난자내 정자 직접주입술에서 난자의 처리방법이 난자의 발생능력에 미치는 영향

경북대학교 의과대학 산부인과학교실 · 대구대학교 자연자원대학 축산학과*

박 기 상 · 이 택 후 · 송 해 범* · 전 상 식

The Effects of Oocyte Preparation on the Developing Capacity of Human Oocytes at Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI)

Kee Sang Park, Taek Hoo Lee, Hai Bum Song* and Sang Sik Chun

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine,
Kyungpook National University, Taegu,
*Department of Animal Science, Taegu University, Kyungbuk, Korea

Objective: In the preparation of ICSI, cumulus and corona cells should be removed from the oocytes by using a combination of enzymatic (hyaluronidase) and mechanical (pipetting) methods. But little is known about the effects of different degrees of oocyte denudation and incubation time between denudation and sperm injection on the outcomes of ICSI. The aim of this study was to evaluate the effects of varying the degrees of oocyte denudation and the lengths of incubation time from denudation to sperm injection on the outcomes of ICSI.

Methods: In experiment 1, patients (oocytes) were grouped into group A and B according to the degree of denudation, complete and partial, respectively. In experiment 2, patients (oocytes) were grouped into group I, II and III according to the length of incubation time of denuded oocytes until sperm injection as < 1, 1 2 and >2 hours, respectively.

Results: There was no significant difference between the degree of oocyte denudation on the survival, fertilization and development rates after ICSI procedure. In case of the incubation time of denuded oocytes until ICSI, survival rates was higher in group III (83.1%) than in group I (61.5%, $P<0.05$) or group II (64.3%). However no statistically significant differences were found between incubation time and fertilization or development rates.

Conclusions: This study reveals that the outcomes of ICSI are not affected by the degree (complete or partial) of oocyte denudation. However, the denuded oocytes with incubation period of more than 2 hours show better outcomes of ICSI than those with the incubation period of less than 2 hours.

Key Words: Degree of oocyte denudation, Incubation time, Intracytoplasmic sperm injection

이 연구는 1998년도 경북대학교병원 의학연구소의 연구비의 지원으로 이루어 졌음

과거에는 체외 수정율이 지나치게 낮거나 항정자항체 또는 남성불임 요인 등으로 일반적인 체외수정방법으로는 임신을 기대할 수 없던 것을, Palermo 등 (1)이 사람에서 처음으로 난자내정자직접주입술 (ICSI)을 사용하여 임신에 성공한 이래, ICSI는 남성불임이나 체외 수정율이 낮게 나타나는 환자의 불임치료에 매우 좋은 결과를 얻고 있다. 그러나 ICSI의 결과에 미치는 요인으로는 연구자의 숙련도와 기술, 난자의 질, 투명대와 난황막의 파열 및 정자의 운동성 또는 정자두부의 기형 등이 있다.2 6 그러나 난구세포를 제거할 때 사용하는 hyaluronidase의 농도와 pipette의 굵기 또는 세포질 성숙 등도 ICSI 결과에 영향을 줄 수 있는 요인으로 보고되고 있다.7 8 ICSI를 실시하기 전에는 필수적으로 난자의 투명대 주위를 둘러싸고 있는 corona cell과 cumulus cell을 hyaluronidase가 첨가된 배양액에서 반복된 pipetting작업으로 제거해주어야 되지만,7 8 이들을 제거할 때 사용하는 pipette의 내경은 1000 μm이상이 되게 하고 효소의 농도는 10IU 이하로 조절해야 난자의 발생능력에 유해한 영향을 주지 않는 것으로 보고되어 있다.7 Van de Veld 등 (8)은 채취한 난자를 ICSI 직전까지 incubation하는 시간 (1-2시간 또는 5-6시간) 에 따라 세포질 성숙을 다르게 하여 ICSI 결과를 비교한 하였을 때 MII 상태의 성숙난자는 추가적인 세포질 성숙이 필요 없었고, 세포질 성숙을 다르게 유도하기 위하여 ICSI 전까지 난자 주위에 난구세포를 부착하여 incubation하는 것이 ICSI 결과에 영향을 주지 않는다고 하였다. 그러나 난구세포를 제거하는 정도와 난자의 세포질이 받을 수 있는 물리적인 손상을 완화시키는데 소요되는 시간의 경과에 대한 기준이 없는 실정이다.

