

## 수정에 실패한 인간 난자에 있어서의 염색체의 수의 이상

차병원 여성의학연구소

손원영 · 이경아 · 박상희\* · 한세열 · 윤태기 · 정형민 · 곽인평 · 차광열

### Chromosomal Abnormalities in Human Oocytes Fail to Fertilize after Insemination In Vitro

Weon-Young Son, Kyung-Ah Lee, Sang-Hee Park, Sei-Yul Han, Tae-Ki Yoon,  
Hyung-Min Jung, In-Pyung Kwak and Kwang-Yul Cha

*Infertility Medical Center, \*Genetics Laboratory, Cha General Hospital, Seoul, 135-081, Korea*

#### = Abstract =

Many oocytes fail to fertilize and cleave in vitro and many embryos transferred back to uterus fail to implant or maintain implantation. Chromosomal abnormalities in the male and female gametes may contribute to this loss. The higher incidence of meiotic chromosomal abnormalities has been found in oocytes than in sperm. The wide range of incidence of chromosomal abnormalities in unfertilized oocytes has been reported in human IVF program (26-63%). However, factors affecting chromosomal abnormalities are not well understood. The present study has been conducted to investigate effects of the method for ovarian hyperstimulation, women's age, and the number of oocytes retrieved per patients on the incidence of numerical chromosomal abnormalities. Five hundred eighty four unfertilized metaphase II oocytes were subjected to chromosomal analysis. Included unfertilized oocytes were from 220 patients (mean age=32.7±3.0) and three hundred thirty oocytes were legible for analysis. Two hundred forty five oocytes out of 330 (73.3%) were normal, while 38 (11.5%) were hyperploidy, 35 (10.6%) were hypoploidy, and 12 (3.6%) were diploidy. Significant difference in chromosomal abnormalities was not found between two patient groups stimulated by follicular stimulating hormone/human menopausal gonadotrophin (FSH/HMG) (25.9%) and gonadotrophin-releasing hormone agonist/follicular stimulating hormone/human menopausal gonadotrophin (GnRHa/FSH/HMG) (28%). There was a tendency of increasing chromosomal abnormalities in unfertilized oocytes from older patients (<30 yrs: 20.3%, 30-34yrs: 26.9%, >34 yrs: 35.3%). The number of oocytes retrieved per patient had no effect the incidence of chromosomal abnormalities (1-5: 31.4%, 6-10: 29.8%, 11-15: 28.6%, > 15: 16.5%). These results from the present study suggest that the chromosomal abnormalities observed in the unfertilized oocytes has not affected by the stimulation methods, patient's age, and the number of oocytes retrieved per patients.

#### 서 론

인간의 in vitro fertilization (IVF)의 임신율은 세

계적으로 20-40%로 보고되고 있고 최적의 과배란 유도 방법과 최적의 체외 배양조건을 갖추어 IVF 임신율을 증가 시키려는 많은 노력이 기울여지고 있다. 그럼에도 불구하고 많은 난자들은

체외에서 수정과 난할에 실패하거나 자궁에 배아를 이식하였을 때 착상을 하거나 또는 착상을 유지하는데 실패한다 (Seppälä, 1985). 이런 현상의 원인중의 한가지 요인으로서 정자와 난자의 염색체 이상이 생각되었다 (Boue et al., 1975; Schlesselman, 1979). 정자에 비해 난자에서 더 높은 비율의 감수분열적인 염색체 이상이 보고 (Mattei et al., 1979; Juberg and Howrey, 1983)되었는데, 정상적인 남성의 정자에서는 5-10%의 염색체 이상이 보고 (Martin, 1985; Brandiff et al., 1986)되었으며 IVF program 에서 환자들의 난자 중 수정이 되지않은 난자에서 염색체 이상의 빈도는 보고자들 사이에 16-63%로 다양하게 보고되어있다 (Plachot et al., 1986; Wramsby and Fredga, 1987; Angell et al., 1991). 최근들어 IVF 기술의 발달로 많은 생식세포들이 연구대상으로 유용하게 사용될 수 있어 여러 연구자들이 난자의 세포 유전학적인 분석 결과를 보고하였다. 모든 연구들의 목적은 인간 난자에서 염색체가 입는 손상 정도를 평가하여 그원인들을 규명하는데 있다. 그러나 염색체 이상을 유발시키는 임상적인 요인에 대해서는 아직도 논란이 많다. 따라서 본연구는 IVF시술시 성숙된 난자들 중 수정에 실패한 난자에 있어서 염색체의 수적 이상의 빈도가 과배란 유도방법, 환자의 나이, 그리고 회수된 난자의 수에 따라 차이가 있는지를 알아보기 위하여 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 수정에 실패한 난자의 준비

