Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI)
Current Status And Future Trend

체외수정연구실 피엘산부인과

최 규 완

서 론

최근 수년 사이에 ART (Assisted Reproductive Technologies)는 혁명적으로 발달을 해왔으며, 괄목할 만한 영역이 남성불임의 치료술이다. 인공수정 (IUI) 혹은 체외수정 시술 (IVF-ET)이 보편적 치료술이었으나 정자의 상태 혹은 다른 요인에 따른 어느 정도의 한계가 있었다. Microdrop insemination 방법 (Gianaroli et al., 1993)에 의해 수정 정자 수를 늘려줄 수는 있었지만, 역시 여러 가지 요인에 의한 수정 실패를 완전히 극복할 수는 없었다. 그러한 의미에서 미세수정 (micro-fertilization)의 등장은 남성불임의 치료에 한 획을 그었다. PZD (partial zona drilling, Malter and Cohen, 1989), SUZI (subzonal insemination, Ng et al., 1988)에 이은 ICSI (intracytoplasmic sperm injection, Palermo et al., 1992)에서의 임신 성공은 남성불임의 정복에 실마리가 되었다. ICSI는 수정에 필요한 생식수관 내에서의 정자의 생리적인 변화와 수정과정의 면역학적 요인을 포함한 대부분의 과정을 생략시켰다. ICSI는 이제 수정 실패의 요인들을 거의 대부분 극복할 수 있게 되었다. 폐쇄성 무정자증은 물론이고 생식 내분비적 이상에 의한 정자 형성 장애의 경우도 어느 정도 극복이 되고 있는 상황이다. 본 장에서는 세포질내 정자 주입법 즉 ICSI에 대한 현재의 임상적 상황과 미래의 연구 방향에 관해 임상적, 생물학적인 면에서 고찰하고자 한다.

본 론

1. ICSI의 적용증 및 임상 결과

남성불임 혹은 남성 요인 불임은 정자의 양적 혹은 질적 (기능적) 저하로 인해 임신이 저해되는 부부를 가리키는 용어로 과거에는 정자의 수 (concentration), 운동성 (motility) 및 형태 (morphology)의 양적 이상으로 인해 임신에 실패한 경우만을 지칭했다. 근래에는 정자에 대한 여러 가지 기능에 대한 평가 방법이 개발되어, 이들의 양적 이상 외에도 기능적 이상이 수정실패의 요인으로 알려지고 있다. 양적인 기준에 대한 세계보건기구 (WHO)는 남성불임으로 비정상적인 정자수 (oligozoospermia)는 cc당 2천만 미만, 정자의 운동성 (asthenozoospermia)은 50% 미만, 정자의 형태 (teratozoospermia)는 정상 정자가 전체의 30% 미만을 정의하고 있다. 정자의 수와 운동성에 대한 기준도 ART의 발달로 그 기준이 낮아지고 있고, 정자의 형태도 Kruger 등 (1986)에 의한 strict morphology의 기준을 적용하여 정상 형태의 정자가 14% 미만일 경우 정자의 수정 능력이 떨어지는 비정상 정자로 규정하고 있다.

이러한 남성불임은 환자의 해부학적 혹은 내분비적 이상으로 유발되어 초기의 비뇨기과적 치료는 호르몬이나 수술적 치료를 진행하였으나, 치료 결과는 해부학적 이상에 대한 수

술적 요법에 의한 교정 후 IUI나 IVF에 일부 제한적으로 효과가 있는 것으로 나타났다. 그러나 92년 Palermo 등에 의한 ICSI의 성공은 남성불임에 대한 비뇨기과적 치료술에 대한 중요성을 격감시켰으며, 더욱 최근의 부정소 혹은 정소 정자를 이용한 MESA-ICSI (Oates et al., 1992), TESE-ICSI (Silber et al., 1995)의 성공으로 남성불임이 거의 정복되었다는 시각도 생겼다.

ICSI에서는 정자가 존재하는 한 정자의 질에 상관없이 60~70%의 수정률을 얻는 것으로 보고되며, 임신율 또한 30% 이상으로 보고되고 있다. 순수한 남성불임일수록 수정실패의 장애가 해결되면 임신은 여성요인에 의한 불임보다 더 쉬울 수 있을 것으로 보인다.

순수한 남성요인 이외에 항정자항체 (antisperm antibody) 혹은 투명대항체 (antizona antibody) 등의 면역학적인 요인의 경우 이들은 생식수관내에서의 정자의 수정능력획득 (capacitation) 및 첨체반응 (acrosome reaction) 등의 생리적 현상과 투명대와의 부착 및 투과의 방해로 인해 수정장애가 나타나지만, 이 또한 ICSI에 의해 쉽게 극복되는 것으로 알려지고 있다 (Nagy et al., 1995).

그밖에도 정액내 백혈구가 cc당 백만개 이상 다량으로 존재하는 정자를 leukocytospermia라 칭하며 생식수관 및 정액내의 백혈구 세포는 cytokines (TNFα, interferon-r) 혹은 ROS 등을 분비하여 정자의 형태 및 운동성, 정자의 수 및 원형질막의 지질 peroxidation을 통해 정자의 수정능력을 위한 생리적 변화가 저해되어 수정실패의 요인이 되는 것으로 알려져 있다. 저자 등 (1997, 출판중)에 의하면 leukocytospermia의 환자에 있어서 ICSI에 의한 결과는 통상적인 IVF에 비하여 수정률, 배아발달 및 임신율이 유의하게 증가하는 것으로 나타났다.

2. MESA-ICSI (microsurgical epididymal sperm aspiration), TESE-ICSI (testicular sperm extraction)

폐쇄성 무정자증 환자 (obstructive azoospermia)는 남성불임 환자의 8% 정도를 차지하는 것으로 알려져 있다. 폐쇄성 무정자증의 원인은 생식수관의 폐쇄로, 선천적 기형인 congenital absence of vas deferens (CAVD), 부정소에서의 postinflammatory obstruction, 감염에 의한 수정관의 폐쇄, 불임시술 등에 의해 기인한다. 종래의 수술적 교정은 부정소에 대해서는 vasoepididymostomy, 정관에 대해서는 vasovasostomy가 사용되었으며, 이들에 의한 임신가능성은 부정소의 경우가 20% 미만 (Schoysman, 1990), 정관복원술은 50% 정도의 임신율을 보고하고 있다. CAVD에 대한 고전적 수술요법인 인공 저정낭 (spermatocoele)은 겨우 4%의 임신을 보고하였다 (Turner, 1988). 그러나 1985년 Temple-Smith 등이 microsurgical epididymal sperm aspiration (MESA) 기술과 IVF-ET의 만남은 CABD 등의 환자에 새로운 치료술이 되었고, 다시 ICSI와의 만남으로 폐쇄성 무정자증은 거의 정복되었다. MESA-ICSI는 여러 원인에 의한 폐쇄성 무정자증과 수술에 의한 교정술에 실패한 경우 및 사정장애 (retrograde ejaculation, anejectulation, sexual dysfunction)의 증상에 적용할 수 있다.

정소정자를 이용하는 TESE (testicular sperm extraction)-ICSI는 모든 MESA-ICSI의 적용을 포함하고, MESA가 불가능할 경우, 정자형성이 적은 hypospermatogenesis와 germ cell aplaza (국소적인 정자형성이 있는 경우), 전신 마취에 장애가 있는 경우, 정자가 괴사흡수되는 necrozoospermia가 적용될 수 있다.

최근의 부정소 및 정소정자를 이용한 ICSI의 수정률, 배발달 및 임신율은 사정정자에 의한 ICSI시술과 비슷하게 보고되고 있다.

3. ROSI: Round spermatid injection

Testicular failure는 전체 남성의 1% 정도이고, 남성불임환자중 10% 정도를 차지하고 있다. Testicular failure에 의한 무정자증 환자는 Sertoli cell only syndrome, maturation arrest와 정소 생검상 hypospermatogenesis의 증상을 보이며 거의 치료 불가능하였다. 1995년 Kimura와 Yanagimachi는 생쥐에서 정자가 아닌 정세포 (spermatid)와 제2정모세포 (secondary spermatocyte)를 난자내에 주입하여 수정된 배아를 이식하여 새끼를 얻음으로써 비폐쇄성 무정자증의 환자의 치료에 적용가능성을 기대할 수 있었다. 이러한 결과는 토끼에서도 확인된 후 사람에 적용하기 위한 노력이 경주되었다. 2년여 동안 사람에서 정세포 (round spermatid injection: ROSI, elongated spermatid injection: ELSI) 혹은 정세포 핵 (round spermatid nuclei injection: ROSNI)을 다양하게 주입하였다. ROSNI방법에 의한 토끼에서는 새끼를 얻었지만, 사람에서는 93명 시행한 환자 중 4명에게서 임신을 얻었으나 자연유산 되었고, 다른 몇 group에서 ROSI방법에 의한 임신 및 출산이 보고되었다 (Tesarik et al., 1995, 1996). 따라서 정세포의 핵만을 주입하는 것보다는 세포질이 포함된 정세포 자체를 주입해야 임신이 유지될 것으로 생각된다. 이에 대한 논리적 근거는 첫째, 정세포의 핵만을 분리함으로써 세포질이 가지고 있는 난자의 활성화 및 정상적 발생에 역할을 할 수 있는 요인의 결핍을 가져올 수 있다. 둘째, 핵의 분리과정에서 정세포의 염색질이 유실될 가능성이 있다. 마지막으로 분리과정에서 핵막 혹은 핵내 물질의 손실로 정상적 출산이 불가능 했을 것으로 생각된다. 그러므로, ROSI는 아직 시험단계 수준으로 성공율과 안전성에 대한 정보와 기술적인 개선이 필요하다.

4. ICSI의 결과에 영향을 주는 요인들 Factors Affecting Results of ICSI

1992년 Palermo 등의 ICSI에 의한 임신이래 ICSI는 심한 남성불임을 치료하기 위한 목적으로 수많은 센터에서 적극적으로 시행되었다. ICSI의 성공은 다음의 몇 가지 요인, 즉 정자의 생존성, 난자의 질, 효과적인 난자의 활성화 및 ICSI시행중의 기계적 trauma에 대한 난자의 내성에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있다.

ICSI에 미치는 정자 요인에 대한 Nagy 등의 1000여 주기의 ICSI 결과의 분석에 의하면 정자의 parameters, origin (사정정자, 부정소 및 정소정자) 및 동결 여부에 관계없이 수정과 임신이 가능했다. 정자의 parameter중 영향을 주는 요인은 운동성으로, 만일 운동성이 없으면 수정률과 임신율은 유의하게 저해된다. 이는 운동성이 정자의 viability를 반영하기 때문이다. 그러나, 운동성이 없는 정자의 경우에도 hypoosmotic swelling test 방법으로 살아있는 정자를 선택할 수 있다 (Casper et al., 1996).

ICSI의 결과에 미치는 여성 요인의 영향을 알아보고자 Oehninger 등은 ICSI를 시행한 92주기 1163개의 난자의 수정율 및 임신율을 조사하였다. 전체적으로 수정률은 61%로 환자의 나이에 영향을 받지 않았다. 그러나 임신율은 35세 미만, 35~39세, 40세 이상에서 49%, 23%와 6%로 나이의 증가에 따라 유의하게 감소하였다. 이러한 임신율의 감소는 40세 이상의 여성으로부터 얻은 수정란에서 염색체 수적이상의 급증과 연관이 있을 것으로 사료된다. 한편, 최근에는 난자의 질 (난자의 색, granulation, inclusions)이 수정률과 배발생에는 영향을 주지 않았지만, 임신율에는 영향을 미치는 것으로 보고하였다 (Xia, 1997). 따라서 여성의 요인으로 나이 뿐만 아니라 난자의 질도 중요한 요인으로 보이며 결국 배란유도 과정 전체가 중요한 요인으로 생각된다.

5. ICSI에서 수정실패와 난자의 활성화
Fertilization Failure after ICSI and Oocyte Acitivation

ICSI에 의해 수정된 난자는 활성화 과정을 거치며 난자와 정자의 염색질 (chromatin)의 형상이 변화한다 (Dozortsev et al., 1995). 정자주입 2~3시간에 난자는 감수분열 후기가 시작되고, 4~5시간에 염색질 뭉치로 관찰된다. 정자는 2시간내에 난자의 활성화에 따라서 탈응축이 시작되는데 이는 난자핵이 말기에 도달되기 전이고, 난자의 염색체가 탈응축되기 시작할 때 정자핵은 탈응축이 모두 완료된다. 따라서 초기 전핵은 정자의 전핵이 먼저 발달되어 크기가 크다. 전핵은 정자 주입후 20여 시간 존재한다. 수정의 실패는 여러가지 요인에 의해 이러한 과정이 중지되는 현상이라고 말할 수 있다.

ICSI에서 수정이 안된 난자의 핵은 거의 배란 난자의 핵상처럼 제2감수분열 중기 (metaphase II) 염색체를 보이며, 표층과립 (cortical granule)이 그대로 존재한다. 제2극체가 보이는 경우도 대개는 감수분열재개에 의한 제2극체 방출 현상의 결과가 아니고 단지 제1극체의 조각일 뿐이다. 정자의 핵은 그대로 존재하거나 부분적인 탈응축 (decondensation) 현상을 보이기도 한다.

정상적 수정은 정자와 난자의 원형질막의 융합에 따라 난자세포질내에서 Ca^{++}이 반복적으로 방출되며 표층과립의 방출, 감수분열재개, 제2극체방출 및 세포골격의 변화 등 일련의 현상들이 진행된다. 따라서 수정현상에서의 Ca^{++}의 방출은 필수적 요인이며, 정자대신 정자의 추출물 (sperm cytosolic factor: SCF or soluble sperm factor: SSF)을 주입시에도 Ca^{++} 방출이 일어나 난자가 활성화되는 것으로 보고되었다. 1996년 Parrington 등은 hamster의 정자추출물로부터 난자를 활성화시키는 물질을 분리, 이를 oscillin이라 명명하였다. Oscillin은 정자의 postacrosomal region에 존재하며, hexose phosphate binding protein으로 종간특이성이 없는 것으로 알려져 있지만 정확한 기작은 알려져 있지 않다. ICSI 시행시 주입된 정자로부터 방출된 oscillin은 endoplasmic reticularm (ER)의 Ca^{++} channel receptor를 통해 Ca^{++}을 방출할 것으로 생각된다.

ICSI에서 정자의 viability는 이러한 oscillin의 방출에 영향을 미쳐 난자 활성화의 저해는 수정실패의 요인이 될 수 있다. 따라서 ICSI를 시행하는 과정에서 정자의 parameter의 요인보다 움직이는 정자를 찾아야만 하는 이유이기도 하다. 문제는 첨체가 존재하지 않는 round headed sperm의 경우로 oscillin이 첨체에 존재하지는 않지만 oscillin의 결핍으로 정자가 난자의 세포질내에 성공적으로 주입되었더라도 수정이 잘 되지 않는 것으로 보고되고 있다. 따라서 이들에 있어서 난자의 활성화를 위한 방법은 연구되어야 할 부분이다.

ICSI에서 난자의 활성화를 위하여 정자의 immobilization 과정 중 정자 꼬리에 상처를 줌으로써 난자의 세포질과 접촉이 용이하게 해주고, 정자로 부터 난자 활성화 요인의 방출을 쉽게 해주었다. 또한 난자의 막 관통시 음압을 높여 물리적 자극을 줌으로써 활성화를 높여주고 있다. 하지만 round-headed sperm에서는 난자 활성화 요인의 결핍에 의해 수정률이 매우 낮은 것으로 보고되고 있다 (Battaglia et al., 1997). 근래에 이는 calcium ionophore를 처리하여 수정률을 높일 수 있다는 보고가 있으나 (Tesarik, 1995), ionophore자체의 안전성이 검증되지 않아 임상에 적용은 무리가 있는 것으로 생각된다. 또다른 방법은 정상적인 정자의 추출물이 난자의 활성화 능력이 검증된 후 추출물 (SSF)을 결핍 정자와 함께 주입함으로 활성화 시키는 방법이다 (Meng & Wolf, 1997). 정자 요인이 아닌 난자 요인에 의한 수정실패의 경우 정상적인 난자의 세포질 이식이 시험적으로 시행되어 활성화를 가능하게 해주는 것으로 보고되었지만, 여러가지 안전성의 검증이 필요한 것으로 사료된다.

6. ICSI 치료에서의 고려할 점
Concerns for ICSI Treatment

Potential transmission of genetic disease

남성불임은 유전적 요인과 어느정도 연관되어 있는 것으로 알려지고 있다. 예컨데, 한국인에서는 나타나지 않지만 cystic fibrosis (CF) mutation을 가진 남성은 congenital absence of vas deference (CAVD)와 깊은 연관을 갖는 것으로 알려져 있다 (Patrizio et al., 1993). 따라서 이들은 ICSI candidate로 ICSI에 의한 수정후 남아의 임신은 유전적 비정상을 피치못하게 유전할 수 밖에 없다.

DNA integrity

수정에 있어서 정자의 가장 큰 역할은 유전물질의 전달이기 때문에 ICSI에서 가장 중요한 부분은 정자의 DNA의 온전성이다. 불임환자의 정자는 DNA의 heterogeneity와 strand breakage가 증가되어 있는 것으로 알려져 있다 (Gorczyca et al., 1993). 대개 이들은 ROS에의 노출 (Fraga et al., 1991), 남성 생식수관에서의 이동시간, 혹은 정자형성 및 성숙과정의 불완전성으로 인한 정자핵의 불완전한 응축 (Cummins et al., 1994) 등에 의해 유발되며 유전자적 상해의 위험을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 또한 정자는 일반 세포들에 비해 DNA repair system이 부족하기 때문에 DNA의 오류를 가질 확률이 높고, ICSI에 의해 수정란에 전달되어 배아의 생존성 (viability)을 감소시킬 가능성이 있다.

Cytoplasmic inheritance

정자의 중심체 (centrosome)는 사람 수정란의 제1분열을 위한 template를 형성하는 것으로 알려져 있다 (Schatte, 1994). 기능적으로 비정상적이거나 미성숙 정자에 의해 전달될 수 있으며, 체외수정 중 불완전한 수정, 배발생 중지 혹은 비정상적 배발생이 증가할 수 있다 (Janny & Menezo, 1994). 사람 정자의 세포질 자체가 배발생 및 태아의 생존성에 어떠한 역할을 하는지는 잘 알려져 있지 않지만, 정세포 (ROSI)와 정세포핵 (ROSNI)의 주입시 태생의 결과를 보면 그 역할을 가늠할 수 있을 것으로 생각된다.

Genomic imprinting

포유동물에서 배우자의 수정에서 얻어진 수정란이 새로운 개체로 정상적 발생하기 위해서는 흔히 말하는 DNA methylation 과정에 의해 특별한 유전자를 발현시킬 수 있게 생식세포계에 유전자가 존재한다. 과거 정자는 부정소의 체부 하단을 통과해야 직진운동성 및 수정능력이 획득되는 것으로 알고 있었다. ICSI의 도입은 부정소 정자는 물론 정소 정자 및 round spermatid까지에서 개체로 발생이 가능했다. 즉 정자형성과정 중 imprinting 시기가 부정소 정자에서 정소 정자, 정세포까지로 밝혀졌다. 생쥐에서는 이미 제2정모세포를 세포질내 주입하여 개체로 발생이 보고되었다 (Kimura & Yanagomachi, 1995). 포유동물에서 배우자 형성과정 중 생식세포의 핵-세포질의 관계는 수정란 이후 태아의 발달에까지 유력한 영향이 있는 것으로 생각된다.

결 론

1985년 국내 최초의 시험관 아기의 출산 성공이래, ART 분야에 미세수정술 (micro-fertilization)의 도입은 가장 극적인 진보였으며, 남성불임의 정복이 가능할 정도로 눈부신 발달을 가져왔다. 순수한 남성불임 요인의 환자에서는 전체적인 시험관 아기 시술 성적보다 높은 임신율을 보이고 있다. 또한 MESA-ICSI, TESE-ICSI 및 ROSI 등은 비뇨기과 영역에서

의 불임 치료술을 바꾸어 놓았다. 하지만 ICSI-IVF에 몇가지 의문들이 남아 있다. 첫째, 모든 IVF대상 환자에 ICSI를 적용할 만큼 안전성을 믿을 수 있느냐, 둘째, ICSI에서 임신이 실패하는 환자의 원인과 대책은, 셋째, ICSI에 의한 유전질환의 전달, 염색체 이상의 유발 가능성 및 출산아에서의 임상의학적 고려 등의 질문이 던져지고 있다. 물론 이들 모두에 확실한 답이 없다는 점에서 보면 아직 ICSI는 실험단계라고 말할 수는 있으나, 모든 치료술과 마찬가지로 약간의 risk를 갖고 있지만 선택의 여지없이 강력한 불임환자의 치료법임에는 틀림없다.

참 고 문 헌

Battaglia DE, Koehler JK, Klein NA and Tucker MJ: Failure of oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection using round-headed sperm. Fertil Steril 68(1), 118-122 1997.

Casper RF, Cowan L, Meriano JS et al: The hypoosmotic swelling test for selection of viable sperm for intracytoplasmic injection in men with complete asthenozoospermia. Fretil Steril 65, 972-976, 1996.

Cummins JM, Jequier AM and Kan R: Molecular biology of human male infertility-links with aging, mitochondrial genetics and oxidative stress? Mol Reprod Dev 37, 345-362, 1994b.

Dozortsev D, Rybouchkin A, De Sutter P, Qian C and Dhont M et al: Human oocyte activation following intracytoplasmic injection: the role of the sperm cell. Hum Reprod 10(2), 403-407, 1995.

Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob RA and Ames BN: Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. Proc Natl Acad Sci USA 88, 11003-11006, 1991.

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fiorentino A, Fortini D and Feliciani E: Outcome of new strategies for moderate and extream male factor infertility. In Gordts, S.(ed.) Current status of micromanipulation. 307-313, 1993.

Gorczyca W, Traganos F, Jesonowska H and Darzynkiewicz Z: Presence of DNA strain of breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. Exp Cell Res 207, 202-205, 1993.

Janny L and Menezo YJR: Evidence for strong parternal effect on human preimplantation embryo development and blastocyst formation. Mol Reprod Dev 38, 36-42, 1994.

Kimura Y and Yanagimachi R: Development of normal mice from oocytes injected with secondary spermatocyte nuclei. Bio Reprod 53, 855-862, 1995.

Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH, Lombard CJ, Vander Merwe JP, Van Zyl JA and Smith K: Sperm morphologic feature as a prognostic factor in in vitro fertilization. Fertil Steril 46, 1118, 1986.

Li M and Wolf DP: Sperm-induced oocyte activation in the rhesus monkey: nuclear and cytoplasmic changes following intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 12(5), 1062-1068, 1997.

Malter HE and Cohen J: Patial zona dissection of the human oocyte: a nontraumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. Fertil Steril 59, 139-148, 1989.

Meng L and Wolf DP: Sperm-induced oocyte activation in the rhesus monkey: nuclear and cy-

toplasmic changes following intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 12, 1062-1068, 1997.

Nagy ZP, Verheyen G, Liu J, Joris H, Janssenswillen C, Wisanto A et al: Results of 55 intracytoplasmic sperm injection cycles in the treatment of male-immunological infertility. Hum Reprod 10, 1775-1780, 1995.

Ng SC, Bonso A, Ratnam S, Sathananthan H, Chan CLK, Wong PC, Hagglund L, Anandakumar C, Wong YC and Goh VHH: Pregnancy after transfer of sperm under zona. Lancet 2, 790, 1988.

Oates RD, Honig S, Berger MJ and Harris D: Microscopic epididymal sperm aspiration (MESA): a new option for treatment of the obstructive azoospermia associated with cystic fibrosis. J Assist Reprod Genet 9, 36-40, 1992.

Palemo G, Joris H, Devroey P and Van Steirteghem AC: Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoa into an oocyte. Lancet 340, 17-18, 1992.

Patrizio P, Asch RH, Handelin B and Silber SJ: Aetiology of congenital absence of vas deferens genetic study of three generations. Hum Reprod 8, 215-220, 1993.

Schatten G: The centrosome and its mode of inheritance-the reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization. Dev Biol 163, 534, 1994.

Schoysman R: Vaso-epididymostomy - A survey of techniques and results with considerations of delay of appearance of spermatozoa after surgery. Acta Eur Fertil 21, 239-245, 1990.

Silber SJ, Van Steirteghem AC, Liu J, Nagy Z, Tournaye H and Devroey P: High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy. Hum Reprod 10, 148-152, 1995.

Tesarik J and Sousa M: More than 90% fertilization rates after intracytoplasmic sperm injectionand artificial induction of oocyte activation with calcium inophore. Fertil Steril 63(2), 343-349, 1995.

Tesarik J, Soussa M and Tesart J: Viable embryos from injection of round spermatid into oocytes. N Eng J Med 333, 525, 1995.

Tesarik J, Rolet F, Brami C et al: Spermatid injection into human oocytes: II. Clinical application in the treatment of non-obstructive azoospermia. Hum Reprod 11, 780-783, 1996.

Turner TT: On the development and use of alloplastic spermatocoeles. Fertil Steril 49, 387-395, 1988.

Xia P: Intracytoplasmic sperm injection : Correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. Hum Reprod 12(8), 1750-1755, 1997.