따라서 본 연구의 목적은 ICSI를 실시하기 전에 난자의 투명대 주위에 부착된 난구세포를 제거하는 기준을 마련하기 위하여 실시하였는데, 난구세포를 제거하는 정도와 난구세포를 제거한 다음 난자의 세포질이 받는 물리적 손상에서의 회복을 최대화 할 수 있는 incubation 시간을 조사하였다.

연구대상 및 방법

1. 배양액의 준비

정자의 처리에 사용한 F-10 Nutrient Mixture Medium (Ham's F-10, 11550-043, Gibco, USA)은 1.2 g/ℓ의 NaHCO3 (S-5761, Sigma, USA)를 첨가하여 제조하였다. ICSI 전·후 및 수정이 확인된 배아의 배양에는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 11966-025, Gibco, USA)을 사용하였다. 배아의 공배양을 위한 *Vero* cell의 monolayer 작성에는 Tissue Culture Medium 199 (TCM-199, 11150-059, Gibco, USA)을 이용하였다. 모든 배양액은 0.5% antibiotics (Streptomycin sulfate, S-9137; Penicillin-G, P-3032, Sigma, USA)를 첨가한 다음, 삼투압 측정기 (Osmomat 030, Gonatec, Germany)를 이용하여 삼투압을 280 mOs㎖/㎏으로 보정하였다. 삼투압을 보정하고 나서 0.2 ㎛의 여과기 (Millex GV, Millipore, USA)로 제균하면서 14 ㎖ tube (2001, Falcon, USA)에 분주한 다음 4℃에서 보관하다가 사용하였다. 배양액은 95% 이상의 습도, 37℃ 및 5% CO2를 유지하고 있는 배양기 (3154, Forma, USA)에서 6시간 이상 평형시킨 다음 이용하였다.

2. 난자의 준비

과배란은 gonadotrophin releasing hormone agonist (GnRH-a) 장기요법을 이용하였다. 즉 Mid-luteal phase로 부터하루 900 ㎍의 Buserelin (Suprefact, Hoechst, Germany)을 투여하고, 혈중 estradiol을 측정하여 뇌하수체 기능이 정지된 것을 확인한 후 human menopausal gonadotropin (hMG, Pergonal, Serono, Italy) 또는 follicle stimulating hormone (FSH, Urofollotropin, Metrodin, Serono, Italy)을 이용하여 과배란을 유도하였다. 난포의 직경이 18 ㎜ 이상인 것이 2개 이상일 때 10,000 IU의 human chorionic gonadotrophin (hCG, Profasi, Serono, Italy)을 주사하고, hCG를 주사한 후 34-36시간째에 질식 초음파를 이용하여 난포에서 난자를 채취하였다.

채취한 난자는 37℃와 5% CO2로 조절된 조작기 (IVF chamber, Hoffman, USA)내에 설치된 해부현미경 (SMZ-10, Nicon, Japan)하에서 0.1% hyaluronidase가 첨가된 2 ㎖의 Ham's F-10 배양액에서 실험 방법에 따라 난구세포를 제거하였다. ICSI를 실시하기 전에 난자의 주위에 부착되어 있는 난구세포의 정도와 난구세포를 제거한 다음 시간의 경과가 ICSI 결과에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실험 1과 실험 2로 나누어 실시하였다.

1) 실험 1: 난구세포를 제거하는 정도가 ICSI 결과 (ICSI 후 난자의 생존율, 정상 수정율 및 배발달율)에 미치는 영향을 조사하기 위하여, ICSI를 실시하기 2시간 전에 난구세포를 완전히 제거한 것 (Group A)과 난구세포의 일부를 남겨두고 제거한 것 (Group B) 간에 ICSI 결과 (생존율, 수정율, 배발달율)를 비교하였다. 그러나 이식할 수 있는 배아의 숫자가 제한되어 실험군 간에 배아 이식을 구별하지 않고 실시함으로써 차후의 발생능력 (임신율과 착상율 등)은 비교하지 못하였다.

2) 실험 2: 난구세포를 제거한 후 시간의 경과에 따른 ICSI 결과를 조사하기 위하여, 난구세포를 제거하고 나서 1시간 이내 (Group Ⅰ), 1 2시간 (Group Ⅱ) 및 2시간 이상 (Group Ⅲ) 경과한 후 ICSI를 실시하여 그 결과를 비교하였다.

3. 난포액 (hFF, human follicular fluid)의 준비

hFF는 체외수정 시술을 하고 있는 환자 중에서 성숙 난자를 갖고 있는 난포에서 채취한 난포액 중에서 혈액이 거의 섞이지 않은 것을 회수하여 이용하였다. 회수한 hFF는 원심분리 (3,500 rpm)를 2회 (30분, 10분) 실시하여 상층액 만을 회수하여 56℃에서 35분간 불활성화시킨 다음 0.2 ㎛의 여과기로 여과하면서 제균하고 나서 -20 ℃에 보존하다가 융해하여 사용하였다. 융해 후 2일이 경과한 것은 실험에서 제외하였다.

4. 난자내정자직접주입술 (ICSI)의 과정

Holding pipette (P-2174, Sigma, USA)의 외경은 100-150 ㎛, 내경은 10-15 ㎛가 되게 제작하고,

sperm injection pipette (ICSI micropipette, Humagen, USA)의 외경은 7-8 ㎛, 내경은 5-6 ㎛인 것을 사용하였다. DPBS에 3% polyvinylpyrolidone (PVP, PVP-360, Sigma, USA)을 10 ㎕의 소적으로 만든 다음 paraffin oil (294365H, BDH, UK)을 덮어서 ICSI를 실시하였다. 난구세포가 제거된 난자 (제1극체가 형성되어 있는 성숙난자)는 DMEM (10% hFF) 소적에 침지시키고, 정자는 PVP 소적에 침지시켰다. 먼저 injection pipette으로 정자의 미부에 물리적인 손상을 주어 운동성을 없앤 후 최소한의 배양액이 들어가도록 하여 injection pipette 내로 흡인하여 난자가 들어 있는 소적으로 이동하여 난자의 세포질 내로 정자를 주입하였다. 난자 내로 정자를 주입할 때 난자에서 제1극체의 위치는 6시 또는 12시 방향으로 향하게 하고, 난자의 세포질을 injection pipette으로 조금 흡입하다가 정자를 주입하여 난자의 activation을 유도하였다. 정자를 주입할 때 배양액은 최소한으로 들어가게 하였다. 주입이 끝난 난자는 2-3회 세척한 다음 공배양 접시로 옮겨 배양하였다. 다음날 아침, 37℃와 5% CO2로 조절된 조작기 내에 있는 해부현미경으로 수정여부를 조사하였다. 자성전핵과 웅성전핵이 형성되어 있고 두개의 극체가 있는 것을 정상 수정이 된 것으로 확인하였다.

5. *Vero* cell의 monolayer 작성

Vero cell의 처리는 Ouhibi 등 (9)의 방법에 따라, 동결되어 있는 cell을 융해하여 2 3 × 106 cell을 세척한 후 flask에서 4일 동안 (6 8 × 106 cell로 증가한다) 배양하고, trypsin으로 처리하여 cell suspension을 시킨 후 3개 정도로 나누어 준비하였다. 이 중에서 한 개는 새로운 flask에서 배양을 하고, 하나는 동결하고, 나머지 한 개는 배양접시에 monolayer를 형성하도록 2 ㎖의 배양액에 200,000 cells의 농도로 조절하여 약 3일간 배양하였다. *Vero* cell의 동결과 융해도 Ouhibi 등 (9)의 방법을 이용하였다.

6. *Vero* cell의 monolayer에서 배아의 공배양

정자 주입이 끝난 난자는 *Vero* cell monolayer가 작성된 배양액에서 공배양을 실시하였다. 공배양 접시의 준비는 공배양을 실시하기 하루 전날 20% hFF가 첨가된 DMEM으로 교체하고, 2-3일 후에 이와 같은 방법으로 준비된 새로운 배양접시로 옮겨주는 방법으로 신선한 배양액을 교체하면서 이식 직전까지 배양하였다.

7. 통계분석

각각의 실험 설계에 따라 ICSI 후 생존율, 수정율 및 배아발달율을 비교·조사하였다. 결과에 대한 분석은 통계프로그램인 SAS package (10)를 이용하였다. 평균에 대한 유의성은 *t*-test를 실시하여 5% 유의수준에서 검정하였다.

결과

1. 난구세포의 제거 정도에 따른 ICSI결과

난구세포를 제거하는 정도가 ICSI 결과 (ICSI 후 난자의 생존율, 정상 수정율 및 배발달율)에 미치는 영향을 조사하기 위하여 ICSI를 실시하기 2시간 전에 난구세포를 완전히 제거한 것 (Group A)과 난구세포의 일부를 남겨두고 제거한 것 (Group B)으로 나누어 ICSI를 실시하였는데, 그 결과는 Table 1과 같았다.

난구세포의 완전 제거군 (Group A)과 부분 제거군 (Group B)에 따라 ICSI 결과를 비교하였을 때, 생존율 (77.3% : 79.2%), 정상 수정율 (2 PN; 65.9% : 54.2%) 및 배발달율 (/2PN; 98.3% : 96.2%)에서 통계적인 차이가 없었다. 비록 통계적으로 유의한 차이는 없었으나 수정율에서 group A (65.9%)가 group B (54.2%)보다 다소 높게 나타났다.

2. 난구세포를 제거한 후 ICSI를 실시하기까지의 시간 경과와 ICSI 결과의 비교

난구세포를 제거한 후 시간의 경과에 따라 ICSI를 실시한 다음 ICSI 결과에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 난구세포를 제거하고 나서 1시간 이내 (Group Ⅰ), 1 2시간 (Group Ⅱ) 및 2시간 이상 (Group Ⅲ) 경과한 후 ICSI를 실시하여 비교한 결과는 다음과 같았다 (Table 2).

난구세포를 제거하고 나서 시간의 경과에 따른 ICSI 결과를 살펴보았을 때, 생존율은 group Ⅲ (83.1%)가 group Ⅰ (61.5%)이나 group Ⅱ (64.3%) 보다 높게 나타나서 시간이 경과할 수록 생존율이 높게 나타나는 경향이었다 (Group Ⅰ : Group Ⅲ; $P<0.05$, Group Ⅱ : Group Ⅲ; NS). 비록 통계적으로 유의한 차이는 없었으나, 정상 수정율 (2PN; 46.2% : 50.0% : 59.3%)과 배발달율 (66.7% : 100% : 100%)도 시간이 경과할수록 높게 나타나는 경향이 있었다.

고찰

ICSI의 성공율은 여성의 나이, 연구자의 숙련도와 기술, 난자의 질, 투명대와 난황막의 파열, 정자의 운동성 및 배란유도 방법 등과 같은 여러 가지 요인에 의해 좌우될 수 있다.2 4,6 8,11,12 그러나 난자의 형태학적인 분석으로 ICSI 결과를 예측하는 것에 대해서는 상반된 보고도 있다.13,14 또한 sperm parameter에 의해서는 ICSI 결과가 영향을 받지 않는다는 보고도 있다.5,14 Ca -ionophore로 난자를 활성화시키면 Ca2+ oscillation이 자극되어 난자가 활성화되므로 ICSI 후 수정율이 증가된다.16,17 한편, Yanagida 등 (18)은 ICSI와 electrical activation을 병행하면 수정을 100% 유도할 수 있고, 이 수정란을 이식해서 높은 임신율과 출산율을 얻어 ICSI 시에는 난자의 전기적인 자극을 병행할 것을 제안하기도 하였다. Palermo 등 (6)은 미성숙 정자를 ICSI에 사용할 때에는 정자의 꼬리에 immobilization을 강하게 실시하면 수정율과 임신율을 높일 수 있었는데, 이는 정자가 성숙하는 동안 분비되는 protein과 lipid는 정자의 활성을 억제시키기 때문에, 핵의 decondensation을 유발시키기 위해서는 정자 꼬리를 강하게 immobilization 시키는 것이 유리하다고 하였으나, Chen 등 (19)은 정자를 immobilization 시킬 때 꼬리의 가장자리 부분을 꺽어 주는 것이 mid-piece를 누르거나 잘라내는 것보다 쉽고 효과적이라고 하였다. 본 실험에서는 Chen 등 (19)의 방법을 이용하여 정자를 immobilization 시켰다. Tasdemir 등 (20)은 정자 두부에 기형이 있는 것을 ICSI에 이용할 경우에는 착상율과 임신율이 낮게 나타난다고 보고하였다. 본 연구에서는 400배 배율의 현미경 하에서 형태학적으로 정상적인 정자만을 선별하여 이용하였으며, 이때 환자의 정자는 형태학적 검사 상 정상이 9% 이상인 경우였다.

Palermo 등 (6)은 정자주입용 미세 피펫을 난자의 세포질 내로 주입하는 과정에서 난황막 (oolemma)이 갑작스럽게 파열 (sudden breakage)되면 수정율 및 배발생율이 저조하게 나타나는데, 난황막의 갑작스런 파열은 배란방법이 나쁜 경우에 나타날 확률이 높다고 하였다. 본 연구에서도 특정 배란촉진제로 배란이 유도된 난자에서 난황막의 급작스런 파열이 두드러지게 나타났는데, 이때에는 생존율이 특히 저조해서 (결과는 제시하지 않았음) 특정한 배란촉진제로 배란이 유도된 경우에는 실험의 결과에서 제외시켰다.

Conaghan 등 (21)은 인간 배아를 2-4 세포기에서 배반포기까지 배양할 때에는 EBSS에 에너지원으로 pyruvate-0.47mM, glucose-free medium을 사용하는 것이 최적의 배양조건이라고 하였다. 그러나 저자들 (22)의 실험에서는 에너지원으로 glutamine이 단독으로 첨가된 배양액인 DMEM으로 인간난자에서 배반포기배의 형성율을 높일 수 있음을 관찰하였다. 본 실험에서는 난자를 MⅡ에서 수정 후 이식직전까지 배양할 때 사용하는 배양액은 DMEM으로 하였다. 배양액에 첨가하는 난포액 (hFF)은 저자들이 (23)생쥐를 이용한 실험의 결과를 바탕으로 하였다.

ICSI를 실시하기 전에는 필수적으로 난자의 투명대 주위를 둘러싸고 있는 난구세포는 hyaluronidase 등과 같은 효소가 첨가된 배양액에서 반복된 pipetting작업으로 제거해 주어야 한다.7 8 Van de Veld 등 (7)은 효소의 농도를 10, 39 및 78 IU/㎖로 나누고, 처리시간을 98-137초로 나누어 난구세포를 제거하고 나서 ICSI를 실시하였을 때 ICSI 결과에는 차이가 없었으며, 기계적으로 난구세포를 제거하기 위하여 pipette의 내경을 250 또는 1000 ㎛이상으로 나누어 난구세포를 제거한 난자에서도 ICSI 결과에는 차이가 없었으나, 예상치 못한 유해 요소 (unknown harmful effect)를 피하기 위해서는 낮은 농도 (10 IU/㎖)의 효소에서 내경이 최소 1000 ㎛인 pipette으로 난구세포를 제거할 것을 제안하였다. 본 연구에서는 효소의 농도는 0.1% (66 IU/㎖), pipette의 내경은 약 200 ㎛로 하여 2-3분 이내에 난구세포를 제거하였으나 난구세포가 잘 제거되지 않을 때에는 처리시간이 다소 길어지는 경우도 있었는데, 난구세포를 제거할 때 사용한 효소의 농도, pipette의 내경 또는 효소에 노출되는 시간이 ICSI 결과에 큰 영향을 끼치지는 않는 것으로 보인다. 그러나 난구세포를 제거할 때 사용하는 hyaluronidase의 농도를 높게 하고 처리시간을 길게 하거나 pipetting을 심하게 하면 ICSI전에 난자의 pathenogenetic activation이 일어날 수 있으므로,24,25 이에 대한 더 많은 연구가 있어야 하겠다.

Van de Veld 등 (8)은 난자를 채취한 다음 ICSI 직전까지 세포질 성숙을 달리 유도하기 위하여 난자주위에 난구세포가 부착된 것과 제거된 것으로 나누어 incubation하고 나서 ICSI를 실시하였으나 결과에는 차이가 나지 않는다고 하였다. 이때에는 incubation하고 나서 ICSI 직전에 난구세포를 제거하고 나서 ICSI를 실시하였다. 본 실험에서는, ICSI를 실시하기 2시간 전에

난자의 주위에 부착되어 있는 난구세포를 완전히 또는 부분적으로 제거하여 난자의 주위에 부착되어 있는 난구세포의 정도가 ICSI 결과에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실시하였다. 난구세포의 완전 제거군과 부분 제거군에 따라 ICSI 결과를 비교하였을 때, 생존율, 정상 수정율 (2 PN) 및 2 세포기 이상의 배발달율에서 통계적 차이가 없었으나 수정율에서 완전 제거군 (65.9%)이 부분 제거군 (54.2%)보다 다소 높게 나타났다. 이는 난구세포를 완전히 제거한 난자에서 실시한 ICSI에서 정자 미세주입 시 현미경을 통한 관찰이 선명하여 정자의 주입을 보다 용이하게 할 수 있었기 때문인 것으로 사료된다. 따라서 ICSI를 실시할 때에는 특별히 난구세포를 제거하기가 매우 어려운 경우를 제외하고는 난자의 주위에 부착되어 있는 난구세포를 깨끗하게 제거하는 것이 ICSI를 보다 용이하게 할 수 있을 뿐만 아니라 수정율을 높이는 데에도 다소 도움이 될 수 있을 것이다.

Van de Veld 등 (8)은 채취한 난자를 ICSI 직전까지 incubation하는 시간 (1-2시간 또는 5-6시간) 에 따라 세포질 성숙을 다르게 하여 ICSI 결과를 살펴 보았으나 MⅡ 상태의 성숙난자는 더 이상의 세포질성숙을 위한 incubation이 필요 없다고 하였다. 본 실험에서는, 난구세포 제거 후 시간의 경과 (<1, 1-2, >2 시간)에 따라 ICSI를 실시한 다음 결과를 살펴보았을 때, 생존율은 시간이 경과할수록 높게 나타나는 경향이었다 (<1 : 1-2; P<0.05, 1-2 : >2; NS). 정상 수정율 (2PN) 및 2 세포기 이상의 배발달율에서도 비록 통계적으로 유의한 차이는 없었으나 시간이 경과할수록 높게 나타나는 경향이었다.

결론적으로, 난구세포를 제거하는 정도는 ICSI 결과에 큰 영향을 주지는 않지만, 난구세포를 깨끗하게 제거하는 것이 ICSI를 보다 쉽고 효과적일 것이다. ICSI를 실시하기 위하여 난구세포를 제거할 때에는 난구세포를 제거하고 2시간이 경과한 다음 ICSI를 실시하는 것이 ICSI 결과를 높일 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340: 17-8.
2. Gordts S, Vercruyssen M, Roziers P. Recent developments in assisted fertilization. *Hum Reprod* 1995; 10 (Suppl. 1): 107-14.
3. Liu J, Nagy Z, Joris H, Tournaye H, Smitz J, Camus M et al. Analysis of 76 total fertilization failure cycles out of 2732 intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1995; 10: 2630-6.
4. Nagy ZP, Liu J, Joris H, Bocken G, Desmet B, Van Ranst H, et al. The influence of the site of sperm deposition and oolemma breakage at intracytoplasmic sperm injection on fertilization and embryo development rates. *Hum Reprod* 1995; 10: 3171-7.
5. Nagy ZP, Liu J, Joris H, Verheyen G, Tournaye H, Camus M, et al. The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum Reprod* 1995; 10: 1123-9.
6. Palermo GD, Alikani M, Bertoli M, Colombero LT, Moy F, Cohen J et al. Oolemma characteristics in relation to survival and fertilization patterns of oocytes treated by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996; 11: 172-6.
7. Van de Veld H, Nagy ZP, Joris H, De Vos A, Van Steirteghem AC. Effects of different hyaluronidase concentrations and mechanical procedures for cumulus cell removal on the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997; 12: 2246-50.
8. Van de Veld H, De Vos A, Joris H, Nagy ZP, Van Steirteghem AC. Effect of timing of oocyte denudation and micro-injection on survival, fertilization and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13: 3160-4.
9. Ouhibi N, Menezo Y, Benet G, Nicollet B. Culture of epithelial cells derived from the oviduct of different species. *Hum Reprod* 1989; 4: 229-235.
10. SAS/STAT. User's guide. release 6.03 ed. Cary, NC: SAS Institute Inc.; 1988.
11. Abdelmassih R, Sollia S, Moretto M, Acost AA. Female age is an important parameter to predict treatment outcome in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1996; 65: 573-7.
12. Rattanachaiyanont M, Leader A, Leveille MC. Lack of correlation between oocyte -corona-cumulus complex morphology and nuclear maturity of oocytes collected in stimulated cycles for inttracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1999; 71: 937-940.
13. Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, Marchant S, Davies M, Khadum MI. Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997; 12: 1267-70.
14. Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R. Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13: 3431-3.
15. Oehninger S, Maloney M, Veek L, Torner J, Lanzendorf S, Masher S. Intracytoplasmic sperm injection: achievement of high pregnancy rates in couples with severe male factor infertility is dependent primarily upon female and nor male factors. *Fertil Steril* 1995; 64: 977-81.
16. Tesarik J, Sousa M. More than 90% fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection and artificial induction of oocyte activation with calcium ionophore. *Fertil Steril* 1995; 63: 343-9.
17. Vanderwalmen P, Zech H, Birkenfeld A, Yemini M, Bertin G, Leijennue B, et al. Intracytoplasmic of spermatids retrieved from testicular tissue: influence of testicular pathology, type of seelcted spermatids and oocyte activation. *Hum Reprod* 1997; 12: 1203-13.
18. Yanagida K, Katayose H, Yazawa H, Kimura Y, Sato A, Yanagimachi H, et al. Successful fertilization and pregnancy following ICSI and electrical oocyte activation. *Hum Reprod* 1999; 14: 1307-11.
19. Chen SU, Ho HN, Chen HF, Huang SC, Lee TY, Yang YS. Intracytoplasmic sperm injection

(ICSI) for severe semen abnormalities: dissecting the tail of spermatozoa at the tip. *Hum Reprod* 1996; 11: 2640-4.
20. Tasdemir I, Tasdemir M, Tavukouglu S, Kahraman S, Biberroglu K. Effect of abnormal sperm head morphology on the outcome of ICSI in human. *Hum Reprod* 1997; 12: 1214-7.
21. Conaghan J, Handyside AH, Winston RML, Leese HJ. Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos *in vittro. J Reprod Fertil* 1993; 99: 87-95.
22. 박기상, 최인경, 이진식, 송해범. 체세포의 공배양체계에서 단일 에너지원이 인간 배반포기배의 형성성에 미치는 영향. 대한불임회지 1998; 25: 65-70.
23. 박기상, 손원영, 김진희, 이경아, 한세열, 고정재 등. 성숙배양액에 첨가하는 인간체액 (Human Body Fluids) 및 성선자극호르몬이 생쥐 미성숙난자의 핵성숙과 수정능력에 미치는 영향. 대한불임회지 1994; 21: 183-90.
24. Palermo G, Joris H, Derde MP et al.: Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1993; 59: 826-35.
25. Van Steirteghem AC, Joris H, Liu J. Protocol for intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1995; Update 1: Item 9, CD-ROM.

Table 1. The effects of degree of oocyte denudation (complete or partial) on the outcomes of ICSI.

	Group A	Group B
	Complete denudation	Partial denudation
No. of cycles	12	9
No. of injected oocytes	88	48
No. of survived oocytes (%)	68 (77.3)	38 (79.2)
No. of 2 PN status oocytes (%)	58 (65.9)	26 (54.2)
No. of cleaved embryos / 2 PN (%)	57 (98.3)	25 (96.2)

No significant difference between group A and B.

Table 2. Effects of incubation period (< 1, 1 2 or > 2 hours) from denudation to sperm injection on the outcomes of ICSI.

	Group I	Group II	Group III
	< 1 hr	1 2 hrs	> 2 hrs
No. of cycles	4	3	11
No. of injected oocytes	39	14	59
No. of survived oocytes (%)	24 (61.5)*	9 (64.3)	49 (83.1)*
No. of 2 PN status oocytes (%)	18 (46.2)	7 (50.0)	35 (59.3)
No. of cultured embryos	15	7	31
No. of cleaved embryos (%)	10 (66.7)	7 (100)	31 (100)

* **P<0.05**