บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มี 2 การทดลอง การทดลองที่ 1 มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของโกรทแฟ็กเตอร์ต่อการเจริญของฟอลลิเคิลขนาดเล็กของกระบือปลัก โดยแบ่งฟอลลิเคิลออกเป็น 3 กลุ่ม ตามขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางคือ กลุ่ม 1 ขนาด 200-399 ไมโครเมตร กลุ่ม 2 ขนาด 400-599 ไมโครเมตร และ กลุ่ม 3 ขนาด 600-799 ไมโครเมตร ฟอลลิเคิลเหล่านี้ถูกเลี้ยงในคอลลาเจนเจลนาน 14 วัน โดยวัดอัตราการเจริญในวันที่ 7 และ 14 จากการทดลองพบว่าโกรทแฟ็กเตอร์ bFGF มีอัตราการรอดและการเจริญของฟอลลิเคิลหลังจากการเลี้ยงดีที่สุดในฟอลลิเคิลทั้ง 3 กลุ่ม (8.7%, 44.8% และ 32.7% ในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ) ส่วนโกรทแฟ็กเตอร์ IGF-I ส่งผลต่อการรอดและการเจริญของฟอลลิเคิลทั้ง 3 กลุ่ม เพียงเล็กน้อยแต่ไม่ได้ยับยั้งการรอดและการเจริญของฟอลลิเคิล (1.7%, 21.6% และ 19.0% ในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ) โกรทแฟ็กเตอร์ bFGF+IGF-I สามารถทำให้ฟอลลิเคิลรอดและเพิ่มขนาดได้ทั้ง 3 กลุ่ม ส่วนฟอลลิเคิลที่เลี้ยงในน้ำยาที่มี EGF อย่างเดียวและ EGF ร่วมกับโกรทแฟ็กเตอร์ตัวอื่นๆ (bFGF+EGF, IGF-I+EGF และ bFGF+IGF-I+EGF) ไม่สามารถทำให้ฟอลลิเคิลรอดได้หลังจากการเลี้ยง การทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า bFGF และ IGF-I มีความต้องการในการจริญของฟอลลิเคิล ในขณะที่ EGF มีผลยับยั้งการรอดและการเจริญของฟอลลิเคิลในกระบือปลัก

การทดลองที่ 2 มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเจริญและการรอดของฟอลลิเคิลที่เลี้ยงในหลอดทดลองในระยะเวลานานต่างกัน และตรวจสอบผลของการเติม bFGF ในน้ำยาเลี้ยงฟอลลิเคิลต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังการทำ ICSI ฟอลลิเคิลที่แยกได้จากรังไข่จะถูกแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มตามขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางคือ กลุ่ม 1: 800-999 ไมโครเมตร กลุ่ม 2: 1000-1199 ไมโครเมตร กลุ่ม 3: 1200-1399 ไมโครเมตร กลุ่ม 4: 1400-1599 ไมโครเมตร และกลุ่ม 5: 1600-1800 ไมโครเมตร ทำการเลี้ยงฟอลลิเคิลนาน 7 14 หรือ 30 วัน จากผลการทดลองพบว่าเลี้ยงนาน 30 วันให้ผลดีที่สุดในแง่ของไข่ที่แยกได้จากฟอลลิเคิลมีนิวเคลียสเจริญถึงระยะ MII ได้สูงสุด อัตรารอดของไข่ระหว่างกลุ่ม 1-5 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งอยู่ระหว่าง 55% to 69% การทดลองต่อมาทำการศึกษาผลของการเติม bFGF (50 ng/ml) ในน้ำยาเลี้ยงฟอลลิเคิลต่อการเจริญของฟอลลิเคิลและการเจริญของนิวเคลียสไข่ที่แยกได้จากฟอลลิเคิล จากการทดลองพบว่ากลุ่ม 4 และ 5 ที่เติม bFGF มีอัตราการเจริญสูงสุด (2.8±0.6 ไมโครเมตร/วัน และ 2.9±0.4 ไมโครเมตร/วัน) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม 1 ที่ไม่เติม bFGF (1.9±0.2 ไมโครเมตร/วัน) และอัตราการเจริญของนิวเคลียสถึงระยะ MII สูงสุดอยู่ที่กลุ่ม 5 ที่เติม bFGF (25%) นำไข่ที่แยกได้จากฟอลลิเคิลทั้ง 5 กลุ่มที่เลี้ยงในน้ำยาที่เติม bFGF นาน 30 วัน ไปเลี้ยงให้พร้อมปฏิสนธิเพื่อทำ ICSI อัตราการรอดของไข่และอัตราการเกิด second polar body ของทั้ง 5 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ มีเพียงไข่ที่แยกจากฟอลลิเคิลกลุ่ม 5 เท่านั้นที่สามารถเจริญถึงระยะบลาสโตซีส (14%) หลังจากทำ ICSI การทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าไข่ที่แยกได้จากฟอลลิเคิลในกลุ่ม 5 ที่เลี้ยงในน้ำยาที่เติม bFGF นาน 30 วันสามารถทำให้ได้ตัวอ่อนเจริญถึงระยะบลาสโตซีสหลังจากทำ ISCI

Abstract

This study was divided into 2 experiments. Expeiment 1 was carried out to examine the effects of growth factors on swamp buffalo preantral follicle growth. Preantral follicles from slaughtered buffalo ovaries were recovered by a combined mechanical and enzymatic methods. The follicle were divided into 3 groups, depending on their diameters, group I: 200-399 μm, group II: 400-599 μm, and group III: 600-799 μm. The follicles had been cultured in collagen gel and culture in medium contain with difference growth factor for 14 days. The diameters of follicles were measured at days 7 and 14. Culture medium supplemented with bFGF yielded the highest survival rate in all size groups of the follicles (8.7%, 44.8% and 32.7% in group I, II and III respectively). With IGF-I supplementation, a minimal but significant supportive effect on survival rates were observed (1.7%, 21.6% and 19.0% in group I, II and III respectively). The combination of bFGF and IGF-I promoted follicle survival in all follicle groups. In contrast, EGF inhibited follicle survival when it was added to the culture medium alone or in combination with bFGF and/or IGF-I. Results from this study can be concluded that both bFGF and IGF-I were required for *in vitro* culture of buffalo early antral follicle. However, bFGF showed more effecting factor suggesting that it was the suitable supplemented factor. In contrast, EGF had inhibitory effect on follicular development.

Experiment 2 was undertaken to isolate swamp buffalo antral follicles (AF), to examine the different *in vitro* culture day on the viability and sizes of swamp buffalo AF and to test the effect of bFGF and subsequent to intracytoplasmic sperm injection (ICSI) on the embryo development competence. Follicle were categorize into 5 groups depending on their diameters, group I: 800-999 μm, group II: 1000-1199 μm, group III: 1200-1399 μm, group IV: 1400-1599 μm and group V: 1600-1800 μm. The follicle were cultured *in vitro* for 7, 14 or 30 days. The results showed that 30 days culture period were the best according to the number of oocytes reached metaphase II (MII) stage. The survival rates among group I, II, III, IV and V were not significantly different. No matter 7, 14 or 30 days culture *in vitro*, which range from 55% to 69%. Further study was examined effects of 50 ng/mL bFGF supplemented into *in vitro* growth medium on the growth of follicle and maturation rate of isolated oocytes. The highest growth rates were obtained in group IV and V supplemented with bFGF (2.8±0.6 μm/day and 2.9±0.4 μm/day) compared to group I without bFGF supplementation (1.9±0.2 μm/day), and the highest MII rate was found in group V supplemented with bFGF (25%). After 30 days culture *in vitro* supplemented with 50 ng/mL bFGF, follicle were subjected to ICSI. The oocytes viability and the second polar body extrusion rates were not differ among 5 groups. Only oocytes in group V could develop to blastocyst stage (14%), which significantly higher than other groups. In conclusion, 30 days

culture supplemented with 50 ng/mL bFGF could support swamp buffalo oocytes isolated from follicle diameter 1600-1800 μm developed to blastocyst stage after ICSI.