

인간의 체외수정배아식술에서 보조부화술이 임신률에 미치는 영향에 관한 연구

제일병원 불임연구실, 불임클리닉¹

이호준 · 김정욱 · 변혜경 · 전진현 · 손일표¹ · 전증영¹

The Effect of Assisted Hatching (AHA) on Pregnancy Rates in Human IVF-ET

H.J. Lee, J.W. Kim, H.K. Byun, J.H. Jun, I.P. Son¹ and J.Y. Jun¹

Infertility Research Laboratory, Infertility Clinic¹ Cheil General Hospital, Seoul 100-380, Korea

= Abstract =

In human IVF-ET, the development and morphology of the embryo have been known to affect implantation and pregnancy rates (PRs). Recently, pregnancy has been reported to be related to the embryos with thick zona-pellucida, high levels of fragmentation, poor blastomere development and zona hardening. Although the mechanism of implantation is unclear, it is thought that the hatching process precedes implantation and that the hatching is related to implantation and PRs. This study was carried out to investigate the effect of assisted hatching (AHA) on the improvement of PRs in human IVF-ET. The results were as follows;

1. The PRs of the AHA group (40.8%) was significantly higher than that of control group (27.2%) ($p < 0.01$).

2. According to the age of patients, the PRs of control and AHA groups were 33.9% (20/59), 44.4% (12/27) in <30 yrs, 26.1% (30/115), 38.3% (18/47) in 31-35 yrs, 22.4% (13/58), 41.4% (12/29) in >36 yrs, respectively.

3. According to the factors of infertility in AHA group, unexplained (immunologic factor) (40.0%) and male factors (41.9%) were higher than female (tubal obstruction, endometriosis, adhesion factor) (28.9%).

As a result, it is suggested that AHA technique improve the PRs in poor prognosis patients. It is concluded that AHA method can be used to improve the PRs in human IVF-ET.

서 론

체외수정시술에서 임신률에 영향을 미치는 요인들로는 과배란유도방법, 난자의 성숙도, 배양의 조건, 이식방법 등 여러가지가 있다. 이러한 요인들은 환자들에 따라 약간의 차이는 있지만 최근에는 많은 연구들이 이루어져 임신률의 향상을 가져왔다. 보조부화술 (assisted hatching)은 체외수정시술에서 임신률을 향상시키는 목적으로

시행되고 있다 (Cohen & Feldberg, 1991, Cohen et al., 1992, Tucker et al., 1993). 체외수정시술의 발달에 따라 배양법과 수정률의 향상은 이루어졌지만 임신률에 있어서는 아직 많은 연구가 진행되고 있다. 그 중에 특히 배아의 부화 (hatching)은 체외에서 배양한 후 체내로 이식되기 때문에 확인할 수 없고 또한 기작도 확실하게 모르고 있는 실정이다.

체외수정을 통한 배아의 발생을 연구한 이래로 부화와 착상에 관한 연구는 지금까지도 꾸준

히 진행되고 있지만 정확한 기작은 아직 밝혀지지 않고 있다. 사람의 난자와 배아는 다른 포유동물과 차이가 있어 환자의 나이, 과배란방법에 따라 난자의 모양과 수정 후 배아의 발달 양상이 다르게 나타난다.

착상이 일어나기 위해서는 배아의 정상적인 발달에 의해 포배기 이후 부화가 일어나야 하지만 그렇지 못할 경우에는 결국 임신이 되지 않게 된다. 지금까지 알려져 있는 부화의 기작은 포배기 이후 trophoblast로부터 분비되는 효소를 비롯한 단백질 입자들이 투명대에 영향을 주어 결국에는 배아가 투명대 밖으로 빠져 나오게 된다고 보고하고 있다(Perona & Wassarman, 1986). 만약 이러한 요인들이 작용하지 않을 경우 배아는 자궁속에서 부화를 일으키지 못하므로 결국 착상에 실패하게 된다. 따라서 부화는 착상과 깊은 관련이 있으며 임신에 영향을 끼친다.

