Glucose와 phosphate가 제거된 m-TALP 배지에서의 난구세포 공배양에 의한 임신율 향상에 관한 연구

모자병원 불임연구실,CL산부인과*,가야자모병원 불임유전연구소**

정범식 · 장우현 · 이문희 · 방지호 · 김규현* · 문진수** · 김광철** · 서태광**

Improvement of pregnancy rates by coculture of human embryos with cumulus cells in glucose and phosphate free m-TALP media

B.S. Chung, W.H. Chang, M.H. Lee, J.H. Bang, K.H. Kim*, J.S. Moon, K.C. Kim**, T.K. Suh****

Infertility Clinic Mo-Ja Hospital, Ulsan, Korea, Infertility Clinic CL's OB/GY, Taegu, Korea, Institute of Human Infertility and Genetics, Kaya Mother-Child's Hospital, Chinju, Korea*

=Abstract=

The beneficial effect of glucose and phosphate ions in culture medium on the development of human embryos in vitro has not been fully elucidated. The purpose of this study was to evaluate the influence of fertilization and culture of embryos in glucose/phosphate-free m-TALP medium on pregnancy rates in IVF-ET program.

The patients in 244 IVF-ET cycles received GnRH agonist + HMG regimens. A does of 10,000 IU HCG was administered when two or more dominent follicles reached 18mm in diameter. Thirty-six hours after HCG, oocytes were recovered transvaginally using ultrasound guidance. Aspirated oocytes were matured for 4 to 6 h in TCM-199 supplemented with 10% follicular fluid (FF). Insemination was carried out with 50,000 motile spermatozoa in TCM-199 + 10% FF or m-TALP + 5% FF + 5% fetal cord serum (FCS) according to experimental design. After 6 h, oocytes were washed 3 to 4 times and cultured in each fresh medium. After 20 h, oocytes were freed from cumulus/corona cells and examined for the presence of pronuclei. Fertilized oocytes were transferred into each co-culture drops and cultured for further incubation. On day 3, embryo transfer was performed with grade 1 and 2 embryos. Monolayers for co-culture of embryos were prepared by plating 1 x 10^5 cumulus cells/ml in 10 ul drop of TCM-199 + 10% FF or m-TALP + 5% FF + 5% FCS media 24 h prior to the onset of co-culture. Development to 4 to 16 cell stage was observed at 70x magnification following two days of incubation. Pregnancy was confirmed by detecting increasing serum β-hCG concentrations for 11 days following embryo transfer. Data were analyzed by X^2-test.

Oocytes from 244 IVF-ET cycles were randomized. The number of cycles and mean age of patients were 97 and 147, 31.3 yrs and 31.2 yrs for TCM-199 (control) and m-TALP groups, respectively. The mean number of retrieved oocytes/cycle, fertilization rates, number of embryos transferred/ET and pregnancy rates were 11.1 and 10.3, 65.1% and 67.3%, 4.1 and 4.7, 28.9% and 43.8% for TCM-199 and m-TALP groups, respectively. Differences in the pregnancy rates were found between control and m-TALP groups ($p<0.05$). The pregnancy rate of patients divided according to maternal age groups of $\leq$30, 31-35, 36$\leq$ were 44.4% and 49.0%, 26.1% and 41.3%, 29.2% and 41.2% for control and m-TALP groups, respectively.

These data indicate that culture of human embryos in glucose/phosphate-free m-TALP medium improves pregnancy rates.

Key Words: Glucose, Culture medium, Embryo co-culture, IVF-ET, Pregnancy rate

서론

1978년 Steptoe와 Edwards에 의한 첫 시험관아기의 탄생이래 in vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET)의 성공률을 높이고자 많은 연구와 이에따른 발전이 이루어졌다. 체외수정시술에서 임신율에 영향을 미치는 요인들은 과배란의 유도, 난자의 성숙, 수정, 배양 및 이식 등 여러 관점에서 볼수있다. 이 중 수정란의 체외배양에 대해서는 많은 연구가 이루어졌음에도 불구하고 그에 따른 임신율은 크게 향상되지 않았다. 일반적으로 수정란의 체외배양은 배양시스템과 배양액을 개선하고자 연구되어 왔으며 배양시스템은 난관, 자궁과 같은 생식도관내의 환경을 모방하여, 수정란의 배양액은 포유동물 생식도관액의 조성분을 모방하고자 그 성분을 개선하여왔다. 생쥐 수정란은 2세포기 이후부터 glucose를 흡수하며 (Gardner & Leese, 1988) 분열단계에서는 상당량의 glucose가 이용된다고 보고됨으로서 (O'Fallon & Wright, 1986) glucose는 energy source의 역할로 수정란 배양액의 한 성분으로서 당연시되어 왔다. 그러나 난관액에 포함되어있는 glucose와 phosphate를 체외배양액에서는 제거함으로서 오히려 수정란의 체외발달에 있어서 2 cell block이 극복되고 발생이 정상적으로 진행된다는 보고이래 (Schini & Bavister, 1988) glucose에 의한 체외에서의 rat (Reed et al., 1992), hamster (Schini & Bavister, 1988; Seshagiri & Bavister, 1989), sheep (Thompson et al., 1991) 초기배 발생억제에 관한 많은 보고가 있었다. 더우기 인간 수정란의 체외배양에 있어서 배양액내의 glucose제거는 배반포의 trophectoderm cell수를 증가시키며 (Conaghan et al., 1993) glucose와 phosphate의 제거는 수정란의 체외발달율 및 착상율을 향상시킨다고 보고되었다 (Quinn, 1995). 한편 체외에서 수정란과 각종 세포들과의 공배양은 수정란의 체외발달과 그에 따른 이식후 임신율을 향상시키는데 (Bongso et al., 1989, 1992, 1994) 이들 공배양용 세포중 난구세포는 환자 자신에게서 유래된 세포를 이용하기 때문에 타세포로부터 오는 감염의 위험을 예방할 뿐만아니라 세포의 획득이 용이하기 때문에 효과적인 공배양 방법으로 이용되고 있다 (Quinn, 1994, 1995).

이에 본 연구는 인간 수정란과 난구세포와의 공배양 시스템에 있어서 glucose와 phosphate가 제거된 m-TALP 배양액의 이용이 임신율에 미치는 영향을 조사하고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. 연구대상

1996년 1월부터 1997년 12월 말까지 불임클리닉에 등록한 환자중 IVF-ET를 실시한 244 주기를 대상으로 하였다.

2. 난포액, 제대혈청 및 배양액

난자의 흡입채취시 함께 흡입된 난포액 (Follicular fluid, FF)은 1000 g에서 30분간 원심분리후 56℃에서 30분간 inactivation 하였으며, 1 ml씩 분주하여 -30°C에서 냉동보관후 임신이 확인된 환자의 난포액만을 연구에 이용하였다. 제대혈청 (Fetal cord serum, FCS)은 AIDS, VDRL 및 hepatitis B, C에 양성반응을 나타내지 않는 정상분만 환자의 fetal cord로부터 채취하여 난포액과 동일한 방법으로 처리후 이용하였다. 난자의 체외성숙용 배양액은 TCM-199 + 10% FF를 이용하였다. 난자의 체외수정 및 수정후 체외배양액은 대조구에서 TCM-199 + 10% FF를, 처리구에서는 glucose와 phosphate가 제거된 m-TALP + 5%FF + 5%FCS를 이용하였으며 m-TALP배양액의 조성은 Table 1과 같다.

Table 1. Composition of m-TALP medium

Component	Concentration
NaCl	106.10(mM)
KCl	3.19
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2.00
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.50
$NaHCO_3$	25.00
Na-pyruvate	0.50
L-Glutamine	0.20
Na-lactate	10.00
EDTA*	0.1
streptomycine	0.04mg/ml
penicilline-G	0.06mg/ml
MEM(×100) (non-essential amine acid)	0.01ml/ml
BME(×50) (essestial amine acid)	0.02ml/ml
BME(×100) (vitamine solution)	0.01ml/ml

* EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid)

3. 과배란 유도, 난자채취 및 체외성숙

IVF-ET 프로그램에 들어간 환자는 황체기 중간부터 GnRH agonist 투여로 내인성 gonadotropin의 영향을 배제한후 HMG를 사용하여 과배란을 유도하였다 (long protocol). 우성난포 (dominant follicle)의 크기와 갯수 (>18㎜, >2-3)가 만족할때 hCG 10,000 IU를 근육주사하고 36시간후에 질식 초음파하에서 흡입하여 난포액과 난자를 회수하였다. 그후 실체현미경하에서 pasteur pipette을 이용하여 회수된 난자는 신선한 배양액으로 3-4회 세척한후 성숙도를 확인하였다. 난자는 20-24시간동안 37℃, 5% CO_2 배양기에서 미리 평형이 이루어진 2 ml의 체외성숙용 배양액에 넣고 난자의 성숙도에 따라 4-6시간 배양 하였다.

4. 난구세포의 준비, 수정 및 수정란의 체외배양

채취된 난자에 부착된 난구세포괴는 30G needle을 이용하여 약 ⅓을 떼내었으며, 이를 0.1% hyaluronidase로 처리하여 단일세포로 분리하였다. 난구세포는 100,000 cells / ml의 농도로 mineral oil이 피복된 10㎕ drop의 TCM-199 + 10% FF 또는 m-TALP + 5% FF + 5% FCS 배양액에 넣고 24시간 배양하였으며, monolayer를 형성후 수정란의 공배양에 이용였다. 체외성숙된 난자는 TCM-199 및 m-TALP 수정배양액에 옮긴후 각각 50,000 sperm cells / oocyte 로 수정하였다. 난자는 수정후 6시간에 각각의 신선한 배양액으로 옮겨 3-4회 세척후 추가배양 하였으며, 수정후 20시간에 주위의 난구세포를 제거한후 수정여부를 확인하였고, 정상수정된 난자는 미리 준비된 각각의 공배양 drop에 넣고 2일간 배양하였다.

5. 배아이식 및 임신판정

4-16세포기까지 발달한 1-2등급 수정란은 TCM-199 + 75% FCS 배양액으로 옮겨 Tom cat catheter에 loading후 자궁내 이식을 실시하였다. 임신여부는 배아이식후 11일째에 환자의 혈액을 채취하여 β-HCG결과로 확인 하였으며, 20이상의 수치를 나타낼 경우 임신으로 판정하였다.

6. 실험설계 및 결과분석

체외성숙된 난자는 TCM-199 및 m-TALP 배양액에서 각각 수정 및 수정란의 체외배양을 시행 하였으며, 수정후 20시간에 웅성 및 자성전핵의 형성여부를, ET후 11일째에 β-HCG 결과를 각각 조사함으로서 배양액에 따른 수정율, 임신율 및 연령과의 관계를 비교분석 하였다. 결과분석은 X^2-test로 하였으며 $p<0.05$인 경우 유의한 것으로 판정하였다.

