

ผลของ Insulin – like growth factor I (IGF-I) ต่อการพัฒนาตัวอ่อนนอกร่างกายของโคลูกผสมบราห์มัน - พื้นเมืองไทย

Effect of insulin – like growth factor I (IGF-I) on embryo development in *In Vitro* embryo production of Thai native-brahman crossbred.

ชาญยุทธ แถมวัน¹ และ เทวินทร์ วงษ์พระลับ^{1*}
Chanyuth Thamwan¹ and Thevin Vongpralub^{1*}

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผล insulin – like growth factor I (IGF-I) ต่อการพัฒนาตัวอ่อนนอกร่างกายของโคลูกผสมบราห์มัน - พื้นเมืองไทยในน้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์ โดยเก็บรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์นำมาเลือกโอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัส (cumulus oocyte complex) สองชั้นขึ้นไป เลี้ยงในน้ำยา TCM-199 เสริม IGF-I ความเข้มข้น 0 (กลุ่มควบคุม), 50, 75 และ 100 ng/ml ฮอร์โมน FSH ความเข้มข้น 1 µg/ml ฮอร์โมน LH ความเข้มข้น 10 µg/ml และ ฮอร์โมน E₂ ความเข้มข้น 1 µg/ml หลังจากเลี้ยงโอโอไซต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเตรียมน้ำเชื้อด้วยการวิธีปั่นล้างอสุจิ ความเข้มข้นของอสุจิ 1×10^6 sperm/ml นำโอโอไซต์ไปปฏิสนธิในน้ำยา IVF-TALP ที่มี heparin 10 µg/ml เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากการปฏิสนธินำไซโกตเลี้ยงในน้ำยา KSOM ที่เสริม FSC 10% ที่อุณหภูมิ 39 °C ,CO₂ 5% การเสริม IGF-I ระดับความเข้มข้นที่ 50, 75, 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าให้ผลต่อร้อยละการแบ่งเซลล์หลังการปฏิสนธิ และ ร้อยละการเจริญของตัวอ่อนสู่ระยะบลาสโตซิสต์ในวันที่ 8 หลังการปฏิสนธิไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($p > 0.05$)

คำสำคัญ: การผลิตตัวอ่อนนอกร่างกาย, โคลูกผสมบราห์มัน - พื้นเมืองไทยและ insulin – like growth factor I (IGF-I)

Abstract: This experiment aimed to study effect of insulin – like growth factor I (IGF-I) during in vitro maturation of bovine oocytes on the subsequent development of embryo. Bovine ovaries were obtained from local abattoir and cumulus oocyte complex were collected. Group of oocytes were randomly placed in maturation medium supplement with 0 (control), 50, 75 and 100 ng/ml of IGF-I, FSH 1 µg/ml, LH 10 µg/ml and E₂ 1 µg/ml at 39 °C in 5% CO₂ in air. After 24 hrs of maturation, in vitro fertilization (IVF) was performed with swim-up technique under spermatozoa concentration of 1×10^6 sperm/ml in IVF-TALP with 10 µg/ml heparin. At 18 hrs post-insemination presumptive zygotes were transferred to KSOM media supplemented with 10% FCS. Zygotes were cultured at 39 °C in 5% CO₂ in air for 8 days. There were no significant difference in cleavage and blastocysts rate among treatments ($p > 0.05$)

Keywords: Insulin-like growth factor I (IGF-I), In vitro embryo production and Thai native-Brahman crossbred

