

난자 세포질내 정자 주입술 후 동결보존 배아이식: 고식적 체외수정시술과의 비교 연구

서울대학교 의과대학 산부인과학교실, 서울대학교 의학연구원 인공의학연구소*

김석현 · 지병철 · 정병준 · 김희선* · 류범용* · 방명걸* · 오선경* · 손 철
서창석 · 최영민 · 김정구 · 문신용 · 이진용

Clinical Outcome of Transfer of Cryopreserved-Thawed Embryos Obtained after Intracytoplasmic Sperm Injection: Comparison with Conventional In Vitro Fertilization

S.H. Kim, B.C. Jee, B.J. Jung, H.S. Kim*, B.Y. Ryu*, M.G. Pang*, S.K. Oh*,
C. Shon, C.S. Suh, Y.M. Choi, J.G. Kim, S.Y. Moon and J.Y. Lee

*Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Institute of Reproductive
Medicine and Population*, Medical Research Center, Seoul National University,
Seoul, Korea*

= Abstract =

The objective of this study was to compare retrospectively the survival and pregnancy rates (PR) of cryopreserved-thawed embryos obtained from intracytoplasmic sperm injection (ICSI) or conventional in vitro fertilization (IVF). Ninety-six cycles of cryopreserved-thawed embryo transfer (ET) were performed in 79 patients from June, 1996 to September, 1997 and grouped as followings: 20 cycles (16 patients) inseminated by ICSI (ICSI Group) and 76 cycles (63 patients) by conventional IVF (IVF Group). Slow-freezing and rapid-thawing protocol was used with 1.5M propanediol (PROH) and 0.1M sucrose as cryoprotectant. All embryos were frozen-thawed at the two pronuclear (2 PN) stage excluding four cycles in which the early cleavage stage embryos were frozen, and allowed to cleave in vitro for one day before ET.

The duration from freezing to thawing was comparable in both groups (mean \pm SD, 112.1 \pm 80.0 vs. 124.8 \pm 140.1 days). The age of female (31.2 \pm 3.4 vs. 32.6 \pm 3.3 years) and the endometrial thickness prior to progesterone injection (9.4 \pm 2.0 vs. 9.3 \pm 1.8 mm) were also comparable in both groups. There was no significant difference in the outcomes of cryopreserved-thawed ET between two groups: survival rate (85.2 \pm 16.1% vs. 82.2 \pm 19.7%), cleavage rate (96.9 \pm 6.7% vs. 94.7 \pm 13.0%), cumulative embryo score (CES, 54.5 \pm 31.1 vs. 49.0 \pm 20.0), preclinical loss rate (5.0% vs. 5.3%), clinical miscarriage rate (0% vs 29.4%), clinical PR per transfer (35.0% vs. 22.4%), implantation rate (9.9% vs. 5.6%), and multifetal PR (42.9% vs. 17.6%).

In conclusion, human embryos resulting from ICSI can be cryopreserved-thawed and transferred

* 이 연구는 1996년도 서울대학교병원 지정진료 공동연구비(02-96-309) 지원에 의하여 이루어진 것임.

Supported by Grant No. 02-96-309 from Seoul National University Hospital Research Fund.

* 본 논문의 요지는 1997년 11월 28일 대한불임학회 제34차 추계 학술대회에서 구연 발표되었음.

successfully, and the survival rate and PR are comparable to conventional IVF.

Key Words: IVF-ET, Intracytoplasmic sperm injection (ICSI), Conventional IVF, Cryopreservation, Cryopreserved-thawed ET, Survival rate, Cleavage rate, Pregnancy rate (PR)

서 론

체외수정시술 (IVF-ET)시 배아이식 후 여분의 잉여 배아를 동결보존 (cryopreservation)하였다가 필요한 시기에 해동 (thawing)하여 자연 배란주기, 혹은 호르몬 투여로 전처치된 자궁내로 배아이식을 시행하는 동결보존 배아이식은 보조생식술의 중요한 분야로서 냉동생물학 (cryobiology) 및 동결보존 기술이 다양하게 연구 개발됨에 따라 비약적인 발전을 맞이하게 되었다 (Trounson, 1990; Van Steirteghem *et al.*, 1992).

체외수정시술시 다태임신의 발생을 줄이고자 자궁내로 이식되는 배아의 수를 2~3개 정도로 제한하는 현실에서 동결보존 배아이식은 다태임신의 예방에 있어서 임상적으로 매우 유용한 시술 방법이며 (Gelety & Surrey, 1993; Nijs *et al.*, 1993), 난자공여 프로그램에서 난자 공여자와 수혜자 사이에 난소주기가 일치하지 않는 문제가 발생할 때 이를 해결하여 줄 수 있다. 또한 과배란유도시 난소 과자극증후군 (OHSS)의 발생이 예견되는 환자에서 일단 난자채취를 실시한 후 체외수정된 모든 배아를 동결보존하고 후에 배아이식을 시도하여 체외수정시술 주기의 취소를 방지하고, 난소 과자극증후군의 발생을 최소화시킬 수 있는 방편으로도 이용되고 있다 (Amso *et al.*, 1990; Pattinson *et al.*, 1994; Wada *et al.*, 1994; Bergh *et al.*, 1995; Frederick *et al.*, 1995; Awonuga *et al.*, 1996; Shaker *et al.*, 1996).

일반적으로 고식적 체외수정시술 (conventional IVF-ET)시 동결보존 배아이식은 신선 배아이식과 비교할 때 임신율이 상대적으로 낮지만 난자채취 시술주기당 임신율은 증가시킬 수 있어 결과적으로는 전체 임신율이 증진되는 효과를 기대할 수 있는 것으로 인지되고 있다. 1994년의 미국내 통계 (ASRM, 1996)에 의하면 체외수정시술시 배아이식 주기당 임상적 임신율 및 분만율은 신선 배아이식시 각각 29.1%, 23.4%, 동결보존 배아이식시 각각 19.3%, 15.6%이었다. 본 교실에서도 고식적 체외수정시술시 동결보존 배아이식의 주기당 임상적 임신율이 20.5%에 이르는

것으로 보고한 바 있다 (Kim *et al.*, 1996). 한편 배아를 동결보존한 후 자궁내이식을 시행하여도 주산기 사망을 및 기형 발생율에 있어서 유의한 차이가 없는 것으로 보고되고 있어 동결보존 배아이식은 임상적으로 안전한 시술로 인식되고 있다 (Wada *et al.*, 1994).

최근 체외수정시술시 남성인자 불임환자 및 고식적 체외수정시 저수정율 환자 등을 대상으로 미세조작을 이용한 미세보조수정술의 일종인 난자 세포질내 정자 주입술 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI)이 급속히 보편화됨에 따라 (Palermo, *et al.*, 1992; Van Steirteghem *et al.*, 1993) ICSI 시술시에도 배아이식 후 여분의 배아를 일단 동결보존하였다가 후에 배아이식을 시행하게 되었다. 여러 연구 결과 ICSI 시술로 체외수정된 배아를 동결보존한 후 이식하여도 기존의 고식적인 체외수정시술시의 동결보존 배아이식과 비교할 때 임신 결과는 크게 다르지 않은 것으로 보고 (Van Steirteghem *et al.*, 1994; Al-Hasani *et al.*, 1996; Hoover *et al.*, 1997)되고 있지만, 이에 관한 국내 연구 보고는 찾아보기 힘든 실정이다.

이에 저자들은 서울대학교병원에서 시행한 동결보존 배아이식시 ICSI 시술과 기존의 고식적인 체외수정시술을 상호 비교하여 배아의 생존율, 임신율 등에 있어서 유의한 차이가 존재하는지 여부를 규명하고자 본 연구를 실시하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구대상

본 연구에서는 1996년 6월부터 1997년 9월까지 서울대학교병원 불임클리닉에서 실시한 동결보존 배아이식 96주기 (79명) 중 이전의 과배란유도 및 난자채취 주기에서 체외수정의 방법으로서 ICSI 시술을 시행받은 20주기 (16명)를 연구 대상으로 하였다 (ICSI군). ICSI 시술의 적응증으로는 비정상 정액검사 소견을 보인 7주기 (6명), 고식적 체외수정시술시 난자의 수정율이 20% 이하이었던 5주기 (3명) 및 무정자증 8주기 (7명)이었다. 무정자증 환자에서 정자채취의 방법으로 미세수술적 부고환 정자채취술 (micro-

surgical epididymal sperm aspiration, MESA) 3주기, 경피적 부고환 정자채취술 (percutaneous epididymal sperm aspiration, PESA) 2주기, 고환 정자채취술 (testicular sperm extraction, TESE) 3주기가 시행되었다. 연구 대상 배아는 대부분 전핵단계 (pronuclear stage)에서 동결보존을 실시하였으나 ICSI군에는 초기 난할단계 (early cleavage stage)의 배아를 동결보존한 4주기가 포함되었다.

대조군으로는 동일 연구 기간 동안 실시한 고식적 체외수정술 후 동결보존 배아이식 76주기 (63명)를 선정하였다 (IVF군). 대조군에는 이전의 과배란유도시 난소 저반응군 등으로 분류되어 난자공여 프로그램으로 난자를 공여받아 고식적 체외수정을 시행하였으나 배아이식이 여의하지 않아 배아를 동결보존하였던 10주기가 포함되었다.

동결보존 후 배아이식시 자궁내막의 준비 방법으로 gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist/estradiol (E₂) valerate의 병합요법, E₂ valerate 단독요법 및 자연 배란주기가 모두 이용되었으며, ICSI군에서는 각각 15주기, 2주기, 3주기, IVF군에서는 각각 53주기, 16주기, 7주기 이었다.

두 군에서 대상 여성환자의 연령은 각각 31.2 ± 3.4세, 32.6 ± 3.3세로서 통계학적 유의성이 없었다.

2. 연구 방법

1) 과배란유도

대상 환자에서 GnRH agonist (Decapeptyl, D-Trp-6-LH, Ferring, Malmo, Sweden)를 사용한 황체기 장기투여법 (luteal phase long protocol)을 실시하여 과배란유도를 시행하였다 (Chang *et al.*, 1990 & 1994; 문신용 등, 1991; 김석현 등, 1991 & 1995). 과배란유도 주기 전 월경주기 제 3일 오전 8시에 채혈하여 혈중 LH, FSH 및 E₂ 농도를 측정하며, 질식 초음파검사 (transvaginal ultrasonography)를 시행하여 골반내 이상 유무를 확인하였다. 월경주기가 일정한 환자에서는 월경주기 제 14일에 난포의 크기 및 배란 유무를 확인하여 월경주기 제 21일에 GnRH agonist의 피하주사를 시작하였다 (ovarian suppression phase).

GnRH agonist의 피하주사 후 월경이 있으면 월경주기 제 3일에 뇌하수체의 기능 억제 유무를 확인하기 위하여 혈중 LH, E₂, progesterone (P₄)을 측정하여 LH < 5 mIU/ml, E₂ < 50 pg/ml, P₄ < 1

ng/ml인 경우 과배란유도를 시작하였다. 또한 월경주기 제 3일에 질식 초음파검사를 시행하여 GnRH agonist에 의한 난소 낭종이 발생하였거나 난관 수종이 있는 경우를 확인하여 질식 초음파유도하에 질식 천자를 실시하여 흡인 제거하였다. 월경주기 제 3일에 과배란유도를 시작하며 과배란유도제는 FSH (Metrodin, Serono, Switzerland)를 사용하였다 (ovarian stimulation phase). 과배란유도를 시작하는 날을 과배란유도 제 1일로 하고, 제 1일과 제 2일까지는 오전, 오후에 각각 FSH 150 IU를 근육주사하면서 환자의 난소 반응 상태 및 혈중 E₂ 농도에 따라 과배란유도제 용량의 증감을 조절하였다. 과배란유도 제 6일 부터는 혈중 E₂ 농도와 질식 초음파검사를 시행하여 난포 성장을 관찰하였다. 여성난포 크기의 평균 직경이 18mm 이상이거나 16mm 이상인 난포가 3개 이상 관찰되면서 혈중 E₂ 농도가 계속 상승하고, 직경 10mm 이상인 난포당 혈중 E₂ 농도가 300 pg/ml 이상이면 hCG (Profasi, Serono, Switzerland) 10,000 IU를 근육주사하여 배란을 유도하였다.

2) 정액 채취 및 정자 처리

정액의 채취는 남자채취 당일 아침에 수음으로 50 ml pyrex beaker에 무균적으로 채취하여 실온에서 30~40 분간 방치하여 액화시킨 후 기본적인 정액검사를 실시하였다. 정액의 양, 정자의 농도 및 운동성의 평가는 세계보건기구 (World Health Organization, WHO, 1992)의 규정에 따라 시행하였으며, 정자의 형태를 판정하기 위하여 Kruger 등 (1986)에 의하여 고안된 정자의 정밀 형태 분석 (strict morphology criteria)을 실시하였다. 정자의 회수를 위하여 액화된 정액을 80% percoll 5 ml가 들어있는 15 ml conical tube에 넣어 희석한 후 600G로 20분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 정자괴를 잘 풀고, 그 위에 2 ml의 수정 배양액을 넣어 섞은 후 다시 300G로 10분간 원심분리하여 2차 세척을 실시하였다. 세척하여 얻어진 정액을 3.6 mM pentoxifylline (3,7-dimethyl-1,5-oxohexylxanthine, Sigma, USA)으로 30분간 처리한 후 원심분리하여 다시 swim-up 처리한 정자를 사용하였다.

3) 남자 채취

남자의 채취는 hCG 10,000 IU 근육주사 36시간 후에 질식 초음파 유도하에 질벽을 통하여 난포의 흡인 천자를 이용하여 시행하였다. 난자를

포함하고 있는 난포액을 2 ml의 Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS)을 포함하고 있는 난포액 수집통에 흡인하고, 그 직후 다시 2 ml의 D-PBS 용액을 사용하여 난자흡인 주사 침안에 붙어있는 난자가 없도록 재확인하였다. 난포액과 D-PBS 용액이 들은 혼합액을 즉시 배양실로 옮겨서 혼합액의 양과 색을 기록하고 배양접시 (#3002, Falcon Plastics, USA)에 옮긴 후 해부현미경 (dissecting microscope)으로 난자의 존재 여부를 확인하고, 난자의 존재가 확인되면 도립현미경 (inverted microscope)으로 난자-난구세포 복합체 (oocyte-cumulus cell complex, OCCC)의 형태를 관찰하여 미성숙 (immature), 성숙 (mature), 과성숙 (postmature), 변성퇴화 (degenerative) 난자 등으로 구분하였다.

난자를 수정배양액 2 ml가 들어있는 배양접시에 옮긴 후 1~2시간 37°C 5% CO₂ 배양기내에서 배양하였다. 이후 난구세포를 제거하기 위하여 배양된 난자-난구세포 복합체를 0.1% hyaluronidase가 첨가된 D-PBS 용액에 옮겨서 30초간 Pasteur pipette을 이용하여 흡입과 방출을 반복한 후 수정배양액으로 옮겨 다시 Pasteur pipette을 이용하여 난구세포를 깨끗이 제거하고 3회 세척하였다. 세척된 난자를 수정배양액 2 ml가 들어있는 배양접시에 넣어 ICSI 시술 전까지 3~5시간 37°C 5% CO₂ 배양기내에서 배양하였다. ICSI 시술을 시행하기 직전에 난자의 성숙도를 재판정하여 제 1 극체 (first polar body)가 방출된 제 2 감수분열 중기 (metaphase II, M II)의 난자만을 선별하여 ICSI 시술의 대상 난자로 사용하였다.

배양액은 Ham's F-10 (Gibco #430-1200)을 이용하여 250 ml의 5차 증류수로 배양액 (4x)을 만들고, penicillin G 75 mg, streptomycin sulfate 75 mg을 추가한 후 가압여과 소독을 시행하여 4°C 냉장고에 보관하였다. 이와 같이 제조된 배양액 (4x) 25 ml에 5차 증류수 75 ml를 첨가하고, calcium lactate 24.52 mg과 NaHCO₃ 210.6 mg을 추가하여 pH는 7.4, 삼투압은 280~285 mOsm/l가 되도록 하여 매 실험 직전 가압 여과 소독한 후 신생아 제대혈청 (human fetal cord serum, FCS)의 농도가 수정배양액에서는 7.5%, 성장배양액에서는 15%가 되도록 혈청을 첨가한 후 실험에 사용하였다.

4) 고식적 체외수정

과배란유도 후 채취된 난자는 미리 처리된 정

자로 수정시키고 (insemination), 수정배양액인 7.5% FCS을 함유한 Ham's F-10 2 ml가 들어있는 배양접시로 옮기었다. 수정을 위하여 미성숙난자는 6~24시간, 나머지 난자는 4~6시간 동안 37°C 5% CO₂ 배양기내에서 배양한 후 수정을 실시하였다. 수정 직전 정자 부유액내의 정자의 운동성과 수를 검사한 후 추가배양이 끝난 난자를 함유하고 있는 수정배양액 배양접시내에 정자의 농도가 1~2x10⁵/ml되도록 조정하여 수정하였다. 수정 후 16~18시간이 경과한 후 미세피펫 (micropipette, 직경 200 μm)을 이용하여 난자 주위의 난자-난구-관상세포 복합체 (oocyte-cumulus-corona complex, OCCC)를 제거한 후 각각의 난자에 2개의 전핵 (2 pronuclei, 2PN)이 형성되었는지를 관찰하여 정상적으로 수정이 이루어진 난자만을 선별하여 성장배양액인 15% FCS을 함유한 Ham's F-10 2.5 ml가 들어있는 배양접시로 옮긴 후 24~28시간 배양하였다.

5) 난자 세포질내 정자 주입술 (ICSI 시술)

미세보조수정술, 즉 ICSI 시술의 시행 방법은 이미 본 교실에서 발표한 바와 같다 (문신용 등, 1996 & 1997a, b). ICSI 시술을 위한 집게피펫 (holding pipettes) 및 주입피펫 (injection pipettes)은 Narishige사의 GD-1 유리모세관 (glass capillary tube)을 사용하여 만들었다. 유리모세관은 2% 7x 세척제 (detergent)에서 초음파 세척 후 다시 초순수 증류수에서 30분씩 2회 초음파 세척하고 100°C dry-oven에서 건조 멸균한 후 사용하였다. 집게피펫은 피펫 puller를 이용하여 피펫을 가늘고 길게 뽑은 후 microforge (MF-9, Narishige)에서 자르고 불에 달구어서 (fire polishing) 내경이 15~20 μm, 외경이 100~120 μm 정도 되게 다듬어서 사용하였다. 주입피펫은 피펫 puller로 가늘고 길게 뽑은 피펫을 미세연마기 (microgrinder)에서 3~5분 동안 갈아서 피펫 끝의 내경이 4~5 μm, 외경이 8~9 μm 이며, 40° 정도의 각도를 갖게 하였다. 이때 미세연마기에 증류수를 천천히 떨구어 주어 피펫 내부로 유리 파편이 들어가는 것을 방지하였다.

ICSI 시술은 도립현미경 (Diaphot 300, Nikon, Japan)에 장착된 1쌍의 미세조작기 (micromanipulator; NT-88, Narishige, Japan)를 이용하였으며, 준비된 집게 및 주입피펫을 3차원 수압식 미세조작기 (micromanipulator)의 기구버팀목 (tool holder)에 고정하고, 미세주입기 (microinjector)에 연결

하였다.

준비된 운동성 정자를 oil이 덮혀있는 배양접시내의 10% polyvinylpyrrolidone (PVP) 용액 소적에 넣어 정자의 운동성을 감소시키고, 주입피펫을 이용하여 정자의 중편부 (midpiece)에 물리적인 힘을 가하여 비활동화 (immobilization)시켰다. 비활동화된 정자를 꼬리 부위부터 주입피펫내로 흡입하였다. 집게피펫을 이용하여 준비된 성숙난자 (M II)의 방출된 제 1극체가 6시, 혹은 12시 방향이 되도록 난자를 고정된 후 주입피펫을 난자의 정중앙인 3시에서 9시 방향으로 통과시켜 난자의 세포질내로 정자를 주입하였다. 정자 주입시 주입피펫으로 난자의 세포질을 흡입하여 난막 (oolemma)이 정확히 관통되었음을 확인하였고, 이후 PVP 용액이 난자 세포질내로 들어가지 않도록 조심스럽게 정자와 흡입된 난자의 세포질을 다시 주입하였다. 정자 주입이 완료된 후 oil이 피복된 수정배양액의 20 μ l 소적 마다 1개씩의 난자를 넣어서 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 배양기내에서 배양하였다.

6) 난자의 수정 확인

ICSI 시술 후의 과정은 통상적인 체외수정시술 과정과 동일하였다. ICSI 시술 16~18시간 후 역반사현미경 (x200, x400)을 이용하여 난자의 손상 여부 및 전핵의 형성 여부 등을 자세히 관찰하였다. 2개의 극체 (polar body)와 세포질내에 핵소체 (nucleolus)를 포함하고 있는 선명한 2개의 전핵 (pronucleus)이 관찰되면 정상적으로 수정된 배아로 간주하였다. 정상적으로 수정된 배아에서 24시간 후 배아의 난할 (cleavage)을 관찰하였으며, 할구 (blastomeres)의 균등성, 할구파편 (anucleate fragments)의 포함 정도 등에 따라 배아의 질적 등급 (embryo grading)을 평가하였다 (김석현 등, 1995).

7) 배아의 동결보존 및 해동

배아의 동결보존 및 해동은 완만동결-급속해동 (slow freezing-rapid thawing) 방법을 이용하였다 (Kim *et al.*, 1996). 20% FCS이 포함된 D-PBS를 기본 용액으로 하였으며, 동결보존액 (cryoprotectant)으로 1.5M propanediol (PROH)과 0.1M sucrose를 사용하였다. 배아를 동결보존액에 10분 동안 노출시켜 탈수화를 유도한 후 0.25 ml plastic straw에 1~2개씩의 배아를 넣어 자동 세포동결기 (Kryo-10, Planer)에서 동결하였다. 10 $^{\circ}$ C에서 -7 $^{\circ}$ C까지는 분당 -2 $^{\circ}$ C씩 냉각시켰으며, -7 $^{\circ}$ C에서

일단 5분 동안 정지시켰다. 정지 1분 후 과냉각을 방지하기 위하여 액체 질소 (liquid nitrogen, LN₂)에서 냉각된 핀셋으로 식빙 (seeding)을 실시하였다. -7 $^{\circ}$ C에서 -30 $^{\circ}$ C까지는 분당 -0.3 $^{\circ}$ C씩 냉각시켰으며, -30 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 정지시킨 후 액체 질소통에 넣어 보관하였다.

배아의 해동은 동결보존된 straw를 액체 질소통에서 대기 중으로 옮겨 20초 동안 노출시킨 후 straw 표면의 물기를 제거하고, 알코올을 문힌 거즈로 닦아 소독하였다. Straw내의 배아와 동결보존액을 배양접시에 부어 해부현미경하에서 배아의 수를 확인한 후 용해액으로 옮겼다. 기본 용해액은 20% FCS이 포함된 D-PBS로 하여 1 단계에서는 1.0M PROH과 0.2M sucrose 용액에서 5분 동안, 2 단계에서는 0.5M PROH과 0.2M sucrose 용액에서 5분 동안, 3 단계에서는 0.2M sucrose 용액에서 5분 동안 노출시키고, 마지막 단계에서는 기본 용해액에서 5분 동안 두었다. 해부현미경하에서 세포질과 투명대가 맑고 완전한 배아를 생존한 것으로 판정하였고, 생존 배아는 Medicult 배양액에서 배아이식시까지 배양하였다.

8) 자궁내막의 준비: 호르몬 투여

동결보존 배아이식을 위한 자궁내막의 준비는 호르몬 투여, 즉 GnRH agonist/E₂ valerate의 병합요법을 기본으로 하였다. GnRH agonist (Decapeptyl, Ferring, Malmo, Sweden)는 황체가 중기부터 매일 0.1 mg씩 피하주사하여 뇌하수체 억제를 유도한 후 월경주기 제 2일부터 E₂ valerate (Divina, Orion, Denmark)를 경구 투여하였으며, 이때부터 GnRH agonist 용량을 0.05 mg으로 감소시켰다. E₂ valerate는 2 mg, 4 mg, 6 mg씩 순차적으로 각각 4일간, 총 12일 동안 경구 투여하였다. 이후 질식 초음파검사상 자궁내막의 두께가 10 mm 이상이면 E₂ valerate의 용량을 4 mg으로 감량시킨 후 GnRH agonist 투여를 중단하였으며, progesterone in oil (Progest, Samil Pharma, Korea) 100 mg을 최소한 3회 이상 근주한 후 다음날 동결보존 배아이식을 실시하였다. 만일 자궁내막의 두께가 10 mm에 도달하지 못한 경우에는 E₂ valerate의 용량을 8 mg으로 증량시켜 4일간 추가로 투여한 후 자궁내막의 두께에 상관없이 동결보존 배아이식을 실시하였다. 배아이식 후에는 E₂ valerate 4 mg을 매일 경구 투여하였고, progesterone in oil 100 mg을 매일 근주하였다.

E₂ valerate만을 투여하는 단독요법은 GnRH

agonist의 투여 없이 월경주기 제 2일부터 E₂ valerate를 2 mg, 4 mg, 6 mg씩 순차적으로 각각 4일간, 총 12일 동안 경구 투여하였다. 이후 자궁 내막의 두께가 10 mm 이상이면 E₂ valerate의 용량을 4 mg으로 감량시키면서 progesterone in oil 100 mg을 최소한 3회 이상 근주한 후 다음날 동결보존 배아이식을 실시하였다. Progesterone in oil을 투여하기 전에 혈중 progesterone (P₄) 농도를 측정하여 내인성 LH surge가 없음을 확인하였다. 배아이식 후에는 E₂ valerate 4 mg을 매일 경구 투여하였고, progesterone in oil 100 mg을 매일 근주하였다.

자연 배란주기를 이용하는 방법은 혈중 E₂ 농도 측정과 질식 초음파검사로 우성난포의 성장과 발달을 감시하면서 우성난포의 평균 직경이 15 mm에 도달하면 매일 두번씩 urinary LH kit를 이용하여 내인성 LH surge가 없음을 지속적으로 확인한다. 우성난포의 직경이 18 mm에 도달하면 hCG 10,000 IU를 투여하여 배란을 유도하며, hCG 투여 다음날부터 progesterone in oil 100 mg을 최소한 3회 이상 근주한 후 다음날 동결보존 배아이식을 실시하였다. 배아이식 후에는 progesterone in oil 100 mg을 매일 근주하였다.

9) 배아의 질적 등급 및 자궁내 배아 이식

배아의 질적 등급은 Veeck classification system에 따른 5단계의 형태학적 등급을 이용하여 배아이식 직전 관찰한 등급을 사용하였다. 이때 grade 1은 5점, grade 2는 4점, grade 3은 3점, grade 4는 2점, grade 5는 1점을 주어 해당 배아의 난할세포 수 (number of blastomeres)와 곱하고, 이를 모두 더하여 각각의 주기에서 배아이식당 누적배아지수 (cumulative embryo score, CES)를 계산하였다. 2PN 배아와 1PN 배아는 배아의 등급이 없으므로 모두 0점으로 처리하였고, 8-세포기 이상의 배아는 난할세포의 수를 알 수 없으므로 모두 8-세포기 배아와 동일하게 취급하였다 (김석현 등, 1995).

난할이 확인된 배아는 Jones catheter를 이용하여 등급이 좋은 배아를 최고 6개까지 환자의 자궁내로 배아이식하였다 (Kim et al., 1996). 배아의 자궁내이식 후에는 최소한 4시간 정도 안정을 취하였다.

10) 임신 확인

임신의 확인은 배아이식 후 제 11일에 혈중 β-hCG 농도를 확인하여 3 mIU/ml 이상이고, 1주일

후 실시한 추적검사에서 혈중 β-hCG의 상승을 보이며, 임신 제 5~6주경에 실시한 질식 초음파 검사에서 태낭 (gestational sac) 및 태아의 심장 박동이 관찰되는 경우와 임상적으로 유산이 의심되어 실시한 인공소파술에 의하여 병리조직학적으로 태아 조직이 확인된 경우를 임상적 임신으로 판정하였다. 생화학적 임신 (biochemical pregnancy)은 혈중 β-hCG 농도의 상승 후 감소를 보이는 경우로 정의하였으며, 임상적 임신의 범주에서 제외하였다. 임상적 임신으로 진단된 환자는 임신 및 분만의 결과를 추적 관찰하여 확인하였다.

β-hCG의 측정은 hCG-beta-kit (Serono Diagnostics, Switzerland & International)를 이용한 방사면역측정법 (RIA)을 사용하였으며, 측정의 민감도는 3 mIU/ml, intraassay CV는 3.1%, interassay CV는 6.0% 이었다.

11) 연구 결과 분석

연구 결과에 대한 통계학적 분석은 chi-square test, Student's t-test 등을 이용하였다. p<0.05인 경우 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

연구 결과

동결보존 배아의 해동 결과를 분석 비교하였을 때 회수된 동결보존 배아의 수 및 동결보존 배아의 회수율 (recovery rate)에 있어서 ICSI군과 IVF군 사이에 통계학적으로 유의한 차이가 없었으며 (6.8 ± 1.3 vs. 6.7 ± 2.3 , $100.0 \pm 0.0\%$ vs. $99.5 \pm 2.7\%$), 생존 배아의 수 및 동결보존 배아의 생존율 (survival rate)에 있어서도 역시 유의한 차이가 없었다 (5.6 ± 1.3 vs. 5.4 ± 2.0 , $85.2 \pm 16.1\%$ vs. $82.2 \pm 19.7\%$) (Table 1).

동결보존 및 해동 후 자궁내로 이식된 배아의 수는 ICSI군에서 IVF군에 비하여 많았지만 유의한 차이는 없었다 (5.5 ± 1.2 vs. 5.0 ± 1.6). 양군에서 배아의 해동 후 난할율은 각각 $96.9 \pm 6.7\%$, $94.7 \pm 13.0\%$ 로서 유의한 차이가 없이 모두 90% 이상이었으며, 따라서 전핵단계에서 동결보존된 배아가 해동 후 대부분 성공적으로 초기 난할 단계로 발달하였다. 배아이식시 배아의 질적 상태를 반영하는 누적배아지수 (CES)도 양군에서 유의한 차이가 없었다 ($54.5 \pm 31.1\%$ vs. 49.0 ± 20.0).

동결보존 배아의 배아이식 주기당 임상적 임

Table 1. Cycle characteristics of cryopreserved-thawed embryo transfer in ICSI and conventional IVF groups

No.	ICSI	Conventional IVF
Patients	16	63
Cycles	20	76
Thawed embryos	6.8±1.3	6.7±2.3
Recovered embryos	6.8±1.3	6.7±2.3
Recovery rate (%)	100.0	99.5±2.7
Survived embryos	5.6±1.3	5.4±2.0
Survival rate (%)	85.2±16.1	82.2±19.7
Transferred embryos	5.5±1.2	5.0±1.6
Cleavage rate (%)	96.9±6.7	94.7±13.0
Cumulative embryo score (CES)	54.5±31.1	49.0±20.0

Mean ± SD

Not significant (p>0.05) for all parameters.

신율은 ICSI군에서 35.0% (7/20)로서 IVF군의 22.4% (17/76)에 비하여 높았지만 유의한 차이는 없었으며, 시술환자당 임상적 임신율도 각각 43.8% (7/16), 27.0% (17/63)로서 역시 유의한 차이가 없었다 (Table 2).

배아이식 후 혈중 β-hCG 농도만 상승하고, 자궁내 임신낭이 관찰되지 않았던 생화학적 임신율은 양군 사이에 유의한 차이가 없었다. 임상적 유산율은 각각 0%, 29.4% (5/17)로서 유의한 차이가 없었다.

다태임신율은 ICSI군에서 42.9% (3/7)로서 IVF군의 17.6% (3/17)에 비하여 높았지만 유의한 차이는 없었으며, 양군 모두 쌍태임신 2예와 삼태임신 1예가 각각 성립되었는데 삼태임신의 경우 선택적 유산술 (selective fetal reduction, SFR)이 성공적으로 시행되었다.

동결보존 배아이식 후 배아당 자궁내막 착상율은 각각 9.9% (11/111), 5.6% (21/378)로서 ICSI군에서 높았지만 유의성은 없었다.

동결보존 배아이식을 위한 자궁내막의 준비에 있어서 progesterone 투여 직전에 측정된 자궁내막의 두께는 각각 9.4±2.0 mm, 9.3±1.8 mm로서 유의한 차이가 없었다.

배아의 동결보존부터 해동시까지의 기간, 즉 배아의 동결보존 기간은 ICSI군에서 112.1±80.0 일로서 IVF군의 124.8±140.1일에 비하여 길었으

Table 2. Pregnancy outcomes of cryopreserved-thawed embryo transfer in ICSI and conventional IVF groups

No.	ICSI	Conventional IVF
Biochemical preg.	1	4
per cycle	5.0%	5.3%
per patient	6.3%	6.3%
Clinical preg.	7	17
per cycle	35.0%	22.4%
per patient	43.8%	27.0%
Clinical abortions	0	5 (29.4%)
Multiple preg.	3 (42.9%)	3 (17.6%)
Twin	2	2
Triplet	1	1
Implantation rate (%)	9.9% (11/111)	5.6% (21/378)

Not significant (p>0.05) for all parameters.

나 유의한 차이는 없었다.

고 찰

체외수정시술 분야에 ICSI 시술이 도입된 이후 Van Steirteghem 등 (1994)은 최초로 ICSI 시술군과 고식적 체외수정시술군에서의 동결보존 배아이식 결과를 비교하여 동결보존 배아의 생존율 (53% vs. 51%), 배아이식 주기당 임상적 임신율 (12.9% vs. 10.7%) 및 분만율 (5.9% vs. 7.1%), 배아당 착상율 (7.8% vs. 5.9%)이 크게 다르지 않음을 보고하였다. 그러나 생화학적 임신율 (40.9% vs. 27.0%)과 임신 제 1삼분기의 유산율 (27.3% vs. 16.2%)은 ICSI 시술군에서 더 높아 ICSI 시술의 임상 적용시 주의를 요한다고 하였으며, 이러한 결과가 ICSI 시술 자체에서 기인하는지 여부에 관하여는 더 많은 연구가 필요하다고 결론지었다.

이후 Al-Hasani 등 (1996)도 유사한 연구에서 동결보존 배아의 생존율 (76.5% vs. 78%), 주기당 임상적 임신율 (17% vs. 20%) 및 유산율 (18% vs. 22%), 배아당 착상율 (6% vs. 7%)은 양군에서 유의한 차이를 보이지 않았다고 보고하였다.

본 연구에서 ICSI 시술로 체외수정 후 동결보존하였던 배아를 이식하더라도 기존의 고식적 체외수정 후의 동결보존 배아이식과 비교하여 동결보존 배아의 회수율, 생존율, 임신율, 착상율

등에 있어서 유의한 차이가 없어 상기한 연구 보고들과 유사한 결과를 얻었다. 그러나 본 연구에서는 Van Steirteghem 등 (1994)의 보고와는 상이하게 생화학적 임신율 및 유산율에 있어서 양군 사이에 유의한 차이가 없었다. 한편 본 연구에서는 Al-Hasani 등 (1996)의 연구 방법과 동일하게 대부분 전핵단계의 배아를 동결보존한 후 배아이식하였으므로 난할단계의 배아를 동결보존하였던 Van Steirteghem 등 (1994)의 연구 결과와의 직접적인 비교는 곤란할 것으로 생각된다.

그러나 Van Steirteghem 등 (1994)이 난할단계의 배아를 동결보존한 것이 해동 후 상대적으로 낮은 배아의 생존율과 배아이식 후 높은 생화학적 임신율을 초래하였는지는 미지수이다. Testart 등 (1988)은 전핵단계의 동결보존 배아이식 시 난할단계의 동결보존 배아이식에 비하여 생존율과 임신율이 더 낮았다고 보고하였고, Troup 등 (1991)은 배아의 생존율 (72% vs. 60%) 및 주기당 임상적 임신율 (47% vs. 14%)이 초기 난할단계에 비하여 전핵단계의 동결보존에서 높았으나 유의성은 없었다고 보고한 반면, Fugger 등 (1991)은 전핵단계의 동결보존시 유의하게 주기당 임신율이 높았다 (21.8% vs. 11.5%)고 보고하여 배아의 동결보존 결과에 있어서 배아의 발달 단계에 따른 차이성의 존재 여부에 관하여는 아직 논란이 많은 실정이다.

전핵단계의 배아를 동결보존한 경우 난할단계에 비하여 생존율이 떨어지는 기전으로서 배아의 자연선택 (natural selection) 기전이 상대적으로 덜 일어나고, 핵내 물질이 불안정하게 유사분열 직전에 있을 가능성이 크므로 mitotic spindle 이 상대적으로 손상을 입기 쉬운 점 등이 제시되고 있다. 본 연구 결과로 이러한 기전을 직접 설명할 수는 없으나 해동 후 배아의 생존율이 80% 이상으로 비교적 높고, 해동 후 전핵단계의 배아가 난할단계로 발달하는 비율, 즉 배아의 난할율이 전체적으로 95%를 상회하므로 전핵단계의 동결보존도 매우 유용한 배아의 동결보존 방법이라고 사료된다.

본 연구에서 배아의 생존율은 동일하게 전핵단계의 배아를 동결보존한 Al-Hasani 등 (1996)의 연구 결과 보다도 더 높았는데 일반적으로 동결보존 배아의 해동 후 생존율을 결정하는 요인으로는 동결 전 배아의 상태가 가장 중요하며 (Camus et al., 1989), 이외에 동결보존제, 동결 및

해동의 기술적 측면 등이 영향을 줄 수 있을 것으로 인지되고 있다 (Van der Elst et al., 1995). 그러나 Van der Elst 등 (1995)은 배아의 동결보존시 dimethylsulfoxide (DMSO)를 이용한 방법이 1,2-propanediol (PROH)을 이용한 방법에 비하여 배아의 생존율 (52.6% vs. 32.0%)이 더 높았다고 보고한 반면, PROH를 이용하였던 본 연구에서는 전체적으로 80% 이상의 높은 생존율을 나타내었다. 한편 전핵단계의 배아를 동결보존한 경우에는 동결 전 배아의 상태를 평가하기가 거의 불가능하므로 이에 관한 연관성은 추론할 수가 없다는 단점이 존재한다.

본 연구 결과 ICSI군과 IVF군에서 동결보존 및 해동 후 배아의 생존율에 유의한 차이가 없는 것으로 미루어 보아 최소한 ICSI 시술 자체가 배아의 동결보존 후 생존력에는 별다른 영향을 미치지 않을 것으로 사료된다.

최근 Hoover 등 (1997)도 ICSI 시술군과 고식적 체외수정시술군에서 동결보존 배아이식 결과를 비교하면서 배아의 생존율 (93.2% vs. 94.8%)과 난할율 (95.2% vs. 94.7%)에 있어서 유의한 차이가 없었고, 임상적 임신율 (14.0% vs. 17.4%), 유산율 (25.0% vs. 23.1%) 및 착상율 (5.8% vs. 6.7%)에 있어서도 유의한 차이가 없었다고 보고하였다. Hoover 등 (1997)의 결과는 기본적으로 전핵단계의 배아를 동결보존하였고, 동결보존제로 PROH를 이용하였으며, 배아의 생존율이나 난할율이 모두 90% 이상으로 높다는 점 등에서 본 연구 결과와 가장 유사하다고 할 수 있다.

체외수정시술시 신선 배아이식의 경우와 동일하게 동결보존 배아이식의 경우에도 이식되는 배아의 수 (Anderson-Sykes et al., 1994), 배아이식 직전 관찰되는 배아의 질 (Schalkoff et al., 1993; Tucker et al., 1995; Lightman et al., 1997) 등은 향후의 임신율에 영향을 미친다. Schalkoff 등 (1993)의 다인자분석 (multifactorial analysis) 연구에 의하면 동결보존 배아이식시 환자의 연령과 이식 배아의 질이 예후인자로서 작용하며, 반면에 이식 배아의 수, 배아의 동결보존 기간, 이전의 과배란유도 중 혈중 E₂ 농도의 최고치는 임신 결과에 영향을 주지 않았다. 즉 동결보존 배아이식시 양질 (good quality)의 배아 (sponsoring embryo)가 하나라도 이식 배아 중에 존재하는 경우 임신율이 유의하게 높았으며 (35% vs. 15%), 40세 이상의 환자에서 임신 예는 한 경우도 없었다. Light-

man 등 (1997)도 배아이식시 *sponsoring embryo*가 하나라도 존재하는 경우 임신율이 유의하게 높았으며 (18.2% vs. 9.8%), 배아당 착상율도 유의하게 높았다고 보고하였다 (7.0% vs. 3.1%).

본 연구에서 ICSI군과 IVF군 비교시 여성의 연령과 누적배아지수 (CES)로 표현되는 이식 배아의 질에 있어서 유의한 차이가 없었으며, 더구나 본 연구에서는 progesterone 투여 직전에 자궁내막의 두께를 측정하였는데 양군에서 각각 9.2 ± 1.9 mm, 9.3 ± 1.8 mm로서 유의한 차이가 없었다. 한편 본 연구에서 배아의 동결보존 기간을 분석한 결과 양군에서 각각 110.8 ± 81.0 일, 124.2 ± 142.8 일로서 IVF군에서 동결보존 기간이 긴 경향이 있었지만 역시 유의한 차이가 없었다.

본 연구 대상 중 IVF군에는 이전의 과배란유도시 저반응군으로 분류되어 난자공여 프로그램으로 난자를 공여받은 후 배아이식이 여의하지 않아 배아를 동결보존시켰던 10주기도 포함되어 있다. De Ziegler 등 (1990)은 고식적 체외수정시술 후 동결보존 배아이식시 난자를 공여받았던 경우에서 임신율이 유의하게 높았다고 (33.3% vs. 9%) 보고한 바 있으며, 이에 근거하여 본 연구에서 IVF군에 난자공여 주기가 포함됨으로써 연구 결과가 변형되었을 가능성을 배제할 수 없다. 그러나 난자를 공여받았던 10주기를 제외한 IVF군 66주기와 ICSI군 20주기를 상호 비교하였을 경우에도 동결보존 및 배아이식 후 연구 결과에 상기한 모든 변수들에 있어서 통계학적 유의성이 없었다. 한편 IVF군 76주기만을 난자공여군 10주기와 비난자공여군 66주기로 대별하여 상호 비교하였을 경우 난자공여군에서 임신율이 높은 경향은 있었으나 유의한 차이는 없어서 (40.0% vs. 19.7%) De Ziegler 등 (1990)의 연구 결과와는 상이하였다.

본 연구 결과 체외수정시술시 남성인자 불임 환자 및 저수정을 환자를 대상으로 체외수정의 방법으로서 ICSI 시술을 시행하여 잉여 배아를 동결보존한 후 배아이식을 실시하여도 기존의 고식적 체외수정시술에서의 동결보존 배아이식과 비교하여 배아의 회수율, 생존율, 임신율, 유산율, 착상율 등에 있어서 유의한 차이가 없었다. 또한 본 연구에서는 누락되었지만 향후 더 많은 ICSI 시술 환자를 대상으로 동결보존 배아이식 후 임신 예에서의 분만 결과, 선천성 기형 발생 등에 관한 장기간의 추적조사가 필요할 것

으로 사료된다.

결 론

저자들은 1996년 6월부터 1997년 9월까지 서울대학교병원 불임클리닉에서 시행하였던 완만 동결-급속해동 방법을 이용한 동결보존 배아이식 96주기 (79명)를 대상으로 동결보존 배아이식에 있어서 ICSI 시술 (20주기, 16명)과 기존의 고식적 체외수정시술 (76주기, 63명)시 배아의 생존율 및 임신 결과를 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 대상 환자의 연령은 양군에서 각각 31.2 ± 3.4 세, 32.6 ± 3.3 세로서 유의한 차이가 없었다.
2. 동결보존 배아의 해동 결과를 비교하였을 때 회수된 동결보존 배아의 수, 동결보존 배아의 회수율, 생존 배아의 수, 동결보존 배아의 생존율은 양군에서 유의한 차이가 없었다.
3. 배아의 해동 후 난할율은 모두 90% 이상으로서 유의한 차이가 없었으며, 이식 배아의 질적 상태를 반영하는 누적배아지수 (CES)도 유의한 차이가 없었다.
4. 동결보존 배아의 배아이식 주기당 및 시술 환자당 임상적 임신율은 ICSI군에서 각각 35.0% (7/20), 43.8% (7/16)로서 IVF군의 22.4% (17/76), 27.0% (17/63)에 비하여 각각 높았지만 유의한 차이는 없었다.
5. 임상적 유산율 및 다태임신율도 양군에서 유의한 차이가 없었다.
6. 동결보존 배아이식 후 배아당 자궁내막 착상율은 ICSI군에서 9.9% (11/111)로서 IVF군의 5.6% (21/378)에 비하여 높았지만 유의성은 없었다.

7. 동결보존 배아이식을 위한 자궁내막의 준비시 progesterone 투여 직전에 측정된 자궁내막의 두께는 각각 9.4 ± 2.0 mm, 9.3 ± 1.8 mm로서 유의한 차이가 없었다.

8. 배아의 동결보존 기간은 ICSI군에서 112.1 ± 80.0 일로서 IVF군의 124.8 ± 140.1 일에 비하여 길었으나 유의한 차이는 없었다.

결론적으로 체외수정시술 후 동결보존 배아이식시 난자와 정자의 체외수정 방법 중 ICSI 시술과 고식적 체외수정시술을 상호 비교하였을 때 동결보존 및 해동 후 배아의 회수율, 생존율, 임신율, 유산율, 착상율 등에 있어서 유의한 차이

가 없었다.