1994년 7월부터 12월까지 차병원 여성의학 연구소에서 IVF-ET program을 시행한 220명의 불임환자로부터 회수된 난자들중 수정에 실패한 난자들을 본 실험에 공시하였다. 환자들의 평균 나이는 32.7세 (21-46세) 이었고 남성원인의 불임 부부는 본 연구에서 제외시켰다. 환자들의 과배란 유도를 위해서는 FSH/HMG 또는 GnRH<sub>a</sub>/FSH/HMG 를 사용하였다. HCG 주입 36시간후에 transvaginal method로 난자를 난포로부터 회수하였다. 회수된 난자는 배우자의 정자로 수정을 시켰으며 20% 인간 체대혈청이 들어있는 TCM-199 배양액에서 배양하였다. 수정 약 35-40시간 후에 난할이 된 배아들을 자궁으로 이식 시켰다. 수정 후 40시간까지 전핵이 보이지 않는 제 1극체가

있는 성숙 난자들 본 실험에 공시하여 세포유전학적인 분석을하였다.

### 2. 난자의 염색체 준비

Tarkowski (1966)의 air-drying 방법을 변형하여 난자의 염색체를 준비하였다. 난자를 약 15분동안 0.9% sodium-citrate 저장용액에 넣은 후 그 난자를 작은 점적으로 이물질을 제거한 slide에 올려 놓고 2단계로 염색체를 고정하였다. 먼저 고정액 I (메탄올: 빙초산: 증류수 = 5:1:4)을 난자가 있는 작은 점적에 부가하여 약 1 분동안 난자의 투명대를 제거한후 고정액 II (메탄올: 빙초산= 3:1)을 천천히 난자가 있는 점적에 부가하여 염색체를 고정시켰다. 그 slide를 공기중에서 말린 후 5% Giemsa 용액에 15분동안 침지시켜 난자의 염색체를 염색시켰다. 염색체의 준비동안 염색체 분실의 가능성이 있으므로 심하게 퍼져있는 hypoploidy 세포들은 분석에서 제외시켰다.

### 3. 결과의 분석

결과의 분석은 수정이 되지 않은 난자에서 전체적인 염색체를 분석한 후, 과배란 유도방법, 환자의 나이, 그리고 환자당 회수된 난자의 수에 따른 염색체의 수적 이상을 나누어서 분석하였다. 실험 결과에 대한 유의성 여부는 X<sup>2</sup> 검정을 이용하였으며, 표준 오차율은 Standard error of mean (SEM)으로 나타내었다.

