

항동해제에 따른 생쥐 동결수정란의 생존율 및 체외발달율

순천향대학교 의과대학 산부인과학교실

차상현 · 선우재근 · 박효숙 · 이임순 · 조태호

Survival and In Vitro Development Rate of Frozen Mouse Embryos in Various Cryoprotectants

Sang Hun Cha, M.D., Jae Gun Sunwoo, M.D., Hyo Suk Park, M.D.,
Im Soon Lee, M.D. and Tai Ho Cho, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, Soonchunhyang University

= Abstract =

This study was carried out to clarify the effects of various kinds of cryoprotectants which were frequently used in freezing embryos of domestic animals on the survival of frozen-thawed mouse embryos.

Mouse embryos were collected by hyperstimulation induction of ICR mouse. The samples were slowly cooled (1°C/min) to temperatures between -7°C and -30°C before direct transfer to liquid nitrogen (-196°C) and thawed rapidly (-500°C/min).

As cryoprotectants, Glycerol, DMSO, Ethylene glycol and Propylene glycol were used and applied each 2 cell, 8 cell, morula in embryo stage.

After normal mouse embryos developed to blastocyst by in vitro culture, we observed recovery rate and developing rate of embryos at thawing.

The results obtained in these experiments were as follows :

1. The in vitro development rate from the frozen-thawed 2 cell embryos to the blastocyst were 67.7% in ethylene glycol, 65.7% in Propylene glycol, 55.2% in glycerol and 50.0% in DMSO respectively.
2. The in vitro development rate from the frozen-thawed 8 cell embryos to the blastocyst were 83.6% in DMSO, 75.7% in glycerol, 52.2% in propylene glycol respectively.
3. The in vitro development rate from the frozen-thawed morula to the blastocyst were 84.2% in glycerol, 80.0% in DMSO, 66.6% in propylene glycol and 55.2% in ethylene glycol respectively.

서 론

수정란의 동결보존은 우수한 유전형질을 장기간 보존할 수 있다는 것과 시공을 어느정도까지는 초월할 수 있다는 장점을 지니고 있다. 또한 장기보존을 위하여는 난자의 분열을 정지시킬 뿐 아니라 난자의 생리작용을 대폭감소 혹은 거의 완전히 정지시키지 않으면 안된다.

이러한 목적을 위한 방법으로는 아직까지 동결보존의 방법 이외에는 다른 방법이 없다.

1776년 Spallanzani가 처음으로 종마의 정자의 동결을 시도한 이래 많은 분야에서 동결방법이 연구되어지고 발전되어 왔다. 1983년 Alan Trounson과 Mohr에 의하여 배아동결보존 후 자궁내에 이식함으로써 최초로 사람에서 임신이 성공하였다.

Whittingham (1972) 등이 생쥐수정란을 동결

보존하는데 성공한 이래 각종 동물에 있어서 수정란의 동결보존에 관한 실험이 다수 실시되어 적절한 동결-융해 속도와 적합한 항동해제의 사용이 성공의 요체라는 결론을 얻었다. 초기에는 완만-완만융해만 가능하다고 믿었으나 최근에는 완만-급속, 급속-급속, 초급속-급속 등의 방법이 가능하다는 보고가 제출되고 있다.

항동해제로는 DMSO가 주로 사용되었으나 근래들어 그 외에도 glycerol이나 methanol, ethylene glycol, propylene glycol등도 좋은 결과를 가져온다는 보고가 있으며 sucrose 첨가유무에 따른 결과도 보고되고 있다.

이러한 연구결과들을 바탕으로 저자들은 IVF 혹은 GIFT등의 human infertility program에서 남은 잉여 난자의 동결보존에 필요한 기초지식을 습득할 목적으로 생쥐수정란을 사용하여 각 배아기와 항동해제의 종류가 동결수정란의 생존성에 미치는 영향을 검토하고자 실험하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) 공시동물

동일한 환경에서 사육된 20-25gm된 3-4주령의 ICR계통의 암컷생쥐와 생식능이 확인된 10-14주령의 수컷생쥐를 사용하였다. 물과 사료는 무제한 공급하였다.

