اثر اسید هیالورونیک بر باروری آزمایشگاهی تخمک‌های بدون سلولهای کومولوس گاو

دکتر پرویز تاجیک[1]

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۳، شماره ۱ و ۲، ۱۴-۱۰، (۱۳۷۷)

تخمکهای گاو که در شرایط آزمایشگاهی بالغ شده بودند بوسیله هیالورونیداز و مکشهای مکرر با پیپت پاستور که قطر قسمت قدام آن بوسیله حرارت و کشش بسیار باریک شده بود بدون سلولهای کومولوس گردیده و سپس با اسپرم از انجماد خارج شده در محیط باروری دارای ۵ میلی‌مول کافئین و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر هپارین بدون پروتئین، با یا بدون پلی‌وینیل پیرولیدون و مقادیر مختلف اسید هیالورونیک تلقیح گردید. هنگامیکه محیط فاقد پلی‌وینیل پیرولیدون بود، هیچگونه باروری بدون اسید هیالورونیک بوقوع نپیوست. در حالیکه با افزودن ۰/۰۰۱ تا ۱ میلی‌گرم اسیدهیالورونیک در میلی‌لیتر محیط، میزان باروری ۹ تا ۱۵ درصد بود. غلظت‌های مختلف این اسید اختلاف معنی‌داری در باروری اسپرم گاو ایجاد نکرد. با افزودن پلی‌وینیل پیرولیدون به محیط باروری، افزایشی در میزان نفوذ اسپرمهای گاو به تخمک این دام بوقوع پیوست بطوری که وجود ۰/۰۰۱ تا ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اسید هیالورونیک باعث ایجاد ۵۰ تا ۶۴ درصد باروری گشت. در این میان باروری تخمک‌های گاو در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اسیدهیالورونیک بطور معنی‌داری از محیط فاقد این اسید بیشتر بود ($p<0/05$). نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که وجود اسیدهیالورونیک در هنگام باروری تخمک‌های گاو می‌تواند اثر مثبتی برروی نفوذ اسپرم این دام بداخل تخمک داشته باشد.

واژه‌های کلیدی : باروری آزمایشگاهی، گاو، اسیدهیالورونیک

---

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

اسپرم پستانداران می‌بایستی قبل از باروری تخمک دو مرحله را پشت سر بگذارد. این دو مرحله بنام تواناشدن (ظرفیت‌پذیری) و واکنش آکروزومی نام مشهور است. روندهای متعددی تاکنون برای تسهیل تواناشدن اسپرم گاو ایجاد شده است (فرست و پاریش ۱۹۸۷، پاریش ۱۹۹۱) گزارش دادند که مواد شیمیایی مختلف مانند کافئین (نیوا و همکاران ۱۹۸۸، شیویا و همکاران ۱۹۸۸)، هپارین (پاریش و همکاران ۱۹۸۶ و ۱۹۸۸) و یونوفورکلسیم (بیرد، ۱۹۸۱) می‌توانند تواناشدن اسپرم گاو را آسان کنند. در آزمایشهای ذکر شده همیشه آلبومین سرم گاو موجود بوده است. مولکولهای بزرگ پروتئین مثل آلبومین سرم گاو ممکن است در اسپرم گاو تواناشدن و واکنش آکروزومی را آسان کنند (بیرد، ۱۹۸۱).

گزارش شده است که سلولهای کومولوس باروری آزمایشگاهی تخمکهای هامستر (باویستر، ۱۹۸۲) و موش (فریزر، ۱۹۸۵) را آسان می‌سازد. از سوی دیگر تزاریک (۱۹۸۵) و سیتری (۱۹۸۸) گزارش کرده‌اند که در گرمخانه قراردادن اسپرم توانا شده انسان با سلولهای کومولوس منجر به انجام واکنش اکروزومی می‌گردد. سالیوان و همکاران (۱۹۹۰) گزارش کرده‌اند که سلولهای کومولوس انسان می‌تواند تولید پروتئین نماید و ممکن است قدرت ایجاد واکنش آکروزومی را داشته باشد. میزل و همکاران (۱۹۹۰) همچنین نشان داده‌اند که واکنش آکروزومی در اسپرم انسان و هامستر بوسیله پروژسترون ایجاد می‌شود که آن را از ترشحات سلولهای کومولوس می‌دانند (هیلنجو، ۱۹۸۵).

