

배양액 내 인간 난포액 및 성선자극호르몬 첨가가 인간 미성숙 난자의 체외성숙, 수정 및 체외 배발달에 미치는 영향

김은국^{1,*}, 김동원², 정병준¹

¹대전 서울여성병원, ²광주 미래와 희망 산부인과의원

Influence of Human Follicular Fluid and Gonadotropins in the Culture Medium on the *In Vitro* Maturation, Fertilization and Development of Human Immature Oocytes

Eun-Kuk Kim^{1,*}, Dong-Won Kim² and Byung-Jun Jeong¹

¹Daejeon Seoul Woman's Hospital, Daejeon 302-120, Korea

²Gwangju Mirae & Heemang Ob./Gyn., Gwangju 502-200, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to examine the effects of human follicular fluid and gonadotropin (FSH + HCG + rhEGF) on *in vitro* maturation, fertilization and development of human immature oocytes.

Cumulus-oocyte complexes (COCs) were collected following for *in vitro* fertilization and embryo transfer (IVF-ET) cycles of the patients. At the time of oocytes collection, oocytes were classified into MII, MI and GV in accordance with their appearance (MII: Fully mature oocyte at metaphase II of meiosis; MI: Nearly mature oocytes at metaphase I of meiosis; GV: Immature oocytes at prophase I of meiosis). After controlled ovarian stimulation using gonadotropin(FSH) and human chorionic gonadotropin (HCG) in 70 ICSI cycles, 158 MI to MII matured oocytes were intracytoplasmic sperm injection (ICSI) ~4 h after *in vitro* culture and 553 MII oocytes were ICSI after denudation. The aspirated MI and GV oocytes were cultured in culture medium containing 10% (v/v) serum protein substitute (SPS), 10% (v/v) human follicular fluid (hFF) and 10% (v/v) serum protein substitute (SPS) + 1 IU/ml FSH + 10 IU/ml HCG + 10 ng/ml recombinant human epidermal growth factor (rhEGF). The maturation rate of immature oocytes was similar among the three group. When maturation medium was supplemented with 10% SPS, 10% hFF or gonadotropins, the fertilization rate of *in vitro* matured oocytes was higher in 10% SPS (80.0%), but there was no statistical significance (78.2%; hFF, 76.9%; gonadotropin, $p>0.05$). The development rate of human embryos developed to 6~8 cells were not significant difference in the medium containing SPS, hFF and gonadotropins (65.6%, 65.9% and 66.7%).

The results of these study suggest that human follicular fluid and gonadotropins supplemented in the culture medium was not effected on the *in vitro* maturation, fertilization and development of human immature oocytes.

(Key words : immature oocyte, human follicular fluid(hFF), gonadotropin, *in vitro* maturation)

서 론

1978년, 체외수정에 의한 최초의 시험관 아기 성공(Steptoe와 Edwards, 1978) 이후 과배란 유도(controlled ovarian hyperstimulation, COH) 방법은 불임시술에서 계획적으로 많은 난자를 얻기 위해 많이 사용되어지고 있다. 일반적으로 시험관 아기 시술을 위해 과배란 유도 후 난자를 채취하면 약 20~30%의 미성숙 난자가 얻어지게 되는데(Mandelbaum 등, 1996; De Vos 등, 1999), 채취된 난자의 수가 적은 환자의 경우, 미성숙 난자의 체외성숙은 중요한 의미가 있다. 미성숙 난자의 체외성

숙율(*in vitro* maturation rate)은 난핵포(germinal vesicle, GV) 단계가 약 75%, 제 1감수분열 중기(metaphase I, MI)의 단계가 74% 정도이고, 이 중 70% 정도가 수정능이 있다고 보고되고 있으며, 여러 불임시술 병원에서 미성숙 난자를 체외성숙시켜 임신까지의 보고를 하고있다(Cha 등, 1996; Coetzee와 Windt, 1996; Edirisinghe 등, 1997).

그러나 미성숙 난자의 체외성숙은 체내 성숙난자보다 발달 저하 및 늦은 난할 속도를 보여서 세포질(cytoplasm)의 질(quality)이 떨어지는 것으로 생각되며, 이 때문에 임신 결과가 낮게 나오는 것으로 보고되고 있다(Barnes 등, 1996; Trounson

* Correspondence : E-mail : cruz108@naver.com

등, 1998). 이러한 이유는 난자 자체의 결합이나 현재의 배양 조건이 불완전하기 때문에 발생할 수도 있는데, 이를 극복하기 위해서 배양액 내 성선자극호르몬(gonadotropin)을 첨가하여 체외성숙을 유도하기도 하였다(Son 등, 2006).

