

تاثیر هپارین در باروری اسپرم، لقاح تخمک و تولید رویان‌های دوسلولی موش NMRI در محیط کشت

فاطمه توده دهقان^{۱*}، نرگس نبوی^۲ و عبدالحسین شیروی^۲

^۱ کرج، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، بخش جانوران سمی و تهیه پادزهر

^۲ دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، گروه زیست‌شناسی

تاریخ پذیرش: ۹۲/۵/۲۱

تاریخ دریافت: ۹۰/۴/۴

چکیده

هپارین بعنوان بهبود دهنده باروری اسپرم و تکوین جنین در برخی از گونه‌های حیوانی، شناخته شده است. لقاح آزمایشگاهی در موش بعنوان یک آزمایش استاندارد برای مطالعات باروری یاری شده تعیین شده است. به منظور بهینه نمودن این آزمایش، در مطالعه حاضر اثر محیط‌های M16 و T6 هپارین دار (۱۰ μg/ml) و بدون هپارین بر پارامترهای باروری اسپرم و تخمک شامل تعداد، میزان تحرک و بقای اسپرم، میزان لقاح پذیری تخمک‌ها و تکوین زیگوت‌ها تا مرحله دوسلولی در موش غیر همخون NMRI، مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌ها از نظر تاثیر هپارین در دو گروه آزمایش و شاهد نشان داد که میزان لقاح در محیط T6 ($P < 0.001$) و تکوین زیگوت‌ها به رویان‌های دوسلولی در محیط M16 ($P < 0.001$) با همدیگر اختلاف معنی‌دار دارند. همچنین در مقایسه دو محیط کشت از نظر تحرک و بقای اسپرم محیط M16 ($P < 0.05$) و از نظر میزان لقاح تخمک‌ها و تعداد رویان‌های دوسلولی، محیط T6 مطلوب‌تر ($P < 0.001$) از دیگری است. بطور کلی می‌توان گفت که محیط M16 بویژه هپارین دار آن بهتر از محیط T6 (با و بدون هپارین) برای افزایش تحرک و بقای اسپرم و محیط T6 هپارینه مناسب‌تر از محیط T6 بدون هپارین و M16 (با و بدون هپارین) از نظر موفقیت لقاح آزمایشگاهی در موش غیر همخون NMRI عمل می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: هپارین، تخمک، اسپرم، رویان دوسلولی، موش NMRI

* نویسنده مسئول، تلفن: ۴۶-۴۵۷۰۰۳۸-۰۲۶۱، پست الکترونیکی: f.todehdehghan@rvsri.ac.ir

مقدمه

فناوری باروری یاری شده است (۱۷، ۱۳، ۱۰، ۵، ۴) اشاره کرد. از سیستم‌های کشت همزمان جنین با سلول‌های حاصل از دستگاه تولید مثل و یا رده‌های سلولی دیگر نیز استفاده شده است (۴، ۵) که این سیستم‌ها با دلیل صرف وقت و هزینه بالا مقرون به صرفه نیستند. ساده بودن محیط، عملکرد مطلوب و قابلیت رشد مناسب جنین در مطالعات جنینی و باروری آزمایشگاهی حائز اهمیت است. محیط‌های کشت با ترکیبات شیمیایی مشخص (۱۶) و یا دارای قدرت یونی بالا (۶)، کلسیم یونوفور (۳، ۸) کافئین (۱۵، ۲۱، ۲۲) و هپارین (۲، ۱۴، ۲۰، ۲۱، ۲۵) باعث القاء

به کارگیری محیط‌های متفاوت کشت و همچنین تفاوت در گونه‌های جانوری و مراحل تکاملی جنین، می‌تواند منجر به پدید آمدن نتایج متفاوتی در مطالعات شود. به منظور شناخت و مطالعه باروری آزمایشگاهی و تکوین جنین، محیط‌های کشت مختلفی طراحی شده است. پس از ارائه محیط کشت BMOC توسط برینستر در سال ۱۹۶۵، برای رشد تخمک محیط کشت‌های دیگری طراحی و ارائه شدند که می‌توان به محیط کشت تغییر یافته Witten (۲۸) و محیط‌های M16، T6، CZB و KMSO که هنوز بطور گسترده‌ای مورد مصرف در

