

## 보조부화술 (Assisted Hatching)

삼성제일병원 생식생물 및 불임연구실

김 정 욱

포유동물에서 정자와 난자가 결합하여 수정란을 형성한 후 계속되는 세포분열을 통해 포배기에 이르게 되면 포배기 배아는 주위를 둘러싸고 있는 투명대를 뚫고 나와 자궁내막에 착상을 하게 된다. 이렇게 투명대를 뚫고 나오는 과정을 부화 (hatching)라고 하며 이는 배아의 착상과정에서 선행되어야 하는 필수적인 과정이다. 투명대는 난자를 둘러싸고 있는 ECM (extracellular matrix)으로 수정과정에서 중 특이적인 sperm barrier의 역할을 하며 일단 수정이 일어나면 다른 정자의 침입을 막는 역할을 한다 (Wassarman, 1992). 뿐만 아니라 leukocyte의 침입으로부터 난자를 보호하고 (Modlinski, 1970) 박테리아나 기타 fungus에 의한 감염을 막아주는 역할도 한다 (Singh, 1987).

포배기 배아의 부화과정은 두 가지 요인에 의해 결정되는데 첫 번째는 배아 혹은 여성의 생식수관 내에서 분비되는 특정 효소 (lysin)에 의해 lysis가 일어나야 하며 (McLaren, 1970), 두 번째는 포배의 팽창에 따른 투명대에 대한 압력의 증가이다 (Cole, 1967). Perona와 Wassarman (1986)은 부화가 일어나기 전에 포배기 배아의 trophoctoderm에서 trypsin-like proteinase (strypsin)가 분비된다고 보고하였으며, protease의 분비도 보고되었다 (Austin and Short, 1990). 또한 생쥐 배아의 부화가 일어난 배양액에서 이러한 효소가 발견된다는 것도 밝혀졌다 (Sawada *et al.*, 1990). 그리고 protease inhibitor를 배양액 내에 첨가할 경우, 배아의 부화가 억제된다는 보고도 있으며 (Dabich, 1981; Yamazaki *et al.*, 1985) Gordon과 Dapunt (1993)는 위의 두 가지 요인 중에 포배기 배아의 부화과정에서 투명대의 lysis가 압력증가보다 더 중요한 요인으로 작용한다고 주장하였다. 포유류의 배아를 체외에서 배양할 경우, 배아의 부화율이 체내의 경우보다 감소하는 것으로 알려져 있으며 이것은 체외배양시 투명대의 경화 (Cohen, 1991; Zhang *et al.* 1991)가 일어나거나 혹은 투명대를 녹이는 lysin의 농도가 낮기 때문인 것으로 알려져 있다 (Gordon and Dapunt, 1993; Schiewe *et al.*, 1995).

투명대의 경화현상은 수정 후에 3가지 중요한 역할을 수행하는데 1) 다정자 침입을 막는 역할 (Austin, 1961)과 2) 발생중인 배아를 보호하고 (Gwatkin, 1977) 3) 난관을 통해 자궁까지 배아의 이동을 도와주는 역할 (Betteridge *et al.*, 1976)을 한다. 이러한 투명대의 경화현상은 수정 직후 일어나며 체외에서 배양을 할 때에도 역시 이러한 현상이 일어나고 체내에서 오랜 시간이 경과하여도 경화현상이 일어나는 것으로 알려져 있다 (De Fellici and Siracusa, 1982; Downs *et al.*, 1986; Longo, 1981). 그러므로 시험관아기 시술의 경우, 체외에서 2~5일간 배양을 하게 되므로 이러한 체외의 환경이 배아가 정상적으로 부화되는데 나쁘게 작용할 수 있어 시험관아기 시술의 성공률을 감소시키는 요인으로 설명되기도 한다 (Drobnis *et al.*, 1988). 특히 예후가 좋지 않은 환자 즉, 높은 연령의 환자의 경우, 호르몬 분비양상의 변화로 인해 투명대의 두께가 증가하거나 lysin의 분비가 감소하여 부화가 억제될 수 있다. 또한 여러 주기에 걸쳐 양

질의 배아를 이식하여도 임신이 되지 않은 원인불명의 불임 환자의 경우 투명대가 더 두껍다는 보고도 있어 (De Mola *et al.*, 1997), 시험관아기 시술의 성공률을 감소시키는 요인으로 작용할 수 있다. 이러한 것을 해결하기 위한 노력의 하나로 1990년대 초부터 시험관아기 시술의 성공률을 높이기 위해 투명대를 인위적으로 절개하거나 혹은 녹여주어 배아의 부화를 도와 결과적으로 착상률을 증가시키려는 보조부화술 (assisted hatching, AH)이 개발되었다 (Cohen, 1990; 1992). 특히 시험관아기 시술 시 예후가 좋지 않은 환자의 경우 보조부화술을 이용하여 높은 임신율과 착상율을 보고한 예가 있다 (Magli *et al.*, 1998). 그러나 이러한 보조부화술이 특정 환자들에게 정말 효과적으로 작용하여 임신율을 증가시키는지에 대한 논란은 현재까지 계속되고 있는 실정이다 (Schoolcraft *et al.*, 1994; Antinori *et al.*, 1996a,b; Tucker *et al.*, 1996; Bider *et al.*, 1997; Lanzendorf *et al.*, 1998).

## 1. 보조부화술의 역사

보조부화술이란 용어는 1990년 Cohen에 의해 처음 만들어 졌으며 최초의 보조부화술 방법은 투명대 일부를 가는 유리판을 이용하여 절개해 주는 partial zona dissection (PZD)이었다. 그 후 pH 2.3~2.5 정도의 산성용액 (acid Tyrode's solution)을 이용하여 투명대의 일부분을 녹여주는 zona drilling 방법이 개발되었으며 (Cohen *et al.*, 1992) 부화과정 시에 체내에서 작용하는 효소와 비슷한 pronase나 protease를 배양액에 첨가하여 투명대의 두께를 전체적으로 감소시키는 방법도 개발되었다 (Lee *et al.*, 1997). 그러나 이러한 방법들은 고도로 숙련된 미세조작술을 필요로 하고 있으며 특히 zona drilling 방법의 경우, 할구세포에 damage를 줄 수 있어 보다 세심한 작업자의 기술을 필요로 한다. 이러한 문제점을 개선하기 위해 개발된 것이 laser를 이용한 보조부화술이다 (Strohmer and Feichtinger, 1992). 현재 zona drilling 방법과 laser를 이용한 보조부화술이 세계적으로 가장 많이 이용되고 있다.

## 2. 보조부화술의 종류와 방법

### 1) Mechanical assisted hatching (PZD) (Table 1)

이미 1980년대 후반 동물실험에서 수정을 유도할 목적으로 개발된 partial zona dissection은 미세조작기 (micromanipulator)를 이용하여 투명대의 일부분을 기계적으로 절개해 주는 방법으로 보조부화술 중 가장 먼저 개발되어 인간에게 적용된 방법이다 (Cohen *et al.*, 1990). 이 기술은 남성불임 환자에서 운동성이 떨어지거나 숫자가 부족한 경우, 수정을 유도하기 위해 많이 이용되었던 방법으로 투명대의 일부분을 pipette을 이용하여 절개하여 포배기의 배아가 부화하는데 도움을 줄 수 있는 방법이다. 가장 간단한 방법으로, 미세조작기만 있으면 시행이 가능하고 다른 chemical들은 사용하지 않기 때문에 안전하다. 최근에는 3-D PZD를 개발하여 좋은 성적을 보고한 논문도 있다 (Ceislak *et al.*, 1999). 그리고 ICSI에도 이용되고 있는 piezo-micromanipulator를 이용한 보조부화술도 개발되어 임상에 이용되고 있으며 기존의 미세조작기 보다 정밀하게 조작할 수 있는 장점이 있다 (Nakayama *et al.*, 1998; 1999).

