กมลชนก โทนคำ: ผลของการเติมเรสเวอราทรอลในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนต่อความสามารถในการพัฒนา ความอยู่รอดหลังการแช่แข็ง และการแสดงออกของยีนในตัวอ่อนโคที่ผลิตในหลอดแก้ว (EFFECT OF RESVERATROL SUPPLEMENTATION INTO *IN VITRO* CULTURE MEDIUM ON DEVELOPMENTAL COMPETENCE, CRYOTOLERANCE AND GENE EXPRESSION OF *IN VITRO* PRODUCED BOVINE EMBRYOS) อาจารย์ที่ปรึกษา: ศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย, 67 หน้า.

คำสำคัญ: โค/การพัฒนาของตัวอ่อน/เรสเวอราทรอล/ภาวะเครียดออกซิเดชัน/การแช่แข็งแบบ vitrification

ในเทคโนโลยีช่วยการสืบพันธุ์ (ART) การแช่แข็งตัวอ่อนโดยเฉพาะวิธี vitrification เป็นสิ่งจำเป็นในการรักษาคุณภาพตัวอ่อนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง อย่างไรก็ตาม การแช่แข็งวิธี vitrification อาจส่งผลต่อความมีชีวิตหลังการละลายตัวอ่อน เนื่องจากเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันจากอนุมูลอิสระ (ROS) การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบผลของเรสเวอราทรอลซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ต่อการรอดชีวิตและความสามารถในการพัฒนาของตัวอ่อนโครยะยะบลาสโตซิสต์ที่เลี้ยงในหลอดแก้ว ในการทดลองที่ 1 ตัวอ่อนที่ผลิตในหลอดทดลองถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ 1) เติมเรสเวอราทรอล 0.5 µM ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน (+R) และ 2) กลุ่มควบคุม ซึ่งไม่เติมเรสเวอราทรอลในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน (-R) จากผลการศึกษา พบว่าอัตราการแบ่งเซลล์และการพัฒนาสู่ระยะบลาสโตซิสต์ ในกลุ่ม +R (81.70% และ 37.75%) สูงกว่ากลุ่ม -R (75.13% และ 29.82%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) การทดลองที่ 2 นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ที่ผลิตในกลุ่ม +R และ -R ที่นำไปแช่แข็งโดยวิธี vitrification แล้วนำไปทำละลายในน้ำยาที่ไม่เติมเรสเวอราทรอลก่อนนำไปเลี้ยงต่อในหลอดทดลองที่เติมและไม่เติมเรสเวอราทรอล ซึ่งพบว่าการเติมเรสเวอราทรอลเฉพาะระหว่างการเลี้ยงตัวอ่อนแต่ไม่เติมในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนหลังละลาย (+R/−R) ได้อัตราการฟักตัวของตัวอ่อน (71.50%) สูงกว่ากลุ่มเติมเฉพาะน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนหลังละลาย (−R/+R, 45.03%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตาม เรสเวอราทรอลไม่ส่งผลต่อจำนวนเซลล์โทรเฟคโทเดิร์ม (TE) เซลล์ไอซีเอ็ม (ICM) หรือจำนวนเซลล์ทั้งหมดในตัวอ่อนสดและตัวอ่อน vitrification การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนแสดงให้เห็นว่า เรสเวอราทรอลช่วยเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันอนุมูลอิสระ (*SOD1, CAT*) ความต้านทานต่อความเครียด (*SIRT1*) การทำงานของไมโตคอนเดรีย (*TFAM*) การต้านการตายของเซลล์ (*BCL2*) การควบคุมอีพีเจเนติกส์ (*DNMT1, DNMT3A*) การคงความเป็นเซลล์พลูโพเทนท์ (*OCT4*) และการส่งสัญญาณการตั้งท้อง (*IFN-tau*) ในตัวอ่อนสด ส่วนในตัวอ่อนที่ผ่านการ vitrification เรสเวอราทรอลสามารถคงระดับการแสดงออกของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ

GPX4 ไว้สูงโดยเฉพาะเมื่อได้รับเรสเวอราทรอลในช่วงเลี้ยงตัวอ่อน นอกจากนี้เรสเวอราทรอลยังลดการแสดงออกของยีนที่กระตุ้นการตายของเซลล์ (*BAX*) ในตัวอ่อนที่ได้รับการเติมสารระหว่างการเลี้ยงในหลอดทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งบ่งชี้ถึงการเพิ่มความมีชีวิตของเซลล์โดยสรุปผลลัพธ์ทั้งหมดชี้ให้เห็นถึงผลดีของการเติมเรสเวอราทรอลระหว่างเลี้ยงตัวอ่อนต่อการเพิ่มความทนทานต่อการแช่แข็ง การควบคุมการแสดงออกของยีน และความสามารถในการพัฒนาของตัวอ่อนโค

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา.....กมลชนก.....

ปีการศึกษา 2567 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

KAMOLCHANOK TONEKAM: EFFECT OF RESVERATROL SUPPLEMENTATION INTO *IN VITRO* CULTURE MEDIUM ON DEVELOPMENTAL COMPETENCE, CRYOTOLERANCE AND GENE EXPRESSION OF *IN VITRO* PRODUCED BOVINE EMBRYOS. THESIS ADVISOR: RANGSUN PARNPAI, Ph.D., 67 PP.

Keyword: bovine/embryo development/resveratrol/oxidative stress/vitrification

In assisted reproductive technology (ART), embryo cryopreservation, particularly via vitrification, is essential for preserving the quality of ruminant embryos. However, vitrification can adversely affect embryo viability post-thawing due to oxidative stress induced by reactive oxygen species (ROS). The present study aimed to evaluate the effects of resveratrol, a known antioxidant, on the survival and developmental competence of bovine embryos cultured *in vitro*. In Experiment 1, *in vitro*-produced embryos were divided into two groups: (1) supplemented with 0.5 μM resveratrol in embryo culture medium (+R) and (2) without resveratrol in embryo culture medium (-R) which served as control group. Results indicated that cleavage and blastocyst developmental rates in the +R group (81.70% and 37.75%, respectively) were significantly higher ($P < 0.05$) than the -R group (75.13% and 29.82%, respectively). Experiment 2, investigated the developmental outcomes of blastocysts from the +R and -R groups subjected to vitrification, warmed in media without resveratrol, and then subsequently cultured *in vitro* with or without resveratrol. The results found that supplemented resveratrol only in culture medium (not in post-warming, +R/-R) exhibited significantly higher ($P < 0.05$) hatching rates (71.50%) compared to those supplemented only in post-warming culture medium (-R/+R, 45.03%). However, resveratrol supplementation did not affect the number of trophectoderm (TE), inner cell mass (ICM), or total cell numbers in both fresh and vitrified embryos. Gene expression analysis revealed that resveratrol enhanced expression of antioxidant-related genes (*SOD1*, *CAT*), stress resistance (*SIRT1*), mitochondrial function (*TFAM*), anti-apoptosis (*BCL2*), epigenetic regulation (*DNMT1*, *DNMT3A*), pluripotency (*OCT4*), and pregnancy signaling (*IFN-tau*) in fresh embryos. In vitrified embryos, resveratrol maintained high levels of *GPX4* expression, particularly

when administered during embryo culture. Moreover, resveratrol significantly reduced the expression of the pro-apoptotic gene (*BAX*) in embryos cultured *in vitro*, suggesting improved cell viability. In conclusion, the findings demonstrate the beneficial effects of resveratrol supplementation during embryo culture, enhancing cryotolerance, regulating gene expression, and promoting developmental competence of bovine embryos.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology
Academic Year 2024

Student's Signature.....Kamolchanok.....
Advisor's Signature.....