

레이저를 이용한 부분적 보조부화술이 생쥐 수정란의 부화에 미치는 효과

을지병원 의과학연구소¹, 을지의대 산부인과², 생리학교실³

김동훈¹ · 김묘경¹ · 이회창¹ · 고덕성¹ · 박원일² · 권혁찬² · 이호준^{1,3}

Effect of Partial Laser Assisted Hatching on Mouse Embryos

Dong-Hoon Kim¹, Myo-Kyung Kim¹, Hoi-Chang Lee¹, Duck-Sung Ko¹,
Won-Il Park², Hyuck-Chan Kwon², Ho-Joon Lee^{1,3}

*Medical Science Institute¹, Eulji General Hospital, Department of OB/GYN² and Physiology³,
Eulji University School of Medicine, Seoul, 139-711, Korea*

Objective: The present study was performed to investigate the efficiency of partial laser assisted hatching (p-LAH; lased 1/2 ZP width from ZP edge) on hatching of mouse blastocysts.

Methods: We used non-contact 1.48 μm diode laser (MTM, Switzerland) to create a precise hole on zona pellucida. 2-cell embryos were collected from the mouse (ICR) oviduct at 48 hours after hCG administration. Collected 2-cell embryos were cultured in the P-1 medium supplemented with 0.4% BSA. For experiments, embryos at 8-cell stage were used after 20~22 hours in culture. After conventional (c-LAH) or partial laser assisted hatching, the embryos were further cultured in P-1 medium supplemented with 0.4% BSA for 3 days. To compare efficiency of complete and partial laser assisted hatching, hatching rate, hatching time and blastocyst diameter and zona pellucida thickness at hatching time were investigated. Embryos were examined every 12 hours. Blastocyst diameter and zona pellucida thickness at hatching time were measured with an ocular micrometer.

Results: Hatching rates of p-LAH group (84.2%) was significantly higher than that of control group (39.3%), but there was no difference between the p-LAH (84.2%) and c-LAH (91.2%). p-LAH group was hatched 12 hours earlier than control group, but hatched 12 hours later than c-LAH group. The diameter of blastocyst at hatching time of p-LAH group ($113.1 \pm 6.4 \mu\text{m}$) was smaller than that of control group ($122.2 \pm 5.0 \mu\text{m}$), but larger than that of c-LAH group ($102.2 \pm 2.7 \mu\text{m}$). Zona pellucida thickness at hatching time of p-LAH group ($6.4 \pm 0.9 \mu\text{m}$) was thicker than that of control group ($4.5 \pm 1.5 \mu\text{m}$), but thinner than that of c-LAH group ($10.0 \pm 0.8 \mu\text{m}$).

Conclusion: These results suggest that p-LAH may maintains the cell arrangement of early embryos to ensure successful development and prevent precocious hatching of blastocyst when compare to c-LAH and conventional (acidic tyrode) AH. Thus, p-LAH may provide a valuable and effective AH technique for human ART program.

Key Words: Mouse embryo, Hatching, Partial laser assisted hatching, Conventional laser assisted hatching

인간 생식보조술의 많은 발전에도 불구하고, 수정란 이식 후 착상율은 낮은 것으로 보고되고 있다. 이렇게 착상율이 낮은 원인 중의 하나는 완전히 적합하지 못한 체외배양 조건에 의한 부화율의 저하에 의한 것으로 제시되어져 왔으며,¹ 자연상태에서 수정란의 착상율이 약 25%인데 반하여 체외수정 시술에 의한 수정란의 착상율이 20% 미만이라는 사실이 이것을 뒷받침하고 있다.² 이러한 부화의 문제점을 해결하기 위하여 수정란의 투명대를 인위적으로 조작하는 보조부화술 방법이 이용되고 있다.

보조부화술의 방법으로는 투명대의 일부를 절개하는 partial zona dissection,^{1,3,4} acidic tyrode 용액을 이용하여 투명대의 일부에 구멍을 내는 zona drilling,⁵ 그리고 enzyme 용액에 수정란을 침지하여 투명대를 용해시키는 zona thinning⁶⁻⁸과 같은 방법이 이용되고 있다. 최근에는 레이저를 이용한 보조부화술을 실시하고 있으며, 보다 진보된 방법으로 현미경의 대물렌즈에서 직접 레이저가 방출되어 조작이 간편한 non-contact type이 이용되고 있다.⁹⁻¹¹ 그리고 이러한 보조부화술의 이용은 인간의 체외수정 시술에 있어서 임신율과 착상율을 증진시키는 것으로 확인되었다. 미세조작기나 레이저 장비를 이용한 보조부화술은 수정란의 투명대에 인위적인 구멍을 만들어 줌으로서 부화율을 증진시키고 부화시간을 단축시키게 된다. 그렇지만 이러한 방법들을 이용하게 되면 부화과정 중에 배반포가 투명대의 인위적인 구멍에 걸려서 불완전한 부화를 하게 되거나,¹² 생식기관의 수축작용에 의하여 투명대의 구멍을 통하여 할구가 손실될 수 있다고 보고되고 있다.¹³

Khalifa 등²은 미세조작기를 이용한 보조부화술에서 투명대의 인위적인 구멍에 의해서 유발될 수 있는 문제점들을 보완하고자, acidic tyrode 용액을 이용하여 투명대의 일부분에 구멍을 완전히 뚫는 것이 아니라 부분적으로 투명대를 얇게 하는 방법을 사용함으로써 생쥐 수정란의 부화율과 완전부화된 배반포의 비율이 증가한다고 보고하였다. 이러한 결과를 보았을 때, 투명대를 부분적으로 얇게 하는 방법은 기존의 방법보다는 보다 정상적인 부화과정에 가깝게 배반포의 팽창과 투명대의 두께가 얇아지는 과정을 진행하게 됨으로서 보다 효과적인 보조부화술 방법으로 이용될 수 있으며, 또한 레이저 보조부화술에도 이러한 방법이

유용하게 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

이에 본 연구는 보조부화 방법 중에서 레이저를 이용한 부분적인 보조부화술의 효용성을 알아보고자 생쥐 수정란을 이용하여 실험을 실시하였다.

연구대상 및 방법

1. 수정란의 준비

본 실험에는 5~6주령된 ICR 계통의 자성 생쥐를 이용하였다. 생쥐의 복강 내에 5 IU의 PMSG를 주사한 다음, 48시간 후에 5 IU의 hCG를 주사하여 과배란을 유도하였으며, 수정란을 획득하기 위하여 10~12주령된 웅성 생쥐와 1:1의 비율로 합사시켜 교미를 유도하였다. hCG 주사 후 48시간째에 경추탈골법을 이용하여 생쥐를 희생시킨 후, 적출된 난관을 관류하여 2세포기의 수정란을 회수하였다. 회수된 2세포기 수정란은 0.4% BSA가 첨가된 P-1배양액에서 배양을 실시하였으며, 인간의 보조생식술에서 보조부화술 시술과정과 동일하게 하기 위하여, 배양 18~20시간째 8세포기로 발달된 수정란만을 선별하여 실험에 이용하였다.

2. 레이저 보조부화술

1) Laser system

본 실험에서는 non-contact type의 diode laser system (Fertilase, MTM Medical Technology, Switzerland)을 이용하였다. Laser system에 대하여 간단히 설명하면, 670 nm diode aiming beam과 collimated 1.48 μ m cw laser beam이 반사경을 통하여 도립현미경으로 운반되고, 다시 laser beam은 현미경 대물렌즈 (x45)를 통하여 빛을 방출하게 됨으로서, 배양접시를 투과하여 수정란의 투명대를 용해시키게 된다. 그리고 빛의 강도는 조사시간 (irradiation time)을 조정함으로써 조절이 가능한데 본 연구에서는 이전의 결과에 근거하여 조사시간을 4 ms로 하여 보조부화술을 실시하였다.¹⁴

