大韓不妊學會誌: 第29卷 第4號 2002
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 29, No. 4, 2002, 12

# 마우스에서 배반포 형성, 세포 수 및 ICM의 비율에 미치는 배양액의 효과

대구대학교 생명자원학부[1], 경북대학교병원 산부인과[2]

박기상[1,2] · 이택후[2] · 전상식[2] · 송해범[1]

# Effects of Medium on Blastocyst Formation, Cell Number and Percentage of ICM in Mice

**Kee Sang Park[1,2], Taek Hoo Lee[2], Sang Sik Chun[2], Hai Bum Song[1]**

*[1]Division of Life Resources, Daegu University, Gyungbuk,*
*[2]Department of OB/Gyn, Kyungpook National University Hospital, Daegu, Korea*

**Objective:** The aim of this study was to evaluate the influence of different media on blastulation, mean cell number, percentage of inner cell mass (ICM) of total cells and ICM : trophectoderm (TE) ratio in mice.

**Materials and methods:** A total 552 two cell embryos were retrieved from ICR female mice (4 weeks old) at 48 hr after hCG injection (mated just after hCG injection) and cultured in MEM (n=276) or TCM (n=276) supplemented with 20% hFF. The grading of blastocysts from zona-intact (ZiB) to -escape (hatching and hatched, ZeB) was performed at 72 hours after culture. Total, TE and ICM cell numbers were analyzed by differential staining of blastocyst. Statistical analysis was performed using *t*-test with SigmaPlot-2001. P-values < 0.05 were accepted as statistically significant.

**Results:** The blastulation rate in MEM (64.9±4.95%) was significantly higher (p=0.0031) than that in TCM (57.2±5.22%). No differences were found in the number of ZiB and ZeB between MEM (31.9 ±2.62, 33.0±4.58%), and TCM (27.2±4.28, 30.1±4.58%). A total 314 blastocysts (MEM=166; TCM= 148) were stained differentially. Mean cell number of blastocysts was significantly higher (p=0.0002) in TCM (73.1±3.3) than in MEM (61.7±2.5). Differential staining was successfully performed in 155 blastocysts (MEM=77; TCM=78). The percentage of ICM was significantly higher in MEM than in TCM (20.9±1.3 vs. 17.1±1.2%, p=0.0281). The ICM : TE ratio was higher in TCM than in MEM (1 : 4.85±0.68 vs. 1 : 3.78±0.78, NS).

**Conclusion:** These results show that MEM increase the blastocyst formation and percentage of ICM of total cells comparing with TCM in mice.

**Key Words:** Mice, Medium, Blastulation, Inner cell mass (ICM), Trophectoderm (TE)

**주관책임자**: 송해범, 우) 712-714 경상북도 경산시 진량면 내리리 산 25번지, 대구대학교 생명자원학부
Tel: (053) 850-6723, Fax: (053) 850-6720, e-mail: goatsong@daegu.ac.kr
**이 논문은 2001년도 대구대학교 학술연구비 지원에 의해 수행되었음.**
**연락저자**: 박기상, 우) 700-721 대구광역시 중구 삼덕동 2가 50번지, 경북대학교병원 산부인과
Tel: (053) 420-5727, Fax: (053) 423-7905, e-mail: keespark@yahoo.com
**이 논문의 요지는 2002년 9월 28~29일 서울 매리어트 호텔에서 개최된 제 88차 대한산부인과학회 학술대회에서 구두 발표되었음.**

배반포 배는 다능성 세포인 내세포괴 (ICM)와 상피성 세포인 영양배엽 (TE)으로 이루어져 있다.[1,2] ICM은 태아로 발달하는 모든 세포로 분화되고, TE는 배반포의 발달 과정에서 태아와 모체간의 체액을 수송하고 자궁내막에 착상되어 태아측 태반을 형성하게 된다. 이들 두 종류로 분화된 세포의 외형은 여러 동물 종에서 체외 배양 체계를 측정하는데에 유용하게 이용되고 있다.[3~6] 배 발생 능력의 지표로는 배반포기까지의 발달 속도,[7] 배반포 배아에서 ICM의 크기 및 모양[3] 또는 세포 수와 ICM의 비율[4~6,8] 등이 사용되고 있으나, 일반적으로 배반포 형성률, 배반포기까지의 발달 속도, 세포 수 및 ICM의 비율 등이 주로 인용된다. 이런 발생 능력 지표를 이용하여 착상률과 임신율에 직접적으로 영향을 미칠 수 있는 최적의 배반포 생산을 위한 배양 체계에 대해서는 오랜 동안 연구가 이루어지고 있으나 연구자마다 많은 이견을 보이고 있다.

