

## 적응 요인에 따른 보조부화술 (Assited Hatching, AH)의 효과

피엘산부인과 체외수정 연구실, 바이오메드 연구소<sup>1</sup>, 효성병원 체외수정 연구실<sup>2</sup>,  
강산부인과 체외수정 연구실<sup>3</sup>, 김석제산부인과 체외수정 연구실<sup>4</sup>

김지수 · 강승호 · 권윤정 · 손인표<sup>1</sup> · 최규완<sup>1</sup> · 김수경<sup>2</sup>  
전한식<sup>3</sup> · 이제규<sup>4</sup> · 이승재 · 박종민

### The Effects of Assisted Hatching (AH) According to the Indications

JS Kim, SH Kang, YJ Kwon, IP Son<sup>1</sup>, KW Choi<sup>1</sup>, SK Kim<sup>2</sup>, HS Chun<sup>3</sup>,  
JG Lee<sup>4</sup>, SJ Lee and JM Park

*IVF Research Laboratory, PL Infertility Clinic, Seoul, Korea, BIO-MED Institute, Suwon, Korea<sup>1</sup>, IVF Research Laboratory, Hyo-Sung Women's Clinic, Kumi, Korea<sup>2</sup>, IVF Research Laboratory, Kang Infertility Clinic, Suwon, Korea<sup>3</sup>, IVF Research Laboratory, Kim's Women's Clinic, Chungju, Korea<sup>4</sup>*

#### = Abstract =

Implantation rates remain low following human in vitro fertilization (IVF). Suboptimal culture conditions may limit the ability of embryos to hatch as blastocysts, and artificial opening of the zona pellucida has been proposed as a means to promote subsequent hatching (assisted hatching).

In this study, assisted hatching (AH) by zona drilling using acidic Tyrode's solution was performed in 320 patients, due to their age of more than 38 years (group A), the thick zona pellucida (group Z; ZP  $\geq$  18  $\mu$ m), and failures in implantation more than 3 times in previous IVF-ET trial (group P). This study was designed firstly, to study the effects of AH on the outcomes of IVF-ET according to the indications and secondly, to verify the appropriate application of AH. The results were as follows;

1. There was no difference in pregnancy rate between AH group (26.6%) and non-AH group (26.5%).

2. Assisted hatching (AH) showed significantly higher pregnancy rate of the patients with thick zona pellucida than those of the patients with age factor and with the history of repeated implantation failure. But in the patients with age factor only, AH resulted in higher pregnancy rate.

3. Interestingly, the patients with complex factors including zona factor (Z: 33.9%; ZA: 30.4%; ZP: 31.6%; ZAP: 21.4%) showed higher pregnancy rates than other complex factors excluding zona factor (A: 24.4%, P: 0%; AP: 10.8%).

From these results, AH is more helpful to the patients with thick zona pellucida rather than patients with older age and/or previous repeated implantation failure.

**Key Words:** Assisted hatching (AH), Age, Zona pellucida, Repeated implantation failure

체외수정기술 (IVF-ET)에 있어서 미세수정술 (micro-fertilization) 및 공배양 (co-culture) 등의 배양기술의 발달로 근래의 남성 불임의 극복 및 수정률과 임신율은 크게 향상되었으나, 자궁 내로 이식된 배아의 착상률은 아직 10~15%로 낮은 상태이다.

포유동물에서 포배기까지 발생된 배아는 투명대를 뚫고 나오는 부화 (hatching)라는 과정을 거치며, 이는 배아가 자궁내막에 착상하기 위한 필수 불가결한 과정이다. 부화의 기작은 정확히 밝혀져 있지는 않지만, 자궁내막 혹은 배아로부터 분비되는 단백질 분해 효소와 물리적인 팽압에 의해 배아가 투명대로부터 이탈되는 것으로 알려져 있으며 (Perona & Wassarman, 1986; Swada *et al.*, 1990), 최근 햄스터 등의 체내 부화 현상은 단백질 분해 효소의 역할의 중요성을 시사한다 (Gonzales & Bavister, 1995).

