ณัฐชนก พวงจิตร์ : ผลของสารเรสเวอราทรอลในน้ำยาเลี้ยงและน้ำยาแช่แข็งต่อความสามารถในการพัฒนาและการแสดงออกของยีนของตัวอ่อนหนูเม้าส์ระยะบลาสโตซีส (THE EFFECT OF RESVERATROL IN CULTURE MEDIUM AND VITRIFICATION SOLUTION ON DEVELOPMENTAL COMPETENCE AND GENE EXPRESSION OF MOUSE BLASTOCYSTS) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย, 87 หน้า.

การผลิตตัวอ่อนในหลอดแก้ว (*In vitro* embryo production) เป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์ในการศึกษาการพัฒนาตัวอ่อนระยะก่อนฝังตัว อย่างไรก็ตามสภาวะแวดล้อมของการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้วนั้นยังคงเป็นสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเพียงพอ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงประเมินผลของสารเรสเวอราทรอล (resveratrol) ที่มีศักยภาพเป็นสารต้านอนุมูลอิสระต่อการพัฒนาของตัวอ่อนสี่เซลล์ของหนูเม้าส์ การแช่แข็งตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสเพื่อทดสอบความสามารถในการทนทานต่อการแช่แข็ง และการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีนอะพอพโทซิสและยีนที่เกี่ยวข้องกับการฝังตัวในมดลูกของตัวอ่อน

การทดลองที่หนึ่ง เพื่อทดสอบผลของการเติมสารเรสเวอราทรอลความเข้มข้นต่างๆ ในน้ำยาเลี้ยง (potassium simplex optimization medium, KSOM) ต่อความสามารถในการพัฒนาของตัวอ่อน ผลการศึกษาพบว่าอัตราการพัฒนาไปสู่ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสที่ความเข้มข้นของสารเรสเวอราทรอล 0.5 และ 1 ไมโครโมลาร์ (ร้อยละ 100 และร้อยละ 96.6 ตามลำดับ) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม 0 ไมโครโมลาร์ (ร้อยละ 100) นอกจากนี้ในกลุ่มที่เติมสารเรสเวอราทรอลความเข้มข้น 0.5 และ 1 ไมโครโมลาร์ (ร้อยละ 74.2 และร้อยละ 70.8 ตามลำดับ) พบว่ามีความสามารถของการพัฒนาของตัวอ่อนไปเป็นระยะบลาสโตซิสพร้อมฝังตัว (hatched blastocyst) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม 0 ไมโครโมลาร์ (ร้อยละ 52.8)

การทดลองที่สอง เพื่อตรวจสอบผลของการเติมสารเรสเวอราทรอลในน้ำยาเลี้ยง KSOM ในช่วงก่อนและหลังการแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเคชั่นต่อความสามารถในการกลับคืนสู่สภาพเดิมและความสามารถในการพัฒนาของตัวอ่อน โดยการศึกษาพบว่าไม่มีความแตกต่างในอัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อนหลังการแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเคชั่นในทุกกลุ่มการทดลองทุกกลุ่มทดลองให้ ผลการรอดชีวิตเป็น 100% และที่น่าสนใจหลังการเติมสารเรสเวอราทรอลความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ และทำการแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเคชั่น (0.5 ไมโครโมลาร์ resveratrol/Vitrified) (ร้อยละ 73.7) พบว่ามีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในการเพิ่มความสามารถในการทนทานต่อการแช่แข็ง

โดยมีค่าอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนไปเป็นระยะบลาสโตซิสพร้อมฝังตัวสูงที่สุด ดังนั้นการเติมสารเรสเวอราทรอลความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดสำหรับศักยภาพในการพัฒนาของตัวอ่อนทั้งตัวอ่อนหนูเม้าส์ที่ผ่านและไม่ผ่านการการแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเคชั่น

การทดลองที่สาม เพื่อประเมินประสิทธิภาพของการเติมสารเรสเวอราทรอลในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน KSOM และ/หรือ น้ำยาแช่แข็งวิทริฟิเคชั่นต่อความสามารถในการอยู่รอดต่อความเย็นและความสามารถในการพัฒนาของตัวอ่อนหนูเม้าส์ พบว่าการเติมสารเรสเวอราทรอลความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ในน้ำยาเลี้ยง KSOM มีอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนไปเป็นระยะบลาสโตซิสพร้อมฝังตัวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับทุกกลุ่มที่ไม่มีการเติมสารเรสเวอราทรอลในน้ำยาเลี้ยง KSOM

