Archive of SID

باروری آزمایشگاهی تخمکهای کومولوس دار یا بدون کومولوس گاو در غلظتهای مختلف آلبومین سرم گاو با و یا بدون کافئین و هپارین

دکتر پرویز تاجیک[1]* پروفسور کوجی نیوا[2] دکتر حمید قاسم زاده نوا[1]

دریافت مقاله: ۱۱ خرداد ماه ۱۳۸۱
پذیرش نهایی: ۱۱ مر داد ماه ۱۳۸۲

هدف: بررسی آزمایشگاهی میزان باروری تخمکهای بالغ شده گاو در مجاورت آلبومین سرم گاو و در حضور یا غیاب کافئین و هپارین.
طرح: مطالعه مداخله ای.
نمونه ها: تخمکهای گاو بالغ شده در آزمایشگاه.
روش: جمع آوری و انتقال تخمدانهای دامهای ذبح شده در کشتارگاه در محیط سرم فیزیولوژی استریل و در دمای ۳۵-۳۰ درجه سانتیگراد و حاوی آنتی بیوتیک، مکش فولیکول ها و جدا سازی تخمکها و کشت آنها در محیط کشت سلول TC-199 دارای ۱۰ درصد سرم گوساله جنینی توسط حرارت غیرفعال شده، کشت تخمکها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با حرارت ۳۸/۵ درجه سانتیگراد و ۵ درصد گاز کربنیک، گرفتن کومولوس نیمی از تخمکها و تقسیم اتفاقی آنها در محیط باروری حاوی کافئین یا هپارین و غلظتهای مختلف از آلبومین سرم گاو تلقیح تخمکها با اسپرم از ذوب خارج شده و قرار دادن آنها به مدت ۲۴-۲۲ ساعت در انکوباتور، ثابت نمودن تخمکها در اسید الکل و رنگ آمیزی آنها با استواورسئین و سپس مطالعه آنها با میکروسکوپ فاز کنتراست جهت تعیین میزان باروری.
تجزیه و تحلیل آماری: آنالیز واریانس و در صورت وجود اختلاف معنا دار، استفاده از آزمون دانکن.
نتایج: هنگامی که تخمکهای دارای کومولوس در حضور کافئین تلقیح شدند، اختلاف معناداری در باروری آنها در غلظتهای مختلف آلبومین سرم گاو وجود نداشت (۷۲ درصد در محیط فاقد آن، ۷۸ درصد در محیط حاوی ۵ میلی گرم در سی سی، ۸۳ درصد در محیط حاوی ۱۰ میلی گرم در سی سی و ۶۲ درصد در محیط حاوی۲۰ میلی گرم در سی سی). در صورتی که میزان باروری تخمکهای بدون کومولوس در محیط فاقد آلبومین (صفر) به طور معناداری کمتر (P<۰/۰۵) از باروری آن در غلظتهای مختلف آلبومین (به ترتیب ۱۸،۱۹ و ۱۵ درصد) بود. باروری تخمکهای کومولوس دار و در حضور هپارین در محیط فاقد آلبومین ۴۶ درصد و کمتر (P<۰/۰۵) از میزان باروری آنها در غلظتهای مختلف آن بود. در حالی که باروری تخمکهای بدون کومولوس در محیط فاقد آلبومین (صفر) و به طور معناداری کمتر (P<۰/۰۰۱) از محیط های حاوی غلظتهای مختلف آن بود. در محیط فاقد کافئین و هپارین میزان باروری بسیار کم و بیشترین آن مربوط به باروری تخمکهای بدون کومولوس در غلظت ۱۰ میلی گرم در سی سی آلبومین سرم گاو بود که ۲۱ درصد آنها بارور شدند.
نتیجه گیری: هنگامی که تخمکهای گاو در شرایط آزمایشگاهی فاقد کومولوس است، هپارین اثر سینرژیستی با آلبومین سرم گاو در باروری آنها دارد. در صورتی که تخمکهای دارای کومولوس باشند، آلبومین را می توان از محیط باروری حذف نمود ولی وجود کافئین یا هپارین برای باروری الزامی است. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۲)، دوره ۵۸، شماره ۳، ۲۴۷-۲۴۱.

واژه های کلیدی: باروری آزمایشگاهی، گاو، آلبومین سرم گاو، کافئین، هپارین.

در سال ۱۹۷۵ دو دانشمند به نامهای Brackett و Oliphant محیطی را برای باروری تخمکهای خرگوش به کار بردند که از آن پس به عنوان محیط پایه برای باروری آزمایشگاهی تخمکهای سایر پستانداران نیز به کار رفت (۴). از آن به بعد تلاشهای پیگیری در آزمایش مواد و ترکیبات شیمیایی

۱) گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران
۲) بخش علوم حیوانی و تکنولوژی دانشگاه اوکایاما، اوکایاما-ژاپن.
*) نویسنده مسئول ptajik@ut.ac.ir

In vitro fertilization of cumulus intact and cumulus free bovine oocytes in different concentrations of bovine serum albumin with or without caffeine and/or heparin

Tajik, P.,[1] Niwa, K.[2] Ghasemzadeh-Nava, H.[1]

[1]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran -Iran.* [2]*Division of Animal Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Okayama , Okayama - Japon.*

