

Oocyte Quality: What does it mean and What determines it ?

제일병원 의학연구소 불임연구소
이 호 준

사람 난자의 성장과 성숙은 태아의 난소에서, 폐경기에 이르기까지 약 40년간 지속되는 과정으로써 난자형성과정(oogenesis)과 배란과정에 대하여 계속해서 연구되고 있다. 특히 최근 체외수정기술의 발달과 함께 사람 난자를 이용한 연구가 용이해짐에 따라 이와 관련된 연구들이 빠르게 진행되고 있다.

체외수정기술에서 임신률에 영향을 미치는 요인들로는 불임의 원인에 따라 조금의 차이는 있지만 대체로 과배란 유도방법, 난자의 질, 정자의 질, 배양의 조건, 배아의 상태, 이식방법 그리고 보조생식술의 적용 등을 들 수 있다. 특히 이 중에서 난자의 상태는 초기에 수정여부를 결정짓게 되는 요인이기 때문에 중요하다.

체외수정기술시 과배란 유도에 의해 획득되는 난자들은 자연적인 배란과정에 의해 성숙되는 난자와 차이가 없다고 보고되고 있으나, 최근의 과배란 유도방법의 발달과 함께 호르몬에 의해 유도된 많은 수의 난자들은 형태와 상태에 따라 여러 가지 종류로 다양하게 구분된다. 이러한 난자의 질을 결정하는 기준으로는 난자의 모양, 난구복합체, 극체의 존재 등 외형적인 기준과 현미경 시야에서 관찰된 난자의 전체적인 모양에 의해 난자의 질을 결정한다. 그러나 난자의 질은 성숙도에 따라 외형과는 많은 차이가 있으며 수정률과 발생률이 다르게 나타난다고 보고하고 있다.

본 장에서는 사람의 체외수정기술에 필요한 난자의 생성과 모양 그리고 질에 관해서 살펴보고 또한 사람 난자가 체외수정기술에 미치는 영향을 살펴보았다.

1. 난자의 성장(Oocyte Growth)

사람 난자는 태아에서 난포체가 임신 4-5개월시 수백만개의 작은 난포를 형성하여 7개월째 감수분열을 거쳐 최종적으로 diplotene 기에 이르게 된다. 이러한 난포들은 태어나서 일부의 난포들이 퇴화과정(atresis)을 거쳐 지속적으로 사라지며, 첫번째 생식주기에 이르기까지 난자는 성장하지 않고(non-growing) 멈춰 있게 된다. 사람의 난자는 태어날 때 약 2백만개의 난자를 가지고

있다고 보고하고 있는데 폐경기에 이를 때까지 난포들이 계속해서 사라지면서 적은 수의 난포만을 가지게 된다. 난자를 가지고 있는 난포의 수는 크게 두가지 비율로 사라지는데 첫째 37세를 전후로 지수학적으로 급격히 퇴화되어 25,000개의 난포수까지 감소하고 두번째는 51세를 전후로 1000개의 난포의 수까지 감소한다고 보고하고 있다.

난포가 성장하여 완전한 graafian 난포가 되기까지는 primordial 난포과정을 지나 primary, preantral, early antral, preovulatory 난포과정을 거쳐 배란하게 되는데 이러한 난포형성과정(folliculogenesis)에는 약 85일간의 긴 시간이 소요되며 난자형성과정은 이러한 과정과 함께 진행된다.

난자는 non-growing 난포 상태로 3가지 형태를 나타내는데 i) primordial follicle 상태에서 편평한 granulosa cells(GC)로 둘러 쌓여 있고 ii) intermediary follicle 상태에서 편평한 GC와 입방형 GC로 쌓여있고 iii) primary follicle 상태에서는 한층의 입방형 GC로 둘러쌓여 있게 된다. 이때 GC의 수와 크기는 차이가 있지만 난자의 크기와 핵의 크기는 차이가 없는 것으로 보아 이 과정은 성장하는 것이 아니라고 보고하고 있다(Gougeon, 1993).

