วัชระ วิปัสสา : ผลของสารไครโอโพรเทกแทนต์ต่อการแช่แข็งไข่โคด้วยวิธีวิทริฟิเกชั่น (THE EFFECTS OF DIFFERENCE COMBINATIONS OF CRYOPROTECTANTS FOR THE VITRIFICATION OF *IN VITRO* MATURED BOVINE OOCYTES) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย, 69 หน้า

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นพิษและประสิทธิภาพในการแช่แข็งของสารไครโอโพรเทกแทนต์ต่ออัตราการรอดชีวิตและการพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะต่างๆของไข่โคภายหลังแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเกชั่น ในการศึกษานี้สารไครโอโพรเทกแทนต์ ได้แก่ เอทิลีนไกลคอล (EG) โพรพิลีนไกลคอล (PROH) และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ได้ถูกนำมาใช้ในอัตราส่วน 4% (v/v) ในน้ำยา equilibration (ES) และ 35% (v/v) ในน้ำยา vitrification โดยใช้แบบผสม ดังนี้ EG + DMSO, EG + PROH, PROH + DMSO และ EG + PROH + DMSO

การทดลองที่หนึ่ง เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทกแทนต์ ไข่โคที่ผ่านการเลี้ยงให้สุกในหลอดทดลองถูกนำไปผ่านน้ำยาแช่แข็งที่มีส่วนผสมของสารไครโอโพรเทกแทนต์แตกต่างกัน 4 ชนิด เป็นเวลา 30 วินาที โดยไม่ผ่านการแช่แข็ง ผลปรากฏว่า อัตราการรอดชีวิต (93.53% – 94.86%) การพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะ cleavage (58.73% - 61.39%) และบลาสโตซีสต์ (22.65% - 22.82%) ในกลุ่มไข่โคที่ผ่านน้ำยาแช่งแข็งทั้ง 4 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติและเมื่อเปรียบเทียบกับไข่โคในกลุ่มควบคุม (95.53%, 62.08% และ 24.88% ตามลำดับ)

การทดลองที่สอง เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการแช่แข็งของสารไครโอโพรเทกแทนต์ไข่โคที่ผ่านการเลี้ยงให้สุกในหลอดทดลองถูกนำไปผ่านน้ำยาแช่แข็งที่มีส่วนผสมของสารไครโอ-โพรเทกแทนต์แตกต่างกัน 4 ชนิด เป็นเวลา 30 วินาที แล้วนำไปแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเกชั่นและเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว ผลปรากฏว่า อัตราการรอดชีวิตหลังทำละลายในกลุ่มไข่โคที่ผ่านการแช่งแข็งด้วยน้ำยาแช่แข็งทั้ง 4 ชนิด (89.56% - 92.37%) ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับไข่โคในกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง (95.96%) ภายหลังการเลี้ยงไข่โคแช่แข็งที่รอดชีวิตต่อในหลอดทดลอง พบว่า อัตราการพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะ cleavage (36.80% - 41.56%) และระยะบลาสโตซีสต์ (5.45% - 7.61%) ในกลุ่มไข่โคที่ผ่านการแช่งแข็งด้วยน้ำยาแช่แข็งทั้ง 4 ชนิด ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ให้ผลต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับไข่โคในกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง (64.86% และ26.35% ตามลำดับ)

การทดลองที่สาม ไข่โคถูกนำไปเลี้ยงให้สุกในน้ำยาเลี้ยงที่เติมสาร IGF-1 ในปริมาณ 0, 50, 100 และ 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในน้ำยาเลี้ยงไข่สุก ภายหลังการแช่แข็งและทำละลายผลปรากฏว่า ไม่พบความแตกต่างทางสถิติในอัตราการรอดชีวิตของกลุ่มไข่โคที่ผ่านการเลี้ยงในน้ำยา

เลี้ยงไข่สุกที่เติมสาร IGF-1 ก่อนการแช่งแข็ง (92.55% - 95.11%) และไข่โคในกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง (95.96%) ภายหลังการปฏิสนธิในหลอดทดลอง ถึงแม้ว่าอัตราการพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะ cleavage ในกลุ่มไข่โคที่ผ่านการเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงไข่สุกที่เติมสาร IGF-1 ในปริมาณ 50 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (50.91% และ 53.15%) ก่อนการแช่งแข็งให้ผลสูงกว่ากลุ่มไข่โคแช่แข็งที่ไม่ได้เติมสาร IGF-1 (0 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) ในน้ำยาเลี้ยงไข่สุกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับไข่โคในกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง (63.51%) ปรากฏว่าให้ผลต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในส่วนอัตราการพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต์ในกลุ่มไข่โคที่ผ่านการเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงไข่สุกที่เติมสาร IGF-1 (7.19% - 8.24%) ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มการเติมสาร IGF-1 ในน้ำยาเลี้ยงไข่สุกในปริมาณต่างๆ แต่ให้ผลต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับไข่โคในกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง (25.11%)

ผลของการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า สามารถแช่แข็งไข่โคโดยใช้น้ำยาแช่แข็งที่มีส่วนผสมของสารไครโอโพรเทกแทนต์ ทั้ง เอทิลีนไกลคอล โพรพิลีนไกลคอล และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ซึ่งน้ำยาแช่แข็งเหล่านั้นไม่ก่อความเป็นพิษและให้ประสิทธิภาพการแช่แข็งที่เหมือนกันต่ออัตราการรอดชีวิตและการพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะต่างๆของการแข็งไข่โคด้วยวิธีวิทริฟิเคชั่น และถึงแม้การเติมสาร IGF-1 ในน้ำยาเลี้ยงไข่สุกจะช่วยเพิ่มอัตราการพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะ cleavage แต่ไม่มีผลต่อการพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต์ของการแข็งไข่โคด้วยวิธีวิทริฟิเคชั่น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2560 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

VAJARA WIPASSA : THE EFFECTS OF DIFFERENCE COMBINATIONS OF CRYOPROTECTANTS FOR THE VITRIFICATION OF *IN VITRO* MATURED BOVINE OOCYTES. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. RANGSUN PARNPAI, Ph.D., 69 PP.

BOVINE OOCYTE/CRYOPROTECTANT/IGF-1/VITRIFICATION

The objectives of this study were to investigate the toxic effect and vitrification efficiency of permeating cryoprotectants (CPAs) on oocyte survival and embryo development of *in vitro* matured (IVM) bovine oocytes after vitrification. In this study, three CPAs including ethylene glycol (EG), dimethyl-sulfoxide (DMSO) and propylene glycol (PROH) were added in a equilibration solution (ES) and a vitrification solution (VS) in total 4% (v/v) and 35% (v/v) of 4 kinds of combinations (EG + DMSO, EG + PROH, PROH + DMSO and EG + PROH + DMSO).

In experiment I, the toxic effect of these solutions was investigated. IVM bovine oocytes were exposed to 4 kinds of CPA combinations for15 min in ES and 30 sec in VS without cooling. There was no difference on survival (93.53% – 94.86%), cleavage (58.73% - 61.39%) and blastocyst rates (22.65% - 22.82%) in CPA exposed groups compared to the fresh control group (95.53%, 62.08%, and 24.88%, respectively).

In experiment II, the vitrification efficiency of these solutions was investigated. IVM bovine oocytes were vitrified with the above 4 kinds of CPAs combinations by using Cryotop. After warming, the survival rate in the 4 vitrified groups (89.56% - 92.37%) was not significantly different compared to the fresh control (95.96%).

The rates of cleavage (36.80% - 41.56%) and blastocyst (5.45% - 7.61%) in the 4 vitrified groups were significantly lower (P > 0.05) than those of the fresh control group (64.86% and 26.35%, respectively). But, these solutious made no statistically significant difference in the blastocyst rate among the 4 vitrified groups (P>0.05), EG+DMSO (7.61%), EG + PROH (6.74%), EG + PROH + DMSO (6.11%), and PROH + DMSO (5.45%), respectively.

In experiment III, bovine oocytes were IVM supplemented with 0, 50, 100 and 200 ng/mL IGF-1. Following vitrification and warming, the oocyte survival rates were not significantly different among the IGF-1 supplemented groups (92.55% - 95.11%) and fresh control (96.33%). The cleavage rate in the 50 and 100 ng/mL IGF-1 groups (50.91% and 53.15%) were significantly higher (p < 0.05) than those in 0 ng/mL IGF-1 group (42.73%) but there was significantly lower than that in the fresh control group (63.51%). The blastocyst rate was not significantly different among IGF-1 supplemented groups (7.19% - 8.24%) but significantly lower than that in the fresh control group (25.11%). The number of ICM and TE cells was not significantly different among IGF-1 supplemented groups and fresh control group.

In conclusion, there was no difference on the toxic effect among those CPAs combination treatments. They had the same efficientcy on oocyte survival and embryo development in IVM bovine oocytes vitrification. Although, the supplementation of IGF-1 during IVM of bovine oocytes improved their total cleavage rate, there was no

School of Biotechnology Student's Signature Vajara Wipassa

Academic Year 2017 Advisor's Signature