한편, 난포액은 난모세포가 성숙되면서 수정 및 발생 능력을 획득하게 되는 물리적, 생리적 환경이 되는데(McNatty 등, 1979), 난포액 성분의 대부분은 혈장에서 유래하고 난포막의 내·외부 세포들에 의해 합성된 steroid hormone들이 고농도로 존재한다(McNatty와 Sawers, 1975). 배란 전 난포액은 난자의 성숙을 억제한다는 보고도 있지만, 그 억제 기능은 난포내 과립막 세포에 의한 것이며, 과립막 세포가 제거된 난포액은 난자의 성숙 억제 능력을 상실한다고 한다(Sirard, 1990), 인간의 난포액(Human Follicular Fluid, hFF)을 이용하여 인간 미성숙 난자의 성숙을 유도하고 정상적인 수정란을 생산 후, 이를 자궁에 이식하여 임신에 성공한 보고도 있다(Cha 등, 1991).

따라서 본 연구는 배양액 내 인간의 난포액과 성선자극호르몬 첨가가 인간 미성숙란의 체외성숙과 수정, 배발달에 얼마나 효과가 있는지 알아보려고 실시하였다.

재료 및 방법

1. 연구 대상

본 연구는 2007년 4월부터 2009년 4월까지 광주 미래와희망 산부인과의원과 대전 서울여성병원에서 성선자극호르몬(gonadotropin)으로 과배란 유도를 하고 체외수정 기술 방법 중 세포질내 정자 주입법(Intracytoplasmic sperm injection, ICSI)을 실시한 70명의 환자들을 대상으로 하였으며, 이때 불임의 원인 및 환자의 연령은 고려하지 않았다.

2. 과배란 유도 및 난자 채취

단기 요법은 월경 주기 제2일째부터 GnRH agonist(Lucrin, Laboratories Abbott, France)를 이용하여 뇌하수체를 억제하고 제3일째부터 성선자극호르몬(Follitroph, LG생명과학, Korea)을 환자에 따라 적절한 용량을 주사하면서 초음파 및 혈중 E₂ 농도를 지속적으로 측정하여 우성난포의 평균 직경이 18 mm 이상이거나 16 mm 이상인 난포가 3개 이상 관찰되면서 혈중 E₂ 농도가 계속 상승하거나, 직경 10 mm 이상인 난포당 혈중 E₂ 농도가 200 pg/ml 이상이면 hCG(ovidrel, Serono, Switzerland) 250 µg을 피하 주사하여 배란 촉발을 유도한 후 35~36시간 뒤에 질식 초음파 유도하에 난자 채취를 시행하였다. 장기요법의 경우 월경주기 일주일 전부터 GnRH agonist를 이용하여 뇌하수체를 억제하고, 월경이 시작되면 월경 주기 제 3일에 뇌하수체의 기능 억제 유무를 확인하기 위하여 혈중 LH, estradiol, progesterone(P₄)을 측정하고 LH < 5 mIU/ml, E₂ < 50 pg/ml, P₄ < 1 ng/ml인 경우 과배란 유도를 시

작하였고 그 후 과배란 과정은 단기 요법과 같았다. 길항 요법은 월경 시작 3일째에 초음파 검사 및 위에서 언급한 호르몬 검사를 실시하여 난소낭종이 없고, 호르몬 검사상 월경주기 3일째에 합당한 수치의 결과가 보이면 단기로요법에서 언급한 성선자극호르몬을 투여하기 시작하고, 생리주기 6~8일째 다시 초음파 검사를 실시하여 난포의 크기가 14 mm에 도달하면 조기 LH surge를 예방하기 위해 GnRH antagonist(Cetrootide, Serono, Switzerland) 0.25 mg를 매일 투여하였으며, 그 후 난자 채취를 위한 hCG 등의 주사는 위에서 언급한 바와 같이 시행하였다.

3. 난자의 회수

시험관 아기 시술을 위해 과배란을 유도한 환자에서 hCG(ovidrel, Serono, Switzerland)를 투여한 후 36시간째 질식 초음파 유도하에 17 gauge 난자 채취용 바늘(Cook, Eight Mile Plains, Queensland, Australia)을 사용하여 채취하였고, 채취용 흡입펌프의 음압은 80~100 mmHG로 유지하였다.

채취된 난자는 헤파린 40 IU/ml(Choongwae Pharmacology, Hwasung, Korea)와 10% Serum Protein Substitute(SPS; Sage BioPharma, USA)가 함유된 PBS(Sage BioPharma, USA)를 이용하여 2~3회 세척 후 난구세포를 벗겨내기 전 까지 10% SPS + Q-Fert(HTF)(Sage BioPharma, USA)에서 배양하였다.

4. 난포액의 준비

시험관아기 시술을 받는 환자 중 과거 병력이 없고 간염, 매독, HIV 검사 등에서 음성 반응을 보인 환자를 선택하여 시험관아기 시술시 난자와 함께 채취된 난포액 중 난자를 골라내고 남은 난포액에서 육안적으로 혈액이 포함되지 않은 것만을 골라 2,000×g로 30분 동안 원심분리를 하였다. 그 후 상층액을 회수하여 56℃ 항온수조에서 30분간 inactivation을 시킨 후 0.4 µm syringe filter(Sartorius, Germany)로 1차, 0.22 µm syringe filter(Sartorius, Germany)로 2차 여과시킨 후 소량 씩 분주하여 냉동보관하며 사용하였다.

5. 난구세포 제거 및 성숙난자 분류

질식 초음파를 통한 난자 채취 2시간 후, 0.1% hyaluronidase(Sage BioPharma, USA) 농도의 Q-HEPES(Sage BioPharma, USA) 용액에서 피펫을 이용하여 난구세포를 제거하고 실체현미경(stereomicroscope)하에서 MII 단계에 나타나는 제 1극체(polar body) 방출 여부와 세포질 내 난핵포(GV) 붕괴 여부로 성숙된 난자와 미성숙 난자를 구분하였다.

6. 미성숙 난자의 배양 및 수정

난구세포가 제거된 난자를 5% CO₂ 농도의 배양기에서 3~4시간 체외배양 후, 극체가 방출된 성숙된 난자만을 선별하여

세포질내 정자주입술(ICSI)을 실시하였고, 10% SPS가 첨가된 Q-Cleavage(Sage BioPharma, USA)에서 배양하였으며, 중간난자(Intermediate, MI)와 미성숙 난자(GV)는 각각 10% SPS, 10% hFF, 10% SPS + 1 IU/ml FSH(LG생명과학, Korea) + 10 IU/ml HCG(LG생명과학, Korea) + 10 ng/ml recombinant human epidermal growth factor(Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)가 첨가된 Q-Fert(Sage BioPharma, USA)에 넣은 다음 37 °C, 5% CO₂로 조절된 배양기에서 배양하면서 4, 24, 28시간 간격으로 관찰하며 성숙이 된 난자는 ICSI를 실시하였다. 수정 후 18시간이 지난 뒤 실체현미경(Nikon, Japan) 하에서 두 개의 전핵이 관찰되는 경우 수정으로 판별하여 배양에 들어갔다.

7. 통계처리

통계적 유의성 검정은 SAS(statistical analysis system)를 이용한 χ^2 -text를 실시하여 유의성 검정을 하였고 $p < 0.05$ 일 때 유의하다고 판정하였다.

결 과

시험관아기 시술시 난자를 채취한 후 난구세포를 제거하고 실체 현미경 하에서 성숙난자와 미성숙난자를 분류하였는데, 각 단계별 난자 분류는 Fig. 1처럼 제 1극체가 방출된 난자(MII)를 성숙난자, 난핵포(germinal vesicle, GV)가 붕괴되어 보이지 않고 제 1극체가 방출되지 않은 중간난자(Intermediate, MI)와 세포질 내 난핵포(GV)가 존재하는 난자는 미성숙 난자로 구분하였다. 성숙된 MII 난자는 ICSI를 하였고 미성숙 난자(MI, GV)는 계속 배양하면서 시간대 별로 관찰하여 제 1극체가 방출되면 ICSI를 시행하였다.

