

SO SÁNH HIỆU QUẢ TẠO PHÔI NANG GIỮA HAI LOẠI MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY ĐƠN BƯỚC VÀ NUÔI CẤY CHUYỂN TIẾP

Võ Nguyên Thúc⁽¹⁾, Nguyễn Ngọc Quỳnh⁽¹⁾, Phạm Dương Toàn⁽¹⁾, Huỳnh Gia Bảo⁽¹⁾, Đặng Quang Vinh^(1,2)
(1) Bệnh viện Đa khoa Mỹ Đức, (2) Đại học Quốc gia TP.HCM

Từ khóa: Môi trường đơn bước, môi trường chuyển tiếp, tỷ lệ tạo phôi nang.

Tóm tắt

Mục tiêu: So sánh hiệu quả tạo phôi nang giữa hai loại môi trường nuôi cấy đơn bước và chuyển tiếp.

Thiết kế nghiên cứu: Đây là nghiên cứu đoàn hệ hồi cứu. Số liệu được thu thập trong thời gian từ tháng 7/2015 đến tháng 4/2016 tại IVFMD, trong đó 92 bệnh nhân có phôi được nuôi cấy trong môi trường đơn bước và 108 bệnh nhân có phôi được nuôi cấy trong môi trường chuyển tiếp. Yếu tố đánh giá kết quả bao gồm tỷ lệ tạo phôi nang, tỷ lệ phôi nang hữu dụng, tỷ lệ thai diễn tiến, tỷ lệ làm tổ.

Kết quả: Không có sự khác biệt giữa hai nhóm bệnh nhân về độ tuổi, chỉ số khối cơ thể (BMI), số lần điều trị, thời gian vô sinh, nguyên nhân vô sinh. Tỷ lệ tạo phôi nang giữa hai môi trường đơn bước và chuyển tiếp là tương đương (57% và 60%, $P>0,05$). Không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa tỷ lệ phôi nang hữu dụng, tỷ lệ thai diễn tiến, tỷ lệ làm tổ giữa hai môi trường đơn bước và chuyển tiếp (lần lượt là 49% và 50%; 57% và 62%; 45,8% và 50,7%; $P>0,05$).

Kết luận: Môi trường đơn bước có hiệu quả tương đương với môi trường chuyển tiếp trong việc tạo phôi và nuôi cấy phôi trong thụ tinh trong ống nghiệm.

Abstract

THE EFFECTIVENESS OF SINGLE STEP CULTURE MEDIA AND SEQUENTIAL CULTURE MEDIA ON THE BLASTULATION RATE

Objective: To compare the effectiveness of the blastulation rate between the two types of culture media: the single-step media and the sequential media.

Patients and Methods: This was a retrospective cohort study. The data was collected from July-2015 to April-2016 in IVFMD. There were 92 patients with embryos were cultured in the single step media and 108 patients with embryos were cultured in the sequential media. The

Tác giả liên hệ (Corresponding author):
Võ Nguyên Thúc,
email: thuc.vn@myduchospital.vn
Ngày nhận bài (received): 19/9/2016
Ngày phản biện đánh giá bài báo (revised):
23/12/2016
Ngày bài báo được chấp nhận đăng
(accepted): 30/12/2016

primary outcome was the blastulation rate and the secondary outcomes were the utilization rate, the on-going pregnancy rate and the implantation rate.

Results: There were no differences in patient characteristics between two groups (age, BMI, number of treatment cycles, infertility duration, type of infertility). There was no difference in the blastulation rate between the sequential media and the single-step media (57% vs 60%, $P>0.05$). There were no differences in the utilization rate, the pregnancy rate, and the implantation rate between two groups respectively (49% vs 50%; 57% vs 62%; 45,8% vs 50,7%; $P>0.05$).

Conclusion: The two media were equivalent in relation to the blastocyst rate.

1. Đặt vấn đề

Trong 10-15 năm qua đã có những tiến bộ lớn trong lĩnh vực thụ tinh trong ống nghiệm (TTTON) để cải thiện các dịch vụ cũng như tỷ lệ thành công. Trước đây, bệnh nhân thường được chuyển phôi sau 2-3 ngày nuôi cấy trong môi trường in-vitro tức là lúc phôi ở giai đoạn 4-8 tế bào. Tuy nhiên, kể từ năm 1997, việc nuôi phôi dài ngày bắt đầu được chú ý do nuôi cấy đến giai đoạn phôi nang có thể cung cấp để chọn phôi tiềm năng hơn để chuyển cho bệnh nhân. Điều này cho phép chuyển ít phôi với khả năng làm tổ cao hơn, không ảnh hưởng đến tỷ lệ thai, và làm giảm được tỉ lệ đa thai. Một lý do thứ hai giúp ích cho việc sử dụng các phương pháp chẩn đoán di truyền tiền làm tổ, thông thường, sinh thiết phôi được thực hiện vào ngày 3 và tiếp tục nuôi cấy đến ngày 5 để chờ kết quả của sinh thiết trước khi chuyển phôi hoặc sinh thiết vào ngày 5 và trữ phôi cho chu kỳ chuyển phôi trữ kế tiếp. Để đáp ứng cho việc nuôi phôi dài ngày, hệ môi trường nuôi cấy phôi cần đáp ứng được nhu cầu dinh dưỡng của phôi ở từng giai đoạn phát triển.

Hầu hết các trung tâm TTTON thường sử dụng các sản phẩm môi trường nuôi cấy thương mại, trong đó các sản phẩm thương mại được sản xuất dựa theo hai xu hướng: “trở về tự nhiên” hay “để cho phôi chọn” (1).

“Trở về tự nhiên” là quan điểm dựa trên việc thiết lập môi trường có thành phần gần giống

với sinh lý tự nhiên, phôi được tiếp xúc với các chất dinh dưỡng khác nhau từ ống dẫn trứng và từ tử cung, và do đó trong hệ môi trường nuôi cấy chuyển tiếp sẽ có hai loại môi trường chứa các thành phần khác nhau ứng với hai giai đoạn phát triển trước khi nén và sau khi nén của phôi (môi trường chuyển tiếp). Khi nuôi cấy với hệ môi trường chuyển tiếp, phôi phải được chuyển sang một môi trường nuôi cấy khác vào ngày ba.

“Để cho phôi chọn” là quan điểm có liên quan đến việc sử dụng đồng thời các thành phần có trong môi trường nuôi cấy, ảnh hưởng của mỗi thành phần trong môi trường có thể phụ thuộc vào nồng độ của các thành phần khác. Miễn là nồng độ của các thành phần nằm trong “phạm vi chấp nhận được”, phôi sẽ tự thích nghi và sử dụng bất cứ thành phần chất nào mà phôi muốn (môi trường đơn bước). Do đó, hệ môi trường đơn bước chỉ có một loại môi trường nuôi cấy cho phôi phát triển cho hai giai đoạn phát triển trước khi nén và sau khi nén của phôi. Khi nuôi cấy với hệ môi trường đơn bước sẽ có hai cách nuôi cấy: thứ nhất là nuôi cấy liên tục không đổi môi trường vào ngày ba, thứ hai là nuôi cấy có chuyển môi trường vào ngày ba. Việc nuôi cấy có chuyển môi trường hay không chuyển môi trường phụ thuộc vào quy trình của labo, cũng như độ sạch và độ ổn định của hệ thống nuôi cấy phôi. Tuy nhiên không có sự khác biệt về kết quả

nuôi cấy giữa việc thay môi trường hay không thay môi trường vào ngày ba.

Hiện nay, các nghiên cứu trên thế giới vẫn chưa xác định được môi trường chuyển tiếp hay môi trường đơn bước có tính ưu việt hơn trong việc nuôi cấy phôi. Tuy nhiên, môi trường đơn bước được nhiều quan tâm hơn do sử dụng thuận tiện và ít tốn kém. Hơn nữa, khi nuôi cấy với môi trường đơn bước, sẽ có ít thao tác lên trứng và phôi (2). Sau một thời gian xây dựng quy trình và thử nghiệm, chúng tôi đã đưa vào sử dụng hệ môi trường nuôi cấy đơn bước vào tháng 07 năm 2016. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm so sánh hiệu quả nuôi cấy phôi giữa hai nhóm môi trường đơn bước và chuyển tiếp.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Thiết kế nghiên cứu:

Đây là nghiên cứu đoàn hệ hồi cứu được thực hiện tại IVFMD, bệnh viện Mỹ Đức. Bệnh nhân thực hiện TTON trong thời gian tháng 07/2015 đến tháng 4/2016.

Tiêu chuẩn chọn mẫu:

- Số chu kỳ điều trị TTON ≤ 2 chu kỳ.
- Kích thích buồng trứng bằng phác đồ antagonist.
- Sử dụng GnRH agonist để gây trưởng thành noãn.
- Nuôi cấy phôi đến ngày 5.

Tiêu chuẩn loại trừ:

- Các chu kỳ xin-cho trứng.
- Các chu kỳ nuôi trưởng thành trứng non.
- Hồ sơ không đầy đủ dữ liệu cần thiết.

Yếu tố đánh giá kết quả:

Yếu tố chính:

- Tỷ lệ tạo phôi nang.

Yếu tố phụ:

- Tỷ lệ phôi nang hữu dụng.
- Tỷ lệ thai diễn tiến.
- Tỷ lệ làm tổ.

Phương pháp tiến hành:

Kích thích buồng trứng bằng phác đồ antagonist được áp dụng cho bệnh nhân có chỉ định TTON. Vào ngày thứ 2-3 vòng kinh, liều FSH đầu tiên được xác định dựa trên số nang noãn thứ cấp AFC và nồng độ AMH. Vào ngày

5, mũi antagonist được tiêm và kéo dài đến ngày tiêm mũi gây trưởng thành noãn. Đồng thời, qua siêu âm nang noãn và xét nghiệm nội tiết để đánh giá đáp ứng buồng trứng, và sau 2-3 ngày việc đánh giá được thực hiện lại. Kích thích trưởng thành noãn khi có ít nhất 3 nang có kích thước trên 17mm khi siêu âm. Chọc hút noãn được tiến hành qua ngả âm đạo dưới gây mê và tê tại chỗ.

Chuẩn bị cho môi trường đơn bước LifeGlobal (LG) và môi trường chuyển tiếp Origio Sequential (OS) được thực hiện cho một ca vào buổi chiều ngày trước chọc hút trứng (ngày -1), buổi sáng trước chọc hút (ngày 0), buổi sáng ngày 3 (ngày 3), và buổi chiều ngày trước chuyển phôi (ngày 4). Tất cả các quy trình tìm rửa trứng, lọc rửa tinh trùng, tách trứng, tiêm tinh trùng vào bào tương noãn (ICSI), kiểm tra thụ tinh, đọc phôi, lựa phôi, chuyển phôi đều được thực hiện theo quy trình labo thường quy.

Noãn sau khi chọc hút sẽ được nuôi cấy khoảng 2 giờ ở 37°C, 6%CO₂ và 5%O₂. Trong khi đó, tinh trùng của người chồng sẽ được lọc rửa theo phương pháp thang nồng độ. Sau đó noãn được tách tế bào quanh noãn và được thực hiện phương pháp ICSI. Noãn sau ICSI của hai nhóm sẽ được nuôi cấy theo nhóm (tối đa 3 trứng một giọt môi trường) trong cùng điều kiện 37°C, 6%CO₂ và 5%O₂. Tủ cấy được sử dụng để nuôi cấy là tủ K-system G185. Thụ tinh được kiểm tra vào khoảng 16-18 tiếng sau ICSI dưới kính hiển vi đảo ngược. Các ca tiếp tục nuôi cấy ngày 5 sẽ được chuyển môi trường nuôi cấy ở ngày 3.

Vào ngày 5, các phôi được đánh giá vào thời điểm 116-118 giờ sau ICSI. Phôi ngày 5 được xác định khi có 3 tiêu chí đánh giá: độ nở rộng của khoang, khối ICM, TE. Phôi hữu dụng ngày 5 bao gồm phôi loại I và II. Kết quả phôi được thông báo cho bệnh nhân. Số phôi nang chuyển cho bệnh nhân là 1-2 phôi. Bệnh nhân được hẹn thử thai beta-hCG 11 ngày sau chuyển phôi. Hỗ trợ hoàng thể đến khi thai ít nhất 07 tuần bằng estradiol và progesterone ngoại sinh.

Các số liệu được phân tích giữa hai nhóm như tuổi người vợ, chỉ số khối cơ thể (BMI), thời gian vô sinh, số chu kỳ TTON, chỉ định TTON,

số noãn chọc hút, số noãn trưởng thành, tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ tạo phôi nang, số phôi hữu dụng ngày 5.

Các số liệu sẽ được trình bày dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn hay dưới dạng phần trăm. Sự khác biệt giữa các giá trị trung bình được kiểm định bằng Student's t-test cho dữ liệu theo luật phân phối chuẩn, kiểm định wilcoxon test cho dữ liệu không theo luật phân phối chuẩn, luật phân phối của các biến được kiểm tra bằng phương pháp shapiro test và giá trị phần trăm được kiểm định sự khác biệt bằng Chi-square test, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê được xác định khi $P < 0,05$.

3. Kết quả

Trong thời gian từ tháng 7/2015 đến tháng 4/2016, có 200 bệnh nhân thỏa tiêu chuẩn nhận loại, trong đó có 92 bệnh nhân sử dụng môi trường đơn bước và 108 bệnh nhân sử dụng môi trường chuyển tiếp. Đặc điểm chung của bệnh nhân trong hai nhóm được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1: Đặc điểm bệnh nhân giữa 2 nhóm

Đặc điểm	Môi trường đơn bước (n=92)	Môi trường chuyển tiếp (n=108)	P
Tuổi (năm)	31,32 (4,83)	31,03 (4,19)	0,652
BMI (kg/m ²)	21,12 (2,64)	20,97 (2,14)	0,661
Số chu kì điều trị (%)	1	72 (78,3)	0,217
	2	20 (21,7)	
Loại vô sinh (%)	Nguyên phát	49 (53,3)	0,329
	Thứ phát	43 (46,7)	
Nguyên nhân vô sinh (%)	Chưa rõ nguyên nhân	7 (7,6)	0,838
	Lạc nội mạc tử cung	3 (3,3)	
	Vô sinh nam	30 (32,6)	
	Khác	8 (8,7)	
	Rối loạn phóng noãn	25 (27,2)	
Tai vòi	19 (20,7)	29 (26,9)	

Bảng 2: Kết quả phôi học

Đặc điểm	Môi trường đơn bước	Môi trường chuyển tiếp	P
Số trứng chọc hút	22,43 (7,86)	22,90 (8,89)	0,699
Số trứng trưởng thành	18,70 (6,35)	19,24 (6,86)	0,563
Tỷ lệ thụ tinh	88% (0,1)	85% (0,11)	0,074
Tỷ lệ phôi nang hữu dụng	49% (0,23)	50% (0,21)	0,717
Tỷ lệ tạo phôi nang/thụ tinh	57% (0,2)	60% (0,16)	0,237

Bảng 3: Kết quả thai

Đặc điểm	Môi trường đơn bước	Môi trường chuyển tiếp	P
Tỷ lệ thai diễn tiến	57%	62%	0,623
Tỷ lệ làm tổ	45,8%	50,7%	0,387

4. Bàn luận

Đây là một nghiên cứu được thực hiện nhằm so sánh hiệu quả của nuôi cấy phôi trong môi trường đơn bước và môi trường chuyển tiếp. Kết quả nghiên cứu cho thấy không có sự khác biệt về tỷ lệ tạo phôi nang, tỷ lệ tạo phôi hữu dụng, tỷ lệ thai diễn tiến, tỷ lệ làm tổ giữa hai nhóm.

