

# 전핵 시기에서의 수정란 동결이 체외수정 및 배아이식술에서의 누적 분만율에 미치는 영향

관동대학교 의과대학 제일병원 생식생물학 및 불임연구실<sup>1</sup>, 산부인과<sup>2</sup>

김묘경<sup>1</sup> · 이선희<sup>1</sup> · 최수진<sup>1</sup> · 최혜원<sup>1</sup> · 박동욱<sup>1</sup> · 임천규<sup>1</sup> · 송인옥<sup>2</sup> · 이형송<sup>1\*</sup>

## Effect of Cryopreservation of Sibling 2PN Zygotes on Cumulative Delivery Rates in the Human IVF-ET Program

Myo Kyung Kim<sup>1</sup>, Sun-Hee Lee<sup>1</sup>, Su Jin Choi<sup>1</sup>, Hye Won Choi<sup>1</sup>, Dong-Wook Park<sup>1</sup>, Chun Kyu Lim<sup>1</sup>, In Ok Song<sup>2</sup>, Hyoung-Song Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Reproductive Biology & Infertility, <sup>2</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Cheil General Hospital and Women's Healthcare Center, Kwandong University School of Medicine, Seoul, Korea

**Objective:** This study was carried out to know whether cryopreservation of sibling 2PN zygotes could increase the cumulative delivery rates in the patients who had less than 10 fertilized zygotes.

**Methods:** A retrospective analysis was performed in 138 *in vitro* fertilization-embryo transfer (IVF-ET) cycles with less than 10 fertilized zygotes during January 2003 to December 2007 in Cheil General Hospital. These cycles were divided into two groups. In Group I (n=86), all fertilized embryos were cultured to transfer on day 3 without cryopreserved embryos at the 2PN stage. In Group II (n=52), among fertilized zygotes, some sibling zygotes were frozen at the 2PN stage, the remainder were cultured to transfer. Clinical outcomes in fresh ET cycles and cumulative ongoing pregnancy rates after subsequent frozen-thawed (FT)-ET cycles were compared.

**Results:** There were no significant differences in female mean age, number of retrieved oocytes and total fertilized embryos between two groups. Number of cultured embryos was significantly lower in Group II (5.2±0.5) than in Group I (8.4±0.7) ( $p<0.01$ ). Also, number of transferred embryos was significantly lower in Group II (3.3±0.6) compared with Group I (3.6±0.6) ( $p<0.01$ ).  $\beta$ -hCG positive rates and delivery rates (51.2 vs. 46.2 % and 41.9 vs. 34.6 %, respectively) after fresh ET were slightly higher in Group I than in Group II. However, the differences were not statistically significant. Also, the cumulative delivery rates after subsequent FT-ET cycles were not significantly different between Group I (48.8%) and Group II (50.0%).

**Conclusion:** This study showed that cryopreservation of sibling 2PN zygotes from patients who had less than 10 zygotes in the fresh ET cycles did not increase cumulative delivery outcomes. But, it could provide an alternative choice for patients due to offering more chance for embryo transfers if pregnancy was failed in fresh IVF-ET cycles.

[Korean. J. Reprod. Med. 2010; 37(4): 329-338.]

**Key Words:** Cryopreservation, PN zygotes, Frozen-thawed embryo transfer, Cumulative delivery rates

### 동결-해동 배아이식 (frozen-thawed embryo transfer)

접 수 일: 2010년 11월 29일, 수정일: 2010년 12월 17일  
게재확정일: 2010년 12월 22일  
주관책임자: 이형송, 우) 100-380 서울특별시 중구 목정동 1-19,  
관동대학교 의과대학 제일병원 생식생물학 및 불임연구실  
Tel: (02) 2000-7592, Fax: (02) 2265-5621  
e-mail: hslee999@gmail.com

은 수정 후 발생한 잉여의 배아를 동결하여 다음 주기에 사용하는 보조생식술 (assisted reproductive technology)로 과배란 유도 과정에서 야기될 수 있는 과배란증후군 (ovarian hyperstimulation syndrome)의 위험을 줄일 수 있고, 이식 배아의 수를 조절

하여 다태임신의 가능성을 줄이고, 체외수정 및 배아이식 주기당 임신 시도 회수를 증가시킬 수 있는 매우 효과적인 보조생식술 방법으로 제시되고 있다.<sup>1-3</sup> 최근에는 배아의 동결, 해동 기술 및 동결-해동 배아이식을 위한 자궁내막 준비 방법 등이 발전되어 신선주기 배아이식과 비교하여 임신율이나 착상률에서도 유의한 차이 없이 좋은 성적을 보고하고 있다.<sup>4,5</sup> 그러나 아직은 수정란의 동결 시기, 즉 배아의 발달 단계인 전핵 단계 (pronuclear stage), 난할 단계 (cleavage stage) 또는 포배기 단계 (blastocyst stage)에 따른 동결-해동 배아이식의 임신율은 연구자 마다 상이한 결과를 보고하고 있다.<sup>3,5</sup>

잉여 배아가 많이 생성된 체외수정 및 배아이식술 주기에서 전핵 단계의 배아와 배양 2일째에 양질의 난할 단계 배아 (2~4 세포기 등)를 각각 동결하였을 때, 그 다음 동결-해동 배아이식 주기 시 전핵 단계에서 동결-해동 후 이식한 군이 난할 단계 배아에서 동결한 군에 비해 통계적으로 유의하게 높은 누적 임신율을 보였다는 연구<sup>6</sup>가 있는 반면에, Salumnets 등<sup>7</sup>은 전핵 단계와 배양 2일, 3일째의 배아를 동결하고 이를 해동 후 임신율을 비교하였을 때, 생존율은 전핵 단계 (86.5%)가 가장 높게 나타났으나, 세 군간에 임신율, 착상률, 분만율은 유의한 차이가 없었다고 보고하였다. 그러나, 유산율 (miscarriage rate)은 배양 3일째 배아를 동결-해동 이식하였을 때, 다른 두 군에 비해 통계적으로 유의하게 높게 나타났다고 보고한 바 있다. 일부 연구자들은 전핵 단계에서의 동결은 배아의 정상적 발달 가능성을 형태학적으로 판단하기 어렵기 때문에 양질의 난할 배아나 포배기 배아를 동결-해동 후 이식하는 것이 보다 좋은 임신 결과를 기대할 수 있다고 주장하였다.<sup>8</sup> 그러나, 본원에서는 다년간 전핵 단계에서의 동결-해동 배아이식 주기에서도 높은 임신율과 분만율을 보고하였으며, 38세 이상의 고령 환자군에서도 동결-해동 배아이식이 효과적임을 보고한 바 있다.<sup>4,9</sup>

여러 연구자들이 잉여의 배아가 많이 생성된 주

기에서 전핵이나 난할 단계의 일부 수정란을 동결하는 것은 전체적인 누적 임신율을 올릴 수 있는 보조생식술의 배아이식 전략으로 소개하고 있다.<sup>5,10,11</sup> 이는 대부분의 환자가 적절한 난자 수와 수정란을 가지는 좋은 예후에 해당하기 때문이라 생각되어 지고, 잉여의 수정란이 많지 않은 주기의 경우, 일부 전핵 단계에서의 동결이 누적 임신율을 높일 수 있는지에 대한 연구는 아직까지 미흡한 상태이다.

따라서 본 연구에서는 수정란의 수가 10개 미만인 주기에서 전핵 단계에서의 동결이 향후 동결-해동 배아이식 주기를 통해 누적 임신율과 분만율을 증가시킬 수 있는지 확인하고자 하였으며, 수정 확인 당일 수정란이 8개 확인된 환자의 경우에 있어서 배양 3일째 배아이식을 계획하고, 수정된 배아를 모두 키우는 군 (Group I)과 전핵 단계에서 일부 동결 후 나머지 배아를 배양하여 이식한 군 (Group II)에서의 누적 임신율과 분만율을 후향적으로 비교 분석하였다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 연구대상

2003년 1월부터 2007년 12월까지 제일병원 아이소망센터를 내원하여 과배란 유도에 의해 체외수정 (일반체외수정법/세포질내정자주입술, conventional *in vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection [ICSI])과 이식을 시행한 주기 중 다음의 조건에 맞는 주기를 후향적으로 비교 분석하였다.

연구대상은 체외수정 후 18~20시간째에 2개의 정상적인 전핵을 가지고 있는 수정란 8개를 가진 환자의 주기만을 대상으로 하였으며, 선택된 주기는 8개의 전핵 배아와 전핵이 1개만 보이거나 수정 확인이 되지 않고 늦게 난할이 이루어진 배아의 수를 합하여 10개 이하인 주기만을 포함하였다. 수정된 모든 배아를 3일까지 배양하고 상태가 양호한 배아를 이식한 주기들을 Group I으로, 수정이 확인된 배아 중 일부를 전핵 단계에서 동결하고, 나머

**Table 1.** Embryo scoring system according to cleavage speed and embryo grade at day 3

Cell stage	Score (A)	Grade	Score (B)
< 4 cells	1	I	5
4~7 cells	2	I-1	4
8 cells and more	3	II	3
		II-1	2
		III	1

Embryo score at day 3=A×B.

Grade I, blastomeres have even size and no fragmentation; Grade I-1, blastomeres have even size and showed < 20% fragmentation; Grade II, blastomeres have uneven size and < 20% fragmentation; Grade II-1, blastomeres have uneven size and > 20% fragmentation; Grade III, blastomeres have uneven size and > 50% fragmentation.

*Myo Kyung Kim. Effect of Cryopreservation of Sibling 2PN Zygotes on Cumulative Delivery Rates in the Human IVF-ET Program. Korean J Reprod Med 2010.*

지를 3일간 배양하여 상태가 양호한 배아를 이식한 주기들을 Group II로 구분하였다. 고환정자나, 해동-고환정자를 사용한 주기, 착상전 유전진단 (preimplantation genetic diagnosis) 주기, 공여 난자군과 40세 이상의 고령의 여성 환자군의 주기는 본 연구대상에서 제외하였다.

## 2. 배아의 동결보관 및 배아이식

수정이 확인된 배아는 Group I의 경우 양질의 배아를 이식하고 남은 배아 중 배아의 상태가 양호한 경우에 배양 3일째 또는 5일째 배아를 동결보관하였으며, Group II의 경우 일부의 전핵 단계의 배아 (3~4개)를 완판 동결법으로 동결보관하고, 이식 후 남은 배아는 5일까지 배양하여 양질의 포배기 배아로 발달하면 동결보관하였다. 이식 당시 배아의 등급은 형태학적 기준으로 할구의 수, 할구세포 크기의 균등율과 파편화 (fragmentation) 정도에 따라 다섯 등급으로 나누고, 세포의 난할 속도를 감안하여 점수화하였다 (Table 1).

## 3. 임신 및 누적 분만 확인

임신의 확인은 배아이식 후 12일째 혈중  $\beta$ -hCG가 5 mIU/mL 이상이고, 임신 5~6주 사이에 태낭 (gestational sac)이 확인되면 임상적 임신 (clinical pregnancy)으로 판정하였다. 임신 후 추적 조사를 통해 자궁외 임신 및 유산 여부와 분만 결과를 확인하였다. 신선주기 배아이식 후 이식 주기당 분만율을 조사하였으며, 신선주기 배아이식에서 분만을 하지 못한 군에서 동결란을 이용해 임신을 시도한 군과 분만 후 두 번째 임신을 시도하는 군에서의 동결-해동 이식주기의 임신과 분만 여부를 확인하였다. 누적 분만율은 최초 과배란 유도 주기를 기준으로 누적 배아이식 주기를 통해 분만이 이루어진 건수로 계산하였다.

## 4. 통계 분석

통계적인 분석은 Student's *t*-test와 chi-square test 또는 Fisher's exact test를 이용하였으며,  $p < 0.05$ 인 경우 통계학적 유의성이 있는 것으로 간주하였으며, 데이터는 평균±표준편차로 표시하였다.

## 결 과

수정이 확인된 배아를 배아이식 전까지 모두 배양한 Group I은 전체 86주기 (환자수 83명)였으며, 전핵 단계에서 일부 배아를 동결하고 나머지 배아 중에서 배아이식을 시도한 Group II는 52주기 (환자 52명)였다. 신선주기 배아이식에서 여성 환자의 나이는 두 군 간에 차이가 없었으며, 주기의 특징은 Table 2에 기술하였다.

과배란 유도에 의해 회수된 난자의 수는 두 군간에 차이가 없었으며, 전핵 단계에서 일부 동결한 Group II의 경우 이식을 위해 배양된 수정란의 수는  $5.2 \pm 0.5$ 개로 Group I의  $8.4 \pm 0.7$ 개에 비해 통계적으로 유의하게 적었으며, 이식한 배아 수 또한, Group II가  $3.3 \pm 0.6$ 개로 Group I ( $3.6 \pm 0.6$ )에 비해 통계적으로 유의하게 적었다 ( $p < 0.01$ ). 형태학적 기

**Table 2.** Characteristics and causes of infertility in fresh IVF-ET cycles

	Group I	Group II	<i>p</i>
No. of cycles	86	52	
Mean age of female partners	33.2±3.5	33.6±3.9	NS
Causes of infertility			
Female factor	49 (57.0)	22 (42.3)	NS
Male factor	17 (19.8)	9 (17.3)	NS
Idiopathic factor	13 (15.1)	8 (15.4)	NS
Combined factor	7 (8.1)	13 (25.0)	<0.02
ART			
IVF	26 (30.2)	10 (19.2)	NS
Split ICSI	37 (43.0)	26 (50.0)	NS
ICSI	23 (26.7)	16 (30.8)	NS

Values are presented as mean±SD or number (%).

IVF-ET, *in vitro* fertilization-embryo transfer; ART, assisted reproduction technology; ICSI, intracytoplasmic sperm injection; NS, no statistical significance (*p*>0.05).

Myo Kyung Kim. Effect of Cryopreservation of Sibling 2PN Zygotes on Cumulative Delivery Rates in the Human IVF-ET Program. Korean J Reprod Med 2010.

준을 근거로 점수화한 이식 배아의 상태 평균 값은 Group I에서 높았으나, 두 군간에 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. 임상적 임신율과 분만율은 Group I에서 각각 47.7%와 41.9%로 나타나 Group II의 44.2%와 34.6%에 비해 통계적 유의성은 없었지만 조금 높은 경향을 보였다 (Table 3).

신선주기 배아이식 후 비임신 또는 임신 후 유산으로 분만을 하지 못한 환자들 중 동결란이 보관되어 있는 환자들의 경우 동결-해동 배아이식을 실시하였다. 또한 신선주기에서 첫 아이 분만 후 둘째 아이 임신을 위해서 동결-해동 배아이식을 시도한 주기가 총 6건이 있었다. Group I (n=86)은 전핵 단계에서의 동결을 시도하지 않았으며, 배양 3일째 배아이식 후 남은 양질의 난할 단계의 배아를 동결한 주기가 19주기였고, 포배기에서 동결한 주기가 8주기, 난할 단계와 포배기에서 모두 동결한 주기가 2주기로 전체 29주기에서 배아를 동결 보관하였다. Group II는 전체 52주기에서 모두 전핵 단계의 동결 배아를 가지고 있었으며, 12주기에서

는 포배기에서도 동결을 수행하였다. Group I에서는 2번의 신선 배아이식을 실시한 환자가 3명이었으며, 이들 중 1명만이 배반포 배아 1개를 동결보관 하였으나, 배반포 해동 후 다른 신선주기와 같이 이식하여 누적 임신율에서는 제외하였다.

Group I에서는 신선배아 이식주기에서 분만을 하지 못한 50주기 중 15주기, 임신한 36주기 중 14주기에서 배아 동결보관을 시행하였으며 이 중에서 총 14주기에서 동결란 해동을 실시하였다. 해동 후 배아의 상태로 이식이 취소된 주기가 3주기가 있었으며, 또한 이번 실험대상의 주기 이외의 다른 주기 (신선주기 또는 다른 동결-해동 이식주기)에서 생성된 배아와 함께 이식한 2주기가 있었으며, 이 경우 이번 실험 결과의 누적 임신율에서는 제외하였다. 따라서 동결-해동 배아이식은 신선배아 이식주기에서 분만을 못한 군에서 7주기, 분만 후 다음 임신을 위한 주기가 2주기에서 시행되었다. Group II에서는 전체 52 신선배아 이식주기에서 임신하지 못한 34주기 중 동결란을 해동한 주기가

**Table 3.** Clinical outcomes in fresh *in vitro* fertilization-embryo transfer cycles

	Group I	Group II	<i>p</i>
No. of cycles	86	52	
No. of retrieved oocytes	13.0±4.2	12.9±3.2	NS
No. of fertilized embryos	715 (8.3±0.5)	436 (8.4±0.5)	NS
No. of cultured embryo	8.4±0.7	5.2±0.5	<0.01
No. of transferred embryo	3.6±0.6	3.3±0.6	<0.01
Mean transferred embryo score	9.3±2.7	8.9±2.4	NS
Top transferred embryo score	11.8±3.1	10.8±2.9	NS
β-hCG positive rates	44 (51.2)	24 (46.2)	NS
Clinical pregnancy rates	41 (47.7)	23 (44.2)	NS
Implantation rates	71/309 (23.0)	27/172 (15.7)	NS
Ectopic rates	3 (3.5)	1 (1.9)	NS
Abortion rates	5 (5.8)	5 (9.6)	NS
Delivery rates	36 (41.9)	18 (34.6)	NS

Values are presented as mean±SD or number (%).

NS, no statistical significance ( $p>0.05$ ).

Myo Kyung Kim. Effect of Cryopreservation of Sibling 2PN Zygotes on Cumulative Delivery Rates in the Human IVF-ET Program. Korean J Reprod Med 2010.

28주기 있었으며, 신선배아 이식주기에서 분만하고 다음 임신을 위해 동결-해동 주기를 실시한 경우가 3주기였다. 해동 후 배아의 발달이 정지되어 이식하지 못한 1주기를 제외하고, 모두 30주기에서 동결-해동 배아이식이 시행되었다 (Table 4). 동결-해동 배아이식은 모든 환자에서 1회만 시행되었으며 동결-해동 배아이식을 2회 이상 실시한 환자는 없었다.

결과를 요약하면 Group I은 9주기, Group II는 30주기의 동결-용해 배아이식을 실시하였으며, 각각 6주기 (66.7%)와 10주기 (33.3%)에서 임상적 임신에 성공하였다. 결과적으로 처음 신선배아 이식주기와 다음 동결-해동 이식주기에서의 분만까지의 누적 분만율을 계산하였을 때, Group I에서 42주기 (48.8%), Group II에서 26주기 (50.0%)를 보여 두 군간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다 (Table 5).

## 고 찰

체외수정 및 배아이식 기술에서 잉여 배아의 동결보관은 한 번의 과배란 유도를 통해 얻어진 배아를 이용하여 임신 기회를 높여 줄 수 있는 유용한 보조생식술로 시행되고 있다.<sup>4,5</sup> 최근 동결-해동 기술의 발달로 해동 후 높은 생존율과 난할률을 보이고 있으며, 난할 단계나 포배기에서도 많은 연구자들이 높은 임신 결과를 보고하고 있다.<sup>8,12</sup> 또한 38세 이상의 고령 환자들에 있어서도 동결-해동 배아이식이 신선주기 배아이식에 비해 임상적 임신을 통계적으로 유의하게 높일 수 있다고 보고된 바 있다 (29.0% vs. 16.5%,  $p<0.05$ ).<sup>9</sup>

Senn 등<sup>6</sup>은 초기 난할 배아 (early cleavage embryo)와 달리 전핵 단계의 수정란은 형태학적으로 가장 좋은 배아를 선택하기가 어렵기 때문에 높은 임신을 기대하기 힘들다고 하였다. 물론 Tesarik과

**Table 4.** Characteristics of frozen-thawed embryo transfer (FT-ET) cycles

	Group I	Group II
No. of embryo-frozen cycles	29	52
Cycles of frozen embryos		
No. of PN frozen cycles	0	40 (3.2±0.4)
No. of CL frozen cycles	19 (4.3±1.0)	0
No. of BL frozen cycles	8 (1.4±0.5)	0
No. of CL and BL frozen cycles	2 (4±1.4/1±0)	0
No. of PN and BL frozen cycles	0	12 (3.3±0.5/1.3±0.7)
No. of FT-ET cycles in the non-pregnant cycles*	11/15	28/34
No. of FT-ET cycles in the delivered cycles†	3/14	3/18
Cancelled FT-ET cycles	3‡	1§
Frozen-thawed cycles with next fresh cycles	2	0
No. of FT-ET cycles	9	30

Values are presented as mean±SD or number (%).

PN, pronuclear stage; CL, cleavage embryo; BL, blastocyst; FT-ET, frozen-thawed ET.

\*No. of FT-ET cycles in subsequent cycles and the frozen cycles among the non-pregnant cycles after fresh ET.

†No. of FT-ET cycles in subsequent cycles and the frozen cycles among the delivered cycles after fresh ET.

‡Thawed blastocysts were all dead, §Thawed embryos were all arrested.

Myo Kyung Kim. Effect of Cryopreservation of Sibling 2PN Zygotes on Cumulative Delivery Rates in the Human IVF-ET Program. Korean J Reprod Med 2010.

**Table 5.** Outcomes of the FT-ET cycles and cumulative delivery rates

	Group I	Group II	p
No. of fresh IVF-ET cycles	86	52	
No. of embryo-frozen cycles	29 (33.7)	52 (100)	<0.01
No. of FT- ET cycles	9	30	
Clinical pregnancy rates in FT-ET*	6 (66.7)	10 (33.3)	NS
Cumulative delivery rates (per started cycle)	36+6 (48.8)	18+8 (50.0)	NS

Values are presented as mean±SD or number (%).

FT-ET, frozen-thawed embryo transfer; IVF-ET, *in vitro* fertilization-embryo transfer; NS, no statistical significance ( $p>0.05$ ).

\*Fisher's exact test.

Myo Kyung Kim. Effect of Cryopreservation of Sibling 2PN Zygotes on Cumulative Delivery Rates in the Human IVF-ET Program. Korean J Reprod Med 2010.

Greco<sup>13</sup>이 전핵 내 인의 분포 형태에 따른 전핵 배아의 질을 판단하는 기준을 제시하기도 하였지만, 난할 단계에서 배아의 질을 판단하는 것 보다는 그

예후가 떨어진다는 연구 결과를 보여주었다. 이와 같이 전핵 단계에서의 동결은 해동 후 높은 생존율을 기대할 수 있으나, 동결 당시 배아의 발달능력

을 판단하기 어려운 점이 있다.<sup>13</sup> 그러나, 불임 환자의 관점에서 볼 때 전핵 단계에서의 배아 동결은 적어도 두 번 이상의 배아이식 기회를 제공받을 수 있다는 장점을 가지고 있다.

본 연구 결과에서는 Group I의 경우 신선배아이식주기에서 모든 수정란을 배양한 후 선별하여 이식하였기 때문에 Group II에 비해 양질의 배아를 이식하였고, 통계적으로 유의하게 더 많은 배아를 이식할 수 있었다. 따라서 더 높은 임신율과 분만율을 나타낼 것이라고 예상하였으나, Group II에 비하여 높은 분만율을 보이기는 하였지만, 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 두 군간에 이식 배아 개수를 보정하여 분석하였을 때도 동일한 결과를 얻을 수 있었다. Group I의 경우 배아이식 후 남은 배아의 경우 동결 가능성이 불확실하기 때문에 (본 연구실에서는 grade II 이상의 배아가 있을 경우에만 이식 후 남은 배아를 분할 또는 포배기 단계에서 동결 실시), 전체 86주기 중 29주기에서만 동결보관이 시행된 반면, Group II에서는 우선 전핵 단계에서 일부 동결을 실시하였기 때문에 50주기 모두 동결란을 보관할 수 있었다. 따라서 처음의 신선주기에서 임신을 실패하거나, 분만 후 둘째 아이를 임신하기 위한 경우, Group II에서 더 많은 배아이식 기회를 가질 수 있었다.

동결-해동 이식주기에서 Group I의 경우 배아의 동결이 난할과 배반포 단계에서 이루어졌으며, 동결-해동 후 생존율은 난할 단계 배아의 경우 88.9%, 포배기 배아의 경우 50%를 나타냈다. Group II의 전핵 단계에서 동결한 경우 91.7%, 포배기 배아의 경우 40%의 생존율을 보였다. 동결-해동 배아이식 주기에서 이식 배아 개수는 Group I이 평균  $3.0 \pm 0.7$ 개, Group II에서는  $2.9 \pm 0.6$ 개로 통계적으로 유의한 차이는 없었으나, 동결-해동 배아이식 주기에서도 신선배아 이식주기와 마찬가지로 Group I에서 보다 양질의 배아가 이식되었다 ( $2.6 \pm 1.4$  vs.  $1.7 \pm 1.2$ ). Group I의 동결 난할 배아는 배양 3일째에 발달능을 확인한 양질의 배아 (grade II 이상)이기 때문에 동결-해동 배아이식 주기에서 전

체적으로 높은 임신율을 기대할 수 있었다고 생각된다. Group I과 II에서 전체적인 동결-해동 배아이식 주기의 분만율에 통계적인 차이는 없었으나, 각각 발달 단계가 다른 배아가 동결된 후 해동, 이식되었으므로 배아의 발달차이에서 오는 임신율의 차이를 배제할 수 없어, 그 결과에 대해 직접적으로 비교하기에는 한계가 있다.

본 연구 후, Group I은 환자의 동의 하에 동결된 배아가 폐기된 경우가 4주기 있었으며, 앞으로 동결-해동 배아이식이 가능한 주기는 11주기 (11/86, 12.8%)였다. Group II에서는 임신 등을 이유로 환자의 동의 하에 폐기한 10주기를 제외하면 11주기 (11/52, 21.2%)에서 동결 배아가 보관되어 있어 향후 임신을 시도할 수 있는 것으로 파악되었다. 따라서 Group II의 이식 전략은 한 번의 과배란 유도를 통해 적어도 두 번 이상의 이식 기회를 가지게 됨으로써 환자의 심리적인 안정뿐만 아니라, 과배란 유도에 따른 경제적 부담을 줄여 줄 수 있는 장점이 있다.

시험관 아기 시술에 있어서 적절한 수의 배아이식은 매우 중요한 단계이며, 당 주거나 환자 개개인의 특성을 통해 결정지을 수 있다.<sup>14,15</sup> 여러 연구자들에 의하면, 동결-해동 배아이식 주기의 결과는 해당 동결-해동 배아가 유래한 신선주기의 여러 가지 요인 (여성의 나이, 동결 방법, 수정 방법, 배아의 발달 단계, 동결 당시의 배아의 질과 해동 후 할구의 생존율 또는 세포분열 재개 여부)에 의해 영향을 받을 수 있으며, 또한 신선 배아 이식주기에서의 임신 여부나 임신 경험 여부가 다음 동결-해동 이식주기의 임신 결과와 관련이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>16~19</sup> 최근 Prades 등<sup>20</sup>은 1개의 난할 단계의 배아 동결이 누적 임신율을 증가시킬 수 있는지에 대한 후향적인 연구에서, 그렇지 못하다는 결론을 내렸으며, 여러 개의 동결란을 가진 경우에는 누적 임신율을 올릴 수 있다고 보고하였다. Home 등<sup>21</sup>도 수정이 많이 된 경우에는 전핵 단계에서의 동결이 누적 임신율을 높이지만 수정란이 4개 미만일 경우에는 모두 배양하여 이식하는 것이

높은 임신율을 기대할 수 있다고 보고하였다.<sup>4</sup> 이는 본 연구의 결과에서도 전핵 단계 배아 3개만을 동결-해동한 군과 그 이상의 수의 동결 배아를 가진 동결-해동 주기를 비교한 결과, 4개 이상의 전핵 단계 배아를 동결-해동 이식한 군에서 임신율이 다소 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (data not shown). 따라서 과배란 후 생성된 수정란의 동결을 결정할 때, 신선주기의 여러 가지 주요 요인들과 전 주기에서 관찰된 배아의 발달 예후 등을 고려하여 동결 유무와 동결 배아의 수 등을 결정하는 것이 매우 합리적일 것으로 생각된다. 최근에는 난할 단계에서의 이식보다 포배기까지 배양 후 가장 양질의 배아를 한 개 또는 두 개만을 이식한 임상 결과를 많이 보고하고 있다.<sup>22~24</sup> 따라서, 동결-해동 배아이식 주기에서도 포배기 배아이식을 통한 임신율 향상에 대한 연구가 검토되어야 할 것으로 생각된다.

결론적으로 본 연구에서 적은 수의 수정란 (10개 미만의 수정란)을 얻은 환자군에서 일부 전핵 단계의 동결보관이 누적 분만율을 향상시키는 효과를 확인할 수 없었다. 이는 한 번의 동결-해동 배아이식까지의 누적 분만율만이 비교되었고, 두 군의 신선주기 배아이식에서의 이식 후 배아 동결의 생성 유무나 동결 단계가 결과적으로 분만율에 영향을 미칠 수 있다는 점 등 각 군의 임상적 특성을 고려할 때, 두 이식 전략에서 단순히 누적 분만율에 차이가 없다는 것으로 결론을 내리기에는 한계가 있다고 생각된다. 그러나, 수정란 개수가 적은 체외수정 및 배아이식 주기에서도 일부 전핵 단계의 배아 동결보관이 환자에게 있어 해당 주기에서 임신을 실패하였을 경우, 추가적인 이식 기회를 제공함으로써 환자의 임신 실패에 대한 부담을 덜어 줄 수 있다는 장점이 있으므로, 불임 환자의 심리적, 경제적 상황이나, 체외수정 과정의 여러 인자들을 고려하여, 배아이식 전략의 하나로 고려해 볼 수 있을 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Schnorr JA, Doviak MJ, Muasher SJ, Jones HW Jr. Impact of a cryopreservation program on the multiple pregnancy rate associated with assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 2001; 75: 147-51.
2. Tiitinen A, Husa LM, Tulppala M, Simberg N, Seppala M. The effect of cryopreservation in prevention of ovarian hyperstimulation syndrome. *Br J Obstet Gynaecol* 1995; 102: 326-9.
3. Wang JX, Yap YY, Matthews CD. Frozen-thawed embryo transfer: influence of clinical factors on implantation rate and risk of multiple conception. *Hum Reprod* 2001; 16: 2316-9.
4. Kim MK, Choi SJ, Choi HW, Bang KH, Kim HO, Yang KM, et al. Pregnancy and implantation rates related to serum estradiol concentration of controlled ovarian hyperstimulation in fresh IVF-ET and frozen-thawed ET cycles. *Korean J Reprod Med* 2007; 34: 197-205.
5. Ubaldi F, Rienzi L, Baroni E, Ferrero S, Iacobelli M, Minasi MG, et al. Cumulative pregnancy rates after transfer of fresh and thawed embryos. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; 115 Suppl 1: S106-9.
6. Senn A, Vozzi C, Chanson A, De Grandi P, Germond M. Prospective randomized study of two cryopreservation policies avoiding embryo selection: the pronucleate stage leads to a higher cumulative delivery rate than the early cleavage stage. *Fertil Steril* 2000; 74: 946-52.
7. Salumets A, Tuuri T, Makinen S, Vilska S, Husu L, Tainio R, et al. Effect of developmental stage of embryo at freezing on pregnancy outcome of frozen-thawed embryo transfer. *Hum Reprod* 2003; 18: 1890-5.
8. Surrey E, Keller J, Stevens J, Gustofson R, Minjarez D, Schoolcraft W. Freeze-all: enhanced outcomes with cryopreservation at the blastocyst stage versus pronuclear stage using slow-freeze techniques. *Reprod Biomed Online* 2010; 21: 411-7.
9. Choi SJ, Lee SH, Song IO, Koong MK, Kang IS, Jun JH. Efficacy of frozen-thawed ET in patients with old age or non-pregnant in fresh ET cycles. *Korean J Fertil Steril*. 2006; 33: 237-43.
10. Anderson AR, Weikert ML, Crain JL. Determining the most optimal stage for embryo cryopreservation. *Reprod Biomed*



- Online 2004; 8: 207-11.
11. Dowling-Lacey D, Mayer JF, Jones E, Bocca S, Stadtmauer L, Oehninger S. Live birth from a frozen-thawed pronuclear stage embryo almost 20 years after its cryopreservation. *Fertil Steril*. In press 2010.
  12. Veeck LL, Amundson CH, Brothman LJ, DeScisciolo C, Maloney MK, Muasher SJ, et al. Significantly enhanced pregnancy rates per cycle through cryopreservation and thaw of pronuclear stage oocytes. *Fertil Steril* 1993; 59: 1202-7.
  13. Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* 1999; 14: 1318-23.
  14. Stern JE, Goldman MB, Hatasaka H, MacKenzie TA, Surrey ES, Racowsky C. Optimizing the number of cleavage stage embryos to transfer on day 3 in women 38 years of age and older: a Society for Assisted Reproductive Technology database study. *Fertil Steril* 2009; 91: 767-76.
  15. Veeck LL. Does the developmental stage at freeze impact on clinical results post-thaw? *Reprod Biomed Online* 2003; 6: 367-74.
  16. Gabrielsen A, Fedder J, Agerholm I. Parameters predicting the implantation rate of thawed IVF/ICSI embryos: a retrospective study. *Reprod Biomed Online* 2006; 12: 70-6.
  17. Lin YP, Cassidenti DL, Chacon RR, Soubra SS, Rosen GF, Yee B. Successful implantation of frozen sibling embryos is influenced by the outcome of the cycle from which they were derived. *Fertil Steril* 1995; 63: 262-7.
  18. Schalkoff ME, Oskowitz SP, Powers RD. A multifactorial analysis of the pregnancy outcome in a successful embryo cryopreservation program. *Fertil Steril* 1993; 59: 1070-4.
  19. Urman B, Balaban B, Yakin K. Impact of fresh-cycle variables on the implantation potential of cryopreserved-thawed human embryos. *Fertil Steril* 2007; 87: 310-5.
  20. Prades M, Golmard JL, Vauthier D, Lefebvre G, Poirot C. Can cumulative pregnancy rates be increased by freezing and thawing single embryos? *Fertil Steril* 2009; 91: 395-400.
  21. Horne G, Critchlow JD, Newman MC, Edozien L, Matson PL, Lieberman BA. A prospective evaluation of cryopreservation strategies in a two-embryo transfer programme. *Hum Reprod* 1997; 12: 542-7.
  22. 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.
  23. Malizia BA, Hacker MR, Penzias AS. Cumulative live-birth rates after in vitro fertilization. *N Engl J Med* 2009; 360: 236-43.
  24. Thurin A, Hausken J, Hillensjo T, Jablonowska B, Pinborg A, Strandell A, et al. Elective single-embryo transfer versus double-embryo transfer in in vitro fertilization. *N Engl J Med* 2004; 351: 2392-402.

## = 국문초록 =

**목 적:** 본 연구에서는 10개 이하의 2PN 접합자를 얻은 환자군에서 전핵 단계 배아의 동결보관이 누적 분만율을 증가시키는 지를 살펴보고자 하였다.

**연구방법:** 2003년 1월부터 2007년 12월까지 제일병원 아이소망센터를 내원하여 과배란 유도에 의해 체외수정 및 배아 이식술을 시행한 주기를 후향적으로 비교 분석하였다. 본 연구에서는 일반적 체외수정법 또는 세포질내 정자주입술을 이용하여 수정을 시도한 후 20~22시간에 8개의 수정란을 확인하거나, 또는 전핵이 1개만 보이는 접합자와 발달 지연 배아를 포함하여 수정란이 10개 미만인 138주기의 체외수정 및 배아이식 주기를 대상으로 분석하였다. 분석 대상을 두 군으로 나누었으며 그룹 I (n=86)은 배아의 동결 없이 모든 수정란을 배양하여 3일째 이식한 군으로 하였으며, 그룹 II (n=52)는 전핵 시기에 일부 수정란을 동결하고 나머지를 배양하여 3일째 이식한 군으로 분류하였다. 두 군간 신선배아 이식주기와 그 다음 동결-해동 이식주기 후의 임상적 임신율과 누적 임신율을 각각 비교하였다.

**결 과:** 비교 대상군 사이에 여성의 평균 나이, 획득 난자의 수 및 수정란의 수에서는 통계적 차이를 보이지 않았다. 배양된 배아의 수는 그룹 II ( $5.2 \pm 0.5$ )가 그룹 I ( $8.4 \pm 0.7$ )에 비하여 유의하게 적었다 ( $p < 0.01$ ). 또한 이식한 배아의 수 역시 그룹 II ( $3.3 \pm 0.6$ )가 그룹 I ( $3.6 \pm 0.6$ )에 비하여 통계적으로 유의하게 적었다 ( $p < 0.01$ ). 신선주기 배아이식에서  $\beta$ -hCG 양성을 보인 환자 수와 분만을 한 환자의 수는 그룹 I이 그룹 II에 비하여 약간 높은 양상을 보였다 (51.2 vs. 46.2% and 41.9 vs. 34.6%). 동결-해동 배아이식 후 누적 분만율을 비교하였을 때 그룹 I (48.8%)과 그룹 II (50.0%)에서 통계적으로 유의한 차이를 관찰할 수 없었다.

**결 론:** 적은 수의 수정란을 얻은 환자군에서 일부 전핵 단계에서의 동결보관이 누적 분만율을 향상 시키는 효과를 확인할 수 없었다. 그러나 일부 수정란의 동결보관은 해당 신선주기에서 임신에 실패하였을 경우 환자에게 추가적인 배아이식 기회를 제공해 줄 수 있는 장점을 가지고 있는 것으로 생각된다.

**중심단어:** 동결보관, 전핵 시기 배아, 동결-해동 배아이식, 누적 분만율