



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการประเมินความเป็นพิษของสารอะทราซีนต่อการ
พัฒนาและความสามารถในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางชีว
โมเลกุลของโอโอไซด์สุกร

โดย อ.น.สพ.ดร.นันทิ อ่ำอินทร์และคณะ

เดือน ปี ที่เสร็จโครงการ
พฤษภาคม 2557

สัญญาเลขที่ MRG5680131

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการประเมินความเป็นพิษของสารอะทราซีนต่อการ
พัฒนาและความสามารถในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางชีว
โมเลกุลของโอโอไซด์สุกร

ผู้วิจัย

1. อ.น.สพ.ดร.นัทธิ อำอินทร์
2. ผศ.น.สพ.ดร.ธีรวัฒน์ ธาราตานิต
3. รศ.น.สพ.ดร.รอย เคิร์กกู๊ด
4. ผศ.น.สพ.ดร.มงคล เตชะกำพุ

สังกัด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
University of Adelaide
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา สำนักงาน
กองทุนสนับสนุนการวิจัยและจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ.และสกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

Atrazine is an organic herbicidal compound used to eradicate broadleaf and grassy weeds in agricultural crops. Atrazine exposure leads to altered membrane lipid composition and cell morphology, induces DNA damage, and changes the level of antioxidant enzymes and vitamin E. There are studies demonstrating that atrazine has an effect on the reproductive system, possibly due to oxidative stress. The aim of this present study was to investigate the effect of atrazine on ovarian follicular cells the maturation of porcine oocyte and the development of embryos in in vitro. Porcine cumulus-oocyte complexes were cultured with atrazine at 0, 5 or 10 ppb and oocyte maturation evaluated. The follicular cells and culture media were examined for level of lipid peroxidation and antioxidant status. Mature oocytes from normal culture were fertilized in in vitro and cultured in culture media cultured with atrazine at 0, 5 or 10 ppb and blastocyst evaluated. We determined that atrazine in maturation media increased levels of lipid peroxidation ($P<0.05$) and decreased the antioxidant status and oocyte maturation rate ($P<0.05$). Atrazine did not effect on blastocyst rate but effected on cell number of blastocyst ($P<0.05$). In conclusion, low levels of atrazine can induce lipid peroxidation in follicular cells surrounding the oocyte and decrease antioxidant in the media. These conditions may induce follicle cell death, consequently inhibit oocyte maturation and decrease cell number of blastocyst.

Keywords: atrazine, blastocyst, lipid peroxidation, oocyte maturation rate, pig

บทคัดย่อ

อะทราซีนเป็นยาปราบวัชพืชที่ถูกใช้เพื่อกำจัดหญ้าศัตรูพืชในการเพาะปลูกพืชกลีกรวมการได้รับอะทราซีนโน้มนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์รูปร่างของเซลล์ ทำให้ ดี เอ็น เอ เสียหายและเปลี่ยนระดับของสารต้านอนุมูลอิสระชนิดเอนไซม์และวิตามิน อี มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าสารอะทราซีนส่งผลต่อระบบสืบพันธุ์เนื่องจากสภาวะความเครียดออกซิเดชัน วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้คือศึกษาผลของสารอะทราซีนต่อพอลลิคูลาร์เซลล์ของรังไข่ ผลของมันต่อการเจริญของเซลล์ไข่สุกและการเจริญของตัวอ่อนในหลอดทดลอง เซลล์ไข่ที่มีพอลลิคูลาร์เซลล์ล้อมรอบจะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ไข่ที่มีสารอะทราซีนผสมอยู่ 0.5 และ 10 พี พี บี ตามลำดับ และความสมบูรณ์ของการเจริญของเซลล์ไข่จะถูกประเมิน พอลลิคูลาร์เซลล์และอาหารเลี้ยงเซลล์ไข่จะถูกตรวจวัดระดับลิปิดเปอร์ร็อกซิเดชันและระดับสารต้านอนุมูลอิสระ เซลล์ไข่ที่เจริญเต็มที่จากการเลี้ยงแบบปกติจะถูกปฏิสนธิและถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนที่มีสารอะทราซีนผสมอยู่ 0.5 และ 10 พี พี บี ตามลำดับและทำการประเมินคุณภาพของตัวอ่อน พวกเราพบว่าสารอะทราซีนในอาหารเลี้ยงเซลล์ไข่ เพิ่มระดับลิปิดเปอร์ร็อกซิเดชัน ($P < 0.05$) และลดระดับสารต้านอนุมูลอิสระและอัตราการเจริญของเซลล์ไข่ ($P < 0.05$) สารอะทราซีนไม่ได้ส่งผลต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนไปเป็นระยะบลาสโตซิสแต่ส่งผลต่อจำนวนเซลล์ในระยะบลาสโตซิส สรุปผลการทดลอง สารอะทราซีนในระดับต่ำสามารถกระตุ้นการเกิดลิปิดเปอร์ร็อกซิเดชันในพอลลิคูลาร์เซลล์ที่อยู่ล้อมรอบเซลล์ไข่และลดระดับสารต้านอนุมูลอิสระในอาหารเลี้ยงเซลล์ไข่ สภาวะเช่นนี้อาจกระตุ้นให้พอลลิคูลาร์เซลล์ตายผลที่ตามมาคือเกิดการยับยั้งการเจริญของเซลล์ไข่และยังสามารถลดจำนวนเซลล์ในระยะบลาสโตซิส

คำสำคัญ: สารอะทราซีน บลาสโตซิส ลิปิดเปอร์ร็อกซิเดชัน อัตราการเจริญของเซลล์ไข่ สุกร

Project Code : MRG-5680131

(รหัสโครงการ)

Project Title :

การประเมินความเป็นพิษของสารอะทราซีนต่อการพัฒนาและความสามารถในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางชีวโมเลกุลของโอโอไซด์สุกร

Investigator : อ.น.สพ.ดร.นัทธี อ่ำอินทร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address : nutthee.a@chula.ac.th

Project Period : 12 เดือน

(ระยะเวลาโครงการ)

วัตถุประสงค์โครงการ

1. ศึกษาผลของสารอะทราซีนต่อการเจริญและพัฒนาของเซลล์ไข่สุกรในหลอดทดลอง
2. ศึกษาผลของสารอะทราซีนต่อการเจริญและพัฒนาของตัวอ่อนสุกรในหลอดทดลอง

วิธีทดลอง

สารเคมีทั้งหมดยกเว้นที่กล่าวไว้ท้ายวิธีการทดลองในแต่ละหัวข้อเป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Sigma (St. Louis, MO, USA)

การทดลองที่ 1 ผลของสารอะทราซีนต่อการเจริญของเซลล์ไข่สุกรในหลอดทดลอง

1.1 การเก็บเซลล์ไข่และการเจริญของเซลล์ไข่ในหลอดทดลอง (Oocyte collection and in vitro maturation; IVM)