Sự phát triển của môi trường chuyển tiếp dựa trên nồng độ đo được của các thành phần ở ống dẫn trứng và lòng tử cung. Phôi có khả năng chủ động kiểm soát sự trao đổi chất, và do đó có thể điều chỉnh môi trường nội bào của mình. Vì vậy, thành phần môi trường đã được thay đổi trong từng giai đoạn và thời điểm phát triển để đáp ứng các nhu cầu của phôi (3). Do đó việc thay đổi môi trường ở ngày ba thường được thực hiện. Với môi trường nuôi cấy đơn bước, phôi được nuôi cấy liên tục trong một môi trường từ giai đoạn hợp tử đến giai đoạn phôi nang, có thể nuôi cấy không bị gián đoạn hoặc gián đoạn để thay đổi môi trường mới vào ngày ba (4). Tuy nhiên, cho dù sử dụng hệ môi trường nào, việc đánh giá sự phát triển của phôi đa phần được thực hiện ở môi trường bên ngoài tử cung. Điều này gây một phần ảnh hưởng lên phôi do sự thay đổi đột ngột về pH, nhiệt độ, ánh sáng từ kính hiển vi soi nổi. Điểm quan trọng chính đó là các phôi khác nhau sẽ phát triển khác nhau (5). Do đó nhu cầu dinh dưỡng cung cấp cho phôi tại một thời điểm sẽ khác nhau. Đối với môi trường chuyển tiếp, ở ngày ba, việc cung cấp nguồn dinh dưỡng mới cho phôi bị chậm trễ do việc thay môi trường vào buổi chiều theo quy trình labo. Đối với môi trường đơn bước, thành phần dinh dưỡng cho phôi đã có đủ và cung cấp ngay khi phôi cần bất cứ lúc nào.

Ngày nay, với việc nuôi cấy bằng tủ time-lapse cho phép đánh giá phôi liên tục mà không cần phải đưa phôi ra khỏi tủ cấy. Điều này có giảm thiểu stress do việc di chuyển phôi ra khỏi tủ cấy. Trong thực tế, việc giảm số lần mở cửa tủ cấy làm tăng sự ổn định của môi trường nuôi cấy và một phần cải thiện sự phát triển của phôi (6). Hơn nữa, đối với môi trường chuyển tiếp đòi hỏi cần phải thay đổi môi trường nuôi cấy ở ngày ba, việc di chuyển phôi giữa các giọt môi trường nuôi cấy bằng pipet có thể gây ra sự gia

tăng stress cho phôi. Đồng thời, mỗi thao tác với phôi cũng làm tăng nguy cơ mất phôi. Tuy nhiên, nuôi cấy bằng tủ time-lapse và hệ môi trường đơn bước, không cần thiết phải đổi môi trường vào ngày ba (7). Do đó, việc không thay đổi môi trường đồng với việc giảm thao tác và giảm stress cho phôi.

Các nghiên cứu về môi trường nuôi cấy phôi hiện nay đang tập trung vào việc tránh tác động của di truyền ngoài nhân lên phôi (8,9). Những tiến bộ trong khoa học này sẽ dần thay thế cách đánh giá về hình thái và sinh tổng hợp của phôi bằng việc tập trung nhiều vào những tác động của môi trường nuôi cấy trên biểu hiện gen trong quá trình phát triển và các phản ứng chuyển hóa của phôi (10). Môi trường nuôi cấy phôi không những có vai trò quan trọng đến sự phát triển phôi về mặt hình thái mà còn ảnh hưởng đến di truyền ngoài nhân (11).

Hiện nay có nhiều nghiên cứu so sánh hai hệ môi trường đơn bước và chuyển tiếp. Nghiên cứu chia trứng nuôi cấy đến ngày 5 so sánh môi trường đơn bước (KSOMAA) và môi trường chuyển tiếp P-1 và CCM cho thấy không có sự khác biệt trong sự phát triển phôi nang giữa hai môi trường (12). Tương tự, nghiên cứu ngẫu nhiên so sánh sự phát triển của phôi trong môi trường đơn bước Rotterdam và môi trường chuyển tiếp G1 / G2 không tìm thấy bất kỳ sự khác biệt trong tỷ lệ tạo phôi nang, tỷ lệ làm tổ và tỷ lệ thai (2). Kết quả tương tự cũng được tìm thấy ở nghiên cứu khác khi sử dụng môi trường đơn bước (Global) cho kết tương đương với môi trường chuyển tiếp (13). Một nghiên cứu khác gần đây của Hardarson và cộng sự, nghiên cứu ngẫu nhiên mù đôi cho kết quả tỷ lệ tạo phôi nang tương tự ở nhóm môi trường đơn bước là 54,7% và nhóm môi trường chuyển tiếp là 56,4% (7).

Ngoài ra, một kết quả khác cho thấy phôi nang phát triển tốt hơn và tỷ lệ làm tổ cao hơn khi nuôi ở môi trường đơn bước (14,15). Một lý

do giải thích vì sao môi trường đơn bước giúp phôi phát triển tốt hơn là do thành phần amino acid. Ngược lại với môi trường chuyển tiếp, môi trường đơn bước cung cấp số lượng và hàm lượng lớn các amino acid cho phôi ở giai đoạn trước khi nén. Amino acid đã được chứng minh có liên quan đến phát triển phôi và tỷ lệ thai (16,17). Một lý do khác khi sử dụng môi trường chuyển tiếp là cần phải đổi môi trường nuôi cấy ở ngày ba. Phôi có thể bị ảnh hưởng do việc phải thích nghi với môi trường có thành phần và nồng độ khác (18,19). Hầu hết các nghiên cứu trên có thiết kế nghiên cứu giống với nghiên cứu của chúng tôi là đều có đổi môi trường vào ngày ba đối với hệ môi trường đơn bước. Kết quả của các nghiên cứu cho thấy không có sự khác biệt giữa hai môi trường và cũng tương tự với kết quả của chúng tôi.

Hạn chế trong nghiên cứu của chúng tôi là việc kiểm tra thụ tinh và kiểm tra phôi đều thực hiện ở môi trường ngoài tủ cấy do đó không tránh được các yếu tố stress cho phôi. Đây chỉ là nghiên cứu hồi cứu, cần có nghiên cứu lâm sàng ngẫu nhiên có nhóm chứng để cho kết quả thuyết phục hơn. Tuy nhiên, khi sử dụng môi trường đơn bước, hiệu quả của việc quản lý chất lượng, kinh tế và thời gian sẽ được tối ưu, khối lượng công việc ít hơn, chuẩn bị đĩa nuôi cấy thuận tiện hơn. Với những lợi thế khi sử dụng môi trường đơn bước cùng với các bằng chứng ngày càng nhiều về kết quả của nuôi cấy phôi tương đương và thậm chí tốt hơn so với môi trường chuyển tiếp. Do đó, cần cần nhắc sử dụng môi trường nào phù hợp với điều kiện và quy trình của labo để mang lại hiệu quả cao cho bệnh nhân.

5. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy môi trường nuôi cấy đơn bước có thể được sử dụng thường quy trong labo TTON với tỷ lệ tạo phôi nang và tỷ lệ thai tương đương môi trường chuyển tiếp.

Tài liệu tham khảo

1. Summers MC, Biggers JD. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. *Hum Reprod Update*. 2003; 9:557-82.
2. Macklon, N.S., Pieters, M.H., Hassan, M.A., et al., A prospective randomized comparison of sequential versus mono- culture systems for in-vitro human blastocyst development. *Hum. Reprod*. 2002; 17:2700-2705.
3. Lane, M., Gardner, D.K. Embryo culture medium: which is the best? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2007; 21:83-100.
4. Biggers JD and Summers MC. Choosing a culture medium: making informed choices. *Fertil Steril*. 2008; 90:473-83.
5. Y.S.L. Lee, G.A. Thouas, and D.K. Gardner ., Developmental kinetics of cleavage stage mouse embryos are related to their subsequent carbohydrate and amino acid utilization at the blastocyst stage. *Hum Reprod*, 2015 Vol.30, No.3 pp. 543 – 552,
6. Sepulveda, S., Garcia, J., Arriaga, E., et al. In vitro development and pregnancy outcomes for human embryos cultured in either a single medium or in a sequential media system. *Fertil Steril*. 2009; 91:1765-1770.
7. Hardarson T, Bungum M, Conaghan J, Meintjes M, Chantilis SJ, Molnar L, Gunnarsson K, Wikland M. No inferiority, randomized, controlled trial comparing embryo development using media developed for sequential or undisturbed culture in a time-lapse setup. *Fertil Steril*. 2015; 104:1452-9.
8. Niemitz E, Feinberg AP. Epigenetics and assisted reproductive technology: a call for investigation. *Am J Hum Genet*. 2004; 74:599-609.
9. Johnson M. The problematic in vitro embryo in the age of epigenetics. *Reprod BioMed Online*. 2005; 10(Suppl 1):88-96.
10. Young L. Human embryonic stem cell methyl cycle enzyme expression: modeling programming in assisted reproduction. *Reprod BioMed Online*. 2005; 10:755-66.
11. Market-Velker BA, Fernandes AD, Mann MR. Side-by-side comparison of five commercial media systems in a mouse model: suboptimal in vitro culture interferes with imprint maintenance. *Biol Reprod*. 2010; 83(6):938-50.
12. Biggers, J.D., Racowsky, C., The development of fertilized human ova to the blastocyst stage in KSOM(AA) medium: is a two-step protocol necessary? *Reprod. Biol Med Online*. 2002; 5:133-140.
13. Angus, S., Grunert, G.M., Dunn, R.C., et al., No advantage of using the sequential GIII media versus the single media global. *Fertil Steril*. 2006; 86:229.
14. Zech, N., Stecher, A., Zech, H., et al., Prospective analysis of embryo development to day 5 and transfer outcomes in sequential medium (G1.3–G2.3) versus a one step protocol (Global medium). *Hum Reprod*. 2006; 21:i162.
15. Sepulveda, S., Garcia, J., Arriaga, E., et al., In vitro development and pregnancy outcomes for human embryos cultured in either a single medium or in a sequential media system. *Fertil Steril*. 2009; 91:1765-1770.
16. Brison, D.R., Houghton, F.D., Falconer, D., et al., Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Hum Reprod*. 2004; 19:2319-2324.
17. Houghton, F.D., Hawkhead, J.A., Humpherson, P.G., et al., Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo development capacity. *Hum. Reprod*. 2002; 17:999-1005.
18. Biggers, J.D., McGinnis, L.K., Raffin, M., Amino acids and preimplantation development of the mouse in protein-free potassium simplex optimized medium. *Biol Reprod*. 2000; 63:281-293.
19. Ho, Y., Wigglesworth, K., Eppig, J.J., et al., Preimplantation development of mouse embryos in KSOM: augmentation by amino acids and analysis of gene expression. *Mol Reprod Dev*. 1995; 41:232-238.