SUT3-304-53-36-08

รายงานการวิจัย

ผลของวิธีการกระตุ้นการเจริญเติบโตหลังการฉีดอสุจิเข้าในไข่โคต่ออัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนและอัตราการตั้งท้องหลังการย้ายฝากตัวอ่อน

(Effects of activation protocol after intracytoplasmic sperm injection on the embryo development and pregnancy after transfer embryo in cattle)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

SUT3-304-53-36-08

รายงานการวิจัย

ผลของวิธีการกระตุ้นการเจริญเติบโตหลังการฉีดอสุจิเข้าในไข่โคต่ออัตรา การเจริญเติบโตของตัวอ่อนและอัตราการตั้งท้องหลังการย้ายฝากตัวอ่อน

(Effect of activation protocol after intracytoplasmic sperm injection on the embryo development and pregnancy after transfer embryo in cattle)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รศ. ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

รศ. ดร.มารินา เกตุทัต คาร์นส์

นายเพลิน เมินกระโทก

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2552

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กรกฎาคม 2557

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2553-2555 คณะวิจัยขอขอบคุณสมาชิกศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้รายงานการวิจัยของคณะวิจัยดำเนินการไปได้อย่างดียิ่ง และสำเร็จลุล่วง

รองศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย
หัวหน้าโครงการ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

การฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่โดยเตรียมอสุจิด้วยเทคนิค swim-up จากนั้นตัวอสุจิจะถูกฉีดเข้าไปในไซโพลาสซึมของไข่โคที่ถูกเลี้ยงให้สุกในหลอดแก้วด้วยเครื่อง micromanipulator หลังจากนั้นกระตุ้นด้วย 5μM ionomycin (Io) หรือ 7% ethanol (EtOH) นาน 5 นาที จะเกิดการปลดปล่อยโพลาบอดี้ที่สองในชั่วโมงที่ 3 หลังจากกระตุ้นด้วยสารเคมี โดยพบว่าอัตราการปลดปล่อยโพลาบอดี้ที่สองเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (85-87%) ในกลุ่ม EtOH (EtOH + 6-DMAP, EtOH + CHX) จากนั้นไข่ที่มีการปลดปล่อยโพลาบอดี้ที่สองจะถูกคัดเลือกไปไว้ในน้ำยาที่มี 1.9 mM 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) หรือ 10 μg/mL cycloheximide (CHX) และเลี้ยงต่ออีก 3 และ 5 ชั่วโมง ตามลำดับ หลังจากไข่ถูกกระตุ้นด้วยสารเคมีแล้วจะนำไปเลี้ยงในน้ำยา mSOF เป็นเวลา 2 วัน และเลือกเฉพาะตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ไปเลี้ยงร่วมกับเซลล์บุท่อนำไข่โคนาน 5 วัน พบว่าอัตราการแบ่งตัวในกลุ่ม Io+6-DMAP, EtOH+6-DMAP และ EtOH+CHX เป็น 76%, 70% และ 80% ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่ากลุ่ม Io + CHX (59%) และกลุ่มที่ไม่ได้ฉีดอสุจิเข้าไปในไข่(53%, 53%, 53% และ 45% ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อัตราการเจริญของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสในกลุ่ม Io + 6-DMAP และ EtOH + CHX (25 และ 27% ตามลำดับ) สูงกว่ากลุ่ม Io + CHX และ EtOH + 6-DMAP (16 and 17% ตามลำดับ) รวมทั้งกลุ่มที่ไม่ได้ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ (9%, 53%, 53% และ 45% ตามลำดับ) นอกจากนี้ จำนวนเซลล์ของ TE ICM และ total cell number ในกลุ่มที่ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบจากเปอร์เซ็นต์การเจริญของตัวอ่อนจนถึงระยะบลาสโตซีส กลุ่มที่กระตุ้นด้วย EtOH + CHX มีประสิทธิภาพที่สุดในการกระตุ้นไข่โคหลังจากฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ ซึ่งจะใช้วิธีการกระตุ้นนี้ในการทดลองต่อไป การทดลองต่อมาได้นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเกรด 1 และ เกรด 2 อายุ 7 วัน ที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้วหรือการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่เพื่อทำการแช่แข็งด้วย Cryotop และ microdrop และทำละลาย 1 หรือ 3 ขั้นตอน สำหรับตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเกรด 1 พบอัตรารอดสูงสุดในกลุ่มที่ปฏิสนธิในหลอดแก้วและแช่แข็งด้วย Cryotop (81-84%) กลุ่มที่ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่และแช่แข็งด้วย microdrop ที่มีการทำละลายแบบ 3 ขั้นตอน (84%) และกลุ่มที่ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่และแช่แข็งด้วย Cryotop (80-88%) นอกจากนี้พบอัตรารอดต่ำสุดในกลุ่มที่ปฏิสนธิในหลอดแก้วและแช่แข็งด้วย microdrop ที่มีการทำละลายแบบ 1 ขั้นตอน (53%) กลุ่มที่ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่และแช่แข็งด้วย Cryotop ที่มีการทำละลายแบบ 1 (74%) และ 3 (77%) ขั้นตอน ให้อัตราการเจริญถึงระยะแฮชบลาสโตซีสหลังการเลี้ยง 48 ชั่วโมงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนสูงกว่ากลุ่มอื่น สำหรับตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเกรด 2 พบว่ากลุ่มที่ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่และแช่แข็งด้วย Cryotop ที่มีการทำละลายแบบ 1 และ 3 ขั้นตอน มีอัตรารอดชีวิต และอัตราการเจริญถึงระยะแฮช บลาสโตซีสหลัง 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมงตามลำดับสูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีลูกโคเกิดมา 1 ตัว หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนสดที่ผลิตโดยการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ จากผลการทดลองสรุปได้ว่าการกระตุ้นไข่โคด้วย Io + 6-DMAP และ EtOH + CHX มีประสิทธิภาพสูงต่อการเพิ่มอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนและอัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซีสและกลุ่มที่ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ที่ทำการแช่แข็งด้วย Cryotop มีประสิทธิภาพดีที่สุด นอกจากนั้นการผลิตตัวอ่อนด้วยวิธีดังกล่าวเมื่อนำไปย้ายฝากให้โคตัวรับสามารถให้กำเนิดลูกโคปกติได้

Abstract

A single spermatozoon prepared by swim-up method was injected into the cytoplasm of *in vitro* matured (IVM) bovine oocytes using a micromanipulator under an inverted microscope. The release of the second polar body from injected oocytes was examined at 3 h after activation either by exposure to 5μM ionomycin (Io group) or 7% ethanol (EtOH group) for 5 min. Significantly higher rate of second PB extrusion (85-87%) were obtained in the EtOH groups (EtOH + 6-DMAP, EtOH + CHX) after 3 h of ICSI. Injected oocytes extruded the second polar body at 3 h of activation were transferred to the medium supplemented either with 1.9 mM 6-dimethylaminopurine (6-DMAP group) or 10 μg/mL cychloheximide (CHX group) and cultured for 3 and 5 h, respectively. The activated oocytes were further cultured in mSOF medium for 2 days, and then embryos developed to 8-cell stage were selected and co-cultured with bovine oviduct cells for additional 5 days. The cleavage rates of Io+6-DMAP, EtOH+6-DMAP and EtOH+CHX groups were 76%, 70% and 80%, respectively, and significantly higher than those in Io + CHX group (59%) and sham injected group in all activation treatments. Significantly higher blastocyst formation rates were obtained in Io + 6-DMAP and EtOH + CHX groups (25 and 27% respectively) than those in Io + CHX and EtOH + 6-DMAP groups (16 and 17%, respectively) and sham injected groups. The highest TE, ICM and total cell number were obtained from all the sperm injection/ICSI groups, which were significantly higher than those in all sham-injection groups. Base on the percentage of blastocysts, EtOH + CHX was more effective for activation of bovine oocytes following ICSI, which will be used in the following experiment. Expanded G1 or G2 Blastocysts obtained on day 7 after IVF or ICSI were cryopreserved by the Cryotop and microdrop devices and 1 step warming and 3 step warming methods. For Grade 1 blastocysts, the survival rate tended to be highest in the Cryotop vitrified IVF groups (81-84%), microdrop vitrified ICSI with 3 steps warming group (84%) and Cryotop vitrified ICSI groups (80-88%). And the lowest survival rate was achieved in microdrop vitrified IVF with 1 step warming group (53%). The highest blastocyst hatched rate post 48 h IVC were obtained from Cryotop vitrified ICSI with 1 step (74%) and 3 steps (77%) warming groups. For Grade 2 blastocysts, when Cryotop vitrified ICSI embryos were warmed by 1 step and 3 step methods, the rates of survival, hatched blastocyst stages after 24 and 48 h, respectively, of culture were significantly higher than those of other groups. One calf was born from embryo transferred of ICSI-derived fresh embryos to recipient. Our results indicated that bovine oocytes were effectively activated by combination treatment of Io with 6-DMAP and EtOH with CHX resulting in the highest cleavage and blastocyst formation rates. ICSI-derived blastocysts were highly effective vitrified by Cryotop method

สารบัญเรื่อง

หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ค
สารบัญเรื่อง.....ง
สารบัญตาราง..... ฉ
บทที่ 1 บทนำ
1.1 ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย.....1
1.2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....1
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....2
1.4 ขอบเขตของการวิจัย..... 3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย..... 3
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย
2.1 การผลิตตัวอ่อนโดยวิธีฉีดตัวอสุจิเข้าในไข่โคและการกระตุ้น..... 4
2.1.1 การเตรียมไข่สำหรับการการฉีดอสุจิ..... 4
2.1.2 การเตรียมน้ำเชื้อสำหรับการการฉีดอสุจิเข้าในไข่โค..... 4
2.1.3 การฉีดอสุจิเข้าในไข่..... 4
2.1.4 การกระตุ้นการปฏิสนธิด้วยสารเคมีหลังการฉีดอสุจิเข้าไปในไข่.....5
2.1.5 การเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว..... 5
2.2 การผลิตตัวอ่อนโดยวิธีปฏิสนธิในหลอดแก้ว..... 5
2.2.1 การเตรียมไข่..... 5
2.2.2 การเตรียมตัวอสุจิเพื่อการปฏิสนธิในหลอดแก้ว..... 5
2.2.3 การปฏิสนธิในหลอดแก้ว..... 6
2.2.4 การเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว..... 6
2.3 การย้อมสีตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส..... 6
2.4 การแช่แข็งตัวอ่อน..... 6
2.5 การย้ายฝากตัวอ่อนให้โคตัวรับ.....7
2.8 การวางแผนการวิจัย.....7
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล
3.1 การเหนี่ยวนำของโพลาบอดี้ที่สองด้วย EtOH หรือ Io..... 9
3.2 ผลของการกระตุ้นหลังจากฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อน..... 9

3.3 การย้อมสีเซลล์ในตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสวันที่ 7 จากการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่……..... 9
3.4 ผลการทดลองเปรียบเทียบการแช่แข็งตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้วและการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่……..…….....….. 10
3.5 ผลการย้ายฝากตัวอ่อนให้โคตัวรับ……..…….……10
บทที่ 4 อภิปรายและวิจารณ์ผล……...…….……..……....16
บรรณานุกรม……..…….…….....….. 20
ประวัติผู้วิจัย……..…. 26

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ผลของการกระตุ้นด้วยสารเคมีต่างๆต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโค……..…..…..…..….. 11

ตารางที่ 2 จำนวนเซลล์ของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้จากการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่
และกระตุ้นด้วยสารเคมีแบบต่างๆ …..... 12

ตารางที่ 3 แสดงอัตรารอด และ อัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะแฮชบลาสโตซีสหลังจากแช่แข็ง
ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเกรด 1 และทำละลาย……..……..13

ตารางที่ 4 แสดงอัตรารอด และ อัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะแฮชบลาสโตซีสหลังจากแช่แข็งตัวอ่อน
ระยะบลาสโตซีสเกรด 2 และทำละลาย……..……..……. 14

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1. ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในปัจจุบันเทคโนโลยีการผลิตตัวอ่อนโคในหลอดแก้วที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในคนและสัตว์คือ การปฏิสนธิในหลอดแก้ว (*In vitro* fertilization; IVF) และการฉีดอสุจิเข้าในไข่ (Intracytoplasmic sperm injection; ICSI) จากการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อของพ่อโคในการปฏิสนธิในหลอดแก้ว (ชุติ และคณะ, 2549; Alomar และคณะ, 2006; Zhang และคณะ, 2003) พบว่าพ่อโคแต่ละตัวจะมีความสามารถในการปฏิสนธิกับไข่ได้ไม่เท่ากัน นอกจากนี้ช่วงอายุ สุขภาพ และการเก็บน้ำเชื้อพ่อโคแต่ละครั้งล้วนมีผลกระทบต่อคุณภาพของน้ำเชื้อที่ได้ (Otoi และคณะ, 1993) ทำให้อัตราการปฏิสนธิโดยวิธี IVF ลดต่ำลง วิธีการแก้ไขสามารถทำได้โดยการทำ ICSI วิธีนี้สามารถใช้ได้ทั้งอสุจิที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต (Hoshi และคณะ, 1994; Goto และคณะ, 1990) และแก้ปัญหาเรื่องอายุของพ่อโค ความผันแปรของคุณภาพน้ำเชื้อที่เก็บต่างกัน และความสามารถในการปฏิสนธิที่แตกต่างกันของพ่อโคแต่ละตัวได้ อย่างไรก็ตามการทำ ICSI ในโคจำเป็นต้องใช้สารเคมีกระตุ้นเพื่อช่วยให้ขบวนการปฏิสนธิเกิดได้อย่างสมบูรณ์ ในปัจจุบันยังคงมีการศึกษากันอย่างต่อเนื่องเพื่อหาวิธีการกระตุ้นที่ส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อน (Chen and Seidel, 1997; Chung และคณะ, 2000; Emuta และ Horiuchi, 2001; Galli และคณะ, 2003; Oikawa และคณะ, 2005) ซึ่งงานวิจัยส่วนใหญ่มิได้นำตัวอ่อนที่ผลิตได้ไปย้ายฝากให้โคตัวรับ ทำให้ยังไม่มีข้อมูลที่ยืนยันว่าวิธีการกระตุ้นด้วยสารเคมีที่แตกต่างกันมีผลกระทบต่ออัตราการตั้งท้อง อัตราการแท้ง และอัตราการคลอดหลังการย้ายฝากตัวอ่อนให้โคตัวรับหรือไม่

