

동결 해동한 포배 이식에 있어서 동결시기가 임신결과에 미치는 영향

함춘 여성 클리닉

김현정 · 김충현 · 이종엽 · 권재희 · 황도영 · 김기철*

Effect of Cryopreservation Day on Pregnancy Outcomes in Frozen-thawed Blastocyst Transfer

Hyun Jung Kim, Chung Hyon Kim, Joong Yeup Lee, Jae Hee Kwon, Doyeong Hwang, Ki Chul Kim*

Hamchoon Women's Clinic

Objectives: Likewise fresh cycle, it is also important to select right blastocysts for transfer in purpose of improving the pregnancy and implantation rates in frozen-thawed embryo transfer (ET) cycles. To investigate the relationship between the developmental velocity at the time of cryopreservation and pregnancy rates, we compared pregnancy rates between the day 5 cryopreservation group and the day 6 cryopreservation group.

Methods: Transfers of frozen-thawed blastocysts which had been cryopreserved by vitrification on day 5 or day 6 were performed between January 2006 and June 2007. Ethylene glycol, DMSO, and pull and cut straws were used for vitrification and artificial shrinkage was done in expanded blastocysts. Thawing was performed on the day before transfer and thawed blastocysts were cultured in for 15~18 hrs in Quinn's blastocyst media. Blastocyst survival was assessed before transfer and post-thaw survival was defined as >50% of cells remaining intact and blastocoele re-expansion by the time of transfer.

Results: Transfers of thawed blastocyst had been cryopreserved on day 5 were 52 cycles and 41 transfer cycles were cryopreserved on day 6. Patient characteristics, the number of transferred embryos and the survival rate of thawed blastocysts were not different in each cryopreservation day. But the biochemical pregnancy, clinical pregnancy, ongoing pregnancy, and implantation rate were significantly high in transfer of frozen-thawed blastocyst which were cryopreserved on day 5.

Conclusions: The clinical pregnancy and implantation rate of day-5 blastocyst showed significantly higher than those of day-6 blastocyst in frozen-ET cycles. This result indicated that developmental rate of blastocyst at cryopreservation time in frozen-thawed cycle is discriminative marker of pregnancy outcome as like in fresh cycle.

[Korean. J. Reprod. Med. 2010; 37(1): 57-64.]

Key Words: Frozen-thawed blastocyst, Cryopreservation day, Vitrification, Blastocyst transfer

포배 이식은 양질의 배아를 선택할 수 있는 장점 뿐 아니라 자궁내막과 배아의 발달 상태가 자연 임신과 동일하여 착상율이 높은 것으로 알려져 있으며, 수정 후 3일의 초기 배아를 이식할 때 보

다 적은 수의 배아를 이식할 수 있어 다태 임신의 위험성 또한 줄일 수 있다.¹ 최근에는 배아의 배양 조건과 동결 기술의 발달로 동결-해동한 포배의 이식이 크게 증가하였는데, 초기 발달 배아보다 동결-해동시 생존율도 높고, 임신을 또한 높은 것으로 보고되고 있다.^{2~5}

포배의 이식은 포배의 발달 정도에 따라 임신

주관책임자: 김기철, 우) 137-878 서울특별시 서초구 서초1동 1621-7, 함춘 여성 클리닉
Tel: (02) 522-0123, Fax: (02) 522-2388
e-mail: kck57@hamchoon.com

성공 여부가 결정되는데,⁶ Khorram 등은 수정 후 5일째 포배로 발달한 배아의 이식이 6일째 포배로 발달한 배아의 이식보다 높은 임신율 및 착상율을 나타내었으며 이는 발달이 빠른 배아가 착상력이 더 높을 것이라는 가능성을 제시하였다.⁷ 또한 Shapiro 등도 5일째 포배로 발달한 배아의 이식에서 6일째 포배로 발달한 배아 이식보다 두 배 가까이 높은 착상율과 임신율을 보고하였다.⁸ 하지만 아직까지 6일째 포배가 5일째 포배보다 생존력이 떨어지고, 발달 지연이 생존력의 저하를 나타내는지에 대해서는 논란이 있으며, 이러한 발달 속도의 차이를 임신 결과를 예측할 수 있는 지표로 활용할 수 있는지에 대한 연구 또한 부족한 실정이다. 또한 신선 주기에서는 수정 후 5일과 6일의 자궁내막의 상태가 동일하지 않을 수 있으므로 착상 환경의 변화 또한 고려하지 않을 수 없다. 해동-이식 주기의 경우 배란 후 이식하는 시기가 동일하므로, 5일째 포배로 발달한 배아와 6일째 포배로 발달한 배아의 해동-이식의 임상적 결과를 좀 더 정확히 비교할 수 있을 것으로 사료된다

