

## 생쥐 수정란의 보조부화술에 있어서 Non-Contact Type인 Diode Laser의 이용

을지병원 의과학연구소<sup>1</sup>, 산부인과<sup>2</sup>, 대전을지대학병원 산부인과<sup>3</sup>,  
건국대학교 축산학과<sup>4</sup>

김동훈<sup>1</sup> · 이명섭<sup>3</sup> · 강희규<sup>1</sup> · 한성원<sup>1</sup> · 김묘경<sup>1</sup> · 박원일<sup>2</sup>  
이훈택<sup>4</sup> · 정길생<sup>4</sup> · 이호준<sup>1</sup>

### Use of Non-Contact Type Diode Laser on Assisted Hatching of Mouse Embryos

D.H. Kim<sup>1</sup>, M.S. Lee<sup>3</sup>, H.G. Kang<sup>1</sup>, S.W. Han<sup>1</sup>, M.K. Kim<sup>1</sup>, W.I. Park<sup>2</sup>,  
H.T. Lee<sup>4</sup>, K.S. Chung<sup>4</sup> and H.J. Lee<sup>1</sup>

*Medical Science Institute<sup>1</sup> and OB/GYN<sup>2</sup> of Eulji General Hospital, OB/GYN of  
Eulji Medical College Hospital<sup>3</sup> and Department of Animal Science,  
Kon-Kuk University<sup>4</sup>*

#### = Abstract =

The present study was performed to investigate the efficacy and safety of laser assisted hatching (AH) on mouse embryos. Non-contact 1.48  $\mu\text{m}$  diode laser system used to create a precise hole on zona pellucida. 2-cell embryos were collected from the mice (ICR) that had the coitus vaginal plug confirmed at 48 hours after hCG injection. Collected 2-cell embryos were cultured in the HTF medium supplemented with 0.4% BSA. For experiments, embryos at 8-cell stage were used after 18-22 hours in culture. After assisted hatching, the embryos were further cultured in HTF medium containing 0.1% PVP (anti-hatching system) for 3 days. For evaluate efficiency of laser on mouse embryo hatching, the effect of AH methods (acidic tyrode, pronase and laser), the number of artificial holes (1, 2 and 3 hole) and the irradiation time of laser (2, 4, 6, 8 and 10 ms) were examined. Hatching rates of laser AH group (95.2%) was significantly higher than that of control group (50.8%), but there was no differences among the laser (95.2%), acidic tyrode (100%) and pronase (98.5%) groups. Hatching rates of the number of zona pellucida opening by laser, there were no differences among the 1 hole (87.5%), 2 hole (92.1%) and 3 hole (85.9%) groups. Developmental and hatching rates of embryos according to laser irradiation time were similar in the treatment groups. Therefore, these results suggest that laser AH using non-contact 1.48  $\mu\text{m}$  diode laser is a simple and accurate and effective procedure for AH. Based on these results, laser AH could be use safely for human ART program.

**Key Words:** laser assisted hatching, 1.48  $\mu\text{m}$  diode laser, anti-hatching system

## 서 론

투명대로 부터 배반포의 부화는 인간을 포함한 포유동물의 발생에 있어서 하나의 중요한 과정이다. 만약 배반포가 자궁의 implantation window 시간 내에 부화를 하지 못한다면 임신이 성립될 수 없기 때문이다. 수정란의 부화율이 저하되는 원인 으로서는 비정상적인 투명대의 경화현상 (Cohen *et al.*, 1990; Cohen, 1991; Tucker *et al.*, 1991), 증가된 투명대의 두께 (Cohen *et al.*, 1992) 그리고 투명대를 용해시키기 위해 수정란 자체에서 분비 되는 enzymatic lysin의 부족 (Cohen, 1991; Cohen *et al.*, 1992a; Khalafa *et al.*, 1993; Schiewe *et al.*, 1995)에 기인한다고 보고하고 있다. 이러한 투명대로 부터 야기된 수정란의 부화의 문제점을 해결하기 위하여 수정란의 투명대를 인위적으로 조작하는 보조부화술 방법이 이용되고 있다. 보조부화술의 방법으로는 투명대의 일부를 절개하는 partial zona dissection (Cohen *et al.*, 1990; Cohen & Feldberg, 1991; Tucker *et al.*, 1991), acidic tyrode 용액을 이용하여 투명대의 일부에 구멍을 내는 zona drilling (Cohen *et al.*, 1992a), 그리고 enzyme 용액에 수정란을 침지하여 투명대를 용해시키는 zona thinning (Gorden & Dapunt, 1993a, b; Lee *et al.*, 1997)과 같은 방법이 이용되어져 왔다. 그러나 micromanipulator를 이용하는 partial zona dissection이나 zona drilling 방법의 경우, 숙달된 기술이 필요하며, 또한 동일하고 규격화된 크기로 투명대를 뚫는데 어려움이 있다 (Germond *et al.*, 1995).