전체 1,018개의 채취된 난자를 성숙 단계별로 구분했을 때 결과는 Fig. 2와 같이 각각 성숙난자(MII) 54.3%(553개), 중간난자(MI) 25.6%(261개), 미성숙난자(GV) 20.0%(204개)의 분

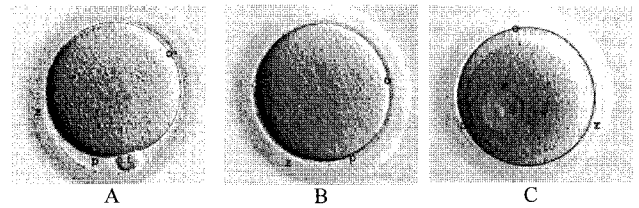


Fig. 1. The morphology of human oocytes(x200). (A) Fully mature oocyte at metaphase II(MII) of meiosis. (B) Nearly mature oocytes at metaphase I(intermediate, MI) of meiosis. (C) Immature oocytes at prophase I(PI) of meiosis. o, oolemma; p, perivitelline space; f, first polar body; z, zona pellucida; g, germinal vesicle

포를 보였다.

제 1극체가 방출되지 않은 중간난자(MI)와 미성숙난자(GV)는 난포액과 성선자극호르몬이 첨가된 각각의 배양액에서 배양하면서 시간대 별로 난자의 성숙율을 관찰하였는데 그 결과는 Table 1, 2와 같다.

채취된 중간난자를 각각의 배양액에 배양했을 때 4시간 후 각각 60.5%, 61.5%, 59.2%가 성숙난자로 발달을 하였고, 28시간 배양 시, 세 군 모두 100% 성숙난자로 발달을 하였으며

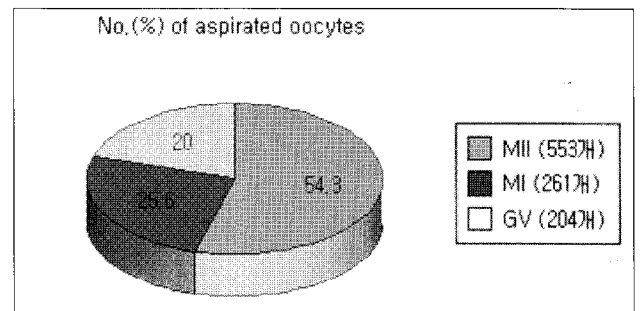


Fig. 2. Comparison of MII, MI and GV stage oocyte by aspiration.

Table 1. Effect of the addition of human follicular fluid and gonadotropins on maturation of human Intermediate(MI) oocytes in culture medium

Culture medium	No. of intermediate oocytes	No.(%) of oocytes matured to					
		4 h		24 h		28 h	
		MII	MI	MII	MI	MII	MI
10% SPS	86	52(60.5%)	34(39.5%)	82(95.3%)	4(4.7%)	86(100%)	0
10% hFF	104	64(61.5%)	40(38.5%)	98(94.2%)	6(5.8%)	104(100%)	0
Gonadotropins	71	42(59.2%)	29(40.8%)	66(93.0%)	5(7.0%)	71(100%)	0

SPS : Serum protein substitute.

hFF : Human follicular fluid.

Gonadotropins : 10% SPS + 1 IU/ml FSH + 10 IU/ml HCG + 10 ng/ml EGF.

Table 2. Effect of the addition of human follicular fluid and gonadotropins on maturation of human immature (GV) oocytes in culture medium

Culture medium	No. of immature oocytes	No.(%) of oocytes matured to							
		4 h		24 h			28 h		
		MI	GV	MII	MI	GV	MII	MI	GV
10% SPS	53	13 (24.5%)	40 (75.5%)	33 (62.3%)	14 (26.4%)	6 (11.3%)	40 (75.5%)	7 (13.2%)	6 (11.3%)
10% hFF	78	23 (29.5%)	55 (70.5%)	44 (56.4%)	21 (26.9%)	13 (16.7%)	55 (70.5%)	12 (15.4%)	11 (14.1%)
Gonadotropins	73	18 (24.7%)	55 (75.3%)	46 (63.0%)	18 (24.7%)	9 (12.3%)	52 (71.2%)	10 (13.7%)	11 (15.1%)

SPS : Serum protein substitute.

hFF : Human follicular fluid.

Gonadotropins : 10% SPS + 1 IU/ml FSH + 10 IU/ml HCG + 10 ng/ml EGF.

유의적인 차이는 없었다.

미성숙난자를 각각의 배양액에 시간대 별로 배양시 4시간 후 중간난자로의 발달율은 10% hFF가 첨가된 배양액이 29.5%로 약간 높았고, 28시간 쯤 배양시 각각 75.5%, 70.5%, 71.2%의 성숙율을 보였으나 유의적인 차이는 없었다.

