ธัญญา ประนมพนธ์ : ผลของเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โคแบบสเฟียรอยด์ในการเลี้ยงตัวอ่อนภายนอกร่างกายต่อคุณภาพของตัวอ่อนและรูปแบบทรานสคริปโตมิกส์ (EFFECTS OF BOVINE OVIDUCT EPITHELIAL SPHEROIDS DURING *IN VITRO* EMBRYO CULTURE ON QUALITY OF EMBRYO AND TRANSCRIPTOMICS PATTERN) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย, 132 หน้า.

คำสำคัญ: เซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โคแบบสเฟียรอยด์/การเลี้ยงตัวอ่อนภายนอกร่างกาย/ทรานสคริปโตมิกส์

แบบจำลองภายนอกร่างกายของเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ ที่ใช้ศึกษาเชิงลึกเกี่ยวกับการสื่อสารระหว่างตัวอ่อนและแม่ ซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดเซลล์ดิฟเฟอเรนทิเอชันหรือมีความท้าทายทางด้านเทคนิคการใช้ ในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้เสนอแบบจำลองเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โคแบบสเฟียรอยด์ (OES) ที่มีรูปทรงเฉพาะ ที่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 100–200 ไมโครเมตร อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันหนึ่งในการอภิปรายที่สำคัญที่สุดในช่วงการเจริญของตัวอ่อนก่อนระยะการฝังตัวภายนอกร่างกาย คือ ความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันซึ่งส่งผลเสียต่อการพัฒนาและคุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ ผู้วิจัยทดสอบ OES เพื่อใช้เป็นแนวทางการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนภายนอกร่างกายโดยการเพาะเลี้ยงร่วมแบบใหม่เพื่อสนับสนุนการเจริญของตัวอ่อนภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงแบบปกติ (5% ออกซิเจน) และสภาวะที่มีความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (20% ออกซิเจน)

ในการทดลองแรกมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา 1) สภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมของ OES ในการเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอย โดยการประเมินสัณฐานวิทยา จำนวนเซลล์ทั้งหมด ความมีชีวิต และกิจกรรมของเซลล์ที่มีขน; 2) ติดตามการแสดงออกของยีนใน OES ณ ช่วงเวลาที่มีการก่อตัว (วันที่ 0) และในช่วง 10 วันของการเพาะเลี้ยง และ 3) ทดสอบว่าตัวอ่อนระยะกำลังเจริญส่งผลต่อเกณฑ์คุณภาพ OES หรือไม่ จากผลการทดลอง ณ วันที่ 10 พบว่ามีสัดส่วนของ OES รูปทรงเวสิเคิล (V-OES) สูงใน M199/500 (เพาะเลี้ยงด้วยน้ำยา HEPES-buffered TCM-199 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร) และในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน synthetic oviduct fluid (SOF)/25 (หยดน้ำยา SOF ขนาด 25 ไมโครลิตร ภายใต้ mineral oil) สัดส่วนของเซลล์มีชีวิตใน V-OES ไม่ได้รับผลกระทบจากการเพาะเลี้ยงและยังคงสูง (>80%) จนถึงวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง จำนวนเซลล์ทั้งหมดต่อ V-OES ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป ยกเว้นใน SOF/25 ในขณะที่สัดส่วนของเซลล์ที่มีขนเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปใน M199/500 แต่ลดลงใน M199/25 และ SOF/25 แอมพลิจูดของการเคลื่อนที่ของ OES ในการเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอยลดลงเมื่อเวลาผ่านไปภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงทั้งหมด นอกจากนี้ การแสดงออกของยีน *ANXA1*, *ESR1*, *HSPA8* และ *HSPA1A* ใน OES ยังคงมีเสถียรภาพในระหว่างการเพาะเลี้ยง ในขณะที่การแสดงออกของยีน *PGR* และ *OVGP1* ลดลงจากวันที่ 0 ถึงวันที่ 10 ท้ายสุดนี้ การเพาะเลี้ยงร่วมระหว่างตัวอ่อนระยะกำลังเจริญกับ OES ใน SOF/25 เพิ่มสัดส่วนของ V-OES เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยง OES เพียงอย่างเดียว

การทดลองที่สองมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบผลของ OES ต่อการเจริญและคุณภาพของตัวอ่อนในแง่ของจำนวนเซลล์บลาสโตซิสต์และทรานสคริปโตมของบลาสโตซิสต์ตามช่วงเวลาการเพาะเลี้ยงร่วม (4 วัน เทียบกับ 7 วัน) และปริมาณของออกซิเจน (5% เทียบกับ 20%) ภายใต้สภาวะ 5% ออกซิเจน OES เพิ่มจำนวนเซลล์ต่อบลาสโตซิสต์เมื่อเพาะเลี้ยง OES ร่วมกับตัวอ่อนเป็นเวลา 7 วัน (137.6 ± 10.8 เทียบกับ 102.6 ± 8.4 เซลล์ในกลุ่มควบคุม; P <0.05) ภายใต้สภาวะ 20% ออกซิเจน OES เพิ่มอัตราตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ในวันที่ 7 และ 8 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (30.7% และ 31.8% สำหรับ 4 และ 7 วัน ของการเพาะเลี้ยงร่วมเทียบกับ 19.8% ในกลุ่มควบคุม; P<0.05) และเพิ่มจำนวนเซลล์ต่อบลาสโตซิสต์โดยไม่มีความแตกต่างระหว่างการเพาะเลี้ยงร่วม 4 และ 7 วัน (112.7 ± 7.8. และ 138.1 ± 10.5 เซลล์ ตามลำดับ เทียบกับ 82.1 ± 4.5 เซลล์ในกลุ่มควบคุม; P <0.0001) จำนวนและสัดส่วนสูงสุดของยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกัน (DEGs) แบบเฉพาะพบในการเพาะเลี้ยงร่วมกับ OES 7 วัน เทียบกับกลุ่มควบคุมภายใต้ 20% ออกซิเจน ท้ายสุดนี้ คำศัพท์ด้านหน้าที่ ซึ่งพบมากที่สุดของ DEGs ที่ได้รับผลกระทบจากการเพาะเลี้ยงร่วม OES โดยไม่คำนึงถึงระดับออกซิเจนและเวลาของการเพาะเลี้ยงร่วม รวมถึง "การเผาผลาญของไขมัน" "การตอบสนองต่อการกระตุ้นภายนอกเซลล์" "การตอบสนองต่อระดับออกซิเจน"

โดยสรุป ผลลัพธ์เหล่านี้ชี้ว่า OES เป็นแบบจำลองที่ใช้งานง่าย ได้มาตรฐาน และเป็นแบบจำลองทางสรีรวิทยาเพื่อศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวอ่อนกับแม่ในโค ซึ่งเป็นการศึกษาแรกที่รายงานผลสนับสนุนของ OES ต่อการเจริญของตัวอ่อนและผลสนับสนุนของตัวอ่อนระยะกำลังเจริญต่อสัณฐานวิทยาของ OES นอกจากนี้ OES ยังเปลี่ยนแปลงรูปแบบทรานสคริปโตมของตัวอ่อนโดยมีผลกระทบสูงสุดภายใต้สภาวะความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งพิสูจน์ให้เห็นเป็นครั้งแรกถึงการปรับเปลี่ยนการโต้ตอบของตัวอ่อนและ OES ตามสภาพแวดล้อมของตัวอ่อน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2566

ลายมือชื่อนักศึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

THANYA PRANOMPHON : EFFECTS OF BOVINE OVIDUCT EPITHELIAL SPHEROIDS DURING *IN VITRO* EMBRYO CULTURE ON QUALITY OF EMBRYO AND TRANSCRIPTOMICS PATTERN. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. RANGSUN PARNPAI, Ph.D. 132 PP.

Keyword: Bovine Oviduct Epithelial Spheroids/*In Vitro* Embryo Culture/Transcriptomics

Most *in vitro* models of oviduct epithelial cells (OEC) used thus far to gain insights into embryo–maternal communication induce cell dedifferentiation or are technically challenging. Here, we propose a model based on bovine oviduct epithelial spheroids (OES) with specific shape and diameter (100–200 µm) criteria. So far, however, one of the most significant discussions during pre-implantation embryo development *in vitro* is oxidative stress with deleterious effects on blastocyst development and quality. We tested OES as a new co-culture approach to support embryo development under both usual (5% O_2) and oxidative stress (20% O_2) culture conditions.

The objectives in the first experiment were to 1) determine the appropriate culture conditions of bovine OES cultured in suspension by evaluating their morphology, total cell number, viability, and activity of ciliated cells; 2) monitor gene expression in OES at the time of their formation (day 0) and over the 10 days of culture; and 3) test whether the vicinity of developing embryos affects OES quality criteria. On day 10, the proportions of vesicle-shaped OES (V-OES) were higher in M199/500 (500 µL of HEPES-buffered TCM-199) and synthetic oviduct fluid (SOF)/25 (25-µL droplet of SOF medium under mineral oil) than in M199/25 (25-µL droplet of M199 under mineral oil). The proportion of viable cells in V-OES was not affected by culture conditions and remained high (>80%) through day 10. The total number of cells per V-OES decreased over time except in SOF/25, while the proportions of ciliated cells increased over time in M199/500 but decreased in M199/25 and SOF/25. The movement amplitude of OES in suspension decreased over time under all culture conditions. Moreover, the gene expression of *ANXA1*, *ESR1*, *HSPA8*, and *HSPA1A* in OES remained stable during culture, while that of *PGR* and *OVGP1* decreased from day 0 to day 10. Last, the co-culture of developing embryos with OES in SOF/25 increased the proportion of V-OES compared to OES cultured alone.

The objective in the second experiment was to examine the effect of OES on embryo development and quality in terms of blastocyst cell numbers and blastocyst transcriptome according to the co-culture time (4 vs 7 days) and oxygen tensions (5%

vs. 20%). Under 5% O_2, the presence of OES increased the number of cells per blastocyst when OES were co-cultured for 7 days (137.6 ± 10.8 vs. 102.6 ± 8.4 cells in control; $P<0.05$). Under 20% O_2, the presence of OES significantly increased blastocyst rates on days 7 and 8 (30.7% and 31.8% for 4 and 7 days vs. 19.8% in controls; $P<0.05$) and cell numbers per blastocyst with no difference between 4 and 7 days of co-culture (112.7 ± 7.8. and 138.1 ± 10.5 cells, respectively, vs. 82.1 ± 4.5 cells in controls; $P<0.0001$). The highest number and proportion of specific differentially expressed genes (DEGs) was observed for the 7dOES vs. control under 20% oxygen. Finally, the most enriched functional terms of DEGs impacted by OES co-cultured regardless of the oxygen level and time of co-culture including "metabolism of lipids", "response to extracellular stimulus", "response to oxygen levels".

In conclusion, these results point to OES as an easy-to-use, standardizable, and physiological model to study embryo–maternal interactions in cattle. This is the first study reporting the supportive effect of OES on embryo development and of developing embryos on OES morphology. The OES altered the embryonic transcriptome with the highest impact under oxidative stress conditions, also evidencing for the first time a modulation of the embryo-OES dialog according to the embryonic environment.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology
Academic Year 2023

Student's Signature Thanya Pramomphon
Advisor's Signature
Co-advisor's Signature