برای تهیه تخمک، تعداد ۳۶ سر موش ماده نژاد NMRI ۷-۸ هفته، جفت نخورده به طور تصادفی انتخاب شدند و در آنها سوپر اوولاسیون القاء گردید (۱). برای ایجاد سوپراوولاسیون و افزایش تخمک‌گذاری، موش‌های ماده به ترتیب بوسیله هورمون‌های PMSG و HCG در دزهای مساوی ۸IU و به فاصله ۴۸-۴۶ ساعت به صورت داخل صفاقی (ip) تزریق شدند.

برای استحصال تخمک، ۲۴ ساعت پس از تزریق HCG، موش‌ها با کشتش گردنی معدوم شدند و اوویداکت آنها جدا و در قطره‌های محیط M16 و T6 حاوی ۴ mg/ml BSA که بر روی وارمر 37°C قرار گرفته بود منتقل شدند. پس از ایجاد شکاف در قسمت برجستگی آمپولا، تخمک‌ها به درون محیط رها و در زیر میکروسکوپ معکوس (invert) جمع‌آوری و شمارش شدند.

برای تهیه اسپرم، تعداد ۳۴ سر موش نر بالغ، نژاد NMRI با سابقه جفت‌خوردگی، بطور تصادفی انتخاب و مورد استفاده قرار گرفتند. بعد از کشتن موش به روش کشتش گردنی، اپیدیدیم‌های آنها جدا و در محیط‌های M16 و T6 هپارین دار ($10\mu\text{g/ml}$) (گروه آزمایش) و بدون هپارین (گروه شاهد)، جمع‌آوری شدند، سپس به مدت ۴۵ دقیقه تا یک ساعت در انکوباتور در دمای 37°C و $5\% \text{CO}_2$ قرار داده شدند تا اسپرم‌ها به روش swim up داخل محیط رها و ظرفیت‌پذیر شوند. تمامی محیط‌های کشت آزمایش و شاهد حاوی BSA (4 mg/ml) بودند. تعداد اسپرم‌ها با استفاده از هموسایتومتر شمارش شد و سپس تحرک و بقای آن‌ها در زیر میکروسکوپ مورد مطالعه قرار گرفت (۱۲).

برای بررسی میزان لقاح آزمایشگاهی (IVF) و تکوین رویان‌ها، ده میکرولیتر از اسپرم تهیه شده به هریک از محیط‌های M16 و T6 با و بدون هپارین، حاوی تخمک اضافه شد و پس از انکوباسیون در دمای 37°C و $5\% \text{CO}_2$ ،

ظرفیت‌پذیری و افزایش باروری آزمایشگاهی اسپرم می‌شوند. مطالعات نشان داده است ظرفیت‌پذیری اسپرم تحت شرایط کشت آزمایشگاهی نیازمند زمان است. در سال ۱۹۸۸ پریش و همکاران اعلام کردند ظرفیت‌پذیری اسپرم انزالی گاو در حضور هپارین طی مدت ۴ ساعت انجام می‌پذیرد که ممکن است با القاء واکنش آکروزومی، لقاح آزمایشگاهی مناسبی را در پی داشته باشد. از طرفی پریش و همکاران در سال ۱۹۸۶ با پیش‌انکوبه کردن اسپرم‌های منجمد و ذوب شده در حضور هپارین به مدت ۱۵ دقیقه، باعث افزایش میزان لقاح آزمایشگاهی شدند، حال آنکه اکسو و گرو (۱۹۸۸) نشان دادند تحت همین شرایط، اسپرم‌ها ۶ ساعت پس از ورود به محیط کشت، شروع به نفوذ به داخل اووسیت می‌کنند. در مطالعه نیوا و اوگودا (۱۹۸۸) با مجاور کردن اسپرم‌های منجمد و ذوب شده با اووسیت‌ها در محیط حاوی مخلوط کافئین و هپارین، نفوذپذیری اسپرم‌ها به داخل تخمک در محیط لقاح به میزان قابل توجهی در مقایسه با محیط‌های حاوی کافئین و یا هپارین، افزایش می‌یابد. (۲۱،۲۳). از آنجائی که لقاح آزمایشگاهی در موش بعنوان یک آزمایش استاندارد برای مطالعات باروری یاری شده تعیین شده است (۱۱،۲۸). محققین همواره تلاش بر بهینه نمودن کیفیت و کمیت میزان لقاح و تکوین جنین در موش آزمایشگاهی دارند. لذا در مطالعه حاضر اثر همزمان هپارین و محیط‌های کشت M16 و T6 که مصرف بالایی در تحقیقات تولید مثلی دارند بر روی باروری آزمایشگاهی از نظر تاثیر بر تحرک و بقای اسپرم، لقاح آزمایشگاهی و رشد رویان‌ها تا مرحله دوسلولی در موش آزمایشگاهی نژاد NMRI مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