1.2. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ICSI เป็นเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์วิธีหนึ่งที่ใช้อย่างแพร่หลายในมนุษย์และหนู การทำ ICSI ประสบความสำเร็จแล้วในสัตว์หลายชนิด ได้แก่ กระต่าย (Hosoi และคณะ, 1988) โค (Goto และคณะ, 1990) มนุษย์ (Palermo และคณะ, 1992; Van Steirteghem และคณะ, 1993;) และหนูถีบจักร (Kimura และ Yanagimachi, 1995; Ahmadi และคณะ, 1995; Lacham-Kaplan และTrounson, 1995) มีการศึกษาพบว่าการเลือกใช้อสุจิที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตก็สามารถผลิตลูกโคเกิดได้ (Goto และคณะ, 1990) และมีการติดตามเกี่ยวกับอัตราการเจริญเติบโต อุปนิสัย และระบบสืบพันธุ์อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 5 ปี พบว่าไม่มีความผิดปกติแต่อย่างใด (Goto และ Yanagita, 1995) แต่อย่างไรก็ตามอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนหลังจากการทำ ICSI ในโคยังไม่ดีนัก (Goto และคณะ, 1990; Goto, 1993; Li และคณะ, 1993; Iwasaki และ Li, 1994) ปัจจุบันการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคภายหลังการทำ ICSI มุ่งเน้นไปที่การกระตุ้นให้เกิดการ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เจริญเติบโตและแบ่งตัวได้ดีขึ้น โดยใช้ Ionomycin (Rho และคณะ, 1998), Calcium ionophore A23187 (Keefer และคณะ, 1990; Goto, 1993; Chung และคณะ, 2000), Ethanol (Emuta และ Horiuchi, 2001; Horiuchi และคณะ, 2002; Fujinami และคณะ, 2004), Electric stimulation (Behalova และคณะ, 1993; Hwang และคณะ, 2000) การทำ ICSI ไข่หนูและไข่มนุษย์ไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมีในการกระตุ้น เนื่องจากขบวนการดูด cytoplasm เข้ามาภายในเข็ม ICSI เพียงเล็กน้อยก็สามารถกระตุ้นระดับแคลเซียมภายในไข่เพิ่มสูงได้จนเพียงพอต่อการพัฒนาของตัวอ่อน (Tesarik และ Sousa., 1995) นักวิทยาศาสตร์ได้ตั้งสมมติฐานว่าระดับแคลเซียมที่เพิ่มขึ้นในไข่มนุษย์ภายหลังที่มีการทำ ICSI มิได้เป็นผลจากกระบวนการทำ ICSI แต่เกิดจาก Sperm-associated oocyte-activating factor (SAOAF) ที่ออกมาจากหัวอสุจิ (Edwards and Van Steirtegham, 1993; Dozortsev และคณะ, 1995) การปฏิสนธิตามธรรมชาติ SAOAF จะหลั่งออกจากหัวอสุจิหลังจากผนังที่บริเวณหัวอสุจิหลอมรวมกับผนังเซลล์ไข่ (Dozortsev และคณะ, 1997)

สำหรับไข่โค การดูด cytoplasm เข้ามาภายในเข็ม ICSI เพียงเล็กน้อยเหมือนไข่มนุษย์และไข่หนูไม่สามารถทำให้ไข่เจริญเติบโตได้ (Horiuchi และคณะ, 1998) และการฉีดอสุจิเข้าไปในไข่เพียงอย่างเดียวไม่ส่งผลให้ปริมาณแคลเซียมภายในไข่เพิ่มได้ ทำให้อัตราการปฏิสนธิเกิดได้ไม่ดี จึงต้องมีการกระตุ้นด้วยสารเคมีเพื่อช่วยให้ระดับแคลเซียมภายในไข่เพิ่มสูงขึ้นจนเพียงพอต่อขบวนการปฏิสนธิ ทำให้ตัวอ่อนสามารถเจริญเติบโตได้ (Chung และคณะ, 2000; Emuta และ Horiuchi, 2001; Galli และคณะ, 2003; Oikawa และคณะ, 2005) การกระตุ้นด้วยสารเคมีเป็นวิธีการทำให้ระดับของแคลเซียมภายในไข่เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งเป็นการเลียนแบบการปฏิสนธิตามธรรมชาติ เมื่อระดับแคลเซียมในไข่เพิ่มขึ้นจะส่งผลทำให้ระดับ Maturation promoting factor (MPF) ลดลง ระดับ MPF จะสูงที่สุดที่ระยะ MII ระดับของ MPF จะทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการแบ่งตัวของไข่ หลังการปฏิสนธิตามธรรมชาติระดับของ MPF จะลดลง เนื่องจากความเข้มข้นของแคลเซียมภายในไข่เพิ่มสูงขึ้นทำให้ cyclin B สลายตัว (MPF ประกอบด้วย $p34^{cdc2}$ และ cyclin B) เมื่อ cyclin B สลายตัวจึงส่งผลให้ระดับของ MPF ลดลง (Fujinami และคณะ, 2004)

การศึกษาการกระตุ้นด้วยสารเคมีหลังการทำ ICSI ในโค ยังไม่สามารถชี้ชัดได้ว่าสารเคมีตัวใดที่เหมาะสมในการนำมาใช้ ดังนั้นจึงยังคงมีความจำเป็นที่ต้องศึกษาเพื่อหาสารเคมีที่ใช้กระตุ้นที่เหมาะสมที่ช่วยให้การทำ ICSI ในโคมีประสิทธิภาพดี

1.3.วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.3.1. ศึกษาผลของการใช้สารเคมีที่แตกต่างกันในการกระตุ้นต่ออัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคที่ผลิตโดยวิธี ICSI

1.3.2. ศึกษาอัตราการรอดของตัวอ่อนหลังการแช่แข็งด้วยวิธีวิตริฟิเกชั่น โดยการเปรียบเทียบตัวอ่อนที่ได้จากการกระตุ้นด้วยสารเคมีที่แตกต่างกัน

1.3.3. ศึกษาอัตราการตั้งท้องหลังย้ายฝากตัวอ่อนสดและแช่แข็งด้วยวิธีวิตริฟิเกชั่นโดยการเปรียบเทียบตัวอ่อนที่ได้จากการกระตุ้นด้วยสารเคมีที่แตกต่างกัน

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1.4.1. จะทำการศึกษาวิจัยถึงผลของการใช้สารเคมีที่แตกต่างกันในการกระตุ้นต่ออัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคที่ผลิตโดยวิธี ICSI

1.4.2. จะทำการศึกษาวิจัยถึงอัตราการรอดของตัวอ่อนโคที่ผลิตโดยวิธี ICSI ที่ได้จากการกระตุ้นด้วยสารเคมีที่แตกต่างกัน หลังการแช่แข็งโดยวิธีวิทริฟิเกชั่นโดยเปรียบเทียบกับตัวอ่อนที่ผลิตโดยวิธี IVF

1.4.3. จะทำการศึกษาอัตราการตั้งท้องและการคลอดของตัวอ่อนโคที่ผลิตโดยวิธี ICSI และวิธี IVF

1.5. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ผลงานวิจัยที่ได้จะช่วยสร้างแนวทางการผลิตตัวอ่อนโดยวิธี ICSI และนำองค์ความรู้ที่ได้ไปผลิตตัวอ่อนโคเพื่อกระจายตัวอ่อนพันธุกรรมดีสู่ภาคเอกชน และสามารถพัฒนาสู่เชิงพาณิชย์ได้ นอกจากนี้คาดว่าหลังเสร็จสิ้นการวิจัยจะสามารถเสนอผลงานวิจัยในระดับนานาชาติได้อย่างน้อย 1 เรื่อง และเผยแพร่ข้อมูลสู่เกษตรกรและองค์กรที่สนใจโดยการจัดประชุมเชิงวิชาการเทคโนโลยีการผลิตตัวอ่อนโค เพื่อนำไปประยุกต์ใช้จริงในฟาร์มเกษตรกรผู้เลี้ยงโคต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

2.1. การผลิตตัวอ่อนโดยวิธีฉีดตัวอสุจิเข้าในไข่โคและการกระตุ้นด้วยสารเคมี

2.1.1. การเตรียมไข่สำหรับการการฉีดอสุจิ

เก็บรังไข่โคจากโรงฆ่าสัตว์ไว้ในน้ำเกลือ (0.9% NaCl) ขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ แล้วใช้เข็มเบอร์ 18G ต่อกับกระบอกฉีดยาขนาด 10 ซีซี ดูดไข่จากฟอลลิเคิลที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-8 mm ทำการคัดเลือกไข่ที่มีชั้นเซลล์คิวมูลัสหุ้มอย่างน้อย 3 ชั้นไปเลี้ยงในน้ำยาในจานเลี้ยงเซลล์ซึ่งปิดคลุมน้ำยาด้วย mineral oil เลี้ยงในสัดส่วน 20 ใบ/100 µl น้ำยาเลี้ยงไข่ประกอบด้วย TCM199 ที่เติมด้วย 10% FCS, 50 IU/ml HCG (HCG, Chorulon®, Intervet), 0.02 AU/ml FSH (FSH, Antrin®, Denka Pharmaceutical, Japan) และ 1 µg/ml 17 β estradiol นำไปเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 21 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาย่อยเซลล์คูมูลัสออกในน้ำยาที่มี 0.2% hyarulonidase จากนั้นคัดเฉพาะไข่ที่พัฒนาเข้าสู่ระยะ MII สำหรับทำ ICSI ต่อไป

2.1.2. การเตรียมน้ำเชื้อสำหรับการการฉีดอสุจิเข้าในไข่โค

ใช้น้ำเชื้อแช่แข็งจากพ่อพันธุ์ที่มีประวัติให้อัตราการผสมติดสูง จะทำละลายน้ำเชื้อในอากาศ 10 วินาที จากนั้นนำไปใส่ไว้ในน้ำอุณหภูมิ 37°C นาน 20 วินาที ตัดหลอดน้ำเชื้อใส่ในน้ำยาสำหรับปฏิสนธิในหลอดแก้ว (TALP) เอียงหลอดทดลองในตู้เลี้ยงตัวอ่อนนาน 30 นาที เพื่อแยกอสุจิที่ยังมีชีวิตออกจากอสุจิตาย และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,100 รอบ นาน 5 นาที จากนั้นดูดน้ำยาด้านบนทิ้ง แล้วล้าง 2 รอบด้วยน้ำยาสำหรับปฏิสนธิในหลอดแก้ว (TALP) นำไปปั่นที่ 2100 รอบ ครั้งละ 5 นาที จากนั้นนำน้ำยาส่วนบนที่มีอสุจิย้ายไปไว้ใช้สำหรับการทำ ICSI

2.1.3. การฉีดอสุจิเข้าไปในไข่

นำไข่ระยะ MII จำนวนครั้งละ 10 ใบ ลงในหยดน้ำยาสำหรับฉีดอสุจิ (Injection drop; Emcare holding medium) หลังจากแยกอสุจิที่มีชีวิตออกจากที่ไม่มีชีวิตแล้วจะใส่อสุจิลงไป 2 µl ในหยดน้ำยา 10% polyvinylpyrrolidone (PVP) + 0.3% BSA ปริมาณ 5 µl ที่มี ละลายอยู่ หางอสุจิจะถูกปลายเข็ม ICSI (ICSI pipette) ตีให้หักเพื่อไม่ให้อสุจิเคลื่อนที่ได้ จากนั้นดูดตัวอสุจิเข้ามาใน ICSI pipette โดยเริ่มดูดจากส่วนหางเข้ามาก่อน จากนั้นย้าย ICSI pipette ที่มีอสุจิเข้าไปยัง Injection drop แล้วใช้เข็มดูดจับไข่ (Holding pipette) จัดให้ตำแหน่ง 1st Polar body อยู่ที่ 6 หรือ 12 นาฬิกา จากนั้นใช้ ICSI pipette แทงทะลุผ่านเปลือกไข่ (Zona pellucida) ที่ตำแหน่ง 3 นาฬิกา แล้วดูด cytoplasm เข้ามาใน ICSI pipette เล็กน้อย จากนั้นจึงปล่อย cytoplasm และอสุจิเข้าไปในไข่ นำไข่ที่ทำ ICSI ทั้งหมดไปกระตุ้นการปฏิสนธิด้วยสารเคมีต่อไป

2.1.4. การกระตุ้นการปฏิสนธิด้วยสารเคมีหลังการฉีดอสุจิเข้าไปในไข่

ไข่ที่ทำ ICSI แล้วจะถูกกระตุ้นด้วย 5 μM Ionomycin (Io) หรือ 7% Ethanol (EtOH) นาน 5 นาที และย้ายไปเลี้ยงใน TCM199 + 10% FCS อีก 3 ชั่วโมง นำเฉพาะไข่ที่มี 2nd Polar body มาเลี้ยงในน้ำยาที่มี 10 μg/ml cycloheximide (CHX) นาน 5 ชั่วโมง หรือนำมาเลี้ยงในน้ำยาที่มี 1.9 mM 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอ่อนไปเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2

2.1.5. การเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว

ใช้วิธีการเดียวกับที่รายงานไว้แล้ว (รังสรรค์ และคณะ, 2530) นำไข่ที่ผ่านการกระตุ้นแล้วมาเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa + 0.6% BSA ในสัดส่วน 10-20 ใบ/100 μl ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้ บรรยากาศที่มี 5% O_2, 5% CO_2 และ 90% N_2 นาน 2 วัน แล้วคัดเลือกตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ ไปเลี้ยงแบบ co-culture กับเซลล์บุท่อนำไข่โค ในน้ำยา SOFaa + 0.6% BSA ในสัดส่วน 10 ใบ/100 μl แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 5 วัน เปลี่ยนน้ำยาทุกๆ วัน พร้อมทั้งบันทึกการเจริญเติบโตของตัวอ่อน

2.2. การผลิตตัวอ่อนโดยวิธีปฏิสนธิในหลอดแก้ว

2.2.1. การเตรียมและเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้ว

เก็บรังไข่โคจากโรงฆ่าสัตว์ไว้ในน้ำเกลือ (0.9% NaCl) ขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ แล้วใช้เข็มเบอร์ 18G ต่อกับกระบอกฉีดยาขนาด 10 ซีซี ดูดไข่จากฟอลลิเคิลที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-8 mm ทำการคัดเลือกไข่ที่มีชั้นเซลล์คิวมูลัสหุ้มอย่างน้อย 3 ชั้นไปเลี้ยงในน้ำยาในจานเลี้ยงเซลล์ซึ่งปิดคลุมน้ำยาด้วย mineral oil เลี้ยงในสัดส่วน 10 ใบ/50 μl น้ำยาเลี้ยงไข่ประกอบด้วย TCM199 ที่เติมด้วย 10% FCS, 50 IU/ml HCG (HCG, Chorulon®, Intervet), 0.02 AU/ml FSH (FSH, Antrin®, Denka Pharmaceutical, Japan) และ 1 μg/ml 17β estradiol นำไปเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 21 ชั่วโมง