2) 보편적 레이저 보조부화술 (Conventional laser assisted hatching: c-LAH)

보조부화술을 실행하기 위하여, 8세포기의 수정란 (5~10개)을 mineral oil이 피복된 20 μ l의 P-1배양액 소적에 옮긴 후, 배양접시를 레이저 장비가 장착된 현미경의 stage에 위치시켰다. 그리고 현미경의 stage를

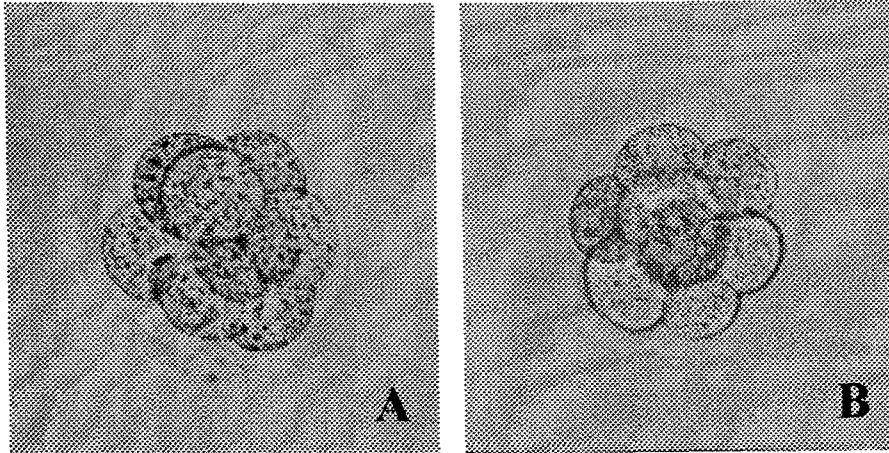


Figure 1. Photographs of mouse embryos after laser assisted hatching (LAH). **A:** Conventional-LAH, **B:** Partial-LAH

이동시켜서 수정란의 투명대에 초점을 정확히 맞춘 후, laser를 조사해서 완전히 투명대에 구멍이 형성되도록 하였다 (Figure 1-A).

3) 부분적 레이저 보조부화술 (Partial laser assisted hatching: p-LAH)

8-세포기 수정란 (5~10개)를 mineral oil이 피복된 20 μ l의 P-1배양액 소적에 옮긴 후, 배양접시를 현미경의 stage 위에 위치시켰다. 레이저 초점은 수정란의 투명대로부터 약간 바깥쪽으로 맞추어서, 투명대 두께의 절반 만이 용해되도록 하였다 (Figure 1-B).

3. 수정란의 배양

보조부화술을 실시한 수정란은 0.4% BSA가 첨가된 P-1배양액에서 3일간 배양을 실시하였으며, 수정란의 발달상태는 매 12시간마다 관찰하여 조사하였다. 그리고 부화가 진행되는 배반포의 직경과 투명대 두께는 현미경에 부착된 ocular micrometer를 이용하여 측정하였다.

4. 실험계획

생쥐 수정란에 있어서 보편적인 laser 보조부화술과 부분적인 laser 보조부화술의 효과를 비교하기 위하여 1) 보조부화 방법에 따른 부화율을 비교하였고, 2) 보조부화 방법에 따른 배반포의 부화시간을 조사하였고, 3) 보조부화 방법에 따른 부화시점에서 배반포의 직경과 투명대의 두께를 비교 조사하였다.

5. 통계처리

본 연구에서 얻어진 실험 결과의 통계처리는 t-Test와 χ^2 Test를 실시하였으며, $p < 0.05$ 이하인 경우만을 통계학적 차이로 인정하였다.

