LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

3 1 AUG 1992

THE VIABILITY TESTING OF FROZEN-THAWED BOVINE EMBRYO PRODUCED IN VITRO

CHAINARONG TOCHARUS

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

อภินันทนาการ
จาก
ภาควิชากายวิภาคศาสตร์

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1992

Copyright by Mahidol University

19323

ชื่อวิทยานิพนธ์ การทดสอบการอยู่รอดของตัวอ่อนโคหลอดแก้วแช่แข็ง

ผู้วิจัย ชัยณรงค์ โตจรัส

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ กนก ภาวสุทธิไพศิฐ M.D.,Ph.D.
ประเสริฐ โสภน Ph.D.
สุขุมาล จงธรรมคุณ Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 21 พฤษภาคม พ.ศ. 2535

บทคัดย่อ

การศึกษาความอยู่รอดของตัวอ่อนโคที่ผลิตจากหลอดทดลอง หลังจากการเก็บตัวอ่อนแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว โดยตัวอ่อนที่ได้นี้ได้ผ่านขั้นตอนการนำเซลล์ไข่ของโคมาเพาะเลี้ยง จนกระทั่งเจริญเป็นไข่สุกในน้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อน (TCM-199) และปฏิสนธิกับเซลล์อสุจิโดย ทำให้เซลล์อสุจิพร้อมผสมกับเซลล์ไข่ และมีสารเฮฟปารินในน้ำยาเพาะเลี้ยง (TALP-glucose free) ตัวอ่อนได้พัฒนาและแบ่งเซลล์หลังจากการปฏิสนธิ โดยการเพาะเลี้ยงกับเซลล์บุท่อนำไข่โคในหลอดทดลอง โดยใช้น้ำยาเพาะเลี้ยง (TCM-199 + 10% HTFCS) หลังจากตัวอ่อนได้แบ่งตัวจนถึงระยะมอรูลาหนาแน่น, บลาสโตซีสระยะต้นและบลาสโตซีส ซึ่งเป็นระยที่จะถ่ายฝากให้กับแม่โคตัวรับได้ ได้ทดสอบการอยู่รอดของตัวอ่อนภายหลังการแช่แข็ง การแช่แข็งตัวอ่อนกระทำโดย ผ่านน้ำยาแช่แข็งขั้นตอนเดียว (1.5 M กลีเซอรอล 10 นาที) ก่อนทำการแช่แข็ง การละลายตัวอ่อนหลังจากการแช่แข็ง ใช้น้ำยาซูโครสที่มีความเข้มข้น 0.5 M นาน 10 นาที ขั้นตอนเดียวเช่นกัน ได้ทดสอบอัตราการอยู่รอดของตัวอ่อน 2 วิธี คือ การนำไปย้ายฝากให้กับแม่โคตัวรับ โดยวิธีไม่ผ่าตัด และการอยู่รอดของตัวอ่อนโดยการเพาะเลี้ยงในตู้อบต่อไป การทดสอบความอยู่รอดของตัวอ่อน พบว่า วิธีการแช่แข็งและการทำละลายแบบขั้นตอนเดียวดีกว่า การใช้วิธีโดยผ่านน้ำยาแช่แข็งตัวอ่อน

Copyright by Mahidol University

หลายขั้นตอน (0.75 M กลีเซลรอล และ 0.3 M ซูโครส; 0.375 M กลีเซลรอลและ 0.3 M ซูโครส; 0.3 M ซูโครส) ซึ่งรายงานโดยนักวิจัยกลุ่มอื่น (50% ต่อ 35% ในระยะมอรูลาหนาแน่น; 75% ต่อ 41% ในระยะบลาสโตซีสระยะต้น; 33% ต่อ 33% ในระยะบลาสโตซีส) ผลการวิจัยพบว่า เซลล์ไข่ที่หุ้มด้วยเซลล์หุ้มไข่ ให้ผลการปฏิสนธิและการพัฒนาการแบ่งตัวของตัวอ่อน จนถึงระยะบลาสโตซีสสูงกว่าเซลล์ไข่ที่ไม่มีเซลล์หุ้มไข่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า ตัวอ่อนโคที่ผลิตในหลอดทดลองสามารถที่จะนำมาแช่แข็งเก็บรักษาไว้ได้ และอัตราการอยู่รอดของตัวอ่อนทดสอบโดยการย้ายฝากตัวอ่อนแบบไม่ผ่าตัดให้กับแม่โคตัวรับ โดยผ่านน้ำยาแช่แข็งตัวอ่อนแบบขั้นตอนเดียว ให้ผลดีกว่าการผ่านน้ำยาหลายขั้นตอนทั้งก่อนนำไปแช่แข็งและหลังจากผ่านการแช่แข็งแล้ว ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสระยะต้นเป็นระยะที่มีอัตราการอยู่รอดสูงที่สุด

Copyright by Mahidol University

Thesis Title The viability Testing of Frozen-Thawed Bovine Embryo Produced *In Vitro*

Name Chainarong Tocharus

Degree Master of Science (Anatomy)

Thesis Supervisory Committee

Kanok Pavasuthipaisit, M.D.,Ph.D.

Prasert Sobhon, Ph.D.

Sukumal Chongthammakun,Ph.D.

Date of Graduation 21 May B.E. 2535 (1992)

ABSTRACT

To investigate the viability and normality after freezing and thawing of bovine embryos produced *in vitro*, we have accomplished the procedures to mature oocytes (in TCM-199 medium) and fertilize *in vitro* with heparin treated sperm (in TALP-glucose free medium).The oviductal epithelial cells were co-cultured *in vitro* (in TCM-199 + 10% HTFCS) and were capable of supporting normal growth of embryos to the stages at which non-surgical embryo transfer could be performed (compact morula,early blastocyst and blastocyst). Oocytes with intact cumulus cells showed higher ($P<0.01$) fertilization rate and higher ($P<0.01$) percent of embryonic development than those without the cumulus cells. Single step in freezing (1.5 M glycerol for 10 min) and thawing (0.5 M sucrose for 10 min) was employed and the survival rate of embryos tested by non-surgical transferring to recipients was highest in early blastocyst and was superior to the conventional multiple step dilution procedure (0.75 M glycerol and 0.3 M sucrose; 0.375 M glycerol and 0.3 M sucrose; and 0.3 M sucrose) reported by other investigators (50% VS 35% in compact morula; 75% VS 41% in early blastocyst; 33% VS 33% in blastocyst). *In vitro* testing, the competency of embryonic development to an advanced stage was higher in blastocyst than those from compact morula or early blastocyst.

The result indicated that bovine embryos produced *in vitro* could be frozen and thawed similar to those obtained from *in vivo* procedures. The survival rate tested by non-surgical transferring to recipients was better by using single step in freezing and thawing, and the early blastocysts were the best survivors.

Copyright © Chulalongkorn University