

## 동결-융해 배아 이식에서 손상된 할구의 미세 수술적 제거의 임상적 효과

포천중문의과대학교 차병원 여성의학연구소

최원윤 · 손지온 · 박은아 · 이동률 · 이우식 · 한세열 · 박이석  
조정현 · 김수희 · 차광렬 · 윤태기

### Clinical Outcomes of Frozen-thawed Embryo Transfer after Microsurgical Removal of Damaged Blastomere

Won Yun Choi, Jie Ohn Sohn, Eun A Park, Dong Ryul Lee, Woo Sik Lee, Se Yul Han,  
Lee Suk Park, Jung Hyun Cho, Soo Hee Kim, Kwang Yul Cha, Tae Ki Yoon

*Fertility Center of CHA General Hospital, CHA Research Institute,  
Pochon CHA University, Seoul, Korea*

**Objective:** Human infertility clinics have been faced the demand for improving clinical results. The purpose of this study was to evaluate the effect of microsurgical removal of damaged blastomeres (DB) in frozen-thawed embryos on the clinical outcomes.

**Methods:** From January 2003 to May 2004, out of 258 thawing ET cycles were divided into three groups: Group-1 (n=46): Intact cleaved embryos after thawing. Remained cycles with embryos containing DB were randomly divided into two groups. Group-2 (n=102): Drilling zona pellucida (ZP) of frozen-thawed embryos by acidified Tyrode's solution. Group-3 (n=110): Drilling ZP and removal of DB. Embryos after microsurgical manipulation were transferred into the uterus of patients.

**Results:** Clinical profiles and the mean number of transferred embryos among three groups were not different. Pregnancy and implantation rates were similar in three groups. It were 30.4% and 9.3% in Group-1, 29.4% and 7.8% in Group-2, and 26.4% and 7.6% in group-3, respectively. Miscarriage rate in Group-3 (37.9%) was slightly higher than those in Group-1 and Group-2 (14.3% and 23.3%), but it was not statistically significant.

**Conclusion:** Intact cleaving embryos after DB removal showed higher potent of pregnancy and implantation. We could not find any improvement of clinical outcome by removal of DB in frozen-thawed embryos.

**Key Words:** Damaged blastomeres (DB), Microsurgical removed, Frozen-Thawed embryo, Pregnancy rate

---

연락처: 최원윤, 우) 135-081 서울특별시 강남구 역삼1동 606-5, 포천중문의과대학교 차병원 여성의학연구소  
Tel: (02) 3468-3423, Fax: (02) 501-8704, e-mail: journeyblue@hanmail.net  
주관책임자: 이동률, 우) 135-081 서울특별시 강남구 역삼1동 606-5, 포천중문의과대학교 차병원 여성의학연구소  
Tel: (02) 3468-3421, Fax: (02) 501-8704, e-mail: drleedr@cha.ac.kr

\*본 연구는 교육 인적 자원부 특성화 대학 지원 사업과 세로노 코리아에 의해 지원받아 수행되었음.

1972년 뒤에서 동결 배아를 이용한 산자의 생산이 성공한<sup>1</sup> 이후 초기 배아의 동결보존 기술은 가족을 포함한 대동물과 인간에게도 적용이 확대되었다.<sup>2,3</sup> 그 결과로 1984년 호주에서 최초로 인간의 동결 배아 이식 후에 성공적인 분만이 보고되었고,<sup>4</sup> 그 후 계속되는 연구를 통해 많은 발전이 이루어졌다. 한편 지난 20년 동안 괄목할만한 과배란 유도 방법의 발전으로 채취된 난자의 수와 배아의 수가 증가하였다.<sup>5</sup> 또한, 배양 기술의 발전과 다태아 임신의 방지책으로 소수의 배아만이 이식되어 발생 능력을 가진 잉여 배아가 증가하였고, 이들의 보관을 위한 배아의 동결보존 방법은 시험관 아기 기술 과정에서 가장 중요한 업무 중 하나가 되었다.<sup>6</sup> 그 외에도 난소 과자극 증후군 (ovarian hyperstimulation syndrome)이 심할 경우,<sup>7</sup> 난자채취 후 체외수정이 불가능한 경우, 그리고 난자 공여자와 수여자간의 착상시기가 일치하지 않을 경우, 암과 같은 병의 치료를 위해서 방사선 치료를 받아 그 이후의 생식 기능의 유지에 문제가 발생할 것으로 사료되는 환자에서도 동결보존이 생식 능력을 유지할 수 있는 대안으로 제시되고 있다.

