บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ในการวิจัยแช่แข็งโอโอไซท์คือ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการแช่แข็งโอโอไซท์โครยะ MII โดยใช้วิธี solid surface vitrification (SSV) และ Cryotop โดยจะศึกษาถึงประสิทธิภาพของการแช่แข็งโอโอไซท์ต่ออัตรารอดหลังการแช่แข็ง อัตราการปฏิสนธิในหลอดแก้ว (IVF) การเกิด pronucleus หลังปฏิสนธิ และอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนหลังการเลี้ยงในหลอดทดลอง โอโอไซท์ที่เลี้ยงในน้ำยา IVM จะถูกนำมาบ่มในน้ำยา equilibration และ vitrification solution นานตามวิธีการแช่แข็งแบบ SSV จากนั้น โอโอไซท์จะถูกแช่แข็งทั้งแบบหยดลงบนผิวแท่งเหล็กที่จุ่มในกล่องโฟมที่มีไนโตรเจนเหลว (กลุ่ม SSV) หรือวางโอโอไซท์บนปลาย Cryotop แล้วจึงจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว (กลุ่ม Cryotop) การละลายทำตามวิธีการละลายแบบ SSV โอโอไซท์บางกลุ่มจะถูกบ่มในน้ำยาแช่แข็ง แต่จะถูกนำไปบ่มในน้ำยาละลายโดยไม่ผ่านการแช่แข็ง (กลุ่ม Solution control) การแยกว่าโอโอไซท์รอดหรือไม่หลังการแช่แข็งจะแยกโดยใช้ fluorescein diacetate staining (FDA) โดยโอโอไซท์ที่มีชีวิตจะถูกนำไปทำ IVF และนำตัวอ่อนไปเลี้ยงในหลอดแก้ว อัตรารอดของโอโอไซท์มีความใกล้เคียงกันระหว่างกลุ่มควบคุม (โอโอไซท์ที่ไม่ถูกแช่แข็ง) Solution control กลุ่ม SSV และกลุ่ม Cryotop หลังการแช่แข็ง ไม่พบความแตกต่างของอัตราการปฏิสนธิ การเกิด pronuclear และ monospermy ระหว่างทุกกลุ่ม อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนจากกลุ่ม SSV และ Cryotop (41.6 และ 53.2%, ตามลำดับ) ต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่ม Solution control (65.9 และ 61.3% ตามลำดับ) อัตราการเจริญเติบโตสู่ระยะบลาสโตซีสจากกลุ่ม SSV และ Cryotop ไม่มีความแตกต่างกัน (10.3 และ 12.8% ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามทั้งสองกลุ่มมีอัตราการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสที่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่ม Solution control (36.4 และ 24.8% ตามลำดับ) ปริมาณเซลล์ inner cell mass, trophectoderm และจำนวนเซลล์ทั้งหมดของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสไม่มีความแตกต่างกันทั้งจากกลุ่มควบคุม กลุ่ม Solution control กลุ่ม SSV และ Cryotop จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าโอโอไซท์โคที่เลี้ยงในน้ำยา IVM สามารถผ่านการแช่แข็งโดย Cryotop และ SSV ได้โดยมีประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกัน

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

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

Abstract

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

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

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