

사람 정자의 성숙도와 운동성에 따른 세포질내 정자주입 후 전핵형성과 초기 배발생

김근주 · 김종흥* · 이상찬* · 김병기
동의대학교 자연과학대학 생물학과
*세화불임클리닉

Pronuclei Formation and Early Development of Human Oocytes after Intracytoplasmic Sperm Injection according to Maturity and Motility of Spermatozoa

Geun-Joo Kim, Jong-Heung Kim*, Sang-Chan Lee*, and Byung-Ki Kim

Department of Biology, College of Natural Sciences, Donggeui University, Pusan, 614-714, Korea

*Saewha Infertility Institute, Pusan, Korea

요 약 : 성선자극호르몬으로 자극된 난소로부터 회수된 사람의 성숙난자의 전핵형성과 초기배발생에 정자의 운동성과 성숙도가 미치는 영향을 조사하였다. 세포질내정자주입 (ICSI)은 HEPES-buffer mTCM-199 배양액에서 실시하였다. 체내에서 성숙된 난구세포부착난자를 ICSI에 의하여 사정된 운동성 정자 또는 비운동성 정자로 수정하였을 때 운동성 정자로 수정된 난자가 비운동성 정자로 수정된 난자보다 전핵형성율이 높았다 (79.8% vs 51.7% ; $p < 0.002$). 그러나 체내에서 성숙된 난구세포부착난자를 ICSI에 의해 정소 내 운동성 정자 또는 비운동성 정자로 수정하였을 때 운동성 정자와 비운동성 정자 사이의 전핵형성율은 차이가 없었다. 10.0 mM lactate, 0.5 mM pyruvate, 0.2 mM taurine, 1.0 mM glutamine, 2.22 mM MEM amino acids, vitamin 그리고 10% 사람 난포액이 포함된 수정 Tyrode 배지에서 전핵이 형성된 수정란의 초기 발생은 정자의 체취원과 운동성에 관계없이 9~16세포기로 발생하였다.

ABSTRACT : In the present study, we investigated the effect of maturity and motility of spermatozoa on the formation of pronucleus and subsequent developmental capacity of the human embryo *in vitro*. The fertilization was performed by means of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in HEPES-buffered m-TCM-199 medium. In the first part of the experiment, motile or immotile human spermatozoa ejaculated were injected into cumulus-enclosed human oocytes matured *in vivo*. Significantly ($p < 0.002$) higher proportion of oocytes that was injected with motile spermatozoa formed 2 pronuclei than the oocytes injected with immotile spermatozoa (79.8% vs 51.7%). In the second part of the experiment, cumulus-enclosed human oocytes matured *in vivo* were injected with motile or immotile spermatozoa collected from testes. There was no difference between motile and immotile spermatozoa. In the third part of the experiment, using modified Tyrode's medium containing 10.0 mM lactate, 0.5 mM pyruvate, 0.2 mM taurine, 1.0 mM glutamine, 2.22 mM MEM amino acids, vitamin and 10% human follicular fluid, we found that the development of oocytes that formed 2 pronuclei were able to develop to 9-16 cells regardless of maturity and motility of spermatozoa.

Key words : Intracytoplasmic sperm injection, Ejaculated spermatozoa, Testicular spermatozoa, Pronuclei, *In vitro* development.

서 론

포유류의 수정은 부정소에서 성숙한 정자가 자성생식기관을 통과하면서 수정능력을 획득하고 수관관 팽대부에서 난자와 만나며, 난자 주위의 난구와 접촉하면서 침체반응이 시작하여 투명대에 도착하여 침체반응을 종료시킨 후 투명대를 통과하여 난자와 정자의 원형질막이 융합하여 정자핵이 난자세포질 속으로 포함되면서 이루어진다 (Yanagimachi, 1981). Uehara 와 Yanagimachi (1976)가 햄스터 난자내에 정자핵을 미세외과적으로 주입하여 전핵 형성을 최초로 성

공시킨 이후 많은 연구자들에 의하여 세포질내정자주입 (intracytoplasmic sperm injection ICSI)법으로 임신과 산자를 생산하려는 시도가 있었으나 제한된 성공이 보고되고 있다.

최근 사람에서 ICSI에 의한 최초의 임신이 보고된 이래 (Palermo et al., 1992) 남성 원인 불임의 치료는 획기적인 발전을 가져왔다. 그 결과로서 ICSI는 일반적인 체외수정으로 임신을 성공하지 못하였거나, 정자를 정소 또는 부정소에서 채취하여야 하는 남자에서 널리 적용되고 있다. ICSI가 적용되는 대부분의 환자는 사정된 정액에서 정자의 숫자 감소, 운동성 및 형태의 결함 등을 갖고 있다. 이러한 결함정자에도 불구하고 수정율과 임신율은 높으며 지금까지 태어난

신생아는 성염색체이상 (Meschede & Horst, 1997)을 제외하고는 다행스럽게도 정상이다 (Bonduelle et al., 1996).

ICSI는 정자가 난자의 원형질막을 우회하여 통과하므로 수정기전이 체내 및 체외수정과는 다르며 아직 잘 밝혀져 있지 않다. 따라서 ICSI는 정자와 난자의 원형질막 상호작용보다는 정자의 핵 상태와 난자가 농축된 정자 핵을 팽화하여 전핵을 형성하는 능력에 초점을 맞추어야 할 것으로 사료된다. 본 연구에서는 사람의 체외수정 program에서 정자의 성숙도와 운동성 차이가 ICSI 후 전핵형성과 초기 배발생에 영향을 미치는지를 조사하였다. 이를 위하여 부정소에서 성숙 과정이 이루어진 사정된 정자와 정소내의 정자를 운동성 정자와 비운동성 정자로 구분하여 ICSI를 실시한 후 전핵형성과 초기 배발생에 미치는 영향을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 난자 및 정자의 회수

환자들을 시상하부-뇌하수체 전엽 축의 억제를 유도하기 위하여 Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonist (Superfact ; Hoechst AG, Germany)를 사용한 황체기 장기 투여법을 실시하였다. 즉 월경 주기가 일정한 환자에서는 월경 주기 제 14일에 난포의 크기 및 배란 유무를 확인하고 월경 주기 제 21일부터 GnRH agonist를 매일 피하 주사한 후 월경이 있으면 월경 주기 제3일에 뇌하수체의 기능 억제 유무를 확인하기 위하여 혈중 estradiol (E₂)을 측정하여 그 값이 50 pg/ml 미만이거나 질식 초음파 (Combison 320, Krtztechnik, Austria)로 관찰되는 난포의 직경이 10 mm 미만인 경우에 성공적으로 기능 억제가 되었다고 생각하고 외인성 성선자극호르몬을 투여하여 과배란유도를 시작하였다. 과배란유도는 Human menopausal gonadotropin (hMG; Pergonal, Serono, Switzerland)과 human follicle stimulating hormone (hFSH; Metrodin HP, Serono Switzerland)을 단계적 용량감소법 (step-down fashion)을 채택하였으며, hMG와 hFSH 투여 시작 4일 후부터 질식 초음파를 이용하여 난포의 성장을 감시하였고, 난포의 성장 정도에 따라 외인성 성선자극호르몬의 용량을 조절하였다. 최대 난포 (leading follicle)의 평균 직경이 18mm에 도달하였거나 평균 직경이 16mm 이상인 난포가 3개 이상 관찰되면 human chorionic gonadotropin (hCG; Profasi, Serono, Switzerland) 10,000 IU를 근육 주사하여 배란을 유도하고, hCG 주사 36시간 후에 질식 초음파 유도하에 질벽을 통하여 난자를 채취하였다. 난자회수 후 2-3시간에 25 IU hyaluronidase/ml (type

VIII, Sigma)에서 배양하여 난구세포를 제거하여 제1극체가 방출한 난자를 사용하였다.

난자회수 전날 또는 당일 개방 정소 biopsy에 의하여 정자를 채취하였다. 처음 음낭 피부를 절개한 후 peritoneal tunica vaginalis를 통하여 밀려나온 정소조직 일부를 절제하여 1ml Earle's HEPES-buffered 배양액에 0.5% human serum albumin (HSA)가 함유되어 있는 Falcon tube에 옮기고, 같은 배양액으로 3회 세척하였다. 세척 후 Petri dish에서 slide glass와 바늘을 사용하여 정소조직을 파쇄하여 정소의 세정관내 정자세포를 채취하였다.

사정에 의하여 채취된 정액은 실온에서 20~30분간 방치하여 액화시킨 후 정액에 포함된 정자의 농도 및 운동성을 조사하였다. 운동성을 가진 정자는 swim-up 및 mini-percoll 방법을 사용하여 분리하여 5ml의 Ham's F-10이 담긴 conical tube에 주입하여 1,500×g로 5분간 원심분리에 의하여 2회 세척하였으며, 마지막 세척 후 정자괴에 포함된 정자를 사용하였다. 세척 후 바로 사용되어지는 정자는 20% 사람 난포액이 첨가된 Ham's F-10에서 3~5시간 동안 37°C, 5% CO₂와 95% 공기, 상대습도 100%의 CO₂ 배양기에서 배양하여 사용하였으며, 나머지 정자는 egg yolk가 첨가된 동결보존액에서 냉동보관 후 해동시켜 사용하였다.

정소 또는 사정에 의하여 채취되어진 정자운동성 판정은 정자편모의 파동 또는 전진이동을 나타낸 정자를 운동성을 가진 정자로 분류하였고, 정자 검사하는 동안 편모파동 또는 전진이동을 전혀 나타내지 않는 정자를 비운동성 정자에 포함하였다.

2. 배양액

난자 세척 및 배발생을 위한 기본배양액은 modified-TALP를 기본으로 하여 사용하였으며, 그 조성은 110 mM NaCl, 3.2 mM KCl, 2.25 mM CaCl₂ · 2H₂O, 0.5 mM MgCl₂ · 6H₂O, 25.0 mM NaHCO₃, 10.0 mM Na-lactate, 0.5 mM Na-pyruvate이며, 0.2 mM taurine, 1.0 mM glutamine, 2.22 mM MEM amino acids, 1.0 mL/100 mL vitamin을 첨가하여 pH는 7.4, 삼투압은 280~285 mOsm로 조정하여 실험 직전 10% 사람 난포액을 첨가하였다.

정자 처리를 위한 배양액은 Ham's F-10 (Gibco. BRL. Cat. no. 430~1200EA)을 기본으로 하여 0.8 mM Ca-lactate, 5 mM KHCO₃, 20 mM NaHCO₃, streptomycin 0.0185g/L와 penicillin G 0.0750g/L을 첨가하여 정자를 세척하였으며 세척 후 20%의 사람 난포액을 첨가하였다.

ICSI를 위한 배양액은 TCM-199 (Gibco. BRL. Cat. no.

400~1100)으로 1.8 mM Ca-lactate, 0.4 mM Na-pyruvate, 2.5 mM HEPES, 26.2 mM NaHCO₃, streptomycin 0.1g/L와 penicillin G 0.06g/L을 첨가하여 사용하였다.

사람 난포액은 난자 채취시 완전히 성숙된 직경 20mm이상의 배란 전 난포로부터 채취하여 원심분리 후 상층액을 2 μ m필터로 여과 후 56°C에서 30분 비활성화하여 -20°C에서 사용시 까지 보존하였다.

3. 세포질내 정자주입 (ICSI)

ICSI는 도립현미경 (Diaphot 300, Nikon, Japan)에 장착된 미세조작기 (NT-88, Narishige, Japan)를 이용하였으며, 난자고정을 위한 holding pipette은 외경과 내경이 각각 100~120 μ m, 15~20 μ m인 것을 사용하였고, 정자주입을 위한 injection pipette은 외경과 내경이 각각 8~9 μ m, 4~5 μ m인 것을 사용하였다. 준비된 정자를 mineral oil로 피복된 10% polyvinylpyrrolidone (PVP, Sigma)이 첨가된 배양액 drop으로 옮겨 injection pipette을 이용하여 정자의 중편부에 물리적인 힘을 가하여 비운동화 시켰다. 비운동화된 정자의 미부부터 injection pipette으로 흡입하였고 난자는 holding pipette으로 제1극체가 12시 또는 6시 방향에 위치하도록 하여 고정된 후 정자가 흡입된 injection pipette을 염색체의 손상을 피하기 위해 난자의 3시 방향에서 9시 방향으로 주입하였다.

정자주입 시 injection pipette으로 난자의 세포질을 소량 흡입하여 난자의 원형질막의 관통여부를 확인하였고, injection pipette에서 난자세포질내 정자방출시 injection pipette내의 PVP용액이 들어가지 않도록 정자를 세포질 내에 조심

스럽게 주입하였다. 주입이 완료된 난자의 ICSI 후 16~20시간 내에 전핵형성을 확인하였다.

4. 통계 처리

본 연구에서 얻어진 결과의 유의성은 X² 검정을 실시하였다.

결 과

1. 사정된 정자의 운동성 유무에 따른 ICSI 후 전핵형성을 성선자극호르몬 투여 후 체내에서 성숙한 난자 세포질 내에 사정된 정자를 직접 주입하였을 때 주입한 정자의 운동성이 전핵형성에 미치는 영향은 Table 1에서 보는 바와 같이 운동성을 갖고 있는 정자를 주입한 난자에서 주입한 난자의 5.3%가 손상되었으며, 손상되지 않은 난자에서 전핵이 형성된 난자와 형성되지 않은 난자는 각각 79.8%와 20.2%이었다. 운동성을 갖지 않는 정자를 주입한 난자에서는 주입한 난자의 51.7%가 전핵이 형성되어 운동성을 갖는 정자를 주입한 난자에 비하여 전핵형성율이 유의적 ($P < 0.002$)으로 감소하였다.

2. 정소 내 정자의 운동성 유무에 따른 ICSI 후 전핵형성을 성선자극호르몬 투여 후 체내에서 성숙한 난자 세포질 내에 정소로부터 채취한 정자를 직접 주입하였을 때 정자의 운동성이 전핵형성에 미치는 영향은 Table 2에서 보는 바와 같이 운동성을 갖고 있는 정자를 주입한 난자에서 11.6%의 난자가 손상되었으며, 손상되지 않은 난자에서 78.6%의 난자

Table 1. Effect of the motility of ejaculated spermatozoa on pronuclei formation in the mature oocytes collected from the stimulated ovaries

With (+) or without (-) sperm motility	No. of oocytes (M II) injected	No. of damaged oocytes (%)	No. of 2PN oocytes (%)	No. of unfertilized oocytes (%)
+	188	10 (5.3)	142 (79.8) ^a	36 (20.2)
-	31	2 (6.5)	15 (51.7) ^b	14 (48.3)

Values with different superscript within the same column are significantly different ($p < 0.002$).

Table 2. Effect of the motility of testicular spermatozoa on pronuclei formation in the oocytes collected from the stimulated ovaries

With (+) or without (-) sperm motility	No. of oocytes (M II) injected	No. of damaged oocytes (%)	No. of 2PN oocytes (%)	No. of unfertilized oocytes (%)
+	95	11 (11.6)	66 (78.6)	18 (21.4)
-	55	7 (12.7)	34 (70.8)	14 (29.2)

Table 3. Effect of sperm motility and sperm source on the cleavage of embryos after intracytoplasmic sperm injection in the stimulated women

With (+) or without (-) sperm motility	Source of sperm	No. of 2PN oocytes	No. of embryos cleaved (%)		
			2~4cell (30h)	5~8cell (60h)	9~16cell (76h)
+	ejaculated	160	153 (95.6)	111 (69.4)	34 (21.3)
	testicular	86	82 (93.9)	59 (68.6)	16 (18.6)
-	ejaculated	24	22 (91.7)	16 (66.6)	5 (20.8)
	testicular	54	52 (94.1)	35 (64.8)	10 (18.5)

에서 전핵이 형성되었으며, 전핵이 형성되지 않은 난자는 21.4%이었다. 운동성을 갖지 않는 정자를 주입한 난자에서 70.8%의 난자가 전핵이 형성되어 정소에서 채취한 정자에서는 정자의 운동성이 전핵형성에 영향을 미치지 않았다.

3. 정자의 채취원과 운동성 유무에 따른 ICSI 후 초기 배발생

정자의 채취원과 운동성이 수정 후 초기분할에 미치는 영향은 Table 3에서 보는 바와 같이 사정 또는 정소 내의 운동성을 갖고 있는 정자를 주입한 난자에서 주입 후 30시간에 2~4세포기로 진행된 수정란은 각각 95.6%와 93.9%이었고, 주입 후 60시간에서 5~8세포기로 진행된 수정란은 각각 69.4%와 68.6%, 76시간에서는 9~16세포기로 진행된 수정란이 각각 21.3%, 18.6%이었다. 사정 또는 정소 내의 비운동성 정자에서는 30시간에서 2-4세포기 배아는 각각 91.7%와 94.1% 이었으며 60시간에서 5~8세포기로 진행된 난자는 66.6%와 64.8%를 나타내었고 76시간째 9~16세포기로 분할된 난자는 20.8%와 18.5%를 각각 나타내어 전핵이 형성된 난자의 초기 배분할에서는 정자 원과 운동성에 따른 차이가 없었다.

고 찰

ICSI는 정상적인 체내수정 또는 일반적인 체외수정법으로 수정되어질 수 없는 심한 희소무력정자를 난자 세포질내에 주입하여 수정시킬 수 있는 생식 분야의 새로운 기술이다 (Palermo et al., 1992). 본 연구에서 정자 채취원 (사정 또는 정소)에 관계없이 비운동성 정자로서 ICSI 후 전핵형성과 초기분할이 가능하였다. Vandervorst et al. (1997)은 운동성이 없는 사정된 정자를 ICSI에 의하여 주입된 난자의 12.4%에서 2PN이 형성되었다고 보고하였다. Kahraman et al. (1996)도 사정된 정자에서 운동성이 없는 정자로 ICSI 후 52.2%의 수정율과 수정된 난자의 90%이상에서 초기분할이

진행되어 본 실험과 거의 일치하였다. Nijs et al. (1996)은 정소와 부정소에서 유래한 정자에서 운동성을 갖거나 비운동성 정자사이에는 ICSI 후 수정능력에 차이는 없었으나, 사정 후 운동성을 가지지 않은 정자는 정소와 부정소에서 유래한 비운동성 정자에 비하여 ICSI 후 수정능력이 유의적으로 감소하여 본 연구와 일치하는 경향이다. 정자의 운동성은 질에서 나팔관까지 이동, 투명대 침투와 수정에 포함되어지는 여러 과정에서 중요한 역할을 담당하므로 사정된 정자가 운동성을 상실한다면 생리적 수정이 불가능하며, 따라서 운동성 상실은 남성불임의 주요 원인으로 생각하고 있다. 무력정자증 사람에서 일반적인 체외수정으로는 수정율이 극히 저조하다 (Mahadevan et al., 1984). 운동성을 갖지 못한 정자를 사정하는 사람에게 수정율을 증가시킬 수 있는 방법은 비운동성 정자를 그대로 ICSI에 의하여 난자 내로 주입하거나, 부정소 또는 정소에서 채취된 미성숙정자를 이용하여 난자의 세포질에 직접 주입하는 방법 등이 있다. 운동성이 없는 정자가 전핵을 형성할 수 있다는 것은 새로운 발견은 아니다. 일부 포유류의 정자핵 또는 운동성이 손상된 정자를 헬스터 난자에 주입하여 전핵이 형성된다 (Uehere and Yanagimachi, 1976). 최근 완전한 무력정자증 사람에서도 정소 내 비운동성 정자를 ICSI하여 임신을 보고하였다 (Kahraman et al., 1996).

사정된 정자에서 운동성이 없는 정자는 수정율이 저하되었으나 정소내의 정자는 운동성에 영향을 받지 않았다. 운동성이 없는 정자라고 해서 전체 정자가 사멸된 것은 아니다 (Eliasson, 1977). 본 실험에서는 정자의 생존여부를 조사하지 않았기 때문에 주입한 정자에서 운동성을 상실한 정자가 사멸되었는지는 확실하지 않다. 사정 또는 부정소 및 정소 내 정자는 energy 대사 이상, 미부 미세구조적 결함 (Ryder et al., 1990)과 편모 내 dynein arms의 전체 또는 부분적 결함 (Papadimas et al., 1997) 등으로 운동성을 손상 받는다. 사정된 비운동성 정자의 일부는 이미 사멸되었을 것으로 사료되며, 실험에 사용되어진 사정된 정자는 대부분 오랜 기간

금육으로 세정관으로부터 생산된 정자가 부정소에서 장시간에 걸쳐 수송이 이루어졌을 것으로 사료된다. 정자의 부정소에서 장시간 정체는 정자의 사멸 또는 퇴화를 증가시킨다 (Bedford, 1994). 정자의 노화는 DNA를 손상시키고, DNA protamine포장이 불안정하게 되어 응성전핵형성이 제한된다 (Nijs et al., 1996).

ICSI는 세포주기를 조절하거나 정자에서 유래한 난자의 활성화 기전을 연구하는 기회를 제공한다. Meng 과 Wolf (1997)는 rhesus monkey에서 성숙난자에 정자주입으로 86%의 난자에서 2PN이 형성되었으며, 정자두부만 주입된 난자에서 87%의 난자가 전핵이 형성되었으나, 정자의 미부를 주입한 난자에서는 19%의 난자에서 활성화되었고, 정자의 추출물을 주입한 난자에서는 76%의 난자에서 활성화되었다고 보고하였다. 본 연구에서는 위의 보고에 비하여 낮은 전핵형성을 나타내고 있지만 ICSI에 의한 정자주입으로 부정소 성숙 및 수정능력획득과정 없이 전핵형성과 뒤이은 체외 초기난할을 계속할 수 있음을 의미한다.

생리적 수정은 수정능력을 획득한 정자만이 난자의 세포질내로 침입하여 난자의 피질반응, 감수분열의 회복, 대사능력의 증가와 세포골격의 재배열 등이 포함되는 난자의 활성화를 유도한다(Van Blerkom et al., 1995). ICSI는 정자-난자간의 막의 부착과 융합을 우회하는 과정이다. ICSI에 의하여 난자가 활성화되는 기전은 생리학적이 아니며 이에 대하여는 아직 잘 규명되어 있지 않다. ICSI에 의한 난자 활성화 기전은 첫째로 난자가 세포의 고농도 calcium에 일시적인 노출로 사료된다. 마우스 난자에 정자 침입 없이 calcium만을 주입하여도 단위생식을 유지할 수 있다(Fulton & Whittingham, 1978). 사람의 난자를 calcium이 포함된 배지에서 비운동성 정자를 주입하면 응성전핵을 형성하였으나, calcium이 첨가되지 않은 배지에서 주입하면 응성전핵이 형성되지 않는 것으로 보아 calcium은 응성전핵형성과 난자의 활성화에 중요한 인자로 작용한다(Gearon et al., 1995). 본 연구에서도 정자 주입배지에 calcium이 1.8 mM 첨가되어 있으므로 주입시 calcium이 난자 내로 주입되었을 것으로 사료된다. 둘째로 calcium이 첨가되지 않은 배지에서 정자를 주입하여도 ICSI에 의하여 난자가 활성화되었으므로 ICSI과정 동안 주입바늘이 난자 내로 삽입되면서 세포막의 파손과 세포질의 기계적인 자극으로 난자가 활성화되는 것으로 사료된다 (Edward & Van Steirteghem, 1993). 셋째로 정자 두부에서 sperm-associated activation factor(SAOAF)를 난자 내 방출 (Edward & Van Steirteghem, 1993; Parrington et al., 1996) 하여 난자를 활성화시킨다. 이러한 인자는 햄스터(Swann,

1990)와 토끼(Stice & Robl, 1990)등에서도 정자의 cytosolic fraction(CF)에 있으며, 사람의 CF를 마우스난자에 주입하여도 마우스난자를 활성화시킬 수 있으므로 종 특이성(Stice & Robl, 1990)은 없다. 난자의 sperm nucleus decondensing factor에 의하여 정자의 핵이 팽화되고, 팽화된 정자의 두부로부터 SAOAF가 난자 내에 방출하여 난자를 활성화시킨다 (Dozortsev et al., 1997). 정자 형성과정에서 SAOAF가 만들어지는 시기는 확실하지 않으나 본 연구에서 정소로부터 채취한 정자에는 이미 SAOAF의 형성이 완료된 것으로 사료된다. 결론적으로 운동성 결함을 나타내는 사정된 정자는 전핵형성율이 낮으며, 정소내 정자는 정자의 운동성이 전핵형성에 영향을 미치지 않으며, 전핵형성이 완료된 수정란의 초기발생에는 정자의 성숙도와 운동성이 영향을 미치지 않는다.

인용문헌

- Bedford J (1994) Epididymal physiology: its implications for epididymal microsurgery. In: Schoysman R (ed.), *Microsurgery of Male Infertility*. Fondazione per gli studi sulla riproduzione umana, Palermo, Italy, pp 71-100.
- Bonduelle M, Legein J, Buysse A, Van Assche E, Wisanto A, Devroey P, Van Steirteghem AC, Liebaers I (1996) Prospective follow-up study of 423 children born after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 9 (Suppl):38
- Dozortsev D, Qian C, Ermilov A, Rybouchkin A, De Sutter P, Dhont M (1997) Sperm-associated oocyte-activating factor is released from the spermatozoon within 30 minutes after injection as a result of sperm-oocyte interaction. *Hum Reprod* 12:2792-2796.
- Edward RG, Van Steirteghem AC (1993) Intracytoplasmic sperm injection: Does calcium hold the key to success? *Hum Reprod* 8:988-989.
- Eliasson R (1977) Supravital staining of human spermatozoa. *Fertil Steril* 29:1-6.
- Fulton BP, Whittingham DG (1978) Activation of mammalian oocytes by intracellular injection of calcium. *Nature* 273:149-151.
- Kahraman S, Tasdemir M, Vicdan K (1996) Pregnancies achieved with testicular and ejaculated spermatozoa in

- combination with intracytoplasmic sperm injection in men with totally or initially immotile spermatozoa in the ejaculate. *Hum Reprod* 11:1343-1346.
- Mahadevan M, Trounson A (1984) The influence of seminal characteristics on the success rate of human *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 42:400-405.
- Martin RH, Ko E, Rademaker A (1988) Human sperm chromosome complements after microinjection of hamster eggs. *J Reprod Fertil*. 84:179-186.
- Meng L, Wolf DP (1997) Sperm-induced oocyte activation in the rhesus monkey: nuclear and cytoplasmic changes following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 12:1062-1068.
- Nijs M, Vanderzwalmen P, Vandamme B, Segal-Bertin G, Lejeune B, Segal L, Van Roosendaal E, Schoysman R (1996) Fertilizing ability of immotile spermatozoa after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reprod* 11: 2180-2185.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghen AC (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoa into an oocyte. *Lancet* 340: 17-18.
- Papadimas J, Koliakou K (1997) Therapeutic approach of immotile cilia syndrome by intracytoplasmic sperm injection: a case report. *Fertil Steril* 67:562-565.
- Parrington J, Swann K, Shevchenko VI (1996) Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature* 379:364-368.
- Ryder T, Mobberley M, Hughes L (1990) A survey of the ultrastructural defects associated with absent or impaired human sperm motility. *Fertil Steril* 53:556-560.
- Stice SL, Robl JM (1990) Activation of mammalian oocytes by a factor obtained from rabbit sperm. *Mol Reprod Dev* 25:272-280.
- Swann K (1990) A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increase and mimics fertilization in hamster eggs. *Development* 110:1295-1302.
- Uehara T, Yanagimachi R (1976) Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol Reprod* 15:467-470.
- Van Blerkom J, Davis P, Merriam J, Sinclair J (1995) Nuclear and cytoplasmic dynamics of sperm penetration, pronuclear formation and microtubule organization during fertilization and early preimplantation development in the human. *Hum Reprod Update* 1:429-461.
- Vandervorst M., Tournaye H, Camus M (1997) Patients with absolutely immotile spermatozoa and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 12:2429-2433.
- Yanagimachi R (1981) Mechanism of fertilization in mammals. In: Mastroianni L, Jr & Biggers J (ed.), *Fertilization and Embryonic Development In Vitro*. Plenum Press, New York, pp 82-184.