**Table 1.** Results of Mechanical Assisted Hatching (PZD)

| Author                    | Publication                    | Method                                 | Indication   | Main Outcome Measures   | Results  | P value      |
|---------------------------|--------------------------------|--|--|-------------------------|--|--------------|
| Cohen <i>et al.</i>       | Fertil Steril, 1990            | Conventional PZD                       | Unselected patients                                | Clinical pregnancy rate | Control : 26%<br>AH : 44%  | 0.112        |
| Dokras <i>et al.</i>      | Fertil Steril, 1994            | Conventional PZD                       | Unselected patients                                | Hatching rate (day 5)   | Control : 22%<br>AH : 50%  | 0.02         |
| Stein <i>et al.</i>       | Fertil Steril, 1995            | Conventional PZD                       | Repeated implantation failure, Old age             | Clinical pregnancy rate | 1. Age ≤ 38<br>Control : 23.0%<br>AH : 15.4%<br>2. Age > 38<br>Control : 7.0%<br>AH : 23.9%                      | NS<br>< 0.05 |
| Helebaut <i>et al.</i>    | J Assist Reprod Genetics, 1996 | Conventional PZD                       | Unselected patients                                | Clinical pregnancy rate | Control : 38.1%<br>AH : 42.1%  | NS           |
| Chao <i>et al.</i>        | Fertil Steril, 1997            | Conventional PZD                       | Repeated implantation failure                      | Clinical pregnancy rate | Control : 19.6%<br>AH : 36.7%  | 0.057        |
| Nakayama <i>et al.</i>    | Fertil Steril, 1998            | Piezo-PZD                              | Unselected patients                                | Hatching rate           | Control : 15.3%<br>AH : 86.7%  | < 0.001      |
| Nakayama <i>et al.</i>    | Fertil Steril, 1999            | Piezo-PZD                              | Repeated implantation failure                      | Clinical pregnancy rate | Control : 5.7%<br>AH : 13.5%   | < 0.05       |
| Edirisinghe <i>et al.</i> | J Assist Reprod Genetics, 1999 | Conventional PZD                       | Repeated implantation failure, Old age, Thick zona | Clinical pregnancy rate | 1. Age < 38<br>Control : 25.0%<br>AH : 20.0%<br>2. Age ≥ 38<br>Control : 4.5%<br>& 17.0%<br>AH : 9.1%<br>& 10.0% | NS           |
| Cieslak <i>et al.</i>     | Fertil Steril, 1999            | 3-dimensional PZD vs. Conventional PZD | Unselected patients                                | Clinical pregnancy rate | 3-D PZD : 42.0%<br>Conventional PZD : 33.3%  | NS           |
| Hershlag <i>et al.</i>    | Fertil Steril, 1999            | Conventional PZD                       | Period divided                                     | Clinical pregnancy rate | Control : 25.2%<br>AH : 37.1%  | < 0.0001     |

## 2) Chemical assisted hatching (Zona thinning & drilling) (Table 2)

Chemical assisted hatching 방법은 Cohen 등 (1991)이 처음 적용하였으며 acid Tyrode's solution 을 가는 유리관 (내경, 10~15 μm; 외경, 15~20 μm)을 통해 불어내어 투명대의 일부분을 녹여 주거나 (zona thinning) (Gorden and Dapunt, 1993; Tucker *et al.*, 1993) 구멍을 내는 (zona drilling) 방법이다. 착상전 유전자 진단을 위해 할구세포를 분리할 때 이용되는 방법과 거의 동일하다 (Handyside *et al.*, 1989, 1990). 강한 산성용액을 사용하기 때문에 배아의 할구세포에 손상을 줄 수 있는 가능성이 있어 조작하는 사람의 각별한 주의가 필요하며 solution의 산도나 양, 점도에

**Table 2.** Results of Chemical Assisted Hatching (Zona thinning & drilling)

| Author                    | Publication                    | Method        | Indication   | Main Outcome Measures   | Results   | P value |
|---------------------------|--------------------------------|---------------|--|-------------------------|---|---------|
| Tucker <i>et al.</i>      | J Assist Reprod Genetics, 1993 | Zona thinning | Unselected Patients  | Clinical pregnancy rate | Control : 37.0%<br>AH : 44.6%   | NS      |
| Schoolcraft <i>et al.</i> | Fertil Steril, 1994            | Zona drilling | Age ≥ 39, Repeated implantation failure, day 3 FSH > 18 mIU/ml | Ongoing pregnancy rate  | Control : 19%<br>AH : 64%   | 0.0001  |
| Schoolcraft <i>et al.</i> | J Assist Reprod Genetics, 1995 | Zona drilling | Old age Age ≥ 40   | Clinical pregnancy rate | Control : 21%<br>AH : 58%   | 0.005   |
| Check <i>et al.</i>       | Fertil Steril, 1996            | Zona drilling | Frozen-thawed ET   | Clinical pregnancy rate | Control : 15.2%<br>AH : 30.4%   | p<0.05  |
| Tucker <i>et al.</i>      | Hum Reprod, 1996               | Zona drilling | Age ≥ 35   | Clinical pregnancy rate | Control : 16.7%<br>AH : 45.2%   | p<0.05  |
| Tao & Tamis               | J Assist Reprod Genetics, 1996 | Zona drilling | Frozen-thawed ET   | Clinical pregnancy rate | Control : 0%<br>AH : 24%  |         |
| Bider <i>et al.</i>       | Hum Reprod, 1997               | Zona drilling | Age > 38   | Clinical pregnancy rate | Control : 5.1%<br>AH : 8.9%   | NS      |
| Magli <i>et al.</i>       | Hum Reprod, 1998               | Zona drilling | Age ≥ 38, Repeated implantation failure                        | Clinical pregnancy rate | 1. Age ≥ 38<br>Control : 10%<br>AH : 31%<br>2. Repeated implantation failure<br>Control : 17%<br>AH : 36% | p<0.05  |
| Hurst <i>et al.</i>       | J Assist Reprod Genetics, 1998 | Zona drilling | Good prognosis patients  | Clinical pregnancy rate | Control : 81.0%<br>AH : 17.0%   | NS      |
| Lanzendorf <i>et al.</i>  | Hum Reprod, 1998               | Zona drilling | Age ≥ 36   | Clinical pregnancy rate | Control : 35.4%<br>AH : 29.3%   | NS      |
| Samsung Cheil             | unpublished data               | Zona drilling | Age ≥ 35   | Clinical pregnancy rate | Control : 15.6%<br>AH : 22.3%   | NS      |
| Samsung Cheil             | unpublished data               | Zona drilling | Frozen-thawed ET   | Clinical pregnancy rate | Control : 18.4%<br>AH : 28.5%   | NS      |
| Samsung Cheil             | unpublished data               | Zona drilling | Repeated implantation failure                                  | Clinical pregnancy rate | Control : 28.2%<br>AH : 23.7%   | NS      |

따라 얇아지는 투명대의 범위와 투명대에 생기는 구멍의 깊이나 크기가 달라질 수 있다. Zona drilling의 경우, 보통 10~20 μm 정도의 크기로 구멍을 내게 된다. 배아 내에 있는 fragment나 동결-융해한 배아 내의 죽은 할구세포를 제거할 수 있는 장점이 있다. 일반적으로 사용하는 solution의 산도는 pH 2.3~2.5 정도가 많이 사용되고 있으며 solution이 갑자기 확산되는 것을

**Table 3. Results of Biochemical Assisted Hatching by Enzyme**

| Author     | Publication      | Method                                 | Indication                     | Main Outcome Measures   | Results   | P value   |
|------------|------------------|--|--------------------------------|-------------------------|---|-----------|
| Lee et al. | Hum Reprod, 1997 | Zona-thinning by enzyme                | Unselected mouse embryo        | Hatching rate           | 1. Pronase<br>Control : 39.2%<br>BAH : 60.4%<br>2. Proteinase K<br>Control : 35.3%<br>BAH : 71.8% | p<0.01    |
| Lee et al. | ASRM, 1999       | Zona-drilling, Zona-thinning by enzyme | Frozen-thawed embryo transfers | Clinical pregnancy rate | Control* : 22.2%<br>AH : 30.0%<br>BAH* : 39.3%  | * p<0.005 |

**Table 4. Results of Laser Assisted Hatching**

| Author          | Publication       | Method                     | Indication  | Main Outcome Measures                          | Results  | P value               |
|-----------------|-------------------|----------------------------|---|--|--|-----------------------|
| Obruca et al.   | Hum Reprod, 1994  | Zona drilling Er:YAG laser | 1. Unselected mouse embryo,<br>2. Repeated implantation failure | 1. Hatching rate<br>2. Clinical pregnancy rate | 1. Hatching rate<br>Control : 29.3%<br>AH : 80.0%<br>2. Clinical pregnancy rate<br>Control : 16.2%<br>AH : 40.0% | 0.0001<br>p<0.05      |
| Antinori et al. | Hum Reprod, 1996a | Zona thinning Er:YAG laser | 1. Repeated implantation failure,<br>2. Unselected 1st trial    | Clinical pregnancy rate                        | 1. RIF<br>Control : 23.1%<br>AH : 42.7%<br>2. Unselected 1st trial<br>Control : 19%<br>AH : 39.6%                | 1. 0.053<br>2. p<0.05 |
| Antinori et al. | Hum Reprod, 1996b | Zona drilling UV laser     | Repeated implantation failure                                   | Clinical pregnancy rate                        | Control : 19.3%<br>AH : 44.4%  | p<0.05                |

방지하기 위해 점도가 높은 PVP (polyvinyl pyrrolidone)를 첨가하여 사용한다.

