

12 JUL 2000



**INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-I PROMOTES
MATURATION RATE OF THE DOMESTIC CAT OOCYTES
*IN VITRO***

DAMRI DARAWIROJ

อธิการบดี

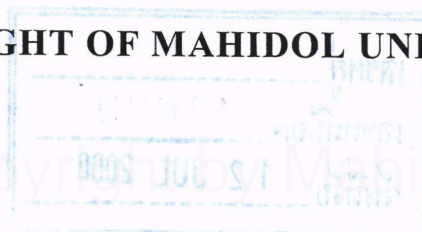
จาก

ศาสตราจารย์ ดร. ทศพลี ม.ม. ผกค.

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

ISBN 974-663-923-4

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY



Copyrights / Mahidol University

TH
D166i
2000
C 2
11000

4136277 SCAN/M : MAJOR : ANATOMY ; M.Sc. (ANATOMY)

KEY WORDS : INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-I / DOMESTIC CAT/
IN VITRO MATURATION

DAMRI DARAWIROJ : INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR -I PROMOTES
MATURATION RATE OF THE DOMESTIC CAT OOCYTES IN VITRO.
THESIS ADVISOR: KANOK PAVASUTHIPAISIT Ph.D., YINDEE KITIYANANT
M.Sc., VIJITTRA LEARDKAMOLKARN Ph.D. 61 p. ISBN 974-663-923-4

The objectives of the present study were to determine the influence of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on domestic cat oocyte maturation *in vitro* and to identify the optimal time for the *in vitro* maturation (IVM). In experiment I, a total of 879 oocytes were obtained from cats subjected to ovariectomy and were classified into 4 grades using the criteria of the complement of cumulus cells and the morphology of oocyte cytoplasm: grade 1 with tightly compacted cumulus cells; grade 2 with less than 5 layers cumulus surrounding; grade 3 with partial cumulus surrounding; and grade 4 with denuded oocytes. Both grades 1 and 2 oocytes have uniformly dark ooplasm, whereas grades 3 and 4 have either dark or pale ooplasm. The oocytes in each grade were randomly divided and cultured in Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) containing 0.4% BSA; 1 µg/ml FSH, LH and estradiol with or without 100 ng/ml IGF-I at 38°C, 5% CO₂. After 32h, the assessment of oocyte maturation was performed. The immature oocytes were stained to identify the meiotic stages. The percentage of grades 1 and 2 mature oocytes (43.54%,46.41%) was markedly increased in DMEM + IGF-I compared to the control (22.40%, 29.50%). In addition, the percentage of mature oocytes in grades 1 and 2 were significantly higher than those in grades 3 and 4 ($p < 0.05$) both in the control and experimental groups. The majority of immature oocytes both in DMEM and DMEM+IGF-I were arrested at germinal vesicle breakdown (GVBD) and metaphase I (MI). On the other hand, no effects of IGF-I on the maturation rate of grades 3 and 4 were observed. In experiment II, to determine the time required for IVM, grades 1 and 2 oocytes were cultured using the same protocol for 32, 36 and 48h. There were no significant differences ($p > 0.05$) in maturation rate among the three incubation times. These results suggested that IGF-I was able to exert the stimulatory effect on only good quality domestic cat oocytes during maturation *in vitro*. This effect may be mediated via cumulus cells. In IVM of domestic cat oocytes, the 32-h culturing time is sufficient for resumption of meiotic maturation.

4136277 SCAN/M : สาขาวิชา : กายวิภาคศาสตร์ ; วท.ม. (กายวิภาคศาสตร์)

คำริ ดาราวีโรจน์ : ผลของ insulin-like growth factor-I ต่ออัตราการสุกของเซลล์ไข่ของแมวที่เพาะเลี้ยงภายนอกร่างกาย (INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-I PROMOTES MATURATION RATE OF THE DOMESTIC CAT OOCYTES IN VITRO) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: กนก ภาวสุทธิไพศิฐ, ปร.ด., ยินดี กิตยานันท์, วท.ม., วิจิตรา เลิศกมลกาญจน์, Ph.D. 61 หน้า. ISBN 974-663-923-4

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบผลของ insulin-like growth factor-I (IGF-I) ต่อการสุกของเซลล์ไข่ของแมวและตรวจหาเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่แมวนอกอกร่างกาย ทำการเก็บรังไข่แมวที่มารับการทำหมันจากโรงพยาบาลสัตว์ โดยแช่ในน้ำเกลือ (0.9% normal saline) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำมาเจาะเก็บเซลล์ไข่อ่อนที่ห้องปฏิบัติการภายในเวลา 4 ชั่วโมง ในการทดลองที่หนึ่ง แบ่งเซลล์ไข่อ่อน เป็น 4 เกรด (เกรด 1 มีเซลล์หุ้มเซลล์ไข่นานมากกว่า 5 ชั้น เกรด 2 มีเซลล์หุ้มเซลล์ไข่ไม่เกิน 5 ชั้น เกรด 3 มีเซลล์หุ้มเซลล์ไข่เพียงบางส่วน เกรด 4 ไม่มีเซลล์หุ้มเซลล์ไข่) แบ่งเซลล์ไข่แต่ละเกรดออกเป็นสองกลุ่ม กลุ่มแรกเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) ที่เติม 0.4 % BSA และ ฮอร์โมน FSH, LH และ estrogen 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กลุ่มที่สอง เลี้ยงใน DMEM ที่มี IGF-I 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากเลี้ยงในตู้บออุณหภูมิตั้งที่ 38 องศาเซลเซียส 5% CO₂ เป็นเวลา 32 ชั่วโมง นำเซลล์ไข่ทั้งสองกลุ่มไปตรวจการสุกโดยใช้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ กำลังขยาย 20 เท่า และ ตรวจดูระยะของการเจริญแบบ meiosis ของเซลล์ไข่ โดยใช้การย้อมด้วย สี aceto-orcein พบว่า เซลล์ไข่เกรด 1 และ 2 มีอัตราการสุกมากกว่าในเกรด 3 และ 4 ทั้งในกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง และเซลล์ไข่ที่เลี้ยงใน DMEM ที่มี IGF-I มีอัตราการสุกสูงกว่าที่เลี้ยงใน DMEM อย่างเดียวเฉพาะในเกรด 1 และ 2 เท่านั้น การเสื่อมของเซลล์ไข่ พบมากในเกรด 3 และ 4 ในการทดลองที่สอง เพาะเลี้ยงเซลล์ไข่เกรด 1 และ 2 ใน DMEM และ DMEM ที่มี IGF-I เป็นเวลา 32, 36 และ 48 ชั่วโมง แล้วตรวจนับจำนวนไข่สุก และระยะแบ่งเซลล์แบบ meiosis ด้วยวิธีเดียวกันกับการทดลองแรก พบว่า อัตราการสุกของเซลล์ไข่แมว ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 32, 36 และ 48 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกัน ทั้งในกลุ่มที่เลี้ยงในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า IGF-I สามารถเพิ่มอัตราการสุกของเซลล์ไข่แมว โดยผลของ IGF-I อาจเป็นการผ่านทางเซลล์หุ้มเซลล์ไข่ และเวลาที่ใช้ในการเลี้ยง 32 ชั่วโมงเพียงพอต่อการสุกของเซลล์ไข่ของแมวที่เพาะเลี้ยงภายนอกร่างกาย