

인간의 미성숙난자의 동결보존에 관한 연구

차병원 여성의학연구소

김은경 · 손원영 · 지희준 · 고정재 · 윤태기 · 차광열

Cryopreservation of Human Immature Follicular Oocyte

Eun Kyung Kim, Weon Young Son, Hee June Chi, Jung Jae Ko, Tae Ki Yoon
and Kwang Yul Cha

*Department of Obstetrics and Gynecology, Infertility Medical Center of Cha Women's Hospital,
Seoul, Korea*

= Abstract =

This study was carried out to set up the ovum bank for ovum donation and to determine the best freezing method for human immature oocytes.

Human immature follicular oocytes were cryopreserved by slow freezing and rapid thawing method. Immature follicular oocytes were treated by propanediol(PROH) solution by 2 and 4 step method in protocols A & B, respectively. In protocol C, immature oocytes were exposed to sucrose prior to treatment of PROH by 4 step method. We compared survival rate, maturation rate, and fertilization rate of immature oocytes among three protocols. Results were as follows.

1. Oocytes treated by the protocol C showed the highest survival rate(70.3%) and maturation rate(34.6%) after thawing.
2. Survival rate of oocytes treated by the protocol C was significantly higher than that of the protocol B after thawing($p < 0.05$).

In conclusion, treatment of oocytes with sucrose prior to expose PROH was the best freezing method. Sucrose may have reduced the toxic effect of cryoprotectant to oocytes. We failed to induce fertilization of oocytes, which were treated by any protocols, by conventional insemination method, but obtained 28.8% fertilization rate by using partial zona dissection(PZD) method. This result suggests that micromanipulation(PZD) of the thawed oocytes before insemination will improve the fertilization rate.

서 론

인간의 난자(oocyte)와 수정란(embryos)의 동결보존법(cryopreservation)은 체외수정(In vitro fertilization:IVF) program에서 빠르게 적용되어온 방법으로, 더우기 난자의 동결 보존은 조기폐경, 난소기능장애, 화학적 또는 방사선 치료를 받은 여성들에게 난자를 공여하는 pro-

gram에서 유용하게 사용될 수 있다(Van Eum et al., 1987). 1986년 Chen에 의해 성숙난자의 동결보존후 융해하여 체외수정과정을 통하여 첫번째 아기가 출생된 것이 보고되었다(Chen, 1986).

미성숙난자의 동결은 여성 생식세포의 동결보존의 또 다른 접근 방식이다. 소(Van Blerkom et al., 1980), 돼지(Mattioli et al., 1989), 양(Crozet et al., 1987), 토끼(Van Blerkom and McGaughey, 1978)와 생쥐(Van Blerkom and Rumer., 1984) 같은 종들의 미성숙 난자들은 융해후 체외성숙도가 높고(>80%) 수정후에

본 논문의 요지는 1992년 4월 8일-12일 미국 Indian Wells에서 열린 제40차 태평양 불임학회(Pacific Coast Fertility Society)에서 발표되었음.

계속 발생하여 산자로 분만되었다. 인간의 미성숙난자들의 경우도 체외배양시 동물의 경우와 유사한 성숙 정도를 보였으며(Jagiello et al., 1976) 또 수정이 가능하다는 것이 알려져 있다(Veek et al., 1983). 미성숙난자를 동결보존할 때의 첫번째 장점은 염색체 응축(chromosome condensation)이 일어나기전인 GV-stage에서 동결을 함으로 metaphase II (MII) 상태에서 동결할 때 일어나는 방추체(spindle)의 파괴로 인한 aneuploidy가 일어나지 않는다는 것이다(Van Blerkom, 1990a). 두번째 장점은 핵성숙(nuclear or chromosomal maturation)의 진행과정을 추적할 수 있고 광학 현미경하에서 세포질 성숙(cytoplasmic maturation)이 정상적으로 일어나는지 알 수 있다는 점이다. 그러나, 현재까지는 미성숙 난자들의 동결융해후에 발생학적으로 계속 발달할 수 있는 난자들을 얻는 시도는 제한적으로만 성공을 거두고 있다.

미성숙 난자의 동결과 융해에는 수정란의 동결과 융해에서 사용하고 있는 방법(Chen, 1986)을 사용하며, 항동해제(cryoprotectants)도 수정란의 동결에 사용되는 dimethylsulfoxide(DMSO: Diedric et al., 1986) 또는 propanediol(PROH: Quinn et al., 1986)를 사용한다. 결빙 억제제인 DMSO와 PROH은 1.5M 농도까지가 난포난(pre-ovulatory oocytes)의 표층립(cortical granules)의 방출(exocytosis)을 70-80% 정도 촉진한다고 알려져 있으며(Schalkoff, 1989) 높은 농도의 항동해제에 노출되기전에 비투과성 삼투 물질(nonpermeating osmotic reagent)인 sucrose 용액에 먼저 노출시키면 난자의 위험성이 감소된다고 알려져 있다(Eric S. Surrey and Patric, 1990). 동결 후 융해시킨 난자들의 경우, cumulus cell로 싸여 있는 난자들이 cumulus cell이 없는 것에 비해 생존율이 좋다고 알려져 있다(Pelicer, 1988).

본 연구는 항동해제로 PROH와 sucrose를 사용하여, 항동해제의 3가지 다른 배합 방법이나 같은 완만 동결과 급속융해 방법으로 미성숙 난자들을 동결보존, 융해 하였으며, 융해후 생존율, 성숙율, 그리고 수정율을 비교하여 인간의 미성숙난자의 동결에 있어서 가장 좋은 방법을 찾고자 실시하였고, 궁극적으로는 난자 공여(ovum donation)을 위한 난자은행(ovum bank)의 가능성을 실현하고자 실시하였다.

재료 및 방법

미성숙 난자는 부인파적 질병으로 인해 적출되어 폐기되는 난소로부터 환자의 동의를 받고 채취하였으며 동결을 위해 공여한 난자는 cumulus cell로 싸여있는 GV stage 난자를 사용하였다. 위의 난자들은 20% fetal cord serum (FCS)을 포함하는 Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS)에 1.5M PROH, 0.2M sucrose를 첨가한 용액에서 3가지 방법으로 동결 혹은 융해하였다. 동결과 융해는 세포 냉동기(cryo-10 cell freezer, planer biomed, USA)를 사용하여 완만 동결과 급속융해 방법으로 시행하였다.

동결 방법은 표1에 요약한 것처럼 Trounson과 Mohr(1983)의 방법에 따라 미성숙난자들을 20% FCS을 포함하는 D-PBS에 10분간 정지시킨 후 3가지 방법으로 PROH 용액을 시간별로 처리한 후, straw에 난자들을 넣고 sealing powder로 입구를 봉하였다. 냉각 과정은 그림 1에서처럼 상온에서부터 -7°C까지는 비교적 빠른속도(2°C/min)로 냉각하고 -7°C가 되면 미리 액화질소통에 넣어 냉각시킨 편셋을 straw내의 냉동액 표면 수준에 접촉하므로써 식빙(seed-

Table 1. Freezing protocols for human immature oocytes

Solutions*	Time
PROH 2 step freezing(Protocol A)	
D-PBS washing	
1.5M PROH	10 min
1.5M PROH+0.1M Sucrose	15 min
PROH 4 step freezing(Protocol B)	
D-PBS washing	
0.5M PROH	10 min
1.0M PROH	10 min
1.5M PROH	10 min
1.5M PROH+0.2M Sucrose	10 min
PROH 4 step freezing(Protocol C)	
D-PBS washing	
0.1M Sucrose	10 min
0.1M Sucrose+0.5M PROH	10 min
0.2M Sucrose+1.0M PROH	10 min
0.2M Sucrose+1.5M PROH	10 min

*Supplemented with 10% FCS

ing)을 시행하고 10분간 정치하였다. -7°C 에서부터 -30°C 까지는 완만하게($-0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$) 냉각시킨 후 액화 질소통(-196°C)에 직접 넣었다. 용해방법은 액화질소통으로부터 straw를 꺼내어 상온에서 40초간 방치한 후 미리 37°C 으로 맞추어둔 water bath에 넣고 분당 500°C 의 속도로 용해한 후 straw를 다시 꺼내어 해부 현미경하에서 난자들을 회수 하였다. 항동해제를 제거하기 위하여 용해후 생존된 난자들은 표 2에서 처럼 10% FCS를 포함하고 있는 0.1M PROH+0.2M Sucrose 용액, 0.5M PROH+0.2M Sucrose 용액, 0.2M Sucrose 용액에 각각 5분동안 처리한 후 D-PBS로 세척하여 50% human peritoneal fluid(HPF)가 있는 TCM-199에서 성숙시켰다. 48시간 후에 난자들을 공여정자(donor sperm)를 이용하여 수정시켰다. 이때

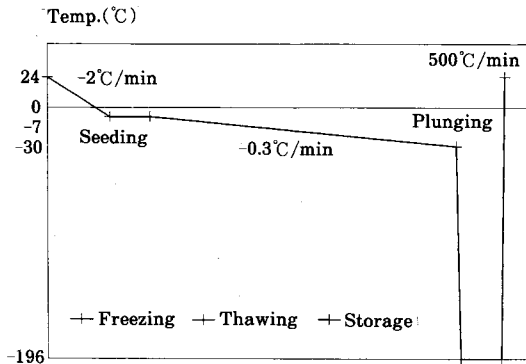


Fig. 1. Schematic diagram of freezing and thawing procedure.

Table 2. Thawing procedure for human immature oocytes

Solutions*	Time
1.0M PROH+0.2M Sucrose	5 min
0.5M PROH+0.2M Sucrose	5 min
0.2M Sucrose	5 min
D-PBS washing	

*Supplemented with 10% FCS

Table 3. Results in maturation of immature oocytes according to the different freezing methods

Treatment	No. of Exp.	No. of Oocytes	Survival after Thawing(%)	Maturation	
				GVBD(%)	1s PB(%)
A	10	28	16 (57.1)	10(62.5)	4(25.0)
B	5	23	10*(43.7)	7(70.7)	2(20.0)
C	13	37	20*(70.3)	16(61.5)	9(34.6)

* $p < 0.05$, A:1.5M PROH 2 step, B:1.5M PROH 4 step, C:1.5M PROH 4 step with sucrose.

일부의 난자들은 미세조작 기법은 partial zona dissection(PZD)을 실시하였다.

동결방법 A는, 회수한 난자들을 D-PBS로 옮겨 세척한 후 1.5M PROH 용액과 1.5M PROH+0.1M Sucrose 용액에 각각 10분, 15분 동안 처리한 후 0.25ml straw에 장착하여 냉동하였다. 동결방법 B는 회수한 난자들을 D-PBS로 옮겨 세척한 후 0.5M PROH 용액, 1.0M PROH 용액, 1.5M PROH 용액, 1.5M PROH+0.2M Sucrose 용액에 각각 10분동안 차례로 처리한 후 0.25ml straw에 장착하여 냉동하였다. 방법 C는 회수한 난자들을 D-PBS로 옮겨 세척한 후 0.1M Sucrose 용액, 0.1M Sucrose+0.5M PROH 용액, 0.2M Sucrose+1.0M PROH 용액, 0.2M Sucrose+1.5M PROH 용액에 각각 10분동안 차례로 처리한 후 0.25ml straw에 장착하여 냉동하였다. 난자들중 일부는 용해후에 미세조작(micromanipulation)을 시행하였다.

결 과

여러가지 동결방법들이 미성숙난자의 생존과 성숙에 미치는 영향을 표 3에 요약하였다. 동결방법들중에서 sucrose를 이용한 방법 C가 용해후에 가장 높은 생존율(70.3%)과 성숙율(34.6%)를 보였다. 같은 4step이며 sucrose를 씻지만 sucrose를 먼저 처리한 방법 C가 생존율이 더 좋은것으로 나타났다. 그러나 Germinal Vesicle Break Down(GVBD)와 1st polar body(PB) extrusion비율에서는 유의한 차이가 없었다.

표 4는 방법 C에서 동결후 용해한 난자들의 PZD 조작후 수정율을 나타낸 것으로 PZD를 하지 않은 treatment group보다 수정율이 28.6%로 높게 나타났다.

고 찰

미수정란의 수정란의 동결보존은 1787년

Table 4. The effect of PZD on the fertilization of Oocytes frozen and thawed in PROH 4 step C

Treatment	No. of Exp.	No. of Oocytes	Survival after thawing (%)	GVBD (%)	Development 1st PB (%)	Fert. (%)
without P.Z.D.	11	27	19(70.4)	10(52.6)	5(26.3)	-
with P.Z.D.	2	10	7(70.0)	6(85.7)	4(57.1)	2(28.6)

P.Z.D.:partial zona dissection.

Spallazani가 곤충을 대상으로 -7°C 에서 보존한 이래 많은 연구에 의하여 발전은 거듭하여 왔다. 임상에서도 체외수정 program이 시행되면서 이식하고 남은 수정란의 보존을 위한 수정란의 동결을 시도하게 되었고 1983년 Tronson과 More에 의해 세계 최초로 동결 보존후 이식하여 임신성공을 보고하였으며, 전 세계적으로 많은 불임센터에서 동결보존 후 융해한 수정란에 의한 출산의 성공이 보고되고 있다. 수정란 또는 미수정란의 냉동과 융해에 사용되는 항동해제는 막침투성의 유무에 따라 두 종류로 나눌 수 있다. 막침투성이 있는 것으로는 1, 2-propanediol, dimethylsulfoxide, glycerol과 methanol등이며, 침투성이 없는 것은 sucrose, dimethyl formamide, erythritol과 polyvinyl pyrrolidone등인데 이들 침투성이 없는 항동해제는 그 자체만으로는 침투성이 있는 항동해제에 비해 효과가 떨어진다고(Frideler et al., 1988). 그 중에서 sucrose는 동결, 융해후 항동해제의 제거시 삼투압 격차에 의한 해를 줄이는데(Szell and Shelton, 1986), 빠른 탈수반응(rapid dehydration)을 위해(Testart et al., 1986) 사용되었다. Testart등(1986)은 propanediol과 sucrose를 혼합하여 사용함으로써 높은 생존율(80%)을 얻었다.

MII stage에 있는 난자들에 대한 동결 보존은 난자에 손상을 주는 결과를 가져올 수가 있는데 그 예로는, 첫번째로 spindle instability에 의한 chromosomal abnormality(Chen, 1986; Mohr, 1986; Glenister et al., 1987)가 나타나고, 두번째로 체외수정시 polyspermy 비율이 높아질 수 있다는 것이다(Glenister et al., 1987). 세째로 표층립(cortical granules)의 premature exocytosis로 인한 zona pellucida의 hardening 현상이 나타나 수정율이 감소되는 경향을 나타낸다(Chuong et al., 1986). 표층립은 많은 포유동물에서 난자의 cortex에 존재하며(Longo, 1985; Schalkoff and Powers, 1986; Szollosi et

al., 1986), 성숙한 난자와 정자의 수정시 표층립 방출에 의해 다정자 침입을 막는 기능을 한다. 그러나 난자들을 동결보존시 항동해제등에 의해 표층립이 조기 방출되면 zona pellucida가 hardening되어 정자의 침입이 어렵다(Schalkoff, 1989). 이러한 요인으로 인해 미성숙난자의 동결방법에 대한 많은 연구가 진행중이며 상업적으로 유용한 소와 같은 종에서는 이미 널리 사용되고 있다(Van Blerkom et al., 1990). 동물종에서 미성숙난자가 in vitro에서 높은 정도로 성숙하며 수정과 분할 및 임신이 가능한 사실은 미성숙난자의 동결보존이 유용하게 사용될 수 있다는 것을 시사한다. GV-stage에 있는 인간의 미성숙난자의 동결보존은 조기폐경, 노화, 난소기능장애, 또는 유전적결함을 가지고 있는 환자들의 경우에 생식세포 공여체계를 만들 수 있다는 점에서 임상적인 유용성이 있다. Hormone 처리되지 않은 난소의 난포에서 회수하는 GV-stage에 있는 난자들은 FSH와 LH같은 gonadotropins에 의한 영향을 받지 않은 작은 난포들로 부터 얻을 수 있기 때문에 hormone 처리후에 원시 난포들로 부터 얻어진 것에 비해 stage가 같고 정상적인 난자를 많이 얻을 수 있다(van Blerkom, 1990b). 또 GV-stage에 있는 인간의 난자들을 동결하면 성숙한 난자의 냉동보존보다 in vitro에서 meiosis의 재개후에 anuploidy의 빈도가 매우 낮다(Van Blerkom, 1990a). 그러나 Junca등(1988)은 GV-stage에 있는 인간의 난자가 융해후에 생존율이 낮으며 단지 적은수만이 meiosis를 재개하여 성숙된다고 하였다. 이것은 세포가 융해후에 세포막과 세포질의 구조 또는 구성의 변화가 일어난 발생학적으로 viability를 유지하는 능력을 기본적으로 변화시킨다는 것을 나타낸다(Van Blerkom, 1990b).

본 연구에서 보듯이 미성숙난자 동결방법에서 항동해제로 sucrose와 PROH를 함께 사용할때 생존율은 높았으나 일반적인 수정방법에

의해 수정이 일어나지 않은 것은 동결 용해과정에서 항동해제 등에 의해 세포가 화학적, 물리적 영향을 받아 표층립의 조기 방출이 일어나 zona pellucida의 hardening 현상에 의해 수정 실패한 것으로 추정된다. 그러나 이것을 극복하는 방법의 일환으로 미세조작법인 PZD를 시행하여 투명대 일부를 절개하여 정자의 침입을 용이하게 하여줌으로써 수정율을 증가시킬 수 있었다. 그러나 미세조작법 시행시에는 난자에 damage를 줄 수 있고 다정자침입의 문제가 일어날 수 있는 단점이 있으므로 일반적인 수정방법에 의해 수정이 유도되도록 동결용해과정에서 난자가 받는 화학적, 물리적 영향을 줄일 수 있는 항동해제등의 이용 조건이 확립되어야 할 것이며, 미성숙 난자의 동결용해후 핵성숙과 세포질 성숙을 위한 배양조건의 개발과 각 성숙단계에서 난자가 받는 세포적 동해등을 분석하는 것이 선행되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구는 부인과적인 질병을 가진 환자들의 난소로부터 얻은 미성숙 난자들(GV stage)을 3가지의 다른 동결 방법으로 동결 보존했다가 용해한 후 그 난자들의 생존율과 성숙율, 그리고 수정율을 비교함으로써, 인간의 미성숙 난자의 가장 좋은 동결 방법을 찾아내고자 시행하였다. 미성숙 난자들을 방법 A와 B에서는 PROH와 sucrose로 처리하였으며, 방법 C에서는 PROH 처리전에 sucrose로 처리하였다. 동결용해 방법은 완만동결과 급속용해 방법을 사용하였으며, 그 결과는 다음과 같다.

1. 동결 방법중에 sucrose를 사용한 방법 C가 용해 후에 가장 높은 생존율(70.3%)과 성숙율(34.6%)을 보였다.

2. 실험에 사용한 4 step방법인 B보다 sucrose를 미리 처리한 방법 C가 생존율에서 통계적으로 유의성 있게 높았다($p < 0.05$).

이상의 결과로 동결용해 방법에서 PROH 처리전에 sucrose를 처리한 방법 C가 가장 좋은 방법이며, 따라서 sucrose가 미성숙난자의 동결 보존시 항동해제의 위험한 영향들을 감소시킨다고 생각된다. 일반적으로 수정에 쓰고 있는 수정방법으로는 동결과 용해 후의 난자들을 수정시키는데 실패 하였으나 PZD(Partial Zona Dissection) 방법을 사용하여서 28.6%의 수정

율을 얻어, micromanipulation(PZD) 방법이 동결용해한 미성숙난자의 수정율을 증가시킬 수 있을 것이라고 사료된다.

인 용 문 헌

- Chen C: Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1986, 1(8486), 884.
- Chuong CJ, Coulam CB: Effects of cryopreservation on the viability and fertilizability of unfertilized hamster oocytes. *Am J Obstet Gynecol* 1986, 155(6), 1240.
- Crozet N, Huneau D, Desmedet V, Theron MC, Szollosi D, Torres S, Sevellec C: *In vitro* fertilization with normal development in the sheep. *Gamete res* 1987, 16, 159.
- Diedrich K, Al Hasani S, Van der Ven H, Krebs D: Successful *in vitro* fertilization of frozen-thawed rabbit and human oocytes. *J in vitro Fertil Embryo Transfer* 1986, 3, 65.
- Eric S, Surrey Patrick J, Quinn: Successful ultrarapid freezing of unfertilized oocytes. *J of in vitro Fertil and Embryo Transfer* 1990, 7(5), 262.
- Friedler S, Giudice LC, Lamb EJ: Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil Steril* 1988, 49, 743.
- Glenister H, Wood MJ, Kirby C, Whittingham DG: Incidence of chromosome abnormalities in first cleavage mouse embryos obtained from frozen-thawed oocytes fertilized *in vitro*. *Gamete Res* 1987, 16, 205.
- Jagiello G, Ducayen J, Fang, Graffeo, J: Cytogenetic observations in mammalian oocytes. *In Chromosome today* (ed. P. Pearson and K. Lewis), vol. 5, p. 43, Wiley & Son, New York, 1976.
- Junca AM, Mandelbaum J, Alnot MO, Plachot M, Cohen J, Salat Baroux J: Factors involved in the success of human embryo freezing. Does cryopreservation really improve the IVF results? *Ann NY Acad Sci* 1988, 541, 575.
- Longo FJ: Fine structure of the mammalian egg cortex. *Am J Anat* 1985, 174, 303.
- Mandeibaum J, Junca AM, Tibi C, Palchot M, Alnot MD, Rim H, Salat-Baroux J, Cohen,

- J:Cryopreservation of immature and mature hamster and human oocytes. *Ann NY Acad Sci* 1988, 541:550.
- Mattioli, M Bacci ML, Galeati G, Sereni E: Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 1989, 31, 1201.
- Mohr LR: Principles of human embryo and oocyte cryopreservation. *J in vitro Fertil Embryo Transfer* 1986, 3, 183.
- Pellicer A, Lightman, A, Parmer TG, Behrman HR, De Cherney AH: Morphologic and functional studies of immature rat oocyte-cumulus complexes after cryopreservation. *Fertil Steril* 1988, 50, 805.
- Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant RM, Currie RM: Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil Steril* 1990, 54, 102.
- Quinn P, Kerin JF, Stone BA, Wilson LA: Successful cryopreservation of human oocytes. *Cojoint Annual Meeting of the American Fertility Society and Canadian Fertility and Andrology Society*, Toronto:1986, 207 (Abstr).
- Schalkoff ME, Power RD: An ultrastructural investigation of cortical granule synthesis and migration in the mouse oocyte: effects of microtubule manipulation. *J Cell Biol* 1986, 103, 370a.
- Schalkoff ME, Oskowitz SP, Power RD: Ultrastructural observations of human and mouse oocytes treated with cryopreservation. *Biol reprod* 1989, 40, 379.
- Szell A, Shelton JN: Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. *J Reprod Fertil* 1986, 76, 401.
- Szollisi D, Mandelbaum J, Planchot M, Salat-Baroux J, Cohen J: Ultrastructure of the human preovulatory oocyte. *J in Vitro Fertil and Embryo Transfer* 1986, 3, 233.
- Tesfart J, Lassalle B, Belaish Allart J, Hazout A, Forman R, Rainhorn JD, Fryman R: High pregnancy rate after early embryo freezing. *Fertil Steril* 1986, 46, 268.
- Trounson AO, Mohr L: Human pregnancy following cryopreservation thawing transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983, 305, 707.
- Van Blerkom J, MaGaughey RW: Molecular differentiation of the rabbit ovum. I. During the *in vivo* and *in vitro* maturation of the oocyte. *Dev. Biol* 1978, 63, 139.
- Van Blerkom J, Rumer M: Mitochondrial reorganization during resumption of arrested meiosis in the mice. *Am J Anat* 1984, 171, 335.
- Van Blerkom J, Bell H, Weipz, D: Cellular and developmental biological aspects of bovine meiotic maturation, fertilization and preimplantation embryogenesis *in vitro*. *J Electron Microscop Tech* 1990, 16, 298.
- Van Blerkom J: Extrinsic and intrinsic influences on human oocyte and early embryo developmental potential. In *Elements of fertilization* (ed. P. Wassarman), p. 82. CRC press, Boca Raton, Florida.
- Van Blerkom J: Occurrence and developmental consequences of aberrant cellular organization in meiotically mature human oocytes after exogenous ovarian hyperstimulation. *J Electron Microscop Tech* 1990b, 16, 324.
- Van Eum JF, Siebzehnruhl ER, Schuh B, Kock R, Trontno S, Lang N: Birth after cryopreservation of unfertilized oocytes. *Lancet* 1987, 1(8535), 752.
- Veek L, Wortham JW, Witmyer J, Sandowm BA, Acosta A, Garcia GS, Jones G, Jones H: Maturation and fertilization of morphological immature human oocytes in a program of *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1983, 39, 594.