

## 체외수정 시술시 배양액에 첨가된 과립구 대식세포 증식인자 (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor)의 효과

을지의과대학교 산부인과<sup>1</sup>, 생리학교실<sup>2</sup>, 을지병원 의과학연구소<sup>3</sup>

박원일<sup>1</sup> · 권혁찬<sup>1</sup> · 김동훈<sup>3</sup> · 강희규<sup>3</sup> · 김묘경<sup>3</sup> · 이회창<sup>3</sup>  
정지학<sup>1</sup> · 이명섭<sup>1</sup> · 이호준<sup>2,3</sup>

### The Effect of GM-CSF Supplementation in Culture Medium in the Human IVF Programs

Won Il Park<sup>1</sup>, Hyuck Chan Kwon<sup>1</sup>, Dong Hoon Kim<sup>3</sup>, Hee Kyo Kang<sup>3</sup>, Myo Kyung Kim<sup>3</sup>,  
Hoi Chang Lee<sup>3</sup>, Ji Hak Jung<sup>1</sup>, Myong Seop Lee<sup>1</sup>, Ho-Joon Lee<sup>2,3</sup>

*Department of OB/GYN<sup>1</sup> and Physiology<sup>2</sup>, Eulji University School of Medicine,  
Medical Science Institute<sup>3</sup>, Eulji General Hospital, Seoul, 139-711, Korea*

**Objective:** Granulocyte-macrophage colony stimulating factors known to be secreted in murine and human reproductive tract. The development of human, bovine and murine embryos could be promoted by addition of GM-CSF in culture medium. However, the pregnancy and implantation rate of embryos cultured in GM-CSF have not been evaluated. The aim of this study was to assess the effect of GM-CSF in embryo development, pregnancy and implantation rate.

**Methods:** A total of 191 IVF cycles were divided into control and GM-CSF supplement group (control =96, GM-CSF=95). The embryos were cultured for three day with or without 2 ng/ml of recombinant human GM-CSF. The quality of embryo, developmental velocity, pregnancy and implantation rates were compared.

**Results:** There was no difference in age, number of gonadotropin ampules used, number of oocytes and fertilization. The number of ICSI cycle was higher in GM-CSF group. In GM-CSF group, G-1 grade embryos were the highest in proportion (56.4%), while G-2 grade embryos were highest (44.3%) in control group. The developmental velocity of embryos were not different between GM-CSF and control group. The pregnancy and implantation rates were significantly higher in GM-CSF group than control (47.4% vs. 33.3%, 17.0% vs. 11.1% respectively).

**Conclusion:** By adding GM-CSF in culture medium, the quality of embryo, pregnancy and implantation rate could be improved.

**Key Words:** GM-CSF, Embryo, IVF

최근 들어 보조생식술은 광범위하게 이루어지고 있으나, 아직도 체외에서 배양된 배아의 발달 속도와 착상율은 자연임신의 경우에 비해 낮은 실정이다.

다. 최근 이러한 문제점을 극복하기 위한 시도로서 배아를 체외에서 장기 배양하여 포배기까지 발달시켜 이식을 하게 되면 배아의 착상율을 증가시킬 수

**Table 1.** Characteristics of study subjects

	Control (IVF/ICSI)	GM-CSF (IVF/ICSI)
No. of cycles	96 (59/37)	95 (27/68)*
Age	34.7±4.3 (34.7/34.6)	33.6±5.0 (34.2/32.1)
Ampules of gonadotropin	28.5±3.7 (26.1/30.9)	31.6±4.5 (30.8/33.4)
No. of oocytes	884 (553/331)	1131 (358/773)
No. of mature oocytes	536 (257/279)	792 (143/649)
No. of embryos transferred	4.1±2.0 (4.4/3.7)	4.7±1.9 (4.8/4.6)

\*p<0.05, chi square test, Values are mean ± SE

있다는 보고가 있으나,<sup>1</sup> 이 또한 모든 기관에서 가능한 방법은 아니며 포배 발달율이 낮다는 점, 그리고 포배기까지 배양시 발달 속도는 자연임신의 경우보다 더 늦어져서 자궁내막과의 시간적 불균형이 초래된다는 문제점도 지적되고 있다.

배아의 체외배양에 있어서, 배양조건을 향상하려는 시도는 많은 연구자들에 의하여 진행되어져 왔으며, 최근 들어 몇 가지 cytokine과 성장인자 (growth factor)가 배아의 발달에 중요한 역할을 한다는 것이 알려지고 있다. 대표적 물질로는 표피성 성장인자 (epidermal growth factor: EGF),<sup>2</sup> 인슐린양 성장인자 (insulin-like growth factor-1: IGF-1),<sup>3</sup> 백혈병 억제인자 (leukemia inhibitory factor: LIF),<sup>4</sup> 및 colony stimulating factor-1 (CSF-1) 등을 들 수 있다.<sup>5</sup> 이들 물질은 주로 난관과 자궁의 상피세포로부터 분비되며 주로 배란 전후부터 착상기에 분비되어 배아에 작용하는 것으로 믿어지고 있으며, 많은 경우에 이들 물질에 대한 수용체가 배아에서 확인되어 이들 물질이 배아 발달에 관여할 것이라는 추측에 신빙성을 더하게 되었다.

사람의 경우에도 이들 물질을 배양액에 첨가한 경우 배 발달을 촉진시킨다는 보고가 계속되고 있다. LIF를 첨가한 경우 사람의 배아에서 포배기까지의 발달율이 향상되며, 배아의 등급도 향상된다는 보고가 있으며,<sup>4</sup> EGF를 첨가한 경우에는 배 발달율과 부화율이, IGF-1을 첨가한 경우에는 배 발달율 및 배반포 내의 세포수가 증가한다는 보고가 있다.<sup>3</sup> 최근 GM-CSF를 첨가한 경우 냉동 배아의 배 발달이 향상되고, 특히 inner cell mass의 세포수가 증가된다는 보고가 있었다.<sup>6</sup> 그러나 현재까지 사람의 배아로 대상으로 한 연구는 모두 잉여 배아를 사용하여 배

발달을 연구한 것으로 대상 배아 수는 100개 이하이며, 더욱이 임신율 및 착상율을 조사한 연구는 전무한 실정이다.

본 연구는 배양액 내 GM-CSF로 첨가한 경우 배아 발달의 향상은 물론 임신율과 착상율을 향상시킬 수 있을 것이라는 가정 하에 시작하였다.

## 연구 대상 및 방법

2000년 6월부터 2001년 4월 사이에 을지병원 불임 클리닉을 방문하여 체외수정 시술을 받을 대상으로 결정된 불임 부부를 GM-CSF 처리군과 대조군으로 나누어 전향적 연구를 실시하였다.

GM-CSF 처리군과 대조군이 각 100주기가 될 때까지 환자를 무작위로 나누었으며 환자 축적이 끝난 시점에서 두 군을 비교한 결과 나이, 불임기간, 배란 유도 방법, 사용된 성선자극 호르몬의 용량, 획득 난자수 등에서는 두 군간에 차이가 없었으나 세포질 내 정자 주입술 (ICSI)을 실시한 비율은 두 군간에 유의한 차이를 나타내었다 (Table 1).

각각 100주기의 환자를 대상으로 연구를 실시하였으나 주기 취소 (cycle cancellation), 이식 취소, 의무기록 미비 등으로 대조군 4주기, GM-CSF 처리군에서 5주기가 누락되었다.

환자 포함 항목 (inclusion criteria)은 conventional IVF와 ICSI를 시행하는 환자로 하였고 배란 유도 방법은 GnRH 유도체를 이용한 장기요법과 GnRH 유도체를 사용하지 않고 pureFSH만으로 배란 유도를 한 환자로 하였으며, 그 외 다른 방법에 의한 배란 유도는 연구에 포함되지 않았다. 배아 이식은 배

**Table 2.** Fertilization rate of oocytes

	Control (%)			GM-CSF (%)		
	Total	IVF	ICSI	Total	IVF	ICSI
2 PN	529	373 (67.5)	156 (56.0)	713	232 (64.8)	481 (74.1)
1 PN	14	7 (1.3)	7 (2.5)	36	16 (4.5)	20 (3.1)
3 PN	11	10 (1.8)	1 (0.4)	17	6 (1.7)	11 (1.7)

