

## The Present and Future of Micro-assisted Fertilization

성균관대학교 의과대학 삼성제일병원 산부인과

강 인 수

### 1. Introduction

ICSI는 정자와 난자의 상호작용과 fusion상의 문제를 bypass하여 정자를 난자의 세포질내에 직접 주입하는 방법으로서 1992년 Dr. Palermo 등에 의해서 소개되었다. 이로서 종래에 시행되던 zona drilling, partial zona dissection (PZD), subzonal sperm injection (SUZI) 방법의 낮은 수정율을 극복하여 남성불임의 치료에 획기적인 전기를 맞게 되었다.

ICSI의 적응증

- 1) No or poor fertilization in previous IVF (conventional insemination) cycles.
- 2) Epididymal/testicular spermatozoa
- 3) Teratozoospermia: Globozoospermia, amorphous head and tail
- 4) Severe asthenospermia, Immotile spermatozoa
- 5) Frozen-thawed spermatozoa with poor survival
- 6) Preimplantation genetic diagnosis (PGD)

IVF와 ICSI를 병용하는 적응증 (Split method, half ICSI)

- 1) Total unfertilization or poor (<15%) fertilization in the first cycle  
첫 IVF 주기에서 poor fertilization이 발생한 부부의 약 2/3가 다음 주기에서 양호한 수정율을 보인다.
- 2) Oligozoospermia:  $< 0.8 \times 10^6$  total motile sperm count after preparation
- 3) Teratozoospermia:  $< 5\%$  normal sperm morphology
- 4) Immune factor: High titer of antisperm antibody

### 2. Outcome of ICSI

2.1. World wide data: ESHRE Task Force (1993-1995), 101 centers

(결론) 1995년 worldwide ICSI data에 의하면 주입하는 sperm의 기원에 관계없이 높은 수정율과 임신율을 얻었다. 아기의 성염색체의 이상이 약간 증가된 경향을 보였으나 다행히 major/minor 기형의 빈도는 증가되지 않았다. 결론을 정확히 내리려면 더 많은 data가 축적되어야 하며 특히 태어난 아이들을 추적 관찰하는 것이 중요하겠다.

**Table 1.** ICSI results using ejaculated, epididymal and testicular spermatozoa

	Ejaculated	Epididymal	Testicular
No. of oocytes (MII) injected	143598	9197	7834
No. (%) of oocytes damaged	13374 ( 9.3)	762 ( 8.3)	668 ( 8.5)
No. (%) of oocytes fertilized	91898 (64)	5745 (62.5)	4051 (51.7)
No. (%) of good embryos (transferred/frozen)	62444 (43.5)	4202 (45.7)	3046 (38.9)
No. (%) of embryo transfers	15407 (86)	952 (88.1)	731 (90)
No. (%) of cycles with freezing	4154 (23.2)	235 (21.8)	216 (26.6)

ESHRE

**Table 2.** Pregnancy outcome after ICSI using ejaculated, epididymal and testicular spermatozoa in 1995

	Source of spermatozoa		
	Ejaculated	Epididymal	Testicular
No. of positive $\beta$ -HCG tests	5012 (28%)	322 (29.8%)	218 (26.8%)
No. (%) of viable pregnancies	3808 (21.3)	236 (21.8)	152 (18.7)
No. of ongoing pregnancies	1908	83	82
No. of delivered pregnancies	1900	153	70
No. (%) of biochemical Preg.	464 ( 9.3)	41 (12.7)	22 (10.1)
No. (%) of clinical abortions	723 (14.4)	34 (10.6)	34 (15.6)
No. (%) of ectopic pregnancies	70 ( 1.4)	0 (0)	1 (0.5)

ESHRE

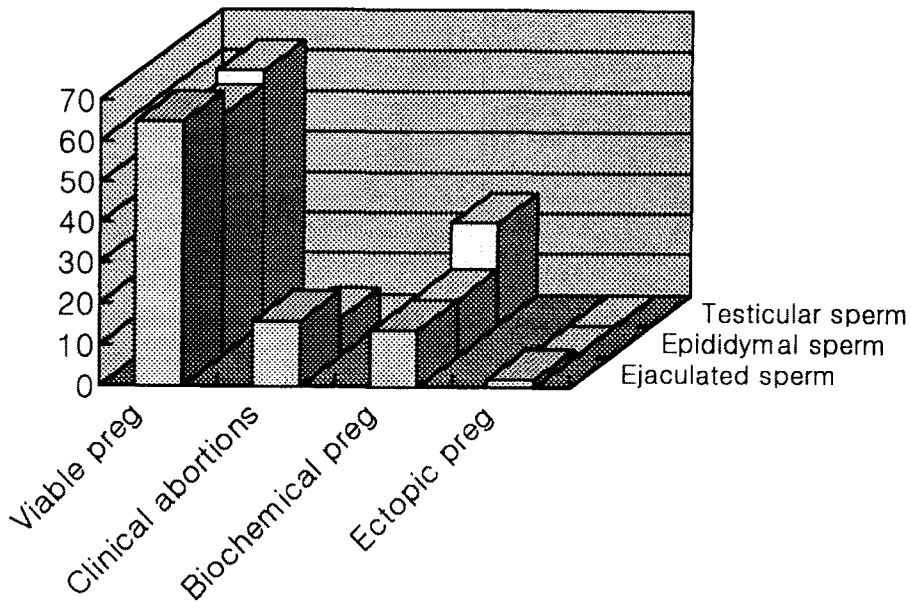
**Table 3.** Congenital malformations in children born after ICSI using ejaculated, epididymal and testicular spermatozoa

	Source of spermatozoa		
	Ejaculated	Epididymal	Testicular
No. of children born	2486	119	63
No. (%) of malformations			
Major	47 (1.9)	0	3 (4.8)
Minor	185 (7.4)	3 (2.5)	2 (3.2)
No. of abnormalities detected by ultrasound	17	0	0
No. of therapeutic abortions	17	0	0

ESHRE

## 출산아의 7년간 추적 조사

Maryse Bonduelle 등은 ICSI로 태어난 1987명의 아기를 최고 7년간 추적하여 결과를 보고하였다. 전향적 연구로 조사하여 염색체 이상, 기형아, 성장지표를 조사하고 생후 2개월, 1년,



2년에 이학적 검사를 시행하였다. 1991년 4월부터 1997년 8월 사이에 ejaculated, epididymal testicular spermatozoa로 ICSI를 시행하여 태어난 아기는 각각 1699, 91, 118명이었다. ICSI후 냉동 보관된 수정란으로 79명이 출생하였다. 1082명이 산전검사에서 염색체 분석을 시행한 결과, 18명이 비정상적이고 de novo (1.66%: 9 autosomal, 9 sex chromosomal aberrations), 그리고 10명 (0.92%)이 유전된 구조적 이상을 보였고 이중 9명은 부친으로부터 유전되었다. 10명은 산전 염색체 진단을 한 결과 비정상적으로 판명되어 임신을 종료시켰다. 출생 시 major congenital anomaly는 46명 (2.3%)이었고, 7명의 기형아는 산전 초음파검사로 발견되어 임신을 종료시켰다. 20주 이후에 사산된 경우는 21명이었는데 (1.1%), 이 중 4명에서는 심한 기형이 동반되었다. 임신이 유지된 기간은 단태아가 38.7주, 쌍태아가 36주, 삼태아는 32주 이었다. 어떠한 group에서도 특이하게 기형이 증가되지는 않았다.

그러므로 ICSI를 시행하기에 앞서 불임부부와 상담할 때에는 염색체의 이상이나 주로 성염색체에서 발생하는 de novo 염색체 이상, 그리고 불임문제가 다음대로 전파될 수 있는 가능성에 대해 알려주어야 한다. 그리고 심각한 기형율의 발생율은 ICSI후에 2.3%로서 자연임신시의 발생율과 유사하다는 것도 주지시켜야 하겠다.

## 2.2. 삼성제일병원의 ICSI 결과 자료 (Table 4~6)

### 3. Limitation and Concerns of ICSI

정상적인 수정과 배아 발생의 요건으로서 우선, 정자는 형태와 운동성이 양호하고 난자의 투명대에 부착될 수 있어야 하며 acrosome reaction이 일어나고, 난자세포막과 융합될 수 있

**Table 4.** Overall outcome of ICSI treatments (1994-1999)

	1994	1995	1996	1997	1998	1999 half
No. of cycles	211	544	579	666	690	457
Female' age	32.1±4.6	33.4±4.0	33.8±4.5	33.5±4.6	33.3±4.8	33.6±4.6
Retrieved oocytes	2564	6495	6755	7195	7492	5097
(mean±SD)	12.2±6.8	11.9±7.9	11.7±7.8	10.8±7.6	10.8±8.0	11.2±8.3
Injected oocytes	1941	5214	5537	5915	5957	4010
(mean±SD)	(75.7%)	(80.3%)	(82.0%)	(82.2%)	(79.9%)	(78.7%)
	9.2±5.3	9.6±6.4	9.6±6.6	8.9±6.3	8.7±6.4	8.8±6.8
Fertilized oocytes	1103	3963	3854	3844	4058	2788
(mean±SD)	(56.8%)	(76.0%)	(69.6%)	(65.0%)	(68.1%)	(69.55%)
	5.2±5.8	7.3±5.2	6.7±4.9	5.8±4.5	5.9±4.9	6.1±5.3
Transferred embryos	993	2804	2461	2183	2161	1704
(mean±SD)	(90.1%)	(70.8%)	(63.9%)	(56.8%)	(53.3%)	(61.1%)
	4.7±2.8	5.2±2.6	4.3±2.2	3.3±1.6	3.1±1.6	3.7±2.3
Unfert cycles	8	8	16	26	26	22
	(3.9%)	(1.5%)	(2.8%)	(3.5%)	(3.8%)	(4.8%)
Transfer cycles	203	534	551	637	646	428
	(96.2%)	(98.2%)	(95.2%)	(95.6%)	(93.6%)	(93.7%)
Positive hCG	78	164	203	222	226	132
	(38.4%)	(30.7%)	(36.8%)	(34.9%)	(35.0%)	(30.8%)
Abortion	19	35	65	51	39	33
	(24.4%)	(21.3%)	(32.0%)	(23.0%)	(17.3%)	(25.0%)
Delivery	59	129	138	171	187	99
	(29.1%)	(24.1%)	(25.0%)	(26.8%)	(28.9%)	(23.1%)

(삼성제일병원)

어야 한다. 한편, 난자는 성숙되어 2차 감수분열 중기에 arrest 되어야 하며 정자와의 상호작용을 성공적으로 수행하여야 한다 (Navara, et. al., 1997). 현재 ICSI기술은 정자와 난자의 상호작용과 융합의 문제를 bypass 시키는 것에만 초점을 두고 있다. 그러나 ICSI를 해서 정자가 난자의 세포질 내로 들어가더라도 그 후에 다음과 과정이 원활히 이루어져야만 수정란이 정상적으로 발생하게 된다.

1. 정자의 난자 세포질내 침투
2. 2차 극체가 방출되고 난자가 성숙된다.
3. 정자의 핵과 난자의 염색체가 decondensation되어
4. male과 female pronucleus가 형성된다.
5. 정자의 centrosome이 나타나서 male, female pronucleus가 서로 근접하기 위한 microtubule이 생성된다.

**Table 5.** Outcome of COH-ICSI cycle related with etiology of infertility (1994-1999)

	Etiology of Infertility		
	Male	Non-male	Combined
No. of cycle	1680	966	162
Female' age	31.9±3.5	34.1±4.6	38.6±4.5
Retrieved oocytes	23296 13.9±7.6	10062 10.4±7.1	1330 8.2±6.9
Injected oocytes	18715 (80.3%) 11.1±6.2	8023 79.7% 8.3±5.8	1098 (82.6%) 5.7±6.8
Fertilized oocytes	12559 (67.1%) 7.5±4.9	5756 71.7% 6.0±4.6	742 (67.6%) 4.6±4.5
Transferred embryo	7566 (60.2%) 4.5±2.1	3701 64.3% 3.8±2.1	516 (69.5%) 3.2±2.3
Unfertilized cycle	26 1.5%	24 2.5%	16 9.9%
Transfer cycle	1635 97.3%	924 95.7%	145 89.5%
Pregnancy	654 40.0%	293 31.7%	27 18.6%
Abortion	140 21.4%	79 27.0%	7 25.9%
Ongoing pregnancy	514 31.4%	214 23.2%	20 13.8%

(삼성제일병원)

**Table 6.** Outcome of COH-ICSI cycle related with origin of injected sperm

	1994-1999		
	Ejaculated	Epididymal	Testicular
No. of cycle	2076	191	154
Female' age	33.3±4.4	31.6±3.8	32.5±4.1
Retrieved oocytes	24532 11.8±7.5	2567 13.4±7.2	7589 14.0±7.9
Injected oocytes	19684 (80.2%) 9.5±6.2	2070 (80.6%) 10.8±6.0	6082 (80.1%) 11.3±6.3
Fertilized oocytes	13535 (68.8%) 6.5±4.8	1444 (69.8%) 7.6±5.2	4078 (67.1%) 7.5±4.9
Transferred embryo	8500 (62.8%) 4.1±2.2	931 (64.5%) 4.9±2.4	2352 (57.7%) 4.3±2.0
Unfertilized cycle	54 (2.6%)	1 (0.5%)	11 (2.0%)
Transfer cycle	1991 (95.9%)	189 (99.0%)	524 (96.9%)
Pregnancy	680 (34.2%)	79 (41.8%)	215 (41.0%)
Abortion	166 (24.4%)	18 (22.8%)	43 (20.0%)
Ongoing pregnancy	515 (25.9%)	61 (32.3%)	172 (32.8%)

(삼성제일병원)

### 3.1. ICSI 후의 수정 실패나 비정상적인 수정

원인적 요인 - ICSI후 수정이 전혀 안된 경우는 3% (1343주기 중 37주기) 정도 발생한다. 수정에 실패한 1005개 난자를 Hoechst 염색해 본 결과 828 (82%)개는 metaphase II이었고 177 (18%)개는 activation되었다. 대부분의 난자에서 정자가 보였고 대부분이 정자 두부가 부분적 또는 완전히 decondensation되었다. 따라서 ICSI후 수정이 실패하는 대부분의 원인은 난자의 활성화 과정에 문제가 있기 때문이라 생각된다. 그 반면, 난자가 활성화는 되었으나 수정이 안된 경우는 metaphase II에 비해서 정자핵이 응축되어 있는 경우가 많았다. 그리고 활성화된 난자의 56%는 정자두부가 탈응축 (decondensation) 되었지만 male pronucleus로 발달하지 못하였다.

예후 - ICSI로 수정이 실패한 경우에 다음 주기에서 예후는 어떠한가? 이에 대하여 Moomjy 등 (1998)은 ICSI한 후 수정이 한번 안되었다고 해서 다음 ICSI 주기에서 수정이나 분만이 안 일어난다고 볼 수 없다고 했다. Devroey 등 (1998)도 첫 IVF 주기에서 poor fertilization이 발생한 부부의 약 2/3가 다음 주기에서 양호한 수정율을 나타냈다고 보고하였다.

그러나 ICSI에 의해서도 반복적으로 수정이 실패한 경우 또는 수정율이 낮은 경우는 앞으로 극복해야 할 문제이다.

### 3.2. 유전자 결함이 유전되는 문제

정소에서는 여러가지 형태의 microdeletion이 de novo로 발생한다. 이것은 pachytene stage에서 mismatching이 되기 때문에 발생한다고 보는데, 심한 oligozoospermia 나 무정자증에서 Yq의 유전자 결손율은 8~10%에 달한다. 이러한 환자에서 발생하는 Y 염색체상의 gene으로서 AZF, RBM, DAZ 등이 보고되었다. 그러나 spermatogenesis를 조절하는 유전자는 Y 염색체 뿐만 아니라 autosomal gene에도 있는데 DAZ와 구조적 유사점이 많아서 Dazla (DAZ-like autosomal) gene 이라고 명명되었다. 이 유전자는 chromosome 3p24에 위치하며 autosomal recessive mode로 나타나는 남성불임의 candidate gene으로 생각되고 있다. 1994년 Lilford 등은 남성불임환자가 많이 발생한 가계를 보고하였는데 이것으로 보아 남성의 subfertility의 약 60% 까지 autosomal gene transmission을 한다고 본다.

### 3.3 Foreign DNA가 전파될 가능성

Chan 등 (2000)은 green fluorescence protein (GFP)을 encoding하는 rhodamine-tagged plasmid DNA를 부착시킨 spermatozoa를 이용하여 ICSI를 시행한 후 rhesus macaques의 수정란에서 이 transgene이 나타나는 것을 보여주었다. 즉, ICSI 후 난자로부터 포배기에 이르기 까지 착상전 배아에서 GFP를 표현하는 것을 볼 수 있었다. 이러한 현상은 ICSI 후에만 나타났고 통상적인 IVF를 시행한 경우에는 나타나지 않은 점이 특기할 만하다. 7개 수정란을 이식하여 건강한 3마리 새끼를 낳았는데 이 결과로 보아, 주위환경에서 부착된 DNA를 가진 spermatozoa를 사용하여 ICSI를 시행한 경우 임신 결과는 양호하였지만, ICSI 기술은 감염된 유전물질을 수정란에 전파시킬 수 있는 위험성을 가지고 있다는 우려를 자아내게 한다.

### 3.4 난자의 cytoskeleton과 spindle의 파괴 가능성

ICSI 과정은 난자의 세포질에 직접적으로 정자를 미세 유리관을 통하여 주입하는 과정이므

로 난자의 세포골격을 파괴할 수 있으며, 염색체의 이동에 중요한 역할을 담당하고 있는 spindle에 구조적인 변화를 유발할 수 있다. 최근에 Wang 등 (1999)이 보고한 LC Polscope를 이용하면, ICSI 시행시에 spindle을 관찰할 수 있어 이러한 손상을 방지할 수 있을 것으로 생각된다.

#### 4. Future Direction of Microfertilization

현재까지는 ICSI를 대체할 수 있는 효과적인 방법은 없다. 그러나 가까운 미래에는 다음과 같은 방법의 개발 및 병용으로 ICSI의 한계를 극복하여 수정율을 향상시키고 배아의 정상적인 발생율을 높일 뿐 아니라 transgene model을 용이하게 개발할 수 있겠다.

##### 4.1. Sperm factor injection

Sperm factor hypothesis: 정자가 난자내로 들어가면 난자의 세포질내에 calcium이 분비되어 calcium 이온의 농도가 주기적으로 변화하는 진동현상 (calcium oscillation)에 의해 난자가 활성화되는 것으로 알려져 있다. 그러나 과연 어떤 물질이 calcium 농도의 진동을 유발하는지 아직 확실치 않다. 이 가설은 정자와 난자의 융합 후에 정자의 세포질에 있는 어떤 물질이 난자의 세포질로 확산되어 들어가서 난자의 calcium농도의 진동을 일으킨다는 것이다. ICSI후에 일정시간이 경과한 후 난자의 활성화가 되는 것은 정자의 원형질막이 깨져서 물질이 확산되는데 소요되는 시간이 필요하기 때문으로 본다. 그러나 sperm factor의 성상은 확실히 규명되지 않았다. 정자 내에는 cGMP, IP3, nicotinamide, nucleotide metabolites, calcium ion 등이 많으나 이들 자체가 수정 시 일어나는 calcium 진동에 관계된다고 보기는 힘들다. 최근들어 Parrington 등 (1996)은 hamster 난자에서 calcium 진동을 일으키는 단백질을 정자로부터 sequencing 하였다. 그러나 난자를 활성화시키는 물질은 그 외에도 여러개일 가능성이 있고 IP3 induced calcium release (IICR)와 calcium induced calcium release (CICR)의 2가지 경로와 물질들이 존재한다고 보고 있다 (Wilding et. al., 1997).

수정시 일어나는 calcium 진동을 유발하는 물질이 앞으로 규명된다면 이것을 ICSI시행 시에 injection하여 ICSI후에 unfertilization이 발생하는 문제를 일부분 해결할 수 있겠다.

##### 4.2. Sperm Centriole donation

정자가 난자를 뚫고 들어가면 수 시간 뒤에 sperm centrosome에서 많은 수의 microtubule 가닥이 중합되기 시작한다. Microtubule array가 나타나는 것은 syngamy가 일어나기 전에 전핵들이 association되는 것과 관계있다. 1996년 Van Blerkom은 severe oligoteratozoospermic patients에서 수정에 실패하거나 pronuclear-arrested 된 수정란의 sperm centrosome에서 microtubule의 중합과 aster development가 정상적으로 이루어지지 않기 때문에 PN stage에서 수정란의 발육이 정지되며 초기 배의 조기 발육부전과 관련된 정자의 결함으로 분류할 수 있다고 주장하였다.

현재 사용되고 있는 정자의 평가는 운동성, 형태 그리고 난자의 평가는 감수분열에 따른 성숙도와 세포질의 형태적 관찰에 의존하고 있다. Centrosome에 이러한 기능적 결함이 있는 경우 정자가 침투한 후에도 수정이 안되거나 배아의 초기단계에서 발육이 정지되는 것으로 보아 앞으로 정자 난자에 대한 새로운 분석방법이 개발되어야 할 것으로 생각된다.

### 4.3. Cytoplasmic donation

포유류에서 난자의 세포질이 난자의 성숙과 활성화에 미치는 영향은 잘 알려져 있다. 1998년 Cohen 등은 체외수정에서 반복적으로 실패한 7명의 8주기에서 metaphase II의 donor ooplasm 소량을 환자의 metaphase II 난자에 주입 (ooplasmic injection) 하거나 전기자극으로 융합시킨 후 그 임상적 결과를 보고하였다. 전기 융합시킨 경우보다 난자 원형질을 직접 주입한 경우에서 정상 수정율도 높고 (63% vs. 23%), 5명중 2명에서 이전보다 배아 발육이 호전되고 임신되었다. 난자 세포질을 Metaphase II stage에서 이식하는 이 방법은 배아 발육이 저해된 환자에서 도움이 될 것으로 시사된다. 그러나 ooplasm의 내에 많이 존재하는 mitochondria 이상이나 기술적인 최적화를 기하기 위해서는 더 연구가 필요하겠다.

### 4.4. Mammalian transgenesis by ICSI

과거의 transgenesis시키는 방법은 그 효율이 낮았는데, 1999년 Anthony 등은 정자의 두부에 exogenous DNA를 부착시켜 ICSI를 시행함으로써 transgene을 표현하는 배아를 64~94%를 얻을 수 있었고, 약 20%의 새끼가 integrated transgene을 표현하였다. 이것은 ICSI를 이용하여 exogenous DNA를 난자에 효과적으로 전달할 수 있다는 것을 뜻한다.

### 4.5. Germ line gene therapy

현재까지 gene therapy는 somatic cell 을 변형시키고자 하는 시도가 대부분이며, 그 기술도 아직 연구단계에 머물러 있고 임상실험에서 환자가 사망하는 등 안전성과 효율성에 어려운 문제점을 가지고 있다. 그러나 앞으로 이러한 문제점이 해결된다면 수정란이 만들어지는 단계에서 위의 transgenesis방법에 의한 germ line gene therapy가 가능할 수도 있고 이것으로 선천성 효소 결핍 등 각종 유전질환을 치료할 수 있는 길이 열릴 것이다.

## 5. Conclusion

남성불임의 문제는 1992년 ICSI 기술이 소개됨으로써 획기적인 전기를 맞게 되었다. ICSI의 적응증에는 이전 IVF 주기에서 수정율이 아주 낮거나 수정이 실패한 경우, 부고환이나 고환정자를 이용하는 경우, 정자의 심한 형태적 이상, 심한 정자 운동성 저하 등이 있다. 정상적인 수정과정은 acrosome reaction, 정자의 침투, calcium의 변화, 난자의 활성화, 극체의 방출, PN형성, 난할 등 여러 단계를 거쳐 이루어지나, ICSI 후의 수정에 수반되는 과정에 관한 기초적인 이해는 아직 부족하다. 그럼에도 불구하고 임상결과는 성공적이어서 지금까지 세계의 많은 center (ESHRE Task Force)들과 본원의 data에 의하면 심한 정자 결함을 가진 남성불임환자에서 ICSI를 시행했을 때 정자의 source에 관계없이 높은 수정율과 임신율을 얻을 수 있었다. 태어난 아기의 염색체 중 성염색체 이상이 약간 증가된 경향을 보였으나 다행히 major, minor 기형의 빈도는 자연임신에 비하여 증가되지 않는 것으로 보인다. 그러나 아직 확실한 결론을 얻기에는 이르며 더 많은 수의 분석이 필요하다. 반면, 최근 영장류 실험에서 외부의 감염물질을 정자에 부착시킨 경우에 착상 전 배아에서 transgene이 표현되는 것이 입증됨으로써 ICSI로 인한 감염물질 전파에 관한 우려를 배제할 수 없겠다. 또한 비정상적인 발육을 하는 난자와 배아의



기능을 회복시키기 위한 최근의 시도로서 donor ooplasm transfer는 기술적인 최적화를 위한 연구 뿐 아니라 세포질의 안전성도 철저히 검증하여야 할 것이다. 앞으로 고도로 발달할 유전자 치료법을 sperm을 적용하여 germ line therapy 를 하는 방법에도 micro-assisted fertilization 기법이 그 일익을 담당하리라 본다. 그러나 ICSI 기술에 의하여 태어난 아기를 더 장기적으로 추적 관찰하여 다각도로 분석하는 것이 필요하다. 또한, gamete를 다루는 모든 procedure는 윤리적 규범에 따라 안전성을 우선하여 의사 결정을 내려야 할 것이다.

## 6. REFERENCES

- Perry ACF, Wakayama T, Kishikawa H, Kasai T, Okabe M, Toyoda Y and Yanagimachi R. Mammalian Transgenesis by ICSI. *Science* 1999; 284: 1180-3.
- Bonduelle M, et al. Seven years of ICSI and follow-up of 1987 subsequent children. In ART in the year 2000. ESHRE campus workshop, Eds. K.Diedrich and R. Felberbaum. Oxford University Press, Human Reproduction 14: Supp. 1 Sep. 1999.
- Chan AW, et al. Foreign DNA transmission by ICSI: injection of spermatozoa bound with exogenous DNA results in embryonic GFP expression and live Rhesus monkey births. *Mol Hum Reprod* 2000; 6(1): 26-33.
- Cohen J, et al. Ooplasmic transfer in mature human oocytes. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 269-80.
- Colombero LT, et al. The role of structural integrity of the fertilizing spermatozoon in early human embryogenesis. *Zygote* 1999; 7: 157-63.
- Devroey, Tarlatzis, Steirteghem. Current theory and practice of ICSI 1998.
- Edwards, New approaches to human fertilization. in Global trends in assisted human reproduction. Eds. Cohen, J, Hamberger, L and Jones Jr, H.W. 1998
- Lilford R, et al. Case-control study of whether subfertility in men is familial. *Br Med J* 1994; 309: 570-3.
- Moomjy M, Sills ES, Rosenwaks Z and Palermo GD. Implications of complete fertilization failure after intracytoplasmic sperm injection for subsequent fertilization and reproductive outcome. *Hum Reprod* 1998; 13: 2212-6.
- Parrington J, Swann K, Shevchenko V, et al. Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature* 1996; 379: 364-8.
- Van Blerkom J. Sperm centrosome dysfunction: a possible new class of male factor infertility in the human. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 349-54.
- Wang WH, Hackett RJ, Meng L and Keefe DL. Spindel observation and its relationship with fertilization after ICSI in living human oocytes. Annual Meeting of American Society for Reproductive Medicine and Canadian Fertility and Andrology Society. Abstract #O-001 (Toronto, Canada), pS1, 1999.
- Wilding M and Dale B. Sperm factor: what is it and what does it do? *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 269-73.