인 용 문 헌

- 김석현, 송은섭, 송용상, 이경희, 김정구, 문신용, 이진용, 장윤석: 기초 혈중 follicle stimulating hormone 농도가 높은 체외수정시술 환자의 과배란유도시 gonadotropin-releasing hormone agonist의 단기투여법과 장기투여법의 비교. 대한불임학회지 1991, 18, 201-208.
- 김석현, 지병철, 정경남, 김희선, 류범용, 오선경, 문신용, 이진용, 장윤석: 체외수정시술시 다탄임신의 예방에 관한 연구: 배아 등급과 누적배아지수의 의의. 대한산부회지 1995, 38, 2333-2346.
- 문신용, 김석현, 김광례, 채희동, 이재훈, 정경남, 김희선, 서창석, 최영민, 김정구, 이진용: 남성인자 불임환자에서의 체외수정시술시 난자 세포질내 정자 주입술을 이용한 미세보조수정술의 임상적 효용성에 관한 연구. 대한산부회지 1996, 39, 2310-2323.
- 문신용, 김석현, 류범용, 오선경, 서창석, 최영민, 김정구, 이진용: 체외수정시술시 난자 세포질내 정자 주입술을 이용한 난자의 미세보조수정술에 관한 연구. 대한산부회지 1997a, 40, 1117-1130.
- 문신용, 김석현, 채희동, 김광례, 이재훈, 김희선, 류범용, 오선경, 서창석, 최영민, 김정구, 이진용: 미수정 및 저수정율의 기왕력을 지닌 체외수정시술 환자에서의 난자 세포질내 정자 주입술을 이용한 미세보조수정술에 관한 연구. 대한불임학회지 1997b, 24, 83-93.
- 문신용, 최진, 송용상, 김석현, 김정구, 이진용, 장윤석: 체외수정시술을 위한 과배란유도시 gonadotropin-releasing hormone agonist의 장기투여법과 단기투여법의 비교. 대한산부회지 1991, 34, 1125-1133.
- Al-Hasani S, Ludwig M, Gagsteiger F, K pker W, Sturm R, Yilmaz A, Bauer O, Diedrich K: Comparison of cryopreservation of supernumerary pronuclear human oocytes obtained after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and after conventional in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1996, 11, 604-607.
- American Society for Reproductive Medicine/Society for Assisted Reproductive Technology Registry: Assisted reproductive technology in the United States and Canada: 1994 results. *Fertil Steril* 1996, 66, 697-705.
- Amso NN, Ahuja KK, Morris N: The management of predicted ovarian hyperstimulation involving gonadotropin-releasing hormone analog with elective cryopreservation of all pre-embryos. *Fertil Steril* 1990, 53, 1087-1090.
- Anderson-Sykes S, Dunphy BC, Pattinson HA, Jarrell J, Zhang XQ: Factors predicting outcome in 215 consecutive thawed embryo replacements. *Fertil Steril* 1994, 61, 1156-1157.
- Awonuga AO, Dean N, Zaidi J, Pittrof RU, Bekir JS, Tan SL: Outcome of frozen embryo replacement cycles following elective cryopreservation of all embryos in women at risk of developing ovarian hyperstimulation syndrome. *J Assist Reprod Genet* 1996, 13, 293-297.
- Bergh C, Werner C, Nilsson L, Hamberger L: Cumulative birth rates following cryopreservation of all embryos in stimulated in vitro fertilization (IVF) cycles. *J Assist Reprod Genet* 1995, 12, 191-194.
- Camus M, Van den Abbeel E, Van Waesberghe L, Wisanto A, Devroey P, Van Steirteghem AC: Human embryo viability after freezing with dimethylsulphoxide as a cryoprotectant. *Fertil Steril* 1989, 51, 460-465.
- Chang YS, Kim CH, Kim SH, Shin CJ, Kim JG, Moon SY, Lee JY: Use of GnRH Agonist in IVF Program. In: Mori T, Tominaga T, Aono T, Hiroi M, eds. *Frontiers in Endocrinology: Perspectives on Assisted Reproduction (Vol. 4)*. Ares-Serono Symposia Publications, 1994, 285-291.
- Chang YS, Kim SH, Shin CJ, Kim JG, Moon SY, Lee JY: The Efficacy of a combination administration of gonadotropin-releasing hormone agonist and gonadotropins for controlled ovarian hyperstimulation in IVF program. *Asia-Oceania J Obstet Gynecol* 1990, 16, 337-345.
- De Ziegler D, Frydman R: Different implantation rates after transfers of cryopreserved embryos originating from donated oocytes or from reg-

- ular in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1990, 54, 682-688.
- Frederick JL, Ord T, Kettel LM, Stone SC, Balmaceda JP, Asch RH: Successful pregnancy outcome after cryopreservation of all fresh embryos with subsequent transfer into an unstimulated cycle. *Fertil Steril* 1995, 64, 987-990.
- Fugger EF, Bustillo M, Dorfmann AD, Schulman JD: Human preimplantation embryo cryopreservation: selected aspects. *Hum Reprod* 1991, 6, 131-135.
- Gelety T, Surrey E: Cryopreservation of embryos and oocytes: an update. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1993, 5, 606-614.
- Hoover L, Baker A, Check JH, Lurie D, Summers D: Clinical outcome of cryopreserved human pronuclear stage embryos resulting from intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1997, 67, 621-624.
- Kim SH, Kim CH, Suh CS, Moon SY, Lee JY, Chang YS: Simultaneous program of natural-cycle in vitro fertilization and cryopreserved-thawed embryo transfer. *J Assist Reprod Genet* 1996, 13, 716-721.
- Lightman A, Kol S, Wayner V, Vertman D, Manor D, Itskovitz-Eldor J: The presence of a sponsoring embryo in a batch of poor quality thawed embryos significantly increases pregnancy and implantation rate. *Fertil Steril* 1997, 67, 711-716.
- Lin YP, Cassidenti DL, Chacon RR: Successful implantation of frozen sibling embryos is influenced by the outcome of the cycle from which they were derived. *Fertil Steril* 1995, 63, 262-267.
- Nijs M, Geerts L, van Rosendaal E: Prevention of multiple pregnancies in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1993, 59, 1245-1250.
- Pattinson HA, Hignett M, Dunphy BC, Fleetham JA: Outcome of thawed embryo transfer after cryopreservation of all embryos in patients at risk of ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 1994, 62, 1192-1196.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC: Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992, 340(8810), 17-18.
- Shalkoff ME, Oskowitz SP, Powers RD: A multifactorial analysis of the pregnancy outcome in a successful embryo cryopreservation program. *Fertil Steril* 1993, 59, 1070-1074.
- Shaker AG, Zosmer A, Dean N, Bekir JS, Jacobs HS, Tan SL: Comparison of intravenous albumin and transfer of fresh embryos with cryopreservation of all embryos for subsequent transfer in prevention of ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 1996, 65, 992-996.
- Testart J, Lasalle B, Belasch-Allart J: Human embryo freezing. *Ann NY Acad Sci* 1988, 541, 531-32.
- Trounson AO: Cryopreservation. *Br Med Bull* 1990, 46, 695-708.
- Troup SA, Matson PL, Critchlow JD, Morroll DR, Lieberman BA, Burslem RW: Cryopreservation of human embryos at the pronucleate, early cleavage, or expanded blastocyst stages. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1991, 38, 133-139.
- Tucker MJ, Morton PC, Sweitzer CL: Cryopreservation of human embryos and oocytes. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1995, 7, 188-192.
- Van der Elst J, Camus M, Van den Abbeel E: Prospective randomized study on the cryopreservation of human embryos with dimethylsulfoxide or 1,2-propanediol protocols. *Fertil Steril* 1995, 63, 92-100.
- Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Schmidt J: High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1993, 8, 1061-1066.
- Van Steirteghem AC, Van den Abbeel E, Camus M: Cryopreservation of human embryos. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1992, 6, 313-325.
- Van Steirteghem AC, Van der Elst J, Van den Abbeel E, Joris H, Camus M, Devroey P: Cryopreservation of supernumerary multicellular human embryos obtained after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1994, 62, 775-780.
- Veeck L: The morphological assessment of human oocytes and early concepti. In: Keel BA, Webster BW, eds. *Handbook of the laboratory di-*

- agnosis and treatment of infertility*. Boca Raton: CRC Press, 1990, 353.
- Veeck L: Preembryo grading. *Atlas of the human oocyte and early conceptus (vol. 2): preembryo grading*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1991, 121.
- Wada I, Macnamee MC, Wick K: Birth characteristics and perinatal outcome of babies conceived from cryopreserved embryos. *Hum Reprod* 1994, 9, 543-546.
-