**Table 3.** Clinical results of GM-CSF supplementation

	Control (%)			GM-CSF (%)		
	Total	IVF	ICSI	Total	IVF	ICSI
No. of cases	96	59	37	95	27	68
Pregnancy	32 (33.3)	26 (44.1)	6 (16.2)	45 (47.4)*	17 (63.0)*	28 (41.2)*
On-going	26 (27.1)	20 (33.9)	6 (16.2)	37 (38.9)*	16 (59.3)*	21 (30.9)*
Implantation rate	11.1	15.0	4.3	17.0*	23.8*	14.2*

\*p&lt;0.05, Fisher exact test

**Table 4.** Pregnancy rate according to age of women

Age	Control (%)	GM-CSF (%)
≤ 29	7/14 (50.0)	11/19 (57.9)
30~34	11/33 (33.3)	21/38 (55.3)*
35~39	11/37 (29.7)	11/26 (42.3)
≥ 40	3/12 (25.0)	2/12 (16.7)

\*p&lt;0.05, Fisher exact test

양 후 3일에 실시한 환자를 대상으로 하였고, 배양 3일째와 5일째에 2회 배아 이식을 한 경우도 연구에서 제외하였다.

수정에 사용된 배양액은 P-1 배양액을 변형시킨 배양액에 10%의 합성 혈청 대체 용액 (synthetic serum substitute; SSS)이 포함된 배양액이었으며 수정 다음 날 아침, 난자의 수정 여부를 확인하였다. 정상 수정된 배아는 동일한 배양액에 20%의 SSS가 첨가된 배양액으로 발달시켰다. GM-CSF 처리군은 이 때 배양액에 recombinant human GM-CSF (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 2 ng/ml의 농도로 첨가하여 배양하였다.

이상의 조건에서 대조군과 GM-CSF 첨가군에서 배아의 등급 (grade), 배 발달 속도, 임신율, 착상율에

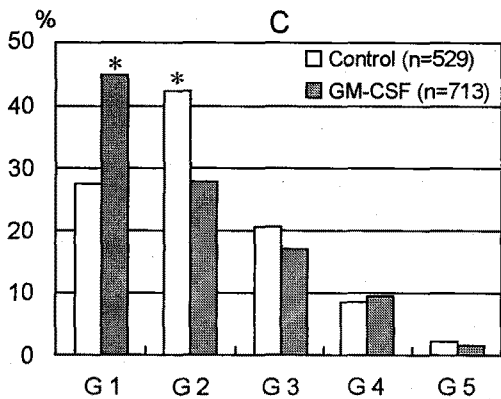
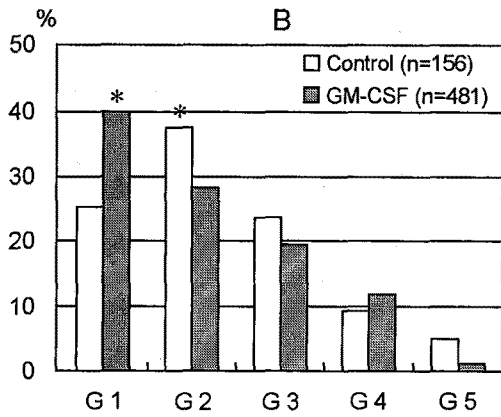
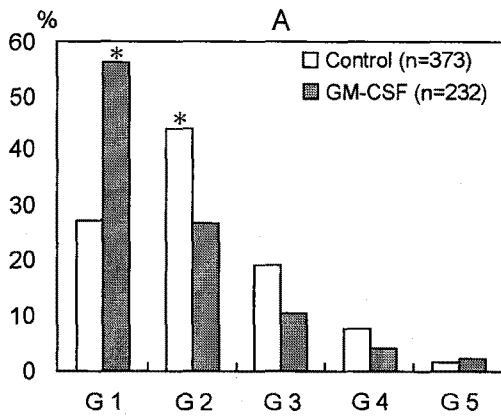
대하여 두 군간의 차이를 비교하였고, 또한 두 군간의 성적을 ICSI군과 conventional IVF군으로 나누어 비교하였다. 통계 처리는 t-test, chi-square test 및 Fisher-exact test를 사용하였으며, p값이 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의한 차이를 보이는 것으로 정의하였다.

