กาญจนา ปัญญาไว : การเพิ่มประสิทธิภาพเทคนิคการแช่แข็งแบบ vitrification เพื่อการเจือจางในขั้นตอนเดียวหลังการทำละลายของตัวอ่อนโคที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดทดลองและผ่านการตัดแบ่งตัวอ่อน (IMPROVEMENT OF VITRIFICATION TECHNIQUE FOR ONE STEP DILUTION OF VITRIFIED BIOPSIED BOVINE IVF-DERIVED EMBRYOS) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย, 97 หน้า.

การแช่แข็งตัวอ่อนโคระยะบลาสโตซีสที่ได้จากการผลิตในหลอดทดลองด้วยวิธี vitrification จำเป็นต้องมีการพัฒนาเพื่อป้องกันการปนเปื้อน และสามารถเจือจางสารแช่แข็งได้ในขั้นตอนเดียวหลังการทำละลาย ซึ่งจะเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของตัวอ่อนโคที่ได้จากการผลิตในหลอดทดลอง การศึกษาแรกเพื่อประเมินประสิทธิภาพของอุปกรณ์แช่แข็ง micro volume air cooling (MVAC) ในการแช่แข็งด้วยวิธี vitrification โดยนำไข่โคที่ผ่านการเลี้ยงให้สุกในหลอดทดลองและตัวอ่อนโคระยะบลาสโตซีสได้จากการผลิตในหลอดทดลอง มาแช่แข็งด้วยอุปกรณ์ MVAC โดยใช้ Cryotop ซึ่งเป็นอุปกรณ์แช่แข็งมาตรฐานที่มีอัตรารอดหลังการทำละลายสูงเป็นกลุ่มเปรียบเทียบ ส่วนการแช่แข็งด้วย MVAC นั้นจะทำการเปรียบเทียบในสองระบบคือ MVAC group ซึ่งไข่หรือตัวอ่อนจะไม่สัมผัสกับไนโตรเจนเหลวโดยตรง ส่วนระบบที่สองคือ MVAC in LN_2 group ระบบนี้ไข่หรือตัวอ่อนจะสัมผัสกับไนโตรเจนเหลวโดยตรง และเป็นระบบเดียวกับการแช่แข็งด้วย Cryotop เมื่อนำไข่หลังการทำละลายจากทั้งสามกลุ่มการทดลอง คือ MVAC, MVAC in LN_2 และ Cryotop มาทำการปฏิสนธิในหลอดทดลอง ผลการทดลองไม่พบความแตกต่างทางสถิติของอัตราการแบ่งตัว และอัตราการเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะบลาสโตซีส (53.1% to 56.6% and 20.0% to 25.5%, ตามลำดับ) ส่วนตัวอ่อนโคระยะบลาสโตซีสได้จากการผลิตในหลอดทดลอง เมื่อนำมาแช่แข็งด้วยวิธีการดังกล่าวข้างต้น ผลการทดลองไม่พบความแตกต่างทางสถิติของอัตราการเจริญสู่ระยะแฮชบลาสโตซิสในตัวอ่อนทุกกลุ่ม

การศึกษาที่สองเพื่อเพิ่มอัตรารอดและการเจริญต่อในหลอดทดลองของตัวอ่อนโคระยะบลาสโตซีสที่ได้จากการผลิตในหลอดทดลอง เมื่อนำมาแช่แข็งโดยใช้อุปกรณ์ 0.25 mL straw ในการทดลองนี้ได้หาปัจจัยร่วมที่เหมาะสมในการแช่แข็งด้วย 0.25 mL straw โดยใช้การแช่แข็งด้วย Cryotop เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในน้ำยาเจือจางสารแช่แข็ง และวิธีการจุ่มหลอด 0.25 mL straw ลงในไนโตรเจนเหลว ไม่มีผลต่ออัตรารอดและการเจริญต่อในหลอดทดลองของตัวอ่อนโคระยะบลาสโตซีสที่แช่แข็งด้วย 0.25 mL straw นอกจากนี้ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของอัตรารอดและการเจริญต่อในหลอดทดลอง เมื่อใช้น้ำยาแช่แข็งที่

ประกอบด้วย EG-DMSO (VS1) และ EG-Gly (VS2) ในการแช่แข็งตัวอ่อนโครยะบลาสโตซีสที่ได้จากการผลิตในหลอดทดลองด้วย 0.25 mL straw แต่อย่างไรก็ตามพบว่าประสิทธิภาพของการแช่แข็งด้วยวิธี 0.25 mL straw ยังต่ำกว่า Cryotop

