



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

### โครงการ

ผลของการแช่แข็งต่อคุณภาพภายหลังการทำละลาย  
ของโอโอไซต์แมว

**(The effects of cryopreservation on the post-thaw quality  
of cat oocytes)**

โดย ธีรวัฒน์ ธาราसानิต

ระยะเวลาดำเนินงานวิจัย 1 กรกฎาคม พ.ศ. 2549 ถึง 30 กันยายน พ.ศ. 2551

สัญญาเลขที่ MRG4980108

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ผลของการแช่แข็งต่อคุณภาพภายหลังการทำละลาย  
ของโอโอไซด์แมว

โดย

ธีรวัฒน์ ธาราसानิต

ภาควิชาสัตวศาสตร์ เหนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์  
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

Abstract

---

**Project Code: MRG4980108**

**Project Title: The effect of cryopreservation on the post-thaw quality of cat oocytes**

**Investigator: Theerawat Tharasanit**

**Department of Obstetrics, Gynaecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University**

**E-mail Address: Theerawat.t@chula.ac.th, Tharasanit@hotmail.com**

**Project Period: July 2006 to 30 September 2008**

*In vitro* matured oocytes demonstrate poor developmental competence, and this stems embryo development of cryopreserved-thawed oocytes. This study examined the effect of “LH-free” recombinant human FSH (rhFSH) on meiotic competence, redistribution of oocyte’s cytoskeleton and also capability of the oocytes to withstand cryopreservation. In experiment I, cumulus oocyte complexes (COCs) were cultured for 24h in a defined maturation medium containing with 0, 0.01, 0.05, 0.1, and 1.0 IU rhFSH and also in a combination of either luteinizing hormone (LH), insulin like growth factor-1 (IGF-1) or epidermal growth factor (EGF). Nuclear and cytoplasmic maturation of the oocytes was assessed by means of fluorescent labelling of the oocyte’s chromatin and cytoskeletal elements (actin microfilaments and microtubules) and also *in vitro* embryo culture. In experiment II, the oocytes were vitrified at immature stage and then subjected to *in vitro* maturation, fertilization and embryo culture.

rhFSH significantly increased the number of oocytes reaching metaphase II (MII) stage when compared with non-rhFSH treated controls (MII rates: 67.9% vs 36.9%,  $p < 0.05$ ). Because rhFSH at 0.01, 0.05, 0.1 and 1 IU/ml yielded similar MII rates (~70%), the medium dose of 0.1 IU/ml rhFSH was used in subsequent study. When examined the cytoplasmic maturation, rhFSH induced normal redistribution of actin microfilaments and microtubules during the course of *in vitro* maturation. Although rhFSH enhanced meiotic competence of cat oocytes but *in vitro* maturation of oocyte using either rhFSH+EGF or rhFSH+IGF-1 yielded high rates of blastocyst development (23.2% and 21.9, respectively). In exp. II, vitrification and warming of immature cat oocytes significantly reduced MII rates (~40 % vs. ~70% of controls), while cryoprotectants used *per se* did not affect meiotic competence. Cryopreservation of the oocytes induced poor developmental competence, in terms of cleavage and blastocyst formation rates (i.e., ~ 30% and 7%, respectively). In conclusion, rhFSH and growth factors are capable of enhancing nuclear and cytoplasmic maturation of cat oocytes by means of meiotic competence, normal reorganisation of oocyte’s cytoskeleton and embryo development. Vitrification of cat immature oocytes induces poor *in vitro* maturation, fertilizability and embryo development.

**Keywords:** cat, oocyte, follicle stimulating hormone, growth factor, vitrification

รหัสโครงการ: MRG4980108

ชื่อโครงการ: ผลของการแช่แข็งต่อคุณภาพภายหลังการทำละลายของโอโอไซต์แมว

ชื่อนักวิจัย: อีรวัฒน์ ธาราสนิต

ภาควิชาสัตวศาสตร์ ฐานเวทยาและวิทยาการสืบพันธุ์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address: Theerawat.t@chula.ac.th, Tharasanit@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ: กรกฎาคม พ.ศ. 2549 ถึง 30 กันยายน พ.ศ. 2551

โอโอไซต์แมวที่ผ่านการเจริญพร้อมปฏิสนธิภายนอกร่างกายเจริญเป็นตัวอ่อนได้น้อย ทำให้ประสิทธิภาพการผลิตตัวอ่อนของโอโอไซต์แช่แข็งอยู่ในเกณฑ์ต่ำ การศึกษาในครั้งนี้ทดสอบความสามารถของการใช้ ฟอลลิเคิล สติมูเลตติ้ง ฮอร์โมน (rhFSH) ในขนาดต่างๆ ต่อการเจริญพร้อมปฏิสนธิ การกระจายตัวของเซลล์โครงร่าง อัตราการปฏิสนธิและการผลิตตัวอ่อนระยะบลาสโตซิส การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของการใช้ rhFSH ขนาดต่างๆ กัน ร่วมกับการใช้ฮอร์โมนแอล เอช และโกรท แฟคเตอร์ 2 ชนิด (epidermal growth factor และ insulin like growth factor-1) ส่วนในการทดลองที่ 2 นั้นศึกษาประสิทธิภาพการแช่แข็งโอโอไซต์ด้วยวิธีวิทริฟิเคชัน (vitrification) จากนั้นนำโอโอไซต์มาเลี้ยงพร้อมปฏิสนธิ ปฏิสนธิและผลิตตัวอ่อนตามลำดับ

rhFSH กระตุ้นอัตราการเจริญพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์ได้สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่มี rhFSH (อัตราโอโอไซต์ระยะ MII: 67.9% vs 36.9%,  $p < 0.05$ ) เนื่องจาก rhFSH ในแต่ละขนาดให้ผลการเลี้ยงโอโอไซต์ไม่ต่างกัน การศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้ rhFSH ขนาด 0.1 IU/มล. เมื่อทำการตรวจการกระจายตัวของเซลล์โครงร่างในโอโอไซต์จะพบว่าการเปลี่ยนแปลงควบคู่ไปกับการเจริญพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์ อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่า rhFSH จะช่วยให้จำนวนโอโอไซต์ระยะพร้อมปฏิสนธิเพิ่มจำนวนขึ้น การใช้โกรท แฟคเตอร์ร่วมกับ rhFSH ช่วยให้ผลิตตัวอ่อนได้มากขึ้น (23.2 และ 21.9 สำหรับ EGF+rhFSH และ IGF-1+rhFSH ตามลำดับ) สำหรับในการทดลองที่ 2 นั้นพบว่า การแช่แข็ง (วิทริฟิเคชัน) โอโอไซต์มีผลทำให้อัตราการเจริญพร้อมปฏิสนธิและอัตราการผลิตตัวอ่อนบลาสโตซิสลดลง (7% เทียบกับ 30%) การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า rhFSH และ โกรท แฟคเตอร์ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตตัวอ่อนแมว การแช่แข็งและการทำละลายโอโอไซต์แมวมียผลในทางลบต่อการเจริญพร้อมปฏิสนธิและการผลิตตัวอ่อนแมวบ่าน

คำสำคัญ: แมว; โอโอไซต์; ฟอลลิเคิล สติมูเลตติ้ง ฮอร์โมน; โกรท แฟคเตอร์; วิทริฟิเคชัน

### หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานของอาจารย์รุ่นใหม่

## 1. ชื่อโครงการ

(ภาษาไทย) ผลของการแช่แข็งต่อคุณภาพภายหลังการทำละลายของโอโอไซต์แมว

(ภาษาอังกฤษ) The effect of cryopreservation on the post-thaw quality of cat oocytes

## 2. ชื่อ หัวหน้าโครงการวิจัย หน่วยงานที่สังกัด

อ.น.สพ. ดร. ชีรวัฒน์ ธาราปานิต

ภาควิชาสัตวศาสตร์ เชนเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทร. 2189644-5 Fax. 02-2520738

Email: [theerawat.t@chula.ac.th](mailto:theerawat.t@chula.ac.th), [tharasanit@hotmail.com](mailto:tharasanit@hotmail.com)

