

체외수정 및 배아이식술에서 레이저를 이용한 보조부화술의 효용성에 대한 연구

포천중문의과대학교 차병원 여성의학연구소

이정현 · 한지은 · 김유신 · 원형재 · 조정현 · 곽인평 · 엄진희
박은아 · 최윤정 · 이동률 · 윤태기*

Efficacy of Assisted Hatching by Laser in Human IVF-ET Program

Jung Hyun Lee, Ji Eun Han, You Shin Kim, Hyung Jae Won, Chung Hyun Cho, In Pyung Kwak,
Jin Hee Eum, Eun A Park, Yoon Jung Choi, Dong Ryul Lee, Tae Ki Yoon*

Fertility Center of CHA General Hospital, CHA Research Institute, Pochon CHA University

Objective: To evaluate efficacy of assisted hatching by laser (AHL) and acidified Tyrode solution (AHA) in selected groups of IVF-ET patients who have a poor prognosis.

Methods: From February 2006 to September 2006, total of 328 IVF-ET cycles with advanced female age (≥ 38 years), recurrent implantation failure (≥ 3 cycles), thick zona ($\geq 17 \mu\text{m}$), and/or poor quality of embryo were randomly divided into assisted hatching by acidified Tyrode solution (AHA, n=180) and the assisted hatching using the ZILOS-tk laser (AHL, n=148) groups. Clinical outcomes were analyzed and compared between AHA and AHL group based on the patient characteristics.

Results: In all AHL and AHA group, there were no significant differences in pregnancy (42.6%, 63/148 vs. 33.3%, 60/180) and implantation rates (17.4%, 82/470 vs. 16.0%, 89/556). However, in advanced female age group (Group 1), pregnancy (37.0%, 20/54 vs. 18.7%, 14/75) and implantation rates (14.4%, 23/160 vs. 7.1%, 15/210) in AHL group were significantly ($p < 0.05$) higher than those of AHA, although there was no difference in patient parameters of both groups. And, the clinical outcome of groups with recurrent implantation failure (Group 2), thick zona pellucida (Group 3) and poor quality embryo (Group 4) were improved in AHL compared to those of AHA: 43.8% (21/48) and 31.6% (25/79) in Group 2, 43.8% (32/73) and 34.1% (28/82) in Group 3, 25.0% (7/28) and 14.6% (6/41) in Group 4, but no significance.

Conclusion: The AHL improved the pregnancy and implantation rates in patients with advanced female age and recurrent implantation failure when compared to outcomes achieved from AHA. Therefore, this AHL technique may be a efficient and safe method for patients with poor prognosis.

[Korean. J. Reprod. Med. 2008; 35(3): 193-202.]

Key Words: Assisted hatching, Laser, Acidified Tyrode's solution, IVF-ET, Clinical outcome

과배란 약제의 발전과 체외수정 시술 (in vitro fertilization-embryo transfer) 기법의 발전으로 난자의 회수율과 수정률, 임신율은 크게 향상되고 있으나, 자궁에 이식된 배아의 착상률은 크게 증가하지 않

고 있다.¹ 착상률의 증진이 다른 부분에 비해 저조한 이유는 자궁 또는 자궁내막의 이상으로 인한 착상력 (implantation receptivity)의 부족, 또는 난자나 수정란의 문제로 인한 배반포로의 발달 장애, 부화 (hatching)과정에서의 이상 등으로 설명되고 있다.²⁻⁵ 이중에서도 특히 부화과정의 이상은 체외에서 배양하는 수정란 또는 배아의 투명대가 부적

주관책임자: 윤태기 우) 135-081 서울특별시 강남구 역삼동 605,
포천중문의과대학교 차병원 여성의학연구소
Tel: (02) 3468-3409, Fax: (02) 501-8704
e-mail: tkyoon@cha.ac.kr

절한 배양환경에 의해 경화되거나, 배아발생 과정 동안 생식수관계 (reproductive tract)를 거치는 과정이 생략되어 투명대에 미치는 효소 (enzymatic lysis)의 노출이 체내보다 낮기 때문이라고 알려져 있다.^{6,7} 또한 이외에도 체외수정 기술을 하는 여성 환자의 나이가 많거나, 또는 난소의 기능이 떨어져 기저 FSH의 농도가 높은 경우, 이식하는 배아의 질이 나쁜 경우, 그리고 난자성장 및 성숙과정의 이상으로 투명대의 두께나 모양이 비정상인 경우에도 착상률은 매우 저조하다고 보고되고 있다.^{8~10}

배아의 투명대를 조작하여 투명대를 통한 배아의 부화를 도와주는 보조부화술 (assisted hatching)은 많은 체외수정 기술기관에서 임신율과 착상률을 높이기 위해 도입되고 있다. 최초로는 날카로운 유리피펫을 이용하여 투명대를 절개하는 방법이 도입되었고,¹¹ 그 후로 투명대를 얇게 하거나 절개하는 여러 가지 방법이 여러 연구자들에 의해 개발된 바 있다. 그 중 가장 보편화된 방법으로는 강산성 용액을 이용하여 투명대를 얇게 하거나 투명대에 구멍을 내는 방법 (Assisted Hatching by Acidified Tyrode's solution, AHA)이 대표적이며,^{9,12} laser beam을 이용한 방법¹³ 등도 도입되기 시작하였다. 이 방법들은 배아에 최소한의 손상을 주면서 부화과정을 도와주는 것을 목적으로 투명대를 얇게 만들거나 구멍을 뚫어주는 방법이다.¹⁴

보조부화술은 기존의 다른 보조생식술에 비해 대단히 적극적인 방법으로 그 장점에 비해 외부환경에의 불필요한 노출, 작업 중의 기계적 또는 화학적인 손상의 위험성이 매우 높아 그 임상적 효과에 대해서는 일부 논쟁의 여지가 매우 많다. 특히 가장 널리 사용되고 있는 AHA의 경우는 그 임상적 효과는 일부 인정되고 있으나, 강산성의 용액을 사용하기 때문에 유해성에 관한 위험이 있고, 또한 이를 줄이기 위한 연구자의 숙달된 기술이 필요하며, 투명대를 동일하고 규격화된 크기로 절개하는 것과 같은 표준화된 작업이 용이하지 않다는 단점이 있다.^{15,16} 이러한 문제점들은 보조부화술의 모든 체외수정 프로그램에의 도입을 막아 특정 불

임요인 환자에게만 사용케 하고 있다. 최근에 이러한 문제점을 극복하고 또한 보조부화술의 효과를 극대화하기 위해 일부 연구자들에 의해 laser를 이용한 방법 (Assisted Hatching by Laser, AHL)이 제시되고 있다.¹⁷ 이 방법은 laser beam을 방출하여 일정한 크기로 투명대를 뚫을 수 있고 조작시간이 다른 방법에 비해 짧고 간편하여 가장 이상적인 보조부화술 방법이라고 제안된 바 있다.¹⁸ 하지만 AHL의 임상적 임신율과 착상률 역시 연구자간에는 상이하게 보고되고 있으며, 여러 불임요인에 따른 효용성에 관한 임신율과 착상률에 대한 결과도 많이 연구되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 일차적으로 저조한 임신율의 극복을 위해 보조부화술이 적용되는 선별된 환자군을 대상으로 AHA와 AHL의 효용성을 비교하여, 보다 효과적으로 임신율과 착상률을 높일 수 있는 보조부화술의 방법을 찾고자 한다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

본 연구는 2006년 2월부터 9월까지 강남 차병원 여성의학연구소에서 체외수정 기술을 시행한 환자 중 여러 요인들에 의해 보조부화술을 필요로 하는 328주기를 대상으로 하였다. 본 병원에서 시행되는 보조부화술의 대상 환자는 다음과 같다; (i) 환자의 나이가 38세 이상, (ii) 투명대의 두께가 17 μm 이상, (iii) 기저 FSH 농도가 15 mIU/ml 이상, (iv) 체외수정 기술을 3회 이상 실패, (v) 이식하는 배아수가 2개 이하, (vi) 배아의 상태가 양호하지 않은 경우로 이상의 적응요인이 있으면 실시하였다. 본 연구에서는 AHL 148주기와 AHA 180주기를 1주일씩 무작위로 나누고 각각을 격주 간격으로 시행하였다.

2. 과배란 유도 및 체외수정 기술방법

본 연구대상 환자의 과배란 유도를 위해서는 GnRH agonist (Lucrine, Abbotte France)와 recombinant FSH (rFSH)를 사용하는 장기요법과 rFSH와 GnRH

antagonist (Cetrotide, Serono, Germany)를 사용하는 단기요법을 병용하였다. 초음파상 17 mm 이상의 난포가 2개 이상 관찰되었을 때 10,000 IU의 hCG를 주사하였고, 34~36시간 후 질식초음파를 이용하여 난자를 채취하였다. 체외수정 시술환자의 불임 요인에 따라 일반수정법 (conventional insemination) 또는 세포질 내 정자주입술 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI)을 시행하였다. 수정 유도 후 16~20 시간째 전핵형성 유무와 극체 수를 관찰하여 수정 여부를 확인하였고, 정상적인 수정란을 성장배양액 소적으로 옮겨 2일간 추가배양하였다. 배양은 37°C, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂가 유지되는 배양기 (Hera Cell 240, Germany)에서 수행되었고, 성장배양액은 10% synthetic serum substitute (SSS, Irvine scientific, Santa Ana, CA)가 포함된 P1 배양액 (Irvine scientific)을 사용하였다. 보조부화술의 시행여부와 방법은 이식하는 날 아침에 기준에 따라 결정하였다. 연구의 공정성을 위하여 AHL와 AHA 방법을 각각 1주일 동안 무조건적으로 사용하였다. 배아이식 후 11일에서 12일 후 환자의 혈액 내 β-hCG 확인하고, 초음파로 태낭 (gestation sac)을 확인한 경우 임상적 임신으로 판정하였다.

3. 레이저를 이용한 보조부화술 (AHL)

Laser를 이용한 보조부화술은 도립위상차현미경에 ZILOS-tk (Zona Infrared Laser Optical System, Hamilton Thorne Instruments Biosciences, Beverly, MA)를 설치하여 시행하였다. 10% SSS가 첨가된 HEPES-buffered modified HTF 배양액 (Irvine scientific) 소적 내에 2~3개의 이식할 배아를 옮겼다. Holding pipette을 이용하여 6-8세포기 배아를 laser beam이 3시 방향에서 투명대를 통과할 수 있도록 정렬한 후 고정하였고, 0.5 msec 동안에 2~3 pulse로 천공하였다. 가능한 한 할구에 영향을 주지 않게 하기 위해 할구와 할구사이에 존재하는 공간쪽에 위치한 투명대에 천공하였다. 투명대에 천공된 구멍의 크기는 평균 5~10 μm 정도이며, 각 배아마다 투명대에 두께에 맞게 천공횟수를 조절하였다.

AHL를 시행한 배아는 다시 P1 배양액으로 옮겨서 2~3시간 배양하였고, 환자의 자궁 내로 이식하였다.

4. 산성 용액을 이용한 보조부화술 (AHA)

전술한 바와 같이 HEPES-buffered modified HTF 배양액에 배아를 옮긴 후 holding pipette을 이용하여 배아를 정렬하고, 고정하였다. 강산성 (pH 2.5) Tyrode solution (Irvine scientific)을 작업 pipette (내경: 10 μm) 내로 흡입한 후, 투명대의 일부를 천공하였다. 이식할 배아의 할구에 영향을 최소화 하기 위해 할구사이 빈 공간이 3시 방향으로 위치하도록 고정하였다. 투명대에 강산성 Tyrode solution을 분사하여 투명대가 녹는 것을 확인하고, 재빨리 재흡입하여 너무 많이 분출되어 할구에 세포막이나 세포질에 손상이 생기지 않도록 하였다. 시술을 시행한 후 P1 배양액으로 재빨리 옮겨 여러 번 세척한 후 이식하였다.

5. 통계분석 (Statistical Analysis)

각 군별 환자들의 임상적 특징은 평균값 ± 표준편차로 표기되었고, 각 군별 치료결과의 비교는 χ^2 -test를 이용하여 비교하였다.

결 과

연구기간 중에 AHL과 AHA 방법을 이용하여 보조부화술을 시행한 전체 환자군의 임상적 특징과 임신율과 착상률을 분석하였다. 전체 328주기 중 148주기는 AHL 방법으로, 180주기는 AHA 방법으로 보조부화술을 시행하였다. 두 군 간에 환자의 나이는 AHL군은 36.2±4.4였고 AHA군은 36.4±4.4, 기저 FSH 수치는 7.1±3.3와 7.9±5.2, 체외수정을 시행한 횟수는 2.2±1.6와 2.4±1.6, 투명대의 두께는 16.5±0.8와 16.5±0.9, 자궁내막의 두께는 1.0±0.2와 1.0±0.2로 환자의 임상적 특징에는 차이가 없었다. 또한 AHL군과 AHA군은 각각 1451개 (9.8±6.3), 1770개 (9.8±7.8)의 난자가 회수되었고, 수정률은 79.6%, 78.4%였으며, 이식한 배아수도 487 (3.3±1.0)

과 556 (3.1±1.1)개였으며 이식한 배아의 질도 등급간 유의적 차이가 나타나지 않았다. 이로써 두 방법을 이용한 환자군 간의 체외수정방법에서의 차이는 관찰할 수 없었다. 임신율은 AHL군에서 42.6%로 AHA군의 33.3%에 비해 약간 높았으나 통계적으로 유의하지는 않았다 (p=0.086). 또한 착상률도 각각 17.4%, 16.0%로 두군 간에 차이가 없었다 (Table 1).

본 연구에서 과거 여러 연구자에 의해 보조부화술이 효과적으로 적용된 적응증별로 보조부화술 방법에 의한 결과를 비교하여 보다 효율적인 방법을 찾고자 하였다. 전체 환자군에서 환자의 나이로 여성의 나이가 38세 이상인 환자군 (group 1), 3번 이상 체외수정 시술에 실패한 환자군 (group 2), 투명대의 두께가 17 µm 이상인 환자군 (group 3), 이식한 배아가 Veeck's classification¹⁹ 따라 3~4 등급

으로 양호하지 않은 질을 가진 환자군 (group 4)으로 나누어 비교하였다. 특정불임요인별로 나눈 각각의 네 군간에 AHL 방법과 AHA 방법에서의 환자의 임상적 특징에는 위와 표와 같이 유의적 차이는 없었다. 다만 적응증별로 나누었기 때문에 전체 환자군보다 일정한 수치들이 높게 나타났다. 나이가 많은 환자군 (group 1)의 평균 나이는 AHL에서는 41.1±2.2 AHA에서는 40.9±2.0로 나이가 많았고, 세 번 이상 체외수정 시술에 실패한 환자군 (group 2)에서는 체외수정 시술횟수가 4.1±1.5와 4.0±1.0로 다른 환자군보다 평균 시술횟수가 많았다. 투명대의 두께가 두꺼운 환자군 (group 3)에서는 투명대 두께가 17.2±0.4와 17.2±0.8로 평균 투명대 두께가 두꺼웠으며, 배아의 질이 양호하지 않은 군 (group 4)에서는 3~4등급의 평균 이식배아수가 배아등급 3이 2.0±1.2와 1.9±1.2 배아등급 4가

Table 1. Comparison of clinical outcome of Assisted Hatching by Laser (AHL) and Assisted Hatching by Acidified Tyrode's solution (AHA) in IVF cycles

Characteristics/Outcomes	AHL	AHA
No. of embryo transfer cycle	148	180
Mean±SD age (years)	36.2±4.4	36.4±4.4
Mean±SD basal FSH (mIU/ml)	7.1±3.3	7.9±5.2
Mean±SD no. of previous assisted reproduction cycle	2.2±1.6	2.4±1.6
Zona thickness (µm)	16.5±0.8	16.5±0.9
Retrieve oocytes per cycle (mean ± SD)	1451 (9.8±6.3)	1770 (9.8±7.8)
Fertilization rate (%)	79.6	78.4
Number of embryo transferred (mean ± SD)	487 (3.3±1.0)	556 (3.1±1.1)
Grade 1 transferred embryo per ET (mean ± SD)	13 (1.6±1.1)	8 (1.3±0.5)
Grade 2 transferred embryo per ET (mean ± SD)	264 (2.2±1.1)	306 (2.2±1.1)
Grade 3 transferred embryo per ET (mean ± SD)	154 (1.8±0.9)	164 (1.7±0.9)
Grade 4 transferred embryo per ET (mean ± SD)	56 (1.6±0.9)	78 (1.5±0.7)
Endometrial thickness (mm)	1.0±0.2	1.0±0.2
Clinical pregnancy rate (%)	63 (42.6)*	60 (33.3)*
Implantation rate (%)	82/470 (17.4)	89/556 (16.0)

* 0.05 < p > 0.1 (p=0.086), Note: Data is presented as mean ± S.D.

Table 2. Patient characteristics and cycle outcome of Assisted Hatching by Laser (AHL) and assisted hatching by acidified Tyrode's solution (AHA) in each selected groups of patients who have a poor prognosis

Characteristics/ Outcomes	GROUP 1		GROUP 2		GROUP 3		GROUP 4	
	AHL	AHA	AHL	AHA	AHL	AHA	AHL	AHA
No. of embryo transfer cycle	54	75	48	79	73	82	28	41
Mean ± SD age(years)	41.1±2.2	40.9±2.0	37.6±4.2	36.6±4.1	36.1±4.1	35.1±4.5	35.6±4.5	37.3±4.7
Retrieve oocytes per cycle (mean ± SD)	405 (7.5±5.2)	532 (7.1±5.4)	436 (9.1±7.4)	811 (10.3±8.9)	655 (9.0±5.5)	878 (10.7±8.4)	231 (8.3±5.7)	293 (7.2±5.5)
Fertilization rate (%)	80.4	78.1	82.2	78.4	80.1	78.1	74.8	77.6
Number of embryo transferred (mean ± SD)	160 (3.0±1.2)	210 (2.8±1.2)	149 (3.1±1.1)	245 (3.1±1.1)	241 (3.3±0.9)	257 (3.1±1.0)	84 (3.0±1.0)	107 (2.6±1.2)

Group 1: Group with advanced female age (≥38 years)
 Group 2: Group with recurrent implantation (≥3 cycles)
 Group 3: Group with thick zona pellucida embryo (≥17 μm)
 Group 4: Group with poor quality embryo transfer (grade 3~4)

2.0±1.1와 1.6±0.7로 질이 좋지 않은 이식배아수가 높게 나타났다. 그러나 나이가 많은 환자군에서는 AHL은 54주기 AHA는 75주기로 회수된 난자수는 405개 (7.5±5.2), 532 (7.1±5.4), 수정률은 각각 80.4%, 78.1%로 차이가 나타나지 않았다. 또한 이식한 배아수도 160 (3.2±1.2), 210 (2.8±1.2)이었으며, 배아등급간 이식한 평균 배아수도 차이가 나타나지 않았다. 이와 같이 체외수정 시술에 실패한 환자군, 투명대의 두께가 두꺼운 환자군, 이식한 배아의 질이 양호하지 않은 환자군들에서는 체외수정방법에 있어 유의적 차이는 전체 환자군과 같이 나타나지 않았다 (Table 2).

Figure 1, 2는 적응증별로 AHL 방법과 AHA 방법에 임신율과 착상률을 도표화한 것이다. 도표와 같이 나이가 많은 환자군에서는 AHL 방법이 임신율 (n=20, 37.0%와 n=14, 18.7% p<0.05)과 착상률 (n=23, 14.4%와 n=15 7.1% p<0.05)이 AHA 방법에 비해 유의하게 높게 나타났다. 세 번 이상 체외수정에 실패한 환자군에서는 AHL 방법이 임신율 (n=21, 43.8%와 n=25, 31.6%)이 높았고 착상률 (n=22, 14.8%와 n=40, 16.3%)은 AHA 방법이 약간 높았으

나 유의성은 없었다. 투명대의 두께가 두꺼운 환자군에서도 임신율 (n=32, 43.8%와 n=28, 34.1%)과 착상률 (n=47, 19.5%와 n=42, 16.3%)이 AHL 방법이 약간 높았으나 비슷한 양상을 보였다. 이식하는 배아의 상태가 양호하지 않은 환자군에서도 AHL 방법이 임신율 (n=7, 25.0%와 n=6, 14.6%)과 착상률 (n=8, 9.5%와 n=5, 4.7%)이 높게 나타났으나 통계적으로 유의하지 않았다.

고찰

초기 배아의 부화과정은 착상을 위해서는 필수적인 과정이지만 그 자세한 기작에 대해서는 아직 명확하게 밝혀지지 않았다. 현재까지의 연구를 종합하면 여러 가지 기작이 종합적으로 관여하는 것으로 생각되며 다음의 세 가지 기작으로 요약할 수 있다. 첫째, 배아 발생을 통한 세포수의 증가와 포배강의 형성으로 인해 생기는 물리적인 압력의 증가로 투명대에 가해지는 기계적인 압력이다. 둘째, 포배의 영양배엽 (trophoectoderm)에서 생성, 분비되는 여러 종류의 단백질 분해효소에 의한 투명대

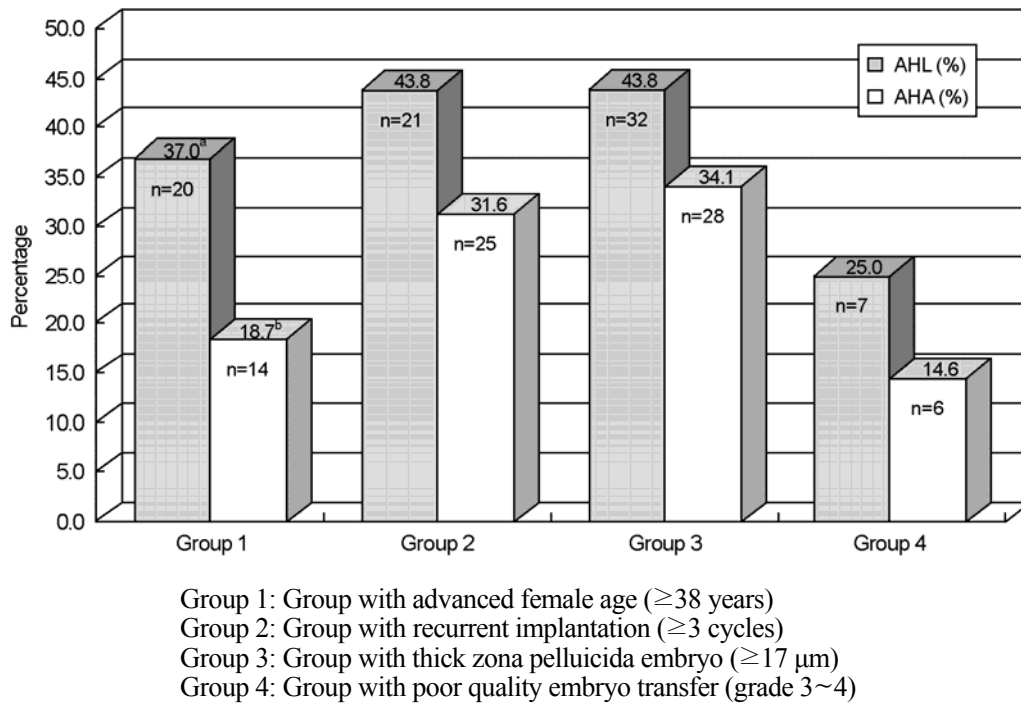


Figure 1. Clinical pregnancy rates of Assisted Hatching by Laser (AHL) and assisted hatching by acidified Tyrode's solution (AHA) in each selected groups of patients who have a poor prognosis. ^a vs. ^b $p < 0.05$

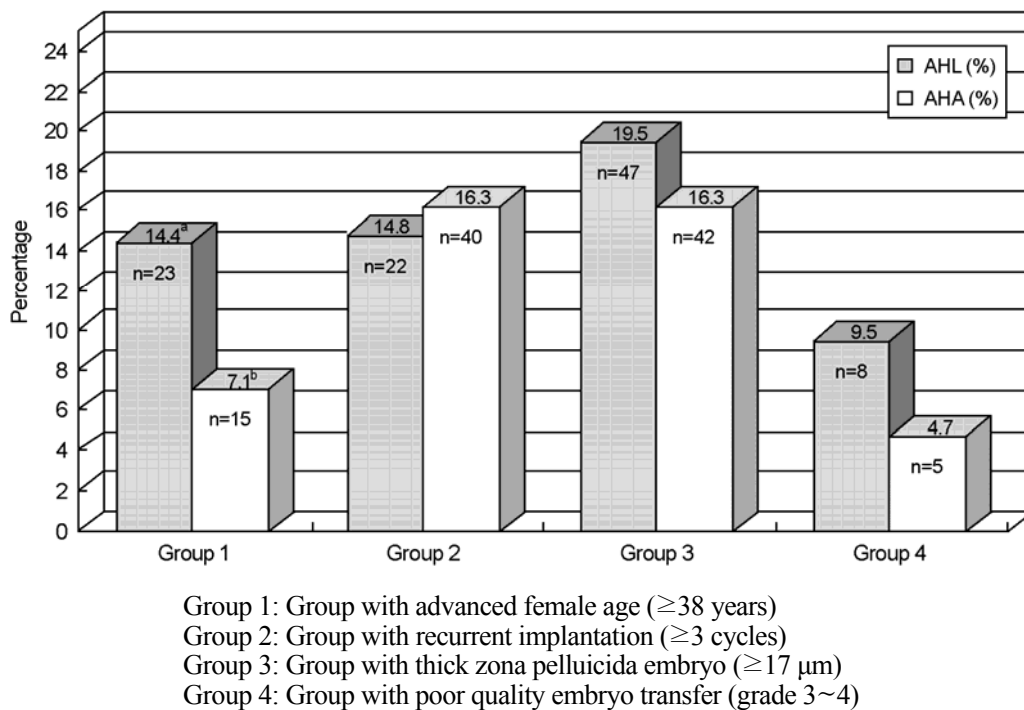


Figure 2. Implantation rates of Assisted Hatching by Laser (AHL) and assisted hatching by acidified Tyrode's solution (AHA) in each selected groups of patients who have a poor prognosis. ^a vs. ^b $p < 0.05$

의 약화 현상이다.^{16,20} 특히 체외에서 배양되는 배아의 경우는 체내 환경에서 성장한 배아에 비해 발생이 불량한 경우가 많고, 이로 인한 배아 내 영양 배엽세포수의 감소로 인해 단백질 분해효소가 감소하여 부화율이 낮게 되는 것으로 제안된 바 있다. 또한 고령 또는 여러 원인으로 난자의 질이 떨어질 경우에도 배아의 발생이 늦어지거나 억제되는 경우도 많다. 세 번째 부화의 기작은 모체의 생식수관계에서 분비되는 각종 요인들과 단백질 분해효소에 의한 투명대의 약화이다. 여러 연구결과에서 이미 밝혀진 바와 같이 여성의 생식수관계에 존재하는 많은 세포들은 여러 가지 요소들을 분비하여 배아의 발생에 도움을 주고 있다.¹⁶ 또한 이들 성분 중에는 투명대의 약화를 유도하여 부화에 도움을 주는 여러 가지 단백질 분해효소도 포함되어 있는 것으로 알려져 있다. 체외배양과정에는 이러한 모체환경에 노출이 되지 않아 배아발생이 늦어지거나 투명대의 경화가 유발되고, 이로 인해 부화율이 체내환경에 비해 저조한 것으로 제안되고 있다.^{7,20}

보조부화술을 사용하였을 때 착상률이 증진되는 이유는 아직 명확하지는 않지만 체외배양을 통해 늦어진 배아발생으로 인한 부화의 시기를 자궁에 수정란이 착상할 수 있는 시기 (implantation window)에 부화할 수 있도록 도와주는데 있다.²¹ 즉 보조부화술의 장점은 착상을 해야 할 배아와 자궁내막 사이의 시간적 불일치를 해소하여 동기화 (synchronization)를 유도하는데 있다. 실제로 이러한 동

기화의 불일치는 착상률에도 영향을 주며, 착상이 일어나더라도 유산될 확률을 높이는 것으로 알려져 있다.²²

체외수정 기술에서 보조부화술의 효과는 연구자간에 따라 논란이 많다. 실제로 여러 연구자들이 보조부화술의 임상효과에 대해 분석을 시도하였으나 일관된 결과가 나타나지 않았다.^{9,30} 최근의 연구결과를 종합하면 전체 체외수정 시술환자에게는 별다른 임상적 효율의 증진은 기대하기 어려우나, 고령 또는 여러 요인에 의해 배아의 발생이 늦어져 부화가 늦어지는 일부의 환자군에서 임신율이나 착상률이 증가했다는 보고가 많다.^{8,10,14,23} 따라서 본 연구는 이러한 여러 연구자들의 연구와 본 연구진의 선행연구를 종합하여 전체 체외수정환자를 대상으로 하지 않고, 보조부화술의 임상효과가 입증된 선별된 환자군을 대상으로 하여 보다 나은 보조생식술 방법을 찾기 위해서 시행되었다.

일반적으로 많은 병원에서 채택하고 있는 AHA 방법은 처음에 사용되었던 보조부화술인 날카로운 유리피펫을 이용한 기계적인 방법보다는 조작 방법이 쉬우며, laser 방법보다는 비용이 훨씬 경제적이다. 또한 구멍 크기가 기계적인 방법보다는 크게 만들 수 있으며, 더 일정한 크기를 만들 수 있다.²⁴ 일부 연구자들에 의하면 보조부화술에 구멍 크기가 작을 경우 배아 발달에 역효과를 나타내고, 완전한 부화과정이 일어나지 않는다고 보고하고 있다. 또한 다른 동물실험에서도 AHA 방법으로 투명대를 얇게 하는 방법이 체내의 부화과정과 흡사

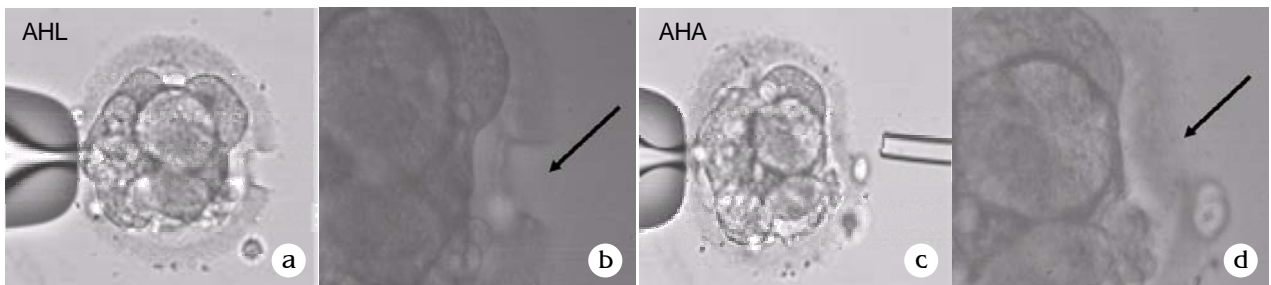


Figure 3. Photomicrograph of human embryo after Assisted Hatching by Laser (AHL) and assisted hatching by acidified Tyrode's solution (AHA) (arrows mark margins of defect). Original magnification, $\times 200$ (a, c), $\times 400$ (b, d).

하며, 더 좋은 결과를 나타냈다고 보고하였다.²⁵ 본 실험에 이용한 방법 또한 투명대를 얇게 하는 방식이었다 (Figure 3c, d). 그러나 강산성인 acidified Tyrode's solution에 배아가 노출되고, 초기 보조부화술 방법보다는 일정하지만 laser 방법보다는 동일하고 규격화된 크기의 표준화된 작업이 어렵고, 초기 미수정란의 투명대에 acidified Tyrode's solution에 노출되었을 때 산성 용액에 의한 손상으로 배아 발달의 유해한 효과가 나타났다는 보고가 있으며,⁹ 배아가 노출됨으로 인하여 배아독성을 나타낼²⁶ 가능성은 여전히 남아있는 문제이다.

본 연구에 사용한 laser는 비접촉방식 (non-contact type)으로 현미경의 대물렌즈를 통해 빛이 방출되며, 배양접시와 배양액에 의해 laser의 빛을 최소화하여 흡수하게 하여 다른 방식의 laser보다 샘플에 미치는 영향을 최소화 할 수 있다.¹⁸ 본 연구에 사용된 적외선 diode laser는 1.48 μm 파장으로 DNA 흡수 스펙트럼 (약 300 nm)과 단백질 흡수 스펙트럼 (약 308 nm) 범위에 크게 벗어나 수정란의 체외 및 체내 발달에 유해한 영향을 미치지 않는 것으로 보고되고 있다.^{15,27} 또한 다른 동물 모델 (생쥐, 소)에서도 정상 산자가 태어나 안전하다는 것을 증명하였고, 인간을 대상으로 한 연구에서도 laser를 이용한 보조부화술을 시행하여 태어난 아이들을 추적 조사 한 결과 유전적 기형과 염색체적 이상은 증가하지 않았다고 보고된 바 있다.^{28,29} 그러나 가격이 비싸고 laser beam에 열에 의한 잠재적인 부작용이 제기된 바도 있다. 본 연구에서는 타 연구자의 선행연구에서 안전하게 사용된 최소한의 beam power (300 mW)와 pulse 시간 (0.5 msec)을 이용하였고³⁰ (Figure 3a, b), 그 결과 시술 중 손상을 입은 할구나 수정란은 없었다.

본 연구 대상 환자군에서 AHL를 이용하여 보조부화술을 시행하였을 때 임신율과 착상률은 AHA를 사용하였을 때 비해 유의적 차이는 없었지만 약간 증가하였다. 이러한 결과는 선별된 환자군에서 4가지 보조부화술 방법들 간의 임상효율을 비교한 타 연구자의 결과와 유사하였다.²⁴ 그러나 보

조부화술의 임상적 효율이 높은 것으로 알려진 고령의 환자군 (≥ 38)에서는 AHL를 이용한 보조부화술이 AHA에 비해 높은 임신율과 착상률을 보였다. 이러한 결과는 타 연구자의 결과에서도 보여진 바와 같이 고령인 환자군에서 보조부화술이 임상효율을 증진시킨데 효과적이며,³¹ 특히 AHL이 AHA에 비해 정확하고 빠르며 화학적인 유해성도 피할 수 있기 때문에 임상적 효용성을 보다 증진하는 것으로 사료된다. 실제로 AHL를 사용할 경우 배양기 밖 환경에 노출하는 시간을 약 절반 이상 감소시킬 수 있었다.

나이 이외의 다른 조건을 비교하였을 때 또한 임상효율을 약간 증진된 바 있으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 이러한 이유는 연구 대상군의 수가 충분히 많지 않았으며, 임상결과에 보다 복합적으로 다양한 요인이 관여했기 때문이라고 사료된다. 결론적으로 이상의 결과를 볼 때 보조부화술 적용 환자군에서는 AHL 방법이 AHA 방법보다 좀 더 좋은 임신율과 착상률을 보여주고 있다. 특히 보조부화술의 효과가 많이 기대되는 고령의 환자군에서는 AHL이 보다 안전하고 효율적인 결과를 기대할 수 있다고 사료된다.

참 고 문 헌

1. Hsieh YY, Huang CC, Cheng T, Chang CC, Tsai HD, Lee MS. Laser-assisted hatching of embryo is better than chemical method for enhancing the pregnancy rate in women with advanced age. *Fertil Steril* 2002; 78: 179-82.
2. Edwards RG, Fishel SB, Cohen J. Factors influencing the success of in-vitro fertilization for alleviating human infertility. *J In Vitro Fert Embryo Trans* 1986; 1: 3-23.
3. Yaron Y, Botchan A, Amit A. Endometrial receptivity in the light of modern assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 1994; 62: 225-32.
4. Van Kooij RJ, Looman CW, Habbema JD, Dorland M, Te Velde ER. Age-dependent decrease in embryo implantation rate after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1996; 66: 769-75.
5. Blake DA, Forsberg AS, Johansson BR, Wikland M. Laser zona pellucida thinning- an alternative approach to assisted

- hatching. *Hum Reprod* 2001; 16: 1959-64.
6. Cohen J. Assisted hatching of human embryo *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1991; 8: 179-90.
 7. Gordon JW, Dapunt U. A new mouse model for embryo with a hatching deficiency and its use to elucidate the mechanism of blastocyst hatching. *Fertil Steril* 1993; 59: 1296-301.
 8. Lanzendorf SE, Ratts VS, Moley KH, Goldstein JS, Dahan MH, Odem RR. A randomized, prospective study comparing laser-assisted hatching and assisted hatching using acidified medium. *Fertil Steril* 2007; 87: 1450-6.
 9. Cohen J, Alikani M, Trowbridge J. Implantation enhancement by selected assisted hatching using zona drilling of human embryo with poor prognosis. *Hum Reprod* 1992; 7: 685-91.
 10. Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Fortini D, Aicardi G, Montanaro N. Rescue of implantation potential in embryo with poor prognosis by assisted zona hatching. *Hum Reprod* 1998; 13: 1331-5.
 11. Cohen J, Elsner C, Kort H. Impairment of hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisted hatching using micromanipulation. *Hum Reprod* 1990; 5: 7-13.
 12. Stein A, Rufas O, Amit S, Averech O, Pinkas H, Ovadia J. Assisted hatching by partial zona dissection of human pre-embryo in patients with recurrent implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1995; 63: 838-41.
 13. Rink k, Delacretaz G, Salathe RP, Senn A, Nocera D, Germond M, et al. Non-contact microdrilling of mouse zona pellucida with an objective-delivered 1.48-microns diode laser. *Laser Surg Med* 1996; 18: 52-62.
 14. Makrakis E, Angeli I, Agapitou K, Pappas K, Dafereras A, Panos K. Laser versus mechanical assisted hatching; a prospective study of clinical outcomes *Fertil Steril* 2006; 86: 1596-9.
 15. Germond M, Nocera D, Senn A, Rink K, Delacretaz G, Fakan S. Microdissection of mouse and human zona pellucida using 1.48 µm diode laser beam; efficacy and safety of the procedure *Fertil Steril* 1995; 64: 604-11.
 16. Al-Nuaim LA, Jenkins JM. Assisted hatching in assisted reproduction. *An International Journal of Obst Gynaecol* 2002; 109: 856-62.
 17. Stromer H, Feichting W. Successful clinical application of laser for micromanipulation in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1992; 58: 212-4.
 18. Wong BC, Boyd CA, Lanzendorf SE. Randomized controlled study of human zona pellucida dissection using the Zona Infrared Laser Optical System: evaluation of blastomere damage, embryo development, and subsequent hatching. 2003; 80: 1249-54.
 19. Veeck LL. Preembryo grading. In: Veeck LL, editor. *Atlas of human oocyte and early conceptus*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1991. p.121-49.
 20. Schiewe MC, Hazeleger NL, Scimienti C, Balmaceda JP. Physiological characterization of blastocyst hatching mechanism by use of mouse anti-hatching mode. *Fertil Steril* 1995; 63: 288-94.
 21. Liu hc, Cohen J, Alikani M, Noyes N, Rosenwaks Z. Assisted hatching facilitates earlier implantation. *Fertil Steril* 1993; 60: 871-5.
 22. Liu HC, Rosenwaks Z. Early pregnancy wastage in in vitro fertilization patients. *J. In Vitro Fertil Embryo Transf* 1990; 8: 65-72.
 23. Vosa D, Van steirteghem A. Zona harding, zona drilling and assisted hatching; new achievements in assisted reproduction. *Cell Tissues Organs* 2000; 166: 220-7.
 24. Balanban B, Urman B, Alatas C, Mercan R, Mumcu A, Isiklar A. A comparison of four different techniques of assisted hatching. *Hum Reprod* 2002; 17: 1239-43.
 25. Khalifa EAM, Tucker MJ, Hunt P. Cruciate thinning of zona pellucida for more successful enhancement of blastocyst hatching in the mouse. *Hum Reprod* 1992; 7: 532-6.
 26. Malter HE, Cohen J. Blastocyst formation and hatching in vitro following zona drilling of mouse and human embryo. *Gamete Res* 1989; 24: 67-80.
 27. Germond M, Nocera D, Senn A, Rink K, Delacretaz G, Pedrazzini T. Improved fertilization and implantation rates after non-touch zona pellucida microdrilling of mouse oocytes with a 1.48 microm diode laser beam. *Hum Reprod* 1996; 11: 1043-8.
 28. Kanyo K, Konc J. A follow-up study of children born after diode laser assisted hatching. *Eur J obstet Gynecol reprod biol* 2003; 110: 117-80.
 29. Primi M, Senn A, Montag M, Van der Ven H, Mandelbaum J, Veiga A. A European multicentre prospective randomized study to assess the use of assisted hatching with diode laser and the benefit of an immunosuppressive/antibiotic treatment in different patient population. *Hum Reprod* 2004; 19: 2325-33.

30. Douglas-Hamilton DH, Conia J, Thermal effects in laser-assisted preembryo zona drilling. J. Biomed Optics 2001; 6: 205-13.

31. Montag M, Vander Ven H. Laser-assisted hatching in assisted reproduction. Croat Med J 1999; 40: 398-403.

= 국문초록 =

목 적: 보조부화술이 적용되는 좋지 않은 예후를 보여주는 선별된 환자군을 대상으로 산성 용액을 이용한 AHA 방법과 레이저를 이용한 AHL 방법의 효용성을 비교하여, 보다 효과적으로 임신율과 착상률을 높일 수 있는 보조부화술 방법을 찾고자 하였다.

연구방법: 2006년 2월부터 9월까지 체외수정 시술을 시행한 환자 중 보조부화술이 필요한 328주기를 대상으로 산성 용액을 이용한 AHA 방법 (180주기)과 ZILOS-tk 레이저를 이용한 AHL 방법 (148주기)으로 나누어 시행하였다. 보조부화술을 시행한 환자군은 환자의 나이가 38세 이상이거나 투명대의 두께가 18 μm 이상, 기저 FSH 농도가 15 mIU/ml 이상, 체외수정 시술을 3번 이상 실패한 환자, 이식하는 배아의 상태가 양호하지 않은 환자들로 이상에 적용요인이 있으면 시행하여 무작위로 보조부화술 방법간에 환자들의 임상적 특징과 임신율과 착상률을 분석하였다.

결 과: 전체 보조부화술을 시행한 환자군에 AHL 방법과 AHA 방법간에 임신율 (42.6%, 63/148 vs. 33.3%, 60/180)과 착상률 (17.4%, 82/470 vs. 16.0%, 89/556)에 유의적 차이는 나타나지 않았다. 그러나 나이가 많은 환자군인 Group 1은 임신율 (37.0%, 20/54 vs. 18.7%, 14/75)과 착상률 (14.4%, 23/160 vs. 7.1%, 15/210)이 AHL 방법이 AHA 방법보다 유의적 ($p < 0.05$)으로 높게 나타났다. 전체 환자군이나 선별된 각 군내에 보조부화술 방법간에 환자의 임상적 특징은 유의적 차이가 나타나지 않았다. 3번 이상 체외수술에 실패한 환자군 [Group 2: 43.8% (21/48)과 31.6% (25/79)], 투명대의 두께가 18 μm 이상인 환자군 [Group 3: 43.8% (32/73)과 34.1% (28/82)], 이식한 배아의 질이 양호하지 않은 환자군 [Group 4: 25.0% (7/28)과 14.6% (6/41)]에서는 AHL 방법이 임상결과는 좋았으나 유의적 차이는 없었다.

결 론: 레이저를 이용한 AHL 방법이 나이가 많은 환자군과 3번 이상 체외수정 시술에 실패한 환자군에서 AHA 방법에 비해 높은 임신율과 착상률을 나타내었다. 결론적으로, AHL을 이용한 보조부화술이 임상적으로 보다 효과적이고 안전한 방법이라고 사료된다.

중심단어: 보조부화술, 레이저, Acidified Tyroid's solution, 체외수정 시술, 임상결과
