



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยง สัตว์ฐานวิทยา
และลักษณะโปรตีนที่หลังจากเซลล์บุท่อหน้าไข่

และเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่สุกร

Study on *In Vitro* Culture Technique, Morphology and
Characterization of Secretory Protein from Porcine Oviductal
Epithelial and Cumulus Cells

โดย

ผศ. ดร. มยุรา อารีกิจเสรี และคณะ

พฤษภาคม 2549

สัญญาเลขที่ : MRG4780028

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์



โครงการศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยง สัณฐานวิทยา และลักษณะโปรตีนที่หลั่งจากเซลล์บุท่อหน้าไข่ และเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่สุกร

Study on *In Vitro* Culture Technique, Morphology and
Characterization of Secretory Protein from Porcine Oviductal
Epithelial and Cumulus Cells

คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. ผศ. ดร. มยุรา อารีกิจเสรี

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศิลปากร

2. รศ. ดร. เรณู เวชรัชต์พิมล

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศิลปากร

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	1
Executive summary.....	5
บทนำ.....	5
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	7
ระเบียบวิธีการวิจัย	7
ขอบเขตการของการวิจัย.....	9
แผนดำเนินงานวิจัย.....	10
เนื้อหาางานวิจัย.....	11
บทนำ.....	11
รายละเอียดของการดำเนินการวิจัย.....	13
ผลการทดลอง.....	37
วิจารณ์การทดลอง.....	65
กิตติกรรมประกาศ.....	75
เอกสารอ้างอิง.....	75
Output ที่ได้รับจากโครงการ.....	83
ภาคผนวก.....	85
กิจกรรมอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง.....	86

สารบัญตาราง

ตารางที่

หน้า

1	สูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง POEC และ CC+GC	20
2	องค์ประกอบของอาหารสูตร M 199 และ RPMI1640 และ DMEM.....	21
3	แบบแผนเพื่อประเมินการเกิด acrosome reaction +POEC	34
4	แบบแผนเพื่อประเมินการเกิด acrosome reaction + CC+GC	34
5	แสดงเปอร์เซ็นต์การรอดตายของเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยง 3 สูตร	38
6	เปอร์เซ็นต์ของ POEC ทั้งสองชนิด	41
7	แสดงจำนวนเซลล์ไข่ที่แบ่งตามการล้อมรอบของเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่.....	47

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ภาพวาดแสดงกล่องและถุงบรรจุตัวอย่าง	14
2 ท่อนำไข่หลังจากล้างทำความสะอาด	16
3 การล้างเซลล์บุท่อนำไข่ในน้ำยา Hepes buffered tyrodes medium	17
4 มดลูกและปีกมดลูกสุกรที่ล้างด้วยวิธีปลอดเชื้อ.....	18
5 COCs และ GC ที่ดูดแยกได้จากน้ำในถุงไข่ที่อยู่ในถุงของรังไข่	19
6 แสดงการล้างเซลล์ CC+GC ใน cap tube	19
7 ภาพวาดแสดงการถ่ายเซลล์เพาะเลี้ยงลงใน falcon dish.....	25
8 Laminar air flow ใช้เพื่อทำงานแบบปลอดเชื้อและตู้เพาะเลี้ยงเซลล์	26
9 แสดงการห่อตัวอย่าง	28
10 แสดงการทำ post thawing deep frozen semen โดยอุ่น	32
11 แสดงอสุจิที่แข็งแรงได้ว่ายขึ้นสู่ด้านบนของน้ำยาเลี้ยงเซลล์อสุจิ	33
12 แสดงการเตรียมหยดน้ำยา	35
13 แสดง POEC ระยะฟอลลิคูลาร์	40
14 แสดง POEC ระยะฟอลลิคูลาร์	40
15 แสดง POEC ระยะลูทีน	40
16 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดง POE.....	42
17 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดง POEC	43
18 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดง POEC เพาะเลี้ยงใน	43
19 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดง POEC เพาะเลี้ยงใน	44
20 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดงเซลล์ไข่สุกรที่เจาะได้จากรังไข่.....	45
21 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดงเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่น.....	46
22 กราฟแสดงขนาดของ COCs ที่เจาะได้จากรังไข่แยกตามประเภท	48
23 เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....	49
24 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดง COCs	50
25 ภาพจาก SEM แสดง CC ของ COCs ชนิดที่ 1.....	51

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
26 ภาพจาก SEM ที่กำลังขยายสูง แสดง CC ของ COCs	51
27 ภาพจาก SEM ที่กำลังขยายสูง แสดง CC ของ COCs	51
28 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดง GC เซลล์ที่อยู่ในถุงไข่	52
29 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดง GC เซลล์เพาะเลี้ยงในอาหาร.....	53
30 แสดงแถบโปรตีนจากสารหลังจาก POEC และ CC+GC ที่หลังในอาหาร.....	54
31 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดง กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม	57
32 ภาพวาดแสดงหัวเซลล์สุจิติดตามยาวที่ไม่เกิด acrosome reaction	58
33 ภาพจาก TEM แสดงเซลล์สุจิหัวเซลล์ด้านบนที่เกิด acrosome reaction	59
34 ภาพจาก TEM แสดงเซลล์สุจิหัวตัดตามยาว กลุ่มที่ 1.....	60
35 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิด acrosome reaction ในเซลล์สุจิหัว	63
36 ภาพจาก TEM แสดงเซลล์สุจิหัวบ่มกับสารหลัง POEC บ่ม 4 ชั่วโมง	64
37 ภาพแสดงตัวอ่อนวาระยะ 6 ถึง 18 เซลล์ ที่หยุดการเจริญเติบโต.....	74

รหัสโครงการ: MRG4780028

ชื่อโครงการ: โครงการศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยง สัตฐานวิทยา และลักษณะโปรตีนที่หลังจาก
เซลล์บุท่อไข่และเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่สุกร

ชื่อนักวิจัย: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มยุว อารีกิจเสรี

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์
จังหวัดนครปฐม

E-Mail Address: Maijackee@hotmail.com, Maijackee@yahoo.com

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยคือศึกษาและพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์บุท่อไข่ (porcine oviductal epithelial cells: POEC) เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ (cumulus cells: CC) และเซลล์แกรนูโลซาสุกร (granulosa cells: GC) ในสูตรอาหารที่เหมาะสมและปลอดภัย พร้อมศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ในสภาพธรรมชาติ (*in vivo*) และสภาพเพาะเลี้ยง (*in vitro*) แล้วเก็บสารที่เซลล์หลั่งเพื่อศึกษารูปแบบของโปรตีนที่เซลล์หลั่งสู่อาหารเพาะเลี้ยงในช่วงเวลาต่างๆ สุดท้ายได้ทดสอบสารหลังที่ขัดขวางต่อการเกิด acrosome reaction ในเซลล์อสุจิ

ผลการวิจัยพบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร M199, RPMI 1640 และ DMEM ที่เสริมด้วย 10% heat treated fetal calf serum (HTFCS) บ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์และมีความชื้นสูง ให้ผลการเพาะเลี้ยงที่ดีมีเปอร์เซ็นต์รอดตายของเซลล์สูง สามารถทำได้จริง ไม่สิ้นเปลืองเวลาและประหยัดค่าใช้จ่าย สัณฐานวิทยาของ POEC ในสภาพธรรมชาติในระยะฟอลลิคูล่าพบว่าเนื้อเยื่อบุชั้นในท่อไข่ส่วนแอมพูลามีเซลล์บุท่อไข่ที่มีซีเลียอยู่เป็นจำนวนมาก ในขณะที่ระยะลูเตียมีเซลล์ที่มีซีเลียจำนวนน้อยกว่า แต่มีเซลล์รูปร่างกลมที่ไม่มีซีเลียและมีไมโครวิลไลสั้นๆ อยู่ด้านบนของเซลล์นั้น มีจำนวนมากขึ้น ในสภาพเพาะเลี้ยงพบว่า POEC ส่วนมากเกาะรวมกลุ่มกันอยู่ เซลล์มีรูปร่างยาวมีซีเลียอยู่ด้านบนและเรียงตัวชั้นเดียวและมีเซลล์รูปร่างกลมที่ไม่มีซีเลียเกาะรวมอยู่ด้วย เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์นานขึ้นพบว่าเซลล์ได้หลุดแยกออกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ เพิ่มมากขึ้น สำหรับเซลล์ไข่สุกรที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ (COCs) ที่เจาะได้จาก รังไข่มีขนาด 89 ถึง 145 ไมโครเมตร แยกได้ 4 ชนิดคือ เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบเกาะแน่น เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้น เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เพียงบางส่วนและเซลล์ไข่ที่ไม่มีเซลล์ล้อมรอบ คิดเป็น 19.87, 18.13, 28.88 และ 33.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่ง COCs มีขนาดเซลล์ทั้ง 4 ชนิดเรียงตามลำดับข้างต้นเท่ากับ 144.68 ± 8.79 , 122.82 ± 4.78 , 106.20 ± 8.72 และ 89.16 ± 5.69 ไมโครเมตร ส่วน GC ที่อยู่ในถุงไข่มีรูปร่างกลมอยู่รวมเป็นกลุ่มและเพาะเลี้ยงได้ดีในอาหารสูตร M199, RPMI 1640 และ DMEM และเมื่อเพาะเลี้ยงยาวนานขึ้นเซลล์ก็ยังมีรูปร่างกลมเช่นเดิมและแยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ มีขนาดเซลล์ 6 ถึง 8 μm เมื่อนำ COCs ชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรที่เลือกคือ M199 ที่เสริมด้วย 10% HTFCS และเสริมด้วยฮอร์โมนและเพาะเลี้ยงที่สภาพเดิมนาน 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบเกาะแน่น CC ได้คลี่แยกออกจากเซลล์ไข่ ส่วนเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้นนั้น CC เกิดการ

กระจายตัวออก และเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบเกาะแน่นที่คล่อออก แล้วนั้นเซลล์ที่เคยมีรูปร่างกลมเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นคล้ายรูปหยดน้ำตาหันด้านปลายแหลมของ เซลล์แทงเข้าแทรกเมมเบรนของเซลล์ไข่ ส่วนเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้น CC ได้กระจาย ตัวออกและหลุดออกจากเซลล์ไข่ แสดงว่าเซลล์ไข่ทั้งสองชนิดสามารถเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ไข่สุก (matured oocyte) ได้ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เสริมด้วยฮอร์โมนดังกล่าว

การศึกษารูปแบบของโปรตีนที่เซลล์หลังด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่ารูปแบบโปรตีนที่สร้างขึ้น จากเซลล์ทั้งสองชนิดมีความคล้ายคลึงกันมาก โดยพบแถบโปรตีนที่น่าสนใจมีขนาดประมาณ 17, 22 kDa และที่มีขนาดมากกว่า 220 kDa ในสารหลังจากเซลล์ทั้งสองที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง นาน 48, 72, 96 ชั่วโมง

ผลจากการบ่มเซลล์สุจิวัวแช่แข็งกับสารหลัง POEC และ CC+GC เพื่อประเมินคุณภาพของ สารหลังที่แช่แข็งในระยะ 1 ถึง 3 เดือน ต่อการเตรียมความพร้อมของเซลล์สุจิ พบว่าเซลล์สุจิวัว ที่บ่มกับสารหลัง POEC ที่ไม่ได้แช่แข็ง และที่แช่แข็งนาน 1 เดือน ถึง 3 เดือน มีเปอร์เซ็นต์การเกิด acrosome reaction เท่ากับ 78.44 ± 7.25 , 75.78 ± 4.41 , 65.22 ± 5.59 , 50.56 ± 6.25 ตามลำดับ และกลุ่มที่เซลล์สุจิวัวบ่มกับสารหลัง CC+GC ที่ไม่ได้แช่แข็ง และที่แช่แข็งนาน 1 เดือน ถึง 3 เดือน มีเปอร์เซ็นต์การเกิด acrosome reaction เท่ากับ 88.67 ± 4.03 , 82.22 ± 3.46 , 71.00 ± 3.16 , 58.56 ± 4.69 ตามลำดับ โดยต่างจากกลุ่มที่ไม่บ่มกับหลัง ที่เกิด acrosome reaction เพียง 3.89 ± 3.72 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากผลการทดลองนี้ทำให้เกิดความเข้าใจมากขึ้นถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและธรรมชาติของ เซลล์ POEC และ CC+GC ในสภาพธรรมชาติและสภาพเพาะเลี้ยง ข้อมูลนี้มีความสำคัญต่อ การศึกษาสารที่เซลล์หลังและองค์ประกอบทางชีวเคมีของเซลล์ โดยมีความสำคัญมากในการใช้ เซลล์เพื่อเสริมในอาหารเพาะเลี้ยง เพื่อใช้ในการทำปฏิสนธิในหลอดแก้วต่อไป

Project Code: MRG4780028

Project Title: Study on *in vitro* culture technique, morphology and characterization of secretory protein from porcine oviductal epithelial and cumulus cells.

Investigator: Assist. Prof. Dr. Mayuva Areekijseree

E-Mail Address: Maijackee@hotmail.com, Maijackee@yahoo.com

Project Period: 2 years

Abstract

The objectives of this research were to study the morphology and structure of porcine oviductal epithelial cells (POEC), cumulus-oocyte complexes (COCs) and granulosa cells (GC). They were investigated *in vivo* and *in vitro* conditions using scanning electron microscopy (SEM) and inverted microscopy. The protein pattern of their secretion were studied and determined ability of acrosome reaction with bovine sperm.

From *in vivo* study, the mucosal surfaces of the POEC at the follicular and luteal phases were examined to observe the cell types and cellular populations. At the follicular phase, the POEC contained a great number of high ciliated cells, whereas those at the luteal phase consisted of lesser number and were filled up with numerous of round shaped non-ciliated cells with short microvilli on the apical surface. This change in morphological features of POEC seemed to serve well on their functions as oocyte transporters at follicular phase. Meanwhile, the GC in the follicular fluid was also round in shape and found as clusters. From *in vitro* study, the POEC contained columnar ciliated cells and spherical shaped non-ciliated cells. Both non-ciliated cells and ciliated cells appeared either in groups or distributing among each other. However, the isolation of cells was observed after culture for 48 h.

COCs were round in shape, surrounded by zona pellucida with layers of cumulus cells ranging between 89.16-144.68 μm in size. They were morphologically classified into 4 types based on the accumulation and arrangement of cumulus cells around the oocytes. These were intact-, multi-, partial-cumulus cell layers and completely denuded oocyte at the percentage composition of 19.87%, 18.13 %, 28.88 % and 33.12 %, respectively. The mean diameters of four types of COCs were found that, the mean diameter of intact cumulus cell layer from the healthy antral follicle was significantly different from those of multi cumulus cell layer, partial cumulus cell layer and completely denuded oocyte ($144.68 \pm 8.79 \mu\text{m}$, $122.82 \pm 4.78 \mu\text{m}$, $106.20 \pm 8.72 \mu\text{m}$ and $89.16 \pm 5.69 \mu\text{m}$, respectively). Interestingly, changes in the morphology of COCs were observed after culturing for 24 h. In Type I COCs the cumulus cell layer was peel off from the oocyte, but the cell shape was

still round. Moreover, it was also found that COCs Type II contained expanded cumulus cell shape, while the cells remained intact on the surface of the oocytes. After 24 h of culture of COCs in the culture M199 medium, it was observed that the round shape CC, which attached to the surface of the oocyte before adapted themselves into a teardrop-like shape. They had a pointy, conical end that clearly stuck into the oocyte. Meanwhile, the elongated CC of COCs Type II was detached from the oocyte surface. The GC in the follicular fluid was also round in shape and found as clusters. After culturing in *in vitro* for 48 h, no change in morphology was observed. The GC appeared in smaller clusters were present as single cells and their sizes ranged from 6-8 μm .

The results from SDS-PAGE to determine secretion proteins from POEC when cultured in the M199 medium for 48, 72, 96 h showed a similar pattern. From the comassie blue-stained gels, the protein bands sized about 17, 22, and > 220 kDa were observed. These protein bands were also found in the CC cultured in the same conditions media and periods of time.

The ability of frozen secretion proteins from POEC and CC+GC (storage for 1, 2 or 3 months) in inducing acrosome reaction of bovine spermatozoa was determined. The percentage of the tested groups (added with POEC: storage for 1, 2 or 3 months) were 78.44 ± 7.25 , 75.78 ± 4.41 , 65.22 ± 5.59 , 50.56 ± 6.25 , respectively. Meanwhile the percentage of the other tested groups (added with CC+GC: storage for 1, 2 or 3 months) were 88.67 ± 4.03 , 82.22 ± 3.46 , 71.00 ± 3.16 , 58.56 ± 4.69 respectively. It was higher than those of the controlled groups (without secretion proteins). Comparison of percentage between two groups was statistically analyzed and the results indicated that it was significantly different.

The results obtained from this study allow us to have a better understanding of the morphology and nature of cells under both *in vivo* and *in vitro* conditions. This information is also important for the study of their secretions and biochemical compositions, which is of great importance to the use of cells as feeder cells in *in vitro* fertilization in current studies.

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)
ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ 2547
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

1. ชื่อโครงการ: โครงการศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยง สัตว์ฐานวิทยา และลักษณะโปรตีน
ที่หลั่งจากเซลล์บุท่อไข่และเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่สุกร

: Study on *In Vitro* Culture Technique, Morphology and
Characterization of Secretory Protein from Porcine Oviductal Epithelial and
Cumulus Cells.

2. ชื่อหัวหน้าโครงการ: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มยุภา อารีกิจเสรี

2.1 สถานที่ทำงาน ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ วิทยาเขตพระราชวัง-

สนามจันทร์ อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม 73000

โทรศัพท์ 034-243429, 034-273 045-6

โทรสาร 034-255820 โทรศัพท์มือถือ 01- 4937640

E-mail: maijackee@yahoo.com

2.2 ที่อยู่

83/18 หมู่บ้านราชาวดี ซอยพุทธบูชา 36 ถนนพุทธบูชา

ตำบลบางมด อำเภอทุ่งครุ จังหวัดกรุงเทพมหานคร 10140

3. สาขาวิชาที่ทำการวิจัย: สาขาชีววิทยา

(sterile technique) ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาทางเซลล์เทคโนโลยี (cell technology) การเพาะเลี้ยงเซลล์สืบพันธุ์ (gamete development) และการทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว (*in vitro* fertilization) ตัวอย่างเช่น

ก. การนำเซลล์เพาะเลี้ยงมาใช้เสริมในอาหารเพาะเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้วเพื่อใช้เป็น feeder cells ทำให้ตัวอ่อนสามารถพัฒนาผ่านระยะต่างๆ จนถึงระยะย้ายฝากได้ นักวิจัยพบว่าสัตว์ที่ตกหลูกได้ครั้งละหลายๆ ตัวเช่นสุกรมีสารภายในระบบสืบพันธุ์ (reproductive tract) ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของตัวอ่อนได้ดีกว่าสัตว์ที่ตกหลูกได้เพียงครั้งละหนึ่งตัว จากรายงานของ Kittiyant และคณะ (1993) พบว่าเซลล์บุท่อนำไข่สุกรช่วยส่งเสริมการเจริญพัฒนาของตัวอ่อนวัวให้เพิ่มขึ้นมากกว่าเซลล์บุท่อนำไข่ของวัวเองและยังส่งเสริมการเจริญพัฒนาตัวอ่อนในสัตว์อื่นๆ ได้เป็นอย่างดีตลอดจนทำให้เปอร์เซ็นต์ของการปฏิสนธิสูงขึ้น

ข. เซลล์เพาะเลี้ยงในระบบสืบพันธุ์ช่วยในการเตรียมความพร้อมของเซลล์สุจิ สัตว์ก่อนผสมกับเซลล์ไข่ในการทำปฏิสนธิสัตว์หลอดแก้วได้เป็นผลดี (White และคณะ, 1993; Park และ Sirand, 1996; Romar และคณะ, 2001, 2002)

ค. เซลล์เพาะเลี้ยงสามารถนำมาใช้เป็นต้นแบบ (model) เพื่อใช้ทดสอบความเป็นพิษของโลหะหนักที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อมเพื่อประเมินผลกระทบต่อเซลล์ได้เป็นอย่างดี (Reeves และคณะ 1996; Briske-Anderson และคณะ 1997; Takano และคณะ 2002) ซึ่งจะได้ผลชัดเจนดีกว่าการใช้สัตว์ทดลองมาเพราะเป็นการทดสอบโดยตรงต่อสภาวะที่เซลล์จะนำโลหะหนักเข้าเซลล์และเป็นการถูกต้องตามหลักจริยธรรมของการใช้สัตว์ทดลองอีกด้วย

ประโยชน์ที่กล่าวมาทั้งหมดนี้น่าสนใจมากและควรทำการศึกษาเป็นอย่างยิ่ง แต่ทำเช่นไรจึงจะเพาะเลี้ยงเซลล์เหล่านี้ให้มีชีวิตรอดสูงได้ในห้องปฏิบัติการแบบปลอดเชื้อตลอดจนการศึกษาถึงสัณฐานวิทยาของเซลล์บุท่อนำไข่และเซลล์ที่ล้อมรอบเซลล์ไข่ตามธรรมชาตินั้นยังมิได้มีผู้ศึกษาน้อยมาก โดยเฉพาะการศึกษาโครงสร้างและลักษณะสามมิติด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ตลอดจนการศึกษาสารที่หลั่งจากเซลล์เพาะเลี้ยงออกมาสู่อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ (condition medium) แล้วนำมาแช่แข็ง (freezing) ในสภาพที่เหมาะสมเก็บไว้เป็น stock และศึกษาปริมาณและลักษณะโปรตีนแล้วนำมาทดสอบการใช้ประโยชน์ต่อการเจริญพันธุ์ของสัตว์อื่นๆ ต่อไป

7. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

วัตถุประสงค์หลักคือต้องการนำทรัพยากรที่มีอยู่มากในจังหวัดนครปฐม คือซากของท่อน้ำไข่และรังไข่สุกร โดยนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงให้ได้ผลดีที่สุด ตลอดจนศึกษาความเป็นไปได้ที่จะนำเซลล์และสารหลังจากเซลล์ไปใช้ประโยชน์ทางชีววิทยาการเจริญพันธุ์ทางการแพทย์ และใช้ในการทดสอบสารพิษในห้องทดลองได้จริง เพื่อให้บรรลุถึงจุดประสงค์หลักข้างต้น การศึกษาในขั้นแรกได้แยกเป็นวัตถุประสงค์ย่อยๆ ดังนี้

7.1 เพื่อศึกษาและพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยง POEC และ CC+GC สุกรในสูตรอาหารที่เหมาะสม โดยทดลองใช้อาหาร 3 สูตร ด้วยเทคนิคที่ปลอดภัย

7.2 เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ POEC และ CC+GC สุกรในสภาพธรรมชาติ (*in vivo*) และสภาพเพาะเลี้ยง (*in vitro*)

7.3 เพื่อเปรียบเทียบปริมาณและรูปแบบของโปรตีนที่เซลล์เพาะเลี้ยงของ POEC และ CC+GC ที่หลังสู้อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 48, 96 และ 144 ชั่วโมง และศึกษาวิธีเก็บรักษาสารหลังจากเซลล์ที่อุณหภูมิต่ำ (-20 องศาเซลเซียส และที่ -196 องศาเซลเซียส)

7.4 เพื่อศึกษาผลของสารหลังจาก POEC และ CC+GC สุกรต่อการเตรียมความพร้อมของเซลล์อสุจิ (คือการเกิด acrosome reaction) ในสัตว์เศรษฐกิจ

8. ระเบียบวิธีการวิจัย

8.1 การศึกษาและพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยง POEC และ CC+GC

8.1.1 การเก็บท่อน้ำไข่และรังไข่สุกร โดยเก็บจากโรงฆ่าสัตว์ในจังหวัดนครปฐม ตัดและล้างท่อน้ำไข่และรังไข่ใน 0.9% normal saline ที่ผสมยาปฏิชีวนะบรรจุใส่กระติกควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ถึง 30 องศาเซลเซียส จึงนำตัวอย่างกลับมาล้างห้องปฏิบัติการภายใน 3 ชั่วโมง

8.1.2 ล้างท่อน้ำไข่ โดยตัดเยื่อหุ้มต่างๆ ออก ทำความสะอาดทั้งภายนอกและภายในแบบปลอดภัยด้วยน้ำยาล้างตัวอย่าง (washing medium) แล้วซับทำความสะอาดด้วยผ้าสะอาดปลอดภัย

8.1.3 ขูด POEC เขย่าล้างด้วยน้ำยาล้างเซลล์ด้วยความเบามือ ดังทิ้งไว้เพื่อให้เซลล์หล่นตกที่ก้นหลอด ล้างเซลล์ซ้ำอีก 5 ครั้ง

8.1.4 สำหรับรังไข่ล้างทำความสะอาดเช่นเดียวกับ POEC โดยใช้ เข็มเบอร์ 18 เจาะดูด (suction) เซลล์ไข่ซึ่งมีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ (cumulus oocyte complexes:

COCs) แล้วใช้ปิเปตขนาดเล็กมากดูดแยก COCs ออกจาก CC+GC ทำภายใต้ stereo microscope

8.1.5 เลี้ยงเซลล์ทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเซลล์บ่มในตู้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์และมีความชื้นสูง การทดลองจะทดสอบเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยงอย่างน้อย 3 ชนิด

8.2 การศึกษาและเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ในสภาพธรรมชาติและสภาพเพาะเลี้ยง โดยเปรียบเทียบเซลล์เพาะเลี้ยงและเซลล์ที่มีได้เพาะเลี้ยงภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดดังนี้

8.2.1 คงสภาพของเนื้อเยื่อตัวอย่างด้วยบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์นาน 2 ชั่วโมง แล้วนำมาแช่ในบัฟเฟอร์ฟอร์มาลินความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์นาน 24 ชั่วโมง

8.2.2 ตึงน้ำออกจากตัวอย่างโดยแช่ตัวอย่างในแอลกอฮอล์ จากความเข้มข้นน้อยไปยังความเข้มข้นมาก (10, 20, 30, 50, 70, 80, 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์) ขั้นตอนละ 2 ครั้ง

8.2.3 ทำตัวอย่างให้แห้ง ณ จุดวิกฤตด้วยเครื่องทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤต (critical point dryer: CPD) แล้วติดตัวอย่างบนฐานรองตัวอย่างด้วยเทปคาร์บอน

8.2.4 ฉาบตัวอย่างด้วยผงทองโดยใช้เครื่อง ion sputter แล้วศึกษาตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning electron microscope)

8.3 การศึกษาปริมาณและรูปแบบสารหลังจากเซลล์เพาะเลี้ยงและเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็ง

8.3.1 เก็บสารหลังจาก POEC และ CC+GC ใส่หลอดขนาดเล็กนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

8.3.2 ดูดเก็บสารด้านบนนำไปแช่แข็งด้วยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสและ -196 องศาเซลเซียส

8.4 การศึกษาลักษณะโปรตีนที่เซลล์เพาะเลี้ยงหลังสู้อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์

8.4.1 วัดปริมาณโปรตีนด้วย spectrophotometer ที่ช่วงค่าความยาวคลื่นแสง 280 นาโนเมตร คำนวณหาค่าโปรตีนเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนมาตรฐาน (standard protein of bovine serum albumin)

8.4.2 ศึกษาโปรตีนที่เซลล์หลั่งด้วยวิธี Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) วิเคราะห์สารหลังจากเซลล์หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นนาน 48, 96 และ 144 ชั่วโมง

8.5 ทดสอบสารหลังจาก POEC และ CC+GC ในการเตรียมความพร้อมของเซลล์ อสุจิวัวแช่แข็ง

8.5.1 นำเซลล์อสุจิกับสารหลังจากเซลล์ POEC หรือ CC+GC ในตู้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์และมีความชื้นสูง เพื่อประเมินคุณภาพของสารหลังจากเซลล์ที่แช่แข็งในระยะเวลาต่างๆ (1, 2 และ 3 เดือน)

8.5.2 เมื่อครบเวลาบ่มจึงประเมินผลของการเกิด acrosome reaction ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (Inverted microscope) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope)

9. ขอบเขตการของการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ทำการวิจัยภายใต้ขอบเขตดังนี้

9.1 การศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยง POEC และ CC+GC ของสุกรนั้น ศึกษาทดลองในสูตรอาหารอย่างน้อย 3 สูตรอาหาร เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการเพาะเลี้ยง โดยคำนึงถึงอัตราการรอดตายของเซลล์ในช่วงเวลาที่เพาะเลี้ยง

9.2 การศึกษาและเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ POEC และ CC+GC สุกรในสภาพธรรมชาติและสภาพเพาะเลี้ยงนั้น โดยศึกษาในช่วงการเพาะเลี้ยงที่สนใจเท่านั้น ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

9.3 การแช่แข็งสารหลังจากเซลล์เพาะเลี้ยงนั้น ได้แช่แข็งสารหลังทั้งสองที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส

9.4 การวิเคราะห์โปรตีนที่เซลล์เพาะเลี้ยงหลั่งสู่อาหารเพาะเลี้ยง ได้วิเคราะห์หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48, 96 และ 144 ชั่วโมง (โดยเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงทุกๆ 2 วัน)

