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 زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۰/۴/۴ تاریخ پذیرش: ۹۲/۵/۲۱

چکیده

هپارین بعنوان بهبود دهندهٔ باروری اسپرم و تکوین جنین در برخی از گونه های 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 محیط های M16 و T6 هپارین دار (۱۰µg/ml) و بدون هپارین بر پارامترهای باروری اسپرم و تخمک شامل تعداد، میزان تحرک و بقای اسپرم، میزان لقاح پذیری تخمک ها و تکوین زیگوت ها تا مرحله دوسلولی در موش غیر همخون NMRI، مورد بررسی قرار گرفت. یافته ها از نظر تاثیر هپارین در دو گروه آزمایش و شاهد نشان داد که میزان لقاح در محیط T6 ($P<0.001$) و تکوین زیگوت ها به رویان های دوسلولی در محیط M16 ($P<0.001$) با همدیگر اختلاف معنی دار دارند. همچنین در مقایسه دو محیط کشت از نظر تحرک و بقای اسپرم محیط M16 ($P<0.05$) و از نظر میزان لقاح تخمک ها و تعداد رویان های دو سلولی، محیط T6 مطلوب تر ($P<0.001$) از دیگری است. بطور کلی می توان 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 مناسب تر از محیط T6 بدون هپارین و M16 (با و بدون هپارین) از نظر موفقیت لقاح آزمایشگاهی در موش غیر همخون NMRI عمل می نمایند.

واژه های کلیدی: هپارین، تخمک، اسپرم، رویان دو سلولی، موش NMRI

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

مقدمه

به کارگیری محیط های متفاوت کشت و همچنین تفاوت در گونه های جانوری و مراحل تکاملی جنین، می تواند منجر به پدید آمدن نتایج متفاوتی در مطالعات شود. به منظور شناخت و مطالعه باروری آزمایشگاهی و تکوین جنین، محیط های کشت مختلفی طراحی شده است. پس از ارائه محیط کشت BMOC توسط برینستر در سال ۱۹۶۵، برای رشد تخمک محیط کشت های دیگری طراحی و ارائه شدند که می توان به محیط کشت تغییر یافته Witten (۲۸) و محیط های M16، T6، CZB و KMSO که هنوز بطور گسترده ای مورد مصرف در فناوری باروری یاری شده است (۱۷, ۱۳, ۱۰, ۵, ۴) اشاره کرد. از سیستم های کشت همزمان جنین با سلول های حاصل از دستگاه تولید مثل و یا رده های سلولی دیگر نیز استفاده شده است (۴,۵) که این سیستم ها بدلیل 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.

محیط های کشت با ترکیبات شیمیایی مشخص (۱۶) و یا دارای قدرت یونی بالا (۶)، کلسیم یونوفور (۳,۸) کافئین (۱۵,۲۱,۲۲) و هپارین (۲۱,۲۵ ,۲۰ ,۲,۱۴) باعث القاء

Archive of SID
www.SID.ir

ظرفیت پذیری و افزایش باروری آزمایشگاهی اسپرم می شوند. مطالعات نشان داده است ظرفیت پذیری اسپرم تحت شرایط کشت آزمایشگاهی نیازمند زمان است. در سال ۱۹۸۸ پریش و همکاران اعلام کردند ظرفیت پذیری اسپرم انزالی گاو در حضور هپارین طی مدت ۴ ساعت انجام می پذیرد که ممکن است با القاء واکنش آکروزومی، لقاح آزمایشگاهی مناسبی را در پی داشته باشد. از طرفی پریش و همکاران در سال ۱۹۸۶ با پیش انکوبه کردن اسپرم های 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، اسپرم ها ۶ ساعت پس از ورود به محیط کشت، شروع به نفوذ به داخل اووسیت می کنند. در مطالعه نیوا و اوگودا (۱۹۸۸) با مجاور کردن اسپرم های منجمد و ذوب شده با اووسیت ها در محیط حاوی مخلوط کافئین و هپارین، نفوذپذیری اسپرم ها به داخل تخمک در محیط لقاح به میزان قابل توجه ای در مقایسه با محیط های حاوی کافئین و یا هپارین، افزایش می یابد. (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 محیط های 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 رویان ها تا مرحله دوسلولی در موش آزمایشگاهی نژاد NMRI مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

مواد و روشها

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

برای تهیه تخمک، تعداد ۳۶ سر موش ماده نژاد NMRI ۸-۷ هفته، جفت نخورده به طور تصادفی انتخاب شدند و در آنها سوپر اوولاسیون القاء گردید (۱). برای ایجاد سوپراوولاسیون و افزایش تخمک گذاری، موش های ماده به ترتیب بوسیله هورمون های PMSG و HCG در دزهای مساوی۸IU و به فاصله ۴۸-۴۶ ساعت به صورت داخل صفاقی (ip) تزریق شدند.

