

생쥐배아의 부화와 탈각에 미치는 Pronase의 영향

서울대학교 의과대학 산부인과학교실¹, 서울대학교 의학연구원 인구의학연구소²
성균관대학교 의과대학 삼성제일병원 산부인과³

문신용^{1,2} · 최성미^{1,2} · 김희선^{1,2} · 류범용^{1,2} · 오선경^{1,2} · 서창석¹
김석현¹ · 최영민¹ · 김정구¹ · 최규홍^{2,3} · 이진용¹

Effect of Pronase Treatment on Mouse Embryos: Improving Hatching and Hatched Rates

Shin Yong Moon^{1,2}, Sung Mi Choi^{1,2}, Hee Sun Kim^{1,2}, Buom Yong Ryu^{1,2},
Sun Kyung Oh^{1,2}, Chang Suk Suh¹, Seok Hyun Kim¹, Young Min Choi¹,
Jung Gu Kim¹, Kyu Hong Choi^{2,3}, Jin Yong Lee¹

*Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine¹, Institute of Reproductive
Medicine and Population, Medical Research Center², Seoul National University,
Department of Obstetrics and Gynecology, Samsung Cheil Hospital,
Sungkyunkwan University School of Medicine³, Seoul, Korea*

Objective: Hatching of the blastocyst from the zona pellucida (ZP) is a key event in mammalian implantation. In vivo, two factors have been identified as possible mediators of hatching: lysis of the ZP by substances elaborated either from the embryo or female reproductive tract and pressure exerted on the zona by expansion of the blastocyst. Two methods of zona manipulation were already in use to enhance the ability of embryos to hatch: mechanical PZD and chemical ZD by acidic Tyrode's solution. But several controversies of each method have been reported. The purpose of this study was to investigate the effect of pronase for mouse embryo hatching.

Methods: Mouse embryos were obtained following ovulation induction of F₁ animals. Fresh and cryo-thawed morula embryos were exposed to 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 µg/ml pronase in Ham's F10 for 72 hrs. Main outcome measures were the rates of partial hatching and completely hatched blastocysts, and cell number of it.

Results: In fresh and cryo-thawed group, the rates of completely hatched blastocyst were significantly higher in 5 µg/ml pronase treatment group than control group. There was no difference in completely hatched blastocyst total cell number between pronase treatment group and control group. This suggest that pronase treatment did not harmful in mouse embryo development. In pronase treatment group, zona pellucida were thinner than control group.

Conclusion: The addition of pronase to culture media may accelerate the hatching of embryo. So, enzymatic treatment of the zona may provide a valuable and effective assisted hatching technique for human in-vitro fertilization-embryo transfer.

Key Words: Pronase, Hatching, Assisted hatching

투명대 (zona pellucida)로부터 포배 (blastocyst)의 탈각 (hatching)은 포유동물의 발생 (mammalian

development)에서 중요한 현상으로 만약 포배가 자궁이 착상에 대한 수용성을 가지고 있는 기간에

탈각되지 않으면 임신이 일어나지 않는다.

인간 체외수정 (IVF) 시행시 모체의 연령이 높거나 기저 FSH의 수치가 높을 때 또는 체내와는 다른 배양조건 등으로 인해 투명대 경화 (zona hardening)이 일어난 경우 배아의 탈각이 저해되는 것으로 알려져 있다. Cohen 등¹²은 IVF 후 착상물이 자연상태에서 보다 낮아짐을 보고하였으며 in vitro 배양을 통해 인간의 포배가 팽윤되어도 대부분이 탈각의 문제를 가지고 있으며 이들이 day 6 또는 day 7에 퇴화된다고 보고하였다. 이러한 탈각의 문제를 극복하기 위하여 미세조작기를 이용한 보조부화술 (assisted hatching; AH)이 도입되었다.