본 연구에서는 자궁내막의 상태가 배란 후 5일로 동일한 해동-이식 주기에 있어서, 수정 후 5일에 포배로 발달한 배아를 동결하여 해동-이식한 주기와, 6일에 포배로 발달한 배아를 동결하여 해동-이식한 주기의 임신 결과를 비교하여 동결 시기가 임신 결과에 미치는 영향을 확인하고, 이러한 발달 속도의 차이를 임신 결과를 예측할 수 있는 지표로 활용할 수 있는지 확인하고자 한다

연구대상 및 방법

1. 연구대상

본 연구는 2006년 1월부터 12월까지 본원에서 시험관아기 시술을 받은 환자 중 수정 후 5일 또는 6일에 발달한 잉여의 포배를 동결하여 2007년 6월까지 해동-이식한 환자 87명, 93주기를 대상으로 하였다. 이때 5일째 포배와 6일째 포배를 한 주기에 같이 융해하여 이식한 경우는 제외하였다.

2. 과배란 유도 및 난자채취

과배란 유도 방법은 gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist (Decapeptyl; Ferring, Germany)를 사용하여 뇌하수체 기능을 억제하고 (장기요법 또는 초단기요법), recombinant FSH (Gonal F, Serono, Italy)와 human menopausal gonadotropin (Menogon, Ferring, Germany)을 병합 투여하여 난소를 과자극하였다. 초음파상으로 18 mm 이상의 난포가 최소한 3개 이상일 때, human chorionic gonadotropin (hCG; Pregnyl, Netherland) 10,000 IU를 주사하였고, 36시간 후에 질식초음파를 이용하여 난자를 채취하였다. 채취된 난자는 수정 능력을 획득할 때까지 Quinn's advantage fertilization media (SAGE, CA, USA)에서 배양하였다.

3. 정자의 분리 및 수정

80%, 40% PureCeption (SAGE, CA, USA)으로 농도 구배를 만든 층에 사정된 정자를 분주하여 450 ×g에서 20분간 원심분리하여 모은 하층액을 Quinn's sperm washing media (SAGE, CA, USA)로 250 ×g에서 10분간 세척한 다음 37°C 배양기에서 능동부유 (swim-up)를 시행하였다. 최종적으로 수득한 고향력 정자를 난자가 있는 배양액에 첨가하여 수정을 유도하거나, 난구세포를 제거한 후 직접 주입하는 난자 세포질내 정자주입술 (Intracytoplasmic sperm injection; ICSI)을 시행하였다.

4. 수정란의 배양

수정 후 14~18시간에 정상적인 수정란을 선별하여 2일까지는 Quinn's cleavage media (SAGE, CA, USA)에서 배양하였고, 3일부터 5일 또는 6일까지는 Quinn's blastocyst media (SAGE, CA, USA)에서 배양하여 포배 발달을 관찰하였다.

5. 동결 및 융해

동결과 융해는 모두 20% human serum albumin (HSA)이 첨가된 PBS 용액을 기본으로 하여 실온

(25℃)에서 시행하였다.

1) 초자화 동결

5일째 또는 6일째 관찰 시 초기 포배 (early blastocyst) 이상으로 발달한 모든 배아를 초자화 동결법으로 동결하였으며, 팽창 포배 (expanded blastocyst)의 경우에는 30^{1/2} gauge 주사바늘로 artificial shrinkage를 실시한 다음 동결하였다. 먼저 7.5% ethylene glycol과, 같은 농도의 dimethylsulfoxide 혼합액에서 20분간 전처리 후, 15% ethylene glycol, 15% dimethylsulfoxide, 0.5 M sucrose 혼합액에서 처리하고 자체 제작한 pull and cut (PNC) straw에 점적 후 바로 액체 질소에 침지하였다. 한 straw에는 3개 이하의 배아를 점적하도록 하였고, 전처리 과정 후부터 액체 질소에 침지하는 과정까지는 1분 내로 이루어지도록 하였다.

