อนิรุธ อารีเอื้อ : การทำ vitrification ไข่สุก และตัวอ่อนหนูถีบจักรระยะต่างๆ: เปรียบเทียบการใช้วิธี Cryotop และ hemi straw closed system (VITRIFICATION OF MOUSE MATURED OOCYTES AND EMBRYOS AT VARIOUS STAGES: COMPARISON OF CRYOTOP AND HEMI STRAW CLOSED SYSTEM METHODS) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย, 107 หน้า.

การแช่แข็ง เป็นการรักษาสภาพของเซลล์ให้คงสภาพได้ยาวนานขึ้น โดยวิธีแช่แข็งแบบเยื่อแก้ว (vitrification) ถูกใช้เป็นวิธีหลักในการศึกษาการแช่แข็งในปัจจุบัน ซึ่งการศึกษานี้ในการทดลองที่หนึ่ง ตัวอ่อนหนูถีบจักรถูกผลิตจากไข่แช่แข็งด้วยวิธีฉีดอสุจิเข้าไปในไซโตพลาสซึมของไข่ โดยใช้เครื่องเปียโซ โดยเปรียบเทียบวิธีการแช่แข็ง ด้วยการใช้ Cryotop กับ hemi straw closed system (HS-CS) เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้แช่แข็ง โดยสองวิธีนี้ใช้น้ำยาแช่แข็งและน้ำยาละลายความเข้มข้นสูตรเดียวกัน คือ น้ำยาปรับความสมดุลที่มี 7.5% EG + 7.5% DMSO + 20% FBS นาน 5 นาที ตามด้วย แช่ในน้ำยาแช่แข็งที่มี 15% EG + 15% DMSO + 20% FBS + 0.6 M ซูโครส นาน 30 วินาที และน้ำยาละลายที่ความเข้มข้นต่างกันคือ 1.0 M, 0.5 M, 0.25 M และ 0 M ซูโครสและ 20% FBS ในสารละลายของ D-PBS นานสารละลายละ 5 นาที ซึ่งจากอัตราการรอดที่สูงหลังการละลายไข่แช่แข็ง และอัตราการพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะเอ็กซ์แพนบลาสโตซีส ในกลุ่ม HS-CS พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติจากกลุ่ม Cryotop (อัตราการรอดคือ 98.6% และ 96.9% และอัตราการพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะเอ็กซ์แพนบลาสโตซีสคือ 29.1% กับ 27.3% ของแต่ละกลุ่มเรียงตามลำดับ โดยค่านัยสำคัญน้อยกว่าร้อยละห้า) ยิ่งไปกว่านั้น เมื่อพิจารณาอัตราส่วนของมวลเซลล์ภายในต่อโทรเฟคโตเดิร์ม ของทั้งสองกลุ่มแช่แข็ง พบว่ามีค่าที่ต่ำกว่าแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้แช่แข็ง (0.42 $\pm$0.10, 0.41$\pm$0.11 และ 0.45$\pm$0.11 ของแต่ละกลุ่มเรียงตามลำดับ โดยค่านัยสำคัญมากกว่าร้อยละห้า) ซึ่งจากผลการทดลองนี้บ่งชี้ได้ว่า การแช่แข็งแบบใช้ HS-CS และวิธีการใช้ Cryotop มีประสิทธิภาพในการแช่แข็งไข่ได้ดี ส่วนในการทดลองที่สอง ตัวอ่อนหนูถีบจักร จากหลายๆระยะ เช่น สองเซลล์ สี่เซลล์ แปดเซลล์ มอรูล่า และบลาสโตซีส ช่วงต้นที่ผลิตด้วยวิธีฉีดอสุจิเข้าไปในไซโตพลาสซึมของไข่โดยใช้เครื่องเปียโซ ถูกนำไปแช่แข็ง และทำการเปรียบเทียบวิธีระหว่างการใช้ Cryotop, HS-CS กับ กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้แช่แข็ง ซึ่งผลจากการทดลองที่สองนี้บ่งชี้ว่าวิธี HS-CS มีประสิทธิภาพเทียบเท่าวิธี Cryotop เมื่อพิจารณาที่อัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อนและพัฒนาการของตัวอ่อนหลังการละลาย ยิ่งไปกว่านั้นที่ระยะเอ็กซ์แพนบลาสโตซีส จากกลุ่มแช่แข็งทั้งสองวิธี พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการแช่แข็ง เมื่อพิจารณาที่จำนวนเซลล์ทั้งหมดและอัตราส่วนของมวลเซลล์ภายในต่อโทรเฟคโตเดิร์ม

ดังนั้นจึงกล่าวโดยสรุปได้ว่า การแช่แข็งแบบ HS-CS มีประสิทธิภาพสำหรับแช่แข็งไข่และตัวอ่อนของหนูถีบจักร ซึ่งเตรียมอุปกรณ์ใช้ได้เอง ราคาไม่แพง และสามารถลดหรือกำจัดปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อ ดังนั้น วิธีนี้จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปประยุกต์ใช้ ในการแช่แข็งไข่และตัวอ่อนของมนุษย์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2554 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ANIRUTH AREE-UEA : VITRIFICATION OF MOUSE MATURED OOCYTES AND EMBRYOS AT VARIOUS STAGES: COMPARISON OF CRYOTOP AND HEMI STRAW CLOSED SYSTEM METHODS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. RANGSUN PARNPAI, Ph.D., 107 PP.

OOCYTES AND EMBRYOS VITRIFICATION/CRYOTOP/HEMI STRAW CLOSED SYSTEM/PIEZO MICROMANIPULATOR/INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION.

Cryopreservation plays a key role in long-term cell preservation. A process called vitrification is a method used as a milestone in cryopreservation technique. In the first experiment, mouse blastocysts were produced from vitrified oocytes following intracytoplasmic sperm injection (ICSI) by using piezo micromanipulator. While, two vitrification methods, Cryotop and hemi straw closed system (HS-CS) were investigated using the same freezing (equilibration medium, 7.5% EG + 7.5% DMSO + 20% FBS for 5 min and vitrification medium, 15% EG + 15% DMSO + 20% FBS + 0.6 M sucrose for 30 sec) and thawing media (D-PBS solutions supplemented with 1.0 M, 0.5 M, 0.25 M and 0 M sucrose + 20% FBS for 5 min each period). Survival rate after frozen-thawed oocytes, and the expanded blastocyst formation rate in the HS-CS group was not significantly different with the Cryotop group (Survival rates: 98.6% vs 96.9%, and the expanded blastocyst formation rates: 29.1% vs 27.3%, respectively; $P>0.05$). Furthermore, the ICM/TE ratio from both vitrified groups were not significant difference but lower than the non-vitrified group. (0.42 ± 0.10 vs 0.41 ± 0.11 vs 0.45 ± 0.11, respectively; $P>0.05$). The result indicated that HS-CS method is effective to vitrify oocytes as well as Cryotop method were effective

to vitrify oocytes. In the second experiment, various stages of embryos, such as 2-cell, 4-cell, 8-cell, morula and early blastocyst stage derived from piezo-ICSI method, were vitrified. The HS-CS method wsa compared with the Cryotop method and the non-vitrified group. The results indicate that the HS-CS method is as effective as the Cryotop method in both embryo survival and embryo development after warming. Furthermore, the expanded blastocysts rate which developed after vitrification-warming were not significantly different from the non-vitrified embryos in terms of cell counts and ICM/TE ratios, suggesting their functional competence.

From the results, it can be concluded that the HS-CS method is an effective method for mouse embryo vitrification, because it is simple to operate, inexpensive to establish and also eliminates or minimizes the risk of contamination. This method would potentially be applicable to human oocyte and embryo cryopreservation.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Biotechnology Student's Signature _____

Academic Year 2011 Advisor's Signature _____