مواد و روشها

تمامی مواد و محیط‌های مورد استفاده در این مطالعه از شرکت سیگما و درجه مخصوص جنین (Embryo graded) خریداری گردید.

متوسط تحرک اسپرم در دو گروه با و بدون هپارین به ترتیب $10/4 \pm 7/7\%$ و $24/3 \pm 1/16\%$ و میزان بقای اسپرم نیز به ترتیب $5/8 \pm 1/7\%$ و $14/5 \pm 4/9\%$ بود که اختلاف معنی‌داری با همدیگر نداشتند ($P > 0.05$).

میزان لقاح آزمایشگاهی در محیط M16 آزمایش (هپارین دار) $20 \pm 3/35\%$ و در گروه شاهد (بدون هپارین) $24/6 \pm 37/5\%$ و میزان رسیدن زیگوت‌ها به مرحله دوسلولی به ترتیب $15/7 \pm 8/8\%$ و $10 \pm 50\%$ بود که از نظر تکوین زیگوت‌ها به رویان‌های دوسلولی گروه آزمایش اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نشان داد. ($P < 0.001$) (جدول ۲).

در محیط T6 با و بدون هپارین تعداد اسپرم به ترتیب $4/75 \times 10^6 / ml$ و $2/9 \times 10^6 / ml$ محاسبه گردید و میزان دو فاکتور تحرک و بقای اسپرم حاوی هپارین به ترتیب $37/7 \pm 12/5\%$ و $44/7 \pm 10\%$ و در گروه بدون هپارین نیز به ترتیب $37/2 \pm 19/8\%$ و $47/9 \pm 14/5\%$ بود که اختلاف معنی‌داری در بین آنها مشاهده نگردید ($P > 0.05$) (جدول ۱).

میزان لقاح و مراحل رشد رویان‌ها به مدت ۲۶-۲۴ ساعت در هر دو محیط، مورد بررسی قرار گرفت.

حیوانات در مدت آزمایش از نظر غذا با پلت استاندارد تهیه شده در موسسه تحقیقات واکنش و سرم‌سازی رازی کرج و آب لوله‌کشی به مقدار کافی تغذیه شده و در شرایط محیطی دمای $22 \pm 2^\circ C$ ، رطوبت $50 \pm 5\%$ و تعویض هوای تازه ۱۰-۱۲ بار در ساعت، بستر پوشال استریل، نگهداری شدند.

نتایج

از مجموع ۳۶ سر موش ماده تعداد ۳۱۰ تخمک بدست آمد که ۱۶۰ عدد از آنها در محیط‌های M16 و T6 حاوی هپارین (گروه‌های آزمایش) و ۱۵۰ عدد دیگر نیز در محیط‌های M16 و T6 بدون هپارین (گروه‌های شاهد) استفاده گردید.

از نظر مقایسه تاثیر هپارین در محیط M16، تعداد اسپرم شمارش شده در گروه‌های با و بدون هپارین به ترتیب $3/93 \times 10^6 / ml$ و $2/6 \times 10^6 / ml$ ($P > 0.05$)، مقدار

جدول ۱- میانگین تعداد، تحرک و بقای اسپرم موش در محیط‌های M16 و T6 هپارین دار و بدون هپارین (شاهد)

T6		M16		محیط کشت پارامترهای اسپرمی
آزمایش (هپارین دار)	شاهد (بدون هپارین)	آزمایش (هپارین دار)	شاهد (بدون هپارین)	
$4/75 \times 10^6 / ml$	$2/9 \times 10^6 / ml$	$3/93 \times 10^6 / ml$	$2/6 \times 10^6 / ml$	تعداد
$37/7 \pm 12/5^d$	$37/2 \pm 19/8^c$	$71/7 \pm 10/4^b$	$61/1 \pm 24/3^a$	تحرک (%)
$44/7 \pm 10^d$	$47/9 \pm 14/5^c$	$81/7 \pm 5/8^b$	$77/4 \pm 12/1^a$	بقا (%)

از نظر تحرک: a با c در حد ۰/۰۱ و b با c در حد ۰/۰۲ و d با c در حد ۰/۰۵ (در حد ۰/۰۵) اختلاف معنی‌دار داشتند. از نظر بقا: a با c و d در حد ۰/۰۱ و b با c (در حد ۰/۰۲) و d با c (در حد ۰/۰۱) اختلاف معنی‌دار نشان دادند.

زیگوت‌ها به مرحله دو سلولی $17 \pm 82/4\%$ و $12 \pm 61/5\%$ بود که این اختلاف معنی‌دار نبود ($P > 0.05$) (جدول ۲).

میزان لقاح در محیط T6 در دو گروه آزمایش و شاهد به ترتیب $10 \pm 58/6\%$ و $8 \pm 24/1\%$ محاسبه گردید که اختلاف آنها معنی‌دار بود ($P < 0.001$). میزان رسیدن

جدول ۲- درصد باروری تخمک و تعداد رویان‌های دو سلولی موش در محیط‌های M16 و T6 هپارین دار و بدون هپارین (شاهد)

T6		M16		محیط کشت پارامترهای اووسیت و رویان
آزمایش (هپارین دار)	شاهد (بدون هپارین)	آزمایش (هپارین دار)	شاهد (بدون هپارین)	
۵۸	۵۴	۱۰۲	۹۶	تعداد تخمک
۵۸/۶±۱۰ ^d	۲۴/۱±۸ ^c	۳۵/۳±۲۰ ^b	۳۷/۵±۲۴/۶ ^a	تخمک‌های لقاح یافته (%)
۸۲/۴±۱۷ ^d	۶۱/۵±۱۲ ^c	۸۸/۹±۱۵/۷ ^b	۵۰±۱۰ ^a	رویان‌های دوسلولی (%)

از نظر میزان لقاح: a و b با d در حد ۰/۰۲ و همین‌طور c با d در حد ۰/۰۱ اختلاف معنی‌دار دارند. از نظر رسیدن به رویان‌های دوسلولی: a با b (در حد ۰/۰۰۱) و با d (در حد ۰/۰۱) و همچنین b با c (در حد ۰/۰۵) اختلاف معنی‌دار دارند.

با و بدون هپارین در حد ۰/۰۰۱ اختلاف معنی‌دار داشت. بنابراین از نظر دو فاکتور میزان تحرک و بقای اسپرم موش، محیط M16 بهتر از محیط T6 بوده و اختلافشان معنی‌دار می‌باشد. این اثر در محیط M16 با حضور و بدون حضور هپارین بهتر بود. هر چند که وجود هپارین در محیط M16 اثر گسترده تری بر میزان تحرک اسپرم نسبت به محیط T6 داشت به لحاظ اینکه با وجود هپارین در محیط M16، میزان اختلاف با گروه هپارین دار و بدون هپارین محیط T6 معنی‌دار می‌باشد اما M16 بدون هپارین، فقط با گروه بدون هپارین T6 اختلاف معنی‌دار را نشان داد.

