Executive Summary

องค์ความรู้ใหม่ที่เป็นพื้นฐานต่อการพัฒนา ปี 2550

(1 กันยายน 2550 – 31 สิงหาคม 2553)

ชื่อโครงการ การอนุรักษ์และเพิ่มจำนวนกระบือปลักพันธุ์ดีด้วยการผลิตตัวอ่อนในหลอดแก้วและการย้ายฝากนิวเคลียสด้วยเซลล์ร่างกาย

Conservation and multiplication of swamp buffalo with exotic genetics using in vitro embryo production and somatic cell nuclear transfer

ผู้วิจัยหลัก นายรังสรรค์ พาลพ่าย

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย นางทัศนีย์ เพิ่มไทย

ภาควิชาสูตินรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล

มหาวิทยาลัยมหิดล

ผลงานวิจัยที่ทำได้

1. ทำการทดลอง intracytoplasmic sperm injection (ICSI) เข้าในไข่สุกกระบือปลัก โดยทดสอบวิธีการกระตุ้นที่เหมาะสมสำหรับไข่กระบือปลักที่ผ่านการทำ ICSI เริ่มต้นโดยเก็บรังไข่กระบือปลักจากโรงฆ่าสัตว์แล้วทำการดูดไข่อ่อนออกจากรังไข่มาเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วนาน 21 ชั่วโมง แล้วคัดเลือกไข่ที่สุกแล้ว (มี 1st PB) มาทำการทดลอง เริ่มโดยทำการตรวจสอบการเกิด 2nd PB หลังจากกระตุ้นด้วยสารเคมีสอง ชนิดคือ 5 μM ionomycin (Io) หรือ 7% ethanol (EtOH) ที่ 3 6 และ 9 ชั่วโมงหลังทำ ICSI แล้วนำไข่ไปตรวจสอบการเกิดเกิด 2nd PB พบว่า ที่ 3 ชั่วโมงหลังทำ ICSI มีการเกิด 2nd PB สูงที่สุด และในกลุ่มที่กระตุ้นด้วย EtOH มี 2nd PB (68%) สูงกว่ากลุ่มที่กระตุ้นด้วย Io (46%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คัดเลือกไข่ที่มี 2nd PB ไปเลี้ยงในน้ำยาที่มี 1.9 mM 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) นาน 3 ชั่วโมง หรือ 10 μg/mL cychloheximide (CHX) นาน 5 ชั่วโมง แล้วนำไปเลี้ยงต่อในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว หลังจากทำ ICSI 18 ชั่วโมงนำไข่ไปย้อมดูการเกิด pronucleus พบว่าอัตราไข่มี male และ female pronuclei ในกลุ่ม EtOH ร่วมกับ CHX (EtOH+CHX) (62%) สูงกว่ากลุ่ม Io+CHX (42%) และ EtOH+6-DMAP (48%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่กลุ่ม Io+6-DMAP ให้ผลปานกลาง (58%) นำไข่ที่ผ่านการทำ ICSI และกระตุ้นแล้วมาเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa+0.3% BSA ในสัดส่วน 10-20 ใบ/100 μL ที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้ บรรยากาศที่มี 5% O_2, 5% CO_2 และ 90% N_2 นาน 2 วัน แล้วคัดเลือกตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ ไปเลี้ยงแบบ co-culture กับเซลล์บุท่อนำไข่โค ในน้ำยา mSOFaa+0.3% BSA ในสัดส่วน 10ใบ/100 μL แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2

นาน 5 วัน เปลี่ยนน้ำยาทุกๆวัน พร้อมทั้งบันทึกการเจริญเติบโตของตัวอ่อน ซึ่งพบว่าอัตราตัวอ่อนเจริญถึงระยะบลาสโตซีสสูงสุดได้จากกลุ่ม Io+6-DMAP (29%) และ EtOH+CHX (24%) ซึ่งสูงกว่ากลุ่ม Io+CHX (6%) and EtOH+6-DMAP (17%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นด้วย Io ร่วมกับ 6-DMAP และ EtOH ร่วมกับ CHX ทำให้ไข่กระบือปลักที่ผ่านการทำ ICSI มีการแบ่งตัวและเจริญถึงระยะบลาสโตซีสได้สูงที่สุด

2. ทำการทดลองเพื่อตรวจสอบผลของเซลล์ต้นแบบ 4 ชนิดเพื่อทำโคลนนิ่งโคและกระบือปลัก ได้แก่ เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหู เซลล์ไฟโบรบลาสจากลูกอ่อน เซลล์แกรนูโลซา และเซลล์คิวมูลัส เพื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญของตัวอ่อนโคลนโคและกระบือปลัก ผลิตตัวอ่อนโคลนโคและกระบือปลักโดยการเก็บเซลล์ต้นแบบ 3 ชนิดคือเซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหู เซลล์ไฟโบรบลาสจากลูกอ่อน และเซลล์แกรนูโลซา มาเลี้ยงให้มีปริมาณมากๆจนถึง passage 4 แล้วแช่แข็งเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว ส่วนเซลล์คิวมูลัสจะเก็บสดจากไข่ที่ผ่านการเลี้ยงให้สุกในหลอดแก้ว เก็บรังไข่โคและกระบือปลักจากโรงฆ่าสัตว์ แล้วนำมาเจาะดูดไข่อ่อนออกมาเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วนาน 22 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกไข่สุกมาดูดนิวเคลียสออก แล้วเชื่อมเซลล์ต้นแบบกับไข่ที่ดูดนิวเคลียสออกแล้วด้วยกระแสไฟฟ้า นำตัวอ่อนโคลนและไข่สุกที่ไม่ได้ดูดนิวเคลียสออกไปกระตุ้นแบบ parthenogenetic activatiom (PA) โดยนำไปไว้น้ำยาที่มี 7% ethanol ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที และเลี้ยงในน้ำยาที่มี 10 μg/mL cycloheximide และ 1.25 μg/mL cytochalasin D ในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5 °C นาน 5 ชั่วโมง และเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa+0.3% BSA ในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5 °C นาน 7 วัน เพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโตถึงระยะบลาสโตซีส ใช้วิธี differential staining ตรวจสอบจำนวนเซลล์ trophectoderm (TE) และ inner cell mass (ICM) และสัดส่วนของ ICM ในตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเพื่อประเมินคุณภาพของตัวอ่อน จากการทดลองพบว่าอัตราการเชื่อมของเซลล์คิวมูลัสกับไข่ที่ดูดนิวเคลียสออกแล้วต่ำกว่าเซลล์ต้นแบบชนิดอื่นทั้งในโคและกระบืออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อัตราการแบ่งตัวและตัวอ่อนเจริญถึงระยะ 8 เซลล์ มอรูลา และบลาสโตซีสของตัวอ่อนโคลนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติภายในสปีชีส์เดียวกัน อย่างไรก็ตามการแบ่งตัวของตัวอ่อนโคลนโคที่ได้จากเซลล์ไฟโบรบลาสจากลูกอ่อนมีอัตราสูงกว่าตัวอ่อนโค PA และตัวอ่อนกระบือโคลนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตัวอ่อนโคลนโคเจริญถึงระยะบลาสโตซีสยกเว้นที่ได้จากเซลล์คิวมูลัสมีอัตราสูงกว่าตัวอ่อนโคลนกระบืออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในการทำโคลนนิ่งกระบือ ตัวอ่อนที่ได้จากเซลล์คิวมูลัสเพียงชนิดเดียวที่มีอัตราการเจริญถึงระยะบลาสโตซีสสูงกว่าตัวอ่อน PA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในทางตรงกันข้ามตัวอ่อนโคลนโคจากเซลล์ต้นแบบทุกชนิดเจริญถึงระยะบลาสโตซีสสูงกว่าตัวอ่อนโค PA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สัดส่วนของ ICM ระหว่างตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้จากเซลล์ต้นแบบทุกชนิดไม่มีความแตกต่างกันของทั้งสองสปีชีส์ การทดลองนี้สรุปได้ว่าเซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหู เซลล์ไฟโบรบลาสจากลูกอ่อน เซลล์แกรนูโลซา และเซลล์คิวมูลัส ที่ใช้ในการโคลนนิ่งโคและกระบือมีศักยภาพในการสนับสนุนการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซีสได้เท่าเทียมกันโดยมีคุณภาพตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสไม่แตกต่างกัน

3. ทำการทดลองเพื่อตรวจสอบศักยภาพของไข่สุกกระบือปลักระยะ metaphase II (MII) ที่แช่แข็งโดยวิธี vitrification และทำละลาย เจริญถึงระยะบลาสโตซีสหลังจากทำ pharthenogenetic activation (PA) หรือ

intracytoplasmic sperm injection (ICSI) การทดลองนี้แบ่งออกเป็น 3 การทดลองย่อย ในการทดลองที่ 1 เก็บรังไข่กระบือจากโรงฆ่าสัตว์ แล้วนำมาเจาะดูดไข่อ่อนออกมาเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วนาน 21 ชั่วโมง แล้วคัดเลือกไข่สุก (มี 1st PB) เข้าทำการทดลอง โดยทำการตรวจสอบผลของระยะเวลาที่ไข่อยู่ใน cryoprotectant (CPA) ต่อการเจริญหลังจากทำ PA นำไข่ไปไว้ในน้ำยาที่มี 20% DMSO + 20% EG + 0.5 M sucrose นาน 30 วินาที 45 วินาที หรือ 60 วินาที (กลุ่ม1min+30s 1min+45s และ 1min+60s ตามลำดับ) หลังจากนั้นนำไข่ไปไว้ในน้ำยาทำละลาย (TCM199 HEPES + 20% FBS และ0.5M sucrose) นาน 5 นาที แล้วล้างในน้ำยา TCM199 HEPES + 20% FBS นาน 5 นาที ใช้ไข่สุกที่ไม่ถูก CPA เป็นกลุ่มควบคุม อัตราการมีชีวิตรอดของไข่หลังจากย้อมดูด้วย fluorescein diacetate (FDA) เป็น 100% ในทุกกลุ่ม อัตราการเจริญถึงระยะบลาสโตซีสหลังจากทำ PA ระหว่างกลุ่ม 1min+30s (16%) และกลุ่มควบคุม (26%) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่สูงกว่ากลุ่ม 1min+45s (10%) และ 1min+60s (2%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในการทดลองที่ 2 ทำการทดสอบผลของระยะเวลาที่ไข่อยู่ใน CPA สองกลุ่มคือ 1min+30s และ1min+45s แล้วนำไข่ไปแช่แข็งโดยวิธี Microdrop vitrification เพื่อดูอัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังจากทำ PA อัตราการมีชีวิตรอดของไข่แช่แข็งในกลุ่ม 1min+30s 1min+45s และกลุ่มควบคุม (ไม่ถูก CPA) ซึ่งได้ผลไม่แตกต่างกัน (97% 95% และ 100% ตามลำดับ) การเจริญถึงระยะ บลาสโตซีสของไข่ที่มีชีวิตรอดในกลุ่มแช่แข็ง 1min+30s (8%) สูงกว่ากลุ่ม 1min+45s (4%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (26%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในการทดลองที่ 3 ทำการทดสอบผลของระยะเวลาที่ไข่อยู่ใน CPA สองกลุ่มคือ 1min+30s และ1min+45s แล้วนำไข่ไปแช่แข็งโดยวิธี Microdrop vitrification เพื่อดูอัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังจากทำ ICSI อัตราการมีชีวิตรอดของไข่แช่แข็งในกลุ่ม 1min+30s 1min+45s และกลุ่มควบคุมไม่แตกต่างกัน (96% 91% และ 100% ตามลำดับ) หลังจากทำ ICSI จะทำการกระตุ้นไข่ และคัดเลือกไข่ที่มี 2nd PB ไปเลี้ยงในหลอดแก้วนาน 7 วัน การเจริญถึงระยะบลาสโตซีสของไข่แช่แข็งกลุ่ม 1min+30s (11%) สูงกว่ากลุ่ม 1min+45s (7%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (23%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การทดลองนี้สรุปได้ว่าไข่แช่แข็งโดยวิธี Microdrop vitrification กลุ่ม 1min+30s ให้อัตรา ตัวอ่อนเจริญถึงระยะบลาสโตซีสสูงสุดหลังการทำ PA และ ICSI

4. ทำการทดลองเพื่อตรวจสอบผลของน้ำยา vitrification สองชนิดและวิธีทำ vitrification สองชนิดต่ออัตราการมีชีวิตรอดของไข่สุกกระบือปลัก และทำการตรวจสอบอัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังจากทำ intracytoplasmic sperm injection (ICSI) เก็บรังไข่กระบือปลักจากโรงฆ่าสัตว์แล้วทำการดูดไข่อ่อนออกจากรังไข่มาเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วนาน 21 ชั่วโมง แล้วคัดเลือกไข่ที่สุกแล้ว (มี 1st PB) มาแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มเพื่อแช่แข็งโดยใช้ 1) วิธี Cryotop ร่วมกับน้ำยา VA (10% DMSO+10% EG นาน 1 นาที และนำไปไว้ใน 20% DMSO+20%EG+0.5M sucrose นาน 30 วินาที; Cryotop+VA), 2) วิธี Cryotop ร่วมกับน้ำยา VB (4% EG นาน 12-15 นาที และนำไปไว้ใน 35% EG+5% PVP และ 0.4 M trehalose นาน 30 วินาที; Cryotop+VB), 3) วิธี Microdrop ร่วมกับน้ำยา VA (Microdrop+VA), 4) วิธี Microdrop ร่วมกับน้ำยา VB (Microdrop+VB), 5) กลุ่มควบคุมที่ย้อมด้วย fluorescein diacetate (FDA) (control), 6) กลุ่มควบคุมที่ไม่ย้อม FDA (fresh control) ทำการตรวจสอบอัตราการมีชีวิตรอดของไข่ด้วย FDA แล้วคัดเลือกไข่ที่มีชีวิตรอดไปทำ

ICSI อัตราไข่มีชีวิตรอดในน้ำยา VA (Microdrop+VA: 93% และ Cryotop+VA: 97%) สูงกว่าน้ำยา VB (Microdrop+VB: 79%, และ Cryotop+VB: 81%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ต่ำกว่ากลุ่ม control (100%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อัตราการเกิด second polar body (2^{nd} PB) และตัวอ่อนเจริญถึงระยะบลาสโตซีสในกลุ่ม control และ fresh control สูงกว่ากลุ่มที่แช่แข็ง แต่ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่แช่แข็งทั้งอัตราการเกิด 2^{nd} PB และตัวอ่อนเจริญถึงระยะบลาสโตซีส การทดลองนี้สรุปได้ว่าน้ำยา VA ให้อัตราไข่มีชีวิตรอดสูงกว่าน้ำยา VB การแช่แข็งโดยวิธี Cryotop และ Microdrop vitrification ให้ผลสำเร็จเท่าเทียมกัน

5. ทำการทดลองเพื่อตรวจสอบผลของน้ำยา vitrification สองชนิดและวิธีทำ vitrification สองชนิดต่ออัตราการมีชีวิตรอดของไข่สุกกระบือปลัก และอัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังจากทำ *in vitro* fertilization (IVF) เก็บรังไข่กระบือปลักจากโรงฆ่าสัตว์แล้วทำการดูดไข่อ่อนออกจากรังไข่มาเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงไข่ให้สุกในหลอดแก้วนาน 21 ชั่วโมง แล้วคัดเลือกไข่ที่สุกแล้ว (มี 1^{st} PB) มาแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มเพื่อแช่แข็งโดยใช้ 1) วิธี Cryotop ร่วมกับน้ำยา VA (10% DMSO+10% EG นาน 1 นาที และนำไปไว้ใน 20% DMSO+20%EG+0.5M sucrose นาน 30 วินาที; Cryotop+VA), 2) วิธี Cryotop ร่วมกับน้ำยา VB (4% EG นาน 12-15 นาที และนำไปไว้ใน 35% EG+5% PVP และ 0.4 M trehalose นาน 30 วินาที; Cryotop+VB), 3) วิธี SSV ร่วมกับน้ำยา VA (SSV+VA), 4) วิธี SSV ร่วมกับน้ำยา VB (SSV+VB), 5) กลุ่มควบคุมที่ไม่ย้อม FDA (fresh control) ทำการตรวจสอบอัตราการมีชีวิตรอดของไข่ด้วย FDA แล้วคัดเลือกไข่ที่มีชีวิตรอดไปทำ IVF อัตราการมีชีวิตรอดของไข่ที่แช่แข็งในกลุ่ม Cryotop+VA (92%) สูงกว่ากลุ่ม SSV+VA (86%), Cryotop+VB (76%) และ SSV+VB (71%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามยังคงต่ำกว่ากลุ่ม fresh control (100%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซีสของไข่แช่แข็งในกลุ่ม Cryotop+VA (9%) สูงกว่ากลุ่ม Cryotop+VB (3%), SSV+VA (5%) และ SSV+VB (1%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ยังคงต่ำกว่ากลุ่ม fresh control (19%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าการแช่แข็งโดยวิธี Cryotop vitrification ร่วมกับการใช้น้ำยา VA ให้อัตราไข่มีชีวิตรอดและได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสสูงสุด

6.ทำการทดลองเพื่อศึกษาผลของโกรทแฟ็กเตอร์ที่มีต่อการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลขนาดเล็กภายนอกร่างกายในกระบือปลัก แบ่งฟอลลิเคิลออกเป็น 3 กลุ่ม ตามขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง กลุ่มที่ 1 ขนาด 200-399 ไมโครเมตร กลุ่มที่ 2 ขนาด 400-599 ไมโครเมตร และ กลุ่มที่ 3 ขนาด 600-799 ไมโครเมตร การทดลองแบ่งออกเป็น 8 กลุ่ม คือ ทรีทเม้นท์ 1 ไม่มีการเติมโกรทแฟ็กเตอร์ (กลุ่มควบคุม), ทรีทเม้นท์ 2 เติม 50 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF), ทรีทเม้นท์ 3 เติม 100 ng/mL insulin-like growth factor-I (IGF-I), ทรีทเม้นท์ 4 เติม 50 ng/mL epidermal growth factor (EGF), ทรีทเม้นท์ 5 เติม 50 ng/mL bFGF+100 ng/mL IGF-I, ทรีทเม้นท์ 6 เติม 50 ng/mL bFGF+50 ng/mL EGF, ทรีทเม้นท์ 7 เติม 100 ng/mL IGF-I+50 ng/mL EGF และ ทรีทเม้นท์ 8 เติม 50 ng/mL bFGF+100 ng/mL IGF-I+50 ng/mL EGF การตรวจสอบการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลทำโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของฟอลลิเคิลในวันที่ 7 และ วันที่ 14 ของการเลี้ยง ผลการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของฟอลลิเคิลในวันที่ 7 และ 14 พบว่าฟอลเคิลในกลุ่มที่ 1 ซึ่งเลี้ยงในน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ bFGF, IGF-I, bFGF+IGF-I, bFGF+EGF, IGF-I+EGF และ bFGF+IGF-I+EGF สามารถเพิ่มขนาดของ

เส้นผ่าศูนย์กลางของฟอลลิเคิลในวันที่ 7 ได้ แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ส่วนผลการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางในวันที่ 14 พบว่าฟอลลิเคิลที่เลี้ยงในน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ bFGF และ bFGF+IGF-I สามารถเพิ่มขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของฟอลลิเคิลได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ผลการวัดขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของฟอลลิเคิลในกลุ่มที่ 2 วันที่ 7 และ14 พบว่าฟอลลิเคิลที่เลี้ยงในน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ bFGF และ bFGF+IGF-I สามารถเพิ่มขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของฟอลลิเคิลได้มากกว่าฟอลลิเคิลที่เลี้ยงในทรีทเม้นท์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) การวัดอัตราการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลในกลุ่มที่ 3 วันที่ 7 พบว่าน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ bFGF IGF-I และ bFGF+IGF-I สามารถเพิ่มขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของฟอลลิเคิลได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) อย่างไรก็ตามผลการวัดอัตราการเจริญของฟอลลิเคิลในวันที่ 14 พบว่ามีเพียงน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ bFGF เท่านั้นที่สามารถเพิ่มขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของฟอลลิเคิลได้ (P<0.05) การศึกษาอัตราการอยู่รอดของไข่พบว่า โกรทแฟ็กเตอร์ bFGF มีอัตราการรอดชีวิตของไข่มากกว่า ทรีทเม้นท์อื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่าระยะเวลาในการเลี้ยงมีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของไข่ โดยฟอลลิเคิลในกลุ่มที่ 1 ต้องการระยะเวลาในการเลี้ยงมากกว่า 14 วัน ซึ่งเห็นได้จาก meiotic stage หยุดอยู่ที่ระยะ GV ฟอลลิเคิลในกลุ่มที่ 2 เหมาะสมกับการเลี้ยงในระยะเวลา 14 วัน โดยเห็นได้จาก meiotic stage ของไข่สามารถเจริญได้จนถึงระยะ MI ในขณะที่ฟอลลิเคิลในกลุ่มที่ 3 ต้องการระยะเวลาในการเลี้ยงน้อยกว่า 14 วัน โดยเห็นได้จากอัตราการมีชีวิตรอดของไข่มีน้อยมาก ซึ่งพบว่าไข่จำนวนมากตายเนื่องจากระยะเวลาในการเลี้ยงนานเกินไป จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโกรทแฟ็กเตอร์ bFGF, IGF-I และ bFGF+IGF-I ช่วยให้ฟอลลิเคิลมีขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางเพิ่มขึ้นแต่ในทางกลับกันโกรทแฟ็กเตอร์ EGF นั้นไม่ช่วยให้ฟอลลิเคิลมีขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางเพิ่มขึ้น และยังอาจส่งผลให้มีการยับยั้งการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลในกระบือปลักอีกด้วย

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

Output ที่ได้จากโครงการ

1. ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติที่มี impact factor 2 เรื่อง

1.1. Liang Y.Y., Ye, D.N., Laowtammathron, C., Phermthai, T., Nagai, T., and Parnpai, R. **2010.** 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.*** doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01636.x (IF = 1.606) **เอกสารแนบหมายเลข 1**

1.2. 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. (IF = 1.697) **เอกสารแนบหมายเลข 2**

1.3. Liang, Y., Phermthai, T., Nagai, T., Somfai, T. and Parnpai, R. 2010. *In vitro* development of vitrified buffalo oocytes following parthenogenetic activation and intracytoplasmic sperm injection.

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 2 ก.ค. 2555
เลขทะเบียน 246747
เลขเรียกหนังสือ

Theriogenology Submitted 21 September 2010; Revised and re-submitted 28 December 2010; Accepted 31 December 2010 (IF = 2.073) **เอกสารแนบหมายเลข 3**

2. Manuscript กำลังเขียนเพื่อส่งไปตีพิมพ์

2.1. Liang, Y., Phermthai, T., Nagai, T., Somfai, T. and Parnpai, R. 2011. Survival rates of matured buffalo oocytes after vitrification by Microdrop and Cryotop and subsequent embryos development after intracytoplasmic sperm injection. จะส่งไปตีพิมพ์ในวารสาร ***Anim. Reprod. Sci.*** (IF = 1.563) **เอกสารแนบหมายเลข 4**

2.2. Liang, Y., Phermthai, T., Nagai, T., Somfai, T. and Parnpai, R. 2011. Effect of SSV and Cryotop vitrification on subsequent development of in vitro matured swamp buffalo oocytes following in vitro fertilization. จะส่งไปตีพิมพ์ในวารสาร ***Theriogenology*** (IF = 2.073)

3. ส่งผลงานไปประชุมวิชาการในการประชุมระดับนานาชาติ 3 เรื่อง

3.1. Liang, Y., Phermthai, T., Nagai, T., Somfai, T. and **Parnpai, R.** 2010. Developmental rates of vitrified buffalo oocytes following parthenogenetic activation and intracytoplasmic sperm injection. Proceeding of The 9th World Buffalo Congress, 25-28 April, 2010, Buenos Aires, Argentina, p.850-857. **เอกสารแนบหมายเลข 5**

3.2. Liang Y. Y., Ye D. N., Laowtammathron C., Phermthai T., and Parnpai R. 2009. In vitro production of swamp buffalo embryos by intracytoplasmic sperm injection: effect of chemical activation treatments. Proceeding of the Annual Conference of International Embryo Transfer Society, 3-6 January, 2009, San Diego, USA, Published in ***Reprod. Fert. Dev.*** 21: 230. **เอกสารแนบหมายเลข 6**

3.3. Srirattana, K., Ketudat-Cairns, M., Phermthai, T., Takeda, K., Nagai T. and Parnpai, R. 2009. Somatic cell nuclear transfer in swamp buffalo. ***Proceeding of Buffalo Propagation Conference, 17 December, 2009, Tainan, Taiwan, RPC.*** **เอกสารแนบหมายเลข 7**

4. ส่งผลงานไปประชุมวิชาการในการประชุมระดับชาติ 3 เรื่อง

4.1. หยวนหยวน เหลียง และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2553. อัตราการอยู่รอดของไข่สุกกระบือปลักที่ผ่านการ vitrification ด้วยวิธี Microdrop และ Cryotop และการเจริญเติบโตของตัวอ่อนภายหลังการฉีดตัวอสุจิเข้าในไซโตพลาสซึม. ***เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 48 เล่มที่ 3 สาขาสัตวแพทยศาสตร์.*** กรุงเทพฯ, หน้า 95-102. **เอกสารแนบหมายเลข 8**

4.2. ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ กาญจนา ปัญญาไว ศิวัช สังข์ศรีทวงษ์ และ **รังสรรค์ พาลพ่าย.** 2553. ผลของโกรทแฟ็กเตอร์ต่อการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลขนาดเล็กภายนอกร่างกายในกระบือปลัก: การศึกษาเบื้องต้น. ***การประชุมวิชาการเกษตร ครั้งที่ 11 ประจำปี 2553 คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น***, หน้า 309-313. **เอกสารแนบหมายเลข 9**

4.3. หยวนหยวน เหลียง อนวัช แสงมาลี สุเมธ อิ่มสุนทรรักษา จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์ กนกวรรณ ศรีรัตนา นุชจรินทร์ ศรีปัญญา วันวิสาข์ ผิวสร้อย ขวัญฤดี แก้วมุงคุณ ชุติ เหล่าธรรมธร ดานา เย มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และ รังสรรค์ พาลพ่าย. 2552. ผลของการใช้สารเคมีกระตุ้นการแบ่งตัวต่อการพัฒนาของตัวอ่อนกระบือภายหลังการ ICSI. ***เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 47 เล่มที่ 3 สาขาสัตวแพทยศาสตร์.*** กรุงเทพฯ, หน้า 78-86. **เอกสารแนบหมายเลข 10**

5. รางวัลที่ได้รับซึ่งเป็นผลมาจากการทำวิจัยเรื่องนี้

5.1. รางวัลแทนคุณแผ่นดิน สาขาวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2550 จากเครือเดอะเนชั่น

6. การดำรงตำแหน่งในองค์กรด้านกระบือนานาชาติ

เมื่อเดือนตุลาคม 2552 ในการประชุม The 6th Asian Buffalo Congress (ABC) ณ ประเทศปากีสถาน หัวหน้าโครงการวิจัยได้รับการคัดเลือกให้ดำรงตำแหน่ง President of Asian Buffalo Association และเมื่อเดือนเมษายน 2553 ในการประชุม The 9th World Buffalo Congress ณ ประเทศอาร์เจนตินา หัวหน้าโครงการวิจัยได้รับการคัดเลือกให้ดำรงตำแหน่ง President of International Buffalo Federation (IBF) และในฐานะที่เป็น Standing Committee ของ IBF หัวหน้าโครงการวิจัยได้จัดทำแผนการเสนอตัวให้ประเทศไทยเป็นเจ้าภาพจัดการประชุม The 10th World Buffalo Congress และ The 7th Asian Buffalo Congress ณ ภูเก็ต ในเดือนพฤษภาคม 2556 ซึ่งได้รับการลงคะแนนจากสมาชิกให้เป็นเจ้าภาพจัดการประชุมดังกล่าวได้ ดังโปสเตอร์ประชาสัมพันธ์การประชุมที่แนบมาด้วย