ผลเชิงปกป้องของไกลซีน กลูตามีนและเทารีนต่อการเจริญของเอ็มบริโอแฮมสเตอร์ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีค่าออสโมลาริตีสูงผิดปกติ

นางสาววรรณสิริ วรรณรัตน์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-2881-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I21486153

PROTECTIVE EFFECTS OF GLYCINE, GLUTAMINE AND TAURINE ON THE DEVELOPMENT OF HAMSTER EMBRYOS CULTURE IN ABNORMALLY HIGH OSMOLARITY MEDIUM

Miss Wannasiri Wannarat

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Zoology

Department of Biology
Faculty of Science
Chulalongkorn University

Academic Year 2002

ISBN 974-17-2881-6

Thesis Title	PROTECTIVE EFFECTS OF GLYCINE, GLUTAMINE AND TAURINE ON THE DEVELOPMENT OF HAMSTER EMBRYOS CULTURE IN ABNORMALLY HIGH OSMOLARITY MEDIUM
By	Miss Wannasiri Wannarat
Field of study	Zoology
Thesis Advisor	Associate Professor Vithaya Yodyingyuad, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

..... Dean of Faculty of Science

(Associate Professor Wanchai Phothiphichitr, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Professor Siriwat Wongsiri, Ph.D.)

..... Thesis Advisor

(Associate Professor Vithaya Yodyingyuad, Ph.D.)

..... Member

(Assistant Professor Orawan Satayalai, Ph.D.)

..... Member

(Assistant Professor Patchanee Singh-asa, Ph.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วรรณสิริ วรรณรัตน์: ผลเชิงปกป้องของไกลซีน กลูตามีนและเทารีนต่อการเจริญของเอ็มบริโอแฮมสเตอร์ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีค่าออสโมลาริตีสูงผิดปรกติ(PROTECTIVE EFFECTS OF GLYCINE, GLUTAMINE AND TAURINE ON THE DEVELOPMENT OF HAMSTER EMBRYOS CULTURE IN ABNORMALLY HIGH OSMOLARITY MEDIUM) อาจารย์ที่ปรึกษา: รศ.ดร.วิทยา ยศยิ่งยวด จำนวนหน้า 64 หน้า. ISBN 974-17-2881-6

จุดมุ่งหมายของงานวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาผลเชิงปกป้องของไกลซีน กลูตามีนและเทารีนต่อการเจริญของเอ็มบริโอแฮมสเตอร์ระยะ 2-เซลล์ และ 8- เซลล์ ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มข้นสามระดับคือ 275, 325 และ 375 mOsmol โดยเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอระยะที่ต้องการศึกษาในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เติมกรดอะมิโนชนิดเดียว น้ำยาเพาะเลี้ยงที่เติมกรดอะมิโนพร้อมกันสองชนิด น้ำยาเพาะเลี้ยงที่เติมกรดอะมิโนพร้อมกันทั้งสามชนิด และน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ไม่เติมกรดอะมิโนทั้งสามชนิด(กลุ่มควบคุม) เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเจริญของเอ็มบริโอได้เมื่อเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอไปแล้ว 48 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้น 275 mOsmol การเติมไกลซีน กลูตามีนและเทารีนในแบบต่างๆและกลุ่มควบคุม ส่งเสริมให้เอ็มบริโอระยะ 2-เซลล์ เจริญถึงเพียงระยะ 8-เซลล์ เท่านั้น โดยกลุ่มที่เติมไกลซีนและกลุ่มที่เติมไกลซีนและกลูตามีนให้เปอร์เซ็นต์เอ็มบริโอระยะ 4-เซลล์ สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับเอ็มบริโอระยะ 8-เซลล์ พบว่าที่ความเข้มข้น 275 mOsmol ที่ 48 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง กลุ่มที่เติมกลูตามีนอย่างเดียว กลุ่มที่เติมกลูตามีนและเทารีน กลุ่มที่เติมกลูตามีนและไกลซีนให้เปอร์เซ็นต์บลาสโทซิสสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อความเข้มข้นของน้ำยาเพาะเลี้ยงสูงขึ้นเป็น 325 และ 375 mOsmol พบว่าเอ็มบริโอระยะ 8-เซลล์ มีเปอร์เซนต์เจริญเป็นบลาสโทซิสลดลงในทุกกลุ่มการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์บลาสโทซิสที่ได้จากกลุ่มที่เติมกรดอะมิโนเดียวกันที่ความเข้มข้น 275 mOsmol ที่ความเข้มข้น 325 mOsmol ที่48 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง พบว่ากลุ่มที่เติมเทารีน กลูตามีน และกรดอะมิโนทั้งสามชนิดให้เปอร์เซ็นต์บลาสโทซิสสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างไม่มีนัยสำคัญ ที่ความเข้มข้น 375 mOsmol พบว่าเอ็มบริโอระยะ 8-เซลล์ ส่วนหนึ่งเจริญเป็นมอรูลาและมีส่วนน้อยที่เจริญเป็นบลาสโทซิส โดยกลุ่มที่เติมกลูตามีน กลุ่มที่เติมกลูตามีนและเทารีน กลุ่มที่เติมกลูตามีนและไกลซีน และกลุ่มที่เติมกรดอะมิโนทั้งสามชนิดให้เปอร์เซนต์มอรูลาสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ การศึกษาครั้งนี้มีแนวโน้มบ่งชี้ว่าไกลซีน กลูตามีน และเทารีน ปกป้องเอ็มบริโอแฮมสเตอร์ระยะ 2-เซลล์ และ 8- เซลล์ จากผลเชิงลบของน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีค่าออสโมลาริตีสูงผิดปกติได้ในระดับหนึ่ง ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่ากรดอะมิโนสามชนิดนี้จะทำหน้าที่เป็น osmoprotectant เมื่ออยู่ในน้ำยาเพาะเลี้ยงมีค่าออสโมลาริตีสูงผิดปกติ

ภาควิชา.....ชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....สัตววิทยา.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2545.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4372391623: MAJOR ZOOLOGY

KEYWORD: osmolyte/amino acid/ hamster embryo/osmoprotectant/glycine/glutamine/taurine

WANNASIRI WANNARAT: PROTECTIVE EFFECTS OF GLYCINE, GLUTAMINE AND TAURINE ON THE DEVELOPMENT OF HAMSTER EMBRYOS CULTURE IN ABNORMALLY HIGH OSMOLARITY MEDIUM. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. VITHAYA YODYINGYUAD, Ph.D. 64 pp. ISBN 974-17-2881-6

This experiment aims to find out the protective effects of glycine, glutamine, and taurine on the development of two-cell and eight-cell hamster embryos cultured in a chemical defined culture medium, HECM–10, at three osmolarity levels (275, 325 and 375 mOsmol). Two-cell and eight–cell embryos were randomly distributed among different culture media with either single or combinations of these amino acids and without these amino acids (the control group). Embryos were cultured for 48 hr. and the percentages of embryonic development were compared. Results showed that at 275 mOsmol with or without amino acids, two-cell embryos were not able to develop beyond the eight stage *in vitro*. However, the percentages of four-cell embryos in HECM-10 supplemented with glycine and glycine plus glutamine were significantly higher than that of the control group. Development of eight-cell embryos to blastocyst stage in HECM-10 supplemented with glutamine alone, glutamine plus taurine, and glycine plus glutamine at 275 mOsmol, after 48 hr. culture, were significantly higher than those in the control group. Blastocyst development was decreased in the high osmolarity medium (325 and 375 mOsmol) compared to 275 mOsmol. At 325 mOsmol, the percentages of blastocyst in medium containing taurine, glutamine and all three amino acids, after 48 hr. in culture, were higher than that of the control group. At 375 mOsmol, a number of eight-cell embryos developed to morula stage while just a few reach blastocyst stage. The percentages of morula in medium containing glutamine, taurine plus glutamine, glycine plus glutamine and all three amino acids were significantly higher than that of the control group. This study tend to indicate that glycine, glutamine and taurine were able to protect the development of two-cell and eight-cell embryos against the deleterious effect of high osmolarity medium to a certain limit. Hence they could possibly act as the osmoprotectant in abnormally high osmolarity medium.

Department.....Biology.....Student's signature.....wannasiri wannarat.....

Field of study.....Zoology.....Advisor's signature.....Vithaya Yodyingyuad.....

Academic year.....2002.....Co-advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express at my deepest gratitude to my advisor, Associate Professor Dr.Vithaya Yodyingyuad, for his excellent instruction, guidance, encouragement and support throughout this thesis. Without his kindness and understanding, this work could not be accomplished.

My gratitude is also extended to Assistant Professor Dr.Orawan Satayalai, Assistant professor Dr.Patchanee Singh-asa, for serving as thesis committee, for their valuable comments and also for useful suggestion.

I wish to acknowledge Institute for the Promotion of Teaching Science and Technology (IPST) for supporting the Master's degree scholarship, Department of Biology, and Graduate School, Chulalongkorn University for providing parts of these research expenses.

Sincere thanks are also expressed to all staff members and friends of Biology Department for their assistance in the laboratory and friendship.

Finally, the greatest gratitude is expressed to my parents, my brothers, and my friends for their unlimited love, support and understanding, to Mr. Daecha Sermvithayawong and Miss Nattanid Suansawat for article searching.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS

Page

THAI ABSTRACT.....iv

ENGLISH ABSTRACT.....v

ACKNOWLEDGEMENT.....vi

CONTENTS.....vii

LIST OF TABLES.....ix

LIST OF FIGURES.....xi

ABBREVIATIONS.....xiii

CHAPTER I: INTRODUCTION.....1

CHAPTER II: REVIEW LITERATURES

1. Osmolyte.....3
2. Reproductive tract environment.....9
3. Amino acids in mammalian reproductive tract.....9
4. The role of amino acid as the osmolyte in mammalian embryo in hypertonic fluid.....10
5. The effects of amino acids on development of hamster embryos *in vitro*.....11
6. The effect of osmolarity on the development of hamster embryos *in vitro*.....14

CHAPTER III: METERIALS AND METHODS

1. Equipment.....15
2. Chemicals.....16
3. Animals.....18
4. Superovulation.....18
5. Preparation of equipment.....18
6. Collection of embryo.....18
7. Culture media.....19

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS (Continued)

Page

8. Preparation of culture media.....19
9. Embryo culture.....20
10 Experimental design.....20
11 Data collection and statistic.....21

CHAPTER IV: RESULT

1. The effects of single amino acid, combination of either two amino acids, or combination of all three amino acids on the development of eight-cell hamster embryos at 275 mOsmol.....26
2 The effects of single amino acid, combination of either two amino acids, or combination of all three amino acids on the development of eight-cell hamster embryos at 325 mOsmol.....32
3 The effects of single amino acid, combination of either two amino acids, or combination of all three amino acids on the development of eight-cell hamster embryos at 375 mOsmol.....38
4. The effects of single amino acid, combination of either two amino acids, or combination of all three amino acids on the development of two-cell hamster embryos at 275 mOsmol.....44

CHAPTER V: DISCUSSION.....50

CHAPTER VI: CONCLUSION.....56

REFERENCES.....57

BIOGRAPHY.....64

LIST OF TABLES

Page

Table 1 Distributions of organic osmolytes in major organism groups.....7

Table 2 Experimental design for embryo culture in various culture media and osmolarities.....20

Table 3 Compositions of Hamster Embryo Culture Medium-10 (HECM-10) for hamster embryo culture.....22

Table 4 Effects of glutamine, glycine, and taurine on development of eight-cell hamster embryos in HECM-10 at 275 mOsmol after 24 hr. in culture.....28

Table 5 Effects of glutamine, glycine, and taurine on development of eight-cell hamster embryos in HECM-10 at 275 mOsmol after 48 hr. in culture.....29

Table 6 Effects of glutamine, glycine, and taurine on development of eight-cell hamster embryos in HECM-10 at 325 mOsmol after 24 hr. in culture.....34

Table 7 Effects of glutamine, glycine, and taurine on development of eight-cell hamster embryos in HECM-10 at 325 mOsmol after 48 hr. in culture.....35

Table 8 Effects of glutamine, glycine, and taurine on development of eight-cell hamster embryos in HECM-10 at 375 mOsmol after 24 hr. in culture.....40

Table 9 Effects of glutamine, glycine, and taurine on development of eight-cell hamster embryos in HECM-10 at 375 mOsmol after 48 hr. in culture.....41

Table 10 Effects of glutamine, glycine, and taurine on development of two-cell hamster embryos in HECM-10 at 275 mOsmol after 24 hr. in culture.....46

LIST OF TABLES (Continued)

Page

Table 11 Effects of glutamine, glycine, and taurine on development of two-cell hamster embryos in HECM-10 at 275 mOsmol after 48 hr. in culture.....47

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Page

Figure 1 Effects of a stabilizing solute (S) and a destabilizing solute (D).....5

Figure 2 Preparation of micropipettes.....23

Figure 3 Female hamster reproductive organs.....24

Figure 4 Embryos collection (a) Removal of oviduct
(b) Oviductal Flushing 25

Figure 5 Effect of taurine, glutamine and glycine on the development of eight-cell hamster embryos in HECM-10 at 275 mOsmol (a) after 24 hr. in culture, (b) after 48 hr. in culture.....30

Figure 6 The development of eight-cell hamster embryos in HECM –10 supplemented with glycine plus glutamine at 275 mOsmol (a) morula and blastocyst formation after 24 hr. in culture, X10 (b) blastocyst formation after 48 hr. in culture, X 20.....31

Figure 7 Effect of taurine, glutamine and glycine on the development of eight-cell hamster embryos in HECM-10 at 325 mOsmol (a) after 24 hr. in culture, (b) after 48 hr. in culture.....36

Figure 8 The development of eight-cell hamster embryos in HECM –10 supplemented with taurine at 325 mOsmol (a)morula and blastocyst formation after 24 hr. in culture, X10 (b) blastocyst formation after 48 hr. in culture, X20.....37

Figure 9 Effect of taurine, glutamine and glycine on the development of eight-cell hamster embryos in HECM-10 at 375 mOsmol after 24 hr. in culture.....42

Figure 10 The development of eight-cell hamster embryos in HECM –10 supplemented with glycine plus glutamine plus taurine at 375 mOsmol (a) morula and blastocyst formation after 24 hr. in culture, X20 (b) blastocyst formation after 24 hr. in culture, X 20.....43

LIST OF FIGURES (Continued)

Page

Figure 11 Effect of taurine, glutamine and glycine on the development of two-cell hamster embryos in HECM-10 at 275 mOsmol after 24 hr. in culture.....48

Figure 12 The development of two-cell hamster embryos in HECM –10 supplemented with glycine at 275 mOsmol after 24 hr. in culture, X10 49

Figure 13 Effect of taurine, glutamine and glycine on the development of eight-cell hamster embryos in HECM-10 at 275, 325 , and 373mOsmol (a) after 24 hr. in culture, (b) after 48 hr.in culture.....54

Figure 14 Effect of taurine, glutamine and glycine on the development of eight-cell hamster embryos in HECM-10 at 275, 325, and 375mOsmol (a) after 24 hr. in culture, (b) after 48 hr. in culture.....55

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ABBREVIATIONS

BSA	Bovine serum albumin
^{0}C	Degree Celsius
HECM-10	Hamster Embryo Culture Medium
hr	Hour
l	Litre
LM	Light microscope
mm.	Milimetre
mM	Millimolar
μM	Micromolar
μl	Microlitre
ml	Mililitre
mg	Miligram
M.W.	Molecular weight
RVD	Regulatory volume decrease
RVI	Regulatory volume increase
PMSG	Pregnant mare's serum
PVA	Polyvinylalcohol

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย