نشریه دامپزشکی
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۱۰۰، پاییز ۱۳۹۲

مقایسه روش های آزمایشگاهی IVF و Piezo–ICSI از نظر تکوین جنین در موش NMRI غیر همخون

• **محمدحسن متدین** (نویسنده مسئول)
عضو هیأت علمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
• **فاطمه توده دهقان**
عضو هیأت علمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
• **سوسن حقیقی**
عضو هیأت علمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

تاریخ دریافت: خرداد ماه ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش: دی ماه ۱۳۹۱
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۳۶۱۸۲۸۹
Email:m.motedayen@rvsri.ir

چکیده

برای انجام لقاح آزمایشگاهی IVF، از ۲۰ سرموش ماده نژاد غیرهمخون NMRI پس از ازدیاد تخمک گذاری، ۴۳۵ اووسیت در محیط M۲ حاوی ۴ درصد BSA جمع آوری شد که ۸۵ درصد (n=۳۷۰) از آن ها در فاز MII بودند. تعداد ۳۳۲ اووسیت در قطرک های محیط T۶ حاوی ۴ درصد BSA در مجاورت اسپرم های اپیدیدیمی در انکوباتور قرارگرفتند. میزان لقاح اووسیت ها ۷۹/۸ درصد (n=۲۶۵) مشاهده و ثبت گردید که ۲۷/۵ درصد (n=۷۳) از این سلول های لقاح یافته به مرحله جنینی مورولا، ۲۰/۸ درصد (n=۵۵) به مرحله جنینی بلاستوسیت رسیدند برای انجام پیزو -ICSI (ICSI -Piezo)، نیز از ۲۰ سر موش ماده نژاد NMRI سوپر اوله شده، استفاده شد. تعداد ۳۵۵ اووسیت در محیط M۲ حاوی ۴ درصد BSA جمع آوری شدند. ارزیابی ها نشان داد ۸۳ درصد (n=۲۹۵) از اووسیت ها در فاز MII بودند. با استفاده از دستگاه میکرو انجکشن پیزو، اسپرم های اپیدیدیمی به داخل سیتوپلاسم ۲۱۳ اووسیت فاز MII تزریق و سپس اووسیت ها انکوبه شدند. مشاهدات نشان داد (n=۱۳۳) ۶۲/۴ درصد از اووسیت ها پس از ریز تزریقی لقاح یافتند و ۱۴ درصد (n=۳۰) منحط شدند. ۳۹ درصد (n=۵۲) از سلول های لقاح یافته به مرحله مورولا، و ۱۲/۸ درصد (n=۱۷) به مرحله بلاستوسیت در محیط آزمایشگاه رسیدند. در این مطالعه، میزان باروری سلول های جنسی، رشد و بقای جنین های تولید شده در محیط آزمایشگاه مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان می دهند که با استفاده از تکنیک لقاح آزمایشگاهی (IVF) در موش آزمایشگاهی غیرهمخون- متعارف در شرایط معمول، میزان لقاح آزمایشگاهی افزایش یافته و جنین های آزمایشگاهی با کیفیت وکمیت بهتری تولید می شوند ضمن آنکه روشی آسان تر و مقرون به صرفه تر از روش میکرواینجکشن پیزو -ICSI است. بطور کلی پیشنهاد می شود در انجام تحقیقات از موش آزمایشگاهی غیر همخون NMRI که در شرایط متعارف به آسانی قابل تکثیر و نگهداری می باشند، برای دریافت تخمک و تولید جنین در فناوری باروری یاری شده (Assisted Reproduction Technology) استفاده گردد.

کلمات کلیدی: ریزتزریقی، پیزو-ICSI، لقاح آزمایشگاهی IVF، جنین آزمایشگاهی، موش آزمایشگاهی غیرهمخون

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 100 pp: 10-15

Comparison of two IVF and Piezo-ICSI experimental methods from standpoint of embryo development in outbred NMRI mouse

By: M. H. Motedayen, (Corresponding Author; Tel: +989123618289), F. Todehdehghan and Sousan Haghighi, Members of Scientific Board of Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj Iran.

