หยวนหยวน เหลียง : ผลของวิธีการแช่แข็งแบบแก้วต่ออัตรารอดของไข่กระบือและอัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังจากฉีดอสุจิเข้าไปในไข่ (EFFECTS OF VITRIFICATION TECHNIQUE ON THE SURVIVAL OF BUFFALO OOCYTES AND DEVELOPMENTAL POTENTIAL OF EMBRYO FOLLOWING INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย, 121 หน้า

การฉีดอสุจิเข้าสู่ไซโตพลาซึมของไข่ (อิ๊กซี่) เป็นเทคนิคการปฏิสนธิภายนอกร่างกายวิธีหนึ่ง โดยใช้อสุจิหนึ่งตัวฉีดเข้าไปในไข่หนึ่งใบโดยตรง ซึ่งลูกที่ได้จากเทคนิคอิ๊กซี่มีรายงานในสัตว์หลายสปีชีส์ในการทดลองแรกได้ทำการศึกษากระบวนการกระตุ้นของเทคนิคอิ๊กซี่ในกระบือ พบว่าอัตราการเกิด second polar body (PB) ปรากฏสูงที่สุดเมื่อไข่ได้ถูกกระตุ้น 3 ชั่วโมง และการเกิด second PB พบในกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย ethanol (EtOH) มากกว่ากลุ่ม Io อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้พบว่าวิธีการกระตุ้นโอโอไซต์กระบือที่ผ่านการทำอิ๊กซี่ที่ได้ประสิทธิภาพ คือ การกระตุ้นด้วย Io ร่วมกับ 6-dimethyl amino purine (6-DMAP) และ EtOH ร่วมกับ cycloheximide (CHX) ซึ่งให้อัตราการแบ่งตัวและการพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสสูงที่สุด และวิธีการกระตุ้นด้วย EtOH ร่วมกับ CHX ถูกนำมาใช้กับไข่กระบือที่ผ่านการแช่แข็งแล้วนำมาทำอิ๊กซี่ ในการทดลองที่สองศึกษาผลของระยะเวลาการสัมผัสกับสารป้องกันการแข็งตัว cryoprotectant (CPA) ของโอโอไซต์และเทคนิคการแช่แข็งต่อการพัฒนาของตัวอ่อนภายนอกร่างกายหลังจากการกระตุ้นให้ไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิแบ่งตัว parthenogenetic activation (PA) และอิ๊กซี่ โดยโอโอไซต์ที่ผ่านกระบวนการเลี้ยงให้เป็นไข่สุกภายนอกร่างกาย (IVM) สัมผัสกับ 10% DMSO ร่วมกับ 10% EG เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ สัมผัสกับ 20% DMSO + 20% EG + 0.5 M sucrose เป็นเวลา 30 วินาที 45 วินาที หรือ 60 วินาที (กลุ่ม 1 นาที + 30 วินาที กลุ่ม 1 นาที + 45 วินาที และกลุ่ม 1 นาที + 60 วินาที ตามลำดับ) ผลของอัตราการพัฒนาเป็นตัวอ่อนภายหลังการสัมผัสกับ CPA หรือการแช่แข็ง พบว่า กลุ่มที่สัมผัสกับสาร CPA เป็นระยะเวลา 1 นาที + 30 วินาที แล้วนำมาแช่แข็งด้วยวิธี microdrop สามารถได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสสูงสุดภายหลังจากการทำ PA และ อิ๊กซี่ และเมื่อย้อมด้วย FDA เพื่อดูการมีชีวิตรอดพบว่าการย้อมด้วย FDA ไม่ส่งผลเสียต่อการพัฒนาของตัวอ่อนภายนอกร่างกาย การทดลองที่สามศึกษาสารละลายสำหรับการแช่แข็ง 2 ประเภท คือ VA (10% DMSO + 10% EG เป็นเวลา 1 นาที และต่อด้วย 20% DMSO +20% EG + 0.5 M sucrose เป็นเวลา 30 วินาที) และ VB (4% EG เป็นเวลา 12-15 นาที และต่อด้วย 35% EG + 50 mg/ml PVP + 0.4 M trehalose เป็นเวลา 30 วินาที) ร่วมกับวิธีการแช่แข็ง 2 วิธี คือ microdrop และ cryotop ต่ออัตราการอยู่รอด การสร้าง pronuclear และการพัฒนาภายหลังการทำอิ๊กซี่ของโอโอไซต์กระบือระยะ MII

ที่ผ่านการแช่แข็งและทำละลาย พบว่า การมีชีวิตรอดของโอโอไซต์ที่แช่แข็งด้วยสารละลาย VA (ด้วยวิธีการแช่แข็งแบบ microdrop 93% และแบบ cryotop 97% ตามลำดับ) สูงกว่ากลุ่มที่แช่แข็งด้วยสารละลาย VB (ด้วยวิธีการแช่แข็งแบบ microdrop 79% และแบบ cryotop 81% ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ แต่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (100%) อย่างมีนัยสำคัญ สารละลาย VA ให้อัตราการรอดและการสร้าง pronuclear 2 อันของโอโอไซต์ที่ผ่านการแช่แข็งที่สูงกว่า ส่วนวิธีการแช่แข็งแบบ microdrop และ cryotop เป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการแช่แข็งโอโอไซต์กระบือ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2553 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

YUANYUAN LIANG : EFFECTS OF VITRIFICATION TECHNIQUES ON THE SURVIVAL OF BUFFALO OOCYTES AND DEVELOPMENTAL POTENTIAL OF EMBRYO FOLLOWING INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. RANGSUN PARNPAI, Ph.D., 121 PP.

BUFFALO/OOCYTES VITRIFICATION/EMBRYO/ INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is an *in vitro* fertilization procedure in which a single sperm is injected directly into an egg. ICSI offsprings have been reported in many species. In the first experiment, activation protocol of buffalo ICSI was studied. The highest rate of second polar body (PB) extrusion occurred at 3 h of activation and the second PB extrusion in ethanol (EtOH) treated group was significantly higher than that in ionomycin (Io) treated group. The result indicated that buffalo ICSI oocytes were effectively activated by combination treatment of Io with 6-dimethyl amino purine (6-DMAP) and EtOH with cycloheximide (CHX) resulting in the highest cleavage and blastocyst formation rates, and EtOH + CHX activation protocol was used in the vitrified buffalo oocytes following ICSI. In the second experiment, the effects of exposure time of oocytes to cryoprotectant (CPA) and vitrification on their *in vitro* development after parthenogenetic activation (PA) or ICSI was examined. IVM oocytes were placed in 10% DMSO + 10% EG for 1 min and then exposed to 20% DMSO + 20% EG + 0.5 M sucrose for 30 s, 45 s or 60

s (1min+30s, 1min+45s and 1min+60s groups, respectively). The results of embryo developmental rates after CPA exposure or vitrification showed that 1min+30s CPA treatment regimen could yield the highest blastocyst formation rates after PA and ICSI for oocytes vitrified by the microdrop method. The fluorescein diacetate (FDA) staining for viability checking had no detrimental effect on the embryo development *in vitro*. In the third experiment, two kinds of vitrification solution VA (10% DMSO + 10% EG for 1 min, 20% DMSO + 20%EG + 0.5M sucrose for 30 sec) and VB (4% EG for 12-15 min, 35% EG+ 50 mg/ml PVP and 0.4 M trehalose for 30 sec) were examined with Microdrop and Cryotop methods on the survival rates, pronuclear formation, and developmental competence following ICSI of vitrified-warmed MII buffalo oocytes. The oocytes viability with VA solution (Microdrop: 93%, Cryotop: 97%, respectively) were significantly higher than that with VB solution (Microdrop: 79%, Cryotop: 81%), but significantly lower than control groups (100%). VA solution yielded higher survival rate and 2 pronuclei formation rates of vitrified oocytes. Thus, Cryotop and Microdrop are equally suitable methods for buffalo oocytes vitrification.

School of Biotechnology Student's Signature_____

Academic Year 2011 Advisor's Signature_____