현재 사용되고 있는 보조부화술의 방법에는 물리적으로 투명대의 일부를 찢어주는 방법 (partial zona dissection; PZD)이나 acidic Tyrode 용액을 사용해 투명대의 일부에 구멍을 뚫어주는 방법 (zona drilling; ZD)이 있고 최근에는 laser를 이용한 방법 등이 사용되고 있다.^{3,7} 그러나 생쥐를 대상으로 보조부화술을 시행하였을 때 ZD의 경우 크기가 과도하게 만들어진 구멍을 통해 할구가 유실되거나, 그 구멍을 통해 배아발생에 필요한 여러 물질들이 배아 밖으로 빠져나가 발생이 저해될 수도 있고, acidic tyrode 용액 자체가 배아에게 해로운 영향을 미칠 수 있다는 사실이 보고되었다.⁸ 또한 PZD 시행시 투명대를 절개하는 과정에서 물리적인 자극이 배아에 해로운 영향을 줄 수도 있고, 배아가 탈각과정 중 절개된 투명대에 걸려 complete hatching rate가 낮아질수도 있다는 보고도 있다.⁹ 투명대가 배아를 둘러싸는 protective coat의 역할을 더 이상 수행할 수 없게 된다는 보고도 또한 있다.² 이 두 가지 방법은 체내에서 일어나는 탈각기작 (hatching mechanism)과는 많은 차이가 있는 것으로 알려져 있다.¹⁰

한편 최근에는 체내에서의 탈각기작을 연구하여 이를 보조부화술에 응용하려는 보고들이 있다. 탈각의 기작은 크게 두가지로 나누어 볼 수 있다. 하나는 배아 또는 reproductive tract에서 분비되는 물질로 인한 투명대의 lysis이고 다른 하나는 포배의 팽창에 의한 압력이다. Perona와 Wassarman¹¹은 생쥐 포배에서 mural trophoctoderm으로부터 trypsin-like proteinase가 분비된다고 하였으며 이를 "strypsin"이라 불렀다. 또한 Sawada 등¹²도 생쥐배아가 탈각할 때 배양액내에도 trypsin-like protease가 분비된다고 하였으며 이를 hatching enzyme으로 보고하였다. Gordon과 Dapunt¹³는 생쥐를 이용한 실험에서 탈

각에 주로 영향을 끼치는 것은 포배의 팽창에 의한 압력 때문이 아니라 zona lysis라고 보고하였다. Gonzales와 Bavister¹⁴는 hamster 배아를 이용하여 in vivo와 in vitro에서의 발생의 형태와 hatching time을 비교하였다. 이들은 in vivo에서는 투명대가 "global lysis"로써 전체적으로 얇아지고 소실되어 가지만 in vitro에서는 "focally lysis"로써 탈각되고 나서도 대부분의 투명대가 hole을 가진채 존재한다고 하였다. Lee 등¹⁵은 proteinase의 일종인 pronase를 사용하여 투명대를 얇게 만들어 줌으로써 탈각률이 증가한다고 보고하였고 이를 Fong 등^{16,17}은 인간보조부화술에 사용하였다.

본 실험에서는 pronase를 생쥐상실배아 (fresh embryo)와 냉동융해된 상실배아 (cryo-thawed embryo)에 72시간 처리하여 부화율과 탈각률 그리고 투명대 모양의 변화를 관찰하였다.

연구대상 및 방법

1. 실험 동물

본 실험에서는 생쥐 제 1세대 잡종 (C57BL ♀×CBA ♂)으로 생후 6~8주된 암컷과 12주된 생식력이 확인된 수컷을 사용하였다. 이들을 명기와 암기가 조절되는 (12시간 : 12시간) 사육실에서 사육하였다. 과배란 유도를 위해 7.5 I.U.의 pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG, Sigma)을 생쥐암컷에 복강주사하고 48시간 후 5 I.U.의 human chorionic gonadotropin (hCG, Sigma)을 복강주사하였다.

2. 배아의 획득

실험에 이용된 배아는 체외수정과정을 통해 획득하였다. 수정능력이 확인된 12주령의 수컷생쥐를 경추탈구법으로 희생시키고 부정소 미부와 정관 부위를 분리하여 Ham's F-10 배양액에 넣었다. 26G 주사침으로 정자괴를 유리시켜 이를 5% CO₂가 공급되고 37°C가 유지되는 배양기에서 10분간 배양하였다. 상층액 부분 0.5 ml을 0.4% BSA (bovine serum albumin)가 첨가된 Ham's F-10 배양액에 옮긴 후에 10분 이상 수정을 시키는 시간까지 배양하였다.

HCG 주사 후 14시간에 암컷생쥐를 경추탈구법으로 희생시키고 양쪽 난관을 분리하여 Ham's F-10에 0.4% BSA가 첨가된 배양액이 담긴 배양접시로 옮겼다. 해부현미경하에서 난관의 팽대부를 26G 주사침으로 찢어 난자-난구세포를 얻었다. 이들을 세 번의 세척과정을 거친 후에 Ham's F-10에 0.4% BSA

Table 1. The effect of development and hatching rate of fresh mouse morulae treated with pronase

Pronase ($\mu\text{g/ml}$)	< BL (%)	Partial HA (%)	Com. HA (%)	Shrink or deg (%)	Total
Control	5 (3.8)	34 (25)	75 (57.3)	17 (13)	131
0.5	2 (1.5)	24 (18.1)	91 (68.9)	15 (11.4)	132
1	3 (2.3)	21 (15.9)	91 (68.9)	17 (12.9)	132
2	4 (3.0)	20 (15.2)*	91 (68.9)	17 (12.9)	132
5	1 (0.7)	10 (7.3)**	110 (80.3)**	16 (16.7)	137

BL; blastocyst, HA; hatched blastocyst, deg; degeneration

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ **Table 2.** The effect of development and hatching rate of cryo-thawed mouse morulae treated with pronase

Pronase ($\mu\text{g/ml}$)	Partial HA (%)	Complete HA (%)	Frag, shrink or deg (%)	Total
Control	113 (19.7)	45 (68.2)	8 (12.1)	66
0.5	7 (10.6)	52 (78.8)	7 (10.6)	66
1	6 (9.1)	53 (80.3)	7 (10.6)	66
2	10 (15.4)	46 (79.8)	9 (13.8)	65
5	1 (1.4)**	61 (87.1)**	8 (11.4)	70

HA; hatched blastocyst, frag; fragmentation, deg; degeneration

** $p < 0.01$ **Table 3.** The cell number of complete hatched mouse fresh and cryo-thawed embryos treated with pronase at day 5 and day 6

Pronase ($\mu\text{g/ml}$)	Fresh embryo		Cryo-thawed embryo	
	Day 5	Day 6	Day 5	Day 6
Control	105.8 (± 17.5)	114.4 (± 20.5)	106.8 (± 17.3)	107.0 (± 19.9)
0.5	110.0 (± 23.2)	111.6 (± 19.1)	109.7 (± 18.6)	107.8 (± 25.9)
1	119.8 (± 21.4)	107.6 (± 23.4)	106.4 (± 16.2)	104.8 (± 15.3)
2	113.0 (± 26.8)	110.5 (± 18.1)	102.7 (± 19.8)	104.5 (± 17.6)
5	117.1 (± 20.1)	109.6 (± 18.5)	105.4 (± 18.7)	110.3 (± 22.7)

Day 0; IVF day

가 첨가된 배양액 2 ml이 들어있는 수정용 배양접시 (Falcon #3037)에 모았다.

준비된 수정능력을 획득한 정자의 부유액을 수정용 배양접시에 $10^5 \sim 10^6/\text{ml}$ 의 농도씩 넣어 수정을 시켰다.

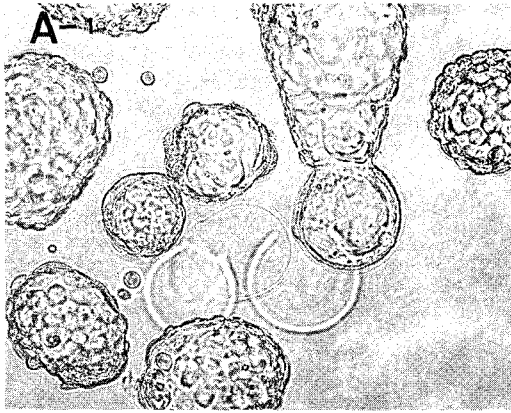
수정 후 24시간에 2세포기 배아를 선별하여 일부는 냉동보존 하였고 나머지는 상실배까지 Ham's F-10에 0.4% BSA가 첨가된 배양액 2 ml이 들어있는 배양접시에서 사용시까지 5% CO_2 가 공급되고 37°C

가 유지되는 배양기에서 배양하였다.

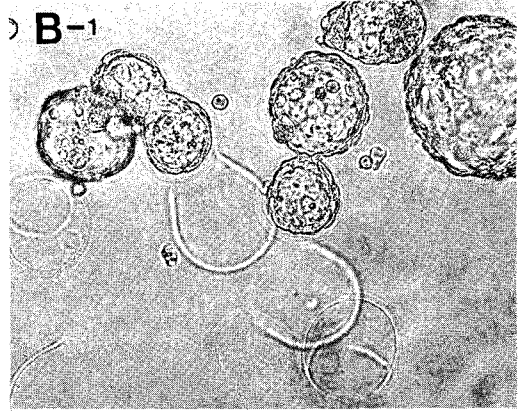
3. 배아의 동결 및 융해

배아의 동결보존액은 20% SSS (synthetic serum substitute, IRVINE SCIENTIFIC)가 포함된 D-PBS에 1.5 M PROH와 0.1 M sucrose를 첨가하여 사용하였다.

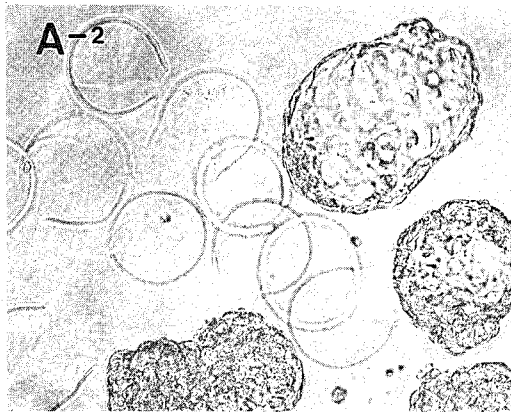
배아를 동결보존액에 10분간 노출시켜 탈수화를 유도한 후 0.25 ml plastic straw에 7개에서 10개씩의



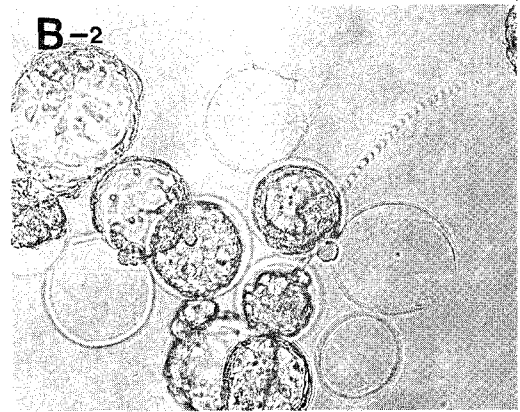
A-1; control at Day 5



B-1 ; The embryos treated with pronase (5 µg/ml) at Day 5



A-2; control at Day 6



B-2; The embryos treated with pronase (5 µg/ml) at Day 6

Figure 1. The morphology of hatching and hatched blastocysts at Day 5 and Day 6 ($\times 200$)

배아를 넣어 자동 세포동결기 (Kryo-10, Planer)에서 동결하였다.

10°C에서 -7°C까지는 분당 -2°C씩 냉각시키고 -7°C에서 5분간 정지시키고 정지 1분 후 과냉각을 방지하기 위하여 액체질소에서 냉각된 핀셋으로 식빙 (seeding)을 시행하였다. -7°C에서 -30°C까지는 분당 -0.3°C씩 냉각하였으며 -30°C에서 10분간 정지 후 액체질소통에 넣어 보존하였다.

배아의 융해는 동결된 straw를 액체질소통에서 대기중으로 옮겨 20초간 노출시킨 후 straw 표면의 물기를 제거한 다음 알코올을 문힌 거즈로 닦아 소독하였다. Straw내의 배아와 동결보존액을 배양접

시에 부어 해부현미경하에서 배아의 수를 확인한 후 용해액으로 옮겼다.

기본 용해액은 20% SSS가 포함된 D-PBS로 하여 첫 단계에서는 1.0 M PROH와 0.2 M sucrose 용액에서 5분간, 두번째 단계에서는 0.5 M PROH와 0.2 M sucrose 용액에서 5분간, 세번째 단계에서는 0.2 M sucrose 용액에서 5분간 노출시키고 마지막 단계에서는 기본 용해액에서 5분간 두었다. 해부현미경하에서 할구가 모두 살아있고 투명대가 밝고 온전한 배아만을 생존한 것으로 판정하였고, 생존한 배아는 48시간 더 0.4% BSA가 첨가된 Ham's F-10 배양액에서 상실배까지 배양하였다.

4. Pronase 처리

Pronase (protease, Sigma P-8811)를 초순수 증류수에 1 µg/ml의 1,000배 stock solution (1 mg/ml)을 만들어 사용하였다. 0.5, 1, 2, 5 µg/ml 각 농도별로 Ham's F10 배양액에 희석하여 사용하였고, 각 농도별로 30 µl media drop을 만들어 oil covering한 후 각 drop에 10~15개의 상실배아를 넣어 배양하였다.

부화율은 배아가 투명대에서 완전히 벗어나지 못하고 부분적으로 나온 것으로 정의하였고 탈각률은 투명대에서 완전히 벗어난 것으로 정의하였다.

5. Cell Number Counting

Day 5와 Day 6에 complete hatched된 배아만을 골라 Hoechst (Sigma #33342)로 핵 염색한 후 형광현미경하에서 세포수를 세었다.

6. 통계 분석

실험 결과들의 통계적 신빙도를 판정하기 위해 student t-test를 이용하여 $p > 0.01$, $p > 0.05$ 일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

결 과

생쥐상실배아에 pronase를 72시간 동안 농도별로 처리하였을 때 투명대에서 완전히 벗어난 탈각률이 대조군보다 높게 나타났다 (Table 1). 특히 pronase 5.0 µg/ml 처리군은 대조군보다 탈각률이 유의하게 높았다 ($p < 0.05$).

동결보존하였던 배아를 융해하여 배양한 후 상실배아에 pronase를 농도별로 처리하였을 때 탈각률이 5.0 µg/ml 농도에서 대조군과 0.5, 1.0, 2.0 µg/ml pronase 처리군보다 유의하게 높았다 (Table 2, $p < 0.01$).

Pronase가 배아발생에 미치는 영향을 알아보기 위해 투명대에서 완전히 벗어난 탈각된 배아만을 pronase 처리 후 48, 72시간에 Hoechst 염색을 하여 세포수를 비교하였다 (Table 3). 대조군과 처리군에서 세포수에서 차이가 보이지 않아 pronase가 배아발생에 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

탈각이 일어난 투명대를 대조군과 5.0 µg/ml pronase를 처리한 군을 비교하였을 때 처리군의 투명대 절개 부위가 넓고 얇아진 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 1).

인간보조생식술 시행시 모체의 연령이 높거나, 기저 FSH 수치가 높을 때, 또한 체내와는 다른 체외 배양조건 등으로 인해 난자에 투명대 경화현상 (zona hardening)이 유도되는 것으로 알려져 있다. 이러한 투명대 경화현상을 극복하기 위해 보조부화술이 도입되었다. 미세조작기를 사용하는 보조부화술의 방법은 투명대의 일부를 바늘로 찢어주는 물리적인 방법 (PZD; Partial Zona dissection)과 acidic Tyrode 용액을 사용해 투명대 일부를 녹여주는 화학적인 방법 (ZD; zona drilling)이 사용되고 있다.^{5,10} 위의 두가지 방법은 투명대의 일부를 찢거나 녹여주는 방법으로 체내에서 일어나는 탈각기작과는 많은 차이가 있다. 체내에서는 female reproductive tract와 배아자체에서 분비되는 trypsin-like proteinase에 의해 투명대가 얇아지거나 포배의 팽윤에 의해 투명대가 압력을 받아 부화과정이 일어나는 것으로 알려져 있다.¹¹

Gordon과 Dapunt¹³는 microneedle을 이용하여 할구의 일부를 파괴하였을 때 남아있는 할구들은 투명대 안에서 건강한 포배로 자라지만, 탈각은 유의하게 저해를 받는다고 하였다. 이때 투명대내의 팽윤을 위해 파괴시킨 할구 대신 oil 방울을 투명대 안에 넣어주어도 탈각률은 개선되지 않았지만 투명대를 acidic Tyrode 용액으로 얇게 녹여주었을 때는 투명대의 넓은 공간을 통해 배아가 탈각되고 탈각률은 증가함을 보여 zona lysis가 탈각에 유의한 영향을 미침을 보고하였다. 그러나 acidic Tyrode는 배아자체에 해로운 영향을 미칠 수 있음이 보고된 바 있다.⁷

본 실험에서는 proteinase의 일종인 pronase를 각각 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 µg/ml의 농도로 생쥐상실배에 72시간 처리하여 부화률과 탈각률 그리고 투명대 모양의 변화를 관찰하였다. 또한 냉동융해한 배아에도 같은 농도와 시간을 처리하여 부화율과 탈각률의 차이를 비교하여 보았다.

Pronase 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 µg/ml 처리군에서 부화율은 대조군과 차이가 없었고, 탈각률이 대조군보다 높게 나타났다 (Table 1). 특히 5.0 µg/ml pronase 처리군은 대조군보다 탈각률이 유의하게 높았다 ($p < 0.05$). 또한 대조군과 pronase 처리군의 세포수를 비교하였을 때 그 유의한 차이가 없어 pronase가 배아발달에는 영향을 미치지 않고 탈각률만 증

가시킴을 알 수 있었다. 이것은 Lee 등¹⁵이 생쥐 2세포배아를 1.0 µg/ml pronase (PE)와 0.1 µg/ml proteinase K (PK)에 72시간 처리하였을 때 배아의 발생에는 영향을 미치지 않지만, 탈각물은 유의하게 증가시킨다는 보고와 유사한 결과를 보였다.

동결융해는 생쥐난자에서 투명대 경화현상을 일으켜 수정률을 감소시키는 것으로 보고되고 있다.¹⁸ 그러나 배아의 경우, Tucker 등¹⁹과 Check 등²⁰은 냉동융해한 배아의 경우 투명대 경화현상 때문에 임신율이 낮아져 이들 배아에 보조부화술을 시행하였을 때 임신율이 증가된다고 보고하였다. 그러나 Matson 등²¹이 α-chymotrypsin을 가지고 투명대를 녹이는데 걸리는 시간을 관찰하였을 때 동결융해한 배아와 대조군에서 차이가 없음을 보여 동결이 배아의 투명대에 영향을 주지는 않는 것으로 보고하였다. 본 실험에서도 대조군과 동결융해한 배아의 Day 6에서의 탈각률이 비슷한 것으로 나타났으며 (57.3% vs 68.2%) pronase에 동일한 농도로 동일한 시간 노출하였을 때 각 농도당 탈각률에서 차이를 보이지 않았고 동결융해군도 대조군에서와 같이 pronase 처리군에서 탈각률이 높아졌으며 특히 5.0 µg/ml pronase 처리군에서 유의하게 높게 나타났다. 따라서 동결융해한 생쥐배아에서도 pronase 처리시 부화율과 탈각률이 대조군보다 높게 나타나 동결융해한 배아에서도 pronase가 부화와 탈각에 효과적임을 알 수 있었다.

한편, Gonzales와 Bavister¹⁴가 햄스터 포배의 탈각현상을 *in vivo*와 *in vitro*에서 비교하여 보고하였는데 *in vivo*의 경우는 투명대가 전체적으로 얇아지고 발생이 지연된 배아도 또한 전체적으로 투명대가 얇아진 것을 보여주는 반면 *in vitro*에서는 투명대가 intact하고 전체적인 lysis 모습은 보여주지 못하고 발생이 지연된 배아는 탈각을 하지 못한다고 보고하였다. 본 실험에서도 Day 6에 대조군의 부분적인 탈각률이 25%인 반면 5.0 µg/ml pronase 처리군에서는 7.3%로 대조군보다 처리군이 유의한 차로 낮아짐을 알 수 있었다. 또한 탈각된 투명대의 모양도 5.0 µg/ml pronase 처리군이 전체적으로 얇고 탈각된 부위가 넓게 절개되어 있어 체내에서 탈각이 일어난 투명대와 같이 얇아진 것을 관찰할 수 있었다. 이것은 pronase를 첨가함으로써 female reproductive tract와 유사한 환경을 배아에게 제공하는 것으로 보여진다.

이상과 같이 생쥐상실배아에 pronase를 처리하여 효과적인 부화율과 탈각률을 얻음으로써 기존에 사

용되고 있는 PZD나 zona drilling 방법과 더불어 인간보조생식술 시행시 사용되는 보조부화술로써 유용하리라 사료된다.

참 고 문 헌

1. Cohen J, Inge KL, Suzman M, Wiker SR, Wright G. Videocinematography of fresh and cryopreserved embryos: a retrospective analysis of embryonic morphology and implantation. *Fertil Steril* 1989; 51: 820-7.
2. Cohen J, Malter H, Elsner C, Kort H, Massey J, Mayer MP. Immunosuppression supports implantation of zona pellucida dissected human embryos. *Fertil Steril* 1990a; 53: 662-5.
3. Cohen J, Elsner C, Kort H. Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisted hatching using micromanipulation. *Hum Reprod* 1990b; 5: 7-13.
4. Cohen J, Feldberg D. Effects of the size and number of zona pellucida openings on hatching and trophoblast outgrowth in the mouse embryo. *Mol Reprod Dev* 1991; 30: 70-8.
5. Cohen J, Alikani M, Trowbridge J, Rosenwaks Z. Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis. *Hum Reprod* 1992; 7: 685-91.
6. Bider D, Livshits A, Yonish M, Yemini Z, Mashiach S, Jehoshua D. Assisted hatching by zona drilling of human embryos in women of advanced age. *Hum Reprod* 1997; 12: 317-20.
7. Nichols J, Gardner RL. Effect of damage to the zona pellucida on development of preimplantation embryos in the mouse. *Hum Reprod* 1989; 4: 180-7.
8. Antinori S, Panci C, Selman HA, Caffa B, Dani G, Versaci C. Zona thinning with the use of laser: a new approach to assisted hatching in humans. *Hum Reprod* 1996; 11: 590-4.
9. Khalifa EA, Tucker MJ, Hunt P. Cruciate thinning of the zona pellucida for more successful enhancement of blastocyst hatching in the mouse. *Hum Reprod* 1992; 7: 532-6.
10. Malter HE, Cohen J. Blastocyst formation and hatching *in vitro* following zona drilling of mouse

- and human embryos. *Gamete Res* 1989; 24: 67-80.
11. 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: 42-52.
 12. 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.
 13. 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: 1296-301.
 14. Gonzales DS, Bavister BD. Zona pellucida escape by hamster blastocysts in vitro is delayed and morphologically different compared with zona escape in vivo. *Biol Reprod* 1995; 52: 470-80.
 15. Lee DR, Lee JE, Yoon HS, Lee HJ, Kim MK, Roh SI. The supplementation of culture medium with protease improves the hatching rate of mouse embryos. *Hum Reprod* 1997; 12: 2493-8.
 16. Fong CY, Bongso A, Ng SC, Anandakumar C, Trounson A, Ratnam S. Ongoing normal pregnancy after of zona-free blastocysts: implications for embryo transfer in the human. *Hum Reprod* 1997; 12: 557-60.
 17. Fong CY, Bonso A, Ng SC, Kumar J, Trounson A, Ratnam S. Blastocyst transfer after enzymatic treatment of the zona pellucida: improving in-vitro fertilization and understanding implantation. *Hum Reprod* 1998; 13: 2926-32.
 18. Carroll J, Depypere H, Matthews CD. Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *J Reprod Fert* 1990; 90: 547-53.
 19. Tucker M, Cohen J, Massey J, Mayer MP, Wiker S, 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: 341-5.
 20. Check JH, Hoover L, Nazari A, O'Shaughnessy A, Summers D. The effect of assisted hatching on pregnancy rates after frozen embryo transfer. *Fertil Steril* 1996; 65: 254-7.
 21. Matson PL, Graefling J, Junk SM, Yovich J, Edirisinghe WR. Cryopreservation of oocytes and embryos: use of a mouse model to investigate effects upon zona hardness and formulate treatment strategies in an in-vitro fertilization programme. *Hum Reprod* 1997; 12: 1550-3.