อชิต คูมาร์ พอล : การพัฒนาอุปกรณ์และปรับปรุงเทคนิคสำหรับการแช่แข็งไข่และตัวอ่อนโคโดยวิธี vitrification (DEVELOPMENT OF A NOVEL DEVICE AND IMPROVED TECHNIQUES FOR BOVINE OOCYTES AND EMBRYOS VITRIFICATION) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย, 164 หน้า.

การผลิตตัวอ่อนในหลอดแก้ว และการแช่แข็งไข่ มีความสำคัญในการเก็บรักษาพันธุกรรมที่ดีไว้ จุดประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อพัฒนาอุปกรณ์ และปรับปรุงเทคนิคสำหรับการแช่แข็งไข่สุกและตัวอ่อนโคระยะบลาสโตซีสโดยวิธี vitrification การศึกษานี้พบว่า Paper device ที่พัฒนาขึ้นมาให้ผลเทียบเท่า Cryotop device ที่เป็นอุปกรณ์มาตรฐาน อัตารอดของไข่หลังจากการแช่แข็ง และอัตราตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ผลิตได้ไม่แตกต่างกันในกลุ่มที่ใช้ Paper device และ Cryotop device ไข่โคแช่แข็งด้วยวิธี 2-ขั้นตอน สามารถมีชีวิตรอดได้แต่อัตราตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส ที่ผลิตได้ต่ำกว่ากลุ่มไข่สดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) ดังนั้นจึงได้พัฒนาการทำ virification ไข่ โดยวิธี 3-ขั้นตอน จากการศึกษานี้พบว่าน้ำยาทำ vitrification โดยวิธี 3-ขั้นตอน ไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อการอยู่รอดของไข่ และการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซีส อีกทั้งยังพบว่าไข่ที่ผ่านการแช่แข็งด้วยวิธี 3-ขั้นตอน ให้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสสูงกว่าไข่ที่แช่แข็งด้วยวิธี 2-ขั้นตอน แต่ต่ำกว่ากลุ่มไข่สดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) การแช่แข็งตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสด้วยวิธี 3-ขั้นตอน พบว่ามีอัตารอด และอัตราการฟักตัวของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเกรด 2 สูงกว่าการแช่แข็งด้วยวิธี 2-ขั้นตอน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่กับตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเกรด 1 พบว่าการแช่แข็งทั้ง 2 แบบ มีอัตารอด และอัตราการฟักตัวของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสไม่แตกต่างกัน

การทดลองอีกประการเป็นการศึกษาอัตราการฟักตัวของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส หลังจากการแช่แข็งไข่สุก และตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสโดยวิธี vitrification 3-ขั้นตอน และใช้ Paper device ในการทดลองนี้ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ A) กลุ่มไข่สด และตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสสด B) กลุ่มไข่สด และแช่แข็งตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส C) กลุ่มไข่แช่แข็ง และตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสสด และ D) กลุ่มที่แช่แข็งทั้งไข่ และตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส ผลการทดลองพบว่าอัตราตัวอ่อนเจริญถึงระยะบลาสโตซีสในกลุ่ม A, B, C และ D เป็น 15.7, 16.5, 9.4 และ 9.4% ตามลำดับ ในกรณีของอัตราการฟักตัวของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต่อจำนวนตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสของกลุ่ม A, B, C และ D เป็น 73.3, 56.5, 66.6 และ 16.7% ตามลำดับ อัตราการฟักตัวของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต่อจำนวนตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสของกลุ่ม C และ D ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่ม A อย่างไรก็ตาม อัตราการฟักตัวของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต่อจำนวน

ของไข่ที่ทำ IVF ของกลุ่ม C (6.3%) ต่ำกว่ากลุ่ม A (12.1%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และสูงกว่ากลุ่ม D (1.6%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) อัตราการฟักตัวของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต่อจำนวนไข่ที่ทำ IVF ของกลุ่ม D (1.6%) ต่ำกว่ากลุ่ม A (12.1%) B (9.4%) และ C (6.3%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) การทดลองนี้สรุปได้ว่าการแช่แข็งด้วยวิธี vitrification 3-ขั้นตอน โดยใช้ Paper device เหมาะสำหรับแช่แข็งไข่โคสุก และตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส แต่ยังไม่เหมาะสำหรับการทำ double vitrification

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ปีการศึกษา 2557 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

ASHIT KUMAR PAUL : DEVELOPMENT OF A NOVEL DEVICE AND IMPROVED TECHNIQUES FOR BOVINE OOCYTES AND EMBRYOS VITRIFICATION. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. RANGSUN PARNPAI, Ph.D., 164 PP.

BOVINE/*IN VITRO*/ VITRIFICATION/VITRIFICATION DEVICE/OOCYTE/ EMBRYO

The *in vitro* embryo production and vitrification of oocytes and embryos are crucial for preserving desired genetics. The aims of this study were to develop a novel device and improved techniques for bovine matured (MII) oocytes and blastocysts vitrification. This study found that the developed paper device gave similar results with modern standard Cryotop device. There was no difference in the rate of oocytes survival and blastocysts production after vitrification of oocytes using paper or Cryotop devices. Oocytes could survive from the 2-steps method but the blastocyst rate was significantly ($p<0.01$) lower than that of the fresh group. Therefore, the 3-steps technique for oocytes vitrification was developed. The results showed that the 3-steps vitrification solution was non-toxic for oocytes survival and embryo development to blastocyst stage. Additionally, the blastocyst rate in the 3-steps method of MII oocytes vitrifcation was higher than that of the 2-steps but was significantly ($p<0.05$) lower than those in the fresh group. In case of blastocysts vitrification, the 3-steps technique gave significantly higher survival as well as hatched blastocyst rates of grade-2 blastocysts than that of 2-steps ($p<0.05$), whereas for grade-1 blastocysts, it did not show any significant difference in both cases.

Another experiment was carried out to determine the blastocyst hatchability following MII oocytes and blastocyst vitrification using Paper device and 3-steps vitrification. This experiment was conducted into four groups; A) fresh MII oocytes and blastocysts, B) fresh MII oocytes with vitrified blastocysts, C) vitrified MII oocytes with fresh blastocysts and D) vitrified both MII oocytes and blastocysts. The results found that blastocyst production rates of group A, B, C and D were 15.7, 16.5, 9.4 and 9.4, respectively. In case of blastocysts hatchability rate, the blastocysts in group A, B, C and D were 73.3, 56.5, 66.6 and 16.7%, respectively. The blastocysts hatchability rates of blastocyst of group C and D were not different when compared with group A. However, blastocysts hatched rate of IVF oocytes in group C (6.3%) was significantly ($p<0.05$) lower than that of Group A (12.1%) and significantly ($p<0.05$) higher than that of group D (1.6%). The blastocyst hatched rate of IVF oocytes in group D (1.6%) was also significantly ($p<0.05$) lower than that of group A (12.1%), B (9.4%) and C (6.3%). This experiment can be concluded that 3-steps vitrification using paper device was suitable for bovine MII oocytes and blastocysts, but was not suitable for double vitrification.

School of Biotechnology Student's Signature _____

Academic Year 2014 Advisor's Signature _____