รหัสโครงการวิจัย SUT3-304-58-24-18

รายงานการวิจัย

การพัฒนาอุปกรณ์และเทคนิคสำหรับการแช่แข็งไข่และตัวอ่อนโค ด้วยวิธี Vitrification

(Development of a novel device and improved techniques for bovine oocytes and embryos vitrification)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการวิจัย SUT3-304-56-36-18

รายงานการวิจัย

การพัฒนาอุปกรณ์และเทคนิคสำหรับการแช่แข็งไข่และตัวอ่อนโคด้วยวิธี Vitrification

(Development of a novel device and improved techniques for bovine oocytes and embryos vitrification)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2558

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2560

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2556-2558 คณะวิจัยขอขอบคุณสมาชิกศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้รายงานการวิจัยของคณะวิจัยดำเนินการไปได้อย่างดียิ่ง และสำเร็จลุล่วง และขอขอบคุณโรงฆ่าสัตว์รังสิต อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี รวมทั้งโรงฆ่าสัตว์พระพุทธบาท จ.สระบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์รังไข่โค และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 1 ที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่ในการทดลอง

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย)

หัวหน้าโครงการ

สิงหาคม 2560

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

การแช่แข็งไข่และตัวอ่อนมีความสำคัญในการเก็บรักษาพันธุกรรมที่ดีของสิ่งมีชีวิตทั้งมนษย์และสัตว์ไว้ จุดประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อพัฒนาอุปกรณ์ และปรับปรุงเทคนิคสำหรับการแช่แข็งไข่สุกและตัวอ่อนโครระยะบลาสโตซีสโดยวิธี vitrification

การทดลองที่ 1 ได้ทำการแช่แข็งตัวอ่อนโครระยะบลาสโตซีสที่มีอายุ 7 วันและ 8 วัน ด้วยวิธี Cryotop vitrification พบว่าอัตรารอดไม่แตกต่างกันในกลุ่มแช่แข็งและตัวอ่อนสด แต่กลุ่มแช่แข็งตัวอ่อนที่มีอายุ 7 วัน มีอัตราการฟักตัวของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ 24 ชั่วโมงที่สูงกว่ากลุ่มแช่แข็งตัวอ่อนที่มีอายุ 8 วัน

การทดลองที่ 2 ได้ทำการแช่แข็งไข่โคสุกด้วยวิธี Paper device และ Cryotop vitrification พบว่า อัตรารอดของไข่หลังจากการแช่แข็ง และอัตราตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ผลิตได้ไม่แตกต่างกันในกลุ่มที่ใช้ Paper device และ Cryotop ไข่โคแช่แข็งแบบ 2 ขั้นตอน สามารถมีชีวิตรอดได้แต่อัตราตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ผลิตได้ต่ำกว่ากลุ่มไข่สดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังนั้นจึงได้พัฒนาการทำ virification ไข่แบบ 3 ขั้นตอน จากการศึกษานี้พบว่าไข่ที่ผ่านการแช่แข็งแบบ 3 ขั้นตอน ให้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสสูงกว่าไข่ที่แช่แข็งด้วยแบบ 2-ขั้นตอน แต่ต่ำกว่ากลุ่มไข่สดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่กับการแช่แข็งตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส พบว่าการแช่แข็งทั้ง 2 แบบ มีอัตรารอดและอัตราการฟักตัวของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสไม่แตกต่างกัน

และการทดลองที่ 3 ได้ทำการแช่แข็งแข็งตัวอ่อนโครระยะบลาสโตซีสด้วยวิธี Paper device vitrification แบบ 2 และ 3-ขั้นตอน พบว่า อัตรารอดและอัตราการฟักตัวของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสไม่แตกต่างกันทั้งในกลุ่มการแช่แข็งแบบ 2 และ 3 ขั้นตอนและกลุ่มตัวอ่อนสด

การทดลองนี้สรุปได้ว่า การแช่แข็งด้วยวิธี Paper device ที่พัฒนาขึ้นมาให้ผลเทียบเท่า Cryotop ที่เป็นอุปกรณ์มาตรฐาน และการแช่แข็งด้วยวิธี vitrification แบบ 3 ขั้นตอน โดยใช้ Paper device เหมาะสำหรับแช่แข็งไข่โคสุก และตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

Vitrification of oocytes and embryos are crucial for preserving desired genetics of living organism including human and animals. The aims of this study were to develop a device and improved techniques for bovine matured (MII) oocytes and blastocysts vitrification.

In experiment 1, bovine blastocysts at D7 and D8 were vitrified using Cryotop vitrification. The results found that the survival rate of vitrified D7 and D8 blastocyst was not significantly different from control group but D7 vitrified blastocyst showed superior rates of hatchability than those of D8.

In experiment 2, MII ooctes were vitrified using Paper device and Ctyotop vitrification. 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 ($p<0.05$) lower than that of the fresh group. Therefore, the 3-steps technique for oocytes vitrification was developed. The results showed the blastocyst rate in the 3-steps method of MII oocytes vitrification 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, it did not show any significant difference in both cases.

In experiment 3, bovine blastocysts were vitrified using Paper device vitrification with 2-steps and 3-steps technique. The results found the survival and hatched rate of vitrified blastocyst was not significantly different from fresh control.

This experiment can be concluded that the developed paper device gave similar results with modern standard Cryotop device, and 3-steps vitrification using paper device was suitable for bovine MII oocytes and blastocysts.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	1
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	1
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม	2
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล	4
3.1 วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล	4
3.2 การทดลองที่ 1 ผลของอายุตัวอ่อนโคระยะบลาสโตซีสที่มีต่ออัตรารอดหลังการทำละลายหลังแช่แข็งด้วยวิธี Vitrification	4
3.2.1 การเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้ว	4
3.2.2 การเตรียมอสุจิสำหรับปฏิสนธิในหลอดแก้ว	4
3.2.3 การปฏิสนธิในหลอดแก้ว	5
3.2.4 การเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว	5
3.2.5 การแช่แข็งตัวอ่อนด้วยวิธี Cryotop vitrification แบบ 2 ขั้นตอน	5
3.2.6 อัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังการทำละลาย	5
3.2.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ	6
3.3 การทดลองที่ 2 การแช่แข็งไข่ด้วยวิธี Cryotop vitrification แบบ 2 ขั้นตอน	6
3.3.1 การเตรียม paper device	6
3.3.2 การแช่แข็งไข่	6
3.3.4 การทำละลายไข่	7
3.3.5 วิธีตรวจสอบการรอดชีวิตของไข่หลังการละลาย	7
3.3.6 การปฏิสนธิในหลอดแก้วและการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว	7

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3.7 การย้อมตัวอ่อนเพื่อนับจำนวน Trophectroderm และ inner cell mass	7
3.3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ	7
3.4 การทดลองที่ 3 การแช่แข็งตัวอ่อนด้วยวิธี paper device vitrification แบบ 2-step และ 3-step	8
3.4.1 การเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้ว การปฏิสนธิในหลอดแก้ว และการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว	8
3.4.2 การแช่แข็งตัวอ่อน	8
3.4.3 การทำละลายตัวอ่อน	8
3.4.4 อัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังการทำละลาย	8
3.4.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ	9
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	
4.1 ผลการทดลอง	10
4.1.1 ผลของอายุตัวอ่อนโคระยะบลาสโตซีสที่มีต่ออัตรารอดหลังการทำละลายหลังแช่แข็งด้วยวิธี vitrification	10
4.1.2 ผลของวิธี Paper device vitrification แบบ 2 และ 3 ขั้นตอน ต่ออัตรารอดและการเจริญเติบโตของไข่หลังแช่แข็งและทำละลาย	11
4.1.3 ผลของวิธี Paper device vitrification แบบ 2 และ 3 ขั้นตอน ต่ออัตรารอดและการเจริญเติบโตของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสหลังแช่แข็งและทำละลาย	14
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	17
5.1 สรุปผลการวิจัย	17
5.2 ข้อเสนอแนะ	17
บรรณานุกรม	18
ประวัติผู้วิจัย	24
ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์	34

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 อัตรารอดและการเจริญเติบโตของตัวอ่อนหลังจากการทำละลายหลังแช่แข็งด้วยวิธี Cryotop vitrification แบบ 2 ขั้นตอน 10

ตารางที่ 2 อัตรารอดและการเจริญเติบโตของไข่จากการทำละลายหลังแช่แข็งด้วยวิธี Cryotop และ Paper device vitrification 12

ตารางที่ 3 จำนวน TE และ ICM ในบลาสโตซีสจากไข่จากการทำละลายหลังแช่แข็งด้วยวิธี Cryotop และ Paper device vitrification 12

ตารางที่ 4 อัตรารอดและการเจริญเติบโตของไข่จากการทำละลายหลังแช่แข็งด้วยวิธี Paper device vitrification แบบ 2 ขั้นตอน และ 3 ขั้นตอน 13

ตารางที่ 5 จำนวน TE และ ICM ในบลาสโตซีสของไข่จากการทำละลายหลังแช่แข็งด้วยวิธี Paper device vitrification แบบ 2 ขั้นตอน และ 3 ขั้นตอน 13

ตารางที่ 6 อัตราการรอดและการเจริญเติบโตของตัวอ่อนหลังจากการทำละลายหลังแช่แข็งด้วยวิธี Paper device vitrification แบบ 2 ขั้นตอน และ 3 ขั้นตอน 15

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 Paper device 6

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การแช่แข็งไข่และตัวอ่อนด้วยวิธี vitrification มีความนิยมแพร่หลายเนื่องจากเป็นวิธีการที่สะดวก รวดเร็ว และมีอัตรารอดหลังการทำละลายสูง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการคิดค้นวิธีการและอุปกรณ์ในการแช่แข็งที่ช่วยลดต้นทุนและเวลาที่ใช้ ปัจจุบันมีการใช้อุปกรณ์แช่แข็งหลายชนิด เช่น Open Pulled Straw, Cryotop, Cryoloop, Electron microgrid และ Hemistraw เป็นต้น อย่างไรก็ตามอุปกรณ์ดังกล่าวยังมีข้อจำกัดอยู่มาก เนื่องจากอุปกรณ์มีราคาแพงและใช้งานยาก ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จะทำการพัฒนาอุปกรณ์และเทคนิคสำหรับการแช่แข็งไข่และตัวอ่อนโคที่มีราคาถูกอีกทั้งสามารถใช้งานได้ง่าย เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในภาคสนามได้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาผลของอายุตัวอ่อนโครระยะบลาสโตซีสที่มีผลต่ออัตรารอดหลังการทำละลายหลังแช่แข็งด้วยวิธี Vitrification

1.2.2 เพื่อพัฒนาอุปกรณ์และเทคนิคการแช่แข็งไข่และตัวอ่อนโค

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ทำการผลิตตัวอ่อนโคโดยวิธีปฏิสนธิในหลอดแก้ว และนำตัวอ่อนโครระยะบลาสโตซีสที่อายุ 7 และ 8 วัน มาทำการแช่แข็งและศึกษาอัตรารอดหลังการทำละลาย เพื่อให้ทราบอายุของตัวอ่อนโคที่เหมาะสมในการทำแช่แข็ง นอกจากนั้นทำการพัฒนาอุปกรณ์แช่แข็งไข่และตัวอ่อนโคด้วย Paper device โดยเปรียบเทียบกับ Cryotop และพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งด้วยวิธี vitrification แบบ 2 ขั้นตอน และ 3 ขั้นตอน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบทราบอายุของตัวอ่อนโคที่เหมาะสมในการแช่แข็ง ได้อุปกรณ์และวิธีการแช่แข็งไข่และตัวอ่อนโค นำข้อมูลที่ได้ไปเสนอผลงานวิชาการในระดับนานาชาติ มีผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติอย่างน้อย 1 ฉบับ

บทที่ 2
การทบทวนวรรณกรรม

การแช่แข็งไข่และตัวอ่อนด้วยวิธี vitrification เป็นวิธีการที่ให้อัตรารอดหลังการละลายสูง (Vajta and Kuwayama, 2006) และถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในสัตว์หลายชนิด เช่น โค (Martino et al., 1996), สุกร (Isachenko et al., 1998), ม้า (Hurtt et al., 2000), กระบือ (Dhali และคณะ, 2000), มนุษย์ (Kuwayama and Kato, 2000), แมว (Murakami, 2004), แกะ (Isachenko et al., 2001) และแพะ (Begin et al., 2003) ปัจจัยที่ส่งผลต่อความสำเร็จในการแช่แข็งด้วยวิธี vitrification ประกอบด้วย การเลือกใช้สารแช่แข็ง (cryoprotectant) ที่เหมาะสมกับชนิด ของไข่หรือตัวอ่อน และอุปกรณ์ที่ใช้ในการแช่แข็ง จากรายงานก่อนหน้านี้ พบว่ามีอุปกรณ์หลายชนิดที่ใช้ในการแช่แข็งไข่และตัวอ่อนด้วยวิธี Vitrification ในสัตว์ชนิดต่างๆเช่นวิธี Open Pulled Straw (OPS; Vajta และคณะ 1998) Cryotop (Kuwayama และ Kato 2000), Cryoloop (Mukaida, 2001) Electron microgrid (Cho และคณะ, 2002) Hemistraw (Vanderzwalmen และคณะ, 2003) Cryotip (Kuwayama และคณะ, 2005) Cryoleaf (Chian และคณะ, 2005) Rapid-I (Larman และ Gardner, 2010) และ Hollow fiber (Matsunari และคณะ, 2012) อย่างไรก็ตามอุปกรณ์ดังกล่าวมีราคาค่อนข้างสูง ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ และผู้ใช้งานต้องมีความชำนาญในควบคุมไข่หรือตัวอ่อนระหว่างการแช่แข็งและการทำละลาย ยกตัวอย่างเช่น Cryotop ซึ่งเป็นอุปกรณ์แช่แข็งที่มีประสิทธิภาพสูง มีราคาประมาณ 1,050 บาทต่ออัน และต้องนำเข้าจากประเทศญี่ปุ่น ในการทดลองนี้ผู้วิจัยจะทำการพัฒนาอุปกรณ์การแช่แข็ง โดยใช้กระดาษไขซึ่งราคาถูกและหาซื้อได้ง่าย โดยกระดาษไข 1 แผ่น (ขนาด A4) ราคาแผ่นละ 4 บาท สามารถตัดแบ่งได้เป็นอุปกรณ์แช่แข็งถึง 100 ชิ้น ซึ่งการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ในการแช่แข็งไข่และตัวอ่อน และสามารถช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้

ในปัจจุบันการแช่แข็งไข่หรือตัวอ่อนด้วยวิธี vitrification ทำโดยการบ่มไข่หรือตัวอ่อนในน้ำยาแช่แข็งที่มีสารแช่แข็งที่มีความเข้มข้นสูงในเวลาอันสั้น ตามด้วยการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วโดยจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า การใช้สารแช่แข็งที่ความเข้มข้นสูงจะเป็นพิษต่อตัวอ่อน ดังนั้นควรให้ตัวอ่อนอยู่ในน้ำยาไม่เกิน 60 วินาทีหรือน้อยกว่า (Shaw และคณะ, 1992; Hunter และคณะ, 1995; Chung และคณะ, 2000; Wu และคณะ, 2001; Yoon และคณะ, 2003) การลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วจะช่วยเพิ่มอัตรารอดของไข่แช่แข็งหลังการทำละลาย (Stachecki และคณะ, 2008) อย่างไรก็ตาม รายงานดังกล่าวศึกษาในตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่มีคุณภาพดีและเป็นการศึกษาอัตรารอดของไข่หลังการทำละลายด้วย FDA เพียงเท่านั้น ซึ่งยังขาดข้อมูลสำคัญคือ ข้อมูลการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสของไข่แช่แข็ง และการเจริญสู่ระยะแฮชชิ่งบลาสโตซีสของตัวอ่อนแช่แข็ง

การแช่แข็งด้วยวิธี vitrification ทำให้ไข่หรือตัวอ่อนมีอัตรารอดหลังการละลายสูงกว่าการแช่แข็งด้วยวิธีการอื่น เนื่องจากการใช้สารแช่แข็งที่มีความเข้มข้นสูงทำให้สามารถป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์ การลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วในการแช่แข็งด้วยวิธี vitrification ทำให้เซลล์และน้ำยาแช่แข็งเปลี่ยน

สภาพเป็นของแข็งคล้ายแก้ว สารแช่แข็งความเข้มข้นสูงที่นิยมใช้ในการแช่แข็งด้วยวิธี vitrification ได้แก่ dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol (EG), glycerol (Gly) และ polyethylene glycol (PEG) ซึ่งมีความเข้มข้นอยู่ที่ระดับ 3.5-5.5 โมลาร์ (Mullen และคณะ, 2012) อย่างไรก็ตามการใช้สารแช่แข็งที่มีความเข้มข้นสูงจะเพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ทำการแช่แข็ง จากการศึกษาของ Saito และคณะ (1994) พบว่าการเสริมสารประเภทน้ำตาลลงไปในน้ำยาทำลายจะช่วยเพิ่มอัตรารอดหลังการทำละลายของตัวอ่อน ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จะทำการบ่มไข่และตัวอ่อนในน้ำยาแช่แข็ง ที่มีสารแช่แข็งจากความเข้มข้นต่ำไปสูง (ความเข้มข้นละ 30 วินาที) และทำการละลายในน้ำยาที่มีกลูโคสความเข้มข้นสูงไปต่ำ ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการแช่แข็งไข่และตัวอ่อนให้ดียิ่งขึ้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

3.1. วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

ใช้ห้องทดลองศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.2 การทดลองที่ 1 ผลของอายุตัวอ่อนโครยะยะบลาสโตซีสที่มีต่ออัตรารอดหลังการทำละลายหลังแช่แข็งด้วยวิธี vitrification

ทำการผลิตตัวอ่อนโดยวิธีปฏิสนธิในหลอดแก้ว จากนั้นนำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่มีอายุ 7 และ 8 วันมาทำการแช่แข็งด้วยวิธี Cryotop แบบ 2 ขั้นตอน vitrification ตัวอ่อนที่ทำการแช่แข็งจะถูกเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 1 เดือน แล้วจึงนำมาละลาย ตรวจสอบอัตรารอดและการเจริญเติบโตของตัวอ่อนหลังจากการทำละลาย

3.2.1 การเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้ว

เก็บรังไข่โคจากโรงฆ่าสัตว์โดยแช่ไว้ในน้ำเกลือขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ แล้วใช้เข็มขนาด 18G ต่อกับกระบอกฉีดยาขนาด 10 ml ดูดไข่จากถุงไข่ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-8 มม. ทำการคัดเลือกไข่ที่มีชั้นเซลล์คิวมูลัสห่อหุ้มอย่างน้อย 2 ชั้น นำมาล้างในน้ำยา modified Dulbecco's phosphate buffered saline (mDPBS) + 0.1% polyvinyl pyrolidone (PVP, Sigma, P-0930) ก่อนที่จะนำไปเลี้ยงในน้ำยาสำหรับเลี้ยงไข่ซึ่งปิดคลุมน้ำยาด้วย mineral oil (Sigma, M-8410) เลี้ยงในสัดส่วน 20 ใบ/100 µl น้ำยาเลี้ยงไข่ประกอบด้วย TCM199 (Sigma, M-5017) ที่เติมด้วย 10% FBS, 50 IU/ml hCG (Intervet, Netherlands, CDN781851), 0.02 AU/ml FSH (Antrin®, Denka Pharmaceutical, Japan) และ 1µg/ml 17β-estradiol (Sigma, E-8875) นำไข่ไปเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เป็นเวลา 23 ชั่วโมง (Parnpai และคณะ, 1999)

3.2.2 การเตรียมอสุจิสำหรับปฏิสนธิในหลอดแก้ว

นำน้ำเชื้อโคแช่แข็งมาทำละลาย โดยนำออกมาจากถังไนโตรเจนเหลวทิ้งไว้ในอากาศเป็นเวลา 10 วินาที หลังจากนั้นจุ่มลงใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 วินาที แล้วทำความสะอาดด้านนอกหลอดด้วย 70 % ethanol จากนั้นตัดหลอดเพื่อให้น้ำเชื้อที่ละลายแล้วไหลลงหลอด eppendorf แล้วดูดน้ำเชื้อไปไว้ก้นหลอด conical ขนาด 15 ml ที่มีน้ำยา TALP ปริมาตร 1.5 ml แล้วนำไปวางเอียง 45 องศาในตู้อบอุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air นาน 30 นาที เพื่อให้อสุจิที่มีชีวิตว่ายขึ้นด้านบนของผิวน้ำยา (sperm swim-up) อสุจิที่ผ่านกระบวนการดังกล่าวจะเกิดความพร้อมสำหรับการปฏิสนธิโดยมีความสามารถในการเคลื่อนที่เร็ว (hyperactive) และเกิดคาพาซิเตชั่น (capacitation) ทำให้เพิ่มอัตราการเจาะทะลุ (penetration) ชั้นของเซลล์คิวมูลัสและ zona pellucida (Dode et al., 2002) หลังจากนั้นดูดน้ำยาส่วนบน 1 ml ไปไว้ในหลอด conical tube ที่มีน้ำยา TALP 5 ml แล้วนำไปปั่นที่ 2000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดน้ำยาส่วนใสทิ้งเหลือไว้เฉพาะอสุจิที่ก้นหลอด เจือจางอสุจิที่ได้ด้วย

น้ำยา TALP ให้มีความเข้มข้นของอสุจิ 1-2 ล้านตัวต่อซีซี แล้วนำไปหยดลงบนจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 mm (100 µl/หยด) แล้วปิดด้วย mineral oil แล้วนำไปไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5 ℃ ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เพื่อรอปฏิสนธิกับไข่

3.2.3 การปฏิสนธิในหลอดแก้ว (*in vitro* fertilization, IVF)

นำไข่ที่เลี้ยงครบ 23 ชั่วโมง มากำจัดเซลล์คิวมูลัส ออกบางส่วน ด้วย 0.1 % hyaluronidase ให้เหลือเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบไข่เพียง 1-2 ชั้น แล้วนำไข่มาล้างด้วยน้ำยา TALP 2 ครั้ง หลังจากนั้นนำไข่ที่เตรียมไว้ 20-25 ใบ มาใส่ในหยดน้ำยาที่มีอสุจิที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.2. แล้วนำไปบ่มไว้ในตู้อบเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 38.5 ℃ ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air นาน 10 ชั่วโมง

3.2.4 การเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว

เมื่อบ่มไข่และอสุจิด้วยกันครบ 10 ชั่วโมง นำไข่ไปเลี้ยงในน้ำยา modified oviduct synthetic fluid with amino acids medium (mSOFaa, Gardner และคณะ, 1994) ในสัดส่วน 20 ใบ ต่อน้ำยา 100 µl ที่อุณหภูมิ 38.5 ℃ ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 เป็นเวลา 2 วัน แล้วคัดเลือกตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ ไปเลี้ยงร่วมกับเซลล์บุท่อนำไข่โคในน้ำยา mSOFaa ในสัดส่วน 10 ใบ ต่อน้ำยา 100 µl ที่อุณหภูมิ 38.5 ℃ ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เป็นเวลา 6 วัน ทำการเปลี่ยนน้ำยาทุก 24 ชั่วโมง และบันทึกการเจริญเติบโตของตัวอ่อนทุกวัน

3.2.5 การแช่แข็งตัวอ่อนด้วยวิธี Cryotop แบบ 2 ขั้นตอน vitrification

นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสอายุ 7 และ 8 วัน มาทำการแช่แข็ง โดยนำตัวอ่อนมาล้างในน้ำยา TCM199 Hepes (Sigma, H-4034) + 20% FBS (BM) จากนั้นนำตัวอ่อนมาแช่ในน้ำยา BM ที่มี 10% dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma, D-1435) + 10% ethylene glycol (EG, Sigma, E-9129) นาน 1 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ในน้ำยา vitrification ซึ่งประกอบด้วย BM + 20% DMSO + 20% EG + 0.5 M sucrose (Sigma, S-1888) เป็นเวลา 30 วินาที (2 ขั้นตอน vitrification) จากนั้นนำตัวอ่อนกลุ่มละ 2-3 ใบ วางบนปลายของ Cryotop แล้วนำไปจุ่มลงในไนโตรเจนเหลวทันที แล้วทำการปิดครอบปลาย Cryotop

จากนั้นนำตัวอ่อนที่แช่แข็งไปเก็บในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 เดือน แล้วนำตัวอ่อนที่แช่แข็งมาทำการละลาย โดยนำปลายของ Cryotop ไปไว้ในน้ำยา BM + 0.5 M sucrose 2 ml ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 mm ที่ 38.5 ℃ นาน 5 นาที แล้วจึงย้ายตัวอ่อนไปล้างในน้ำยา BM 5 ครั้ง โดยแต่ละครั้งจะพักตัวอ่อนในน้ำยานานหลุมละ 1 นาที

3.2.6 อัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังการทำละลาย

นำตัวอ่อนหลังจากการทำละลายไปล้างในน้ำยา mSOF+BSA จำนวน 3 ครั้ง แล้วเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบอัตรารอดโดยดูรูปร่างของตัวอ่อน จากนั้นเลี้ยงตัวอ่อนต่อไปนาน 48 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบอัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังจากการทำละลาย

3.2.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

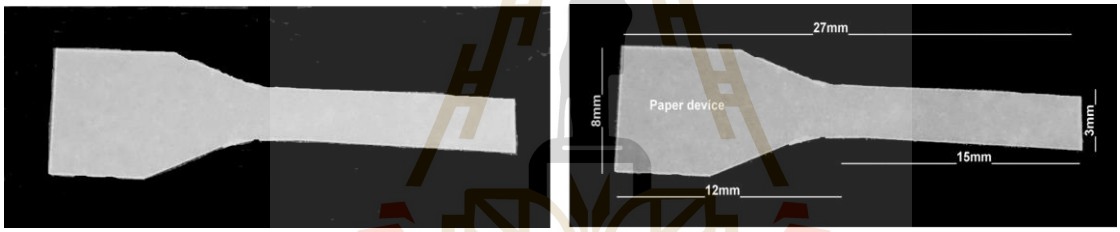
อัตรารอดและอัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังการแช่แข็งและทำละลาย วิเคราะห์โดยหาค่าความแตกต่างทางสถิติ โดยใช้วิธี ANOVA ด้วยโปรแกรม Statistical Package for Social Sciences (SPSS®) โดยคิดค่าความแตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.05$

3.3 การทดลองที่ 2 การแช่แข็งไข่ด้วยวิธี Cryotop vitrification แบบ 2 ขั้นตอน

นำไข่ที่เลี้ยงให้สุกในหลอดแก้วนาน 23 ชั่วโมง มาแช่แข็งด้วยวิธี Paper device โดยเปรียบเทียบกับวิธี Cryotop vitrification แบบ 2 ขั้นตอน และ 3 ขั้นตอน จากนั้นนำไข่แช่แข็งมาทำละลาย แล้วนำไปปฏิสนธิในหลอดแก้ว และศึกษาอัตราการเจริญของตัวอ่อน

3.3.1 การเตรียม Paper device

ตัดกระดาษไข (กระดาษไขมาสเตอร์อาร์ต A4, 90 แกรม, บ. ดีเอชเอสยามวาลา, ประเทศไทย) โดยให้มีด้ามจับ กว้าง 8 mm ยาว 12 mm และมีส่วนปลายสำหรับวางไข่หรือตัวอ่อน กว้าง 3 mm ยาว 15 mm โดยความยาวทั้งหมดของ Paper device เป็น 27 mm ดังรูปที่ 1 จากนั้นนำ Paper device มาทำการฆ่าเชื้อโดยการอาบแสงอัลตร้าไวโอเลตนาน 30 นาที



ภาพที่ 1 Paper device

3.3.2 การแช่แข็งไข่

ทำการเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วตามวิธี 3.2.4 จากนั้นนำไข่มากำจัดเซลล์คิวมูลัส ออกบางส่วน ด้วย 0.1 % hyaluronidase ให้เหลือเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบไข่เพียง 1-2 ชั้น แล้วนำไข่มาล้างในน้ำยา BM จากนั้นนำตัวอ่อนมาแช่ในน้ำยา BM ที่มี 10% DMSO + 10% EG นาน 1 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ในน้ำยา vitrification solution ซึ่งประกอบด้วย BM + 20% DMSO + 20% EG + 0.5 M sucrose เป็นเวลา 30 วินาที (2 ขั้นตอน vitrification) หรือ แช่ในน้ำยา BM ที่มี 5% DMSO + 5% EG นาน 30 วินาที หลังจากนั้นนำไปแช่ในน้ำยา BM ที่มี 12% DMSO + 12% EG + 0.25 M sucrose นาน 30 วินาที แล้วนำไปแช่ใน vitrification solution เป็นเวลา 30 วินาที (3 ขั้นตอน vitrification) จากนั้นนำไข่กลุ่มละ 4-5 ใบ วางบนปลายของ Paper device หรือ Cryotop แล้วนำไปจุ่มลงในไนโตรเจนเหลวทันที แล้วนำ Paper device ใส่ลงไปใน Cryovial หรือ ปิดครอบปลาย Cryotop ด้วยพลาสติกก่อนเก็บในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 เดือน

3.3.4 การทำละลายไข่

ไข่ที่แช่แข็งแบบ 2 ขั้นตอน จะทำการละลายโดยนำปลายของ Paper device หรือ Cryotop ไปไว้ในน้ำยา BM + 0.5 M sucrose 2 ml ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 mm ที่ 38.5 °C นาน 5 นาที แล้วจึงย้ายไข่ไปล้างในน้ำยา BM 5 ครั้ง โดยแต่ละครั้งจะพักไข่ในน้ำยานานหลุมละ 1 นาที

ไข่ที่แช่แข็งแบบ 3 ขั้นตอน จะทำการละลายโดยนำปลายของ Paper device หรือ Cryotop ไปไว้ในน้ำยา BM + 0.5 M sucrose 2 ml ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 mm ที่ 38.5 °C นาน 2 นาที แล้วย้ายไปแช่ในน้ำยา BM + 0.25 M sucrose นาน 2 นาที จากนั้นย้ายไข่ไปแช่ในน้ำยา BM + 0.125 M sucrose นาน 2 นาที แล้วจึงย้ายไข่ไปล้างในน้ำยา BM 5 ครั้ง

3.3.5 วิธีตรวจสอบการรอดของไข่หลังการละลาย

หลังจากทำละลายและเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงไข่ 1 ชั่วโมง ไข่จะถูกตรวจสอบการรอดโดยวิธีการย้อมด้วย fluorescein diacetate (FDA) ตามวิธีของ Morh และ Trounson (1980) โดยแช่ไข่ในน้ำยา PBS ที่มี 2.5 µg/ml FDA และ 5 mg/ml BSA ที่ 38.5°C นาน 2 นาที (ไม่ให้ถูกแสง) จากนั้นล้างในน้ำยา PBS ที่มี 5 mg/ml BSA 3 ครั้ง แล้วนำไปส่องดูภายใต้แสง UV ไข่ที่เรืองแสงสีเขียวจะเป็นไข่ที่ยังมีชีวิต และคัดเฉพาะไข่ที่มีชีวิตนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.6 การปฏิสนธิในหลอดแก้วและการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว

นำไข่ที่มีชีวิตมาปฏิสนธิในหลอดแก้วและเลี้ยงตัวอ่อนตามวิธีข้อ 3.2.2.-3.2.4

3.3.7 การย้อมตัวอ่อนเพื่อนับจำนวน Trophectroderm และ inner cell mass

เพื่อศึกษาคุณภาพของตัวอ่อนที่ผลิตได้ นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสมาย้อมเพื่อนับจำนวน trophectoderm (TE) และ inner cell mass (ICM) โดยปรับปรุงวิธีการย้อมจากรายงานที่มีมาก่อนหน้านี้ (Suteevun และคณะ, 2006) กล่าวคือ ย่อยเปลือกตัวอ่อนออกโดยบ่มใน 0.5% protease (Sigma, P-8811) จากนั้นนำตัวอ่อนที่ไม่มีเปลือก (Zona-free blastocyst) มาบ่มใน 10% rabbit anti-bovine spleenocyte antibodies เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปบ่มในน้ำยาที่มี 10% guinea pig complement (Sigma, S-1639), 10 µg/ml propidium iodide (Sigma, P-4170) และ 10 µg/ml Hoechst 33258 (Sigma, B-2883) นาน 30 นาที แล้วจึงผนึกตัวอ่อนบนสไลด์แก้วด้วย glycerol (Merck, 4094) ปิดทับด้วยแผ่น cover slip แล้วจึงนำไปส่องนับจำนวนเซลล์ TE (ติดสีแดง) และ ICM (ติดสีน้ำเงิน) ภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต

3.3.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

อัตรารอด อัตราการเจริญของไข่หลังทำละลาย และจำนวน trophectoderm (TE) และ inner cell mass (ICM) ของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส วิเคราะห์โดยหาค่าความแตกต่างทางสถิติ โดยใช้วิธี ANOVA ด้วยโปรแกรม SPSS® โดยคิดค่าความแตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.05$

3.4 การทดลองที่ 3 การแช่แข็งตัวอ่อนด้วยวิธี Paper device vitrification แบบ 2 ขั้นตอน และ 3 ขั้นตอน

นำไข่ที่เลี้ยงให้สุกในหลอดแก้วนาน 23 ชั่วโมง มาปฏิสนธิในหลอดแก้ว จากนั้นนำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส (อายุที่เหมาะสม) มาแช่แข็งด้วยวิธี Paper device โดยใช้ 2 ขั้นตอน และ 3 ขั้นตอน vitrification ตัวอ่อนที่ทำการแช่แข็งจะถูกเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 1 เดือน แล้วจึงนำมาละลาย ตรวจสอบอัตรารอดและการเจริญเติบโตของตัวอ่อนหลังจากการทำละลาย

3.4.1 การเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้ว การปฏิสนธิในหลอดแก้ว และการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว

ทำการเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้ว การปฏิสนธิในหลอดแก้ว และการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว ตามวิธีข้อ 3.2.1-3.2.4

3.4.2 การแช่แข็งตัวอ่อน

นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสอายุที่เหมาะสม (จะทราบได้จากการทดลองที่ 13.2) มาทำการแช่แข็ง โดยนำตัวอ่อนมาล้างในน้ำยา BM จากนั้นนำตัวอ่อนมาแช่ในน้ำยา BM ที่มี 10% DMSO + 10% EG นาน 1 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ในน้ำยา vitrification solution ซึ่งประกอบด้วย BM + 20% DMSO + 20% EG + 0.5 M sucrose เป็นเวลา 30 วินาที (2 ขั้นตอน vitrification) หรือ แช่ในน้ำยา BM ที่มี 5% DMSO + 5% EG นาน 30 วินาที หลังจากนั้นนำไปแช่ในน้ำยา BM ที่มี 12% DMSO + 12% EG + 0.25 M sucrose นาน 30 วินาที แล้วนำไปแช่ใน vitrification solution เป็นเวลา 30 วินาที (3 ขั้นตอน vitrification) จากนั้นนำตัวอ่อนกลุ่มละ 2-3 ใบ วางบนปลายของ Paper device แล้วนำไปจุ่มลงในไนโตรเจนเหลวทันที แล้วนำ Paper device ใส่ลงไปใน Cryovial ก่อนเก็บในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 เดือน

3.4.3 การทำละลายตัวอ่อน

ตัวอ่อนที่แช่แข็งแบบ 2 ขั้นตอน จะทำการละลายโดยนำปลายของ Paper device ไปไว้ในน้ำยา BM + 0.5 M sucrose 2 ml ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 mm ที่ 38.5 °C นาน 5 นาที แล้วจึงย้ายตัวอ่อนไปล้างในน้ำยา BM 5 ครั้ง โดยแต่ละครั้งจะพักตัวอ่อนในน้ำยานานหลุมละ 1 นาที

ตัวอ่อนที่แช่แข็งแบบ 3 ขั้นตอน จะทำการละลายโดยนำปลายของ Paper device ไปไว้ในน้ำยา BM + 0.5 M sucrose 2 ml ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 mm ที่ 38.5 °C นาน 2 นาที แล้วย้ายไปแช่ในน้ำยา BM + 0.25 M sucrose นาน 2 นาที จากนั้นย้ายตัวอ่อนไปแช่ในน้ำยา BM + 0.125 M sucrose นาน 2 นาที แล้วจึงย้ายตัวอ่อนไปล้างในน้ำยา BM 5 ครั้ง

3.4.4 อัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังการทำละลาย

นำตัวอ่อนหลังจากการทำละลายไปล้างในน้ำยา mSOF+BSA จำนวน 3 ครั้ง แล้วเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบอัตรารอดโดยดูรูปร่างของตัวอ่อน จากนั้นเลี้ยงตัวอ่อนต่อไปนาน 48 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบอัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังจากการทำละลาย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.4.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

อัตรารอด อัตราการเจริญของไข่หลังทำละลาย และจำนวน trophectoderm (TE) และ inner cell mass (ICM) ของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส วิเคราะห์โดยหาค่าความแตกต่างทางสถิติ โดยใช้วิธี ANOVA ด้วยโปรแกรม SPSS® โดยคิดค่าความแตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.05$

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการทดลอง

4.1.1 ผลของอายุตัวอ่อนโครยะยะบลาสโตซีสที่มีต่ออัตรารอดหลังการทำละลายหลังแช่แข็งด้วยวิธี vitrification

จากผลการทดลองแช่แข็งตัวอ่อนโครยะยะบลาสโตซีสที่มีอายุ 7 วัน (D7) และ 8 วัน (D7) ด้วยวิธี Cryotop vitrification แบบ 2 ขั้นตอน พบว่า อัตรารอดของตัวอ่อนหลังทำละลาย (Vitrified) ในกลุ่มตัวอ่อนที่มีอายุ 7 วัน (97.1%) และ 8 วัน (85.7%) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Fresh; 100 และ 100% ตามลำดับ) (ตารางที่ 1) และภายหลังเลี้ยงตัวอ่อนนาน 24 ชั่วโมง พบว่า อัตราการเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะ hatching ในกลุ่มควบคุมสูงกว่ากลุ่มตัวอ่อนแช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม อัตราการเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะ hatched ในกลุ่มตัวอ่อนที่มีอายุ 7 วัน สูงกว่ากลุ่มตัวอ่อนที่มีอายุ 8 วัน ทั้งในกลุ่มควบคุม (57.1 vs 38.2%) และกลุ่มตัวอ่อนแช่แข็งหลังทำละลาย (48.6 vs 21.4%) ตามลำดับ

ตารางที่ 1 อัตรารอดและการเจริญเติบโตของตัวอ่อนหลังจากการทำละลายหลังแช่แข็งด้วยวิธี Cryotop vitrification แบบ 2 ขั้นตอน

Day	Embryo type	No. of embryos	Survival (%)	Hatching rate (%)			
				24 h		48 h	
				Hing	Hed	Hing	Hed
D7	Fresh	35	35/35 (100)[a]	13/35 (37.1)[a]	20/35 (57.1)[a]	2/35 (5.7)[a]	33/35 (94.3)[a]
	Vitrified	35	34/35 (97.1)[a]	6/35 (17.1)[b]	17/35 (48.6)[a]	3/35 (8.6)[a]	29/35 (82.8)[a]
D8	Fresh	34	34/34 (100)[a]	21/34 (61.8)[a]	13/34 (38.2)[b]	6/34 (17.6)[b]	29/34 (85.3)[a]
	Vitrified	28	24/28 (85.7)[a]	6/28 (21.4)[b]	6/28 (21.4)[b]	2/28 (7.1)[a]	20/28 (71.4)[a]

[a,b,c] ภายใน Column เดียวกัน, ความแตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.05$

Hing: Hatching, Hed: Hatched

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การแช่แข็งด้วยวิธี vitrification เป็นวิธีการแช่แข็งไข่และตัวอ่อน พัฒนาขึ้นโดย Rall and Fahy (1985) ประสพความสำเร็จในการแช่แข็งตัวอ่อนหนู โดยการแช่แข็งด้วยวิธีดังกล่าวจะอาศัยหลักการลดอุณหภูมิที่เร็วมากด้วยไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิต่ำ (-169°C) และสาร CPA ที่มีความเข้มข้นสูง จะทำให้ไม่มีการเกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์ ในขณะที่การแช่แข็งแบบอื่นๆ จะมีผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์ ซึ่งเป็นต้นเหตุสำคัญในการทำลายเซลล์ของตัวอ่อนจากการขยายตัวเวลาทำละลาย (Moreira da Silva และ Metelo, 2005) และจากผลการทดลองพบว่าตัวอ่อนแช่แข็งมีอัตรารอดภายหลังการทำละลายอยู่ที่สูงถึง 85.7 – 97.1% และไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สอดคล้องกับรายงานการทดลองของ Inaba และคณะ (2011) ที่ได้ทำการแช่แข็งตัวอ่อนโครระยะบลาสโตซีสด้วยวิธี vitrification และพบว่าอัตรารอดของตัวอ่อนสูงถึง 94.3% ซึ่งตัวอ่อนที่ผ่านการแช่แข็งด้วยวิธี vitrification มีอัตรารอดหลังการทำละลายที่สูง เนื่องจากเป็นวิธีแช่แข็งที่เกิดความเสียหายต่อเซลล์และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ภายหลังการละลายน้อย และนอกจากนั้นรูปร่าง คุณภาพ รวมทั้งอายุของตัวอ่อนล้วนมีความสำคัญต่อ อัตรารอดของตัวอ่อนภายหลังการแช่แข็งและทำละลาย (Massip และคณะ, 1995)

ภายหลังเลี้ยงตัวอ่อนหลังทำละลายต่อ พบว่าอัตราการเจริญต่อของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะ Hatched ภายหลัง 24 ชั่วโมง ในกลุ่มตัวอ่อนอายุ 7 วัน ให้ผลอัตราการเจริญเติบโตที่สูงกว่ากลุ่มตัวอ่อนอายุ 8 วัน ที่นำมาแช่แข็ง และตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสอายุ 8 วัน มีจำนวน inner cell ที่น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อนที่เจริญเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสที่ 7 วัน ซึ่งจำนวน inner cell บ่งบอกถึงคุณภาพและความสามารถในการเจริญเติบโตต่อไปของตัวอ่อน (Saha และ Suzuki, 1997) และสอดคล้องกับการศึกษาของ Mezzalira และคณะ (2004) ที่พบว่าตัวอ่อนระยะบลาสตซีสอายุ 8 วัน มีอัตราการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ hatched ที่แตกต่างจากกลุ่มอายุอื่น

อย่างไรก็ตาม ผู้ทดลองพบว่าอัตรารอดของตัวอ่อนหลังแช่แข็งและทำละลายไม่ได้ขึ้นขึ้นอยู่กับอายุของตัวอ่อนที่นำมาทำการแช่แข็ง แต่ทว่าปัจจัยอายุของตัวอ่อนที่นำมาแช่แข็งนั้นมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตหลังการแช่แข็งและทำละลาย

4.1.2 ผลของวิธี Paper device vitrification แบบ 2 ขั้นตอน และ 3 ขั้นตอน ต่ออัตรารอดและการเจริญเติบโตของไข่หลังแช่แข็งและทำละลาย

จากการนำไข่ที่เลี้ยงให้สุกในหลอดแก้วนาน 23 ชั่วโมง มาแช่แข็งด้วยวิธี Paper device โดยเปรียบเทียบกับวิธี Cryotop vitrification จากนั้นนำไข่แช่แข็งมาทำละลาย พบว่า อัตรารอดไม่แตกต่างกันทางสถิติในกลุ่ม Cryotop (89.2%) Paper device (90.1%) และกลุ่มควบคุม (99.1%) (ตารางที่ 2) อย่างไรก็ตาม ภายหลัง IVF พบว่าอัตราการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ cleavage ในกลุ่ม Cryotop (48.0%) และ Paper device (90.1%) ไม่แตกต่างกัน แต่ต่ำกว่าในกลุ่มควบคุม (74.3%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับอัตราการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสที่ไม่แตกต่างกันในกลุ่ม Cryotop และ Paper device แต่ต่ำกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และคุณภาพของตัวอ่อน (ตารางที่ 3) จากจำนวน TE และ ICM ในบลาสโตซีส พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติทั้งในกลุ่มแช่แข็งและกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 2 อัตรารอดและการเจริญเติบโตของไข่จากการทำละลายหลังแช่แข็งด้วยวิธี Cryotop และ Paper device vitrification

Groups	No. oocytes IVM	No. (%) oocytes survived	No. IVF	No. (%) CL	No. (%) 0ocytes develop to					
					8-C	16-C	Mo	No. (%) BL at day		
								D6	D7	D8
Control	110	109 (99.1)	109	81[a] (74.3)	50[a] (45.9)	40[a] (36.7)	34[a] (31.2)	8[a] (7.3)	23[a] (21.2)	29[a] (26.6)
Cryotop	112	100 (89.2)	100	48[b] (48.0)	23[b] (23.0)	22[b] (22.0)	18[b] (18.0)	4[b] (4.0)	9[b] (9.0)	9[b] (9.0)
Paper	111	100 (90.1)	100	54[b] (54.0)	22[b] (22.0)	21[b] (21.0)	17[b] (17.0)	4[b] (4.0)	8[b] (8.0)	9[b] (9.0)

[a,b,c] ภายใน Column เดียวกัน, ความแตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.05$

CL= Cleavage, 8-C = 8 cells, 16-C = 16 cells, Mo = Morula, D = day

ตารางที่ 3 จำนวน TE และ ICM ในบลาสโตซีสจากไข่จากการทำละลายหลังแช่แข็งด้วยวิธี Cryotop และ Paper device vitrification

Groups	Differential staining of BL			
	No. BL evaluated	Number of cells		
		TE	ICM	Total
Control	14	68.7	26.1	94.8
Cryotop	13	46.6	21.7	68.4
Paper	14	50.6	22.8	73.4

[a,b,c] ภายใน Column เดียวกัน, ความแตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.05$

BL = Blastocyst, TE = Trophoectoderm, ICM= Inner cell mass

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

และจากการนำไข่ที่เลี้ยงให้สุกในหลอดแก้วนาน 23 ชั่วโมง มาแช่แข็งด้วยวิธี Paper device แบบ 2 ขั้นตอน และ 3 ขั้นตอน vitrification พบว่า อัตรารอดของไข่หลังแช่แข็งและทำละลายไม่แตกต่างกันทางสถิติทั้งในกลุ่ม 2 ขั้นตอน (91.4%) และ 3 ขั้นตอน vitrification (93.2%) และกลุ่มควบคุม (100%) (ตารางที่ 4) และภายหลัง IVF พบว่าอัตราการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ cleavage ในกลุ่ม 2 ขั้นตอน vitrification (42.3%) ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (70.2%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับอัตราการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสที่อายุ 6 วัน ในกลุ่ม 2 ขั้นตอน vitrification (3.8%) ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (10.8%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และอัตราการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสที่อายุ 7 วัน และ 8 วัน ในกลุ่ม 2 ขั้นตอน และ 3

ขั้นตอน 2 ขั้นตอน vitrification (6.7 และ 8.62% ตามลำดับ) ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (17.5 และ 26.3% ตามลำดับ) และคุณภาพของตัวอ่อน (ตารางที่ 5) จากจำนวน TE และ ICM ในบลาสโตซีส พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 4 อัตรารอดและการเจริญเติบโตของไข่จากการทำละลายหลังแช่แข็งด้วยวิธี Paper device vitrification แบบ 2 ขั้นตอน และ 3 ขั้นตอน

Group	No. oocytes IVM	No. (%) survived	No. oocytes IVF	No. (%) CL	No. (%) oocytes developed to					
					8-C	16-C	Mo	No. (%) BL at day		
								D6	D7	D8
Control	114	114 (100)	114	80[a] (70.2)	47[a] (41.2)	40[a] (35.1)	36[a] (31.5)	12[a] (10.8)	20[a] (17.5)	30[a] (26.3)
2 ขั้นตอน	114	104 (91.4)	104	44[b] (42.3)	18[b] (17.3)	16[b] (15.3)	13[b] (12.5)	4[b] (3.8)	7[b] (6.7)	9[b] (8.6)
3 ขั้นตอน	118	110 (93.2)	110	64[ab] (58.2)	42[ab] (33.3)	32[ab] (29.1)	26[b] (23.6)	8[ab] (7.2)	11[b] (10.0)	15[b] (13.6)

[a,b,c] ภายใน Column เดียวกัน, ความแตกต่างทางสถิติที่ *P < 0.05*

CL= Cleavage, 8-C = 8 cells, 16-C = 16 cells, Mo = Morula, D = day

ตารางที่ 5 จำนวน TE และ ICM ในบลาสโตซีสของไข่จากการทำละลายหลังแช่แข็งด้วยวิธี Paper device vitrification แบบ 2 ขั้นตอน และ 3 ขั้นตอน

Group	Differential staining of BL			
	No. BL evaluated	Number of cells		
		TE	ICM	Total
Control	12	72.3	23.9	96.2
2 ขั้นตอน	11	46.3	20.8	67.1
3 ขั้นตอน	12	52.3	22.4	74.7

[a,b,c] ภายใน Column เดียวกัน, ความแตกต่างทางสถิติที่ *P < 0.05*

BL = Blastocyst, TE = Trophoectoderm, ICM= Inner cell mass

การศึกษาเกี่ยวกับการแช่แข็งไข่ในสัตว์หลายสายพันธุ์ ทั้งใน วัว (Albarracin และคณะ, 2005; Morato และคณะ, 2008; Sripunya และคณะ, 2010; Zhao และคณะ, 2011) และสกุร (Somfai และคณะ, 2007) พบว่าอัตราการเจริญเติบโตหลังการแช่แข็งและทำละลายที่ได้ค่อนข้างต่ำ ซึ่งการพัฒนาวิธีการแช่แข็ง

