หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของรอสโควิทินต่อการสุกของไข่ในหนูถีบจักรและการเจริญของตัวอ่อนภายหลังการปฏิสนธินอกกาย

ผู้เขียน นางสาว วัลลภา ก๊กมาศ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สรีรวิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษา

ผศ. ดร. พรภิมล ตั้งชัยสิน	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ศ. นพ. ธีระพร วุฒเยวนิช	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผศ. ดร. ชัยณรงค์ โตจรัส	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อพัฒนาการเพาะเลี้ยงไข่อ่อนโดยวิธี Two-step IVM ในหนูถีบจักร และประเมินประสิทธิผลของรอสโควิทินที่เติมลงในน้ำยา Prematuration (PMC) ต่อการเจริญเต็มที่ของเซลล์ไข่หนูถีบจักรและการเจริญของตัวอ่อนภายหลังการปฏิสนธินอกร่างกาย การทดลองที่ 1 นำไข่อ่อนที่มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบมาเพาะเลี้ยงในน้ำยา PMC ที่เติมรอสโควิทินที่ความเข้มข้นต่างๆ (0, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครโมล) เป็นเวลานาน 3 6 และ 12 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบหาความเข้มข้นของรอสโควิทินและเวลาที่เหมาะสมในการยับยั้งการคืนสภาพการแบ่งเซลล์แบบไมโอทิคที่เกิดขึ้นเองภายนอกร่างกายของไข่หนูไว้ที่ระยะ germinal vescicle (GV) ผลจากย้อมเซลล์ด้วยสีเฮิกซ์ พบว่าไข่อ่อนที่มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาที่เติมรอสโควิทินด้วยความเข้มข้น 25 ไมโครโมลเป็นเวลา 3ชั่วโมง สามารถคงค้างไว้ที่ระยะ GV ได้มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (79.1% และ 25.4%, p <0.001) และมีเพียงเล็กน้อย (18.6%) ที่เจริญเข้าสู่ระยะ germinal vesicle breakdown (GVBD) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (65.8%) (P<0.001)

ในการทดลองที่ 2 เพื่อศึกษาความสามารถในการเจริญเต็มที่ของไข่อ่อนภายหลังการคงค้างไว้ที่ระยะ GV ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เติมรอสโคสวิทินที่ความเข้มข้น 25 ไมโครโมล เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และนำมา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เพาะเลี้ยงต่อในน้ำยาเพาะเลี้ยง IVM จนครบ 24 ชั่วโมง ไข่อ่อนที่เพาะเลี้ยงแบบ Two-step IVM มีแนวโน้มเจริญต่อไปจนถึงระยะเมทาเฟสทูได้ดีกว่าไข่อ่อนที่เพาะเลี้ยงแบบ IVM (76.69% และ 71.26%) อย่างไรก็ตาม ไข่อ่อนที่เจริญเข้าสู่ระยะเมทาเฟสทูจากทั้งกลุ่ม Two-step IVM และกลุ่ม IVM มีจำนวนน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (86.15%, P<0.05) พบว่าเซลล์คิวมูลัสที่ล้อมรอบไข่แบบแผ่ขยายเต็มที่ในกลุ่ม Two-step IVM และกลุ่ม IVM น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (100%, P<0.001) แต่อย่างไรก็ตามเซลล์คิวมูลัสที่ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบแผ่ขยายในกลุ่ม Two-step IVM มากกว่าในกลุ่ม IVM (P< 0.05) เพื่อศึกษาความสามารถในการปฏิสนธินอกร่างกายและการเจริญของตัวอ่อนภายหลังการเจริญเต็มที่ของไข่อ่อนนอกร่างกาย ไข่ระยะเมทาเฟสทูจากทั้ง 3 กลุ่มจะถูกผสมกับอสุจิของหนูเพศผู้และประเมินอัตราการปฏิสนธิและการเจริญของตัวอ่อนที่ได้ พบว่า อัตราการปฏิสนธิไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในระหว่างกลุ่ม Two-step IVM (76.72%) กลุ่ม IVM (75.13%) และกลุ่มควบคุม (80.58%) เช่นเดียวกันกับ อัตราของเซลล์ไข่ที่ไม่มีการปฏิสนธิจากทั้งกลุ่ม Two-step IVM และกลุ่ม IVM ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (12.70%, 7.40% เปรียบเทียบกับ 9.35%) อย่างไรก็ตาม อัตราการตายของเซลล์ไข่ของหนูถีบจักรภายหลังการปฏิสนธินอกร่างกายกับอสุจิหนูถีบจักรจากทั้งสองกลุ่ม Two-step IVM และกลุ่ม IVM มีมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (10.59%,17.51% เปรียบเทียบกับ 1.0%) อัตราการเจริญของตัวอ่อนของหนูถีบจักรจากระยะ 2-เซลล์ ไปเป็น8-เซลล์ morula expanded blastocyst และ hatching blastocyst จากกลุ่ม Two-step IVM มีแนวโน้มมากกว่ากลุ่ม IVM (76.72% และ 75.13%), (32.80% และ 31.22%), (17.46 % และ 14.81%), (11.64% และ 7.94%) ตามลำดับ

ผลการทดลองที่ได้จากการศึกษานี้พิสูจน์ได้ว่าการเติมรอสโควิทินลงในน้ำยาเพาะเลี้ยงส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของไข่อ่อนระยะ GV ในหนูถีบจักรได้ การยับยั้งเป็นแบบชั่วคราวและไข่สามารถเจริญต่อไปยังระยะ GVBD, MII , cleavage, blastocyst และระยะ hatching ได้เช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม ดังนั้นการนำรูปแบบ Two-step IVM ด้วยรอสโควิทินสามารถปรับปรุงคุณภาพของไข่หนูถีบจักรโดยไม่ส่งผลต่อการเจริญของเซลล์ไข่ การปฏิสนธิ และการเจริญของตัวอ่อน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Effects of Roscovitine on Oocyte Maturation in Mice and Subsequent Embryo Development After *In Vitro* Fertilization

Author Miss Wanlapa Kokmas

Degree Master of Science (Physiology)

Advisory Committee Asst. Prof. Dr. Pornpimon Tangchaisin Advisor
Prof. Teraporn Vutyavanich, M.D. Co-advisor
Asst. Prof. Dr. Chainarong Tocharus Co-advisor

ABSTRACT

The aims of this study were to develop a murine two-step IVM model and assess the effectiveness of Roscovitine as a prematuration medium on maturation of mouse oocytes and subsequent embryo development after *in vitro* fertilization. In the first experiment, the optimal concentration of Roscovitine and exposure time to inhibit spontaneous meiotic resumption in mouse GV stage oocytes was determined. Cumulus oocyte complexes (COCs) were cultured in PMC medium supplemented with various concentrations of roscovitine (0, 12.5, 25 and 100 µM) and assessed the meiotic maturation after cultured for 3, 6 and 12 hours. Hoechst staining showed that the COCs cultured in 25 µM Roscovitine for 3 hours was the most efficient concentration producing meiotic arrest. There was significantly higher ($P < 0.0001$) proportion of oocytes (79.1%) that remained at the GV stage than that of oocytes cultured in absence of Roscovitine (25.4%) and the fewest oocytes (18.6%) escaped from the inhibition and underwent GVBD when compared with control group (65.8%) ($P<0.001$).

In the second experiment, the acquisition of oocyte developmental competence by maintaining oocytes at the GV stage *in vitro* via two-step IVM system was assessed.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

COCs were cultured in PMC medium supplemented with 25 μM Roscovitine for 3 hours and then matured in a conventional step-wise IVM system up to 24 hours. The two-step IVM oocytes trended to reach the MII stage better than conventional IVM oocytes (76.69% versus 71.26%). However, the MII oocytes matured from both two-step IVM and conventional IVM systems were significantly lower than *in vivo* maturation (IVO) control group (86.15%). The fully cumulus cells expansion in two-step IVM and IVM control (88.85% and 81.53%) were significantly lower than IVO control (100%, $P<0.001$). However, fully expansion of cumulus cells of two-step IVM was significantly higher than that of IVM control ($P<0.05$). To study the subsequent *in vitro* fertilization and early embryo development, MII oocytes derived from all three groups were inseminated with mouse sperm and assessed for their fertilization rate and subsequent embryo development. The fertilization rates were not significantly different between two-step IVM (76.72%), IVM (75.13%) and IVO (80.58%) groups. Similarly, unfertilization rate from both two-step IVM and IVM groups were not significantly different from IVO control group (12.70%, 7.40% versus 9.35%). However, the degeneration rate of mouse oocytes after insemination from both two-step IVM and IVM groups were significantly higher than IVO control group (10.59%, 17.51% versus 1.0%). Rate of embryo development from 2-cell to 8-cell, morula, expand blastocyst and hatching blastocyst stages from two-step IVM tended to be higher than conventional IVM (76.72% versus 75.13%), (32.80% versus 31.22%), (17.46 %versus 14.81%), (11.64% versus 7.94%), respectively.

The results from the present study demonstrated that supplementation of the PMC medium with 25 μM Roscovitine resulted in efficient maintaining mouse oocytes at the GV stage *in vitro*. The inhibitory activity was reversible, and oocytes underwent GVBD and MII stage, cleavage rate, blastocyst and hatching rate to the same extent as non-arrested IVM oocytes. Although a two-step IVM with Roscovitine could not improve the quality of mouse oocytes but without compromising subsequent maturation, fertilization and embryo development.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved