

2세포기로의 조기난할 배아 선별을 이용한 체외수정술의 임신율 증가

좋은문화병원 불임의학연구소¹, 산부인과²

박세희¹ · 주보선¹ · 이수경¹ · 김경서² · 문화숙²

Improvement of Pregnancy Rate by the Selection of Early Cleavage Embryos to 2-cell Stage in Human IVF

Sea Hee Park¹, Bo Sun Joo¹, Su Kyung Lee¹, Kyung Sue Kim², Hwa Sook Moon²

¹Center for Reproductive Medicine, ²Department of Obstetrics and Gynecology,
Good Moonhwa Hospital

Objective: Evaluation of embryos using early cleavage to 2-cell stage has been proposed, but a critical time-point for selecting embryos is unclear. The aim of the present study is to provide a guideline including critical time-point in the selection of early cleaving embryo for the reduction of multiple pregnancies as well as the increase of pregnancy rate in human IVF.

Methods: This prospective study was performed in 116 cycles from 85 patients who underwent conventional IVF or ICSI at the infertility clinic of Good Moonhwa Hospital from January 2002 to December 2003. Early cleavage (EC) of embryos to 2-cell stage was assessed at 25 h and 27 h postinsemination/microinjection. Embryos that had early cleaved at each time point were designated as EC-1 and EC-2, respectively, while others were designated as non-early cleavage (NEC).

Results: At least one early cleavage embryo was observed in 54 (46.6%) for the EC-1 and 84 (72.4%) for the EC-2 of the 116 cycles assessed. Clinical pregnancy rates (PR) were significantly higher in the EC-1 group (66.7%) compared to the EC-2 group (53.6%) or the NEC group (31.2%) ($p < 0.05$). Significant improvement of the pregnancy rate was found when at least two or more embryos were early cleaved at 25 h postinsemination or when the proportion of early cleavage embryo at 25 h postinsemination was higher than 20% ($p < 0.05$).

Conclusions: The critical time-point for the selection of early cleavage embryos with high implantation potential is more effective in 25 h postinsemination/microinjection compared to 27 h. The proportion as well as number of early cleavage embryos is also an important factor for the prediction of pregnancy outcome and the chance of multiple pregnancies. These results demonstrated that the evaluation of early cleavage embryos to 2-cell stage is an easy, simple, and objective method for the selection of good quality embryos suitable for embryo transfer.

Key Words: Early cleaving 2-cell embryos, Pregnancy outcomes

지난 20여 년에 걸쳐 체외수정술의 임신율은 많은 증가를 보였으나 여전히 이식한 배아 수에 비해 착상율은 낮은 편이다. 임신율을 증가시키기 위해 다수의 배아를 이식하게 되었고 그 결과 다태임신의 증가가 체외수정술의 문제점으로 대두되고 있다. 이런 점에서 착상력이 우수한 배아를 선발하고 이식되는 배아의 수를 최소화함으로써 다태임신의 가능성을 감소시킬 필요성이 제기되고 있다.^{1~3}

최근, 전핵단계에서부터^{4~7} 포배아단계까지^{8,9} 착상력이 우수한 배아를 평가하고 선발하려는 많은 연구들이 보고되고 있다. 그러나 포배아단계에서의 선발은 장기 체외배양에 따른 배아의 유전적 불안정성 뿐 아니라 포배아 형성 이전에 배발생 정지 등의 우려가 있어 상용적으로 이용되지 못하고 있다.^{10~12} 또한 인 (nucleolus)의 수와 위치, 전핵과 인의 배열, 세포질의 모양 및 극체의 방향 등을 기준으로 한 전핵단계에서의 배아 선발은 시간이 소요되고 복잡하며 다소 주관적이라는 문제점을 내포하고 있다.¹³ 따라서 보다 간단하고 비침습적이며 효율적인 배아의 선발 방법이 요구되고 있다.¹⁴

1997년 Shoukir 등¹⁵이 2세포기로의 배아 발생 속도에 따른 배아 생존력과 임신 결과를 예측하는 방법을 제시한 이후, 많은 연구들이 조기난할 배아의 관찰이 전핵단계에서의 배아 관찰이나 포배아 이식에 비해 배아의 질과 체외수정의 성공을 예측하는데 보다 빠르고 간단하며 객관적인 방법이 될 수 있음을 보고하고 있다.^{16~19}

그러나 이러한 연구들은 배아 선발을 위한 조기난할의 관찰시간으로 서로 다른 시간대 (time-point)를 이용하였다. 사람에 있어서 첫 번째 세포분열의 시기는 배아마다 차이가 있으며, 어느 특정 시간대에서의 배아의 난할 관정은 2세포기 배아간 차이를 확인할 수 없다. 따라서 본 연구는 체외수정의 임신율을 증가시키기 위한 조기난할 배아 선발의 정확한 시간대 설정 등을 포함한 기준을 제시하고자 한다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

본 연구는 2002년 1월부터 2003년 12월까지 좋은 문화병원 불임클리닉에서 체외수정술을 받은 105명

불임환자로부터의 116주기를 대상으로 하였으며, 수정이 되지 않았거나 휴일 등의 이유로 2세포기로의 조기난할을 관찰하지 않았던 주기는 제외하였다.

2. 연구 방법

1) 과배란 유도

과배란 유도는 GnRH analogue (GnRH α , Lucrin[®], Abbott, France)를 이용한 장요법 또는 단요법을 사용하였으며 hMG (IVF-M[®], LG Inc., Korea)와 highly purified FSH (Follimon[®], LG Inc., Korea)를 생리 3일째부터 투여하여 직경 18 mm 이상인 우성 난포가 2개 이상이면 hCG (IVF-C[®], LG Inc., Korea) 10,000 IU를 근육주사하여 남자성숙 및 배란을 유도하였다.

난자의 채취는 hCG 투여 약 36시간 후 질식초음파 유도 하에 질벽을 통하여 난포의 천자 및 흡입을 시행하였다.

2) 체외수정과 조기난할 관찰

일반적인 체외수정 또는 미세수정 (ICSI)은 난자의 성숙도에 따라 난자채취 5~9시간 후에 시행하였고, 미세수정은 극체가 확인된 성숙 난자만을 대상으로 하였다. 수정 후 16~20시간에 2개의 전핵을 관찰하여 수정여부를 확인했다.

2세포기로의 조기난할은 수정 또는 미세수정 후 25시간과 27시간 2번에 걸쳐 관찰하였고, 이때 관찰된 조기난할 배아는 다른 배양접시로 옮겨 배양했다. 25시간과 27시간에 관찰된 조기난할 배아를 EC (early cleavage)-1, EC-2로, 조기난할이 없는 배아들을 NEC (non-early cleavage)로 정의하였으며, EC-2의 배아 수는 EC-1의 배아 수를 포함한다.

모든 배아는 2일째부터 자가 난구세포를 이용하여 배아이식까지 공배양 하였고 배아이식은 3일째 조기난할된 배아를 우선적으로 선발하여 시행하였다. 배아의 등급은 이식직전에 할구의 크기와 세포질의 단편화의 정도에 따라 결정하였다.

임신의 확인은 배아이식 후 제 12일에 혈중 β -hCG 농도로 확인하였으며, 임신 제 6~7주에 질식초음파에서 태낭 및 태아의 심장박동이 관찰되는 경우를 임상적 임신으로 판정하였다. 착상율은 이식한 배아 수에 대한 태낭의 수로 나타냈다.

Table 1. Comparison of IVF outcomes among EC-1, EC-2 or NEC groups

	EC-1	EC-2	NEC
No. of cycles	54	84	32
Age (yrs)	32.7±4.8	33.2±4.9	35.5±4.5
No. of oocytes	10.1±6.6	10.2±7.1	8.9±5.9
No. of 2PN embryos	9.0±6.5	9.2±6.7	7.7±4.9
No. of EC-1	3.2±2.7*		0
No. of EC-2	5.8±3.9	4.0±3.5	0
No. of embryos transferred	3.6±0.9	3.6±0.8	3.5±1.1
No. of clinical pregnancy (%)	36 (66.7)*	45 (53.6)	10 (31.2)
Implantation rate (%)	27.6*	17.2	9.3

EC-1; 수정 후 25시간째 조기난할된 배아 군, EC-2; 수정 후 27시간째 조기난할된 배아 군 (EC-1 포함), NEC; 조기난할이 전혀 없었던 군. *p<0.05 (EC-1 versus NEC group)

3) 연구 결과 분석

연구 결과에 대한 통계학적 분석은 unpaired student t-test와 chi-square test로 시행하였고, p<0.05인 경우를 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

총 116주기 중 최소 하나 이상의 조기난할 배아는 EC-1의 경우 54주기 (48.6%), EC-2의 경우는 84주기 (72.4%)에서 관찰되었으며, 조기난할이 없었던 경우는 32주기 (27.6%)였다. 임상적 임신율은 EC-1군에서 66.7% (36/54), EC-2에서 53.6% (45/84), NEC에서 31.2% (10/32)였다. 착상율은 각각 27.6%, 17.2%, 9.3%로, EC-1군에서 임신율과 착상율이 EC-2나 NEC보다 유의하게 높았다 (p<0.05). 각 환자군간 연령, 채취된 난자 수, 수정된 배아 수, 이식한 배아 수 등에서는 유의한 차이가 없었다 (Table 1).

수정 후 25시간에 조기난할이 있었던 군 (EC-1)과 그렇지 않은 군의 임상적인 임신율과 착상율을 비교했을 때, EC-1군이 EC-1을 제외한 EC-2와 NEC를 포함한 군보다 유의하게 높게 나왔다 (Table 2). 또한 EC-1 배아의 수와 전체 채취된 난자 수 가운데 EC-1 배아의 비율에 따른 체외수정의 결과를 분석한 결과, EC-1 배아가 적어도 두 개 이상인 경우 (Table 3)와 EC-1 배아의 비율이 20% 이상일 경우

Table 2. Comparison of IVF outcomes between with and without early cleavage at 25 h postinsemination

	EC-1	EC-2 ^a + NEC
No. of cycles	54	62
Age (yrs)	32.7±4.8	34.2±4.8
No. of oocytes	10.1±6.6	8.7±6.3
No. of 2PN embryos	9.0±6.5	7.6±5.9
No. of EC-1	3.2±2.7 ^b	0
No. of embryos transferred	3.6±0.9	3.5±1.0
No. of clinical pregnancy (%)	36 (66.7) ^b	19 (30.6)
Implantation rate (%)	27.6 ^b	8.9

EC-1; 수정 후 25시간째 조기난할된 배아 군

^aEC-2; EC-1 배아를 제외한 EC-2 배아 수, NEC; 조기난할이 전혀 없었던 군

^bp<0.05 (EC-1 versus EC-2 + NEC group)

임상적인 임신율과 착상율이 유의하게 높게 나타났다 (Table 4). 그러나 각 군간 연령, 채취된 난자 수, 수정된 배아 수, 이식된 배아의 수에서는 유의한 차이가 없었다.

고 찰

다양한 과배란 유도과 배양기술의 발달에도 낮은

Table 3. Analysis of IVF cycle parameters according to the number of EC-1 embryos

	0	1	2	3≤
No. of cycles	62	15	13	26
Age (yrs)	34.2±4.8	33.9±5.5	33.5±5.1	31.7±4.2
No. of oocytes	8.7±6.3	7.6±7.0	9.2±6.6	12.0±6.1
No. of 2PN embryos	7.6±5.9	6.5±6.6	8.1±6.3	10.9±6.1
No. of EC-1	0	1	2.0	5.0±2.8
No. of EC-2	4.0±3.5	2.2±1.3	5.2±3.0	7.1±4.0
No. of embryos transferred	3.5±1.0	3.1±1.0	3.5±0.9	3.4±0.7
No. of clinical pregnancy (%)	30.6 ^a	46.7	61.5 ^b	76.9 ^b
Implantation rate (%)	8.9 ^a	15.3	24.4 ^b	33.7 ^b

EC-1; 수정 후 25시간째 조기난할된 배아 군, EC-2; 수정 후 27시간째 조기난할된 배아 군 (EC-1 포함), NEC; 조기난할이 전혀 없었던 군. p<0.05 (^b versus ^a)

Table 4. Analysis of IVF cycle parameters according to the proportion of EC-1 embryos

	0	≤20%	20%<
No. of cycles	62	13	41
Age (yrs)	34.2±4.8	33.2±5.2	32.6±4.8
No. of oocytes	8.7±6.3	14.1±7.9	8.9±5.7
No. of 2PN embryos	7.6±5.9	12.6±7.9	7.9±5.6
No. of EC-1	0	1.5±0.9	3.7±2.8 ^b
No. of EC-2	4.0±3.5	3.5±0.5	3.6±0.9
No. of embryos transferred	3.5±1.0	3.3±1.2	3.5±1.1
No. of clinical pregnancy (%)	30.6 ^a	46.5	68.3 ^b
Implantation rate (%)	8.9 ^a	17.7 ^b	29.5 ^b

EC-1; 수정 후 25시간째 조기난할된 배아 군, EC-2; 수정 후 27시간째 조기난할된 배아 군 (EC-1 포함), NEC; 조기난할이 전혀 없었던 군. p<0.05 (^b versus ^a)

착상율에 비해 다태임신율 증가는 사람의 체외수정술에서 해결해야 할 과제로 남아 있다. 다태임신의 증가 원인은 착상력이 우수한 배아의 정확한 평가와 선별 방법의 부재에 따른 다수의 배아를 이식하는데 있다. 따라서 이식에 가장 적합한 생존력 있는 배아를 선별하는 정확한 방법이 확립된다면 다태임신의 증가는 극복될 수 있을 것이다. 이런 점에서 생존력 있고 높은 착상율을 가진 배아를 선별하는 방법을 모색하려는 많은 연구들이 시도되고 있다.

최근 2세포기까지의 첫 번째 난할속도를 이용한

배아의 질과 임신율을 예측하는 방법들이 보고되고 있다.^{15-17,20,21} 지금까지의 결과들은 배아의 조기난할이 배아의 질과 임신 결과를 예측하는 매우 유용한 인자임을 시사하고 있다. 본 연구에서도 2세포기로의 조기난할과 임신율 증가가 직접적인 연관이 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들은 조기난할 배아의 관찰이 간단하고 비침습적이며, 생존 배아의 선별과 체외수정의 임신 결과를 예측하는데 있어서 중요한 방법임을 의미한다.

그러나 사람의 배아가 2세포기로 조기분열하는 정

확한 시간은 연구자들마다 20시간에서 29시간으로 다양하고 임신율과 착상율에 영향을 줄 수 있는 결정적인 시간대에 대해서는 논란이 되고 있다. Nagy 등²²은 미세수정 20시간 후에 11%의 배아가, Van Wissen 등²³은 약 30%의 배아가 수정 후 25.5시간에서 27시간에, Sakkas 등¹⁶은 미세수정 후 27시간에 61%의 배아가 2세포기 배아로 난할됨을 보고하였다. 또한 Bos-Mikich 등¹⁸은 수정 또는 미세수정 후 25시간에서 29시간 사이에 2세포기 단계에 이른 배아를 선택하여 이식하는 것이 체외수정술을 시도하는 환자들에서 예후가 좋다고 제안하였다. Fendwick 등²⁰과 Lundin 등¹⁷은 수정 후 25시간과 25~27시간이 배아의 발생능력을 결정할 수 있는 가장 좋은 지표라고 하였다. 어느 특정 시간대에서의 배아의 관찰은 비록 조기난할된 배아가 그렇지 못한 배아보다 먼저 난할을 하였다 할지라도 그 난할속도의 차이를 관찰할 수 없을 수 있다. 따라서 조기난할 배아의 선발을 위한 결정적 시간대의 결정은 배아간 차이를 극대화하는데 무엇보다도 중요한 요인이 되고 있다.

본 연구에서는 아직까지 많은 논란이 되고 있는 수정 또는 미세수정 후 25시간 (EC-1)과 27시간 (EC-2)에 첫 번째 난할을 관찰한 결과, 수정 후 25시간에 조기난할이 있었던 배아군에서 27시간이나 조기난할이 없었던 군 (NEC)보다 임신율과 착상율이 높았다. 이러한 결과는 수정 후 25시간에 조기난할이 있었던 군에서 조기난할이 없었던 군보다 임신율이 유의하게 높다는 Shoukir 등의 결과와 일치하며, 수정 후 25시간에서 조기난할을 관찰하는 것이 27시간째보다 효과적임을 시사하고 있다.¹⁵

체외수정술 한 주기 당 조기난할된 배아의 수 역시 임신율과 착상율에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다.^{15,16} 이러한 결과들은 조기난할이 하나 또는 하나도 없었던 군보다 두 개 또는 세 개의 조기난할된 배아가 있었던 군에서 임신율이 현저하게 높았던 본 연구 결과와 일치하였다. 이외도 본 연구에서는 채취한 난자 수에 대한 조기난할 배아의 비율과 착상율 및 임신율에 유의한 관계가 있음을 발견하였는데, 전체 채취된 난자 중에 조기난할된 배아가 20% 이상인 경우 임신율이 유의하게 증가하였다. 저자 등의 문헌고찰에 의하면 본 연구가 임

신 결과의 예측을 위한 cut-off value로서 조기난할된 배아의 비율을 처음으로 제시한 연구인 것으로 사료된다.

조기난할 배아의 선발이 임신율을 증가시키는 이유는 확실하지 않으나 난자의 성숙도 또는 수정 후 배아의 조기분열을 촉진하거나 도와주는 난자 내의 인자 등 여러 가지 원인이 추론되고 있다.²⁴ 이로 인해 조기난할이 있는 배아는 조기난할이 없는 배아에 비해 배아의 형태나¹⁷ 할구 수,¹⁹ 포배아 형성 속도²⁰ 등에 있어서 더 좋은 양상을 보여주고 있다.

일반적으로 미성숙 난자들은 성숙 난자보다 늦게 수정이 되며 난할 또한 늦어진다고 한다.²⁴ 물론 미세수정이 성숙한 난자에서만 적용되기 때문에 난자의 성숙도와 배아의 조기난할과 관계가 없다는 가능성이 제기되기도 한다.^{18,25} 그러나 이러한 연구는 제 1 극체의 형성과 정자 주입사이의 시간차를 고려하지 않고 있다. Balakier 등은 미세수정과정 전에 배양시간을 증가시키면 수정율과 발달율이 증가한다고 보고하면서 난자의 활성이 제 2 감수분열 중기 정지기간과 밀접한 연관이 있음을 제안하였다.²⁶ 따라서 미세수정이 동일한 제 2 감수분열 중기 정지기간을 지닌 성숙 난자에서 시행되었을 때 2세포기까지의 조기난할율의 비교 연구가 필요할 것으로 사료된다.

배아의 조기난할에 관여하는 난자 내 미지의 여러 인자들 중 첫 번째 후보군으로 human leukocyte antigen (HLA-G)의 발현이 난할속도의 증가와 관련이 있는 것으로 보고되고 있다.²⁷ 두 번째 인자로는 난자내의 ATP 양이다. 난자내 ATP 양은 배아의 발생 정도에 따라 매우 다양하며^{28,29} 발생속도가 느린 사람의 배아는 ATP 양과 같은 모계의 mRNA가 결핍될 수 있음이 제기되고 있다.³⁰ ATP 생성은 미토콘드리아의 양과 매우 밀접하다. 최근 하나의 배아에서 유래한 할구들 간 또는 한 사람 유래의 배아들 간 미토콘드리아 DNA의 수가 다양한 것으로 보고되고 있다.³¹ 그러므로 앞으로 난자 내 미토콘드리아 DNA 수와 배아의 조기난할 능력의 관계에 관한 연구가 수반되어야 할 것이다.

결론적으로, 본 연구는 수정 또는 미세수정 후 25시간이 27시간보다 높은 착상능력을 지닌 조기난할 배아의 선발에서 보다 효과적인 시간대이며, 조

기난할 배아의 수 뿐 아니라 비율 또한 체외수정술의 임신 결과를 예측할 수 있는 중요한 인자임을 보여주고 있다. 이러한 결과들은 2세포기로의 조기 난할 관찰이 높은 생존력과 착상능을 지닌 배아를 선별하는 쉽고 간단하고 객관적인 방법이 될 수 있음을 시사하고 있다.

참 고 문 헌

- Gerris J, De Neubourg D, Mangelschots K. Elective single day 3 embryo transfer halves the twinning rate without decrease in the ongoing pregnancy rate of an IVF/ICSI programme. *Hum Reprod* 2002; 17: 2626-31.
- Hamberger L, Hazekamp J. Towards single embryo transfer in IVF. *J Reprod Immunol* 2002; 55: 141-8.
- De Sutter P, Van der Elat J, Coetsier T, Dhont M. Single embryo transfer and multiple pregnancy rate reduction in IVF/ICSI: a 5 year appraisal. *Reprod BioMed Online* 2003; 6: 464-9.
- Scott L, Smith S. The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum Reprod* 1998; 13: 1003-13.
- Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal pre-implantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* 1999; 14: 1318-23.
- Ludwig M, Schopper B, Al-Hasani S, Diedrich K. Clinical use of a pronuclear stage score following intracytoplasmic sperm injection: impact on pregnancy rates under the conditions of the German embryo protection law. *Hum Reprod* 2000; 15: 325-9.
- Scott L. The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos. *Fertil Steril* 2003; 9: 237-49.
- Gardner D. Development of serum-free media for the culture and transfer of human blastocysts. *Hum Reprod* 1998; 13: 218-25.
- Milki AA, Hinckley MD, Fisch JD, Dasig D, Behr B. Comparison of blastocyst transfer with day 3 embryo transfer in similar patient populations. *Fertil Steril* 2000; 73: 126-9.
- Van Blerkom J. Can the developmental competence of early human embryos be predicted effectively in the clinical IVF laboratory? *Hum Reprod* 1997; 12: 1610-4.
- Behr B, Fisch JD, Racowsky C, Miller K, Pool TB, Milka AA. Blastocyst ET and monozygotic twinning. *J Assist Reprod Genet* 2000; 17: 349-51.
- Da Costa ALE, Abdelmassih S, de Oliveira FG, Abdelmassih B, Abdelmassih R, Nagy ZP, et al. Monozygotic twins and transfer at the blastocyst stage after ICSI. *Hum Reprod* 2001; 16: 333-6.
- Zollner U, Zollner P, Hartl G, Dielt J, Steck T. The use of a detailed zygote score after IVF/ICSI to obtain good quality blastocysts: the German experience. *Hum Reprod* 2002; 17: 1327-33.
- Scott L. Pronuclear scoring as a predictor of embryo development. *Reprod BioMed Online* 2003; 6: 201-14.
- Shoukir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Reprod* 1997; 12: 1531-6.
- Sakkas D, Shoukir T, Chardonens D, Bianchi PG, Campana A. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum Reprod* 1998; 13: 182-7.
- Lundin K, Bergh C, Hardarso T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod* 2001; 16: 2652-7.
- Bos-Mikich A, Mattos ALG, Ferrari AN. Early cleavage of human embryos: an effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome. *Hum Reprod* 2001; 16: 2658-61.
- Sakkas D, Percival G, D'Arcy Y, Sharif K, Afnan M. Assessment of early cleaving in vitro fertilized human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection. *Fertil Steril* 2001; 76: 1150-6.
- Fenwick J, Platteau P, Murdoch AP, Herbert M. Time

- from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Hum Reprod* 2002; 17: 407-12.
21. Wharf E, Dimitrakopoulos A, Khalaf Y, Pickering S. Early embryo development is an indicator of implantation potential. *Reprod BioMed Online* 2003; 8: 212-8.
 22. Nagy Z, Liu J, Joris H. Time-course of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in human oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1994; 9: 1743-8.
 23. Van Wissen B, Wolf JP, Bomsel-Helmreich O. Timing of pronuclear development and first cleavages in human embryos after subzonal insemination: influence of sperm phenotype. *Hum Reprod* 1995; 10: 642-8.
 24. Balakier H, MacLusky NJ, Casper RF. Characterization of the first cell cycle in human zygotes: implications for cryopreservation. *Fertil Steril* 1993; 59: 359-65.
 25. Isiklar A, Mercan R, Balaban B, Alatas C, Aksoy S, Urman B. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage. *J Reprod Med* 2002; 47: 540-4.
 26. Balakier H, Sojecki A, Motamedi G, Librach C. Time-dependent capability of human oocytes for activation and pronuclear formation during metaphase II arrest. *Hum Reprod* 2004; 19: 982-7.
 27. Jurisicova A, Casper RF, MacLusky NJ. HLA-G expression during preimplantation human embryo development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 161-5.
 28. Van Blerkm J, Davis PW, Lee J. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* 1995; 10: 415-24.
 29. Martin W, Dale B, Marino M, Matteo LD, Alviggi C, Pisaturo ML, et al. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod* 2001; 16: 909-17.
 30. Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 1988; 332: 459-61.
 31. Lin DPC, Huang CC, Wu HM, Cheng TC, Chen CI, Lee MS. Comparison of mitochondrial DNA contents in human embryos with good or poor morphology at the 8-cell stage. *Fertil Steril* 2004; 81: 73-9.