

مقایسه اثر میو - اینوزیتول با MEM ویتامین حاوی میو - اینوزیتول بر نمو رویان

گوسفند نژاد سنجابی در محیط کشت

فرخ کفیلزاده Ph.D.*، حامد گرمی 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 به صورت 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. تیمار I: کشت کمپلکس کومولوس - تخمک در محیط کشت کامل بلوغ شامل محیط مایع بلوغ اویداکتی مصنوعی غنی شده با گونادوتروفین کوریونیک اسب، گونادوتروفین کوریونیک انسان، سرم آلبومین گاو و فاکتور رشد اپیدرمال، تیمار II: کشت کمپلکس کومولوس - تخمک در محیط کشت کامل بلوغ همراه با MEM ویتامین‌ها، تیمار III: 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 به صورت 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 بلاستوسیت را در مقایسه با گروه کنترل و MEM ویتامین به صورت معنی‌داری افزایش داد (به ترتیب: ۳۲/۶۳، ۱۳/۹۶ و ۲۱/۰۶) ($p < 0.05$).

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

علاوه بر از سرگیری بلوغ هسته، تغییرات سیتوپلاسمی نیز روی می‌دهد [۱] که این موفقیت پیوسته و قابل اعتماد در بلوغ

در فرایند تولید رویان آزمایشگاهی، مرحله بلوغ تخمک از اهمیت به سزایی برخوردار است. طی بلوغ آزمایشگاهی،

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

E-mail: kafilzadeh@razi.ac.ir

بلاستوسیت‌ها در شرایط آزمایشگاهی شده است [۹]. حذف اینوزیتول از محیط کشت رویان‌های جوندگان باعث بیشترین کاهش در درصد بلاستوسیت‌ها 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 صرفاً اثر ویتامین‌ها به صورت 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 (گوناوتروپین کورونیونیک 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 ۵ درصد دی‌اکسید کربن انکوبه شد.

جمع‌آوری تخمک‌ها

تخمندان‌ها از کشتارگاه بیستون در فلاسک‌های حاوی سرم فیزیولوژی غنی شده با ۱۰۰ واحد بین‌المللی در لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر استرپتومایسین در دمای ۳۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد و کمتر از ۲ ساعت به آزمایشگاه منتقل شد. کمپلکس کومولوس - تخمک از فولیکول‌های با

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

میو- اینوزیتول یک الکل حلقوی با ۶ 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 مهمی در فعالیت‌های فیزیولوژیک نظیر شرکت در ساختار و عملکرد غشاها، تولید ایکوزینوئیدها 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 از MEM ویتامین‌ها (MEM vitamins: Minimal essential medium vitamins) در محیط نیمه تعریف شده بلوغ، توانایی نمو بعدی رویان‌های بز را افزایش داده است [۴]. همچنین افزودن این مکمل به محیط غیر تعریف شده (حاوی مایع فولیکولی) نمو پارتنوژنیک تخمک‌های خوک را افزایش داده است [۵]. به علاوه، وجود غلظت‌های پایین MEM ویتامین در محیط غیر تعریف شده، نمو رویان‌های حاصل از انتقال هسته خوکی را افزایش داده است [۶]. افزودن غلظت MEM ۱/۵ 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، ریوفلاوین، 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 بلاستوسیت‌ها شده است [۸].

افزودن ۷۵ میکرومولار اینوزیتول به محیط نیمه تعریف شده کشت مورولاهای جوندگان باعث افزایش قطر و درصد

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 $200 \times g$ 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 1×10^6 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 دی‌اکسید کربن برای مدت ۲۴-۲۲ ساعت انکوبه شد.

کشت آزمایشگاهی

۲۴-۲۲ 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 اویداکتی مصنوعی کشت ۱ و ۲ پوشیده شده با روغن معدنی به ترتیب برای مدت ۲ و ۶ روز در اتمسفر مرطوب حاوی ۵ درصد گاز اکسیژن و ۵ درصد گاز دی‌اکسید 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

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 $14/24$ میلی‌گرم در میلی‌لیتر هپسین 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 $0/23$ میلی‌مول در لیتر پیرووات 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: تیمار I: کشت کمپلکس کومولوس - تخمک در محیط کشت کامل بلوغ شامل محیط مایع بلوغ اویداکتی مصنوعی غنی شده با گونادوتروفین کوریونیک اسب، گونادوتروفین کوریونیک انسان، سرم آلبومین گاو و فاکتور رشد اپیدرمال، اپیدرمال، تیمار II: کشت کمپلکس کومولوس - تخمک در محیط کشت کامل بلوغ همراه با غلظت ۱ از MEM ویتامین‌ها و تیمار III: کشت کمپلکس کومولوس - تخمک در محیط کشت کامل بلوغ همراه با $0/02$ گرم 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 ۲۴-۲۲ ساعت در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد گاز دی‌اکسید کربن در اتمسفر ۱۰۰ درصد مرطوب دنبال شد.

کامل بلوغ، درصد مورولا را در مقایسه با کنترل به طور معنی داری افزایش داد (به ترتیب: ۳۴/۳۹ و ۲۴/۱۸ درصد؛ جدول ۱). بین تیمار II و تیمار I در درصد مورولا تفاوت معنی داری مشاهده نشد. افزودن میو- اینوزیتول به محیط کشت بلوغ درصد بلاستوسیت را در تیمار III در مقایسه با تیمار I و تیمار II به صورت معنی داری افزایش داد (به ترتیب: ۳۲/۶۳، ۱۳/۹۶ و ۲۱/۰۶ درصد؛ $p < 0.05$).

جدول ۱. میزان نمو تخمک های گوسفندی بالغ شده در شرایط آزمایشگاهی در گروه های مورد مطالعه

تیمار	درصد تسهیم	نسبت درصد مورولا به تخمک ها	نسبت درصد بلاستوسیت به تخمک ها
تیمار I	۲۱۴	$62/62 \pm 7/47^a$	$24/18 \pm 2/96^a$
تیمار II	۲۱۱	$73 \pm 7/81^a$	$21/06 \pm 4/47^a$
تیمار III	۲۱۰	$71/30 \pm 2/63^a$	$32/63 \pm 1/96^b$

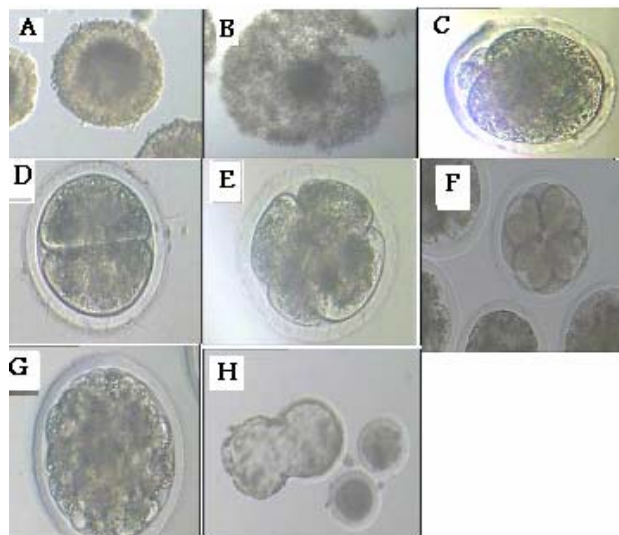
تیمار I: کشت در محیط کشت کامل بلوغ شامل محیط مایع بلوغ اویداکتی مصنوعی؛ تیمار II: کشت در محیط کشت کامل بلوغ همراه با MEM ویتامین ها، تیمار III: کشت در محیط کشت کامل بلوغ همراه با میو- اینوزیتول در هر ستون مقادیری که حداقل یک حرف مشترک دارند از لحاظ آماری معنی دار نیستند و مقادیری که حرف مشترک ندارند از لحاظ آماری معنی دار هستند ($p < 0.05$).

بحث

محیط مایع اویداکتی مصنوعی بر مبنای آنالیز بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مایع اویداکتی گوسفند ساخته شده [۱۳] و در بلوغ آزمایشگاهی تخمک های گاو [۱۳ و ۱۴]، بز [۴]، سگ [۱۵] و کشت آزمایشگاهی رویان های گوسفندی به کار رفته است [۱۶ و ۱۳].

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

روزهای ۶-۸ ارزیابی شد. (شکل ۱) محیط کشت ۴۸ 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 سلول های کومولوس متسع شده پس از ۲۴-۲۲ 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- بلاستوسیت در حال شکوفایی

تجزیه و تحلیل آماری

این آزمایش حداقل در ۵ تکرار و تخمک ها به صورت تصادفی در هر گروه تیماری قرار داده شدند. داده ها به وسیله ANOVA یک طرفه با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۳ آنالیز، و اختلافات بین تیمارها با به کارگیری مقایسه میانگین دانکن Duncan's Multiple Range Test انجام شد و $p < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