체외에서의 난자의 성숙 및 배아 발달과정에서 체내와 여러 가지 다른 환경으로 인하여 투명대 경화 (zona hardening)가 일어나고, 이는 부화를 저해하여 착상률이 낮아지는 이유중의 하나로 보여진다. 체외수정 기술에서는 부화의 기작보다는 임신율을 높이기 위한 방법으로 여러 가지의 보조부화술 (assisted hatching: AH)이 시행되어 왔다 (partial zona dissection: PZD, Malter & Cohen, 1989a; zona drilling: ZD, Gordon & Talansky, 1986; Laser-ZD, Strohmmer & Feichtinger, 1992).

이러한 보조부화술은 환자의 나이가 많거나, 난포자극호르몬의 기저치 상승으로 인해 투명대의 두께가 두꺼운 경우, 양질의 배아에도 불구하고 지속적인 착상 실패를 경험한 환자를 대상으로 시행되었지만, 그 효과에 대해서는 아직도 많은 논란이 제기되고 있다 (Liu *et al.*, 1993; Stein *et al.*, 1995; Hellebaut *et al.*, 1996; Bider *et al.*, 1997; Lanzendorf *et al.*, 1998).

본 연구에서는 각각의 적응례에 따른 보조부화술의 결과를 비교하여 보조부화술의 유용성을 알아보고, 적응례를 확대함으로써 보다 높은 임신율을 얻고자 시행하였다.

### 1. 연구대상

1996년 1월부터 1997년 10월까지 본원에서 체외수정 기술을 시행한 976주기 중에서 보조부화술을 시행한 320주기를 대상으로 하였다. 보조부화술을 시행한 대상으로는 환자의 나이가 38세 이상인 군 (A:45례), 투명대의 두께가 18  $\mu\text{m}$  이상인 군 (Z:115례), 반복적으로 착상에 실패 (3회 이상)한 군 (P:10례)과 이들 요인 중 두 가지 이상의 복합요인을 가진 군 (AZ:23례, AP:37례, ZP:76례, AZP:14례)으로 나누어 분석하였다.

### 2. 연구방법

#### 1) 체외수정 시행

난자를 획득하기 위한 과배란 유도는 GnRH-agonist와 FSH/HMG를 병용하여 사용하였으며 여성 난포의 크기가 18 mm 이상이 되면 10,000IU의 hCG를 주사한 후 34시간에 질식 초음파를 이용하여 난자를 채취하였다. 당일 채취 후 3~5시간에 수정하였으며, 수정 후 16~20시간 후에 수정 확인하여 성장 배양액으로 옮겨 48시간 배양 후 자궁강에 이식을 하였다. 수정 및 배양에 사용한 배양액은 HTF 배양액에 10% 인조혈청 (synthetic serum substitute: SSS, Irvine, USA)을 혼합하여 사용하였다. 투명대 요인의 환자는 수정 확인시 투명대의 두께를 측정하여 보조 부화술의 시행여부를 판단하였다. 임신 확인은 이식 10일 후 hCG로 확인하였고, 초음파상 심장 박동을 확인한 경우를 임신으로 판단하였다.

#### 2) 미세관의 준비

보조부화술을 시행하기 위해서는 배아를 움직이지 못하도록 고정시켜주는 holding pipette (외경: 150  $\mu\text{m}$ , 내경: 30  $\mu\text{m}$ )과 직접 투명대에 구멍을 뚫어주는 데 사용하는 AH micropipette (내경: 10  $\mu\text{m}$ )을 제작하였다. AH micropipette은 micro-puller (750B, Kopf, USA)를 사용하여 제작하였고, pipette의 끝은 microforge (Alcatel, France)를 사용하여 절단 후 절단면은 다듬어 투명대나 세포질에 해를 입히지 않도록 준비하였다.

#### 3) 배아의 준비

배양접시 (60 mm, Falcon)에 배양액 (10% SSS-HTF)과 pH가 2.5로 적정된 Acid Tyrode 용액으로 각각 20  $\mu\text{l}$ , 40  $\mu\text{l}$ 의 방울을 만들고 그 위에 oil을

덮어 준비하였다. 배아는 난자 채취 후 3일째 이전에 배양액 방울로 옮겨 보조부화술을 시행하였다.

#### 4) 보조부화술의 시행

보조부화술은 미세조작기 (micro-manipulator, NT-88, Narishige, Japan)를 이용하여 시행하였으며 micro-injector를 사용하지 않고 mouth-controlled aspirator를 이용하여 흡입을 조절하였다. 우선 AH micro-pipette으로 acid Tyrode용액을 적당량 흡입한 후 배아가 놓여진 배양액 방울로 이동하여 holding pipette으로 배아를 고정하였다. 그 다음으로 AH micro-pipette을 투명대 가까이에 접근시킨 다음 천천히 투명대를 향해 acid Tyrode 용액을 불어내어 25  $\mu\text{m}$  정도의 구멍이 뚫리는 순간 재빨리 흡입하여 acid Tyrode용액이 너무 많이 분출되어 배아의 세포막이나 세포질에 손상이 생기지 않도록 하였다. 보조부화술을 시행한 배아는 신선한 배양액으로 옮겨 세척한 후 2~3시간 안에 이식하였다.

### 3. 통계학적 분석

결과에 대한 통계학적인 분석은  $X^2$ -test를 이용하여 시행하였고, p값이 0.05 이하인 경우에 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

## 결 과

동 기간에 시술한 환자들에서 보조부화술을 시행한 실험군과 시행하지 않은 대조군간의 환자들의 특징을 살펴보면 환자의 나이, 체외수정

**Table 1.** Total outcomes of IVF-ET with or without AH

|                          | Non-AH group            | AH group                |
|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Number of cycles         | 656                     | 320                     |
| Mean age                 | 33.2 $\pm$ 4.1          | 35.6 $\pm$ 4.1          |
| Cycle ranks              | 2.2 $\pm$ 1.6           | 3.5 $\pm$ 2.3           |
| Oocytes retrieved        | 13.2 $\pm$ 8.7          | 12.4 $\pm$ 7.6          |
| Oocytes fertilized (%)   | 7.3 $\pm$ 6.0<br>(55.3) | 7.1 $\pm$ 4.9<br>(57.3) |
| Embryos transferred      | 4.8 $\pm$ 2.8           | 5.4 $\pm$ 2.8           |
| Clinical pregnancies (%) | 174 (26.5)              | 85 (26.6)               |

Values are mean $\pm$ SD

시술횟수, 채취된 난자의 수, 수정률, 이식한 배아의 수에서는 유의한 차이가 없었으며 실험군 (26.6%)과 대조군 (26.5%)간의 임신율도 차이가 없는 것으로 나타났다 (Table 1).

환자의 나이 요인 (38세 이상)으로 인해 보조부화술을 시행한 군의 임신율은 21.0%로 그 외의 요인으로 시행한 군의 임신율 (31.3%)보다 낮은 것으로 나타났으며 (p=0.06, Table 2), 같은 시기에 순수한 나이 요인을 가진 환자 중 보조부화술을 시행한 군 (24.4%)은 시행하지 않은 군 (15.8%) 보다는 임신율이 높아진 것으로 나타났다.

