

난자공여 프로그램에서 난자수혜자의 연령이 임신율에 미치는 영향에 관한 연구

서울대학교 의과대학 산부인과학교실, 인구의학연구소*

서창석 · 오선경* · 김석현 · 최영민 · 김정구 · 문신용 · 이진용

Effect of Recipient's Age on the Pregnancy Outcomes in Oocyte Donation Program

C.S. Suh, S.K. Oh*, S.H. Kim, Y.M. Choi, J.G. Kim, S.Y. Moon and J.Y. Lee

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

= Abstract =

Oocyte donation program developed to reach the pregnancy in those patients suffering from premature ovarian failure or surgery induced menopause, particularly in their reproductive age. With technical advances and popularity of ART (assisted reproductive technology), the indication of oocyte donation program extended to low responders, and even to naturally menopausal patients that has led them quite successfully to getting in pregnancy.

The purpose of this study was to evaluate which one is involved in the decline of fertility between the oocyte and uterine factor.

One hundred five cycles of oocyte donation program were performed in 84 patients from Jan., 1993 to Dec., 1996. Oocytes were donated from healthy, young, fertile anonymous donors or relatives or infertile patients with supernumerary oocytes. The study population was divided into 3 groups according to the age of recipients. Group 1 was less than 35 years old, Group 2 was between 35 to 39 years old, and Group 3 was more than 39 years old.

The results were as follows: The mean age of oocyte donor was 31.5 ± 3.3 (range; 25-36). The mean concentration of basal serum FSH and peak serum estradiol were not different among groups. The mean number of oocytes retrieved from donors, embryos transferred to recipients, and fertilization rate were not different among groups. The clinical pregnancy rate was 37.3% in Group 1, 31.6% in Group 2, and 31.6% in Group 3, respectively. The spontaneous abortion rate was 16.0% in Group 1, 16.7% in Group 2, and 16.7% in Group 3, respectively. The multiple pregnancy rate was 20.0% in Group 1, 16.7% in Group 2, 16.7% in Group 3, respectively. The implantation rate was 11.3% in Group 1, 10.3% in Group 2 and 10.0% in Group 3, respectively. All of the pregnancy outcomes were not different statistically among groups.

In conclusion, endometrial receptivity does not seem to be impaired as age increases with transfer of good quality embryos and adequate endometrial preparation.

Key Words: Assisted reproductive technology (ART), Oocyte donation, Age, Endometrial receptivity, Pregnancy rate

본 연구는 1995년도 서울대학교병원 임상공동연구비(01-95-022)의 지원에 의한 것임.

서 론

체외수정시술시 난자공여 프로그램은 난소적출술을 시행받았거나 조기난소부전증 (premature ovarian failure)으로 인하여 조기폐경된 환자에서 임신을 시도하기 위하여 고안되었다 (Trounson *et al.*, 1983). 최근에는 유전질환을 가진 환자 (Rosenwaks, 1987), 폐경기의 호르몬 양상을 보이는 과배란유도 저반응군 (Burton *et al.*, 1992; Ezra *et al.*, 1992; Remohi *et al.*, 1993) 뿐만 아니라 일부 연구자들은 자연폐경된 50세 이상의 여성에게도 난자공여 프로그램을 적용하고 있다 (Sauer *et al.*, 1993).

동물에서 난자공여에 의한 임신은 토끼에서 최초로 시도되었으며 (Heape, 1890), 이후 다른 동물에서도 우수한 종자로 난자공여를 시행하여 양질의 고기를 얻고자 하는 방법으로 이용되고 있으며, 현재까지도 활발히 시행되고 있다 (Seidel, 1981).

인간에서도 체외수정시술이 본격적으로 시행되기 이전의 난자공여는 난자공여자에게 과배란유도를 시킨 후 난자수혜자 남편의 정액을 인공수정하고, 5~7일 후 난자공여자의 자궁강 내를 세척하여 (uterine lavage) 획득된 배포 (blastocyst)를 난자수혜자의 자궁강 내에 이식하는 방법을 적용하였다 (Buster *et al.*, 1983). 그러나 이러한 방법은 난자공여자가 원하지 않는 임신에 도달할 수 있는 부작용으로 인하여 현재에는 사용되고 있지 않다.

현재에 시행되고 있는 난자공여 프로그램은 난자공여자에게 과배란유도를 시행한 후 채취된 난자를 난자수혜자의 남편 정액과 체외수정하므로써 얻어진 배아를 난자수혜자의 자궁강 내로 배아이식하는 체외수정시술 방법이다. 이러한 방법으로 임신이 보고된 이후로 (Trounson *et al.*, 1983; Lutjen *et al.*, 1984; Rosenwaks *et al.*, 1986), 난자공여 프로그램은 높은 임신율로 인하여 세계적으로 매우 활발히 시행되고 있다 (Remohi *et al.*, 1993; SART/AFS, 1993).

여성의 자연 수태 능력은 연령이 증가함에 따라 감소하며 (Menken *et al.*, 1986; Edwards *et al.*, 1984), 체외수정시술을 시행하여도 환자의 연령은 임신 성공율에 나쁜 영향을 미치는 가장 중요한 원인 중의 하나로 보고되고 있다. 환자의 연령이 증가함에 따라 자연 수태 능력 또는 체외수정시술 시행시 임신율이 감소하는 원인으로써 노

화된 난자로 인하여 배아의 질적 저하, 또는 자궁내막의 수용성 감소, 또는 양자의 복합 작용을 생각할 수 있다. 환자의 연령 증가에 따른 임신 성공률의 감소가 어떠한 원인에 의하여 초래되는지 알아보고자 할 경우 난자공여 프로그램은 위의 원인 인자 중 난자의 질을 일정하게 유지할 수 있으므로, 연령의 증가에 따른 자궁내막의 수용성 감소 여부를 확인할 수 있는 일종의 생체 모델이 될 수 있다 (Flamigni *et al.*, 1993; Navot *et al.*, 1994).

