

## 동결보존에 의한 인간배아의 생존률과 임신에 관한 연구

제일병원 산부인과 체외수정 연구실, 한양대학교 자연과학대학 생물학과\*

이호준 · 이승재 · 노성일 · 백혜란 · 김문규\*

### Study on Pregnancy and Viability of Frozen-Thawed Human Embryos by Cryopreservation : DMSO as Cryoprotectant

Ho Joon Lee, Seung Jae Lee, Sung Il Roh, Hye Ran Paik and Moon Kyoo Kim\*

IVF Research Laboratory, Department of Obstetrics and Gynecology,  
Cheil General Hospital, Seoul 110, Korea

\*Department of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133, Korea

#### = Abstract =

This study was done to verify factors affecting viability after cryopreservation and pregnancy rate after frozen-thawed embryo transfer into uterus. Embryos were cryopreserved slow freezing and slow thawing and used DMSO as cryoprotectant. The results were to follows.

1. Viability of frozen-thawed embryos were 75.5% (94/105), which compared with viability of embryos according to cell stage, 2~5 cell was 68.4% and 6~16 cell 80.4% were significant differences ( $p < 0.05$ ).
2. No significant difference in duration of cryopreservation on effects affecting pregnancy rate was observed.
3. Number of embryo transferred into uterus was significant differences ( $p < 0.05$ ).
4. Four pregnancies resulted following replacement of 35 frozen-thawed.

#### 서 론

불임환자의 치료방법으로 체외수정술(IVF-ET)이 발달됨에 따라 임신률을 높이기 위한 방법들이 연구개발 되어왔다. 특히, 과배란 유도방법(Ovulation & Induction)들의 발달에 따라 여러가지 호르몬을 사용하여 성숙된 많은 난자를 획득하게 되었고, 또한 많은 숫자의 배아를 얻게 되었다. 따라서, 정상적 체외수정술시 자궁내에 배아를 이식 시키고 남은 배아를 보관하기 위하여 동결보존법(cryopreservation)이 연구되기 시작하였다(Trounson & Mohr 1983).

1983년 처음으로 호주의 Alan Trounson 등이 동결보존한 배아에 의해 임신에 성공한 이래로, 계속해서 여러가지 방법들을 이용하여 배아의 동결보존에 관한 연구(Trounson et al., 1986; Cohen et al., 1985; Lasselle & Testart,

1986; Mandelbaum et al., 1987)가 계속되었고, 임상적으로 유용하게 사용되고 있다.

동결보존시 생존률에 가장 영향을 주는 요인으로는 배아의 시기와 상태, 결빙억제제(cryoprotectant)의 종류 그리고, 동결보존방법(Leibo et al., 1974; Miyamoto et al., 1983; Rall et al., 1984)등을 들고 있다. 배아의 시기에 따른 생존률과 임신률은 결빙억제제의 종류에 따라 다르게 나타난다(Wilmot, 1972; Mandelbaum et al., 1987). 결빙억제제로써 DMSO를 사용하여 배아를 동결보존할 경우 대체로, 4 또는 8 세포기 시기의 배아에서 좋은 생존률(Trounson et al., 1988)을 보였으며, 1-2 Propanediol (PROH)을 사용할 경우에는 전핵시기(pronucleus stage) (Testart et al., 1987)에서 보다 좋은 생존률을 보인다고 보고하고 있고, 또한 2 또는 4세포기에서 생존률이 좋다(Mandelbaum et al., 1987)고 보고하는 것도 있다. 한편, Ma-

ndelbaum등(1988)은 배아의 시기와는 상관없이 전핵시기에서 8세포기까지 생존률이 60%를 유지한다고 보고하고 있어, 배아의 시기에 따른 생존률은 결빙억제제의 종류와 동결, 해빙속도등 여러가지 요인들에 의해 영향을 받으므로 앞으로 계속 연구되어야 할 것이라 사료된다.