เช่น การศึกษาขั้นตอนการแช่แข็งและทำละลาย ระยะเวลา อุปกรณ์หรือ CPA สามารถเพิ่มอัตรารอดและการเจริญเติบโตหลังการแช่แข็งและทำละลายได้ จากรายงานก่อนหน้านี้ พบว่ามีอุปกรณ์หลายชนิดที่ใช้ในการแช่แข็งไข่และตัวอ่อนด้วยวิธี Vitrification ในสัตว์ชนิดต่างๆ เช่น วิธี Open Pulled Straw (OPS; Vajta และคณะ 1998) Cryotop (Kuwayama และ Kato 2000), Cryoloop (Mukaida, 2001) Electron microgrid (Cho และคณะ, 2002) Hemistraw (Vanderzwalmen และคณะ, 2003) Cryotip (Kuwayama และคณะ, 2005) Cryoleaf (Chian และคณะ, 2005) Rapid-I (Larman และ Gardner, 2010) และ Hollow fiber (Matsunari และคณะ, 2012) อย่างไรก็ตามอุปกรณ์ดังกล่าวมีราคาค่อนข้างสูง ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ และในการศึกษานี้ได้ทำการเปรียบเทียบการแช่แข็งด้วยวิธี Cryotop และ Paper device ซึ่ง Cryotop ถือเป็นอุปกรณ์แช่แข็งไข่และตัวอ่อนที่ได้รับความนิยมที่ใช้ในมนุษย์และสัตว์ (Kuwayama and Kato, 2000) อีกยังใช้งานง่าย และสามารถแช่แข็งไข่และตัวอ่อนได้จำนวนมาก แต่ยังคงมีราคาสูง ส่วนการแช่แข็งด้วยวิธี Paper device เตรียมจากกระดาษไข และจากการศึกษาเปรียบเทียบ พบว่าอัตรารอดของไข่หลังแช่แข็งและทำละลายของทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้น วิธี Paper device จึงเป็นอุปกรณ์ที่สามารถในการแช่แข็งไข่ได้

ในการศึกษานี้ได้ทำการเปรียบเทียบการแช่แข็งด้วยวิธี Paper device แบบ 2 ขั้นตอน และ 3 ขั้นตอน vitrification พบว่า ให้อัตรารอดและการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสที่ไม่แตกต่างกัน แต่อัตราการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสที่อายุ 6 และ 7 วัน ในกลุ่มไข่ที่แช่แข็ง vitrification แบบ 2 ขั้นตอน ให้ผลต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มไข่ที่แช่แข็ง vitrification แบบ 3 ขั้นตอน และกลุ่มควบคุม ส่วนอัตราการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ cleavage และบลาสโตซีสของไข่แช่แข็งหลังทำละลายในการศึกษานี้พบว่ามีอัตราสูงกว่าหลายการศึกษาเคยที่มีการรายงานมา (Martino และคณะ,1996 ; Chen และคณะ, 2003; Albarracin และคณะ, 2005; Morato และคณะ, 2008, Sripunya และคณะ, 2010) อาจเป็นเพราะการใช้ CPA หรือขั้นตอนการแช่แข็งและทำละลายที่แตกต่างกันในแต่ละการศึกษา ล้วนแต่เป็นปัจจัยที่สำคัญในกระบวนการแช่แข็ง ซึ่งผู้ทดลองเชื่อว่าขั้นตอนการแช่แข็งและการเจือจาง CPA ในการทำละลายที่รวดเร็วจะลดผลกระทบจากความเป็นพิษของ CPA และความเครียดจากการลดอุณหภูมิที่สร้างความเสียหายต่อเซลล์ไข่ เช่น metaphase spindle (Shaw และคณะ, 2000; Hwang และ Hochi, 2014), mitochondria และ endoplasmic reticulum (Fuku และคณะ, 1995; Sathananthan, 1997 and Khalili และคณะ, 2012)

และในส่วนของคุณภาพตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส พิจารณาจากจำนวน TE และ ICM ที่ได้จากไข่ที่ผ่านการแช่แข็งด้วยวิธี 2 ขั้นตอน และ 3 ขั้นตอน vitrification พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับหลายการศึกษาในการแช่แข็งไข่ แต่ก็ยังคงเป็นคำถามอยู่ว่าเหตุใดคุณภาพตัวอ่อนถึงไม่มีความแตกต่างกัน

4.1.3 ผลของวิธี Paper device vitrification แบบ 2 ขั้นตอน และ 3 ขั้นตอน ต่ออัตรารอดและการเจริญเติบโตของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสหลังแช่แข็งและทำละลาย

จากการนำตัวอ่อนโครยะยะบลาสโตซีสมาแช่แข็งด้วยวิธี Paper device vitrification แบบ 2 ขั้นตอน และ 3 ขั้นตอน พบว่า อัตรารอดและการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ hatched ของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสหลัง

การแช่แข็งและทำละลาย ในกลุ่มการแช่แข็งด้วยวิธี Peper device vitrification แบบ 2 ขั้นตอน (76.6 และ 60.0%) แบบ 3 ขั้นตอน (86.7 และ 73.3%) ไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (100 และ 86.2%) (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 6 **อัตราการรอดและการเจริญเติบโตของตัวอ่อนหลังจากการทำละลายหลังแช่แข็งด้วยวิธี** Paper device vitrification **แบบ** 2 **ขั้นตอน และ** 3 **ขั้นตอน**

Groups	No. BL	No. (%) survival at 24 h	No. (%) hatched at 48 h
Fresh	29	29 (100.0)[a]	25 (86.2)[a]
2 ขั้นตอน	30	23 (76.6)[a]	18 (60.0)[a]
3 ขั้นตอน	30	26 (86.7)[a]	22 (73.3)[a]

[a,b,c,d] ภายใน Column เดียวกัน, ความแตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.05$

G1= grade 1, G2= grade 2, BL= blastocyst

ในการทดลองนี้ ผู้วิจัยได้ใช้การแช่แข็งตัวอ่อนโคระยะบลาสโตซีสด้วยวิธี vitrification โดยใช้ Paper device ที่เตรียมจากกระดาษไข ซึ่งมีรายงานการใช้ครั้งแรกโดย Kim และคณะ (2012) ในการแช่แข็งตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสโค โดยได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของอุปกรณ์แช่แข็งชนิด Paper device และ EM grid ต่ออัตรารอด การเจริญเติบโตของบลาสโตซีสแช่แข็งภาพหลังทำละลาย ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกัน และประสพความสำเร็จในการผลิตลูกโคด้วยการย้ายฝากตัวอ่อนโดยใช้ตัวอ่อนที่ผ่านการแช่แข็งด้วย Paper device จึงเป็นสิ่งที่ยืนยันได้ว่าอุปกรณ์แช่แข็งชนิด Paper device มีประสิทธิภาพในการแช่แข็งและให้ผลลัพธ์เทียบเท่ากับการใช้อุปกรณ์แช่แข็งที่ได้รับการยอมรับและมีมาตรฐาน อย่างเช่น EM grid

ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสประกอบด้วยเซลล์ และ blastocoel ซึ่งเปรียบเสมือนของเหลวในตัวอ่อน และในกระบวนการแช่แข็งนั้น การลดอุณหภูมิเพื่อแช่แข็งจะทำให้ของเหลวในตัวอ่อนกลายสภาพเป็นผนึกน้ำแข็งและสร้างความเสียหายให้กับเซลล์ข้างเคียงในขั้นตอนการแช่แข็งและทำละลาย ดังนั้นเพื่อเพิ่มอัตรารอดและการเจริญเติบโตของตัวอ่อนหลังแช่แข็งและทำละลาย การทดลองนี้จึงได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบขั้นตอนการแช่แข็งด้วยวิธี vitrification แบบ 2 ขั้นตอน และ 3 ขั้นตอน ซึ่งผู้ทดลองเชื่อว่าขั้นตอนการแช่แข็งและทำละลายนั้นมีผลต่อการลดปริมาณของเหลวภายในเซลล์ ลดโอกาสการเกิดผลึกน้ำแข็ง ลดความเสียหายต่อเซลล์โดยรอบ และช่วยเพิ่มอัตรารอดและการเจริญเติบโตของตัวอ่อนหลังแช่แข็งและทำละลาย

และจากผลการทดลอง พบว่า อัตราการการรอดและการเจริญเติบโตหลังทำละลายของตัวอ่อนที่แช่แข็งด้วยวิธี vitrification แบบ 2 ขั้นตอน และ 3 ขั้นตอน ให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน เช่นเดียวกับในการศึกษาของ

Inaba และคณะ (2011) ที่ทำการเปรียบเทียบขั้นตอนการแช่แข็งตัวอ่อนด้วยวิธี vitrification แบบหลายขั้นตอน และให้ผลการรอดของตัวอ่อนหลังแช่แข็งและทำละลายที่ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Machatcova และคณะ (2006) พบว่าอัตรารอดของตัวอ่อนหลังแช่แข็งและทำละลายในการทดลองนี้สูงกว่าที่พวกเขาได้ศึกษาไว้ถึงสองเท่า นอกจากปัจจัยด้านขั้นตอนการแช่แข็งและทำละลาย ในการศึกษาของ Bruyere และคณะ (2012) ได้ทำการศึกษาการเติมสารสังเคราะห์จากซีรั่มสัตว์ (synthetic subtitition; CRY03) ในน้ำยาแช่แข็ง พบว่าช่วยเพิ่มอัตรารอดของตัวอ่อนหลังแช่แข็งและทำละลาย

การศึกษาของ Yavin และคณะ (2009) ได้รายงานการลดปริมาณ CPA ในน้ำยาแช่แข็งร่วมกับการเพิ่มอัตราการลดอุณหภูมิ หรือ cooling rate เป็นวิธีที่ช่วยลดความเป็นพิษของ CPA ต่อตัวอ่อน และมีผลต่อการรอดและการเจริญเติบโตของตัวอ่อนหลังแช่แข็งและทำละลาย และการศึกษาของ Saragsty และ Arav (2011) ได้ทำการศึกษาปัจจัยของ cooling rate ความหนืดและปริมาณของน้ำยาแช่แข็งในการแช่แข็งตัวอ่อน ซึ่งทุกปัจจัยล้วนมีผลต่อการป้องกันการเกิดความเสียหายต่อตัวอ่อนและการรอดของตัวอ่อนหลังแช่แข็งและทำละลาย

ในส่วนของปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนหลังการทำละลาย ในหลายการศึกษาเชื่อว่าความสามารถในการเจริญเติบโตของตัวอ่อนหลังทำละลาย ขึ้นอยู่กับความทนทานต่อการแช่แข็งของตัวอ่อน ซึ่งพิจารณาจากคุณภาพตัวอ่อน รูปร่างและอายุตัวอ่อนที่เลือกมาแช่แข็ง (Fahning และ Garcia 1992; Balasubramanian และคณะ 1998; Machatkova และคณะ 2006) แต่ความสำเร็จในการแช่แข็งตัวอ่อนไม่ได้ขึ้นอยู่เพียงแค่ชนิดของอุปกรณ์ ขั้นตอน หรือตัวอ่อนเท่านั้น แต่ยังมีปัจจัยจากทักษะและความชำนาญของผู้ปฏิบัติงาน (Saragsty และ Arav, 2011) ที่ให้ผลสำเร็จที่ต่างกัน ถึงแม้ว่าจะใช้อุปกรณ์และวิธีการเดียวกัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

5.1.1 อายุของตัวอ่อนโครยะบลาสโตซีสไม่มีผลต่ออัตรารอดของตัวอ่อน แต่มีผลต่อการเจริญเติบโตหลังการแช่แข็งและทำละลาย ซึ่งตัวอ่อนโครยะบลาสโตซีสที่มีอายุ 7 วันเป็นระยะที่เหมาะสมในการนำมาทำการแช่แข็ง

5.1.2 การแช่แข็งวิธี Paper device vitrification สามารถใช้ในการแช่แข็งไข่และตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสโคได้

5.1.3 อัตราการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสของไข่ที่ผ่านการแช่แข็งด้วยวิธี Paper device vitrification แบบ 3 ขั้นตอน สูงกว่าแบบ 2 ขั้นตอน

5.1.4 อัตรารอดและการเจริญเติบโตหลังแช่แข็งและทำละลายของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส ด้วยวิธี Paper device vitrification แบบ 3 ขั้นตอน สูงกว่าแบบ 2 ขั้นตอน

5.1.5 การแช่แข็งด้วยวิธี Paper device vitrification แบบ 3 ขั้นตอน เป็นวิธีที่เหมาะสมในการแช่แข็งไข่และตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส

ผลการวิจัยนี้ได้รับการตีพิมพ์ในวารสาร Animal Science Journal ดังมีรายละเอียดดังนี้

Paul, A.K., Liang, Y., Srirattana, K., Nagai, T. and Parnpai, R.* 2018. Vitrification of bovine matured oocytes and blastocysts in a paper container. ***Anim. Sci. J.*** 89: 307-315.

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 เพื่อเป็นการพัฒนาและปรับปรุงเทคนิคการแช่แข็งไข่และตัวอ่อนที่สมบูรณ์ ควรมีการศึกษาปัจจัยในการแช่แข็งอื่น เช่น ชนิดและความเข้มข้นของ CPA ในน้ำยา vitrification และระยะเวลาในการแช่แข็ง ซึ่งล้วนแต่มีผลต่อการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของไข่และตัวอ่อน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

Albarracin, J. L., Morato, R., Rojas, C., and Mogas, T. (2005). Effects of vitrification in open-pulled straws on the category of on *in vitro* matured prepubertal and adult bovine oocytes. **Theriogenology.** 63: 890-901.

Balasubramanian, S., Rho, G., and Leibo, S. (1998). Effect on development of chilling *in vitro* produced bovine embryos at various cleavage stages. **Theriogenology.** 49: 162.

Begin, I., Bhatia, B., Baldassarre, H., Di Nnyes, A., and Keefer, C. L. (2003). Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2- to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods. **Theriogenology** 59: 1839-1850.

Bruyere, P., Baudot, A., Guyader-Joly, C., Guerin, P., Louis, G., and Buff, S. (2012). Improved cryopreservation of in vitro produced bovine embryos using a chemically defined freezing medium. **Theriogenology** 78: 1294-1302.

Chen, S. U., Lien, Y. R., Chao, K. H., Ho, H. N., Yang, Y. S., and Lee, T. Y. (2003). Effect of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocytes freezing-a review article. **Mol. Cell Endo.** 202: 101-107.

Chian, R. C., Son, W. Y., Huang, J. Y., Cui, S. J., Buckett, W. M., and Tan, S. L. (2005). High survival rates and pregnancies of human oocytes following vitrification: preliminary report. **Fertil. Steril.** 84: S36.

Cho, H. J., Son, W. Y., Yoon, S. H., Lee, S. W., and Lim, J. H. (2002). An improved protocol for dilution of cryoprotectants from vitrified human blastocysts. **Hum. Reprod.** 17: 2419-2422.

Chung, H. M., Hong, S. W., Lim, J. M., Lee, S. H., Cha, W. T., Ko, J. J., Han, S. Y., Choi, D. H., and Cha, K. Y. (2000). In vitro blastocyst formation of human oocytes obtained from unstimulated and stimulated cycles after vitrification at various maturational stages. **Fertil. Steril.** 73: 545–551.

Dhali, A., Manik, R.S., Das, S.K., Singla, S.K. and Palta, P. (2000). Vitrification of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. **Theriogenology.** 53: 1295-1303.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Dode, M. A. N., Rodovalho, N. C., Ueno, V. G., and Fernandes, C. E. (2002). The effect of sperm preparation and co-incubation time on in vitro fertilization of Bos indicus oocytes. **Anim. Reprod. Sci.** 69: 15-23.

Fahning, M., and Garcia, M. (1992). Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. **Cryobiology** 29: 1-18.

Fuku, E., Xia, L., and Downey, B. R. (1995). Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. **Cryobiology** 2: 139-156.

Hunter, J. E., Fuller, B. J., Bernard, A., Jackson, A., and Shaw, R. W. (1995). Vitrification of human oocytes following minimal exposure to cryoprotectants; initial studies on fertilization and embryonic development. **Hum. Reprod.** 10: 1184-1188.

Hurtt, A. E., Landim-Alvarenga, F., Seidel, G. E., and Squires, E. L. (2000). Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws. **Theriogenology** 54: 119-128.

Hwang, I. S., and Hochi, S. (2014). Recent progress in cryopreservation of bovine oocytes. **BioMed Research Int.** 2014: Article ID 570647.

Inaba, Y., Alkawa, T., Hirai, T., Hashiyada, Y., Yamanouchi, T., Misumi, K., Ohtake, M., Somfai, T., Kobayashi, S., Saito, N., Matoba, S., Konishi, K., and Imai, K. (2011). In-straw cryoprotectant dilution for bovine embryos vitrified using Cryotop. **J. Reprod. Dev.** 57: 437-443.

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.

Isachenko, V., Soler, C., Isachenko, E., Perez-Sanchez, F., and Grishchenko, V. (1998). Vitrification of immature porcine oocytes: effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant. **Cryobiology**. 36: 250-253.

Khalili, M. A., Maione, M., Palmerini, M. G., Bianchai, S., Macchiarelli, G., and Nottola, S. A. (2012). Ultrastucture of human mature oocytes after vitrification. **Europ. J. Histochem.** 56: 236-242.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Kim, Y. M., Uhm, S. J., Gupta, M. K., Yang, J. S., Lim, J. G., Das, Z. C., Heo, Y. T., Chung, H. J., Kong, I. K., Kim, N. H., Lee, H. T., and Ko, D. H. (2012). Successful vitrifcation of bovine blastocysts on paper container. **Theriogenology.** 78: 1085-1093.

Kuwayama, M. (2007). Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. **Theriogenology**. 67: 73-80.

Kuwayama, M., and Kato, O. (2000). All-round vitrification method for human oocytes and embryos. **J. Assist. Reprod. Genet.** 17: 477.

Kuwayama, M., Vajta, G. Kato, O. and Leibo, S. P. (2005). Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Reprod. Biomed. Online.** 300: 308.

Kuwayama, M., Vajta, G., Ieda, S., and Kato, O. (2005). Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. **Reprod. Biomed. Online**. 11: 608-614.

Larman, M. G., and Gardner, D. K. (2010). Vitrifying mouse oocytes and embryos with super-cooled air. **Hum. Reprod.** 25: i265.

Machatkova, M., Hanzalova, K., Horakova, J., Reckova, Z., and Hulinska, P. (2006). Collection of oocytes from donors in the growth phase of follicular development can enhance the production of bovine embryos for cryopreservation. **Veterinarni Medicina.** 51: 232-238.

Machatkova, M., Horakova, J., Rybar, R., Hanzalova, K., and Rubes, J. (2005). Embryos produced in vitro from bulls carrying 16; 20 and 1; 29 Robertsonian translocations: efficiency and kinetics of oocyte fertilization and embryo development. **Zygote** 13:97-101.

Martino, A. N., Songsasen, S., and Leibo, S. P. (1996). Development in to blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biol. Reprod.** 54: 1059-1069.

Massip, A., Mermillod, P., and Dinnyes, A. (1995). Morhology and biochemistry of in vitro produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. **Hum. Reprod.** 10: 3004-3011.

Massip, A., Mermillod, P., Van Langendonckt, A., Touze, J. L., and Dessy, F. (1995). Survival and viability of fresh and frozen-thawed in vitro bovine blastocysts. **Reproduction Nutrition Development**. 35: 3-10.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Matsunari, H., Maehara, M., Nakano, K., Ikezawa, Y., Hagiwara, Y., Sasayama, N., Shirasu, A., Ohta, H., Takahashi, M., and Nagashima, H. (2012). Hollow fiber vitrification: A novel method for vitrifying multiple embryos in a single device. **J. Reprod. Dev.** 58: 599-608.

Mezzalira, A., Mezzalira, J. C., Moraes, A. N., Thaler Neto, A., Vieira, A. D., Barreta, M. H., and Damiani, J. (2004). Vitrification of bovine IVP embryos: Age of embryos and exposure time to cryoprotectant influence viability. **Archiv. Vet. Sci.** 9: 107-111.

Morato, R., Izquierdo, D., Paramio, M. T., and Mogas, T. (2008). Cryotop versus ope-pulled straws (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: Effect of spindle and chromosome configuration and embryo development. **Cryobiology** 57: 137-141.

Moreira da Silva, F., and Metelo, R. (2005). Relation between physical properties of the zona pellucida and viability of bovine embryos after slow-freezing and vitrification. **Reprod. Dom. Anim.** 40: 205-209.

Mukaida, T., Nakamura, S., Tomiyama, T., Wada, S., Kasai, M., and Takahashi, K. (2001). Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of a cryoloop containerless technique. **Fertil. Steril.** 76: 618-620.

Mukaida, T., Nakamura, S., Tomiyama, T., Wada, S., Kasai, M., and Takahashi, K. (2001). Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts using a cryoloop container-less technique. **Fertil. Steril**. 76: 618-620.

Mullen, S. F., and Fahy, G. M. (2012). A chronologic review of mature oocyte vitrification research in cattle, pigs, and sheep. **Theriogenology**. 78: 1709-1719.

Murakami, M. K., Otoi, T., Karja, N. W. K., Wongsrikeao, P., Agung, B., and Suzuki, T. (2004). Blastocysts derived from in vitro-fertilized cat oocytes after vitrification and dilution with sucrose. **Cryobiology**. 48: 341-348.

Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. (1999). Deveopment 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.

Saha, S., and Suzuki, T. (1997). Vitrification of in vitro produced bovine embryos at different ages using one and three step addition of cryoprotective additives. **Reprod. Fertil. Dev.** 9: 741-746.

Saragusty, J., and Arav, A. (2011). Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. **Reproduction.** 141: 1-19.

Sathananthan, A. H., (1997). Ultrastructure of human egg. **Hum. Cell**. 10: 21-38.

Shaw, J. M., Oranratnachai, A., and Trouson, A. O. (2000). Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology.** 53: 59-72.

Somfai, T., Ozawa, M., Noguchi, J., Kaneko, H., Karja, N. W. K., Farhudin, M., Dinnyes, A., Nagai, T., and Kikuchi, K. (2007). Developmental competence of in vitro fertilized porcine oocytes after *in vitro* maturation and solid surface vitrification: Effect of cryopreservationon oocytes antioxydative system and cell cycle stage. **Cryobiology.** 55: 115-126.

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

Stachecki, J. J., Garrisi, J., Sabino, S., Caetano, J. P. J., Wiemer, K. E. and Cohen, J. (2008). A new safe, simple and successful vitrification method for bovine and human blastocysts. **Reprod. BioMed. Online.** 17: 360-367.

Vajta, G., and Kuwayama, M. (2006). Improving cryopreservation systems. **Theriogenology.** 65: 236-244.

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., Standaert, V., Bollen, N., van Roosendaal, E., Vandervorst, M., Schoysman, R., and Zech, N. (2003). Vitrification of human blastocysts with the Hemi-Straw carrier: application of assisted hatching after thawing. **Hum. Reprod.** 18: 1504-1511.

Wu J., Zhang, L. and Wang, X. (2001). *In vitro* maturation, fertilization and embryo development after ultrarapid freezing of immature human oocytes. **Reproduction.** 121: 389-393.

Yavin, S., Aroyo, A., Roth, Z., and Arav, A. (2009). Embryo cryopreservation in the presence of low concentration of vitrification solution with sealed pulled straws in liquid nitrogen slush. **Hum. Reprod.** 24: 797-804.

Yoon, T. K., Kim, T. J., Park, S. E. Hong, S. W., Ko, J. J., Chung, H. M.,and Cha, K. Y. (2003). Live births after vitrification of oocytes in a stimulated in vitro fertilization-embryo transfer program. **Fertil. Steril.** 79: 1323-1326.

Zhao, X. M., Du, W. H., Wang, D., Hao, H. S., Liu, Y., Qin, T., and Zhu, H. B. (2011). Recovcery of Mitochondrial function and endogenous antioxidant systems in vitrified bovine oocytes during extended in vitro culture. **Mol. Reprod. Dev.** 78: 942-950.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาย รังสรรค์ พาลพ่าย

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Rangsun Parnpai

2. วันเกิด 7 มีนาคม 2502

3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้

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 30000 โทร. 081-4706393

5. ประวัติการศึกษา

5.1. ปริญญาตรี สาขาวิชา ชีววิทยา ปีที่จบ 2523
สถาบัน มหาวิทยาลัยบูรพา ประเทศ ไทย

5.2. ปริญญาโท สาขาวิชา สัตววิทยา ปีที่จบ 2525
สถาบัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศ ไทย
Thesis title: Plasma progesterone and oestrone sulphate during early pregnancy in swamp buffalo.

5.3. ปริญญาเอก สาขาวิชา Animal Reproduction ปีที่จบ 2541
สถาบัน Kyoto University ประเทศ ญี่ปุ่น (ได้รับทุนรัฐบาลญี่ปุ่น)
Thesis title: Study on the establishment of bovine embryonic stem cells.

5.4. ฝึกอบรมสาขา Embryo transfer and *in vitro* fertilization in farm animals.
ด้วยทุน British Council สถาบัน Cambridge University, U.K. ระหว่าง ตุลาคม 2527 - กุมภาพันธ์ 2528.

5.5. สมาชิกสมาคมวิชาชีพ:

5.5.1. International Embryo Transfer Society (IETS) Since 1998

5.5.2. President International Buffalo Federation (2010-2013)

5.5.3. President Asian Buffalo Association (2010-2013)

6. ประวัติการทำงาน:

6.1 9 ธันวาคม 2525-31 ตุลาคม 2543 นักวิจัย โครงการวิจัยวิทยาศาสตร์ไทย-เนเธอร์แลนด์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ

6.2 1 พฤศจิกายน 2543–ปัจจุบัน อาจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา

7. สาขาวิชาที่มีความเชี่ยวชาญพิเศษ

7.1 การโคลนนิ่งตัวอ่อนโค กระบือ สุกร แมว โดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบ

7.2 การย้ายฝากตัวอ่อนโค กระบือ แพะ

7.3 การปฏิสนธิในหลอดแก้วโค กระบือ

7.4 Embryonic and somatic stem cells

7.5 Cryopreservation of gametes and embryos

8. ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ ย้อนหลัง 5 ปี

2016

Suttirojpattana, T., Somfai, T.*, Matoba, S., Nagai, T., **Parnpai, R.*** and Geshi, M. 2016. Pretreatment of bovine sperm with dithiobutylamine (DTBA) significantly improves embryo development after ICSI. ***J. Reprod. Dev.*** Accepted July 19, 2016. (IF=1.515; เป็น Correspondence)

Suttirojpattana, T., Somfai, T.*, Matoba, S., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Geshi, M. 2016. Effect of medium additives during liquid storage on developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. ***Anim. Sci. J.*** doi: 10.1111/asj.12623

Parnpai, R.*, Liang, Y., Ketudat-Cairns, M., Somfai, T. and Nagai, T. 2016. Vitrification of buffalo oocytes and embryos. ***Theriogenology.*** 86: 214-220. (IF=1.798; เป็น Correspondence)

Ye, D., Li, T., Heraud, P. and **Parnpai. R.*** 2016. Effect of chromatin-remodeling agents in hepatic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro and in vivo. ***Stem Cell Intl.*** 3038764. (IF=2.813; เป็น Correspondence)

Suttirojpattana, T., Somfai, T.*, Matoba, S., Nagai, T., **Parnpai, R.*** and Geshi, M. 2016. The effect of temperature during liquid storage of in vitro-matured bovine oocytes on subsequent embryo development. ***Theriogenology.*** 85: 509-518. (IF=1.798; เป็น Correspondence)

2015

Imsoonthornruksa, S., Pruksananonda, K., **Parnpai, R.**, Rungsiwiwut, R. and Ketudat-Cairns, M.* 2015. Expression and purification of recombinant human basic fibroblast growth factor fusion proteins and their uses in human stem cell culture. ***J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*** 25: 372-380. (IF=2.104)

Chasombat, J., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T.* 2015. Pretreatment of *in vitro* matured bovine oocytes with docetaxel before vitrification: Effects on cytoskeleton integrity and developmental ability after warming. ***Cryobiology***. 71: 216-223. (IF=1.587)

Khamlor, T., Pongpiachan, P., **Parnpai, R.**, Punyawai, K., Sangsritavong. and Chokesajjawatee, N.* 2015. Bovine embryo sex determination by multiplex loop-mediated isothermal amplification. ***Theriogenology.*** 83: 891-896. (IF=1.792)

Punyawai, K., Anakkul, N., Srirattana, K., Aikawa, Y., Sangsritavong, S., Nagai, T., Imai K. and **Parnpai R.*** 2015. Comparison of Cryotop and micro volume air cooling methods for cryopreservation of bovine matured oocytes and blastocysts. ***J. Reprod. Dev.*** 61 : 431-437. (IF=1.515; เป็น Correspondence)

Yoisungnern, T., Choi, Y.J., Woong, H.J., Kang, M.H., Das, J., Gurunathan, S., Kwon D.N., Cho, S.G., Park, C., Kyung Chang, W., Chang, B.S., **Parnpai R.** and Kim, J.H.* 2015. Internalization of silver nanoparticles into mouse spermatozoa results in poor fertilization and compromised embryo development. ***Sci. Rep.*** doi: 10.1038/srep11170. (IF=5.578)

Yoisungnern, T., Das, J., Choi, Y.J., **Parnpai, R.** and Kim, J.H.* 2015. Effect of hexavalent chromium-treated sperm on in vitro fertilization and embryo development. ***Toxicol. Ind. Health***. pii: 0748233715579805. (IF=1.859)

2014

Carter, R.L., Chen, Y., Kunkanjanawan, T., Xu, Y., Moran, S.P., Putkhao, K., Yang, J., Huang, A.H.C., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S.* 2014. Reversal of cellular phenotypes in neural cells derived from Huntington's disease monkey-induced pluripotent stem cells. ***Stem Cell Reports*** 3: 1-9. (IF=5.365)

Chasombat, J., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T.* 2014. Ovarian follicular dynamics and hormones throughout the estrous cycle in Thai native heifer. ***Anim. Sci. J.*** 85: 15-24. (IF=0.96)

Parnpai, R.*, Liang, Y.Y., Paul, A.K., Ngernsoungnern, A., Ngernsoungnern, P. and Ketudat-Cairns, M. 2014. Cryopreservation of buffalo oocytes. ***Thai J. Vet. Med*** 44 (Supplement 1): 119-123. (IF=0.123; เป็น Correspondence)

Paul, A.K., Liang, Y.Y., Nagai, T. and **Parnpai, R.*** 2014. Blastocysts hatchability following oocytes and blastocyst vitrification. ***Thai J. Vet. Med*** 44 (Supplement 1): 237-240. (IF=0.123; เป็น Correspondence)

Paul, A.K., Liang, Y.Y., Nagai, T. and **Parnpai, R.*** 2014. In vitro development potentiality of expanded bovine blastocysts subsequent Cryotop vitrification. ***Thai J. Vet. Med.*** 44: 513-521. (IF=0.123; เป็น Correspondence)

Punyawai, K., Sangsritavong, S., Liang, Y.Y., Sripunya, N. and **Parnpai, R.*** 2014. Effect of thawing solutions on survival of bovine blastocyst using in-straw vitrificationn method. ***Thai J. Vet. Med*** 44 (Supplement 1): 241-243. (IF=0.123; เป็น Correspondence)

Putkhao, K.*, Chan, A.W.S.*, Yuksel, A. and **Parnpai, R.*** 2013. Cryopreservation of transgenic Huntington's disease rhesus macaque sperm: A case report. ***Cloning and Transgenesis*** 2: 1000116.

Sripunya, N., Liang, Y., Panyawai, K., Srirattana, K., Ngernsoungnern, A., Ngernsoungnern, P., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.*** 2014. Cytochalasin B efficiency in the cryopreservation of immature bovine oocytes by Cryotop and solid surface vitrification methods. ***Cryobiology*** 69: 496-499. (IF=1.587; เป็น Correspondence)

Srirattana, K., Ketudat-Cairns, M., Nagai, T., Kaneda, M.* and **Parnpai, R.*** 2014. Effects of Trichostatin A on *in vitro* development and DNA methylation level of the satellite I region of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) cloned embryos. ***J. Reprod. Dev.*** 60: 336-341. (IF=1.515; เป็น Correspondence)

2013

Chasombat, J., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T.* 2013. Ovarian follicular dynamics, ovarian follicular growth, oocyte yield, *in vitro* embryo production and repeated oocyte pick up in Thai native heifers undergoing superstimulation. ***Asian-Australasian J. Anim. Sci.*** 26: 488-500. (IF=0.541)

Chasombat, J., Sakhong, D., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T*. 2012 Superstimulation of follicular growth in Thai native heifers by a single administration of follicle stimulating

hormone dissolved in polyvinylpyrrolidone. ***J. Reprod. Dev.*** 59: 214-218. (IF=1.515)

Kaewmungkun, K., Srirattana, K., Panyawai, K., Sripunya, N., Liang, Y., Sangsritavong, S. and **Parnpai, R.*** 2013. Influence of growth factors on survival and development of swamp buffalo early antral follicle cultured *in vitro*. ***Buffalo Bulletin*** 32: (Special Issue 2): 617-621. (IF=0.027; เป็น Correspondence)

Liang, Y.Y., Somfai, T., Nagai, T. and **Parnpai, R.*** 2013. Vitrification of buffalo oocytes: Current status and perspectives. ***Buffalo Bulletin*** 32 (Special Issue 1): 196-203. (IF=0.027; เป็น Correspondence)

Phongnimitr, T. Liang, Y., Srirattana, K., Panyawai, K., Sripunya, N., Treetampinich, C. and **Parnpai, R.*** 2013. Effects of L-carnitine supplemented in maturation medium on the maturation rate of swamp buffalo oocytes. ***Buffalo Bulletin*** 32: (Special Issue 2): 613-616. (IF=0.027; เป็น Correspondence)

Phongnimitr, T., Liang, Y.Y., Srirattana, K., Panyawai, K., Sripunya, N., Treetampinich, C.* and **Parnpai, R.*** 2013. Effect of L-carnitine on maturation, cryo-tolerance and embryo developmental competence of bovine oocytes. ***Anim. Sci. J.*** 84: 719-725. (IF=0.96; เป็น Correspondence)

Srirattana, K., Sripunya, N., Sangmalee, A., Imsoonthornruksa, S., Liang, Y.Y., Ketudat-Cairns M.K. and **Parnpai, R***. 2013. Developmental potential of vitrified goat oocytes following somatic cell nuclear transfer and parthenogenetic activation. ***Small Rum. Res.*** 112: 141-146. (IF=1.125; เป็น Correspondence)

2012

Imsoonthornruksa, S., Srirattana, K., Phewsoi, W., Tunwattana, W., Parnpai, R*. and Ketudat-Cairns, M*. 2012. Segregation of donor cell mitochondrial DNA in gaur-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos, fetuses and an offspring. ***Mitochondrion*** 12: 506-513. (IF=3.249; เป็น Correspondence)

Imsoonthornruksa, S., Sangmalee, A., Srirattana, K., **Parnpai, R.***, Ketudat-Cairns, M*. 2012. Development of intergeneric and intrageneric somatic cell nuclear transfer (SCNT) cat embryos and the determination of telomere length in cloned offspring. ***Cell. Reprogram.*** 14: 79-87. (IF=1.788; เป็น Correspondence)

Liang, Y.Y., Srirattana, K., Phermthai, T., Somfai, T., Nagai, T. and **Parnpai, R*.** 2012. Effects of vitrification cryoprotectant treatment and cooling method on the viability and development of buffalo oocytes after intracytoplasmic sperm injection. ***Cryobiology*** 65: 151-156. (IF=1.587; เป็น Correspondence)

Liang, Y., Rakwongrit, D., Phermthai, T., Somfai, T., Nagai, T., and **Parnpai, R.*** 2012. Cryopreservation of immature buffalo oocytes: Effects of cytochalasin B pretreatment on the efficiency of cryotop and solid surface vitrification methods. ***Anim. Sci. J.*** 83: 630-638. (IF=0.96; เป็น Correspondence)

Putkhao, K., Kocerha, J., Cho, I.K., Yang, J.J., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S*. 2012. Pathogenic cellular phenotypes are germline transmissible in a transgenic primate model of Huntington's Disease. ***Stem Cell Dev.*** 22: 1198-1205. (IF=3.727)

Srirattana, K., Imsoonthornruksa, S., Laowtammathron, C., Sangmalee, A., Tunwattana, W., Thongprapai, T., Chaimongkol, C., Ketudat-Cairns, M*. and **Parnpai, R*.** 2012. Full-term development of gaur-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos: effect of trichostatin a treatment. ***Cell Reprogram.*** 14: 248-257. (IF=1.788; เป็น Correspondence)

Takeda, K*., Srirattana, K., Matsukawa, K., Akagi, S., Kaneda, M., Tasai, M., Nirasawa, K., Pinkert, C.A., **Parnpai, R.** and Nagai, T. 2012. Influence of intergeneric/interspecies mitochondrial injection; parthenogenetic development of bovine oocytes after injection of mitochondria derived from somatic cells. ***J. Reprod. Dev.*** 58: 323-329. (IF=1.515)

Ye, D.N., Tanthanuch, W., Thumanu, K., Sangmalee, A., **Parnpai, R*.** and Heraud, P*. 2012. Discrimination of functional hepatocytes derived from mesenchymal stem cells using FTIR microspectroscopy. ***Analyst*** 135: 4774-4784. (IF=4.107; เป็น Correspondence)

2011

Imsoonthornruksa, S., Lorthongpanich, C., Sangmalee, A., Srirattana, K., Laowtammathron, C., Tunwattana, W., Somsa, W., Ketudat-Cairns, M., Nagai, T. and **Parnpai, R*.** 2011. The effects of manipulation medium and recipient cytoplast on *in vitro* development of intraspecies and intergeneric felid embryos. ***J. Reprod. Dev.*** 57: 385-392. (IF=1.515; เป็น Correspondence)

Imsoonthornruksa, S., Noisa, P., **Parnpai, R.** and Ketudat-Cairns, M*. 2011. A simple method for production and purification of soluble and biological activity recombinant humen leukemia inhibitory factor (hLIF) fusion protein in *Escherichia coli*. ***J. Biotechnol.*** 151: 295-302. (IF=2.871)

Kunkanjanawan, T., Noisa, P*. and **Parnpai, R*.** 2011. Modeling neurological disorders by human induced pluripotent stem cells. ***J. Biomed. Biotechnol.*** 350131. (IF=3.169 ; เป็น Correspondence)

Liang, Y., Phermthai, T., Nagai, T., Somfai, T. and **Parnpai, R***. 2011. *In vitro* development of vitrified buffalo oocytes following parthenogenetic activation and intracytoplasmic sperm injection. ***Theriogenology*** 75: 1652-1660. (IF=1.798; เป็น Correspondence)

Liang Y.Y., Ye, D.N., Laowtammathron, C., Phermthai, T., Nagai, T., and **Parnpai, R*.** 2011. Effects of chemical activation treatment on development of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes matured in vitro and fertilized by intracytoplasmic sperm injection. ***Reprod. Domestic Anim.*** 46: e67-e73. (IF=1.515; เป็น Correspondence)

Lorthongpanich, C*, Chuti Laowtammathron, C. and **Parnpai, R*.** 2011. From microsurgery to single blastomere culture: conventional and novel methods for ES cell establishment. ***Thai J. Vet. Med.*** 41: 11-22. (IF=0.123; เป็น Correspondence)

Parnpai, R., Srirattana, K., Imsoonthornruksa, S. and Ketudat-Cairns, M. 2011. Somatic cell cloning for livestock and endangered species. ***Thai J. Vet. Med*** Suppl. 41: 77-85. (IF=0.123; เป็น Correspondence)

Rattanasuk, S., **Parnpai, R.** and Ketudat-Cairns, M*. 2011. Multiplex polymerase chain reaction used for bovine embryo sex determination. ***J. Reprod. Dev.*** 57: 539-542. (IF=1.515)

Srirattana, K., Matsukawa,K., Akagi, S., Tasai, M., Tagami, T., Nirasawa, K., Nagai, T., Kanai, Y., **Parnpai, R.** and Takeda, K*. 2011. Constant transmission of mitochondrial DNA in intergeneric cloned embryos reconstructed from swamp buffalo fibroblasts and bovine ooplasm. ***Anim. Sci. J.*** 82: 236-243. (IF=0.96)

Thumanu, K., Tanthanuch, W., Ye, D., Sangmalee, A., Lorthongpanich, C., **Parnpai, R*.** and Heraud, P*. 2011. Spectroscopic signature of mouse embryonic stem cells derived hepatocytes using Synchrotron FTIR microspectroscopy. ***J. Biomed. Optics*** 16: 057005-1. (IF = 2.859; เป็น Correspondence)

9. การเขียนตำรา-หนังสือ

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

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

รังสรรค์ พาลพ่าย สรรเพชญ โสภณ มณีวรรณ กมลพัฒนะ กำธร มีบำรุง กิติยา ศรีศักดิ์วัฒนะ ประชุม อินทรโชติ ธวัชชัย สุวรรณกำจาย ประภากร วัฒโนดร พฤฒิ เกิดชูชื่น และ สมสวัสดิ์ ตันตระกูล. 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.

รังสรรค์ พาลพ่าย 2553. เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน. เอกสารคำสอนวิชา 314 533 Stem Cell Technology. 238 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.

10. ผลงานวิจัยที่ประสบความสำเร็จ

10.1. ประสบผลสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนโคนม ได้ลูกแฝดเพศเมียเกิดมาเมื่อวันที่ 8 กันยายน 2529 นับเป็นรายแรกของประเทศไทย (ขณะทำงาน ณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ)

10.2. ประสบผลสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนแพะ ได้ลูกแพะเกิดมาเมื่อปี 2532 นับเป็นรายแรกของประเทศไทย (ขณะทำงาน ณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ)

10.3. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งโค โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งเกิดมาเมื่อวันที่ 6 มีนาคม 2543 นับเป็นรายแรกของเอเชียอาคเนย์ และรายที่ 6 ของโลก (ขณะทำงาน ณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ)

10.4. ประสบความสำเร็จการโคลนนิ่งตัวอ่อนกระบือปลักโดยใช้เซลล์ร่างกายลูกอ่อนโคและเซลล์แกรนูโลซาเป็นเซลล์ต้นแบบ นับเป็นรายแรกของโลกที่ทำและตีพิมพ์ผลงานใน Buffalo Journal 1999, 15: 371-384. (ขณะทำงาน ณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ)

10.5. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งโคบราห์มันเพศผู้ชื่อ “ตูมตาม” โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งจากเซลล์ต้นแบบตัวเดียวกัน 7 ตัวเกิดมา ลูกโคทุกตัวผ่านการตรวจสอบดีเอ็นเอแล้วพบว่ามีดีเอ็นเอเหมือน“ตูมตาม”เจ้าของเซลล์ต้นแบบทุกประการ และมีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงดีมาก

10.6. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งแมวพันธุ์โคราช โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ ต้นแบบ ได้ลูกแมวโคลนนิ่งเกิดมา 2 ตัว รายแรกของประเทศไทย เมื่อวันที่ 25 ธันวาคม 2549

10.7. ประสบความสำเร็จในการโคลนนิ่งแมวบ้าน โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกแมวคลอดออกมามีชีวิต 2 ตัว ในวันที่ 25 ธันวาคม 2549 แต่ลูกแมวเสียชีวิต 2 และ 5 วัน หลังคลอด ขณะนี้ยังคงทำโคลนนิ่งแมวบ้าน และแมวป่า อย่างต่อเนื่อง

10.8. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งโคพันธุ์ขาวลำพูนเพศผู้ชื่อ “อินทนนท์” โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งเกิดมารายแรกของประเทศไทย เมื่อวันที่ 21 มี.ค. 2550 ได้รับการตั้งชื่อว่า “ขาวมงคล”

10.9. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งแพะพันธุ์บอร์เพศผู้ โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกแพะโคลนนิ่งเกิดมารายแรกของประเทศไทย เมื่อวันที่ 27 พ.ค. 2550 1 ตัว และ วันที่ 4 ก.ค. 2550 1 ตัว

10.10. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งกระทิงเพศผู้ โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ ต้นแบบ ได้ลูกกระทิงโคลนนิ่งเกิดมารายที่ 2 ของโลก เมื่อวันที่ 4 มี.ค. 2551 จำนวน 1 ตัว แต่ลูกกระทิงเสียชีวิต 12 ชั่วโมง หลังคลอด

11. รางวัลที่ได้รับ

11.1. จากผลงานวิจัยการย้ายฝากตัวอ่อนโคนมจนประสบผลสำเร็จ ได้ลูกแฝดโคนมเกิดมาครั้งแรกของประเทศไทยเมื่อวันที่ 8 กันยายน 2529 ทำให้งานวิจัยนี้ถูกยกย่องให้เป็น 1 ใน 10 ข่าวเด่นของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

11.3. รางวัลผลงานวิจัยดี สาขาวิทยาศาสตร์ ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง “การทดสอบค่ากระแสไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการทำโคลนนิ่งตัวอ่อนแมวโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ” ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 พ.ศ. 2546

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

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

11.6. รางวัลบุคลากรสายวิชาการที่มีผลงานดีเด่นด้านการวิจัย ประจำปี 2548 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

11.7. รางวัลแทนคุณแผ่นดิน สาขาวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2550 จากเครือเดอะเนชั่น

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

11.9. ศิษย์เก่าดีเด่น คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พ.ศ. 2555

11.10 รางวัลบุคลากรสายวิชาการที่มีผลงานดีเด่นด้านการบริการวิชาการ ประจำปี 2558 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

12. การจดสิทธิบัตร

12.1. รังสรรค์ พาลพ่าย วิศิษฐิพร สุขสมบัติ อาวุธ อินทรชื่น อุดมวิทย์ มณีวรรณ คมสัน ภาษยเดช แสงเพ็ชร งอนชัยภูมิ ป้องภัยรี มีสมบัติ สมิง เติมพรมราช “อุปกรณ์ควบคุมการเคลื่อนที่ก้านสูบของไมโครไซริงท์” ยื่นคำขอเมื่อวันที่ 11 มิถุนายน 2547 ได้รับสิทธิบัตรเมื่อเดือน เมษายน 2550

12.2. รังสรรค์ พาลพ่าย วิศิษฐิพร สุขสมบัติ อาวุธ อินทรชื่น อุดมวิทย์ มณีวรรณ คมสัน ภาษยเดช แสงเพ็ชร งอนชัยภูมิ ป้องภัยรี มีสมบัติ สมิง เติมพรมราช ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ วิชัย ศรีสุรักษ์ “เครื่องเชื่อมเซลล์ด้วยไฟฟ้ากระแสตรง” ยื่นคำขอเมื่อวันที่ 11 มิถุนายน 2547

12.3. สุรชัย รัตนสุข รังสรรค์ พาลพ่าย มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ “ผลิตภัณฑ์โมโนโคลนัลแอนติบอดีต่ออสุจิเพศผู้ของโค และกระบวนการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่ออสุจิเพศผู้ของโคดังกล่าว” ยื่นคำขอเมื่อวันที่ 27 กรกฎาคม 2555

12.4. สุรชัย รัตนสุข รังสรรค์ พาลพ่าย มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ “กระบวนการแยกเพศอสุจิโคด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่ออสุจิเพศผู้ของโค และการใช้อสุจิที่ผ่านกระบวนการดังกล่าวในการปฏิสนธิในหลอดทดลอง” ยื่นคำขอเมื่อวันที่ 27 กรกฎาคม 2555

12.5. รังสรรค์ พาลพ่าย ศิวัช สังศรีทวงษ์ กาญจนา ปัญญาไว “ภาชนะบรรจุตัวอ่อนแช่แข็งด้วยวิธีลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วที่มีการเจือจางสารแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและการใช้ภาชนะบรรจุดังกล่าว” เลขทะเบียน 9367 อนุมัติวันที่ 28 พ.ย. 2557

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Animal Science Journal
Animal Science Journal (2018) 89, 307–315 doi:10.1111/asj.12892

ORIGINAL ARTICLE

Vitrification of bovine matured oocytes and blastocysts in a paper container

Ashit Kumar PAUL,[1,2] Yuanyuan LIANG,[1] Kanokwan SRIRATTANA,[1] Takashi NAGAI[3,4] and Rangsun PARNPAI[1]

[1]*Embryo Technology and Stem Cell Research Center, School of Biotechnology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand;* [2]*Department of Medicine and Surgery, Faculty of Animal Science and Veterinary Medicine, Patuakhali Science and Technology University, Barisal, Bangladesh;* [3]*International Cooperation Section, National Agriculture and Food Research Organization (NARO), Tsukuba, Japan; and* [4]*Seoul National University 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul, Korea*

ABSTRACT

In the present study, we aimed to determine the applicability of a paper container for the vitrification of *in vitro* matured (IVM) bovine oocytes. In experiment 1, IVM oocytes were exposed to vitrification solution (20% dimethylsulfoxide (DMSO), 20% ethylene glycol (EG), and 5 mol/L sucrose), using a two-step method, for 30 s; loaded onto either a paper container or Cryotop; and stored in liquid nitrogen. No significant difference ($P < 0.05$) in the survival and blastocyst formation rates after *in vitro* vitrification was observed between the paper container and Cryotop. In experiment 2, IVM oocytes were exposed to either a two- or three-step vitrification solution. The three-step vitrification solution was not significantly different from the two-step solution in terms of oocyte survival, cleavage and blastocyst rates. In experiment 3, *in vitro* produced blastocysts were graded according to the manual of the International Embryo Transfer Society (grades 1 and 2) and vitrified using the two- and three-step methods. For grade 2 blastocysts, the three-step method showed significantly higher ($P < 0.05$) survival and hatched blastocyst rates than the two-step method, whereas for grade 1 blastocysts, no significant difference was observed. In conclusion, the paper device and three-step technique are suitable for oocytes and embryo vitrification.

Key words: *blastocysts, oocytes, paper device, vitrification.*

INTRODUCTION

In the field of reproduction, vitrification is one of the methods that replaced conventional slow-freezing cryopreservation. It is frequently described as being inexpensive, fast and simple (Stachecki *et al.* 2008). However, when choosing to adapt a particular technique, it is more important to consider its improved performance resulting in higher survival rates and an average increase in calving rates, as well as enhanced and ensured safety for the animal. Nonetheless, rapid freezing or vitrification has been the focus of research in recent years based on a growing number of reports in the literature (Mandawala *et al.* 2016); in many instances, it is the preferred method. The idea of vitrification, or achieving a glass-like state, was first conceived in 1860, as described by Luyet (1937). It was not until approximately 50 years later that Rall and Fahy (1985) mentioned the idea again and designated 'vitrification' as a potential alternative to slow-freezing/cooling.

There are several cryodevices used for vitrification, that is electron microscope (EM) grid (Steponkus *et al.* 1990; Martino *et al.* 1996; Cho *et al.* 2002), Cryotop (Hamawaki *et al.* 1999; Kuwayama & Kato 2000), Cryoloop (Lane *et al.* 1999), nylon mesh (Matsumoto *et al.* 2001), Cryoleaf (Chian *et al.* 2005), plastic blade (Sugiyama *et al.* 2010), and Vitri-Inga (Almodin *et al.* 2010). In the tubing system—which includes the plastic straw (Rall & Fahy 1985)—the open pulled straw (OPS; Vajta *et al.* 1997, 1998), closed pulled straw (CPS; Chen *et al.* 2001), Cryo-Tip (Kuwayama *et al.* 2005a,b), Rapid-i (Larman & Gardner 2010), and hollow fiber (Matsunari *et al.* 2012) are effectively used for the vitrification of oocytes and embryos from different

Correspondence: Rangsun Parnpai, Embryo Technology and Stem Cell Research Center, School of Biotechnology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand. (Email: rangsun@g.sut.ac.th)
Received 11 January 2017; accepted for publication 10 July 2017.

© 2017 Japanese Society of Animal Science

animals. In 2012, Kim *et al.* reported a new, easy to perform, simple, inexpensive, and successful method for the vitrification of bovine blastocysts, using a paper container.

Since the vitrification of oocytes and embryos became prevalent, several new ideas have been developed, including: (i) exposure to the final solution with the highest concentration of cryoprotectants should be reduced to 60 s or less because high concentrations of cryoprotectants are toxic (Shaw *et al.* 1992; Hunter *et al.* 1995; Hong *et al.* 1999; Chung *et al.* 2000; Wu *et al.* 2001; Yoon *et al.* 2003); and (ii) the faster the cooling rate, the better the survival rate (Stachecki *et al.* 2008). The two key constraints of vitrification are: (i) the toxic effect of cryoprotective agents (CPAs), which damages the micro-organelles of oocytes and cells of embryos; and (ii) the duration of CPA exposure, which could result in ice crystal formation if not properly timed (Katkov 2007). This study was designed to investigate the potential of using a paper container for the vitrification of bovine oocytes in comparison to using a Cryotop container.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and culture media

All reagents were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA) unless otherwise stated. TCM199 medium, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 0.02 AU/mL follicle-stimulating hormone (FSH; Antrin, Kyoritsu Seiyaku, Tokyo, Japan), 50 IU/mL, human chorionic gonadotropin (hCG; Chorulon; Intervet, Boxmeer, Netherlands) and 1 μg/mL estradiol-17β, was used for *in vitro* maturation (IVM). Modified synthetic oviduct fluid (mSOF), supplemented with amino acids and 0.3% fatty acid-free bovine serum albumin (BSA), was used for embryo culture (Gardner *et al.* 1994). Tyrode's albumin lactate pyruvate (TALP) medium (Bavister & Yanagimachi 1977), supplemented with 1 mmol/L caffeine, 100 μg/mL heparin, 20 mmol/L penicillamine, 10 mmol/L hypotaurine, and 20 mmol/L epinephrine, was used for sperm preparation.

Preparation of the paper cryodevice

The paper device was cut from translucent tracing paper (Staedtler, Bleiweißsteftmacher, Germany) (Fig. 1); its dimensions allowed for easy loading into a cryovial to be stored in liquid nitrogen (LN_2). Before vitrification, the paper device was exposed to UV light for 20 min for sterilization. During loading, the oocytes or blastocysts were placed onto its tip, and the excessive CPAs were removed before plunging it into LN_2.

Collection and IVM of oocytes

Bovine ovaries were obtained from slaughterhouses and kept in 0.9% NaCl during transportation to the laboratory within 4 h at room temperature (24–25°C). Cumulus-oocyte complexes (COCs) were collected from follicles measuring 2–8 mm in diameter, using an 18 gauge needle connected to a 10 mL syringe. Groups of 20 COCs were cultured in 100 μL droplets of IVM medium on 60-mm culture dishes (SPL Life Sciences, Yeoju-si, Gyeonggi-do, Korea) covered with mineral oil in a humidified atmosphere of 5% CO_2 in air at 38.5°C for 22–23 h. After IVM, the COCs were partially denuded and surrounded by 2–3 layers of cumulus cells.

Vitrification-warming of IVM oocytes or blastocysts

Two-step method

Vitrification and warming (V-W) of IVM oocytes was carried out as described before (Liang *et al.* 2011) with partial modifications. Groups of four to five oocytes or one to three IVP blastocysts were washed in TCM199-Hepes + 20% FBS as a base medium (BM) before being placed in BM containing 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) and 10% ethylene glycol (EG) as an equilibration solution (ES) for 1 min. They were then exposed to BM containing 20% DMSO, 20% EG, and 0.5 mol/L sucrose as a vitrification solution (VS) for 30 s at room temperature (24–25°C). The oocytes/blastocysts together with <1 μL VS were placed on the top of the Cryotop or paper device before being plunged into LN_2. After vitrification, the Cryotop or paper devices were warmed by direct immersion into 2 mL of BM with 0.5 mol/L sucrose for 5 min on a warming plate at 35–37°C, transferred to BM for 5 min, and then washed five times in each.

Three-step method

Groups of four to five oocytes (one to three IVP blastocysts) were washed in BM before being placed in BM containing 5% DMSO and 5% EG as ES for 30 s. They were then transferred to BM containing 12% DMSO, 12% EG, and 0.25 mol/L sucrose for

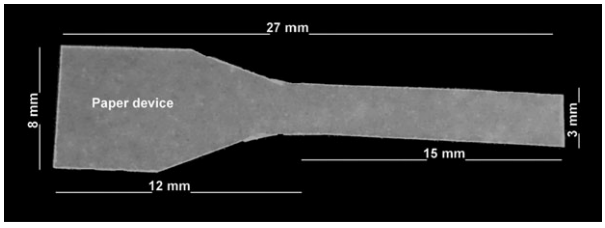


Figure 1 Size and shape of the paper device.

© 2017 Japanese Society of Animal Science

30 s. Subsequently, they were transferred to the final VS (BM containing 20% DMSO, 20% EG, and 0.5 mol/L sucrose) for 30 s at room temperature on a warm plate 37–38°C. The oocytes/blastocysts together with <1 μL VS were placed on a Cryotop or paper device and then plunged into LN_2. The Cryotop or paper devices containing the oocytes/blastocysts were warmed by direct immersion into 2 mL of BM with 0.5 mol/L sucrose for 2 min on a warming plate at 35–37°C. They were then transferred to BM with 0.25 mol/L sucrose for 2 min, and then BM with 0.125 mol/L sucrose for another 2 min, before being finally washed with BM.

Evaluation of oocyte viability

The viability of oocytes was evaluated by fluorescein diacetate (FDA) staining according to the method previously described by Mohr and Trounson (1980). Briefly, oocytes were treated with 2.5 μg/mL FDA in PBS supplemented with 5 μg/mL BSA at 38.5°C for 2 min in a dark room. Then they were washed three times in PBS supplemented with 5 μg/mL BSA and evaluated under a fluorescent microscope (IX71; Olympus, Tokyo, Japan) with UV irradiation using a U-MWIB# filter with an excitation wavelength of 460–495 nm and emission wavelength of 510 nm. Oocytes expressing a bright green fluorescence were regarded as viable and were subsequently used for experiments.

In vitro fertilization and culture

One straw of frozen semen (0.25 mL straw, 25×10^6 sperms/straw, Holstein Friesian breed) was thawed in a water bath at 39°C for 30 s, and then 100 μL of thawed semen was placed at the bottom of a snap tube containing 2 mL of TALP for 30 min to obtain swimming-up spermatozoa. Then, the supernatant including the spermatozoa was collected in a 15 mL conical tube and centrifuged at $500 \times g$ for 5 min. The resultant supernatant was discarded and 3 mL TALP was added for washing. The sample was centrifuged again, and sperm concentration was calculated using a hemocytometer, and then adjusted to 2×10^6/mL (Seneda *et al.* 2001). Finally, 10 oocytes were placed into each 100 μL drop of sperm suspension and co-incubated in a humidified atmosphere of 5% CO_2 in air at 38.5°C for 13–14 h. The presumptive zygotes were further cultured in mSOFaa medium (20 zygotes/100 μL) under a humidified atmosphere of 5% CO_2, 5% O_2 and 90% N_2 at 38.5°C for 48 h. On day 2 (*in vitro* fertilization, IVF was considered as day 0) the cleavage rates were recorded. Thereafter, embryos at the eight-cell stage were selected and co-cultured with bovine oviduct epithelial cells in mSOFaa medium under a humidified atmosphere of 5% CO_2 in air at 38.5°C, as reported previously (Parnpai *et al.* 1999), for 6 days. Half of the medium was replaced with fresh medium during the embryo development observation. The development of IVF oocytes to the blastocyst stage was recorded on days 7 and 8.

Evaluation of blastocysts by differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells

Differential staining of inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE) cells of pooled blastocysts was performed by the method previously described by Sripunya *et al.* (2010). 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 40–60 s to make the membrane permeable 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 using cover slips, and examined under UV light with an excitation wavelength of 330–385 nm under a fluorescent microscope (IX71; Olympus, Tokyo, Japan). The nuclei of TE cells appeared pink or red when they were labeled by both PI and Hoechst, whereas the nuclei of ICM cells appeared blue when they were labeled only by Hoechst. A digital image of each embryo was taken, and the cell numbers of both cell types were counted using the National Institutes of Health Image J (v. 1.40) software (Abramoff *et al.* 2004). The numbers of ICM and TE cells were counted separately in embryos that had clearly distinguishable populations of red and blue nuclei.

Grading of blastocysts and evaluation of their survivability after V-W

The IVP blastocysts were graded according to the manual of the International Embryo Transfer Society (IETS); their development and the quality of ICM and TE were evaluated. First, the blastocysts were categorized as blastocysts (the blastocoel volume is more than 50% of the total volume) or expanded blastocysts (the blastocoel occupies the entire volume inside the zona pellucida (ZP) and has started expansion, leading to thinning of the ZP). The blastocysts and expanded blastocysts were then divided again into grade 1 (G1: ICM contains many small compacted cells and the TE appears clearly made of many small cells tightly attached and forming a single layer of epithelium) and grade 2 (G2: the cells in the ICM are still separated and poorly compacted

© 2017 Japanese Society of Animal Science

and the TE is made of few identifiable cells). The re-expansion or development to a more advanced stage of vitrified blastocysts with a clearly visible ICM after 24 h of warming was an indication of survived blastocysts.

Experimental design

Experiment 1: Effect of container type (Cryotop vs. paper)

IVM oocytes were divided into three groups: (i) oocytes without vitrification (Control group); (ii) oocytes vitrified using Cryotop (Cryotop group); and (iii) oocytes vitrified using paper (Paper group). After warming, the survival rates were evaluated by FDA staining. Surviving oocytes were fertilized and cultured *in vitro* for 8 days, and embryo development was recorded and compared. The quality of the obtained blastocysts was evaluated by differential staining of ICM and TE cells. Five replications were performed for this experiment.

Experiment 2: Toxicity test of the two- and three-step methods

IVM oocytes were divided into three groups: (i) oocytes without exposure to any V-W solutions (Control group); (ii) oocytes exposed to the two-step V-W solutions (two-step group); and (iii) oocytes exposed to the three-step V-W solutions (three-step group). Oocyte viability was evaluated by FDA staining. Surviving oocytes were cultured in IVM medium for 2 h, followed by IVF and *in vitro* culture (IVC) for 8 days, and embryo development was recorded and compared. The quality of the obtained blastocysts was evaluated by differential staining of ICM and TE cells. Four replications were performed for this experiment.

Experiment 3: Vitrification of oocytes by the two- and three-step methods using the paper device

IVM oocytes were divided into three groups: (i) oocytes without vitrification (Control group); (ii) oocytes vitrified using the two-step method (two-step group); and (iii) oocytes vitrified using the three-step method (3-step group) using paper devices. Survival rates were evaluated by FDA staining. After culture in IVM medium for 2 h, surviving oocytes were subjected to IVF. The development of IVF embryos derived from the vitrified groups was compared with the development of those derived from the Control group. The quality of the obtained blastocysts was evaluated by differential staining of ICM and TE cells. Five replications were performed for this experiment.

Experiment 4: Vitrification of blastocysts by the two- and three-step methods using the paper device

IVP blastocysts obtained on day 8 were graded and divided into three groups: (i) blastocysts without vitrification (Control group); (ii) blastocysts vitrified using the two-step method (two-step group); and (iii) blastocysts vitrified using the three-step method (three-step group). Survival rates and hatchabilities were assessed and compared. Seven replications were performed for this experiment.

Statistical analysis

The data on oocyte survivability and embryo development after the different treatments were expressed as percentages (%) and analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA). The correlation regressions (R^2 value) between oocyte survival rate and cleavage rate were determined by curve estimation, using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS®) software (version 16.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Differences were considered significant at a level of $P < 0.01$ and $P < 0.05$.

RESULTS

Experiment 1

When IVM oocytes were vitrified using the two-step method, similar ($P > 0.05$) survival rates were observed among the Cryotop (89.2%), Paper (90.1%), and Control (99.1%) groups (Table 1). However, after IVF, the oocyte cleavage rate in the Cryotop group (48%) was similar ($P > 0.05$) to that in the Paper group (54%) but both were significantly lower ($P < 0.05$) than that in the Control group (74.3%). Additionally, the blastocyst formation rates in the Cryotop group were significantly lower than those in the Control group, but were similar to those in the Paper group. Interestingly, there was no significant difference ($P > 0.05$) in the TE and ICM number of blastocysts among the three groups.

Experiment 2

No significant difference was found among the three groups in terms of oocyte survival rates (Table 2). However, after IVF, the rates of oocytes developing to cleavage and eight-cell stages in the three-step group (65.6 and 38.7%, respectively) were significantly higher than those in the two2-step group (48.9 and 25.0%, respectively). The blastocyst formation rates of the two- and three-step groups on day 8 were not significantly different, but they were significantly lower than those of the Control group ($P < 0.05$). Nevertheless, the blastocyst qualities

© 2017 Japanese Society of Animal Science

Table 1 Comparison of the efficiency of Cryotop and paper devices for oocyte vitrification

Groups	No. oocytes IVM	No. (%) oocytes survived	No. (%) ZP broken	No. IVF	No. (%) CL	No. (%) oocytes develop to						Differential staining of BL			
						8-C	16-C	Mo	No. (%) BL at day			No. BL evaluated	Number of cells		
									D6	D7	D8		TE	ICM	Total
Control	110	109 (99.1)	0 (0.0)[a]	109	81 (74.3)[a]	50 (45.9)[a]	40 (36.7)[a]	34 (31.2)[a]	8 (7.3)[a]	23 (21.2)[a]	29 (26.6)[a]	14	68.7	26.1	94.8
Cryotop	112	100 (89.2)	2 (1.8)[b]	100	48 (48.0)[b]	23 (23.0)[b]	22 (22.0)[b]	18 (18.0)[b]	4 (4.0)[b]	9 (9.0)[b]	9 (9.0)[b]	13	46.6	21.7	68.4
Paper	111	100 (90.1)	1 (0.9)[b]	100	54 (54.0)[b]	22 (22.0)[b]	21 (21.0)[b]	17 (17.0)[b]	4 (4.0)[b]	8 (8.0)[b]	9 (9.0)[b]	14	50.6	22.8	73.4

[a,b]Within a column letters represent significant differences ($P < 0.05$). Five replications were performed. ZP, zona pellucida; CL, cleavage; 8-C, eight cells; 16-C, 16 cells; Mo, morula; D, day; BL, blastocyst; TE, trophectoderm; ICM, inner cell mass.

Table 2 Toxicity test of two-step and three-step vitrification solution

Group	No. oocytes IVM	No. (%) oocytes survived	No. oocytes IVF	No. (%) CL	No. (%) oocytes developed to						Differential staining of BL			
					8-C	16-C	Mo	No. (%) BL at day			No. BL evaluated	Number of cells		
								D6	D7	D8		TE	ICM	Total
Control	89	89 (100.0)	89	63 (70.8)[a]	39 (43.8)[a]	36 (40.4)[a]	32 (35.9)[a]	12 (13.5)[a]	17 (19.1)[a]	25 (28.1)[a]	14	76	26	102
Two-step	93	88 (94.6)	88	43 (48.9)[b]	22 (25.0)[b]	21 (23.8)[b]	18 (20.5)[b]	3 (3.4)[b]	6 (6.8)[b]	8 (9.0)[b]	12	49.9	23.3	73.2
Three-step	95	93 (97.8)	93	61 (65.6)[a]	36 (38.7)[a]	30 (32.3)[ab]	27 (29.0)[ab]	8 (8.6)[ab]	12 (12.9)[a]	13 (13.9)[b]	14	65.9	25.8	91.7

[a,b]Within a column letters represent significant differences ($P < 0.05$). Four replications were performed. CL, cleavage; 8-C, eight cells; 16-C, 16 cells; Mo, morula; D, day; BL, blastocyst; TE, trophectoderm; ICM, inner cell mass.

© 2017 Japanese Society of Animal Science

(ICM, TE and total cell numbers) were similar in all three groups ($P > 0.05$).

Experiment 3

The oocytes survival rates were not significantly different ($P > 0.05$) among all the groups. The ZP broken rate in the two-step group (1.7%) was significantly higher ($P < 0.05$) than that in the Control (0.0%) and three-step (0.7%) groups (Table 3). The cleavage rate in the two-step group (42.3%) was significantly lower than that in the Control group (70.2%). The blastocyst formation rate on day 6 also showed similar results in the two-step and control groups (3.8% vs. 10.8%, respectively). The blastocyst formation rates on days 7 and 8 in the two-step and three-step groups (6.7 and 8.6%, respectively) were significantly lower than those in the Control group (17.5 and 20.3%, respectively). Interestingly, the cell numbers of the blastocysts were not significantly different among all the groups.

Experiment 4

The survival rate of G1 blastocysts after V-W and their subsequent hatching rate were not significantly different among all the groups (Table 4). However, in case of G2 blastocysts, the survival rate after V-W and the subsequent hatching rate in the three-step group (75.0% and 41.7%, respectively) were significantly higher ($P < 0.05$) than those in the two-step group (36.0% and 12.0%, respectively), whereas they did not differ significantly from those in the Control group (100% and 60.9%, respectively).

DISCUSSION

The cryopreservation of oocytes and embryos by vitrification offers a better and more feasible approach to their storage than slow freezing/cooling techniques. The refinement of previous methods involves the use of different containers or devices and a rapid cooling rate that coincide with a marked increase in the survival rate of oocytes and blastocysts. Here, we applied the newly developed method of using a paper container for the vitrification of bovine IVM oocytes and IVP blastocysts, which was first described by Kim *et al.* (2012).

The paper device was cheaper than Cryotop, and the survival rate of oocytes as well as their subsequent development after IVF was not significantly different between the Paper and Cryotop groups (Experiment 1). Because the paper device absorbs some of the vitrification solution, it may minimize the volume of vitrification solution surrounding the oocytes or blastocysts and, hence, increases the cooling and warming rates. Our results are similar to

Table 3 Comparison of two-step and three-step method for oocyte vitrification by using paper device and assessments of embryo quality

Group	No. oocytes IVM	No. (%) survived	No. (%) ZP broken	No. oocytes IVF	No. (%) CL	No. (%) oocytes developed to						Differential staining of BL			
						8-C	16-C	Mo	No. (%) BL at day			No. BL evaluated	Number of cells		
									D6	D7	D8		TE	ICM	Total
Control	114	114 (100)	0 (0.0)	114	80 (70.2)^{a}	47 (41.2)^{a}	40 (35.1)^{a}	36 (31.5)^{a}	12 (10.8)^{a}	20 (17.5)^{a}	30 (26.3)^{a}	12	72.3	23.9	96.2
Two-step	114	104 (91.4)	2 (1.7)	104	44 (42.3)^{b}	18 (17.3)^{b}	16 (15.3)^{b}	13 (12.5)^{b}	4 (3.8)^{b}	7 (6.7)^{b}	9 (8.6)^{b}	11	46.3	20.8	67.1
Three-step	118	110 (93.2)	1 (0.7)	110	64 (58.2)^{ab}	42 (33.3)^{ab}	32 (29.1)^{ab}	26 (23.6)^{b}	8 (7.2)^{ab}	11 (10.0)^{b}	15 (13.6)^{b}	12	52.3	22.4	74.7

^{a,b}Within a column letters represent significant differences ($P < 0.05$). Five replications were performed. ZP, zona pellucida; CL, cleavage; 8-C, eight cells; 16-C, 16 cells; Mo, morula; D, day; BL, blastocyst; TE, trophectoderm; ICM, inner cell mass.

© 2017 Japanese Society of Animal Science

Table 4 Comparison of two-step and three-step method for blastocysts vitrification by using paper device

Groups	Grade	No. BL	No. (%) survival at 24 h	No. (%) hatched at 48 h
Control	G1	29	29 (100.0)[a]	25 (86.2)[a]
	G2	23	23 (100.0)[a]	14 (60.9)[a]
2-step	G1	30	23 (76.6)[a]	18 (60.0)[a]
	G2	25	9 (36.0)[b]	3 (12.0)[b]
3-step	G1	30	26 (86.7)[a]	22 (73.3)[a]
	G2	24	17 (75.0)[a]	10 (41.7)[a]

[a,b]Within a column letters represent significant differences ($P < 0.05$). Seven replications were performed. G1, grade 1; G2, grade 2; BL, blastocyst.

those in Kim's report (2012), where the paper device (5 × 5 mm) was considered a successful container for the cryopreservation of bovine blastocyst in terms of the high survival and hatching rates after warming compared with the EM grid, OPS, Cryoloop and straw. Kim *et al.* (2012) also found that their paper container and EM grid were equally efficient in vitrification of day 8 expanded blastocysts, and they were able to obtain live offspring from the blastocysts vitrified-warmed using a paper container. Therefore, the paper device might be considered as a standard along with the Cryotop device.

Previous reports regarding the vitrification of IVM oocytes and their post-warming embryonic development in bovine (Albarracin *et al.* 2005; Morato *et al.* 2008; Sripunya *et al.* 2010; Zhao *et al.* 2011) and swine (Somfai *et al.* 2007) revealed very low rates of development of oocytes after V-W and IVF. Fuku *et al.* (1995), Sathananthan (1997) and Khalili *et al.* (2012) reported that the high concentrations of CPAs inhibited and damaged the micro-organelles, especially mitochondria and the endoplasmic reticulum. Therefore, most researchers obtain good survival rates of oocytes after V-W but not good cleavage and blastocyst formation rates after IVF. In this study, we hypothesized that a rapid, stepwise vitrification and warming technique would be less toxic and stressful than the standard technique.

In our experiments, both the two- and three-step vitrification solutions had similar effects on the survival rates of vitrified-warmed MII oocytes and blastocyst formation rates after IVF. Moreover, the quality of blastocysts was not affected by the vitrification protocols in terms of ICM and TE cell numbers. The results of experiment 3, in which we vitrified MII oocytes using the two- and three-step methods, were similar to those of experiment 2. The cleavage and blastocyst formation rates in our study were higher than those in other reports (Martino *et al.* 1996; Chen *et al.* 2003; Albarracin *et al.* 2005; Morato *et al.* 2008; Sripunya *et al.* 2010). Although the exact reason for these high rates is not clear, it might be due to the different concentrations of CPAs as well as the technique used.

To increase the survival rates of blastocysts after vitrification-warming, we compared the two- and three-step vitrification methods for different grades of blastocysts. For G1 blastocysts, the survival rate and hatched blastocyst rate were not significantly different between the two methods. However, for G2 blastocysts, the three-step method had significantly higher survival and hatchability rates; this could be owing to the effect of gradual warming (Mtango *et al.* 2001; Isachenko *et al.* 2004). Thus, exposure of bovine blastocysts to the two-step vitrification method is perhaps not sufficient for low quality blastocyst cryopreservation. In this study, the survival rate of G1 expanded blastocysts was similar to that reported by Inaba *et al.* (2011), who used only G1 embryos for a different vitrification technique, but was almost double that reported by Pereira *et al.* (2007) and Machatkova *et al.* (2006). Research on factors involved in post-thaw survival of embryos demonstrated that the cryotolerence of an embryo was dependent on its morphology and the developmental stage at the moment of freezing (Fahning & Garcia 1992; Balasubramanian *et al.* 1998; Machatkova *et al.* 2006). However, we are in agreement with Massip *et al.* (1995), who state that in addition to the morphology and developmental stage of embryos, the kinetics of embryo development and their age before freezing play important roles in embryo survival after thawing.

Conclusions

In summary, paper devices are an inexpensive, effective alternative to Cryotop for the vitrification of bovine IVM oocytes and IVP blastocysts. Moreover, our three-step vitrification method may be better for vitrification of oocytes and blastocysts.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission and Suranaree University of Technology. YY Liang and K Srirattana were supported by the SUT post-graduate fellowship.

REFERENCES

Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ. 2004. Image processing with image. *Biophotonics International* **11**, 36–42.

Albarracin JL, Morato R, Rojas C, Mogas T. 2005. Effects of vitrification in open-pulled straws on the category of on in vitro matured prepubertal and adult bovine oocytes. *Theriogenology* **63**, 890–901.

© 2017 Japanese Society of Animal Science

Almodin CG, Minguetti-Camara VC, Paixao CL, Pereira PC. 2010. Embryo development and gestation using fresh and vitrified oocytes. *Human Reproduction* **25**, 1192–1198.
Balasubramanian S, Rho G, Leibo S. 1998. Effect on development of chilling in vitro-produced bovine embryos at various cleavage stages. *Theriogenology* **49**, 162. Abstract.
Bavister BD, Yanagimachi R. 1977. The effects of sperm extract and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster sperm in vitro. *Biology of Reproduction* **16**, 228–237.
Chen SU, Lien YR, Cheng YY, Chen HF, Ho HN, Yang YS. 2001. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Human Reproduction* **16**, 2350–2356.
Chen SU, Lien YR, Chao KH, Ho HN, Yang YS, Lee TY. 2003. Effect of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocytes freezing-a review article. *Molecular and Cellular Endocrinology* **202**, 101–107.
Chian RC, Son WY, Huang JY, Cui SJ, Buckett WM, Tan SL. 2005. High survival rates and pregnancies of human oocytes following vitrification: preliminary report. *Fertility and Sterility* **84**, S36. Abstract.
Cho HJ, Son WY, Yoon SH, Lee SW, Lim JH. 2002. An improved protocol for dilution of cryoprotectants from vitrified human blastocysts. *Human Reproduction* **17**, 2419–2422.
Chung HM, Hong SW, Lim JM, Lee SH, Cha WT, Ko JJ, *et al.* 2000. In vitro blastocyst formation of human oocytes obtained from unstimulated and stimulated cycles after vitrification at various maturational stages. *Fertility and Sterility* **73**, 545–551.
Fahning M, Garcia M. 1992. Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. *Cryobiology* **29**, 1–18.
Fuku E, Xia L, Downey BR. 1995. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* **2**, 139–156.
Gardner DK, Lane M, Spitzer A, Batt PA. 1994. Enhanced rates of cleavage development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in vitro in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryo in groups stimulate development. *Biology of Reproduction* **50**, 390–400.
Hamawaki A, Kuwayama M, Hamano S. 1999. Minimum volume cooling method for bovine blastocyst vitrification. *Theriogenology* **51**, 165. Abstract.
Hong SW, Chung HM, Lim JM, Ko JJ, Yoon TK, Yee B, *et al.* 1999. Improved human oocyte development after vitrification: a comparison of thawing methods. *Fertility and Sterility* **72**, 142–146.
Hunter JE, Fuller BJ, Bernard A, Jackson A, Shaw RW. 1995. Vitrification of human oocytes following minimal exposure to cryoprotectants; initial studies on fertilization and embryonic development. *Human Reproduction* **10**, 1184–1188.
Inaba Y, Aikawa Y, Hirai T, Hashiyada Y, Yamanouchi T, Misumi K, *et al.* 2011. In-straw cryoprotectant dilution for bovine embryos vitrified using Cryotop. *Journal of Reproduction and Development* **57**, 437–443.
Isachenko V, Montag M, Isachenko E, Nawroth F, Dessole S, van der Ven H. 2004. Developmental rate and ultrastructure of vitrified human pronuclear oocytes after step-wise versus direct rehydration. *Human Reproduction* **19**, 660–665.
Katkov PAG II. 2007. Influence of exposure to vitrification solutions on 2-cell mouse embryos: II. Osmotic effects or chemical toxicity? *CryoLetters* **28**, 409–427.
Khalili MA, Maione M, Palmerini MG, Bianchi S, Macchiarelli G, Nottola SA. 2012. Ultrastucture of human mature oocytes after vitrification. *European Journal of Histochemistry* **56**, 236–242.
Kim YM, Uhm SJ, Gupta MK, Yang JS, Lim JG, Das ZC, *et al.* 2012. Successful vitrification of bovine blastocysts on paper container. *Theriogenology* **15**, 1085–1093.
Kuwayama M, Kato O. 2000. All-round vitrification method for human oocytes and embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **17**, 477. Abstract.
Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O. 2005a. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reproductive BioMedicine Online* **11**, 608–614.
Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. 2005b. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reproductive BioMedicine Online* **300**, 308. Abstract.
Lane M, Forest KT, Lyons EA, Bavister BD. 1999. Live births following vitrification of hamster embryos using a novel containerless technique. *Theriogenology* **51**, 167. Abstract.
Larman MG, Gardner DK. 2010. Vitrifying mouse oocytes and embryos with super-cooled air. *Human Reproduction* **25**, i265. Abstract.
Liang YY, Phermthai T, Nagai T, Somfai T, Parnpai R. 2011. In vitro development of vitrified buffalo oocytes following parthenogenetic activation and intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* **75**, 1652–1660.
Luyet B. 1937. The vitrification of organic colloids and protoplasm. *Biodynamica* **1**, 1–14.
Machatkova M, Hanzalova K, Horakova J, Reckova Z, Hulinska P. 2006. Collection of oocytes from donors in the growth phase of follicular development can enhance the production of bovine embryos for cryopreservation. *Veterinarni Medicina* **51**, 232–238.
Mandawala AA, Harvey SC, Roy TK, Fowler KE. 2016. Cryopreservation of animal oocytes and embryos: current progress and future prospects. *Theriogenology* **15**, 1637–1644.
Martino AN, Songsasen S, Leibo SP. 1996. Development in to blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biology of Reproduction* **54**, 1059–1069.
Massip A, Mermillod P, Dinnyes A. 1995. Morhology and biochemistry of in vitro produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. *Human Reproduction* **10**, 3004–3011.
Matsumoto H, Jiang JY, Tanaka T, Sasada H, Sato E. 2001. Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology* **42**, 139–144.
Matsunari H, Maehara M, Nakano K, Ikezawa Y, Hagiwara Y, Sasayama N, *et al.* 2012. Hollow fiber vitrification: a novel method for vitrifying multiple embryos in a single device. *Journal of Reproduction and Development* **58**, 599–608.
Mohr LR, Trounson AO. 1980. The use of fluorescein diaacetate to assess embryo viability in the mouse. *Journal of Reproduction and Fertility* **58**, 189–196.
Morato R, Izquierdo D, Paramio MT, Mogas T. 2008. Cryotop versus open-pulled straws (OPS) as carriers for

© 2017 Japanese Society of Animal Science

the cryopreservation of bovine oocytes: effect of spindle and chromosome configuration and embryo development. *Cryobiology* **57**, 137–141.

Mtango NR, Varisanga MD, Dong YJ, Otoi T, Suzuki T. 2001. The effect of prefreezing the diluent portion of the straw in a step-wise vitrification process using ethylene glycol and polyvinylpyrrolidone to preserve bovine blastocysts. *Cryobiology* **42**, 135–138.

Parnpai R, Tasripoo K, 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 Journal* **15**, 371–384.

Pereira RM, Baptista MC, Vasques MI, Horta AE, Portugal PV, Bessa RJ, *et al.* 2007. Cryosurvival of bovine blastocyst is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t, 12c CLA). *Animal Reproduction Science* **98**, 293–301.

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

Sathananthan AH. 1997. Ultrastructure of human egg. *Human Cell* **10**, 21–38.

Seneda MM, Esper CR, Garcia JM, Oliveira JA, Vantini R. 2001. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal recovery. *Animal Reproduction Science* **67**, 37–43.

Shaw PW, Bernard AG, Fuller BJ, Hunter JH, Shaw RW. 1992. Vitrification of mouse oocytes using short cryoprotectant exposure: effects of varying exposure times on survival. *Molecular Reproduction and Development* **33**, 210–214.

Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Kuriani Karja NW, Farhudin M, *et al.* 2007. Developmental competence of in vitro fertilized porcine oocytes after in vitro maturation and solid surface vitrification: effect of cryopreservationon oocytes antioxydative system and cell cycle stage. *Cryobiology* **55**, 115–126.

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 oocytes. *Journal of Reproduction and Development* **56**, 176–181.

Stachecki JJ, Garrisi J, Sabino S, Caetano JP, Wiemer KE, Cohen J. 2008. A new safe, simple and successful vitrification method for bovine and human blastocysts. *Reproductive BioMedicine Online* **17**, 360–367.

Steponkus PL, Myers SP, Lynch DV, Gardner L, Bronshteyn V, Leibo SP, *et al.* 1990. Cryopreservation of Drosophila melanogaster embryos. *Nature* **345**, 170–172.

Sugiyama R, Nakagawa K, Shirai A, Sugiyama R, Nishi Y, Kuribayashi Y, *et al.* 2010. Clinical outcomes resulting from the transfer of vitrified human embryos using a new device for cryopreservation (plastic blade). *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **27**, 161–167.

Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. 1997. Vitrification of porcine embryos using the open pulled straw (OPS) method. *Acta Veterinaria Scandinavica* **38**, 349–352.

Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, *et al.* 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molecular Reproduction and Development* **51**, 53–58.

Wu J, Zhang L, Wang X. 2001. In vitro maturation, fertilization and embryo development after ultrarapid freezing of immature human oocytes. *Reproduction* **121**, 389–393.

Yoon TK, Kim TJ, Park SE, Hong SW, Ko JJ, Chung HM, *et al.* 2003. Live births after vitrification of oocytes in a stimulated in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertility and Sterility* **79**, 1323–1326.

Zhao XM, Du WH, Wang D, Hao HS, Liu Y, Qin T, *et al.* 2011. Recovcery of Mitochondrial function and endogenous antioxidant systems in vitrified bovine oocytes during extended in vitro culture. *Molecular Reproduction and Development* **78**, 942–950.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

© 2017 Japanese Society of Animal Science