¹ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

* Corresponding author: vthevi@kku.ac.th

บทนำ

โคพื้นเมืองไทยจัดอยู่ในกลุ่ม โคอินเดีย หรือ โคชีบู (*Zebu cattle*) ซึ่งเป็นโคที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมของประเทศไทย (ศรเทพ, 2540) จุดเด่นของโคพื้นเมืองคือ สามารถทนร้อน ทนต่อโรคและแมลง หากินเก่ง อัตราการให้ลูกสูง สามารถใช้ประโยชน์จากอาหารหยาบได้ดี ในปัจจุบันประชากรโคพื้นเมืองไทยได้ลดจำนวนลงเป็นลำดับอย่างน่าเป็นห่วง ทั้งนี้เนื่องจากมีการผสมข้ามระหว่างแม่โคพื้นเมืองไทยกับพ่อพันธุ์หรือน้ำเชื้อของโคต่างประเทศทั้งตระกูลอินเดียและตระกูลยุโรปซึ่งทำให้ได้ลูกผสมที่โตเร็วกว่าโคพื้นเมืองไทย จึงได้รับความนิยมจากเกษตรกร จากสถานการณ์ดังกล่าวอาจทำให้โคพื้นเมืองไทยสูญพันธุ์ไปในที่สุดอันส่งผลกระทบต่อความหลากหลายทางชีวภาพ (Biodiversity) ให้ลดลงดังนั้นจึงควรอนุรักษ์พันธุ์กรรมโคพื้นเมืองไทยไว้ การผลิตตัวอ่อนในหลอดแก้ว (In vitro production of embryo, IVP) เป็นเทคนิคหนึ่งที่สามารถนำมาเป็นแนวทางในการอนุรักษ์พันธุ์กรรมโคพื้นเมืองไทยได้ ซึ่งการเสริม IGF-I ในน้ำยา maturation จะส่งเสริมให้เกิดการแบ่งเซลล์แบบ meiosis และกระตุ้นการเกิด nuclear maturation ในโอโอไซต์ของโค (Sakaguchi et al., 2002; Hainaut et al., 1991) รวมทั้งสามารถเพิ่มสัดส่วนตัวอ่อนระยะ morula และ blastocyst (Herrler et al., 2003) ซึ่งในงานทดลองครั้งนี้ใช้หน่วยทดลองเป็นโอโอไซต์จากโคลูกผสมบราห์มัน – พื้นเมืองไทยเพื่อเป็นแนวทางนำไปใช้กับโคพื้นเมืองไทย ดังนั้นการศึกษาถึงผลของระดับความเข้มข้น IGF-I ที่เหมาะสมในการพัฒนาของโอโอไซต์เพื่อเพิ่มการพัฒนาของตัวอ่อนนอกร่างกายของโคพื้นเมืองไทย อันจะเป็นประโยชน์สำหรับการเพาะขยายพันธุ์โคพื้นเมืองไทย ซึ่งมีประโยชน์ทั้งในเชิงอนุรักษ์และอาจนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงการค้าต่อไป

วิธีการศึกษา

เก็บรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์ ล้างด้วยน้ำเกลือ 0.9 % นำมาที่ห้องปฏิบัติการภายใน 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นใช้ใบมีดผ่าตัดทำการตัดเฉือนรังไข่เป็นชิ้นบางๆที่บริเวณฟอลลิเคิล ขนาด 2-8 mm เพื่อเก็บโอโอไซต์ที่มีเซลล์คลุมล้อมรอบสองชั้นขึ้นไป (cumulus-oocyte complexes; COCs) แล้วนำมาล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ D-PBS (Mucci et al., 2006) การเลี้ยงโอโอไซต์ให้พัฒนานจนสมบูรณ์พร้อมปฏิสนธิ (in vitro maturation) โดยเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ ประกอบด้วย TCM-199 (Gibco, 12340), Fetal bovine serum (Gibco, 10270-106) 10%, FSH (Sigma, F2293-1VL) 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, LH (Sigma, L5269-1VL) 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, estradiol (sigma, E-4389) 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ penicillin-streptomycin (Gibco, 15140) 1 % โดยเสริม IGF-I ในระดับความเข้มข้น ดังนี้ 0 (กลุ่มควบคุม), 50, 75 และ 100 ng/ml ใช้แผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) 12 ซ้ำ จำนวนโอโอไซต์ 668 ใบ หลังจากนั้นนำโอโอไซต์ที่ได้ มาใส่จานพลาสติกกลมปลอดเชื้อที่ภายในบรรจุน้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์ตามแผนการทดลองดังกล่าวแล้วเทปิดด้วย mineral oil (Sigma, M-8410) นำเข้าตู้เพาะเลี้ยงคาร์บอนไดออกไซด์ (Shellab, model TC2323) ที่อุณหภูมิ 38.5 °C คาร์บอนไดออกไซด์ 5 % ความชื้นสัมพัทธ์ 99 % เพาะเลี้ยงไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การเตรียมอสุจิโดยนำน้ำเชื้อแช่แข็ง (frozen semen) ทำการปั่นล้างอสุจิในสารละลาย Tyrode's albumin lactate pyruvate (TALP) หลังจากนั้นนำโอโอไซต์จำนวน 20 – 25 ใบมาบ่มร่วมกับอสุจิความเข้มข้น 1×10^6 ตัวต่อมิลลิลิตร ในน้ำยา TALP-IVF ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปิดทับด้วย mineral oil แล้วบ่มในตู้เพาะเลี้ยงคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลานาน 18 ชั่วโมง ในการเพาะเลี้ยงตัวอ่อน (in vitro culture) หลังผ่านการปฏิสนธิ นอกร่างกาย (in vitro fertilization) นำ zygotes มาเพาะเลี้ยงในน้ำยา KSOM ผสม FCS 10% ร่วมกับเซลล์