Received: June 2010 **Accepted: January 2012**

In order to do *in vitro* fertilization (IVF), 435 oocytes were collected from 20 super ovulated NMRI female mice, in M2 media with 4% BSA. 85% (n=370) of collected oocytes were in MII phase. Epididymal sperms were added to 332 oocytes in T6 media drops with 4% BSA and incubated. Fertilization rate was 79.8% (n=265) out of which 27.5% (n=73) grew to morula and 20.8% (n=55) achieved blastocyst stages.For Piezo- intracytoplasmic sperm injection (Piezo-ICSI), 20 super ovulated female mice were sacrificed and 355 oocytes were collected in M2 media with 4% BSA. 83% (n=295) of collected oocytes were in MII phase. Epididymal sperms were piezo-injected to cytoplasm of 213 MII oocytes and incubated. 62.4% (n=133) of injected oocytes were fertilized and 14% (n=30) degenerated. 39% (n=52) of fertilized cells grew to morula and 12.8% (n=17) to blastocyst stages embryos at laboratory conditions. In this study the fertilization rate of gametes, growth and survival rate of laboratory embryos were evaluated *in vitro*. Results show higher fertilization rate and the laboratory embryos with desirable quality and quantity were obtained by the use of IVF technique from conventional-outbreed laboratory mouse, that is economical and easy as compare to Piezo-ICSI. However, outbred laboratory NMRI mouse that can be easily bred and kept in conventional conditions is recommended for use in oocyte recovery and embryo production in assisted reproductive technology.

Keywords: Piezo- ICSI, IVF, Mouse embryo, Outbreed laboratory mouse

مقدمه

میزان تخمک گذاری، رشد جنین و باروری آزمایشگاهی در نژاد های موش های آزمایشگاهی مختلف، متفاوت است(۱۰، ۲۴) و اغلب اطلاعات موجود در مورد باروری موش های آزمایشگاهی همخون است (۲۴) که تکثیر و نگهداری آن ها نیاز به محیط، فضا و دقت بیشتری دارد. تکنیک های ریز تزریقی اسپرم (Intracytoplasmic Sperm Injection, ICSI)، لقاح آزمایشگاهی (In vitro Fertilization, IVF) در زمینه های بیوتکنولوژی تولیدمثل و جنین شناسی، جزء روش های اختصاصی و انتخابی می باشند. تکنیک های سوپراوولاسیون و لقاح آزمایشگاهی از سالیان دور انجام می گرفته و به ویژه دهه های ۱۹۵۰ و ۱۹۶۰ دوره طلائی برای این تکنیک ها در خرگوش نام گرفته است (۵). با این حال بدلیل عوامل بسیار زیادی که بر نتیجه کار لقاح آزمایشگاهی موثر هستند. موفقیت در این تکنیک ها همواره دچار نوسان بوده و بر روی عوامل تاثیرگذار مختلف مانند گونه های مختلف حیوانات (۲۴، ۲۶)، محیط های شیمیائی (۲، ۳، ۹، ۱۴، ۲۲)، عوامل فیزیکی موثر برروی فرآیندها و همچنین ساخت تجهیزات جدید کارهای تحقیقاتی مختلفی انجام می گردد تا نتایج را بهبود بخشند (۱۲، ۱۸). روش های باروری آزمایشگاهی عمدتاً به عنوان راه کار ویژه برای ارزیابی سلول های جنسی و پارامترهای تولیدمثلی حیوانات آزمایشگاهی، تولید و نگهداری حیوانات مدل که امکان تولید و نگهداری آنها مشکل و یا برای زمانی غیرضروری می باشند و همچنین در درمان ناباروری ها و پژوهش های نوین به خصوص برای اصلاح نژاد دام های بزرگ و مقاوم سازی حیوانات تولیدی در مقابل بیماری ها، استفاده می شوند. هدف از انجام این مطالعه ارزیابی تکنیک های ICSI و IVF برای تولید جنین موش در شرایط آزمایشگاهی و به منظور بررسی و کنترل پارامترهای تولیدمثلی موش های آزمایشگاهی غیر همخون و ایجاد شرایطی مناسب برای تولید حیوانات آزمایشگاهی که تولید آنها مشکل و یا غیرممکن است، می باشد. علاوه بر آن از این روش ها می توان برای تولید حیواناتی با ساختار ژنتیکی یکنواخت و مشخص و یا دارای میکرو فلورهای متفاوت استفاده نمود. لذا دستیابی به تکنیک های مذکور و بررسی کار آمدی آن ها می تواند زمینه های نوینی را در تولید حیوانات آزمایشگاهی مورد نیاز موسسه ها، مراکز علمی، پژوهشی و درمانی کشور فراهم آورد و نژاد های حیواناتی که در کشور به آسانی در دسترس و قابل تکثیر و نگهداری است را برای استفاده در دستکاری جنین و فناوری تولیدمثل معرفی نماید.

مواد و روش کار

مواد و محیط های مورد استفاده در این مطالعه از شرکت سیگما خریداری شده و گرید آنها مخصوص جنین بود. برای انجام آزمون های IVF و ICSI تعداد ۴۰ سر موش ماده جفت نخورده ۸-۷

هفتــه ای، از نــژاد NMRI) National Medical Research Institute) انتخــاب و بــه طور تصادفی به دو گروه مســاوی ۲۰ تایی تقسیم شدند. برای استحصال اسپرم، از بین موش های نر بالغ با سابقه جفت خوردگی نژاد NMRI، ۸ سر بطور تصادفی انتخاب و در هر نوبت آزمایش یک سر از آنها تصادفاً برای تهیه اسپرم استفاده گردید.

مــوش های تحت آزمایش، در شــرایط متعارف دمای ۲±۲۲ درجه ســانتی گراد رطوبت ۵± ۵۰ درصد و تعویض هوا ۱۲-۱۰ بار در ساعت، تغذیه اســتاندارد از پلیت تهیه شــده در موسســه تحقیقات واکســن و سرم سازی رازی کرج و آب لوله کشی به مقدار کافی نگهداری شدند.

برای کســب تخمک بیشــتر، موش های ماده قبل از استفاده سوپر اوولـه شدند و ۲۰ سر از آنها برای اخذ اووسیت و انجام IVF و ۲۰ سر دیگر نیز برای کســب اووســیت و انجام ICSI در ۴ نوبت آزمایش (هر نوبت ۵ ســر) برای IVF و چهار نوبت مجزا برای انجام ICSI اســتفاده شدند.

برای سوپراوولاســیون موش های ماده، به ترتیب بوســیله هورمون هایPMSG و HCG در دوزهای IU ۸ و به فاصله ۴۸-۴۶ ساعت به صورت داخل صفاقی تزریق شدند. برای تهیه اووسیت ۱۶-۱۳ ساعت پــس از تزریق HCG، اوویداکت هــا از تخمدان ها و لوله های رحمی موش های ماده سوپر اوولـه شده جدا و در قطرهای محیط M۲ حاوی BSA ۴ mg/ml داخــل پتــری دیش ها (بر روی گــرم کن ۳۸-۳۷ درجه ســانتی گراد) قرار داده شــدند. سپس این پتری ها را به زیر لوپ برده و با ایجاد شکاف در قسمت برجستگی شفاف، اووسیت ها به درون محیط رها شــدند و بعد اووســیت ها به قطرات محیط T۶حاوی mg/ml BSA ۱۵ منتقل و تا زمان افزودن اســپرم، در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و CO_2 ۵ درصد انکوبه شدند.

برای اسپرم گیری در هر نوبت از آزمایش، یک جفت اپیدیدیم موش نــر جــدا و به محیط T۶ حاوی BSA ۱۵ mg/ml که بر روی ســطح گرمکن ۳۸-۳۷ درجه ســانتی گراد قرار داشــت وارد گردید. سپس به مدت ۴۵ دقیقه تا یک ســاعت در داخــل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO_2 قرار داده شد تا اسپرم ها از اپیدیدیم ها به داخل محیط رها و ظرفیت پذیر شوند (۱۰). بلافاصله پس از انکوباسیون، ارزیابی میکروسکوپی بر روی اسپرم های رها شده انجام گردید و بدون اینکه ذخیره سازی در مورد آنها اعمال گردد به قطره های حاوی تخمک اضافه شدند.

پس از اضافه کردن µL ۱۰ اسپرم (تراکم اسپرم mL/ $۲/۷ \times ۱۰^۶$) به قطره های حاوی اووسیت در محیط T۶ حاوی BSA ۱۵ mg/ml و انکوباسیون آن ها، مراحل تشکیل زیگوت و رشدجنین ها به مدت ۴-۳ روز مشاهده و بررسی گردید. ۷- ۵ ساعت پس از مجاورت تخمک ها با اسپرم، اووسیت های لقاح یافته دارای دو پیش هسته و پولار بادی و حدود ۲۵-۲۲ ساعت بعد، جنین های دو و چهار سلولی مشاهده شدند سپس این جنین ها در قطرات محیط کشت خودشان شستشو و بعد به قطرات محیط G۲ منتقل شــدند. جنین های هشــت سلولی حدود ۴۸ ساعت بعد و جنین های مورولا و بلاستوسیت های اولیه حدود ۷۲ ساعت بعد و بلاستوسیت های پیشرفته حدود ۹۶ ساعت بعد رؤیت شدند. برای انجام ICSI نیز پس از اخذ اسپرم از اپیدیدیم موش نر و انکوباسیون به مدت ۴۵ دقیقه تا یک ساعت و قطع دم اسپرم توسط بازوی پیزو، ریزتزریقی ســر اسپرم به سیتوپلاسم اووسیت های فاز MII به روش پیزو- ICSI انجام گرفت. سپس سلول های تزریق شده به محیط T۶حاوی mg/ml BSA ۱۵ منتقل و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO_2 قرار گرفتند و حدود ۲۴ ســاعت بعد از ICSI ، جنین های دو ســلولی تشــکیل شده به قطرات محیط G۲ منتقل شدند. باروری و رشد جنین های تشکیل شده به مدت ۴-۳ روز مورد بررسی و با نتایج حاصل ازگروه IVF مقایســه شد. ارزیابی جنین های حاصل از دو تکنیک ریز تزریقی و لقاح آزمایشــگاهی بر اســاس مورفولوژی سیتوپلاسم و دیواره سلولی، صورت گرفت و سپس نسبت جنین های زنده، رشد کرده که به مرحله بلاستوســیت رسیده به کل اووســیت ها و مورولاها در هرگروه محاسبه شــدند و نتایج بدست آمده با روش کای اسکور (X^2) در P<۰/۰۰۱ و P> ۰/۰۵ مورد مقایسه آماری قرار گرفتند (۱۵).

نتایج

مشــاهدات نشــان داد از ۴۳۵ اووســیت حاصلــه از ۲۰ ســرموش آزمایشــگاهی سوپراوولـه شده ۸۵ درصد (n=۳۷۰)، در فاز سلولی MII بودند. در لقاح آزمایشــگاهی IVF ، از مجاورت اسپرم های اپیدیدیمی با ۳۳۲ اووسیت درمحیط آزمایشگاه ۷۹/۸ درصد (n=۲۶۵)، از اووسیت ها لقاح یافتند. ۲۷/۵ درصد (n=۷۳) از سلول های لقاح یافته به مرحله جنینی مورولا رســیدند و ۲۰/۸ درصــد (n=۵۵) نیز به مرحله جنینی بلاستوسیت نائل آمدند (جدول ۱).

در آزمایش ICSI، از ۲۰ ســر موش ماده نژاد NMRI ســوپر اوولـه شده، تعداد ۳۵۵ اووسیت جمع آوری شد. ارزیابی ها نشان دادند که ۸۳ درصد (n=۲۹۵) از اووســیت ها در فاز MII بودند. مشاهدات نشان داد در نتیجه ریزتزریقی اســپرم های اپیدیدیمی به داخل سیتوپلاسم ۲۱۳ اووسیت فاز MII، ۶۲/۴ درصد ۱۴درصد (n=۳۰) از اووسیت ها پس از ریز تزریقی منحط شدند و (n=۱۳۳) لقاح یافتند. ۳۹ درصد (n=۵۲) از اووسیت های لقاح یافته به مرحله جنینی مورولا و ۱۲/۸ درصد (n=۱۷) نیز به مرحله بلاستوسیت رسیدند (جدول ۲).

بحث

تولید جنین آزمایشگاهی با استفاده از روش های لقاح آزمایشگاهی و ریزتزریقی ، از راه های اصولی و نوین در حوزه بیوتکنولوژی تولیدمثل است. برای تولید جنین آزمایشگاهی با کیفیت وکمیت مطلوب، راه کار های متفاوتی در مراحل مختلف رشد جنینی وجود دارد. از زمان انجام اولین لقاح آزمایشــگاهیIVF (۵) تا به امروزکه منتــج به راه اندازی و استفاده از تکنیک هایی همچون ICSI متعارف (۲۴)، پیزو-ICSI (۲۰) و ICSI لیزری (۱) شده است دستکاری ها، تحولات تکنیکی وتغییرات شــرایط محیطی زیادی صورت گرفته اســت. در این مطالعه از دو روش IVF و ICSI - پیزو برای تولید جنین آزمایشگاهی موش استفاده شد. ارزیابی ها نشــان داد در روش IVF ، ۸۵ درصد (n=۳۷۰) از اووســیت های جمع آوری شده از موش NMRI در فاز متافاز دو (MII) بودند و این میزان در روش ICSI، ۸۳ درصد (n= ۲۹۵) محاسبه شد. گزارشات نشان می دهد قابلیت تخمک گذاری و رسیدن به فاز متافاز دو (MII)

جدول ۱- میزان اووسیت ها و جنین های آزمایشگاهی حاصل از دو روش IVF و ICSI در موش آزمایشگاهی NMRI

پارامترها	IVF	ICSI
تعداد موش های استفاده شده برای اخذ اووسیت (سر)	۲۰	۲۰
تعداد اووسیت های جمع آوری شده	۴۳۵	۳۵۵
تعداد و درصد اووسیت های فاز MII	(۸۵ درصد) ۳۷۰	(۸۳ درصد) ۲۹۵
تعداد اووسیت های استفاده شده	۳۳۲	۲۱۳
تعداد و درصد اووسیت های دژنره شده پس از ICSI	-	(۱۴درصد) ۳۰
تعداد اووسیت های لقاح یافته (۲PN* دار)	۲۶۵	۱۳۳
تعداد و درصد مورولاهای بدست آمده	(۲۷/۵ درصد) ۷۳	(۳۹ درصد) ۵۲
تعداد بلاستوسیت های بدست آمده	۵۵	۱۷

* اووسیت ها در مرحله دو پیش هسته (Two pronuclear) هستند.

جدول۲- مقایسه میزان لقاح و بلاستوسیت های حاصل از دو روش IVF و ICSI

پارامترها	IVF	ICSI	مقایسه آماری
تعداد اووسیت های استفاده شده	۳۳۲	۲۱۳	-
درصد اووسیت های لقاح یافته (۲PN* دار)	٪ ۷۹/۸ [a]	٪ ۶۲/۴ [b]	P<۰/۰۰۱
درصد بلاستو سیت های بدست آمده	٪ ۲۰/۸ [c]	٪ ۱۲/۸ [d]	P>۰/۰۵

* اووسیت ها در مرحله دو پیش هسته (Two pronuclear) هستند.

a و b در P < ۰/۰۰۱ با هم اختلاف معنی دار دارند.

c و d با هم اختلاف معنی دار ندارند (P > ۰/۰۵).

در نژاد ها و شـرایط آزمایشگاهی مختلف، متفاوت است (۱۹، ۲۶، ۲۷). میزان لقاح اووسیت ها در روش IVF ۷۹/۸ درصد (n=۲۶۵) بود که در مقایسـه با روش ICSI ۶۲/۴ درصـد (n=۱۳۳) در P<۰/۰۰۱ اختلاف معنی داری نشـان دادند. میزان رسـیدن اووسـیت های لقاح یافته به مرحله جنینی بلاستوسـیت در دو روش IVF و ICSI به ترتیب ۲۰/۸ (n=۵۵) و ۱۲/۸درصـد (n=۱۷) بـود اگر چه در مقایسـه آماری در P >۰/۰۵ اختـلاف معنی داری ندارند ولی باید یادآور شـد که در تکنیک هـای IVF و ICSI حتی اختلاف داشـتن یک جنیـن خوب نیز حائز اهمیت بوده و ممکن است منتج به تولد نوزاد مورد نظر شود.

در تحقیقات گزارش شده میانگین میزان موفقیت لقاح آزمایشگاهی ۶۰ درصد (صفر تا ۱۰۰ درصد) بوده که با نرخ بدسـت آمده در این تحقیق متفـاوت اسـت (۴، ۱۶، ۲۱، ۲۲) این اختلافات را می تـوان به میزان ظرفیت پذیر بودن اسـپرم های اسـتفاده شده (۱، ۶، ۷، ۹)، تاثیر دما و نور اضافی درموقع انجام کار (۴، ۱۲، ۲۵) زیاد شـدن فاصله زمانی بین معدوم کردن حیوان و برداشت اووسیت (۱۶)، کیفیت محیط کشت (۲، ۳، ۹، ۱۴، ۲۲)، میزان لقاح پذیر بودن تخمک ها (۲۱)، تراکم تخمک در قطره های لقاح (۱۶، ۲۱) تجربه کاری و تجهیزات آزمایشـگاهی ارتباط داد. گزارشات نشان می دهند برای انجام ICSI موفق در موش، از روش ریزتزریقی پیزو به جای ریزتزریقی متعارف اسـتفاده می شـود و میزان بقای اووسـیت های تزریق شده و درصد بلاستوسیت های بدست آمده مناسب اعلام شده است (۲۰، ۲۶). میزان بقای اووسیت های تزریق شده (توسط دستگاه مجهز به پیزو) در مطالعه ما در مقایسه با مطالعات دیگر اختلاف معنی داری ندارد (۲۶) که شـاید به دلیل تجهیزات و شـرایط مناسب آزمایشگاهی و مهارت و تجربه کاری فرد تزریق کننده باشد، ولی میزان رسیدن اووسیت های تزریق شده به مرحله جنینی بلاستوسیت در محیط آزمایشـگاه با نتایج گزارش شـده محققین دیگر تفاوت دارد (۲۵، ۲۶، ۲۹، ۳۲) به نظر می رسد این امر به علت اختلاف در نژاد موش (۲۶) شرایط نور، دمای محیط کار و ترکیبات محیط کشت سلولی باشد (۱۹، ۲۷). متداول ترین نژاد های مورد اسـتفاده برای اخذ و دستکاری جنین در دنیا ، موش های هم خون

FVB/N,C57BL6 x C3H F1s C57/BL6 x SJL F1

هسـتند (۲۴) کـه در ایـران تولیـد نمی شـوند و شـرایط تکثیر و نگهـداری آنهـا نیز مشـکل اسـت. بطـور کلی بـا توجه بـه نتایج بدسـت آمـده بـه نظر می رسـد مـوش غیـر همخـون NMRI از نظر باروی آزمایشـگاهی نژاد مناسـبی بوده و پیشـنهاد می شـود در زمینه های مختلف بیوتکنولوژی تولیدمثل در کشور استفاده گردد.

منابع مورد استفاده

1-Aitken, R. J., Harkiss, D., Knox, W., Paterson, M. and. Irvine, D. S (1998) A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterized by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. *Journal of Cell Science,* 111, 645-656.

2- Anahita, V., Asilian, A., Khalesi F., Khodami, L. and Shahtalebi, M.A. (2005) Caffeine effect in treatment of *Pezoriazis volgaris*: Randomal clinical experimental work, *Seasonal Journal of Skin Diseases*, 181(6), 465-62.

3- Aparicio, N. J. (1979) Therapeutical use of pentoxiphylline in disturbed male fertility. *Singapore Med*. J. 20 (suppl 1): 43-51.

4- Barlow, P., Puissant, F., Van der Zwalmen, P., Vandromme, J., Trigaux, P. and Leroy, F. (1992) *In vitro* fertilization, development and implantation after exposure of mature mouse oocyte to visible light. *Mol. Reprod. Dev*. 33(3), 297-302.

5- Bavister, BD. (2002) Early history of *in vitro* fertilization. *Reproduction*, 124,181-96.

6- Brackett, BG. and Oliphant, G (1975) Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biology of Reproduction*, 12, 260-74

7- De Lamirande, E., Leclerc, P. and Gagnon, C. (1997) Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization, *Molecular Human Reproduction*. 3(3), 175–94.

