Thesis Title Cryopreservation of Mature Mouse Oocytes by Closed-system Solid Surface Vitrification Technique and Slow Freezing Technique

Author Miss Petdao Petchuay

Degree Master of Science (Physiology)

Thesis Advisory Committee

Asst. Prof. Dr. Pornpimon Tangchaisin Chairperson

Assoc. Prof. Teraporn Vutyavanich, M.D. Member

Asst. Prof. Dr. Apisate Pleumsamran, M.D. Member

ABSTRACT

Oocyte cryopreservation has several benefits including the breeding and maintaining of animals or using in the laboratory. It could be a valuable tool in human assisted reproductive technologies. The traditional method to cryopreserve oocytes is slow freezing which has several disadvantages. A vitrification has been developed to replace slow freezing technique. The method of Closed-system solid surface vitrification (Closed-system SSV) has been done successfully in embryo cryopreservation, but, not yet in oocyte. Therefore, the goal of this study was to investigate the effect of cryopreservation by closed-system solid surface vitrification and slow freezing in mature mouse oocytes on their survival rate, fertilizing ability and development.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Mature oocytes were collected from the uterine tube of 6-to 8-week-old female ICR mice, incubated 1 hour at 37^{o}C in 6% CO_2 in air. They were randomly divided into 3 groups for cryopreservation as: control, slow freezing and Closed-system SSV After warming, cryopreserved oocytes were immediately assessed for their survival. The survival rate of vitrified oocytes was significantly ($P<0.05$) higher than that of the slow-frozen oocytes (95.51% and 58.33%). To test the fertilizating ability and developmental potential of cryopreserved oocytes, all oocytes were fertilized with sperm collected from epididymides of mature male mice of the same strain, and incubated at 37^{o}C in 6% CO_2 in air for 4 hours. There was no significant difference in fertilization rate between control and vitrified oocytes (92.73%, 87.06 %), but it was significantly ($P<0.05$) lower in slow-frozen oocytes (61.22%). Rates of embryo development to 2-cell (91.82%, 53.06% and 76.47%), 4-cell (87.27%, 40.81% and 65.88%), 8-16-cell (81.82%, 30.61% and 55.29%), morula (71.82%, 24.49% and 49.41%) and blastocyst stage (60.00%, 18.37% and 42.35%) at 24, 48, 72, 96 and 120 hours post insemination, respectively, were significantly different ($P<0.05$) among those three groups (control, slow freezing and Closed-system SSV).

This study showed that cryopreserved mature mouse oocytes by closed-system solid surface vitrification had higher rates of survival, fertilization and development than slow-frozen oocytes. The Closed-system SSV is very simple, the materials and the instruments are inexpensive. The method is very effective, eliminates or greatly reduces the chance of contamination. This method deserves further detailed study before it can be adapted for use in human assisted conception laboratory and animal breeding programs.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การแช่แข็งเซลล์ไข่หนูถีบจักรที่เจริญเต็มที่ โดยวิธีการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วด้วยความเร็วยิ่งยวดบนพื้นผิวโลหะระบบปิด และวิธีการแช่แข็งแบบช้า

ผู้เขียน นางสาวเพชรดาว เพชรช่วย

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สรีรวิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ. ดร. พรภิมล ตั้งชัยสิน	ประธานกรรมการ
รศ. นพ. ธีระพร วุฒเยวนิช	กรรมการ
ผศ. ดร.นพ. อภิเศรษฐ ปลื้มสำราญ	กรรมการ

บทคัดย่อ

การแช่แข็งเซลล์ไข่ที่สุกเต็มที่มีความสำคัญหลายประการ ทั้งในด้านการผสมพันธุ์และการสงวนพันธุ์สัตว์ชนิดต่างๆ หรือเพื่อประโยชน์ในงานทางด้านการศึกษาวิจัย อีกทั้งยังมีความสำคัญในด้านเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ในคน วิธีการแช่แข็งที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการแช่แข็งเซลล์ไข่ คือวิธีการแช่แข็งแบบช้า ซึ่งพบว่ามีข้อเสียต่างๆมากมาย จึงได้มีการพัฒนาวิธีการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วขึ้นมา เพื่อใช้แทนวิธีการแช่แข็งแบบช้า วิธีการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วบนพื้นผิวโลหะด้วยความเร็วยิ่งยวดระบบปิด (Closed-system SSV) ได้ประสบความสำเร็จในการแช่แข็งตัวอ่อนแต่ยังไม่เคยมีการศึกษาในเซลล์ไข่มาก่อน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายเพื่อศึกษาผลของการแช่แข็งเซลล์ไข่หนูถีบจักรที่เจริญเต็มที่ โดยวิธีการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วด้วยความเร็วยิ่งยวดบนพื้นผิวโลหะระบบปิด และการแช่แข็งแบบช้า

เก็บเซลล์ไข่ที่สุกเต็มที่จากท่อนำไข่ของหนูถีบจักร เพศเมียสายพันธุ์ ICR อายุ 6-8 สัปดาห์ นำไปเพาะเลี้ยงไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 37^{o}C ใน 6% CO_2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งเซลล์ไข่แบบสุ่มออกเป็นสามกลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ทำการแช่แข็งแบบช้า และกลุ่มที่ทำการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วด้วยความเร็วยิ่งยวดบนพื้นผิวโลหะระบบปิด ภายหลังการทำละลาย นำเซลล์ไข่ที่ได้มาประเมินอัตราการรอดชีวิต พบว่าเซลล์ไข่ในกลุ่มที่แช่แข็งด้วยวิธีการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วด้วยความเร็วยิ่งยวดบนพื้นผิวโลหะระบบปิด มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่าเซลล์ไข่ที่แช่แข็งด้วยวิธีการแช่แข็งแบบช้าอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (95.51% และ 58.33 % ตามลำดับ)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เพื่อทดสอบความสามารถในการปฏิสนธิ และการเจริญพัฒนาเป็นตัวอ่อนของเซลล์ไข่ที่แช่แข็ง นำเซลล์ไข่จากแต่ละกลุ่มมาทำการปฏิสนธิกับเซลล์อสุจิซึ่งเก็บมาจากส่วน epididymides ของหนูเพศผู้สายพันธุ์เดียวกัน อายุ 12-24 สัปดาห์ และเพาะเลี้ยงไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 37^{o}C, 6% CO_2 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มแช่แข็งแบบเนื้อแก้วด้วยความเร็วยิ่งยวดบนพื้นผิวโลหะระบบปิด มีอัตราการปฏิสนธิที่ไม่แตกต่างกัน (92.73% และ 87.06 %) แต่มีอัตราการปฏิสนธิที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับการแช่แข็งแบบช้า ($P<0.05$) (61.22%) ตรวจสอบอัตราการเจริญเติบโตภายหลังปฏิสนธิที่ระยะเวลาต่างๆ พบว่ามีการเจริญพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะ 2-cell (91.82%, 53.06% และ 76.47%), 4-cell (87.27%, 40.81% และ 61.18%), 8-16-cell (81.82%, 30.61% และ 55.29%), morula (71.82%, 24.49% และ 49.41%) และ blastocyst (60%, 18.37% และ 42.35%) ที่เวลา 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง ภายหลังปฏิสนธิตามลำดับ มีอัตราการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ทั้งกลุ่มควบคุม, กลุ่มแช่แข็งแบบช้า และกลุ่มแช่แข็งแบบเนื้อแก้วด้วยความเร็วยิ่งยวดบนพื้นผิวโลหะระบบปิด

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า การแช่แข็งเซลล์ไข่ที่สุกเต็มที่ ด้วยวิธีการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วด้วยความเร็วยิ่งยวดบนพื้นผิวโลหะระบบปิด มีอัตราการรอดชีวิต การปฏิสนธิ และการเจริญเติบโตของตัวอ่อนที่สูงกว่าการแช่แข็งแบบช้า วิธีการแช่แข็งนี้สามารถทำได้ง่าย อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ราคาไม่แพง เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพและปราศจากหรือลดการปนเปื้อนติดเชื้อ วิธีการแช่แข็งนี้หากมีการทดลองเพิ่มเติม สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการแช่แข็งในเซลล์ไข่ของคนและการผสมพันธุ์สัตว์ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved