

## 성숙난포액을 이용한 생쥐배아의 발달에 관한 연구

고려대학교 의과대학 산부인과학교실

박세영 · 이정재 · 김선행 · 구병삼

### Effect of Mature Human Follicular Fluid on the Development of Mouse Embryos *in vitro*

S.Y. Park, J.J. Lee, S.H. Kim and P.S. Ku

Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Korea University, Seoul, Korea

#### = Abstract =

The possible effect of human follicular fluid(hFF) on the growth and development of fertilized oocytes and embryos is important because the fallopian tubes are exposed to FF after follicular rupture and the processes of fertilization and embryo cleavage occur inside the fallopian tubes. Previously, it was suggested that human FF might adversely affect on the development of early mouse embryos.

In order to investigate the effect of hFF on the development of embryos, early mouse embryos were cultured in media containing various protein sources as bovine serum albumin(BSA), fetal cord serum(FCS) and FF. And we evaluated the development of early mouse embryos in terms of the morphology, cleavage rate, and cell count of blastocysts.

There were no significant differences in the morula and blastocyst formation rates of 2-cell mouse embryos cultured in the media containing three different protein sources and three different concentrations of FF.

The blastocyst formation rate of 1-cell mouse embryo cultured in FF group was significantly higher than that cultured in BSA group( $P < 0.05$ ).

The morula and blastocyst formation rates of 2-cell mouse embryos of the group cultured in the media containing FF were comparable with those of other two groups, in addition, the cell count of blastocysts of FF group in the 2-cell embryo culture was higher than those of BSA group and FCS group( $P < 0.01$ ), and this finding was also noted in 1-cell embryo culture.

There was no difference in the morula and blastocyst formation rates of the 2-cell mouse embryos cultured in the media containing different concentrations of FF.

These results suggest that mature human follicular fluid has no inhibitory activity on the development of early mouse embryos even in high concentration and may be a good protein source which is positively associated with the development of mouse embryos *in vitro* especially in 1 cell embryo culture.

#### 서 론

난관은 난포 파열 후 난포액에 노출되고, 수정과 배아난할은 난관내에서 일어나므로, 사람

의 성숙난포액(follicular fluid, FF)이 수정된 난자와 배아의 성장과 발달에 미치는 영향은 중요하다(Hung TT, et al., 1985).

근래에는 사람의 성숙난포액을 미성숙난의 시험관내 성숙을 위한 배양액이나(Cha KY, et

al., 1991) 정자의 수정 및 침체반응의 유도를 위한 정자처리배양액 등에 일정한 농도로 첨가하여 사용되어 왔으며(Naito K, et al., 1988, Mattioli M, et al., 1988), 생식세포난관내이식(gamete intrafallopian transfer, GIFT)을 포함하여 수정배양액(insemination media)에 사용한 예도 있다(Tucker MJ, et al., 1989).

그러나 동물실험에서 난포액은 초기 배아발달을 억제하는 물질을 포함하고 있다고 이미 알려져 왔고(Hung TT, et al., 1985, Richards DW, et al., 1990, Yee B, et al., 1985), Marrs등(Richards DW, et al., 1990)은 1990년에 사람의 난포액 성분중에는 생쥐배아의 발달을 억제하는 물질이 있고, 이 난포액의 억제효과는 난자의 발달잠재성과 관련이 있는 바, 즉 퇴행성 난포의 난포액은 강한, 그리고 성숙난포의 난포액은 약한 억제효과를 갖는다고 보고 하였다.

이처럼 사람의 성숙난포액은 사람에게 있어서 생식세포난관내이식등 수정배양액에 사용할 경우, 이것이 난자의 수정과정에는 영향이 없다 하더라도, 수정이후의 초기 배발달과정을 억제하는 가능성을 배제할 수 없으므로, 저자들은 초기 생쥐배아를 사람의 성숙난포액을 비롯한 2가지 다른 단백질 공급원을 포함하는 배양액에서 각기 배양하여 이들의 발달과정과 형태를 관찰하고 그 결과를 비교 분석함으로써, 사람의 성숙 난포액이 수정된 난자의 난할과 배아의 발달에 미치는 영향을 규명하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시동물

공시동물은 ICR 계통의 생쥐로서, 자성생쥐는 4-6주령, 체중은 15-20g이었으며, 웅성생쥐는 12-14주령, 체중은 30-45g이었다. 일조시간은 14시간(오전 7시-오후 9시)으로 조절하였으며, 사료와 식수는 무제한 공급하였다.

### 2. 배양액

본 연구에 사용된 기초배양액은 M16 배양액(Wittingham, D.G. 1971)이며 배아의 배양을 위한 단백질 공급원으로는 0.3% BSA(bovine serum albumin), 20% HCS(human cord serum) 및 성선자극호르몬 투여에 의한 과배란유도에서 획득한 FF 20%, FF 50%와 자연주기에서 획득한 FF 20%등을 기초배양액에 첨가하여

사용하였다.

1세포기 배아의 경우 회수시에는 배아에 둘러싸인 난구세포의 제거를 위하여 0.1% Hyaluronidase를 기초배양액에 첨가하여 사용하였고, 배양시에는 단백질이 함유된 배양액에 100uM의 EDTA를 첨가하여 사용하였으며, 모든 배양액의 pH는 7.2-7.4로, 삼투압은 290-300 mOsm로 맞추어 사용하였다.

### 3. 배아의 회수

자성생쥐의 복강내에 5IU의 PMSG(pregnant mare's serum gonadotropin)와 hCG를 48시간 간격으로 주사하여 과배란을 유도한 후, 웅성생쥐와 합사시켜 익일 아침에 질전의 유무를 확인하고, 질전이 있는 개체만을 hCG주사 후 20-22시간 및 42-44시간에 도살하여 외과적인 방법으로 난관을 적출하였다. 1세포기 배아의 회수는 적출된 난관을 Paraffin oil이 덮혀 있는 Petridish내의 배양액으로 옮겨, 40-60배의 실제현미경하에서 해부침을 사용하여 난관팽대부로부터 난구세포와 함께 회수하여 0.1% Hyaluronidase 용액에서 난구세포를 제거하였으며, 2세포기 배아는 실제 현미경하에서 30G 주사침을 사용하여 난관관류법으로 회수하였다. 회수한 모든 배아들은 3회 반복 세척하였으며, 이후 형태학적으로 정상적인 배아만을 회수하여 실험에 공시하였다.

### 4. 배아의 배양

BSA, HCG 및 FF의 각기 다른 단백질 공급원을 함유하는 배양액에 2세포기 생쥐배아는 493례를, 1세포기 생쥐배아는 292례를 각기 균등하게 배분하여 배양하였고, 과배란 유도에서 획득한 FF 20% 및 50%와 자연주기에서 획득한 FF 20%의 난포액이 함유된 배양액에서는 2세포기 생쥐배아 314례를 각각 121개, 75개 및 118개로 배분하여 배양하였다. 배아는 Paraffin oil이 덮혀있는 Petridish내 20 $\mu$ l의 각 배양액소적으로 15-20개씩 나누어 옮긴 다음 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ , 95% 공기 조건하의 CO $_2$  배양기에서 계속 배양하면서 매 24시간 간격으로 발달상태를 관찰하였다.

### 5. 배반포의 할구수 관찰

일정시간 배아를 배양한 후 형태학적으로 정상적인 배반포로 발달한 것만을 골라 4% Giemsa solution을 사용해 Air-dried prepara-

tion-cell count(Tarkowski AK, et al., 1966) 방법으로 관찰하였다.