การศึกษาที่สามเพื่อศึกษาผลกระทบของการตัดแบ่งตัวอ่อนด้วยไมโครเบลดก่อนการแช่แข็งแบบ vitrification ด้วยอุปกรณ์สองชนิดคือ Cryotop และ 0.25 mL straw ต่ออัตรารอดและการเจริญต่อในหลอดทดลองของตัวอ่อนโครยะบลาสโตซีสได้จากการผลิตในหลอดทดลอง โดยนำตัวอ่อนโคดังกล่าวนำมาตัดแบ่งเซลล์ออกบางส่วนด้วยไมโครเบลด ส่วนกลุ่มตัวอ่อนที่ไม่ถูกตัดแบ่งเซลล์จะใช้เป็นกลุ่มควบคุม จากนั้นนำตัวอ่อนทั้งสองกลุ่มมาแช่แข็งด้วยวิธี Cryotop และ 0.25 mL straw ผลการทดลองพบว่าอัตรารอดและการเจริญต่อในหลอดทดลองในตัวอ่อนแช่แข็งทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างทางสถิติกับกลุ่มตัวอ่อนสดที่ไม่แช่แข็ง ส่วนในตัวอ่อนที่ผ่านการตัดแบ่งตัวเซลล์ไม่พบความแตกต่างของอัตรารอดและการเจริญต่อในหลอดทดลองในกลุ่มตัวอ่อนแช่แข็งด้วย Cryotop หรือตัวอ่อนสด แต่อย่างไรก็ตามอัตราดังกล่าวในทั้งสองกลุ่มการทดลอง สูงกว่ากลุ่มตัวอ่อนที่ผ่านการตัดแบ่งเซลล์และแช่แข็งด้วย 0.25 mL straw ทางสถิติ นอกจากนี้ผลของค่าเฉลี่ยเซลล์ apoptotic ต่อบลาสโตซีสพบค่าเฉลี่ยสูงในทุกกลุ่มของตัวอ่อนที่ผ่านการแช่แข็งมากกว่าในกลุ่มตัวอ่อนสด ($P<0.05$)

จากการศึกษาดังกล่าวข้างต้นสรุปได้ว่า สามารถพัฒนาการแช่แข็งตัวอ่อนที่ผ่านการตัดแบ่งเซลล์ด้วยอุปกรณ์ 0.25 mL straw ซึ่งช่วยลดการปนเปื้อน และสามารถเจือจางสารแช่แข็งในขั้นตอนเดียวหลังการทำละลายเพื่อการย้ายฝากตรงในภาคสนาม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ปีการศึกษา 2558 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

KANCHANA PUNYAWAI : IMPROVEMENT OF VITRIFICATION TECHNIQUE FOR ONE STEP DILUTION OF VITRIFIED BIOPSIED BOVINE IVF-DERIVED EMBRYOS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. RANGSUN PARNPAI, Ph.D., 97 PP.

IN VITRO PRODUCED BOVINE BLASTOCYSTS/MICRO VOLUME AIR COOLING/CRYOTOP/0.25 ML STRAW

Vitrification of *in vitro* produced bovine (IVP) blastoycsts is necessary to develop for sanitary and one-step dilution after warming to improve the economic value of IVP bovine embryos. In the first study, to evaluate the efficiency of the micro volume air cooling (MVAC) system, IVM-oocytes and IVP bovine blastocysts were vitrified using the MVAC device without direct contact with liquid nitrogen (LN_2; MVAC group) and directly plunged into LN_2 (MVAC in LN_2 group) as similar to the Cryotop method (without direct contact with LN_2). After warming, vitrified oocytes were fertilized and cultured *in vitro*. Between the three vitrified groups, there were no significant differences in cleavage and blastocyst formation rates, ranging from 53.1% to 56.6% and 20.0% to 25.5%, respectively. In vitrified IVP bovine blastocysts, the rate of development of vitrified-warmed blastocysts changed into the hatched blastocyst stage after 72 h of culturing; there was no significant diffence between the groups.

In the second study, to improve the *in vitro* survival rates of vitrified IVP bovine blastocysts using the 0.25 mL straw method with the optimum combined factors when compared with the standard Cryotop. The result suggested that the sucrose concentrations and the methods of immersion of 0.25 mL straw into the LN_2 did not

affect the *in vitro* survival of vitrified IVP bovine blastocyst with 0.25 mL straw method. Moreover, the vitrification solution which was composed of the mixtures of cryoprotectants (CPAs) between EG-DMSO (VS1) and EG-Gly (VS2) showed equal efficiency for both mixtures of CPAs used for vitrifying IVP bovine blastocysts using 0.25 mL straws. However, the *in vitro* survival rates of the Cryotop were higher than those of vitrification using the 0.25 mL straw method.

In the third study, to evaluate the effects of biopsying with microblade prior to vitrification using the Cryotop or 0.25 mL straw methods on their *in vitro* survival rates after vitrification-warming. IVP bovine blastocysts were subjected to biopsy with microblade and were not subjected to biopsy before vitrified using the Cryotop or 0.25 mL straw methods. *In vitro* survival rates of non biopsied groups were not different when vitrified using the Cryotop, 0.25 mL straw, and fresh control groups. In the biopsy-derived blastocyst groups, the difference in *in vitro* survival rates after vitrification-warming using the Cryotop and fresh control groups were not found. Moreover, they were higher than the rates of vitrification of biopsied-derived blastocysts using 0.25 mL straw. In addition, the numbers of apoptotic cells per blastocyst were higher in all vitrified groups derived from biopsied and non-biopsied blastocysts than those of fresh control groups ($P<0.05$).

In conclusion, this study can develop the 0.25 mL straw device for sanitary vitrification, which enables one step dilution after warming for the direct transfer of biopsied IVP bovine embryos on farm.

School of Biotechnology Student's Signature_____

Academic Year 2015 Advisor's Signature_____