برای استحصال تخمک، ۲۴ ساعت پس از تزریق HCG، موش ها با کشش گردنی معدوم شدند و اوویداکت آنها جدا و در قطره های محیطM16 و T6 حاوی ۴ mg/ml BSA که بر روی وارمر ۳۷°C قرار گرفته بود منتقل شدند. پس از ایجاد شکاف در قسمت برجستگی آمپولا، تخمک ها به درون محیط رها و در زیر میکروسکوپ معکوس (invert) جمع آوری و شمارش شدند.

برای تهیه اسپرم، تعداد ۳۴ سر موش نر بالغ، نژاد NMRI با سابقه جفت خوردگی، بطور تصادفی انتخاب و مورد استفاده قرار گرفتند. بعد از کشتن موش به روش کشش گردنی، اپیدیدیم های آنها جدا و در محیط هایM16 وT6 هپارین دار (۱۰µg /ml) (گروه آزمایش) و بدون هپارین (گروه شاهد)، جمع آوری شدند، سپس به مدت ۴۵ دقیقه تا یک ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷C° و ۵٪CO2 قرار داده شدند تا اسپرم ها به روش swim up به داخل محیط رها و ظرفیت پذیر شوند. تمامی محیط های کشت آزمایش و شاهد حاوی BSA (۴ mg/ml) بودند. تعداد اسپرم ها با استفاده از هموسایتومتر شمارش شد و سپس تحرک و بقای آن ها در زیر میکروسکوپ مورد مطالعه قرار گرفت (۱۲).

برای بررسی میزان لقاح آزمایشگاهی (IVF) و تکوین رویان ها، ده میکرولیتر از اسپرم تهیه شده به هریک از محیط های M16 و T6 با و بدون هپارین، حاوی تخمک اضافه شد و پس از انکوباسیون در دمای ۳۷C° و٪CO2،

www.SID.ir

Archive of SID

میزان لقاح و مراحل رشد رویان ها به مدت ۲۶- ۲۴ ساعت در هر دو محیط، مورد بررسی قرارگرفت.

حیوانات در مدت آزمایش از نظر غذا با پلت استاندارد تهیه شده در موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج و آب لوله کشی به مقدار کافی تغذیه شده و در شرایط محیطی دمای ۲۲±۲°C، رطوبت ٪ ۵± ۵۰ و تعویض هوای تازه ۱۲-۱۰ 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 محیط های M16 و T6 حاوی هپارین (گروه‌های آزمایش) و ۱۵۰ عدد دیگر نیز در محیط های M16 و T6 بدون هپارین (گروه‌های شاهد) استفاده گردید.

از نظر مقایسه تاثیر هپارین در محیط M16، تعداد اسپرم شمارش شده در گروه های با و بدون هپارین به ترتیب ml / $۱۰^{۶}$ × ۳/۹۳ و ml / $۱۰^{۶}$ × ۲/۶ و (P>0.05)، مقدار متوسط تحرک اسپرم در دو گروه با و بدون هپارین به ترتیب ۱۰/۴± ۷۱/۷٪ و ۲۴/۳±۶۱/۱٪ و میزان بقای اسپرم نیز به ترتیب ۵/۸± ۸۱/۷٪ و ۱۴/۵±۴۷/۹٪ بود که اختلاف معنی داری با همدیگر نداشتند (P>0.05).

میزان لقاح آزمایشگاهی در محیط M16 آزمایش (هپارین دار)۲۰ ±۳۵/۳٪ و درگروه شاهد (بدون هپارین) ۲۴/۶ ± ۳۷/۵٪ و میزان رسیدن زیگوت ها به مرحله دوسلولی به ترتیب ۱۵/۷± ۸۸/۹٪ و ۱۰± ۵۰٪ بود که از نظر تکوین زیگوت ها به رویان های دوسلولی گروه آزمایش اختلاف معنی داری با گروه شاهد نشان داد. (P<0.001) (جدول ۲).

در محیط T6 با و بدن هپارین تعداد اسپرم به ترتیب / ml $۱۰^{۶}$ × ۴/۷۵ و ml / $۱۰^{۶}$ × ۲/۹ محاسبه گردید و میزان دو فاکتور تحرک و بقای اسپرم حاوی هپارین به ترتیب ۱۲/۵±۳۷/۷٪ و ۱۰±۴۴/۷٪ و در گروه بدون هپارین نیز به ترتیب ۱۹/۸±۳۷/۲٪ و ۱۴/۵±۴۷/۹٪ بود که اختلاف معنی داری در بین آنها مشاهده نگردید (P>0.05) (جدول ۱).

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

محیط کشت / پارامترهای اسپرمی	M16		T6	
	شاهد (بدون هپارین)	آزمایش (هپارین دار)	شاهد (بدون هپارین)	آزمایش (هپارین دار)
تعداد	ml / $۱۰^{۶}$ × ۲/۶	ml / $۱۰^{۶}$ × ۳/۹۳	ml / $۱۰^{۶}$ × ۲/۹	ml / $۱۰^{۶}$ × ۴/۷۵
تحرک (٪)	$۶۱/۱±۲۴/۳^{a}$	$۷۱/۷±۱۰/۴^{b}$	$۳۷/۲±۱۹/۸^{c}$	$۳۷/۷±۱۲/۵^{d}$
بقا (٪)	$۷۷/۴±۱۲/۱^{a}$	$۸۱/۷± ۵/۸^{b}$	$۴۷/۹±۱۴/۵^{c}$	$۴۴/۷±۱۰^{d}$

از نظر تحرک: a با c در حد ۰/۰۱ و b با c (در حد۰/۰۲) و با d (درحد ۰/۰۵) اختلاف معنی دار داشتند. از نظر بقا: a با c و d در حد ۰/۰۰۱ و b با c (درحد ۰/۰۰۲) و با d (درحد ۰/۰۱) اختلاف معنی دار نشان دادند.

میزان لقاح در محیط T6 در دو گروه آزمایش و شاهد به ترتیب،۱۰± ۵۸/۶٪ و ۸± ۲۴/۱٪ محاسبه گردید که اختلاف آنها معنی دار بود (P<0.001). میزان رسیدن زیگوت ها به مرحله دو سلولی ۱۷± ۸۲/۴٪ و ۱۲± ۶۱/۵٪ بود که این اختلاف معنی دار نبود (P>0.05) (جدول ۲).

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲- درصد باروری تخمک وتعداد رویان های دو سلولی موش در محیط های M16 و T6 هپارین دار و بدون هپارین (شاهد)

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

از نظر میزان لقاح: a و b با d در حد ۰/۰۲ و همین طور c با d در حد ۰/۰۰۱ اختلاف معنی دار دارند. از نظر رسیدن به رویان های دوسلولی: a با b (درحد ۰/۰۰۱) و با d (در حد ۰/۰۱) و همچنین b با c درحد ۰/۰۵ اختلاف معنی دار دارند.

در مقایسه پارامترهای مورد مطالعه در محیطهایM16 وT6، اختلافات معنی داری در بین گروه های آزمایش و شاهد آنها با همدیگر مشاهده گردید که در جداول شماره ۱ و ۲ و زیر نویس آنها آورده شده است.

بحث

تاثیر نوع محیط کشت و مکمل هایی هم چون هپارین، کافئین و کلسیم یونوفور در افزایش کیفیت پارامترهای باروری اسپرم و میزان لقاح آزمایشگاهی در مورد انسان و دام های بزرگ همچون گاو بررسی و مشخص شده است (۲,۱۱۳,۱۶،۱۴,۲۰,۲۱,۲۲). در این مطالعه میزان تحرک اسپرم در محیط M16 نسبت به محیط T6 مطلوب تر بود به طوری که اسپرم های محیط M16 حاوی هپارین با گروه های T6 هپارین دار و بدون هپارین اختلاف معنی داری را به ترتیب در حد ۰/۰۵ و ۰/۰۲ نشان داد. محیط M16 بدون هپارین، فقط با گروه بدون هپارین محیط T6 اختلاف معنی دار 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 معنی دار را نشان داد. همچنین گروه M16 بدون هپارین نیز با گروه های T6 با و بدون هپارین در حد ۰/۰۰۱ اختلاف معنی دار داشت. بنابراین از نظر دو فاکتور میزان تحرک و بقای اسپرم موش، محیط M16 بهتر از محیط T6 بوده و اختلافشان معنی دار می باشد. این اثر در محیط M16 با حضور و بدون حضور هپارین بهتر بود. هر چند که وجود هپارین در محیط M16اثر 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 معنی دار می باشد اما M16 بدون هپارین، فقط با گروه بدون هپارین T6 اختلاف معنی دار را نشان داد.

دو فاکتور تحرک و بقای اسپرم در داخل هر کدام از گروه های M16 و T6 اختلاف معنی داری را بین گروه های شاهد (بدون هپارین) و آزمایش (هپارین دار) از خود نشان ندادند (P>0.05). به نظر می رسد اختلاف موجود دو محیط کشت M16 و T6، در میزان تحرک و بقای اسپرم موش، که با نتایج دیگرمحققین نیز همخوانی دارد، مربوط به ترکیبات محیط کشت باشد (۶ ،۱۰) که موجب تحرک بیشتر اسپرم درمحیط M16 نسبت به محیط T6 می گردد. از نظر میزان اسپرم استحصال شده از موش های نر، هرچند اختلافاتی در داخل و در بین گروه های دو محیط M16 و T6 وجود داشت اما معنی دار نبود (P>0.05).

www.SID.ir

میزان لقاح تخمک ها در محیط T6 هپارین دار بهتر از سایر گروه ها بود به طوری که این گروه با T6 بدون هپارین در حد ۰/۰۰۱ و با M16 با و بدون هپارین درحد ۰/۰۲ اختلاف معنی دار 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 لقاح پذیری تخمک ها و همچنین ظرفیت پذیر شدن اسپرم ها می باشد. کیفیت مرفولوژیک اووسیت بر اساس فشردگی و تعداد لایه های سلول های کومولوس است که تاثیر مثبت به سزائی بر باروری آزمایشگاهی، لقاح و رشد جنینی تا مراحل مرولا و بلاستولا دارد (۱۸). میزان تکوین زیگوت ها و تشکیل رویان دو سلولی در مقایسه داخل گروهی فقط در محیط M16 در بین گروه آزمایش و شاهد اختلاف معنی داری را نشان داد ($P<0.001$) اما در محیط T6، اختلافات آنها در دو گروه آزمایش و شاهد، معنی دار 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 معنی دار را نشان داد. اطلاعات موجود اذعان دارند هپارین بر مرحله اولیه تقسیم سلولی جنینی موش، تاثیر دارد و به نظر می رسد در این مرحله از رشد جنینی اختلاف در محتویات محیط کشت اثر کم رنگتری داشته باشد. لیو و همکاران (۲۰۰۴) دریافتند که میزان نفوذپذیری اووسیت ها، لقاح و تقسیم سلولی با افزایش مقدار هپارین از صفر به ۲ میکروگرم/ میلی لیتر افزایش می یابد و غلظت ۱۰ میکروگرم/ میلی لیتر هپارین، باعث افزایش پلی اسپرمی می گردد. با این حال شای (۱۹۸۷) با بررسی اثر دزهای مختلف هپارین، در غلظت های ۰، ۲، ۶، ۱۰، ۱۸، 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 غلظت های ۱۸ و بالاتر از ۱۸ میکروگرم/ میلی لیتر نیز تعداد جنین های بدست آمده را حداکثر گزارش کرد. گویادر و همکاران (۱۹۹۰) نیز با افزودن هپارین به محیط لقاح به میزان ۲-۰/۵ میکروگرم/ میلی لیتر دریافتند که بیشترین درصد تولید جنین در غلظت یک میکروگرم/ میلی لیتر بدست می آید. همچنین گوردن (۱۹۹۴) گزارش نمود هپارین نه تنها بر فرآیند لقاح اثر می گذارد 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 می گردد. مطالعه فیک و همکاران (۲۰۰۹) نشان داد که پیش انکوباسیون 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٪ می گردد. اما در تعداد فرزندان به ازای هر زایش تغییر معنی‌داری با گروه کنترل ایجاد نمی کند. استفاده از هپارین برای بالا بردن کیفیت باروری اسپرم و جنین های آزمایشگاهی گاو توسط دارابی و همکاران (۱۳۸۲) نیز توصیه شده است.

به طورکلی براساس یافته های این مطالعه چنین به نظر می رسد که محیط M16 بویژه اگر حاوی هپارین باشد بهتر از محیط T6 با و بدون هپارین برای افزایش تحرک و بقای اسپرم موش عمل می کند. همچنین از نظر میزان لقاح آزمایشگاهی، محیط T6 هپارین دار مناسب تر از محیط T6 بدون هپارین و M16 با و بدون هپارین می باشد.

منابع

۱- توده دهقان، ف. و متدین، م. ح. ۱۳۹۰ بررسی میزان تولید رویان در ۴ نژاد موش آزمایشگاهی در پاسخ به هورمونهای گونادوتروپین، مجله زیست شناسی ایران، (۵)۲۴، ص۶۹۳-۶۸۸

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 اووسیت های نابالغ گاو و دوز های

Archive of SID
www.SID.ir

مختلف هپارین و نوع سمن بر میزان لقاح آزمایشگاهی، مجله پزشکی کوثر، (۳)۸، ص۱۲۵- ۱۱۹

۳. شاهوردی ، ا. ، موحدین، م.، رضازاده ولوجردی، م.، کاظمی، س. ۱۳۸۴. مقایسه تاثیر افزودن پروژسترون و کلسیم یونوفور بر پارامترهای اسپرم موش و میزان باروری، مجله علوم تشریح ایران، سال سوم، (۱)۱۰، ص۲۵ - ۱۹

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 şi 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), 819-830Theriogenology 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., Langendonckt, 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.,

Archive of SID

www.SID.ir

cattle oocytes. Proc. Ilth 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

Todehdehghan 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 inT6 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

Archive of SID

www.SID.ir