EFFECTS OF VITRIFICATION ON MOUSE EMBRYONIC GENE ACTIVITY, CYTOLOGY OF SWAMP BUFFALO OOCYTE AND SUBSEQUENT DEVELOPMENT

DUANGJAI BOONKUSOL

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY (ANATOMY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2006

ISBN

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

ผลของการแช่แข็งต่อการแสดงออกของยีนในเอมบริโอของหนูเม้าส์ เซลล์วิทยาของโอโอไซต์กระบือปลัก และผลต่อการพัฒนาของเอมบริโอ

EFFECTS OF VITRIFICATION ON MOUSE EMBRYONIC GENE ACTIVITY, CYTOLOGY OF SWAMP BUFFALO OOCYTE AND SUBSEQUENT DEVELOPMENT

ดวงใจ บุญกุศล 4537318 SCAN/D

ปร.ด. (กายวิภาคศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์, ยินดี กิติยานันท์, D.V.M., M.Sc. (Anatomy),

เจริญศรี ธนบุญสมบัติ, Ph.D. (Animal Science), จำเนียร สายขุน, ปร.ด. (กายวิภาคศาสตร์),

ANDRAS DINNYES, D.V.M., Ph.D., D.Sc., Dr.habil.

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพในการแช่แข็งแบบวิทริฟิเกชั่น 2 วิธี คือ solid surface vitrification (SSV) และ in-straw vitrification (ISV) ต่อเอมบริโอของหนูเม้าส์และโอโอไซต์ของกระบือปลัก เอมบริโอและโอโอไซต์ผ่านการแช่แข็งโดยใช้น้ำยาเอทิลีนไกลคอล 35 เปอร์เซ็นต์ สำหรับวิธี SSV และ 40 เปอร์เซ็นต์ สำหรับวิธี ISV ประสิทธิภาพของการแช่แข็ง ทั้ง 2 วิธีต่อเอมบริโอในระยะ pronuclear และระยะ 8 เซลล์ ตรวจสอบจากอัตราการอยู่รอด อัตราการเจริญระยะบลาสโตซีส และการแสดงออกของยีน พบว่าอัตราการอยู่รอดของเอมบริโอที่ผ่านการแช่แข็งทั้ง 2 วิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ อัตราการเจริญระยะบลาสโตซีสของเอมบริโอที่ผ่านการแช่แข็งโดยวิธี SSV มีค่าไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่มีค่าสูงกว่าวิธี ISV การแสดงออกของยีนในเอมบริโอระยะ pronuclear หลังการแช่แข็ง พบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ stress เพิ่มขึ้นหลังจากการทำให้อุ่นขึ้น 3 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมพบการแสดงออกมากขึ้น 2-33 เท่าในกลุ่ม ISV และการแสดงออกของยีนจะลดลงหลังจากการทำให้อุ่นขึ้น 10 ชั่วโมง ส่วนกลุ่ม SSV พบว่าเพิ่มขึ้นเพียง 0.3-2 เท่า ในเอมบริโอระยะ 8 เซลล์มีรูปแบบการแสดงออกของยีนไม่แน่นอน หลาย ๆ ยีนมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นทั้งในระยะหลังการทำให้อุ่นขึ้น 3 และ 10 ชั่วโมง ประสิทธิภาพของการแช่แข็งทั้ง 2 วิธีต่อโอโอไซต์ของกระบือปลัก ได้ตรวจสอบจากอัตราการอยู่รอด อัตราการเจริญระยะบลาสโตซีส หลังจาก parthenogenetic activation ลักษณะทางเซลล์วิทยาของโอโอไซต์ พบว่าอัตราการอยู่รอดและการเจริญในระยะบลาสโตซีสของโอโอไซต์ที่ผ่านการแช่แข็งโดยวิธี SSV มีค่าสูงกว่าวิธี ISV โดยอัตราการอยู่รอดและการเจริญในระยะบลาสโตซีสจากทั้ง 2 กลุ่มทดลองยังคงต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับลักษณะทางเซลล์วิทยาพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของโอโอไซต์ ในกลุ่มที่ผ่านน้ำยา ISV และกลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งโดยวิธี SSV และ วิธี ISV โดยพบการถูกทำลายและการเปลี่ยนแปลงของ microvilli, mitochondria, oolemma, และ cortical granules รวมทั้งขนาดและตำแหน่งของ vesicles

87 หน้า ISBN 974-04-7174-9

EFFECTS OF VITRIFICATION ON MOUSE EMBRYONIC GENE ACTIVITY, CYTOLOGY OF SWAMP BUFFALO OOCYTE AND SUBSEQUENT DEVELOPMENT

DUANGJAI BOONKUSOL 4537318 SCAN/D
Ph.D. (ANATOMY)
THESIS ADVISORS : YINDEE KITIYANANT, D.V.M., M.Sc. (ANATOMY),
CHAROENSRI THONABULSOMBAT, Ph.D.(ANIMAL SCIENCE),
JUMNIAN SAIKHUN, Ph.D. (ANATOMY),
ANDRAS DINNYES, D.V.M., Ph.D., D.Sc., Dr.habil.

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the efficiency of two vitrification procedures, solid surface vitrification (SSV) and in-straw vitrification (ISV) for mouse embryos and swamp buffalo oocytes. Both embryos and oocytes were vitrified using 35% ethylene glycol (EG) and 40% EG as vitrification solution in SSV and ISV, respectively. In mouse embryos, efficiency of the two vitrifications for pronuclear stage and 8-cell stage embryos was compared based on morphological survival, blastocyst formation, and changes in embryonic gene expression. No significant differences were found between immediate survival rates of embryos vitrified by SSV and ISV in both stages. Blastocyst rates were significantly higher with SSV and not significantly different from that of control. The quantification of selected gene transcripts from single embryos was carried out by quantitative real-time RT-PCR. The upregulation of all stress related genes was found at 3 h post-warming in pronuclear stage embryos. Expression of these genes showed much higher level (2-33 fold) in ISV than in in vitro control embryos. In SSV treated embryos we could detect only slight changes (0.3-2 fold). At 10 h post-warming, all genes were downregulated in embryos vitrified by ISV. In contrast to pronuclear stage, there was no clear pattern of gene expression changes after vitrification in 8-cell stage embryos. Several genes were upregulated both at 3 and 10 h post-warming.

Efficiency of the two vitrifications for swamp buffalo in vitro matured oocytes was examined based on developmental capacity after parthenogenetic activation and ultrastructural changes. Survival and blastocyst rates were significantly higher with SSV than ISV, although still significantly lower than that of control. For examining the ultrastructural changes, fresh, VS-exposed (SSV and ISV), and vitrified-warmed oocytes were processed for transmission electron microscopy. In VS-exposed oocytes, ultrastructural reduction of microvilli abundance and damage of mitochondrial membrane were found in ISV group, but it was not found in the SSV group. In vitrified-warmed oocytes, however, it was clear that both procedures of vitrification induced profound ultrastructural modifications to microvilli, mitochondria, oolemma, cortical granules as well as to the size and position of the vesicles. Damaged mitochondria were, however, more abundant in ISV vitrified oocytes than in SSV vitrified oocytes which correlated to developmental data.

KEY WORDS : VITRIFICATION/MOUSE/BUFFALO/GENE EXPRESSION/ OOCYTE CYTOLOGY
87 pp. ISBN 974-04-7174-9