아지고 있다. 이에 반해 생리적으로는 연령 증가에 따라서 생식능력이 급격히 감소하게 되어 임신을 원하는 고령의 여성에게는 사실상 획기적인 방안이 미흡하였다. 여성의 연령별로 나누어 1000명 여성을 기준으로 출생률을 살펴보면 20세에서 24세의 연령군에서는 250~560명이 출생하는 반면 40세에서 44세의 연령군에서는 70~200명의 출생률을 보여 연령이 증가함에 따라 현저한 생식능력의 감소를 보인다 (Gray RH, 1979). 연령별 출생률에 의한 생식능력의 평가는 배우자의 연령과 생식능력 및 생리적인 변화에 따른 성교횟수의 감소에 의해 임신률에 미치는 영향을 배제하기 어려우므로 인공수정이나 난자 공여, IVF/GIFT 등의 인위적인 시술로써 여성의 연령에 따른 생식능력을 평가함이 타당하다. 1982년 CECOS연구에 의하면 배우자가 무정자증인 초산부 여성에서 냉동보존된 정자 공여를 하였을 때 역시 여성의 연령에 따라 임신률은 감소함을 나타낸다. IVF-ET시 40세 이상 여성에서는 4~12%의 임상적 임신율을 보이며 이는 젊은 여성의 19~30% 임신율에 비교하면 무척 낮은 상황이다. 자연유산의 빈도도 39세 미만의 여성에서는 24~29%이나 고령에서는 aneuploidy의 빈도가 증가하여 무려 50~60%에서 자연유산이 된다. 따라서 40세 이상 여성의 생식능력 감소는 성교횟수의 감소 이외에도 노화에 의한 난소기능의 저하, 배아의 염색체이상 빈도의 증가, 자궁의 착상능력의 저하와 자연유산의 증가등이 복합적으로 관련된다. 이러한 변화는 폐경전 최소 15년전부터 시작되며 이를 극복하기 위하여서는 각각의 평가 방법과 진단 기준의 설정이 선행되어야 한다.

1. 노령에서 IVF 임신율

IVF 임신율은 연령에 의한 자연적인 생식능력의 감소와 유사한 양상으로 감소된다. 1992년 Tan 등은 5회 IVF시행후에 20~34세 여성에서의 누적임신율은 54%, 생존아 출생률은 45%, 40세 이상은 각각 20.2%, 14.4%로 보고하였다. 또한 난자채취 주기당 생존출생율은 40세 미만에서 21.5%이지만 40세 이상에서는 8.6%으로 매우 낮다. 따라서 노령은 그 자체만으로 IVF의 모든 시술과정에서 나쁜 영향을 주어 매우 불량한 임신률을 보인다. 원인으로서는 먼저 배란유도시 난포자극호르몬 약제에 대한 반응이 저조하여 취소율이 높다.

노령의 환자중 IVF를 하는 경우에 3명 중 1명의 빈도로 배란유도시 반응이 저조하여 취소하게 된다. 채취되는 난자의 수가 적고 그 상태도 불량하여 수정 후 얻게되는 수정란의 질도 떨어진다. 하지만 수정률이나 수정란의 발달상황은 연령의 영향을 받지 않는 것으로 알려져 있다 (Edwards et al., 1984; Romeu et al., 1987). 그외에 착상률이 낮고 유산률이 높아 전반적으로 생존아 출생률이 낮게 된다. 1996년부터 1997년까지 본원에서 IVF시술시 임상적 임신률은 40세 미만에서는 37.1%이나 40세 이상에서는 14.5%이며, 착상률에 있어서도 40세 미만은 13.5%이나 40세 이상에서는 6.1%로 연령에 따른 현저한 감소를 보였다.

2. Assessment of diminished ovarian reserve

Basal FSH level at MCD#3

Basal E2 level at MCD#3

CCCT (clomiphene challenge test)

GAST (GnRHa stimulation test)

3. In vivo model of uterine receptivity

난자공여프로그램으로 자궁의 receptivity에 관한 많은 지식을 얻게 되었다. 1991년 Navot 등은 젊은 여성이나 노령 여성에서나 난자공여를 받은 경우 유사한 임신성과 유산빈도를 보이므로 난자를 제공한 여성의 나이만이 수혜자의 임신성공에 있어 가장 중요한 인자라고 하였다. 이는 호르몬치료로 인공적인 월경주기를 만들어 주면 어느 연령이라도 그 receptivity는 영향을 받지 않는다고 할 수 있다. 하지만 IVF시술시 자신의 채취된 난자중 반수를 제공하였던 연구결과에서는 수혜자가 연령이 높았으며 착상율이 공여자군보다 유의있게 낮았기 (25.6% vs 42.5%) 때문에 어느정도 자궁의 노화가 착상률 저하에 영향을 미칠 수 있음을 의미한다.

4. How to overcome the diminished fertility in older women undergoing IVF

(1) Improving the stimulation response of older women

과배란 유도에 대한 난소반응이 저조한 이유는 난소에 남아있는 생식세포의 절대적인 수의 감소 때문이다. 나이가 많거나, 이전에 난소수술을 하였거나, 심한 자궁내막증이 있거나 그밖의 원인이 없어도 난소반응이 저조할 수 있다. 이에 대한 치료법은 poor responder에서와 유사하게 적용된다. Poor responder의 정의는 과배란 유도시에 최고 혈중 에스트라디올농도가 300~500pg/ml밖에 되지않고 이전에 채취 난자수가 적었으며 배아이식수도 매우 적었던 경우로 ART를 하는 환자중 평균 5~18%정도를 차지한다.

① High dose of gonadotropin

난포자극호르몬의 용량을 통상적인 용량보다 많은 하루 6 ampoule 을 사용하여 효과를

보고한 경우도 있으나 하루 4 ampoule를 사용할 때와 유의한 차이가 없으며 고용량의 난포자극호르몬을 투여하는 것만으로는 oocyte recruitment를 증가시키지 못해 효용성이 떨어진다.

② Introduce GnRHa

CC/hMG에 비하여 GnRHa를 병용하여 hMG를 사용하는 경우가 35세 미만에서는 유의한 차이가 없으나 35세 이상의 여성에서는 CC/hMG를 사용한 경우 4%의 임신률을 보이나, long GnRHa-hMG에서는 24%의 더욱 좋은 임신률을 보고하였다 (Csemiczky et al., 1994). 따라서 배란유도시 GnRHa를 병용하는 것이 바람직하다.

③ Minidose of GnRHa

GnRHa를 이용하여 pituitary down-regulation을 하는 경우에 exogenous gonadotropin을 투여하는 시기에 GnRHa의 용량을 줄이면 premature LH surge는 막을 수 있으면서 endogenous gonadotropin의 분비는 자극하여 배란유도를 성공적으로 할 수 있다. 이는 일종의 GnRHa의 flare effect를 이용하는 것이다 (Scott and Navot, 1994).

④ Natural cycle

고령의 환자에서는 배란유도시 적은 숫자의 난자가 채취되거나 수정률이나 배아발달은 젊은 환자에서와 다르지 않아 질적으로는 비교적 좋은 상태의 배아가 적은 개수로 이식되는 상황이다. 환자가 난소기능은 감소하였으나 규칙적인 배란을 하고 월경을 유지하고 있는 경우에는 자연주기의 배란을 이용하여 gonadotropin 약제의 비용을 들이지 않고도 수정란을 얻을 수 있다. 주기당 1~2개의 배아를 얻게 되지만 쉬지 않고 매달 시도할 수 있다는 장점이 있다.

⑤ Pulsatile intravenous infusion of GnRHa

폐경전후나 임박한 난소부전증환자에서 자연배란 주기를 이용하여 주기적으로 GnRHa를 정맥주사함으로써 FSH를 일시적으로 증가시키고 LH는 여전히 낮게 유지하여 난포의 성장과 E2상승을 유도할 수 있다 (Jones et al., 1986).

⑥ Temporal pause of ovulation with contraceptive steroids

37세 이후부터는 난자의 수가 격감하고 FSH가 상승하여 난포가 FSH에 내성을 가지게 되므로, 30대 초반부터 GnRH agonist, GnRH antagonist 또는 contraceptive steroids를 이용하여 오랜기간 동안 pituitary down regulation을 하게 되면 낮은 FSH, LH level로 유지할 수 있어 down regulation을 제거하면 난소가 원하는 시기에 다시 자연적인 배란을 할 수 있다 (Marcus and Edward 1994). 평균 폐경 연령인 51세경에는 약 1000개의 난포가 존재하나 이렇게 장기간 down regulation을 하게 되면 난소에서 난자의 소멸속도를 감소시켜 충분한 난포를 노령까지 유지할 수 있다. 이는 자궁을 착상에 유리하게 유도할 뿐아니라 노령에서도 충분한 수의 난포가 저장된다는 장점이 있다.

⑦ Cotreatment with Growth Hormone (GH)

GH를 함께 투여함으로써 난소반응을 향상시켜 난자회수율, 이식되는 배아의 수, 수정률 및 임신율을 높인다고 한다. Exogenous gonadotropin과 동시에 GH (4 IU/d IM)을 함께 투여하는 것으로 hCG를 투여하는 날까지 투여한다. 1997년 William 등은 이전에 배란유도를

실패한 여성에서 microdose GnRHa long protocol과 FSH와 GH를 함께 이용하여 난소반응을 향상시켰으며 평균 10.9개의 난자를 채취하고 50%의 임신률을 보고하였다. 사용하는 GH의 용량이나 방식에 따라 결과가 다양하며 GnRHa 사용방식에 따라서도 영향을 받을 수 있다.

(2) Assisted hatching

착상율과 임신율을 향상시키기 위하여 4세포기 때에 수정란의 ZP에 물리적으로 작은 절개를 하여 부화를 보조하여주는 것을 시초로 (Cohen et al., 1990) 물리적 또는 화학적으로 많은 방법이 시도되었다. 노령에서는 ZP가 두꺼워 파열되지 못하면 부화가 저해되므로 이것이 IVF-ET후에도 착상률이 저조한 이유이었다. 보조적 부화술의 직접적인 작용기전은 아직 불명확하나 인공적인 구멍으로 대사물질이나 growth factor가 원활하게 이동하거나, 조기에 부화되면서 수정란과 자궁내막이 조기에 접촉하는 것으로 착상을 도모한다고 한다 (Cohen et al., 1992). IVF시 반복적인 착상실패로 임신이 어려운 환자들에게는 좋은 방법으로 이용되고 있다. Zona pellucida는 난자의 분비물질로 합성되므로 노령에 이르러서는 zona pellucida의 상태가 난소의 기능을 대변한다고 한다. 연령이 증가할수록 zona는 경화 (hardening) 되고 두꺼워지므로 경화방지 및 인공적인 구멍을 내주어 부화를 촉진시키는 것이 추천된다. 그러나 인공적인 구멍으로 인하여 부화되는 과정에서 작은 구멍에 수정란이 끼이면 monozygotic twinning이나 conjoined twinning와 연관된다고도 한다 (Slotnick et al., 1996).

① Partial Zona Dissection (PZD)

Micromanuplation 장치하에서 micropipette으로 zona pellucida (ZP)을 일부 관통하여 holding pipette에 비비면서 일부를 절개한다. Laser를 이용한 cruciate thinning방법도 있으며 배아 이식시기에는 prednisolone과 antibiotics를 4일간 투여하여 구멍을 통한 면역세포의 침입이나 자궁내막에서의 면역반응을 줄일 수도 있다.

② Zona Drilling (ZD) with acid Tyrode solution

Acid Tyrode용액을 이용하여 ZP를 녹이며, 이 용액은 미수정난의 ZP에는 해로운 영향이 있으나 수정란에서는 사용한 경우는 발달에 장애를 주는 것 같지 않다. 1993년 basal FSH가 높거나 39세 이상 (≥ 39 yrs), zona 두께가 두꺼운 경우 ($\geq 15 \mu\text{m}$)에 선택적으로 시도하여 유의한 임신율의 상승을 보고하였다 (Cohen et al., 1993). 장점은 첫째, PZD보다 큰 구멍을 뚫어주므로 수정란의 모양이 손상되지않고 그대로 부화되며 둘째, 배아발달에 PZD보다 영향을 적게 미치고 셋째, 일란성 쌍태아의 빈도가 높지 않으며 넷째, ZD은 배아발달 3일째에 시행하므로 이 시기는 배아의 할구사이사이에 연결부위 (structural junction)가 형성되어 있어 배아이식시 할구가 분리될 위험이 없다는 점이다. 보조적 부화술은 38세 미만이거나 zona가 얇은 경우에는 도움이 되지 않을 수 있고, 이것이 부화율이나 착상률, 임신율의 증가에는 도움이 되지만 노령의 여성에서는 이것이 주된 문제가 아니라 난자나 이식되는 자궁의 생물학적인 연령이 가장 중요한 인자이므로 유산율이나 take-home baby rate를 비교할 때는 보조적 부화술을 시행한군 과 대조군사이에 결국 유의한 차이가 없었다는 보고도 있다 (Bider et al., 1997)어 선택적인 시술이 고려된다.

③ Biochemical Assisted Hatching(BAH)

최근 물리적인 방법이 아니라 효소를 이용한 생화학적 방법으로 zona pellucida를 얇게 녹여주는 BAH를 이용하게 되었다. 체내에서 부화 및 착상시 zona pellucida가 깨어져서 그 틈으로 부화가 되는지, 아니면 zona pellucida가 배아 또는 자궁의 내막에서 분비한 어떠한 효소들에 의하여 안팎으로 녹여지는 지는 아직 불명확하나 후자쪽의 가능성이 높다. 본원에서는 pronase E를 이용하여 수정 후 24시간후부터 pronase E를 첨가한 배양액에 24시간동안 배양한 뒤 배아이식하여 35세 이상, 난자채취가 3개 미만인 환자군에서 유의있게 높은 임신율을 보고한 바 있다 (Lee et al., 1997). 이 방법은 micromanipulator를 이용하지 않는 간편하고도 안전한 장점이 있으며 선택적인 사용의 적응증은 더욱 연구해 보아야 할 것이다.

(3) Co-culture

체외배양체계는 배아의 생존 능력을 감소시키게 되는 주 원인으로서 지금까지 여러 배양방법의 발달이 있었다. 체세포를 배양기에 단일층으로 자라게 한 뒤 수정란을 그 위에 놓아 함께 배양하는 co-culture는 난관세포나 자궁세포, Vero cell 등을 이용할 수 있다. 이로써 배아발달과 착상능력을 향상시켰다는 보고가 있었다 (Wiemer et al., 1993). 이러한 정확한 기전은 아직 알려지지 않았으나 가능한 기전으로는 이용하는 체세포가 배아성장인자를 제공하여 발달을 향상시키거나, 배양액내 유해한 성분을 제거시키기 때문으로 이해하고 있다. 또한 Zona hardening을 방지하여 결국 부화에 도움을 주어 선택적부화술과 함께 coculture를 함으로써 기저 FSH가 높았거나 IVF에 반복적인 실패를 한 환자들에게서 유의한 임신율상승이 있었다 (Wiemer et al., 1994).

(4) High order embryo transfer

40세 이상의 모든 여성들에서 과배란유도시 난소반응이 좋지 않은 것은 아니다. IVF-ET 시 4개 이상 배아를 이식할 정도인 경우 40세 미만인 여성에서는 47.6%, 40세 이상인 경우에는 34.4%의 임신율을 보여 난소반응이 좋은 40대 여성들은 젊은 여성에서의 임신률과 유의한 차이가 없었다고 한다 (Widra et al., 1996; Roest et al., 1996). 노령이면서도 난소 반응이 좋은 환자를 배란유도를 하기 이전에는 선별할 수 없으므로 난자공여를 권유하기 이전에 한 번은 배란유도를 시행해 보는 것이 도움이 된다. 또한 배아 이식시 젊은 여성에서의 경우와 달리 노령에서는 착상률이 낮고, 배아의 염색체이상 빈도가 높아 이를 극복하기 위하여 자신의 난자인 경우 다수의 배아이식을 하면 임상적 임신율을 상승시키나 (Antinori et al., 1996) 또한 다태아 임신위험이 약간 있다. 만약 난자공여를 받는 경우에는 이것이 해당되지 않으며 영국에서는 자신의 난자이든 공여된 난자이든 3개 이하로 배아이식수를 정하고 있다.

(5) Embryo biopsy for detection of aneuploidy

배아의 형태나 발달이 정상적으로 보이는 경우에도 여성의 연령이 많아지면 분열시 aneuploidy의 빈도가 증가한다. 배아의 할구중 일부를 생검하여 착상전 배아 염색체진단

(Preimplantational Genetic Diagnosis: PGD)으로써 FISH technique을 이용하여 cytogenetic analysis보다 더 효율적으로 배아이식 이전에 aneuploidy유무를 검색한다. X와 Y의 성염색체와 18, 16, 13/21번 염색체의 특정부위에 결합하는 probe를 이용하여 형광물질을 발색시켜 (multi-color and multi-probe fluorescence in situ hybridization technique) 진단한다.

(6) The future: Improvement of the quality of the oocyte: Oocyte reconstruction

Aged oocyte에서 aneuploidy가 증가되는 것은 이미 주지된 사실로 받아들여지고 있다. 이는 germinal vesicle에서부터 감수분열이 진행되어 성공적인 수정을 할 때까지, 또는 이 이후 체세포 분열과정에 centrosome 등 세포질 조절 (cytoplasmic regulator)에 있어서 aged oocyte의 경우에는 많은 결함을 보이기 때문으로 이해된다. 총괄적인 극복방안은 난자공여를 할 수 있지만 최근 aged or suboptimal oocyte단계에서 난자의 질적 향상을 위한 구제방법이 시도되고 있다. 일차로 수정되지 못한 난자 (recipient oocyte)에게 건강한 난자로부터 일부의 세포질을 떼어내 cytoplasmic substitution을 하면 recipient oocyte에서 제 2차 극체와 전핵형성을 이룰 수 있게 되었다 (Zang et al., 1997a). 또한 IVF-ICSI시술시 폐기될 미성숙 난자들을 이용해 핵치환함으로써 감수분열을 재개할 수 있도록 하여 난자의 감수분열 과정에 대한 연구가 가능해졌다 (Zang et al., 1997b). 따라서 인간의 oocyte를 핵과 세포질 수준에서 재건하는 것이 가능하며 이에 대한 많은 연구가 진행되면 향후 난자공여를 대체할 수 있을 것이다.

(7) Ovum donation

40세 이상의 여성이 IVF로 한 번 성공적인 임신을 하게되는 비용을 조사하면 난자공여를 받는 것이 가장 경제적인 방법 (Legro et al., 1997)일 정도로 임신율은 난자공여시 이식 주기당 37%에서 71.4%까지 높다. 이는 배란유도시 고비용을 절감하는 한편 난자의 노화에 따른 염색체이상의 위험도도 줄이므로 처음으로 고려할 만한 치료항목이 된다.

5. How to counsell with older women wishing to be fertile

고령에서의 성공적인 임신의 어려움을 설명하고 대부분 고령에 임신을 원하는 여성들은 난자공여를 받기까지 오랜 시간을 심사숙고하나 가급적 초기에 시행하도록 하는 것이 도움이 된다. 노령의 모든여성은 생식능력이 떨어지므로 1년내 임신가능성은 25%정도로 이들에게는 통상적으로 일정 불임기간을 정한다는 것은 무의미하여 적극적이며 다각적인 치료가 필요하다. 자신의 난자로서 임신을 성공하게되면 산전 염색체검사로 태아의 이상 유무를 반드시 확인해 주어야 한다.

REFERENCE

Antinori S, Caffa B, Selman HA et al: Enhancement of pregnancy in patients with repeated IVF

- failures by increasing the number of embryos transferred. *Hum Reprod* 1996, 11, 121.
- Bider D, Livshits A, Yonish M, Yemini Z, Mashiach S, Dor J: Assisted hatching by zona drilling of human embryos in women of advanced age. *Human Reprod* 1997, 12(2), 317-320.
- CECOS: Female fecundity as a function of age: results of artificial insemination in 2193 nulliparous women with azoospermic husbands. *N Engl J Med* 1982, 306, 404-406.
- Cohen J, Alikani M, Trowbridge J, Rosenwaks Z: Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis. *Human Reprod* 1992, 7(5), 685-691.
- Csemiczky G, Hagenfeldt K, Wramsby H: Selection of ovarian stimulation protocol is related to IVF treatment outcome in women 35 years of age and over. *J Assist Reprod Genet* 1994 Oct, 11(9), 474-477.
- Edwards RG, Fishel SB, Cohen T et al: Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1984, 1, 3-23.
- Gray RH: Social influences in fertility at later ages of reproduction. *J Biosoc Sci Suppl* 1979, 6, 97-115.
- Jones GS, Muasher SJ, Rozenwaks Z, Acosta AA, Liu HC: The perimenopausal patients in in vitro fertilization: the use of gonadotropin-releasing hormone. *Fertil Steril* 1986, 46(5), 885-891.
- Lee JE, Lee DR, Paik HR, Kim HC, Shim HN, Lee SH, Cho JH, Roh SI, Yoon HS: Application of biochemical assisted hatching (BAH) by proteases in human assisted technology program. *Fertil Steril Suppl* 1997, S147.
- Legro RS, Shackelford DP, Moessner JM, Gnatuk CL, Dodson WC: ART in women 40 and over: Is the cost worth it? *J Reprod Med* 1997, 42, 76-82.
- Marcus SF, Brinsden PR: In-vitro fertilization and embryo transfer in women aged 40 years and over. *Human Reproduction* 1996, 2(6), 459-468.
- Roest J, Zeilmaker GH, van Heusden AM, Verhoeff A, Mous H: The ovarian response as a predictor for successful in vitro fertilization treatment after the age of 40 years. *Fertil Steril* 1996, 66(6), 969-973.
- Romeu A, Muasher SJ, Acosta AA et al: Results of in vitro fertilization attempts in women 40 years of age and older: the Norfolk experience. *Fertil Steril* 1987, 47, 130-136.
- Rosenwaks Z, Davis OK, Damario MA: The role of maternal age in assisted reproduction. *Human Reproduction* 1995, 10(1), 165-173.
- Schoolcraft W, Stevens J, Schlenker T, Wagley L, Gee M: Improved controlled ovarian hyperstimulation in poor responder in vitro fertilization patients with a microdose follicle-stimulating hormone flare, growth hormone protocol. *Fertil Steril* 1997, 67, 93-97.
- Scott RT, Navot D: Enhancement of ovarian responsiveness with microdoses of gonadotropin-releasing hormone agonist during ovulation induction for in vitro fertilization. *Fertil Steril*

1994, 61, 880-885.

- Slotnick RN, Ortega JE: Monoamniotic twinning and zona manipulation: a survey of U.S. IVF centers correlating zona manipulation procedures and high-risk twinning frequency. *J Assist Reprod Genet* 1996, 13, 381-383.
- Tan SL, Royston P, Campbell S et al: Cumulative conception and livebirth rates after in-vitro fertilization. *Lancet* 1992, 339, 1390-1394.
- Widra EA, Gindoff PR, Smotrich DB, Stillman RJ: Achieving multiple-order embryo transfer identifies women over 40 years of age with improved in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1996, 65(1), 103-108.
- Wiemer EK, Hoffman DI, Maxon WS et al: Embryonic morphology and rate of implantation of human embryos following co-culture on bovine oviductal epithelial cells. *Hum Reprod* 1993, 8, 97-101.
- Wiemer EK, Hu Y, Cuevo M et al: The combination of coculture and selective assisted hatching: results from their clinical application. *Fertil Steril* 1994, 62, 105-110.
- Zhang J, Blaszczyk A, Grifo J, Li L, Licciardi F, Noyes N, Krey L: Reconstruction of human MII oocytes by partial cytoplasmic substitution. *Fertil Steril Suppl* 1997a, S154.
- Zhang J, Grifo J, Blaszczyk A, Meng L, Adler A, Chin A, Krey L: In vitro maturation (IVM) of human preovulatory oocytes reconstructed by germinal vesicle (GV) Transfer. *Fertil Steril Suppl* 1997b, S1.