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 เชิญวิทยาของโอโอไซต์กระบือปลัก และผลต่อการพัฒนาของเอมบริโอ

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

ดวงใจ บุญกุศล 4537318  SCAN/D

ประ. (กายวิภาคศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์, ยินดี กิติยานันท์, D.V.M., M.Sc. (Anatomy),
เจริญศรี ธนาญสมบัติ, Ph.D. (Animal Science), จีนชี สายชุบ, ปร. (กายวิภาคศาสตร์),
ANDRAS DINNYES, D.V.M., Ph.D., D.Sc., Dr.habil.

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษารูปนี้เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพในการแช่แข็งแบบวิทริฟิเกชั่น 2 วิธีคือ solid surface vitrification (SSV) และ in-straw vitrification (ISV) ต่อเอมบริโอของหนูเม้าส์ และโอโอไซต์ของกระบือปลัก เอมบริโอและโอโอไซต์ผ่านการแช่แข็งโดยใช้น้ํายาเอทิลีนไกลคอล 35 เบอร์เซ็นต์ สำหรับวิธี SSV และ 40 เบอร์เซ็นต์ สำหรับวิธี ISV ประสิทธิภาพของการแช่แข็งทั้ง 2 วิธีต่อเอมบริโอในระยะ pronuclear และระยะ 8 เซลล์ ตรวจสอบจากอัตราการอยู่รอด ธีโอการเครื่องยนต์ และการแสดงออกของยีน พบว่าอัตราการอยู่รอดของเอมบริโอที่ผ่านการแช่แข็งทั้ง 2 วิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ อัตราการเจริญระยะบลาสโตซีสของเอมบริโอที่ผ่านการแช่แข็งโดยวิธี SSV มีค่าไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมแต่เมื่อสังเกตุวิธี ISV การแสดงออกของยีนในเอมบริโอระยะ pronuclear หลังการแช่แข็ง พบการลดของยีนที่เกี่ยวกับการเร่งแสงเช่น stress เพิ่มขึ้นหลังจากการทำให้ลุกขึ้น 3 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมการแสดงออกมาก 2-33 เท่าในกลุ่ม ISV และการแสดงออกของยีนจะลดลงหลังจากการทำให้ลุกขึ้น 10 ชั่วโมง สำหรับกลุ่ม SSV พบว่าเพิ่มขึ้นเพียง 0.3-2 เท่า ในเอมบริโอระยะ 8 เซลล์ที่แช่แข็งแล้วแสดงออกไม่แน่นอน หลาย ๆ ยีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นทันต่อระยะหลังจากการทำให้ลุกขึ้น 3 และ 10 ชั่วโมง ประสิทธิภาพของการแช่แข็งทั้ง 2 วิธีต่อโอโอไซต์ของกระบือปลัก ได้ตรวจสอบจากอัตราการอยู่รอด อัตราการเจริญระยะบลาสโตซีส หลังจาก parthenogenetic activation ลักษณะเซลล์วิทยาของโอโอไซต์ พยาธิการอยู่รอดและการเจริญ ในระยะบลาสโตซีสของโอโอไซต์ที่ผ่านการแช่แข็งโดยวิธี SSV มีค่าสูงกว่าวิธี ISV โดยอัตราการอยู่รอดและการเจริญในระยะบลาสโตซีสจากทั้ง 2 กลุ่มลดลงอย่างมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับลักษณะเซลล์วิทยาพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของโอโอไซต์ในกลุ่มที่ผ่านน้ํายา ISV และกลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งโดยวิธี SSV และวิธี ISV โดยพบการเปลี่ยนแปลงและเปลี่ยนแปลงของ microvilli, mitochondria, oolemma, และ cortical granules รวมทั้งขนาดและจำนวนของ vesicles
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