

Glutamine 함유 배양액에 첨가한 에너지원이 마우스의 배 발달에 미치는 영향

대구대학교 자연자원대학 축산학과¹, 경북대학교병원 산부인과학교실²

김주환¹ · 박기상^{1,2} · 이택후² · 전상식² · 송해범¹

Effect of Energy Sources (Glucose, Pyruvate and Lactate) Added to Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) on the Mouse 2-cell Embryo Development

Ju Hwan Kim¹, Kee Sang Park^{1,2}, Taek Hoo Lee², Sang Sik Chun²,
Hai Bum Song¹

¹Department of Animal Science, Taegu University and ²Department of Obstetrics and Gynecology, Kyungpook National University Hospital

Objective: Mammalian embryos undergo changes of energy environment for transfer from oviduct to uterus. Also, the human reproductive organ (oviduct, uterus) contains energy sources of different concentration (oviduct - glucose: 0.5 mM, pyruvate: 0.32 mM, lactate: 10.5 mM; uterus - glucose: 3.15 mM, pyruvate: 0.1 mM, lactate: 5.87 mM, respectively). This study was conducted to examine the effect of these energy sources added in DMEM with glutamine on the mouse embryo development.

Methods: There was used ICR female mouse. Two cell embryos of mouse are collected by method of 'flushing'. Flushing fluid was used Ham's F-10 added to 20% FBS. The collected 2 cell embryos were cultured in media such as Control (only DMEM), group A and B (DMEM supplemented with 0.5 mM and 3.15 mM glucose), and group C and D (DMEM supplemented with 0.1 mM and 0.32 mM pyruvate), and group E and F (DMEM supplemented with 5.87 mM and 10.5 mM lactate). All experimental media supplemented with 20% hFF, respectively. Pattern of embryo development was observed to interval at 24hr during 96hr.

Results: The media with glutamine added glucose (group A: 51.0%; group B: 48.4%) was significantly ($p < 0.05$) higher than other experimental group in development into the morula stage after 24 hr in culture, but not significantly different compared with control and the rate of development into the blastocyst was significantly ($p < 0.05$) low in the both of pyruvate (group C: 7.9%, group D: 6.8%) and lactate (group E: 7.1%, group F: 7.1%) treatment group after 48 hr in culture. Development into the blastocyst and hatched blastocyst after 72 hr in culture revealed similarly in control (81.9%) and glucose treatment group (group A: 83.3%, group B: 82.8%). However, development into the hatched and attached blastocyst after 96hr in culture revealed significantly ($p < 0.05$) development in the glucose treatment group (group A: 82.3%, group B: 78.5%) than control (63.2%), and its of pyruvate (group C: 34.1%, group D: 34.1%) and lactate (group E: 25.9%, group F: 33.3%) treatment group were significantly ($p < 0.05$) lower than control similar to previous observations.

Conclusion: The glucose added to the DMEM with only glutamine, as energy source, was

highly to the rate of development compared with control, but the other energy sources were not, synthetically. Above refer to, the human reproductive organ (oviduct, uterus) contains energy sources of different concentration. Thus, further studies are will examine continuously to effects by interaction of different energy sources in the mouse embryo development, and these results will provide to foundation on the human embryo culture.

Key Words: Glutamine, Energy sources, Embryo development, Culture medium

포유동물의 수정란은 난관에서 자궁으로 이동하는 동안 생체 내 환경의 영향을 받게 되는데 대사를 위한 에너지원도 환경요인 중의 하나이다. 따라서 체외에서 수정란의 배 발달을 유도할 때 각 발달 단계에 따른 에너지 요구량이 다른데 체외에서 배 발달을 유도할 때 인위적으로 에너지를 공급하는 데에는 한계가 있기 때문에 이런 조건에서 수정란의 이식에 이용할 수 있는 배반포기 배의 확보에 많은 어려움이 있다.