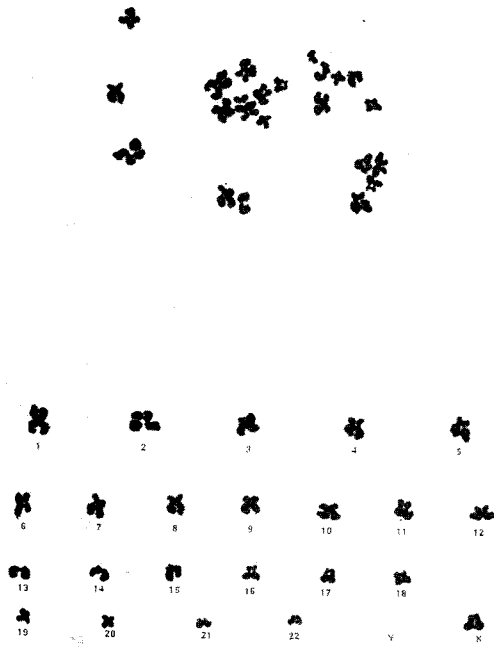
## 결 과

### 1. 수정에 실패한 인간 난자에서 전체적인 염색체의 수적 이상

염색체 준비를 위하여 사용한 584개의 난자들 중 330개의 난자 (56.5%)를 성공적으로 분석하였다 (Table1). 분석한 난자 330개중 245개가 정상적인 haploidy (74.2%)이었고, hyperploidy 난자는 38개 (11.5%), hypoploidy 난자는 35개 (10.6%), 그리고 diploidy 난자는 12개 (3.6%)로 전체적으로 염색체 수적 이상을 가진 난자는 85개 (25.8%)이었다. 그림 1은 정상적인 난자의 23개의 염색체를 보여주고있다. 그림 2는 23개의 염색체중 G군의 염색체 (21번)가 1개없는 hypoploidy이고, 그림 3은 G군의 염색체 (22번)가 두개인 hyperploidy의 사진이다. 그리고 그림 4는 2배수체의 인간 난자의 염색체를 보여준다. 분석한 난

**Table 1.** Cytogenetic data of human unfertilized oocytes in IVF program

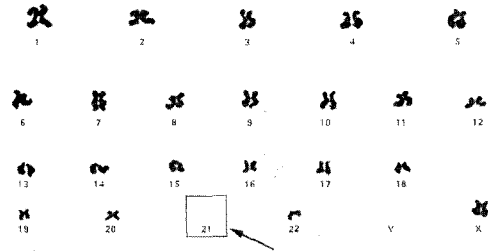
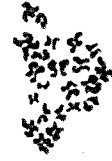
No. of MII oocytes	584 (100%)
Not analyzed	254
Analyzed	330 (56.5%)
<hr/>	
No. of analyzed oocytes	
Haploidy	330 (100%)
Aneuploidy	245 (74.2%)
- hyperploidy	73 (22.1%)
- hypoploidy	38 (11.5%)
Diploidy	35 (10.6%)
	12 (3.6%)
<hr/>	
Total No. of abnormal oocytes	85 (25.8%)



**Fig. 1.** A metaphase plate of a haploidy MII oocyte and its karyotype, showing 23, X.

자 염색체의 수적 이상의 빈도를 다시 과배란 유도방법, 환자의 나이, 그리고 회수된 난자의 수 등에 따라서 분석하였고 그 상관 관계를 조사하였다.

**2. 과배란 유도방법에 따른 난자 염색체의 수적 이상**



**Fig. 2.** A metaphase plate of a haploidy MII oocyte and its karyotype, showing 22, X, -G (arrow).

수정이 되지 않은 난자에서의 염색체의 수적 이상을 과배란 유도방법에 따라 나누어 본것을 그림 5에 정리하였다. FSH/HMG 실험군의 염색체의 수적 이상은 25.9% (aneuploidy, 29/116; diploidy, 1/116), GnRHa/FSH/HMG 실험군은 28% (aneuploidy, 35/161; diploidy, 10/161)으로 두 실험군 사이에 통계학적인 유의차가 없었다.

**3. 환자의 연령에 따른 난자 염색체의 수적 이상**

수정되지 않은 난자의 염색체의 수적 이상을 환자의 나이별로 나누어 본 것이 그림 6이다. 29세 이하인 경우 염색체 이상의 빈도는 20.3% (aneuploidy, 22/118; diploidy, 2/118), 30세 부터 34세 이하인 경우 26.9% (aneuploidy, 31/134; diploidy, 5/134), 35세 이상인 경우 35.3% (aneuploidy, 15/51; diploidy, 3/51)로 염색체의 수적인 이상이 환자의 나이가 증가함에 따라 증가 되는 경향은 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다 ( $p=0.06$ ).