배아의 동결과 융해 그리고 그 배아의 이식은 시험관 아기 기술 프로그램에서 많이 연구되고 있음에도 불구하고 동결과 융해 이후 배아의 생존율과 안전성, 이식 이후의 착상율과 임신율은 동결과 융해의 과정을 거치지 않은 배아의 착상율과 임신율에 비해 저조하게 나타나고 있다.<sup>8</sup> 이러한 차이를 극복하고 임상적인 착상율과 임신율의 상승과 안정을 위하여 연구자들은 보다 안정한 동결보호제와 동결 방법을 개발하고자 노력하고 있다. Trounson과 Mohr<sup>4</sup>는 1983년에 완만동결 방법으로 동결보호제인 1.5 M dimethylsulphoxide (DMSO)을 사용하여 인간의 4~8세포기 배아를 -80℃까지 동결시킨 뒤 액체 질소에 보관하였고, 융해 후 이식하여 최초의 임신 성공을 보고한 바 있다. 그 후 Zeilmaker 등<sup>9</sup>은 1.45 M DMSO를 사용하여 -40℃까지 완만동결한 배아를 이용하여 일란성 쌍생아의 탄생을 보고하였다. Lassalle 등<sup>10</sup>은 배아를 1.5 M 1,2-propanediol (PROH)와 0.1 M sucrose을 사용하여 평형을 시킨 후 -30℃까지 완만동결을 시도하였다. 최근에는 ethylene glycol (EG)이 세포 내 투과성이 높고 독성이 낮은 장

점 때문에 동물과 인간 난자와 배아의 동결에 널리 이용되고 있다.<sup>11</sup>

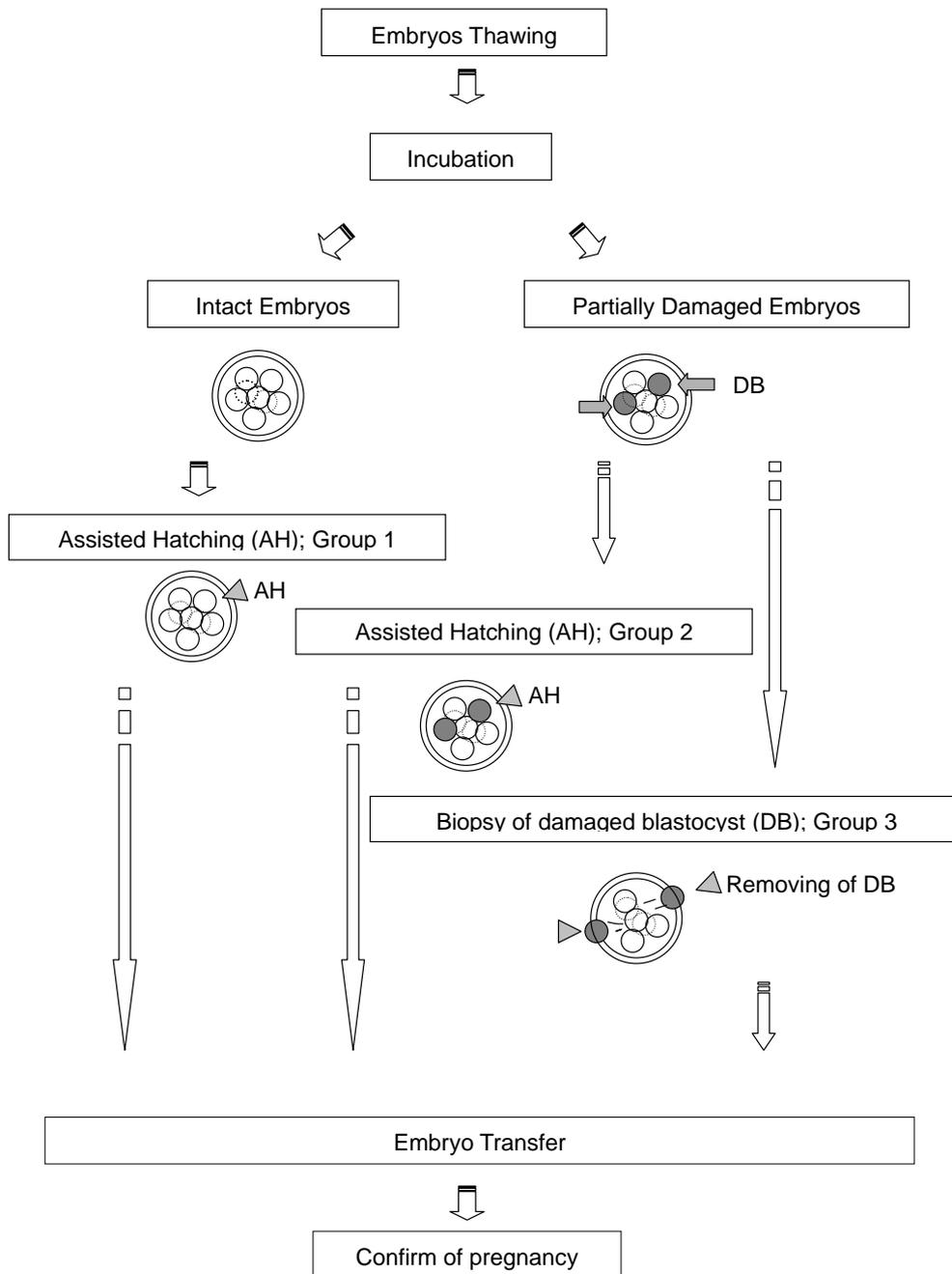
이러한 동결보존제의 선택 외에도 동결 방법에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. 기존의 완만동결법과 달리 고농도의 동결보호제를 사용하여 초급속으로 동결하여 세포내에 얼음 결정 (Ice Crystal)이 생기지 않게 하는 초급속동결법 (vitrification)이 도입되어 좋은 임상 결과를 얻고 있다.<sup>12~14</sup> 이러한 동결 방법의 발전은 동결 배아의 생존율을 증진시키고 있으나 아직도 배아의 상태에 따라 동결 해동 후 일부 할구에 상해가 나타나곤 한다. Etienne<sup>15</sup>와 El-Toukhy<sup>16</sup> 등은 일반적으로 발생기 배아의 상해는 포배 내 할구수의 감소를 유도하고 배아에서 기인되는 성장인자의 생산 감소에 의해 저조한 부화율과 임신율의 원인이 될 수 있다고 하였다. 또한, 이러한 손상 할구는 주변 할구에 좋지 않은 영향을 주어 배아의 발생과 착상 과정을 저해할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 미세조작술을 이용하여 동결-융해 후 손상된 할구를 제거하고 이러한 과정이 착상율과 임신율 그리고 유산율에 미치는 영향을 비교하여 임상적 효용성을 확인하고자 하였다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. 연구 대상

