

성숙배양액에 첨가하는 인간체액 (Human Body Fluids) 및 성선자극호르몬이 생쥐 미성숙난자의 핵성숙과 수정능력에 미치는 영향

차병원 여성의학연구소

박기상 · 손원영 · 김진희 · 이경아 · 한세열 · 고정재 · 차광열

Influences of Human Body Fluids and Gonadotropins Supplemented in the Maturation Medium on the Nuclear Maturation and Fertilizability of Mouse Immature Oocytes

K.S. Park, W.Y. Son, J.H. Kim, K.A. Lee, S.Y. Han, J.J. Ko and K.Y. Cha

Infertility Medical Center, CHA General Hospital

= Abstract =

Purpose of the present study was to find the optimal culture conditions for the maturation and fertilization of immature oocytes by the use human body fluids and gonadotropins (Gn) in the mouse model. Cumulus-enclosed mouse immature oocytes were incubated in the medium containing various human body fluids with or without Gn *in vitro*, and examined to confirm nuclear maturation (NM) and fertilization. Female ICR mice were stimulated with 7.5 IU pregnant mares' serum gonadotropin (PMSG). Cumulus-enclosed immature oocytes were isolated at 48-52 hr post PMSG injection and cultured in TCM 199 supplemented with various concentrations (20, 50, and 70%) of human body fluids such as fetal cord serum (hCS), follicular fluid (hFF), peritoneal fluid (hPF) and amniotic fluid (hAF) in the presence or absence of 10 IU/ml PMSG and 10 IU/ml human chorionic gonadotropin (hCG) for 18 hr. Fetal calf serum (FCS) was used as a control for the supplements. Matured oocytes were fertilized with sperm collected from the epididymis of male mice. Fertilization was conducted in T6 medium containing 15 mg/ml bovine serum albumin, and confirmed at 6 hr post-insemination. Evaluation of nuclear maturation and fertilization was carried out by rapid staining using fuchin. There was no significant difference between the effects of human body fluids and FCS supplements on nuclear maturation of cumulus enclosed mouse immature oocytes. When maturation medium was supplemented with 20% hPF or 20% hAF, fertilization rates were significantly ($P < 0.01$) lower than that of 20% FCS, hCS and hFF groups. However, higher concentrations of body fluids during IVM were not more beneficial on fertilizability of oocytes. The addition of Gn significantly increased the fertilization rates in hPF and hAF groups (hPF without Gn; 51.5%, compared with 85.1% for addition of Gn, and hAF without Gn; 30.1% compared with 85.8% for addition of Gn) at 20% concentration. These results suggest that human body fluids at 20% concentration and gonadotropins can be used as supplements for the maturation of mouse immature oocytes *in vitro*. When gonadotropins supplemented with the human body fluids in the maturation medium, fertilizability of mouse immature oocytes was increased in hPF and hAF groups. These results can be applied to maturation of human immature oocytes *in vitro*.

서 론

현재까지 미성숙난자를 체외성숙시킬 때 다양한 배양액에 난포액, 복수액, 혈청, 소태아 혈청과 양수등 여러가지 체액을 첨가하여 효과적으로 배양체계에 이용하려고 하는 연구가 많이 되어왔다(bovine: Leibfried-Rutledge et al., 1986; Zuelke and Brackett, 1993; human: Bar-Ami et al., 1993; Gomez et al., 1993; mouse: Eppig, 1991; Das et al., 1992; pig: Tsafiriri et al., 1975; Funahash and Day, 1993; rabbit Collas et al., 1991; sheep: Sun et al., 1994). 그러나 배양액에 첨가하는 체액의 종류에 따라 그 효과가 상이하게 보고되어 있는데, 이는 난포액에 난자의 발생에 영향을 미치는 다양한 성분이 함유되어 있어 난포가 성숙함에 따라 단백질과 호르몬 등 그 함량과 성분이 변화되는 것과 같이(Chari et al., 1983; Hillensjo et al., 1978; Channing et al., 1982, 1983; Tsafiriri, 1988; Das et al., 1992), 여러가지 체액이 각기 다른 성분을 함유하고 있기 때문이라고 할 수 있다(Javed and Wright, 1990; Nagai et al., 1990; Sun et al., 1994; Quero et al., 1994). 그러나, 인간 미성숙난자에서 사용할 수 있는 최적의 배양체계를 확립하기 위해서는 미성숙난자의 발생능력에 미치는 이들 물질의 정확한 평가가 구축되어야 할 것이다(Bar-Ami et al., 1993; Gomez et al., 1993).