8- Dinnyés, A., Dai, Y., Barber, M., Liu, L., Xu, J., Zhou, P. and Yang, X. (2001) Development of cloned embryos from adult rabbit fibroblasts: Effect of activation treatment and donor cell preparation. *Biology of reproduction*, 64, 257-263.

9- Fornier,V., Leclerc, P., Cormier, N. and Bailey, J. (2003) Implication of calmodulin-dependent phosphodiesterase type 1 during bovine sperm capacitation. *J. Androl*. 24, 104–12.

10- Gardner, D. A., Weissman, A., Howles, C. M. and Shoham, Z. (2001) Text book of Assisted Reproductive Techniques, *Laboratory and Clinical Perspectives*, 99,106, 223-32.

11- Garty, NB, and Salomon, Y. (1987) Stimulation of partially purified adenylate cyclase from bull sperm by bicarbonate. *FEBS Lett.* 218,148–52.

12- Hegele-Hartung, C., Schumacher, A. and Fischer, B. (1991) Effects of visible light and room temperature on the ultrastructure of preimplantation rabbit embryos: A time course study. *Anat. Embryol.* (Berl), 183(6),559-71.

13- Heyman, Y. (1988) Timing of transplantation and success of pregnancy in mammals. *Reprod. Nutr. Develop*. 28(6B), 1773-80.

14- Homonnai, Z.T., Paz G., Sofer, A., Kraicer P. F. and Harell, A. (1976) Effect of caffeine on the motility, viability, oxygen consumption and glycolytic rate of ejaculated human normokinetic and hypokinetic spermatozoa. *Int. J. Fertil*. 21(3),162-70.

15- http://math.hws.edu/javamath/ryan/ChiSquare.htm

16- Khurana, N.K. and Niemann, H. (2000) Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology*, 54(5), 741-56.

17- Kusakabe, H., Szczygiel, M.A., Whittingham, D.G., and Yanagimachi, R. (2001) Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. *Applied Biological Sciences*, 98(24), 13501-6.

18- Granot, I. and Dekel, N. (2001) Preparation and evaluation of oocytes for ICSI, P. 99-106. In textbook of assisted reproductive techniques, Laboratory and Clinical Perspectives. By Dunitz, M.

19- Khosla, S., Dean, W., Brown, D., Reik, W., and Feil, R. (2001) Culture of preimplantation mouse embryos affects fetal development and the expression of imprinted genes. *Biology of Reproduction,* 64, 918-926.

20- Kimura, Y. and Yanagimachi, R. (1995) Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biology of Reproduction*, 52, 709-720.

21- Lane, M. and Gardner, DK. (1992) Effect of incubation volume and embryo density on the development and viability of mouse embryos *in vitro*. *Human Reproduction*, 7(4): 558-562.

22- Loutradis, D., Drakakis, P., Kallianidis, K., Sofikitis, N., Kallipolitis, G., Milingos, S., Makris, N. and Michalas, S. (2000) Biological factors in culture media affecting *in vitro* fertilization, pre implantation, embryo development and implantation. *Annals of the New York Academy of Science*, 900,325-335.

23- Sakkas, D. (2001) Evaluation of embryo quality: a strategy for sequential analysis of embryo development with the aim of single embryo transfer. P. 228-229 in Textbook of assisted reproductive techniques. *By Martin*, D.Z.,UK.

24-Taketo, M., Schroede,r A. C., Mobraaten, L. E., Gunning, K. B., Hanten, G., Fox, R. R., Roderick, T. H., Stewart, C. L., Lilly, F. and Hansen, C. T. (1991) FVB/N: An inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proc Natl Acad Sci* U S A, 88(6): 2065–- 69.

25- Tucker, KE. and Jansen, CAM. (2002) Really, just how important is the level of room lighting in the IVF laboratory on embryo development? Proceedings 2nd international workshop for embryologists.

26- Szczygiel, M.A., et al. (2002) Intracytoplasmic sperm injection is more efficient than *in vitro* fertilization for generating mouse embryo from cryopreserved spermatozoa. *Biology of Reproduction* 67, 1278-84.

27- Yamano, S., Nakagawa, K., Nakasaka, H. and Aono, T. (2000) Fertilization failure and oocyte activation. *J. Med. Invest*., 47, 1-8.