ฐตวัชร ยอดรักษ์ : ผลของการแช่แข็งไข่และตัวอ่อนโคแบบเนื้อแก้วต่อคุณลักษณะทางอีพิจีนิติกและการแสดงออกของยีนที่สำคัญต่อการเจริญเติบโต (THE EFFECT OF BOVINE OOCYTE AND EMBRYO VITRIFICATION ON EPIGENETIC CHARACTERISTICS AND DEVELOPMENTALLY IMPORTANT GENES EXPRESSION) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย, 113 หน้า.

การเก็บรักษาไข่และตัวอ่อนของโคในระยะยาวได้มีการประยุกต์ใช้ในเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ และการปรับปรุงพันธ์มาอย่างแพร่หลาย ในปัจจุบันการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วเป็นวิธีมาตรฐานในการเก็บรักษาไข่และตัวอ่อน อย่างไรก็ตาม วิธีนี้มีอัตราการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตต่ำ เมื่อเทียบกับไข่และตัวอ่อนที่ไม่ได้แช่แข็ง ในการทดลองแรกมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบผลของความเข้มข้นของสารป้องกันการแช่แข็งในช่วงการปรับสมดุลต่อประสิทธิภาพการแช่แข็งตัวอ่อนโคแบบเนื้อแก้วในระยะบลาสโตซีสต์และการแสดงออกของยีนที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อน โดยทำการปรับสมดุลตัวอ่อนโคที่ผลิตจากกระบวนการในหลอดแก้วในน้ำยาที่มีส่วนผสมของ 7.5% เอทิลีนไกลคอล (EG) และ7.5% ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) เป็นกลุ่ม Va หรือใช้ 2% EG+2% DMSO เป็นกลุ่ม Vb จากนั้นทำการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วโดยใช้น้ำยาที่มีส่วนผสมของ 16.5% EG+16.5% DMSO+0.5M ซูโครส โดยใช้อุปกรณ์ Cryotop หลังจากทำละลายนำตัวอ่อนไปเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิต การฟักตัว และจำนวนเซลล์ที่เสียหายทั้งหมดระหว่างกลุ่มแช่แข็งทั้งสองและกลุ่มตัวอ่อนสดที่เป็นกลุ่มควบคุม ผลการทดลองพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มแช่แข็ง ในส่วนของอัตราการรอดชีวิต จำนวนเซลล์ทั้งหมด และความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ การแช่แข็งแบบเนื้อแก้วเพิ่มจำนวนเซลล์ที่เสียหายของทั้งสองกลุ่มการแช่แข็ง แต่พบความเสียหายมากกกว่าในกลุ่ม Vb การแช่แข็งแบบเนื้อแก้วเพิ่มการแสดงออกของยีน HSP70 อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในกลุ่ม Va เทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่ม Vb ส่วนการแสดงออกของยีน IGF2R SNRPN HDAC1 DNMT3B BAX OCT4 and IFN-t ของทั้งกลุ่มแช่แข็งและกลุ่มควบคุมไม่แตกต่างกัน สรุปได้ว่าความเข้มข้นของสารป้องกันการแช่แข็ง ในช่วงการปรับสมดุลนั้นไม่มีผลกระทบต่อออัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อนโคแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว อย่างไรก็ตามสารป้องกันการแช่แข็งในช่วงการปรับสมดุลที่ความเข้มข้น 15% สามารถคงไว้ซึ่งจำนวนเซลล์ปกติโดยที่มีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของยีน HSP70

ในการทดลองที่สองมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบผลของการแช่แข็งไข่โคแบบเนื้อแก้วที่ระยะ GV และ MII ต่อคุณลักษณะทางอีพิจีนิติกและการเจริญเติบโต จากผลการทดลองพบว่าการแช่แข็งไข่โคทั้งสองระยะทำให้การเจริญเติบโตของตัวอ่อนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภาย

หลังจากกการทำการปฏิสนธิภายในหลอดแก้ว อย่างไรก็ตาม การแช่แข็งไข่โคที่ระยะ GV ให้ผลการเจริญเติบโตของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซีสต์สูงกว่าระยะ MII การแช่แข็งไข่โคแบบเนื้อแก้วไม่มีผลกระทบต่อระดับของ 5mC ในสายดีเอ็นเอของไข่ อย่างไรก็ตามตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต์ที่เกิดจากไข่โคแช่แข็งแบบเนื้อแก้วทั้งสองระยะมีระดับ 5mC ลดลง การแช่แข็งไข่โคแบบเนื้อแก้วไม่มีผลต่อระดับของ H3K9me3 และ acH3K9 ในทั้งไข่และตัวอ่อนที่เกิดจากไข่แช่แข็งดังกล่าว จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการแช่แข็งไข่โคแบบเนื้อแก้วกระทบต่อระดับการเติมหมู่เมทิลในตัวอ่อนที่ผลิตได้ ถึงแม้จะไม่มีสามรถพบได้ในไข่ก็ตาม การค้นพบดังกล่าวนี้แสดงถึงว่าการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วนั้นส่งผลทำให้รบกวนการเปลี่ยนแปลงระดับอีพิจีนิติก โดยการลดระดับของการเติมหมู่เมทิลของดีเอ็นเอ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของความบกพร่องในการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคที่เกิดจากการแช่แข็งไข่โคที่แตกต่างกันทั้งสองระยะ นอกจากนี้การแช่แข็งไข่แบบเนื้อแก้วไม่มีผลต่อระดับการเติมหมู่อะเซทิล และหมู่เมทิลของฮิสโตนในไข่ และตัวอ่อนที่เกิดจากไข่แช่แข็งดังกล่าวอีกด้วย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ปีการศึกษา 2563 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

THATAWAT YODRUG : THE EFFECT OF BOVINE OOCYTE AND EMBRYO VITRIFICATION ON EPIGENETIC CHARACTERISTICS AND DEVELOPMENTALLY IMPORTANT GENES EXPRESSION. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. RANGSUN PARNPAI, Ph.D., 113 PP.

BOVINE/OOCYTE/EMBRYO/VITRIFICATION/EPIGENETIC

Long-term preservation of bovine oocyte and embryo have widespread applications in assisted reproductive technologies and genetic improvement of livestock species. Vitrification is the current gold standard of bovine oocyte and embryo cryopreservation. However, this technique still has inadequate survivability and developmental competency of oocyte and embryo compare with non-cryopreservation. The first experiment aimed to assess the effects of cryoprotectant concentration during equilibration on the efficiency of bovine blastocyst vitrification and the expression of selected developmentally important genes. In vitro produced bovine blastocysts were equilibrated in either 7.5% ethylene glycol (EG)+7.5% DMSO (Va group) or in 2% EG+2% DMSO (Vb group) then vitrified on Cryotop sheets in 16.5% EG+16.5% DMSO+0.5M sucrose. After warming, embryos were cultured for 48 h. Re-expansion, hatching, and the numbers of total and membrane damaged cells were compared among vitrified groups and fresh embryos as a control. There was no significant difference between the vitrified groups in survival, total cell numbers and the extent of membrane damage. Vitrification increased the number of membrane-damaged cells in both groups, however, in a greater extent in the Vb group. Vitrification increased ($P<0.05$) the expression of the *HSP70* gene in Va but

not in Vb embryos. The expression of *IGF2R*, *SNRPN*, *HDAC1*, *DNMT3B*, *BAX*, *OCT4*, and *IFN-t* genes were similar in control and vitrified groups. In conclusion, the concentration of cryoprotectants during equilibration did not affect the survival rate; however, normal cell numbers could be maintained only by equilibration in 15% cryoprotectants which was associated with an increased *HSP70* expression.

The second experiment aimed to compare the effect of bovine oocytes vitrification either at the GV or MII stages on epigenetic characteristics and subsequently developing embryos. The results showed that vitrification of oocytes at both meiotic stages significantly reduced blastocyst development after IVF compared with the fresh control. Oocyte vitrification did not affect 5-methylcytosine (5mC) immunostaining intensity in oocyte DNA. Nevertheless, at both stages of oocyte it caused a similar reduction of 5mC levels in DNA of subsequently developing blastocysts. Vitrification of the oocyte had no effect on the intensity of H3K9me3 and acH3K9 immunostaining in oocytes and subsequent blastocysts. The results showed that oocyte vitrification alters global methylation in resultant embryos although such alteration in the oocytes was not detected. It can be inferred from this finding that vitrification also alters epigenetic modification by reducing DNA methylation level and might be a cause of impaired developmental competency of bovine embryo derived vitrified oocyte in both developmental stages. Furthermore, oocyte vitrification did not affect histone acetylation and methylation in oocytes and resultant embryos.

School of Biotechnology

Academic Year 2020

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____