Original Article

Comparison of the Effects of Myo-Inosito Alone or in Combination with MEM Vitamins on Embryo Development in Sanjabi Sheep

Kafilzadeh F., Ph.D.*, Karami Shabankareh H., Ph.D., Soltani L., M.Sc., Kazemine jasemi V., M.Sc.

** Animal Science Department, Agriculture Faculty, Razi University, Kermanshah, Iran*

Abstract

Purpose: The objective of this study was to evaluate the effects of myo-inositol alone or in combination with MEM vitamins on embryo development in sanjabi sheep.

Materials and Methods: Sheep Cumulus Oocytes Complexes (COCs) were matured in vitro at 39°C, in humidified 5% CO2 atmosphere for 22-24 h. There were three treatments, culture in synthetic oviductal fluid medium (treatment I), culture in synthetic oviductal fluid medium supplemented with1 × MEM vitamins (treatment II), culture in synthetic oviductal fluid medium supplemented with myo-inositol (treatment III), COCs were then fertilized and cultured in vitro for 8 days when the ratios of in vitro embryo development of the hatched blastocysts were assessed and compared with the control group.

Results: The presence of myo-inpsitol significantly improved overall morula rates (34.39%) than that of control group (24.18%), but there was no difference between myo-inositol and 1 × MEM vitamins in the percentage of embryos successfully developing to the morula stage ($p<0.05$). The addition of myo-inositol improved the mean blastocyst formation compared to the oocytes matured in medium containing no MEM (control) or 1 × MEM vitamins (32.63, 13.96 and 21.06% respectively). However, the mean percentage of cleavage rate was not substantialy different between treatments.

Conclusion: These results suggest that adding myo-inositol to SOF medium be more beneficial for subsequent sheep embryonic development.

Key words: Myo–inositol, In vitro fertilization, Embryo development, Sanjabi sheep

مقاله تحقیقی

مقایسه اثر میو – اینوزیتول با MEM ویتامین حاوی میو – اینوزیتول بر نمو رویان گوسفند نژاد سنجابی در محیط کشت

فرخ کفیل‌زاده Ph.D. *، حامد کرمی شبانکاره Ph.D.*، لیلا سلطانی M.Sc.**، ویدا کاظمین جاسمی M.Sc.**

* گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

**آزمایشگاه IVF و انتقال رویان گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت: آبان ماه ۸۹، تاریخ پذیرش:دی ماه ۸۹

چکیده

هدف: ارزیابی اثر حضور میو – اینوزیتول به‌صورت مجزا و یا در ترکیب MEM ویتامینه در محیط بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های گوسفندی بر روند نمو رویان

مواد و روش‌ها: تخمدان‌های گوسفند نژاد سنجابی از کشتارگاه به آزمایشگاه دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی انتقال یافت. کمپلکس کومولوس – تخمک (COCs) جمع آوری شده از تخمدان‌ها در شرایط آزمایشگاهی، دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد، در اتمسفر مرطوب حاوی ۵ درصد گاز دی اکسید کربن در ریز قطره‌های روغن به مدت ۲۴–۲۲ ساعت در گروه‌های تیماری زیر بالغ شدند. تیمارI: کشت کمپلکس کومولوس – تخمک در محیط کشت کامل بلوغ شامل محیط مایع بلوغ اویداکتی مصنوعی غنی شده با گونادوتروفین کوریونیک اسب، گونادوتروفین کورونیک انسان، سرم آلبومین گاو و فاکتور رشد اپیدرمال، تیمارII: کشت کمپلکس کومولوس – تخمک در محیط کشت کامل بلوغ همراه باMEM ویتامین‌ها، تیمارIII: کشت کمپلکس کومولوس – تخمک در محیط کشت کامل بلوغ همراه با میو – اینوزیتول. کمپلکس کومولوس – تخمک پس از بلوغ با منی ناحیه جنب بیضه‌های گوسفند نژاد سنجابی کشتارگاهی لقاح یافته و در آزمایشگاه برای ۸ روز کشت شدند. میزان تکوین آزمایشگاهی رویان‌ها ارزیابی و با گروه کنترل مقایسه شد

