

불임환자에 있어서 Partial Zona Dissection(PZD)의한 임상적인 결과

차병원 여성의학연구소

박성은 · 최동희 · 노환철 · 고정재 · 박종영 · 차광열

Clinical Results of Partial Zona Dissection for Infertility

Sung Eun Park, Dong Hee Choi, Hwan Cheol Rho, Jung Jae Ko, Jong Young Park
and Kwang Yul Cha

*Department of Obstetrics and Genecology, Infertility Medical
Center of CHA Women's Hospital, Seoul, Korea*

= Abstract =

Micromanipulation procedures have been used to improve fertilization rates in patients with male factor or with unexplained infertility.

Partial zona dissection(PZD), a method using mechanical force to open the zona pellucida increase the chances of fertilization.

The purpose of this study is to increase rates of fertilization and pregnancy in the ART program by using PZD.

The influence of PZD on the fertilization rate was investigated in 57 couples with semen defects, antisperm antibodies(ASA), or unknown factors.

PZD directly performed in 35 couples with a history of fertilization failure in previous cycle (Group 1), and PZD applied in 22 couples with the failure of initial fertilization in the same cycle (Group 2).

The fertilization rates of the male factor, ASA positive factor and unknown factor in Group 1 were 37.6%, 20.0% and 59.2%, respectively.

The rates of fertilization of male factor, ASA positive factor and unknown factor in Group 2 were 34.8%, 20.0% and 26.5%, respectively.

The incidences of polyspermy in Group 1 and Group 2 were 5.9% and 9.0%, respectively. Among 35 patients of Group 1, one patient was pregnant and successfully delivered, whereas 1 of 22 patients of Group 2 became pregnant, but aborted at 7 weeks.

서 론

체외수정 과정동안 미세조작기법은 유전적, 병리학적 원인에 의한 남성, 여성의 결함으로 수정에 실패하는 경우 이를 극복하기 위해 이용되고 있다.

본 논문의 요지는 1992년 제70차 추계 산부인과 학회에서 발표되었음.

특히 남성불임요인인 정자 부족증(oligospermia), 운동성 부전증(asthenospermia), 기형 정자증(teratozoospermia)을 나타내는 환자 경우 수정율이 정상적인 경우에 비해 매우 낮다 (Overstreet et al., 1980).

이들 남성불임환자의 경우 원인에 대해 광범위 하게 연구한 결과 정자수, 형태, 운동성, 침체결손, 감염, 효소와 생화학적 결함, 항체등의 원인이 규명되어져 왔으며(Jeulin et al., 1986;

Fukuda et al., 1989; Schill, 1991), 또한 원인 불명의 불임환자의 경우는 난자투명대의 비정상성 또는 정자의 투명대 통과 능력의 기능적인 결함 등과 연관되어져 있는 것으로 알려져 있다(Audibert et al., 1989; Barlow et al., 1990).

이들 불임원인들의 치료를 위해 많은 동물종에서 미세조작기법을 이용한 연구가 다각적으로 진행되어(Uehara and Yanagimachi, 1976; Iritani, 1988; Lanzendorf et al., 1988) 기초적인 지식과 기술이 축적되어 몇가지 방법들은 이미 임상에 적용되어 성공을 거두고 있다.

난자의 위관강내에 정자를 주입시키는 방법인 위관강 삽입법(subzonal injection: SZI)이 성공적으로 시행되어 분만된 것이 보고(Ng et al., 1988)되었고, 난자의 세포질내에 정자를 직접 주입하는 세포질주입법(intra-cytoplasmic sperm insertion: ICSI)이 성공을 거두어 아기가 분만되었고(Palermo et al., 1993), 물리적 기법을 이용한 부분적 투명대 절개법(partial zona dissection, PZD; Cohen et al., 1988)이나 효소를 이용한 부분적 투명대 절개법(zona drilling, ZD; Gordon et al., 1988)이 이용되고 있다.

이중 부분적 투명대 절개법의 경우는 난자에 손상을 최소한 줄일 수 있고(Cohen et al., 1988), 동물실험이 많이 축적되어 있으며(Tsunoda et al., 1986; Depypere et al., 1988; Odawara and Lopata, 1989), 정자의 난자의 투명대 통과시 정자의 인위적 선택 과정이 필요없다는 장점을(Cohen et al., 1988; Malter and Cohen 1989 a, b)가지고 있다.

따라서 본 연구는 미세조작기법중 부분적 투명대 절개법을 이용하여 남성불임 환자나 면역학적 원인이나 원인불명으로 수정에 실패한 환자의 수정율과 임신율을 향상시키기 위해 시행하였다.

재료 및 방법

1. 대상

1991년 5월부터 1992년 9월까지 본 병원 여성의학연구소에서 체외수정시술을 받은 불임환자 57명을 대상으로 하였다. 이들 환자는 Group 1과 Group 2로 분류하였으며 Group 1 환자 35명은 이전에 체외수정 시술을 실시하여 수정이 일어나지 않은 환자들로 남성불임 환자(n=28)와 항정자 항체를 가진 환자(n=1)와 원인 불명으로 수정이 일어나지 않은 환자(n=6)가

Table 1. Profile of patients in PZD

	No. of patients	Cause of infertility		
		Male factor	ASA positive	Unknown factor
Group 1	35	28	1	6
Group 2	22	9	3	10
Total	57	37	4	16

포함되었다(표 1).

Group 2의 환자 22명은 체외수정시술에서 수정에 실패한 경우 다음날 PZD방법을 실시한 후 재수정을 시킨 환자들로 Group 1의 경우와 같은 3종류의 불임 원인으로 분류하였다(표 1).

Group 1과 Group 2의 37명의 남성불임환자들은 WHO의 기준에 의하여 정자감소증 환자(<20×10⁶/ml)이거나, 운동성부전증(<40% 운동성)환자이거나, 기형정자증(<40% 정상정자)을 가진 환자들을 대상으로 하였고, ASA positive환자는 immunobead를 이용한 방법으로 정자나 난자를 검사한 결과 Immunoglobulin A (IgA), 또는 Immunoglobulin G (IgG)가 40% 이상인 환자를 대상으로 하였다.

2. 체외수정과정

1) 난자의 획득

난자를 채취하기 위한 과배란 유도방법으로서, Clomiphene citrate와 HMG, FSH와 HMG를 병용하거나 GnRHa와 HMG를 사용하였으며 공히 hCG를 주사한 후 36시간후에 질식초음파(Vaginal ultra-sonography)에 의해 난자채취를 실시하였다.

난자를 채취한 당일부터 PZD를 실시하는 환자에게 면역억제를 위해 Methylprednisolone (Upjohn, 16mg)과 Doxycycline-hydrate (Pfizer, 200mg)을 4일간 투여하였다. 난자를 채취한 후 성숙도에 따라 구분하고 10% 태아혈청이 첨가된 TCM 199 (Gibco, U.S.A.) 배양액으로 옮겨 배양기에서 제1극체가 방출될때 까지 배양하였다.

PZD방법을 시행하기 위해 PBS (Gibco, U.S.A.) 용액에 1% hyaluronidase (Sigma, U.S.A.)가 첨가된 용액에서 2분간 처리하여 난자를 둘러싸고 있는 난구세포들을 완전히 제거 후 배양액에서 3-4회 씻은 후 미세하게 뽑은 pasteur pipette (Corning, U.S.A.)을 이용하여 방사관세포를 제거하였다.

2) 정자의 처리

정자의 처리를 정액상에 따라 달리하였는데 정상적인 정액상을 나타내는 환자의 경우는 swim-up 방법을 사용하였다.

채취된 정액을 실온에서 30-40분간 방치하여 액화시킨후 10% 태아혈청이 첨가된 Ham's F-10배양액으로 혼합희석시키고 300G에서 10분간 원심분리시킨 후 상층액을 제거하고 남아 있는 원침(pellet)에 Ham's F-10배양액을 넣고 동일한 방법으로 원심분리시킨 후 상층액을 제거한 후 원침에 0.4ml 10% 태아혈청이 첨가된 Ham's F-10배양액을 올리고, 1시간 배양하여 swim-up시킨 후 상층액을 취하여 정자의 수와 운동성을 검사후 수정에 이용하였다.

비정상적 정액상을 보이는 남성불임환자의 경우는 Percoll density gradient방법을 이용하였다.

Percoll density gradient를 이용한 정자분리법은 10배 농도의 Ham's F-10배양액과 percoll 원액을 혼합하여 각각 90%, 80%, 70%, 55%, 35% isotonic percoll을 만들고 1-1.5ml의 100%, 90%, 80%, 70%, 55%, 35% isotonic percoll을 시험관에 넣어 층층을 만든 후 정액을 맨 윗층에 넣고 300G로 20-30분간 원심분리하여 80%, 90%, 100% isotonic percoll layer를 취하여 2-3회 씻은 후 percoll을 제거시키고 운동성이 있는 정자를 얻은 후 수정에 이용하였다.

3) 부분적 투명대 절개법(Partial zona dissection:PZD)

미세조작기법을 실시하기 위해 도립현미경(inverted microscope, Nikon, Japan)에 미세조작기(micromanipulator, Leitz, Germany)를 부착시켜 이용하였다.

난자를 고정하기 위한 holding pipette(외경 70-80 μ m)과 투명대를 절개하기 위한 cutting pipette(외경 1 μ m)을 미세관(micro-needle, Leitz, Germany)을 사용하여, pipette puller(KOPF, U.S.A.)와 microforge(Alcatel, France)로 제작하였다.

난자는 oil drop방법에 의해 Petri dish(Falcon, U.S.A.)내에 20% 태아혈청이 첨가된 PBS로 소적을 만들고 Paraffin oil(Sigma, U.S.A.)로 피복시킨 후 난자를 넣고 200배 현미경 시야 아래서 PZD방법을 시행하였다.

Holding pipet을 이용 난자를 좌측 9시 방향에서 고정 후, cutting pipet을 이용하여 12시 방향에서 투명대를 관통시키고, holding pipet아

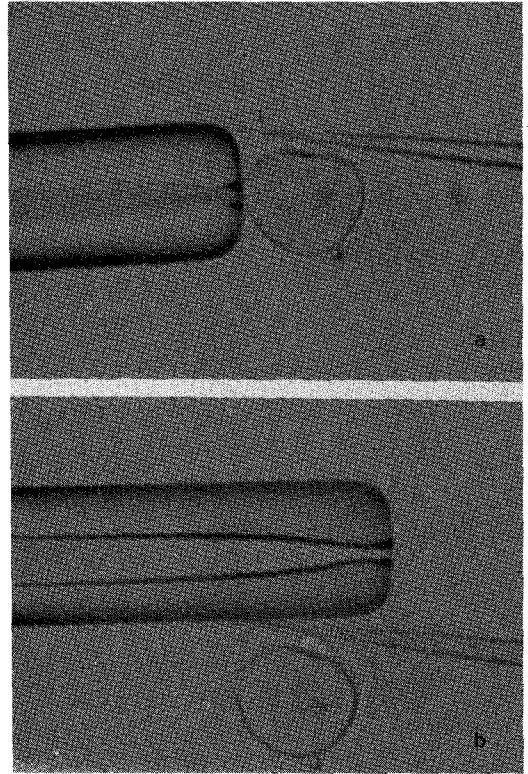


Fig. 1. Procedures of PZD.

래에서 관통된 난자의 투명대 일부를 문질러 투명대를 제거시켰다(그림 1).

4) 체외 수정 및 배양

PZD방법을 시행한 난자는 배양액이 첨가된 배양 접시(organo culture dish, Falcon)로 옮긴 후 수정을 시켜 5% CO₂, 37°C의 배양기에서 16-20시간 배양후 전핵이 확인되면 20% 태아혈청이 첨가된 TCM 199배양액으로 옮겨 배양하였다. 수정이 확인된 접합자를 나팔관내로 이식하거나, 48시간 배양후에 2세포기에서 8세포기난자를 자궁내로 이식하였고, 임신여부는 배아이식 후 14일째 혈중 β -hCG로 측정하였다.

결 과

모든 결과는 Group 1과 Group 2로 분류하였으며, Group 1은 이전의 체외수정과정에서 수정에 실패한 환자로 남성불임, 면역학적 요인, 원인불명의 요인으로 분류하였고, Group 2는 체외수정결과 수정에 실패 후 다음날 PZD방법을 시행후 재수정시킨 환자들로 Group 1과 같

Table 2. Semen profile of PZD patients

Group	Factors	No. of patients	Total count (million/ml)	Alive count (million/ml)	Motility(%)	Morphology(%)
1	Male*	28	26 ± 6.6	9.3 ± 2.1	34.6 ± 2.4	33.3 ± 5.5
	ASA(+)	1	66.0	16.0	45.0	50.0
	Unknown	6	55.8 ± 11.6	25.8 ± 5.8	51.2 ± 2.7	55.0 ± 5.0
2	Male	9	17.2 ± 5.7	5.2 ± 0.9	41.3 ± 4.6	41.3 ± 8.5
	ASA(+)	3	137.5 ± 86.6	138.0 ± 72.0	50.0 ± 4.1	55.0 ± 4.1
	Unknown	10	53.6 ± 8.5	29.1 ± 6.2	50.6 ± 6.3	55.0 ± 2.3

Data are expressed as mean ± SEM,

*: Oligozoospermia, athenozoospermia, or teratozoospermia.

Table 3. Fertilization and fate of embryos from PZD in Group 1

Factors	No. of patients(n)	Fate of embryo				
		No. of PZD oocytes	No. of fertilized (%)	No. of polyspermy (%)	No. of ET patients (%)	Pregnancy/trans (%)
Male	28	178	67(37.6)	7(3.9)	21(75.0)	1*(4.8)
ASA(+)	1	10	2(20.0)	—	1(100.0)	—
Unknown	6	49	29(59.2)	12(24.5)	6(12.2)	—
Total	35	317	98(30.9)	19(5.9)	28(80.0)	1 (3.5)

*:Term delivered.

Table 4. Fertilization and fate of embryos from PZD in Group 2

Factors	No. of patients(n)	Fate of embryo				
		No. of PZD oocytes	No. of fertilized (%)	No. of polyspermy (%)	No. of ET patients (%)	Pregnancy/trans (%)
Male	9	46	16(34.8)	4(8.7)	4(44.4)	—
ASA(+)	3	15	3(20.0)	—	3(100.0)	—
Unknown	10	49	13(26.5)	6(12.2)	5(50.5)	1*(20.0)
Total	22	110	32(29.0)	10(9.0)	12(54.5)	1 (8.3)

*:Aborted.

이 3가지 요인으로 분류하였다. Group 1과 Group 2의 정액상을 비교해 본 결과, Group 1과 Group 2에서 남성불임환자는 정자감소증이거나, 운동성부전증이거나, 기형정자증을 나타내었다(표 2).

Group 1과 Group 2의 20명의 항정자항체를 가진 환자와 원인 불명의 불임환자의 경우는 정상적 정자상태를 나타내었다(표 2). Group 1에서 남성불임환자의 경우 수정율은 37.6%(67/178)를 나타내었고, 항정자항체를 가진 환자의 경우는 20%(2/10)의 수정율을 나타내었으며 원인불명의 환자의 경우는 59.2%(29/49) 수정율을 나타내었다(표 3).

Group 2에서는 남성불임환자, 항정자항체를

가진 환자, 원인불명의 환자에서 수정율은 각각 34.8%(16/46), 20%(3/15), 26.5%(13/49)를 나타내었으며, Group 1과 Group 2의 평균수정율은 30.9%(98/317), 29%(32/110)를 나타내었다(표 4).

다정자침입의 빈도는 Group 1과 Group 2에서 각각 5.9%(19/98), 9.0%(10/32)로 관찰되었다. Group 1과 Group 2에서 수정된 난자는 나팔관이식을 하거나 자궁이식을 하였으며, Group 1에서는 28명의 환자에 이식한 결과 1명이 임신되어 분만되었다. 한편 Group 2에서는 12명의 환자에 이식한 결과 1명이 임신되었으나 7주에 유산이 되었다.

