

동결수정란 이식주기에서 수정란 융해 후 생존율과 임신율에 영향을 미치는 요인

성균관대학교 의과대학 삼성제일병원 생식생물학 및 불임연구실, 산부인과¹

김정옥 · 변혜경 · 염혜원 · 전진현 · 박용석 · 송인옥¹ · 송지홍¹
최범채¹ · 궁미경¹ · 전종영¹ · 강인수¹

Analysis of Factors Affecting Survival and Pregnancy Rate in Frozen-thawed Embryo Transfers

Jeong-Wook Kim, Hye Kyung Byun, Hye Won Youm, Jin Hyun Jun, Yong-Seog Park,
In Ok Song¹, Ji Hong Song¹, Bum Chae Choi¹, Mi Kyoung Koong¹,
Jong Young Jun¹, Inn Soo Kang¹

Laboratory of Reproductive Biology & Infertility, Department of OB/GYN¹ Samsung Cheil Hospital & Women's Healthcare Center Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

Objective: The purpose of this study was to determine the important factors affecting survival and pregnancy rate in frozen-thawed embryo transfer cycles.

Methods: We performed retrospective analysis in 738 cycles of frozen-thawed embryo transfers, in relation to the insemination methods, the freezing stage of embryo, patient's age, infertility factors and the origin of injected sperm in ICSI cycles. After conventional IVF or ICSI, the supernumerary PN stage zygotes or multicellular embryos were cryopreserved by slow freezing protocol with 1,2-propanediol (PROH) as a cryoprotectant.

Results: The survival rates of thawed embryos were 69.3% (1585/2287) in conventional IVF group and 71.7% (1645/2295) in ICSI group. After frozen-thawed embryo transfers, 27.0% (92/341) and 32.0% (109/341) of pregnancy rates were achieved in conventional IVF and ICSI group, respectively. There were no significant difference in the survival and pregnancy rates according to the insemination methods, the freezing stage and patient's age. However, the pregnancy rate (36.2%) of male factor infertility was significantly higher than the tubal (27.2%) and other female factor infertility (22.9%). In ICSI group, the origin of injected sperm did not affect the outcome of frozen-thawed embryo transfer cycles.

Conclusion: The present study demonstrates that acceptable clinical outcomes can be achieved after the transfer of frozen-thawed embryos regardless of the stage of embryos for freezing, the patient's age and the origin of injected sperm.

Key Words: Cryopreservation, Intracytoplasmic sperm injection (ICSI), Survival rate, Pregnancy rate, Infertility factors

동결수정란 이식으로 최초 임신이 성공한 이래,¹ 수정란의 동결보존은 매우 보편적인 보조생식술 중의 하나로 자리잡았다. 국내에서도 1980년대 후반부터 수정란 동결보존법이 보급되어 현재 많은 기관에서 수정란의 동결보존을 시행하고 있으며 좋은 성적을 보고하고 있다.^{2,3} 1990년대 초반 세포질내 정자주입술 (ICSI)이 도입됨으로써⁴ 일반적인 체외수정방법으로는 수정이 어려웠던 환자들에게서도 높은 수정률을 얻을 수 있게 되었으며 ICSI 방법으로 수정된 수정란의 동결-융해 후 이식에서도 만족할 만한 임상결과를 얻고 있다.⁵⁻⁷ 수정란 동결보존의 장점으로는 여러 번의 과배란 유도 없이 한번의 과배란 유도로 얻어진 수정란으로 누적 임신율을 증가시킬 수 있으며, 이식하는 수정란의 수를 제한하여 다태아 임신을 예방할 수 있다. 또한, 과배란 증후군이 예상되는 환자에서 모든 수정란을 동결보존하여 다음 주기에 이식함으로써 환자를 보호할 수 있다. 이러한 수정란의 동결보존은 수정란의 동결시기, 동해억제제의 종류 등에 따라 임상결과에서 약간의 차이를 보이고 있으나, 일반적으로 전핵시기나 4~8세포기의 수정란은 1,2-propanediol (PROH)로 동결하는 방법이 가장 많이 이용되고 있으며,⁸⁻¹¹ 고농도의 동해억제제를 이용하여 포배기 수정란을 급속 냉동 (vitrification)하는 방법도 보고되었다.¹²⁻¹⁵ 그러나, 이러한 수정란의 동결-융해 후 임상적 결과에 영향을 줄 수 있는 요인에 대한 연구는 많지 않은 실정이다.

따라서 본 연구에서는 일반적인 체외수정 및 세포질내 정자주입술 후 얻어진 잉여의 수정란을 동결-융해한 후 이식한 주기에서 수정란의 수정방법, 수정란의 동결시기, 환자의 나이, 불임원인 그리고 세포질내 정자주입술시 이용된 회수정자의 종류 등이 수정란의 생존율 및 임신율에 미치는 영향을 분석하여, 동결수정란 이식주기에서 임상적 결과에 영향을 미치는지 요인에 대해 알아보고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

본 연구는 삼성제일병원 불임클리닉에서 시험관아기술 후 잉여의 수정란을 동결보존한 환자 중 1996년 1월부터 1998년 12월까지 동결수정란을 융해한 후 이식을 시행한 726명의 738주기를

대상으로 하였다. 연구 대상을 수정란의 수정방법, 동결시기, 환자의 연령, 불임의 원인 그리고 세포질내 정자주입술 시행 시 이용한 회수정자의 종류 등에 따라 구분하여 수정란 동결-융해 후 수정란의 생존율과 수정란 이식 후 임신율을 비교하였다.

2. 과배란 유도

난자를 획득하기 위한 과배란 유도는 FSH/hMG와 GnRH-agonist를 병용하여 사용하였으며, 18 mm 이상의 난포가 2개 이상 존재하는 경우 10,000 IU의 hCG를 주사하였고, 주사 후 34시간에 질식 초음파를 이용하여 난자를 채취하였다.

3. 난자 및 정자의 준비

채취한 난자-난구 복합체는 1차적으로 광학현미경하에서 성숙도를 판정하였다. 일반적인 체외수정을 시행하는 경우는 난자채취 후 6~8시간에 남편의 정자를 난자가 있는 배양접시에 넣어주는 방법으로 insemination했으며, ICSI를 시행하는 경우는 난자채취 후 3~4시간에 0.1% hyaluronidase를 처리하여 난구세포를 제거하고 난자의 성숙도를 확인하여 제 1극체가 방출된 제 2 감수분열중기 (metaphase II)의 성숙난자만을 ICSI에 사용하였다.

정자의 준비는, 일반적인 체외수정을 시행하는 경우에는 Percoll gradient centrifugation 방법으로 운동성이 좋은 정자를 회수하여 insemination에 이용하였다. ICSI를 시행하는 경우, 사정정자는 Percoll gradient centrifugation 방법을 이용하였고, MESA (microsurgical epididymal sperm aspiration) 방법으로 채취한 부고환정자는 swim-up 방법으로 운동성 정자를 회수하여 ICSI에 이용하였으며, TESE (testicular sperm extraction) 방법으로 채취한 고환정자는 0.4% BSA (bovine serum albumin, Sigma)가 포함된 HTF (human tubal fluid, Irvine) 배양액에서 ICSI 시행 전까지 5% CO₂, 95% air 조건의 배양기에 보관하였다.

4. 동결보존 과정

전핵시기 수정란의 경우, 수정을 시킨 후 16~18시간에 광학현미경하에서 수정 여부를 관찰하여 두개의 전핵이 뚜렷하게 보이는 수정란만을 동결보존에 이용하였으며, 4~8세포기의 수정란의 경우, 난자채취 3일 후 이식하고 남은 수정란

중 fragmentation이 50% 이하인 수정란을 동결하였다. 동결보존 과정은 기존에 보고된 일반적인 방법을 이용하였다.^{3,11} 즉, 20% 제대혈청이 포함된 Dulbecco phosphate buffered saline (dPBS; GIBCO Laboratory)을 기본배양액으로 하여 1.5 M의 PROH와 0.1 M의 sucrose를 동해억제제로 사용하였다. 즉, 수정란을 1.5 M PROH에서 10분, 1.5 M PROH / 0.1 M sucrose에서 10분씩 상온에서 처리한 후 2개의 수정란을 0.25 ml straw에 동결용액 50 μ l와 함께 넣고 양쪽 끝을 뜨거운 forcep이나 sealing powder로 봉합하여 세포 동결기 (Kryo-10, Planer)를 이용하여 완만 냉각방법으로 동결하였다. 동결과정은 세포 동결기를 이용하여 상온에서 -7 $^{\circ}$ C까지 -2 $^{\circ}$ C/min의 속도로 냉각하였고, -7 $^{\circ}$ C에서 미리 액체질소에서 냉각시킨 forcep을 이용하여 식빙 (seeding)을 시행한 후 10분간 정지시켰다. 정지 후 -7 $^{\circ}$ C부터 -40 $^{\circ}$ C까지 -0.3 $^{\circ}$ C/min의 속도로 냉각시킨 후 straw를 액체 질소통에 직접 넣어 해빙시킬 때까지 -196 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

5. 해빙 및 수정란 이식 과정

해빙은 급속 해빙방법 (500 $^{\circ}$ C/min)을 이용하였다. 즉, 액체 질소통에서 꺼낸 straw를 상온에서 40초간 방치한 후 35 $^{\circ}$ C 항온수조에서 완전히 녹을 때까지 시행하였다. 해빙된 수정란은 1.0 M PROH + 0.2 M sucrose, 0.5 M PROH + 0.2 M sucrose에서 각각 5분씩 처리한 후 0.2 M sucrose와 dPBS에서 10분씩 처리하여 10% SSS (Synthetic serum substitute, Irvine)가 포함된 HTF (Human tubal fluid, Irvine) 배양액으로 옮겨 이식 시까지 배양하였다.

해빙된 전핵시기의 수정란의 경우, 3~4시간 배양하여 전핵이 보이고 세포질이 투명한 경우에 생존한 것으로 판정하였고 2일간 배양하여 이식하는 날 아침에 2세포기 이상으로 발생한 수정란만을 이식하였으며, 4~8세포기의 수정란은 최초 할구수의 50% 이상의 할구가 생존한 경우를 생존

한 것으로 판정하였다. 수정란 이식 전에 보조부화술을 병행하는 경우에는 이식하는 날 아침에 정상적으로 발생한 양질의 수정란만을 대상으로 0.2% acid Tyrode's solution을 이용하여 투명대의 일부분을 녹여주는 방법을 이용하였다.^{16,17} 보조부화술 시행 3~5시간 후에 수정란을 자궁 내에 이식하였으며 임신에 대한 확인은 이식 후 10일째에 혈청 내 β -hCG를 측정하여 5 mIU 이상인 경우를 임신으로 판정하였으며 2일 간격으로 계속 측정하여 증가양상을 보이고 7주째에 태아의 심박동이 초음파로 확인된 경우를 임상적 임신으로 판정하였다.

6. 통계처리

결과에 대한 통계적 분석은 ABStat (rel 6.54, Anderson-Bell Co.)의 Chi-square test를 이용하였고, p값이 0.05 이하인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 수정방법에 따른 비교

일반적인 체외수정방법으로 얻어진 수정란을 융해한 364주기에서 2287개의 수정란을 융해한 결과, 69.3%인 1585개의 수정란이 생존하였고 92주기에서 임신에 성공하여 27%의 임신율을 보였으며 세포질내 정자주입술로 얻어진 2295개의 수정란 중 1645개가 생존하여 71.7%의 생존율을 보였고 109주기에서 임신에 성공하여 32%의 임신율을 나타내었다 (Table 1).