따라서 본 연구에서는 난자수혜자의 연령에 따른 임신율을 비교하므로써 여성의 연령 증가에 따른 수태 능력 감소가 자궁내막의 수용성 감소 여부와 관련이 있는지 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

연구 대상

1993년 1월부터 1996년 12월까지 불임검사 결과 기저 혈중 난포호르몬 및 에스트로젠 농도가 폐경기 수준을 보이거나, 자연적인 조기폐경, 양측 난소의 외과적 절제술 후 폐경된 경우, 염색체 이상에 의한 조기난소부전증 환자 중에서 난자공여를 시행한 84명 (105 주기)을 대상으로 본 연구를 시행하였다. 난자공여자의 기준으로는 수태 능력이 확인된 35세 미만의 여성 또는 잉여난자를 가진 35세 미만의 불임환자를 원칙으로 하였으나, 부득이한 경우 35세 이상의 수태 능력이 확인된 공여자도 포함하였다.

연구대상군 중 Group 1은 난자수혜자의 연령이 35세 미만인 경우로 구분하였고, Group 2는 35세~39세, Group 3은 40세 이상인 경우로 정의하였다.

연구 방법

1) 체외수정시술

난소의 과배란유도, 체외수정시술 방법, 난자공여를 위한 자궁내막의 준비는 본 교실에서 이미 발표한 바와 같다 (Chang *et al.*, 1990; 김석현 등, 1991; 김석현 등, 1994; 김석현 등, 1995). 과배란유도 전에 난자공여자 부부 및 난자수혜자 부부 모두에서 VDRL, HBs 항원, AIDS 항체 검사를 시행하였으며, 서면동의서를 받은 후 본 연구를 시행하므로써 난자공여에 따른 감염성 질환의 전파 및 법적 분쟁 발생을 예방하고자 하였다.

(1) 과배란유도 (난자공여자)

난소의 과배란유도는 gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist인 D-Trp-6-LHRH (Decapeptyl, Ferring, Malmo, Sweden), follicle stimulating hormone (FSH; Metrodin, Serono, Aubonne, Switzerland), human menopausal gonadotropin (hMG; Pergonal, Serono, Aubonne, Switzerland)를 사용하였다. 난포 성장의 관찰은 5.0 MHz 질식 초음파 (Combison 320, Kretztechnik, Austria)를 이용하였고, 난소의 반응 상태 및 혈중 estradiol (E_2) 농도에 따라 과배란유도제의 용량을 조절하였다. 최대 우성난포의 직경이 18 mm 이상이거나 평균 직경이 16 mm 이상인 난포가 2개 이상 관찰되면서 혈중 E_2 농도가 계속 상승하고, 직경 10 mm 이상인 난포당 혈중 E_2 농도가 300 pg/ml 이상이면 human chorionic gonadotropin (hCG; Profasi, Serono, Aubonne, Switzerland) 10,000 IU를 근주하여 배란을 유도하였다.

혈중 E_2 농도의 측정은 방사면역측정법 (RIA)으로서 estradiol-ter-kit (Serono Diagnostics, Switzerland & International)를 사용하였다. 이 측정의 민감도는 20~2,000 pg/ml이고, estrone과의 교차 반응도는 1.3%, estriol과는 0.4% 이었으며, interassay variance는 4.2%, intraassay variance는 5.5% 이었다. 혈중 E_2 최고치(peak E_2 level)는 hCG 투여일 (day 0)과 투여전날 (day -1)에 측정한 혈중 E_2 농도 중 가장 높은 것으로 정의하였다.

(2) 정액 준비 (난자수혜자 남편)

정액의 채취는 난자 채취 당일에 시행하는데 수정 3~4시간 전에 난자수혜자의 남편으로부터 수음에 의하여 50 ml pyrex beaker에 무균적으로 채취하였고, 실온에서 20~30분간 방치하여 액화시킨 후 기본적인 정액검사를 실시하였다. 정액의 농도, 운동성은 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 이용하였다.

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 그위에 2 ml의 수정배양액을 넣어 잘 섞은 후 다시 300G로 10분간 원심분리 하여 2차 세척하였다. 상층액을 조심스럽게 제거하고 정자괴를 잘 풀어준 후 정자의 수

와 정자괴의 양을 고려하여 0.2~1 ml의 수정 배양액을 조심스럽게 올려 놓은 후 37℃ 5% CO_2 배양기내에서 1시간 배양하였다. 이후 수정능 획득 (capacitation)을 위하여 상층의 정자 부유액을 회수하여 수정시까지 동일 배양기 내에서 배양하였다.

(3) 난자 채취 및 배양 (난자공여자)

난자 채취는 hCG 10,000 IU 근육주사 36시간 후에 정맥마취를 시행한 후 질식 초음파 유도하에 난자공여자로부터 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 담긴 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 역반사현미경 (inverted microscope)으로 난자의 형태를 관찰하였다. 채취된 난자는 미성숙 (immature), 성숙 (mature), 과성숙 (postmature), 변성퇴화(degenerative) 등으로 구분하여, 미리 처리된 정자로 수정 (insemination) 시켰다. 이때 수정배양액 (insemination media, IM)인 7.5% human fetal cord serum (FCS)을 함유한 Ham's F-10 2 ml가 들어있는 culture dish로 옮겼다. 수정을 위하여 미성숙난자는 624시간, 나머지 난자는 46시간 동안 37℃ 5% CO_2 배양기내에서 배양한 후 수정을 실시하였다. 이때 정자의 수, 운동성, 형태가 정상 수준이 아니면 oil-covered microdroplet에서 수정시켰다. 배양액은 Ham's F-10 (Gibco #430-1200)을 이용하여 250 ml의 5차 증류수로 배양액 (4X)을 만들고, pencillin G 75 mg, streptomycin sulfate 75 mg을 추가한 후 가압 여과 소독을 시행하여 4℃ 냉장고에 보관하였다. 이와 같이 제조된 배양액 (4X) 25 cc에 5차 증류수 75 cc를 첨가하고, calcium lactate 24.52 mg과 $NaHCO_3$ 210.6 mg을 추가하여 pH를 7.4에 맞추고 삼투압은 280-285 mOsm/liter가 되도록 하여 매 실험 직전 가압 여과 소독한 후 신생아 제대혈청의 농도가 수정배양액에서는 7.5%, 성장배양액 (growth media, GM)에서는 15%가 되도록 혈청을 첨가한 후 사용하였다.