ทำการเก็บรังไข่สุกรสาวก่อนวัยเจริญพันธุ์จากโรงฆ่าสุกรและเก็บรักษาในสารละลาย 0.9% (w/v) NaCl solution containing 75 mg/ml potassium penicillin G and 50 mg/ml streptomycin sulfate ที่อุณหภูมิ 30–37°C เพื่อขนส่งมาที่ห้องปฏิบัติการภายใน 2 ชั่วโมง เซลล์ไข่ที่มีแกรนูโลซาเซลล์ล้อมรอบ (Cumulus-oocyte complexes ;COCs) จะถูกเก็บจากฟอลลิเคิลที่มีขนาด 3-6 มิลลิเมตร โดยใช้เข็มเบอร์ 18 เกาที่ละ 1 ใบและใส่ลงใน TL-HEPES-PVA ซึ่งประกอบด้วย 114 mM NaCl, 3.2 mM KCl, 2 mM NaHCO₃, 0.34 mM NaH₂PO₄, 0.5 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 12 mM sorbitol, 10 mM Hepes, 10 mM sodium lactate, 0.2 mM sodium pyruvate, 25 mg/ml gentamycin, 65 mg/ml potassium penicillin G, and 1 mg/ml PVA และทำการเลือก COCs ที่มีแกรนูโลซาเซลล์ล้อมรอบตั้งแต่ 2 ชั้นขึ้นไปมาทำการล้างในน้ำยา IVM ซึ่งประกอบด้วย BSA-free NCSU 23 (Petters and Wells, 1993) supplemented with 10% (v/v) porcine follicular fluid (pFF), 10 IU/ml hCG (Chorulon®, Intervet (Thailand) Ltd.), 10 IU/ml eCG (Folligon®, Intervet (Thailand) Ltd.), 2.505 mM NaHCO₃, 10 µl/ml Antibiotic-Antimycotic (Gibco®, France), and 10 µl/ml GlutaMAX™ (Gibco®, France) เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและย้ายไปสู่น้ำยา IVM ที่ปราศจาก eCG และ hCG อีก 24 ชั่วโมงในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 38 °C 5% CO₂ และทำการตรวจประเมินอัตราการเจริญของเซลล์ไข่ (Maturation rates)

1.2 การเติมสารอะทราซีนลงในน้ำยา IVM และการแบ่งกลุ่มการทดลอง

COCs ที่ผ่านการคัดเลือกในขั้นตอนก่อนหน้านี้จำนวน 150 เซลล์จะถูกแบ่งเป็น 3 กลุ่มกลุ่มละ 50 เซลล์และเลี้ยงในน้ำยา IVM ที่มีส่วนประกอบต่างกันโดย

- เลี้ยงในน้ำยา IVM ปกติ
- เลี้ยงในน้ำยา IVM ที่มีส่วนประกอบของสารอะทราซีน 5 ppb
- เลี้ยงในน้ำยา IVM ที่มีส่วนประกอบของสารอะทราซีน 10 ppb

ซึ่งเราทำการเลี้ยงและแบ่งกลุ่มในลักษณะนี้จำนวน 10 ครั้ง

1.3 การเก็บตัวอย่าง

หลังจากทำการเลี้ยงในน้ำยา IVM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างเซลล์ไข่ที่ทำการกำจัดแกรนูโลซ่าเซลล์ที่ล้อมรอบออก (denuded oocytes) และทำการประเมิน Maturation rates ในแต่ละกลุ่มการทดลอง น้ำยา IVM ที่มีแกรนูโลซ่าเซลล์อยู่หลังจากขั้นตอนการกำจัดแกรนูโลซ่าเซลล์ที่ล้อมรอบจะถูกนำไปปั่นที่ 700×g เป็นเวลา 20 นาทีที่ 4 °C และเก็บตะกอนและของเหลวแยกกันแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอส่งวิเคราะห์ต่อไป

1.4 การตรวจประเมินอัตราการเจริญของเซลล์ไข่ (Evaluation of Maturation rate)

เซลล์ไข่ที่ทำการกำจัดแกรนูโลซ่าเซลล์ที่ล้อมรอบออกจะถูกย้อมด้วย DAPI (the denuded oocytes were incubated for 15 min with 20 μ M DAPI to label the chromatin for evaluation of maturation. Labeled samples were mounted on a glass microscope slide in a 2 μ l droplet of antifade medium (Vectashield, Vector Lab, CA, USA) to retard photobleaching)

1.5 การตรวจประเมินระดับลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (Lipid hydroperoxide evaluation)

ตะกอน (แกรนูโลซ่าเซลล์) และของเหลว (น้ำยา IVM) ที่ถูกเก็บในขั้นตอนการเก็บตัวอย่างจะถูกตรวจประเมินระดับลิพิดเปอร์ออกซิเดชันโดยใช้ 96-well enzyme immunoassay kit (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA).

1.6 การตรวจประเมินระดับสารต้านอนุมูลอิสระ

ของเหลว (น้ำยา IVM) ที่ถูกเก็บในขั้นตอนการเก็บตัวอย่างจะถูกตรวจประเมินระดับสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ TAS Randox® kit (Cat No. NX2332, Randox laboratories, Ltd, Crumlin, UK)

1.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

อัตราการเจริญของเซลล์ไข่ ระดับลิพิดเปอร์ออกซิเดชันและระดับสารต้านอนุมูลอิสระนำเสนอในรูปแบบของค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มการทดลองด้วย ANOVA และหาค่าความสัมพันธ์ของระดับสารอะทราซีนในน้ำยา IVM กับอัตราการเจริญของเซลล์ไข่ ระดับลิพิดเปอร์ออกซิเดชันและระดับสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้ Pearson's correlation ซึ่งค่านัยสำคัญกำหนดไว้ที่ $P < 0.05$

การทดลองที่ 2 ผลของสารอะทราซีนต่อการเจริญตัวของอสุกรในหลอดทดลอง

2.1 การเก็บเซลล์ไข่และการเจริญของเซลล์ไข่ในหลอดทดลอง (Oocyte collection and in vitro maturation; IVM)

ขั้นตอนนี้จะกระทำเหมือนขั้นตอน 1.1 และเลี้ยงในน้ำยา IVM ที่ปราศจากสารอะทราซีนโดยเลี้ยงเซลล์ไข่ทั้งสิ้น 200 เซลล์

2.2 การปฏิสนธิของเซลล์ไข่และตัวอสุจิในหลอดทดลอง (In vitro fertilization, IVF) และการเจริญของตัวอ่อนในหลอดทดลอง (In vitro Culture, IVC)

น้ำเชื้อสุกรแช่แข็งจะถูกละลายที่ 37 °C และทำการปั่นคัดแยกตัวอสุจิที่มีชีวิตด้วยสารละลายเปอร์คอลล์แบบ 2 ชั้น (45/90%) โดยใช้สารละลาย Pig FM (NaCl 90mM, KCl 12 mM, NaHCO₃ 25 mM, NaH₂PO₄ 0.5 mM, MgSO₄ 7H₂O 0.5 mM, Sodium Lactate 10 mM, Hepes 10 mM, CaCl₂ 2H₂O 8 mM, Sodium pyruvate 2 mM, Caffeine Anhydrous 2 mM, BSA 5 mg/mL) เป็นตัวทำละลาย นำตัวอสุจิที่ได้เลี้ยงไว้ใน ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 38 °C 5% CO₂ เตรียมเซลล์ไข่ที่ได้จากขั้นตอนที่ 2.1 โดยเลือกเซลล์ไข่ทั้งหมด 150 เซลล์และล้างในน้ำยา Pig-FM จำนวน 2 ครั้ง แบ่งเลี้ยงใน 4-well multidish ที่มีน้ำยา Pig-FM หลุมละ 50 เซลล์ หลังจากนั้นนำตัวอสุจิที่เตรียมก่อนหน้านี้ไปปล่อยลงไปเพื่อให้เกิดการปฏิสนธิโดยใช้จำนวนตัวอสุจิ 1,000 ตัวเป็นต่อ 1 เซลล์ไข่ เลี้ยงไว้ใน ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 38 °C 5% CO₂ เป็นเวลา 6 ชั่วโมงและทำการล้างในน้ำยา IVC (BSA-free NCSU 23 10× 100 µl/ml, NaHCO₃, 100 µl/ml Antibiotic-Antimycotic (Gibco®, France), and 10 µl/ml GlutaMAX™ (Gibco®, France), BSA 0.004 g/ml) และทำการเลี้ยงต่อในน้ำยา IVC จนครบ 6 วันโดยเปลี่ยนน้ำยาทุกๆ 2 วัน