9.5 การทดสอบสารหลังจากเซลล์เพาะเลี้ยงในการเตรียมความพร้อมของเซลล์อสุจิของสัตว์ที่สนใจ โดยดูผลของการเกิด acrosome reaction ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านและกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ หลังจากบ่มเซลล์อสุจิกับสารหลัง เพื่อประเมินคุณภาพของสารหลังที่แช่แข็งในระยะเวลาต่างๆ คือ 1, 2 และ 3 เดือน

10. แผนดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ 2 ปี

แผนงานวิจัย	เดือนที่							
	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-18	19-21	22-24
1. สืบค้นข้อมูล จัดซื้อ สารเคมีและอุปกรณ์ต่างๆ	↔							
2. เตรียมสารเคมีและเก็บ ตัวอย่างจากโรงฆ่าสุกร	←			→	←		→	
3. เตรียมตัวอย่าง เพาะเลี้ยง POEC และ CC+GC ในสภาพปลอดเชื้อ	←			→	←		→	
4. เก็บสารหลังจาก POEC และ CC+GC และแช่แข็งที่ อุณหภูมิ -80°C	←			→	←		→	
5. เตรียมตัวอย่างทาง SEM และศึกษาภายใต้ SEM			↔					
6. วิเคราะห์โปรตีนจากสาร หลังจากเซลล์ทั้งสองชนิด			↔					
7. ทดสอบสารหลังจากเซลล์ทั้ง สองในการเตรียมความพร้อม ของเซลล์สุจิและประเมินผล ด้วย TEM และ inverted microscope						←		→
8. วิเคราะห์และวิเคราะห์ผลการ ทดลอง			↔				↔	
9. จัดทำรายงานฉบับสมบูรณ์ และเตรียมบทความเพื่อส่ง ตีพิมพ์วารสารระดับนานาชาติ				↔			↔	↔

เนื้อหางานวิจัย

ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ 2547

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

โครงการศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยง สัณฐานวิทยา และลักษณะโปรตีนที่หลังจาก เซลล์บุท่อนำไข่และเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่สุกร

1. บทนำ (Introduction)

ตามธรรมชาติเซลล์บุท่อนำไข่ (oviductal cells) จะช่วยในการเตรียมพร้อมของเซลล์อสุจิซึ่งเซลล์อสุจิจะผ่านกระบวนการเกิด capacitation และ acrosome reaction ที่เกิดขึ้นได้เองเมื่อเซลล์อสุจิเคลื่อนผ่านอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (female reproductive tract) คือมดลูก (uterus) และท่อนำไข่ (oviduct) ที่มีเซลล์บุท่อนำไข่ที่หลั่งสารและช่วยในการโบกพัดเซลล์อสุจิเกิดกระบวนการ capacitation และยังพบว่าสารสื่อประสาท (neurotransmitter chemicals) เช่น epinephrine, taurine และ hypotaurine ในอวัยวะสืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเพศเมียช่วยเหนี่ยวนำให้เกิด capacitation ของเซลล์อสุจิสัตว์ได้ด้วย (Chang., 1951)

การศึกษาของ Anderson และ Killian (1994) พบว่าโปรตีนที่หลังจากเซลล์บุท่อนำไข่ส่วน isthmus ในระยะที่เป็นสัด (estrus cycle) มีบทบาทสำคัญต่อการเพิ่มกระบวนการ capacitation ของเซลล์อสุจิ และจากการศึกษาของ Grippo (1995) พบว่าเซลล์อสุจิที่เพาะเลี้ยงในเซลล์บุท่อนำไข่จากส่วนแอมพูลล่า (ampulla part) ใน nonluteal phase นั้นทำให้เกิด acrosome reaction และทำให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิในงานเพาะเลี้ยงเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อสุจิที่เพาะเลี้ยงในเซลล์บุท่อนำไข่จากส่วนแอมพูลล่าใน luteal phase และเซลล์อสุจิที่เพาะเลี้ยงในเซลล์บุท่อนำไข่ส่วน Isthmic ใน nonluteal phase อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wegner และ Killian (1992) ที่พบว่าความสัมพันธ์ของโปรตีนกับการเป็นสัดในช่วงเริ่มต้นของ nonluteal phase นั้น ความเข้มข้นของโปรตีนส่วนแอมพูลล่าจะมากกว่าส่วน isthmus ซึ่ง King และคณะ (1994) ได้รายงานว่าปริมาณโปรตีนที่หลังจากท่อนำไข่สู่

อาหารเพาะเลี้ยงมีความสัมพันธ์กับเมมเบรนของเซลล์อสุจิซึ่งจะไปเพิ่มกระบวนการ capacitation และเพิ่มการปฏิสนธิในเซลล์อสุจิของวัวได้

Kitiyant และคณะ (1993) รายงานว่าเซลล์บุท่อนำไข่ของสุกรที่ผสมในอาหารเพาะเลี้ยงช่วยส่งเสริมการพัฒนาตัวอ่อนวัวให้พัฒนาผ่าน cells block ไปจนถึงระยะมอรูล่าและระยะบลาสโตซิสได้มากกว่าเซลล์ที่บุท่อนำไข่ของวัวเองและยังมีงานวิจัยที่รายงานไว้ว่า สารหลังจากเยื่อบุภายในท่อนำไข่ของสัตว์หลายชนิด เช่น หนูเม้าส์ หนูแฮมสเตอร์ กระต่ายและสุกร ช่วยส่งเสริมการพัฒนาตัวอ่อนสุกรตั้งแต่ระยะเริ่มต้นจนถึงระยะสุดท้ายของการพัฒนาตัวอ่อน และสารหลังยังช่วยส่งเสริมให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิของตัวอ่อนสูงขึ้นด้วย (White และคณะ, 1989)

Suzuki และคณะ (2000) ศึกษาความสัมพันธ์ของเซลล์ที่ล้อมรอบเซลล์ไข่กับเซลล์ไข่สุกรในช่วงเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ (*in vitro* oocyte maturation) พบว่าในช่วงที่ 44 (อยู่ในช่วง M-I และ M-II stage) ของการเพาะเลี้ยง เซลล์ที่ล้อมรอบเซลล์ไข่แยกตัวออกจากเซลล์ไข่ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์ไข่กำลังจะเจริญสมบูรณ์และพบว่ายังมีการเกาะกันอยู่ระหว่างเซลล์ที่ล้อมรอบเซลล์ไข่เอง (cumulus-cumulus communications) ซึ่งก็ยังไม่ทราบหน้าที่ทางชีวภาพของเซลล์ที่เกาะกันนี้

Hashimoto และคณะ (1988) รายงานว่าความหนาแน่นของเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่วัวจำนวน 1.6 ล้าน ถึง 3.2 ล้าน ที่เติมในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่วัวที่ยังไม่พัฒนาในระยะที่เกิด *in vitro* oocyte maturation นั้นทำให้เซลล์ไข่เจริญพัฒนาได้ดีที่สุด ซึ่งเซลล์ที่ล้อมรอบเซลล์ไข่มีประโยชน์ต่อเซลล์ไข่ในการหลังสารที่มีผลต่อการเจริญพัฒนาหรืออาจช่วยในการนำสารที่กีดการเจริญเติบโต (growth inhibitor) ออกไปจากอาหารเพาะเลี้ยง และ Romar และคณะ (2003) พบว่าการเติมเซลล์บุท่อนำไข่และเซลล์ที่ล้อมรอบเซลล์ไข่สุกรที่ผสมในอาหารเพาะเลี้ยงช่วยให้เซลล์อสุจิสามารถเจาะผ่านเซลล์ไข่สุกรในการทำปฏิสนธิในจานแก้วเพิ่มมากขึ้น งานวิจัยทั้งหมดเป็นการศึกษาประโยชน์ที่นำเซลล์บุท่อนำไข่และเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ไปใช้ในการทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว แต่การศึกษาถึงลักษณะโปรตีน สัณฐานวิทยาของเซลล์ทั้งสองชนิดที่เพาะเลี้ยงนั้น มีการศึกษาน้อยมาก เนื่องจากการศึกษาการแช่แข็งสารหลังจากเซลล์และการนำสารหลังแช่แข็งมาศึกษาการเตรียมความพร้อมของเซลล์อสุจินั้นก็ยังไม่มีความคืบหน้า ดังนั้นการศึกษาดังนี้จึงมีประโยชน์มาก เพราะถ้าสามารถเพาะเลี้ยงเซลล์บุท่อนำไข่และเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่พร้อมศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์อย่างละเอียดได้ทั้งในสภาพธรรมชาติและสภาพที่

เพาะเลี้ยง และสามารถแช่แข็งสารหลังจากเซลล์ในสภาพเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมที่ไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพหรือเสียสภาพโปรตีนน้อยที่สุด ซึ่งก็จะสามารถนำโปรตีนจากสารหลัสนี้มาใช้ประโยชน์ได้จริงดังความคาดหวัง ทางผู้วิจัยก็สามารถที่จะเป็นศูนย์กลางในการเก็บ stock ของสารหลังจากเซลล์ทั้งสองชนิดเพื่อนักวิจัยท่านอื่นที่จะนำสารหลัสนี้ไปศึกษาวิจัยและนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไป

2. รายละเอียดของการดำเนินการวิจัย (Material and Method)

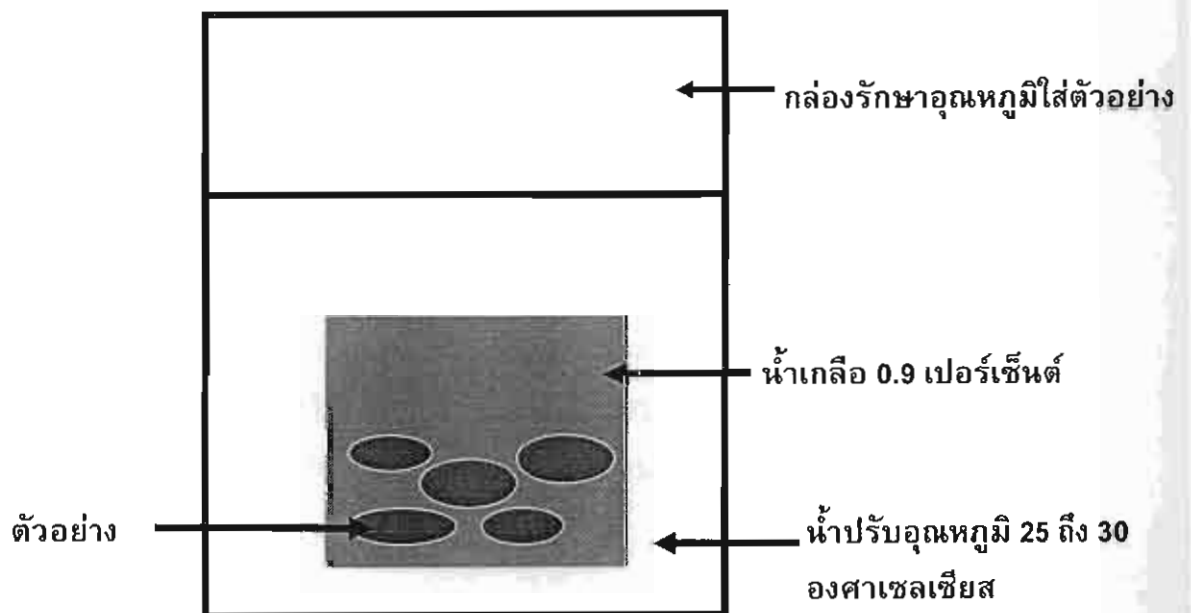
งานวิจัยมีวัตถุประสงค์คือศึกษาและพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยง POEC และ CC ซึ่งรวมอยู่กับเซลล์แกรนูโลซ่า (GC) ในสูตรอาหารที่เหมาะสมด้วยเทคนิคที่ปลอดภัย ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ทั้งสอง ในสภาพธรรมชาติ (*in vivo*) และสภาพเพาะเลี้ยง (*in vitro*) พร้อมศึกษาปริมาณและรูปแบบของโปรตีนที่เซลล์เพาะเลี้ยงทั้งสองหลัส่งูอาหารเพาะเลี้ยงหลัจากเพาะเลี้ยงไปแล้วในช่วงเวลาหนึ่ง งานหลัสุดท้ายคือศึกษาผลของสารหลั (condition medium) จากเซลล์ทั้งสองชนิดต่อการเกิด acrosome reaction ของเซลล์อสุจิในสัตว์เศรษฐกิจที่เลือกศึกษาคือเซลล์อสุจิของวัวที่แช่แข็ง ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ดำเนินการวิจัยตามแผนงานที่วางไว้ได้เป็นอย่างดี ซึ่งประกอบด้วย การทบทวนเอกสารและหาข้อมูลอย่างละเอียดรอบคอบ ได้จัดซื้อสารเคมีและอุปกรณ์ต่างๆ จนครบถ้วนเพื่อเตรียมพร้อมสำหรับงานวิจัย แล้วจึงได้เริ่มศึกษา ผู้วิจัยขอเสนอถึงรายละเอียดของการดำเนินการวิจัยและขออธิบายทุกขั้นตอนอย่างละเอียดเพื่อประโยชน์สูงสุดสำหรับผู้ที่ต้องการศึกษางานทางด้านนี้ต่อไป

2.1 การศึกษาและพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์บุนำไข่และเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบปลอดภัย

2.1.1 การศึกษาและพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยง POEC และ CC ซึ่งเกาะติดกับเซลล์ไข่คือ COCs และอยู่ร่วมกับ GC ผู้วิจัยได้คัดเลือกและเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงแบบปลอดภัย 3 สูตร เพื่อค้นหาสูตรอาหารที่เหมาะสมได้ศึกษาจากตำราและงานวิจัยของผู้อื่นอย่างละเอียดรอบคอบ โดยยึดหลักการว่าสูตรอาหารนี้ต้องเป็นสูตรอาหารที่สามารถเตรียมได้เองในห้องปฏิบัติการ เตรียมง่าย สะดวก ราคาถูก สามารถใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองกลุ่มได้ผลดี

2.1.2 เมื่อได้สูตรอาหารแล้วจึงเริ่มเก็บตัวอย่างจากโรงฆ่าสุกรในจังหวัด นครปฐม เตรียมและเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาพปลอดเชื้อ (sterile technique) โดยทำดังนี้

ก. วิธีการเก็บและเตรียม POEC และ CC+GC สุกรเพื่อเพาะเลี้ยงคือเก็บ ท่อน้ำไขและรังไข่สุกรจากโรงชำแหละสุกรในจังหวัดนครปฐม โดยใช้กรรไกรตัดตัวอย่าง ออกจากซากของสุกรที่เพิ่งตาย ล้างท่อน้ำไขและรังไข่ด้วย 0.9% normal saline ที่ผสม ยาปฏิชีวนะ 2 ถึง 3 ครั้ง จึงบรรจุใส่ถุงเก็บตัวอย่างที่ปลอดเชื้อ (ภาพที่ 1) นำถุงเก็บ ตัวอย่างใส่กระติกที่หล่อด้วยน้ำกลั่น ที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 25 ถึง 30 องศาเซลเซียส และนำตัวอย่างกลับห้องปฏิบัติการภายใน 3 ชั่วโมง จึงนำมาเตรียมเซลล์และการ เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ดังนี้



ภาพที่ 1 ภาพวาดแสดงกล่องและถุงบรรจุตัวอย่าง (รังไข่และปีกมดลูก) ในการออกเก็บ ตัวอย่างภาคสนาม

ข. ล้างท่อนำไข่และรังไข่ ด้วย 0.9% normal saline ที่ผสมยาปฏิชีวนะ แล้วใช้กรรไกรปลายแหลมตัดเยื่อหุ้มต่างๆ ออกจนเหลือไว้เฉพาะท่อนำไข่เท่านั้น (ภาพที่ 2 ก ข และ 4 ค)

ค. ล้างด้านนอกท่อนำไข่และรังไข่ ล้างทำความสะอาดภายนอกแบบปลอดเชื้ออีกครั้งด้วย 0.9% normal saline ที่ผสมยาปฏิชีวนะ แล้วซับทำความสะอาดด้วยผ้า gauze ที่ปลอดเชื้อ

ง. ใช้เข็มดูด 0.9% normal saline ที่ผสมยาปฏิชีวนะต่อกับ syringe สอดภายในท่อเพื่อฉีดน้ำยาเข้าภายใน จากนั้นซับทำความสะอาดด้วยผ้า gauze ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

จ. แบ่งตัวอย่างท่อนำไข่ส่วนหนึ่งนำมาศึกษาสัณฐานวิทยาในสภาพธรรมชาติ โดยตัดจัดแยกท่อนำไข่เป็นสองกลุ่ม กลุ่มที่หนึ่งระยะลูเตียล (luteal phase) และกลุ่มที่สองระยะฟอลลิคูลาร์ (follicular phase) (ท่อนำไข่ระยะลูเตียลนั้นเนื้อเยื่อรอบท่อมี่เส้นเลือดมาเลี้ยงมากเส้นเลือดจะขยายขนาดใหญ่ประกอบกับรังไข่จะพบแผลที่รังไข่เป็นจุดแดงแสดงถึงการเกิดการตกไข่ ส่วนท่อนำไข่ระยะฟอลลิคูลาร์นั้นเส้นเลือดที่มาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อรอบท่อมี่ขนาดปกติและรังไข่ของระยะนี้พบแต่ฟอลลิเคิลที่ยังไม่ตกไข่) ตัดตัวอย่างให้ได้ขนาด 2 ถึง 3 มิลลิเมตร เพื่อนำไปศึกษาทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

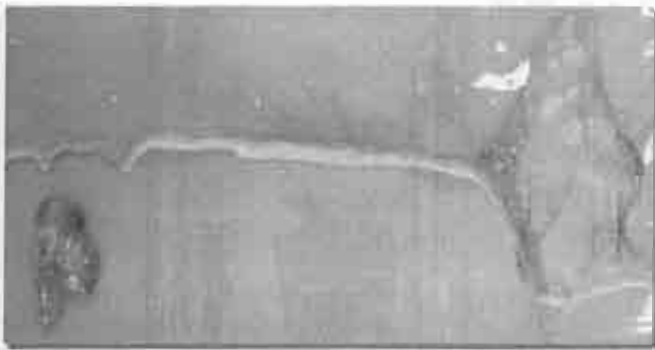
ฉ. นำท่อนำไข่วางในจานแก้วแล้วชุดเซลล์บุท่อนำไข่ด้วยแผ่น glass slide ให้ชุดลากจากส่วนตันท่อไปยังส่วนปลายท่อด้วยความเบามือ (ภาพที่ 2 ง) เซลล์จะหลุดออกทางปลายท่อ แล้วจึงนำเซลล์ใส่ใน cap tube ขนาด 15 มิลลิลิตร



(ก)



(ข)



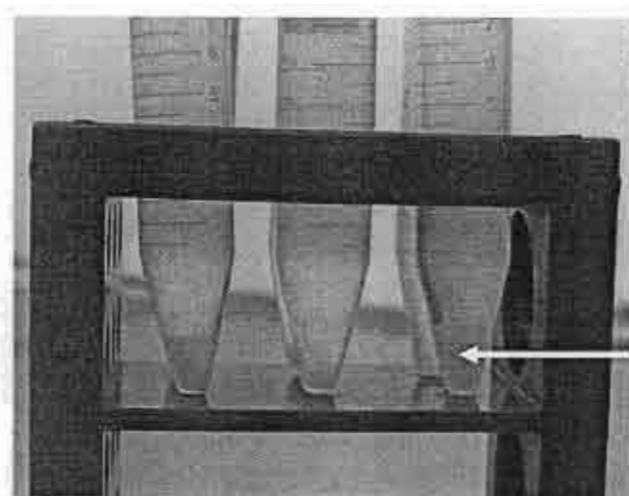
(ค)



(ง)

ภาพที่ 2 (ก) ท่อนำไข่หลังจากล้างทำความสะอาดแล้วจึงถูกซับด้วยผ้า gauze ที่ปลอดเชื้อ (ข) การตัดเยื่อออกจากท่อนำไข่ (ค) ท่อนำไข่และรังไข่ที่ตัดเยื่อหุ้มต่างๆ ออกเรียบร้อยแล้ว (ง) ชุดเซลล์บุท่อนำไข่ด้วยแผ่น glass slide โดยชุดลากจากส่วนต้นท่อไปยังส่วนปลายท่อ

ซ. ให้เติม Hepes buffered tyrodes medium ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ลงใน cap tube แล้วเขย่าล้างด้วยความเบาเมื่อนาน 1 ถึง 2 นาที ตั้งหลอดไว้ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์และมีความชื้นสูงนาน 10 นาที เพื่อให้เซลล์หล่นลงมาตกที่ก้นหลอดแล้ว (ภาพที่ 3) จึงดูดน้ำยาต้านบนทิ้งไปให้คงเหลือแต่เซลล์ที่ก้นหลอดแล้วล้างเซลล์ซ้ำอีก 5 ถึง 7 ครั้ง



เซลล์ที่ล้างตกลงสะสม
ที่ก้นหลอด

ภาพที่ 3 การล้างเซลล์บ่อน้ำไขในน้ำยา HEPES buffered tyrodes medium

ซ. สำหรับการเตรียม CC+GC ให้เตรียมโดยล้างรังไข่ด้วย 0.9% normal saline แล้วเจาะถุงไข่ (follicles) (ภาพที่ 4 ค และ ง) ที่มีขนาด 2 ถึง 6 มิลลิเมตรด้วย เข็มเบอร์ 18 ที่ต่อด้วย 5 มิลลิลิตรของ disposable syringe ผลคือเจาะได้น้ำในถุงไข่ (follicular fluid) ซึ่งภายในมี CC ที่อยู่ล้อมรอบเซลล์ไข่และมี GC ที่อยู่ภายในน้ำในถุงไข่ ให้รวบรวมน้ำในถุงไข่ใส่ใน petri dish แล้วใช้ปิเปตปลายเล็กขนาดมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 200 ไมโครเมตร เลือกดูดเซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ (รวมเรียก cumulus oocyte cumulus complex: COCs) ภายใต้กล้อง stereo microscope (ภาพที่ 4 จ) แบ่งตัวอย่างเพื่อนำมาศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ในสภาพธรรมชาติด้วย กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแล้วนำไปเตรียมตัวอย่างทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดต่อไป



(ก)



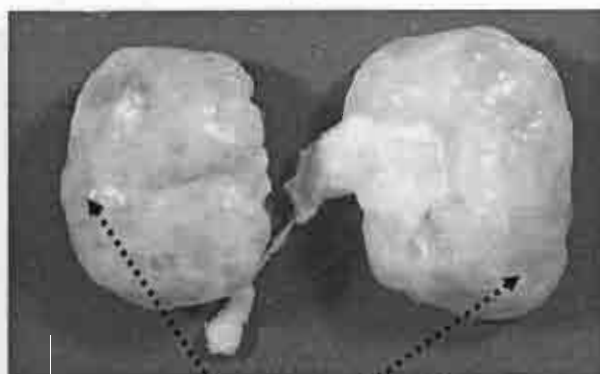
(ข)



(ค)



(ง)



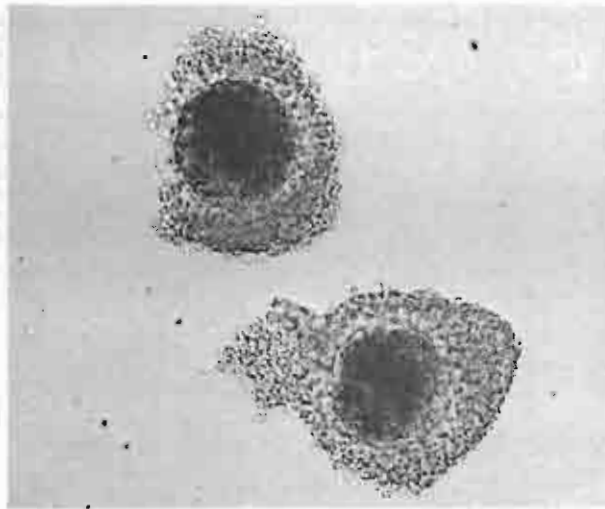
ตำแหน่งที่ใช้เข็มเจาะเซลล์ไข่

(จ)

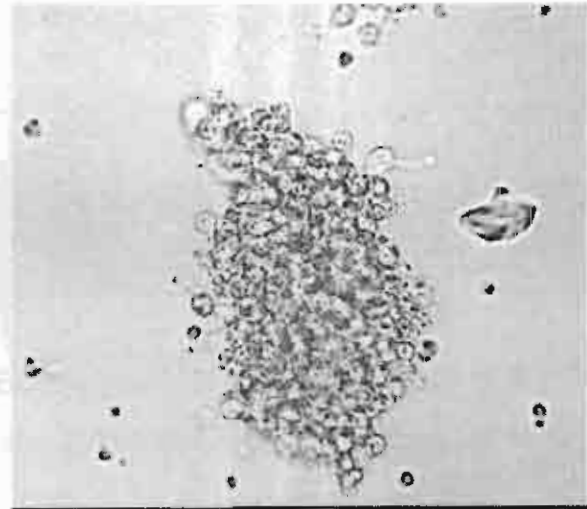


(ฉ)

ภาพที่ 4 (ก) มดลูกและปีกมดลูกสุกรที่ล้างด้วยวิธีปลอดเชื้อ (ข) การตัดรังไข่ออกจากปีกมดลูก (ค) รังไข่ถูกซับทำความสะอาดด้วยผ้า gauze ปลอดเชื้อ (ง) การใช้เข็มเบอร์ 18 ดูดน้ำในถุงไข่ออกจากรังไข่ (จ) แสดงตำแหน่งถุงไข่ที่ใช้เข็มเจาะเซลล์ไข่ (ฉ) การใช้ mouth piece ดูดการแยก COCs และ GC ออกจากน้ำในถุงไข่ที่ทำภายใต้กล้อง stereo microscope



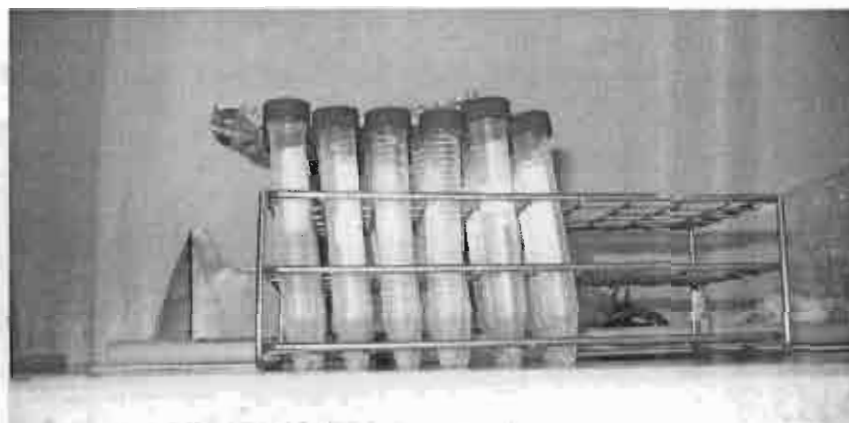
(ก)



(ข)

ภาพที่ 5 (ก) COCs และ (ข) GC ที่ดูดแยกได้จากน้ำในถุงไข่ที่อยู่ในถุงของรังไข่

ฉ. นำเซลล์ CC+GC ส่วนที่เหลือใส่ใน cap tube ขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วเติม HEPES buffered tyrodes medium ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ลงใน cap tube แล้วเขย่าล้างเซลล์ด้วยความเบาเมื่อนาน 1 ถึง 2 นาที ตั้งหลอดไว้ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ และมีความชื้นสูง นาน 10 นาที เพื่อให้เซลล์หล่นมาตกที่ก้นหลอดแล้วจึงดูดน้ำยาด้านบนทิ้งไปให้คงเหลือแต่เซลล์ที่ก้นหลอด แล้วล้างเซลล์ซ้ำอีก 5 ถึง 7 ครั้ง



ภาพที่ 6 แสดงการล้างเซลล์ CC+GC ใน cap tube ที่เติม HEPES buffered tyrodes medium ปริมาณ 10 มิลลิลิตร

ญ. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองนั้นเตรียมจากสูตรอาหารดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง POEC และ CC+GC

อาหารเพาะเลี้ยง	สูตรอาหาร
สูตรที่ 1: Medium 199*	Medium 199 with Earle's salts (Sigma) supplement with 10% Fetal calf serum, 2.2 mg/ml NaHCO_3 (Sigma), 1 M Hepes (Sigma, H-9136), 0.2 mM pyruvic acid and 50 $\mu\text{g/mL}$ gentamicin sulfate (pH 7.2)
สูตรที่ 2: RPMI 1640**	RPMI 1640 (Gibco), 10% Fetal calf serum, 0.2 mM pyruvic acid and 50 $\mu\text{g/mL}$, gentamicin sulfate, penicillin-streptomycin (Dumex), Fungizone, 1 M Hepes (Sigma, H-9136), NaHCO_3 (10%) (Sigma) (pH 7.2)
สูตรที่ 3: DMEM***	DMEM with 10% Fetal calf serum, 2.2 mg/ml NaHCO_3 (Sigma), 1 M Hepes (Sigma, H-9136), 0.2 mM pyruvic acid and 50 $\mu\text{g/mL}$ gentamicin sulfate (pH 7.2)

อาหารสูตร M 199 เหมาะสำหรับใช้เลี้ยง endothelium cells ต่างๆ ส่วนอาหารสูตร Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 สำหรับเลี้ยงเซลล์ที่เป็นเซลล์ตั้งต้นของเซลล์เม็ดเลือด ซึ่งสูตรอาหารดัดแปลงมาจาก McCoy 5A medium เหมาะสำหรับใช้เลี้ยง human leukemia, human tumor cells, human lymphoblastoid cell lines, mouse leukemia, mouse erythroleukemia, mouse myeloma และอาหารสูตร DMEM เป็นอาหารสูตรดัดแปลงเหมาะสำหรับใช้เลี้ยง epithelial cells และ endothelium cells (เรณู เวชรัชต์พิมล; 2540) M199* และ RPMI1640** และ และ DMEM*** ที่มีองค์ประกอบของกรดอะมิโน วิตามิน แร่ธาตุที่สำคัญอื่นๆ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของอาหารสูตร M 199* และ RPMI1640** และ DMEM***
(Freshney, R. I.; 1987)

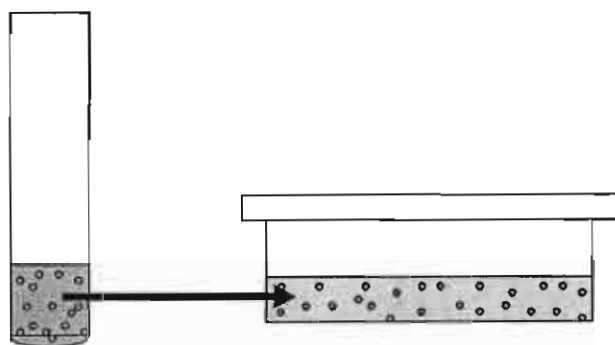
องค์ประกอบ	อาหารสูตร Medium 199*	อาหารสูตร RPMI 1640**	อาหารสูตร DMEM***
	mg/l	mg/l	mg/l
Amino acids			
L-alanine	25.0	-	-
L-arginine (freebase)	-	200	-
L-arginine.HCl	70.0	-	84.0
L-asparagine	-	50.0	-
L-asparagine.H ₂ O	-	-	-
L-aspartic acid	30.0	20.0	-
L-cysteine (free base)	-	-	-
L-cystine	-	50.0	48.0
L-cystine,2Na	23.7	-	-
L-cysteine HCl.H ₂ O	0.0987	-	-
L-glutamic acid	66.8	20.0	-
L-glutamine	100	300	584
Glycine	50.0	10.0	30.0
L-histidine (free base)	-	15.0	-
L-histidine HCl.H ₂ O	21.9	-	42.0
L-hydroxy-proline	10.0	20.0	-
L-isoleucine	20.0	50.0	105
L-leucine	60.0	50.0	105
L-lysine HCl	70.0	40.0	146
L-methionine	15.0	15.0	30.0
L-phenylalanine	25.0	15.0	66.0
L-proline	40.0	20.0	-
L-serine	25.0	30.0	42.0
L-threonine	30.0	20.0	95.0
L-tryptophan	10.0	5.00	16.0
L-tyrosine	-	20.0	72.0
L-tyrosine 2Na	49.7	-	-
L-Valine	25.0	20.0	94.0

องค์ประกอบ	อาหารสูตร Medium 199*	อาหารสูตร RPMI 1640**	อาหารสูตร DMEM***
	mg/l	mg/l	mg/l
Vitamins			
L- ascorbic acid	0.050	-	-
Biotin	0.010	0.200	-
D-Ca pantothenate	0.010	0.250	4.00
Calciferol	0.100	-	-
Choline chloride	0.500	3.00	4.00
Folic acid	0.010	1.00	4.00
l-inositol	0.050	35.0	7.20
Nicotinamide	0.025	1.00	4.00
Pyridoxal HCl	0.025	-	4.00
Riboflavin	0.010	0.20	0.40
Thiamine HCl	0.010	1.00	4.00
Vitamine B ₁₂	-	0.005	-
Pyridoxine HCl	0.025	1.00	-
Cholesterol	-	-	-
Para-aminobenzoic acid	0.050	1.00	-
Nicotinic acid	0.025	-	-
Menaphthone sodium bisulphite 3H ₂ O	0.019	-	-
DL-α tocopherol PO ₄ .2Na	0.01	-	-
Vitamin A acetate	0.115	-	-
Riboflavin PO ₄ .2Na	-	-	-
Thiamin mono PO ₄ . 2H ₂ O	-	-	-
Inorganic salts			
CaCl ₂ (anhyd.)	-	-	200
CaCl ₂ .2H ₂ O	186.0	-	-
Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	0.10	-	0.10
KCl	400	400	400
KH ₂ PO ₄	60.0	-	-

องค์ประกอบ	อาหารสูตร Medium 199*	อาหารสูตร RPMI 1640**	อาหารสูตร DMEM***
	mg/l	mg/l	mg/l
MgCl ₂ .6H ₂ O	-	-	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	200	100	200
NaCl	8,000	6,000	6,400
NaHCO ₃	350	2,200	3,700
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	-	-	125
Na ₂ HPO ₄ (anhyd.)	47.5	-	-
Na ₂ H ₂ PO ₄ .7H ₂ O	-	1,512	-
CuSO ₄ .5H ₂ O	-	-	-
FeSO ₄ .7H ₂ O	-	-	-
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-	-	-
CaNO ₃ .4H ₂ O	-	100	-
Other components			
D-glucose	1,000	2,000	4,500
D-galactose	-	-	-
Lipoic acid	-	-	-
Phenol red	17.0	5.00	15.0
Sodium pyruvate	-	-	110
Hypoxanthine	0.30	-	-
Linoleic acid	-	-	0.084
Putrescine 2HCl	-	-	-
Thymidine	-	-	-
Coccarboxylase	-	-	-
Coenzyme A	-	-	-
Deoxyadenosine	-	-	-
Deoxycytidine HCl	-	-	-
Deoxyguanosine	-	-	-
Diphosphopyridine nucleotide.4H ₂ O	-	-	-

องค์ประกอบ	อาหารสูตร Medium 199*	อาหารสูตร RPMI 1640**	อาหารสูตร DMEM***
	mg/l	mg/l	mg/l
Ethanol for solubilizing	-	-	-
lipid component			
dinucleotide			
Glutathione (reduced)	0.05	1.00	-
5-methyl-deoxycytidine	-	-	-
Sodium acetate . 3H ₂ O	-	-	-
Sodium glucuronate. H ₂ O	-	-	-
Triphosphopyridine	-	-	-
nucleotide			
Tween 80	5.00	-	-
Uridine triphosphate.4H ₂ O	-	-	-
Adenine SO ₄	10.0	-	-
5' AMP	0.02	-	-
ATP- 2Na	10.0	-	-
Cholesterol	0.02	-	-
2-Deoxyribose	0.50	-	-
Guanine HCl	0.30	-	-
D-ribose	0.50	-	-
Na acetate	36.7	-	-
Thymine	0.30	-	-
Uracil	0.30	-	-
Xanthine	0.30	-	-
CO ₂ (gas phase)	Ambient	5%	10%

ฏ. ให้นำเซลล์ที่เตรียมได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ 3 สูตรที่เตรียมไว้แล้วในอัตราส่วนเซลล์ 1 ส่วนต่ออาหารเพาะเลี้ยง 50 ส่วน โดยเลี้ยงเซลล์ใน 60 มิลลิเมตร falcon dish (ภาพที่ 7) บ่มเซลล์ในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ ที่มีความชื้นสูง เพื่อการศึกษาเปอร์เซ็นต์การรอดตายของเซลล์ เมื่อเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดในการเพาะเลี้ยงเซลล์ จากนั้นศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ในขณะเพาะเลี้ยงต่อไป



ภาพที่ 7 ภาพวาดแสดงการถ่ายเซลล์เพาะเลี้ยงลงใน falcon dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตร ในอัตราส่วนเซลล์ 1 ส่วนต่ออาหารเพาะเลี้ยง 50 ส่วน



(ก)



(ข)



(ค)

ภาพที่ 8 (ก) Laminar air flow ใช้เพื่อทำงานแบบปลอดเชื้อ (ข) ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์หรือตู้ปั๊มเซลล์ (incubator) ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เสริมด้วยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์และมีความชื้นสูง (ค) แสดงสภาพภายในตู้ปั๊มที่วางจานเพาะเลี้ยง falcon dish (ลูกศรที่ชี้ขึ้นที่ 2)

เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ทั้งสองในสภาพธรรมชาติและสภาพเพาะเลี้ยงภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับและกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดนานเป็นเวลา 48, 96 และ 144 ชั่วโมง จึงเก็บสารหลังจากเซลล์เพาะเลี้ยง (condition medium) นำมาแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำ (ทดสอบสองแบบคือที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และที่ -196 องศาเซลเซียส) พร้อมวัดปริมาณโปรตีน คำนวณหาค่าโปรตีนของสารหลังจากเซลล์เปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนมาตรฐาน แล้วศึกษาลักษณะโปรตีนและวิเคราะห์สารหลังจากเซลล์ทั้งสอง

สำหรับสัณฐานวิทยาของ CC มีรูปร่างกลม (round shape) และไม่มีซีเลีย ซึ่ง CC อยู่ชิดติดกับเมมเบรนของเซลล์ไข่ ส่วน GC ที่อยู่ในถุงไข่ นั้นมีรูปร่างกลม เซลล์ทั้งสองมีขนาดประมาณ 5 ถึง 8 ไมโครเมตร อยู่รวมเป็นกลุ่มและสามารถเพาะเลี้ยงได้ดีในอาหารสูตร M199, RPMI 1640 และ DMEM เช่นกัน

การศึกษารูปแบบของโปรตีนที่หลังจากเซลล์ทั้งสองด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่ารูปแบบของโปรตีนที่สร้างขึ้นจากเซลล์ทั้งสองชนิดมีความคล้ายคลึงกัน โดยพบแถบโปรตีนที่น่าสนใจมีขนาดประมาณ 17, 22 kDa และที่มีขนาดมากกว่า 220 kDa ซึ่งต้องทำการศึกษาต่อไปว่าเป็นโปรตีนชนิดใด

2.2 การศึกษาและเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ POEC และ CC+GC รวมถึง COCs ในสภาพธรรมชาติและสภาพเพาะเลี้ยง

ผู้วิจัยได้ศึกษาเซลล์เพาะเลี้ยงและเซลล์ที่มิได้เพาะเลี้ยงของเซลล์ทั้งหมดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยวิธีการเตรียมตัวอย่างทางจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดมีดังนี้

2.2.1 นำตัวอย่างคงสภาพของเนื้อเยื่อในน้ำยาคงสภาพคือ 2.5% glutaraldehyde ที่ผสมใน 0.1M phosphate buffered pH 7.2 นาน 24 ชั่วโมง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2.2 ครบเวลาให้ล้างตัวอย่าง (washing) ใน 0.1M phosphate buffered pH 7.2 จำนวน 3 ครั้ง นานครั้งละ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2.3 ตีน้ำออกจากตัวอย่างโดยแช่ตัวอย่างในแอลกอฮอล์ จากความเข้มข้นน้อยไปยังความเข้มข้นมาก (10, 20, 30, 50, 70, 80, 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์) ทำขั้นตอนละ 2 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2.4 ทำตัวอย่างให้แห้ง ณ จุดวิกฤตด้วยเครื่องทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤต (critical point dryer) ซึ่งต้องห่อเตรียมตัวอย่างดังภาพที่ 9 จึงนำตัวอย่างเข้าเครื่อง



(ก)



(ข)



(ค)

ภาพที่ 9 แสดงการห่อตัวอย่าง (ก ถึง ค) ที่อยู่ในแอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำตัวอย่างเข้าเครื่องทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤต

2.2.5 เมื่อตัวอย่างแห้งให้ติดตัวอย่างบนฐานรองตัวอย่าง (stub) ด้วยเทปคาร์บอน (carbon tape)

2.2.6 ฉาบตัวอย่างด้วยทอง (gold coat) ให้มีความหนา 20 นาโนเมตร แล้วทำการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (CamScan Analytical, Maxim 2000S) ที่กระแสไฟฟ้า 10 kV.

2.3 การศึกษาเปอร์เซ็นต์การรอดตายของเซลล์ (Percent viability) ในอาหารเพาะเลี้ยง 3 สูตร

โดยศึกษาเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์นาน 48, 96, 144, 192 และ 240 ชั่วโมง ใช้วิธีการสุ่มเลือกเซลล์เพาะเลี้ยงจากจานเพาะเลี้ยงมาหนึ่งหยดย้อมด้วยสี 0.4% trypan blue 1 หยด ผสมให้เข้ากัน ปิด cover slide เพื่อดูเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง นับจำนวนและคิดเปอร์เซ็นต์รอดตาย ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.4 การเก็บสารหลังและรักษาสารหลังจากเซลล์เพาะเลี้ยง (condition medium) ด้วยวิธีแช่แข็ง

2.4.1 เก็บสารหลังจากเซลล์เพาะเลี้ยงทั้งสองและรักษาด้วยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ ต่ำ หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์นาน 48, 96 และ 144 ชั่วโมง

2.4.2 นำเซลล์ที่ผสมในสารหลังไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จึงดูดเก็บสารด้านบนใส่หลอดแช่แข็งแล้วนำไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว (อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส) ซึ่งสามารถเก็บสารหลังได้นาน แต่ต้องคอยเติมลิควิดไนโตรเจนในถัง ตลอดเวลาอย่าให้ลิควิดไนโตรเจนแห้ง

2.5 ศึกษาลักษณะโปรตีนที่เซลล์เพาะเลี้ยงทั้งสองชนิดหลังในอาหาร เพาะเลี้ยง โดยทำการศึกษาดังนี้

2.5.1 วัดปริมาณโปรตีนของสารหลังจากเซลล์ด้วยวิธีของ Lowry (1951) ใช้ spectrophotometer ที่ช่วงค่าความยาวคลื่นแสง 280 นาโนเมตร คำนวณหาค่าโปรตีน เปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนมาตรฐาน (standard protein of bovine serum albumin)

2.5.2 ศึกษาโปรตีนที่เซลล์หลังด้วยวิธี Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) วิเคราะห์สารหลังจากเซลล์หลังจากเพาะเลี้ยงเป็น นาน 48, 96 และ 144 ชั่วโมง โดยมีวิธีการดังนี้

การเตรียมวัสดุและอุปกรณ์

- ก. Automatic pipette: Pipetteman, Gilson, France
- ข. Freezer (-20°C)
- ค. UV/VIS Spectrophotometer: Model 7800, Jasco Ltd., Japan
- ง. Vortex mixer: Science Industries
- จ. เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส XCell SureLock™ Mini-Cell (invitrogen)
- ฉ. NuPAGE® Novex Bis-Tris Gels (invitrogen)
- ช. NuPAGE® LSD Sample buffer (4 X) (invitrogen)
- ซ. NuPAGE® Reducing Agent (10 X) (invitrogen)
- ณ. โปรตีนมาตรฐาน BenchMark™ Protein ladder (invitrogen)
- ญ. Staining solution ประกอบด้วย
 - Coomassie Brilliant Blue R-250 จำนวน 250 กรัม

- Destaining solution
- เมทานอลปริมาณ 500 มิลลิลิตร
- Glacial acetic acid ปริมาณ 170 มิลลิลิตร
- น้ำกลั่นปริมาณ 1,300 มิลลิลิตร

2.5.3 วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่างโดยวิธีของ Lowry (1951) แล้วเตรียมสารตัวอย่างให้มีปริมาณโปรตีนคงที่เท่ากันคือ 50 ไมโครกรัม ต่อตัวอย่าง โดยผสมสารตัวอย่าง ดังนี้

สารตัวอย่าง	x	ไมโครลิตร
NuPAGE [®] LSD Sample buffer (4 ×)	2.5	ไมโครลิตร
NuPAGE [®] Reducing Agent (10 ×)	1.0	ไมโครลิตร
น้ำ deionized เติมจนได้ปริมาณเป็น	10	ไมโครลิตร

2.5.4 ผสมสารตัวอย่างให้เข้ากันดี นำสารตัวอย่างนี้ไปต้มให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วนำไป load ลงในแต่ละ well ทำเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน BenchMark[™] Protein ladder ทำการแยกโดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 200 โวลต์ นานประมาณ 50 นาที ใน MOPS buffer

2.5.5 นำเจลที่ได้ไปย้อมใน staining solution นาน 2 ชั่วโมง แล้ว destain ด้วย destaining solution

2.6 ทดสอบสารหลังจาก POEC และ CC+GC ในการเตรียมความพร้อมของเซลล์อสุจิัววแช่แข็ง

การศึกษานี้ประเมินจากการที่เซลล์อสุจิสามารถเกิดกระบวนการ acrosome reaction ได้หลังจากบ่มกับสารหลังจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยง เพื่อประเมินคุณภาพของสารหลังจากเซลล์เพาะเลี้ยงที่แช่แข็งในระยะเวลาต่างๆ (1, 2 และ 3 เดือน) โดยแบ่งการทดลองเป็น 9 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมคือเซลล์อสุจิไม่ได้บ่มกับสารหลังใดแต่ให้เซลล์อสุจิบ่มกับอาหารเลี้ยงเซลล์อสุจิแทน

กลุ่มที่ 2 เซลล์อสุจิบ่มกับสารหลังจาก POEC ที่ไม่ได้แช่แข็ง

กลุ่มที่ 3 เซลล์อสุจิบ่มกับสารหลังจาก POEC ที่แช่แข็งนาน 1 เดือน

กลุ่มที่ 4 เซลล์อสุจิบ่มกับสารหลังจาก POEC ที่แช่แข็งนาน 2 เดือน

กลุ่มที่ 5 เซลล์อสุจิบ่มกับสารหลังจาก POEC ที่แช่แข็งนาน 3 เดือน

กลุ่มที่ 6 เซลล์อสุจิบ่มกับสารหลังจาก CC+GC ของสุกรไม่ได้แช่แข็ง

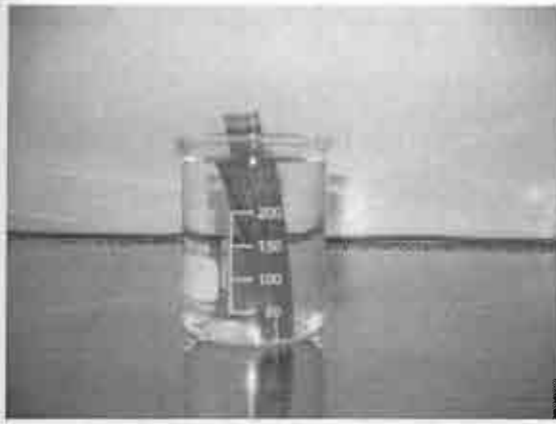
กลุ่มที่ 7 เซลล์อสุจิบ่มกับสารหลังจาก CC+GC ของสุกรที่แช่แข็งนาน 1 เดือน
กลุ่มที่ 8 เซลล์อสุจิบ่มกับสารหลังจาก CC+GC ของสุกรที่แช่แข็งนาน 2 เดือน
กลุ่มที่ 9 เซลล์อสุจิบ่มกับสารหลังจาก CC+GC ของสุกรที่แช่แข็งนาน 3 เดือน

2.6.1 การเตรียมเซลล์อสุจิัวแช่แข็งก่อนการบ่มคือ การนำเซลล์อสุจิัวที่แช่แข็งมาคัดเลือกเซลล์อสุจิที่แข็งแรงโดยวิธีการว่ายน้ำขึ้น (swim-up technique) ตามวิธีของ Kittiyant และคณะ (1993) มีขั้นตอนคือ

ก. นำเซลล์อสุจิัวแช่แข็งออกจากถังไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) จำนวน 20 หลอด นำมาให้อยู่ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (post thawing deep frozen semen) โดยอุ่นหลอดที่บรรจุเซลล์อสุจิในน้ำที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 1 ถึง 2 นาที แล้วจึงเขี่ยหลอดให้สะอาดด้วยผ้าขาวบางที่ปลอดเชื้อ (ภาพที่ 10 ก และ ข)

ข. ตัดปลายหลอดทั้งสองด้านออกเพื่อให้เซลล์อสุจิไหลออกมาแล้วนำมาใส่หลอดทดลองที่ปลอดเชื้อ (ภาพที่ 10 ค และ ง)

ค. เตรียมน้ำยาล้างเซลล์อสุจิ (sperm washing medium) สำหรับล้างเซลล์อสุจิหลอดละ 2 มิลลิลิตร แล้วหยอดเซลล์อสุจิปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงที่ก้นหลอดทดลอง (ดังภาพที่ 10 จ ถึง ฉ) นำหลอดเข้าตู้บ่มที่สิ่งแวดล้อมเดียวกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ข้างต้น เป็นนาน 1 ชั่วโมง เพื่อคัดเลือกเซลล์อสุจิที่แข็งแรงให้ว่ายน้ำขึ้นสู่ด้านบนของน้ำยาเพาะเลี้ยง ส่วนเซลล์ที่ไม่แข็งแรงยังคงอยู่ที่ก้นหลอดทดลอง



(ก)



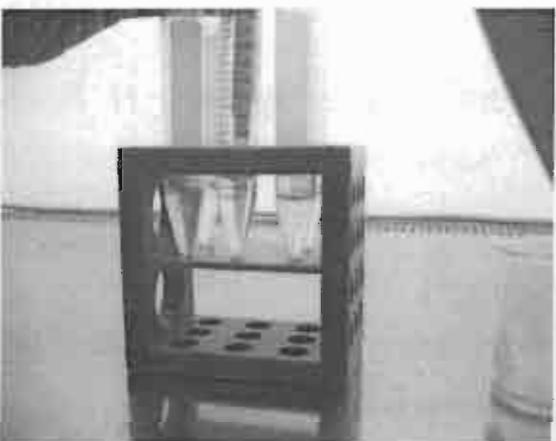
(ข)



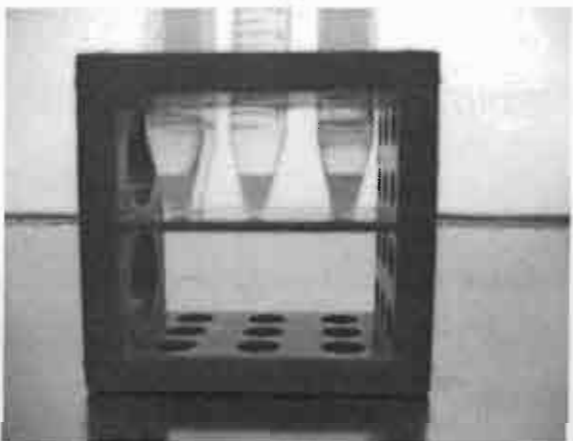
(ค)



(ง)



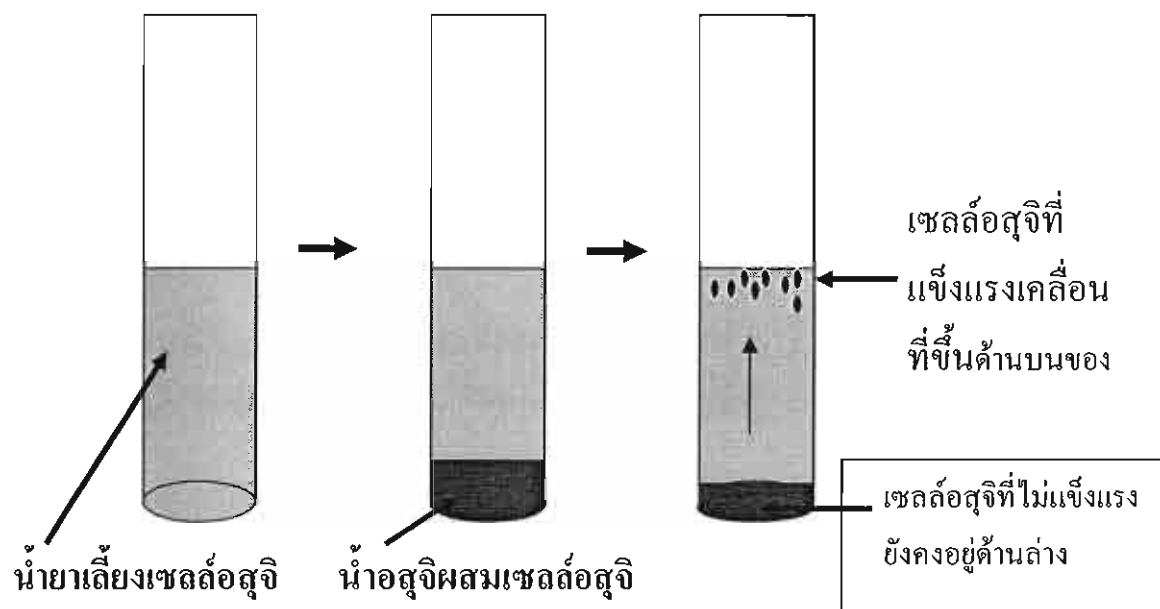
(จ)



(ฉ)

ภาพที่ 10 (ก) แสดงการทำ post thawing deep frozen semen โดยอุ่นหลอดที่บรรจุ เซลล์อสุจิในน้ำที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 1 ถึง 2 นาที (ข) เช็ดหลอดให้สะอาดด้วย ผ้าขาวบางที่ปลอดเชื้อ (ค และ ง) ตัดปลายหลอดทั้งสองด้านออกเพื่อให้เซลล์อสุจิไหลลง ปีกเกอร์ที่ปลอดเชื้อ (จ และ ฉ) หยอดเซลล์อสุจิปริมาตร 200 ไมโครลิตรลงที่ก้นหลอดที่มี sperm washing medium ปริมาณ 2 มิลลิลิตร

ง. เมื่อครบเวลาจึงดูดเซลล์อสุจิด้านบนที่แข็งแรงเก็บไว้ใส่หลอดทดลองอันใหม่ตามภาพที่ 11 แล้วล้างเซลล์อสุจิให้สะอาดด้วยน้ำยาล้างเซลล์อสุจิประมาณ 10 มิลลิลิตร โดยเติมน้ำที่สะอาดที่มีเซลล์อสุจิและเขย่าล้างเบาๆ จึงนำไปปั่นแยกด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 ถึง 2,000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที ครบเวลาแล้วดูดน้ำยาล้างเซลล์อสุจิส่วนบนทิ้ง



ภาพที่ 11 แสดงอสุจิที่แข็งแรงได้ว่ายขึ้นสู่ด้านบนของน้ำยาเลี้ยงเซลล์อสุจิ ส่วนเซลล์ที่ไม่แข็งแรงยังคงอยู่ที่ก้นหลอดทดลอง

จ. การเตรียมหัดอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์อสุจิให้อาหารเพาะเลี้ยงปริมาตร 50 ไมโครลิตร หยดในจานเพาะเลี้ยงด้านบนให้ปกคลุมหยดน้ำยาด้วยฟาราฟิน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วเติมเซลล์อสุจิจำนวน 500,000 ถึง 1,000,000 เซลล์ ต่อน้ำยาเพาะเลี้ยง 1 หยด ที่บ่มกับสารหลังที่ต้องการศึกษา (POEC หรือ CC+GC) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตามตารางที่ 3 และกลุ่มที่สองบ่มกับสารหลังของ CC+GC ตามตารางที่ 4

ฉ. บ่มเซลล์อสุจิทั้ง 9 กลุ่มในตู้บ่มเซลล์ ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เสริมด้วยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์ และมีความชื้นสูง

ช. เมื่อครบเวลาให้ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับพร้อมบันทึกภาพ (ภาพที่ 12)

ตารางที่ 3 แบบแผนการทดลองเพื่อประเมินการเกิด acrosome reaction ของอสุจิวัวที่ บ่มกับสารหลัง POEC ที่แช่แข็งในระยะเวลาต่างๆ

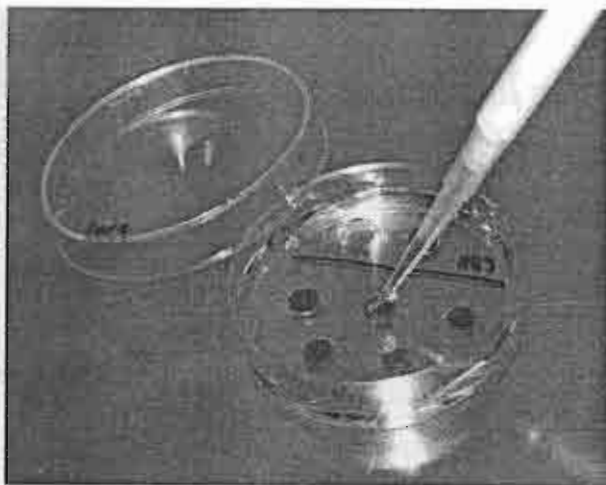
กลุ่มที่	เซลล์ อสุจิ	สารหลัง POEC ไม่ได้ แช่แข็ง	สารหลัง POEC แช่แข็งนาน 1 เดือน	สารหลัง POEC แช่ แข็งนาน 2 เดือน	สารหลัง POEC แช่ แข็งนาน 3 เดือน
1. กลุ่มควบคุม	/	-	-	-	-
2. เซลล์อสุจิ + สารหลัง POEC ไม่ได้แช่แข็ง	/	/	-	-	-
3. เซลล์อสุจิ + สารหลัง POEC แช่แข็ง 1 เดือน	/	-	/	-	-
4. เซลล์อสุจิ + สารหลัง POEC แช่แข็ง 2 เดือน	/	-	-	/	-
5. เซลล์อสุจิ + สารหลัง POEC แช่แข็ง 3 เดือน	/	-	-	-	/

หมายเหตุ: เครื่องหมาย / คือมีส่วนที่เติมสารหลัง
เครื่องหมาย - คือไม่ได้เติมสารหลังจากเซลล์

ตารางที่ 4 แบบแผนการทดลองเพื่อประเมินการเกิด acrosome reaction ของเซลล์อสุจิ วัวกับสารหลังจาก CC+GC ที่แช่แข็งในเวลาต่างๆ

กลุ่มที่	เซลล์ อสุจิ	สารหลัง CC+GC ไม่ได้แช่ แข็ง	สารหลัง CC+GC แช่แข็งนาน 1 เดือน	สารหลัง CC+GC แช่แข็งนาน 2 เดือน	สารหลัง CC+GC แช่แข็งนาน 3 เดือน
1. กลุ่มควบคุม	/	-	-	-	-
2. เซลล์อสุจิ + สารหลัง CC+GC ไม่ได้แช่แข็ง	/	/	-	-	-
3. เซลล์อสุจิ + สารหลัง CC+GC แช่แข็ง 1 เดือน	/	-	/	-	-
4. เซลล์อสุจิ + สารหลัง CC+GC แช่แข็ง 2 เดือน	/	-	-	/	-
5. เซลล์อสุจิ + สารหลัง CC+GC แช่แข็ง 3 เดือน	/	-	-	-	/

หมายเหตุ: เครื่องหมาย / คือมีส่วนที่เติมสารหลังและเครื่องหมาย
เครื่องหมาย - คือไม่ได้เติมสารหลังจากเซลล์



(ก)



(ข)

ภาพที่ 12 แสดงการเตรียมหยดน้ำยาเพาะเลี้ยง (culture drop) เซลล์อสุจิเพื่อบ่มกับสารหลัง (POEC หรือ CC) (ข) แสดงการศึกษาการเกิด acrosome reaction ภายใตกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ

2.6.2 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อประเมินการเกิด acrosome reaction ของเซลล์อสุจิหลังการบ่มด้วยสารหลังที่ต้องการศึกษา ภายใตกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านมีรายละเอียดดังนี้

ก. นำเซลล์อสุจิหลังบ่มกับสารหลังจาก POEC และ CC+GC (คำนวณตามปริมาตรของการทดลองที่ 2.6.1) เมื่อครบเวลาที่บ่มให้นำทุกกลุ่มทดลองมาปั่นล้างด้วยเครื่องปั่นแรงสูง 1,500 ถึง 2,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อเปลี่ยนและล้างของสารเดิมออก

ข. คงสภาพตัวอย่างด้วยน้ำยาคงสภาพกลูตาราลดีไฮด์ 2.5 เปอร์เซ็นต์ (2.5% glutaraldehyde) ที่ผสมอยู่ใน 0.1M phosphate buffer pH 7.2 โดยตัวอย่างอยู่ในน้ำยาคงสภาพนาน 24 ชั่วโมง (ทุกขั้นตอนตั้งแต่ข้อ ข. ถึง ฉ. ต้องทำในตู้ดูดควัน)

ค. ใช้ปิเปตดูดน้ำยาคงสภาพเดิมทิ้งแล้วล้างตัวอย่างด้วยบัฟเฟอร์คือ 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 ใหม่อีก 2 ครั้ง จากนั้นเติมน้ำยาคงสภาพตัวที่สองคือ 1% osmium tetroxide (OsO_4) ซึ่งผสมอยู่ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 แล้วแช่ตัวอย่างในน้ำยาคงสภาพนาน 2 ชั่วโมง (ทำในที่มืดและในตู้ดูดควัน)

ง. ครบเวลาให้ใช้ปิเปตดูด OsO_4 ออกแล้วล้างตัวอย่างด้วยบัฟเฟอร์อีก 2 ครั้ง

จ. ตี้งน้ำออกจากเซลล์โดยใช้เอทิลแอลกอฮอล์ ให้ดูดซับเฟอร์เก่าออกจากตัวอย่างแล้วเติมเอทิลแอลกอฮอล์ ดังนี้ 30, 50, 70, 80, 90 และ 95 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยแช่ตัวอย่างนานครั้งละ 10 ถึง 15 นาที ทำขั้นตอนละ 2 ครั้ง (ทุกครั้งต้องล้างเอทิลแอลกอฮอล์ของเดิมออก) สุดท้ายเป็นเอทิลแอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์ ทำ 2 ครั้งเช่นกัน

ฉ. แทนที่เอทิลแอลกอฮอล์ด้วยพลาสติกโดยใช้ propylene oxide เดิมลงไปให้ท่วมตัวอย่างทิ้งไว้นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาแล้วเท propylene oxide ออกแล้วเติม propylene oxide ใหม่อีก 2 ครั้ง ตั้งตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อ propylene oxide แทรกซึมเข้าชิ้นตัวอย่างได้อย่างทั่วถึง

ช. ให้ผสม epoxy resin หนึ่งส่วนกับ propylene oxide หนึ่งส่วน กวนให้ส่วนผสมเข้ากันได้ดี จึงเทส่วนผสมนี้ลงใน capsule ขนาด 1.5 มิลลิเมตร แล้วค่อยๆ เชียกก่อนเซลล์สุญให้จมลงไปในส่วนผสม จึงปิดฝา capsule เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง

ซ. ผสม epoxy resin สองส่วนกับ propylene oxide หนึ่งส่วน แล้วกวนให้ส่วนผสมเข้ากันได้ดีแล้วจึงค่อยๆ เชียขึ้นตัวอย่างจากส่วนผสมเดิม (ส่วนผสม epoxy resin หนึ่งส่วนต่อ propylene oxide หนึ่งส่วน) มาใส่ในส่วนผสมใหม่ (ส่วนผสม epoxy resin สองส่วนต่อ propylene oxide หนึ่งส่วน) เพื่อให้ epoxy resin ค่อยๆ แทรกซึมเข้าไปในตัวอย่างได้ดี จากนั้นปิดฝา capsule เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 12 ชั่วโมง

ณ. ครบเวลาให้เปิดฝา capsule เพื่อให้ propylene oxide ระเหยออกให้หมดใช้เวลาประมาณ 2 ถึง 3 ชั่วโมง และต้องทำในตู้ดูดควันเพราะ propylene oxide เป็นสารพิษ

ญ. ผังชิ้นตัวอย่าง (embedding) ลงใน pure epoxy resin โดยนำ pure epoxy resin เทลงไปในแม่พิมพ์ (mold) แล้วค่อยๆ เชียตัวอย่างนำมาฝังใน pure epoxy resin ที่อยู่ในแม่พิมพ์ ให้ตั้งแม่พิมพ์ไว้ในตู้ดูดไอสารเคมีที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้นำแม่พิมพ์ที่มีตัวอย่างไปเข้าตู้อบ (hot oven) ตั้งอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ครบเวลาแล้วปรับอุณหภูมิของตู้อบให้เป็น 60 องศาเซลเซียส แล้วตั้งตัวอย่างไว้ในตู้อบต่อไปอีก 72 ชั่วโมง เพื่อให้ pure epoxy resin แข็งตัวขึ้น (polymerize)

ฎ. เมื่อ pure epoxy resin แข็งตัวแล้วให้แกะชิ้นตัวอย่างออกจากแม่พิมพ์ และตัดแต่ง block ให้ได้ขนาดที่เหมาะสม

ฏ. นำ block ตัวอย่างไปตัดให้บาง 60 ถึง 90 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอัลตราไมโครโทม (ultra microtome) โดยใช้มีดกระจก (glass knife) แล้วจึงซ้อนตัวอย่างที่ถูกตัดบางวางลงบน grid (เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 มิลลิเมตร) จึงย้อมตัวอย่างด้วยยูเรนิลอะซิเตต 5 เปอร์เซ็นต์ (UO_2) ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$)₂ .2H₂O และ เลดอะซิเตต 0.5 เปอร์เซ็นต์ $\text{Pb}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ เพื่อเพิ่มความเปรียบต่าง (contrast) และตัวอย่างนำไฟฟ้าได้ดี แล้วล้างส่วนที่เกินออกด้วยน้ำกลั่น 2 ถึง 3 ครั้งจึงจับให้แห้ง

ฐ. นำชิ้นตัวอย่างไปศึกษาโครงสร้างภายในด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน ที่กระแสไฟแรงสูง 80 kV.

2.7 การคำนวณผลทางสถิติ

การคำนวณ Mean และ Standard deviation ของค่ากลางของแต่ละการทดลอง เช่นการวัดเส้นรอบวงของเซลล์ไข่หรือเปอร์เซ็นต์ของการเกิด acrosome reaction ของเซลล์สุจิในแต่ละกลุ่มการทดลอง ถูกคำนวณผลทางสถิติด้วย Analysis of variance (ANOVA) ความเชื่อมั่นที่ 95% (P-value < 0.05)

3. ผลการทดลอง (Results)

3.1 การศึกษาและพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยง POEC และ CC+GC แบบปลอดเชื้อและการศึกษาเปอร์เซ็นต์การรอดตายของเซลล์

การเพาะเลี้ยง POEC และ CC+GC ในอาหารเพาะเลี้ยง 3 สูตรที่เตรียมขึ้นเอง เพาะเลี้ยงในตูบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เสริมด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ 5 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ และมีความชื้นสูง ได้ศึกษาเปอร์เซ็นต์การรอดตายของเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48, 96, 144, 192 และ 240 ชั่วโมง โดยใช้การส้อมเลือกเซลล์เพาะเลี้ยงจากจานเพาะเลี้ยงย้อมดูด้วยสี 0.4% trypan blue เพื่อดูเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตาย นับจำนวนและคิดเปอร์เซ็นต์การรอดตาย โดยส้อมเลือก 3 ครั้ง ผลการทดลองพบว่าเซลล์ทั้งสองมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดดังนี้

3.1.1 ในอาหารสูตร M199 เซลล์บู่ท่อนำไข่มีชีวิตรอดเท่ากับ 95, 88, 81, 70 และ 65 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่มีชีวิตรอดเท่ากับ 94, 90, 83, 72 และ 66 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

3.1.2 ในอาหารสูตร RPMI เซลล์บู่ท่อนำไข่มีชีวิตรอดเท่ากับ 80, 74, 70, 67 และ 60 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่มีชีวิตรอดเท่ากับ 82, 77, 71, 67 และ 59 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

3.1.3 ในอาหารสูตร DMEM เซลล์บู่ท่อนำไข่มีชีวิตรอดเท่ากับ 92, 84, 78, 68 และ 62 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่มีชีวิตรอดเท่ากับ 94, 85, 76, 68 และ 60 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งผลแสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงเปอร์เซ็นต์การรอดตายของเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยง 3 สูตร

ระยะเวลาบ่มเซลล์ (ชั่วโมง)	อาหารเพาะเลี้ยง M199		อาหารเพาะเลี้ยง RPMI 1640		อาหารเพาะเลี้ยง DMEM	
	POEC (เปอร์เซ็นต์)	CC+GC	POEC (เปอร์เซ็นต์)	CC+GC	POEC (เปอร์เซ็นต์)	CC+GC
0	100	100	100	100	100	100
48	95	94	80	82	92	94
96	88	90	74	77	84	85
144	81	83	70	71	78	76
192	70	72	67	67	68	68
240	65	66	60	59	62	60

หมายเหตุ

POEC: pocine oviductal epithelial cells = เซลล์บู่ท่อนำไข่สุกร

CC: cumulus cells = เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่สุกร, GC: เซลล์แกรนูโลซ่า

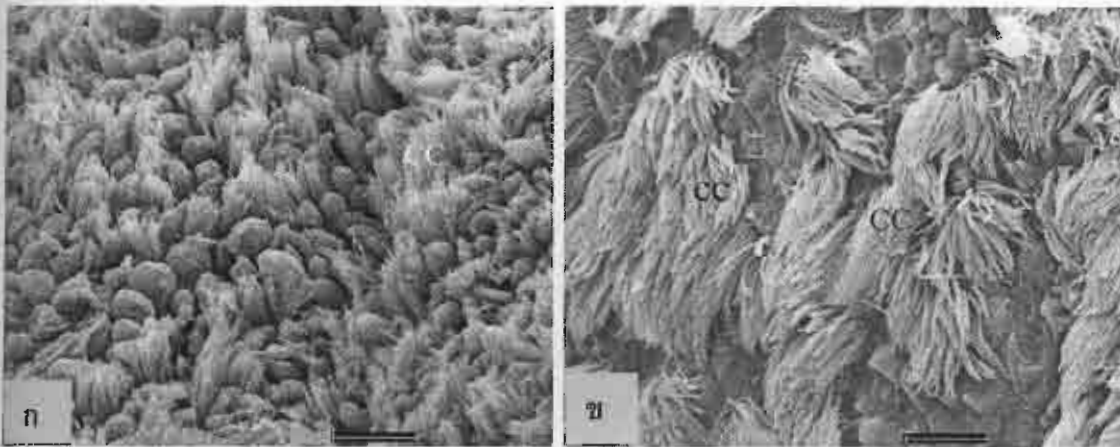
จากตารางที่ 5 พบว่า POEC และ CC+GC มีชีวิตรอดในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร M199 สูงมากกว่าอาหารเพาะเลี้ยงสูตรอื่นๆ (RPMI และ DMEM) คือเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ POEC และ CC+GC นานถึง 240 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ทั้งสองมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร M199 สูงสุดคือ 65 และ 66 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่ด้วยเปอร์เซ็นต์การรอดตายของเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยงทั้ง 3 สูตร มิได้แตกต่างกันนัก ประกอบกับองค์ประกอบของอาหาร รวมถึงราคาอาหารเพาะเลี้ยงที่ใกล้เคียงกันและ

ความสะดวกในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยง ก็สามารถใช้อาหารเพาะเลี้ยงทั้ง 3 สูตร นี้ได้เป็นอย่างดี แต่สำหรับงานวิจัยในขั้นตอนต่อไปได้เลือกเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองในอาหารสูตร M199 และในขณะที่เพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองก็ได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ POEC, COCs และ CC+GC ของสุกรภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดเพิ่มเติม (ซึ่งมากกว่าที่กำหนดในวิธีการทดลองตั้งแต่แรก แต่ทำเพื่อความสมบูรณ์ของผลงานด้วย)

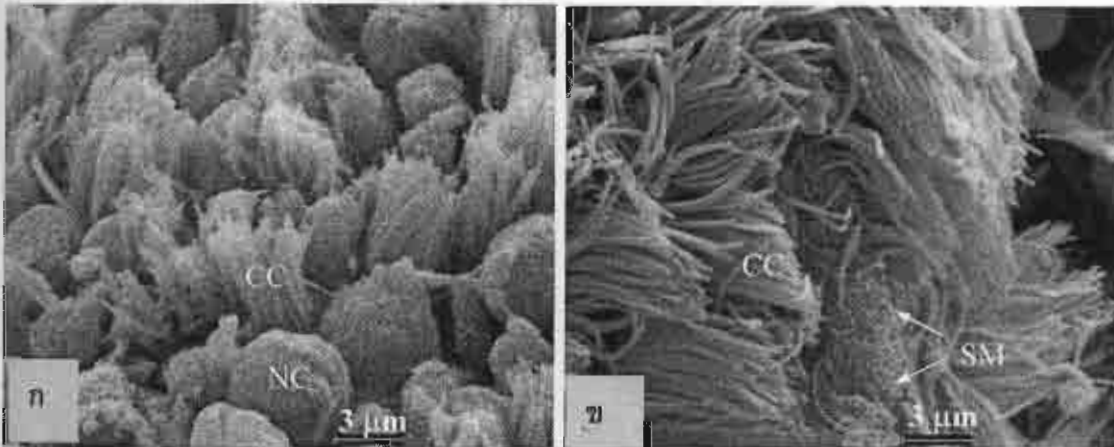
3. 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ POEC ในสภาพธรรมชาติ (*In vivo* study of POEC) และสภาพเพาะเลี้ยง (*In vitro* study of POEC)

3.2.1 POEC ในสภาพธรรมชาติ (*In vivo* study of POEC)

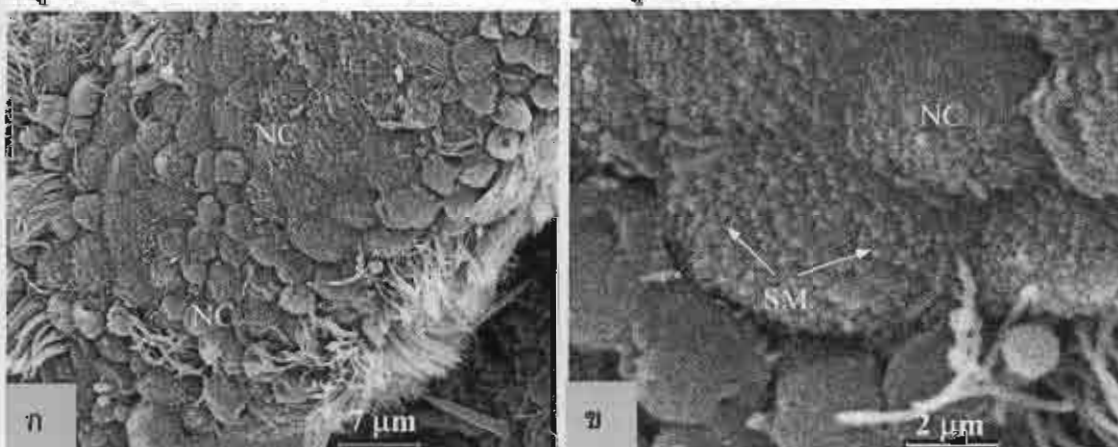
ผลงานวิจัยพบว่าเทคนิคที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองในอาหารเพาะเลี้ยง 3 สูตรคือ M199, RPMI 1640 และ DMEM ที่เสริมด้วย 10% fetal calf serum บ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เสริมด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ 5 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์และมีความชื้นสูง ให้ผลการเพาะเลี้ยงดีมีเปอร์เซ็นต์รอดตายของเซลล์ทั้งหมดสูง เป็นวิธีการเพาะเลี้ยงที่ทำให้ได้จริง ไม่สิ้นเปลืองเวลาและประหยัดค่าใช้จ่าย เนื่องจากใช้สารเคมีในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงขึ้นเองซึ่งรวมแล้วราคาไม่แพงและการศึกษาสัณฐานวิทยาของ POEC ในสภาพธรรมชาติ (*in vivo*) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทั้งสองแบบเพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ชนิดต่างๆ ที่พบและศึกษาความหนาแน่นของเซลล์ พบว่าในระยะฟอลลิคูล่า (follicular phases: estrus cycle days 15) เนื้อเยื่อบุชั้นในท่อนำไข่สุกรส่วนแอมพูลล่า (ampulla) มีเซลล์บุท่อนำไข่ชนิดที่มีซีเลีย (ciliated cells) อยู่เป็นจำนวนมาก ในขณะที่ระยะลูเตียล (leuteal phases: estrus cycle days 1-2) นั้นกลับมีเซลล์ที่มีซีเลียจำนวนน้อยลง แต่มีเซลล์รูปร่างกลม (round shape) ที่ไม่มีซีเลีย (non-ciliated cells) และมีไมโครวิลไลสั้นๆ (short microvilli) อยู่ด้านบนของเซลล์เป็นจำนวนมากขึ้น (ดังภาพที่ 13, 14 และ 15)



ภาพที่ 13 (ก) แสดง POEC ระยะฟอลลิคูลาร์ ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบเซลล์บุท่อไข่ที่มีซีเลียจำนวนมาก (ciliated cells: CC) (ข) ที่กำลังขยายที่สูงขึ้นแสดงเซลล์บุท่อไข่ชนิดที่มีซีเลียจำนวนมาก



ภาพที่ 14 (ก) แสดง POEC ระยะฟอลลิคูลาร์ ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบเซลล์รูปร่างกลมไม่มีซีเลีย (non-ciliated cells: NC) (ข) ที่กำลังขยายที่สูงขึ้นแสดงเซลล์บุท่อไข่รูปร่างกลมไม่มีซีเลียและมี short microvilli (SM) อยู่โดยรอบเซลล์



ภาพที่ 15 (ก) แสดงการทำ post thawing deep frozen semen ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบเซลล์รูปร่างกลมไม่มีซีเลีย (NC) จำนวนมากและเซลล์ที่มีซีเลีย (ciliated cells: CC) จำนวนน้อยกว่า (ข) ที่กำลังขยายที่สูงขึ้นแสดง POEC รูปร่างกลมไม่มีซีเลียและมี short microvilli (SM) อยู่โดยรอบเซลล์

จำนวนน้อยกว่า (ข) ที่กำลังขยายสูงขึ้นแสดง POEC รูปร่างกลมไม่มีซีเลียและมี short microvilli (SM) อยู่โดยรอบเซลล์

เมื่อนับจำนวนและคำนวณเปอร์เซ็นต์ของ POEC ทั้งสองชนิดพบว่าในระยะฟอลลิคูล่านั้นเซลล์ที่ไม่มีซีเลียมีจำนวน 40.67 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์ที่มีซีเลียมีจำนวน 59.33 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในระยะลูเตียนั้นกลับพบว่าเซลล์ที่ไม่มีซีเลียมีจำนวนเพิ่มขึ้นเป็น 80.17 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์ที่มีซีเลียมีจำนวนลดลงเหลือเพียง 19.83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังตารางที่ 6 ซึ่งดูเหมือนกับว่าเนื้อเยื่อบุท่อนำไข่สุกรนั้นมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างลักษณะของเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่เพื่อประโยชน์ในการทำงานในการช่วงของการสืบพันธุ์

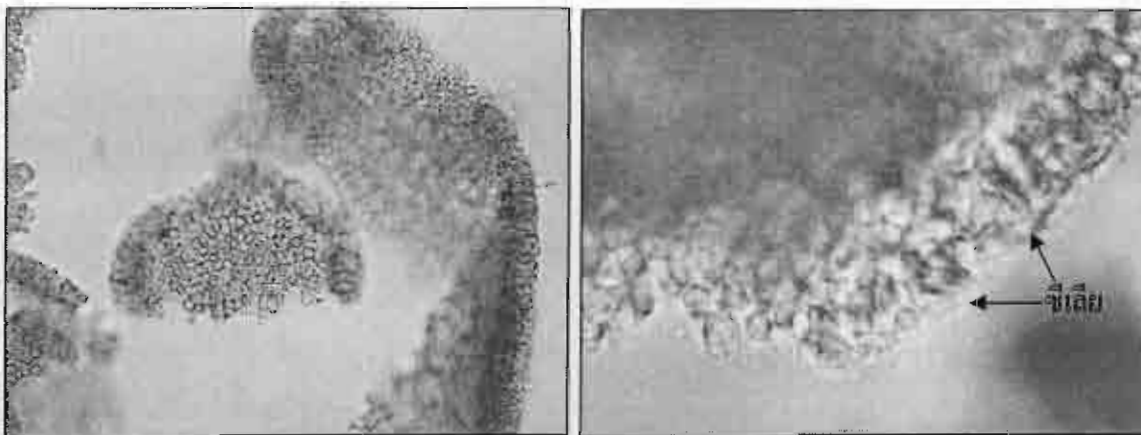
ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์ของ POEC ทั้งสองชนิดคือเซลล์ที่มีรูปร่างกลมไม่มีซีเลีย (non-ciliated cells) และเซลล์ที่มีซีเลีย (ciliated cells) ที่พบในระยะลูเตียและระยะฟอลลิคูล่าของรอบการเป็นสัดในสุกร

จำนวนของ ตัวอย่าง (No. of sample)	ระยะฟอลลิคูล่า (follicular phase)		ระยะลูเตีย (luteal phase)	
	non-ciliated cells (เปอร์เซ็นต์)	ciliated cells (เปอร์เซ็นต์)	non-ciliated cells (เปอร์เซ็นต์)	ciliated cells (เปอร์เซ็นต์)
1	40	60	82	18
2	42	58	80	20
3	41	59	83	17
4	44	56	82	18
5	39	61	79	21
6	38	62	75	25
Means $\pm$ SD	40.67 $\pm$ 1.92	59.33 $\pm$ 1.92	80.17 $\pm$ 2.67	19.83 $\pm$ 2.67

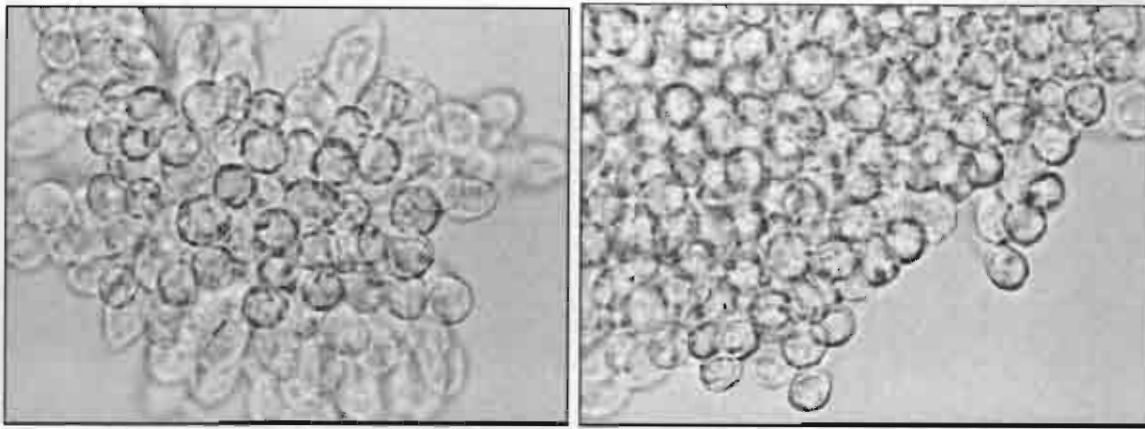
3.2.2 การศึกษา POEC ในสภาพเพาะเลี้ยง (*In vitro* study of POEC)

cells) และพบเซลล์ที่ไม่มีซีเลียเกาะรวมอยู่ด้วย และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานมากขึ้น พบว่าเซลล์เหล่านี้ได้หลุดแยกออกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ เพิ่มมากขึ้นด้วย

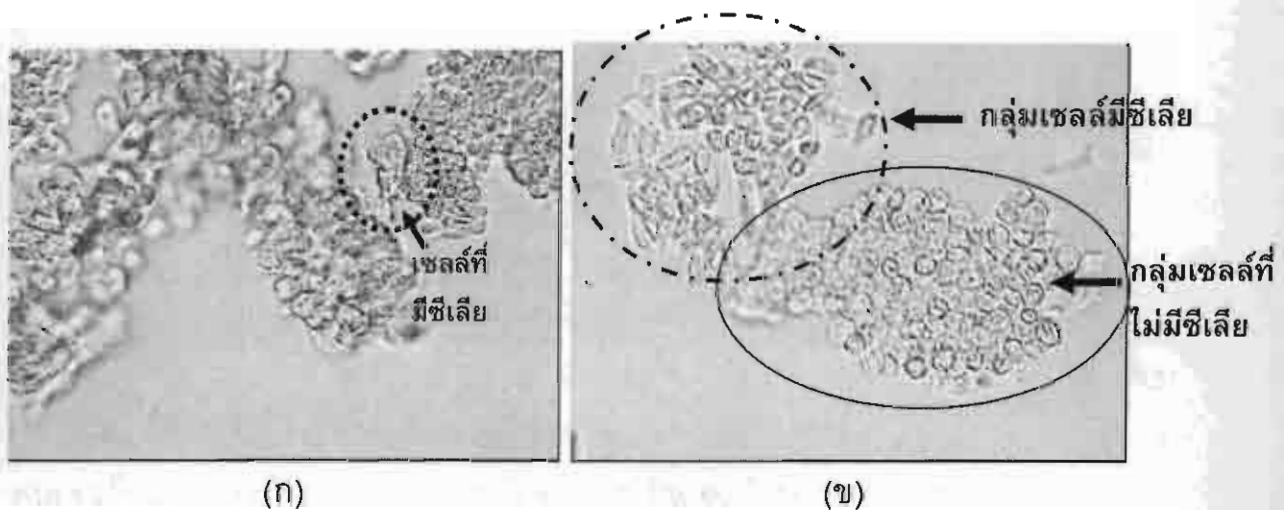
สำหรับสัณฐานวิทยาของเซลล์บุท่อนำไข่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร M199 ที่ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ พบว่าเซลล์ส่วนมากเกาะรวมกลุ่มกันและมีการเรียงตัวชั้นเดียว (ภาพที่ 16 ก) ลักษณะเซลล์บุท่อนำไข่เรียงตัวชั้นเดียวมีรูปร่างยาวซึ่งมีซีเลียอยู่ด้านบน (simple ciliated columnar epithelial cells) และมีเซลล์ที่ไม่มีซีเลียเกาะรวมอยู่ด้วย (ภาพที่ 16 ข) นอกจากนี้มีบางเซลล์ที่หลุดแยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานวันขึ้นคือตั้งแต่ 48 ชั่วโมงขึ้นไป เซลล์ก็แยกตัวเป็นเซลล์เดี่ยวๆ เพิ่มมากขึ้น (ภาพที่ 19)



ภาพที่ 16 (ก) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดง POEC เรียงตัวเป็นเซลล์ชั้นเดียว (ข) เซลล์มีซีเลียซึ่งเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร M199 ที่เสริม 10% fetal calf serum บ่มในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์และตู้บ่มมีความชื้นสูง ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดง 24 ชั่วโมง (กำลังขยาย 100 เท่า)



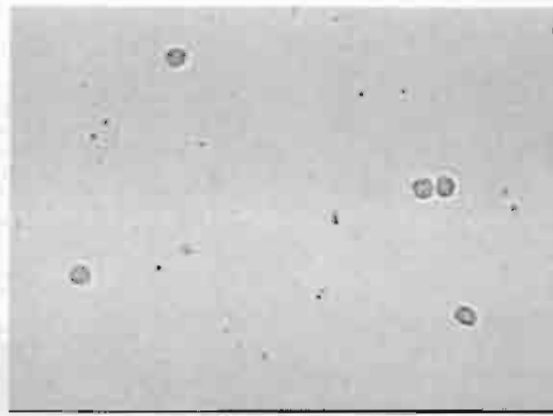
ภาพที่ 17 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดง POEC ที่มีรูปร่างกลมเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร M 199 เสริมด้วย 10% fetal calf serum ป่มในตู้ป่ม 37 องศาเซลเซียส เสริมด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ตู้ป่มที่มีความชื้นสูง เพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง (กำลังขยาย 400 เท่า)



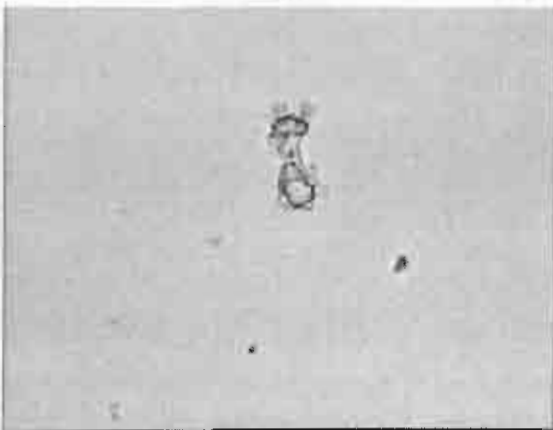
ภาพที่ 18 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดง (ก และ ข) POEC เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร M199 เสริมด้วย 10% fetal calf serum ป่มในตู้ป่ม 37 องศาเซลเซียส มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ และตู้ป่มมีความชื้นสูง เพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์เรียงตัวชั้นเดียวมีรูปร่างยาวมีซีเลียอยู่ด้านบนและมีเซลล์ที่ไม่มีซีเลียเกาะรวมอยู่ด้วย (กำลังขยาย 100 เท่า)



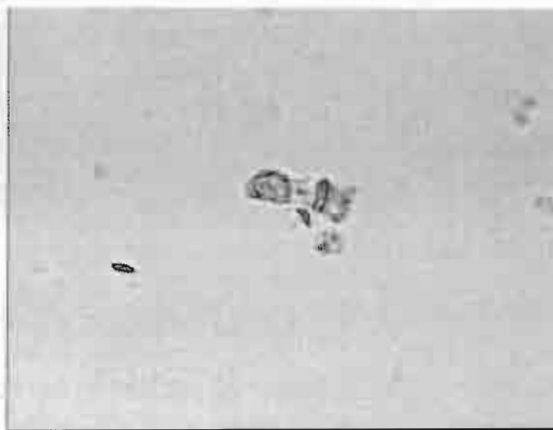
(ก)



(ข)



(ค)



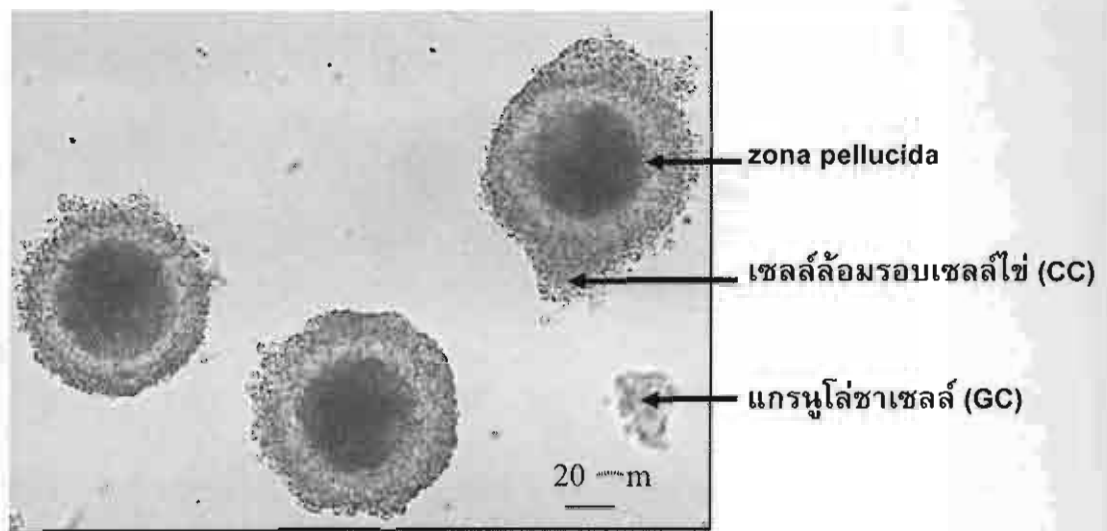
(ง)

ภาพที่ 19 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดง POEC เพาะเลี้ยงในอาหาร M 199 เสริมด้วย 10% fetal calf serum และบ่มในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส ที่เสริมด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่มีความชื้นสูง เพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง (ก ค และ ง) พบเซลล์รูปร่างยาวมีซีเลียอยู่ด้านบนที่หลุดแยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ (ข) เซลล์รูปร่างกลมไม่มีซีเลียที่หลุดแยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ (กำลังขยาย 400 เท่า)

3.3 เซลล์ไข่และเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่สุกรในสภาพธรรมชาติ (*In vivo* study of COCs) และสภาพเพาะเลี้ยง (*In vitro* study of COCs)

การศึกษาลักษณะวิทยาของเซลล์ไข่และเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่สุกร (COCs) ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าเซลล์ไข่มีรูปร่างกลม มีขนาดอยู่ในช่วง 89 ถึง 145 ไมโครเมตร ถูกล้อมรอบด้วยไกรโคโปรตีน คือ zonapellucida ถัดมาคือเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ซึ่งเซลล์มีรูปร่างกลม (ภาพที่ 20)

และจากการเจาะรังไข่จำนวน 20 รังไข่ ได้เซลล์ไข่ทั้งหมด 921 เซลล์ ซึ่งเฉลี่ยแล้ว 1 รังไข่มีเซลล์ไข่ประมาณ 46 เซลล์



ภาพที่ 20 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดงเซลล์ไข่สุกรที่เจาะได้จากรังไข่เป็นเซลล์รูปร่างกลมล้อมรอบด้วย zonapellucida และถัดออกมาคือเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ (CC) และพบเซลล์แกรนูโลซา (GC)

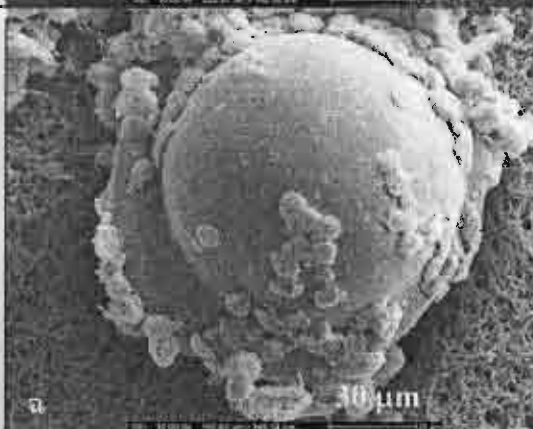
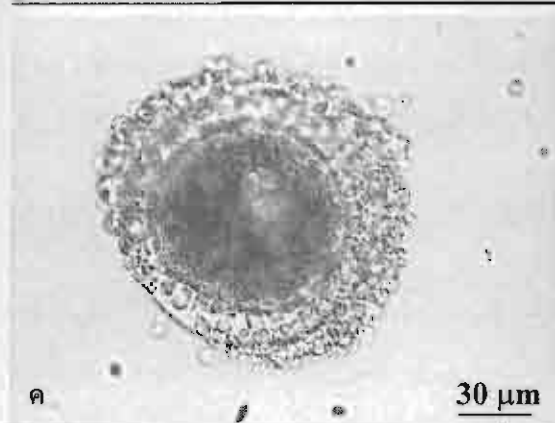
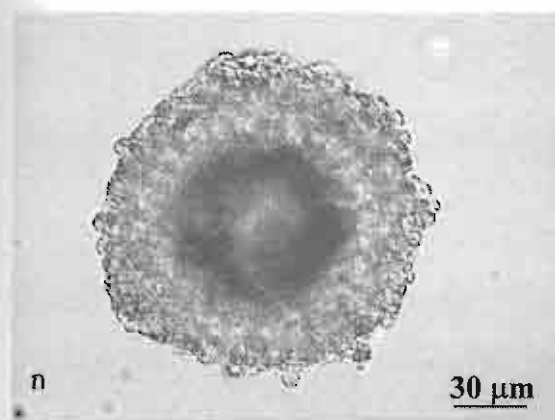
จากการศึกษาสามารถแบ่ง COCs ได้เป็น 4 ชนิด โดยแบ่งตามการเรียงตัวของเซลล์ที่อยู่ล้อมรอบเซลล์ไข่ได้เป็น

3.3.1 เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่น (Intact cumulus cell layer) (ภาพที่ 21 ก และ ข)

3.3.2 เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้น (Multi cumulus cells layer) (ภาพที่ 21 ค และ ง)

3.3.3 เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เพียงบางส่วน (Partial cumulus cells) (ภาพที่ 21 จ และ ฉ)

3.3.4 เซลล์ไข่ที่ไม่มีเซลล์ล้อมรอบ (Completed denude oocyte) (ภาพที่ 21 ช และ ซ)



ภาพที่ 21 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับและ SEM แสดง (ก และ ข) เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่น (ค และ ง) เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้น (จ และ ฉ) เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เพียงบางส่วนและ (ช และ ซ) เซลล์ไข่ที่ไม่มีเซลล์ล้อมรอบ

จากการนับจำนวนและคำนวณเปอร์เซ็นต์เซลล์ไข่ตามลักษณะการล้อมรอบของเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่พบว่าเซลล์ไข่ที่ไม่มีเซลล์ล้อมรอบมีจำนวนมากที่สุดคือ 33.12 เปอร์เซ็นต์ ลำดับที่สองเป็นเซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเพียงบางส่วนมีจำนวนเท่ากับ 28.88 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบแบบติดแน่นและมีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้นมีจำนวนใกล้เคียงกันเป็นลำดับที่สามและลำดับที่สี่คือ 19.87 เปอร์เซ็นต์ และ 18.13 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงจำนวนเซลล์ไข่ที่แบ่งตามการล้อมรอบของเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่

ชนิดของ COCs	จำนวนเซลล์ไข่ (เซลล์)	เปอร์เซ็นต์ (%)
1. เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่น (Intact cumulus cell layer)	183	19.87
2. เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้น (Multi cumulus cell layer)	167	18.13
3. เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เพียงบางส่วน (Partial cumulus cell layer)	266	28.88
4. เซลล์ไข่ที่ไม่มีเซลล์ล้อมรอบ (Completely denude oocyte)	305	33.12
รวม	921	100.00

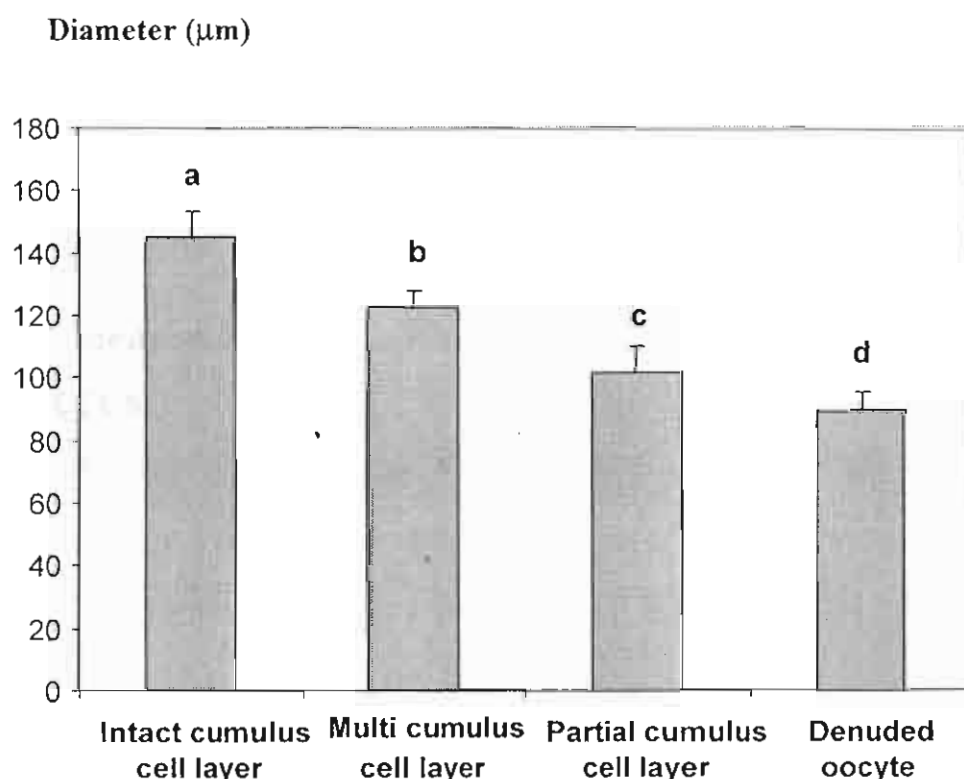
จากการศึกษาขนาดของ COCs นั้นมีขนาดอยู่ในช่วง 89 ถึง 145 ไมโครเมตรและจากการวัดเส้นผ่าศูนย์กลาง (diameter) ของ COCs และแยกตามประเภทของ COCs พบว่าขนาดของเซลล์แต่ละประเภทคือ

ก. เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่น (Intact cumulus cells layer) มีขนาดเซลล์เท่ากับ 144.68 ± 8.79 ไมโครเมตร (n=30)

ข. เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้น (Multi cumulus cells layers) มีขนาดเซลล์เท่ากับ 122.82 ± 4.78 ไมโครเมตร (n=30)

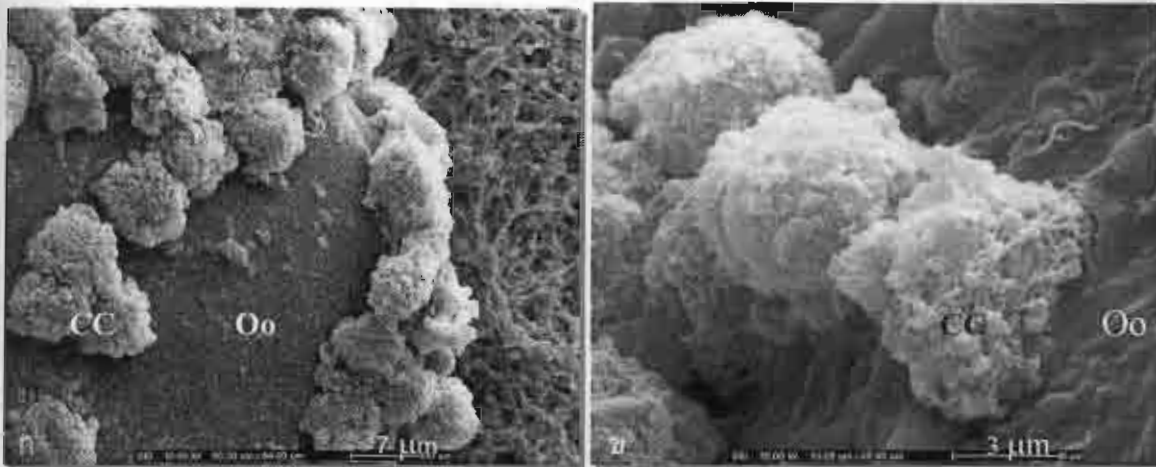
ค. เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เพียงบางส่วน (Partial cumulus cells) มีขนาดเซลล์เท่ากับ 106.20 ± 8.72 ไมโครเมตร (n=30)

ง. เซลล์ไข่ที่ไม่มีเซลล์ล้อมรอบ (Completely denuded oocyte) มีขนาดเซลล์เท่ากับ 89.16 ± 5.69 ไมโครเมตร (n=30) ดังภาพที่ 22



ภาพที่ 22 กราฟแสดงขนาดของเซลล์ไข่และเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ (COCs) ที่เจาะได้จากรังไข่แยกตามประเภทของ COCs (ตัวหนังสือเหนือกราฟแสดงค่าทางสถิติที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$)

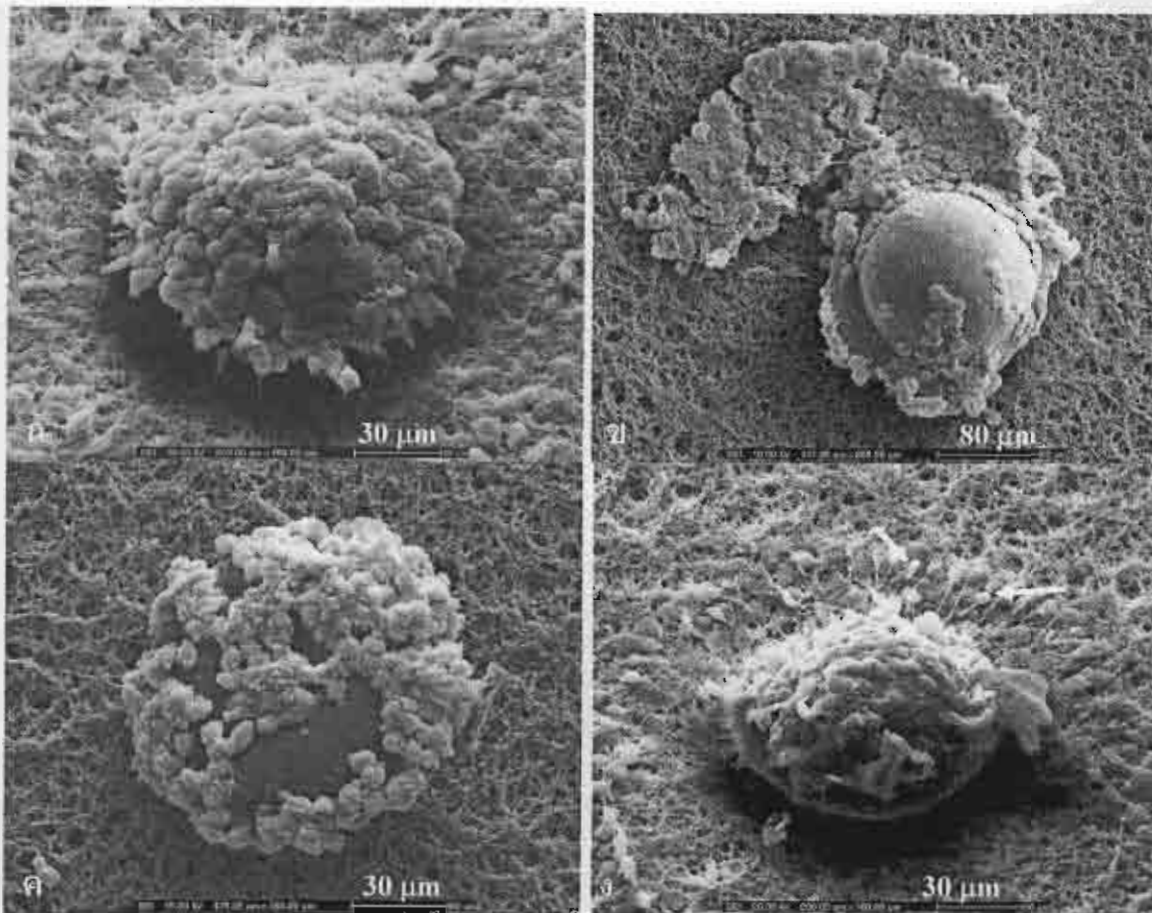
เมื่อศึกษาเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ที่อยู่ติดติดกับผิวของเซลล์ไข่ได้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่มีกำลังขยายสูงมากขึ้นพบว่าเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างกลม (round shape) ซึ่งเซลล์นั้นสัมผัสแน่นกับผิวเซลล์ไข่ดังภาพที่ 23



ภาพที่ 23 เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดง (ก) เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ (CC) ลักษณะกลมสัมผัสผิวเซลล์ไข่ (Oo) (ข) ภาพขยายเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ลักษณะกลมสัมผัสผิวเซลล์ไข่

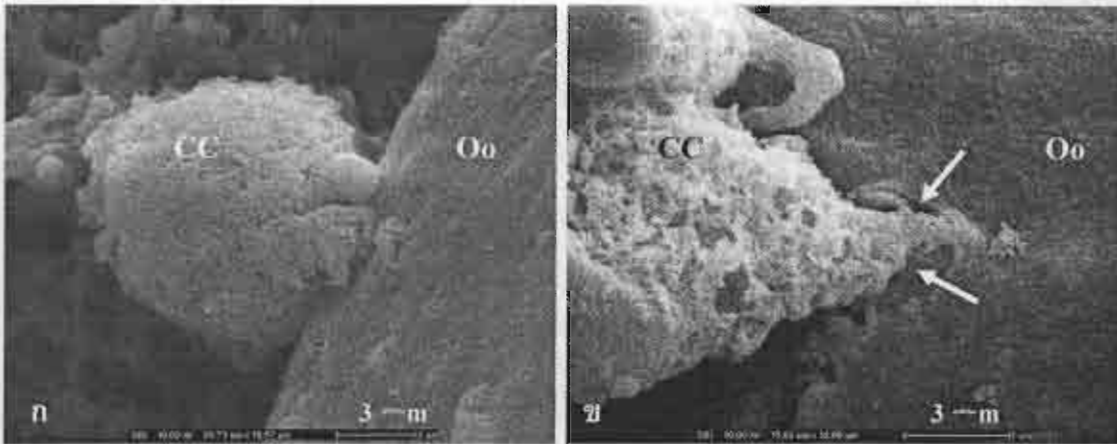
3.4 การศึกษาเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่สุกร (COCs) ในสภาพเพาะเลี้ยง (*In vitro study of COCs*)

เมื่อนำเซลล์ไข่และเซลล์ล้อมรอบอยู่ (COCs) ที่เจาะได้จากรังไข่ซึ่งเลือกเฉพาะเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่น (Compacted cells layers: ชนิดที่ 1) (ภาพที่ 24 ก และ ค) และเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่หลายชั้น (Multiple cumulus cells layer: ชนิดที่ 2) นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร M 199 และบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เสริมด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์และมีความชื้นสูง เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของเซลล์ไข่และเซลล์ล้อมรอบเซลล์หรือการเปลี่ยนแปลงไปของสัณฐานวิทยาของเซลล์ทั้งสองภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดด้วยกำลังขยายที่สูงขึ้นพบว่า เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ ชนิดที่ 1 นั้น กลุ่มเซลล์ที่ล้อมรอบเริ่มคลี่ตัวออก (peel off) จากผิวของเซลล์ไข่หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 24 ข) และเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ ชนิดที่ 2 นั้นมีการเปลี่ยนแปลงคือเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แผ่ขยายตัวออก (expansion) ดังภาพที่ 24 ง หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง

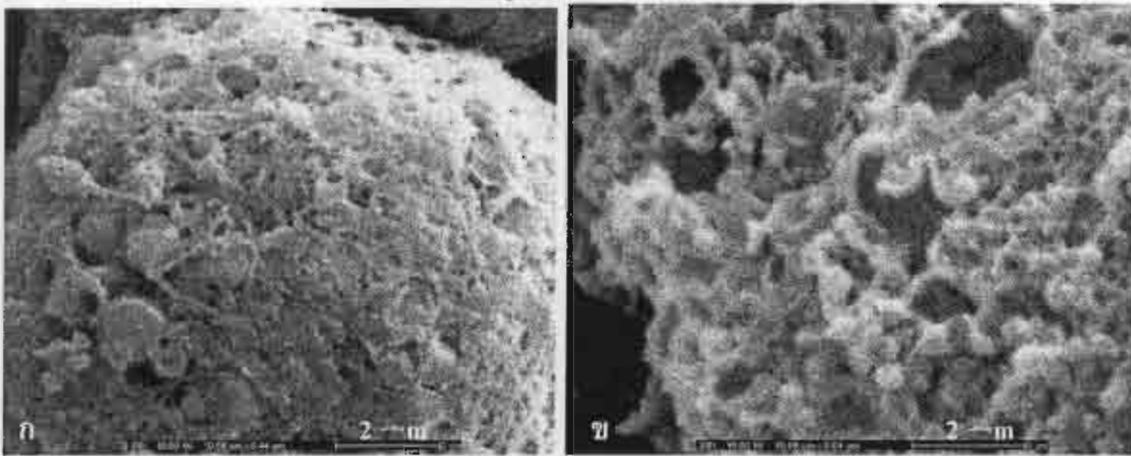


ภาพที่ 24 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดง COCs (ก และ ค) ชนิดที่ 1 และ 2 ที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ (ข) แสดง CC ที่อยู่ล้อมรอบเซลล์ไข่ได้คี่ตัวออกจาก zonapellucida (ง) แสดง CC ที่อยู่ล้อมรอบเซลล์ไข่แผ่ขยายตัวออกหลังจากที่เพาะเลี้ยง COCs ในอาหารเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง

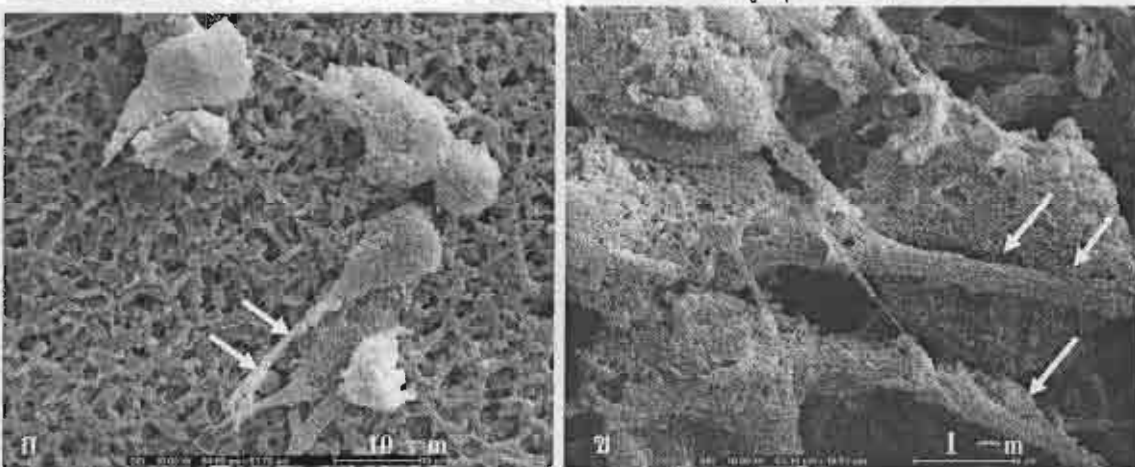
เมื่อศึกษาที่กำลังขยายสูงเพื่อดูผิวสัมผัสระหว่างเซลล์ทั้งสองที่เพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ที่เคยมีลักษณะกลมนั้นเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายหยดน้ำตาโดยหันด้านแหลมเข้าหาพื้นผิวของเซลล์ไข่ดังภาพที่ 25 ก และ ข เมื่อศึกษาพื้นผิวของเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ที่กำลังขยายสูงขึ้นพบว่าผิวเซลล์มีลักษณะเป็นโครงสร้างที่เป็นรูพรุน (mesh-like structure) จำนวนมากที่ผิวเซลล์ดังภาพที่ 26 ก และ ข สำหรับเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ที่มีโครงสร้างเป็นหยดน้ำตาบางส่วนจะหลุดออกจากผิวเซลล์ไข่แต่จะสังเกตเห็นว่าปลายด้านแหลมยืดยาวมากขึ้นดังภาพที่ 27 ก และ ข



ภาพที่ 25 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดง (ก) CC ของ of COCs ชนิดที่ 1 มีรูปร่างกลม เกาะอยู่กับผิวของเซลล์ไข่ (cumulus cells: CC, oocyte: Oo) CC of COCs ชนิดที่ 2 หลังจากเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง (ข) แสดง CC ที่หันด้านแหลมของเซลล์ (ลูกรัง) ทางเข้าที่พื้นผิวของเซลล์ไข่



