

๗๑๑๗๗ ๑๑๔-๑๑๘.

๑๑๔๑๑๗๗ ๑๑๔๑๑๗๗.

โครงสร้างละเอียดของเอมบริโอ และเยื่อคุมตัวระยะก่อนการฝังตัว
และผลของเลคตินต่อการฝังตัวในแฮมสเตอร์



นางประไพ์ เศรษฐ์รักษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาตรีบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. ๒๕๓๐


ISBN 974-568-560-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

014292

I 10293929

**ULTRASTRUCTURE OF EMBRYOS AND ENDOMETRIA DURING
PREIMPLANTATION PERIOD AND THE EFFECTS
OF LECTINS ON IMPLANTATION IN HAMSTER**



Mrs. Prapee Sretarugsa

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy**

Biological Science

Graduate School

Chulalongkorn University

1987

ISBN 974-568-560-7

Thesis Title Ultrastructure of embryos and endometria during
 preimplantation period and the effects of lectins
 on implantation in hamster

By Mrs. Prapee Sretarugsa

Program Biological Sciences

Thesis Advisors Associate Professor Vithaya Yodyingyuad, Ph.D.
 Associate Professor Prasert Sobhon, Ph.D.



Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in
Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of Doctor of
Philosophy.

Thavorn Vajrabhaya

..... Dean of Graduate School
(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

M.R. Puttipongse Varavudhi
..... Chairman
(Professor M.R. Puttipongse Varavudhi, Ph.D.)

V. Yodyingyuad
..... Thesis Advisor
(Associate Professor Vithaya Yodyingyuad, Ph.D.)

Prasert Sobhon
..... Thesis Advisor
(Associate Professor Prasert Sobhon, Ph.D.)

S. Patinawin
..... Member
(Associate Professor Sudsanong Patinawin, Ph.D.)

Jariya Boonjawat
..... Member
(Associate Professor Jariya Boonjawat, Ph.D.)

CONTENTS



	Page
Abstract (Thai)	i
Abstract (English)	ii
Acknowledgements	iii
List of figures	v
List of tables	ix
List of abbreviations	x
Chapter	
I Introduction	1
1.1 General ultrastructural appearance of the egg	3
1.2 The cytoskeletons	6
1.3 Cell surface or surface coats	14
1.4 Lectins	17
1.5 Objectives	27
II Materials and methods	27
2.1 Animals	28
2.2 Natural ovulation and superovulation	28
2.3 Recovery of embryos	29
2.4 Procedure for studying the characteristics of surface structure of embryos by SEM	29
2.5 Procedure for studying the ultrastructure of embryos by TEM	30
2.6 Preparation of cytoskeletons of embryos	31
2.7 Characterization of cell surface carbohydrate residues of preimplantation embryos and uteri	33
2.8 Procedure for intrauterine injection of Con A and WGA to determine their effects on implantation	34
2.9 Histological preparation of uterine tissues	36

	Page
2.10 Embryo transfer	36
III Results	39
3.1 Surface characteristics of embryos as revealed by SEM	39
3.2 Ultrastructure of preimplantation embryo as revealed by TEM	49
3.3 The organization of cytoskeletons in preimplantation embryos	71
3.4 Binding of lectins to embryos	74
3.5 Binding of lectins to uterine epithelium	127
3.6 Implantation after lectins administration	155
3.7 Implantation after embryo transfer	162
3.8 The effect of lectins on uterine morphology	169
IV Discussion	180
4.1 Changes in the surface characteristic of preimplantation embryos	180
4.2 Ultrastructural characteristic of preimplantation embryos	181
4.3 The organization of cytoskeleton in preimplantation embryos	194
4.4 The binding of lectins to embryos and uterine epithelia	201
4.5 Effects of lectins on implantation	209
4.6 Conclusions	212
References	215
Appendix	249
Biography	251



