

체세포의 공배양체계에서 단일 에너지원이 인간 배반포기 배의 형성에 미치는 영향

대구대학교 축산학과¹, 한미산부인과의원 불임센터²

박기상¹ · 최인경^{1,2} · 이진식² · 송해범¹

The Effects of Glutamine on Blastulation of Human Embryos on Vero Cells *In Vitro*

Kee-Sang Park¹, In-Kyung Choi^{1,2}, Jin-Shik Lee² and Hai-Bum Song¹

¹Department of Animal Science, Taegu University and ²Infertility Medical Center,
Han-Mee Women's Clinic, Korea

= Abstract =

This study was conducted to investigate the effects of Tissue Culture Medium 199 (TCM) and Dulecco's Modified Eagle Medium (DMEM) on the blastulation and grade of human oocytes on Vero cells *in vitro*.

A cohort of 79 and 93 oocytes in metaphase II stage were used in TCM 199 and DMEM respectively. No differences were found in the number of oocytes showing two-pronuclei between TCM (82.3%) and DMEM (86.0%). The number of fertilized oocytes reaching the blastocyst was not significant in TCM (60.0%) and DMEM (63.1%). A total of 89 blastocysts were categorized into the four grades (BG1, BG2, BG3 and early) depending on their morphology. The number of embryos achieving the blastocyst grade 1 (BG1) was significantly higher ($p < 0.05$) in DMEM (50.8%) than TCM (15.0%).

It is concluded that cultured oocytes in DMEM with glutamine on Vero cells should be significantly increased BG1.

Key Words: Tissue Culture Medium 199 (TCM), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Two-pronuclei, Blastulation, Blastocyst, Blastocyst grade 1 (BG1)

서 론

인간의 자궁은 배란 후 5~7일 경에 착상을 위한 최상의 생리적 상태로 되기 때문에 포배강이 형성된 (cavitated) 배반포기 배 (blastocyst)가 fallopian tube에서 자궁내로 들어가 착상이 성공적으로 이루어지게 된다 (Schillaci 등, 1994; Gardner와 Lane, 1997). 그러나 체외수정기술 (IVF cycle)에서 자궁에 수정란을 이식하는 시기는 일반적으로 난자 채취 2 또는 3일 후에 실시하고 있

는데 (Dokras 등, 1993; Turner and Lenton, 1996), 그 이유는 배양기간이 길어지면 수정란의 발달이 중지되거나 degeneration이 증가되어 이식할 수 있는 배아의 수가 줄어 들기 때문이다 (Dokras 등, 1993; Huisman 등, 1994). 이와 같은 현상은 부적절한 배양조건 (Schillaci 등 1994) 중에서 에너지원의 조절이 부적절하기 때문인데, 인간에서 수정란은 난관을 통하여 자궁으로 들어가는 동안 이용할 수 있는 에너지원이 다르다. 자궁이 난관보다 상대적으로 glucose의 농도는 높고 pyruvate와 lactate의 농도는 낮게 나타나는데, 이는 초기

배발달에 에너지원으로 glucose가 상대적으로 많이 사용되지 않기 때문일 것이다 (Gardner와 Lane, 1997). Hamster의 수정란은 에너지를 생산하는데 있어서 glycolysis를 이용하지 못하는 "Crabtree effect" (Crabtree, 1929; Koobs, 1972) 때문에 배양액에 에너지원으로 첨가된 glucose는 배반포기까지의 배발달에 유해한 영향을 미친다 (Seshagiri와 Bavister, 1989; Barnett과 Bavister, 1996). Glutamine은 mouse의 수정란에서 metabolic source로서 이용되는데, glutamine transaminase를 통하여 에너지가 생산된다. 체외에서 배양하여 얻은 배반포기 배 중에서 발생능력은 grade에 따라 다르게 나타나고 있다. 포배기 배의 grade는 BG1, BG2 및 BG3로 나눌 수 있는데, hatching과 attachment율이 다르게 나타났으며, attachment 후 hCG 생성율에 있어서도 grade에 따라 다르게 나타나서, 포배기 배의 grade에 따라 착상율과 임신율에 직접적으로 관련이 있는 발생능력이 다르게 나타날 수 있다 (Dokras 등, 1993; Turner와 Lenton, 1996).