بهر حال اگر چه بعضی از اعمال کومولوس اواوفوردس در سال ۱۹۸۱ بوسیله یاناگیماچی مورد بحث و مرور قرار گرفته است، ولی نقش حقیقی آن در هنگام باروری آزمایشگاهی متناقض ارزیابی شده است (یاناگیماچی، ۱۹۸۸). مثلاً (فوکویی و همکاران ۱۹۸۹، لو و همکاران، ۱۹۸۷) معتقدند که وجود سلولهای کومولوس در هنگام باروری لازم نیست. در حالیکه فوکویی یکسال بعد (۱۹۹۰) گزارش کرده است که گرفتن سلولهای کومولوس باعث کاهش باروری در تخمکهای گاو می‌شود.

آنچه تاکنون در اثرات مجموعه کومولوس بر باروری نادیده گرفته شده اسید هیالورونیک می‌باشد. اسید هیالورونیک از خانواده گلیکوز امینوگلیکانها (Glycosaminoglycans) یا موکوپلی ساکاریدها (Mucopolysaccharides) می‌باشد. هپارین نیز در این خانواده جای دارد. این خانواده خصوصیاتی از قبیل نگهداری حجم زیاد آب در داخل خود، اشغال فضا و از اینرو خاصیت لغزنده‌سازی دیگر مواد را با کمک گروههای زیاد بار منفی OH- دارد و همچنین امکان اتصال پروتئین دارند (موری و همکاران، ۱۹۹۱).

از طرف دیگر گزارش شده است که افزودن پلی‌وینیل پیرولیدون (پی‌وی‌پی) (Polyvinyl pyrolidone [PVP]) و پلی‌وینیل الکل (پی‌وی‌ای) (Polvinylalcohol [PVA]) به محیط می‌تواند تحرک اسپرم موش و هامستر (هوپ و ویتن ۱۹۷۴، با ویستر، ۱۹۷۴) و گاو (پاریش و همکاران، ۱۹۸۹) را حفظ کند. لیکن افزایش این مواد به محیط باروری حاوی هپارین بندرت توانسته در تخمکهای بدون کومولوس گاو در مقایسه با آلبومین سرم گاوی (Bovine serum albumin) ایجاد باروری نماید (پاریش و همکاران، ۱۹۸۹) اما اینکه آیا اسیدهیالورونیک هم می‌تواند باروری آزمایشگاهی تخمکهای گاو را در محیط بدون پروتئین بیشتر کند یا خیر تاکنون مورد آزمایش قرار نگرفته است.

در این بررسی سعی شده تا اثر مقادیر مختلف اسید هیالورونیک را در باروری آزمایشگاهی تخمکهای بالغ شده گاو در خارج از بدن در محیط بدون پروتئین مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش کار

تخمدانهای گاوهای ذبح شده در کشتارگاه را بلافاصله گرفته و در سرم فیزیولوژیک (۸/۵ در هزار نمک طعام در آب مقطر) و در دمای ۳۵-۳۰ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه منتقل گردید.

در آزمایشگاه تخمدانها مورد بررسی قرار گرفت و سپس با کمک سرسوزن ۱۸ متصل به سرنگ ۱۰ میلی‌لیتری فولیکولهای بین ۲ تا ۸ میلی‌متر مکیده شد. در پایان مجموعه تخمکهای حاوی سلولهای کومولوس اواوفوروس مناسب انتخاب و چهار بار در محیط کشت سلول TC-199 دارای ۲۵ میلی‌مول ان ۲- هیدروکسی اتیل پیپرازین ان ۲- اتان سولفونیک اسید (Hepes) و دارای ۱۰ درصد سرم گوساله جنینی (Fetal calf serum (FCS) غیرفعال شده در حرارت، ۱۰۰ واحد در هر میلی‌لیتر پنی‌سیلین جی و ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر استرپتومایسین شستشو شد. سپس در هر ۱۰ تخمک دارای سلولهای کومولوس اواوفوروس نسبتاً مناسب (بیش از ۵ لایه به دور تخمک) به داخل قطره‌هایی به حجم ۰/۱ میلی‌لیتر از محیط یادشده در ظروف کشت سلول پلی‌استرن (۱۰×۳۵ میلی‌متر) در زیر پارافین مایع که قبلاً حداقل دو ساعت در گرمخانه گاز کربنیک‌دار و دارای رطوبت کافی و حرارت ۳۹/۵ قرار داده شده بود منتقل گردید. پس از ۲۲ تا ۲۴ ساعت کشت تخمکها بررسی و بطور اتفاقی ابتدا در چهار غلظت مختلف اسید هیالورونیک مورد تلقیح قرار گرفت. در آزمایش دیگر با توجه به اینکه گزارش شده است که افزودن پلی‌وینیل پیرولیدون از ۰/۱ تا ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر محیط می‌تواند تحرک اسپرم موش و هامستر را حفظ کند (هوپ و ویتن، ۱۹۷۴ و باویستر، ۱۹۷۴) و از طرفی تحرک اسپرم گاو در محیط بدون ماکرومولکولها (که در آن باروری انجام نمی‌گیرد) به سرعت به حد صفر می‌رسد (اطلاعات منتشر نشده) با افزودن یک میلی‌گرم پلی‌وینیل پیرولیدون به غلظتهای سه گانه اسیدهیالورونیک تلقیح مجددی صورت گرفت تا باروری تخمکهای گاو در محیطهای بدون پروتئین جدید ارزیابی گردد.

محیط باروری :

محیط باروری تقریباً همان بود که توسط براکت و اولیفانت (۱۹۷۵) برای خرگوش مورد استفاده قرار گرفته بود. این محیط پس از این برای اختصار BO نامیده خواهد شد. محیط شستشوی اسپرم هم همان محیط BO بود در حالیکه فاقد تمام مواد مورد آزمایش و هپارین ولی دارای ۱۰ میلی‌مول کافئین بود. در هر آزمایش مواد مورد نظر و هپارین (۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) را بصورت دو برابر به محیط شستشوی تخمک که پس از ۲۴ ساعت کشت در آن قرار می‌گرفت افزوده و با افزودن حجمهای مساوی از محیط اسپرم به قطرات تخمک، حجم مطلوبی از مواد مورد نظر بدست می‌آمد. بنابراین محیط آزمایش علاوه‌بر غلظت مورد نظر از مواد مورد تحقیق حاوی ۵ میلی‌مول کافئین و ۱۰ میکروگرم هپارین در میلی‌لیتر می‌شد.

پس از ذوب‌نمودن دو لوله ۰/۵ میلی‌لیتری از منی منجمد گاو هلشتاین در حمام ۳۷ درجه سانتیگراد، اسپرمها دو بار در محیط BO تحت تأثیر نیروی گریز از مرکز به مدت هر بار ۱۰ دقیقه و کششی حدود ۸۰۰ برابر قوه جاذبه شستشو شده و هر بار تمامی قسمت بالای آن دور ریخته شد (حدود ۰/۹۸). سپس بوسیله همان محیط پس از ارزیابی غلظت اسپرم در میلی‌لیتر غلظت مورد نظر تنظیم گردیده و مقدار کافی در قطره‌های دارای تخمک وارد گردید. تمام تخمکها ۲۰ تا ۲۴ ساعت بعد شستشو و در محیط یک قسمت اسید استیک در سه قسمت الکل اتیلیک بین لام و لامل ثابت گردید. در مراحل بعد توسط استواورسئین رنگ‌آمیزی گشته و بوسیله میکروسکوپ فاز کنتراست مورد ارزیابی قرار گرفت. تمام مواد شیمیایی از شرکت سیگما و تنها FCS از شرکت گیبکو تهیه گردید. هر گروه آزمایشی سه بار تکرار شد. تخمک‌هایی بارور تلقی می‌شدند که یکی از شرایط زیر را دارا باشند :

۱. وجود سر اسپرم متورم در داخل سیتوپلاسم

۲. وجود یک پیش هسته به همراه قسمت میانی دم اسپرم در داخل سیتوپلاسم

جدول ۱ - اثر مقادیر مختلف اسید هیالورونیک در محیط بدون پروتئین بر باروری آزمایشگاهی تخمکهای گاو

غلظت اسید هیالورونیک (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)	تعداد تخمک مورد آزمایش	جمع (٪)	تعداد تخمک بارورشده با سر اسپرم متورم	تعداد تخمک بارورشده* با پیش‌هسته‌های نر و ماده(٪)	باروری با* بیش از یک اسپرم(٪)
۰	۵۵	۰(۰)	۰	۰	۰
۰/۰۰۱	۵۳	۵(۹)	۰	۵(۱۰۰)	۱(۲۰)
۰/۰۱	۵۷	۵(۹)	۰	۵(۱۰۰)	۰
۰/۱	۶۰	۹(۱۵)	۰	۹(۱۰۰)	۰
۱	۵۰	۶(۱۲)	۰	۶(۱۰۰)	۰

* درصد تعیین‌شده از تعداد تخمکهای بارورشده محاسبه گردیده است

جدول ۲ - اثر مقادیر مختلف اسید هیالورونیک همراه با یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر پلی‌وینیل پیرولیدون در محیط بدون پروتئین بر باروری آزمایشگاهی تخمکهای گاو

غلظت اسید هیالورونیک (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)	تعداد تخمک مورد آزمایش	جمع (٪)	تعداد تخمک بارورشده با سر اسپرم متورم	تعداد تخمک بارورشده* با پیش‌هسته‌های نر و ماده(٪)	باروری با* بیش از یک اسپرم(٪)
۰	۶۷	۲۵(۳۷)[a]	۴	۲۱(۸۳)	۲(۱۰)
۰/۰۰۱	۶۲	۳۱(۵۰)	۴	۲۷(۸۷)	۶(۱۹)
۰/۰۱	۶۱	۳۹(۶۴)[b]	۲	۳۷(۹۵)	۳(۸)
۰/۱	۵۷	۳۲(۵۶)	۲	۳۰(۹۴)	۳(۹)

* درصد تعیین‌شده از تعداد تخمکهای بارورشده محاسبه گردیده است

a و b اختلاف معنی‌دار ($p<0/05$)

۳. وجود دو پیش هستک به همراه جسم قطبی دوم
۴. وجود بیش از یک سر اسپرم متورم (باروری پلی‌اسپرمی)
۵. وجود بیش از دو پیش هستک همراه قسمت‌های میانی دمهای اسپرم (باروری چند اسپرمی)

در تمام آزمایشها میزان باروری تخمکها و تخمکهای بارور شده با بیش از یک اسپرم بوسیله ANOVA مورد ارزیابی قرار گرفت. هر گاه این تست اثر معنی‌داری نشان می‌داد تیمارها بوسیله تست Duncan ارزیابی شد.

نتایج

همانطور که در جدول شماره ۱ آمده است، هنگامی که محیط باروری بدون پروتئین فاقد اسید هیالورونیک بود، هیچیک از تخمکهای گاو بارور نگردید. با افزایش مقادیر ۰/۰۰۱ تا ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اسید هیالورونیک میزان باروری بین ۹ تا ۱۵ درصد حاصل گردید. غلظت بالای اسید هیالورونیک یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر نتوانست باروری بهتری از غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر داشته باشد.

جدول شماره ۲ میزان باروری (نفوذ اسپرم گاو به داخل تخمک بالغ شده) این دام را در محیط بدون پروتئین حاوی یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر پلی‌وینیل پیرولیدون و غلظتهای مختلف اسید هیالورونیک نشان می‌دهد. در این حال با افزودن غلظتهای مختلف اسید هیالورونیک میزان باروری بین ۵۰ تا ۶۴ درصد حاصل شد. در این آزمایش بالاترین میزان باروری تخمک گاو توسط اسپرم این دام (۶۴٪) با اضافه‌نمودن ۰/۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اسید هیالورونیک در محیط دارای یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر پلی‌وینیل پیرولیدون بدست آمد که بطور معنی‌داری از محیط فاقد اسید هیالورونیک بیشتر بود ($p<0/05$).

بحث

نتایج آزمایش حاضر نشان می‌دهد که وجود اسید هیالورونیک در میزان باروری تخمکهای گاو توسط اسپرم این دام بطور مثبت تأثیر می‌گذارد. باویستر (۱۹۸۱ و ۱۹۸۲) نشان داد که حتی وجود ماکروملکولهایی که می‌تواند تحرک اسپرم را حفظ نمایند در باروری تخمک هامستر توسط اسپرم این حیوان بی‌اثرند. در صورتی که در آزمایش حاضر افزودن این ماکرومولکولها به محیط توانست اثر مثبتی بر تأثیر اسید هیالورونیک بگذارد.

در تحقیق قبل میزان بالایی (۹۳٪) از تخمکهای گاو که سلولهای کومولوس آنها دست‌نخورده بود در محیط بدون پروتئین بارور گردید، در حالیکه این باروری در تخمکهای بدون کومولوس تقریباً منفی بود. در بررسی حاضر با افزودن پلی‌وینیل الکل یا اسید هیالورونیک میزان باروری افزایش یافته و با ترکیبی از این دو باروری تا میزان ۶۴ درصد حاصل گردید که با میزان باروری تخمکهای تلقیح شده بدون کومولوس در محیطهای میزانهای مختلف BSA (۳۹ تا ۶۸٪) آزمایش یاد شده مشابه و در عین حال از میزان باروری تخمکهای بدون کومولوس در محیطهای مختلف توسط موچی زوکی و همکاران (۲۳ تا ۴۳٪) بالاتر است.

References

1. Bavister, B.D. Evidence for a role of post -ovulatory cumulus components in supporting fertilizing ability of hamster spermatozoa. J. Androl. 3: 365-372, (1982).
2. Bavister, B.D. Substitution of a synthetic polymer for protein in a mammalian gamete culture system. J. Exp. Zool. 217: 45-51, (1981).
3. Bavister, B.D. The effect of variations in culture conditions on the motility of hamster spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 98: 431-440, (1974).
4. Brackett, B.G. and Oliphant, G. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. Biol. Reprod. 12: 260-274, (1975).
5. Byrd, W. In vitro capacitation and the chemically induced acrosome reaction in bovine spermatozoa. J. Exp. Zool. 215: 35-46, (1981).
6. First, N.L. and Parrish, J.J. In vitro fertilization of ruminants. J. Reprod. Fertil., Suppl. 34: 151-165, (1987).
7. Fraser, L.R. Albumin is required to support the acrosome reaction but not the capacitation in mouse spermatozoa in vitro. J. Reprod. Fertil. 74: 185-196, (1985).
8. Fukui, Y. 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, (1990).

