



**STUDIES ON THE EFFECT OF INHIBITING FACTOR-  
HYPOXANTHINE ON THE *IN VITRO* MATURATION  
OF BOVINE OOCYTES USING LIGHT AND  
TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY**

**BUSABA PANYARACHUN**

๐

อธิการบดีมหาวิทยาลัย

จาก

ศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY (ANATOMY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2000**

TH

B9760

๕๐๐๐

ISBN 974-346-018-7

**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

44647 ค.๑

3736140 SCAN/D : MAJOR : ANATOMY ; Ph.D. (ANATOMY)

KEYWORD : BOVINE, OOCYTE, MATURATION, MEIOTIC ARREST  
CHROMOSOME CONDENSATION

BUSABA PANYARACHUN : STUDIES ON THE EFFECT OF INHIBITING FACTOR-HYPOXANTHINE ON THE *IN VITRO* MATURATION OF BOVINE OOCYTES USING LIGHT AND TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY. THESIS ADVISOR : KANOK PAVASUTHIPAISIT, M.D., Ph.D., REON SOMANA, Ph.D., M.D., AHNOND BOONYARATAVEJ, Ph.D., PRAPEE SRETARUGSA, Ph.D., SANGCHAI PRUTTIPUN, M.D., PRAKONG TANGPRAPRUTGUL, Ph.D.

The inhibitory effects of hypoxanthine (HX) on nuclear and cytoplasmic maturation of cumulus bovine oocyte complexes (COCs) were studied by light and transmission electron microscopy (LM and TEM). COCs were exposed to 4 mM HX in TCM 199 for 0, 8, 16 and 24 h. Nuclear stages during maturation of normal oocytes occur during various time were compared with those oocytes treated with HX in the same intervals. To study the reversibility of HX action, COCs were washed out of HX after 24 h treatment and re-cultured in the inhibitory-free culture medium (TCM 199) for 24 h. At 0, 8, 16 and 24 h of HX treatment, the percentages of oocytes in GV stage were 95, 93, 81 and 76, respectively whereas in the untreated group, all oocytes underwent GVBD by 8 h culture. GVBD occurred completely after 5 h incubation which was twice as fast as in the control medium (9 h). However, seventy-six percent of oocytes could reach metaphase II (M II) after 24 h incubation whereas 80% of control oocytes reached M II. However, the percentages of oocytes reaching M II in both groups at 24 h were not statistically significant. The morphological study at the beginning of treatment with HX (0 h) showed that GV was intact without chromosome condensation. But after 8, 16 and 24 h treatments, oocytes were maintained in the GV stage with condensed chromosome and normal intact nuclear membrane. During the maturation period, the oocytes underwent a series of clearly defined nuclear meiotic events. Oocyte maturation was also characterized by cytoplasmic changes. The cortical granules (CG) were composed of heterogenous and homogenous particles demonstrated by both the different electron densities and the different sizes similar to those immature oocytes. In contrast, the oocytes after washing out of HX and recultured in control medium. There were more dense electron particles and similar size granules as observed in the normal mature oocytes. These results indicated that 4 mM HX could inhibit the nuclear membrane breakdown but it could not prevent chromosome condensation at 8, 16 and 24 h after treatment. Furthermore, HX could also inhibit the cytoplasmic maturation of CG. The HX treated oocytes could be recultured to mature and normally reached M II after washing out of HX. The morphology of both nuclear and cytoplasmic maturation of HX treated oocytes and their reversibility was demonstrated by TEM. The distribution of CG and the stages of DNA during normal oocyte maturation were also revealed by the confocal laser scanning microscope.

3736140/SCAN : สาขาวิชา : กายวิภาคศาสตร์ : ปร.ด. (กายวิภาคศาสตร์)

บุษบา ปันยารชุน : การศึกษาสารยับยั้งที่มีผลต่อการสุกของไข่วัวในจานแก้ว โดยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาและจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (STUDIES ON THE EFFECT OF INHIBITING FACTOR-HYPOXANTHINE ON THE *IN VITRO* MATURATION OF BOVINE OOCYTES USING LIGHT AND TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : กนก ภาวสุทธิพิศุ, พ.บ.,Ph.D., เรือน สมณะ, Ph.D.,พ.บ., อานนท์ บุญยะรัตเวช, Ph.D., ประพรี เสริมฐรรักษ์, Ph.D., แสงชัย พฤทธิพันธุ์, พ.บ., ประคอง ตั้งประพฤทธิกุล, Ph.D.

การศึกษาสารยับยั้ง, Hypoxanthine (HX) ที่มีผลต่อการเจริญของนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมของไข่วัวด้วยกรรมวิธีทางจุลทรรศน์ธรรมดาและจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน มีการประเมินผลไข่ที่ได้รับการเพาะเลี้ยงในน้ำยาที่มีสาร HX โดยดูระยะของนิวเคลียสทุกช่วงเวลา 0,8,16, และ 24 ชั่วโมง ในชั่วโมงที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงในน้ำยาที่มีสาร HX พบว่า ระยะนิวเคลียสของไข่อยู่ในระยะ germinal vesicle (GV) 93% ในชั่วโมงที่ 16 และ 24 พบว่า HX ไม่สามารถยับยั้งระยะการเจริญของนิวเคลียสให้อยู่เฉพาะในระยะ GV เท่านั้น ไข่ 13% และ 17% สามารถเจริญไปอยู่ในระยะ germinal vesicle breakdown (GVBD) ได้ตามลำดับ ในการศึกษาการผันกลับฤทธิ์ของสารHX ไข่ที่ได้รับการเพาะเลี้ยงในน้ำยาที่มีสาร HX เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาล้างและทำการเพาะเลี้ยงต่อในน้ำยาปกติที่ไม่มีสาร HX เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่า เกิด GVBD อย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่ไข่ปกติจะเกิด GVBD ในชั่วโมงที่ 9 ซึ่งเร็วเกือบเป็น 2 เท่าของไข่ในกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ไข่ในกลุ่มที่ล้าง HX ออกสามารถเจริญและสุกถึงระยะ metaphase II 76% ในขณะที่ไข่ในกลุ่มควบคุมสุก 80% ในชั่วโมงที่ 24 ในช่วงเวลา 8,16 และ 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงในสาร HX พบว่า มีการเกิด chromosome condensation ขึ้นใน GV โดยที่เชื่อมุมนิวเคลียสยังปกติ ส่วนไข่ที่ถูกยับยั้งด้วยสาร HX เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบกลุ่มของคอร์ติคอลแกรนูลที่ประกอบด้วยสารเนื้อเดียวกันและสารเนื้อผสม และมีขนาดแตกต่างกัน ลักษณะนี้พบได้ในคอร์ติคอลแกรนูลในไข่ปกติที่ยังไม่สุก เมื่อนำไข่กลุ่มนี้มาล้างและเพาะเลี้ยงต่อในน้ำยาปกติ พบว่า ลักษณะของคอร์ติคอลแกรนูลจะเรียงตัวกันเป็นแนวเดียวและติดสีเข้ม ซึ่งลักษณะเช่นนี้พบได้ในคอร์ติคอลแกรนูลในไข่ปกติที่สุกแล้ว จากการวิจัยพบว่าสาร HX สามารถยับยั้งการสลายของเชื่อมุมนิวเคลียส แต่ไม่สามารถป้องกันการเกิด chromosome condensation และยับยั้งการเจริญของคอร์ติคอลแกรนูลในขณะที่การเปลี่ยนแปลงของออร์แกเนลล์อื่นๆในไซโตพลาสซึมไม่ปรากฏเด่นชัด ไข่ที่ถูกยับยั้งด้วยสาร HX เมื่อนำมาเพาะเลี้ยง ภายหลังจากล้าง HX ออก สามารถสุกถึงระยะ M II ได้ตามปกติ การศึกษาการสุกของไข่ทั้งในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมที่เพาะเลี้ยงด้วยHX และภายหลังการล้างออกของ HX ได้ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน นอกจากนี้ยังสามารถศึกษาระยะนิวเคลียสและคอร์ติคอลแกรนูลได้พร้อมกันในเวลาเดียวกันด้วยกล้อง confocal laser scanning microscope