결 과

1. 보조부화술 방법에 따른 발달율과 부화율의 비교

보조부화술 방법에 따른 생쥐 수정란의 발달율과 부화율을 조사한 결과는 Table 1에 제시한 바와 같다. 발달율에 있어서는 대조군과 레이저 보조부화술군 간에 차이가 나타나지 않았다, 부화율에 있어서는 c-LAH군 (91.2%)과 p-LAH군 (84.2%)이 대조군 (39.3%)에 비하여 유의하게 높은 것으로 나타났지만, c-LAH군과 p-LAH군 간에는 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

2. 보조부화술 방법에 따른 배반포의 부화시간

보조부화술 방법에 따른 생쥐 배반포의 부화시간을 조사한 결과는 Figure 2에 제시된 바와 같다. 대조군은 hCG 투여 후 114시간째부터 부화가 진행되기 시작하여, 126시간째에 25%가 부화하였으며, 138시간째에 부화를 완료하였다. 이에 반하여 p-LAH군은 114시간째부터 부화를 하기 시작하여, 126시간째에 40% 이상이 부화를 하였으며, 138시간째에 부화가 완료되었

Table 1. Comparison of developmental and hatching rates between p-LAH and c-LAH

Method	No. of embryos examined	No. (%) of embryos developed to		
		Morular	Blastocyst	Hatching-BL*
Control	56	56 (100)	55 (98.2)	22 (39.3) ^a
c-LAH	57	57 (100)	56 (98.2)	52 (91.2) ^b
p-LAH	57	57 (100)	57 (100)	48 (84.2) ^b

*Hatching blastocyst, ^{ab}: p<0.05

Table 2. Comparison of blastocyst diameter and zona pellucida thickness between p-LAH and c-LAH at hatching time

Method	Blastocyst diameter (μm) Mean±SEM	ZP thickness (μm) Mean±SEM
Control	122.2±5.0 ^a	4.5±1.5 ^a
c-LAH	102.2±2.7 ^c	10.0±0.8 ^c
p-LAH	113.1±6.4 ^{ab}	6.4±0.9 ^{ab}

^{ab}: p<0.05, ^{ac}: p<0.001

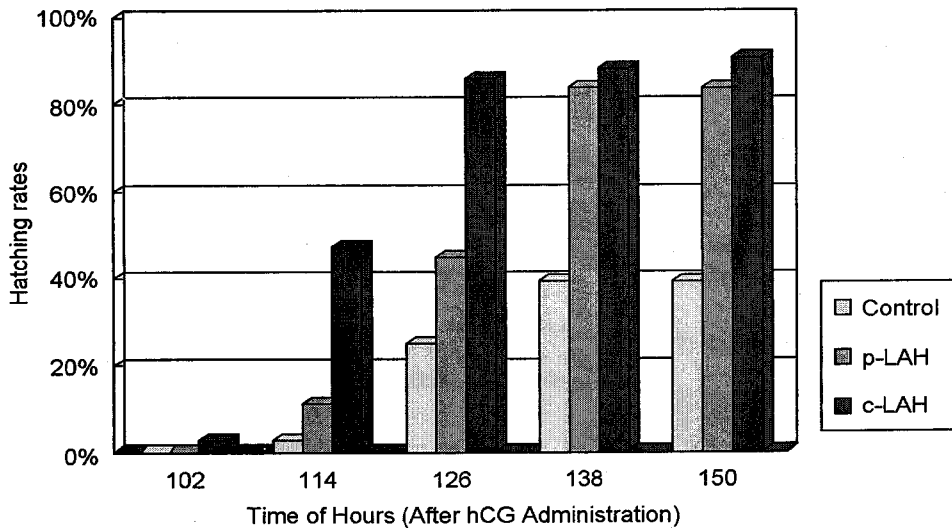


Figure 2. Comparison of timing of hatching between p-LAH and c-LAH.

다. 그리고 c-LAH군에서는 102시간째부터 부화가 진행되기 시작하여, 114시간째에 50% 이상이 부화하였으며, 126시간째에 대부분의 부화가 완료되었다. 이러한 결과들을 살펴보았을 때, p-LAH군 대조군에 비하여 부화가 빨리 진행되고, c-LAH군에 비해서는 느리게 진행된다는 것을 확인하였다.

