

In Vitro Maturation of Human Immature Oocyte

강서 미즈메디 병원 여성의학연구소

도 병 록

1990년대 초반 사람의 미성숙난자가 체외에서 성숙되고, 수정 후 정상적인 발달을 거쳐 건강한 아기로 탄생할 수 있음이 보고된 이래 불임의학의 전반에서 미성숙난자의 효용성이 부각되어 왔다. 1994년 다낭성난포증후군 환자에서 과배란 유도 없는 시험관아기 기술이 성공하였고, 1997년에는 정상적인 생리주기를 갖는 불임환자에 있어서도 미성숙난자를 사용한 임신의 성공이 보고되었다. 이러한 과배란 유도 없는 시험관아기 기술은 시간, 비용 및 고농도의 배란유도제에 의한 부작용 감소 등의 이점이 있어 그 효용성이 부각되고 있다.

그러나 실제로 이러한 난자들이 체외성숙이 가능한 크기의 미성숙난자로 자라는데는 매우 복잡하고 다양한 분화 및 성장의 단계를 거치게 된다. 태아기간동안 primordial germ cell과 interstitial cell들의 분화결과 형성된 primordial follicle 내에 존재하는 primary oocyte (dictate, or GV stage oocyte)는 성장이 개시될 때까지 일생을 통하여 성장의 개시를 기다리며, 원시난포가 성장을 개시하면 분화된 과립세포 (granulosa cell)와 협막세포 (theca cell)에 싸여 성장을 시작하게 된다. 난자 및 난포가 성장결과 감소를 이루고 일정 크기 이상으로 자라게 되면 생식소 자극호르몬 등의 영향을 받아 성숙과정을 거쳐 배란에 이르게 된다.

포유동물 미성숙난자의 체외성숙

미성숙난자의 성숙 재개능력은 종, 난포 및 난자의 크기 등에 따라 다양한 것으로 보고되어 있다. 즉, 체외배양을 통해 성숙재개의 능력을 확인한 실험들에서 생쥐와 양의 경우는 작은 크기의 난포 (small antral follicle)에서 얻은 난자에서도 난자의 성숙이 재개되는 반면, 돼지와 소의 경우는 중간 크기의 난포 (medium size antral follicle)이상에서만 성숙이 관찰된다. 일반적으로 포유동물의 체외성숙능 획득은 난자의 크기가 자연주기에서 충분히 자라 배란된 난자의 80% 이상 크기에 도달하여야만 가능한 것으로 보고되어 있다 (사람의 경우 난포의 크기가 약 600 μm 정도일 때 난자의 크기가 약 80 μm 에 이르는 것으로 알려져 있다). 사람의 경우에도 태아기 형성된 원시난포가 일차난포, 난포강난포의 단계를 거치면서 성장하고, 성장을 시작한 일차난포내 난자가 성숙되어 배란되기까지 약 80일 이상이 걸리는 것으로 알려져 있다. 난포의 크기가 2~5 mm 정도인 class 5 시기가 되면 혈액내 변화하는 생식소 자극호르몬들의 영향을 받아 (gonadotropin regulated growth phase), 급격한 성장을 하고 다음 생리주기에 생식소 자극호르몬, growth factor, cytokines 등이 관여하는 복잡하고 다양한 성숙과정을 거쳐 배란이 되게 된다.

본 원고에서는 미성숙난자의 성숙시기에 일어나는 현상들과 성숙과정에 관여하는 요인들을 살펴보고, 실제 ART에의 응용을 위한 체외성숙의 조건들을 살펴보고자 하였다.

난자의 성장

원시난포내 난자는 과립세포간 및 과립세포와 난자간의 gap junction들을 통한 긴밀한 협조에 의해 성장하며, 특히 10만개 이상의 수많은 타원형 미토콘드리아 및 차후 성숙, 수정, 초기 배 발달에 사용될 다량의 저장된 RNA, cortical granule 및 투명대 등 일반적인 세포와는 다른 특징을 지닌, 체세포의 100배 이상 체적을 가지는 성숙 가능한 난자로 성장한다.

이렇게 성장한 난자는 중기 난포기 높은 생식소 자극호르몬들의 역할에 의해 성숙이 개시되게 된다. 난자의 성숙은 크게 핵 성숙과 세포질 성숙으로 나뉘어 지며, 이들이 충족되어야만 정상적인 성숙과 수정 및 발생이 이루어질 수 있다고 알려져 있다.