การทดลองที่สี่ การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนโดยวิเคราะห์ระดับของการถอดรหัสของยีนอะพอพโทซิสและยีนที่เกี่ยวของกับการฝังตัวในมดลูกของตัวอ่อน ผลการศึกษาพบว่าการเติมสารเรสเวอราทรอลความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ในน้ำยาเลี้ยง KSOM ไม่ได้เปลี่ยนการแสดงออกของยีน *Bax* แต่สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน *Bcl-2* และ *ErbB4* อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมสารเรสเวอราทรอลในน้ำยาเลี้ยง KSOM

ในการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า การเติมสารเรสเวอราทรอลในน้ำยาเลี้ยง KSOM ในความเข้มข้นต่ำ (0.5 ไมโครโมลาร์) ช่วยเพิ่มความสามารถในการพัฒนาของตัวอ่อนของหนูเม้าส์ โดยแสดงให้เห็นจากประสิทธิภาพในการพัฒนาของตัวอ่อนไปเป็นระยะบลาสโตซิสพร้อมฝังตัวและเพิ่มความสามารถในการทนทานต่อการแช่แข็ง ทั้งนี้ความสัมพันธ์ของการเติมสารเรสเวอราทรอลและกระบวนการแช่แข็งตัวอ่อนโดยวิธีวิทริฟิเคชั่นสามารถมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ *Bax*, *Bcl-2* และ *ErbB4* ที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์และการฝังตัวในมดลูกของตัวอ่อน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ปีการศึกษา 2562 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

NATCHANOK PUANGJIT : THE EFFECT OF RESVERATROL IN CULTURE MEDIUM AND VITRIFICATION SOLUTION ON DEVELOPMENTAL COMPETENCE AND GENE EXPRESSION OF MOUSE BLASTOCYSTS : ASSOC. PROF. RANGSUN PARNPAI, Ph.D., 87 PP.

RESVERATROL/*IN VITRO* CULTURE (IVC)/VITRIFICATION/MOUSE EMBRYO/GENE EXPREESION

In vitro embryo production is a valuable tool to study preimplantation embryonic development. However, *in vitro* environments provide a suboptimal environment. This study, therefore, evaluated the effect of resveratrol, an antioxidant, on the development of mouse 4-cell embryo, blastocyst vitrification in terms of cryotolerance and alternation of apoptotic and implantation genes expression.

Firstly, the effects of different concentrations of resveratrol supplementation in *in vitro* culture medium (potassium simplex optimization medium, KSOM) on mouse embryo developmental competency were determined. The rate of embryos developed to the blastocyst stage in 0.5 and 1 μM resveratrol groups (100% and 96.6%, respectively) were not significantly different when compared with the 0 μM resveratrol group (100%). Additionally, the medium containing 0.5, 1 μM resveratrol (74.2% and 70.8%, respectively) significantly improved ($P < 0.05$) the rate of embryo developed to the hatched blastocyst stage, compared with the 0 μM resveratrol group (52.8%). Secondly, the effects of resveratrol supplementation in KSOM culture medium during pre- and post-vitrification on retrieval efficiency and embryo development were investigated. There were no significant differences in the post-vitrification survival

rates of mouse blastocyst embryos in all treatments. They were 100% in all treatments. Interestingly, the treatment with 0.5 μM resveratrol/Vitrified (73.7%) significantly improved ($P<0.05$) the cryotolerance, as indicated by the highest rate of embryo developed to the hatched blastocyst stage following post-warming culture. Therefore, 0.5 μM resveratrol was the most suitable for improving developmental potential of fresh and vitrified mouse embryos. Thirdly, the effects of resveratrol supplementation in KSOM culture medium and/or vitrification solution on cryo-survivability and developmental competency of vitrified mouse embryos were determined. Supplementation of 0.5 μM resveratrol in KSOM significantly enhanced ($P<0.05$) the rate of embryo developed to the hatched blastocyst stage when compared with non-supplemented resveratrol group. Lastly, expression levels of genes involved in apoptosis and implantation were analyzed. The results showed that the addition of 0.5 μM resveratrol to the KSOM medium did not alter the expression of *Bax* in fresh hatched blastocysts whereas the expression of *Bcl-2* and *ErbB4* were up significantly ($P<0.05$), compared with the control group without resveratrol supplementation in KSOM. In conclusion, these results demonstrated that low levels (0.5 μM) of resveratrol during *in vitro* culture (KSOM) improved developmental competency of mouse embryos, indicated by their effective development of mouse hatched blastocysts with enhanced cryotolerance. The association of resveratrol supplementation and the vitrification process can alter the expression of *Bax*, *Bcl-2* and *ErbB4* genes related to apoptosis and implantation in the developing embryos.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology

Academic Year 2019

Student's Signature Natchanok P.

Advisor's Signature