본 연구에서는 2003년 1월부터 2004년 5월까지 본원에 내원하여 동결 배아의 융해 후 이식을 시행한 258 주기를 대상으로 하였다. 융해된 배아는 다음과 같은 3개의 군으로 무작위로 나누어졌다. Group-1 (n=46)은 해동 시 손상된 할구가 없는 군으로 산성화된 Tyrode-용액 (pH=2.3)을 사용하여 보조부화술을 시행하였다. 해동 후 손상된 할구를 가진 배아는 무작위로 두 개의 실험 군으로 나누었다. Group-2 (n=102)는 산성화된 Tyrode-용액을 사용하여 보조부화술만을 시행하였고, Group-3 (n=110)은 산성화된 Tyrode-용액을 이용하여 투명대의 일부를 녹여내고 미세조작술로 손상 받은 할구를 제거하였다 (Figure 1).



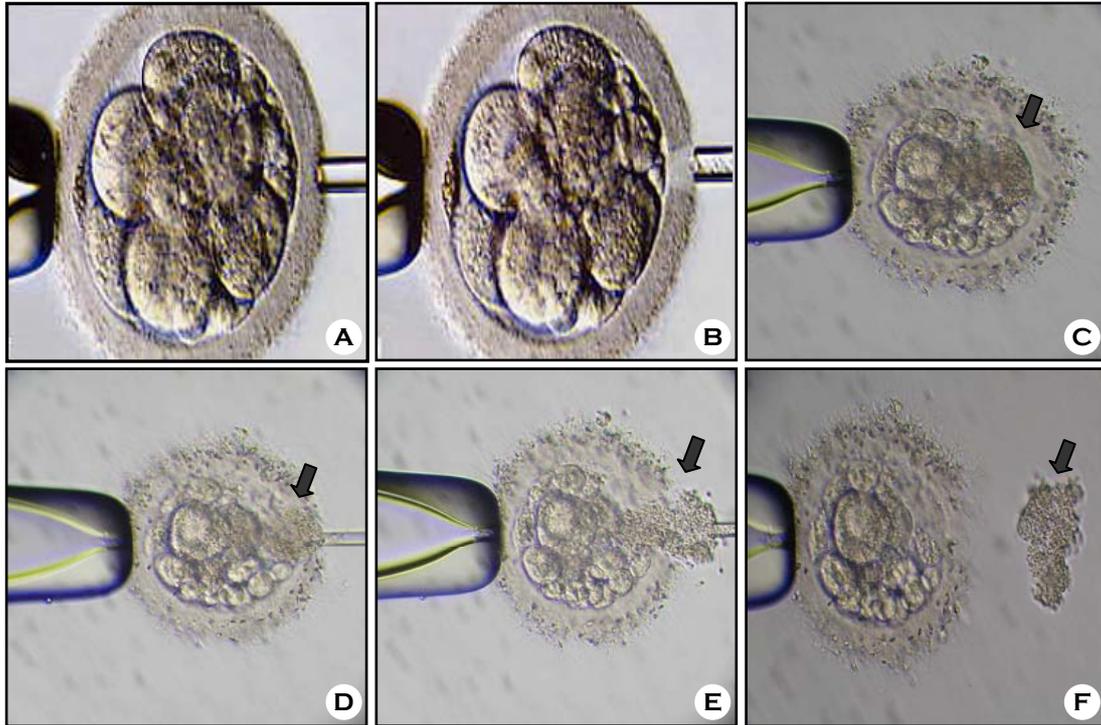
**Figure 1.** Schematic flow chart for this study.