DMSO를 이용한 방법은 호주의 Alan Trounson이 개발하여 널리 사용하게 되었으나 단계가 번거로우며 시간이 오래걸리는 단점을 갖고 있어, 이를 보다 간단하고, 편리하게 하기위한 방법들이 연구되어졌다. 프랑스의 Lasselle등(1985)에 의해 결빙억제제를 PROH로 사용하여 보다 간편하고 짧은 시간에 할 수 있는 새로운 방법이 보고되었는데, 지금은 이 방법이 널리 이용되고 있다. 그리고, 최근에는 새로운 방법으로 초급속동결법(Ultra-rapid Freezing)이 연구개발되어 보고(Trounson et al., 1987; Trounson et al., 1988; Wilson & Quinn, 1989)되었다. 이 방법은 임상에 아직 널리 이용되고 있지는 않지만, 방법이 간단하고, 비용이 적게 들며, 기계를 사용하지 않아도 되는 장점이 있어 앞으로 널리 보급될 것이라 사료된다. 그러나, 기존의 방법들에 비해 생존률과 임신률이 현저히 낮기 때문에 이러한 문제점을 보완하기 위하여 많은 연구가 필요로 하고있다.

본 연구는 결빙억제제로 DMSO를 사용하여 완만동결과 완만해빙방법에 의하여 배아를 동결보존하였으며, 해빙 후 생존률과 임신률에 영향을 미치는 요인을 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

본 연구는 1988년 1월부터 1989년 7월까지 본원에서 체외수정시술을 받은 509명의 환자 중에서 배아를 동결보존한 67례의 환자를 대상으로 하였으며, 40례를 해빙하여 비교 분석하였다.

### 1. 난자의 획득 및 배아의 배양

난자를 획득하기 위해 사용되는 과배란유도 방법은 Clomiphene Citrate(CC)와 Human Menopausal Gonadotropin(HMG, Pergonal, Serono) 그리고 hCG(Profasi, Seronon)(Lopata, 1983; Wood et al., 1985; Trounson, 1986)를 혼용한 방법과 FSH(Metrodin, Serono)와 HMG 그리고 hCG(Garcia et al., 1983; Johnes et al., 1984; Bernadus et al., 1985)를 혼용한 방법을

이용하였으며, 난자의 획득 방법은 복강경과 질식초음파(vagina ultra-sonography, Ausonics)를 이용하였다. 난자를 배양하기 위한 배양액으로서는 Ham's F10(Flow Labo.)을 사용하였으며, 56°C에서 미리 30분간 비동화 시킨 환자의 혈청을 10% 넣은 배양액을 사용하였다. 획득된 난자는 성숙도에 따라 구분(Veeck et al., 1983)하여 배양접시(well dish, Falcon)에 옮겨졌으며, 배양기(incubator, Queue 2700)에 넣어 배양시켰다. 배양조건은 공기중 5% CO<sub>2</sub>와 충분한 습도 그리고 37°C로 유지하였다 수정 시간(insemination time)은 성숙도에 따라 3~18시간 사이에 결정하였다. 수정(fertilization)의 확인은 수정(insemination)후 약 16~20시간이 지난 다음 전핵(pronucleus)이 형성된 것을 확인함으로써 알 수 있었다. 수정된 난자는 10% 환자의 혈청을 혼합한 성숙 배양액으로 옮겨 계속 배양하였다. 자궁내 이식은 수정(insemination)후 48시간이 지난다음 4세포기에서 시행하였고, 배아의 숫자는 최고 4개까지 이식하였으며, 그외 남은 배아는 20~24시간 더 배양하여 8세포기에서 동결 보존하였다.

### 2. 동결과 해빙

위와 같이 획득한 배아들은 10% fetal calf serum(FCS, Flow Lab.)을 포함한 Phosphate Buffered Saline(PBS)에 결빙억제제로 dimethyl sulfoxide(DMSO, Merck)를 녹여 일련의 농도별(0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5M DMSO in

**Table 1.** Procedure of freezing of human embryos

Process	Time or Cooling rate
Addition of cryoprotectant	
PBS + 10% FCS	10 min
0.25M DMSO	10 min
0.5 M DMSO	10 min
1.0 M DMSO	10 min
1.5 M DMSO	5 min
Packaging in glass ampoule (1~3embryos/ampoule)	
Coling to -6°C	2°C/min
Seeding at -6°C	20 min
Cooling to -6°C	0.3°C/min
Plunging in liquid nitrogen (-196°C)	

PBS) 냉동액을 만들어 처리하고, 동결 혹은 해빙하였다. 동결과 해빙은 세포 냉동기 (cell freezer, Planar Products LTD, R 204)를 사용하여 행하였다.

동결방법은 표 1에 요약한 것처럼 배아들을 10% FCS를 포함한 PBS에 10분간 정치한 후 4단계의 농도별 DMSO용액 (0.25, 0.5, 1.0, 1.5M DMSO in PBS)을 시간별로 처리하고, 1.5M DMSO용액 0.2ml을 넣은 유리관병 (2ml ampoule, Wheaton Scientific)에 1~3개의 배아를 넣고 강한 불꽃으로 입구를 봉하였다. 냉각과정은 상온에서부터 -6°C까지는 비교적 빠른 속도 (2°C/min)로 냉각하고 -6°C가 되면 미리 액화질소통에 넣어 냉각 시킨 핀셀으로 유리관병 내의 냉동액 표면 수준에 접촉하므로써 식빙 (seeding)을 시행하고 20분간 정치하였다. -6°C에서부터 -80°C까지는 완만하게 (-0.3°C/min) 냉각시킨 후 액화 질소통 (-196°C, MVE, 43L)에 직접 넣었다. 이렇게 동결한 배아들은 액화 질소통 속에서 1개월에서 1년까지 저장하였다 (Wood & Farrant, 1980; Trounson & Mohr, 1983; et al., 1987).

해빙방법은 표 2에 요약한 것처럼 완만해빙을 적용하였다. 완만해빙은 액화질소통으로부터 유리관병을 꺼내어 미리 -80°C로 맞추어 둔 세포냉동기에 넣고 +8°C/min의 속도로 +4°C까지 해빙한 후 유리관병을 다시 꺼내어 상온에 2분간 정치하였다.

결빙억제제를 제거하기 위하여 해빙된 배아

**Table 2.** Procedure of thawing for human embryo

Process	Time or Warming rate
Slow thawing	
Warming rate from -80°C to +40°C	+8°C/min
Standing at room temp.	2min
Removal of cryoprotectant	
1.5 M DMSO	10 min
1.25M DMSO	10 min
1.0 M DMSO	10 min
0.75M DMSO	10 min
0.5 M DMSO	10 min
0.25M DMSO	10 min
PBS+10%FCS (two times washing)	3 min

들은 6단계의 농도별 DMSO용액 (1.5, 1.25, 1.0, 0.75, 0.5, 0.25M in PBS)을 시간별로 처리한 후 10% FCS를 포함한 PBS로 세척하여 10% 환자의 혈청을 포함한 Ham's F10에 옮겼다. 해빙된 배아의 생존여부는 도립현미경 (inverted microscope, Nikon, TMD)아래에서 검경하여 50% 이상 상해를 입지않은 것을 정상배아로 판정 (Mandelbaum et al., 1987)하여 이식을 위하여 배양하였다.

### 3. 자궁내 이식

배아의 자궁내 이식은 해빙된 배아들을 6~12시간 배양하여 자궁과 일치하는 시기에 맞추어 50%의환자의 혈청을 넣은 Ham's F10으로 자궁내 이식하였다. 일반적으로 자연주기 (spontaneous cycles)를 이용하였으며, 무배란 환자에게는 호르몬에 의해 유도하여 주기 (stimulated cycles)를 맞추었고, 수정란 대여 환자에서는 인공주기 (artificial cycles)를 이용하여 시행하였다 (Trounson et al., 1987).

난포 성장은 환자들의 생리주기를 기준으로 하여 검사하였는데 일반적으로 생리 9일부터 초음파를 이용하여 난포의 크기를 조사하였으며, 혈중 에스트로젠과 황체화 호르몬 (LH)을 측정하여 추적하였다. 배란시기는 혈중 황체화 호르몬의 surge (Testart et al., 1981) 또는 난포의 크기 (10mm < 와) 혈중 에스트로젠 (170pg/ml) 수준을 기준으로 하여 hCG (5000iu)를 주사하여, 36시간이 지나면 배란이 일어난다고 예측하였고, 배아의 이식은 배란 후 3일째되는 날 시행하였다. 임신여부는 배아이식후 14일째 혈중 hCG를 측정하여 10mIU/ml이상이면 임신으로 규정하였다. 통계적 유의성 검정은 Chi-square test에 의해서 분석하였고, p < 0.05일때 유의하다고 판정하였다.

