

รหัสโครงการ SUT3-304-49-36-01



รายงานการวิจัย

การแช่แข็งโอโอไซท์โคเพื่อทำปฏิสนธิในหลอดแก้วและทำโคลนนิ่ง

Vitrification of bovine oocytes for *in vitro* fertilization
and somatic cell nuclear transfer

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผศ. ดร. รัชสรรค์ พาลพ่าย
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย

ผศ. ดร. มาริษา เกตุทัต คาร์นส์

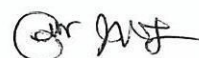
ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2546

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มีนาคม 2553

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสมาชิกศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิดทุกท่าน ดร.ชุตี เหล่าธรรมธร ดร.จันทร์เจ้า ลือทองพานิชย์ น.ส.สุจิตรา หมั่นไธสง นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา เจ้าหน้าที่สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คุณปรานค์ขาว ปรุเขตต์ ขอขอบคุณโรงพยาบาลสัตว์ อำเภอพระพุทธบาท จังหวัดสระบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์รังไข่โค และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 1 (F1) ที่ให้การสนับสนุนทางด้านสถานที่ในการทดลอง



.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย)

หัวหน้าโครงการ

มีนาคม 2553

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ในการวิจัยแช่แข็งโอโอไซท์คือ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการแช่แข็งโอโอไซท์ในระยะ MII โดยใช้วิธี solid surface vitrification (SSV) และ Cryotop โดยจะศึกษาถึงประสิทธิภาพของการแช่แข็งโอโอไซท์ต่ออัตราการรอดหลังการแช่แข็ง อัตราการปฏิสนธิในหลอดแก้ว (IVF) การเกิด pronucleus หลังปฏิสนธิ และอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนหลังการเลี้ยงในหลอดทดลอง โอโอไซท์ที่เลี้ยงในน้ำยา IVM จะถูกนำมาบ่มในน้ำยา equilibration และ vitrification solution นานตามวิธีการแช่แข็งแบบ SSV จากนั้น โอโอไซท์จะถูกแช่แข็งทั้งแบบหยดลงบนผิวแท่งเหล็กที่จุ่มในกล่องโฟมที่มีไนโตรเจนเหลว (กลุ่ม SSV) หรือวางโอโอไซท์บนปลาย Cryotop แล้วจึงจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว (กลุ่ม Cryotop) การละลายทำตามวิธีการละลายแบบ SSV โอโอไซท์บางกลุ่มจะถูกบ่มในน้ำยาแช่แข็ง แต่จะถูกนำไปบ่มในน้ำยาละลายโดยไม่ผ่านการแช่แข็ง (กลุ่ม Solution control) การแยกว่าโอโอไซท์รอดหรือไม่หลังการแช่แข็งจะแยกโดยใช้ fluorescein diacetate staining (FDA) โดยโอโอไซท์ที่มีชีวิตจะถูกนำไปทำ IVF และนำตัวอ่อนไปเลี้ยงในหลอดแก้ว อัตรารอดของโอโอไซท์ที่มีความใกล้เคียงกันระหว่างกลุ่มควบคุม (โอโอไซท์ที่ไม่ถูกแช่แข็ง) Solution control กลุ่ม SSV และกลุ่ม Cryotop หลังการแช่แข็ง ไม่พบความแตกต่างของอัตราการปฏิสนธิ การเกิด pronuclear และ monospermy ระหว่างทุกกลุ่ม อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนจากกลุ่ม SSV และ Cryotop (41.6 และ 53.2%, ตามลำดับ) ต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่ม Solution control (65.9 และ 61.3% ตามลำดับ) อัตราการเจริญเติบโตสู่ระยะบลาสโตซิสต์จากกลุ่ม SSV และ Cryotop ไม่มีความแตกต่างกัน (10.3 และ 12.8% ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามทั้งสองกลุ่มมีอัตราการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะบลาสโตซิสต์ที่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่ม Solution control (36.4 และ 24.8% ตามลำดับ) ปริมาณเซลล์ inner cell mass, trophoctoderm และจำนวนเซลล์ทั้งหมดของตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ไม่มีความแตกต่างกันทั้งจากกลุ่มควบคุม กลุ่ม Solution control กลุ่ม SSV และ Cryotop จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าโอโอไซท์ที่เลี้ยงในน้ำยา IVM สามารถผ่านการแช่แข็งโดย Cryotop และ SSV ได้โดยมีประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกัน

การแช่แข็งเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์ในการเก็บรักษาโอโอไซท์ เพื่อใช้เป็นแหล่งสำหรับผลิตตัวอ่อนโคลนนิ่งและการผลิตตัวอ่อนในหลอดแก้ว วัตถุประสงค์ของการทดลองต้องการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการแช่แข็งโอโอไซท์โดย Microdrop และ Cryotop โดยดูอัตราการเจริญเติบโตหลังการทำโคลนนิ่ง (SCNT) และการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวด้วยสารเคมี (PA) โอโอไซท์ที่เลี้ยงในน้ำยา IVM จะถูกนำมาแช่แข็งด้วย Microdrop และ Cryotop และทำการตรวจการรอดหลังละลายด้วย การย้อมสี FDA พบว่าการแช่แข็งด้วย Microdrop และ Cryotop มีอัตราการรอดที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (100, 91 และ 97% ตามลำดับ) หลังจากการนำโอโอไซท์แช่แข็งด้วย

Microdrop (70.94%) และ Cryotop (73.50%) มาทำโคลนนิ่งพบว่าอัตราการเชื่อมเซลล์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (70.34%) แต่อัตราการแบ่งตัวของโอโอไซท์ที่ไม่ได้แช่แข็งสูงกว่าทั้งกลุ่ม Microdrop และ Cryotop โอโอไซท์ที่แช่แข็งด้วย Microdrop และ Cryotop ที่ถูกนำมาทำ PA สามารถเจริญเติบโตสู่ระยะบลาสโตซิสต์ได้ (16.67 และ 2.99%) ซึ่งต่ำกว่าตัวอ่อนกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (28.45%; $P < 0.05$)

Figure 1. The effects of vitrification on oocyte viability, in vitro fertilization (IVF), pronuclei formation and subsequent *in vitro* development were assessed. *In vitro* matured (IVM) oocytes were subjected to equilibration and vitrification solutions according to the SSV method then the oocytes were vitrified either by dropping onto a solidified surface (SSV) or plunging into liquid nitrogen on Cryotop sheets (Cryotop). Following warming according to the SSV method, some oocytes were subjected to the IVF procedure and fertilized without cooling (solution-control group). The functional status of oocytes was determined by fluorescein diacetate staining. The oocytes were subjected to IVF, and the resultant embryos cultured *in vitro*. The rates of live embryos were similar among the fresh control, SSV and Cryotop groups. There was no difference in the rate of fertilization, pronuclei formation and mono-spermy among these groups. The cleavage rates (41.6 and 53.2%, respectively) were significantly lower than solution-control groups (53.9 and 61.3%, respectively). The blastocyst rates did not differ (10.3 and 11.2%, respectively) however the loss in the fresh control and solution-control groups (26.4 and 11.1%) in cell mass, trophectoderm and total cell numbers in blastocysts did not differ among the fresh control, solution-control, SSV and Cryotop groups. Our results suggest that bovine oocytes could be cryopreserved successfully using the cooling system. SSV method with similar efficacy.

Cryopreservation is a useful technique to providing source of oocytes and *in vitro* embryo production. The aim of this study was to compare oocyte oocytes by Microdrop and Cryotop on the developmental rate after SCNT and PA. Oocytes from IVM were vitrified by Microdrop and Cryotop. Oocyte survival after evaluated by FDA staining were similar among fresh, Microdrop and Cryotop (100, 91 and 97%, respectively). After SCNT, fusion rate of oocytes derived from Microdrop (70.94%) and Cryotop (73.50%) were similar to fresh control (70.34%). However, the cleavage rate of oocytes from fresh control was higher than Microdrop and Cryotop. The vitrified-thawed oocytes from Microdrop and Cryotop were not

Abstract

The aim of the oocytes vitrification study was to compare the efficacies of the cooling systems of the solid surface (SSV) and Cryotop vitrification methods for cryopreservation of bovine oocytes at the MII stage. The effects of vitrification on oocyte viability, *in vitro* fertilization (IVF), pronucleus formation and subsequent *in vitro* development were assessed. *In vitro* matured (IVM) bovine oocytes were subjected to equilibration and vitrification solutions according to the SSV method, and then the oocytes were vitrified either by dropping onto a cold dry metal surface (SSV group) or by plunging into liquid nitrogen on Cryotop sheets (Cryotop group). Warming was conducted according to the SSV method. Some oocytes were subjected to the cryoprotectants and warming regimen without cooling (Solution control group). The live/dead status of oocytes was evaluated by fluorescein diacetate staining. Live oocytes were subjected to IVF, and the resultant embryos were cultured *in vitro*. The rates of live oocytes were similar among the Fresh control, Solution control, SSV and Cryotop groups. There was no difference in the rates of fertilization, pronuclear formation and monospermy among these groups. The cleavage rates in the SSV and Cryotop groups (41.6 and 53.2%, respectively) were significantly lower than those in the Fresh control and Solution control groups (65.9 and 61.3%, respectively). The blastocyst rates in SSV and Cryotop groups did not differ (10.3 and 12.8%, respectively); however, they were significantly lower than those in the Fresh control and Solution control groups (36.4 and 24.8%, respectively). The inner cell mass, trophectoderm and total cell numbers in blastocysts did not significantly differ among the Fresh control, Solution control, SSV and Cryotop groups. Our results indicate that IVM bovine oocytes could be cryopreserved successfully using the cooling systems of the Cryotop and SSV methods with similar efficacy.

Cryopreservation is a useful technique to providing source of oocytes for nuclear transfer and *in vitro* embryo production. The aim of this study was to compare cryopreservation of bovine oocytes by Microdrop and Cryotop on the developmental rate after SCNT and PA. Oocytes from IVM were vitrified by Microdrop and Cryotop. Oocytes survivals after examined by FDA staining were similar among fresh, Microdrop and Cryotop (100, 91 and 97%, respectively). After SCNT, fusion rate of oocytes derived from Microdrop (70.94%) and Cryotop (73.50%) were similar to Fresh control (70.34%). However, the cleavage rate of oocytes from Fresh control was higher than Microdrop and Cryotop. The vitrified-thawed oocytes from Microdrop and Cryotop were not

developing to blastocyst after SCNT. After PA, oocytes derived from Microdrop and Cryotop developed to balstocyst stage (16.67 and 2.99%) significant lower than Fresh control (28.45%; P<0.05).

	หน้า
โรดภาค	11
บทนำ	12
บทวิจารณ์บท	13
.....	14
12	15
13	16
14	17
15	18
หน้า	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาวิจัย	19
1.2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	20
1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	21
1.4 ขอบเขตของงานวิจัย	22
1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย	23
บทที่ 2 วิธีดำเนินงานวิจัย	
2.1 การเตรียมตัวและวัสดุ-อุปกรณ์	24
2.2 การเตรียมการเพาะเลี้ยงไข่ไข่	25
2.3 การปฏิสนธิไข่	26
2.4 การทำโคลนนิ่ง	27
2.5 การย้ายเอ็มบริโอเซลล์	28
2.6 การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ	29
2.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ	30
บทที่ 3 ผลการวิจัยและข้อค้นพบวิจัย	
3.1 การเตรียมตัวไข่ไข่	31
3.2 การเตรียมตัวไข่ไข่	32
3.2.1 ปริมาณและอัตราการเตรียมไข่ไข่	33
การตายตัว	34
3.2.2 ปริมาณและอัตราการเตรียมไข่ไข่	35

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
1.2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	1
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.4 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	3
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
2.1 การแช่แข็งและละลายโอโอไซท์	5
2.2 การประเมินการรอดของโอโอไซท์.....	6
2.3 การปฏิสนธิในหลอดแก้ว.....	6
2.4 การทำโคลนนิ่ง	6
2.5 การย้อมนับเซลล์ตัวอ่อน	8
2.6 รูปแบบการดำเนินการวิจัย	8
2.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ	8
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและข้อวิจารณ์	
3.1 การแช่แข็ง โอโอไซท์เพื่อผลิตตัวอ่อนโดยวิธีปฏิสนธิในหลอดแก้ว.....	10
3.2 การแช่แข็ง โอโอไซท์เพื่อผลิตตัวอ่อนโดยโคลนนิ่ง	10
3.2.1 ปริมาณและอัตราการรอดของโอโอไซท์หลังการแช่แข็งและ ละลายด้วย Microdrop และ Cryotop	10
3.2.2 อธิทธิพลของการแช่แข็งโอโอไซท์ต่อความสำเร็จในการ โคลนนิ่ง	12
3.2.3 อัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อน SCNT ที่ผลิต จาก โอโอไซท์แช่แข็ง	12

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.4 อัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อน PA ที่ผลิตจาก โอโอไซต์แช่แข็ง.....	13
3.2.5 อัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อน SCNT และ PA ที่ผลิต จากโอโอไซต์แช่แข็ง.....	13
3.3 ข้อวิจารณ์.....	13
บทที่ 4 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	
สรุปผลและข้อเสนอแนะ	18
บรรณานุกรม	19
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	26
ประวัติผู้วิจัย	27

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงปริมาณ โอโอไซต์ที่ได้ก่อนและหลังการแช่แข็งและ	10
แสดง โอโอไซต์ที่มีชีวิตหลังการแช่แข็งและละลายโดยตรวจ	10
สอบโดยใช้สี FDA	11
ตารางที่ 2 ผลการทำโคลนนิ่ง โดยใช้โอโอไซต์ที่แช่แข็งต่ออัตราความสำเร็จในการ	
Enucleation, Injection และ Fusion	12
ตารางที่ 3 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อน SCNT และ PA ที่ผลิต	
จากโอโอไซต์แช่แข็งโดย Microdrop และ Cryotop	14

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

การทำปฏิสนธิในหลอดแก้วและการโคลนนิ่งในโคจำเป็นต้องใช้โอโอไซท์หรือไข่โคในการทำตามปกติ เราได้โอโอไซท์โคจากการเก็บรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์แล้วนำมาเจาะดูดไข่อ่อนเพื่อนำไปเลี้ยงในหลอดแก้วให้เป็นไข่อสุก ในบ้านเรามีจำนวนโคเพศเมียเข้าโรงฆ่าสัตว์น้อยทำให้ได้รังไข่ในแต่ละวันไม่มาก บางครั้งไม่เพียงพอต่อการทดลองในแต่ละวัน และในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการแช่แข็งโอโอไซท์โคเพื่อใช้ในการทดลองโคลนนิ่งและปฏิสนธิในหลอดแก้วมาก่อน ดังนั้นจึงยังไม่มีรายงานว่าควรที่จะใช้น้ำยาแช่แข็งแบบใดที่จะทำให้โอโอไซท์โคที่แช่แข็ง สามารถนำมาทำโคลนนิ่งหรือปฏิสนธิในหลอดแก้วและสามารถพัฒนาต่อไปจนได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาวจัยการแช่แข็งโอโอไซท์โคไว้ใช้ทดลองในเวลาที่เหมาะสมในอนาคต

1.2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

หลังจากรายงานความสำเร็จของการแช่แข็งตัวอ่อนโดยวิธี Vitrification (Rall และ Fahy, 1985) ได้มีการนำวิธีการดังกล่าวมาใช้ในการแช่แข็งไข่ มีการพัฒนาภาชนะบรรจุไข่เพื่อเพิ่มอัตราการรอดอุณหภูมิให้เร็วที่สุด เช่น Electron microscope grids (Martino และคณะ, 1996) Open pulled straw (OPS, Vajta และคณะ, 1997) Hemi straw (Vanderzwalmen และคณะ, 2000) Solid-surface vitrification (SSV, Dinnyes และคณะ, 2000) Droplets vitrification (Papis และคณะ, 2000) Nylon loop (Lane และคณะ, 2001), Flexipet-denuding pipette (Liebermann และคณะ, 2002) Martino และคณะ (1996) รายงานความสำเร็จครั้งแรกในการแช่แข็งไข่โคโดยใช้ Electron microscope grids นำโอโอไซท์ที่แช่แข็งมาทำละลายแล้วเข้าปฏิสนธิในหลอดแก้ว พบว่าตัวอ่อนที่ผลิตได้สามารถเจริญเข้าสู่ระยะ บลาสโตซิสต์ได้ มีรายงานว่าสามารถแช่แข็งโอโอไซท์โคระยะ GV ได้สำเร็จและละลายออกมาผลิตตัวอ่อนได้โดยวิธีปฏิสนธิในหลอดแก้ว (Isachenko และคณะ, 2001; Matsumoto และคณะ, 2001) Men และคณะ (2002) ทำการทดลองแช่แข็งโอโอไซท์ระยะ GV และ MII แล้วพบว่าโอโอไซท์ที่ระยะ MII จะมีอัตราการรอดหลังละลายสูงกว่าโอโอไซท์ระยะ GV นอกจากนี้โอโอไซท์จากกลุ่ม GV ยังมีการพัฒนาหลังจากปฏิสนธิในหลอดแก้วน้อยกว่าโอโอไซท์กลุ่ม MII อีกด้วย มีการทดลองนำโอโอไซท์ที่แช่แข็งมาทำปฏิสนธิในหลอดแก้วเพื่อผลิตตัวอ่อนจำนวนมาก อาทิเช่น ในปี 2000 Papis และคณะ แช่แข็งโอโอไซท์โคระยะ MII โดยใช้วิธี Droplets vitrification แล้วนำมาทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว สามารถได้ตัวอ่อนเจริญเข้าสู่ระยะบลาสโตซิสต์ 29.7% Chang และคณะ (2004)

ใช้วิธีเดียวกันกับ Papis และคณะ (2000) ในการแช่แข็งโอโอไซท์โคแล้วละลายมาปฏิสนธิในหลอดแก้วพบว่าสามารถผลิตตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ได้ 26% ซึ่งข้อมูลมีค่าใกล้เคียงกันกับข้อมูลของ Papis และคณะ (2000) ต่อมาในปี 2004 Inaba และคณะ นำโอโอไซท์โคที่แช่แข็งและละลายมาปฏิสนธิในหลอดแก้วพบว่าสามารถผลิตตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ได้ 28% มีการทดลองนำตัวอ่อนที่ผลิตได้จากโอโอไซท์ที่แช่แข็งไปย้ายฝากให้แก่โคตัวรับพบว่าสามารถผลิตลูกโคได้ อาทิเช่น ในปี 1998 Vajta และคณะ ทดลองแช่แข็งโอโอไซท์โคระยะ MII และตัวอ่อนโคระยะบลาสโตซิสต์ โดยใช้ OPS หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ ทั้งที่ผลิตจากโอโอไซท์แช่แข็งและตัวอ่อนแช่แข็งให้ตัวรับพบว่าได้ลูกโคเกิด 3 ตัว ในปี 2000 Papis และคณะ นำตัวอ่อนที่ผลิตได้จากโอโอไซท์แช่แข็งไปย้ายฝากให้แม่ตัวรับ 4 ตัว พบว่ามีแม่โคตั้งท้อง 2 ตัว แท้งวันที่ 135 ของการตั้งท้อง 1 ตัวและคลอด 1 ตัว มีสุขภาพแข็งแรงดี อย่างไรก็ตามความสำเร็จในการทำยังค่อนข้างจำกัด อัตราความอยู่รอดยังต่ำมาก ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาวิจัยการแช่แข็งโอโอไซท์โคเพื่อทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว

ผลสำเร็จครั้งแรกของการโคลนนิ่งสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมรายงานโดย Illmensee and Hope (1981) ด้วยการโคลนนิ่งหนูถีบจักรโดยใช้เซลล์จากตัวอ่อนเป็นเซลล์ต้นแบบฉีดเข้าในโอโอไซท์ที่ควินิวเคลียสออก จากนั้นเลี้ยงตัวอ่อนโคลนนิ่งในหลอดแก้ว แล้วนำไปย้ายฝากให้หนูตัวรับจนได้ลูกเกิดมา ความสำเร็จครั้งแรกของการโคลนนิ่งในปศุสัตว์จนได้ลูกแกะ (Willadsen, 1986); ลูกโค (Prather และคณะ, 1987) และ ลูกสุกร (Prather และคณะ, 1989) จากความสำเร็จเหล่านี้ทำให้นักวิทยาศาสตร์ทั้งหลายต่างพยายามวิจัย เพื่อพัฒนาเทคนิคการทำโคลนนิ่งโดยเฉพาะในโคซึ่งเป็นปศุสัตว์ที่มีความสำคัญทั้งด้านเนื้อและนม จนในที่สุดสามารถทำโคลนนิ่งโคเชิงการค้าได้ (Bondioli และคณะ, 1990; Bondioli, 1993; Stice and Keefer, 1993) ประมาณกันว่าจำนวนลูกโคโคลนนิ่งเกิดมาทั่วโลกจนถึงปี 2538 มีอยู่ระหว่าง 1,000 ถึง 2,000 ตัว ซึ่งส่วนใหญ่ผลิตในบริษัทเอกชนแถบอเมริกาเหนือ (Seidel, 1995) ซึ่งทั้งหมดนี้ยังคงใช้เซลล์จากตัวอ่อน เป็นเซลล์ต้นแบบจนกระทั่งเดือนมีนาคม 2540 ได้มีรายงานการเกิดของลูกแกะดอลลีจากการโคลนนิ่ง ด้วยเซลล์จากต่อมน้ำนมของแกะโตเต็มวัย (Wilmut และคณะ, 1997) นับจากนั้นเป็นต้นมานักวิทยาศาสตร์ต่างพยายามทำโคลนนิ่งในสัตว์ชนิดต่างๆ โดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบจนประสบความสำเร็จในหนูถีบจักร (Wakayama และคณะ, 1998) โค (Kato และคณะ, 1998; Cibelli และคณะ, 1998; Vignon, และคณะ, 1999; Wells และคณะ, 1999; Zakhartchenko และคณะ, 1999) แพะ (Baguisi และคณะ, 1999; Reggio และคณะ, 2001; Keefer และคณะ, 2002) สุกร (Onishi และคณะ, 2000; Polejaeva และคณะ, 2000) แมว (Shin และคณะ, 2002) นอกจากนี้ยังมีรายงานการโคลนนิ่งกระบือปลักโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากลูกอ่อน เซลล์ไขกระดูกและเซลล์แกรนูโลไซตาเป็นเซลล์ต้นแบบ (รังสรรค์ และคณะ 2543b; Parnpai และคณะ, 1999, 2000a, 2000b, 2002, 2003) ในประเทศไทย ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย และทีมงานได้ประสบความสำเร็จการโคลนนิ่งโค โดยใช้เซลล์ไขกระดูกเนื้อพันธุ์เบอร์กัสเป็นเซลล์

ต้นแบบจนได้ลูกโคโคลนนิ่งเกิดมาในวันที่ 6 มีนาคม 2543 นับเป็นรายแรกของเอเชียอาคเนย์และรายที่ 6 ของโลก นอกจากนี้ยังประสบความสำเร็จในการนำเซลล์ใบหูโคเนื้อพันธุ์บราห์มันเพศเมียเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งเกิดมาเมื่อวันที่ 3 เมษายน 2544 นับเป็นความสำเร็จของการโคลนนิ่งโคพันธุ์บราห์มันรายแรกของโลก (รังสรรค์ และคณะ 2543a; Parnpai และคณะ, 2000; <http://www.vet.chula.ac.th>) นอกจากนี้ยังประสบความสำเร็จในการนำเซลล์ใบหูโคเนื้อพันธุ์บราห์มันเพศผู้เป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งเกิดมา 7 ตัวจากเซลล์ใบหูโคตัวเดียวกัน ตั้งแต่วันที่ 25 ตุลาคม 2546 เป็นต้นมา (รังสรรค์ และคณะ, 2547) แต่ความสำเร็จเหล่านี้ใช้โอโอไซท์สดในการทำโคลนนิ่ง ยังไม่มีรายงานความสำเร็จการทำโคลนนิ่งโดยใช้โอโอไซท์แช่แข็ง ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาวิจัยการแช่แข็งโอโอไซท์โคเพื่อทำโคลนนิ่ง

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อสร้างธนาคาร โอโอไซท์โค
2. เพื่อให้ได้วิธีการและส่วนประกอบของน้ำยาที่ใช้แช่แข็งที่เหมาะสมในการแช่แข็ง โอโอไซท์
3. เพื่อให้ได้ข้อมูลอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อน โคจากการปฏิสนธิในหลอดแก้วที่ผลิตโดยใช้โอโอไซท์สดและ โอโอไซท์ที่ผ่านการแช่แข็งมาแล้ว
4. เพื่อให้ได้ข้อมูลอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อน โคจากการโคลนนิ่งที่ผลิตโดยใช้โอโอไซท์สดและ โอโอไซท์ที่ผ่านการแช่แข็งมาแล้ว

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

การทดลองจะใช้โอโอไซท์ระยะ MII มาแช่แข็งด้วยวิธี Vitrification โดยเปรียบเทียบการแช่แข็งด้วยวิธี Solid surface vitrification (SSV) และการแช่แข็งโดยใช้ Cryotop ต่ออัตราการรอดหลังจากละลาย หลังจากละลายโอโอไซท์แล้วจะคัดเลือกเฉพาะ โอโอไซท์ที่มีลักษณะปกติมาใช้ในการทดลองโคลนนิ่งและปฏิสนธิในหลอดแก้ว และบันทึกการพัฒนาของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะต่างๆ โดยเปรียบเทียบกับตัวอ่อนที่ผลิตจากโอโอไซท์ที่ไม่ได้แช่แข็ง นอกจากนี้จะนำโอโอไซท์ที่ผ่านการแช่แข็งแล้วมาทำเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับเพื่อทำโคลนนิ่งและศึกษาอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนที่เจริญเข้าสู่ระยะต่างๆ โดยเปรียบเทียบกับตัวอ่อนที่ผลิตจากโอโอไซท์ที่ไม่ได้แช่แข็ง

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ได้ข้อมูลเพื่อทำเป็นธนาคาร โอโอไซท์โคพันธุ์ดีไว้ใช้ในอนาคต
2. สามารถนำองค์ความรู้ที่ได้ไปแก้ปัญหาในการวิจัยการทำโคลนนิ่ง ที่บางครั้งมีปริมาณ โอโอไซท์สดไม่เพียงพอในการทดลอง ก็สามารถนำโอโอไซท์แช่แข็งละลายออกมาใช้ได้

3. นำข้อมูลที่ได้ไปเสนอผลงานวิชาการในระดับนานาชาติ
4. สามารถนำองค์ความรู้ที่ได้เผยแพร่เทคโนโลยีสู่เกษตรกร และพัฒนาเข้าสู่การค้าต่อไปในอนาคต

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การแช่แข็งและละลายโอโอไซท์

ทำการเก็บรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์ไว้ในน้ำเกลือ (0.9% NaCl) ขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ แล้วใช้เข็มเบอร์ 18G ต่อกับกระบอกฉีดขนาด 10 ซีซี ดูดโอโอไซท์จากฟอลลิเคิลที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-8 มม. ทำการคัดเลือกโอโอไซท์ที่มีชั้นคิวมูลัสเซลล์ห่อหุ้มอย่างน้อย 3 ชั้น ไปเลี้ยงในน้ำยาในงานเลี้ยงเซลล์ซึ่งปิดคลุมน้ำยาด้วย mineral oil เลี้ยงในสัดส่วน 10 ใบ/50 μ l น้ำยาเลี้ยงโอโอไซท์ประกอบด้วย TCM199 ที่เติมด้วย 10% FCS, 50 IU/ml HCG, 0.02 AU/ml FSH และ 1 μ g/ml E_2 นำไปเลี้ยงในตู้บัพที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 23 ชั่วโมง

โอโอไซท์สำหรับการปฏิสนธิในหลอดแก้ว: นำไข่ที่ผ่านการเลี้ยงมาแล้ว 20 ชั่วโมงมาย่อยเซลล์คิวมูลัส ออกให้เหลือ 1-2 ชั้น นำไข่ที่ได้ไปทำการแช่แข็งโดยวิธี Vitrification น้ำยาที่ใช้แช่แข็งประกอบด้วยน้ำยาหลักคือ TCM199-HEPES+20% FCS ซึ่งจะศึกษาถึงผลของการแช่แข็งด้วยวิธี Vitrification โดยเปรียบเทียบการแช่แข็งด้วยวิธี Solid surface vitrification (SSV) และการแช่แข็งโดยใช้ Cryotop (Kitazato Supply Co., Tokyo, Japan) ต่ออัตราการรอดหลังจากละลาย การแช่แข็งทำโดยนำโอโอไซท์ 5-10 ใบ มาล้างในน้ำยา TCM199-Hepes ที่มี 20% FBS (BM) จากนั้นนำโอโอไซท์ย้ายไปไว้ในน้ำยา Equilibration medium ที่ประกอบด้วย BM + 4% (v/v) Ethylene glycol (EG) นาน 12-15 นาที ที่ 38.5°C จากนั้นนำโอโอไซท์ย้ายไปไว้ในน้ำยา Vitrification ที่ประกอบด้วย BM + 35% (v/v) EG + 50 mg/ml Polyvinyl pyrrolidone (PVP) + 0.4M Trehalose นาน 30 วินาที จากนั้นจึงนำโอโอไซท์กลุ่มละ 5-10 ใบ ครอบโดยตรงลงบนอนุภาคนิยิมฟลอยลอยที่ลอยอยู่บนไนโตรเจนเหลว (SSV) หรือนำไปวางไว้บนแผ่นพลาสติกของ Cryotop แล้วจึงจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว

การละลายโอโอไซท์ทำโดยการนำโอโอไซท์จากกลุ่ม SSV และ Cryotop ไปจุ่มลงในน้ำยาละลายโอโอไซท์ซึ่งประกอบด้วย BM + 0.3M Trehalose ที่อุณหภูมิ 38.5°C จากนั้นนำโอโอไซท์ย้ายไปไว้ในน้ำยา BM ที่มี 0.15M, 0.075M และ 0.0375M Trehalose ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 38.5°C นานน้ำยาละ 1 นาที จากนั้นนำโอโอไซท์ไปล้างในน้ำยา BM แล้วจึงนำไปเลี้ยงในตู้บัพในน้ำยา IVM ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้ 5% CO_2 in air นาน 2 ชั่วโมง

โอโอไซท์สำหรับการโคลนนิ่ง: นำโอโอไซท์ที่ผ่านการเลี้ยงมาแล้ว 23 ชั่วโมงมาย่อยเซลล์คิวมูลัสออกให้หมด โดยนำไข่ที่ได้ไปแช่แข็งโดยเปรียบเทียบการแช่แข็งระหว่าง Cryotop และ Microdrop การแช่แข็งทำโดยนำโอโอไซท์กลุ่มละ 5 ใบ มาล้างในน้ำยา BM จากนั้นนำโอโอไซท์ย้ายไปไว้ในน้ำยา Equilibration medium ที่ประกอบด้วย BM + 10% (v/v) EG + 10% DMSO นาน 1 นาที จากนั้นนำโอโอไซท์ย้ายไปไว้ในน้ำยา Vitrification ที่ประกอบด้วย BM + 20% (v/v) EG + 20%

DMSO + 0.5M Sucrose นาน 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 22-24°C จากนั้นจึงนำโอโอไซท์และน้ำยาประมาณ 2 μ l ครอบลงไปตรงๆ ในไมโครเจนเหลว (Microdrop) หรือนำไปวางไว้ที่ปลายพลาสติกของ Cryotop จากนั้นจึงจุ่มลงในไมโครเจนเหลว

สำหรับการละลายโอโอไซท์ทำโดยการนำโอโอไซท์จากกลุ่ม Microdrop และ Cryotop ไปจุ่มลงในน้ำยาละลายโอโอไซท์ซึ่งประกอบด้วย BM + 0.5M Sucrose ที่อุณหภูมิ 38.5°C นาน 5 นาที จากนั้นย้ายไปไว้ในน้ำยา BM ที่อุณหภูมิ 38.5°C นาน 5 นาที จากนั้นนำโอโอไซท์ไปล้างในน้ำยา BM แล้วจึงนำไปเลี้ยงในตู้บ่มในน้ำยา IVM ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้ 5% CO₂ in air นาน 1 ชั่วโมง

2.2 การประเมินการรอดของโอโอไซท์

หลังจากละลายโอโอไซท์มาแล้ว 1-2 ชั่วโมง จะทำการตรวจประเมินการรอดของโอโอไซท์โดยการย้อม Fluorescein diacetate (FDA) โดยนำโอโอไซท์แช่ในน้ำยา PBS ที่มี 2.5 μ g/ml FDA + 5 mg/ml Bovine serum albumin (BSA) ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายในห้องมืด นาน 2 นาที จากนั้นนำโอโอไซท์ไปล้างในน้ำยา PBS + 5 mg/ml BSA แล้วจึงนำไปประเมินการรอดภายใต้แสง UV ภายใต้กล้อง Epifluorescence microscope โอโอไซท์ที่เรืองแสงสีเขียวภายใต้แสง UV จะประเมินว่ามีชีวิตรอดหลังการแช่แข็งและละลาย แล้วจึงนำโอโอไซท์ดังกล่าวไปใช้ในการทดลอง IVF หรือโคลนนิ่งต่อไป

2.3 การปฏิสนธิในหลอดแก้ว

นำน้ำเชื้อโคที่ถูกแช่แข็งครั้งละ 1 หลอด ออกจากถังไมโครเจนเหลว นำไปละลายในอากาศ นาน 10 วินาที และนำไปละลายต่อในน้ำที่มีอุณหภูมิ 37°C นาน 30 วินาที ดูดน้ำเชื้อไปไว้ที่ก้นหลอดทดลองที่มีน้ำยา TALP อยู่ 2 ml จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้ 5% CO₂ in air นาน 30 นาที โดยวางหลอดให้อยู่ในลักษณะเอียง 45 องศา เพื่อแยกอสุจิมีชีวิตออกจากอสุจิที่ตาย โดยอสุจิมีชีวิตว่ายขึ้นบนผิวน้ำยา จากนั้นจึงดูดส่วนใสด้านบนของน้ำยาออกมา 1.8 ml แล้วนำไปใส่ในหลอดทดลองแล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2100 rpm นาน 7 นาที แล้วจึงดูดส่วนใสทิ้งให้เหลือแต่สะเกอ นอสุจิ แล้วจึงเติมน้ำยา TALP ลงไปอีก 1 ml แล้วจึงนำไปตรวจความเข้มข้นของตัวอสุจิ โดยปรับให้อสุจิมีความเข้มข้น 8-10 ล้านตัว/ml แล้วนำไปทำ microdrop (50 μ l/drop) ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 mm แล้วปิดคลุมด้วย mineral oil จากนั้นนำไปแช่ที่เลี้ยงไว้แล้ว 23 ชั่วโมง และไขที่ผ่านการแช่แข็งมาแล้ว microdrop ตัวอสุจิที่เลี้ยงรอไว้แล้วในสัดส่วน 20 ใบ/drop แล้วนำตัวอสุจิและไข่ไปเลี้ยงร่วมกันในตู้บ่มภายใต้ 5% CO₂ in air ที่อุณหภูมิ 38.5°C นาน 10 ชั่วโมง แล้วนำไข่มาย่อยเซลล์ คิวมูล์สออก แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน

2.4 การทำโคลนนิ่ง

การเตรียมเซลล์ต้นแบบ

เก็บตัวอย่างใบหูโคพันธุ์ดีไว้ในน้ำเกลือขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ ทำความสะอาดผิวหนังด้านนอกด้วยสบู่น้ำเชื้อ แล้วฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% โดยทำในตู้ปลอดเชื้อ ลอกผิวหนัง

ด้านนอกและด้านในออกจากส่วนกระดูกอ่อนแล้วตัดให้มีขนาดประมาณ 1x1 มิลลิเมตร แล้วนำไป
 แล้วนำไปวางบนจานเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตร แล้วปิดทับด้วยกระจกสไลด์
 ก่อนเติมน้ำยา α MEM +10% FBS ปริมาณ 5 ml แล้วนำไปเลี้ยงในตู้บัพ ที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้ 5%
 CO_2 in air โดยเปลี่ยนน้ำยาทุก 3 วัน เมื่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เจริญออกมาแล้วจะทำการ Passage โดย
 ใช้สารละลาย Trypsin/EDTA (0.25% Trypsin/0.04% EDTA ใน PBS ที่ไม่มี Ca^{++} และ Mg^{++}) แล้วนำ
 เซลล์ไปปั่นแยกที่ 500x g นาน 10 นาที แล้วละลายเซลล์ที่ปั่นแยกได้ด้วยน้ำยา α MEM +10% FCS
 แล้วนำไปเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ (culture flask) ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร ในตู้บัพที่อุณหภูมิ 37°C
 ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เมื่อเซลล์แบ่งตัวเต็มขวดเลี้ยงเซลล์แล้วเก็บเกี่ยวเซลล์ด้วย
 สารละลาย Trypsin/EDTA จากนั้นนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงต่ออีกในขวดเลี้ยงเซลล์ เพื่อให้มีปริมาณ
 มากๆ จนถึง passage ที่ 4 แล้วแช่แข็งเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวไว้ใช้งานต่อไป

นำเซลล์ที่แช่แข็งไว้มาเลี้ยงใหม่ในน้ำยา α MEM+10% FCS ในขวดเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C
 C ภายใต้บรรยากาศ 5% CO_2 in air แล้ว passage ทุกๆ 3-4 วัน จะใช้เซลล์จนถึง passage ที่ 8

การเตรียมไซโทพลาสซึมผู้รับ

นำไข่สดที่ผ่านการเลี้ยงในหลอดแก้วมาแล้ว 23 ชั่วโมงมาย่อยเซลล์คิวมูลัสออก
 และนำไข่ที่ผ่านการแช่แข็งมาแล้ว มาคัดเลือกโอโอไซท์ที่สุกแล้ว (มี first polar body) ไปดูเอา
 นิวเคลียสออกด้วย micromanipulator ภายใต้กล้อง inverted microscope ในน้ำยาที่มี 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
 cytochalasin B ตรวจสอบผลสำเร็จการคูดนิวเคลียสด้วยการนำส่วนที่คูดได้ไปย้อมด้วย 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
 Hoecht 33342

การฉีดเซลล์ต้นแบบและเชื่อมเซลล์

ใช้วิธีการเดียวกับที่รายงานไว้แล้ว (รังสรรค์และคณะ 2543a; Parnpai และคณะ,
 2000) โดยใช้ micromanipulator ภายใต้กล้อง inverted microscope ฉีดเซลล์ต้นแบบ 1 เซลล์ เข้าไป
 ในบริเวณ perivitelline space ของไข่ที่คูดนิวเคลียสออกแล้ว จากนั้นนำไข่ครั้งละใบไปไว้ระหว่าง
 ปลายสองข้างของ fusion electrode เพื่อเชื่อมเซลล์เข้าด้วยกัน โดยใช้เครื่องเชื่อมเซลล์ด้วย
 กระแสไฟฟ้า จ่ายกระแสไฟ 25 V/ใบ ระยะเวลา 15 μsec 2 ครั้งต่อเนื้อกัน แล้วนำไปไว้ในน้ำยา
 TCM199 + 20% FCS นาน 1 ชั่วโมง จึงทำการตรวจสอบการเชื่อมกันภายใต้กล้อง inverted
 microscope คัดเฉพาะเซลล์ที่เชื่อมกันแล้วไปกระตุ้นด้วย 7% ethanol นาน 5 นาที แล้วนำไปเลี้ยงใน
 น้ำยา TCM199 + 10% FCS ที่เติมด้วย 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cycloheximide (CHX) และ 1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cytochalasin
 D(CD) ในตู้บัพที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้ บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 5 ชั่วโมง

การเลี้ยงตัวอ่อนโคลนนิ่งในหลอดแก้ว

ใช้วิธีการเดียวกับที่รายงานไว้แล้ว (รังสรรค์และคณะ 2543a; Parnpai et al. 2000)
 นำไข่ที่ผ่านการกระตุ้นแล้วมาเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa (Gardner และคณะ, 1994) + 0.6% BSA ใน

สัดส่วน 10-20 ใบ/100 μ l ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% O₂, 5% CO₂ และ 90% N₂ นาน 2 วัน แล้วคัดเลือกตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ ไปเลี้ยงแบบ co-culture กับเซลล์บุท่อนำไข่โค ในน้ำยา SOFaa + 0.6% BSA ในสัดส่วน 10ใบ/100 μ l แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5° C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂ นาน 5 วัน เปลี่ยนน้ำยาทุกๆวัน พร้อมทั้งบันทึกการเจริญเติบโตของตัวอ่อน

2.5 การย้อมนับเซลล์ตัวอ่อน

การย้อมนับเซลล์ตัวอ่อนจะทำโดยวิธี Differential staining เพื่อแยกนับเซลล์ ICM และ TE โดยนำตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสมาใส่ในน้ำยาที่มี 0.1 mg/ml propidium iodide (PI) และ 0.2% Triton X-100 ที่ละลายในน้ำยา PBS นาน 60 วินาที จากนั้นนำไปไว้ในน้ำยาที่มี 25 μ g/ml Hoechst 33342 ที่ละลายใน 99.5% Ethanol นาน 5 นาที แล้วจึงนำตัวอ่อนไปวางบนแผ่นกระจกสไลด์แล้วหยด Glycerol หยดลงบนตัวอ่อน แล้วปิดทับตัวอ่อนด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วจึงนำไปตรวจภายใต้กล้อง Epifluorescence microscope โดยตรวจสอบตัวอ่อนภายใต้แสง UV โดยนิวเคลียสของ TE จะถูกย้อมด้วยทั้งสีของ PI และ Hoechst ซึ่งจะพบสีชมพูหรือแดง แต่สีนิวเคลียสของ ICM โคนย้อมด้วยสีของ Hoechst เท่านั้นซึ่งจะมองเห็นเป็นสีน้ำเงิน จากนั้นจึงทำการถ่ายรูปและบันทึกผลย้อมนับเซลล์ ICM และ TE

2.6 รูปแบบการดำเนินการวิจัย

การทดลองแช่แข็งโอโอไซท์เพื่อนำไปผลิตตัวอ่อนโดยวิธีปฏิสนธิในหลอดแก้ว จะแบ่งเป็น 4 กลุ่มเปรียบเทียบ คือ กลุ่มโอโอไซท์ที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง (Fresh control), กลุ่มที่สองคือกลุ่มโอโอไซท์ที่ผ่านน้ำยาที่ใช้ในการแช่แข็งแต่จะไม่นำไปแช่ลงในไนโตรเจนเหลว แต่จะนำไปผ่านน้ำยาละลายเพื่อดูความเป็นพิษของน้ำยาแช่แข็งต่ออัตราการรอดของโอโอไซท์ (Solution control), กลุ่มที่สามจะเป็นกลุ่มที่แช่แข็งโอโอไซท์ด้วยวิธี SSV (SSV), กลุ่มที่สี่จะเป็นกลุ่มที่แช่แข็งโอโอไซท์ด้วย Cryotop (Cryotop) หลังจากการประเมินการมีชีวิตของโอโอไซท์ด้วย FDA แล้วจะนำโอโอไซท์ที่มีชีวิตไปผลิตตัวอ่อนโดยวิธีปฏิสนธิในหลอดแก้ว แต่ละซ้ำของการทดลองของแต่ละกลุ่มจะใช้ตัวอ่อนระยะ Zygote จำนวน 10 ตัวอ่อน โดยวิธีการคัดเลือกแบบสุ่ม

การทดลองแช่แข็งโอโอไซท์เพื่อนำไปผลิตตัวอ่อนโดยวิธีโคลนนิ่ง โอโอไซท์จะถูกแช่แข็งด้วยวิธี Vitriification แบบหยด (Microdrop) และแบบที่ใช้ Cryotop หลังการละลายโอโอไซท์จะถูกย้อมด้วย FDA เพื่อแยกเฉพาะโอโอไซท์ที่มีชีวิตมาทำการโคลนนิ่งและทำ Parthenogenetic จากนั้นจะทำการบันทึกผลอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนจนถึงระยะบลาสโตซิส

2.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลอัตราการปฏิสนธิ การเจริญเติบโตของตัวอ่อน และจำนวนเซลล์ตัวอ่อนจะถูกคิดค่าสถิติด้วยวิธี One-way ANOVA โดยใช้ KyPlot package (Ver. 4.0, KyensLab, Tokyo, Japan) โดยใช้จำนวนการทดลองจำนวน 5 ครั้ง ในแต่ละกลุ่มการทดลอง

หมายเหตุ

1. สูตรของน้ำยาแช่แข็งที่ใช้ในการทดลองแช่แข็งโอโอไซท์สำหรับการปฏิบัติในหลอดแก้ว เป็นน้ำยาสูตรเดียวกับรายงานที่มีก่อนหน้าคือในปี 2000 Dinnyes และคณะได้ทำการแช่แข็งโอโอไซท์โคด้วยวิธี SSV พบว่าโอโอไซท์มีอัตราการรอดหลังการละลายสูงถึง 86% (Dinnyes และคณะ, 2000) ในการทดลองครั้งนี้จึงมุ่งไปในการเปรียบเทียบวิธีการแช่แข็ง
2. สูตรน้ำยาแช่แข็งที่ใช้ในการทดลองแช่แข็งโอโอไซท์สำหรับการโคลนนิ่ง เป็นสูตรน้ำยาเดียวกับรายงานที่มีก่อนหน้าคือ Laowtammathron และคณะ, 2005 ซึ่งประสบความสำเร็จในการแช่แข็งตัวอ่อนโคที่ได้จากการโคลนนิ่ง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้น้ำยาตัวเดียวกัน

บทที่ 3

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและข้อวิจารณ์

3.1 การแช่แข็งโอโอไซท์เพื่อผลิตตัวอ่อนโดยวิธีปฏิสนธิในหลอดแก้ว

ผลการทดลองดังกล่าวได้ถูกนำไปตีพิมพ์แล้วในวารสาร Journal of Reproduction and Development

Sripunya N, Somfai T, Inaba Y, Nagai T, Imai K, Pampai R. 2010. A comparison of cryotop and solid surface vitrification methods for the cryopreservation of in vitro matured bovine oocytes. *J Reprod Dev.* 56:176-181.

จากการทดลองดังกล่าว สามารถสรุปได้ดังนี้ เมื่อนำโอโอไซท์โคที่แช่แข็งด้วยวิธี Cryotop และ solid surface vitrification (SSV) มาทำละลายพบว่าอัตราการรอดหลังการทำละลายไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม เมื่อนำโอโอไซท์แช่แข็งที่มีชีวิตรอดไปทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว พบว่าอัตราการปฏิสนธิ การเกิด pronuclear และ monospermy ไม่แตกต่างกันในกลุ่มการทดลอง อย่างไรก็ตามอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนที่ได้จากโอโอไซท์แช่แข็งด้วยวิธี Cryotop และ SSV มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซิสต์ของตัวอ่อนที่ได้จากโอโอไซท์แช่แข็งด้วยวิธี Cryotop และ SSV ไม่มีความแตกต่างกันแต่มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพิจารณาคุณภาพของบลาสโตซิสต์ที่ได้ในแง่ของจำนวน inner cell mass, trophectoderm และเซลล์ทั้งหมด พบว่าคุณภาพของตัวอ่อนไม่มีความแตกต่างกันในทุกกลุ่มการทดลอง กล่าวโดยสรุปคือ การแช่แข็งโอโอไซท์โคด้วยวิธี Cryotop และ SSV มีอัตราการรอดชีวิตหลังการทำละลายสูง อีกทั้งโอโอไซท์ยังสามารถเจริญสู่จนถึงระยะบลาสโตซิสต์หลังการทำปฏิสนธิในหลอดแก้วได้

3.2 การแช่แข็งโอโอไซท์เพื่อผลิตตัวอ่อนโดยโคลนนิ่ง

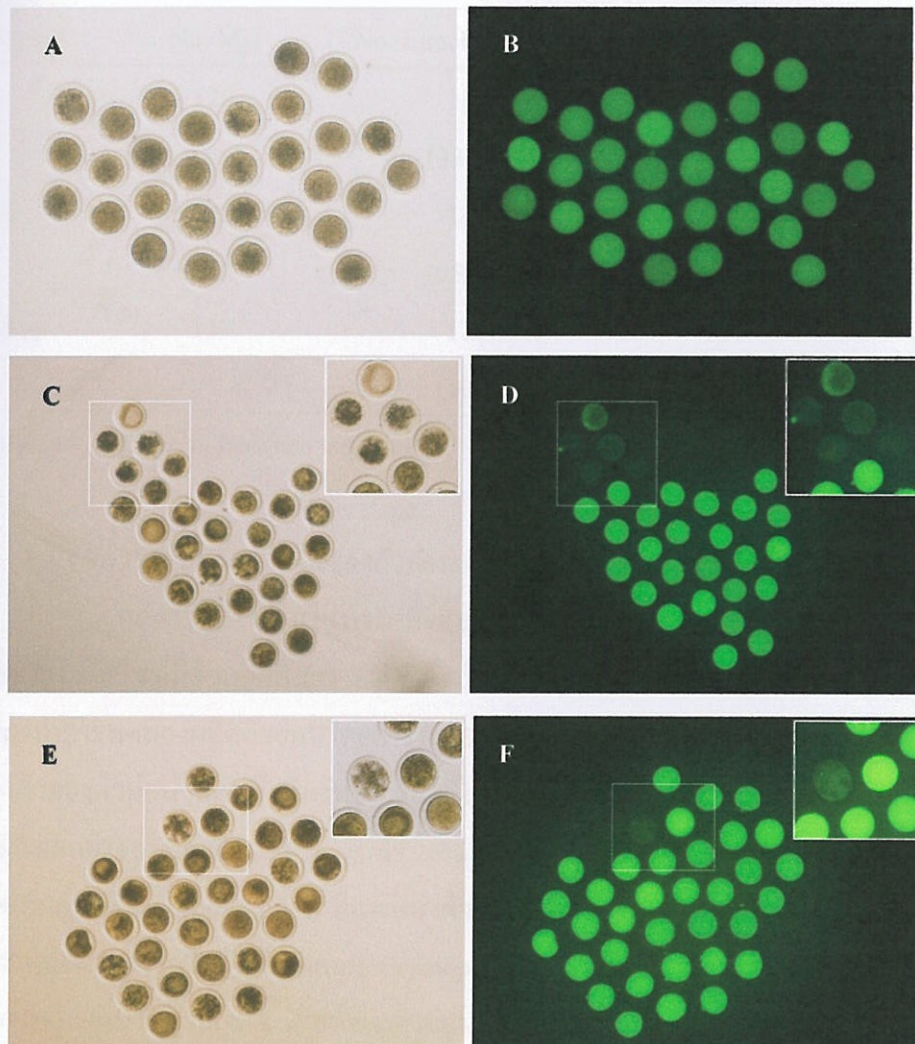
3.2.1 ปริมาณและอัตราการรอดของโอโอไซท์หลังการแช่แข็งและละลายด้วย Microdrop และ Cryotop

ผลการทดลองแช่แข็งและละลายโอโอไซท์แสดงในตารางที่ 1 หลังการแช่แข็งและละลายโอโอไซท์พบว่า ปริมาณโอโอไซท์ที่ได้หลังการละลายไม่มีความแตกต่างกันระหว่างวิธี Microdrop และ Cryotop (243/239, 98% vs 244/245, 99% ตามลำดับ) เมื่อข้อมโอโอไซท์ที่ได้จากทั้งสองกลุ่มด้วยสี FDA ดังแสดงในภาพที่ 1 พบว่าโอโอไซท์ที่แช่แข็งโดยใช้ Cryotop มีอัตราการรอด (97%) ที่สูงกว่ากลุ่ม Microdrop (91%) แต่อัตราการรอดของโอโอไซท์จากทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งโอโอไซท์ทุกใบข้อมคติดสีของ FDA (100%)

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณ โอโอไซท์ที่ได้ก่อนและหลังการแช่แข็งและแสดง โอโอไซท์ที่มีชีวิตหลังการแช่แข็งและละลาย โดยตรวจสอบโดยใช้สี FDA

Treatments	No. of MII	Recovery rate (%)	FDA viability (%)
Microdrop	243	239(98)	217(91)
Cryotop	245	244(99)	237(97)
Control	241	241(100)	241(100)

No significantly different between treatments



ภาพที่ 1 โอโอไซท์หลังจากย้อมด้วยสี FDA ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ โดยย้อมกลุ่ม โอโอไซท์ที่ไม่ได้แช่แข็ง (A และ B) โอโอไซท์ที่แช่แข็งด้วย Microdrop (C และ D) และกลุ่มที่แช่แข็งด้วย Cryotop (E และ F) โอโอไซท์ที่ตายจะไม่เรืองแสงสีเขียวหรือมีการเรืองแสงจางๆ

3.2.2 อิทธิพลของการแช่แข็งโอโอไซท์ต่อความสำเร็จในการโคลนนิ่ง

ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 2 ซึ่งพบว่าหลังจากนำโอโอไซท์ที่ตรวจด้วย FDA ว่ารอดจากการแช่แข็งแล้วโอโอไซท์จะถูกนำมาทำโคลนนิ่งและ PA ผลการทำโคลนนิ่งพบว่า เมื่อเปรียบเทียบโอโอไซท์ที่ไม่ถูกแช่แข็งกับโอโอไซท์ที่แช่แข็งด้วย Microdrop และ Cryotop พบว่าการแช่แข็งทั้งสองไม่มีผลกระทบต่อการ enucleation (98.33, 95.12 และ 100% ตามลำดับ), injection (100, 100 และ 100% ตามลำดับ) และ fusion (70.34, 73.50 และ 70.94% ตามลำดับ)

ตารางที่ 2 ผลการทำโคลนนิ่งโดยใช้โอโอไซท์ที่แช่แข็งต่ออัตราความสำเร็จในการ enucleation, injection และ fusion

Oocyte	No. MII	No. Enucleation (%)	No. Injection (%)	No. Fused (%)
Fresh	120	118 (98.33)	118 (100)	83 (70.34)
Cryotop	123	117 (95.12)	117 (100)	86 (73.50)
Microdrop	117	117 (100)	117 (100)	83 (70.94)

No significantly different between treatments

3.2.3 อัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อน SCNT ที่ผลิตจากโอโอไซท์แช่แข็ง

หลังจากนำโอโอไซท์จากทั้งสองกลุ่มที่แช่แข็งและละลายไปย้อมด้วยสี FDA จะเลือกเฉพาะโอโอไซท์ที่ย้อมติดสีของ FDA ซึ่งเป็นการคัดเลือกโอโอไซท์ที่มีชีวิตรอดจากการแช่แข็งเท่านั้นมาทำการทดลองผลิตตัวอ่อนโดยการทำ SCNT และ PA ดังแสดงในตารางที่ 3 เมื่อพิจารณาการแบ่งตัวของตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ผลิตจากโอโอไซท์ที่แช่แข็งด้วยวิธี Microdrop และ Cryotop พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (32.0% vs 59.26% ตามลำดับ) แต่การแบ่งตัวของตัวอ่อนโคลนนิ่งจากโอโอไซท์กลุ่ม Microdrop (32.0%) มีการแบ่งตัวที่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (81.33%) อย่างมีนัยสำคัญ แต่อัตราการแบ่งตัวของโอโอไซท์จากกลุ่ม Cryotop (59.26%) ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม และพบว่าการเจริญเติบโตสู่ระยะ 8 เซลล์ของตัวอ่อนกลุ่มควบคุม (38.67%) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) กับตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ของกลุ่มโอโอไซท์ที่แช่แข็งด้วย Cryotop (25.93%) แต่ตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์จากทั้งกลุ่ม Cryotop และกลุ่มควบคุมเจริญเติบโตสู่ระยะ 8 เซลล์ได้สูงกว่ากลุ่ม Microdrop (4.0%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) หลังจากเลี้ยงตัวอ่อนจนนาน 8 วัน พบว่ามีเพียงกลุ่มควบคุมเท่านั้นที่ตัวอ่อนโคลนนิ่งสามารถเจริญเติบโตสู่ระยะบลาสโตซิสต์ได้ (37.70%) แต่

ตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ผลิตจากการใช้โอโอไซท์ที่แช่แข็งทั้ง 2 กลุ่มไม่สามารถเจริญเติบโตผ่านระยะ 8 เซลล์ได้

3.2.4 อัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อน PA ที่ผลิตจากโอโอไซท์แช่แข็ง

เมื่อละลายโอโอไซท์ที่แช่แข็งด้วย Cryotop และ Microdrop โอโอไซท์ส่วนหนึ่งที่เกิดคือ FDA จะถูกนำมาผลิตเป็นตัวอ่อน PA เพื่อคัดอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อน ซึ่งผลการแบ่งตัวของตัวอ่อนมีทิศทางที่แตกต่างกับตัวอ่อนกลุ่มโคลนนิ่ง คือ ตัวอ่อนกลุ่มควบคุม (95.87%) มีอัตราการแบ่งตัวที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากตัวอ่อน PA ที่ผลิตจากโอโอไซท์ที่แช่แข็งด้วย Cryotop (61.47%) และ Microdrop (12.12%) นอกจากนี้อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนกลุ่ม Cryotop (61.47%) ยังสูงกว่ากลุ่ม Microdrop (12.12%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วย ($P < 0.05$) ตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์พบมากที่สุดในกลุ่มควบคุม (63.63%) รองลงมาคือกลุ่ม Cryotop (24.77) และกลุ่ม Microdrop (4.04) เป็นกลุ่มที่เจริญเข้าสู่ระยะ 8 เซลล์ได้น้อยที่สุด ซึ่งเมื่อเทียบความแตกต่างทางสถิติพบว่า ทุกกลุ่มที่ระยะ 8 เซลล์ล้วนมีความแตกต่างทางสถิติต่อกัน ($P < 0.05$) แต่เมื่อตัวอ่อนสามารถเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะมอูลตาแล้วก็จะสามารถเจริญเข้าสู่ระยะบลาสโตซิสต์ได้ ตัวอ่อนกลุ่มควบคุมสามารถเจริญระยะมอูลตาและบลาสโตซิสต์ได้มากที่สุด คือ 33 ตัวอ่อน (28.45%) รองลงมาคือกลุ่ม Microdrop (16.67%) และที่น้อยที่สุดคือกลุ่ม Cryotop (2.99%) ซึ่งทั้งสามกลุ่มล้วนมีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) จากผลการทดลองพบว่าแม้ตัวอ่อนจากกลุ่ม Microdrop จะสามารถแบ่งตัวได้น้อยที่สุดในกลุ่ม แต่หลังจากเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้วตัวอ่อนสามารถเจริญเติบโตสู่ระยะมอูลตาและบลาสโตซิสต์ได้ดีกว่ากลุ่ม Cryotop

3.2.5 อัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อน SCNT และ PA ที่ผลิตจากโอโอไซท์แช่แข็ง

ผลการทดลองพบว่าอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนกลุ่ม Microdrop (32.0%) ที่นำไปทำโคลนนิ่ง (SCNT) มีอัตราการแบ่งตัวที่สูงกว่ากลุ่ม PA (12.12%) แต่ความแตกต่างดังกล่าวไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่การแบ่งตัวของตัวอ่อนกลุ่ม Cryotop (59.26%) ที่นำมาทำโคลนนิ่งมีอัตราการแบ่งตัวต่ำกว่าตัวอ่อนกลุ่ม PA (61.47%; $P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบตัวอ่อนที่พัฒนาเข้าสู่ระยะ 8 เซลล์ที่ผลิตจากโอโอไซท์แช่แข็งกลุ่ม Microdrop ที่พบว่าที่ระยะ 8 เซลล์ตัวอ่อนจากกลุ่ม SCNT (4.0%) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติต่อกลุ่ม PA (4.04%) แต่เฉพาะโอโอไซท์ที่นำมาทำ PA เท่านั้นที่ตัวอ่อนที่ใช้โอโอไซท์แช่แข็งด้วย Cryotop (2.99%) และ Microdrop (16.67%) สามารถเจริญเข้าสู่ระยะมอูลตาและบลาสโตซิสต์ได้ (ภาพที่ 2)

3.3 ข้อวิจารณ์

การแช่แข็งเซลล์สัตว์ด้วยวิธี vitrification เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว มีประสิทธิภาพ มีต้นทุนในการดำเนินการต่ำ เนื่องจากเทคนิคนี้ช่วยป้องกันไม่ให้เกิดผลึกน้ำแข็ง ทำให้เซลล์ที่ถูกแช่แข็งไม่ได้รับอันตรายจากผลึกน้ำแข็ง ซึ่งแตกต่างจากวิธีการลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆ ที่ต้องมีการเหนี่ยวนำ

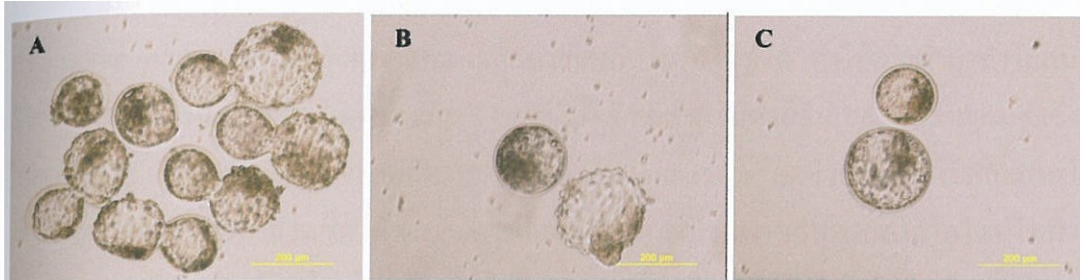
การเกิดผลึกน้ำแข็ง (Fahy และคณะ, 1984) อย่างไรก็ตาม การแช่แข็งด้วยวิธี vitrification จำเป็นต้องใช้ความเข้มข้นของ cryoprotectant ที่สูงมาก ดังนั้นมีโอกาสที่จะทำให้เซลล์ได้รับผลจากการเปลี่ยนแปลงของแรงดันออสโมติก และหากปล่อยให้เซลล์แช่อยู่ในน้ำยาดังกล่าวเป็นเวลานานจะทำให้เซลล์ได้รับอันตรายจากความเป็นพิษของสารที่ใช้เป็น cryoprotectant ซึ่งมีการศึกษาถึงความเข้มข้นของ cryoprotectant ที่นำมาใช้แล้วว่าสารตัวใดมีความเป็นพิษที่น้อยที่สุดต่อเซลล์ที่ระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการแช่แข็ง (Fuller และคณะ, 2004; Kuwayama และคณะ, 2005) มีการศึกษาและ

ตารางที่ 3 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อน SCNT และ PA ที่ผลิตจากโอโอไซท์แช่แข็งโดย Microdrop และ Cryotop

Treatment	No.Culture	Embryo development				
		Cleavage (%)	8 Cells (%)	Morula (%)	Blastocyst (%)	
SCNT	Fresh	75	61 ^b (81.33)	29 ^b (38.67)	23 ^a (37.70)	23 ^a (37.70)
	Microdrop	75	24 ^{cd} (32.0)	3 ^c (4.0)	0 ^b (0)	0 ^b (0)
	Cryotop	81	48 ^{bc} (59.26)	21 ^b (25.93)	0 ^b (0)	0 ^b (0)
PA	Fresh	121	116 ^a (95.87)	77 ^a (63.63)	33 ^a (28.45)	33 ^a (28.45)
	Microdrop	99	12 ^d (12.12)	4 ^c (4.04)	2 ^b (16.67)	2 ^b (16.67)
	Cryotop	109	67 ^b (61.47)	27 ^b (24.77)	2 ^b (2.99)	2 ^b (2.99)

SCNT: Somatic cell nuclear transfer

PA: Parthenogenetic activation



ภาพที่ 2 แสดงตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์อายุ 7 วัน จากกลุ่มโคลนนิ่งโดยใช้โอโอไซท์ที่ไม่ถูกแช่แข็ง (A) ตัวอ่อน PA จากการแช่แข็งด้วย Microdrop (B) และตัวอ่อนที่แช่แข็งด้วย Cryotop (C)

พัฒนาอุปกรณ์และวิธีการแช่แข็งที่ช่วยให้อัตราการรอดอุณหภูมิกัดได้อย่างรวดเร็ว เช่น Electron microscope grid (Martino และคณะ, 1996) Open pulled straw (OPS; Vajta และคณะ, 1998) Nylon loop (Lane และคณะ, 2001) และ Cryotop (Kuwayama และ Kato, 2000) ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยพบว่า การแช่แข็งโอโอไซท์โดยวิธี Microdrop และ Cryotop ส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อน การแช่แข็งโอโอไซท์จะมีความสำเร็จที่น้อยกว่าการแช่แข็งตัวอ่อน เนื่องจากโอโอไซท์ที่ระยะ MII สาย spindle fiber ภายในจะมีความอ่อนไหวต่ออุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไปและการแช่แข็งทำให้โอโอไซท์ได้รับความเสียหายจากความเย็นได้ง่ายกว่าตัวอ่อน (Shaw และคณะ, 2000) เนื่องจากการแช่แข็งด้วยวิธี vitrification ตัวอ่อนหรือโอโอไซท์จะอยู่ในน้ำยาแช่แข็งได้ในระยะสั้นๆ ดังนั้นน้ำยาแช่แข็งจึงต้องมีความเข้มข้นของ cryoprotectant ที่สูงเพื่อให้อัตราการซึมเข้าภายในเซลล์เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเพียงพอที่จะไม่ทำให้เซลล์ได้รับอันตรายจากความเป็นพิษของ cryoprotectant และมีความเข้มข้นที่เพียงพอที่จะทำให้เซลล์ไม่ได้รับอันตรายหลังจากการแช่แข็ง และต้องมีการลดอุณหภูมิต่างรวดเร็วเพื่อให้การลดอุณหภูมิจำเป็นที่จะไม่ทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งเกิดขึ้นในขบวนการแช่แข็งโดยวิธี vitrification ซึ่งการแช่แข็งโอโอไซท์โดยใช้ Microdrop, SSV และ Cryotop สามารถทำให้อัตราเร็วของอุณหภูมิลดลงเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งช่วยให้ไม่เกิดผลึกน้ำแข็งเกิดขึ้นในระหว่างการแช่แข็ง (Papis และคณะ, 2000; Kuwayama และ Kato, 2000; Dinnyés และคณะ, 2000) Cryotop โอโอไซท์หรือตัวอ่อนจะถูกวางไว้ที่ปลายแผ่นพลาสติกบางๆ และมีปริมาณน้ำยาประมาณเพียง 1 µl ที่ปิดโอโอไซท์หรือตัวอ่อนอยู่ ซึ่งมีปริมาณที่น้อยมาก ซึ่งช่วยให้การลดอุณหภูมิกัดขึ้นได้อย่างรวดเร็วภายหลังจากจุ่ม Cryotop ลงในไนโตรเจนเหลวแล้ว (Kuwayama และ Kato, 2000) วิธี Microdrop โอโอไซท์หรือตัวอ่อนจะถูกหยดลงในไนโตรเจนพร้อมกับน้ำยาแช่แข็งปริมาณ 2 µl ซึ่งจะช่วยให้อัตราการลดอุณหภูมิกัดได้อย่างรวดเร็ว (Papis และคณะ, 2000) ส่วนวิธี SSV เป็นวิธีการประยุกต์จากวิธี Microdrop โดยการให้ Microdrop ตกบนผิวหน้าที่เย็นจัดที่โผล่พ้นไนโตรเจนเหลวของแท่งอลูมิเนียมที่แช่อยู่ในไนโตรเจนเหลว ซึ่งจะช่วยให้การถ่ายเทอุณหภูมิกัดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว

เช่นเดียวกัน (Dinnyés และคณะ, 2000) ผลการทดลองที่ได้พบว่าการแช่แข็งโอโอไซท์ด้วย Microdrop และ Cryotop ยังคงเกิดความเสียหายขึ้นกับโอโอไซท์โค ทำให้เมื่อนำมาทำโคลนนิ่งตัวอ่อนจึงไม่สามารถเจริญเติบโตผ่านระยะ 8 เซลล์ไปได้ แต่สำหรับตัวอ่อน PA พบว่าการแช่แข็งโอโอไซท์โคด้วย Microdrop จะลดอัตราการแบ่งตัวในระยะแรก แต่ตัวอ่อนยังคงมีศักยภาพในการเจริญเติบโตสู่ระยะบลาสโตซิสได้ การศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่า การแช่โอโอไซท์ในน้ำยาที่มี cryoprotectant อย่างเดียวโดยไม่ได้แช่ในไนโตรเจนเหลวหรือการแช่แข็งโอโอไซท์ระยะ MII จะกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่คล้ายกับขบวนการปฏิสนธิ คือการเกิดการเปลี่ยนแปลงของ zona pellucida ที่หนาและแข็งขึ้น ซึ่งเมื่ออสุจิปฏิสนธิกับโอโอไซท์แล้ว zona pellucida จะหนาขึ้นเพื่อป้องกันไม่ให้อสุจิตัวอื่นเข้ามาได้และ/หรืออาจกระตุ้นให้โอโอไซท์เจริญเติบโตได้ โดยไม่ต้องเกิดขบวนการปฏิสนธิ (Parthenogenetic activation) ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าวมีรายงานในสัตว์หลายชนิด (Carroll และคณะ, 1990; Somfai และคณะ, 2007; Van der Elst J และคณะ, 1992; Larman และคณะ, 2006; Matson และคณะ, 1997; Tian และคณะ, 2007)

การแช่แข็งโอโอไซท์เป็นหัวข้อการศึกษาที่ยังคงมีผู้สนใจมากมายเพื่อแช่แข็งโอโอไซท์ ให้ยังคงศักยภาพในการเจริญเติบโตใกล้เคียงกับโอโอไซท์ที่ไม่ถูกแช่แข็ง เพื่อที่จะสามารถเก็บไว้ใช้เป็นแหล่งรองรับการนำมาใช้ในอนาคต ซึ่งสามารถนำมาใช้สำหรับทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว การทำโคลนนิ่ง (Booth และคณะ, 1999; Atabay และคณะ, 2004; Hou และคณะ, 2005; Yang และคณะ 2008) แต่จนถึงปัจจุบันการศึกษากการแช่แข็งโอโอไซท์เพื่อทำโคลนนิ่งยังคงไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร แม้แต่ตัวอ่อนที่ผลิตจาก PA เองก็ยังคงไม่มีศักยภาพที่จะเจริญเติบโตได้เหมือนโอโอไซท์ที่ไม่ถูกแช่แข็ง การแช่แข็งโอโอไซท์นั้นค่อนข้างยากลำบากเนื่องจากขนาดของเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ ประกอบกับมีปริมาณน้ำภายในเซลล์สูงทำให้โอโอไซท์เสียหายได้ง่ายภายใต้อุณหภูมิต่างๆ ในระหว่างการแช่แข็ง และการแช่แข็งโอโอไซท์ที่ยากกว่าการแช่แข็งตัวอ่อนระยะคัพพะ (Zygote) เนื่องจากความเสียหายต่อ Spindle microtubule ในระยะ Metaphase เกิดการเสียหายได้ง่าย (Martino และคณะ 1996) อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการแช่แข็งโอโอไซท์ที่ไม่มีผลต่อความสำเร็จในการ enucleation, injection และ fusion แต่อย่างไรก็ตามการแช่แข็งมีผลกระทบต่ออัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนเมื่อเทียบกับตัวอ่อนที่ผลิตจากโอโอไซท์ที่ไม่ถูกแช่แข็ง Yang และคณะ (2008) รายงานการแช่แข็งโอโอไซท์โดยใช้ Microdrop ว่าอัตราการรอดหลังแช่แข็งและละลายโอโอไซท์คือ 92.5% ซึ่งใกล้เคียงกับการทดลองในครั้งนี้ เมื่อนำโอโอไซท์ดังกล่าวมาทำ PA มีตัวอ่อนแบ่งตัว 46.5% และเจริญเติบโตจนถึงระยะบลาสโตซิส 11.1% จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่า อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนจากการทดลองของ Yang และคณะ (2008) มีอัตราที่สูงกว่าการทดลองนี้ แต่อย่างไรก็ตามอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนสู่ระยะบลาสโตซิสของ PA ยังคงต่ำกว่าการทดลองในครั้งนี้ ซึ่งสามารถผลิตตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสจากโอโอไซท์แช่แข็งได้ 16.67%

การแช่แข็งโอโอไซท์ระยะ MII ยากกว่าแช่แข็งตัวอ่อนเนื่องจาก spindle fiber ของโอโอไซท์ระยะ MII ค่อนข้างเสียหายง่ายเมื่อทำการแช่แข็ง (Chilling injury; Shaw และคณะ 2000) ดังนั้น อัตราความสำเร็จในการแช่แข็งจึงขึ้นอยู่กับอัตราเร็วในการลดอุณหภูมิ และความเข้มข้นของ cryoprotectant ที่ใช้ มีรายงานว่า การแช่แข็งโดยใช้ Microgrids และ Nylon slush มีอัตราเร็วในการลดอุณหภูมิประมาณ 24,000 °C/นาทีก และวิธี OPS มีอัตราเร็วในการลดอุณหภูมิลดลงประมาณ 22,500 °C/นาทีก (Hochi และคณะ 2001; Vajta, 2000) ดังนั้นผลการแช่แข็งโอโอไซท์ด้วย Cryotop และ Microdrop จึงมีโอโอไซท์ที่มีชีวิตในอัตราที่สูงกว่ารายงานอื่น โดย Atabay และคณะ (2004) รายงานว่าหลังการแช่แข็งมีโอโอไซท์รอด 80% Dinnyes และคณะ (2000) รายงานอัตราการรอดของโอโอไซท์ที่แช่แข็งโดย SSV ว่ามีโอโอไซท์รอดหลังการแช่แข็ง อยู่ระหว่าง 79-85% อย่างไรก็ตามจากอัตราการรอดที่สูงหลังจากแช่แข็งและละลายของโอโอไซท์ แต่ตัวอ่อนไม่มีศักยภาพค่อนข้างต่ำในการการเจริญเติบโตเข้าสู่ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ น่าจะมีสาเหตุมาจากการบาดเจ็บที่ไม่ส่งผลกระทบต่อรุนแรงจนทำให้โอโอไซท์ตายในทันที แต่ส่งผลให้โอโอไซท์ดังกล่าวหยุดการเจริญเติบโตในระยะต่อมา ซึ่งสาเหตุน่าจะเกิดจากความเสียหายของ meiotic spindle และ cytoskeleton (Chen และคณะ, 2003; Albarracín และคณะ, 2005) ความเสียหายของ organelles ต่างๆ เช่น mitochondria หรือ endoplasmic reticulum (Fuku และคณะ, 1995; Rho และคณะ, 2002; Lowther และคณะ, 2009) การเสื่อมสลายลงของระดับ mRNA ในไซโตพลาสซึม (Succu และคณะ, 2008) ซึ่งเป็นสาเหตุที่สามารถพบได้ในการแช่แข็งโอโอไซท์ ซึ่งการศึกษาเพื่อพัฒนาการแช่แข็งเพื่อลดความเสียหายดังกล่าวจึงมีความจำเป็น ซึ่งจะช่วยให้อัตราการรอดและอัตราการเจริญเติบโตหลังการปฏิสนธิหลังการแช่แข็งเพิ่มสูงมากยิ่งขึ้น

จากผลการทดลองครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าการแช่แข็งโดยใช้ Microdrop และ Cryotop เพื่อใช้เป็นแหล่งสำหรับการทำโคลนนิงนั้นจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติม เพื่อให้ได้โอโอไซท์หลังการแช่แข็งที่มีศักยภาพที่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้

บทที่ 4

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

การแช่แข็งโอโอไซท์เป็นงานวิจัยที่ยังคงมีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย โดยมุ่งเน้นให้โอโอไซท์ที่ถูกแช่แข็งยังคงศักยภาพในการเจริญเติบโตต่อไปได้หลังถูกละลาย ซึ่งประโยชน์จากงานวิจัยสามารถนำไปใช้ในการแช่แข็งโอโอไซท์สำรองไว้ใช้ได้ในอนาคต จากการทดลองแช่แข็งโอโอไซท์โคเพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งในการผลิตตัวอ่อนด้วยวิธีปฏิสนธิในหลอดแก้วพบว่า โอโอไซท์หลังละลายมีอัตราการรอดมากกว่า 90% นอกจากนี้อัตราการปฏิสนธิยังไม่มี ความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มโอโอไซท์แช่แข็งและกลุ่มควบคุม แต่การแช่แข็งด้วยวิธี SSV ยังมีผลต่ออัตราการแบ่งตัวในระยะแรก แต่เมื่อเลี้ยงตัวอ่อนจนเข้าสู่ระยะบลาสโตซิสพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และไม่มีความแตกต่างของปริมาณเซลล์ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มแช่แข็ง จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าการแช่แข็งโอโอไซท์โดยวิธี SSV และ Cryotop สามารถนำมาใช้ในการแช่แข็งโอโอไซท์โคเพื่อใช้ในการผลิตตัวอ่อนด้วยวิธีปฏิสนธิในหลอดแก้วได้ สำหรับการทดลองในอนาคตจะมีการทดลองในการย้ายฝากตัวอ่อนให้ตัวรับเพื่อศึกษาอัตราการตั้งท้องและคลอดต่อไป โดยจะทำการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบกับ การย้ายฝากตัวอ่อนที่ผลิตจากโอโอไซท์ที่ไม่ถูกแช่แข็ง เปรียบเทียบกับตัวอ่อนที่ผลิตจากโอโอไซท์แช่แข็ง โดยจะศึกษาว่าการแช่แข็งโอโอไซท์มีผลกระทบต่ออัตราการตั้งท้องและคลอดหรือไม่ สำหรับการแช่แข็งโอโอไซท์โคเพื่อใช้เป็นแหล่งในการทำโคลนนิ่งนั้นพบว่าจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปเพื่อให้ได้ตัวอ่อนที่สามารถเจริญเติบโตสู่ระยะบลาสโตซิสที่สูงเพิ่มมากขึ้น

บรรณานุกรม

- รังสรรค์ พาลพ่าย เกรียงศักดิ์ ทาศรีภู และ มณีวรรณ กมลพัฒนะ. 2543a. ความเป็นไปได้ในการผลิตโค พันธุ์ดีด้วยเทคโนโลยีโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ. **การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38** สาขาสัตว์ 1-4 กุมภาพันธ์ 2543.
- รังสรรค์ พาลพ่าย เกรียงศักดิ์ ทาศรีภู และ มณีวรรณ กมลพัฒนะ. 2543b. การโคลนนิ่งตัวอ่อนกระป๋องปลักโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากลูกอ่อนเป็นเซลล์ต้นแบบ. **การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตร ศาสตร์ ครั้งที่ 38** สาขาสัตว์ 1-4 กุมภาพันธ์ 2543.
- รังสรรค์ พาลพ่าย และ สรรพชญ โสภณ. 2530. เทคนิคการย้ายฝากตัวอ่อนในโคโดยวิธีไม่ผ่าตัด. มณีวรรณ กมลพัฒนะ (บรรณาธิการ). **การปฏิสนธิในหลอดแก้วและการย้ายฝากตัวอ่อน**. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. หน้า 133-158.
- รังสรรค์ พาลพ่าย ชูติ เหล่าธรรมธร จันทรเจ้า สือทองพานิชย์ สุจิตรา หมื่นไธสง ธวัชชัย เวชยันต์ เสวียน สัมหวาน เพลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาติตั้ง สุริยา กิจสำเร็จ และ สมบัติ ศิริอุดม เศรษฐ. 2547. การใช้เทคโนโลยีโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดี. **การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42** สาขาสัตว์.
- Albarracín JL, Morató R, Rojas C, Mogas T. 2005. Effects of vitrification in open pulled straws on the cytology of *in vitro* matured prepubertal and adult bovine oocytes. **Theriogenology** 63: 890–901.
- Atabay, E.C., Takahashi, Y., Katagiri, S., Nagano, M., Koga, A., Kanai, Y. 2004. Vitrification of bovine oocytes and its application to intergeneric somatic cell nuclear transfer. **Theriogenology** 61: 15–23.
- Baguisi, A., Behboodi, E., Melican, D.T., Pollock, J.S., Destrempe, M.M., Cammuso, C., Williams, J.L. Nims, S.D., Porter, C.A., Midura, P., Palacios, M.J., Ayres, S.L., Denniston, R.S., Hates, M.L., Ziomek, C.A., Meade, H.M., Godke, R.A., Gavin, W.G., Overstrom, E.W. and Echelard, Y. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. **Nat. Biotechnology** 17: 456-461.
- Bondioli, K.R., Westhusin, M.E. and Looney, C.R. 1990. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. **Theriogenology** 33: 165-174.
- Bondioli, K.R. 1993. Nuclear transfer in cattle. **Mol.Reprod.Dev.** 36: 274-275.

- Booth, P.J., Vajta, G., Hoj, A., Holm, P., Jacobsen, H., Greve, T., Callesen, H. 1999. Full-term development of nuclear transfer calves produced from open-pulled straw (OPS) vitrified cytoplasts: work in progress. **Theriogenology** 51:999–1006.
- Carroll J, Depypere H, Matthews CD. 1990. Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. **J Reprod Fert** 90: 547–553.
- Chang, W.C., Xu, J., Jiang, S., Tian, X.C., Yang, X., and Du, F.L. 2004. Effect of pre-equilibration procedures on the development potential of vitrified bovine oocytes after IVF. **Reprod.Fertil.Steril.** 16: 166.
- Chen SU, Lien YR, Chao KH, Ho HN, Yang YS, Lee TY. 2003. Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing-a review article. **Mol Cell Endocrinol** 202: 101–107.
- Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F.A. and Robl, J.M. 1998. Clones transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. **Science** 280: 1256-1258.
- Dinnyés A, Dai Y, Jiang S, Yang X. 2000. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. **Biol Reprod** 63: 513–518.
- Dominko T., Mitalipova M., Haley B., Beyman Z., Memili E., and N. First. (1998). Bovine oocyte as a universal recipient cytoplasm in mammalian nuclear transfer. **Theriogenology** 49 : 389.
- Dinnyes, A., Dai, Y., Jiang, S., and Yang, X. 2000. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. **Biol. Reprod.** 63: 513-518.
- Fahy GM, McFralane DR, Angell CA, Meryman HT. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology** 21: 407–426.
- Farin P.W., and C.E. Farin.,(1995) Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: Survival and fetal development. **Biol. Reprod.** 52 : 676-682.
- Fuku E, Xia L, Downey BR. 1995 Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. **Cryobiology** 2: 139–156.

- Fuller B, Paynter S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. 2004. **Reprod Biomed Online** 9: 680–691.
- Gardner, D.K., Lane, M. and Batt, P. 1994. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: Amino acids, vitamins and culturing embryos in groups stimulate development. **Biol.Reprod.** 50: 390-400.
- Hochi, S., Mitsuhiro, A., Minagawa, G., Kimura, K., Hanada, A. 2001. Effects of cooling and warming rates during vitrification on fertilization of *in vitro*-matures bovine oocytes. **Cryobiology** 41: 69–73.
- Hou, Y.P., Dai, Y.P., Zhu, S.E., Zhu, H.B., Wu, T.Y., Gong, G.C., Wang, H.P., Wang, L.L., Liu, Y., Li, R., Wan, R., Li, N. 2005. Bovine oocytes vitrified by the open pulled straw method and used for somatic cell cloning supported development to term. **Theriogenology** 64:1381–1391.
- Illmensee, K. and Hoppe, P.C. 1981. Nuclear transplantation in *Mus musculus* : Developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. **Cell** 23: 9-18.
- Inaba, Y., Dochi, O., and Koyama, H. 2004. Effect of using micro-pipette tips of different diameters and volume of vitrification solution on the viability of IVM bovine oocytes after vitrification. **Reprod.Fertil.Steril.** 16 :171.
- Isachenko, V., Alabart, J.L., Nawroth, F., Isachenko, E., Vajta, G., and Folch, J. 2001. The open pulled straw vitrification of ovine GV-oocytes: positive effect of rapid cooling or rapid thawing or both?. **Cryo-Letters** 22: 157-162.
- Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H. and Tsunoda, Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. **Science** 282: 2095-2098.
- Keefer, C.L., Keyston, R., Lazaris, A., Bhatia, B., Begin, I., Bilodeau, A.S., Zhou, F.J., Kafidi, N., Wang, B., Baldassarre, H. and Karatzas, C.N. 2002. Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. **Biol. Reprod.** 66: 199-203.
- Kuwayama M, Kato O. 2000. All-round vitrification method for human oocytes and embryos. **J Assist Reprod Genet** 17: 477 (abstract).
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. 2005. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Reprod Biomed** 300: 308 (abstract).

- Lane, M., and Gardner, D.K. 2001. Vitrification of mouse oocytes using a nylon loop. **Mol. Reprod. Dev.** 58: 342-347.
- Lanza R.P., Cibelli, J.B., Daiz, F., Moraes, C.T., Farin, P.W., Farin C.E., Hammer C.J., Weat, M.D., and P. Damiani.,(2000). Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. **Cloning 2** :79-90.
- Larman MG, Sheehan CB, Gardner DK. 2006. Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes. **Reproduction** 131: 53–61.
- Laowtammathron C, Lorthongpanich C, Ketudat-Cairns M, Hochi S, Parnpai R. 2005. Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: effects of hatching stage, linoleic acid-albumin in IVC medium and Ficoll supplementation to vitrification solution. **Theriogenology** 64: 1185-1196.
- Liebermann, J., and Tucker, M.J. (2002). Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification. **Reproduction** 124: 483-489.
- Lowther KM, Weitzman VN, Maier D, Mehlmann LM. 2009. Maturation, fertilization, and the structure and function of the endoplasmic reticulum in cryopreserved mouse oocytes. **Biol Reprod** 81: 147-154.
- Martino, A., Songsasen, N., and Leibo, S.P. (1996). Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biol. Reprod.** 24: 1059-1069.
- Matson PL, Graefling J, Junk SM, Yovich JL, Edirisinghe WR. 1997. Cryopreservation of oocytes and embryos: use of a mouse model to investigate effects upon zona hardness and formulate treatment strategies in an *in vitro* fertilization programme. **Hum Reprod** 12: 1550–1553.
- Matsumoto, H., Jiang, J.Y., Tanaka, T., Sasada, H., and Sato, E. 2001. Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. **Cryobiology** 42: 139-144.
- Men, H., Monson, R.L., and Rutledge, J.J. 2002. Effect of meiotic stages and maturation protocols on bovine oocyte's resistance to cryopreservation. **Theriogenology** 57: 1095 -1103.
- Morató R, Izquierdo D, Paramio MT, Mogas T. 2008. Cryotop versus open-pull straw (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: Effect on spindle and chromosome configuration and embryo development. **Cryobiology** 57: 137–141.

- Onishi, A., Iwamoto, M., Akita, T., Mikawa, S., Takeda, K., Awata, T., Hanada, H., Perry, A.C.F. 2000. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. **Science** 289: 1188-1190.
- Papis, K., Shimizu, M., and Izaïke, Y. 2000. Factor effect on the survival of bovine oocytes vitrified in droplets. **Theriogenology** 54: 651-658.
- Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 1999. Development of cloned swamp buffalo embryos derived from fetal fibroblasts: comparison *in vitro* cultured with or without buffalo and cattle oviductal epithelial cells. **Buffalo J.** 15: 371-384.
- Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 2000a. Developmental potential of cloned bovine embryos derived from quiescent and non-quiescent adult ear fibroblasts after different activation treatments. **Theriogenology** 53: 239.
- Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 2000b. Comparison of cloning swamp buffalo embryos using fetal fibroblasts and granulosa cells as donor cells. **Proceeding of the 14th International Congress on Animal Reproduction**. Stockholm, July 2-6, 2000. Abstract Vol. 2: 241.
- Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 2001. Cloning of pig embryo by using ear fibroblasts and tail muscle cells as donor nuclei : Effect of time after maturation and fusion parameters on the rate of fusion and development of embryo. **Thai J.Agric.Sci.** 34: 187-194.
- Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 2002. Comparison of cloning efficiency in bovine and swamp buffalo embryo using fetal fibroblasts ear fibroblasts and granulosa cells. **Theriogenology** 57: 443.
- Parnpai, R. and Tasripoo, K. 2003. Effects of different activation protocols on the development of cloned swamp buffalo embryos derived from granulosa cells. **Theriogenology** 59: 279.
- Polejaeva, I.A., Chen, S-H., Vaught, T.D., Page, R.L., Mullins, J.B., Dai, Y., Boone, J., Walker, S., Ayares, D.L., Colman, A. and Campbell, K.H.S. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nature** 407: 86-90.
- Prather, R.S., Barnes, F.L., Sim, M.M., Robl, J.M. Eystone, W.H. and First, N.L. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryos: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. **Biol.Reprod.** 37: 859-866.
- Prather, R.S., Sim, M.M. and First, N.L. 1989. Nuclear transplantation in early pig embryos. **Biol.Reprod.** 41: 414-418.

- Rall, W.F., and Fahy, G.M. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. **Nature** 313: 573-575.
- Reggio, B.C., James, A.N., Green, H.L., Gavin, W.G., Behboodi, E., Echelard, Y. and Godke, R.A. 2001. Cloned transgenic offspring resulting from somatic cell nuclear transfer in the goat: oocytes derived from both follicle-stimulating hormones-stimulated and nonstimulated abattoir-derived ovaries. **Biol.Reprod.** 65: 1528-1533.
- Rho GJ, Kim S, Yoo JG, Balasubramanian S, Lee HJ, Choe SY. 2002. Microtubulin configuration and mitochondrial distribution after ultra-rapid cooling of bovine oocytes. **Mol Reprod Dev** 4: 464-470.
- Seidel, G.E. 1995. Sexing, bisection and cloning embryo: perspectives and applications to animal breeding. In: **Proc. of Symposium on Reproduction and Animal Breeding**, Milan, pp. 147-154.
- Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO. 2000. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology** 53: 59-72.
- Shin, T., S., Kraemer, D., Pryor, J., Lui, I., Rugila, J., Howe, L., Buck, S., Murphy, K. Lyons, L. and Westhusin, M.W. 2002. Nature published online. 14 February 2002. **Nature** 723.
- Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Karja NWK, Farhudin M, Dinnyes A, Nagai T, Kikuchi K. 2007. Developmental competence of *in vitro*-fertilized porcine oocytes after *in vitro* maturation and solid surface vitrification: Effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage. **Cryobiology** 55: 115-126.
- Stice, S.L. and Keefer, C.L. 1993. Multiple generation bovine embryo cloning. **Biol.Reprod.** 48: 715-719.
- Succu S, Bebbere D, Bogliolo L, Ariu F, Fois S, Leoni GG, Berlinguer F, Naitana S, Ledda S. 2008. Vitrification of *in vitro* matured ovine oocytes affects *in vitro* pre-implantation development and mRNA abundance. **Mol Reprod Dev** 3: 538-546.
- Tian SJ, Yan CL, Yang HX, Zhou GB, Yang ZQ, Zhu SE. 2007. Vitrification solution containing DMSO and EG can induce parthenogenetic activation of *in vitro* matured ovine oocytes and decrease sperm penetration. **Anim Reprod Sci** 101: 365-371.
- Van der Elst J, Van den Abbeel E, Nerinckx S, Van Steirteghem A. 1992. Parthenogenetic activation pattern and microtubular organization of mouse oocyte after exposure to 1,2-propanediol. **Cryobiology** 29: 549-562.

- Vajta, G., 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Anim. Reprod. Sci.** 2:357-364.
- Vajta, G., Booth, P.J., Holm, P., Greve, T., and Callesen, H. 1997. Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. **Cryo-Letters** 18: 191-195.
- Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, M., Booth, P.J., Jacobsen, H., Greve, T., and Callesen, H. 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Mol. Reprod. Dev.** 51: 53-58.
- Vanderzwalmen, P, Bertin, G., Debauche, C.H., Standaert, V., and Schoysman, R. (2000). *In vitro* survival of metaphase II oocytes and blastocysts after vitrification in an Hemi Straw (HS) system. **Fertil. Steril.** 74: 215.
- Vignon, X., LeBourthis, D., Chesne, P., Marchal, J., Heyman, Y. and Renard, J.P. 1999. Development of bovine nuclear transfer embryos reconstituted with quiescent and proliferative skin fibroblasts. **Theriogenology** 51: 216.
- Wells, D.N., Misica, P.M. and Tervit, H.R. 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. **Biol.Reprod.** 60: 996-1005.
- Wakayama, T., Perry, A.C., Zuccotti, M. Jonhson, K.R. and Yanagimachi, R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. **Nature** 394: 369-374.
- Willadsen, S.M. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. **Nature** 320: 63-65.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J. and Campbell, K.S.H. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature** 385: 810-813.
- Yang BC, Im GS, Kim DH, Yang BS, Oh HJ, Park HS, Seong HH, Kim SW, Ka HH, Lee CK. 2008. Development of vitrified-thawed bovine oocytes after *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. **Anim Reprod Sci.** 103:25-37.
- Zakhartchenko, V., Durcova-Hills, G., Stojkovic, M., Schernthaner, W., Prelle, K., Steinborn, R., Muller, M., Brem, G. and Wolf, E. 1999. Effects of serum starvation and re-cloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts. **J.Reprod.Fert.** 115: 325-331.

ภาคผนวก ก

การเผยแพร่ผลงานวิจัยในระดับชาติ และนานาชาติ

1. Sripunya N, Somfai T, Inaba Y, Nagai T, Imai K, Parnpai R. 2010. A comparison of cryotop and solid surface vitrification methods for the cryopreservation of in vitro matured bovine oocytes. **J Reprod Dev.** 56:176-181.

—Technical Note—

A Comparison of Cryotop and Solid Surface Vitrification Methods for the Cryopreservation of *In Vitro* Matured Bovine Oocytes

Nucharin SRIPUNYA^{1,2)}, Tamás SOMFAI^{2,3)}, Yasushi INABA^{2,3)}, Takashi NAGAI³⁾, Kei IMAI²⁾ and Rangsun PARNPAI¹⁾

¹⁾Embryo Technology and Stem Cell Research Center, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand, ²⁾National Livestock Breeding Center, Fukushima 961-8511 and ³⁾National Institute of Livestock and Grassland Science, Ibaraki 305-0901, Japan

Abstract. The aim of the present study was to compare the efficacies of the cooling systems of the solid surface (SSV) and Cryotop vitrification methods for cryopreservation of bovine oocytes at the metaphase II stage. The effects of vitrification on oocyte viability, *in vitro* fertilization (IVF), pronucleus formation and subsequent *in vitro* development were assessed. *In vitro* matured (IVM) bovine oocytes were subjected to equilibration and vitrification solutions according to the SSV method, and then the oocytes were vitrified either by dropping onto a cold dry metal surface (SSV group) or by plunging into liquid nitrogen on Cryotop sheets (Cryotop group). Warming was conducted according to the SSV method. Some oocytes were subjected to the cryoprotectants and warming regimen without cooling (Solution control group). The live/dead status of oocytes was evaluated by fluorescein diacetate staining. Live oocytes were subjected to IVF, and the resultant embryos were cultured *in vitro*. The rates of live oocytes were similar among the Fresh control, Solution control, SSV and Cryotop groups. There was no difference in the rates of fertilization, pronuclear formation and monospermy among these groups. The cleavage rates in the SSV and Cryotop groups (41.6 and 53.2%, respectively) were significantly lower than those in the Fresh control and Solution control groups (65.9 and 71.3%, respectively). The blastocyst rates in SSV and Cryotop groups did not differ (10.3 and 12.8%, respectively); however, they were significantly lower than those in the Fresh control and Solution control groups (36.4 and 24.8%, respectively). The inner cell mass, trophoctoderm and total cell numbers in blastocysts did not differ significantly among the Fresh control, Solution control, SSV and Cryotop groups. Our results indicate that IVM bovine oocytes could be cryopreserved successfully using the cooling systems of the Cryotop and Solid Surface Vitrification methods with similar efficacy.

Key words: Bovine, Cryotop, Oocyte, Solid surface vitrification, Vitrification

(J. Reprod. Dev. 56: 176–181, 2010)

Cryopreservation of bovine oocytes is of great importance in the preservation of female genetic resources. Cryopreserved oocytes can be used for *in vitro* fertilization (IVF), nuclear transfer and genetic manipulation. Rall and Fahy [1] were the first to report vitrification, a glass-like solidification, by ultra-rapid cooling of mouse embryos, showing an alternative to traditional freezing methods to avoid chilling injury and ice crystal formation. Vitrification has been widely applied to cryopreserve oocytes in other mammalian species including cattle [2], pigs [3], sheep [4], goats [5], horses [6], buffalo [7], cats [8] and humans [9].

In general, oocytes are more susceptible to cooling damage than zygotes because metaphase spindle microtubule integrity is disrupted during cooling and the high concentration of cryoprotectants affects oocytes during equilibration [10]. Also, differences in the membrane structures seem to make oocytes more sensitive to chilling compared with zygotes [11]. Although the toxicity of cryoprotectants can be minimized by increasing the cooling rate [12], other side effects of cooling and cryoprotectants such as zona

hardening and parthenogenetic activation may affect fertilization results and cause low development rates to the blastocyst stage [12, 13]. Successful vitrification of oocytes requires pretreatment with permeating cryoprotective agents (CPAs) at a relatively low concentration before the final treatment with a vitrification solution containing high concentrations of permeating and non-permeable CPAs. The low intracellular CPA level of the pretreated oocytes would be concentrated to a higher level by severe dehydration in the vitrification solution, which is a key factor in avoiding intracellular ice formation during the subsequent cooling using liquid nitrogen [14]. Practical use of vitrification to preserve bovine oocytes is still limited since vitrified oocytes seem to exhibit an impaired developmental competence after *in vitro* fertilization. Several methods had been developed to achieve rapid cooling by minimizing the volume of vitrification solution containing oocytes and embryos, such as vitrification with electron microscope grids [2], glass capillaries [15], open pulled straws [16], cryoloops [17], Cryotops [9] and solid surface vitrification (SSV) [18]. These methods differ in CPA composition and treatment regimen and also in the methods for cooling and storing the preserved specimens. Two methods, the SSV and Cryotop vitrification methods have been reported to be highly efficient for cryopreservation of bovine oocytes [18, 19]. These methods have different cooling strategies

Received: June 19, 2009

Accepted: September 8, 2009

Published online in J-STAGE: October 8, 2009

© 2010 by the Society for Reproduction and Development

Correspondence: T Somfai (e-mail: somfai@affrc.go.jp)

and apply different cooling and carrier devices. The objective of this study was to compare the efficacies of the cooling systems of the SSV and Cryotop methods for cryopreservation of *in vitro* matured bovine oocytes in terms of oocyte survival fertilization and subsequent *in vitro* development of the resultant embryos.

Materials and Methods

Chemicals and media

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, USA), unless otherwise indicated.

Oocyte collection and *in vitro* maturation (IVM)

Collection and IVM of bovine follicular oocytes were performed as previously described [20]. Ovaries from approximately 28–32-month-old Japanese Black heifers were collected at a local slaughterhouse and transported to the laboratory. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were then aspirated from small follicles (2–6 mm in diameter) using a 5-ml syringe and a 19-gauge needle. The maturation medium consisted of 25 mM Hepes buffered TCM199 (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) and 5% calf serum (CS, GIBCO BRL). COCs were washed twice with the maturation medium and cultured for 20 h in 600- μ l droplets (in groups of 80–100/droplet) of the maturation medium covered with paraffin oil (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) in 35-mm plastic dishes (Nalge Nunc International, Roskilde, Denmark) at 38.5 C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air.

Oocyte vitrification

In vitro matured oocytes were partially denuded by a brief treatment with 0.1% (w/v) hyaluronidase followed by gentle pipetting through a fine glass pipette. Equilibration and cryoprotectant (Solution control) treatment were performed by the methods previously described by Dinnyes *et al.* [18]. Briefly, the oocytes were washed three times in a basic medium (BM), which was composed of 25 mM Hepes buffered TCM199 supplemented with 20% (v/v) fetal bovine serum (FBS, GIBCO BRL), and then treated with an equilibration medium which was composed of BM supplemented with 4% (v/v) ethylene glycol (EG), for 12 to 15 min at 38.5 C. Groups of 5–10 equilibrated oocytes were rinsed three times in 20- μ l droplets of a vitrification solution, which was composed of BM supplemented with 35% (v/v) EG, 50 mg/ml polyvinyl pyrrolidone and 0.4 M trehalose, for 30 sec and then either directly dropped with about 2 μ l vitrification solution onto the chilled dry surface of an aluminum foil floating on LN₂ (SSV group) [21] or placed on a sheet of a Cryotop (Kitazato Supply, Tokyo, Japan; Cryotop group) and plunged into LN₂ [9]. Vitrified oocytes were warmed without storage by transferring microdrops/Cryotops into a warming solution (0.3 M trehalose in BM) at 38.5 C. One to 2 min later, the oocytes were consecutively transferred for 1 min into 500- μ l droplets of BM supplemented with each of 0.15, 0.075 and 0.0375 M trehalose, respectively. They were washed three times in BM at 38.5 C and then returned into their original droplets of maturation medium and incubated for an additional 2 h at 38.5 C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air.

Evaluation of oocyte viability

At 2 h after warming, oocyte viability was evaluated by fluorescein diacetate (FDA) staining according to the method previously described by Mohr and Trounson [22]. Briefly, oocytes were treated with 2.5 μ g/ml FDA in PBS supplemented with 5 mg/ml bovine serum albumin (BSA) at 38.5 C for 2 min in a dark room and then washed three times in PBS supplemented with 5 mg/ml BSA and evaluated under an epifluorescence microscope (IX-71, Olympus, Tokyo, Japan) with UV irradiation using a U-MWIB3 filter with an excitation wavelength of 460–495 nm and emission at 510 nm. Oocytes expressing bright green fluorescence were regarded as living and used in subsequent experiments.

In vitro fertilization (IVF)

IVF of surviving oocytes was carried out as previously reported [20]. Briefly, frozen-thawed semen of a Japanese Black bull was thawed in a 37 C water bath for 30 sec and then centrifuged in 3 ml of a 90% Percoll solution at 740 \times g for 10 min. The pellet was re-suspended and centrifuged in 6 ml of sperm washing medium, which was composed of Brackett and Oliphant (BO) solution [23] supplemented with 10 mM hypotaurine and 4 U/ml heparin (Novo-Heparin Injection 1000, Aventis Pharma, Tokyo, Japan), at 540 \times g for 5 min. Then, the pellet was re-suspended with sperm washing solution and BO medium supplemented with 20 mg/ml BSA to achieve the final concentrations of 3 \times 10⁶ spermatozoa/ml, 5 mM hypotaurine, 2 U/ml heparin and 10 mg/ml BSA. One hundred μ l drops of this sperm suspension were prepared in 35-mm plastic dishes, covered with mineral oil and used as fertilization droplets. The oocytes were removed from the maturation medium, washed twice in BO medium supplemented with 10 mg/ml BSA, placed in the fertilization droplets (20 oocytes/droplet) and cultured for 6 h at 38.5 C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air with saturated humidity.

In vitro culture (IVC)

IVC was performed in 100 μ l droplets of CR1aa medium [24] supplemented with 5% CS covered with paraffin oil. At the end of insemination, putative zygotes were completely denuded from cumulus cells and spermatozoa by gentle pipetting with a fine glass pipette in preincubated IVC medium. Fifteen to twenty five zygotes were placed in each culture drop and then cultured at 38.5 C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air for 9 days. The day of IVF was considered to be Day 0.

Evaluation of fertilization events

At 16–18 h after insemination, some oocytes of each treatment group were mounted on glass slides and fixed with acetic alcohol (acetic acid 1:ethanol 3) for at least 3 days. The oocytes were stained with 1% (w/v) orcein in acetic acid, rinsed in glycerol:acetic acid:water (1:1:3) and then examined under a phase-contrast microscope. Oocytes with a female pronucleus were considered to be activated. Oocytes with a male pronucleus and/or sperm heads with the contributing sperm tails were classified as fertilized. The presence of one female and one male pronucleus was considered to indicate normal fertilization.

Evaluation of *in vitro* development

Embryo development was assessed by occasional viewing under a stereo microscope. Cleavage rates in each treatment group were recorded on Day 2. Since early developmental speed has been reported to predict developmental competence [25], the rates of embryos developing beyond the four cell stage were also recorded at this time. The rates of embryos developing to the blastocyst stage were recorded on Day 7, Day 8 and Day 9.

Blastocyst evaluation by differential staining of inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE) cells

Differential staining of ICM and TE nuclei in blastocysts was performed by the method previously described by Thouas *et al.* [26], with slight modifications. Briefly, blastocysts were simultaneously treated with 0.1 mg/ml propidium iodide (PI) and 0.2% Triton X-100 dissolved in Dulbecco's phosphate buffered saline for 60 sec to permeabilize the membrane and stain the nuclei of TE cells. The embryos were then treated with 25 µg/ml Hoechst 33342 (Calbiochem, San Diego, CA, USA) dissolved in 99.5% ethanol for 5 min, mounted on glass slides in glycerol droplets, flattened by cover slips and examined under UV light with an excitation wavelength of 330–385 nm using an epifluorescence microscope (IX-71, Olympus, Tokyo, Japan). The nuclei of TE cells labeled by both PI and Hoechst appeared pink or red, whereas the nuclei of ICM cells labeled only by Hoechst appeared blue. A digital image of each embryo was taken, and the cell numbers of both cell types were counted using the NIH Image J (v. 1.40) software [27]. Total cell numbers were counted in all embryos. The numbers of ICM and TE cells were counted separately in embryos that had clearly distinguishable populations of red and blue nuclei.

Experimental design

Four treatment groups were compared in this study; the Fresh control group consisted of *in vitro* matured oocytes without exposure to cryoprotectants or cooling. To assess cryoprotectant toxicity, oocytes were exposed to equilibration and vitrification treatments as described above, but without cooling, and subjected to the rehydration (warming) procedure (Solution control group). To compare cryodevice efficiency, *in vitro* matured oocytes were cryopreserved either by using Cryotop devices (Cryotop group) or SSV (SSV group). They were also warmed in the same manner as described above. The viability of oocytes in each group was compared 2 h after the treatments. Live oocytes were fertilized *in vitro*, and the resultant embryos were cultured *in vitro*. In each replication, a sample of 10 putative zygotes was selected randomly from each treatment group at 16–18 h after IVF to assess their fertilization status. The rest of the oocytes were subsequently cultured to compare *in vitro* development and blastocyst cell numbers.

Statistical analysis

Data for embryo development, fertilization and embryo cell numbers were arcsine transformed and analyzed by one-way ANOVA using the KyPlot package (Ver. 4.0, KyensLab, Tokyo, Japan). Five replications of the experiments were performed.

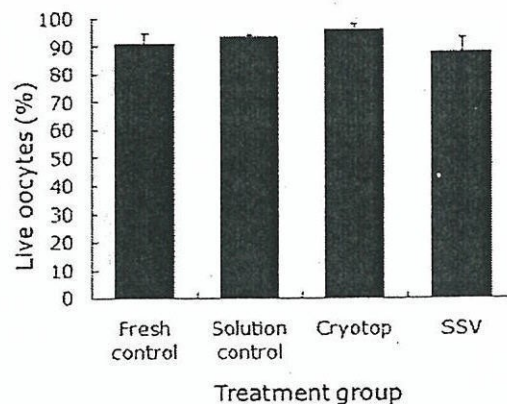


Fig. 1. Viability of oocytes after different treatments evaluated by FDA staining. The four treatment groups shown here are the Fresh control group (n=252), oocytes without treatment; Solution control group (n=249), oocytes pretreated with vitrification solution and recovered without cooling; Cryotop group (n=238), oocytes vitrified by the Cryotop method; and SSV group (n=239), oocytes vitrified by solid surface vitrification. Five replications were performed. No significant difference was detected among the treatment groups at $P < 0.05$ using one-way ANOVA.

Results

Effect of cooling device on viability of oocytes

The viability of oocytes selected by morphology was examined by FDA staining. The rates of live oocytes in the non-vitrified, Solution control and both vitrified groups were over 90% (Fig 1.). There was no significant difference in the rates of live oocytes after treatment among the Fresh control, Solution control, Cryotop and SSV groups.

Effect of cooling device on fertilization results after IVF of surviving oocytes

As shown in Table 1, there was no significant difference among the Fresh control, Solution control, SSV and Cryotop groups in the rates of fertilization and monospermy after IVF. The total fertilization rates of oocytes vitrified in the Cryotop and SSV groups were similar (78.0 and 64.0%, respectively) and did not differ significantly from those in the Fresh control and Solution control groups (54.0 and 62.0%, respectively). There was no significant difference in the percentage of activated oocytes among the Fresh control, Solution control, SSV and Cryotop groups (50.0, 58.0, 48.0 and 62.0%, respectively). The rates of normal fertilization of oocytes in the Fresh control and Solution control exposed groups (36.0 and 40.0%, respectively) were not significantly different from those of oocytes in the Cryotop and SSV groups (34.0 and 36.0%, respectively).

Effect of cooling device on *in vitro* development of surviving oocytes

As shown in Table 2, the cleavage rate in the SSV group was significantly lower compared with that of the Solution control group but did not differ from those of the Fresh control and Cryo-

Table 1. Fertilization status of oocytes at 18 h after IVF

Treatment	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes		
		Fertilized	Activated	Normal fertilization
Fresh control	50	27 (54.0 ± 9.7)	25 (50.0 ± 8.9)	18 (36.0 ± 11.2)
Solution control	50	31 (62.0 ± 11.1)	29 (58.0 ± 9.1)	20 (40.0 ± 8.3)
Cryotop	50	39 (78.0 ± 8.0)	31 (62.0 ± 6.6)	17 (34.0 ± 8.1)
SSV	50	32 (64.0 ± 7.4)	24 (48.0 ± 8.6)	18 (36.0 ± 12.0)

Five replications were performed. Data in parentheses are presented as means ± SEM. No significant difference was detected among the treatment groups at $P < 0.05$ using one-way ANOVA. Solution control: Oocytes were pretreated with vitrification solution and recovered without cooling. Cryotop: Oocytes were vitrified by the Cryotop method. SSV: Oocytes were vitrified by the solid surface vitrification method. Oocytes with a female pronucleus were considered to be activated. Oocytes with a male pronucleus(i) and/or sperm heads with the contributing sperm tails were classified as fertilized. The presence of one female and one male pronucleus was considered to indicate normal fertilization.

Table 2. *In vitro* development of control, CPA and vitrified oocytes after IVF

Treatment	No. of oocytes cultured	Day 2 *		Oocytes (%) developed to the blastocyst stage on		
		Cleaved	> 4 Cell	Day 7	Day 8 [#]	Day 9 [#]
Fresh control	175	117 (65.9 ± 10.9) ^{ab}	79 (45.1 ± 3.2) ^a	44 (25.3 ± 7.4) ^a	59 (33.1 ± 7.3) ^a	65 (36.4 ± 7.6) ^a
Solution control	171	106 (61.3 ± 5.9) ^a	80 (46.7 ± 8.2) ^a	31 (18.1 ± 2.6) ^a	40 (23.2 ± 3.1) ^a	43 (24.8 ± 3.9) ^{ab}
Cryotop	162	88 (53.2 ± 9.4) ^{ab}	68 (41.9 ± 7.3) ^{ab}	10 (6.1 ± 3.7) ^b	14 (8.7 ± 5.1) ^b	21 (12.8 ± 5.0) ^b
SSV	140	55 (41.6 ± 4.7) ^b	37 (26.4 ± 6.6) ^b	13 (8.0 ± 3.6) ^b	16 (9.8 ± 5.0) ^b	17 (10.3 ± 5.1) ^b

Five replications were performed. Data in parentheses are presented as means ± SEM. ^{ab} Different superscripts in the same column indicate a significant difference at $P < 0.05$ (one-way ANOVA). *The day of IVF was considered to be Day 0. [#] Cumulative values. Solution control: Oocytes were pretreated with vitrification solution and recovered without cooling. Cryotop: Oocytes were vitrified by the Cryotop method. SSV: Oocytes were vitrified by the solid surface vitrification method.

top groups. The percentages of embryos that developed beyond the 4-cell stage on Day 2 did not differ significantly between the Cryotop and SSV groups (41.9 and 26.4%, respectively); however, the percentage in the SSV group was significantly lower than that of the Fresh control group (45.1%). The rates of cleavage and embryo development to the blastocyst stage on Day 7, Day 8 and Day 9 were not significantly different between the Fresh control and Solution control groups. The blastocyst rates did not differ between Cryotop and SSV groups on Day 7 (6.1 vs. 8.0%, respectively), Day 8 (8.7 vs. 9.8%, respectively) and Day 9 (12.8 vs. 10.3%, respectively) but they were significantly lower than those of the Fresh control group (25.3, 33.1 and 36.4%, respectively).

Effect of cooling device on blastocyst quality

As shown in Table 3, there was no significant difference among the Fresh control, Solution control, SSV and Cryotop groups in the total numbers of nuclei in blastocysts, which ranged between 73.9 ± 12.5 and 90.9 ± 3.1 on Day 9. Similarly, no significant difference was found in the numbers of ICM and TE cells among the Fresh control, Solution control, SSV and Cryotop groups.

Discussion

Vitrification is a simple, rapid and cost-effective method for cryopreservation of mammalian cells. Using this method cryopreserved cells are less likely to experience solution effects and intracellular ice formation compared with the traditional method of slow cooling [28]. On the other hand, due to the high concentrations of cryoprotective agents the cells may be exposed to detrimental osmotic effects. Therefore, the period of exposure to CPAs before plunging into LN₂ is critical and should not be extended. High concentrations of CPA used for vitrification have been proven to be toxic to cells [29, 30]. However, in our study, CPA treatment did not affect survival and development of oocytes, suggesting that the present CPA treatment regimen is suitable for vitrification of M-II bovine oocytes. Metaphase II oocytes are more difficult to cryopreserve than embryos due to the temperature sensitive metaphase spindle and its susceptibility to chilling injury [31]. Thus, successful vitrification requires high concentrations of permeable cryoprotectants and a very rapid cooling rate, which can be provided by both the Cryotop and SSV methods [9, 18]. The Cryotop method applies a thin plastic sheet on which oocytes/embryos are placed with a minimum amount of vitrification solution before plunging into LN₂ [9]. On the other hand, the SSV

Table 3. Cell numbers in blastocysts developed from control, CPA and vitrified oocytes

Groups	No. of blastocysts evaluated	No. of nuclei \pm SEM		
		Total cells	TE	ICM
Fresh control	52	90.9 \pm 3.1	65.5 \pm 2.5	25.3 \pm 3.9
Solution control	39	83.4 \pm 5.9	52.7 \pm 4.9	30.5 \pm 3.2
Cryotop	17	77.9 \pm 14.3	46.1 \pm 12.5	31.8 \pm 2.8
SSV	13	73.9 \pm 12.5	46.5 \pm 17.0	27.4 \pm 4.4

Five replications were performed. No significant difference was detected among the treatment groups at $P < 0.05$ using one-way ANOVA. Solution control; Oocytes were pretreated with vitrification solution and recovered without cooling. Cryotop, Oocytes were vitrified by the Cryotop method. SSV; Oocytes were vitrified by the solid surface vitrification method.

method achieves a high cooling rate by using a combination of microdrops and improved heat exchange by direct contact with a dry metal surface cooled by LN₂ [18]. In this study, high survival and fertilization rates were achieved for vitrified oocytes by both the Cryotop and SSV methods, which enabled their subsequent *in vitro* development after IVF. The high survival rates and normal morphology of the vitrified-thawed bovine oocytes could have been achieved due to high rates of cooling and warming. Previous reports have shown that treatment with CPAs or cooling of M-II oocytes may trigger biochemical reactions similar to those phenomena occurring during fertilization, which can result in hardening of the zona pellucida and/or parthenogenetic activation of the oocyte in several mammalian species [12, 13, 32–35]. However, we observed similar fertilization, monospermy and pronuclear formation rates among the Fresh control, Solution control, SSV and Cryotop groups, suggesting that the Solution control treatment, both cooling methods and the warming regimen used in the present study did not cause such phenomena in M-II bovine oocytes and allowed their normal fertilization by IVF. Also, we observed similar rates of subsequent blastocyst formation on Day 7, Day 8 and Day 9 for oocytes vitrified by the Cryotop and SSV methods. Taken together, these results indicate that the cooling strategies of the SSV and Cryotop vitrification methods are equally effective for cryopreservation of bovine IVM oocytes. In this respect, both of these cooling methods can be recommended for cattle oocyte vitrification. The choice between the two methods may depend on the advantage and convenience of each method and the actual circumstances (e.g., the number of oocytes for cryopreservation) of the work. SSV is a very cheap method that enables preservation of several microdrops of vitrification solution within a short period of time, each containing a large number of oocytes. On the other hand, controlling the droplet size by this method requires extensive practice, and there is a constant chance of oocyte loss since some oocytes tend to attach to the inner surface of the glass capillary during droplet formation. This method is therefore more suitable for rapid cryopreservation of large quantities (hundreds) of oocytes/embryos. More precise control of the volume of the vitrified solution and oocyte numbers can be achieved by Cryotop vitrification, and this method offers a convenient way of storage and handling after cooling. However, the numbers of oocytes that can be preserved on each Cryotop sheet is limited, and preservation of large numbers of oocytes by this method takes an

extended period of time.

The cleavage and blastocyst formation rates of bovine M-II oocytes cryopreserved by either the Cryotop and SSV methods in our study were higher than those reported by Roser *et al.* [36] using the Cryotop method. On the other hand, the cleavage and blastocyst formation rates of surviving vitrified oocytes in both the Cryotop and SSV groups were still reduced compared with those of the Fresh control and Solution control groups. Similar to previous studies of cattle and pig oocytes [13, 18], treatment of M-II stage oocytes with cryoprotectants without vitrification according to the SSV protocol did not influence fertilization and *in vitro* development. Taken together with the high survival rates, this suggests that the impaired developmental ability of vitrified oocytes was caused by sub-lethal damage that could be mainly related to the cooling and/or warming procedure. Such sub-lethal damage may include disruption of the meiotic spindle and other cytoskeletal elements [10, 37], damage and dysfunction of organelles such as mitochondria or endoplasmic reticuli [38–40] or degradation of cytoplasmic mRNA levels [41], which have been reported to occur in cryopreserved mammalian oocytes. Further improvements of the present vitrification protocols will be necessary to avoid such damage.

In conclusion, our data indicate that both the Cryotop and SSV vitrification methods could yield high rates of surviving oocytes that could develop to the blastocyst stage after IVF. The cooling systems of the Cryotop and SSV methods were proven to be equally effective for preservation of IVM bovine oocytes in terms of their survival and subsequent developmental competence after IVF and IVC. However, further studies are necessary to improve the developmental competence of cryopreserved oocytes.

Acknowledgments

This study was supported by the NRCT-JSPS 2008 Joint Research program and Suranaree University of Technology. The authors would like to thank all members of the Embryo Transfer Team of the National Livestock Breeding Center, Japan, for their technical assistance.

References

1. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature* 1985; 313: 573–575.

2. Martino AN, Songsasen S, Leibo SP. Development in to blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod* 1996; 54: 1059-1069.
3. Isachenko V, Soler C, Isachenko E, Perez-Sanchez F, Grishchenko V. Vitrification of immature porcine oocytes: effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant. *Cryobiology* 1998; 3: 250-253.
4. Isachenko V, Alabart JL, Nawroth F, Isachenko E, Vajta G, Folch J. The open pulled straw vitrification of ovine GV-oocytes: positive effect of rapid cooling or rapid thawing or both? *Cryo Lett* 2001; 22: 157-162.
5. Begin I, Bhatia B, Baldassarre H, Dinnyes A, Keefer CL. Cryopreservation of goat oocytes and *in vitro* derived 2- to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods. *Theriogenology* 2003; 59: 1839-1850.
6. Hurtt AE, Landim-Alvarenga F, Seidel Jr GE, Aquires EL. Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. *Theriogenology* 2000; 54: 119-128.
7. Dhali A, Manik RS, Das SK, Singla SK, Palta P. Vitrification of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. *Theriogenology* 2000; 53: 1295-1303.
8. Murakami M, Otoi T, Karja NW, Wongsrikhao P, Agung B, Suzuki T. Blastocyst derived from *in vitro* fertilized cat oocytes after vitrification and dilution with sucrose. *Cryobiology* 2004; 48: 341-348.
9. Kuwayama M, Kato O. All-round vitrification method for human oocytes and embryos. *J Assist Reprod Genet* 2000; 17: 477 (abstract).
10. Chen SU, Lien YR, Chao KH, Ho HN, Yang YS, Lee TY. Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing—a review article. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 202: 101-107.
11. Ghetler Y, Yavin S, Shalgi R, Arav A. The effect of chilling on membrane lipid phase transition in human oocytes and zygotes. *Hum Reprod* 2005; 12: 3385-3389.
12. Carroll J, Depypere H, Matthews CD. Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *J Reprod Fert* 1990; 90: 547-553.
13. Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Karja NWK, Farhudin M, Dinnyes A, Nagai T, Kikuchi K. Developmental competence of *in vitro*-fertilized porcine oocytes after *in vitro* maturation and solid surface vitrification: Effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage. *Cryobiology* 2007; 55: 115-126.
14. Hoshi S, Terao T, Kamei M, Koto M, Hirabayashi M, Hirao M. Successful vitrification of pronuclear-stage rabbit zygotes by minimum volume cooling procedure. *Theriogenology* 2004; 61: 267-275.
15. Hoshi S, Fujimoto T, Braun J, Oguri N. Pregnancies following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology* 1994; 42: 483-488.
16. Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobson H, Greve T, Callesen H. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 1998; 51: 53-58.
17. Lane M, Bavister BD, Lyons EA, Forest KT. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 1234-1236.
18. Dinnyes A, Dai Y, Jiang S, Yang X. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod* 2000; 63: 513-518.
19. Chian RC, Kuwayama M, Tan L, Tan J, Kato O, Nagai T. High survival rate of bovine oocytes matured *in vitro* following vitrification. *J Reprod Dev* 2004; 50: 685-696.
20. Imai K, Tagawa M, Yoshioka H, Matoba S, Narita M, Inaba Y, Aikawa Y, Ohtake M, Kobayashi S. The efficiency of embryo production by ovum pick-up and *in vitro* fertilization in cattle. *J Reprod Dev* 2006; 52: 19-29.
21. Li X, Su L, Li Y, Ji W, Dinnyes A. Vitrification of Yunnan cattle oocytes: work in progress. *Theriogenology* 2002; 58: 1253-1260.
22. Mohr LR, Trounson AO. The use of fluorescein diacetate to assess embryo viability in the mouse. *J Reprod Fert* 1980; 58: 189-196.
23. Brackett BG, Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol Reprod* 1975; 12: 260-274.
24. Rosenkrans Jr CF, Zeng GQ, Mcnamara GT, Schoff PK, First NL. Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. *Biol Reprod* 1993; 49: 459-462.
25. Holm P, Shukri NN, Vajta G, Booth P, Bendixen C, Callesen H. Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine *in vitro* produced embryos in relation to their *in vitro* viability and sex. *Theriogenology* 1998; 50: 1285-1299.
26. Thous GA, Korfiatis NA, French AJ, Jones GM, Trounson AO. Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. *Reprod Biomed Online* 2001; 3: 25-29.
27. Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ. Image processing with image. *J Biophotonics International* 2004; 11: 36-42.
28. Fahy GM, McFralane DR, Angell CA, Meryman HT. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 1984; 21: 407-426.
29. Fuller B, Paynter S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reprod Biomed Online* 2004; 9: 680-691.
30. Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed* 2005; 300: 308 (abstract).
31. Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology* 2000; 53: 59-72.
32. Van der Elst J, Van den Abbeel E, Nerinckx S, Van Steirteghem A. Parthenogenetic activation pattern and microtubular organization of mouse oocyte after exposure to 1,2-propanediol. *Cryobiology* 1992; 29: 549-562.
33. Larman MG, Sheehan CB, Gardner DK. Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes. *Reproduction* 2006; 131: 53-61.
34. Matson PL, Graefling J, Junk SM, Yovich JL, Edirisinghe WR. Cryopreservation of oocytes and embryos: use of a mouse model to investigate effects upon zona hardness and formulate treatment strategies in an *in vitro* fertilization programme. *Hum Reprod* 1997; 12: 1550-1553.
35. Tian SJ, Yan CL, Yang HX, Zhou GB, Yang ZQ, Zhu SE. Vitrification solution containing DMSO and EG can induce parthenogenetic activation of *in vitro* matured ovine oocytes and decrease sperm penetration. *Anim Reprod Sci* 2007; 101: 365-371.
36. Morató R, Izquierdo D, Paramio MT, Mogas T. Cryotop versus open-pull straw (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: Effect on spindle and chromosome configuration and embryo development. *Cryobiology* 2008; 57: 137-141.
37. Albarraçin JL, Morató R, Rojas C, Mogas T. Effects of vitrification in open pulled straws on the cytology of *in vitro* matured prepubertal and adult bovine oocytes. *Theriogenology* 2005; 63: 890-901.
38. Fuku E, Xia L, Downey BR. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 1995; 2: 139-156.
39. Rho GJ, Kim S, Yoo JG, Balasubramanian S, Lee HJ, Choe SY. Microtubulin configuration and mitochondrial distribution after ultra-rapid cooling of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 2002; 4: 464-470.
40. Lowther KM, Weitzman VN, Maier D, Mehlmann LM. Maturation, fertilization, and the structure and function of the endoplasmic reticulum in cryopreserved mouse oocytes. *Biol Reprod* 2009 Mar 18. [Epub ahead of print]
41. Succu S, Bebbere D, Bogliolo L, Ariu F, Fois S, Leoni GG, Berlinguer F, Naitana S, Ledda S. Vitrification of *in vitro* matured ovine oocytes affects *in vitro* pre-implantation development and mRNA abundance. *Mol Reprod Dev* 2008; 3: 538-546.

ประวัติผู้วิจัย

ผศ. ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาย รังสรรค์ พาลพ่าย

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Rangsun Pampai

ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 52 2094 00002 42 3

3. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้

ที่ทำงาน: สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

111 ถ.มหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000

โทร. 044-224234 โทรสาร. 044-224154

ที่อยู่บ้าน: 51/31 หมู่ 6 ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา

4. ประวัติการศึกษา

4.1. ปริญญาตรี สาขาวิชา ชีววิทยา ปีที่จบ 2523

สถาบัน มหาวิทยาลัยบูรพา ประเทศ ไทย

4.2. ปริญญาโท สาขาวิชา สัตววิทยา ปีที่จบ 2525

สถาบัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศ ไทย

Thesis title: Plasma progesterone and oestrone sulphate during early pregnancy

in swamp buffalo.

4.3. ปริญญาเอก สาขาวิชา Animal Reproduction ปีที่จบ 2541

สถาบัน Kyoto University ประเทศ ญี่ปุ่น (ได้รับทุนรัฐบาลญี่ปุ่น)

Thesis title: Study on the establishment of bovine embryonic stem cells.

4.4. ฝึกอบรมสาขา Embryo transfer and *in vitro* fertilization in farm animals.

ด้วยทุน British Council

สถาบัน Cambridge University, U.K. ระหว่าง พฤศจิกายน 2527 - กุมภาพันธ์ 2528.

4.5. สมาชิกสมาคมวิชาชีพ: International Embryo Transfer Society (IETS)

5. ประวัติการทำงาน:

- 9 ธันวาคม 2525 – 31 ตุลาคม 2543 นักวิจัย โครงการวิจัยวิทยาศาสตร์ไทย-เนเธอร์แลนด์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ
- 1 พฤศจิกายน 2543–ปัจจุบัน อาจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา

6. สาขาวิชาที่มีความเชี่ยวชาญพิเศษ

- 6.1 การโคลนนิ่งตัวอ่อนโค กระบือ สุกร แมว โดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบ
- 6.2 การย้ายฝากตัวอ่อนโค กระบือ แพะ
- 6.3 การปฏิสนธิในหลอดแก้วโค กระบือ
- 6.4 Embryonic stem cells
- 6.5 Cryopreservation of gametes and embryos

7. ผลงานวิจัย

7.1. ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

- Tanthanuch, W., Thumanu, K., Lorthongpanich, C., **Parnpai, R.** and Heraud, P. **2009.** Neural differentiation of mouse embryonic stem cells studied by FT-IR spectroscopy. *J. Mol. Struct.* 967: 189-195.
- Laowtammathron, C., Cheng, E.C., Cheng, P.H, Snyder, B.R., Yang, S.H., Johnson, Z., Lorthongpanich, C., Kuo, H.C., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S. **2009.** Monkey Hybrid Stem Cells Develop Cellular Features of Huntington's Disease. *BMC Cell Biology.* Accepted 24 December, 2009.
- Imsoonthornruksa, S., Lorthongpanich, C., Sangmalee, A., Srirattana, K., Laowtammathron, C., Tunwattana, W., Somsa, W., Ketudat-Cairns, M., and **Parnpai, R.** **2009.** Abnormalities in the transcription of reprogramming genes related to global epigenetic events of cloned endangered felid embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* Accepted 5 October, 2009.
- Sripunya, N., Somfai, T., Inaba, Y., Nagai, T., Imai, K. and **Parnpai, R.** **2009.** A comparison of Cryotop and Solid Surface Vitrification methods for the cryopreservation of in vitro matured bovine oocytes. *J. Reprod. Dev.* 56: 176-181.

ตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ผลิตจากการใช้โอโอไซท์ที่แช่แข็งทั้ง 2 กลุ่มไม่สามารถเจริญเติบโตผ่านระยะ 8 เซลล์ได้

3.2.4 อัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อน PA ที่ผลิตจากโอโอไซท์แช่แข็ง

เมื่อละลายโอโอไซท์ที่แช่แข็งด้วย Cryotop และ Microdrop โอโอไซท์ส่วนหนึ่งที่เกิดคือ FDA จะถูกนำมาผลิตเป็นตัวอ่อน PA เพื่อคัดอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อน ซึ่งผลการแบ่งตัวของตัวอ่อนมีทิศทางที่แตกต่างกับตัวอ่อนกลุ่มโคลนนิ่ง คือ ตัวอ่อนกลุ่มควบคุม (95.87%) มีอัตราการแบ่งตัวที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากตัวอ่อน PA ที่ผลิตจากโอโอไซท์ที่แช่แข็งด้วย Cryotop (61.47%) และ Microdrop (12.12%) นอกจากนี้อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนกลุ่ม Cryotop (61.47%) ยังสูงกว่ากลุ่ม Microdrop (12.12%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วย ($P < 0.05$) ตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์พบมากที่สุดในกลุ่มควบคุม (63.63%) รองลงมาคือกลุ่ม Cryotop (24.77) และกลุ่ม Microdrop (4.04) เป็นกลุ่มที่เจริญเข้าสู่ระยะ 8 เซลล์ได้น้อยที่สุด ซึ่งเมื่อเทียบความแตกต่างทางสถิติพบว่า ทุกกลุ่มที่ระยะ 8 เซลล์ล้วนมีความแตกต่างทางสถิติต่อกัน ($P < 0.05$) แต่เมื่อตัวอ่อนสามารถเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะมอูลตาแล้วก็จะสามารถเจริญเข้าสู่ระยะบลาสโตซิสต์ได้ ตัวอ่อนกลุ่มควบคุมสามารถเจริญระยะมอูลตาและบลาสโตซิสต์ได้มากที่สุด คือ 33 ตัวอ่อน (28.45%) รองลงมาคือกลุ่ม Microdrop (16.67%) และที่น้อยที่สุดคือกลุ่ม Cryotop (2.99%) ซึ่งทั้งสามกลุ่มล้วนมีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) จากผลการทดลองพบว่าแม้ตัวอ่อนจากกลุ่ม Microdrop จะสามารถแบ่งตัวได้น้อยที่สุดในกลุ่ม แต่หลังจากเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้วตัวอ่อนสามารถเจริญเติบโตสู่ระยะมอูลตาและบลาสโตซิสต์ได้ดีกว่ากลุ่ม Cryotop

3.2.5 อัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อน SCNT และ PA ที่ผลิตจากโอโอไซท์แช่แข็ง

ผลการทดลองพบว่าอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนกลุ่ม Microdrop (32.0%) ที่นำไปทำโคลนนิ่ง (SCNT) มีอัตราการแบ่งตัวที่สูงกว่ากลุ่ม PA (12.12%) แต่ความแตกต่างดังกล่าวไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่การแบ่งตัวของตัวอ่อนกลุ่ม Cryotop (59.26%) ที่นำมาทำโคลนนิ่งมีอัตราการแบ่งตัวต่ำกว่าตัวอ่อนกลุ่ม PA (61.47%; $P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบตัวอ่อนที่พัฒนาเข้าสู่ระยะ 8 เซลล์ที่ผลิตจากโอโอไซท์แช่แข็งกลุ่ม Microdrop ที่พบว่าที่ระยะ 8 เซลล์ตัวอ่อนจากกลุ่ม SCNT (4.0%) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติต่อกลุ่ม PA (4.04%) แต่เฉพาะโอโอไซท์ที่นำมาทำ PA เท่านั้นที่ตัวอ่อนที่ใช้โอโอไซท์แช่แข็งด้วย Cryotop (2.99%) และ Microdrop (16.67%) สามารถเจริญเข้าสู่ระยะมอูลตาและบลาสโตซิสต์ได้ (ภาพที่ 2)

3.3 ข้อวิจารณ์

การแช่แข็งเซลล์สัตว์ด้วยวิธี vitrification เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว มีประสิทธิภาพ มีต้นทุนในการดำเนินการต่ำ เนื่องจากเทคนิคนี้ช่วยป้องกันไม่ให้เกิดผลึกน้ำแข็ง ทำให้เซลล์ที่ถูกแช่แข็งไม่ได้รับอันตรายจากผลึกน้ำแข็ง ซึ่งแตกต่างจากวิธีการลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆ ที่ต้องมีการเหนี่ยวนำ

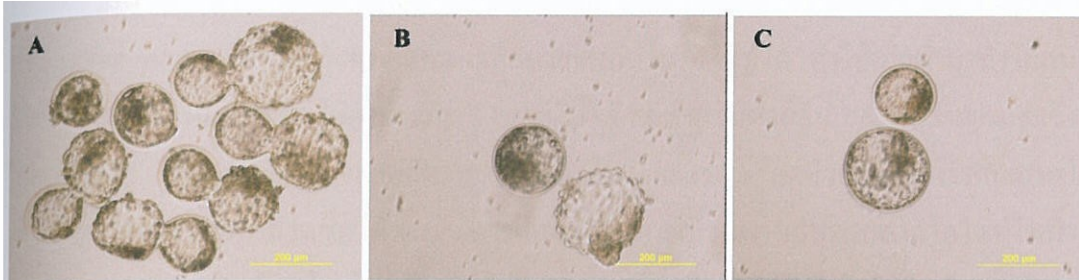
การเกิดผลึกน้ำแข็ง (Fahy และคณะ, 1984) อย่างไรก็ตาม การแช่แข็งด้วยวิธี vitrification จำเป็นต้องใช้ความเข้มข้นของ cryoprotectant ที่สูงมาก ดังนั้นมีโอกาสที่จะทำให้เซลล์ได้รับผลจากการเปลี่ยนแปลงของแรงดันออสโมติก และหากปล่อยให้เซลล์แช่อยู่ในน้ำยาดังกล่าวเป็นเวลานานจะทำให้เซลล์ได้รับอันตรายจากความเป็นพิษของสารที่ใช้เป็น cryoprotectant ซึ่งมีการศึกษาถึงความเข้มข้นของ cryoprotectant ที่นำมาใช้แล้วว่าสารตัวใดมีความเป็นพิษที่น้อยที่สุดต่อเซลล์ที่ระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการแช่แข็ง (Fuller และคณะ, 2004; Kuwayama และคณะ, 2005) มีการศึกษาและ

ตารางที่ 3 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อน SCNT และ PA ที่ผลิตจากโอโอไซท์แช่แข็งโดย Microdrop และ Cryotop

Treatment	No.Culture	Embryo development				
		Cleavage (%)	8 Cells (%)	Morula (%)	Blastocyst (%)	
SCNT	Fresh	75	61 ^b (81.33)	29 ^b (38.67)	23 ^a (37.70)	23 ^a (37.70)
	Microdrop	75	24 ^{cd} (32.0)	3 ^c (4.0)	0 ^b (0)	0 ^b (0)
	Cryotop	81	48 ^{bc} (59.26)	21 ^b (25.93)	0 ^b (0)	0 ^b (0)
PA	Fresh	121	116 ^a (95.87)	77 ^a (63.63)	33 ^a (28.45)	33 ^a (28.45)
	Microdrop	99	12 ^d (12.12)	4 ^c (4.04)	2 ^b (16.67)	2 ^b (16.67)
	Cryotop	109	67 ^b (61.47)	27 ^b (24.77)	2 ^b (2.99)	2 ^b (2.99)

SCNT: Somatic cell nuclear transfer

PA: Parthenogenetic activation



ภาพที่ 2 แสดงตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์อายุ 7 วัน จากกลุ่มโคลนนิ่งโดยใช้โอโอไซท์ที่ไม่ถูกแช่แข็ง (A) ตัวอ่อน PA จากการแช่แข็งด้วย Microdrop (B) และตัวอ่อนที่แช่แข็งด้วย Cryotop (C)

พัฒนาอุปกรณ์และวิธีการแช่แข็งที่ช่วยให้อัตราการรอดอุณหภูมิกิดได้อย่างรวดเร็ว เช่น Electron microscope grid (Martino และคณะ, 1996) Open pulled straw (OPS; Vajta และคณะ, 1998) Nylon loop (Lane และคณะ, 2001) และ Cryotop (Kuwayama และ Kato, 2000) ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยพบว่า การแช่แข็งโอโอไซท์โคโดยวิธี Microdrop และ Cryotop ส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อน การแช่แข็งโอโอไซท์จะมีความสำเร็จที่น้อยกว่าการแช่แข็งตัวอ่อน เนื่องจากโอโอไซท์ที่ระยะ MII สาย spindle fiber ภายในจะมีความอ่อนไหวต่ออุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไปและการแช่แข็งทำให้โอโอไซท์ได้รับความเสียหายจากความเย็นได้ง่ายกว่าตัวอ่อน (Shaw และคณะ, 2000) เนื่องจากการแช่แข็งด้วยวิธี vitrification ตัวอ่อนหรือโอโอไซท์จะอยู่ในน้ำยาแช่แข็งได้ในระยะสั้นๆ ดังนั้นน้ำยาแช่แข็งจึงต้องมีความเข้มข้นของ cryoprotectant ที่สูงเพื่อให้อัตราการซึมเข้าภายในเซลล์เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเพียงพอที่จะไม่ทำให้เซลล์ได้รับอันตรายจากความเป็นพิษของ cryoprotectant และมีความเข้มข้นที่เพียงพอที่จะทำให้เซลล์ไม่ได้รับอันตรายหลังจากการแช่แข็ง และต้องมีการลดอุณหภูมิต่างรวดเร็วเพื่อให้การลดอุณหภูมิจำเป็นที่จะไม่ทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งเกิดขึ้นในขบวนการแช่แข็งโดยวิธี vitrification ซึ่งการแช่แข็งโอโอไซท์โดยใช้ Microdrop, SSV และ Cryotop สามารถทำให้อัตราเร็วของอุณหภูมิลดลงเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งช่วยให้ไม่เกิดผลึกน้ำแข็งเกิดขึ้นในระหว่างการแช่แข็ง (Papis และคณะ, 2000; Kuwayama และ Kato, 2000; Dinnyés และคณะ, 2000) Cryotop โอโอไซท์หรือตัวอ่อนจะถูกวางไว้ที่ปลายแผ่นพลาสติกบางๆ และมีปริมาณน้ำยาประมาณเพียง 1 µl ที่ปิดโอโอไซท์หรือตัวอ่อนอยู่ ซึ่งมีปริมาณที่น้อยมาก ซึ่งช่วยให้การลดอุณหภูมิกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วภายหลังจากจุ่ม Cryotop ลงในไนโตรเจนเหลวแล้ว (Kuwayama และ Kato, 2000) วิธี Microdrop โอโอไซท์หรือตัวอ่อนจะถูกหยดลงในไนโตรเจนพร้อมกับน้ำยาแช่แข็งปริมาณ 2 µl ซึ่งจะช่วยให้อัตราการลดอุณหภูมิกิดได้อย่างรวดเร็ว (Papis และคณะ, 2000) ส่วนวิธี SSV เป็นวิธีการประยุกต์จากวิธี Microdrop โดยการให้ Microdrop ตกบนผิวหน้าที่เย็นจัดที่โผล่พ้นไนโตรเจนเหลวของแท่งอลูมิเนียมที่แช่อยู่ในไนโตรเจนเหลว ซึ่งจะช่วยให้การถ่ายเทอุณหภูมิกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว

เช่นเดียวกัน (Dinnyés และคณะ, 2000) ผลการทดลองที่ได้พบว่าการแช่แข็งโอโอไซท์ด้วย Microdrop และ Cryotop ยังคงเกิดความเสียหายขึ้นกับโอโอไซท์โค ทำให้เมื่อนำมาทำโคลนนิ่งตัวอ่อนจึงไม่สามารถเจริญเติบโตผ่านระยะ 8 เซลล์ไปได้ แต่สำหรับตัวอ่อน PA พบว่าการแช่แข็งโอโอไซท์โคด้วย Microdrop จะลดอัตราการแบ่งตัวในระยะแรก แต่ตัวอ่อนยังคงมีศักยภาพในการเจริญเติบโตสู่ระยะบลาสโตซิสได้ การศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่า การแช่โอโอไซท์ในน้ำยาที่มี cryoprotectant อย่างเดียวโดยไม่ได้แช่ในไนโตรเจนเหลวหรือการแช่แข็งโอโอไซท์ระยะ MII จะกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่คล้ายกับขบวนการปฏิสนธิ คือการเกิดการเปลี่ยนแปลงของ zona pellucida ที่หนาและแข็งขึ้น ซึ่งเมื่ออสุจิปฏิสนธิกับโอโอไซท์แล้ว zona pellucida จะหนาขึ้นเพื่อป้องกันไม่ให้อสุจิตัวอื่นเข้ามาได้และ/หรืออาจกระตุ้นให้โอโอไซท์เจริญเติบโตได้ โดยไม่ต้องเกิดขบวนการปฏิสนธิ (Parthenogenetic activation) ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าวมีรายงานในสัตว์หลายชนิด (Carroll และคณะ, 1990; Somfai และคณะ, 2007; Van der Elst J และคณะ, 1992; Larman และคณะ, 2006; Matson และคณะ, 1997; Tian และคณะ, 2007)

การแช่แข็งโอโอไซท์เป็นหัวข้อการศึกษาที่ยังคงมีผู้สนใจมากมายเพื่อแช่แข็งโอโอไซท์ ให้ยังคงศักยภาพในการเจริญเติบโตใกล้เคียงกับโอโอไซท์ที่ไม่ถูกแช่แข็ง เพื่อที่จะสามารถเก็บไว้ใช้เป็นแหล่งรองรับการนำมาใช้ในอนาคต ซึ่งสามารถนำมาใช้สำหรับทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว การทำโคลนนิ่ง (Booth และคณะ, 1999; Atabay และคณะ, 2004; Hou และคณะ, 2005; Yang และคณะ 2008) แต่จนถึงปัจจุบันการศึกษากการแช่แข็งโอโอไซท์เพื่อทำโคลนนิ่งยังคงไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร แม้แต่ตัวอ่อนที่ผลิตจาก PA เองก็ยังคงไม่มีศักยภาพที่จะเจริญเติบโตได้เหมือนโอโอไซท์ที่ไม่ถูกแช่แข็ง การแช่แข็งโอโอไซท์นั้นค่อนข้างยากลำบากเนื่องจากขนาดของเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ ประกอบกับมีปริมาณน้ำภายในเซลล์สูงทำให้โอโอไซท์เสียหายได้ง่ายภายใต้อุณหภูมิต่างๆ ในระหว่างการแช่แข็ง และการแช่แข็งโอโอไซท์ที่ยากกว่าการแช่แข็งตัวอ่อนระยะคัพพะ (Zygote) เนื่องจากความเสียหายต่อ Spindle microtubule ในระยะ Metaphase เกิดการเสียหายได้ง่าย (Martino และคณะ 1996) อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการแช่แข็งโอโอไซท์ที่ไม่มีผลต่อความสำเร็จในการ enucleation, injection และ fusion แต่อย่างไรก็ตามการแช่แข็งมีผลกระทบต่ออัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนเมื่อเทียบกับตัวอ่อนที่ผลิตจากโอโอไซท์ที่ไม่ถูกแช่แข็ง Yang และคณะ (2008) รายงานการแช่แข็งโอโอไซท์โดยใช้ Microdrop ว่าอัตราการรอดหลังแช่แข็งและละลายโอโอไซท์คือ 92.5% ซึ่งใกล้เคียงกับการทดลองในครั้งนี้ เมื่อนำโอโอไซท์ดังกล่าวมาทำ PA มีตัวอ่อนแบ่งตัว 46.5% และเจริญเติบโตจนถึงระยะบลาสโตซิส 11.1% จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่า อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนจากการทดลองของ Yang และคณะ (2008) มีอัตราที่สูงกว่าการทดลองนี้ แต่อย่างไรก็ตามอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนสู่ระยะบลาสโตซิสของ PA ยังคงต่ำกว่าการทดลองในครั้งนี้ ซึ่งสามารถผลิตตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสจากโอโอไซท์แช่แข็งได้ 16.67%

การแช่แข็งโอโอไซท์ระยะ MII ยากกว่าแช่แข็งตัวอ่อนเนื่องจาก spindle fiber ของโอโอไซท์ระยะ MII ค่อนข้างเสียหายง่ายเมื่อทำการแช่แข็ง (Chilling injury; Shaw และคณะ 2000) ดังนั้น อัตราความสำเร็จในการแช่แข็งจึงขึ้นอยู่กับอัตราเร็วในการลดอุณหภูมิ และความเข้มข้นของ cryoprotectant ที่ใช้ มีรายงานว่า การแช่แข็งโดยใช้ Microgrids และ Nylon slush มีอัตราเร็วในการลดอุณหภูมิประมาณ 24,000 °C/นาทีก และวิธี OPS มีอัตราเร็วในการลดอุณหภูมิประมาณ 22,500 °C/นาทีก (Hochi และคณะ 2001; Vajta, 2000) ดังนั้นผลการแช่แข็งโอโอไซท์ด้วย Cryotop และ Microdrop จึงมีโอโอไซท์ที่มีชีวิตในอัตราที่สูงกว่ารายงานอื่น โดย Atabay และคณะ (2004) รายงานว่าหลังการแช่แข็งมีโอโอไซท์รอด 80% Dinnyes และคณะ (2000) รายงานอัตราการรอดของโอโอไซท์ที่แช่แข็งโดย SSV ว่ามีโอโอไซท์รอดหลังการแช่แข็ง อยู่ระหว่าง 79-85% อย่างไรก็ตามจากอัตราการรอดที่สูงหลังจากแช่แข็งและละลายของโอโอไซท์ แต่ตัวอ่อนไม่มีศักยภาพค่อนข้างต่ำในการการเจริญเติบโตเข้าสู่ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิส น่าจะมีสาเหตุมาจากการบาดเจ็บที่ไม่ส่งผลกระทบต่อรุนแรงจนทำให้โอโอไซท์ตายในทันที แต่ส่งผลให้โอโอไซท์ดังกล่าวหยุดการเจริญเติบโตในระยะต่อมา ซึ่งสาเหตุน่าจะเกิดจากความเสียหายของ meiotic spindle และ cytoskeleton (Chen และคณะ, 2003; Albarracín และคณะ, 2005) ความเสียหายของ organelles ต่างๆ เช่น mitochondria หรือ endoplasmic reticulum (Fuku และคณะ, 1995; Rho และคณะ, 2002; Lowther และคณะ, 2009) การเสื่อมสลายลงของระดับ mRNA ในไซโตพลาสซึม (Succu และคณะ, 2008) ซึ่งเป็นสาเหตุที่สามารถพบได้ในการแช่แข็งโอโอไซท์ ซึ่งการศึกษาเพื่อพัฒนาการแช่แข็งเพื่อลดความเสียหายดังกล่าวจึงมีความจำเป็น ซึ่งจะช่วยให้อัตราการรอดและอัตราการเจริญเติบโตหลังการปฏิสนธิหลังการแช่แข็งเพิ่มสูงมากยิ่งขึ้น

จากผลการทดลองครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าการแช่แข็งโดยใช้ Microdrop และ Cryotop เพื่อใช้เป็นแหล่งสำหรับการทำโคลนนิงนั้นจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติม เพื่อให้ได้โอโอไซท์หลังการแช่แข็งที่มีศักยภาพที่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้

บทที่ 4

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

การแช่แข็งโอโอไซท์เป็นงานวิจัยที่ยังคงมีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย โดยมุ่งเน้นให้โอโอไซท์ที่ถูกแช่แข็งยังคงศักยภาพในการเจริญเติบโตต่อไปได้หลังถูกละลาย ซึ่งประโยชน์จากงานวิจัยสามารถนำไปใช้ในการแช่แข็งโอโอไซท์สำรองไว้ใช้ได้ในอนาคต จากการทดลองแช่แข็งโอโอไซท์โคเพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งในการผลิตตัวอ่อนด้วยวิธีปฏิสนธิในหลอดแก้วพบว่า โอโอไซท์หลังละลายมีอัตราการรอดมากกว่า 90% นอกจากนี้อัตราการปฏิสนธิยังไม่มี ความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มโอโอไซท์แช่แข็งและกลุ่มควบคุม แต่การแช่แข็งด้วยวิธี SSV ยังมีผลต่ออัตราการแบ่งตัวในระยะแรก แต่เมื่อเลี้ยงตัวอ่อนจนเข้าสู่ระยะบลาสโตซิสพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และไม่มีความแตกต่างของปริมาณเซลล์ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มแช่แข็ง จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าการแช่แข็งโอโอไซท์โดยวิธี SSV และ Cryotop สามารถนำมาใช้ในการแช่แข็งโอโอไซท์โคเพื่อใช้ในการผลิตตัวอ่อนด้วยวิธีปฏิสนธิในหลอดแก้วได้ สำหรับการทดลองในอนาคตจะมีการทดลองในการย้ายฝากตัวอ่อนให้ตัวรับเพื่อศึกษาอัตราการตั้งท้องและคลอดต่อไป โดยจะทำการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบกับ การย้ายฝากตัวอ่อนที่ผลิตจากโอโอไซท์ที่ไม่ถูกแช่แข็ง เปรียบเทียบกับตัวอ่อนที่ผลิตจากโอโอไซท์แช่แข็ง โดยจะศึกษาว่าการแช่แข็งโอโอไซท์มีผลกระทบต่ออัตราการตั้งท้องและคลอดหรือไม่ สำหรับการแช่แข็งโอโอไซท์โคเพื่อใช้เป็นแหล่งในการทำโคลนนิ่งนั้นพบว่าจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปเพื่อให้ได้ตัวอ่อนที่สามารถเจริญเติบโตสู่ระยะบลาสโตซิสที่สูงเพิ่มมากขึ้น

บรรณานุกรม

- รังสรรค์ พาลพ่าย เกียรติศักดิ์ ทาศรีภู และ มณีวรรณ กมลพัฒนะ. 2543a. ความเป็นไปได้ในการผลิตโค พันธุ์ดีด้วยเทคโนโลยีโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ. **การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38** สาขาสัตว์ 1-4 กุมภาพันธ์ 2543.
- รังสรรค์ พาลพ่าย เกียรติศักดิ์ ทาศรีภู และ มณีวรรณ กมลพัฒนะ. 2543b. การโคลนนิ่งตัวอ่อนกระป๋องปลักโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากลูกอ่อนเป็นเซลล์ต้นแบบ. **การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตร ศาสตร์ ครั้งที่ 38** สาขาสัตว์ 1-4 กุมภาพันธ์ 2543.
- รังสรรค์ พาลพ่าย และ สรรเพชญ โสภณ. 2530. เทคนิคการย้ายฝากตัวอ่อนในโคโดยวิธีไม่ผ่าตัด. มณีวรรณ กมลพัฒนะ (บรรณาธิการ). **การปฏิสนธิในหลอดแก้วและการย้ายฝากตัวอ่อน**. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. หน้า 133-158.
- รังสรรค์ พาลพ่าย ชูติ เหล่าธรรมธร จันทรเจ้า สือทองพานิชย์ สุจิตรา หมื่นไธสง ธวัชชัย เวชยันต์ เสวียน สัมหวาน เพลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาติตั้ง สุริยา กิจสำเร็จ และ สมบัติ ศิริอุดม เศรษฐ. 2547. การใช้เทคโนโลยีโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดี. **การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42** สาขาสัตว์.
- Albarracín JL, Morató R, Rojas C, Mogas T. 2005. Effects of vitrification in open pulled straws on the cytology of *in vitro* matured prepubertal and adult bovine oocytes. **Theriogenology** 63: 890–901.
- Atabay, E.C., Takahashi, Y., Katagiri, S., Nagano, M., Koga, A., Kanai, Y. 2004. Vitrification of bovine oocytes and its application to intergeneric somatic cell nuclear transfer. **Theriogenology** 61: 15–23.
- Baguisi, A., Behboodi, E., Melican, D.T., Pollock, J.S., Destrempe, M.M., Cammuso, C., Williams, J.L. Nims, S.D., Porter, C.A., Midura, P., Palacios, M.J., Ayres, S.L., Denniston, R.S., Hates, M.L., Ziomek, C.A., Meade, H.M., Godke, R.A., Gavin, W.G., Overstrom, E.W. and Echelard, Y. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. **Nat. Biotechnology** 17: 456-461.
- Bondioli, K.R., Westhusin, M.E. and Looney, C.R. 1990. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. **Theriogenology** 33: 165-174.
- Bondioli, K.R. 1993. Nuclear transfer in cattle. **Mol.Reprod.Dev.** 36: 274-275.

- Booth, P.J., Vajta, G., Hoj, A., Holm, P., Jacobsen, H., Greve, T., Callesen, H. 1999. Full-term development of nuclear transfer calves produced from open-pulled straw (OPS) vitrified cytoplasts: work in progress. **Theriogenology** 51:999–1006.
- Carroll J, Depypere H, Matthews CD. 1990. Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. **J Reprod Fert** 90: 547–553.
- Chang, W.C., Xu, J., Jiang, S., Tian, X.C., Yang, X., and Du, F.L. 2004. Effect of pre-equilibration procedures on the development potential of vitrified bovine oocytes after IVF. **Reprod.Fertil.Steril.** 16: 166.
- Chen SU, Lien YR, Chao KH, Ho HN, Yang YS, Lee TY. 2003. Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing-a review article. **Mol Cell Endocrinol** 202: 101–107.
- Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F.A. and Robl, J.M. 1998. Clones transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. **Science** 280: 1256-1258.
- Dinnyés A, Dai Y, Jiang S, Yang X. 2000. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. **Biol Reprod** 63: 513–518.
- Dominko T., Mitalipova M., Haley B., Beyman Z., Memili E., and N. First. (1998). Bovine oocyte as a universal recipient cytoplasm in mammalian nuclear transfer. **Theriogenology** 49 : 389.
- Dinnyes, A., Dai, Y., Jiang, S., and Yang, X. 2000. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. **Biol. Reprod.** 63: 513-518.
- Fahy GM, McFralane DR, Angell CA, Meryman HT. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology** 21: 407–426.
- Farin P.W., and C.E. Farin.,(1995) Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: Survival and fetal development. **Biol. Reprod.** 52 : 676-682.
- Fuku E, Xia L, Downey BR. 1995 Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. **Cryobiology** 2: 139–156.

- Fuller B, Paynter S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. 2004. **Reprod Biomed Online** 9: 680–691.
- Gardner, D.K., Lane, M. and Batt, P. 1994. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage *in vitro* in the absence of serum and somatic cells: Amino acids, vitamins and culturing embryos in groups stimulate development. **Biol.Reprod.** 50: 390-400.
- Hochi, S., Mitsuhiro, A., Minagawa, G., Kimura, K., Hanada, A. 2001. Effects of cooling and warming rates during vitrification on fertilization of *in vitro*-matures bovine oocytes. **Cryobiology** 41: 69–73.
- Hou, Y.P., Dai, Y.P., Zhu, S.E., Zhu, H.B., Wu, T.Y., Gong, G.C., Wang, H.P., Wang, L.L., Liu, Y., Li, R., Wan, R., Li, N. 2005. Bovine oocytes vitrified by the open pulled straw method and used for somatic cell cloning supported development to term. **Theriogenology** 64:1381–1391.
- Illmensee, K. and Hoppe, P.C. 1981. Nuclear transplantation in *Mus musculus* : Developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. **Cell** 23: 9-18.
- Inaba, Y., Dochi, O., and Koyama, H. 2004. Effect of using micro-pipette tips of different diameters and volume of vitrification solution on the viability of IVM bovine oocytes after vitrification. **Reprod.Fertil.Steril.** 16 :171.
- Isachenko, V., Alabart, J.L., Nawroth, F., Isachenko, E., Vajta, G., and Folch, J. 2001. The open pulled straw vitrification of ovine GV-oocytes: positive effect of rapid cooling or rapid thawing or both?. **Cryo-Letters** 22: 157-162.
- Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H. and Tsunoda, Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. **Science** 282: 2095-2098.
- Keefer, C.L., Keyston, R., Lazaris, A., Bhatia, B., Begin, I., Bilodeau, A.S., Zhou, F.J., Kafidi, N., Wang, B., Baldassarre, H. and Karatzas, C.N. 2002. Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. **Biol. Reprod.** 66: 199-203.
- Kuwayama M, Kato O. 2000. All-round vitrification method for human oocytes and embryos. **J Assist Reprod Genet** 17: 477 (abstract).
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. 2005. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Reprod Biomed** 300: 308 (abstract).

- Lane, M., and Gardner, D.K. 2001. Vitrification of mouse oocytes using a nylon loop. **Mol. Reprod. Dev.** 58: 342-347.
- Lanza R.P., Cibelli, J.B., Daiz, F., Moraes, C.T., Farin, P.W., Farin C.E., Hammer C.J., Weat, M.D., and P. Damiani.,(2000). Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. **Cloning 2** :79-90.
- Larman MG, Sheehan CB, Gardner DK. 2006. Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes. **Reproduction** 131: 53–61.
- Laowtammathron C, Lorthongpanich C, Ketudat-Cairns M, Hochi S, Parnpai R. 2005. Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: effects of hatching stage, linoleic acid-albumin in IVC medium and Ficoll supplementation to vitrification solution. **Theriogenology** 64: 1185-1196.
- Liebermann, J., and Tucker, M.J. (2002). Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification. **Reproduction** 124: 483-489.
- Lowther KM, Weitzman VN, Maier D, Mehlmann LM. 2009. Maturation, fertilization, and the structure and function of the endoplasmic reticulum in cryopreserved mouse oocytes. **Biol Reprod** 81: 147-154.
- Martino, A., Songsasen, N., and Leibo, S.P. (1996). Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biol. Reprod.** 24: 1059-1069.
- Matson PL, Graefling J, Junk SM, Yovich JL, Edirisinghe WR. 1997. Cryopreservation of oocytes and embryos: use of a mouse model to investigate effects upon zona hardness and formulate treatment strategies in an *in vitro* fertilization programme. **Hum Reprod** 12: 1550–1553.
- Matsumoto, H., Jiang, J.Y., Tanaka, T., Sasada, H., and Sato, E. 2001. Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. **Cryobiology** 42: 139-144.
- Men, H., Monson, R.L., and Rutledge, J.J. 2002. Effect of meiotic stages and maturation protocols on bovine oocyte's resistance to cryopreservation. **Theriogenology** 57: 1095 -1103.
- Morató R, Izquierdo D, Paramio MT, Mogas T. 2008. Cryotop versus open-pull straw (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: Effect on spindle and chromosome configuration and embryo development. **Cryobiology** 57: 137–141.

- Onishi, A., Iwamoto, M., Akita, T., Mikawa, S., Takeda, K., Awata, T., Hanada, H., Perry, A.C.F. 2000. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. **Science** 289: 1188-1190.
- Papis, K., Shimizu, M., and Izaïke, Y. 2000. Factor effect on the survival of bovine oocytes vitrified in droplets. **Theriogenology** 54: 651-658.
- Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 1999. Development of cloned swamp buffalo embryos derived from fetal fibroblasts: comparison *in vitro* cultured with or without buffalo and cattle oviductal epithelial cells. **Buffalo J.** 15: 371-384.
- Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 2000a. Developmental potential of cloned bovine embryos derived from quiescent and non-quiescent adult ear fibroblasts after different activation treatments. **Theriogenology** 53: 239.
- Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 2000b. Comparison of cloning swamp buffalo embryos using fetal fibroblasts and granulosa cells as donor cells. **Proceeding of the 14th International Congress on Animal Reproduction**. Stockholm, July 2-6, 2000. Abstract Vol. 2: 241.
- Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 2001. Cloning of pig embryo by using ear fibroblasts and tail muscle cells as donor nuclei : Effect of time after maturation and fusion parameters on the rate of fusion and development of embryo. **Thai J.Agric.Sci.** 34: 187-194.
- Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 2002. Comparison of cloning efficiency in bovine and swamp buffalo embryo using fetal fibroblasts ear fibroblasts and granulosa cells. **Theriogenology** 57: 443.
- Parnpai, R. and Tasripoo, K. 2003. Effects of different activation protocols on the development of cloned swamp buffalo embryos derived from granulosa cells. **Theriogenology** 59: 279.
- Polejaeva, I.A., Chen, S-H., Vaught, T.D., Page, R.L., Mullins, J.B., Dai, Y., Boone, J., Walker, S., Ayares, D.L., Colman, A. and Campbell, K.H.S. 2000. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. **Nature** 407: 86-90.
- Prather, R.S., Barnes, F.L., Sim, M.M., Robl, J.M. Eystone, W.H. and First, N.L. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryos: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. **Biol.Reprod.** 37: 859-866.
- Prather, R.S., Sim, M.M. and First, N.L. 1989. Nuclear transplantation in early pig embryos. **Biol.Reprod.** 41: 414-418.

- Rall, W.F., and Fahy, G.M. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. **Nature** 313: 573-575.
- Reggio, B.C., James, A.N., Green, H.L., Gavin, W.G., Behboodi, E., Echelard, Y. and Godke, R.A. 2001. Cloned transgenic offspring resulting from somatic cell nuclear transfer in the goat: oocytes derived from both follicle-stimulating hormones-stimulated and nonstimulated abattoir-derived ovaries. **Biol.Reprod.** 65: 1528-1533.
- Rho GJ, Kim S, Yoo JG, Balasubramanian S, Lee HJ, Choe SY. 2002. Microtubulin configuration and mitochondrial distribution after ultra-rapid cooling of bovine oocytes. **Mol Reprod Dev** 4: 464-470.
- Seidel, G.E. 1995. Sexing, bisection and cloning embryo: perspectives and applications to animal breeding. In: **Proc. of Symposium on Reproduction and Animal Breeding**, Milan, pp. 147-154.
- Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO. 2000. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology** 53: 59-72.
- Shin, T., S., Kraemer, D., Pryor, J., Lui, I., Rugila, J., Howe, L., Buck, S., Murphy, K. Lyons, L. and Westhusin, M.W. 2002. Nature published online. 14 February 2002. **Nature** 723.
- Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Karja NWK, Farhudin M, Dinnyes A, Nagai T, Kikuchi K. 2007. Developmental competence of *in vitro*-fertilized porcine oocytes after *in vitro* maturation and solid surface vitrification: Effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage. **Cryobiology** 55: 115-126.
- Stice, S.L. and Keefer, C.L. 1993. Multiple generation bovine embryo cloning. **Biol.Reprod.** 48: 715-719.
- Succu S, Bebbere D, Bogliolo L, Ariu F, Fois S, Leoni GG, Berlinguer F, Naitana S, Ledda S. 2008. Vitrification of *in vitro* matured ovine oocytes affects *in vitro* pre-implantation development and mRNA abundance. **Mol Reprod Dev** 3: 538-546.
- Tian SJ, Yan CL, Yang HX, Zhou GB, Yang ZQ, Zhu SE. 2007. Vitrification solution containing DMSO and EG can induce parthenogenetic activation of *in vitro* matured ovine oocytes and decrease sperm penetration. **Anim Reprod Sci** 101: 365-371.
- Van der Elst J, Van den Abbeel E, Nerinckx S, Van Steirteghem A. 1992. Parthenogenetic activation pattern and microtubular organization of mouse oocyte after exposure to 1,2-propanediol. **Cryobiology** 29: 549-562.

- Vajta, G., 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Anim. Reprod. Sci.** 2:357-364.
- Vajta, G., Booth, P.J., Holm, P., Greve, T., and Callesen, H. 1997. Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. **Cryo-Letters** 18: 191-195.
- Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, M., Booth, P.J., Jacobsen, H., Greve, T., and Callesen, H. 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Mol. Reprod. Dev.** 51: 53-58.
- Vanderzwalmen, P, Bertin, G., Debauche, C.H., Standaert, V., and Schoysman, R. (2000). *In vitro* survival of metaphase II oocytes and blastocysts after vitrification in an Hemi Straw (HS) system. **Fertil. Steril.** 74: 215.
- Vignon, X., LeBourthis, D., Chesne, P., Marchal, J., Heyman, Y. and Renard, J.P. 1999. Development of bovine nuclear transfer embryos reconstituted with quiescent and proliferative skin fibroblasts. **Theriogenology** 51: 216.
- Wells, D.N., Misica, P.M. and Tervit, H.R. 1999. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. **Biol.Reprod.** 60: 996-1005.
- Wakayama, T., Perry, A.C., Zuccotti, M. Jonhson, K.R. and Yanagimachi, R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. **Nature** 394: 369-374.
- Willadsen, S.M. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. **Nature** 320: 63-65.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J. and Campbell, K.S.H. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature** 385: 810-813.
- Yang BC, Im GS, Kim DH, Yang BS, Oh HJ, Park HS, Seong HH, Kim SW, Ka HH, Lee CK. 2008. Development of vitrified-thawed bovine oocytes after *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. **Anim Reprod Sci.** 103:25-37.
- Zakhartchenko, V., Durcova-Hills, G., Stojkovic, M., Schernthaner, W., Prelle, K., Steinborn, R., Muller, M., Brem, G. and Wolf, E. 1999. Effects of serum starvation and re-cloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts. **J.Reprod.Fert.** 115: 325-331.

ภาคผนวก ก

การเผยแพร่ผลงานวิจัยในระดับชาติ และนานาชาติ

1. Sripunya N, Somfai T, Inaba Y, Nagai T, Imai K, Parnpai R. 2010. A comparison of cryotop and solid surface vitrification methods for the cryopreservation of in vitro matured bovine oocytes. **J Reprod Dev.** 56:176-181.

—Technical Note—

A Comparison of Cryotop and Solid Surface Vitrification Methods for the Cryopreservation of *In Vitro* Matured Bovine Oocytes

Nucharin SRIPUNYA^{1,2)}, Tamás SOMFAI^{2,3)}, Yasushi INABA^{2,3)}, Takashi NAGAI³⁾, Kei IMAI²⁾ and Rangsun PARNPAI¹⁾

¹⁾Embryo Technology and Stem Cell Research Center, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand, ²⁾National Livestock Breeding Center, Fukushima 961-8511 and ³⁾National Institute of Livestock and Grassland Science, Ibaraki 305-0901, Japan

Abstract. The aim of the present study was to compare the efficacies of the cooling systems of the solid surface (SSV) and Cryotop vitrification methods for cryopreservation of bovine oocytes at the metaphase II stage. The effects of vitrification on oocyte viability, *in vitro* fertilization (IVF), pronucleus formation and subsequent *in vitro* development were assessed. *In vitro* matured (IVM) bovine oocytes were subjected to equilibration and vitrification solutions according to the SSV method, and then the oocytes were vitrified either by dropping onto a cold dry metal surface (SSV group) or by plunging into liquid nitrogen on Cryotop sheets (Cryotop group). Warming was conducted according to the SSV method. Some oocytes were subjected to the cryoprotectants and warming regimen without cooling (Solution control group). The live/dead status of oocytes was evaluated by fluorescein diacetate staining. Live oocytes were subjected to IVF, and the resultant embryos were cultured *in vitro*. The rates of live oocytes were similar among the Fresh control, Solution control, SSV and Cryotop groups. There was no difference in the rates of fertilization, pronuclear formation and monospermy among these groups. The cleavage rates in the SSV and Cryotop groups (41.6 and 53.2%, respectively) were significantly lower than those in the Fresh control and Solution control groups (65.9 and 71.3%, respectively). The blastocyst rates in SSV and Cryotop groups did not differ (10.3 and 12.8%, respectively); however, they were significantly lower than those in the Fresh control and Solution control groups (36.4 and 24.8%, respectively). The inner cell mass, trophoctoderm and total cell numbers in blastocysts did not differ significantly among the Fresh control, Solution control, SSV and Cryotop groups. Our results indicate that IVM bovine oocytes could be cryopreserved successfully using the cooling systems of the Cryotop and Solid Surface Vitrification methods with similar efficacy.

Key words: Bovine, Cryotop, Oocyte, Solid surface vitrification, Vitrification

(J. Reprod. Dev. 56: 176–181, 2010)

Cryopreservation of bovine oocytes is of great importance in the preservation of female genetic resources. Cryopreserved oocytes can be used for *in vitro* fertilization (IVF), nuclear transfer and genetic manipulation. Rall and Fahy [1] were the first to report vitrification, a glass-like solidification, by ultra-rapid cooling of mouse embryos, showing an alternative to traditional freezing methods to avoid chilling injury and ice crystal formation. Vitrification has been widely applied to cryopreserve oocytes in other mammalian species including cattle [2], pigs [3], sheep [4], goats [5], horses [6], buffalo [7], cats [8] and humans [9].

In general, oocytes are more susceptible to cooling damage than zygotes because metaphase spindle microtubule integrity is disrupted during cooling and the high concentration of cryoprotectants affects oocytes during equilibration [10]. Also, differences in the membrane structures seem to make oocytes more sensitive to chilling compared with zygotes [11]. Although the toxicity of cryoprotectants can be minimized by increasing the cooling rate [12], other side effects of cooling and cryoprotectants such as zona

hardening and parthenogenetic activation may affect fertilization results and cause low development rates to the blastocyst stage [12, 13]. Successful vitrification of oocytes requires pretreatment with permeating cryoprotective agents (CPAs) at a relatively low concentration before the final treatment with a vitrification solution containing high concentrations of permeating and non-permeable CPAs. The low intracellular CPA level of the pretreated oocytes would be concentrated to a higher level by severe dehydration in the vitrification solution, which is a key factor in avoiding intracellular ice formation during the subsequent cooling using liquid nitrogen [14]. Practical use of vitrification to preserve bovine oocytes is still limited since vitrified oocytes seem to exhibit an impaired developmental competence after *in vitro* fertilization. Several methods had been developed to achieve rapid cooling by minimizing the volume of vitrification solution containing oocytes and embryos, such as vitrification with electron microscope grids [2], glass capillaries [15], open pulled straws [16], cryoloops [17], Cryotops [9] and solid surface vitrification (SSV) [18]. These methods differ in CPA composition and treatment regimen and also in the methods for cooling and storing the preserved specimens. Two methods, the SSV and Cryotop vitrification methods have been reported to be highly efficient for cryopreservation of bovine oocytes [18, 19]. These methods have different cooling strategies

Received: June 19, 2009

Accepted: September 8, 2009

Published online in J-STAGE: October 8, 2009

© 2010 by the Society for Reproduction and Development

Correspondence: T Somfai (e-mail: somfai@affrc.go.jp)

and apply different cooling and carrier devices. The objective of this study was to compare the efficacies of the cooling systems of the SSV and Cryotop methods for cryopreservation of *in vitro* matured bovine oocytes in terms of oocyte survival fertilization and subsequent *in vitro* development of the resultant embryos.

Materials and Methods

Chemicals and media

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, USA), unless otherwise indicated.

Oocyte collection and *in vitro* maturation (IVM)

Collection and IVM of bovine follicular oocytes were performed as previously described [20]. Ovaries from approximately 28–32-month-old Japanese Black heifers were collected at a local slaughterhouse and transported to the laboratory. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were then aspirated from small follicles (2–6 mm in diameter) using a 5-ml syringe and a 19-gauge needle. The maturation medium consisted of 25 mM Hepes buffered TCM199 (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) and 5% calf serum (CS, GIBCO BRL). COCs were washed twice with the maturation medium and cultured for 20 h in 600- μ l droplets (in groups of 80–100/droplet) of the maturation medium covered with paraffin oil (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) in 35-mm plastic dishes (Nalge Nunc International, Roskilde, Denmark) at 38.5 C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air.

Oocyte vitrification

In vitro matured oocytes were partially denuded by a brief treatment with 0.1% (w/v) hyaluronidase followed by gentle pipetting through a fine glass pipette. Equilibration and cryoprotectant (Solution control) treatment were performed by the methods previously described by Dinnyes *et al.* [18]. Briefly, the oocytes were washed three times in a basic medium (BM), which was composed of 25 mM Hepes buffered TCM199 supplemented with 20% (v/v) fetal bovine serum (FBS, GIBCO BRL), and then treated with an equilibration medium which was composed of BM supplemented with 4% (v/v) ethylene glycol (EG), for 12 to 15 min at 38.5 C. Groups of 5–10 equilibrated oocytes were rinsed three times in 20- μ l droplets of a vitrification solution, which was composed of BM supplemented with 35% (v/v) EG, 50 mg/ml polyvinyl pyrrolidone and 0.4 M trehalose, for 30 sec and then either directly dropped with about 2 μ l vitrification solution onto the chilled dry surface of an aluminum foil floating on LN₂ (SSV group) [21] or placed on a sheet of a Cryotop (Kitazato Supply, Tokyo, Japan; Cryotop group) and plunged into LN₂ [9]. Vitrified oocytes were warmed without storage by transferring microdrops/Cryotops into a warming solution (0.3 M trehalose in BM) at 38.5 C. One to 2 min later, the oocytes were consecutively transferred for 1 min into 500- μ l droplets of BM supplemented with each of 0.15, 0.075 and 0.0375 M trehalose, respectively. They were washed three times in BM at 38.5 C and then returned into their original droplets of maturation medium and incubated for an additional 2 h at 38.5 C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air.

Evaluation of oocyte viability

At 2 h after warming, oocyte viability was evaluated by fluorescein diacetate (FDA) staining according to the method previously described by Mohr and Trounson [22]. Briefly, oocytes were treated with 2.5 μ g/ml FDA in PBS supplemented with 5 mg/ml bovine serum albumin (BSA) at 38.5 C for 2 min in a dark room and then washed three times in PBS supplemented with 5 mg/ml BSA and evaluated under an epifluorescence microscope (IX-71, Olympus, Tokyo, Japan) with UV irradiation using a U-MWIB3 filter with an excitation wavelength of 460–495 nm and emission at 510 nm. Oocytes expressing bright green fluorescence were regarded as living and used in subsequent experiments.

In vitro fertilization (IVF)

IVF of surviving oocytes was carried out as previously reported [20]. Briefly, frozen-thawed semen of a Japanese Black bull was thawed in a 37 C water bath for 30 sec and then centrifuged in 3 ml of a 90% Percoll solution at 740 \times g for 10 min. The pellet was re-suspended and centrifuged in 6 ml of sperm washing medium, which was composed of Brackett and Oliphant (BO) solution [23] supplemented with 10 mM hypotaurine and 4 U/ml heparin (Novo-Heparin Injection 1000, Aventis Pharma, Tokyo, Japan), at 540 \times g for 5 min. Then, the pellet was re-suspended with sperm washing solution and BO medium supplemented with 20 mg/ml BSA to achieve the final concentrations of 3 \times 10⁶ spermatozoa/ml, 5 mM hypotaurine, 2 U/ml heparin and 10 mg/ml BSA. One hundred μ l drops of this sperm suspension were prepared in 35-mm plastic dishes, covered with mineral oil and used as fertilization droplets. The oocytes were removed from the maturation medium, washed twice in BO medium supplemented with 10 mg/ml BSA, placed in the fertilization droplets (20 oocytes/droplet) and cultured for 6 h at 38.5 C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air with saturated humidity.

In vitro culture (IVC)

IVC was performed in 100 μ l droplets of CR1aa medium [24] supplemented with 5% CS covered with paraffin oil. At the end of insemination, putative zygotes were completely denuded from cumulus cells and spermatozoa by gentle pipetting with a fine glass pipette in preincubated IVC medium. Fifteen to twenty five zygotes were placed in each culture drop and then cultured at 38.5 C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air for 9 days. The day of IVF was considered to be Day 0.

Evaluation of fertilization events

At 16–18 h after insemination, some oocytes of each treatment group were mounted on glass slides and fixed with acetic alcohol (acetic acid 1:ethanol 3) for at least 3 days. The oocytes were stained with 1% (w/v) orcein in acetic acid, rinsed in glycerol:acetic acid:water (1:1:3) and then examined under a phase-contrast microscope. Oocytes with a female pronucleus were considered to be activated. Oocytes with a male pronucleus and/or sperm heads with the contributing sperm tails were classified as fertilized. The presence of one female and one male pronucleus was considered to indicate normal fertilization.

Evaluation of *in vitro* development

Embryo development was assessed by occasional viewing under a stereo microscope. Cleavage rates in each treatment group were recorded on Day 2. Since early developmental speed has been reported to predict developmental competence [25], the rates of embryos developing beyond the four cell stage were also recorded at this time. The rates of embryos developing to the blastocyst stage were recorded on Day 7, Day 8 and Day 9.

Blastocyst evaluation by differential staining of inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE) cells

Differential staining of ICM and TE nuclei in blastocysts was performed by the method previously described by Thouas *et al.* [26], with slight modifications. Briefly, blastocysts were simultaneously treated with 0.1 mg/ml propidium iodide (PI) and 0.2% Triton X-100 dissolved in Dulbecco's phosphate buffered saline for 60 sec to permeabilize the membrane and stain the nuclei of TE cells. The embryos were then treated with 25 µg/ml Hoechst 33342 (Calbiochem, San Diego, CA, USA) dissolved in 99.5% ethanol for 5 min, mounted on glass slides in glycerol droplets, flattened by cover slips and examined under UV light with an excitation wavelength of 330–385 nm using an epifluorescence microscope (IX-71, Olympus, Tokyo, Japan). The nuclei of TE cells labeled by both PI and Hoechst appeared pink or red, whereas the nuclei of ICM cells labeled only by Hoechst appeared blue. A digital image of each embryo was taken, and the cell numbers of both cell types were counted using the NIH Image J (v. 1.40) software [27]. Total cell numbers were counted in all embryos. The numbers of ICM and TE cells were counted separately in embryos that had clearly distinguishable populations of red and blue nuclei.

Experimental design

Four treatment groups were compared in this study; the Fresh control group consisted of *in vitro* matured oocytes without exposure to cryoprotectants or cooling. To assess cryoprotectant toxicity, oocytes were exposed to equilibration and vitrification treatments as described above, but without cooling, and subjected to the rehydration (warming) procedure (Solution control group). To compare cryodevice efficiency, *in vitro* matured oocytes were cryopreserved either by using Cryotop devices (Cryotop group) or SSV (SSV group). They were also warmed in the same manner as described above. The viability of oocytes in each group was compared 2 h after the treatments. Live oocytes were fertilized *in vitro*, and the resultant embryos were cultured *in vitro*. In each replication, a sample of 10 putative zygotes was selected randomly from each treatment group at 16–18 h after IVF to assess their fertilization status. The rest of the oocytes were subsequently cultured to compare *in vitro* development and blastocyst cell numbers.

Statistical analysis

Data for embryo development, fertilization and embryo cell numbers were arcsine transformed and analyzed by one-way ANOVA using the KyPlot package (Ver. 4.0, KyensLab, Tokyo, Japan). Five replications of the experiments were performed.

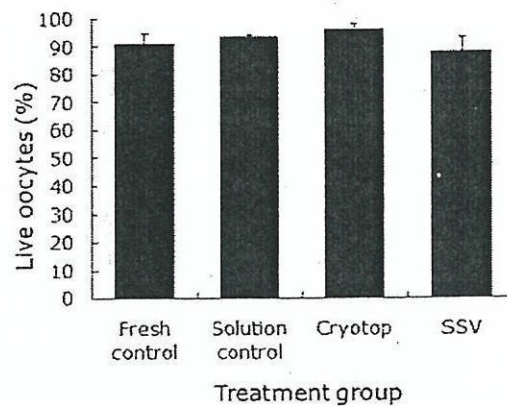


Fig. 1. Viability of oocytes after different treatments evaluated by FDA staining. The four treatment groups shown here are the Fresh control group (n=252), oocytes without treatment; Solution control group (n=249), oocytes pretreated with vitrification solution and recovered without cooling; Cryotop group (n=238), oocytes vitrified by the Cryotop method; and SSV group (n=239), oocytes vitrified by solid surface vitrification. Five replications were performed. No significant difference was detected among the treatment groups at $P < 0.05$ using one-way ANOVA.

Results

Effect of cooling device on viability of oocytes

The viability of oocytes selected by morphology was examined by FDA staining. The rates of live oocytes in the non-vitrified, Solution control and both vitrified groups were over 90% (Fig 1.). There was no significant difference in the rates of live oocytes after treatment among the Fresh control, Solution control, Cryotop and SSV groups.

Effect of cooling device on fertilization results after IVF of surviving oocytes

As shown in Table 1, there was no significant difference among the Fresh control, Solution control, SSV and Cryotop groups in the rates of fertilization and monospermy after IVF. The total fertilization rates of oocytes vitrified in the Cryotop and SSV groups were similar (78.0 and 64.0%, respectively) and did not differ significantly from those in the Fresh control and Solution control groups (54.0 and 62.0%, respectively). There was no significant difference in the percentage of activated oocytes among the Fresh control, Solution control, SSV and Cryotop groups (50.0, 58.0, 48.0 and 62.0%, respectively). The rates of normal fertilization of oocytes in the Fresh control and Solution control exposed groups (36.0 and 40.0%, respectively) were not significantly different from those of oocytes in the Cryotop and SSV groups (34.0 and 36.0%, respectively).

Effect of cooling device on *in vitro* development of surviving oocytes

As shown in Table 2, the cleavage rate in the SSV group was significantly lower compared with that of the Solution control group but did not differ from those of the Fresh control and Cryo-

Table 1. Fertilization status of oocytes at 18 h after IVF

Treatment	No. of oocytes examined	No. (%) of oocytes		
		Fertilized	Activated	Normal fertilization
Fresh control	50	27 (54.0 ± 9.7)	25 (50.0 ± 8.9)	18 (36.0 ± 11.2)
Solution control	50	31 (62.0 ± 11.1)	29 (58.0 ± 9.1)	20 (40.0 ± 8.3)
Cryotop	50	39 (78.0 ± 8.0)	31 (62.0 ± 6.6)	17 (34.0 ± 8.1)
SSV	50	32 (64.0 ± 7.4)	24 (48.0 ± 8.6)	18 (36.0 ± 12.0)

Five replications were performed. Data in parentheses are presented as means ± SEM. No significant difference was detected among the treatment groups at $P < 0.05$ using one-way ANOVA. Solution control: Oocytes were pretreated with vitrification solution and recovered without cooling. Cryotop: Oocytes were vitrified by the Cryotop method. SSV: Oocytes were vitrified by the solid surface vitrification method. Oocytes with a female pronucleus were considered to be activated. Oocytes with a male pronucleus(i) and/or sperm heads with the contributing sperm tails were classified as fertilized. The presence of one female and one male pronucleus was considered to indicate normal fertilization.

Table 2. *In vitro* development of control, CPA and vitrified oocytes after IVF

Treatment	No. of oocytes cultured	Day 2 *		Oocytes (%) developed to the blastocyst stage on		
		Cleaved	> 4 Cell	Day 7	Day 8 [#]	Day 9 [#]
Fresh control	175	117 (65.9 ± 10.9) ^{ab}	79 (45.1 ± 3.2) ^a	44 (25.3 ± 7.4) ^a	59 (33.1 ± 7.3) ^a	65 (36.4 ± 7.6) ^a
Solution control	171	106 (61.3 ± 5.9) ^a	80 (46.7 ± 8.2) ^a	31 (18.1 ± 2.6) ^a	40 (23.2 ± 3.1) ^a	43 (24.8 ± 3.9) ^{ab}
Cryotop	162	88 (53.2 ± 9.4) ^{ab}	68 (41.9 ± 7.3) ^{ab}	10 (6.1 ± 3.7) ^b	14 (8.7 ± 5.1) ^b	21 (12.8 ± 5.0) ^b
SSV	140	55 (41.6 ± 4.7) ^b	37 (26.4 ± 6.6) ^b	13 (8.0 ± 3.6) ^b	16 (9.8 ± 5.0) ^b	17 (10.3 ± 5.1) ^b

Five replications were performed. Data in parentheses are presented as means ± SEM. ^{ab} Different superscripts in the same column indicate a significant difference at $P < 0.05$ (one-way ANOVA). *The day of IVF was considered to be Day 0. [#] Cumulative values. Solution control: Oocytes were pretreated with vitrification solution and recovered without cooling. Cryotop: Oocytes were vitrified by the Cryotop method. SSV: Oocytes were vitrified by the solid surface vitrification method.

top groups. The percentages of embryos that developed beyond the 4-cell stage on Day 2 did not differ significantly between the Cryotop and SSV groups (41.9 and 26.4%, respectively); however, the percentage in the SSV group was significantly lower than that of the Fresh control group (45.1%). The rates of cleavage and embryo development to the blastocyst stage on Day 7, Day 8 and Day 9 were not significantly different between the Fresh control and Solution control groups. The blastocyst rates did not differ between Cryotop and SSV groups on Day 7 (6.1 vs. 8.0%, respectively), Day 8 (8.7 vs. 9.8%, respectively) and Day 9 (12.8 vs. 10.3%, respectively) but they were significantly lower than those of the Fresh control group (25.3, 33.1 and 36.4%, respectively).

Effect of cooling device on blastocyst quality

As shown in Table 3, there was no significant difference among the Fresh control, Solution control, SSV and Cryotop groups in the total numbers of nuclei in blastocysts, which ranged between 73.9 ± 12.5 and 90.9 ± 3.1 on Day 9. Similarly, no significant difference was found in the numbers of ICM and TE cells among the Fresh control, Solution control, SSV and Cryotop groups.

Discussion

Vitrification is a simple, rapid and cost-effective method for cryopreservation of mammalian cells. Using this method cryopreserved cells are less likely to experience solution effects and intracellular ice formation compared with the traditional method of slow cooling [28]. On the other hand, due to the high concentrations of cryoprotective agents the cells may be exposed to detrimental osmotic effects. Therefore, the period of exposure to CPAs before plunging into LN₂ is critical and should not be extended. High concentrations of CPA used for vitrification have been proven to be toxic to cells [29, 30]. However, in our study, CPA treatment did not affect survival and development of oocytes, suggesting that the present CPA treatment regimen is suitable for vitrification of M-II bovine oocytes. Metaphase II oocytes are more difficult to cryopreserve than embryos due to the temperature sensitive metaphase spindle and its susceptibility to chilling injury [31]. Thus, successful vitrification requires high concentrations of permeable cryoprotectants and a very rapid cooling rate, which can be provided by both the Cryotop and SSV methods [9, 18]. The Cryotop method applies a thin plastic sheet on which oocytes/embryos are placed with a minimum amount of vitrification solution before plunging into LN₂ [9]. On the other hand, the SSV

Table 3. Cell numbers in blastocysts developed from control, CPA and vitrified oocytes

Groups	No. of blastocysts evaluated	No. of nuclei \pm SEM		
		Total cells	TE	ICM
Fresh control	52	90.9 \pm 3.1	65.5 \pm 2.5	25.3 \pm 3.9
Solution control	39	83.4 \pm 5.9	52.7 \pm 4.9	30.5 \pm 3.2
Cryotop	17	77.9 \pm 14.3	46.1 \pm 12.5	31.8 \pm 2.8
SSV	13	73.9 \pm 12.5	46.5 \pm 17.0	27.4 \pm 4.4

Five replications were performed. No significant difference was detected among the treatment groups at $P < 0.05$ using one-way ANOVA. Solution control; Oocytes were pretreated with vitrification solution and recovered without cooling. Cryotop, Oocytes were vitrified by the Cryotop method. SSV; Oocytes were vitrified by the solid surface vitrification method.

method achieves a high cooling rate by using a combination of microdrops and improved heat exchange by direct contact with a dry metal surface cooled by LN₂ [18]. In this study, high survival and fertilization rates were achieved for vitrified oocytes by both the Cryotop and SSV methods, which enabled their subsequent *in vitro* development after IVF. The high survival rates and normal morphology of the vitrified-thawed bovine oocytes could have been achieved due to high rates of cooling and warming. Previous reports have shown that treatment with CPAs or cooling of M-II oocytes may trigger biochemical reactions similar to those phenomena occurring during fertilization, which can result in hardening of the zona pellucida and/or parthenogenetic activation of the oocyte in several mammalian species [12, 13, 32–35]. However, we observed similar fertilization, monospermy and pronuclear formation rates among the Fresh control, Solution control, SSV and Cryotop groups, suggesting that the Solution control treatment, both cooling methods and the warming regimen used in the present study did not cause such phenomena in M-II bovine oocytes and allowed their normal fertilization by IVF. Also, we observed similar rates of subsequent blastocyst formation on Day 7, Day 8 and Day 9 for oocytes vitrified by the Cryotop and SSV methods. Taken together, these results indicate that the cooling strategies of the SSV and Cryotop vitrification methods are equally effective for cryopreservation of bovine IVM oocytes. In this respect, both of these cooling methods can be recommended for cattle oocyte vitrification. The choice between the two methods may depend on the advantage and convenience of each method and the actual circumstances (e.g., the number of oocytes for cryopreservation) of the work. SSV is a very cheap method that enables preservation of several microdrops of vitrification solution within a short period of time, each containing a large number of oocytes. On the other hand, controlling the droplet size by this method requires extensive practice, and there is a constant chance of oocyte loss since some oocytes tend to attach to the inner surface of the glass capillary during droplet formation. This method is therefore more suitable for rapid cryopreservation of large quantities (hundreds) of oocytes/embryos. More precise control of the volume of the vitrified solution and oocyte numbers can be achieved by Cryotop vitrification, and this method offers a convenient way of storage and handling after cooling. However, the numbers of oocytes that can be preserved on each Cryotop sheet is limited, and preservation of large numbers of oocytes by this method takes an

extended period of time.

The cleavage and blastocyst formation rates of bovine M-II oocytes cryopreserved by either the Cryotop and SSV methods in our study were higher than those reported by Roser *et al.* [36] using the Cryotop method. On the other hand, the cleavage and blastocyst formation rates of surviving vitrified oocytes in both the Cryotop and SSV groups were still reduced compared with those of the Fresh control and Solution control groups. Similar to previous studies of cattle and pig oocytes [13, 18], treatment of M-II stage oocytes with cryoprotectants without vitrification according to the SSV protocol did not influence fertilization and *in vitro* development. Taken together with the high survival rates, this suggests that the impaired developmental ability of vitrified oocytes was caused by sub-lethal damage that could be mainly related to the cooling and/or warming procedure. Such sub-lethal damage may include disruption of the meiotic spindle and other cytoskeletal elements [10, 37], damage and dysfunction of organelles such as mitochondria or endoplasmic reticuli [38–40] or degradation of cytoplasmic mRNA levels [41], which have been reported to occur in cryopreserved mammalian oocytes. Further improvements of the present vitrification protocols will be necessary to avoid such damage.

In conclusion, our data indicate that both the Cryotop and SSV vitrification methods could yield high rates of surviving oocytes that could develop to the blastocyst stage after IVF. The cooling systems of the Cryotop and SSV methods were proven to be equally effective for preservation of IVM bovine oocytes in terms of their survival and subsequent developmental competence after IVF and IVC. However, further studies are necessary to improve the developmental competence of cryopreserved oocytes.

Acknowledgments

This study was supported by the NRCT-JSPS 2008 Joint Research program and Suranaree University of Technology. The authors would like to thank all members of the Embryo Transfer Team of the National Livestock Breeding Center, Japan, for their technical assistance.

References

1. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature* 1985; 313: 573–575.

2. Martino AN, Songsasen S, Leibo SP. Development in to blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod* 1996; 54: 1059-1069.
3. Isachenko V, Soler C, Isachenko E, Perez-Sanchez F, Grishchenko V. Vitrification of immature porcine oocytes: effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant. *Cryobiology* 1998; 3: 250-253.
4. Isachenko V, Alabart JL, Nawroth F, Isachenko E, Vajta G, Folch J. The open pulled straw vitrification of ovine GV-oocytes: positive effect of rapid cooling or rapid thawing or both? *Cryo Lett* 2001; 22: 157-162.
5. Begin I, Bhatia B, Baldassarre H, Dinnyes A, Keefer CL. Cryopreservation of goat oocytes and *in vitro* derived 2- to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods. *Theriogenology* 2003; 59: 1839-1850.
6. Hurtt AE, Landim-Alvarenga F, Seidel Jr GE, Aquires EL. Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. *Theriogenology* 2000; 54: 119-128.
7. Dhali A, Manik RS, Das SK, Singla SK, Palta P. Vitrification of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. *Theriogenology* 2000; 53: 1295-1303.
8. Murakami M, Otoi T, Karja NW, Wongsrikhao P, Agung B, Suzuki T. Blastocyst derived from *in vitro* fertilized cat oocytes after vitrification and dilution with sucrose. *Cryobiology* 2004; 48: 341-348.
9. Kuwayama M, Kato O. All-round vitrification method for human oocytes and embryos. *J Assist Reprod Genet* 2000; 17: 477 (abstract).
10. Chen SU, Lien YR, Chao KH, Ho HN, Yang YS, Lee TY. Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing—a review article. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 202: 101-107.
11. Ghetler Y, Yavin S, Shalgi R, Arav A. The effect of chilling on membrane lipid phase transition in human oocytes and zygotes. *Hum Reprod* 2005; 12: 3385-3389.
12. Carroll J, Depypere H, Matthews CD. Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *J Reprod Fert* 1990; 90: 547-553.
13. Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Karja NWK, Farhudin M, Dinnyes A, Nagai T, Kikuchi K. Developmental competence of *in vitro*-fertilized porcine oocytes after *in vitro* maturation and solid surface vitrification: Effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage. *Cryobiology* 2007; 55: 115-126.
14. Hoshi S, Terao T, Kamei M, Koto M, Hirabayashi M, Hirao M. Successful vitrification of pronuclear-stage rabbit zygotes by minimum volume cooling procedure. *Theriogenology* 2004; 61: 267-275.
15. Hoshi S, Fujimoto T, Braun J, Oguri N. Pregnancies following transfer of equine embryos cryopreserved by vitrification. *Theriogenology* 1994; 42: 483-488.
16. Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobson H, Greve T, Callesen H. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 1998; 51: 53-58.
17. Lane M, Bavister BD, Lyons EA, Forest KT. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 1234-1236.
18. Dinnyes A, Dai Y, Jiang S, Yang X. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod* 2000; 63: 513-518.
19. Chian RC, Kuwayama M, Tan L, Tan J, Kato O, Nagai T. High survival rate of bovine oocytes matured *in vitro* following vitrification. *J Reprod Dev* 2004; 50: 685-696.
20. Imai K, Tagawa M, Yoshioka H, Matoba S, Narita M, Inaba Y, Aikawa Y, Ohtake M, Kobayashi S. The efficiency of embryo production by ovum pick-up and *in vitro* fertilization in cattle. *J Reprod Dev* 2006; 52: 19-29.
21. Li X, Su L, Li Y, Ji W, Dinnyes A. Vitrification of Yunnan cattle oocytes: work in progress. *Theriogenology* 2002; 58: 1253-1260.
22. Mohr LR, Trounson AO. The use of fluorescein diacetate to assess embryo viability in the mouse. *J Reprod Fert* 1980; 58: 189-196.
23. Brackett BG, Oliphant G. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol Reprod* 1975; 12: 260-274.
24. Rosenkrans Jr CF, Zeng GQ, Mcnamara GT, Schoff PK, First NL. Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. *Biol Reprod* 1993; 49: 459-462.
25. Holm P, Shukri NN, Vajta G, Booth P, Bendixen C, Callesen H. Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine *in vitro* produced embryos in relation to their *in vitro* viability and sex. *Theriogenology* 1998; 50: 1285-1299.
26. Thous GA, Korfiatis NA, French AJ, Jones GM, Trounson AO. Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. *Reprod Biomed Online* 2001; 3: 25-29.
27. Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ. Image processing with image. *J Biophotonics International* 2004; 11: 36-42.
28. Fahy GM, McFralane DR, Angell CA, Meryman HT. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 1984; 21: 407-426.
29. Fuller B, Paynter S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reprod Biomed Online* 2004; 9: 680-691.
30. Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed* 2005; 300: 308 (abstract).
31. Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology* 2000; 53: 59-72.
32. Van der Elst J, Van den Abbeel E, Nerinckx S, Van Steirteghem A. Parthenogenetic activation pattern and microtubular organization of mouse oocyte after exposure to 1,2-propanediol. *Cryobiology* 1992; 29: 549-562.
33. Larman MG, Sheehan CB, Gardner DK. Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes. *Reproduction* 2006; 131: 53-61.
34. Matson PL, Graefling J, Junk SM, Yovich JL, Edirisinghe WR. Cryopreservation of oocytes and embryos: use of a mouse model to investigate effects upon zona hardness and formulate treatment strategies in an *in vitro* fertilization programme. *Hum Reprod* 1997; 12: 1550-1553.
35. Tian SJ, Yan CL, Yang HX, Zhou GB, Yang ZQ, Zhu SE. Vitrification solution containing DMSO and EG can induce parthenogenetic activation of *in vitro* matured ovine oocytes and decrease sperm penetration. *Anim Reprod Sci* 2007; 101: 365-371.
36. Morat6 R, Izquierdo D, Paramio MT, Mogas T. Cryotop versus open-pull straw (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: Effect on spindle and chromosome configuration and embryo development. *Cryobiology* 2008; 57: 137-141.
37. Albarrac6n JL, Morat6 R, Rojas C, Mogas T. Effects of vitrification in open pulled straws on the cytology of *in vitro* matured prepubertal and adult bovine oocytes. *Theriogenology* 2005; 63: 890-901.
38. Fuku E, Xia L, Downey BR. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 1995; 2: 139-156.
39. Rho GJ, Kim S, Yoo JG, Balasubramanian S, Lee HJ, Choe SY. Microtubulin configuration and mitochondrial distribution after ultra-rapid cooling of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 2002; 4: 464-470.
40. Lowther KM, Weitzman VN, Maier D, Mehlmann LM. Maturation, fertilization, and the structure and function of the endoplasmic reticulum in cryopreserved mouse oocytes. *Biol Reprod* 2009 Mar 18. [Epub ahead of print]
41. Succu S, Bebbere D, Bogliolo L, Ariu F, Fois S, Leoni GG, Berlinguer F, Naitana S, Ledda S. Vitrification of *in vitro* matured ovine oocytes affects *in vitro* pre-implantation development and mRNA abundance. *Mol Reprod Dev* 2008; 3: 538-546.

ประวัติผู้วิจัย

ผศ. ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาย รังสรรค์ พาลพ่าย

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Rangsun Pampai

ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 52 2094 00002 42 3

3. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้

ที่ทำงาน: สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

111 ถ.มหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000

โทร. 044-224234 โทรสาร. 044-224154

ที่อยู่บ้าน: 51/31 หมู่ 6 ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา

4. ประวัติการศึกษา

4.1. ปริญญาตรี สาขาวิชา ชีววิทยา ปีที่จบ 2523

สถาบัน มหาวิทยาลัยบูรพา ประเทศ ไทย

4.2. ปริญญาโท สาขาวิชา สัตววิทยา ปีที่จบ 2525

สถาบัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศ ไทย

Thesis title: Plasma progesterone and oestrone sulphate during early pregnancy

in swamp buffalo.

4.3. ปริญญาเอก สาขาวิชา Animal Reproduction ปีที่จบ 2541

สถาบัน Kyoto University ประเทศ ญี่ปุ่น (ได้รับทุนรัฐบาลญี่ปุ่น)

Thesis title: Study on the establishment of bovine embryonic stem cells.

4.4. ฝึกอบรมสาขา Embryo transfer and *in vitro* fertilization in farm animals.

ด้วยทุน British Council

สถาบัน Cambridge University, U.K. ระหว่าง พฤศจิกายน 2527 - กุมภาพันธ์ 2528.

4.5. สมาชิกสมาคมวิชาชีพ: International Embryo Transfer Society (IETS)

5. ประวัติการทำงาน:

- 9 ธันวาคม 2525 – 31 ตุลาคม 2543 นักวิจัย โครงการวิจัยวิทยาศาสตร์ไทย-เนเธอร์แลนด์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ
- 1 พฤศจิกายน 2543–ปัจจุบัน อาจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา

6. สาขาวิชาที่มีความเชี่ยวชาญพิเศษ

- 6.1 การโคลนนิ่งตัวอ่อนโค กระบือ สุกร แมว โดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบ
- 6.2 การย้ายฝากตัวอ่อนโค กระบือ แพะ
- 6.3 การปฏิสนธิในหลอดแก้วโค กระบือ
- 6.4 Embryonic stem cells
- 6.5 Cryopreservation of gametes and embryos

7. ผลงานวิจัย

7.1. ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

- Tanthanuch, W., Thumanu, K., Lorthongpanich, C., **Parnpai, R.** and Heraud, P. **2009.** Neural differentiation of mouse embryonic stem cells studied by FT-IR spectroscopy. *J. Mol. Struct.* 967: 189-195.
- Laowtammathron, C., Cheng, E.C., Cheng, P.H, Snyder, B.R., Yang, S.H., Johnson, Z., Lorthongpanich, C., Kuo, H.C., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S. **2009.** Monkey Hybrid Stem Cells Develop Cellular Features of Huntington's Disease. *BMC Cell Biology.* Accepted 24 December, 2009.
- Imsoonthornruksa, S., Lorthongpanich, C., Sangmalee, A., Srirattana, K., Laowtammathron, C., Tunwattana, W., Somsa, W., Ketudat-Cairns, M., and **Parnpai, R.** **2009.** Abnormalities in the transcription of reprogramming genes related to global epigenetic events of cloned endangered felid embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* Accepted 5 October, 2009.
- Sripunya, N., Somfai, T., Inaba, Y., Nagai, T., Imai, K. and **Parnpai, R.** **2009.** A comparison of Cryotop and Solid Surface Vitrification methods for the cryopreservation of in vitro matured bovine oocytes. *J. Reprod. Dev.* 56: 176-181.

- Srirattana, K., Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Imsoonthornruksa S., Ketudat-Cairns, M., Phermthai, T., Nagai, T. and **Parnpai, R.** 2009. Effect of donor cell types on developmental potential of cattle (*Bos taurus*) and swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) cloned embryos. *J. Reprod. Dev.* 56: 49-54.
- Thumanu, K., Tanthanuch, W., Lorthongpanich, C., Heraud, P. and **Parnpai, R.** 2009. FTIR microspectroscopic imaging as a new tool to distinguish chemical composition of mouse blastocyst. *J. Mol. Struct.* 933: 104-111.
- Suteevun-Phermthai, T., Curchoe, C.L., Evans, A.C., Boland, E., Rizos, D., Fair, T., Duffy, P., Sung, L.Y., Du, F., Chaubal, S., Xu, J., Wechayant, T., Yang, X., Lonergan, P., **Parnpai, R.**, and Tian, X. 2009. Allelic switching of the imprinted *IGF2R* gene in cloned bovine fetuses and calves. *Anim. Reprod. Science.* 116: 19-27.
- Lorthongpanich, C., Yang, S.H., Piotrowska-Nitsche, K., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S. 2008. Development of single blastomere derived mouse embryos, outgrowths and embryonic stem cells. *Reproduction.* 135: 805-813.
- Lorthongpanich, C., Yang, S.H., Piotrowska-Nitsche, K., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S. 2008. Chemical enhancement in embryo development and stem cell derivation from single blastomeres *Cloning Stem Cells* 10: 503-512.
- Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Chan, A.W.S., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2008. Development of interspecies cloned monkey embryo reconstructed with bovine enucleated oocyte. *J. Reprod. Dev.* 54: 306-313.
- Parnpai, R.** 2007. Production of cloned embryos in buffalo. *Ital. J. Anim. Sci.* 6. Suppl. 2: 102-106.
- Chan, A.W.S., Lorthongpanich, C., Yang, S.H., Piotrowska-Nitche, K. and **Parnpai, R.** 2007. Competence of early embryonic blastomeres for establishment of embryonic stem cell line. *Fertility and Sterility* 88: S396-S396.
- Muenthaisong, S., Laowtammathron, C., Ketudat-Cairns, M., **Parnpai, R.** and Hochi, S. 2007. Quality analysis of buffalo blastocysts derived from oocytes vitrified before or after enucleation and reconstructed with somatic cell nuclei. *Theriogenology* 67: 893-900.
- Suteevun, T., Smith, S.L., Muenthaisong, S., Yang, X., **Parnpai, R.** and Tian, X.C. 2006. Anomalous mRNA levels of chromatin remodeling genes in swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) cloned embryos. *Theriogenology.* 65: 1704-1715.

- Suteevun, T., **Parnpai, R.**, Smith, S.L., Chang, C.C., Muenthaisong, S. and Tian, X.C. 2006. Epigenetic characteristics of cloned and in vitro-fertilized swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *J. Anim. Sci.* 84: 2065-2071.
- Laowtammathron, C., Lorthongpanich, C., Ketudat-Cairns, C., Hochi, C., and **Parnpai, R.** 2005. Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: effects of hatching stage, linoleic acid–albumin in IVC medium and Ficoll supplementation to vitrification solution. *Theriogenology* 64: 1185-1196.
- Parnpai, R.**, Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 2001. Cloning of pig embryo by using ear fibroblasts and tail muscle cells as donor nuclei : Effect of time after maturation and fusion parameters on the rate of fusion and development of embryo. *Thai J. Agri. Sci.* 34: 187-194.
- Parnpai, R.**, Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 1999. Development of cloned swamp buffalo embryos derived from fetal fibroblasts: comparison *in vitro* cultured with or without buffalo and cattle epithelial cells. *Buffalo J.* 15 (3): 371-384.

7.2. ตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ

- จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2546. การโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์เพื่ออนุรักษ์และเพิ่มจำนวนสัตว์ใกล้สูญพันธุ์. *Lab.Today.* 2: 33-37.
- รังสรรค์ พาลพ่าย. 2530. อดีต ปัจจุบัน และ อนาคตของการย้ายฝากตัวอ่อน. *เวชสารสัตวแพทย์* 16: 258-269.
- รังสรรค์ พาลพ่าย สรรเพชญ โสภณ มณีวรรณ กมลพัฒนะ กำธร มีบำรุง กิตติยา ศรีศักดิ์วัฒน์ ประชุม อินทรโชติ ธวัชชัย สุวรรณกำจาย ประภากร วัฒนนคร พฤติ เกิดชูชื่น และ สมสวัสดิ์ ตันตระกูล. 2530. การย้ายฝากตัวอ่อน (E.T.) ในประเทศไทย. *แก่นเกษตร* 15: 271-280.
- รังสรรค์ พาลพ่าย และ จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์. 2545. แนวทางการโคลนนิ่งเพื่ออนุรักษ์และเพิ่มจำนวนสัตว์ใกล้สูญพันธุ์. *วารสารสัตว์ป่าเมืองไทย.* 10: 82-85.

7.3. นำเสนอในการประชุมนานาชาติ

- Srirattana, K., Ketudat-Cairns, M., Phermthai, T., Takeda, K., Nagai T. and **Parnpai, R.** 2009. Somatic cell nuclear transfer in swamp buffalo. *Proceeding of Buffalo Propagation Conference, 17 December, 2009, Tainan, Taiwan, RPC.*
- Srirattana, K., Takeda, K., Matsukawa, K., Tasai, M., Akagi, S., Nirasawa, K., Nagai, T., Y., Kanai, Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2009. Quantitative analysis of mitochondrial DNA in

swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) interspecies cloned embryos. *Proceeding of the 6th Annual Conference of Asian Reproductive Biotechnology Society conference, 16-20 November, 2009, Siem Reap City, Cambodia.* P.57.

Parnpai, R. 2009. Progress of inter-species somatic cell nuclear transfer in bovidae and felidae family. *Proceeding The 7th Asian Symposium on Animal Biotechnology.* Chungbuk National University, Korea, 19 June, 2009.

Suksawaeng, S. Danna, Y. and **Parnpai, R.** 2009. Heart chicken may able to maintain and induce mice embryonic stem cells to form hepatic plate-like structure. *Proceeding of the 4th World Congress on Regenerative Medicine, 12-14 March 2009, Bangkok, Thailand.* p.174.

Srirattana K., Laowtammathron C., Devahudi R., Imsoonthornruksa S., Sangmalee A., Tunwattana W., Lorthongpanich C., Sripunya N., Keawmungkun K., Phewsoi W., Ketudat-Cairns M., and **Parnpai R.** 2009. Effect of Trichostatin A on developmental potential of inter-species cloned gaur (*Bos gaurus*) embryos. *Proceeding of the Annual Conference of International Embryo Transfer Society, 3-6 January, 2009, San Diego, USA, Published in Reprod. Fert. Dev.* 21: 126.

Liang Y. Y., Ye D. N., Laowtammathron C., Phermthai T., and **Parnpai R.** 2009. In vitro production of swamp buffalo embryos by intracytoplasmic sperm injection: effect of chemical activation treatments. *Proceeding of the Annual Conference of International Embryo Transfer Society, 3-6 January, 2009, San Diego, USA, Published in Reprod. Fert. Dev.* 21: 230.

Imsoonthornruksa, S., Lorthongpanich, C., Sangmalee, A., Srirattana, K., Sripunya, N., Keawmungkun, K., Wanwisa, P., Laowtammathron, C., Tunwattana, W., Somsa, W., Kongkham, W., Ketudat-Cairns, M., and **Parnpai, R.** 2007. Expression profile of Oct4 in pre-implantation embryo of cloned endangered felid species. *Proceeding of the 4th Asian Reproductive Biotechnology Conference, 24-26 November, 2007. National University of Singapore, Singapore:* p. 89.

Laowtammathron, C., Srirattana, K., Lorthongpanich, C., Imsoonthornruksa, S., Sripunya, N., Phewsoi, W., Keawmungkun, K., Davahudee, R., Sangmalee, A., Thongprapai, T., Chaimongkol, C., Ketudat-Cairns, M., and **Parnpai, R.** 2007. Effect of activation treatments on development of bovine embryos after intracytoplasmic sperm injection (ICSI).

- Proceeding of the 4th Asian Reproductive Biotechnology Conference*, 24-26 November, 2007. National University of Singapore, Singapore: p. 137.
- Lorthongpanich, C., Yang, S.H., Piotrowska-Niches, K., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S. 2007. Embryonic stem cell establishment from mouse single blastomere. *Proceeding of the 4th Asian Reproductive Biotechnology Conference*, 24-26 November, 2007. National University of Singapore, Singapore: p. 112.
- Parnpai, R.** 2007. The progress of interspecies SCNT: Bovidae and felidae cases. *Proceeding of the 4th Asian Reproductive Biotechnology Conference*, 24-26 November, 2007. National University of Singapore, Singapore: p. 46.
- Sangmalee, A., Srirattana, K., Sripunya, N., Phewsoi, W., Keawmungkun, K., Imsoonthornruksa S., Lorthongpanich, C., Laowtammathron, Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2007. Birth of cloned goat : a preliminary study for conservation of endangered mountain goat. *Proceeding of the 4th Asian Reproductive Biotechnology Conference*, 24-26 November, 2007. National University of Singapore, Singapore: p. 80.
- Srirattana, K., Imsoonthornruksa S., Tunwattana, W., Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Sripunya, Keawmungkun, K., Wanwisa, P., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2007. Telomerase activity of in inter-species somatic cell nuclear transfer gaur embryos. *Proceeding of the 4th Asian Reproductive Biotechnology Conference*, 24-26 November, 2007. National University of Singapore, Singapore: p. 130.
- Imsoonthornruksa S., Lorthongpanich, C., Srirattana, K., Sripunya, N., Laowtammathron, C., Ketudat Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2007. Effect of manipulation medium on the development of reconstructed domestic cat embryos. *Proceeding of the Annual Conference of the International Embryo Transfer Society*, 6-10 January 2007, Kyoto, Japan, Published in *Reprod. Fertil. Dev.* 19: 141.
- Lorthongpanich, C., Srirattana, K., Imsoonthornruksa S., Sripunya, N., Laowtammathron, C., Kumpong, O., Ketudat-Cairns, M., and **Parnpai, R.** 2007. Expression and distribution of Oct-4 in interspecies-cloned long-tailed monkey (*Macaca fascicularis*) embryos. *Proceeding of the Annual Conference of the International Embryo Transfer Society*, 6-10 January 2007, Kyoto, Japan, Published in *Reprod. Fertil. Dev.* 19: 149.
- Parnpai, R.**, Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Imsoonthornruksa S., Muenthaisong, S., and Ketudat Cairns, M. 2006. Recent status of somatic cell nuclear transfer for conservation

- of endangered species. *Proceeding of the 3rd Asian Reproductive Biotechnology Conference*, 29 November – 3 December 2006, Hanoi, Vietnam, p. 44-47.
- Lorthongpanich, C., Srirattana, K., Imsoonthornruksa S., Sripunya, N., Laowtammathron, C., Somsa, W., Kongsila, A., Kretapol, K., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2006. Development of interspecies cloned long tailed monkey (*Macaca fascicularis*) embryos after reconstructed with bovine enucleated oocytes and culturing in different condition. *Proceeding of the 3rd Asian Reproductive Biotechnology Conference*, 29 November – 3 December 2006, Hanoi, Vietnam, p. 125-126.
- Srirattana, K., Lorthongpanich, C., Imsoonthornruksa S., Sripunya, N., Tangthai, C., Laowtammathron, C., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2006. Effect of donor cell types on development of cloned swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) and bovine (*Bos taurus*) embryos. *Proceeding of the 3rd Asian Reproductive Biotechnology Conference*, 29 November – 3 December 2006, Hanoi, Vietnam, p. 134-135.
- Imsoonthornruksa S., Lorthongpanich, C., Srirattana, K., Sripunya, N., Laowtammathron, C., Tanwatana, W., Somsa, W., Kongkham, W., Kretapol, K., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2006. Differentiation of marbled cat (*Pardofelis marmorata*) nuclei after reconstructed with enucleated domestic cat and bovine oocytes. *Proceeding of the 3rd Asian Reproductive Biotechnology Conference*, 29 November – 3 December 2006, Hanoi, Vietnam, p. 140.
- Parnpai, R.**, Muenthaisong, S., Suteevun, T., Na-Chiangmai, A., Laowtammathron, C., Lorthongpanich, C., Sanghuayphrai, N. and Ketudat Cairns, M. 2006. Production of swamp buffalo embryos: Comparison of in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer techniques. *Proceeding of the 5th Asian Buffalo Congress*, Naning, China, 18-22 April, 2006, p. 616-620.
- Curchoe, C., Suteevun, T., Yang, X., **Parnpai, R.** and Tian, X.C. 2005. Analysis of the expression pattern of the imprinted *IGF2R* gene in cloned cattle. *Proceeding of the 2nd Asian Reproductive Biotechnology Conference*, 2-7 November, 2005, Bangkok, Thailand. p 159.
- Lorthongpanich, C., Laowtammathron C., Monson R.L., M. Wiltbank., Sangsitavong S., **Rarnpai R.** and Rutledge, J.J. 2005. Kinetic changes of *in vitro* produced bovine sexed pre-implantation embryos. 2005. *Proceeding of the 2nd Asian Reproductive Biotechnology Conference*, Bangkok, Thailand, 3-4 November, 2005, p.157.

- Sang-ngam, C., Imsoonthornruksa S., Tangthai C., Srirattana, K., Tunwattana, W., Muenthaisong, S., Laowtammathron C., Lorthongpanich, C., Ketudart-cairn, M. and **Parnpai, R.** 2005. Interspecies nuclear transfer using female and male gaur (*Bos gaurus*) skin fibroblasts reconstructed with enucleated bovine oocytes. *Proceeding of the 2nd Asian Reproductive Biotechnology, 2-7 November, 2005, Bangkok, Thailand.* p 170.
- Suteevun, T., Smith, S.L., Muenthaisong, S., Yang, X., **Parnpai, R.** and Tian, X.C. 2005. Expression of chromatin remodeling genes in cloned and IVF swamp buffalo embryos. *Proceeding of the 2nd Asian Reproductive Biotechnology, 2-7 November, 2005, Bangkok, Thailand.* p 97-99.
- Laowtammathron, C., Imsoonthornraksa, S., Mueanthaisong, S., Lorthongpanich, C., Vetchayun, T., Sang-ngam, C., Tangthai, C., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2005. Effect of two concentrations of cryoprotectant in vitrification solution on post-warmed survival of cloned bovine blastocysts vitrified by micro-drop technique. *Proceeding of the 12th International Congress on Biotechnology in Animal Reproduction.* Chiangmai, Thailand, 4-6 August 2005, p. 135-140.
- Muenthaisong, S., Laowtammathron, C., Lorthongpanich, Imsoonthornsuksa, S., Tangthai, C., Sang-ngam, C., Hochi, S., Ketudat-Cairns, M., and **Parnpai, R.** 2005. Developmental potential of parthenogenetic activation of swamp buffalo embryos between fresh and vitrified oocytes. *Proceeding of the 12th International Congress on Biotechnology in Animal Reproduction.* Chiangmai, Thailand, 4-6 August 2005, p. 93-97.
- Parnpai, R.** 2005. Somatic cell nuclear transfer of cattle and buffalo in Thailand. *Proceeding of the 12th International Congress on Biotechnology in Animal Reproduction.* Chiangmai, Thailand, 4-6 August 2005, p. 4-16.
- Laowtammathron, C., Terao, T., Lorthongpanich, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Hochi, S., and **Parnpai, R.** 2004. Effect of hatching status on vitrification of cloned bovine blastocysts. *Proceeding of Annual Meeting of the International Embryo Transfer Society Conference,* Portland, USA, 10-14 January, 2004. Published in *Reprod. Fert. Dev.* 16: 174.
- Laowtammathron, C., Terao, T., Lorthongpanich, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Hochi, S. and **Parnpai, R.** 2004. The effect of ficoll in vitrification solution and hatching status of cloned bovine blastocysts on the survival rate after vitrification by using cryotop. *Proceeding*

- of the 1st Asian Reproductive Biotechnology Conference. Ho Chi Minh City, Vietnam. 12-14 April, 2004, p. 67.
- Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Wongviriyaya, W., Ketudat-Cairns, M., Likitdecharote, B. and **Parnpai, R.** 2004. Cloning of leopard cat embryos using enucleated domestic cat oocytes as recipient cytoplasm. *Proceeding of the 1st Asian Reproductive Biotechnology Conference*. Ho Chi Minh City, Vietnam. 12-14 April 2004. p. 61.
- Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Ketudat-Cairns, M., Likitdecharote, B. and **Parnpai, R.** 2004. In vitro development of enucleated domestic cat oocytes reconstructed with skin fibroblasts of domestic and leopard cats. *Proceeding of Annual Meeting of the International Embryo Transfer Society Conference*, Portland, USA, 10-14 January, 2004. Published in *Reprod. Fert. Dev.* 16: 149.
- Parnpai, R.**, Laowtammathron, C., Terao, T., Lorthongpanich, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., and Hochi, S. 2004. Development into blastocysts of swamp buffalo oocytes after vitrification and nuclear transfer. *Proceeding of Annual Meeting of the International Embryo Transfer Society Conference*. Portland, USA, 10-14 January, 2004, Published in *Reprod. Fert. Dev.* 16: 180-181.
- Laowtammathron, C., Lorthongpanich, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Somwan, S., Muankatoke, P., Patitung, S. and **Parnpai, R.** 2003. Production of dairy and beef cattle by cloning technology. *Proceeding of the 10th Tri-University International Joint Seminar and Symposium*. Mie University, Mie, Japan, 21 October 2003. p. 389-393.
- Laowtammathron, C., Terao, T., Lorthongpanich, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Hochi, S. and **Parnpai, R.** 2003. Effect of Ficoll in vitrification solution on the post-warmed development of vitrified cloned bovine hatching blastocysts. *Proceeding of Stem Cell and Somatic Cell Cloning Research. Present status and future trends*. Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 3 December 2003. p. 48-51.
- Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Terao, T., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Hochi, S., and **Parnpai, R.** 2003. Developmental potential of cloned swamp buffalo embryo reconstructed with vitrified matured oocytes. *Proceeding of Stem Cell and Somatic Cell Cloning Research. Present status and future trends*. Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 3 December 2003. p. 43-47.

- Parnpai, R.** 2003. Mammalian somatic cell cloning status in Thailand. *Proceeding of Stem Cell and Somatic Cell Cloning Research. Present Status and Future Trends*. Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 3 December 2003, p. 18-26.
- Parnpai, R.** and Tasripoo, K. 2003. Effects of different activation protocols on the development of cloned swamp buffalo embryos derived from granulosa cells. *Proceeding of Annual Meeting of the International Embryo Transfer Society Conference*. Auckland, New Zealand, 11-15 January, 2003, Published in *Theriogenology* 59: 279.
- Parnpai, R.,** Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 2002. Comparison of cloning efficiency in bovine and swamp buffalo embryo using fetal fibroblasts ear fibroblasts and granulosa cells. *Proceeding of Annual Meeting of the International Embryo Transfer Society Conference*. Foz Do Iguassu, Brazil, 12-15 January, 2002., Published in *Theriogenology* 57: 443.
- Parnpai, R.,** Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 2001. Developmental potential of vitrified cloned swamp buffalo morulae derived from granulosa cells. *Proceeding of Annual Meeting of the International Embryo Transfer Society Conference*, Omaha, USA, 13-16 January, 2001, Published in *Theriogenology* 55: 284.
- Parnpai, R.,** Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 2000. Developmental potential of cloned bovine embryos derived from quiescent and non-quiescent adult ear fibroblasts after different activation treatments. *Proceeding of Annual Meeting of the International Embryo Transfer Society Conference*, Masstricht, The Netherlands, 9-11 January, 2000. Published in *Theriogenology* 53: 239.
- Parnpai, R.,** Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 2000. Comparison of cloning swamp buffalo embryos using fetal fibroblasts and granulosa cells as donor cells. *Proceeding of the 14th International Congress on Animal Reproduction*. Stockholm, Sweden, 2-6 July 2000, Abstracts Volume 2: 241.
- Parnpai, R.,** Chuangsoongneon, U. and Kamonpatana, M. 1991. Assessment of optimum time for acrosome reaction in swamp buffalo frozen semen. *Proceeding of the 3rd World Buffalo Congress*, Varna, 17-19 May, 1991.
- Parnpai, R.** and Kamonpatana, M. 1990. Swamp buffalo oocyte maturation in vitro: The optimum assessment using 199 media supplement with FSH, 17β -estradiol, fetal calf serum and oestrus cow serum. *Proceeding of the 5th AAAP Animal Science Congress*, Taipei, Taiwan, 27May -1 June, Vol. III, p. 223.

- Parnpai, R.**, Sophon, S. and Kamonpatana, M. 1987. Short period storage of mouse embryo. *Proceeding of the 4th AAAP Animal Science Congress*, Hamilton, New Zealand, 1-6 February, 1987, p. 261.
- Parnpai, R.**, Intarachote, P., Sophon, S., Wattanodorn, P., Kurdchuchurn, P., Tantrakul, S., Suwankumjaya, T., Srisakwatana, K. and Kamonpatana, M. 1986. Embryo transfer of dairy crossbred cows in tropical environment. *Paper Presented to International Symposium on Modern Advance in Animal Reproduction*, Bangkok, 20-23 October, 1986.
- Parnpai, R.** and Kamonpatana, K. 1989. Optimization of culture media supplement with FSH, 17β -estradiol, fetal calf serum and oestrus cow serum in vitro oocyte maturation of swamp buffaloes. *Proceeding of the 1st Symposium on Ruminant Reproduction and Parasitology*, Chiangmai, 27-29 November, 1989, p. IV-3.
- Prongcharoen, M., Chewataworn, S., Chumrasboon, C., **Parnpai, R.**, and Kamonpatana, M. 1989. Surgical embryo transfer in goat: Effect of breeds on superovulatory response. *Proceeding of the 1st Symposium on Ruminant Reproduction and Parasitology*, Chiangmai, 27-29 November, 1989, p. V-4.
- Sridech, P., Suwankumjaya, T., **Parnpai, R.**, Meebumroong, K., Intarachote, P. and Kamonpatana, M. 1989. Reciprocal embryo transfer between beef and dairy cattle: Using beef cattle as donor and dairy cattle as recipient. *Proceeding of the 1st Symposium on Ruminant Reproduction and Parasitology*, Chiangmai, 27-29 November, 1989, p. V-3.

7.4. นำเสนอในการประชุมระดับชาติ

- Srirattana K., Imsoonthornrukxa S., Laowtammathron C., Lorthongpanich C., Sripunya N., Phewsoi W., Keawmungkun K., Devahudi R., Sangmalee A., Tunwattana W., Somsa W., Ketudat-Cairns M. and Parnpai R. 2009. Effect of Trichostatin A on developmental potential of cloned cattle embryos and inter-species cloned gaur embryos. *Proceeding of the 47th Kasetsart University Annual Conference, 18-20 March 2009, Bangkok, Thailand*. 10-16.
- Laowtammathron C., Srirattana K., Sangmalee A., Imsoonthornrukxa S., Lorthongpanich C., Sripunya N., Phewsoi W., Keawmungkun K., Davahudee R., Thongprapai T. Chaimongkol C., Ketudat-Cairns M. and Parnpai R. 2009. Birth of cloned calves after transferred frozen embryos using drop vitrified technique. *Proceeding of the 47th Kasetsart University Annual Conference, 18-20 March 2009, Bangkok, Thailand*. 99-105.

- Liang Y.Y., Sangmalee A., Imsoonthornruksa S., Lorthongpanich C., Srirattana K., Sripunya N., Phewsoi W., Keawmungkun K., Laowtammathron C., Ye D.N., Ketudat-Cairns M. and Parnpai R. 2009. Effect of chemical activation treatments on the development of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) follicular oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Proceeding of the 47th Kasetsart University Annual Conference, 18-20 March 2009, Bangkok, Thailand.* 78-86.
- Sangmalee A., Imsoonthornruksa S., Lorthongpanich C., Srirattana K., Sripunya N., Phewsoi W., Keawmungkun K., Laowtammathron C., Davahudee R., Ketudat-Cairns M. and Parnpai R. 2009. Effect of donor cell source on development and quality of somatic cell nuclear transfer embryos in cattle. *Proceeding of the 47th Kasetsart University Annual Conference, 18-20 March 2009, Bangkok, Thailand.* 87-94.
- Imsoonthornruksa S., Lorthongpanich C., Sangmalee A., Srirattana K., Laowtammathron C., Ketudat-Cairns M. and Parnpai R. 2008. Expression of nuclear reprogramming genes in cloned endangered felid embryos. *Proceeding of the 20th Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology, 14-17 October 2008. Mahasarakhum , Thailand.* p. 292-297.
- Thumanu K., Tanthanuch W., Lorthongpanich C. and Parnpai R. 2008. Comparison between synchrotron infrared microspectroscopic mappings and focal plane array imaging of mouse blastocyst. *Proceeding of the 20th Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology, 14-17 October 2008. Mahasarakhum , Thailand.* 131.
- Rattanasuk S., Parnpai R. and Ketudat-Cairns M. 2008. Comparison of primers used for bovine sex determination. *Proceeding of the 20th Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology, 14-17 October 2008. Mahasarakhum , Thailand.* 184.
- ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ กนกวรรณ ศรีรัตนา สุเมธ อิมสุนทรรักษา ชูติ เหล่าธรรมธร จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ นุชจรินทร์ ศรีปัญญา วันวิสาข์ ผิวสร้อย อนวัช แสงมาลี ฤทธิวิวัฒน์ เทวาคูดี รุ่ง จันทาบุญ มาริษา เกตุทัต-คาร์นส์ และ รั้งสรรค์ พาลพ่าย. 2551. การอนุรักษ์โคพันธุ์ขาวลำพูนโดยการทำโคลนนิ่ง. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 25-30.*
- นุชจรินทร์ ศรีปัญญา กนกวรรณ ศรีรัตนา ชูติ เหล่าธรรมธร วันวิสาข์ ผิวสร้อย ฤทธิวิวัฒน์ เทวาคูดี อนวัช แสงมาลี ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ สุเมธ อิมสุนทรรักษา จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ มาริษา เกตุทัต-คาร์นส์ วันชัย ต้นวัฒนะ ธรรมบุญ ทองประไพ โชคชัย ชัยมงคล และ รั้งสรรค์ พาลพ่าย.

2551. การผลิตกระทิงโคลนนิ่งโดยเทคนิคการโคลนนิ่งข้ามชนิด. *เรื่องดีมีการประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46*. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 78-84.
- วันวิสาข์ ผิวสร้อย นุชจรินทร์ ศรีปัญญา กนกวรรณ ศรีรัตนา อนวัช แสงมาลี ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ สุเมธ อิมสุนทรรักษา ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ ฤทธิวิวัฒน์ เทวาหุดี มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ รั้งสรรค์ พาลพ่าย. 2551. ลูกแพะเกิดจากการโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบร بلاสจากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ. *เรื่องดีมีการประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46*. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 19-24.
- อนวัช แสงมาลี สุเมธ อิมสุนทรรักษา จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ กนกวรรณ ศรีรัตนา นุชจรินทร์ ศรีปัญญา วันวิสาข์ ผิวสร้อย ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ ชุติ เหล่าธรรมธร ฤทธิวิวัฒน์ เทวาหุดี มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ รั้งสรรค์ พาลพ่าย. 2551. ลูกแมวบ้านโคลนนิ่งเกิดจากการทำย้ายฝากนิวเคลียสของเซลล์ร่างกาย. *เรื่องดีมีการประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46*. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 85-90.
- Imsoonthornruksa, S., Lorthongpanich, C., Sangmalee, A., Srirattana, K., Sripunya, N., Keawmungkun, K., Wanwisa, P., Laowtammathron, C., Tunwattana, W., Somsa, W., Kongkham, W., Ketudat-Cairns, M., and **Parnpai, R.** 2008. Oct4 expression in cloned embryo of endangered feline family. Proceeding of the 4th Symposium on Thermotolerance in Domestic Animals, 31 January 2008. Khon Kaen, Thailand. p. 344-348.
- Laowtammathron, C., Srirattana, K., Lorthongpanich, C., Imsoonthornruksa, S., Sripunya, N., Phewsoi, W., Keawmungkun, K., Davahudee, R., Sangmalee, A., Thongprapai, T., Chaimongkol, C., Ketudat-Cairns, M., and **Parnpai, R.** 2008. Evaluation of activation treatments of bovine oocyte after intracytoplasmic sperm injection. Proceeding of the 4th Symposium on Thermotolerance in Domestic Animals, 31 January 2008, Khon Kaen, Thailand, p. 349-352.
- Lorthongpanich, C., Yang, S.H., Piotrowska-Nitsche, K., Chan, A.W.S. and **Parnpai, P.** 2008. Supplemented compound enhances success rate of ES cell establishment from single blastomere. Proceeding of the 4th Symposium on Thermotolerance in Domestic Animals, 31 January 2008. Khon Kaen, Thailand. p. 340-343.
- Sangmalee, A., Srirattana, K., Sripunya, N., Phewsoi, W., Keawmungkun, K., Imsoonthornruksa S., Lorthongpanich, C., Laowtammathron, Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2008. Birth of cloned goats by somatic cell nuclear transfer : Possibility of endangered mountain goat

conservation. Proceeding of the 4th Symposium on Thermotolerance in Domestic Animals, 31 January 2008. Khon Kaen, Thailand. p. 332-335.

Srirattana, K., Imsoontronruksa S., Tunwattana, W., Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Sripunya, Keawmungkun, K., Wanwisa, P., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2008. Development and telomerase activity of gaur embryos derived from inter-species somatic cell nuclear transfer. Proceeding of the 4th Symposium on Thermotolerance in Domestic Animals, 31 January 2008. Khon Kaen, Thailand. p. 336-339.

ชุตติ เหล่าธรรมธร จันทรเจ้า ล้อทองพานิชย์ สุเมธ อิมสุนทรรักษา อนวัช แสงมาลี กนกวรรณ ศรีรัตนานุชจรินทร์ ศรีปัญญา วันวิสาข์ ผิวสร้อย ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ ธรรมบุญ ทองประไพ โขกชัย ชัยมงคล มาริษา เกตุทัต-คาร์นส์ และ รังสรรค์ พาสพ่าย. 2550. ประสิทธิภาพการปฏิสนธิและอัตราการพัฒนาในหลอดแก้วของตัวอ่อนโคนมโดยใช้น้ำเชื้อโคนมแช่แข็งจากพ่อโค 5 ตัว. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 245-250.

สุเมธ อิมสุนทรรักษา ชุตติ เหล่าธรรมธร จันทรเจ้า ล้อทองพานิชย์ กนกวรรณ ศรีรัตนานุชจรินทร์ ศรีปัญญา อนวัช แสงมาลี รุ่ง จันทานุญ มาริษา เกตุทัต-คาร์นส์ และ รังสรรค์ พาสพ่าย. 2550. อัตราการตั้งท้องหลังการย้ายฝากตัวอ่อนโคบราห์มันแช่แข็งแบบย้ายฝากโดยตรงหรือการล้างตัวอ่อนแบบ 3 ขั้นตอนก่อนนำไปย้ายฝาก. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 260-265

Laowtammathron, C., Lorthongpanich, C., Imsoontronruksa, S., Srirattana, K., Sangsritavong, S., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2006. Production of sexed bovine embryos by *in vitro* fertilization. การประชุม RGJ seminar series XLVII “Reproductive Biotechnology for Improving Animal Breeding Strategies”. 20 ตุลาคม 2549 ณ จังหวัดน่าน หน้า 7

Imsoontronruksa, S., Lorthongpanich, C., Srirattana, K., Sripunya, N., Laowtammathron, C., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2006. Effect of hatching stage on cryosurvival of cloned domestic cat blastocyst after vitrification. การประชุม RGJ seminar series XLVII “Reproductive Biotechnology for Improving Animal Breeding Strategies”. 20 ตุลาคม 2549 ณ จังหวัดน่าน หน้า 59.

Srirattana, K., Lorthongpanich, C., Imsoontronruksa, S., Sripunya, N., Thangthai, C., Laowtammathron, C., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2006. Effect of donor cell types on development of cloned swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. การประชุม RGJ

seminar series XLVII “Reproductive Biotechnology for Improving Animal Breeding Strategies”. 20 ตุลาคม 2549 ณ จังหวัดน่าน หน้า 47-48.

ชัชชัย เวชยันต์ ชูติ เหล่าธรรมธร จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมั่นไธสง ปิยะมาศ การสมดี มาริษา เกตุทัต คาร์นส์ เพลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาติตัง สมบัติ ศิริอุดมเศรษฐ์ สุริยา กิจสำเร็จ และ รั้งสรรคร์ พาลพ่าย. 2548. การเจริญเติบโตของลูกโคโคลนนิ่งที่ผลิตจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของพ่อโคพันธุ์รามัน. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 67-72.*

สุจิตรา หมั่นไธสง ชูติ เหล่าธรรมธร จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุเมธ อิมสุนทรรักษา ชัยสิทธิ์ แสงงาม ชมพูนุท แดงไทย ชัชชัย เวชยันต์ มาริษา เกตุทัต คาร์นส์ ชินิชิ โฮชิ และ รั้งสรรคร์ พาลพ่าย. 2548. การเจริญเติบโตของตัวอ่อนกระป๋องปลัก Parthenogenetic activation จากโอโอไซท์สดและโอโอไซท์แช่แข็งโดยวิธี Vitrification. *เอกสารประกอบการสัมมนางานวิจัยของคณาจารย์ ม.ท.ส และความร่วมมือด้านการพัฒนาทีมงานวิจัยในเครือข่ายอุดมศึกษานครราชสีมา, ประจำปี 2548. หน้า 37-39.*

สุจิตรา หมั่นไธสง ชูติ เหล่าธรรมธร จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุเมธ อิมสุนทรรักษา ชัยสิทธิ์ แสงงาม ชมพูนุท แดงไทย ทศสุมา เทราโอ ชัชชัย เวชยันต์ สรยุทธ ใจช่วง มาริษา เกตุทัต คาร์นส์ ชินิชิ โฮชิ และ รั้งสรรคร์ พาลพ่าย. 2548. การเจริญเติบโตสู่ระยะบลาสโตซิสของตัวอ่อนกระป๋องปลักโคลนนิ่งจากการใช้โอโอไซท์แช่แข็งด้วยวิธี Vitrification. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 59-66.*

สุเมธ อิมสุนทรรักษา ชัยสิทธิ์ แสงงาม วันชัย ดันวัฒนะ สุจิตรา หมั่นไธสง ชูติ เหล่าธรรมธร จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ มาริษา เกตุทัต คาร์นส์ และ รั้งสรรคร์ พาลพ่าย. 2548. การเจริญของตัวอ่อนกระทิงโคลนนิ่งโดยใช้ไข่โคเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 73-77.*

จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ ชูติ เหล่าธรรมธร ทศสุมา เทราโอ สุจิตรา หมั่นไธสง ชัชชัย เวชยันต์ ชินิชิ โฮชิ และ รั้งสรรคร์ พาลพ่าย. 2547. การเจริญสู่ระยะบลาสโตซิสของตัวอ่อนควายโคลนนิ่งหลังจากการแช่แข็งไข่โดยวิธี Vitrification. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 83-87.*

จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ ชูติ เหล่าธรรมธร สุจิตรา หมั่นไธสง ชัชชัย เวชยันต์ วัชระ วงศ์วิริยะ มาริษา เกตุทัต-คาร์นส์ บัญชร ลิขิตเดชาโรจน์ และ รั้งสรรคร์ พาลพ่าย. 2547. การโคลนนิ่งข้ามสปีชีส์โดยใช้ไข่แมวบ้านเป็นไซโตพลาสซึมผู้รับและเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังแมวความเป็นเซลล์ต้นแบบ. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. สาขาสัตวแพทย์. กรุงเทพฯ, หน้า 351-355.*

ชุตติ เหล่าธรรมธร ทศสุมา เทราโอ จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมิ่นไธสง รัชชัช เวชยันต์ ชินิชิ โฮชิ และ รั้งสรรค์ พาลพ่าย. 2547. ผลของ Hatching stage ของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งต่ออัตราการรอดหลังจาก vitrification. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 88-93.*

รั้งสรรค์ พาลพ่าย ชุตติ เหล่าธรรมธร จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมิ่นไธสง รัชชัช เวชยันต์ เสวียน สัมหวาน เพลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาดิตัง สุริยา กิจสำเร็จ และ สมบัติ ศิริอุดม เศรษฐ์. 2547. การใช้เทคโนโลยีโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดี. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัย เกษตร ศาสตร์. ครั้งที่ 42. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 94-98.*

รั้งสรรค์ พาลพ่าย รัชชัช เวชยันต์ ชุตติ เหล่าธรรมธร จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมิ่นไธสง ปิยะมาส การสมดี มารินา เกตุทัต คาร์นส์ เพลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาดิตัง สมบัติ ศิริอุดม เศรษฐ์ สุริยา กิจสำเร็จ. 2547. การเจริญเติบโตของลูกโคโคลนนิ่งที่ผลิตจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ไขว้ของพ่อโคพันธุ์บราห์มัน. *บทความย่อผลงานวิจัยการสัมมนาเรื่อง กลุ่มงานวิจัยในภาควิชาสัตวบาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี 2547. หน้า 29.*

สุจิตรา หมิ่นไธสง ชุตติ เหล่าธรรมธร จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุเมธ อิมสุนทรรักษา ชัยสิทธิ์ แสงงาม ชมพูนุท แดงไทย ทศสุมา เทราโอ รัชชัช เวชยันต์ สรยุทธ ใจช่วง มารินา เกตุทัต คาร์นส์ และ รั้งสรรค์ พาลพ่าย. 2547. การเจริญเติบโตสู่ระยะบลาสโตซิสต์ของตัวอ่อนกระบือปลัดโคลนนิ่งจากการใช้ไอโอไอโซท์แช่แข็งด้วยวิธี Vitrification. *บทความย่อผลงานวิจัยการสัมมนาเรื่องกลุ่มงานวิจัยในภาควิชาสัตวบาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี 2547. หน้า 26.*

จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ ชุตติ เหล่าธรรมธร สุจิตรา หมิ่นไธสง วัชรระ วงษ์วิริยะ และ รั้งสรรค์ พาลพ่าย. 2546. การโคลนนิ่งตัวอ่อนแมวควา (*Felis bengalensis*) ข้ามชนิดโดยใช้ไข่แมวบ้าน (*Felis catus*) เป็นไซโตพลาสซึมผู้รับ. *เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ครั้งที่ 13 พันธุศาสตร์กับการพัฒนาที่ยั่งยืน. พิษณุโลก, หน้า 112-115.*

จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ ชุตติ เหล่าธรรมธร สุจิตรา หมิ่นไธสง และ รั้งสรรค์ พาลพ่าย. 2546. การทดสอบค่ากระแสไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการทำโคลนนิ่งตัวอ่อนแมว โดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากไขว้เป็นเซลล์ต้นแบบ. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 สาขาวิทยาศาสตร์ กรุงเทพฯ, หน้า 84-88.*

ชุตติ เหล่าธรรมธร จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุจิตรา หมิ่นไธสง รัชชัช เวชยันต์ เสวียน สัมหวาน เพลิน เมินกระโทก สมพงษ์ ปาดิตัง และ รั้งสรรค์ พาลพ่าย. 2546 การทดสอบการผลิตโคนมและโคเนื้อพันธุ์ดีโดยเทคโนโลยีโคลนนิ่ง. *เอกสารประกอบการสัมมนาในงานวิจัยของคณาจารย์ ม.ท.ส และความร่วมมือดำเนินงานวิจัยในภาควิชาสัตวบาล นครราชสีมา ประจำปี 2546. หน้า 54-55.*

รังสรรค์ พาลพ่าย เกรียงศักดิ์ ทาศรีภู และ มณีวรรณ กมลพัฒนะ. 2543. การโคลนนิ่งตัวอ่อนกระบือ ปลักโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากลูกอ่อนเป็นเซลล์ต้นแบบ. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 86-89.*

รังสรรค์ พาลพ่าย เกรียงศักดิ์ ทาศรีภู และ มณีวรรณ กมลพัฒนะ. 2543. ความเป็นไปได้ในการผลิต โคนันธุ์ดีด้วยเทคโนโลยีโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากไข่มุเป็นเซลล์ต้นแบบ. *เรื่องเต็มการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38. สาขาสัตว. กรุงเทพฯ, หน้า 79-85.*

8.5. การเขียนตำรา-หนังสือ

รังสรรค์ พาลพ่าย. 2530. การเร่งการตกไข่เพื่อทำอีทีในโค. มณีวรรณ กมลพัฒนะ (บรรณาธิการ), *การปฏิสนธิในหลอดแก้วและการย้ายฝากตัวอ่อน.* โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, หน้า 41-77.

รังสรรค์ พาลพ่าย และ สรรเพชญ์ โสภณ. 2530. เทคนิคการย้ายฝากตัวอ่อนในโคโดยวิธีไม่ผ่าตัด. มณีวรรณ กมลพัฒนะ (บรรณาธิการ), *การปฏิสนธิในหลอดแก้วและการย้ายฝากตัวอ่อน* โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, หน้า 133-158.

รังสรรค์ พาลพ่าย สรรเพชญ์ โสภณ มณีวรรณ กมลพัฒนะ กำธร มีบำรุง กิตติยา ศรีศักดิ์วัฒนะ ประชุม อินทรโชติ ธวัชชัย สุวรรณกำจาย ประภากร วัฒนนคร พฤทธิ เกิดชูชื่น และ สมสวัสดิ์ ดันตระกูล. 2530. ผลสำเร็จการย้ายฝากตัวอ่อนโคนมลูกผสมในประเทศไทย. มณีวรรณ กมลพัฒนะ (บรรณาธิการ), *การปฏิสนธิในหลอดแก้วและการย้ายฝากตัวอ่อน* โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, หน้า 273-288.

รังสรรค์ พาลพ่าย 2549. เทคโนโลยีการโคลนนิ่งโค. เอกสารคำสอนวิชา 304 553 Animal Cloning Technology และ 304 554 Selected Research in Animal Cloning Technology. 389 หน้า.

Parnpai, R., Minami, N. and Yamada, M. 1998. Current status of research for the establishment of bovine embryonic stem (ES) cells. In: Miyamoto, H. and Manabe, N. (eds.), Reproductive Biology Update: Novel Tools for Assessment of Environmental Toxicity. Nakanishi Printing, Kyoto, pp. 383-388.

9. รางวัลที่ได้รับ

9.1. จากผลงานวิจัยการย้ายฝากตัวอ่อนโคนมจนประสบผลสำเร็จ ได้ถูกแปลโคนมเกิดมาครั้งแรกของประเทศไทยเมื่อวันที่ 8 กันยายน 2529 ทำให้งานวิจัยนี้ถูกยกย่องให้เป็น 1 ใน 10 ข่าวเด่นของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9.2. รางวัลผลงานวิจัยดี (อันดับ 1 สาขาสัตว์) ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง “ความเป็นไปได้ในการผลิตโคพันธุ์ดีด้วยเทคโนโลยีโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์เป็นเซลล์ต้นแบบ” ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 พ.ศ. 2543

9.3. รางวัลผลงานวิจัยดี สาขาวิทยาศาสตร์ ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง “การทดสอบค่ากระแสไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการทำโคลนนิ่งตัวอ่อนแมวโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ” ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 พ.ศ. 2546

9.4. รางวัลนักวิจัยดีเด่น จากสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย ได้รับเชิญเป็นผู้ปาฐกถาอาซิโนะโมะโตะ เรื่อง “Somatic cell cloning in bovine using ear fibroblast as donor cells” ในการประชุมประจำปีของสมาคมปี พ.ศ. 2547

9.5. รางวัลผลงานวิจัยดี (อันดับ 1 สาขาสัตว์) ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง “การใช้เทคโนโลยีโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดี” ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42 พ.ศ. 2547

9.6. รางวัลบุคลากรสายวิชาการที่มีผลงานดีเด่นด้านการวิจัย ประจำปี 2548 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

9.7. รางวัลแทนคุณแผ่นดิน สาขาวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2550 จากเครือเดอะเนชั่น

9.8. รางวัลผลงานวิจัยดี (อันดับ 1 สาขาสัตว์) ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง “การอนุรักษ์โคพันธุ์ชาวลำพูนโดยการโคลนนิ่ง” ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46 พ.ศ. 2551

10. การจดสิทธิบัตร

13.1. รังสรรค์ พาลพ่าย วิศิษฐพร สุขสมบัติ อาวุธ อินทรชั้น อุดมวิทย์ มณีวรรณ คมสัน ภายหลัง แสงเพชร งอนชัยภูมิ ป้องภักย์ มีสมบัติ สมิง เต็มพรมราช “อุปกรณ์ควบคุมการเคลื่อนที่ก้านสูบของไมโครไซริงท์” ยื่นคำขอเมื่อวันที่ 11 มิถุนายน 2547 ได้รับสิทธิบัตรเมื่อเดือนเมษายน 2550

13.2. รังสรรค์ พาลพ่าย วิศิษฐพร สุขสมบัติ อาวุธ อินทรชั้น อุดมวิทย์ มณีวรรณ คมสัน ภายหลัง แสงเพชร งอนชัยภูมิ ป้องภักย์ มีสมบัติ สมิง เต็มพรมราช ชูติ เหล่าธรรมธร จันทรเจ้า ล้อทองพานิชย์ วิชัย ศรีสุรภัย “เครื่องเชื่อมเซลล์ด้วยไฟฟ้ากระแสตรง” ยื่นคำขอเมื่อวันที่ 11 มิถุนายน 2547

ผศ.ดร. มาริษา เกตุทัต คาร์นส์

1. ชื่อ (ไทย) ผศ.ดร. มาริษา เกตุทัต คาร์นส์
(อังกฤษ) Assistant Professor Dr. Mariena Ketudat Cairns
2. รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ (ถ้ามี) 38-40-0999
บัตรประจำตัวประชาชนเลขที่ 3 1014 01120 08 7
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
4. สถานที่ติดต่อ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักเทคโนโลยีเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
เลขที่ 111 ถนนมหาวิทยาลัย อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000
โทรศัพท์.044-224-355
โทรสาร 044-224-150
E-mail: ketudat@ccs.sut.ac.th
5. ประวัติการศึกษา
 - พ.ศ. 2531 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา)
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 - พ.ศ. 2538 Ph.D. (Biological chemistry)
University of California, San Diego, USA
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญ/สนใจพิเศษ
Molecular Biology, Molecular Genetics, Recombinant Protein production
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุ
สถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัย
ในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น
 - 7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย: -
 - 7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย:
 - 7.2.1 Production of Tilapia Transglutaminase, หัวหน้าโครงการ
 - 7.2.2 Expression of β -glucosidase from Thai Plants in *Pichia pastoris*, หัวหน้าโครงการ

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว:

- 7.3.1 Functional Analysis of the Maize bZIP Protein Opaque-2, ผู้ร่วมวิจัย NIH, USA
แล้วเสร็จ 1994
- 7.3.2 Purification of the Enzyme Taq DNA Polymerase หัวหน้าโครงการ NSTDA แล้ว
เสร็จ 1998
- 7.3.3 Tilapia Sex Chromosome Identification Using DNA Probe, หัวหน้าโครงการ
NSTDA แล้วเสร็จ 2000
- 7.3.4 Clonal Selection of Sweet Bamboo for Commercial and Industrial Uses, ผู้ร่วมวิจัย
แล้วเสร็จ 2002
- 7.3.5 Molecular identification of *Dendrocalamus asper* from SUT farm, หัวหน้า
โครงการ NRCT แล้วเสร็จ 2003
- 7.3.6 Genetic, Mophology and Behavior Characterization in Thai Native Fowl, หัวหน้า
โครงการ CP 2004

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

- Singhapol, C. and Ketudat-Cairns, M. (2003) Microsarellite Polymorphism in Thai Native Fowl (*Gallus gallus domesticus*) Proceeding of the 10th Tri-University International Joint Seminar & Symposium 2003, Role of Asia in the World, Oct. 18-21 Mie Univ., Tsu, Mie, Japan
- Chumnarnsilpa, S., Boonkerd, N. and Ketudat-Cairns, M. (2003) (in preparation) Growth Kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* K1-V1116 and Killer toxin production in Winemaking
- Srilunchang, K. and Ketudat-Cairns, M. (2003) (in preparation) Genetic relationship and molecular marker identification of *Dendrocalamus asper* in Thailand
- Charoenrat, T. and Ketudat-Cairns (2003) Influence of pH on Recombinant β -glucosidase Production by *Pichia pastoris* Poster presentation BioThailand 2003 Technology for Life 17-20 July, Pattaya, Thailand

- Loonchanta, A. and Ketudat-Cairns (2003) Primer Design for Amplification of Transglutaminase Gene from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Poster presentation BioThailand 2003 Technology for Life 17-20 July, Pattaya, Thailand
- Singhapol, C. and Ketudat-Cairns, M. (2003) Microsarellite Polymorphism in Thai Native Fowl (*Gallus gallus domesticus*).. Poster presentation BioThailand 2003 Technology for Life 17-20 July, Pattaya, Thailand
- Loonchanta, A., Chumnarnsilpa S., and Ketudat-Cairns, M. (2002) Comparison of recombinant β -glucosidase production by *Pichia pastoris* in stirred and air-lift bioreactor. Proceeding the 14th annual meeting of Thai Society for Biotechnology 13-15 Nov. Khonkan Thailand (Oral presentation)
- Srilunchang, K. and Ketudat-Cairns, M. (2002) The study of genetic relationship and molecular marker identification of SUT *Dendrocalamus asper* Proceeding the 14th annual meeting of Thai Society for Biotechnology 13-15 Nov. Khonkan Thailand (poster presentation)
- Manatrinon S., Na Lampang P., Likitdecharote B., Phalaraksh K., Ketudat-Cairns M. and Duangjinda M. The Association of the Bovine Lymphocyte Antigen DRB3.2 (BoLA-DRB3.2) Alleles with Occurrence of Clinical Mastitis in Dairy Cattle Proceeding the 14th annual meeting of Thai Society for Biotechnology 13-15 Nov. Khonkan Thailand (Oral presentation)
- Chumnarnsilpa, S., Ketudat-Cairns, M. and Boonkerd, N. (2001) Growth kinetic of *Saccharomyces cerevisiae* K1-V1116 and killer toxin production in wine making Poster presentation, Biothailand, , 7-10 Nov, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand
- Srilunchang, K. and Ketudat-Cairns, M. (2001) The study of genetic relationship and molecular marker identification of SUT *Dendrocalamus asper* Poster presentation, Biothailand, 7-10 Nov, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand
- Srilunchang, K., Khumlert, R. and Ketudat-Cairns, M. (2001) The study of genetic relationship and molecular marker identification of SUT *Dendrocalamus asper*. Poster presentation, Second Graduate conference, Mahidol University, Bangkok

- Kanchanatawee, S., Wanapu, C. and Ketudat-Cairns, M. (2000) Biotechnology Graduate Education in Thailand. *Thai J. of Biot* 2 (1): 55-62
- Ngamjun, P., Teaumroong, N., Boonkerd, N., and Ketudat-Cairns, M. (2000). Tilapia sex chromosome identification DNA probe. First National Symposium on Grad-Research Chiang Mai University 10-11 June 2000, P206-211.
- Carlini, L.E., M. Ketudat, R.L. Parsons, S. Prabhakar, R. J. Schmidt and M. J. Guiltinan (1999) The maize bZIP protein orthologue of EmBP-1: Activation of gene expression in yeast from an O2 box and localization of a bipartite nuclear localization signal (NLS). *Plant Molec. Biol.*41: 339-349. (M. Ketudat and L. Carlini are Co-first authors)
- Ngamjan, P., Boonanantanasarn, S. and Ketudat-Cairns, M. (1999) Tilapia Sex Chromosome Identification using DNA Probe. Poster presentation, The 5th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference, Phuket, Thailand
- Ketudat-Cairns, M. (1998) Biotechnology and Daily Life. *Suranaree J. Sci Technol* 5:208-211
- Manakasem Y., Sornsuk P., and Ketudat-Cairns M. (1998) A survey of the Status and Problems of the Vegetable and Fruit Production and Post-Harvest Handling System in Nakhon Ratchasima Province. *Suranaree J. Sci Technol* 5:95-100
- Ketudat-Cairns, M. Boonanantanasarn, S. and Ngamjan, P. (1998) Paper presentation The Development of Tilapia Sex chromosome Identification System, Biotech forum, Biotechnology for Aquaculture National Science and Technology Development Agency, Bangkok Thailand.
- Ketudat-Cairns, M. (1998) Biotechnology and Daily Life. *Suranaree J. Sci Technol* 5:208-211
- Manakasem Y., Sornsuk P., and Ketudat-Cairns M. (1998) A survey of the Status and Problems of the Vegetable and Fruit Production and Post-Harvest Handling System in Nakhon Ratchasima Province. *Suranaree J. Sci Technol* 5:95-100
- Schmidt, R. J., Pysh, L. D., Ketudat, M., Parsons, R. L., and Hoschek, G. (1994) bZIP Proteins Regulating Gene Expression in Maize Endosperm. In *Molecular Genetic Analysis of Plant Metabolism and Development* (G. Coruzzi and P. Puigdomenech, eds.) NATO ASI Proceedings

Schmidt, R. J., Ketudat, M., Aukerman, M. J., and Hoschek, G. (1992) Opaque-2 is a Transcriptional Activator that Recognizes a Specific Target Site in 22-kD Zein Genes. *Plant Cell* 4:701-709

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ:

7.4.1 Production of Tilapia Transglutaminase, หัวหน้าโครงการ

7.4.2 Expression of beta-glucosidase from Thai Plants in *Pichia pastoris*, หัวหน้าโครงการ