211510

รหัสโครงการ: MRG4980108

ชื่อโครงการ: ผลของการแช่แข็งต่อคุณภาพภายหลังการทำละลายของโอโอไซต์แมว

ชื่อนักวิจัย: **ธีรวัฒน์ ธาราศานิต**
ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
E-mail Address: Theerawat.t@chula.ac.th, Tharasanit@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ: กรกฎาคม พ.ศ. 2549 ถึง 30 กันยายน พ.ศ. 2551

โอโอไซต์แมวที่ผ่านการเจริญพร้อมปฏิสนธิภายนอกร่างกายเจริญเป็นตัวอ่อนได้น้อย ทำให้ประสิทธิภาพการผลิตตัวอ่อนของโอโอไซต์แช่แข็งอยู่ในเกณฑ์ต่ำ การศึกษาในครั้งนี้ทดสอบความสามารถของการใช้ ฟอลลิเคิล สติมูเลติ้ง ฮอร์โมน (rhFSH) ในขนาดต่างๆ ต่อการเจริญพร้อมปฏิสนธิ การกระจายตัวของเซลล์โครงร่าง อัตราการปฏิสนธิและการผลิตตัวอ่อนระยะบลาสโตซิส การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของการใช้ rhFSH ขนาดต่างๆ กัน ร่วมกับการใช้ฮอร์โมน แอล เอช และโกรท แฟคเตอร์ 2 ชนิด (epidermal growth factor และ insulin like growth factor-1) ส่วนในการทดลองที่ 2 นั้นศึกษาประสิทธิภาพการแช่แข็งโอโอไซต์ด้วยวิธีวิทริฟิเคชั่น (vitrification) จากนั้นนำโอโอไซต์มาเลี้ยงพร้อมปฏิสนธิ ปฏิสนธิและผลิตตัวอ่อนตามลำดับ

rhFSH กระตุ้นอัตราการเจริญพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์ได้สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่มี rhFSH (อัตราโอโอไซต์ระยะ MII: 67.9% vs 36.9%, $p<0.05$) เนื่องจาก rhFSH ในแต่ละขนาดให้ผลการเลี้ยงโอโอไซต์ไม่ต่างกัน การศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้ rhFSH ขนาด 0.1 IU/มล. เมื่อทำการตรวจการกระจายตัวของเซลล์โครงร่างในโอโอไซต์จะพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงควบคู่ไปกับการเจริญพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์ อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่า rhFSH จะช่วยให้จำนวนโอโอไซต์ระยะพร้อมปฏิสนธิเพิ่มจำนวนขึ้น การใช้โกรท แฟคเตอร์ร่วมกับ rhFSH ช่วยให้ผลิตตัวอ่อนได้มากขึ้น (23.2 และ 21.9 สำหรับ EGF+rhFSH และ IGF-1+rhFSH ตามลำดับ) สำหรับในการทดลองที่ 2 นั้นพบว่า การแช่แข็ง (วิทริฟิเคชั่น) โอโอไซต์มีผลทำให้อัตราการเจริญพร้อมปฏิสนธิและอัตราการผลิตตัวอ่อนบลาสโตซิสลดลง (7% เทียบกับ 30%) การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า rhFSH และ โกรท แฟคเตอร์ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตตัวอ่อนแมว การแช่แข็งและการทำละลายโอโอไซต์แมวมีผลในทางลบต่อการเจริญพร้อมปฏิสนธิและการผลิตตัวอ่อนแมวบ้าน

Project Code: MRG4980108
Project Title: The effect of cryopreservation on the post-thaw quality of cat oocytes
Investigator: Theerawat Tharasanit
Department of Obstetrics, Gynaecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University
E-mail Address: Theerawat.t@chula.ac.th, Tharasanit@hotmail.com
Project Period: July 2006 to 30 September 2008

In vitro matured oocytes demonstrate poor developmental competence, and this stems embryo development of cryopreserved-thawed oocytes. This study examined the effect of "LH-free" recombinant human FSH (rhFSH) on meiotic competence, redistribution of oocyte's cytoskeleton and also capability of the oocytes to withstand cryopreservation. In experiment I, cumulus oocyte complexes (COCs) were cultured for 24h in a defined maturation medium containing with 0, 0.01, 0.05, 0.1, and 1.0 IU rhFSH and also in a combination of either luteinizing hormone (LH), insulin like growth factor-1 (IGF-1) or epidermal growth factor (EGF). Nuclear and cytoplasmic maturation of the oocytes was assessed by means of fluorescent labelling of the oocyte's chromatin and cytoskeletal elements (actin microfilaments and microtubules) and also *in vitro* embryo culture. In experiment II, the oocytes were vitrified at immature stage and then subjected to *in vitro* maturation, fertilization and embryo culture.

rhFSH significantly increased the number of oocytes reaching metaphase II (MII) stage when compared with non-rhFSH treated controls (MII rates: 67.9% vs 36.9%, $p<0.05$). Because rhFSH at 0.01, 0.05, 0.1 and 1 IU/ml yielded similar MII rates (~70%), the medium dose of 0.1 IU/ml rhFSH was used in subsequent study. When examined the cytoplasmic maturation, rhFSH induced normal redistribution of actin microfilaments and microtubules during the course of *in vitro* maturation. Although rhFSH enhanced meiotic competence of cat oocytes but *in vitro* maturation of oocyte using either rhFSH+EGF or rhFSH+IGF-1 yielded high rates of blastocyst development (23.2% and 21.9, respectively). In exp. II, vitrification and warming of immature cat oocytes significantly reduced MII rates (~40 % vs. ~70% of controls), while cryoprotectants used *per se* did not affect meiotic competence. Cryopreservation of the oocytes induced poor developmental competence, in terms of cleavage and blastocyst formation rates (i.e., ~ 30% and 7%, respectively). In conclusion, rhFSH and growth factors are capable of enhancing nuclear and cytoplasmic maturation of cat oocytes by means of meiotic competence, normal reorganisation of oocyte's cytoskeleton and embryo development. Vitrification of cat immature oocytes induces poor in vitro maturation, fertilizability and embryo development.