난자의 성숙

난자의 성숙은 난포가 일정 크기 이상으로 성장하여야만 가능한 것으로 알려져 있다. 그러나 성숙의 과정은 난자가 스스로 진행시키는 것이 아니라 생식소 자극호르몬, 특히 고농도의 LH에 노출되는 것에 의해 진행되게 된다. 생쥐와 양의 경우는 난자의 크기가 배란시의 80%에 이르기만 한다면 small antral follicle에서 회수된 난자들도 체외에서 성숙능력을 가지지만, 돼지, 양, 소, 염소의 경우에는 난포의 크기가 최소 3 mm 이상이 되어야 하며, 사람의 경우에도 class 5 (2~5 mm)에 이르러서야 체외배양시 성숙능력을 획득하는 것으로 보고되어 있다. 이러한 난자의 성숙과정은 단계적이며, 성장과정에서 비축된 mRNA의 순차적인 발현에 의해 조절된다.

일부 포유동물에서 난포내에 존재하는 성숙가능한 크기의 난포들이 생식소 자극호르몬의 영향이 있어야만 성숙을 개시하는데 반해서 체외에서는 생식소 자극호르몬의 영향이 없이도 성숙이 재개됨을 관찰할 수 있으며, 이러한 경우는 난포내에 난자의 성숙을 억제하는 물질 (oocyte maturation inhibitor, OMI)이 존재함을 의심할 수 있다. 즉, 과립세포에 의해 만들어진 OMI는 난구세포를 통해 난자에 영향을 줄 것이며, 그 결과 난자의 성숙이 억제된다고 생각할 수 있다. 실제로 난자-난구세포 복합체를 purine base, adenosine, purine nucleotide, hypoxantine, cAMP phosphodiesterase inhibitor 등 난포액 내에 함유되어 있는 물질들이 포함된 배양액 내에서 배양하면 성숙이 억제되는 것을 관찰할 수 있어 상기 물질들이 난자의 성숙을 억제하는 역할을 함을 확인할 수 있다. 그러나 성숙과 배란을 유도할 수 있는 농도의 생식소 자극호르몬 분비에 의해 성숙이 재개된 후에도 adenosine과 hypoxantine의 농도에는 변화가 없음이 확인되어, 이들은 단지 난자의 성숙을 억제하는 하나의 요인에 불과함을 알 수 있었다.

난자내 cAMP 농도는 난자의 성숙재개에 중요한 역할을 한다. 즉, 체외배양시 dibutyl cAMP, forskoline, isobutylmethyl-xantine (IBMX), adynyl cyclase 등이 난자내로 유입되면 난자내 cAMP의 농도가 증가하게 되고 결과적으로 난자의 성숙이 억제됨을 관찰할 수 있다. 또한 cAMP-dependent protein kinase를 생쥐 난자에 주입한 경우에도 난자의 성숙억제를 관찰할 수 있다. 그러나 같은 방법으로 protein kinase inhibitor를 동시에 난자에 주입한 경우에는 난자의 성숙이 유도된다. 위 결과들로 보아 난자내 cAMP 농도의 감소는 protein kinase와 밀접한 연관이 있으며, 난자의 성숙에 주요한 역할을 함을 확인할 수 있다.

포유류의 성장하는 난포내 과립세포-난구세포-난자사이에는 gap junction이 매우 잘 발달되어 있고 이를 통해 활발한 물질의 교환이 이루어지고 있다. 대부분의 포유동물의 경우 난자-난구

세포간의 gap junction을 끊으면 매우 짧은 시간 내에 체외성숙을 시작하고 germinal vesicle break down (GVBD)이 일어난다. 많은 연구자들이 gap junction의 역할들에 대해 연구하였고, 일련의 실험을 통해 밝혀진 바를 종합하면, gap junction을 통하여 난구세포로부터 유입되던 OMI가 생식소 자극호르몬의 투여에 의해 사라진 gap junction 때문에 유입되지 못하고 그 결과 난자가 성숙을 재개하게 된다는 가설을 지지하였다.