결과

연구대상 환자의 평균연령 및 시술당 회수된 평균 난자수는 TCM-199 과 m-TALP군간에 차이가 없었으나 시술횟수는 m-TALP군이 많았다 (Table 2). TCM-199 배양액에서 체외 성숙배양이 이루어진 난자를 기본적으로 glucose와 phosphate가 첨가된 TCM-199 (대조군) 또는 glucose와 phosphate가 첨가되지 않은 m-TALP 배양액에서 수정, 배양시 그 수정율은 각각 65.1%와 67.3%, 자궁내 이식된 grade 1, 2 수정란의 평균수는 각각 4.1개와 4.7개로서 차이가 없었으나, 이식후 임신율은 각각 28.9% 및 43.8%로서 m-TALP 배양액에서 수정 및 배양된 수정란의 임신율이 높았다 ($p<0.05$, Table 2).
연령에 따른 임신율은 TCM-199 및 m-TALP군에 있어서 30세 이하에서는 각각 44.4%와 49.0%, 31-35세 에서는 각각 26.1%와 41.3%, 36세 이상에서는 각각 29.2%와 41.2%로서 연령이 많아짐에 따라 m-TALP 배양액에서 수정 및 배양된 수정란의 임신율이 대조군에 비해 높은 경향을 나타내었다 (Figure 1).

Table 2. Comparison of clinical characteristics between TCM-199 and m-TALP group

	TCM-199	m-TALP
Mean age of patients (yrs)	31.3	31.2
No. of cycles	97	147
Mean No. of retrieved oocytes/cycle	11.1	10.3
Fertilization rates (2PN, %)	65.1	67.3
Mean No. of embryos transferred/ET	4.1	4.7
Pregnancy rates/ET (%)	26.8[a]	44.2[a]

[a] $p<0.05$

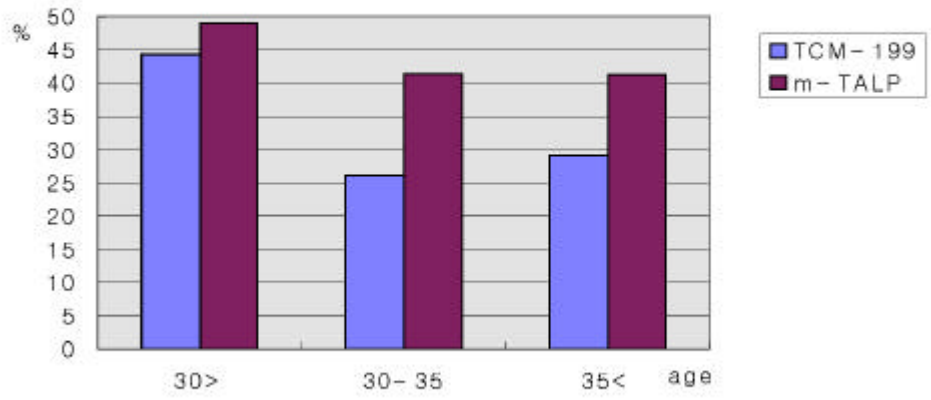

Figure 1. Pregnancy rates between TCM-199 and m-TALP according to age

고찰

시험관아기 시술에 있어서 난자 및 수정란의 체외배양에 이용되는 다양한 배양액들의 조성분중 glucose, phosphate 성분이 수정란의 체외발달 및 이식후 임신율에 미치는 영향에 대해서는 현재 많은 연구가 진행중이다 (Quinn, 1995; Gardner, 1998).

생리적인 측면에서 난관내의 환경을 볼 때 난구세포가 부착된 수정후 초기분할 단계의 난자는 glucose 성분을 함유하는 난관액내에 노출되나, 실제로는 난자 주위를 둘러싸는 대사활동이 매우 활발한 난구세포들에 의해 glucose가 소비됨으로서 초기배 난자는 glucose-free 환경에 노출되어 있다고 볼 수 있다. 그러나 초기배의 발생진행 및 난관에서 자궁방향으로의 난자이동과 함께 난구세포가 떨어져 나감에 따라 수정란은 소량일지라도 난관액내의 glucose에 노출된다 (Gardner & Lane, 1997). Glucose는 체외에서 생쥐난자의 수정에 관여할 뿐만아니라 (Hoppe, 1976) 2세포기 이후에서 수정란이 glucose transporter를 가진다고 알려져 있기 때문에 (Gardner & Leese, 1988) 난관내의 환경을 모방한 수정란의 체외발생용 배양액에 일반적으로 함유되어 있다. 그러나 시험관아기 시술에 이용되는 각종 배양액의 조성분들은 생식도관액에 비해 그 조성비 및 농도의 불균형으로 인해 수정란 발달을 저해할 수 있다 (Conaghan et al., 1993). 이들 성분중 특히 생체내 난관액에 존재하는 glucose와 phosphate를 체외배양액에서는 제거함으로서 오히려 수정란의 체외발달에 있어서 2 cell block이 극복되고 발생이 정상적으로 진행된다는 보고 이래 (Schini & Bavister, 1988) glucose에 의한 포유동물 초기배의 발생억제에 관한 많은 연구가 진행되었다 (Schini & Bavister, 1988; Seshagiri & Bavister, 1989; Reed et al., 1992; Thompson et al., 1991).

Quinn (1995)은 glucose, phosphate가 제거된 human tubal fluid (HTF) 배양액에서 인간의 난자를 체외수정시 정자의 초기 운동속도와 수정율이 glucose, phosphate가 함유된 대조구에 비해 낮아졌으나, 정자농도를 높였을때에는 수정율의 차이가 없었으며 난구세포와 공배양시 배반포기로의 발달율 및 이식후 착상율은 각각 47%와 38%로서 대조구에서 배양된 수정란의 29% 및 18%에 비해 현저히 높아진다고 보고하였다. 또한 배양액내 glucose의 제거는 4-8 세포기의 block stage 극복에 도움을 주고, 초기 분할율을 높임으로서 발달한 배반포의 trophectoderm cell 수를 증가시킨다고 알려져있다 (Conaghan et al., 1993).

본연구에서는 TCM-199와 m-TALP 배양액에서의 정자 운동속도와 배반포기로의 체외 발달율을 비교하지는 않았으나 수정율은 각각 65.1% 및 67.3%로서 차이가 없었다. 그러나 이식후 임신율은 각각 28.9% 및 43.8%로서 glucose, phosphate가 제거된 m-TALP 배양액에서 수정, 발달된 수정란의 임신율이 현저히 높아 Quinn (1995)의 보고와 유사한 결과를 얻었다. 배양방법으로 이용한 난구세포 공배양은 세포의 획득 및 환자자신 유래의 세포이용이라는 측면에서 이용성 및 안전성이 높으며, 배지내에서 항독소작용과 배양환경을 개선시킬 뿐만아니라 growth factor를 공급함으로 배아의 발달을 향상시켜 (Bavister BD, 1988) 배아의 생존율, 발달율 및 임신율을 증가시킨다고 알려져있다 (Menezo et al., 1990, 1992; Freeman et al., 1993).

그러나 Gardner (1998)는 난관액 및 자궁액내에도 glucose가 함유되어 있기 때문에 in vitro에서 나타나는 glucose의 수정란발달 저해작용은 인위적인 것이며, Gardner와 Lane (1997)은 배양액내에 아미노산을 첨가할 경우 이들이 에너지 대사, 삼투압 및 산도에 관여함으로서 저해작용이 방지된다고 보고하였다. 또한 glucose가 제거된 배양액에서도 수정란이 배반포기까지 발달하나 glucose가 함유된 배양액에서 발달한 배반포에 비해 이식후 발생능이 감소하며 (Gardner & Lane, 1996) glucose transporter 1 (GLUT-1)의 작용으로 수정후부터 인간수정란에 의한 glucose의 흡수가 일어난다고 보고됨으로서 (Dan-Goor et al., 1997) 논란의 여지가있다.

한편 m-TALP 배양액에 첨가된 EDTA는 중금속 이온등 toxic ion을 제거하는 chelator로서 작용하여 초기배 발달율을 증가시키는 것으로 알려져있다 (Gardner & Lane, 1997). 그러나 수정란의 발달단계에 따라 8세포기 이전에서는 발생촉진, 8세포기 이후에는 발생저해작용을 함으로서 소 수정란의 경우 compaction 이후 단계에서 EDTA에 노출시 배반포기로의 발달율 저하 및 수정란의 세포수를 감소시키고(Gardner, 1997), 생쥐수정란의 경우는 이식후 태

아발달을 저해한다고 알려져있다 (Gardner & Lane, 1996). 배양액내의 아미노산 또한 포유동물 수정란의 발달에 영향하여 cell block을 완화시키는데 비필수 아미노산과 glutamine은 trophectoderm cell의 수와 부화율 (hatching)을 증가시키나, 필수아미노산의 경우 8세포기 이전 단계에서는 수정란의 발달저해, 8세포기 이후 에서는 발달촉진 작용을 한다고 알려져 있다 (Lane & Gardner, 1997).
수정란의 체외발달능과 더불어 환자의 연령은 시험관아기 시술에서 임신율에 큰 영향을 미치는 요인으로 작용하며 환자의 연령과 임신율은 반비례한다고 알려져있다 (Check et al., 1994). Tan 등 (1992)은 시술을 받는 환자의 연령을 35세 이하, 35-39세. 40세 이상으로 분류하였을 때 연령의 증가에따라 임신율이 급격히 감소하였으며 Serour 등 (1996)도 이와 유사한 결과를 보고하였다. 본연구에서도 나이가 많아짐에 따라 임신율이 감소하였으나 m-TALP 배양액을 이용시 대조구에 비해 연령에 따른 임신율의 감소는 현저하지 않는 경향을 나타내었다.

본 연구결과와 여러 연구자들의 보고를 토대로 미루어 볼 때 glucose와 phosphate가 제거되고 아미노산과 EDTA가 첨가된 m-TALP 배지에서 수정 및 초기배아를 난구세포와 공배양할 경우 임신율의 향상에 도움이 되리라 사료된다.

결론

시험관아기 시술에 이용되는 배양액의 조성분은 초기배의 체외발달 뿐만 아니라 그에 따른 이식후 착상 및 임신에 영향을 미치기 때문에 매우 중요하다. 이 중 배양액내 glucose와 phosphate 성분의 유용성에 대해서는 현재 많은 연구가 진행중이다. 본 연구는 난구세포와의 공배양을 통한 IVF-ET 시스템에서 glucose와 phosphate가 제거된 m-TALP 배양액에서의 수정 및 초기배 배양이 이식후 임신율에 미치는 영향을 조사하고자 시행하였으며 그 결과는 다음과 같다.

1. 총 244 주기의 IVF-ET를 난자의 수정 및 수정란의 체외배양액에 따라 TCM-199 및 m-TALP군으로 나누었을 때 임신율은 각각 26.8% 및 43.8%로 m-TALP군이 유의적으로 높았다 ($P < 0.05$).

2. 연령에 따른 임신율은 TCM-199 및 m-TALP군에 있어서 30세 이하에서는 각각 44.4%, 49.0%, 31 35세 사이에서는 각각 26.1%, 41.3%, 36세 이상에서는 각각 29.2%, 41.2%로 m-TALP군이 높은 경향을 나타내었다.

따라서 본 연구의 결과로 보아 난자의 수정 및 체외배양에는 glucose와 phosphate를 첨가하지않은 배양액을 이용하는 것이 이식후 임신율을 향상시키는데 도움이 된다고 사료된다.

인용문헌

Bavister BD: Role of oviductal secretions in embryonic growth in vivo and in vitro. Theriogenology 1988, 29, 143-154.

Bongso A, Ng SC, Sathananthan H, Ng PL, Rauff M, Ratnam SS: Improvement quality of human embryos when co-cultured with human ampullary cells. Hum Reprod 1989, 4, 700-713.

Bongso A, Ng SC, Fong CY, Anandakumar C, Marshall B, Edirisingghe R, Ratnam S: Improved pregnancy rate after transfer of embryos grown in human fallopian tubal cell coculture. Fertil Steril 1992, 58, 569-574.

Bongso A, Fong CY, Ng SC, Ratnam S: Human embryonic behavior in a sequential human oviduct-endometrial coculture system. Fertil Steril 1994, 61, 976-978.

Check JH, Lurie D, Callan C, Baker A, Benfer K: Comparison of the cumulative probability of pregnancy after in vitro fertilization-embryo transfer by infertility factor and age. Fertil Steril 1994, 61, 257-261.

Conaghan J, Handyside, AH, Winston RML, Leese HJ: Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos in vitro. J Reprod Fertil 1993, 99, 87-95.

Dan-Goor M, Sasson S, Davarashvili A, Almagor M: Expression of glucose transporter and glucose uptake in human oocytes and preimplantation embryos. Hum Reprod 1997, 12, 2508-2510.

Freeman MR, Bastias MC, Hill GA, Osteen KG: Co-culture of mouse embryos with cells isolated from the human ovarian follicle oviduct, and uterine endometrium. Fertil Steril 1993, 59, 138-142.

Gardner DK: Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. Theriogenology 1998, 49, 83-102.

Gardner DK, Lane M: Alleviation of the '2-cell block' and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters. Hum Reprod 1996, 11, 2701-2712.

Gardner DK, Lane M: Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF?. Hum Reprod Update 1997, 3, 367-382.

Gardner DK, Lane MW, Lane M: Bovine blastocyst cell number is increased by culture with EDTA for the first 72 h of development from the zygote. Theriogenology 1997, 47, 278.

Gardner DK, Leese HJ: The role of glucose and pyruvate transport in regulating nutrient utilization by preimplantation mouse embryos. Development 1988, 104, 423-429.

Hoppe PC: Glucose requirement for mouse sperm capacitation in vitro. Biol Reprod 1976, 15, 39-45.

Lane M, Gardner DK: Differential regulation of mouse embryo developments and viability by amino acids. J Reprod Fertil 1997, 109, 153-164.

Menezo Y, Guerin JF, Czyba JC: Improvement of human early embryo development in vitro by coculture on monolayers of vero cells. Biol Reprod 1990, 42, 301-306.

Menezo Y, Hazout A, Dumount M, Herbaut N, Nicollet B: Coculture of embryos on vero cells and transfer of blastocysts in humans. Hum Reprod 1992, 7(suppl.1), 101-106.

O"Fallon JV, Wright RW: Quantitative determination of the pentose phosphate pathway in preimplantation mouse embryos. Biol. Reprod 1986, 34, 58-64.

Quinn P: Use of coculture with cumulus cells in insemination medium in human in vitro fertilization (IVF). J Assist Reprod Genet 1994, 11, 270-277.

Quinn P: Enhanced results in mouse and human embryo culture using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate. J Assist Reprod Genet 1995, 12, 97-105.

Reed ML, Jin DI, Petters RM: Glucose and inorganic phosphate inhibits rat 8-cell embryo development in vitro. Theriogenology 1992, 37, 282.

Schini SA, Bavister BD: Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. Biol Reprod 1988, 39, 1183-1192.

Serour G, Mansour R, Aboulghar M, Kamal A, Tawab N, Ramzi A, Sattar M: Factors affecting the results of ICSI in 650 cycles. 12th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Maastricht, Netherlands, June 1996, abs 110.

Seshagiri PB, Bavister BD: Glucose inhibits development of hamster 8-cell embryo in vitro. Biol Reprod 1989, 40, 599-606.

Steptoe PC, Edwards RG: Birth after reimplantation of human embryo. Lancet 1978, 2, 366.

Tan SL, Royston P, Campbell S, Jacobs HS, Betts J, Mason B: Cumulative conception and live birth rates after in vitro fertilization. Lancet 1992, 339, 1390-1394.

Thompson JGE, Simpson AC, Pugh PA, Wright RW, Tervit HR: Glucose utilization by sheep embryos derived in vivo and in vitro. Reprod Fertil Dev 1991, 3, 571-576.