본 실험은 각기 다른 배양액에서 마우스 2 세포기 배를 배양하여 배반포 형성률과 세포 수 및 ICM의 비율 등 배 발생 능력에 미치는 효과를 조사함으로써, 인간 IVF에 응용할 수 있는 기초 자료를 마련하고자 실시하였다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. 공시 동물

본 연구에 사용된 마우스는 국내에서 사육 중인 ICR 계통 마우스로, 암컷은 생후 4주령, 수컷은 10~15주령인 것을 사용하였다. 마우스는 온도와 명암이 조절되는 곳에서 실험에 사용될 때까지 사육하였으며, 명암의 주기는 10시간 : 14시간으로 조절하였고, 사료와 물은 무제한으로 급여하였다.

### 2. 배양액 및 염색 용액의 준비

#### 1) 배양액

마우스 2 세포기 배의 난관 관류는 Ham's F-10 (F-10, 11550-043, Gibco, USA)을 사용하였다. 2 세포기 배의 배양에는 MEM (119660-025, Gibco, USA) 또는 TCM-199 (TCM, 11150-059, Gibco, USA)를 이용하였다. 모든 배양액은 0.0125 g/l의 Streptomycine sulfate (S-9137, Sigma, USA)와 0.01375 g/l의 Penicillin-G (P-3032, Sigma, USA)를 첨가한 다음 삼투압 측정기를 이용하여 삼투압을 280 mOsmol/kg으로 보정하고 나서, 0.2 ?m 여과기 (Millex-GV, Millipore, USA)로 제균하면서 14 ml tube (2001, Falcon, USA)에 분주한 다음 4℃ 냉장고 (3682, Forma, USA)에서 보관하였다. 2 세포기 배를 배양할 때에는 20% hFF를 첨가한 다음 37℃를 유지하고 있는 5% $CO_2$ 배양기에서 6시간 이상 평형시킨 다음 사용하였다.

#### 2) 형광 염색 용액

배반포기에 도달한 배의 형광 염색은 염색액 1과 2에서 실시하였다.

(1) 염색액 1

Ham's F-10 (BSA free) + 1% Triton X-100 (T-9254, Sigma, USA) + 100 ?g/ml propidium iodide (PI, P-4170, Sigma, USA)

(2) 염색액 2

EtOH (Absolute Ethanol, Duksan, Kore) + 25 ?g/ml bisbenzimide (B-2883, Sigma, USA)

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

hFF는 체외수정 시술을 하고 있는 환자 중에서 성숙난자를 갖고 있는 난포에서 회수한 난포액에 혈액이 거의 섞이지 않은 것을 5명 이상의 환자로부터 회수한 다음 희석하여 이용하였다. 회수한 hFF는 원심분리 (3,500 rpm)를 30분간 실시하여 상층액만을 회수한 후 0.2 ?m 여과기로 제균하고 나서 56℃의 질탕기에서 35분간 불활성화시킨 다음 -20℃에 보관하다가 융해하여 사용하였다. 융해 후 2일이 경과한 것은 실험에서 제외하였다.

### 4. 난자의 준비

과배란을 유도하기 위하여 암 마우스에게 7.5 IU의 pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG, G-4877, Sigma, USA)과 5 IU의 human chorionic gonadotropin (hCG, CG-10, Sigma, USA)을 48시간 간격으로 복강주사하고 나서 수컷과 동숙시켰다. hCG 주사 후 48시간째에 경추탈골법으로 암 마우스를 희생시킨 다음 난관을 적출하여 실체 현미경 (MZ 12.5, Leica, Switzerland)으로 보면서 2-well 배양접시 (3037, Falcon, USA)에서 난관을 관류하고 나서 정상적으로 보이는 2 세포기 배만을 회수하여 배양에 이용하였다.

**Table 1.** Influence of medium on blastocyst formation and their cell number in mice

| Variables | MEM | TCM | p-value |
|---|---|---|---|
| No. of 2-cell embryos used | 276 | 276 | - |
| No. of blastocysts | | | |
| Total | 179 (64.9±5.0) | 158 (57.2±5.2) | 0.0031 |
| Zona-intact | 88 (31.9±2.6) | 75 (27.2±4.4) | NS |
| Early | 16 (5.8) | 24 (8.7) | NS |
| Middle | 15 (5.4) | 19 (6.9) | NS |
| Late | 57 (20.7) | 32 (11.6) | NS |
| Zona-escape | 91 (33.0±4.6) | 83 (30.1±4.1) | NS |
| Hatching | 86 (31.2) | 77 (27.9) | NS |
| Hatched | 5 (1.8) | 6 (2.2) | NS |
| No. of blastocysts stained | 166 | 148 | - |
| Cell number | | | |
| Total | 10,243 | 10,814 | - |
| Mean | 61.7±2.5 | 73.1±3.3 | 0.0002 |
| Range | 8~162 | 5~168 | - |

NS=not significant. Values are mean±SEM.

### 5. 2-세포기 배의 배양 및 관찰

회수된 552개의 2 세포기 배는 MEM (n=276) 또는 TCM (n=276) 50 ?l 소적에 mineral oil (M-8410, Sigma, USA)을 덮은 배양접시 (3002, Falcon, USA)에서 72시간 동안 배양하였다. 배반포기 배는 zona-intact (ZiB)와 escape (hatching-hatched, ZeB)로 나누어 관찰·기록한 다음, 형광 염색법을 이용하여 총 세포 수 및 ICM/TE 세포 수를 조사하였다.

### 6. 배반포 배의 형광 염색

각각의 배양액에서 각기 형성된 배반포기 배는 Thouas 등[6]의 differential staining법을 변형한 방법으로 ICM과 TE를 염색하여 관찰하였다.

배반포 배를 염색액 1에서 10초 이내로 노출하고 나서 즉시 염색액 2로 옮긴 다음 4℃에서 1.5시간 이상 방치하여 염색을 유도하였다. 염색이 완료된 배반포 배는 glycerol (G-2025, Sigma, USA)에서 과다한 양의 염색액을 제거하고 나서 slide glass에 올려 놓은 다음 cover glass를 덮었다. 형광 현미경 (BX 50, Olympus, Japan)에 부착된 형광 여과기에 UV를 통과시켜 염색이 완료된 배반포기 배를 관찰하였다. 염색액 1에 포함된 PI는 적색 (Figure 1A)으로, 염색액 2에 포함된 bisbenzimide는 청색 (Figure 1B)으로 발광한다. TE는 적색 (PI)과 청색 (bisbenzimide)이 혼합되어 분홍색으로 나타내고 ICM은 여전히 청색으로 나타나서 각각의 색으로 TE와 ICM을 구분할 수 있었다 (Figure 1C).

### 7. 관찰 및 분석

배반포기 배를 염색하여 총 세포 수는 PI와 bis-benzimide가 특이 또는 비특이적으로 염색된 모든 것을 대상으로 하였고, %ICM과 ICM : TE ratio는 ICM/TE가 특이적으로 반응한 것만을 대상으로 하였다. %ICM은 총 세포 수에서 차지하는 ICM의 비율로, ICM : TE ratio는 ICM을 1로 보았을 때 나타나는 TE의 비율로 하였다. 결과 (배반포 형성률, 세포수)에 대한 불연속 변수에 대해서는 표준오차율 (±SEM)로 나타내었다. 처리군간 결과에 대한 유의성은 *t*-test를 실시하여 5% 유의 수준에서 검정하였다.

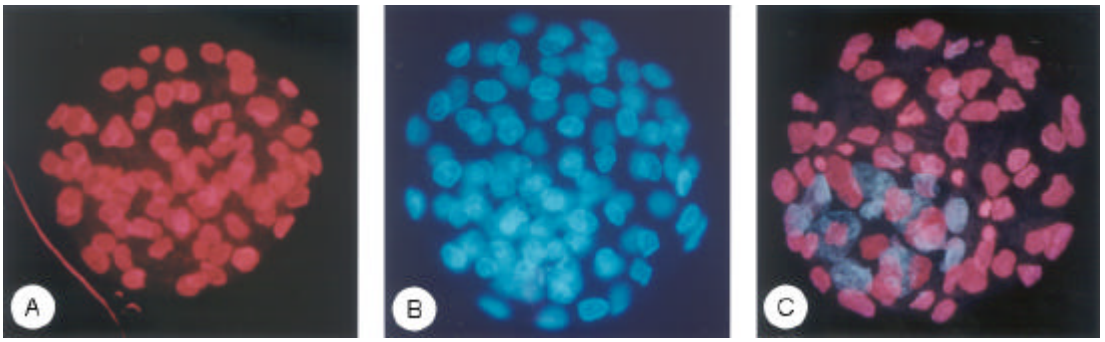


**Figure 1.** Differential staining of mouse blastocysts (×400): **(A)** propidium iodide (PI), **(B)** bisbenzimide and **(C)** differentially stained. Note that the intense pink color represents the chromatin in nuclei of lysed trophectoderm (TE) cells that had been both red (PI) and blue (bisbenzimide). ICM nuclei remain blue, because these cells were not permeabilized.

**Table 2.** Inner cell mass (ICM), trophectoderm (TE) and total cell number of mouse blastocysts differentially stained after 2-cell embryos cultured in two different medium

| Variables | No. of blastocysts differentially stained | Cell number | | | %ICM of total cells | ICM : TE ratio |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Total | ICM | TE | | |
| MEM | 77 | 4,829 | 1,011 | 3,818 | 20.9±1.31 | 1 : 3.78±0.78 |
| TCM | 78 | 6,628 | 1,132 | 5,496 | 17.1±1.19 | 1 : 4.85±0.68 |
| p-value | - | - | - | - | 0.0281 | NS |

NS=not significant. Values are mean±SEM.

통계 처리는 SigmaPlot-2001 (v7.0)을 이용하였다.

## 결 과

배양액의 종류에 따른 마우스 2 세포기 배 (n=552)의 발생 능력을 조사하기 위하여 MEM (n=276) 또는 TCM (n=276)에서 72시간 동안 배양한 다음 배반포 형성률과 세포 수에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 1과 2에 나타내었다.

총 배반포 형성률은 MEM (64.9±5.0%, 179/276)이 TCM (57.2±5.2%, 158/276) 보다 현저하게 (p=0.0031) 높았다. ZiB (31,9±2.6 vs. 27.2±4.4%; p=0.8334, NS)와 ZeB (33.0±4.6 vs. 30.1±4.1%; p=0.3765, NS)로 세분하여 살펴보면 MEM 과 TCM 사이에 차이가 없었다. ZiB와 ZeB를 세분화한 early, middle, late, hatching 및 hatched blastocyst로 나누어 보았을 때에도 MEM (5.8, 5.4, 20.7%)과 TCM (8.7, 6.9, 11.6%)에서 차이가 없었다.

552개의 2 세포기 배 중에서 337개 (MEM=179; TCM=158)가 배반포기에 도달하였는데, 이 중에서 314개를 성공적으로 형광 염색하여 (MEM=166; TCM=148) 세포 수를 확인하였다. 평균 세포 수는 TCM (Mean: 73.1±3.3; Range: 5~168)이 MEM (Mean: 61.7±2.5; Range: 8~162) 보다 현저히 많았다 (p=0.0002) (Table 1).

형광 염색된 314개의 배반포 배 중에서 ICM과 TE가 또렷하게 구분되는 155개 (MEM=77; TCM=78)를 대상으로 ICM과 TE 세포 수를 조사하였다. %ICM은 총 세포 수에서 ICM이 차지하는 ICM의 비율로, ICM :TE ratio는 ICM을 1로 하여 나타난 TE의 비율로 하였다. ICM (13.1 vs. 14.5)과 TE의 평균 세포 수 (49.6 vs. 70.5)는 TCM이 MEM 보다 많았다. 그러나 %ICM은 MEM (20.9±1.3%)이 TCM (17.1±1.2%) 보다 현저하게 (p=0.0281) 높았고, ICM : TE ratio는 TCM (1 : 4.85±0.68)이 MEM (1 : 3.78±0.78) 보다 높게 나타났다 (NS) (Table 2).

