

اثرات متقابل غلظتهای مختلف سرم جنین گاو با کافتین یا هیپارین بر باروری تخمکهای گاو و ایجاد پلی اسپرمی

دکتر پرویز تاجیک^۱

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۶، شماره ۴، ۱۰۲-۹۷ (۱۳۸۰)

تخمکهای گاو دارند. همچنین Bosch و همکاران (۲۰۰۱) اثر هیپارین همراه با کلسیم را در آزاد شدن اسپرم گاو از سلولهای اویدوکت، Chamberland و همکاران (۲۰۰۱) اثر هیپارین را در پارامترهای تحرک اسپرم مورد ارزیابی قرار داده اند با این وجود در آزمایشهای ذکر شده همیشه آلبومین سرم گاو ("Bovine serum albumin" BSA) در محیط باروری موجود بوده است.

از طرف دیگر اعتقاد بر این است که سلولهای کومولوس باروری آزمایشگاهی تخمک پستانداران را افزایش می دهد. مطالعات انجام شده توسط Bavister (۱۹۸۲) روی هامستر و Fraser (۱۹۸۵) بر روی موش تأیید کننده این حقیقت است. Tesarik (۱۹۸۵) و Sitteri (۱۹۸۸) نیز گزارش کرده اند که در گرمخانه قرار دادن اسپرمی که مراحل توانا شدن (Capacitation) را پشت سر گذاشته است، همراه با سلولهای کومولوس منجر به انجام واکنش آکروزومی (Acrosome reaction) می گردد. Sullivan و دیگران (۱۹۹۰) گزارش نموده اند که فعالیت ایجاد واکنش آکروزومی توسط سلولهای کومولوس می تواند مربوط به پروتئینی باشد که این سلولها در زمان کشت در محیط تولید می نمایند (Stock و همکاران، ۱۹۸۹، Sullivan و همکاران، ۱۹۹۰، Drahorad و همکاران، ۱۹۹۱) از طرف دیگر Meizel و همکاران (۱۹۹۰) نشان داده اند که ایجاد واکنش آکروزومی در اسپرمهای انسان و هامستر، به وسیله پروژسترون رخ می دهد که آنرا از ترشحات سلولهای کومولوس می دانند (Hillenjo، ۱۹۸۵).

بدین ترتیب علی رغم مطالعات زیاد توسط محققین مختلف، نقش حقیقی کومولوس یا پروتئین به هنگام باروری روشن نشده است (Yanagimachi، ۱۹۸۱، Xum و دیگران، ۱۹۸۷، Yanagimachi، ۱۹۹۷، Fukui و دیگران، ۱۹۸۹، Lu و دیگران، ۱۹۸۹، و Fukui و دیگران، ۱۹۹۰). بدین ترتیب مشاهده می شود که از طرفی نقش مواد پروتئینی همانند سرم جنین گاو و آلبومین سرم گاوی به ترتیب در هنگام بلوغ و باروری تخمکهای گاو بر هیچ کس پوشیده نیست. بدین جهت تاکنون سعی شده است که اثر دقیق این مواد را نیز در هنگام بلوغ و باروری مورد بررسی قرار دهند (Leibfried-Rutledge و همکاران، ۱۹۸۶، Ohboshi و همکاران، ۱۹۹۷، Yoshida و همکاران، ۱۹۹۷، و Van Langendonck و همکاران، ۱۹۹۷). این دسته از محققین FCS را از جنبه های مختلف با BSA مقایسه کرده اند تا در صورت امکان و لزوم بتوانند آنها را جایگزین نمایند. از طرف دیگر BSA پروتئینی است بسیار گران قیمت و متغیر، زیرا طبق نظر اکثر محققین اختلافهای چشمگیر بین بسته های مختلف تولیدات آن از لحاظ پاسخ به آزمایش وجود دارد. از این نظر جایگزینی پروتئین ارزانیقیمت تر دیگری که بتواند نیاز آزمایشگاههای باروری آزمایشگاهی را بر آورده سازد مطلوب همگان است. در حالی که قبلاً نقش FCS در بارور شدن تخمکهای گاو توسط Leibfried-Rutledge و همکاران (۱۹۸۶) و Younis و همکاران (۱۹۸۹) مورد ارزیابی قرار گرفته است، و همچنین ما قبلاً اثر غلظتهای مختلف را به همراه کافتین و هیپارین در باروری تخمکهای گاو بررسی نموده ایم (Tajik و همکاران، ۱۹۹۳)، متأسفانه تاکنون اثرات آنها به تنهایی در باروری با تفکیک اثر آنها از اثرات کافتین و هیپارین (که خود هر دو در توانا شدن اسپرم نقش اساسی دارند) در محیط های حاوی غلظتهای مختلف سرم جنین گاو، مورد ارزیابی قرار نگرفته است. زیرا گفته شده است که گلیکوزامینوگلیکانها (Glycosaminoglycans) هم سنگهای پروتئوگلیکانها، (Proteoglycans) که هیپارین هم از آن دسته به حساب می آید، با تأثیر گذاری بر

جهت بررسی تأثیر کافتین یا هیپارین در باروری آزمایشگاهی تخمکهای با یا بدون سلولهای کومولوس که در آزمایشگاه بالغ شده اند، پس از گرفتن تخمک از تخمدان گاوهای کشتار شده و بالغ نمودن آنها در شرایط آزمایشگاه، نیمی از آنها با استفاده از محلول هیالورونیداز بدون سلولهای کومولوس گردیده و سپس هر دو گروه (تخمکهای بالغ شده با سلولهای کومولوس اووفروس و تخمکهای بالغ شده که پس از بلوغ سلولهای کومولوس آنها گرفته شده است) جهت تلقیح در محیطهای حاوی غلظتهای مختلف (صفر تا ۲۰ درصد) از سرم جنین گاو ("Fetal calf serum" FCS) همراه یا بدون کافتین یا هیپارین قرار گرفته و با اسپرم از انجام خارج شده تلقیح گردیدند. در محیطهای حاوی ۵ درصد تا ۲۰ درصد از FCS در حضور کافتین میزان باروری تخمکهای دارای کومولوس (۸۵ درصد تا ۹۴ درصد) به طور معناداری ($P < 0.05$) بیش از باروری تخمکهای بدون کومولوس (۲۲ درصد تا ۵۶ درصد) بود. در این حالت ۷۲ تولید هر دو پیش هسته در گروههای مختلف آزمایش تفاوت معناداری نداشته ولی درصد باروری با بیش از یک اسپرم (پلی اسپرمی) در هریک از گروههای کومولوس دار با افزایش غلظت FCS از ۱۰ درصد به ۲۰ درصد افزایش یافت (۲۷ درصد، ۳۴ درصد، ۵۸ درصد و ۷۶ درصد به ترتیب برای غلظتهای صفر، ۵ درصد، ۱۰ و ۲۰ درصد سرم). در تخمکهای بدون کومولوس، با افزایش غلظت سرم از ۱۰ درصد به ۲۰ درصد کاهش معناداری در میزان باروری و همچنین ایجاد پلی اسپرمی به وجود آمد. در حضور هیپارین، باروری تخمکهای بدون کومولوس با افزایش غلظت سرم تغییری نداشته و در حد بالای خود (۱۰۰ درصد) قرار داشت. در این حالت ایجاد پلی اسپرمی در مجموع به طور محسوسی در تخمکهای بدون کومولوس بیش از تخمکهای کومولوس دار بود. هنگامی که این آزمایشها در محیط فاقد کافتین و هیپارین انجام شد، میزان باروری و همچنین ایجاد پلی اسپرمی به میزان شدیدی کاهش یافت. بدین ترتیب به نظر می رسد که: اولاً: حضور کومولوس در هنگام وجود کافتین می تواند به عنوان تحریک باروری مورد قبول قرار گیرد. ثانیاً: هیپارین در سلولهای بدون کومولوس اثر تحریکی بیشتری بر باروری تخمکهای گاو در غلظتهای مختلف FCS دارد. ثالثاً: وجود FCS به تنهایی در محیط کشت پایه نمی تواند باعث تحریک باروری تخمکهای گاو گردد.

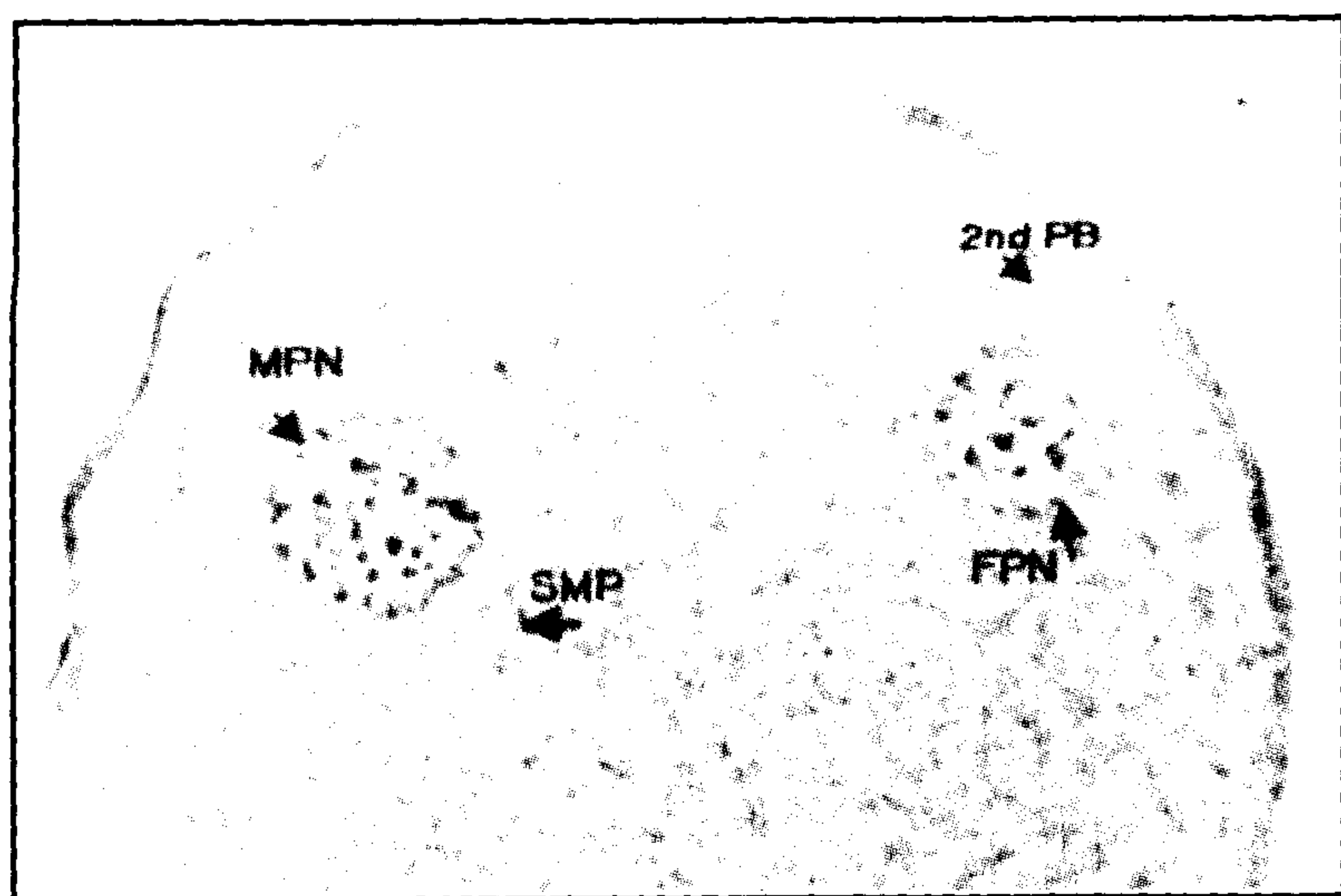
واژه های کلیدی: باروری آزمایشگاهی، تخمکهای گاو، سرم جنین گاو، کافتین، هیپارین.

تاکنون ترکیبات مختلفی برای باروری آزمایشگاهی تخمکهای پستانداران پیشنهاد شده است. اولین ترکیب ثبت شده مربوط می شود به دو نفر به نامهای Brackett و Oliphant در سال ۱۹۷۵ که آنرا برای باروری تخمکهای خرگوش به کار بردند. از آن به بعد تلاشهای پیگیری در آزمایش مواد و ترکیبات شیمیایی مختلف در باروری آزمایشگاهی پستانداران خصوصاً گاو انجام شد. به عنوان مثال گزارش شده است که موادی مانند کافتین (Niwa و دیگران، ۱۹۸۸، Shioya و دیگران، ۱۹۸۸)، هیپارین (Parrish و دیگران، ۱۹۸۶ و ۱۹۸۸) و یونوفور کلسیم (Byrd، ۱۹۸۱)، کافتین و هیپارین (Niwa و Ohgoda، ۱۹۸۸)، کافتین و سلولهای کومولوس (Cox و همکاران، ۱۹۹۳) اثر مثبتی در باروری آزمایشگاهی

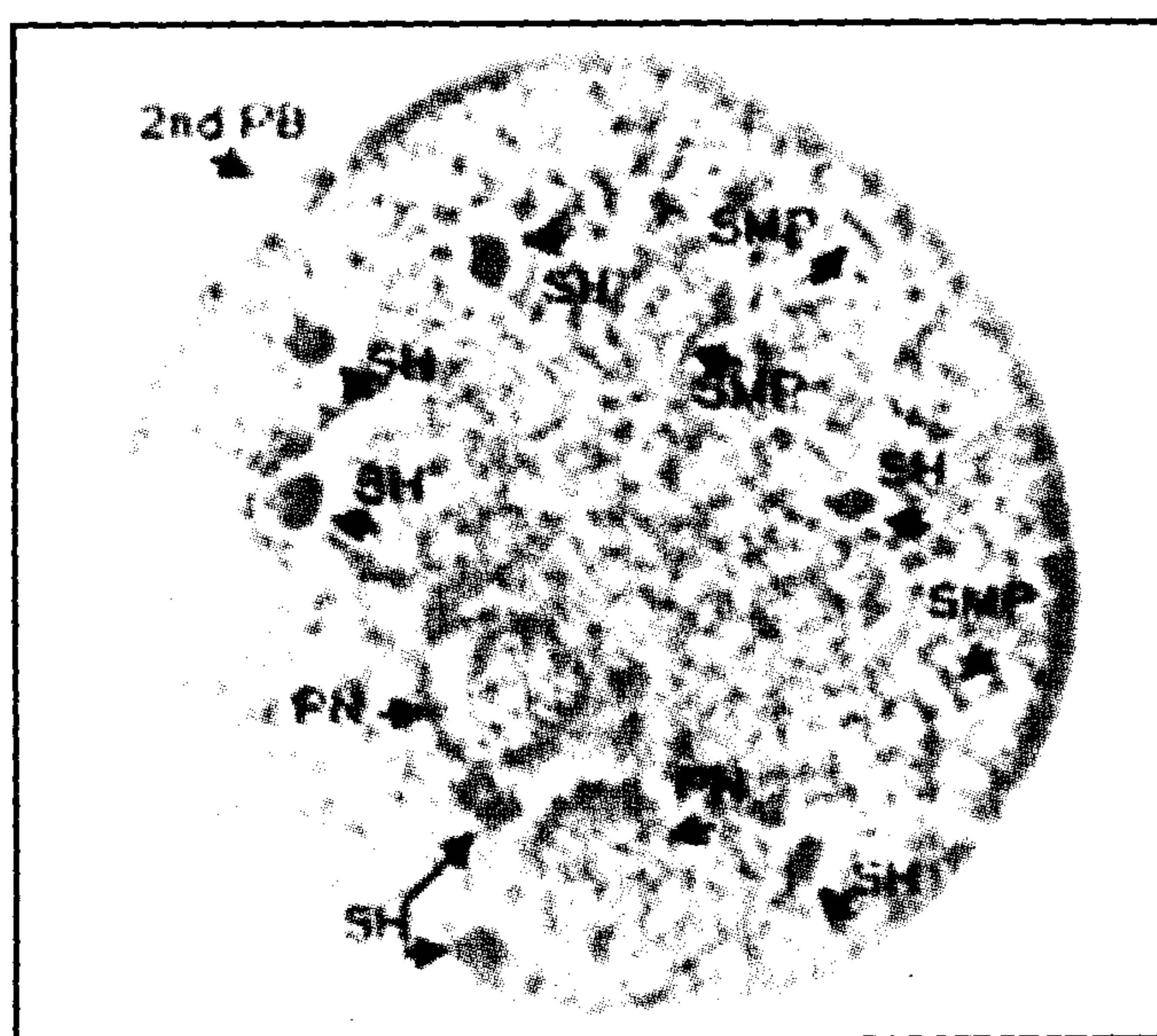
۱) گروه آموزشی علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.



است. به طور خلاصه، پس از ذوب نمودن پایت های اسپرم در Water bath آنها را دو بار همراه سانتریفوژ با قدرت نیروی گریز از مرکز ۸۳۳ گرم شستشو می‌دادیم و هر بار تمامی قسمت‌های بالای لوله خارج می‌شد تا باقیمانده زاید مواد انجماد منی و اسپرم‌های مرده از محیط خارج گردد، در نهایت پلست اسپرم به میزان مورد نیاز در محیط شستشوی تازه قرار گرفته و قطرات حاوی تخمک تلقیح گردید. برای به دست آوردن غلظت نهایی از هر ماده مورد آزمایش، محیط جایگاه تلقیح به گونه ای انتخاب شد که غلظت مواد مورد لزوم دو برابر مورد نیاز باشد. بدین ترتیب با افزودن مایع میزان ۵۰ میکرون از مایع شستشوی اسپرم (هم حجم قطره جایگاه تلقیح) در هنگام تلقیح که فاقد مواد مورد آزمایش بود، غلظت مورد نظر از مواد مورد آزمایش به دست می‌آمد. تخمک‌های تلقیح شده ۲۲-۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفته و سپس برنامه ثابت نمودن آنها به ترتیب زیر انجام می‌شد. تخمک‌های فاقد کومولوس کاملاً شستشو شده و بین لام و لامل ثابت می‌گردید. تخمک‌های دارای کومولوس ابتدا فاقد کومولوس گردیده، سپس خوب شستشو شده و بین لام و لامل ثابت می‌گردید. شستشوی تخمک‌ها در این مرحله بسیار اساسی است زیرا می‌بایست تمام اسپرم‌های متصل به سطح شسته شود. لام حاوی تخمک‌ها را به مدت ۳-۴ روز در محلول دارای ۷۵ درصد الکل اتیلیک و ۲۵ درصد اسید استیک قرار داده و سپس به کمک محلول ۱ درصد اورسئین رنگ آمیزی نموده و در زیر میکروسکپ فاز کنتراست جهت باروری مورد ارزیابی قرار می‌گرفت. در تمام آزمایشها میزان باروری و باروری پلی اسپرمی به وسیله آزمون تجزیه واریانس (ANOVA) مورد ارزیابی قرار گرفت. در صورتی که در هر یک از موارد اثر معناداری مشاهده شد، گروهها به وسیله آزمون تکمیلی Duncan تجزیه و تحلیل گردید.



تصویر ۱- تخمک بارور شده گاو با وجود هر دو پروتئوسوم. دومین جسم قطبی = 2ndPB، قطعه میانی اسپرم = SMP، پروتئوسوم نر = MPN، پروتئوسوم ماده = FPN.



تصویر ۲- تخمک بارور شده گاو در حالت پلی اسپرمی. در اینجا با وجود پروتئوسوم‌های نر و ماده تعداد زیادی سر اسپرم در اوپلاسم دیده می‌شود. سر اسپرم = SH.

توانا شدن اسپرم و انجام واکنش آکروزومی در آن، در باروری نقش دارند (Lenz و همکاران ۱۹۸۳، Parrish و همکاران ۱۹۸۰). گفته شده است که cAMP با تحریک پروتئین کیناز وابسته به آن، هورمون غیر فعال تری آسیل گلیسرول لیپاز (Triacylglycerol lipase) رابه لیپاز فعال تبدیل می‌کند. لذا عمل لیپولیز به میزان زیادی توسط cAMP حاضر در بافت کنترل می‌گردد. هر عملی که cAMP را نابود یا غیر فعال سازد، لیپولیز را کاهش می‌دهد. کافئین از تغییر یافتن cAMP جلوگیری می‌نماید (Mayer ۱۹۸۸). وجود cAMP برای متابولیز ATP لازم است. این متابولیز شدن است که امکان تحرک اسپرم Sperm motility را فراهم ساخته و در نهایت در باروری مؤثر است (Gamer و Hafez ۲۰۰۰). اما علی‌رغم مسایل عنوان شده وجود این عناصر به تنهایی در محیط کشت نتوانسته است تا باروری را حمایت نماید (Parrish و همکاران ۱۹۸۹). بدین سبب مطالعه حاضر برای تفکیک یا تعیین دقیقتر اثر بعضی از مواد مانند کافئین، هیپارین، سلولهای کومولوس، و سرم جنین گاو در باروری آزمایشگاهی تخمک گاو انجام پذیرفت.

مواد و روش کار

مواد شیمیایی از شرکت سیگما تهیه شد باستثناء پارافین که محصول شرکت مرک بود. سرم گوساله جنینی تهیه شده توسط جهاد دانشگاهی دانشکده دامپزشکی بود. تخمدانهای دامهای ذبح شده در کشتارگاه قائم و زیاران بلافاصله گرفته شده و در محیط سرم فیزیولوژی استریل و در دمای ۳۵-۳۰ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه منتقل می‌گشت. در آزمایشگاه تخمدانها مورد بررسی قرار گرفته و سپس با کمک سرسوزن ۱۸ متصل به سرنگ ۱۰ میلی لیتری، فولیکولهای بین ۲ تا ۸ میلیمتر مکش می‌گردید. در پایان تخمک‌های با سیتوپلاسم یکنواخت و حاوی سلولهای کومولوس اووفروس مناسب (بیش از ۴ لایه سلولهای کومولوس) انتخاب و ۴ بار در محیط کشت سلول TC-199 دارای ۲۵ میلی مول هیس و ۱۰ درصد FCS که قبلاً توسط حرارت غیر فعال شده بود، همچنین ۱۰۰ واحد پنی سیلین جی و ۱۰۰ میکروگرم استرپتومایسین در هر میلی لیتر شستشو شد. پس از شستشو هر ۱۰ عدد از تخمک‌های دارای سلولهای کومولوس اووفروس مناسب را درون قطره‌های ۱۰۰ میکرونی از محیط کشت که قبلاً در ظروف کشت پلی استرن (۳۰×۱۰ میلیمتر) تهیه نموده و پارافین اشباع روی آن قرار داده و حداقل ۴ ساعت قبل از انتقال تخمک‌ها در انکوباتور دارای رطوبت کافی قرار گرفته بود منتقل گردید. حرارت داخلی انکوباتور ۳۹/۵ درجه و میزان CO₂ آن ۵ درصد ثابت گردیده بود. ۲۴ ساعت پس از کشت تخمک‌ها به دو دسته تقسیم شده، یک دسته از آنها به کمک محلول PBS حاوی ۰/۱ درصد از هیالورونیداز از سلولهای کومولوس عاری گشته و دسته دوم دست نخورده باقی ماند. سپس هر دو گروه چند بار شستشو شده و به محیط باروری منتقل گردید. محیط باروری شامل مواد زیر بود: ۱۱۲ میلی مول NaCl، ۴/۰۲ میلی مول KCl و ۲/۲۵ میلی مول CaCl₂، ۰/۸۳ میلی مول NaH₂PO₄، ۰/۲۵ میلی مول MgCl₂، ۲۷ میلی مول NaHCO₃، ۱۳/۹ میلی مول گلوکز، ۱/۲۵ میلی مول پیرووات سدیم، ۳۱ میکروگرم در میلی لیتر پنی سیلین پتاسیم G. محیط به دو بخش تقسیم می‌شد: بخش اول که آنرا جایگاه تلقیح نام می‌نهمیم حاوی محیط BO و غلظت‌های مختلف از مواد شیمیایی (کافئین یا هیپارین) یا سرم (FCS) مورد آزمایش بود (در این قسمت غلظت مواد مورد آزمایش دو برابر مقدار مورد نیاز تهیه می‌گردید که علت آن در ذیل شرح داده شده است). از این محیط قطرات ۵۰ میکرونی تهیه شده و در ظروف پتری قرار می‌گرفت. سپس بر روی آن پارافین اشباع قرار گرفته و حداقل ۴ ساعت قبل از باروری در انکوباتور یادشده قرار می‌گرفت. بخش دوم که از این به بعد به آن محیط شستشوی اسپرم می‌گوییم، حاوی محیط BO و بدون اینکه هیچیک از مواد آزمایش در آن وجود داشته باشد.

در این آزمایش جهت آنکه شستشوی اسپرم اثری در آزمایش نداشته باشد در محیط BO فاقد مواد شیمیایی مورد آزمایش انجام شد. روش آماده سازی اسپرم همان است که توسط Niwa و همکاران در سال ۱۹۸۸ ارائه شده



نتایج

کومولوس دار دارد. در این آزمایش میزان باروری با هر دو پرونوکلئوس در تمام گروه‌های مورد آزمایش از لحاظ آماری مشابه بود لیکن با افزودن سرم میزان پلی اسپرمی افزایش یافته و مجدداً در غلظت ۲۰ درصد سرم کاهش یافت.

در جدول ۴ باروری تخمک‌های بدون کومولوس در همان شرایط آزمایش ۳ مشاهده می‌شود. در این آزمایش هم مانند آزمایش دوم (جدول ۲)، هیچ‌کدام از تخمک‌های فاقد کومولوس در محیط فاقد سرم بارور نگشت. در حالی که افزودن سرم به‌طور معناداری ($P < 0.001$) میزان باروری را افزایش داد (۱۰۰ درصد باروری برای تمام گروه‌ها). در این آزمایش میزان باروری با هر دو پیش هسته (۸۴ درصد، ۸۷ درصد و ۹۴ درصد به ترتیب برای ۵ درصد، ۱۰ درصد و ۲۰ درصد سرم) و میزان پلی اسپرمی (به ترتیب ۹۱ درصد، ۸۰ درصد و ۱۰۰ درصد برای همان گروه) بالا بود.

در هنگام بررسی باروری تخمک‌ها در محیط فاقد کافئین و هپارین و دارای غلظت‌های مختلف FCS هنگامی که تخمک‌های دارای کومولوس (جدول ۵) مورد بررسی قرار گرفت، مشاهده شد که میزان باروری به شدت کاهش پیدا کرده است (۸ درصد، ۱۸ درصد، ۳۴ درصد و ۲۹ درصد برای غلظت‌های ۰، ۵ درصد، ۱۰ درصد و ۲۰ درصد از FCS). در این آزمایش ایجاد هر دو پرو نوکلئوس در تخمک‌های بارور در غلظت‌های مختلف سرم به‌طور معناداری ($P < 0.05$) بیش از محیط فاقد سرم بود (۳۳ درصد برای فاقد سرم و ۵۶ درصد تا ۶۶ درصد برای محیط‌های سرم دار).

هنگامی که تخمک‌های بدون کومولوس مورد آزمایش قرار گرفت (جدول شماره ۶)، میزان باروری مجدداً کاهش پیدا کرد. در این آزمایش هم مانند آزمایش‌های قبل در مورد تخمک‌های بدون کومولوس و هیچ‌یک از تخمک‌ها در محیط فاقد سرم بارور نگشت.

بحث

گزارش شده است که مجموعه کومولوس در هامستر می‌تواند باروری را تسهیل بخشد (Bavister ۱۹۸۲). با توجه به اینکه تفاوت معناداری بین باروری تخمک‌های کومولوس دار و بدون کومولوس در محیط عاری از کافئین

جدول ۱ باروری تخمک‌های دارای سلول‌های کومولوس را در حضور کافئین و مقادیر مختلف FCS نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، با افزودن مقادیر آزمایش شده از FCS باروری تخمک‌ها افزایش داشت (۷۲ درصد، ۹۴ درصد، ۹۱ درصد، ۸۵ درصد به ترتیب برای غلظت‌های ۰، ۵ درصد، ۱۰ درصد و ۲۰ درصد از FCS) ولی این افزایش در وهله اول با محیط کنترل (بدون سرم) اختلاف معنادار نداشت و در وهله دوم افزایش باروری ارتباطی را با افزایش غلظت سرم نشان نداد (در محیط با ۲۰ درصد از FCS باروری کمتر از ۵ درصد از FCS است). در این آزمایش میزان باروری پلی اسپرمی در محیط ۲۰ درصد سرم به‌طور معناداری ($P < 0.01$) بیش از محیط بدون سرم و با سرم ۵ درصد بود. در این جدول اختلاف معناداری در میزان باروری مطلوب (تخمک با هر دو پرونوکلئوس) مشاهده نشد. تصویر ۱ باروری تخمک گاو در حالی که دارای هر دو پرونوکلئوس می‌باشد را نشان می‌دهد. تصویر ۲ باروری تخمک گاو را در حال پلی اسپرمی نشان می‌دهد.

در جدول ۲ همان شرایط در مورد تخمک‌های بدون کومولوس رعایت شده است. در این آزمایش در محیط بدون سرم هیچ‌یک از تخمک‌ها بارور نگشت لیکن در غلظت‌های ۵ درصد و ۱۰ درصد میزان باروری به ترتیب ۵۳ درصد و ۵۶ درصد بود که به‌طور معناداری ($P < 0.05$) بیش از باروری در غلظت ۲۰ درصد (با باروری ۲۲ درصد) بود. در این آزمایش همچنین میزان پلی اسپرمی در غلظت ۲۰ درصد (۱۳ درصد پلی اسپرمی) از میزان پلی اسپرمی در غلظت ۱۰ درصد سرم (۴۱ درصد پلی اسپرمی) کمتر بود ($P < 0.05$). که احتمال می‌رود به علت باروری کمتر در غلظت ۲۰ درصد باشد.

هنگامی که هپارین به جای کافئین برای باروری به کار رفت، در تخمک‌های کومولوس دار (جدول ۳) میزان باروری در محیط‌های دارای سرم به‌طور معناداری بیش از محیط فاقد سرم بود ($P < 0.05$). در این آزمایش باروری در محیط فاقد سرم ۴۸ درصد و برای غلظت‌های ۵ درصد، ۱۰ درصد و ۲۰ درصد به ترتیب ۱۰۰ درصد، ۸۹ درصد و ۷۸ درصد بود. در این مورد هم همان‌طور که ملاحظه می‌شود. افزایش غلظت سرم اثر ممانعتی در باروری تخمک‌های

جدول ۱- میزان باروری تخمک‌های کومولوس دار در غلظت‌های مختلف FCS و میزان ۵ mM کافئین

غلظت سرم	تعداد تخمک	مجموع بارور شده (%)	دارای هر دو پرونوکلئوس **	تعداد پلی اسپرمی (%) **
۰	۳۶	۲۶(۷۲)	۲۰(۷۷)	۷(۲۷) ^a
۵٪	۳۱	۲۹(۹۴)	۲۵(۸۶)	۱۰(۳۲) ^{ab}
۱۰٪	۳۴	۳۱(۹۱)	۲۹(۹۴)	۱۸(۵۸) ^{bc}
۲۰٪	۳۴	۲۹(۸۵)	۲۱(۷۲)	۲۲(۷۶) ^c

(*نسبت به تعداد کل تخمک محاسبه می‌گردد، **نسبت به تعداد تخمک بارور شده محاسبه می‌گردد، a-c اختلاف معنادار ($P < 0.05$) است.

جدول ۲- میزان باروری تخمک‌های بدون کومولوس در غلظت‌های مختلف FCS و میزان ۵ mM کافئین

غلظت سرم	تعداد تخمک	مجموع بارور شده (%)	دارای هر دو پرونوکلئوس **	تعداد پلی اسپرمی (%) **
۰	۳۷	۰	۰	۰
۵٪	۳۶	۱۹(۵۳) ^a	۱۵(۷۹)	۴(۲۱) ^{ab}
۱۰٪	۳۹	۲۲(۵۶) ^a	۲۰(۹۱)	۹(۴۱) ^a
۲۰٪	۳۷	۸(۲۲) ^b	۶(۷۵)	۱(۱۳) ^b

(*نسبت به تعداد کل تخمک محاسبه می‌گردد، **نسبت به تعداد تخمک بارور شده محاسبه می‌گردد، a-c اختلاف معنادار ($P < 0.05$) است.

جدول ۳- میزان باروری تخمک‌های کومولوس دار در غلظت‌های مختلف FCS و میزان ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر هپارین

غلظت سرم	تعداد تخمک	مجموع بارور شده (%)	دارای هر دو پرونوکلئوس **	تعداد پلی اسپرمی (%) **
۰	۳۱	۱۵(۴۸) ^a	۲۰(۷۷)	۳(۲۰) ^a
۵٪	۳۲	۳۲(۱۰۰) ^b	۲۵(۸۶)	۱۶(۵۰) ^b
۱۰٪	۳۷	۳۳(۸۹) ^b	۲۹(۹۴)	۲۰(۶۱) ^b
۲۰٪	۲۷	۲۱(۷۸) ^b	۲۱(۷۲)	۹(۴۳) ^{ab}

(*نسبت به تعداد کل تخمک محاسبه می‌گردد، **نسبت به تعداد تخمک بارور شده محاسبه می‌گردد، a-c اختلاف معنادار ($P < 0.05$) است.



باروری تخمکهای دارای کومولوس موش در محیط عاری از BSA انجام شده است، چنین اظهار شده است که آلبومین یا ماکرومولکول کافی دیگر که از مایع فولیکولی یا اویدوکت به دست آمده است ممکن است در میان سلولهای کومولوس به تله افتاده باشد، بنابراین به نظر می‌رسد که این مقدار پروتئین در هنگام باروری مؤثر باشد (Fraser ۱۹۸۵). البته شرایط کشت بلوغ در آزمایشگاه حاضر ممکن است این ظن را تقویت نماید. زیرا کشت در محیط TC-199 حاوی ۱۰ درصد از FCS انجام شده است و می‌تواند در هنگام باروری در آزمایش دخالت نماید، اما یادآوری دو نکته در این مورد ضروری است: اولاً آنکه قبل از باروری تخمکها به خوبی و چند بار شستشو شده و در نهایت حجم مجموعه تخمک - کومولوس چیزی کمتر از ۱ درصد محیط تلقیح بود که به هر حال پروتئین منتقل شده (در حالی که انتقال صورت گرفته باشد)، نسبت به کل حجم محیط ناچیز است. ثانیاً اینکه مقایسه باروری در محیط حاوی هیپارین مؤید این نظر است که اگر قرار بود پروتئینی از محیط کشت در کومولوس حبس شده باشد (که FCS بوده است)، می‌بایستی باروری تخمکها در محیط بدون سرم با محیطهای دارای سرم مشابه باشد. البته این احتمال که کومولوس خود پروتئین خاصی بسازد تا در باروری دخالت نماید منتفی نیست هنگامی که محیط باروری فاقد کافئین و هیپارین بود، سلولهای کومولوس نتوانست انجام باروری را تسهیل نماید. بدین ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که در شرایط حاضر (محیط BO) وجود پروتئین، کافئین، هیپارین و سلولهای کومولوس هر کدام برای خود دارای مفهوم بوده و هر کدام به نوعی در باروری مؤثر هستند. به هر حال برای روشن شدن این اثرات آزمایشها و تحقیقات بیشتری مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل مطالعه ای است که با استفاده از بودجه و امکانات دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انجام شده است. مجری و طراح این تحقیق بدین وسیله کمال تشکر خود را از ریاست، معاونت اداری مالی و معاونت پژوهشی دانشکده ابراز می‌نماید. همچنین لازم است تا در اینجا از کارکنان کشتارگاه قائم شهرداری تشکر خود را اعلام نمایم.

و هیپارین وجود داشت، نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که وجود سلولهای کومولوس نمی‌تواند در محیط بدون کافئین و هیپارین باروری را در تخمک گاو مورد حمایت قرار دهد.

چنین گزارش شده است که هرگاه محیط باروری BO در حالی که فاقد پروتئین ولی دارای کافئین و هیپارین باشد، میزان بالایی (۹۰ درصد) از تخمکهای دارای کومولوس بارور می‌گردد (تاجیک و همکاران ۱۹۹۳). در مطالعه حاضر باروری برای تخمکهای دارای کومولوس در حضور کافئین تقریباً بیش از باروری تخمکهای بدون کومولوس بود. در حالی که در حضور هیپارین میزان باروری مشابهی برای تخمکهای با کومولوس یا بدون کومولوس رخ داد. یعنی وجود کومولوس تنها در حضور کافئین توانست اثر مثبتی بر باروری بگذارد، در حالی که در محیطهای حاوی هیپارین و یا فاقد کافئین و هیپارین وجود کومولوس اثر مثبتی بر باروری نداشت. بدین ترتیب به نظر می‌رسد که در شرایط حاضر سلولهای کومولوس اثر سینرژستی با کافئین دارد. از طرف دیگر در محیطهای فاقد سرم با افزودن کافئین باروری بالاتری (۷۲ درصد) نسبت به هنگام افزودن هیپارین (۴۸ درصد) به دست آمد.

گزارش شده است که حضور کومولوس می‌تواند میزان پلی اسپرمی را کاهش دهد (Ball و دیگران ۱۹۸۳). در مطالعه حاضر در حضور کافئین کومولوس نه تنها از پلی اسپرمی ممانعت نمود، بلکه باعث افزایش آن نیز شد. گزارش شده است که هنگامی که محیط باروری حاوی ۱۰ میکرو گرم در میلی لیتر هیپارین باشد، افزودن ۱۰ درصد سرم جنین گاو به محیط باعث افزایش پلی اسپرمی می‌گردد (Leibfried-Rutledge و همکاران ۱۹۸۶). در مطالعه حاضر میزان پلی اسپرمی مشابهی با آن گزارش رخ داد. به هر حال این مطالعه نشان داد که تمام غلظتهای سرم جنین گاو در حضور ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر هیپارین باعث افزایش پلی اسپرمی می‌گردد. مضافاً به اینکه در این حالت است که سلولهای کومولوس همان طور که Ball و دیگران (۱۹۸۳) گزارش کرده‌اند می‌تواند میزان پلی اسپرمی را کاهش دهد. بدین ترتیب به نظر می‌رسد که وجود و یا عدم وجود کومولوس اثر خاصی در پلی اسپرمی ندارد. بلکه این مجموعه شرایط حاکم بر آزمایش است که میزان باروری یا پلی اسپرمی را تعیین می‌نماید. در مورد باروری در محیط بدون پروتئین از آنجایی که

