

Human IVM/F-ET Program에서 미성숙 난자의 체외성숙과 수정 및 체외배양

- In vitro Maturation of Immature Oocytes Followed by Fertilization and Development in vitro in Human IVM/F-ET Program -

윤산현 · 이원돈 · 임진호

마리아 병원

서 론

미성숙 난자를 채취하고 체외성숙과 체외수정을 유도하는 IVM/F-ET program은 이용할 수 있는 난자나 배아들의 수를 늘리기 위하여 여러 가지 성선자극호르몬들 (gonadotrophins)을 투여하여 과배란을 유도해야 하는 전통적인 IVF-ET program의 매력적인 대안이 될 수 있다.

전통적인 IVF-ET program에서는 시험관아기 기술을 성공적으로 이끌기 위하여 일반적으로 성선자극호르몬들과 성선자극호르몬방출호르몬 (GnRH)들의 유사체 (agonist)나 길항체 (antagonist)를 이용하여 과배란을 유도한다. 이는 시간적, 경제적으로 환자에게 부담이 되기도 하지만 난포의 성장이 정상적으로 동기화되지 않으면 그 부작용과 낮은 성공율로 다시 육체적, 정신적인 부담이 크다. 난소과자극증후군 (ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS)은 위험요인들, 배란유도방법, 황체기유도 및 임신 등에 따라 차이가 있을 수 있지만 전통적인 IVF-ET program에서 나타날 수 있는 난소과자극의 심각한 여병이라 할 수 있다. 특히, 다낭성 난소 (polycystic ovaries, PCO)나 다낭성난소증후군 (polycystic ovary syndrome, PCOS)을 지닌 환자들은 정상적인 난소를 지닌 환자에 비해 훨씬 더 많은 OHSS의 위험에 노출된다. 게다가 불임치료의 약품들과 유방암 및 난소암과의 관련성이 확인된 바는 없지만, 불임치료의 약품들에 의한 암의 발병설이 출현하고 있는 것도 사실이다 (Duckint와 Temleton, 1998). 또한, 성선자극호르몬의 반응을 잘 나타내지 않는 PCO(S)를 지닌 환자에게는 상대적으로 많은 성선자극호르몬들을 투여하지만 난포의 성장과 동기화가 잘 일어나지 않아 채취한 난자들이 다양한 성숙도를 보일 수 있다. 그들 중 난핵포기 (germinal vesicle stage)에 있는 난자들도 체외성숙과 체외수정을 유도하면 정상적인 배아로 발생하여 임신에 이른 바 있으나 그 성공율은 매우 낮다 (Check 등, 2001).

대부분의 센터에서 이러한 환자가 발생하면 시험관아기 기술을 포기시키는 것이 관례였다. 그러나, 과배란을 유도하는 과정에서 OHSS의 위험이 있거나 성선자극호르몬들의 반응을 잘 나타내지 않는 PCO(S)를 지닌 환자가 있다면 적절한 시기에 HCG만을 투여하고 난자를 채취하여 IVM/F-ET를 시행한다면 포기하는 사례 없이 시험관아기 기술을 성공적으로 이끌 수 있을 것이다 (Son 등, 2002). 또한, 이러한 환자에게는 자연주기에서 적절한 시기에 HCG만을 투여하고 난자를 채취하여 IVM/F-ET를 실시함으로써 부작용을 발생시키지 않고 전통적인 IVF-ET program과 같은 임신을 이끌 수 있을 것이다 (Trounson 등, 1994; Tan 등, 2002). 한편, 여러 가지 불임원인을 지닌 환자의 자연주기에서 우세난포

(dominant follicle)로부터 성숙난자를 채취하여 체외수정하고, 작은 난포로부터 미성숙 난자를 채취하여 체외성숙 및 체외수정을 유도한 후 이식되는 배아의 수를 증가시키면, 전통적인 natural IVF-ET program의 것보다 유의하게 높은 임신성공율을 얻을 수 있을 것이다 (Chian 등, 2004).

이에 본문에서는 체내에서 난자의 성숙과 수정 및 배아의 착상에 대한 과정을 살펴보고 체외에서 유도할 수 있는 성숙과 수정 및 배아의 발생과 포배기 배아들의 동결 및 용해하는 방법들을 간단히 기술하고자 한다.

체내에서 난자의 성숙과 수정 및 배아의 착상

일반적으로 사람의 배아는 원시란 (oogonium)으로부터 성장한 성숙한 난자가 수정능력을 획득한 고향력 정자와 수정함으로써 발생한다. 원시생식세포 (primordial germ cell)에서 유래한 oogonium은 일찍이 태아기 동안에 난소의 기저피질에서 빠르게 증식한다. Oogonia가 지속적으로 증식하면서 약 5개월이 지나면 난모세포 (oocyte)로 성장하거나 많은 퇴화가 일어난다 (Ohno 등, 1962). 즉, oogonia가 일련의 유사분열을 마친 후 oocyte로 분화하기 위하여 감수분열을 시작한다. 감수분열은 2차에 걸쳐 실행되는데 각각은 전기, 중기, 후기 및 말기로 나뉜다. 태생기나 출생기를 통하여 제1차 감수분열의 전기에 이른다 (Gondos 등, 1971). 난모세포는 제1차 감수분열의 세사기, 접합기, 태사기 및 이중기를 차례로 통과하여 관동기에서 성선자극호르몬의 자극이 원활한 성인이 될 때까지 휴지상태로 있게 된다. 성인이 되어 배란이 이루어지는 시기에 난모세포는 선택적으로 성선자극호르몬의 영향을 받아 감수분열을 완성하기에 이른다. 대부분의 감수분열은 출현한 난포속에서 진행하는데 원시난포가 형성하기 전에 oogonia의 증식 및 체세포와의 상호작용을 조절하는 요인들은 거의 알려지지 않았다 (Picton 등, 2003). 다만, 사람의 태생기에는 난소내에서 생식세포증식의 autocrine 및 paracrine의 조절을 activin이라는 물질이 관여할 수 있다는 것을 밝혔을 뿐이다 (Martins da Silva 등, 2004). 출생기에 난소 내에서 oocyte와 그를 둘러싼 난포세포 (follicle cell)들은 oocyte 및 난포세포들간의 영양분들뿐만 아니라 신호들의 전달을 촉진하는 하나의 교신체계를 공유하고 있다. c-kit receptor와 그 수용체, IGF-1과 IGF-1 수용체들, IGF 결합 단백질들, TGF-beta족, 특히 골 형성 단백질들과 같은 요인들이 oogenesis, 원시난포의 활성화 및 잇따른 난모세포/난포세포의 성장 및 증식에 있어서 현저한 역할을 한다고 알려졌다 (Fair, 2003).