## 결 과

난자의 수정율은 2PN, 1PN, 3PN의 빈도 모두 대조군과 GM-CSF군의 차이는 없었다. ICSI의 수정율은 대조군이 56%, GM-CSF군이 74.1%로 대조군에서 떨어지는 경향을 나타내었다 (Table 2).

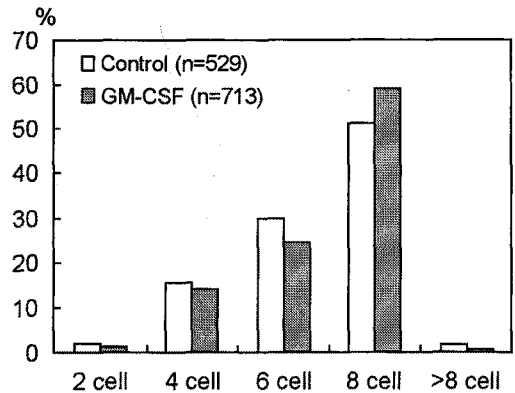
배아의 등급을 비교해 볼 때, IVF만을 대상으로 한 경우 GM-CSF군은 G-1이 56.4%로 가장 많았으나 대조군의 경우는 G-2 등급이 44.3%로 가장 많았다 (Figure 1A). ICSI만을 대상으로 조사한 경우에도 GM-CSF군은 G-1이 39.8%로 가장 많고 대조군은 G-2가 37.4%로 가장 많았다 (Figure 1B). IVF와 ICSI를 합하여 계산하면 GM-CSF군은 G-1이 44.8%, 대조군은 G-2가 42.3%로 동일한 분포를 나타내었다 (Figure 1C).

배아의 발달 속도를 비교해 보면 IVF만을 대상으로 한 경우에 GM-CSF군, 대조군 모두 8세포기 배아



**Figure 1.** Grade of embryos cultured in control (open bar) and GM-CSF (black bar) medium. Data represent IVF cycles (A), ICSI cycles (B) and IVF + ICSI cycles (C). \* $p < 0.05$ , chi square test

가 가장 높은 빈도를 차지하였으며 (각각 66.5% 및 50.6%), 이는 ICSI만을 비교한 경우에도 마찬가지



**Figure 2.** Developmental velocity of embryos cultured in control (open bar) and GM-CSF (black bar) medium for 3 days. Data include IVF and ICSI cycles. \* $p < 0.05$ , chi square test

8세포기 배아가 가장 많았다 (각각 56.3% 및 53.2%). ICSI와 IVF를 합하여 계산한 경우에도 GM-CSF군 및 대조군 모두 8세포기 배아가 가장 많았다 (각각 59.3% 및 51.4%, Figure 2).

임신율은 IVF만을 계산했을 때 44.1% 대 63.0%, ICSI만을 계산했을 때 16.2% 대 41.2%로 모두 GM-CSF군에서 유의하게 높게 나타났으며 두 경우를 합하여 계산해도 GM-CSF군이 47.4%, 대조군은 33.3%로 GM-CSF를 첨가한 경우 유의하게 증가하였다 (Table 3). 조기 유산을 제외한 On-going pregnancy의 경우도 IVF와 ICSI 각각의 경우 모두 GM-CSF군에서 높았으며, 이는 두 경우를 합하여 계산했을 때도 GM-CSF군은 38.9%, 대조군은 27.1%로 나타났다. 배아의 착상율은 조사했을 때에도 IVF와 ICSI 및 두 경우를 합했을 때 모두 GM-CSF군이 높게 나타났다.