اگرچه بین گروه های تیماری I، II و III (به ترتیب: ۶۲/۶۲، ۷۳ و ۷۱/۳۰ درصد) اختلاف معنی داری در میزان تسهیم مشاهده نشد؛ اما حضور میو- اینوزیتول به صورت مجزا در محیط کشت

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 بلاستوسیت‌ها در محیط کشت کامل بلوغ حاوی اینوزیتول است، قابل مشاهده است. براساس مطالعه کن (Kane) اینوزیتول برای رشد و تفریح بلاستوسیت‌های 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، ریوفلاوین و نیکوتین آمید و فولیک اسید سبب افزایش رشد بلاستوسیت‌های جوندگان شده است [۲۳]. براساس مطالعات کن (Kane)، غلظت ۷۵ میکرو مولار اینوزیتول باعث افزایش معنی‌دار قطر و درصد بلاستوسیت‌های جوندگان شده است [۲۴]. همچنین مطالعات این محقق و باویستر (Bavister) نشانگر آثار مثبت اینوزیتول، پنتوتنات و کولین بر میزان بلاستوسیت‌های 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 بلاستوسیت‌ها، تکثیر سلول و سنتز پروتئین شده است [۹]. در تحقیق حاضر افزودن میو - اینوزیتول به محیط کشت بلوغ باعث بهبود تشکیل بلاستوسیت شده که با نتایج قبلی یعنی افزودن همین ترکیب به تنهایی در محیط‌های کشت بلوغ و کشت رویان همخوانی دارد [۱۰-۸، ۲۴ و ۲۳]. در مطالعه حاضر، اینوزیتول به صورت مجزا اثر بهتری در طول بلوغ آزمایشگاهی و نمو آتی رویان گوسفندی

معنی‌داری در درصد رویان‌های حاصل در مرحله بلاستوسیت 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 ۴-فسفات و سپس به فسفاتیدیل اینوزیتول ۴ و ۵-فسفات تبدیل می‌شود. تحریک گیرنده‌های غشای سلولی به وسیله فاکتورهای رشد پپتیدی و دیگر تحریک‌کننده‌ها، منجر به شکستن فسفاتیدیل اینوزیتول ۴ و ۵-فسفات و تبدیل آن به دو پیامبر ثانویه به نام‌های ۴، ۵ و ۱، ۴، ۵ تری فسفات اینوزیتول و دی اسیل گلیسرول می‌شود. ۴، ۵ و ۱ تری فسفات اینوزیتول سبب آزاد سازی یون کلسیم از ذخیره داخلی که همراه با دی اسیل گلیسرول سبب فعال سازی پروتئین کیناز C می‌شود که ترکیب اخیر، برخی پروتئین‌ها را فسفریله و سبب ایجاد آثار فیزیولوژیک خاص می‌شود [۱۹، ۲۰] با توجه به نقش اینوزیتول به عنوان پیامبر ثانویه برای عملکرد بسیاری از هورمون‌های پپتیدی و فاکتورهای رشد [۶]، به نظر می‌رسد که حضور این ترکیب در محیط کشت بلوغ باعث بهبود عملکرد هورمون‌های موجود در مطالعه حاضر (گوناودتروفین کوریونیک اسب، انسان و فاکتور رشد اپیدرمال) شده است. وجود اینوزیتول برای سنتز دیواره‌های فسفولیپیدی ضروری است [۲۱ و ۲۲]، 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 [۲۱ و ۲۲]، به نظر می‌رسد این ترکیب از طریق تحریک سنتز ترکیبات دیواره‌های جدید فسفولیپیدی بر

رویانی گوسفند در محیط غنی شده با MEM فاقد اینوزیتول توصیه می‌شود.

تقدیر و تشکر

از زحمات آقایان مهندس جعفر سالاری و احسان کرندی برای جمع آوری نمونه‌های کشتارگاهی تشکر و قدردانی می‌شود.

در مقایسه با MEM ویتامینه که حاوی هشت ویتامین و شبه ویتامین از جمله اینوزیتول است داشته است. به نظر می‌رسد تداخل عملکرد اجزای موجود در ترکیب ویتامینه مبهم و در مقایسه با عملکرد اینوزیتول به تنهایی بر رشد رویانی آثار زیان باری داشته است. گرچه، براساس نتایج مطالعه حاضر، حضور میو- اینوزیتول در محیط بلوغ نیمه تعریف شده باعث تسریع در روند تکامل رویان‌های گوسفندی شده است، اجرای آزمایشی دیگر مبنی بر بلوغ آزمایشگاهی و نمو

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 pathways. 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 porcine 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 International 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, and expansion 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, Britton-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 glycosyl phosphoinositides 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.