한편 양서류인 두꺼비에서 발견된 maturation promoting factor (MPF)는 난자의 성숙을 유도하는 물질로 알려져 있다. 즉, MPF를 미성숙난자에 주입하면 RNA 합성, 또는 단백질의 변화 없이 난자의 성숙이 재개되며, 종간의 특이성이 없는 특징이 있다. 따라서 MPF는 비 특이적이며 일반적인 세포에서도 G2에서 M 시기로의 전환에 관여하는 것으로 알려져 있다. 유전자변형 효모에서 이루어진 실험의 결과에 의하면 MPF는 각각 34 KD과 45 KD인 2개의 subunit로 구성되어 있으며, 34 KD subunit의 경우는 전 세포주기에서 일정한 농도를 가지고 있는 반면, 45 KD의 경우는 cyclin B로 불리며 세포주기동안 양의 변화가 관찰된다. Cyclin들은 분열간에 합성되고 phosphorylation을 통해 활성화되어 작용한 뒤 사라지게 된다. MPF의 작용은 염색체의 응축, spindle microtubule의 형성, GVBD 등에 중요한 역할을 하는 일련의 인산화과정을 활성화하는 것으로 알려져 있다.

난자가 정상적으로 성숙, 수정 및 발달을 하기 위해서는 세포질의 성숙 또한 중요한 요인으로 작용한다.

다수정을 막는 역할을 하는 것으로 알려진 cortical granule 들은 이차난포내 난자에서 이미 관찰이 시작되며, 난자의 성장과정동안 골지체에서 만들어져 지속적으로 저장되게 된다. 난자가 다 자란 난포에서 분리되면, 골지체의 일부가 분리후 수많은 vesicle로 되어 난자 원형질막 하부의 난구세포에서 분포되었던 foot process들이 분포했던 부위의 cortical actin layer의 actin filament와 결합하여 외부로 exocytosis될 준비를 하게 된다.

또한 세포질내 plasminogen activator의 농도가 높아지며 그 결과 actin이 안정화 되며 난자의 표층에 존재하던 actin filament들이 재정렬되어 cortical granule들의 분포에 관여하게 되며, 이들은 Ca⁺⁺의 농도에 민감하게 반응한다. 미성숙난자의 체외성장과 성숙에 영향을 주는 기타 요인 들로는 생식소 자극호르몬, calcium, xantine, cytokines (TGF, inhibin, activin), IGF family 등이 있다.

사람 미성숙난자의 체외성숙과 과배란 유도 없는 시험관아기 시술법

1965년 Edwards가 체외에서 포유동물 난자 성숙을 보고한 이래, 1991년 Cha 등은 폐기되는 난소조직에서 얻은 미성숙난자를 체외에서 성숙, 수정시켜 다른 환자에게 공여하여 임신 및 분만에 성공하였으며, 1994년 Trounson 등은 생식소 자극호르몬을 사용한 배란유도 없이 다낭성난포증후군 환자로부터 얻은 미성숙난자를 성숙, 수정, 이식하여 임신에 성공함을 보고하였다. 또한 난포기 뿐 아니라 황체기에 얻어진 미성숙난자도 난자공여에 의해 임신이 가능성이 확인되었고, Russell 등은 자궁내막의 준비를 위해 난자채취 전 E₂를 투여한 환자에서 중기난포기에 과배란 유도 없이 채취한 미성숙난자를 이용하여 임신을 보고한 바 있다.

일반적인 시험관아기 시술 시 gonadotropin의 투여로 과배란을 유도하여, 많은 난포들을 성장, 성숙시켜 다량의 난자를 채취하는 것을 기본으로 한다. 그러나 과배란 유도는 고가의 gonadotropin 사용으로 인한 경제적 부담, 매일 주사를 맞아야 하는 신체적 고통, follicle monitoring

을 위해 병원을 나와야 하는 번거로움, 과배란 자극증후군의 위험 및 암 발생의 가능성이 높아질 수 있는 등 어려움이 있다. 1990년대에 들어 이러한 과배란 유도 단점을 피하기 위한 한 방법으로 자연주기 미성숙난자 및 다낭성난포증후군에서 과배란 유도 없는 미성숙난자를 이용한 시험관아기 기술을 불임환자에게 도입하였다.

그러나 이러한 과배란 유도 없는 미성숙난자 시험관아기 기술 시, 배아의 이식시기가 일반적인 시험관아기 기술보다 빨라지게 되어 배아의 착상시기와 자궁내막의 착상가능시기에 차이 나게 되어 정상적인 임신이 어려워지는 단점이 있다. 따라서 자궁내막의 준비가 매우 중요한 요인으로 작용하게 된다. 자연 임신의 경우, 초-중기난포기 동안 estrogen의 영향을 받아 자궁내막세포가 분열하여 내막세포가 비후화 하며, 황체에 생성된 progesterone (P_4)에 의해 착상에 적합한 상태가 된다. 그러나 과배란 유도에 의한 시험관아기 기술시에는 일반적으로 P_4 를 투여하여 착상에 유리한 자궁내막을 유도 및 초기 임신 유지를 시켜왔다. 또한 시험관아기 기술 시 배란을 위해 투여한 hCG가 황체를 자극하여 P_4 를 분비하도록 하며 임신초기에 착상을 증가시킬 수 있음이 보고되어 있고, 최근 자궁 내강에 직접 투여한 hCG가 자궁내막의 cytokines과 growth factors 분비양상을 변화시킴이 보고되어 있다. 또한 hCG가 collagenase, urokinase-plasminogen activator의 activity를 조절함으로써 수정란의 착상에 중요 역할을 하며, 자궁내막세포에 hCG투여가 탈락막 분화를 촉진시킨다는 보고가 있어, 착상시 hCG의 역할의 중요성이 부각되고 있다. 그러나 과배란 유도 없는 시험관아기 기술법에서는 일반적인 시험관아기 기술법 또는 자연주기임신과는 달리, 배란을 위한 hCG의 투여나 LH surge가 없다.

미성숙난자를 이용한 시험관아기 기술 시 중기난포기에 난자를 회수하는 것이 필수요건으로 작용한다. 초기난포기의 경우에는 대부분의 2~5 mm 이상의 난포들이 건강한 반면 난포의 크기가 작아 난자의 회수가 어려운 단점이 있으며, 후기난포기에 난자를 회수하는 경우에는 난포들의 크기가 큰 반면 선택된 한 개의 난포를 제외한 대부분의 난포들이 폐쇄되어 건강한 난포를 얻을 수 있는 확률이 줄어들게 된다. Russell, Wynn 등 미성숙난자를 이용한 시험관아기 기술을 시도한 연구자들 역시 중기난포기에 난포의 회수를 시행하였다. 본 연구실에서도 미성숙난자의 채취시기를 규칙적인 월경주기를 갖는 환자의 경우에는 난포기 중기에 실행하였으며, 불규칙한 월경주기 환자의 경우에는 자궁내막의 두께가 8 mm 정도 되었을 때 난자의 회수를 실시하였다.

Trounson 등은 다낭성난포증후군 환자에서의 난자회수에 질식 초음파와 17-gauge short beveled aspiration needle을 사용하여 약 80 mmHg의 압력에서 난자를 채취하였고, Wynn 등은 16 gauged double lumen needle을 사용하여 난자를 회수하였으며 이들 두 군간 난자 회수율에 차이가 없었다. 본원의 경우에는 미성숙난자 채취에 질식초음파와 20-gauged ultrasound injection needle을 사용하였으며, 난자의 회수율에는 큰 차이가 없었다.

미성숙난자의 체외성숙에는 생식소 자극호르몬을 배양액내에 투여하는 방법을 사용하며, Cha 등은 50% 사람 난포액 또는 복강액을 TCM-199 배양액에 첨가하여 성숙을 유도하였고, Trounson 등은 상대적으로 저농도의 FSH와 LH를 사용하였다. 본 연구실의 경우 미성숙난자는 TCM-199 media (Gibco BRL, 11153-038, USA)에 20% human follicular fluid (hFF)를 첨가한 배양액에, 10 IU/ml FSH (FSH-HP, Serono), 20 IU/ml hCG, 10 ng/ml E_2 (estradiol, water soluble, Sigma E-4389)를 첨가하여 37°C, 5% CO_2 가 유지되는 배양기내에서 24~48시간 배양하였다. 배양후 성숙된 난자들은 정자직접 주입법 (ICSI)에 의해 수정시켰고, 수정확인을 위하여 ICSI시행

16~18시간 후에 전핵의 형성 여부를 관찰하였으며, 두개의 전핵이 형성된 경우를 정상적인 수정란으로 판정하였다. 수정란은 10% SSS 포함된 HTF 배양액에서 24~72시간 배양하였고, 이식하기 24시간 전에 생화학적 보조 부화술 (biochemical assisted hatching, BAH, 1 µg/ml pronase E, 0.5% BSA in HTF)을 실행하였다. 배아의 이식은 2~8세포기에 자궁 내에 이식하거나, 수정란~4세포기에 나팔관내에 이식하였다.