## 결 과

BSA, HCS 및 FF의 각기 다른 단백질공급원을 함유하고 있는 배양액에서 2세포기 생쥐 배아를 배양한 결과, 각각 90.2%, 90.6% 및 93.8%에서 상실배까지, 그리고 84.7%, 83.3% 및 90.1%에서 배반포까지 도달하였으며, 각 군간에 통계학적으로 유의한 차이가 없었다(Table 1). 그러나 각 실험군의 배반포들의 핵수에 있어서는  $78.25 \pm 5.56$ ,  $78.00 \pm 11.11$  및  $97.58 \pm 12.19$ 개로서 FF군이 BSA나 HCS군에 비해 유의하게 높은 핵수를 나타내었다( $P < 0.01$ , Fig. 1).

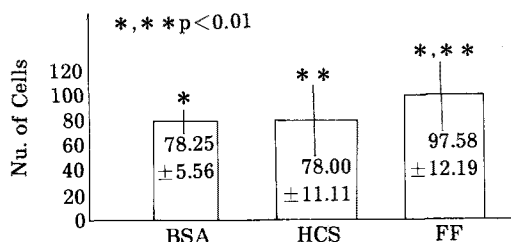
또한 2세포기 생쥐배아를 과배란유도에서 획득한 FF 20%, FF 50% 및 자연주기에서 획득

한 FF 20%의 난포액이 함유된 배양액에서 배반포까지 배양한 결과, 96.2%, 84.4% 및 89.4%의 발달율을 각각 나타내어 50%군이 다른 두 실험군에 비해 다소 낮은 발달율을 보였으나 통계학적으로 유의한 차이는 없었다(Table 2).

BSA, HCS 및 FF가 함유된 배양액에 100uM의 EDTA를 첨가하여 1세포기 생쥐 배아를 배반포까지 배양한 결과 각각 92.8%, 92.8% 및 94.9%에서 2세포기까지 도달하였고 각각 60.8%, 62.9% 및 74.5%에서 상실배까지 도달하여 유의한 차이를 발견할 수 없었으나, 각각 51.6%, 54.6% 및 68.4%에서 배반포까지 도달하여 배반포 발달율에 있어서는 FF군이 BSA군에 대하여 통계학적으로 유의한 차이를 보였으며 ( $P < 0.05$ , Table 3). 1세포기 배아배양군의 배반포 세포수는 각각  $53.90 \pm 7.66$ ,  $52.86 \pm 4.86$ , 및  $57.47 \pm 5.12$ 개로써 FF군이 BSA나 HCS군에 비해 통계학적으로 유의하게 높은 핵수를

**Table 1.** Comparison of Morula/Blastocyst Formation Rates of 2-Cell Mouse Embryos in the Media Containing Three Different Protein Sources

Culture medium	Number	Nu. of embryos developed to	
		morula (%)	blastocyst (%)
BSA(0.3%)	163	147(90.2)	138(84.7)
HCS(20%)	168	152(90.6)	140(83.3)
FF (20%)	162	152(93.8)	146(90.1)



**Fig. 1.** Cell Counts of the Blastocysts developed from 2-Cell Embryo in the Media Containing Different Protein Sources

**Table 2.** Morula/Blastocyst Formation of 2-Cell Mouse Embryos in the Media Containing Various Concentrations of Follicular Fluid

Culture medium	Number	Nu. of embryos developed to	
		morula (%)	blastocyst (%)
FF Stimulated, 20%	121	115(95.0)	110(90.9)
50%	75	72(96.0)	63(84.4)
FF Natural, 20%	118	116(98.3)	106(89.8)

**Table 3.** Comparison of Morula/Blastocyst Formation Rates of 1-Cell Mouse Embryo in the Media Containing BSA, HCS and FF

Culture medium	Number	Nu. of embryos developed to		
		2-cell (%)	morula (%)	blastocyst (%)
BSA(0.3%) + EDTA(100uM)	97	90(92.8)	59(60.8)	50(51.6)*
FCS(20%) + EDTA(100uM)	97	90(92.8)	61(62.9)	53(54.6)
FF (20%) + EDTA(100uM)	98	93(94.9)	73(74.5)	67(68.4)*