이제까지 알려져 있는 투명대의 역할은 수정이 일어나면서 다수정을 억제하고 수정이 된 후에는 난관을 거쳐 자궁으로 흘러들어가는 동안 외부로부터 감염을 막아줌으로써 배아가 정상적으로 발생이 잘 되도록 한다. 따라서 수정 후에 일어나는 투명대의 역할은 이 부분만이 알려져 있고 배아가 투명대의 밖으로 나오는 부화의 기작은 여러 연구자에 따라서 다르게 보고되고 있다(Schiewe et al., 1995a, b).

체외에서 배양된 배아는 배양환경의 영향으로 인해 체내의 배아에 비해 발생 능력이 떨어져 포배기로의 발생률이 30% 내외로 보고되고 있다(Bongso et al., 1989). 이 과정에서 부화는 착상과 깊은 관련이 있다. 배아가 정상적인 부화를 할 수 있게 하거나 또는 쉽게 할 수 있다면 착상률을 향상시킬 수 있을 것으로 사료되어 보조부화술이 개발되었다. 생쥐실험을 통한 체외에서의 발생률은 zona drilling을 이용한 방법으로 Cohen (1991)등의 보고에 의하면 30% 이상 향상되고 또한 효소를 이용한 투명대 용해방법으로 부화률이 향상되는 것을 알 수 있었으며 착상률도 향상되었다(Cohen & Feldberg, 1991, Khalifa et al., 1992).

부화를 쉽게 하기 위한 여러가지 기계적인 연구들 가운데 이제까지 알려져 있는 것들을 살펴보면 첫째, 투명대를 미세관으로 절개하는 방법, 둘째, 효소를 이용하여 순간적으로 투명대를 녹여 주는 방법, 셋째, 화학용액 및 laser를 이용하

여 투명대에 구멍을 뚫어주는 방법이 있다. 보고자들에 따라 효과에 대해서 많은 차이가 있지만 대체로 부화를 도와 준다고 보고하고 있다(Katayama, 1994, Tucker et al., 1993).

보조부화술을 시행하는 대상은 환자가 나이가 많거나, FSH 수치가 높거나, 배아의 발생은 잘되지만 임신이 잘되지 않거나, 투명대의 두께가 두꺼운 환자인 경우에 시행하여 좋은 결과들을 얻고 있다고 보고하고 있다(Cohen et al., 1992, Schoolcraft et al., 1994).

본 연구는 체외수정시술에서 Acidic Tyrode 용액을 이용하여 투명대에 구멍을 뚫어주는 방법인 투명대 천공(zone drilling)을 이용하여 배아가 쉽게 부화되도록 하고 보조부화술이 임신률에 미치는 영향을 알아보고자 시행하였다.

재료 및 방법

1. 연구대상

제일병원 불임클리닉을 내원한 불임환자를 대상으로 하였다. 기간은 1994년 6월부터 1995년 1월까지이며 시술 건수는 본 병원에서 체외수정시술을 시행한 335 주기를 대상으로 하였다. 난자는 GnRH-agonist와 FSH/HMG를 이용하여 과배란을 유도하였고 질식초음파를 이용하여 β -hCG 주사 후 36시간에 채취하였다.

보조부화술(AHA)을 시행하기 위하여 선택적인 기준을 정하였다. 기준을 살펴보면 첫째, 나이가 35세 이상인 경우 둘째, 초기 FSH 수치가 15miu/ml 이상인 경우 셋째, 시험관외수술을 3회 이상 시술한 경우 넷째, 투명대의 두께가 17 μ m 이상인 경우 다섯째, 원인불명인 경우 그리고 마지막으로 남성불임인 경우 intracytoplasmic sperm injection(ICSJ)을 시행한 후 보조부화술을 시행하였다.

2. 연구방법

I. 투명대천공(zone drilling)을 위한 준비

I-1. 미세관의 준비: 투명대에 구멍을 뚫기 위해서는 holding pipette(내경 100 μ m)과 insertion pipette 또는 AHA micropipette (내경 10 μ m) (Drummond Co, USA)이 필요하다. AHA 미세관의 끝은 microforge(Narishige Co.)에서 깨끗이 다듬고 닦아내어 투명대나 세포질에 해를 입히지 않도록 준비한다.

Acidic Tyrode(AT) 용액은 pH가 2.3~2.4 정도로 맞춰 만든다.

I-2. 배아의 준비: 미세관과 AT가 준비되면 petri dish(Falcon, 1006)에 배양액(0.4% HSA-HTF-Hepes buffered medium)방울과 AT방울을 각각 만들어 미리 배양한다. 난자 채취 후 72 시간이 되면 배아는 8 세포기로 발생된다. 이 상태의 배아를 HTF (Irvine Co., USA) 방울에 옮긴 후 AHA를 시행한다.

II. 보조부화술 (assisted hatching)

보조부화술은 미세조작기(micromanipulator) (Narishige Co., MO-88)를 이용하여 시행하며 AHA는 microinjector를 사용하지 않고 mouth piece를 이용하여 흡입을 조절한다. 투명대천공은 우선 AHA 미세관을 AT 방울로 옮겨 적당량의 AT를 흡입한다. 그런 후 배아가 놓여진 방울로 옮긴 후 holding 미세관으로 8 세포기 배아를 고정하여 초점을 맞추고 투명대가 잘 보이도록 조절한다. AHA 미세관을 투명대에 가까이 접근한 다음 천천히 투명대를 향해 AT를 불어낸다. 적당량의 AT가 나오면 투명대의 주위를 천천히 분출하면서 8세포기의 할구크기 정도로 구멍을 뚫게 된다. 구멍이 생기는 순간 재빨리 흡입하여 AT가 너무 많이 분출되는 것을 막는다. 너무 많이 분출되면 배아의 세포막이 상해를 입게 되므로 가능하면 빠른 동작으로 시행하는 것이 좋다. 구멍이 뚫린 배아는 신선한 배양액으로 옮겨 세척해서 6시간이 지난 후 배아의 상태를 확인한 후 이식한다(Fig. 1).

이상의 방법에 의해 보조부화술을 시행하게 되며 환자에게는 난자를 채취한 날로부터

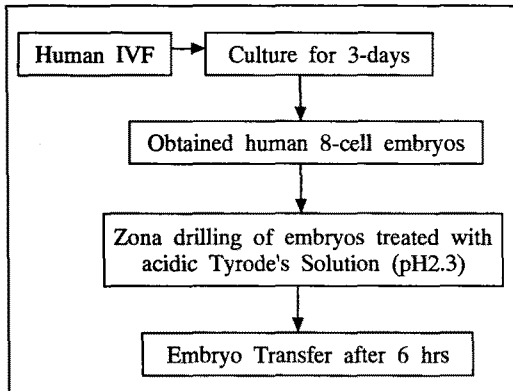


Fig. 1. Flowchart of Procedure of Assisted Hatching(AHA) in Human IVF & ET Program.

Methylprednisolone (30 mg 2 times per day)과 Tetracycline (100 mg 2 times per day)을 4일 동안 복용시킨다.

3. 통계학적 분석

결과에 대한 분석은 X²-test를 이용하여 시행하였고, p 값이 0.05 이하일 경우에 유의하다고 정의하였다.

결 과

두 군간의 특징을 살펴보면 환자의 나이, FSH의 수치, 채취된 난자수 등은 차이가 없었으나

Table 1. Comparison of Patient Data Between Control and AHA (Assisted Hatching) Groups

Parameter	control	Assisted Hatching
Total no. of cycles	232	103
Maternal age (yrs) [*]	32.0±3.9	33.1±3.9
FSH (U) ^{**}	6.8±2.3	7.5±2.5
No. of prior IVF [*]	1.3±0.5	1.8±1.0
No. of eggs per patient [*]	12.3±6.8	11.9±6.8
No. of embryos per patient [*]	5.7±2.6	5.6±2.8

^{*} The values are means ± SD, ^{**} mIU/mL=IU/L

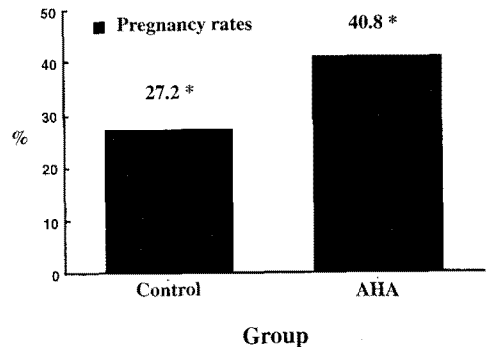


Fig. 2. Pregnancy Rates Between Control and AHA Groups p<0.01.

체외수정시술 회수는 AHA 군이 조금 많았다 (Table 1).

두 군간의 임신률을 살펴보면 대조군이 27.2% (63/232), 실험군이 40.8% (36/103)로 나타나 통계적으로 유의하게 나타났다(p<0.01)(Fig. 2, Table 2). 그러나 두 군간의 채취된 난자수, 수정률, 이

Table 2. Comparison of Pregnancy Rates Between Control and AHA Groups

Groups	No. of Cycles	No. of Oocytes	Fertil. Rates (%)	No. of ET*	Pregnancy (%)	Clinical Pregnancy (%)
Control	232	12.3±6.8	65.6±20.3	2.8±1.6	63 (27.2)**	61 (26.3)**
AHA	103	11.9±6.8	63.6±22.5	2.6±1.7	42 (40.8)**	37 (35.9)**

* The values are means±SD, ** p<0.01

Table 3. Comparison of Pregnancy Rates Between Control and AHA Groups According to Age

Age (yrs)	<30	31~35	>36
Groups	Pregnancy (%)	Pregnancy (%)	Pregnancy (%)
Control	20/59 (33.9)	30/115 (26.1)	13/58 (22.4)
AHA	12/27 (44.4)	18/47 (38.3)	12/29 (41.4)
Total	32/86 (37.2)	48/162 (29.6)	25/87 (28.7)

Table 4. Results of IVF in Assisted Hatching Group According to Factors

Factors	No. of Cycles	No. of prior IVF*	No. of Oocytes*	Fertil. Rates (%)*	No. of Embryos*	No. of ET*	Pregnancy (%)	Clinical Pregnancy (%)
Unexplained ^a	15	1.8±0.9	12.8±7.7	72.7±23.8	6.7±3.2	3.2±2.1	6/15 (40.0)	6/15 (40.0)
Female ^b	45	2.0±1.2	11.8±7.4	66.5±20.2	5.4±3.0	2.8±1.3	14/45 (31.1)	13/45 (28.9)
Male ^c	43	1.7±0.8	11.7±6.1	57.4±23.1	5.2±2.5	2.8±1.7	22/43 (51.2)	18/43 (41.9)
Total	103	1.8±1.0	11.9±6.8	63.6±12.4	5.6±2.8	2.9±1.8	42/103 (40.8)	37/103 (35.9)

^a Unexplained factor contains immunologic factor, ^b Female factor contains tubal obstruction, endometriosis, adhesion, ^c Male factor contains OATS, TESE, MESA, * The values are means ± SD

식된 배아의 수 등은 유의한 차이가 없었다 (Table 2).

나이에 따른 두 군간의 임신률의 차이는 대조군과 실험군을 비교하여 보면 30세 이하에서 33.9% (20/59), 44.4% (12/27), 31~35세 사이에서 26.1% (30/115), 38.3% (18/47), 36세 이상에서 22.4% (13/58), 41.4% (12/29)로 나타났다(Table 3).

실험군을 원인별로 분류하여 원인불명(면역학적 원인 포함)군, 여성원인(난관, 자궁내막증, 유착 등)군 그리고 남성원인군으로 나누어 비교하면 보조부화술은 남성원인군(41.9%)과 원인불명군(40.0%)이 여성원인군(28.9%)에 비해 높은 임신률을 유지하는 것을 알 수 있었다(Table 4).

고 찰

체외수정시술에서 나이가 많거나, 반복적으로

시도하거나, 배아의 상태가 좋지 않거나 투명대의 두께가 두껍거나 경질화되는 환자들은 임신에 대한 예후가 좋지 않다(Cohen et al., 1992, Schoolcraft et al., 1994). 본 실험의 결과에서 이러한 환자들의 임신을 향상시키기 위해 보조부화술이 좋은 방법으로서 사용될 수 있다는 것을 알 수 있었는데 이는 나이가 많아짐에 따라 호르몬의 비정상적인 기작으로 인해 난소로부터 투명대의 불균형적인 합성에 의해 변형된 것을 보조부화술로서 극복하여 부화할 수 있도록 도울 수 있다는 것을 의미한다.

부화의 기작은 아직 정확하게 알려져 있지 않지만 첫번째 기작으로 알려져 있는 포배기에서 물리적인 팽압에 의한 팽창으로 투명대를 뚫고 나오는 것은 아니며(Schiewe et al., 1995a), 배아로부터 분비되는 zona lysin이 부화를 시작하게 하며 변형된 아미노산 용액을 넣거나(Spindle &

Pedersen, 1973, Gardner & Lane, 1993) serine protease inhibitors를 넣은 배양액에서 부화가 억제된다는 것을 실험적으로 알아냄으로써 배아의 부화는 특수한 효소에 의해 지배된다는 것을 보고하였고 난자의 투명대가 수정 후 변화를 거쳐 배아가 발생함에 따라 초기 포배기에서 trophoctoderm 으로부터 분비되는 trypsin-like proteinase (strypsin)에 의해 투명대가 녹아 배아가 포배기 이후 투명대 밖으로 나오게 된다고 알려져 있다(Perona & Wassarman, 1986, Swada et al., 1990). 따라서 부화를 유도하는 strypsin 같은 효소가 배아로부터 생성 되지 않거나 배아의 비정상적인 발생에 의한 세포수의 감소와 기능 등의 원인으로 해서 부족한 양이 만들어진다면 배아의 부화는 일어날 수 없게 된다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 공동배양술을 이용하여 세포를 정상적으로 발생할 수 있도록 유도하고 배아의 절편을 줄이고 세포의 기능을 향상시킴으로써 투명대를 얇게 한다는 것을 알게 되었고 따라서 배아의 정상적인 성장과 기능을 갖추기 위해서는 배양액 조성의 변화, 특히 ammonium 농도와 toxic 요소의 제거(Gardner & Lane, 1993), 공동배양술의 시행(Wiemer et al., 1992, Lee et al., 1994), 배아의 autocrine과 paracrine 한 요소들(Gandolfi, 1994)을 포함한 정상적인 배양과정을 진행할 때 체외에서 배아의 발생이 정상적으로 이루어질 수 있다는 것을 알 수 있다(Schiewe et al., 1995a).

부화를 돕기 위한 방법으로 여러가지 방법들이 사용되어 왔다. 초기에는 생쥐의 배아를 이용하여 배아의 발생률을 향상시키는 방법으로 acidic tyrode 용액을 이용하여 투명대에 구멍을 뚫어 주어 좋은 결과를 얻었으나 사람을 대상으로 사용하기에는 acidic tyrode 용액이 유해하다고 하여 사용을 꺼려하였다(Malter & Cohen, 1989a, 1989b). 그후 투명대에 미세관을 사용하여 투명대를 절개하는 방법으로 부화를 도와주게 되었는데 연구자에 따라 많은 차이를 나타냄을 알 수 있었다(Katayama, 1994). 그 외에도 trypsin 과 같은 효소나 acidic tyrode 용액에 배아를 짧은 시간 처리함으로써 투명대를 녹이는 방법을 이용하여 생쥐의 발생률을 향상시켰다는 보고도 있으며 최근에는 pronase를 배양액에 첨가하여 배아와 배양함으로써 배아의 발생률을 향상시키고 또한 임신률도 향상되었다는 보고가 있다(unpublished data). 이상과 같은 방법들은 결국 투

명대의 구조적인 변화를 인위적으로 만들어 줌으로써 경질화된 또는 두꺼운 투명대를 녹여 구멍을 만들어 줌으로써 배아가 밖으로 나오기 쉽게 해주는 것이므로 이론적으로는 어느 것이 가장 좋은 방법인지 연구자에 의해 달리 보고되고 있으나, 본 실험의 결과에 의하면 acidic tyrode 용액을 이용한 투명대 천공법은 배아의 발생과 상태에 유해하지 않음을 알 수 있었고 또한 임신률을 향상시키는 결과를 나타내어 앞으로 체외수정시술에서 좋은 방법으로 사용할 수 있다고 사료된다.

Cohen(1992)등에 의하면 체외수정시술에서 반응이 좋지 않은 환자들을 대상으로 AHA를 시행한 결과, 특히 나이가 많은 환자에서 유의한 차이를 보이며 임신률에 영향을 미친다고 보고하고 있다. 이는 배아의 투명대에 경질화현상(zona hardening)이 생겨남에 따라 부화가 체내에서 일어나지 않게 되는 것을 의미한다. 본 실험에서도 대조군에 비해 실험군이 높은 임신률을 유지하는 것을 알 수 있었으며 특히 36세 이상의 나이가 많은 환자에서 보조부화술을 시행한 경우 대조군에 비해 임신률이 향상되었다(Table 2, 3).

보조부화술을 시행한 실험군을 살펴보면 원인 불명군과 남성불임군이 여성원인군에 비해 높은 임신률을 나타냄을 알 수 있었다(Table 4). 이는 원인불명군과 남성불임군은 원인이 간단하고 대체로 수정과정에 어려움이 많고 발생은 정상적이기 때문에 수정이 해결되면 그 이후의 과정은 배아의 정상적인 발생과정이 진행되므로 임신에 이르기가 용이한 반면 여성원인군은 원인의 종류도 다양하며 몇번의 반복적인 시술을 받은 환자들 많이 포함되어 있기 때문에 부화에 의한 원인 뿐만 아니라 복합적으로 문제를 가지고 있다고 사료된다. 최근에는 남성원인군에서 보여 주듯이 남성불임의 경우 ICSI를 통해서 수정과정이 해결될 경우에는 다른 군에 비해서 높은 임신률을 유지할 수 있다(Jun et al., 1994).

보조부화술을 성공적으로 시행하기 위한 조건으로는 여러가지를 들 수 있다. 첫째는 숙련된 전문가가 필요하며, 둘째는 투명대에 뚫어주는 구멍의 크기와 수, 셋째는 acidic tyrode 용액의 유해성 등을 들 수 있다. 따라서 이러한 원인으로 인해 아직도 이 방법에 대해 많은 문제를 제기하고 있지만 본 실험 결과 그리고 많은 다른 보고자들에 의해 이 방법은 가장 안전하고 유용한 방

법으로 사용되고 있다(Cohen et al., 1992, Schoolcraft et al., 1994).

본 연구에서 보조부화술은 체외수정시술에서 시행되어 임신률을 향상시키는 것을 알았으며 특히, 나이가 많거나, 반복적인 시술 시행환자, 두꺼운 투명대를 가진 환자, 높은 FSH 수치를 가진 환자 등 임신의 예후가 좋지 않은 경우에 실시하여 높은 임신률을 유지할 수 있는 좋은 방법이며 앞으로 체외수정시술에서 보다 광범위하게 적용하여 임신률을 향상시킬 수 있으리라 사료된다.

결 론

체외수정시술에서 배아의 발생과 형상은 착상률과 임신률에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 비록 착상의 정확한 기작은 알 수 없지만 부화과정은 착상과 임신에 깊은 관련이 있다. 본 연구는 보조부화술이 체외수정 시술에서 임신률에 미치는 영향을 알아보기 위하여 시행하였다.

보조부화술을 시행한 결과는 다음과 같다.

1. 대조군과 실험군간의 임신률은 27.2%, 40.8%로 나타나 유의한 차이를 나타내었다($p < 0.01$).

2. 나이에 따른 두 군간의 임신률의 차이는 대조군과 실험군을 비교하여 보면 30세 이하에서 33.9%(20/59), 44.4%(12/27), 31~35세 사이에서 26.1%(30/115), 38.3%(18/47), 36세 이상에서 22.4%(13/58), 41.4%(12/29)로 나타났다(Table 3).

3. 실험군을 원인별로 분류하여 원인불명(면역학적원인 포함)군, 여성원인(난관, 자궁내막증, 유착 등)군 그리고 남성원인군으로 나누어 비교하면 보조부화술은 남성원인군(41.9%)과 원인불명군(40.0%)이 여성원인군(28.9%)에 비해 높은 임신률을 유지하는 것을 알 수 있었다.

결론적으로 보조부화술은 체외수정시술에서 좋지 않은 예후를 나타내는 환자에게서 시행되어 임신률을 향상시키는 것을 알 수 있었으며 앞으로 좋은 방법으로 사용될 수 있으리라 사료된다.

인 용 문 헌

Bongso A, Ng SC, Sathananthan H, Ng PL, Rauff M, Ratnam SS: Improvement quality of human embryos when co-cultured with human

ampullary cells. *Hum Reprod* 1989, 4, 700-713.

Cohen J, Feldberg D: Effects of the size and number of zona pellucida opening on hatching and trophoblast outgrowth in the mouse embryo. *Mol Reprod Dev* 1991, 30, 70-78.

Cohen J, Alikani M, Trowbridge J, Rosenwaks Z: Impantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis, *Hum Reprod* 1992, 5, 685-91.

Gandolfi F: Autocrine, paracrine and environmental factors influencing embryonic development from zygote to blastocyst. *Theriogenology* 1994, 41, 95-100.

Gardner DK, Lane M: Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biol Reprod* 1993, 48, 377-85.

Jun JH, Lee HJ, Kim JW, Park YS, Lee YS, Hong JY, Son IP, Jun JY: Fertilization and pregnancy rate of intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *KJ Fertil Steril* 1994, 21, 247-52.

Katayama KP: Assisted hatching: The current status and future projections. *Assisted Reprod Rev* 1994, 4, 33-38.

Khalifa EAM, Tucker MJ, Hunt P: Cruciate thinning of the zona pellucida for more successful enhancement of blastocyst hatching in the mouse. *Hum Reprod* 1992, 7, 532-36.

Lee HJ, Byun HK, Kim JW, Hwang JH, Jun JY, Kim MK: The effects of the epithelial cells of genital tract on the development of mouse early embryos and human fertilized oocytes. *K J Fertil Steril* 1994, 21, 315-23.

Malter ME, Cohen J: Partial zona dissection of the human oocyte: a non-traumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. *Fertil Steril* 1989a, 51, 139-48.

Malter ME, Cohen J: Blastocyst formation and hatching in vitro following zona drilling of mouse and human embryos. *Gamete Res* 1989b, 24, 67-80.

Perona RM, Wassarman PM: Mouse blastocysts hatch in vitro by using a trypsin-like proteinase

- associated with cells of mural trophectoderm. *Dev Biol* 1986, 114, 42-58.
- Sawada H, Yamazaki K, Hoshi M: Trypsin-like hatching protease from mouse embryos: evidence for the presence in culture medium and its enzymatic properties. *J Exp Zool* 1990, 254, 83-7.
- Schiewe M, Hazeleger NL, Scimmenti C, Balmaceda JP: Physiology characterization of blastocyst hatching mechanisms by use of a mouse antihatching model. *Fertil Steril* 1995a, 63, 288-94.
- Schiewe MC, Araujo E, Asch RH, Balmaceda JP: Enzymatic characterization of zona pellucida hardening in human eggs and embryos. *J Assisted Reprod Genetics* 1995b, 12, 2-7.
- Schoolcraft, WB, Schlenker T, Gee M, Jones GS, Jones HW: Assisted hatching in the treatment of poor prognosis in vitro fertilization candidates. *Fertil Steril* 1994, 62, 551-54.
- Spindle AI, Pedersen RA: Hatching, attachment, and outgrowth of mouse blastocysts in vitro: fixed nitrogen requirements. *J Exp Zool* 1973, 186, 305-18.
- Tucker MJ, Wiker SR, Kort HI: Embryonal zona pellucida thinning and uterine transfer. *Assisted Reprod Rev* 1993, 3, 168-71.
- Wiemer, KE, Cohen j, Amborski GF, Wright G, Wiker S, Munyakazi L, Godke RA: In-vitro development and implantation of human embryos following culture on fetal bovine uterine fibroblast cells. *Hum Reprod* 1992, 4, 595-60.
-