따라서, 본 연구에서는 생쥐 미성숙난자의 성숙배양 시 제대혈청(human cord serum; hCS), 난포액(human follicular fluid), 복수액(human peritoneal fluid; hPF) 그리고 양수(human amniotic fluid; hAF)와 같은 인간체액과 성선자극호르몬을 이용하여 핵성숙과 수정능력에 미치는 최적의 배양체계를 연구함으로써, 궁극적으로 인간난자의 최적배양조건을 마련하고자 이 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 배양액의 준비

난자의 실온에서의 조작은 2mg/ml의 BSA (Sigma, USA)가 포함된 M2 배양액(M2+BSA, Quinn et al., 1982)을 이용하였으며, CO₂ 배양기내에서의 배양은 TCM 199(TCM, GIBCO,

U.S.A) 배양액을 이용하였다. M2 배양액은 매 주 stock 용액으로 준비하여 BSA를 첨가한 후 37°C로 조절하여 이용하였다. TCM은 각각의 체액을 첨가한 후 0.2 μ m filter(Millipore, USA)를 통과시켜 멸균한 후 CO₂ 배양기내에서 6시간 이상 평형시킨 후 이용하였다.

2. 체액의 준비

제대혈청(hCS)은 신생아 제대로 부터 회수한 혈청, human follicular fluid(hFF)는 최외수정 시술 중에 있는 환자에서 성숙난자를 갖고있는 난포에서 회수한 난포액, hPF는 황체에 있는 환자의 복강에서 회수한 복수액, 그리고 human amniotic fluid(hAF)는 임신 12-16주의 정상적인 환자로 부터 회수한 양수등을 이용하였다. 회수한 체액은 원심분리(3500 rpm)를 30분과 10분간 2회 실시하여 상층액 만을 회수한 후 56°C에서 35분간 불활성화시켜 0.2 μ m의 filter로 여과하여 멸균하고나서 -20°C에서 냉동 보존하다가 사용하였다. 해동 후 2주일이 경과한 것은 실험에서 제외하였다.

3. 난자의 채취

3-4주령된 ICR 자성생쥐에게 7.5 IU의 PMSG(Intervert, Holland)를 복강주사 후 48-52 시간에 경추탈골법으로 생쥐를 희생시켜 M2 배양액에서 난포를 해부침으로 터뜨려 난자를 회수하였으며, 이렇게 회수된 난자 중 난구세포가 치밀하게 부착된 난자-난구세포 복합체만을 각각의 배양액에서 3-4회 세척한 후 배양에 사용하였다.

4. 난자의 배양

미성숙난자의 체외배양은 TCM 배양액을 기초 배양액으로하고, 채취된 여라가지의 체액을 20, 50, 및 75%의 농도로 첨가하여 실험에 사용하였다. 그리고 대조군으로는 fetal calf serum(FCS, GIBCO, USA)을 사용하였다. 또한, 성선자극호르몬(gonadotropin; Gn, Sigma, USA)으로는 각각 10 IU/ml의 PMSG와 10 IU/ml의 hCG를 첨가하였다. 난자의 성숙을 위한 체외배양은 직경이 60mm 크기의 배양접시(Falcon, USA)에 50 μ l의 배양액을 소적한 후 액상파리핀 오일(Sigma, USA)을 덮어 5% CO₂, 37°C 배양기에서 18시간 동안 지속 배양하였다.

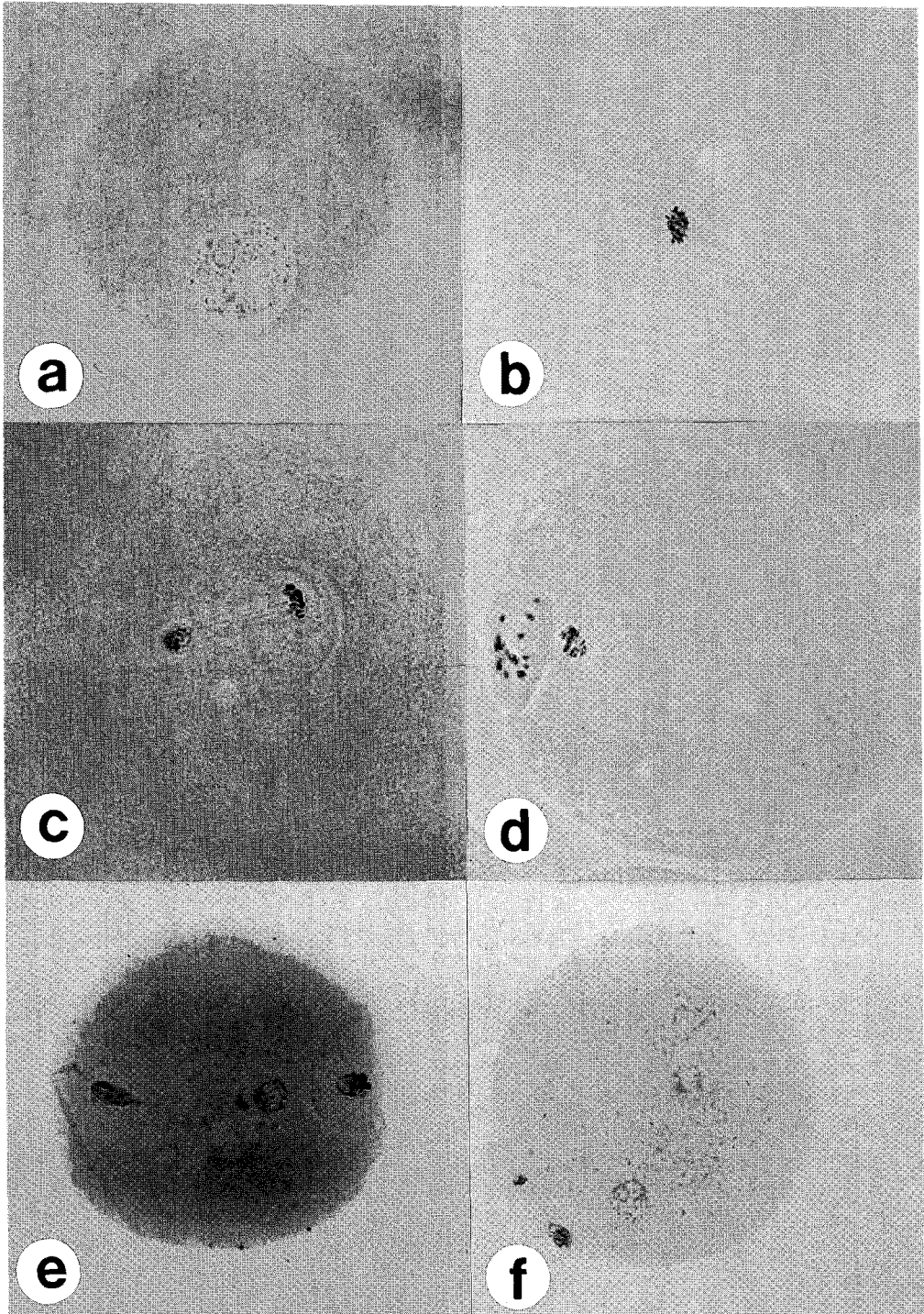


Fig. 1. Evaluation of nuclear maturation and fertilization was carried out by rapid staining using fuchin(a: germinal vesicle, b: metaphase I, c: telophase I, d: metaphase II, e: mono spermy, and f: poly spermy).

1) 실험 1: TCM 배양액에 첨가하는 각기 다른 체액에 따른 효과를 검토하기 위하여

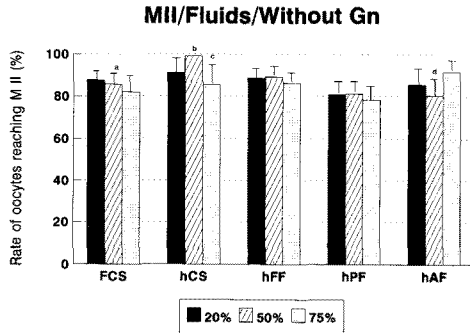


Fig. 2. Effects of various body fluids at various concentration on the nuclear maturation of immature oocytes in mouse(mean \pm SEM). a:b(p<0.01), d:e(p<0.05).

FCS, hCS, hFF, hAF 그리고 hPF를 각각 첨가한 TCM 배양액에서 미성숙난자의 핵성숙을 유도한 후, T6(Quinn et al., 1982) 배양액에서 체외수정을 실시하여 수정율에 미치는 영향을 조사하였다.

2) 실험 2: 생쥐 미성숙난자의 체외성숙 시 호르몬을 첨가하여 성숙시킨 난자를 체외수정에 이용하여 효과를 조사하였다. 즉, 성선자극 호르몬의 영향을 검토하기 위하여, 실험 1의 방법대로 준비한 배양액에 10 IU/ml의 PMSG와 10 IU/ml의 hCG를 첨가하여 그 안에서 핵성숙을 유도한 후 T6 배양액에서 수정율의 변화를 조사하였다.

5. 체외수정

체외수정용 난자는 성숙배양 후 150 IU/ml의 hyaluronidase(Sigma, USA) 용액에서 반복된 pipetting으로 난구세포를 제거한 난자를 M2 배양액에서 3회 세정한 후 제 1극체가 명확히 보이며, 그 크기가 비정상적인 것은 모두 제외시키고 정상 소견을 보이는 MII 난자만을 선발하여 T6 배양액으로 3회 세정하여 수정에 이용하였다.

체외수정용 정자는 ICR 웅성생쥐(10주령 이상)를 희생시켜 정소상체미부만을 회수하여 BSA를 함유하지 않은 500 μ l의 T6 배양액에 옮겨 정자괴를 15-20분동안 CO₂ 배양기 내에서 배양하여 정자를 보유했으며 정자 drop 내에 있는 응집된 정자를 제거한 후 15 mg/ml의 BSA(Fraction V, Sigma, USA)를 포함한 500 μ l의 T6 배양액(T6+BSA)으로 옮겨 수정능획득이 일어나도록 유도한 후 체외수정

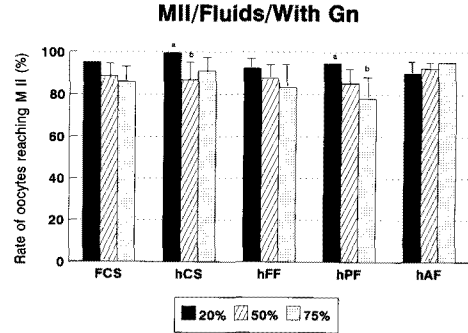


Fig. 3. Effects of various body fluids at various concentration and gonadotropins on the nuclear maturation of mouse immature oocytes (mean \pm SEM). a:b(p<0.05).

에 이용하였다(Lee et al., 1988). 수정능 획득을 유기한 정자의 농도는 1-2 \times 10⁶/ml이 되도록 조절하여 10-15개의 난자를 BSA가 첨가된 50 μ l의 T6 배양액으로 옮긴 다음 2-6시간 동안 정자와 함께 배양함으로써 수정을 유도하였다.

6. 난자의 분석

미성숙난자의 핵성숙 및 성숙난자에 대한 정자침입의 판정은 급속염색법(Byun et al., 1991)을 이용하여 18시간 후에 분석하였으며(그림 1, a-d), 수정의 여부는 난자 내에 정자 두부의 팽화와 정자미부에 해당하는 부분이 발견되는 것과, 난자가 핵분열을 보이거나 전핵이 형성된 것을 수정된 것으로 판정하였다(그림 1, e-f). 실험결과에 대한 유의성 여부는 X² 검정을 이용하였으며, 표준 오차율은 SEM으로 나타내었다.

결 과

1. 체액의 종류 및 농도에 따른 핵성숙의 변화

배양액에 첨가하는 체액이 미성숙난자의 체외성숙시 핵성숙에 미치는 효과를 그림 2에 보여주었다.

성숙배양액에 첨가하는 각기 다른 체액이 핵성숙에 미치는 영향을 농도별로 살펴보았을 때, 50%의 hCS(99%; 94/95)와 75%의 hAF(91.7%; 132/144)가 FCS(85.6%; 83/97, 82%; 63/89)에 비하여 현저히(p<0.05) 높은 성숙율을 얻은 것을 제외하고는 FCS(82-87%)

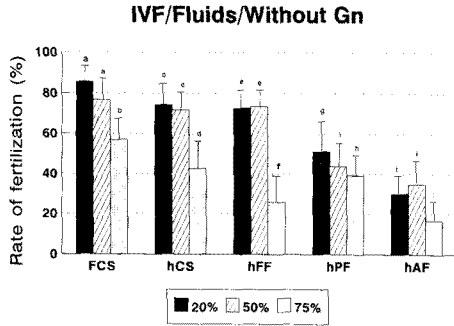


Fig. 4. Effects of various body fluids added in maturation medium during in vitro maturation on the fertilizability of matured oocytes in vitro (mean \pm SEM). a:b:c,e,g,i; b:d,f,h,j; c:d,e:f,g,h,i; i:j ($p < 0.01$).

와 인간체액(78.3-91.1%)이 성숙율에 미치는 효과에는 통계적인 유의차가 인정되지 않았다. 또한 체액별로 살펴 보았을 때에도, 20% 농도를 기준으로 보았을 때 핵성숙율이 통계적인 유의차가 없이 거의 유사한 경향을 보여 줌으로써, 미성숙난자의 성숙배양을 위한 첨가제로서 20%의 농도로 조절한 인간체액을 사용할 수 있다는 것을 알았다.

핵성숙 시 각기 다른 인간체액에 성선자극 호르몬을 첨가한 후 성숙배양 시켰을 때(그림 3), 대조군(FCS)과는 통계적인 유의차가 없었으나 성선자극호르몬을 첨가하지 않은 것(그림 2)보다 핵성숙을 증가시키는 경향이 있었다.

2. 체액의 종류에 따른 성숙배양 후 난자의 수정능력의 변화

미성숙난자의 체외성숙에 첨가하는 각기 다른 체액이 핵성숙 후 체외수정에 미치는 영향을 그림 4에 보여 주었다.

체액을 종류별로 나누어 보았을 때, 20% 농도를 기준으로하여 살펴보면 FCS(85.6%; 89/104), hCS(74.3%; 84/113)와 hFF(72.7%; 85/117)에서는 75% 농도(56.9%; 37/65, 42.6; 23/54, 25.7%; 18/70)에서 수정율이 급격히 ($p < 0.01$) 감소하여 저농도에 비하여 고농도로 증가할수록 수정율이 감소하였다. 또한, 체액을 농도별로 살펴보았을 때, 20%와 50%의 농도에서는 FCS(85.6%, 76.7%)에 비하여 hCS(74.3, 71.8)와 hFF(72.7-73.6%)의 경우는 수정율이 유사하였으나 hPF(51.5, 43.8)와

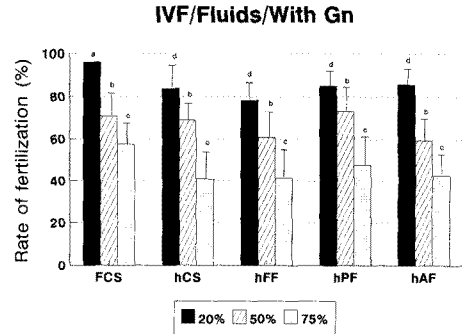


Fig. 5. Effects of various body fluids at various fluids concentration and gonadotropins on the fertilizability of matured oocytes in vitro (mean \pm SEM). a:b,c,d; b:c, d:b,c ($p < 0.01$), a:d ($p < 0.05$).

hAF(30.1, 34%)에서는 수정율이 급격히 ($p < 0.01$) 감소하였으며 75%의 고농도에서는 인간체액 첨가군 전체(16.7-42.6%)가 FCS(56.9%)에 비하여 수정율이 통계적으로 유의있게 ($p < 0.01$) 감소하였다. 성숙배양 시, 성선자극호르몬을 첨가하였던 경우(그림 5)에는 첨가하지 않았던 경우(그림 4)와 비교하여, 전 group에서 수정율이 증가하는 것을 볼 수 있었다. 특히, 성선자극호르몬은 hPF와 hAF군에서 수정율을 급격히 증가시켜 대조군(FCS)과 거의 유사한 성적을 얻을 수 있었다. 따라서, 성숙배양액에 첨가하는 체액의 농도는 20%로 고정할 것과 아울러, 성선자극호르몬의 첨가가 난자의 수정능력을 향상시키는데 효과적으로 이용될 수 있다고 사료된다.

고 찰

소난자를 성숙배양시킬 때 estrus cow serum (78%), FCS(79%), 소 양수(bAF, 77%)와 소 난포액(bFF, 52%)을 첨가하였을 때 bFF에서 핵성숙율이 특히 저조하며(Quero et al., 1994), 돼지난자를 FCS와 돼지 난포액(pFF)이 첨가된 배양액에서 성숙배양을 시킨 후 체외수정을 유도하였을 때, pFF(33%)보다 FCS(54%) 첨가군에서 수정율이 증가(Funahash and Day, 1993)하여, 본 실험과는 차이가 있었다. 사람 난포액(hFF)에 함유된 growth factor에 의해 생쥐난자의 핵성숙이 향상되지만(Das et al., 1992), 포유동물의 난포액은 난자의 핵성숙을 억제한다는 현상이 여러 연구자에 의해 보고

되고 있다(Chari et al., 1983; Hillensjo et al., 1978). 그러나, 이와같은 이유는 난포액이 함유하고있는 estradiol, progesterone, prolactin, nonsteroidal oocyte substance, inhibin 그리고 luteinization stimulator와 같은 물질들의 함량과 성분이 난포가 성숙함에 따라 변화되기 때문에, 이들을 체외배양에 이용할 때 미성숙난자의 체외성숙율이 변화(Channing et al., 1982, 1983; Tsafiriri, 1988)되는 것으로 생각된다. 돼지난자를 성숙시킬 때 돼지양수(pAF)에 성선자극호르몬을 첨가해서 핵성숙율과 핵성숙 후의 체외수정율을 향상시켰고(Nagai et al., 1990), 면양의 난자를 성숙배양 시킬때도 면양과 사람의 난포액을 첨가해서 핵성숙을 증가시켰으며 여기에 LH를 첨가하여 수정율과 배발달율이 증가된다(Sun et al., 1994)고 보고하여, 본 실험의 결과와 유사함을 볼 수 있다. 본 실험에서는 성숙배양액에 첨가하는 체액의 종류에 따라 체외성숙율에는 주목할 만한 차이가 나타나지 않았지만, hPF(39.3-51.5%)와 hAF(16.7-34%)에서 정자침입이 억제되는 현상이 관찰되었으며, 또한 이들 물질은 난자의 핵성숙에서는 특이한 현상이 없었으나, 핵성숙 후의 수정율을 저하시키는 작용을 하였는데, 이는 성숙배양 동안에 일어나는 투명대의 경화현상에 의한(Bavister, 1981; Zhang et al., 1991)것으로 생각된다. 그러나 체외성숙 중에 첨가하는 인간체액이 난자의 발생능력에 각기 다르게 미치는 요인을 분석해야 하는 과제가 남아 있어 더 많은 연구가 수행되어야 할 것이다.

결 론

생쥐 미성숙난자의 성숙배양에서 난자의 핵성숙에 hCS, hFF, hPF와 hAF와 같은 인간체액을 이용하여 핵성숙과 수정능력에 미치는 최적의 배양체계를 확립하여, 인간난자의 기초배양체계를 마련하고자 이 실험을 수행하였다.

인간체액을 성숙배양액에 첨가하였을 때에 난자의 핵성숙과 성숙배양 후에 미치는 수정율을 살펴보면 다음과 같다. 첫째, 핵성숙에 미치는 영향은 체액의 종류에 따른 핵성숙의 변화에는 큰 차이가 없었으며, 성선자극호르몬의 첨가 효과도 두드러지게 나타나지 않았다. 둘째, 체외성숙 후 수정에 미치는 영향은 FCS에 비하여 hPF와 hAF에서 급격히($p < 0.01$)

감소하여 hPF와 hAF의 어떤 성분이 성숙배양 중에 난자의 수정능력을 저하시키는 역할을 한 것으로 보이며, 첨가농도가 증가할수록 모든 첨가군에서 수정율이 급격히 감소($p < 0.01$)하여 첨가물질의 농도는 20%를 유지하여 사용해야 효과적일 것이며, 성숙배양액에 hPF와 hAF를 첨가할 때 성선자극호르몬과 함께 첨가하여 미성숙 난자를 배양하므로써 수정능력이 급격히($p < 0.01$) 증가되므로, 인간체액을 이용한 배양체계에서 성선자극호르몬을 효과적으로 사용할 수 있겠다. 결론적으로, 인간 체액을 미성숙난자의 체외배양에 사용할 때에는 20%의 농도의 체액에 성선자극 호르몬을 첨가하여 배양을 시키면 발생능력이 우수한 난자를 획득 할 수 있다.

인 용 문 헌

- Bar-Ami S, Khoury C, Zlotkin E, Brandes JM: Increasing progesterone secretion in human granulosa luteal cells induced by human follicular fluid. *Hum Reprod* 1993, 8(1), 46-52.
- Bavister BD: Substitution of a synthetic polymer for protein in a mammalian gamete culture system. *J Exp Zool* 1981, 217, 45-51.
- Bavister BD, Arlotto T: Influence of single amino acids on the development of hamster one-cell embryos *in vitro*. *Molecul Reprod & Develop* 1990, 25, 45-51.
- Byun TH, Lee SH, Song HB: Development of a rapid staining method for nucleus of the domestic animals. *Korean J Anim Sci* 1991, 33, 25-31.
- Channing CP, Anderson LD, Hoover DJ, Kolena J, Osteen KG, Pomerantz SH: The role of nonsteroidal regulators in control of oocyte and follicular maturation. *Recent Prog. Horm Res* 1982, 38, 331-408.
- Channing CP, Liu CQ, Jones GS, Jones H: Decline of follicular oocyte maturation inhibitor coincident with maturation and achievement of fertilizability of oocytes recovered at midcycle of gonadotropin-treated women. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983, 80, 4184-4188.

- Chari S, Hellenslo T, Magnusson C, Sturm G, Daume E: *In vitro* inhibition of rat oocyte meiosis by human follicular fluid fractions. *Arch Gynecol* 1983, 233, 155-164.
- Choi TS, Mori M, Khmoto K, Shoda Y: Beneficial effect of serum on the fertilizability of mouse oocytes matured *in vitro*. *J Reprod Fert* 1987, 79, 565-568.
- Collas PC, DUBY RT, Robl JM: *In vitro* development of rabbit pronuclear embryos in rabbit peritoneal fluid. *Biol Reprod* 1991, 44, 1100-1107.
- Das K, Phipps ER, Hensleigh HC, Tagatz GE: Epidermal growth factor in human follicular fluid stimulates mouse oocyte maturation *in vitro*. *Fertil Steril* 1992, 57(4), 895-901.
- Eppig JJ: Maintenance of meiotic arrest and the induction of oocyte maturation in mouse oocyte-granulosa cell complexes developed *in vitro* from preantral follicles. *Biol Reprod* 1991, 45, 824-830.
- Funahashi H, Day BN: Effects of different supplements in maturation medium on meiotic and cytoplasmic maturation of pig oocytes. *Theriogenology* 1993, 39, 965-973.
- Funahashi H, Day BN: Effects of follicular fluid at fertilization *in vitro* on sperm penetration in pig oocytes. *J Reprod Fert* 1993, 99, 97-103.
- Funahashi H, Day BN: Effects of the duration of exposure to hormone supplements on cytoplasmic maturation of pig oocytes *in vitro*. *J Reprod Fert* 1993, 98, 179-185.
- Gomez E, Tarin JJ, Pellicer A: Oocyte maturation in human: the role of gonadotropins and growth factors. *Fertil Steril* 1993, 60(1), 40-46.
- Hillensjo T, Sjorgen A, Strender B, Andino N: Steroid secretion by cumulus cells isolated from human preovulatory follicles. *Acta Endocrinol* 1985, 108, 407-413.
- Hinsch KD, Hinsch E, Meinecke B, Topfer-Petersen E, Pfisterer S, Schill WB: Identification of mouse protein in mammalian oocytes with antisera against synthetic ZP3 peptides. *Biol Reprod* 1994, 51, 193-204.
- Huisman GJ, Leerentveld RA, Lo-A-Njoe NM, Verhoeff A, Alberda AT, Zeilmaker GH: Comparison of results obtained with human serum and a protein solution as a supplement for *in vitro* fertilization culture medium. *Fertil Steril* 1992, 58, 637-639.
- Javed MH, Wright RW: Bovine amniotic and allantoic fluids for the culture of murine embryos. *Theriogenology* 1990, 34(3), 445-460.
- Leibfried-Rutledge ML, Crister ES, First NL: Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on *in vitro* maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. *Biol Reprod* 1986, 35, 850-857.
- Nagai T, Takahashi T, Shioya Y, Ogura N: Maturation and fertilization of pig follicular oocytes cultured in pig amniotic fluid. *Theriogenology* 1990, 34(2), 195-204.
- Quero JMO, Millan MM, Cordoba MV, Franganillo AR: The influence of different types of media supplement on the meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*. *Theriogenology* 1994, 41, 405-411.
- Quinn P, Barros C, Whittingham DG: Preservation of hamster oocyte at -196°C and fertilization *in vitro* of the frozen-thawed oocytes. *J Reprod Fert* 1982, 66, 161-168.
- Shirley B, Wartham JWE, Witmyer J, Condon-Mahony M, Fort G: Effects of human serum and plasma on development of mouse embryos in culture media. *Fertil Steril* 1985, 43(1), 129-134.
- Suello CE, Rathwick G, Lambert H, Swanson J, Steinleitner: The effect of peritoneal fluid from patients with endometriosis on murine sperm-oocyte interaction. *Fertil Steril* 1987, 48(4), 697-699.
- Sun FJ, Holm P, Irvane B, Seamark RF: Effect of sheep and human follicular fluid on the maturation of sheep oocytes *in vitro*. *Theriogenology* 1994, 41, 981-988.
- Tajik P, Niwa K, Murase T: Effects of different proteins in fertilization medium on *in vitro* penetration of cumulus-intact and

- cumulus-free bovine oocytes matured in culture. *Theriogenolgy* 1993, 40, 949-958.
- Tsafiriri A:Local nonsteroidal regulators of ovarian function. In:E Knobil, editors. *The Physiology of Reproduction*, 1988, Vol2. New York, Raven Press, 527-565.
- Tsafiriri A, Channing CP:Influence of follicular maturation and culture conditions on the meiosis of pig oocytes *in vitro*. *J Reprod Fertil* 1975, 43, 149-152.
- Zhang X, Rutledge J, Armstrong DT:Studies on zona hardning in rat oocytes that are matured *in vitro* in a serum-free medium. *Molecul Reprod & Develop* 1991, 28, 292-296.
- Zuelke KA, Brackett BG:Increased glutamin metabolism in bovine cumulus cell-enclosed and denuded oocytes after *in vitro* maturation with luteinlzing hormone. *Biol Reprod* 1993, 48, 815-820.
-