Objectives: To assess fertilizability of in vitro matured bovine oocytes in different concentrations of bovine serum albumin (BSA) with or without caffeine or heparin.
Design: Interventional study.
Samples: In vitro matured bovine oocytes.
Procedure: Ovaries were removed from cows and heifers in local slaughterhouses, carried to the laboratory. Follicles were aspirated and intact oocytes were isolated and transferred into TCM-199 supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum, cultured for up to 24h in a CO_2 incubator. After culture half of the oocytes were denuded and put into BO medium containing different concentrations of BSA and with or without caffeine or heparin and inseminated with frozen thawed semen. After 22-24 h inseminated oocytes were fixed for 3 days in acetic alcohol, stained in aceto orcein and examined under a phase-contrast microscope for the evidence of sperm penetration.
Statistical analysis: ANOVA and when a significance different was seen, Duncan's Multiple Range Test.
Results: When cumulus intact oocytes were inseminated in caffeine supplemented BO, there was no significant different among different concentrations of BSA (72%, 78%, 83% and 62% penetration rates for 0, 5mg, 10mg and 20mg/ml BSA respectively). However, in cumulus-free oocytes, there was significantly lower penetration in protein-free medium comparing other concentrations of BSA ($P<0.05$). When inseminations of oocytes were carried in heparin-supplemented medium, penetration of cumulus-intact and-free oocytes were lower in protein-free medium than those other concentrations of BSA.
Conclusion: When cumulus-free bovine oocytes are inseminated in vitro, heparin may have synergistic effects with protein. However, when cumulus-intact bovine oocytes are inseminated in vitro protein may be eliminated from medium, but caffeine and heparin are prerequisites for in vitro fertilization in this condition. ***J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 58, 3: 241-247, 2003.***
Key words: In vitro fertilization, Bovine, BSA, Caffeine, Heparin.
Corresponding author email:ptajik@ut.ac.ir

مختلف در باروری آزمایشگاهی پستانداران خصوصاً گاو انجام شد. به عنوان مثال Niwa و دیگران همچنین Shioya و دیگران گزارش کرده اند که موادی مانند کافئین اثر مثبتی بر باروری تخمکهای بالغ شده گاو در شرایط آزمایشگاهی دارد (۲۳،۳۲). همچنین این اثر مثبت در مورد هپارین توسط Parish و همکاران در مورد گاو و خوک (۲۷،۲۸،۲۹،۳۰) و یونوفور کلسیم توسط Byrd (۵)، کافئین و هپارین توسط Niwa و Ohgoda (۲۲)، کافئین و سلولهای کومولوس توسط Cox و همکاران گزارش شده است (۹). همچنین Bosch و همکاران اثر هپارین همراه با کلسیم را در آزاد شدن اسپرم گاو از سلولهای اویدوکت(۳)، و Chamberland و همکاران اثر هپارین را در پارامترهای

www.SID.ir

Archive of SID

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.

همچنین گزارش شده است که سلولهای کومولوس، باروری آزمایشگاهی تخمک پستانداران را افزایش می دهد. مطالعات انجام شده توسط Bavister روی هامستر (۲) و Fraser برروی موش تأیید کننده این حقیقت است (۱۱). Chian و همکاران نیز اثر مثبت کومولوس در بارور شدن تخمکهای بالغ شده در آزمایشگاه را گزارش نموده اند (۸). Sitteri و همکاران (۳۳) و Tesarik (۳۹) نیز گزارش کرده اند که در گرمخانه قرار دادن اسپرمی که مراحل توانا شدن را پشت سر گذاشته است، همراه با سلولهای کومولوس منجر به انجام واکنش آکروزومی می گردد. بر طبق گزارش Sullivan و دیگران (۳۴) حمایت واکنش آکروزومی اسپرم توسط کومولوس شاید مربوط به پروتئینی است که آنها در هنگام کشت تخمک جهت بلوغ در محیط تولید می نمایند. این امر مجدداً از طرف Meizel و همکاران (۲۱)، که نشان داده اند ایجاد واکنش آکروزومی در اسپرمهای انسان و هامستر، به وسیله پروژسترون رخ می دهد که خود از ترشحات سلولهای کومولوس می باشد (۱۵)، مورد تأیید قرار گرفت. با این ترتیب علی رغم مطالعات زیاد توسط محققین مختلف مانند Yanagimachi (۴۲،۴۳)، Xum و دیگران (۴۱)، Fukui و همکاران (۱۲،۱۳)، Lu و همکاران (۱۹)، نقش حقیقی کومولوس یا پروتئین در هنگام باروری روشن نشده است. بدین ترتیب از طرفی نقش مواد پروتئینی همانند سرم جنین گاو و آلبومین سرم گاوی به ترتیب در هنگام بلوغ و باروری تخمکهای گاو ادعا شده است. از طرف دیگر Zhang و همکاران (۴۶) اظهار نمودند که نقش سلولهای کومولوس نه در باروری و نه در تسهیم (Cleavage) بلکه این نقش به طور معناداری در ایجاد مورولا و بلاستوسیست خود را نشان می دهد. بدین جهت تاکنون سعی شده است که اثر دقیق این مواد را نیز درهنگام بلوغ و باروری مورد بررسی قرار دهند (۱۷،۲۵،۴۰،۴۴). در حالی که قبلاً نقش FCS در بارور شدن تخمکهای گاو توسط Leibfried-Rutledge و همکاران و Younis و همکاران مورد ارزیابی قرار گرفته است (۱۷،۲۵)، اظهار شده است که FCS پروتئین مناسبی برای باروری آزمایشگاهی گاو نبوده و ایجاد پلی اسپرمی در هنگام باروری ارزش آن را در این مورد زیر سؤال می برد.

از طرف دیگر در مورد نقش کافئین و هپارین بر روی باروری آزمایشگاهی نظریاتی موجود می باشد. به عنوان مثال نقش گلوکزامینوگلیکان ها که دارای خواص لوبریکانت برای تحرک اسپرم می باشند (۲۰) در باروری آزمایشگاهی خرگوش مورد استفاده قرار گرفته اند (۱۸). با این حال هنوز اثرات این مواد از جمله کافئین و هپارین به تنهایی (در محیط فاقد پروتئین) روی باروری تخمکهای کومولوس دار یا فاقد کومولوس گاو مورد ارزیابی قرار نگرفته است. در مطالعه حاضر نقش کافئین، هپارین و وجود کومولوس به همراه غلظتهای مختلف آلبومین سرم گاو در باروری آزمایشگاهی تخمکهای گاو مورد ارزیابی قرار می گیرد.