جدول ۴- میزان باروری تخمکهای بدون کومولوس در غلظتهای مختلف FCS و میزان ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر هیپارین

غلظت سرم	تعداد تخمک	مجموع بارور شده (%)	دارای هردو پروتئین کلتوس**	تعداد پلی اسپرمی (%)**
۰	۳۲	۰	۰	۰
۵٪	۳۲	۳۲(۱۰۰) ^b	۲۷(۸۴)	۲۹(۹۱)
۱۰٪	۳۰	۳۰(۱۰۰) ^b	۲۶(۸۷)	۲۴(۸۰)
۲۰٪	۳۳	۳۳(۱۰۰) ^b	۳۱(۹۴)	۳۳(۱۰۰)

(* نسبت به تعداد کل تخمک محاسبه می‌گردد، ** نسبت به تعداد تخمک بارور شده محاسبه می‌گردد، a-c اختلاف معنادار (P<۰/۰۵) است.

جدول ۵- میزان باروری تخمکهای کومولوس دار در غلظتهای مختلف FCS و بدون کافئین یا هیپارین

غلظت سرم	تعداد تخمک	مجموع بارور شده (%)	دارای هردو پروتئین کلتوس**	تعداد پلی اسپرمی (%)**
۰	۳۷	۳(۸) ^a	۱(۳)	۰
۵٪	۲۳	۶(۱۸) ^{ab}	۴(۶۶)	۲(۲۳)
۱۰٪	۳۷	۹(۳۴) ^b	۵(۵۶)	۱(۱۱)
۲۰٪	۲۵	۱۰(۲۹) ^{ab}	۱۰(۶۰)	۱(۱۰)

(* نسبت به تعداد کل تخمک محاسبه می‌گردد، ** نسبت به تعداد تخمک بارور شده محاسبه می‌گردد، a-c اختلاف معنادار (P<۰/۰۵) است.

جدول ۶- میزان باروری تخمکهای بدون کومولوس در غلظتهای مختلف FCS و بدون کافئین یا هیپارین

غلظت سرم	تعداد تخمک	مجموع بارور شده (%)	دارای هردو پروتئین کلتوس**	تعداد پلی اسپرمی (%)**
۰	۲۱	۰	۰	۰
۵٪	۲۲	۴(۱۸)	۳(۷۵)	۰
۱۰٪	۲۲	۶(۲۷)	۶(۱۰۰)	۱(۱۷)
۲۰٪	۲۲	۲(۹)	۲(۱۰۰)	۰

(* نسبت به تعداد کل تخمک محاسبه می‌گردد، ** نسبت به تعداد تخمک بارور شده محاسبه می‌گردد، a-c اختلاف معنادار (P<۰/۰۵) است.



References

1. Ball, G.D., Leifried, M.L., Lenz, R.W., Ax, R.L., Bavister, B.D. and First, N.L. (1983): Factors affecting successful in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *Biol. Reprod.* 28: 717-725.
2. Bavister, B.D. (1982): Evidence for a role of post-ovulatory cumulus components in supporting fertilizing ability of hamster spermatozoa. *J. Androl.* 3: 365-372.
3. Bosch P., de Avila J.M., Ellington J.E. and Wright, Jr. R.W. (2001): Heparin and Ca^{2+} - free medium can enhance release of bull sperm attached to oviductal epithelial cell monolayers. *Theriogenology*, 56: 247-260.
4. Brackett, B.G. and Oliphant, G. (1975): Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.* 12: 260-274.
5. Byrd, W. (1981): In vitro capacitation and the chemically induced acrosome reaction in bovine spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 215: 35-46.
6. Chamberland A., Fournier V., Tradif S., Sirard M.A., Sullivan R. and Bailey M.A. (2001): The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during bovine sperm capacitation. *Theriogenology*, 55: 823-835.
7. Cox J.F., Hormazabal J. and Santa Maria A. (1993): Effect of the cumulus on in vitro fertilization of bovine matured oocytes. *Theriogenology*, 40: 1259-1267.
8. Drahorad J., Terarik J., Cechova D. and Vilim V. (1991): Proteins and glycosaminoglycans in the intracellular matrix of human cumulus - oophorus and their effect on conversion of proacrosin to acrosin. *J. Reprod. Fert.*, 93: 253-262.
9. First, N.L. and Parrish, J.J. (1987): In-vitro fertilization of ruminants. *J. Reprod. Fert., Supp.* 34: 151-156.
10. Fraser, L.R. (1985): Albumin is required to support the acrosome reaction but not the capacitation in mouse spermatozoa in vitro. *J. Reprod. Fert.* 74: 185-196.
11. Fukui, Y. (1990): Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization, and development competence of bovine oocytes matured in vitro. *Mol. Reprod and Devel.* 26: 40-46.
12. Fukui, Y., Urakawa, M., Sasaki, C., Chikamatsu, N., and Ono, H. (1989): Development to the late morula or blastocyst stage following in vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 18: 139-148.
13. Garner, D.L. and Hafez E.S.E. (2000): Spermatozoa and seminal plasma. In Hafez E.S.E and Hafez B. (eds) *Reproduction in Farm Animals*. 7th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Tokyo, pp 107.
14. Hillenjo, T., Sjogern, A., Strander, B. and Andino, N. (1985): Steroid secretion by cumulus cells isolated from human preovulatory follicles. *Acta Endocrinol.* 108:407-413.
15. Leibfried-Rutledge, M.L., Crister, E.S. and First, N.L. (1986): Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on in vitro maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes. *Biol. Reprod.* 33: 850-857.
16. Lenz R.W., Bellin M.E. and Ax B.L. (1983): Rabbit spermatozoa undergo an acrosome reaction in the presence of glycosaminoglycans. *Gamete Res.*, 8: 11-19.
17. Lu., K.H., Gordon, I., Gallagher, M. and McGoven, M. (1987): Pregnancy established in cattle by transfer of embryos from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro. *Vet. Rec.* 121: 259-260.
18. Mayes, P.A. (1988): Lipid transport and storage. In: Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A. and Rodwell V.W. (eds) *Harperr's Biochemistry* 24th Edition, Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut, San Mateo, California, PP: 238.
19. Meizel, S., Pillai, M.C., Diaz-Prez, E. and Thomas, P. (1990): Initiation of the human sperm acrosome reaction by components of human follicular fluid and cumulus secretions including steroids. In: Bavister, BD., Cumminas, J. and Roldan, ERS. (eds) *Fertilization in Mammals*. Serono Symposio. Norwell, PP: 205-222.
20. Niwa, K. and Ohgoda, O. (1988): Synergistic effect of caffeine and heparin on in vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture. *Theriogenology*, 30: 733-741.
21. Niwa, K., Ohgoda, O. and Yuhara, M. (1988): Effects of caffeine in media for pretreatment of frozen-thawed sperm on in-vitro penetration of cattle oocytes. *Proc. 11th int. Congr. Anim. Reprod. A.I. Dublin*, 3, 346 (3 pages).
22. Ohboshi, S., Etoh, T., Sakamoto, K., Fujihara, N., Yoshida, T. and Tomogane, H. (1997): Effects of bovine serum proteins in culture medium on post-warming survival of bovine blastocysts developed in vitro. *Theriogenology* 47: 1237-1243.
23. Parrish, J. J., (1991): Application of in vitro fertilization to domestic animals. In: Wasserman, E. (ed). *Elements of Mammalian Fertilization*. Vol II. Practical Applications. CRC Press. Boca. Raton. Florida PP: 111-133.
24. Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L. and First, N.L. (1988): Capacitation of bovine sperm by heparin, inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Reprod.* 41: 683-699.
25. Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., Leibfried-Rutledge, M.L., Critser, E.S., Eyestone, N.H. and First, N.L. (1986): Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25: 591-600.
26. Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., Winter, M.A. and First, N.L. (1988): Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* 38: 1171-1180.
27. Parrish, J.J., Wincek T.J. and Polakoski. (1980): Glycosaminoglycan stimulation of the in vitro conversion of boar proacrosin into acrosin. *J. Androl.* 1: 89-95.
28. Shioya, Y., Kumayama, M., Fukushima, M., Iwasaki, S. and Hanada, A. (1988): In vitro fertilization and cleavage capacity of bovine follicular oocytes