투명대의 두께 요인 (18  $\mu\text{m}$  이상)으로 인해 보조부화술을 시행한 군은 32.2%의 임신율을 보여 그 외의 다른 요인으로 시행한 군의 임신율

**Table 2.** Comparison of the outcomes of AH between complex age factor and the other factors

|                          | <sup>1</sup> Age factor | Other factors           |
|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Number of cycles         | 119                     | 201                     |
| Mean age                 | 39.8 $\pm$ 1.6          | 33.1 $\pm$ 2.9          |
| Cycle ranks              | 3.8 $\pm$ 2.7           | 3.3 $\pm$ 2.1           |
| Oocytes retrieved        | 10.2 $\pm$ 6.5          | 13.7 $\pm$ 7.9          |
| Oocytes fertilized (%)   | 5.7 $\pm$ 3.9<br>(55.9) | 8.0 $\pm$ 5.1<br>(58.4) |
| Embryos transferred      | 4.6 $\pm$ 2.7           | 5.8 $\pm$ 2.7           |
| Clinical pregnancies (%) | 25 (21.0)               | 63 (31.3)               |

<sup>1</sup>patient's age: more than 38 years

Values are mean $\pm$ SD

**Table 3.** Comparison of outcomes of AH between complex zona factor and the other factors

|                          | <sup>1</sup> Zona factor | Other factors           |
|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Number of cycles         | 227                      | 93                      |
| Mean age                 | 33.9 $\pm$ 3.5           | 39.5 $\pm$ 4.0          |
| Cycle ranks              | 3.3 $\pm$ 2.3            | 3.8 $\pm$ 2.4           |
| Oocytes retrieved        | 13.3 $\pm$ 7.7           | 10.3 $\pm$ 7.0          |
| Oocytes fertilized (%)   | 7.8 $\pm$ 5.0<br>(58.6)  | 5.5 $\pm$ 4.3<br>(53.4) |
| Embryos transferred      | 5.7 $\pm$ 2.8            | 4.5 $\pm$ 2.7           |
| Clinical pregnancies (%) | 73 (32.2)*               | 15 (16.1)*              |

<sup>1</sup>zona thickness: more than 18  $\mu\text{m}$

Values are mean $\pm$ SD, \*p<0.01

**Table 4.** Comparison of outcomes of AH between complex repeated implantation failure factor and the other factors

|                          | <sup>1</sup> RIF factor | Other factors     |
|--------------------------|-------------------------|-------------------|
| Number of cycles         | 137                     | 183               |
| Mean age                 | 36.2±3.3                | 35.1±4.6          |
| Cycle ranks              | 5.6±2.0                 | 1.9±0.8           |
| Oocytes retrieved        | 12.3±7.5                | 12.5±7.7          |
| Oocytes fertilized (%)   | 7.2±4.6<br>(58.5)       | 7.1±5.0<br>(56.8) |
| Embryos transferred      | 5.6±2.8                 | 5.2±2.7           |
| Clinical pregnancies (%) | 19 (13.9)*              | 56 (30.6)*        |

<sup>1</sup>RIF: previous repeated implantation failure more than 3 times

Values are mean±SD, \*p<0.01

(16.1%)보다 유의하게 높은 것으로 나타났다 (p<0.01, Table 3).

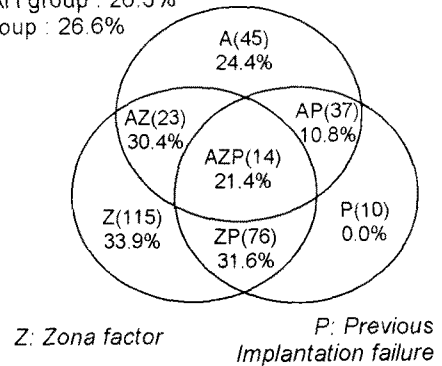
반복적으로 착상에 실패 (3회 이상)하여 보조부화술을 시행한 경우는 임신율이 13.9%로 다른 요인으로 시행한 군의 임신율 (30.6%)보다 유의하게 낮은 것으로 나타났으며 (p<0.01, Table 4) 같은 시기에 보조부화술을 시행하지 않은 군 (26.2%)보다도 낮은 임신율을 보여주었다.

그림 1에서 보이는 결과는 각각의 요인들과 두 가지 이상의 복합요인들에 따른 보조부화술의 임신 결과이다. 임신율은 투명대를 포함한 복합요인군이 나이요인 및 반복적인 착상실패 요인의 복합군보다 유의하게 높게 나타났다.

## 고 찰

포유동물의 난자 및 배아는 당단백질로 이루어진 투명대 막으로 둘러 싸여 있어서 난자의 수정 시에는 정자의 생리적 변화를 조절하고, 수정 직후 다른 정자의 침입을 막아 주며, 수정란의 발생 시에는 다른 세포의 침입과 할구의 분할을 막아준다. 투명대는 수정 직후 투명대 반응과 체외에서의 발생과정 중 투명대가 체내에서 발생 시보다 단단해지는 투명대 경화 현상이 있는 것으로 알려져 있다 (김지수 등, 1997) 수정란이 포배기까지의 발생뿐만 아니라 투명대로부터의 이 탈 과정인 부화는 착상에의 필수적인 과정이다. 이러한 부화의 기작에 대해서는 아직 밝혀진 바

Total pregnancy : 26.5% A: Age factor  
Non-AH group : 26.5%  
AH group : 26.6%



**Figure 1.** Comparison of pregnancy rates from AH treatment due to the different indications. The values in parentheses are the number of treatment cycles.

가 미흡하지만, 현재까지 알려진 바로는 포배강의 형성으로 인해 생기는 물리적인 압력의 증가, 혹은 배아와 자궁내막에서 분비되는 단백질 분해효소의 작용에 의해 이루어지는 것으로 알려져 있다 (Gordon & Dapunt, 1993; Schiewe *et al.*, 1995). 최근에는 이들 중 후자에 대한 보다 직접적인 증거가 제시되고 있다. 부화에 관련이 있는 효소로는 생쥐의 경우 영양배엽에서 분비되는 trypsin-like proteinase (strypsin)가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Swada *et al.*, 1990).

체외수정 시술과정에서 과배란 유도는 환자 개개인의 나이 혹은 FSH 기저치 및 과배란 기간에 따라 투명대의 두께가 차이가 있으며, 이는 착상 시기에 부화의 실패로 인한 착상 실패의 한 원인이 되기도 한다 (Cohen *et al.*, 1992; Schoolcraft *et al.*, 1995; Bider *et al.*, 1997). 따라서 체외수정 시술 시 임신율을 향상 시키기 위하여 여러 가지의 보조부화술이 시행되어 왔다. 초기 투명대를 절개하는 PZD 방법 (Cohen *et al.*, 1990)과 선택적인 투명대 thinning 방법 (Khalifa *et al.*, 1992)이 소개되었으나, 이들 방법은 현재 통상 사용되는 acid Tyrode 용액을 이용한 투명대에 구멍을 뚫어주는 ZD 방법보다 효과가 낮은 것으로 보고되었다. 초기에는 강 산성 용액의 유해성이 제기되었으나 (Malter & Cohen, 1989b), 이후의 여러 연구 결과들에서 안전하고 효율적인 방법으로 제시되었다 (Cohen *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1993; Schoolcraft *et al.*, 1994).

보조부화술은 특히 나이가 많은 환자 (Schoolcraft *et al.*, 1995), 양질의 배아에도 불구하고 반복적으로 임신에 실패한 환자 (Stein *et al.*, 1995), 투명대의 두께가 두꺼운 경우에 주로 적용되고 있으며, 착상과 임신에 도움을 주는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 보조부화술의 시행 여부에 따른 대조군과 실험군간의 임신율의 차이가 없게 나온 결과는 부화술의 임의 적용이 아니라 적용증에 해당된 환자에만 적용했기 때문이고, 임신율이 비슷한은 오히려 실험군에서 임신율이 향상되었다고 말할 수 있다. 한편, Cohen 등 (1992)은 정상적인 FSH기저치의 환자들을 보조부화술의 시행 여부에 따라 임의로 나누어진 두 군간에 착상률이나 임신율에 차이를 나타내지 않았으나 환자의 나이가 많거나 투명대의 두께가 15  $\mu\text{m}$  이상인 경우에 보조부화술을 시행하였을 경우에는 착상률이나 임신율이 유의하게 높아지는 것은 본 연구의 결과와 일치하는 것이라 사료된다.

환자의 나이 요인으로 적용된 보조부화술에서 임신율이 증가하지 않았다는 보고 (Bider *et al.*, 1997; Lanzendorf *et al.*, 1998)와는 다르게 본 연구에서는 나이 단일 요인 환자에서 보조부화술은 임신율을 증가 시켰다. 또한 나이 요인에 의한 보조부화술을 시행한 환자군에서 투명대 요인과 복합적으로 적용된 경우에는 나이 단일 환자군에서보다 임신율이 증가한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 보조부화술이 환자의 나이와 투명대의 두께 요인에 모두 효과적으로 작용하는 것으로 보여진다.

본 연구에서 3회 이상 착상에 실패한 경험이 있는 환자들을 대상으로 한 보조부화술은 보조부화술을 시행하지 않은 대조군보다 임신율이 감소한 것으로 나타났다. 그러나, 투명대 요인이 복합적으로 적용되었을 경우에는 임신율이 유의하게 증가한 것으로 나타났다. 이는 Stein 등 (1995)의 연구결과에서의 3번 이상 착상에 실패한 경험이 있는 환자들을 대상으로 시행한 보조부화술에서 대조군과 임신율에서 큰 차이를 보이지 않았으나 환자의 나이가 38세 이상인 경우에는 유의하게 임신율이 증가한 결과와 일부 상응하는 결과로 보여진다. 이는 반복적인 착상 실패는 배아의 부화과정 자체가 직접적인 원인이 되기 보다는 배아 그 자체 혹은 자궁 내의 환경 등 기타의 다른 요인들이 복합적으로 관여하고 있음을 제시해준다.

본 연구의 결과, 보조부화술은 나이가 많은 환자와 투명대의 두께가 두꺼운 환자에서 임신율이 향상되었고, 특히 투명대 요인을 포함한 복합 요인의 환자에서 보조부화술의 효과가 큰 것으로 보아 보조부화술은 배아의 질에는 미치는 영향이 없으며 다만 두꺼운 투명대의 예후에 효과적인 보조생식 기술로 사료된다.

## 결 론

보조부화술은 환자의 나이와 난포자극호르몬 기저치의 상승에 따른 투명대 두께의 증가와 원인불명의 요인에 의한 반복적 착상실패 등의 경우에 적용하는 보조생식술로, 본원에서 체외수정을 시술한 320주기를 대상으로 각각의 적용례에 따른 보조부화술의 효용성을 알아보았다. 그 결과는 다음과 같았다.

1. 보조부화술을 시행한 군과 대조군의 임신율은 26.6%와 26.5%로 유의한 차이를 나타내지 않았다.
2. 보조부화술을 시행한 군 중에서 투명대의 두께가 두꺼운 경우 임신율이 32.2%로 환자의 나이 요인이나 반복적인 착상실패 요인의 환자에 비해 가장 높은 임신율을 보여주었다. 나이 단일 요인의 환자에서는 보조부화술을 시행한 실험군이 나이 많은 환자의 대조군에 비해 임신율이 증가되었으나, 착상 실패군에서는 그렇지 않았다.
3. 보조부화술을 시행한 군 중에서 투명대 요인을 포함한 복합요인을 가진 환자의 임신율 (Z: 33.9%; ZA: 30.4%; ZP: 31.6%; ZAP: 21.4%)이 그 외의 요인을 가진 환자 (A: 24.4%, P: 0%; AP: 10.8%)보다 높게 나타났다.

본 연구의 결과로 볼 때 보조부화술은 나이가 많거나 반복적인 착상 실패를 보이는 환자보다는 투명대의 두께가 두꺼운 환자에게 유용하며 체외수정 시술시 보조부화술을 적용할 때 우선적으로 투명대의 두께 요인에 시행하는 것이 임신율을 향상시키는데 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

## 인 용 문 헌

Bider D, Livshits A, Yonish M, Yemini Z, Mashiach S, Dor J: Assisted hatching by zona drilling of

- human embryos in women of advanced age. *Hum Reprod* 1997, 12, 312-320.
- Cohen J, Elsner C, Kort H, Malter HJ, Massey J, Mayer MP, et al: Impairment of the hatching process following IVF in human and improvement of implantation by assisted hatching using micromanipulation. *Hum Reprod* 1990, 5, 7-13.
- Cohen J, Alikani M, Trowbridge J, Rosenwaks Z: Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of embryos with poor prognosis. *Hum Reprod* 1992, 7, 685-691.
- Gonzales DS, Bavister BD: Zona pellucida escape the hamster blastocysts *in vitro* is delayed and morphologically different compared with the zona escape *in vitro*. *Biol Reprod* 1995, 52, 470-480.
- Gordon JW, Dapunt U: A new mouse model for embryos with a hatching deficiency and its use to elucidate the mechanism of blastocyst hatching. *Fertil Steril* 1993, 59, 1296-1301.
- Gordon JW, Talansky BE: Assisted fertilization by zona drilling: a mouse model for correction of oligospermia. *J Exp Zool* 1986, 239, 347-354.
- Hellebaut S, De Sutter P, Dozortsev D, Onghena A, Qian C, Dhont M: Does assist hatching improve implantation rates after *in vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection in all patients? A prospective randomized study. *J Assist Reprod Genet* 1996, 13, 19-22.
- Khalifa E, Tucker M, Hunt P: Cruciate thinning of the zona pellucida for more successful enhancement of blastocyst hatching in the mouse. *Hum Reprod* 1992, 7, 532-536.
- 김지수, 김해권, 박종민, 이승재, 이준영, 김문규: 체내에서 성숙이 재개된 생쥐난자의 투명대 경화. *대한불임학회지* 1997, 24, 1-11.
- Lanzendorf SE, Nehchiri F, Mayer JF, Oehninger S, Muasher SJ: A prospective, randomized double-blind study for the evaluation of assisted hatching in patients with advanced maternal age. *Hum Reprod* 1998, 13, 409-413.
- Liu HC, Cohen J, Alikani M, Noyes N, Rosenwaks Z: Assisted hatching facilitates earlier implantation. *Fertil Steril* 1993, 60, 871-875.
- 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, 139-148.
- 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 trophoctoderm. *Dev Biol* 1986, 114, 42-58.
- Schiewe M, Hazeleger NL, Scimienti C, Balmaceda JP: Physiology characterization of blastocyst hatching mechanisms by use of a mouse antihatching model. *Fertil Steril* 1995, 63, 288-294.
- 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, 551-554.
- Schoolcraft WB, Schlenker T, Jones GS, Jones HW: *In vitro* fertilization in woman age 40 and older: the impact of assist hatching. *J Assist Reprod Genet* 1995, 12, 581-584.
- Stein A, Rufas O, Amit S, Avrech O, Pinkas H, Ovadia J, Fiscej B: Assisted hatching by partial zona dissection of human pre-embryos in patients with recurrent implantation failure after *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1995, 63, 838-841.
- Strohmer H, Feichtingr W: Successful clinical application of laser for micromanipulation in an *in vitro* fertilization program. *Fertil Steril* 1988, 58, 212-214.
- Swada 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, 83-87.