2) Pull and cut (PNC) straw 제작

0.25 ml straw 양 끝을 잡고 알코올 램프로 가열하여 가늘게 뽑은 뒤, 길이가 8~9.5 cm 되게 면도날로 가는 부위를 비스듬히 잘라서 loading straw로 사용한다. 새로운 0.25 ml straw를 길이가 3~4 cm 되게 자르고, 한 쪽 끝을 열처리하여 입구를 막아서 cap으로 사용한다.

3) 해동

Straw를 액체 질소에서 꺼내어 손으로 가볍게 쥐어서 따뜻하게 한 다음 straw cap을 벗겨서 포배를 회수하고, 1 M sucrose 용액에서 1 분간, 0.5 M sucrose 용액에서 3분간, 마지막으로 기본용액에서 5분간 2회 처리하였다. 이때 1 M sucrose 용액과 기본용액에서의 처리과정은 37℃에서 시행하였고 나머지 과정은 모두 실온에서 시행하였다. 동결 포배의 해동은 이식 하루 전에 시행하여 15~18시간 정도 Quinn's blastocyst media (SAGE, CA, USA)에서 배양한 후 이식 직전에 생존 여부를 확인하였다.

6. 자궁내막의 준비

생리 2~3일째 초음파 검사를 시행하여 자궁내막이 5 mm 미만이고 양측 난소에 별다른 이상소견이 없으면 경구용 에스트로겐 (프로기노바, 한국

쉐링) 6 mg을 투여하였다. 다음 초음파 추적을 생리 11~13일 경에 시행해서 크고 있는 난포가 없으면서 자궁내막 두께가 8 mm 이상이면 progesterone in oil (삼일제약) 1 cc를 매일 근육주사 하도록 하였다. 만일 내막두께가 기준에 도달하지 않은 경우에는 프로기노바의 용량을 8 mg으로 증량하고 일주일 뒤에 초음파 검사를 재시행하였다. 프로게스테론 투여 6일째 배아 이식을 시행하였고, 이식 후 9일째 혈액검사를 통해서 임신이 확인되면 경구용 에스트로겐과 프로게스테론 투여를 계속하였고 태아심박동을 확인한 후 임신 7주가 되면 별다른 이상이 없는 한 투여를 중지하였다.

7. 이식 및 임신 확인

용해한 포배는 50% 이상의 세포가 살아 있고 재팽창된 경우에만 생존한 것으로 판단하였다. 이식 후 9일째 혈청내 hCG 농도를 측정하여 양성 수치일 때를 생화학적 임신 (biochemical pregnancy)으로, 4~5주 후 태낭 (gestational sac) 및 심장박동 태아 (fetal heart beat)가 관찰될 때 임상적 임신 (clinical pregnancy), 임신이 24주 이상 진행되고 있는 환자를 조사하여 진행 임신 (ongoing pregnancy)으로 판정하였으며, 동일 환자가 동결일이 다른 포배를 같은 주기에 이식하는 경우가 있으므로, 위의 임신율은 용해 주기에 따른 임신율과 이식 주기에 따른 임신율 각각으로 구분하였다. 그리고 이식한 포배의 수 중 관찰된 심장박동 태아의 수를 착상율 (implantation rate)로 하였다.

8. 통계 분석

Chi-square test와 Student t-test를 이용하여 통계 분석하였고, $p < 0.05$ 인 경우를 유의하다고 판정하였다.

