รหัสโครงการ SUT3-304-53-36-06

รายงานการวิจัย

การศึกษาวิธีการคัดแยกและเลี้ยงฟอลลิเคิลขนาดเล็กในกระบือปลักเพื่อทำปฏิสนธิในหลอดแก้วและการฉีดตัวอสุจิเข้าในไข่

Study on isolation and culture the small follicle of swamp buffalo for *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-304-53-36-06

รายงานการวิจัย

การศึกษาวิธีการคัดแยกและเลี้ยงฟอลลิเคิลขนาดเล็กในกระบือปลักเพื่อทำปฏิสนธิในหลอดแก้วและการฉีดตัวอสุจิเข้าในไข่

Study on isolation and culture the small follicle of swamp buffalo for *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รศ. ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

รศ. ดร.มารินา เกตุทัต คาร์นส์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2553

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2558

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2553-2555 คณะวิจัยขอขอบคุณสมาชิกศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้รายงานการวิจัยของคณะวิจัยดำเนินการไปได้อย่างดียิ่ง และสำเร็จลุล่วง และขอขอบคุณโรงฆ่าสัตว์รังสิต อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์รังไข่กระบือ และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 1 ที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่ในการทดลอง

.....

รองศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย

หัวหน้าโครงการ

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.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
สารบัญเรื่อง	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	1
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.4 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	3
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	5
การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของโกรทแฟ็กเตอร์ต่อการเจริญของฟอลลิเคิลขนาดเล็ก	5
2.1 การแยกฟอลลิเคิลออกจากรังไข่	5
2.2 การเลี้ยงฟอลลิเคิลขนาดเล็กในสภาวะที่ตรึงด้วยคอลลาเจนเจล	5
2.3 การเลี้ยงไข่ที่ได้จากการเลี้ยงฟอลลิเคิล	6
2.4 การตรวจสอบอัตราการรอดของไข่	6
2.5 การตรวจสอบระยะการเจริญของไข่	7
การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของขนาดของฟอลลิเคิล และโกรทแฟ็กเตอร์ต่อการเจริญของฟอลลิเคิลขนาดเล็ก และอัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ (Intracytoplasmic sperm injection, ICSI)	7
2.6 การแยกฟอลลิเคิลออกจากรังไข่	7
2.7 การเลี้ยงฟอลลิเคิล	7
2.8 การตรวจสอบอัตราการรอดของไข่ภายหลังการเลี้ยงฟอลลิเคิล	8
2.9 การเลี้ยงไข่ให้พร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลอง	8
2.10 การตรวจสอบระยะการเจริญของนิวเคลียสไข่	8
2.11 การทำ ICSI	8
2.12 การกระตุ้นไข่หลังการฉีดอสุจิเข้าไปในไข่	8
2.13 การเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดทดลอง	8

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
2.14 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ	9
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและข้อวิจารณ์	10
ผลการทดลองที่ 1	10
ผลการทดลองที่ 2	20
ข้อวิจารณ์	30
บทที่ 4 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	33
บรรณานุกรม	34
ภาคผนวก ก	
ประวัติผู้วิจัย	38
ประวัติผู้ร่วมวิจัย	48

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงโกรทแฟ็กเตอร์ที่ใช้ในการทดลอง 6

ตารางที่ 2 แสดงอัตราการรอดของฟอลลิเคิลหลังจากเลี้ยงนาน 14 วัน 11

ตารางที่ 3 แสดงอัตราการเจริญของฟอลลิเคิลในกลุ่ม 1 15

ตารางที่ 4 แสดงอัตราการเจริญของฟอลลิเคิลในกลุ่ม 2 16

ตารางที่ 5 แสดงอัตราการเจริญของฟอลลิเคิลในกลุ่ม 3 16

ตารางที่ 6 แสดงอัตราการรอดของไข่และการเจริญของนิวเคลียสไข่จากฟอลลิเคิลในกลุ่ม 1 18

ตารางที่ 7 แสดงอัตราการรอดของไข่และการเจริญของนิวเคลียสไข่จากฟอลลิเคิลในกลุ่ม 2 19

ตารางที่ 8 แสดงอัตราการรอดของไข่และการเจริญของนิวเคลียสไข่จากฟอลลิเคิลในกลุ่ม 3 19

ตารางที่ 9 แสดงอัตราการเจริญของฟอลลิเคิลภายหลังการเลี้ยง 7 14 และ 30 วัน 20

ตารางที่ 10 แสดงอัตราการรอดของไข่ภายหลังการเลี้ยงฟอลลิเคิล 21

ตารางที่ 11 แสดงการเจริญของนิวเคลียสไข่ที่แยกจากฟอลลิเคิลที่เลี้ยงนาน 7 วัน 24

ตารางที่ 12 แสดงอัตราการเจริญของนิวเคลียสไข่ที่แยกจากฟอลลิเคิลที่เลี้ยงนาน 14 วัน 25

ตารางที่ 13 แสดงอัตราการเจริญของนิวเคลียสไข่ที่แยกจากฟอลลิเคิลที่เลี้ยงนาน 30 วัน 26

ตารางที่ 14 แสดงอัตราการเจริญของฟอลลิเคิลที่เลี้ยงในน้ำยาที่เติม bFGF นาน 30 วัน และอัตราการรอดของไข่ 27

ตารางที่ 15 แสดงอัตราการเจริญของนิวเคลียสไข่ที่แยกได้จากฟอลลิเคิลที่เลี้ยงในน้ำยาที่เติมและไม่เติม bFGF 28

ตารางที่ 16 แสดงอัตราการเจริญของตัวอ่นหลังการทำ ICSI ของไข่ที่แยกได้จากฟอลลิเคิลที่เลี้ยงนาน 30 วันในน้ำยาที่เติม bFGF 29

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 แสดงการรอดและการเจริญของฟอลลิเคิลในกลุ่ม 1 (Ø 200-399 μm) 12
ภาพที่ 2 แสดงการรอดและการเจริญของฟอลลิเคิลในกลุ่ม 2 (Ø 400-599 μm) 13
ภาพที่ 3 แสดงการรอดและการเจริญของฟอลลิเคิลในกลุ่ม 3 (Ø 600-799 μm) 14
ภาพที่ 4 แสดงไข่จากฟอลลิเคิลในกลุ่ม 2 ภายใต้แสงปกติ (A) และไข่หลังจากย้อมด้วย สี FDA (B) และไข่ที่รอดชีวิตในแสงปกติ (C) และนิวเคลียสของไข่หลังจาก ย้อม Hoechst 33342 (D) 17
ภาพที่ 5 แสดงระยะการเจริญของนิวเคลียสไข่ ระยะ GV (A), MI (B), degenerate chomosome (C) และไข่ที่ไม่พบจำนวนโครโมโซม (D) 17
ภาพที่ 6 แสดงการเจริญของนิวเคลียสไข่ระยะ MII 22
ภาพที่ 7 แสดงตัวอ่อนกระบือระยะมอรูล่าที่ผลิตจากการเลี้ยงฟอลลิเคิล แล้วแยกไข่ไป เลี้ยงให้พร้อมปฏิสนธิ แล้วทำ ICSI 23
ภาพที่ 8 แสดงตัวอ่อนกระบือระยะบลาสโตซีส ที่ผลิตจากการเลี้ยงฟอลลิเคิล แล้วแยก ไข่ไปเลี้ยงให้พร้อมปฏิสนธิ แล้วทำ ICSI 23

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในขณะนี้ประชากรกระบือปลักกำลังลดลงอย่างมาก จากสถิติกรมปศุสัตว์ประเทศไทยเคยมีกระบือมากที่สุดในปี 2522 - 2523 จำนวน 6 ล้านตัว ต่อมาจำนวนลดลงช้า ๆ คงที่ในปี 2534-2536 เหลือ 4.8 ล้านตัว และลดลงอย่างรวดเร็ว จากปี 2536-2541 ในอัตราเฉลี่ยปีละ 11.9% หลังจากประเทศไทยประสบภาวะวิกฤติเศรษฐกิจปี 2540 เป็นต้นมา จำนวนกระบือได้ลดลงเฉลี่ยปีละ 7.6% ปี 2547 เหลือ 1.49 ล้านตัว ปี 2548 เพิ่มขึ้นเป็น 1.62 ล้านตัว ปัจจุบันมีจำนวนกระบือปลักไม่ถึง 1 ล้านตัว ซึ่งมีสาเหตุหลักจากเกษตรกรใช้เครื่องจักรกลทำการเกษตรแทนการใช้แรงงานกระบือปลัก (จำนงค์ และ วรวิทย์, 2551) ปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีต่างๆมาใช้ในการเพิ่มจำนวนกระบือปลักพันธุ์ดีเช่น การผสมเทียม (Crudeli, และคณะ, 1999), การโคลนนิ่ง (Muenthaisong และคณะ, 2007) และการทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว (Suteevun และคณะ, 2006) ซึ่งการจะทำได้นั้นต้องอาศัยไข่ที่พร้อมปฏิสนธิจากตัวอสุจิ จากการศึกษาพบว่าในรังไข่กระบือมีฟอลลิเคิลระยะ Primordial follicle จำนวน 10,000-19,000 ใบ ส่วนในรังไข่โคมีประมาณ 15,000 ใบ (Santos และคณะ, 2006) แม้ในกระบือจะมีจำนวน Primordial follicle มาก แต่อัตราการผสมพันธุ์และการกระตุ้นให้เกิดการตกไข่ของกระบือค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับโค (Presicce, 2007) เนื่องจากฟอลลิเคิลขนาดเล็กจำนวนมากฝ่อและสลายไปขณะที่อยู่ภายในรังไข่ มีฟอลลิเคิลเพียงบางส่วนเท่านั้นที่สามารถเจริญจนตกไข่ได้ (Leigh และคณะ, 2004) ปัจจุบันจึงมีการพยายามพัฒนาเทคนิค การเลี้ยงฟอลลิเคิลขนาดเล็กในกระบือเพื่อให้ได้ฟอลลิเคิลที่เจริญจนสามารถได้ไข่ที่พร้อมปฏิสนธิได้เพิ่มขึ้น เพื่อนำไข่ที่ได้ไปใช้ประโยชน์ต่อไป

1.2 การทบทวนวรรณกรรม (reviewed literature) / สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

ภายในรังไข่ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะประกอบด้วยฟอลลิเคิลระยะต่างๆ จำนวนมากโดยเริ่มจาก primordial follicle เจริญต่อไปเป็น primary follicle secondary follicle growing follicle หรือ developing follicle และ mature follicle หรือ graafian follicle ตามลำดับ (Slomianka, 2006) ซึ่งฟอลลิเคิลเหล่านี้เมื่อได้รับการกระตุ้นจากฮอร์โมนจะทำให้เกิดการเจริญขึ้นมา เช่น เกิดช่องว่างภายใน (antrum), มีการเพิ่มขึ้นของเซลล์แกรนูโลซา (granulosa cell) และขนาดของไข่ (Alm และคณะ 2006) ในระหว่างการเจริญเติบโตมีฟอลลิเคิลเพียงบางส่วนเท่านั้นที่เติบโตเป็น graafian follicle และมีการตกไข่ แต่มีฟอลลิเคิลจำนวนมากภายในรังไข่ที่ไม่ได้เติบโตจนเป็น graafian follicle ซึ่งฟอลลิเคิลเหล่านั้นจะฝ่อไปในระหว่างที่มีการเจริญเติบโตเรียกว่าเกิดขบวนการ atresia (Leigh และ คณะ, 2004) เนื่องจากการพัฒนาของฟอลลิเคิลบนรังไข่ ในช่วงที่ฟอลลิเคิลยังไม่มีช่องว่างภายในเรียกว่า พรีแอนทรัลฟอลลิเคิล (preantral follicle) ซึ่งได้แก่ช่วงที่ยังเป็น primordial follicle primary follicle และ secondary follicle จะยังไม่ถูกควบคุมด้วย

ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินหรือฮอร์โมนมีผลน้อยมาก การเจริญหรือการฝ่อสลายไปของฟอลลิเคิล จะถูกควบคุมด้วยกลไกภายในรังไข่เอง โดยฟอลลิเคิลใบใหญ่กว่าจะคอยยับยั้งฟอลลิเคิลใบเล็กกว่าไม่ให้เจริญหรือให้ฝ่อสลายไป (ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์, 2007)

จากเหตุผลดังกล่าวจึงได้มีการพัฒนาเทคนิคในการเลี้ยงฟอลลิเคิลขนาดเล็กเพื่อให้ preantral follicle สามารถเจริญเป็น graafian follicle ได้มากขึ้นก่อนที่จะฝ่อ ซึ่งการเลี้ยงฟอลลิเคิลนั้นมีรายงานในสัตว์หลายชนิดเช่น หนูถีบจักร (Rose และคณะ, 1999; Demeester และคณะ, 2002) สุกร (Telfer และคณะ, 2000; Kagawa และคณะ, 2005) แพะ (Zhou และ Zhou, 2005; Rajarajan และคณะ, 2006) และ โค (Saha และคณะ, 2000; Senbon และคณะ, 2004; Alm และคณะ, 2006) เทคนิคการเลี้ยงฟอลลิเคิลมีทั้งการเลี้ยงในสภาวะที่ตรึงด้วยคอลลาเจนเจลและเลี้ยงแบบไม่ตรึงด้วยคอลลาเจนเจล (Yousaf และ Chohan, 2003; Santos และคณะ, 2006) การเลี้ยงในคอลลาเจนเจล ทำให้ฟอลลิเคิลอยู่ในลักษณะสามมิติและมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์แกรนูโลซาในฟอลลิเคิลและเกิดช่องว่างในฟอลลิเคิลมีโครงสร้างเหมือนกับไข่ที่โตจนถึงระยะ graafian follicle (Miyano, 2005) โดยอาหารเลี้ยงเซลล์สามารถผ่านคอลลาเจนเจลเข้าไปเลี้ยงไข่ได้ (Kreeger และคณะ, 2006)

ความสำเร็จในการเลี้ยงฟอลลิเคิลนั้นมีรายงานครั้งแรกในปี 1999 โดย Eppig และ O'Brien ซึ่งได้ทำการเลี้ยง primordial follicle ของหนูและนำไข่ที่ได้มาทำการปฏิสนธิในหลอดแก้วจนได้ลูกหนูตัวแรกซึ่งเกิดจากการเลี้ยงฟอลลิเคิลขนาดเล็ก นอกจากนี้ Yamamoto และคณะในปี 1999 ได้มีการนำไข่โคที่ได้จากการเลี้ยง early antral follicles มาใช้ในการทำปฏิสนธิในหลอดแก้วจนได้ลูกโคเกิดขึ้น โดยใช้ฟอลลิเคิลขนาด 0.5-0.7 มิลลิเมตร เลี้ยงในสภาวะที่ตรึงด้วยคอลลาเจนเจลในน้ำยา TCM 199 เป็นเวลา 14 วัน ได้ไข่ในระยะพร้อมปฏิสนธิ 90% หลังทำปฏิสนธิในหลอดแก้วพบว่ามีตัวอ่อนโตจนถึงระยะ บลาสโตซีส 3.7% เมื่อนำไปย้ายฝากให้ตัวรับ 3 ตัว มีลูกโคเกิดจำนวน 1 ตัว

รังไข่กระบือมีฟอลลิเคิลระยะ primordial follicle จำนวน 10,000-19,000 ใบ ส่วนในรังไข่โคมีประมาณ 15,000 ใบ (Santos และคณะ, 2006) แม้ในกระบือจะมีจำนวน primordial follicle มากแต่อัตราการผสมพันธุ์และการกระตุ้นให้เกิดการตกไข่ของกระบือค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับโค (Presicce, 2007) ปัจจุบันจึงมีการนำเทคนิคการเลี้ยงฟอลลิเคิลขนาดเล็กมาใช้ในกระบือเพื่อให้ได้ฟอลลิเคิลที่เจริญเป็นระยะ graafian follicle เพิ่มขึ้น ในปี 2003 Yousaf และ Chohan ศึกษาเปรียบเทียบฟอลลิเคิลของกระบือขนาด 1-8 มิลลิเมตร พบว่าสามารถเจริญได้ถึงระยะ germinal V และฟอลลิเคิลขนาด 2-8 มิลลิเมตร สามารถเติบโตจนถึง metaphase II (MII) ได้ Gupta และคณะ ในปี 2002 และ Santos และคณะ ในปี 2006 ศึกษาโกรทแฟ็กเตอร์ที่เหมาะสมกับการเลี้ยงฟอลลิเคิลขนาดเล็กของกระบือพบว่า ฟอลลิเคิล สติมูเลติ้งฮอร์โมน (FSH) และ อินซูลินทรานสเฟอร์ลิน (ITS) เหมาะสมในการเลี้ยงฟอลลิเคิลขนาดเล็กของกระบือโดยใช้ระยะเวลาในการเลี้ยง 7 วัน และ 15 วัน นอกจากนั้นยังพบว่าโกรทแฟ็กเตอร์ตัวอื่นๆอย่างเช่น insulin-like growth factor-I (IGF-I) , epidermal growth factor (EGF) และ basic fibroblast growth factor (bFGF) มีผลต่อการเจริญของฟอลลิเคิล (Zhou และ Zhang, 2005; Rajarajan และคณะ, 2006; Celestino และคณะ, 2011; Magalhães-Padilha และคณะ, 2012; Saha และคณะ, 2000; Gupta และคณะ, 2002; Sharma และคณะ, 2009; Gupta และ Nandi, 2010; Nilsson และคณะ, 2001) อย่างไรก็ตามชนิดของ โกรท

แฟ็กเตอร์และความเข้มข้นโกรทแฟ็กเตอร์ที่เหมาะสมกับการเจริญของฟอลลิเคิลของสัตว์แต่ละชนิดนั้นยังต้องการการศึกษาค้นคว้าอีกมาก โดยในการทดลองนี้จะทำการเลี้ยงฟอลลิเคิลของกระบือในสภาวะตรึงด้วยคอลลาเจนเพื่อเปรียบเทียบผลของโกรทแฟ็กเตอร์ที่มีต่ออัตราการรอดและการเจริญของฟอลลิเคิลในกระบือปลัก

1.3. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.3.1. ศึกษาการคัดแยกฟอลลิเคิลขนาดเล็กออกจากรังไข่กระบือปลัก

1.3.2. ศึกษาวิธีการเลี้ยงที่เหมาะสมกับฟอลลิเคิลขนาดเล็กของกระบือปลัก

1.3.3. ศึกษาสูตรน้ำที่เหมาะสมกับการเลี้ยงฟอลลิเคิลขนาดเล็กของกระบือปลัก

1.3.4. ศึกษาอัตราการเจริญของฟอลลิเคิลและการเจริญของนิวเคลียสไข่ที่ได้จากการเลี้ยงฟอลลิเคิลขนาดเล็ก

1.3.5. ศึกษาเปรียบเทียบอัตราการปฏิสนธิของไข่กระบือที่ได้จากการเลี้ยงฟอลลิเคิลโดยใช้เทคนิคการปฏิสนธิในหลอดแก้วและการฉีดตัวอสุจิเข้าในไข่

1.3.6. ศึกษาอัตราการเจริญของตัวอ่อนที่เกิดจากไข่ซึ่งได้จากการเลี้ยงฟอลลิเคิลขนาดต่างๆด้วยการปฏิสนธิในหลอดแก้วและการฉีดตัวอสุจิเข้าในไข่

1.3.7. ศึกษาอัตราการตั้งท้องหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนที่ได้จากการเลี้ยงฟอลลิเคิลขนาดเล็ก

1.4. ขอบเขตของโครงการวิจัย

นำรังไข่กระบือปลักที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์มาคัดแยกเอาฟอลลิเคิลขนาดเล็กด้วยการใช้ใบมีดเฉือนเอาเฉพาะชั้นคอร์เทคของรังไข่ จากนั้นใช้เอนไซม์เพื่อช่วยในการย่อยและทำการแยกฟอลลิเคิลขนาดเล็กโดยใช้ปากคีบปลายแหลม แล้วนำไปเข้าเลี้ยงโดยแยกเส้นผ่าศูนย์กลาง ขนาด 200-399 ไมโครเมตร, 400-599 ไมโครเมตร และ 600-799 ไมโครเมตร แล้วเลี้ยงในสภาวะที่ตรึงด้วยคอลลาเจนเจลโดยเปรียบเทียบการเจริญของฟอลลิเคิลในน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ที่แตกต่างกัน เลี้ยงนาน 14 วัน วัดเส้นผ่าศูนย์กลางเพื่อดูการเจริญของไข่ทุกๆ 7 วัน โดยใช้ กล้อง inverted microscope ซึ่งต่อกับกล้อง CCD เมื่อเลี้ยงครบ 14 วัน นำไข่ไปเลี้ยงในน้ำยาสำหรับเลี้ยงไข่ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิในหลอดแก้วนาน 21 ชั่วโมง แล้วนำไข่ที่ได้มา fix และย้อมสี ทำการตรวจสอบระยะการเจริญของนิวเคลียสไข่ (meiotic stage) ด้วยกล้อง inverted microscope

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ได้ทราบวิธีการที่เหมาะสมในการคัดแยกฟอลลิเคิลขนาดเล็กออกจากรังไข่กระบือปลัก
2. ได้ข้อมูลวิธีการเลี้ยงที่เหมาะสมกับการเลี้ยงฟอลลิเคิลขนาดเล็กของกระบือปลัก
3. ได้สูตรน้ำและโกรทแฟ็กเตอร์ที่เหมาะสมกับการเลี้ยงฟอลลิเคิลขนาดเล็กของกระบือปลัก
4. ทราบอัตราการเจริญของฟอลลิเคิลและการเจริญของนิวเคลียสไข่ที่ได้จากการเลี้ยงฟอลลิเคิลขนาดเล็ก

5. สามารถนำองค์ความรู้ที่ได้ไปแก้ปัญหาในการขาดแคลนไข่กระบือปลักเพื่อใช้ในการทำงานวิจัยได้
6. สามารถนำวิธีการนี้ไปประยุกต์ใช้กับการเลี้ยงฟอลลิเคิลในสัตว์อื่นๆ โดยเฉพาะในสัตว์ใกล้สูญพันธุ์เพื่อให้ได้ไข่ที่พร้อมทำการผสมเพิ่มขึ้น

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของโกรทแฟ็กเตอร์ต่อการเจริญของฟอลลิเคิลขนาดเล็ก

2.1. การแยกฟอลลิเคิลออกจากรังไข่

ทำการเก็บรังไข่กระบือปลักจากโรงฆ่าสัตว์ไว้ในน้ำเกลือ (0.9% NaCl) ล้างรังไข่ด้วย 70% เอททานอล นาน 1 นาที จากนั้นล้างรังไข่ 3 ครั้ง ใช้ใบมีดเฉือนเอาเฉพาะชั้นคอร์เทคออกเป็นชิ้นเล็กๆ ให้มีขนาดหนาประมาณ 1-2 มิลลิเมตร นำชิ้นของรังไข่ที่ได้ล้าง 3 ครั้ง ในน้ำเกลือ จากนั้นใส่ในจานเลี้ยงเซลล์ที่มี 0.1% collagenase และ 40 units/ml DNase จากนั้นนำไปไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดเอนไซม์ทิ้ง แล้วเติม HEPES-buffered TCM 199 ลงไปเพื่อล้างเอนไซม์ ล้างด้วย HEPES-buffered TCM 199 จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเติม HEPES-buffered TCM 199 ลงในจานเลี้ยงเซลล์และนำเนื้อเยื่อรังไข่ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ไปคัดแยกเอาเฉพาะฟอลลิเคิลโดยใช้ปากคีบปลายแหลมช่วยในการแยก หลังจากแยกเสร็จแล้ววัดขนาดของฟอลลิเคิลโดยทำภายใต้กล้อง inverted microscope ซึ่งต่อกับกล้อง CCD แบ่งฟอลลิเคิลออกเป็น 3 กลุ่ม ตามขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง โดยกลุ่ม 1 ขนาด 200-399 ไมโครเมตร กลุ่ม 2 ขนาด 400-599 ไมโครเมตร และ กลุ่ม 3 ขนาด 600-799 ไมโครเมตร

2.2. การเลี้ยงฟอลลิเคิลขนาดเล็กในสภาวะที่ตรึงด้วยคอลลาเจนเจล

เตรียมสารละลายคอลลาเจนเจลโดยใช้ collagen gel type I นำสารละลาย 3.0% acid collagen ผสมกับ 10 เท่าของน้ำยา TCM 199 และ 0.05 N sodium hydroxide solution ซึ่งมี 22 mg/ml $NaHCO_3$ และ 47.7 mg/ml HEPES ในอัตราส่วน 8:1:1 (v:v:v) ระหว่างการเตรียมสารละลายคอลลาเจนต้องทำในน้ำแข็ง เนื่องจากสารละลายคอลลาเจนสามารถแข็งตัวได้ที่อุณหภูมิห้อง แบ่งสารละลายคอลลาเจนออกเป็นสองส่วนสำหรับทำชั้น base layer และ top layer จากนั้นนำสารละลายที่แบ่งไว้สำหรับทำชั้น base layer เติมลงใน 4 well dish (Nunc) โดยใส่ well ละ 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 5 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัว จากนั้นนำฟอลลิเคิลที่แบ่งกลุ่มไว้วางบนชั้น base layer โดยวางฟอลลิเคิล 4 ใบต่อ well จากนั้นทำชั้น top layer โดยนำสารละลายคอลลาเจนที่ใช้ทำชั้น top layer แช่ในน้ำอุณหภูมิ 25°C นาน 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายคอลลาเจนทับลงไปบนชั้น base layer ซึ่งมีฟอลลิเคิลวางอยู่ โดยใส่ well ละ 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 10 นาที จากนั้นเติมน้ำยาเลี้ยงฟอลลิเคิลซึ่งประกอบด้วย TCM 199 เติมด้วย 10 µg/ml FSH, 2 mM glutamate, 0.23 mM sodium pyruvate, 2 mM hypoxanthine, 1% ITS, 0.1 mg/ml streptomycin และ 100 IU/ml penicillin ลงไป 500 ไมโครลิตร ทำการเปลี่ยนน้ำยาทุกๆ 2 วัน โดยดูดน้ำยาเก่าออก 250 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำยาใหม่ลง 250 ไมโครลิตร โดยเลี้ยงฟอลลิเคิลนาน 14 วัน จะวัดอัตราการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลที่วันที่ 7 และ 14 ภายใต้กล้อง inverted microscope ซึ่งต่อกับกล้อง

CCD น้ำยาเลี้ยงฟอลลิเคิลจะมีการเติมโกรทแฟ็กเตอร์ตามแต่ละทรีทเม้นท์ซึ่งแสดงในตารางที่ 1 โดยแต่ละการทดลองใช้ฟอลลิเคิลครั้งละ 12 ใบ ทำซ้ำทั้งหมด 10 ครั้งในแต่ละการทดลอง

ตารางที่ 1 แสดงโกรทแฟ็กเตอร์ที่ใช้ในการทดลอง

Treatments	bFGF (50 ng/ml)	IGF-I (100 ng/ml)	EGF (50 ng/ml)
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	-	-	+
5	+	+	-
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

2.3. การเลี้ยงไข่ที่ได้จากการเลี้ยงฟอลลิเคิล

ฟอลลิเคิลที่เจริญเติบโตจากการเลี้ยงฟอลลิเคิลจะถูกนำมาแยกไข่ที่อยู่ภายในฟอลลิเคิลออกโดยใช้ปากคีบปลายแหลม โดยจะทำการแยกฟอลลิเคิลในน้ำยา Dulbecco's phosphate buffer saline (mDPBS) ซึ่งประกอบด้วย 0.1% polyvinylpyrrolidone (PVP) และนำไข่ที่ได้มาล้างใน mDPBS+0.1% PVP จำนวน 5 ครั้ง แล้วนำไข่ที่ได้ไปเลี้ยงในน้ำยาในจานเลี้ยงเซลล์ซึ่งปิดคลุมน้ำยาด้วย mineral oil เลี้ยงในสัดส่วน 10 ใบ/50 µl น้ำยาสำหรับเลี้ยงไข่ประกอบด้วย TCM199 ที่เติมด้วย 10% FCS, 50 IU/ml HCG, 0.02 AU/ml FSH และ 1 µg/ml E_2 นำไปเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 24 ชั่วโมง

2.4. การตรวจสอบอัตราการรอดของไข่

หลังจากเลี้ยงไข่ครบ 21 ชั่วโมง ไข่ที่ได้จะถูกนำมาย่อยเซลล์คิวมูลัสออกโดยการใช้ปิเปตดูดไข่ขึ้นลงในน้ำยาซึ่งประกอบด้วย 0.2% hyaluronรdase แล้วนำไข่ที่ได้ไปล้าง 3 ครั้ง ในน้ำยา mDPBS+PVP ไข่ที่ผ่านการย่อยเซลล์คิวมูลัสออกแล้วจะถูกนำมาย้อมด้วยน้ำยา Fluorescein diacetate (FDA) โดยนำไข่แช่ในน้ำยา PBS ที่มี 2.5 µg/ml FDA + 5 mg/ml Bovine serum albumin (BSA) ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายในห้องมืด นาน 2 นาที จากนั้นไข่ไปล้างในน้ำยา mDPBS+PVP จำนวน 3 ครั้ง แล้วจึงนำไปตรวจสอบอัตราการรอดภายใต้แสง UV ภายใต้กล้อง Epifluorescene microscope ไข่ที่เรืองแสงสีเขียวภายใต้แสง UV จะประเมินว่ามีชีวิตรอดหลังการเลี้ยง

2.5. การตรวจสอบระยะการเจริญของนิวเคลียสไข่

การย้อมสีนิวเคลียสของไข่: หลังจากตรวจสอบอัตราการรอดของไข่แล้ว ไข่ที่รอดจะถูกนำมาย้อมนิวเคลียสเพื่อดูระยะการเจริญของไข่ โดยจะนำไข่มาล้างในน้ำยา mDPBS+PVP จำนวน 3 ครั้ง นำไข่ไปย้อมในน้ำยา Hoechst 33342 นาน 15 นาที แล้วล้างด้วย mDPBS+PVP จำนวน 3 ครั้ง นำไข่ไปตรวจสอบระยะการเจริญภายใต้แสง UV ภายใต้กล้อง Epifluorescene microscope นิวเคลียสของไข่จะติดสีน้ำเงินทำให้สามารถทราบระยะการเจริญของไข่ได้

การ Fix และย้อมสีไข่: เพื่อให้การตรวจสอบระยะการเจริญของไข่นั้นถูกต้องและมีความผิดพลาดน้อยที่สุดไข่ที่ทำการย้อมสีนิวเคลียสของไข่แล้วจะถูกนำมา Fix และย้อมสีอีกครั้งเพื่อดูระยะการเจริญของนิวเคลียสไข่ โดยการนำไข่ไป Fix บนสไลด์และเก็บไว้ในสารละลาย acetic alcohol ซึ่งประกอบด้วย gracial acetic acid และ 95% ethanol alcohol ในอัตราส่วน 1:3 นาน 1 วัน หลังจากนั้นไข่จะถูกนำย้อมด้วยสี aceto-orcein นาน 10 นาที แล้วจึงนำไปล้างในสารละลายซึ่งประกอบด้วย glycerol, 95% ethanol และน้ำ ในอัตราส่วน 1:1:1 ระยะการเจริญของไข่จะถูกตรวจสอบภายใต้กล้อง inverted microscope ซึ่งต่อกับกล้อง CCD

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของขนาดของฟอลลิเคิล และโกรทแฟ็กเตอร์ต่อการเจริญของฟอลลิเคิลขนาดเล็กและอัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ (Intracytoplasmic sperm injection, ICSI)

2.6. การแยกฟอลลิเคิลออกจากรังไข่

ใช้วิธีการเดียวกับข้อ 2.1. โดยจะแบ่งฟอลลิเคิลออกเป็น 5 กลุ่ม ตามขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง โดยกลุ่ม 1 ขนาด 800-899 ไมโครเมตร กลุ่ม 2 ขนาด 1,000-1,199 ไมโครเมตร กลุ่ม 3 ขนาด 1,200-1,399 ไมโครเมตร กลุ่ม 4 ขนาด 1,400-1,599 ไมโครเมตร และ กลุ่ม 5 ขนาด 1,600-1,800 ไมโครเมตร

2.7. การเลี้ยงฟอลลิเคิล

นำฟอลลิเคิลแต่ละกลุ่ม มาเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงฟอลลิเคิล น้ำยาประกอบด้วย TCM 199 ที่เติมด้วย 2 mM L-glutamine, 0.23 mM sodium pyruvate, 2 mM Hypoxantine, 1% ITS (6.25 µg/ml Insulin, 6.25 µg/ml Transferrin, 6.25 µg/ml Selenium) 100 IU/ml penicillin G, 0.1 mg/ml streptomycin, 1 µg/ml FSH (Folltropin-v® Bellevi, Ontario, Canada) และ 10% FBS เลี้ยงฟอลลิเคิล 5-10 ใบ/100 µl ที่ปิดด้วย mineral oil นำไปเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 7 14 และ 30 วัน เปลี่ยนน้ำยาใหม่ครึ่งหนึ่งทุกๆ 2 วัน จะวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของฟอลลิเคิลภายใต้กล้อง inverted microscope ซึ่งต่อกับกล้อง CCD ในวันที่ 7 14 และ 30 วันของการเลี้ยง

หลังจากนั้นคัดเลือกผลการเลี้ยงฟอลลิเคิลที่ 7 14 หรือ 30 วัน ที่ดีที่สุดมาทำการทดลองต่อ โดยนำฟอลลิเคิลที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางแตกต่างกันทั้ง 5 กลุ่ม มาเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงฟอลลิเคิลที่เติมด้วย 50 ng/ml bFGF โดยกลุ่มควบคุมจะไม่เติม bFGF

2.8. การตรวจสอบอัตราการรอดของไข่ภายหลังการเลี้ยงฟอลลิเคิล

เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงและวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของฟอลลิเคิลในข้อ 2.7. แล้วจะแยกไข่ออกจากฟอลลิเคิล แล้วนำไปย้อมด้วย FDA เพื่อตรวจสอบการรอดของไข่ ตามวิธีในข้อ 2.4.

2.9. การเลี้ยงไข่ให้พร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลอง

นำไข่ที่รอดจากข้อ 2.8 มาล้างใน mDPBS+0.1% PVP จำนวน 5 ครั้ง แล้วนำไข่ที่ได้ไปเลี้ยงในน้ำยาในจานเลี้ยงเซลล์ซึ่งปิดคลุมน้ำยาด้วย mineral oil เลี้ยงในสัดส่วน 20 ใบ/100 µl น้ำยาสำหรับเลี้ยงไข่ประกอบด้วย TCM199 ที่เติมด้วย 10% FCS, 50 µM cysteamine, 50 IU/ml HCG, 0.02 AU/ml FSH และ 1 µg/ml E_2 นำไปเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 24 ชั่วโมง

2.10. การตรวจสอบระยะการเจริญของนิวเคลียสไข่

หลังจากเลี้ยงไข่ครบ 24 ชั่วโมง จะนำไข่มาย่อยเซลล์คิวมูลัสออกให้หมด แล้วนำไข่ไป Fix บนสไลด์และเก็บไว้ในสารละลาย acetic alcohol ซึ่งประกอบด้วย gracial acetic acid และ 95% ethanol alcohol ในอัตราส่วน 1:3 นาน 1 วัน หลังจากนั้นนำไข่ไปย้อมด้วยสี aceto-orcein นาน 10 นาที แล้วจึงนำไปล้างในสารละลายซึ่งประกอบด้วย glycerol, 95% ethanol และน้ำ ในอัตราส่วน 1:1:1 ระยะการเจริญของนิวเคลียสไข่จะถูกตรวจสอบภายใต้กล้อง inverted microscope ซึ่งต่อกับกล้อง CCD เพื่อดูระยะการเจิญของนิวเคลียสซึ่งประกอบไปด้วยระยะต่างๆคือ germinal vesicle (GV) germinal vesicle break down (GVBD) metaphase I (MI) anaphase I (AI) telophase I (T1) และ metaphase II (MII) ซึ่งเป็นระยะพร้อมปฏิสนธิ

2.11. การทำ ICSI

นำไข่ระยะ MII จำนวนครั้งละ 5 ใบ ลงในหยดน้ำยาสำหรับฉีดอสุจิ (Injection drop; Emcare holding medium) หลังจากแยกอสุจิที่มีชีวิตออกจากที่ไม่มีชีวิตแล้วจะใส่อสุจิลงไป 2 µl ในหยดน้ำยา 10% polyvinylpyrrolidone (PVP) + 0.3% BSA ปริมาณ 5 µl 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

2.12. การกระตุ้นไข่หลังการฉีดอสุจิเข้าไปในไข่

ไข่ที่ทำ ICSI แล้วจะถูกกระตุ้นด้วย 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 จากนั้นนำตัวอ่อนไปเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดทดลอง

2.13. การเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดทดลอง

ใช้วิธีการเดียวกับที่รายงานไว้แล้ว (รังสรรค์ และคณะ, 2530) นำไข่ที่ผ่านการกระตุ้นแล้วมาเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa + 0.6% BSA ในสัดส่วน 5 ใบ/50 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 กับเซลล์บุท่อ

นำไข่โค ในน้ำยา SOFaa + 0.6% BSA ในสัดส่วน 5 ใบ/50 µl แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 5 วัน เปลี่ยนน้ำยาทุกๆ วัน พร้อมทั้งบันทึกการเจริญของตัวอ่อน

2.14. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การทดลองที่ 1 วิเคราะห์ผลการทดลอง อัตราการรอดของฟอลลิเคิลในแต่ละทรีทเม้นท์จะถูกคิดค่าสถิติด้วยวิธี Chi-square ส่วนอัตราการเจริญของฟอลลิเคิลและระยะการเจริญของไข่จะคิดค่าสถิติโดย ANOVA วางแผนการทดลองแบบ CRD ใช้โปรแกรม SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) ในการวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยใช้จำนวนการทดลองจำนวน 10 ซ้ำ ในแต่ละกลุ่มการทดลอง

การทดลองที่ 2 อัตราการเจริญของฟอลลิเคิล ระยะการเจริญของไข่และตัวอ่อน จะคิดค่าสถิติโดย ANOVA วางแผนการทดลองแบบ CRD ใช้โปรแกรม SAS โดยใช้จำนวนการทดลองจำนวน 5 ซ้ำ ในแต่ละกลุ่มการทดลอง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและข้อวิจารณ์

ผลการทดลองที่ 1

ผลของโกรทแฟ็กเตอร์ต่ออัตราการรอดของฟอลลิเคิล

ผลของอัตราการรอดของฟอลลิเคิลกระบือปลักทั้ง 3 กลุ่ม แสดงในตารางที่ 2 และภาพแสดงการรอดและการเจริญของฟอลลิเคิลในกลุ่ม 1, 2 และ 3 แสดงในภาพที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

ฟอลลิเคิลของกระบือในกลุ่มที่ 1 (Ø 200-399 ไมโครเมตร) ที่เลี้ยงในน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ bFGF , bFGF+IGF-I และน้ำยาควบคุม (ไม่มีการเติมโกรทแฟ็กเตอร์) มีอัตราการรอดของฟอลลิเคิลซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีอัตราการรอดของฟอลลิเคิลอยู่ที่ 8.7%, 7.5% และ 6.8% ตามลำดับ ดั้งนั้นจึงสรุปได้ว่าน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ bFGF และ bFGF+IGF-I ไม่มีผลในการเพิ่มอัตราการรอดของฟอลลิเคิลในกลุ่ม 1 ส่วนฟอลลิเคิลที่เลี้ยงในน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ IGF-I พบว่ามีอัตราการรอดของฟอลลิเคิลเพียงเล็กน้อยคือ 1.7% ซึ่งต่ำกว่าน้ำยาควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าฟอลลิเคิลซึ่งเลี้ยงในน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ EGF, bFGF+EGF, IGF-I+EGF และ bFGF+IGF-I+EGF นั้นไม่สามารถรอดและเจริญเติบโตได้แสดงว่าน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ EGF, bFGF+EGF, IGF-I+EGF และ bFGF+IGF-I+EGF นั้นมีผลยับยั้งการรอดของฟอลลิเคิลในการเลี้ยงฟอลลิเคิลของกระบือปลัก

อัตราการรอดของฟอลลิเคิลกระบือในกลุ่ม 2 (Ø 400-599 ไมโครเมตร) พบว่าฟอลลิเคิลที่เลี้ยงในน้ำยาที่มี bFGF มีอัตราการรอดสูงที่สุดคือ 44.8% โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำยาควบคุมแสดงว่าน้ำยาที่มี bFGF มีความเหมาะสมต่อการเลี้ยงฟอลลิเคิลของกระบือปลักในกลุ่ม 2 นอกจากนี้ฟอลลิเคิลที่เลี้ยงในน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ bFGF+IGF-I, น้ำยาควบคุม และ IGF-I ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติโดยมีอัตราการรอดของฟอลลิเคิลอยู่ที่ 37.3%, 26.1% และ 21.6% ตามลำดับ แสดงว่าน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ bFGF+IGF-I และ IGF-I ไม่มีผลต่ออัตราการรอดของฟอลลิเคิลในกลุ่ม 2 ส่วนฟอลลิเคิลซึ่งเลี้ยงในน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ EGF, bFGF+EGF, IGF-I+EGF และ bFGF+IGF-I+EGF นั้นแสดงว่ามีผลยับยั้งอัตราการรอดของฟอลลิเคิลเช่นเดียวกับในกลุ่ม 1

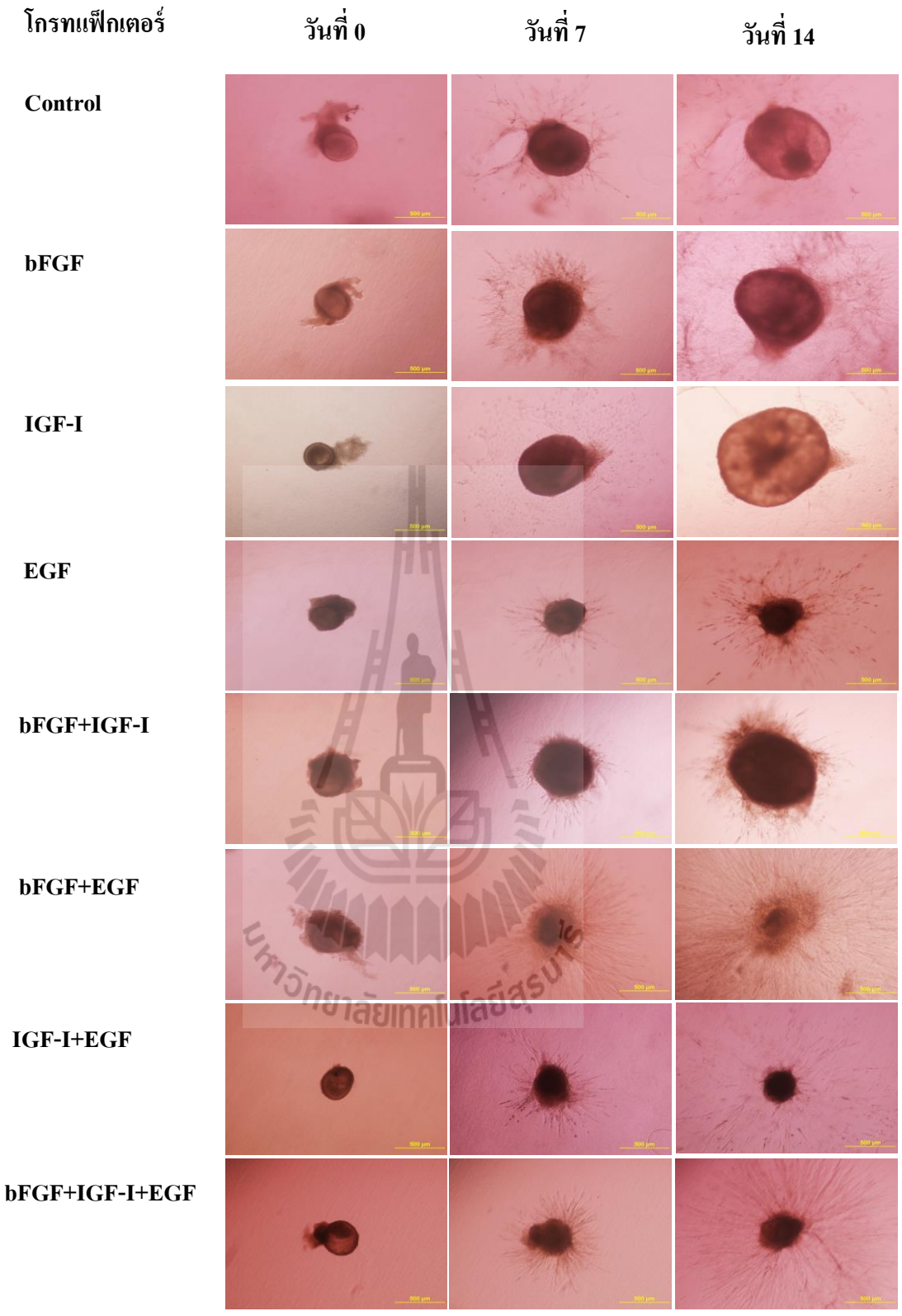
ฟอลลิเคิลในกลุ่ม 3 (Ø 600-799 ไมโครเมตร) มีอัตราการอดของฟอลลิเคิลหลังเลี้ยงเป็นไปในแนวทางเดียวกันกับฟอลลิเคิลในกลุ่ม 2 โดยฟอลลิเคิลที่เลี้ยง bFGF มีอัตราการรอดสูงที่สุดคือ 32.7% โดยมีความแตกต่างกับน้ำยาในทรีทเม้นท์อื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนฟอลลิเคิลที่เลี้ยงในน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ IGF-I, น้ำยาควบคุม และ bFGF+IGF-I ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติโดยมีอัตราการรอดของฟอลลิเคิลอยู่ที่ 19.0%, 12.8% และ 11.8% ตามลำดับ และฟอลลิเคิลซึ่งเลี้ยงในน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ EGF, bFGF+EGF, IGF-I+EGF และ bFGF+IGF-I+EGF นั้นก็แสดงผลเช่นเดียวกับในกลุ่ม 1 และ 2 คือไม่มีฟอลเคิลที่เลี้ยงในน้ำยาดังกล่าวรอดแสดงว่าน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ EGF, bFGF+EGF, IGF-I+EGF และ bFGF+IGF-I+EGF ไม่เหมาะสมต่อการเลี้ยงฟอลลิเคิลกระบือปลักและมีผลในการยับยั้งการรอดของฟอลลิเคิล

ตารางที่ 2 แสดงอัตราการรอดของฟอลลิเคิลหลังจากเลี้ยงนาน 14 วัน

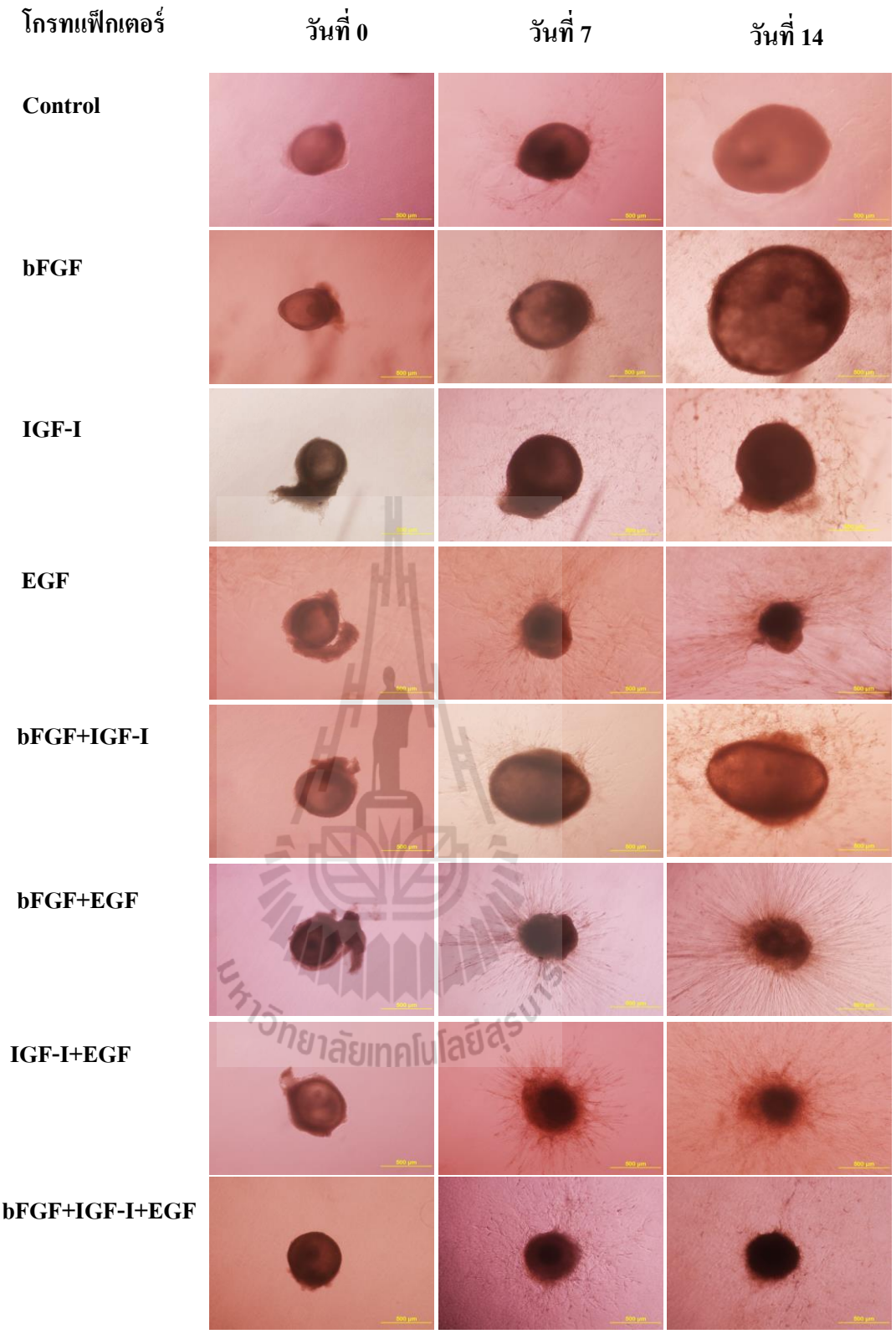
Treatments	Survival rate of buffalo follicle (%)		
	Group I (Ø 200-399 µm)	**Group II (Ø 400-599 µm)**	**Group III (Ø 600-799 µm)**
Control	8/117[a] (6.8)	30/115[b] (26.1)	14/109[b] (12.8)
bFGF	9/103[a] (8.7)	52/116[a] (44.8)	35/107[a] (32.7)
IGF-I	2/115[b] (1.7)	25/116[b] (21.6)	20/105[b] (19.0)
EGF	0/107[b] (0.0)	0/119[c] (0.0)	0/96[c] (0.0)
bFGF+IGF-I	9/120[a] (7.5)	44/118[ab] (37.3)	13/110[b] (11.8)
bFGF+EGF	0/115[b] (0.0)	0/116[c] (0.0)	0/108[c] (0.0)
IGF-I+EGF	0/110[b] (0.0)	0/110[c] (0.0)	0/116[c] (0.0)
bFGF+IGF-I+EGF	0/108[b] (0.0)	0/119[c] (0.0)	0/93[c] (0.0)

[a,b,c] Mean within columns with different superscripts differ (P<0.05, Chi-square).

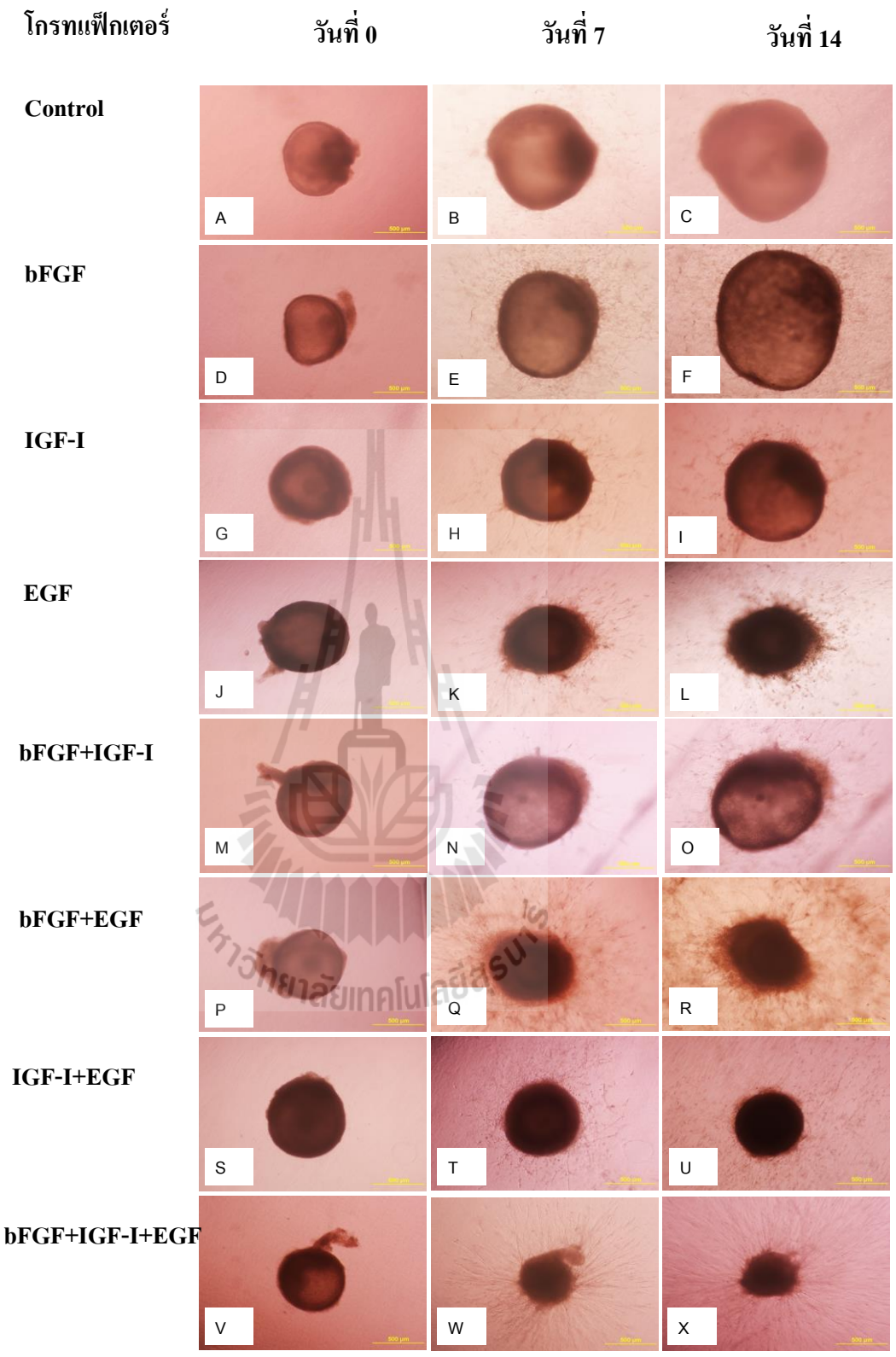
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 1 แสดงการรอดและการเจริญของฟอลลิเคิลในกลุ่ม 1 (Ø 200-399 µm)



ภาพที่ 2 แสดงการรอดและการเจริญของฟอลลิเคิลในกลุ่ม 2 (Ø 400-599 µm)



ภาพที่ 3 แสดงการรอดและการเจริญของฟอลลิเคิลในกลุ่ม 3 (Ø 600-799 µm)

ผลของโกรทแฟ็กเตอร์ต่ออัตราการเจริญของฟอลลิเคิล

อัตราการเจริญของฟอลลิเคิลในการทดลองนี้ทำการคำนวนเฉพาะฟอลลิเคิลที่สามารถมีชีวิตรอดได้หลังจากเลี้ยงนาน 14 วัน เท่านั้น โดยในกลุ่ม 1 ฟอลลิเคิลที่เลี้ยงในน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ bFGF , bFGF+IGF-I และน้ำยาควบคุมมีอัตราการของฟอลลิเคิลดีกว่าฟอลลิเคิลที่เลี้ยงในน้ำยาอื่นๆ ส่วนอัตราการเจริญของฟอลลิเคิลในกลุ่ม 1 แสดงไว้ในตารางที่ 3 โดยผลจากการวัดอัตราการเจริญของฟอลลิเคิลในวันที่ 7 ของการเลี้ยงพบว่าฟอลลิเคิลที่เลี้ยงในน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ bFGF+IGF-I มีอัตราการเจริญของฟอลลิเคิลสูงกว่าฟอลลิเคิลที่เลี้ยงใน bFGF และน้ำยาควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามผลการวัดอัตราการเจริญของฟอลลิเคิลในวันที่ 14 กลับพบว่าฟอลลิเคิลที่เลี้ยงใน bFGF มีอัตราการเจริญของฟอลลิเคิลสูงกว่าฟอลลิเคิลที่เลี้ยงใน bFGF+IGF-I และน้ำยาควบคุมอย่างมีนัยสำคัญางสถิติ แสดงว่าฟอลลิเคิลในกลุ่ม 1 ในช่วงวันที่ 0-7 อาจจะเหมาะสมที่จะเลี้ยงในน้ำยาที่มี bFGF+IGF-I ส่วนในช่วงวันที่ 7-14 ควรจะเลี้ยงในน้ำยาที่มี bFGF อย่างเดียว

ตารางที่ 3 แสดงอัตราการเจริญของฟอลลิเคิลในกลุ่ม 1

Growth factors	**Follicle diameter (µm) (mean ± S.E.M.)**			**Increasing follicle diameter (µm) (mean ± S.E.M.)**	
	Day 0	**Day 7**	**Day 14**	**Day 0-7**	**Day 7-14**
Control	335.8±4.9	402.2±10.1[b]	559.7±17.9	66.4±7.6[b]	157.5±9.3[a]
bFGF	355.6±3.2	465.6±8.18[b]	769.9±22.6	110.1±7.1[b]	304.3±17.5[b]
bFGF+IGF-I	371.3±1.5	583.6±8.7[a]	684.2±14.7	212.2±8.3[a]	100.6±7.2[a]

[a,b] Mean with different superscripts in the same column differ significantly (P<0.05, CRD).

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

อัตราการเจริญของฟอลลิเคิลในกลุ่ม 2 ในช่วง 7 แรกพบว่าฟอลลิเคิลที่เลี้ยงในน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ bFGF, IGF-I, bFGF+IGF-I และน้ำยาควบคุมไม่มีความแตกต่างทางสถิติส่วนอัตราการเจริญของฟอลลิเคิลในช่วง 7-14 วัน พบว่าฟอลลิเคิลที่เลี้ยงในน้ำยา bFGF มีอัตราการเจริญของฟอลลิเคิลสูงกว่าฟอลลิเคิลที่เลี้ยงในน้ำยาที่มี bFGF+IGF-I และน้ำยาควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงอัตราการเจริญของฟอลลิเคิลในกลุ่ม 2

Growth factors	Follicle diameter (µm) (mean ± S.E.M.)			Increasing follicle diameter (µm) (mean ± S.E.M.)	
	Day 0	Day 7	Day 14	Day 0-7	Day 7-14
Control	532.3±8.1	698.1±13.9	926.0±16.3[b]	165.8±9.5	228.0±10.6[b]
bFGF	500.5±5.9	697.0±12.7	1084.6±19.4[a]	196.5±9.9	387.6±15.9[a]
IGF-I	502.6±6.4	712.8±9.9	973.0±21.0[ab]	210.3±9.0	260.1±15.0[ab]
bFGF+IGF-I	512.6±4.6	732.9±9.9	925.0±19.1[ab]	220.3±8.0	192.1±14.3[b]

[a,b] Mean with different superscripts in the same column differ significantly (P<0.05, CRD).

อัตราการเจริญของฟอลลิเคิลในกลุ่ม 3 จากวันที่ 0-7 และจากวันที่ 7-14 พบว่ามีแนวโน้มเป็นไปในทางเดียวกันโดยฟอลลิเคิลที่เลี้ยงในน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ bFGF, IGF-I และน้ำยาควบคุมไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ ส่วนฟอลลิเคิลที่เลี้ยงในน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ bFGF+IGF-I มีอัตราการเจริญของฟอลลิเคิลต่ำกว่าในน้ำยาตัวอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 5

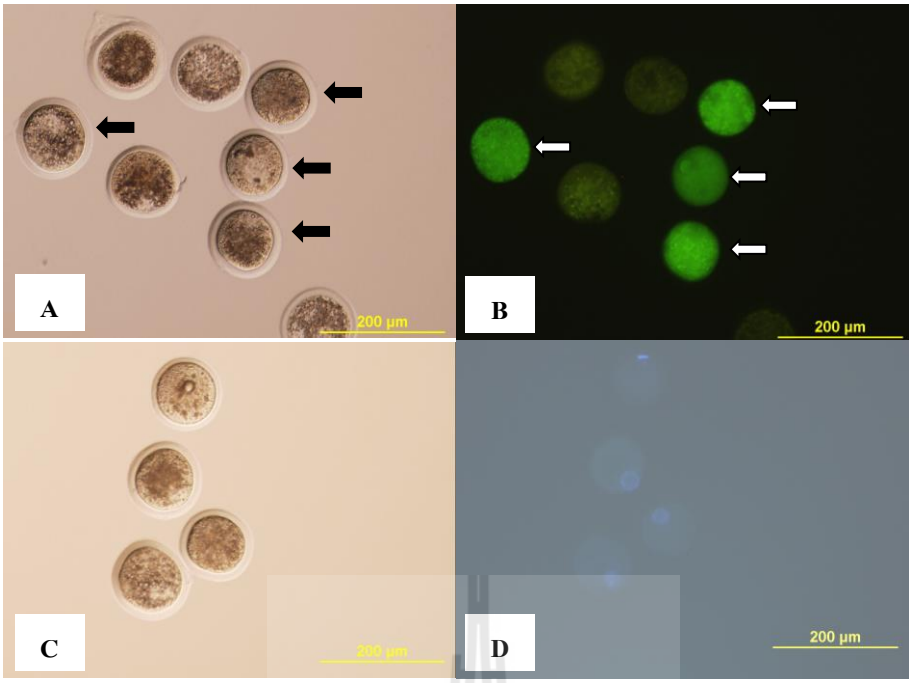
ตารางที่ 5 แสดงอัตราการเจริญของฟอลลิเคิลในกลุ่ม 3

Growth factors	Follicle diameter (µm) (mean ± S.E.M.)			Increase in follicle diameter (µm) (mean ± S.E.M.)	
	Day 0	Day 7	Day 14	Day 0-7	Day 7-14
Control	686.1±4.8	897.8±10.7	1050.3±19.0[a]	211.7±9.6[ab]	152.5±12.9[ab]
bFGF	684.7±4.7	943.9±14.2	1174.3±19.8[a]	259.1±14.1[a]	230.4±13.8[a]
IGF-I	714.3±5.8	899.0±12.0	1000.3±19.6[ab]	184.8±9.7[ab]	101.3±14.7[ab]
bFGF+IGF-I	697.5±5.4	805.0±8.8	865.0±11.2[b]	107.5±5.6[b]	60.0±4.2[b]

[a,b] Mean with different superscripts in the same column differ significantly (P<0.05, CRD).

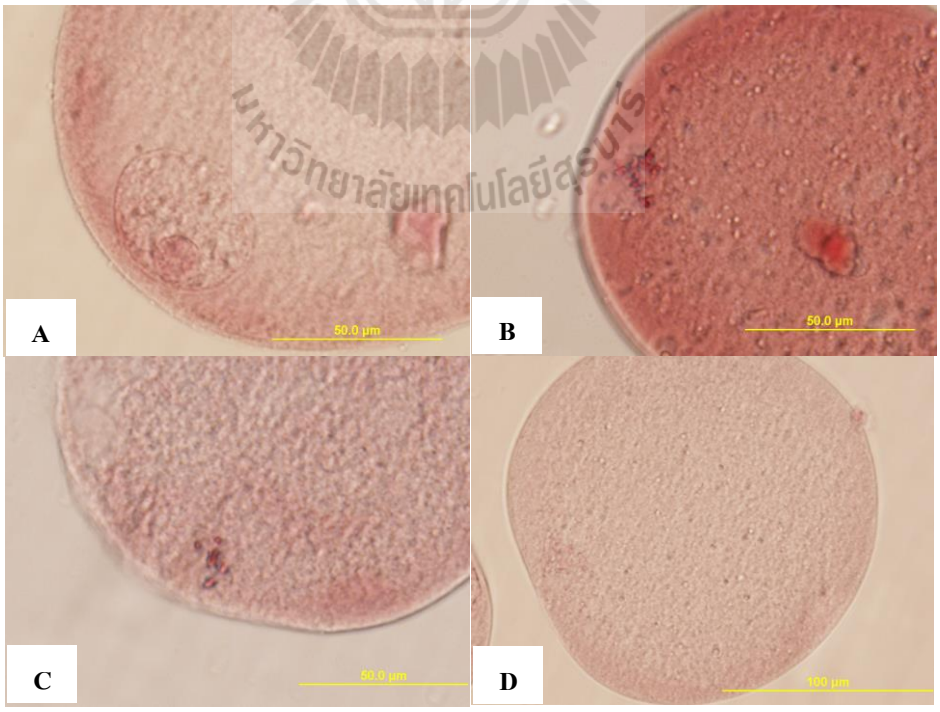
ผลของโกรทแฟ็กเตอร์ต่ออัตราการรอดของไข่และระยะการเจริญของนิวเคลียสไข่

การวัดอัตราการรอดของไข่ในการทดลองครั้งนี้ทำได้โดยการนำไข่ที่แยกจากฟอลลิเคิลมาทำการเลี้ยงในน้ำยาสำหรับเลี้ยงไข่นาน 24 ชั่วโมง และนำไข่ที่ได้มาทำการย่อยเพื่อเอาเซลล์คิวมูลัสออก จากนั้นจึงนำย้อมด้วยสี FDA โดยไข่ที่รอดชีวิตจะเรืองแสงสีเขียวภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนส่วนไข่ที่ตายจะไม่เรืองแสงสีเขียวหรือมีการเรืองแสงจางๆ ระยะการเจริญของไข่สามารถตรวจสอบได้จากการย้อมสีนิวเคลียสของไข่ด้วยสี Hoechst 33342 โดยนิวเคียสของไข่จะเรืองแสงสีน้ำเงินทำให้สามารถทราบระยะการเจริญของไข่ได้ดังที่แสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 แสดงไข่จากฟอลลิเคิลในกลุ่ม 2 ภายใต้แสงปกติ (A) และไข่หลังจากย้อมด้วยสี FDA (B) และไข่ที่รอดชีวิตในแสงปกติ (C) และนิวเคลียสของไข่หลังจากย้อม Hoechst 33342 (D)

เมื่อนำไข่ที่ผ่านการ Fix และย้อมด้วยสี aceto-orcein เพื่อตรวจสอบระยะการเจริญของนิวเคลียสไข่ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 แสดงระยะการเจริญของนิวเคลียสไข่ ระยะ GV (A), MI (B), degenerate chomosome (C) และไข่ที่ไม่พบจำนวนโครโมโซม (D)

ไข่ที่แยกจากฟอลลิเคิลในกลุ่ม 1 พบว่ามีอัตราการรอดสูงโดยไข่ที่แยกจากฟอลลิเคิลซึ่งเลี้ยงในน้ำยาควบคุมและน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ bFGF มีอัตราการรอดอยู่ที่ 100% และ 89% ตามลำดับ ส่วนฟอลลิเคิลซึ่งเลี้ยงในน้ำยาที่มี bFGF+IGF-I มีอัตรารอดของไข่ต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับน้ำยาตัวอื่นคือ 56% ไข่ที่แยกจากฟอลลิกลุ่ม 1 พบว่ามีระยะการเจริญของไข่อยู่ที่ระยะ GV โดยอัตราการรอดของไข่และระยะการเจริญของไข่จากฟอลลิเคิลในกลุ่ม 1 แสดงไว้ในตารางที่ 6

ผลของอัตราการรอดของไข่ที่แยกจากฟอลลิเคิลในกลุ่ม 2 ซึ่งแสดงในตารางที่ 7 พบว่าอัตราการรอดของไข่ในน้ำยาที่เติมโกรทแฟ็กเตอร์และน้ำยาควบคุมไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติและระยะการเจริญของนิวเคลียสไข่ในกลุ่มนี้ส่วนมากอยู่ที่ระยะ GV มีเพียงไข่ที่เลี้ยงในน้ำยาที่มี bFGF เท่านั้นที่สามารถเจริญจนถึงระยะ MI แต่ไม่มีการเจริญถึงระยะ MII

ตารางที่ 6 แสดงอัตราการรอดของไข่และการเจริญของนิวเคลียสไข่จากฟอลลิเคิลในกลุ่ม 1

Growth factors	**Oocytes viability (%)**	**Meiotic stages**			
		GV (%)	**MI (%)**	**Degenerate (%)**	**Chromosome not found (%)**
Control	9/9[a] (100)	7/9 (78)	0	0	2/9 (22)
bFGF	8/9[a] (89)	6/8 (67)	0	0	2/8 (25)
bFGF+IGF-I	5/9[b] (56)	4/5 (80)	0	0	1/5 (20)

[a,b] Mean within columns with different superscripts differ ($P<0.05$, Chi-square)

ฟอลลิเคิลในกลุ่ม 3 มีอัตราการรอดของไข่ในฟอลลิเคิลที่เลี้ยงด้วยน้ำยาควบคุมและในกลุ่มที่เลี้ยงในน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ IGF-I สูงกว่าในฟอลลิเคิลที่เลี้ยงด้วย bFGF และ bFGF+IGF-I อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนผลของระยะการเจริญของนิวเคลียสไข่ไข่แสดงให้เห็นว่าฟอลลิเคิลในกลุ่มที่ 3 ที่เลี้ยงในน้ำยาควบคุมและน้ำยาที่มี bFGF และ IGF-I สามารถเจริญได้ถึงระยะ GV และ MI

ตารางที่ 7 แสดงอัตราการรอดของไข่และการเจริญของนิวเคลียสไข่จากฟอลลิเคิลในกลุ่ม 2

Growth factors	Oocytes viability (%)	Meiotic stages			
		GV (%)	MI (%)	Degenerate (%)	Chromosome not found (%)
Control	16/30 [ab] (53.3)	15/16 (93.8)	0	0	1/16 (6.3)
bFGF	32/52 [a] (61.5)	28/32 (87.5)	2/32 (6.3)	1/32 (3.1)	1/32 (3.1)
IGF-I	13/25 [ab] (52.0)	13/13 (100)	0	0	0
bFGF+IGF-I	14/44 [b] (31.8)	14/14 (100)	0	0	0

[a,b] Mean within columns with different superscripts differ (P<0.05, Chi-square).

ตารางที่ 8 แสดงอัตราการรอดของไข่และการเจริญของนิวเคลียสไข่จากฟอลลิเคิลในกลุ่ม 3

Growth factors	Oocytes viability (%)	Meiotic stages			
		GV (%)	MI (%)	Degenerate (%)	Chromosome not found (%)
Control	7/14[a] (50)	2/7 (28.6)	2/7 (28.6)	2/7 (28.6)	1/7 (14.3)
bFGF	5/35[b] (14.3)	3/5 (60)	1/5 (20.0)	1/5 (20.0)	0
IGF-I	8/21[a] (38.1)	6/8 (75)	2/8 (25.0)	0	0
bFGF+IGF-I	1/13[b] (7.7)	1/1 (100)	0	0	0

[a,b] Mean within columns with different superscripts differ (P<0.05, Chi-square).

ผลการทดลองที่ 2

การเจริญของฟอลลิเคิลในหลอดทดลอง

จากการทดลองที่ 1 พบว่าฟอลลิเคิลทั้ง 3 กลุ่ม ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 200-399; 400-599 และ 600-799 ไมโครเมตร เมื่อนำไปเลี้ยงแล้วมีการเจริญไม่ดี ในการทดลองที่ 2 นี้จึงคัดฟอลลิเคิลที่มีขนาดใหญ่ขึ้นมาเข้าทำการเลี้ยงนาน 30 วัน จากตารางที่ 9 พบว่าฟอลลิเคิลกลุ่ม 1 มีขนาดเพิ่มจาก 870 เป็น 989 ไมโครเมตร กลุ่ม 2 มีขนาดเพิ่มจาก 1,120 เป็น1,201 ไมโครเมตร กลุ่ม 3 มีขนาดเพิ่มจาก 1,282 เป็น 1,367 ไมโครเมตร กลุ่ม 4 มีขนาดเพิ่มจาก 1,529 เป็น1,659 ไมโครเมตร และ กลุ่ม 5 มีขนาดเพิ่มจาก 1,749 เป็น 1,907 ไมโครเมตร

ตารางที่ 9 แสดงอัตราการเจริญของฟอลลิเคิลภายหลังการเลี้ยง 7 14 และ 30 วัน

Follicle size	**No. of evaluated follicles**	**Follicle size (μm) Mean ±S.E.M.**			
		Day 0	**Day 7**	**Day 14**	**Day 30**
Group 1, 800-999 μm	45	870.4±9.2	884.5±8.1	923.9±11.1	989.1±7.5
Group 2, 1000-1199 μm	48	1120.8±11.7	1148.2±12.7	1176.3±8.4	1201.3±10.7
Group 3, 1200-1399 μm	49	1282.1±8.1	1301.2±10.4	1338.1±14.3	1367.6±12.1
Group 4, 1400-1599 μm	43	1529.6±15.6	1579.5±13.2	1630.0+9.7	1659.4±11.9
Group 5, 1600-1800 μm	40	1749.2±20.3	1797.3±17.6	1859.8±13.5	1907.5±14.2

No significant difference was found among groups

อัตราการรอดของไข่ภายหลังการเลี้ยงฟอลลิเคิล

จากการแยกไข่ออกจากฟอลลิเคิลทั้ง 5 กลุ่ม เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงฟอลลิเคิลที่ 7 14 และ 30 วัน แล้วนำไปย้อมด้วย FDA เพื่อตรวจสอบอัตรารอดของไข่ จากตารางที่ 10 พบว่า อัตราการรอดของไข่อยู่ระหว่าง 55-69% ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติของฟอลลิเคิลทั้ง 5 กลุ่ม

อัตราการเจริญของนิวเคลียสไข่

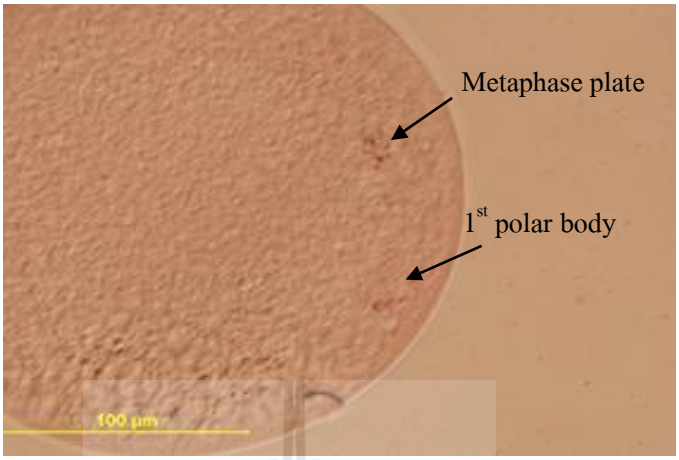
จากการเลี้ยงฟอลลิเคิลนาน 7 วัน แล้วแยกไข่ออกมาเลี้ยงให้พร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลอง พบว่าไข่ที่แยกได้จากฟอลลิเคิลกลุ่ม 1 (∅800-999 ไมโครเมตร) และกลุ่ม 2 (∅1000-1199 ไมโครเมตร) นิวเคลียสไข่หยุดที่ระยะ GV ไข่ที่แยกได้จากฟอลลิเคิลกลุ่ม 3 (∅ 1200-1399 ไมโครเมตร) นิวเคลียสไข่หยุดที่ระยะ GVBD ไข่ที่แยกได้จากฟอลลิเคิลกลุ่ม 4 (∅1400-1599 ไมโครเมตร) นิวเคลียสไข่หยุดที่ระยะ MI มีเพียงไข่ที่แยกจากฟอลลิเคิลกลุ่ม 5 (∅1600-1800 ไมโครเมตร) เท่านั้นที่นิวเคลียสเจริญถึง

ระยะ MII (ภาพที่ 6) ซึ่งได้อัตราต่ำเพียง 3% (ตารางที่ 11) ส่วนการเลี้ยงฟอลลิเคิลนาน 14 วัน แล้วแยกไข่ออกมาเลี้ยงให้พร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลอง พบว่ามีเพียงไข่ที่แยกได้จากฟอลลิเคิลกลุ่ม 1 เท่านั้นที่นิวเคลียสไม่เจริญถึงระยะ MII การเจริญถึงระยะ MII ของไข่ที่แยกจากฟอลลิเคิลกลุ่ม 5 (17%) สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับไข่ที่แยกได้จากฟอลลิเคิลกลุ่ม 2 3 และ 4 (4, 4 และ 9% ตามลำดับ) (ตารางที่ 12) ส่วนการเลี้ยงฟอลลิเคิลนาน 30 วัน แล้วแยกไข่ออกมาเลี้ยงให้พร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลอง พบว่าไข่ที่แยกได้จากฟอลลิเคิลทุกกลุ่มนิวเคลียสสามารถเจริญถึงระยะ MII โดยไข่ที่แยกจากฟอลลิเคิลกลุ่ม 5 ให้อัตราสูงสุด (21%) ซึ่งสูงกว่ากลุ่ม 1 และ 2 (5 และ 15%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การเจริญถึงระยะ MII ของไข่ที่แยกได้จากฟอลลิเคิลกลุ่ม 3 และ 4 (10 และ 13%) ต่ำกว่ากลุ่ม 5 แต่ไม่แตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 10 แสดงอัตราการรอดของไข่ภายหลังการเลี้ยงฟอลลิเคิล

Group	**Follicle size**	**No. of follicles**	**FDA positive oocytes (%)**
7 days culture	Group 1, 800-999 µm	50	29(58)
	Group 2, 1000-1199 µm	51	30(59)
	Group 3, 1200-1399 µm	49	31(63)
	Group 4, 1400-1599 µm	51	33(65)
	Group 5, 1600-1800 µm	51	33(65)
14 days culture	Group 1, 800-999 µm	48	28(58)
	Group 2, 1000-1199 µm	53	30(57)
	Group 3, 1200-1399 µm	51	31(61)
	Group 4, 1400-1599 µm	47	30(64)
	Group 5, 1600-1800 µm	45	31(69)
30 days culture	Group 1, 800-999 µm	36	20(56)
	Group 2, 1000-1199 µm	38	21(55)
	Group 3, 1200-1399 µm	36	21(58)
	Group 4, 1400-1599 µm	37	23(62)
	Group 5, 1600-1800 µm	36	24(67)

No significant difference was found among groups



ภาพที่ 6 แสดงการเจริญของนิวเคลียสไข่ระยะ MII

การเติม bFGF ต่ออัตราการเจริญของฟอลลิเคิลและการเจริญของนิวเคลียสไข่ที่แยกจากฟอลลิเคิล

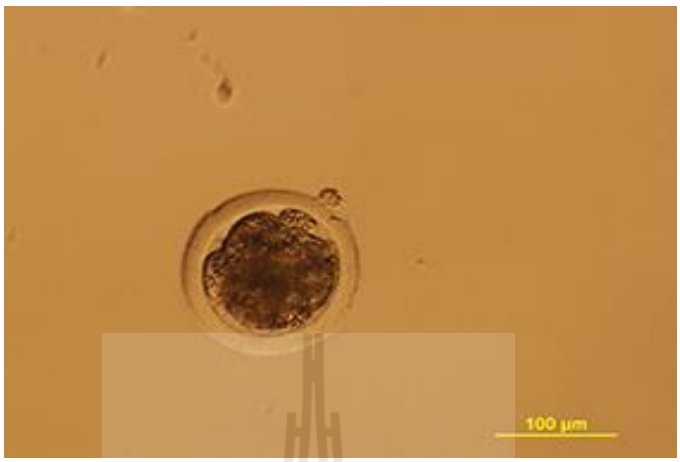
จากการเติม bGFG ในปริมาณ 50 ng/ml ในน้ำยาเลี้ยงฟอลลิเคิลแล้วเลี้ยงเป็นเวลา 30 วัน โดยน้ำยาที่ไม่เติม bFGF ใช้เป็นกลุ่มควบคุม หลังจากนั้นแยกไข่ออกมาเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง จากตารางที่ 14 ฟอลลิเคิลกลุ่ม 4 และ 5 ที่เลี้ยงในน้ำยาที่เติม bFGF มีอัตราการเจริญสูงที่สุด (2.8±0.6 ไมโครเมตร/วัน และ 2.9±0.4 ไมโครเมตร/วัน) แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับฟอลลิเคิลกลุ่มอื่นๆ นอกจากนี้การเติม bFGF ไม่มีผลทำให้อัตราการเจริญของฟอลลิเคิลเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่เติม bFGF ส่วนอัตราการรอดของไข่หลังจากเลี้ยงฟอลลิเคิลทุกๆกลุ่ม ในน้ำยาที่เติมและไม่เติม bFGF ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

จากตารางที่ 15 เมื่อแยกไข่ออกมาเลี้ยงให้พร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลอง พบว่าไข่ที่แยกได้จากฟอลลิเคิลกลุ่ม 5 ที่เลี้ยงในน้ำยาที่เติมด้วย bFGF ให้อัตราการเจริญถึงระยะ MII สูงที่สุด (25%) โดยสูงกว่าฟอลลิเคิลกลุ่ม 1-4 ทั้งที่เติมและไม่เติม bFGF

การทำ ICSI และการเจริญของตัวอ่อนในหลอดทดลอง

จากผลการทดลองที่กล่าวมา ได้นำเฉพาะฟอลลิเคิลในกลุ่ม 1-5 เลี้ยงในน้ำยาที่เติม bFGF นาน 30 วันมาแยกไข่ออกมาเลี้ยงให้พร้อมปฏิสนธิ แล้วนำไข่ระยะ MII ไปทำ ICSI จากตารางที่ 16 พบว่าหลังจากทำ ICSI แล้วกระตุ้นด้วย 5% Ethanol ได้อัตราการเกิด second polar body ของทั้ง 5 กลุ่มได้ระหว่าง 5-11% ซึ่งไม่แตกต่างทางถิติ นอกจากนี้ภายหลังการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดทดลองพบว่าอัตราการแบ่งตัว (50-67%) ของทั้ง 5 กลุ่ม ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ กลุ่ม 1-3 ไม่มีตัวอ่อนเจริญถึงระยะ 8 เซลล์ โดยกลุ่ม 5 เจริญถึงระยะ 8 เซลล์ (43%) สูงกว่ากลุ่ม 4 (20%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีเพียงกลุ่ม 5 กลุ่มเดียวที่

ตัวอ่อนเจริญถึงระยะมอรูล่า (14%) (ภาพที่ 7) และระยะบลาสโตซีส (14%) (ภาพที่ 8) เนื่องจากได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเพียงใบเดียวจึงไม่ได้นำไปย้ายฝากให้ตัวรับ



ภาพที่ 7 แสดงตัวอ่อนกระบือระยะมอรูล่าที่ผลิตจากการเลี้ยงฟอลลิเคิลแล้วแยกไข่ไปเลี้ยงให้พร้อมปฏิสนธิ แล้วทำ ICSI

ภาพที่ 8 แสดงตัวอ่อนกระบือระยะบลาสโตซีส ที่ผลิตจากการเลี้ยงฟอลลิเคิลแล้วแยกไข่ไปเลี้ยงให้พร้อมปฏิสนธิ แล้วทำ ICSI

ตารางที่ 11 แสดงการเจริญของนิวเคลียสไข่ที่แยกจากฟอลลิเคิลที่เลี้ยงนาน 7 วัน

Follicle size	No. of follicle	No. (%) Meiotic stages					
		GV	GVBD	MI	MII	Degenerate	Chromosome not found
Group 1, 800-999 µm	29	14(48)	0[b]	0[b]	0[b]	2(7)[a]	13(45)[a]
Group 2, 1000-1199 µm	30	19(63)	0[b]	0[b]	0[b]	1(3)[a]	10(33)[ab]
Group 3, 1200-1399 µm	31	20(65)	3(10)[a]	0[b]	0[b]	1(3)[a]	7(23)[b]
Group 4, 1400-1599 µm	33	22(67)	2(6)[a]	1(3)[a]	0[b]	2(6)[a]	6(18)[b]
Group 5, 1600-1800 µm	33	23(70)	1(3)[a]	2(6)[a]	1(3)[a]	0[b]	6(18)[b]

[a,b] Values in the same column with different superscripts differ significantly ($P<0.05$)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 12 แสดงอัตราการเจริญของนิวเคลียสไข่ที่แยกจากฟอลลิเคิลที่เลี้ยงนาน 14 วัน

Follicle size	No. of follicle	No. (%) Meiotic stages					
		GV	GVBD	MI	MII	Degenerate	Chromosome not found
Group 1, 800-999 µm	24	11(46)	7(29)	1(4)	0[b]	1(4)[a]	4(17)[b]
Group 2, 1000-1199 µm	25	10(40)	5(20)	1(4)	1(4)[ab]	0[b]	8(32)[a]
Group 3, 1200-1399 µm	23	9(39)	4(17)	2(9)	1(4)[ab]	0[b]	7(30)[a]
Group 4, 1400-1599 µm	22	7(32)	6(27)	2(9)	2(9)[ab]	1(5)[a]	4(18)[b]
Group 5, 1600-1800 µm	23	9(39)	6(26)	1(9)	4(17)[a]	0[b]	3(13)[b]

[a,b] Values in the same column with different superscripts differ significantly ($P<0.05$)

ตารางที่ 13 แสดงอัตราการเจริญของนิวเคลียสไข่ที่แยกจากฟอลลิเคิลที่เลี้ยงนาน 30 วัน

Follicle size	No. of follicle	No. (%) Meiotic stages					
		GV	GVBD	MI	MII	Degenerate	Chromosome not found
Group 1, 800-999 µm	20	8(40)	6(30)	1(5)	1(5)[b]	1(5)[a]	3(15)[ab]
Group 2, 1000-1199 µm	21	8(38)	4(19)	2(10)	1(5)[b]	1(5)	5(24)[a]
Group 3, 1200-1399 µm	21	6(29)	4(19)	3(14)	2(10)[ab]	2(10)	4(19)[ab]
Group 4, 1400-1599 µm	23	8(35)	5(22)	3(13)	3(13)[ab]	1(4)	3(13)[ab]
Group 5, 1600-1800 µm	24	9(38)	5(21)	2(8)	5(21)[a]	1(4)	2(8)[b]

[a,b] Values in the same column with different superscripts differ significantly ($P<0.05$)

ตารางที่ 14 แสดงอัตราการเจริญของฟอลลิเคิลที่เลี้ยงในน้ำยาที่เติม bFGF นาน 30 วัน และอัตราการรอดของไข่

Follicle size	bFGF supplementation	Mean diameter of follicle (day 0) Mean ±S.E.M.	Growth rates of oocytes follicle (µm/day) Mean ±S.E.M.	Survival rates of oocytes (FDA positive) (%) Mean ±S.E.M.
Group 1, 800-999 µm	+	887.5±6.1	2.1±0.1[ab]	63.3±7.5
	-	868.2±7.0	1.9±0.2[b]	58.1±5.4
Group 2, 1000-1199 µm	+	1085.4±11.3	2.2±0.2[ab]	66.2±5.1
	-	1102.6±13.1	2.1±0.3[ab]	58.9±6.4
Group 3, 1200-1399 µm	+	1318.1±15.7	2.4±0.5[ab]	67.5±6.9
	-	1330.4±17.2	2.0±0.1[ab]	60.2±7.0
Group 4, 1400-1599 µm	+	1467.3±19.5	2.8±0.6[a]	72.4±5.8
	-	1485.1±20.2	2.2±0.2[ab]	63.1±8.5
Group 5, 1600-1800 µm	+	1692.8±21.0	2.9±0.4[a]	76.3±5.6
	-	1721.3±23.4	2.3±0.3[ab]	66.2±6.0

[a,b] Values in the same column with different superscripts differ significantly ($P<0.05$)

ตารางที่ 15 แสดงอัตราการเจริญของนิวเคลียสไข่ที่แยกได้จากฟอลลิเคิลที่เลี้ยงในน้ำยาที่เติมและไม่เติม bFGF

Follicle size	bFGF supplementation	No of. follicles	Meiotic stages					
			GV	GVBD	MI	MII	Degenerate	Chromosome not found
Group 1, 800-1000 µm	+	23	8(35)[a]	5(22)	1(4)	2(9)[bc]	3(13)	4(17)
	-	21	6(29)[ab]	4(19)	0	1(5)[c]	5(24)[a]	5(24)
Group 2, 1000-1200 µm	+	24	7(29)[ab]	6(25)	1(4)	2(8)[bc]	4(17)	4(17)
	-	25	8(32)[a]	6(24)	1(4)	1(4)[c]	6(24)[a]	3(12)
Group 3, 1200-1400 µm	+	25	5(20)[b]	7(28)	2(8)	3(12)[b]	3(12)	5(15)
	-	22	7(32)[a]	5(23)	1(5)	2(9)[bc]	2(9)[b]	5(23)
Group 4, 1400-1600 µm	+	26	6(23)[ab]	7(27)	2(8)	4(15)[b]	4(15)	3(12)
	-	23	9(39)[a]	4(17)	2(9)	2(9)[bc]	2(9)[b]	4(17)
Group 5, 1600-1800 µm	+	28	5(18)[b]	9(32)	2(7)	7(25)[a]	3(11)	2(7)
	-	21	4(19)[b]	5(24)	2(10)	4(19)[ab]	3(14)	3(14)

[a,b] Values in the same column with different superscripts differ significantly ($P<0.05$)

ตารางที่ 16 แสดงอัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังการทำ ICSI ของไข่ที่แยกได้จากฟอลลิเคิลที่เลี้ยงนาน 30 วันในน้ำยาที่เติม bFGF

Follicle size	No. of oocytes	FDA viability (%)	ICSI Success (%)	2nd PB	Cleavage (%)	No (%) of oocytes developed to			
						8C	16C	Mor	BL
Group 1, 800-999 µm	122	67(55)	60(90)	3(5)	2(67)	0^{c}	0^{b}	0^{b}	0^{b}
Group 2, 1000-1199 µm	117	69(59)	61(88)	3(5)	2(67)	0^{c}	0^{b}	0^{b}	0^{b}
Group 3, 1200-1399 µm	103	63(61)	58(92)	4(7)	2(50)	0^{c}	0^{b}	0^{b}	0^{b}
Group 4, 1400-1599 µm	106	67(63)	61(91)	5(8)	3(60)	$1(20)^{b}$	$1(20)^{a}$	0^{b}	0^{b}
Group 5, 1600-1800 µm	108	71(66)	62(87)	7(11)	4(57)	$3(43)^{a}$	$2(29)^{a}$	$1(14)^{a}$	$1(14)^{a}$

^{a,b,c} Values in the same column with different superscripts differ significantly ($P<0.05$)

3.4. ข้อวิจารณ์

การทดลองที่ 1

จากผลการเลี้ยงฟอลลิเคิลทั้ง 3 กลุ่ม พบว่าฟอลลิเคิลสามารถรอดและเจริญได้ในน้ำยาควบคุมซึ่งอาจจะเป็นเพราะว่าในน้ำยาควบคุมมีสารอาหาร ฮอร์โมนและโกรทแฟ็กเตอร์ที่เหมาะต่อการรอดและการเจริญของฟอลลิเคิลเช่น FSH ITS และ hypoxanthine โดย FSH มีหน้าที่ในการช่วยเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์แกรนูโลซ่า และช่วยในการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Senbon และคณะ, 2003; Richards และคณะ, 2003) นอกจากนี้ยังพบว่า FSH สามารถช่วยในการเจริญของฟอลลิเคิลของโคและกระบือในการเลี้ยงฟอลลิเคิลในห้องทดลอง (Saha และคณะ, 2000; Gupta และคณะ, 2002) และ ITS ช่วยในการกระตุ้นการเจริญของเซลล์แกรนูโลซ่า และจากผลการศึกษาการเลี้ยงฟอลลิเคิลของกระบือแม่น้ำยังพบว่า ITS ช่วยให้ฟอลลิเคิลและเซลล์แกรนูโลซ่า สามารถเจริญและเพิ่มขนาดขึ้นในการเลี้ยงในห้องทดลอง (Gupta และคณะ, 2002) ส่วน hypoxanthine ทำหน้าที่ในการหยุดระยะการเจริญของนิวเคลียสของไข่ให้อยู่ในระยะ meiotic จนกระทั้งไข่สามารถเจริญได้เต็มที่ไข่ก็จะสามารถเริ่มต้นเข้าสู่การเจริญในระยะ meiotic ได้เอง (Miyano, 2005) การเลี้ยงฟอลลิเคิลในกลุ่ม 2 และ 3 พบว่าฟอลลิเคิลจากทั้งสองกลุ่มนี้สามารถรอดและเจริญได้ดีที่สุดในน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ bFGF ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานที่มีมาก่อนหน้านี้ว่า bFGF สามารถเพิ่มอัตราการรอดของ preantral follicle ในแพะ (Zhou และ Zhang, 2005) และ bFGF ที่มีความเข้มข้นสูงช่วยเพิ่มอัตราการรอดในการเลี้ยงฟอลลิเคิลแกะ (Peng และคณะ, 2010) ส่วนการเลี้ยงฟอลลิเคิลของกระบือในน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ IGF-I ในพบว่าฟอลลิเคิลนั้นสามารถรอดและเจริญได้น้อยกว่าในน้ำยาควบคุมแสดงว่า IGF-I ไม่มีผลช่วยในการรอดและการเจริญของฟอลลิเคิลหลังเลี้ยง นอกจากนี้ยังมีแนวโน้มว่าจะทำให้ฟอลลิเคิลรอดและเจริญได้น้อยลงซึ่งผลการทดลองนี้มีความแตกต่างจากรายงานที่มีมาก่อนหน้านี้โดยมีรายงานว่า IGF-I สามารถช่วยให้ฟอลลิเคิลของกระบือแม่น้ำรอดและเจริญได้หลังเลี้ยง (Sharma และคณะ, 2009; Gupta และ Nandi, 2010) ซึ่งผลของ IGF-I ในการทดลองนี้ยังไม่อาจจะจะบอกได้แน่นอนดังนั้นควรที่จะมีการทำการทดลองซ้ำอีกครั้งเพื่อเป็นการยืนยัน ส่วนฟอลลิเคิลที่เลี้ยงในน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ bFGF+ IGF-I นั้นสามารถช่วยให้ฟอลลิเคิลทั้ง 3 กลุ่มสามารถรอดและเจริญได้หลังเลี้ยงโดยเฉพาะฟอลลิเคิลในกลุ่ม 2 ซึ่งมีอัตราการรอดของฟอลลิเคิลใกล้เคียงกับกลุ่มที่เลี้ยงใน bFGF อย่างเดียว ส่วนฟอลลิเคิลที่เลี้ยงในน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ EGF, bFGF+EGF, IGF-I+EGF และ bFGF+IGF-I+EGF นั้นไม่สามารถรอดได้หลังเลี้ยงแสดงว่าน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ EGF ส่งผลในการยับยั้งอัตราการรอดของฟอลลิเคิลกระบือปลัก

จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าโกรทแฟ็กเตอร์ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงฟอลลิเคิลในกลุ่ม 2 และ 3 คือ bFGF ส่วนฟอลลิเคิลในกลุ่ม 1 นั้นยังต้องมีการศึกษาวิจัยต่อไปเพื่อให้ได้โกรทแฟ็กเตอร์ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงฟอลลิเคิลในกลุ่มนี้ ส่วนโกรทแฟ็กเตอร์ EGF มีผลในการยับยั้งการเจริญของฟอลลิเคิลในกระบือปลัก

ผลของการศึกษาระยะการเจริญของนิวเคลียสไข่ที่ได้จากการเลี้ยงฟอลลิเคิลนั้นพบว่าไข่ในกลุ่ม 1 มีอัตราการรอดสูงแต่ไข่ส่วนมากจะอยู่ในระยะ GV ส่วนระยะการเจริญของไข่จากฟอลลิเคิลในกลุ่ม 2

พบว่าส่วนมากอยู่ที่ระยะ GV มีเพียงไข่จากฟอลลิเคิลที่เลี้ยงน้ำยาที่มีโกรธแฟ็กเตอร์ bFGF เท่านั้นที่สามารถเจริญได้จนถึงระยะ MI และไข่จากฟอลลิเคิลในกลุ่ม 3 นั้นสามารถเจริญได้ทั้งในระยะ GV และ MI โดยไข่ในกลุ่มนี้มีอัตราการเจริญของไข่ในระยะ MI สูงกว่าในกลุ่ม 2 แสดงว่าขนาดของฟอลลิเคิลเริ่มต้นอาจจะมีผลต่อระยะการเจริญของนิวเคลียสของไข่หลังเลี้ยง ส่วนผลของโกรทแฟ็กนั้นมีผลต่ออัตราการเจริญของไข่หรือไม่นั้นยังบอกไม่ได้แน่นชัดเนื่องจากจำนวนไข่ที่ได้จากการเลี้ยงฟอลลิเคิลในการทดลองครั้งนี้มีจำนวนน้อยเกินไปทำให้เห็นผลของการทดลองได้ไม่ชัดเจน

การทดลองที่ 2

จากการทดลองที่ 1 ฟอลลิเคิลที่นำมาทำการทดลองมีเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 800 ไมโครเมตร ซึ่งอยู่ในระยะ preantral ทำให้มีการเจริญที่ไม่ดี ตอบสนองต่อโกรทแฟ็กเตอร์ไม่ดี นิวเคลียสของไข่ที่แยกได้จึงไม่สามารถเจริญจนถึงระยะ MII ดังนั้นในการทดลองที่ 2 นี้ จึงได้นำฟอลลิเคิลที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 800 ไมโครเมตร ซึ่งอยู่ในระยะ antral มาทำการทดลอง ฟอลลิเคิลทั้ง 5 กลุ่มที่เลี้ยงในน้ำยาที่ไม่เติม bFGF เป็นเวลานาน 7 14 และ 30 วัน มีการเจริญโดยมีการเพิ่มขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ฟอลลิเคิลในกลุ่ม 5 มีอัตราการเจริญสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ ไข่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่แยกออกจากฟอลลิเคิลสามารถเจริญจนพร้อมปฏิสนธิเมื่อนำไปเลี้ยงในหลอดทดลอง (Pincus and Enzmann, 1935) นิวเคลียสของไข่จะมีการเจริญไปพร้อมๆกับการเจริญของฟอลลิเคิลจนเข้าสู่ระยะ MII เมื่อฟอลลิเคิลเจริญเต็มที่ดังที่มีรายงานในหนูถีบจักรและสุกร (Sorensen and Wassarman, 1976; Motlik et al, 1984) สำหรับในโคไข่ที่แยกได้จากฟอลลิเคิลที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 6 มม.ขึ้นไปจะมีความสามารถเจริญเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสได้สูงกว่าไข่ที่แยกได้จากฟอลลิเคิลที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 6 มม. (Tan and Lu, 1990; McCaffrey et al, 1992; Lonergan et al, 1994) มีรายงานการศึกษาในแพะพบว่าไข่ที่แยกจากฟอลลิเคิลที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-0.8 มม. เมื่อนำไปเลี้ยงแล้วนิวเคลียสเริ่มเจริญได้ โดยจะเจริญถึงระยะ MI หากเป็นไข่ที่แยกจากฟอลลิเคิลเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-1.8 มม. (De Smedt et al, 1994) แม้ว่าไข่ที่แยกจากฟอลลิเคิลเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 2 มม.จะมีการเจริญของนิวเคลียสถึง 86% แต่การเจริญเติบโตเป็นตัวอ่อนหลังการปฏิสนธิยังอยู่ในอัตราที่ต่ำ (Crozet et al, 1993) จากข้อมูลของการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าฟอลลิเคิลที่มีขนาดใหญ่ขึ้นสามารถเจริญได้ดีกว่าฟอลลิเคิลขนาดเล็กและมีความสอดคล้องกันว่าไข่ที่แยกได้จากฟอลลิเคิลขนาดใหญ่โดยเฉพาะฟอลลิเคิลกลุ่ม 5 ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1600-1800 ไมโครเมตร มีนิวเคลียสเจริญถึงระยะ MII ในอัตราที่สูงกว่ากลุ่มอื่นๆที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่า ในการทดลองนี้ทำการเลี้ยงฟอลลิเคิลในหลอดทดลอง 3 ช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งพบว่าเลี้ยงนาน 30 วันมีการเจิญดีกว่า 14 และ 7 วัน และไข่ที่แยกได้จากฟอลลิเคิลที่เลี้ยงนาน 30 วันมีนิวเคลียสเจริญถึงระยะ MII สูงกว่าไข่ที่แยกจากฟอลลิเคิลที่เลี้ยงนาน 14 และ 7 วัน การเจริญพร้อมปฏิสนธิต้องพร้อมกันทั้งสองอย่างคือนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม จึงจะสามารถสนับสนุนให้ตัวอ่อนเจริญได้ดีหลังการปฏิสนธิ (Moor and Trounson, 1977) การศึกษานี้เลี้ยงฟอลลิเคิลทั้ง 5 กลุ่มในน้ำยาที่ไม่เติม bFGF นาน 30 วัน ได้อัตราไข่รอด 55-67% นอกจากนี้มีรายงานการเลี้ยงฟอลลิเคิลกระบือที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 100-1,500 ไมโครเมตร นาน 60 วัน ได้อัตราไข่รอด 76-92% Gupta and Nandi (2010)

จากผลการทดลองนี้ที่เติม bFGF ลงในน้ำยาเลี้ยงฟอลลิเคิล สามารถช่วยเพิ่มอัตราการเจริญของฟอลลิเคิลและอัตราไข่ที่แยกได้มีการเจริญของนิวเคลียสถึงระยะ MII สูงขึ้นด้วย ซึ่งมีรายงานการทดลองของ Zhou และ Zhang (2005) ที่เลี้ยงฟอลลิเคิลแพะในน้ำยาที่เติม bFGF ซึ่งช่วยทำให้อัตรารอดของฟอลลิเคิลดีขึ้น แต่ไม่ได้ช่วยเพิ่มอัตราการเจริญของฟอลลิเคิล ในเซลล์แกรนูโลซาของโคจะเกิดกิจกรรมทางด้านภูมิคุ้มกัน ทางด้านชีวภาพ และมี mRNA ในปริมาณมาก (Neufeld et al., 1987) ไม่ว่าจะเป็น bFGF อย่างเดียวหรือ bFGF ร่วมกับ FSH จะช่วยให้ฟอลลิเคิลมีชีวิต ทำให้เซลล์แกรนูโลซาเจริญ และเพิ่มขนาดของฟอลลิเคิล แต่ถ้า bFGF ร่วมกับ transforming growth factor β (TGF-β) จะไปยับยั้งไม่ให้ bFGF ทำงานในการเพิ่มการเจริญของฟอลลิเคิล อีกทั้งยังไปลดการรอดของฟอลลิเคิลอีกด้วย (Neufeld et al., 1987) bFGF อย่างเดียวสามารถกระตุ้นให้ผลิตฮอร์โมน estradiol และ progesterone ในระหว่างการเลี้ยงฟอลลิเคิลโค (Wandji et al., 1996)

ผลการทำ ICSI ในการศึกษาครั้งนี้ ไม่มีความแตกต่างกันของอัตราความสำเร็จของการทำ ICSI อัตราการเกิด 2nd PB ในไข่ที่แยกได้จากฟอลลิเคิลทั้ง 5 กลุ่ม แต่มีเพียงไข่ที่แยกได้จากฟอลลิเคิลที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1600-1800 ไมโครเมตรเท่านั้น ที่สามารถเจริญถึงระยะบลาสโตซีส จากข้อมูลนี้แสดงว่าฟอลลิเคิลเส้นผ่าศูนย์กลาง 1600-1800 ไมโครเมตร ที่เลี้ยงไว้นาน 30 วัน จะสามารถสังเคราะห์ maternal factor ที่มีความจำเป็นต่อความพร้อมปฏิสนธิของไข่ และการเจริญของตัวอ่อน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

ในการทดลองที่ 1 วิธีการเลี้ยงฟอลลิเคิล และผลของโกรทแฟ็กเตอร์ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงฟอลลิเคิลของกระบือปลัก ซึ่งพบว่าวิธีการเลี้ยงฟอลลิเคิลโดยการตรึงด้วยคอลลาเจนเจลทำให้ฟอลลิเคิลสามารถรอดและเจริญได้หลังเลี้ยง และโกรทแฟ็กเตอร์ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงฟอลลิเคิลในกลุ่มที่ 2 และ 3 คือ bFGF ส่วนโกรทแฟ็กเตอร์ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงฟอลลิเคิลในกลุ่มที่ 1 นั้นยังต้องการการศึกษาค้นคว้าต่อไป ส่วนผลของโกรทแฟ็กเตอร์ IGF-I ในการทดลองนี้นั้นยังบอกได้ไม่แน่ชัดเพราะฟอลลิเคิลที่เลี้ยงยังสามารถรอดและเจริญได้แต่ก็มีแนวโน้มว่าอัตราการรอดและการเจริญนั้นต่ำกว่าน้ำยาควบคุม ส่วนฟอลลิเคิลที่เลี้ยงในน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ EGF อย่างเดียว และ EGF ร่วมกับโกรทแฟ็กเตอร์ตัวอื่นๆนั้นไม่สามารถรอดได้หลังเลี้ยงแสดงว่า EGF มีผลในการยับยั้งการรอดของฟอลลิเคิลในกระบือปลัก

ในการทดลองที่ 2 ฟอลลิเคิลที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1600-1800 ไมโครเมตร ที่ผ่านการเลี้ยงในน้ำยาที่เติม bFGF นาน 30 วัน มีความสามารถที่จะเจริญได้ดี และให้ไข่ที่มีนิวเคลียสเจริญถึงระยะ MII ที่พร้อมปฏิสนธิดีที่สุด ตลอดจนทำให้ตัวอ่อนเจริญถึงระยะบลาสโตซีสภายหลังการทำ ICSI ควรมีการศึกษาต่อไปถึงผลของขนาดฟอลลิเคิลกระบือที่ใหญ่ขึ้น และระยะเวลาการเลี้ยงที่นานขึ้น ต่ออัตราการเจริญของฟอลลิเคิล ตลอดจนศักยภาพของไข่ที่แยกได้จากฟอลลิเคิลเหล่านี้ ว่าจะมีการเจริญของนิวเคลียสถึงระยะ MII ได้ดีขึ้น และการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซีสได้สูงขึ้นหรือไม่

การเลี้ยงฟอลลิเคิลจะทำให้ได้ไข่เพื่อใช้ในการทดลองเพิ่มขึ้นจากไข่ปกติที่เจาะได้จากรังไข่เพราะหลังจากเจาะฟอลลิเคิลที่มีขนาดใหญ่ไปแล้วภายในรังไข่ยังคงมีฟอลลิเคิลขนาดเล็กอีกมากมายและนอกจากนี้การเลี้ยงฟอลลิเคิลยังช่วยให้เข้าใจกระบวนการการเจริญของฟอลลิเคิลมากขึ้นและยังสามารถนำเทคนิคนี้ไปประยุกต์ใช้ในสัตว์ใกล้สูญพันธุ์เพื่อเพิ่มโอกาสในการได้ไข่ที่จะนำมาใช้ทำการทดลองเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามความรู้ความเข้าใจในการเลี้ยงฟอลลิเคิลและการหาน้ำยาที่เหมาะสมในการเลี้ยงฟอลลิเคิลของสัตว์ชนิดต่างๆนั้นยังต้องการการศึกษาวิจัยเพื่อให้ได้วิธีการเลี้ยงและน้ำยาที่เหมาะสมที่สุดในการเลี้ยงฟอลลิเคิลของสัตว์ในแต่ละชนิด

บรรณานุกรม

จำนงค์ จังอินทร์ และ วรวิทย์ ธนสุนทรสุทธิ์. 2551. การศึกษาสภาพการเลี้ยงกระบือและทัศนคติของเกษตรกรที่เลี้ยงกระบือในจังหวัดศรีสะเกษ. **สำนักสุขศาสตร์สัตว์และสุขอนามัยที่ 1**. แหล่งที่มา:http://www.dld.go.th/region1/column/column13.pdf.

ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. 2007. สรีรวิทยาระบบสืบพันธุ์โคเพศเมีย. **บทความเชิงวิชาการด้านเทคโนโลยีชีวภาพ**. แหล่งที่มา: http://www.dld.go.th /biotech/Source%20Docs/From%20Dr%20Chirut/AI_Article/C-2_Cow_Repro_System.pdf. September 10, 2007.

Alm, H., Katska-Ksiazkiewicz, L., Ryn'ska, A. and Tuchscherer, A. 2006. Survival and meiotic competence of bovine oocytes originating from rerly antral ovarien follicles. **Theriogenology** 65: 1422-1434.

Celestino, J.J., Bruno, J.B., Saraiva, M.V., Rocha, R.M., Brito, I.R., Duarte, A.B., Araújo, V.R., Silva, C.M., Matos, M.H., Campello, C.C., Silva, J.R. and Figueiredo J.R. 2011. Steady-state level of epidermal growth factor (EGF) mRNA and effect of EGF on *in vitro* culture of caprine preantral follicles. **Cell Tissue Res.** 344: 539-50.

Crozet, N., De Smedt, V., Ahmed-Ali, M. and Sévellec, C. 1993. Normal development following in vitro oocyte maturation and fertilization in the goat. **Theriogenology** 39: 206 (Abstract)

Crudeli, G.A., Stahringer, R.C., Vargas, P. M. and Barbaran M.S.F. 1999. Artificial Insemination in Buffalo in Northeastern Argentina. **Buffalo J.** 1: 61-67

Demeestere, I., Delbaere, A., Gervy, C., Van den Bergh, M., Devreker. F. and Englert. 2002. Effect of preantral follicle isolation technique on *in vitro* follicular growth, oocyte maturation and embryo development in mice. **Human Reprod.** 8: 2152-2159.

De Smedt, V., Crozet, N., Ahmed-Ali, M., Martino, A. and Cognié, Y. 1992. In vitro maturation and fertilization of goat oocytes. **Theriogenology** 37: 1049-1060.

De Smedt, V., Crozet, N. and Gall, L. 1994. Morphological and functional changes accompanying the acquisition of meiotic competence in ovarian goat oocyte. Journal of Experimental Zoology 269:128-139.Eppig, J.J. and Brien, M.J. 1996. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. **Biol. Reprod.** 54: 197-207.

Gupta, P., Nandi, S., Ravindranatha, B. and Sarma, P. 2002. *In vitro* culture of buffalo (*Bubalus bubalis*) preantral follicles. **Theriogenology** 57: 1839-1854.

Gupta, P.S. and Nandi, S. 2010. Viability and growth of buffalo preantral follicles and their corresponding oocytes *in vitro*: effect of growth factors and beta mercaptoethanol. **Reprod. Domest. Anim.** 45: 147-54.

Kawaka, N., Kuwayama, M., Miyano, T. and Manabe, N. 2005. Growth and maturation of follicles and oocytes following xenotransplantation of procine ovarian tissue and *in vitro* maturation. **Reprod. Dev**. 51: 741-748.

Kreeger, P., Deck, J., Woodruff, T. and Shea, L. 2006. The *in vitro* regulation of ovarian follicle development using alginate-extracellular matrix gels. **Biomaterials** 27: 714-723.

Leigh, J.C., Helen, F.I., Arun M.D. and Raymond, J.R. 2004. Theca Interna: The Other Side of Bovine Follicular Atresia. **Biol. Reprod.** 71: 1071–1078.

Liang, Y.Y., Ye, D.N., Laowtammathron, C., Phermthai, T., Nagai, T., Somfai, T. and Parnpai, R. 2010. Effect of chemical activation treatment on development of swamp buffalo (Bubalus bubalis) oocytes matured in vitro and fertilized by intracytoplasmic sperm injection. **Reprod. Dom. Anim**. doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01636.x

Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, M.P. and Gordon, I. 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. **Mol. Reprod. Dev.** 37: 48-53.

Magalhães-Padilha, D.M., Duarte, A.B., Araújo, V.R., Saraiva, M.V., Almeida, A.P., Rodrigues, G.Q., Matos, M.H., Campello, C.C., Silva, J.R., Gastal, M.O., Gastal, E.L. and Figueiredo, J.R. 2012 Steady-state level of Insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor mRNA and the effect of IGF-I on the *in vitro* culture of caprine preantral follicles. **Theriogenology** 77: 206-13.

McCaffrey, C., Lu, K.H. and Sreenan, J.M. 1992. Factors involved in the in vitro development of IVF cattle ova. **Proceedings of the Irish Grassland and Animal Production Association, 18th Annual Research Meeting**, Dublin, pp 33-34.

Miyano, T. 2005. JSAR outstanding research award in vitro growth of mammalian oocytes. **Reprod. Dev.** 51: 169-176.

Moor, R.M. and Trounson, A.O. 1977. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity. **J. Reprod. Fertil.** 49: 101-109.

Motlik, J., Crozet, N. and Fulka, J. 1984. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. **J. Reprod. Fertil.** 72: 323-328.

Muenthaisonga, S., Laowtammathrona, C., Ketudat-Cairnsa, M., Parnpaia, 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.

Neufeld, G., Ferrara, N., Schweigerer, L., Mitchell, R. and Gospodarowicz, D. 1987. Bovine granulosa cells produce basic fibroblast growth factor**. Endocrinology** 121: 597-603.

Nilsson, E.E., Parrott, J.A. and Skinner, M.K. 2001. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Mol. Cell Endocrinol.** 175: 123-30.

Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 1999. Development of cloned swamp buffalo embryos derived from fetal fibroblasts: comparison in vitro cultured with or without buffalo and cattle oviductal epithelial cells. **Buffalo J.** 15: 371-384.

Pincus, G. and Enzmann, E.V. 1935. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. I. The activation of ovarian eggs. **J. Exp. Med.** 62: 665-675.

Presicce, G. 2007. Reproduction in the Water Buffalo. **Reprod. Dom. Anim.** 42: 24–32.

Rajarajan, B., Roa, S., Vagdevi, R., Tamilmani, G., Arunakumari, G., Sreenu, M., Amarnath., Naik, B. and Roh, V. 2006. Effect of various growth factors on the *in vitro* development of goat preantral follicles. **Small Ruminant Research** 63: 204-212.

Rose. U., Hanssen, R. and Kloosterboer, H. 1999. Development and Charaterization of an *in vitro* ovulation model using mouse ovarian follicles. **Biol. Reprod.** 61: 503-511.

Saha, S., Shimizu, M., Geshi, M. and Izaike, Y. 2000. *In vitro* culture of bovine preantral follicles. **Anim. Reprod. Sci.** 63: 27-39.

Santos, S., Biondi, F., Cordero, M., Mirando, M., Dantas, J., Figueiredo, J. and Ohashi, O. 2006. Isolation, follicular density, and culture of preantral follicles of buffalo fetuses of different ages. **Anim. Reprod. Sci.** 95: 1-15.

Senbon, S., Fukmi, Y., Hamawaki, A., Yoshikawa, M. amd Miyano, T. 2004. Bovine oocyte grown in serum-free medium acquire fertilization competence. **J. Reprod. Dev**. 50: 541-547.

Slomianka, L. 2006. Female Reproductive System. **Blue Histology-Notes**. Available source: http://www.lab. anhb.uwa.edu.au/mb140/. Semtember 14, 2007.

Sorensen, R.A. and Wassarman, P.M. 1976. Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. **Dev. Biol.** 50: 531-536.

Suteevun, T., Parnpai, R., Smith, S. L., Chang, C-C., Muenthaisong, S. and Tian**,** X. C. 2006. Epigenetic characteristics of cloned and in vitro-fertilized swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. **J**. **Anim**. **Sci.** 84: 2065–2071.

Tan, S.J. and Lu, K.H. 1990. Effects of different oestrous cycle stages of ovaries and sizes of follicles on generation of IVF early embryos. **Theriogenology** 33: 335.

Telfer, E., Binnie, J., McCaffery, F. and Cambell, B. 2000. *In vitro* development of oocytes from procine and bovine primary follicles. **Mol. Cell Endocrinol** 163: 117-123.

Wandji, S.A., Srsen, V., Voss, A.K., Eppig, J.J. and Fortune, J.E. 1996. Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. **Biol. Reprod.** 55: 942-948.

Yamamoto, K., Otoi, T., Koyama, N. Horikita, N., Tachikawa, S. and Miyano, T. 1999. Development to live young from bovine small oocytes after growth, maturation and fertilization *in vitro*. **Theriogenology** 52: 81-89.

Yousaf, M. and Chohan, K. 2003. Nuclear morphology, diameter and meiotic competence of buffalo oocytes relative to follicle size. **Reprod Fertil Dev** 15: 223-229.

Zhou, H. and Zhang, Y. 2005. Regulation of in vitro growth of preantral follicles by growth factors in goats. Domest. **Anim. Endocrinol.** 28: 235-242.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ก
ประวัติผู้วิจัย
ประวัติ รศ. ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาย รังสรรค์ พาลพ่าย

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Rangsun Parnpai

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 52 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. 044-224154

ที่อยู่บ้าน: 51/31 หมู่ 6 ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000 โทร. 081-4706393

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:

6.1 9 ธันวาคม 2525-31 ตุลาคม 2543 นักวิจัย โครงการวิจัยวิทยาศาสตร์ไทย-เนเธอร์แลนด์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ

6.2 1 พฤศจิกายน 2543–ปัจจุบัน อาจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา

7. สาขาวิชาที่มีความเชี่ยวชาญพิเศษ

7.1 การโคลนนิ่งตัวอ่อนโค กระบือ สุกร แมว โดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบ

7.2 การย้ายฝากตัวอ่อนโค กระบือ แพะ

7.3 การปฏิสนธิในหลอดแก้ว โค กระบือ

7.4 Embryonic stem cells

7.5 Cryopreservation of gametes and embryos

8. ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ ย้อนหลัง 5 ปี

Carter, R.L., Chen, Y., Kunkanjanawan, T., Xu, Y., Moran, S.P., Putkhao, K., Yang, J., Huang, A.H.C., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S.* 2014. Reversal of cellular phenotypes in neural cells derived from Huntington's disease monkey-induced pluripotent stem cells. ***Stem Cell Reports*** 3: 1-9.

Chasombat, J., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T. 2015. Pretreatment of in vitro matured bovine oocytes with docetaxel before vitrification: Effects on cytoskeleton integrity and developmental ability after warming. ***Cryobiology***. doi: 10.1016/j.cryobiol.2015.07.002.

Chasombat, J., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T.* 2014. Ovarian follicular dynamics and hormones throughout the estrous cycle in Thai native heifer. ***Anim. Sci. J.*** 85: 15-24.

Chasombat, J., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T.* 2013. Ovarian follicular dynamics, ovarian follicular growth, oocyte yield, *in vitro* embryo production and repeated oocyte pick up in Thai native heifers undergoing superstimulation. ***Asian-Australasian J. Anim. Sci.*** 26: 488-500.

Chasombat, J., Sakhong, D., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T*. 2013. 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

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***. 12: 506-513.

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: 79-87.

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 humen leukemia inhibitory factor (hLIF) fusion protein in *Escherichia coli*. ***J. Biotechnol.*** 151: 295-302.

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.

Kaewmungkun, K., Srirattana, K., Panyawai, K., Sripunya, N., Liang, Y., Sangsritavong, S. and **Parnpai, R.*** 2013. Influence of growth factors on survival and development of swamp buffalo early antral follicle cultured *in vitro*. ***Buffalo Bulletin.*** 32: (Special Issue 2): 617-621.

Khamlor, T., Pongpiachan, P., **Parnpai, R.**, Punyawai, K., Sangsritavong. And Chokesajjawatee, N.* 2015. Bovine embryo sex determination by multiplex loop-mediated isothermal amplification. Theriogenology. 83: 891-896.

Kunkanjanawan, T., Noisa, P.* and **Parnpai, R*.** 2011. Modeling neurological disorders by human induced pluripotent stem cells. ***J. Biomed. Biotechnol.*** 350131.

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.

Liang, Y.Y., Somfai, T., Nagai, T. and **Parnpai, R.*** 2013. Vitrification of buffalo oocytes: Current status and perspectives. ***Buffalo Bulletin***. 32 (Special Issue 1): 196-203.

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.*** 65: 151-156.

Liang, Y., Rakwongrit, D., Phermthai, T., Somfai, T., Nagai, T. and **Parnpai, R**.* 2012. Cryopreservation of immature buffalo oocytes: Effects of cytochalasin B pretreatment on the efficiency of cryotop and solid surface vitrification methods. ***Anim. Sci. J.*** doi:10.1111/j.1740-0929.2012.01013.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.

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.

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.

Noisa, P.* and **Parnpai, R.** 2011. Technical challenges in the derivation of human pluripotent cells. ***Stem Cells Int.*** 907961.

Parnpai, R.*, Liang, Y.Y., Paul, A.K., Ngernsoungnern, A., Ngernsoungnern, P. and Ketudat-Cairns, M. 2014. Cryopreservation of buffalo oocytes. ***Thai J. Vet. Med*** 44 (Supplement 1): 119-123.

Parnpai, R.*, Srirattana, K., Imsoonthornruksa, S. and Ketudat-Cairns, M. 2011. Somatic cell cloning for livestock and endangered species. ***Thai J. Vet. Med Suppl.*** 41: 77-85.

Paul, A.K., Liang, Y.Y., Nagai, T. and **Parnpai, R.*** 2014. Blastocysts hatchability following oocytes and blastocyst vitrification. ***Thai J. Vet. Med*** 44 (Supplement 1): 237-240.

Paul, A.K., Liang, Y.Y., Nagai, T. and **Parnpai, R.*** 2014. In vitro development potentiality of expanded bovine blastocysts subsequent Cryotop vitrification. ***Thai J. Vet. Med.*** 44: 513-521.

Phongnimitr, T. Liang, Y., Srirattana, K., Panyawai, K., Sripunya, N., Treetampinich, C. and **Parnpai, R.*** 2013. Effects of L-carnitine supplemented in maturation medium on the maturation rate of swamp buffalo oocytes. ***Buffalo Bulletin***. 32: (Special Issue 2): 613-616.

Phongnimitr, T., Liang, Y.Y., Srirattana, K., Panyawai, K., Sripunya, N., Treetampinich, C. and **Parnpai, R.*** 2013. Effect of L-carnitine on maturation, cryo-tolerance and embryo developmental competence of bovine oocytes. ***Anim. Sci. J.*** 84: 719-725.

Punyawai, K., Anakkul, N., Srirattana, K., Aikawa, Y., Sangsritavong, S., Nagai, T., Imai K. and **Parnpai R.*** 2015. Comparison of Cryotop and micro volume air cooling methods for cryopreservation of bovine matured oocytes and blastocysts. ***J. Reprod. Dev.*** Accepted 29 May, 2015.

Punyawai, K., Sangsritavong, S., Liang, Y.Y., Sripunya, N. and **Parnpai, R.*** 2014. Effect of thawing solutions on survival of bovine blastocyst using in-straw vitrificationn method. ***Thai J. Vet. Med*** 44 (Supplement 1): 241-243.

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.

Putkhao, K., Yuksel, A., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S.* 2013. Cryopreservation of transgenic Huntington's disease rhesus macaque sperm: A case report. ***Cloning and Transgenesis***. doi.org/10.4172/2168-9849.1000116

Rattanasuk, S., **Parnpai, R.** and Ketudat-Cairns, M*. 2011. Multiplex polymerase chain reaction used for bovine embryo sex determination. ***J. Reprod. Dev.*** 57: 539-542.

Sripunya, N., Liang, Y., Panyawai, K., Srirattana, K., Ngernsoungnern, A., Ngernsoungnern, P., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.*** 2014. Cytochalasin B efficiency in the cryopreservation of immature bovine oocytes by Cryotop and solid surface vitrification methods. ***Cryobiology*** 69: 496-499.

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., Ketudat-Cairns, M., 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.*** 60: 336-341.

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.

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: 236-243.

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: 248-257.

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

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.*** 58: 323-329.

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.

Thumanu, K., Tanthanuch, W., Ye, D., Sangmalee, A., Lorthongpanich, C., **Parnpai, R*.** and Heraud, P*. 2011. Spectroscopic signature of mouse embryonic stem cells derived hepatocytes using Synchrotron FTIR microspectroscopy. ***J. Biomed. Optics.*** 16: 057005-1.

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.

Yoisungnern, T., Choi, Y.J., Woong, H.J., Kang, M.H., Das, J., Gurunathan, S., Kwon D.N., Cho, S.G., Park, C., Kyung Chang, W., Chang, B.S., **Parnpai R.** and Kim, J.H.* 2015. Internalization of silver nanoparticles into mouse spermatozoa results in poor fertilization and compromised embryo development. ***Sci. Rep.*** doi: 10.1038/srep11170.

Yoisungnern, T., Das, J., Choi, Y.J., **Parnpai, R.** and Kim, J.H.* 2015. Effect of hexavalent chromium-treated sperm on in vitro fertilization and embryo development. ***Toxicol. Ind. Health***. pii: 0748233715579805.

9. การเขียนตำรา-หนังสือ

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

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

รังสรรค์ พาลพ่าย สรรเพชญ โสภณ มณีวรรณ กมลพัฒนะ กำธร มีบำรุง กิติยา ศรีศักดิ์วัฒนะ ประชุม อินทรโชติ ธวัชชัย สุวรรณกำจาย ประภากร วัฒโนดร พฤฒิ เกิดชูชื่น และ สมสวัสดิ์ ตันตระกูล. 2530. ผลสำเร็จการย้ายฝากตัวอ่อนโคนมลูกผสมในประเทศไทย. มณีวรรณ กมลพัฒนะ (บรรณาธิการ), *การปฏิสนธิในหลอดแก้ว และการย้ายฝากตัวอ่อน* โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, หน้า 273-288.

รังสรรค์ พาลพ่าย 2549. เทคโนโลยีการโคลนนิ่งโค. เอกสารคำสอนวิชา 304 553 Animal Cloning Technology และ 304 554 Selected Research in Animal Cloning Technology. 389 หน้า.

Parnpai, R., Minami, N. and Yamada, M. 1998. Current status of research for the establishment of bovine embryonic stem (ES) cells. In: Miyamoto, H. and Manabe, N. (eds.), Reproductive Biology Update: Novel Tools for Assessment of Environmental Toxicity. Nakanishi Printing, Kyoto, pp. 383-388.

10. งานวิจัยที่ประสบความสำเร็จแล้ว

10.1. ประสบผลสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนโคนม ได้ลูกแฝดเพศเมียเกิดมาเมื่อวันที่ 8 กันยายน 2529 นับเป็นรายแรกของประเทศไทย

10.2. ประสบผลสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนแพะ ได้ลูกแพะเกิดมาเมื่อปี 2532 นับเป็นรายแรกของประเทศไทย

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

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

10.5. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งโคบราห์มันเพศผู้ชื่อ “ตูมตาม” โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งจากเซลล์ต้นแบบตัวเดียวกัน 7 ตัวเกิดมา ลูกโคทุกตัวผ่านการตรวจสอบดีเอ็นเอแล้วพบว่ามีดีเอ็นเอเหมือน“ตูมตาม”เจ้าของเซลล์ต้นแบบทุกประการ และมีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงดีมาก

10.6. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งแมวพันธุ์โคราช โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกแมวโคลนนิ่งเกิดมา 2 ตัว รายแรกของประเทศไทย เมื่อวันที่ 25 ธันวาคม 2549

10.7. ประสบความสำเร็จในการโคลนนิ่งแมวบ้าน โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกแมวคลอดออกมามีชีวิต 2 ตัว ในวันที่ 25 ธันวาคม 2549 แต่ลูกแมวเสียชีวิต 2 และ 5 วัน หลังคลอด ขณะนี้ยังคงทำโคลนนิ่งแมวบ้าน และแมวป่า อย่างต่อเนื่อง

10.8. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งโคพันธุ์ขาวลำพูนเพศผู้ชื่อ “อินทนนท์” โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งเกิดมารายแรกของประเทศไทย เมื่อวันที่ 21 มี.ค. 2550 ได้รับการตั้งชื่อว่า “ขาวมงคล”

10.9. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งแพะพันธุ์บอร์เพศผู้ โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกแพะโคลนนิ่งเกิดมารายแรกของประเทศไทย เมื่อวันที่ 27 พ.ค. 2550 1 ตัว และ วันที่ 4 ก.ค. 2550 1 ตัว

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

11. รางวัลที่ได้รับ

11.1. จากผลงานวิจัยการย้ายฝากตัวอ่อนโคนมจนประสบผลสำเร็จ ได้ลูกแฝดโคนมเกิดมาครั้งแรกของประเทศไทยเมื่อวันที่ 8 กันยายน 2529 ทำให้งานวิจัยนี้ถูกยกย่องให้เป็น 1 ใน 10 ข่าวเด่นของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11.2. รางวัลผลงานวิจัยดี (อันดับ 1 สาขาสัตว์) ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง “ความเป็นไปได้ในการผลิตโคพันธุ์ดีด้วยเทคโนโลยีโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสเป็นเซลล์ต้นแบบ” ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 พ.ศ. 2543

11.3. รางวัลผลงานวิจัยดี สาขาวิทยาศาสตร์ ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง “การทดสอบค่ากระแสไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการทำโคลนนิ่งตัวอ่อนแมวโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ” ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 พ.ศ. 2546

11.4. รางวัลนักวิจัยดีเด่น จากสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย ได้รับเชิญเป็นผู้ปาฐกถาอายิโน๊ะโมะโต๊ะ เรื่อง “Somatic cell cloning in bovine using ear fibroblast as donor cells” ในการประชุมประจำปีของสมาคมปี พ.ศ. 2547

11.5. รางวัลผลงานวิจัยดี (อันดับ 1 สาขาสัตว์) ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง “การใช้เทคโนโลยีโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดี” ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42 พ.ศ. 2547

11.6. รางวัลบุคลากรสายวิชาการที่มีผลงานดีเด่นด้านการวิจัย ประจำปี 2548 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

11.7. รางวัลแทนคุณแผ่นดิน สาขาวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2550 จากเครือเดอะเนชั่น

11.8. รางวัลผลงานวิจัยดี (อันดับ 1 สาขาสัตว์) ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง “การอนุรักษ์โคพันธุ์ขาวลำพูนโดยการทำโคลนนิ่ง” ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46 พ.ศ. 2551

11.9. รางวัลบุคลากรสายวิชาการที่มีผลงานดีเด่นด้านบริการวิชาการ ประจำปี 2558 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

12. การจดสิทธิบัตร

12.1. รังสรรค์ พาลพ่าย วิศิษฐิพร สุขสมบัติ อาวุธ อินทรชื่น อุดมวิทย์ มณีวรรณ คมสัน ภายยเดช แสงเพ็ชร งอนชัยภูมิ ป้องภัยรี มีสมบัติ สมิง เติมพรมราช “อุปกรณ์ควบคุมการเคลื่อนที่ก้านสูบของไมโครไซริงท์” ยื่นคำขอเมื่อวันที่ 11 มิถุนายน 2547 ได้รับสิทธิบัตรเมื่อเดือน เมษายน 2550

12.2. รังสรรค์ พาลพ่าย วิศิษฐิพร สุขสมบัติ อาวุธ อินทรชื่น อุดมวิทย์ มณีวรรณ คมสัน ภายยเดช แสงเพ็ชร งอนชัยภูมิ ป้องภัยรี มีสมบัติ สมิง เติมพรมราช ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ วิชัย ศรีสุรักษ์ “เครื่องเชื่อมเซลล์ด้วยไฟฟ้ากระแสตรง” ยื่นคำขอเมื่อวันที่ 11 มิถุนายน 2547

12.3. สุรชัย รัตนสุข รังสรรค์ พาลพ่าย มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ “ผลิตภัณฑ์โมโนโคลนัลแอนติบอดีต่ออสุจิเพศผู้ของโค และกระบวนการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่ออสุจิเพศผู้ของโคดังกล่าว” ยื่นคำขอเมื่อวันที่ 27 กรกฎาคม 2555

12.4. สุรชัย รัตนสุข รังสรรค์ พาลพ่าย มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ “กระบวนการแยกเพศอสุจิโคด้วยโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่ออสุจิเพศผู้ของโค และการใช้อสุจิที่ผ่านกระบวนการดังกล่าวในการปฏิสนธิในหลอดแก้ว ” ยื่นคำขอเมื่อวันที่ 27 กรกฎาคม 2555

12.5. รังสรรค์ พาลพ่าย ศิวัช สังศรีทวงษ์ กาญจนา ปัญญาไว ภาชนะบรรจุตัวอ่อนแช่แข็งด้วยวิธีลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วที่มีการเจือจางสารแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและการใช้ภาชนะบรรจุดังกล่าว เลขทะเบียน 9367 อนุมัติวันที่ 28 พ.ย. 2557

ประวัติผู้ร่วมวิจัย

รศ.ดร. มารินา เกตุทัต คาร์นส์

1. ชื่อ (ไทย) รศ.ดร. มารินา เกตุทัต คาร์นส์

   (อังกฤษ) Assistant Professor Dr. Mariena Ketudat Cairns

2. บัตรประจำตัวประชาชนเลขที่ 3 1014 01120 08 7

3. ตำแหน่งบริหาร หัวหน้าสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

   ตำแหน่งวิชาการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่สังกัด สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักเทคโนโลยีเกษตร

   มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

   สถานที่ติดต่อ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักเทคโนโลยีเกษตร

   มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

   เลขที่ 111 ถ. มหาวิทยาลัย อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000

   โทรศัพท์ 044-224-355

   โทรสาร 044-224-150

   E-mail: ketudat@g.sut.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

   5.1. ปริญญาตรี สาขาวิชา ชีววิทยา ปีที่จบ 2531

   สถาบัน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ประเทศ ไทย

   5.2. ปริญญาเอก สาขาวิชาชีวเคมี ปีที่จบ 2538

   สถาบัน University of California, San Diego ประเทศ สหรัฐอเมริกา

1. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญ/สนใจพิเศษ

   Molecular Biology, Molecular Genetics, Recombinant Protein production

2. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย เป็นต้น

   7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย: –

   7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย:

   7.2.1 Production of Tilapia Transglutaminase, หัวหน้าโครงการ

   7.2.2 Expression of β-glucosidase from Thai Plants in *Pichia pastoris,* หัวหน้าโครงการ

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว:

7.3.1 Functional Analysis of the Maize bZIP Protein Opaque-2, ผู้ร่วมวิจัย NIH, USA แล้วเสร็จ 1994

7.3.2 Purification of the Enzyme Taq DNA Polymerase หัวหน้าโครงการ NSTDA แล้วเสร็จ 1998

7.3.3 Tilapia Sex Chromosome Identification Using DNA Probe, หัวหน้าโครงการ NSTDA แล้วเสร็จ 2000

7.3.4 Clonal Selection of Sweet Bamboo for Commercial and Industrial Uses, ผู้ร่วมวิจัย แล้วเสร็จ 2002

7.3.5 Molecular identification of Dendrocalamus asper from SUT farm, หัวหน้าโครงการ NRCT แล้วเสร็จ 2003

7.3.6 Genetic, Mophology and Behavior Characterization in Thai Native Fowl, หัวหน้าโครงการ CP 2004

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

Singhapol, C. and Ketudat-Cairns, M. (2003) Microsarellite Polymorphism in Thai Native Fowl (*Gallus gallus domesticus*) Proceeding of the 10th Tri-University International Joint Seminar & Symposium 2003, Role of Asia in the World, Oct. 18-21 Mie Univ., Tsu, Mie, Japan

Chumnarnsilpa, S., Boonkerd, N. and Ketudat-Cairns, M. (2003) (in preparation) Growth Kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* K1-V1116 and Killer toxin production in Winemaking Srilunchang, K. and Ketudat-Cairns, M. (2003) (in preparation) Genetic relationship and molecular marker identification of *Dendrocalamus asper* in Thailand.

Charoenrat, T. and Ketudat-Cairns (2003) Influence of pH on Recombinant β-glucosidase Production by *Pichia pastoris* Poster presentation BioThailand 2003 Technology for Life 17-20 July, Pattaya, Thailand

Loonchanta, A. and Ketudat-Cairns (2003) Primer Design for Amplification of Transglutaminase Gene from Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Poster presentation BioThailand 2003 Technology for Life 17-20 July, Pattaya, Thailand

Singhapol, C. and Ketudat-Cairns, M. (2003) Microsarellite Polymorphism in Thai Native Fowl (*Gallus gallus domesticus*).. Poster presentation BioThailand 2003 Technology for Life 17-20 July, Pattaya, Thailand

Loonchanta, A., Chumnarnsilpa S., and Ketudat-Cairns, M. (2002) Comparison of recombinant β-glucosidase production by *Pichia pastoris* in stirred and air-lift bioreactor. Proceeding the 14th annual meeting of Thai Society for Biotechnology 13-15 Nov. Khonkan Thailand (Oral presentation)

Srilunchang, K. and Ketudat-Cairns, M. (2002) The study of genetic relationship and molecular marker identification of SUT *Dendrocalamus asper* Proceeding the 14th annual meeting of Thai Society for Biotechnology 13-15 Nov. Khonkan Thailand (poster presentation)

Manatrinon S., Na Lampang P., Likitdecharote B., Phalaraksh K., Ketudat-Cairns M. and Duangjinda M. The Association of the Bovine Lymphocyte Antigen DRB3.2 (BoLA-DRB3.2) Alleles with Occurrence of Clinical Mastitis in Dairy Cattle Proceeding the 14th annual meeting of Thai Society for Biotechnology 13-15 Nov. Khonkan Thailand (Oral presentation)

Chumnarnsilpa, S., Ketudat-Cairns, M. and Boonkerd, N. (2001) Growth kinetic of *Saccharomyces cerevisiae* K1-V1116 and killer toxin production in wine making Poster presentation, Biothailand, , 7-10 Nov, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand

Srilunchang, K. and Ketudat-Cairns, M. (2001) The study of genetic relationship and molecular marker identification of SUT *Dendrocalamus asper* Poster presentation, Biothailand, 7-10 Nov, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand

Srilunchang, K., Khumlert, R. and Ketudat-Cairns, M. (2001) The study of genetic relationship and molecular marker identification of SUT *Dendrocalamus asper*. Poster presentation, Second Graduate conference, Mahidol University, Bangkok

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

Ngamjun, P., Teaumroong, N., Boonkerd, N., and Ketudat-Cairns, M. (2000). Tilapia sex chromosome identification DNA probe. First National Symposium on Grad-Research Chiang Mai University 10-11 June 2000, P206-211.

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)

Ngamjan, P., Boonanantanasarn, S. and Ketudat-Cairns, M. (1999) Tilapia Sex Chromosome Identification using DNA Probe. Poster presentation, The 5th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference, Phuket, Thailand

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 Post-Harvest Handling System in Nakhon Ratchasima Province. Suranaree J. Sci Technol 5:95-100

Ketudat-Cairns, M. Boonanantanasarn, S. and Ngamjan, P. (1998) Paper presentation The Development of Tilapia Sex chromosome Identification System, Biotech forum, Biotechnology for Aquaculture National Science and Technology Development Agency, Bangkok Thailand.

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 Post-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* 4:701-709

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

7.4.1 Production of Tilapia Transglutaminase, หัวหน้าโครงการ

7.4.2 Expression of beta-glucosidase from Thai Plants in *Pichia pastoris*, หัวหน้าโครงการ