(4) 난자와 정자의 체외수정

수정 직전 정자 부유액 내의 정자의 운동성과 수를 검사한 후 추가배양이 끝난 난자를 함유하고 있는 수정배양액 배양접시 내에 정자의 농도가 $1-2 \times 10^5/\text{ml}$ 되도록 조정하여 수정 (insemination)시켰다.

수정 후 16~18시간이 경과한 후 정상적으로 수정이 이루어진 난자만을 선별하여 성장배양액인 15% human fetal cord serum (FCS)을 함유한 Ham's F-10 2.5 ml가 들어있는 배양접시로 옮긴 후 24~28시간 배양하여 배아의 난할 여부, 할구의 균등 여부, 핵이 제거된 할구 파편 (anucleate fragments)의 존재 여부와 그 정도에 따라 배아의 발달 상태를 동일한 검사자에 의하여 관찰하고, 배아의 질적 등급 (embryo grading)을 평가하였다 (Veeck, 1990; Veeck, 1991).

(5) 자궁내막의 준비 (난자수혜자)

난자수혜자가 월경이 있는 경우 월경 제 21일에 GnRH agonist (decapeptyl) 0.1 mg을 피하주사하고, 난자수혜자가 월경이 없는 경우에는 decapeptyl을 투여하지 않았다. 난자공여자가 월경이 시작되면 난자수혜자는 이때부터 estradiol valerate (prognova, Shering) 2 mg을 3~5일 간격으로 2배씩 증량하면서 경구 복용하여 난자공여자의 월경 제 3일째가 난자수혜자의 월경 제 5일째가 되도록 조정하였다. 난자공여자가 난자채취를 시행하기 전날 부터 progesterone in oil (삼일제약) 50 mg을 근육주사하여 황체기보강을 시행하고, progesterone을 주사하는 날부터 estradiol valerate의 용량은 4 mg으로 감량하였다.

(6) 배아의 자궁강 내 이식 (난자수혜자)

난할이 확인된 배아는 Jones 배아 도관을 이용하여 난자수혜자의 자궁강 내로 이식하였다. 배아를 자궁강 내로 이식 후에는 최소한 4시간 정

도 안정을 취한 후 귀가하였다.

(7) 임신 확인

임신의 확인은 배아이식 후 제 11일에 혈중 β -hCG 농도가 20 mIU/ml 이상이고, 1주일 후 추가 검사에서 혈중 β -hCG의 상승을 보이며, 임신 제 5~6주경 질식 초음파검사서 자궁강 내의 태낭 (gestational sac) 및 태아의 심장 박동이 관찰되는 경우를 임상적 임신 (clinical pregnancy)으로 판정하였다. 임신이 확인된 경우에는 estradiol valerate의 용량을 8 mg으로 증량하고, progesterone 50~100 mg을 임신 12주까지 계속 주사하였다.

2) 통계학적 처리

SPSS ver 7.0 프로그램을 사용하여 χ^2 -test, Kruskal-Wallis test, One-way ANOVA test (duncan, tukey)를 이용하여 통계학적인 검정을 시행하였다. P-value가 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

연구 결과

대상환자군 84명 (105주기) 중 Group 1은 55명 (67주기), Group 2는 12명 (19주기), Group 3은 17명 (19주기)이었다 (Table 1). 난자수혜자의 최고 연령은 자연폐경된 49세의 환자이었으며, 최저 연령은 Turner씨 증후군으로 조기난소부전증에 이른 23세의 환자이었다.

난자공여를 시행한 적응증은 Group 1의 경우 28명 (31주기)은 조기폐경으로 호르몬대체요법을 시행하고 있는 환자이었으며, 10명 (14주기)은 난소종양으로 양측성 난소절제술을 시행한 경우하였고, 17명 (22주기)은 과거 난소낭종으로 낭종절제술을 시행하였거나 심한 자궁내막증에 의한 골반유착으로 골반유착 박리술 후 체외수정시술

Table 1. Indication of oocyte donation according to the age

Recipient's Age	Patient No. (cycle)	Indication (patient No./cycle)
Group 1	55 (67)	Premature ovarian failure (28/31)
		Bilateral oophorectomy (10/14)
		Poor responder (17/22)
Group 2	12 (19)	Bilateral oophorectomy (2/3)
		Perimenopausal hormone level (10/16)
Group 3	17 (19)	Perimenopausal hormone level (15/17)
		Naturally menopausal (2/2)

Group 1: <35 yr, Group 2: 35-39 yr, Group 3: >=40 yr.

Table 2. The outcomes of in vitro Fertilization according to the recipient's age

	Group 1	Group 2	Group 3	p-value
No. of Patients (cycle)	55 (67)	12 (19)	17 (19)	
Patient's age (yr)	29.1 ± 2.7	36.5 ± 1.5	42.0 ± 2.9	
Donor's age (yr)	30.6 ± 2.2	31.9 ± 3.7	31.9 ± 3.4	NS
Basal serum FSH (IU/L)	17.0 ± 5.1	16.8 ± 3.0	18.9 ± 4.4	NS
Peak serum E2 (pg/ml)	1926.7 ± 652.5	1832.4 ± 253.6	2001.4 ± 431.1	NS
No. of oocytes retrieved	9.3 ± 4.8	8.5 ± 4.9	9.3 ± 4.8	NS
Fertilization rates (%)	68.4 ± 21.8	65.6 ± 14.7	66.5 ± 14.9	NS
No. of embryos transferred	4.1 ± 2.2	4.0 ± 1.9	3.9 ± 1.7	NS

Mean ± S.D., NS: not significant.

Table 3. Pregnancy outcomes according to the recipient's age

	Group 1	Group 2	Group 3	p-value
Clinical pregnancy (%)	25/67 (37.3)	6/19 (31.6)	6/19 (31.6)	NS
Spontaneous Abortion (%)	4/25 (16.0)	1/6 (16.7)	1/6 (16.7)	NS
Multiple pregnancy (%)	5/25 (20.0)	1/6 (16.7)	1/6 (16.7)	NS
Implantation rate (%)	31/275 (11.3)	7/68 (10.3)	7/70 (10.0)	NS

NS: Not Significant.

을 시행하였으나 3회 이상 반복적으로 과배란유도에 저반응을 보인 경우이었다. 특히 조기폐경된 28명 중 4명은 염색체에 이상이 있었으며, 이 중 3명은 Turner씨 증후군, 1명은 Swyer 증후군이었으며, 염색체에 이상이 없는 20명은 원인불명의 조기폐경 환자이었다. Group 2의 환자 12명 중 2명은 양측성 난소절제술을 시행한 환자이었으며, 10명은 난소 및 골반내 수술 과거력이 있거나 또는 심한 자궁내막증으로 인한 골반내 유착으로 폐경기 수준의 높은 기저 혈중 FSH 농도를 보이는 저반응군 환자이었다. Group 3의 환자 17명 중 15명은 폐경기 수준의 높은 기저 혈중 FSH 농도를 보이는 경우이었었고, 6명은 난소 및 골반내 수술 병력은 없었으나 폐경기 수준의 높은 기저 혈중 FSH 농도를 나타낸 환자이었다. Group 3의 환자 17명 중 2명은 자연폐경된 경우이었다.

난자공여자의 평균 연령은 31.5±3.3 (range; 25~36세)세이었으며, 난자공여자의 평균 연령은 각 군간에 통계적인 차이가 없었다 (Table 2). 난자공여자에서 관찰된 기저 혈중 FSH 농도 및 과배란유도 후 혈중 최고 estradiol 농도도 각 군간에 통계적인 차이가 없었다. 과배란유도 후 채취된 난자의 갯수, 수정율 및 자궁강 내 이식된 배아의 갯수도 각 군간에 통계적인 차이가 없었다.

각 군에서 관찰된 시술주기당 임상적 임신율은 Group 1의 경우 37.3% (25/67), Group 2의 경우 31.6% (6/19), Group 3의 경우에는 31.6% (6/19)로 각 군간에 통계적인 차이가 없었다 (Table 3). 임상적 임신으로 확인된 난자수혜자의 최고 연령은 49세 이었고, 임신 중 특별한 합병증이 없었으며, 임신 제 38.5주에 제왕절개 분만으로 건강한 남아를 분만하였다.

자연유산율은 Group 1의 경우 16.0% (4/25), Group 2의 경우에는 16.7% (1/6), Group 3의 경우에는 16.7% (1/6)로 각 군간에 통계적인 차이를 보이지 않았다.

다태임신율은 Group 1의 경우 20.0% (5/25), Group 2의 경우에는 16.7% (1/6), Group 3의 경우에는 16.7% (1/6)로 각 군간에 통계적인 차이를 보이지 않았다. Group 1의 삼태아 (triplet) 1례를 제외하고는 모두 쌍태아 (twin) 이었다. 다태임신이 확인된 난자수혜자의 최고 연령은 43세 이었다.

착상율은 Group 1의 경우 11.3%, Group 2의 경우에는 10.3%, Group 3의 경우에는 10.0%로 각 군간에 통계적인 차이를 보이지 않았다.

Group 1, 2, 3 중 수태 능력이 확인된 환자로부터 난자를 공여받은 경우 (fertile donor, FD)와 잉여난자를 가진 불임환자로부터 난자를 공여받은 경우 (infertile donor, ID)를 분류하여 6군으로 세

Table 4. Pregnancy outcomes according to the profile of donor

	Group 1		Group 2		Group 3	
	FD (n=14)	ID (n=53)	FD (n=3)	ID (n=16)	FD (n=1)	ID (n=18)
Donor's Age (yr)	29.7±3.2	31.4±3.5	30.0±2.0	32.9±2.7	24.0	32.3±2.9
Clinical PR (%)	6/14 (42.6)	19/53 (35.8)	1/3 (33.3)	5/16 (31.3)	1/1 (100.0)	5/18 (27.8)
SAR (%)	3/6 (50.9)	1/19 (5.3)	1/1 (100.0)	0/5	0/1	1/5 (20.0)
Multiple PR (%)	1/6 (33.3)	4/19 (21.1)	0/1	1/5 (25.0)	0/1	1/5 (25.0)
IR (%)	8/66 (12.1)	23/209 (11.0)	1/14 (7.1)	6/54 (11.1)	1/6 (16.7)	5/64 (7.8)

FD: fertile donor, ID: infertile donor with supernumary oocytes
PR: pregnancy rate, SAR: spontaneous abortion rate, IR: implantation rate.

분하였을 때, 각 Group내에서 FD군 및 ID군의 공여자 연령 및 6군에서의 공여자 연령은 통계학적인 차이가 없었다 (Table 4).

Group 1의 경우 FD군과 ID군에서의 임상적 임신율은 각각 42.6% (6/14), 35.8% (19/53)로 통계학적인 차이가 없었다. Group 2의 경우 FD군과 ID군에서의 임상적 임신율은 각각 33.3% (1/3), 31.3% (5/16)로 통계학적인 차이가 없었다. Group 3의 경우 FD군과 ID군에서의 임상적 임신율은 각각 100.0 (1/1), 27.8% (5/18)로 통계학적인 차이가 없었다 ($p=0.684$). 또한 Group 1, 2, 3의 FD군에서 임상적 임신율을 비교하였을 경우 통계학적인 차이가 없었다. Group 1, 2, 3의 ID군에서 임상적 임신율을 비교하였을 경우에도 통계학적인 차이가 없었다.

Group 1, 2, 3의 FD군에서 비교한 자연유산율, 다태임신율 및 착상율은 통계학적인 차이가 없었다. Group 1, 2, 3의 ID군에서 비교한 자연유산율, 다태임신율 및 착상율에서도 통계학적인 차이가 없었다.

고 찰

체외수정시술을 이용한 난자공여 프로그램의 적응증은 난소의 외과적 적출술 후 폐경이 되었거나, 조기폐경된 환자이었다 (Trounson *et al.*, 1983). 최근 여성의 활발한 사회 활동 참여 및 결혼 연령의 증가로 자연히 여성의 출산 연령 증가를 유발하므로써 자연 임신율의 감소를 초래하였다 (Mosher and Pratt, 1991; Pantos *et al.*, 1993). 특히 40세 이상 여성의 30%는 기저 혈중 FSH 및 E₂ 농도의 증가로 체외수정시술시 과배란유도를 시행하여도 저조한 난포의 반응을 보이므로써 임

신율의 감소를 초래한다 (Sauer *et al.*, 1990; Pantos *et al.*, 1993). 또한 체외수정시술시 과배란유도에 저조한 난포 반응을 보이는 과배란유도 저반응군은 40세 이상의 여성 뿐 아니라 40세 이하의 여성에서도 발생하며, 40세 이하 연령군의 9% 정도는 과배란유도시 저반응군으로 보고되고 있다. 이러한 환자에서 적당량의 난자를 획득하기 위하여 과배란유도제를 증량하여도 난소의 반응은 매우 저조하다 (Pellicer *et al.*, 1987; Remohi *et al.*, 1993). 체외수정시술시 과배란유도에 반응을 보이지 않으면서 3회 이상 반복된 임신 도달 실패를 보이는 환자는 환자 본인의 남자보다는 젊은 연령의 난자공여자로부터 난자를 공여받는 것이 임신율이 높고, 유산율이 낮으므로 최근에는 이러한 과배란유도 저반응군도 난자공여 프로그램 시술의 대상 환자로 인정되고 있다. 이외에도 유전질환을 가지고 있어서 본인의 난자로 임신을 해서는 안되는 환자 (Rosenwaks, 1987), 자연폐경에 이른 50세 이상의 여성에서도 난자공여에 의한 임신 및 분만이 가능하다고 보고되어 현재에 시행되고 있는 난자공여 프로그램의 적용 대상군은 초기에 비하여 확대되게 되었다 (Sauer *et al.*, 1993).

연령의 증가에 따른 여성의 수태 능력 감소는 피임을 시도하지 않은 정상 여성 뿐 아니라 보조생식술을 시행하는 환자들에게도 관찰되는 현상이다 (Wilkox, 1982; Menken *et al.*, 1986; Risch *et al.*, 1988; Feldberg *et al.*, 1990; Piette *et al.*, 1990; Navot *et al.*, 1991a). 여성의 연령 증가에 따른 수태 능력 감소가 난자의 노화에 의한 것인지 (Legro *et al.*, 1995; Rosenwak *et al.*, 1995), 자궁내막의 수용성 감소에 의한 것인지 (Guanes *et al.*, 1996), 또는 난자의 노화 및 자궁내막 수용성 감

소가 모두 작용하는가 (Pellicer *et al.*, 1995)에 대하여는 연구자들 간에 아직까지도 확실한 의견의 일치를 보이고 있지 않다.

수학적인 모델을 동원하여 계산한 40세 이하 환자에서의 배아생존율은 0.27에서 40세 이상에 이르면 배아생존율이 0.16으로 감소하며, 자궁내막 수용성도 0.42에서 0.29로 감소한다고 보고되어, 연령 증가에 따른 임신율의 감소는 배아의 질적 저하 및 자궁내막 수용성 감소가 모두 작용하기 때문으로 보고되고 있다 (Chetkowski *et al.*, 1991). 그러나 수학적인 계산에 의하여 얻어진 임신율 및 착상율에 미치는 인자를 확인하는 것 보다는 난자공여 프로그램이 착상에 영향을 미치는 요인을 알아보는 생체모델로서 보다 적합한 방법으로 인지되고 있다 (Cano *et al.*, 1995).

Mouse, hamster, 토끼 등 젊은 주령의 동물에서 얻은 배아를 동종의 늙은 주령의 자궁내로 이식할 경우 착상율이 매우 감소하는 것으로 보고되고 있으며 (Blaha, 1964; Talbert and Krohn, 1966; Adams, 1979), 동물에서는 연령 증가에 따른 임신율의 감소가 자궁의 수용성에도 영향을 미친다고 보고되고 있다. 사람에서 시행된 난자공여 프로그램에서는 40세 이상의 환자에서 난자공여를 시행하였을 때 40세 미만의 여성에 비하여 임신율에 차이가 없다고 보고되기도 하며 (Rotsztein and Asch, 1991; Meldrum, 1993; Check *et al.*, 1994; Navot *et al.*, 1994; Balmaceda *et al.*, 1994), 40세 이상의 환자에서 임신율이 통계학적으로 현저히 낮다고 보고되기도 한다 (Abdalla *et al.*, 1990; Fla-migni *et al.*, 1993; Yaron *et al.*, 1993). 따라서 인간에서 연령이 증가함에 따라 난소의 기능 감소와 더불어 자궁내막의 수용성 감소가 임신율에 영향을 미치는지 유무는 아직까지도 확실한 결론이 없는 상태이다.

최근 Meldrum 등 (1993)은 35세 이하의 젊은 난자공여자로부터 획득된 난자를 체외수정 후 난자수혜자의 자궁강 내에 배아이식한 결과 40세 이하에서의 임신유지율/분만율 (ongoing/delivered)은 40%, 40세 이상에서는 8%로 두 군간에 통계적으로 유의한 차이를 보인다고 보고하였다. 그러나 자궁내막을 준비하기 (synchronization) 위하여 사용된 progesterone 용량을 40세 이상의 환자에서 100 mg으로 증량하여 보충한 뒤 두 군간의 임신유지율/분만율을 비교할 경우 40세 이하의 환자에서는 43%, 40세 이상에서는 46%로 두 군간에

차이가 없는 것을 관찰하였다. 즉 난자수혜자의 자궁내막이 외부에서 투여된 progesterone에 반응하여 나타나는 변화로서 가장 중요한 것은 자궁내막의 분비성 변화 (secretory change)이며, 체외수정시술시 착상에 실패한 환자의 자궁내막을 조직검사한 결과 배아가 착상에 실패하는 이유로서 자궁내막이 분비기로 이행되는 것이 지연되기 때문으로 생각되고 있다 (Sterzik *et al.*, 1988). 분비기로의 이행이 지연되는 비율은 35세 이상의 환자에서 증가되며 (Sterzik *et al.*, 1988), 분비기로의 이행이 지연되는 것을 교정하기 위하여 외부에서 투여하는 progesterone 용량을 증량하면 분비기로의 이행이 가속화되므로써 정상 월경주기의 소위 window period라 불리는 월경 제 17~19일의 자궁내막 형태를 관찰할 수 있다고 보고되고 있다 (Navot *et al.*, 1991b). 이러한 결과를 종합하면 연령의 증가에 따라 난소 및 자궁내막의 수용성이 모두 감소할 수 있다는 것을 시사하는 소견이나 자궁내막의 수용성은 난소의 기능저하와 달리 고용량의 progesterone (supraphysiological progesterone)을 투여하므로써 교정 가능한 것으로 생각되고 있다.

본 연구에서는 40세 이상 여성에서도 progesterone 50 mg을 투여하였으나 임상적임신율 및 착상율은 각 연령군에서 차이를 보이지 않았다. 이것은 정상 여성 및 체외수정시술을 시행하는 여성에서 연령 증가에 따른 임신율의 감소가 자궁내막 요인 보다는 난소의 요인이 더 중요한 것으로 해석될 수 있는 결과이다.

일반적으로 여성의 연령 증가에 따른 임신 초기의 유산율은 증가하며, 체외수정시술시에도 여성의 연령 증가에 따른 유산율은 증가하는 것으로 보고되고 있다 (Padilla and Garcia, 1989). 난자공여 프로그램에서는 수혜자의 연령 보다는 공여자의 연령이 증가할 경우에 유산율이 증가하는 것으로 보고되고 있다 (Levrant *et al.*, 1991). 즉 난자공여자의 연령이 35세 이하인 경우 유산율은 난자수혜자의 연령이 40세 이상일 경우에도 25~34%로 정상수태 능력을 가진 40세 이하 여성의 유산율과 비교할 때 차이가 없는 것으로 보고되고 있다 (Pantos *et al.*, 1993). 이것은 여성의 연령 증가에 따른 임신 초기 유산율 증가의 원인으로 자궁내막의 수용성 감소보다는 난자의 노화로 배아의 결함을 초래하기 때문으로 해석되고 있다.

본 연구에서도 자연유산율은 수혜자의 연령에 따라 차이가 없는 것으로 관찰되어 위 연구자들의 보고와 일치하였다.

난자공여 프로그램을 시행할 때 난자공여자는 주로 가임력이 확인된 자원자를 대상으로 하는 것이 원칙이나 현재 국내의 사정은 가임력이 확인된 친척, 친지에 의존하고 있는 실정이다. 그러나 핵가족화와 출산율의 감소로 가임력이 확인된 친척, 친지를 확보하는 것은 현실적으로 어려움이 많으며, 이러한 경우에는 체외수정시술시 잉여난자를 가진 불임환자에 의존할 수 밖에 없다. 체외수정시술시 잉여난자를 가질 수 있는 과배란유도 고반응군은 주로 임상적, 내분비학적으로 다낭성난포 증후군 (polycystic ovary syndrome) 을 보이거나, 월경 초기에 시행하는 초음파 검사상 다수의 난포가 관찰되는 (multifollicular ovary) 환자이다. 일반적으로 다낭성난포 증후군을 보이는 환자에서 얻어진 난자는 높은 혈중 LH 농도로 인하여 난자의 질이 낮아 수정율이 감소하며, 자연유산율이 증가한다고 보고되고 있다. 그러나 다낭성난포 증후군 환자에서 얻어진 난자를 이용하여 난자공여를 하여도 단순 난관인자만을 가진 환자의 난자로 체외수정시술을 시행하였을 때와 수정율, 자연유산율, 임신율에서 큰 차이가 없으므로 난자공여자로 적합하다고 보고되기도 한다 (Ashkenazi et al., 1995). 그러나 대부분의 보고에서는 가임력이 확인된 자원자와 잉여난자를 가진 불임환자로부터 난자를 공여받아 체외수정시술을 시행한 결과는 대개 가임력이 확인된 자원자의 연령이 낮아서 비교할 수 없는 경우가 많다.

본 연구에서는 가임력이 확인된 공여자와 불임 환자 공여자의 연령이 통계학적인 차이가 없었으며, 두군을 비교하였을 때 임신율 및 착상율에 차이가 없었다. 이 결과는 잉여난자를 가진 불임 환자라도 연령이 낮은 환자로 대상군을 신중하게 선정할 경우에는 적절한 난자공여자가 될 수 있음을 시사하는 소견으로 생각되고 있다.

난자공여 프로그램을 시행하여 임신에 성공한 수혜자의 최고 연령은 61세로 보고되고 있으며, 이 환자는 임신중독증이 발생하였으나 제왕절개술로 건강한 신생아를 분만하였다고 보고되었다 (Flamigni et al., 1993). 이후 여러 연구자들에 의하여 50세 이상의 고령의 환자에서도 난자공여를 통하여 건강한 아이의 임신 및 출산이 가능한

것으로 보고되고 있으나, 50세 이상의 고령 환자는 일반적으로 임신과 관련된 합병증 발생율이 높고, 출산 후 부모의 잔여 생존 기간이 짧고, 부모의 은퇴로 인한 경제적인 어려움으로 인하여 아이의 정상적인 양육에 지장을 초래할 수 있다. 그러므로 난자공여 프로그램을 시행하는 최대 연령에 대한 제한을 가하자는 논의가 있으나 아직까지는 명확한 기준선이 없는 실정이다.

본 연구에서도 49세의 환자에서 임신 및 분만에 성공하였으며, 이 환자의 경우에는 임신과 관련한 특별한 합병증은 없었다.

결론적으로 연령의 증가에 따른 수태율의 감소는 자궁의 착상 능력 감소보다는 난자의 질 감소와 관련이 있는 것으로 생각되며, 난자공여자의 연령이 낮은 경우에는 가임 확인 공여자 뿐 아니라 잉여난자를 가진 불임 환자의 경우도 적당한 난자 공여자가 될 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

1993년 1월부터 1996년 12월까지 불임검사 결과 기저 혈중 난포호르몬 및 에스트로겐 농도가 폐경기 수준을 보이거나, 자연적인 조기폐경, 양측 난소의 외과적 절제술 후 폐경된 경우, 염색체 이상에 의한 조기난소부전증 환자 중에서 난자공여를 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 대상환자군 84명 (105주기) 중 Group 1은 55명 (67주기), Group 2는 12명 (19주기), Group 3은 17명 (19주기)이었다. 난자수혜자의 최고 연령은 자연폐경된 49세의 환자이었으며, 최저 연령은 Turner씨 증후군에 의한 난소부전증을 가진 23세의 환자이었다.

2. 난자를 공여한 난자공여자의 평균 연령은 31.5 ± 3.3 (range; 25~36세)세 이었으며, 난자공여자의 평균 연령은 각 연령군에서 통계적인 차이가 없었다. 난자공여자의 기저 혈중 FSH 농도, 혈중 최고 E2 농도, 채취된 난자의 개수, 수정율 및 난자수혜자의 자궁내 이식된 배아의 개수에도 각 연령군에서 차이가 없었다.

3. 각 연령군에서의 임상적 임신율은 Group 1의 경우 37.3% (25/67), Group 2의 경우 31.6% (6/19), Group 3의 경우에는 31.6% (6/19)로 각 연령군 간에 통계적인 차이가 없었다.

4. 자연유산율은 Group 1의 경우 16.0% (4/25), Group 2의 경우에는 16.7% (1/6), Group 3의 경우

에는 16.7% (1/6)로 각 연령군 간에 통계적인 차이가 없었다.

5. 다태임신율은 Group 1의 경우 20.0% (5/25), Group 2의 경우에는 16.7% (1/6), Group 3의 경우에는 16.7% (1/6)로 각 연령군 간에 통계적인 차이가 없었다.

6. 착상율은 Group 1의 경우 11.3% (31/275), Group 2의 경우에는 10.3% (7/68), Group 3의 경우에는 10.0% (7/70)로 각 연령군 간에 통계적인 차이가 없었다.

7. 수태 능력이 확인된 난자 공여자와 잉여난자를 가진 불임환자 공여자로부터 얻은 난자로 난자공여를 시행하였을 때의 임신율, 자연유산율, 다태임신율 및 착상율에는 통계적인 차이가 없었다.

이상의 결과로 연령의 증가에 따른 수태율의 감소는 자궁의 착상 능력 감소보다는 난자의 질 감소와 관련이 있는 것으로 생각되며, 난자공여자의 연령이 낮은 경우에는 가임 능력이 확인된 공여자 뿐 아니라 잉여난자를 가진 불임 환자의 경우도 적당한 난자 공여자가 될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Abdalla HI, Baber R, Kirkland A, Leonard T, Power M, Studd JWW: A Report on 100 cycles of oocyte donation: factors affecting the outcome. *Hum Reprod* 1990, 5, 1018-1022.
- Adams CE: Aging and reproduction in female mammal with particular reference to the rabbit. *J Reprod Fertil Suppl* 1979, 12, 1-16.
- Ashkenazi J, Farhi J, Orvieto R, Homburg R, Dekel A, Feldberg D, Ben Rafael Z: Polycystic ovary syndrome patients as oocyte donors: the effect of ovarian stimulation protocol on the implantation rate of the recipient. *Fertil Steril* 1995, 64, 564-567.
- Balmaceda JP, Bernardini L, Ciuffardi I, Felix C, Ord T, Sueldo CE, Asch RH: Oocyte donation in humans: a model to study the effect of age on embryo implantation rate. *Hum Reprod* 1994, 9, 2160-2163.
- Blaha GC: Effect of age of the donor and recipient on the development of transferred golden hamster ova. *Anat Rec* 1964, 150, 413-416.
- Burton G, Abdalla HI, Kirkland A, Studd JWW: The role of oocyte donation in women who are unsuccessful with in vitro fertilization treatment. *Hum Reprod* 1992, 7, 1103-1105.
- Buster JE, Bustillo M, Thorneycraft IH: Non-surgical transfer of in vitro fertilized donated ova to five infertile women: report of two pregnancies. *Lancet* 1983, 2, 223-224.
- Cano F, Simon C, Remohi J, Pellicer A: Effect of aging on the female reproductive system: evidence for a role of uterine senescence in the decline in female fecundity. *Fertil Steril* 1995, 64, 584-589.
- Chang YS, Kim SH, Choi YM, Moon SY, Lee JY: Oocyte donation program using simplified hormonal regimen. *Asia-Oceania J Obstet Gynecol* 1990, 16, 181-190.
- Check JH, Askari HA, Fisher C, Vanaman L: The use of a shared donor oocyte program to evaluate the effect of uterine senescence. *Fertil Steril* 1994, 61, 252-256.
- Chetkowski RJ, Rode RA, Burrue V, Nass TE: The effect of pituitary suppression and the women's age on embryo viability and uterine receptivity. *Fertil Steril* 1991, 56, 1095-1103.
- Edwards RG, Fishel SB, Cohen J, Fehilly CB, Purdy JM, Slater JM, Steptoe PC, Webster JM: Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1984, 1, 3-23.
- Ezra Y, Simon A, Laufer N: Defective oocytes: a new subgroup of unexplained infertility. *Fertil Steril* 1992, 58, 24-27.
- Flamigni C, Borini A, Violini F, Bianchi L, Serrao L: Oocyte donation: comparison between recipients from different age groups. *Hum Reprod* 1993, 8, 2088-2092.
- Feldberg D, Farhi J, Dicker D, Ashkenazi J, Shelef M, Goldman JA: The impact of embryo quality on pregnancy outcome in elderly women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET). *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1990, 7, 257-261.
- Guanes PP, Remohi J, Gallardo E, Valbuena D,

- Simon C, Pellicer A: Age does not affect uterine resistance to vascular flow in patients undergoing oocyte donation. *Fertil Steril* 1996, 66, 265-270.
- Heape W: Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova with a uterine foster mother. *Proc R Soc Lond* 1890, 48, 457.
- 김석현, 신창재, 김정구, 문신용, 이진용, 장운석: 난자공여를 이용한 체외수정기술에 관한 연구. *대한산부회지* 1991, 34(4), 559-570.
- 김석현, 이철민, 김정훈, 최영민, 신창재, 김정구, 문신용, 이진용, 장운석: 과거 임신력이 체외수정기술 결과에 미치는 영향. *대한산부회지* 1994, 37, 1591.
- 김석현, 지병철, 이진용: 단일배아의 자궁내 이식 시 배아의 난할단계가 임신율에 미치는 영향에 관한 연구. *대한산부회지* 1995, 38, 239.
- Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH, Lomard CJ, Van der Merwe JP, Van Zyl JA, Smith K: Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1986, 46, 1118-1123
- Legro RS, Paulson RJ, Lobo RA, Sauer MV: Association of early beta-human chorionic gonadotrophin values with pregnancy wastage and multiple implantation in a donor oocyte programme. *Hum Reprod* 1995, 10, 3293-3296.
- Levrán D, Ben-Shlomo I, Dor J, Ben-Rafael Z, Nebel L, Masulach S: Aging of endometrium and oocytes: observations on conception and abortion rates in an egg donation model. *Fertil Steril* 1991, 56, 1091-1094.
- Lutjen P, Trounson A, Leeton J, Findlay J, Wood C, Renon P: The establishment and maintenance of pregnancy using in vitro fertilization and embryo donation in patient with primary ovarian failure. *Nature* 1984, 307, 174-175.
- Meldrum DR: Female reproductive aging-ovarian and uterine factors. *Fertil Steril* 1993, 59, 1-5.
- Menken J, Trussel J, Larsen U: Age and infertility. *Science* 1986, 233, 1389-1394.
- Mosher WD, Pratt WF: Fecundity and infertility in the United States: incidence and trends. *Fertil Steril* 1991, 56, 192-193.
- Navot D, Bergh PA, Williams M, Garrisi GJ, Guzman I, Sandler B, Fox J, Schreiner-Engel P, Hofmann GE, Grunfeld L: An insight into early reproductive process through the in vivo model of ovum donation. *J Clin Endocrinol Metab* 1991a, 72-408-414.
- Navot D, Scott RT, Droesch K, Veeck LL, Liu HC, Rosenwaks Z: The window of embryo transfer and the efficiency of human conception in vitro. *Fertil Steril* 1991b, 55, 114-118.
- Navot D, Drewna MR, Bergh PA, Guzman I, Karstaedt A, Scott RT Jr: Age related decline in female fertility is not due to diminished capacity of the uterus to sustain embryo implantation. *Fertil Steril* 1994, 61, 97-101.
- Padilla SL, Garcia JE: Effect of maternal age and number of in vitro fertilization procedures on pregnancy outcome. *Fertil Steril* 1989, 52, 270-273.
- Pantos K, Meimeti-Damianaki T, Vaxevanoglou T, Kapetanakis E: Oocyte donation in menopausal women aged over 40 years. *Hum Reprod* 1993, 8, 488-491.
- Pellicer A, Lightman A, Diamond MP, Russell JB, De Cherney AH: Outcome of in vitro fertilization in women with low response to ovarian stimulation. *Fertil Steril* 1987, 47, 812-815.
- Pellicer A, Simon C, Remohi J: Effects of aging on the female reproductive system. *Hum Reprod* 1995,10, 77-83.
- Piette C, Mouzon J, Banchelot A, Spira A. In vitro fertilization: influence of woman's age on pregnancy rates. *Hum Reprod* 1990, 5, 56-59.
- Remohi J, Vidal A, Pellicer A: Oocyte donation in low responders to a conventional ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1993, 59, 1208-1215.
- Risch HA, Weiss NS, Clarke AE, Miller AB: Risk factors for spontaneous abortion and its recurrence. *Am J Epidemiol* 1988, 128, 420-425.
- Rosenwaks Z, Veeck LL, Liu HC: Pregnancy following transfer of in vitro fertilized donated oocytes. *Fertil Steril* 1986, 45, 417.
- Rosenwaks Z. Donor eggs: their application in modern reproductive technologies. *Fertil Steril* 1987, 47, 895-909.

- Rosenwaks Z, Davis OK, Damario MA: The role of maternal age in assisted reproduction. *Hum Reprod* 1995, 10, 165-173.
- Rotsztejn DA, Asch RH: Effect of aging on assisted reproductive technologies (ART): experience from egg donation. *Semin Reprod Endocrinol* 1991, 9, 272-279.
- Sauer MV, Paulson RJ, Lobo RA: A preliminary report on oocyte donation extending reproductive potential to women over 40. *N Engl J Med* 1990, 323, 1157-1160.
- Sauer MV, Paulson RJ, Lobo RA: Pregnancy after age 50: application of oocyte donation to women after natural menopause. *Lancet* 1993, 341, 321-323.
- Seidel GEJ Jr: Superovulation and embryo transfer in cattle. *Science* 1981, 211, 351.
- Society for Assisted Reproductive Technology, The American Fertility Society: Assisted reproductive technology in the United States and Canada: 1991 results from the Society for Assisted Reproductive Technology from the American Fertility Society Registry. *Fertil Steril* 1993, 59, 943-952.
- Sterzik K, Dallenbach C, Schneider V, Sasse V, Dallenbach-Hellweg G: In vitro fertilization: the degree of endometrial insufficiency varies with the type of ovarian stimulation. *Fertil Steril* 1988, 50, 457-620.
- Talbert GB, Krohn PL: Effect of maternal age on viability of ova and uterine support of pregnancy in mice. *J Reprod Fertil* 1966, 11, 399-406.
- Trounson A, Leeton J, Besanko M, Wood C, Conti A: Pregnancy established in an infertile patients after transfer of a donated embryo fertilized in vitro. *Br Med J* 1983, 286, 835-838.
- Veeck L. The morphological assessment of human oocytes and early concepti. In Keel BA, Webster BW, eds. Handbook of the laboratory diagnosis and treatment of infertility. Boca Raton: CRC Press, 1990, 353.
- Veeck L. Atlas of the human oocyte and early conceptus (vol. 2): preembryo grading. Baltimore: Williams and Wilkins, 1991, 121.
- Wilcox AJ: Female fecundity as a function of age (letter). *N Engl J Med* 1982, 307, 373.
- World Health Organization: WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm cervical mucus interaction. Cambridge: Cambridge University Press, 1992.
- Yaron Y, Botchan A, Amit A, Kogosowski A, Yovel I, Lessing JB: Endometrial receptivity: the age-related decline in pregnancy rates and the effects of ovarian function. *Fertil Steril* 1993, 60, 314-318.