## 2. 연구 방법

### 1) 배아의 동결-융해 및 배양

동결보존을 위한 기본 용액은 10% Serum Sub-

stitute Supplement (SSS, Irvine Scientific)가 첨가된 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS, GIBCO BRL)을 사용하였고, 투과성 동결보호제로는 1.5 M ethylene glycol (EG, Sigma Chemical Co.), 그리고 비



**Figure 2.** Assisted hatching (AH) and microsurgical removal of damaged blastomere (DB) in thawed embryos. AH in a thawed embryo (A, B); Damaged blastomere arrow in thawed embryo (C); Microsurgical removal of DB in a thawed embryos (D, E); Removed DB (F).

투과성 동결보호제로는 0.2 M sucrose (Sigma)를 이용하였다. 시험관 아기 시술 과정에서 잉여 배아로 남겨진 4~8세포기 배아를 10% SSS - DPBS, 0.5 M EG, 1.0 M EG, 1.5 M EG, 그리고 1.5 M EG + 0.2 M sucrose에 각각 5, 5, 5, 10, 그리고 5분씩 처리하여 탈수하였다. 이후 0.25 ml plastic-straw에 loading한 뒤 24°C로 준비된 세포 동결기 (Kryo 10 serise III, Planer; Cryomagic I& II, Miraebiotec)를 이용하여 완만동결 하였다. 24°C에서 -7°C까지는 -2°C/min의 비율로 온도를 내린 뒤, 5분간 유지 뒤에 식빙 (seeding)을 시행하였다. 그리고 -39°C까지는 -0.3°C/min의 비율로 온도를 내린 뒤 액체질소에 침지 보관하였다. 보관의 시기는 최소 1개월에서 최대 약 5년까지 다양하였다.

해동을 위하여 보관된 Straw를 액체질소에서 꺼내 대기 중에서 40초 동안 방치 후 항온수조 내 37°C의 물에서 40초 동안 융해했다. 재수화는 4단계의 평형 (equilibration)용액을 사용하였다. 즉, 1 M

EG + 0.2 M sucrose, 0.5 M EG + 0.2 M sucrose, 0.2 M sucrose, 그리고 10% SSS-DPBS에 각각 5, 5, 5, 그리고 5분씩 처리하였으며, 2002년 이전에 동결된 배아는 투과성 동결보호제로 1,2-Propanediol (PROH, Sigma)를 그리고 비투과성 동결보호제로 sucrose를 사용하였으며 기본용액으로 20% fetal bovine serum (FBS, Sigma) - DPBS를 사용하여 해동하였다. 동결과 융해 과정은 실온에서 각 단계별로 해당 과정을 처리하였다.

융해된 배아는 BL배양액 (Irvine Scientific or SAGE) 또는 G2배양액 (Vitrolife)에 침지하여 5% CO<sub>2</sub>와 37°C가 유지되는 배양기 내에서 배양했다.

#### 2) 융해된 배아에서의 손상된 할구의 제거

융해된 배아의 투명대를 산성화된 Tyrode를 이용하여 부분적으로 녹여낸 후에 미세조작기를 이용해서 DB를 제거하여 배양액으로 옮겨 놓았다 (Figure 2).

**Table 1.** Patient characteristics according to the groups

	Group-1 (n=46)	Group-2 (n=102)	Group-3 (n=110)
Infertility duration	4.91±3.95	4.18±2.43	3.92±2.37
Age of female	33.43±4.62	32.40±4.32	33.1±4.16
No. of induction cycles	1.61±1.06	1.67±1.04	1.55±0.91
No. of follicles	14.72±4.03	15.41±5.89	14.88±4.45
No. of retrieved oocytes	20.43±9.67	21.76±10.30	19.70±8.83
No. of frozen embryos	12.24±6.83	13.30±8.78	12.45±6.97
No. of thawed embryos	7.78±3.03	8.34±2.52	8.24±2.76
No. of transferred embryos	4.20±1.05*	4.68±0.71*	4.44±0.86*

Mean ± SD., \*The values with different superscripts in the row are significantly different (p<0.05) (a, b)

### 3) 배아의 이식

해동된 배아는 각 군별로 배아 이식용 catheter (COOK)에 loading하여 배면초음파 혹은 질식초음파를 이용하여 자궁의 위치를 확인하며 이식하였다.

### 4) 임신과 착상의 확인

이식 후 약 2주 (14일) 후에 혈액내의 β-hCG를 측정하여 임신의 유무를 확인하고 초음파로 태낭의 수를 관찰하여 착상된 배아의 수를 확인하였다. 또한 환자를 추적 관찰하여 임신 지속여부를 확인하였다.

### 3. 통계분석

통계적인 분석은 Student's *t*-test와 Chi-square test를 이용하였고, p 값이 0.05이하인 경우를 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

## 결 과

전체 258주기 중 46주기 (18%)는 동결 해동 과정에서 할구가 전혀 손상 받지 않아 Group-1로 분류되었고, 나머지 212주기 (82%)는 배아 중 일부 혹은 전부가 손상을 받았으며 무작위로 Group-2와 Group-3으로 나뉘어 졌다. Group-1과 Group-2는 산성화된 Tyrode용액을 사용하여 보조부화술만을 시행하였다. Group-3의 배아는 산성화된 Tyrode용액을 이용하여 투명대의 일부를 녹여내고 미세조작술로 손상된 할구를 제거하였다.

세 환자군 간의 기본 정보는 불임 기간, 나이, 난자의 평균 채취 개수, 동결된 배아의 수는 Table 1에서와 같이 유의적인 차이는 없으나 이식된 배아의 수에서 Group-1과 Group-2군 간에는 유의한 차이 (p<0.006)를 보였다.

임신율은 Group-1,-2,-3에서 각각 30.4% (29/110), 29.4% (31/102) 그리고 26.4% (14/46)로 나타났고, 이 세 군 사이에 유의적인 차이는 없었다. 하지만 손상된 할구를 제거한 Group-3에서 나머지 두 군에 서보다 임신율이 약간 저조한 것을 볼 수 있었다. 또한 이들의 착상율과 유산율을 비교해본 결과 착상율의 경우 Group-1,-2,-3에서 각각 9.3% (18/193), 7.8% (37/477), 7.6% (37/488)이었으며, 유산율의 경우 14.3% (2/14), 23.3% (7/30), 37.9% (11/29)로 나타났다. 세 군 사이의 유의한 차이는 없으나 Group-3의 유산율이 다른 두 군에 비하여 약간 높은 경향을 나타냈다 (Table 2).

연구 대상을 ICSI와 일반적인 체외수정을 시도한 경우로 구분하여 그 임상결과를 비교, 분석하였다. 일반적인 체외수정의 경우 임신율은 Group-1,-2,-3에서 각각 34.8% (8/23), 31.1% (14/45), 23.8% (15/63)로 나타났고, 착상율은 11.1% (11/99), 8.5% (18/211), 5.7% (16/277)이고, 유산율은 25.0% (2/8), 28.5% (4/14), 40.0% (6/15)로 나타났다. 또한 ICSI를 시행한 경우 임신율은 각각 26.1% (6/23), 28.1% (16/57), 29.8% (14/47)였고, 착상율은 7.5% (7/94), 7.1% (19/266), 10.0% (21/211)이고, 유산율은 0.0% (0/6), 18.7%

**Table 2.** Comparison of pregnancy, implantation and abortion rate among Group-1,-2 and -3

	Group-1*	Group-2**	Group-3***
Pregnancy rate	26.4 (14/46)	29.4 (31/102)	30.4 (29/110)
Implantation rate	9.3 (18/193)	7.8 (37/477)	7.6 (37/488)
Abortion rate (/pregnancies)	14.3 ( 2/14)	23.3 ( 7/30)	37.9 (11/29)
Ongoing/delivery rate	85.7 (12/14)	76.7 (23/30)	62.1 (18/29)

\*Group-1: Embryos with intact blastomeres after freezing thawing and then undergone AH

\*\*Group-2: Embryos with damaged blastomere (DB) after freezing and thawing and then undergone AH

\*\*\*Group-3: Embryos with damaged blastomere (DB) after freezing and thawing and then undergone AH and DB removal

**Table 3.** Comparison of clinical outcomes between standard IVF (IVF) and ICSI in thawing embryo transfer program

	Group-1*		Group-2**		Group-3***	
	IVF	ICSI	IVF	ICSI	IVF	ICSI
Implantation rate	11.1 (11/99)	7.5 (7/94)	8.5 (18/211)	7.1 (19/266)	5.7 (16/277)	10 (21/211)
Abortion Rate (/pregnancies)	25.0 (2/8)	0.0 (0/6)	28.5 (4/14)	18.7 (3/16)	40.0 (6/15)	35.7 (5/14)
Ongoing/ Delivery Rate	75.0 (6/8)	100.0 (6/6)	71.5 (10/14)	81.3 (13/16)	60.0 (9/15)	64.3 (9/14)

\*Group-1: Embryos with intact blastomeres after freezing thawing and then undergone AH

\*\*Group-2: Embryos with damaged blastomere (DB) after freezing and thawing and then undergone AH

\*\*\*Group-3: Embryos with damaged blastomere (DB) after freezing and thawing and then undergone AH and DB removal

(3/16), 35.7% (5/14)로 나타났다. 각 군 간의 임상결과와는 유의한 차이가 나타나지 않았다 (Table 3).

## 고 찰

배아 동결 및 융해는 시험관 아기 시술 프로그램의 많은 발전으로 인해 발생하는 잉여 배아의 보존을 위하여 그 필요성이 더욱 가중 되고 있으며 보조생식술의 가장 중요한 부분 중의 하나로 자리 잡고 있다.

이에 여러 가지 방법으로 동결보존 방법이 발전하고 연구되고 있다. 여러 가지 종류의 동결보존제의 처리 및 동결보존제의 노출 시간 정도를 조절하는 일 또한 그러한 방법들 중의 하나이다. 그러나 물리 화학적인 여러 측면에서 지금까지도 문제가 되고 있는 것은 동결 배아의 해동 시 생겨나게 되는 할구의 일부 혹은 전체적인 손상에 관한 것이다. 전체 손상을 입은 할구를 가진 배아의 경우 이식이 불가하나 부분 손상을 입은 할구를 가진 배아의 경

우 이식을 하기도 한다. Van den Abbeel<sup>15</sup>과 El-Tokukhy<sup>16</sup> 등도 이와 관련되어 할구의 부분적 손상이나 손실에 관한 연구를 진행하였다. 하지만 이것이 배아의 발달 혹은 임신과 착상에 어떠한 영향을 미칠지에 관해서는 아직까지 연구가 미진하다. 본 연구는 이점에서 착안하여 해동 시에 손상된 할구를 미세조작술을 이용하여서 제거한 후에 그 임신율과 착상율 그리고 그와 수반되어 나타나는 유산율 등을 비교하여 보았다.

본 연구에서의 환자군은 총 258주기로서 총 3개의 군으로 나누어서 진행되었다. 배아의 동결 시기는 환자의 난자채취 시기에 따라 다르며 동결 보존제 (PROH/EG)와 기본 용액 (SSS/FBS+DPBS)의 조성 또한 시기적인 차이가 있지만 이들 동결보존제와 기본 용액 사이의 차이는 이번 연구에서 크게 작용하지 않았다. Group-1은 해동 후에 손상된 할구가 존재하지 않고 보조부화술을 시행한 군으로 총 46주기 (18% (46/258))에 해당하며 손상된 할구가 존재하는 나머지 총 212주기 (82% (212/258))를 1군

과 마찬가지로 AH만 진행되는 Group-2 (102주기)와 미세조작술에 의해서 손상된 할구를 제거하는 Group-3 (110주기)으로 나누었다.

각 실험 군에서 환자의 나이, 불임기간 그리고 동결된 배아의 개수와 같은 환자의 기본 정보는 유의적인 차이를 가지지 않았다 (Table 1). 그러나 이식된 배아의 개수에서 1군과 2군 간에는 유의적인 차이가 있었으나 ( $p<0.006$ ) Group-1과 -3 사이와 Group-2과 -3 사이에는 차이가 없었다.

Group-1과 -2 그리고 -3군의 임신율을 비교해 보면 각각 30.4% (14/46), 29.4% (30/102), 26.4% (29/110)으로 각각의 유의한 차이는 없으나 손상된 할구를 제거한 Group-3군에 비해서 Group-1과 -2에서 약간 높은 것으로 나타났다. 착상율을 비교해 보면 각각 9.3% (18/193), 7.8% (37/477), 7.6% (37/488)로 Group-1이 나머지 군보다 약간 높은 것을 볼 수 있으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 또한 유산율을 비교해 보면 각각 14.3% (2/14), 23.3% (7/30), 37.9% (11/29)로 Group-1보다 -2과 -3이 높고 이 중에서 Group-3이 가장 높은 것으로 나타났다. 현재 임신 중이거나 출산 된 경우는 각각 85.7% (12/14), 76.7% (23/30), 62.1% (18/29)로 Group-1에서 가장 높게 나타났다 (Table 2).

착상전 유전진단 (Preimplantation Genetic Diagnosis, PGD)에서 유전자 진단을 위해 발생 중 배아에서 하나 또는 두 개의 할구 제거는 배반포의 형성 및 임신율에 큰 영향을 주지 않는다고 보고된 바 있다.<sup>19,20</sup> 반대로 발생중의 배아에서 할구 손상이 어떠한 요인으로든 임신율에 영향을 미친다고 보고된 바도 있다.<sup>15~17</sup> 본 연구에서는 손상된 할구를 제거한 군에서 기대한 바와 달리 임신율이 높지 않았다. 그 원인으로는 손상된 할구의 제거 시에 발생하는 화학적 혹은 물리적인 요인을 생각할 수 있다.<sup>21</sup> 실제로 본 연구에서도 동결, 해동 중 손상을 받지 않은 배아를 이식한 경우가 손상을 받은 배아를 이식하는 경우에 비해 통계적으로 유의하지는 않지만 착상율이 약간 높은 경향을 보여준다. 이는 손상 받은 할구와 그렇지 않은 할구 사이의 autocrine 또는 paracrine기작에 의한 영향을<sup>15,17</sup> 받기 때문으로 여겨지며 손상 받은 할구의 제거를 통해 이를 극복하고자 하였다. 그러나 손상된 할구를 제거한 Group-3

에서 그렇지 않은 Group-2에 비교해 착상율의 증가는 관찰되지 않고 오히려 유산율이 통계적 유의성은 없으나 증가하는 것으로 나타났다. 이것은 손상 할구의 제거를 위해 사용된 미세조작술에 의한 물리 화학적인 손상 이 더욱 나쁜 영향을 미친 것으로 생각되며, 그 원인의 분석을 위해서는 다른 미세조작술의 적용과 이에 따른 세포 고사, 배아 발생 능력 등의 비교와 같은 추가 연구가 필요하다.

체외수정 방법에 따른 임상결과 비교에서도 전체적인 결과와 유사한 경향을 나타냈다. 이들 사이에서도 유의적인 차이는 관찰되지 않았으나 ICSI를 시행한 경우와 일반적인 체외수정을 시행한 경우 임신율에는 큰 차이를 보이지 않았다 (28.3%, 28.2%). 하지만 본 연구에서 무작위로 나눈 실험 군을 기준으로 분석한 결과에서 ICSI를 시행한 경우에서 Group-3의 임신율 및 착상율이 다른 두 군에 비해 높아지는 결과가 나타났다. 또한 일반적인 체외수정을 시행한 군에서 보다 유산율이 낮게 나타났다. 이것은 지금까지 나타난 결과와 다른 양상의 결과로서 그 이유에 관해서는 보다 많은 추가 연구가 필요하다고 사료되나 환자군의 불임 요인이 그 원인 중 하나로 여겨진다. 즉 ICSI를 시행한 환자군의 불임 요인이 주로 남성에게 의한 문제이고, 이는 ICSI를 이용하여 극복되었고, 여성의 자궁 내에서 불임을 유발하는 여러 요인이나 난자의 질 등의 여러 여성 요인에 관한 문제가 일반적인 체외수정 방법에 비해 그 비율이 높지 않기 때문으로 여겨진다.

다른 연구자들의 보고와 유사하게 본 연구에서도 해동 시 할구의 손상이 없는 배아 군에서의 임신율 및 착상율이 통계적인 유의차는 없으나 높은 것으로 나타났다.<sup>20,21</sup> 배아의 동결과 융해에서 손상된 할구가 생기지 않도록 하는 것이 중요하며 손상된 할구가 생겼을 경우의 대처방안에 있어서 손상된 할구를 제거했을 경우 유의한 임신율의 상승은 관찰되지 않았다. 또한 할구의 제거 시 보조부화술만을 시행한 group에 비해 유산율이 증가되는 경향을 볼 수 있었다. 결론적으로 본 연구에서 동결-융해된 배아의 손상된 할구의 제거가 임상적으로 유의한 장점을 나타내지 않았으며, 투명대 천공 및 손상 할구 제거 과정에서 배아의 상해를 최소화 하는 것뿐만 아니라 동결-융해과정에서 할구 손상을 최

소화할 수 있는 방법의 개발이 필요한 것으로 사료된다.

### 참 고 문 헌

1. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196 and -269°C. *Science* 1973; 178: 411-4.
2. Wilmut I, Rowson LEA. Experiments on the low temperature preservation of cow embryos. *Vet Rec* 1973; 92: 686-90.
3. Leibo S, Loskutoff NM. Cryobiology of in vitro derived bovine embryos. *Theriogenology* 1993; 39: 81-94.
4. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983; 305: 707-9.
5. Hong SW, Chung HM, Lim JM, Ko JJ, Yoon TK, Cha KY, et al. Improved human oocyte development after vitrification: a comparison of thawing methods. *Fertil Steril* 1999; 72(1): 142-6.
6. Hamberger L, Hazekamp J. Towards singled embryo transfer in IVF. *J. Reprod Immunol* 2002; 55(1-2): 141-8.
7. D'Angelo A, Amso NN. Embryo freezing for preventing ovarian hyperstimulation syndrome: a Cochrane review. *Hum Reprod* 2002; 17(11): 2787-94.
8. Kolibianakis EM, Zikopoulos K, Devroey P. Implantation potential and clinical impact of cryopreservation-a review. *Placenta* 2003; 24 Suppl B: S27-33.
9. Zeilmaker GH, Alberta AT, Van Gent I. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertil Steril* 1984; 42: 293-26.
10. Lassalle B, Testart J, Renard JP. Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2-propanediol. *Fertil Steril* 1985; 44: 645-51.
11. Bafrani HH, Salsabil N, Pasbakhsh P, Hassani H, Movahedin M, Al-tarihi T, et al. Comparison of 1,2-propanediol and ethylene glycol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes and their subsequent development. *J Assist Reprod Genet* 2003; 20(6): 234-40.
12. Kelly SM, Buckett WM, Abdul-Jalil AK, Tan SL. The cryobiology of assisted reproduction. *Minerva Ginecol* 2003; 55(5): 389-98.
13. Tharnprisarn W, Suwajanakorn S, Sereepapong W, Pruksananonda K, Boonyakasemsanti W, Virutamasen P, et al. Mouse blastocyst vitrification compared with the conventional slow-freezing method. *J Med Assoc Thai* 2003; 86(7): 666-71.
14. Boone WR, Johnson JE, Blackhurst DW, Higdon III HL. Cryopreservation methodologies: freezing location and protocol alter development of mouse embryos. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2004; 43910: 26-31.
15. Van den Abbeel E, Camus M, Van Waesberghe L, Devroey P, Van Steirteghem A. Viability of partially damaged human embryos after cryopreservation. *Hum Reprod* 1997; 12(9): 206-10.
16. El-Toukhy T, Khalaf Y, Al-Darazi K, Andritsos V, Taylor A, Braude P. Effect of blastomere loss on the outcome of frozen embryo replacement cycles. *Fertil Steril* 2003; 79(5): 1106-111.
17. Rienzi L, Nagy ZP, Ubaldi F, Iacobelli M, Anniballo R, Tesarik J, et al. Laser-assisted removal of necrotic blastomeres from cryopreserved embryos that were partially damaged. *Fertil Steril* 2002; 77(6): 1196-201.
18. Jericho H, Wilton L, A.Gook D, H.Edgar D. A modified cryopreservation method increases the survival of human biopsied cleavage stage embryos. *Hum Reprod* 2003; 18(3): 568-71.
19. Ludwig M, Muschalla H, Al-Hasani S, Diedrich K. The effect of multiple cryopreservation procedures and blastomere biopsy on the in-vitro development of mouse embryos. *Hum Reprod* 1998; 13(11): 3165-8.
20. Joris H, De Vos A, Janssens R, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. Comparison of PGD results of human embryo biopsy and outcome of PGD after

- zona drilling using acid Tyrode medium or a laser. Hum Reprod 2003; 18(9): 1896-902.
21. Wong BC, Boyd CA, Lanzendorf SE. Randomized controlled study of human zona pellucida dissection using the Zona Infrared Laser optical system: evaluation of blastomere damage, embryo development, and subsequent hatching. Fertil Steril 2003; 80(5): 1249-54.
-