3. 보조부화술 방법에 따른 부화시 배반포의 직경과 투명대 두께의 비교

보조부화술 방법에 따른 생쥐 배반포의 부화시 직경과 투명대 두께를 비교한 결과는 Table 2에 제시된 바와 같다. 부화시 배반포의 직경을 조사한 결과는 c-LAH군 (102.2±2.7 μm)과 p-LAH군 (113.1±6.4 μm)이

대조군 ($122.2 \pm 5.0 \mu\text{m}$)에 비하여 유의하게 직경이 작은 것으로 나타났으며, c-LAH군과 p-LAH군 간을 비교했을 때는 p-LAH군이 유의하게 큰 것으로 나타났다. 투명대 두께를 조사한 결과는 c-LAH군 ($10.0 \pm 0.8 \mu\text{m}$)과 p-LAH군 ($6.4 \pm 0.9 \mu\text{m}$)이 대조군 ($4.5 \pm 1.5 \mu\text{m}$)에 비하여 유의하게 투명대가 두꺼운 것으로 조사되었으며, c-LAH군과 p-LAH군 간을 비교했을 때는 p-LAH군이 유의하게 얇은 것으로 조사되었다.

고 찰

포유동물에 있어서, 배반포가 투명대로부터 부화의 실패 그리고 불완전한 부화가 착상실패의 원인 중 하나인 것으로 알려져 있다. 배반포의 부화를 증진시키기 위하여, partial zona dissection과 chemical zona drilling과 같은 보조부화술이 제시되어 왔고, 현재에도 많이 이용되고 있다. 이러한 방법들은 배반포의 부화를 도와줄 목적으로 투명대에 작은 크기의 구멍을 뚫어 주는 것으로서, 배반포의 부화를 증진시킨다고 보고되고 있다. 그렇지만 투명대에 구멍을 뚫는 것은 수정란의 정상적인 발달에 부정적인 영향을 줄 가능성이 많은 것으로 생각되어지고 있다.^{1,15} 이러한 보조부화술에 의하여, 배반포가 투명대가 얇아지면서 팽창하는 자연적인 과정을 거치지 않기 때문에 배반포가 부화과정 중에 투명대의 구멍에 걸리는 불완전한 부화가 일어날 가능성이 높으며,¹² 생식도관의 수축작용에 의하여 투명대 구멍을 통해서 할구가 유실될 수 있으며,¹³ 투명대가 수정란을 보호하는 protective coat 역할을 더 이상 수행을 할 수 없게 되어 면역세포로부터 공격을 받을 수 있으며,¹⁶ 그리고 인공적인 투명대의 구멍에 의해서 투명대가 완전히 팽창하지 못한 상태에서 조기부화되는 현상이 나타난다는^{12,17} 보고들이 있다.

이러한 문제점을 해결하기 위하여, Khalifa 등²은 acidic tyrode용액으로 생쥐 수정란의 투명대를 십자형으로 얇게 녹이는 방법을 이용했을 때, 부화율이 증가하고, 특히 완전부화된 배반포의 비율이 zona drilling 방법보다 유의하게 증가된다고 보고하였다. 이에 반하여, Tucker 등¹⁸은 사람의 수정란을 chemical zona thinning을 하였을 경우에는 착상율을 증가시키지 못한다고 보고했으며, 이것은 아마도 생쥐 수정란은 단

층형태의 투명대를 가지고 있는 반면에 사람 수정란은 이중형태의 투명대를 가지고 있기 때문인 것으로 추정하였다. Antinori 등¹⁹은 contact type의 Erbium YAG laser를 이용하여 사람 수정란을 zona thinning하여 이식한 결과, 착상율과 임신율을 유의하게 증가시켰다고 보고하였다. 따라서 이러한 결과는 laser system을 이용하는 것이 보다 효율적인 zona thinning 방법이 될 수 있음을 보여주었다.