생쥐에서는 난포를 둘러싸고 있는 난포세포들의 자극에 의해서 난자가 성장을 시작하며 유전물질의 합성을 시작하는 것으로써 난포성장을 한다고 보고하고 있으나(Lintern-Moore and Moore, 1979) 사람의 경우는 정확한 기작은 알려져 있지 않지만 핵의 크기가 19 um이고 primary 난포의 절편에서 15 개의 GC가 존재할 때 난포성장의 시작을 나타내는 형태학적인 기준이라고 보고하고 있다(Gougeon and Chainy, 1987). 이와 같이 난자는 난포형성과정과 함께 성장한 난포 속에서 난포세포로 둘러쌓여 성숙과정을 기다리게 된다.

2. 난자의 성숙(Oocyte Maturation)

난포가 성장하여 graafian 난포가 되면 호르몬의 영향에 의해 배란되고 난포 속에 난포세포로 둘러 쌓여 있는 난자는 성숙과정을 거치면서 밖으로 빠져나오게 된다. 일반적으로 난자는 핵성숙(nuclear maturation)과 세포질 성숙(cytoplasmic maturation)의 두가지 형태로써 성숙과정을 거친다.

2-1. 핵성숙(Nuclear Maturation)

사람과 포유동물의 난자는 혈중의 LH surge 또는 외부로부터 주사하는 hCG에 의해 성숙되어 일정시간이 지난 후 난포로부터 빠져 나오게 된다. 난자성숙은 감수분열의 재개와 세포질의 변화, mRNA의 전사 등을 필요로 하고 있으며 이 시기에 actin 유전자의 전사가 이루어진다.

난자의 핵을 germinal vegicle (GV)이라고 부르며 성숙의 첫번째 단계로서 감수분열이 재개되

어 핵이 사라지는 현상인 germinal vesicle breakdown (GVBD)이 일어나게 되는데 이 때의 난자를 primary oocyte 라고 하며 분열기를 거쳐 metaphase I 시기가 된다. 이는 체내에서 gonadotropin의 surge에 의해서 시작되는데, 배란과정을 거치면서 난자는 감수분열을 완성하게 된다. 이때 난자는 metaphase II 시기의 난자로서 secondary oocyte라고 부르게 된다.

핵성숙과 관련해서 GV를 유지하기 위해서 존재하는 물질로는 cAMP, forskolin, PKA hypoxanthine, IBMX 등을 들 수 있다(Tornell and Hillensjo, 1993; Hartshorne et al., 1994). 이들은 난포액 내에 존재하여 난자가 GV 상태로 멈춰 있게 함으로써 GVBD가 일어나지 않도록 한다. 그러나 그에 반해 GVBD는 gonadotropin에 의존적이다. 특히 체내에서는 전배란 LH surge에 의해, 체외에서 배양된 성숙한 난포는 LH에 의해 GVBD가 직접 유도된다. 난자에는 LH 수용체가 없기 때문에 난포세포들에 의해 간접적으로 중재되어 GVBD가 유도될 것으로 보고하고 있다. 또한 GC 세포와 난자 사이에 존재하는 gap junction을 통해 성숙억제성분의 이동을 감소 또는 중지 시킴으로써 GVBD를 유도한다고 보고하고 있으며 GC 세포에서 LH가 gap junction을 통해서 난자로 전달하는 positive GVBD 유도신호물질을 유도한다고 제안하였다. 그외에도 난자의 성숙을 일어나게 도와주는 물질로는 Ca 이온, maturation promoting factor (MPF), c-mos 의 단백질인 pp39mos 등을 들 수 있다. 성장인자와 호르몬에 의해서도 난자의 성숙이 유도되는데 EGF, TGF- α 및 β , estradiol과 몇몇 steroid 호르몬들이 성숙을 향상시킨다고 보고하였다. 그외에도 Ca 이온이 난자의 성숙을 촉진하는 역할을 한다고 보고하였는데 정확한 기작은 알 수 없으나 세포내 Ca 이온을 억제시키면 감수분열을 억제시킴으로써 성숙을 저해한다고 하였다(Tornell et al., 1991 ; Homa et al., 1993).

사람의 체외수정기술에서 GnRH-a를 이용하여 획득된 난포액으로부터 호르몬 비율을 이용하여 난자의 성숙도를 비교하였을 때 estradiol, progesterone 그리고 17α -hydroxyprogesterone 을 분석한 결과 난자의 성숙도와 수정률은 무관하다는 결과를 보고하였다(Tavmergen et al., 1992).

Metaphase I 시기는 몇시간 정도 지속되고 분열을 계속한다. 제 1극체가 나타나는 시기는 LH 또는 hCG 주사 후 36시간이 소요되는데, 일반적으로 자연주기 상태에서 뇨에서의 LH surge 후 24-28시간이 걸린다고 보고하고 있다. 사람의 난포는 혈중에서의 hCG 주사 후 38시간 그리고 뇨에서의 LH surge 후 30시간이 지난 후 배란을 시작한다. 이렇게 배란된 난자는 제1극체가 위관강 사이에 나타나면서 Metaphase II 상태의 완전히 성숙한 난자가 되어 정자와 수정되기 위한 준비를 한다.

2-2. 세포질성숙(Cytoplasmic Maturation)

세포질성숙은 핵성숙과 더불어 진행되며 수정과 배아의 발생을 준비하는 과정이다. 초기의 연구자들은 세포질성숙이 일어나지 않는 것으로 보고하였으나 최근에 와서 체외에서 연구된 많은

증거들이 세포질성숙이 일어난 후 높은 수정률과 발생률을 나타냄으로써, 세포질성숙이 중요한 과정으로 생각하게 되었다(Thibault, 1977 ; Schroeder and Eppig, 1984).

정상적인 세포질성숙에서는 거대분자와 여러 가지 요소들이 만들어져야 하는데, 이중에서도 수정 후 정자의 전핵형성에 필요한 glutathione의 생성은 정자의 염색사의 형성과정에 관여한다. glutathione의 농도는 GV 시기의 난자에서는 낮으나 Metaphase II 난자와 수정란에서 최고치를 나타내는 것으로 보아 세포질에서 이러한 물질들이 생성된다고 보고하였다(Perreault et al., 1984).

세포질성숙에서 중요한 특징은 난자형성과정동안 축적되는 mRNA의 해독과정이다. 난자성숙 동안에 안정되게 해독되어 특별하게 세포질성숙이 이루어지도록 하고 있다. 예로써 tissue plasminogen activator (tPA)를 들고 있는데 GVBD가 일어난 후 3시간 뒤 tPA mRNA는 해독되고 분해되는 과정을 거치게 된다. antisense mRNA를 사용하여 tPA mRNA의 untranslated sequence를 파괴한다면 연속적으로 일어날 과정인 polyadenylation, translation, 분해 등의 과정을 방해함으로써 성숙과정에 꼭 필요한 polyadenylation의 시작을 하지 못하게 된다(Vassalli et al., 1989).

작은 난포와 성숙한 난포에서 추출된 난자의 발생능력은 많은 차이가 있다. 수정 후 이들이 정상적인 발생을 할 때 체외에서 성숙을 유도한 미성숙난자들이 정상적으로 포배기까지 발생하는 능력이 떨어지는 것은 난자의 세포질성숙이 일어나야 할 현상들 즉, mRNA의 전사 및 해독 그리고 새로운 단백질의 합성이 결핍됨으로써 정상적인 발생을 하지 못하게 되며 이러한 현상은 난자의 크기와는 상관이 없으며 대체로 세포질 내에서 생성되어야 할 정량적인 물질의 차이로 인해 나타난다.

핵성숙이 핵막의 붕괴와 같이 뚜렷하게 나타나야 할 현상인 반면 세포질성숙은 세포질 내에서 연속적으로 일어나는 현상이다. 따라서 난자의 성숙은 이 두가지 성숙과정이 완전하게 이루어졌을 때 정상적인 수정과 발생과정을 거칠 수 있다. 특히 체외수정시 획득되는 난자는 모양에 따라 분류되므로 세포질 내에서 일어나는 현상은 알아내기 어렵다. 성숙에 필요한 여러 가지 요인들을 외부로부터 공급하여 정상적인 체내배양에서 일어나는 조건을 갖추어 줌으로써 성숙과정을 완전하게 해준다면 자연주기에서 획득되는 난자와 같은 조건의 난자를 획득하게 되고 체외수정에서 보다 높은 수정률과 발생률을 얻을 수 있을 것이다.

3. 체외수정시술시 난자의 판정(Oocyte Classification in Human IVF)

체외수정시술에서 획득된 난자에 대한 판정은 난자의 성숙도에 따라 구분하게 되는데, 연구실과 연구원에 따라 그 기준을 달리하여 조금씩 구별하여 사용하고 있다(Veeck, 1986a ; 1986b).

난자의 판정을 위한 criteria는 대체로 외형적인 기준에 의해 이루어지고 있다. 기준을 살펴보면 첫째, 난자핵의 존재, 둘째, 난자-난구복합체의 모양, 셋째, 제1극체의 존재, 넷째, 난구세포의 피사현상 (pycnosis) 등을 들 수 있다.

3-1. 난자의 구조

성숙된 사람 난자의 모양은 현미경적 시야에서 관찰할 때 투명대, 세포질, 제1극체 그리고 난구세포의 모양으로 나눌 수 있다. 그러나 이러한 난자를 모양에 따라 미세구조를 관찰해보면 세포질 내에 존재하는 기관들에 따라 많은 차이가 있음을 알 수 있다. 성숙도에 따라 피질과립의 분포, mitochondria, 액포 등 세포질내의 기관들이 다르게 분포되어 있고 난자와 난구세포간의 분포정도에 따라 상호간의 분비되는 물질들이 다르므로 난자의 성숙도에 영향을 미치게 되므로 난자의 구조에 많은 차이가 있다(Sathananthan, 1984; Dandekar et al., 1992; Hammitt et al., 1992). 한편, 난자의 크기에 따라 성숙도가 달라지므로 난자의 구조에도 영향을 미친다(Durinzi et al., 1995).

3-2. 난자의 질(Oocyte Quality)

난자의 특징을 종류별로 살펴보면 다음과 같다.

i) immature oocyte (Prophase I)

난자의 모양은 여러 층의 난구세포로 둘러싸여 있으며 난자의 핵인 GV가 존재하고 있어 현미경상에서 뚜렷하게 구분할 수 있다. 체외수정시 약 24시간 정도 배양하여 성숙을 유도한 후 수정을 시키게 된다.

ii) intermediate oocyte (Metaphase I)

GBVD가 일어나서 핵은 사라지고 아직까지 제1극체는 출현하지 않은 상태로 존재한다. 난구세포와 난자간의 모양이 느슨해진다. 체외수정시 약 6-15시간까지 배양이 필요하다. 제1극체가 출현한 후 수정을 시켜주면 된다.

iii) mature oocyte (Metaphase II)

핵성숙이 일어나서 제1극체가 위란강에 뚜렷하게 나타나며 세포질 성숙도 잘 일어난 상태라고 여겨지는 시기이다. 난구-난자 복합체의 모양이 마치 방사선모양으로 넓게 퍼지게 되며 전체적으로 난구세포와 난자간의 연결도 느슨한 형태를 나타내게 된다. 난자채취 후 2~5시간 후 수정을 시키게 된다.

iv) atretic oocyte (including postmature)

성숙과정에서 정상적인 성숙과정을 거치지 못하고 난자의 상태가 좋지 않아 세포질에서 핵을

축현상이 일어나면서 난자가 죽어가는 현상과 성숙의 정도가 지나쳐 과성숙되어 난자의 괴사현상이 일어나는 현상이다. 이러한 난자에서는 정상적인 수정이 일어나지 않으며 수정이 일어나더라도 비정상인 다수정현상이 일어나며 발생도 잘 되지 않는다. 특히 이러한 난자의 유전학적인 검사에 의하면 염색체 이상의 빈도가 높게 나타난다.

v) Others

과배란 유도에 의해 추출된 난자 중에 투명대가 깨져 있거나 세포질이 밖으로 흘러나와 있는 형태의 난자를 확인 할 수 있는데 이들은 모두 비정상적인 난자로서 수정을 시킬 수 없다. 또한 한 투명대내에 두 개의 세포질을 함유한 난자들도 나타나고 있는데 이것도 모두 비정상적인 난자로서 이란성 쌍생아의 가능성을 뒷받침해 줄 수 있는 근거를 마련할 수 있지만 두 난자의 성숙도가 차이가 남에 따라 같은 시기에 수정이 일어나지 않는 것을 관찰할 수 있다.

4. 난자가 체외수정시술에 미치는 영향

최근들어 체외수정시술의 발달과 함께 난자와 관련된 연구들이 많이 이루어지고 있다. 과배란 유도의 발달에 의해 많은 난자를 획득하게 됨에 따라 잉여난자를 이용한 연구에 의해 난자의 미세구조와 생리적인 기작이 밝혀지고 있다.

호르몬을 이용하여 과배란유도를 시키면 성숙한 난자를 획득할 시기를 잘 결정해야 하는데 대체로 혈중 Estradiol농도와 난포의 크기를 이용하여 hCG주사 시기를 결정한다. 여기에서 난포의 크기는 난자의 질과 밀접한 관계를 갖게 되는데 일반적으로 16 um이상의 난포로부터 획득된 난자의 경우는 성숙도와 수정률이 높게 나타난다고 보고하였는데 난포의 크기가 난자의 질을 예견할수 있는 좋은 방법이 될 수 있다(Dubey et al., 1995). 그러나 난포의 크기를 결정하는 것은 과배란 방법에 따라 조금씩 차이가 난다(Wittmaack et al., 1994; Greenblatt et al., 1995).

앞서 말한 기준에 의해 판정된 난자들은 난자를 관찰하는 연구원들에 의해서 조금씩 차이가 나는 것을 알 수 있는데 이것은 풍부한 경험이 밑바탕이 되어야 한다는 것을 의미한다(Hammit et al., 1992). 난자의 숫자에 의해 수정률과 임신률의 차이를 살펴보면 1-5, 6-10 그리고 10개 이상의 난자를 획득한 환자에서 임신률은 차이가 없었으나 10개이상의 환자에서 동결보존할 수 있는 기회를 얻게 됨으로써 결과적으로 축적된 임신률이 조금 향상됨으로써 좋은 결과를 얻고 있다고 보고하고 있다. 따라서 많은 난자를 획득함으로써 첫 번째 주기에서 실패하여도 다음 주기에 사용하기 위해 수정란을 동결보존함으로써 임신을 시킬 수 있다고 보고하고 있다(Toner et al., 1991). 그러나 많은 난자를 획득하기 위한 과도한 호르몬 사용으로 인해 최근들어 ovarian hyperstimulation syndrome(OHSS)이 나타나므로 환자에게 가장 적합한 방법의 배란 방법을 쓰는 것이 중요하다.

한편, 배란 방법에 의해 난자의 획득 및 수정률을 살펴보면 과거에 사용하던 자연주기방법은 단지 1개의 난자 만을 획득하지만 이때 채취된 난자는 성숙도가 66.8%이며 수정률도 75.2%로 나타났고 FSH와 HMG를 이용한 환자군에서는 많은 난자를 획득하였지만 성숙도는 53.5%였고 수정률도 55.0%였다. 그리고 최근에 많이 사용되고 있는 GnRH-a를 이용한 방법은 많은 난자 뿐만 아니라 성숙도가 63.5%이고 수정률도 58.4%로 나타나 많은 수의 난자와 좋은 결과를 얻고 있다(unpublished data). 그러나 이러한 GnRH-a를 이용한 방법은 질적인 향상보다는 양적인 향상이 많다는 보고도 있다(Liu et al., 1992).

CC/hMG와 GnRH-a/hMG방법을 이용하여 채취한 난자에서 세포유전학적 검사에 의해 염색체 이상의 정도를 측정하였는데 수정률은 GnRH-a군이 높았으나 수정되지 않은 난자에서 염색체 검사결과 aneuploid율이 GnRH-a군에서 높게 나타났다. 그러나 획득된 전체난자에 대한 난자의 염색체 검사결과는 차이가 없다(Sutter et al., 1992). 수정되지 않은 난자를 이용한 세포유전학적 검사는 연구자들에 따라 많은 차이가 있다(Tarin et al., 1991; Selva et al., 1991; Angell et al., 1991; Blerkom and Henry, 1992; Almeida and Bolton, 1994).

환자의 나이에 따른 난자의 형태를 살펴보면 일반적으로 과배란 유도 방법과 상관 없이 나이가 많은 환자들에게서 적은 난자가 획득되는 것을 알 수 있다. 특히 40세 이상의 환자에서 획득된 난자들은 수정률도 떨어질 뿐만 아니라 난자의 염색체 이상이 젊은 환자들에 비해 많이 나타난다고 보고하고 있다. 이러한 원인은 나이가 먹을수록 난소에 반응하는 능력이 떨어져서 난자의 성장과 성숙에 영향을 미침으로써 염색체의 정상적인 분열현상을 방해하게 되어 난자의 염색체 이상을 야기시킨다고 보고하였다(Wissen et al., 1991; Wood et al., 1992; Angell et al., 1993; Almeida and Bolton, 1993).

최근에 남성불임 뿐만 아니라 여러 가지 요인에 의해 시행되는 intracytoplasmic sperm injectin(ICSI)에서도 난자의 중요성을 강조하였는데 이것은 정상적으로 성숙한 난자만이 ICSI를 시행할 수 있기 때문에 가능하면 성숙도 높은 난자를 많이 획득해야 많은 배아를 획득할 수 있기 때문이다. 따라서 많은 난자를 획득할 수 있는 Long protocol을 이용하면 보다 좋은 결과를 얻을 수 있다고 보고하고 있다(Greenblatt et al., 1995). 또한 성숙한 난자를 이용한 체외수정기술에서 형태학적으로 비정상적으로 보이는 난자와 정상적인 난자를 이용하여 체외수정을 시킨 결과 수정률과 발생률에서도 차이가 없음을 보고하였는데 이는 모습보다는 난자가 성숙도가 외형보다는 훨씬 더 중요함을 알 수 있다(Sutter et al., 1996).

5. 결론

지금까지 난자의 구조와 성장 및 성숙과정을 살펴보았다. 사람의 체외수정기술이 발전하면서 수정률과 임신률에 영향을 미치는 여러 가지 중요한 요인들 중 난자의 질은 초기의 수정과정과 배아의 발생 그리고 임신에 이르기까지 영향을 미치는 것을 알 수 있다.

결론적으로 난자의 형태적인 분석은 개인의 주관에 의해 또는 경험의 미숙으로 잘못 판단 되어질 수 있고 난자의 외형적인 모습에서 성숙도를 결정하게 되므로 정확한 기준을 정하여 분석을 하여야만 한다. 또한 난자의 정확한 판정을 위해서는 꾸준히 난자의 질과 수정률, 임신률에 대한 결과를 분석함으로써 난자의 상태를 잘 유지할 수 있는 지표로 삼는 것이 중요하다. 몇몇 연구자들에 의해 제시된 기준들이 마련되어 있지만 환자마다 그리고 과배란 유도방법에 따라 획득되는 난자의 형태가 다르므로 이러한 결과들도 계속해서 분석하여 연구실마다의 정확한 판정기준을 마련하는 것이 중요하다. 이제 환자에게서 과배란유도로 나타나는 여러 가지 부작용을 고려한다면, 체외수정기술에서는 과다한 난자를 획득하는 것도 중요하지만 가능하면 환자에게 영향을 미치지 않도록 하면서 적당하게 양질의 난자를 획득하고 이러한 난자를 가장 잘 배양할 수 있는 적합한 배양조건들, 즉 난자의 성숙도에 따라 배양액을 바꾸거나 공동배양술을 사용하여 최적의 배양조건 등을 이용하여 좋은 배아를 얻어 적은 수로도 임신률을 유지할 수 있는 방법을 선택해야 한다고 사료된다.

참 고 문 헌

- Almeida P, Bolton V: Immaturity and chromosomal abnormalities in oocytes that fail to develop pronuclei following insemination in vitro. *Human Reprod* 1993, 8, 229-232.
- Almeida P, Bolton V: The relationship between chromosomal abnormalities in the human oocyte and fertilization in vitro. *Human Reprod* 1994, 9, 343-346.
- Angell R, Ledger W, Yong E, Harkness, Baird D: Cytogenetic analysis of unfertilized human oocytes. *Human Reprod* 1991, 6, 568-573.
- Angell R, Xian J, Keith J: Chromosome anomalies in human oocytes in relation to age. *Human Reprod* 1993, 8, 1047-1054.
- van Blerkom J, Henry G: Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation. *Human Reprod* 1992, 7, 379-390.

- Dandekar P, Aggeler J, Taalbot P: Structure, distribution and composition of the extracellular matrix of human oocytes and cumulus masses. *Human Reprod* 1992, 3, 391-398.
- Durinzi K, Saniga E, Lanzendorf S: The relationship between size and maturation in vitro in the unstimulated human oocyte. *Fertil Steril* 1995, 63, 404-406.
- Eppig J: Regulation of mammalian oocyte maturation. In Adashi and Leung, eds. *The Ovary*. Raven press, 1993. 185-208
- Gougeon A, Chainy G: Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different age. *J Reprod Fertil* 1987, 81, 433-442.
- Gougeon A: Dynamics of human follicular growth. In: Adashi and Leung, eds. *The Ovary*. Raven press, 1993. 21-39.
- Greenblatt E, Meriano J, Casper R: Type of stimulation protocol affects oocyte maturity, fertilization rate, and cleavage rate after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1995, 64, 557-563.
- Hammit D, Syrop C, Van Voorhis B, Walker D, Miller T, Barud K, Hood C: Prediction of nuclear maturity from cumulus-coronal morphology: Influence of embryologist experience. *J Assist Reprod Genetics* 1992, 9, 439-446.
- Hartshorne G, Sargent I, Barlow D: Growth rates and antrum formation of mouse ovarian follicles in vitro in response to follicle-stimulating hormone, relaxin, cyclic AMP and hypoxanthine. *Human Reprod* 1994, 9, 1003-1012.
- Homa S, Carroll, Swann K: The role of calcium in mammalian oocyte maturation and egg activation. *Human Reprod* 1993, 8, 1274-1281.
- Lintern Moore S, Moore G: The initiation of follicle and oocyte growth in the mouse ovary. *Biol Reprod* 1979, 20, 773-778.
- Lintern-Moore S, Peters H, Moore G, Fabver M: Follicular development in the infant human ovary. *J Reprod Fertil* 1974, 39, 53-63.
- Liu H-C, Lai Y-M, Davis O, Berkeley A, Graf M, Grifo J, Cohen J, Rosenwaks Z: Improved pregnancy outcome with gonadotropin releasing hormone agonist(GnRH-a)stimulation is due to the improvement in oocyte quantity rather than quality. *J assist Reprod Genetics* 1992, 9, 338-344.
- Perreault S, Wolff R, Zirkin B: The role of disulfide bond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation in vivo. *Dev Biol* 1984, 101, 160-167.
- Perreault S, Barbee R, Slott V: Importance of glutathione in the acquisition and maintenance

- of sperm nuclear decondensation activity in maturing hamster oocytes. *Dev Biol* 1988, 125, 181-186.
- Sathananthan A: Ultrastructural morphology of fertilization and early cleavage in the human. In Trounson A, Wood C, eds.: *In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*. London: Churchill Livingstone, 1984, 131-150.
- Selva, J, Martin-Pont B, Hugues J, Rince P, Fillion C, Herve F, Tamboise, Tamboise: Cytogenetic study of human oocytes uncleaved after in-vitro fertilization. *Human Reprod* 1991, 6, 709-713.
- Schroeder A, Eppig J: The developmental capacity of mouse oocytes that matured spontaneously in vitro is normal. *Dev Biol* 1984, 102, 493-497.
- Sutter P, Dhont M, Vandkerckhove D: Hormonal stimulation for in vitro fertilization: a comparison of fertilization rates and cytogenetic findings in unfertilized oocytes. *J Assist Reprod Genetics* 1992, 9, 254-258.
- Sutter P, Dozortsev D, Qian C, Dhont M: Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reprod* 1996, 11, 595-597.
- Tarin J, Gomez E, Sampaio M, Ruiz M, Remohi J, Pellicer: Cytogenetic analysis of human oocytes from fertile women. *Human Reprod* 1991, 6, 1100-1103.
- Tavmergen E, Tavmergen EN, Capanoglu R: Do analogues of gonadotrophin releasing hormone influence follicular fluid steroid levels, oocyte maturity and fertilization rates? *Human Reprod* 1992, 7, 479-482.
- Thibault C: Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes? *J Reprod Fertil* 1977, 51,1-15.
- Toner J, Brzyski R, Oehninger S, Veeck L, Simonetti S, Muasher S: Combined impact of the number of pre-ovulatory oocytes and cryopreservation on IVF outcome. *Human Reprod* 1991, 6, 284-289.
- Tornell J, Billig H, Hillensjo T: Regulation of oocyte maturation by changes in ovarian levels of cyclic nucleotides. *Human Reprod* 6, 411-422.
- Tornell J, Hillensjo T: Effect of cyclic AMP on the isolated human oocyte-cumulus complex. *Human Reprod* 1993, 8, 737-739.
- Vassalli J-D, Huare J, Belin D, Gubler P, Vassalli A, O'Connell M, Parton L, Rickles R: Regulated polyadenylation controls mRNA translation during meiotic maturation of

mouse oocytes. *Genes Dev* 1989, 3, 2163-2171.

Veeck L: The morphologic estimation of mature oocyte and their preparation for insemination. In Jones H Jr, Jones G, Hodgen G, Rosenwaks Z, eds.: *In Vitro Fertilization-Norfolk*. Baltimore, Williams & Wilkins 1986a, 81-87.

Veeck L: *Atlas of the Human Oocyte and Conceptus*. Baltimore, Williams & Wilkins 1986b. 68.

van Wissen B, Bomsel-Helmreich O, Debey P, Eisenberg C, Vautier D, Pennehouat G: Fertilization and ageing processes in non-divided human oocytes after GnRHa treatment: An analysis of individual oocytes. *Human Reprod* 1991, 6, 879-884.

Wittmaack F, Tureck R, Kreger D, Mastroianna L, Blasco L, Lessey B: Effect of follicular size on oocyte retrieval, fertilization, cleavage, and embryo quality in invitro fertilization cycles: a 6-year data collection. *Fertil Steril* 1994, 62, 6, 1205-1210.

Wood C, Calderon I, Crombie A: Age and fertility: Results of asisted reproductive technology in women over 40 year. *J Assist Reprod Genetics* 1992, 9, 428-484.