고 찰

정상적인 체외수정 과정에 의한 수정율은 정상적인 정자에서 70% 정도를 나타내고 있으나 비정상적인 정자를 가진 환자의 경우 수정율은 0-10% 정도로 낮으며(Vanderzwalmen et al., 1991), 원인불명으로 수정에 실패하는 경우도 있다(Barlow et al., 1990).

남성불임환자에서 PZD 방법을 시행한 후 수정율이 향상됨이 많은 보고자들에 의해 관찰되었다(Cohen et al., 1989; Cohen et al., 1991; Tucker et al., 1991).

본 연구에서도 남성불임환자나 면역학적으로서 원인불명으로 이전의 체외수정과정에서 수정에 실패한 환자와 정상적인 수정 후 수정에 실패하여 PZD 방법을 시행한 환자들에서 수정율이 향상되었다.

본 연구에서와 같이 PZD 방법은 투명대 통과가 불가능한 정자를 절개된 투명대를 통해 위관강내로 침입할 수 있도록 도와줌으로써 수정율을 향상시킨다. PZD 후 수정율에 영향을 주는 2가지 요인은 위관강내에 존재하는 정자의 수와 난자의 원형질막에 융합하는 정자의 능력에 의해 결정이 된다.

PZD 후 난자의 위관강내에 존재하는 정자의 수는 투명대의 절개된 부분의 크기와 난자와 정자의 비율(수정시 정자농도), 정자와 난자의 융합에 요구되는 시간에 의해 결정되어진다. Hamster 난자와 human 정자의 model system에서 PZD 후 투명대 절개부위의 크기에 의해 위관강내에 존재하는 정자의 수가 결정됨을 보고하였다(Levron et al., 1990). 이와같은 요인의 조절로 위관강내에 정자의 침입을 증가시킴으로써 수정율을 향상시킬 수 있으나, 정상적인 체외수정과정보다 수정율이 낮은 이유는 미세조작을 실시해도 난자의 절반정도가 위관강내로 정자의 침입이 일어나지 않았기 때문으로 보고하였다(Levron et al., 1993).

수정에 실패한 난자를 관찰결과 위관강내에 침입된 정자가 침체반응이 일어나지 않은 것으로 보고하였고, 정자처리 후 배양하는 동안 과잉의 반응된 산소의 분비로 정자의 원형질막이 손실되어 정상적인 침체반응이 일어나지 않은 것으로 보고하였다(Aitken et al., 1991). 따라서 남성불임환자에서 pentoxifylline과 2'-deoxyadenosine을 첨가하여 인위적으로 침체반응을

유기시킨 정자를 미세조작시 이용한 경우 수정율이 향상됨이 보고되었다(Fuscaldo et al., 1991). 또한 정상적인 체외수정의 경우와 비교하여 난자의 발달율이 낮은 것으로 관찰되었으며, 이는 난자와 정자의 상태, 미세조작시 사용되는 효소와 온도와 배양액의 pH 등에 의해 영향을 받는 것으로 관찰되었다.

Yovich and Stranger(1984)는 기형정자증환자의 경우 수정 후 배발달율이 늦어짐을 보고하였다.

PZD 후 난자의 위관강내로 정자의 침입을 막는 장애물이 없으므로 많은 정자가 위관강내로 침입하여 난자의 원형질막에 융합하여 다정자 침입의 빈도가 증가되는 것으로 보고하였고(Malter and Cohen, 1989. a, b; Cohen et al., 1989; Cohen et al., 1991; Tucker et al., 1991) 본 연구에서는 Group 1과 Group 2에서 각각 5.9%, 10%의 다정자침입빈도를 나타내었다.

다정자침입빈도는 투명대 절개부분의 크기가 커질수록 증가되며, acid Tyrode's 용액이나 chymotrypsin을 이용한 경우 투명대를 제거하는데 효율적인 것으로 보고하였으나(Gordon et al., 1988; Depypere et al., 1988) 다정자침입의 빈도가 물리적인 힘을 이용한 PZD보다 높다.

또한 동물종에서 PZD 후 형성된 투명대 절개부분을 통해, 이식 후 자궁내에 존재하는 면역세포들이 난자내로 침입하는 것으로 보고되었다(Moore et al., 1968). 따라서 면역세포에 의한 난자가 받은 상해를 줄이고 착상율을 증가시키기 위해 Methylprednisolone과 tetracycline을 투여하는 면역억제방법이 효율적인 것으로 보고되었다(Cohen et al., 1990). PZD 방법은 기술적인 어려움이 없고 난자의 생존율에 손상을 주지 않은 것으로 보고되었고(Cohen et al., 1989; Malter and Cohen, 1989 a, b), 본 연구 결과에서 처럼 남성불임환자나 원인불명의 불임환자에서 수정율을 높일수 있는 것으로 관찰되어 졌으며, 현재까지 분만된 아기의 경우는 정상적이었으며, 핵형분석결과도 정상적인 것으로 보고되었다.

본 병원에서 분만된 아기의 경우도 정상적이었으며, 핵형분석 결과도 정상적인 것으로 관찰되었다.

따라서, 본 연구결과에서 PZD 방법은 남성불임환자나 원인불명의 환자, 면역학적이상을 가진 환자에 있어서 수정율을 증가시키고, 임신율을 증가시킬 수 있다는 것이 입증되어졌으며

로, PZD방법을 이들 불임환자의 치료법으로 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

그러나 PZD방법을 실시할 경우 수정을 위해 운동성이 있는 정자가 있어야 하며 심한 남성 불임환자의 경우 수정율이 매우 낮고, 또한 환자의 선택에 대한 명확한 기준과 기술적인 차이에 의한 수정율의 차이에 대한 문제는 더 많은 연구가 필요하다.

결 론

차병원 여성의학연구소를 내원한 불임환자 57명을 대상으로 미세조작기법인 PZD방법을 시행한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 이전에 체외수정 과정에서 수정에 실패한 Group 1의 환자에서 PZD방법을 시행한 결과 남성불임원인, 면역학적 원인, 원인불명의 환자에서 수정율이 각각 37.6%, 20%, 59.2%로 향상되었다.

2. 정상적인 체외수정과정 결과 수정에 실패하여 PZD후 재수정을 시킨 Group 2의 남성불임원인, 면역학적 원인, 원인불명의 환자에서 수정율이 34.8%, 20.0%, 26.5%로 향상되었다.

3. Group 1과 Group 2에서 다정자 침입의 빈도는 5.9%와 9.0%로 나타났다.

4. 제 Group 1에서 국내 최초로 PZD방법을 시행하여 한명의 아기가 분만되었다.

결론적으로, PZD방법은 남성불임원인, 면역학적 요인, 원인불명의 환자에 있어서 수정율을 향상시키고 임신율을 높일 수 있을 것으로 사료된다.

인 용 문 헌

Aitken RJ, Clartson JS, Fishel S: Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 1989, 40, 183-197.

Audibert F, Hedon B, Arnal F, Humeau C, Badoc E, Virenque V, Boulot P, Mares P, Laffargue P, Viala JL: Results of IVF attempts in patients with unexplained infertility. *Huma Reprod* 1989, 4, 766-771.

Barlow P, Englert Y, Puissant F, Lejeune B, Delvigne A, Van Rysseberg M, Leroy F: Fertilization failure in IVF: why and what

next? *Human Reprod* 1990, 5, 451-456.

Cohen J, Malter H, Wright G, Kort H, Massey J, Mitchell D: Partial zona dissection of human oocytes when failure of zona pellucida penetration is anticipated. *Hum Reprod* 1989, 4, 435-442.

Cohen J, Malter H, Elsner C, Kort H, Massey J, Mayer MP: Immunosuppression support implantation of zona pellucida dissected human embryo. *Fertil Steril* 1990, 50, 662-665.

Cohen J, Malter M, Fehilly C, Wright G, Elsner C, Korf H, Massey J: Implantation of embryos after partial opening of oocyte zona pellucida to facilitate sperm penetration. *Lancet* 1988, 2, 162.

Cohen J, Talansky BE, Malter HM: Microsurgical fertilization and teratozoospermia. *Human Reprod* 1991, 6, 118-123.

Depypere HT, McLaughlin KJ, Seamark RF, Warnes GM, Matthews CD: Comparison of zona cutting and zona drilling as techniques for assisted fertilization in the mouse. *J Reprod fertil* 1988, 84, 205-211.

Fukuda M, Morales P, Overstreet JW: Acrosomal function of human spermatozoa with normal and abnormal head morphology. *Gamete Res* 1989, 24, 59-65.

Fuscaldo G, Sobieszczuk D, Trounson AO: Improved fertilization rates following microinjection of human spermatozoa, pretreated with 2'-deoxyadenosin and pentoxifylline. 7th meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology and the 7th World Congress of IVF and Assisted Procreation, Paris, June-July 1991, Abstract 110.

Gordon JW, Grunfeld L, Garrisi GJ, Talansky BE, Richards C, Laufer N: Fertilization of human oocytes by sperm from infertile males after zona pellucida drilling. *Fertil Steril* 1988, 50, 68-73.

Iritanti A: Current status of biotechnological studies in mammalian reproduction. *Fertil Steril* 1988, 50, 543-551.

Jeulin C, Feneux D, Serres C, Jouannet P, Guillet-Rosso F, Belaish-Allart J, Frydman

- R, Testsr J: Sperm factors related to failure of human in vitro fertilization. *J Reprod Fertil* 1986, 76, 735-744.
- Lanzendorf S, Maloney M, Ackerman S, Acosta A, Hodgen G: Fertilizing potential of acrosome-defective sperm following microsurgical injection into eggs. *Gamete Res* 1988, 19, 329-337.
- Levron J, Manor D, Brandes JM, Itskovitz J: Human sperm and hamster oocyte interaction: a model system to assess sperm entry into the oocyte after partial zona dissection. *Fertil Steril* 1990, 54, 342-345.
- Levron J, Stein DW, Brandes JM, Itskovitz J: Presence of sperm in the perivitelline space predicts fertilization rate after partial zona dissection. *Fertil Steril* 1993, 59, 820-825.
- Malter H, Cohen J: Embryonic development after microsurgical repair of polyspermic human zygotes. *Fertil Steril* 1989b, 52, 373-380.
- Malter H, Cohen J: Partial zona dissection of the human oocyte: A nontraumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. *Fertil Steril* 1989a, 51, 139-148.
- Moore NW, Adams CE, Rowson LEA: Developmental potential of single blastomeres of the rabbit egg. *J Reprod Fertil* 1968, 17, 527-531.
- Ng SC, Bongso A, Ratnam SS, Sathanathan H, Chans LK, Wong PC, Hagglund L, Anandakumar C, Wong VC and Goh VHH: Pregnancy after transfer of multiple sperm under the zona. *Lancet* 1988, 11, 790.
- Odawara Y, Lopata A: A zona opening procedure for improving in vitro fertilization at low sperm concentration: a mouse model. *Fertil Steril* 1989, 51, 699-704.
- Overstreet J, Yanagimachi R, Katz D: Penetration of human spermatozoa into human zona pellucida and the zona free hamster egg: a study of fertile donors and infertile patients. *Fertil Steril* 1980, 33, 534-542.
- Palermo G, Camus M, Joris H, Devroey P, Derde MP, Steirteghem AV: Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insertion and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1993, 59, 826-834.
- Schill WB: Some disturbances of acrosomal development and function in human spermatozoa. *Hum Reprod* 1991, 6, 969-978.
- Tsunoda Y, Yasui T, Nakamura K: Effect of cutting the zona pellucida on the pronuclear transplantation in the mouse. *J Exp Zool* 1986, 240, 119-125.
- Tucker MJ, Bishop FM, Cohen J, Wiker SR, Wright G: Routine application of partial zona dissection for male factor infertility. *Human Reprod* 1991, 6, 676-681.
- Uehara T, Yanagimachi R: Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol Reprod* 1976, 15, 467-470.
- Vanderzwalmen P, Bertin G, Geerts L, Debauche C, Schoysman R: Spermatozoal morphology and IVF pregnancy rate: a comparison between percoll gradient centrifugation and swim-up procedures. *Hum Reprod* 1991, 6, 581-588.
- Yovich JL, Stranger JD: The limitation of in vitro fertilization from males with severe oligospermia and abnormal sperm morphology. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1984, 1, 172-179.