یافته‌ها: گرچه بین گروه‌های تیماری اختلاف معنی‌داری در میزان تسهیم مشاهده نشد، اما حضور میو – اینوزیتول به‌صورت مجزا در محیط کشت کامل بلوغ، درصد مورولا را در مقایسه با کنترل به طور معنی‌داری افزایش داد (به ترتیب: ۳۴/۳۹ و ۲۴/۱۸ درصد). افزودن میو – اینوزیتول به محیط کشت کامل بلوغ درصد بلاستوسیست را در مقایسه با گروه کنترل و MEM ویتامین به‌صورت معنی‌داری افزایش داد(به ترتیب: ۳۲/۶۳، ۱۳/۹۶ و ۲۱/۰۶) (p<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: حضور میو– اینوزیتول در محیط بلوغ تخمک‌های گوسفندی باعث تسریع در روند تکامل رویان‌های حاصل شد.

کلیدواژه‌ها: میو – اینوزیتول، لقاح آزمایشگاهی، تکوین رویان، گوسفند نژاد سنجابی

مقدمه

در فرایند تولید رویان آزمایشگاهی، مرحله بلوغ تخمک از اهمیت به سزایی برخوردار است. طی بلوغ آزمایشگاهی، علاوه بر از سرگیری بلوغ هسته، تغییرات سیتوپلاسمی نیز روی می‌دهد[۱] که این موفقیت پیوسته و قابل اعتماد در بلوغ

آدرس مکاتبه: کرمانشاه، دانشگاه رازی، دانشکده کشاورزی، گروه علوم دامی

E-mail: kafilzadeh@razi.ac.ir

تخمک (هر دو سیتوپلاسم و هسته) سبب بهبود راندمان نمو و تکامل رویان پیش لانه‌گزینی (افزایش درصد مورولا و بلاستوسیست) و به همان اندازه نمو رویان می‌شود [۲].

میو – اینوزیتول یک الکل حلقوی با ٦ گروه هیدروکسیل بوده که شکل فسفریله شده این ترکیب، در انتقال سیگنال‌های داخل سلولی نقش مهمی دارد و در ساختار فسفولیپیدها شرکت می‌کند. به نظر می‌رسد شکل فعال متابولیکی میو – اینوزیتول، یعنی فسفاتیدیل اینوزیتول نقش مهمی‌در فعالیت‌های فیزیولوژیک نظیر شرکت در ساختار و عملکرد غشاها، تولید ایکوزینوییدها و فعالیت حدواسط در پاسخ‌های سلولی به محرک‌های خارجی برعهده دارد [۳].

آثار ویتامین‌ها بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک و سیستم‌های کشت آزمایشگاهی رویان پیش لانه‌گزینی گزارش شده است. وجود غلظت ۱ ازMEM ویتامین‌ها (MEM vitamins: Minimal essential medium vitamins) در محیط نیمه تعریف شده بلوغ، توانایی نمو بعدی رویان‌های بز را افزایش داده است [٤]. همچنین افزودن این مکمل به محیط غیر تعریف شده (حاوی مایع فولیکولی) نمو پارتنوژنیک تخمک‌های خوک را افزایش داده است [٥]. به علاوه، وجود غلظت‌های پایین MEM ویتامین در محیط غیر تعریف شده، نمو رویان‌های حاصل از انتقال هسته خوکی را افزایش داده است [٦]. افزودن غلظت MEM۱/٥ ویتامین‌ها به محیط بدون مکمل پروتئین آثار زیان باری بر نمو رویانی داشته است [۷]. ترکیب MEM ویتامینه حاوی هشت ویتامین و شبه ویتامین شامل تیامین، ریبوفلاوین، نیاسین، پنتیوتنات، پیریدوکسال، فولیک اسید و کولین و اینوزیتول است. براساس گزارش‌های موجود، حضور اینوزیتول، کولین و پنتیوتنات در محیط‌های تعریف شده رویان‌های هشت سلولی همستر باعث افزایش درصد بلاستوسیست‌ها شده است [۸].