배양기간이 길어짐 (5~6일)에 따른 배아의 발달 중지로 인한 이식할 수 있는 수정란의 감소 때문에 인간의 체외수정기술에서 일반적인 수정란의 이식 시기는 난자 채취 2일 또는 3일 후이다.^{1,2} 또한 이러한 원인이 발생하는 것은 체외배양을 할 때 배 발달에 따라 배양액 속에 첨가해야 하는 에너지원을 부적절하게 조절하였기 때문이다.³ 배양액에 첨가하는 주요 에너지원으로는 glutamine,⁴ glucose,⁶⁻⁸ pyruvate^{9,10} 및 lactate^{11,12} 등이 있는데, 사람의 생식도관에서 glucose, pyruvate 및 lactate와 같은 에너지원의 농도는 난관에서 0.50, 0.32, 10.5 mM, 자궁에서 3.15, 0.1, 5.87 mM로 각각 다르게 나타난다.⁵ 난관은 자궁보다 glucose 농도가 낮고 pyruvate 및 lactate의 농도가 높다. 그런 반면에 자궁은 난관보다 glucose 농도가 높고 pyruvate 및 lactate의 농도가 낮기 때문에, 배반포기가 되기 전의 초기배 발달에서 에너지의 이용성은 상대적인 차이를 보인다고 알려져 있다.⁸ 한편, 이들 에너지원이 배 발달에 미치는 영향에 대한 연구가 많이 진행되었으나, 연구자나 실험 환경에 따라 각각 다르게 보고되고 있을 뿐만 아니라 배 발달의 단계에 따라 배양액에 첨가해야 하는 각 에너지원의 농도에 대한 자료가 제한되어 있다.^{1,4,7,9,10}

따라서, 본 실험은 인간의 체외수정기술에서 임신율을 향상시킬 수 있는 방법을 모색하기 위해 glutamine이 단독 에너지원으로 함유되어 있는 배양액 (DMEM)에 첨가한 glucose, pyruvate 및 lactate가 생쥐 배의 발달에 미치는 영향을 조사하였다.

연구대상 및 방법

1. 공시동물

본 연구에 사용된 생쥐는 국내에서 사육중인 ICR 계통 마우스로, 암컷은 생후 3~6주령, 수컷은 10~15주령인 것을 사용하였다. 생쥐는 온도와 명암이 조절되는 곳에서 실험에 사용될 때까지 사육되었으며, 명암의 주기는 14시간: 10시간으로 조절하였고, 사료와 물은 무제한으로 급여하였다.

2. 배양액의 준비

생쥐 2-세포기 배의 관류는 Ham's F-10 (F-10, 11550-043, Gibco, USA)을 사용하였다. 난자의 배양은 glutamine을 단독 에너지원으로 함유하고 있는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; 11966-025, Gibco, USA)을 기본배양액으로 사용하였고, 기본배양액에 glucose는 0.5 mM (group A)과 3.15 mM (group B), pyruvate는 0.1 mM (group C)과 0.32 mM (group D), lactate는 5.87 mM (group E)과 10.5 mM (group F)을 각각 첨가하여 실험에 이용하였다. 각 배양액은 0.5% antibiotics (Streptomycin sulfate, S-9137; Penicillin-G, P-3032, Sigma, USA)를 첨가한 다음 삼투압 측정기 (Osmomat 030, Gonotec, Germany)를 이용하여 삼투압을 280 mOsmol/kg로 보정하였다. 삼투압을 보정하고 나서 0.2 µm의 여과기 (Millex-GV, Millipore, USA)로 제균하면서 14 ml tube (2001, Falcon, USA)에 분주한 다음 4°C에서 보관하다가 사용하였다.

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

hFF는 체외수정기술을 하고 있는 환자 중에서 성숙난자를 갖고 있는 난포에서 회수한 난포액에 혈액이 거의 섞이지 않은 것을 회수하여 이용하였다. 회수한 hFF는 원심분리 (3,500 rpm)를 2회 (30분, 10분) 실시하여 상층액만을 회수한 후 56°C에서 35분간 불활성화시켜 0.2 µm의 여과기

로 여과하여 제공한 다음 -20℃에 보존하면서 사용하였다.