이러한 문제점을 극복하기 위한 대안으로 laser를 이용한 보조부화술이 제시되었다 (Tadir *et al.*, 1991). 지금까지 다양한 종류의 laser가 생쥐 (Blanchet *et al.*, 1992; Neev *et al.*, 1993; Schiewe *et al.*, 1995), 소 (Schutze *et al.*, 1994) 그리고 인간 (Strohmer & Feichtinger, 1992; Antinori *et al.*, 1996a; Antinori *et al.*, 1996b)의 수정란 투명대에 hole을 만들기 위하여 이용되어져 왔다. 몇몇 보고자들은 glass pipette이나 optical fiber와 같은 laser를 유도하는 관이 필요한 contact type system을 이용하였는데 (Strohmer & Feichtinger, 1992; Obruca *et al.*, 1994), 이 system은 숙련된 기술이 필요하며, pipette이나 fiber를 소독해야 하는 단점으로 인하여 그 효용가치가 크게 인정되지 않았다. 그러나 최근에 laser 유도관이 필요없이 현미경의 대물렌

즈에서 직접 laser가 방출되어 수정란의 조작시간이 단축되고, 조작이 간편한 non-contact type system이 이용되고 있으며, 유용한 것으로 보고되고 있다 (Neev *et al.*, 1993; Germond *et al.*, 1995; Schiewe *et al.*, 1995).

이에 본 연구는 생쥐 수정란을 이용하여 non-contact type인 diode laser를 이용한 보조부화술이 배반포의 부화에 효과적인가를 조사하고, 또한 이상의 결과를 바탕으로 인간의 생식보조술에 응용을 위한 기초자료로 이용하는데 그 목적이 있다.

## 재료 및 방법

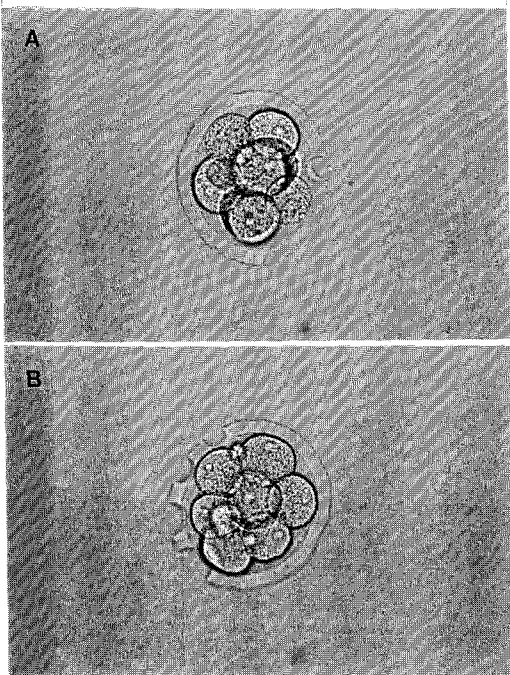
### 1. 수정란의 준비

본 실험에는 5~6주령된 ICR계통의 자성 생쥐를 이용하였다. 생쥐의 복강 내에 5 IU의 PMSG를 주사한 다음, 48시간 후에 5 IU의 hCG를 주사하여 과배란 유도를 하였으며, 수정란을 획득하기 위하여 웅성 생쥐와 1:1의 비율로 합사시켜 교미를 유도하였다. hCG 주사 후 48시간째 경추탈골법을 이용하여 생쥐를 도살한 후, 적출된 난관에서 난관관류법을 통하여 2세포기의 수정란을 회수하였다. 회수된 2세포기 수정란은 0.4% BSA가 첨가된 HTF배양액에서 배양을 실시하였으며, 인간의 보조생식술에 있어서 보조부화술 시술과정과 동일하게 하기 위하여, 배양 18~20시간째 8세포기로 발달된 수정란만을 선별하여 실험에 이용하였다.

### 2. 수정란의 보조부화 (Assisted hatching)

#### 1) Laser

본 실험에서는 non-contact type의 diode laser system (Fertilase, MTM Medical Technology, Switzerland)을 이용하였다. Laser system에 대하여 간단히 설명하면, 670 nm diode laser aiming beam과 collimated 1.48  $\mu$ m cw laser beam이 반사경을 통하여 도립현미경으로 운반되고, 다시 laser beam은 현미경 대물렌즈 (x45)를 통하여 빛을 방출하게 됨으로서, 배양접시를 투과하여 수정란의 투명대에 hole을 형성하게 된다. 그리고 hole의 크기는 조사시간 (irradiation time)을 조정함으로써 조절이 가능하다. Assisted hatching (AH)를 실행하기 위하여, 8세포기의 수정란 (5~10개)을 mineral oil 이 피복된 20  $\mu$ l의 HTF-Hepes배양액 소적에 옮긴 후, 배양접시를 현미경의 stage에 위치시켰다. 그



**Fig. 1.** Laser drilled mouse embryo with 1.48  $\mu$ m diode laser. **A:** Embryo after zona drilling. **B:** Holes of various sizes according to irradiation time (2, 4, 6, 8 and 10 ms, counterclockwise).

리고 현미경의 stage를 이동시켜 수정란의 투명대에 laser의 초점을 맞춘 후, laser를 조사해서 AH를 실시하였다 (Fig. 1).

#### 2) Acidic tyrode

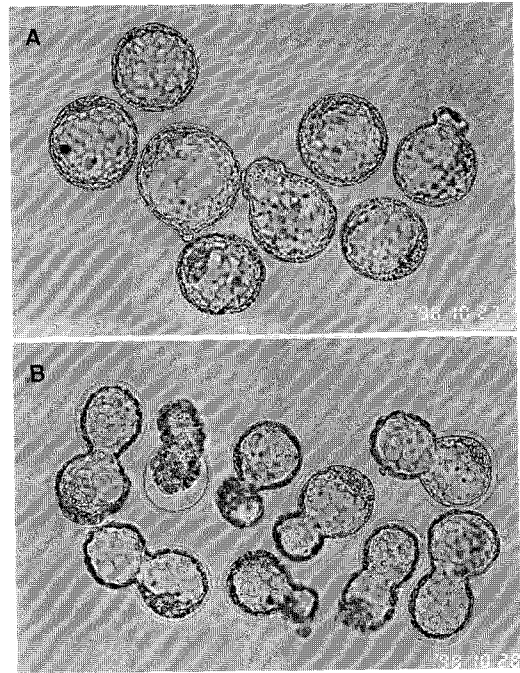
8세포기의 수정란 (3~5개)을 mineral oil이 피복된 20  $\mu$ l의 HTF-Hepes배양액 소적으로 옮긴 후, 배양접시를 micromanipulator에 위치시켰다. 한 개의 수정란을 holding pipette으로 고정시킨 후, 3시 방향에서 acidic tyrode용액이 함유된 pipette을 이용하여 acidic tyrode용액 (pH 2.3)을 수정란의 투명대에 천천히 방출함으로써 AH를 실시하였다.

#### 3) Pronase

수정란의 투명대를 thinning시키기 위하여, 1  $\mu$ g/ml pronase (P-8811, Sigma)가 첨가된 HTF배양액에서 8세포기 수정란을 3일간 배양을 실시하였다.

#### 3. 수정란의 배양

각기 다른 방법으로 보조부화술을 실시한 수정란은 보조부화술의 효과를 보다 확실하게 살펴보기 위하여, Alikani와 Cohen (1992)의 방법에 준하여 anti-hatching culture system, 즉 protein-free



**Fig. 2.** Hatching of drilled and non-drilled mouse embryos. **A:** Non-drilled blastocysts, **B:** Laser drilled blastocysts.

배양액에서 수정란을 3일간 배양을 실시하였다. 한편 수정란이 배양접시에 부착되는 것을 방지하기 위하여 protein 대신에 0.1% PVP를 첨가하였다. 수정란의 발달상태는 12시간 간격으로 관찰하여 조사하였다(Fig. 2).

#### 4. 실험

생쥐 수정란에 있어서 laser 보조부화술의 효과를 알아보기 위하여 1) 보조부화술 방법에 따른 부화율을 비교하였고, 2) laser 보조부화시 투명대의 hole수에 따른 부화율을 비교하였고, 3) laser 조사시간 (irradiation time)에 따른 발달율과 부화율을 조사하였고, 4) 보조부화술 방법에 따른 배반포의 부화시간을 비교 관찰하였다.