افزودن ۷٥ میکرومولار اینوزیتول به محیط نیمه تعریف شده کشت مورولاهای جوندگان باعث افزایش قطر و درصد بلاستوسیست‌ها در شرایط آزمایشگاهی شده است [۹]. حذف اینوزیتول از محیط کشت رویان‌های جوندگان باعث بیشترین کاهش در درصد بلاستوسیست‌ها در مقایسه با سایر ویتامین‌ها شده است [۱۰]. حضور میو – اینوزیتول در محیط کشت نمو پیش از لانه‌گزینی را در رویان گاو بهبود داده است [۱۱]. همچنین افزودن میو – اینوزیتول در محیط کشت بلوغ تخمک‌های موش، اثر مثبتی بر بلوغ و شایستگی نمو رویانی داشته است [۱۲].

به نظر می‌رسد در مطالعات اخیر صرفا اثر ویتامین‌ها به‌صورت گروهی به عنوان محرک رشد رویانی بررسی شده است و کمتر به بررسی اثر انفرادی ویتامین‌ها توجه شده است. بنابراین در مطالعه حاضر مقایسه اثر یکی از ویتامین‌های محلول در آب با گروه ویتامین‌ها بر نمو رویانی گوسفندان نژاد سنجابی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

فاکتور رشد اپیدرمال، میو- اینوزیتول،MEM ویتامینه و دیگر مواد شیمیایی از شرکت سیگما (Sigma, USA)، پتری دیش از فالکون (Falcon, UK) و هورمون‌ها (گونادوتروپین کوریونیک اسب و انسان) از شرکت اینتروت (Intervet, Netherland) خریداری شد. همه محیط‌ها ۱ ساعت قبل از استفاده در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد، اتمسفر مرطوب حاوی ٥ درصد دی اکسید کربن انکوبه شد.

جمع‌آوری تخمک‌ها

تخمدان‌ها از کشتارگاه بیستون در فلاسک‌های حاوی سرم فیزیولوژی غنی شده با ۱۰۰ واحد بین المللی در لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر استرپتومایسین در دمای ۳٥-۳۰ درجه سانتی‌گراد و کمتر از ۲ ساعت به آزمایشگاه منتقل شد. کمپلکس کومولوس - تخمک از فولیکول‌های با

قطر ۸-۲ میلی‌متر با روش ساکشن کردن با به‌کارگیری سرنگ ۱۰ میلی‌لیتری متصل به سر سرنگ گوژ ۲۱ حاوی حدود ۱ میلی‌لیتر محیط مایع اویداکتی مصنوعی همراه با بافر هپس (HEPES-buffered) و ۱٤/۲٤ میلی‌گرم در میلی‌لیتر هپارین همراه با ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر جنتامایسن جمع‌آوری شد.

بلوغ تخمک

کمپلکس کومولوس - تخمک با حداقل سه لایه فشرده سلول‌های کومولوس و سیتوپلاسم یکنواخت و گرانوله در محیط مایع اویداکتی مصنوعی حاوی بافر هپس و محیط مایع بلوغ اویداکتی مصنوعی مکمل شده با ۰/۲۳ میلی‌مول در لیتر پیروات سدیم، ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر فاکتور رشد اپیدرمال، ۱۰ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر گونادوتروفین کوریونیک اسب و ۱۰ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر گونادوتروفین کوریونیک انسان، ۱۰۰ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین شستشو شد.