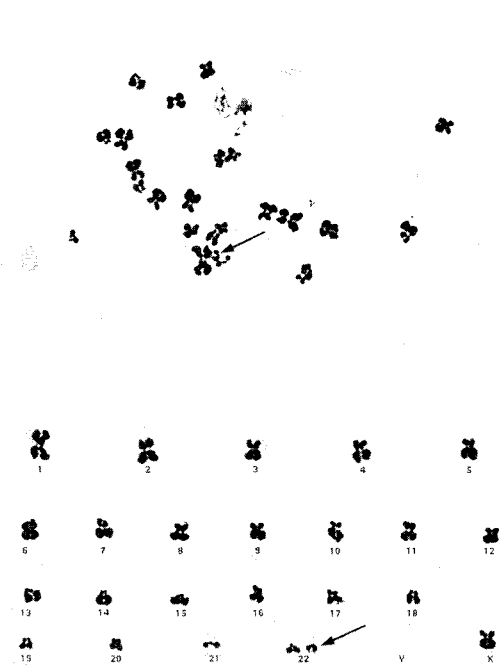


Fig. 3. A metaphase plate of a haploidy MII oocyte and its karyotype, showing 24, X, +G (arrow).

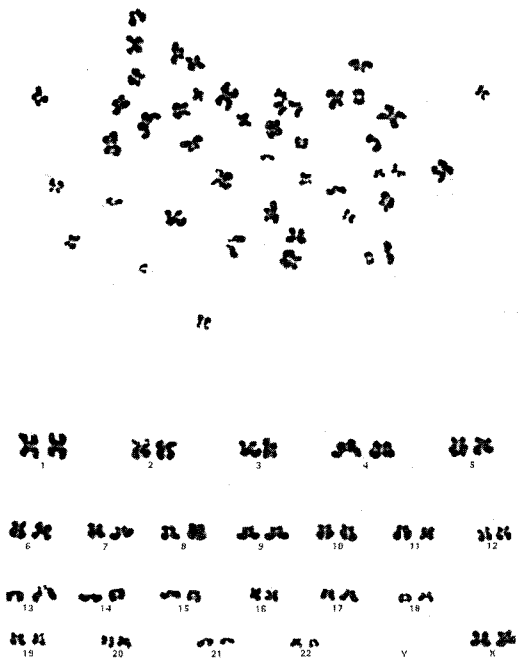


Fig. 4. A metaphase plate of a diploidy MII oocyte and its karyotype, showing 46, XX.

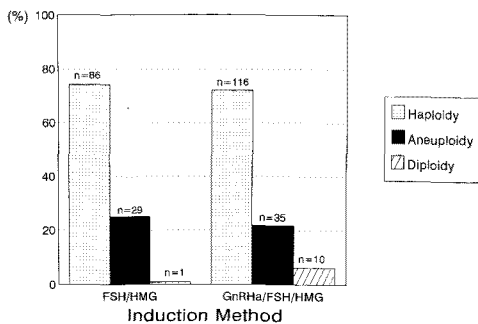


Fig. 5. The incidence of chromosomal abnormalities in human oocytes according to the induction method.

#### 4. 환자당 회수된 난자의 수에 따른 염색체의 수적 이상

환자당 회수한 난자의 수에 따른 염색체의 수적 이상의 빈도는 그림 7에 나타내었다. 환자당 회수한 난자가 5개 이하인 경우 31.4% (aneuploidy, 10/35; diploidy, 1/35), 6-10개인 경우

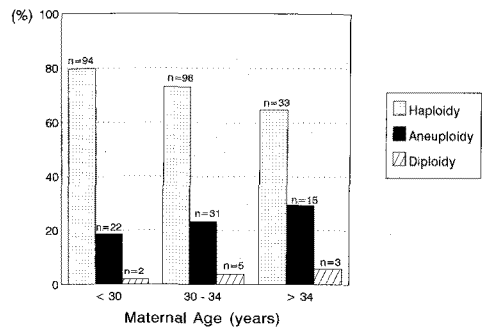


Fig. 6. The incidence of chromosomal abnormalities in human oocytes with increasing maternal age.

29.8% (aneuploidy, 27/104; diploidy, 4/104), 11-15개인 경우 28.6% (aneuploidy, 14/63; diploidy, 4/63), 16개 이상인 경우 16.5% (aneuploidy, 17/115; diploidy, 2/115)의 염색체의 수적 이상을 보였다. 역시 마찬가지로 각 실험군 사이의 통계적 유의차는 없었다.

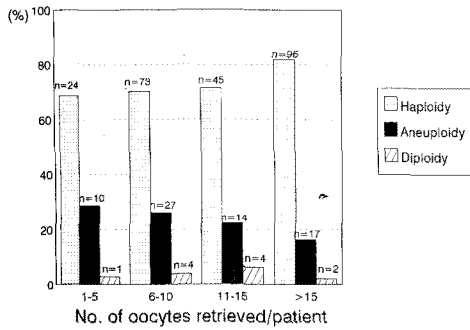


Fig. 7. The incidence of chromosomal abnormalities in human oocytes according to the number of oocytes retrieved per patient.

## 고찰

체의 수정 기술의 발달로 인해 난자에서 염색체 이상을 유발시키는 여러가지 임상적인 요인들에 대해서는 많은 연구들이 이루어져왔다. 그중에서도 가장 관심이 되어왔던 요인들은 과배란을 유도시키는 방법과 환자의 연령, 그리고 불임의 원인등이었다. 그러나 IVF 프로그램에 있어서 정상적인 난자는 환자에게 이식을 시켜야 하기 때문에 염색체 이상의 관찰은 대부분 IVF-ET cycle에서 수정에 실패한 난자들에서 한정된 연구(Edirisinghe, 1992)가 이루어졌고, 본 연구도 수정에 실패한 난자를 실험에 공시하여 간접적으로 임상적인 요인들과 염색체 이상의 상관 관계를 밝혀 보려고 하였다.

Pellistor (1991)는 인간의 많은 난자들이 broken metaphase plate를 보이고 염색체가 없거나 겹쳐져 있어 50%이상의 인간 난자들이 세포유전학적 분석을 위해 적당하지 않다고 보고하였다. 난자의 염색체를 분석하는 세포유전학적 연구들이 공통적으로 가지고 있는 문제점의 하나는 peripheral blood leukocytes같은 체세포 조직과 달리 염색체 분석이 전체적으로 하나의 metaphase에 의존하기 때문에 다른 세포들을 통해 재확인 할 수 없다는 것이다. 그러므로 난자의 핵물질을 슬라이드에 고정시키는 방법이 염색체 분석의 성공을 결정하는 관건이 된다. 본 실험에서 사용한 방법이 기존의 보고된 방법과 다른점은 기존의 연구에서는 난자를 먼저 고정액으로 처리한 후 슬라이드에 난자를 옮겼는데 본 연구에서는 슬라이드상에 만들어진 작은 점

적의 저장액으로 난자를 옮긴 후 고정액 I을 처리함으로써 기존의 연구에서 난자의 투명대가 제거됨으로 피펫의 관벽에 붙어서 잃어버리게 되는 가능성을 줄였으며, 고정액 I의 처리시간도 1분 이하로 줄여 투명대를 완전히 제거하지 않고 어느 정도만 제거해 고정시 한꺼번에 난자가 터짐으로서 염색체가 과다하게 퍼지는 것도 막아 주었다. 그래서 대부분의 경우 염색체가 잘 분산되어 분석이 용이했다. Martin등 (1986)은 염색체 준비시에 염색체 중 일부를 잃어버려 그들이 관찰한 28%의 hypoploidy가 실험상의 오류가 아닌가 보고하였다. 이와같이 기존의 연구 보고에서 hypoploidy염색체 이상이 높은 빈도로 보고된 반면, 본 연구에서는 hypoploidy염색체를 가진 난자 (11.5%)나 hyperploidy 염색체를 가진 난자 (10.6%)의 비율이 차이를 나타내지 않았다. 전체적으로 584개의 MII 난자들중 330개 (56.5%)가 분석 가능하였다. 나머지 분석에서 제외시킨 경우는 난자를 고정하는동안 잃어버린 경우, 염색체가 잘 퍼지지 않은 경우, 그리고 염색체가 너무 퍼져있어 hypoploidy로 판정되는 경우 등이었다.

IVF 시술시 수정이 되지 않은 난자중에서 염색체의 수적인 이상이 본 연구에서는 25.8%로서 Ma등 (1989)이 보고한 47.7%보다는 낮았으나, Veiga등 (1987)의 22.2%, de Jong 등 (1985)의 23%, Spielmann등 (1985)의 11%와는 유사하였다. Pellestor (1991)도 최근에 1,500개의 난자에 대한 염색체 분석에서 성숙 난자들의 전체 염색체 이상은 24.0%으로 보고하였다. Edirisinghe 등 (1992)은 수정시키지 않은 성숙 난자의 염색체 이상이 16.7%이고 in vitro에서 수정이 되지 않은 난자에서의 25.2%와 통계적인 유의차가 없는 것으로 보고하고 있다.

수정이 안된 인간 난자들에서 대부분의 연구를 종합한 평균적인 염색체의 구조적 이상은 약 4.6% 정도로 보고 (Kamiguchi et al., 1993) 하고 있고, 일반적으로 수적인 염색체 이상보다 적게 일어나는 것으로 보고되어 있다. 그러나 중기 상태에 있는 난자의 미세한 구조적 염색체 이상을 분석하기 어렵기 때문에 간과되는 것이 아닐까 사료된다. 실제로 난자의 염색체는 백혈구 세포나 양수 세포같은 다른 세포에 비해 길이가 짧고 두꺼우므로 정확한 banding이 불가능하기 때문에 염색체의 구조적 이상을 정확히 판단하기는

힘들다. 본 실험에서도 수정에 실패한 난자에서 염색체의 구조적 이상의 분석은 고려하지 않았다.

De Sutter (1991)은 764개의 수정에 실패한 난자의 세포 유전학적 연구에서 제 2차 증기에서 diploidy의 난자의 수가 6%로 보고되었다. 지금까지 보고된 수정되지 않은 난자에서 polyploidy rate는 대략 9%정도로 보고되고 있다 (Kamiguchi et al., 1993). 본 실험에서는 전체적으로 3.6%의 diploidy가 분석되어 기존의 보고들과 큰 차이를 보이지 않았다.

본 연구는 IVF program에서 과배란을 유기시키는 방법에 따른 염색체의 이상을 gonadotrophin만으로 과배란을 유도한 경우와 GnRH agonist를 사용한 경우로 나누어서 그 관련성을 분석하였다. 기존의 보고에 의하면 De Sutter (1992)등은 GnRHa처리 방법과 Clomiphene citrate/human menopausal gonadotrophin (CC/HMG) 처리 방법을 비교해 본 결과 GnRHa처리 방법에서 유의하게 높은 염색체 이상성을 보고하였으나 Pieters등 (1991)은 CC/HMG방법과 GnRH agonists방법을 비교해 본 결과 과배란 방법과 염색체 이상의 빈도는 관련성이 없다고 보고하였다. 본 실험에서 분석한 FSH/HMG 방법과 GnRHa/FSH/HMG방법에 따른 염색체 이상은 발견되지 않았다. 따라서 과배란 방법의 차이에 의해서 난자의 염색체 이상이 많이 유기되는 것은 아닌것으로 사료된다.

Maudlin과 Fraser (1978)는 생쥐연구를 통해 늙은생쥐로부터 회수한 난자들에서 aneuploidy가 되는 non-disjunction배아들이 훨씬 많이 발생한다고 보고하였으며 Plachot등 (1986)은 IVF program에 참여하는 35세 이상의 여성들에게서 유의성있게 높은 aneuploidy의 경향성을 보고하였다. 그러나 Pellestor와 Séle (1988) 그리고 Almeida와 Bolton (1994)등은 환자의 나이에 따른 염색체 이상의 경향성에서 유의한 차이가 없음을 보고하였다. 본 실험에서는 환자의 나이가 증가함에 따라 염색체의 수적인 이상이 증가되는 경향은 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다. Plachot등 (1986)은 불임의 원인에 따라서 분석해 본 결과 염색체 이상이 차이가 없음을 보고하였다. 그러나 Pellister와 Séle (1988) 그리고 De Sutter등 (1991)은 남성불임의 원인을 가진 부부에서 tubal factor인 부부에 비해 수정되지 않은

난자의 aneuploidy 빈도가 낮게 나타남을 보고하였다. 본 실험에서는 불임의 원인에 따른 염색체 분석의 결과 차이가 없는 결과가 관찰되었다 (미 발표). 그러나 여러가지 불임의 원인별로 난자 염색체의 수적 이상을 분석하려면 많은 수의 난자가 요구된다. 따라서 분석할 수 있는 난자의 수를 늘여서 각 불임의 요인별로 염색체의 이상을 분석하는 연구가 더 필요하다고 하겠다.

De Sutter (1991)는 GnRH agonist 처리후에 15개 이상의 난자들을 얻은 경우 임신율이 떨어진다고 보고하였는데, 이들은 이 연구에서 GnRH agonist를 처리하여 얻은 난자들에서 높은 빈도의 aneuploidy를 발견하였다. 그래서 그들은 과배란 유도시 보통 염색체 이상을 가진 atresia가 될 난자들도 성숙되어 회수되기 때문에, 많은 수의 난자를 얻었을 경우 염색체 이상이 높을 것이라고 주장하였다. 본 실험에서는 GnRH agonist를 처리한 방법과 FSH/HMG 처리 방법에서 환자당 평균 13개와 9개의 난자를 회수하였으나, 두 방법에서 염색체 이상성의 차이가 없었으며, 더구나 전체적으로 분석하여 보았을때도 환자당 회수된 난자의 수와 염색체의 수적 이상은 관찰되지 않았으므로 난자의 수가 많이 나오는 것은 환자의 생리적인 환경 차이일 뿐이지 염색체 이상성을 가진 난자도 성숙되어 회수되는 것으로 볼 수 없다.

## 결 론

결론적으로, 수정되지 않은 난자들에서 관찰된 염색체의 수적 이상이 과배란 방법, 환자당 회수된 난자의 수와 관련이 없었다. 그러나 환자의 나이가 증가함에 따라 염색체의 수의 이상이 증가하는 경향을 보였다. 기존의 연구나 본 연구에서 대두되는 문제점은 분석한 난자를 정상적인 여성으로부터 얻은 것이 아니라 불임 여성으로부터 얻었으며 IVF 프로그램에서 수정에 실패한 난자에서 연구가 이루어졌기 때문에, 이런 문제점이 해결될 수 있다면 여러가지 임상적인 요인들과 염색체 이상의 관련성을 좀 더 잘 설명할 수 있지 않을까 생각된다.

## 인 용 문 헌

Almeida PA and Bolton VN: The relationship

- between chromosomal abnormalities in the human oocyte and fertilization in vitro. *Hum Reprod* 1994, 9, 343-346.
- Angell RR, Ledger W, Yong EL, Harkness L, Baird DT: Cytogenetic analysis of unfertilized human oocytes. *Hum Reprod* 1991, 6, 568-573.
- Boue J, Boue A, and Lazar P: Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions. *Teratology* 1975, 12, 11-26.
- Brandiff B, Gordon L, Ashworth LK, Watchmaker G, and Carrano AV: Detection of chromosomal abnormalities in human sperm. *Prog Clin Biol Res* 1986, 2098, 469-476.
- de Jong P, Ronen J, Wiswedel K, Bosschieter J, and Kola I: A chromosomal analysis of oocytes that remain unfertilized and cleavage-arrested embryos in the Groote Schuur Hospital (GSH) in vitro fertilization (IVF) program. Abstract of 4th World Congress, Melbourne, Australia, *IVF* 1985, 3, 131.
- De Sutter P: Investigation of determining factors for in vitro fertilization of human oocytes. Cytogenetic analysis. Postdoctoral Thesis. Ghent, Belgium: University of Ghent 1991, pp. 72-130.
- De Sutter P, Dhont M, Vandekerckhove D: Hormonal stimulation for in vitro fertilization: A comparison of fertilization rates and cytogenetic findings in unfertilized oocytes. *J Assist Reprod Genet* 1992, 9, 254-258.
- Edirisinghe WR, Murch AR, Yovich JL: Cytogenetic analysis of human oocytes and embryos in an in-vitro fertilization programme. *Hum Reprod* 1992, 7, 220-236.
- Juberg RC and Mowrey PN: Origin of non-disjunction in trisomy 21 syndrome: All studies compiled, parental age analysis and international comparisons. *Am J Med Gen* 1983, 16, 111-116.
- Kamiguchi Y, Rosenbusch B, Sterzik K, Mikamo K: Chromosomal analysis of unfertilized human oocytes prepared by a gradual fixation-air drying method. *Hum Genet* 1993, 90, 533-541.
- Ma S, Kalouse DK, Zouves C, Yuen BH, Gomet V, and Moon YS: Chromosome analysis of human oocytes failing to fertilize in vitro. *Fertil Steril* 1989, 51, 992-997.
- Martin RH: Chromosomal abnormalities in human sperm. In Dellarco, V.L., Voytek, P.E. and Hollaender, A. (eds), *Aneuploidy: Etiology and Mechanisms*. New York: Plenum Press 1985, pp.91-102.
- Martin RH, Mahadevan MM, Taylor PJ, Hildebrand K, Long-Simpson L, Peterson D, Yamamoto J, and Fleetham J: Chromosomal analysis of unfertilized human oocytes. *J Reprod Fert* 1986, 78, 673-678.
- Mattei JF, Mattei MG, Ayme S, and Girard F: Origin of the extra chromosome in trisomy 21. *Hum Genet* 1979, 46, 107-110.
- Maudlin I, Fraser LR: Maternal age and the incidence of aneuploidy in first-cleavage mouse embryos. *J Reprod Fert* 1978, 54: 423-426.
- Pellestor F, Séle B: Assessment of aneuploidy in the human female by using cytogenetics of IVF failures. *Am J Hum Genet* 1988, 42: 274-283.
- Pellestor F: Frequency and distribution of aneuploidy in human female gametes. *Hum Genet* 1991, 86, 283-288.
- Pieters MH, Dumoulin JC, Engelhart CM, Bras M, Evers JL, Geraedts JP: Immaturity and aneuploidy in human oocytes after different stimulation protocols. *Fertil Steril* 1991, 56: 306-310.
- Plachot M, Junca AM, Mandelbaum J, Grouchy J de, SalaBaroux J, and Cohen J: Chromosome investigation in early life I, Human oocytes recovered in an IVF programme. *Hum Reprod* 1986, 1, 547-551.
- Schlesselman JJ: How does one assess the risk of abnormalities from human in vitro fertilization? *Am J Obstet Gynecol* 1979, 135, 135-138.
- Seppälä M: The world collaborative report on in vitro fertilization and embryo replacement: current state of the art in January 1984. *Ann NY Acad Sci* 1985, 442, 558-563.
- Spielmann H, Krueger C, Staube M, and Vogel R:

Abnormal chromosome behavior in human oocytes which remained unfertilized during human in vitro fertilization. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1985, 2, 138-142.

Tarkowski AK: An air drying method for chromosome preparation from mouse eggs. *Cytogenetics* 1966, 5, 394-400.

Veiga A, Calderon G, Santalo J, Barri PN, and

Egozcue J: Chromosome studies in oocytes and zygotes from an IVF programme. *Hum Reprod* 1987, 2, 425-430.

Warmsby H, and Fredga K: Chromosome analysis of human oocytes failing to cleave after insemination in vitro. *Hum Reprod* 1987, 2, 137-142.

---