دو فاکتور تحرک و بقای اسپرم در داخل هر کدام از گروه‌های M16 و T6 اختلاف معنی‌داری را بین گروه‌های شاهد (بدون هپارین) و آزمایش (هپارین دار) از خود نشان ندادند ($P>0.05$). به نظر می‌رسد اختلاف موجود دو محیط کشت M16 و T6، در میزان تحرک و بقای اسپرم موش، که با نتایج دیگر محققین نیز همخوانی دارد، مربوط به ترکیبات محیط کشت باشد (۶، ۱۰) که موجب تحرک بیشتر اسپرم در محیط M16 نسبت به محیط T6 می‌گردد. از نظر میزان اسپرم استحصال شده از موش‌های نر، هرچند اختلافاتی در داخل و در بین گروه‌های دو محیط M16 و T6 وجود داشت اما معنی‌دار نبود ($P>0.05$).

در مقایسه پارامترهای مورد مطالعه در محیط‌های M16 و T6، اختلافات معنی‌داری در بین گروه‌های آزمایش و شاهد آنها با همدیگر مشاهده گردید که در جداول شماره ۱ و ۲ و زیر نویس آنها آورده شده است.

بحث

تأثیر نوع محیط کشت و مکمل‌هایی هم چون هپارین، کافئین و کلسیم یونوفور در افزایش کیفیت پارامترهای باروری اسپرم و میزان لقاح آزمایشگاهی در مورد انسان و دام‌های بزرگ همچون گاو بررسی و مشخص شده است (۲۲، ۲۱، ۲۰، ۱۴، ۱۶، ۱۱۳، ۲). در این مطالعه میزان تحرک اسپرم در محیط M16 نسبت به محیط T6 مطلوب‌تر بود به طوری که اسپرم‌های محیط M16 حاوی هپارین با گروه‌های T6 هپارین دار و بدون هپارین اختلاف معنی‌داری را به ترتیب در حد ۰/۰۵ و ۰/۰۲ نشان داد. محیط M16 بدون هپارین، فقط با گروه بدون هپارین محیط T6 اختلاف معنی‌دار در حد ۰/۰۱ را نشان داد.

از نظر میزان بقای اسپرم نیز گروه M16 وضعیت بهتری را نسبت به گروه T6 بروز داد در این رابطه گروه M16 دارای هپارین (گروه آزمایش) با گروه T6 با و بدون هپارین به ترتیب در حد ۰/۰۱ و ۰/۰۰۲ اختلاف معنی‌دار را نشان داد. همچنین گروه M16 بدون هپارین نیز با گروه‌های T6

۵۴، ۱۶۲، ۴۸۶ میکروگرم/ میلی لیتر پلی اسپرمی زیادی را در لقاح آزمایشگاهی (IVF) گاو مشاهده نکرد و میزان تقسیم سلولی را ۸۳٪ اعلام نمود و در غلظت‌های ۱۸ و بالاتر از ۱۸ میکروگرم/ میلی لیتر نیز تعداد جنین‌های بدست آمده را حداکثر گزارش کرد. گویادر و همکاران (۱۹۹۰) نیز با افزودن هپارین به محیط لقاح به میزان ۲-۵/ میکروگرم/ میلی لیتر دریافتند که بیشترین درصد تولید جنین در غلظت یک میکروگرم/ میلی لیتر بدست می‌آید. همچنین گوردن (۱۹۹۴) گزارش نمود هپارین نه تنها بر فرآیند لقاح اثر می‌گذارد بلکه ممکن است بر مراحل رشد جنینی نیز تاثیر گذار باشد. مندس و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که وجود هپارین در محیط کشت لقاح موجب بهبود تولید رویان گاو در محیط آزمایشگاه می‌گردد. مطالعه فیک و همکاران (۲۰۰۹) نشان داد که پیش‌انکوباسیون اسپرم خرگوش در محیط کشت حاوی هپارین قبل از تلقیح مصنوعی، موجب کاهش زمان ظرفیت پذیر شدن اسپرم، افزایش میزان بارداری به مقدار ۲/۳٪ می‌گردد. اما در تعداد فرزندان به ازای هر زایش تغییر معنی‌داری با گروه کنترل ایجاد نمی‌کند. استفاده از هپارین برای بالا بردن کیفیت باروری اسپرم و جنین‌های آزمایشگاهی گاو توسط دارابی و همکاران (۱۳۸۲) نیز توصیه شده است.

به طور کلی براساس یافته‌های این مطالعه چنین به نظر می‌رسد که محیط M16 بویژه اگر حاوی هپارین باشد بهتر از محیط T6 با و بدون هپارین برای افزایش تحرک و بقای اسپرم موش عمل می‌کند. همچنین از نظر میزان لقاح آزمایشگاهی، محیط T6 هپارین دار مناسب‌تر از محیط T6 بدون هپارین و M16 با و بدون هپارین می‌باشد.

میزان لقاح تخمک‌ها در محیط T6 هپارین دار بهتر از سایر گروه‌ها بود به طوری که این گروه با T6 بدون هپارین در حد ۰/۰۰۱ و با M16 با و بدون هپارین در حد ۰/۰۲ اختلاف معنی‌دار را نشان داد اما محیط M16 هپارین دار و بدون هپارین با همدیگر اختلافی نداشتند. شواهد موجود نشانگر تاثیر ترکیبات محیط کشت (۷،۱۱) بر میزان کیفیت و لقاح‌پذیری تخمک‌ها و همچنین ظرفیت پذیر شدن اسپرم‌ها می‌باشد. کیفیت مرفولوژیک اووسیت بر اساس فشردگی و تعداد لایه‌های سلول‌های کومولوس است که تاثیر مثبت به سزائی بر باروری آزمایشگاهی، لقاح و رشد جنینی تا مراحل مرولا و بلاستولا دارد (۱۸). میزان تکوین زیگوت‌ها و تشکیل رویان دو سلولی در مقایسه داخل گروهی فقط در محیط M16 در بین گروه آزمایش و شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.001$) اما در محیط T6، اختلافات آنها در دو گروه آزمایش و شاهد، معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). همچنین در مقایسه بین گروهی، محیط M16 آزمایش با شاهد T6 در حد ۰/۰۵ از نظر تکوین زیگوت‌ها و تشکیل رویان دوسلولی اختلاف داشت. که در مقایسه، T6 آزمایش با شاهد M16 در حد ۰/۰۱ اختلاف معنی‌دار را نشان داد. اطلاعات موجود اذعان دارند هپارین بر مرحله اولیه تقسیم سلولی جنینی موش، تاثیر دارد و به نظر می‌رسد در این مرحله از رشد جنینی اختلاف در محتویات محیط کشت اثر کم‌رنگتری داشته باشد. لیو و همکاران (۲۰۰۴) دریافتند که میزان نفوذپذیری اووسیت‌ها، لقاح و تقسیم سلولی با افزایش مقدار هپارین از صفر به ۲ میکروگرم/ میلی لیتر افزایش می‌یابد و غلظت ۱۰ میکروگرم/ میلی لیتر هپارین، باعث افزایش پلی اسپرمی می‌گردد. با این حال شای (۱۹۸۷) با بررسی اثر دزهای مختلف هپارین، در غلظت‌های ۰، ۲، ۶، ۱۰، ۱۸،

منابع

۲. دارابی، م.، کریمی جشنی، ح.ا.، صادقی، ح.، نصر اصفهانی، م. ح.، ایمانی، ح.، مردانی، م.، بهاروند، ح.، شیرازی، ا. ۱۳۸۲. تاثیر نوع سرم بر بلوغ آزمایشگاهی اووسیت‌های نابالغ گاو و دوزهای

۱- توده دهقان، ف. و متدین، م. ح. ۱۳۹۰ بررسی میزان تولید رویان در ۴ نژاد موش آزمایشگاهی در پاسخ به هورمونهای گونادوتروپین، مجله زیست‌شناسی ایران، (۵) ۲۴، ص ۶۹۳-۶۸۸