کمپلکس کومولوس - تخمک در سه گروه تیماری: تیمارI: کشت کمپلکس کومولوس - تخمک در محیط کشت کامل بلوغ شامل محیط مایع بلوغ اویداکتی مصنوعی غنی شده با گونادوتروفین کوریونیک اسب، گونادوتروفین کورونیک انسان، سرم آلبومین گاو و فاکتور رشد اپیدرمال، اپیدرمال، تیمارII: کشت کمپلکس کومولوس - تخمک در محیط کشت کامل بلوغ همراه با غلظت ۱ ازMEM ویتامین‌ها و تیمارIII: کشت کمپلکس کومولوس - تخمک در محیط کشت کامل بلوغ همراه با ۰/۰۲گرم در لیتر میو-اینوزیتول در گروه‌های ۱۰ تایی و درون قطرات ۵۰ میکرولیتری در پتری دیش‌های کشت رویان پوشیده شده با روغن معدنی.. بلوغ برای مدت ۲٤-۲۲ ساعت در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد گاز دی اکسید کربن در اتمسفر ۱۰۰ درصد مرطوب دنبال شد.

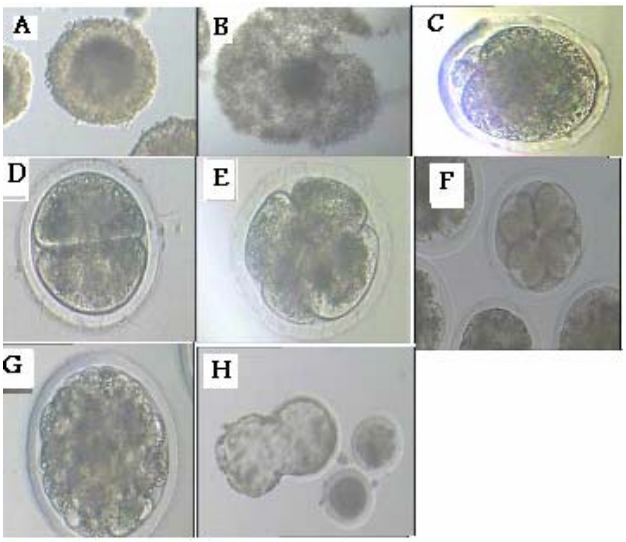
آماده‌سازی اسپرم و لقاح آزمایشگاهی

در انت‌های دوره بلوغ تخمک‌ها در محیط مایع بلوغ اویداکتی مصنوعی قرار داده شد و به دنبال آن با پیپتینگ ملایم، سلول‌های کومولوس جدا و سپس سه مرتبه در محیط لقاح شستشو داده شدند. منی از جنب بیضه‌های کشتارگاهی جمع‌آوری و در درجه حرارت اتاق برای بیش از ۲ ساعت نگهداری شد. سپس منی جمع‌آوری شده در محیط مایع اویداکتی مصنوعی و در شریط $g \times ۲۰۰$ برای مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از شمارش و بررسی کیفیت (ریخت‌شناسی، طبیعی بودن و عدم وجود ناهنجاری در سر، قطعه میانی و دم) و تحرک اسپرم‌ها (حداقل ۸۰ درصد حرکت پیش رونده)، تعداد ۱۵-۱۰ تخمک همراه با اسپرم (غلظت نهایی^{٦}۱۰ × ۱ اسپرم متحرک در هر میلی‌متر) به قطرات ۱۰۰ میکرولیتری محیط لقاح شامل Na-lactate, Na-pyruvate , BSA , NaCl , KCl , KH_2PO_4 , $CaCl_2$, $MgCl_2$, $NaHCO_3$غنی شده با ۱۰ درصد سرم غیر فعال شده گوسفند فحل [۱۳] انتقال داده شدند. سپس قطرات حاوی اسپرم و تخمک همراه با پوشش روغن معدنی در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد و اتمسفر مرطوب حاوی ۵ درصد گاز دی اکسید کربن برای مدت ۲٤-۲۲ ساعت انکوبه شد.