2) 배양액

수정란의 회수 및 보존에 사용된 배양액은 Ham's F-10을 사용하였고 배양에는 T₆ 배양액을 사용하였다. 두 배양액을 PH 7.4, 삼투압은 280-285mOsm로 조정하였으며 혈청은 BSA (3mg/ml)를 사용하였고 millipore filter로 여과하여 사용하였다.

3) 과배란유도 및 수정란 회수

과배란을 유도하기 위하여 PMSG (Pregnant mare serum gonadotropin)를 5IU를 복강내에 주사한 48시간후에 hCG (human chorionic gonadotropin)를 동량 복강내에 주사한후 1:1의 비율로 융성과 합사하여 교배를 유도하였다. 다음날 오전에 질전 (vaginal plug)의 유무를 확인하여 교배의 유무를 판정하여 질전이 있는 것만을 골라 실험에 사용하였다. 질전이 확인된 후 24시간, 48시간, 72시간, 86시간째에 경추분리법 (cervical dislocation method)을 이용하여 2세포기, 4세포기, 8세포기, 포배기의 배

아를 획득하였는데 (그림 1, 2, 3, 4) 난관이나 자궁을 외과적으로 적출하여 배양액이 담겨있는 organdish or petri dish에 넣어 관류법 (flushing method)을 사용하여 회수하였다.

2. 실험방법

1) 항동해제의 첨가

항동해제로는 1.5M DMSO, glycerol, propylene glycol, ethylene glycol과 0.1M의 sucrose를 사용하였다. 각각의 항동해제는 petri dish내에 미리 주입된 0.5ml배양액에 수정란을 옮긴 후, 3M의 각 항동해제를 5단계로 나누어 첨가하여 실온에서 각 항동해제가 1.5M이 되도록 평형 처리하였다.

2) 수정란의 동결

항동해제로 처리된 수정란을 0.5ml plastic straw에 5-10개씩 주입하여 straw powder로 밀봉한 후 programmable freezer (Osaka Sanso Co., Japan)에 장착하여 동결시켰다. 실온에서 -7°C까지는 1°C/min의 속도로 완만냉각 하였고 -7°C에서 식빙 (seeding)을 하고 10분간 지속시켰다. 그후 -30°C까지는 0.5°C/min의 완만한 속도로 냉각시켰으며 -80°C까지는 25°C/min로 냉각시킨 후 -196°C 액체질소에 침적하여 24시간 이상 보관하였다.

3) 동결수정란 융해

액체질소내에 보존된 straw를 37°C 항온조 (water bath)에 평형을 유지하면서 침적시켜 급속융해 (500°C/min)하였다.

4) 항동해제의 제거

5단계법으로 petri dish에 1.5M 항동해제 농도의 배양액 0.1ml를 담은 후 융해된 수정란을 넣고 그위에 배양액을 5단계로 나누어 첨가시켰다. 이후 항동해제가 전혀 없는 신선한 배양액에 옮긴 후 2회 세척하였다.

5) 시험관내 배양

T₆ 배양액이 담긴 petri dish에 동결융해되어 손상을 입지 않았다고 판단되는 2세포기에서 72시간 이상, 4세포기에서 60시간 이상, 8세포기에서 48시간 이상, 포배기에서 12시간이상씩 37°C 5% CO₂ 배양기에서 배양시킨 후 수정란의 발달상태를 관찰하였다.

결 과

각각의 세포 stage에 따른 항동해제를 사용하여 그들의 동결과 융해에 대한 결과를 분석

Table 1. Effects of various cryoprotectants at the survival of mouse embryos following freezing and thawing

Cryoprotectants	Embryo stage	No. of frozen embryos	No. of recovered embryos at thawing(%)
1.5M DMSO	2 cell	46	26 (56.5)
	8 cell	65	55 (84.6)
	morula	35	25 (71.4)
	Total	146	106 (72.6)
1.5M Glycerol	2 cell	55	29 (52.7)
	8 cell	52	37 (71.1)
	morula	43	38 (88.4)
	Total	150	104 (69.3)
1.5M Ethylene Glycol	2 cell	54	31 (57.4)
	8 cell	40	22 (55.0)
	morula	45	29 (64.4)
	Total	139	82 (59.0)
1.5M Propylene Glycol	2 cell	50	35 (70.0)
	8 cell	45	23 (51.1)
	morula	45	24 (53.3)
	Total	140	82 (58.6)

하였다.

1. 항동해제 종류별로 본 동결 용해 후 수정란의 회수율

항동해제로 1.5M DMAO를 사용하였을 경우에는 동결 용해후 수정란의 회수율이 2세포기, 8세포기및 상실배기에 각각 56.5, 84.6및 71.4%로 전체로는 총 146개중 106개 (72.6%)였다. 1.5M Glycerol을 사용하였을 경우에는 동결 용해 후 수정란의 회수율이 2세포기, 8세포기및 상실배기에 각각 52.7, 71.1및 88.4%로 전체로는 총 150개중 104개 (69.3%)였다.

항동해제로 1.5M Ethylene glycol을 사용하였을 경우에는 수정란의 회수율은 2세포기, 8세포기및 상실배기에 각각 57.4, 55.0및 64.4%로 전체로는 총 139개중 82개 (59%)였다. 한편 1.5M propylene glycol을 사용하였을 경우에는 2세포기, 8세포기및 상실배기에 70.0, 51.1및 53.3%로 전체로는 총 140개중 82 (58.6%)였다 (표 1).

2. 항동해제 종류별로 본 동결 용해후 포배기로 배양된 수정란의 생존율

1.5M DMSO를 사용해서 동결 용해후 배양하

Table 2. Effects of various cryoprotectants at the survival of mouse embryos following freezing and thawing

Cryoprotectants	Embryo stage	No. of recoverd embryos at thawing	No. of embryos developed to blastocyst (%)
1.5M DMSO	2 cell	26	13 (50.0)
	8 cell	55	46 (83.6)
	morula	25	20 (80.0)
	Total	106	79 (74.5)
1.5M DMSO	2 cell	55	29 (52.7)
	8 cell	52	37 (71.1)
	morula	43	38 (88.4)
	Total	150	104 (88.4)
1.5M Ethylene Glycol	2 cell	31	21 (67.7)
	8 cell	22	14 (63.6)
	morula	29	38 (84.2)
	Total	82	51 (62.2)
1.5M Propylene Glycol	2 cell	35	23 (65.7)
	8 cell	23	12 (52.2)
	morula	24	16 (66.6)
	Total	82	51 (62.2)

였을 경우 포배기로의 정상적인 발달정도는 2세포기, 8세포기및 상실배기에서 50.0, 83.6및 80.0%로 전체로는 총 106개중 79개 (74.5%)였고, 1.5M glycerol을 사용하였을 경우에는 2세포기, 8세포기및 상실배기에서 55.2, 75.7및 84.2%로 전체로는 총 104개중 76개 (73.1%)였다.

항동해제로 1.5M ethylene glycol을 사용해서 동결 용해후 배양하였을 경우 포배기로의 정상적인 발달정도는 2세포기, 8세포기및 상실배기에서 67.7, 63.6및 55.2%로 전체로는 총 82개중 51개 (62.2%)였다.

한편 1.5M propylene glycol을 사용하였을 경우에는 2세포기, 8세포기및 상실배기에 65.7, 52.2및 66.6%로 전체로는 총 82개중 51개 (62.2%)였다 (표 2).

항동해제 종류별로 본 동결 용해후 수정란 회수율은 2세포기에서는 1.5M의 propylene glycol이 70.0%로 가장 성격이 좋았으며, 8세포기에서는 1.5M의 DMSO 84.6%로, 상실배기에서는 1.5M glycerol이 88.4%로 각각 가장 좋은 결과를 나타내었다.

고 찰

미수정란과 수정란의 동결보존은 1787년 Spallazani가 곤충을 대상으로 -7°C 에서 보존한 이래 많은 실험에 의하여 발전을 거듭하여 왔다. 인간에서도 IVF program이 성행되면서 이식하고 남은 수정란의 보존처리가 문제시 되어 인간 수정란의 동결을 시도하게 되었고 1983년 Tronson에 의해 세계 최초로 냉동보관법이 시도되었으며 몇몇의 클리닉에서 냉동수정란에 의한 임신 출산의 성공이 보고되고 있다.

1970년 중반에 Edward에 의한 인간 수정란 동결보존의 첫시도가 실패하였으나 1971년 Whittingham에 의하여 처음으로 포유동물 즉 쥐의 배아에서 임신이 성공하였고 1983년 Alan Tronson과 Mohr에 의하여 사람에서 최초로 임신에 성공하였다. 1984년 Zeilmaker등에 의하여 첫 쌍태아의 분만성공이 있었고 1985년 Cohen등은 glycerol을 이용한 포배기의 냉동보존 후 분만이 성공되었다. 동결보존을 시행한 세포조직은 빙점이하에서 생물학적 생리적, 생화학적으로 많은 변화가 일어나게 되어 대사율은 최저상태로 되며 이러한 변화들은 동시에 여러상태로 나타나므로 구별하여 분석하기도 상당히 어려우나 이런것들을 알아내어 세포조직의 변화를 줄임으로써 배아생존율을 높게 할 수 있다.

동물동결보존기술의 주용한 변이의 하나는 Willadsen에 의하여 이루어졌는데 수정란을 액체질소속에 직접 넣기전에 -30°C 에서 -40°C 의 비교적 높은 영하온도까지 분당 -0.1°C 에서 -0.5°C 의 완만동결을 한후 급속융해하는 방법이다.

동결융해 방법에 있어서 가장 중요한 요인으로는 동결융해속도와 적합한 항동해제의 사용을 들 수 있다. 항동해제의 구비조건으로 중성 물질이면서 친수성이 강한 glycerol이나 DMSO (dimethyl sulfoxide)같은 화학구조중 hydrogen bond를 만들기 쉬운 그룹을 가지고 있어야 하며 세포막에 대한 투과성이 좋아야하고 세포에 대한 독성이 적어야하는데 본 실험에서는 이와 같은 조건을 고려하여 DMSO, ethylene glycol, propylene glycol, glycerol을 사용하게 되었다.

배아동결보존법의 방법으로는 동결 및 해빙 속도에 따라 완만냉각-완만융해, 완만냉각-급속융해, 초급속냉각-급속융해, 유리화현상등으로 크게 나눌 수 있으며 수정란의 동결연구가 시작된 후 1971년 polyvinyl pyrrolidone을 사용하여 생쥐배동결보존의 가능성이 시사되었다. 이어 DMSO로 생쥐배아를 다른 모체에 이식하

여 생존성을 얻는 Whittingham의 동결융해법을 기초로 연구되어지고 있다. 이 연구에서는 완만냉각과 급속융해를 사용하였는데 적절한 slow cooling rate는 필요한 세포내 용매의 농도를 유지하면서, 온도가 떨어지면서 발생하는 빙점형성을 방지시킬 수 있다.

배아냉동보존법의 필요성으로는 첫째 체외수정과 수정란이식 시행시 남게된 수정란 혹은 전배아의 보존에 필요하며 둘째, 자연월경주기에서의 자궁내 착상이 체외수정과 수정란이식을 시행하는 과배란 유도주기보다 착상이 순조롭기 때문에 임신성공의 가능성이 높아진다는 점과 셋째, 난자채취를 하기위해 시도되는 여러차례의 수술을 피할 수 있다는 점이다.

본 실험에서는 Miyamoto와 Ishibashi와 Rall과 Polge가 좋다고한 완만냉각후 급속융해법을 실시하였는데, 아직도 특별히 정해진 방법은 없는 실정이다.

동결및 해빙과정에서 세포에 손상을 일으킬 수 있는 원인으로는 해빙시에 일어나는 재결빙 현상에 의한 물리적 손상과 결빙억제제의 이동에 따른 삼투압의 변화와 전해물질의 응고에 대한 완충제 역할의 상실로 인한 급격한 pH의 변화, 배양액에 녹아 있던 탄산가스가 해빙시에 온도가 올라감에 따라 탄산가스에 용해도가 낮아져서 생기는 기포화현상 등을 들 수 있다.

해동된 배아의 생존여부는 동결전배아의 모양과 해동후의 모양을 비교하고 색깔, 분열여부, 투명대의 보존상태들을 관찰하여 판정한다. 배아의 팽창 및 원상회복여부에 따라 판별하기도 하며 배양기에서 해동후 배양하여 세포분열 현상여부로도 알 수 있으며 그외에 fluorescein diacetat염색을 하여서도 세포막 투과성여부로 생존여부를 결정할 수 있다.

인간의 수정란 동결보존에서 오스트레일리아 방법에서는 4-8세포기 동결에서와 마찬가지로 DMSO를, 영국방법에서는 포배기에서 glycerol을 이용한 방법이 적합하고, 1세포기와 2세포기 수정란에서는 propylene glycol의 사용이 가장 적합하다고 한다.

Testart등은 체외수정 2일의 수정란보다 1일의 수정란에서 동결보존에 따른 생존율이 더 좋다고 하였고, 2일의 수정란중 2및 4세포기는 1일의 수정란과 비슷한 생존율을 보인다고 하였다. 그리고 지수의 할구를 가진 수정란(2및 4세포기)이 중간세상태의 수정란(3, 5및 6세포기)보다 더 나은 결과를 보일 수 있다고 하

었다. 이것은 아마도 핵의 중간기(interphase stage)가 동결에 더 좋은 조건을 부여해주며 할구(blastomere)의 서로 다른 세포막 안정성과도 관련이 있는 듯하다고 하였다. 그러나 8세포기 수정란에서는 이 가설이 적용되지 않으며 propylene glycol은 4세포기가 지나면 적합한 항동해제가 되지 못한다.

냉각속도에 영향을 미치는 인자로는 결빙억제제의 투과력(permeability) 배아세포 표면적의 크기(cell surface), 세포의 용적 등을 들 수 있다. 그러므로 이러한 원인들을 미연에 방지하거나 가급적 변화를 줄임으로써 배아생존율을 높일 수 있다.

본 연구에서는 과거로부터 연구되었던 항동해제를 가지고 연구한 결과 즉 융해시 배아의 회복율과 포배기로 발달된 배아의 수가 다른 논문에서 발표된 것보다는 비교적 낮은 편이었으며 그것은 작업환경과 생쥐의 사육환경등이 원인이라고 볼 수 있으며 또한 계절적으로 더운 여름에 이 실험을 시행했다는 점과 기술상의 문제점등도 고려할 수 있다.

본 연구에서는 과거로부터 연구되었던 항동해제를 가지고 연구한 결과 즉 융해시 배아의 회복율과 포배기로 발달된 배아의 수가 다른 논문에서 발표된 것보다는 비교적 낮은 편이었으며 그것은 작업환경과 생쥐의 사육환경등이 원인이라고 볼 수 있으며 또한 계절적으로 더운 여름에 이 실험을 시행했다는 점과 기술상의 문제점등도 고려할 수 있다.

결론적으로 연구성작으로 포배기로 발유가능한 배아의 비율은 2세포기에서는 각각의 항동해제가 모두 통계학적인 유의성이 없었으며, 8세포기에서는 1.5M propylene glycol의 결과가 가장 낮았고 다른 항동해제와 비교하여 볼때 통계학적 유의성을 보였고, 상실배기에서는 1.5M의 ethylene glycol이 가장 낮은 결과를 보여 다른 항동해제에 비해 통계학적 유의성을 보였다. 이 결과는 cohen등이 주자안 DMSO propylene glycol들은 비슷한 세포막 투과력을 가지고 있어서 8세포기 미만의 배아동결에 적당하며 DMSO는 4-8세포기에 적당하며 glycerol은 포배기의 배아동결에 적당하다는 보고와 거의 일치한다고 볼 수 있다.

수정란 및 미수정란의 동결보존은 앞으로도 많은 과제를 눈앞에 두고있으며 특히 기술상의 문제점 항동해제의 보다 깊은 연구등 동물배아를 이용하여 반복적으로 여러가지 동결방법을

비도하여 가장 나은 방법을 발견해 내는 노력이 필요하다. 수정란의 동결보존 프로그램에 대한 연구들이 활발하게 진행되고 있으나 특별한 정설이 없으므로 앞으로도 계속 연구하여 보편화될 수 있기를 기대한다.

결 론

본 실험은 항동해제에 따른 동결수정란의 생존율 및 체외발달율을 알아보고 각 배아기에 대한 항동해제의 영향을 규명하고자 한다.

ICR 계통의 생쥐에 과배란을 유도하여 얻은 수정란의 2세포기, 8세포기 및 상실배기에 각각의 항동해제를 5단계로 나누어 첨가하여 동결시킨 후 적어도 24시간이상 액화질소(-196°C)에 보관한 후 급속융해시켜 37°C, 5%CO₂배양기에서 포배기로 배양시킨 후 포배기로 발육한 배아의 수를 비교하여 각 배아기별 항동해제의 효과를 관찰하였다.

1. 각 배아별 항동해제의 효과를 보면 2세포기에서 배양에 의해 포배기로 발유된 배아의 비율은 1.5M ethylene glycol이 67.6%로 가장 높았고 1.5M propylene glycol이 65.7%, 1.5M glycerol이 55.2%였고 1.5M의 DMSO가 50.5%로 가장 낮았으며 양군사이에 통계학적인 유의성은 없었다.

2. 8세포기에서 배양에 의해 포배기로 발육된 배아의 비율은 1.5M의 DMSO가 83.6%로 가장 높았고 1.5M glycerol이 75.7%, 1.5M ethylene glycol이 63.6%였고 1.5M의 propylene glycol이 52.2%로 가장 낮았다. 그러나 단지 DMSO의 propylene glycol만이 통계학적인 유의성이 있었다.

3. 상실배기에서는 1.5M glycerol이 84.2%로 가장 높았고 1.5M DMSO가 80.0%, 1.5M propylene glycol이 66.6%였고, 1.5M ethylene glycol이 55.2%로 가장 낮았다. 각각의 항동해제중 단지 glycerol과 ethylene glycol만이 통계학적인 유의성이 있었다.

인 용 문 헌

- Ashood-smith MJ : Review-The cryopreservation of human embryos, Human reproduction. 1986, 1, 319.
Cohen J, Simons RF, Edwards RG, Fehilly CB, Fishel SB : Pregnancies following the frozen

- storage of expanding human blastocysts. *J Vitro Fertil. Embryo Trans.* 1985, 2, 59.
- Kasai, M, Niwa K and A. Iritani : Effects of various cryoprotectants on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos, *J Reprod Fertil* 1981, 63, 175-180.
- Lassalle B, Testart J and Renard JP : Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1, 2 Propanediol. *Fertil Steril* 1985, 44, 645.
- 임경순 : 난자의 동결보존, 가축번식학 연구 pp 139, 한국가축번식 연구회 편집위원회 1985.
- Miyamoto H and Ishibashi T : Survival of mouse embryos frozen-thawed slowly or rapidly in the presence of various cryoprotants. *J Expl Zool* 1983, 226, 123.
- Parkers AS : Factors affecting the viability of frozen ovarian tissue. *J Endocrinol* 1985, 17, 337.
- Rall WF, Wood MJ, Kirby C and Whittingham DG : Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *J Reprod Fertil* 1987, 80, 449-504.
- Rall WF & Polge C : Effect of warming rate on mouse embryos frozen and thawed in glycerol. *J Reprod Fertil* 1984, 70, 285-292.
- Testart J, Lassalle, B, Froman R, Gazengel A, Belaish-Allart J, Hazout A, Rainhorn JD and 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 A Peura A and Kirby C : Ultrarapid freezing : a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertil Steril* 1987, 48, 843-850.
- Whittingham DG : Symposium on freezing of ova and embryosynopsis pattern : Freezing embryos of Laboratory species. *Cryobiol* 1978, 15, 367.
- Whittingham DG, Wood M, Farrant J, Lee J and Halsey JA : Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196°C. *J Reprod Fertil Steril* 1979, 56, 11-21.
- Willadsen SM : Factors affecting the survival of sheep embryos during deep-freezing and thawing. In the freezing of Mammalian Embryos, Edited by Elliott K and Whellan J Ciba Foundation. pp. 175, Excerpta Medica, Amsterdam 1977.
- Wilmot 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, 1071-1079.
- Zeilmaker GH, Alberda A.T., Van Gent I, Rijkmans CPM and Drogendijk AC : Two pregnancies following transfer of intact frozen thawed embryos. *Fertil Steril* 1984, 2, 293.