ธีศิษฏ์ จ๋วนพานิช : ผลของแท่งเจลและน้ำยาแช่แข็งต่ออัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคแยกบลาสโตเมียร์ (EFFECT OF GEL EMBEDDED MATERIALS AND VITRIFICATION SOLUTIONS ON DEVELOPMENTAL COMPETENCE OF BOVINE SEPARATED BLASTOMERE) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย, 119 หน้า.

การแยกบลาสโตเมียร์จากตัวอ่อนโคระยะ 2 เซลล์ และ 8 เซลล์สามารถช่วยเพิ่มจำนวนตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์เพื่อนำไปใช้ในการย้ายฝากตัวอ่อน อย่างไรก็ตาม การเลี้ยงตัวอ่อนแยกบลาสโตเมียร์ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนส่งผลให้การเจริญเติบโตของตัวอ่อนแยกบลาสโตเมียร์ลดลง การทดลองที่ 1 มีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาระบบการเลี้ยงบลาสโตเมียร์ที่แยกจากตัวอ่อนโค การทดลองที่ 1.1 นำตัวอ่อนโคระยะไซโกตที่ผลิตโดยใช้ไข่จากโรงฆ่าสัตว์ปฏิสนธิในหลอดทดลอง จากนั้นนำไปเลี้ยงในแท่งเจล 1% agarose และแท่งเจล 1% calcium alginate และจานเลี้ยง Well of Well (WOW) จากการทดลองพบว่าตัวอ่อนระยะไซโกตที่นำไปฝังในแท่งเจล 1% agarose และ 1% calcium alginate สามารถเจริญเติบโตเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ (44% และ 49% ตามลำดับ) ซึ่งไม่แตกต่างกับตัวอ่อนที่เลี้ยงในหยดน้ำยาเลี้ยงปกติ (48%) การทดลองที่ 1.2 นำตัวอ่อนที่แยกและไม่แยกบลาสโตเมียร์จากตัวอ่อนที่ผลิตโดยใช้ไข่จากโรงฆ่าสัตว์ปฏิสนธิในหลอดทดลอง ระยะ 2 เซลล์ และ 8 เซลล์ ไปเลี้ยงในแท่งเจล 1% calcium alginate และจานเลี้ยง WOW สำหรับตัวอ่อนกลุ่มที่ไม่แยกบลาสโตเมียร์ ตัวอ่อนระยะ8 เซลล์ที่เลี้ยงในจานเลี้ยง WOW มีอัตราการเจริญเติบโตถึงระยะบลาสโตซิสต์สูงกว่า ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ที่เลี้ยงในแท่งเจล 1% calcium alginate อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (68% และ 46% ตามลำดับ) แต่ไม่ต่างกับกลุ่มอื่นๆ สำหรับกลุ่มแยกบลาสโตเมียร์ จากตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ มีอัตราการเจริญเติบโตถึงระยะบลาสโตซิสต์ไม่แตกต่างกันทั้งกลุ่มที่เลี้ยงในจานเลี้ยง WOW และในแท่งเจล 1% calcium alginate (115% และ 111.7% ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามบลาสโตเมียร์ที่แยกจากตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ กลุ่มที่เลี้ยงในจานเลี้ยง WOW มีอัตราเจริญเติบโตถึงระยะบลาสโตซิสต์สูงกว่าตัวอ่อนที่ฝังในแท่งเจล 1% calcium alginate (125.6% และ 88.3% ตามลำดับ) และมีอัตราการเจริญสูงกว่าบลาสโตเมียร์ที่แยกจากตัวอ่อนในกลุ่มอื่นๆ การทดลองที่ 1.3 นำตัวอ่อนที่แยกและไม่ได้แยกบลาสโตเมียร์จากตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ที่ผลิตโดยใช้ไข่ที่เก็บด้วยวิธี OPU ปฏิสนธิในหลอดทดลอง นำไปเลี้ยงในจานเลี้ยง WOW พบว่าอัตราการเจริญเติบโตถึงระยะบลาสโตซีสต์ในกลุ่มบลาสโตเมียร์ที่แยกจากตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์สูงกว่าตัวอ่อนที่ไม่ได้แยกบลาสโตเมียร์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (81.8% และ 24.4% ตามลำดับ) แต่พบว่าจำนวนเซลล์ของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้จากการแยกบลาสโตเมียร์ มี

จำนวนน้อยกว่ากลุ่มของตัวอ่อนปกติ สรุปได้ว่าการเลี้ยงใน WOW มีความเหมาะสมสำหรับเลี้ยงบลาสโตเมียร์ที่แยกจากตัวอ่อน เนื่องจากความสามารถในการเจริญเติบโตถึงระยะบลาสโตซิสต์

การทดลองที่ 2 มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาอัตรารอดและอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนและ
การทดลองที่ 2 มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาอัตรารอดและอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนและ
บลาสโตเมียร์ที่แยกมาจากตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ และระยะ 8 เซลล์ ที่ผลิตโดยใช้ไข่จากโรงฆ่าสัตว์ปฏิสนธิในหลอดทดลองหลังผ่านการกระบวนการแช่แข็งด้วยวิธี Cryotop vitrification การทดลองที่ 2.1 เปรียบเทียบน้ำยาแช่แข็ง 2 สูตรในการแช่แข็งตัวอ่อนโครยะบลาสโตซีสต์ โดยน้ำยาแช่แข็งสูตรที่ 1 ประกอบด้วย Ethylene glycol (EG) + Propylene glycol (PG) และน้ำยาแช่แข็งสูตรที่ 2 ประกอบด้วย EG เพียงอย่างเดียว จากการทดลองพบว่าอัตรารอดหลังทำละลายของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต์ในกลุ่ม EG+PG (88.4%) สูงกว่ากลุ่ม EG (76.9%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การทดลองที่ 2.2 เปรียบเทียบน้ำยาแช่แข็ง 2 สูตรที่ใช้ในการทดลอง 2.1 ในการแช่แข็งตัวอ่อนโครยะ 2 เซลล์ และ 8 เซลล์ จากการทดลองพบว่ากลุ่มที่ใช้น้ำยา EG+PG หลังจากทำลายตัวอ่อนแช่แข็งระยะ 2 เซลล์ และ 8 เซลล์ ตัวอ่อนเจริญเติบโตต่อถึงระยะบลาสโตซีสต์ (0%, 0.5%) ซึ่งต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ใช้น้ำยา EG (34%, 42%) ตามลำดับ การทดลองที่ 2.3 ทำการแช่แข็งบลาสโตเมียร์ที่แยกมาจากตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ และระยะ 8 เซลล์โดยใช้น้ำยาสูตร EG พบว่าอัตราการเจริญต่อถึงระยะบลาสโตซีสต์ของบลาสโตเมียร์แช่แข็ง (21%, 18%) ต่ำกว่ากลุ่มบลาสโตเมียร์ที่ไม่ได้แช่แข็ง (44%, 50%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการทดลองทั้งหมดสรุปได้ว่าเทคนิคการแยกบลาสโตเมียร์สามารถเพิ่มจำนวนตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต์ได้ นอกจากนั้นบลาสโตเมียร์ที่แยกมาจากตัวอ่อนโครยะ 2 เซลล์ และระยะ 8 เซลล์ สามารถเจริญเติบโตในแท่งเจล 1% calcium alginate และสามารถนำไปแช่แข็งในน้ำยาแช่แข็งสูตร EG ได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ปีการศึกษา 2559 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

THEESIT JUANPANICH : EFFECT OF GEL EMBEDDED MATERIALS AND VITRIFICATION SOLUTIONS ON DEVELOPMENTAL COMPETENCE OF BOVINE SEPARATED BLASTOMERE.
THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. RANGSUN PARNPAI, Ph.D., 119 PP.

BOVINE/SEPARATED BLASTOMERE/EMBEDDED EMBRYO/VITRIFICATION

Blastomere separation from 2-cell and 8-cell stages bovine embryos would be useful for increasing the number of embryos available for embryo transfer program. However, the small numbers of separated blastomere cultured in medium give rise to low developmental competence of embryo. The aim of experiment 1 was to develop culture system of blastomere separated from bovine embryos. In experiment 1.1, bovine zygotes derived from slaughterhouse oocytes fertilized *in vitro* were cultured in 1% agarose gel and 1% calcium alginate compared in Well of Well (WOW) culture system. The results showed that the zygotes embedded in 1% agarose and 1% calcium alginate gel could develop to blastocyst stage (44% and 49%) with no different from control (48%). In experiment 1.2, the intact and separated blastomere of slaughterhouse oocytes fertilized *in vitro* embryo at 2-cell and 8-cell stages were cultured 1% calcium alginate and WOW. In the case of intact embryo, the 8-cell stage embryo cultured in WOW showed significantly higher blastocyst rate (68%) than intact embryos at 2-cell stage embedded in 1% calcium alginate (46%) but was not different from the other groups. In separated blastomere from embryo at 8-cell stage, culturing the quadruple blastomere in 1% calcium alginate and WOW showed no different embryo development to blastocyst stage (111.7% and 115%). However, the blastocyst rate of blastomere separated from 2-cell cultured in WOW was higher than 1% calcium alginate group (125.6% and 88.3%) and was higher than the other separated blastomere groups. In experiment 1.3, intact and separated blastomere from

2-cell stage embryos derived from OPU-oocytes fertilized *in vitro* were cultured in WOW. The blastocyst rate of separated blastomere from 2-cell stage embryos culturing in WOW was significantly higher than intact 2-cell stage embryos (81.8% and 24.4%); however, the total numbers of cell in separated-derived blastocyst was lower than the intact-derived blastocyst.

The second experiment aimed to investigate the survival and *in vitro* developmental competence among intact and separated blastomere of 2 and 8-cell stages bovine embryos derived from slaughterhouse oocytes fertilized *in vitro* after freezing by using Cryotop vitrification method. In experiment 2.1, two different equilibration and vitrification solutions were used for cryopreservation of bovine expanded blastocysts. The first solution containing ethylene glycol (EG) + propylene glycol (PG) and the second solution containing only EG. The survival rate of vitrified-warmed expanded blastocysts using EG+PG (88.4%) was significantly higher than the EG group (76.9%). In experiment 2.2, the two vitrification solutions were used for cryopreservation of 2-cell and 8-cell stages bovine embryos. The results showed that in the EG+PG group, vitrified-warmed 2-cell and 8-cell embryos did not developed to blastocyst stage (0% and 0.5%, respectively) which were significantly lower than of the EG group (34% and 42%, respectively). In experiment 2.3, separated blastomeres from 2-cell and 8-cell stage embryos were vitrified-warmed by using EG-based solution. The blastocyst formation rates of vitrified-warmed separated blastomeres from 2-cell and 8-cell stage embryos (21% and 18%, respectively) were significantly lower than the fresh separated blastomeres (44% and 50%, respectively).

In conclusion, separated blastomere from 2-cell and 8-cell embryos embedded in 1% calcium alginate can develop to blastocyst stage. Furthermore, separated blastomere could be vitrified-warmed by using EG-based vitrification solution.

School of Biotechnology Student's Signature_____

Academic Year 2016 Advisor's Signature _____