2.3 การเติมสารอะทราซีนลงในน้ำยา IVM และการแบ่งกลุ่มการทดลอง

คัดเลือก COCs ที่ผ่านการเลี้ยงในขั้นตอน 2.1 จำนวน 150 เซลล์ แบ่งเป็น 3 กลุ่มกลุ่มละ 50 เซลล์และเลี้ยงในน้ำยา IVC ที่มีส่วนประกอบต่างกันโดย

- เลี้ยงในน้ำยา IVC ปกติ
 - เลี้ยงในน้ำยา IVC ที่มีส่วนประกอบของสารอะทราซีน 5 ppb
 - เลี้ยงในน้ำยา IVC ที่มีส่วนประกอบของสารอะทราซีน 10 ppb
- ซึ่งเราทำการเลี้ยงและแบ่งกลุ่มในลักษณะนี้จำนวน 5 ครั้ง

2.3 การตรวจประเมินอัตราการเจริญของเซลล์ไข่ (Evaluation of Maturation rate)

จะนำเซลล์ไข่ที่เหลือจากขั้นตอนที่ 2.2 ประมาณ 40-45 เซลล์มาทำการตรวจประเมินตามขั้นตอน 1.4

2.4 การตรวจประเมินคุณภาพของตัวอ่อน

หลังจาก 6 วันหลังการปฏิสนธิจากขั้นตอนที่ 2.2 ตัวอ่อนจะถูกคัดแยกและประเมิน Blastocyst rate และประเมินคุณภาพโดยย้อม DAPI staining ตามขั้นตอน 1.4 และทำการนับจำนวนเซลล์

2.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

Blastocyst rate และจำนวนเซลล์ใน Blastocyst นำเสนอในรูปแบบของค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มการทดลองด้วย ANOVA ซึ่งค่านัยสำคัญกำหนดไว้ที่ $P < 0.05$

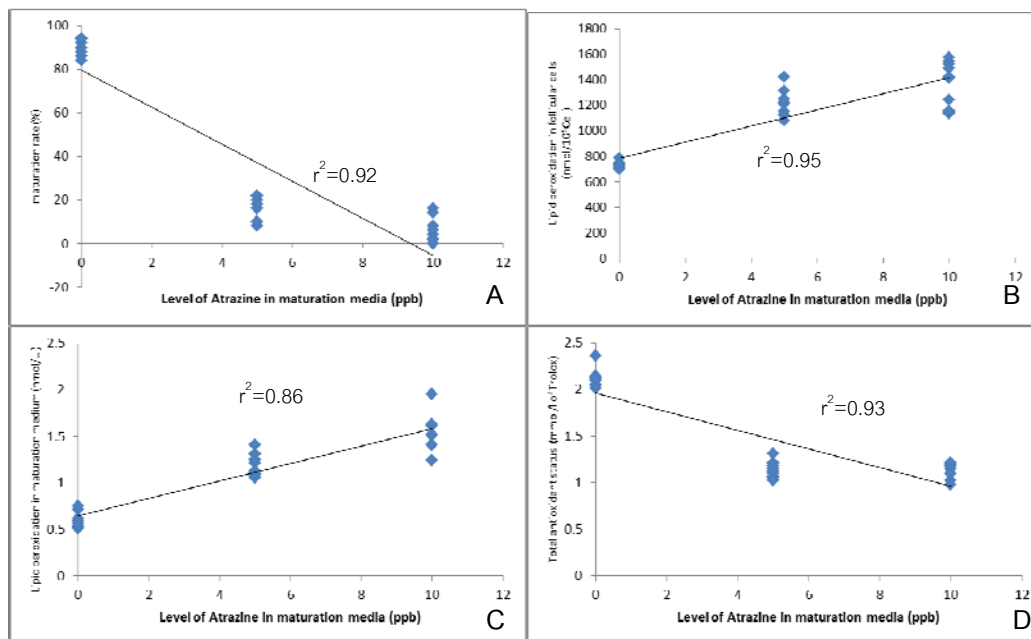
ผลการทดลอง

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าระดับลิปิดเปอร์ออกซิเดชันในแกรนูโลซ่าเซลล์และน้ำยา IVM และระดับสารต้านอนุมูลอิสระน้ำยา IVM มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่ม 0ppb เมื่อเทียบกับกลุ่ม 5 และ 10 ppb (ตารางที่ 1) อัตราการเจริญของเซลล์ไข่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้ง 3 กลุ่ม (ตารางที่ 1) Blastocyst rate มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้ง 3 กลุ่มแต่จำนวนเซลล์ใน Blastocyst ในกลุ่ม 0 ppb มีค่าสูงกว่าอีกทั้ง 2 กลุ่มที่เหลืออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1) พบว่าระดับอะทราซินที่เติมลงไปในน้ำยา IVM มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับลิปิดเปอร์ออกซิเดชันในแกรนูโลซ่าเซลล์และน้ำยา IVM และมีความสัมพันธ์เชิงลบกับอัตราการเจริญของเซลล์ไข่และระดับสารต้านอนุมูลอิสระน้ำยา IVM (รูปที่ 1) นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการเจริญของเซลล์ไข่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับระดับลิปิดเปอร์ออกซิเดชันในแกรนูโลซ่าเซลล์และน้ำยา IVM และมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับสารต้านอนุมูลอิสระน้ำยา IVM (รูปที่ 2)

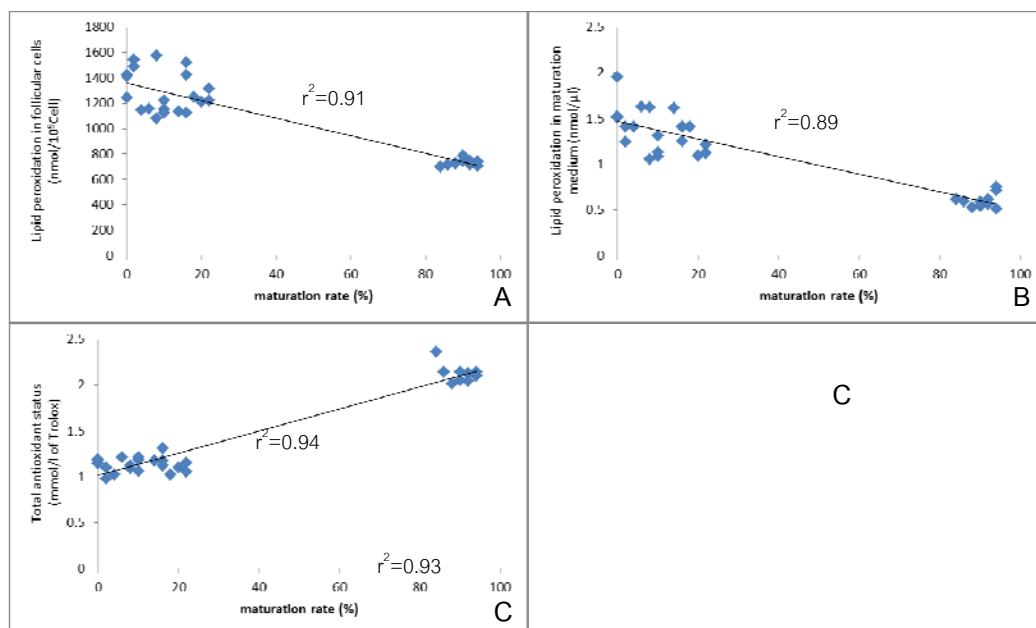
ตารางที่ 1 แสดงอัตราการเจริญของเซลล์ไข่ ระดับลิปิดเปอร์ออกซิเดชันในแกรนูโลซ่าเซลล์ ระดับลิปิดเปอร์ออกซิเดชันและระดับสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำยา IVM Blastocyst rate และจำนวนเซลล์ใน Blastocyst เปรียบเทียบกันในกลุ่มที่มีการเติมสารอะทราซินเข้าไปในน้ำยา IVM และ IVC

