Phosphate가 제거된 단순배양액중 아미노산의 첨가가 체외수정시술후 임신율에 미치는 영향

홍산부인과[1], 혜성산부인과병원[2], 신아산부인과 불임클리닉[3]

이 지 삼[1]. 홍 정 의[1]. 유 승 환[2]. 정 구 성[2]. 홍 기 언[2]
전 은 숙[3]. 허영문[3]. 이 종 인[3]

Effects of Amino Acids in Simple Phosphate-Free Media on Pregnancy Rate in Human *In Vitro* Fertilization and Embryo Transfer(IVF-ET)

Ji-Sam Lee[1], Jeong-Eui Hong[1], Seung-Hwan Yoo[2], Goo-Sung Jung[2]
Ki-Eon Hong[2], Eun-Suk Jeon[3], Young-Mun Hur[3], Jong-In Lee[3]

Infertility Clinics
Hong's OB/GYN, Taejon[1], Hae-Sung OB/GYN Hospital, Cheonan[2]
Shin-A OB/GYN, Taejon[3]

=Abstract=

The role of amino acids in culture media for IVF-ET was examined in a total of 68 patients with 76 cycles. Patients received clomiphene citrate(CC) followed by hMG or GnRH-a combined with gonadotropins(FSH/hMG) for controlled ovarian hyperstimulation. Severe male(<4 X 10^6 motile sperm) or age factor(>39 y) patients were excluded in this study. Pregnancy was classified as clinical if a gestational sac or fetal cardiac activity was seen on ultrasound. The mean number of exogenous gonadotrpins was not different between bHTF(without amino acids) and mHTF(with amino acids) groups. No significant differences were found in age, duration of infertility, follicle size, the level of E_2 on the day of hCG injection, the mean number of oocytes retrieved, total motile sperm count, fertilization rate and the mean number of embryos transferred. However, total ampules of gonadotropins

were higher($P<0.01$) in mHTF group than in bHTF group. Significantly ($P<0.05$) more clinical pregnancies were resulted from mHTF group(13/30) compared with bHTF group(9/46). The multiple pregnancy rates were 11.1% in bHTF group and 7.7% in mHTF group. There were one ectopic pregnancy in mHTF group and one heterotopic pregnancy in bHTF group. Abortion rates were 22.2% in bHTF group and 7.7% in mHTF, respectively. The ongoing pregnancy or livebirth rate was significantly($P<0.05$) higher in mHTF group (12/30) than in bHTF group(7/46). These results suggest that the addition of amino acids in culture media is essential for culture of zygotes *in vitro* and adjustment of energy substrates in phosphate-free culture media appear to be beneficial for human IVF-ET procedure.

Key Words : Embryo culture, Amino acids, Pregnancy, IVF-ET

서 론

체외수정-수정란 이식(IVF-ET)에 의하여 정상적인 임신에 이르기 위하여는 양질의 난자확보, 난자와 정자의 수정율의 향상, 안정적인 수정란의 배양 및 숙련된 수정란이식 등의 조건들이 충족되어져야 한다. 그러나 이들중 수정란의 부적절한 배양조건은 체외수정과정에서 임신율을 저하시키는 중요한 원인들중 하나이다. 수정란의 배양액은 기본적으로 단순배양액과 복합배양액의 두 종류가 있지만 (Gardner & Lane, 1993a) 복합배양액에는 glucose의 농도가 생식기도내의 수준보다 높고, 수정란의 발육에 유해한 hypoxanthine 이나 nicotinamide 등이 포함되어 있다(Bastias et al., 1993; Tsai & Gardner, 1994). 포유동물의 초기수정란은 glucose 또는 phosphate의 존재하에서는 발육이 억제됨이 보고되고 있다 (Conaghan et al., 1993; Barnett & Bavister, 1996). 따라서 최근에는 수정란의 배양액중 glucose와 phosphate를 제거하여 좋은 결과를 보고하고 있지만(Quinn, 1995; Carrillio et al., 1998) 이와는 반대로 포유동물의 난관액에는 생리적 수준의 glucose가 포함되어 있고(Gardner & Leese, 1990; Nichol et al., 1992; Gardner et al., 1996), glucose는 수정과정에 필요하다(Hoppe, 1976; Mahadevan et al., 1997). 사람의 생식기도분비액에서 에너지원인 glucose, pyruvate 및 lactate의 농도는 난관에서는 0.5 mM, 0.3 mM 및 10.5 mM 정도이지만 자궁에서는 3.2 mM, 0.1 mM 및 5.8 mM 정도로 그 농도가 다르다(Gardner et al., 1996). 따라서 이러한 생리적 변화과정을 토대로 최근에 Gardner 등(1998)과 Jones 등(1998)이 수정란의 발육단계에 적합하도록 조성한 2단계 배양액을 사용하여 높은 임신율을 보고한 바 있다.

포유동물의 난관분비액내에는 많은 종류의 아미노산들이 있으며, 아미노산은 배양중 초기수정란의 발육을 조절하는 중요한 구성성분(Schultz et al., 1981; Gardner & Leese, 1990; Boatman, 1997; Tay et al., 1997)으로 배양액중 적정수준의 아미노산의 첨가는 포배기(blastocyst stage)까지 수정란의 발육을 촉진시킨다(Barnett & Bavister, 1996; Gardner & Lane, 1997; Devreker et al., 1998). 그러므로 본 연구는 사람의 체외수정-수정란이식 과정에서 phosphate가 제거된 단순배양액중 아미노산(amino acids)의 첨가가 체외수정시술후 임신율에 미치는

효과를 검증하기 위하여 실시하였다.

