

체외수정을 위한 과배란 유도 주기에서의 혈중의 난포자극홀몬, 황체형성홀몬, 프로락틴, Estradiol, Testosterone의 농도와 난포성숙도와의 관계*

계명대학교 의과대학 산부인과학 교실

이 두 룽·육 상 수

=Abstract=

Study on relationship of serum Follicle Stimulating Hormone, Luteinizing Hormone, Prolactin, Estradiol, Testosterone and ovum maturity in superovulated cycle for In Vitro Fertilization

Du Ryong Lee, MD; Sang Su Yuk, MD

*Department of Obstetrics and Gynecology
Keimyung University, School of Medicine, Taegu, Korea*

Twenty patients with irreparable tubal disease were stimulated by Follicle Stimulating Hormone/Human Menopausal Gonadotropin for the purpose of in vitro fertilization and embryo transfer, blood sampling performed for FSH, LH, PRL, E₂, Testosterone, 1 Hour before follicle fluid aspiration by laparotomy and the following results were obtained.

Serum hormonal levels of preovulatory oocytes(10 case):

FSH(mIU/ml) Mean±S.D. 6.755±1.662, Range 4.690-9.130

LH(mIU/ml) Mean±S.D. 45.36±203, Range 37.840-58.610

PRL(ng/ml) Mean±S.D. 54.699±39.725, Range 9.900-94.050

E₂(pg/ml) Mean±S.D. 1551.347±1447.270, Range 426.650-3772.020

Serum hormonal levels of non-preovulatory oocytes(10 case):

FSH(mIU/ml) Mean±S.D. 7.042±2.171, Range 4.820-11.160

LH(mIU/ml) Mean±S.D. 51.283±16.541, Range 24.000-74.910

PRL(ng/ml) Mean±S.D. 72.089±33.878, Range 32.570-133.600

E₂(pg/ml) Mean±S.D. 1991.555±1264.231, Range 609.720-3542.310

Testosterone(ng/ml) Mean±S.D. 0.988±0.859, Range 0.530-3.160

There is no statistical difference between serum FSH, LH, PRL, E₂, Testosterone levels of preovulatory oocytes patients(10 case) and serum FSH, LH, PRL, E₂, Testopsterone levels of non-preovulatory oocytes patients(10 case).

* 이 논문은 1988년도 계명대학교 동산의료원 특수과제 연구비로 이루어졌음.

서 론

난포의 성장을 촉진시키는 과배란유도는 체외수정 및 배아의 자궁내이식(in vitro fertilization and embryo transfer)에 있어서 나수의 성숙된 배란직전의 난자를 얻기 위해 필요한 과정이다¹⁾. 1982년 Trounson²⁾은 clomiphene citrate를 이용한 정상월경주기를 갖는 부인에서 과배란을 유도하여, 난자를 흡인하여 체외에서 수정시켜 배아를 자궁내 이식을 시행하여 임신에 성공하였다고 보고한 후 Lopata³⁾, Testart⁴⁾ 및 Edwards⁵⁾는 clomiphene citrate로 과배란을 유도하여 임신에 성공하였음을 보고하였다. Jones Rock⁶⁾은 human menopausal gonadotropin(이하 HMG로 약함)으로 과배란을 유도한 후 체외수정 및 배아의 자궁내 이식을 시행하여 임신에 성공하였다고 보고하였다. 과배란유도를 시행할 때는 혈중 에스트라디올(estriadiol; 이하 E₂로 약함) 치와 초음파로 난포의 성장을 관찰하는 방법 및 자궁경부 점액(cervical mucus)의 변화를 관찰하는 방법으로 난포의 성장을 관찰하였다. 특히 배아를 자궁내이식후 임신이 성공되기 위해서는 가능한 한 많은 수의 성숙된 난자를 얻어야 하므로 초음파 활영법은 과배란유도시에 난포의 크기 및 위치를 확인하는 중요한 배란탐지 방법으로 이용되고 있다⁷⁾. 그러나 과배란유도시에 난소가 지나치게 자극되면 많은 수의 난자를 얻을 수는 있으나, 난포를 흡인하기 전에 배란되어 버리거나, 혹은 난자가 과성숙되어 성숙된 배란직전의 난자를 얻기가 어려우며, 난자를 얻었다 하더라도 난구세포가 황체화되어 있으면 난자의 체외수정율은 저하된다⁸⁾. 과배란유도를 시행하면서 혈중 E₂ 치와 초음파를 이용하여 난포의 성장을 관찰하는 이유는 가능하면 수정 가능한 배란직전의 성숙된 난자를 많이 얻어 체외수정 및 배아의 자궁내이식후 임신율을 높이는데 있다. 과배란유도는 자연배란에 비교하여 많은 난자를 얻을 수 있고, 임신율을 증가시킬 수는 있으나 현재까지 표준화된 과배란유도법은 확립되어 있지 못하다. 왜냐하면 과배란유도 약제에 대한 개개인의 감수성이 다르기 때문이다. 최근에는 Jones⁹⁾이 개발한 pure follicle stimulating hormone(이하 FSH로 약함)을 초기의 난포기에 추가하는 방법이 고안되어 새로운 과배란유도방법으로 사용되고 있다. 과배란이 유도된 월경주기에서 혈중 E₂ 치와 초음파로 확인된 난포의 성

장에 따라서 어느 경우에는 임신이 불가능하다고 예측할 수 있는 시점이 있다면, 과배란이 불만족스럽게 유도된 주기에서는 난자의 흡인을 시행하지 않아도 될 것이다. 저자는 자연배란이 이미 확인된 정상월경주기를 갖는 불임부인을 대상으로 FSH/HMG를 사용하여 과배란을 유도하여, 혈중 E₂ 치와 초음파로 난포의 성장을 관찰하고, 가장 큰 난포의 크기가 16~17mm에 도달했을 때 Human chorionic gonadotropin(이하 HCG로 약함) 10,000IU를 근육주사 한 후 34~36시간에 난포액을 흡인하였다. 난포액 흡인 1시간 전에 혈액을 채취하여 혈청중의 FSH, 황체형성호르몬(Luteinizing Hormone, 이하 LH로 약함), 푸로락틴(Prolactin, 이하 PRL로 약함), E₂, Testosterone의 농도와 난자의 성숙도와의 관계를 분석하여 체외수정 및 배아의 자궁내 이식에 있어서 임신율을 높이는데 가장 중요한 요인 가운데 하나인 배란직전의 성숙한 난자를 얻는데의 하나의 시도로 삼으려는 의도에서 이 연구를 시도하였다.

재료 및 방법

1. 대상

계명대학교 의과대학 산부인과학 교실 불임환자 등록된 환자 중, 모든 불임검사가 끝나고, 난관의 원인으로 임신이 되지 않는 정상월경주기를 가지고 있는 20명의 환자를 대상으로 1988년 12월 30일부터 1989년 10월 26일까지 이 연구를 실시하였다.

2. 방법

1) 배란유도

과배란을 유도하기 위하여 월경주기 3일째 및 4일째 오전에 FSH(75 I.U.) 2 ampules을 근육주사하고, 오후에 HMG(FSH 75 I.U.+LH 75I.U) 2 ampules을 각각 근육주사하였다. 그 후 월경주기 5일째부터 E₂ 및 초음파로서 난포의 크기 및 성장을 관찰하면서 HMG 2 ampules씩을 오후에 근육주사한 후 월경주기 9일 내지 10일째에 가장 큰 난포의 크기가 16~17mm에 도달하고, LH surge가 일어나기 전, 마지막 HMG주사 후 약 35시간 후에 HCG 10,000I.U.를 근육주사하였다.

2) 초음파 단층 활영법

초음파 단층 활영은 오후 1시부터 3시 사이에 실시하였으며, 검사 2시간 전부터 약 500~1,000ml의 식수

몇 음료수를 마시게 하여 방광이 충만한 상태에서 실시하였다. 초음파진단기는 Acuson 128, β -mode이며, 환자의 치골결합연(symphysis pubis)으로부터 1cm간격으로 횡단면의 초음파단층상을 관찰하여 난소난포의 직경을 측정하고, 복부정중앙부위에서 좌측 혹은 우측으로 transducer를 기울여서 관찰되는 종단면의 초음파단층상에서의 난소난포의 직경을 측정하여 이들사이의 차이가 1cm미만인 경우를 택하여 평균치를 산출하였다. 초음파단층촬영은 월경주기 세 1일에 처음 실시하여 할반강내 기관에 대한 평가를 실시한후 월경주기 3일째부터 매일 실시하여 난자흡인전날 까지 계속하였다.

3) 혈중 FSH, LH, PRL, E₂, Testosterone 측정

20의 환자에서 난관성형술 및 난포액채취를 동시에 시행하였는데 개복후 바로 난포액을 10ml주사기에 14Gauge spinal needle(Ulti-Med International, INC. U.S.A.)을 연결해서 흡인하였는데, 난포액 흡인 1시간전인 오전 8시에 말초혈액 10ml을 채취하여 혈청을 원심분리하여 Radioimmunoassay 방법으로 측정하였다.

4) 난포액의 흡인

난포액의 흡인은 Jones 등¹⁰이 고안한 방법을 이용하여 HCG주사 약 34~36시간후에 시행하였다. 난포액이 들어있는 뷔브(Corning 15ml centrifuge tube)는 즉시 배양실에 옮기서 난포액의 냄새, 색깔을 기록하고 배양접시(Falcon #3002)에 옮긴후 해부현미경하에서 난자의 존재 여부를 확인하였고, 난자의 존재가 확인되면 역반사현미경으로 난자의 형태 및 성숙도를 관찰하였다.

5) 배양액

Ham's F-10 \bar{c} glutamate 9.81g(Gibco #430-1200)을 이용하여 250ml의 5차 증류수 Q water로 monthly stock media를 만들고, penicillin G(Sigma) 75mg, Streptomycin sulfate(Hoechst) 75mg을 추가한후, 충분히 용해하도록 철저히 혼는후, 0.2micron Nalgene-filter를 통하여 여과시킨후 4°C 냉장고에 보관하였다. 이와같이 만들어진 monthly stock media 25ml에 5차증류수 Q water 75ml를 혼합하고, lactic acid, ca salt(Hoechst) 27.87mg과 NaHCO₃(Mallincrodt) 210.6mg, phenol red(Grand Island Biological Company) 25 micro liter를 추가한후, pH는 7.4에 맞추고, 삼투압 280~284mosm이 되도록 하여 CO₂ incubator 안에 보관해 두었다가, 신생아 세대혈청의 농도가 10% 배

양액은 수정배양액으로, 20%는 수정된후 성장배양액으로 사용하였다.

6) 정자의 준비 및 수정

남편의 정액을 수정 3~4시간전에 수유(masturbation)으로 50ml 별관소독된 specimen cup(녹십자)에 무균적으로 채취하여 액화되도록 실온에서 30~40분간 방치하여 액화된후 기본적인 정액검사를 실시하여 정자의 수, 운동성 및 형태를 관찰하였다. 정자에 수정능력을(capacitation) 부여하기 위하여 정액을 동량의 수정(受精)배양액으로 회석하여 원심분리기에서 800xg로 10분간 원심분리를 시행하여 상층액을 제거하고, 다시 2.5ml의 수정배양액을 추가하여 원심분리를 되풀이 한후, 이와같은 과정을 반복하여 정자의 원심(pellet)을 만들었다. 여기에 0.5ml의 Ham's F-10 배양액을 정자의 원심이 흔들리지 않도록 추가한후 5% 탄산가스 37°C 배양기 내에 2시간동안 방치하여 운동성 정자가 상층액에 부유된 것을 확인한후, 상층액만 모아 정자의 수와 운동성을 검사하였다. 그후 추가 배양이 끝난 난자를 험유하고 있는 수정배양액내의 정자의 농도가 0.5x10⁶/ml이 되도록 수정 시켰다. 수정시킨후 16~18시간후에 20%의 신생아 세대혈청을 포함한 Ham's F-10 성장배양액으로 옮겼다. 난포의 성숙도는 난포액 채취직후 해부현미경하에서 난포를 확인한후, 역반사현미경으로 검사하였다.

성 적

연구결과 얻어진것은 Table 1 및 Table 2와 같다. Table 1은 배란직전의 성숙된 난자(Fig 1)를 보인 환자의 난포액 채취 1시간전의 혈청중의 흡본치를



Fig 1. Preovulatory oocyte(x100).