임신율을 환자의 나이별로 비교해 볼 때, 모든 나이군에서 GM-CSF의 효과가 있는 경향을 보였으나, 통계적으로 유의한 차이로 보인 경우는 환자의 나이가 30~34세인 경우로 나타났다 (Table 4).

## 고찰

GM-CSF는 hematopoietic cells의 증식과 기능을 조절하는 cytokine의 일종이다. GM-CSF는 최초로 과립구와 단핵구의 증식과 분화를 유도하는 물질로 분리되었으며 144개의 아미노산으로 구성된 glycoprotein으로 분자량은 22,000 d인 것으로 알려져 있다.<sup>7</sup> 처음

에 GM-CSF는 T-임파구에서 분비되는 것으로 확인되었으나 현재까지 GM-CSF를 분비할 수 있는 세포는 T, B 임파구, 대식세포, 섬유아세포, 혈관 내피세포, 골아세포 등 정상적 상태에서도 10여 가지가 알려져 있으며, 병적인 상태에서는 종양세포, 활액막 등에서도 분비된다고 알려져 있다.<sup>8</sup> GM-CSF의 가장 중요한 기능은 감염, 염증 등의 현상에 대한 방어 체계의 일환으로 과립구와 대식세포를 증식시키고 활성화하는 것이라고 생각되어진다.<sup>9</sup>

최근 GM-CSF 면역체계 이외의 부분에서도 중요한 작용을 한다는 증거가 제시되고 있으며 특히 생식과정에서의 역할에 대한 많은 증거가 대두되었다. 우선 생쥐와 사람의 난관 및 자궁 상피세포에서 GM-CSF가 분비된다는 사실이 확인되었고,<sup>10</sup> 또한 설치류와 반추동물인 면양의 배아에는 GM-CSF의 수용체가 존재한다는 사실도 밝혀졌다.<sup>11</sup> 사람의 배아에는 GM-CSF 수용체 중  $\alpha$ -chain만이 존재하는 것으로 알려져 있다.<sup>6</sup> 또한 GM-CSF가 결손된 생쥐의 경우는 포배까지의 발달이 저하되고 특히 inner cell mass의 크기가 감소한다고 알려져 있다. 그 결과 태아의 크기도 감소하며 태아 사망 및 출생 직후 사망이 늘어난다고 보고되었다.<sup>12</sup>

GM-CSF를 배양액에 첨가하여 배아 발달을 시키는 경우에 대한 연구도 많이 이루어져 있다. 최초의 연구는 소의 배 발달을 증가시킨다는 보고가 있었으며,<sup>13</sup> 그 후 설치류와 사람에서도 유사한 결과를 나타내었다.<sup>14</sup> 그러나 전술한 바와 같이 GM-CSF를 사람에 적용한 연구는 많지 않으며 연구의 대부분은 잉여 배아를 이용한 배 발달율에 관한 연구이었으며, 본 연구처럼 직접 임상에 적용하여 향상된 임신율을 보고한 경우는 없는 것으로 알고 있다.

본 연구 결과, 배아의 등급은 대조군에서는 G-2가 많은 반면 GM-CSF군에서는 G-1이 많아서 GM-CSF는 배아의 질을 향상시킬 수 있다는 결론을 내릴 수 있다. 이는 Sjöblom 등이 발표한 포배기 배아의 inner cell mass의 증가와 일맥상통하는 점이 있다.<sup>6</sup> 그러나 그들의 연구에서는 배아의 발달 속도는 증가했으나 배아의 질은 특별히 향상되지 않았다. 본 연구의 결과와 차이가 나타난 이유는 아마도 그들의 실험에서는 냉동 배아를 사용했다는 차이점에 기인한 것이라고 추측된다. 어떤 기전에 의해 세포의 활성화도와

분화가 증가하는지는 아직 분명하지 않지만, GM-CSF의 작용은 전술한 바처럼 세포의 분열과 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있다. GM-CSF 수용체는 IL-3, IL-5와  $\beta$ c chain을 공유하며, 이 세 가지 수용체는 type I cytokine receptor superfamily에 속한다.<sup>15</sup>  $\beta$ c chain은 intrinsic kinase activity는 없으나, 다른 tyrosin kinase receptor와 유사하게 다른 많은 종류의 단백질을 인산화시켜 그 작용을 발휘한다. 현재까지 알려진 GM-CSF의 down stream은 JAK/STAT pathway와 MAP kinase pathway, 그리고 PI3-kinase pathway 들 수 있다. JAK/STAT pathway 활성화의 결과로서 c-myc 유전자의 활성화가 일어나고, 따라서 세포의 증식이 촉진되며, MAP kinase pathway와 PI3-kinase pathway 활성화의 결과로 c-jun, c-fos 유전자의 활성화가 일어나고, 이에 따라서 세포의 분화와 생존이 유지되게 된다. 그러나 이상의 연구 결과는 모두 hematopoietic cells에서 이루어진 것이며,<sup>15</sup> 배아에서도 이러한 현상이 나타나는지는 아직 불분명하다.

배양액 내에 GM-CSF를 처리할 경우 어떤 농도가 가장 이상적인가는 아직 규명되지 않았다. 사람의 난관과 자궁 내에서 정상적으로 분비되는 GM-CSF에 의해 유지되는 *in vivo* 농도도 아직 모르는 상태이다. 본 연구에서는 Sjöblom 등이 실험에 사용했던 2 ng/ml을 적용하였다.<sup>6</sup> 본 연구진이 실시하고 있는 생쥐 배아를 사용한 dose-finding study의 결과로는 생쥐의 경우 10 ng/ml이 가장 유용한 것으로 나타났으나, 사람에서 가장 적절한 농도를 결정하는데 있어서는 보다 많은 연구 결과가 축적되어야 할 것으로 생각된다.

배양액에 GM-CSF를 첨가할 경우, 태아의 안전성에 대해서도 논란이 일어날 수 있다. 그러나, 본 연구에서 GM-CSF 첨가군 중 임신되어 24주 이상 유지되고 있거나 출산한 23명의 태아에서는 단 1건의 기형도 발견되지 않았으며, 더욱이 GM-CSF는 사람의 자궁과 난관에서 정상적으로 분비되는 물질이기 때문에 teratogenicity에 대해서는 가능성이 높지 않다고 생각된다. 그러나 GM-CSF의 농도에 따라 그 결과가 달라질 수 있으므로 계속 임상 결과를 주목할 필요가 있다고 생각한다.

GM-CSF가 어떤 기전으로 임신율을 향상시키는지도 아직 확실하지 않다. 전술한 바처럼 배아의 질

을 향상시키고 inner cell mass의 크기를 증가시키는 작용이 있을 수 있다. 생쥐의 경우에는 배 발달에 필요한 에너지원인 포도당의 이용을 증가시킨다는 보고도 있다. 그러나, 그 외에도 trophectoderm에서 anti-luteotropic signal interferon (IFN)- $\tau$ 의 분비가 증가되고 이에 따라 trophoctoderm의 증식이 이루어질 것으로 추측하고 있다.<sup>16</sup> 또한, 배아에서 배아증식 및 착상을 촉진하는 다른 물질의 분비를 증가시켜서 간접적으로 착상을 증진시킬 가능성도 있다. 현재 진행되는 연구에 따르면 GM-CSF를 처리한 배아에서는 LIF mRNA의 발현이 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 착상관련 물질의 증가에 의해 착상이 증가될 가능성도 높다고 생각한다.

동물에서 GM-CSF가 자궁내막에 작용하여 착상에 관여한다는 사실은 이미 알려져 있다. 그러나 사람에서는 자궁내막에서의 GM-CSF의 증가는 착상에 바람직하지 못한 결과를 초래할 가능성이 더 높다. GM-CSF는 항원표지세포에 작용하여 IL-12를 증가시키는 대표적인 물질이다. 자궁내막에서 IL-12가 증가되면 Th-1 계열의 cytokine이 증가하고 이에 따라 유산이 일어날 가능성도 배제할 수 없으므로 사람의 착상에서는 높은 농도의 GM-CSF가 자궁내막에 작용할 가능성은 높다고 생각된다.

본 연구에서는 포배기까지의 배 발달을 조사하지는 못했다. 그 이유는 대조군에서 포배기까지 배양을 시도한 배아의 수가 너무 적어서 비교가 곤란했기 때문이다. 그렇지만, GM-CSF 첨가군에서의 배 발달율은 38.8%로 나타났는데 본 기관의 포배기까지의 배 발달율이 본 연구를 시작하기 이전에 30%를 약간 상회하는 수준이었다는 점을 감안한다면 GM-CSF의 첨가는 포배기까지의 배 발달을 증가시킬 가능성이 높다고 사료된다.

결론적으로 배양액에 GM-CSF를 첨가하여 체외수정을 시도하면 임신율과 착상율의 향상을 가져오는 것으로 나타났다. 이러한 결과가 나타난 이유는 배아의 질의 향상과 GM-CSF에 의한 배아 내 착상관련 물질의 합성증가에 의한 것이라고 추측된다.

## 참 고 문 헌

- Olivennes F, Hazout A, Lelaidier C, Freitas S, Fan-
- chin R, de Ziegler D, et al. Four indications for embryo transfer at the blastocyst stage. *Hum Reprod* 1994; 9: 2367-73.
- Martin KL, Barlow DH, Sargent IL. Heparin-binding epidermal growth factor significantly improves human blastocyst development and hatching in serum-free medium. *Hum Reprod* 1998; 13: 1645-52.
- Lighten AD, Moore GE, Winston RM. Routine administration of human insulin-like growth factor-I ligand could benefit clinical in vitro fertilization culture. *Hum Reprod* 1998; 13: 3144-50.
- Dunglison GF, Barlow DH, Sargent IL. Leukaemia inhibitory factor significantly enhances the blastocyst formation rates of human embryos cultured in serum-free medium. *Hum Reprod* 1996; 11: 191-6.
- Pampfer S, Arceci RJ, Pollard JW. Role of colony stimulating factor-1 (CSF-1) and other lymphohematopoietic growth factors in mouse pre-implantation development. *Bioessays* 1991; 13: 535-40.
- Sjöblom C, Wikland M, Robertson SA. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes human blastocyst development *in vitro*. *Hum Reprod* 1999; 14: 3069-76.
- Gasson JC, Weisbart RH, Kaufman SE, Clark SC, Hewick RM, Wong GG, et al. Purified human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: direct action on neutrophils. *Science* 1984; 226: 1339-42.
- Gasson JC. Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1991; 77: 1131-45.
- Stanley E, Lieschke GJ, Grail D, Metcalf D, Hodgson G, Gall JA, et al. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 5592-6.
- Robertson SA, Mayrhofer G, Seamark RF. Ovarian steroid hormones regulate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor synthesis by uterine epithelial cells in the mouse. *Biol Reprod* 1996; 54: 183-96.
- Sharkey AM, Dellow K, Blayney M, Macnamee M,

- Charnock-Jones S, Smith SK. Stage-specific expression of cytokine and receptor messenger ribonucleic acids in human preimplantation embryos. *Biol Reprod* 1995; 53: 974-81.
12. Robertson SA, Roberts CT, Farr KL, Dunn AR, Seamark RF. Fertility impairment in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. *Biol Reprod* 1999; 60: 251-61.
  13. de Moraes AA, Hansen PJ. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes development of *in vitro* produced bovine embryos. *Biol Reprod* 1997; 57: 1060-5.
  14. Robertson SA, Sjoblom C, Jasper MJ, Norman RJ, Seamark RF. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promotes glucose transport and blastomere viability in murine preimplantation embryos. *Biol Reprod* 2001; 64: 1206-15.
  15. Guthridge MA, Stomski FC, Thomas D, Woodcock JM, Bagley CJ, Berndt MC, et al. Mechanism of activation of the GM-CSF, IL-3, and IL-5 family of receptors. *Stem Cells* 1998; 16: 301-13.
  16. Imakawa K, Helmer SD, Nephew KP, Meka CS, Christenson RK. A novel role for GM-CSF: enhancement of pregnancy specific interferon production, ovine trophoblast protein-1. *Endocrinology* 1993; 132: 1869-71.
-