کشت آزمایشگاهی

۲٤-۲۲ ساعت پس از افزودن اسپرم، زیگوت‌های فرضی پس از پیپتینگ ملایم در محیط مایع اویداکتی مصنوعی هپس دار از سلول‌های اطراف جدا شده و سپس در همان محیط قبل از انتقال به قطرات کشت سه مرتبه شستشو داده شدند. کشت رویان در محیط مایع اوویداکتی مصنوعی کشت ۱ و ۲ پوشیده شده با روغن معدنی به ترتیب برای مدت ۲ و ٦ روز در اتمسفر مرطوب حاوی ۵ درصد گاز اکسیژن و ۵ درصد گاز دی اکسید کربن و ۹۰ درصد گاز نیتروژن در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد انجام شد. تسهیم بعد از ۲ روز و تعداد رویان‌های نمو یافته به مرحله مورولا و بلاستوسیست در

روزهای ۸-٦ ارزیابی شد. (شکل ۱) محیط کشت ٤٨ ساعت یکبار تعویض شد.



شکل ۱. کمپلکس کومولوس – تخمک و رویان گوسفندی در مراحل مختلف تکوین رویانی

A- کمپلکس کومولوس – تخمک **B**- تخمک بالغ همراه با سلول‌های کومولوس متسع شده پس از ٢٤-٢٢ ساعت **C**- تخم لقاح یافته به همراه دو جسم قطبی **D**- رویان دو سلولی **E**- رویان چهار سلولی **F**- رویان هشت سلولی **G**- مورولا **H**- بلاستوسیست در حال شکوفایی

تجزیه و تحلیل آماری

این آزمایش حداقل در ۵ تکرار و تخمک‌ها به‌صورت تصادفی در هر گروه تیماری قرار داده شدند. داده‌ها به وسیله ANOVA یک طرفه با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۳آنالیز، و اختلافات بین تیمارها با به‌کارگیری مقایسه میانگین دانکن Duncan' s Multiple Range Test انجام شد و $p<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

اگرچه بین گروه‌های تیماری I، II و III (به ترتیب: ٦٢/٦٢، ٧٣ و ٣٠/ ٧١ درصد) اختلاف معنی‌داری در میزان تسهیم مشاهده نشد؛ اما حضور میو – اینوزیتول به‌صورت مجزا در محیط کشت کامل بلوغ، درصد مورولا را در مقایسه با کنترل به طور معنی‌داری افزایش داد (به‌ترتیب: ٣٤/٣٩ و ٢٤/١٨درصد; جدول۱). بین تیمار II و تیمار Iدر درصد مورولا تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. افزودن میو – اینوزیتول به محیط کشت بلوغ درصد بلاستوسیست را در تیمارIII در مقایسه با تیمارI و تیمار II به‌صورت معنی‌داری افزایش داد (به ترتیب: ٣٢/٦٣، ١٣/٩٦ و ٠٦/ ٢١درصد؛ $p<0/05$).

جدول ۱. میزان نمو تخمک‌های گوسفندی بالغ شده در شرایط آزمایشگاهی در گروه‌های مورد مطالعه

تیمار	تعداد تخمک	درصد تسهیم	نسبت درصد مورولا به تخمک‌ها	نسبت درصد بلاستوسیست به تخمک‌ها
تیمار I	٢١٤	٦٢/٦٢±٦/٤٧[a]	٢٤/١٨ ± ٢/٩٦[a]	١٣/٩٦ ±١/٨٢[a]
تیمار II	٢١١	٧٣±٧/٨١[a]	٢٨/٢٨ ± ٣/٤٥[ab]	٢١/٠٦ ±٤/٤٧[a]
تیمار III	٢١٠	٧١/٣٠±٢/٦٣[a]	٣٤/٣٩ ±٣/٠٣ [b]	٣٢/٦٣ ±١/٩٦[b]

تیمارI: کشت در محیط کشت کامل بلوغ شامل محیط مایع بلوغ اویداکتی مصنوعی؛ تیمارII: کشت در محیط کشت کامل بلوغ همراه باMEM ویتامین‌ها، تیمارIII: کشت در محیط کشت کامل بلوغ همراه با میو-اینوزیتول در هر ستون مقادیری که حداقل یک حرف مشترک دارند از لحاظ آماری معنی‌دار نیستند و مقادیری که حرف مشترک ندارند از لحاظ آماری معنی‌دار هستند ($p<0/05$).

بحث

محیط مایع اویداکتی مصنوعی بر مبنای آنالیز بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مایع اوویداکتی گوسفند ساخته شده [١٣] و در بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های گاو [١٣و١٤]، بز [٤]، سگ [١٥] و کشت آزمایشگاهی رویان‌های گوسفندی به‌کار رفته است [١٣و١٦].

در مطالعه حاضر، اثر حضور میو-اینوزیتول به‌صورت مجزا و یا ترکیب MEM ویتامین در محیط مایع اویداکتی مصنوعی بر بلوغ آزمایشگاهی تخمک‌های گوسفندی و نمو آتی رویان‌های حاصل ارزیابی شد. افزودن میو- اینوزیتول به محیط کشت کامل بلوغ تخمک‌های گوسفندی باعث افزایش

معنی‌داری در درصد رویان‌های حاصل در مرحله بلاستوسیست در مقایسه با تیمار I و تیمار II شد. میو – اینوزیتول به عنوان فاکتور رشد در بسیاری از سلول‌ها عمل کرده است [۱۷]. اینوزیتول به عنوان بخشی از چرخه فسفاتیدیل اینوزیتول نقش مهمی در کنترل تکثیر سلولی در محدوده وسیعی از هر دو سلول‌های طبیعی و سرطانزا ایفا می‌کند [۱۸]. در این چرخه، اینوزیتول نخست با فسفاتیدیل اینوزیتول ترکیب شده و به فسفاتیدیل اینوزیتول ٤–فسفات و سپس به فسفاتیدیل اینوزیتول ٤و ٥–فسفات تبدیل می‌شود. تحریک گیرنده‌های غشای سلولی به وسیله فاکتورهای رشد پپتیدی و دیگر تحریک‌کننده‌ها، منجر به شکستن فسفاتیدیل اینوزیتول ٤و٥–فسفات و تبدیل آن به دو پیامبر ثانویه به نام‌های ١،٤و٥ تری فسفات اینوزیتول و دی اسیل گلیسرول می‌شود. ١،٤و٥ تری فسفات اینوزیتول سبب آزاد سازی یون کلسیم از ذخیره داخلی که همراه با دی اسیل گلیسرول سبب فعال‌سازی پروتئین کیناز ***C*** می‌شود که ترکیب اخیر، برخی پروتئین‌ها را فسفریله و سبب ایجاد آثار فیزیولوژیک خاص می‌شود [۲۰،۱۹] با توجه به نقش اینوزیتول به عنوان پیامبر ثانویه برای عملکرد بسیاری از هورمون‌های پپتیدی و فاکتورهای رشد[٦]، به نظر می‌رسد که حضور این ترکیب در محیط کشت بلوغ باعث بهبود عملکرد هورمون‌های موجود در مطالعه حاضر (گونادوتروفین کوریونیک اسب، انسان و فاکتور رشد اپیدرمال) شده است. وجود اینوزیتول برای سنتز دیواره‌های فسفولیپیدی ضروری است [۲۱و۲۲]، پس این احتمال وجود دارد که ترکیب حاضر سبب تحریک سنتز ترکیبات دیواره‌های جدید فسفولیپیدی در مراحل بعدی نمو رویانی شده باشد. به علاوه؛ اینوزیتول نقش مهمی در تشکیل پیش هسته‌ها در طول لقاح آزمایشگاهی ایفا می‌کند [۸]. همچنین با توجه به اهمیت حضور این ماده برای سنتز غشای فسفولیپیدی سلول [۲۱و۲۲]، به نظر می‌رسد این ترکیب از طریق تحریک سنتز ترکیبات دیواره‌های جدید فسفولیپیدی بر نمو رویانی اثر می‌گذارد.

از هشت ویتامین محلول در آب به کار رفته در مجموعه ویتامین‌ها، به نظر می‌رسد که حضور اینوزیتول به تن‌هایی برای تکامل رویانی کافی باشد. اهمیت این موضوع با نگاهی به جدول شماره ۱ که نشانگر درصد سنتز بلاستوسیست‌ها در محیط کشت کامل بلوغ حاوی اینوزیتول است، قابل مشاهده است. براساس مطالعه کن (Kane) اینوزیتول برای رشد و تفریخ بلاستوسیست‌های موش ضروری است. به عبارت دیگر؛ اینوزیتول نقش مهمی در رشد و تکامل رویانی پستانداران بر عهده دارد. در مطالعه دانیل (Daniel)، برخلاف ویتامین ب ۱۲، کولین و پنتوتنات و بیوتین حضور اینوزیتول، پیریدوکسال، ریبوفلاوین و نیکوتین آمید و فولیک اسید سبب افزایش رشد بلاستوسیست‌های جوندگان شده است [۲۳]. براساس مطالعات کن (Kane)، غلظت ۷۵ میکرو مولار اینوزیتول باعث افزایش معنی‌دار قطر و درصد بلاستوسیست‌های جوندگان شده است [٢٤]. همچنین مطالعات این محقق و باویستر (Bavister) نشانگر آثار مثبت اینوزیتول، پنتوتنات و کولین بر میزان بلاستوسیست‌های همستر کشت شده در مرحله ۸ سلولی در شرایط آزمایشگاهی است، به گونه‌ای که حذف مجزای هر یک از این ویتامین‌ها از ترکیب ویتامینه اثر مشابه با حذف کل ترکیب ویتامینه بر جای گذاشته است [۸]. همچنین مطالعات فاهی و کن (Kane and Fahy) نشان داد که حضور اینوزیتول در محیط نیمه تعریف شده کشت مورولاهای جوندگان سبب افزایش درصد بلاستوسیست‌ها، تکثیر سلول و سنتز پروتئین شده است [۹]. در تحقیق حاضر افزودن میو – اینوزیتول به محیط کشت بلوغ باعث بهبود تشکیل بلاستوسیست شده که با نتایج قبلی یعنی افزودن همین ترکیب به تن‌هایی در محیط‌های کشت بلوغ و کشت رویان همخوانی دارد [۱۰–۸، ٢٤و ٢٣]. در مطالعه حاضر، اینوزیتول به‌صورت مجزا اثر بهتری در طول بلوغ آزمایشگاهی و نمو آتی رویان گوسفندی

در مقایسه با MEM ویتامینه که حاوی هشت ویتـامین و شـبه ویتامین از جمله اینوزیتول است داشته است. به نظر می‌رسـد تداخل عملکرد اجزای موجود در ترکیب ویتامینـه مـبهم و در مقایسه با عملکرد اینوزیتول به تن‌هایی بر رشـد رویـانی آثـار زیان باری داشته است. گرچه، براساس نتایج مطالعـه حاضـر، حضور میو- اینوزیتـول در محـیط بلـوغ نیمـه تعریـف شـده باعث تسریع در رونـد تکامـل رویـان‌هـای گوسـفندی شـده است، اجرای آزمایشی دیگر مبنی بر بلوغ آزمایشگاهی و نمـو رویانی گوسفند در محیط غنی شده با MEM فاقـد اینوزیتـول توصیه می‌شود.