2.2.2. การเตรียมตัวอสุจิเพื่อการปฏิสนธิในหลอดแก้ว

ใช้น้ำเชื้อแช่แข็งจากพ่อพันธุ์ที่มีประวัติให้อัตราการผสมติดสูง และจากพ่อพันธุ์ตัวเดียวกับน้ำเชื้อที่ใช้ทำการทดลองฉีดตัวอสุจิเข้าในไข่ ทำการละลายน้ำเชื้อในอากาศนาน 10 วินาที จากนั้นจุ่มหลอดน้ำเชื้อลงใน water bath อุณหภูมิ 37°C นาน 20 วินาที เมื่อน้ำเชื้อละลายดีแล้วทำการดูดน้ำเชื้อไปไว้ก้นหลอด snap tube ขนาด 5 ml ที่มี 2 ml ของน้ำยา TALP ที่เติมด้วย heparin (5 units/ ml) และ caffeine (10 nM) แล้วนำไปบ่มในตู้อบอุณหภูมิ 38.5° C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 30 นาที เพื่อให้อสุจิที่มีชีวิตว่ายขึ้นบนผิวของน้ำยา ใช้ปิเปตดูดน้ำยาจากหลอด snap tube โดยเลือกดูดส่วนบนของหลอดประมาณ 1.5 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2100 รอบ นาน 5 นาที แล้วทำซ้ำอีกครั้ง จากนั้นดูดน้ำยาส่วนบนทิ้ง แล้วนำ sperm pellet มาเติมด้วยน้ำยา TALP เพื่อปรับให้มีความเข้มข้นตัวอสุจิ $2x10^6$ ตัว/ml จากนั้นนำไปหยดลงในจานเลี้ยงเซลล์ในปริมาตร 100 μl/หยด แล้วปิดคลุมน้ำยาด้วย mineral oil จากนั้นนำไปไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นานประมาณ 10 นาที เพื่อรอไข่เข้าปฏิสนธิ

2.2.3. การปฏิสนธิในหลอดแก้ว

ภายหลังเลี้ยงไข่ครบ 21 ชั่วโมง นำไข่มาล้างด้วยน้ำยาสำหรับปฏิสนธิในหลอดแก้ว (TALP) แล้วดูดไข่ที่เตรียมไว้สำหรับการปฏิสนธิในหลอดแก้ว ไปใส่ไว้ในหยดน้ำยาที่มีตัวอสุจิที่เตรียมไว้แล้วใช้สัดส่วนไข่ 10 ใบ/ น้ำยา 100 µl แล้วนำไปเลี้ยงในตู้อบภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 ที่มีอุณหภูมิ 38.5°C นาน 12 ชั่วโมง

2.2.4. การเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว

เมื่อครบ 12 ชั่วโมง นำไข่ที่ได้ผ่านการปฏิสนธิไปล้างด้วยน้ำยา mSOFaa ที่เติม 3 mg/ml BSA จำนวน 3 ครั้ง โดยใช้ปิเปตแก้วดูดไข่ขึ้นลงหลายๆครั้งเพื่อให้ตัวอสุจิและเซลล์คิวมูลัสที่อยู่รอบๆไข่หลุดออกไป จากนั้นนำมาเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa ที่เติม 3 mg/ml BSA ในสัดส่วน 10-20 ใบ/100 µl ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้ บรรยากาศที่มี 5% O_2, 5% CO_2 และ 90% N_2 นาน 2 วัน แล้วคัดเลือกตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ ไปเลี้ยงแบบ co-culture กับเซลล์บุท่อนำไข่โค ในน้ำยา mSOFaa ที่เติม 3 mg/ml BSA ในสัดส่วน 10 ใบ/100 µl แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 5 วัน เปลี่ยนน้ำยาทุกๆ วัน พร้อมทั้งบันทึกการเจริญเติบโตของตัวอ่อน

2.3. การย้อมสีตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส

นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสอายุ 7 วัน ที่ได้จากการฉีดอสุจิและจากการฉีดปลอมมาย้อมสี โดยย้อมตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสด้วย 0.1 mg/ml propidium iodide (PI) และ 0.2% Triton X-100 ในน้ำยา DPBS นาน 1 นาที แล้วย้ายตัวอ่อนไปไว้ในน้ำยาเอทานอลความเข้มข้น 99.5% ที่มี 25 µg/ml Hoechst 33342 นาน 5 นาที ก่อนย้ายไข่ไปวางบนสไลด์แก้ว วางไข่ในน้ำยา glycerol ก่อนปิดทับด้วยแผ่น cover slip เซลล์ TE จะย้อมติดสีแดงหรือชมพูของ PI

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2.4. การแช่แข็งตัวอ่อน

นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเกรด 1 และ 2 ที่ได้จากการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่และจากการปฏิสนธิในหลอดแก้ว มาทำการแช่แข็งโดยวิธีวิทริฟิเคชั่น 2 วิธี คือ 1) Microdrop และ 2) Cryotop นำตัวอ่อนไปล้างในน้ำยา base medium (BM) ที่ประกอบด้วย TCM199-Hepes เติมด้วย 20% FCS จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นนำตัวอ่อนจำนวน 1-5 ใบมาไว้ในน้ำยา Equilibration medium ที่ประกอบด้วย BM ที่เติมด้วย 7.5% Ethylene glycol (EG) + 7.5% Dimethyl sulfoxide (DMSO) นาน 3 นาที จากนั้นย้ายตัวอ่อนทั้งหมดไปไว้ในน้ำยา vitrification medium ที่ประกอบด้วย BM ที่เติมด้วย 16.5% EG + 16.5% DMSO + 0.5 M Sucrose นาน 1 นาที แล้วใช้ปิเปตแก้วย้ายตัวอ่อนพร้อมน้ำยา vitrification medium ประมาณ 1-2 µl ไปหยดในไนโตรเจนเหลว หรือย้ายไข่พร้อมน้ำยาวางบนปลายของ Cryotop โดยให้มีน้ำยา vitrification medium ติดออกมาน้อยที่สุด (< 1µl) แล้วจุ่ม Cryotop ลงในไนโตรเจนเหลว ทำการเก็บตัวอ่อนที่แช่แข็งทั้ง 2 วิธี ไว้ในไนโตรเจนเหลวอย่างน้อย 1 สัปดาห์ แล้วนำไปตรวจสอบอัตรารอดชีวิตหลังการละลาย โดยนำตัวอ่อนที่แช่

แข็งมาทำละลาย 2 แบบคือ 1) การละลายแบบขั้นตอนเดียว นำตัวอ่อนจากไนโตรเจนเหลวไปไว้ในน้ำยา BM ที่เติม 0.5 M Sucrose ที่อุณหภูมิ 38°C นาน 5 นาที แล้วนำไปล้างในน้ำยา BM จำนวน 5 ครั้ง 2) การละลายแบบ 3 ขั้นตอน นำตัวอ่อนจากไนโตรเจนเหลวไปไว้ในน้ำยา BM ที่เติม 0.5 M Sucrose ที่อุณหภูมิ 38°C นาน 5 นาที จากนั้นนำไปล้างในน้ำยา BM ที่เติม 0.25 M Sucrose นาน 2 นาที และ BM ที่มี 0.125 M Sucrose นาน 2 นาที แล้วนำไปล้างในน้ำยา BM ซ้ำอีกจำนวน 5 ครั้ง จากนั้นนำตัวอ่อนไปเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว (mSOFaa + 3 mg/ml BSA) ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง เพื่อดูอัตรารอดชีวิตหลังการทำละลาย และอัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะแฮชบลาสโตซีส

2.5. การย้ายฝากตัวอ่อน

ใช้โคสาวพันธุ์โคนมลูกผสมอายุระหว่าง 18-20 เดือน เป็นตัวรับ จะฉีดฮอร์โมนโปรสตาแกลนดินกระตุ้นให้โคเป็นสัด ด้วยวิธีการที่รายงานโดยรังสรรค์และสรรเพชญ (2530) โดยจะฝากตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสซึ่งเป็นตัวอ่อนที่ไม่ได้ผ่านการแช่แข็ง ที่ได้จากการทำ ICSI และ IVF เข้าไปในปีกมดลูกของตัวรับหลังจากเป็นสัดมาแล้ว 7-8 วัน จำนวน 1 ตัวอ่อน/ตัว หลังจากย้ายฝากตัวอ่อนแล้วจะสังเกตการเป็นสัดตัวรับทุกวัน และในวันที่ 45 และ 60 วันหลังจากเป็นสัดจะใช้อัลตราซาวด์ตรวจการตั้งท้อง และล้วงตรวจการตั้งท้องในวันที่ 90 และ 120 หลังจากเป็นสัด ตัวใดตั้งท้องจะดูแลใกล้ชิดจนกระทั่งคลอดออกมา

2.6. การวางแผนการวิจัย

1. หลังจากฉีดตัวอสุจิเข้าในไข่โคหรือไม่ได้ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่โคแล้วทำการเปรียบเทียบการกระตุ้น 4 ชนิดคือ
   1.1. Io + 6-DMAP แล้วนำไปเลี้ยงในหลอดแก้ว
   1.2. Io + CHX แล้วนำไปเลี้ยงในหลอดแก้ว
   1.3. EtOH + 6-DMAP แล้วนำไปเลี้ยงในหลอดแก้ว
   1.4. EtOH + CHX แล้วนำไปเลี้ยงในหลอดแก้ว

   เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของตัวอ่อนในแต่ละวิธีและย้อมสีเพื่อนับจำนวนเซลล์ของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส
2. การแช่แข็งตัวอ่อน จะนำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเกรด 1 และ 2 ที่ผลิตโดยวิธีฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่โค และจาก การปฏิสนธิในหลอดแก้ว โดยเปรียบเทียบการแช่แข็ง 2 วิธี คือ
   2.1. Microdrop
   2.2. Cryotop
3. การทำละลายตัวอ่อน จะทำละลาย 2 วิธีคือ

3.1 ละลายตัวอ่อนแบบขั้นตอนเดียว นำตัวอ่อนจากไนโตรเจนเหลวไปไว้ในน้ำยา TCM199-HEPES + 20% FCS ที่เติม 0.5 M Sucrose ที่อุณหภูมิ 38°C นาน 5 นาที แล้วนำไปล้างในน้ำยา TCM199-HEPES+20% FCS ซ้ำอีก 5 ครั้ง

3.2 ละลายตัวอ่อนแบบ 3 ขั้นตอน นำตัวอ่อนจากไนโตรเจนเหลวไปไว้ในน้ำยา TCM199-HEPES + 20% FCS ที่เติม 0.5 M Sucrose ที่อุณหภูมิ 38°C นาน 5 นาที จากนั้นนำไปไว้ในน้ำยา TCM199-HEPES + 20% FCS ที่เติม 0.25 M และ 0.125 M Sucrose น้ำยาละ 2 นาที แล้วจึงนำไปล้างซ้ำในน้ำยา TCM199-HEPES+20% FCS จำนวน 5 ครั้ง จากนั้นนำตัวอ่อนไปเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง เพื่อดูอัตราการรอดชีวิต และอัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะแฮชบลาสโตซีส

4. การย้ายฝากตัวอ่อนให้โคตัวรับ

ย้ายฝากตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่เป็นตัวอ่อนสด ที่ได้จากการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่และการปฏิสนธิในหลอดแก้ว จำนวน 1 ตัวอ่อน/ตัว โดยย้ายฝากให้โคตัวรับ 10 ตัวในแต่ละกลุ่ม เปรียบเทียบอัตราการตั้งท้องและการคลอด

2.6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองนี้ใช้โปรแกรม ANOVA วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติพิจารณาจากค่า $p<0.05$

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

3.1. การเหนี่ยวนำของโพลาบอดี้ที่สองด้วย EtOH หรือ Io

จากตารางที่ 1 พบอัตราการปลดปล่อยโพลาบอดี้ที่สองหลัง 3 ชั่วโมงจากการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่เพิ่มสูงสุดในกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย EtOH (EtOH + 6-DMAP, EtOH + CHX) (85-87%) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย Io (76-81%) นอกจากนี้ไม่พบความแตกต่างของอัตราการปลดปล่อยโพลาบอดี้ที่สองระหว่างกลุ่มที่กระตุ้นด้วย EtOH และ Io ในกลุ่มที่ไม่ได้ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ จากผลการทดลองพบว่า EtOH มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นไข่โคหลังจากฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่มากกว่า Io โดยเปรียบเทียบจากอัตราในการปลดปล่อยโพลาบอดี้ที่สอง

3.2. ผลของการกระตุ้นหลังจากฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อน

จากตารางที่ 1 อัตราการแบ่งตัวของการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ในกลุ่ม Io + 6-DMAP, EtOH + 6-DMAP และEtOH + CHX groups (76%, 70% และ 80%, ตามลำดับ) สูงกว่ากลุ่ม Io + CHX group (59%) และกลุ่มที่ไม่ได้ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อัตราการเจริญไปเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสในกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย Io + 6-DMAP และ EtOH + CHX groups (25 และ 27% ตามลำดับ) สูงกว่ากลุ่มที่กระตุ้นด้วย Io + CHX และ EtOH + 6-DMAP (16 และ 17%, ตามลำดับ) และกลุ่มที่ไม่ได้ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในกลุ่มที่ไม่ได้ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ พบอัตราการแบ่งตัวของไข่ที่ถูกกระตุ้นทั้ง 4 กลุ่ม ไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม อัตราการแบ่งตัวไปเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสในกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย Io + CHX (7%) และ EtOH + 6-DMAP (10%) ต่ำกว่ากลุ่ม Io + 6-DMAP (16%) และ EtOH + CHX (17%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยสารเคมีมีอัตราการการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะ บลาสโตซีสสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปรียบเทียบจากอัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซีส กลุ่มที่กระตุ้นด้วย EtOH + CHX มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นไข่โคหลังจากฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ซึ่งจะใช้กลุ่มนี้ในการทดลองถัดไป

3.3 การย้อมสีเซลล์ในตัวอ่อนบลาสโตซีสวันที่ 7 จากการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่

จากตารางที่ 2 พบว่าจำนวนเซลล์ TE ICM และ total cell number ที่ได้จากการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบความแตกต่างของ TE ICM และ total cell number ในกลุ่มที่ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ทั้ง 4 กลุ่ม เช่นเดียวกับกลุ่มที่ไม่ได้ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ก็พบว่ามีจำนวน TE ICM และ total cell number ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกันสรุปได้ว่า

กลุ่มที่ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่มีจำนวนเซลล์ในบลาสโตซีสสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่

3.4. ผลการทดลองเปรียบเทียบการแช่แข็งตัวอ่อนบลาสโตซีสที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้วและการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่

จากตารางที่ 3 พบว่าตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเกรด 1 ให้อัตรารอดชีวิตสูงสุดในกลุ่มที่ปฏิสนธิในหลอดแก้วและแช่แข็งด้วย Cryotop (81-84%) กลุ่มที่ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่และแช่แข็งด้วยวิธี Microdrop ที่มีการทำละลายแบบ 3 ขั้นตอน (84%) และกลุ่มที่ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่และแช่แข็งด้วย Cryotop (80-88%) ซึ่งสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นๆ และพบอัตรารอดต่ำที่สุดในกลุ่มที่ปฏิสนธิในหลอดแก้วและแช่แข็งด้วยวิธี Microdrop ที่มีการทำละลายแบบขั้นตอนเดียว (53%) อัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะแฮชบลาสโตซีสหลัง 24 ชั่วโมง พบว่าสูงในกลุ่มที่ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่และแช่แข็งด้วย Cryotop ที่มีการทำละลายแบบ 3 ขั้นตอน (59%) เช่นเดียวกับอัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะแฮชบลาสโตซีสหลัง 48 ชั่วโมง พบว่าสูงในกลุ่มที่ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่และแช่แข็งด้วย Cryotop ที่มีการทำละลายแบบ 1 (74%) และ 3 ขั้นตอน (77%) ส่วนอัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะแฮชบลาสโตซีสหลัง 24 ชั่วโมง (31%) และ48 ชั่วโมง (41%) พบว่าต่ำในกลุ่มที่ปฏิสนธิในหลอดแก้วและแช่แข็งด้วยวิธี Microdrop ที่มีการทำละลายแบบ 1 ขั้นตอน

จากตารางที่ 4 ในตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเกรด 2 กลุ่มที่ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่และแช่แข็งด้วย Cryotop ที่ทำละลายแบบ 1 และ 3 ขั้นตอน พบว่าอัตรารอดชีวิตและอัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะแฮชบลาสโตซีสหลัง 24 และ 48 ชั่วโมง สูงกว่ากลุ่มอื่นๆ ยกเว้นอัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะแฮชบลาสโตซีสหลัง 24 ชั่วโมงในกลุ่มที่ปฏิสนธิในหลอดแก้วและแช่แข็งด้วย Cryotop ที่มีการทำละลายแบบ 3 ขั้นตอน และกลุ่มที่ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่และแช่แข็งด้วยวิธี Microdrop ที่มีการทำละลายแบบ 3 ขั้นตอน

3.5. ผลการย้ายฝากตัวอ่อนให้โคตัวรับ

จากตารางที่ 5 ผลการย้ายฝากตัวอ่อนโคที่ผลิตโดยวิธีฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ และ ปฏิสนธิในหลอดแก้ว พบว่าตัวอ่อนที่ผลิตโดยวิธีปฏิสนธิในหลอดแก้วให้อัตราตั้งท้อง (4/10, 40%) และลูกโคเกิด (4/10, 40%) สูงกว่าตัวอ่อนที่ผลิตโดยวิธีฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ (2/10, 20% และ 1/10, 10% ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยแม่โคตัวรับตัวอ่อนที่ผลิตโดยวิธีฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่แท้งลูก 1 ตัว ในวันที่ 112 ของการตั้งท้อง

ตารางที่ 1: ผลของการกระตุ้นด้วยสารเคมีต่างๆต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโค

รูปแบบการกระตุ้น	การฉีด	จำนวนไข่ (%)			จำนวน (%)	อัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะ (%)		
ด้วยสารเคมี	อสุจิ	ฉีด	การปลดปล่อยโพลาบอดี้ที่ 2	ไข่เข้าเลี้ยง	แบ่งตัว	8 เซลล์	มอรูลา	บลาสโตซีส
Io + 6-DMAP	+	139	112(81)^{ab}	112	85(76)^{a}	54(48)^{a}	36(32)^{a}	28(25)^{a}
	-	105	74(70)^{b}	74	37(50)^{b}	28(38)^{ab}	16(22)^{b}	12(16)^{b}
Io + CHX	+	135	102(76)^{ab}	102	60(59)^{b}	39(38)^{ab}	20(20)^{b}	16(16)^{b}
	-	102	68(67)^{b}	68	30(44)^{b}	13(19)^{b}	8(12)^{c}	5(7)^{c}
EtOH + 6-DMAP	+	137	116(85)^{a}	116	81(70)^{a}	40(34) ^{ab}	29(25)^{b}	20(17)^{b}
	-	100	69(69)^{b}	69	35(51)^{b}	21(30)^{ab}	12(17)^{c}	7(10)^{c}
EtOH + CHX	+	135	117(87)^{a}	117	94(80)^{a}	56(48)^{a}	41(35)^{a}	32(27)^{a}
	-	102	70(69)^{b}	70	38(54)^{b}	27(39)^{ab}	16(23)^{b}	12(17)^{b}

EtOH: Ethanol; Io: Ionomycin; 6-DMAP: 6-dimethylaminopurine; CHX: Cycloheximide

$^{a, b, c}$ เปอร์เซ็นต์ภายในคอลัมน์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$ ANOVA)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2: จำนวนเซลล์ของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้จากการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ และกระตุ้นด้วยสารเคมีแบบต่างๆ

รูปแบบการกระตุ้นด้วยสารเคมี	**การฉีดอสุจิ**	**จำนวนตัวอ่อนที่ตรวจ**	**ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ (± S.D.)**		
			TE	**ICM**	**Total**
Io + 6-DMAP	+	12	67.5±13.2[a]	21.3±6.4[a]	88.6±16.2[a]
	-	10	53.3±12.1[ab]	16.4±3.2[ab]	70.1±15.3[b]
Io + CHX	+	12	56.2±13.5[ab]	19.8±6.3[a]	77.2±12.8[ab]
	-	5	44.1±11.3[b]	12.4±4.8[b]	57.7±12.2[c]
EtOH + 6-DMAP	+	11	63.7±13.2[a]	22.7±5.2[a]	84.1±17.4[a]
	-	7	52.2±11.7[ab]	13.0±3.5[ab]	66.2±10.7[b]
EtOH + CHX	+	12	68.1±12.5[a]	22.5±5.9[a]	89.2±15.7[a]
	-	10	53.1±12.4[ab]	16.1±3.6[ab]	70.2±12.4[b]

EtOH: Ethanol, Io: Ionomycin, 6-DMAP: 6-dimethylaminopurine, CHX: Cychloheximide

[a, b, c] ค่าเฉลี่ยภายในคอลัมน์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$ ANOVA)

TE = trophectoderm; ICM = inner cell mass

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3: แสดงอัตรารอด และ อัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะแฮชบลาสโตซีสหลังจากแช่แข็งตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเกรด 1 และทำละลาย

กลุ่ม	วิธีการแช่แข็ง	ขั้นตอนการทำละลาย	จำนวนบลาสโตซีส	อัตราการกู้คืน (%)	อัตรารอด (%)	อัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซีสหลังทำละลาย 24h (%)	อัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซีสหลังทำละลาย 48h (%)
IVF-derived blastocyst	Microdrop	1 step	32	32(100)	17(53)^{c}	10(31)^{d}	13(41)^{d}
		3 step	33	33(100)	22(67)^{b}	13(40)^{c}	16(48)^{c}
	Cryotop	1 step	32	32(100)	26(81)^{a}	16(50)^{b}	19(59)^{bc}
		3 step	32	32(100)	27(84)^{a}	17(53)^{ab}	20(63)^{b}
ICSI-derived blastocyst	Microdrop	1 step	29	29(100)	21(72)^{b}	12(41)^{c}	17(59)^{bc}
		3 step	31	31(100)	26(84)^{a}	14(45)^{bc}	20(65)^{b}
	Cryotop	1 step	30	30(100)	24(80)^{a}	16(53)^{b}	22(74)^{a}
		3 step	31	31(100)	27(88)^{a}	18(59)^{a}	24(77)^{a}

$^{a, b, c, d}$ เปอร์เซ็นต์ภายในคอลัมน์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$ ANOVA)

ตารางที่ 4: แสดงอัตรารอด และ อัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะแฮชบลาสโตซีสหลังจากแช่แข็งตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเกรด 2 และทำละลาย

กลุ่ม	วิธีการแช่แข็ง	ขั้นตอนการทำละลาย	จำนวนบลาสโตซีส	อัตราการกู้คืน (%)	อัตรารอด (%)	อัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะแฮชบลาสโตซีสหลังทำละลาย 24h (%)	อัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะแฮชบลาสโตซีสหลังทำละลาย 48h (%)
IVF-derived blastocyst	Microdrop	1 step	21	21(100)	9(43)^{c}	4(20)^{c}	7(33)^{b}
		3 step	20	20(100)	9(45)^{c}	4(20)^{c}	7(35)^{b}
	Cryotop	1 step	20	20(100)	9(45)^{c}	5(25)^{b}	8(40)^{ab}
		3 step	20	20(100)	10(50)^{b}	6(30)^{ab}	8(40)^{a}
ICSI-derived blastocyst	Microdrop	1 step	17	17(100)	9(53)^{b}	4(24)^{b}	5(29)^{ab}
		3 step	18	18(100)	10(56)^{b}	5(28)^{ab}	7(39)^{ab}
	Cryotop	1 step	19	19(100)	12(63)^{a}	6(32)^{ab}	8(42)^{a}
		3 step	18	18(100)	12(67)^{a}	7(39)^{a}	8(44)^{a}

$^{a, b, c, d}$ เปอร์เซ็นต์ภายในคอลัมน์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$ ANOVA)

ตารางที่ 5 ผลการย้ายฝากตัวอ่อนโคที่ผลิตโดยวิธีฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ และ การปฏิสนธิในหลอดแก้ว

ชนิดตัวอ่อน	จำนวนตัวรับฝากตัวอ่อน	จำนวน (%) ตัวรับตั้งท้อง	จำนวน (%) ลูกโคคลอด
ICSI	10	2 (20)[a]	1 (10)[a]
IVF	10	4 (40)[b]	4 (40)[b]

[a, b] เปอร์เซ็นต์ภายในคอลัมน์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05 ANOVA)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
อภิปรายและวิจารณ์ผล

จากการทดลองนี้พบว่าการกระตุ้นด้วยสารเคมี 4 กลุ่มหลังการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่โคเมื่อนำมาเปรียบเทียบเพื่อหาวิธีการการกระตุ้นที่เหมาะสมที่สุดในการปลดปล่อยของโพลาบอดี้ที่สอง การแบ่งตัวของตัวอ่อนและการพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส จากการทดลองพบว่า การกระตุ้นด้วยสารเคมี Io + 6-DMAP และ EtOH + CHX ให้อัตราการปลดปล่อยโพลาบอดี้ที่สองสูงสุดและให้อัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซีส และ จำนวนเซลล์ที่สูง การกระตุ้นด้วยสารเคมี Io + 6-DMAP มีการศึกษาว่าให้ผลดีที่สุดในแกะ (Shirazi และคณะ, 2008) แพะ (Ongeri และคณะ, 2001) และ โค (Rho และคณะ, 1996) นอกจากนี้การกระตุ้นด้วย EtOH และ CHX มีรายงานว่าให้อัตราการกระตุ้นไข่สูงที่สุดทั้งในไข่โคที่อายุน้อยและอายุมาก (Presicce และ Yang, 1994a; Presicce และ Yang, 1994b) การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่โดยใช้เครื่อง Piezo มีประสิทธิภาพสูงกว่าการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่รูปแบบเดิม (Katayose และคณะ, 1999) อย่างไรก็ตาม รายงานการศึกษาส่วนมากพบว่า การฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่โดยใช้เครื่อง Piezo ไม่เพียงพอที่จะกระตุ้นแคลเซียมเมื่ออสุจิโคและหนูถูกฉีดเข้าไปในไข่โค (Malcuit และคณะ, 2006)

ความจำเป็นในการกระตุ้นด้วยสารเคมีหลังจากการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่เพื่อให้ตัวอ่อนเจริญเติบโตนั้นมีรายงานในสัตว์สายพันธุ์ต่างๆ เช่น โค (Rho และคณะ, 1996) และ สุกร (Lee และคณะ, 2003) ในทางตรงกันข้าม แฮมสเตอร์ (Uehara และ Yanagimachi, 1976) กระต่าย (Keefer, 1989) และมนุษย์ (Terasik และคณะ, 1994) การฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่เพียงพอที่จะกระตุ้นไข่ให้เจริญเติบโต การกระตุ้นโดยการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่นั้นไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการปลดปล่อยโพลาบอดี้ที่สองเพื่อให้กระบวนการ meiosis เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ในโค สุกร และกระบือนั้น ยังไม่พบสาเหตุที่แน่ชัด สาเหตุนั้นอาจเกี่ยวข้องกับการขดตัวกันแน่นกันแน่นของโครมาตินในอสุจิซึ่งมีรายงานว่ามีความคงตัวในอสุจิโคมากกว่าสายพันธุ์อื่น ยกตัวอย่างเช่น มนุษย์ หนู และแฮมเตอร์ (Perreault และคณะ, 1988)

หลังจากอสุจิหลอมรวมกับไข่ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของระดับแคลเซียมซึ่งเป็นสิ่งที่สำคัญในการเกิด เอกโซไซโทซิสของคอร์ติคอลแกรนูลและพัฒนาต่อจากกระบวนการ meiotic arrest ในไข่หนู (Kline และ Kline, 1992) กระบวนการ meiosis ที่สมบูรณ์วัดจากอัตราที่ไข่ปลดปล่อยโพลาบอดี้ที่สองหลังจากกระตุ้นด้วยสารเคมี ในการทดลองนี้พบว่า การกระตุ้นด้วย EtOH มีประสิทธิภาพมากกว่า Io ในการกระตุ้นไข่จากการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่โค ซึ่งผลสอดคล้องกับไข่กระบือ (Liang และคณะ, 2010) เป็นไปได้ว่าเกิดจากการกระตุ้นแคลเซียมในรูปแบบที่แตกต่างกันของ EtOH และ Io การกระตุ้นไข่ด้วย EtOH จะเพิ่ม inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) ซึ่งจะไปเพิ่มการหลั่งของแคลเซียมผ่านการกระตุ้นการสร้าง IP_3 ที่พลาสมาเมมเบรน จากนั้นจะไปกระตุ้นการเพิ่มแคลเซียมจากภายนอกและภายในเซลล์ (Shilina และคณะ, 1993) ในขณะที่ Io จะไปกระตุ้นการเพิ่มของแคลเซียมในไข่จากภายในเซลล์เท่านั้น (Vincent และคณะ, 1992) จากผลการทดลองนี้พบว่าสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่ EtOH สามารถกระตุ้นการเพิ่มของแคลเซียมและปล่อยแคลเซียมในระยะเวลาที่นานกว่าในการปฏิสนธิในหลอดแก้ว (Nakada และ Mizuno, 1998)

หลังจากการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมภายในเซลล์ ไข่ระยะ MII จะพัฒนาเข้าสู่กระบวนการ meiosis จนกระทั่งเกิดการปลดปล่อยโพลาบอดี้ที่สอง ในการทดลองนี้พบว่า ไข่โค 87% มีการปลดปล่อยโพลาบอดี้ที่สองในชั่วโมงที่ 3 หลัง

การฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ ซึ่งให้ผลเหมือนกับการศึกษาก่อนหน้าที่ไข่โค 93% มีการปลดปล่อยโพลาบอดี้ที่สองภายในชั่วโมงที่ 3 หลังการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ (Fulka และคณะ, 1991; Susko-Parrish และคณะ, 1994; Rho และคณะ, 1998)

จากผลทดลองพบว่า อัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซีสจากการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่มีอัตราที่สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่เช่นเดียวกับที่พบในไข่กระบือ (Liang และคณะ, 2010) แต่พบว่ากลุ่มที่ไม่ได้ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่และถูกกระตุ้นด้วยสารเคมีสามารถปลดปล่อยโพลาบอดี้ที่สองและพัฒนาไปเป็นบลาสโตซีสได้เช่นกัน อย่างไรก็ตาม กลุ่มที่ไม่ได้ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ให้อัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซีสและจำนวนเซลล์ (TE, ICM, total cell number) ต่ำกว่ากลุ่มที่ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ พบว่าตัวอ่อนที่ได้จากกลุ่มที่ไม่ได้ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่จะมีจำนวนโครโมโซมเป็น haploid และการพัฒนาของตัวอ่อนที่มีจำนวนโครโมโซม haploid มีรายงานว่าต่ำกว่ากลุ่มมีจำนวนโครโมโซมเป็น diploid ในหนู (Tarkowski และ Rossant, 1976) จำนวนเซลล์ที่ลดลงของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสและอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซีสที่ลดลงในกลุ่มไม่ได้ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ พบว่า ตัวอ่อนที่มีจำนวนโครโมโซมเป็น haploid อาจมีจำนวนดีเอ็นเอไม่เพียงพอต่อการพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะต่างๆเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อนที่มีจำนวนโครโมโซมเป็น diploid จากการทดลองพบว่าการกระตุ้นด้วย Io + 6-DMAP และ EtOH + CHX ในกลุ่มที่ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ให้อัตราการกระตุ้นและการของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสสูงที่สุด

ในกลุ่มที่ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่และกระตุ้นด้วย Io + 6-DMAP พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ nuclear configurations ที่ผิดปกติในระยะโปรนิวเคลียส (Bevacqua และคณะ, 2010) ทำให้ตัวอ่อนที่ได้จากกลุ่มที่ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่และกระตุ้นด้วย Io + 6-DMAP มีอัตรารอดชีวิตต่ำเมื่อย้ายฝากเข้าไปในตัวรับ (Rho และคณะ, 1998b; Oikawa และคณะ, 2005; Ock และคณะ, 2003)

ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการแช่แข็งในกลุ่มที่ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่โคนั้นยังมีจำกัด (Keskintepe และ Brackett, 2000; Abdalla และคณะ, 2010) Keskintepe และ Brackett (2000) รายงานว่า ตัวอ่อนระยะเอ็กซแพน บลาสโตซีสอายุ 7 วัน จำนวน 16 ใบ และตัวอ่อนระยะแฮชบลาสโตซีสจำนวน 16 ใบหลังจากแช่แข็งเป็นเวลา 18 ชั่วโมงพบอัตรารอด 75 และ 88% ตามลำดับ Abdalla และคณะ (2010) รายงานว่ากลุ่มที่ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่โดยนำระยะเอ็กซแพนบลาสโตซีสเต็มที่ (fully expanded blastocyst) อายุ 7 หรือ 8 วันให้อัตรารอดชีวิตหลังจากแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเคชั่นด้วย Cryotop เช่นเดียวกับที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้ว ในขณะที่ระยะเอ็กซ แพนบลาสโตซีสที่ได้จากการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่นั้นไม่คงตัวเมื่อวิทริฟิเคชั่นด้วย Cryotop เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเอ็กซแพนบลาสโตซีสเต็มที่

จากการทดลองนี้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสอายุ 7 วัน ที่ได้จากการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ให้อัตรารอดเท่ากับตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้การปฏิสนธิในหลอดแก้ว แต่ความสามารถในการพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะแฮชบลาสโตซีสมากกว่าการปฏิสนธิในหลอดแก้ว เป็นไปได้ว่าเกิดจากรูเล็กๆใน zona pellucida ของกลุ่มที่ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ามีการเจริญถึงระยะแฮชบลาสโตซีสในกลุ่มที่ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่เร็วกว่าเนื่องจากการใช้เครื่อง Piezo เจาะรูใน zona pellucida ซึ่งอาจทำให้ความสามารถในการ hatching ลดลง (Abdalla และคณะ, 2010) นอกจากนี้พบว่าการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะแฮชบลาสโตซีสจากระยะเอ็กซแพนบลาสโตซีส ในกลุ่มที่ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ต่ำกว่ากลุ่มที่ปฏิสนธิในหลอดแก้ว อาจเกิดจากระบบสิ่งแวดล้อมที่ใช้ไม่เหมาะสมต่อการ

เจริญเติบโต หรือคุณภาพตัวอ่อนด้อยกว่ากลุ่มที่ปฏิสนธิในหลอดแก้ว (Abdalla และคณะ, 2010) นอกจากนี้พบว่าระบบสิ่งแวดล้อมที่ใช้เลี้ยงตัวอ่อนนั้นมีอิทธิพลต่อการ hatching (Krisher และคณะ, 1999)

จากผลการทดลองพบว่า ระยะเอ็กซแพนบลาสโตซีสที่ได้จากกลุ่มที่ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่และกลุ่มที่ปฏิสนธิในหลอดแก้วมีความไวต่อการวิทริฟิเคชั่นด้วย Microdrop มากกว่าการวิตริฟิเคชั่นด้วย Cryotop ดังนั้น การวิตริฟิเคชั่นด้วย Cryotop จึงดีกว่า Microdrop ในการแช่แข็งตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส และให้อัตรารอดชีวิตและการเจริญถึงระยะแฮชบลาสโตซีสหลังการแช่แข็งและทำละลาย สูงกว่าวิธี Microdrop เนื่องจากการแช่แข็งแบบ Cryotop มีปริมาตรของน้ำยาวิทริฟิเคชั่นที่น้อยกว่าในการแช่แข็ง

วิธี Microdrop เป็นเทคนิคที่ง่ายในการแช่แข็งด้วยการหยดไข่พร้อมน้ำยาวิทริฟิเคชั่นลงไปในไนโตรเจนเหลวโดยตรง และเป็นเทคนิคที่ไม่ต้องการเครื่องมือพิเศษเพื่อแช่แข็งไข่ ส่วนการวิทริฟิเคชั่นด้วย Cryotop นั้นเคยใช้ในการแช่แข็งไซโกตกระต่ายระยะโปรนิวเคลียส (Hochi และคณะ, 2004) ตัวอ่อนสุกรระยะ pre-hatching (Esaki และคณะ, 2004; Ushijima และคณะ, 2004) ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสของโคและกระบือที่ได้จากการโคลนนิ่ง (Laowtammathron และคณะ, 2005) และไข่ระยะ MII ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดแก้วในมนุษย์ (Kuwayama และ Kato, 2000; Katayama และคณะ, 2003; Hiraoka และคณะ, 2004 อัตรารอดชีวิตหลังแช่แข็งนั้นสัมพันธ์กับปริมาตรของสารแช่แข็งใน Cryotop ส่งผลให้เพิ่มอัตราเร็วของการแช่แข็งและทำละลาย มากไปกว่านั้นการใช้ปริมาตรที่น้อยของน้ำยาวิทริฟิเคชั่น ในการทำวิทริฟิเคชั่นจะช่วยลดการแตกหัก ซึ่งส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อ zona pellucida และเกิดการสลายของพลาสมาเมมเบรน (Vajta, 1997)

จากการศึกษาพบว่า การแช่แข็งและทำละลายของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส จะสามารถพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะแฮชบลาสโตซีสได้สูงในกลุ่มที่ทำละลาย 3 ขั้นตอนมากกว่าทำละลาย 1 ขั้นตอน โดยการทำละลาย 3 ขั้นตอน พบว่าอัตรารอดไม่แตกต่างจากทำละลาย 1 ขั้นตอน จากผลการทดลองนี้พบว่าการทำละลายเป็นขั้นตอนที่สำคัญต่ออัตรารอดของบลาสโตซีส โดยการทำละลายเพียง 1 ขั้นตอนนั้นไม่เพียงพอในการกำจัดสารป้องกันการถูกทำลายเซลล์จากการแช่แข็ง ในขณะที่การทำละลาย 3 ขั้นตอนนั้นมีความเหมาะสม ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเกรด 2 ที่ทำการแช่แข็งมีความสามารถในการพัฒนาต่ำกว่าบลาสโตซีสเกรด 1 โดยดูจากอัตรารอดชีวิตและอัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะแฮชบลาสโตซีส

ผลการย้ายฝากตัวอ่อนที่ผลิตโดยวิธีปฏิสนธิในหลอดแก้วจากการศึกษานี้ให้อัตราตั้งท้อง และลูกโคเกิดสูงกว่าตัวอ่อนที่ผลิตโดยวิธีฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนที่ผลิตโดยวิธีฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ในการศึกษานี้ (20%) ต่ำกว่ารายงานของ Horiuchi และคณะ(2002) ที่ได้อัตราการตั้งท้อง 50% และต่ำกว่ารายงานของ Wei และ Fukui (2002) ที่ได้อัตราการตั้งท้อง 57% และมีอัตราเท่ากันกับรายงานของ Hamano และคณะ (1999) ที่ได้อัตราการตั้งท้อง 20.8% ทั้งนี้มีปัจจัยหลายประการที่ส่งผลต่อความสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนในโคได้แก่ คุณภาพตัวอ่อน คุณภาพโคตัวรับ ความสามารถและประสบการณ์ของผู้ทำย้ายฝากตัวอ่อน เป็นต้น

การศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่าการกระตุ้นด้วย Io + 6-DMAP และ EtOH + CHX ในกลุ่มที่ฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ให้อัตราการแบ่งตัวและอัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซีสสูงกว่ากลุ่มอื่น นอกจากนี้ Cryotop ยังเป็นเครื่องมือที่เหมาะสมในการทำวิทริฟิเคชันตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสมากกว่า Microdrop ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้จากการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่มีความสามารถในการเจริญไปเป็นตัวอ่อนระยะแฮชบลาสโตซีสมากกว่ากลุ่มที่ปฏิสนธิในหลอดแก้วหลังขั้นตอนการแช่แข็งและทำละลาย และพบว่าการทำละลายแบบ 3 ขั้นตอนเป็นวิธีที่เหมาะสมมากกว่าการทำละลายแบบ 1 ขั้นตอน นอกจากนี้ยังได้โคตัวรับตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนที่ผลิตโดยวิธีฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ แต่อัตราการตั้งท้องยังต่ำกว่าตัวอ่อนที่ผลิตโดยวิธีปฏิสนธิในหลอดแก้ว

บรรณานุกรม

Abdalla, H., Shimoda, M., Hara, H., Morita, H., Kuwayama, M., Hirabayashi, M. and Hochi, S. 2010. Vitrification of ICSI- and IVF-derived bovine blastocysts by minimum volume cooling procedure: effect of developmental stage and age. **Theriogenology** 74: 1028-1035.

Ahmadi, A., Ng, S.C., Liow, S.L., Ali, J., Bongso, A. and Ratnam, S.S. 1995. Intracytoplasmic injection of mouse oocytes with 5 mM Ca at different intervals. **Hum. Reprod.** 10: 431-435.

Alomar, M., Mahieu, J., Verhaeghe, B., Defoin, L. and Donnay, I. 2006. Assessment of sperm quality parameters of six bulls showing different abilities to promote embryo development in vitro. **Reprod. Fertil. Dev**. 18: 395-402.

Behalova, E., Smith, S.D., Hyttel, P. and Greve, T. 1993. Pronucleus formation in bovine oocytes activated by a single electric pulse. **Reprod. Nutr. Dev**. 33: 437–445.

Bevacqua, R.J., Pereyra-Bonnet, F., Fernandez-Martin, R., Salamone, D.F. 2010. High rates of bovine blastocyst development after ICSI-mediated gene transfer assisted by chemical activation. **Theriogenology** 74: 922-931.

Chen, S.H. and Seidel, Jr G.E. 1997. Effect of oocyte activation and treatment of spermatozoa on embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in cattle. **Theriogenology** 48: 1265-1273.

Chung, J.T., Keefer, C.L. and Downey, B.R. 2000. Activation of bovine oocytes following intracytoplasmic sperm injection (ICSI). **Theriogenology** 53: 1273-1284.

Dozortsev, D., Rybouchkin, A., De Sutter, P.D., Qian, C. and Dhont, M. 1995. Human oocyte activation following intracytoplasmic injection: the role of the sperm cell. **Hum. Reprod**. 10: 403–407.

Dozortsev, D., Qian, C., Ermilov, A., Rybouchkin, A., De Sutter, P.D. and Dhont, M. 1997. Sperm-associated oocyte-activating factor is released from the spermatozoon within 30 minutes after injection as a result of the sperm-oocyte interaction. **Hum. Reprod.** 12: 2792-2796.

Edwards, R.G. and Van Steirteghem, A.C. 1993. Intracytoplasmic sperm injection and human fertilization: Does calcium hold the key to success? **Hum. Reprod**. 8: 988–989.

Emuta, C. and Horiuchi, T. 2001. Effect of timing of activation and aging of bovine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) on cleavage and subsequence embryonic development *in vitro*. **J. Reprod. Dev.** 47: 399-405.

Esaki, R., Ueda, H., Kurome, M., Hirakawa, K., Tomii, R. and Yoshioka, H. 2004. Cryopreservation of porcine embryos derived from in vitro matured oocytes. **Biol. Reprod**. 71: 432–437.

Fujinami, N., Hosoi, Y., Kato, H., Matsumoto, K., Saeki, K., and Iritani, A. 2004. Activation with ethanol improves embryo development of ICSI-derived oocytes by regulation of kinetic of MPF activity. **J. Reprod. Dev.** 50: 171-178.

Fulka, JJr., Leibfried-Rutledge, M.L. and First, N.L. 1991. Effect of 6-dimethylaminopurine on germinal vesicle breakdown of bovine oocytes. **Mol. Reprod. Dev.** 29: 379–384.

Galli, C., Vassiliev, I., Lagutina, I., Galli, A., Lazzari, G. 2003. Bovine embryo development following ICSI: effect of activation, sperm capacitation and pre-treatment with dithiothreitol. **Theriogenology** 60: 1467-1480.

Goto, K., Kinoshita, A., and Takuma, Y. 1990. Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilized, killed spermatozoa. **Vet. Rec.** 127: 517-520.

Goto, K. 1993. Bovine microfertilization embryo transfer. **Mol. Reprod. Dev.** 36: 288-290.

Goto, K., and Yanagita, K. 1995. Normality of calves obtained by intracytoplasmic sperm injection. **Hum. Reprod**. 10: 1554.

Hamano, K., Li, X., Qian, X., Funauchi, K., Furudate, M. and Minato, Y. 1999. Gender preselection in cattle with intracytoplasmiccally injected, flow cytometrically sorted sperm heads. **Biol. Reprod.** 60: 1194-1197.

Hiraoka, K., Hiraoka, K., Kinutani, M. and Kinutani, K. 2004. Blastocoele collapse by micropipetting prior to vitrification gives excellent survival and pregnancy outcomes for human day 5 and 6 expanded blastocysts. **Hum. Reprod**. 19: 2884–2888.

Hochi, S., Terao, T., Kamei, M., Kato, M., Hirabayashi, M. and Hirao, M. 2004. Successful vitrification of pronuclear-stage rabbit zygotes by minimum volume cooling procedure. **Theriogenology** 61: 267–275.

Horiuchi, T., Yamauchi, Y., Emuta, C., Takahashi, K., Numabe, T., Okiawa, T., Katayose, H., and Yanagida, K. 1998. Effect of artificial activation on pronuclear formation and in vitro development of bovine oocytes after ICSI of a tail-scored motile bull spermatozoon. **J. Mamm. Ova. Res.** 15: S33 (Abstract)

Horiuchi, T., Emuta, C., Yamauchi, Y., Okiawa, T., Numabe, T., Yanagimachi, R. 2002. Birth of normal calves after intracytoplasmic sperm injection of bovine oocytes: a methodological approach. **Theriogenology** 57: 1013-1024.

Hoshi, K., Yanagida, K., Yazawa, H., Katayose, H., and Sato, A. 1994. Pregnancy and delivery after intracytoplasmic injection of an immobilized killed spermatozoon into and oocyte. **J. Assist Reprod. Genet.** 11: 325-326.

Hosoi, Y., Miyake, M., Utsumi, K., and Iritani, A. 1988. Development of rabbit oocytes after microinjection of spermatozoon. In: **Proc. 11th Int. Congrress Animal Reproduction and AI** 3: 331-333 (Abstract).

Hwang, S., Lee, E., Yoon, J., Yoon, B., Lee, J., and Choi, D. 2000. Effects of electric stimulation on bovine oocyte activation and embryo development in intracytoplasmic sperm injection procedure. **J. Assist. Reprod. Genet**. 17: 310-314.

Iwasaki, S., Li, X. 1994. Experimental production of triploid bovine embryos by microinjection of two sperm and their development. **J. Reprod. Dev.** 40: 17–322.

Katayama, K.P., Stehlik, J., Kuwayama, M., Osamu, K. and Stehlik, E. 2003. High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. **Fertil. Steril**. 80: 223–224.

Katayose, H., Yanagida, K., Shinoki, T., Kawahara, T., Horiuchi, T. and Sato, A. 1999. Efficient injection of bull spermatozoa into oocytes using a Piezo-driven pipette. **Theriogenology** 52: 1215–1224.

Keefer, C.L. 1989. Fertilization by sperm injection in the rabbit. **Gamete, Res**. 22: 59–69.

Keefer, C.L., Younis, A.I., Brackett, B.G. 1990. Cleavage development of bovine oocytes fertilized by sperm injection. **Mol. Reprod. Dev.** 25: 281–285.

Keskintepe, L., Brackett, B.G. 2000. Cryopreservation of bovine blastocysts obtained by intracytoplasmic sperm injection. **Theriogenology** 53: 1041–1052.

Kimura, Y., and Yanagimachi, R. 1995. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. **Biol. Reprod.** 52: 709-720.

Kline, D. and Kline, J.T. 1992. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. **Dev. Biol**. 149: 80–89.

Krisher, R.L., Lane, M. and Bavister, B.D. 1999. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. **Biol. Reprod**. 60: 1345–1352.

Kuwayama, M. and Kato, O. 2000. All-round vitrification method for human oocytes and embryos. **J. Assist. Reprod. Genet.** 17: 477 (abstract).

Lacham-Kaplan, O., and Trounson, A. 1995. Intracytoplasmic sperm injection in mice: increased fertilization and development to term after induction of the acrosome reaction. **Hum. Reprod.** 10: 2642-2649.

Laowtammathron, C., Lorthonpanich, C.,Ketudat-Cairns, M., Hochi, S. and Parnpai, R. 2005. Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: effects of hatching stage, linoleic acid-albumin in IVC medium and Ficoll supplementation to vitrification solution. **Theriogenology** 64: 1185–1196.

Lee, J.W., Tian, X.C.and Yang, X. 2003. Failure of male pronucleus formation is the major cause of lack of fertilization and embryo development in pig oocytes subjected to intracytoplasmic sperm injection. **Biol. Reprod**. 68: 1341–1347.

Li, X., Iwasaki, S., and Nakahara, T. 1993. Investigation of various conditions in micro-fertilization of bovine oocytes and subsequent changes in nuclei and development to embryos. **J. Reprod. Dev.** 39: 49–55.

Liang, Y.Y., Ye, D.N., Laowtammathron, C., Phermthai, T., Nagai, T., Somfai, T. and Parnpai R. 2011. Effects of chemical activation treatment on development of swamp buffalo (*bubalus bubalis*) oocytes matured in vitro and fertilized by intracytoplasmic sperm injection. **Reprod. Domes. Anim.** 46: e67–73.

Malcuit, C., Maserati, M., Takahashi, Y., Page, R. and Fissore, R.A. 2006. Intracytoplasmic sperm injection in the bovine induces abnormal [$Ca2^{+}$] responses and oocyte activation. **Reprod. Fertil. Dev**. 18: 39 –51.

Nakada, K.and Mizuno, J. 1998. Intracellular calcium responses in bovine oocytes induced by spermatozoa and by reagents. **Theriogenology** 50: 269–282.

Ock, S.A., Bhak, J.S., Balasubramanian, S., Lee, H.J., Choe, S.Y. and Rho, G.J. 2003. Different activation treatments for successful development of bovine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. **Zygote** 11: 69 –76.

Oikawa, T., Takada, N., Kikuchi, T., Numabe, T., Takenaka, M. and Horiuchi, T. 2005. Evaluation of activation treatments for blastocyst production and birth of viable calves following bovine intracytoplasmic sperm injection. **Anim. Reprod. Sci**. 86: 187–194.

Ongeri, E.M., Bormamn, C.L., Butler, R.E., Melican, D. and Gavin ,W.G. 2001. Development of goat embryos after *in vitro* fertilization and parthenogenetic activation by different methods. **Theriogenology** 55: 1933–1945.

Otoi, T., Tachikawa, S., Kondo, S. and Suzuki T. 1993. Effects of different lots of semen from the same bull on in vitro development of bovine oocytes fertilized *in vitro*. **Theriogenology** 39: 713-718.

Palermo, G., Joris, H., Devroey, P. and Van Steirteghem, A.C. 1992. Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection of single spermatozoon into an oocyte. **Lancet** 340: 17-18.

Perreault, S.D., Barbee, R.R. and Slott VL. 1988 Importance of glutathione in the acquisition and maintainance of sperm nuclear decondensing activity in maturing hamster oocytes. **Dev. Biol**. 125(1): 181-188.

Presicce, G.A. and Yang, X. 1994a. Nuclear dynamics of parthenogenesis of bovine oocytes matured in vitro for 20 and 40 h and activated with combined ethanol and cycloheximide treatment. **Mol. Reprod. Dev**. 37: 61–68.

Presicce, G.A and Yang X. 1994b. Parthenogenetic development of bovine oocytes matured in vitro for 24 h and activated by ethanol and cycloheximide. **Mol. Reprod. Dev**. 38: 380–385.

Rho, G.J., Kawarsky, S., Johnson, W.H., Kochhar, K. and Betteridge, K.J. 1998. Sperm and oocyte treatment to improve the formation of male and female pronuclei and subsequent development following intracytoplasmic sperm injection into bovine oocytes. **Biol. Reprod.** 59: 918–924.

Rho, G.J., Wu, B., Kawarsky, S., Leibo, S.P. and Betteridge, K.J. 1998b. Activation regimens to prepare bovine oocytes for intracytoplasmic sperm injection. **Mol. Reprod. Dev**. 50: 485–92.

Shilina, Y., Kaneda, M., Matsuyama, K., Tanaka, K., Hiroi, M. and Doi, K. 1993. Role of the extracellular Ca^{2+} on the intracellular Ca^{2+} changes in fertilized and activated mouse oocytes. **J. Reprod. Fertil**. 97: 143–150.

Shirazi, A., Ostad-Hosseini, S., Ahmadi, E., Heidari, B. and Shams-Esfandabadi, N. 2008. In vitro developmental competence of ICSI-derived activated ovine embryos. **Theriogenology** 71: 342–348.

Susko-Parrish, J.L., Leibfried-Rutledge, M.L., Northet, D.L. Schutzkus, V. and First, N.L. 1994. Inhibition of protein kinases after induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. **Dev. Biol**. 166: 729–739.

Tarkowski, A.K. and Rossant, J. 1976. Haploid mouse blastocysts developed from bisected zygotes. **Nature** 259: 663-665.

Tesarik, J., Sousa, M. and Testart, J. 1994. Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. **Hum. Reprod**. 9: 511–518.

Tesarik, J., and Sousa, M., 1995. More than 90% fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection and artificial induction of oocytes activation with calcium ionophore. **Fertil. Steril**. 63: 343–349.

Uehara, T. and Yanagimachi, R. 1976. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. **Biol. Reprod**. 15: 467–470.

Ushijima, H., Yoshioka, H., Esaki, R., Takahashi, K., Kuwayama, M., Nakane ,T., et al. 2004. Improved survival of vitrified in vivo-derived porcine embryos. **J. Reprod. Dev**. 50: 481–486.

Vajta, G. 1997. Vitrification of bovine oocytes and embryos. **Embryo Transfer Newslett** 15, 12–18.

Van Steirteghem, A.C., Liu, J., Joris, H., Nagy, Z., Jassenswillen, C., Tournaye, H., Derde, M.P., Van Assche, E., and Devroey, P. 1993. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. **Hum. Reprod.** 8: 1061-1066.

Vincent, C., Cheek, T.R. and Johnson, M.H. 1992. Cell cycle progression of parthenogenetically activated mouse oocytes to interphase is dependent on the level of internal calcium. **J. Cell. Sci**. 103: 389–396.

Wei, H. and Fukui, Y. 2002. Births of calves derived from embryos produced by intracytoplasmic sperm injection without exogenous oocytes activation. **Zygote** 10: 149-153.

Zhang M., K.H. Lu and G.E. Seidel Jr. 2003. Development of bovine embryos after *in vitro* fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. **Theriogenology** 60: 1657-1663.

ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา อนวัช แสงมาลี กนกวรรณ ศรีรัตนา นุชจรินทร์ ศรีปัญญา วันวิสาข์ ผิวสร้อย ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ ธรรมนุญ ทองประไพ โชคชัย ชัยมงคล

มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2549. ประสิทธิภาพการปฏิสนธิและการเจริญเติบโตในหลอดแก้วของตัวอ่อนโคนมหลังจากใช้น้ำเชื้อโคนมแช่แข็งจากพ่อโค 5 ตัว. **การประชุมวิชาการครั้งที่ 45 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.** *สาขาสัตว์.* หน้า 245-250.

รังสรรค์ พาลพ่าย. 2530. การเร่งการตกไข่เพื่อทำอีทีในโค. มณีวรรณ กมลพัฒนะ (บรรณาธิการ), **การปฏิสนธิในหลอดแก้วและการย้ายฝากตัวอ่อน.** โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, หน้า 41-77.

รังสรรค์ พาลพ่าย และ สรรเพชญ โสภณ. 2530. เทคนิคการย้ายฝากตัวอ่อนในโคโดยวิธีไม่ผ่าตัด. มณีวรรณ กมลพัฒนะ (บรรณาธิการ), **การปฏิสนธิในหลอดแก้วและการย้ายฝากตัวอ่อน** โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ. หน้า 133-158.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

รศ. ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาย รังสรรค์ พาลพ่าย

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Rangsun Parnpai

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 5 2094 00002 42 3

3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้

ที่ทำงาน: สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
111 ถ.มหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000
โทร. 044-224234 โทรสาร. 044-223164

5. ประวัติการศึกษา

5.1 ปริญญาตรี สาขาวิชา ชีววิทยา ปีที่จบ 2523
สถาบัน มหาวิทยาลัยบูรพา ประเทศ ไทย

5.2 ปริญญาโท สาขาวิชา สัตววิทยา ปีที่จบ 2525
สถาบัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศ ไทย
Thesis title: Plasma progesterone and oestrone sulphate during early pregnancy in swamp buffalo.

5.3 ปริญญาเอก สาขาวิชา Animal Reproduction ปีที่จบ 2541
สถาบัน Kyoto University ประเทศ ญี่ปุ่น (ได้รับทุนรัฐบาลญี่ปุ่น)
Thesis title: Study on the establishment of bovine embryonic stem cells.

5.4 ฝึกอบรมสาขา Embryo transfer and *in vitro* fertilization in farm animals. ด้วยทุน British Council สถาบัน Cambridge University, U.K. ระหว่าง พฤศจิกายน 2527 - กุมภาพันธ์ 2528.

5.5 สมาชิกสมาคมวิชาชีพ: International Embryo Transfer Society (IETS)

6. ประวัติการทำงาน:

- 9 ธันวาคม 2525 – 31 ตุลาคม 2543 นักวิจัย โครงการวิจัยวิทยาศาสตร์ไทย-เนเธอร์แลนด์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ

- 1 พฤศจิกายน 2543 – ปัจจุบัน อาจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา

7. สาขาวิชาที่มีความเชี่ยวชาญพิเศษ

7.1 การโคลนนิ่งตัวอ่อนโค กระบือ สุกร แมว โดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบ

7.2 การย้ายฝากตัวอ่อนโค กระบือ แพะ

7.3 การปฏิสนธิในหลอดแก้วโค กระบือ

7.4 Embryonic stem cells

7.5 Cryopreservation of gametes and embryos

8. ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ (ย้อนหลัง 5 ปี)

Srirattana, K., Ketudat-Cairns M.K. Nagai, T., Kaneda, M. and **Parnpai, R***. 2014. Effects of Trichostatin A on *in vitro* development and DNA methylation level of the satellite I region of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) cloned embryos. ***J. Reprod. Dev*** http://dx.doi.org/10.1262/jrd.2013-116.

Chasombat, J., Sakhong, D., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T*. 2012 Superstimulation of follicular growth in Thai native heifers by a single administration of follicle stimulating hormone dissolved in polyvinylpyrrolidone. ***J. Reprod. Dev.*** http://dx.doi.org/10.1262/jrd.2012-119

Srirattana, K., Sripunya, N., Sangmalee, A., Imsoonthornruksa, S., Liang, Y.Y., Ketudat-Cairns M.K. and **Parnpai, R***. 2012. Developmental potential of vitrified goat oocytes following somatic cell nuclear transfer and parthenogenetic activation. ***Small Rum. Res.*** http://dx.doi.org/10.1016/j. smallrumres.2012.10.011

Putkhao, K., Kocerha, J., Cho, I.K., Yang, J.J., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S*. 2012. Pathogenic cellular phenotypes are germline transmissible in a transgenic primate model of Huntington's Disease. ***Stem Cell Dev.*** 22: 1198-1205.

Ye, D.N., Tanthanuch, W., Thumanu, K., Sangmalee, A., **Parnpai**, **R*.** and Heraud, P*. 2012. Discrimination of functional hepatocytes derived from mesenchymal stem cells using FTIR microspectroscopy. ***Analyst*** 135: 4774-4784.

Imsoonthornruksa, S., Srirattana, K., Phewsoi, W., Tunwattana, W., **Parnpai, R.** and Ketudat-Cairns, M. 2012. Segregation of donor cell mitochondrial DNA in gaur- bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos, fetuses and an offspring. ***Mitochondrion*** http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2012.07.108

Srirattana, K., Imsoonthornruksa, S., Laowtammathron, C., Sangmalee, A., Tunwattana, W., Thongprapai, T., Chaimongkol, C., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2012. Full- term development of gaur-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos: effect of trichostatin a treatment. ***Cell Reprogram.*** 14(3): 248-257.

Liang, Y.Y., Srirattana, K., Phermthai, T., Somfai, T., Nagai, T. and **Parnpai, R.** 2012. Effects of vitrification cryoprotectant treatment and cooling method on the viability and development of buffalo oocytes after intracytoplasmic sperm injection. ***Cryobiology*** http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.04.006

Takeda, K., Srirattana, K., Matsukawa, K., Akagi, S., Kaneda, M., Tasai, M., Nirasawa, K., Pinkert, C.A., **Parnpai, R.** and Nagai, T. 2012. Influence of Intergeneric/interspecies Mitochondrial Injection; Parthenogenetic Development of Bovine Oocytes after Injection of Mitochondria Derived from Somatic Cells. ***J. Reprod. Dev.*** http://dx.doi.org/10.1262/jrd.2011-013

Imsoonthornruksa, S., Sangmalee, A., Srirattana, K., **Parnpai, R.** and Ketudat-Cairns, M. 2012. Development of intergeneric and intrageneric somatic cell nuclear transfer (SCNT) cat embryos and the determination of telomere length in cloned offspring. ***Cell Reprogram.*** 14(1): 79-87.

Kunkanjanawan, T., Noisa, P. and **Parnpai, R.** 2011. Modeling neurological disorders by human induced pluripotent stem cells. ***J. Biomed. Biotechnol.*** 350131. Noisa, P. and Parnpai, R. 2011. Technical challenges in the derivation of human pluripotent cells. Stem Cells Int. 907961.

Srirattana, K., Matsukawa, K., Akagi, S., Tasai, M., Tagami, T., Nirasawa, K., Nagai, T., Kanai, Y., **Parnpai, R.** and Takeda, K. 2011. Constant transmission of mitochondrial DNA in intergeneric cloned embryos reconstructed from swamp buffalo fibroblasts and bovine ooplasm. ***Anim. Sci. J.*** 82(2): 236-243.

Thumanu, K., Tanthanuch, W., Ye, D., Sangmalee, A., Lorthongpanich, C., Heraud, P., and **Parnpai, R.** 2011. Spectroscopic signature of mouse embryonic stem cells derived hepatocytes using Synchrotron FTIR microspectroscopy. ***J. Biomed. Optics*** 16(5): 057005.

Lorthongpanich, C, Chuti Laowtammathron, C and **Parnpai, R.** 2011. From microsurgery to single blastomere culture: conventional and novel methods for ES cell establishment. ***Thai J. Vet. Med.*** 41: 11-22.

Liang, Y., Phermthai, T., Nagai, T., Somfai, T. and **Parnpai, R**. 2011. *In vitro* development of vitrified buffalo oocytes following parthenogenetic activation and intracytoplasmic sperm injection. ***Theriogenology*** 75: 1652-1660.

Imsoonthornruksa, S., Lorthongpanich, C., Sangmalee, A., Srirattana, K., Laowtammathron, C., Tunwattana, W., Somsa, W., Ketudat-Cairns, M., Nagai, T. and **Parnpai, R.** 2011. The effects of manipulation medium and recipient cytoplast on *in vitro* development of intraspecies and intergeneric felid embryos. ***J. Reprod. Dev.*** 57: 385-392.

Imsoonthornruksa, S., Noisa, P., **Parnpai, R.** and Ketudat-Cairns, M. 2011. A simple method for production and purification of soluble and biological activity recombinant human leukemia inhibitory factor (hLIF) fusion protein in *Escherichia coli*. ***J. Biotechnol.*** 151: 295-302.

Srirattana, K., Matsukawa,K., Akagi, S., Tasai, M., Tagami, T., Nirasawa, K., Nagai, T., Kanai, Y., **Parnpai, R**. and Takeda, K. 2011. Constant transmission of mitochondrial DNA in intergeneric cloned embryos reconstructed from swamp buffalo fibroblasts and bovine ooplasm. ***Anim. Sci. J.*** doi:10.1111/j.1740-0929.2010.00827.x

Liang Y.Y., Ye, D.N., Laowtammathron, C., Phermthai, T., Nagai, T., and **Parnpai, R.** 2011. Effects of chemical activation treatment on development of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes matured in vitro and fertilized by intracytoplasmic sperm injection. ***Reprod. Domestic Anim.*** 46: e67-e73.

Tanthanuch, W., Thumanu, K., Lorthongpanich, C., **Parnpai, R**. and Heraud, P. 2010. Neural differentiation of mouse embryonic stem cells studied by FT-IR spectroscopy. ***J. Mol. Struct.*** 967: 189-195.

Laowtammathron, C., Cheng, E.C., Cheng, P.H, Snyder, B.R., Yang, S.H., Johnson, Z., Lorthongpanich, C., Kuo, H.C., **Parnpai, R**. and Chan, A.W.S. 2010. Monkey Hybrid Stem Cells Develop Cellular Features of Huntington's Disease. ***BMC Cell Biology.*** 11: 12.

Imsoonthornruksa, S., Lorthongpanich, C., Sangmalee, A., Srirattana, K., Laowtammathron, C., Tunwattana, W., Somsa, W., Ketudat-Cairns, M., and **Parnpai, R.** 2010. Abnormalities in the transcription of reprogramming genes related to global epigenetic events of cloned endangered felid embryos. ***Reprod. Fertil. Dev.*** 22: 613-624.

Sripunya, N., Somfai, T., Inaba, Y., Nagai, T., Imai, K. and **Parnpai, R.** 2010. A comparison of Cryotop and Solid Surface Vitrification methods for the cryopreservation of *in vitro* matured bovine oocytes. ***J. Reprod. Dev.*** 56: 176-181.

Srirattana, K., Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Imsoonthornruksa S., Ketudat-Cairns, M., Phermthai, T., Nagai, T. and **Parnpai, R.** 2010. Effect of donor cell types on developmental potential of cattle (*Bos taurus*) and swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) cloned embryos. ***J. Reprod. Dev.*** 56: 49-54.

Thumanu, K., Tanthanuch, W., Lorthongpanich, C., Heraud, P. and **Parnpai.** R. 2009. FTIR microspectroscopic imaging as a new tool to distinguish chemical composition of mouse blastocyst. ***J. Mol. Struct.*** 933: 104-111.

Suteevun-Phermthai, T., Curchoe, C.L., Evans, A.C., Boland, E., Rizos, D., Fair, T., Duffy, P., Sung, L.Y., Du, F., Chaubal, S., Xu, J., Wechayant, T., Yang, X., Lonergan, P., **Parnpai, R.**, and Tian, X. 2009. Allelic switching of the imprinted *IGF2R* gene in cloned bovine fetuses and calves. ***Anim. Reprod. Science.*** 116: 19-27.

Lorthongpanich, C., Yang, S.H., Piotrowska-Nitsche, K., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S. 2008. Development of single blastomere derived mouse embryos, outgrowths and embryonic stem cells. ***Reproduction***.135: 805-813.

Lorthongpanich, C., Yang, S.H., Piotrowska-Nitsche, K., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S. 2008. Chemical enhancement in embryo development and stem cell derivation from single blastomeres ***Cloning Stem Cells*** 10: 503-512.

Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Chan, A.W.S., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.** 2008. Development of interspecies cloned monkey embryo reconstructed with bovine enucleated oocyte. ***J. Reprod. Dev.*** 54: 306-313.

Parnpai, R. 2007. Production of cloned embryos in buffalo. ***Ital. J. Anim. Sci.*** 6. Suppl. 2: 102-106.

Chan, A.W.S., Lorthongpanich, C., Yang, S.H., Piotrowska-Nitche, K. and **Parnpai, R.** 2007. Competence of early embryonic blastomeres for establishment of embryonic stem cell line. ***Fertility and Sterility*** 88: S396-S396.

Muenthaisong, S., Laowtammathron, C., Ketudat-Cairns, M., **Parnpai, R.** and Hochi, S. 2007. Quality analysis of buffalo blastocysts derived from oocytes vitrified before or after enucleation and reconstructed with somatic cell nuclei. ***Theriogenology*** 67: 893-900.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

9. งานวิจัยที่ประสบความสำเร็จแล้ว

1. ประสบผลสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนโคนม ได้ลูกแฝดเพศเมียเกิดมาเมื่อวันที่ 8 กันยายน 2529 นับเป็นรายแรกของประเทศไทย

2. ประสบผลสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนแพะ ได้ลูกแพะเกิดมาเมื่อปี 2532 นับเป็นรายแรกของประเทศไทย

3. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งโค โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งเกิดมาเมื่อวันที่ 6 มีนาคม 2543 นับเป็นรายแรกของเอเชียอาคเนย์ และรายที่ 6 ของโลก

4. ประสบความสำเร็จการโคลนนิ่งตัวอ่อนกระบือปลักโดยใช้เซลล์ร่างกายลูกอ่อนโคและเซลล์แกรนูโลซาเป็นเซลล์ต้นแบบ นับเป็นรายแรกของโลกที่ทำและตีพิมพ์ผลงานใน Buffalo Journal 1999, 15: 371-384.

5. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งโคบราห์มันเพศผู้ชื่อ “ตูมตาม” โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งจากเซลล์ต้นแบบตัวเดียวกัน 7 ตัวเกิดมา ดังนี้

1. “ตูมตาม2” เกิดมาเมื่อวันที่ 25 ตุลาคม 2546
2. “ตูมตาม3” เกิดมาเมื่อวันที่ 25 พฤศจิกายน 2546
3. “ตูมตาม4” เกิดมาเมื่อวันที่ 30 พฤศจิกายน 2546
4. “ตูมตาม5” เกิดมาเมื่อวันที่ 24 ธันวาคม 2546
5. “ตูมตาม6” เกิดมาเมื่อวันที่ 28 ธันวาคม 2546
6. “ตูมตาม7” เกิดมาเมื่อวันที่ 5 มกราคม 2547
7. “ตูมตาม8” เกิดมาเมื่อวันที่ 7 มกราคม 2547

ลูกโคทุกตัวผ่านการตรวจสอบดีเอ็นเอแล้วพบว่ามีดีเอ็นเอเหมือน“ตูมตาม”เจ้าของเซลล์ต้นแบบทุกประการ และมีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงดีมาก

6. ประสบความสำเร็จในการโคลนนิ่งแมวบ้าน โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกแมวคลอดออกมามีชีวิต 2 ตัว ในวันที่ 25 ธันวาคม 2549 แต่ลูกแมวเสียชีวิต 2 และ 5 วัน หลังคลอด

7. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งโคพันธุ์ขาวลำพูนเพศผู้ชื่อ “อินทนนท์” โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งเกิดมารายแรกของประเทศไทย เมื่อวันที่ 21 มีนาคม 2550 ได้รับการตั้งชื่อว่า “ขาวมงคล” และตัวที่สอง “เศวต” เกิดเมื่อวันที่ 1 กุมภาพันธ์ 2555

8. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งแพะพันธุ์บอร์เพศผู้ โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ ต้นแบบ ได้ลูกแพะโคลนนิ่งเกิดมารายแรกของประเทศไทย เมื่อวันที่ 27 พ.ค. 2550 1 ตัว และ วันที่ 4 ก.ค. 2550 1 ตัว

9. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งกระทิงเพศผู้ โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ ต้นแบบ ได้ลูกกระทิงโคลนนิ่งเกิดมารายที่ 2 ของโลก เมื่อวันที่ 4 มี.ค. 2551 จำนวน 1 ตัว แต่ลูกกระทิงเสียชีวิต 12 ชั่วโมง หลังคลอด

ประวัติผู้วิจัย

รศ.ดร. มารินา เกตุทัต-คาร์นส์

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาง มารินา เกตุทัต-คาร์นส์

(ภาษาอังกฤษ) Mrs. Mariena Ketudat-Cairns

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1014 01120 08 7

รหัสประจำตัวนักวิจัย 38 40 0999

3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เลขที่ 111 ถ. มหาวิทยาลัย ต. สุรนารี
อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000
โทรศัพท์ (044) 224355 โทรสาร (044) 224150
e-mail: ketudat@sut.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2531 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) 3.24
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

พ.ศ. 2538 Ph.D. (Biology) 4.00
University of California, San Diego, USA

พ.ศ. 2538 ประกาศนียบัตร Industrial Biotechnology
Gesellschaft fur Biotechnologische Forschung mbH, Germany

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

Molecular Biology & Genetic Engineering (Plant & Animal)

Recombinant Protein Production

Gene Expression in cloned animals and stem cells

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ : ระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น

7.1 **ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย** : โครงการการผลิตกรดซัคซินิคโดยใช้เชื้อแบคทีเรียในกระบวนการหมักแบบกะ ส่งรายงาน 2554

7.2 **ผู้ประสานงานชุดโครงการ** การวิจัยโปรตีนแห่ง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2551

7.3 **หัวหน้าโครงการวิจัย** : มีชื่อโครงการวิจัย ดังต่อไปนี้

- การหาเครื่องหมายโมเลกุลบ่งชี้ทางพันธุกรรมที่สัมพันธ์กับความต้านทานโรคแคงเกอร์ในมะนาวสายพันธุ์พิจิตร (M33)
- โมโนโคลนัลแอนติบอดีต่ออสุจิ Y ของวัว
- การโคลนและผลิตโปรตีนไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรีย ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2555
- การพัฒนาเครื่องหมายการตรวจสอบย้อนกลับปลานิลจากมทส ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2553
- การค้นหาและการแสดงออกของกลุ่มยีน Glycosyl Hydrolases ในจีโนมของข้าวหอมมะลิ ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2554
- การโคลนและผลิตเอ็นไซม์เอนเทอโรไคเนสสายสั้น ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2551
- การผลิตรีคอมบิแนนท์ทรานสกลูตามิเสนจากปลานิล ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2550
- การผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ Thermostable DNA polymerase จาก *Pyrococcus furiosus* ในแบคทีเรีย *Escherichia coli* ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2550

- การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในถังหมัก ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2549
- การแสดงออกและการผลิตเบต้ากลูโคสิเดส โดย *Pichia pastoris* ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2548
- การจำแนกลักษณะทางพันธุกรรม สรีระวิทยา และพฤติกรรมของไก่พื้นเมืองไทย ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2547
- การหาแผนที่ทางพันธุกรรมของไผ่ตง ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2546
- การพัฒนาวิธีการตรวจหาชนิดของโครโมโซมเพศปลานิล ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2543
- การผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ Taq DNA polymerase ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2541

ผู้ร่วมวิจัยในโครงการวิจัย ดังต่อไปนี้

การโคลนนิ่งตัวอ่อนโค กระบือ แมว และสัตว์ป่าใกล้สูญพันธ์ โดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบ

Investigation of Rice Beta-Glycosidase Gene Functions.