ประพีร์ เศรษฐวิรัช : โครงสร้างละเอียดของเอมบริโอ และเยื่อมดลูกระยะก่อนฝังตัว และผลของเลคตินต่อการฝังตัวในแฮมสเตอร์ (ULTRASTRUCTURE OF EMBRYOS AND ENDOMETRIA DURING PREIMPLANTATION PERIOD AND THE EFFECTS OF LECTINS ON IMPLANTATION IN HAMSTER) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. วิทยา ยศยิ่งยวด และ รศ.ดร. ประเสริฐ ไสภณ 251 หน้า

การศึกษาโครงสร้างละเอียดของเอมบริโอของแฮมสเตอร์ระยะก่อนฝังตัว ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด พบว่า ผิวของเอมบริโอระยะแรกประกอบด้วยไมโครวิลไลชนิดแท่งยาวเป็นจำนวนมาก ความยาว และจำนวนของไมโครวิลไลนี้หดสั้น และลดจำนวนลง ขณะเดียวกันก็มีไมโครริคจ์แบน ๆ เพิ่มจำนวนเมื่อเอมบริโอเจริญมากขึ้น จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านพบว่าไซโตพลาสซึมของเอมบริโอระยะ 1-4 เซลล์ มีลักษณะแบ่งได้เป็น 3 บริเวณ คือ บริเวณนอกประกอบด้วยเวลิเคิล เป็นจำนวนมาก ไมโตคอนเดรีย ลาเมลลาสตรีคเจอร์ (LSS) และมัดติเวลิคูลา บอดี้มีน้อย บริเวณกลางส่วนใหญ่ประกอบด้วย LSS บริเวณในประกอบด้วยไมโตคอนเดรีย เวลิเคิลขนาดเล็ก และกอลจี คอมเพลกซ์ เป็นจำนวนมาก โพลาริตีของเซลล์เริ่มพบในเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ ไทรเฟตโตเดอรัมของบลาสโตซิสมีโครงสร้างละเอียดคล้ายกับบริเวณนอก ส่วน ICM คล้ายกับบริเวณกลาง และในของเอมบริโอระยะ 1-4 เซลล์ จากการศึกษา ไซโตสเกลิตัน โดยวิธีการสกัดด้วย Triton X-100 พบว่า เอมบริโอระยะก่อนฝังตัวของแฮมสเตอร์ประกอบด้วยไซโตสเกลิตัน 4 ชนิด คือ 1) ไมโครฟิลาเมนต์ ส่วนใหญ่เรียงขนานไปตามความยาวของไมโครวิลไล และได้เยื่อหุ้มเซลล์ ส่วนในไซโตพลาสซึมมีน้อย 2) ไมโครทิวบูล เรียงกระจายไปทุกทิศทางในไซโตพลาสซึม 3) อินเตอร์มีเดียท ฟิลาเมนต์ มีการเรียงตัวเป็นมัดเล็ก ๆ ในไซโตพลาสซึมบริเวณนอก พบในเอมบริโอระยะ 1- และ 2-เซลล์ 4) ไมโครทราเบคูลาเนตเวอคมีลักษณะเป็นเส้นใยของอสุณกันคล้ายกับลูกบิดที่อยู่บนเส้นด้าย

จากการศึกษาโอลิโกแซคคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของกลัยโคแคลิค ของเอมบริโอ และเยื่อมดลูกระยะก่อนการฝังตัวในแฮมสเตอร์ โดยใช้ เลคตินจับกับฮอสเตรติส เพอร์ออกซิเดส (HRP) คือ Con A-HRP, WGA-HRP และ RCA₁₁₉-HRP การจับของเลคตินเหล่านี้แสดงว่าผิวของเอมบริโอ และเยื่อมดลูกทุกระยะประกอบด้วยโอลิโกแซคคาไรด์ พวกแอลฟา-ดีแมนโนส และ/หรือ แอลฟา-ดีกลูโคส เอน-อซีดีล กลูโคซามีน และ/หรือ กรดไซอาลิก และมีตา-ดีกาแลคโตส โดยที่ แอลฟา-ดีแมนโนส และ/หรือ แอลฟา-ดีกลูโคส บนผิวของเอมบริโอลดลง แต่เพิ่มขึ้นในเยื่อมดลูกระยะสุดท้ายก่อนฝังตัว ส่วนเอน-อซีดีล กลูโคซามีน และ/หรือ กรดไซอาลิก และมีตา-ดีกาแลคโตส มีจำนวนมาก และปริมาณไม่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเจริญของเอมบริโอ ปริมาณของมีตา-ดีกาแลคโตส ลดลงมากในเยื่อมดลูกระยะท้องวันที่ 4 ขณะที่ เอน-อซีดีล กลูโคซามีน และ/หรือ กรดไซอาลิก ลดลงเล็กน้อย

การศึกษาผลกระทบของเลคตินต่อการฝังตัวในผนังมดลูก โดยการฉีดเลคตินเข้าไปในโพรงมดลูกก่อนที่จะมีการฝังตัว พบว่า Con A สามารถห้ามการฝังตัวได้บางส่วน ส่วน WGA สามารถห้ามการฝังตัวได้หมด Con A มีผลทำให้เกิดช่องว่างในเยื่อมดลูก และภาวะบวมน้ำในช่องว่างระหว่างเซลล์ของชั้นสโตรมา ผลนี้ไม่พบในกลุ่มที่ฉีดด้วย WGA ส่วนการแช่เอมบริโอด้วยเลคติน แล้วถ่ายฝากไปฝังตัวรับที่ท้องเทียม พบว่าเอมบริโอที่แช่ใน WGA 500 ไมโครกรัม/มล. ขึ้นไป ไม่มีการฝังตัว แต่เอมบริโอที่แช่ใน Con A มีอัตราการฝังตัวตามปกติ

ภาควิชา
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ
ปีการศึกษา 2530

ลายมือชื่อนิสิต
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา V. Jodykornad

PRAPEE SRETARUGSA : ULTRASTRUCTURE OF EMBRYOS AND ENDOMETRIA DURING PREIMPLANTATION PERIOD AND THE EFFECTS OF LECTINS ON IMPLANTATION IN HAMSTER. THESIS ADVISORS : ASSO. PROF. VITHAYA YODYINGYUAD, Ph.D. AND ASSO. PROF. PRASERT SOBHON, Ph.D. 251 pp.

The ultrastructure of preimplantation hamster embryos were investigated by scanning and transmission electron microscope (SEM & TEM). The surface of early stages preimplantation embryos, exhibited rod-shaped microvilli that were reduced in length and number during development and replaced by flat microridges. TEM showed three distinct regions in the cytoplasm of embryonic cells of 1- to 4-cell embryos : the outer region contained numerous vesicles, a few mitochondria, few lamellar structures and multivesicular bodies; the middle region consisted principally of lamellar structures in parallel arrays; the inner region contained the presence of numerous mitochondria, small vesicles, and Golgi complexes. The polarity of blastomeres was observed in 8-cell embryos. Ultrastructure of trophoctoderms were similar to the appearances of the outer region, while those of ICM were similar to the middle and inner regions of cell in 1- to 4-cell embryos. Triton X-100 extraction revealed four types of cytoskeleton: (i) microfilaments which were straight fibers arranged in longitudinal bundles within the cores of microvilli and under plasma membrane, and a few in the interior of the cell cytoplasm; (ii) microtubules which were distributed in all directions in the cytoplasm; (iii) intermediate filaments which were tightly packed together in small bundles lying mostly in the cortical cytoplasm of 1- and 2-cell embryos; (iv) microtrabecular network that consisted of zig-zag fibers with beads on a string appearance.

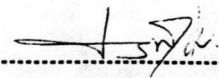
To study the surface oligosaccharides components of glycocalyx of hamster embryos and uterine epithelium during preimplantation period, lectin-horseradish peroxidase (HRP) probes (Con A-HRP, WGA-HRP, RCA₁-HRP) were employed. The binding of these probes indicated that α -D mannose and/or α -D glucose, N-acetyl glucosamine and/or sialic acid and β -D galactose were present in all stages of preimplantation of both embryos and uterine epithelia. α -D Mannose and/or α -D glucose on the surface of embryos decreased, while it increased in uterine epithelia during later stages of development. N-acetyl glucosamine and/or sialic acid and β -D galactose on the surface of embryos were abundant and were not changed during preimplantation. The dramatic reduction of β -D galactose was found on D₄ uterine epithelium while N-acetyl glucosamine and/or sialic acid was slightly reduced.

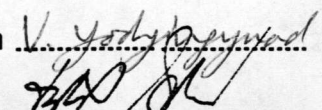
The effect of lectins on implantation was studied by injection of lectins into the uterine lumen prior to implantation and by preincubating embryos with respective lectins before transfer to pseudopregnant recipients. It was found that Con A partially inhibited implantation, while complete inhibition was observed in WGA treated groups. Both the uterine epithelium and stroma were affected by Con A, as evidenced by vacuolization in the epithelium and edema in the intercellular space. These appearances were not observed in WGA treated uteri. In addition, implantation did not occur in surrogate mothers transferred with embryos preincubated with WGA beyond 500 μ g/ml, whereas normal rate of implantation was observed from the transfer of those preincubated with Con A.

ภาควิชา

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

ปีการศึกษา 2530

ลายมือชื่อนิสิต 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา 

ACKNOWLEDGEMENT

I am deeply grateful to Professor Dr. M.R. Puttipongse Varavudhi for accepting me in to the graduate program of Biological Sciences, and for his guidance and suggestions during the course of the study as well as constructive comments on the thesis.

I wish to express my deepest gratitude and appreciation to both of my major advisors, Associate Professor Dr. Vithaya Yodyingyud and Associate Professor Dr. Prasert Sobhon, for their invaluable guidances, suggestions and discussions and for their comments and editing of the thesis.

I am very grateful to Associate Professor Dr. Sudsanong Patinawin and Associate Professor Dr. Jariya Boonjawat for their excellent guidances and suggestions and for their comments and corrections of the thesis.

I greatly appreciate the assistance given by Associate Professor Dr. Prakong Tangpraprutigul for her valuable advice at the beginning of the study, as well as Associate Professor Dr. Nongnuj Tanphaichitr for her corrections and comments on the thesis.

I would like to express my sincerest thank to Assistance Professor Pim Bubpaniroj for her assistance in light microscopic work and Assistance Professor Dr. Chaitip Vanichanon for his advices and assistance in photography.

I would also like to express my great gratitude and appreciation to the Graduate School of Chulalongkorn University as well as the Ministry of Science, Technology and Energy for providing a research grant for this study, and Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University for providing the facility in EM works.

I wish to thank Miss Pornchan Saitongdee for her competent assistance in EM works as well as the graduate and Ph.D. students in Electron Microscopy and Cell Biology Laboratory of the Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University for their assistances and encouragement throughout the course of my study.

I would also like to express my special thank to Miss Varaporn Thavisin for her assistance in typing this thesis.

Lastly, I wish to express my great appreciation to my husband, Mr. Apiwat Sretarugsa, and my daughter, Miss Apirapee Sretarugsa, for their consistent encouragement, perseverance and inspirations, without whose understanding I would not have finished this work.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Scanning electron micrograph of 1- and 2-cell embryos	42
2	Scanning electron micrograph of 4- and 8-cell embryos	44
3	Scanning electron micrograph of morula and early blastocyst	46
4	Scanning electron micrograph of late stage blastocyst	48
5	Electron micrographs of 1-cell embryos prepared by conventional TEM method	51
6	Electron micrographs of 1- and 2-cell embryos prepared by conventional TEM method	
7	Electron micrographs of 2-cell embryos performed by conventional TEM method	56
8	Electron micrographs of 4-cell embryos prepared by conventional method	59
9	Electron micrographs of 8-cell embryos prepared by conventional TEM method	61
10	Electron micrographs of 8-cell embryos prepared by conventional TEM method	63
11	Electron micrographs of early morulae prepared by conventional TEM method	65
12	Electron micrographs of morulae prepared by conventional TEM method	68
13	Electron micrographs of blastocyst prepared by conventional TEM method	70
14	Electron micrographs of preimplantation embryos extracted with Triton X-100 for 2 hrs.	76

LIST OF FIGURE (Cont.)

Figure		Page
15	Electron micrographs of 1-cell embryos extracted with Triton X-100 for 1 hr.	78
16	Electron micrographs of 1-cell embryos extracted with Triton X-100 for 1 hr.	80
17	Electron micrographs of 2-cell embryos extracted with Triton X-100 for 1 hr.	82
18	Electron micrographs of 4-cell embryos extracted with Triton X-100 for 1 hr.	84
19	Electron micrographs of 8-cell embryos extracted with Triton X-100 for 1 hr.	86
20	Electron micrographs of early blastocysts extracted with Triton X-100 for 1 hr.	88
21	Electron micrographs of blastocysts extracted with Triton X-100 for 1 hr.	90
22	Electron micrograph of blastocysts extracted with Triton X-100 for 1 hr.	92
23	Electron micrographs of 1-cell embryos extracted with Triton X-100 for 1 hr.	94
24	Electron micrographs of 2-cell embryos extracted with Triton X-100 for 1 hr.	96
25	Electron micrographs of 2-cell embryos extracted with Triton X-100 for 1 hr.	98
26-29	TEM micrographs of the surface of preimplantation embryos exposed to Con A + HRP + DAB + H ₂ O ₂	102

LIST OF FIGURES (Cont.)

Figure		Page
30-33	TEM micrographs of the surface of preimplantation embryos exposed to WGA-HRP+DAB+H ₂ O ₂ .	110
34-37	TEM micrographs of the surface of preimplantation embryos exposed to RCR ₁ -HRP+DAB+H ₂ O ₂ .	118
38	TEM micrographs of control groups of preimplantation embryos that were exposed to HRP + DAB + H ₂ O ₂ .	126
39-42	TEM micrographs of the surface of uterine epithelium during preimplantation period that was exposed to Con A + HRP + DAB + H ₂ O ₂ .	130
43-46	TEM micrographs of the surface of uterine epithelium during preimplantation period exposed to WGA - HRP + DAB + H ₂ O ₂ respectively.	138
47-50	TEM micrographs of the surface of uterine epithelium during preimplantation period exposed to RCA ₁ - HRP + DAB + H ₂ O ₂ .	146
51	TEM micrographs of control uteri exposed to HRP + DAB + H ₂ O ₂ .	154
52	Gross structure of uterine horns with implanted fetuses	156
53	The effect of lectins administration on implantation	161
54	Characteristics of implantation sites from embryo transfers	163
55	Implantation after transfer of embryos treated with Tectins	168
56	Histology of uteri treated with normal saline on D ₃ , and uterine morphology was observed on D ₄ and D ₆	171

LIST OF FIGURES (Cont.)

Figure		Page
57	Histology of uteri treated with WGA (200 μ g/0.1 ml NS) on D ₃ , uterine morphology was observed on D ₄ and D ₆ .	173
58	Histology of uteri treated with 100 μ g Con A/0.1 ml NS on D ₃ , uterine morphology was observed on D ₄ .	175
59	Histology of uteri treated with 400 μ g Con A/0.1 ml NS on D ₃ , uterine morphology was observed on D ₄	177
60	Histology of uteri treated with 200 and 400 μ g Con A/0.1 ml NS on D ₃ , uterine morphology was observed on D ₆ .	179



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		Page
1.1	Developmental schedule of hamster embryo <i>in vivo</i>	2
1.2	Some lectins suitable for use in electron microscopy	18
3.1	Size and distribution of cytoskeletal elements in preimplantation embryos	73
3.2	Lectins binding to hamster embryos and uterine epithelia during preimplantation stage	100
3.3	The effect of administration of 0.1 ml normal saline (NS) intraluminally on implantation	157
3.4	The effect of Con A administered intraluminally on implantation	158
3.5	The effect of WGA administered intraluminally on implantation	159
3.6	The effect of lectins administered intraluminally on implantation (summarizes of tables 3.3-3.5)	160
3.7	Implantation after transferred of embryos incubated in NS for 10 minutes	164
3.8	Implantation after transferred of embryos treated with various concentrations of Con A for 10 minutes	165
3.9	Implantation after transferred of embryos treated with various concentrations of WGA for 10 minutes	166
3.10	Implantation after transferred of embryos treated with lectins (summarizes of Tables 3.7-3.9)	167

LIST OF ABBREVIATIONS

AV	:	autophagic vacuole
BPA	:	Banhinia purpurea
BSA-I	:	Bandeiraca simplicifolia
CG	:	Cortical granule
Con A	:	Concanavalin A
D ₁	:	day 1 of pregnancy
DAB	:	3,3' diaminobenzidine
DBA	:	Dolichos biflorus
DB	:	dense body
DSL	:	deep stromal layer
EGTA	:	Ethyleneglycol-bis-(β -aminoethyl ether) - N,N,N',N' -tetraacetic acid
EM	:	electron microscope
En	:	endometrium
EP	:	epithelium
FITC	:	fluorescein isothiocyanate
GJ	:	gap junction
Go1	:	Golgi complex
hCG	:	human chorionic gonadotrophin
HRP	:	horseradish peroxidase
hr	:	hour
ICM	:	inner cell mass
IF	:	intermediate filament
IJ	:	intercellular junction
IM	:	inner membrane

IP	:	intraperitoneal injection
i.u.	:	international unit
L	:	lumen
LCA	:	Lens culinaris agglutinin
LS	:	lamellar structure
MF	:	microfilament
ML	:	microtrabecular lattice
MN	:	microtrabecular network
MPA	:	Maclura purnifer
MT	:	microtubule
mTr	:	mural trophectoderm
Mr	:	apparent molecular weight
MVB	:	multivesicular body
MV	:	microvilli
My	:	myometrium
NS	:	normal saline
OM	:	outer membrane
pTr	:	polar trophectoderm
PB ₁	:	modified Dulbecco's phosphate-buffer medium
PBS	:	phosphate buffer saline
PHA-E, PHA-L	:	Phaseolus vulgaris
PIPES	:	piperazine-N,N' -bis (Z-ethanesulfonic acid); 1,4-piperazinediethanesulfonic acid
PMSG	:	pregnant mare's serum gonadotrophin
PNA	:	Peanut agglutinin
RCA ₁ , RCA ₂	:	Ricinus communis agglutinin
RER	:	rough endoplasmic reticulum
RM	:	residual membrane
SBA	:	Soybean agglutinin

SC	:	stromal cell
sCon A	:	succinyl concanavalin A
SEM	:	Scanning electron microscope
SER	:	smooth endoplasmic reticulum
SL	:	stromal layer
SSL	:	superficial stromal layer
ST	:	sperm tail
sWGA	:	succinyl wheat germ agglutinin
TEM	:	transmission electron microscope
TC	:	trophectoderm cell
Tr	:	trophectoderm
UEA ₁	:	Ulex europaeus agglutinin
V	:	vesicle
WGA	:	wheat germ agglutinin
ZP	:	zona pellucida

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย