

พธิตา สุทธิโรจน์พัฒนา : ผลของอุณหภูมิและสารเคมีในการเก็บรักษาไข่พร้อมปฏิสนธิในสารละลายต่ออัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อน (EFFECT OF TEMPERATURE AND MEDIUM ADDITIVES DURING LIQUID STORAGE ON DEVELOPMENTAL COMPETENCE IN MATURED BOVINE OOCYTES) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย, 129 หน้า.

การเก็บรักษาไข่ระยะสั้นโดยปราศจากการแช่แข็ง เช่น การขนส่งระยะไกลหรือการใช้ประโยชน์ในการผลิตตัวอ่อนในห้องปฏิบัติการสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการค้าและปศุสัตว์ได้ การทดลองแรกมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิ (4°C, 15°C, 25°C และ 38.5°C) ในการเก็บรักษาไข่ระยะสั้นของไข่โคพร้อมปฏิสนธิต่ออัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคคุณภาพของตัวอ่อนระยะ blastocyst ระดับ ATP และ กลูตาไธโอน และการเกิด apoptosis จากผลการทดลองพบว่า กลุ่มที่เก็บที่อุณหภูมิ 25°C และ 38.5°C ให้ผลการเจริญไปเป็นตัวอ่อนระยะ blastocyst สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เก็บรักษาในที่อุณหภูมิอื่นๆ อย่างไรก็ตามการเก็บรักษาที่ 38.5°C มีจำนวนเซลล์ทั้งหมดในตัวอ่อนระยะ blastocyst ต่ำ การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C ลดระดับเมตาโบลิซึมโดยวัดจากระดับของ ATP ที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิอื่นๆ ระดับกลูตาไธโอนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกกลุ่มที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ การเก็บรักษาที่ 4°C และ 15°C เพิ่มอัตราการเกิด apoptosis ในไข่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบความแตกต่างในกลุ่มที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C และ 38.5°C เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาแบบระยะสั้นของไข่โคพร้อมปฏิสนธิเนื่องจากความสามารถในการเจริญไปเป็นตัวอ่อนระยะ blastocyst และคุณภาพของตัวอ่อนระยะ blastocyst

การทดลองที่สองมีวัตถุประสงค์ที่จะเพิ่มอัตราการเจริญของตัวอ่อนโคในการเก็บรักษาระยะสั้น โดยใช้การเก็บไข่โคพร้อมปฏิสนธิในน้ำยา HEPES buffered TCM 199 (base medium) นาน 20 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 25°C จากผลการทดลองแรกเป็นกลุ่มควบคุม พบว่าการเติม 10% (v/v) new born calf serum หรือ 10.27 mM pyruvate ไม่สามารถเพิ่มอัตราการเจริญไปเป็นตัวอ่อนระยะ blastocyst อย่างไรก็ตามการเติมสารทั้งสองตัวพร้อมกันสามารถเพิ่มอัตราการเจริญไปเป็นตัวอ่อนระยะ blastocyst ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การเติม DL-dithiothreitol (DTT) ใน holding medium ไม่มีผลต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อน blastocyst ในกลุ่มที่เก็บรักษา ถึงแม้ว่า cyclosporine (CsA) สามารถลดระดับการเกิด apoptosis ในไข่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เติม BAPTA AM และ ruthenium red การเติม CsA ไม่สามารถเพิ่มอัตราการเจริญไปเป็นตัวอ่อนระยะ blastocyst ได้ สรุปได้จากการทดลองว่าการเติม pyruvate และ new

born calf serum มีผลร่วมกันในการเพิ่มอัตราการเจริญไปเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซิส ในขณะที่ mitochondrial membrane pore inhibitor CsA และ antioxidant DTT ไม่มีผลต่อการเจริญของตัวอ่อนโค



สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่อนักศึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

TAYITA SUTTIROJPATTANA : EFFECT OF TEMPERATURE AND
MEDIUM ADDITIVES DURING LIQUID STORAGE ON
DEVELOPMENTAL COMPETENCE IN MATURE BOVINE OOCYTES.
THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. RANGSUN PARNPAI, Ph.D.,
129 PP.

BOVINE/TEMPERATURE/LIQUID STORAGE/MEDIUM ADDITIVES

Short term preservation without freezing the oocytes, such as during long distance transport or subsequent *in vitro* embryo production would be useful for the flexible timing of their use in assisted reproduction techniques. The first experiment aimed to investigate the effect of temperature (4°C, 15°C, 25°C and 38.5°C) during the temporal preservation of matured bovine oocytes compared with control without storage on embryo development, blastocyst quality, cytoplasmic ATP, glutathione level and apoptosis status. The results suggested that after storage in HEPES TCM 199 (base medium) for 20 h, oocytes stored at 25°C and 38.5°C showed the highest rates of blastocyst formation compared with other storage groups. However, storage at 38.5°C reduced the total cell numbers in resultant blastocysts. Storage at 4°C reduced the metabolic activity characterized by cytoplasmic ATP compared with other groups. The glutathione content was significantly decreased in all storage groups. Storage at 4°C and 15°C significantly increased the proportion of apoptotic oocytes but not in those stored at 25°C and 38.5°C compared with control group. These results suggest that preservation at 25°C is the most suitable temperature for temporal storage of

mature bovine oocytes due to the ability to develop to blastocyst stage and the quality of resultant blastocysts.

The second experiment aimed to improve the developmental competence of matured bovine oocytes during liquid storage. *In vitro* matured oocytes were stored at 25°C according to the best temperature of the first experiment. Supplementation of the medium with 10% (v/v) new born calf serum or 10.27 mM pyruvate alone did not improve the blastocyst development. However, their simultaneous addition significantly improved the blastocyst rate. Addition of DL-dithiothreitol (DTT) in holding medium did not improve the embryonic developmental competence of stored oocytes. Although cyclosporine (CsA) could significantly reduce the percentage of apoptotic oocytes unlike BAPTA-AM and ruthenium red, CsA supplementation could not improve the proportion of blastocyst rate. In conclusion, pyruvate and new born calf serum had a synergistic effect to increase the blastocyst rate whereas the mitochondrial membrane pore inhibitor CsA and antioxidant DTT did not affect the embryo development.

School of Biotechnology

Academic Year 2015

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____