

전핵 시기 및 2-4 세포 시기에 동결 보존된 배아의 발생률 및 임신률

P.L. 산부인과 체외수정 연구실

양현원 · 최규완 · 전한식 · 차영범 · 이승재 · 박종민

Pregnancy and Development Rates of Human Embryos Cryopreserved at Pronuclear and 2-4 cell stages

Hyun Won Yang, Kyoo Wan Choi, Han Sik Cheon, Young Beom Cha, Seung Jae Lee and Jong Min Park

IVF Research Laboratory, Park & Lee Infertility Clinic, Seoul 135-270, Korea

= Abstract =

The survival and pregnancy rates were compared between non-frozen embryos and cryopreserved embryos at either pronucleate or 2-4 cell stages using the freezing and thawing techniques being identical in both groups were compared with fresh embryos. 496 embryos were frozen with 1, 2-propanediol and sucrose and 117 2-4 cell stages embryos had been thawed and 79.6 and 66.0% of them respectively were survival. Clinical pregnancy rate was 19.2% for embryos frozen at the pronucleate stage and 19.0% for embryos frozen at the 2-4 cell stages while the pregnancy rate of non-frozen embryos was 21.3%. There were no significant difference in the survival and pregnancy rates of embryos frozen at pronucleate and 2-4 cell stages. The current cumulative pregnancy rate per retrieval in all cycles with frozen zygotes is 35.4%, considerably higher than observed in single transfers of embryos without cryopreservation(21.3%); predicted pregnancy rate after transfer of all frozen embryos is 43.3%. It is concluded that firstly, the survival and pregnancy rate of cryopreserved embryos at pronucleate or 2-4 cell stages are very similar to those from their fresh embryos and non-frozen embryos and secondly, cryopreservation substantially enhances pregnancy attainment from in vitro fertilization.

서 론

과배란 유도 방법은 다수의 난자 및 배아를 얻게 되며 이러한 잉여 난자와 배아에 대한 동결 보존 방법이 활발하게 연구 개발되어 왔다(Fehilly et al., 1985; Al-Hasani et al., 1987; Siebzehnruel et al., 1989; Choi et al., 1991).

배아의 동결 보존은 분열 시기에 따라 여러 종류의 동결 및 해빙 방법이 보고되고 있으나, 아직까지도 동결 보존을 위해 배아 시기의 선택이나 동결할 배아와 당주기에 이식할 배아를 결정하는 문제는 논란이 되고 있다

(Mandelbaum et al., 1988; Trounson et al., 1988; Wilson et al., 1989; Macas et al., 1991; Han et al., 1993; Trounson, Veek and Steirteghem, 1993). 현재까지는 4 세포기 이내의 초기 배아, 특히 전핵시기의 배아를 가지고 1, 2-propanediol(PROH)를 사용하여 저속 동결 방법으로 동결 보존하는 것이 가장 널리 사용되고 있다(Lassalle et al., 1985; Testart et al., 1986; Fugger et al., 1988; Cohen et al., 1988; Veek et al., 1993). 또한 체외 수정 및 배아 이식 시술에 있어서 이러한 잉여 배아의 동결 보존은 다태아 임신의 비율을 줄이고, 전체적인 누적 임신률을 향상시킬 수 있는 것으로

보고되고 있다(Demoulin et al., 1991; Veek et al., 1993).

이에 본원에서는 PROH를 사용하여 전핵 시기에 동결 보존을 시행한 48례와 2-4 세포기에 동결 보존을 시행한 21례를 대상으로 해빙후 생존률과 발생률을 조사하여 비동결 배아와의 차이를 알아보았고, 해빙후 배아의 상태와 이식한 배아의 갯수가 임신률에 미치는 영향을 조사하였다. 그리고 이러한 동결 보존이 배아의 다태아 임신률을 얼마나 감소시킬 수 있고, 또한 시험관 아기 시술에 있어 전체적인 누적 임신률을 얼마나 향상시킬 수 있는지를 동결 보존을 시행하지 않은 군과 비교하여 알아보았다.

재료 및 방법

1. 연구 대상

1992년 7월 1일부터 1993년 12부터 30일까지 본원에서 체외 수정 및 배아 이식을 시행한 환자 989명 1287주기를 대상으로 하였다. 989명 중 870례는 동결을 시행하지 않고 당주기에 전 배아를 이식하였으며, 119례는 당주기에 이식하고 남은 잉여 배아를 동결 보존하였다. 그중 69례를 해빙하여 비교 분석하였으며 난자 공여에 의한 동결 보존례는 결과에서 제외시켰다.

2. 과배란 유도

과배란 유도는 hMG(Humegon, Organon)와 FSH(Metrodin, Serono)를 병용하여 사용하거나 GnRH-a(Buserelin acetate, Superfact, Hoechst)를 함께 투여하여 난소에 과배란을 유도하였다(Cha et al., 1993).

3. 체외수정 배양 조건

배양 조건은 100% 습도, 5% CO₂와 37°C가 유지되는 배양기에서 조직 배양 접시(Falcon 3037; Falcon Plastics, Oxnard, CA)안에 난자를 옮겨 배양하였으며, 난자는 10% 제대 혈청(human fetal cord serum)을 포함한 Ham's F-10(GIBCO Laboratories)에서 수정시키기 전 4-6시간 배양하였고, 수정을 시킨 후 16-18시간 같은 배양액에서 배양하였다. 수정 확인시 두개의 전핵을 가진 배아가 9개 이상 얻어진 경우, 전체적으로 세포질이 투명하고 형태적으로 건강한 양질의 배아이면 당주기에 4

개의 배아를 이식하고 나머지 배아는 후기 전핵 시기에 동결 보존하였고, 세포질이 불투명하거나 형태적으로 불규칙한 경우에는 수정란 전부를 24시간 배양하여 양질의 배아가 4개 이상이면 4개는 이식을 시행하였고 나머지 배아는 2-4세포 시기에 동결 보존을 시행하였다. 그러나 양질의 배아가 4개 미만인 경우는 모두 당주기에 이식하였다.

4. 동결보존 과정

먼저 전핵 시기 배아의 동결보존은 현미경 하에서 두개의 전핵이 접근하여 있고, 전핵안에 인이 적도면에 일렬로 분포하고 있는 후기 전핵 시기의 배아를 임의적으로 선택하여 동결하였으며, 2-4 세포기 배아는 균등한 할구를 가지고 있는 건강한 배아를 동결하였다. 2-4 세포기 배아 및 전핵 시기 배아 모두 동일하게 세포동결기(Kryo-10, Planer)을 이용하여 저속 동결방법으로 동결을 시행하였고, 동결 및 해빙액은 1, 2-propanediol(Sigma Chemical Co.)을 20% 제대 혈청이 포함된 배양액에 첨가하여 사용하였다.

배아는 Dubblecco's phosphate buffered saline (dPBS; GIBCO Laboratories)에 20% 제대 혈청이 포함된 배양액에서 세척하였다. 세척된 배아는 1.5M PROH가 포함된 동결액에 옮겨 37°C가 유지되는 배양기안에서 15분간 방치한 후 1.5M PROH와 0.1M sucrose(Sigma Chemical Co.)가 포함된 동결액으로 옮겼다. 동결액에 옮겨진 배아는 상온에서 15분간 방치하면서 0.25ml straw에 동결액 50 μ l와 함께 넣은 후 전기접착기를 이용 양쪽 끝을 봉합한 후 동결을 시행하였다. 동결은 세포동결기를 이용 -2°C/min 속도로 -7°C까지 냉각하였고, -7°C에서 미리 액체질소에 담가 두었던 forcep을 straw내 동결액의 표면수준에 접촉함으로써 식빙(seeding)을 시행한 후 10분간 정지시켰다. -7°C에서부터 -30°C까지 -0.3°C/min 속도로 동결한 후 straw를 세포동결기에서 꺼내 액체 질소통에 직접 넣었다. 이렇게 동결된 배아는 해빙할 때까지 -196°C 액체 질소통에서 보관하였다.

5. 해빙 및 배아 이식 과정

해빙은 급속 해빙(500°C/min) 방법으로 시행하였다. 즉, 액체 질소통에서 거낸 straw는 공기중에 40초동안 노출시킨 후 straw를 양

손바닥 사이에 수평을 유지하게 놓고 채운으로 해빙을 시행하였다. 해빙된 배아는 1.0M PROH+0.2M sucrose 또는 0.5M PROH+0.2M sucrose를 포함한 해빙액(20% 제대혈청이 포함된 dPBS)에서 각각 5분간 처리한 후 0.2M sucrose만 포함된 해빙액에서 5분간 처리한다. 마지막으로 배아는 dPBS(20% 제대혈청 포함)에서 5분간 처리하고 배양액에 옮겨 배양하였다. 해빙 과정을 마친 후 배아의 생존 여부는 현미경하에서 배아를 관찰하여 모양이 둥글고 세포질이 밝으며 온전한 투명대를 가진 배아를 생존한 것으로 판정하였으며, 특히 2-4 세포기의 배아는 생존한 할구수에 따라 생존율을 나타냈다.

해빙된 전핵 시기의 배아는 배아 이식전 배아의 발생 상태를 확인하였다. 24시간 배양한 배아는 현미경하에서 관찰하여 전체적인 할구의 형태와 fragment의 정도에 따라 4개의 등급으로 나누었다. 1등급은 같은 크기의 할구를 가지고 있으면서 세포질의 fragment가 없는 것을, 2등급은 같은 크기의 할구를 가지고 있으면서 약간의 fragment가 있는 것을, 3등급은 다른 크기의 할구를 가지면서 약간의 fragment가 있는 것을 그리고 전체적으로 세포질에 fragmentation이 심하게 일어난 것을 4등급으로 나누었다.

배아 이식은 전핵 시기 배아인 경우 자연 주기에 배란일 또는 배란일 다음날에 해빙을 하여 24시간 배양 후 이식을 시행하였으며, 2

4 세포 시기 배아의 해빙은 배란일로부터 이틀 후에 이식하기 2-4시간전에 시행하여 이식할 때까지 배양기에서 배양한 후 이식하였다.

5. 임신 확인

임신에 대한 확인은 배아 이식 후 10-14일 경과 후 3일 간격으로 혈청내 β hCG를 측정하여 지속적인 증가를 보인 환자를 임신으로 판정하였으며, 태아의 심박동이 보이기전 β hCG 수치가 떨어지면 생화학적 임신으로 판정하였다.

결 과

전핵 시기 배아 또는 2-4 세포기의 배아를 가지고 동결 및 해빙을 시행한 환자는 69명에 73주기였으며, 채취된 난자수는 1430개 였다. 그 중 107개의 난자는 나관내 이식(GIFT)을 하였고, 나머지 1323개의 난자는 체외수정을 시행하였다. 수정 후 다음날 2개의 전핵이 보인 난자는 870개였으며 수정률은 65.7%를 나타냈다. 수정이 확인된 난자 중 374개는 24시간 배양하여 당주기에 배아 이식을 시행하였고, 나머지 496개는 동결을 시행하여 동결보존률은 57.0%를 나타냈다. 동결 보존을 시행한 496개의 배아 중 366개는 전핵 시기에 그리고 130개는 2-4 세포시에 동결을 시행하였다. 동결 보존된 배아는 일반적으로 3-5개월이 지난 후에 해빙을 시행하였다. 먼저 전핵 시기에 동결보존한 배아는 366개 중 315개를 해

Table 1. Survival Rates of Fresh and Frozen-thawed Embryos from Cryopreserved Embryos Patients

	Fresh	Frozen	
		2 PN	2-4 Cell
Patients	69		
Retrieval	73		
Oocytes recovered	1430		
Oocytes inseminated	1323		
2PN embryos	870 (65.7%)		
Embryos frozen		366	130
Embryos thawed		315	117
Embryos recovered		280(88.9%)	103(88.0%)
Embryos intact post-thaw		223(79.6%)	*68(66.0%)
2PN embryos cultured	374	223	
2PN embryos cleaved	350(93.6%)	191(85.7%)	

*Embryos included >75% intact blastomeres after thawing.

빙하여 280개가 회수되었고(회수율:88.9%), 그 중 223의 배아가 상해를 받지 않은 건강한 형태를 보임으로써 해빙 후 생존율은 79.6%를 보였다. 생존한 배아를 이식 전까지 24시간동안 배양한 결과 2-6 세포기까지 발생률은 85.7%를 나타냈으며, 이는 동결을 시행하지 않은 배아의 발생률 93.6% 보다 다소 낮은 경향을 보였다. 2-4 세포기에 동결보존을 시행한 배아 130개 중 117개를 해빙하여 103개가 회수되어(회수율:88.0%) 전핵 시기의 회수율과 같은 수준을 보임을 알 수 있었고, 생존율은 100% 완전한 할구의 생존을 보인 것이 40개(38.8%), 75% 생존을 보인 것이 28개(27.2%), 50% 보인 것이 22개(21.3%) 그리고 25% 보인 것이 13개(12.6%)로 임신이 가능하다고 판단되는 배아, 75% 이상의

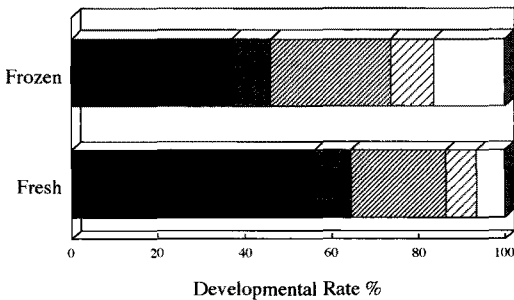


Fig. 1. Developmental rates of fresh and frozen-thawed PN embryos after 24 hour-culture. ■:G1, ▨:G2, ▩:G3, □:G4, □:PN.

완전한 할구를 가지고 있는 해빙된 배아의 생존율은 66%(68/103)를 나타냈다(표 1).

비동결 배아와 전핵 시기에 동결 및 해빙을 시행한 배아의 발생률을 비교한 결과 24시간 배양 후 1등급으로 발생한 비율은 비동결 배아에서 56.1%와 해빙한 배아에서 36.8%, 2등급은 8.3%와 9.4%, 3등급은 21.9%와 27.4%, 4등급은 7.2%와 9.9%를 보였으며, 전핵 시기에 더 이상 발생하지 않은 배아는 6.4%와 16.6%를 나타냈다. 두 군사이에 발생 정도는 전체적으로 같은 비율로 진행되어 감을 알 수 있었으나, 동결 보존을 시행했던 배아에서 1등급으로 발생되는 비율이 비동결 배아에 비해 20%정도 감소되는 것을 알 수 있었고, 또한 전핵 시기에 발생을 멈추는 비율이 동결 및 해빙을 시행한 군에서 2배정도 높게 나타남을 알 수 있었다(그림 1).

동결 보존을 시행했던 환자 중 당주기에 비동결 배아를 이식하여 얻은 임신율은 119명의 환자(127주기) 중 31명이 임신되어 주기당 임신율은 24.4%를 나타냈으며, 동결 보존했던 배아를 해빙하여 임신된 레는 69명(73주기) 중 14명으로 주기당 임신율은 19.1%를 보였다. 이러한 임신율은 동결 보존을 시행하지 않은 환자군의 임신율 21.3%와 비교해 보면 비슷한 수준을 보임을 알 수 있었다. 또한 전핵 시기에 동결된 배아와 2-4 세포기에 동결된 배아의 임신율을 비교해 본 결과 19.2%와 19.0%로 차이없이 같은 임신 성공률을 보

Table 2. Summary of Embryos Transferred During Retrieval Cycles and Thaw(Natural) Cycles

	Non frozen cycles	Frozen cycles			
		Fresh	Thawed		
			Total	PN	2-4C
Patient number	870	119	69	48	21
Retrieval cycles	1160	127	73	52	21
Thawed cycles(TC)			81	59	22
Total Embryos replaced	4756	610	259	191	68
Embryos/transfer	4.1	4.8	3.2	3.2	3.1
Total pregnancies	247	31	14	10	4
Pregnancy rate/retrieval	21.3%	24.4%	19.1%	19.2%	19.0%
Current pregnancies of			45		
Fresh & Thawed cycles(%)			(35.4%)		
Patients with embryos to be thawed			50	32	18
Expected TC pregnancies(19.1%)			10	6	4
Total expected pregnancies	247		55		
Predicted total % pregnant	21.3%		43.3%		

임을 알 수 있었다(표 2).

동결 보존을 시행한 환자의 총 임신률은 119명(127주기) 중 비동결 배아로 임신한 31명과 동결 보존된 배아로 임신한 14명을 합하여 45명으로 35.4%의 주기당 임신률을 보이고 있으며, 앞으로 현재 동결 보존중인 50명의 환자의 배아를 모두 해빙하여 이식할 경우 기대할 수 있는 임신률은 50명에 현재까지 동결된 배아를 사용하여 얻은 임신률 19.2%를 곱한 수 9.6명으로 약 10명의 임신을 더 기대할 수 있다. 따라서 동결보존을 시행한 환자에게서 기대할 수 있는 총 임신률은 119명 중 55명으로 43.3%의 누적 임신률을 기대할 수 있을 것으로 판단된다(표 2).

고 찰

체의 수정 및 배아 이식에 있어서 잉여 난자와 배아에 대한 동결 보존 방법의 도입은 시험관 아기 시술에서의 임신 성공률을 향상시켜 왔다. 현재 전핵 시기 또는 분할 시기의 배아를 가지고 동결 보존한 결과 20-30%의 임신률을 보고하고 있으며, 또한 포배기 시기에 동결 보존한 배아의 임신률은 20% 내외를 보고하고 있다(Fugger et al., 1991; Demoulin et al., 1991; Oehninger et al., 1992; Menezo et al., 1992). 그러나 아직까지도 어느 시기의 배아를 가지고 동결 보존하는 것이 가장 좋은 방법인지는 논란의 대상이 되고 있다.

배아의 시기에 따라서 각기 다른 여러 종류에 동결억제제를 사용하고 있으며, 동결 및 해빙 방법 또한 각기 다른 방법을 선택하고 있다. 일반적으로 전핵 시기에 동결 보존은 1.5M의 PROH를 동결억제제로 사용하여 저속으로 동결을 시행하고 있으며, 초기 분할시기(2-4 세포기)의 배아 또한 같은 방법으로 동결 보존을 하고 있다. 포배기 배아는 일반적으로 glycerol를 사용하여 급속 동결하여 보존하고 있으나 널리 사용되는 방법은 아니다. (Cohen et al., 1986; Hartshorne et al., 1991; Menezo et al., 1992). 그러나 포배기 시기에 동결 보존은 먼저 수정된 배아를 포배기까지 배양해야 하는 배양 수준의 향상이 선행되어야 하는 문제점을 가지고 있으며, 동결억제제로 사용되는 glycerol 또한 다른 동결억제제보다 독성이 심하고 배아에 상해를 많이 주는 것으로 보고되고 있다. 그리고 분할 시기에

배아를 동결 보존하는데는 짝수 분할 시기(2, 4, 6, 8-세포기)에 동결하는 것이 홀수 분할 시기(3, 5, 7-세포기)에 동결하는 것보다 안정된 성공률을 보이고 있으며, 특히 2-4 세포기의 초기 분할 시기에 배아가 보다 더 동결 보존에 유리한 것으로 알려지고 있다(Lassalle et al., 1985). 또한 전핵 시기의 배아에 있어서는 전핵과 세포질내 환경이 보다 안정된 후기 전핵 시기 배아를 가지고 동결 보존하는 것이 보다 효과적인 것으로 보고하고 있다 (Van der Anwera et al., 1992; Yang et al., 1993).

본 연구의 일차적인 목적은 저자들이 발표한 동물 실험을 근거로 사람에 전핵 시기, 특히 후기 전핵시기에 동결 보존을 시행했던 배아와 같은 방법으로 동결 보존했던 2-4 세포기 배아의 생존률과 발생률을 조사하고, 전체적인 임신률을 조사함으로써 기존에 보고된 여러가지 동결 보존 방법 중 본원에 가장 적합한 방법을 선택하여 정립하기 위한 것이었다.

1992년 7월부터 1993년 12월까지 18개월간 동결 보존을 시행한 환자수는 119명으로 전체 환자의 13.7%를 차지하였으며, 동결 보존된 배아 중 432개를 해빙한 결과 전핵 시기 배아의 생존률 79.6%와 2-4 세포기의 생존률 66.0%를 보임으로써 기존에 보고된 Fugger (1988, 1991)의 결과 93%와 71%, Cohen (1988)의 61%와 77%, Demoulin(1991)의 56%와 47%와 비교해서 큰 차이없이 같은 경향을 보임을 알 수 있었다. 그리고 전핵 시기에 동결 보존된 배아를 해빙하여 배양한 결과 85.7%가 2세포기로 발생하여 비동결 배아의 발생률 93.6%보다 다소 낮은 경향을 보였으나, 이러한 결과는 fugger, Cohen과 Testart 등이 발표한 발생률(80-85%)과 같은 수준임을 알 수 있었다. 또한 발생한 배아의 등급별로 발생 정도를 비교해 보면 전체적으로 두 군이 비슷한 발생률을 보이나 1등급으로 발생한 배아의 비율을 비교해 볼때 해빙한 배아에서 10%정도 낮은 발생률을 나타냈다. 이러한 이유는 동결 보존과정 중 동결억제제 또는 결빙으로 인한 상해가 해빙한 배아의 발생을 억제한 것으로 사료된다.

Trounson와 Mohr(1983)은 다세포 시기에 동결 보존된 배아는 해빙 후 50%의 할구가 생존하면 배아 이식하여 임신이 가능한 것으로 보고하고 있다. 이러한 기준으로 발표된

기존의 결과를 보면 해빙된 다세포 배아의 이식률은 40%에서 70%까지 다양한 보고를 하고 있다. 그러나 이러한 결과를 본 연구의 결과와 비교해 보면 차이를 보임을 알 수 있었다. 먼저 50%의 할구 생존을 보인 비율을 87.3%의 높은 수준을 보임을 알 수 있었고, 100%의 완전한 할구의 생존을 보인 배아의 비율만도 38.8%를 보였다. 그러나 임신된 4례를 보면 모두 해빙 후 100% 완전한 할구를 가진 배아를 이식했던 레에서만 임신되었음을 알 수 있었고 죽은 할구를 포함한 배아의 이식에서는 임신된 레가 없었다. 이러한 결과는 해빙된 전핵 시기의 배아를 이식하여 얻은 임신례에서도 같은 결과를 볼 수 있었다. 즉 해빙 후 24시간 배양하여 1등급으로 발생한 배아를 이식한 경우에서만 임신이 됨을 알 수 있었고, 2등급 이하의 배아만을 이식하여 임신된 레는 없었다. 이러한 결과에서 동결 보존의 성공은 동결 및 해빙 과정 뿐만 아니라 배아의 발생을 위한 배양 조건 또한 안정되어야 한다고 생각된다.

임신률은 전핵 시기의 해빙된 배아에서 19.2%, 2-4 세포기의 해빙된 배아에서 19.0%로 같은 수준을 보임을 알 수 있었고, 이러한 임신률은 당주기에 비동결 배아를 이식하여 얻은 임신률 24.4%보다 낮은 수준을 보이고 있으나 주기당 이식된 배아의 갯수를 고려해 볼 때 해빙된 배아는 평균 3.2개의 배아를 이식한 반면 비동결 배아는 4.8개로 평균 1.5개 정도 많은 배아를 이식했음을 알 수 있었다. 이러한 임신률은 Cohen(1988)등의 35%(전핵 시기의 해빙된 배아)와 17%(2-5세포기의 해빙된 배아), Fugger(1991)등의 22%와 12%, Demoulin(1991)등의 23%와 8%의 결과와 비교해 볼 때 같은 수준에 임신률을 보임을 알 수 있었다. 다태아 임신률을 비교해보면 비동결 배아를 이식해서 1개 또는 2개의 태낭을 보인 비율은 89.7%를 보였고, 해빙한 배아를 이식하여 얻은 결과는 81.8%를 보여 큰 차이 없음을 알 수 있었다. 그러나 전체적으로 3개 이상의 태낭이 관찰된 레가 10-20%로 앞으로 다태아 임신률을 10% 이하로 낮추기 위한 노력이 필요하다고 생각된다. 해빙된 배아를 이식하여 임신된 레중 자연 유산된 경우는 2례로 14.3%의 자연 유산률을 보였고, 자궁외 임신이 1례가 있었고, 현재 9례가 임신중이며 2명의 건강한 아기가 출산하였다. 그리고 현

재 동결 보존을 시행했던 환자의 누적 임신률과 앞으로 기대할 수 있는 전체적인 임신률을 고려해 볼 때 35.4%와 43.3%로 동결 보존을 시행하지 않은 군의 임신률 21.3%보다 2배 정도 높은 임신성공률을 얻을 수 있을 것으로 기대하고 있다.

결 론

전핵 시기의 배아와 2-4 세포기의 배아를 동일한 방법으로 동결 보존하여 두 군사이에 생존률과 임신률을 비교 조사하였고, 또한 동결보존을 시행하지 않은 군과 비교하여 동결보존이 체외수정 및 이식에 있어서 전체적인 임신률의 향상에 미치는 영향을 알아보았다. 이를 위하여 전핵 시기의 배아 또는 2-4 세포기의 배아 496개를 가지고 1, 2-propanediol과 sucrose를 사용하여 동결을 시행하였다. 315개의 전핵 시기의 배아와 117개의 2-4 세포기의 배아를 해빙한 결과 79.6%와 66.0%의 생존률을 보였으며, 임신된 레는 전핵 시기 배아에서 10례(19.2%)와 2-4 세포기에서 4례(19.0%)를 보여 두 군사이에 생존률과 임신률에 있어서 차이가 없음을 알 수 있었다. 동결 보존을 시행했던 군에 비동결 배아 또는 해빙된 배아를 가지고 이식을 시행하여 얻은 주기당 임신률이 35.4%로 동결 보존을 하지 않은 군에서의 임신률 21.3%보다 향상된 것을 알 수 있었고, 앞으로 동결된 배아를 모두 해빙하여 이식을 하면 43.3%의 누적 임신률을 보일 것으로 기대된다. 전핵 시기 또는 2-4 세포시기에 동결 보존된 배아의 임신률은 비동결 배아와 비교해서 비슷한 결과를 보임을 알 수 있었고, 이러한 동결 보존이 체외수정 및 이식에 있어서 전체적인 임신률 향상에 도움을 준다는 것을 알 수 있었다.

인 용 문 헌

- Al-Hasani S, Diedrich K, van der Van H, Reinecke A, Hartje M, Krebs D: Cryopreservation of human oocytes. *Hum Reprod* 1987, 2, 695-702.
- Cha YB, Park JM, Lee SJ, Choi KW, Yang HW, Kang HK: Transcervical GIFT & ZIFT by tactile sensation. *Kor J Obstet*

- Gynecol* 1993, 36, 634-639.
- Choi KW, Lee HJ, Kang HK, Chun YP, Kim MK: Study on the survival of frozen-thawed mouse oocytes according to maturation stage and cryoprotectants. *Kor J Fertil Steril* 1991, 18, 55-61.
- Cohen J, Simons RS, Fehilly CB, Edwards RG: Factors affecting survival and implantation of cryopreserved human embryos. *J Vitro Fert Embryo Transfer* 1986, 3, 46-52.
- Cohen J, Devane G, Elsner C, Fehilly C, Kort H, Massey J, Turner T: Cryopreservation of zygotes and early cleaved human embryos. *Fertil Steril* 1988, 49, 283-289.
- 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.
- Fehilly CB, Cohen J, Simons RF, Fishel SB, Edwards RG: Cryopreservation of cleaving embryos and expanded blastocysts in the human: A comparative study. *Fertil Steril* 1985, 44, 638-643.
- Fugger EF, Bustillo M, Katz LP, Dorfmann AD, Bender SD, Schulman JD: Embryonic development and pregnancy from fresh and cryopreserved sibling pronucleate human zygotes. *Fertil Steril* 1988, 50, 273-278.
- Fugger EF, Bustillo M, Dorfmann AD, Schulman JD: human preimplantation embryo cryopreservation: selected aspects. *Hum Reprod* 1991, 6, 131-135.
- Han HD, Kim YD, Shon SW, Kwon JY, Lee YJ, Chung IB, Cha DS: Effect of cell stage on development of mice embryo after cryopreservation and thawing. *Kor J Fertil Steril* 1993, 20, 161-164.
- 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, 136-141.
- Lassalle B, Testart J, Renard J: Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1, 2-propandiol. *Fertil Steril* 1985, 44, 645-651.
- Macas E, Xie M, Keller PJ, Imthurn B, Ruelicke T: Developmental capacities of two-cell mouse embryos frozen by three methods. *J IVF & ET* 1991, 8, 208-212.
- Mandelbaum JM, Junca AM, Plachot M, Alnot MO, Salat-Baroux J, Alvarez S, Tibi C, Cohen J, Debache C, Tesquier L: Cryopreservation of human embryos and oocytes. *Hum Reprod* 1988, 3, 117-119.
- Menezo Y, Nicollet B, Herbaut N, Andre D: Freezing cocultured human blastocysts. *Fertil Steril* 1992, 58, 977-980.
- Oehninger S, Toner JP, Veek LL, Brzyski RG, Acosta AA, Muasher SJ: Performance of cryopreserved preembryos obtained in in vitro fertilization cycles with or without a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Fertil Steril* 1992, 57, 620-625.
- Siebzehnuebl ER, Todorow S, van Uem J, Koch R, Wildt L, Lang N: Cryopreservation of human and rabbit oocytes and one-cell embryos: a comparison of DMSO and propanediol. *Hum Reprod* 1989, 4, 312-317.
- Testart J, Lassalle B, Belaisch-Allart J, Hazoult A, Forman R, Rainhorn JO, Frydman R: High pregnancy rate after early human embryo freezing. *Fertil Steril* 1986, 46, 268-272.
- Trounson A, Peura A, Kirby C: Ultrarapid freezing of early cleavage stage human embryos and eight-cell mouse embryos. *Fertil Steril* 1988, 49, 822-826.
- Trounson A and Mohr L: Human pregnancy following cryopreservation thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983, 305, 707-709.
- Trounson A, Jones G, Veek LL, Van Steirtegham AC: Controversies in assisted reproduction. *JARGE* 1993, 10, 179-186.
- Van der Auwera I, Cornillie F, Pijnenborg R, Koninckx PR: The age of pronucleate mouse ova influences their development in vitro and survival after freezing. *Hum Reprod* 1992, 7, 660-664.

Veek LL, Maloney MK, Amundson CH, Muasher SJ, Brothman LJ, Jones HW, DeScisciolo C: Significantly enhanced pregnancy rates per cycle through cryopreservation and thaw of pronuclear stage oocytes. *Fertil Steril* 1993, 59, 1202-1207.

Wilson L, Quinn P: Development of mouse embryos cryopreserved by an ultra-rapid

method of freezing. *Hum Reprod* 1989, 4, 86-90.

Yang Hw, Kang HK, Choi KW, Cha YB, Lee SJ, Park JM: Effects of the age of pronucleate ova on survival and development in cryopreservation of mouse embryos. *Kor J Fertil Steril* 1993, 20, 31-36.