본 실험은 체세포 공배양체계에서 에너지원이 각기 다르게 함유된 TCM과 DMEM이 인간 배반포기 배의 형성과 배반포기 배의 grade에 미치는 영향을 조사함으로써 체외수정기술에서 배아의 착상율과 임신율을 향상시킬 수 있는 방법을 모색하기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

1. 배양액의 준비

정자의 처리에 사용한 F-10 Nutrient Mixture Medium (F-10, 11550-043, Gibco, USA)은 0.8 mM Ca-lactate (276044X, BDH, UK), 5.1 mM KHCO₃ (P-9144, Sigma, USA) 및 20 mM NaHCO₃ (S-5761, Sigma, USA)를 첨가하여 제조하였다. 난자의 수정과 배양에는 TCM (11150-059, Gibco, USA) 또는 DMEM (11966-025, Gibco, USA)을 사용하였고, Vero cell의 준비에는 TCM을 이용하였다. 모든 배양액은 0.5% antibiotics (Streptomycine sulfate, S-9137; Penicillin-G, P-3032, Sigma, USA)를 첨가한 다음 삼투압 측정기 (Osmomat 030, Gonotec, Germany)를 이용하여 삼투압을 280 mOsm/kg으로 보정하였다. 삼투압을 보정하고 나서 0.2 µm의 여과기 (Minisart 17597, Sartorius, Germany)로 제균하면서 14 ml tube (2001, Falcon, USA)에 분주한 다음 4°C에서 보관하였다. 배양액은 95%

이상의 습도, 37°C 및 5% CO₂를 유지하고 있는 배양기 (3154, Forma, USA)에서 6시간 이상 평형시킨 다음 이용하였다.

2. 난자의 준비

과배란은 gonadotrophin releasing hormone agonist (GnRHa)를 이용한 장기요법을 실시하여 유도하였다. Mid-luteal phase의 환자에게 하루 300 µg의 Buserelin (Suprefact, Hoechst, Germany)을 두번씩 투여하고, follicular phase 3일째에 225 IU의 human menotrophins [human menopausal gonadotropin (hMG, Pergonal, Serono, Italy)] 와/또는 follicle stimulation hormones (FSH, Urofollotropin, Metrodin, Serono, Italy)을 GnRHa와 병용하여 4일간 투여했다. 매일의 oestradiol의 농도, 난포수 및 난소의 크기를 기초로 한 난소 반응에 따라 menotrophins의 투여량을 결정하였다. 난소는 과배란 유도를 시작하지 6~8일째에 초음파 검사와 oestradiol의 농도를 측정하여 과배란유도의 정도를 측정하였다. 난포의 직경이 18 mm 이상인 것이 1개 이상이고 oestradiol의 농도가 900 pg/ml 이상일 때 10,000 IU의 human chorionic gonadotrophin (hCG, Profasi, Serono, Italy)을 투여하여 배란을 유도하였다. hCG를 주사한 후 36~38시간 제에 질식 초음파를 이용하여 난포에서 난자를 채취하였다.

채취한 난자는 37°C와 5% CO₂로 조절된 조작기 (IVF chamber, Illjin, Korea)내에서 해부현미경을 이용하여 난구세포의 특징을 기준으로 난자의 성숙 정도를 확인 (Veeck, 1991)한 다음, 10% human follicular fluid (hFF)를 첨가한 TCM 또는 DMEM이 들어 있는 배양접시 (3260, Costar, USA)로 옮겨 수정시기까지 배양기에서 배양하였다. 수정에 이용하는 난자는 배양접시 당 5개 이하가 되도록 조절하였다.

3. 난포액 (hFF, human follicular fluid)의 준비

hFF는 체외수정 기술을 하고 있는 환자 중에서 성숙 난자를 갖고 있는 난포에서 회수한 난포액에 혈액이 거의 섞이지 않은 것을 회수하여 이용하였다. 회수한 hFF는 원심분리 (3,500 rpm)를 2회 (30분, 10분) 실시하여 상층액 만을 회수한 후 56°C에서 35분간 불활성화시켜 0.2 µm의 여과기로 여과하여 제균하고 나서 -20°C에 보존하다가 용해하여 사용하였다. 용해 후 2일이 경과

한 것은 실험에서 제외하였다.

4. 체외수정

정자는 난자를 채취하기 전에 수음 (masturbation)을 이용하여 정액을 회수하였고, 정자의 농도와 운동성은 World Health Organization Criteria (WHO, 1993)에 따라 측정하였으며, 정액이 액상화되고 나서, 10% hFF가 첨가된 F-10 배양액으로 1,500 rpm에서 2회 (5분, 3분) 원심분리하여 세척하였다. 세척 후 pellet이 흩어지지 않게 1 ml의 F-10 배양액을 조심스럽게 첨가하여 1시간 동안 배양기 내에서 정자를 부유시켰다. 부유된 정자는 5 ml tube (2003, Falcon, USA)에 보관하면서 수정에 이용하였다.

수정에 이용하는 정자는 200,000마리가 되게 수정 시기의 난자가 있는 2 ml의 배양액 내로 주입하였다. 다음날 아침, 37℃와 5% CO₂로 조절된 조작기 내에 있는 해부현미경 하에서 syringe needle (320310, Becton Dickinson, USA)을 이용하여 난구세포를 제거하고 수정여부를 조사하였다. 자성전핵과 응성전핵이 형성되어 있고 두개의 극체가 있는 것을 수정이 된 것으로 확인하였다.

5. Vero cell의 준비

Vero cell은 Ouhibi 등 (1989)의 방법에 따라 동결되어 있는 cell을 용해하여 2-3 × 10⁶ cell을 세척한 후 flask에서 4일 동안 (6-8 × 10⁶ cell) 배양하고, trypsin을 처리하여 cell suspension을 시켜서 3개 정도로 나누어 준비하였다. 이 중에서 한개는 새로운 flask에서 배양을 하고, 하나는 동결하고, 나머지 한개는 배양접시에 monolayer를 형성하도록 2 ml의 배양액에 200,000 cell의 농도로 조절하여 약 3일간 배양하였다. 배양액은 10% fetal bovine serum (FBS, 26140-079, Gibco, USA)이 첨가된 TCM 배양액을 이용하였다. Vero cell의 동결과 용해도 Ouhibi 등 (1989)의 방법을 이용하였다.

6. Vero cell monolayer 상에서의 수정란 공배양

수정이 확인된 난자는 Vero cell과 공배양을 실시하였다. 공배양 접시의 준비는 공배양을 실시하기 하루 전날 20% hFF가 첨가된 TCM 또는 DMEM으로 교체하였으며, 2~3일 후에 이와같은 방법으로 준비된 새로운 배양접시로 옮겨주는 방법으로 신선한 배양액을 교체하면서 배반포기 배가 될 때까지 배양하였다.

7. 배반포기 배의 grade

배반포기 배의 grade (BG)는 Dokras 등 (1993)의 방법에 따라, BG1은 early cavitation되고 나서 expanded cavity (ICM과 trophoctoderm layer로 구분되는)가 있는 것으로 하였다. BG2는 initial cavitation 후 1~2일 후에 BG1의 모양이 되는 것 ("late" 또는 "slow" developper)으로 하였으나, initial cavitation 후 1~2일 간 배양을 하지 않고 5일 째에 바로 이식을 실시한 경우에는 초기 배반포기 배 (early blastocyst)로 하였다. 그리고 BG3는 처음에 vacuole이 보이고 나서 degenerative foci가 보이는 것으로 하였는데, vacuole morula는 vacuole에 의해서 cavity로 보일 수도 있고, BG3는 ICM과 trophoctoderm이 잘 보이지 않아 초기 배반포기 배와 구별하기 힘든 경우도 있다.

8. 분석

성숙 난자를 에너지원이 다르게 함유된 배양액인 TCM 또는 DMEM으로 옮겨 수정을 시키고 수정율을 비교하였다. 수정이 확인된 수정란은 난자 채취 후 5~7일간 Vero cell과 공배양을 지속하면서 배양액에 따른 배반포기 배의 출현율과 배반포기 배의 grade에 미치는 효과를 조사하였다.

결과에 대한 분석은 통계프로그램인 SAS (Statistical Analysis System, 1988) package를 이용하였다. 평균에 대한 유의성은 t-test를 실시하여, 5% 유의수준에서 검정하였다.

결 과

21쌍의 불임 환자로 부터 회수한 총 172개의 성숙난자 (Metaphase II)를 TCM (n=93, 11 cycle)과 DMEM (n=79, 10 cycle)으로 나누어 수정과 배양을 실시하였다. 172개의 난자중에서 수정이 이

Table 1. Effects of different culture media on *in vitro* fertilization of human oocytes

Treatment	No of cycles examined	No of embryos cultured	Fertilization (%) ^a
DMEM	10	79	65 (82.3)
TCM	11	93	80 (86.0)

^aNo significant differences

Table 2. Effects of different culture media on development of *in vitro* fertilized oocytes

Treatment	No of cycles examined	No of embryos cultured	Blastocyst (%)				
			Total	BG1	BG2	BG3	Early
DMEM	10	65	41 (63.1)	33 (50.8) ^a	4 (6.2)	1 (1.5)	5 (7.7) ^a
TCM	11	80	48 (60.0)	12 (15.0) ^b	4 (5.0)	4 (5.0)	28 (35.0) ^b

^{a-b}Within columns treatments with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

루어진 145개의 수정란 (TCM: 80; DMEM: 65)을 Vero cell과 공배양하여 채란 후 5~7일까지 배양하여 배반포기까지의 발달능력을 조사하였다.

성숙난자 중에서 수정이 이루어진 난자의 수는 TCM 86.0% (80/93)과 DMEM 82.3% (65/79)사이에서 차이가 없었다 (Table 1).

수정란 중에서 배반포기까지의 발달율에 있어서도 TCM 60.0% (48/80)과 DMEM 63.1% (41/65)간에 차이가 없었다 (Table 2). 그러나 배반포기 배의 형태에 따라 BG1, BG2 와 BG3 및 early로 grade를 나누어 살펴보면, 임신율을 높이는데 가장 좋은 형태를 갖고 있는 것으로 알려진 BG1의 출현율은 DMEM 50.8% (33/65)이 TCM 15.0% (12/80)보다 현저히 ($p < 0.05$) 높게 나타났다 (Table 2). BG2와 BG3의 출현율은 두 배양액간에 차이가 없었다. 그러나 초기 배반포기 배 (early blastocyst)의 출현율은 TCM 35.0% (28/80)이 DMEM 7.7% (5/65) 보다 높게 ($p < 0.05$) 나타났다. 따라서 체세포 공배양체계에서 발달능력이 가장 우수한 BG1을 갖고 있는 인간 배반포기 배의 출현율은 DMEM이 TCM 보다 더 우수하였다.

고 찰

Table 1과 2에서 보는 바와 같이 배양액에 따른 수정을 및 전체 배반포기 배의 출현율에는 차이가 없었다. 그러나 배반포기 배의 grade에 미치는 효과를 보았을 때, 임신율과 가장 밀접한 관계가 있는 것으로 알려진 BG1의 출현율은 DMEM (50.8%)이 TCM (15.0%) 보다 유의하게 ($p < 0.05$) 높게 나타났다. 그러나 초기 배반포기 배 (early blastocyst)의 출현율은 TCM (35.0%)이 DMEM (7.7%) 보다 높았다 ($p < 0.05$). 따라서 DMEM에 에너지원으로 포함되어 있는 glutamine은 수정란의 발달을 촉진시키는 것에 비하여 TCM에 포함되어 있는 glucose는 배의 발달을 지연시킨 원인이 되는 것으로 생각된다.

Barnett 과 Bavister (1996)는 1 mM의 glutamine 과 0.1~0.25mM의 pyruvate가 들어 있는 HECM 배양액에 glucose/inorganic phosphate (Gu/Pi, 5 mM/0.35 mM)의 첨가 유무에 따라 hamster 2 세포기의 배를 배반포기까지 배양할 때, 무첨가군 (75%)이 첨가군 (36%)보다 유의하게 ($p < 0.05$) 높아서 Glu/Pi가 배의 발달에 저해작용을 한다고 하였다. 이와 같은 저해작용은 Glu/Pi action에 의한 glycolysis 때문에 일어나는데, 과도한 glycolysis가 일어나면 cytosolic metabolism과 mitochondrial metabolism 사이의 균형을 잡기 위해서 oxidative phosphorylation이 일어나게 되어 배의 발달에 유해한 역할을 하게 되는 것으로 알려져 있다 (Crabtree effect; Crabtree, 1929; Koobs, 1972).

Seshagiri 와 Bavister (1989)도 hamster 8 세포기의 배를 배반포기까지 배양할 때 glucose는 배의 발달에 저해작용을 하는 것으로 보고하였는데, hamster 8 세포기의 배는 energy를 생산하는데 있어서 glycolysis를 이용하지 못하는 "Crabtree effect" (Crabtree, 1929; Koobs, 1972)가 있기 때문이라고 하였다. 이와 같은 "Crabtree effect" 작용으로 여러 가지 에너지원이나 단백질원의 oxidative potential이 줄어 들게 되어 결과적으로 Krebs cycle을 통한 지속적인 catabolism이 억제되어 결과적으로 배의 발달에 유해한 작용을 하게 된다 (Seshagiri와 Bavister, 1989; Barnett와 Bavister, 1996).

Glutamine은 glutamine transminase를 통하여 2-oxoglutarate로 변하여 에너지를 생산하는데 (Hornsby, 1982), mouse embryo는 metabolic source로서 glutamine을 이용한다 (Nasr-Esfahani 등, 1992). Gardner와 Lane (1997)은 사람에서 pyruvate, lactate, glucose와 같은 에너지원의 농도가 oviduct (0.32, 10.5, 0.50 mM)와 uterus (0.10, 5.87, 3.15)에서 각기 다르게 나타나는데, oviduct가 uterus 보다 상대적으로 glucose의 농도가 낮기 때문에 배반포기가 되기 전의 초기 배의 발달에는 에너지 원으로서 glucose를 상대적으로 필요로 하지 않

는다고 하였다.

Dokras 등 (1993)과 Turner와 Lenton (1996)은 배반포기 배를 형태적인 차이에 따라 BG1, BG2 및 BG3 등 3가지로 구분할 수 있는데, 착상능력은 grade에 따라 다르게 나타난다고 하였다. 발생능력이 가장 우수한 것은 BG1인데, BG1 보다 발달이 1~2일 늦어 6~7일째에 BG1의 형태가 되는 BG2는 BG1에 비하여 초기 착상능력이 저조하여 배반포기 배를 당일 이식해야 하는 경우에는 착상율과 임신율이 떨어지게 된다. 그러나 BG2를 동결하고 나서 자궁의 착상단계에 맞추어 융해 한 다음 이식하면 착상율과 임신율이 BG1에 비하여 차이가 없다고 하였다. BG3는 자궁의 착상단계와는 무관하게 BG1이나 BG2에 비하여 임신율이 현저하게 떨어진다. 대부분의 배반포기 배가 방출하는 hCG는 10~11일에 최대에 도달하고 그 이후로는 줄어들게 된다 (Dokras 등, 1993).

BG1과 BG2에서 방출하는 hCG는 초기의 방출 pattern에서 차이가 있는데, BG1은 8일과 9일에 BG2보다 유의하게 높다고 보고되어 있다 (Dokras 등, 1993). 따라서 배반포기 배의 grade는 잠재적인 발달능력 (developmental potential)과 직접적으로 연관이 있다고 할 수 있다 (Dokras 등, 1993, Turner와 Lenton, 1996).

본 연구에서 얻어진 결과에서는 배양액 간에 수정율에는 차이가 없었지만, 에너지원으로 glutamine만 첨가되어 있는 DMEM이 glucose와 glutamine이 복합적으로 첨가되어 있는 TCM 보다 임신율과 직결되는 BG1의 생산에 더 효과적인 것으로 나타나서, TCM 배양액에 첨가되어 있는 glucose가 배의 발달을 지연시킨 것으로 보인다.

수정이 이루어진 난자를 5~7일간 배양하면 부적절한 배양환경으로 인해서 배반포기 배의 형성이 저조하게 나타나게 되므로 (Gardner와 Lane, 1997), human ampullary cells (Bongso 등, 1989), bovine uterine fibroblasts (Wiemer 등, 1989) 및 monkey Vero cells (Schillaci 등, 1994; Turner와 Lenton, 1996; Gardner와 Lane, 1997)와 같은 feeder cell을 이용하여 공배양을 실시하고 있다.

본 연구에서 얻어진 결과에서도, 체외에서 인간 난자를 배반포기까지 배양하는데 Vero cells를 이용한 체세포 공배양체계에서 단일 에너지원으로 glutamine이 첨가된 DMEM 배양액을 효과적으로 이용할 수 있었다.

결 론

본 연구는 체외수정시술에서 배아의 착상율과 임신율을 향상시킬 수 있는 방안을 모색하기 위하여 체세포 공배양체계에서 에너지원이 다르게 함유된 배양액인 TCM과 DMEM이 인간 배반포기 배의 형성과 배반포기 배의 grade에 미치는 영향을 조사하였으며 그 결과는 아래와 같다.

1. 배양액에 따른 수정율에서는 TCM (86.0%)과 DMEM (82.3%)에서 차이가 나지 않았다.

2. 수정이 이루어진 난자를 각각의 배양액이 첨가된 Vero cell과 공배양하고 나서 전체 배반포기 배의 출현율을 보았을 때 TCM (60.0%)과 DMEM (63.1%)에서 차이가 나지 않았다.

3. 배반포기 배를 형태에 따라 grade를 BG1, BG2, BG3 및 early로 나누어 살펴 보았을 때, 발생능력이 가장 우수한 것으로 알려진 BG1의 출현율은 DMEM (50.8%)이 TCM (15.0%) 보다 높게 ($p < 0.05$) 나타났다. 반면, 초기 배반포기 배 (early blastocyst)의 출현율은 TCM (35.0%)이 DMEM (7.7%) 보다 높게 ($p < 0.05$) 나타나서, TCM에 첨가되어 있는 glucose가 배의 발달에 유해한 작용을 한 것으로 사료된다.

따라서 Vero cell을 이용한 공배양체계에서 에너지원으로 glucose와 glutamine이 혼합된 TCM 보다는 glutamine이 단독 첨가된 DMEM이 blastocyst-ET를 위한 배양체계에 효과적으로 이용될 수 있을 것이다. 그러나 배반포기 배의 형성에 미칠 수 있는 여러 가지 에너지원 간의 상호적 관계에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다.

인 용 문 헌

- Barnett DK, Bavister BD: Inhibitory effect of glucose and phosphate on the second cleavage division of hamster embryos: is it linked to metabolism? *Hum Reprod* 1996, 11, 177-183.
- Bongso A, Ng SC, Sathanathan H, Ng PL, Rauff M, Ratnam SS: Improved quality of human embryos when co-cultured with human ampullary cell. *Hum Reprod* 1989, 4, 706-713.
- Crabtree HG: Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem J* 1929, 23, 536-545.

- Dokras A, Sargent IL, Barlow DH: Human blastocyst grading: an indicator of developmental potential? *Hum Reprod* 1993, 12, 2119-2127.
- Gardner DK, Lane M: Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Hum Reprod Update* 1997, 3, 367-382.
- Huisman GJ, Verhoeff A, Alberda AT, Zeimaker GH, Leerentveld RA: A comparison of *in vitro* fertilization results after embryo transfer after 2, 3, and 4 days of embryo culture. *Fertil Steril* 1994, 61, 970-971.
- Koobs HD: Phosphate mediation of the Crabtree and Pasteur effects. *Science* 1972, 178, 127-133.
- Nasr-Esfahani MH, Winston NJ, Johnson MH: Effects of glucose, glutamine, ethylenediaminetetraacetic acid and oxygen tension on the concentration of reactive oxygen species and on development of the mouse preimplantation embryos *in vitro*. *J Reprod Fert* 1992, 96, 219-231.
- Ouhibi N, Menezo Y, Benet G, Nicollet B: Culture of epithelial cells derived from the oviduct of different species. *Hum Reprod* 1989, 4, 229-235.
- SAS/STAT: User's guide. release 6.03 edition SAS institute Inc., 1988, Cary. NC. USA.
- Schillaci R, Ciriminna R, Cefalu E: Vero cell effect on *in vitro* human blastocyst development: preliminary results. *Hum Reprod* 1994, 9, 1131-1135.
- Seshagiri PB, Bavister B: Phosphate is required for inhibition by glucose of development of hamster 8-cell embryos *in vitro*. *Biol Reprod* 1989, 40, 607-614.
- Turner K, Lenton EA: The influence of Vero cell culture on human embryo development and chorionic gonadotrophin production *in vitro*. *Hum Reprod* 1996, 11, 1966-1974.
- Veeck LL: Atlas of the human oocyte and early conceptus Volume 2. 1991, Maryland, Williams and Wilkins Press.
- Wiemer KE, Cohen J, Wiker S, Malter H, Wright G, Godke RA: Coculture of human zygotes on fetal bovine uterine fibroblasts: embryonic morphology and implantation. *Fertil Steril* 1989, 52, 503-508.
- World Health Organization: Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction 3rd ed. 1993, New York, Cambridge University Press.