



การผลิตตัวอ่อนแบบนอกร่างกายและการเก็บรักษาโดยการแช่แข็งเพื่อเป็นเทคโนโลยีช่วยในการผลิตโคเนื้อคุณภาพ

ชาตรี ชำนาญดี^{1,*} นวรัตน์ ผอบงา¹ และมาลัย จงเจริญ²

¹สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยนครพนม อำเภอเมือง จังหวัดนครพนม 48000

²สหกรณ์การเลี้ยงปศุสัตว์ กรป.กลาง โพนยางคำ จำกัด อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร 47000

บทคัดย่อ: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเทคนิคการผลิตตัวอ่อนนอกร่างกายและการแช่แข็งตัวอ่อนในระดัห้องปฏิบัติการเพื่อเป็นเทคโนโลยีช่วยในการผลิตโคเนื้อคุณภาพ โดยใช้ตัวอ่อนระยะตั้งแต่ 4 เซลล์ขึ้นไปจำนวน 124 ตัวอ่อนจากโอโอไซต์ทั้งหมด 342 โอโอไซต์ แบ่งตัวอ่อนออกเป็น 3 กลุ่มการทดลอง ดังต่อไปนี้คือ กลุ่มการทดลองที่ 1 คือกลุ่มไม่ผ่านการแช่แข็ง (กลุ่มควบคุม) กลุ่มการทดลองที่ 2 คือกลุ่มแช่แข็งแบบวิธรีไฟเคชันด้วยวิธีไมโครดรอเพลท และกลุ่มการทดลองที่ 3 คือกลุ่มแช่แข็งแบบวิธรีไฟเคชันด้วยวิธีผิวสัมผัสของแผ่นโลหะ ผลการศึกษาพบว่า สัดส่วนของโอโอไซต์ที่ได้รับการปฏิสนธิคิดเป็นร้อยละ 52.9 (181/342) ส่วนตัวอ่อนที่สามารถพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะตั้งแต่ 4 เซลล์ขึ้นไปคิดเป็นร้อยละ 36.3 (124/342) กลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งแบบวิธรีไฟเคชันด้วยวิธีไมโครดรอเพลท และกลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งแบบวิธรีไฟเคชันด้วยวิธีผิวสัมผัสของแผ่นโลหะ ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะมอรูลา และระยะบลาสโตซิสต์ได้ ซึ่งในกลุ่มที่ไม่ผ่านการแช่แข็งสามารถพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ (ร้อยละ 4.9; 2/40) แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างกลุ่มการทดลอง ($P>0.05$) ในขณะที่สัดส่วนของตัวอ่อนระยะมอรูลา (ร้อยละ 26.8; 11/40) สูงกว่ากลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งแบบวิธรีไฟเคชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq 0.05$) ผลการประเมินคุณภาพของตัวอ่อนพบว่าตัวอ่อนในกลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งแบบวิธรีไฟเคชันด้วยวิธีไมโครดรอเพลทมีคุณภาพจัดอยู่ในระดับคะแนน 3 (ร้อยละ 10.0) และตัวอ่อนที่มีคุณภาพจัดอยู่ในระดับคะแนน 4 (ร้อยละ 50.0) เช่นเดียวกันกับในกลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งแบบวิธรีไฟเคชันด้วยวิธีผิวสัมผัสของแผ่นโลหะพบตัวอ่อนที่มีคุณภาพจัดอยู่ในระดับคะแนน 3 (ร้อยละ 2.3) และตัวอ่อนที่มีคุณภาพจัดอยู่ในระดับคะแนน 4 (ร้อยละ 39.5) ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ผลการวิจัยนี้สรุปได้ว่าการผลิตตัวอ่อนนอกร่างกายในระดับห้องปฏิบัติการสามารถผลิตตัวอ่อนระยะ 4-16 เซลล์และระยะบลาสโตซิสต์ได้ อย่างไรก็ตามตัวอ่อนที่ผ่านการแช่แข็งแบบวิธรีไฟเคชันไม่สามารถพัฒนาไปสู่ระยะอื่นๆ ได้

คำสำคัญ: การเก็บรักษาด้วยการแช่แข็ง การผลิตตัวอ่อนนอกร่างกาย โคเนื้อคุณภาพ การวิธรีไฟเคชัน

*ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทยมหาวิทยาลัย. 2565. 17(2): 293-304.

E-mail address: chatree@npu.ac.th

In Vitro Production of Embryo and Cryopreservation as the Assistant Technology of Producing Quality Beef Cattle

Chatree Chumnandee^{1,#}, Nawarat Pha-obnga¹, and Malai Chongcharoen²

¹Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Technology, Nakhon Phanom University, Nakhon Phanom 48000, Thailand; ²Pon-Yang-Khram Livestock Breeding Cooperative NSC.Ltd. Sakon Nakhon 47000, Thailand

Abstract: The objective of this study was to observe the techniques of *in vitro* embryo production and cryopreservation at the laboratory level as the assistant technology of producing quality beef cattle. A total of 124 embryos with at least 4 cells which developed from 342 cumulus oocyte complexes (COCs) were divided into 3 groups; group 1; non-vitrification (control), group 2; microdroplets vitrification (MDV), and group 3; solid surface vitrification (SSV). The results showed that the proportion of fertilization oocytes was 52.9% (181/342). The proportion of embryos with at least 4 cells was 36.3% (124/342). The vitrified embryos in MDV and SSV groups can not to develop into morula and blastocyst stage. The proportion of blastocyst (4.9%; 2/40) in control group was not different among groups ($P>0.05$), while proportion of morula (26.8%; 11/40) was significantly higher than those of both vitrified groups ($P\leq 0.05$). The embryo quality in MDV group was classified at score 3 (10.0%) and score 4 (50.0%), as well as in SSV group was classified at score 3 (2.3%) and score 4 (39.5%) which not different between vitrified groups ($P>0.05$). In conclusion, the results showed that *in vitro* embryo production in our laboratory can produce embryos at 4-16 cells and a few of blastocysts. However, the vitrified embryos cannot develop into other stages.

Keywords: Cryopreservation, *In vitro* production of embryo, Quality beef cattle, Vittrification

#Corresponding author

J. Mahanakorn Vet. Med. 2022 17(2): 293-304.

E-mail address: chatree@npu.ac.th

บทนำ

จากสถานการณ์การลดลงของโคเนื้อของประเทศ ไทยในระหว่างปี 2550-2555 ส่งผลต่อจำนวนของแม่ พันธุ์โคเนื้อ โดยในปี 2550 มีโคเนื้อทั้งหมด 3.25 ล้านตัว และลดลงเหลือเพียงจำนวน 1.59 ล้านตัวในปี 2554 (Department of Livestock Development; DLD, 2012) ซึ่งฐานแม่พันธุ์โคเนื้อย่อมกระทบต่อการ

ขยายพันธุ์สัตว์ด้วย อย่างไรก็ตามในปี 2560 พบว่ามีการ เลี้ยงโคเนื้อเพิ่มขึ้นร้อยละ 2.43 เนื่องจากมีการส่งเสริม การเลี้ยงและการเพิ่มศักยภาพการผลิตโคเนื้อจากภาครัฐ ตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 12 (Office of Agricultural Economics, 2016) จาก สถานการณ์ในอดีตแสดงให้เห็นโอกาสในการเลือก เทคโนโลยีชีวภาพทางการสืบพันธุ์ เช่น การผสมเทียม

การย้ายฝากตัวอ่อน การผลิตตัวอ่อนนอกร่างกาย และการเก็บรักษาตัวอ่อนด้วยการแช่แข็ง เพื่อมาช่วยในการเพิ่มจำนวนโคเนื้อ ซึ่งสามารถประหยัดเวลาได้มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตแบบธรรมชาติ (Wood *et al.*, 2004) เทคโนโลยีการผลิตตัวอ่อนนอกร่างกายและเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อน (*in vitro*-produced embryo transfer; IVP-ET) เป็นเทคโนโลยีขั้นสูงที่พัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้เพิ่มประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของสัตว์เพศเมียที่มีพันธุกรรมชั้นเลิศ ช่วยในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ได้อย่างรวดเร็ว และยังช่วยป้องกันโรคติดต่อทางระบบสืบพันธุ์ โดยตัวอ่อนที่ผลิตแบบนอกร่างกายจากการใช้โอโอไซต์ที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์จะช่วยลดต้นทุนและอาจประหยัดกว่าตัวอ่อนที่ผลิตโดยวิธีการกระตุ้นให้มีการตกไข่หลายใบ (superovulation) (Food and Agriculture Organization; FAO, 1991)

การเก็บรักษาตัวอ่อนด้วยการแช่แข็งแบบการวิทริฟิเคชัน (vitrification) คือการแช่แข็งภายในเวลาเร็วยิ่งยวด (ultra-rapid) โดยทำให้ตัวอย่างและสารละลายเกิดการแข็งตัวจนมีลักษณะคล้ายกระจก (glass-like) ทั้งภายในและภายนอกเซลล์อย่างรวดเร็วก่อนจะเกิดการสร้างผลึกน้ำแข็ง (Rall and Fahy, 1985) โดย Caamao *et al.* (2015) ได้ศึกษาการแช่แข็งตัวอ่อนโคแบบวิทริฟิเคชันพบว่าหลังการทำละลายที่ 48 ชั่วโมงตัวอ่อนมีอัตราการการฟักตัว หรือ การแฮทซิง (hatching rates) และจำนวนเซลล์รวม (total cell number) สูงกว่าการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิช้าๆ ส่วนการศึกษาของ Malenko *et al.* (2017) รายงานการใช้วัสดุบรรจุตัวอ่อนแบบ Hollow Fiber Vitrification (HFV) ผลการศึกษาพบว่าหลังการทำละลายที่ 48 ชั่วโมง ตัวอ่อนมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 83.3 และสามารถแฮทซิงได้ร้อยละ 50.7 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้แช่แข็ง

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและพัฒนาเทคนิคการผลิตตัวอ่อนนอกร่างกายและการแช่แข็งตัวอ่อนในห้องปฏิบัติการ ซึ่งนำไปสู่การใช้

เทคโนโลยีชีวภาพทางการสืบพันธุ์ในการย้ายฝากตัวอ่อนเพื่อผลิตโคเนื้อคุณภาพต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บรังไข่และการเก็บโอโอไซต์

การศึกษานี้ได้รับการรับรองให้ดำเนินการเลี้ยงสัตว์และใช้สัตว์จากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงสัตว์และใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครพนม ใบรับรองเลขที่ NPU008/2565 เมื่อวันที่ 19 มกราคม 2565 โดยเก็บรังไข่โคเพศเมียจากโรงฆ่าสัตว์ในเขตจังหวัดสกลนคร นำมายังห้องปฏิบัติการสาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยนครพนม ภายใน 3 ชั่วโมง ทำการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีการเจาะดูจากฟอลลิเคิลขนาดตั้งแต่ 2-6 มิลลิเมตรบนรังไข่ ด้วยเข็มปลอดเชื้อขนาด 18G ความยาว 1½ นิ้ว กับกระบอกฉีดยาปริมาตร 5 มิลลิลิตร คัดเลือกเฉพาะโอโอไซต์ที่โอโอพลาสซึมมีสีน้ำตาลดำเป็นเนื้อเดียวกันตลอด มีรูปร่างทรงกลมไม่บิดเบี้ยวและมีเซลล์คิวมูลัส (cumulus cells) ตั้งแต่ 2 ชั้นขึ้นไป ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ

การเพาะเลี้ยงโอโอไซต์จนสมบูรณ์พร้อมปฏิสนธินอกร่างกาย

การเพาะเลี้ยงโอโอไซต์จนสมบูรณ์พร้อมปฏิสนธินอกร่างกาย (*in vitro* maturation, IVM) โดยการนำโอโอไซต์ที่คัดเลือกแล้วมาล้างในสารละลาย tissue culture media - 199 with Earle's salt (M0650, Sigma) เ ส ริ ม hydroxyethylpiperazine ethanesulfonic acid (H4034, Sigma) (TCM-199-HEPES) จำนวน 3 ครั้ง แบ่งโอโอไซต์กลุ่มละจำนวน 20-25 โอโอไซต์ เพื่อเพาะเลี้ยงในหยด (drops) สารละลายเพาะเลี้ยงโอโอไซต์จนสมบูรณ์พร้อมปฏิสนธิ (oocytes maturation medium, OMM) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย TCM-199 with Earle's salt โดยเสริมด้วย fetal bovine serum (FBS) ความเข้มข้นร้อยละ 5

และ Pregnant Mare Serum Gonadotrophin (PMSG, Folligon, MSD animal health) ความเข้มข้น 0.05 หน่วยสากลต่อมิลลิลิตร ในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกปลอดเชื้อขนาด 35X10 มิลลิเมตรปิดทับด้วย mineral oil (M8410, Sigma) บ่มเลี้ยงนาน 22-24 ชั่วโมงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส ประกอบด้วยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ในบรรยากาศ

การปฏิสนธินอกร่างกาย

การปฏิสนธินอกร่างกาย (*In vitro* fertilization, IVF) ปฏิบัติตามการศึกษาของ Chumnandee *et al.* (2017) โดยการเตรียมน้ำเชื้อโคพันธุ์อเมริกันบรามันท์แช่แข็ง (AB, 16.06.2019, DLD) ด้วยวิธีการสวิมอัพ (swim up) จากนั้นเตรียมหลอดสารละลายปฏิสนธิ TALP-IVF ปริมาตรหยดละ 100 ไมโครลิตร เสริมด้วย bovine serum albumin (BSA) (A-9418, Sigma) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเฮปาริน (heparin, H-4784, Sigma) ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปิดทับด้วย mineral oil ให้พ้นเหนือหลอดสารละลายสำหรับปฏิสนธิ หลังจากนั้นใส่น้ำเชื้อที่เตรียมไว้โดยปรับความเข้มข้นสุดท้ายของอสุจิคือ 2×10^6 ตัวต่อมิลลิลิตร ในสารละลายปฏิสนธิ 100 ไมโครลิตร ขึ้นสุดท้ายนำโอโอไซต์จำนวน 20-25 โอโอไซต์มาบ่มเลี้ยงรวมกันกับตัวอสุจิในสารละลายปฏิสนธิที่เตรียมไว้ บ่มเลี้ยงนาน 16-18 ชั่วโมงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส ประกอบด้วยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ในบรรยากาศ

การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนนอกร่างกาย

การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนนอกร่างกาย (*in vitro* culture, IVC) บ่มเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส ประกอบด้วยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ในบรรยากาศ ปฏิบัติโดยนำไซโกตที่คาดว่าจะได้รับการปฏิสนธิ (presumptive zygote) มาทำการแยกเอาเซลล์คิวมูลัสที่ล้อมรอบออก ล้างและเพาะเลี้ยงในสารละลาย synthetic oviduct fluid (SOF) ที่ประกอบด้วย กลูตา

มิน (glutamine, G8540, Sigma) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ และเสริม BSA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยนำไซโกต จำนวน 15-20 ไซโกต บ่มในสารละลายเพาะเลี้ยงปริมาตร 50 ไมโครลิตร ปิดทับด้วย mineral oil ให้พ้นเหนือหลอดสารละลายเพาะเลี้ยง บ่มเลี้ยงในตู้บ่ม หลังจากการปฏิสนธิที่ 72 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกตัวอ่อนที่มีการแบ่งตัวตั้งแต่ 4 เซลล์ขึ้นไป ซึ่งบางส่วนจะถูกแบ่งเข้าสู่กลุ่มการวิเคราะห์เคชันและทำการทำละลาย ส่วนที่เหลือจะเลี้ยงต่อไปตามขั้นตอนปกติ โดยย้ายลงในสารละลายเพาะเลี้ยง SOF ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย ซิเตรต (citrate, C7129, Sigma) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ และกลูโคส (glucose, G7021, Sigma) ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ ปิดทับด้วย mineral oil ให้พ้นเหนือหลอดสารละลายเพาะเลี้ยง บ่มเลี้ยงในตู้บ่ม หลังการปฏิสนธิที่ 144 ชั่วโมง ย้ายตัวอ่อนลงในสารละลายเพาะเลี้ยง OMM เสริม FBS ความเข้มข้นร้อยละ 2 ปิดทับด้วย mineral oil ให้พ้นเหนือหลอดสารละลายเพาะเลี้ยง บ่มเลี้ยงในตู้บ่ม บันทึกตัวอ่อนระยะต่างๆ

การวิเคราะห์เคชันตัวอ่อนและการทำการละลาย

การวิเคราะห์เคชันในการศึกษานี้ใช้สารละลายวิเคราะห์เคชัน (vitrification solution, VS) ซึ่งจะประกอบด้วย อีทิลีนไกลคอล (ethylene glycol, EG, GK7641, Glentham Life Sciences) และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide, DMSO, D-360, Glentham Life Sciences) ในสารละลายพื้นฐาน (base medium) ที่ประกอบด้วย TCM-199 และ FBS ความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยปฏิบัติบนแท่นความร้อน (hot plate) ที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส และอยู่ในบรรยากาศที่มีอุณหภูมิห้องเฉลี่ย 28-30 องศาเซลเซียส โดยให้นำตัวอ่อนตั้งแต่ 4 เซลล์ขึ้นไปจำนวน 1-3 ตัวบ่มในสารละลายวิเคราะห์เคชันที่ 1 (10%EG + 10%DMSO) นาน 2 นาที ต่อจากนั้นย้ายมาบ่มในสารละลายวิเคราะห์เคชันที่ 2 (20%EG + 20%DMSO) ซึ่งตั้งแต่การสัมผัสสารละลาย

วิธีพิศเคชันที่ 2 จนถึงหยดตัวอ่อนลงในไนโตรเจนเหลว ปฏิบัติให้เสร็จสิ้นภายใน 15-30 วินาที การหยดตัวอ่อนลงในไนโตรเจนในการวิธีพิศเคชันด้วยวิธีไมโครดรอปเลต (microdroplets) โดยดูดตัวอ่อนเพียง 1-3 ตัวอ่อนขึ้นมาด้วยปิเปตแก้วปลอดเชื้อ และใช้เทคนิคเป่าเบาๆ เพื่อเคลื่อนตัวอ่อนมาที่ปลายปิเปตแก้วแล้วสลัดเบาๆ เพื่อให้หยดตัวอ่อนลงในไนโตรเจนเหลวโดยตรง (Papis *et al.*, 2000) ส่วนในการวิธีพิศเคชันด้วยวิธีผิวสัมผัสของแผ่นโลหะ (solid surface vitrification; SSV) โดยดูดตัวอ่อนเพียง 1-3 ตัวอ่อนขึ้นมาด้วยปิเปตแก้วปลอดเชื้อ และใช้เทคนิคเป่าเบาๆ เพื่อเคลื่อนตัวอ่อนมาที่ปลายปิเปตแก้วแล้วสลัดเบาๆ ลงบนแผ่นอลูมิเนียม (aluminum foil) ที่วางอยู่บนผิวของไนโตรเจนเหลว (Gupta *et al.*, 2007) ในขั้นตอนสุดท้ายของทั้งสองวิธีใช้ปากคีบปลายเล็กคีบหยดขนาดเล็กจากการแช่แข็งบรรจุลงในหลอดพลาสติกทนความเย็น (cryovial) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และจัดเก็บในถังไนโตรเจนเหลว

การละลายหลังจากผ่านการวิธีพิศเคชัน สามารถดำเนินการปฏิบัติบนแท่นความร้อน ที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส และอยู่ในบรรยากาศที่มีอุณหภูมิห้องเฉลี่ย 28-30 องศาเซลเซียส ซึ่งเตรียมสารละลายสำหรับการละลายหลังการแช่แข็งลงในจานเพาะเลี้ยงปลอดเชื้อแบบชนิด 4 หลุม โดยเริ่มจากการนำหลอดพลาสติกที่ทนความเย็นซึ่งบรรจุตัวอ่อนขึ้นมาจากไนโตรเจนเหลวและสัมผัสอากาศ 5 วินาที จากนั้นเทตัวอ่อนลงในสารละลายสำหรับการทำการละลายที่ 1 (สารละลายพื้นฐาน + 0.26 M sucrose) นาน 1 นาที หลังจากนั้นย้ายตัวอ่อนมายังสารละลายสำหรับการทำการละลายที่ 2 (สารละลายพื้นฐาน + 0.13 M sucrose) นาน 2 นาที ในลำดับถัดมาย้ายตัวอ่อนมาลงในสารละลายพื้นฐาน 2 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที ในขั้นสุดท้ายนำตัวอ่อนที่ผ่านการทำการละลายแล้วเข้าสู่กระบวนการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนนอกร่างกายตามปกติ ทำการประเมินการคืนสภาพ

ประเมินคุณภาพและความสามารถในการพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะต่างๆ ต่อไป

การประเมินคุณภาพตัวอ่อนหลังการทำการละลาย

เกณฑ์ในการประเมินคุณภาพตัวอ่อนโดยยึดบนพื้นฐานรูปร่างที่สมบูรณ์ของตัวอ่อนสุดตามการศึกษาของ Bo and Mapletoft (2013) โดยแบ่งระดับคะแนนจาก 1-4 ดังนี้ 1) ระดับ 1 ดีเยี่ยมหรือดี (excellent หรือ good) คือ ตัวอ่อนที่มีลักษณะรูปร่างแบบสมมาตร เป็นทรงกลม บลาสโตเมียร์มีขนาด สี่ และความหนาแน่นเท่ากัน มีการพัฒนาตรงตามระยะ พบความผิดปกติเพียงเล็กน้อย ส่วนประกอบเซลล์ควรมีความสมบูรณ์อย่างน้อยร้อยละ 85 โซนนาเฟลลูซิตามีขอบเขตเรียบ ไม่มีการเว้า โหว่ หรือแฟบ หากเป็นตัวอ่อนสุดสามารถนำมาแช่แข็งได้ (freezable embryo) และเป็นที่ยอมรับในการค้าระหว่างประเทศ 2) ระดับ 2 พอใช้ (fair) คือ ตัวอ่อนที่มีภาพรวมของลักษณะรูปร่าง ขนาด สี่ และความหนาแน่นของบลาสโตเมียร์ไม่สม่ำเสมอปานกลาง ส่วนประกอบเซลล์ควรมีความสมบูรณ์อย่างน้อยร้อยละ 50 การรอดหลังการแช่แข็งน้อยกว่าระดับ 1 หากเป็นตัวอ่อนสุดสามารถนำไปย้ายฝากในแม่โคตัวรับได้ 3) ระดับ 3 ไม่สมบูรณ์ (poor) คือตัวอ่อนที่มีภาพรวมของลักษณะรูปร่าง ขนาด สี่ และความหนาแน่นของบลาสโตเมียร์ไม่สม่ำเสมออย่างมาก ส่วนประกอบเซลล์ควรมีความสมบูรณ์อย่างน้อยร้อยละ 25 หากนำไปย้ายฝากในแม่โคตัวรับได้อัตราการตั้งท้องต่ำกว่าระดับ 2 และ 4) ระดับ 4 เสื่อมหรือตาย (dead หรือ degenerating) คือตัวอ่อนที่มีลักษณะรูปร่างคล้ายโอโอไซต์ หรือเป็นตัวอ่อนเซลล์เดียว ไม่มีลักษณะของการมีชีวิตควรคัดทิ้ง

การออกแบบการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษานี้ทำการทดลองจำนวน 4 ซ้ำ โดยใช้โอโอไซต์ทั้งหมด 342 โอโอไซต์ สามารถพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะตั้งแต่ 4 เซลล์ขึ้นไปจำนวนเท่ากับ 124 ตัวอ่อน โดยนำมาแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 กลุ่มไม่ผ่านการวิธีพิศเคชัน (กลุ่มควบคุม) และกลุ่มที่ 2 วิธีพิ

ฟิเคชันด้วยวิธีไมโครดรอปเลท (microdroplets; MDV) และกลุ่มที่ 3 วิทริฟิเคชันแบบผิวสัมผัสของแผ่นโลหะ (solid surface vitrification; SSV) การวิเคราะห์ข้อมูล ด้วยวิธีการทดสอบไคสแควร์ (Chi-square test) กำหนดให้ค่ามีนัยสำคัญทางสถิติต่ำกว่า หรือเท่ากับ 0.05 ($P \leq 0.05$)

ผลการศึกษา

ผลการศึกษาเรื่อง การผลิตตัวอ่อนแบบนอก ร่างกายและการเก็บรักษาโดยการแช่แข็งเพื่อเป็น เทคโนโลยีช่วยในการผลิตโคเนื้อคุณภาพ โดยใช้โอโอไซต์ ทั้งหมด 342 โอโอไซต์ พบว่าสัดส่วนของโอโอไซต์ที่ได้รับการปฏิสนธิและสามารถแบ่งตัวพัฒนาเป็นตัวอ่อนมี จำนวนเท่ากับ 181 โอโอไซต์ หรือคิดเป็นร้อยละ 52.9 ซึ่งเป็นสัดส่วนที่เกินครึ่งหนึ่งของโอโอไซต์ทั้งหมด ส่วนตัวอ่อนที่สามารถพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะตั้งแต่ 4 เซลล์ ขึ้นไป มีจำนวนเท่ากับ 124 ตัวอ่อน หรือคิดเป็นร้อยละ 36.3 โดยตัวอ่อนระยะดังกล่าวเป็นกลุ่มที่ต้องแบ่งเข้าสู่ การวิทริฟิเคชันต่อไป ความสามารถในการพัฒนาไปเป็น ตัวอ่อนระยะต่างๆ ภายหลังการวิทริฟิเคชัน พบว่ากลุ่มที่ ผ่านการวิทริฟิเคชันด้วยวิธีไมโครดรอปเลท และกลุ่มที่ ผ่านการวิทริฟิเคชันด้วยวิธีผิวสัมผัสของแผ่นโลหะ ไม่ สามารถพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะมอรูลา และระยะบลาสโตซิสต์ได้ ในขณะที่กลุ่มที่ไม่ผ่านการ วิทริฟิเคชัน สามารถพัฒนาไปถึงระยะมอรูลาคิดเป็นร้อยละ

20.1±16.8 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์คิดเป็นร้อยละ 5.0±10.0 แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ผ่านการวิทริฟิเคชันทั้งสองวิธี (Table 1)

ความสามารถในการพัฒนาของตัวอ่อนระยะ ต่างๆ ในแต่ละกลุ่มการทดลอง พบว่า ในกลุ่มที่ไม่ผ่านการ วิทริฟิเคชันสามารถพัฒนาจากตัวอ่อนระยะตั้งแต่ 4 เซลล์ไปเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ได้ ในขณะที่ใน กลุ่มที่ผ่านการวิทริฟิเคชันด้วยวิธีไมโครดรอปเลท และ กลุ่มที่ผ่านการวิทริฟิเคชันด้วยวิธีผิวสัมผัสของแผ่นโลหะ สามารถกลับคืนสภาพภายหลังการทำละลายได้แต่ไม่ สามารถพัฒนาต่อไปได้ โดยพบว่าขอบเขตของบลาสโต เมียร์ถูกทำลายไม่มีความคมชัด และมีสีที่จาง (Figure 1)

ผลการศึกษาการประเมินคุณภาพของตัวอ่อนหลัง การแช่แข็งแบบวิทริฟิเคชันและการทำละลาย เมื่อ เปรียบเทียบกับเกณฑ์ในการประเมินคุณภาพตัวอ่อนของ Bo and Mapletoft (2013) (Figure 2) พบว่า อัตราการ สูญเสียในกลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งแบบวิทริฟิเคชันด้วยวิธี ไมโครดรอปเลทคิดเป็นร้อยละ 50.0±57.7 และกลุ่มที่ ผ่านการแช่แข็งแบบวิทริฟิเคชันด้วยวิธีผิวสัมผัสของแผ่น โลหะคิดเป็นร้อยละ 67.9±47.2 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกัน ทางสถิติ ($P > 0.05$) ผลการประเมินคุณภาพของตัวอ่อน ไม่พบตัวอ่อนที่มีคุณภาพจัดอยู่ในระดับคะแนน 1 และ ระดับคะแนน 2 โดยในกลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งแบบ

Table 1 Developmental competence of vitrified-warmed ≥ 4 cells bovine embryos

Groups	≥ 4 cells (% mean±SD)	8-16 cells (% mean±SD)	Morula (% mean±SD)	Blastocyst (% mean±SD)
Non-vitrification	41 (100.0±0.0)	29 (66.3±35.0)	11 (20.1±16.8) ^a	2 (5.0±10.0)
MDV	40 (100.0±0.0)	20 (50.7±40.9)	0 (0.0±0.0) ^b	0 (0.0±0.0)
SSV	43 (100.0±0.0)	22 (45.2±31.9)	0 (0.0±0.0) ^b	0 (0.0±0.0)

Note: Values with different letters within a column denote significant difference ($P \leq 0.05$). microdroplets vitrification (MDV), and solid surface vitrification (SSV)

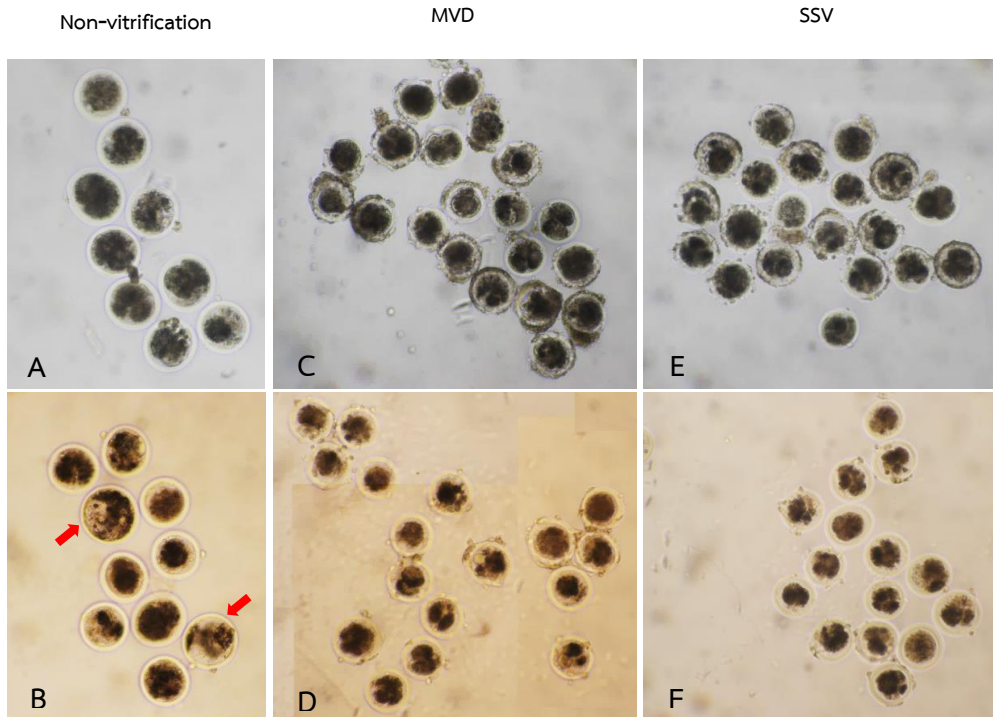


Figure 1 Developmental competence of embryos, (A); ≥ 4 cells, (B); blastocyst (arrow) in non-vitrification group (100X), (C); pre-vitrification, (D); post-vitrification embryos in MDV group (40X), (E); pre-vitrification, and (F); post-vitrification embryos in SSV group (40X)

วิทวีพีเคชันด้วยวิธีไมโครดรอปเลทพบตัวอ่อนที่มีคุณภาพจัดอยู่ในระดับคะแนน 3 คิดเป็นร้อยละ 5.9 ± 11.8 และตัวอ่อนที่มีคุณภาพจัดอยู่ในระดับคะแนน 4 คิดเป็นร้อยละ 44.1 ± 51.8 ส่วนในกลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งแบบวิทวีพีเคชันด้วยวิธีผิวสัมผัสของแผ่นโลหะพบตัวอ่อนที่มีคุณภาพจัดอยู่ในระดับคะแนน 3 คิดเป็นร้อยละ 1.6 ± 3.1 และตัวอ่อนที่มีคุณภาพจัดอยู่ในระดับคะแนน 4 คิดเป็นร้อยละ 30.6 ± 44.2 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) (Table 2)

วิจารณ์การทดลอง

จากผลการศึกษาพบว่าสัดส่วนของโอโอไซด์ที่ได้รับการปฏิสนธิและสามารถแบ่งตัวพัฒนาเป็นตัวอ่อนคิดเป็นร้อยละ 52.9 ซึ่งเป็นสัดส่วนที่เกินครึ่งหนึ่งของโอโอไซด์ทั้งหมด หากทว่าเป็นสัดส่วนที่สูงมากนักเมื่อ

เปรียบเทียบกับการศึกษาอื่นๆ โดย Ezoe *et al.* (2015) ได้รายงานตัวอ่อนที่มีการแบ่งตัวเท่ากับร้อยละ 74.9 ± 1.6 เช่นเดียวกับรายงานของ Ishii *et al.* (2018) ที่แสดงร้อยละของตัวอ่อนที่มีการแบ่งตัวเท่ากับ 63.8 ± 4.2 อย่างไรก็ตามเมื่อเทียบกับบางรายงานถือว่าค่าใกล้เคียงกัน ซึ่ง Aono *et al.* (2013) ได้รายงานร้อยละของตัวอ่อนที่มีการแบ่งตัวเท่ากับ 50.7 ± 5.1 ในขณะที่ Faizah *et al.* (2016) ได้รายงานร้อยละของโอโอไซด์ที่ได้รับการปฏิสนธิเท่ากับ 42.9 นอกจากนี้ในการศึกษานี้ได้รายงานผลของตัวอ่อนที่สามารถพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะตั้งแต่ 4 เซลล์ขึ้นไปคิดเป็นร้อยละ 36.3 เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมามีค่าใกล้เคียงกับรายงานของ Faheem *et al.* (2014) ได้รายงานตัวอ่อนระยะ 4 เซลล์คิดเป็นร้อยละ 25.7 ± 6.5 ในขณะที่ Canon-Beltran *et al.* (2021) รายงานตัวอ่อนระยะตั้งแต่ 8 เซลล์ขึ้นไปคิดเป็นร้อยละ 60.0

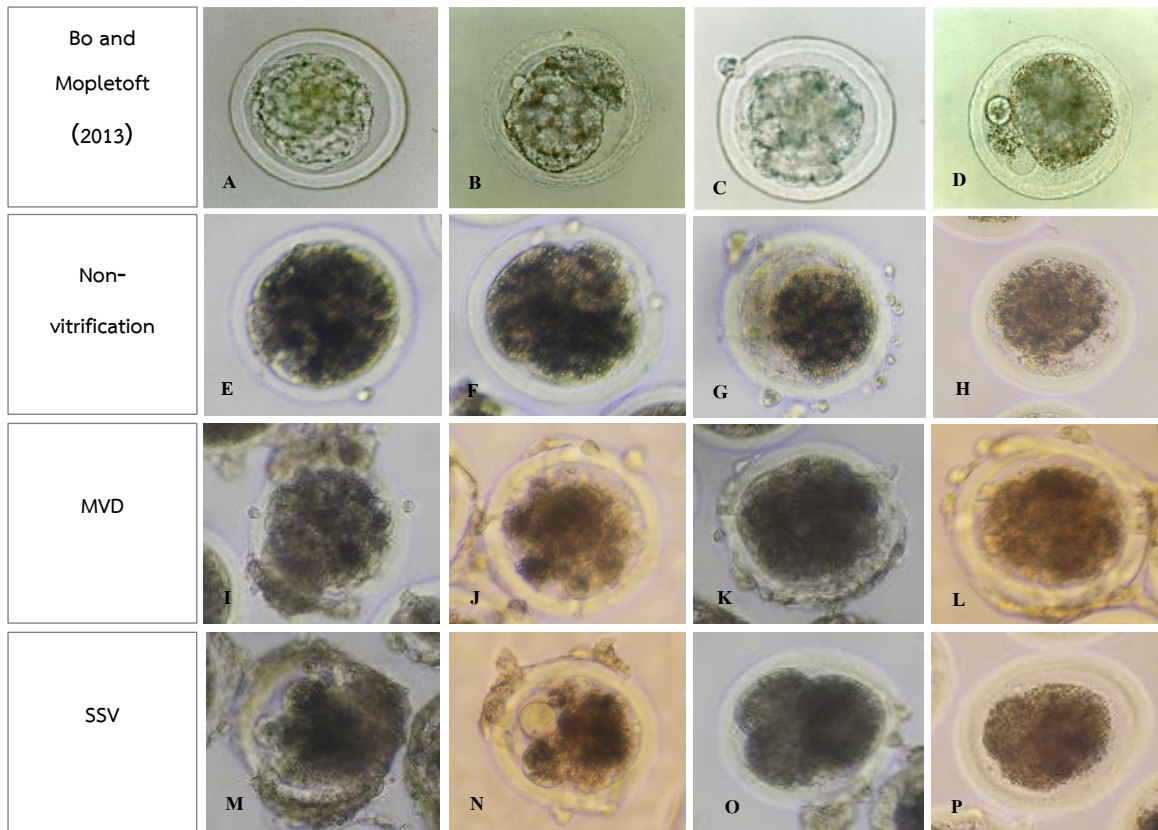


Figure 2 Evaluation of vitrified-warmed embryos quality, (A); quality score 1, (B); quality score 2, (C); quality score 3, and (D); quality score 4 (Bo and Mapletoft, 2013), (E) and (F); embryos quality score 1, (G) and (H); embryos quality score 2 in non-vitrification group, (I) and (K); pre-vitrification embryos quality score 3, (J) and (L); post-vitrification embryos quality score 3 in MDV group, (M) and (O); pre-vitrification embryos quality score 4, and (N) and (P); post-vitrification embryos quality score 4 in SSV group, 40X

Table 2 Classification of vitrified-warmed embryos quality

Groups (numbers)	Vitrified-warmed embryos ≥ 4 cells (% mean $\pm$ SD)		Embryos quality score (% mean $\pm$ SD)			
	Lost	Remaining	Score 1	Score 2	Score 3	Score 4
Non-vitrification (41)	-	-	23 (58.3 $\pm$ 18.7) ^a	11 (24.0 $\pm$ 19.3) ^a	5 (11.4 $\pm$ 9.5)	0 (0.0 $\pm$ 0.0)
MDV (40)	16 (50.0 $\pm$ 57.7)	24 (50.0 $\pm$ 47.9)	0 (0.0 $\pm$ 0.0) ^b	0 (0.0 $\pm$ 0.0) ^b	4 (5.9 $\pm$ 11.8)	20 (44.1 $\pm$ 51.8)
SSV (43)	25 (67.9 $\pm$ 47.2)	18 (32.1 $\pm$ 42.4)	0 (0.0 $\pm$ 0.0) ^b	0 (0.0 $\pm$ 0.0)	1 (1.6 $\pm$ 3.1)	17 (30.6 $\pm$ 44.2)

Note: Values with different letters within a column denote significant difference ($P \leq 0.05$). microdroplets vitrification (MDV), and solid surface vitrification (SSV)

จากผลการศึกษาความสามารถในการพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะต่างๆ ภายหลังการแช่แข็งแบบวิทรีฟิเคชัน พบว่ากลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งแบบวิทรีฟิเคชันด้วยวิธีไมโครดรอปเลท และกลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งแบบวิทรีฟิเคชันด้วยวิธีผิวสัมผัสของแผ่นโลหะ ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะมอรูลา และระยะบลาสโตซิสต์ได้ และหยุดอยู่ที่ระยะเดิมคือในช่วง 4-16 เซลล์ โดย Asgari *et al.* (2012) ได้รายงานการแช่แข็งวิทรีฟิเคชันตัวอ่อนระยะ 5-8 เซลล์ พบว่าสามารถพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์เท่ากับร้อยละ 35.0 และได้ อธิบายเกี่ยวกับระยะของตัวอ่อนและจลศาสตร์ของการพัฒนาของตัวอ่อนว่ามีผลต่อการแช่แข็งและความสามารถในการพัฒนา โดยได้แนะนำว่าตัวอ่อนที่เหมาะสมในการแช่แข็งควรเป็นตัวอ่อนที่อยู่ในระยะหลังจากเริ่มการทำงานในการถอดรหัสพันธุกรรมของตัวอ่อน (embryonic genome activation; EGA) ซึ่ง Asami *et al.* (2022) กล่าวว่า EGA จะเกิดขึ้นในช่วงตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ อย่างไรก็ตามยังไม่เป็นที่ทราบชัดเจนถึงช่วงเวลาที่เหมาะสมและรายละเอียด ซึ่งสอดคล้องกับ Frei *et al.* (1989) กล่าวว่าในการพัฒนาของตัวอ่อนโคตั้งแต่ 1-8 เซลล์พบว่าระดับการสังเคราะห์โปรตีนจะลดลงในเชิงปริมาณ แต่ไม่มีผลกระทบเชิงคุณภาพ และที่ตัวอ่อนระยะ 8-16 เซลล์ จะพบว่าระดับการสังเคราะห์โปรตีนมีการเปลี่ยนแปลงเชิงคุณภาพอย่างเห็นได้ชัด ดังนั้นตัวอ่อนในช่วงระยะ EGA จึงเป็นช่วงที่มีความอ่อนไหวจากปัจจัยต่างๆ ที่เข้ามากระทบและส่งผลต่อการพัฒนาไปสู่ระยะบลาสโตซิสต์ได้

จากผลการศึกษาการประเมินคุณภาพของตัวอ่อนหลังการแช่แข็งแบบวิทรีฟิเคชันและการทำละลาย พบว่า อัตราการสูญเสียในกลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งแบบวิทรีฟิเคชันด้วยวิธีไมโครดรอปเลท (ร้อยละ 50.0±57.7) และกลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งแบบวิทรีฟิเคชันด้วยวิธีผิวสัมผัสของแผ่นโลหะ (ร้อยละ 67.9±47.2) อาจเกิดขึ้นในขั้นตอนต่างๆ ของการแช่แข็งและการทำละลาย เช่น

ตัวอ่อนอาจติดที่ปิเปตแก้วที่ใช้ดูดตัวอ่อนเพื่อหยดลงบนไนโตรเจนเหลว หรือ เกิดขึ้นหลังจากที่หยดตัวอ่อนที่อยู่สารละลายการวิทรีฟิเคชันลงบนไนโตรเจนเหลว ซึ่งขนาดของหยดหรือผลึกจะมีขนาดเล็กมาก โดยมีค่าเฉลี่ยประมาณ 2.0 ± 0.6 ไมโครลิตร ทำให้ในขั้นตอนการเก็บผลึกใส่ลงในหลอดทนความเย็นอาจเก็บได้ไม่หมด

ผลการประเมินคุณภาพของตัวอ่อนในการศึกษานี้ เปรียบเทียบกับเกณฑ์คุณภาพตัวอ่อนของ Bo and Mapletoft (2013) ไม่พบตัวอ่อนที่มีคุณภาพจัดอยู่ในระดับคะแนน 1 และระดับคะแนน 2 โดยในกลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งแบบวิทรีฟิเคชันด้วยวิธีไมโครดรอปเลทและด้วยวิธีผิวสัมผัสของแผ่นโลหะพบตัวอ่อนที่มีคุณภาพจัดอยู่ในระดับคะแนน 3 คือ ตัวอ่อนที่ไม่สมบูรณ์ (poor) และตัวอ่อนที่มีคุณภาพจัดอยู่ในระดับคะแนน 4 คือ ตัวอ่อนที่เสื่อมหรือตาย (dead หรือ degenerating) ซึ่งหากเป็นตัวอ่อนสดที่สามารถนำมาแช่แข็งได้ (freezable embryo) ควรมีคุณภาพของตัวอ่อนอยู่ในระดับ 1 คือ ตัวอ่อนดีเยี่ยมหรือดี (excellent หรือ good) อย่างไรก็ตามที่ทราบกันดีว่าการเก็บรักษาด้วยความเย็นมีผลกระทบต่อตัวอ่อน ซึ่ง Vajta and Kuwayama (2006) กล่าวว่า การเก็บรักษาด้วยความเย็นจะทำให้รูปร่างตัวอ่อนได้รับความเสียหาย เนื่องจากการเผชิญขั้นตอนต่างๆ ระหว่างกระบวนการแช่แข็งและการทำละลาย เช่น ความเครียดจากการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมซิส และอุณหภูมิ ซึ่งขอบเขตของการบาดเจ็บอยู่ปัจจัยต่างๆ เช่น ความสามารถในการซึมผ่านของเมมเบรน ขนาดและรูปร่างของตัวอ่อน และคุณภาพและความไวของบลาสโตเมียร์ ซึ่งสอดคล้องกับ Van den Abbeel and Van Steirteghem (2000) ที่ได้กล่าวถึงความเสียหายของตัวอ่อนของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่เกิดจากการเก็บรักษาด้วยความเย็น ซึ่งสามารถเกิดจากหลายปัจจัย เช่น การเกิดผลึกน้ำแข็ง ผลจากสารละลายหรือผลจากความดันออสโมซิส และเมื่อนำตัวอ่อนที่เก็บรักษาออกจากไนโตรเจนเหลวจะส่งผลให้บลาสโตเมียร์

ถูกทำลาย หรือโซนาเพลลูซิตามีการแตก ซึ่งมีรายงานความเสียหายของโซนาเพลลูซิตาเท่ากับร้อยละ 16.6 จากการแช่แข็งแบบวิทริฟิเคชันด้วยวิธีพลาสติกไครโอไวอัล (plastic cryovial) ซึ่งสูงกว่าด้วยวิธีพลาสติกมินิสตรอว์ (plastic mini straw) ที่มีค่าเท่ากับร้อยละ 2.3

จากการศึกษานี้ได้เปรียบเทียบกลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งแบบวิทริฟิเคชันด้วยวิธีไมโครดรอปเลทและกลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งแบบวิทริฟิเคชันด้วยวิธีผิวสัมผัสของแผ่นโลหะพบว่าไม่มีความแตกต่างทั้งคุณภาพและความสามารถในการพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะต่างๆ อย่างไรก็ตามรูปแบบภาชนะในการบรรจุตัวอย่าง (container หรือ carrier) ทั้งสองย่อมมีข้อจำกัดที่แตกต่างกัน กล่าวคือ วิธีไมโครดรอปเลทเป็นวิธีการวิทริฟิเคชันที่ตัวอย่างสามารถสัมผัสกับไนโตรเจนเหลวได้โดยตรง เพราะฉะนั้นจะมีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส และมีขนาดของหยดเฉลี่ยประมาณ 6.0 ± 2.0 ไมโครลิตร (Papis *et al.*, 2000) ซึ่งได้มีรายงานอัตราการมีชีวิตของตัวอ่อนสุกระยะมอรูลาที่ผ่านการวิทริฟิเคชันด้วยวิธีนี้เท่ากับร้อยละ 72.0 และสามารถพัฒนาไปถึงระยะบลาสโตซิสต์เท่ากับร้อยละ 64 (Montagner *et al.*, 2006) ในขณะที่ผิวสัมผัสของแผ่นโลหะจะมีอุณหภูมิที่ผิวสัมผัสของโลหะ หรือแผ่นอลูมิเนียม (aluminum foil) อยู่ระหว่าง -150 ถึง -180 องศาเซลเซียส (Gupta *et al.*, 2007) โดยได้มีรายงานอัตราการมีชีวิตของตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ที่ผ่านการวิทริฟิเคชันด้วยวิธีนี้เท่ากับร้อยละ 82.6 (Akkoc *et al.*, 2011) รูปแบบภาชนะในการบรรจุตัวอย่างส่งผลต่อการรอดและการพัฒนาของตัวอ่อนได้ เนื่องจากปัจจัยที่สัมพันธ์กัน เช่น ความสามารถในการเปลี่ยนถ่ายอุณหภูมิในขณะที่แช่แข็งและการทำลาย ความจุของปริมาตรสารละลายวิทริฟิเคชัน ดังนั้นภาชนะในการบรรจุตัวอย่างควรมีคุณสมบัติบรรจุสารละลายวิทริฟิเคชันได้ในปริมาณน้อยที่สุด สามารถที่จะสัมผัสกับไนโตรเจนเหลวได้ใกล้ชิด

ที่สุด ซึ่งจะเอื้อต่อการเปลี่ยนผ่านของอุณหภูมิ และมีอัตราเร็วในการลดอุณหภูมิที่สูง (Begin *et al.*, 2003)

สรุปผลการศึกษาได้ว่าการผลิตตัวอ่อนนอกร่างกายในระดับห้องปฏิบัติการสามารถผลิตตัวอ่อนระยะ 4-16 เซลล์และพัฒนาไปถึงระยะบลาสโตซิสต์ได้ ในขณะที่ตัวอ่อนที่ผ่านการแช่แข็งแบบวิทริฟิเคชันไม่สามารถพัฒนาไปสู่ระยะอื่นๆได้

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยและนวัตกรรม มหาวิทยาลัยนครพนม งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2564 ขอขอบคุณสหกรณ์การเลี้ยงปศุสัตว์ กรป.กลาง โพนยางคำ จำกัด ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างรังไข่โค และขอขอบคุณสำนักงานปศุสัตว์จังหวัดนครพนมที่อนุเคราะห์น้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อโค

เอกสารอ้างอิง

- Akkoc, T., Taskin, A.C., Caputcu, A.T., Arat, S. and Bagis, H. 2011. The effect of solid surface vitrification (SSV) versus classic vitrification technique on survive rate of in vitro produced bovine blastocysts. J. Anim. Vet. Adv. 10(22): 2885-2891.
- Aono A, Nagatomo H, Takuma T, Nonaka R, Ono Y, Wada Y, Abe, Y., Takahashi, M., Watanabe, T. and Kawahara, M. 2013. Dynamics of intracellular phospholipid membrane organization during oocyte maturation and successful vitrification of immature oocytes retrieved by ovum pick-up in cattle. Theriogenology. 79: 1146-1152.

- Asami, M., Lam, B.Y.H., Ma, M.K., Rainbow, K., Braun, S., VerMilyea, M.D., Yeo, G.S.H. and Perry, A.C.F. 2022. Human embryonic genome activation initiates at the one-cell stage. *Cell Stem Cell*. 29: 209–216.
- Asgari, V., Hosseini, S.M., Forouzanfar, M., Hajian, M. and Nasr-Esfahani, M.H. 2012. Vitrification of in vitro produced bovine embryos: Effect of embryonic block and developmental kinetics. *Cryobiology*. 65: 278–283.
- Begin, I., Bhatia, B., Blaldassarre, H., Dinnyes, A. and Keefer, C.L. 2003. Cryopreservation of goat oocytes and *in vivo* derived 2 to 4 cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid surface vitrification (SSV) methods. *Theriogenology*. 59: 1839-1850.
- Bo, G.A. and Mapletoft, R.J. 2013. Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim. Reprod*. 10(3): 344-348.
- Caamao, J.N., Gomez, E., Trigal, B., Munoz, M., Carrocera, S., Martin, D. and Diez, C. 2015. Survival of vitrified in vitro–produced bovine embryos after a one-step warming in-straw cryoprotectant dilution procedure. *Theriogenology*. 83: 881–890.
- Canon-Beltran, K., Cajas, Y.N., Pérez-Cerezales, S., Leal, C.L.V., Agirregoitia, Ek., Gutierrez-Adán, A., González, E.M. and Rizos, D. 2021. Nobiletin enhances the development and quality of bovine embryos in vitro during two key periods of embryonic genome activation. *Sci. Rep*. 11: 11796.
- Chumnandee, C., Wangsomnuk, P. and Sirisathien, S. 2017. Effects of polyvinyl alcohol on vitrification of mature and immature bovine oocytes. *Asia Pac J Sci Technol*. 22(4): 1-9.
- Department of Livestock Development (DLD). 2012. Beef Cattle Strategy 2012-2016. Ministry of Agriculture and Cooperatives. Bangkok. (In Thai)
- Ezoe, K., Yabuuchi, A., Tani, T., Mori, C., Miki, T., Takayama, Y., Beyhan, Z., Kato, Y., Okuno, T., Kobayashi, T. and Kato, K. 2015. Developmental competence of vitrified-warmed bovine oocytes at the germinal-vesicle stage is improved by cyclic adenosine monophosphate modulators during *in vitro* maturation. *Plos One*. 10: 1-14.
- Faheem, M.S., Baron, E., Carvalhais, I., Chaveiro, A., Pavani, K. and da Silva, F.M. 2014. The effect of vitrification of immature bovine oocytes to the subsequent *in vitro* development and gene expression. *Zygote*. 26: 1-10.
- Faizah, Z., Darsini, N. and Hinting, A. 2016. Fertilization of bovine oocytes vitrified pre and post *in vitro* maturation. *FMI*. 52(2): 104-107.
- Food and Agriculture Organization (FAO), 1991. Training manual for embryo transfer in cattle. www.fao.org/docrep/004/t0117e/t0117e00.htm (Accessed 15 September, 2015).

- Frei, R.E., Schultz, G.A. and Church, R.B. 1989. Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8-16 cell stage of embryogenesis in the cow. *J. Reprod. Fert.* 86: 637-641.
- Gupta, M.K., Uhm, S.J. and Lee, H.T. 2007. Cryopreservation of immature and *in vitro* matured porcine oocytes by solid surface vitrification. *Theriogenology*. 67: 238-248.
- Ishii, T., Tomita, K., Sakakibara, H. and Ohkura, S. 2018. Embryogenesis of vitrified mature bovine oocytes is improved in the presence of multi-layered cumulus cells. *J. Reprod. Dev.* 64: 95-99.
- Malenko, G.P., Kornienko, E.V., Nesterov, I.I. and Kosovsky, G.Y. 2017. A new simple and reliable vitrification device based on Hollow Fiber Vitrification (HFV) method evaluated using IVP bovine embryos. *Anim. Reprod.* 14(2): 392-399.
- Montagner, M.M., Gonçalves, P.B.D., Mills, G.A., Christenson, R.K. and White, B.R. 2006. Freezing swine embryos: do success rates differ between breeds? *Nebraska Swine Rep.* 21-25.
- Office of Agricultural Economics. 2016. Situation of important agricultural products and trends in 2017. Agricultural Information Center Office of Agricultural Economics. Ministry of Agriculture and Cooperatives. Bangkok. 241 p. (In Thai)
- Papis, K., Shimizu, M. and Izaïke, Y. 2000. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology*. 54: 651-658
- Rall, W.F. and Fahy, M. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 °C by vitrification. *Nature*. 313: 573-575.
- Vajta, G. and Kuwayama, M. 2006. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*. 65: 236-244.
- Van den Abbeel, E. and Van Steirteghem, A. 2000. Zona pellucida damage to human embryos after cryopreservation and consequences for their blastomere survival and *in vitro* viability. *Hum. Reprod.* 15(2): 373-378.
- Woods, E.J., Benson, J.D., Agca, Y. and Critser, J.K. 2004. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*. 48: 146-156.