تقدیر و تشکر

از زحمات آقایان مهندس جعفـر سـالاری و احـسان کرنـدی برای جمع آوری نمونه‌های کشتارگاهی تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. **Ali A, Sirard MA.** Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation. Biol Reprod 2002; 66: 901-5.
2. **Sagirkaya H, Misirlioglu M, Kaya A, First NL, Parrish JJ, Memili E.** Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. Anim Rep Sci 2007; 101:225-40.
3. **Michal G.** Biochemical phathways. Spektrum: Berlin,1999, p108-17.
4. **Bormann CL, Ongeri EM, Krisher RL.** The effect of vitamins during maturation of caprine oocytes on subsequent developmental potential in vitro. Theriogenology 2003; 59:1373-80.
5. **Naruse K, Kim HR, Shin YM, Chang SM, Lee HR, Park CS, et al.** Low concentrations of MEM vitamins during in vitro maturation of porcine oocytes improve subsequent parthenogenetic development. Theriogenology 2007; 67:407-12
6. **Naruse K, Quan Y S, Choi SM, Park CS, Jin DI**. Treatment of procine oocytes with MEM Vitamins during in vitro maturation improves subsequent blastocyst development following nuclear transfer. J Rep Dev 2007; 53: 679-84
7. **Karami Shabankareh H, Kafilzadeh F, Soltani L.** The effect of various concentrations of MEM vitamins on further development of sheep oocytes during in vitro maturation. 14th Internatinal Biotechnology Symposium and Exhibition, Rimini, 14-18 september 2010.
8. **Kane MT, Bavister BD.** Vitamin requirements for development of eight-cell hamster embryos to hatching blastocysts in vitro. Biol Reprod 1988; 39:1137-43.
9. **Fahy MM, Kane MT.** Inositol stimulates DNA and protein synthesis, andexpansion by rabbit blastocysts in vitro. Hum Reprod 1992; 7: 550-2.
10. **Kane MT.** The effects of water-soluble vitamins on the expansion of rabbit blastocysts in vitro. J Exp Zool 1988;245: 220-3.
11. **Chiu TY, Rogers MS, Briton-Jones C, Haines C.** Effects of myo-inositol on the in-vitro maturation and subsequent development of mouse oocytes. Hum Reprod. 2003; 18, 2: 408-16.
12. **Hynes AC, Sreenan JM, Kane MT.** Uptake and incorporation of myo-inositol by bovine preimplantation embryos from two-cell to early blastocyst stages. Mol. Reprod. Dev 2000; 55: 265-9.
13. **Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LEA.** Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. J Reprod Fertil 1972; 30:493-7.
14. **Gandhi AP, Lane M, Gardner DK, Krisher RL.**

A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. Hum Reprod 2000; 15:395-401

15. **Bolamba D, Russ KD, Olson MA, Sandler JL, Durrant BS.** In vitro maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicles in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential. Theriogenology 2002; 58:1689-703.
16. **Gardner DK, Lane M, Spitzer A, Batt PB.** Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. Biol Reprod 1994;50: 390-400.
17. **Eagle H, Oyama VI, Levy M, Freeman AE.** Myo-Inostol as an essential growth factor for normal and malignant human cells in tissue culture. J Biol Chem 1957; 226:191-207.
18. **Berridge MJ.** Inositol lipids and cell proliferation. Biochim Biophys Acta 1987; 907: 33-45.
19. **Low MG.** Biochemistry of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane protein anchors. J Biochem 1987; 244: 1-13
20. **Saltiel AR, Osterman DG, Darnell JC, Sorbara-Cazan LR, Chan, BL, Low MG, et al.** The function of glycosgl phsophoiositides in hormone action. Phil Trans R Soc Lond [B] 1988; 320: 345-358
21. **Hawthorne JN.** Inositol phospholipids. In: Hawthorne JN, Ansell GB. editors. Phospholipids. Elsevier Biomed Press Amsterdam 1982; 263-78.
22. **Vance DE.** Phospholipid metabolism in eukaryotes. In: Vance DE, Vance JE, editors. Biochemistry of lipids and membranes. Menlo Park, CA: The Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc, p 1986, 242-70
23. **Daniel CJ.** Vitamins and growth factors in the nutrition of rabbit blastocysts in vitro. Growth 1967; 31: 71-7.
24. **Kane MT.** Effects of the putative phospholipid precursors, inositol, choline, serine and ethanolamine, on formation and expansion of rabbit blastocysts in vitro. J Reprod Fert 1989; 87: 275-9.