3) Biochemical assisted hatching (Zona thinning by enzyme treatment) (Table 3)

기본적으로 in vivo 환경에서 부화가 일어나기 직전에 자궁 내 혹은 배아 내부에서 분비되는 효소에 의해 투명대가 얇아지므로 이러한 현상을 model로 하여 적용된 방법으로, 다른 보조부화술이 투명대의 일부분을 절개하거나 녹이는 반면에 이 방법은 배양액에 일정한 농도의 proteinase, pronase, trypsin-like enzyme 등을 첨가하여 투명대 전체를 좀더 얇게 하여 부화과정을 도와주는 방법이다 (Lee et al., 1997).

4) Laser assisted hatching (Table 4)

Tadir 등 (1989)이 정자의 운동성을 조절하기 위해 최초로 laser를 이용한 이래 최근 보조생

식술 분야에서 laser의 적용 범위가 점차 확대되고 있다. 보조부화술이나 착상전 유전자 진단을 위해 투명대를 절개하는데 이용되고 있으며 ICSI 시행전에 정자의 immobilization, 그리고 hemizona assay를 위해 투명대를 반으로 나누는데 이용되고 있다. 보조부화술의 경우, 초기의 연구들은 모두 동물을 대상으로 시행되었으며 laser source와 embryo간의 접촉 여부에 따라 contact type과 non-contact type으로 나뉜다. Contact type으로는 Er-YAG laser가 가장 많이 사용되고 있으며 (Strohmer and Feichtinger, 1992; Obruca *et al.*, 1994; Antinori, 1996a,b), non-contact type으로는 UV laser (Antinori *et al.*, 1996)와 diode laser (Germond *et al.*, 1995, 1996; Schopper *et al.*, 1999)가 많이 이용된다. Contact type의 경우 laser beam이 할구에 직접적으로 영향을 줄 수 있는 단점이 있어 non-contact type이 보다 안전하며 정확하다고 할 수 있다 (Schopper *et al.*, 1999). 이것은 다시 파장에 따라 193~532 nm의 파장을 갖는 자외선을 이용하는 경우 (Tadir *et al.*, 1991; Blanchet *et al.*, 1992; Laufer *et al.*, 1993; Simon *et al.*, 1993)와 적외선을 이용하는 경우 (Coddington *et al.*, 1992; Germond *et al.*, 1995), 그리고 2940 nm의 파장을 갖는 erbium-yttrium-aluminium-garnet (Er:YAG) laser를 이용하는 경우로 나눌 수 있다. 투명대의 구멍은 laser fiber의 직경이나 에너지 세기를 이용하여 결정할 수 있으며 일반적으로 3  $\mu\text{m}$ 의 두께로 투명대에 구멍을 만들게 된다. Laser를 이용한 보조부화술의 장점은 물리적으로 세포에 직접적으로 자극을 주지 않으며 살아 있는 세포에 아무런 독성도 보이지 않고 조작작하기가 용이하다는 것이다 (Obruca *et al.*, 1997). 또한 다른 보조부화술에 비해 작업시간이 짧은 장점이 있다. 반면에 단점으로는 장비의 가격이 매우 비싸다는 것이다 (약 200,000 \$). 그럼에도 불구하고 최근 보조부화술에 적용하는 예가 증가하는 추세이다.

### 3. 보조부화술의 적용 대상

어느 환자를 대상으로 보조부화술을 적용할 것인가에 대하여는 아직도 논란이 많은 것이 사실이다. 그러나 대체로 1) 투명대가 정상 두께에 비해 두껍거나 2) 환자의 나이가 많은 경우, 3) 과배란 유도 3일째의 FSH의 level이 정상보다 높은 경우, 4) 양질의 배아를 여러 주기에 걸쳐 이식하였으나 계속적으로 착상에 실패하는 경우, 5) 배아 내에 fragment가 너무 많거나 배아의 상태가 너무 나빠 부화과정에 이상이 있을 것으로 생각되는 경우, 6) 동결-융해과정을 거치면서 투명대의 경화현상이 일어난 것으로 생각되는 경우에 시행한다. 즉, 보조부화술은 시험관아기 시술 시에 위의 경우처럼 예후가 좋지 않을 것으로 예상되는 환자 (poor prognosis patients)들을 대상으로 하고 있으며 아래 내용은 연구자들에 따라 약간의 차이는 있지만 지금까지 보고된 논문들에서 제시한 보조부화술의 적용 기준을 정리한 것이다.

- 1) Thick zona pellucida :  $\geq 15 \mu\text{m}$  or  $17 \mu\text{m}$
- 2) Old age :  $\geq 38$  year or 40 year
- 3) High basal (day 3) FSH level : 15 mIU/ml or 18 mIU/ml
- 4) Repeated implantation failure :  $\geq 2$  or 3 times
- 5) Poor embryo quality and fragmentation rates in excess of 20%
- 6) Frozen-thawed embryo

#### 4. 결 론

1990년대에 들어 GnRH-analogue와 세포질 내 정자주입술 (ICSI)의 개발로 다수의 난자를 획득하여 높은 수정율을 얻을 수 있었다. 또한 동결보존 기술도 발전하여 소수의 배아만을 이식할 수 있고 만약 실패하더라도 다음 주기에 동결된 배아를 융해하여 이식하면 비슷한 임신율을 기대할 수 있다. 그러나 아직도 30% 내외의 임신율을 나타내고 있으며 특히 착상률은 20%를 넘지 못하고 있다. 즉, 양질의 배아를 이식하여도 착상이 되지 않는 경우가 많았다. 이러한 것을 해결하기 위해 고안된 것이 보조부화술로 특히 특별한 이유 없이 여러 번 양질의 배아를 이식하여도 임신이 되지 않는 implantation failure 환자의 경우, 현재까지 공동배양이나 보조부화술 이외의 특별한 해결책이 없는 실정이다. 그러나 여러 적응증에 따라, 또한 보고자마다 보조부화술의 효용성에 차이를 보고하고 있고 일란성 쌍생아의 빈도가 증가하는 등 (Hershlag *et al.*, 1999) 아직도 체내에서 일어나는 정확한 부화기작을 알지 못하므로 논란의 여지가 있다. 그러나 대체적인 결과를 종합해보면 예후가 좋지 않은 환자, 특히 38세 이상의 환자에서는 높은 임신율과 착상률을 보고하고 있으며 (Schoolcraft *et al.*, 1994; Stein *et al.*, 1995; Magli *et al.*, 1998) 동결란 이식 주기 (Check *et al.*, 1996; Tao and Tamis, 1996)나 특별히 투명대의 두께가 두꺼운 환자, 그리고 배아 내에 fragmentation이 많은 경우에 보조부화술을 이용하여 좋은 결과를 얻었으며 앞으로 인간 배아의 정확한 부화기작에 대한 연구가 계속되어야 할 것으로 생각된다.

#### 5. 참 고 문 헌

- Antinori S, Panci C, Selman HA, et al. Zona thinning with the use of laser: a new approach to assisted hatching in humans. *Hum Reprod* 1996a; 11: 590-4.
- Antinori S, Selman HA, Caffa B, et al. 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: 2488-92.
- Austin CR. *The Mammalian Egg*. Oxford, Blackwell Scientific, 1961, pp 89-97.
- Betteridge KJ, Flood PF and Mitchell P. Possible role of the embryo in the control of oviductal transport in mares. In *Ovum Transport and Fertility Regulation*, Harper MJK, Pauerstein CJ, Adams CE, Coutinho EM, Croxatto HB, Paton EM (eds). Copenhagen, Scriptor, 1976, pp 381-389.
- 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: 317-20.
- Blanchet GB, Russell JB, Fincher CR, Portmann M. Laser micromanipulation in the mouse embryo: a novel approach to zona drilling. *Fertil Steril* 1992; 57: 1337-41.
- Chao KH, Wu MY, Chen SU, Yang YS, Chen HF, Ho HN. Assisted hatching increases the implantation and pregnancy rate of in vitro fertilization (IVF)-embryo transfer (ET), but not that of IVF-tubal ET in patients with repeated IVF failures. *Fertil Steril* 1997; 67: 904-8.
- 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.
- Cieslak J, Ivakhnenko V, Wolf G, Sheleg S, Verlinsky Y. Three-dimensional partial zona dissection for preimplantation genetic diagnosis and assisted hatching. *Fertil Steril* 1999; 71: 308-13.
- Coddington CC, Veeck LL, Swanson RJ, et al. The YAG laser used in micromanipulation to transect the zona pellucida of hamster oocytes. *J Assist Reprod and Genetics* 1992; 9: 557-63.
- Cohen J. Assisted hatching of human embryos. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1991; 8: 179-90.
- Cohen J, Alikani M, Trowbridge J, et al. Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis. *Hum Reprod* 1992; 7: 685-91.
- Cole RJ. Cinemicrographic observation on the trophoblast and zona pellucida of the mouse blastocyst. *J Embryol Exp Morphol* 1967; 17: 481-90.
- Dabichi D. Impairment of mouse blastocyst hatching by naturally occurring serine proteinase inhibitors. *Fed Proc* 1981; 40: 1808.
- DeFelice M, Siracusa G. "Spontaneous" hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during in vitro culture. *Gamete Res* 1982; 6: 107-13.
- DeMola JRL, Garside WT, Bucci J, Tureck RW and Heyner S. Analysis of the human zona pellucida during culture: Correlation with diagnosis and the preovulatory hormonal environment. *J Assist Reprod and Genetics* 1997; 14: 332-6.
- Dokras A, Sargent I, Ross C, Barlow DH, Gosden B. Micromanipulation of human embryos to assist hatching. *Fertil Steril* 1994; 61: 514-20.
- Downs SM, Schroeder AC, Eppig JJ. Serum maintains the fertilizability of mouse oocytes matured in vitro by preventing hardening of the zona pellucida. *Gamete Res* 1986; 15: 115-22.
- Drobnis EZ, Andrew JB, Katz DF. Biophysical properties of the zona pellucida measured by capillary suction: is zona hardening a mechanical phenomenon? *J Exp Zool* 1988; 245: 206-19.
- Edirisinghe WR, Ahnonkitpanit V, Promviengchai S, Suwajanakorn S, et al. A study failing to determine significant benefits from assisted hatching: Patients selected for advanced age, Zonal thickness of embryos, and previous failed attempts. *J Assist Reprod and Genetics* 1999; 16: 294-301.
- Germond M, Nocera D, Senn A, et al. Microdissection of mouse and human zona pellucida using a 1.48-micron diode laser beam: efficacy and safety of the procedure. *Fertil Steril* 1995; 64: 604-11.
- Germond M, Nocera D, Senn A, et al. Improved fertilization and implantation rates after non-touch zona pellucida microdrilling of mouse oocytes with a 1.48 micron diode laser beam. *Hum Reprod* 1996; 11: 1043-8.
- 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* 1993; 59: 1296-1301.
- Gwatkin RBL. *Fertilization Mechanisms in Man and Mammals*. New York, Plenum Press. 1977, pp 91-108.
- Handyside AH, Penketh RJ, Winston RL, et al. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet* 1989; i: 347-9.
- Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RML. Pregnancy from biopsied human preimplantation embryos sexed by specific DNA amplification. *Nature* 1990; 344: 768-70.



- Helebaut S, De Sutter P, Dozortsev D, Onghena A, Qian C, Dhont M. Does assisted hatching improve implantation rates after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection in all patients? A prospective randomized study. *J Assist Reprod and Genetics* 1996; 13: 19-22.
- Hershlag A, Paine T, Cooper GW, Scholl GM, Rawlinson K, Kvapil G. Monozygotic twinning associated with mechanical assisted hatching. *Fertil Steril* 1999; 71: 144-6.
- Hurst BS, Tucker KE, Awoniyi CA, Schlaff WD. Assisted hatching does not enhance IVF success in good-prognosis patients. *J Assist Reprod and Genetics* 1998; 15: 62-4.
- Lanzendorf SE, Nehchiri F, Mayer JF, et al. A prospective, randomized, double-blind study for the evaluation of assisted hatching in patients with advanced maternal age. *Hum Reprod* 1998; 13: 409-13.
- Laufer N, Palanker D, Shufaro T, et al. The efficacy and safety of zona pellucida drilling by a 193-nm excimer laser. *Fertil Steril* 1993; 59: 889-95.
- 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.
- Longo FJ. Changes in the zonae pellucidae and plasmalemmae of aging mouse eggs. *Biol Reprod* 1981; 25: 399-411.
- Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, et al. Rescue of implantation potential in embryos with poor prognosis by assisted zona hatching. *Hum Reprod* 1998; 13: 1331-5.
- McLaren A. The role of the zona pellucida in mice. *J Embryol Exp Morphol* 1970; 23: 1-19.
- Modlinski JA. The role of the zona pellucida in the development of mouse eggs in vivo. *J Embryol Exp Morphol* 1970; 23: 539-47.
- Nakayama T, Fujiwara H, Tastumi K, Fujita K, Higuchi T, Mori T. A new assisted hatching technique using a piezo-micromanipulator. *Fertil Steril* 1998; 69: 874-788.
- Nakayama T, Fujiwara H, Yamada S, Tastumi K, Honda T, Fujii S. Clinical application of a new assisted hatching method using a piezo-micromanipulator for morphologically low-quality embryos in poor-prognosis infertile patients. *Fertil Steril* 1999; 70: 1014-8.
- Neev J, Tadir Y, Ho P, et al. Microscope-delivered ultraviolet laser zona dissection: principles and practice. *J Assist Reprod and Genet* 1992a; 9: 513-23.
- Obruca A, Strohmer H, Sakkas D, Menezo Y, Kogosowski A, Barak Y, Feichtinger W. Use of laser in assisted fertilization and hatching. *Human Reprod* 1994; 9: 1723-6.
- Obruca A, Strohmer H, Blaschitz A, et al. Ultrastructural observations in human oocytes and preimplantation embryos after zona opening using an erbium-yttrium-aluminium-garnet (Er:YAG) laser. *Hum Reprod* 1997; 12: 2242-5.
- Perona RM and Wassarman PM. Mouse blastocysts hatch in vitro by using a trypsin-like proteinase associated with cells of mural trophoectoderm. *Dev Biol* 1986; 114: 42-52.
- Sawada H, Yamasaki K and Hoshi M. Trypsin-like protease from mouse embryos: evidence for the presence in culture medium and its enzymatic properties. *J Exp Zool* 1990; 254: 83-7.
- Schiewe MC, Hazeleger NL, Sclimenti C, et al. Physiological characterization of blastocyst hatching mechanism by use of mouse antihatching model. *Fertil Steril* 1995; 63: 288-94.

- Schoolcraft WB, Schlenker T, Gee M, Jones G, Jones HW Jr. Assisted hatching, in the treatment of poor prognosis in vitro fertilization candidates. *Fertil Steril* 1994; 62: 551-4.
- Schoolcraft WB, Schlenker T, Jones GS, Jones HW Jr. In vitro fertilization in women age 40 or older: The impact of assisted hatching. *J Assist Reprod and Genetics* 1995; 12: 581-4.
- Schopper B, Ludwig M, Edenfeld J, Al-Hasani S, Diedrich K. Possible application of laser in assisted reproductive technologies. *Hum Reprod* 1999; 14 (suppl.1): 186-93.
- Singh EL. The disease control potential of embryos. *Theriogenology* 1987; 27: 9-20.
- Simon A, Palanker D, Harpaz-Eisenberg V, et al. Interaction between human sperm cells and hamster oocytes after argon fluoride excimer laser drilling of the zona pellucida. *Fertil Steril* 1993; 60: 159-64.
- Stein A, Pinkas H, Rufas O, Ovadia J, et al. Assisted hatching by partial zona dissection of human pre-embryos in patients with recurrent implantation failure after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1995; 63: 838-41.
- Strohmer H and Feichtinger W. Successful clinical application of laser for micromanipulation in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1992; 58: 212-4.
- Tao J and Tamis R. Application of assisted hatching for 2-day-old, frozen-thawed embryo transfer in a poor-prognosis population. *J Assist Reprod and Genetics* 1997; 14: 128-30.
- Tucker MJ, Luecke NM, Wiker SR, Wright G. Chemical removal of the outside of the zona pellucida of day 3 human embryos has no impact on implantation rate. *J Assist Reprod and Genetics* 1993; 10: 187-91.
- Tucker MJ, Morton PC, Wright G, et al. Enhancement of outcome from intra cytoplasmic sperm injection: does co-culture or assisted hatching improve implantation rates? *Hum Reprod* 1996; 11: 2434-7.
- Wassarman PM. Mouse gamete adhesion molecules. *Biol Reprod* 1992; 46: 186-91.
- Yamazaki K, Kato Y and Hoshi M. Protease inhibitors block the zona shedding of mouse embryos in vitro. *Dev Growth Differ* 1985; 27: 491.