결 과

수정 후 5일에 포배로 발달한 배아의 동결-해동이 52례, 6일에 발달한 포배의 동결-해동이 41례였다. 이중 이식까지 진행된 것이 각각 48례와 35례

Table 1. Patient demographic characteristics of each cryopreservation group

	D5 cryopreservation	D6 cryopreservation	<i>p</i> -value
Thawing cycles	52	41	
Transfer cycles	48	35	
Maternal age (yr)	31.4±3.0	33.5±3.3	NS
% ICSI	21.2	34.1	NS
Infertility diagnosis % (n)			
Male factor	7.7% (4)	19.5% (8)	NS
Uterus	11.5% (6)	14.6% (6)	NS
Tubal	5.8% (3)	9.8% (4)	NS
Ovulatory	44.2% (23)	24.4% (10)	<0.05
Unexplained	7.7% (4)	9.8% (4)	NS
Other*	28.8% (15)	22.0% (9)	NS
Mean no. of blastocysts transferred	3.3±1.4	2.2±1.1	NS
Blastocysts expanded at the time of cryopreservation (%)	72.1	73.9	NS
Survival rate (%)	80.8±29.4	65.2±35.8	NS

NS: not significant

*Other: ovum donation, sperm donation, habitual abortion

Hyun Jung Kim. Effect of Cryopreservation Day on Pregnancy Outcomes in Frozen-thawed Blastocyst Transfer. Korean J Reprod Med 2010.

였다. 환자의 평균 연령은 31.4±3.0세, 33.5±3.3세로 유의한 차이가 없었다. 동결 배아가 유래한 신선 주기에서 ICSI를 시행하였던 비율은 각각 21.2%와 34.1%로 6일째 포배의 동결-해동 주기에서 다소 높았으나 유의한 차이는 없었다. 불임 원인 중에서는 배란 장애가 5일째 포배의 동결-해동 주기에서 더 많았다. 동결 당시 팽창 포배의 비율은 각각 72.1% (145/201)와 73.9% (82/111)로 유사하였다. 생존율은 5일째 포배 동결-해동 주기에서 80.8±29.4%로 6일째 포배 동결-해동 주기의 65.2±35.8%보다 높았으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 이식한 포배의 수는 5일째 포배기 동결-해동 주기에서 평균 3.3±1.4개로 6일째 포배 동결-해동 주기의 2.2±1.1개보다 다소 많았으나 유의한 차이는 없었다 (Table 1).

반면, 두 그룹의 해동 주기에 따른 생화학적 임

신율과 이식 주기에 따른 생화학적 임신율은 각각 38.5%와 12.2%, 41.7%와 14.3%로 5일째 포배 동결-해동 주기에서 유의하게 높게 나타났다 (Table 2, Figure 1). 임상적 임신율도 해동 주기에 따른 임신율이 각각 32.7%와 12.2%, 이식 주기에 따른 임신율이 각각 35.4%와 14.3%로 5일째 포배 동결-해동 주기에서 6일째 포배 동결-해동 주기보다 유의하게 높은 것으로 나타났다 (Table 2, Figure 2). 진행 임신율 역시 해동 주기에 따른 임신율이 각각 23.1%와 7.3%, 이식 주기에 따른 임신율이 각각 25.0%와 8.6%로 5일째 포배기 동결-해동 주기에서 유의하게 높은 것으로 나타났다. 착상율도 각각 15.2%와 6.3%로 5일째 포배 동결-해동 주기에서 높게 나타났다 (Table 2, Figure 3).

Table 2. Pregnancy outcomes of each cryopreservation group

	Thawing cycle			ET cycle		
	D5	D6	<i>p</i>	D5	D6	<i>p</i>
	cryopreser- vation (n=52)	cryopreser- vation (n=41)		cryopreser- vation (n=48)	cryopreser- vation (n=35)	
Biochemical pregnancy rate (%)	38.5	12.2	<0.01	41.7	14.3	<0.01
Clinical pregnancy rate (%)	32.7	12.2	<0.05	35.4	14.3	<0.05
Ongoing pregnancy rate (%)	23.1	7.3	<0.05	25.6	8.6	<0.05
Implantation rate (%)	ND	ND	ND	15.2	6.3	<0.05

ND: not detected

Hyun Jung Kim. Effect of Cryopreservation Day on Pregnancy Outcomes in Frozen-thawed Blastocyst Transfer. Korean J Reprod Med 2010.

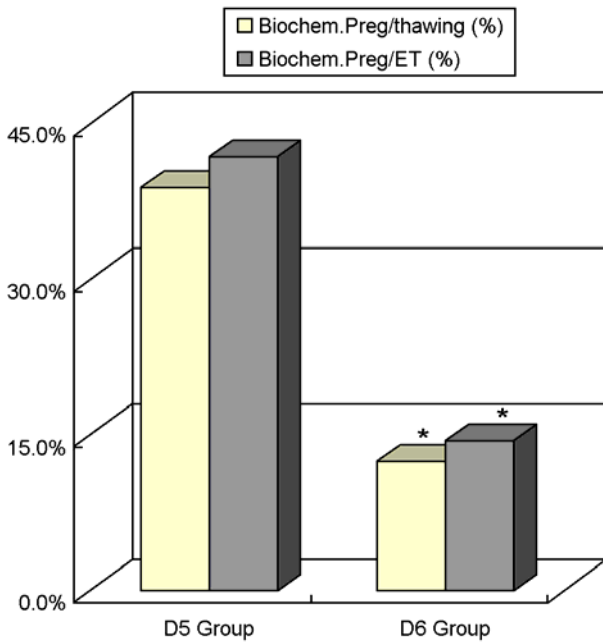


Figure 1. Biochemical pregnancy rate of each cryopreservation group. (D5 group: Transfer of thawing blastocyst cryopreserved on Day 5, D6: group: Transfer of thawing blastocyst cryopreserved on Day 6). **p*<0.01

Hyun Jung Kim. Effect of Cryopreservation Day on Pregnancy Outcomes in Frozen-thawed Blastocyst Transfer. Korean J Reprod Med 2010.

고찰

본 연구에서는 신선 주기에서와 마찬가지로⁸ 해

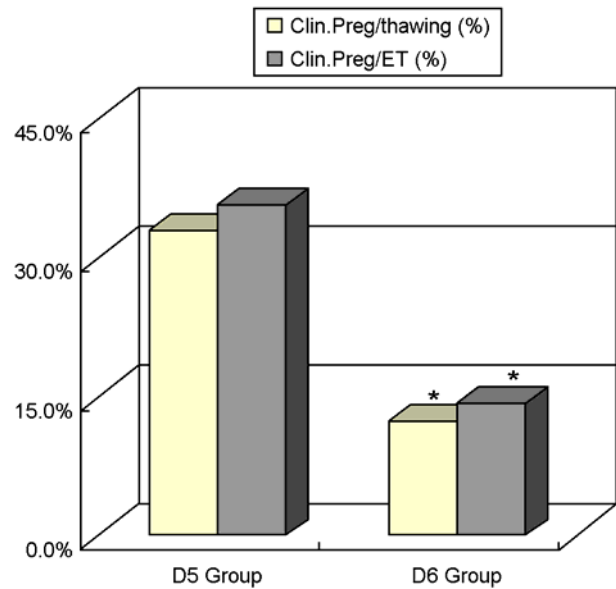


Figure 2. Clinical pregnancy rate of each cryopreservation group. **p*<0.05

Hyun Jung Kim. Effect of Cryopreservation Day on Pregnancy Outcomes in Frozen-thawed Blastocyst Transfer. Korean J Reprod Med 2010.

동-이식 주기에서도 수정 후 5일째 포배로 발달한 배아가 6일째 포배로 발달한 배아보다 임신율이 2배 이상 높았다. 해동-포배 이식 주기에서는 자궁내막의 상태가 배란 후 5일째로 모두 동일하기 때문에, 이러한 임신율의 차이는 자궁내막의 착상 환경의 변화보다는 배아의 발달 속도가 임신율에 영향을 준다고 할 수 있다. 즉 수정 후 6일째가 되

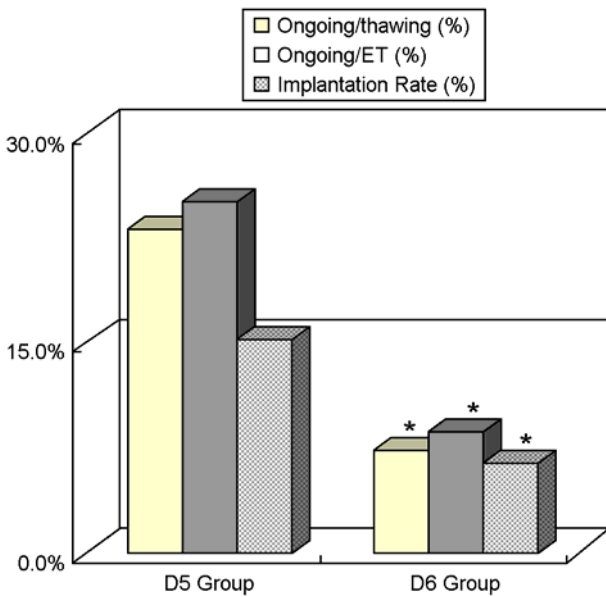


Figure 3. Ongoing pregnancy and implantation rate of each cryopreservation group. * $p < 0.05$

Hyun Jung Kim. Effect of Cryopreservation Day on Pregnancy Outcomes in Frozen-thawed Blastocyst Transfer. Korean J Reprod Med 2010.

서야 포배로 발달하는 것은 지연된 배아 발달을 하고 있으며 이것은 배아의 질이 낮음을 의미한다. 이와 같은 결과는 포배 이식 시, 하루 늦게 포배로 발달한 배아의 임신율이 정상 발달을 한 배아의 임신율의 1/2 밖에 되지 않는다는 Shapiro 등의 보고⁹와 일치한다. 또한 5일째 1개 또는 2개의 최상급 배아를 이식했을 때와 최상급 배아 없이 이식했을 때 임신율의 차이는 신선 주기에서 5일째 또는 6일째 포배기 배아를 이식했을 때의 임신율 차이와 유사하였다.^{9,10} 이는 포배의 발달 속도의 차이와 질의 차이와의 상관관계를 뒷받침하는 결과로서, 배아의 발달 속도가 임신율을 예측할 수 있는 중요한 지표임을 시사한다.

두 그룹의 환자 특성을 비교해보면 대부분 차이가 없으나, 불임의 원인 중 5일째 포배의 해동 주기에서 배란 장애가 차지하는 비율이 44.2%로 6일째 포배의 해동 주기의 24.4%보다 높았다. 그리고 6일째 동결 배아가 5일째 동결 배아보다 ICSI를 시행한 비율이 통계적으로 유의하지는 않지만 다소 높았다 (34.1% vs. 21.2%). ICSI 시술시 정자가

난자 내 재배열되는 위치와 세포막의 파열 양상이 배아의 발달률에 영향을 미칠 수 있다는 보고¹¹와 같이 ICSI 자체가 배아 발달에 영향을 줄 가능성이 있으므로, 향후 ICSI에서 유래한 5일째와 6일째 포배의 해동-이식 주기의 임신 결과를 비교 연구하는 것도 필요하리라 사료된다.

인간 포배에서 임신성공을 예측할 수 있는 지표로는 형태적인 지표들이 보편적으로 사용되지만,^{12~17} 그 외에 배양액내 포도당의 흡수량을 비침습적으로 측정하는 등 생화학적인 지표도 있다.^{18,19} Balaban 등은 인간 포배 내 일부 내세포외 퇴화의 징후가 착상을 감소를 예측한다고 보고하였고,¹² Scott 등은 발달 초기 접합자의 전핵 모양에 따라 높은 착상 능력을 가진 포배를 선별할 수 있다고 하였다.¹³ 또한 Lane 등은 생쥐 배아에서, 세포의 수 (특히 내세포외의 세포수)가 생존력의 중요한 지표가 된다고 보고하였다.¹⁴ Dokras와 Gardner 등이 각각 제시한 포배의 등급화 체계는 높은 착상 능력을 가진 포배를 선별하는 보다 구체적인 방법으로 이용되고 있다.^{15~17} Gardner의 포배의 등급화 체계에서는, 우선 포배의 크기로 1부터 6까지 등급화하고, 이를 다시 내세포외 및 영양배엽의 발달에 따라서 각각 A에서 C까지 등급화였다. Gardner의 등급화에 따르면 3AA 이상 등급은 임신성공의 좋은 지표가 되며, 3AA 이상의 포배를 하나 이상 포함해서 이식한 경우, 그렇지 않은 경우에 비해서 2배 이상의 높은 임신율을 나타내었다.^{16,17}

신선 주기와 비교하여 해동-이식 주기에서의 포배 선별에 대한 연구는 많이 부족한 실정이다. 해동 후 2~4시간 내에 포배강의 50% 이상이 재팽창되는 포배가 그렇지 않은 포배보다 임신율 및 착상율이 2배 이상 높았다는 보고와,²⁰ Desai의 단일 해동 배아 이식 보고 등에서는²¹ 해동 포배의 "빠른 재팽창"이 포배 선별의 중요한 형태적 지표가 됨을 제시하고 있다. 본 연구에서는 5일째 포배로 발달한 배아가 6일째 포배로 발달한 배아보다 동결 후 해동-이식했을 때 임신율 및 착상율이 2배 이상 높은 것을 확인함으로써, Shapiro 등이 신

선 주기에서 밝힌 바와 같이 해동-이식 주기에서도 포배의 발달 속도가 임신 성공을 예측할 수 있는 중요한 지표가 될 수 있음을 재확인하였다. 동결 시기에 더하여 향후 동결 당시 포배의 등급에 따른 임신율을 함께 조사한다면 보다 정확한 지표를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

최근에는 이식하는 배아의 수를 제한하는 등 이식 배아의 수를 최소화하는 추세이다. 따라서 잉여 배아의 동결이 많아져서 해동-이식 주기 또한 증가할 것으로 예상된다. 신선 주기 뿐만 아니라 해동-이식 주기에서도 질 좋은 배아를 선별하는 것은 임신 성공 여부를 결정하는 아주 중요한 과제이며, 본 연구와 같이 동결 시기가 6일째보다는 5일째인 포배로의 발달이 빠른 것을 우선으로 해동-이식할 때 더 좋은 임신 결과를 기대할 수 있을 것이다. 이와 함께, 포배를 구성하는 내세포괴, 영양배엽 및 그 외 다른 필요한 요소들을 종합화하여 보다 구체적인 해동-이식 주기의 포배 선별 방법을 제시하는 연구가 필요할 것이다.

결론적으로 포배의 해동-이식 주기에서 동결 시기는 임신 결과를 예측할 수 있는 중요한 지표로 활용될 수 있다. 즉 동결 당시 신선 주기에서의 배아의 발달 속도가 동결-해동 이식 성공의 중요한 열쇠가 되므로 좋은 포배를 동결할 수 있는 배양 조건 및 기술의 개발에도 끊임없는 노력이 필요할 것이라 사료된다.

참 고 문 헌

- Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril* 1998; 69: 84-8.
- Yokota Y, Sato S, Yokota M, Ishikawa Y, Makita M, Asada T, Araki Y. Successful pregnancy following blastocyst vitrification. *Hum Reprod* 2000; 15: 1802-3.
- Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, Kasai M, Takahashi K. Successful birth after transfer of vitrified human blastocyst with use of a cryo-loop containerless technique. *Fertil Steril* 2001; 76: 618-20.
- Cho HJ, Son WY, Yoon SH, Lee SW, Lim JH. An improved protocol for dilution of cryoprotectant from vitrified human blastocyst. *Hum Reprod* 2002; 17: 2419-22.
- Son WY, Yoon SH, Lee SM, Lim JH. Pregnancy outcome following transfer of human blastocysts vitrified on electron microscopy grids after induced collapse of the blastocoel. *Hum Reprod* 2003; 18: 137-9.
- Alves da Motta EL, Alergetti JR, Baracat EC, Olive D, Serafini PC. High implantation and pregnancy rates with transfer of human blastocysts developed in preimplantation stage one and blastocyst media. *Fertil Steril* 1998; 70: 659-63.
- Khorrarn O, Shapiro SS, Jones JM. Transfer of nonassisted hatched and hatching human blastocysts after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2000; 74: 163-5.
- Shapiro BS, Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST. A comparison of day 5 and day 6 blastocyst transfers. *Fertil Steril* 2001; 75: 1126-30.
- Shapiro BS, Harris DC, Richter KS. Predictive value of 72-hour blastomere cell number on blastocyst development and success of subsequent transfer based on the degree of blastocyst development. *Fertil Steril* 2000; 73: 582-6.
- Huisman GJ, Fauser BC, Eijkemans MJ, Pieters MH. Implantation rates after in vitro fertilization and transfer of a maximum of two embryos that have undergone three to five days of culture. *Fertil Steril* 2000; 73: 117-22.
- Nagy ZP, Liu J, Joris G, Bocken G, Desmet B, Vankelecom A, et al. The influence of the site of sperm deposition and mode of oolemma breakage at intracytoplasmic sperm injection on fertilization and embryo development rates. *Hum Reprod* 1995; 10: 3171-777.
- Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Alsoy S, Mercan R. Blastocyst quality affects the success of blastocyst-stage embryo transfer. *Fertil Steril* 2000; 74: 282-7.
- Scott L, Alvero R, Leondires M, Miller B. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod* 2000; 15: 2394-403.
- Lane M, Gardner D. Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *J Reprod Fertil* 1997; 109: 153-64.
- Dokras A, Sargent IL, Barlow DH. Human blastocyst grading: an indicator of developmental potential? *Hum Reprod* 1993;

8: 2119-27.

16. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril* 2000; 73: 1155-8.

17. Balaban B, Yakin K, Urman B. Randomized comparison of two different blastocyst grading systems. *Fertil Steril* 2006; 85: 559-63.

18. Renard J, Philippon A, Menezo Y. In-vitro uptake of glucose by bovine blastocysts. *J Reprod Fertil* 1980; 58: 161-4.

19. Gardner DK, Leese HJ. Assessment of embryo viability prior to transfer by the noninvasive measurement of glucose uptake. *J Exp Zool* 1987; 242: 103-5.

20. Shu Y, Watt J, Gebhardt J, Dasig J, Appling J, Behr B. The value of fast blastocoele re-expansion in the selection of a viable thawed blastocyst for transfer. *Fertil Steril* 2009; 91: 401-6.

21. Desai N, Goldfarb J. Examination of frozen cycles with replacement of a single thawed blastocyst. *Reprod Biomed Online* 2005; 11: 349-54.

= 국문초록 =

목적: 배양 환경과 동결 기술이 발달함에 따라 동결 포배의 해동-이식의 빈도가 증가하고 있으며, 신선 주기와 마찬가지로 해동-이식 주기에서도 질 좋은 배아를 선별하는 것은 임신 성공 여부를 결정하는 아주 중요한 과제이다. 본 연구는 동결 당시 포배로의 발달 속도가 임신 결과에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 수정 후 5일 및 6일째 동결한 포배의 해동-이식 후 임신율을 비교 분석하였다.

연구방법: 2006년 1월부터 12월까지 5일째 또는 6일째 동결한 포배를 해동하여 2007년 6월까지 융해 이식한 87명, 93 주기를 대상으로 하였다. 동결법은 ethylene glycol과 DMSO를 이용한 유리화 동결법을 이용하였으며, 팽창 포배는 인위적인 수축을 시행 후 동결하였다. 해동 과정은 이식 전날 시행하여 15~18시간 배양액에서 배양 후 재팽창 여부를 확인하였다.

결과: 5일째 동결한 포배를 해동-이식한 52주기와 6일째 동결한 포배를 해동-이식한 41주기에서 환자의 나이, 이식한 배아의 수, 해동 배아의 생존율 등 임신 결과에 영향을 미칠만한 요인들의 차이는 없었다. 그러나 생화학적 임신율, 임상적 임신율, 진행 임신율, 착상율 등은 5일째 동결한 포배를 해동-이식한 주기에서 높게 나타났다.

결론: 5일째 동결한 포배를 해동-이식했을 때의 임신율은 6일째 동결한 포배를 해동-이식했을 때의 임신율보다 2배 이상 높았으며, 이는 신선 주기와 마찬가지로 해동-이식 주기에서도 동결 전 배아의 발달 속도의 차이를 임신 성공 예측의 중요한 지표로 사용할 수 있음을 시사한다.

중심단어: 해동-이식, 동결일, 유리화 동결법