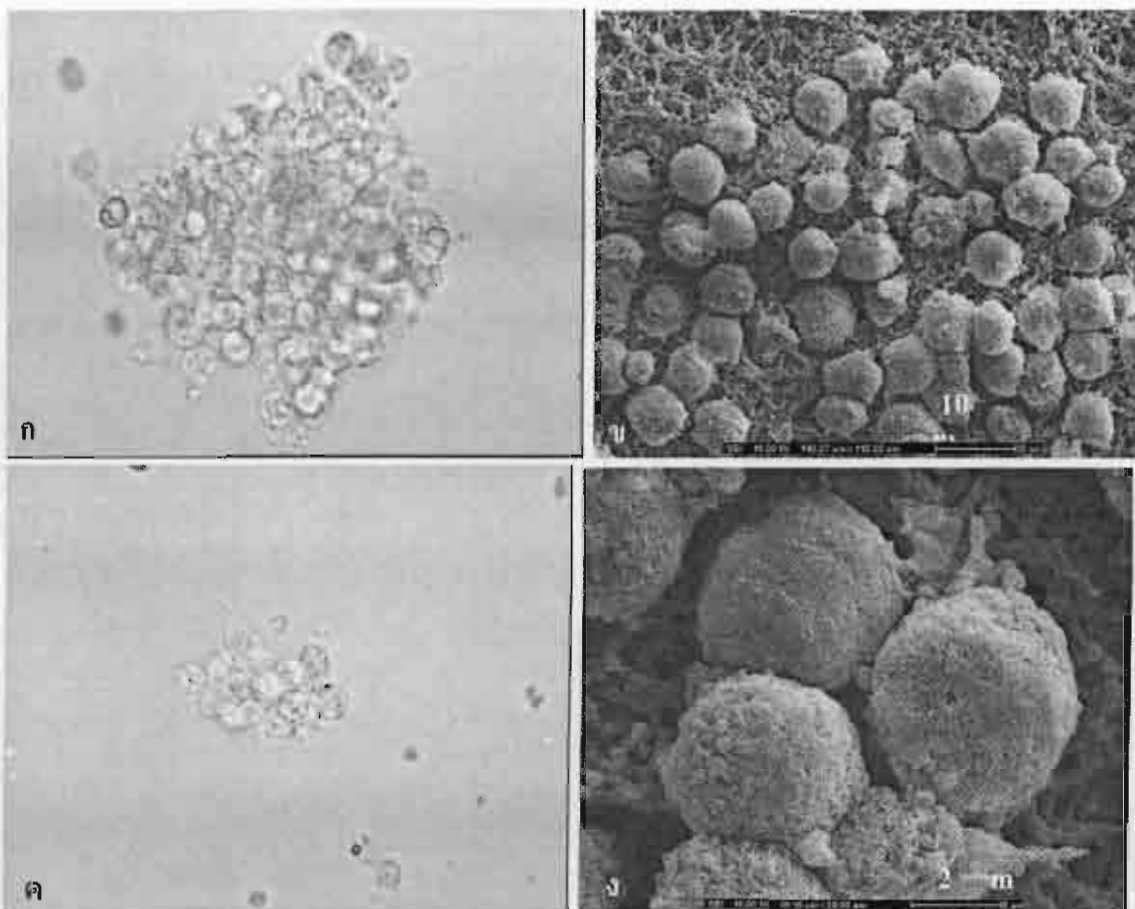
ภาพที่ 27 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยายสูงแสดง (ก และ ข) แสดง CC ของ of COCs แสดงพื้นผิวของเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่มีลักษณะเป็นโครงสร้างที่มีรูพรุน (mesh-like structure)



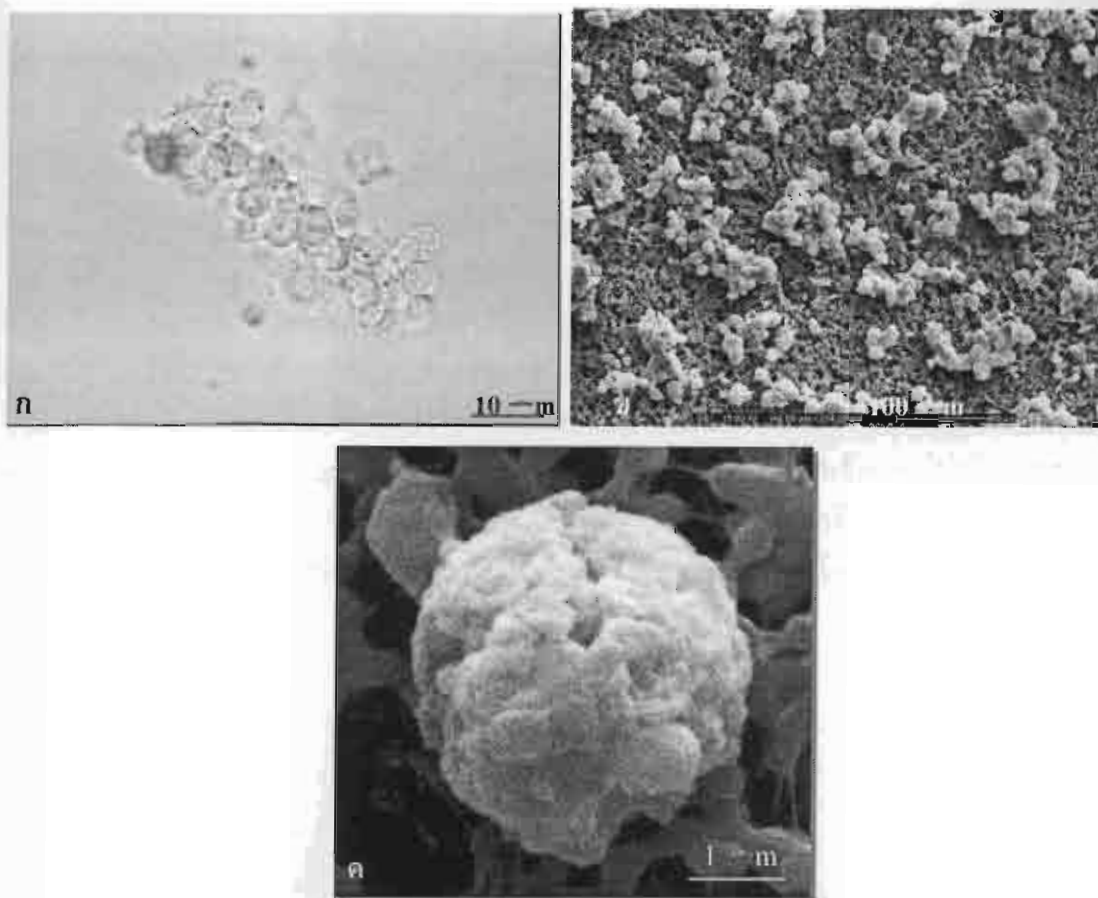
ภาพที่ 28 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยายสูงแสดง (ก และ ข) แสดง CC ของ of COCs ที่มีโครงสร้างเป็นหยดน้ำตาหลุดออกจากผิวเซลล์ไข่และมีปลายด้านแหลมที่ยืดยาวมาก (ลูกรัง)

3. 5 การศึกษาเซลล์แกรนูโลซ่า ในสภาพธรรมชาติ (*In vivo* study of GC) และสภาพเพาะเลี้ยง (*In vitro* study of GC)

สำหรับสัณฐานวิทยาของ GC เซลล์ที่อยู่ในถุงไข่ที่แยกได้จากการเจาะผนังเซลล์ไข่พบว่าเซลล์มีรูปร่างกลม ส่วนมากจับกันเป็นกลุ่มก้อนที่หนาแน่น (ภาพที่ 28) เมื่อนำ GC เซลล์ไปเพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เสริมด้วย 10% fetal calf serum และบ่มในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส ที่เสริมด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ และที่มีความชื้นสูง เพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าเซลล์ที่มีรูปร่างกลมและไม่มีซีเลียนั้นส่วนมากจะเกาะรวมกลุ่มกันน้อยลง นอกจากนี้ยังพบว่าบางเซลล์หลุดแยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ เพิ่มมากขึ้น (ภาพที่ 29)



ภาพที่ 28 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดง (ก และ ค) GC เซลล์ที่อยู่ในถุงไข่ (follicular fluid) เซลล์มีรูปร่างกลมจับเป็นกลุ่ม (กำลังขยาย 100 เท่า) (ข และ ง) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดง GC เซลล์ที่เจาะได้จากถุงไข่



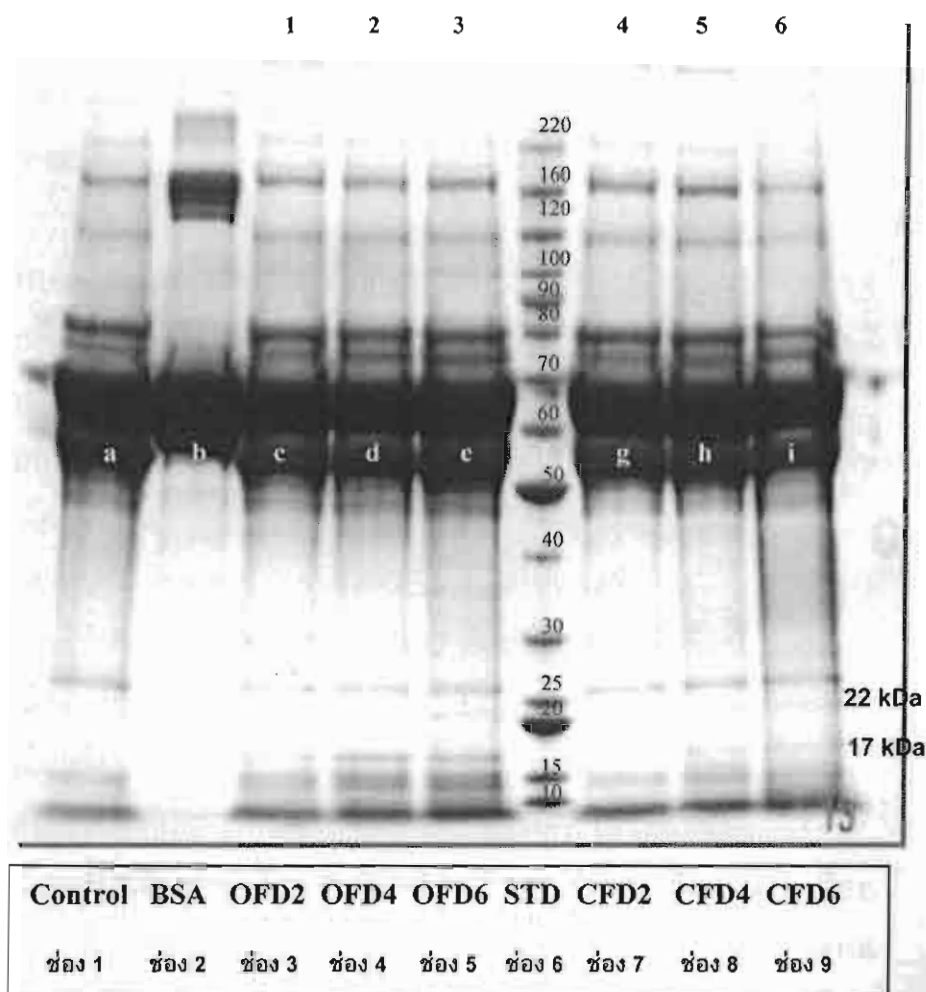
ภาพที่ 29 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดง GC เซลล์เพาะเลี้ยงในอาหาร M 199 เสริมด้วย 10% fetal calf serum และบ่มในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส ที่เสริมด้วย 5 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์และมีความชื้นสูงนาน 48 ชั่วโมง (ก) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดง GC เซลล์รูปร่างกลมจับเป็นกลุ่มน้อยลงซึ่งบางเซลล์หลุดออกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ (กำลังขยาย 100 เท่า) และภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดง (ข และ ค) เซลล์รูปร่างกลม

3.6 การเก็บรักษาสารหลังจากเซลล์เพาะเลี้ยง (condition medium)

การเก็บรักษาสารหลังจากเซลล์เพาะเลี้ยงทั้งสองโดยแช่แข็งในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ -20 องศาเซลเซียส และการแช่แข็งไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาที่ศึกษาคือ 48, 72, 144 และ 196 ชั่วโมง พบว่าลักษณะโปรตีนที่เซลล์หลังและวิเคราะห์ด้วยวิธี Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ให้ผลการวิเคราะห์ที่เหมือนกัน

3.7 การศึกษาลักษณะโปรตีนที่เซลล์เพาะเลี้ยงทั้งสองชนิดหลังในอาหารเพาะเลี้ยง (Condition medium)

การศึกษาลักษณะโปรตีนที่เซลล์เพาะเลี้ยงของเซลล์บุท่อนำไข่ สารหลังจาก (POEC) และเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่+เซลล์แกรนูโลซา (CC+GC) ที่หลังในอาหารเพาะเลี้ยงที่เพาะเลี้ยงในช่วงเวลา 48, 72, 144 และ 196 ชั่วโมง โดยใช้วิธี SDS-PAGE พบว่ารูปแบบโปรตีนจากสารหลังในอาหารเพาะเลี้ยงทั้งสองที่ชนิดมีความคล้ายกันดังภาพที่ 30 คือพบแถบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 17 kDa ในตัวอย่างของ OFD₂ (แถบ c) และแถบโปรตีนนี้จะชัดขึ้นในตัวอย่าง OFD₄ และ OFD₆ (แถบโปรตีน d และแถบโปรตีน e) ส่วนตัวอย่างสารหลังจากเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ไม่พบแถบโปรตีนดังกล่าวในตัวอย่าง CFD₂ แต่พบแถบโปรตีนนี้จางๆ ในตัวอย่าง CFD₄ และตัวอย่าง CFD₆ (แถบ g และ แถบโปรตีน h เหนือแถบโปรตีนขนาด 17 kDa พบแถบโปรตีนที่มีขนาด 22 kDa OFD₆ (แถบโปรตีน a) และพบแถบโปรตีนขนาดเดียวกันนี้แต่จางกว่าในตัวอย่าง CFD₆ (แถบโปรตีน b) เหนือชั้นตอนบนของเจล พบแถบโปรตีนที่มีขนาดมากกว่า 220 kDa (1, 2, 3, 4, 5 และ 6)



ภาพที่ 30 แสดงแถบโปรตีนจากสารหลังจาก POEC และ CC+GC ที่หลังในอาหารเพาะเลี้ยงเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์นาน 48, 96 และ 144 ชั่วโมง

หมายเหตุ

ช่องที่ 1: Control = M199 + 10% fetal calf serum

ช่องที่ 2: BSA = Bovine serum albumin

ช่องที่ 3: OFD2 = สารหลังจาก POEC ที่เพาะเลี้ยงนาน 2 วัน (48 ชั่วโมง)

ช่องที่ 4: OFD4 = สารหลังจาก POEC ที่เพาะเลี้ยงนาน 4 วัน (96 ชั่วโมง)

ช่องที่ 5: OFD6 = สารหลังจาก POEC ที่เพาะเลี้ยงนาน 6 วัน (144 ชั่วโมง)

ช่องที่ 6: STD = Standard protein marker

ช่องที่ 7: CFD2 = สารหลังจาก CC+GC ที่เพาะเลี้ยงนาน 2 วัน (48 ชั่วโมง)

ช่องที่ 8: CFD4 = สารหลังจาก CC+GC ที่เพาะเลี้ยงนาน 4 วัน (96 ชั่วโมง)

ช่องที่ 9: CFD6 = สารหลังจาก CC+GC ที่เพาะเลี้ยงนาน 6 วัน (144 ชั่วโมง)

1,2,3,4,5,6,a,b,c,d,e,f,g = แถบโปรตีนที่พบในสารหลัง POEC และ CC+GC

3.8 การทดสอบสารหลังจากเซลล์ทั้งสองกลุ่มในการเตรียมความพร้อมของเซลล์อสุจิว่าแช่แข็งโดยประเมินผลจากการที่เซลล์อสุจิสามารถเกิด acrosome reaction

หลังจากบ่มเซลล์อสุจิกับสารหลังจากเซลล์ทั้งสองกลุ่ม (ทดสอบกับสารหลังที่เก็บจากการเพาะเลี้ยงเป็นนาน 48 ชั่วโมง) ที่แช่แข็งในระยะเวลาต่างๆ คือสารหลังที่แช่แข็งนาน 1, 2 และ 3 เดือน ซึ่งการทดลองแบ่งออก 9 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมคือเซลล์อสุจิไม่ได้บ่มกับสารหลังใดแต่ให้เซลล์บ่มในอาหารเลี้ยงเซลล์อสุจิแทน

กลุ่มที่ 2 เซลล์อสุจิบ่มกับสารหลังจาก POEC ที่ไม่ได้แช่แข็ง

กลุ่มที่ 3 เซลล์อสุจิบ่มกับสารหลังจาก POEC ที่แช่แข็งนาน 1 เดือน

กลุ่มที่ 4 เซลล์อสุจิบ่มกับสารหลังจาก POEC ที่แช่แข็งนาน 2 เดือน

กลุ่มที่ 5 เซลล์อสุจิบ่มกับสารหลังจาก POEC ที่แช่แข็งนาน 3 เดือน

กลุ่มที่ 6 เซลล์อสุจิบ่มกับสารหลังจาก CC+GC ของสุกรไม่ได้แช่แข็ง

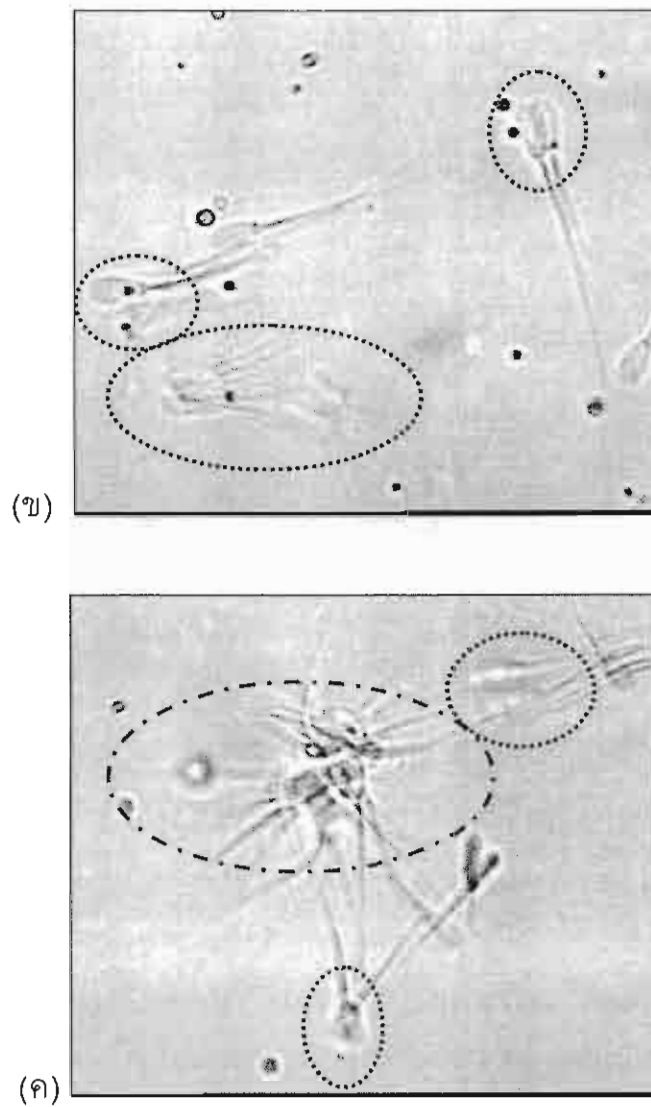
กลุ่มที่ 7 เซลล์อสุจิบ่มกับสารหลังจาก CC+GC ของสุกรที่แช่แข็งนาน 1 เดือน

กลุ่มที่ 8 เซลล์อสุจิบ่มกับสารหลังจาก CC+GC ของสุกรที่แช่แข็งนาน 2 เดือน

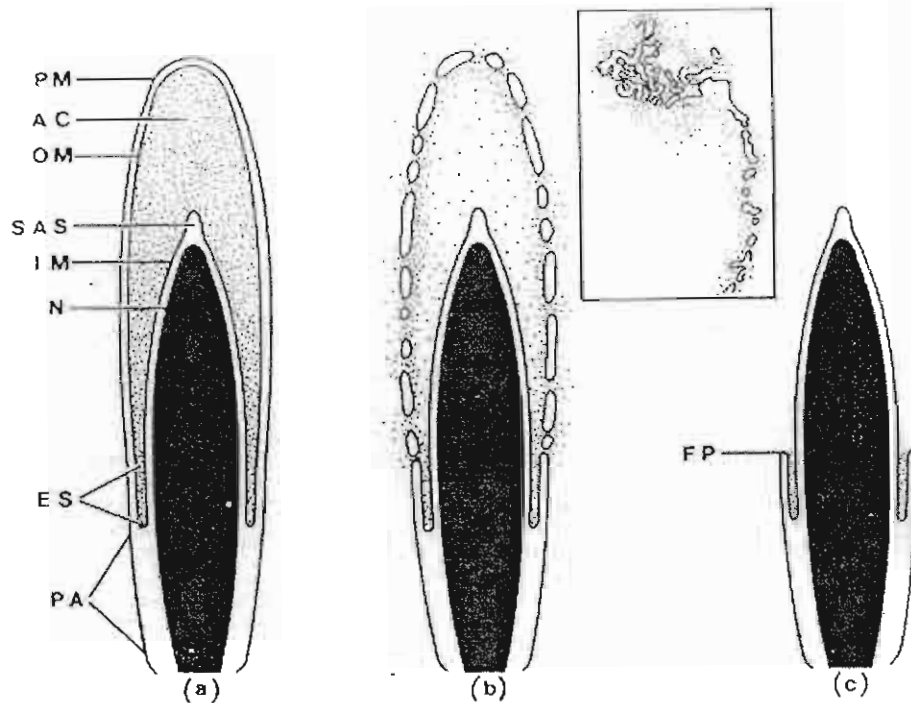
กลุ่มที่ 9 เซลล์อสุจิบ่มกับสารหลังจาก CC+GC ของสุกรที่แช่แข็งนาน 3 เดือน

ทำการบ่มเซลล์อสุจิกับสารหลังที่ต้องการศึกษารวมทั้งกลุ่มควบคุมนาน 4 ชั่วโมง ในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์และมีความชื้นสูง ในการทดลองได้ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ และถ่ายภาพไว้เพื่อนับจำนวนเซลล์และคำนวณเปอร์เซ็นต์เซลล์อสุจิที่เกิด acrosome reaction ในกลุ่มต่างๆ พร้อมแบ่งตัวอย่างในแต่ละกลุ่มนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเป็นการยืนยันสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไปของเซลล์อสุจิที่เกิด acrosome reaction เมื่อครบเวลานำเซลล์อสุจิมาศึกษาและนับจำนวนพร้อมคำนวณเปอร์เซ็นต์เซลล์อสุจิที่เกิด acrosome reaction ในแต่ละกลุ่มการทดลอง พบว่ากลุ่มที่ 1 คือเซลล์อสุจิที่ไม่ได้บ่มกับสารหลังได้นั้นเซลล์อสุจิเกิด acrosome reaction เพียง 3.89 ± 3.72 เท่านั้น โดยเซลล์ส่วนมากไม่เกิด acrosome reaction เซลล์อสุจิส่วนมากว่ายเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ไปด้านหน้าได้ดังภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (ภาพที่ 31 ก) และเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบว่าสัณฐานวิทยาของหัวเซลล์อสุจิไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลงแต่อย่างไรมิคงพบว่า plasma membrane (PM), inner acrosomal membrane, outer acrosomal membrane, nuclear membrane และนิวเคลียส เป็นปกติ นอกจากนี้สามารถเห็น subacrosomal space ที่ยอดสุดของนิวเคลียสดังภาพวาดแสดงที่ 32 (a) ภาพที่ 33 (เซลล์ด้านล่าง) และภาพที่ 34 ซึ่งเซลล์มีสภาพเหมือนเซลล์อสุจิที่หลั่งออกจากท่อนำเซลล์อสุจิ (ejaculatory duct) ทุกประการ (Oba และคณะ, 1990; Campbell และคณะ, 1999)

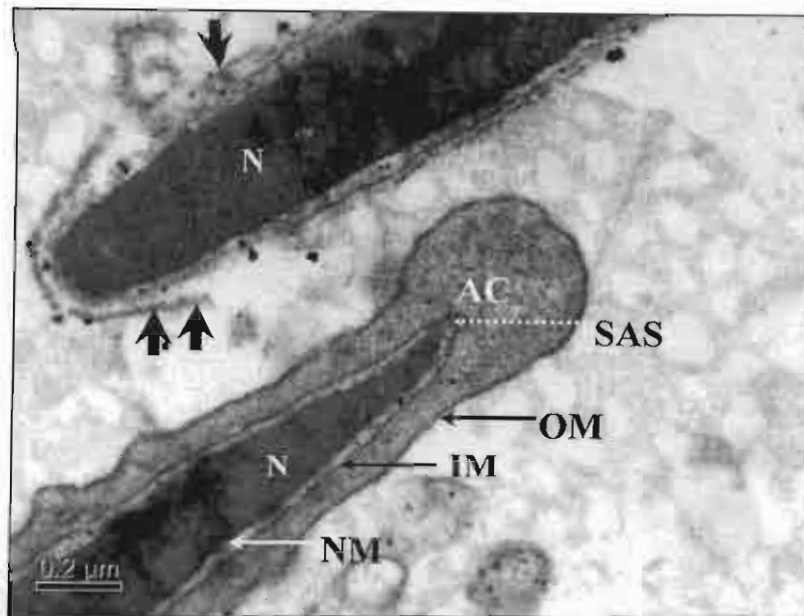




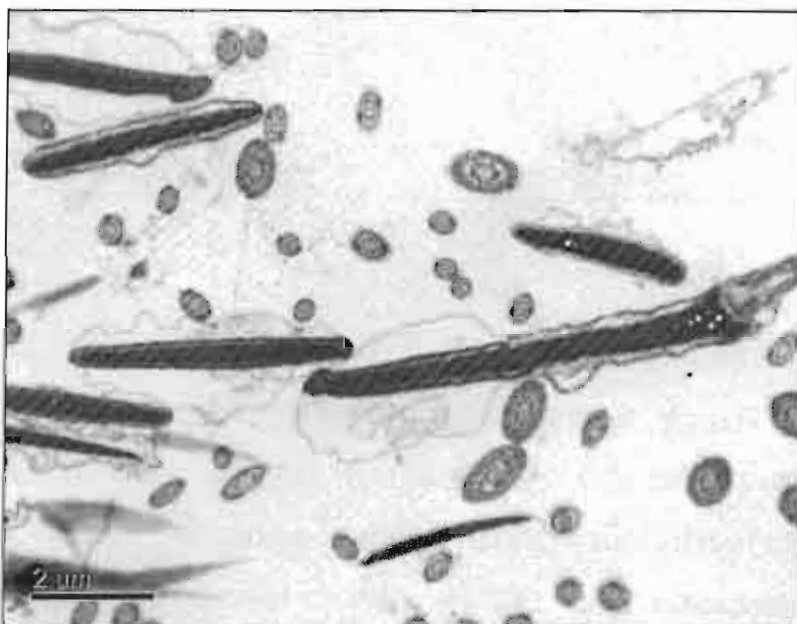
ภาพที่ 31 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดง (ก) กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมเป็น เซลล์อสุจิที่ไม่ได้ป้อนกับสารหลังใด พบว่าเซลล์อสุจิไม่เกิด acrosome reaction จำนวน มากและว่ายเป็นเซลล์เดี่ยวๆ (ก และ ข) เซลล์อสุจิไว้วเกิด acrosome reaction (ในวงกลม) หัวเซลล์อสุจิตัดกันมากกว่า 2 เซลล์และเซลล์อสุจิว่ายไปด้วยกัน



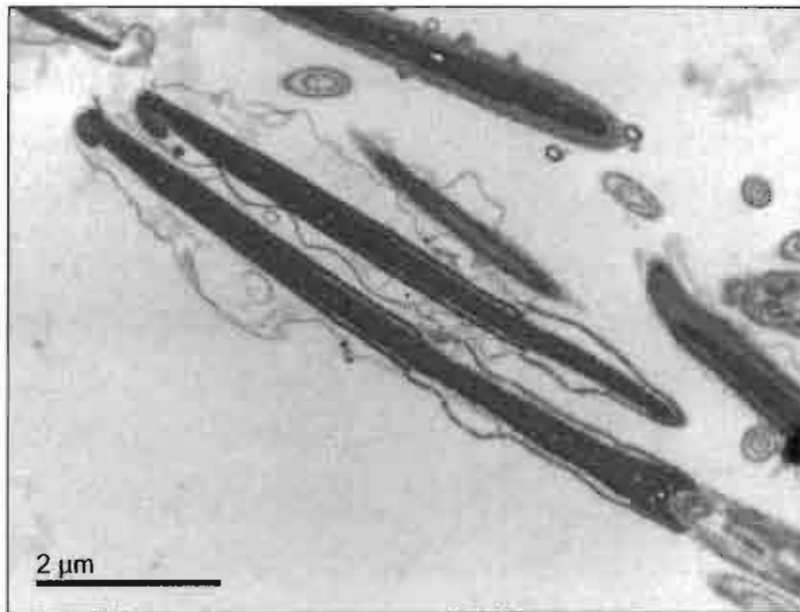
ภาพที่ 32 ภาพวาดแสดง (a) หัวเซลล์อสุจิติดตามยาวที่ไม่เกิด acrosome reaction คือ ไม่มีการเชื่อม membrane ระหว่าง plasma membrane (PM) กับ outer acrosomal membrane (OM) (b) ขณะเกิด acrosome reaction พบว่ามีการเชื่อม membrane ของ PM กับ OM ทำให้ acrosin (AC) ที่อยู่ที่หัวเซลล์อสุจิหลังออกมาเพื่อใช้ย่อย zonapellucida ของเซลล์ไข่ (c) เซลล์อสุจิหลังการเกิด acrosome reaction เสร็จสมบูรณ์ พบบริเวณ fusion point (FP) คือบริเวณที่เซลล์อสุจิสัมผัสกับ membrane ของเซลล์ไข่เพื่อฝังนิวเคลียส (N) ของเซลล์อสุจิเข้าเซลล์ไข่ (IM คือ inner acrosomal membrane, ES คือ equatorial segment, PA คือ plasma membrane, SAS คือ subacrosomal space) (จาก Yanagimachi, 1994)