ที่เลี้ยงซึ่งเป็นเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ (Mucci et al., 2006) แล้วนำเข้าสู่เพาะเลี้ยงคาร์บอนอินคิวเตอร์

การบันทึก และวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติวิเคราะห์ร้อยละการแบ่งเซลล์หลังปฏิสนธิ และร้อยละการเจริญของตัวอ่อนสู่ระยะบลาสโตซิสต์ด้วย ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของข้อมูลด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Statistical analysis system (SAS, 1985) ระยะเวลาดำเนินงาน ตั้งแต่ 1 มิถุนายน พ.ศ. 2552 ถึง 30 กรกฎาคม พ.ศ. 2553 สถานที่ทำการวิจัย ณ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การพัฒนาของตัวอ่อนนอกอวัยวะของโคลูกผสมบราห์มัน - พันเมืองไทยเมื่อไม่มีการเสริม IGF-I (กลุ่มควบคุม) และ กลุ่มที่มีการเสริม IGF-I ที่ระดับความเข้มข้น 50, 75 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิเมตร พบว่าค่าร้อยละการแบ่งเซลล์หลังการปฏิสนธิเท่ากับ 64.54 ± 6.32 , 71.62 ± 6.32 , 74.26 ± 6.32 และ 66.19 ± 6.32 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของแต่ละกลุ่มการทดลองพบว่าค่าร้อยละการแบ่งเซลล์หลังการปฏิสนธิ ทั้ง 4 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ ($P > 0.05$) (Table 1) สอดคล้องกับ Herrier et al. (2003) รายงานว่าการเสริม IGF-I ในน้ำยา maturation ที่ไม่เลี้ยงร่วมกับเซลล์แกลนูโลซา พบว่าค่าร้อยละการแบ่งเซลล์หลังการปฏิสนธิไม่แตกต่างจากกับกลุ่มควบคุมที่ไม่เสริม IGF-I ($p > 0.05$) เช่นเดียวกับรายงานของ Matsui et al. (1997) ซึ่งรายงานว่าการเสริม IGF-I ระดับความเข้มข้นดังนี้ 0, 0.2, 2, 20, 200 นาโนกรัมต่อมิลลิเมตร (84.3 ± 1.0 , 82.9 ± 0.8 , 83.7 ± 1.4 , 83.6 ± 1.2 , 82.4 ± 1.2) ให้ค่าร้อยละการแบ่งเซลล์หลังการปฏิสนธิที่ไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ($p > 0.05$)

ร้อยละการเจริญของตัวอ่อนสู่ระยะบลาสโตซิสต์หลังการปฏิสนธิวันที่ 8 มีค่าเท่ากับ 18.76 ± 3.74 , 13.68 ± 3.74 , 14.00 ± 3.74 และ 15.03 ± 3.74 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของแต่ละกลุ่มการทดลอง พบว่าค่าร้อยละการเจริญของตัวอ่อนสู่ระยะบลาสโตซิสต์หลังการปฏิสนธิวันที่ 8 ทั้ง 4 กลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ ($p > 0.05$) (Table 1) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Herrier et al. (1993) ซึ่งพบว่าการเสริม IGF-I ที่ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิเมตร ไม่มีผลต่อการเจริญของตัวอ่อนในวันที่ 7 หลังจากการปฏิสนธิ ($p > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่เสริม IGF-I เช่นเดียวกับงานทดลองของ Harvey และ Kaye (1992) ซึ่งรายงานว่าการเสริม IGF-I ไม่ส่งผลเชิงบวกต่อการเจริญของตัวอ่อนหลังการปฏิสนธิที่ 7 วัน เมื่อเสริม IGF-I ที่ระดับความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิเมตร Matsui et al. (1997) รายงานว่าการเจริญของตัวอ่อนโคไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ($p > 0.05$) ระหว่างการเสริม oestrous cow serum (ECS) กับการเสริม IGF-I ร่วมกับ ECS ซึ่งพบว่ามี ECS มี endogenous IGF-I มีความเข้มข้นประมาณ 34.8 นาโนกรัมต่อมิลลิเมตร จึงอาจทำให้กลุ่มควบคุมไม่แตกต่างกันในทางสถิติกับกลุ่มที่เสริม IGF-I ซึ่งต่อมา Herrier et al. (2003) ได้รายงานผลที่ขัดแย้งว่าการเสริม IGF-1 ในน้ำยา maturation และ ในน้ำยา culture ร่วมกับเซลล์แกลนูโลซาให้ค่าร้อยละการเจริญของตัวอ่อนสู่ระยะบลาสโตซิสต์สูงกว่ากลุ่มควบคุม (31 และ 16 เปอร์เซ็นต์) แตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) เนื่องจากการเสริม IGF-I ในน้ำยา maturation กระตุ้นการเกิด nuclear maturation ในโอโอไซต์โค (Hainaut et al., 1991) ซึ่งสัมพันธ์กับงานทดลองของ Lorenzo et al. (1995) ได้ทดลองโดยเสริม IGF-I ในน้ำยา maturation ระดับความเข้มข้นที่ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิเมตร ร่วมกับการเสริม FCS ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถกระตุ้น nuclear maturation เนื่องจากว่า IGF-I กระตุ้น maturation promoting factor (MPF) โดยผ่านวิถี tyrosine dephosphorylation เพื่อไปกระตุ้นโอโอไซต์เกิด

Table 1 Effect of IGF-I on cleavage and embryo developmental rate.

Treatments	No. of oocytes	cleavage (%)	Blastocysts (day 8) / 4 cells (%)	Blastocysts (day 8) / oocytes (%)
control	175	64.55 ± 6.32	18.76 ± 3.74	8.44 ± 2.21
IGF-I (50 ng/ml)	169	71.62 ± 6.32	13.69 ± 3.74	8.86 ± 2.21
IGF-I (75 ng/ml)	159	74.26 ± 6.32	14.00 ± 3.74	10.11 ± 2.21
IGF-I (100 ng/ml)	165	66.20 ± 6.32	15.04 ± 3.74	10.93 ± 2.21

การแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสต่อหลังจากเกิดการพักการแบ่ง
เซลล์ครั้งที่แรก (Hainaut et al.,1991)

เอกสารอ้างอิง

- Hainaut, P., S. Giorgetti, A. Kowlaski, R. Ballotti, E. Van Obberghen. (1991). Antibodies to phosphotyrosine injected to xenopus laevis oocytes modulate maturation induced by insulin/IGF-I. *Exp Cell Res*, 195:129-136.
- Harvey, M.B. and P.L. Kaye. (1992). Insulin-like growth factor-1 stimulates growth of mouse preimplantation embryos in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 31:195-199.
- Herrler, A., A. Lucas-Hahn and H. Niemann. (1993). Effects of insulin-like growth factor-I on in-vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, 37:1213-1224.
- Lorenzo, P.L., M.J. Illera, J.C. Illera and M. Illera. (1995). Role of EGF, IGF-I, sera and cumulus cells on maturation in vitro of bovine oocytes. *Theriogenology*, 44: 109-118.
- Matsui, M., Y. Takahashi, M. Hisshinuma and H. Kanagawa. (1997). Stimulation of the development of bovine embryo by insulin and IGF-I is mediated through the IGF-I receptor. *Theriogenology*, 48: 605-616.

สรุป

ผลการศึกษาพบว่า การเสริม IGF-I ระดับความเข้มข้นที่ 50, 75, 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และกลุ่มที่ไม่เสริม IGF-I (กลุ่มควบคุม) ไม่ส่งผลกระทบต่อร้อยละการแบ่งเซลล์หลังการปฏิสนธิ และ ร้อยละการเจริญของตัวอ่อนสู่ระยะบลาสโตซิสต์ในระยะต่างๆ ในวันที่ 8 หลังการปฏิสนธิ ($p > 0.05$)

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน, ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร มหาวิทยาลัยร่วม มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้จัดสรรเงินทุนสนับสนุนงานวิจัย และ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ ที่สนับสนุนวัสดุอุปกรณ์ และสถานที่ในการวิจัย