9. Fukui, Y., Urakawa, M., Sasaki, C., Chikamatsu, N. and Ono, H. Development to the late morula or blastocyst stage following in vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. Anim. Reprod. Sci. 18: 139-148, (1989).
10. Hillensjo, T., Sjogren, A., Strander, B. and Andino, N. Steroid secretion by cumulus cells isolated from human pre-ovulatory follicles. Acta Endocrinol. 108: 407-413, (1985).
11. Hoppe, P.C. and Whitten, W.K. An albumin requirement for fertilization of mouse eggs in vitro. J. Reprod. Fertil. 39: 433-436, (1974).
12. Lu, K.H., Gordon, I., Gallagher, M. and McGovern, M. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro. Vet. Rec. 121: 259-260, (1987).
13. Meizel, S., Pillai, M.C., Diaz-Perez, E. and Thomas, P. Initiation of the human sperm acrosome reaction by components of human follicular fluid and cumulus secretions including steroids. In: Bavister, B.D., Cummins, J. and Roldan, E.R.S. (eds.) Fertilizatiion in Mammals. Serono Symposia, Norwell, pp: 205-222, (1990).
14. Mochizuki, H., Fukui, Y. and Ono, H. Effects of the number of granulosa cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization and development of bovine oocytes. Theriogenology, 36: 973-986, (1991).
15. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A. and Rodwell, V.W. Harper's Biochemistry, Appleton & Lange, Norwalk, Connectcut/San Mateo, California, (1991).
16. Niva, K. and Ohgoda, O. Synergistic effect of caffeine and heparin on in-vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture. Theriogenology, 30: 733-741, (1988).
17. Niwa, K., Ohgoda, O. and Yuhara, M. Effects of caffeine in media for pretreatment of frozen-thawed sperm on in-vitro penetration of cattle oocytes. Proc. 11th Int. Congr. Anim. Reprod. AI, Dublin, (1988).
18. Parrish, J.J. 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, (1991).
19. Parrish, J.J., Susko-Parrish, J. and First, N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. Biol. Reprod. 41: 683-699, (1989).
20. Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., Winer, M.A. and First, N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin. Biol. Reprod. 38: 1171-1180, (1988).
21. Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., Leibfried-Rutledge, M.L., Critser, E.S., Eyestone, N.H. and First, N.L. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. Theriogenology, 25: 591-600, (1986).
22. Shioya, Y., Kuwayama, M., Fukushima, M., Iwasaki, S. and Hanada, A. In vitro fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro. Theriogenology, 30: 489-496, (1988).
23. Siiteri, J.I., Dandekar, P. and Meizel, S. Human sperm acrosome reaction-initiating activity associated with the human cumulus oophorus and mural granulosa cells. J. Exp. Zool. 246: 71-80, (1988).
24. Sullivan, R., Duchense, C., Fahmy, N., Morin, N. and Dionne, P. Protein synthesis and acrosome reaction-inducing activity of human cumulus cells. Human Reprod. 5(7): 830-834, (1990).
25. Tajik, P., Niwa, K. and Murase, T. 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, (1993).
26. Tesarik, J. Comparison of acrosome reaction-inducing activities of human cumulus oophorus, follicular fluid and ionophore A23187 in human sperm populations of proven fertilizing ability in vitro. J. Reprod. Fertil. 74: 383-388, (1985).
27. Xu, K.P., Greve, T., Callensen, H. and Hyttel, P. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized in vitro. J. Reprod. Fert. 81: 501-504, (1987).
28. Yanagimachi, R. Mechanism of fertilization in mammals. In: Mastroianni, Jr. and J.D. Biggers (eds.) Fertilization and Embryonic Development in vitro. Plenum Press, New York, pp: 81-182, (1981).
29. Yanagimachi, R. Mammalian fertilization. In: Knobit, E. and J.D. Neil (eds.) Physiology of Reproduction. Reven Press, New York, pp: 135-185, (1988).

Effect of hyaluronic acid in fertilization in vitro of cumulus-free bovine oocytes

Tajik P:

Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran - Iran.

Bovine oocytes matured in culture were denuded from cumulus cells with hyaluronidase and by repeat pipetting trough a fine pasture pipete and were inseminated with frozen-thawed spermatozoa in a protein-free BO medium containing 5m M-caffeine, 10µg heparin/ml and with or without polyvinyl pyrrolidone (PVP) and different concentrations of hyaluronic acid. When oocytes were inseminated in the absence of polyvinyl pyrrolidone, no penetration was observed in the absence of hyaluronic acid. However, 9 to 15% penetration was observed in the presence of 0.001 to 1 mg hyaluronic acid. Different

concentrations of hyaluronic acid did not significantly changed the penetration rates of oocyes. When polyvinyl pyrrolidone was added to the fertilization medium, higher penetration rates (50-64%) were observed in different concentrations of hyaluronic acid. In the presence of polyvinyl pyrrolidone, significant higher penetration rates ($p<0.05$) were observed in the presence of 0.01 mg/ml hyaluronic acid in the control (no acid). The results of the present study indicate that the presence of hyaluronic acid may have positive effect on oocyte penetration in vitro by bovine spermatozoa.

Key words : In vitro fertilization, Bovine, Hyaluronic acid