ตัวแปร	ระดับสารอะทราซิน		
	0 ppb	5 ppb	10 ppb
อัตราการเจริญของเซลล์ไข่ (%)	90.4±3.5 ^a	15.2±5.3 ^b	5.2±5.8 ^c
ระดับลิปิดเปอร์ออกซิเดชันในแกรนูโลซ่าเซลล์ (nmol/10 ⁵ Cell)	729.9±25.5 ^a	1210.5±101.4 ^b	1363.0±176.6 ^b
ระดับลิปิดเปอร์ออกซิเดชันในน้ำยา IVM (nmol/μl)	0.60±0.08 ^a	1.21±0.13 ^b	1.53±0.19 ^b
ระดับสารต้านอนุมูลอิสระ (mmol/l of Trolox)	2.12±0.09 ^a	1.13±0.09 ^b	1.13±0.08 ^b
Blastocyst rate (%)	16.4±4.6 ^a	15.6±3.8 ^a	15.2±4.1 ^a
จำนวนเซลล์ใน Blastocyst (เซลล์)	111.4±10.7 ^a	85.7±9.2 ^b	69.8±13.9 ^b

(a,b,c) ที่ต่างกันในแต่ละแถวแสดงถึงระดับนัยสำคัญที่ต่างกัน (p<0.05)



รูปที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับสารอะทราซีนในน้ำยา IVM และ (A) Maturation rate, (B) Lipid peroxidation in แกรนูโลซ่าเซลล์, (C) Lipid peroxidation in maturation medium and (D) Total antioxidant status in maturation medium



รูปที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Maturation rate และ (A) Lipid peroxidation in แกรนูโลซ่าเซลล์, (B) Lipid peroxidation in maturation medium and (C) Total antioxidant status in maturation medium

B

D

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

อะทราซีนเป็นสารปราบวัชพืชที่ให้ผลดีและมีราคาถูก ใช้กันอย่างแพร่หลายในการเพาะปลูกพืชเกษตรกรรมทั่วโลก ซึ่งบางครั้งก็ปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำ ดินและพืชอาหารสัตว์ มีรายงานว่า การได้รับสารอะทราซีนสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของไขมันที่เป็นองค์ประกอบคี่ในระดับเซลล์ และเปลี่ยนแปลงระดับสารต้านอนุมูลอิสระในหนู (Singh et al., 2008a, b) จากผลของการทดลองนี้ พบว่าสารอะทราซีนที่เติมเข้าไปในน้ำยา IVM นั้นทำให้เกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันในแกรนูโลซ่าเซลล์ และทำให้ระดับสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำยา IVM ลดลง รายงานก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าอะทราซีนในระดับที่ใช้ในการทดลองไม่ได้มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ไข่ซึ่งก็สอดคล้องกับการทดลองนี้ (Casas et al., 2010) แต่ในการทดลองในครั้งนี้พบว่าระดับสารอะทราซีนมีผลต่อการเจริญของเซลล์ไข่ แม้ว่าอะทราซีนจะไม่ได้ทำให้เกิดการตายของเซลล์ไข่แต่ส่งผลทำให้แกรนูโลซ่าเซลล์ชนิดคูลัมที่ล้อมรอบเซลล์ไข่เกิดการหยุดการพัฒนาในน้ำยา IVM ที่เติมสารอะทราซีนลงไป ซึ่งแกรนูโลซ่าเซลล์เหล่านี้ทำหน้าที่สนับสนุนการเจริญเติบโตของเซลล์ไข่ ซึ่งมีรายงานว่าถ้าจำนวนเซลล์เหล่านี้ลดลงจะมีผลทำให้สารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไข่ลดลงตามไปด้วยส่งผลให้การเจริญของเซลล์ไข่หยุดชะงัก (Vatzias and Hagen, 1999) แกรนูโลซ่าเซลล์เหล่านี้จะผลิตสารโปรตีนบางชนิดที่จำเป็นกับการเจริญเติบโตของเซลล์ไข่ถ้าจำนวนเซลล์ลดลงปริมาณสารโปรตีนก็จะลดลงตามไปด้วยซึ่งในการทดลองนี้ แกรนูโลซ่าเซลล์น่าจะได้รับผลกระทบจากสารอนุมูลอิสระทำให้เกิดความเสียหายและตาย ทำให้ปริมาณสารโปรตีนลดลงส่งผลต่อการเจริญของเซลล์ไข่ (Ducolomb et al., 2013; Silva et al., 2014) มีรายงานว่าอะทราซีนกระตุ้นการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันและลดสารต้านอนุมูลอิสระในเซลล์เม็ดเลือดแดงของหนู (Bhatti et al., 2011) ซึ่งในการศึกษาในครั้งนี้เราพบว่าระดับลิปิดเปอร์ออกซิเดชันในแกรนูโลซ่าเซลล์และน้ำยา IVM มีปริมาณเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่มีการเติมสารอะทราซีนลงในน้ำยา IVM และระดับที่เพิ่มขึ้นนี้ส่งผลเชิงลบต่อการทำงานของแกรนูโลซ่าเซลล์

อะทราซีนถูกรายงานว่าเป็นพิษกับการเจริญของตัวอ่อนเมื่อฉีดเข้าไปในหนูทดลองที่ขนาด 1000-2000 mg/kg (Peter and Cook, 1973) การฉีดอะทราซีนในขนาด 30 mg/kg ทำให้เกิดการตายของตัวอ่อนและติดก้นกับสุรางค์ภายในแกะ (Binn and Johnson, 1970) ในการเลี้ยงตัวอ่อนหนูทดลองในหลอดทดลองนั้นพบว่าในระยะ 2 เซลล์ไม่ได้ส่งผลต่อการเจริญของตัวอ่อนไปเป็นระยะ blastocyst และจำนวนเซลล์ ซึ่งในการทดลองในสุกรในครั้งนี้พบว่าอะทราซีนไม่ได้ส่งผลต่อการเจริญของตัวอ่อนไปเป็นระยะ blastocyst ซึ่งสอดคล้องกันแต่ส่งผลต่อจำนวนเซลล์ในระยะ Blastocyst ซึ่งในกลุ่มที่ไม่ได้เติมสารอะทราซีนมีค่าสูงกว่ากลุ่มที่เติมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งขัดแย้งกัน (McIntosh et al., 2000)

การทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารอะทราซีนในระดับต่ำนั้นสามารถส่งผลกระทบต่อ การเจริญของเซลล์ไข่ในหลอดทดลองได้โดยอาจไปยับยั้งการเจริญของแกรนูโลซ่าเซลล์ที่ล้อมรอบเซลล์ไข่ ทำให้ขาดสารจำเป็นบางชนิดที่ส่งผลต่อการพัฒนาของเซลล์ไข่ อีกทั้งยังสามารถลดระดับสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นตัวปกป้องสารอนุมูลอิสระที่จะมาทำความเสียหายต่อแกรนูโลซ่าเซลล์ทำให้ระดับลิปิดเปอร์ออกซิเดชันในแกรนูโลซ่าเซลล์เพิ่มขึ้นส่งผลให้เกิดการการเจริญของแกรนูโลซ่าเซลล์ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ในส่วนของการเจริญของตัวอ่อนสารอะทราซีนไม่สามารถยับยั้งการเจริญของตัวอ่อนไปเป็นระยะ blastocyst ได้แต่สามารถลดจำนวนเซลล์ในระยะ blastocyst ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อคุณภาพของตัวอ่อนได้

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

1. งานทดลองครั้งนี้ยังขาดส่วนที่ต้องทดลองในสัตว์จริงซึ่งจะสามารถตอบโจทย์ได้จริงว่าสุกรที่ได้รับสารอะทราซีนจะส่งผลกระทบต่อผลผลิตหรือไม่
2. การหาเซลล์ไข่ที่มีคุณภาพดีนั้นเป็นสิ่งจำเป็นในบางช่วงของการทดลองเช่นในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงพฤษภาคมเซลล์ไข่ที่ได้ขาดคุณภาพจึงไม่สามารถนำมาใช้ในการทดลองได้ดังนั้นการวางแผนเรื่องช่วงเวลาจึงเป็นสิ่งสำคัญ

เอกสารอ้างอิง

- Binns, W and Johnson, AE. Dec. 1970. Chronic and teratogenic effects of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) and atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine) to sheep. Proc. North Cent. Weed Control Conf. 25: 100
- Casas E, Bonilla E, Ducolomb Y and Betancourt M. 2010. Differential effects of herbicides atrazine and fenoxaprop-ethyl, and insecticides diazinon and malathion, on viability and maturation of porcine oocytes in vitro. Toxicology in Vitro. 24(1): 224-230.
- Ducolomb Y, González-Márquez H, Fierro R, Jiménez I, Casas E, Flores D, Bonilla E, Salazar Z and Betancourt M. 2013. Effect of porcine follicular fluid proteins and peptides on oocyte maturation and their subsequent effect on in vitro fertilization. Theriogenology. 79(6): 896-904.
- McIntosh, AC, Richardson, ME and Bernard, RS. 2000. The effects of atrazine on early embryonic development in mice. S. C. Acad. Sci. 62: 72
- Peters, JW and Cook, RM. 1973. Effects of atrazine on reproduction in rats. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 9(5): 301-304.
- Petters RM and Wells KD. 1993. Culture of pig embryos. Journal of reproduction and fertility. Supplement. 48: 61-73.
- Silva PV, Guimarães SEF, Guimarães JD, Nascimento CS, Lopes PS, Siqueira JB, Amorim LS, Fonseca e Silva F and Foxcroft GR. 2014. Follicular dynamics and gene expression in granulosa cells, corpora lutea and oocytes from gilts of breeds with low and high ovulation rates. Reproduction, Fertility and Development. 26(2): 316-327.
- Singh M, Kaur P, Sandhir R and Kiran R. 2008a. Protective effects of vitamin E against atrazine-induced genotoxicity in rats. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 654(2): 145-149.
- Singh M, Sandhir R and Kiran R. 2008b. Atrazine-induced alterations in rat erythrocyte membranes: Ameliorating effect of vitamin E. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology. 22(5): 363-369.

Vatzias G and Hagen DR. Effects of porcine follicular fluid and oviductconditioned media on maturation and fertilization of porcine oocytes in vitro. 1999. Biol Reprod. 60: 42–48.

เอกสารแนบหมายเลข 3

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานเรื่อง “Atrazine induces lipid peroxidation in ovarian แกรนูโลซ่าเซลล์ and disrupts maturation of porcine oocytes in vitro” อยู่ในขั้นตอนการรอตอบรับตีพิมพ์

Atrazine induces lipid peroxidation in ovarian follicular cells and disrupts maturation of porcine oocytes in vitro

Nutthee Am-in^{1,*}, Roy N. Kirkwood², Theerawat Tharasanit¹ and Mongkol Techakumphu¹.

¹ Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand 10330

² School of Animal and Veterinary Sciences, University of Adelaide, Roseworthy, SA 5371, Australia

*Corresponding author. *E-mail address*: nutthee.a@chula.ac.th (Nutthee Am-in)

Tel.: +662 218 9644; fax: +662 252 0738

Abstract

Atrazine is an organic herbicidal compound used to eradicate broadleaf and grassy weeds in agricultural crops. Atrazine exposure leads to altered membrane lipid composition and cell morphology, induces DNA damage, and changes the level of antioxidant enzymes and vitamin E. There are studies demonstrating that atrazine has an effect on the reproductive system, possibly due to oxidative stress. The aim of this present study was to investigate the effect of atrazine on ovarian follicular cells and the effects on the maturation of porcine oocyte. Porcine cumulus-oocyte complexes were cultured with atrazine at 0, 5 or 10 ppb and oocyte maturation evaluated. The follicular cells and culture media were examined for level of lipid peroxidation and antioxidant status. We determined that atrazine in maturation media increased levels of lipid peroxidation ($P<0.05$) and decreased the antioxidant status and oocyte maturation rate ($P<0.05$). In conclusion, low levels of atrazine can induce lipid peroxidation in follicular cells surrounding the oocyte and decrease antioxidant in the media. These conditions may induce follicle cell death and consequently inhibit oocyte maturation.

Keywords: atrazine, lipid peroxidation, oocyte maturation rate, pig

สารอะทราซีนกระตุ้นให้เกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในฟอลลิคูลาร์เซลล์ของรังไข่และรบกวนการ

เจริญของเซลล์ไข่สุกรในหลอดทดลอง

นัทธี อำอินทร์¹* รอย เคิร์กวูด² ชีรวัฒน์ ชาราศานิต¹ มงคล เตชะกำพุ¹

¹คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ ประเทศไทย 10330

²School of Animal and Veterinary Sciences, University of Adelaide, Roseworthy, SA 5371,

Australia

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail: nutthee.a@chula.ac.th (นัทธี อำอินทร์)

โทร: +662 218 9644; แฟกซ์: +662 252 0738

บทคัดย่อ

อะทราซีนเป็นยาปราบวัชพืชที่ถูกใช้เพื่อกำจัดหญ้าศัตรูพืชในการเพาะปลูกพืชกลีกรวมการ

ได้รับอะทราซีนโน้มนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์รูปร่างของ

เซลล์ ทำให้ดี เอ็น เอ เสียหายและเปลี่ยนระดับของสารต้านอนุมูลอิสระชนิดเอนไซม์และวิตามิน อี

มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าสารอะทราซีนส่งผลต่อระบบสืบพันธุ์เนื่องจากสภาวะความเครียด

ออกซิเดชัน วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้คือศึกษาผลของสารอะทราซีนต่อฟอลลิคูลาร์เซลล์ของ

รังไข่และผลของมันต่อการเจริญของเซลล์ไข่สุกร เซลล์ไข่ที่มีฟอลลิคูลาร์เซลล์ล้อมรอบจะถูกเลี้ยง
 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ไข่ที่มีสารอะทราซีนผสมอยู่ 0.5 และ 10 พี พี บี ตามลำดับ และความสมบูรณ์
 ของการเจริญของเซลล์ไข่จะถูกประเมิน ฟอลลิคูลาร์เซลล์และอาหารเลี้ยงเซลล์ไข่จะถูกตรวจวัด
 ระดับลิปิดเปอร์ออกซิเดชันและระดับสารต้านอนุมูลอิสระ พวกเราพบว่าสารอะทราซีนในอาหาร
 เลี้ยงเซลล์ไข่ เพิ่มระดับลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน ($P < 0.05$) และลดระดับสารต้านอนุมูลอิสระและอัตรา
 การเจริญของเซลล์ไข่ ($P < 0.05$) สรุปผลการทดลอง สารอะทราซีนในระดับต่ำสามารถกระตุ้นการ
 เกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันในฟอลลิคูลาร์เซลล์ที่อยู่ล้อมรอบเซลล์ไข่และลดระดับสารต้านอนุมูล
 อิสระในอาหารเลี้ยงเซลล์ไข่ สภาวะเช่นนี้อาจกระตุ้นให้ฟอลลิคูลาร์เซลล์ตายและผลที่ตามมาคือ
 เกิดการยับยั้งการเจริญของเซลล์ไข่

คำสำคัญ: สารอะทราซีน ลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน อัตราการเจริญของเซลล์ไข่ สุกร

Introduction

Atrazine is 2-chloro-4-(ethylamino)-6-(isopropylamino)-s-triazine, an organic compound used to stop or eradicate the emergence broadleaf and grassy weeds in agricultural crops. This compound is both inexpensive and effective and thus is suitable for productive systems with very low profit margins, as is often the case with maize. Atrazine is the most commonly used herbicide in conservative tillage systems, which are designed to prevent soil erosion. There are contamination of atrazine in the drinking water of the pig farm surrounded by agricultural area whose owner use atrazine as a herbicidal chemical in Croatia (Gojmerac et al., 1996) and contamination of atrazine was reported in sow feed and water in each week during gestation period in Thailand (Am-in and Tuntasuparuk, 2012). Oxidative stress occurs when the antioxidant to free radical ratio is imbalanced, leading to production of reactive oxygen species (ROS). In aquatic animals and organisms, the residues of herbicides, insecticides and heavy metals contaminating the environment are known to stimulate antioxidant defensive systems and to induce oxidative damage via ROS production (Risso-de Faverney et al., 2001; Achuba and Osakwe, 2003; Liu et al., 2006; Monteiro et al., 2006). In rats, atrazine exposure leads to alteration of acetylcholinesterase (AChE) activity, membrane lipid composition, and erythrocyte morphology (Singh et al., 2008b). It also induces DNA damage and change in the levels of hepatic antioxidant enzymes and vitamin E, which are major antioxidant defenses against damage induced by atrazine in rats (Singh et al., 2008a). ROS, such as the hydroxyl radical ($\text{OH}\cdot$), superoxide anion (O_2^-) and hydrogen peroxide (H_2O_2), when at higher than normal levels can react with biological macromolecules potentially leading to enzyme inactivation, lipid peroxidation (LPO), DNA damage and even cell death (Peña-Llopis et al., 2003; Banudevi et al., 2006). as aAlthough

there are a few studies suggesting atrazine has an effect on the reproductive system, currently it is considered only slightly toxic. Several studies report that sexual development in frogs was disrupted by atrazine via an increased conversion of androgens to estrogens (Hayes et al., 2002; Freeman and Rayburn, 2004; Murphy et al., 2006). To our knowledge, there are no data investigating atrazine induced lipid peroxidation in ovarian follicular cell membranes and consequent effects on maturation of porcine oocytes. The aim of the present study was to investigate the effect of atrazine on follicular cells and effects on the maturation of porcine oocytes.

Materials and Methods

Unless otherwise stated, all reagents used in this study were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Oocyte collection and *in vitro* maturation (IVM)

Ovaries were collected from prepubertal gilts at a slaughterhouse and transported within 2 h to the laboratory in 0.9% (w/v) NaCl solution containing 75 mg/ml potassium penicillin G and 50 mg/ml streptomycin sulfate at 30–37°C. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were collected by aspiration of 3-6 mm follicles into TL-HEPES-PVA composed of 114 mM NaCl, 3.2 mM KCl, 2 mM NaHCO₃, 0.34 mM NaH₂PO₄, 0.5 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 12 mM sorbitol, 10 mM Hepes, 10 mM sodium lactate, 0.2 mM sodium pyruvate, 25 mg/ml gentamycin, 65 mg/ml potassium penicillin G, and 1 mg/ml PVA, and washed three times with maturation medium. The medium used for maturation of oocytes was BSA-free NCSU 23 (Petters and Wells, 1993) supplemented with 10% (v/v) porcine follicular fluid (pFF), 10 IU/ml hCG (Chorulon®, Intervet (Thailand) Ltd.), 10 IU/ml eCG (Folligon®, Intervet (Thailand) Ltd.), 2.505 mM NaHCO₃, 10 µl/ml Antibiotic-Antimycotic (Gibco®, France), and 10 µl/ml GlutaMAX™ (Gibco®, France). The pFF was

withdrawn from superficial follicles (3–6 mm in diameter) on maturing pig ovaries using an 18 g needle fixed to a 10 ml syringe. The pFF was centrifuged at $1500\times g$ for 15 min at room temperature to remove cells and debris, and the supernatant stored at -4°C until used (Naito et al., 1988). Oocytes surrounded by compact and dense cumulus cell layers were selected. Groups of 50 COCs were matured for 24 h in maturation medium and then matured for a further 24 h in maturation medium without eCG and hCG. Maturation rates were evaluated by DAPI staining.

Atrazine treatment

150 COCs were equally divided into 3 groups with different culture conditions:

- COCs cultured under IVM condition as described above (Control; $n=50$)
- As for Control, but culture media included 5 ppb of atrazine (AZ5; $n=50$)
- As for Control, but culture media included 10 ppb of atrazine (AZ10; $n=50$)

This methodology was replicated 10 times

Sample collection

At the end of the 2 d culture period, the denuded oocytes were collected and evaluated the percentage of mature oocytes in each group. The maturation media with granulosa cells were centrifuged at $700\times g$ for 20 min at 4°C , the pellet and $200\text{ }\mu\text{l}$ of supernatant were then frozen separately at -20°C and transported to the laboratory waiting for analysis.

Evaluation of maturation rate

To label their microtubules, the denuded oocytes were incubated for 15 min with $20\text{ }\mu\text{M}$ DAPI to label the chromatin for evaluation of maturation. Labeled samples were mounted on a glass microscope slide in a $2\text{ }\mu\text{l}$ droplet of antifade medium (Vectashield, Vector Lab, CA, USA) to retard photobleaching.

Lipid hydroperoxide evaluation

The pellets and 100 µl of supernatants were thawed in a 37°C water bath for 5 min. Lipids were extracted from the samples using methanol and chloroform (Christie, 1982). The lipid hydroperoxide (LPO) was quantified using a commercially available 96-well enzyme immunoassay kit (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA).

Total antioxidants in maturation medium

An aliquot of 100 µl of the supernatant (maturation medium) was analyzed for total antioxidant status (TAS) by a commercial TAS Randox® kit (Cat No. NX2332, Randox laboratories, Ltd, Crumlin, UK) using a Sunrise Absorbance Reader (TECAN®, Austria). The linearity of calibration extended from 0.025 to 2.5 mmol/l of Trolox. Inter- and intra-assay coefficients of variation were 6.4% and 5.3%, respectively.

Statistical analysis

Maturation rate, the level of lipid peroxide and TAS are presented as mean±SD. Data comparison between groups were analyzed using ANOVA. For determining normality of the data before applying ANOVA, data were subjected to Arc-Sine transformation. Where ANOVA revealed a significant effect ($P < 0.05$), the treatment means were compared using Tukey's test. The correlation between level of atrazine in maturation media, maturation rate, levels of LPO and TAS were tested using Pearson's correlation. All analyses used SAS 9.3 (SAS®, Cary, NC, USA).

Results

Oocyte maturation rate was markedly reduced by inclusion of atrazine in the maturation media (90.4 ± 3.5 , 15.2 ± 5.3 and $5.2 \pm 5.8\%$ for Control, AZ5 and AZ10, respectively; $P < 0.05$). The atrazine level in maturation rate was negatively correlated ($r = 0.92$, $P = 0.003$) with atrazine level in the maturation media (Fig. 1A).

Follicular cell LPO concentrations were increased by inclusion of atrazine in the maturation media (729.9 ± 25.5 , 1210 ± 101.4 , and 1363 ± 176.6 nmol/ 10^5 cells for Control, AZ5 and AZ10, respectively; $P < 0.05$). Similarly, maturation media LPO was increased by atrazine (0.60 ± 0.08 , 1.21 ± 0.13 , and 1.53 ± 0.16 nmol/ μ l for Control, AZ5 and AZ10, respectively; $P < 0.05$). In concert, total antioxidant status was reduced by atrazine (2.12 ± 0.09 , 1.13 ± 0.09 , and 1.13 ± 0.08 mmol/l Trolox for Control, AZ5 and AZ10, respectively; $P < 0.05$). Maturation media atrazine inclusion levels were positively correlated with follicular cell LPO ($r = 0.95$, $P < 0.05$; Fig. 1B), positively correlated with media LPO ($r = 0.86$, $P < 0.05$; Fig. 1C) and negatively correlated with total antioxidant status ($r = 0.93$, $P < 0.05$; Fig. 1D).

The lipid peroxidation of follicular cells and maturation media had strong negative correlations with maturation rate ($r = 0.95$, $P < 0.02$; Fig 2A and $r = 0.94$, $P < 0.05$; Fig 2B, respectively). In concert, total antioxidant status of maturation media had a positive correlation with oocyte maturation rate ($r = 0.97$, $P = 0.01$; Fig 2C).

Discussion

Atrazine is the most commonly used herbicide due to its efficacy and low cost. However, its widespread use has resulted in contamination of agricultural crops, water and soil. Previous studies have reported that atrazine induced changes in lipid composition and hepatic antioxidant enzyme levels in rats (Singh et al., 2008a, b). In the present study, atrazine induced lipid peroxidation in porcine ovarian follicular cells and also reduced antioxidant level in the in vitro maturation media. A recent study demonstrated that atrazine may have a more noticeable effect on oocyte maturation than on viability. Although the mechanisms were not determined it could imply that atrazine does something to interrupt oocyte development. In the present study, there was no evident effect on oocyte viability. This result confirms the finding

of Casas et al. (2010) who also noted no effect of atrazine on vitality. The levels of atrazine used in the present study are very low. However, effects on oocyte maturation rate were evident. Although the atrazine levels we employed will not induce oocyte death, we noted that the surrounding cumulus follicular cells appeared to be undeveloped when cultured in the presence of atrazine. Follicular cells within the follicle surround and support the oocyte and are necessary for oocyte development. Their numbers decrease directly in response to reduce the microenvironment of the oocyte during follicular maturation (Vatzias and Hagen, 1999). Granulosa cells also produce peptides involved in oocyte maturation. This effect was decreased when the granulosa cell or peptides were damaged (Ducolomb et al., 2013; Silva et al., 2014) agreed with this present study which the granulosa cells were damaged and died by ROS.

Atrazine induced lipid peroxidation and reduced the antioxidant status in rat erythrocytes (Bhatti et al., 2011). Similarly, in the present study, granulosa cell and maturation media LPO content were increased by atrazine inclusion and this likely negatively impacted follicle cell function. Indeed, a recent study reported that atrazine-induced oxidative stress and decreased cell viability can occur concurrently but that malondialdehyde and ROS production increased at lower concentrations and after a shorter period of culture than did cell death, suggesting that atrazine-induced oxidative stress is the mechanism for reduction in cell viability (Abarikwu et al., 2012). The increased antioxidant enzyme levels clearly demonstrates that antioxidant gene expression seems to be an adaptive response to oxidative stress, especially considering that atrazine has been reported to induce lipid peroxidation in several models (Abarikwu et al., 2010; Adesiyun et al., 2011).

In conclusion, the low level of atrazine employed in the present study can induce lipid peroxidation in follicular cell which surrounded the oocyte in *in vitro* and

decrease antioxidant in the media. These conditions may induce follicular cell death resulting in inhibition of oocyte maturation *in vitro*.

Acknowledgements

The present study was supported by Office of the Higher Education Commission, The Thailand Research Fund and Chulalongkorn University (MRG-5680131)

References

- Abarikwu S, Adesiyani A, Oyeloja T, Oyeyemi M and Farombi E. 2010. Changes in Sperm Characteristics and Induction of Oxidative Stress in the Testis and Epididymis of Experimental Rats by a Herbicide, Atrazine. *Arch Environ Contam Toxicol*. 58(3): 874-882.
- Abarikwu SO, Pant AB and Farombi EO. 2012. Dietary Antioxidant, Quercetin, Protects Sertoli-Germ Cell Coculture from Atrazine-Induced Oxidative Damage. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 26(11): 477-485.
- Achuba FI and Osakwe SA. 2003. Petroleum – induced free radical toxicity in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 29(2): 97-103.
- Adesiyani AC, Oyejola TO, Abarikwu SO, Oyeyemi MO and Farombi EO. 2011. Selenium provides protection to the liver but not the reproductive organs in an atrazine-model of experimental toxicity. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 63(3): 201-207.
- Am-in N and Tantasuparuk P. P2012. Low levels of the herbicide Atrazine contaminated sow feed and water affect litter size, sex ratio of litter and increase mummified fetuses in pigs (Abstracts). *Reprod Domes Anim*. 47: 561.
- Banudevi S, Krishnamoorthy G, Venkataraman P, Vignesh C, Aruldas MM and Arunakaran J. 2006. Role of α -tocopherol on antioxidant status in liver, lung

- and kidney of PCB exposed male albino rats. *Food and Chemical Toxicology*. 44(12): 2040-2046.
- Bhatti JS, Sidhu IPS and Bhatti GK. 2011. Ameliorative action of melatonin on oxidative damage induced by atrazine toxicity in rat erythrocytes. *Mol Cell Biochem*. 353(1-2): 139-149.
- Casas E, Bonilla E, Ducolomb Y and Betancourt M. 2010. Differential effects of herbicides atrazine and fenoxaprop-ethyl, and insecticides diazinon and malathion, on viability and maturation of porcine oocytes in vitro. *Toxicology in Vitro*. 24(1): 224-230.
- Christie WW. 1982. Lipid analysis; isolation, separation, identification, and structural analysis of lipids. In: Pergamon Press, Oxford, New York.
- Ducolomb Y, González-Márquez H, Fierro R, Jiménez I, Casas E, Flores D, Bonilla E, Salazar Z and Betancourt M. 2013. Effect of porcine follicular fluid proteins and peptides on oocyte maturation and their subsequent effect on in vitro fertilization. *Theriogenology*. 79(6): 896-904.
- Freeman JL and Rayburn AL. 2004. In vivo genotoxicity of atrazine to anuran larvae. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 560(1): 69-78.
- Gojmerac T, Kartal B, Bilandžić N, Roić B and Rajković-Janje R. 1996. Seasonal atrazine contamination of drinking water in pig-breeding farm surroundings in agricultural and industrial areas of Croatia. *Bull Environ Contam Toxicol*. 56(2): 225-230.
- Hayes TB, Collins A, Lee M, Mendoza M, Noriega N, Stuart AA and Vonk A. 2002. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99(8): 5476-5480.

- Liu Y, Zhang Y, Liu J and Huang D. 2006. The role of reactive oxygen species in the herbicide acetochlor-induced DNA damage on *Bufo raddei* tadpole liver. *Aquatic Toxicology*. 78(1): 21-26.
- Monteiro DA, de Almeida JA, Rantin FT and Kalinin AL. 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 143(2): 141-149.
- Murphy MB, Hecker M, Coady KK, Tompsett AR, Jones PD, Du Preez LH, Everson GJ, Solomon KR, Carr JA, Smith EE, Kendall RJ, Van Der Kraak G and Giesy JP. 2006. Atrazine concentrations, gonadal gross morphology and histology in ranid frogs collected in Michigan agricultural areas. *Aquatic Toxicology*. 76(3-4): 230-245.
- Naito K, Fukuda Y and Toyoda Y. 1988. Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured in vitro. *Gamete Research*. 21(3): 289-295.
- Peña-Llopis S, Ferrando MD and Peña JB. 2003. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. *Aquatic Toxicology*. 65(4): 337-360.
- Petters RM and Wells KD. 1993. Culture of pig embryos. *Journal of reproduction and fertility*. Supplement. 48: 61-73.
- Risso-de Faverney C, Devaux A, Lafaurie M, Girard JP, Bailly B and Rahmani R. 2001. Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygene species. *Aquatic Toxicology*. 53(1): 65-76.

- Silva PV, Guimarães SEF, Guimarães JD, Nascimento CS, Lopes PS, Siqueira JB, Amorim LS, Fonseca e Silva F and Foxcroft GR. 2014. Follicular dynamics and gene expression in granulosa cells, corpora lutea and oocytes from gilts of breeds with low and high ovulation rates. *Reproduction, Fertility and Development*. 26(2): 316-327.
- Singh M, Kaur P, Sandhir R and Kiran R. 2008a. Protective effects of vitamin E against atrazine-induced genotoxicity in rats. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 654(2): 145-149.
- Singh M, Sandhir R and Kiran R. 2008b. Atrazine-induced alterations in rat erythrocyte membranes: Ameliorating effect of vitamin E. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 22(5): 363-369.
- Vatzias G and Hagen DR. Effects of porcine follicular fluid and oviductconditioned media on maturation and fertilization of porcine oocytes in vitro. 1999. *Biol Reprod*. 60: 42–48.

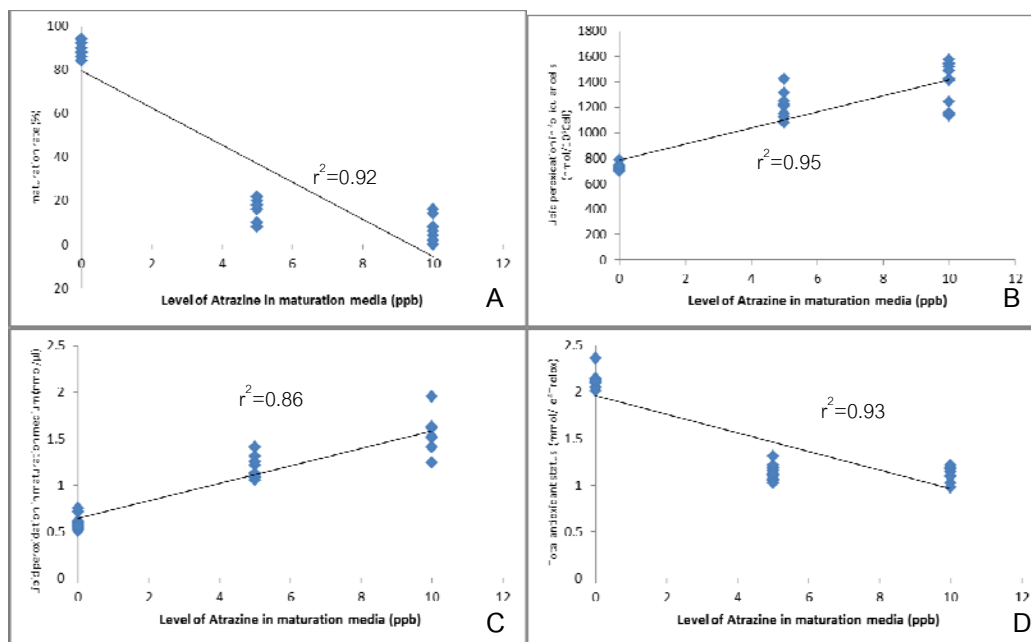


Figure 1 Correlation between Level of Atrazine in maturation media and (A) Maturation rate, (B) Lipid peroxidation in follicular cells, (C) Lipid peroxidation in maturation medium and (D) Total antioxidant status in maturation medium

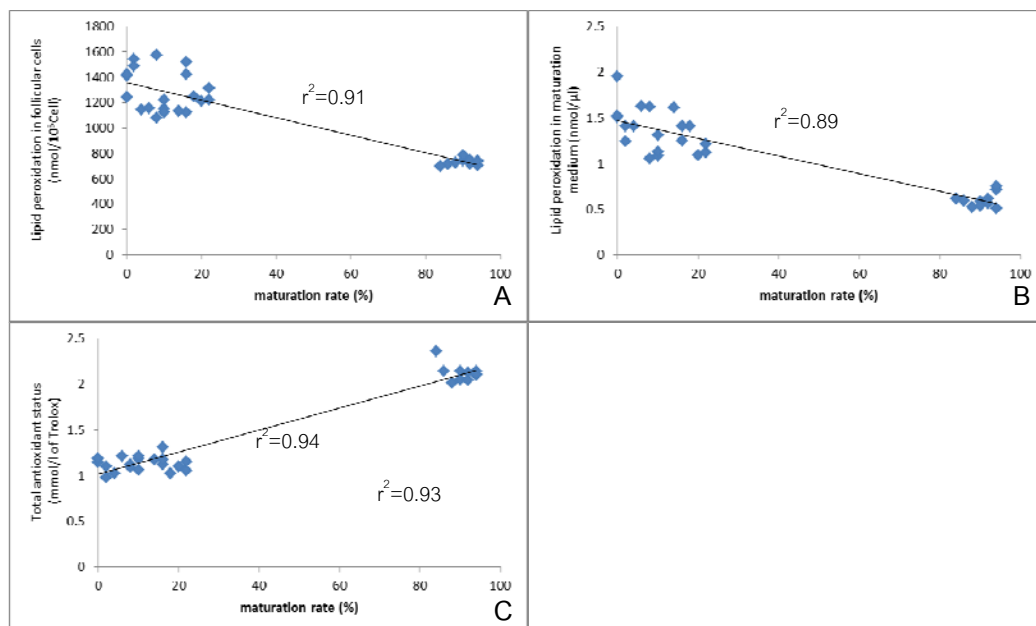


Figure 2 Correlation between Maturation rate and (A) Lipid peroxidation in follicular cells, (B) Lipid peroxidation in maturation medium and (C) Total antioxidant status in maturation medium