\* $p < 0.05$

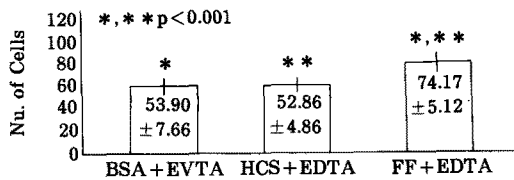


Fig. 2. Cell Counts of the Blastocysts developed from 1-cell Embryo in the Media Containing Different Protein Sources

나타내었다. ( $p < 0.001$ , Fig. 2).

## 고 찰

사람의 난포액은 난자의 성숙 또는 감수분열의 시작에 영향을 주는 스테로이드, 단백질 또는 다른 종류의 물질들을 포함하고 있다고 알려져 왔으나(Yee B, et al., 1985, Tsafirri A, et al., 1975, Tsafirri A, et al., 1975, Tsafirri A, et al., 1976, Channing CP, et al., 1978, Stone SI, et al., 1978), 이미 수정된 난자의 난할이나 배아의 발달에 미치는 영향에 대한 연구는 많지 않다(Hung TT, et al., 1985, Richards DW, et al., 1990).

난자의 성숙도, 수정력 그리고 착상의 잠재력 등은 난포액내 estradiol, progesterone, LH, FSH, 그리고 prolactin 등의 양과 비율적 특성에 의하여 영향을 받는다고 보고 되어 왔으며(Botero-Ruiz W, et al., 1984, Lobo RA, et al., 1985, Fischei SB, et al., 1985, Fischei SB, et al., 1983, Carson RS, et al., 1982, McNatty KF, et al., 1979, Fowler RE, et al., 1977, Wrambsy H, et al., 1981, Stone BA, et al., 1988), 여러 특정 단백질, 총단백질양, 또는 난포액의 양 또한 여기에 관여하는 것으로 보고되고 있다(diZerega GS, et al., 1983, Hillensjo T, et al., 1978).

난포액이 배아의 발달에 미치는 영향에 대하여, Hung과 Millard(Hung TT, et al., 1985)는 사람의 배란전 난포액은 생쥐의 수정란 뿐만 아니라 배아의 난할도 억제하고, 이러한 억제효과는 고농도에서는 비가역성이지만 저농도에서는 가역성이라고 하였는데, 본 연구에서는 배양액에 난포액을 20%에서 50%의 고농도로 함유하지 않은 배양액에서의 배반포 형성율과 비교될 만한 것이었다. 그리고 Hung과 Millard(Hung TT, et al., 1985)는 억제효과의 정도가 난포액내 estradiol의 농도에는 비례하고 progesterone의 농도에는 반비례하는 것으로 보아

서 난포가 성숙할수록 이러한 억제물질이 더 많이 생산한다고 하였고, Stone, Vargyas 등(Stone, et al., 1988)과 Fowler, Chan 등(Fowler RE, et al., 1977)도 난포액내 Progesterone의 농도가 높을수록 난자, 배아의 발달 또는 임신율이 높았다고 하였다. 그러나 Carson 등(Carson RS, et al., 1982)과 McNatty 등(McNatty KF, et al., 1979)은 estradiol의 농도가 높은 난포액을 함유하는 난포가 향후 수정될 난자를 포함한다고 하여 Hung과 Millard(Hung TT, et al., 1985)의 보고와 상충되고, Marrs 등(Richards DW, et al., 1990)도 각기 다른 단계의 배란전 난포액에서 estradiol 또는 progesterone의 양의 차이점을 발견할 수 없어 이러한 estrogen과 progesterone의 양과 비율이 난포액의 억제효과를 담당할 것으로 사료되지 않는다고 하였다.

또한 Marr 등(Richards DW, et al., 1990)은 사람 난포액의 생쥐배아발달에 대한 억제효과는 난포의 성숙도가 높을수록 낮다고 하였고, 따라서 사람의 난포액이 난자의 성숙도와 연계된 억제물질을 포함하고 있다고 하였으나, 본 연구의 2세포기 생쥐배아의 배양실험에서는 사람난포액의 첨가에 따른 배아의 발달 억제효과는 관찰되지 않았고 오히려 1세포기 생쥐 배아의 배양에서는 사람난포액의 첨가가 배아의 발달을 촉진하는 작용이 있는 것으로 나타났다.

Cha 등(Cha KY, et al., 1991)은 미성숙 난자의 체외배양실험에서 단백질공급원으로써 배양액에 FCS을 첨가하는 것보다 성숙한 난포의 난포액을 첨가할수록 더 좋은 성숙율을 보였다고 하였고, 또한 Tsafirri와 Channing(Tsafirri A, et al., 1975)도 난포액내 난자성숙촉진물질이 있어 이것이 난포가 성숙하면서 난자성숙억제물질을 양적으로 초과하게 되어 배란시에는 지금까지 억제되어 왔던 난자의 감수분열이 시작된다고 하였다. Bae 등(Bae IH, et al., 1982)는 돼지동물실험에서 난포성숙에 따르는 난포내 난자성숙억제물질의 감소를 재규명하였으며 Reichert 등(Reichert LE, et al., 1982)은 이러한 난자성숙촉진물질에 의한 난자성숙억제물질 효과의 업제작용은 중독이성도 없다고 하였다.

Naito 등(Naito K, et al., 1988)은 돼지난자배양에 있어서 돼지난포액이 전핵형성에 미치는 영향에 대하여 전핵형성의 실패원인은 주로 핵성숙은 잘 되나 세포질성숙이 불완전하기 때문이며, 이때 FSH의 첨가만으로는 불충분하여

난포액을 첨가함으로써 전핵형성율을 높였다고 하였고, Mattioli 등(Mattioli M, et al., 1988)은 돼지 동물실험에서 난포액이 첨가된 배양액에서는 난자와 卵丘(cumulus)의 偶力(intercellular coupling)이 오래 지속되었고, 정자의 난자에 대한 침투율이 높았으며 전핵형성율도 높았다고 하였다.

본 연구에서 시행한 각기 다른 단백질공급원을 포함하는 배양액내 초기생쥐배아의 발달 비교 중, FF군은 타군보다 특히 1세포기 생쥐배아의 배양에서 배반포의 형성율이 높고, 세포수 역시 현저하게 높으며, 난할하는 배아들이 형태학적으로 더 좋고 난할속도도 빠른 것으로 보아, 기존에 사람의 난포액이 초기 생쥐배아에 억제효과가 있다고 알려져 왔으나, 최소한 사람의 성숙된 난포액은 이러한 억제효과를 없애 뿐만아니라 초기 생쥐배아의 발달을 촉진하는 좋은 단백질공급원이 될 수 있을 것으로 사료되었다.

사람의 체외수정시 배아이식 후의 배아생존력과 자궁내에서의 착상력의 향상은 높은 임신율에 필수적이며, 따라서 사람배아의 적용가능성과 사람난포액의 초기배아발달에 연계된 물질을 규명하기 위해서는 앞으로 더 많은 표본의 분석과 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 결 론

저자들은 사람의 성숙난포액이 수정된 난자의 난할과 배아의 발달에 미치는 영향을 규명하기 위하여, 초기 생쥐배아를 과배란유도와 자연주기에서 획득한 서로 다른 비율의 사람성숙 난포액 및 BSA, FCS 등의 단백질공급원을 함유하는 배양액에서 각기 배양하여 이들의 발달과정과 형태를 관찰하고 그 결과를 비교 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. BSA, HCS 및 FF의 각기 다른 단백질 공급원을 함유하는 배양액에서 2세포기 생쥐배아를 배반포까지 배양한 결과, 84.7%, 83.3% 및 90.1%의 배 발달율을 나타내었으며 각 군간에 통계학적으로 유의한 차이가 없었다.