## 3. สาขาวิชา

วิทยาการสืบพันธุ์สัตว์

## 5. ระยะเวลาดำเนินการ

2 ปี

## 6. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การเก็บรวบรวมและการเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์ (อสุจิ โอโอไซต์ และตัวอ่อน) ด้วยการแช่แข็ง (cryopreservation) เพื่อเป็นธนาคารเก็บรวบรวมสายพันธุ์กรรม (gene resource bank) เป็นอีกเทคโนโลยีหนึ่งที่สำคัญ โดยภายหลังการแช่แข็งและเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์ในระยะยาว เซลล์เหล่านี้จะคงความสามารถในการปฏิสนธิในกรณีของอสุจิ หรือสามารถเจริญพร้อมปฏิสนธิในกรณีของโอโอไซต์ และท้ายที่สุดตัวอ่อนที่ได้ต้องสามารถเจริญต่อไปจนได้ลูกสัตว์ที่แข็งแรงและสมบูรณ์ การแช่แข็งเซลล์สืบพันธุ์ในลักษณะนี้จะช่วยให้ง่ายต่อการขนส่งเซลล์ไปยังสถานที่ต่างๆ ได้สะดวกยิ่งขึ้น ลดการขนส่งหรือย้ายตัวสัตว์ ทำให้การแลกเปลี่ยนสายพันธุ์กรรมระหว่างสัตว์แต่ละชนิดเป็นไปได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้การแช่แข็งสารพันธุกรรมยังมีประโยชน์ในแง่ของการเก็บรักษาพันธุกรรมของสัตว์ป่าหายากที่ตายอย่างกะทันหัน ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคโนโลยีชีวภาพอื่นๆ เช่น การผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกายและการโคลนนิ่ง (conventional *in vitro* embryo production and cloning) ถึงแม้ว่าในปัจจุบันการแช่แข็งอสุจิจะได้รับการพัฒนาและประสบความสำเร็จในระดับที่ดี การแช่แข็งอสุจิเพื่อใช้สำหรับการผสมเทียมเป็นเพียงการเก็บรักษาพันธุกรรมของสัตว์เพศผู้เท่านั้น การเก็บรักษาพันธุกรรมในสัตว์ป่าหายากเพศเมีย (เก็บรักษารังไข่ ฟอลลิเคิล และโอโอไซต์) จึงยังคงเป็นสิ่งที่จำเป็นสำหรับการอนุรักษ์สายพันธุ์กรรมของสัตว์เพศเมีย อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของการแช่แข็งโอโอไซต์ยังอยู่ในเกณฑ์ต่ำ และจำนวนตัวอ่อนที่ผลิตได้จากโอโอไซต์แช่แข็งมีจำนวนน้อยเมื่อเทียบกับโอโอไซต์ที่ไม่ได้ผ่านการ

แช่แข็ง ในปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุที่แท้จริงว่าตัวแปรไหนจะช่วยเสริมประสิทธิภาพการแช่แข็ง โอโอไซต์ ทั้งนี้เนื่องจากยังขาดความรู้พื้นฐานและประยุกต์ในเรื่องสรีรวิทยาและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ระหว่างและภายหลังการแช่แข็ง ดังนั้นเพื่อเป็นการศึกษาและพัฒนาศักยภาพของการแช่แข็งโอโอไซต์ การศึกษาผลกระทบของการแช่แข็งต่อการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างต่างๆ ภายในโอโอไซต์ รวมถึงพัฒนาการของโอโอไซต์ภายหลังการแช่แข็ง จึงมีความจำเป็นในการเพิ่มประสิทธิภาพการเก็บรักษาพันธุกรรมของสัตว์ตระกูลแมวเทศเมีย องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้จะใช้ประโยชน์ในเชิงอนุรักษ์โดยเฉพาะสัตว์ตระกูลแมว

## 7. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการเลี้ยงโอโอไซต์แมวให้เจริญพร้อมปฏิสนธิ และเจริญเป็นตัวอ่อน
2. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการแช่แข็งโอโอไซต์สำหรับใช้เป็นงานวิจัยนำร่องเพื่อการเก็บรักษาพันธุกรรมในสัตว์ตระกูลแมว
3. เพื่อศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงระหว่างและภายหลังการแช่แข็งโอโอไซต์ในระยะยังไม่พร้อมปฏิสนธิ (immature oocytes) และระยะพร้อมปฏิสนธิ (mature oocytes)

## 8. ระเบียบวิธีวิจัย (อย่างย่อ)

### 8.1 การเก็บรังไข่และโอโอไซต์

รังไข่ที่ได้จากการผ่าตัดทำหมันแมวเทศเมียจะถูกเก็บรักษาในน้ำเกลือที่ผสมยาปฏิชีวนะ (เพนนิซิลินและสเตปโตมัยซิน) ที่อุณหภูมิประมาณ 30°C รังไข่จะถูกตัดแบ่งเป็นชิ้นเล็กๆ เพื่อให้โอโอไซต์หลุดออกมาภายในระยะเวลาประมาณ 2-4 ชั่วโมงนับจากการตัดรังไข่ออกจากตัวสัตว์ ทำการประเมินคุณภาพของ โอโอไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ โอโอไซต์ที่มีเซลล์คลุมลิสหุ้มหนาแน่นและไซโทพลาสซึมสีดำนเข้มและเป็นเนื้อเดียวกัน จะจัดเป็นโอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิ (immature oocytes) และจะถูกนำไปใช้สำหรับงานวิจัย

### 8.2 การแช่แข็งโอโอไซต์

นำโอโอไซต์ระยะพร้อมและไม่พร้อมปฏิสนธิไปแช่แข็งแบบรวดเร็ว (vitrification) ในน้ำยาแช่แข็งโอโอไซต์ที่ประกอบด้วยในสารป้องกันการแช่แข็งได้แก่ ไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulphoxide; 20%) และ เอทิลีนไกลคอล (ethylene glycol; 20%) ในสารละลายชนิด M199 ที่ผสม HEPES ภายหลังสัมผัสน้ำยาแช่แข็งโอโอไซต์แล้ว โอโอไซต์จะถูกดูดเข้าไปในหลอดแช่แข็ง (freezing straw) ที่ถูกยืดจนมีขนาดเล็กหรือที่เรียกว่า โอ พี เอส (OPS; open pulled straw) เพื่อให้มีการชักนำและแลกเปลี่ยนอุณหภูมิได้ไวยิ่งขึ้น ภายใน 1 นาทีหลังจากโอโอไซต์สัมผัสกับน้ำยาแช่แข็ง หลอดโอพีเอสจะถูกจุ่มและเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวประมาณ 1-2 สัปดาห์ ก่อนจะนำมาใช้ศึกษาต่อไป

### 8.3 การเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญถึงระยะพร้อมปฏิสนธิ การปฏิสนธิและการเลี้ยงตัวอ่อน (*in vitro* maturation, fertilization and embryo culture)

โอโอไซต์ที่เก็บได้จากรังไข่แมวบ้านจะถูกนำมาประเมินคุณภาพและคัดเลือก เลี้ยงโอโอไซต์ที่คุณภาพดีในน้ำยาที่ประกอบด้วย M199, ฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ชนิดรีคอมบิแนนท์ (recombinant human follicle stimulating hormone; rhFSH) และโกรทแฟกเตอร์อื่นๆ เช่นอีพีเดอร์มอล โกรท แฟกเตอร์ (epidermal growth factor) insulin like growth factor-1 และ 0.4 % (w/v) โปรตีนอัลบูมิน (bovine serum albumin; BSA) ในตู้อบชนิด 5 %CO<sub>2</sub> อุณหภูมิ 38.5 °C ภายหลังการเลี้ยงโอโอไซต์ 24 ชั่วโมง โอโอไซต์ระยะพร้อมปฏิสนธิจะสังเกตได้จากการมี 1<sup>st</sup> polar body โอโอไซต์ระยะพร้อมปฏิสนธินี้จะถูกเลี้ยงในน้ำยาสำหรับปฏิสนธิ (*in vitro* fertilization medium) พร้อมกับอสุจิที่ความเข้มข้น  $0.5 \times 10^6$  ต่อ 1 มิลลิลิตร นาน 20-22 ชั่วโมง ในตู้อบชนิด 5 %CO<sub>2</sub> อุณหภูมิ 38.5 °C โอโอไซต์ที่ผ่านการปฏิสนธิจะถูกนำไปเลี้ยงในสารละลายสังเคราะห์ของท่อไข่ (synthetic oviductal fluid; SOF) ที่ประกอบด้วย 10% (w/v) ซีรัม (fetal calf serum) และกรดอะมิโนชนิดจำเป็นและไม่จำเป็น (essential and non-essential amino acids)

#### 8.4 แผนการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้แบ่งออกเป็น 2 การทดลองย่อยดังนี้

8.4.1 การศึกษาสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิด้วยการใช้ฮอร์โมน rhFSH ในขนาดต่างๆ ได้แก่ 0.01, 0.05, 0.1 และ 1 IU/มล. น้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์ที่ไม่ใส่ฮอร์โมนเป็นกลุ่มควบคุม ทำการวัดผลการเจริญพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์ด้วยการย้อมสีเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำการตรวจอัตราการปฏิสนธิภายหลังการทำการปฏิสนธิภายนอกร่างกายเพื่อคัดเลือกขนาดของ rhFSH ที่เหมาะสม จากนั้นนำมาทำการศึกษาถึงผลของฮอร์โมน LH, IGF-1 และ EFG ร่วมกับการใช้ rhFSH ในการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย โอโอไซต์บางส่วนถูกนำมาย้อมสีเรืองแสงเพื่อตรวจการเปลี่ยนแปลงของเซลล์โครงร่าง (cell cytoskeleton) ที่ประกอบด้วย แอคติน ไมโครฟิลาเมนต์ และไมโครทิวบูล) ที่ชั่วโมงที่ 0, 6, 12, 18 และ 24 ชม. ของการเลี้ยงโอโอไซต์พร้อมปฏิสนธิ

8.4.2 การศึกษาผลของการแช่แข็งแบบรวดเร็ว หรือวิทริฟิเคชัน (vitrification) ต่อคุณภาพของโอโอไซต์ภายหลังการทำละลาย ทำการเลือกหาสภาพที่เหมาะสมในการแช่แข็งโอโอไซต์ระยะ immature ได้แก่ ชนิดและวิธีสัมผัสสารป้องกันการแช่แข็ง ผลของปริมาณน้ำตาล และอัตราปฏิสนธิและอัตราการผลิตตัวอ่อนของโอโอไซต์แช่แข็ง

#### 8.5 การเก็บข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ประสิทธิภาพของการแช่แข็งโอโอไซต์จะถูกประเมินจากความสามารถในการเจริญของโอโอไซต์ทั้งระยะไม่พร้อมปฏิสนธิ (immature oocytes) และโอโอไซต์ระยะพร้อมปฏิสนธิ (mature oocytes) ความปกติของเซลล์โครงร่างและความสามารถในการปฏิสนธิ (fertilizability)

และพัฒนาการของโอโอไซต์จนถึง ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิส (developmental competence) ตัวแปรต่างๆ จะถูกเปรียบเทียบระหว่างโอโอไซต์ที่ผ่านการแช่แข็งในระยะ immature และ กลุ่มควบคุม โดยใช้วิธี Chi-square จากโปรแกรมทางสถิติ SAS version 9.1

## 8.6 ผลการศึกษา

### การทดลองที่ 1

#### 1. ผลของระดับ rhFSH ต่อการเจริญพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์แมว

ระดับ rhFSH มีความสำคัญต่อการเจริญพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์แมว โดยระดับของ rhFSH เพียงเล็กน้อยมีผลในการกระตุ้นการพัฒนาของโอโอไซต์ในระดับนิวเคลียสและระดับไซโทพลาสซึม ระดับ rhFSH ที่ 0.01, 0.05, 0.1 และ 1.0 IU/ มล. ให้ผลกระตุ้นการเจริญโอโอไซต์ที่ไม่แตกต่างกัน (ประมาณ 70% MII) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงโอโอไซต์โดยไม่ใส่ฮอร์โมน

#### 2. ผลของระดับ rhFSH ต่อการอัตราปฏิสนธิโอโอไซต์แมว

ระดับ rhFSH มีความสัมพันธ์กับอัตราการปฏิสนธิของโอโอไซต์แมว โดยมีอัตราการปฏิสนธิประมาณ 50-70 เปอร์เซ็นต์ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงโอโอไซต์โดยไม่ใส่ฮอร์โมน (อัตราปฏิสนธิเท่ากับ 24.7%)

#### 3. การรูปแบบการเจริญและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์โครงร่างของโอโอไซต์แมว

พบว่าโอโอไซต์ที่เก็บได้จากรังไข่จะอยู่ในระยะไม่พร้อมปฏิสนธินานประมาณ 6-12 ชม. ซึ่งโอโอไซต์ระยะนี้จะมีการกระจายตัวของแอคติน ไมโครฟิลาเมนต์ ทั่วไปในโอโอไซต์ ส่วนไมโอติก สปินเดิล ที่เกิดจากการรวมตัวของไมโครทิวบูลพัฒนาเสร็จสมบูรณ์เมื่อโอโอไซต์ถูกเลี้ยงประมาณ 12-18 ชม. ไมโอติก สปินเดิลนี้ทำหน้าที่ในการแยกชุดโครโมโซม โดยมีแอคติน ไมโครฟิลาเมนต์ช่วย การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของโอโอไซต์ทั้งในระดับนิวเคลียสและไซโทพลาสซึม การพัฒนาพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์เกิดขึ้นไม่พร้อมกัน

#### 4. ผลของ rhFSH ร่วมกับ LH, EGF และ IGF-1 ต่อการพัฒนาตัวอ่อนแมว

rhFSH สามารถใช้เป็นฮอร์โมนกระตุ้นการพัฒนาของตัวอ่อนได้แต่ในปริมาณที่ต่ำ การเพิ่มฮอร์โมน แอลเอช ในน้ำเลี้ยงโอโอไวต์ไม่สามารถจำนวนตัวอ่อนที่ผลิตได้ ส่วนโกรท แพคเตอร์ที่ใช้ทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ IGF-1 และ EGF ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตตัวอ่อนโดยในการศึกษาครั้งนี้สามารถผลิตตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสในอัตราประมาณ 20% (คำนวณจากโอโอไซต์เริ่มต้น)

### การทดลองที่ 2

#### 1. ผลของชนิดและวิธีสัมผัสสารป้องกันการแช่แข็ง

เมื่อทำการเปรียบเทียบชนิดของสารป้องกันการแช่แข็งและวิธีการสัมผัสของสารป้องกันการแช่แข็ง จะพบว่าการให้โอโอไซต์สัมผัสสารป้องกันการแช่แข็งอย่างซ้ำๆ (4-step) ช่วยเพิ่ม



อัตราการรอดของโอโอไซต์ภายหลังการแช่แข็ง (อัตราเจริญพร้อมปฏิสนธิประมาณ 30-40%) เมื่อเปรียบเทียบกับโอโอไซต์ที่สัมผัสสารป้องกันการแช่แข็งแบบ 2-step

## 2. ผลของปริมาณน้ำตาลต่อประสิทธิภาพการแช่แข็งโอโอไซต์แมว

การศึกษานี้ทำเพื่อศึกษาผลของการเติมน้ำตาลซูโครสที่ 2 ความเข้มข้นคือ 0.3 และ 0.6 โมลาร์ การศึกษาครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของอัตราการเจริญพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์แช่แข็งแต่การเติมน้ำตาล 0.6 โมลาร์มีแนวโน้มให้โอโอไซต์ที่มีคุณภาพดีกว่า

## 3. อัตราปฏิสนธิและอัตราการผลิตตัวอ่อนของโอโอไซต์แมวแช่แข็ง

เมื่อทำการแช่แข็งโอโอไซต์และทำละลายแล้ว นำโอโอไซต์มาเลี้ยงพร้อมปฏิสนธิ ปฏิสนธิ และเลี้ยงตัวอ่อน พบว่าประสิทธิภาพการผลิตตัวอ่อนจากโอโอไซต์แช่แข็ง (7.5% blastocyst rate) อยู่ในเกณฑ์ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่โอโอไซต์ไม่ผ่านการแช่แข็ง

## 8.6 วิจารณ์ผลการศึกษา

ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการผลิตตัวอ่อนแมวสามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการแต่เนื่องจากมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการผลิตตัวอ่อนหลายประการ การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเกี่ยวกับการใช้ฮอร์โมน rhFSH ต่อการเจริญพร้อมปฏิสนธิและการผลิตตัวอ่อน โดยไม่จำเป็นต้องใช้ฮอร์โมน LH ซึ่งผลของการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์เพื่อใช้ในการศึกษากลไกการควบคุมและกระตุ้นการเจริญของโอโอไซต์ การตรวจโอโอไซต์ทุกๆ 6 ชม. ช่วยให้สามารถตรวจการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างไมโครทิวบูล และ แอคติน ไมโครฟิลาเมนต์ ในขบวนการเจริญพร้อมปฏิสนธิได้ และรูปแบบการเปลี่ยนแปลงเป็นไปในแนวทางเดียวกับสัตว์ชนิดอื่นๆ อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่า rhFSH จะสามารถกระตุ้นโอโอไวต์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิได้ แต่อัตราความสำเร็จอยู่ในเกณฑ์ต่ำ จากการศึกษาจะเห็นได้ว่าฮอร์โมน LH ไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตตัวอ่อนได้ แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงโอโอไซต์ให้พร้อมปฏิสนธิอาจไม่ผ่านกลไกของฮอร์โมน LH ในลักษณะที่พบในการเจริญของโอโอไซต์ในร่างกาย (*in vivo* oocyte maturation) นอกจากนี้โกรทแฟกเตอร์ IGF-1 และ EGF สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเป็นตัวอ่อนได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานในสัตว์ชนิดอื่นๆ

การศึกษาในการทดลองที่ 2 แสดงให้เห็นว่าสามารถทำการแช่แข็งโอโอไซต์ระยะไม่พร้อมปฏิสนธิได้ แต่ทำให้อัตราความสามารถของโอโอไซต์ในการเจริญเป็นตัวอ่อน เทคนิคการแช่แข็งมีผลอย่างยิ่งต่ออัตราของตัวอ่อน เนื่องจากการแช่แข็งด้วยวิธีวิทรีฟิเคชันจำเป็นต้องใช้สารป้องกันการแช่แข็งในความเข้มข้นที่สูงซึ่งมักทำให้เกิดความเป็นพิษกับตัวอ่อน การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารป้องกันการแช่แข็งไวเกินไปอาจทำให้เกิดแรงดันออสโมซิสที่สูงและมีผลต่อการทำลายโครงสร้างของโอโอไซต์ ยังคงต้องมีการพัฒนาการแช่แข็งโอโอไซต์แมวต่อไปเนื่องจากมีความสำคัญในการเก็บรวบรวมพันธุ์กรรมสัตว์ป่าตระกูลแมว

## 8.7 บทสรุป

สามารถผลิตตัวอ่อนภายนอกครรภ์ได้ด้วยอัตราที่ใกล้เคียงกับระดับนานาชาติ ชนิดของฮอร์โมนและโกรท แพคเตอร์มีความสำคัญต่อการเจริญของโอโอไซต์แม่ว การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถทำการแช่แข็งโอโอไซต์แม่วได้ ถึงแม้ว่าอัตราความสำเร็จยังอยู่ในเกณฑ์ต่ำเมื่อเทียบกับโอโอไซต์ที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง

## Importance and rational

Fundamental and application study of *in vitro* maturation (IVM), *in vitro* fertilization (IVF) and *in vitro* culture of embryo (IVC) in domestic cat has become increasingly important aspects for conservation of endangered felid species (reviewed by Swanson, 2006). In addition, the domestic cat has also been used as a model for biomedical research because cat genome is highly conserved and exhibits the most similarity to that of human (O'Brien et al., 1999). To date, however the efficiency of these techniques has met only limited success, especially when oocytes are matured *in vitro* (Swanson et al., 1994). During oocyte maturation, the oocyte must undergo a series of nuclear and cytoplasmic changes in order to complete its competence. Most *in vivo* matured oocytes acquire their developmental competence by bidirectional communication or interaction between the oocyte and companion somatic cells within the follicle (Matzuk et al., 2002). When these oocytes are fertilized and cultured *in vitro*, they demonstrate greater fertilization and blastocyst formation rates compared favorably to *in vitro* matured oocytes (Roth et al., 1994). More specifically, intrinsic factors within the ovary/follicle promote cytoplasmic competence that supports fertilization process and enhances embryo developmental capability. Currently, a number of strategies have been tested, aimed specifically to improve cytoplasmic competence of mammalian oocytes during oocyte maturation (see review: Gilchrist and Thompson, 2007). These strategies would reveal the mechanism underlying the process of oocyte maturation *in vitro*, and also to find potential markers that reflect their developmental competence. Follicle stimulating hormone (FSH) known to enhance meiotic and developmental competence of oocytes, while the gonadotrophin preparation used during *in vitro* oocyte maturation is usually contaminated with luteinizing hormone (LH). Many reports revealed that FSH is only gonadotrophin of choice for *in vitro* maturation. Until recently, role of LH during IVM has not yet clearly understood. Using DNA technology, recombinant FSH without any action of LH has been developed in human. This recombinant FSH would be beneficial to characterize the individual action of FSH and LH, however recombinant human FSH (rhFSH) has not yet been tested for embryo production in cat species. It is therefore essential to examine the effects of rhFSH on developmental competence of cat oocytes. In addition, it is also worth to note that the synchronization between nuclear and cytoplasmic maturation is critically important to determine oocyte's developmental competence, while most IVM studies have only focused on nuclear maturation and information regarding to the cytoplasmic maturation of the cat oocyte is very limited.

*In vitro* maturation of oocyte is a complex process that occurs spontaneously when an immature oocyte (germinal vesicle stage: GV) is removed from inhibitory factors within the follicle (Pincus and Enzmann, 1935). After condensation of chromatin, nuclear membrane then starts to disintegrate (germinal vesicle breakdown: GVBD) and microtubule-rich domain is formed and become the meiotic spindle. This meiotic spindle plays an essential role in segregating chromosomes during meiosis and also contributes to many aspects during fertilization (Kim et al., 1997). In addition, actin microfilaments support cell plasma membrane and also involve in several cell functions. These two cell cytoskeleton elements have been used to evaluate cytoplasmic changes during *in vitro* maturation and also cell damage after cryopreservation (Tremoleda et al., 2001, Tharasanit et al., 2006, Comizzoli et al., 2004).

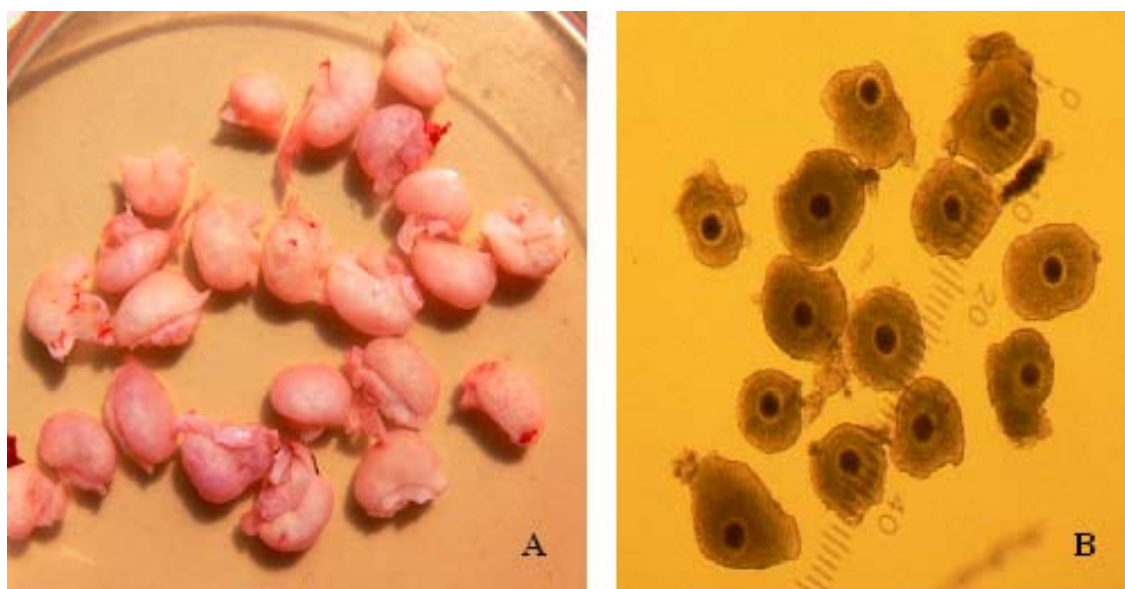
Domestic cat has been used as a valuable model for wild species, and therefore it is also of importance to examine the cryopreservability of the oocytes. This technique would be useful when the animals would unexpectedly and the facility for producing embryo (*in vitro* oocyte maturation, fertilization and embryo culture) is restricted. To date, knowledge about the response of oocyte to cryopreservation is poor.

### Materials and Methods

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, USA, unless otherwise specified.

#### Isolation and *in vitro* maturation of cumulus oocyte complexes

Domestic cat ovaries (Figure 1A) from mixed breeds and various stages of estrous cycle were collected immediately after routine ovariohysterectomy (OVH) from the Veterinary Public Health, Division of the Bangkok Metropolitan Administration. The ovaries were then maintained and transported at room temperature in 0.9% (w/v) normal saline solution supplemented with 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Within 6h after OVH, the ovaries were dissected free from connective tissue and washed twice in holding medium consisting of Hepes buffered tissue culture medium 199 (M199), 1.0 mM pyruvate, 2.0 mM glutamine, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 4 mg/ml bovine serum albumin (BSA). To obtain cumulus oocyte complexes (COCs), ovarian cortex was minced using a surgical blade. The COCs with darkened homogenous ooplasm and completely surrounded by at least 3-5 layers of cumulus cells were only used in this study (Figure 1B). For *in vitro* maturation, a group of 15-25 COCs were cultured at 38.5°C in humidified condition of 5% CO<sub>2</sub> in air. The maturation medium was consisted of NaHCO<sub>3</sub> buffered M199, 2.0 mM L-glutamine, 1.0 mM pyruvate, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 4 mg/ml BSA and 0.1 IU/ml recombinant human follicle stimulating hormone (rhFSH).



**Figure 1** Feline ovaries obtained after ovariohysterectomy (A) and grade A cumulus oocyte complexes used in this study (B)

### **Vitrification of immature oocytes using the open pulled straw (OPS) technique**

OPS vitrification of COCs was performed essentially as described by Vajta et al. (1998). In brief, 0.25 ml polyvinyl chloride straws were modified by heating them over a hot plate (approximately 100°C) and then stretching them manually until the outer diameter was approximately half of its original size. COCs were maintained in holding medium (HM) consisting of Hepes buffered tissue culture medium 199 (M199), 1.0 mM pyruvate, 2.0 mM glutamine, 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 4 mg/ml bovine serum albumin (BSA). The COCs were prepared for vitrification by equilibration for 60 sec in a 50µl droplet of HM supplemented with 10% (v/v) Ethylene glycol (EG), and were then transferred to a 50 µl droplet of 20 %, 30 % EG solutions for 30 sec in each step. The COCs were vitrified by transferred the COCs into vitrification solution that contained with 40% EG and 0.5M sucrose. After approximately 15 sec, the oocytes were moved to a 2µl droplet of fresh vitrification solution and loaded into an OPS by capillary action. The loaded straws were submerged immediately in liquid nitrogen, such that oocytes were exposed to vitrification medium for a total of only 20-25 sec prior to vitrifying. Warming of vitrified oocytes was performed by immersing the OPS straw at 37°C in a thawing solution consisting of 0.3M sucrose in holding medium. The oocytes were expelled into this solution and incubated for 5 min before being transferred to holding medium.

### ***In vitro* fertilization and embryo culture**

After 24 h of *in vitro* maturation, the cumulus cells were partially removed from COCs by gently pipetting. *In vitro* fertilization was performed essentially as described by Pope (2004) with minor modifications. In brief, groups of 5-10 oocytes were transferred to 50 µl droplets of IVF medium (Tyrode's balanced salt solution containing 1% MEM non-essential amino acid (NEAA), 6 mg/ml BSA, 100 IU/ml penicillin, 30 µg/ml heparin and IVFx100). Semen used in this study was collected by electro ejaculation tom cats, and then stored frozen. The frozen sperm was thawed in air for a few second and then submerged into 70 °C water for 6 sec. The thawed semen was immediately diluted 1:1 in Tris buffer solution. After the frozen-thawed sperm were washed twice with IVF medium, the oocytes were then co-cultured with sperm at a final concentration of  $0.5 \times 10^6$  sperm/ml for 18-24 hrs. In the first day of embryo culture, presumptive zygotes were cultured in 20 µl droplet of synthetic oviductal fluid (SOF) containing 4 mg/ml BSA and 100 IU/ml penicillin. SOF containing 10% (v/v) FCS (Gibco, USA) was used for embryo culture during day 2 to day 7. In all cases, *in vitro* culture was performed at 38.5 °C in a humidified condition of 5% CO<sub>2</sub> in air. Embryo development by means of cleavage and blastocyst rates was examined on day 2 and day 7 of embryo culture, respectively. The blastocysts were typified by the embryos that demonstrated and contained with more than 60 cells.

### **Assessment of nuclear status and embryo development**

To evaluate stages of nuclear maturation during *in vitro* maturation, COCs were denuded, fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde and stained with a fluorescent DNA labeling (4',6-Diamidino-2-phenylindole: DAPI). The oocytes were mounted onto a microscopic glass slide and then examined their nuclear status using an epifluorescent microscope (BX51 Olympus, Japan). Nuclear status of the oocytes was classified as GV, MI and MII stage. The percentage of cleaved embryos (2 to 8 cells), and blastocysts containing >50 cells with blastocoelic cavity were evaluated on day 2 and 7 of embryo culture, respectively. Embryonic nuclei were evaluated with DAPI staining.

### **Immunofluorescent labeling of the meiotic spindle and chromatin**

Denuded oocytes were incubated for 45 min at 37°C in a glycerol-based microtubule stabilizing solution containing 25% (v/v) glycerol, 50 mM KCL, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM 2-mercaptoethanol, 50 mM imidazol, and 4% Triton-X-100 (Simerly and Schatten, 1993). After a brief wash with PBS-BSA, the oocytes were fixed and stored in 4% (w/v) paraformaldehyde until analysis.

When required, oocytes destined to microtubule labeling were first incubated for 1h at room temperature with a 1:100 solution of mouse monoclonal anti- $\alpha$ -tubulin antibody (clone B1-5-1-2: Sigma-Aldrich) in PBS-BSA. After a further wash with PBS-BSA, the oocytes were incubated for 1h with a 1:100 solution of goat anti-mouse second antibody conjugated to tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC) in PBS supplemented with 2% (v/v) goat serum. To visualize actin microfilament, the oocytes were then incubated in a solution of 0.165  $\mu$ M Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 phalloidin (Molecular probes) in PBS-BSA for 30 min. The oocytes were finally stained with 0.1  $\mu$ g/ml fluorescent DNA labelling (4'6' Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride: DAPI) to visualize the chromatin configuration of the oocytes.

### **Confocal laser scanning microscopy (CLSM)**

To assess cell cytoskeleton and chromatin configurations during *in vitro* maturation, fluorescent-labeled oocytes were mounted on glass microscope slides in a 2  $\mu$ l droplet of antifade medium (Vectashield, Vector Labs, Burlingame, CA, USA) to retard photobleaching, and sealed under a coverslip using nail polish. Examination was performed using a confocal laser-scanning microscope (C1, Nikon, Japan). Three laser sources from Diode 408 nm, Argon 488 nm and HeNe 543 nm were used to simultaneously excite the fluorescent signals from DAPI, Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 phalloidin (microfilaments) and TRITC (microtubules) respectively. The digital-micrographs produced using the sequential scanning mode for the 3 separate colors were merged into single panel using EZ-C1 software (Nikon, Japan). The resulting multi-color micrographs were subsequently examined using Adobe<sup>®</sup> Photoshop CS (Adobe System Inc., Mountain View, CA, USA).

## **Experimental design**

### **Experiment I**

This experiment examined the effect of recombinant human follicle stimulating hormone and growth factors on developmental competence of cat oocytes. Cumulus oocyte complexes (COCs) were cultured in a defined maturation medium containing with 0.01 (n=82), 0.05 (n=72), 0.1 (n=68), and 1.0 IU (n=70) rhFSH. The COCs cultured in an absence of rhFSH served as controls (n=103). After 24h of culture, the oocytes were fixed, stained with DAPI and examined for stage of nuclear maturation. For examination of fertilization rate, a total of 233 COCs were matured with 0.01 (n=51), 0.05 (n=39), 0.1 (n=36), and 1.0 IU (n=38) rhFSH and then subjected to *in vitro* fertilization. The presumptive embryos were fixed and analyzed for % fertilization. The COCs cultured with no rhFSH added were used as controls. Since the results indicated that rhFSH in all chosen doses was capable of enhancing nuclear maturation of cat oocytes. The medium dose of rhFSH (0.1 IU) was selected to use in the following experiment. In addition to *in vitro* fertilization, this study also examined the effects of luteinizing hormone (LH; n= 100), insulin like growth factor-1 (n= 105) and epidermal growth factor (n= 164) adding into maturation medium in order to study whether a combination of rhFSH and LH and growth factors would actually improve the

cytoplasmic maturation of feline oocytes. Oocytes cultured with only rhFSH (n=160) served as negative controls. Finally, the cytoplasmic maturation of cat oocytes was assessed by means of fluorescent labelling of the oocyte's cytoskeletal elements (actin microfilaments and microtubules) and also embryo culture. To establish normal pattern of cell cytoskeleton changes as to examine the cytoplasmic maturation of COCs matured using EGF+rhFHS, a total of 302 oocytes were examined at the specific time point during the course of *in vitro* maturation (0, 6, 12, 18 and 24 h) to ensure that all important stages of nuclear and cytoplasmic changes of cat oocytes were analyzed. The fluorescent labelled oocytes were examined using a confocal laser scanning microscope. This microscope provides a significant improvement of image quality compared with conventional fluorescent microscopes and also allows spontaneous excitement of the three fluorescent colours (actin microfilament, microtubule and chromatin).

## Experiment II

This experiment was designed to examine the effect of vitrification of immature cat oocytes on the meiotic and developmental competence following warming. Since successful protocol for feline immature oocytes has not yet been established, a total of 272 oocytes were exposed to vitrification solutions using 3 different expose techniques: 1) 20% EG+ 20% DMSO, 2-step; 2) 20% EG+ 20% DMSO, 4-step and 3) 40% EG, 4-step. In addition, two concentrations of sucrose (0.3, n= 137 and 0.6 M (n=116) sucrose) was also examined. Finally, vitrified oocytes (n=254) were warmed, matured, fertilized and cultured *in vitro* in order to examine their development. Cryoprotectant treated COCs (n=86) and non-CPA/non-vitrified COCs (n=120) served as controls.

## Results

Overall, rhFSH significantly increased the number of oocytes reaching metaphase II (MII) stage when compared with non-rhFSH treated controls (MII rates: ~ 60-70 % vs. 36.9,  $p < 0.05$ , Table 1).

**Table 1** Meiotic competence of cat oocytes matured for 24 h in a presence of different concentrations of recombinant human follicle stimulating hormone

Groups	Total oocytes	Oocytes that developed to			
		GV (%)	MI (%)	MIH (%)	Degenerate (%)
0 IU rhFSH	103	55 (53.4) <sup>a</sup>	3 (2.9)	38 (36.9) <sup>a</sup>	7 (6.8)
0.01 IU rhFSH	82	28 (34.1) <sup>b</sup>	2 (2.8)	49 (59.8) <sup>b</sup>	3 (3.7)
0.05 IU rhFSH	72	10 (13.9) <sup>c</sup>	6 (8.3)	49 (68.1) <sup>b</sup>	7 (9.7)
0.1 IU rhFSH	68	9 (13.2) <sup>c</sup>	3 (4.4)	49 (72.1) <sup>b</sup>	7 (10.3)
1.0 IU rhFSH	70	9 (12.9) <sup>c</sup>	6 (8.6)	50 (71.4) <sup>b</sup>	5 (7.1)

<sup>a, b, c</sup> Within a column, different superscripts denote values that differ significantly.

When these rhFSH treated oocytes were fertilized *in vitro*, they demonstrated higher fertilization rate when compared with oocytes that cultured in an absence of rhFSH ( $P<0.05$ , Table 2).

**Table 2** Fertilization of in cat oocytes cultured in maturation media containing with or without recombinant FSH

Groups	Total oocytes	No. fertilized oocytes (%)
0 IU rhFSH	69	17 (24.6) <sup>a</sup>
0.01 IU rhFSH	51	25 (49) <sup>b</sup>
0.05 IU rhFSH	39	24 (61.5) <sup>b</sup>
0.1 IU rhFSH	36	20 (55.6) <sup>b</sup>
1.0 IU rhFSH	38	23 (60.5) <sup>b</sup>

According to the results, the medium dose of rhFSH (0.1 IU/ml) was selected in the following experiment. Although rhFSH was capable of inducing both nuclear and cytoplasmic maturation, in terms of *in vitro* maturation and blastocyst-stage embryo development, the capability of rhFSH was limited (blastocyst rate =12.5 %, Table 3). While rhLH did not significantly improve the rate of blastocyst development, the EGF and IGF-1 significantly enhanced cytoplasmic maturation of feline oocytes (blastocyst rate: 23.2, 21.9% respectively for EGF and IGF-1, Table 3).

**Table 3** Developmental competence of cat oocytes matured *in vitro* in maturation media supplemented with rhFSH, LH, EGF and IGF-1

Groups	Total oocytes	No. of cleaved embryos (%)	No. of blastocyst (%)	Cell number (mean±SD)
rhFSH	160	65 (40.6) <sup>a</sup>	20 (12.5) <sup>a</sup>	80.6±17.2 <sup>a</sup>
rhFSH/LH	100	41 (41) <sup>a</sup>	11 (11) <sup>a</sup>	76.9±13.1 <sup>a</sup>
rhFSH/EGF	164	102 (62.2) <sup>b</sup>	38 (23.2) <sup>b</sup>	89.4±22.5 <sup>a</sup>
rhFSH/IGF-1	105	58 (55.2) <sup>b</sup>	23 (21.9) <sup>b</sup>	90.2±16.3 <sup>a</sup>

<sup>a, b</sup> Within a column, different superscripts denote values that differ significantly.

To confirm that rhFSH and EGF induced nuclear and cytoplasmic maturation of cat oocytes, the oocytes were matured and fixed at 6, 12, 18 and 24 h in order to examine a series of changes of nuclear maturation and reorganization of cell cytoskeleton. Although a large proportion of these COCs were arrested at GV stage (92.5%), they asynchronously resumed meiosis through metaphase I (MI), anaphase I (AI), telephase I (TI) and finally metaphase II (MII) during 24 h of IVM (Table 4). The GV oocytes required approximately 12 h to reach MI stage while *in vitro* culture for 24 h was sufficient to complete nuclear maturation of cat oocytes (63% MII).

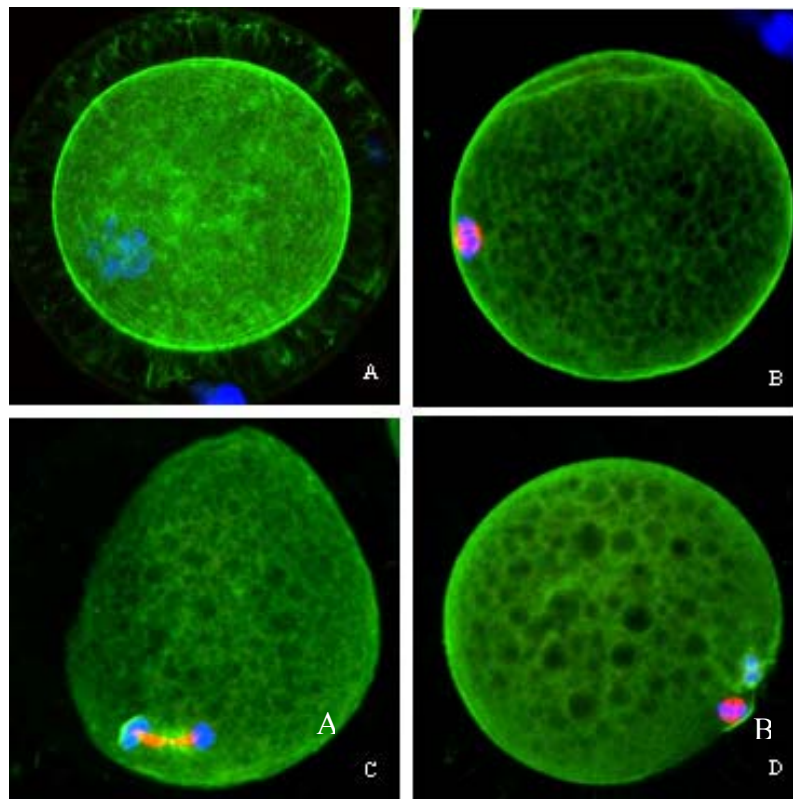
The fluorescently microtubule-, actin microfilament- and DNA-labeled oocytes were examined with a confocal laser scanning microscope. At 0-12 h of IVM, the chromatin of GV oocyte was unevenly distributed and confined within nuclear membrane (germinal vesicle, Fig. 2A). At this stage, actin microfilaments were typically distributed throughout the ooplasm with a moderate concentration beneath oolema, while the oocyte demonstrated a weak staining of microtubules (Fig. 2A). A microtubule-rich domain, however, developed rapidly following germinal vesicle breakdown without any obvious microtubule organizing centre.



**Table 4** Data demonstrate mean  $\pm$  SD of percentage of nuclear maturation of cat oocytes matured in vitro for 0, 6, 12, 18 and 24 h. Data were pooled from 3 independent replications.

Time Nuclear stage	0h (n=114)	6h (n=80)	12h (n=78)	18h (n=77)	24h (n=147)
GV	94 $\pm$ 2.0	97.8 $\pm$ 1.9	59.7 $\pm$ 20.2	23 $\pm$ 19.9	18.3 $\pm$ 3.0
MI	3.2 $\pm$ 2.0	2.2 $\pm$ 1.9	40.3 $\pm$ 20.2	48 $\pm$ 0.5	12.3 $\pm$ 7.5
Ana I/Tel I	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	16.2 $\pm$ 4.2	2.2 $\pm$ 1.9
MII	1.4 $\pm$ 2.4	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	12.8 $\pm$ 16.2	63.6 $\pm$ 9.1
degen/parthenote	1.4 $\pm$ 1.2	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	3.6 $\pm$ 3.3

Metaphase I plate (meiotic spindle) that is formed by polymerization of microtubules was completely developed at 12-18 h, and this was typified by the formation of a symmetrical barrel-shaped meiotic spindle with the two sets of homologous chromosomes aligned at its center (Fig. 2B). During Anaphase I and Telephase I, the sets of chromosomes redirected to each anastral poles of meiotic spindle, the actin microfilaments then formed a dense network between the segregated sets of chromosomes (Figs. 2C, 2D). Finally, the second meiotic spindle was soon formed and, with assistance of actin microfilaments, one set of chromosomes was extruded as the first polar body that enveloped by unorganized microtubules and actin microfilaments (Fig. 2D).



**Figure 2** photomicrographs demonstrating redistribution of cell cytoskeleton (actin and microtubule) during in vitro maturation of cat oocytes.

## Experiment II

Experiment II examined the effect of vitrification of immature cat oocytes on the meiotic and developmental competence following warming. Four-step equilibration techniques either EG alone or in combination of DMSO gave superior maturation rates (MII rate ~30-40%) when compared to only 6% of 2-step equilibration technique. Although in vitro maturation rates of vitrified-warmed oocytes were in acceptable range, the MII rates were significantly lower than those obtained from non-CPA/non-vitrified and CPA treated controls (Table 5). In addition, reducing sucrose to 0.3 M in vitrification medium tended to decrease the cryopreservability of immature cat oocyte.

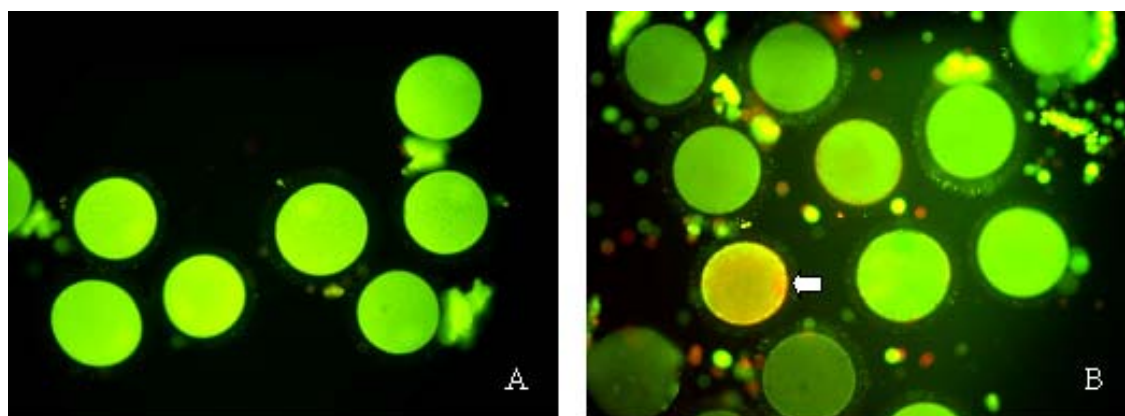
**Table 5** Meiotic competence of immature cat oocytes that had been exposed to cryoprotectants and/or vitrification. The COCs were subsequently matured in vitro for 24 h

Groups	Total oocyte	Oocytes that developed to			
		GV	MI	MIH	Degen
Control	59	10 (16.9)	7 (11.9)	36 (61) <sup>a</sup>	6 (10.2)
EG+DMSO 2 step	37	8 (21.6)	5 (13.5)	20 (54.1) <sup>a</sup>	4 (10.8)
EG+DMSO 4 step	46	10 (21.7)	5 (10.9)	26 (56.5) <sup>a</sup>	5 (10.9)
EG 4 step	48	9 (18.8)	3 (6.3)	30 (62.5) <sup>a</sup>	6 (12.5)
EG+DMSO 2 step-vitrified	67	2 (3)	6 (9)	6 (9) <sup>b</sup>	53 (79)
EG+DMSO 4 step-vitrified	88	5 (5.7)	14 (15.9)	28 (31.8) <sup>c</sup>	41 (46.6)
EG 4 step-vitrified 0.6 M sucrose	63	4 (3)	15 (13)	44 (37.6) <sup>c</sup>	54 (46.2)
EG 4 step-vitrified 0.3 M sucrose	137	19 (13.9)	25 (18.2)	39 (28.5) <sup>c</sup>	54 (39.4)

To test viability of these oocytes after vitrification and warming, the COCs either treated with CPA or vitrified-warmed were stained with viability marker (ethidium homodimer-1 and calceine-AM). Although vitrification of feline immature oocytes using EG-OPS (4-step equilibration) protocol yielded high viability (96%) of oocytes (Table 6, Figure 3), the developmental competence of these vitrified-warmed oocytes were compromised in terms of poor cleavage, morula and blastocyst formation rate (Table 7, Fig. 4)

**Table 6** Viability test of vitrified-warmed immature feline oocytes

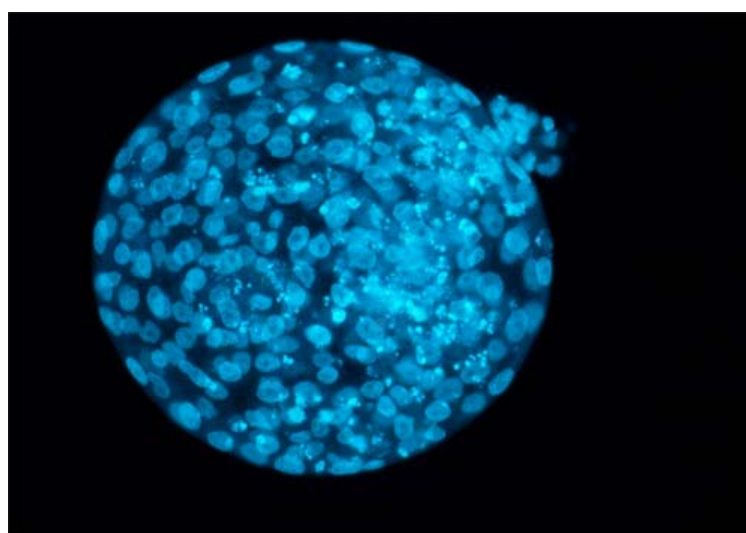
Groups	Total oocytes	Alive oocytes (%)	Dead oocytes (%)
Non-CPA/vitrified	50	50 (100)	0
CPA-treated	37	37 (100)	0
Vitrified-warm	96	92 (95.8)	4 (4.2)



**Figure 3** Photomicrographs illustrating the viability of vitrified immature cat oocytes. Viable oocytes demonstrate an intense-calcein AM staining (green) confined within ooplasm (A). Dead oocytes (white arrow) typified by red cytoplasm (positive with ethidium homodimer-1, non-permeable DNA staining) indicating the damage of oocyte's plasma membrane.

**Table 7** Developmental competence of vitrified-warm immature oocytes after in vitro fertilization and embryo culture

Group	No. oocytes	Oocytes that developed to			Blastocyst cell numbers	Nuclear fragmentation (%)
		Cleavage (%)	Morula (%)	Blastocyst (%)		
Control	120	75 (62.5)	53 (44.2)	37 (30.8) <sup>a</sup>	97.6± 32.5	12.8 ±6.9
CPA	86	49 (57)	40 (46)	23 (26.7) <sup>a</sup>	92.3± 9.9	10± 4.3
Vitrified-warmed	254	63(24.8)	31 (12.2)	19 (7.5) <sup>b</sup>	85.8± 20.4	12.8 ±5.1



**Figure 4** A blastocysts produced from *in vitro* embryo culture.

## Discussion

This study examined the effect of recombinant human FSH and growth factors on developmental competence of cat oocytes. The data demonstrated clearly that rhFSH can be used as meiotic competence enhancer, although the meiosis resumption occurs spontaneously when the oocytes are removed from their follicle (Pincus and Enzmann, 1935). The process of maturation of mammalian oocytes is a multifaceted processes in which immature or germinal vesicle stage oocytes resumes and reach MII stage. In vivo, meiotic competence of oocytes is triggered by the surge of preovulatory luteinizing hormone (Baker, 1982), while LH alone does not induce meiotic progression in vitro. This evidence indicates convincingly that the mechanism of meiotic resumption differs between in vivo and in vitro environments. Since oocytes lack gonadotrophin receptors follicle stimulating hormone (FSH) promotes meiotic resumption via an indirect mechanism mediated by the cumulus cells (Eppig and Downs 1987). Recombinant human FSH is commercially available LH-free preparation that has been widely used in vitro maturation medium for immature oocytes from many species, such as human, porcine, equine, mouse and bovine. In addition, because the action of LH is absent, it therefore allows interpretation of individual roles of FSH and LH without the hormone cross-contamination. Although the signalling pathway of rhFSH mediated meiotic resumption appeared to be different among species The main signal transduction resulting from FSH binding to cumulus-granulosa cells is considered to be cAMP-protein kinase A (PKA) (Eppig and Downs, 1984) and protein kinase C (PKC) (Aberdam and Dekel, 1985, Su *et al.* 1999). In this study, small amount of rhFSH (0.01 IU/ml) was capable of inducing meiotic resumption. However, this was less efficient when compared to other doses. It is therefore suggesting that rhFSH at  $\geq 0.05$  IU should be added into maturation medium because these rhFSH doses yielded reasonable MII and embryo developmental rates (60-70% MII and 20-30% blastocyst rate), although the development in utero has yet to be examined.

Experiment II tested the effect of cryoprotectants, equilibration techniques and vitrification on developmental competence of oocytes, in terms of in vitro maturation rate, cleavage and also blastocyst formation rate. Open pulled straw vitrification was selected to use in this study because it is simple to perform and high viability of OPS-vitrified oocytes from a number of species has been reported (Vajta et al., 2002). While GV oocytes are quiescent and many cold-sensitive structure i.e meiotic spindle has not yet formed, many reported suggested that the GV oocytes are sensitive to cryopreservation when compared with mature oocytes. Many factors associated with poor cryopreservability of immature oocytes have been examined. For example, GV oocyte has poorer plasma membrane permeability than MII oocytes and also they demonstrated high transition phase temperature ( $T_m$ ) when compared to MII and embryo. Freezing oocyte at an immature stage, however, is beneficial when animal (especially for wild animal) would die unexpectedly and laboratory facility for performing in vitro maturation is limited. Immature oocytes are readily available in raw ovarian material, do not require exogenous hormonal stimulation to collect, and therefore offer a convenient means of “gamete rescue” for potential in vitro embryo production from genetically valuable individuals (Johnston, 1991). The presence of cumulus cells may protect against rapid influx or efflux of CPA (Van der Elst, 1992; Fabbri, 2001). This study was first demonstrated that feline immature oocytes can be cryopreserved, the capability of the oocytes developed to blastocysts was poor when compared to controls. To date, the exact pathway of freezing induces poor development remains unclear. In this study, we demonstrated that types of cryoprotectant and exposure techniques affected the success of cryopreservation. Exposure to a

hyperosmotic medium containing CPA is the first potentially damaging step for the oocyte because of both osmotic stress and the inherent toxicity of the CPA itself to cell organelles (Agca et al., 2000). Toxicity of the CPA depends on the type, concentration, and temperature of exposure (Lim, 1999).

### **Conclusions**

rhFSH and growth factors are capable of enhancing nuclear and cytoplasmic maturation of cat oocytes by means of meiotic competence, normal reorganisation of oocyte's cytoskeleton and embryo development. Vitrification of cat immature oocytes induces poor *in vitro* maturation, fertilizability and embryo development.

## References

- Aberdam, E. and Dekel, N. 1985. Activators of protein C stimulate meiotic maturation of rat oocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 132: 520–574.
- Agca, Y., Liu, J., Rutledge, J.J., Critser, E.S., Critser, J.K. 2000. Effect of osmotic stress on the developmental competence of germinal vesicle and metaphase II stage bovine cumulus oocyte complexes and its relevance to cryopreservation. *Mol Reprod Dev*. 55: 212–219.
- Baker, T.G. 1982. Oogenesis and ovulation. In *Reproduction in mammals*, 2<sup>nd</sup> ed., Eds CR Austin and RV Short. Cambridge: Cambridge University Press. pp 17–45.
- Comizzoli, P., Wildt, D.E. and Pukazhenth, B.S. 2004. Effect of 1,2-propanediol versus 1,2-ethanediol on subsequent oocyte maturation, spindle integrity, fertilization, and embryo development in vitro in the domestic cat. *Biol Reprod*. 71: 598–604.
- Eppig, J.J. and Downs, S.M. 1984. Chemical signals that regulate mammalian. Oocyte maturation. *Biology of Reproduction*. 30: 1–11.
- Eppig, J.J. and Downs, S.M. 1987. The effect of hypoxanthine on mouse oocyte growth and development in vitro: maintenance of meiotic arrest and gonadotropin-induced oocyte maturation. *Developmental Biology*. 119: 313–321.
- Fabbri, R., Porcu, E., Marsella, T., Rocchetta, G., Venturoli, S., Flamigni, C. 2001. Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Hum Reprod*. 16: 411–416.
- Gilchrist, R. B. and Thompson, J. G. 2007. Oocyte maturation: Emerging concepts and echnologies to improve developmental potential *in vitro*, *Theriogenology*. 67: 6-15.
- Johnston, L.A., Donoghue, A.M., O'Brien, S.J., Wildt, D.E. 1991. Rescue and maturation in vitro of follicular oocytes collected from nondomestic felid species. *Biol Reprod*. 45: 898–906.
- Kim, N.H., Chung, K.S. and Day, B.N. 1997. The distribution and requirements of microtubules and microfilaments during fertilization and parthenogenesis in pig oocytes. *J Reprod Fertil*. 111: 143-149.
- Lim, J.M., Ko, J.J., Hwang, W.S., Chung, H.M., Niwa, K. 1999. Development of in vitro matured bovine oocytes after cryopreservation with different cryoprotectants. *Theriogenology*. 51: 1303–1310.
- Matzuk, M.M., Burns, K.H., Viveiros, M.M., Eppig, J.J. 2002. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science*. 296: 2178-2180.
- O'Brien, S. J., Menotti-Raymond, M., Murphy, W. J., Nash, W. G., Wienberg, J., Stanyon, R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Womack, J. E. and Marshall, G. J. A. 1999. The promise of Comparative Genomics in Mammals. *Science*. 286: 458-462, 479-481.

Pincus, G. and Enzmann, E.V. 1935. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. The Journal of Experimental Medicine. 62: 665–675.

Pope, C.E. 2004. In vitro fertilization and embryo transfer in felids. Methods Mol Biol. 254: 227-44.

Roth, T.L., Swanson, W.F. and Wildt, D.E. 1994. Developmental competence of domestic cat embryos fertilized in vivo versus *in vitro*. Biol Reprod. 51: 441-451.

Simerly, C. and Schatten, H. 1993. Techniques for localization of specific molecules in oocytes and embryos., Pages, PM Wassarman and ML DePamphilis. New York: Academic Press. pp. 516-522

Su, Y.Q., Xia, G.L., Byskov, A.G., Fu, G.D. and Yang, C.R. 1999 Protein kinase C and intracellular calcium are involved in follicle-stimulating hormone-mediated meiotic resumption of cumulus cell-enclosed porcine oocytes in hypoxanthine-supplemented medium. Mol Reprod Dev.. 53: 51–58.

Swanson, W.F., Roth, T.L. and Wildt, D.E. 1994. *In vivo* embryogenesis, embryo migration, and embryonic mortality in the domestic cat. Biol Reprod. 51: 452-464.

Swanson, W. F. 2006. Application of assisted reproduction for population management in felids: The potential and reality for conservation of small cats. Theriogenology. 66: 49-58.

Tharasanit, T., Colenbrander, B., Bevers, M. M. and Stout, T.A. 2006. Effect of maturation stage at cryopreservation on post-thaw cytoskeleton quality and fertilisability of equine oocytes. Mol Reprod Dev. 2006. 73: 627-637.

Tremoleda, J.L., Schoevers, E.J., Stout, T.A., Colenbrander, B. and Bevers, M.M. 2001. Organisation of the cytoskeleton during *in vitro* maturation of horse oocytes. Mol Reprod Dev. 60: 260-269.

Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, M., Booth, P.J., Jacobsen, H., Greve, T., Callesen, H. Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. Mol Reprod Dev 1998; 51: 53-58.

Van der Elst, J., Nerinckx, S., Van Steirteghem, A.C. 1992. In vitro maturation of mouse germinal vesicle-stage oocytes following cooling, exposure to cryoprotectants and ultrarapid freezing: limited effect on the morphology of the second meiotic spindle. Hum Reprod. 7:1440–1446.

#### **Output** จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ จำนวน 1 เรื่อง

Reorganisation of cell cytoskeleton of cat oocytes matured in vitro by Tharasanit et al. 2008. TJVM. 38: 9-16 (เอกสารภาคผนวก 1)

2. ผลงานที่คาดว่าจะตีพิมพ์เพิ่มเติม (Manuscript in preparation) จำนวน 3 เรื่อง

3.1 The effect of recombinant human FSH and growth factors on developmental competence of cat oocytes

3.2 The effect of cryopreservation on the post-thaw quality of cat oocytes

3.3 The effects of roscovitine on cumulus cell apoptosis and developmental competence of domestic cat oocytes

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เชิงวิชาการโดยนำองค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาเพื่อใช้ในการเรียนการสอน โครงการพิเศษ รหัสวิชา 3100610 ระดับปริญญาตรีคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เรื่องผลของการเก็บรักษารังไข่ต่อคุณภาพของฟอลลิเคิลและประสิทธิภาพการเจริญในหลอดทดลองของโอโอไซต์แมว (เอกสารภาคผนวก 7) และการศึกษาในระดับปริญญามหาบัณฑิตที่เกี่ยวข้องกับสรีรวิทยาของการเจริญพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์แมว

- ผลงานอื่นได้แก่ ผลงานตีพิมพ์ในหนังสือรวบรวมบทความวิชาการระดับนานาชาติ จำนวน 2 เรื่อง และระดับชาติจำนวน 3 เรื่อง

- Effect of recombinant human follicle stimulating hormone on developmental competence of cat oocytes. In: Proceeding of the 3<sup>rd</sup> Annual conference of Asian Reproductive Biotechnology Society “innovation for future life” November 29- 3 December, 2006 Hanoi, Vietnam pp.143. (ภาคผนวก 2)

- Effect of roscovitine on meiotic competence of cat oocytes. In: Proceeding of the 3<sup>rd</sup> Annual conference of Asian Reproductive Biotechnology Society “Reproductive Biotechnology, Stem cells and Regenerative Medicine” 24-28 November, 2007, Singapore. pp.105 (ภาคผนวก 3)

- Developmental competence of cat oocytes following in vitro maturation, fertilization and embryo culture. In: proceeding of the 33<sup>rd</sup> Veterinary Medicine and Livestock development annual conference. The Thai Veterinary Medical Association under the Royal Patronage. Pp. 55-57. (ภาคผนวก 4)



- Recombinant human follicle stimulating hormone exerts nuclear and cytoplasmic maturation of cat oocytes. In: proceeding of the 33<sup>rd</sup> Veterinary Medicine and Livestock development annual conference. The Thai Veterinary Medical Association under the Royal Patronage. Pp. 59-61. (ภาคผนวก 5)
- Effect of roscovitine on meiotic arrest and resumption of cat oocytes. In: proceeding of the 33<sup>rd</sup> Veterinary Medicine and Livestock development annual conference. The Thai Veterinary Medical Association under the Royal Patronage. Pp. 63-65. (ภาคผนวก 6)