مواد و روش کار

در این تحقیق از مواد شیمیایی ساخت شرکتهای سیگما، پارافین و BSA محصول شرکت مرک و سرم گوساله جنینی که توسط جهاد دانشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شده بود، استفاده گردید. تخمدانهای مورد استفاده در این تحقیق از گاوهای ذبح شده در کشتارگاههای جنوب تهران شامل کشتارگاههای سرهنگ و لاهوتی بوده و بلافاصله پس از کشتار گرفته شده و جهت تمیز شدن از آلودگیهای احتمالی سطحی با محیط سرم فیزیولوژی استریل حاوی ۱۰۰ میکروگرم در لیتر استرپتومایسین و ۱۰۰ واحد بین المللی پنی سیلین جی شستشو شده و در دمای ۳۵-۳۰ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه منتقل شد. پس از انتقال به آزمایشگاه، تخمدانها مورد بررسی قرار گرفته و سپس با کمک سرسوزن ۱۸ متصل به سرنگ ۱۰ میلی لیتری، فولیکول های بین ۲ تا ۸ میلیمتر مکش گردید. تخمکهای به دست آمده در زیر لوپ به دقت مورد ارزیابی قرار گرفته و 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 TCM-199 دارای ۲۵ میلی مول هپس و ۱۰ درصد از FCS که قبلاً توسط حرارت غیر فعال شده بود، شستشو گشت. این ترکیب نیز حاوی ۱۰۰ واحد پنی سیلین جی و ۱۰۰ میکروگرم استرپتومایسین در هر میلی لیتر بود. سپس از هر ۱۰ تا ۱۵ عدد تخمکهای حاوی سلولهای کومولوس اووفروس مناسب درون قطره های ۰/۱ میلی لیتری از محیط کشت مذکور در ظروف کشت پلی استرن (۱۰×۳۰ میلیمتر) منتقل می گردید. این قطرات قبلاً تهیه و پس از پوشانیدن با پارافین اشباع حداقل ۳ ساعت در انکوباتور CO_2 قرار گرفت. حرارت داخلی انکوباتور ۳۹/۵ درجه و میزان آن ۵ درصد ثابت گردیده و رطوبت آن ۱۰۰ درصد بود. ۲۴ ساعت پس از کشت، تخمکها به دو دسته تقسیم شده، یکدسته از آنها به کمک محلول PBS حاوی ۰/۱ درصد از هیالورونیداز و گذرانیدن از پیپت پاستور بسیار نازک شده (قطر داخلی آن کمی بیش از قطر تخمک بود) از سلولهای کومولوس عاری گشته و دسته دوم دست نخورده باقی ماند. سپس هردو گروه چند بار توسط محیط باروری شستشو شده و به آن منتقل گردید.

محیط باروری که از این پس BO نامیده می شود شامل مواد زیر بود: ۱۱۲ میلی مول NaCl، ۴/۰۲ میلی مول KCl، ۲/۲۵ میلی مول $CaCl_2$، ۰/۸۳ میلی مول NaH_2PO_4، ۰/۲۵ میلی مول $MgCl_2$، ۳۷ میلی مول $NaHCO_3$، ۱۳/۹ میلی مول گلوکز، ۱/۲۵ میلی مول پیروات سدیم، ۳۱ میکروگرم درمیلی لیتر پنی سیلین پتاسیم G.

محیط به دو بخش تقسیم می شد. قبل از تلقیح قطره هایی تهیه شد (بخش اول) که حاوی محیط BO و غلظتهای مختلف از مواد شیمیایی (کافئین یا هپارین) یا پروتئین (BSA) مورد آزمایش بود (در این قطره ها غلظت مواد مورد آزمایش دو برابر مقدار مورد نیاز تهیه شد که علت آن عدم وجود آنها در محیط شستشوی اسپرم می باشد که درنهایت با افزودن مقادیر مساوی از این دو محیط غلظت موردنظر ماده مورد آزمایش حاصل گردید). از این محیط قطرات ۵۰ میکرونی تهیه شده و در ظروف پتری قرار گرفت. سپس بر روی آن پارافین اشباع قرار گرفته و حداقل ۴ ساعت قبل از باروری در انکوباتور یاد شده قرار داده شد.

بخش دوم یا محیط شستشوی اسپرم، حاوی محیط BO و بدون هیچ یک از مواد مورد آزمایش (شامل کافئین، هپارین و BSA) بود.

در این آزمایش جهت آنکه شستشوی اسپرم اثری در آزمایش نداشته باشد در محیط BO فاقد مواد شیمیایی مورد مطالعه قرار گرفت. آماده سازی اسپرم بر طبق روش Niwa و همکاران صورت گرفت (۲۲). به طورخلاصه، پس از ذوب نمودن اسپرم، آنها دوبار توسط سانتریفوژ با قدرت نیروی گریز ازمرکز ۸۳۳ گرم شستشو داده شد و هربار تمامی قسمتهای بالای لوله خارج می شد تا باقیمانده زاید مواد انجماد منی و اسپرمهای مرده از محیط خارج

www.SID.ir

Archive of SID

گردد، درنهایت پلت اسپرم به میزان مورد نیاز در محیط شستشوی تازه قرار گرفته وقطرات حاوی تخمک تلقیح گردید تخمکهای تلقیح شده ۲۴-۲۲ ساعت در انکوباتور قرار گرفته و سپس برنامه ثابت نمودن آنها به ترتیب زیر انجام می شد.

۱- تخمکهای فاقد کومولوس کاملاً شستشو شده و بین لام و لامل ثابت می گردید. ۲- تخمکهای دارای کومولوس ابتدا فاقد کومولوس گردیده، سپس خوب شستشو شده و بین لام ولامل ثابت می گردید. ۳- شستشوی تخمکها در این مرحله بسیار اساسی است زیرا می بایست تمام اسپرمهای متصل به سطح شسته شود. ۴- لام حاوی تخمکها را به مدت ۴-۳ روز در محلول دارای ۷۵ درصد الکل اتیلیک و ۲۵ درصد اسید استیک قرار داده شد و سپس به کمک محلول ۱ درصد اورسئین رنگ آمیزی و در زیر میکروسکوپ فاز کنتراست جهت تعیین باروری مورد ارزیابی قرار می‌گرفت.

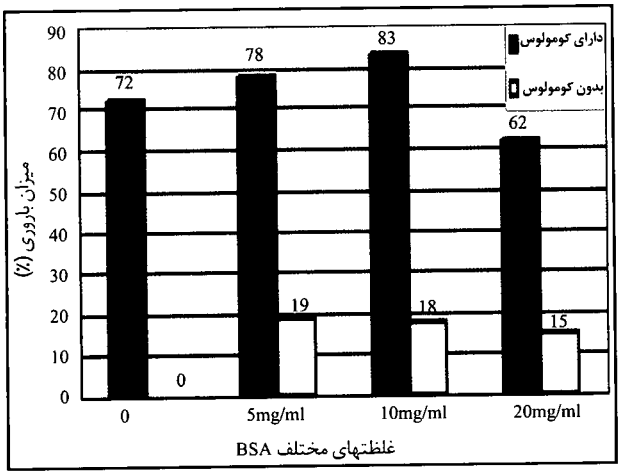
در تمام آزمایشها میزان باروری و باروری پلی اسپرمی به وسیله ANOVA مورد ارزیابی قرار گرفت. در صورت مشاهده اثر معنا دار، گروه ها به وسیله تست Duncan تجزیه و تحلیل می گردید.

نتایج

نمودار ۱ باروری تخمکهای دارای سلولهای کومولوس را در حضور ۵ میلی مول کافئین و مقادیر مختلف BSA نشان می دهد. همان طور که ملاحظه می شود، ۷۲ درصد، ۷۸ درصد، ۸۳ درصد و ۶۲ درصد از تخمکهای تلقیح شد و در غلظتهای صفر، ۵ میلی گرم، ۱۰میلی گرم، و ۲۰ میلی گرم از BSA بارور گشتند که اختلاف معناداری بین آنها وجود نداشت. در حالی که بین این گروه (گروه کومولوس دار) و گروه بدون کومولوس که در آنها باروری به ترتیب صفر، ۱۹ درصد، ۱۸ درصد و ۱۵ درصد برای تخمکهای تلقیح شده در محیط های بدون پروتئین و حاوی ۵ میلی گرم، ۱۰میلی گرم و ۲۰ میلی گرم از BSA اختلاف معنادار بود (P<۰/۰۱). در جدول۱ میزان تخمکهای بارور حاوی هر دو پرونوکلئوس و تخمکهای بارور شده حاوی بیش از یک اسپرم نشان داده شده است. از ۲۶ عدد تخمک کومولوس دار که در محیط فاقد پروتئین بارور شده اند، ۷۷ در صد دارای هر دو پرونوکلئوس نر و ماده بوده و ۷ عدد از تخمکها بیش از یک اسپرم داشتند (یکی از تخمکها هم دارای دو پرو نوکلئوس و هم پلی اسپرمیک بوده است). در محیط فاقد پروتئین هیچ یک از تخمکهای بدون کومولوس بارور نشدند. هنگامی که غلظت پروتئین ۵ میلی گرم در میلی لیتر بود، ۷۵ در صد از تخمکهای بارور حاوی هر دو پرونوکلئوس و ۲۱ در صد از آنها بیش از ۱ اسپرم داشتند. در این گروه یک تخمک دارای اسپرم در سیتوپلاسم بود بدون آنکه پرونوکلئوس نر در آن تشکیل شود. در همین محیط ۱۰۰ در صد از تخمکهای بدون کومولوس حاوی هر دو پرونوکلئوس نر و ماده بودند و یکی از آنها بیش از یک اسپرم داشت. در محیط های حاوی ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر BSA به ترتیب ۸۰ و ۸۱ در صد از تخمکهای کومولوس دار بارور دارای هر دو پرونوکلئوس بوده و میزان رویداد پلی اسپرمی در آنها ۴ و ۲۴ درصد بود. در همین محیط ها به ترتیب ۷۱ و ۸۳ در صد از تخمکهای بارور حاوی هر دو پرونوکلئوس بودند.

نمودار ۲ باروری تخمکهای دارای سلولهای کومولوس را در حضور ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر هپارین و مقادیر مختلف BSA نشان می دهد. در این آزمایش ۴۶ درصد، ۸۸ درصد، ۷۲ درصد و ۷۴ درصد از تخمکهای تلقیح شده به ترتیب در غلظتهای صفر، ۵ میلی گرم، ۱۰میلی گرم، و ۲۰ میلی گرم از BSA بارور گشتند. بین باروری در محیط فاقد پروتئین و دیگر محیطها اختلاف معنادار بود(P<۰/۰۵). در حالی که بین این گروه (گروه کومولوس دار) و گروه بدون کومولوس که در آنها باروری به ترتیب صفر، ۶۷ درصد، ۷۱ درصد و ۷۱درصد برای تخمکهای تلقیح شده در محیط های حاوی ۵ میلی گرم، ۱۰میلی گرم و ۲۰ میلی گرم از BSA اختلاف معنادار وجود نداشت. در جدول ۲ میزان تخمکهای بارور شده حاوی بیش از یک اسپرم نشان داده است. از تخمکهای کومولوس دار که در محیط فاقد پروتئین بارور شده اند، ۹۴ در صد دارای هر دو پرونوکلئوس نر و ماده بوده و ۱۹ درصد از تخمکها بیش از یک اسپرم داشتند (دو عدد از تخمکها هم دارای دو پرو نوکلئوس و هم پلی اسپرمیک بوده است). در محیط فاقد پروتئین همانند محیط فاقد پروتئین حاوی کافئین، هیچ یک از تخمکهای بدون کومولوس بارور نشدند. هنگامی که غلظت پروتئین ۵ میلی گرم در میلی لیتر بود، ۱۰۰ در صد از تخمکهای بارور حاوی هر دو پرونوکلئوس بودند که ۵ عدد از آنها بیش از یک اسپرم داشتند. در همین محیط ۶۴ در صد از تخمکهای بدون کومولوس حاوی هر دو پرونوکلئوس نر و ماده بودند و ۳۲ در صد از تخمکها با بیش از یک اسپرم بارور شده بودند. در محیط های حاوی ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر BSA به ترتیب ۸۷ و ۸۷ درصد از تخمکهای کومولوس دار بارور دارای هر دو پرونوکلئوس بودند. در همین محیط ها به ترتیب ۸۳ و ۸۸ در صد از تخمکهای بارور حاوی هر دو پرونوکلئوس بودند.

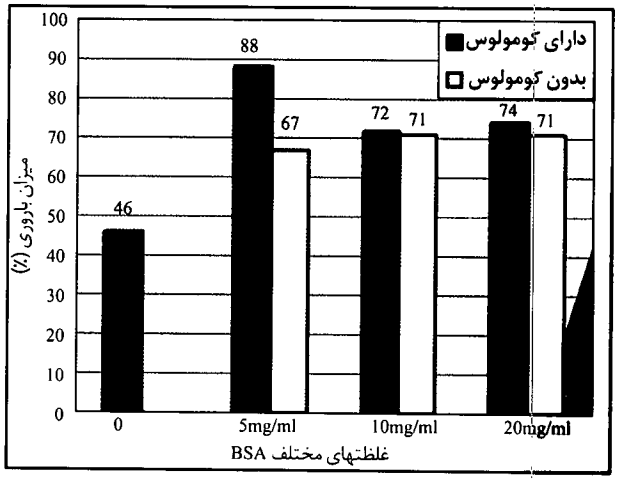
نمودار ۳ باروری تخمکهای دارای سلولهای کومولوس را در محیط بدون کافئین و هپارین و مقادیر مختلف BSA نشان می دهد. در این آزمایش ۹ درصد، ۸ درصد، ۵ درصد و ۷ درصد از تخمکهای تلقیح شده به ترتیب در غلظتهای صفر، ۵ میلی گرم، ۱۰میلی گرم و ۲۰ میلی گرم از BSA بارور گشتند. بین باروری در محیط فاقد پروتئین و دیگر محیط ها اختلاف معنادار وجود نداشت. همچنین بین این گروه (گروه کومولوس دار) و گروه بدون کومولوس که در آنها باروری به ترتیب صفر، ۱۳ درصد، ۲۱ درصد و ۷ درصد برای تخمکهای تلقیح شده در محیط های حاوی ۵ میلی گرم، ۱۰میلی گرم و ۲۰ میلی گرم از BSA اختلاف معنادار وجود نداشت. در جدول ۳ میزان تخمکهای بارور حاوی هر دو پرونوکلئوس و تخمکهای بارور شده حاوی بیش از یک اسپرم نشان داده شده است. از تخمکهای کومولوس دار که در محیط فاقد



نمودار ۱- باروری تخمکهای گاو در غلظتهای مختلف BSA و ۵ میلی مول کافئین.

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۲- باروری تخمکهای گاو در غلظتهای مختلف BSA و ۱۰ میکروگرم در سی سی هپارین.

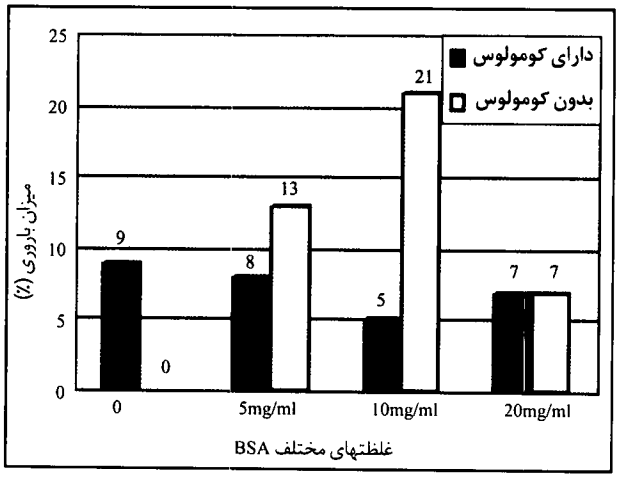
پروتئین بارور شده اند. ۲۵ درصد دارای هر دو پرونوکلئوس نر و ماده بودند. **در محیط فاقد** پروتئین همانند محیط فاقد پروتئین حاوی کافئین، هیچ **یک از تخمکهای** بدون کومولوس بارور نشدند. هنگامی که غلظت پروتئین **۵ میلی گرم در میلی** لیتر بود، ۵۰ در صد از تخمکهای بارور حاوی هر دو **پرونوکلئوس بودند. در** همین محیط ۸۳ در صد از تخمکهای بدون کومولوس **حاوی هر دو پرونوکلئوس** نر و ماده بودند. در محیط های حاوی ۱۰ و ۲۰ **میلی گرم در میلی لیتر** BSA به ترتیب ۵۰ و ۳۳ در صد از تخمکهای کومولوس **دار بارور دارای هر دو پرونو**کلئوس بودند. در همین محیط ها به ترتیب ۷۵ **و ۱۰۰ درصد از تخمکهای** بارور حاوی هر دو پرونوکلئوس بودند.

بحث

گزارش شده است که مجموعه کومولوس در هامستر می تواند باروری **را تسهیل** بخشد (۲). این امر بار دیگر توسط Taghe و همکاران نیز در سال ۲۰۰۳ در مورد تخمکهای گاو عنوان شده است (۳۸). با توجه به اینکه تفاوت معنا داری بین باروری تخمکهای کومولوس دار و بدون کومولوس در محیط عاری از کافئین و هپارین وجود داشت، نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که وجود سلولهای کومولوس نمی تواند در محیط بدون کافئین و هپارین باروری را در تخمک گاو مورد حمایت قرار دهد.

چنین گزارش شده است که هر گاه محیط باروری BO در حالی که فاقد پروتئین ولی دارای کافئین و هپارین باشد، میزان بالایی (۹۰ درصد) از تخمکهای دارای کومولوس بارور می گردد (۳۶). زیرا گفته شده است که گلیکوزامینوگلیکان ها هم سنگهای پروتئوگلیکان ها، که هپارین هم از آن دسته به حساب می آید، با تأثیرگذاری بر توانا شدن اسپرم و انجام واکنش آکروزومی در آن، در باروری نقش دارند (۱۸،۳۰).

گفته شده است که cAMP با تحریک پروتئین کیناز وابسته به آن، هورمون غیر فعال تری آسیل گلیسرول لیپاز را به لیپاز فعال تبدیل می کند. لذا عمل لیپولیز به میزان زیادی توسط cAMP حاضر در بافت کنترل می گردد. هر عملی که cAMPرا نابود یا غیر فعال سازد، لیپولیز را کاهش می دهد. کافئین از تغییر یافتن cAMP جلوگیری می نماید (۲۰). وجود cAMP برای متابولیز ATP لازم است. این متابولیز شدن است که امکان تحرک اسپرم را فراهم ساخته و در نهایت در باروری موثر است (۱۴). اما علی رغم مسایل عنوان شده وجود این عناصر به تنهایی در محیط کشت نتوانسته است باروری را حمایت نماید (۲۶).



نمودار ۳- باروری تخمکهای گاو در غلظتهای مختلف BSA و بدون کافئین و هپارین.

در مطالعه حاضر باروری برای تخمکهای دارای کومولوس در حضور کافئین تقریباً بیش از باروری تخمکهای بدون کومولوس بود. در حالی که درحضور هپارین 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 محیط های حاوی هپارین و یا فاقد کافئین و هپارین وجود کومولوس اثر مثبتی بر باروری نداشت. بدین ترتیب به نظر می رسد که در شرایط حاضر سلولهای کومولوس اثر سینرژیستی با کافئین دارد. از طرف دیگر در محیط های فاقد سرم با افزودن کافئین باروری بالاتری (۷۲ درصد) نسبت به هنگام افزودن هپارین (۴۶ درصد) به دست آمد.

گزارش شده است که حضور کومولوس می تواند میزان پلی اسپرمی را کاهش دهد (۱). در مطالعه حاضر بر خلاف آنچه قبلاً گزارش شده است حضور کافئین از پلی اسپرمی ممانعت ننمود. بدین ترتیب به نظر می رسد 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 می نماید.

در مورد باروری در محیط بدون پروتئین از آنجایی که 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 می رسد که این مقدار پروتئین در هنگام باروری موثر باشد (۱۱). البته شرایط کشت بلوغ تخمک در آزمایش حاضر ممکن است این ظن را تقویت نماید. زیرا کشت در محیط TCM-199 حاوی ۱۰ درصد از FCS انجام شده است و می تواند در هنگام باروری درآزمایش دخالت نماید، اما یادآوری دو نکته در این مورد ضروری است: اولاً آنکه قبل از باروری تخمکها به خوبی و چندبار شستشو شده و در نهایت حجم مجموعه تخمک-کومولوس چیزی کمتر از ۱ درصد محیط تلقیح بود که به هرحال پروتئین منتقل شده (درحالی که انتقال صورت گرفته باشد)، نسبت به کل حجم محیط ناچیز است. ثانیاً اینکه مقایسه باروری در محیط حاوی هپارین مؤید این نظر است که اگر قرار بود پروتئینی از محیط کشت در کومولوس حبس شده باشد (که FCS بوده است)، می بایستی باروری تخمکها در محیط بدون سرم با محیط های دارای سرم مشابه باشد. البته این احتمال که کومولوس خود پروتئین خاصی بسازد تا در باروری دخالت نماید منتفی نیست.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- میزان تخمک بارور شده دارای هر دو پرونوکلئوس و میزان تخمکهای بارور شده دارای بیش از یک اسپرم در غلظتهای مختلف BSA و حاوی ۵ میلی مول کافئین.

	تخمکهای کومولوس دار			تخمکهای بدون کومولوس		
غلظت پروتئین (میلی گرم در میلی لیتر)	تعداد بارور شده	دارای هر دو پرونوکلئوس (درصد)	بارور شده با بیش از یک اسپرم (درصد)	تعداد بارور شده	دارای هردو پرونوکلئوس (درصد)	بارور شده با بیش از یک اسپرم (درصد)
۰	۲۶	۲۰(۷۷)	۷(۲۷)	۰	۰	۰
۵	۲۸	۲۱(۷۵)	۶(۲۱)	۸	۸(۱۰۰)	۱(۱۳)
۱۰	۲۵	۲۰(۸۰)	۱(۴)	۷	۵(۷۱)	۰
۲۰	۲۱	۱۷(۸۱)	۵(۲۴)	۶	۵(۸۳)	۱(۱۷)

جدول ۲- میزان تخمک بارور شده دارای هر دو پرونوکلئوس و میزان تخمکهای بارور شده دارای بیش از یک اسپرم در غلظتهای مختلف BSA و حاوی ۱۰ میکرو گرم در لیتر هپارین.

	تخمکهای کومولوس دار			تخمکهای بدون کومولوس		
غلظت پروتئین (میلی گرم در میلی لیتر)	تعداد بارور شده	دارای هر دو پرونوکلئوس (درصد)	بارور شده با بیش از یک اسپرم (درصد)	تعداد بارور شده	دارای هردو پرونوکلئوس (درصد)	بارور شده با بیش از یک اسپرم (درصد)
۰	۱۶	۱۵(۹۴)	۳(۱۹)	۰	۰	۰
۵	۲۸	۲۸(۱۰۰)	۵(۱۸)	۲۲	۱۴(۶۴)	۷(۳۲)
۱۰	۲۳	۲۰(۸۷)	۳(۱۳)	۲۴	۲۰(۸۳)	۶(۲۵)
۲۰	۲۳	۲۰(۸۷)	۳(۱۳)	۲۴	۲۱(۸۸)	۸(۳۳)

جدول ۳- میزان تخمک بارور شده دارای هر دو پرونوکلئوس و میزان تخمکهای بارور شده دارای بیش از یک اسپرم در محیط بدون کافئین و بدون هپارین حاوی غلظتهای مختلف BSA.

	تخمکهای کومولوس دار			تخمکهای بدون کومولوس		
غلظت پروتئین (میلی گرم در میلی لیتر)	تعداد بارور شده	دارای هر دو پرونوکلئوس (درصد)	بارور شده با بیش از یک اسپرم (درصد)	تعداد بارور شده	دارای هردو پرونوکلئوس (درصد)	بارور شده با بیش از یک اسپرم (درصد)
۰	۴	۱(۲۵)	۰	۰	۰	۰
۵	۴	۲(۵۰)	۰	۶	۵(۸۳)	۰
۱۰	۲	۱(۵۰)	۰	۸	۶(۷۵)	۰
۲۰	۳	۱(۳۳)	۰	۳	۳(۱۰۰)	۰

هنگامی که محیط باروری فاقد کافئین و هپارین بود، سلولهای کومولوس نتوانست انجام باروری را تسهیل نماید. بدین ترتیب می توان نتیجه گرفت که در شرایط حاضر (محیط BO) وجود پروتئین، کافئین، هپارین و سلولهای کومولوس هر کدام برای خود دارای مفهوم بوده و هر کدام به نوعی در باروری مؤثر هستند. به هرحال برای روشن شدن این اثرات آزمایشها و تحقیقات بیشتری مورد نیاز است.

گفته شده است در حضور ۶ میلی گرم در میلی لیتر BSA میزان ۷۷ درصد باروری در هپارین ۰/۲ میکرو گرم در میلی لیتر و ۸۰ در صد میزان هر دو پرونوکلئوس می باشد (۱۷). در مطالعه حاضر ۷۸ درصد باروری برای همین مقدار هپارین و ۵ میلی گرم در میلی لیتر BSA به دست آمد که با نتایج ذکر شده مشابه است.

Saeki و همکاران در سال ۱۹۹۵ گزارش نموده اند که در محیط فاقد هپارین هنگامی که BSA در محیط قرار داشت ۶۵ درصد هر دو پرونوکلئوس ایجاد می شود و در حالی که هپارین حاضر و BSA غایب است این مقدار ۷۵ درصد است (۳۱). میزان هر دو پرونوکلئوس در محیط دارای هپارین و دارای BSA در آزمایش Saeki برا ی گاوهای نر مختلف بین ۳۱ درصد تا ۷۵ درصد به دست آمده است. در مطالعه حاضر نیز۹۴ درصد هر دو پرونوکلئوس برای محیط فاقد BSA و دارای هپارین که بیش از یافته قبل و ۵۰ درصد هر دو پرونوکلئوس ایجاد شد که مشابه همین یافته ها می باشد.

گفته شده است که حذف نمودن BSA از محیط باروری که شبیه اویداکت ساخته شده است میزان بلاستوسیست را کاهش می دهد (۶) درحالی که دیگران در همین سال عقیده ای خلاف آن دارند (۱۶). در آزمایش حاضر میزان بلاستوسیست مورد ارزیابی قرار نگرفت اما نشان داده شد که در تخمکهای دارای کومولوس میزان تشکیل هردو پرونوکلئوس در محیط بدون پروتئین (BSA) و محیط حاوی غلظتهای مختلف آن تفاوت ندارد. زیرا ایجاد پرونوکلئوس پس از باروری از اهمیت زیادی برخوردار است به طوری که آن را با باروری طبیعی همسان می دانند. به عنوان مثال Dell`Aquila و همکاران (۱۰) آن را ملاک ارزیابی باروری موفق در مورد تخمکهای مادیان و Tajik و همکاران (۳۷) آن را به عنوان ملاک ارزیابی در باروری موفق تخمکهای گرفته شده از فولکیول های پری آنترال گاو ذکر نموده اند. در مطالعه ای که توسط Niwa و همکاران (۲۴) انجام شد حدود ۹۶ درصد میزان هر دو پرونوکلئوس در محیط دارای کافئین و هپارین و ۱۰ میلی گرم BSA به دست آمد. در این مطالعه میزان ایجاد هر دو پرونوکلئوس مشابه آزمایش ایشان و در محیط حاوی همین مقدار BSA و تخمکهای کومولوس دار به ترتیب برای محیط های حاوی کافئین ۸۰ درصد، برای محیط حاوی هپارین ۸۷ در صد، و فقط برای محیط فاقد کافئین و هپارین کمتر و ۵۰ درصد بود. در مطالعه مشابه همین میزان بین صفر تا ۱۰۰ درصد گزارش شده است که میزان اعلام شده در مورد کافئین و هپارین به ترتیب ۹۴ درصد و ۹۲ درصد بوده است (۳۵).

