Thesis Title Effect of White Kwao Extract (*Pueraria mirifica*) on *in vitro* Development and Implantation Rate of Mouse Embryo

Author Miss Sansani Rattanawaraha

M.S. Physiology

Experiment committee

Associate Professor Dr. Pramote Vanittanakom Chairman

Associate Professor Dr. Amphawan Apisariyakul Member

Assistant Professor Dr. Umnat Mevatee Member

Assistant Professor Dr. Anchalee Pongchaidecha Member

ABSTRACT

The White Kwao (*Pueraria mirifica*), a potent phytoestrogenic medicinal plant, has long been used in Thailand as a traditional folkmedicine. However, no scientific information of the direct effect of White Kwao on the development of mammalian embryo was available. Therefore, the purpose of this study was to investigate the effect of White Kwao extract on the *in vitro* development and implantation rate of mouse embryos.

This study was designed into two experiments. In the first experiment, the two-cell stage mouse embryos were collected from the oviduct of superovulated mature female mice, and randomly cultured in three different media, the M16, M16 supplemented with 0.52 μg ethinylestradiol-17β, and M16 supplemented with 10mg/ml White Kwao extract. The culture was incubated in CO_2 incubator at 37°C. After the embryos were cultivated, the developments of embryos were observed every

24 hours for 5 days. The developmental rate of embryos from the two-cell stage to blastocyst stage in the media with White Kwao was significantly higher ($p<0.05$) than those of the control group (68.50% versus 43.50%) but did not differ from the positive control group (68.50% versus 57.66%).

In the second experiment, the hatched blastocysts, which obtained from the three different media, were differentially labeled the nuclei with two polynucleotide-specific fluorochromes, the propidium iodide (PI) and the bisbenzimide. The results showed that the number of trophectoderm cells in the blastocysts that cultivated in the media with the White Kwao did not significantly differ from the control (80.00 versus 70.00 cells) and the positive control group (80.00 versus 112.50 cells). The average number of inner cell mass in the White Kwao treated group did not significantly differ from the control group (20.50 versus 16.00 cells) and the positive control group (20.50 versus 20.50 cells). The total cell number including the trophectoderm and the inner cell mass of the individual hatched blastocyst was evaluated. The cell number in the blastocysts obtained from the media with the White Kwao did not significantly differ from the control (94.25 ± 9.50 versus 92.33 ± 4.05) and the positive control group (94.25 ± 9.50 versus 110.33 ± 9.16).

The results demonstrated that the White Kwao treatment group did have a stimulating effect on the *in vitro* development of mouse embryos. The exact mechanism that White Kwao stimulated mouse embryo development is not known. The suspect mechanism may in a manner similar to the mechanism that of estrogen stimulated the development of mouse embryos. Further studies are needed to transfer

the blastocyst into the endometrium of pseudopregnancy mice to evaluate the effect of White Kwao on implantation.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลของสารสกัดกวาวขาวต่อการเจริญในหลอดทดลองและอัตราการฝังตัวของเอ็มบริโอหนู

ชื่อผู้เขียน นางสาว ศันสนีย์ รัตนวราหะ

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสรีรวิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. ปราโมทย์ วณิตย์ธนาคม ประธานกรรมการ

รศ.ดร. อัมพวัน อภิสริยะกุล กรรมการ

ผศ. ดร. อำนาจ มีเวที กรรมการ

ผศ. ดร. อัญชลี พงศ์ชัยเดชา กรรมการ

บทคัดย่อ

กวาวเครือขาว (*Pueraria mirifica*) มีสารที่ออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญและเป็นที่รู้จักกันดีในวงการแพทย์แผนไทย อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับผลโดยตรงของกวาวเครือขาวต่อการเจริญของตัวอ่อนของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อการเจริญในหลอดทดลองและอัตราฝังตัวของตัวอ่อนหนูถีบจักร