- classified by cumulus cells and matured in vitro. *Theriogenology*. 30: 489-496.
29. Sitteri, J.I., Dandekar, P. and Meizel, S. (1988): Human sperm acrosome rection-initiating activity associated with the human cumulus oophorus and mural granulosa cells. *J. Exp. Zool.* 246: 71-80.
 30. Stock, C.E., Batest, R., Lindsay, K.S., Edmonds, D.K. and Fraser, L.R. (1989): Human oocyte-cumulus complexes stimulate the human acrosom reaction. *J. Reprod. Fert.*, 86: 723-730.
 31. Sullivan, R., Duchense, C., Fahmy, N., Morin, N. and Dionne P. (1990): Protein synthesis and acrosome rection-inducing activity of human cumulus cells. *Human Reprod.*, 5:830-834.
 32. Tajik, P., Niwa, K. and Murase, T. (1993): Effects of different protein supplements in fertilization medium on in vitro penetration of cumulus-intact and cumulus-free bovine oocytes matured in culture. *Theriogenology* 40:949-958.
 33. Tesarik, J. (1985): Comparison of acrosome reaction-inducine activities of human cumulus oophorus, follicular fluid and ionophore A23287 in human sperm populations of proven fertilizing ability in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 74:383-388.
 34. Van Langendonck, A., Donnay, I., Schuurbijs, N., Auquier, P., Carolan, C., Massip, A. and Dessy, F. (1997): Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic ovidut fluid medium. *J. Reprod. Fertil.* 109:87-93.
 35. Xum KP., Greve, T., Gallensen, H. and Hyttel, P. (1987): Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 81:501-504.
 36. Yanagimachi, R. Mechanism of fertilization in mammals. In: Mastroianni, J.R. and J.D. Biggers (1981): (eds) *Fertilization and Embryonic Development In Vitro*. Lenum Press, New York PP: 81-182.
 37. Yanagimachi, R. (1997): Mammalian fertilization. In: Knobil E. and Jd Neil (eds) *Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York PP: 189-317.
 38. Yoshida, K., Abas Mazni Othman, Taniguchi, T., Yamanaka, H. and Sekikawa, K. (1997): Differential patterns of blastulation in bovine morulae cultured in synthetic oviduct fluid medium containing FCS or BSA. *Theriogenology* 48:997-1006.
 39. Younis A.I., Brackett B.G. and Fayrer-Hosken R.A. (1986): Influence of serum and hormones on bovine oocytes maturation and fertilization vitro. *Gamete Res.*, 23:189-201.

The interaction effects of different concentrations of Fetal Calf Serum, caffeine or heparin on in vitro penetration of bovine oocytes

Tajik, P.¹

¹*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran. J. Fac. Vet. Med. Tehran. Univ. 56, 4: 97-102, 2001.*

Bovine oocytes were isolated from ovaries recovered in the slaughterhouse and were culture in vitro for maturation. After maturation, oocytes were divided into 2 groups, one group denuded from the cumulus cells by treating with hyaluronidase and the other group left intact. Both groups were then divided into different sub-groups which were transferred into the fertilization media supplemented with different concentration of fetal calf serum (FCS) and with or without 5mM caffeine or 10 ig heparin/ml and were inseminated by frozen thawed semen. When caffeine was added to the medium, the penetration rates of cumulus-intact oocytes were significantly higher than cumulus-free ones in the presence of 5% and 10% FCS. The proportion of both pronucleus was not significantly different among different concentrations of FCS in cumulus-intact and cumulus-free oocytes. However, the proportion of polyspermy increased by increasing the concentration of FCS (27%, 34%, 58% and 76% for 0, 5%, 10% and 20% FCS respectively). In cumulus-free oocytes, penetration rates were drastically decreased when 20% serum was added to the medium. In the presence of heparin, penetration of cumulus-free oocytes were 100% and independent of serum concentration in the doses examined. Polyspermic penetration was higher in cumulus-free oocytes compared with cumulus-enclosed ones. When both chemical (caffeine and heparin) were eliminated from fertilization medium, penetration rates decreased in both cumulus-enclosed and cumulus-free oocytes. It is concluded that: 1) Cumulus cells can induce sperm penetration into bovine oocytes in the presence of caffeine. 2) Heparin has more induction of penetration effect on bovine cumulus – free oocytes in the presence of different concentrations of FCS. 3) Fetal calf serum by itself has not any induction effect on bovine oocytes penetration.

Key words: IVF, FCS, Caffeine, Heparin, Bovine oocyte.

