

IVF-ET 시술 시 파편제거가 파편화된 인간배아의 발달에 미치는 효과

한나여성의원 시험관아기기술센터¹, 미즈메디병원 아이드림센터²

지희준^{1,2*} · 구정진¹ · 이주옥¹ · 류형은² · 김광래² · 박 찬² · 노성일²

Effect of Fragment Removal on Development of Human Fragmented Embryos in IVF-ET Program

Hee-Jun Chi^{1,2*}, Jung-Jin Koo¹, Ju-Ok Lee¹, Hyoung-Eun Ryu², Kwang-Rae Kim², Chan Park², Sung Il Roh²

¹IVF Center of Hanna Women's Clinic, ²i-Dream Center of Mizmedi Hospital, Seoul, Korea

Objective: To investigate the beneficial effect of fragment removal on the subsequent cell division and clinical outcome of the fragmented human embryos.

Methods: A prospective study was performed in Hanna Women's Clinic and Mizmedi Hospital. Sixty couples undergoing *In vitro* fertilization-embryo transfer (IVF-ET) program were participated in the present study. The microsurgical fragment removal was performed in 106 fragmented embryos of 29 patients before the transfer. As a control group, 122 fragmented embryos of 31 patients were transferred without the fragment removal. Effects of fragment removal on morphological changes and clinical outcomes of fragmented embryos were investigated.

Results: Mean morphological grade (G2.79) of fragmented embryos was significantly improved after the fragment removal (G1.63, $p < 0.001$). Most of the fragmented embryos did not show a regeneration of fragments after the fragment removal during the subsequent development, and a beneficial effect of fragment removal on the development of the fragment removed embryos was observed. Implantation and pregnancy rates of fragment removed embryos were 12.3% and 31.3%, whereas the rates of control group embryos were 6.6% and 22.5%, respectively. There was no statistical significance in the rates between the two groups because of the low number of trials.

Conclusion: Microsurgical fragment removal improved the subsequent development as well as the morphological grade of fragmented embryos. The fragment removal may be beneficial for neighboring blastomeres by repairing the intercellular communication and removing the secretion of the potential toxic materials by fragments.

[Korean. J. Reprod. Med. 2010; 37(4): 339-348.]

Key Words: IVF-ET program, Fragment removal, Morphological grade, Clinical outcome

인간의 체외수정 및 배아이식술에서 일반적으로

접 수 일: 2010년 11월 8일, 수정일: 2010년 11월 29일
계재확정일: 2010년 11월 29일
주관책임자: 지희준, 우) 157-723 서울특별시 강서구 내발산동 701-4, 미즈메디병원
Tel: (02) 2007-1840, Fax: (02) 2007-1852
e-mail: ivf129@mizmedi.net

난할중인 배아의 할구 크기가 45 μm 보다 작으면서 핵이 없는 할구와 유사한 구조를 가지고 있을 경우 이를 세포질 파편으로 구별한다.¹ 이러한 핵이 없는 파편은 정상적인 할구들 사이에 존재하면서 이들 할구들의 물질 및 신호전달체계를 방해하고 미

토콘드리아, mRNA 그리고 단백질 등의 세포분열에 필수적인 물질이나 소기관들의 감소를 유발하여 배아의 후기 배발달에 장애요인으로 작용하는 것으로 알려져 있다.^{2~5}

뿐만 아니라 이러한 파편화 현상은 배아의 착상 및 임신율의 감소와^{6~9} 유산과 기형아 출산율을 증가시키는 결과를 초래한다.^{6,10} 이러한 세포파편화는 배아의 염색체 이상,^{6,11~13} apoptosis^{14~16} 또는 oxidative stress^{17~20} 등에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다. 특히 apoptosis의 착상 전 배아의 발달과정 동안 결함이 있는 세포를 제거하는 역할에 대해 많은 연구자들의 관심이 집중되었다.^{21,22} Apoptosis는 유전적 이상,²³ 성장요소와 호르몬의 불균형^{24,25} 외에도 배양액조성이나²⁶ 활성화산소 (reactive oxygen species)²⁰ 등과 같은 부적절한 배양환경에 의해서도 발생한다. 특히 활성화산소에 의한 oxidative stress는 난자의 핵성숙 억제²⁷ 뿐만 아니라 세포질과²⁰ DNA 파편화,^{28,29} 세포막의 과산화³⁰ 및 배아발달 정지까지³¹ 초래한다. 이러한 활성화산소의 해로운 효과를 줄이기 위해 항산화제를 체외배양액에 첨가할 경우 배아발달을 향상시켰으나³² 배아의 파편화 현상을 완전하게 억제하지는 못하였다. 이러한 결과는 배아의 파편화 현상이 한가지의 원인보다는 복합적인 원인에 의해 발생할 수 있다는 가능성을 제시한다. 한편 체외수정 및 배아이식술에서 초기 배아의 파편화 현상이 발견될 경우 배아가 발달함에 따라 배아의 파편화 정도도 함께 심해지는 것을 종종 관찰할 수 있다. 이러한 현상은 파편화된 할구가 주위의 건강한 할구의 발달에도 나쁜 영향을 미친다는 것을 의미한다. 실제로 이러한 파편들로부터 배아발달에 해로운 물질이 생성되는 것이 보고되었으며,^{3,15,33} 이러한 파편을 제거하였을 때 배아의 발달에 도움이 된다는 것이 보고되었다.³² 따라서 배아의 파편화가 회복되기 어려운 유전적 결함에 의해서 발생되었을 경우에는 어렵겠지만 부적절한 체외배양 환경 및 활성화산소 등에 의한 외부적인 요인에 의해 발생한 것이라면 파편제거술을 통해 손상된 발달능력을 어느 정도는 회복시

킬 수 있으리라 생각된다.

이에 본 연구는 체외수정 및 배아이식술 (*In vitro* fertilization-embryo transfer, IVF-ET) 시술 시 파편화된 인간배아를 대상으로 파편제거술을 시행하면서 파편제거술 전후 배아의 형태학적 등급과 할구 수의 변화를 조사하였고 파편제거술이 배아의 발달에 미치는 유의한 효과를 관찰하였다. 또한 대조군인 파편제거술을 시행하지 않은 파편화된 배아와 비교하여 파편제거 후 이식하였을 때 임상적 결과에 미치는 효과를 조사하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 환자

본 연구는 한나여성의원과 미즈메디병원 두 곳의 병원에서 동일한 방법으로 수행된 파편제거술의 임상적 결과를 통합하여 결과를 도출하였다. 총 60명의 불임부부가 본 연구에 참여하였으며 이들 환자의 IVF-ET 시술 63 cycles 중 29명 환자의 IVF-ET 32 cycles은 이식한 모든 배아를 대상으로 파편제거술을 시행한 실험군으로 나머지 31명 환자의 IVF-ET 31 cycles은 파편제거를 전혀 하지 않은 대조군으로 분류하여 본 연구를 수행하였다.

2. 배아의 형태학적 등급 분류

인간배아의 등급은 전체 배아에 대한 파편이 차지하는 비율을 기초로 하여 배아의 등급을 1등급에서 5등급까지 각각 5개 등급으로 구분하였다. 1등급 배아 (grade 1, G1)는 동일한 크기의 할구와 파편이 전혀 없는 배아, 2등급 배아 (grade 2, G2)는 파편비율이 10% 이하인 배아, 3등급 배아 (grade 3, G3)는 파편비율이 10% 이상 25% 이하인 배아, 4등급 배아 (grade 4, G4)는 파편비율이 25% 이상 50% 이하인 배아 그리고 5등급 배아 (grade 5, G5)는 파편비율이 50% 이상인 배아로 각각 분류하였다 (Figure 1).

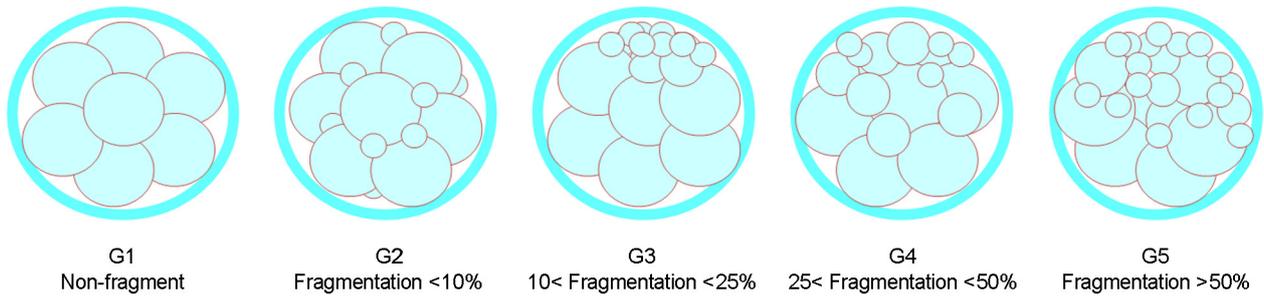


Figure 1. Embryo grading according to the fragmentation ratio and pattern.

Hee-Jun Chi. Effect of Fragment Removal on Development of Human Fragmented Embryos in IVF-ET Program. Korean J Reprod Med 2010.

3. 미세수술적 파편제거

배아의 파편제거는 난자채취 후 3일 또는 4일 때 이식하기 직전에 투명대 일부 절개술을 이용한 보조부화술과 함께 수행하였다. 파편제거 대상인 배아는 10% synthetic serum substitute (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA)이 첨가된 Ca^{++} , Mg^{++} -free PBS에서 30분 동안 노출시킨 후 파편제거술을 수행하였다. 파편제거술은 유리가온판 (Kitazato, Tokyo, Japan) 위에서 미세조작기구 (Narishige, Tokyo, Japan)를 이용하여 수행하였으며 파편을 흡인하는 미세피펫의 내경은 약 15 μm 로 제작하되 날카로운 절단면을 열로 둥글게 마무리해 사용하였다. 먼저 보조부화술로 투명대 일부를 절개하고 이 절개된 틈 사이로 흡인용 미세피펫을 넣어 파편들을 제거하였으며 무리한 압박으로 정상적인 할구에게 손상을 주지 않도록 할구와 할구사이의 경계면으로 피펫을 이동시키도록 하였다. 또한 흡인용 피펫의 보다 미세한 작동을 위해서 필터를 부착시킨 마우스피스 튜브를 직접 피펫에 연결시켜 파편을 제거하였다.

4. 배아의 형태학적 변화 및 임상결과

파편제거술 전과 후의 배아의 형태학적 변화를 배아의 등급과 발달단계의 변화로 측정하였다. 또한 파편제거술이 IVF-ET program의 임상결과에 미치는 영향을 조사하기 위하여 파편제거를 한 실험군과 하지 않은 대조군 환자들의 특성을 비교하였고 이들 두 군간의 이식 후 착상률, 임신율 그리고

임신유지율 등을 비교하였다.

5. 통계처리

통계학적 비교는 Student's *t*-test와 Chi-square test를 이용하였으며 *p*-value가 0.05 미만인 경우 통계학적 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

결 과

1. 파편제거술에 의한 배아의 형태학적 등급 향상효과

파편화된 배아를 대상으로 파편제거술을 수행한 후 배아의 형태학적 등급이 향상되는 것을 현미경으로 관찰하였다 (Figure 2). 그림에서 보는 것과 같이 파편제거술 이후 2등급의 배아는 1등급의 배아로 3등급의 배아는 2등급의 배아로 등급이 향상되는 것이 육안으로도 관찰되었다. 또한 파편화된 배아의 파편제거술 이후 배아의 등급과 배아발달 단계의 변화를 수치로 관찰하였다 (Figure 3). 파편화된 배아의 등급을 수치화하여 각 환자 당 전체 배아의 평균 등급 수치를 구하고 이를 다시 합산하여 전체 실험군의 평균 등급 수치로 나타내었다. 또한 이들 배아의 발달단계의 분포를 조사하여 파편제거술 수행 전과 후에 어떠한 변화를 나타내는지 조사하였다. 배아의 등급은 파편제거술 수행 전 전체 평균 등급이 2.79 ± 0.56 이었지만 파편제거술 이후 1.63 ± 0.44 으로 배아의 전체 평균 등급이 유의하게 향상되는 것을 관찰하였다 ($p < 0.001$). 이식 후

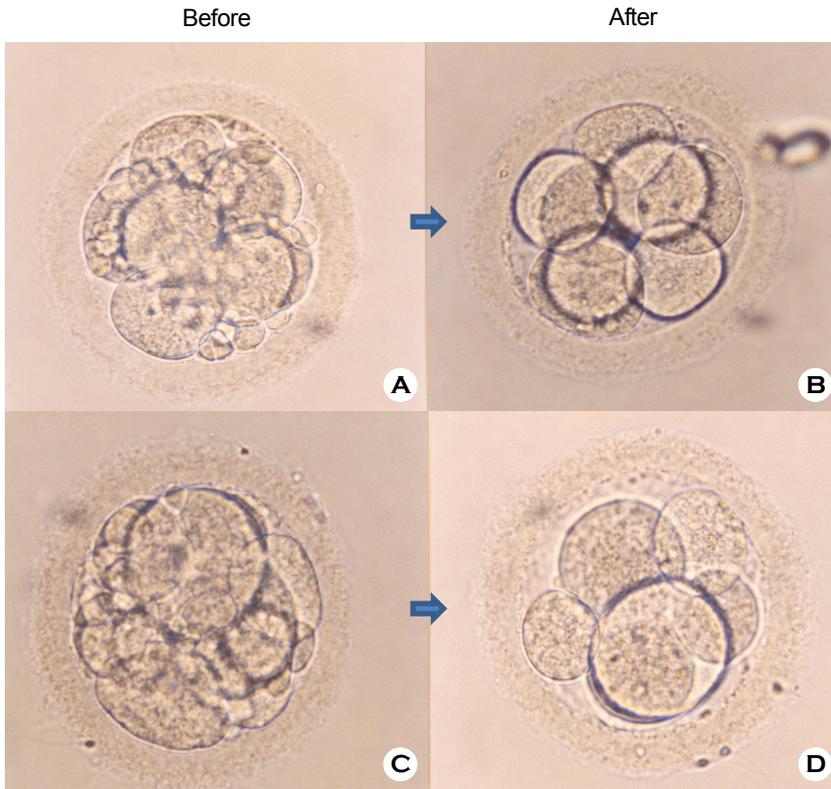


Figure 2. Improvement of morphological grade of fragmented embryos after complete fragment removal. (A) G2 embryos, (B) G1 embryos, (C) G3 embryos, (D) G2 embryos. Original magnification, $\times 400$.

Hee-Jun Chi. Effect of Fragment Removal on Development of Human Fragmented Embryos in IVF-ET Program. Korean J Reprod Med 2010.

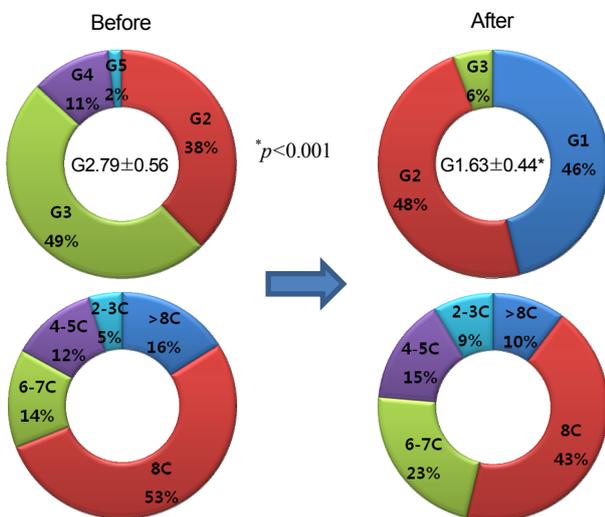


Figure 3. Morphological changes of fragmented embryos after fragment removal. Changes in embryo grade and cell stage were observed after fragment removal. A p -value < 0.05 was considered statistically significant. $*p < 0.001$.

Hee-Jun Chi. Effect of Fragment Removal on Development of Human Fragmented Embryos in IVF-ET Program. Korean J Reprod Med 2010.

착상율이 높은 1등급과 2등급 배아의 비율이 파편 제거술 전에는 38%에서 시술 후에는 94%로 향상되었다. 배아의 발달단계 별 분포는 파편제거술 전 8세포기 이상의 배아의 비율이 69%이었는데 시술 후 53%로 감소되었는데 이는 파편제거술에 의한 할구 수의 소실에 의한 것이었다.

2. 파편제거술이 파편화된 배아의 발달에 미치는 효과

파편화된 배아의 파편을 제거하였을 때 이후 배아의 발달에 유의한 영향을 미치는 지를 확인하기 위하여 현미경적 관찰을 하였다 (Figure 4). 난자채취 후 3일째 이식하고 남은 발달이 느리고 파편화된 배아를 대상으로 파편제거술을 수행한 후 72시간 동안 체외배양하면서 이들의 발달을 관찰하였다. 파편제거 직후 3-4세포기 단계의 배아를 24시간 배양하였을 때 대부분 6세포기 배아로 발달을 하였고 추가적인 파편화 현상은 관찰되지 않았다.



Figure 4. Subsequent development of fragmented embryos after fragment removal. (A) slowly cleaved and fragmented day 3 embryos, (B) embryos cultured for 24 hours after fragment removal, (C) blastocyst stage embryos cultured for 96 hours after fragment removal. Original magnification $\times 200$.

Hee-Jun Chi. Effect of Fragment Removal on Development of Human Fragmented Embryos in IVF-ET Program. Korean J Reprod Med 2010.

이들 배아를 총 96시간 동안 체외배양 하였을 때 비록 비정상적인 형태지만 대부분이 배반포 단계로 발달하는 것을 관찰하였다.

3. 파편제거술 수행한 실험군과 대조군 간의 배아의 등급과 배아 발달단계 분포

파편을 제거하기 전 실험군과 파편을 제거하지 않은 대조군 간의 배아 등급과 발달단계 분포를 비교하였다 (Figure 5). 표에서 보듯이 실험군에서는 1등급 배아는 0%, 2등급 배아는 38% 그리고 3등급 배아는 49%를 나타낸 반면 대조군에서는 1등급 배아 7%, 2등급 배아 50% 그리고 3등급 배아는 39%를 각각 나타냄으로써 전반적으로 대조군의 배아의 등급이 높은 것을 나타냈다. 전체 평균 등급의 경우에도 실험군은 2.79 ± 0.56 으로 대조군의 2.42 ± 0.46 에 비해 유의하게 낮은 등급을 나타내었다 ($p < 0.01$). 배아발달 단계의 분포는 두 군간에 유사한 분포도를 나타내었다.

4. 실험군과 대조군 간의 환자의 특성과 임상적 결과 비교

실험군과 대조군 환자들의 특성과 임상적 결과를 비교함으로써 파편제거술이 임상적 결과에 미치는 효과를 조사하였다 (Table 1). 임상적 결과에 영향을 미칠 수 있는 환자의 나이와 자궁내막의 두께에 있어서는 실험군 (34.8세, 9.5 mm)과 대조군

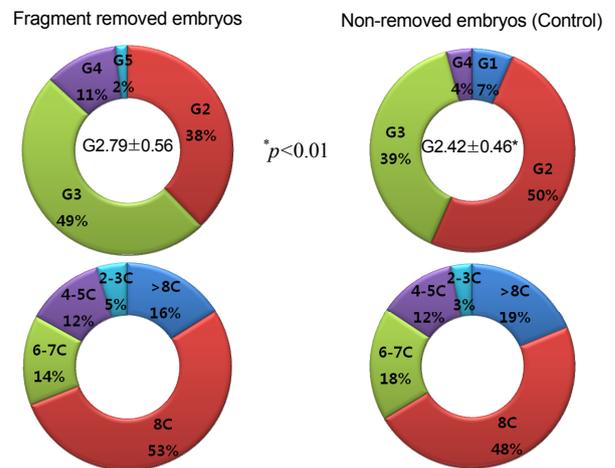


Figure 5. Comparison of morphological characteristics of embryos between the control and fragment removed embryos groups before fragment removal. A p -value < 0.05 was considered statistically significant. * $p < 0.01$.

Hee-Jun Chi. Effect of Fragment Removal on Development of Human Fragmented Embryos in IVF-ET Program. Korean J Reprod Med 2010.

(34.9세, 8.8 mm) 간에 유의한 차이가 없었다. 그러나 이식한 평균 배아 수는 실험군의 3.3개에 비해 대조군에서는 3.9개로 대조군에서 유의하게 많은 배아를 이식하였다. 이식 후 착상률과 임신율은 실험군은 12.3%, 31.3%를 나타내었고 대조군은 6.6%, 22.5%를 각각 나타내었다. 실험군에서 다소 높은 착상률과 임신율을 나타내었으나 실험군의 수가 많지 않은 관계로 통계적 유의성은 없었다.

Table 1. Characteristics of the patients and clinical outcomes IVF-ET program in the fragment removed and control groups

(Mean±SD)	Fragments removed	Control	<i>p</i> -value
No. of patients	29	31	
No. of IVF cycles	32	31	
Age of patients	34.8±4.2	34.9±5.4	0.47
Previous failed cycles	1.3±1.4	0.6±1.1	0.016
Endometrial thickness (mm)	9.5±1.8	8.8±2.3	0.09
No. of ET cycles	32	31	
Oocytes retrieved	273 (8.5±6.8)	284 (9.2±4.7)	0.33
Embryos transferred	106 (3.3±1.1)	122 (3.9±0.8)	0.008
Embryos implanted (%)	13 (12.3%)	8 (6.6%)	0.20
Clinical pregnancy (%)	10 (31.3%)	7 (22.5%)	0.62
Ongoing pregnancy (%)	9 (28.1%)	6 (19.3%)	0.60

A *p*-value <0.05 was considered statistically significant.

IVF-ET, *In vitro* fertilization-embryo transfer; SD, standard deviation.

Hee-Jun Chi. Effect of Fragment Removal on Development of Human Fragmented Embryos in IVF-ET Program. Korean J Reprod Med 2010.

고 찰

본 연구를 통해서 파편제거술이 파편화된 배아의 형태학적 등급을 유의하게 향상시키는 것이 관찰되었다. 이러한 결과는 타 연구자의 연구결과에서도 보고되었다.^{34,35} 이러한 유의한 형태학적 등급의 향상은 본 연구에서처럼 배아의 파편을 완전하게 제거하는 경우에는 확인이 가능하지만 다른 센터에서 수행하는 부분적인 파편제거술로는 이러한 등급의 향상은 기대하기 어렵다. 특히 착상성공률이 높은 1등급과 2등급 배아의 비율이 파편제거술 시술 전 38%에서 시술 후 94%로 향상되었다는 점은 파편제거술이 임상적 결과에 이로운 영향을 미칠 수 있다는 가능성을 제시하였다. 최근에 배아의 파편이 주위의 할구의 발달에 좋지 않은 영향을 미친다고 하였다.^{3,15,33} 실제로 초기 발달단계 단계에서 파편화 현상이 일어난 배아는 발달이 지속됨에 따라 파편화 현상이 심화되어 간다는 것을 확인할

수 있다. 이전의 보고에서 정상적인 할구들이 식세포 작용에 의해서 이러한 파편들을 흡수하여 초기 발달단계에서 나타난 파편들이 후기 발달단계에서 사라진다는 보고가 있었으나,^{7,10,15} 이는 연구자의 배아에 대한 단순한 현미경적 관찰에 의존한 오류에서 나온 결과로 짐작된다. 이러한 현상은 할구들의 식세포 작용에 의한 것이 아니고 배아가 난황을 통해서 발달하면서 할구들의 분할과 이동이 이루어지면서 상대적으로 크기가 작은 파편들이 배아의 중심으로 이동하게 되면서 주위의 할구들에 의해 그 모습이 가려지게 되어 마치 파편들이 사라진 것처럼 보이게 된 것이다. 이러한 현상을 나타낸 배아를 전자현미경으로 그 단면을 촬영하여 관찰하였을 경우 할구들의 중심에 작은 파편들이 모여 있는 것을 관찰할 수가 있었고 배아의 할구는 다른 세포들과 달리 식세포 작용을 할 수 있는 기능이 결여되어 있는 것으로 보고되었다.^{5,36} 파편을 제거한 후 남은 할구들의 발달을 지속적으로 관찰하였

을 때 배아의 발달에 도움이 된다는 것을 현미경적 관찰로 확인하였다. 특히 본 연구에 이용된 배아는 발달이 느리고 과편화 현상이 심해 이식에서 제외되고 동결보존에도 적당하지 않은 배아로 지속적인 체외배양을 통해 배반포로 발달할 경우 동결보존하려던 배아들이었다. 이러한 배아의 특성상 대부분 발달과정에서 발달이 정지되어 퇴행되는 것이 일반적인 현상인데 이들 배아의 과편을 제거한 후 배양한 결과 비록 형태적으로 비정상적이었지만 배반포까지 발달하는 발달능력을 보여주었다. 이러한 결과는 과편을 제거해 주었을 경우 과편의 해로운 영향을 제거함으로써 남은 배아의 할구들의 발달에 도움이 된다는 이전의 연구결과를³² 뒷받침 해주었다. 이와 같이 등급이 낮고 발달속도가 느린 배아의 경우에도 도움이 된다면 이 보다 양호한 상태의 과편화된 배아를 대상으로 과편제거술을 시행할 경우 보다 양호한 결과를 기대할 수 있다는 가능성을 제시해준 결과라 하겠다. 본 연구에서는 과편제거술의 효과를 보다 명확하게 확인하기 위해서 이식한 모든 배아를 대상으로 과편제거술을 수행한 실험군과 유사한 과편화 및 등급을 나타낸 배아들 중 과편제거술 수행하지 않고 이식한 배아들을 대조군으로 하여 두 군의 임상적 결과를 비교함으로써 과편제거술의 임상적 효과를 조사하였다. 비록 통계학적 유의차는 없었지만 과편제거술을 수행한 실험군의 임신율이 (31.3%) 과편제거술을 수행하지 않은 대조군에 (22.5%) 비해 약 10% 정도 임신율이 향상되는 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 본 연구와 마찬가지로 이식한 모든 배아의 과편을 제거한 Kelts 등³³의 연구에서 보고한 임신율 35.9%와 유사한 결과를 얻었다. 이러한 대조군과 실험군 간의 근소한 임신율의 차이는 실험군의 배아의 평균 등급이 G2.79인데 반해 대조군은 G2.42로 유의하게 높았고 착상 성공율이 높은 G1, G2 등급의 배아가 전체 배아에서 차지하는 비율이 실험군은 38%인데 대조군은 57%로서 대조군의 배아 분포에서 보다 유리한 점이 영향을 미친 것으로 생각된다. 또한 이식한 배아의 평균

수도 실험군은 3.3개인데 대조군은 3.9개로 유의하게 높았던 점을 고려하면 실험군이 대조군 보다 높은 임신율을 나타냈다는 것만으로도 과편제거술의 유의한 효과를 입증한 결과라 할 수 있다. 이와 같이 과편제거술은 생성된 배아 모두가 과편화 현상을 나타내는 환자에게는 보다 임신성공률을 높일 수 있는 가장 적합한 선택의 시술이라 할 수 있다. 물론 이러한 과편제거술이 유전적인 문제에 의한 과편화된 배아의 발달능력을 향상시킬 수는 없겠지만 아직은 불완전한 체외배양 환경이나²⁶ 활성화 산소²⁰ 등의 외부적인 요인에 의해 생성된 과편화된 배아의 발달능력을 회복시키는 데는 효과적이라고 생각한다.

또한 배양기 밖에서의 배아조작시간이 과편화된 배아의 수와 과편 정도 및 과편화 형태에 따라 긴 시간을 요구할 수도 있어서 배아의 과편제거술이 자칫 배아에게 다른 손상을 주는 결과를 초래할 수도 있다. 이러한 가능성을 예방하기 위해서 과편제거술은 배아이식에 이용할 배아만을 대상으로 하되 장시간이 예상될 경우 과편제거술용 배양접시를 여러 개 만들어서 배아가 외부환경에 오래 노출되는 것을 방지하는 것이 바람직하다. 그리고 현미경용 가운판을 사용하여 온도에 의한 손상을 받지 않도록 하고 pH 변화에 의한 충격을 줄이기 위해 최근에 시판되고 있는 Heps 또는 Mops 등이 첨가된 배양액을 사용하는 것이 과편제거술 과정 동안 물리적 손상의 가능성을 최소화 하는 방법이라고 할 수 있다.

배아의 과편원인이 주로 세포자멸사 (apoptosis)에 의해 발생한다는 기존의 주장과¹⁴⁻¹⁶ 함께 세포괴사 (necrosis)의 관련 가능성이 제시되고 있다.¹⁵ 현재는 이러한 연구결과를 바탕으로 배아의 과편화 현상과 apoptosis와 necrosis와의 관련 가능성에 대한 연구를 진행하고 있다.

참 고 문 헌

1. 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: 309-13.
2. Alikani M, Calderon G, Tomkin G, Garrisi J, Kokot M, Cohen J. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Hum Reprod* 2000; 15: 2634-43.
 3. 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: 836-42.
 4. Hardy K, Stark J, Winston RM. Maintenance of the inner cell mass in human blastocysts from fragmented embryos. *Biol Reprod* 2003; 68: 1165-9.
 5. Van Blerkom J, Davis P, Alexander S. A microscopic and biochemical study of fragmentation phenotypes in stage-appropriate human embryos. *Hum Reprod* 2001; 16: 719-29.
 6. Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Polz W, Tews G. Embryo fragmentation in vitro and its impact on treatment and pregnancy outcome. *Fertil Steril* 2001; 76: 281-5.
 7. Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meerssche M, Ryckaert G, et al. Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum Reprod* 1999; 14: 2345-9.
 8. Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1997; 12: 1545-9.
 9. Alikani M. Cytoplasmic fragmentation in human embryos in vitro; implications and the relevance of fragment removal. In: Gardner DK, Weissman A, Howles C, Shoham Z. *Textbook of assisted reproductive techniques; laboratory and clinical perspectives*. London: Martin Dunitz Ltd.; 2001. p. 169-82.
 10. Hardarson T, Hanson C, Sjogren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod* 2001; 16: 313-8.
 11. Keefe DL, Franco S, Liu L, Trimarchi J, Cao B, Weitzen S, et al. Telomere length predicts embryo fragmentation after in vitro fertilization in women--toward a telomere theory of reproductive aging in women. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192: 1256-60.
 12. Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP. Chromosomal abnormalities in embryos. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 183 Suppl 1: S29-34.
 13. Ziebe S, Lundin K, Loft A, Bergh C, Nyboe Andersen A, Selleskog U, et al. FISH analysis for chromosomes 13, 16, 18, 21, 22, X and Y in all blastomeres of IVF pre-embryos from 144 randomly selected donated human oocytes and impact on pre-embryo morphology. *Hum Reprod* 2003; 18: 2575-81.
 14. Jurisicova A, Antenos M, Varmuza S, Tilly JL, Casper RF. Expression of apoptosis-related genes during human pre-implantation embryo development: potential roles for the Harakiri gene product and Caspase-3 in blastomere fragmentation. *Mol Hum Reprod* 2003; 9: 133-41.
 15. Jurisicova A, Varmuza S, Casper RF. Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 93-8.
 16. Liu HC, He ZY, Mele CA, Veeck LL, Davis O, Rosenwaks Z. Expression of apoptosis-related genes in human oocytes and embryos. *J Assist Reprod Genet* 2000; 17: 521-33.
 17. Bedaiwy M, Agarwal A, Said TM, Goldberg JM, Sharma RK, Worley S, et al. Role of total antioxidant capacity in the differential growth of human embryos in vitro. *Fertil Steril* 2006; 86: 304-9.
 18. Bedaiwy MA, Falcone T, Mohamed MS, Aleem AA, Sharma RK, Worley SE, et al. Differential growth of human embryos in vitro: role of reactive oxygen species. *Fertil Steril* 2004; 82: 593-600.
 19. Liu L, Keefe DL. Cytoplasm mediates both development and oxidation-induced apoptotic cell death in mouse zygotes. *Biol Reprod* 2000; 62: 1828-34.
 20. Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS. Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod* 1998; 13: 998-1002.
 21. Fabian D, Koppel J, Maddox-Hyttel P. Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. *Theriogenology* 2005; 64: 221-31.
 22. Metcalfe AD, Hunter HR, Bloor DJ, Lieberman BA, Picton HM, Leese HJ, et al. Expression of 11 members of the BCL-2 family of apoptosis regulatory molecules during human preimplantation embryo development and fragmentation. *Mol Reprod Dev* 2004; 68: 35-50.
 23. Levy R. Genetic regulation of preimplantation embryo survival. *Int Rev Cytol* 2001; 210: 1-37.
 24. Fabian D, Il'kova G, Rehak P, Czikkova S, Baran V, Koppel J. Inhibitory effect of IGF-I on induced apoptosis in mouse

- preimplantation embryos cultured in vitro. *Theriogenology* 2004; 61: 745-55.
25. Hardy K, Spanos S. Growth factor expression and function in the human and mouse preimplantation embryo. *J Endocrinol* 2002; 172: 221-36.
26. Kamjoo M, Brison DR, Kimber SJ. Apoptosis in the pre-implantation mouse embryo: effect of strain difference and in vitro culture. *Mol Reprod Dev* 2002; 61: 67-77.
27. Nakamura Y, Yamagata Y, Sugino N, Takayama H, Kato H. Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation. *Biol Reprod* 2002; 67: 1588-92.
28. Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology* 2004; 62: 1186-97.
29. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. Oxford: Oxford University Press; 2007.
30. Williams AC, Ford WC. Relationship between reactive oxygen species production and lipid peroxidation in human sperm suspensions and their association with sperm function. *Fertil Steril* 2005; 83: 929-36.
31. Hashimoto S, Minami N, Yamada M, Imai H. Excessive concentration of glucose during in vitro maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after in vitro fertilization: relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. *Mol Reprod Dev* 2000; 56: 520-6.
32. Nonogaki T, Noda Y, Narimoto K, Umaoka Y, Mori T. Protection from oxidative stress by thioredoxin and superoxide dismutase of mouse embryos fertilized in vitro. *Hum Reprod* 1991; 6: 1305-10.
33. 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: 321-4.
34. Cohen J, Alikani M, Liu HC, Rosenwaks Z. Rescue of human embryos by micromanipulation. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1994; 8: 95-116.
35. 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: 823-32.
36. Hnida C, Ziebe S. Total cytoplasmic volume as biomarker of fragmentation in human embryos. *J Assist Reprod Genet* 2004; 21: 335-40.

= 국문초록 =

목적: 본 연구는 체외수정 및 배아이식술 (*In vitro fertilization-embryo transfer*, IVF-ET)에서 인간의 파편화된 배아를 대상으로 수행한 파편제거술이 배아의 발달과 임상적 결과에 미치는 유용한 결과를 조사하고자 수행하였다.

연구방법: 본 연구는 전향적 연구로서 한나여성의원과 미즈메디병원에서 수행되었으며 IVF-ET 시술을 받는 60명의 환자를 대상으로 하였다. 실험군으로서 29명 환자의 106개의 파편화된 배아를 대상으로 이식하기 전 미세수술적 파편제거술을 수행하였고 대조군으로서 31명의 환자의 122개의 파편화된 배아의 파편을 제거하지 않고 이식하였다. 파편제거술이 파편화된 배아의 형태학적 변화와 임상적 결과에 미치는 영향을 조사하였다.

결과: 실험군 배아의 평균 형태학적 등급은 G2.79였으나 파편제거술 이후 G1.63 ($p < 0.001$)로 유의하게 향상되었다. 대부분의 파편화된 배아는 파편제거 후 이어지는 배양과정 동안 파편화 현상이 재 발생하지 않았으며 파편이 제거된 배아의 발달에 파편제거술이 유용한 효과를 미치는 것이 관찰되었다. 실험군의 착상률과 임신율은 각각 12.3%와 31.3%이었으나 대조군은 각각 6.6%와 22.5%를 나타내었다. 이러한 두 군간의 결과의 차이는 낮은 시술 건수로 인해 통계학적 유의성은 없었다.

결론: 미세수술적 파편제거술은 파편화된 배아의 형태학적 등급뿐만 아니라 지속적인 발달능력을 향상시켰다. 파편제거술은 파편에 의해 손상된 세포간 전달체계의 복원과 파편에 의한 해로운 물질의 생성 가능성을 제거함으로써 주위의 할구들에게 이로운 효과를 나타낸 것으로 생각된다.

중심단어: 체외수정 및 배아이식술, 파편제거술, 형태학적 등급, 임상적 결과