본 실험에서는 Antinori 등¹⁹이 이용한 contact type의 laser system이 아닌 non-contact type의 laser system을 이용하여 생쥐 수정란의 투명대의 일부분을 thinning 했을 때의 그 효용성을 알아보았다. 실험에 이용된 diode laser는 파장이 $1.48 \mu\text{m}$ 로서 물의 흡수 스펙트럼 (약 2900 nm), DNA 흡수 스펙트럼 (약 300 nm) 그리고 단백질 흡수 스펙트럼 (약 308 nm) 범위에서 크게 벗어나 있어서, 수정란의 체외 및 체내 발달에 유해한 영향을 미치지 않는 것으로 보고되어 있다.^{10,20} 실험 결과는 p-LAH를 실시하였을 경우에 배반포의 부화율이 시행하지 않은 경우보다 유의하게 증가되는 것으로 나타났으며, 그리고 c-LAH와 비교했을 경우에는 비슷한 결과를 보여주었다. 부화가 이루어지는 시간을 살펴본 결과는 p-LAH군은 대조군에 비해서는 약 12시간 정도 빨리 진행되는 반면에 c-LAH군에 비해서는 약 12시간 정도 느리게 진행되는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 p-LAH가 효과적인 보조부화술로 이용될 수 있으며, c-LAH에 비하여 부화가 시작되는 시간이 지체됨으로써 배반포가 보다 발달할 수 있는 기회를 주어서 정상적인 부화에 가깝게 진행이 될 수 있을 것으로 사료된다. 자연적인 부화과정에 있어서는 투명대가 얇아지면서 배반포의 팽창에 의하여 부화가 진행이 되지만, partial zona dissection과 chemical zona drilling과 같은 보조부화술을 적용하게 되면 충분히 배반포가 발달하지 못하고 투명대가 얇아지지 않은 상태에서 부화가 진행이 되어 정상적인 발달에 부정적인 영향을 주는 것으로 알려져 있다.¹² 본 실험에서 부화시 배반포의 직경과 투명대의 두께를 비교한 결과, p-LAH군이 c-LAH군에 비하여 배반포의 직경이 증가되고, 투명대의 두께가 보다 감소한 것으로 나타났는데 이러한 결과는 p-LAH가 보다 정상적인 배반포발달과정에 가깝게 부화가 진행되도록 할 것이라는 사실을 재확인한 결과라고 생각

된다. 그렇지만 p-LAH가 보다 정상적인 부화에 가깝게 진행이 이루어진다는 것을 확인하기 위해서는 부화시점 혹은 완전히 부화된 시점에서 배반포의 세포수를 확인할 필요성이 있을 것으로 사료된다.

인간 보조생식술에 있어서 여성의 연령이 많거나, 기저 FSH 수치가 높거나, 투명대가 비정상적으로 두껍거나, 여러번 시술에 실패한 경우에는 배반포의 부화를 도와서 임신율을 증진시킬 목적으로 다양한 보조부화술 방법이 이용되고 있지만, 앞에서 전술한 바와 같은 결점을 해결할 수 있는 방법을 다양하게 모색들을 하고 있는데, 저자들이 제시하는 laser를 이용하여 투명대를 얇게 하는 p-LAH가 새로운 하나의 대안이 되지 않을까 생각된다.

본 실험 결과를 종합해 볼 때, non-contact type인 diode laser를 이용하여 투명대의 일부분을 얇게 하는 p-LAH는 수정란의 발달에 유해한 영향을 주지 않으며, 배반포의 부화율을 향상시키는 것을 알 수 있었다. 특히, 기존의 c-LAH에 비하여 보다 자연적인 배반포의 팽창과 투명대가 얇아지는 과정을 겪게 함으로서 배반포의 발생능을 보다 향상시키는 것으로 추측된다. 또한 p-LAH는 인간보조생식술에서 기존의 방법보다 간편하고 효과적인 보조부화술로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Cohen J, Elsner C, Kort H, Malter H, Massey J, Mayer MP, Wiemer K. Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisted hatching using micromanipulator. *Hum Reprod* 1990; 5: 7-13.
2. Khalifa HAM, Tucker MJ, Hunt PP. Cruciate thinning of the zona pellucida for more successful enhancement of blastocyst hatching in the mouse. *Hum Reprod* 1992; 7: 532-6.
3. Cohen J, Feldberg D. Effects of the size and number of zona pellucida opening on hatching and trophoblast outgrowth in the mouse embryo. *Mol Reprod Dev* 1991; 30: 70-8.
4. Tucker MJ, Cohen J, Massey JB, Mayer MP, Wiker SR, Wright G. Partial dissection of the zona pel-

- lucida of frozen-thawed human embryos may enhance blastocyst hatching, implantation and pregnancy rates. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 65: 341-45.
5. Cohen J, Alikani M, Trowbridge J, Rosenwaks Z. Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis. *Hum Reprod* 1992; 7: 685-91.
6. Gordon JW, Dapunt U. A new mouse model for embryos with a hatching deficiency and its use to elucidate the mechanism of blastocyst hatching. *Fertil Steril* 1993; 59: 1296-301.
7. Gordon JW, Dapunt U. Restoration of normal implantation rates in mouse embryos with a hatching impairment by use a new method of assisted hatching. *Fertil Steril* 1993; 59: 1302-7.
8. Lee DR, Lee JE, Yoon HS, Lee HJ, Kim MK, Roh SI. The supplementation of culture medium with protease improves the hatchinh rate of mouse embryos. *Hum Reprod* 1997; 12: 2493-8.
9. Neev J, Gonzalez A, Licciardi F, Alikani M, Tadir Y, Berns M, Cohen J. Opening of the mouse zona pellucida by laser without a micromanipulator. *Hum Reprod* 1993; 8: 939-44.
10. Germond M, Nocera D, Senn A, Rink K, Delacrétaz 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.
11. Schiewe MC, Hazeleger NL, Schimenti C, Balma-ceda JP. Physiological characterization of blastocyst hatching mechanism by use of a mouse anti-hatching mode. *Fertil Steril* 1995; 63: 288-94.
12. Malter HE, Cohen J. Blastocyst formation and hatching in vitro following zona drilling of mouse and human embryos. *Gamete Res* 1989; 24: 67-80.
13. Nichols J, Gardner RL. Effect of damage to the zona pellucida on development of preimplantation embryos in the mouse. *Hum Reprod* 1989; 4: 180-7.
14. 김동훈, 이명섭, 강희규, 한성원, 김묘경, 박원일, 이훈택, 정길생, 이호준. 생쥐 수정란의 보조부화술에 있어서 Non-contact type인 Diode laser의

- 이용. 대한불임학회잡지 1999; 26: 185-92.
15. Gordon JW, Grunfeld L, Garrisi G, Talansky BE, Richards C, Laufer N. Fertilization of human oocytes by sperm from infertile male after zona pellucida drilling. *Fertil Steril* 1988; 50: 68-73.
 16. Cohen J, Malter H, Elsner C, Kort H, Massey J, Mayer MP. Immunosuppression supports implantation of zona pellucida dissected human embryos. *Fertil Steril* 1990; 53: 662-5.
 17. Hardy K, Martin KL, Leese HJ, Winston RML, Handyside AH. Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Hum Reprod* 1990; 5: 708-14.
 18. Tucker MJ, Luecke NM, Wiker SR, Wright G. Chemical removal of the outside of the zona pellucida of day 3 human embryos has no impact implantation rate. *J Assist Reprod Genet* 1993; 10: 187-91.
 19. Antinori S, Panci C, Selman HA, Caffa B, Dani G, Versaci C. Zona thinning with the use of laser: a new approach assisted hatching in human. *Hum Reprod* 1996; 11: 590-4.
 20. Germond M, Nocera D, Senn A, Rink K, Delacrtaz G, Pedrazzini T, Hornung JP. Improved fertilization and implantation rates after non-touch zona pellucida microdrilling of mouse oocytes with a 1.48 μm diode laser beam. *Hum Reprod* 1996; 11: 1043-8.
-