บทคัดย่อ

การฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่โดยเตรียมอสุจิด้วยเทคนิค swim-up จากนั้นตัวอสุจิจะถูกฉีดเข้าไปในไซโพลาสซึมของไข่โคที่ถูกเลี้ยงให้สุกในหลอดแก้วด้วยเครื่อง micromanipulator หลังจากนั้นกระตุ้นด้วย 5μM ionomycin (Io) หรือ 7% ethanol (EtOH) นาน 5 นาที จะเกิดการปลดปล่อยโพลาบอดี้ที่สองในชั่วโมงที่ 3 หลังจากกระตุ้นด้วยสารเคมี โดยพบว่าอัตราการปลดปล่อยโพลาบอดี้ที่สองเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (85-87%) ในกลุ่ม EtOH (EtOH + 6-DMAP, EtOH + CHX) จากนั้นไข่ที่มีการปลดปล่อยโพลาบอดี้ที่สองจะถูกคัดเลือกไปไว้ในน้ำยาที่มี 1.9 mM 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) หรือ 10 μg/mL cycloheximide (CHX) และเลี้ยงต่ออีก 3 และ 5 ชั่วโมง ตามลำดับ หลังจากไข่ถูกกระตุ้นด้วยสารเคมีแล้วจะนำไปเลี้ยงในน้ำยา mSOF เป็นเวลา 2 วัน และเลือกเฉพาะตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ไปเลี้ยงร่วมกับเซลล์บุท่อนำไข่โคนาน 5 วัน พบว่าอัตราการแบ่งตัวในกลุ่ม Io+6-DMAP, EtOH+6-DMAP และ EtOH+CHX เป็น 76%, 70% และ 80% ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่ากลุ่ม Io + CHX (59%) และกลุ่มที่ไม่ได้ฉีดอสุจิเข้าไปในไข่(53%, 53%, 53% และ 45% ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อัตราการเจริญของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสในกลุ่ม Io + 6-DMAP และ EtOH + CHX (25 และ 27% ตามลำดับ) สูงกว่ากลุ่ม Io + CHX และ EtOH + 6-DMAP (16 and 17% ตามลำดับ) รวมทั้งกลุ่มที่ไม่ได้ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ (9%, 53%, 53% และ 45% ตามลำดับ) นอกจากนี้ จำนวนเซลล์ของ TE ICM และ total cell number ในกลุ่มที่ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบจากเปอร์เซ็นต์การเจริญของตัวอ่อนจนถึงระยะบลาสโตซีส กลุ่มที่กระตุ้นด้วย EtOH + CHX มีประสิทธิภาพที่สุดในการกระตุ้นไข่โคหลังจากฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ ซึ่งจะใช้วิธีการกระตุ้นนี้ในการทดลองต่อไป การทดลองต่อมาได้นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเกรด 1 และ เกรด 2 อายุ 7 วัน ที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้วหรือการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่เพื่อทำการแช่แข็งด้วย Cryotop และ microdrop และทำละลาย 1 หรือ 3 ขั้นตอน สำหรับตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเกรด 1 พบอัตรารอดสูงสุดในกลุ่มที่ปฏิสนธิในหลอดแก้วและแช่แข็งด้วย Cryotop (81-84%) กลุ่มที่ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่และแช่แข็งด้วย microdrop ที่มีการทำละลายแบบ 3 ขั้นตอน (84%) และกลุ่มที่ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่และแช่แข็งด้วย Cryotop (80-88%) นอกจากนี้พบอัตรารอดต่ำสุดในกลุ่มที่ปฏิสนธิในหลอดแก้วและแช่แข็งด้วย microdrop ที่มีการทำละลายแบบ 1 ขั้นตอน (53%) กลุ่มที่ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่และแช่แข็งด้วย Cryotop ที่มีการทำละลายแบบ 1 (74%) และ 3 (77%) ขั้นตอน ให้อัตราการเจริญถึงระยะแฮชบลาสโตซีสหลังการเลี้ยง 48 ชั่วโมงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนสูงกว่ากลุ่มอื่น สำหรับตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเกรด 2 พบว่ากลุ่มที่ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่และแช่แข็งด้วย Cryotop ที่มีการทำละลายแบบ 1 และ 3 ขั้นตอน มีอัตรารอดชีวิต และอัตราการเจริญถึงระยะแฮช บลาสโตซีสหลัง 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมงตามลำดับสูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีลูกโคเกิดมา 1 ตัว หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนสดที่ผลิตโดยการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ จากผลการทดลองสรุปได้ว่าการกระตุ้นไข่โคด้วย Io + 6-DMAP และ EtOH + CHX มีประสิทธิภาพสูงต่อการเพิ่มอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนและอัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซีสและกลุ่มที่ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ที่ทำการแช่แข็งด้วย Cryotop มีประสิทธิภาพดีที่สุด นอกจากนั้นการผลิตตัวอ่อนด้วยวิธีดังกล่าวเมื่อนำไปย้ายฝากให้โคตัวรับสามารถให้กำเนิดลูกโคปกติได้

Abstract

A single spermatozoon prepared by swim-up method was injected into the cytoplasm of *in vitro* matured (IVM) bovine oocytes using a micromanipulator under an inverted microscope. The release of the second polar body from injected oocytes was examined at 3 h after activation either by exposure to 5μM ionomycin (Io group) or 7% ethanol (EtOH group) for 5 min. Significantly higher rate of second PB extrusion (85-87%) were obtained in the EtOH groups (EtOH + 6-DMAP, EtOH + CHX) after 3 h of ICSI. Injected oocytes extruded the second polar body at 3 h of activation were transferred to the medium supplemented either with 1.9 mM 6-dimethylaminopurine (6-DMAP group) or 10 μg/mL cychloheximide (CHX group) and cultured for 3 and 5 h, respectively. The activated oocytes were further cultured in mSOF medium for 2 days, and then embryos developed to 8-cell stage were selected and co-cultured with bovine oviduct cells for additional 5 days. The cleavage rates of Io+6-DMAP, EtOH+6-DMAP and EtOH+CHX groups were 76%, 70% and 80%, respectively, and significantly higher than those in Io + CHX group (59%) and sham injected group in all activation treatments. Significantly higher blastocyst formation rates were obtained in Io + 6-DMAP and EtOH + CHX groups (25 and 27% respectively) than those in Io + CHX and EtOH + 6-DMAP groups (16 and 17%, respectively) and sham injected groups. The highest TE, ICM and total cell number were obtained from all the sperm injection/ICSI groups, which were significantly higher than those in all sham-injection groups. Base on the percentage of blastocysts, EtOH + CHX was more effective for activation of bovine oocytes following ICSI, which will be used in the following experiment. Expanded G1 or G2 Blastocysts obtained on day 7 after IVF or ICSI were cryopreserved by the Cryotop and microdrop devices and 1 step warming and 3 step warming methods. For Grade 1 blastocysts, the survival rate tended to be highest in the Cryotop vitrified IVF groups (81-84%), microdrop vitrified ICSI with 3 steps warming group (84%) and Cryotop vitrified ICSI groups (80-88%). And the lowest survival rate was achieved in microdrop vitrified IVF with 1 step warming group (53%). The highest blastocyst hatched rate post 48 h IVC were obtained from Cryotop vitrified ICSI with 1 step (74%) and 3 steps (77%) warming groups. For Grade 2 blastocysts, when Cryotop vitrified ICSI embryos were warmed by 1 step and 3 step methods, the rates of survival, hatched blastocyst stages after 24 and 48 h, respectively, of culture were significantly higher than those of other groups. One calf was born from embryo transferred of ICSI-derived fresh embryos to recipient. Our results indicated that bovine oocytes were effectively activated by combination treatment of Io with 6-DMAP and EtOH with CHX resulting in the highest cleavage and blastocyst formation rates. ICSI-derived blastocysts were highly effective vitrified by Cryotop method