บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มอัตราการเจริญของไข่อ่อนโคในหลอดแก้วตลอดจนเพิ่มอัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีส รวมถึงสามารถพัฒนาวิธีการเลี้ยงตัวอ่อนเพื่อให้ได้ปริมาณและคุณภาพที่ดี จะสามารถนำไปใช้ในการผลิตตัวอ่อนโคในหลอดทดลองและย้ายฝากตัวอ่อนให้โคตัวรับ เพื่อเพิ่มจำนวนโคที่มีพันธุกรรมดีเยี่ยมในอนาคตต่อไป

การทดลองที่ 1 ทำการทดลองเลี้ยงไข่อ่อนโคให้สุกในหลอดแก้วด้วยน้ำยาเลี้ยงไข่อ่อนที่เติม EGF, cysteamine และเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียว เพื่อศึกษาผลต่ออัตราการปฏิสนธิและการเจริญของตัวอ่อนโค พบว่าอัตราการปฏิสนธิ (61.36% - 78.72%) อัตรา polyspermy (2.27% - 18.86%) และ อัตรา normal fertilization (50.9% - 70.21%) ของไข่โคที่ผ่านการเลี้ยงให้สุกด้วยน้ำยาเลี้ยงไข่อ่อนสูตรต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในแต่ละกลุ่มน้ำยาและเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ((-)Cys; (-)EGF; 74.07%, 9.25% และ 64.81% ตามลำดับ) และภายหลังเลี้ยงตัวอ่อนหลังปฏิสนธิในหลอดแก้วต่อไป พบว่าอัตราการเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะมอรูลาและบลาสโตซีส ในกลุ่มไข่โคที่เลี้ยงในน้ำยาที่เติม cysteamine ((+)Cys; 48.38% และ 47.82%) และน้ำยาที่เติม cysteamine (%) และที่มีเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียว ((+)Cys; (+)COCs; 36.55% และ 36.95) ให้ผลที่สูงกว่ากลุ่มน้ำยาสูตรอื่น (35.86% - 36.90% และ 21.27% - 22.22%) และกลุ่มควบคุม (37.38% และ 24.29%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

การทดลองที่ 2 ทำการทดลองเลี้ยงตัวอ่อนโคในหลอดแก้วในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนและระบบการเลี้ยงที่แตกต่างกัน พบว่า อัตราการเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะคลีเวจ และ 8 เซลล์ ไม่มีความแตกกันทางสถิติ ในแต่ละกลุ่มน้ำยาและระบบการเลี้ยง (74.44% – 84.44% และ 66.66% - 72.22%) และกลุ่มควบคุม (mSOFaa (5% O_2 8 วัน); 76.67% และ 65.55% ตามลำดับ) อย่างไรก็ตาม อัตราการเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะมอรูลาและบลาสโตซีส ในกลุ่มน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน mSOFaa+CCs (56.66% และ 45.55%) และ CR1aa-SOFaa+CCs (57.77% และ 44.44%) ให้ผลสูงกว่ากลุ่มน้ำยาอื่น (41.11& - 57.77% และ 33.33% - 45.55%) และกลุ่มควบคุม (38.88%-32.22%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และจำนวน Trophectoderm (TE) และ Inner Cell Mass (ICM) ในบลาสโตซีส พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ทั้งในกลุ่มสูตรน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนและระบบการเลี้ยงรวมทั้งกลุ่มควบคุม

การทดลองนี้สรุปได้ว่า การเลี้ยงไข่อ่อนโคในน้ำยาเลี้ยงไข่สุกที่เติม cysteamine และมีเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียวมีผลส่งเสริมการเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสภายหลังการปฏิสนธิในหลอดแก้ว และการเลี้ยงตัวอ่อนโคในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนที่มีเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียวมีผลต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะบลาสโตซีส โดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงตัวอ่อนหลังการปฏิสนธิในน้ำยา mSOFaa หรือ CR1aa ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 เป็นเวลา 2 วัน แล้วย้ายตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ไปเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa กับเซลล์คิวมูลัสชั้นเดียว ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เป็นเวลา 6 วัน ซึ่งให้ผลของเจริญของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสสูงสุด

Abstract

This research aimed to improving the maturation rate of immature bovine oocytes for *in vitro* fertilization (IVF) and embryo developmental rate into blastocyst stage as well as improving of culture system for increase the number and quality of embryos that can apply to *in vitro* embryo production and embryo transfer technuque for increase the good genetic cattle.

In experiment 1, bovine oocytes were cultured in different *in vitro* maturation (IVM) medium which were supplemented with epidermal growth factor (EGF), cysteamine (Cys) and cumulus cell monolayers (CCs). The fertilization rate and embryo developmental rate were evaluated after IVF. The results showed that the fertilization rate, polyspermy rate and normal fertilization rate were not significantly different within treatment groups (61.36% - 78.72%, 2.27% - 18.86% and 50.9% - 70.21%) and compared to control group ((-)Cys; (-)EGF; 74.07%, 9.25% and 64.81). The embryo developmental rate into morula and blastocyst stages of oocytes which were cultured in IVM medium supplemented with cysteamine ((+)Cys); 48.38% and 47.82%) and cysteamine with CCs ((+)Cys; (+)COCs; 36.55% and 36.95%, respectively) showed significantly higher ($P<0.05$) than those in other treatment groups (35.86% - 36.90% and 21.27% - 22.22%) and compared to control group (37.38% and 24.29%)

In experiment 2, bovine embryos after IVF were cultured in different embryo cultured medium including mSOFaa and CR1aa with/without cumulus cell monolayers. The results showed that the cleavage and 8-C rates were not significantly different within treatment groups (74.44% – 84.44% and 66.66% - 72.22%) and compared to control group (76.67% and 65.55%). However, the developmental rate into morula and blastocyst of embryos which were cultured in mSOFaa with CCs (mSOFaa+CCs; 56.66% and 45.55%) and CR1aa at early stage and then moved to SOFaa with CCs (CR1aa-mSOFaa+CCs 57.77% and 44.44%) showed significantly higher ($P<0.05$) than those in other treatment groups (41.11& - 57.77% and 33.33% - 45.55%) and compared to control group (38.88% – 32.22%). The number of TE and ICM cells in blastocysts were not significantly different among treatment and control groups.

This experiment can be concluded that IVM medium supplemented with cysteamine with cumulus cell monolayers has the adventages to improve the embryo developmental rate of oocytes into blastocyst stage after fertilization. Morover, *in vitro* culture of embryos

in medium supplemented with CCs can improve the developmental rate of embryo into blastocysts. Especially, when embryos were cultured in mSOFaa or CR1aa medium under humidified atmosphere of 5% O_2 for 2 days and then 8-cell embryo were seleted to continuous cultured in mSOFaa with CCs for 6 days which were gave a highest blastocyst rate in this study.