2. 수정란의 동결시기에 따른 비교

전핵시기 526주기, 4~8세포기 176주기 그리고 두 가지 시기의 수정란을 동시에 융해한 36주기에서 생존율은 전핵시기에서 72.4%로 가장 높았으나 통계적인 유의성은 없었으며 임신율도 비슷하였다 (Table 2).

Table 1. Survival rates and pregnancy rates of frozen-thawed embryos obtained from conventional IVF and ICSI

	No. of thawed cycles	No. of thawed embryos	No. of survived embryos	Survival rate (%)	No. of Pregnant cycles	Pregnancy rate (%)
IVF	364	2287	1585	69.3	92	27.0
ICSI	374	2295	1645	71.7	109	32.0

Table 2. Comparison of survival rates and pregnancy rates of frozen-thawed embryos according to the freezing stage

Stage of Embryos	No. of thawed cycles	No. of thawed embryos	No. of survived embryos	Survival rate (%)	No. of Pregnant cycles	Pregnancy rate (%)
PN	526	3376	2444	72.4	150	29.8
EM	176	924	601	65.0	38	26.4
PN + EM	36	298	187	62.8	13	38.2

PN, pronuclear stage zygotes; EM, 4~8 cell stage embryos.

Table 3. Comparison of survival rates and pregnancy rates of frozen-thawed embryos according to the patient's age

Age	No. of thawed cycles	No. of thawed embryos	No. of survived embryos	Survival rate (%)	No. of Pregnant cycles	Pregnancy rate (%)
< 31	228	1410	995	70.6	58	27.1
31~35	375	2325	1649	70.9	102	29.1
36~40	127	799	548	68.6	37	33.6
> 40	8	48	38	79.2	3	37.5

Table 4. Comparison of survival rates and pregnancy rates of frozen-thawed embryos according to the infertility factors

Etiology	No. of thawed cycles	No. of thawed embryos	No. of survived embryos	Survival rate (%)	No. of Pregnant cycles	Pregnancy rate (%)
Male	267	1640	1201	73.2	89	36.2 ^a
Tubal	263	1694	1150	67.9	66	27.2 ^b
Others*	202	1211	856	70.7	43	22.9 ^b

* Female infertility factors except tubal factor. a vs b: $p < 0.01$.

Table 5. Comparison of survival rates and pregnancy rates of frozen-thawed embryos according to the origin of retrieved sperm in ICSI

Origin of sperm	No. of thawed cycles	No. of thawed embryos	No. of survived embryos	Survival rate (%)	No. of Pregnant cycles	Pregnancy rate (%)
Ejaculated	225	1352	962	71.2	68	32.7
Epididymal	31	171	130	76.0	11	39.3
Testicular	75	492	356	72.4	21	30.9

3. 환자의 나이에 따른 비교

대상 환자를 나이별로 30세 이하, 31~35세, 36~40세, 41세 이상으로 나누어 수정란의 생존율 및 임신율을 비교해 본 결과, 일반적인 체외수정

시술의 결과와는 달리 나이가 증가하여도 각각의 군에서 27.1%, 29.1%, 33.6%, 37.5%로 임신율이 감소하지 않았으며 생존율도 유의한 차이가 없었다 (Table 3).

4. 불임원인에 따른 비교

남성불임요인만을 갖고 있는 환자에서 생존율(73.2%)이 가장 높았으며 임신율은 남성요인군이 36.2%로 난관요인군(27.2%)과 그 밖의 여성요인군(22.9%)에 비해 통계적으로 유의하게 ($p < 0.01$) 높은 결과를 보였다 (Table 4).

5. 세포질내 정자주입술 시행 시 이용된 회수 정자의 종류에 따른 비교

세포질내 정자주입술로 얻어진 수정란을 동결-융해 후 이식한 총 374례 중, 사정정자를 이용한 경우는 225례였으며, 부고환정자를 이용한 경우는 31례, 고환정자를 이용한 경우는 75례였다. 각 군간 수정란의 생존율과 임신율은 유의한 차이를 보이지 않았다 (Table 5).

고 찰

난자 및 수정란의 동결보존에 대한 연구는 오래 전부터 시작되었지만 난자의 경우 염색체의 특성상 아직까지 만족할 만한 결과를 얻지 못하고 있다.^{18,19} Kazem 등²⁰은 동결-융해 후 얻은 74개의 난자를 일반적인 체외수정방법과 ICSI 방법으로 나누어 수정시킨 결과 ICSI 방법의 수정률이 유의하게 높았다고 보고한 바 있으나 난자의 동결-융해 후 생존율과 그 후의 수정률이 너무 낮아 실용화 하기에는 어려운 것으로 보고한 바 있다. 그러나 수정란의 경우 동결시기 또는 동해억제제의 종류에 따라 결과에서 약간의 차이를 보이는 하지만,^{10,21~23} 전핵시기 및 4~8세포기의 수정란을 PROH를 이용하여 완만 동결시키는 방법이 가장 널리 이용되고 있다.

ICSI 방법이 개발되면서 이식 후 남은 잉여의 수정란을 동결보존할 필요성이 많아졌고 이에 따라 ICSI 후에 얻어진 수정란을 동결-융해 한 후 이식한 임상결과에 대해 많이 보고되고 있다.^{7,24} 대부분의 보고에서 전핵시기 및 다세포시기의 수정란을 동결-융해한 결과 일반적인 체외수정방법으로 얻어진 수정란과 세포질내 정자주입술로 얻어진 수정란의 결과가 차이가 없는 것으로 보고하고 있으며, 또한 본원의 결과에서도 큰 차이가 없었다.² 본 연구에서도 일반적인 체외수정방법으로 얻어진 수정란과 세포질내 정자주입술로 얻어진 수정란을 동결-융해한 후 이식한 결과, 수정

란의 동결시기에 관계없이 수정란의 생존율과 임신율에서 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서, 세포질내 정자주입술을 시행한 수정란도 성공적으로 동결보존할 수 있음을 알 수 있었다.

수정란의 동결시기를 전핵시기, 다세포시기 그리고 두 시기의 수정란을 동시에 동결한 경우로 나누어 결과를 분석해 본 결과, 생존율에서는 전핵시기가 가장 높게 나타났으나 통계적 유의성은 없었으며 임신율도 비슷하게 나타나 수정란의 동결시기가 임상결과에 큰 영향을 주지 못함을 알 수 있었다.

일반적인 체외수정의 경우, 환자의 연령이 높을수록 난소나 자궁의 기능이 저하되기 때문에 낮은 임신율을 나타내는 것으로 생각되며 세포질내 정자주입술을 시행한 경우에도 35세 이상에서는 낮은 임신율을 보고하고 있다.²⁵ 그러나 본 연구에서는 환자의 연령이 증가하여도 수정란의 융해 후 생존율 및 임신율은 낮아지지 않았다. 이는 환자의 연령이 높더라도 동결보존 가능한 수의 난자가 획득된다면, 난소나 자궁의 기능이 크게 저하되지 않았다는 것으로 판단할 수 있으므로 높은 연령의 환자에서 다수의 수정란이 확보된다면 성공적으로 동결-융해하여 누적 임신율을 높일 수 있는 것으로 사료된다.

불임의 원인은 매우 다양하며 크게 남성요인과 여성요인으로 나누고 있다. 체외수정시술의 경우, 일반적으로 수정과정의 문제가 해결된다면 남성요인만을 갖는 환자의 임신율이 여성요인을 갖는 군에 비해 높게 보고되고 있다. 본 연구의 동결수정란 이식주기에서도 비슷한 결과를 얻었다. 즉, 남성요인만을 갖는 환자군의 경우 가장 높은 수정란 생존율을 나타내었으며 임신율의 경우, 다른 불임요인들(난관요인, 기타 여성불임요인)을 갖는 환자보다 통계적으로 유의하게 ($p < 0.01$) 높게 나타났다. 즉, 일반적인 체외수정의 경우, 자궁이나 난소 등의 여성불임요인이 있는 경우에는 양질의 수정란을 이식하여도 낮은 임신성공률을 보이는 것처럼 동결수정란 이식주기에서도 여성불임요인이 없는 경우에는 높은 임신율을 기대할 수 있음을 시사하고 있다.

본원에서는 이미 세포질내 정자주입술을 이용하여 사정정자, 부고환정자, 고환정자 및 동결-융해한 고환정자를 이용하여 높은 수정률과 임신율을 보고한 바 있으며,^{26~28} 본 연구결과에서도 이러한 여러 부위에서 채취한 정자를 이용하여 세

포질내 정자주입술을 시행하여 얻어진 수정란을 동결-융해한 후 이식하였을 경우 높은 수정란 생존율과 임신율을 보여 회수된 정자를 이용하여 수정이 확인되면, 동결-융해한 수정란의 이식의 결과에는 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.

결론적으로, 수정란의 동결-융해 후 이식주기에서 임상적 결과에 영향을 줄 수 있는 많은 요인들을 분석한 결과, 수정란의 동결시기, 환자의 나이, 세포질내 정자주입술시 이용된 정자의 종류 등은 결과에 큰 영향을 주지 못하는 것으로 생각되며 여러 불임요인 중, 남성불임요인만을 갖는 환자군에서 가장 높은 임신율을 나타낸 것으로 보아 불임의 원인이 수정란의 동결-융해 후 결과에 가장 큰 영향을 미치는 것으로 생각되며 이러한 남성불임요인만을 갖는 환자의 경우에는 획득되는 난자의 수도 비교적 많으므로 다수의 잉여의 수정란을 동결보존할 경우, 높은 누적 임신율을 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Trounson AO, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservaion, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983; 305: 707-9.
2. 양현원, 최규완, 강희규, 차영범, 이승재, 박종민. 동결보존 과정 중 동결 및 해빙 배양액 내 삼투압의 변화가 수정란의 생존율과 발생률에 미치는 영향. *대한불임학회지* 1996; 23(2): 129-36.
3. 김정욱, 한미현, 변혜경, 전진현, 손일표, 궁미경 등. 일반적인 체외수정방법과 세포질내 정자주입술로 얻어진 수정란의 동결-융해 후 이식의 결과. *대한불임학회지* 1997; 24(1): 111-8.
4. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem A. Pregnancy after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340: 17-8.
5. Van Steirteghem AC, Joris H, Van der Elst J, Camus M, Van den Abbeel E, Devroey P. Cryopreservation of supernumerary multicellular human embryos obtained after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1994; 62: 775-80.
6. Van der Elst J, Van den Abbeel E, Joris H, Camus M, Devroey P, Van Steirteghem AC. Cryopreservation of supernumerary multicellular human embryos obtained after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1994; 9 (Suppl.4): 55.
7. Al-Hasani S, Ludwig M, Gagsteiger F, Kupker W, Sturm R, Yilmaz A, et al. Comparison of cryopreservation of supernumerary pronuclear human oocytes obtained after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and after conventional in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1996; 11: 604-7.
8. Fugger EF, Dorfmann AD, Bustillo M, Bender SD, Katz LP, Schulman JD. Embryonic development and pregnancy from fresh and cryopreserved sibling pronucleate human zygotes. *Fertil Steril* 1988; 50: 273-8.
9. Fugger EF, Bustillo M, Dorfmann AD, Schulman JD. Human preimplantation embryo cryopreservation: Selected aspects. *Hum Reprod* 1991; 6: 131-5.
10. Demoulin A, Jouan C, Gerday C, Dubois M. Pregnancy rates after transfer of embryos obtained from different stimulation protocols and frozen at either pronucleate or multicellular stages. *Hum Reprod* 1991; 6: 799-804.
11. Veeck LL, Amundson CH, Brothman LJ. Significantly enhanced pregnancy rates per cycle through cryopreservation and thaw of pronuclear stage oocytes. *Fertil Steril* 1993; 59: 1202-7.
12. Trounson AO. Cryopreservation. *Br Med J* 1990; 46: 695-708.
13. Gordts S, Roziars P, Campo R, Noto V. Survival and pregnancy outcome after ultrarapid freezing of human embryos. *Fertil Steril* 1990; 53: 469-72.
14. Barg PE, Feichtinger W. Ultrarapid freezing of mouse and human embryos: A modified approach. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1990; 6: 355-7.
15. Feichtinger W, Hochfellner C, Ferstl U. Clinical experience with ultrarapid freezing of embryos. *Hum Reprod* 1991; 6: 735-6.
16. Cohen J, Alikani M, Trowbridge J, Rosenwaks Z. Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of human embryo with poor prognosis. *Hum Reprod* 1992; 5: 685-91.
17. 이호준, 김정욱, 변혜경, 전진현, 손일표, 전종