2. 2세포기 생쥐배아를 과배란 유도에서 획득한 FF 20%, 및 50% 그리고 자연주기에서 획득한 FF 20%의 사람성숙 난포액이 함유된 배양액에서 배반포까지 배양한 결과, 96.2%, 84.4% 및 89.4%의 배 발달율을 나타내었으며 각군간에 난포액의 농도에 따른 통계학적인 유

의한 차이는 없었다.

3. BSA, HCS 및 FF의 각기 다른 단백질을 함유하는 배양액에서 1세포기 생쥐배아를 배반포까지 배양한 결과, 51.6%, 54.6% 및 68.4%의 배 발달율을 보여 FF군이 BSA군 보다 통계학적으로 유의하게 높았다( $P < 0.05$ ).

4. BSA, HCS 및 FF의 각기 다른 단백질을 함유하는 세가지 배양액군 별로 배반포의 핵수를 비교한 결과, 2세포기 생쥐배아 배양에서는  $78.25 \pm 5.56$ ,  $78.00 \pm 11.11$  및  $97.58 \pm 12.19$ 개로서 FF군이 BSA나 HCS군에 비해 통계학적으로 유의하게 높은 핵수를 나타내었고( $P < 0.01$ ), 1세포기 배아배양에서도  $53.90 \pm 7.66$ ,  $52.86 \pm 4.86$  및  $74.17 \pm 5.12$ 개로서 FF군이 양군과 비교하여 통계학적으로 유의하게 높았다( $P < 0.001$ ).

따라서 사람의 성숙난포액은 BSA나 FCS을 포함한 배양액과 비교하여 초기생쥐배아의 발달에 억제효과를 갖지 않으며 부분적으로는 오히려 배아발달에 촉진효과를 갖고, 특히 간접적으로 배아의 질을 나타내는 배반포의 핵수의 증가를 가져오므로, 최소한 초기 생쥐배아의 발달을 억제하지 않으며, 부분적으로는 초기 생쥐배아의 발달을 촉진하는 물질을 함유할 가능성을 제시한 것으로 사료된다.

## 인 용 문 헌

- Botero-Ruizz W, Laufer N, DeCherney AH, Polan ML, Haseltine PP, Behrman HR: The relationship between follicular fluid steroid concentration and successful fertilization of human oocytes in vitro. *Fertil Steril* 1984, 41, 820-826.
- Bae IH, Evans VW, Atlas SJ: Actions of hormones and other factors upon oocyte maturation. *Intraovarian Control Mechanisms*, Edited by Channing CP, Segal SF, New York, Plenum Press, 1982, p191.
- Cha KY, Choi DH, Koo JJ, Han SY, Ko JJ, You TK: Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril* 1991, 51, 109.
- Channing CP, Hillensjo T, Schaerf FW: Hormonal control of oocyte meiosis ovulation and luteinization on mammal. *J Clin Endocrinol*

- Metab* 1978, 7, 601.
- Carson RS, Trounson AO, Findlay JK: Successful Fertilization of human oocytes in vitro: Concentration on estradiol 17 $\beta$ -progesterone and androstenedione in the antral fluid of donor follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 1982, 55, 798-800.
- diZerega GS, Campeau JD, Nakamura RM, Ujita EL, Lobo R, Marrs RP: Activity of a human follicular fluid protein(s) in spontaneous and induced ovarian cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 1983, 57, 838-846.
- Fishei SB, Edwards RG, Walters DE: Follicular steroids as a prognostic factor of successful fertilization of human oocytes in vitro. *J Endocrinol* 1983, 99, 335-334.
- Fowler RE, Chan STH, Walters DE, Edwards RG, Steptoe PC: Steroidogenesis in human follicles approaching ovulation as judged from assays of follicular fluid. *J Endocrinol* 1977, 72, 259, 271.
- Hung TT, Millard MM: Inhibition of mouse embryo by a factor present in the human preovulatory follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 1985, 61, 899.
- Hillensjo T, Batta SK, Schwartz-Kripner A, Wentz AC, Sulewski J, Channing CP: Inhibitory effect of human follicular fluid upon the maturation of porcine oocyte in culture. *J Clin Endocrinol Metab* 1978, 47, 1332-1335.
- Lobo RA, DiZerega GS, Marrs RP: Follicular fluid steroid levels in dysmature and mature follicles from spontaneous and hyperstimulated cycles in normal and anovulatory women. *J Clin Endocrinol Metab* 1985, 60, 81-87.
- Mattioli M, Galeat G, Bacci ML, Seren E: Follicular factors influence oocyte fertilizability by modulating the intercellular cooperation between cumulus and oocyte. *Gamete Res* 1988, 21, 223.
- McNatty KF, Smith DM, Makris A, Osathanonch R, Ryan KJ: The microenvironment of the human antral follicle: Interrelationships among the steroid levels in antral fluid, the population of granulosa cells, and the status of the oocyte in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1979, 49, 851-860.
- Naito K, Fukuda Y, Toyoda Y: Effects of Porcine follicular fluid on male Pronucleus formation in porcine oocytes matured in vitro. *Gamete Res* 1988, 21, 285.
- Richards DW, Ruinn P, Stone BA, Marrs RP: Effect of human follicular fluids from pregnant and nonpregnant patients on the development of mouse zygotes in Vitro. *J In Vitro Fertil Embryo Transf* 1990, 7, 22.
- Reichert LE, Sanzo MA, Fletcher PW, Dias JA, Lee Cy: Properties of follicle stimulating hormone binding inhibitors found in physiological fluid. Intraovarian Control Mechanisms, Edited by Channing CP, Segal Sf, New York, Plenum Press, 1982, p141.
- Stone SI, Kripner AS, Pomeranz SH, Channing CP: Inhibitor of oocyte maturation from porcine follicular fluid: further purification and evidence for reversible action. *Biol Reprod* 1978, 19, 585.
- Stone BA, Vargyas JM, Marrs RP, Quinn PJ, Batzofin JH, Tan T, Kerin JFP, Serafini PC: Levels of steroid and protein hormones in antral fluids of women treated with different combinations of gonadotropins, clomiphene citrate, and a gonadotropin-releasing hormone analog. *Fertil Steril* 1988, 49a, 249.
- Tucker MJ, Chan YM, Chan SY, Wong CJ, Mao KR, Leong MK, Leung CK: The use of human follicular fluid in gamete intrafallopian transfer. *Hum Reprod* 1989, 4, 931.
- Tsafriri A, Channing CP: An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte in vitro. *Endocrinology* 1975, 96, 922.
- Tsafriri A, Channing CP: Influence of follicular maturation and culture conditions upon porcine oocyte meiosis in vitro. *J Reprod Fertil* 1975, 43, 149.
- Tsafriri A, Pomerantz SH, Channing CP: Inhibition of oocyte maturation by porcine follicular fluid: partial Characterization of the inhibitor. *Biol Reprod* 1976, 14, 511.
- Wrambsy H, Kullander S, Liedholm P, Ran-

nevik G, Sundstrom P, Thorell J: The success rate of in vitro fertilization of human oocytes in relation to the concentrations of different hormones in follicular fluid and peripheral plasma. *Fertil Steril* 1981, 36, 448-454.

Yee B, Ogawa T, Marrs RP: The effect of human follicular fluid from mature, immature and stimulated follicles on mouse embryos cultured in vitro. Society for Gynecologic Investigation, Phoenix, Arizona, 1985.

---