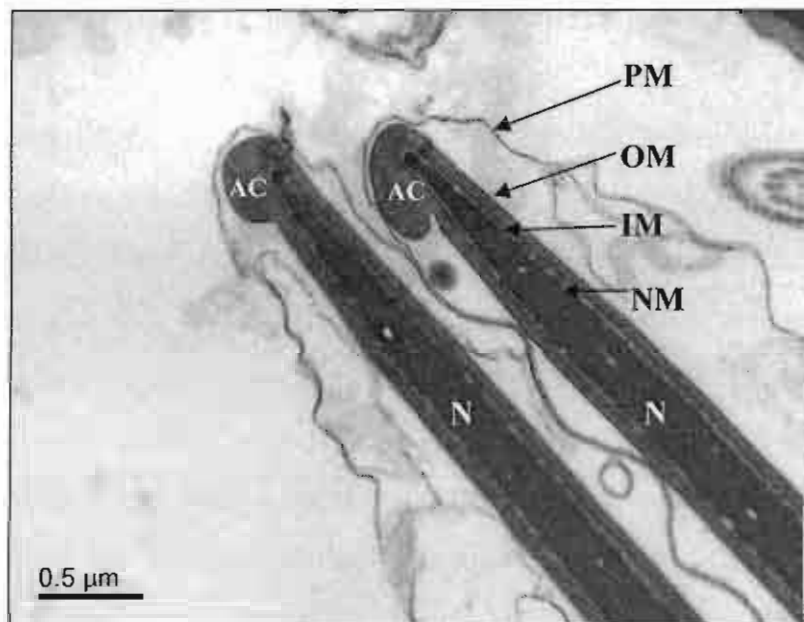
ภาพที่ 33 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านตัดตามยาวแสดงเซลล์อสุจิ วัวเซลล์ด้านบนที่เกิด acrosome reaction คือมีการเชื่อม membrane ระหว่าง plasma membrane กับ outer acrosomal membrane (ลูกศรหนา) โดยเซลล์อสุจิได้หลั่ง acrosin (AC) ไปแล้ว ส่วนเซลล์อสุจิเซลล์ด้านล่างไม่เกิด acrosome reaction ยังพบ acrosin ที่ส่วนหัวเซลล์อสุจิ (SAS คือ subacrosomal space, OM คือ outer acrosomal membrane, IM คือ inner acrosomal membrane, NA คือ nuclear membrane)



(ก)



(ข)



(ค)

ภาพที่ 34 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านแสดงเซลล์อสุจิัวตัดตามยาว กลุ่มที่ 1 (เซลล์อสุจิัวไม่เต็มสารหลังและปมนาน 4 ชั่วโมง) (ก) เซลล์อสุจิจำนวนมากไม่เกิด **acrosome** reaction พบเป็นเซลล์เดี่ยวๆ (ข และ ค) เซลล์อสุจิัวตัดตามยาว กลุ่มที่ 1 ไม่เกิด **acrosome** reaction พบว่าบริเวณหัวประกอบด้วย plasma membrane (PM), outer acrosomal membrane (OM), inner acrosomal membrane (IM), nuclear membrane (NM), acrosin (AC) และนิวเคลียส (N)

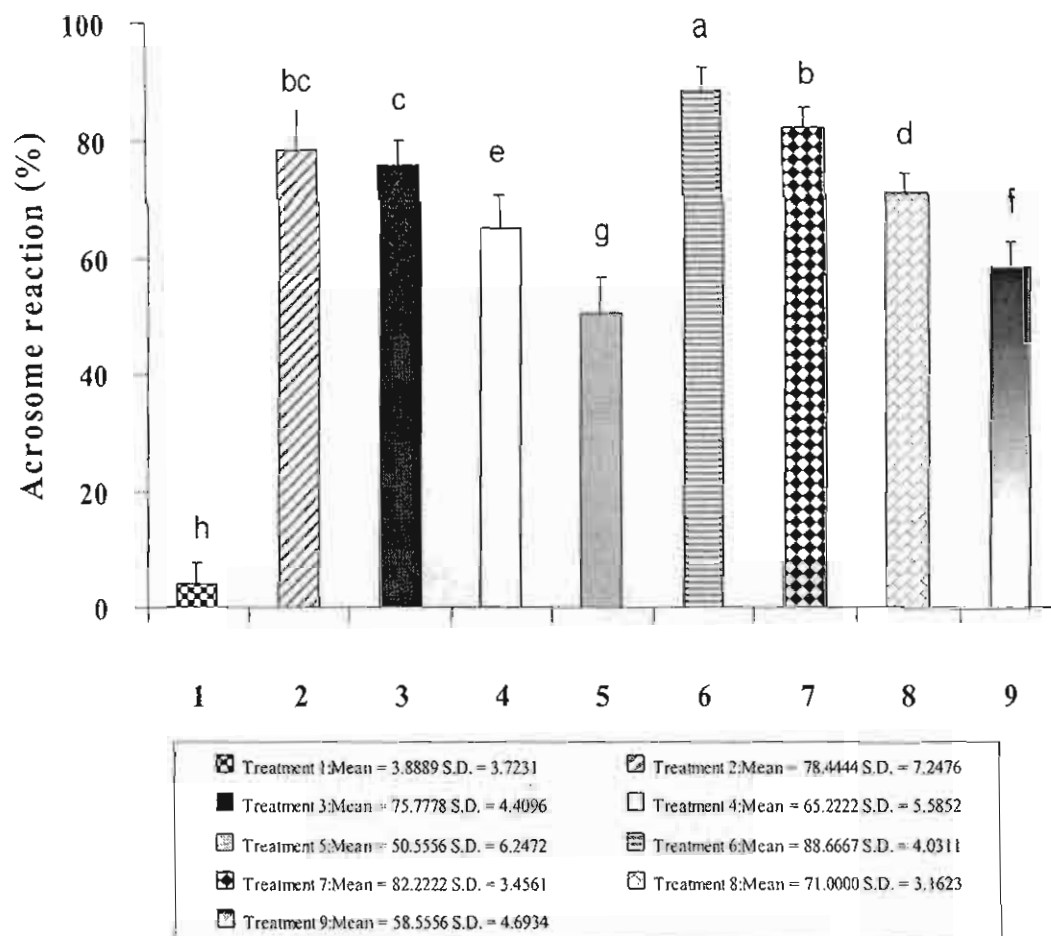
สำหรับการทดลองกลุ่มที่ 2 ถึงกลุ่มที่ 9 ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์อสุจิบ่มกับสารหลังจาก POEC หรือบ่มกับสารหลังจาก CC+GC ของสุกรที่ไม่ได้แช่แข็งหรือที่แช่แข็งนาน 1 ถึง 3 เดือน ที่ทำการทดลองบ่มกับสารหลังดังกล่าวในตูบมเพาะเลี้ยงอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง จากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ นั้นพบว่าทุกกลุ่มเกิด acrosome reaction ในเปอร์เซ็นต์ที่มากกว่าการไม่เกิด acrosome reaction กล่าวคือ กลุ่มที่ 2 ถึง กลุ่มที่ 5 นั้นเซลล์อสุจิที่บ่มกับสารหลังจาก POEC ที่ไม่ได้แช่แข็ง และที่แช่แข็งนาน 1 เดือน ถึง 3 เดือน มีเปอร์เซ็นต์การเกิด acrosome reaction เท่ากับ 78.44 ± 7.25 , 75.78 ± 4.41 , 65.22 ± 5.59 , 50.56 ± 6.25 ตามลำดับ สำหรับกลุ่มที่ 6 ถึงกลุ่มที่ 9 คือเซลล์อสุจิที่บ่มกับสารหลังจาก CC+GC ที่ไม่ได้แช่แข็ง และที่แช่แข็งนาน 1 เดือน ถึง 3 เดือน มีเปอร์เซ็นต์การเกิด acrosome reaction เท่ากับ 88.67 ± 4.03 , 82.22 ± 3.46 , 71.00 ± 3.16 , 58.56 ± 4.69 ตามลำดับ ดังตารางที่ 8 และภาพที่ 35

สภาพของการเกิด acrosome reaction คือเซลล์อสุจิเกิดการเปลี่ยนแปลงทาง สรีรวิทยาที่ส่วนหัวของเซลล์อสุจิเนื่องจากถูกสารหลังจาก POEC หรือสารหลังจาก CC+GC (จาก condition medium) กระตุ้นทำให้ plasma membrane และ outer acrosomal membrane เกิดเชื่อมกัน จึงทำให้เกิดรูเล็กๆ ทำให้เอนไซม์ acrosin (AC) ที่ อยู่ที่หัวเซลล์อสุจิหลั่งออกมา มีผลให้ส่วนหัวของอสุจิตัดกันและเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อย่างรวดเร็วพร้อมโบกสะบัดหางอย่างรวดเร็วในหยดน้ำยาที่เพาะเลี้ยงดังภาพที่ 31 ข ถึง ค และเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบว่าสัณฐานวิทยาของ หัวเซลล์อสุจิเกิดการเปลี่ยนแปลงไป คือมีการเชื่อมตัวกันของ membrane ของ plasma membrane กับ outer membrane ทำให้ acrosin ที่อยู่ที่หัวเซลล์อสุจิหลั่งออกมาเพื่อจะ ย่อยเซลล์ที่ล้อมรอบเซลล์ไข่และ zonapellucida ของเซลล์ไข่ได้ หลังจากเซลล์อสุจิเกิด acrosome reaction แล้วพบบริเวณที่เป็น fusion point (FP) คือบริเวณที่เซลล์อสุจิใช้ สัมผัสกับ membrane ของเซลล์ไข่เพื่อฝัง (penetration) นิวเคลียสของเซลล์อสุจิเข้าไป ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ไข่ นอกจากนี้ยังพบ inner acrosomal membrane แนบชิด กับ nuclear membrane ถัดเข้าไปเป็นนิวเคลียส (ภาพที่ 32 ข และ ค) หลังการเกิด acrosome reaction และพบ equatorial segment (ภาพที่ 36 ก และ ข) นอกจากนี้ยัง พบว่าส่วนโครงสร้างที่เป็นหางเซลล์อสุจิตัดตามขวาง (cross section) มี central microtubule 1 คู่ (CM) (ลูกศรประะ) อยู่ตรงกลางรอบๆ มี spoke head (SH) และ โครงสร้างเป็น microtubule doublet (MD) 9 คู่ อยู่ถัดออกมา ซึ่งมี fibrous sheath (FS)

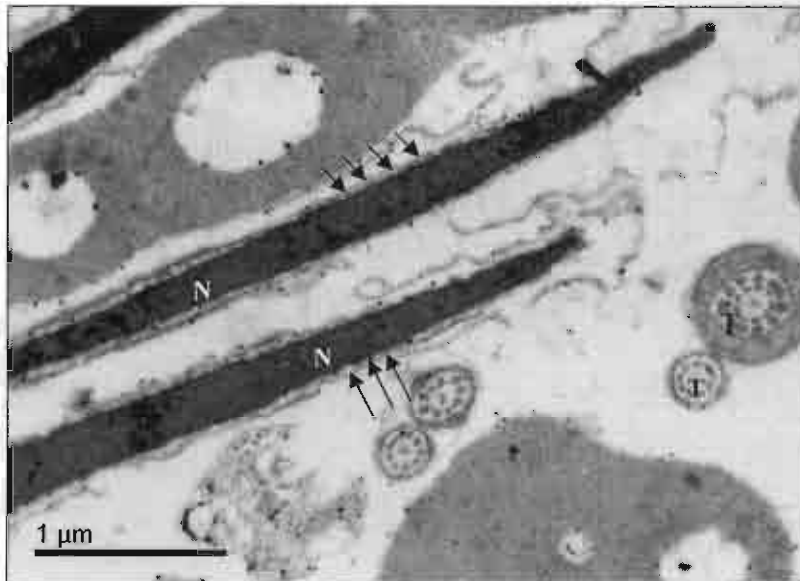
(ลูกศร) หุ้มอยู่รอบนอกสุด (ภาพที่ 36 ก และ ค) โดยโครงสร้างของส่วนหางนี้ไม่ได้เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมก่อนที่จะเกิด acrosome reaction เลย (Oba และคณะ, 1990; Campbell และคณะ, 1999)

ตารางที่ 7 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิด acrosome reaction ของเซลล์อสุจิวัวใน 9 กลุ่มการทดลอง

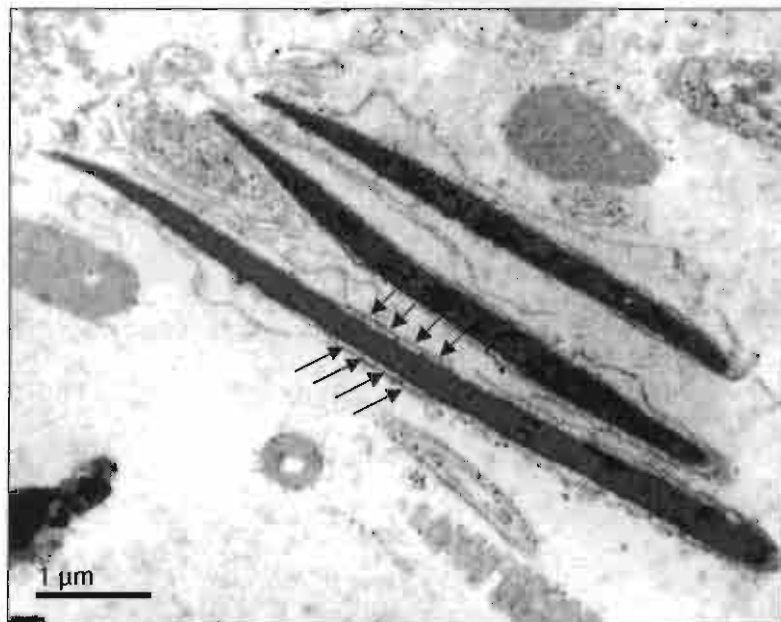
กลุ่มที่	เซลล์อสุจิวัวเกิด acrosome reaction Mean (%)	$\pm$ SD
1. กลุ่มควบคุม (เซลล์อสุจิไม่ได้บ่มกับสารหลังใด)	3.89	3.72
2. เซลล์อสุจิบ่มกับสารหลังจาก POEC ที่ไม่ได้แช่แข็ง	78.44	7.25
3. เซลล์อสุจิบ่มกับสารหลังจาก POEC ที่แช่แข็งนาน 1 เดือน	75.78	4.41
4. เซลล์อสุจิบ่มกับสารหลังจาก POEC ที่แช่แข็งนาน 2 เดือน	65.22	5.59
5. เซลล์อสุจิบ่มกับสารหลังจาก POEC ที่แช่แข็งนาน 3 เดือน	50.56	6.25
6. เซลล์อสุจิบ่มกับสารหลังจาก CC+GC ของสุกรไม่ได้แช่แข็ง	88.67	4.03
7. เซลล์อสุจิบ่มกับสารหลังจาก CC+GC ของสุกรที่แช่แข็งนาน 1 เดือน	82.22	3.46
8. เซลล์อสุจิบ่มกับสารหลังจาก CC+GC ของสุกรที่แช่แข็งนาน 2 เดือน	71.00	3.16
9. เซลล์อสุจิบ่มกับสารหลังจาก CC+GC ของสุกรที่แช่แข็งนาน 3 เดือน	58.56	4.69



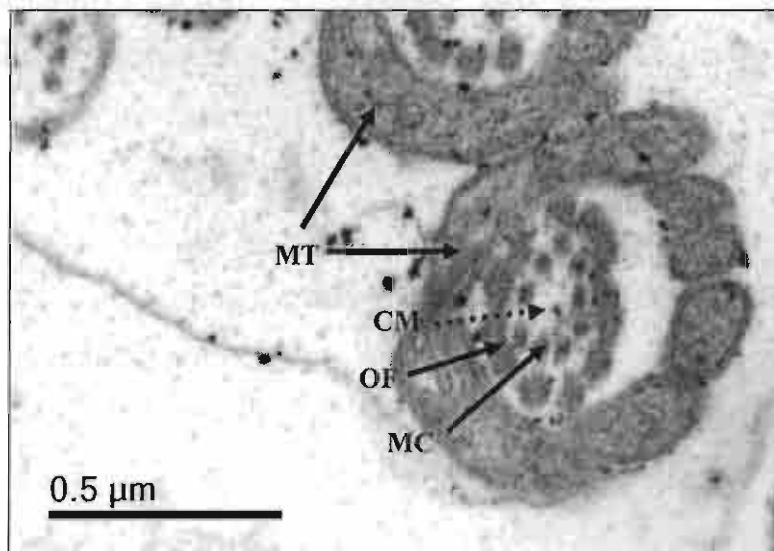
ภาพที่ 35 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์การเกิด acrosome reaction ในเซลล์อสุจิวัวที่บ่มกับ POEC และ GC+CC ที่เข้มข้นในเวลาต่างๆ นาน 4 ชั่วโมง (ตัวหนังสือเหนือกราฟแสดงค่าทางสถิติที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$)



(n)



(u)



(q)

ภาพที่ 36 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (ก) แสดงเซลล์อสุจิัวบ่มกับสารหลัง POEC บ่มนาน 4 ชั่วโมง (ตัดตามยาว) พบว่าเซลล์ 2 เซลล์ติดกันและเกิด acrosome reaction คือ plasma membrane เชื่อม membrane ของ outer acrosomal membrane (ลูกศร) (T คือส่วนหางเซลล์อสุจิ) (ข) แสดงเซลล์อสุจิัวบ่มกับสารหลังจาก CC+GC บ่มนาน 4 ชั่วโมง (ตัดตามยาว) พบเซลล์ติดกัน 3 เซลล์เกิด acrosome reaction และพบ equatorial segment (ลูกศร) (ค) แสดงหางเซลล์อสุจิัวระดับ middle piece (ตัดตามขวาง) ตรงกลางมี central microtubule 1 คู่ (CM) (ลูกศรประ) และมี microtubule doublet (MD) 9 คู่ ถัดมาเป็น outer fibers (OF) รอบๆ ซึ่งมี mitochondria (MT) (ลูกศร) หุ้มอยู่รอบนอก

4. วิจารณ์การทดลอง (Discussion)

ตามธรรมชาติเซลล์ในท่อนำไข่ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีสภาพที่พร้อมสำหรับกระบวนการสืบพันธุ์ เช่น การเคลื่อนตัวของเซลล์อสุจิและสภาพที่เหมาะสมสำหรับเซลล์ไข่ที่ตกออกจากรังไข่ การปฏิสนธิและการพัฒนาของตัวอ่อนในช่วงเริ่มต้น (The early embryonic development) ที่เริ่มจากการแบ่งเซลล์ตั้งแต่ระยะคลีเวจ (cleavage) ระยะมอรูล่า (morular) และระยะบลาสโตซิสต์ (blastocyte) สภาพที่เหมาะสมนี้เกิดจากเซลล์ภายในท่อนำไข่เองและสารที่เซลล์ในท่อนำไข่หลั่งออกมา เซลล์บุท่อนำไข่มีการเรียงตัวเป็นเซลล์ชั้นเดียว (simple epithelium cells) ประกอบด้วยเซลล์สองชนิดคือเซลล์ที่มีซีเลียและเซลล์ที่ไม่มีซีเลีย (Nilsson และ Reinius, 1969) ซึ่งความแตกต่างของสัณฐานวิทยาและโครงสร้างของเซลล์ที่ศึกษาโดย Areekijseeree ในปี ค.ศ. 2005 และ 2006 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าเซลล์บุท่อนำไข่สุกร (POEC) ในสภาพธรรมชาติ (*in vivo*) ของท่อนำไข่สุกรประกอบด้วยเซลล์สองชนิด คือเซลล์บุท่อนำไข่ที่มีรูปร่างกลมไม่มีซีเลียแต่มีไมโครวิลไลสั้นๆ อยู่ผิว (round shape of oviductal with non-ciliated epithelial cells and short microvilli on the apical surface) และเซลล์บุท่อนำไข่รูปทรงกระบอกที่มีซีเลีย (columnar oviductal epithelial with ciliated cells) ทั้งในระยะฟอลลิคูล่าและระยะลูเตีย จากการศึกษาดังนี้ทำให้ทราบว่า POEC มีการเปลี่ยนแปลงจำนวนประชากรของเซลล์ทั้งสองชนิดในช่วงระยะเวลาของการเป็นสัด (estrous cycle) โดยเซลล์ที่มีซีเลียมีการเพิ่มจำนวนในระยะฟอลลิคูล่าและลดจำนวนลงในระยะลูเตีย ซึ่งผลการทดลองนี้

สอดคล้องกับงานวิจัยของ Songthaveesin ในปี ค. ศ. 1998 ที่ศึกษาเซลล์บุท่อนำไข่วัว และถึงแม้การเปลี่ยนแปลงของจำนวนประชากรของเซลล์บุท่อนำไข่ของสัตว์ทั้งสองจะเหมือนกัน แต่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์บุท่อนำไข่ของสัตว์ทั้งสองนั้นกลับแตกต่างกัน ซึ่งจากรายงานของ Xu และคณะในปี ค.ศ. 1992 พบว่าเซลล์บุท่อนำไข่วัวมีรูปร่างลักษณะคล้ายตัวหนอน (wormlike) ซึ่งแตกต่างจากเซลล์บุท่อนำไข่สุกรที่มีรูปร่างเซลล์กลมๆ และรูปทรงกระบอก ตามรายงานของ Murray ในปี ค. ศ. 1992 พบว่าเซลล์ที่ไม่มีซีเลียนี้สร้างและหลั่งสารไกรโคโปรตีนเป็นบางครั้งในบริเวณที่เฉพาะเจาะจงซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะในช่วงของการปฏิสนธิและในช่วงที่ท่อนำไข่มีการเปลี่ยนแปลงในช่วงของการเป็นสัด ไกรโคโปรตีนนี้พบที่ต่อมหลั่งสาร (secretory granules) ของเซลล์ที่ไม่มีซีเลีย ซึ่งพบที่ท่อนำไข่ส่วนแอมพูลล่า (ampulla part) เท่านั้น โดยจะไม่พบที่บริเวณอื่นๆ ของท่อนำไข่เลย ในการทดลองนี้ได้ใช้ท่อนำไข่สุกรส่วนแอมพูลล่าในการศึกษา เพราะท่อนำไข่ส่วนแอมพูลล่าเป็นบริเวณสำคัญของกระบวนการสืบพันธุ์ ถือเป็นบริเวณที่เซลล์อสุจิเคลื่อนที่เข้าหาเซลล์ไข่และการเคลื่อนที่ของเซลล์ไข่ที่ตกมาจากรังไข่แล้วเกิดการปฏิสนธิที่บริเวณนี้ ตลอดจนเป็นบริเวณที่มีการพัฒนาของตัวอ่อนในช่วงเริ่มต้น เซลล์ที่บุในท่อนำไข่ส่วนแอมพูลล่ามีการสร้างและหลั่งสารที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์มากที่สุด (Murray, 1992; Campbell และคณะ, 1999) ท่อนำไข่ส่วนแอมพูลล่าของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมนี้ตลอดระยะฟอลลิคูล่า พบว่ามีเซลล์ที่มีซีเลียจำนวนมากขึ้นกว่าระยะอื่น ซึ่งสอดคล้องกับการเคลื่อนตัวของไข่ที่สุกและตกมาจากรังไข่ (ovulated oocytes) แต่ในระยะลูเตียพบว่ามีเซลล์บุท่อนำไข่ที่ไม่มีซีเลียแต่มีไมโครวิลไลสั้นๆ อยู่จำนวนมากกว่าระยะอื่น ซึ่งสอดคล้องกับสารที่เซลล์หลั่ง (secreted substance) ที่ใช้ในการเลี้ยงตัวอ่อนให้เจริญพัฒนา (Hole และ Koos, 1994) การเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์สืบพันธุ์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมขึ้นกับระดับฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) และ ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (progesterone) (Verhange และ Jaffe, 1986) ยิ่งไปกว่านั้นยังมีรายงานว่าเซลล์บุท่อนำไข่สามารถใช้เลี้ยงเซลล์ไข่ให้สุกได้ในจานเพาะเลี้ยง (*in vitro* oocytes maturation) สามารถใช้เสริมในการเตรียมความพร้อมของเซลล์อสุจิ (sperm preparation) ในจานเพาะเลี้ยง ซึ่ง Nagai และ Moor (1990) ยังพบว่าไกรโคโปรตีนจากเซลล์บุท่อนำไข่ชนิดที่ไม่มีซีเลียสามารถจับกับเซลล์อสุจิสุกรและช่วยลดการเกิดอสุจิหลายตัวเจาะเซลล์ไข่ใบเดียวกันได้ (polyspermy) นอกจากนี้เซลล์บุท่อนำไข่ยังสามารถใช้เสริมในการพัฒนาตัวอ่อนในจานเพาะเลี้ยง (*in vitro* embryonic development) ได้ดีเช่นกัน (White, 1989; Nagai และ Moor, 1990; Kitiyanant และคณะ, 1993; Park, 1996; Vatzias และ Hargen; 1999; Romar และคณะ, 2001; 2003)

ในการศึกษานี้ได้เจาะเซลล์ไข่บริเวณ antral follicle ซึ่งเป็นวิธีที่ทำให้ได้สะดวกพบว่าเซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบ (COCs) มีจำนวนมากถึง 46 เซลล์ต่อหนึ่งรังไข่ ซึ่ง COCs ถูกแบ่งออกได้เป็น 4 ชนิดตามลักษณะ CC ที่ล้อมรอบเซลล์ไข่คือ เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ติดแน่น (Intact cumulus cells layer) เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้น (Multi cumulus cells layers) เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เพียงบางส่วน (Partial cumulus cells) เซลล์ไข่ที่ไม่มีเซลล์ล้อมรอบ (Completely denuded oocyte) มีเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 19.87, 18.13, 28.88 และ 33.12 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่ง COCs ทั้ง 4 ชนิด มีเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ในช่วง 89 ถึง 145 ไมโครเมตร และจากการวัดเส้นผ่าศูนย์กลาง (diameter) ของ COCs และแยกตามประเภทของ COCs พบว่าเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่นมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์มากที่สุดคือเท่ากับ 144.68 ± 8.79 ไมโครเมตร รองลงมาเป็นเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้นมีขนาดเซลล์เท่ากับ 122.82 ± 4.78 ไมโครเมตร ลำดับสามคือเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เพียงบางส่วนมีขนาดเซลล์เท่ากับ 106.20 ± 8.72 ไมโครเมตร ลำดับสุดท้ายคือเซลล์ไข่ที่ไม่มีเซลล์ล้อมรอบมีขนาดเซลล์เท่ากับ 89.16 ± 5.69 ไมโครเมตร ในงานวิจัยนี้ได้ใช้เซลล์ไข่ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางลำดับหนึ่งและสองคือเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่นและเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้น นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง M 199 ที่เสริมด้วย 10% HTFCS, 2.2 mg/mL NaHCO_3 ผสม 1 M Hepes (Sigma, St Louis MO), 0.25 mM pyruvate, 15 $\mu\text{g/mL}$ porcine follicle-stimulating hormone, 1 $\mu\text{g/mL}$ LH, 1 $\mu\text{g/mL}$ ผสม estradiol with ethanol และ 50 $\mu\text{g/mL}$ และยาปฏิชีวนะคือ gentamycin sulfate พบว่าเซลล์ไข่ทั้งสองชนิดมีศักยภาพในการพัฒนาให้ไข่สุก (matured oocyte) ได้สูงซึ่งตรงกับงานวิจัยของ Mori (2000) ที่พบว่า COCs ของสุกรชนิดที่หนึ่งและสองที่ได้นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เสริมด้วย follicular stimulating hormone (FSH) และ leutinizing hormone (LH) นั้นสามารถพัฒนาให้เป็นไข่สุกได้สูงขึ้นเช่นกัน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ เช่นการศึกษาในหนู (Magnusson, 1980) แกะ (Staigmiller และ Moor, 1984) วัวและควาย (Kitiyanant และคณะ, 1989, 1995) พบว่าเซลล์ไข่ของสัตว์เหล่านี้สามารถเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ไข่ที่สุกได้จริง และผลจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดในงานวิจัยครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่า COCs ชนิดที่หนึ่งนั้น CC ที่อยู่ล้อมรอบได้คลี่ตัวออก (peel off) และมีการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ที่มีรูปร่างกลมไปเป็นเซลล์รูปร่างคล้ายหยดน้ำตาในขณะที่ COCs ชนิดที่สองนั้น CC ที่ล้อมรอบเซลล์ไข่ได้แสดงการยืดตัวออก (expansion) คือการยืด

ยาวออกของ CC หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์นาน 24 ชั่วโมง และเมื่อได้เพาะเลี้ยง COCs ชนิดที่สองนาน 48 ชั่วโมง ก็สังเกตเห็น CC ที่อยู่ล้อมรอบเกิดการยืดยาวออกและสามารถหลุดออกจากผิวเซลล์ไข่ได้ จากการศึกษาทั้งหมดทำให้คาดได้ว่าเซลล์ไข่สองชนิดนี้สามารถที่จะพัฒนาและสุกได้ (oocyte become developed and matured) หลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ที่เติมฮอร์โมนและเตรียมขึ้นเองในห้องวิจัย

จากทฤษฎีที่เราทราบว่าถุงไข่ที่เป็น antral follicles มีเซลล์อยู่ 2 ชนิด เซลล์ชนิดแรกเรียกว่า cumulus cells (CC) ที่อยู่ติดกับเซลล์ไข่ ชนิดที่สองคือเซลล์ granulosa (GC) ที่ล้อมรอบในถุงไข่นั้น เซลล์ทั้ง 2 ชนิด มีหน้าที่คือ GC หลังฮอร์โมนเอสโตรเจนสูงในถุงไข่ ฮอร์โมนเอสโตรเจนมีหน้าที่ส่งสารที่มี molecular weight ต่ำๆ เช่น ion nucleotides และ amino acids สู่เซลล์ไข่ระยะแรกที่ยังไม่พัฒนา ซึ่งสารนี้เรียกว่า oocyte maturation inhibitor (OMI) หรือ meiosis arresting factor ที่ทำหน้าที่หยุดการเจริญพัฒนาของเซลล์ไข่ให้อยู่ในระยะ diplotene stage of prophase I ตลอดเวลาและเพื่อป้องกันไม่ให้ primary oocytes พัฒนาไปเป็น secondary oocytes (Eppig, 1993; Whitaker, 1996; Li และคณะ, 2000) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Anderson และ Abertni (1976) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง CC และเซลล์ไข่ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน พบว่า gap junction ระหว่าง CC และไมโครวิลไลจาก CC ที่ยื่นมาสัมผัสกับตัวไซโตพลาสซึมของเซลล์ไข่นั้นมีความสัมพันธ์กันไมโครวิลไลของ CC ซึ่งจะฝังตัวเข้าไปในเมมเบรนของเซลล์ไข่ โดยความสัมพันธ์นี้มีผลอย่างมากกับการเจริญของเซลล์ไข่เพราะว่าส่วนปลายของไมโครวิลไล ของ CC ที่ยื่นออกมาสัมผัสกับไซโตพลาสซึมของเซลล์ไข่มีลักษณะเป็นกระเปาะและภายในมีสารจาก CC มายังเซลล์ไข่ สารนี้เชื่อว่าเป็นมีสารที่จะเป็นตัวยับยั้งการเจริญของเซลล์ไข่ซึ่งทำให้เซลล์ไข่หยุดการเจริญอยู่ในช่วง primary oocyte อยู่ในระยะ prophase I ต่อมาเมื่อได้รับอิทธิพลจากฮอร์โมนของ GnRH จากต่อมใต้สมองส่วนหน้า (Anterior pituitary gland) เซลล์ไข่จึงเจริญต่อไป ซึ่งตรงกับการศึกษาของ Scott และ Hedgen ในปี 1990 ที่พบว่า CC ที่อยู่ล้อมรอบ primary oocyte หลังสารที่เรียกว่า oocyte maturation inhibitor (OMI) ซึ่งจะรักษา meiotic process ไว้ ทำให้หยุดการเจริญของเซลล์ไข่ไม่ให้ผ่านระยะ prophase I ไปได้ เซลล์ไข่จะไม่สามารถเจริญผ่าน primary division เพื่อเข้าสู่ secondary oocyte ได้เลยถ้ายังมี CC ติดอยู่อย่างหนาแน่น แต่ CC ก็มีบทบาทในการเหนี่ยวนำและยับยั้งการพัฒนาของเซลล์ไข่เช่นกัน (Richard และ Sirard, 1996)

การใช้ฮอร์โมน GnRH และ steroid hormone เช่น ฮอร์โมนเอสโตรเจนเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่จะมีผลในการไปเพิ่มปริมาณการปฏิสนธิในจานแก้วและหรือไป

เพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ไข่วัว (Fukushima และ Zuelke, 1989) และเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ไข่นูในจานเพาะเลี้ยงได้เช่นกัน (Shalgi, 1979) เป็นไปได้ว่าฮอร์โมนเหล่านี้ไปมีบทบาทสำคัญต่อและความสมบูรณ์และการพัฒนาของนิวเคลียสและไซโทพลาสซึมของเซลล์ไข่ซึ่งก็ยังมีงานวิจัยอื่นๆ ที่เสริมงานวิจัยเหล่านี้อีก เช่นงานวิจัยของ Saeki และ Heshi (1991) พบว่าการเติมฮอร์โมน FSH, LH และฮอร์โมนเอสโตรเจน ที่เสริมในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่มีผลทำให้เซลล์ไข่วัวเจริญพัฒนามากขึ้นและมีผลไปเพิ่มการแบ่งเซลล์ของตัวอ่อนในระยะบลาสโตซิสเพิ่มมากขึ้นด้วย นอกจากนี้ Yoshinura และ Hosoi (1989) พบว่าฮอร์โมนโพรแลคติน (prolactin) LH, FSH และฮอร์โมนเอสโตรเจน มีผลต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์ไข่กระต่ายในการทำเซลล์ไข่ให้สุกในจานแก้ว (*in vitro* oocyte maturation) มากขึ้นและการศึกษาของ David และ Phillip (1991) ที่ฉีดกระตุ้นหนูด้วยฮอร์โมน PMSG และ hCG และศึกษา COCs ในช่วงเวลาต่างๆ พบว่าเมื่อเซลล์ไข่ได้รับการกระตุ้นจากฮอร์โมน PMSG จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ CC และหลังจากได้รับการฮอร์โมน hCG ไปแล้ว 2 ชั่วโมง germinal vesicle (GV) จะเกิดกระบวนการ germinal vesicle break down (GVB) ซึ่งก็คือการแยกสลายของนิวเคลียสของเซลล์ไข่ (nuclear membrane break down) แสดงว่า primary oocyte มีการเจริญพัฒนาต่อไปภายใน 4 ถึง 8 ชั่วโมงหลังให้ฮอร์โมน hCG และยังพบว่า CC ที่อยู่ล้อมรอบเซลล์ไข่กระจายตัวออกพร้อมที่จะทำให้เซลล์ไข่ มีการเจริญพัฒนาจากระยะ primary meiotic division เข้าสู่ระยะ secondary oocyte stage และพร้อมที่จะเกิดการตกไข่ (ovulation) ได้ในเวลาต่อมา สรุปแล้วว่าฮอร์โมนเหล่านี้สามารถทำให้เซลล์ไข่ในระยะที่หลุดออกจากรังไข่แล้วและ COCs ชนิดที่หนึ่งและที่สองที่มีศักยภาพสามารถพัฒนาได้จนถึงระยะไข่สุกในจานแก้วได้

ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้เมื่อเจาะ COCs ออกจาก antral follicles ก็คล้ายกับการตกไข่ คือทำให้ COCs หลุดออกจาก antral follicles จึงมีผลทำให้ CC แยกตัวออกจาก GC และเมื่อนำ COCs ชนิดที่มีศักยภาพในการสุก มาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่เสริมด้วยฮอร์โมน โดยไม่มี CC+GC ตามออกมา CC+GC ไม่สามารถส่งสารหยุดการเจริญพัฒนาเซลล์ไข่ได้อีก ซึ่งเมื่อนำ COCs ชนิดที่หนึ่งและสองมาเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่เสริมด้วยฮอร์โมนจึงมีผลทำให้ CC ที่อยู่ล้อมรอบเซลล์ไข่ได้คลี่ตัวออกและมีการเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ที่มีรูปร่างกลมไปเป็นเซลล์รูปร่างคล้ายหยดน้ำตาใน ขณะที่ CC ได้แสดงการยึดตัวออกหลังจากเพาะเลี้ยง COCs ในอาหารเพาะเลี้ยงนาน 24 ถึง 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นการแสดงว่าเซลล์ไข่สามารถเจริญพัฒนาเป็น matured oocytes ได้จริง Hinrichs (1997) ได้รายงาน bahwa เซลล์ไข่ของม้ามีการเจริญพัฒนาซึ่งคล้าย

กับการวิจัยนี้ เขารายงานว่าการทำ *in vitro* maturation ของ COCs ชนิดที่หนึ่งและสองของเซลล์ไข่มีศักยภาพที่จะเจริญพัฒนาในอาหารเพาะเลี้ยงสูงกว่าเซลล์ไข่ชนิดอื่นๆ

ในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่ารังไข่ของสุกรมี COCs ชนิดที่หนึ่งและสองอยู่ประมาณ 40 เปอร์เซนต์ ซึ่ง COCs ทั้งสองมีเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ในช่วง 120 ถึง 145 ไมโครเมตร ด้วยข้อมูลที่พบทั้งหมดนี้จึงสามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ COCs ชนิดของ COCs และขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของ COCs เป็นบรรทัดฐานเพื่อที่จะใช้ในการคัดเลือก COCs ก่อนที่จะนำไปเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงซึ่งจะทำให้ได้ oocyted maturation ในเปอร์เซนต์ที่สูงขึ้นกว่าการไม่คัดเลือกเลย ซึ่งผลงานที่ผู้วิจัยได้พบนี้นับว่าเป็นประโยชน์มาก เพราะผู้วิจัยได้ประหยัดเวลาและการใช้สารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในอาหารเพาะเลี้ยงเพราะเตรียมขึ้นเองและใช้ฮอร์โมนบ้างเพียงเล็กน้อย แต่สามารถทำให้ได้เซลล์ไข่สุกจำนวนมากที่สามารถนำมาทำการศึกษาต่อไปได้อย่างดี

จากการศึกษา GC ที่แยกออกจาก COCs ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดเซลล์พบว่า GC ที่อยู่ในน้ำในรังไข่ (follicular fluid) มีสัณฐานกลมและอยู่เป็นกลุ่มและเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง แล้วนั้นจะไม่มี การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาเกิดขึ้น แต่พบว่าเซลล์แยกตัวออกเป็นกลุ่มที่เล็กลงหรือบางส่วนแยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ แต่อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยของ Richard และ Sirard, 1996 พบว่า GC ที่แยกออกเป็นกลุ่มเล็กๆ นี้หลังสารสู่อาหารเพาะเลี้ยง ดังนั้นการใช้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและแบบส่องผ่านนั้นเป็นวิธีที่ดีที่เหมาะสมที่ใช้ในการศึกษาทางสัณฐานวิทยาและการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของ POEC, COCs, CC และ GC ในสภาพธรรมชาติ (*in vivo*) และในสภาพเพาะเลี้ยง (*in vitro*) ได้เป็นอย่างดี

สำหรับการศึกษา oviductal secretory glycoprotein ในช่วงวัยเจริญพันธุ์ของสัตว์เพศเมีย นั้น พบว่าท่อนำไข่มีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและทางชีวเคมีเพื่อให้มีสภาพภายในท่อนำไข่ที่เหมาะสมต่อการปฏิสนธิ (fertilization) และการพัฒนาของตัวอ่อน (embryo development) โดยการเปลี่ยนแปลงนี้เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติด้วยการควบคุมของระบบฮอร์โมนจาก Hypothalamus สู่ Anterior pituitary gland และสู่อวัยวะเป้าหมาย (target organ) นอกจากนี้ยังพบว่ามีสารโมเลกุลขนาดใหญ่หลายร้อยชนิดถูกสร้างขึ้นและหลั่งในท่อนำไข่ (oviductal lumen) ซึ่งได้แก่ estrogen-dependent oviductal secretory glycoprotein (OSP) ที่ทำหน้าที่ช่วยเซลล์อสุจิให้เคลื่อนที่ผ่านท่อ นำไข่สู่เซลล์ไข่ได้ นอกจากนี้ยังพบโปรตีนที่ทำหน้าที่อื่นๆ ได้แก่ protease inhibitors,

growth factors, cytokines binding proteins, enzymes และ immunoglobulins ซึ่งมีรายงานว่าโปรตีนนี้ถูกสร้างและหลั่งออกมาจากรังไข่และจากเซลล์บุท่อนำไข่ของแกะที่ทำในหลอดทดลอง พบว่ามีการสร้างโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กๆ ซึ่งมีขนาดประมาณ 14 ถึง 26 kDa หลายชนิด โปรตีนเหล่านี้อาจมีความสำคัญต่อการเกิดปฏิสนธิหรือการพัฒนาของตัวอ่อนซึ่งเกิดในช่วงเป็นสัด (estrous cycle) และช่วงแรกของการตั้งครรภ์ (early pregnancy) ตามลำดับ โปรตีนต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบของของเหลวที่อยู่ในท่อนำไข่จะมีความแตกต่างกัน การเปลี่ยนแปลงของสารต่างๆ เหล่านี้จะเกิดมากขึ้นเมื่อมีระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนเพิ่มขึ้น สำหรับกลไกและหน้าที่ของโปรตีนเหล่านี้ยังคงต้องมีการศึกษาต่อไป มีรายงานอื่นๆ กล่าวว่าไกรโคโปรตีนในของเหลวที่อยู่ในท่อนำไข่ของสุกรอาจทำหน้าที่เกี่ยวกับการพัฒนาของตัวอ่อนโดยท่อนำไข่ของสุกรสามารถสังเคราะห์และหลั่งโปรตีนได้ถึง 14 ชนิด ได้แก่ porcine oviduct-specific secretory glycoprotein (pOSP) และ tissue inhibitor ของ matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) เป็นต้น ในการศึกษาได้พบสารหลังจาก GC สุกรใน condition medium มีแถบโปรตีนที่มีขนาด 76 kDa แต่ยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่นอน สำหรับงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาโปรตีนจาก POEC และ CC+GC ของสุกรที่หลังสารสู่อาหารเพาะเลี้ยงและเมื่อศึกษารูปแบบของโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE ภายใต้ reducing conditions พบว่ารูปแบบโปรตีนที่สร้างขึ้นจากเซลล์ทั้งสองกลุ่มนั้นมีความคล้ายคลึงกันและที่น่าสนใจก็คือการพบแถบโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 17 kDa ในตัวอย่างของเซลล์บุท่อนำไข่ คือ OFD₂ และแถบโปรตีนนี้จะชัดเจนในตัวอย่าง OFD₄ และ OFD₆ ส่วนตัวอย่างสารหลังจากเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่นั้น ไม่พบแถบโปรตีนดังกล่าวในตัวอย่าง CFD₂ แต่พบแถบโปรตีนนี้บ้างในตัวอย่าง CFD₄ และตัวอย่าง CFD₆ ซึ่งอาจสันนิษฐานได้ว่าเซลล์บุท่อนำไข่อาจมีการผลิตหรือหลั่งโปรตีนดังกล่าวในปริมาณที่มากกว่าเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ ซึ่งต้องทำการทดลองเพิ่มขึ้นเพื่อสรุปข้อสมมุติฐานดังกล่าวต่อไป เหนือแถบโปรตีนขนาด 17 kDa พบแถบโปรตีนที่มีขนาด 22 kDa OFD₆ และพบแถบโปรตีนขนาดเดียวกันนี้แต่จางกว่าในตัวอย่าง CFD₆ แถบโปรตีนขนาด 17 kDa ที่พบนี้อาจเป็นหน่วยย่อยของโปรตีนชนิดหนึ่งที่พบในอาหารเพาะเลี้ยงจากเซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture) เหนือชั้นตอนบนของเจลได้พบแถบโปรตีนที่มีขนาดมากกว่า 220 kDa (คือ หมายเลข 1, 2, 3, 4, 5 และ 6) แต่ยังไม่ทราบว่าเป็นโปรตีนชนิดใดและมีหน้าที่อย่างไร ดังนั้นการที่จะศึกษาโปรตีนเหล่านี้ว่าเป็นโปรตีนชนิดใดอาจศึกษาได้โดยการตัดเจลแล้วทำการแยกโปรตีนออกจากเจล จากนั้นนำไปทำการหาลำดับของกรดอะมิโนหรือทำ Immunoblotting เพื่อตรวจสอบว่าเป็นโปรตีนชนิดใดต่อไป และเนื่องจากโปรตีนขนาด 17 และ 22 kDa ปรากฏในความเข้มของแถบที่ต่ำเมื่อ

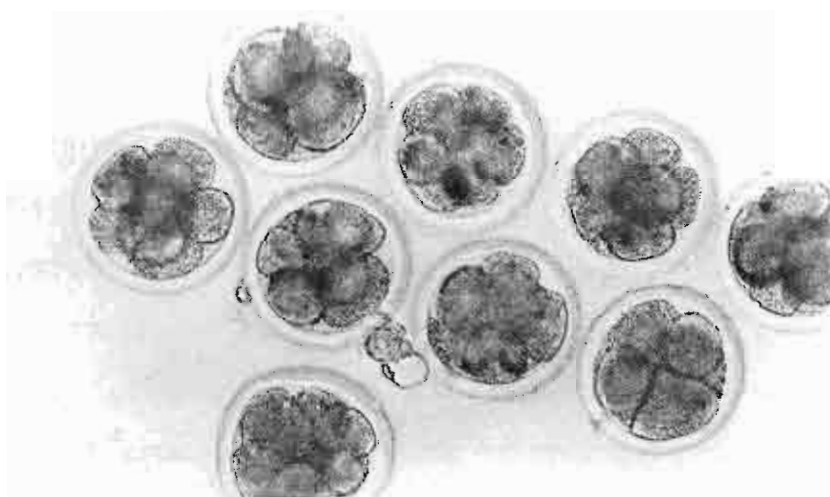
ย้อมเจลด้วย comassie blue ดังนั้นจึงควรย้อมเจลด้วย silver ที่มีความไวในการย้อมติดโปรตีนสูงกว่า comassie blue ด้วยเหตุนี้จึงจะสามารถตรวจสอบโปรตีนที่มีปริมาณน้อยในตัวอย่างได้ ซึ่งสามารถแสดงผลของโปรตีนได้ดีกว่าและสามารถเปรียบเทียบปริมาณของโปรตีนเหล่านี้ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์บูทอไนซ์และเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ได้ รวมถึงทำให้ทราบปริมาณโปรตีนที่ POEC และ CC+GC หลังสู้อาหารเพาะเลี้ยงที่เพาะเลี้ยงในระยะเวลาที่ต่างกันได้ โดยการเปรียบเทียบความเข้มของแถบบนเจลได้อย่างประมาณค่าโดยข้อมูลจากการศึกษาทาง Biochemical compositions ของสารหลังจากเซลล์ทั้งสองกลุ่มนับว่าเป็นข้อมูลประกอบที่มีความสำคัญที่จะนำความรู้ไปใช้ต่อไปในการใช้สารหลังจากเซลล์ทั้งสองกลุ่มเพื่อศึกษาการทำการปฏิสนธิในหลอดแก้ว (*in vitro fertilization*) ต่อไป

การที่ศึกษาประโยชน์ของสารหลัง POEC และ CC+GC ต่อการเตรียมพร้อมเซลล์อสุจิสำหรับงานปฏิสนธิในอกร่างกายนั้นเนื่องจากเซลล์อสุจิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมต้องมีความพร้อมก่อนการทำการปฏิสนธิกับเซลล์ไข่ โดยเซลล์อสุจิจะต้องผ่านกระบวนการ capacitation และ acosome reaction ซึ่งเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติเมื่อเซลล์อสุจิว่ายผ่านท่อของอวัยวะสืบพันธุ์ของสัตว์เพศเมีย (female reproductive tract) คือ มดลูก (uterus) และ ปีกมดลูก (oviduct) (Austin และ Chang 1951) ภายในอวัยวะเหล่านี้มีเซลล์บุภายในซึ่งสามารถหลั่งสารและช่วยบอกพัดให้เซลล์อสุจิให้เคลื่อนไปข้างหน้า พร้อมเกิด capacitation ได้และยังพบสาร neurotransmitter chemicals เช่นสารจำพวก epinephrine, taurine และ hypotaurine ที่เป็นสารที่พบในอวัยวะสืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเพศเมียที่ช่วยเหนี่ยวนำให้เกิด capacitation ก่อนการปฏิสนธิอยู่แล้ว (Meizel และคณะ 1981) คือเกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีระของเซลล์อสุจิ โดยเซลล์จะเคลื่อนที่เร็วขึ้นและส่วนหางของเซลล์อสุจิจะเคลื่อนไหวและสับัดแรงขึ้นลักษณะเช่นนี้เรียกว่าเกิด hyperactivation ซึ่งมีความสัมพันธ์เกี่ยวเนื่องกันก่อนการเกิด capacitation ซึ่งขณะที่เกิด capacitation นั้นไครโคโปรตีนและ seminal plasma จะเคลื่อนออกมาจากส่วนที่เป็น plasma membrane ที่อยู่เหนือ acrosome เกิดแยกออกเป็นช่วงๆ ทำให้เอนไซม์ที่อยู่ส่วนหัวของเซลล์อสุจิเช่น hyaluronidase, acrosin ย่อย zonapellucida เซลล์ไข่ก่อนการฝังส่วนหัวเซลล์อสุจิเข้าเซลล์ไข่เพื่อปฏิสนธิ ซึ่งลักษณะที่กล่าวนี้จะพบทั่วๆ ไปในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Yanagimachi, 1981) ในการทำการปฏิสนธิในจานแก้วก็เช่นกันสามารถเตรียมพร้อมเซลล์อสุจิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมให้เกิด capacitation และ

acrosome reaction ได้ ซึ่งมีผลการทดลองมากมายที่กระตุ้นให้เซลล์อสุจิของสัตว์ เช่น ลิงเกิดกระบวนการ capacitation ด้วยการใส่สารเคมีกระตุ้นเช่นสารพวก caffeine, C-AMP, theophylline, heparin (Parrish, 1988, Ooba และคณะ, 1990, Pavasuthipisit และคณะ, 1995) ผลทดลองพบว่าสารเคมีนี้ไปเพิ่ม secondary messenger ภายใน inner membrane ที่ส่วนหัวของเซลล์อสุจิเท่ากับเป็นการเพิ่ม Ca^{2+} (Ca^{2+} uptake) ซึ่ง Ca^{2+} ที่เพิ่มขึ้นนี้มีผลไปเพิ่มพลังงานในส่วนหางของเซลล์อสุจิทำให้เกิด hyperactivation ซึ่งการเกิด acrosome reaction ของเซลล์อสุจิในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะแตกต่างกันไปตามชนิดของสัตว์ สัตว์บางชนิดสามารถเกิดกระบวนการต่างๆ ได้ในการเตรียมพร้อมเพียงแต่ให้เซลล์อสุจิว่ายขึ้นหรือเพียงให้เซลล์อสุจิว่ายไปมาในน้ำยาเพาะเลี้ยงในช่วงเวลาสั้นๆ เท่านั้น เช่นการศึกษาในหนูเมาส์และหนูแฮมสเตอร์ เพียงนำเซลล์อสุจิของสัตว์ทั้งสองให้เคลื่อนที่ในอาหารเพาะเลี้ยงเช่น Tryode's medium ที่ผสมด้วย glucose, albumin, lactate และ pyruvate (TALP) ก็พบว่าเซลล์อสุจิหนูเมาส์และหนูแฮมสเตอร์ สามารถเกิด capacitation และ acrosome reaction ได้โดย albumin เป็นสารที่เหนี่ยวนำให้เกิด acrosome reaction ในหนูนั้นเอง (Bavister, 1969) แต่ในสัตว์อื่นเช่นหนูตะเภาสามารถเกิดกระบวนการ capacitation และ acrosome reaction ได้ในอาหารเพาะเลี้ยงที่เติม Ca^{2+} จากการวิจัยของ Hyne และ Gerbers (1981) พบว่ากระบวนการ capacitation และ acrosome reaction เกิดได้ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เป็นด่างที่มี pH มากกว่า 7.8 แต่ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มี pH 7.4 นั้นต้องการเติม biological factor และในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีส่วนผสมของ glucose, pyruvate lactate และ albumin นั้นก็สามารถทำให้เกิดกระบวนการ capacitation และ acrosome reaction ได้เช่นกัน สำหรับในสัตว์ใหญ่ๆ เช่นวัว สามารถทำให้เซลล์อสุจิเกิด acrosome reaction ได้โดยใช้สาร heparin (Parish และคณะ, 1988) สารนี้จะช่วยส่งเสริมให้การปฏิสนธิเพิ่มสูงขึ้น heparin จาก hock intestinal mucosal heparin จะคล้าย sodium salt (Sigma chemical co. LTD) เตรียมโดยนำสารมาละลายในน้ำเกลือแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ซึ่งสาร heparin นี้ได้ช่วยในการเหนี่ยวนำให้เซลล์อสุจิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด เช่น วัว (Lenz และคณะ 1983) กระต่าย ลิง (Handrow และคณะ 1984) หนูแฮมสเตอร์ (Weizel และคณะ 1986) สุกร (Reyes และคณะ 1984) และคน (Delgado และคณะ 1982) เกิดกระบวนการ capacitation และ acrosome reaction ได้ดี

ดังนั้นจะเห็นว่าการใช้สารหลังจาก POEC และ CC+GC ของสุกรที่แช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำ สามารถเก็บสารหลังที่มีประโยชน์ไว้ใช้ได้นานและสารหลังทั้งสองกลุ่มใช้ในการกระตุ้นเซลล์อสุจิทำให้เกิด acrosome reaction ได้ในหลอดทดลอง ซึ่งสามารถ

นำไปใช้ประโยชน์ในงานปฏิสนธินอกร่างกาย (*in vitro fertilization*) ได้ และเนื่องจากความสะดวก ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายและที่สำคัญที่สุดคือไม่จำเป็นต้องซื้อสารเคมีที่ใช้เหนียวทำให้เกิดกระบวนการ capacitation และ acrosome reaction ในการทำปฏิสนธิในจานแก้ว จากต่างประเทศอีกต่อไป นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงประโยชน์ของ POEC และ CC+GC ในการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนให้เจริญพัฒนาในจานแก้ว เช่นตัวอ่อนของแพะ แกะและวัว ทั้งยังช่วยแก้ไขการเกิดตัวอ่อนหยุดการแบ่งเซลล์ (cell block stage) ในระยะ 8 ถึง 16 เซลล์ ดังภาพที่ 37 หรือการที่ตัวอ่อนหยุดการเจริญเติบโตแล้วตายไป (cell dead) นอกจากนี้ การใช้ condition medium จาก POEC และ CC+GC สุกรที่แช่แข็งยังทำให้ไม่ต้องเตรียมเซลล์ของระบบสืบพันธุ์สดๆ ทุกครั้งที่ต้องการเลี้ยงตัวอ่อนหรือต้องทำการย้ายฝากตัวอ่อนที่อยู่ในช่วงเซลล์หยุดการแบ่งตัวไปยังสภาพแวดล้อมจริงของท่อนำไข่ในสัตว์ที่มีชีวิตอยู่จริงๆ เช่น ในท่อนำรังไข่ของกระต่ายแต่การทำเช่นนี้ยุ่งยากมาก (Pavasuthipaisit และคณะ, 1993) เพราะต้องใช้งบประมาณในการฉีดฮอร์โมนและการผ่าตัดสัตว์ซึ่งไม่สะดวกเลย ดังนั้นจะเห็นว่าการใช้สารจากเซลล์ที่หลังของ POEC และ CC+GC สุกรที่ศึกษาครั้งนี้จะช่วยใช้เสริมในอาหารเพาะเลี้ยงตัวอ่อนได้ดีเช่นกันซึ่งจะทำให้สะดวกและประหยัดค่าใช้จ่าย ไม่สิ้นเปลืองเวลาเป็นอย่างมาก นอกเหนือจากนี้ยังมีรายงานถึงวิวัฒนาการสมัยใหม่ที่สามารถใช้นิวเคลียสของ POEC, CC และ GC ของเซลล์โคในการโคลนนิ่งลูกโคได้อีกด้วย (กนก ภาวสุทธิไพติฐ และ ยินดี กิตยานันท์, 2544) ซึ่งก็อาจประยุกต์ใช้ได้กับเซลล์สุกรได้ จึงนับได้ว่าเซลล์จากอวัยวะสืบพันธุ์สุกรที่ต้องกำจัดทิ้งจากโรงฆ่าสุกรในจังหวัดนครปฐม ที่ได้นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้ จะนำมาปรับใช้ให้เป็นประโยชน์ต่อวงการเพาะเลี้ยงสัตว์เศรษฐกิจต่อไปได้เป็นอย่างดี



ภาพที่ 37 ตัวอ่อนวาระยะ 6 ถึง 18 เซลล์ ที่หยุดการเจริญเติบโต (cell block stage) ในการทำตัวอ่อนว้าหลอดแก้ว (จาก Pavasuthipaisit และคณะ, 1993)