따라서 마우스 2 세포기 배를 배반포기까지 배양할 때 MEM에서 실시하면 배반포 형성률과 ICM의 비율이 높은 배반포 배를 생산할 수 있을 것이다.

## 고 찰

본 실험에서 마우스 2 세포기 배를 배양할 때 MEM은 배의 발달을 촉진시킨 반면 TCM은 배의 발달을 지연시켰는데, 배양액에 포함되어 있는 에너지원의 구성성분이 그 원인일 것으로 생각된다.

Hamster 2 세포기 배를 배양할 때 glucose를 첨가하여 과도한 glycolysis가 일어나면 cytosolic metabolism과 mitochondrial metabolism 사이의 균형을 잡기 위해서 oxidative phosphorylation이 일어나게 되어 배의 발달에 유해한 역할을 하는데,[9] Seshagiri와 Bavister[10]는 hamster 8 세포기 배는 energy를 생산하는데 있어서 glycolysis를 이용하지 못하는 "Crabtree effect"[11,12]가 있기 때문이라고 하였다. 이와 같은 원인으로 에너지원이나 단백질원의 oxidative potential이 줄게 되어 결과적으로 Krebs cycle을 통한 지속적인 catabolism이 억제되므로 배의 발달이 저하되어[9,10] glucose가 배 발달에 유해하다는 보고가 나오고 있다. Gardner와 Lane[13]은 사람의 난관이 자궁 보다 상대적으로 glucose 농도는 낮고 pyruvate와 lactate의 농도는 높기 때문에 배반포기가 되기 전의 초기배 발달에는 에너지원으로서 glucose를 상대적으로 필요로 하지 않는다고 하였다. 그러나 인간 배아에서 glucose uptake와 glycolytic activity (glucose가 lactate로 전환되는)는 이식을 위한 배반포기 배의 선발기준이 되지 못하고,[14] 마우스 수정란을 배양할 때 첨가되는 glucose (0.2, 0.6, 1.8, 5.4 mmol/*l*)가 배반포 형성, hatching 율 및 총 세포 수 형성에 저해작용을 하지 않는다는 상반된 보고도 있다.[15] Glutamine은 glutamine transminase를 통하여 2-oxoglutarate로 변하여 에너지를 생산하는데, 마우스 배는 metabolic source로 glutamine을 이용한다.[16] 본 연구 (Table 1, 2)와 이전에 실시한 실험[17]에 사용된 배양액인 MEM과 TCM에는 각기 다른 에너지원이 포함되어 있는데, TCM에 포함된 특정 에너지원, 그 조합 또는 배 발달 단계에 부합되지 않는 에너지원에 의해 인간과 마우스 배의 발생 능력이 억제된 것으로 생각되며 여기에 대해서는 저자들이 계속 연구 중이다. 이와 같이 배 발생 능력에 미치는 영향은 배양액의 종류, 에너지원의 종류, 배 발달 단계와 에너지원간의 상호작용, 연구자 및 실험에 이용한 동물 종에 따라서 많은 차이점을 보이고 있다.

Differential staining에서, Thouas 등[8]은 마우스와 소 blastocyst의 약 20%에서 uneven comparison이나 non-specific staining이 나타나서 염색 성공률은 80% 정도이고, 마우스 배반포 배에서 총 세포 수는 75.3±3, %ICM (/total cell number)은 27.8%, ICM : TE ratio는 1 : 2.63이라고 하였지만, 본 연구에서 염색 성공률은 49.4% (155/314), total cell number는 61.7±2.5 (MEM) 또는 73.1±3.3 (TCM), %ICM은 1 : 3.78 (MEM) 또는 1 : 4.85 (TCM)로 염색 성공률, %ICM과 ICM : TE ratio에서 많은 차이를 보였다. 이 같은 차이는, Thouas 등[8]은 hybrid F1에서 획득한 expanded/expanding/partially hatched blastocyst만을 대상으로 한 반면 본연구에서는 ICR 마우스에서 획득한 early-hatched 단계의 배반포 배에서 ICM과 TE가 명확하게 구분되는 것만을 조사하였기 때문일 것으로 생각된다. Mishra와 Seshagiri[4]는 hamster 8 세포기 배를 체외에서 배양하여 배반포 배를 유도하였을 때 %ICM은 26.6~28.4%, ICM : TE ratio는 1 : 2.6~2.7이었고, 체내 배양하여 나타난 hatched blastocyst에서 %ICM은 36.4%, ICM : TE ratio는 1 : 1.9로 나타난다고 하였고, Iwasaki 등[7]은 소 난자를 rabbit oviduct에서 배양할 경우에 배반포기 배의 총 세포 수와 ICM proportion이 증가하므로 난자의 배양 조건이 배 발생 능력에 많은 영향을 준다고 하여, 생식도관과 같은 조건의 배양 환경은 아직 더 많은 연구를 필요로 하고 있다고 하였다.[4,7,18]

배반포기까지의 발달 속도가 빠른 수정란이 발생 능력의 기준으로 삼을 수 있다는 보고도 있다. 배반포기까지의 발육이 빠르면 영양배엽에 대한 ICM의 비율이 높아, 체외수정란 유래 배반포 배의 질을 결정하는 기준이 될 수도 있고,[7,18] 동결 과정에서 생존율을 높이는 기준이 되기도 한다 (Iwasaki 등[7]: -196℃에서 동결할 때 expanded 단계에 있는 것 보다는 hatched blastocyst의 ICM damage가 낮아서 hatched blastocyst의 생존율을 더 높일 수 있다고 하여 발달 단계가 높을수록 동결에 대한 저항도를 높일

수 있다). 그러나 Richter 등[3]은 인간 배반포 배아의 이식에서, 사용한 배양액 (IVC-1/IVC-3 또는 P-1/Blastocyst medium)이나 난자의 source (Donor 또는 Patient)에 따라 착상률에 차이가 없는 반면, 배반포 배아에서 최적의 ICM 크기 (>4,500 ?$m^2$, 55%; <4,500 ?$m^2$, 31%)나 구형에 가까운 모양 (완전한 구형, 7%; 구형에 가까운 모양, 58%; 다소 긴 모양, 33%)일 때 착상률이 좋았고, 이들이 조합된 경우에는 (ICM 크기, >4,500 ?$m^2$ + 구형에 가까운 모양) 착상률 (71%)이 가장 높게 나타나므로 배아의 발생 능력이 ICM의 모양이나 크기에 좌우된다고 하여 세포 수와는 상관관계에 있지 않음을 시사하기도 하였다.

Table 1에서 337개의 배반포 배 중에서 314개에 대한 결과만을 제시한 것은 23개 중 일부는 염색 중에 유실되었고 일부는 세포의 압착 등으로 관찰이 불가능하여 제외하였기 때문이고, Table 2에서 155개의 배반포 배에서 나온 결과를 제시한 것은 염색된 314개의 배반포 배 중에서 TE와 ICM이 명확하게 구분되는 것만을 대상으로 하였기 때문이다.

본 연구에서 마우스 배를 이용한 각각의 배양액에 따른 배 발생에서 배반포 형성률과 (MEM: 64.9% vs. TCM: 57.2%) ICM의 비율 (MEM: 22.3% vs. TCM: 18.4%)은 MEM에서 높게 나타났고, 총 세포 수 (TCM: 73.1 vs. MEM: 61.7)와 ICM의 평균 세포 수 (TCM: 14.5 vs. MEM: 13.1)는 TCM에서 많았다 (Table 1, 2). 따라서 배반포 형성률, 총 세포 수, ICM의 평균 세포 수 및 ICM의 비율 중 어떤 것이 배 발생 능력과 절대적인 상관관계에 있는지는 더 많은 연구가 이루어져야 어떤 배양액이 발생 능력에 더 효과적인지 명확하게 거론할 수 있겠으나, 저자들이 이전에 인간 배아를 MEM이나 TCM에서 배양할 때 수정률 (82.3 vs. 86.0%)과 배반포 형성률 (63.1 vs. 60.0%)에서는 차이가 없는 반면, 발생 능력이 가장 우수한 것으로 알려진 BG1을 갖고 있는 배반포 배아의 출현율은 MEM (50.8%)이 TCM (15.0%) 보다 더 우수하였고,[17] 5일째 배반포 배아를 이식하였을 때 MEM에서 배양한 것 (57.9%)이 TCM에서 한 것 (27.3%) 보다 임신율이 높게 나타나서 (data not shown), 배반포 형성률과 ICM의 비율이 배아의 발생 능력을 결정짓는 요인이 되는 것으로 생각되며, 여기에 사용된 MEM이 인간과 마우스 배의 발생 능력을 증가시킨 것으로 보인다.

결론적으로, 마우스 2 세포기 배를 배양할 때 MEM을 사용하면 배반포 배의 형성률과 ICM의 비율을 높이고 상대적으로 TE의 비율을 낮출 수 있어서 발생 능력이 우수한 배를 얻을 수 있을 것이다. 이상의 연구 결과는 인간 IVF에서 임신율 향상을 위한 기초 자료로 활용할 수 있을 것이다.

## 참 고 문 헌


1. Lawson KA, Meneses JJ, Pederson RA. Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. Development 1991; 113: 891-911.
2. Beddington R. Analysis of tissues fate and prospective potency in the egg cylinder. In Rossant J and Pederson RA (eds): Experimental approaches to mammalians embryonic development. Cambridge University Press, pp. 121-47.
3. Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST, Shapiro BS. Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape. Fertil Steril 2001; 76: 1157-67.
4. Mishra A, Seshagiri PB. Successful development in vitro of hamster 8-cell embryos to 'zona-escape' and attached blastocysts: assessment of quality and trophoblast outgrowth. Reprod Fertil Dev 1998; 10: 413-20.
5. Hardy K, Handyside AH, Winston RM. The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation *in vitro*. Development 1989; 107: 597-604.
6. Papaioannou VE, Ebert KM. The preimplantation pig embryo: cell number and allocation to trophectoderm and inner cell mass of the blastocyst *in vivo* and *in vitro*. Development 1988; 102: 793-803.
7. Iwasaki S, Mizuno J, Kobayashi K, Yoshikane Y, Hayashi T. Hanges in morphology and cell number of inner cell mass of porcine blastocysts during freezing. Theriogenology 1994; 42: 841-8.
8. Thouas GA, Korfiatis NA, French AJ, Jones GM,

Trounson AO. Simplified techniques for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. Reprod BioMed Online Webpap 2001; 3: 25-9.

9. 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: 177-83.
10. Seshagiri PB, Bavister B. Phosphate is required for inhibition by glucose of development of hamster 8-cell embryos *in vitro*. Biol Reprod 1989; 40: 607-14.
11. Crabtree HG. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. Biochem J 1929; 23: 536-45.
12. Koobs HD. Phosphate mediation of the Crabtree and Pasteur effects. Science 1972; 178: 127-33.
13. Gardner DK, Lane M. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? Hum Reprod Update 1997; 3: 367-82.
14. Jones GM, Trounson AO, Vella PJ, Thouas GA, Lolatgis N, Wood C. Glucose metabolism of human morula and blastocyst-stage embryos and its relationship to viability after transfer. Reprod BioMed Online Webpap 2001; 3: 124-32.
15. Biggers JD, Mcginnis LK. Evidence that glucose is not always an inhibitor of mouse preimplantation development *in vitro*. Hum Reprod 2001; 16: 153-63.
16. Nasr-Esfahani MH, Winston NJ, Johnson MH. Effects of glucose, glutamine, ethylenediamine- tetraacetic acid and oxygen tension species and on development of the mouse preimplantation embryos *in vitro*. J Reprod Fert 1992; 96: 219-31.
17. Park KS, Song HB, Chun SS. Blastulation and blastocyst quality of human embryos co-cultured on vero cell monolayers in two different culture media in *in vitro* fertilization-embryo transfer (IVF-ET) cycles. Fertil Steril 2000; 74 (Suppl 1): S82.
18. Iwasaki S, Yoshida N, Ushijima H, Watanabe S, Nakahara T. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*. J Reprod Fert 1990; 90: 279-84.
19. Kong IK. Comparison of cell numbers in inncer cell mass vs trophectoderm and establishment of ES-like cells derived from day 7 to 9 IVF bovine blastocysts. Kor J Anim Reprod 1997; 21: 157-65.