Russell 등은 자연주기 미성숙난자를 이용한 시험관아기 시술 시 자궁내막준비를 위해 초기 난포기 또는 중기난포기부터 에스트로젠을 환자에 투여하여 착상을 위한 자궁내막의 발달을 준비하였다. 그러나 자궁내막의 준비를 위해 투여한 에스트로젠이 뇌하수체에 작용하여 혈중의 FSH 농도를 감소시킬 수 있어, 본 연구실에서는 착상에 적합한 자궁내막의 준비를 위해 미성숙난자 채취당일부터 estradiol valerate (6 mg/day)를 사용하였다. 또한 난자회수 2일후부터 자궁내막의 성숙과 임신의 유지를 위하여 progesterone (50mg/day)을 투여하였다. 또한 직접 자궁내막에 작용하여 자궁내막의 cytokine 분비양상에 변화를 준다고 알려진 hCG를 난자채취 2일 후에 10000 IU 1회 투여하였다.

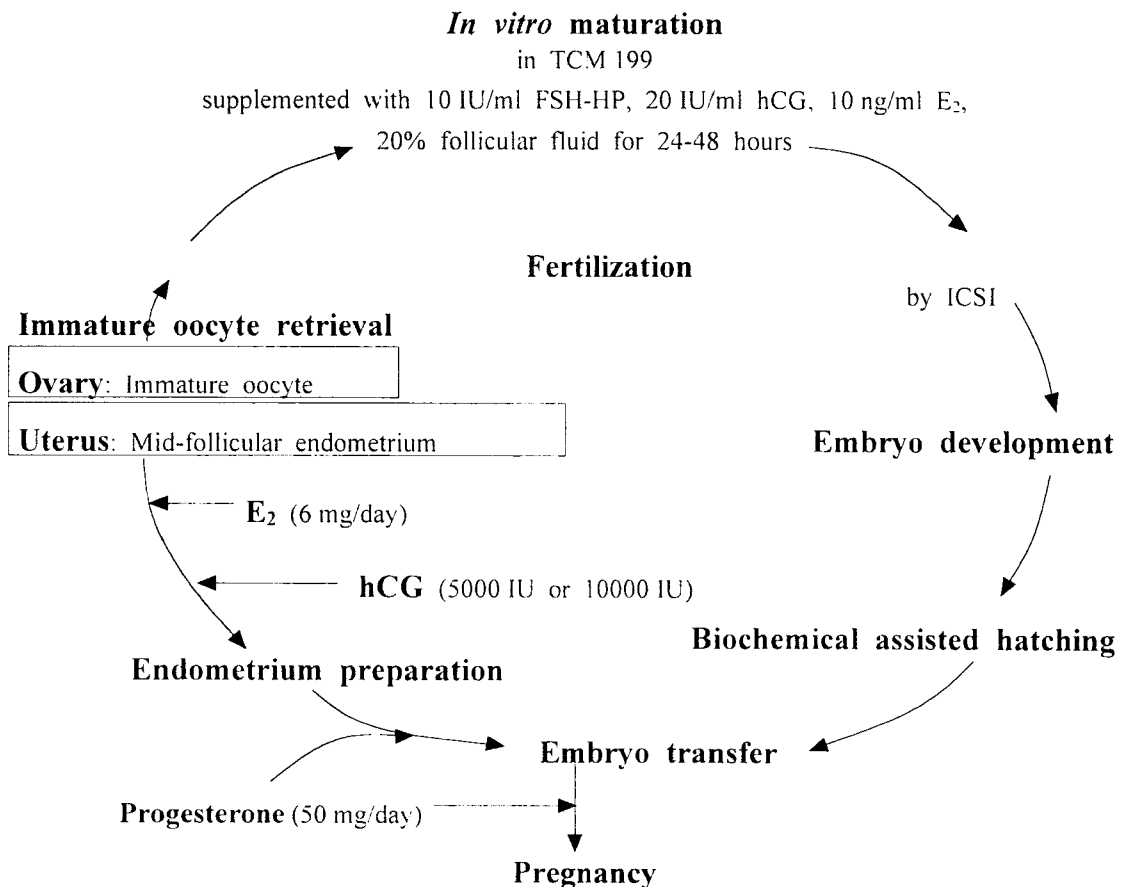


Figure 1. Diagram of immature oocyte program.

본 연구실의 미성숙난자 프로그램에서 성숙율은 82.5% (598/725), 수정률은 69.4% (415/598), 난할률은 89.7% (314/350)를 나타내었다. 미성숙난자 채취 직후 에스트로젠의 투여를 시작하고, 2일 후 hCG를 투여한 실험군에서 20예 임신이 관찰되었고 (27.8%), 규칙적인 월경주기 환자군의 임신률이 불규칙한 월경주기를 갖는 환자군보다 높은 임신율을 나타내었다 (29.0% vs. 26.5%). 규칙적인 월경주기를 갖는 환자군에서 배아이식 시 자궁내막의 두께는 E₂와 hCG 투여 유무, 임신군과 비임신군 사이에서 각각 유의한 차이가 나타나지 않았다.

Table 1. Embryonic development of IVM-derived oocyte according to menstrual cycle

	Regular cycles	Irregular cycles	Total (%)
No. of Cycles (patients)	64 (48)	48 (30)	112 (78)
No. of Oocytes	305 (4.8±2.9)*	599 (12.5±9.3)	904
No. of Healthy Oocytes	250 (82.0%, 3.9±2.4)	475 (79.3%, 9.9±7.5)	725 (80.2)
No. of Maturation	204 (3.2±2.3)	394 (8.2±5.9)	598 (82.5)
No. of Zygote	135 (2.1±1.7)	280 (5.8±4.6)	415 (69.4)
No. of Cleavage (%)	121/135 (89.6)	193/215 [†] (89.8)	314/350 (89.7)
No. of Transfer Cycles (%)	52/64 (81.3)	44/48 (91.7)	96/112 (85.7)
No. of Embryo Transfer [‡]	128 (2.5±1.4)	203 (4.6±2.1)	331
Pregnancy rate / transfer (%)	11/52 (21.2)	9/44 (20.5)	20/96 (20.8)

* Number of retrieved oocytes: regular vs. irregular cycles, p<0.001 by students *t*-test

[†] 47 2PN stage, 18 embryos were cryopreserved

[‡] Including 24 (r: 8, irr: 16) 2PN transfer; Values are Mean±SD

Table 2. Quality of retrieved immature oocytes according to timing of E₂ administration

	E ₂ administration	
	Before IOR group*	After IOR group
No. of Retrieved Oocytes	62	842
No. of Healthy Oocytes (%)	45 (72.6)	680 (80.8)

*E₂ administration before immature oocyte retrieval

Table 3. Pregnancy rate according to timing of E₂ and with or without hCG administration

	E ₂ administration	
	hCG administration	Without hCG
Before IOR group	0/7	0/3
After IOR group	0/14	20/72* (27.8%)

*Pregnancy rate was significantly different between hCG administration group and non-administration group in E₂ administration after IOR.

p<0.05, statistic analysis by χ^2 test

과배란 유도 없는 미성숙난자로 시험관아기 시술 시 여분의 배아를 냉동보존하였고, 3개월 후 녹여서 이식하는 방법으로 1예 임신 성공하여 정상적으로 분만하여 건강하게 잘 자라고 있으며, 고환조직내의 정자를 사용하여 1예 임신에 성공하여 현재 임신 20주로 임신이 유지

Table 4. Pregnancy rate in hCG and E₂ administration group after IOR

hCG dosage	Pregnancy rate / transfer (%)		Total (%)
	Regular cyclic patients	Irregular cyclic patients	
Total	11/38 (29.0)	9/34 (26.5)	20/72 (27.8)

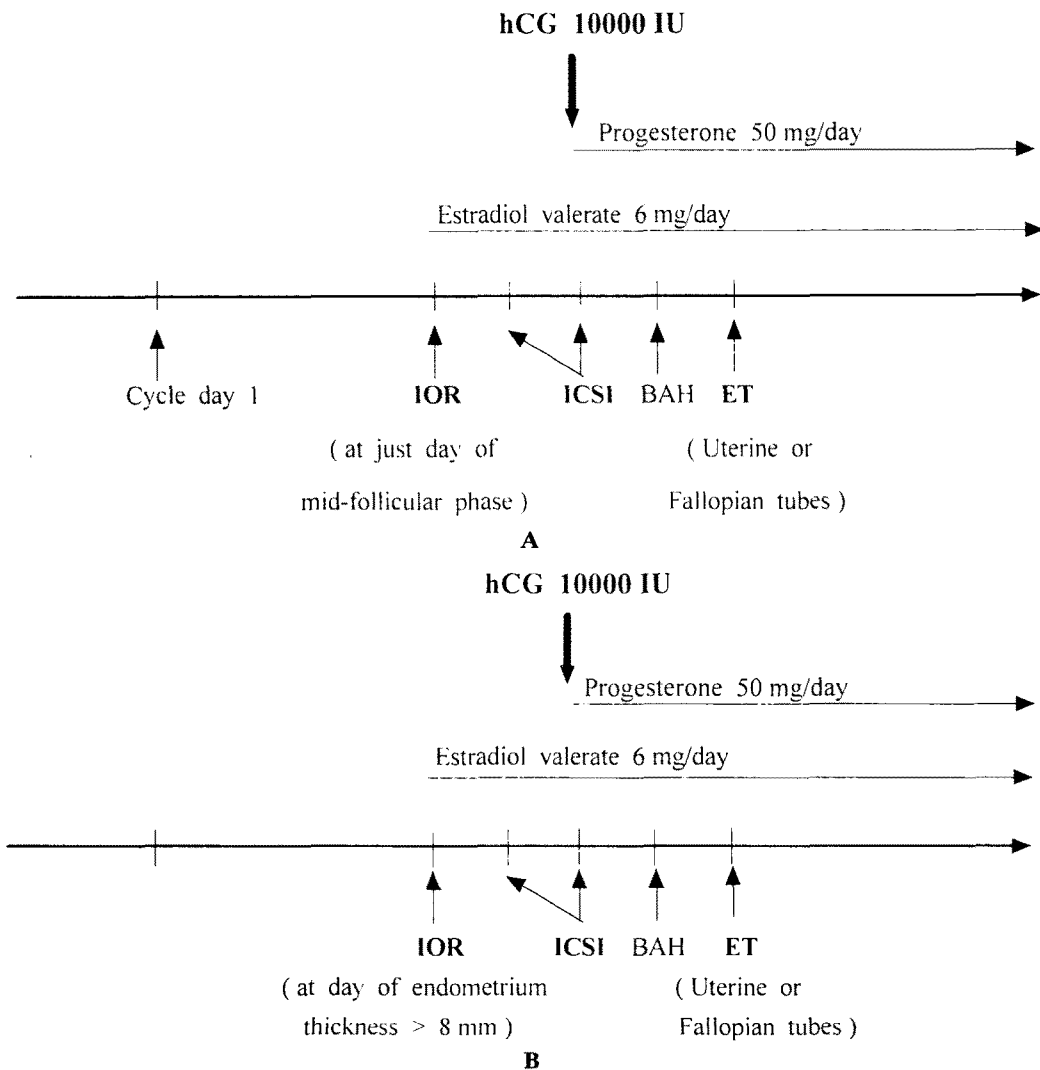


Figure 2. The new protocol for immature oocyte program, **A**; Regular cyclicgroup, **B**; Irregular cyclic group.

되고 있다.

결론적으로 배란유도제를 사용하지 않고 미성숙난자를 이용한 시험관아기 시술법은 시술이 비교적 간단하고 배란유도제 투여 비용의 절약, 초음파를 이용한 배란 추적 및 이에 따른 혈청 호르몬 검사에 따른 노력과 시간의 절약 등의 이점과 과배란 유도에 따른 다양한 약제 부작용으로부터 환자를 보호할 수 있으므로 매우 좋은 보조생식술의 한가지로 생각되며, 특히 다낭성난포증후군의 치료 시 매우 좋은 방법으로 생각되지만, 일반적으로 모든 불임환자에게 사용할 수 있는 새로운 보조생식술로 정립되기 위해서는 많은 미성숙난자 채취, 체외성숙시의 배양 체계 확립, 임신률 향상을 위한 자궁내막의 준비 등에 앞으로 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Adashi EY. The ovarian life cycle. In: Yen SSC and Jaffe RB, eds. *Reproductive Endocrinology*. Philadelphia: Saunders, 1991: 181-237.
- Baird DT. A model for follicular selection and ovulation: Lessons from superovulation. *J Steroid Biochem* 1987; 27: 15-23.
- Barnes FL, Kausche A, Tiglias J, Wood C, Wilton L, Trounson A. Production of embryos from in vitro-matured primary human oocytes. *Fertil Steril* 1996; 65: 1151-6.
- Bergh PA, Navot D. Ovarian hyperstimulation syndrome: a review of pathophysiology. *J Assist Reprod Genet* 1992; 9: 429-38.
- Bubat J, Marcolin G, Guittard C, Herbaut JC, Louvet AL, Dehaene JL. Luteal support after luteinizing hormone-releasing hormone agonist for in vitro fertilization: superiority of human chorionic gonadotropin over oral progesterone. *Fertil Steril* 1990; 53: 490-4.
- Casper RF, Wilson E, Collins JA, Brown SF, Parker JA. Enhancement of human implantation by exogenous chorionic gonadotropin. *Lancet* 1983; 19: 1191.
- Cha KY, Do BR, Chi HJ, Yoon TK, Choi DH, Koo JJ, et al. Viability of human follicular oocytes collected from unstimulated ovaries and matured and fertilized. *In Vitro Reprod Fertil Dev* 1992; 4: 695-701.
- Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK. Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from non-stimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril* 1991; 55: 109-13.
- Cha KY. Further direction of in vitro maturation. In: Kempers RD, Cohen J, Haney AF, Younger JB, eds. *Fertility and Reproductive Medicine*. Elsevier, 1998: 589-95.
- Edwards RG. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 1965; 208: 349-51.
- Gougeon A, Testart J. Influence of human menopausal gonadotropin on the recruitment of human ovarian follicles. *Fertil Steril* 1990; 54: 848-52.
- Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod* 1986; 1: 81-7.

