

Perkembangan Embrio Mencit dan Hamster dalam Medium KSOMaa dan HECM-6

(DEVELOPMENT OF MICE AND HAMSTER EMBRYOS
IN KSOMaa AND HECM-6 MEDIUM)

Bayu Rosadi¹, M Agus Setiadi², Dondin Sajuthi², Arief Boediono³

¹Bagian Reproduksi Fakultas Peternakan, Universitas Jambi,
Jl Jambi-Muara Bulian Km 14 Mendalo Darat, Muaro Jambi Telp (0741)582907.
Email: barostasik@gmail.com

²Departemen Klinik, Reproduksi, dan Patologi, ³Lab Embriologi, Departemen Anatomi,
Fisiologi, dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor,
Jln Agatis, Dramaga, Bogor

ABSTRACT

The purpose of the present study was to investigate the viability of mice and hamster embryos developed in Kalium Simplex Optimized Medium amino acid (KSOMaa) and Hamster Embryo Culture Medium-6 (HECM-6) medium. Female DDD mice were superovulated by injection i.p. of 5 IU Pregnant Mare Serum Gonadotropine (PMSG) and 5 IU Human Chorionic Gonadotropine (hCG) in 48 h interval, hamster (*Phodopus campbelli*) injected by 2.5 IU PMSG and 2.5 IU hCG 48 h later. Then females were mated with fertile males. Eight-cell embryos were recovered at day 3 after natural mating. The mice embryos were cultured in KSOMaa+5% NBCS (New Born Calf Serum) (T1) and HECM-6+5% NBCS (T2), the hamster embryos were cultured in KSOMaa+5% NBCS (T3) and HECM-6 + 5% NBCS (T4) for further development at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air for 48 h. The examinations were replicated five times. The T1 embryos developed to compact morulla and early blastocyst 100% (140/140), 92.1% (129/140) to blastocyst and expanded blastocyst, and 22.9% (32/140) became hatching/hatched. The T3 reached 100% (60/60) to compact morulla and early blastocyst, 85.0% (51/60) blastocyst, and 48.3% (29/60) expanded blastocyst, no embryo observed hatching/hatched. The T2 embryos had more expanded blastocyst than T3 (P<0.05), hatching/hatched rate higher than T1 and T3 but lower than T4 (P<0.05). Shortly, KSOMaa enable to support 8-cell stage mice and hamster embryo, but the hamster embryo developed lower at expanded blastocyst stage. HECM-6 is more appropriate than KSOMaa to support 8-cell mice embryos development and suitable to develop 8-cell stage hamster embryos.

Key words : embryo, medium, mice, hamster

PENDAHULUAN

Komposisi medium menentukan keberhasilan kultur embrio *in vitro* karena kompleksitas fisiologis pada embrio praimplantasi. Metabolisme yang kompleks terjadi dalam proses perkembangan dari zigot menjadi blastosis yang siap mengalami gastrulasi dan implantasi. Perubahan yang terjadi meliputi serangkaian pembelahan sel untuk membentuk morula, diferensiasi sel morula menjadi dua galur sel yaitu *trophoblast* dan *inner cell mass* (ICM) (Rossant 1986, Alarcon dan Marikawa 2004), orientasi spatial kedua macam sel membentuk blastosis yang terdiri dari ICM dan tropektoderm (TE), pengaliran cairan ke dalam blastosul (Biggers *et al.* 1988), dan spesifikasi regional ICM menjadi endoderm primitif

(*hypoblast*) dan ektoderm primitif (*epiblast*) melalui pembentukan matriks ekstraseluler bertipe membran basal (Nadjika dan Hilman 1974).

Mencit dan hamster telah digunakan secara luas sebagai model perkembangan bagi mamalia pada umumnya. Berbagai medium untuk kultur embrio mencit dan hamster telah banyak dicoba. Lawitts dan Biggers (1993) mendesain medium KSOM untuk mengatasi *two-cell block* yang terjadi pada banyak strain *outbred* dan *inbred* mencit, pada perkembangannya medium juga dipakai dalam kultur embrio sapi (Liu dan Foote 1995). Medium ini disempurnakan berdasarkan analisis konsentrasi K⁺ dan Na⁺ pada embrio tahap 2-sel dengan metode mikroanalisis *probe* elektron (Biggers *et al.*, 1993). Medium ini diketahui mampu mendukung perolehan

blastosis yang tinggi dari zigot pada strain *outbred* CF1 dengan jumlah sel lebih banyak dibandingkan menggunakan medium lain (Erbach *et al.*, 1994, Summers *et al.* 1995). Jumlah sel blastosis hasil kultur dengan medium KSOM setara dengan jumlah sel blastosis yang diproduksi *in vivo*. Penambahan asam amino pada medium ini menstimulasi proliferasi sel embrio khususnya ICM dan differensiasi ICM menjadi ektoderm dan endoderm primitif (Biggers *et al.*, 2000). Modifikasi lebih lanjut dari medium ini banyak dilakukan dengan penggantian komponen glutamin dengan glycyl-L-glutamin untuk menurunkan terbentuknya amonium dari penguraian glutamin (Summers *et al.*, 2005).

HECM dengan beberapa serinya (HECM-6, 9, dan 10) merupakan medium yang diformulasikan untuk mendukung perkembangan embrio hamster praimplantasi (McKiernan dan Bavister 2000; Ludwig *et al.*, 2001a,b). Medium tersebut tidak mengandung fosfat karena fosfat dapat mengubah fisiologi embrio hamster sehingga menurunkan kapasitas pertumbuhannya (Ludwig *et al.*, 2001a), sedangkan fosfat merupakan komponen dari KSOM yang digunakan untuk embrio mencit. Penambahan sedikit glukosa pada HECM meningkatkan keberhasilan implantasi dan viabilitas fetus setelah transfer tetapi kadar glukosa tinggi menekan jumlah sel blastosis yang terbentuk (Ludwig *et al.*, 2001b).

Pengujian kapasitas perkembangan embrio mencit dan hamster dapat menentukan jenis medium yang cocok untuk masing-masing embrio dan medium yang dapat dipakai oleh keduanya secara bersamaan. Informasi mengenai satu jenis medium yang mampu mendukung perkembangan embrio dari kedua jenis hewan bermanfaat dalam memproduksi *khimera*. Pada hewan *khimera* hasil gabungan antar spesies yang sama maupun interspesies, kemampuan menumbuhkan embrio *khimera* hasil rekonstruksi secara *in vitro* sangat krusial (Boediono *et al.*, 1999; Shiue *et al.*, 2006).

METODE PENELITIAN

Superovulasi dan Koleksi Embrio

Mencit betina berumur 2-3 bulan disuperovulasi dengan menyuntikkan 5 IU PMSG (Foligon, Intervet, Netherland) dan 5 IU hCG (Chorulon, Intervet, Netherland) dengan selang 48 jam secara intraperitoneum, 24 jam sebelum injeksi PMSG (Foligon, Intervet,

Netherland) mencit diinjeksi GnRH (20 mg/kg Fertilerin, intramuskuler) (Kanter *et al.*, 2004). Hamster mini rusia (*Phodopus campbelli*) disuperovulasi dengan menginjeksikan 2,5 IU PMSG dan 2,5 IU hCG intraperitoneum dengan selang 48 jam. Superovulasi pada hamster jenis ini belum ada laporan sebelumnya, penggunaan protokol superovulasi didasarkan pada hasil penelitian pendahuluan.

Kawin alam dilakukan masing-masing menggunakan pejantan yang sejenis dengan betina. Jantan dan betina dicampur dengan rasio 1:1 setelah injeksi hCG pada betina. Untuk memastikan keberhasilan perkawinan dilakukan pemeriksaan *vaginal plug*. Koleksi embrio dari tuba fallopii dilaksanakan pada hari ke-3 setelah kawin. Mencit dan hamster dikorbankan dengan cara *dislocatio cervicalis*. Tuba fallopii diambil melalui pembedahan dari mencit dan hamster kemudian dilakukan koleksi embrio dengan menoreh tuba fallopii menggunakan jarum 26G pada medium PBS ditambah 2% NBCS (*New Born Calf Serum*). Embrio yang diperoleh diamati secara morfologis dan diseleksi lebih lanjut untuk mengumpulkan embrio tahap 8-sel.

Kultur Embrio *In Vitro*

Medium yang digunakan untuk kultur embrio dalam penelitian ini adalah KSOMaa (Summers *et al.*, 2005) yang mengandung fosfat (KH_2PO_4) dan 5,56 mM glukosa, serta HECM-6 (McKiernan dan Bavister, 2000) yang tidak mengandung fosfat dan glukosa (Tabel 1). Semua garam, karbohidrat, asam amino, dan serum diperoleh dari Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). Embrio mencit dan hamster tahap 8-sel hasil koleksi dikumpulkan masing-masing dalam medium PBS+2% NBCS, selanjutnya dicuci 3 kali dalam medium kultur dan ditempatkan dalam *drop* berisi 20 μ l medium ditutupi *mineral oil* (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA). Embrio mencit ditempatkan dalam medium kultur KSOMaa + 5% NBCS dan HECM-6 + 5% NBCS, embrio hamster dikultur menggunakan KSOMaa + 5% NBCS dan HECM-6+5% NBCS. Masing-masing perlakuan diulang 5 kali. Kultur dilaksanakan selama 48 jam pada kondisi udara 5% CO_2 dengan suhu 37°C. Perkembangan embrio diobservasi setiap 24 jam. Setiap tahapan perkembangan yaitu morula kompak, blastosis awal, blastosis, blastosis lanjut, *hatching*, dan *hatched* dihitung dan diamati morfologinya.

Tabel 1. Komposisi medium KSOMaa dan HECM-6

Komponen	Jumlah (mmol/L)	
	KSOMaa ¹	HECM-6 ²
NaCl	95	113,8
KCl	2,5	3,0
KH ₂ PO ₄	0,35	-
MgCl ₂ ·6H ₂ O	-	2,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	-
CaCl ₂	-	-
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,71	1,0
NaHCO ₃	25	25
Na-laktat	10	4,5
Na-piruvat	0,2	-
Glukosa	5,5	-
EDTA	0,61	-
Glutamin	2,0	0,2
NEAA Solution (%)	1	1
EAA Solution (%)	1	1

- 1) Summers et al. (2005) dengan sedikit modifikasi pada komposisi asam amino
- 2) McKiernan & Bavister (2000) dengan sedikit modifikasi pada komposisi asam amino

Analisis Data

Pengolahan data menggunakan program Minitab ver 12. Data disajikan dalam bentuk rata-rata±standar deviasi dan dianalisis menggunakan sidik ragam. Perbedaan antar perlakuan ditentukan dengan uji Tukey. Pada

analisis statistika, data berupa proporsi ditransformasi lebih dahulu.

HASIL DAN PEMBAHASAN

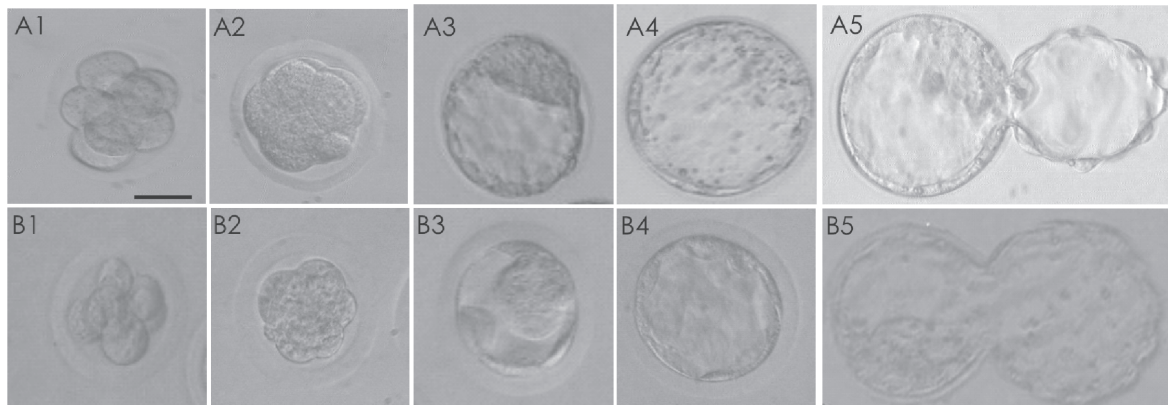
Perkembangan embrio mencit dan hamster tahap 8-sel dalam medium KSOMaa dan HECM-6 menunjukkan bahwa secara keseluruhan kedua macam medium mampu mendukung pertumbuhan embrio mencit dan hamster tahap 8 sel sampai mencapai tahap blastosis (Tabel 2, Gambar 1). Perbedaan mulai tampak ketika memasuki tahap blastosis lanjut dan proses *hatching/hatched*. Embrio hamster yang dikultur dalam medium KSOMaa (T3) perkembangannya menurun secara signifikan (P<0,05) dibandingkan perlakuan T1, T2, dan T4 (Tabel 2). Pada T2 embrio mencit yang dikultur dalam HECM-6 mampu tumbuh setara dengan embrio mencit yang dikultur dalam medium KSOMaa (T1) sampai tahap blastosis akhir, bahkan *hatching/hatched rate* yang diperoleh lebih tinggi dibandingkan T1 (P<0,05). Pada T3 tidak diperoleh satu pun embrio hamster yang berhasil *hatching* atau *hatched*, sedangkan embrio hamster pada T4 mendapatkan angka *hatching* paling tinggi.

Pengaruh komposisi medium terhadap perkembangan embrio tahap 8-sel sejalan dengan proses fisiologis yang terjadi. Pada tahap 8-sel embrio mencit dan hamster mengalami perubahan konfigurasi blastomer karena adanya proses kompaksi (Hogan et al., 1994, Piedrahita et al., 1992). Secara umum, proses kompaksi

Tabel 2. Perkembangan embrio mencit dan hamster tahap 8-sel setelah kultur selama 48 jam

Perlakuan	Jumlah embrio	Tahap perkembangan dan jumlah embrio yang berkembang (%)				
		MK	BAw	Bl	BLj	H/ed
Mencit-KSOMaa (T1)	140	140 (100,0) ^a	140 (100,0) ^a	129 (92,1) ^a	129 (92,1) ^b	32 (22,9) ^b
Mencit-HECM-6 (T2)	52	52 (100,0) ^a	52 (100,0) ^a	52 (100,0) ^a	48 (92,3) ^b	30 (57,7) ^c
Hamster-KSOMaa (T3)	60	60 (100,0) ^a	60 (100,0) ^a	51 (85,0) ^a	29 (48,3) ^a	0 (0,0) ^a
Hamster-HECM-6 (T4)	46	46 (100,0) ^a	46 (100,0) ^a	46 (100,0) ^a	46 (100,0) ^b	34 (73,9) ^d

Ket.: MK: Morula kompak; Baw: blastosis awal; Bl: blastosis; BLj: blastosis lanjut; H/ed: *hatching/hatched* Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata (P<0,05)



Gambar 1. Embrio mencit (A) dan hamster (B) tahap :1. 8-sel, 2. morula kompak, 3. blastosis, 4. blastosis lanjut, dan 5. *hatching* . (Bar = 50 μ m)

merupakan salah satu perbedaan krusial antara embrio mamalia dengan embrio hewan lainnya. Blastomer-blastomer sampai tahap 8-sel membentuk konfigurasi longgar antar blastomer dengan banyak ruang di antaranya. Setelah *cleavage* ketiga, blastomer-blastomer mengalami perubahan fisiologis yang dramatis yang menginisiasi proses kompaksi (Gilbert, 1996). Selanjutnya morula kompak mulai mengalami perubahan morfologis membentuk blastosis, proses diferensiasi pertama pun dimulai dengan berubahnya sel-sel blastomer menjadi dua macam populasi sel yaitu ICM dan *trophoblast* (Alarcon dan Marikawa 2004).

Dinamika fisiologis tersebut melibatkan proses-proses seperti sintesis protein, sintesis asam nukleat, dan transport ion yang memerlukan energi, meningkatkan kebutuhan dan menaikkan aktivitas metabolik. Setiap perubahan proses metabolik menyebabkan kegagalan embrio tumbuh sempurna (Brisson dan Leese 1994; Biggers *et al.*, 2004).

Glukosa merupakan substrat energi, dan fosfat penting untuk produksi ATP, sumber energi dasar untuk aktivitas sel. Pada hamster kombinasi glukosa dan fosfat menghambat pertumbuhan (Schini dan Bavister 1988), menurunkan respirasi (Seshagiri dan Bavister 1991) dan menghancurkan mitokondria (Ludwig *et al.*, 2001a). Penurunan kapasitas perkembangan di akhir tahap blastosis dan kegagalan embrio hamster untuk *hatching* pada T3 kemungkinan karena efek kombinasi glukosa dengan konsentrasi cukup tinggi dan fosfat (KH_2PO_4) yang ada dalam KSOMaa bukan pengaruh tunggal fosfat. Pengaruh negatif tersebut telah dicoba dieliminasi dengan pengaturan konsentrasasi ion Na^+ dan K^+ . Schini

dan Bavister (1988) menemukan bahwa pada embrio hamster tahap 8-sel fosfat saja tidak menyebabkan hambatan perkembangan embrio, tetapi pada tahap lebih awal, konsentrasi rendah hingga 500 nM menghambat perkembangan embrio hamster (Schini dan Bavister, 1988; Ludwig *et al.*, 2001). Fenomena serupa terjadi pada embrio mencit (Lawitts dan Biggers 1991).

KSOMaa cukup efektif dalam mendukung pertumbuhan embrio mencit tahap 8-sel (T1) tetapi belum memadai untuk embrio hamster (T3) sampai tahap blastosis lanjut. Medium ini diketahui mampu mendukung perolehan blastosis yang tinggi dari zigot mencit dengan strain yang mengalami *2-cell block*. Jumlah sel yang diperoleh lebih banyak dibandingkan menggunakan medium lain bahkan setara dengan jumlah sel blastosis yang diproduksi *in vivo* (Erbach *et al.*, 1994; Summers *et al.*, 1995, 2005). Asam amino yang ditambahkan pada medium ini menstimulasi proliferasi sel embrio khususnya ICM dan diferensiasi ICM (Biggers *et al.*, 2000).

Keberadaan glukosa sampai 5,56 mM dalam KSOMaa tidak menjadi menghambat pertumbuhan embrio mencit. Secara alamiah, glukosa ada dalam saluran reproduksi betina pada seluruh spesies yang pernah diuji dengan kisaran 0,5-3,0 mM (Ludwig *et al.*, 2001b). Walau pun metabolisme glukosa rendah pada tahap awal perkembangan embrio, glikolisis meningkat tajam di tahap blastosis pada hamster (Barnet *et al.*, 1993), mencit (Lane dan Gardner 1998). Pada mencit, glukosa merupakan preferensi sumber energi untuk pembentukan ICM (Hewitson dan Leese 1993). Pemaparan embrio hamster pada heksosa (glukosa dan fruktosa) dengan kadar rendah

terbukti meningkatkan viabilitas fetus (Ludwig *et al.*, 2001b). Mekanisme yang membuat glukosa menyebabkan ketidakseimbangan metabolisme seperti pada embrio hamster belum diketahui. Salah satu kemungkinan adanya “*crabtree effect*” yaitu glukosa menstimulasi glikolisis yang menghabiskan cadangan fosfat seluler, akhirnya menghambat fosforilasi oksidatif (Sheshagiri dan Bavister 1991).

Hal yang menarik dari penelitian ini adalah kemampuan HECM-6 dalam mendukung perkembangan embrio mencit tahap 8-sel. Medium ini tidak mengandung glukosa dan sebagai sumber energi digunakan natrium laktat. Embrio yang berhasil *hatching* lebih tinggi ($P < 0,05$) dibandingkan hasil kultur menggunakan medium KSOMaa. Ketiadaan komponen KH_2PO_4 dalam medium tersebut diduga mereduksi efek negatif fosfat terhadap pengorganisasian mitokondria dalam sitoplasma, dengan demikian proses metabolisme berjalan lebih baik. Tingginya angka *hatching/hatched* menunjukkan bahwa embrio mempunyai energi yang cukup untuk memecah dan keluar dari zona pelusida. Belum diketahui apakah hal tersebut berkaitan dengan penggunaan laktat sebagai sumber energi. Embrio hamster yang dikultur dalam medium HECM-6 juga memperoleh angka *hatching* yang tinggi (73,9%). Keberhasilan *hatching* yang tinggi menunjukkan metabolisme berjalan dengan baik, komposisi medium dapat mendukung perkembangan embrio secara sempurna. Pada hamster jenis lain yaitu *golden hamster* (*Mesocricetus auratus*), embrio diketahui menghasilkan faktor proteolitik berupa enzim pronase yang terlibat dalam mekanisme *hatching* yang tidak ditemukan pada spesies hewan lain (Mishra dan Seshagiri 2000). Proses *hatching* umumnya terjadi akibat tekanan mekanik yang meningkat pada blastosis lanjut, menyebabkan timbulnya lubang kecil pada zona dan blastosis secara perlahan akan keluar melalui lubang tersebut. Informasi mengenai embrio hamster mini rusia yang dipakai dalam penelitian tersebut sangat terbatas. Sejauh ini belum ada laporan mengenai produksi dan kultur embrio pada hamster mini rusia (*Phodopus campbelli*) serta adanya faktor proteolitik pada embrio tahap blastosis.

Keberhasilan *hatching* yang tinggi pada T4 mungkin hanya merupakan kontribusi faktor medium yang cocok dengan kebutuhan fisiologis dari embrio hamster mini rusia, atau mungkin

juga dibantu faktor proteolitik jika memang ada. Walau pun demikian terdapat indikasi bahwa faktor medium dominan dalam menentukan keberhasilan *hatching* seperti tercermin pada perlakuan T3, tidak ada embrio hamster yang berhasil *hatching* setelah kultur dengan medium KSOMaa.

SIMPULAN

KSOMaa mampu mendukung perkembangan embrio tahap 8-sel pada mencit dan hamster, tetapi persentase perkembangan embrio hamster lebih rendah memasuki tahap blastosis lanjut. Embrio mencit dan embrio hamster tahap 8-sel tumbuh lebih baik dalam medium HECM-6 dibandingkan KSOMaa.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai melalui Penelitian Hibah Bersaing dengan Nomor kontrak : 007/SP2H/PP/DP2M/III/2008. Untuk itu kami mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional.

DAFTAR PUSTAKA

- Alarcon VB, Marikawa Y. 2004. Molecular study of mouse peri-implantation development using the *in vitro* culture of aggregated inner cell mass. *Mol Reprod Dev* 67: 83-90.
- Barnett DK, Reiger D, Bavister BD. 1993. Changes in metabolism of glucose and glutamin during development of the hamster embryo. *Theriogenology* 39:185.
- Biggers JD, Bell JF, Benos JD. 1988. Mammalian blastocyst: transport function in a developing epithelium. *Am J Physiol* 255C: 419-432.
- Biggers JD, Lawitts JA, Lechene CP. 1993. The protective action of betaine on the deleterious effects of NaCl on preimplantation mouse embryos in vitro. *Mol Reprod Dev* 34:380-390.
- Biggers JD, McGinnis LK, Raffin M. 2000. Amino acids and preimplantation development of the mouse in the protein-free potassium simplex optimized medium. *Biol Reprod* 63: 281-293.
- Biggers JD, McGinnis LK, Lawitts JA. 2004. Enhanced effect of glycyl-L-glutamine on mouse preimplantation embryos in vitro. *Reprod BioMed Online* 9:59-69.

- Boediono A, Suzuki T, Li LY, Godke RA. 1999. Offspring born from chimeras reconstructed from parthenogenetic and *in vitro* fertilized bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 53:159-170.
- Brisson DR, Leese HJ. 1994. Blastocoel cavity formation by preimplantation rat embryos in the presence of cyanide and other inhibitors of oxidative phosphorylation. *J Reprod Fertil* 101:305-309.
- Erbach GT, Lawitts JA, Papaioannou VE, Biggers JD. 1994. Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. *Biol Reprod* 50: 1027-1033.
- Gilbert SF. 1996. *Developmental Biology*. 6th edition. Sunderland Massachusetts: Sinauer Associates Inc. Publisher.
- Hewitson LC, Leese HJ. 1993. Energy metabolism of the trophoderm and inner cell mass of the mouse blastocyst. *J Exp Zool* 267:337-343.
- Hogan B, Constantini F, Lacy E. 1989. *Manipulating Mouse Embryo, a Laboratory Manual*. Second edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Kanter M, Yildiz C, Meral I, Koc A, Tasal I. 2004. Effect of a GnRH agonist on oocyte number and maturation in mice superovulated with eCG and hCG. *Theriogenology* 61: 393-398.
- Lane M, Gardner DK. 1998. Amino acids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocyst. *Human Reprod* 13: 991-997.
- Lawitts JA, Biggers JD. 1993. Culture of preimplantation embryos. *Methods Enzymol* 225:153-164.
- Lawitts JA, Biggers JD. 1991. Optimization of mouse embryo culture media using simplex method. *J Reprod Fertil* 91:543-556.
- Liu Z, Foote RH. 1995. Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. *Biol Reprod* 53: 786-790.
- Ludwig TE, Squirell JM, Palmenberg AC, Bavister BD. 2001a. Relationship between development, metabolism, and mitochondrial organization in 2-cell hamster embryos in the presence of low level of phosphate. *Biol Reprod* 65: 1648-1654.
- Ludwig TE, Lane M, Bavister BD. 2001b. Differential effect of hexoses on hamster embryo development in culture. *Biol Reprod* 64: 1366-1374.
- McKiernan, Bavister BD. 2000. Culture of one-cell hamster embryos with water soluble vitamins: panthothenate stimulate blastocyst formation.
- Mishra A, Seshagiri PB. 2000. Evidence for the involvement of species-specific in zona escape of hamster blastocyst. *Mol Human Reprod* 6 (11): 1005-1012.
- Nadjika M, Hilman N. 1974. Ultrastructural studies of the mouse blastocyst sub stage. *J Embriol Morphol* 32:872-895.
- Piedrahita JA, Gellespie L and Maeda N. 1992. Production of chimeric hamsters by aggregation of eight-cell embryos. *Bio. Reprod Sci.* 47:347-354.
- Rossant J. 1986. Development of the extra-embryonic cell lineage in the mouse embryo. In: Rossant J, Pedersen RA (eds). *Experimental Approaches to Mammalian Embryonic Development*. Pp: 97-120. Cambridge: Cambridge University Press.
- Schini SA, Bavister BD. 1988. Two-cell block to development of cultured hamster embryos caused by phosphate and glucose. *Biol Reprod* 39: 1183-1192.
- Sheshagiri PB, Bavister BD. 1991. Glucose and phosphate inhibit respiration and oxidative metabolism in cultured hamster eight-cell embryos: evidence for the "Crabtree effect". *Mol Reprod Dev* 30:105-111.
- Shiue YL, Jenn-Fa L, Jen-Wen S, Jenn-Rang Y, Yu-Hsin C, Jui-Jain T. 2006. In vitro culture periode but not the passage number influences the capacity of chimera production of inner cell mass and its deriving cells from porcine embryos. *Anim Rep Sci* 93:134-143.
- Summers MC, Bhatnagar PR, Lawitts JA, Biggers JD. 1995. Fertilization in vitro of mouse ova from inbred and outbred strains: complete preimplantation embryo development in glucose-supplemented KSOM. *Biol Reprod* 53:431-437.
- Summers MC, McGinnis LK, Lawitts JA, Biggers JD. 2005. Mouse embryo development following IVF in media containing L-glutamine or glycyl-L-glutamine. *Human Reprod* 20(5): 1364-1371.