대부분의 난모세포(난자)들은 원시난포 내에서 편평한 과립세포들에 의해 둘러싸여 있는데 그 과립세포들이 입방형의 층을 형성하면서 1차 난포가 된다. 이때 과립세포들은 난자가 필요로 하는 물질들을 합성하여 세포간의 비좁은 공간 (gap-junction)을 통하여 난자에게 수송한다. 점차 과립세포들이 분열하여 1차 난포에서 또 하나의 과립세포층이 형성되면서 2차 난포가 된다. 난포의 성장은 주로 성선자극호르몬들에 의해서 조절되는 것으로 알려지고 있다. 2차 난포에서 과립세포가 성선자극호르몬들의 영향을 받아 지속적으로 증식하면서 과립세포층 내에서 체액의 침출물이 고이는 공간 (난포)이 생기며 그 양이 점점 많아지고 난포의 크기가 커짐에 따라 3차 난포가 된다 (graafian follicle). 이때에 gap-junction들을 통하여 포막세포 (theca cell)들간, 과립세포들간, 과립세포들이나 난구세포들과 난자간에 많은 교류들이 일어난다 (Tokuyama 등, 2003). 혈청 내에서 FSH의 수준이 일정 값 이하로 떨어지면 양호한 estrogen을 생산하는 특정한 난포만이 생존한다. 크고 건강한 난포에서는 과립세포들의 증식이 두드러지게 나타난다. 성장중인 난포는 더욱 빠르게 성장하여 난소의 표면에 뚜렷한 벌지

(bulge)를 형성한다. 난자는 난포가 성장할 때 여러 가지 난포세포들이 합성한 물질들을 이용하여 일련의 형태학적 변화를 하면서 LH가 급증한 후 2차 감수분열까지 수행하여 성숙을 진행한다 (Fair, 2003). LH의 급증은 난자의 성숙을 재개시킬 뿐만 아니라 난포가 터지게 하고 난포벽의 황체화를 초래하는 많은 일들이 시작되도록 한다. 즉, LH의 급증이 estrogen을 생산하는 과립세포들로 하여금 바로 progesterone을 생산하도록 전환시키고, 난포세포들이 prostaglandins (PGs)을 생성하도록 자극하며 과립세포가 MMPs (matrix metalloproteinases)와 그들의 수용체 (TIMPs)를 생성하도록 자극하며 과립막 세포층이 맥관화되도록 자극한다 (Duffy와 Stouffer, 2003). 난구세포들에 둘러싸인 성숙 난자는 과립층으로부터 분리되어 난포액에 떠 있게 되는데 정점이 붕괴되어 난포가 터지면 난자가 난구세포와 함께 복강으로 배란된다.

배란된 난자는 난관체에 의해서 나팔관으로 흡입되어 팽대부에 도달한다. 팽대부에 이미 도달한 고활력 정자와 만나게 되며 나팔관의 팽대부와 협부 사이에서 대부분 수정이 이루어 진다. 수정된 난자(배아)는 나팔관내 상피세포의 분비액과 섬모의 도움 및 근육의 연동운동에 의하여 나팔관을 따라 자궁으로 내려간다. 팽대부에서 자궁까지 배아의 이송은 대략 3~4일이 걸린다. 배아의 영양은 난구세포들이나 상피세포들의 분비액 (Menezo와 Guerin, 1997; Gardner 등, 1996)에 의존한다. 배우합체에서 상실배기까지의 발생과정에 있는 첫 3~4일은 나팔관에서 이루어 지고, 그 후 상실배기부터 착상 직전까지 배아가 자궁으로 내려가서 배반포강을 형성하고 배반포액의 점진적인 증가로 팽화하며 자궁의 단백질소들의 도움으로 투명대로부터 탈피하여 자궁내막에 달라붙어 착상에 이른다.

IVF/F-ET program에서 난자채취

Tan 등 (2002)은 IVF/F-ET에 의한 임신율은 채취한 난자의 수와 관련이 있다고 보고하였다. Chian 등 (2004)은 채취할 때 난포의 크기가 잇따른 배아의 발생에 있어서 중요할 수 있지만, 작은 난포로부터 유래한 난자의 발생능력은 우세난포의 존재여부에 상관 없다고 보고하였다. 따라서, 초음파영상에 나타난 포상난포의 수가 IVF/F-ET기술의 좋은 가능자가 될 수 있지만 채취하는 기술이 이 기술의 성공을 위해서 보다 중요하다.

실험실에서는 난자채취 및 난자배양에 사용할 배양액을 준비하는 것이 우선한다. 난자를 채취할 때 채취하는 바늘을 세척하는 용액을 합성배양완충액 (synthetic culture buffer, SCB)의 조성분 중 20 mM NaHCO₃의 대신에 20 mM의 MOPS, 40 IU/ml의 heparin을 첨가한 용액 (heparinized SCB-MOPS)으로 한다. 이들을 시험관 (Falcon 2057)에 10 ml씩 분주하여 냉장고에 보관하는데 난자를 채취하기 하루 전에 한 환자 당 5~6개를 꺼내어 36.8°C의 온도가 조절된 배양기에서 평형을 유도한다. 난자를 찾았을 때 난자를 세척하는 배양액과 수정용 배양액을 15% (v/v)의 수정용 첨가제 (synthetic additive solution for fertilization, SASF)를 첨가한 SCB로 하는데 난자를 채취하기 하루 전에 난자를 세척하는 배양액은 한 개의 배양접시 (Falcon 3001)에 3 ml씩 넣어 한 환자 당 3개의 배양접시를 준비하며, 수정용 배양액은 1개의 배양접시 (Falcon 3037)에 1 ml을 넣어 한 환자 당 1~2개의 배양접시를 준비하고 5%의 CO₂와 36.8°C의 온도가 조절된 배양기에서 평형을 유도한다. 미성숙 난자의 성숙용 배양액을 15% (v/v)의 성숙용 첨가제 (synthetic additive solution for maturation, SASM)를 첨가한 SCB로 하는데 난자를 채취하기 하루 전에 1개의 배양접시 (Falcon 3037)에 1 ml씩 넣어 한 환자 당 1~2개의 배양접시를 준비하고 5%의 CO₂와 36.8°C의 온도가 조절된 배양기에서 평형을 유도한다.

대부분의 시험관아기 program에서 과배란을 유도한 환자로부터 질식초음파기를 이용하여 난자를 채취한다. 이와 비슷하게 미성숙 난자의 채취는 일반적으로 다음과 같이 실시한다 (Yang 등, 2005). 미성숙 난자를 채취하는 주기에서 10,000 IU의 HCG를 투여한 36~38시간 후에 질식초음파와 채취 바늘 (Cook, Eight Mile Plains, Queensland, Australia)을 이용하여 난포의 내용물들 (follicular aspirates)을 80~100 mmHg의 음압으로 흡인한다. 난포의 내용물을 미리 36.8℃로 온도를 조절하고 heparinized SCB-MOPS의 용액이 들어 있는 시험관 (Falcon 2096)에 채집한다. 시험관에 채집한 직후에 36.8℃의 온도로 조절된 조작상 (manipulation chamber, ILLJIN Co.) 내에서 mesh (Falcon 1060, Life Technologies, 70 micrometer)의 귀를 소독된 핀셋으로 잡고 90 mm 배양접시를 mesh의 아랫부분에 비친 다음, 채집한 난포의 내용물들을 mesh에 통과시키며 mesh에 남아있는 세포괴 (cell mass)와 난자-세포괴 (cumulus oocyte complexes, COCs)를 heparinized SCB-MOPS의 용액을 1~2회 통과시켜 세척한다. 이때 거의 모든 적혈구와 세포조각들은 제거된다. 세척된 세포괴와 난자-세포괴들이 들어 있는 mesh를 신선한 heparinized SCB-MOPS 배양액이 들어 있는 배양접시 (Falcon 3002)에 옮기고 COCs를 찾기 용이하게 하기 위하여 pasteur 파이펫을 이용하여 배양액에 잠긴 세포괴와 COCs를 새로운 배양접시 (Falcon 3002)로 배양액과 함께 옮긴다. COCs를 찾아 신선한 배양액으로 2~3회 세척하고 난자의 성숙도를 결정한다.

난자의 성숙도 판정 및 배양

Chian 등 (2004)은 체외성숙에 이용되는 배양조건들이 IVM/F-ET에 의한 임신율에 아주 중요한 영향을 준다고 하였다. Kawano 등 (2004)은 성숙난자를 포함하고 있는 난포액이 미성숙 난자를 포함한 난포액보다 MIP-3alpha를 유의하게 많이 함유하고 있으므로 이것이 난자의 성숙에 관여하는데 IL-1alpha and TNF-alpha에 의해 조절된다고 하였다. Balakier 등 (2004)은 제2차 감수분열 중기에서 일정 시간을 배양하는 것이 정상적인 수정율을 향상시킨다고 보고하였다. 제1극체가 관찰되자마자 ICSI로 수정을 유도했을 때 36%의 수정률을 나타냈고, 2시간 후에 ICSI를 실행하였을 때 43%의 수정률을 나타냈으며, 3~6시간 후에 ICSI하였을 때 61%의 수정률을 나타냈다. 이러한 결과는 일정시간 제2차 감수분열 중기에서 배양하는 동안에 완전한 활성화가 일어나고 정상적인 발생능력을 확립하게 된다는 것을 밝힌 것이다. 그러므로, 전통적인 시험관아기 기술에서와 같이 IVM/F-ET program에서 난자를 채취한 직후나 성숙을 유도한 일정시간 후에 난자들의 성숙도를 판정 (Rattanachaiyanont 등, 1999)하고, 고활력 정자와 함께 수정할 시간을 결정하여야 한다. 미성숙 난자는 난구세포층의 팽창화 (expansion) 정도가 빈약하고 난자주변의 환방사층이 촘촘하며 과립세포층이 응집되어 있고, 중간성숙 난자는 둘러싸인 환방사층이 촘촘하나 난구세포층과 과립세포층은 팽창화되어 있으며, 성숙난자는 난구세포층이 완전히 팽창화되어 있고 환방사층은 완전한 방사형을 나타내며 과립세포들은 매우 느슨하게 서로 연결되어 있다. 또한, 과성숙 난자는 빛깔이 옅고, 그의 주변에는 어두운 갈색에서 심지어 검은색을 띤 세포들이 존재하며 난구세포들은 일그러져 있거나 제라틴화하여 끈적거리며 응축된 세포덩어리들로 퇴화되어 있다.

일반적으로 IVM/F-ET program에서 채취된 난자들 중에서 대부분은 미성숙 난자로 판정되나 약 10~15%의 난자들은 성숙된 난자의 난구세포들을 지니고 있다. 그러나 실제적으로 작은 난포에서 성성자극호르몬의 조기 노출에 의해 완전한 성숙에 이르지 않으면서 난구세포들의 조기 변화가 있을

수 있으므로 직접적인 성숙도의 판정이 있어야 한다. 그 방법은 ICSI주기에서 실시하는 것과 같다. 36.8℃의 온도에서 1 ml 당 80 IU의 hyaluronidase를 첨가한 난자 세척용 배양액 (SCB-MOPS)을 0.7 ml씩 채우고 그 위에 0.7 ml의 mineral oil을 덮은 4-well 접시의 제1 well에 COCs를 약 30~40초 동안 배양한다. SCB-MOPS의 용액을 0.7 ml씩 채우고 그 위에 0.7 ml의 mineral oil을 덮은 4-well 접시의 제2 well에 그 COCs를 옮기고 돌려 쌓인 난구세포층을 안전하게 제거하기 위하여 난구세포피의 외경에 맞는 파이펫을 제작하여 흡인/배출을 반복한다. 시간이 지남에 따라 난구세포들이 조금씩 떨어져 나가기 때문에 난구세포피의 크기는 점차적으로 작아진다. 작아진 난구세포피의 외경에 맞는 여러 개의 파이펫을 제작하여 계속적으로 파이펫을 조작하면 난구세포가 제거되면서 난구세포피 속에서 난자가 천천히 모습을 드러낸다. 난구세포를 완전히 제거하면 난자의 세포질 내에 난핵포 (germinal vesicle, GV)와 세포질 밖에 제1극체가 존재하는지를 관찰할 수 있다. 아직 GV가 존재하면 GV기 미성숙 난자로 판정한다. 더 이상 GV를 볼 수 없고 제1극체도 보이지 않으면 핵막의 소실은 시작되었으나 핵분열의 완성이 이루어 지지 않은 제1차 감수분열 중기 (metaphase I, MI)와 말기 (telophase I, TI)의 중간성숙 난자로 판정한다. 세포밖에 제1극체가 존재하면 제1차 감수분열이 완성되어 제2차 감수분열 중기 (metaphase II, MII)에 있는 성숙 난자로 판정한다.

체외성숙 유도

포상난포에서 포유동물의 난자는 난포내에 존재하는 특수한 요인들에 의하여 감수분열이 휴지된 상태에 있다. cAMP가 감수분열을 조절하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Downs와 Eppig, 1986). 난구세포들은 감수분열을 중지시키는 작용을 유지하는 guanyl이나 xanthyi 복합체들 및 hypoxanthine을 생산한다고 알려져 있다. 사람의 미성숙 난자는 포상난포로부터 분리하여 단순한 배양액에 배양하면 임의적으로 감수분열을 재개하여 성숙을 시작한다고 알려져 왔다 (Edwards, 1965). 감수분열의 재개로 인하여 성숙하는 동안에 피질성 과립 (cortical granule, CG)들이 난자의 피질 내에서 분포의 변화를 겪는데 주로 난막밖으로 배출되어 수에 있어서 많은 감소를 보인다 (Ducibella 등, 1988). 혈청이 없는 배양액에서 난자를 성숙시키면 피질성 과립이 감소하고 dibutyryl cAMP에 의해서 억제되었던 난핵포가 붕괴되며 과립이 없는 영역이 형성되고 투명대의 ZP2가 ZP2f로 변화한다. 혈청이 없는 배양액에서 미성숙 난자를 배양하면 그러한 현상 때문에 난자는 성숙되지만 투명대의 경화가 일어나 수정을 유도하였을 때 정자가 침입하는 것을 방해한다. Ducibella 등 (1990)은 FBS이 첨가된 배양액에서 난자를 배양하면 투명대의 경화 (zona hardening)를 피하면서 성숙을 유도할 수 있다고 하였다. FBS을 첨가함으로써 체외성숙이 유도되고 배아의 발생능력이 향상되는 것은 알부민이 아니라 fetuin이라는 단백질인 것으로 확인되었다. Dell'Aquila 등 (1999)은 난포액과 혈청에 fetuin이 함유되어 있는 것을 확인하였고 혈청이 없는 배양액에 fetuin을 첨가함으로써 투명대의 경화를 막을 수 있다고 하였다. Landim-Alvarenga 등 (2002)은 소의 미성숙 난자의 성숙을 유도하는 동안에 혈청이 없는 배양액에 fetuin을 사용하였던 바 혈청을 첨가한 배양액에서 생산한 정도의 배아발생을 얻었다고 보고하였다.

Moor 등 (1998)은 성숙을 유도하는 과정에서 유입될 수 있는 불만족스런 요인들, 특히 체외성숙을 유도하기 위하여 고안된 부적절한 호르몬 종류와 농도 및 배양방법 때문에 정상적인 배아의 발생이 감소됨을 지적하였다. 그러므로, 난포란을 임상에 이용할 경우에는 적절한 배양환경이 필요로 하다. Schramm와 Bavister (1996)는 체외에서 상실배나 포배기 배아를 얻기 위하여 FSH를 투여한 원숭이로

부터 채취한 신선한 과립세포들 ($5 \times 10^6/\text{ml}$)과 미성숙 난자를 공동배양할 수 있다고 보고하였다. 그러나, Trounson 등 (1994)에 의한 다낭성증후군을 지닌 환자로부터 채취한 미성숙 난자의 체외성숙과 체외수정 및 배아의 체외발생에 관한 연구는 성숙한 과립세포와 함께 하는 공동배양은 효과가 있지 않았다고 밝혔다. Trounson 등 (2001)은 배양할 때 난포지지세포들과 함께하는 것은 난자의 체외성숙을 유도하기 위하여 요구되는 성선자극호르몬으로 인한 반응에 필요로 할 것이며 특히 체내에서 성선자극호르몬의 급증에 노출되지 않았을 때 성선자극호르몬의 농도와 FSH 및 FSH-LH에 노출되는 단계가 중요할 수 있다고 제시하였다. LH로 인하여 재개한 감수분열은 난자를 둘러싼 난구세포들 내에서 glycolytic activity, mitochondrial glucose oxidation 및 glutamine을 증가시킴으로써 pyruvate를 합성하여 성숙하고 있는 난자에게 그것을 제공한다. 과립세포와 난자의 연결은 감수분열의 재개와 관계 있는 단백질과 인산화 반응을 초래하는 것으로 알려지고 있다. 과립세포들이 영향을 미치는 특이단백질의 인산화는 염색질의 응축, 핵막의 붕괴, 방추사의 형성을 초래하는 성숙촉진인자 (maturation promoting factor, MPF)의 활성화에 관계한다 (Cecconi 등, 1991).

일반적으로 성숙촉진인자는 분열세포에서 세포주기조절체계를 통하여 감수분열이 재개할 때 활성화한다. 간단히 밝히자면, 성숙촉진인자의 활성화는 cyclins이라는 단백질 복합체와 p34^{cdc2}라는 단백질과의 상호작용에 의존한다. Cyclins는 세포주기에서 주기적으로 생기는데 분열중기에 가장 높은 농도가 되고 그 후 일시적으로 퇴화되면 가장 낮은 농도가 된다. 성장촉진인자의 활성화는 cyclins가 p34^{cdc2}와 결합할 때 존재한다. 이러한 단백질의 결합과 성숙촉진인자의 활성화는 인산화되는 상황에 의존한다. Cecconi 등 (1991)은 난핵포의 붕괴시기에 난자 내에서 과립세포에 의존적인 인산화의 변화는 과립세포의 분화된 상태에 따라 영향을 받을 수 있다고 보고하였다. 그러므로, 과배란 과정에서 과도한 자극을 받고 있거나 성선자극호르몬의 불균형에 의해 빈약한 반응을 보인 경우가 IVM/F-ET program의 대상이 될 수 있다.

미성숙 난자들은 난구세포층의 팽창화 정도와 과립세포층이 응집되어 있는 정도에 따라 성숙을 유도하기 위하여 1 ml의 성숙용 배양액 (15% SASM을 첨가한 SCB)에서 24~72시간 동안 배양된다. 24시간 마다 광학현미경하에서 배양되고 있는 난자를 관찰한다. 난구세포층과 과립세포층의 형태에 따라 성숙형태를 지닌 난자들이 발견되면 직접적인 방법으로 난구세포들을 제거하고 그들의 성숙도를 판정한다. 성숙난자들은 수정용 배양액에 옮겨 4~6시간 동안 완전한 성숙을 유도하고, 아직 미성숙 상태에 있는 난자들은 신선한 성숙용 배양액에 옮겨 추가적으로 24시간 동안 성숙을 유도한다. 모든 배양은 6% CO₂, 5% O₂ 및 89% N₂로 분압이 조절되고 36.8°C로 온도가 조절된 배양기에서 실시한다.

정지처리 및 체외수정 유도

난자는 수정되기 직전에 제1극체를 돌출시키고 감수분열 중기에서 정자의 침입을 기다리고 있다 (Trounson 등, 1982). 정자는 일반적으로 수정하기 직전에 세 가지의 중요한 변화, 즉 수정능획득 (capacitation), 첨체반응 (acrosome reaction) 및 고활성화 (hyper activation)를 겪는다. 난자가 배양되는 배양접시의 배양액 내에서는 몇 마리의 정자만이 수정능력을 획득하고 첨체반응을 할 뿐 대부분의 정자들은 난자의 투명대와 접촉을 이루면서 첨체반응을 한다 (Sakkas 등, 2003). 꼬리의 고활력성은 정자가 투명대를 침공할 때 필요로 하며 투명대와 난막의 사이에서는 운동성을 멈춘다. 첨체반응한 정자의 내부첨체막 (inner acrosomal membrane)과 난막 (oolemma)의 융합 및 과립반응 (cortical reaction)은

자용전핵의 형성을 동반하는 정상적인 수정을 완성하는데 반드시 필요로 하다 (Tengowski, 2004).

이러한 현상들에 의해 난자가 수정하기에 적합한 하나의 정자만이 선발된다고 하지만 체외에서 수정에 필요한 고히활력 정자의 수는 난자당 최소한 10^5 이며, 적절한 수정률과 착상율을 확보하고 다정자증을 최소화하기 위해서는 난자를 채취한 후 난자의 수정능력을 증가시키기 위하여 최소한 4에서 6시간의 체외배양이 필요로 하다 (Balakier 등, 2004). 불완전하게 성숙된 난자를 정자와 함께 배양해서 수정이 이루어지더라도 자용전핵의 형성율이나 난할율이 저조하며 배아의 과편화가 심하게 나타난다. 그러므로 난자가 성숙한 형태를 나타내더라도 정자를 주입하기 전에 약 4시간 정도 추가적으로 배양하는 것이 수정율을 극대화할 수 있다. 한편, 정자회소증이나 정자무력증과 같이 수정하기 직전에 정자가 수정에 필요한 세 가지의 중요한 변화를 겪을 수 없는 경우나 난자가 수정능력을 충분히 획득하지 못한 경우에는 수정장벽을 바로 통과시킬 수 있는 ICSI를 실시하여 수정을 유도하고 있다 (Palermo 등, 1992). 따라서, IVM/F-ET program에서 수정방법은 ICSI로 실시하는 것이 바람직하다.

고활력 정자의 회수는 다음과 같이 실시한다. 부인으로부터 난자를 채취한 직후에 성숙한 난자들이 존재하면 남편의 정액을 채취하도록 한다. 채취된 정액을 무균작업대에 놓고 30~60분 동안 정액 내에 들어 있는 고형물질들의 액화를 유도한다. 액화된 정액에 3 ml의 정액처리용 배양액 (SCB-MOPS)을 희석한다. 잘 혼합한 다음 희석된 정액의 10 μ l를 Makler chamber에 넣고 cover를 덮는다. 희석된 정액을 파이펫으로 흡인하여 그 부피를 조사하고 원심분리용 시험관 (Falcon 2097)에 옮긴다. 300 g에서 5분 동안 원심분리한다. 원심분리가 진행되는 동안 Makler chamber에 표본한 정자의 농도, 생존율 및 운동성을 검사한다. 5분 후 원심분리된 시험관에서 상층액을 제거하고 정자피만 남긴다. 다시 3 ml의 신선한 SCB-MOPS의 용액을 그 시험관에 넣어 정자피와 잘 혼합하고 고르게 정자들을 부유시킨다. 이 정자용액을 300 g에서 30초가 넘지 않도록 원심분리한다. 부드럽게 형성된 정자피만 남기고 상층액을 회수하여 새로운 원심관 (Falcon 2097)내의 1 ml percoll의 표면 위에 조심스럽게 올려 놓는다. 300 g에서 20분 동안 원심분리한다. 원심분리가 끝나면 percoll층 위의 상층액을 2회에 걸쳐 제거한다. 처음에는 상층액을 제거하고 두번째는 percoll의 표면층의 죽은 정자와 세포의 찌꺼기들을 모두 제거한다. 깨끗하게 percoll층만 남으면 pasteur 파이펫의 끝이 percoll 표면을 뚫고 들어가도록 하고 정자피와 멀리 떨어진 부위에서 정자피가 파괴되지 않게 공기방울을 2~3개 배출되도록 한 다음, 바닥에 형성된 고히활력 정자의 정자피를 회수한다. 회수한 정자피는 3 ml의 신선한 SCB-MOPS의 용액이 들어 있는 새로운 원심분리용 시험관 (Falcon 2097)에 옮기고 잘 희석하며 300 g에서 5분 동안 원심분리하고 고히활력 정자에 붙어 있는 percoll을 제거한다. 동일한 방법으로 미량의 percoll을 다시 한번 제거해 준다. 형성된 정자피 위에 약 0.7 ml의 수정용 배양액 (15% SASF를 첨가한 SCB)을 조심스럽게 올리고 36.8°C의 온도와 5%의 CO₂가 조절된 배양기에서 45° 각도로 시험관을 고정하여 정자의 부유를 유도한다. 약 1시간 후에 정자용액의 상층부위를 회수하고 수정을 유도하기 전까지 시험관 (Falcon 2003)에 넣어 빛이 없는 상온에 둔다.

수정유도는 난자가 들어 있는 1 ml의 수정용 배양액 (15% (v/v) SASF를 첨가한 SCB)에 1.0×10^5 의 고히활력 정자를 주입하므로서 수행된다. 시험관아기 기술에서 수정의 실패는 정액의 질, 첨체반응의 실패와 같은 정자의 기능부전 및 난자의 불완전한 성숙과 밀접한 관련이 있기 때문에 IVM/F-ET program에서는 수정률을 높이기 위하여 ICSI를 추천한다. ICSI를 실시하는 방법은 다음과 같다. 회수한 고히활력 정자는 ICSI를 실시하기 위하여 polyvinylpyrrolidone (PVP)의 용액에 부유된다. PVP 용액은 정자의 활력을 감소시키고 정자의 미세조작을 용이하게 하기 때문이다. 성숙난자와 정자는 편평한 배양접시

(Falcon 3002)에 있는 mineral oil안의 여러 미세소적에 각각 옮긴다. 성숙난자는 미세소적에 1개씩 들어가도록 한다. 주입바늘 끝으로 정자의 목이나 꼬리부분을 배양접시의 바닥을 향해 눌러 그 운동성을 완전히 없앤다. 꼬리부분부터 주입바늘의 관 내부로 정자를 조심스럽게 흡인한다. 한편, 성숙난자는 반대편에 장착된 고정관(holding pipette)을 이용하여 난자를 고정한다. 정자를 주입하는 과정에서 분열중기의 핵에 손상을 주는 것을 피하기 위하여 제1극체로부터 멀리 떨어진 곳이 주입위치가 되도록 난자를 고정한다. 일반적으로 난자를 바르게 정돈하기 위하여 주입바늘의 이용이 필요로 하며 위치가 확정되면 고정관의 작은 음압으로 난자를 고정한다. 이 과정에서 정자의 유실을 막기 위하여 정자를 수시로 바늘의 뒤쪽으로 물리친다. 난자의 고정이 완성되면 주입바늘이 투명대를 관통하기 전에 정자가 주입바늘의 끝에 위치하도록 조절한다. 정자의 주입바늘이 투명대를 지나 난막의 공간(perivitelline space)을 횡단하고 난자에 압력이 가해지도록 한다. 주입바늘이 조금 더 난자를 눌러 이동하지만 난막은 변화되지 않고 그대로 있다. 그래서 난막이 터질 때까지 주입바늘로 난막 부위를 흡인한다. 난막이 터지면 세포질의 갑작스런 흡입이 주입바늘 속에서 관찰된다. 이때 세포질의 내부에 정자를 투여하고 주입바늘이 난자로부터 빠져 나오도록 한다. 정자의 주입이 완성된 몇 분 후에 주입흔적의 끝부분에서 정자를 관찰할 수 있다. 정자를 주입한 난자를 3회 세척한 다음 1 ml의 수정용 배양액(15% SASF를 첨가한 SCB)에 옮기고 다음날 아침 수정확인을 실시할 때까지 36.8°C의 온도와 5%의 CO₂가 조절된 배양기에서 배양한다.

수정확인 및 배아의 체외발생

정자가 난자의 세포질 내로 들어가면 난자의 histone은 정자의 DNA를 치환한다. 정자의 중심체(centrosome)는 genomic activation이 일어나는 4일령 배아가 될 때까지 초기세포분열을 조절하는 것으로 알려져 왔다 (Foulk, 2001). 자용전핵은 난자에서 비롯하는 막에 싸이게 되고 서로 융합한 다음 접합체는 유사분열을 시작한다. 실험실에서 수정된 난자는 정자와 함께 배양한 약 16시간에 자용전핵을 가장 많이 관찰할 수 있다. ICSI를 실시한 난자에서 자용전핵과 제2극체가 형성되는 시간은 전통적인 IVF를 실시한 난자에서의 것과 유사한 것으로 나타났다 (Nagy 등, 1994; Foulk, 2001). 따라서, 정자와 공배양하거나 정자미세주입을 실시한 다음날 아침에 난구세포를 제거한 난자에서 제2극체와 자용전핵을 관찰함으로써 정상적인 수정여부를 판정한다. 수정을 확인하기 위하여 투명대에 달라붙어 있는 환방사세포들을 두 자루의 인슐린 주사기의 바늘이나 난자의 직경과 비슷한 미세파이펫을 이용하여 제거한다.

일반적으로 사람 난자의 체외성숙과 체외수정 및 배아의 배양과 이식은 혈청을 첨가한 여러 가지 배양액에서 실시된다. Menezo 등 (1984)은 전통적인 IVF-ET program에서 혈청의 사용에 대한 긍정적인 효과에 대해서 부정하였다. 체외에서 배양하는 난자나 배아에서 나타난 현상들이 체내에서 나타난 현상들과 비슷하다고 하나 난할속도가 체내에서보다 체외에서 약간 느린 것으로 알려지고 있다. 이것은 적절한 환경을 제공하지 못한 때문이다. 배아는 포배기 배아가 되기 위해서는 genomic activation이 필요로 하나 난할을 하는 과정에서 임의적인 발생중지 현상이 나타난다. 그러므로, 배양하는 배아에서 genomic activation이 일어날 수 있도록 배양하는 조건들을 충분하게 제공하는 것이 중요하다. Gardner와 Schoolcraft (1998)는 배아의 영양적 요구와 생리를 이해하여 보다 생리적인 배양액들을 각각의 발생단계에 맞게 제공하여야 배양으로 인한 스트레스를 최소화하고 정상적인 배아의 기능을 발

회할 수 있다고 하였다. Gardner 등 (2004)은 보다 생리적인 연속배양체계 (G1/G2)를 배아의 배양에 제공하여 한 개의 포배기 배아를 이식하였을 때 60.9%의 착상율과 임신율을 얻었고 두 개의 포배기 배아를 이식하였을 때 56%의 착상율과 76%의 임신율을 얻었다고 보고하였다. 따라서 배아를 배양하는 데 있어서 보다 생리적인 배양체계를 적용하는 것이 바람직할 것이다.

세포질 내에서 자용전핵을 관찰한 후 정상적인 배아만을 선별하여 1 ml의 초기배 성장용 배양액 (SEGM 혹은 G1.3)에 옮겨서 수정배아를 2~3회 세척하고 미리 만들어 놓은 배양접시 (Falcon 3037)내의 5 μ l의 미세소적을 초기배 성장용 배양액으로 2회 세척한 다음, 여기에 20 μ l의 초기배 성장용 배양액과 함께 배아들을 옮긴 후 6% CO₂, 5% O₂ 및 89% N₂로 분압이 조절되고 36.8°C로 온도가 조절된 배양기에 넣고 48시간 동안 배양한다. IVM/F-ET program에서 난자를 채취한 날을 기초로 4일째 아침에 6% CO₂와 36.8°C의 온도로 조절된 조작상에 설치한 광학현미경하에서 4일령 배아를 관찰한다. Bolton (1989)의 등급화 기준에 근거하여 난세포의 균등성 (blastomere regularity), 난세포의 파편화 (blastomere fragmentation) 및 세포질의 입도 (cytoplasmic granularity)를 관찰하고 배아들의 질을 평가한다.

일반적으로 IVM/F-ET program에서는 4일째나 6일째에 배아를 이식할 수 있다. 4일째에 배아를 이식하는 경우에는 4일령 배아들 중에 가장 양호한 배아들을 이식에 이용하고 6일째 이식할 배아와 잉여배아를 Pasteur 파이펫을 이용하여 미리 만들어 놓은 배양접시 (Falcon 3037)내의 5 μ l의 미세소적을 상실배 성장용 배양액 (SMGM, 혹은 G1.3+G2.3)으로 2회 세척한 다음 여기에 20 μ l의 상실배 성장용 배양액과 함께 배아들을 옮기고 6% CO₂, 5% O₂ 및 89% N₂로 분압이 조절되고 36.8°C로 온도가 조절된 배양기에 넣고 24시간 동안 배양한다. 5일째 아침에 6%의 CO₂와 36.8°C의 온도로 조절된 조작상에 설치한 광학현미경하에서 5일령 배아들을 관찰한 후 미리 만들어 놓은 배양접시 (Falcon 3037)내의 5 μ l의 미세소적을 후기배 성장용 배양액 (SLGM, 혹은 G2.3)으로 2회 세척한 다음, 여기에 20 μ l의 후기배 성장용 배양액과 함께 배아들을 옮기고, 6% CO₂, 5% O₂ 및 89% N₂로 분압이 조절되고 36.8°C로 온도가 조절된 배양기에 넣고 24시간 동안 배양한다. 6일째 아침에 6%의 CO₂와 36.8°C의 온도로 조절된 조작상에 설치한 광학현미경하에서 포배를 관찰할 수 있다. 형성된 포배를 팽창화 정도에 따라 초기포배, 초기팽창포배, 중간팽창포배 및 팽창완성포배의 4군으로 나눈다. 또한 포배는 초기팽창포배부터는 그 질을 평가할 수 있는데 A, B, C 및 D급으로 구분한다 (Son 등, 2005). A급의 배아는 태아가 될 내부세포괴 (inner cell mass, ICM)가 크고 단단하게 형성되어 있고 태반이 될 영양배엽세포 (trophectoderm cell, TEC)들은 촘촘하게 구성되어 있으며 치밀하게 상피세포화되어 있다. B급의 배아는 TEC들이 A급과 같으나 ICM은 A급보다 약간 적은 편이다. C급의 배아는 ICM가 약간 느슨하게 형성되어 있고 세포수가 적으나 TEC들은 A급이나 B급과 같은 경우와 ICM가 A급이나 B급과 같으나 TEC들이 매우 적은 수로 느슨하게 엮여 있는 경우다. 마지막으로 D급의 포배는 TEC들이 A급이나 B급과 같으나 ICM가 육안으로 전혀 흔적이 없는 경우와 ICM도 TEC도 모두 빈약한 경우다. 그러나 D급의 배아는 액포 (vacuole)의 형성을 보인 상실배와는 구별된다. 이와 같이 포배를 평가한 다음 6일째 배아를 이식하는 경우에는 6일령 배아들 중에서 가장 양호한 포배를 선별하여 이식에 이용하고 잉여배아들을 배양하면서 C급 이상의 중간팽창포배들이 발생하면 그들을 모두 냉동보관법에 의하여 보관한다. 미리 만들어 놓은 배양접시 (Falcon 3037)내의 5 μ l의 미세소적을 후기배 성장용 배양액으로 2회 세척한 다음 여기에 20 μ l의 후기배 성장용 배양액과 함께 잉여배아들을 옮기고 6% CO₂, 5% O₂ 및 89% N₂로 분압이 조절되고 36.8°C로 온도가 조절된 배양기에 넣고 24시간 동안 배양한다. 7일째

아침에 C급 이상의 중간팽창포배들이 발생하면 그들을 모두 냉동보관법에 의하여 보관한다.

배아 이식과 임신확인

IVM/F-ET program에서 4일령 배아를 이식할 경우에는 이식하는 배아의 수를 5개가 넘지 않게 하고, 6일령 배아를 이식할 경우에는 이식하는 배아의 수를 3개가 넘지 않도록 한다. 이와 같은 각각의 수로 이식을 실시하였을 때 쌍둥이 이상의 임신이 많은 부분을 차지한다면 이식하는 배아의 수를 각각 한 개씩 줄여주는 것이 바람직하다. 배아를 이식하는 이식관은 독성이 없어야 하고 부드러운 재질이어야 한다.

일반적으로 4일령 배아의 이식은 난자를 채취한 날을 기준으로 4일째 오전 11시부터 이식관을 이용하여 자궁경관을 통해 시행한다. 배아이식은 다음과 같은 절차를 거친다. 일반적으로 환자를 안락한 방광석쇄술의 자세로 눕힌다. 따뜻하게 데운 질경경을 이용하여 자궁경부를 노출시키고 면봉을 이용하여 배양액으로 경부입구를 조심스럽게 닦는다. 환자당 5개가 초과되지 않도록 배양접시에 준비해 두었던 4일령 배아를 6%의 CO₂와 36.8℃의 온도로 조절된 조작상에 설치한 광학현미경하에서 20~30 μl의 배양액과 함께 이식관의 끝부분에다 흡인하여 위치시킨다. 이와 같이 배아와 배양액을 흡인한 다음 자궁경부를 통과시키고 자궁에 도달한 이식관의 끝이 자궁의 기저부에서 약 1 cm 정도 떨어진 곳에 위치하도록 고정하고 흡인했던 주사기의 주입기를 눌러 배아와 배양액을 배출시킨다. 이식과정은 자궁에 자극을 가하지 않고 상대적으로 빠른 시간에 완성하는 것이 바람직하다. 이식관의 내용물을 배출시킨 직후에 이식관을 광학현미경하에서 관찰하고 유실되어 이식관에 부착된 배아가 있는지를 확인한다. 일반적으로 배아이식술을 받은 환자는 귀가하기 전에 3~4시간 동안 안락한 침대에 누워 휴식하도록 한다. 6일령의 포배도 6일째 오전 11시부터 이식관을 이용하여 자궁경관을 통해 이식한다. 배아이식의 절차는 4일째 이식의 방법과 같다.

난포형성기에 혈청 E2가 부적절하게 높아지고 난자를 채취할 때 난포로부터 많은 수의 과립세포들이 제거되어 황체기 호르몬의 프로파일에 좋지 않은 영향이 미칠 수 있다. 그러므로, 난자를 채취한 날부터 6 mg의 estradiol valerate (Progynova: Schering, Berlin, Germany)를 환자에게 투여하고 난자를 채취한 3일째부터 100 mg의 progesterone (Progest: Samil Pharmacology, Seoul, Korea)을 매일 환자에게 투여한다. 이와 같은 황체기 유도는 임신여부를 확인할 때까지 계속되며, 임신에 실패했을 때는 투여를 중단하지만 임신이 확인되면 태아의 심장박동이 진행되는 9~10주까지 계속 유지시킨다. 혈청 β-HCG의 양적 검사는 난자를 채취한 날로부터 14~16일에 실시한다. 1 ml 당 20 mIU 이상의 positive 결과를 나타낸 경우에는 1주일 후에 재검을 실시한다. 재검의 결과가 임신으로 확인된 경우에는 난자를 채취한 28일과 42일에 초음파검사를 실시한다. 난자를 채취한 4~6주 후에 초음파상에서 태아의 심장박동이 확인되면 임상적으로 임신이 되었다고 판정한다. 생화학적 임신은 첫 번째 초음파검사 (난자채취 후 28일)를 하기 전에 혈청 β-HCG의 양이 낮아지는 경우로 규정한다. 임상임신율 (clinical pregnancy rate)은 배아를 이식한 총 환자 중에서 임신한 환자의 수로 표현하고 배아의 착상율 (implantation rate)은 이식된 배아의 수 중에서 심장이 박동하는 태아의 수에 근거한다.

포배기 배아냉동과 용해

IVF/ET program에서 OHSS의 위험을 지닌 환자의 배아나 4일째나 6일째에 배아이식을 실시했던 환자의 잉여배아를 위에서도 같이 7일째까지 배양한다. 6일째나 7일째에 중간팽창포배기 이후까지 발달한 배아가 있으면 유리화 (vitrification) 동결을 실시한다. 유리화를 위한 평형용액은 20% (v/v) ethylene glycol (EG)과 20% (v/v) 난포액을 첨가한 m-DPBS를 이용하며, 유리화 용액 (vitrification solution)은 40% EG, 18% (w/v) Ficoll, 0.3 M sucrose 및 20% (v/v) 난포액을 첨가한 m-DPBS를 이용한다 (Son 등, 2005). 유리화 동결을 실시하기 전에 두 자루의 29 gauge의 바늘이 부착된 인슐린주사기를 이용하여 인위적으로 포배낭을 터뜨린다 (artificial shrinkage). 그런 다음에 포배를 유리화의 평형용액에 1.5분 동안 노출하고 유리화 용액에 옮긴 다음 20초 이내에 EM-grid위에 실어 그들을 직접적으로 액체질소에 침지한다. 유리화된 포배가 부착된 EM-grid를 환자의 이름을 기록한 ampoule에 넣어 뚜껑을 닫는다. 이때 ampoule은 윗부분에 환자의 이름을 기록한 aluminum cane에 부착되어 있어 액체질소 통에 보관하기 용이하다. 용해하여 이식에 이용하기 전까지 액체질소 통에 보관한다.

한편, 냉동 및 용해한 포배를 일반적으로 자연주기의 배란 4일째의 자궁강에 이식한다. 그러므로 배아를 이식하기 하루 전날 오후에 냉동된 포배를 상온에서 용해하고 배아를 이식하는 다음날까지 배양한다. 냉동된 포배의 용해 및 배양절차는 다음과 같다. 배아를 용해하기 전에 4-well 배양접시 (NUNC 176740), Pasteur 파이프, 초시계, 미세핀셋, 500 ml의 액체질소를 담은 beaker, 재수화 (rehydration) 용액 및 20% (v/v) 난포액을 첨가한 m-DPBS를 미리 준비한다. Rehydration 용액은 20% (v/v) 난포액을 첨가한 m-DPBS에 0.5 M sucrose를 용해한 것이다. 무균시험대에서 4-well 배양접시의 제1- 및 제2-well에 100 μ l의 rehydration 용액을 각각 넣고 200 μ l의 mineral oil로 그 위를 덮는 반면 제3- 및 제4-well에 100 μ l의 20% (v/v) 난포액을 첨가한 m-DPBS를 각각 넣고 200 μ l의 mineral oil로 그 위를 덮어 용해과정에서 이용할 용액의 접시를 준비한다. Beaker에 500 ml의 액체질소를 채운다. 냉동배아를 보관하는 통으로부터 환자의 이름이 기록된 aluminum cane인을 꺼내어 beaker에 침지한다. Aluminum cane에 부착된 ampoule의 뚜껑을 열고 미세핀셋을 이용하여 EM-grid를 꺼내어 4-well 배양접시의 제1-well에 넣는다. 5분이 경과한 다음 제2-well에 EM-grid를 옮긴다. 약 5분이 경과하면 rehydration 용액이 들어있기 때문에 여기서 용해된 포배들은 자연스럽게 재수화되어 EM-grid에서 rehydration 용액으로 분리되어 나온다. 분리된 옅은 포배들을 Pasteur 파이프를 이용하여 제3- 및 제4-well의 용액에 순차적으로 옮긴다. 재수화가 성공적으로 완성된 배아들을 6%의 CO₂와 36.8°C의 온도로 조절된 조작상에 설치한 광학현미경하에서 후기배 성장용 배양액으로 3회 세척하고 미리 준비해 둔 10 μ l의 난구세포 (2.5 \times 10³) 배양접시의 미세소적에 옮기고 20 μ l의 부피가 되도록 신선한 후기배 성장용 배양액으로 채운다. 배양접시를 6% CO₂, 5% O₂ 및 89% N₂로 gas의 분압이 조절되고 36.8°C로 온도가 조절된 배양기에 넣고 다음날 배아를 이식할 때까지 배양한다. 다음날 아침에 6%의 CO₂와 36.8°C의 온도로 조절된 조작상에 설치한 광학현미경하에서 정상적으로 생존할 수 있는 배아의 발생단계와 배아의 질을 평가한다. 냉동 및 용해한 포배는 배란 후 4일 혹은 5일째 아침에 신선한 배아처럼 자궁강에 이식한다.

결 론

자연배란주기에서 LH의 급증이 나타나는 직후에 난자를 채취할 수 있다 할지라도 체외에서 수정하고 발생한 배아를 성공적으로 이식하는 것은 한계가 있었다. 전통적인 IVF-ET program에서 난자나 배아의 수를 늘려 만족할 만한 임신율을 얻기 위하여 GnRH-agonist나 antagonist와 함께 여러 가지 gonadotrophin들을 사용하고 있으나, 이러한 방법들은 환자에게 상당한 비용을 지불하게 할 뿐만 아니라 성선자극호르몬 용량의 불균형을 초래하여 여러 가지 합병증을 유발할 수 있다. 전통적인 시험관아기 기술에서 PCO(S)를 지닌 불임환자들은 다른 불임요인을 지닌 환자들에 비하여 수정율과 배아의 질이 다소 낮지만, insemination이나 ICSI에 이용하는 난자의 수를 많이 확보할 수 있기 때문에 임신율과 착상율에 있어서는 전혀 차이가 없음을 보고되고 있다 (Urman 등, 2004). 그러나 PCO(S)를 지닌 환자들은 정상적인 난소를 지닌 환자들에 비하여 전통적인 시험관아기 기술에서 gonadotrophin들을 투여했을 때 훨씬 더 많은 OHSS의 위험에 노출되고 있다. 그러므로 이러한 환자들에게는 특히 IVM/F-ET program을 추천해야 할 것이다.

IVM/F-ET program은 여러 가지 방법으로 접근할 수 있다. 난포의 발생과 in vivo 성숙능력을 좀 더 증가시킬 수 있으므로 FSH만을 투여한 후 IVM/F-ET 기술을 실시할 수 있고, FSH를 전혀 투여하지 않고 난자를 채취하기 36시간 전에 HCG만을 투여하는 IVM/F-ET 기술을 실시할 수 있다. 또한, 과배란을 유도하는 과정에서 OHSS의 위험이 있거나 성선자극호르몬의 반응을 잘 나타내지 않는 PCO(S)를 지닌 환자가 있다면 적절한 시기에 HCG만을 투여하고 난자를 채취하여 IVM/F-ET를 시행할 수 있고, 여러 가지 불임원인을 지닌 환자의 자연주기에서 우세난포로부터 성숙난자를 채취하여 IVF하고 작은 난포로부터 미성숙 난자를 채취하여 IVM/F를 유도한 후 발생하는 배아를 함께 이식할 수 있다. 따라서, IVM/F-ET program이 각 불임센터에서 성공적으로 확립되면 시험관아기 기술을 실시함에 있어 나타날 수 있는 OHSS의 위험을 피할 수 있으며 성선자극호르몬의 반응이 잘 나타나지 않은 환자들에게 포기하는 사례없이 시험관아기 기술을 성공적으로 이끌어 불임부부에게 수준 높은 불임치료를 제공할 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

- Balakier H, Sojecki A, Motamedi G, Librach C. Time-dependent capability of human oocytes for activation and pronuclear formation during metaphase II arrest. *Hum Reprod* 2004; 19: 982-7.
- Cecconi S, Tatone C, Buccione R, Mangia F, Colonna R. Granulosa cell-oocyte interactions: the phosphorylation of specific proteins in mouse oocytes at the germinal vesicle stage is dependent upon the differentiative state of companion somatic cells. *J Exp Zool* 1991; 258: 249-54.
- Check ML, Brittingham D, Check JH, Choe JK. Pregnancy following transfer of cryopreserved-thawed embryos that had been a result of fertilization of all in vitro matured metaphase or germinal stage oocytes. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2001; 28: 69-70.
- Chian RC, Buckett WM, Tan SL. In-vitro maturation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2004; 8: 148-66.
- Dell'Aquila ME, De Felici M, Massari S, Maritato F, Minoia P. Effects of fetuin on zona pellucida hardening and

- fertilizability of equine oocytes matured in vitro. *Biol Reprod* 1999; 61: 533-40.
- Downs SM, Eppig JJ. The role of purines in the maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes. *Tokai J Exp Clin Med* 1986; 11: 463-9.
- Ducibella T, Anderson E, Albertini DF, Aalberg J, Rangarajan S. Quantitative studies of changes in cortical granule number and distribution in the mouse oocyte during meiotic maturation. *Dev Biol* 1988; 130: 184-97.
- Ducibella T, Kurasawa S, Rangarajan S, Kopf GS, Schultz RM. Precocious loss of cortical granules during mouse oocyte meiotic maturation and correlation with an egg-induced modification of the zona pellucida. *Dev Biol* 1990; 137: 46-55.
- Duckitt K, Templeton AA. Cancer in women with infertility. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1998; 10: 199-203.
- Duffy DM, Stouffer RL. Luteinizing hormone acts directly at granulosa cells to stimulate periovulatory processes: modulation of luteinizing hormone effects by prostaglandins. *Endocrine* 2003; 22: 249-56.
- Edwards RG. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 1965; 208: 349-51.
- Fair T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci* 2003; 78: 203-16.
- Foulk RA. From fertilization to implantation. *Early Pregnancy* 2001; 5: 61-2.
- Gardner DK, Lane M, Calderon I, Leeton J. Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil Steril* 1996; 65: 349-53.
- Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1998; 13: 3434-40.
- Gardner DK, Surrey E, Minjarez D, Leitz A, Stevens J, Schoolcraft WB. Single blastocyst transfer: a prospective randomized trial. *Fertil Steril* 2004; 81: 551-5.
- Gondos B, Bhiraless P, Hobel CJ. Ultrastructural observations on germ cells in human fetal ovaries. *Am J Obstet Gynecol* 1971; 110: 644-52.
- Kawano Y, Fukuda J, Nasu K, Nishida M, Narahara H, Miyakawa I. Production of macrophage inflammatory protein-3 α in human follicular fluid and cultured granulosa cells. *Fertil Steril* 82 Suppl 2004; 3: 1206-11.
- Landim-Alvarenga FC, Boyazoglu SE, Carvalho LR, Choi YH, Squires EL, Seidel GE, Jr. Effects of fetuin on zona pellucida hardening, fertilization and embryo development in cattle. *Anim Reprod Sci* 2002; 71: 181-91.
- Martins da Silva SJ, Bayne RA, Cambray N, Hartley PS, McNeilly AS, Anderson RA. Expression of activin subunits and receptors in the developing human ovary: activin A promotes germ cell survival and proliferation before primordial follicle formation. *Dev Biol* 2004; 266: 334-45.
- Menezo Y, Guerin P. The mammalian oviduct: biochemistry and physiology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1997; 73: 99-104.
- Menezo Y, Testart J, Perrone D. Serum is not necessary in human in vitro fertilization, early embryo culture, and transfer. *Fertil Steril* 1984; 42: 750-5.
- Moor RM, Dai Y, Lee C, Fulka J, Jr. Oocyte maturation and embryonic failure. *Hum. Reprod Update* 1998; 4: 223-36.

- Nagy ZP, Liu J, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem A. Time-course of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in human oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1994; 9: 1743-8.
- Ohno S, Klinger HP, Atkin NB. Human oogenesis. *Cytogenetics* 1962; 1: 42-51.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340: 17-8.
- Picton HM, Danfour MA, Harris SE, Chambers EL, Huntriss J. Growth and maturation of oocytes in vitro. *Reprod Suppl* 2003; 61: 445-62.
- Rattanachaiyanont M, Leader A, Leveille MC. Lack of correlation between oocyte-corona-cumulus complex morphology and nuclear maturity of oocytes collected in stimulated cycles for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1999; 71: 937-40.
- Sakkas D, Leppens-Luisier G, Lucas H, Chardonnens D, Campana A, Franken DR, Umer F. Localization of tyrosine phosphorylated proteins in human sperm and relation to capacitation and zona pellucida binding. *Biol Reprod* 2003; 68: 1463-9.
- Schramm RD, Bavister BD. Development of in-vitro-fertilized primate embryos into blastocysts in a chemically defined, protein-free culture medium. *Hum Reprod* 1996; 11: 1690-7.
- Son WY, Lee SY, Lim JH. Fertilization, cleavage and blastocyst development according to the maturation timing of oocytes in in vitro maturation cycles. *Hum Replod* 2005; 20: 3204-7.
- Son WY, Yoon SH, Lee SW, Ko Y, Yoon HG, Lim JH. Blastocyst development and pregnancies after IVF of mature oocytes retrieved from unstimulated patients with PCOS after in-vivo HCG priming. *Hum Reprod* 2002; 17: 134-6.
- Tan SL, Child TJ, Gulekli B. In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated ovaries: predicting the number of immature oocytes retrieved by early follicular phase ultrasonography. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186: 684-9.
- Tengowski MW. Microscopic techniques for studying sperm-oocyte interaction during fertilization and early embryonic development. *Methods Mol Biol* 2004; 253: 165-99.
- Tokuyama O, Nakamura Y, Musoh A, Honda K, Ozaki K, Ishiko O. Expression and distribution of cyclooxygenase-2 in human ovary during follicular development. *Osaka City Med J* 2003; 49: 39-47.
- Trounson A, Wood C, Kausche A. In vitro maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertil Steril* 1994; 62: 353-62.
- Trounson AO, Mohr LR, Wood C, Leeton JF. Effect of delayed insemination on in-vitro fertilization, culture and transfer of human embryos. *J Reprod Fertil* 1982; 64: 285-94.
- Trounson A, Anderiesz C, Jones G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reprod* 2001; 121: 51-75.
- Urman B, Tiras B, Yakin K. Assisted reproduction in the treatment of polycystic ovarian syndrome. *Reprod. Biomed Online* 2004; 8: 419-30.
- Yang SH, Son WY, Yoon SH, Ko Y, Lim JH. Correlation between in vitro maturation and expression of LH receptor in cumulus cells of the oocytes collected from PCOS patients in HCG-primed IVM cycles. *Hum Reprod* 2005; 20: 2097-103.