- پارامترهای اسپرم موش و میزان باروری، مجله علوم تشریح ایران، سال سوم، (۱)، ۱۰، ص ۲۵ - ۱۹
- مختلف هپارین و نوع سمن بر میزان لقاح آزمایشگاهی، مجله پزشکی کوثر، (۳)، ۸، ص ۱۲۵ - ۱۱۹
۳. شاهوردی، ا.، موحدین، م.، رضازاده ولوجردی، م.، کاظمی، س. ۱۳۸۴. مقایسه تاثیر افزودن پروژسترون و کلسیم یونوفور بر
- Han, C., Du, S.S., Wu, L.S., Ding, Y.Q., Yao, K.T. 2005. Effects of different concentrations of amino acids in the culture medium on preimplantation mouse embryo development in vitro, *Di Yi Jun Yi Da Xue Bao*, 25(3), 241-245
- 14- Fik, M., Hanusova, J., Arpasova, H. 2009. Reproduction performance of rabbits by incubated semen with heparin in industry rabbit farm. *Zootehnie și Biotehnologii*, 42 (1), 241-246
- 15- Garbers, D.L., First, N. L., Sullivan, J. J. and Lardy, H. A. 1971. Stimulation and maintenance of ejaculated bovine spermatozoa respiration and motility by caffeine. *Biology of Reproduction*, 5(3), 336-339
- 16- Iritani, A., Kasai, M. Niwa, K. and Song, H. 1984. Fertilization in vitro of cattle follicular oocytes with ejaculated spermatozoa capacitated in a chemically defined medium. *J. Reprod. Fert.* 70, 487- 492
- 17- Karran, G. and Legge, M. 1996. Non-enzymatic formation of formaldehyde in mouse oocyte freezing mixtures. *Human Reproduction*, 11(12), 2681-2686
- 18- Khurana, N. K. and Nieman, H. 2000. Effects of oocyte quality cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula / blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology*, 54, 741-756
- 19- Lu, G. E. and Seidel, Jr. K. 2004. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow, 62(5), 819-830 *Theriogenology* cytometrically- sorted sperm.
- 20- Mendes, J. O. B., Burns, Jr., P. D., De La Torre-Sanchez, J. F. and Seidel, Jr. G. E. 2003. Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. *Theriogenology*, 60(2), 331-340
- 21- 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
- 22- Niwa, K., Ohgoda, O. and Yuhara, M. 1988. Effects of caffeine in media for pretreatment of frozen-thawed sperm on in-vitro penetration of
- 4- Baharvand, H., Rezazadeh, M. 2000. The comparison of six different media macromolecule-supplements on the in vitro development and cleavage rate of on-cell mouse embryos. *Yakhteh (The Cell) Medical Journal*, 3, 17-24
- 5- Baharvand, H., Rezazadeh, M., Altarihi, M.T. 1999. Comparison of mouse embryo development by coculture with ampullary and isthmic epithelial cell of hamster oviduct and the effect of injected gonadotrophins. *Yakhteh (The Cell) Medical Journal*, 1, 7-13
- 6- Brackett, B.C., Bousquet, I., Boice, M.L., Donawick, W.J., Evans, J.F. and Dressel, M.A. 1982. Normal development following in-vitro fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* 27, 147-158
- 7- Brinster, R.L. 1965. Studies on the development of mouse embryos in vitro. II. The effect of energy source. *J. Exp. Zool.* 158, 59-68
- 8- Byrd, W. 1981. In vitro capacitation and the chemically induced acrosome reaction in bovine spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 215, 35- 46
- 9- Carolan, C., Lonergan, P., Langendonck, A.V, Mermillod, P., 1995. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviductal fluid following oocyte maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology*, 43, 1115-1128
- 10- Chatot, C.L, Lewis, J.L., Torres, I, Ziomek, C.A. 1990. Development of 1-cell embryos from different strains of mice in CZB medium. *Biol. Reprod.* 42, 432-440
- 11- Cheung, S.W., Ph.D., Strickler, R.C., Yang, V.C., Vera, M.de, Spitznagal, E. L. 2005. A mouse embryo culture system for quality control testing of human in vitro fertilization and embryo transfer media and fetal cord sera. *Gamete Research*, 11(4), 411- 419
- 12- Cooper, T.G., Noonan, E., Eckardstein, S.V., Auger, J., Gordon Baker, H.W., Behre, H.M., Haugen, T.B., Kruger, T., Wang, C., Michael T. Mbizvo, M.T. and Vogelsong, K.M. 2010. World health organization reference values for human semen characteristics. *Human Reproduction Update*, 16(3), 231-245
- 13- Deng, X., Wang, S., Huang, W.J., Liu, Q.Z., Xie, W.B., Zhang, Q.L., Fang, W.Y., Liu, T.F.,

- cattle oocytes. Proc. 11th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I., Dublin 3, 346-348
- 23- Ohgoda, O., Niwa, K., Yuhara, M., Takahashi, S. and Kanoya, K. 1988. Variations in penetration rates in vitro of bovine follicular oocytes do not reflect conception rates after artificial insemination using frozen semen from different bulls. *Theriogenology* 29, 1375-81
- 24- Park, C.-K., Ohgoda, O. and Niwa, K. 1989. Penetration of bovine follicular oocytes by frozen – thawed spermatozoa in the presence of caffeine and heparin. *J. Reprod. Fert.*, 86, 577 - 582
- 25- Parrish, J. J., Susko-Parrish, J., Winer, M. A. and First, N. L. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of Reproduction*, 38(5), 1171-80
- 26- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., Leibfried-Rutledge, M.L., Critser, E.S., Eyestone, W.H. and First, N.L. 1986. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25, 591-600
- 27- Sliwa, L. 1993. Effect of heparin on human Spermatozoa migration in vitro. *Systems. Biology in Reproductive Medicine*. 30 (3), 177-181
- 28- Tucker, K.E., and Jansen, C.A.M. 2002. The mouse embryo bioassay: is it the “Gold Standard” for quality control testing in the ivf laboratory? In: *Proceedings 2nd International workshop for Embryologists: Troubleshooting Activities in the ART lab*. Ed. R. Basuray and D Mortimer
- 29- Whittingham, D.G. 1971. Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 14, 7-12
- 29- Xu, K.P. and Greve, T. 1988. A detailed analysis of early events during in vitro fertilization of bovine follicular oocytes. *J. Reprod. Fert.* 82, 127-134

Effect of heparin on sperm fertility, oocyte's fertilization and tow cell embryos in NMRI mouse in vitro

Todehdeghan F.^{*1}, Nabavi N.² and Shiravi A.H.²

^{*1} Venomous Animals & Antivenin Production Dept., Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, I.R. of Iran

² Biology Dept., Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, I.R. of Iran

Abstract

Heparin is used by researchers to enhance sperm fertility and embryo development. In vitro fertilization in mouse is recognized as a standard test for assisted reproduction studies. In order to improve this test, in the present study the effect of M16 and T6 medium with heparin (10ug/ml) and without heparin were investigated on fertility parameters of sperm and oocyte including, Sperm number, motility and survivability rate, oocytes fertilization rate and embryo development to tow cell stage in NMRI mouse. Results for effect of heparin in two medium treated and control groups show fertilization rate in T6 media ($p < 0.001$) and zygotes development rate to two cell embryos in M16 media ($p < 0.001$) were significantly different. Comparing also effect of these two medium for motility and survivability of sperm, M16 media ($p < 0.05$) and for oocytes fertilization rate and two cell embryo production, T6 ($p < 0.001$) was better media. However, M16 especially with heparin is better than T6 media (with and without heparin) for increment of sperm motility and survivability, and T6 with heparin is more suitable than T6 without heparin and M16 (with and without heparin) for obtaining a better in vitro fertilization rate in NMRI mouse.

Keywords: heparin, media, two cell embryo, sperm, out breed mouse