대상 및 방법

1. 연구대상

본 연구는 1997년 2월부터 1999년 1월까지 체외수정-수정란이식(IVF-ET)을 실시하였던 68명의 환자의 76주기를 대상으로 하였으며, 자궁난관조영술(hystero-salpingography, HSG)상 자궁내 유착이 심하거나 나이가 40세 이상인 환자 및 총운동성 정자수가 4 X 10^6개 이하인 심한 희소정자증(severe oligozoospermia) 환자들의 경우에는 본 연구의 대상에서 제외시켰다.

2. 연구방법

난자의 채취, 정자의 준비 및 수정과정은 홍정의와 이지삼(1997)의 방법과 같았고, 저자들의 기존의 연구결과(홍정의 & 이지삼, 1997, 1998)에 근거하여 과배란 유도법을 구분하지 않고 채취된 난자 및 수정란들을 종합하여 배양액의 효과를 비교하였다.

(1) 과배란 유도

과배란유도는 clomiphene citrate(CC)와 hMG를 병합하거나 GnRH agonist (GnRH-a)와 FSH/hMG의 병합법으로 하였다. CC와 hMG를 병합한 주기에서는 월경 주기의 제 3일부터 매일 CC(Clomifene, 대일약품, 한국) 100 mg씩을 5일간 경구복용케 한후 hMG (Merional, IBSA, Switzerland/IVF-M, LG 제약, 한국) 150 IU씩을 근육주사하여 우성난포의 크기가 18 mm이상이 되거나 16 mm이상의 난포가 3개 이상이면 뇨중 LH검사(Conceive, Quidel, CA, USA)를 실시하여 양성이면 검사후 즉시 hCG(Choriomon, IBSA, Switzweland/IVF-C, LG 제약, 한국) 5,000-10,000 IU를 근육주사하고 16-18시간에 난자를 채취하였으며, 뇨중 LH검사가 음성이면 당일 오후 10시에 hCG 5,000-10,000 IU를 근육주사하고 34-36시간에 난자를 채취하였다. GnRH-a 초단기투여법(ultrashort protocol)에서는 월경주기의 제 2일부터 3일간 triptorelin(Decapeptyl, Ferring, Germany)을 매일 0.1 mg씩 피하 주사한후 FSH 또는 hMG를 매일 150 IU씩 근육주사하였다. GnRH-a

장기투여법(long protocol)에서는 월경주기의 제 21일부터 triptorelin 0.1mg씩을 매일 피하주사하거나 nafarelin acetate(Synarel, Searle, 한국)를 200 μg씩 1일 2회 비강내분무케하고, 다음 월경주기의 제 3일부터 FSH 또는 hMG를 150 IU씩 근육주사하였다. 기왕력 및 검사소견상 다낭성 난포증(PCO)이 심한환자는 이중억제법(dual suppression protocol, Rosenwaks, 1996; Damario et al., 1997; 문신용 등, 1995; 홍정의 & 이지삼, 1998)에 의하여 과배란을 유도하였는데, 환자들은 월경시작일부터 levonorgestrel 0.15 mg과 ethinylestradiol 30 μg을 포함하고 있는 경구용 피임제(Minivlar, Schering, Germany)를 매일 1회씩 25일간 복용케하면서 동주기의 월경 제21일부터 GnRH-a를 장기투여법에서와 같이 피하주사 또는 비강내분무케하고, 다음 월경주기의 제 3일부터 FSH 또는 hMG 150 IU를 매일 근육주사하였다. 과배란유도과정에서 난포발육을 감시하기 위한 초음파검사는 월경주기의 제 7일부터 2-3일 간격으로 한 번씩 실시하였고, 외인성 성선자극호르몬의 투여량은 발육난포수와 크기 및 혈중 estradiol(E_2) 농도에 따라 조절하였다. 초음파 검사상 우성난포의 평균직경이 18 mm이상이거나 16 mm이상의 난포가 3개 이상이면 당일 오후 10시에 5,000-10,000 IU의 hCG(Choriomon, IBSA, Switzerland)를 1회 근육주사한후 34-36시간에 난자를 채취하였다.혈중 E_2의 농도분석은 혈액 5ml을 채취하여 1,000 x *g*에서 10분간 원심분리후 효소면역분석법(enzyme-linked fluorescent immunoassay, ELFA)이나 방사면역분석법(radioimmunoassay, RIA)에 의하여 측정하였다.

(2) 배양액의 준비

난자와 정자의 수정, 수정란의 배양 및 이식에 사용된 배양액은 Quinn(1995)의 human tubal fluid(Basal XI)를 기본배양액(bHTF)으로하여 처리군에서는 7종의 비필수아미노산(non-essential amino acids, NEAA)과 taurine을 0.1 mM 수준으로 첨가한 modified human tubal fluid(mHTF)를 사용하였다. 대조군(bHTF)에서는 이식시까지 동일한 배양액을 사용하였고, 처리군(mHTF)에서는 이식용 배양액(transfer medium)에 glucose 3.4 mM, pyruvate 0.17 mM, lactate 5.7 mM로 조정하여 EDTA와 taurine은 첨가하지 않고, histidine을 0.1 mM첨가

하였으며, 배양액의 조성은 Table 1에 나타난 바와 같다.

(Table 1 위치)

Table 1. Composition of culture media for human IVF-ET

Components(mM)	bHTF	mHTF
NaCl	97.6	97.6
KCl	4.7	4.7
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	0.2
$CaCl_2.2H_2O$	2.04	2.04
Sodium lactate	21.4	10.5
Sodium pyruvate	0.33	0.33
Glucose	0.5	0.5
EDTA	0.1	0.1
$NaHCO_3$	25.0	25.0
Glutamine	1.0	1.0
Alanine	--	0.1
Asparagine	--	0.1
Aspartic acid	--	0.1
Glutamic acid	--	0.1
Glycine	--	0.1
Proline	--	0.1
Serine	--	0.1
Taurine	--	0.1
Phenol red	0.001%	0.001%
Penicillin G(Na)	100 U/ml	100 U/ml
Streptomycin sulfate	50 μg/ml	50 μg/ml

배양액의 제조에 사용된 물은 Milli-Q water system을 이용하여 만들어진 물을 이용하였고, 배양액의 삼투압은 bHTF에서는 280±5mOsm/kg으로 보정하였고, mHTF에서는 보정하지 않고 280±5mOsm/kg이었다. 배양액은 제조후 0.2 μm 여과기(Corning, Corning Medical & Scientific, NY, USA)를 이용하여 멸균여과하여 사용할 때까지 4°C에 보관하였으며, 2주마다 한 번씩 반복제조하였다. 수정용 배양액(insemination media, IM)에는 비동화(heat-inactivated)된 10% 신생아 제대혈청을 첨가하였고, 성장용 배양액(growth media, GM)에는 20%, 이식용

배양액(transfer media, TM)에는 50%의 신생아 제대혈청을 첨가하여 습도가 포화상태인 5% CO_2, 37°C 배양기에서 평형시킨후 사용하였다.

(3) 수정의 확인 및 수정란의 배양

정자와 난자의 수정유도후 18시간경에 미세유리관(Pasteur pipette, Becton Dickinson Labware, BDL 4647, USA)으로 난구세포를 제거하고, 역반사현미경하에서 2개의 전핵을 관찰함으로써 정상적인 수정을 확인하였다. 정상적인 수정이 확인된 접합자들(zygotes)은 mineral oil(Sigma Chem. Co., M-8410, MO, USA)이 피복된 20 μl의 성장용 배양액으로 옮겨 습도가 포화상태인 5% CO_2, 37°C 배양기에서 이식직전까지 배양하였다.

(4) 수정란이식 및 임신의 확인

난자채취후 2-3일경에 가능하면 수정란의 난할이 빠르고, 할구가 균등하며, 할구의 fragmentation이 적은 수정란만을 선택하여 Norfolk이식관(Cook, KNTS-506011, USA)이나 TDT이식관(Laboratoire CCD, Paris, France)을 이용하여 자궁강내에 이식하였다. 수정란 이식후 황체기 보강은 50mg의 progesterone (Progest, 삼일제약, 한국)을 난자채취시부터 임신확인시까지 매일 근육주사하였으며, 혈액검사상 임신으로 확인된 경우에는 1주일 간격으로 한 번씩 hCG 5,000 IU 또는 long acting progesterone(Progesterone-Depot, Jenapharm, Germany) 500 mg을 근육주사하여 황체기를 보강하였다. 임신의 확인은 수정란 이식후 10-12일에 혈중 β-hCG 농도를 측정하여 10 mIU/ml 이상이면 생화학적 임신(biochemical pregnancy)으로 판단하였고, 이후 초음파 검사상 임신낭(gestational sacs)이 보이거나 태아심박동(fetal heart-beats)이 관찰되면 임상적 임신(clinical pregnancy)으로 판단하였다.

3. 통계분석

결과에 대한 통계분석은 Student's *t*-test와 χ^2-test로 실시하였고, $P<0.05$인 경우에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

고 찰

본 연구에서 과배란유도시 외인성 성선자극호르몬(FSH/hMG)의 투여량은 아미노산첨가군이 비첨가군에 비하여 많았으나 혈중 E_2 농도 및 평균 채취난자수는 차이가 없었고, 과배란유도일수는 아미노산 첨가군이 낮았는데, 이러한 이유는 아미노산 첨가군에서 외인성 성선자극호르몬의 투여량의 증가로 인하여 과배란유도일수가 짧아졌기 때문일 것이라 생각된다.

체외수정-수정란이식과정에서 체외(*in vitro*) 배양조건은 체내(*in vivo*)보다 불량하며(Bolton et al., 1989), 체외배양시 중요한 요건이 되는 것은 배양액을 포함한 배양조건으로 사람의 수정란은 체외발육과정중 약 50%정도가 발육정지되는데(Hardy, 1993), 대부분의 수정란들의 발육정지시기는 maternal genome에서 embryonic genome으로 이행하는 시기인 4-8세포기(Braude et al., 1988)이므로 과거와는 달리 4세포기 이상의 수정란을 이식하는 현재의 수정란 이식과정에서는 체외에서 수정란의 발육을 정상적으로 유지시킬 수 있는 배양액의 조성이 더욱 중요하다. 최근에는 사람의 수정란을 체외에서 3-5일이상 배양하여 상실배기-포배기의 수정란을 이식하여 높은 임신율을 나타내고 있으나(Gardner et al., 1998; Jones et al., 1998) 수정란이 체외에서 장기간 배양되면 포배(blastocysts)의 세포수가 현저히 감소하고(Hardy et al., 1989), 육안적으로는 나타나지 않는 세포내 변화 등으로 인하여 착상력(implantation potential)이 저하될 수 있다. 수정란의 이식시기에 관하여 Carrillo 등(1998)은 난자채취후 3일에 이식하였을 때 51%의 임상적 임신율을 보고하였고, Jones 등(1998)은 2단계 배양액(G1, G2)을 사용하여 수정란을 가장 효과적인 방법으로 5일이상 체외배양하여 82개의 포배와 11개의 상실배를 34명의 환자에 이식하였을 때 38%의 진행임신율을 보고하였는데, Jones 등(1998)의 결과에서 포배기까지의 수정란의 발육율이 50%정도일 때 환자당 2.7개의 상실배-포배기 수정란의 이식은 최소한 5개이상의 4-8세포기의 수정란을 이식한 것과 동일한 이식수정란수가 될 것이며, 이러한 결과는 본 연구의 아미노산 첨가군(mHTF)에서 평균 4개정도의 수정란을 이식하였을 때의 진행임신율(및 분만율)인 40.0%를 상회하지 못하는 결과가 될 것이다. 따라서 이러한 결과들과 체내에서 수정란이 난관에서 자궁으로 이송(transport)되는 시기(배란후 80

시간; Croxatto et al., 1978)에 근거하여 수정란의 이식시기는 난자채취후 3일경이 좋은 결과를 가져올 수 있을 것으로 생각된다.

수정란은 발육과정에서 에너지원의 공급이 필수적으로 사람의 생식기도내 glucose의 농도는 0.5-3.2 mM로 체외수정과정에 많이 이용되고 있는 복합배양액들의 glucose 농도인 5.6-6.1 mM보다 훨씬 낮다(Casslen, 1987; Dickens et al., 1995; Gardner et al., 1996). Glucose는 수정란의 체외발육에 유해하므로 (Bavister & McKiernan, 1993), 배양액중 glucose와 phosphate의 제거는 사람 및 포유동물 수정란의 체외발육에 효과적이라고 보고되고 있다(Pinyopumnintr & Bavister, 1991; Conaghan et al., 1993; Quinn, 1995; Carrillo et al., 1998). 이는 glucose와 phosphate가 해당과정(glycolysis)을 촉진하고, 과도한 해당과정은 cytosol 대사와 mitochondria 대사간의 균형을 변화시켜 산화적 인산화과정 (oxidative phosphorylation)을 억제하는 Crabtree effect(Koobs, 1972)를 나타내어 수정란의 발육을 억제하는 것으로 생각되고 있다(Seshagiri & Bavister, 1991). 그러나 수정란의 발육에 대한 glucose의 억제효과는 phosphate의 존재하에서만 일어나고(Pinyopummintr & Bavister, 1991), 수정과정에서는 glucose가 필요하며 (Hoppe, 1976; Rogers와 Perreault, 1990; Mahadevan et al., 1997), 또한 난관액내에는 생리적 수준의 glucose가 존재한다(Gardner & Leese, 1990; Nichol et al., 1992; Gardner et al., 1996). 따라서 phosphate가 제거된 배양액중 생리적 수준의 glucose는 수정과 수정란의 대사과정에 필요할 것이라 생각된다.

많은 연구자들이 배양액중 EDTA와 glutamine의 첨가는 체외 수정란의 발육에 효과적임을 보고하고 있는데(Abramczuk et al., 1977; Nasr-Esfahani et al., 1992; Quinn, 1995; Gardner & Lane, 1996, 1997; Devreker et al., 1998), EDTA는 배양액중에 존재하는 중금속이온(heavy metal ions)을 착화(chelation)시켜 수정란의 발육을 촉진한다(Nasr-Esfahani et al., 1992). 배양액중 EDTA는 초기 수정란에서는 해당작용을 억제함에 의하여 Crabtree effect를 방지하여(Gardner & Lane, 1993b) 수정란의 발육을 촉진하지만, glucose uptake가 증가되는 compaction 이후에는 수정란의 발육이 저하되고, 세포수가 감소하며(Gardner et al., 1997), 포배이식후 태아발달율이 현저히 감소하는데(Gardner & Lane, 1996),

특히 EDTA는 해당작용을 억제하여 내세포괴(inner cell mass, ICM)의 발달을 저해한다(Hewittson & Leese, 1993). 수정란의 초기발육을 촉진하는 EDTA는 단독으로보다는 아미노산과 공동으로 상승효과를 나타내는데, 특히 glutamine은 수정란의 체외발육에 필수적인 아미노산으로 수정란의 체내 또는 체외발육의 모든 단계에서 축적되며, 수정란은 tricarboxylic acid cycle(TCA cycle)을 통하여 glutamine을 부분적으로 이용한다(Wales & Du, 1994). 사람에서는 배양액중 glutamine이 포배까지의 수정란 발육을 현저히 증가시키는 것으로 보고되고 있다(Devreker et al., 1998).

아미노산이 포함되지 않은 배양액내에서 수정란을 배양할 경우에는 세포내 아미노산이 유출되어 세포내 pH와 삼투압에 대한 stress를 주게 되는데(Schultz et al., 1981), 배양액내에 첨가되는 아미노산들중 asparagine, aspartate, glycine, histidine, serine 및 taurine 등은 수정란의 발육을 촉진하지만 cysteine, isoleucine, leucine, phenylalanine, threonine 및 valine 등은 수정란의 발육을 저해한다(Gardner & Lane, 1993a). 특히 수정란의 발육을 촉진하는 비필수아미노산과 glutamine은 삼투압과 이온에 대한 stress를 줄이며(Van Winkle et al., 1990), 대사기능을 조절하고(Gardner & Lane, 1993b), 세포내 pH를 조절하여(Bavister & McKiernan, 1993) 포배기까지의 수정란의 발육을 증가시킨다(Bavister & McKiernan, 1993; Moore & Bondioli, 1993; Devreker et al., 1998). 배양액의 삼투압이 높은 경우에 glycine의 첨가는 수정란의 발육을 촉진하고(Van Winkle et al., 1990), taurine은 삼투압과 Ca의 이동 및 인지질(phospholipid)이나 세포막에 있는 단백질수용체의 상호작용을 조절하며, 항산화제로 작용한다(Huxtable, 1992). 사람의 생식기도내에는 alanine, aspartate, glutamine, glutamate, glycine, serine 및 taurine 등의 농도가 높다(Casslen, 1987; Boatman, 1997). 그러나 배양액중 아미노산은 대사화되어 ammonium을 생성하므로써 수정란의 발육에 유해한 영향을 나타내지만(Gardner & Lane, 1993c; Gardner et al., 1994) 48시간 이내에는 현저한 차이가 나타나지 않는다.

수정란 이식후 착상율은 수정란의 생존성(viability)을 가장 정확하게 반영하는 것으로 본 연구의 결과에서 착상율은 Gardner 등(1998)이나 Jones 등(1998)의

결과보다는 낮았으나 아미노산 첨가군에서는 아미노산 비첨가군보다 높았고, 임상적임신율 및 진행임신율이나 분만율도 아미노산 첨가군에서 높았으며, 아미노산 비첨가군에서는 이식수정란의 수가 많을수록 임신율이 높았으나 아미노산 첨가군에서는 3-4개의 수정란을 이식하였을 때 가장 높은 임신율을 나타내었는데, 이러한 결과는 배양액중 아미노산의 첨가가 수정란의 생존성을 향상시킨 것으로 설명되어질 수 있을 것이다.

배양액중 포함되는 에너지 기질중 pyruvate는 수정란의 발육에 필수적인 것으로 사람에서는 pyruvate만으로도 포배기까지의 발육이 가능한 것으로 보고되고 있으며(Conaghan et al., 1993), 사람의 난관액중 pyruvate의 농도는 0.1-0.3 mM정도이다(Dickens et al., 1995; Gardner et al., 1996; Tay et al., 1997). 사람에서 Conaghan 등(1993)은 배양액중 pyruvate를 완전히 제거하였을 경우에는 포배기까지의 수정란 발육을 저해한다고 하였으나 소에서 Rosenkrans 등(1993)은 lactate가 포함된 수정란 배양액에서 pyruvate는 필요치 않다고 하였다. Lactate는 수정란의 체외발육에 중요한 에너지원으로 lactate와 pyruvate의 적절한 비율은 수정란의 산화-환원력(oxidation-reduction potential)을 유지하는데 중요한 요인이 된다(Brinster, 1965). 대부분의 수정란배양액중 lactate의 농도는 20 mM이상으로 이러한 수준은 사람이나 기타 포유동물의 생식기도내 수준인 5-10 mM(Gardner & Leese, 1990; Nichol et al., 1992; Dickens et al., 1995; Gardner et al., 1996; Tay et al., 1997)보다 훨씬 높다. 고농도의 lactate는 배양액의 삼투압을 증가시키며, 배양액의 삼투압이 높으면 수정란의 발육이 저해되는 것으로 보고되고 있는데, Pomp 등(1988)은 생쥐의 1세포기 배양액의 lactate 농도를 21.6 mM에서 11.65 mM로 낮추었을 경우에 포배기까지의 수정란의 체외발육율이 현저히 높았다고 하였고, Gardner와 Sakkas (1993)는 5 mM이하로 조정하였을 때 생쥐의 임신후 태아발달율을 현저히 증가시켰다고 하였다. 또한 햄스터 수정란의 배양액중 lactate 농도도 10 mM 이하이며(Barnett & Bavister, 1996), 사람에서도 Tay 등(1997)은 기존의 배양액중 20 mM이상의 lactate는 생리적 수준을 상회하기 때문에 적절치 못하다고 하였다. 따라서 배양액중 삼투압은 수정란의 체외발육에 영향을 미치는 중요한 원인들중 하나가 될 것이다(Pinyopummintr & Bavister, 1991;

Gardner et al., 1994). 결론적으로 체외수정-수정란이식과정에서 배양액중 아미노산의 첨가는 수정란의 체외발육에 필수적이며, 발육단계에 따라 배양액중 에너지 기질의 조성을 달리하는 것이 체내상태와 가장 유사한 조건을 제공할 수 있을 것이라 생각된다.

결 과

1. 불임의 원인

체외수정 시술환자들의 불임유형은 아미노산 비첨가군(bHTF group)에서는 2차성 불임이 많았고(72.5%), 아미노산첨가군(mHTF group)에서는 1차성 불임이 많았다(53.6%). 불임의 원인별로는 주된 원인만을 기준으로 난관인자와 배란인자에 의한 불임이 많았으며, 장기간의 원인불명, 남성인자 및 자궁내막증의 순이었다(Table 2).

Table 2. Infertility categories in IVF patients

Categories	bHTF	mHTF
No. of patients	40	28
Types of infertility		
Primary	11(27.5%)	15(53.6%)
Secondary	29(72.5%)	13(46.4%)
Causes of infertility		
Ovulatory	8(20.0%)	12(42.9%)
Tubal	19(47.5%)	8(28.6%)
Endometriosis	2(5.0%)	2(7.1%)
Male	1(2.5%)	5(17.9%)
Unexplained	10(25.0%)	1(3.5%)

2. 평균연령 및 불임기간

불임환자들의 평균연령 및 불임기간은 아미노산 비첨가군이 31.9±0.5세 및 4.3±0.4년이었고, 아미노산 첨가군이 31.3±0.6세 및 3.8±0.6년으로 아미노산 비첨가군과 첨가군간에 평균연령 및 불임기간은 차이가 없었고, 남편들의 연령도 아미노산 비첨가군이 35.0±0.6세, 아미노산 첨가군이 34.4±0.7세로 양군간에 차이가 없었다(Table 3).

Table 3. Comparison of ovarian responses after COH in different media groups

	bHTF	mHTF	P value
No. of patients	40	28	
No. of cycles	46	30	
Age(Years)			
Wives	31.9 ± 0.5	31.3 ± 0.6	NS
Husbands	35.0 ± 0.6	34.4 ± 0.7	NS
Duration of infertility(Years)	4.3 ± 0.4	3.8 ± 0.6	NS
No. of FSH/hMG (Ampules)*	26.0 ± 1.0	35.5 ± 3.5	P<0.01
Days of COH*	12.1 ± 0.3	10.7 ± 0.3	P<0.01
Follicle size(mm)	20.1 ± 0.3	20.9 ± 0.4	NS
E_2 on day of hCG(pg/ml)	2415.4 ± 206.7	3108.2 ± 324.1	NS

1) Values are mean ± SEM. NS : Not significant.
2) * : CC + hMG group was excluded(n=7).

3. 난소반응

과배란유도과정에 사용된 외인성성선자극호르몬(FSH/hMG)의 용량은 75IU 기준으로 아미노산 비첨가군이 26.0±1.0개, 아미노산 첨가군이 35.5±3.5개로 아미노산첨가군에서 많았으나(P<0.01), 투여일수에 있어서는 아미노산 첨가군이 10.7±0.3일로 아미노산 비첨가군의 12.1±0.3일보다 짧았다(P<0.01). hCG 투여당일의 우성난포의 크기는 아미노산 비첨가군이 20.1±0.3 mm, 아미노산 첨가군이 20.9±0.4 mm로서 양군간에 차이가 없었고, hCG투여당일의 혈중 estradiol(E_2) 농도는 아미노산 비첨가군이 2415.4±206.7 pg/ml로서 아미노산 첨가군의 3108.2±324.1 pg/ml과 차이가 없었다(Table 3).

Table 4. Outcomes of in-vitro fertilization and embryo transfer using different culture media

	bHTF	mHTF	P value
No. of oocytes retrieved	8.5 ± 0.8	8.6 ± 0.8	NS

No. of oocytes fertilized	5.3 ± 0.5	5.6 ± 0.5	NS
Total motile sperm ($X10^6$)	123.6 ± 12.2	135.1 ± 16.5	NS
Fertilization rate(%)	61.7	65.0	NS
No. of embryos developed	4.8 ± 0.5	5.3 ± 0.5	NS
No. of embryos transferred	4.1 ± 0.3	4.2 ± 0.3	NS
Biochemical pregnacies(%)*	19/46(41.3)	19/30(63.3)	NS
Clinical pregnacies(%)*	9/46(19.6)	13/30(43.3)	P<0.05
Implantations(%)*	10/187(5.3)	16/126(12.7)	P<0.05
Multiple pregnancies(%)*	1/9(11.1)**	1/13(7.7)	NS
Ectopic pregnancies(%)	1/9(11.1)**	1/13(7.7)	NS
Clinical abortions(%)*	2/9(22.2)	1/13(7.7)	NS
Ongoing pregnacies or deliveries(%)	7/46(15.2)	12/30(40.0)	P<0.05

1) Values are mean ± SEM. NS : Not significant.
2) * : One ectopic and one heterotopic pregnancies were included.
** : Heterotopic pregnancy.

4. 체외수정-수정란이식 결과

과배란유도후 채취된 난자수는 아미노산 비첨가군이 8.5±0.8개, 아미노산 첨가군이 8.6±0.8개로 양군간에 차이가 없었고, 불임환자 남편들의 총운동성 정자수(123.6±12.2 *vs* 135.1±16.5 $X10^6$ sperm)와 수정율(61.7% *vs* 65.0%)도 양군간에 차이가 없었으며, 이식수정란수도 아미노산 비첨가군이 4.1±0.3개, 아미노산 첨가군이 4.2±0.3개로 차이가 없었다(Table 4). 수정란이식후 착상율은 아미노산첨가군(16/126)이 아미노산 비첨가군(10/187)보다 높았고(P<0.05), 임상적 임신율도 아미노산 첨가군(13/30)이 비첨가군(9/46)에 비하여 높았으며(P<0.05), 진행임신율이나 분만율에 있어서도 아미노산 첨가군(12/30)이 비첨가군(7/46)에 비하여 높았다(P<0.05). 아미노산 비첨가군에서는 자궁내임신과 자궁외임신이 공존하는 복합임신(heterotopic pregnancy)이 1례 있었는데, 자궁외 임신의 처치후 자궁내 임신된 태아도 자연유산되었으며, 아미노산 첨가군에서는 자궁외 임신이 1례 있었다. 임상적 임신에 대한 유산율은 아미노산 비첨가군에서는 복합임신 1례를 포함하여 2례로 22.2%이었고, 아미노산 첨가군에서는 자궁외 임신 1례에 의한 유산으로 7.7%이었다. 다태임신율은 아미노산 비첨가군이 복합임신으로 인하여 11.1%이었고, 아미노산 첨가군에서는 삼태아 임신이 1례로 7.7%이었다. 자궁강내에 이식된 수정란의 수와 임상적 임신율은 아미노산 비첨가군에서는 이식수정란수가 많을수

록 임신율이 높았고, 아미노산 첨가군에서는 3-4개의 수정란을 이식하였을 때 가장 높은 임신율을 나타내었다(Table 5).

Table 5. Clinical pregnancies(%) according to number of embryos transferred

No. of embryos transferred	bHTF	mHTF	P value
1	0/4 (0.0)	0/3 (0.0)	-
2	2/7 (28.6)	1/2 (50.0)	NS
3	0/10(0.0)	3/6 (50.0)	NS
4	3/16(18.8)	5/7 (71.4)	P<0.05
≥5	4/9 (44.4)	4/12(33.3)	NS

1) NS : Not significant.

결 론

본 연구는 phosphate가 제거된 단순배양액인 basal HTF를 기본배양액으로 하여 아미노산의 첨가가 체외수정란의 발생과 수정란이식후 임신율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실시하였다. 과배란유도는 CC와 hMG를 병합하거나 GnRH-a와 FSH/hMG의 병합법을 이용하였다.

1. 불임의 유형은 아미노산 비첨가군(bHTF)에서는 2차성 불임이 많았고(72.5%), 아미노산 첨가군에서는 1차성불임이 많았다(53.6%). 불임의 원인별로는 난관인자와 배란인자에 의한 불임이 많았고, 원인불명, 남성인자 및 자궁내막증 순이었다.

2. 불임환자들의 평균연령 및 불임기간은 아미노산비첨가군이 31.9±0.5세 및 4.3±0.4년이었고, 아미노산 첨가군이 31.3±0.6세 및 3.8±0.6년으로 양군간에 차이가 없었고, 남편들의 연령도 35.0±0.6세와 34.4±0.7세로 차이가 없었다.

3. 과배란유도과정에 사용된 FSH/hMG의 용량은 아미노산첨가군이 35.5±3.5개로 비첨가군의 26.0±1.0개에 비하여 많았으나($P<0.01$), 우성난포의 크기는 20.9±0.4 mm와 20.1±0.3 mm로 차이가 없었고, hCG주사당일의 혈중 E_2 농도는 아미노산 비첨가군이 2415.4±206.7 pg/ml로 아미노산 첨가군의 3108.2±324.1 pg/ml과 차이가 없었다.

4. 과배란유도후 채취난자수, 총운동성 정자수, 수정율 및 이식수정란수는 아미노산비첨가군과 첨가군간에 차이가 없었으나 수정란 이식후 착상율은 아미노산 첨가군(16/126)이 비첨가군(10/187)보다 높았고($P<0.05$), 임상적 임신율 및 진행임신율이나 분만율도 아미노산 첨가군에서 높았다($P<0.05$).

5. 이식수정란수에 따른 임신율은 아미노산 비첨가군에서는 이식수정란의 수가

많을수록 임신율이 높았고, 아미노산 첨가군에서는 3-4개의 수정란을 이식하였을 때 가장 높은 임신율을 나타내었다.

이상의 결과를 종합하면 체외수정-수정란 이식과정에 사용되는 배양액중 아미노산의 첨가는 체외수정율에는 유의적인 영향을 미치지는 않지만 수정란의 체외발생에 있어서는 양호한 결과를 나타내어 진행임신율과 만기분만율에서도 향상된 결과를 가져올 수 있으므로 체외배양액중 아미노산의 첨가는 필수적이라 하겠다.

사사

본 연구의 문헌수집을 위하여 귀한 시간을 할애하여 주신 충남대학교 동물자원학부의 한만희 선생님과 진주산업대학교 국제축산개발학과의 박준규 선생님께 감사드립니다.

인 용 문 헌

문 신 용, 노 재 숙, 이 경 순, 서 창 석, 김 석 현, 최 영 민, 신 창 재, 김 정 구, 이 진 용, 장 윤 석 : 다낭성 난소증후군 환자의 체외수정시술시 경구피임제와 GnRH agonist의 병합효과에 대한 비교 연구. 대한산부회지 1995, 38, 1898-1908.

홍 정 의, 이 지 삼 : 체외수정시술시 과배란유도방법이 임신율에 미치는 영향. 대한불임회지 1997, 24, 361-368.

홍 정 의, 이 지 삼 : 자궁강내 인공수정에 의한 임신율. 대한불임회지 1998, 25, 217-231.

Abramczuk J, Solter D, Koprowski H : The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. *Dev Biol* 1977, 61, 378-383.

Barnett DK, Bavister BD : What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence ? *Mol Reprod Dev* 1996, 43, 105-133.

Bastias MC, McGee-Belser ST, Bryan SH, Vasquez JM : In vitro deleterious effect of hypoxanthine in Ham's nutrient mixture F-10 culture medium on human oocyte fertilization and early embryonic development. *Fertil Steril* 1993, 60, 876-880.

Bavister BD, McKiernan SH : Regulation of hamster embryo development *in vitro* by amino acids. *In* : Bavister, BD(ed.), Preimplantation Embryo Development, Springer-Verlag, New York, NY, USA, 1993, pp. 57-72.

Boatman DE : Responses of the oviductal environment. *Hum Reprod* 1997, 12(Suppl. 2), 133-149.

Bolton VN, Hawes SM, Taylor CT, Parsons JH : Development of spare human preimplantation embryos in vitro : An analysis of the correlations among gross morphology, cleavage rates, and development to the blastocyst. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1989, 6, 30-35.

Braude P, Bolton V, Moore S : Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 1988, 332, 459-461.

Brinster RL : Studies on the development of mouse embryos in vitro. IV. Interaction of energy sources. *J Reprod. Fertil* 1965, 10, 227-240.

Carrillo AJ, Lane B, Pridham DD, Risch PP, Pool TB, Silverman IH, Cook CL : Improved clinical outcomes for in vitro fertilization with delay of embryo transfer from 48 to 72 hours after oocyte retrieval : use of glucose- and phosphate-free media. *Fertil Steril* 1998, 69, 329-334.

Casslen BG : Free amino acids in human uterine fluid. Possible role of high taurine concentration. *J Reprod Med* 1987, 32, 181-184.

Conaghan J, Handyside AH, Winston RML, Leese HJ : Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos in vitro. *J Reprod Fertil* 1993, 99, 87-95.

Croxatto HB, Ortiz ME, Diaz S, Hess R, Balmaceda J, Croxatto HD : Studies on the duration of egg transport by the human oviduct. II. Ovum location at various intervals following luteinizing hormone peak. *Am J Obstet Gynecol* 1978, 132, 629-634.

Damario MA, Barmat L, Liu HC, Davis OK, Rosenwaks Z : Dual suppression with oral contraceptives and gonadotrophin releasing-hormone agonists improves in-vitro fertilization outcome in high responder patients. *Hum Reprod* 1997, 12, 2359-2365.

Devreker F, Winston RML, Hardy K : Glutamine improves human preimplantation development in vitro. *Fertil Steril* 1998, 69, 293-299.

Dickens CJ, Maguiness SD, Comer MT, et al., : Human tubal fluid : formation and composition during vascular perfusion of the Fallopian tube. *Hum Reprod* 1995, 10, 505-508.

Gardner DK, Lane M : Embryo culture systems. *In* : Trounson A, Gardner DK, (eds.). Handbook of in vitro fertilization. Boca Raton : CRC Press, 1993a, 85-114.

Gardner DK, Lane M : The 2-cell block in CF1 mouse embryos is associated with an increase in glycolysis and a decrease in tricarboxylic acid(TCA) cycle activity : alleviation of the 2-cell block is associated with the restoration of in vivo metabolic pathway activities. *Biol Reprod* 1993b, 49(Suppl 1), 52.

Gardner DK, Lane M : Amino acids and ammonium regulate the development of mouse embryos in culture. *Biol Reprod* 1993c, 48, 377-385.

Gardner DK, Lane M : Alleviation of the '2-cell block' and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos : role of amino acids, EDTA and physical parameters. *Hum Reprod* 1996, 11, 2703-2712.

Gardner DK, Lane M : Culture and selection of viable blastocysts : a feasible proposition for human IVF ? *Hum Reprod Update* 1997, 3, 367-382.

Gardner DK, Lane M : Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Hum Reprod* 1998, 13(Suppl. 3), 148-159.

Gardner DK, Leese HJ : Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism in vitro. *J Reprod Fertil* 1990, 88, 361-368.

Gardner DK, Sakkas D : Mouse embryo cleavage, metabolism and viability : role of medium composition. *Hum Reprod* 1993, 8, 288-295.

Gardner DK, Lane M, Spitzer A, Batt PA : Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells : amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biol Reprod* 1994, 50, 390-400.

Gardner DK, Lane M, Calderon I, Leeton J : Environment of the preimplantation human embryo in vivo : metabolic analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil Steril* 1996, 65, 349-353.

Gardner DK, Lane MW, Lane M : Bovine blastocyst cell number is increased by culture with EDTA for the first 72 h of development from the zygote. *Theriogenol* 1997, 47, 278.

Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schienker T, Schoolcraft WB : Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfer. *Fertil Steril* 1998, 69, 84-88.

Hardy K : Development of human blastocysts in vitro. *In* : Bavister B(ed), Preimplantation embryo development. Springer-Verlag, NY, 1993, pp. 184-199.

Hardy K, Handyside AH, Winston RML : The human blastocyst : Cell number, death and allocation during late preimplantation development *in vitro*. *Developm* 1989, 107, 597-604.

Hewittson LC, Leese HJ : Effects of metabolic inhibitors on cell number, development and metabolism of isolated mouse inner cell masses. *Biol Reprod* 1993, 8(Suppl 1) : 174.

Hoppe PC : Glucose requirement for mouse sperm capacitation in vitro. *Biol Reprod* 1976, 15, 39-45.

Huxtable RJ : Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* 1992, 72, 101-163.

Jones GM, Trounson AO, Gardner DK, Kausche A, Lolatgis N, Wood C : Evolution of a culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy. *Hum Reprod* 1998, 13, 169-177.

Koobs DH : Phosphate mediation of the Crabtree and Pasteur effects. *Science* 1972, 178, 127-133.

Mahadevan MM, Miller MM, Moutos DM : Absence of glucose decreases human fertilization and sperm movement characteristics *in vitro*. *Hum Reprod* 1997, 12, 119-123.

Moore K, Bondioli KR : Glycine and alanine supplementation of culture medium enhances development of in vitro matured and fertilized cattle embryos. *Biol Reprod* 1993, 48, 833-840.

Nasr-Esfahani MH, Winston NJ, Johnson MH : Effect of glucose, glutamine, ethylenediaminetetraacetic aicd and oxygen tension on the concentration of reactive oxygen species and on development of the preimplantation embryo in vitro. *J Reprod Fertil* 1992, 96, 219-231.

Nichol R, Hunter RHF, Gardner DK, Leese HJ, Cooke GM : Concentrations of energy substrates in oviductal fluid and blood plasma of pigs during the peri-ovulatory period. *J Reprod Fertil* 1992, 96, 699-707.

Pinyopummintr T, Bavister BD : In vitro-matured/in vitro-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined protein-free culture media. *Biol Reprod* 1991, 45, 36-742.

Pomp D, Critser ES, Rutledge JJ : Lower sodium lactate in Whitten's medium improves in vitro developmental capacity of one-cell mouse embryos. *Theriogenol* 1988, 29, 1019-1025.

Quinn P : Enhanced results in mouse and human embryo culture using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate. *J Assist Reprod Genet* 1995, 12, 97-105.

Rogers BJ, Perreault SD : Importance of glycolysable substrates for in vitro capacitation of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1990, 43, 1063-1069.

Rosenkrans CF, Jr., Zeng GQ, Mcnamara GT, Schoff PK, First NL : Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biol Reprod* 1993, 49, 459-462.

Rosenwaks Z : Endocrine assessment and choice of stimulation : Techniques for the difficult patient. Update on reproductive medicine and assisted reproductive technology. *Pacific Rim Soc Fertil Steril* 1996, March 24-28.

Schultz GA, Kaye PL, McKay DJ, Johnson MH : Endogenous amino acid pool sizes in mouse eggs and preimplantation embryos. *J Reprod Fertil* 1981, 61, 387-393.

Seshagiri PB, Bavister BD : Glucose and phosphate inhibit respiration and oxidative metabolism in cultured hamster eight-cell embryos : Evidence for the 'Crabtree effect'. *Mol Reprod Dev* 1991, 30, 105-111.

Tay JI, Rutherford AJ, Killick SR, Maguiness SD, Partridge RJ, Leese HJ : Human tubal fluid : production, nutrient composition and response to adrenergic agents. *Hum Reprod* 1997, 12, 2451-2456.

Tsai FCH, Gardner DK : Nicotinamide, a component of complex culture media, inhibits mouse embryo development in vitro and reduces subsequent developmental potential after transfer. *Fertil Steril* 1994, 61,

376-382.

Van Winkle LJ, Haghighat N, Campione AL : Glycine protects preimplantation mouse conceptuses from a detrimental effect on development of the inorganic ions in oviductal fluid. *J Exp Zool* 1990, 253, 215-219.

Wales RG, Du ZF : The metabolism of glutamine by the preimplantation sheep conceptus and its interaction with glucose. *Reprod Fertil Dev* 1994, 6, 659-667.