

Ham's F-10 배양액에 첨가된 태아제대혈청과 EDTA가 백서 수정란의 분할에 미치는 영향

영남대학교 의과대학 산부인과학교실

김병석 · 이영기 · 박윤기 · 이태형 · 이승호

서 론

체의 수정이란 불임 여성에서 난자를 채취하여 남성에서 얻은 정자와 체외에서 인공적으로 수정하는 것이다. 체외 수정을 하여 얻은 수정란을 여성의 자궁에 직접 주입하여 착상이 되게 함으로써 불임증을 치료할 수 있게 되었다.

인간에 있어서 체외 수정은 1978년 Steptoe 등¹⁾에 의해 처음 성공하여 세계에서 첫 시험관 아기가 출생한 이래, 배란 유도방법의 발전, 수정란 배양액의 질적인 개선, 난자 채취 방법의 개선, 임신 유지 환경의 조성 등으로 임신율을 높이기 위한 노력이 계속되고 있으나 아직도 임신율은 20 - 30% 정도로 낮다.²⁾ 체외 수정이 성공하기 위해서는 배란유도를 잘 하여야 하며 이후 난자 및 정자의 채취, 적절한 배양액, 배양기의 조건 등의 문제가 있으나 이 중 적절한 배양 조건을 확립하는 것이 체외수정을 성공적으로 수행하는데 가장 중요하다. 최근까지 기본 배양액인 Ham's F-10 배양액에 모체의 혈청, 태아제대혈청, 송아지의 혈청중 하나 혹은 둘 이상을 첨가한 배양액을 주로 사용하고 있으나³⁾ 여러 연구^{4,5)}에서 볼 때 초기 수정란의 분열 및 임신에

큰 차이가 없다고 보고 되며 이에 대한 확실한 기준이 정립되어 있지 않다. 실제적으로 인체의 수정란을 이용하여 배양액의 일관성 있는 기준을 확립하기가 어려우므로 같은 포유류인 백서의 수정란을 이용하여 수정란의 분열 상태를 보아서 배양액의 질적인 수준을 평가하게 된다.

따라서 기존의 Ham's F-10 기본 배양액⁶⁾에 태아제대혈청이나 킬레이팅 제제인 ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)를 첨가한 배양액이 백서의 초기 수정란에 있어서 분할과 성장에 미치는 영향을 연구하여 이를 인간의 체외 수정에 있어서의 적용 및 유용성을 확립하기 위한 기초자료로 삼고자 이 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

실험동물은 5-10주 된 백서중 암컷 40마리로부터 미지수의 난자를 추출하고 수컷의 정자를 채취하여 배양액내에서 수정을 시도하였다. 배양액은 Ham's F-10(Gibco)에 benzyl penicillin G (Sigma), streptomycin(Sigma), calcium lactate(Sigma), sodium bicarbonate(Sigma)를 추가하여 18

megaohm의 증류수에 넣어 제조하였으며 삼투압은 280 mOsm/kg, pH는 7.2 - 7.4로 조정하였다.

태아제대혈청은 질식분만 직후 제대를 소독한 후 제대정맥에서 약 50 mL정도 채취하여 실온에서 응고시켜 fibrin을 제거 후 원심분리하고 0.2 μ m 막여과기를 통과시키고 나서 56 $^{\circ}$ C에서 60분간 불활성화하여 10%(v/v) 농도로 하였고, EDTA는 50, 100, 200 μ M의 세 종류를 제조하였다.

과배란 유도과정으로 먼저 난포의 성장을 촉진시키기 위해 암컷 백서에 PMSG(pregnant mare serum gonadotropin, Sigma) 5IU를 복강주사하였고, 48시간 후에 hCG(human chorionic gonadotropin, Sigma) 5IU를 복강주사하였다. 다시 12 - 14시간 후에 난자채취를 위해 경추 탈구에 의해 암컷 백서를 도살한 후 양측 난관과 난소에서 난구(cumulus oophorus)를 얻어서 태아제대혈청이 첨가된 Ham's F-10 배양액에 보존하였다. 정자는 수컷 백서를 경추 탈구에 의해 도살한 후 부고환에서 채취하여 같은 배양액에 따로 보존하여 이산화탄소 배양기에서 37 $^{\circ}$ C, 95% 습도, 5% 이산화탄소 가스의 조건으로 60 - 90분간 배양한 후 한개의 난자에 5-10 x 10⁵/mL 개의 정자를 혼합하여 태아제대혈청이 첨가된 Ham's F-10 배양액에 넣어 체외 수정 후 24시간 정도 있는 후 2 세포기의 배아를 무작위로 선택하여

다음의 예정된 배양액에 옮겨 심었다.

- ① Ham's F-10 배양액
- ② Ham's F-10+태아제대혈청 배양액
- ③ Ham's F-10+태아제대혈청+EDTA 50 μ M 배양액
- ④ Ham's F-10+태아제대혈청+EDTA 100 μ M 배양액
- ⑤ Ham's F-10+태아제대혈청+EDTA 200 μ M 배양액
- ⑥ Ham's F-10+EDTA 50 μ M 배양액
- ⑦ Ham's F-10+EDTA 100 μ M 배양액
- ⑧ Ham's F-10+EDTA 200 μ M 배양액

각 배양액은 배양기에 보관하였으며 매일 오전 같은 시간에 도립 현미경(inverted-microscope)을 이용하여 각 배아의 난활정도를 96시간 동안 관찰하였다.

본 실험 성적의 평가는 각 배양액 사이에 수정란의 분할 정도를 비율 검정을 실시하였으며 $p < 0.05$ 인 경우를 유의한 것으로 하였다.

성 적

실험 결과를 보면 Ham's F-10 조직 배양액만 사용하여 22 개의 2 세포기 배아를 96 시간 배양한 결과, 배양 제 5일에 3 개(13.6%)가 상실배기로, 1 개(13.6%)가 포배기까지 도달하였다(표 1).

10% 태아제대혈청이 첨가된 Ham's F-10 배양

Table 1. Development of mouse zygotes in Ham's F-10 culture medium

Cleavage	Day					
	1	2	3	4	5	
Two cell	22	7	3	2	2	
Four cell		15	17	15	12	
Eight cell				3	5	
Morula				2	2	
Blastocyst					1	

Values are the numbers of zygotes developed to each cleavage state.

액에서는 2 세포기 배아 26 개는 배양 제 5일에 17 개(65.4%)가 상실배기로, 6 개(23.1%)가 포배기에 도달하였다(표2). 또 Ham's F-10 배양액에 10% 태아제대혈청 및 EDTA 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M을 첨가한 배양액에서는 2 세포기 배아는 각각 24, 28, 28 개로 배양 제 5일에 각각 21 개(87.5%), 25 개(89.3%), 19 개(67.9%)가 상실배기로, 9 개(37.5%), 12 개(42.9%), 5 개(17.9%)가 각각 포배기에 도달하였다(표3, 표4, 표5).

Ham's F-10 배양액에 EDTA만 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M을 첨가한 배양액에서는 2 세포기 배아는 각각 25, 22, 27 개로 배양 제 5일에 각각 19 개(76.0%), 9 개(40.9%), 18 개(66.7%)가 상실배기로, 5 개(20.0%), 5 개(22.7%), 4 개(14.8%)가 포

배기에 도달하였다(표6, 표7, 표8).

기존의 Ham's F-10 배양액에 여러 농도의 EDTA와 태아제대혈청을 첨가한 배양액과 EDTA만을 첨가한 배양액에서 2 세포기 배아의 난할 단계에 따른 비율을 비교한 결과 대조군인 Ham's F-10 배양액에 비하여 상실배기에서는 모든 배양액에서 유의하게 높았으나, 포배기에서는 태아제대혈청과 EDTA 각각 50 μ M 및 100 μ M을 첨가한 배양액에서 유의하게 높았다($p < 0.05$)(표 9).

실제 많은 체외수정실에서 사용하고 있는 Ham's F-10 배양액에 10% 태아제대혈청을 첨가한 배양액을 대조군으로 하여 Ham's F-10 배양액에 여러 농도의 EDTA와 태아제대혈청을 첨

Table 2. Development of mouse zygotes in Ham's F-10 culture medium containing 10% fetal cord serum

Cleavage	Day	1	2	3	4	5
Two cell		26	10			
Four cell			11	6	5	5
Eight cell			5	20	10	4
Morula					11	11
Blastocyst						6

Values are the numbers of zygotes developed to each cleavage state.

Table 3. Development of mouse zygotes in Ham's F-10 culture medium containing 10% fetal cord serum and 50 μ M EDTA

Cleavage	Day	1	2	3	4	5
Two cell		24	5			
Four cell			19	2	2	1
Eight cell				15	3	2
Morula				7	19	12
Blastocyst						9

Values are the numbers of zygotes developed to each cleavage state.

Table 4. Development of mouse zygotes in Ham's F-10 culture medium containing 10% fetal cord serum and 100 μ M EDTA

Cleavage	Day	1	2	3	4	5
Two cell		28	1	1	1	1
Four cell			27	4	2	
Eight cell				23	8	2
Morula					17	13
Blastocyst						12

Values are the numbers of zygotes developed to each cleavage state.

Table 5. Development of mouse zygotes in Ham's F-10 culture medium containing 10% fetal cord serum and 200 μ M EDTA

Cleavage	Day	1	2	3	4	5
Two cell		28	3	2	2	2
Four cell			25	4	3	3
Eight cell				22	6	4
Morula					17	14
Blastocyst						5

Values are the numbers of zygotes developed to each cleavage state.

Table 6. Development of mouse zygotes in Ham's F-10 culture medium containing 50 μ M EDTA

Cleavage	Day	1	2	3	4	5
Two cell		25	1	1	1	1
Four cell			24	4	2	2
Eight cell				10	4	3
Morula				10	18	14
Blastocyst						5

Values are the numbers of zygotes developed to each cleavage state.

Table 7. Development of mouse zygotes in Ham's F-10 culture medium containing 10% fetal cord serum and 100 μ M EDTA

Cleavage	Day	1	2	3	4	5
Two cell		26	16			
Four cell			6	13	6	5
Eight cell				9	14	8
Morula					2	4
Blastocyst						5

Values are the numbers of zygotes developed to each cleavage state.

Table 8. Development of mouse zygotes in Ham's F-10 culture medium containing 200 μ M EDTA

Cleavage	Day	1	2	3	4	5
Two cell		27	11			
Four cell			16	12	5	4
Eight cell				15	8	5
Morula					14	14
Blastocyst						4

Values are the numbers of zygotes developed to each cleavage state.

Table 9. Development of mouse zygotes in Ham's F-10 culture medium modified with additions of fetal cord serum and/or EDTA

Cleavage	Zygotes(No.)	4cells	8cells	Morula	Blastocyst
Medium		(%)	(%)	(%)	(%)
H	22	90.9	36.4	13.6	4.5
H+F	26	100.0	80.8*	65.4*	23.1
H+F+E50	24	100.0	95.8*	87.5*#	37.5*
H+F+E100	28	96.4	96.4*	89.3*+#	42.9**
H+E+F200	28	92.9	82.1*	67.9*	17.9
H+E50	25	96.0	88.0*	76.0*	20.0
H+E100	22	100.0	77.3*	40.9*	22.7
H+E200	27	100.0	85.2*	66.7*	14.8

H : Ham's F-10 culture medium

F : 10% Fetal cord serum

E50, E100, E200 : EDTA 50 μ M, 100 μ M and 200 μ M respectively

* P<0.05 : significantly different from H group

+ P<0.05 : significantly different from H+F group

P<0.05 : significantly different from H+E100 in morula

** P<0.05 : significantly different from H+F+E200 and H+E200 group in blastocyst

가한 배양액과 EDTA만 첨가한 배양액에서 2 세포기 배아의 난할 단계에 따른 비율의 비교에서는 Ham's F-10 배양액에 태아제대혈청과 EDTA 100 μ M을 첨가한 배양액이 상실배기에서 유의하게 높았으나($p < 0.05$), 포배기에서는 Ham's F-10 배양액에 태아제대혈청과 EDTA 50 μ M, 혹은 100 μ M을 첨가한 배양액이 다소 높은 경향을 보였다(표9). Ham's F-10 배양액에 여러 농도의 EDTA와 태아제대혈청을 첨가한 배양액과 Ham's F-10 배양액에 여러 농도의 EDTA만을 첨가한 배양액들 사이의 난할의 비율의 비교에서는 상실배기에서 Ham's F-10 배양액에 태아제대혈청과 EDTA 50 μ M, 100 μ M을 첨가한 배양액이 Ham's F-10 배양액에 EDTA 100 μ M만 첨가한 배양액보다 유의하게 높았고($p < 0.05$), 포배기에서는 Ham's F-10 배양액에 태아제대혈청과 EDTA 100 μ M을 첨가한 배양액이 Ham's F-10 배양액에 태아제대혈청과 EDTA 200 μ M을 첨가한 배양액과 Ham's F-10 배양액에 EDTA 200 μ M만 첨가한 배양액들보다 유의하게 높았다($p < 0.05$) (표9).

고 찰

Stephoe 등¹¹⁾이 자연 배란주기를 이용하여 체외 수정에 처음 성공한 이래로 수정률 및 임신의 성공률을 높이기 위한 여러 가지 기술적인 분야에서 많은 발전이 있었다. 그러나 배아 및 수정란의 배양에 있어서 배양액의 발달은 1963년 Brinster⁷⁾가 pyruvate와 lactate를 사용한 이후 점차 질적인 개선이 되고 있으나 아직까지 가장 적당하다고 인정받는 배양액 및 배양 방법은 없는 실정이다. 최근 수년동안에 체외수정 및 초기 수정란의 분열에 많은 영향을 미치는 물의 질적

인 개선, 배양액의 제조⁸⁾ 및 보존방법⁹⁾의 개선을 통하여 수정 및 임신율을 높이기 위한 노력이 지속되고 있고 있으나 아직 만족스러운 성적은 못된다. 실제 인체의 수정란을 이용하여 실험을 하여야 하지만 현실적으로 어렵기 때문에 같은 포유류인 백서의 수정란을 이용하여 초기 수정란의 분할 상태로 배양액의 질적인 수준을 평가하게 되고, 착상전 발육의 최소 단계인 상실배기 이상 분열되어야 의의를 가진다. 수정란의 배양에는 주로 Ca, Cu, Fe, Mg, Zn 등의 중금속 물질과 당, 비타민, 아미노산 등을 함유하고 있는 Ham's F-10 기본 배양액에 NaHCO₃, Calcium lactate 및 항생제를 혼합하여 만든 용액을 사용한다. 최근에는 단백질의 공급원으로 Marrs 등¹⁰⁾은 모체의 배란전 혈청을, Jones 등¹¹⁾은 태아제대혈청을 Ham's F-10 배양액에 첨가하여 사용하였다. Ogawa 와 Marrs¹²⁾는 태아제대혈청이나 모체의 배란전 혈청이 c-AMP, catecholamines, 비타민, 성장인자, 지질, 알부민을 제공하여 체외수정에 도움을 준다고 하였으며, 특히 태아제대혈청이 모체의 배란전 혈청보다 임신률을 더 증가시킨다.^{3,13,14)} Saito 등¹⁵⁾은 배아 성장에 적절한 태아제대혈청의 농도는 최소 10% 정도 되어야 하며 더 높은 농도에서는 배아 성장률을 증가시키지 않는다고 하였다.

Stephoe 등¹⁶⁾은 태아제대혈청을 첨가한 배양액에서 기본 배양액만을 사용한 경우보다 수정란의 분할이 더 잘 된다고 하였으며 마찬가지로 본 연구에서도 태아제대혈청을 첨가한 배양액에서 Ham's F-10 기본 배양액에 비해 2 세포기 배아의 상실배기 및 포배기 난할률이 증가되었다. 반면에 Caro와 Trounson¹⁷⁾은 태아제대혈청을 첨가한 배양액보다 태아제대혈청을 첨가하지 않은 배양액에서 2 세포기 배아의 포배기 난할이 더 잘 된다고 보고하였으며, Metha 와 Kiessling¹⁸⁾은

배양액내 모체혈청이나 송아지 혈청을 첨가하면 수정란의 분할 및 배아로의 발달이 저하 된다고 하였다. 현재까지 모체의 배란전 혈청이나 태아의 제대혈청이 첨가된 배양액이 인간의 체외수정 과정에 가장 흔히 사용되고 있으나 만족할 만한 결과를 주지 못하고 있다.^{19,20)} 따라서 배아 발육의 개선에 도움이 되는 배양액의 첨가물질들은 다른 부적합한 배양조건을 향상시킬 수 있어야 한다.

Sellens 등²¹⁾ 및 Borenfreund와 Puerner²²⁾는 많은 배양액들에서 수정란의 아미노산 공급원이 결여되어 있고 또 수정란이 미량의 중금속으로 오염되어 있다고 하였으며, 많은 연구^{23,24)}에서 중금속 물질을 킬레이트시키는 EDTA의 첨가가 배아의 발달에 영향을 미친다고 하였다. 배양액내에서 EDTA의 작용기전은 정확히 알 수 없지만 EDTA가 난황막 바깥에서 배양액내 중금속 물질의 수정란과 배아에 대한 독성을 킬레이트화시켜주거나 배아발달에 중요한 다른 물질들의 이동을 용이하게 함으로 수정란의 초기 분할 및 배아의 발육을 증가시키며^{24,25)} 또 질소원이 부족할 시에는 EDTA가 아미노산의 흡수를 증가시켜 단백질의 합성을 유도하여 포배기까지의 발달에 중요한 역할을 한다.²³⁾ Metha와 Kiessling²⁶⁾은 아미노산과 EDTA가 있는 배양액에서 수정란의 분할 및 배아의 발달이 기본 배양액에서 보다 2배 증가한다고 하였다. Fissore 등²³⁾은 기본배양액내 중금속의 중화에는 0.5 μ M의 EDTA로 효과가 있다고 하였으며, 비록 배양액내 중금속이 미량으로 있지만 EDTA가 배양액내에 보다 많은 칼슘이온과 비교적 강하게 경쟁적으로 결합하므로 백서 배아가 최대로 발육하는데 필요한 EDTA의 농도는 5-10 μ M이 필요하다고 하였다. 그러나 EDTA와 송아지 혈청을 첨가한 경우와 EDTA만을 첨가한 배양액사이에서 상

실패기 및 포배기 난할률의 차이는 없었다. Metha와 Kiessling²⁶⁾은 Ham's F-10 기본배양액에 비해 EDTA를 첨가한 배양액에서 2 세포기 배아의 상실배기 난할률의 증가는 없었으나 포배기 난할률은 유의하게 높았고, EDTA를 10 μ M에서 150 μ M을 첨가한 배양액들 사이에는 난할률의 유의한 차이가 없었으나 200 μ M을 첨가한 배양액에서 포배기 난할률이 유의하게 낮았다. 그러나 모체혈청이나 태아제대혈청을 첨가한 경우에는 EDTA만 첨가한 배양액에 비해 상실배기 및 포배기 난할률이 유의하게 낮았다. 본 연구에서는 Ham's F-10 기본 배양액과 비교시 태아제대혈청이나 EDTA를 단독 또는 함께 첨가한 배양액에서 2 세포기 배아의 상실배기 및 포배기 난할률이 유의하게 높았고, 흔히 사용하는 태아제대혈청이 첨가된 Ham's F-10 배양액과 비교시 태아제대혈청과 100 μ M의 EDTA가 첨가된 배양액에서 상실기 난할률이 증가되었다. 또 태아제대혈청 및 EDTA 50 μ M 및 100 μ M을 첨가한 배양액에서 EDTA 100 μ M만 첨가한 배양액에 비해 상실배기 난할률이 유의하게 높았으며, 포배기 난할률은 태아제대혈청과 EDTA 100 μ M을 첨가한 배양액에서 EDTA 200 μ M만 첨가한 배양액에 비해 유의하게 높았다. 따라서 Metha와 Kiessling²⁶⁾의 연구와는 달리 태아제대혈청과 50 μ M 및 100 μ M 농도의 EDTA의 첨가가 배아의 발육에 적절한 배양액으로 추정된다. 결과적으로 백서에서 초기 수정란의 발달은 질소원이 없어도 되지만, 상실기 이후 부터는 단백질 합성이 증가하므로 외부로 부터 질소원이 공급되어야 하며 특히 포배기에서는 더 많은 아미노산을 필요로 하여 이 경우에 태아제대혈청이 필요한 아미노산을 공급한다.²²⁾

이상의 성적을 종합하면 Ham's F-10 기본 배양액에 태아제대혈청과 적정 농도의 EDTA

50 μ M 및 100 μ M을 첨가한 배양액에서 초기 수정란의 분할이 우수함을 알 수 있고, 이는 수정란의 배양시 적절한 배양액을 선택할 수 있는 기초 자료로서 유용할 것으로 사료된다.

수함을 알 수 있고, 이는 수정란의 배양시 적절한 배양액을 선택할 수 있는 기초 자료로서 유용할 것으로 사료된다.

요 약

Ham's F-10 기본 배양액과 이 배양액에 여러 가지 농도의 EDTA와 태아제대혈청을 단독 또는 같이 혼합한 배양액을 얻어 각각의 배양액에서 5-10주된 백서를 이용하여 2 세포기 배아의 단계적 분할정도를 96시간 동안 관찰하였다.

Ham's F-10 기본 배양액에 비해 태아제대혈청이나 EDTA 50 μ M에서 100 μ M을 단독 또는 함께 첨가한 배양액에서 2 세포기의 배아의 상실배기 난할률이 매우 높았으며($p < 0.05$), 포배기 난할률은 태아제대혈청과 EDTA 50 μ M에서 100 μ M을 첨가한 배양액에서 유의하게 높았다($p < 0.05$).

체외수정실에서 흔히 사용되는 태아제대혈청을 첨가한 배양액과 비교시 태아제대혈청과 EDTA 100 μ M을 첨가한 배양액에서 상실기 난할률이 유의하게 높았다($p < 0.05$).

태아제대혈청과 여러 농도의 EDTA를 첨가한 배양액과 EDTA만 첨가한 배양액의 비교에서 태아제대혈청과 EDTA 50 μ M 및 100 μ M을 첨가한 배양액에서 EDTA 200 μ M만 첨가한 배양액에 비해 상실기 난할률이 매우 유의하게 높았고($p < 0.05$), 포배기 난할률은 태아제대혈청과 EDTA 100 μ M을 첨가한 배양액이 EDTA 200 μ M을 단독 또는 태아제대혈청과 함께 넣은 배양액에 비해 유의하게 높았다($p < 0.05$).

결론적으로 Ham's F-10 기본 배양액에 태아제대혈청과 적정 농도의 EDTA 50 μ M 및 100 μ M을 첨가한 배양액에서 초기 수정란의 분할이 우

참 고 문 헌

1. Steptoe PC, Edwards RG, Purdy JM: Establishing full term human pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. Br J Obstet Gynaecol 87:737-743, 1980.
2. Brinsden PR, Rainsbury PA: A textbook of in vitro fertilization and assisted reproduction. Parthenon Publishing Group Ltd. New Jersey, 1992, pp 325-328.
3. Condon-Mahoney, Wortham JWE, Bundren JC, Witmyer J, Shirley B: Evaluation of human fetal cord sera, Ham's F-10 medium, and in vitro culture material with mouse in vivo fertilization system. Fertil Steril 44:521-25, 1985.
4. Bonso A, Chye NS, Mok H, Lim MN, Wong PC, Ratnam S: Evaluation of Chang's culture medium for mouse in vitro fertilization and embryonic development. IVF & ET 5:102-107, 1988.
5. Leung PCS, Gronow MJ, Kellow GN, Lopata A, Speirs AL, McBain JC, Plessis YP, Johnston I: Serum supplementation in human in vitro fertilization and embryo development. Fertil Steril 41:36-39, 1984.
6. Jones HW, Jones GS, Hodgen GD, Rosenwaks Z: In vitro fertilization-Norfolk. Waverly Press Inc, New York, 1986, pp 185-186.
7. Brinster RL: A Method for in vitro cultivation

- from two cell to blastocysts. *Exp Cell Res* 32: 205-209,1963.
8. Quinn P, Kerin JF, Warnes GM: Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium base on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril* 44:493-498,1985.
 9. Dandekar PV, Quigley MN: Laboratory setup for human in vitro fertilization. *Fertil Steril* 42: 1-5,1984.
 10. Marrs RP, Vargyas JM, Gibbons: A modified technique of human in vitro fertilization and embryo transfer. *Am J Obstet Gynecol* 141: 318-324,1983.
 11. Jones GS, Garcia JE, Acosta AA: Human menoapusal gonadotropin/human chorionic gonadotroin follicular maturation for oocyte aspiration. *Fertil Steril* 41:31-37,1984.
 12. Ogawa T, Marrs RP: The effect of protein supplementation on single cell mouse embryos in vitro. *Fertil Steril* 47:156-61,1987.
 13. Leung PCS, Gronow MJ, Kellow GN, Lopata A, Speris AL: Serum supplement in human in vitro fertilization and embryo development. *Fertil Steril* 41:36-39,1984.
 14. Kemeter P, Feichtinger W: Pregnancy following in vitro fertilization and embryo transfer using pure human serum as culture and transfer medium. *Fertil Steril* 41:936-37, 1984.
 15. Saito H, Berger T, Mishell DR, Marrs RP: The effect of serum fractions on embryo growth. *Fertil Steril* 41:761-766,1984.
 16. Steptoe PC, Edwards RG, Shulman J, Purdy J: The recovery of human preovulatory oocytes, fertilization in vitro, cleavage and embryo transfer. In cam pos de Paz A. "Recent Advances in Human Reproduction" *Expcerpta Medica Amsterdam* 285-291,1976.
 17. Caro CM, Trounson A: The effect of protein on preimplantation mouse embryo development in vitro. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 3:215-217,1983.
 18. Metha T, Kiessling AA: Developmental potential of mouse embryos conceived in vitro and cultured in EDTA with or without amino acids or serum. *Biol Reprod* 43:600-606,1990.
 19. Shirley B, Edward-Warham JW, Witmyer J, Condon-Mahoney M, Fort G: Effects of human serum and plasma on development of mouse embryos of culture medium. *Fertil Steril* 43: 129-134,1985.
 20. Han HD, Kiessling AA: In vivo development of transferred mouse embryos conceived in vitro in simple and complex media. *Fertil Steril* 50:159-163,1988.
 21. Sellens MH, Stein S, Sherman MI: Protein and free amino acid content in preimplantations mouse embryos and blastocysts under various culture conditions. *J Reprod Fertil* 61:307-15, 1981.
 22. Borenfreund E, Puerner JA: Cytotoxicity of metals, metal-metal and metal-chelator combinations assayed in vitro. *Toxicology* 39: 121-34,1986.
 23. Fissore R, Jackson KV, Kiessling AA: Mouse zygotes development in medium without protein in presense of ethylenediaminetetraacetic acid. *Biol Reprod* 41:835-41,1989.
 24. Abraczuku J, Solter D, Koprowski H: The

- beneficial effect of EDTA on development of mouse one cell embryos in chemically defined medium. *Dev Biol* 61:373-83,1977.
25. Poueymirou WT, Schultz RM: Regulation of mouse preimplantation development:inhibition of synthesis of proteins in the two cell embryo that require transcription by inhibition of cAMP-dependent protein kinase. *Dev Biol* 588-99,1989.
26. Metha T, Kiessling AA: Developmental potential of mouse embryos conceived in Ham's F10 medium containing EDTA. *Fertil Steril* 60:1088-1093,1993.

-Abstract-

The Effect of EDTA and Fetal Cord Serum Supplementation
to Ham's F-10 Culture Medium on Developmental
Potential of Mouse Embryos In Vitro

Byeong Seog Kim, Young Gi Lee, Yoon Kee Park,
Tae Hyung Lee, Sung Ho Lee

*Department of Obstetrics and Gynecology
College of Medicine, Yeungnam University
Taegu, Korea*

It is the most important to select optimal culture conditions to promote safe embryo growth in the technique of human in vitro fertilization and embryo transfer. It has been shown that the addition of biologic fluids, such as blood serum, of various origins, improved fertilization and early cleavage rates in numerous species. The purpose of this study is to attempt to measure developmental potential of mouse eggs fertilized and cleaved in Ham's F10 culture medium containing a chelating agent, EDTA and fetal cord serum. In this study, we selected 40 female mice and 20 male mice, and investigated optimal serum concentrations for mouse embryo growth.

Two cell stage mouse embryos were cultured in Ham's F-10 medium, Ham's F-10 medium with various concentrations of EDTA, or Ham's F-10 medium with EDTA and 10% human cord serum. Developmental ratios to morula in Ham's F-10 medium containing various concentrations of EDTA and/or 10% fetal cord serum were significantly higher than in unsupplemented Ham's F-10 medium ($p < 0.05$). Developmental ratios to blastocyst in Ham's F-10 containing 10% fetal cord serum and 50 μ M or 100 μ M EDTA were significantly higher than in unsupplemented Ham's F-10 medium ($p < 0.05$). Developmental ratios to morula in Ham's F-10 containing 10% fetal cord serum and 100 μ M EDTA were significantly higher than in Ham's F-10 with 10% fetal cord serum used commonly in many human IVF centers ($p < 0.05$). Developmental ratio to blastocyst in Ham's F-10 containing 10% fetal cord serum and 100 μ M EDTA was significantly higher than in Ham's F-10 with 200 μ M EDTA ($p < 0.05$).

In summary, embryo development to morula and blastocyst was significantly higher in the presence of human cord serum or EDTA than in the unsupplemented medium. The most significantly development to morula and blastocyst was obtained at Ham's F-10 medium with 100 μ M concentration of EDTA and 10% fetal cord serum.

These results suggest that Ham's F-10 medium containing 10% fetal cord serum and optimal concentrations of EDTA significantly promoted early cleavage of mouse zygotes, and these will be useful as basic data for the selection of culture medium in human in vitro fertilization.

Key Words : Ethylenediaminetetraacetic acid, Fetal cord serum, Ham's F-10 culture medium