각각의 배양액에서 체외성숙된 난자는 세포질내 정자주입술을 실시하고 18시간 후 2개의 전핵이 보이는 난자를 정상 수정된 난자로 판별하였는데 이 때 수정율은 Table 3과 같다.

10% SPS가 첨가된 배양액에서 성숙시킨 난자가 80.0%의 수정율을 보였고 10% 난포액이 첨가된 배양액에서 성숙된 난자는 78.2%, gonadotropins이 첨가된 배양액에서 성숙된 난자는 76.9%의 수정율을 보였다.

수정된 배아를 체외배양시 발달율은 표 4와 같은데 8시간 쯤 2세포기로 발달율은 각각 78.1%, 76.7%, 77.5%로 비슷한 발달율을 보였고 48시간 쯤 6~8세포기로의 발달율은 각각 65.6%, 65.9%, 66.7%로 유의적인 차이가 없었다.

Table 3. Comparison of fertilization rates of matured oocytes in the media containing SPS, hFF and gonadotropins

Culture medium	No. of ICSI	No.(%) of 2PN
10% SPS	40	32 (80.0%)
10% hFF	55	43 (78.2%)
Gonadotropins	52	40 (76.9%)

SPS : serum protein substitute.

hFF : human follicular fluid.

Gonadotropins : 10% SPS + 1 IU/ml FSH + 10 IU/ml HCG + 10 ng/ml EGF.

고 찰

본 실험은 시험관 아기 기술 프로그램에서 과배란 유도를 통한 난자 채취시 함께 채취된 중간난자와 미성숙 난자를 성숙시켜 이용율을 높이고자 실시하였다. 일반적으로 난자 채취시 미성숙 난자가 약 20~30% 정도 얻어진다고 보고(Mandelbaum 등, 1996; De Vos 등, 1999)되었는데, 세포질내 정자 주입술을 시행하기 전까지 성숙된 난자를 보면 채취된 총 1,018개의 난자 중 711개(553개 + 4시간 배양 후 158개 성숙)가 성숙되어 69.8%의 비슷한 성숙율을 보였다. 미성숙 난자를 성숙시키기 위해 배양액 내 혈청 성분이나 난포액을 첨가하여 배양하는 연

Table 4. Development rates of 2PN oocytes cultured in the media containing SPS, hFF and gonadotropins

Culture medium	No. of 2PN cultured	No.(%) of embryos developed to		
		8 h	24 h	48 h
		2 cells	2~4 cells	6~8 cells
10% SPS	32	25 (78.1%)	28 (87.5%)	21 (65.6%)
10% hFF	43	33 (76.7%)	36 (87.8%)	27 (65.9%)
Gonadotropins	40	31 (77.5%)	32 (88.9%)	24 (66.7%)

SPS : Serum protein substitute.

hFF : Human follicular fluid.

Gonadotropins : 10% SPS + 1 IU/ml FSH + 10 IU/ml HCG + 10 ng/ml EGF.

구가 많은데 난포액에는 스테로이드, 단백질 등의 성분이 포함되어있어 난자의 성숙과 감수분열의 시작에 영향을 준다고 알려져 있고, 또한 IGF, EGF, TGF 및 cytokine 등 많은 종류의 단백질을 포함하고 있어 수정란의 체외발달에 유익하다고 알려져 있다(Stone 등, 1978; Dardik 등, 1993; Heyner 등, 1993). Cha 등(Cha 등, 1991)은 미성숙 난자의 체외배양 실험에서 단백질 공급원으로써 배양액에 FCS를 첨가하는 것 보다 난포액을 첨가할수록 더 좋은 성숙율을 보였다고 하였다. 또한 배양액 내 성선자극호르몬을 첨가하여 인간 미성숙 난포란의 체외 성숙을 유도하기도 하였는데(Nagy 등, 1996; Russell 등, 1997), Son 등은 EGF(epidermal growth factor)를 추가하여 체외성숙을 하였다(Son 등, 2006; Jurenma와 Nogueira 등, 2006). 본 실험에서는 기본 배양액에 10%의 SPS, 10% hFF 및 10% SPS와 성선자극호르몬을 첨가하여 중간난자와 미성숙 난자를 배양하면서 시간대 별로 살펴보았는데, 중간난자(MI)를 ICSI 전 4시간 동안 배양시 각각 24.5%, 29.5% 및 24.7%의 성숙율을 보였고, 28시간 후 세가지 배양액 모두에서 100%의 성숙율을 보이며 유의적인 차이를 보이지 않았다. 미성숙 난자(GV)의 체외 성숙율은 각각 채취 후 28시간째 75.5%, 70.5% 및 71.2%가 성숙이되어 세포질내 정자주입술을 실시할 수가 있었는데 각 구간 유의적인 차이는 보이지 않았고 오히려 기본 배양액에 10% SPS가 첨가된 구에서 조금 더 좋은 발달율을 보였다. 이는 배양액내에 난포액과 성선자극호르몬 및 EGF를 첨가하여 유의적으로 높은 성숙율을 보였다는 결과와 다른 결과를 나타내었다. 일반적인 체외수정 시술(conventional IVF)시 체외성숙된 난자(*in vitro* matured oocyte)의 수정율은 성숙되어 채취된 난자보다 낮다고 보고되고 있고, 체외에서 성숙되는 중간난자(제 1 감수분열 중기, MI)의 수정율도 각각 52.7%와 70.8%로 낮다고 알려져 있다(De Vos 등, 1999). 또한 체외성숙시킨 미성숙 난자는 MII의 방추사가 빨리 퇴화되고 불안정하여 핵의 질(quality)이 더 저하된다고 하였고(Combelles 등, 2002), 장시간 체외배양조건에 노출되어 투명대(zona pellucida)경화현상이 일어나 일반적인 체외수정법은 수정율 감소로 이어진다고 하였다(De Vos와 Van Steirteghem, 2000). 본 실험에서는 체외에서 성숙된 난자를 이용하여 세포질내 정자주입술을 실시한 결과 수정율은 각각 80.0%, 78.2% 및 76.9%로 오히려 10% SPS만 첨가한 배양액에서 좀 더 높은 수정율을 보였는데, 이것은 아마도 상업적으로 판매되고 있는 기본 배양액 품질이 점점 좋아지고, 체외배양 기술이 발달하여 좀 더 높은 수정율을 보였을 거라고 생각된다. 체외성숙 난자 중 정상적으로 수정이 된 배아를 선별하여 체외배양 결과 48시간째 6~8 세포기까지의 배 발달율은 각각 65.6%, 65.9%, 66.7%로 세 군 모두 비슷한 결과를 보였다.

본 연구는 대상수가 적고 환자의 연령 및 불임 원인을 고려하지 않았으며, MI과 GV 단계 난자의 특성과 능력에 차이를

구분하지 않고 시행을 했지만 상업적으로 판매되는 배양액 내에 합성 단백질의 첨가만으로도 충분히 미성숙 난자의 체외성숙이 가능함을 알 수 있었다.

결론

본 연구는 시험관아기 프로그램에서 난자 채취시 발생하는 미성숙 난포란의 효과적인 이용을 위하여 배양액 내 인간의 난포액과 성선자극호르몬 첨가가 체외성숙율, 수정율 및 배발달율에 얼마나 효과가 있는지 알아보려 실시하였다. 난자 채취 시 회수된 성숙난자는 54.3%, 중간난자(MI) 25.6%, 미성숙 난자(GV)가 20.0%였고 중간난자를 세포질내 정자주입술을 시행하기 전까지 체외에서 4시간 배양했을 때 69.8%의 성숙율을 보였다. 체외배양 28시간 째 중간단계 난자는 세 구에서 모두 성숙율 100%를 보였고 미성숙 난자는 각각 75.5%, 70.5%, 71.2%의 성숙율(MII)을 보였다.

체외성숙된 미성숙 난자에게 세포질내 정자주입술을 시행하여 18시간 후 수정율을 살펴봤을 때 10% SPS가 첨가된 배양액에서 80.0%의 수정율을 보였으나 각 처리구(78.2%, 76.9%)간 유의적인 차이는 보이지 않았다.

정상적인 수정이 확인된 배아(2PN)를 체외에서 48시간 배양했을 때 6~8세포기로의 발달율은 각각 65.6%, 65.9% 그리고 66.7%로 비슷한 발달율을 보였다.

참고문헌

- Barnes FL, Kausche A, Tiglias J, Wood C, Wilton L and Trounson A. 1996. Production of embryos from *in-vitro* matured primary human oocytes. *Fertil. Steril.* 65:1151-1156.
- Cha KY, Chung HM, Han SY, Yoon TK, Oum KB and Chung MK. 1996. Successful *in vitro* maturation, fertilization and pregnancy by using immature follicular oocytes collected from unstimulated polycystic ovarian syndrome patients. *Proceeding of Annual Meeting of American Society for Reproductive Medicine.* Abstr. O-044.
- Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY and Yoon TK. 1991. Pregnancy after *in vitro* fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture *in vitro* and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil. Steril.* 55:109-113.
- Coetzee K and Windt ML. 1996. Fertilization and pregnancy using metaphase I oocytes in an intracytoplasmic sperm injection program. *J. Assist. Reprod. Genet.* 13:768-771.
- Combelles CM, Cekleniak NA, Racowsky C and Albertini DF. 2002. Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in

- in-vitro* matured human oocytes. Hum. Reprod. 17:1006-1016.
- Dardik A, Doherty AS and Schultz RM. 1993. Protein secretion by the mouse blastocyst : Stimulatory effect on secretion into the blastocoel by transforming growth factor. Mol. Reprod. Dev. 34:396-401.
- De Vos A, Van de Velde H, Joris H and Van Steirteghem A. 1999. *In-vitro* matured metaphase-I oocytes have a lower fertilization rate but similar embryo quality as mature metaphase- II oocytes after intracytoplasmic sperm injection. Hum. Reprod. 14:1859-1863.
- De Vos A and Van Steirteghem A. 2000. Zona hardening, zona drilling and assisted hatching: new achievements in assisted reproduction. Cells Tissues Organs. 166:220-227.
- Edirisinghe WR, Junk SM, Matson PL and Yovich JL. 1997. Birth from cryopreserved embryos following *in-vitro* maturation of oocytes and intracytoplasmic sperm injection. Hum. Reprod. 12:1056-1058.
- Heyner S, Shi CZ, Jarett L and Smith RM. 1993. Functions of the IGFs in early mammalian development. Mol. Repr. Dev. 35:421-426.
- Jurema MW and Nogueira D. 2006. *In vitro* maturation of human oocytes for assisted reproduction. Fertil. Steril. 86: 1277-1291.
- Mandelbaum J, Junca AM, Belaisch-Allart J, Salat-Baroux J, Plachot M and Antoine JM. 1996. Oocyte maturation and intracytoplasmic sperm injection. Contracept Fertil Sex. 24: 534-538.
- McNatty, KP and Sawers RS. 1975. Relationship between the endocrine environment within the Graafin follicle and the subsequent rate of progesterone secretory human granulosa cells *in vitro*. J. Endocrinol. 66:391-400.
- McNatty, KP, Smith DM, Markris A, Osathanonch R and Ryan KJ. 1979. The microenvironment of the human antral follicle : Interrelationships among the steroid levels in antral fluid, the population of granulosa cells, and the status of the oocyte *in vivo* and *in vitro*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 49:851-860.
- Nagy ZP, Cecile J, Liu J, Loccufier A, Devroey P and Van Steirteghem A. 1996. Pregnancy and birth after intracytoplasmic sperm injection of *in vitro* matured germinal vesicle stage oocytes: case report. Fertil. Steril. 65:1047-1050.
- Russell JB, Knezevich KM and Fabian KF. 1997. Unstimulated immature oocyte retrieval: early versus midfollicular endometrial priming. Fertil. Steril. 67:616-620.
- Sirard MA. 1990. Temporary inhibition of meiosis resumption *in vitro* by adenylate cyclase stimulation in immature bovine oocytes. Theriogenology. 33:757-767.
- Son WY, Yoon SH and Lim JH. 2006. Effect of gonadotropin priming on *in-vitro* maturation of oocytes collected from women at risk of OHSS. Reprod. BioMedicine Online. 13: 340-348.
- Steptoe PC, Edwards RG. 1978. Successful birth after IVF. Lancet II. 366.
- Stone SL, Pomerantz SH, Kripner AS and Channing CP. 1978. Inhibitor of oocyte maturation from porcine follicular fluid : further purification and evidence for reversible action. Biol. Reprod. 19:585-592.
- Trounson A, Anderies Z, Jones GM, Kausche A, Lolatgis N and Wood C. 1998. Oocyte maturation. Hum. Reprod. 13: (Suppl.3) 52-62.