การศึกษานี้แบ่งออกเป็นสองการทดลอง การทดลองแรกเก็บตัวอ่อนหนูถีบจักรระยะ 2-เซลล์จากท่อนำไข่ของหนูถีบจักรเพศเมียที่โตเต็มวัยแล้วทำการกระตุ้นให้เกิดการตกไข่ครั้งละมากๆ จากนั้นแบ่งตัวอ่อนระยะ 2-เซลล์แบบสุ่มออกเป็น 3 กลุ่ม นำไปเพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง 3 ชนิด คือ 1) เพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง M16 เป็นกลุ่มควบคุม, 2) เพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง M16 ที่ใส่ ethinylestradiol-17β ความเข้มข้น 0.52 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, 3) เพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง M16 ที่ใส่สารสกัดกวาวเครือขาวความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, มี 5%คาร์บอนไดออกไซด์ สังเกตและบันทึกผลการเจริญของตัวอ่อนหนูถีบจักรทุก 24 ชั่วโมงจนครบ 5 วัน จากผลการทดลอง พบว่า ภายหลังการเพาะเลี้ยงจนครบ 5 วัน อัตราการเจริญของตัวอ่อนที่เข้าสู่ระยะบลาสโตซีสในกลุ่มกวาวเครือขาว

เจริญมากกว่า กลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (68.50% และ 43.50%)($p<0.05$) แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่มที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ใส่ ethinylestradiol-17β (68.50% และ 57.66%)

การทดลองที่สองนำเอาตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ออกมาจาก zona pellucida ในแต่ละกลุ่มจากการเพาะเลี้ยงในการทดลองที่หนึ่งมาทำการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ คือ propidium iodide(PI) และ bisbenzimideเพื่อศึกษาจำนวนเซลล์ trophectoderm และ inner cell mass จากนั้นนำมาตรวจนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ จากผลการทดลองพบว่า จำนวนของเซลล์ trophectoderm เมื่อทำการเปรียบเทียบในกลุ่มที่ทำการเพาะเลี้ยงด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ใส่สารสกัดจากกวาวเครือขาว และกลุ่มควบคุม (80.00 และ 70.00) และกลุ่มที่ทำการเพาะเลี้ยงด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ใส่ ethinylestradiol-17β (80.00 และ 112.50) มีจำนวนไม่แตกต่างกัน ส่วนจำนวนของเซลล์ inner cell mass เมื่อทำการเปรียบเทียบในกลุ่มที่ทำการเพาะเลี้ยงด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ใส่สารสกัดจากกวาวเครือขาว และกลุ่มควบคุม (20.50 และ 16.00), และกลุ่มที่ทำการเพาะเลี้ยงด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ใส่ ethinylestradiol-17β (20.50 และ 20.50). ในส่วนที่สองพบว่าการย้อมด้วยวิธีการแยก trophectoderm และ inner cell mass ไม่สามารถแยกได้ชัดเจน จึงนับได้เป็นจำนวนเซลล์ทั้งหมดของบลาสโตซีส พบว่า จำนวนเซลล์ทั้งหมดในกลุ่มที่ทำการเพาะเลี้ยงที่ใส่สารสกัดจากกวาวเครือขาว และกลุ่มควบคุม (94.25 ± 9.50 และ 92.33 ± 4.05) และกลุ่มที่ทำการเพาะเลี้ยงด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ใส่ ethinylestradiol-17β (94.25 ± 9.50 และ 110.33 ± 9.16) ไม่แตกต่างกัน

การศึกษานี้บ่งชี้ว่า กลุ่มที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ใส่สารสกัดจากกวาวเครือขาวมีฤทธิ์ในการกระตุ้นการเจริญของตัวอ่อนหนูถีบจักรในหลอดทดลอง กลไกที่แท้จริงที่กวาวเครือขาวสามารถกระตุ้นการเจริญของตัวอ่อนหนูถีบจักรยังไม่สามารถอธิบายได้จากการทดลองนี้ แต่กลไกที่อาจเป็นไปได้คือกลไกที่คล้ายคลึงกับเอสโตรเจนที่มีผลต่อการเจริญของตัวอ่อนหนูถีบจักร