- Han SW, Lei ZM, Roa CV. Upregulation of cyclooxygenase-2 gene expression by chorionic gonadotropin during differentiation of human endometrial stroma cells into decidua. *Endocrinology* 1996; 137: 1791-7.
- Lassalle B, Testart J, Renard JP. Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1, 2 propanediol. *Fertil Steril* 1985; 44: 645-51.
- Laufer N, DeCherney AH, Haseltine FP, Polan ML, Mezer HC, Dlugi AM, Sweeney D, Nero F, Naftolin F. The use of high-dose human menopausal gonadotropin in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1983; 40: 734-41.
- Lee DR, Yoon HS, Lee JE, Cho JH, Roh SI. A new simple assisted hatching technique. *Assisted Reprod Review* 1997; 8: 188-95.
- Licht P, Loesch A, Dittrich R, Neuwinger J, Siebzehnruebl E, Wildt L. Novel insights into human endometrial paracrinology and embryo-maternal communication by intrauterine microdialysis. *Human Reprod Update* 1998; 4: 532-8.
- Lin J, Lei ZM, Lojun S, Rao CV, Satyaswaroop PG, Day TG. Increased expression of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene in human endometrial carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 1483-91.
- Loke YW and King A. *Human Implantation*. New York: Cambridge university press, 1995.
- Mikkelsen AL, Smith SD, Lindenberg S. In-vitro maturation of human oocytes from regularly menstruating women may be successful without follicle stimulating hormone priming. *Hum Reprod* 1999; 14: 1847-51.
- Moor RM, Dai Y, Lee C, Fulka J Jr. Oocyte maturation and embryonic failure. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 223-36.
- Reshef E, Segars JH Jr, Hill GA, Pridham DD, Yussman MA, Wentz AC. Endometrial inadequacy after treatment with human menopausal gonadotropin/human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril* 1990; 54: 1012-6.
- Russell JB, Knezevich KM, Fabian KF, Dickson JA. Unstimulated immature oocyte retrieval: early versus midfollicular endometrial priming. *Fertil Steril* 1997; 67: 616-20.
- Rutherford AJ. The practical aspects of in vitro maturation of human oocytes. In: Kempers RD, Cohen J, Hanczy AF, Younger JB, eds. *Fertility and Reproductive Medicine*. Elsevier, 1998: 577-87.
- Strauss III JF and Gorpide E. The ovarian life cycle. In: Yen SSC and Jaffe RB, eds. *Reproductive Endocrinology*. Philadelphia: Saunders, 1991: 309-56.
- Szollosi D. Oocyte maturation. In: Junter RHF, ed. *Reproduction in mammals and man*. Paris: Ellipses, 1993: 307-25.
- Trounson A, Wood C and Kausche A. In vitro maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertil Steril* 1994; 62: 353-62.
- Yagel S, Geva TE, Soloman H. High levels of human chorionic gonadotropin retard first trimester trophoblast invasion in in vitro by decreasing urokinase plasminogen activator and collagenase activities. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 1506-11.