보여주고 있으며, Table 2는 배란직전의 성숙된 난자가 없었던 환자의 난포액 재취 1시간전의 혈청 중의 흙문차를 나타낸 것이다. 양군 간의 통계처리를 한결과 유의한 차이를 보여주지 못하였다. 연구대상 20예 가운데 10예에서 배란직전의 성숙된 난자를 난포에서 발견할 수 있었고 (Table 1), 10예에서는 난포액에서 배란직전의 성숙된 난포를 발견할 수 없었다 (Table 2).

고 칠

생체내에서 일어나는 자연적인 수정을 체외에서 인위적으로 재현시키는 것을 체외수정(in vitro ferti-

lization)이라한다. 1978년 Edwards 등⁸은 자연배란주기에서 난자를 흡인하여, 난자를 제외수정시킨 후에 세계 최초로 시험관 아기가 출생하였다고 보고하였다. 그러나 자연배란주기를 이용할 경우에는 50% 이하의 환자에서만 난자의 흡인이 가능하였으므로 과배란을 유도한 후 난자흡인을 시행하게 되었고, 이때 Lopata⁹와 Marrs¹⁰은 clomiphene citrate만 사용하거나, clomiphene citrate에 HMG를 추가하여 과배란을 유도하였다. Jones 등¹¹은 HMG를 사용하여 과배란을 유도하여 임신에 성공하였으며, 최근에는 follicle stimulating hormone(FSH)과 HMG를 동시에 사용하거나, FSH만 사용하여 과배란을 유도하였다. 일반적으로 과배란을 유도하는 경우에는 혈중 E₂치와

Table 1. Serum hormonal levels of preovulatory oocytes

Cases	FSH(mIU/ml)	LH(mIU/ml)	PRL(ng/ml)	E ₂ (pg/ml)	Testosterone(ng/ml)
1	6.29	48.52	9.90	764.89	0.45
2	5.59	40.18	91.74	537.05	0.59
3	9.13	44.14	88.46	3722.02	2.19
4	4.69	37.84	94.05	426.65	0.55
5	6.41	58.61	30.53	2421.37	0.72
6	8.43	38.29	20.25	529.95	0.77
7	5.19	40.48	72.49	680.09	0.14
8	6.79	48.64	15.63	330.88	0.52
9	9.43	50.52	35.90	2500.72	0.48
10	5.60	46.38	88.04	3600.12	0.39
Mean±S.D.	6.755±1.662	45.36±8.203	54.699±39.725	1551.347±1447.270	0.68±0.728
Range	4.690~9.130	37.840~58.610	9.900~94.050	426.650~3772.020	0.450~2.190

Table 2. Serum hormonal levels of non-preovulatory oocytes

Cases	FSH(mIU/ml)	LH(mIU/ml)	PRL(ng/ml)	E ₂ (pg/ml)	Testosterone(ng/ml)
11	6.10	57.23	32.57	900.99	0.81
12	7.12	74.91	45.40	1211.17	0.62
13	11.16	46.12	45.69	3542.31	0.93
14	5.83	24.00	133.60	3088.01	1.00
15	4.82	52.10	87.21	3044.52	3.16
16	4.98	33.42	47.76	624.97	0.53
17	4.94	57.63	92.27	609.72	0.68
18	8.20	65.09	58.03	2938.61	0.84
19	10.11	34.14	90.16	2055.14	0.77
20	7.16	68.19	88.20	1900.11	0.54
Mean±S.D.	7.042±2.171	51.283±16.541	72.089±33.878	1991.555±1264.231	0.988±0.859
Range	4.820~11.160	24.000~74.910	32.570~133.600	609.720~3542.310	0.530~3.160

초음파를 이용하여 난포의 성장을 관찰하였다. 한번 Luteinizing Hormone(LH)을 이용하여 배란을 미리 알아내는 경우에는 배란일이 가까워지면 혈중 LH의 농도를 측정하여 평균 LH치의 2배가 되면 26시간 후에 난자의 흡인을 시행하고 있다. 초음파를 이용하면 난소난포의 수와 크기를 알 수 있을 뿐만 아니라, 난소 낭종의 발생여부도 확인할 수 있고 난포가 좌우 어느 쪽에서 발달하는지 확인할 수 있다. Kerin 등¹⁰⁾의 보고에 의하면 난포의 성장은 혈중 E₂치의 농도와 가장 관계가 깊에 나타난다고 하였다.

본 연구에서도 성장하는 난포의 수가 많으면 혈중 E₂농동가 높게 나타났다. clomiphene citrate를 사용하여 과배란을 유도하면 난포의 직경이 18mm인 경우에 HCG를 근육주사하면 배란직전의 성숙된 난자를 얻을 수 있었으며, HMG를 사용한 경우에는 16mm 전후에서 HCG를 근육주사하면 성숙된 난자를 얻을 수 있다고 노형일과 장윤식¹¹⁾은 보고하고 있다. 이는 저자의 경험과도 일치한다. 인간난자의 체외수정 및 태아의 자궁내이식을 시행하면서 초음파를 이용하여 난포의 성장을 관찰하는 경우, 과거에 개복수술을 받아 복강내 유착이 심한 경우, 비만형의 부인 및 장의 가스로 인하여 난포를 관찰할 수 없는 경우에는 제한을 받는다. 이러한 단점에도 불구하고 모든 환자에서 초음파를 이용한 난포의 관찰은 혈중 E₂ 농도와 함께 난포의 성장을 관찰하는 유용한 방법으로 사용될 수 있다. 여기에 추가하여 난포액을 흡인하기 전에 혈청중의 FSH, LH, PRL, E₂, Testosterone의 농도를 알므로서 난자의 성숙도를 미리 알 수 있는 지표를 삼기위하여 본 연구를 시행해 보았는데 배란직전의 성숙난포가 발견된 10예와, 배란직전의 성숙난포가 발견되지 않은 10예를 비교해 보았을 때 통계적으로 양군의 위의 다섯홀몬(FSH, LH, E₂, PRL, Testosterone)의 농도의 유의한 차이를 보여주지 않았다. 난포액을 흡인 직후 해부현미경으로 난포액 중의 난자를 확인하고 다음에 10% 수성 배양액에 넣고나서 역사반사현미경으로 난자의 성숙도를 확인 분류하였다. 이때에는 대기에 노출되는 시간을 최대한으로 단축하기 위하여 최단시간내에 확인한 후 이미 준비된 수정배양액으로 다시 옮겼다. 흡인된 난자의 성숙도는 난자-난구세포 복합체(oocyte-cumulus complex)와 난포액내의 과립세포 및 corona radiata의 특징을 관찰하여 분석하게 된다. 흡인된 난자는 배란직전의 성숙된 난자(Fig 1), 미성숙 난자(immature-oocyte) (Fig 2), 퇴화된 난자(atretic oocyte) (Fig 3) 및 과



Fig 2. Immature oocyte(x100).

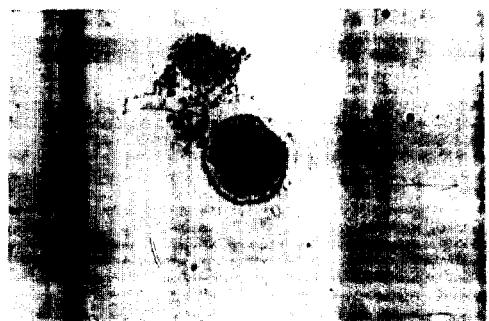


Fig 3. Degenerative oocyte(x100).



Fig 4. Postmature oocyte(x100).

성숙 난자(post-mature oocyte) (Fig 4)로 분류하게 된다. 배란직전의 성숙된 난자는 성숙된 과립세포와 함께 나타나며, 난구세포는 존재하나 크기는 일정하지 아니하다. 난자는 보통 둥글게 보이며 밝은 색조를 띤다. 세일극체(the first polar body)는 난자내에 존재는 하고 있으나 현미경에서의 관찰은 용이하지 아니하다. 이러한 난자는 간수분열(meiotic division)이 완성된 후 흡인이 되었으므로 체외수정전 6~8시간 추가배양을 실시한다. 미성숙 난자는 미성숙 과립세포를 동반한다. 난구세포는 확산되어 있지 않으며, corona radiata의 세포는 밀집되어 난자를 둘러싸고 있다. 난자는 둥근모양을 하고 있으나, corona ra-

diata에 둘러싸여 성숙된 난자에 비하여 어두운 색조를 나타낸다. 제일수체는 존재하지 않으며 germinal vesicle은 존재하거나 또는 없는 경우도 있으나 이러한 사항은 혈미경하에서의 확인은 거의 불가능하다. 미성숙난자는 제일간수분열의 여러상태에 있으므로 체외에서 제일수체의 방출이 가능하도록 22~35시간 정도 추가 배양을 실시하여야 한다. 퇴화된 난자는 퇴화된 과립세포를 동반하며 난자의 모습은 검은 색조의 불규칙적인 모양으로 관찰된다. 제일수체나 germinal vesicle은 관찰되는 경우도 있으나 대부분에서는 관찰되지 아니한다. 과성숙 난자는 성숙된 과립세포를 동반한다. 난구세포는 corona radiata와 함께 불규칙적으로 난자를 둘러싸고 있다. 난자의 모습은 둥글지는 아니하나 검은색조를 띤다. 과성숙 난자는 갑수분열은 완성 되어 있으나 생존력이 없는 난자로 사료된다.

요 약

난관의 원인으로 불임증이 확인된 정상월경주기를 갖인 20명의 환자를 대상으로 체외수정 및 배아의 자궁내 이식을 위한 과배란유도를 월경주기 3일째부터 2일간은 오전에 FSH(75 I.U.) 2 ampules, 오후에 HMG(FSH 75 I.U.+LH 75 I.U.) 2 ampule을 각각 균육주사하고, 월경 5일째부터 HMG 2 ampule을 초음파로서 난포의 크기를 관찰하면서 오후에 균육주사하였다. 최대난포의 크기가 16~17mm에 도달했을 때 HCG 10,000I.U.를 균육주사하고 약 34~36시간후에 난관성형수술과 함께 난포액을 채취하였다. 난포액 채취를 시행하기 1시간전에 말초혈액 10ml을 채혈하여 RIA(Radioimmunoassay)법으로 분석한 결과 배란직전의 성숙한 난포를 보인 10예와 배란직전의 성숙난포를 보이지 않은 10예의 양분의 FSH, LH, PRL, E₂, Testosterone의 농도를 통계처리 해본 결과 유의한 차이를 발견할 수 없었다.

참 고 문 헌

- Jones HW Jr, Jones GS, Andrews MC, et al: The

- program for in vitro fertilization at Norfolk. *Fertil Steril* 1982; 38: 14-19.
- Trounson A0, Mohr LR, Wood C, et al: Effect of delayed insemination on in vitro fertilization, culture and transfer of human embryos. *J Reprod Fertil* 1982; 64: 285-290.
 - Lopata A: Concepts in human in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1983; 40: 289-300.
 - Testart J, Frydman R, de Mouzon, et al: A study of factors affecting the success of human fertilization in vitro. I. Influence of ovarian stimulation upon the number and condition of oocytes collected. *Biol Reprod* 1983; 28: 415-420.
 - Edwards RG, Fishel SB, Purdy JM: In vitro fertilization of human eggs: analysis of follicular growth, ovulation and fertilization, in Beier HM, Lindner HR. *Fertilization of the Human egg in vitro*. Berlin, Springer-Verlag, 1983, pp 169-181.
 - Jones HW, and Rock JS: *Reparative and Constructive Surgery of the Female Generative Tract*. Baltimore/London, Williams & Wilkins, 1983, pp 70-82.
 - Leung PCS, Lopata A, Kellow GN, et al: A histochemical study of cumulus cells for assessing the quality of preovulatory oocytes. *Fertil Steril* 1983; 39: 853-857.
 - Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM: Establishing full term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. *Br J Obstet Gynecol* 1980; 87: 737-743.
 - Marrs PR, Vargyas JM, Gibbons WE, et al: A modified technique of human in vitro fertilization and embryo transfer. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 141: 318-325.
 - Kerin JF, Edmonds DK, Warnes GN, et al: Morphological and functional relations of Graafian follicles growth to ovulation in women using ultrasonic, laparoscopic and biochemical measurements. *Br J Obstet Gynecol* 1981; 88: 81-91.
 - 노형일, 장윤식: 과배란 유도된 인간 난자의 성숙도 및 체외수정 난활용에 관한 연구. 대한산부인과학회지 1988; 31: 1175-1190.