- 영. 인간의 체외수정 수정란이식술에서 보조 부화술이 임신율에 미치는 영향에 관한 연구. 대한불임학회지 1995; 22: 183-9.
18. Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1986; 2: 884-6.
 19. Carroll J, Depypere H, Matthwes CD. Freezethaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *J Reprod Fertil* 1990; 90: 547-53.
 20. Kazem R, Thompson LA, Srikantharajah A, Laing MA, Hamilton MPR, Templeton A. Cryopreservation of human oocytes and fertilization by two techniques: in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1995; 10: 2650-4.
 21. Quinn P, Kerin JFP. Experiences with the cryopreservation of human embryos using the mouse as a model to establish successful techniques. *J IVF ET* 1986; 3: 40-5.
 22. Cohen J, Simons RS, Fehilly CB, Edwards RG. Factors affecting survival and implantation of cryopreserved human embryos. *J IVF ET* 1986; 3: 46-52.
 23. Hartshorne GM, Elder K, Crow J, Dyson H, Edwards RG. The influence of in-vitro development upon post-thaw survival and implantation of cryopreserved human blastocysts. *Hum Reprod* 1991; 6: 136-41.
 24. Kowalik A, Palermo GD, Barnat L, Veeck L, Rimarachin J, Rosenwaks Z. Comparison of clinical outcome after cryopreservation of embryos obtained from intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1998; 13 (10): 2848-51.
 25. 전진현, 임천규, 김정옥, 변혜경, 한미현, 이호준 등. 사정정자를 이용한 세포질내 정자주입술에서 수정률과 임신율에 영향을 미치는 요인. *대한불임학회지* 1998; 41(4): 1001-7.
 26. 전진현, 이호준, 김정옥, 박용석, 이유식, 홍재엽 등. 체외수정 및 수정란이식술에서 세포질내 정자주입술 (ICSI)의 수정률과 임신율. *대한불임학회지* 1994; 21(3): 247-52.
 27. 전진현, 김정옥, 박용석, 이호준, 서주태, 이유식 등. 고환조직 정자채취술 (TESE)의 정자 상태에 따른 세포질내 정자주입술 (ICSI)의 수정률과 임신율. *대한불임학회지* 1995; 22(2): 149-53.
 28. 박용석, 전진현, 김정옥, 이호준, 서주태, 이유식 등. 미세수술적 부고환 정자흡입술 (Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration; MESA) 과 인공정액낭 정자흡입술 (Alloplastic Spermatocoele Aspiration; ASSA)을 이용한 임신율 향상에 관한 연구. *대한불임학회지* 1995; 22(3): 267-72.