(National Science and Technology Development Agency National Center for Genetic Engineering and Biotechnology)

ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2550

- Clonal Selection of Sweet Bamboo for Commercial and Industrial Uses ส่งรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2545
- Functional Analysis of the Maize bZIP Protein Opaque (NIH, USA) แล้วเสร็จ 2537

ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

Srirattana K, , Imsoonthornruksa S., Laowtammathron C, Sangmalee, A., Tunwattana, W., Thongprapai, T., Chaimongkol, C., **Ketudat-Cairns M**, Parnpai, R. (2012).Full-term development of gaur-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos: effect of Trichostatin A treatment *Cellular Reprogramming* 14(3): 1-10 DOI: 10.1089/cell.2011.0099

Imsoonthornruksa, S., A. Sangmalee, K. Srirattana, , R. Parnpai, **M. Ketudat-Cairns** (2011) Development of intergeneric and intrageneric somatic cell nuclear transfer (SCNT) cat embryos and the determination of telomere length in cloned offspring *Cellular Reprogramming* 14(1): 79-87

Songwattana, P. and **Ketudat-Cairns, M**. (2011) Comparison between Serological and Molecular Detection of Citrus Canker Pathogen (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) Molecular Pathogens 2(4) 1-7

Ruamkuson, D., Tongpim, S., and **Ketudat-Cairns, M**. (2011) A Model to develop biological probes from microflora to assure traceability of tilapia Food Control 22: 1742-1747

Rattanasuk, S., Parnpai, R., and **Ketudat-Cairns, M**. (2011) Multiplex Polymerase Chain Reaction used for Bovine Embryo Sex Determination J of Reprod and Dev 57(4)

Imsoonthornruksa, S., C. Lorthongpanich, A. Sangmalee, K. Srirattana, C. Laowtammathron, W. Tunwattana, W. Somsa, **M. Ketudat-Cairns**, T. Nakai, R. Parnpai (2011) The effects of manipulation medium, culture system and recipient cytoplast on *in vitro* development of intraspecies and intergeneric felid embryos *J Reprod Dev* 57(3) 385-392

Imsoonthornruksa, S., Noisa, P., Parnpai, R., **Ketudat-Cairns, M**. (2011) A simple method for production and purification of soluble and biologically active recombinant human leukemia inhibitory factor (hLIF) fusion protein in *Escherichia coli*, *Journal of Biotechnology* (151): 295-302

Imsoonthornruksa, S., C. Lorthongpanich, A. Sangmalee, K. Srirattana, C. Laowtammathron, W. Tunwattana, W. Somsa, **M. Ketudat-Cairns**, R. Parnpai (2010) Abnormalities in the transcription of reprogramming genes related to global epigenetic events of cloned endangered felid embryos *Reprod Fertil Dev 2010; 22(4):613-24*

Srirattana K, Lorthongpanich C, Laowtammathron C, Imsoonthornruksa S, **Ketudat-Cairns M**, Phermthai T, Nagai T, Parnpai R (2010). Effect of Donor Cell Types on Developmental Potential of Cattle (*Bos taurus*) and Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*) Cloned Embryos *J Reprod Dev 2010 Feb; 56(1):49-54.*

Rattanasuk, S., and **Ketudat-Cairns, M**. (2009) Genetic Diversity of Felids' Cytochrome B Suranaree J. Sci Technol 16 (4) 283-290

Ruamkusol, D., and **Ketudat-Cairns, M**. (2009) Optimum Conditions for DGGE of 16S rDNA from SUT Tilapia Intestinal Microflora Suranaree J. Sci Technol 16 (4) 311-317

Kupradit, C., and **Ketudat-Cairns, M**. (2009) The extraction and purification of boar sperm surface protein Suranaree J. Sci Technol 16 (3) 245-251

Rattanasuk, S. and **Ketudat-Cairns, M**. (2009) Chryseobacterium indologenes, novel mannanase producing bacteria, Songklanakarin J. of Sci and Tech 31(4) 395-399

Kupradit, C., Charoenrat, T., and **Ketudat-Cairns, M**. (2008) Recombinant Bovine Enterokinase Light Chain Production by *Pichia pastoris*: Effect of Induction Temperature Thai Journal of Biotechnology 8 (1) 99-105

Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Chan, A. W. S., **Ketudat-Cairns, M**. and Parnpai, R. (2008) Development of interspecies cloned monkey embryos reconstructed with bovine enucleated oocyte J of Reprod and Dev 54(5) 306-313

Phetsom, J., Jung, K., **Ketudat-Cairns, M.,** and Ronald, P. (2007). Quality assessment of NSF Rice Oligonucleotide Array. Agricultural Sci. J. 38(6): 11-14.

Opassiri R., Pomthong B., Akiyama T ., Nakphaichit M., Onkoksoong T, **Ketudat-Cairns M**, and Ketudat Cairns JR. (2007) A stress-induced rice beta-glucosidase represents a new subfamily of glycosyl hydrolase family 5 containing a fascin-like domain Biochem. J. (408) 241-249

Imsoonthornruksa, S., Lorthongpanich, C., Srirattana, K., Sripunya N. Laowtammathron, C., **Ketudat-Cairns, M.** and. Parnpai, R. 2006. Effect of manipulation medium on the development of reconstructed domestic cat embryos. Reproduction, Fertility and Development 19(1) 141

Lorthongpanich, C., K. Srirattana, S. Imsoonthornruksa, N. Sripunya, C. Laowtammathron, O. Kumpong, **M. Ketudat-Cairns** and R. Parnpai (2007) Expression and Distribution of Oct-4 in Interspecies-Cloned Long-Tailed Monkey (*Macaca fascicularis*) Embryo Reproduction, Fertility and Development 19(1) 149 doi:10.1071/RDv19n1Ab62

Muenthaisong S, Laowtammathron C, **Ketudat-Cairns, M.**, Parnpai R, Hochi S. (2007) Quality analysis of buffalo blastocysts derived from oocytes vitrified before or after enucleation and reconstructed with somatic cell nuclei. Theriogenology. 67(4) 893-900

Toonkool, P., Metheenukul, P., Sujiwattanarat, P., Paiboon, P., Tongtubtim, N., **Ketudat-Cairns, M**., Ketudat-Cairns, J., and Svasti, J. (2006) Expression and purification of dalcochinase, a *ß*-glucosidase from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre, in yeast and bacterial hosts. Protein Expression and Purification

Charoenrat, T., **Ketudat-Cairns, M.**, Jahic M., Veide, A., and Enfors, S.-O., (2006) Increase total air pressure versus oxygen limitation for enhance oxygen transfer and production formation in a *Pichia pastoris* recombinant protein process Biochemical Engineering Journal. 30: 205-211.

Charoenrat, T., **Ketudat-Cairns, M.**, Enfors, S.-O., Jahic M., and Veide, A. (2006) Recovery of Recombinant ß-glucosidase by expanded bed adsorption from *Pichia pastoris* high cell density culture broth. Journal of Biotechnology (122) 86-98

Charoenrat, T., **Ketudat-Cairns M.**, Stendahl-Andersen, H., Jahic M., and Enfors S.-O (2005) Oxygen limited fed-batch process: An alternative control for *Pichia pastoris* recombinant protein processes. Bioprocess and Biosystems Engineering (27) 399-406 ** *Received Best paper of the year award.* **

Laowtammathron, C., Lorthongpanich, C., **Ketudat-Cairns, M**., Hochi, S., Parnpai, R. 2005. Factors affecting cryosurvival of nuclear-transferred bovine and swamp buffalo blastocysts: the effects of hatching stage, linoleic acid-albumin in culture medium, and Ficoll supplementation to vitrification solution. Theriogenology **(**64), 1185-1196

Charoenrat, T., Vanichsrirattana, V., and **Ketudat-Cairns, M.** (2004) Recombinant β-glucosidase Production by *Pichia pastoris*: Influence of pH. Thai Journal of Biotechnology 5 (1) 51-55

Lorthongpanich, C., Laowtammathron, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., **Ketudat-Cairns, M.,** Likitdecharote, B. and Parnpai, R. (2004). *In vitro* development of enucleated domestic cat oocytes reconstructed with skin fibroblasts of domestic and leopard cats. *Reprod. Fert. Dev.* (16): 149.

Kanchanatawee, S., Wanapu, C. and **Ketudat-Cairns, M**. (2000) Biotechnology Graduate Education in Thailand. Thai J. of Biot 2 (1): 55-62

Carlini, L.E., **M. Ketudat**, R.L. Parsons, S. Prabhakar, R. J. Schmidt and M. J. Guiltinan (1999) The maize bZIP protein orthologue of EmBP-1: Activation of gene expression in yeast from an O2 box and localization of a bipartite nuclear localization signal (NLS). Plant Molec. Biol.41: 339-349. (M. Ketudat and L. Carlini are Co-first authors)

Ketudat-Cairns, M. (1998) Biotechnology and Daily Life. Suranaree J. Sci Technol 5:208-211

Manakasem Y., Sornsuk P., and **Ketudat-Cairns M.** (1998) A survey of the Status and Problems of the Vegetable and Fruit Production and 6Post-Harvest Handling System in Nakhon Ratchasima Province. Suranaree J. Sci Technol 5:95-100

Schmidt, R. J., Pysh, L. D., **Ketudat, M.**, Parsons, R. L., and Hoschek, G. (1994) bZIP Proteins Regulating Gene Expression in Maize Endosperm. In *Molecular Genetic Analysis of Plant Metabolism and Development* (G. Coruzzi and P. Puigdomenech, eds.) NATO ASI Proceedings

Schmidt, R. J., **Ketudat, M.**, Aukerman, M. J., and Hoschek, G. (1992) Opaque-2 is a Transcriptional Activator that Recognizes a Specific Target Site in 22-kD Zein Genes. *Plant Cell* 4:689-700

Ueda T, Waverczak W, Ward K, Sher N, **Ketudat M**, Schmidt RJ, Messing J. (1992) Mutations of the 22- and 27-kD zein promoters affect transactivation by the Opaque-2 protein. *Plant Cell* 4:701-709.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

นาย เพลิน เมินกระโทก

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาย เพลิน เมินกระโทก

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Plern Mernkrathoke

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 8-34-00087-3007-3

3.ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิชการการเกษตร

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้

ฟาร์มมหาวิทยาลัย สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เลขที่ 111 ถ. มหาวิทยาลัย ต. สุรนารี
อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000
โทรศัพท์ (044) 225015 โทรสาร (044) 225015
e-mail: plern@sut.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2531 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

พ.ศ. 2538 วิยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีการผลิตสัตว์)
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6. สาขาวิชาที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ การจัดการการเลี้ยงโค อาหารและการให้อาหารโค และการจัดการการเลี้ยงไก่พันธุ์

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยภายในประเทศ

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย

7.2 ผู้ร่วมโครงการวิจัย

- เรื่อง การใช้เทคโนโลยีโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อ และโคนมพันธุ์ดีเยี่ยม

(The use of cloning technology to produce exotic beef and dairy cattle.)

ความรับผิดชอบ : จัดเตรียมและดูแลโคตัวรับ ตรวจระบบสืบพันธุ์ สอดหลอดฝากตัวอ่อน ตรวจการตั้งท้อง ดูแลโคตั้งท้องและคลอดลูก

- เรื่อง ผลของสารสกัดจากลูกยอต่อการรักษาโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการในโคนม

(Effect of *Morinda citrifolia* fruit extracta on treatment of bovine subclinicla mastitis in dairy cow.)

- เรื่อง การใช้ประโยชน์จากถั่วไมยราในอาหารโค

(Utilization of Hedge Lucerne Meal in Cattle feed.)

- เรื่อง การทดสอบพันธุ์โคนมฟรีบราห์
- เรื่อง การสร้างสายพันธุ์ไก่เนื้อโคราช เพื่อการผลิตเป็นอาชีพวิสาหกิจชุมชน

7.3 ผลงานวิจัยตีพิมพ์

ผลงานตีพิมพ์วารสารภายในประเทศ

วิศิษฐิพร สุขสมบัติ และเพลิน เมินกระโทก. 2547. การศึกษาการใช้ประโยชน์ต้นอ้อยเป็นอาหารหยาบสำหรับเลี้ยงโคนม. วารสารโคนม 21(2):(26-34)

7.4 ผลงานนำเสนอในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ : -

7.5 งานวิจัยที่กำลังทำ

ชื่อโครงการวิจัย	แหล่งทุน (ระบุระยะเวลาที่ได้รับทุนด้วย)	สถานภาพ
หัวหน้าโครงการวิจัย	-	-
ผู้ร่วมโครงการวิจัย : โครงการการสร้างสายพันธุ์ไก่เนื้อโคราชเพื่อการผลิตเป็นอาชีพวิสาหกิจชุมชน ระยะที่ 2	สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ระยะเวลาดำเนินการ 3 ปี	อยู่ระหว่างการดำเนินการโครงการวิจัย