### 결 론

정상적 체외수정시술시 동결보존을 시행한 환자와 시행하지 않은 환자간의 획득되는 난자와 배아의 숫자는 각각,  $9.7 \pm 3.5$ ,  $5.8 \pm 3.8$ 과  $6.2 \pm 1.7$ ,  $2.7 \pm 1.9$ 로 나타나 난자의 획득숫자와 수정률에서 현저한 차이를 보였다 (p < 0.001). 이식된 배아의 숫자는  $3 \pm 0.5$ 와  $2.4 \pm 1.7$ 로서 유의한 차이는 없었다. 동결보존한 배아의 숫자는  $2.8 \pm 1.1$ 이었으며, 해빙 후 이식한 배아의 숫자는  $1.8 \pm 1.0$ 이었다 (표 3). 동결 보존한 105개의 배아

**Table 3.** Comparison of normal IVF-ET patients and cryopreserved patients according to obtained oocytes, fertilized oocytes, number of transferred embryos

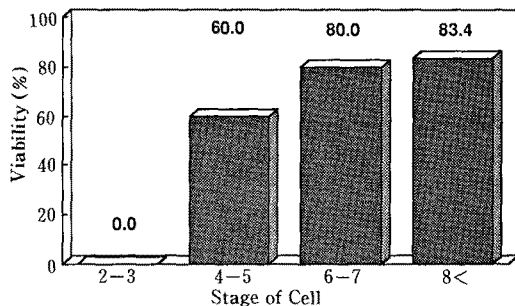
Content	Freezing (n=40)	Normal IVF (n=70)
Oocytes of Retrieval	9.7±3.5*	5.8±3.8*
Fertilized Oocytes	6.2±1.7*	2.7±1.9*
Embryo Transfer	3±0.6	2.4±1.7
Cryopreserved Embryos	2.8±1.1	-
Transferred embryos	1.8±1.0	-

\*p<0.001

**Table 4.** Viability of human embryos after freezing and thawing

Stage of Cell	No. of embryos	Viability (%)
Embryos	94	71(75.5)
2 to 5-Cell	38	26(68.4)*
6 to 16-Cell	56	45(80.4)*

Recovery rate : 94/105(89.5%) \*p<0.05



**Fig. 1.** Viability of frozen-thawed human embryos according to cell stage.

중 94개를 회수하였으며, 이중 71개가 생존하여 75.5%의 생존률을 나타내었다. 이를 세포별로 생존률을 비교해 보면, 2~5세포기에서 68.4%였으며, 6~16세포기에서는 80.4%를 보여 유의한 차이를 보였다(p<0.05)(표 4)(그림 1).

동결보존기간이 임신률에 미치는 영향을 보면 1개월에서 0명(n=2), 2개월에서 2명(n=16), 3개월에서 0명(n=10), 4개월이상에서 2명(n=12) 임신되어 보존기간별 임신률에 차이가 없었다(표 5).

이식된 배아의 숫자가 임신률에 미치는 영향을 보면, 1개월 경우 0명(n=12), 2개월 경우 2명(n=17), 3개월 경우 2명(n=9), 4개월 경

**Table 5.** Effect of duration of storage on Pregnancy rate

Month(s)	No. of Cases	Pregnancy (%)
1	2	0(0.0)
2	16	2(12.5)
3	10	0(0.0)
4<	12	2(16.7)
Total	40	4(10.0)

**Table 6.** Effect of number of transferred embryos on pregnancy rate

No. of Embryos	No. of Cases	Pregnancy (%)
1	10	0(0)
2	15	2(13.3)*
3	9	2(22.2)*
4	1	0(0)
Total	35	4(11.4)

\*p<0.05

**Table 7.** Effect of state of maternal environment on pregnancy rate

Cycles	Transfers	Pregnancy
Spontaneous	33	3
Stimulated	3	0
Artificial	4	1
Total	40	4

우 0명(n=1)으로 나타나서, 배아의 숫자가 2와 3개월 경우 임신률에서 유의한 차이를 보였다(p<0.05)(표 6).

자궁의 환경이 임신률에 미치는 영향을 보면, 자연주기(n=33)에서 3명, 유도된 주기(n=3)에서 0명 그리고 인공주기(n=4)에서 1명 임신되어 유의한 차이는 없었다(표 7).

이상과 같은 결과에서 동결보존한 67명의 환자에서 40례를 해빙하여 이중 상해를 입지 않은 35례의 환자에서 자궁내 이식하여 4명의 환자에게서 임신에 성공하였다.

## 고 찰

체외수정기술에 의한 임신률은 보통 10~20%로 보고 되고있다. 이러한 임신률을 향상시키기 위해서는 과배란 유도방법의 발달, 배양 방법, 배아이식의 방법등 기존의 여러가지 분

제들이 보다 발전되어야 한다.

최근에 들어 과배란 방법의 발달에 따라 많은 난자를 획득하게 되었고 과다한 배아를 얻게 되어 동결 보존법의 발달은 보다 필요한 방법으로 대두 되고있다.

동결보존에 의한 배아의 생존률은 50~80% 까지 보고하고 있으며, 임신률은 10~20% 까지 보고하고 있으나 보고자에 따라 다르게 보고 되고있다(Lassalle et al., 1985; Mandelbaum et al., 1987; Lornage et al., 1990).

동결 배아이식에 의해서 임신성공에 영향을 주는 요인으로는 결빙억제제와 배아의 시기등이 중요한 요인으로 보고되고 있는데, Lassalle 등(1986)은 PROH를 이용하여 전핵시기에서 동결보존하여 80%의 생존률과 20%이상의 높은 임신률을 보고하였으며, Freeman 등(1985)은 DMSO를 이용하여 8세포기에서 70%이상의 생존률과 15%이상의 임신률을 보고 하였으며, Mandelbaum 등(1987)은 PROH를 이용하여 2~3일 된 배아들은 유의한 차이가 없이 56% 이상의 생존률과 20%의 임신률을 나타낸다고 보고 하였다. 또한, 해빙된 배아의 생존률에 영향을 주는 요인으로는 동결 시킬 때의 배아의 상태를 들고있다. 즉, 배아의 상태가 세포질 절편(fragmentation)을 포함한 배아는 해빙후 생존률이 떨어지며(Freeman et al., 1986), 불규칙적인 할구를 가진 배아들은 규칙적인 배아들에 비해 배아의 생존률이 낮게 나타났으며(Cohen et al., 1985), 3, 5, 7세포기의 배아 역기 4, 8세포기보다 생존률이 현저히 낮게 나타난다(Lassalle et al., 1985)고 보고하고 있다. 본 연구에서는 2~4세포기 배아보다 8세포기 이상의 배아에서 보다 높은 생존률을 보여 DMSO를 이용한 완만냉동, 완만해빙에 의한 동결 보존법은 초기 배아보다 분할이 잘된 후기 배아에서 보다 더 효과적임을 알 수 있었다(표 5)(그림 1).

정상적 체외수정기술에 있어 임신률에 영향을 주는 또하나의 요인으로서, 이식되는 배아의 숫자를 들고있는데(Johnes et al., 1984; Wood et al., 1985) 동결보존에 의한 경우에도 같은 결과를 보고하고 있다(Mandelbaum et al., 1987; Lornage et al., 1990). Mandelbaum 등(1987)에 의하면 해빙된 배아에 의한 평균 임신률이 20%라고 보고하고 있는데 3개이상 이식하였을때는 30%까지 임신률을 향상 시킨다고 보고하였다. 본 연구에서도 자궁내 이식된

배아의 숫자에 따라 임신률에 유의한 차이가 나는 것을 알수있었다(표 5).

Trounson(1986), Mandelbaum 등(1987)은 해빙후 배아가 상해(damage)를 입은 정도에 따라 임신률이 차이가 있다고 보고하고 있는데, 일반적으로 50%이상이 정상인 배아에서 높은 임신률을 나타낸다(Cohen et al., 1988)고 보고하고 있으며, Veiga(1987) 등, Lornage(1990) 등은 50%이상 상해를 입은 배아의 이식에 의해서 임신 성공률을 보고하고 있다. Kim 등(1987)의 보고에 의하면 상해를 입은 배아의 경우에도 정상발생 할 수 있다고 보고하고 있어 상해를 입은 배아도 임신은 가능하지만 임신률은 떨어지리라고 사료된다.

이식시 자궁의 환경, 즉 자궁 내막의 상태는 착상에 있어서 가장 중요한 요인이라 할 수 있다. 본 연구에서는 자연주기(n=33)에 의해 3례, 인공주기(n=4)에 의해 1례의 임신을 하여 유의한 차이를 볼 수 없었으며, Mandelbaum 등(1987), Lornage 등(1990)은 자연주기와 호르몬에 의해 유도된 주기에서 자궁의 환경은 유의한 차이가 없다고 보고하고 있어 자궁의 환경이 임신률에 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

이상의 결과로 볼 때 동결보존법에 의한 배아의 이식은 불임환자의 체외수정기술에 있어 임신률을 향상시키는 중요한 방법이라 사료된다. 따라서, 해빙 후 배아의 생존률을 향상시키고 또한 임신률에 영향을 미치는 요인을 찾아내어, 앞으로 체외수정기술에 유용하게 사용할 수 있는 동결보존법들을 개발하기 위하여 계속 연구되어야 할 것이다.

## 결 론

본 연구는 체외수정기술시 자궁내 이식 후 남은 배아를 동결보존하여, 해빙 후 생존률과 임신률에 미치는 요인을 알아보고자 행하였다. 결빙억제제로서는 DMSO를 이용하였으며, 완만동결과 완만해빙을 사용하였다. 본 병원에서 동결보존을 실시한 40례의 환자를 해빙하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 동결 보존한 105개의 배아중 94개를 회수하였으며, 이중 71개가 생존하여 75.5%의 생존률을 보였다. 세포별 생존률을 비교해 보면, 2~5세포기에서 68.4%였으며, 6~16세포기에는 80.4%를 보여 유의한 차이를 보였다( $p < 0.05$ ).

2. 동결 보존기간이 임신률에 미치는 영향은 유의한 차이가 없었다.

3. 이식된 배아의 숫자는 1개 일 경우 0%, 2개일 경우 13.3%, 3개 일 경우 22.2%로 나타나 유의한 차이를 보였다 ( $p < 0.05$ ).

4. 동결 보존한 40례 중 5례는 배아가 상해를 입어 이식하지 못하였으며, 나머지 35례는 자궁내 이식하여 그 중 4(11.4%)례에서 임신에 성공하였다.

이상의 결과로 동결, 해빙한 배아의 자궁내 이식에 의한 임신률에 영향을 미치는 요인으로 동결시 배아의 상태, 배아의 시기 그리고 이식시키는 배아의 숫자들을 들 수 있다.

## 인 용 문 헌

- Bernadus RE, Jones GS, Acosta AA, Garci JE, Lin HC, Jones DI, Resenvaks Z: The significance of the ratio of follicle stimulation hormone and luteinizing hormone in induction of multiple follicular growth. *Fertil Steril* 1985, 43, 373.
- Cohen J, Somons FR, Edwards RG, Fehilly CB, Fishel SB: Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocysts. *J in Vitro Fertil Embryo Transfer* 1985, 2, 59.
- Cohen J, Vane GW, Elsner CW, Fehilly CB, Kort HI, Massey JB, Turner TG, Jr: Cryopreservation of zygotes and early cleaved human embryos. *Fertil Steril* 1988, 49, 283.
- Freemann L, Trounson A, Kirby C: Cryopreservation of human embryos: Progress on the clinical use of the technique in human IVF *J in Vitro Ferti Embryo Transfer* 1985, 3, 53.
- Garcia JE, Jones GS, Acosta AA, Wright G, Jr: Human menopausal gonadotropin/human chorionic gonadotropin follicular maturation for oocyte aspiration: Phase II 1981, *Fertil Steril* 1983, 39, 174.
- Jnes HW, Jr, Acosta AA, Andrews MC, Garcia JE, Jones GS, Mayer J, McDowell JS, Rosenwaks A, Sandow BA, Veeck LL, Willes CA: Three years of in vitro fertilization at Norfolk. *Fertil Steril* 1984, 42, 826.
- Kim MK, Lee HJ, Lee SJ, Jun JY: Effects of warming rate degenerated blastomere(s) on development of frozen and thawed mouse embryos. *Kor J Fertil Steril* 1987, 14, 51.
- Lassale B, Testart J: 1-2 Propanediol: An efficient cryoprotectant for early human embryo freezing and thawing In Menezo Y and Merieux C(eds) Workshop on Embryo and Oocyte Freezing. *Annecy France* 1986, 79, 93.
- Lassale B, Testart J, Renard JP: Human embryo features that influence the success of cryopreservation with use of 1-2 propanediol. *Fertil Steril* 1985, 44, 645.
- Leibo SP, Mazur P, Jackowski CL: Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Exp Cell Res* 1974, 89, 79.
- Lopata A: Concepts in human in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1983, 40, 289.
- Lornage J, Bouliou D, Mathieu C, Guerin JF, Pinatel MC, James R, Alvarado C: Transfers of frozen-thawed human embryos in cycles stimulated by HMG. *Hum Reprod* 1990, 5, 60.
- Mandelbaum J, Junca AM, Plachot M, Alnot MO, Alvarez S, Debache C, Salat-Baroux J, Cohen J: Human embryo cryopreservation extrinsic and intrinsic parameters of success. *Hum Reprod* 1987, 2, 709.
- Mandelbaum J, Junca AM, Plachot M, Alnot MO, Salat-Baroux J, Alvarez S, Tibi C, Cohen J, Debache C, Tesquier L: Cryopreservation of human embryos and oocytes. *Hum Reprod* 1988, 3, 117.
- Miyamoto H, Ishibashi T: Survival of mouse embryos frozen-thawed slowly or rapidly in the presence of various cryoprotectants. *J Exp Zool* 1983, 226, 123.
- Rall WF, Reid DS, Polge C: Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physicochemical methods. *Cryobiology* 1984, 21, 106.
- Testart J, Fryman R, Feinstein MC, Thebault A, Roger M, Scholler R: Interpretation of plasma LH assay for the collection of mature oocytes from women: Definition of an LH surge initiating rise (LH SIR). *Fertil Steril* 1981, 36, 50.
- Testart J, Lassalle B, Belaisch-Allart J, Hazout A, Forman R, Rainhorn JD, Fryman R: High pregnancy rate after early human embryo

- freezing. *Fertil Steril* 1986, 46, 268.
- Testart J, Lassalle B, Forman R, Gazengel A, Belaisch-Allart J, Hazout A, Rainhorn JD, Frydman R: Factors influencing the success rate of human embryo freezing in an in vitro fertilization and embryo transfer program. *Fertil Steril* 1987, 48, 107.
- Trounson AO, Mohr L: Human pregnancy following cryopreservation thawing transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983, 305, 707.
- Trounson A: Preservation of human eggs and embryos. *Fertil Steril* 1985, 46, 1.
- Trounson A, Peura A Kirby C: Ultrarapid freezing: A new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertil Steril* 1987, 48, 843.
- Trounson A, Peura A, Freemann L, Kirby C: Ultrarapid freezing of early cleavage stage human embryos and eight-cell mouse embryos. *Fertil Steril* 1988, 49, 822.
- Veeck LL, Wortham JWE, Jr, Witmyer J, Sandow BA, Acosta AA, Garcia JE, Jones GS, Jones HW, Jr: Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1983, 39, 594.
- Veiga A, Calderon G, Barri PN, Coroleu B: Pregnancy after the replacement of a frozen-thawed with <50% intact blastomeres. *Hum Reprod* 1987, 2, 321.
- Wilmut I: The effect of cooling rate warming rate cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life Science* 1972, 11, 1071.
- Wilson L, Quinn P: Development of mouse embryos cryopreserved by an ultra-rapid method of freezing. *Hum Reprod* 1989, 4, 86.
- Wood MJ, Farrat J: Brief communication preservation of mouse embryos by low-step freezing. *Cryobiology* 1980, 17, 178.
- Wood C, McMaster R, Rennie G, Trounson AO, Leeton JF: Factors influencing pregnancy rate following in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1985, 43, 245.
-