#### 5. 통계처리

본 연구에서 얻어진 모든 실험자료의 통계처리는  $\chi^2$  검정을 실시하여,  $p < 0.05$  이하의 유의성만을 대조구와 처리구간의 통계학적 차이로 인정하였다.

## 결 과

### 1. 보조부화술 방법에 따른 부화율

보조부화술 방법에 따른 생쥐 수정란의 발달율과 부화율을 조사한 결과는 Table 1에 제시한 바와 같다. 배반포까지의 발달율에 있어서는 대조군과 보조부화술군 간에 차이가 나타나지 않았지만, 부화율에 있어서는 acidic tyrode군 (100%), pronase군 (98.5%), laser군 (95.2%)이 BSA대조군 (73.3%)과 PVP대조군 (50.8%)보다 유의하게 높은 부화율을 나타냈다. 그러나 보조부화술 방법 간에는 유의한 차이가 나타나지 않았다. 이 결과를 통하여, anti-hatching system에서 보조부화술이 배반포의 부화에 유효함을 알 수 있었으며, 또한 laser 보조부화술도 효과적임을 확인할 수 있었다.

### 2. Laser 보조부화술시 투명대의 hole수에 따른 부화율

Laser 보조부화술을 시행하는데 있어서 투명대 상의 hole수에 따른 생쥐 수정란의 발달율과 부화율을 조사한 결과는 Table 2에 제시한 바와 같다. 배반포까지의 발달율은 hole수에 따른 차이가 나타나지 않았으며, 부화율에 있어서도 차이가 인정되지 않았다. 따라서 laser를 이용한 보조부화술에 있어서는 투명대 상에 1개 이상의 hole은 배반포의 부화에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

### 3. Laser 조사시간 (irradiation time)에 따른 발달율과 부화율

Laser 보조부화술을 시행하는데 있어서 laser

**Table 1.** Hatching rates according to assisted hatching methods

Method	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to		
		Morular	Blastocyst	Hatching-BL *
Control (BSA)**	60	60 (100)	59 (98.3)	44 (73.3) <sup>ab</sup>
Control (PVP)***	61	61 (100)	60 (98.4)	31 (50.8) <sup>a</sup>
Acidic tyrode***	66	66 (100)	66 (100)	66 (100) <sup>b</sup>
Pronase***	65	65 (100)	65 (100)	64 (98.5) <sup>b</sup>
Laser***	63	63 (100)	63 (100)	60 (95.2) <sup>b</sup>

\*Hatching blastocyst

\*\*Embryos were cultured in HTF supplemented with 0.4% BSA.

\*\*\*Embryos were cultured in HTF containing 0.1% PVP.

<sup>ab</sup>: p<0.05

**Table 2.** Hatching rates according to number of zona pellucida opening by laser

Hole number	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to		
		Morular	Blastocyst	Hatching-BL *
Control (BSA)**	57	57 (100)	54 (94.7)	41 (71.9) <sup>ab</sup>
Control (PVP)***	56	55 (98.5)	47 (83.9)	29 (51.8) <sup>a</sup>
1 hole***	64	64 (100)	63 (98.4)	56 (87.5) <sup>b</sup>
2 hole***	64	63 (98.4)	62 (96.9)	59 (92.1) <sup>b</sup>
3 hole***	64	64 (100)	61 (95.3)	55 (85.9) <sup>b</sup>

\*Hatching blastocyst

\*\*Embryos were cultured in HTF supplemented with 0.4% BSA.

\*\*\*Embryos were cultured in HTF containing 0.1% PVP.

<sup>ab</sup>: p<0.05

**Table 3.** Hatching rates according to irradiation time of laser

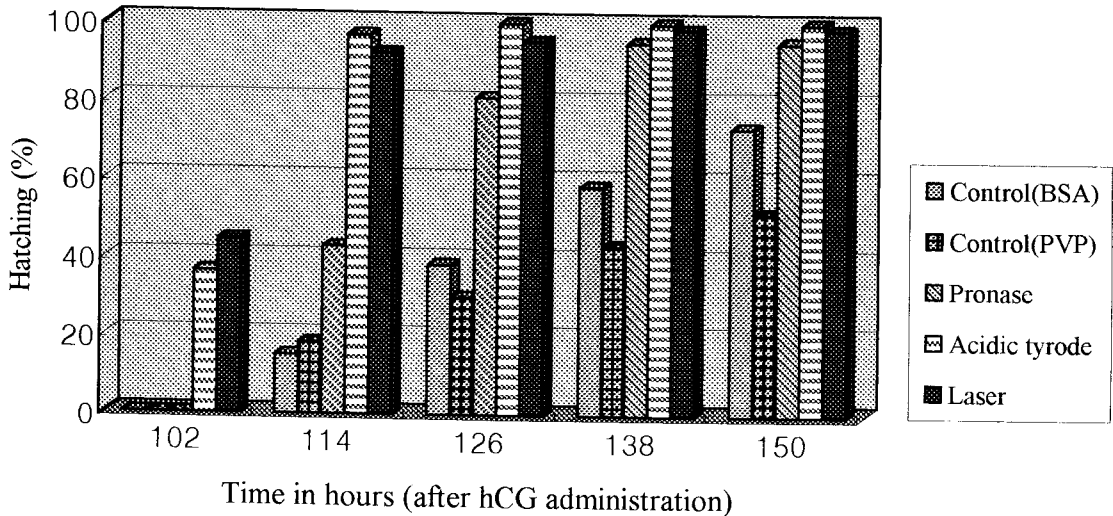
Irradiation time (ms)	No. of embryos cultured	No. (%) of embryos developed to		
		Morular	Blastocyst	Hatching-BL*
Control (BSA)**	61	61 (100)	59 (96.7)	46 (75.4) <sup>ab</sup>
Control (PVP)***	62	62 (100)	62 (100)	26 (41.9) <sup>a</sup>
2 ms***	61	61 (100)	60 (98.4)	57 (93.4) <sup>b</sup>
4 ms***	66	66 (100)	65 (98.5)	64 (97.0) <sup>b</sup>
6 ms***	62	62 (100)	62 (100)	60 (96.8) <sup>b</sup>
8 ms***	63	62 (98.4)	59 (93.7)	57 (90.5) <sup>b</sup>
10 ms***	63	63 (100)	61 (96.8)	60 (95.2) <sup>b</sup>

\*Hatching blastocyst

\*\*Embryos were cultured in HTF supplemented with 0.4% BSA.

\*\*\*Embryos were cultured in HTF supplemented with 0.1% PVP.

<sup>ab</sup>: p<0.05



**Fig. 3.** Timing of hatching of embryos treated with different methods of assisted hatching.

조사시간에 따른 생쥐 수정란의 발달율과 부화율을 조사한 결과는 Table 3에 제시한 바와 같다. Laser 조사시간을 2~10 ms로 조절을 하여 보조부화술을 시행한 결과, 조사시간이 증가되어도 수정란의 배반포까지의 발달율에 유해한 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으며, 부화율에 있어서도 laser 조사시간이 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 고려해 볼 때, 2~10 ms 시간은 수정란에 무해한 것으로 판단되며, 특히 4 ms의 조사시간이 결과상으로 볼 때 가장 적합한 것으로 생각된다.

#### 4. 보조부화술 방법에 따른 배반포의 부화시간

보조부화술 방법에 따른 생쥐 배반포의 부화시간을 조사한 결과는 Figure 3에 제시된 바와 같다. Acidic tyrode군과 laser군은 hCG 투여 후 102시간째에 배반포의 약 40%가 부화를 시작하였으며, 126시간째 대부분이 부화를 완료하였다. 이에 반하여 pronase군과 대조군은 102시간째에는 부화를 시작한 배반포가 전혀 없었으며, 114시간째에 pronase군이 약 40%, 대조군은 약 15% 정도가 부화를 시작했으며, 부화의 완료는 pronase군이 138

시간제, 대조군은 150시간제에 이루어졌다. 이 결과를 살펴볼 때, 투명대 상에 hole을 만들어 주는 보조부화술이 보다 빠른 부화를 유도한다는 것을 알 수 있었으며, laser를 이용한 방법이 빠른 부화를 유도하는데 효과적임을 알 수 있었다.

## 고 찰

배반포의 부화율을 증진시키기 위한 보조부화술에는 화학적 (Cohen *et al.*, 1992) 혹은 기계적 방법 (Cohen *et al.*, 1990, Tucker *et al.*, 1991)이 이용되어져 왔다. 그러나 이러한 방법은 숙련된 기술이 요구되며, 또한 수정란을 장시간 외부에 노출시켜야 하며, 원하는 크기의 정확한 구멍을 낼 수 없다는 문제점이 지적되어 왔다. Laser를 이용한 보조부화술은 기존 방법의 대안으로서 제시되었으며 (Tadir *et al.*, 1991), 다양한 종류의 laser가 이용되고 있다. 보조부화술에 이용되는 laser system은 contact와 non-contact type으로 대별할 수 있다. Contact type은 glass pipette이나 fiber와 같은 laser 유도관에 의하여 빛이 방출되는 형태이며, argon fluoride laser (Laufer *et al.*, 1993), Er:YAG laser (Strohmer & Feichtinger, 1992; Obruca *et al.*, 1994; Antinori *et al.*, 1996; Obruca *et al.*, 1997), Nd:YAG laser (Coddington *et al.*, 1992)가 주로 이용되었다. 그러나 micromanipulator를 이용한 보조부화술과 마찬가지로 시간적 그리고 기술적 문제로 인한 단점 때문에 큰 효용가치가 인정되지 않았었다. Contact type의 단점을 극복하기 위하여 개발된 non-contact type은 빛을 유도하는 유도관이 필요없이 현미경의 대물렌즈를 통하여 빛이 방출되는 형태이며, krypton fluoride excimer laser (Blanchet *et al.*, 1992), XeCl excimer laser (Neev *et al.*, 1993), Ho:YSGG laser (Schiewe *et al.*, 1995), diode laser (Germond *et al.*, 1995), UV laser (Antinori *et al.*, 1996)가 이용되고 있다. 한편, 수정란에 laser를 이용할 때 고려되어야 할 사항은 1) 열에 의한 부작용이 완전히 배제되어야 하며, 2) DNA흡수 범위에서 벗어난 파장을 이용함으로써 유전적 손상을 방지해야 하며, 3) 기계적 손상을 최소화하고 정확도를 기하기 위하여 용제역치 (ablation threshold)가 작아야 하며, 4) 장치가 간결하고 조작이 손쉬워야 한다는 것이다 (Obruca *et al.*, 1994). 특히 non-contact type에서는 빛이 목표 물체에 도달하기 위하여 배양접시와 배양액에

의하여 흡수되는 것이 최소화되어야 한다 (Germond *et al.*, 1995).

몇몇 연구자에 의하면 308 nm excimer laser는 염색체상의 이상 뿐만 아니라 수정란의 비정상적인 발달을 다소 증가시키며 (Virsic-Peuckert *et al.*, 1992; Neev *et al.*, 1993), 248 nm KrF excimer laser는 수정란의 발달을 다소 억제시키며 (Blanchet *et al.*, 1992), 또한 UV 범위의 파장은 유해한 mutagenic effect를 유발할 수 있는 가능성이 있다고 보고하고 있다 (Kochevar, 1989). 그러나 본 실험에 이용된 diode laser는 1.48  $\mu\text{m}$  파장으로 물의 흡수 스펙트럼 (약 2900 nm), DNA 흡수 스펙트럼 (약 300 nm) 그리고 단백질 흡수 스펙트럼 (약 308 nm) 범위에서 크게 벗어나 있어서, 수정란의 체외 및 체내 발달에 유해한 영향을 미치지 않는 것으로 보고되고 있다 (Germond *et al.*, 1995; Germond *et al.*, 1996).

본 실험에서 보조부화술 방법에 따른 부화율을 비교한 결과, 방법들 간에 수정란의 발달 및 부화에 있어서 유사한 결과를 나타냈다. 보조부화술을 시행한 각 처리군의 수정란들을 부화를 억제시키기 위하여 protein-free 배양액에서 배양을 했지만, 대조군 뿐만 아니라 protein을 첨가한 대조군보다도 유의하게 높은 부화율을 나타냈다. 그리고 Schiewe 등 (1995)에 의하면 anti-hatching system에서 배양된 생쥐 수정란에 laser 보조부화술을 시행하여 이식했을 때, 대조군에 비하여 유의하게 높은 착상율을 나타냈으며, protein이 첨가된 배양액에서 배양된 수정란과 유사한 착상율을 나타냈다고 보고하고 있다. 따라서 laser 보조부화술은 수정란의 발달에 무해하며, 부화에 있어서도 유효한 것으로 생각된다. 부화시간을 비교한 결과는 laser군과 acidic tyrode군이 pronase 군과 대조군보다 빠르게 부화가 시작되는 것으로 나타났는데, 이것은 충분한 배반포의 팽창과 투명대의 thinning이 없이도 뚫어진 투명대의 구멍으로 부터 부화가 가능하기 때문이며, 따라서 부화된 배반포의 투명대 형태를 살펴보면 대조군보다 두꺼운 상태를 유지하고 있음을 알 수 있다.

Cohen과 Feldberg (1991)에 의하면 acidic tyrode를 이용한 보조부화술에서 투명대에 2개 혹은 3개의 hole을 만드는 것이 부화에 보다 효과적임을 보고하고 있다. 따라서 laser 보조부화술에 이 방법을 도입한 결과, 1, 2, 3hole군 간에 경향성을 찾을 수는 없었지만, 수치적으로 2hole군이 다소

높은 결과를 나타냈다.

1.48  $\mu\text{m}$  diode laser는 투명대 glycoprotein matrix를 열에 의하여 국소적으로 파괴함으로써 구멍을 뚫게 되는데 (Neev *et al.*, 1993), 구멍의 크기 조절은 조사시간 (irradiation time)을 조절함으로써 가능하다. 따라서 laser 보조부화술에 있어서 조사시간과 구멍크기는 수정란의 발달과 부화에 있어서 중요한 부분이라고 볼 수 있다. 본 실험에서 조사시간에 따른 수정란의 발달과 부화율을 비교한 결과, 2~10 ms의 조사시간은 수정란의 발달 및 부화에 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 그렇지만, 실험을 수행하면서 느낀 경험으로는 4 ms의 조사시간이 보조부화술에서 가장 적합한 것으로 알려져 있는 할구 절반정도의 크기인 약 10  $\mu\text{m}$  크기의 hole을 만들므로 생쥐 수정란의 보조부화술에 적합하다고 생각한다.

본 실험 결과를 종합해 볼 때, 보조부화술에 있어서 non-contact type인 diode laser의 이용이 수정란의 발달에 유해한 영향을 미치지 않으며, 부화율을 유의하게 향상시키는 것을 알 수 있었다. 또한 다른 보조부화술과 비교했을 때, 보다 간편할 뿐만 아니라 작업시간을 크게 단축시킴으로서 수정란의 외부노출시간을 최소화시킬 수 있었다. 이러한 결과를 기초로 인간의 보조부화술에도 laser가 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각되며, 또한 착상전 유전진단을 위한 할구 및 극체의 생검에까지 그 이용범위를 넓힐 수 있을 것으로 사료된다.

## 결 론

본 연구는 생쥐 수정란의 보조부화술에 있어서 laser의 이용이 배반포의 부화에 효과적인가를 조사하기 위하여 실시하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. laser 처리군이 대조군보다 유의하게 높은 부화율을 나타냈다.
2. 보조부화술 방법에 따른 배반포의 부화율은, 방법 간에 차이가 나타나지 않았다.
3. laser처리시 hole수에 따른 배반포의 부화율은, 처리군간에 유의한 차이를 나타내지 않았다.
4. laser 조사시간에 따른 수정란의 발달율과 부화율은, 처리군간에 유의한 차이를 나타내지 않았다.
5. laser처리군과 acidic tyrode처리군이 대조군과

pronase처리군에 비하여 부화시간이 빠른 경향을 나타냈다.

이상의 결과로 볼 때, laser를 이용한 보조부화술은 생쥐 수정란의 발달에 무해하며, 부화율을 향상시키는 것으로 나타났으며, 또한 다른 보조부화술에 비하여 작업시간이 매우 빠르며, 원하는 부위를 정확하게, 원하는 크기만큼 구멍을 낼 수 있다는 장점이 있다. 따라서 사람의 생식보조술에도 laser보조부화술은 매우 유용한 방법이 될 수 있을 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- Antinori S, Panci C, Selman HA, Caffa B, Dani G and Versaci C: Zona thinning with the use of laser: a new approach assisted hatching in human. *Hum Reprod* 1996a, 11, 590-594.
- Antinori S, Selman HA, Caffa B, Panci C, Dani GL and Versaci C: Zona opening of human embryos using a non-contact UV laser for assisted hatching in patients with poor prognosis of pregnancy. *Hum Reprod* 1996b, 11, 2488-2492.
- Alikani M and Cohen J: Micromanipulation of cleaved embryos cultured in protein-free medium: a mouse model for assisted hatching. *J Exp Zool* 1992, 263, 458-463.
- Blanchet GB, Russel JB, Fincher CR and Portman M: Laser micromanipulation in the mouse embryo: a novel approach to zona drilling. *Fertil Steril* 1992, 57, 1337-1341.
- Coddington CC, Veeck LL, Swanson RJ, Kaufmann RA, Lin J, Simonetti S and Bocc S: The YAG laser used in micromanipulation to transect the zona pellucida of hamster oocytes. *J Assist Reprod Genet* 1992, 9, 557-563.
- Cohen J, Elsner C, Kort H, Malter H, Massey J, Mayer MP and Wiemer K: Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisted hatching using micromanipulator. *Hum Reprod* 1990, 5, 7-13.
- Cohen J: Assisted hatching of human embryos. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1991, 8, 179-190.
- Cohen J and 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: Zona pellucida micromanipulation and consequences for embryonic development and implantation, *Micromanipulation of Human Gametes and Embryos*. Raven Press, New York, 1992, pp. 191-219.
- Cohen J, Alikani M, Trowbridge J and Rosenwaks Z: Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis. *Hum Reprod* 1992a, 7, 685-691.
- Germond M, Nocera D, Senn A, Rink K, Delacréaz G and Fakan S: Microdissection of mouse and human zona pellucida using 1.48  $\mu\text{m}$  diode laser beam: efficacy and safety of the procedure. *Fertil Steril* 1995, 64, 604-611.
- Germond M, Nocera D, Senn A, Rink K, Delacréaz G, Pedrazzini T and Hornung JP: Improved fertilization and implantation rates after non-touch zona pellucida microdrilling of mouse oocytes with a 1.48  $\mu\text{m}$  diode laser beam. *Hum Reprod* 1996, 11, 1043-1048.
- Gordon JW and Dapunt U: A new mouse model for embryos with a hatching deficiency and its use to elucidate the mechanism of blastocyst hatching. *Fertil Steril* 1993a, 59, 1296-1301.
- Gordon JW and Dapunt U: Restoration of normal implantation rates in mouse embryos with a hatching impairment by use a new method of assisted hatching. *Fertil Steril* 1993b, 59, 1302-1307.
- Khalafa HAM, Tucker MJ, Hunt PP and Hamidi J: Improved hatching in mouse embryos brought about by combined partial zona dissection and co-culture. *Hum Reprod* 1993, 8, 599-603.
- Kochevar IE: Cytotoxicity and mutagenicity of excimer laser radiation. *Lasers Surg Med* 1989, 9, 440-445.
- Laufer N, Palanker D, Shufaro Y, Safran A, Simon A and Lewis A: The efficacy and safety of zona pellucida drilling by a 193-nm excimer laser. *Fertil Steril* 1993, 59, 889-895.
- Lee DR, Lee JE, Yoon HS, Lee HJ, Kim MK and Roh SI: The supplementation of culture medium with protease improves the hatching rate of mouse embryos. *Hum Reprod* 1997, 12, 2493-2498.
- Neev J, Gonzalez A, Licciardi F, Alikani M, Tadir Y, Berns M and Cohen J: Opening of the mouse zona pellucida by laser without a micromanipulator. *Hum Reprod* 1993, 8, 939-944.
- Obruca A, Strohmer H, Sakkas D, Menezo Y, Kogosowski A, Barak Y and Feichtinger W: Use of lasers in assisted fertilization and hatching. *Hum Reprod* 1994, 9, 1723-1726.
- Obruca A, Strohmer H, Blaschitz A, Schönickle E, Dohr G and Feichtinger W: Ultrastructural observations in human oocytes and preimplantation embryos after zona opening using an erbium-yttrium-aluminium-garnet (Er:YAG) laser. *Hum Reprod* 1997, 12, 2242-2245.
- Schütze K, Clement-Sengewald A and Ashkin A: Zona drilling and sperm insertion with combined laser microbeam and optical tweezers. *Fertil Steril* 1994, 63, 783-786.
- Schiewe MC, Hazeleger NL, Scilimenti C and Bal-maceda JP: Physiological characterization of blastocyst hatching mechanism by use of a mouse anti-hatching mode. *Fertil Steril* 1995, 63, 288-294.
- Strohmer H and Feichtinger W: Successful clinical application of laser for micromanipulation in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1992, 58, 212-214.
- Tadir Y, Wright WH, Vafa O, Liaw LH, Asch R and Berns MW: Micromanipulation of gametes using laser microbeams. *Hum Reprod* 1991, 6, 1011-1016.
- Tucker MJ, Cohen J, Massey JB, Mayer MP, Wiker SR and Wright G: Partial dissection of the zona pellucida of frozen-thawed human embryos may enhance blastocyst hatching, implantation and pregnancy rates. *Am J Obstet Gynecol* 1991, 165, 341-345.
- Virssick-Peuckert RP, Hillirichs G, Jahn R: Form and frequency of chromosome damage after cell irradiation using a 308nm excimer laser. *Lasermedizin* 1992, 8, 182-187.