



7 NOV 1996

**ULTRASTRUCTURAL CHANGES AFTER CRYOPRESERVATION OF
IN VITRO MATURED BOVINE OOCYTES TREATED
WITH DIFFERENT PROCEDURES**

AMNART CHAICHUN

อภินันท์ชาชื่น

จ.ก.

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(ANATOMY)**

**IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

1996

TH
ANAT
1996

37443

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาการเปลี่ยนแปลงหลังการแช่แข็ง ด้วยวิธีการที่แตกต่างกันต่อเซลล์ไข่ของโคที่เพาะเลี้ยงให้สุกในงานแก้ว
ผู้วิจัย	อำนาจ ไชยสุน
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	กนก ภาวสุทธิไพศิฐ M.D.,Ph.D. กฤษณ์ มงคลปัญญา Ph.D. ยินดี กิตยานันท์ D.V.M.,M.So.
วันที่สำเร็จการศึกษา	2 สิงหาคม พ.ศ. 2539

บทคัดย่อ

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของเซลล์ไข่โคภายหลังการแช่แข็ง โดยการนำเซลล์ไข่อ่อนเพาะเลี้ยงให้สุกในงานแก้วด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ (TCM-199) และ 10% ซีรัมของลูกวัว (HTFCS) จากนั้นนำเซลล์ไข่มาทดสอบต่อน้ำยาป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง 2 ชนิด (ethylene glycol และ vitrification solution) และวิธีการแช่แข็ง 2 วิธี ซึ่งได้แก่ใช้เครื่องแช่แข็ง (conventional freezer) และไม่ใช่เครื่องแช่แข็ง (vitrification procedure) จากนั้นนำเซลล์ไข่สุกทุกกลุ่มมาแช่ใน 2.5% glutaraldehyde ใน cacodylate บัฟเฟอร์ pH 7.4 และศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านทะลุ จากการศึกษาพบว่า ลักษณะเซลล์ไข่ปกติมีเซลล์หุ้มไข่ (cumulus cell) กระจายล้อมรอบเซลล์ไข่ บริเวณใต้เยื่อหุ้มเซลล์พบคอร์ติคัลแกรนูลเรียงตัวอยู่เป็นแนวยาว ที่บริเวณรอบนอกของเซลล์ไข่ปรากฏกลุ่มไมโทคอนเดรียและช่องว่าง (vesicle) กระจายอยู่ทั่วไป เซลล์ไข่ที่ถูกแช่แข็งด้วยน้ำยา ethylene glycol พบว่าไซโตพลาสซึมและเมทริกซ์ ของไมโทคอนเดรียมีลักษณะไม่เรียบ ช่องว่างและไมโทคอนเดรียมีรูปร่างบิดเบี้ยวไปจากเดิม ในตัวเซลล์หุ้มไข่พบช่องว่างเกิดขึ้นโดยทั่วไปหลังจากดิงน้ำยา ethylene glycol ออกจากเซลล์ไข่ด้วยน้ำตาลซูโครสพบว่าไซโตพลาสซึมและเมทริกซ์มีลักษณะไม่เรียบ ไมโทคอนเดรียมีรูปร่างบิดเบี้ยว แต่ยังพบคริสตี นอกจากนี้ยังพบช่องว่างขนาดใหญ่เกิดขึ้นภายในเซลล์ไข่ เซลล์หุ้มไข่พบช่องว่างเกิดขึ้นในตัวเซลล์และส่วนปลายสุดเกิดการฉีกขาด หลังจากการแช่แข็งโดยวิธีใช้เครื่องและการละลายในน้ำอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เซลล์ไข่มีการฉีกขาดที่เยื่อหุ้มเซลล์และมีการลดจำนวนของไมโครวิลไล ในบริเวณเดียวกันพบการหลังของคอร์ติคัลแกรนูลเข้าสู่

perivitelline space ไม่พบคริสตีในเมทริกซ์ของไมโตคอนเดรีย ช่องว่างภายในเซลล์กระจัดกระจายทั่วไป แต่ไม่เกิดการรวมตัวกันและไซโตพลาสซึมมีลักษณะหยาบ เซลล์หุ้มไข่ปรากฏช่องว่างทั่วเซลล์ และส่วนปลายที่ยื่นออกมามีการฉีกขาดเซลล์ไข่ที่ผ่านการแช่น้ำยา vitrification พบว่ามีการลดขนาดของเซลล์จนเห็น perivitelline space ชัดเจน ไมโตคอนเดรียและช่องว่างมีการรวมกลุ่มกันอย่างหนาแน่น ลักษณะของไซโตพลาสซึมและเมทริกซ์เข้มข้นกว่าปกติ บางส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์มีการฉีกขาด และพบการหลั่งของคอร์ติคัลแกรนูลในบริเวณนั้นๆ เซลล์หุ้มไข่ปรากฏช่องว่างทั่วเซลล์และมีการฉีกขาดของส่วนปลายสุดที่ยื่นจากตัวเซลล์ หลังจากการละลายน้ำยา vitrification ออกจากเซลล์ไข่พบว่าไมโตคอนเดรียมีรูปร่างปกติ และเห็นคริสตีเด่นชัด เมทริกซ์และไซโตพลาสซึมมีลักษณะเรียบ เยื่อหุ้มเซลล์และไมโครวิลไลมีลักษณะปกติ เซลล์หุ้มไข่ปรากฏช่องว่างภายในตัวเซลล์โดยทั่วไป และมีการฉีกขาดของส่วนปลายสุดที่ยื่นออกจากตัวเซลล์ หลังจากการแช่แข็งด้วยวิธีไม่ใช้เครื่องและละลายในน้ำ 20 องศาเซลเซียส เซลล์ไข่ยังมีไมโครวิลไลปรากฏอยู่ไมโตคอนเดรียรูปร่างปกติ และมีคริสตีเห็นเด่นชัด ช่องว่างไม่มีขนาดใหญ่ขึ้น อย่างไรก็ตามพบว่าการเปลี่ยนแปลงของเซลล์หุ้มไข่ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

จากการศึกษาสรุปได้ว่า เซลล์ไข่ที่ผ่านการแช่แข็งแบบไม่ใช้เครื่องมีการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างน้อยกว่าเซลล์ไข่ที่แช่แข็งแบบใช้เครื่อง แต่อย่างไรก็ตามเซลล์หุ้มไข่มีการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างในทุกกรณี

Thesis Title Ultrastructural Changes After Cryopreservation of In Vitro
Matured Bovine Oocytes Treated With Different Procedures

Name Amnart Chaichun

Degree Master of Science (Anatomy)

Thesis Supervisory Committee

Kanok Pavasuthipaisit M.D.,Ph.D.

Krit Mongkonpunya Ph.D.

Yindee Kitiyanant D.V.M.,M.Sc.

Date of Graduation 2 August B.E. 2539 (1996)

ABSTRACT

The precise nature of damages upon the oocytes caused by freezing and thawing process is mostly unknown. Therefore, the propose of this study is to investigate the possible subcellular damage in the bovine oocytes inflicted by the cryopreservation. The oocytes recovered from abattoir-derived ovaries were *in vitro* matured (IVM) in TCM-199 for 24 hr and randomly frozen in two different techniques : conventional freezing (CFP) and vitrification procedures (VP) that were very commonly used to freeze the embryos. The oocytes were exposed to cryoprotectants (CPAs) to test their toxicity before freezing. The CPAs and their concentrations used in CFP and VP were 2.0 M ethylene glycol (EG) and 40% glycerol + EG in 0.375 M sugar (VS3), repectively.

The IVM oocytes exposed to 2.0 M EG revealed the nonhomogeneity of matrix and cytoplasm with distorted vesicles and mitochondrias. After 2.0 M EG

was removed by 0.5 M sucrose, the large vesicles at the peripheral region were evident. Inversely, IVM oocytes exposed to vitrification solution (VS) demonstrated the reduction in size as determined by visible perivitelline space. In addition, mitochondrias and vesicles remained their round shape. After VS removal, the IVM oocytes showed vesicles scattered at peripheral region but no vesicle accumulate as those exposed to and removed of 2.0 M EG. The IVM oocytes frozen-thawed by CFP revealed the reduction of microvilli and lossing of mitochondrial cristae whereas vitrified oocytes were well preserved. Our result indicated that the integrity of organelle or structure was better preserved in vitrified oocytes than those in conventional freezing procedure.