4. 난자의 준비

과배란을 유도하기 위해 7.5 IU의 pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG, G4877, Sigma, USA)와 5 IU의 human chorionic gonadotropin (hCG, CG-5, Sigma, USA)를 48~52시간 간격으로 복강 주사하고 암컷과 수컷을 동숙시킨 다음, 12시간 후에 질전이 확인된 암컷만 실험에 이용하였다.

hCG 주사 후 42~44시간째에 경추탈골법으로 생쥐를 희생시킨 다음 난관을 적출하여 실체현미경 (×40) 하의 2 well 배양접시 (3037, Falcon, USA)에서 난관을 관류하여 2-세포기 배를 회수하였다.

5. 수정란의 배양 및 관찰

회수된 2-세포기 배는 Control (DMEM + 20% hFF)과 group A (DMEM + 0.5mM glucose + 20% hFF), B (DMEM + 3.15 mM glucose + 20% hFF), C (DMEM + 0.1 mM pyruvate + 20% hFF), D (DMEM + 0.32 mM pyruvate + 20% hFF), E (DMEM + 5.87 mM lactate + 20% hFF), F (DMEM + 10.5 mM lactate + 20% hFF)로 나누어 각 실험구에는 8~18개의 수정란을 배양하였고, 12회 반복실험하였다. 모든 실험구는 96시간 동안 배양하였고, 배양 48시간째에 동일한 배양액을 1/2 씩 교체하였으며, 각

실험구에 대한 배 발달 양상은 24시간 간격으로 검경하여 기록하였다.

6. 분석

마우스 배의 제외발달에 대한 실험결과는 백분율로 나타내었고, 불연속 변수에 대한 표준오차 (±SEM)는 Microsoft Exell 97을 이용하여 처리되었다. 각 처리구 간의 유의성은 χ^2 -검정 (chi-square, K. pearson, 1899)을 실시하여 5% 유의수준에서 검정하였다.

결 과

배양액에 첨가한 에너지원 (glucose, pyruvate 및 lactate)이 생쥐 배 발달에 미치는 영향을 조사하기 위하여 96시간 동안 배양하면서 24시간 간격으로 조사한 결과는 Figure 1-4와 같다.

배양 24시간 경과 후에 morula 단계까지의 발달율은 glucose 첨가구인 group A (0.5 mM) 51.0%와 group B (3.15 mM) 48.4%로 다른 실험구 보다 높은 발달율을 나타내었으며, glucose 첨가구 중에서도 저농도 첨가구 group A가 대조구 37.5% 보다 현저하게 높게 나타났다 ($p < 0.05$). 한편, lactate와 pyruvate 첨가구에서는 0.32 mM pyruvate 첨가구 (group D) 23.9%를 제외한 나머지 첨가구 (group C: 20.5%, group E: 20.2%, group F: 22.6%)는 대조구에 비해 현저하게 낮은 발달율 ($p < 0.05$)을 나타

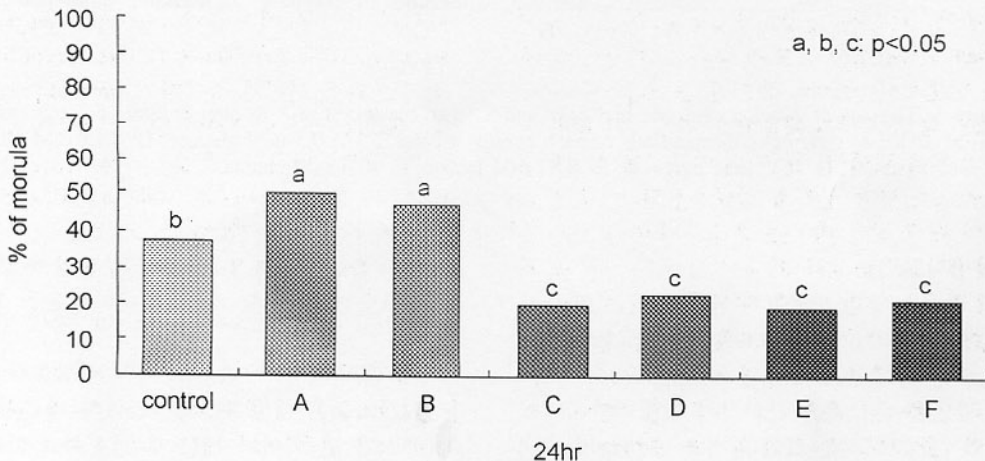


Figure 1. The rate of development into morula at 24hr after culture of 2 cell embryos in DMEM added to different concentrations of each energy sources*. *A: 0.5 mM glucose, B: 3.15 mM glucose, C: 0.1 mM pyruvate, D: 0.32 mM pyruvate, E: 5.87 mM lactate, F: 10.5 mM lactate.

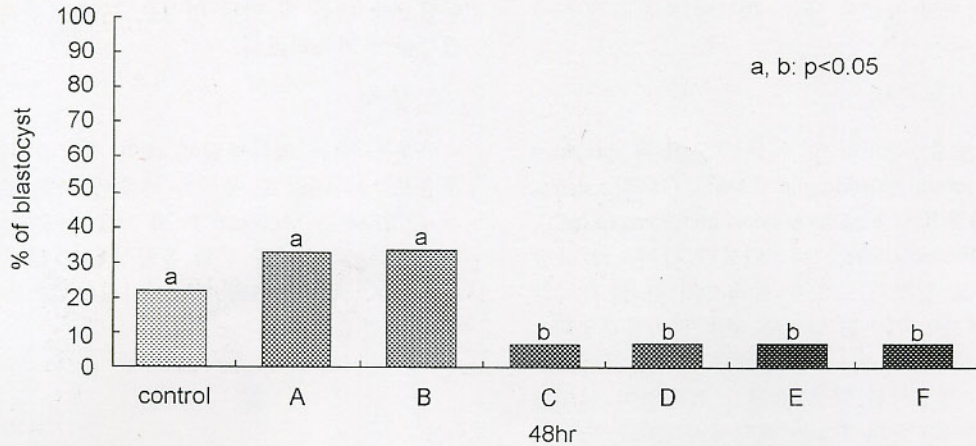


Figure 2. The rate of development into blastocyst at 48hr after culture of 2 cell embryos in DMEM added to different concentrations of each energy sources*. *A: 0.5 mM glucose, B: 3.15 mM glucose, C: 0.1 mM pyruvate, D: 0.32 mM pyruvate, E: 5.87 mM lactate, F: 10.5 mM lactate.

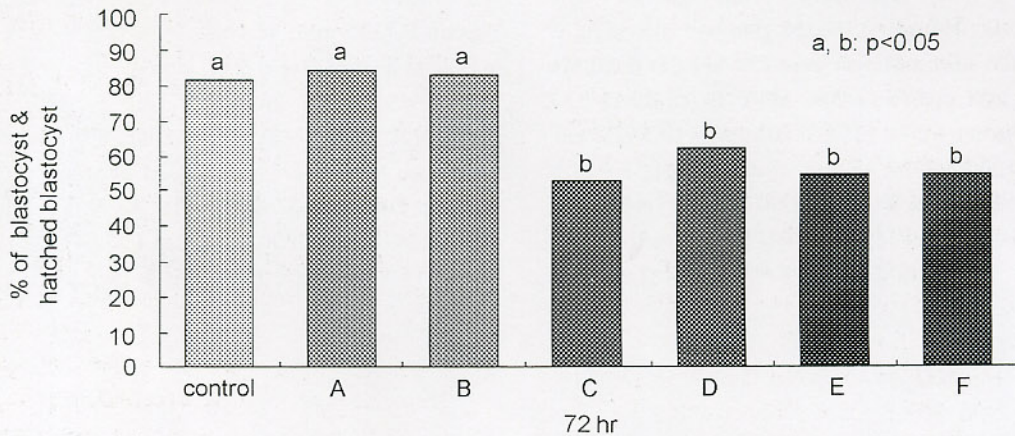


Figure 3. The rate of development into blastocysts and hatched blastocyst at 72hr after culture of 2 cell embryos in DMEM added to different concentrations of each energy sources*. *A: 0.5 mM glucose, B: 3.15 mM glucose, C: 0.1 mM pyruvate, D: 0.32 mM pyruvate, E: 5.87 mM lactate, F: 10.5 mM lactate.

내었다 (Figure 1).

배양 48시간 동안 배반포기 배의 출현율 (Figure 2)은, 대조구가 21.5% (31/144)이고, glucose 첨가구인 group A 33.3% (32/96)와 group B 34.4% (32/93)는 발달율에서 약간의 차이가 있었지만 유의적인 차이를 보이지는 않았다. 그러나 pyruvate 첨가구인 group C 7.9% (7/88)와 group D 6.8% (6/88) 및 lactate 첨가구인 group E 7.1% (6/85)와 group F 7.1% (6/84)는 대조구와 비교할 때 현저한 차이

($p < 0.05$)를 나타내므로써, 24시간 동안 배양했을 때와 비슷한 배 발달 양상이 나타났음을 알 수 있다.

배양 72시간 후 배반포기 배의 형성율과 부화율 (Figure 3)은 배양 24, 48시간째와 마찬가지로 glutamine을 단독 에너지원으로 함유하고 있는 대조구 81.9% (118/144) 및 glucose 첨가구인 group A 83.3% (80/96)와 group B 82.8% (77/93)로 pyruvate 첨가구인 group C 53.4% (47/88)와 group D 62.5%

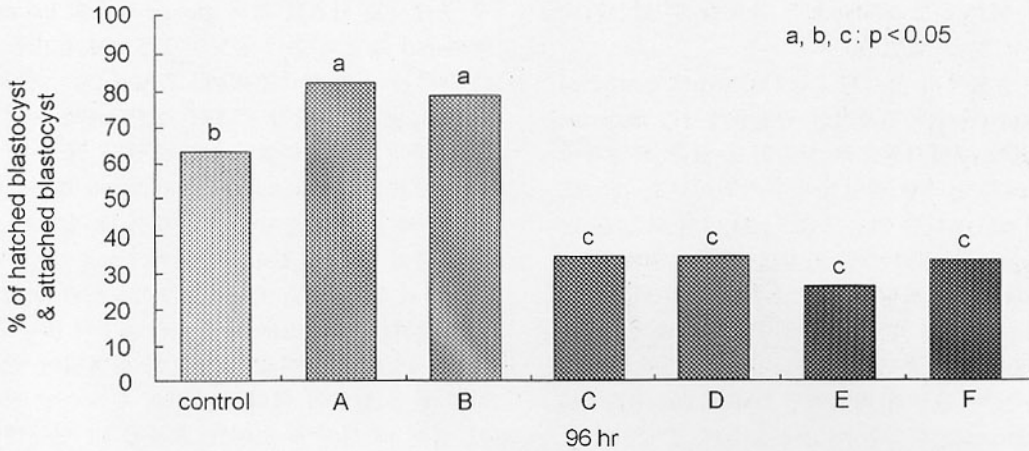


Figure 4. The rate of development into hatched blastocyst and attached blastocyst at 72hr after culture of 2 cell embryos in DMEM added to different concentrations of each energy sources*. *A: 0.5 mM glucose, B: 3.15 mM glucose, C: 0.1 mM pyruvate, D: 0.32 mM pyruvate, E: 5.87 mM lactate, F: 10.5 mM lactate.

(55/88) 및 lactate 첨가구인 group E 55.3% (47/85)와 group F 54.8% (46/84) 보다 현저하게 높은 배 발달율을 나타내었다 ($p < 0.05$).

배양 96시간 쯤에 대한 부화율과 부착율 (Figure 4)은 glucose 첨가구인 group A 82.3% (79/96)와 group B 78.5% (73/93)로 다른 실험구에 비해 현저하게 높은 발달율을 나타내었는데 ($p < 0.05$), 그 중에서도 저농도 (0.5 mM)의 첨가구가 고농도 (3.15 mM)의 첨가구 보다 높은 발달율을 나타내었고, pyruvate 첨가구인 group C 34.1% (30/88)와 group D 34.1% (30/88) 및 lactate 첨가구인 group E 25.9% (22/85)와 group F 33.3% (28/84)는 대조구 보다 현저하게 낮은 발달율을 나타내었다 ($p < 0.05$). 따라서 생쥐 2-세포기 배의 배양에서는 배양 후기로 갈수록 에너지원으로 glucose를 더 많이 필요로 하였고, 고농도 (3.15 mM)에서 보다는 저농도 (0.5 mM)에서 배 발달이 더 효과적이라는 것을 알 수 있었다.

고 찰

본 실험은 glutamine이 단독 에너지원으로 함유되어 있는 배양액 (DMEM)에 첨가한 glucose, pyruvate 및 lactate가 생쥐 배의 발달에 미치는 영향을 조사하여 인간의 체외수정시술에서 임신율을 향상시킬 수 있는 방법을 모색하기 위하여 실시하였는데, 결과에서 보는 바와 같이 생쥐 2-세포

기 배에서 attached blastocyst까지의 전체적인 발달율에서는 배양액에 첨가한 에너지원 중 glucose를 첨가하면 더 우수한 결과를 나타내었다.

배양액에 단독 에너지원으로 함유되어 있는 glutamine은 mouse,^{13,14} hamster^{15,16}의 세포발생증지 현상을 극복하는데 도움을 준다고 하였는데, glutamine은 glutamine transaminase를 통하여 2-oxoglutarate로 변화된 후 에너지를 생산하며, 생쥐 배아는 metabolic source로서 glutamine을 이용한다.¹⁷

일반적으로 생쥐 배아의 대사 에너지로 이용되는 glutamine은 더 이상의 분해과정이 없이 바로 'Krebs cycle'로 들어가 에너지를 생산하지만, glucose는 해당과정을 거쳐야만 에너지대사에 이용될 수 있다.¹⁸ 포유동물 수정란의 체외배양조건에서 배양액에 첨가한 glucose가 배 발달에 미치는 효과의 연구에서 생쥐 초기 배의 glycolytic activity는 아마도 phosphofructokinase activity의 결여 때문에 억제될 것이라 하였는데,¹⁹ 배양액에 첨가한 glucose는 생쥐의 8-세포기 배의 발달을 지지하지 못한다고 하였다.^{20,21} 그러나 본 연구에서 glutamine을 단독 에너지원으로 함유한 배양액 (DMEM)에서의 glucose 첨가는 배 발달을 지지하는 것으로 나타나 상반된 결과를 나타내었다. 본 실험에 사용된 배양액의 glutamine 농도는 다른 연구에서 사용된 농도 (0.2 mM; 0.7 mM; 1 mM)^{4,13,22} 보다 다소 높은 농도 (3.15 mM)가 사용되었으며, 1-세포기가 아니라 2-세포기 배를 배양에 사용하

였기 때문에 '2 cell-block'을 극복할 수 있는지의 여부는 알 수 없었다.

본 실험에서 생쥐의 2 cell embryo에서 attached blastocyst까지의 전체적인 발달율에서는 glutamine을 단독 에너지원으로 함유하고 있는 배양액에 glucose를 첨가한 배양액이 효과적이었고, 고농도 (3.15 mM)보다는 저농도 (0.5 mM)에서 더 높은 발달율을 나타내었는데, 각각의 에너지원과 glutamine과의 혼합배양에 대한 소 수정란의 발달율에 미치는 영향에 대한 연구에서도 glucose에 11AA (amino acid)를 혼합한 배양액이 가장 높았다.²³ 이 결과는 본 연구의 배양액인 DMEM (free glucose)과 glucose를 혼합한 배양액에서 배 발달율이 가장 높은 것과 유사하였다.

Brinster (1965)²²의 연구에 이어 Wale과 Whittingham (1973)²⁴은 마우스의 2 세포기 배 발달을 지지하는 최적의 조건은 pyruvate와 lactate의 농도가 각각 0.3~0.4 mM과 4.0 mM이라고 하였는데, 본 연구에서 이 두 에너지원이 배 발달을 지지하지 못한 것과는 대조적이었다. 또한 pyruvate를 단일 에너지원으로 사용한 연구에서도 마찬가지로 hamster^{25,26}의 blastocyst 단계까지의 발달과 mouse²⁷의 morula 단계까지의 발달을 지지하였다고 하는 연구 보고에서도 pyruvate가 배 발달을 지지한다고 하였지만, 본 실험의 결과와는 상반된 결과를 나타내었다. 그러나 본 연구에서는 glutamine을 함유한 배양액에 첨가한 에너지원의 효과이기 때문에 약간의 차이가 있을 수 있다고 생각된다.

포유동물의 수정란 배양시 체외의 인위적인 환경조건이 배 발달에 대해 최적을 유지하는 데에는 많은 어려움이 있으므로,¹⁻³ 본 연구는 체외수정기술에 사용할 사람 수정란의 수가 적어 실험 용으로는 사용하지 못하는 난점으로 인하여 사람의 난관액과 자궁액에 들어 있는 서로 다른 농도의 에너지원을 따로따로 첨가한 배양액에서의 생쥐 배아의 발달 양상을 조사한 후 사람의 수정란에 대해 응용하기 위해 생쥐 2-세포기 배를 배양할 때 첨가하는 에너지원 (glucose, pyruvate 및 lactate)을 사람의 난관 (각각 0.5, 0.32, 10.5 mM) 또는 자궁 (각각 3.15, 0.1, 5.87 mM)에 함유되어 있는 농도로 조절하여 96시간 동안 배양하면서 24시간 간격으로 배 발달에 미치는 효과를 조사하였다. 다른 에너지원의 첨가구와는 달리 glucose는 glutamine과 혼합한 배양액에서 마우스의 배 발달에 대해 높은 발달율을 유도하였으며, glucose 첨가

구 중에서도 난관액 속의 glucose 농도인 0.5 mM 첨가구가 자궁액 속의 농도인 3.15 mM 첨가구 보다 24시간 (각각 51.0%; 48.4%), 72시간 (각각 83.3%; 82.8%), 96시간 (각각 82.3%; 78.5%)제의 관찰에서 조금씩 높은 배 발달율을 보였다. 또한 전체적으로 볼 때, pyruvate 첨가구와 lactate 첨가구는 대조구와 glucose 첨가구보다 생쥐 배 발달에 대한 효과가 낮은 것으로 나타났다.

이상의 결과로 볼 때, 앞으로 마우스의 metabolic 에너지원인 glutamine을 함유한 배양액 (DMEM)에서 사람의 난관액과 자궁액에 함유되어 있는 서로 다른 농도의 에너지원 간의 상호적인 작용이 생쥐 배 발달에 미치는 효과를 더 연구해야 할 것이며, 이 연구의 결과들은 앞으로 human embryo의 체외배양 조건을 확립하는데 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. Petters RM, Johnson BH, Reed ML, Archibong AE. Glucose, glutamine and inorganic phosphate in early development of the pig embryo in vitro. *J Reprod Fertil* 1990; 89: 269-75.
2. Lewis AMcD, Kaye PL. Characterization of glutamine uptake in mouse two-cell embryos and blastocysts. *J Reprod Fert* 1992; 95: 221-9.
3. Flood MR, Wiebold JL. Glucose metabolism by preimplantation pig embryos. *J Reprod Fertil* 1988; 84: 7-12.
4. Thompson JG, Simpson AC, Pugh PA, Tervit HR. Requirement for glucose during in vitro culture of sheep preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 1992; 31: 253-7.
5. Gardner DK, Lane M. Culture and selection of viable blastocyst: a feasible proposition for human IVF? *Hum Reprod Update* 1997; 3: 367-82.
6. Takahashi Y, First NL. In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 1992; 37: 963-78.
7. Kim JH, Niwa K, Lim JM, Okuda K. Effects of phosphate, energy substrates, and amino acids on development of in vitro-matured, in vitro-fertilized bovine oocytes in a chemically defined, protein-free culture medium. *Biol Reprod* 1993;

- 48: 1320-5.
8. Rosenkrans CF, Zeng GQ, McNamara GT, Schoff PK, First NL. Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biol Reprod* 1993; 49: 459-62.
 9. Huisman GJ, Verhoeff A, Alberda AT, Zeimaker GH, Leerentveld RA. A comparison of in vitro fertilization results after embryo transfer after 2, 3, and 4 days of embryo culture. *Fertil Steril* 1994; 61: 970-1.
 10. Schillaci R, Ciriminna R, Cefalu E. Vero cell effect on in vitro human blastocyst development: preliminary results. *Hum Reprod* 1994; 9: 1131-5.
 11. 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.
 12. Dokras A, Sargent IL, Barlow DH. Human blastocyst grading: an indicator of developmental potential? *Hum Reprod* 1993; 12: 2119-27.
 13. Gardner DK, Leese HJ. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism in vitro. *J Reprod Fertil* 1990; 88: 361-8.
 14. Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL, Torres I. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J Reprod Fertil* 1989; 86: 679-88.
 15. Schini SA, Bavister BD. Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. *Biol Reprod* 1988; 39: 1183-92.
 16. Bavister BD, Leibfried M, Leiberman G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. *Biol Reprod* 1983; 28: 235-47.
 17. Nasr-Esfahani MH, Winston NJ, Johnson MH. Effects of glucose, glutamine, ethylenediamine-tetraacetic acid and oxygen tension on the concentration of reactive oxygen species and on development of the mouse preimplantation embryos in vitro. *J Reprod Fert* 1992; 96: 219-31.
 18. 한국 수정란이식학회. 소 수정란이식. 정문각 1995; 49.
 19. Barbehenn EK, Wales RG, Lowry OH. Measurement of metabolites in single preimplantation embryos; a new means to study metabolic control in early embryos. *J Embryol Exp Morph* 1978; 43: 29-46.
 20. Whitten WK. Culture of tubal ova. *Nature* 1957; 179: 1081-2.
 21. Brinster RL. Studies on the development of mouse embryos in vitro II. The effect of energy sources. *J Exp Zool* 1965; 158: 59-68.
 22. Krisher RL, Bavister BD. Development of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology* 1998; 49: 103-14.
 23. Rose-Hellekant T, Bavister BD. Substrates provided during in vitro maturation modulate acquisition of bovine developmental competence. *Biol Reprod* 1995; 52(suppl 1): 173 abstr.
 24. Wales RG, Whittingham DG. The metabolism of specifically labelled lactate and pyruvate by two-cell mouse embryos. *J Reprod Fertil* 1973; 33: 207-22.
 25. Seshagiri PB, Bavister BD. Glucose inhibits development of hamster 8-cell embryos in vitro. *Biol Reprod* 1989; 40: 599-606.
 26. Seshagiri PB, Bavister BD. Phosphate is required for inhibition by glucose of development of hamster 8-cell embryos in vitro. *Biol Reprod* 1989; 40: 607-14.
 27. Brown JGG, Whittingham DG. The roles of pyruvate, lactate and glucose during preimplantation development of embryos from F₁ hybrid mice in vitro. *Development* 1991; 112: 99-105.