تشکر و قدردانی

بدین وسیله مؤلفین از زحمات و حسن نیت اعضای محترم شورای پژوهشی گروه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و همچنین قطب علمی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران در راستای تأیید و تصویب و حمایت مالی تشکر و قدردانی می نمایند.

www.SID.ir

Archive of SID

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. Carolan, C., Lonergan, A., Van Langendonkt, A. and Mermillond, P. (1995): Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization in vitro. Theriogenology, 43: 1115-1128.
7. Chamberland ,A., Fournier, V., Tardif, S., Sirard, M.A., Sullivan, R. and Bailey, M.A.(2001): The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorilation during bovine sperm capacitation. Theriogenology, 55: 823-835.
8. Chian, R.C., Okuda, K. and Niwa, K. (1995): Influence of cumulus cells on in vitro fertilization of bovine oocytes derived from in vitro maturation. Anim. Reprod. Sci, 38: 37-48.
9. 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.
10. Dell Aquila, M.E., Cho, Y.S., Minoia, P., Traina, V., Fusco, S., Lacalandra, G.M. and Maritato, F. (1997): Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus conventional IVF on abattoir-derived and in vitro-matured equine oocytes. Theriogenology, 47: 1139-1156.
11. Fraser, L.R. (1985): Albumin is required to support the acrosome reaction but not the capacitation in mouse spermatozoa in vitro. J. Reprod. Fertil, 74:185-196.
12. 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.
13. 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.
14. 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 ed. Lippincott Williams & Wilkins, Tokyo, PP: 107.
15. Hillenjo, T., Sjogren, A., Strander, B. and Andino, N. (1985): Steroid secretion by cumulus cells isolated from human pre-ovulatory follicles. Acta Endocrinol, 108:407-413.
16. Keskintepe, L., Burnley, C.A. and Brackett, B.G. (1995): Production of viable bovine blastocyst in defined in vitro condition. Biol. Reprod, 52: 1410-14170.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Mayes, P.A.(1988): Lipid transport & 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.
21. Meizel, S., Pillai, M.C., Diaz-Prez, E. and Thomas, P. (1990): Initiation of the human sperm acrosome rection by components of human follicular fluid and cumulus secretions including steroids. In: Bavister, BD., Cummins, J. and Roldan, ERS. (eds) Fertilization in Mammals. Serono Symposia. Norwell, PP: 205-222.
22. 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.
23. 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. Dublin3, 346 (3 pages).
24. Niwa, K., Park, C.K. and Okuda, K. (1991): Penetration in vitro of bovine oocytes during maturation by frozen-thawed spermatozoa. J. Reprod. Fert. 91: 329-336.
25. 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.

www.SID.ir

Archive of SID

26. 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.

27. 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. Biol. Reprod, 41:683-699.

28. 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 forzen-thawed semen. Theriogenology, 25:591-600.

29. 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.

30. Parrish, J.J., Wincek, T.J. and Polakoski, K.L. (1980): Glycosaminoglycan stimulation of the in vitro conversion of boar proacrosin into acrosin. J. Androl, 1: 89-95.

31. Saeki, K., Nagao, Y. Hoshi, M. and Nagai, M. (1995): Effects of heparin, sperm concentration and bull variation on in vitro fertilization of bovine oocytes in protein-free medium. Theriogenology, 43: 751-759.

32. 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.

33. Sitteri, J.I., Dandekar, P. and Meizel, S. (1988): Human sperm acrosome reaction-initiating activity associated with the human cumulus oophorus and mural granulosa cells. J. Exp. Zool, 246:71-80.

34. Sullivan, R., Duchense, C., Fahmy, N., Morin, N. and Dionne, P. (1990): Protein synthesis and acrosome reaction-inducing activity of human cumulus cells. Human Reprod, 5:830-834.

35. Tajik, P., and Niwa, K. (1998): Effects of caffeine and/or heparin in a chemically defined medium with or without glucose on in vitro penetration of bovine oocytes and their subsequent development. Theriogenology, 49: 771-777.

36. 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.

37. Tajik, P., Wang, WH., Okuda, K. and Niwa, K. (1994): In vitro fertilization of bovine oocytes in a chemically defined, protein-free medium varying the bicarbonate concentration. Biol. Reprod, 50: 1231-1237.

38. Taghe, S., Soon, A.V., Mehrzad, J., Maes, D., Duchateau, L. and de Kruit, A. (2003): Cumulus contributions during bovine fertilization in vitro. Theriogenology, 60: 135-149.

39. Tesarik, J. (1985): Comparison of acrosome reaction-inducing 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.

40. Van Langendonckt, A., Donnay, I., Schuurbiers, 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.

41. Xum, KP., Greve, T, Gallensen, H. and Hyttel, P. (1987): Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertlized in vitro. J. Reprod. Fertil, 81:501-504.

42. Yanagimachi, R. (1981): Mechanism of fertilization in mammals. In: Mastroianni, J.R. and J.D. Biggers (eds) Fertilization and Embryonic Development In Vitro. lenum Press, New York, pp: 81-182.

43. Yanagimachi, R. (1994): Mammalian fertilization. In: Knobil E. and JD Neil (eds) Physiology of Reproduction. Raven Press, New York, pp: 189-317.

44. Yoshida, K., Mazniothman, A., 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.

45. Younis A.I., Brackett, B.G. and Fayrer-Hosken, R.A. (1986): Influence of serum and hormones on bovine oocytes maturation and fertilization in vitro. Gamete Res, 23: 189-201.

46. Zhang, L., Jiang, S., Wozniak, P.J., Yang, X. and Godke R.A. (1995): Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization and embryo development. Mol. Reprod. Develop, 40: 338-344.

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir