



ผลของสารหลังจากถูกไข่สุกรต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิในห้องปฏิบัติการ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ผลของสารหลังจากถูกใส่สู่กรต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิในห้องปฏิบัติการ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

IN VITRO EFFECT OF PORCINE FOLLICULAR FLUID SECRETION ON PRIMARY
CELL CULTURE



By
MISS Chanikarn SRINARK

A Thesis Submitted in partial Fulfillment of Requirements

for Master of Science (BIOLOGY)

Department of BIOLOGY

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2017

Copyright of Graduate School, Silpakorn University

หัวข้อ ผลของสารหลังจากถูกใส่สู่กรดต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิใน
ห้องปฏิบัติการ
โดย ชนิกันต์ ศรีนาค
สาขาวิชา ชีววิทยา แผนก ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก รองศาสตราจารย์ ดร. มยุภา อารีกิจเสรี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณะบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปานใจ ธารทัศน์วงศ์)

พิจารณาเห็นชอบโดย

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กุศลนถ ออบสุวรรณ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. มยุภา อารีกิจเสรี)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(รองศาสตราจารย์ ดร. บุชบา ปันยารชุน)

58303201 : ชีววิทยา แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทบัณฑิต

คำสำคัญ : การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบปฐมภูมิ, สารหลังจากถุงไข่สุกร, เซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกร, เซลล์แกรนูโลซาสุกร, วิธี MTT assay

นางสาว ชนิกันต์ ศรีนาค: ผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิในห้องปฏิบัติการ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รองศาสตราจารย์ ดร. มยุวา อารีกิจเสรี

สารหลังจากถุงไข่สุกรสุภาพติขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3 มิลลิเมตร) ขนาดกลาง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 4-6 มิลลิเมตร) และขนาดใหญ่ (เส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 7 มิลลิเมตร) ถูกเก็บตัวอย่างมาแบบปลอดเชื้อ สารหลังจากไข่ทั้ง 3 ขนาด ถูกนำมาศึกษาผลของการเจริญพัฒนาของเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรระยะ luteal และเซลล์แกรนูโลซาสุกรจากถุงไข่ขนาดกลางนำมาเพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิในอาหาร M199 เสริมด้วย 10% Heat-treated fetal bovine serum (HTFBS), 2.2 mg/mL NaHCO₃, 0.25 mM pyruvate, and 50 µg/mL gentamycin sulfate ที่ความเข้มข้นสูง เสริมด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ก่อนนำมาศึกษา โดยทดสอบเซลล์ทั้ง 2 ชนิด ในอาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่เสริม HTFBS แต่เสริมสารหลังจากถุงไข่ 3 ขนาด ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เสริมในอาหารเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมเชิงบวก (อาหารเพาะเลี้ยงเสริมด้วย 10% HTFBS) ตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์ทั้ง 2 ชนิด ด้วยวิธี MTT assay วิเคราะห์ผลด้วย one-way ANOVA นอกจากนี้เซลล์บุผิวท่อนำไข่และเซลล์แกรนูโลซาถูกนำมาศึกษาสัณฐานวิทยาเมื่อเพาะเลี้ยงทั้งแบบระยะสั้นและระยะยาวในอาหารที่ไม่เสริมสารหลังจากถุงไข่สุกร ผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงระยะสั้นพบว่าเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรแยกได้เป็น 2 ชนิดคือเซลล์ทรงกระบอกมีซีเลียด้านบน (columnar ciliated cells) และเซลล์ทรงกลมไม่มีซีเลีย (non-ciliated cells) โดยเซลล์ทั้ง 2 ชนิด ได้เปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นแบบหัวแหลมท้ายแหลมและยึดเกาะพื้นผิว (ประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 96 ชั่วโมง) เมื่อเพาะเลี้ยงแบบระยะยาวพบเซลล์รูปร่างหลายเหลี่ยม (epithelial-like morphology) 70 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์รูปร่างเรียวยาวหัวแหลมท้ายแหลม (fibroblast-like morphology) 30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงยาวนาน 6 สัปดาห์ ในขณะที่เดียวกันที่เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาสุกรนาน 48 ชั่วโมง พบความหนาแน่นของประชากรเซลล์ยึดเกาะพื้นผิว 70-80 เปอร์เซ็นต์ ต่อมาเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาสุกรแบบระยะยาวพบเซลล์มีสัณฐานวิทยาแบบรูปร่างเรียวยาว หัวแหลมท้ายแหลมยึดเกาะกับพื้นผิว (fibroblast-like morphology) 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 5 สัปดาห์ แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะนี้สามารถเจริญได้ดีและสามารถพัฒนาเป็นเซลล์ไลน์ซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการศึกษาทางเทคโนโลยีชีวภาพต่อไปในอนาคต ผลการศึกษาของ MTT assay พบว่าเปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาของเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่ทั้ง 3 ขนาด ในกลุ่มทดสอบที่ทุกความเข้มข้นมีเปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และสูงกว่ากลุ่มควบคุมเชิงบวกแต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) เป็นที่น่าสังเกตว่าที่ความเข้มข้นโปรตีน 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็กและขนาดใหญ่ และที่ความเข้มข้นโปรตีน 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาของเซลล์สูงที่สุดซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุมเชิงบวกแต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติและสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เซลล์ในกลุ่มทดสอบมีการยึดตัวมากกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมเชิงบวก เปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาของเซลล์แกรนูโลซาสุกรเมื่อทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็กให้ผลต่ำกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมเชิงบวกในทุกความเข้มข้น เมื่อทดสอบสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดกลางต่อเปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาของเซลล์แกรนูโลซาสุกรพบว่าที่ความเข้มข้นโปรตีน 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารหลังจากถุงไข่ขนาดใหญ่ที่ความเข้มข้นโปรตีน 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาของเซลล์สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ที่ความเข้มข้นนี้พบเซลล์แกรนูโลซามีการยึดตัวมากกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมเชิงบวกเป็น 2 เท่า ประมาณ 50-60 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดกลางที่ความเข้มข้นโปรตีน 200 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารหลังจากถุงไข่ขนาดใหญ่ที่ความเข้มข้นโปรตีน 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถใช้เป็นสารส่งเสริมการเจริญและพัฒนาของเซลล์แทนการใช้ซีรัมในอาหารเพาะเลี้ยงได้ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานทางเซลล์เทคโนโลยีได้

58303201 : Major (BIOLOGY)

Keyword : primary cell culture, porcine follicular fluid protein (pFF), porcine oviductal cells (pOEC), porcine granulosa cells (pGCs), MTT assay

MISS CHANIKARN SRINARK : *IN VITRO* EFFECT OF PORCINE FOLLICULAR FLUID SECRETION ON PRIMARY CELL CULTURE THESIS ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR MAYUVA AREEKIJSEREE, PH.D.

The secreted porcine follicular fluid (pFF) of healthy small size follicles (1-3 mm in diameter), medium size follicles (4-6 mm in diameter) and large size follicles (7-8 mm in diameter) were collected using sterile technique. The secretion from 3 follicle sizes were study on the effect on primary in vitro cell culture of porcine oviductal epithelial cells (pOEC) and porcine granulosa cells (pGC) growth. Porcine oviductal epithelial cells of luteal phase and pGC of medium size follicle were in vitro cultured in M199 supplemented with 10% heat-treated fetal bovine serum (HTFBS), 2.2 mg/mL NaHCO₃, 0.25 mM pyruvate, and 50 µg/mL gentamycin sulfate, in 95% air atmosphere with 5% CO₂ at 37°C for 48 h before the testing. Two cell types were study on cell growth and viability at the concentration of pFF at 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500, and 600 µg/mL proteins in the culture medium for 24 h compared with control group and positive control (culture medium supplement with 10% HTFBS) by using MTT assay and analyzed by using one-way ANOVA. Moreover, pOEC and pGC were also studied on morphological characteristic on short-term and long-term culture without pFF treatment. The results of short-term study revealed that, pOEC composites of 2 cell types. They are non-ciliated round shape cells and columnar ciliated epithelial cells. Two cell types were changing their form to fibroblast cells and attach to the culture plate (at 70-80 percent after 96 h of culture time). On long-term study, pOEC showed 70 percentage of healthy morphology on regular dimension (epithelial-like morphology) and contained 30 percentage of an elongated shape (fibroblast-like morphology) at 6 weeks of culture time. Meanwhile, 100 percentage of pGC showed healthy morphology and changed their morphology from round shape to fibroblast-like morphology at 5 weeks of culture time. This means, pOEC and pGC were cultured well in this condition and can derived into cell line which could be useful in the future for biotechnology research works. Results of MTT assay reviewed that percentage of viability of pOEC was increasing when treated with pFF from 3 follicle sizes groups. The treated cells at all protein concentrations were significantly higher than control group (p<0.05) but not to the positive control groups. Interestingly, protein of small and large size follicle at 500 µg/mL, and protein of medium size follicle at 600 µg/mL, showed the highest percentage of cell viability which is higher than the positive control and it is significantly different from control group (P<0.05). All cells in treatment groups showed expanded cells more than control and positive control groups. Viability in percentage of pGC treated with pFF at every protein concentration of small size follicle was decreased to lower than the level of the positive groups (culture medium with 10% HTFBS+hormone). Viability of pGC treated with pFF from medium size follicle at 200 µg/mL proteins and treated with pFF from large size follicle at concentration of 500 µg/mL proteins were reached the highest cell viability which was higher than the positive control and it is significantly different from the control group (P<0.05). At this concentration, pGC was twice elongated and expanded more than the control group and positive control around 50-60 percent. This report implies that pFF of medium size follicle at 200 and 600 µg/mL proteins and large size follicle at 500 µg/mL proteins could be used as a supplement in culture medium to replace FBS for cell growth promotion and development. It could be applied in cell biotechnology researches.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เรื่อง ผลของสารหลังจากถูกไข่สุกรต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิในห้องปฏิบัติการ สำเร็จได้เพราะได้รับความกรุณาจากรองศาสตราจารย์ ดร. มยุภา ยงทรัพย์อนันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำและแนวทางการแก้ไขปัญหาที่ดีอันเป็นประโยชน์ต่อการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร. กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธุ์ ที่ให้คำแนะนำและแนวคิดที่ดีในการศึกษาวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. บุชบา ปันยารชุน และผู้ช่วยศาสตราจารย์กุลนาถ ออบสุวรรณ ที่กรุณามาเป็นกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้คำแนะนำในครั้งนี้ คุณนงนุช กำลังแพทย์ ที่ได้ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในการทำปฏิบัติการตลอดการศึกษา

ขอขอบคุณโรงฆ่าสัตว์วันนุช จังหวัดนครปฐม ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างเพื่อการศึกษา

ขอบคุณเพื่อนๆ รุ่นพี่และรุ่นน้องทุกคนที่คอยให้กำลังใจ ความเป็นกันเองและความอบอุ่นตลอดการศึกษา อีกทั้งยังให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างเพื่อให้สามารถดำเนินงานวิจัยได้อย่างลุล่วงตลอดมา

ขอขอบคุณทุกคนในครอบครัวที่ให้กำลังใจ ให้คำแนะนำดีๆ และเป็นแรงผลักดันที่ดีเสมอมา สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณมารดาเป็นอย่างยิ่งที่ให้การสนับสนุนในทุกๆ ด้าน และยังเป็นทั้งที่ปรึกษาและกำลังใจสำคัญตลอดมา ขอขอบคุณบิดาที่ได้แสดงถึงความภาคภูมิใจในตัวข้าพเจ้าเสมอมา

ขอให้ท่านหมดกังวลและหลับให้สบายค่ะ

ประโยชน์และความรู้ที่ได้จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ย่อมเป็นผลมาจากความกรุณาของท่าน ดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างสูง

ชนิกานต์ ศรีนาค

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	1
สารบัญภาพ.....	3
บทที่ 1 บทนำ.....	10
1. ความสำคัญของปัญหาและที่มาของโครงการวิจัย.....	10
2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	13
3. สมมติฐานของการวิจัย.....	13
4. ขอบเขตของการวิจัย.....	13
5. ข้อตกลงเบื้องต้น.....	13
6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	14
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	15
1. ระบบสืบพันธุ์ของสุกรเพศเมีย.....	16
2. การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบปฐมภูมิ.....	22
2.1 เซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกร (porcine oviductal epithelial cells; pOEC).....	22
2.2 เซลล์แกรนูโลซาสุกร (porcine granulosa cells; pGC).....	26
3. สารหลังจากถุงไข่สุกร (porcine follicular fluid).....	29
4. วิธี MTT assay.....	36
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	38

อุปกรณ์และสารเคมี	38
1. อุปกรณ์.....	38
2. สารเคมี.....	39
วิธีการศึกษาทดลอง.....	40
1. การเตรียมสารเคมี.....	40
1.1 การเตรียมน้ำเกลือเพื่อเก็บตัวอย่างผสมด้วยยาปฏิชีวนะ.....	40
1.2 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์สำหรับเซลล์บุผิวท่อนำไข่และเซลล์แกรนูโลซาสุกร	40
1.3 การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์	41
1.4 การเตรียม MTT assay เพื่อใช้ในการตรวจสอบการเจริญพัฒนาของเซลล์	41
2. การเก็บตัวอย่าง การเตรียม คัดแยก และเพาะเลี้ยงเซลล์แบบปฐมภูมิชนิดต่างๆ จากระบบ สืบพันธุ์.....	42
2.1 การเก็บตัวอย่างเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกร	42
2.2 การเก็บตัวอย่างเซลล์แกรนูโลซาจากรังไข่สุกร	42
2.3 การเตรียมและคัดแยกเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกร	43
2.4 การเตรียมและคัดแยกเซลล์แกรนูโลซาสุกร	43
3. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิจากระบบสืบพันธุ์ที่ เพาะเลี้ยงแบบระยะสั้น (short-term culture).....	44
4. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิจากระบบสืบพันธุ์ที่ เพาะเลี้ยงแบบระยะยาว (long-term culture).....	44
5. ออกแบบการทดลอง	45
6. การเตรียมตัวอย่างสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดเล็ก ขนาดกลาง และขนาดใหญ่	47
7. การศึกษาโปรตีนของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดต่างๆ ด้วยวิธี SDS-PAGE	48
8. การศึกษาเปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาของเซลล์เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิจากระบบสืบพันธุ์ ภายหลังการถูกทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่ที่ความ เข้มข้นต่างๆ.....	49

บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล 51

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์บุผิวท่อนำไข่และเซลล์แกรนูโลซา..... 51

 1.1 เซลล์บุผิวท่อนำไข่..... 51

 1.2 เซลล์แกรนูโลซา..... 57

2. การทดสอบผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่ต่อการมีชีวิตของเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรและเซลล์แกรนูโลซาสุกรเพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิ 63

 2.1 การทดสอบผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดเล็กต่อการมีชีวิตของเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกร..... 63

 2.2 การทดสอบผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดกลางต่อการมีชีวิตของเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกร..... 65

 2.3 การทดสอบผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดใหญ่ต่อการมีชีวิตของเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกร..... 67

 2.4 เปรียบเทียบผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่ต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกร 70

 2.5 การทดสอบผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดเล็กต่อการมีชีวิตของเซลล์แกรนูโลซาสุกร..... 71

 2.6 การทดสอบผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดกลางต่อการมีชีวิตของเซลล์แกรนูโลซาสุกร..... 73

 2.7 การทดสอบผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดใหญ่ต่อการมีชีวิตของเซลล์แกรนูโลซาสุกร..... 76

 2.8 เปรียบเทียบผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่ต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์แกรนูโลซาสุกร 78

3. การศึกษาสารหลังโปรตีนจากถุงไข่สุกรขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่ ด้วยวิธี Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)..... 80

บทที่ 5 สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 83

 อภิปรายผล..... 83

สรุปผล	100
รายการอ้างอิง	102
ภาคผนวก ก การเตรียมสาร	115
ภาคผนวก ข ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ	122
ประวัติผู้เขียน	139



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 สารเสติยรอยด์ฮอร์โมนที่พบในสารหลังจากถุงไข่ของสุกร.....	29
ตารางที่ 2 กรดอะมิโนที่พบในสารหลังจากถุงไข่ของสุกร.....	31
ตารางที่ 3 โปรตีนที่พบในสารหลังจากถุงไข่ของสุกร.....	33
ตารางที่ 4 แสดงการออกแบบการทดลอง.....	45
ตารางที่ 5 แสดงวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวท่อนำไข่และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์บุผิวท่อนำไข่ภายหลังทำการเพาะเลี้ยง.....	84
ตารางที่ 6 เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์บุผิวท่อนำไข่และเซลล์แกรนูโลซาเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แบบชั้นเดียว.....	88
ตารางที่ 7 สรุปรูปขนาดของสารหลังโปรตีนจากถุงไข่ขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่จากการศึกษาด้วยวิธี Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และแสดงชนิดและหน้าที่ของโปรตีนภายในสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดต่างๆ.....	98
ตารางที่ 8 แสดงอัตราส่วนของปริมาณสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดเล็กและขนาดกลางต่อปริมาณอาหารเพาะเลี้ยง.....	118
ตารางที่ 9 แสดงอัตราส่วนของปริมาณสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดใหญ่ต่อปริมาณอาหารเพาะเลี้ยง.....	118
ตารางที่ 10 ผลการวิเคราะห์ One-way ANOVA ของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรภายหลังการทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดเล็กที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ.....	123
ตารางที่ 11 ผลการวิเคราะห์ One-way ANOVA ของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรภายหลังการทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดกลาง ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ.....	124
ตารางที่ 12 ผลการวิเคราะห์ One-way ANOVA ของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรภายหลังการทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดใหญ่ ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ.....	125

ตารางที่ 13 ผลการวิเคราะห์ One-way ANOVA ของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์บุผิวพอน้ำไขสุกร ภายหลังการทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่ เปรียบเทียบที่ความ เข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ.....	126
ตารางที่ 14 ผลการวิเคราะห์ One-way ANOVA ของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์แกรนูโลซาสูกร ภายหลังการทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดเล็กที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ	131
ตารางที่ 15 ผลการวิเคราะห์ One-way ANOVA ของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์แกรนูโลซาสูกร ภายหลังการทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดกลางที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ	132
ตารางที่ 16 ผลการวิเคราะห์ One-way ANOVA ของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์แกรนูโลซาสูกร ภายหลังการทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดใหญ่ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ	133
ตารางที่ 17 ผลการวิเคราะห์ One-way ANOVA ของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์แกรนูโลซาสูกร ภายหลังการทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่ เปรียบเทียบที่ความ เข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ.....	134



สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ระบบสืบพันธุ์ของสุกรเพศเมียทั้งอวัยวะสืบพันธุ์ภายนอก (ประกอบด้วยแคม เม็ดละมุนและปากช่องคลอด) และอวัยวะสืบพันธุ์ภายใน (ประกอบด้วยช่องคลอด มดลูก ท่อนำไข่และรังไข่)	17
ภาพที่ 2 แสดงรูปร่างของท่อนำไข่สุกรที่เชื่อมต่อกับส่วนต่างๆ โดยด้านซ้ายของภาพแสดงปีกมดลูก และท่อนำไข่ถูกตัดแยกออกจากเยื่อยึด (broad ligament) เพื่อแสดงรูปร่างและขนาดของท่อนำไข่สุกรที่อยู่ติดกับปีกมดลูก ด้านขวาล่างแสดงรูปร่างและความยาวของท่อนำไข่ที่ถูกตัดแยกออกมา... 18	18
ภาพที่ 3 องค์ประกอบและลักษณะภายในของท่อนำไข่ เมื่อ (a) คือ infundibulum, (b) คือ ampulla และ (c) คือ isthmus ตามลำดับ ส่วนของ fimbria คือส่วนปลายที่มีลักษณะคล้ายนิ้วมียื่นออกมาอยู่ติดกับส่วน infundibulum	19
ภาพที่ 4 การเจริญพัฒนาของเซลล์ไข่และถุงไข่ของสุกรเพศเมียในช่วงระยะการเป็นสัด เริ่มจากถุงไข่ขนาดเล็กที่มีเซลล์ไข่ระยะ primordial oocyte หรือระยะ primary oocyte จากนั้นเจริญพัฒนาต่อไปจนกระทั่งเกิดการตกไข่ โดยภายหลังการตกไข่เกิดเป็น corpus luteal ซึ่งเป็นสะเก็ดสีขาวอยู่ภายในรังไข่ โดยระยะการเป็นสัดของสุกรอยู่ที่ประมาณ 21 วัน.....	20
ภาพที่ 5 การเจริญพัฒนาของเซลล์ไข่ของสุกรเพศเมียเริ่มต้นจาก primordial germ cells เกิดการแบ่งตัวแบบไมโทซิส ในสุกรเพศเมีก่อนวัยเจริญพันธุ์จะพบเซลล์ไข่ในระยะ primary oocyte จากนั้นเซลล์ไข่จะมีการเจริญพัฒนาไปพร้อมๆ กับถุงไข่จนกระทั่งถึงวัยเจริญพันธุ์ (puberty) ต่อมาเซลล์ไข่เกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในช่วงการตกไข่ จะได้เป็นเซลล์ไข่ระยะ secondary oocyte และ first polar body ภายหลังเซลล์ไข่ได้รับการผสมกับอสุจิ จะเกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสครั้งที่ 2 เกิดการผลัก secondary polar body ออกและเซลล์ไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิจะมีการเจริญพัฒนาต่อไปเป็นตัวอ่อน.....	21
ภาพที่ 6 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรสามารถแบ่งเซลล์ออกได้เป็น 2 ชนิดคือเซลล์ที่มีซิเลีย (ciliated cells; CC) และเซลล์ที่ไม่มีซิเลีย (non-ciliated cells; NC) ในระยะ luteal phase ของรอบการติดสัด ซึ่งเป็นระยะหลังการตกไข่ โดยจะพบเซลล์ที่ไม่มีซิเลียอยู่มาก เนื่องจากมีหน้าที่หลังสารเพื่อส่งเสริมการเกิดปฏิสนธิและการพัฒนาของตัวอ่อนและยังกระตุ้นการเกิดกระบวนการ capacitation และ acrosome reaction ของเซลล์อสุจิ.....	23
ภาพที่ 7 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงเซลล์แกรนูโลซาไม่พบซิเลียที่ผิวนอกของเซลล์ โดยเซลล์แกรนูโลซามีลักษณะเป็นเซลล์รูปร่างทรงกลมพบอยู่โดยรอบของถุงไข่.....	26

ภาพที่ 8 แสดงการทดสอบผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดเล็ก (ก.) ขนาดกลาง (ข.) และขนาดใหญ่ (ค.) ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อเซลล์บุผิวที่หน้าไข่สุกรที่เพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงแบบหลุม 96 หลุม ในแถวที่ 1 และแถวที่ 12 คือหลุม blank แถวที่ 2 คือความเข้มข้นโปรตีนจากสารหลังจากถุงไข่สุกรในกลุ่มควบคุม แถวที่ 3 คือความเข้มข้นโปรตีนจากสารหลังจากถุงไข่สุกรที่ 2 ไมโครกรัม แถวที่ 4 คือความเข้มข้นโปรตีนจากสารหลังจากถุงไข่สุกรที่ 4 ไมโครกรัม แถวที่ 5 คือความเข้มข้นโปรตีนจากสารหลังจากถุงไข่สุกรที่ 20 ไมโครกรัม แถวที่ 6 คือความเข้มข้นโปรตีนจากสารหลังจากถุงไข่สุกรที่ 40 ไมโครกรัม แถวที่ 7 คือความเข้มข้นโปรตีนจากสารหลังจากถุงไข่สุกรที่ 200 ไมโครกรัม แถวที่ 8 คือความเข้มข้นโปรตีนจากสารหลังจากถุงไข่สุกรที่ 400 ไมโครกรัม แถวที่ 9 คือความเข้มข้นโปรตีนจากสารหลังจากถุงไข่สุกรที่ 500 ไมโครกรัม แถวที่ 10 คือความเข้มข้นโปรตีนจากสารหลังจากถุงไข่สุกรที่ 600 ไมโครกรัม และแถวที่ 11 คือความเข้มข้นโปรตีนจากสารหลังจากถุงไข่สุกรในกลุ่มควบคุมเชิงบวก..... 47

ภาพที่ 9 แสดงท่อหน้าไข่สุกรที่ได้จากการเก็บตัวอย่างจากโรงฆ่าสัตว์ ท่อหน้าไข่สุกรมีลักษณะเป็นท่อยาวสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ส่วน ได้แก่ 1. อีสมัท (isthmus) 2. แอมพูลลา (ampulla) 3. ฟิมเบรีย (fimbriae) 4. อินฟันดิบูลัม (infundibulum)..... 51

ภาพที่ 10 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดงเซลล์บุผิวที่หน้าไข่สุกรเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง ก. พบเซลล์รูปทรงระบอบที่มีซีเลีย (cc) เคลื่อนที่ในอาหารเพาะเลี้ยงได้และเซลล์รูปร่างกลมไม่มีซีเลีย (nc) พบเป็นเซลล์เดี่ยวและกลุ่ม เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง ข. พบเซลล์รูปทรงระบอบที่มีซีเลียสามารถเคลื่อนที่ได้และเซลล์รูปร่างกลมไม่มีซีเลีย พบทั้งเซลล์เดี่ยวและกลุ่มเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง ค. พบเซลล์บางส่วนเริ่มยึดเกาะกับพื้นผิวของจานเพาะเลี้ยง (ในบริเวณวงกลม) และกลุ่มเซลล์รูปทรงระบอบที่มีซีเลียสามารถเคลื่อนที่ในอาหารเพาะเลี้ยงได้ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 72 ชั่วโมง ง. เซลล์ยึดเกาะที่พื้นผิวจานเพาะเลี้ยงเพิ่มมากขึ้นประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ แสดงรูปร่าง 2 แบบคือ รูปร่างหัวแหลมท้ายแหลม (fb) และเซลล์ที่มีรูปร่างหลายเหลี่ยม (ep) เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 96 ชั่วโมง (แสดงภาพที่กำลังขยาย 200 เท่า)..... 53

ภาพที่ 11 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดงเซลล์บุผิวที่หน้าไข่สุกรเพาะเลี้ยงแบบระยะยาว พบเซลล์ 2 ลักษณะคือ รูปร่างหลายเหลี่ยม (ep) และรูปร่างหัวแหลมท้ายแหลม (fb) ก. และ ข. พบเซลล์มีรูปร่างแหลมหัวแหลมท้ายประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ และพบเซลล์ที่มีลักษณะรูปร่างแบบหลายเหลี่ยมประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 1 สัปดาห์ ค. และ ง. เซลล์มีรูปร่างแหลมหัวแหลมท้ายประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์ที่มีลักษณะรูปร่างแบบหลายเหลี่ยมประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 2 สัปดาห์ จ. และ ฉ. เซลล์มีรูปร่างแหลมหัวแหลมท้ายประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์ที่มีลักษณะรูปร่างแบบหลายเหลี่ยมประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน

3 สัปดาห์ ช. และ ซ. แสดงเซลล์เพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ ฉ. และ ญ. แสดงเซลล์เพาะเลี้ยงนาน 5 สัปดาห์ ก. และ ฎ. แสดงเซลล์เพาะเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์ เซลล์มีรูปร่างแหลมหัวแหลมท้ายประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์ที่มีลักษณะรูปร่างแบบหลายเหลี่ยมประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ โดยเซลล์รูปร่างหัวแหลมท้ายแหลมจะสานกันเป็นกลุ่มล้อมอยู่โดยรอบและพบเซลล์รูปร่างหลายเหลี่ยมอยู่ตรงกลาง (ภาพ ก. ค. จ. ช. ฉ. และ ฎ. แสดงภาพที่กำลังขยาย 100 เท่า และภาพ ข. ง. ฉ. ญ. และ ฎ. แสดงภาพที่กำลังขยาย 200 เท่า).....	56
ภาพที่ 12 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดงเซลล์แกรนูโลซาสุกุรที่เพาะเลี้ยงในอาหารเสริมด้วยฮอร์โมน (FSH, LH และ estradiol) ก. เซลล์รูปร่างหัวแหลมท้ายแหลมและมีแฉกคล้ายดาว (แทนด้วย fb) ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง ข. เซลล์การยึดเกาะที่พื้นผิวจานเพาะเลี้ยงประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ โดยมีรูปร่างแหลมหัวแหลมท้ายและรูปร่างดาวแบบหลายแฉกมากขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง	58
ภาพที่ 13 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดงเซลล์แกรนูโลซาสุกุรที่เพาะเลี้ยงในอาหารไม่เสริมฮอร์โมน (FSH, LH และ estradiol) ก. เซลล์แกรนูโลซามีรูปร่างหัวแหลมท้ายแหลมคล้ายกระสวย (fb) ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์รูปร่างกลมไม่ยึดเกาะพื้นผิวประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง ข. เซลล์แกรนูโลซាកการยึดเกาะที่พื้นผิวจานเพาะเลี้ยงประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ โดยมีรูปร่างแหลมหัวแหลมท้ายและมีหลายแฉก และเซลล์รูปร่างกลมไม่ยึดเกาะพื้นผิวประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง.....	59
ภาพที่ 14 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดงเซลล์แกรนูโลซาสุกุรเพาะเลี้ยงแบบระยะยาวมากกว่า 96 ชั่วโมง เซลล์แกรนูโลซามีรูปร่างหัวแหลมท้ายแหลม (fb) 100 เปอร์เซ็นต์ ก. และ ข. แสดงเซลล์เพาะเลี้ยงนาน 1 สัปดาห์ เซลล์มีรูปร่างแหลมหัวแหลมท้ายและมีหลายแฉก ค. และ ง. แสดงเซลล์เพาะเลี้ยงนาน 2 สัปดาห์ เซลล์มีรูปร่างแหลมหัวแหลมท้ายเรียวยาวมากขึ้น จ. และ ฉ. แสดงเซลล์เพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์ เซลล์มีรูปร่างแหลมหัวแหลมท้ายมีรูปร่างเรียวและยึดยาวมากขึ้นสานกันเป็นร่างแห ช. และ ซ. แสดงเซลล์เพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ เซลล์มีรูปร่างแหลมหัวแหลมท้ายมีรูปร่างเรียวและยึดยาวมากขึ้นสานกันเป็นร่างแห ฉ. และ ญ. แสดงเซลล์เพาะเลี้ยงนาน 5 สัปดาห์ เซลล์รูปร่างหัวแหลมท้ายแหลมเรียวยาวคล้ายเส้นใยสานกันเป็นร่างแหทั่วจานเพาะเลี้ยง (ภาพ ก. ค. จ. ช. และ ฉ. แสดงภาพที่กำลังขยาย 100 เท่า และภาพ ข. ง. ฉ. ญ. และ ฎ. แสดงภาพที่กำลังขยาย 200 เท่า).....	62
ภาพที่ 15 กราฟแสดงผลของสารหลังจากถูกไข่สุกรขนาดเล็กที่เสริมในอาหารเพาะเลี้ยง M199 ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมง	

ต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์บุท่อนำไข่สุกร (mean±SE) โดยกลุ่มควบคุม (control) คือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เพียงอย่างเดียว และกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) คือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS พบว่าเปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาของเซลล์สูงสุดเมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นโปรตีน 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (498.173 ± 58.87 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งแตกต่างกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมเชิงบวก (400.846 ± 70.17 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)..... 64

ภาพที่ 16 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดงเซลล์บุท่อนำไข่สุกรภายหลังการทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดเล็ก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก. แสดงเซลล์บุท่อนำไข่สุกรในกลุ่มควบคุม (อาหาร M199 เพียงอย่างเดียว) ข. แสดงเซลล์บุท่อนำไข่สุกรในกลุ่มควบคุมเชิงบวก (อาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS) และ ค. แสดงเซลล์บุท่อนำไข่สุกรที่ถูกทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็กที่ความเข้มข้นโปรตีน 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่กำลังขยาย 100 เท่า..... 65

ภาพที่ 17 กราฟแสดงผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดกลางที่เสริมในอาหารเพาะเลี้ยง M199 ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมงต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์บุท่อนำไข่สุกร (mean±SE) โดยกลุ่มควบคุม (control) คือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เพียงอย่างเดียว และกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) คือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS พบว่าเปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาของเซลล์ค่อยๆเพิ่มสูงขึ้นและมีเปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาของเซลล์สูงสุดเมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นโปรตีน 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (625.351 ± 48.37 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งแตกต่างกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมเชิงบวก (392.957 ± 21.29 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)..... 66

ภาพที่ 18 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดงเซลล์บุท่อนำไข่สุกรภายหลังการทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดกลาง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก. แสดงเซลล์บุท่อนำไข่สุกรในกลุ่มควบคุม (อาหาร M199 เพียงอย่างเดียว) ข. แสดงเซลล์บุท่อนำไข่สุกรในกลุ่มควบคุมเชิงบวก (อาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS) และ ค. แสดงเซลล์บุท่อนำไข่สุกรที่ถูกทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่ขนาดกลางที่ความเข้มข้นโปรตีน 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่กำลังขยาย 100 เท่า 67

ภาพที่ 19 กราฟแสดงผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดใหญ่ที่เสริมในอาหารเพาะเลี้ยง M199 ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมงต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์บุท่อนำไข่สุกร (mean±SE) โดยกลุ่มควบคุม (control) คือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เพียงอย่างเดียว และกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) คือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS พบว่าเปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาของเซลล์ค่อยๆ

เพิ่มสูงขึ้นและพบว่าเปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาของเซลล์สูงสุดเมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นโปรตีน 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (456.363 ± 30.32 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งแตกต่างกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมเชิงบวก (359.999 ± 20.57 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)..... 68

ภาพที่ 20 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดงเซลล์บุผิวที่นำเข้าสู่อวัยวะภายหลังการทดสอบด้วยสารหลังจากถูกไข่สุกรขนาดใหญ่ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก. แสดงเซลล์บุผิวที่นำเข้าสู่อวัยวะในกลุ่มควบคุม (อาหาร M199 เพียงอย่างเดียว) ข. แสดงเซลล์บุผิวที่นำเข้าสู่อวัยวะในกลุ่มควบคุมเชิงบวก (อาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS) และ ค. แสดงเซลล์บุผิวที่นำเข้าสู่อวัยวะที่ถูกทดสอบด้วยสารหลังจากถูกไข่ขนาดใหญ่ที่ความเข้มข้นโปรตีน 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่กำลังขยาย 100 เท่า..... 69

ภาพที่ 21 กราฟแสดงผลของสารหลังจากถูกไข่สุกรขนาดเล็ก ผลของสารหลังจากถูกไข่สุกรขนาดกลางและผลของสารหลังจากถูกไข่สุกรขนาดใหญ่ที่เสริมในอาหารเพาะเลี้ยง M199 ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมงต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์บุผิวที่นำเข้า (mean \pm SE) โดยกลุ่มควบคุม (control) คือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เพียงอย่างเดียว และกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) คือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS พบว่าที่ความเข้มข้นโปรตีน 2 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าค่าการมีชีวิตของเซลล์แตกต่างกับค่าการมีชีวิตของเซลล์ที่ทดสอบด้วยโปรตีนจากสารหลังจากถูกไข่ขนาดใหญ่อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)..... 70

ภาพที่ 22 กราฟแสดงผลของสารหลังจากถูกไข่สุกรขนาดเล็ก ที่เสริมในอาหารเพาะเลี้ยง M199 ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมงต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์แกรนูโลซาสุกร (mean \pm SE) โดยกลุ่มควบคุม (control) คือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เสริมด้วย FSH, LH และ estradiol และกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) คือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS, FSH, LH และ estradiol พบว่าที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (70.106 ± 2.76 เปอร์เซ็นต์ 65.344 ± 6.49 เปอร์เซ็นต์ 65.609 ± 3.70 เปอร์เซ็นต์ และ 60.582 ± 6.10 เปอร์เซ็นต์) เปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาของเซลล์มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญ (229.894 ± 25.35 เปอร์เซ็นต์) ($p < 0.05$)..... 72

ภาพที่ 23 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดงเซลล์แกรนูโลซาสุกรเมื่อทดสอบด้วยสารหลังจากถูกไข่สุกรขนาดเล็ก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก. แสดงเซลล์แกรนูโลซาสุกรในกลุ่มควบคุม (อาหาร M199 เสริมด้วย FSH, LH และ estradiol) ข. แสดงเซลล์แกรนูโลซาสุกรในกลุ่มควบคุมเชิงบวก (อาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS, FSH, LH และ estradiol) และ ค. แสดงเซลล์แกรนูโลซา

- สุกรที่ถูกทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็กที่ความเข้มข้นโปรตีน 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่กำลังขยาย 200 เท่า..... 73
- ภาพที่ 24 กราฟแสดงผลของสารหลังจากถุงสุกรขนาดกลาง ที่เสริมในอาหารเพาะเลี้ยง M199 ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมง ต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์แกรนูโลซาสูกร (mean±SE) โดยกลุ่มควบคุม (control) คือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เสริมด้วย FSH, LH และ estradiol และกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) คือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS, FSH, LH และ estradiol พบว่าเปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาของเซลล์มีค่าเพิ่มมากขึ้น ที่ความเข้มข้นโปรตีน 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (224.268 ± 26.21 เปอร์เซ็นต์) แสดงค่าการมีชีวิตของเซลล์สูงที่สุดซึ่งแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมเชิงบวกทางสถิติ (206.159 ± 13.91 เปอร์เซ็นต์) ($p > 0.05$)..... 74
- ภาพที่ 25 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดงเซลล์แกรนูโลซาสูกรเมื่อทดสอบด้วยสารหลังจากถุงสุกรขนาดกลาง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก. แสดงเซลล์แกรนูโลซาสูกรในกลุ่มควบคุม (อาหาร M199 เสริมด้วย FSH, LH และ estradiol) ข. แสดงเซลล์แกรนูโลซาสูกรในกลุ่มควบคุมเชิงบวก (อาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS, FSH, LH และ estradiol) และ ค. แสดงเซลล์แกรนูโลซาสูกรที่ถูกทดสอบด้วยสารหลังจากถุงขนาดกลางที่ความเข้มข้นโปรตีน 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่กำลังขยาย 200 เท่า..... 75
- ภาพที่ 26 กราฟแสดงผลของสารหลังจากถุงสุกรขนาดใหญ่ ที่เสริมในอาหารเพาะเลี้ยง M199 ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมง ต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์แกรนูโลซาสูกร (mean±SE) โดยกลุ่มควบคุม (control) คือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เสริมด้วย FSH, LH และ estradiol และกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) คือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS, FSH, LH และ estradiol พบว่าเปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาของเซลล์มีค่าเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ และพบค่าการมีชีวิตของเซลล์สูงสุดที่ความเข้มข้นโปรตีน 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (264.224 ± 31.70 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และสูงกว่ากลุ่มควบคุมเชิงบวก (215.970 ± 40.14 เปอร์เซ็นต์) แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) 77
- ภาพที่ 27 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดงเซลล์แกรนูโลซาสูกรเมื่อทดสอบด้วยสารหลังจากถุงสุกรขนาดใหญ่ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก. แสดงเซลล์แกรนูโลซาสูกรในกลุ่มควบคุม (อาหาร M199 เสริมด้วย FSH, LH และ estradiol) ข. แสดงเซลล์แกรนูโลซาสูกรในกลุ่มควบคุมเชิงบวก

(อาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS, FSH, LH และ estradiol) และ ค. แสดงเซลล์แกรนูโลซา สุกที่ถูทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่ขนาดใหญ่ที่ความเข้มข้นโปรตีน 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ กำลังขยาย 200 เท่า.....	78
ภาพที่ 28 กราฟแสดงผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดเล็ก สารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดกลางและ สารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดใหญ่กลางที่เสริมในอาหารเพาะเลี้ยง M199 ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ต่อการมีเจริญพัฒนา ของเซลล์แกรนูโลซาสุกร (mean±SE) โดยกลุ่มควบคุม (control) คือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เสริมด้วย FSH, LH และ estradiol และกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) คือเซลล์ที่ เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS, FSH, LH และ estradiol พบว่าที่ทุกความ เข้มข้นโปรตีนของสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็กมีค่าการมีชีวิตของเซลล์ต่ำกว่าค่าการมีชีวิตของเซลล์ที่ ทดสอบด้วยโปรตีนของสารหลังจากถุงไข่กลางและขนาดใหญ่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)..	79
ภาพที่ 29 แสดงรังไข่สุกรที่ได้จากการเก็บตัวอย่างจากโรงฆ่าสัตว์ รังไข่สุกรมีลักษณะคล้ายพวงองุ่น ล้อมรอบด้วยถุงไข่ขนาดต่าง ภาพ ก. แสดงถุงไข่ขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3 มิลลิเมตร) และ ขนาดกลาง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 4-6 มิลลิเมตร) และ ภาพ ข. แสดงถุงไข่ขนาดใหญ่ (เส้นผ่าน- ศูนย์กลางมากกว่า 7 มิลลิเมตร).....	80
ภาพที่ 30 แสดงสีของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดใหญ่ ขนาดกลางและขนาดเล็ก (เรียงจากซ้ายไป ขวา) พบว่าสีของสารหลังจากถุงไข่ขนาดใหญ่มีสีเหลืองจางที่สุด สารหลังจากถุงไข่ขนาดกลางมีสี เหลืองเข้มมากขึ้น และในสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็กมีสีเหลืองเข้มมากที่สุด.....	81
ภาพที่ 31 แสดงแถบของสารหลังโปรตีนจากถุงไข่สุกรขนาดเล็กเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน Broad Range Protein Molecular Weight Markers (Promega) โดยในแถวที่ 1 แสดง แถบของ โปรตีนมาตรฐาน Broad Range Protein Molecular Weight Markers (Promega) แถวที่ 2 และ แถวที่ 3 แสดงผลของสารหลังโปรตีนจากถุงไข่สุกรขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3 มิลลิเมตร) แถว ที่ 4 และแถวที่ 5 แสดงผลของสารหลังโปรตีนจากถุงไข่สุกรขนาดกลาง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 4-6 มิลลิเมตร) และในแถวที่ 7 และแถวที่ 8 แสดงผลของสารหลังโปรตีนจากถุงไข่สุกรขนาดใหญ่ (เส้น ผ่านศูนย์กลางมากกว่า 7 มิลลิเมตร)	82
ภาพที่ 32 แสดงการเกิดสีของสารละลายเมื่อตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง	121

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญของปัญหาและที่มาของโครงการวิจัย

สุกรไม่เพียงแต่เป็นสัตว์เลี้ยงเพื่อการบริโภคเท่านั้น แต่ยังมีประโยชน์ในการเป็นสัตว์ต้นแบบเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องทางวิทยาศาสตร์ ทางการแพทย์และทางปศุสัตว์ (Pond & Houpt, 1978) การใช้สุกรมาเป็นสัตว์ต้นแบบ เนื่องจากสุกรเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีความใกล้เคียงกับมนุษย์ทั้งทางด้านกายวิภาคศาสตร์ ด้านพันธุศาสตร์และทางด้านสรีรวิทยา เช่น สมอ ระบบไหลเวียนเลือด ระบบการย่อยอาหาร ต่อมไร้ท่อ ผิวหนัง ตับอ่อน และระบบสืบพันธุ์ (Hafez, 1974; Swindle, Makin, Herron, Clubb Jr, & Frazier, 2012) รวมถึงสุกรมีการเพาะเลี้ยงทั่วโลก จึงสามารถเตรียมและจัดหาเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ได้สะดวก และเนื่องจากสุกรมีการสืบพันธุ์ตลอดทั้งปี จึงให้ลูกจำนวนมาก (Meurens, Summerfield, Nauwynck, Saif, & Gerdt, 2012) อีกทั้งสามารถใช้ในการศึกษาได้หลายด้านเช่น การศึกษาทางชีวการแพทย์ของโรคต่างๆ การศึกษากลไกการเกิดโรคจากไวรัส แบคทีเรียและปรสิต การศึกษาการปลูกถ่ายอวัยวะในระดับโปรตีน การศึกษาทางด้านสมอและประสาทวิทยา (Bassols et al., 2014) และการศึกษาด้านระบบสืบพันธุ์ เนื่องจากสุกรมีลักษณะของปีกมดลูกแบบ 2 ข้าง ที่เรียกว่า bicornuate uterus เช่นเดียวกับมนุษย์ อีกทั้งโครงสร้างอื่นๆ ยังมีความคล้ายคลึงกับมนุษย์ ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นต้นแบบในการทดสอบทางพิษวิทยา หรือการเจริญพัฒนาของตัวอ่อน (embryo development) ได้ (Chen, Einspanier, & Schoen, 2013; Lossi, D'Angelo, De Girolamo, & Merighi, 2016; Meurens et al., 2012; Swindle et al., 2012)

ระบบสืบพันธุ์ของสุกรเพศเมียประกอบด้วยอวัยวะภายนอก ปากช่องคลอด ช่องคลอด ปากมดลูก มดลูกท่อนำไข่และรังไข่ (Hafez, 1974) ซึ่งรังไข่เป็นอวัยวะที่อยู่ภายในช่องท้องของสุกร มีหน้าที่หลักเกี่ยวข้องกับการเจริญพัฒนาของเซลล์ไข่และหลังฮอร์โมนเพศ มีรูปร่างคล้ายพวงองุ่น เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 2-3 เซนติเมตร โดยจะพบถุงไข่ยื่นออกมาตามผิวหน้าของรังไข่ (Hafez, 1974; Serres, 1992) ภายในถุงไข่จะพบของเหลวอยู่ภายใน (follicular fluid) ซึ่งมีส่วนประกอบของโปรตีน ฮอร์โมนและสารส่งเสริมการเจริญพัฒนา (growth factors) ที่สร้างมาจากเซลล์โดยรอบภายในถุงไข่ ซึ่งสารประกอบเหล่านี้ส่งผลต่อการเจริญของเซลล์ไข่ทำให้เกิดการสุกของไข่ (Bianchi et al., 2007; Leibfried & First, 1980; Revelli et al., 2009) ท่อนำไข่และรังไข่สุกรเป็นของเหลือทิ้งจากโรงฆ่าสัตว์สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาทางด้านสรีรวิทยา กายวิภาคศาสตร์และทางด้านเซลล์ (Way, 2006) มีรายงานการศึกษาที่นำเซลล์จากท่อนำไข่สุกรและเซลล์จากรังไข่สุกรมา

ใช้ประโยชน์เป็นเซลล์ต้นแบบในการศึกษา ดังเช่นการศึกษาของ Chen et al. (2013) ที่นำเซลล์บุผิวท่อหน้าไข่อสุกรมาใช้เป็นเซลล์ต้นแบบ (cell model) ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการศึกษาการทำงานของเซลล์ การสื่อสารกันระหว่างเซลล์ การทดสอบสารพิษ อีกทั้งยังสามารถนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไปพัฒนาต่อไปเป็นเซลล์ไลน์ได้ (Miessen, Sharbati, Einspanier, & Schoen, 2011; Sanmanee & Areekijseeree, 2009; Schoen, Bondzio, Topp, & Einspanier, 2008) นอกจากนี้มีรายงานการใช้เซลล์จากรังไข่สุกรคือเซลล์แกรนูโลซา เพื่อใช้ในการศึกษาการทำงานของเซลล์ การทดสอบเซลล์กับสารต่างๆ และสามารถพัฒนาเซลล์แกรนูโลซาที่เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิไปเป็นเซลล์ไลน์ได้ (Lu et al., 2017; Sadowska et al., 2015; Tiemann et al., 2009)

ในปัจจุบันมีผู้สนใจศึกษาสารหลังจากถุงไข่สุกรซึ่งมีประโยชน์อย่างมากในการช่วยส่งเสริมการเจริญพัฒนาของเซลล์ไข่ภายในห้องปฏิบัติการ (Agung et al., 2013) ดังเช่นการศึกษาของ Algriany, Bevers, Schoevers, Colenbrander, and Dieleman (2004) ทำการเติมสารหลังจากถุงไข่ขนาดใหญ่ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 5-8 มิลลิเมตร) ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การสุกของไข่ (In vitro maturation; IVM) 72 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์สูงกว่าการเติมสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 2-4 มิลลิเมตร) คือ 55 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับผลงานวิจัยของ Ito et al. (2008) ได้เติมสารหลังจากถุงไข่ขนาดใหญ่ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร) และสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร) ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 36 ชั่วโมง เซลล์ไข่ในจานเพาะเลี้ยงที่เติมสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็กมีการเจริญพัฒนา (เกิดการแบ่งตัวแบบไมโอซิสครั้งที่ 2) 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้อยกว่าเปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาของเซลล์ไข่ที่เสริมด้วยสารหลังจากถุงไข่ขนาดใหญ่คือ 35 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการศึกษาของ Oberlender et al. (2013) ทำการศึกษาผลของสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็ก 2-5 มิลลิเมตร และขนาดใหญ่ 6-10 มิลลิเมตร พบว่าการเติมสารหลังจากถุงไข่ขนาดใหญ่ในอาหารเพาะเลี้ยงส่งผลให้เกิดการสุกของไข่ 90.0 ± 6.9 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าการเติมสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็กซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การสุกของไข่ 76.3 ± 10.7 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญ โดยจากรายงานของ Revelli et al. (2009) ได้รายงานถึงส่วนประกอบของสารหลังจากถุงไข่ พบว่าประกอบไปด้วยฮอร์โมนเพศ (sex steroid hormone) อยู่หลายชนิดซึ่งสามารถส่งเสริมการเจริญพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ได้ดี นอกจากนี้ยังพบสารต้านการเกิดกระบวนการ apoptosis สารกระตุ้นการเจริญและโปรตีนหลายชนิด จากการศึกษาของ Ducolomb et al. (2013) ได้ทำการวิเคราะห์สารประกอบโปรตีนของสารหลังจากถุงไข่ของสุกรขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-6 มิลลิเมตร โดยแบ่งสารหลังจากถุงไข่ออกเป็น 5 ส่วน ด้วยวิธีการ Anion chromatography จากนั้นนำมาศึกษาด้วยวิธีการ SDS-PAGE พบโปรตีนทั้งหมด 31 ชนิด มีมวลโมเลกุลอยู่ระหว่าง 11-100 กิโลดาลตัน (kDa) โดยโปรตีนที่พบมากที่สุดคือ immunoglobulin, immunoglobulin fragments, cytokeratin,

transferrin, plasminogen precursor และ transthyretin โปรตีนเหล่านี้ถือเป็นโปรตีนสำคัญที่มีส่วนกระตุ้นให้เกิดการตกไข่ นอกจากนี้มีผู้ศึกษาโปรตีนจากสารหลังจากถุงไข่ขนาดต่างๆ โดยวิธี SDS-PAGE พบว่าโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 38 กิโลดาลตัน พบเฉพาะสารหลังจากจากถุงไข่ขนาดใหญ่ ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นการเจริญพัฒนาของเซลล์ไข่ และพบว่ามีปริมาณน้อยเมื่อศึกษาสารหลังจากจากถุงไข่ขนาดกลาง และไม่พบเมื่อศึกษาสารหลังจากจากถุงไข่ขนาดเล็ก (Marchal, Vigneron, Perreau, Bali-Papp, & Mermillod, 2002)

จากงานวิจัยที่ได้กล่าวในข้างต้นแสดงให้เห็นว่าโปรตีนชนิดต่างๆ และผลของสารหลังจากจากถุงไข่ที่สามารถส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไข่ที่เพาะเลี้ยงภายในห้องปฏิบัติการ ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาผลของสารหลังจากจากถุงไข่ต่อเซลล์บุผิวท่อนำไข่และเซลล์แกรนูโลซาสุกรที่เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิ เนื่องจากการศึกษาทดลองภายในสิ่งมีชีวิตมีความยากลำบากในการศึกษาทำให้ต้องมีการจัดหาเครื่องมือและวิธีการอื่นๆ ในการศึกษา เช่นการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบปฐมภูมิในห้องปฏิบัติการ (Kumar & Mallick, 2016) การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบปฐมภูมิภายในห้องปฏิบัติการคือการนำเซลล์ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตมาเพาะเลี้ยง สามารถแสดงให้เห็นถึงลักษณะของเซลล์ที่มีความคล้ายคลึงกับภายในสิ่งมีชีวิตได้ (In vivo) (Miessen et al., 2011) ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการศึกษาทางวิทยาศาสตร์พื้นฐานและทางระบบสืบพันธุ์ได้อีกด้วย อีกทั้งการเพาะเลี้ยงเซลล์ภายในห้องปฏิบัติการนั้นมีประโยชน์อย่างมากในการช่วยลดการลดการใช้สัตว์ทดลองในการศึกษา (Chen et al., 2013)

การศึกษาในครั้งนี้คาดว่าสารหลังจากจากถุงไข่สุกรจะส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิจากระบบสืบพันธุ์เซลล์ให้มีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น เนื่องจากสารหลังจากจากถุงไข่มีโปรตีนต่างๆ ที่สามารถส่งผลกระทบต่อการเจริญของเซลล์ดังที่ได้กล่าวถึงในข้างต้น ซึ่งประโยชน์จากการศึกษาครั้งนี้สามารถทราบถึงความเข้มข้นที่เหมาะสม (optimum concentration) ของสารหลังจากจากถุงไข่สุกรที่สามารถส่งเสริมการเจริญของเซลล์ได้ดี ซึ่งในอนาคตสามารถพัฒนาเพื่อใช้เป็นสารเสริมในอาหารเพาะเลี้ยงแทนการใช้ซีรัม หรือฮอร์โมนได้อีกด้วย อีกทั้งสามารถนำความรู้ที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในงานด้านการเพาะเลี้ยงเซลล์ภายในห้องปฏิบัติการเพื่อสามารถพัฒนาเซลล์ที่เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิในระยะยาวไปเป็นเซลล์ไลน์เพื่อแข่งขันเก็บรักษาในการศึกษาต่อไปได้ อีกทั้งยังสามารถลดการใช้สัตว์ทดลองลงและถูกต้องตามหลักจริยธรรมอีกด้วย

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อเตรียม คัดแยกเซลล์จากระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ เซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรและเซลล์แกรนูโลซาสุกรให้เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงปฐมภูมิ

1.2.2 เพื่อศึกษาโปรตีนจากสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็ก กลางและใหญ่

1.2.3 ได้ทราบถึงผลของสารหลังจากถุงไข่ขนาดต่างๆ และความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารหลังจากถุงไข่สุกรต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรและเซลล์แกรนูโลซาสุกรที่เพาะเลี้ยงแบบเซลล์ปฐมภูมิ

3. สมมติฐานของการวิจัย

เนื่องจากสารหลังจากถุงไข่ของสุกรมีโปรตีนชนิดต่างๆ ซึ่งส่งผลต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์ในระบบสืบพันธุ์ในร่างกายได้ดี จึงคาดว่าสารหลังจากถุงไข่จะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ในระบบสืบพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิ (primary cell culture) ให้มีการเจริญพัฒนาได้ผลดีเช่นกัน

4. ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาผลของโปรตีนซึ่งเป็นส่วนประกอบของสารหลังจากถุงไข่ของสุกรสายพันธุ์ผสมลาร์จ-ไวท์ อายุ 6 เดือนขึ้นไป โดยเก็บตัวอย่างโดยเก็บตัวอย่างแบบปลอดเชื้อ โดยเก็บสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3 มิลลิเมตร) ถุงไข่ขนาดกลาง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 4-6 มิลลิเมตร) และถุงไข่ขนาดใหญ่ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 7-8 มิลลิเมตร) แล้วนำสารหลังตั้งกล่าวมาทดสอบพร้อมศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและศึกษาผลของสารหลังจากถุงไข่ขนาดต่างๆ ต่อเซลล์ในระบบสืบพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงแบบเซลล์ปฐมภูมิภายในห้องปฏิบัติการ

5. ข้อตกลงเบื้องต้น

ผู้วิจัยได้รับอนุญาตจากเจ้าของโรงชำแหละสุกรในจังหวัดนครปฐม ในการดำเนินการเก็บตัวอย่างอวัยวะสืบพันธุ์ของสุกรคือ ท่อนำไข่และรังไข่สุกร โดยอวัยวะทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นอวัยวะที่ไม่ได้นำไปใช้ประโยชน์ต่อในทางการค้า ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ดำเนินการเก็บตัวอย่างท่อนำไข่และรังไข่สุกรเพื่อนำมาศึกษาในงานวิจัยนี้ ในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้ใช้ประโยชน์จากซากสุกรเพื่องานทางวิทยาศาสตร์ โดยอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ได้รับเลขที่ใบอนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์คือ U1-

03000-2559 (นางมยุรา อารีกิจเสรี) ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์และเซลล์สืบพันธุ์สัตว์
(เลขทะเบียน 2-0280-0024-4)

6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถทดสอบและยืนยันผลของโปรตีนจากสารหลังจากถูกไข่ขนาดต่างๆ ที่อาจมีผลในการกระตุ้นการเจริญพัฒนาของเซลล์ หรือมีผลในการยับยั้งการเจริญพัฒนาของเซลล์เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิในห้องปฏิบัติการและเพื่อนำผลการศึกษาที่ได้ไปประยุกต์ใช้ประโยชน์กับงานวิจัยด้านเทคโนโลยีชีวภาพต่อไป



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สุกรเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ ใกล้เคียงกับมนุษย์ พบการกระจายพันธุ์ได้ทั่วโลก (Meurens et al., 2012)

อนุกรมวิธานของสุกร

Kingdom: Animalia

Phylum: Chordata

Class: Mammalia

Order: Artiodactyla

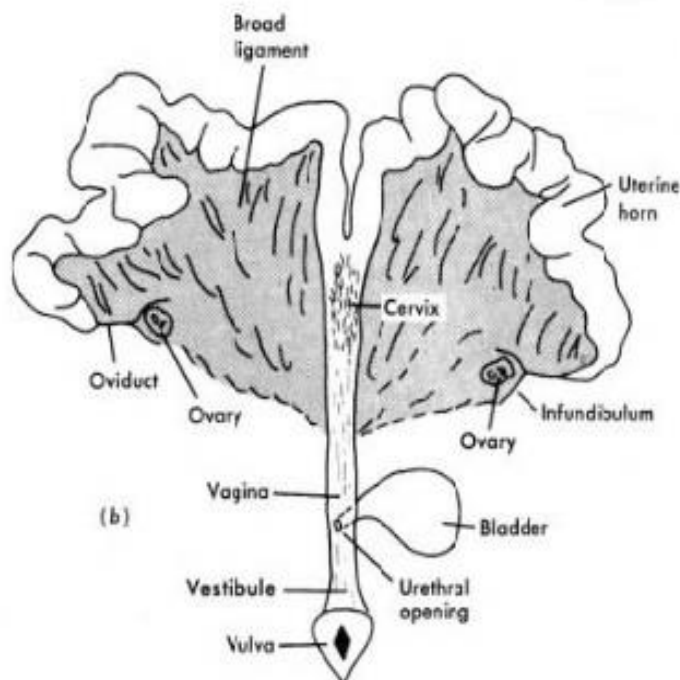
Family: Suidae (Lossi et al., 2016)

สุกรเป็นสัตว์ที่นิยมเลี้ยงเพื่อการบริโภคที่ได้รับความนิยมมากที่สุดชนิดหนึ่ง การทำปศุสัตว์หรือการเพาะเลี้ยงสุกรนั้นไม่เพียงเพื่อตอบสนองต่อความต้องการของตลาดเท่านั้น ยังมีประโยชน์ในการใช้เป็นสัตว์ต้นแบบเพื่อการทำวิจัยที่เกี่ยวข้องกับทางการแพทย์และปศุสัตว์ (Pond & Houpt, 1978) ในปัจจุบันสุกรถือเป็นสัตว์ต้นแบบที่นิยมใช้สำหรับการศึกษาวิจัยมากกว่าสุนัขและวอร์เนอร์ เพราะการเลือกสัตว์เพื่อนำมาใช้เป็นสัตว์ต้นแบบในการศึกษาวิจัยนั้นต้องคำนึงถึงการนำมาใช้ในการศึกษาได้หลายด้าน สะดวกต่อการเตรียมและจัดหา ประกอบกับสุกรมีการกระจายพันธุ์อยู่ทั่วโลก มีการสืบพันธุ์ตลอดทั้งปี อีกทั้งยังให้ลูกดก จึงสามารถจัดหามาใช้ในการศึกษาได้ง่าย (Kobayashi, Hishikawa, Teratani, & Lefor, 2012; Swindle et al., 2012) นอกจากนี้สุกรเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีความใกล้เคียงกับมนุษย์ทั้งทางด้านกายวิภาคศาสตร์ ด้านสรีรวิทยาและในด้านพันธุศาสตร์ เนื่องจากสุกรมีขนาดของโครโมโซมที่ใกล้เคียงกับมนุษย์ (Bassols et al., 2014; Ducolomb et al., 2013) ซึ่งสามารถใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาได้หลายด้าน ทั้งการศึกษาด้านชีวการแพทย์ของโรคต่างๆ เช่นการศึกษาเกี่ยวกับโรคเบาหวาน การศึกษาด้านพันธุศาสตร์ที่ทำให้เกิดโรคอ้วน ด้านระบบการทำงานของหัวใจ ระบบการไหลเวียนโลหิต เนื่องจากลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ของเส้นเลือดโคโรนารี (coronary) ของสุกร สามารถใช้เพื่อศึกษาโรคทางระบบไหลเวียนโลหิตหรือโรคหัวใจ อีกทั้งยังใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาการเกิดโรคจากไวรัส แบคทีเรียและปรสิต เนื่องจากมีการตอบสนองต่อโรคเช่นเดียวกับมนุษย์ ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากในการศึกษาขั้นตอนในการก่อโรค อีกประการหนึ่ง

สมองของสุกรมีความคล้ายคลึงกับมนุษย์มากกว่าสัตว์ฟันแทะ ทั้งการทำงาน การจัดเรียงตัวของเส้นใยไมอีลิน (myelination composition) น้ำหนัก ปริมาตรและการเจริญพัฒนาของสมอง จึงใช้สุกรเป็นต้นแบบเพื่อการศึกษาทางด้านสมองและประสาทวิทยา (Bassols et al., 2014; Lossi et al., 2016; Meurens et al., 2012; Sauleau, Lapouble, Val-Laillet, & Malbert, 2009) รวมถึงระบบสืบพันธุ์ของสุกรมีการจัดเรียงตัวและการกระจายตัวของรก มีปีกมดลูก 2 ข้าง หรือเรียกว่า bicornuate uterus คล้ายกับในมนุษย์ ซึ่งสามารถใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาด้านระบบสืบพันธุ์ การเจริญพัฒนาของตัวอ่อน (embryo development) และเป็นต้นแบบในการทดสอบทางพิษวิทยา ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์จึงสนใจที่จะศึกษาปฏิกิริยาในระดับโมเลกุลของท่อनाไขสุกร ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากในการศึกษาด้านระบบสืบพันธุ์ (Chen et al., 2013; Ducolomb et al., 2013; Miessen et al., 2011; Santos, Schoevers, & Roelen, 2014; Swindle et al., 2012) เช่นเดียวกับการศึกษาในครั้งนี้ที่ผู้ทดลองสนใจที่จะศึกษาเซลล์ของสุกรใช้เป็นสัตว์ต้นแบบในการศึกษาการเจริญและพัฒนาของเซลล์ในระบบสืบพันธุ์ในห้องปฏิบัติการ (in vitro) โดยเก็บซากสดของท่อनाไขและรังไข่สุกร จากโรงฆ่าสัตว์ ใน จังหวัดนครปฐม ซึ่งอวัยวะสืบพันธุ์ของสุกรทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นอวัยวะที่ไม่ได้นำไปใช้ประโยชน์ในทางการค้า ซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากโรงฆ่าสัตว์ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการวิจัยทางเซลล์เทคโนโลยีได้เป็นอย่างดี

1. ระบบสืบพันธุ์ของสุกรเพศเมีย

ระบบสืบพันธุ์ของสุกรเพศเมียประกอบไปด้วยอวัยวะภายนอก ปากช่องคลอด ช่องคลอด ปากมดลูก มดลูก ท่อनाไข และรังไข่ (Hafez, 1974; Patten, 1959) (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ระบบสืบพันธุ์ของสุกรเพศเมียทั้งอวัยวะสืบพันธุ์ภายนอก (ประกอบด้วยแคม เม็ดละมุนและปากช่องคลอด) และอวัยวะสืบพันธุ์ภายใน (ประกอบด้วยช่องคลอด มดลูก ท่อนำไข่และรังไข่)
ที่มา: Campbell, Kenealy, and Campbell (2003)

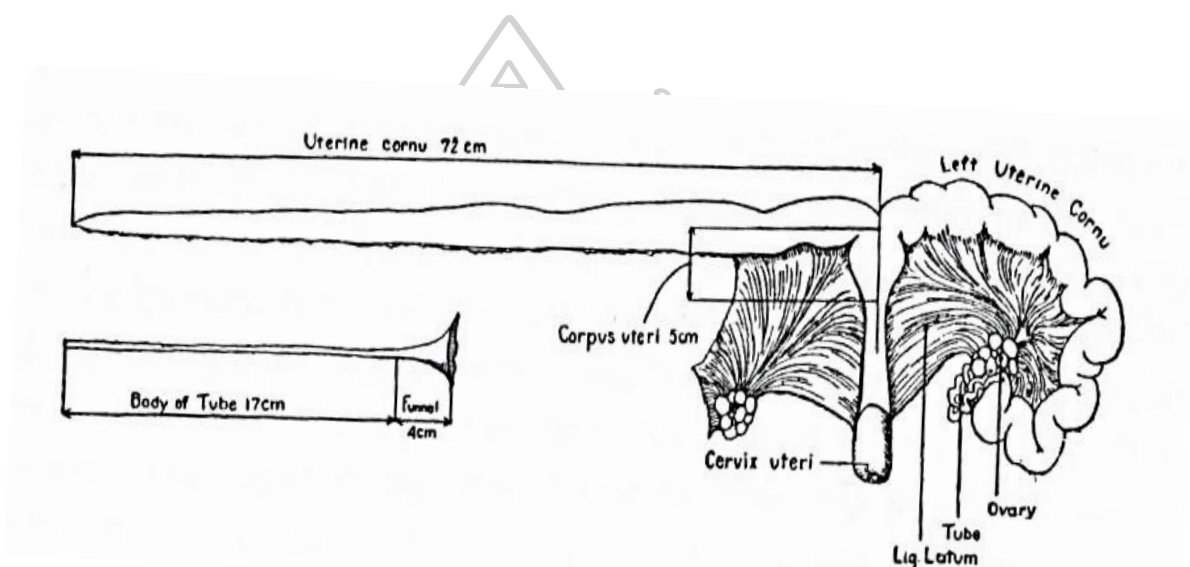
อวัยวะภายนอก (external genitalia) ประกอบด้วยแคม (labia) เม็ดละมุน (clitoris) และปากช่องคลอด (vulva) ซึ่งเป็นส่วนปลายของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย มีความยาวประมาณ 3 นิ้ว ซึ่งมีการทำงานมากในช่วงเป็นสัด (Hafez, 1974; Serres, 1992)

ช่องคลอด (vagina) เป็นอวัยวะสำคัญที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ อยู่ถัดจากคอมดลูก มาเปิดที่ปากช่องคลอด ความยาวประมาณ 8-10 เซนติเมตร

มดลูก (uterus) แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ ปีกมดลูก (uterine horn) และส่วนของคอมดลูก (cervix) มดลูกของสุกรมีรูปร่างเป็นรูปหัวใจ มีปีกมดลูก 2 ข้าง หรือเรียกว่า bicornuate uterus มดลูกมีขนาดยาวประมาณ 35-50 เซนติเมตร และอาจยาวถึง 140 เซนติเมตร ในแม่สุกรที่ผ่านการให้ลูกมาแล้วหลายคอก มดลูกมีหน้าที่สำคัญหลายอย่าง สารที่คัดหลั่งจากมดลูกมีหน้าที่ในกระบวนการเกิด capacitation ของเซลล์อสุจิ อีกทั้งยังมีส่วนช่วยในการฝังตัวและพัฒนาของตัวอ่อน ภายหลังจากการฝังตัว ตัวอ่อนจะได้รับสารอาหารและเลือดมาหล่อเลี้ยงจากผนังชั้นในของมดลูก

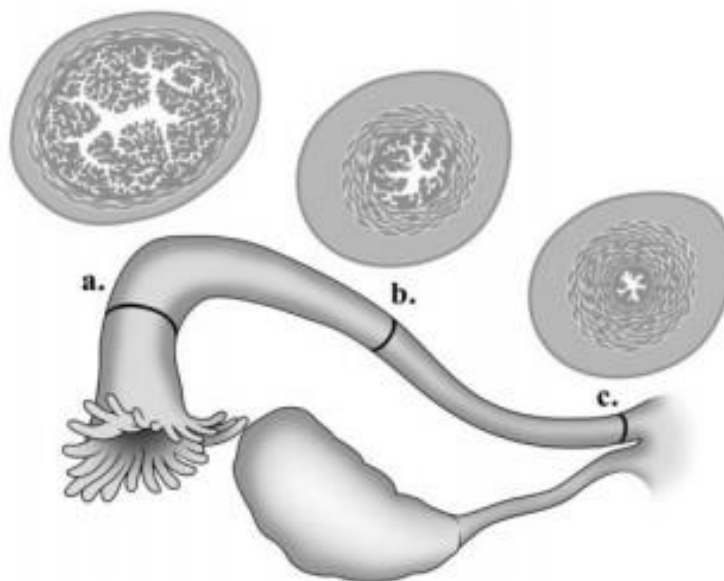
(endometrium) การหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูกส่งผลต่อการขนส่งเซลล์อสุจิ และทำให้เกิดการคลอดลูกอีกด้วย (Hafez, 1974)

ท่อนำไข่ (oviduct) มีความยาวประมาณ 10 นิ้ว เริ่มจากตอนปลายของปีกมดลูกไปจนสุดใกล้กับรังไข่ ท่อนำไข่มีหน้าที่สำคัญในกระบวนการปฏิสนธิ โดยการขนส่งไข่และอสุจิในทิศทางตรงกันข้ามซึ่งส่งเสริมให้เกิดกระบวนการปฏิสนธิเกิดขึ้น อีกทั้งเมื่อไข่และอสุจิได้รับการปฏิสนธิแล้วเจริญพัฒนาเป็นระยะตัวอ่อนนั้นจะอยู่ในท่อนำไข่ก่อนที่จะเกิดการขนส่งไปยังมดลูก (Chen et al., 2013; Desantis et al., 2011; Gualtieri et al., 2012) (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 แสดงรูปร่างของท่อนำไข่อสุจิที่เชื่อมต่อกับส่วนต่างๆ โดยด้านซ้ายของภาพแสดงปีกมดลูกและท่อนำไข่ที่ถูกตัดแยกออกจากเยื่อยึด (broad ligament) เพื่อแสดงรูปร่างและขนาดของท่อนำไข่อสุจิที่อยู่ติดกับปีกมดลูก ด้านขวาล่างแสดงรูปร่างและความยาวของท่อนำไข่ที่ถูกตัดแยกออกมา ที่มา: Patten (1959)

ท่อนำไข่สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ส่วนคือ isthmus, ampulla, infundibulum และ fimbriae มีรูปร่างคล้ายปากแตรอยู่ติดกับรังไข่ fimbriae มีเพียงส่วนเดียวที่อยู่ติดกับรังไข่ ampulla เป็นส่วนที่อยู่บริเวณกึ่งกลางของท่อนำไข่ซึ่งเชื่อมต่อกับส่วนของ isthmus (Hafez, 1974) (ภาพที่ 3)

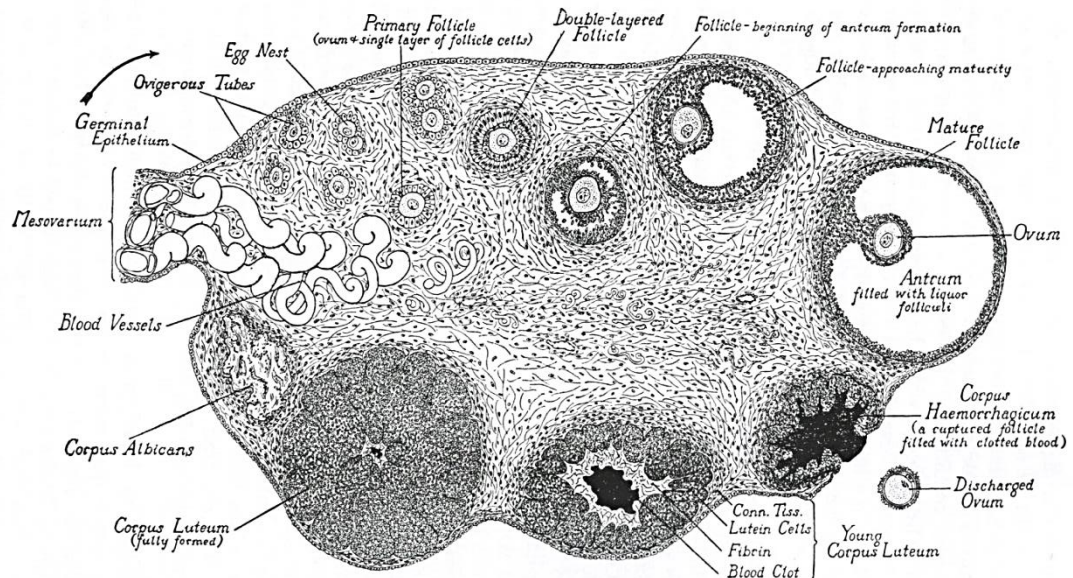


ภาพที่ 3 องค์ประกอบและลักษณะภายในของท่อนำไข่ เมื่อ (a) คือ infundibulum, (b) คือ ampulla และ (c) คือ isthmus ตามลำดับ ส่วนของ fimbria คือส่วนปลายที่มีลักษณะคล้ายนิ้วมือยื่นออกมาอยู่ติดกับส่วน infundibulum

ที่มา: Lyons, Saridogan, and Djahanbakhch (2006)

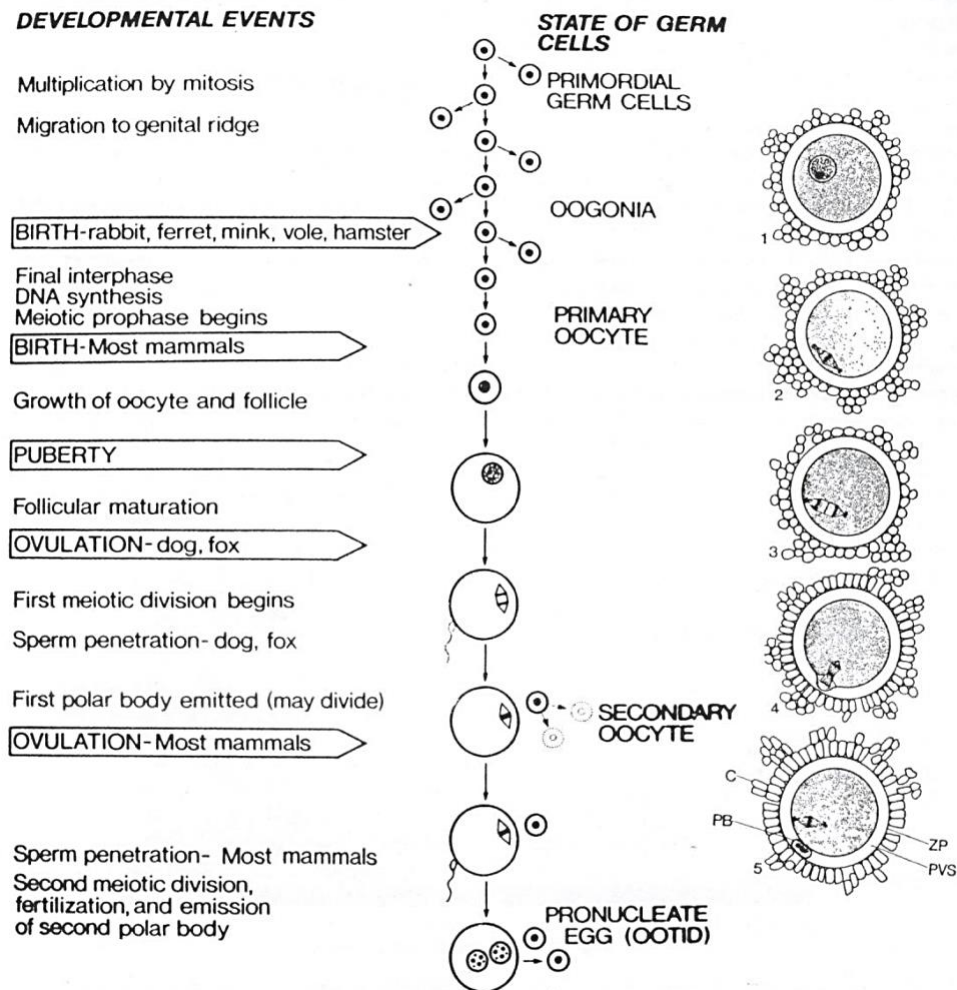
รังไข่ (ovary) เป็นอวัยวะภายในช่องท้องอยู่ติดกับท่อนำไข่ รังไข่ทำหน้าที่เป็นทั้งต่อมมีท่อ (exocrine gland) คือการปล่อยไข่ที่สุกไปยังท่อนำไข่ และต่อมไร้ท่อ (endocrine gland) ซึ่งมีหน้าที่ในการสร้างและปล่อยฮอร์โมน มีรูปร่างคล้ายกับพวงองุ่น ขนาดของรังไข่ในนั้นสามารถผันแปรได้ขึ้นอยู่กับระยะวงจรการสืบพันธุ์ หน้าที่สำคัญของรังไข่คือการผลิตไข่ โดยในแต่ละรอบของการเป็นสัดจะสามารถผลิตเซลล์ไข่ได้ 10-25 เซลล์ ทำให้สุกรสามารถมีลูกได้หลายตัวใน 1 คอก (polytocus) ส่วนของรังไข่ที่ไม่ได้ถูกยึดด้วยเยื่อยึด (mesovarium) จะยื่นเข้าไปภายในช่องท้องและบริเวณผิวหน้าจะมีส่วนยื่นออกมาเป็นถุงไข่ (follicle) รังไข่แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือรังไข่ชั้นใน (medulla) และชั้นนอก (cortex) ซึ่งมีถุงไข่เป็นส่วนประกอบ (Hafez, 1974)

ถุงไข่จะมีการเปลี่ยนแปลงขนาดตามระยะวงจรการเป็นสัดของสุกร (ภาพที่ 4) มีวงจรการเป็นสัดเฉลี่ยอยู่ที่ 21 วัน ซึ่งสุกรสามารถให้ลูกได้ตลอดทั้งปี เมื่อเป็นสัด สุกรจะแสดงอาการกระวนกระวาย ที่อวัยวะเพศมีการบวมแดง (Patten, 1959)



ภาพที่ 4 การเจริญพัฒนาของเซลล์ไข่และถุงไข่ของสุกรเพศเมียในช่วงระยะการเป็นสัด เริ่มจากถุงไข่ขนาดเล็กที่มีเซลล์ไข่ระยะ primordial oocyte หรือระยะ primary oocyte จากนั้นเจริญพัฒนาต่อไปจนกระทั่งเกิดการตกไข่ โดยภายหลังการตกไข่เกิดเป็น corpus luteal ซึ่งเป็นสะเก็ดสีขาวอยู่ภายในรังไข่ โดยระยะการเป็นสัดของสุกรอยู่ที่ประมาณ 21 วัน
ที่มา: Patten (1959)

ภายในรังไข่ปกติจะพบถุงไข่ระยะปฐมภูมิ (primordial follicle) อยู่มาก (Telfer, 1998) โดยเซลล์สืบพันธุ์ปฐมภูมิคือเซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเพียงชั้นเดียว เซลล์ชนิดนี้มีการเพิ่มจำนวนขึ้นโดยการแบ่งตัวแบบไมโทซิส (mitosis) เรียกว่าถุงไข่ทุติยภูมิ (secondary follicle) ภายในถุงไข่จะมีการสร้างเป็นช่องว่าง (antrum) โดยพบน้ำอยู่ภายในช่องว่างนั้น โดยเรียกถุงไข่ระยะนี้ว่าถุงไข่ตติยภูมิ (tertiary follicle) จากนั้นจะทำการพัฒนาไปเรื่อยจนกระทั่งเป็นถุงไข่ที่โตเต็มที่ (graafian follicle) (Hafez, 1974) (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 การเจริญพัฒนาของเซลล์ไข่ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเริ่มต้นจาก primordial germ cells เกิดการแบ่งตัวแบบไมโทซิส ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมก่อนวัยเจริญพันธุ์จะพบเซลล์ไข่ในระยะ primary oocyte จากนั้นเซลล์ไข่จะมีการเจริญพัฒนาไปพร้อมๆ กับถุงไข่จนกระทั่งถึงวัยเจริญพันธุ์ (puberty) ต่อมาเซลล์ไข่เกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในช่วงการตกไข่ จะได้เป็นเซลล์ไข่ระยะ secondary oocyte และ first polar body ภายหลังเซลล์ไข่ได้รับการผสมกับอสุจิ จะเกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสครั้งที่ 2 เกิดการผลัด secondary polar body ออกและเซลล์ไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิจะมีการเจริญพัฒนาต่อไปเป็นตัวอ่อน

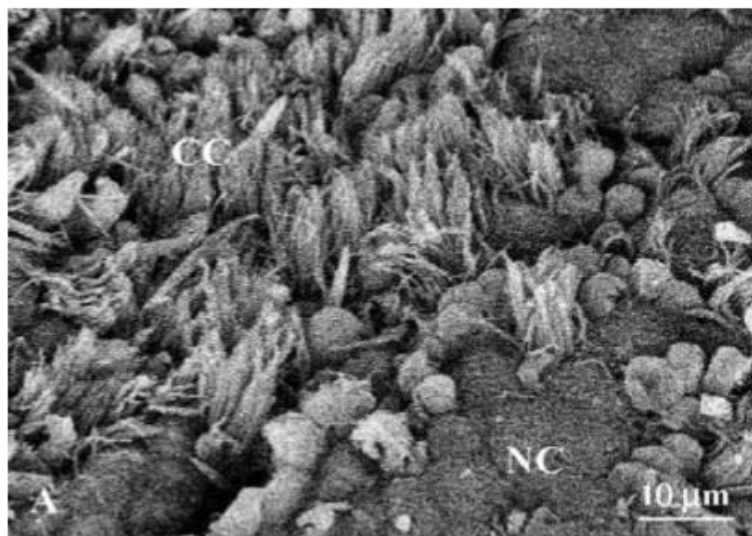
ที่มา: Patten (1959)

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบปฐมภูมิ

2.1 เซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกร (porcine oviductal epithelial cells; pOEC)

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้ทดลองสนใจศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรและเซลล์แกรนูโลซาสุกร ซึ่งเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรมีการเรียงตัวแบบชั้นเดียวและมีรูปร่างของเซลล์เป็นแบบสี่เหลี่ยมผืนผ้า (simple columnar) สามารถแบ่งชนิดของเซลล์ภายในท่อนำไข่ได้เป็น 2 ชนิด (Chen et al., 2013) คือ เซลล์ที่มีซิเลีย (ciliated cells) พบว่ามีส่วนช่วยในการทำหน้าที่ในการพัดโบกเรียกว่า kinocilia หันออกสู่ช่องของท่อนำไข่ (lumen) เซลล์ชนิดนี้มีหน้าที่ในการช่วยพัดโบกไข่และอสุจิในทิศทางตรงกันข้ามส่งผลให้เกิดการปฏิสนธิ และเซลล์ที่ไม่มีซิเลีย (non-ciliated cells or secretory cells) (Chen et al., 2013; Desantis et al., 2011; Hafez, 1974; Miessen et al., 2011) มีหน้าที่ในการคัดหลั่งสารเนื่องจากภายในเซลล์มีแกรนูล (granule) ที่สามารถหลั่งสารได้ ขนาดและจำนวนเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงไปตามรอบการเป็นสัด สารที่ท่อนำไข่หลั่งออกมาส่งเสริมการเกิดการปฏิสนธิ การพัฒนาของตัวอ่อนและยังกระตุ้นเซลล์อสุจิให้เกิดกระบวนการ capacitation และกระบวนการ acrosome reaction ได้อีกด้วย (Areekijsee & Veerapraditsin, 2008; Avilés, Gutiérrez-Adán, & Coy, 2010) (ภาพที่ 6)





ภาพที่ 6 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสองกราดแสดงเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรสามารถแบ่งเซลล์ออกได้เป็น 2 ชนิดคือเซลล์ที่มีซิเลีย (ciliated cells; CC) และเซลล์ที่ไม่มีซิเลีย (non-ciliated cells; NC) ในระยะ luteal phase ของรอบการติดสัด ซึ่งเป็นระยะหลังการตกไข่ โดยจะพบเซลล์ที่ไม่มีซิเลียอยู่มาก เนื่องจากมีหน้าที่หลังสารเพื่อส่งเสริมการเกิดปฏิสนธิและการพัฒนาของตัวอ่อนและยังกระตุ้นการเกิดกระบวนการ capacitation และ acrosome reaction ของเซลล์อสุจิ
ที่มา: Areekijserree and Vejaratpimol (2006)

การทดลองภายในสิ่งมีชีวิตอาจพบปัญหาและมีข้อจำกัดในการศึกษา เช่น การศึกษาการทำงานและการพัฒนาของสมองภายในสิ่งมีชีวิตซึ่งพบข้อจำกัดหลายอย่างที่เป็นปัญหาต่อการศึกษา ทำให้ต้องมีการจัดหาวิธีการและเครื่องมืออื่นๆ ในการศึกษา เช่น การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบปฐมภูมิในห้องปฏิบัติการ (Kumar & Mallick, 2016) การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบปฐมภูมิภายในห้องปฏิบัติการนั้นแสดงให้เห็นถึงลักษณะของเซลล์ที่มีความคล้ายคลึงกับภายในสิ่งมีชีวิตได้ ดังเช่นการศึกษาของ Miessen et al. (2011) ที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรแบบปฐมภูมิภายในห้องปฏิบัติการแบบยาวนาน (long-term culture system) เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าเซลล์มีลักษณะการจัดเรียงตัวเหมือนภายในสิ่งมีชีวิต มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกับภายในสิ่งมีชีวิตคือพบเซลล์ที่มีซิเลีย (cilia) อยู่ด้วย เช่นเดียวกับการศึกษาของ Chen et al. (2013) ที่เพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรแบบปฐมภูมิระยะยาวภายในห้องปฏิบัติการซึ่งพบว่ามีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เหมือนกับภายในสิ่งมีชีวิตเช่นเดียวกัน การเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรแบบปฐมภูมิในห้องปฏิบัติการแบบระยะยาวยังมีประโยชน์ในการศึกษาด้านระบบสืบพันธุ์ในระยะยาว เช่น การศึกษาผลของสารพิษหรือผลทางยาของสารสกัดต่างๆ ต่อระบบสืบพันธุ์ในระยะยาว (Miessen et al., 2011; Palma-Vera,

Einspanier, & Schoen, 2014) อีกทั้งยังช่วยลดขั้นตอนการเตรียมเซลล์ โดยเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในระยะยาวแล้วสามารถนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไปแช่แข็ง (freeze cells) และสามารถพัฒนาต่อไปเป็นเซลล์ไลน์ (cell line) ได้อีกด้วย (Chen et al., 2013; Gualtieri et al., 2012; Palma-Vera et al., 2014; Sordi et al., 2017) ดังเช่นการศึกษาของ Schoen et al. (2008) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวท่อไข่โคไคในห้องปฏิบัติการ จากนั้นนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงมาพัฒนาเป็นเซลล์ไลน์ ซึ่งเซลล์ไลน์ที่พัฒนามานี้ยังคงมีลักษณะเฉพาะตัวที่เหมือนกับในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิ ซึ่งเซลล์ไลน์ที่ได้จากการพัฒนานี้เป็นสิ่งสำคัญที่สามารถนำไปใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนและการทำงานของเซลล์ในระบบสืบพันธุ์ นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวท่อไข่สุกรแบบปฐมภูมิภายในห้องปฏิบัติการเป็นสิ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากสามารถนำมาใช้ศึกษากายภาพของเซลล์ (Palma-Vera et al., 2014) การทำงานระดับเซลล์ของท่อไข่และการใช้ในการศึกษาทางพิษวิทยาในระบบสืบพันธุ์ได้อีกด้วย ซึ่งการเพาะเลี้ยงเซลล์ภายในห้องปฏิบัติการนั้นมีประโยชน์อย่างมากในการลดการใช้สัตว์ทดลองในการศึกษาได้เป็นอย่างดี (Chen et al., 2013; Miessen et al., 2011)

การเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวท่อไข่ภายในห้องปฏิบัติการถือเป็นต้นแบบสำหรับการศึกษาด้านระบบสืบพันธุ์และทางวิทยาศาสตร์พื้นฐาน (Chen et al., 2013; Miessen et al., 2011; Ogunranti, 1993) รวมถึงการเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวท่อไข่ที่มีประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้เพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์ชนิดอื่น (co-culture) เช่น เซลล์ไข่ (oocyte) หรือไซโกต (zygote) เพื่อช่วยส่งเสริมการเจริญพัฒนาของเซลล์ไข่และไซโกตภายในห้องปฏิบัติการ (Abe & Hoshi, 1997; Chen et al., 2013; Miessen et al., 2011; Watson et al., 1994) ดังเช่นการศึกษาของ Gandolfi and Moor (1987) เมื่อนำเซลล์บุผิวท่อไข่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ไข่ของแกะพบว่าช่วยส่งเสริมการพัฒนาของเซลล์ไข่ให้พัฒนาเป็นระยะบลาสโตซิสต์ (blastocyst) ได้ 42 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าเซลล์ไข่ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) มีการเจริญอยู่ที่ 4.5 เปอร์เซ็นต์ และการศึกษาของ White et al. (1989) ได้เปรียบเทียบผลของการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนร่วมกับเซลล์บุผิวท่อไข่สุกร (POEC) เซลล์ไฟโบรบลาสต์ของลูกสุกร (PEF) และการเพาะเลี้ยงร่วมกันของเซลล์ทั้งสองชนิด (PEF-POEC) เป็นเวลา 30 และ 60 วัน พบว่าการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนร่วมกับเซลล์ POEC เป็นเวลา 30 วัน มีค่า 70 เปอร์เซ็นต์ และ 60 วัน คือ 54 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์ PEF-POEC เป็นเวลา 30 วัน มีค่า 67 เปอร์เซ็นต์ และ 60 วัน คือ 61 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลต่อการเจริญพัฒนาของตัวอ่อนไปเป็นระยะบลาสโตซิสต์มากกว่าการเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์ PEF เป็นเวลา 30 วัน มีค่า 27 เปอร์เซ็นต์ และ 60 วัน คือ 23 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญ และ การศึกษาของ Xu et al. (1992) พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์

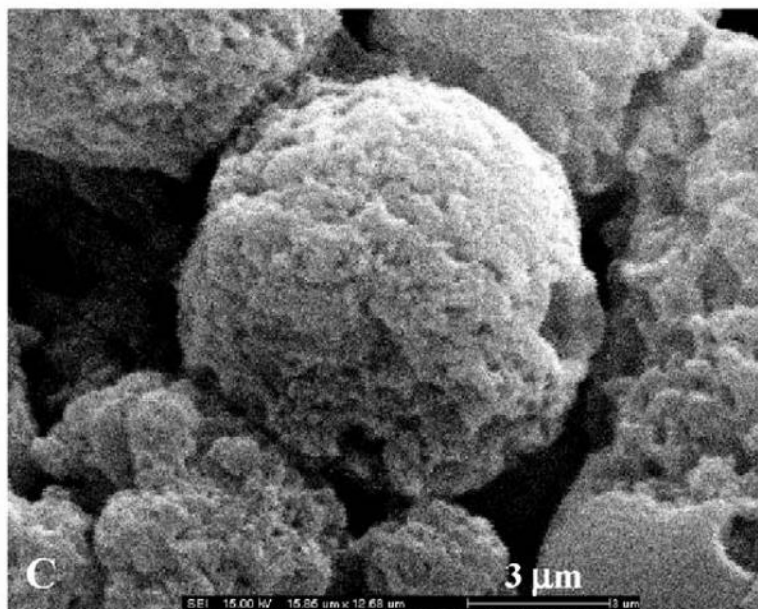
บุผิวท่อนำไข่โคร่วมกับเซลล์ไข่แล้วมีส่วนช่วยในการทำให้ไข่เกิดการพัฒนาดำเนินไปได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ การเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวท่อนำไข่ร่วมกับเซลล์อสุจิส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์อสุจิสูงกว่าในกลุ่มที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์บุผิวท่อนำไข่ จากผลการศึกษาสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการทำกระบวนการการปฏิสนธิภายในห้องทดลอง (Yeste et al., 2009) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Romar, Coy, Ruiz, Gadea, and Rath (2003) และการศึกษาของ Kidson et al. (2003) ที่พบว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวท่อนำไข่ร่วมกับเซลล์ไข่แล้วมีส่วนช่วยในการเกิดการรวมกัน (penetration) ระหว่างเซลล์ไข่และเซลล์อสุจิมากขึ้น นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวท่อนำไข่ยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการเป็นเซลล์ต้นแบบเพื่อทดสอบผลของสารพิษต่างๆ หรือทดสอบคุณสมบัติทางยาและสารต่างๆ (Abe & Hoshi, 1997; Chen et al., 2013) ดังเช่นการศึกษาของ Sanmanee and Areekijserree (2009) ได้ศึกษาผลของแคดเมียมต่อลักษณะทางชีววิทยาของเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกร พบว่าสัญญาณวิทยาของเซลล์เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope; TEM) พบว่าเกิดการรวมกลุ่มกันของนิวเคลียสและไซโทพลาสซึมภายในเซลล์ที่ถูกทดสอบด้วยแคดเมียม แสดงให้เห็นว่าเซลล์เกิดความเสียหายภายหลังได้รับแคดเมียม จากรายงานของ Jordaens et al. (2015) ใช้เซลล์บุผิวท่อนำไข่โคเป็นเซลล์ต้นแบบในการศึกษาผลของสารพิษ โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวท่อนำไข่โคด้วยวิธี air-liquid interface แล้วศึกษาผลของสาร NEFA ซึ่งเป็นสารที่ส่งผลกระทบต่อกระบวนการปฏิสนธิ จากผลการศึกษาพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสาร NEFA แล้วส่งผลทำให้จำนวนของเซลล์บุผิวท่อนำไข่ลดลงและยับยั้งการทำงานของเซลล์อีกด้วยและจากการศึกษาของ Palma-Vera et al. (2014) ที่ใช้เซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรเป็นเซลล์ต้นแบบในการศึกษาผลของฮอร์โมนเอสตราไดออลภายในสารหลังจากถุงไข่มนุษย์ในระยะใกล้ตกไข่จนถึงตกไข่ (perioovulation) ต่อการแสดงออกของยีน เพื่อตรวจสอบผลของฮอร์โมนเอสตราไดออลภายในสารหลังจากถุงไข่ซึ่งมีระดับสูงในช่วงของการตกไข่ต่อเซลล์บุผิวท่อนำไข่ จากผลการศึกษาพบว่าส่งผลกระทบต่อให้เกิดการแสดงออกของยีนที่ทำให้เกิดกระบวนการอักเสบ (inflammation) กล่าวได้ว่าผลของฮอร์โมนเอสตราไดออลในสารหลังจากถุงไข่ระยะใกล้ตกไข่ มีผลต่อลักษณะทางชีววิทยาของเซลล์ ทำให้เกิดการแสดงออกของยีนที่ส่งเสริมกระบวนการอักเสบเนื่องจากไปเพิ่มการทำงานของ ROS ภายในเซลล์ ซึ่งผลนี้สามารถเชื่อมโยงไปถึงกระบวนการอักเสบที่ทำให้เกิดการตกไข่ได้

จะเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวท่อนำไข่ไม่มีประโยชน์อย่างมากต่อการศึกษาวิจัย ซึ่งสามารถใช้เซลล์บุผิวท่อนำไข่มาเป็นเซลล์ต้นแบบในการศึกษาวิจัยได้หลายด้าน ทั้งการเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์อื่นๆ และเพื่อใช้ในการทดสอบผลของสารต่างๆ เช่นเดียวกับการศึกษาในครั้งนี้ได้ใช้

เซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรมาเป็นต้นแบบในการศึกษาผลของสารหลังจากไข่สุกรต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์

2.2 เซลล์แกรนูโลซาสุกร (porcine granulosa cells; pGC)

เซลล์แกรนูโลซาพบล้อมรอบเซลล์ไข่และภายในถุงไข่ โดยระหว่างการพัฒนาของผิวหน้าของถุงไข่นั้น เซลล์บุผิวของถุงไข่มีการเจริญเข้าไปในรังไข่และเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่และล้อมรอบภายในถุงไข่ มีหน้าที่สำคัญในกระบวนการเจริญของเซลล์ไข่ ถุงไข่ กระบวนการตกไข่และมีหน้าที่ในการผลิตฮอร์โมนเพศ (sex steroid hormone) (Hummitzsch et al., 2013; Manikkam, Li, Mitchell, Mason, & Freeman, 2002) เช่น โปรเจสเตอโรน ซึ่งจะกระตุ้นให้ธีคาเซลล์ (theca cells) สร้างฮอร์โมนแอนโดรเจน (androgen) และฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) และเมื่อเกิดกระบวนการตกไข่เซลล์แกรนูโลซาจะสร้างโปรเจสเตอโรนจำนวนมากออกเข้าสู่เส้นเลือดเวนที่รังไข่ (ovarian vein) (Hafez, 1974) จากการศึกษาของ Areekijsee and Vejaratpimol (2006) รายงานถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์แกรนูโลซาในสุกรพบว่ามีรูปร่างกลมไม่พบซีเลียที่ผิวเซลล์ (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงเซลล์แกรนูโลซาไม่พบซีเลียที่ผิวนอกของเซลล์ โดยเซลล์แกรนูโลซามีลักษณะเป็นเซลล์รูปร่างทรงกลมพบอยู่โดยรอบของถุงไข่ ที่มา: Areekijsee and Vejaratpimol (2006)

ปัจจุบันมีผู้ให้ความสนใจศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาแบบปฏิภูมิเพื่อการศึกษาด้านระบบสืบพันธุ์ และพิษวิทยาทางระบบสืบพันธุ์ (Hughes Jr, Lane, Chen, & Gorospe, 1990; Smida, Valderrama, Agostini, Furlan, & Chedrese, 2004; Veldhuis, Kolp, Toaff, Strauss III, & Demers, 1983) การเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาแบบปฏิภูมิส่วนใหญ่นำมาศึกษาในเรื่องของการทำหน้าที่ของเซลล์ การพัฒนาและเปลี่ยนแปลงไปของเซลล์ การมีชีวิตอยู่ของเซลล์และกระบวนการตายของเซลล์ (apoptosis) (Manikkam et al., 2002) ดังเช่นการศึกษาของ Kolesarova, Capcarova, Sirotkin, Medvedova, and Kovacic (2011) ที่ทำการศึกษาผลของโลหะเงิน (silver) ต่อการหลั่งสาร Insulin-like growth factor I (IGF-I), cyclin-B และ caspase-3 เนื่องจากผลของโลหะเงินต่อระบบสืบพันธุ์ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด โดยภายหลังจากการถูกทดสอบด้วยโลหะเงินพบว่าเซลล์แกรนูโลซามีการหลั่งสาร IGF-I หรือ growth factor พบการหลั่ง cyclin-B ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ถึงการมีชีวิตของเซลล์ และสาร caspase-3 แสดงถึงกระบวนการ apoptosis ของเซลล์เพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโลหะเงินมากขึ้น ในการศึกษาด้านพิษวิทยาทางระบบสืบพันธุ์นั้น มีผู้ทำการศึกษาผลของเชื้อรา (mycotoxin) โดยใช้เซลล์แกรนูโลซาเป็นเซลล์ต้นแบบในการทดสอบ ดังเช่นผลการศึกษาของ Ranzenigo, Caloni, Cremonesi, Aad, and Spicer (2008) ได้ทำการศึกษาผลของเชื้อราชนิด *Fusarium* ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ การผลิตสารสเตียรอยด์ (steroidogenesis) และการแสดงออกของยีน เนื่องจากเชื้อราชนิด *Fusarium* นั้นมีผลต่อระบบสืบพันธุ์ซึ่งส่งผลต่อการตั้งท้องของสุกร จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเชื้อราในการเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซา มีผลต่อการสร้างสาร IGF-I ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นการสร้างฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน มีปริมาณลดลง มีผลต่อการมีชีวิตรอดและการแสดงออกของยีนในเซลล์แกรนูโลซาและการศึกษาของ Tiemann et al. (2009) ที่ทดสอบสาร mycotoxin ต่อการสังเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนของเซลล์แกรนูโลซา จากผลการทดลองพบว่าค่าการมีชีวิตรอดของเซลล์และปริมาณการสังเคราะห์โปรเจสเตอโรนมีค่าลดลง อีกทั้งการเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซายังมีประโยชน์ในการเลี้ยงร่วมกับเซลล์อื่น สอดคล้องกับการศึกษาของ Adeldust, Zeinoaldini, Kohram, Roudbar, and Joupari (2015) ที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาพร้อมกับเซลล์ไข่กระปือ พบว่าการเพาะเลี้ยงร่วมกันมีประโยชน์ในการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์เพื่อการเจริญพัฒนาของตัวอ่อนกระปือ เซลล์แกรนูโลซายังสามารถใช้เป็นเซลล์ต้นแบบในการศึกษาการทำงานของเซลล์ในระบบสืบพันธุ์ได้ ได้มีการรายงานถึงการศึกษาการสื่อสารกันระหว่างเซลล์ (cell-cell communication) โดยใช้เซลล์แกรนูโลซาเป็นต้นแบบในการศึกษา โดยศึกษาการแสดงออกของโปรตีนและย้อมสีฟลูออเรสเซน (Stein,

Stoica, Tilley, & Burghardt, 1991) จากรายงานของ He et al. (2016) ได้ใช้แกรนูโลซาเซลล์เป็นต้นแบบในการศึกษาการทำงานของ receptor ที่ผิวเซลล์เมื่อทดสอบกับสารเมลาโทนิน (melatonin) ซึ่งเป็นสารที่เป็นตัวกำหนดนาฬิกาชีวิต หรือการทำงานทางกายภาพของสิ่งมีชีวิตและการทำงานของต่อมไพเนียลในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ภายหลังจากทดสอบเซลล์แกรนูโลซากับเมลาโทนินเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการเกิด apoptosis ของเซลล์แกรนูโลซามีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดและปริมาณการสังเคราะห์ estradiol เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ กล่าวได้ว่าสารเมลาโทนินมีผลต่อการเจริญพัฒนาและการสังเคราะห์ฮอร์โมนของเซลล์แกรนูโลซา และมีรายงานการศึกษา signaling pathway โดยใช้แกรนูโลซาเซลล์สุกรเป็นเซลล์ต้นแบบในการศึกษา พบว่าเมื่อทดสอบสาร Butyric acid (BA) ซึ่งเป็นกรดไขมันชนิดหนึ่ง สารนี้ส่งผลต่อกลไกการทำงานทางสรีรวิทยาของระบบสืบพันธุ์ จากผลการศึกษาพบว่าสาร BA ส่งผลต่อการควบคุมการสังเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและเอสตราไดออลของเซลล์แกรนูโลซาสุกรซึ่งมีผลต่อกระบวนการการทำงานของ signaling pathway ของ cAMP ภายในเซลล์ (Lu et al., 2017)

นอกจากนี้เซลล์แกรนูโลซายังมีประโยชน์ในการนำไปใช้เป็นตัวต้นแบบในการศึกษาผลของสารต่างๆ ต่อเซลล์ในระบบสืบพันธุ์ ดังเช่นการศึกษาของ Ledwitz-Rigby and Rigby (1979) ที่ได้รายงานถึงผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร) ขนาดใหญ่ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 6-12 มิลลิเมตร) และซีรัม (serum) ของสุกรเพศเมียวัยเจริญพันธุ์ต่อเซลล์แกรนูโลซาสุกรแบบชั้นเดียว (monolayer culture) เป็นเวลา 6 วัน แล้วศึกษาปริมาณการสังเคราะห์โปรเจสเตอโรนของเซลล์แกรนูโลซา พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วยสารหลังจากถุงไข่ขนาดใหญ่มีการสังเคราะห์โปรเจสเตอโรนมากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วยสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็กและซีรัมของสุกร ผู้วิจัยได้รายงานว่าจากผลการศึกษาทำให้ทราบถึงโมเลกุลบางชนิดที่อยู่ภายในสารหลังจากถุงไข่ที่สามารถส่งเสริมการทำงานของเซลล์ได้ ซึ่งโมเลกุลนี้จะพบมากขึ้นในสารหลังแปรตามขนาดของถุงไข่

จากรายงานข้างต้นแสดงให้เห็นถึงการนำเซลล์แกรนูโลซามาใช้ประโยชน์ในการเป็นเซลล์ต้นแบบเพื่อศึกษากลไกการทำงานของเซลล์ภายในระบบสืบพันธุ์และผลของสารต่างๆ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจนำเซลล์แกรนูโลซามาเพาะเลี้ยงเพื่อเป็นเซลล์ต้นแบบในการศึกษาผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดต่างๆ

3. สารหลังจากถุงไข่สุกร (porcine follicular fluid)

สารหลังจากถุงไข่คือของเหลวที่อยู่ภายในถุงไข่ ที่อยู่ในส่วนแอนทรม (antrum) ของถุงไข่ สารหลังจากถุงไข่ถือเป็นสารประกอบโปรตีนที่สร้างโดยเซลล์ที่อยู่ล้อมรอบ (Bianchi et al., 2007; Driancourt & Thuel, 1998) นั่นคือเซลล์แกรนูโลซาซึ่งมีการหลั่งโปรตีนออกมาสู่สารหลังจากถุงไข่ (Mahajan & Little, 1978) และสร้างมาจากน้ำเลือดที่ถูกขนส่งมายัง blood follicular barrier (Revelli et al., 2009) โดยโปรตีนที่พบในสารหลังจากถุงไข่ส่วนใหญ่สามารถพบได้ในน้ำเลือด เช่นเดียวกัน (Edwards, 1974) ซึ่งโปรตีนนี้ส่งผลต่อสภาพของถุงไข่และมีผลต่อกระบวนการสุกของเซลล์ไข่ (Ducolomb et al., 2013) โดยส่วนประกอบทางเคมีของสารหลังจากถุงไข่นั้นพบว่าประกอบด้วย อิเล็กโทรไลต์ (electrolyte) กลูโคส (glucose) กรดยูริก (uric acid) เอนไซม์ ลิพิด (lipid) cyclic AMP (cAMP) (Chang, Jones, Ellefson, & Ryan, 1976) สารที่ส่งเสริมการเจริญกรดอะมิโน (amino acid) (Spitzer, Murach, Lottspeich, Staudach, & Illmensee, 1996) และฮอร์โมนอยู่มากซึ่ง ฮอร์โมนที่พบนั้นรวมไปถึงสเตียรอยด์ฮอร์โมน (steroid hormone) ที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ (ตาราง 1) เช่น เอสโตรเจน โปรเจสเตอโรน เป็นต้น สารหลังหรือของเหลวภายในถุงไข่มีหน้าที่สำคัญในการกระตุ้นการเจริญของไข่ที่อยู่ภายในถุงไข่นั้น (Chang et al., 1976; Ito et al., 2008; Kor, 2014; Leibfried & First, 1980) โดยระดับของสเตียรอยด์ฮอร์โมนในสารหลังจากถุงไข่นั้นมีการเปลี่ยนแปลงไปตามช่วงเวลาการเจริญพัฒนาของถุงไข่ (Ainsworth, Tsang, Downey, Marcus, & Armstrong, 1980)

ตารางที่ 1 สารสเตียรอยด์ฮอร์โมนที่พบในสารหลังจากถุงไข่ของสุกร

สัตว์ที่ศึกษา	สเตียรอยด์ฮอร์โมนที่พบในสารหลังจากถุงไข่	ผลของสเตียรอยด์-ฮอร์โมนที่พบในสารหลังจากถุงไข่	อ้างอิง
สุกร	Estrogen, Progesterone, Testosterone	ส่งผลต่อการเจริญพัฒนาของถุงไข่	Chang et al. (1976)
สุกรอายุ 6-12 เดือน	cortisol, progesterone, testosterone, Δ^4 -androstenedione และ estradiol-17 β	มีส่วนในกระบวนการการเจริญของเซลล์ไข่จนกระทั่งเกิดการตกไข่	Mahajan and Little (1978)

สัตว์ที่ศึกษา	สเตียรอยด์ฮอร์โมนที่พบในสารหลังจากถุงไข่	ผลของสเตียรอยด์-ฮอร์โมนที่พบในสารหลังจากถุงไข่	อ้างอิง
สุกรอายุ 4 เดือน	estrone, estradiol-17 β , androstenedione, testosterone + 5 α -dihydrotestosterone (T+DHT), และ progesterone	ส่งผลต่อการเจริญพัฒนาของถุงไข่	Ainsworth et al. (1980)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Gosden, Hunter, Telfer, Torrance, and Brown (1988) ที่ได้รายงานถึงชนิดของอิเล็กโตรไลต์ในสารหลังจากถุงไข่พบว่ามี Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca²⁺ และ Mg²⁺ อีกทั้งพบสารประเภทไขมันในสารหลังจากถุงไข่อีกด้วยเช่น total triglycerides, phospholipids, cholesterol (Chang et al., 1976)

จากการศึกษาของ McGaughey (1975) พบความเข้มข้นของโปรตีนที่แตกต่างกันในสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็กและขนาดใหญ่ โดยพบว่าความเข้มข้นของโปรตีนจากสารหลังจากถุงไข่ขนาดใหญ่ และเล็กมีค่าเท่ากับ 6.97 ± 0.24 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และ 7.41 ± 0.30 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรตามลำดับ จากการศึกษาของ Ito et al. (2008) พบว่าโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลมากกว่า 30 กิโลดาลตัน มีผลในการกระตุ้นการเจริญของนิวเคลียส ในขณะที่โปรตีนที่มีมวลโมเลกุลขนาดน้อยกว่า 30 กิโลดาลตัน ส่งผลในการยับยั้งกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส สอดคล้องกับการศึกษาของ Tsafiri, Pomerantz, and Channing (1976) กล่าวว่าโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลขนาดน้อยกว่า 10 กิโลดาลตัน พบได้ในสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็ก มีผลทำให้เซลล์ไข่อุอยู่ในระยะพักตัวคือ ในระยะโปรเฟส I (Prophase I) ซึ่งแตกต่างกับการศึกษาของ Daen, Sato, Naito, and Toyoda (1994) รายงานถึงโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลน้อยกว่า 6.5 กิโลดาลตัน ซึ่งมีผลในการกระตุ้นการขยายตัวของเซลล์ควมูลัส

จากรายงานของ Yanagishita, Rodbard, and Hascall (1979) พบ proteoglycan ภายในสารหลังจากถุงไข่ ซึ่งพบว่ามีโปรตีน 20 เปอร์เซ็นต์ dermatan sulfate 50 เปอร์เซ็นต์ และ โอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharides) 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบ sialic acid, galactose, mannose, glucosamine และ galactosamine ในปริมาณมาก นอกจากนี้รายงานของ Chang et al. (1976) พบปริมาณของกรดอะมิโนบางชนิดมีการลดลงเมื่อถุงไข่ขนาดใหญ่เริ่มเจริญพัฒนา เนื่องมาจาก

ปริมาณสารหลังจากถุงไข่ขนาดใหญ่มีปริมาณมากกว่าสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็กถึง 10 เท่า ทำให้เกิดการเจือจางปริมาณกรดอะมิโนที่ลดลงไป โดยพบว่ากรดอะมิโนบางตัวเป็นสารตั้งต้น (precursor) ของกรดอะมิโนตัวอื่นๆ เช่น lysine ที่เป็นกรดอะมิโนตั้งต้นของ α -Aminoadipic acid ซึ่งพบว่าปริมาณ lysine มีค่าลดลงเมื่อถุงไข่สุกมีการเจริญพัฒนาเป็นถุงไข่ขนาดใหญ่ ส่งผลให้ α -Aminoadipic acid มีปริมาณลดลง ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 กรดอะมิโนที่พบในสารหลังจากถุงไข่ของสุกร

กรดอะมิโนใน สารหลังจากถุงไข่สุกร	ขนาดของถุงไข่สุกร			อ้างอิง
	ถุงไข่ขนาดเล็ก (เส้นผ่าน- ศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร)	ถุงไข่ขนาดกลาง (เส้นผ่าน- ศูนย์กลาง 3-5 มิลลิเมตร)	ถุงไข่ขนาดใหญ่ (เส้นผ่าน- ศูนย์กลาง 6-12 มิลลิเมตร)	
Phosphoserine	✓	✓	✓	Chang et al. (1976)
Phosphoethanolamine	✓	✓	✓	
Taurine	✓	✓	✓	
Aspartic acid	✓	✓	✓	
Threonine	✓	✓	✓	
Serine	✓	✓	✓	
Asparagine	✓	✓	✓	
Glutamine	✓	✓	✓	
Sarcosine	✓	✓	✓	
Proline	✓	✓	✓	
Glutamic acid	✓	✓	✓	
Citrulline	✓	✓	✓	
Glycine	✓	✓	✓	
Alanine	✓	✓	✓	
α -Aminoadipic acid	✓	✓	✓	
α -Amin-n-butyric acid	✓	✓	✓	
Valine	✓	✓	✓	
Half-cystine	✓	✓	✓	

กรดอะมิโนใน สารหลังจากถุงไข่สุกร	ขนาดของถุงไข่สุกร			อ้างอิง
	ถุงไข่ขนาดเล็ก (เส้นผ่าน- ศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร)	ถุงไข่ขนาดกลาง (เส้นผ่าน- ศูนย์กลาง 3-5 มิลลิเมตร)	ถุงไข่ขนาดใหญ่ (เส้นผ่าน- ศูนย์กลาง 6-12 มิลลิเมตร)	
Methionine	✓	✓	✓	
Isoleucine	✓	✓	✓	
Leucine	✓	✓	✓	
Tyrosine	✓	✓	✓	
Phenylalanine	✓	✓	✓	
β-Alanine	✓	✓	✓	
Ornithine	✓	✓	✓	
Lysine	✓	✓	✓	
Histidine	✓	✓	✓	
3-Methylhistidine	✓	✓	✓	
Carnosine	✓	✓	✓	
Arginine	✓	✓	✓	

หมายเหตุ ✓ หมายถึงพบกรดอะมิโนชนิดนั้นในสารหลังจากถุงไข่สุกร
 หมายถึงพบกรดอะมิโนชนิดสูงที่สุดนั้นในสารหลังจากถุงไข่สุกร

และมีผู้ทำการศึกษาชนิดของโปรตีนต่างๆ ภายในสารหลังจากถุงไข่ดังกล่าวที่ 3 ซึ่งโปรตีน
 ถือเป็นส่วนประกอบหลักของสารหลังจากถุงไข่ ความแตกต่างของโปรตีนของสารหลังจากแต่ละถุงไข่
 ส่งผลต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์ไข่ (Chang et al., 1976; McGaughey, 1975)

ตารางที่ 3 โปรตีนที่พบในสารหลังจากถุงไข่ของสุกร

สัตว์ที่ศึกษา	โปรตีนในสารหลังจากถุงไข่	หน้าที่ของโปรตีนในสารหลังจากถุงไข่	หมายเหตุ	อ้างอิง
สุกรเพศเมีย อายุไม่เกิน 12 เดือน	IGF-I และ IGF-II	มีผลต่อการเจริญพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงเพื่อการทำหน้าที่ของถุงไข่	พบโปรตีนชนิดนี้ทั้งในสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็ก และขนาดใหญ่	Spicer et al. (1992)
มนุษย์	transferrin, serum albumin, arantitrypsin, haptoglobin-1, immunoglobulin Ig-K, chain C region, apolipoprotein A-I, และ subunit ของ serum albumin	ส่งผลต่อต้านสภาพของถุงไข่และเป็นตัวบ่งชี้ว่าถุงไข่ถึงระยะการเจริญ	สารหลังจากถุงไข่มนุษย์ถูกนำมาศึกษาส่วนประกอบของโปรตีนโดยวิธี two-dimensional gel electrophoresis พบโปรตีนขนาด 10-100 กิโลดาลตัน ซึ่งพบ band ของโปรตีนทั้งหมด 7 จุดที่มีสีชัดและเข้มกว่าจุดอื่นๆ จึงเลือกมาทำการศึกษาว่าเป็นโปรตีนชนิดใด	Spitzer et al. (1996)
สุกรเพศเมีย อายุ 6 เดือน	ส่วนที่ 1: Immunoglobulin, cytokeratin, transferrin และ plasminogen-precursor	ส่วนที่ 1: มีส่วนช่วยในการส่งเสริมให้เกิดกระบวนการการสุกของไข่ (IVM) และ	ศึกษาสารประกอบโปรตีนของสารหลังภายในถุงไข่สุกรขนาด 3-6 มิลลิเมตรที่แบ่งเป็น 5 ส่วนด้วยวิธีการ	Ducolomb et al. (2013)

สัตว์ที่ศึกษา	โปรตีนในสารหลังจากถุงไข่	หน้าที่ของโปรตีนในสารหลังจากถุงไข่	หมายเหตุ	อ้างอิง
	<p>ส่วนที่ 2: มี immunoglobulin ทั้งหมด 5 ชนิดและอีกชนิดคือ transthyretin</p> <p>ส่วนที่ 3: พบโปรตีน 6 ชนิด immunoglobulin, immunoglobulin fragment และ transthyretin</p> <p>ส่วนที่ 4: พบโปรตีน 14 ชนิด inter-alpha-trypsin, inhibitor family heavy chain-related protein, alpha-1-antichymotrypsin, haptoglobin, endopin 1b, transthyretin, complement component C8G, precursor of serum albumin, B-factor, properdin, fragment of fumarate hydratase, inhibitor of carbonic</p>	<p>การเกิดการปฏิสนธิภายในห้องทดลอง (IVF)</p> <p>ส่วนที่ 2: ยับยั้งการเกิดกระบวนการไมโอซิส 1</p> <p>ส่วนที่ 3: มีส่วนสำคัญในการทำให้เซลล์ไข่ออยู่ในระยะ germinal vesicle stage (GV stage)</p> <p>ส่วนที่ 4: ยับยั้งการเกิดกระบวนการไมโอซิส 1</p> <p>ส่วนที่ 5: ส่งเสริมกระบวนการ germinal vesicle breakdown (GVB) และการสุกของเซลล์ไข่</p>	<p>Anion chromatography จากนั้นนำมาศึกษาด้วยวิธีการ SDS-PAGE พบโปรตีนทั้งหมด 31 ชนิด โดยโปรตีนที่พบบางชนิดสามารถพบได้ในหลายส่วน แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของโปรตีนอีกทั้งจากผลการทดลองยังสามารถยืนยันได้ถึงผลของโปรตีนต่อการสุกของเซลล์ไข่อภายในห้องปฏิบัติการและส่งเสริมกระบวนการปฏิสนธิภายในห้องปฏิบัติการอีกด้วย</p>	

สัตว์ที่ศึกษา	โปรตีนในสารหลังจากถุงไข่	หน้าที่ของโปรตีนในสารหลังจากถุงไข่	หมายเหตุ	อ้างอิง
	anhydrase, coagulation factor XII และ immunoglobulins 3 ชนิด ส่วนที่ 5: พบโปรตีน 2 ชนิดคือ serum albumin และ keratin			

ในปัจจุบันจึงมีการศึกษาผลของการเติมสารหลังจากถุงไข่ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่เพื่อใช้เป็นสารเสริมการเจริญเติบโต (supplement) ของเซลล์ไข่ (Oberlender et al., 2013) ดังเช่นการศึกษาของ Algriany et al. (2004) กล่าวว่าสารหลังจากถุงไข่สามารถให้ผลที่แตกต่างกันได้ ซึ่งการให้ผลส่งเสริมการเจริญหรือยับยั้งนั้นขึ้นอยู่กับขนาดของถุงไข่ จึงทำการทดลองโดยนำสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็ก (2-4 มิลลิเมตร) และถุงไข่ใหญ่ (5-8 มิลลิเมตร) นำมาเสริมในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ในห้องปฏิบัติการ เมื่อทำการเติมสารหลังจากถุงไข่ขนาดใหญ่พบว่ามีการขยายของเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่หรือเซลล์คิวมูลัส (cumulus cells) เพิ่มมากขึ้นอีกทั้งยังเพิ่มการเจริญพัฒนาของนิวเคลียสของเซลล์ไข่อีกด้วย (277±61 มิลลิเมตร และ 72 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ซึ่งมีความสูงกว่าผลของการเติมสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็ก (238±33 มิลลิเมตร และ 55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตามได้เคยมีผู้ทำการศึกษาค้นคว้าผลของสารหลังจากถุงไข่ขนาดต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไข่ ดังเช่นการทดลองของ Vatzias and Hagen (1999) ที่นำสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่เติมในการเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ให้สุกและระหว่างการพัฒนาปฏิสนธิภายในห้องปฏิบัติการ พบว่าการเติมสารหลังจากถุงไข่ขนาดใหญ่ส่งผลต่อการสุกของไข่และการปฏิสนธิภายในห้องปฏิบัติการที่มากกว่าผลของสารหลังจากถุงไข่ขนาดกลาง และสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็กตามลำดับ ($P < 0.05$) และจากผลการทดลองของ Daen et al. (1994) พบการขยายตัวของเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เพิ่มมากขึ้นเมื่อเติมสารหลังจากถุงไข่ขนาดใหญ่ (79.5 ± 11.3 ตาราง มิลลิเมตร) ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่พบว่าแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบการขยายตัวของเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เมื่อเติมสารหลังจากถุงไข่ขนาดกลางและสาร-

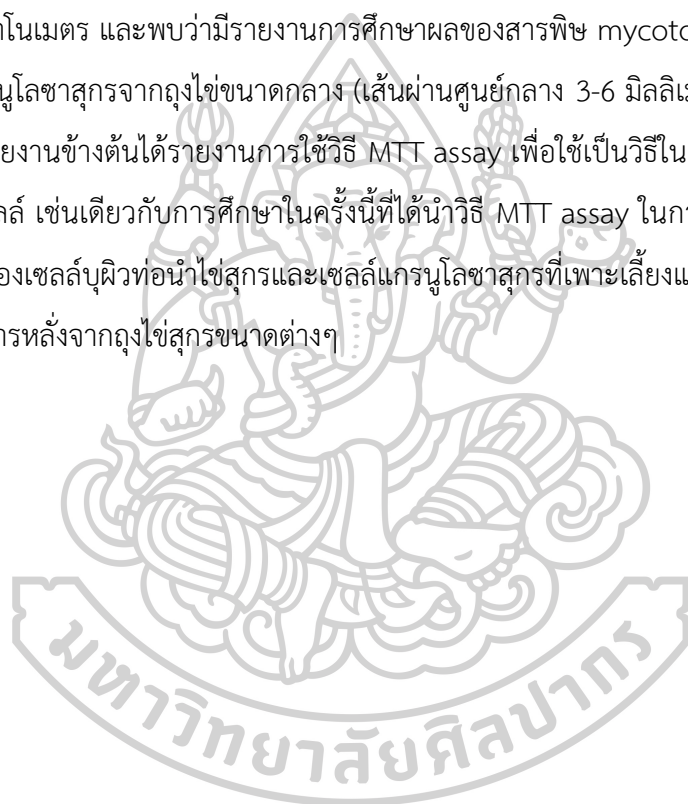
หลังจากถุงไข่ขนาดเล็กพบว่าเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เมื่อเสริมด้วยสารหลังจากถุงไข่ขนาดกลาง (77.2 ± 8.2 ตารางมิลลิเมตร) มีการขยายตัวสูงกว่าเมื่อเสริมด้วยสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็ก (75.7 ± 18.1 ตารางมิลลิเมตร) การขยายตัวของเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ที่เพิ่มขึ้นหมายถึงเซลล์ไข่มีการเจริญพัฒนา ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในการเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ให้เจริญ และปฏิสนธิภายในห้องปฏิบัติ (Yokoo & Sato, 2004) กล่าวได้ว่าผลของสารหลังจากถุงไข่แต่ละขนาดส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไข่ที่เพาะเลี้ยงภายในห้องปฏิบัติการแตกต่างกัน โดยพบว่าผลของสารหลังจากถุงไข่ขนาดใหญ่และขนาดกลางมีผลส่งเสริมการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์มากกว่าผลของสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็กที่มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ไข่ (Algriany et al., 2004; Vatzias & Hagen, 1999) ดังเช่นการศึกษาของ Ito et al. (2008) รายงานถึงผลของสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร) ต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์ไข่และอัตราการเกิดการปฏิสนธิภายในห้องปฏิบัติการพบว่ามีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่เสริมด้วยสารหลังจากถุงไข่ขนาดใหญ่ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร) ซึ่งคาดว่าสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็กให้ผลยับยั้งการเจริญพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เป็นผลมาจากสารตัวหนึ่งซึ่งเป็นส่วนประกอบภายในสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็กคือ oocyte maturation inhibitor (OMI) ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญพัฒนาของเซลล์ไข่ (Channing, Liu, Jones, & Jones, 1983; Tsafirri et al., 1976; Van de Wiel, Bar-Ami, Tsafirri, & De Jong, 1983)

จากที่ได้กล่าวมาข้างต้นถึงสารประกอบโปรตีนและผลของสารหลังจากถุงไข่ของสุกรนั้น การศึกษาครั้งนี้ผู้ทดลองจึงสนใจศึกษาผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรต่อการเจริญเติบโตพัฒนาของเซลล์จากระบบสืบพันธุ์ของสุกร ซึ่งอาจให้ผลส่งเสริมหรือยับยั้งการเจริญพัฒนาของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายในห้องปฏิบัติการ เพื่อสามารถนำผลที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในงานด้านการเพาะเลี้ยงเซลล์และด้านเทคโนโลยีชีวภาพต่อไป

4. วิธี MTT assay

ในการศึกษานี้ศึกษาผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิ โดยใช้วิธี MTT assay ซึ่งเป็นวิธีการในการศึกษาการเจริญพัฒนาของเซลล์ วิธี MTT assay เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาของเซลล์ ภายหลังจากทดสอบกับสารเคมีหรือยา ซึ่งเหมาะสำหรับตรวจสอบการเจริญพัฒนาของทั้งเซลล์ไลน์และเซลล์เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิ วิธี MTT assay เป็นวิธีที่ใช้ตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยการทำให้เกิดสี (colorimetric assay) แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง (Boncler, Róžalski, Krajewska, Podsedek, & Watala, 2014; Fotakis & Timbrell, 2006; van Meerloo, Kaspers, & Cloos, 2011) ซึ่งวิธีนี้มี

ความไวและจำเพาะต่อการตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์มากกว่าวิธีการตรวจสอบด้วยวิธีอื่นๆ ที่ทำให้เกิดสี มีผู้นำวิธี MTT assay มาใช้ตรวจสอบผลของสารต่างๆ ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ ดังเช่น การศึกษาของ Peng et al. (2015) ทำการศึกษาผลของ TIMP1 และ TIMP3 ต่อเซลล์บุผิวท่อลำไส้ และที่เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิ โดยใช้วิธี MTT assay เป็นวิธีในการตรวจสอบผลของ TIMP1 และ TIMP3 ต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์บุผิวท่อลำไส้เพาะ จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร และจากการศึกษาของ Ellington et al. (1998) ศึกษาการเจริญพัฒนาของเซลล์บุผิวท่อลำไส้โคเพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิ โดยใช้วิธี MTT assay ในการตรวจสอบผล แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร และพบว่ามีรายงานการศึกษาผลของสารพิษ mycotoxin ต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์แกรนูโลซาสุกรจากถุงไข่ขนาดกลาง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 3-6 มิลลิเมตร) (Tiemann et al., 2009) จากรายงานข้างต้นได้รายงานการใช้วิธี MTT assay เพื่อใช้เป็นวิธีในการตรวจสอบการเจริญพัฒนาของเซลล์ เช่นเดียวกับการศึกษาในครั้งนี้ที่ได้นำวิธี MTT assay ในการตรวจสอบผลของการเจริญพัฒนาของเซลล์บุผิวท่อลำไส้สุกรและเซลล์แกรนูโลซาสุกรที่เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิภายหลังการทดสอบด้วยสารหลังจากถุงสุกรขนาดต่างๆ



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์

1. ปีกเกอร์ (beaker)
2. จานแก้ว (petri dish)
3. จานเพาะเลี้ยงพลาสติก (plastic petri dish)
4. จานเพาะเลี้ยงแบบหลุม 96 หลุม (96-well plate)
5. กรรไกร (scissors)
6. คีมหนีบ (forceps)
7. ปิเปตแก้ว (pasteur pipette)
8. แผ่นสไลด์ (glass slide)
9. หลอดปั่นเหวี่ยง ขนาด 2 มิลลิลิตร (centrifuge tube 2 ml)
10. หลอดปั่นเหวี่ยง ขนาด 15 มิลลิลิตร (centrifuge tube 15 ml)
11. หลอดปั่นเหวี่ยง ขนาด 50 มิลลิลิตร (centrifuge tube 50 ml)
12. หลอดทดลอง (test tube)
13. เข็มฉีดยาเบอร์ 18 (18-gauge needle)
14. กระบอกฉีดยา (syringe)
15. กระจกใส่น้ำอุ่น (thermos bottle)
16. เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer)
17. ถุงซิปล็อก (zipper bag)
18. pipette tips
19. ไมโครปิเปต (micropipette)
20. ผ้าก๊อซ (gauze)
21. ฟิล์มกรองขนาดรู 0.22 ไมโครเมตร (membrane filter 0.22 μm)
22. กระบอกตวงขนาด (cylinder)
23. ขวดวัดปริมาตรขนาด (volumetric flask)

24. ขวดแก้วใส่น้ำ (duran bottle)
25. ขวดสีชา (brown bottle)
26. ช้อนตักสาร (spatula)
27. แท่งคนสาร (stirring rod)
28. สไลด์นับเซลล์ (haemocytometer)
29. เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance)
30. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
31. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
32. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
33. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope)
34. กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (inverted microscope)
35. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow)
36. ตู้บ่มเซลล์ (incubator)
37. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)

2. สารเคมี

1. น้ำเกลือ (0.9% normal saline solution, NSS)
2. Penicillin-G
3. Streptomycin
4. Amphotericin-B
5. Gentamycin sulfate
6. M199 with Earle's salt (SIGMA-M5017)
7. NaHCO_3
8. ไพรูเวท (pyruvate) (HIMEDIA-RM082)
9. Heat-treated fetal bovine serum; HTFBS) (SIGMA-F7524)
10. Estradiol; E_2 (SIGMA-E8875)
11. Luteinizing hormone; LH (CALBIOCHEM-869003)
12. Follicle stimulating hormone; FSH (SIGMA-F2293)

13. 0.4% Trypan blue
14. Tetrazolium Bromide (SIGMA-M2128)
15. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer solution, PBS)
16. DMSO (Dimethyl sulfoxide)
17. KOH
18. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
19. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
20. เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol)
21. น้ำกลั่น (distilled water)
22. น้ำปราศจากไอออน (deionized water)

วิธีการศึกษาทดลอง

1. การเตรียมสารเคมี

1.1 การเตรียมน้ำเกลือเพื่อเก็บตัวอย่างผสมด้วยยาปฏิชีวนะ (สำหรับเตรียมน้ำเกลือ 1000 มิลลิลิตร)

1. เตรียมยาปฏิชีวนะ 3 ชนิดคือ Penicillin-G 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร (IU/mL) Streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g}/\text{mL}$) และ Amphoterracin-B 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (วิธีคำนวณในภาคผนวก)
2. นำสารที่ซึ่งเตรียมไว้ผสมในน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจนสารละลายเป็นเนื้อเดียว

1.2 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์สำหรับเซลล์บุผิวท่อนำไข่และเซลล์แกรนูโลซาสุกร

1.2.1 การเตรียมอาหาร M199 เพื่อใช้เพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกร

1. เตรียมอาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS NaHCO_3 2.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (mg/mL) ไพรูเวท 0.25 มิลลิโมลาร์ (mM) และ gentamycin sulfat 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (วิธีการคำนวณเพื่อซึ่งสารสามารถศึกษาได้จากภาคผนวก)
2. ก่อนการใช้งาน 24 ชั่วโมง ต้องนำอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ที่คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ และมีความชื้นสูง

1.2.2 การเตรียมอาหาร M199 เพื่อใช้เพาะเลี้ยงเซลล์แรมนูโลซาสุกอร์

1. เตรียมอาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS, NaHCO_3 2.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไพรูเวท 0.25 มิลลิโมลาร์ gentamycin sulfate 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ฮอร์โมน FSH 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ฮอร์โมน LH 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และฮอร์โมน estradiol 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (วิธีการคำนวณเพื่อชั่งสารสามารถศึกษาได้จากภาคผนวก)
2. ก่อนการใช้งาน 24 ชั่วโมง ต้องนำอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ที่คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ และมีความชื้นสูง

1.3 การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

- 1.3.1 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ประกอบด้วยสาร NaCl เข้มข้น 139 มิลลิโมลาร์ KCl เข้มข้น 2.7 มิลลิโมลาร์ Na_2HPO_4 เข้มข้น 8.8 มิลลิโมลาร์ KH_2PO_4 เข้มข้น 1.48 มิลลิโมลาร์ (วิธีการคำนวณเพื่อชั่งสารสามารถศึกษาได้จากภาคผนวก)
- 1.3.2 นำสารที่เตรียมไว้เทลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันจนสารละลายเป็นเนื้อเดียว
- 1.3.3 ปรับค่าความเป็นกรดต่างด้วย HCl หรือ NaOH เพื่อให้ได้ค่า pH 7.2-7.4
- 1.3.4 กรองสารละลายด้วยชุดกรองความดัน
- 1.3.5 เก็บสารละลายในขวดแก้ว เก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

1.4 การเตรียม MTT assay เพื่อใช้ในการตรวจสอบการเจริญพัฒนาของเซลล์

- 1.4.1 เตรียมสาร MTT ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
- 1.4.2 กรองสารละลายด้วยชุดกรองความดัน
- 1.4.3 เก็บสารละลายในขวดสีชา เก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

2. การเก็บตัวอย่าง การเตรียม คัดแยก และเพาะเลี้ยงเซลล์แบบปฐมภูมิชนิดต่างๆ จากระบบสืบพันธุ์

2.1 การเก็บตัวอย่างเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกร

1. เก็บตัวอย่างท่อนำไข่สุกรสายพันธุ์ผสมลาร์จไวท์ อายุ 6 เดือนขึ้นไป โดยเก็บตัวอย่างแบบปลอดเชื้อจากโรงฆ่าสัตว์ จังหวัดนครปฐม โดยเก็บตัวอย่างท่อนำไข่สุกรจากซากสุกรที่ถูกฆ่าและไม่เกิน 30 นาที โดยทำการเก็บตัวอย่างท่อนำไข่สุกรในระยะ luteal phase
2. ทำการตัดตัวอย่างท่อนำไข่สุกรจากส่วนของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์สุกร โดยท่อนำไข่สุกรมีลักษณะเป็นท่อ ปลายด้านหนึ่งอยู่ติดกับมดลูกและอีกด้านอยู่ติดกับรังไข่
3. หลังจากตัดตัวอย่างท่อนำไข่สุกรแล้ว นำตัวอย่างท่อนำไข่ที่ได้เก็บรักษาในน้ำเกลือความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสมยาปฏิชีวนะ 3 ชนิดคือ Penicillin-G 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (IU/mL) Streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g}/\text{mL}$) และ Amphoterracin-B 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเก็บตัวอย่างใส่ในภาชนะที่รักษาอุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตัวอย่างท่อนำไข่สุกรกลับมาล้างห้องปฏิบัติการภายใน 30 นาที

2.2 การเก็บตัวอย่างเซลล์แกรนูโลซาจากรังไข่สุกร

1. เก็บตัวอย่างรังไข่สุกรสายพันธุ์ผสมลาร์จไวท์ อายุ 6 เดือนขึ้นไป โดยเก็บตัวอย่างแบบปลอดเชื้อจากโรงฆ่าสัตว์ จังหวัดนครปฐม เก็บตัวอย่างรังไข่สุกรจากซากสุกรที่ถูกฆ่าและไม่เกิน 30 นาที โดยทำการเก็บตัวอย่างรังไข่สุกรทั้งในระยะ follicular phase และระยะ luteal phase ซึ่งสามารถแบ่งถุงไข่ออกได้เป็น 3 กลุ่มตามขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางคือ ถุงไข่ขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3 มิลลิเมตร) ถุงไข่ขนาดกลาง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 4-6 มิลลิเมตร) และถุงไข่ขนาดใหญ่ (เส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 7 มิลลิเมตร) ตามลำดับ
2. ทำการตัดตัวอย่างรังไข่สุกรจากส่วนของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์สุกร โดยรังไข่สุกรมีลักษณะคล้ายพวงองุ่น ซึ่งอยู่ติดกับท่อนำไข่
3. หลังจากตัดตัวอย่างรังไข่สุกรแล้ว นำตัวอย่างรังไข่ที่ได้เก็บรักษาในน้ำเกลือความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสมยาปฏิชีวนะ 3 ชนิดคือ Penicillin-G 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (IU/mL) Streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ($\mu\text{g}/\text{mL}$) และ Amphoterracin-B 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเก็บตัวอย่างใส่ในภาชนะที่รักษาอุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตัวอย่างรังไข่สุกรกลับมาล้างห้องปฏิบัติการภายใน 30 นาที

2.3 การเตรียมและคัดแยกเซลล์บุผิวท่อหน้าไขสุกร

1. เตรียมเซลล์บุผิวท่อหน้าไขสุกรแบบปลอดเชื้อโดย นำท่อหน้าไขมาล้างด้วยน้ำเกลือที่ผสมยาปฏิชีวนะ 3 ชนิดคือ Penicillin-G 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร Streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Amphoterracin-B 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อทำความสะอาดท่อหน้าไข
2. ซับตัวอย่างให้แห้งด้วยผ้าก๊อซปลอดเชื้อ จากนั้นทำการตัดแยกท่อหน้าไขออกจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและตัดส่วนอินฟันดิบูลัม (infundibulum) ซึ่งมีลักษณะคล้ายนิ้วมือออก เพื่อให้เป็นช่องทางเปิดออกของเซลล์ แล้ววางบนจานแก้วปลอดเชื้อ โดยเตรียมตัวอย่างภายในตู้ปลอดเชื้อ
3. ใช้แผ่นสไลด์ปลอดเชื้อขูดตามแนวยาวของท่อหน้าไขสุกร จากส่วนอิสทมัส (isthmus) ไปยังส่วนฟิมเบรีย (fimbria) จะได้เซลล์เป็นของเหลวสีเหลืองข้นไหลออกจากท่อหน้าไข
4. จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ล้างด้วยน้ำเกลือผสมยาปฏิชีวนะ 5-7 ครั้ง
5. ดูดของเหลวด้านบนทิ้ง
6. เจือจางเซลล์ด้วยอาหารเพาะเลี้ยง M199 เสริมด้วย 10% HTFBS
7. นับจำนวนเซลล์เป็นเซลล์ตายก่อนการเพาะเลี้ยง โดยการย้อมสี 0.4% trypan blue ในอัตราส่วน 1:1 นับเซลล์ด้วย haemocytometer
8. เพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวท่อหน้าไขลงในจานเพาะเลี้ยงแบบหลุม 96 หลุม จำนวน 2×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร
9. เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง ภายในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เสริมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่ความชื้นสูง

2.4 การเตรียมและคัดแยกเซลล์แกรนูโลไซตัส

1. เตรียมเซลล์แกรนูโลไซตัสแบบปลอดเชื้อโดย นำรังไข่มาล้างด้วยน้ำเกลือที่ผสมยาปฏิชีวนะ 3 ชนิดคือ Penicillin-G 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร Streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Amphoterracin-B 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อทำความสะอาดรังไข่
2. ซับตัวอย่างให้แห้งด้วยผ้าก๊อซปลอดเชื้อ จากนั้นทำการตัดแยกรังไข่ออกจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและท่อหน้าไข โดยเตรียมตัวอย่างภายในตู้ปลอดเชื้อ
3. ใช้กระบอกฉีดยาต่อกับเข็มฉีดยาเบอร์ 18 เจาะถุงไข่ โดยจำแนกถุงไข่ตามขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มคือถุงไข่ขนาดเล็ก ถุงไข่ขนาดกลางและถุงไข่ขนาดใหญ่

4. เมื่อเจาะถุงไข่แล้วจะได้น้ำและเซลล์แกรนูโลซาซึ่งอยู่ในถุงไข่ นำไปปั่นเหวี่ยง เพื่อแยกเซลล์ให้ตกตะกอนออกจากสารหลังจากถุงไข่

5. สารละลายด้านบนคือสารหลังจากถุงไข่สุกร ทำการดูสารละลายด้านบนเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

6. ล้างเซลล์แกรนูโลซาที่ตกตะกอนอยู่ด้านล่างด้วยน้ำเกลือผสมยาปฏิชีวนะ 5-7 ครั้ง ในการศึกษาครั้งนี้ทำการศึกษาเซลล์แกรนูโลซาจากถุงไข่ขนาดกลาง

7. ดูดสารละลายด้านบนทิ้ง

8. เจือจางเซลล์ด้วยอาหารเพาะเลี้ยง M199 เสริมด้วย 10% HTFBS

9. นับจำนวนเซลล์ก่อนการเพาะเลี้ยง โดยการย้อมสี 0.4% trypan blue ในอัตราส่วน 1:1 นับเซลล์ด้วย haemocytometer

10. เพาะเลี้ยงเซลล์บิวทอน่าไข่ลงในจานเพาะเลี้ยงแบบหลุม 96 หลุม จำนวน 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

11. เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ภายในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เสริมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่ความชื้นสูง

3. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิจากระบบสืบพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงแบบระยะสั้น (short-term culture)

1. เพาะเลี้ยงเซลล์บิวทอน่าไข่สุกรที่ความหนาแน่นของเซลล์ 2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเซลล์แกรนูโลซาสุกรที่ความหนาแน่นของเซลล์ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายในจานเพาะเลี้ยงพลาสติกขนาด 21.5 ตารางเซนติเมตร

2. ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ

4. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิจากระบบสืบพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงแบบระยะยาว (long-term culture)

1. เพาะเลี้ยงเซลล์บิวทอน่าไข่สุกรที่ความหนาแน่นของเซลล์ 2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเซลล์แกรนูโลซาสุกรที่ความหนาแน่นของเซลล์ 1×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายในจานเพาะเลี้ยงพลาสติก ขนาด 21.5 ตารางเซนติเมตร

2. ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ

3. และทำการเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงใหม่ทุก 48 ชั่วโมง

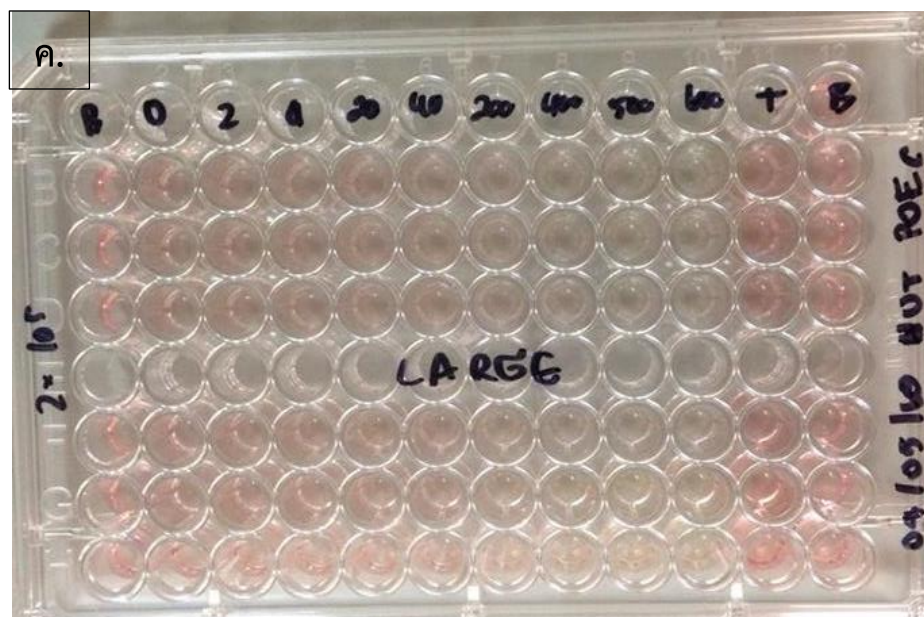
5. ออกแบบการทดลอง

ตารางที่ 4 แสดงการออกแบบการทดลอง

กลุ่มทดลอง	จำนวนเซลล์ต่อหลุม (ในจานเพาะเลี้ยงแบบหลุม 96 หลุม)		อาหารเพาะเลี้ยงและสารที่ใช้เสริม	
	เซลล์บิว ท่อนำไข่	เซลล์แกรนู- โลซา	เซลล์บิวท่อนำไข่	เซลล์แกรนูโลซา
กลุ่มควบคุม (control)	2×10^5 เซลล์ ต่อมิลลิลิตร	1×10^5 เซลล์ ต่อมิลลิลิตร	อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ M199 ไม่เสริมสารใด	อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ M199 เสริมด้วยฮอร์โมน E ₂ , FSH, LH
กลุ่มควบคุม เชิงบวก (positive control)	2×10^5 เซลล์ ต่อมิลลิลิตร	1×10^5 เซลล์ ต่อมิลลิลิตร	อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ M199 เสริมด้วย 10% HTFBS	อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ M199 เสริมด้วย 10% HTFBS และฮอร์โมน E ₂ , FSH, LH
กลุ่มทดสอบ (test group)	2×10^5 เซลล์ ต่อมิลลิลิตร	1×10^5 เซลล์ ต่อมิลลิลิตร	อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ M199 ไม่เสริม HTFBS แต่เสริมด้วยสารหลัง จากถุงไข่สุกรขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาด ใหญ่ที่ความเข้มข้น 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500, 600 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 8)	อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ M199 เสริมด้วยฮอร์โมน E ₂ , FSH, LH แต่ไม่เสริม HTFBS แต่เสริมด้วยสาร หลังจากถุงไข่สุกรขนาด เล็ก ขนาดกลางและ ขนาดใหญ่ที่ความเข้มข้น 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500, 600 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร (ภาพที่ 8)

หมายเหตุ กลุ่มทดสอบ (test group) เพื่อหาความเข้มข้นของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาด
ต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์ (optimum concentration)





ภาพที่ 8 แสดงการทดสอบผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดเล็ก (ก.) ขนาดกลาง (ข.) และขนาดใหญ่ (ค.) ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรที่เพาะเลี้ยงในงานเพาะเลี้ยงแบบหลุม 96 หลุม ในแถวที่ 1 และแถวที่ 12 คือหลุม blank แถวที่ 2 คือความเข้มข้นโปรตีนจากสารหลังจากถุงไข่สุกรในกลุ่มควบคุม แถวที่ 3 คือความเข้มข้นโปรตีนจากสารหลังจากถุงไข่สุกรที่ 2 ไมโครกรัม แถวที่ 4 คือความเข้มข้นโปรตีนจากสารหลังจากถุงไข่สุกรที่ 4 ไมโครกรัม แถวที่ 5 คือความเข้มข้นโปรตีนจากสารหลังจากถุงไข่สุกรที่ 20 ไมโครกรัม แถวที่ 6 คือความเข้มข้นโปรตีนจากสารหลังจากถุงไข่สุกรที่ 40 ไมโครกรัม แถวที่ 7 คือความเข้มข้นโปรตีนจากสารหลังจากถุงไข่สุกรที่ 200 ไมโครกรัม แถวที่ 8 คือความเข้มข้นโปรตีนจากสารหลังจากถุงไข่สุกรที่ 400 ไมโครกรัม แถวที่ 9 คือความเข้มข้นโปรตีนจากสารหลังจากถุงไข่สุกรที่ 500 ไมโครกรัม แถวที่ 10 คือความเข้มข้นโปรตีนจากสารหลังจากถุงไข่สุกรที่ 600 ไมโครกรัม และแถวที่ 11 คือความเข้มข้นโปรตีนจากสารหลังจากถุงไข่สุกรในกลุ่มควบคุมเชิงบวก

6. การเตรียมตัวอย่างสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดเล็ก ขนาดกลาง และขนาดใหญ่

1. เก็บตัวอย่างรังไข่สุกรแบบปลอดเชื้อจากโรงฆ่าสัตว์ จังหวัดนครปฐม จากซากสุกรที่ถูกชำแหละไม่เกิน 30 นาที โดยเก็บตัวอย่างรังไข่สุกรทั้งในระยะ follicular phase และระยะ luteal phase และสามารถแบ่งถุงไข่ออกได้เป็น 3 กลุ่มตามขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางคือ ถุงไข่ขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3 มิลลิเมตร) ถุงไข่ขนาดกลาง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 4-6 มิลลิเมตร) และถุงไข่ขนาดใหญ่ (เส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 7 มิลลิเมตร) ตามลำดับ โดยเก็บตัวอย่างในกล่องควบคุมอุณหภูมิที่ 30-35 องศาเซลเซียส

2. นำรังไข่มาล้างด้วยน้ำเกลือที่ผสมยาปฏิชีวนะ 3 ชนิดคือ Penicillin-G 100 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร Streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Amphoterracin-B 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อทำความสะอาด ซับตัวอย่างให้แห้งด้วยผ้าก๊อชปลอดเชื้อ จากนั้นทำการตัดแยกรังไข่ออกจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและท่อไข่ โดยเตรียมตัวอย่างภายในตู้ปลอดเชื้อ

3. ใช้กระบอกฉีดยาต่อกับเข็มฉีดยาเบอร์ 18 เจาะถุงไข่ โดยจำแนกถุงไข่ตามขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มคือถุงไข่ขนาดเล็ก ถุงไข่ขนาดกลางและถุงไข่ขนาดใหญ่ และเจาะสารหลังจากถุงไข่โดยใช้กระบอกฉีดยาและเข็มเจาะแยกกันตามกลุ่มขนาดของถุงไข่

4. เมื่อเจาะถุงไข่แล้วจะได้น้ำและเซลล์แกรนูโลซาซึ่งอยู่ในถุงไข่ นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ให้ตกตะกอนออกจากสารหลังจากถุงไข่เป็นเวลา 2-3 นาที

5. สารละลายด้านบน (supernatant) คือสารหลังจากถุงไข่สุกร ทำการดูดสารละลายด้านบนเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการศึกษาต่อไป

6. เมื่อต้องการนำสารหลังจากถุงไข่สุกรมาใช้ ต้องทำการละลายน้ำแข็ง (thawed) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 3-5 นาที หรือสารหลังจากถุงไข่ละลายรวมกันเป็นเนื้อเดียว

7. การศึกษาโปรตีนของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดต่างๆ ด้วยวิธี SDS-PAGE

ที่มา: Lowry, Rosebrough, Farr, and Randall (1951)

หลักการการวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry

วิธีของ Lowry เป็นวิธีที่สามารถวัดปริมาณโปรตีนได้ที่ระดับความเข้มข้นน้อยๆ จนถึง 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สีที่เกิดขึ้นอาศัยปฏิกิริยา 2 ชนิด คือ Biuret reaction และ Reduction ของกรดอะมิโน Tyrosine และ Tryptophan ด้วย Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งมีส่วนผสมของ Phosphomolybdate-phosphotungstate ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จะเกิดสีน้ำเงินเข้ม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 750 นาโนเมตร หากมีปริมาณโปรตีนมากกว่า 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สีที่ได้จะเข้มมากเกินไป จึงจำเป็นต้องเจือจางสารละลายตัวอย่างก่อน เมื่อนำค่าที่ได้เทียบกับกราฟหรือ Calibration curve ก็จะได้ทราบค่าความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายได้ มีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

1. เตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA และเจือจางสำหรับการทำกราฟมาตรฐาน (Standard curve) (ตามตารางในภาคผนวก)

2. เติมน้ำสารละลายผสม A (Na_2CO_3) สาร B ($\text{CuSO}_4 \cdot 5(\text{H}_2\text{O})$) และสาร C (Na tartrate $\cdot 2(\text{H}_2\text{O})$) ลงในหลอดทดลองทั้งหมดที่เตรียมไว้ หลอดละ 3 มิลลิลิตร
3. นำสารละลายผสมไปปั่น (vortex) เพื่อให้เป็นเนื้อเดียวกัน
4. ตั้งสารละลายทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
5. เติมน้ำ Folin phenol reagent (เตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อใช้งาน) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอดทดลอง
6. นำสารละลายผสมไปปั่น (vortex) เพื่อให้เป็นเนื้อเดียวกัน
7. ตั้งสารละลายทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เกิดสี
8. เมื่อครบเวลาให้นำหลอด Blank ไปปรับศูนย์ (0) และวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (nm) ในแต่ละหลอด ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
9. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ นำมาเขียนกราฟมาตรฐาน โดยสารละลายตัวอย่างให้บันทึกค่าที่ได้ แล้วนำมาเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณหาปริมาณโปรตีนตัวอย่าง
10. เมื่อทราบปริมาณโปรตีนแล้ว ทำการศึกษาต่อด้วยวิธี SDS-PAGE ด้วยกระบวนการอิเล็กโตรโฟรีซิส (Run-gel electrophoresis)

8. การศึกษาเปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาของเซลล์เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิจากระบบสืบพันธุ์ ภายหลังการถูกทดสอบด้วยสารหลังจากถูกไข่สุกรขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่ที่ความเข้มข้นต่างๆ

1. เพาะเลี้ยงเซลล์บิวทอ์นำไข่และเซลล์แกรนูโลซาสุกรตามข้อมูลข้างต้น ภายในจานเพาะเลี้ยงแบบหลุม 96 หลุม
2. ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ทุก 24 ชั่วโมง ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ
3. เมื่อครบเวลาการเพาะเลี้ยง ทำการทดสอบสารหลังจากถูกไข่สุกรขนาดเล็ก ขนาดกลาง และขนาดใหญ่ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500, 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คำนวณความเข้มข้นของสารหลังจากถูกไข่สุกรด้วยสูตร (วิธีการคำนวณอยู่ในภาคผนวก)

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

หมายเหตุ C_1 คือ ความเข้มข้นตั้งต้นของสารหลังจากถูกไข่

C_2 คือ ความเข้มข้นของสารหลังจากถูกไข่ที่ต้องการ

V_1 คือ ปริมาตรของสารละลายที่เตรียม

V_2 คือ ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

4. ทำวิธี MTT assay มีขั้นตอนดังนี้

4.1 เมื่อครบเวลาการทดสอบสารหลังจากถูกใส่กับเซลล์บิวทิวที่นำไปสู่กร ดูอาหารเพาะเลี้ยงที่เสริมด้วยสารหลังจากถูกใส่ทั้ง

4.2 ล้างเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง ครั้งละ 200 ไมโครลิตร

4.3 เติมสาร MTT หรือ tetrazolium หลุมทดลองละ 50 ไมโครลิตร จะมีสีเหลือง ขั้นตอนนี้ต้องทำในที่มืด

4.4 บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

4.5 เมื่อครบเวลา ดูดสารเคมีทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง ครั้งละ 200 ไมโครลิตร

4.6 เติมสารละลาย DMSO เพื่อละลาย formazan จากเซลล์ จะเกิดเป็นสีม่วง

4.7 นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

4.8 คำนวณเปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาของเซลล์

$$\%viability = \frac{\text{Test} - \text{Blank}}{\text{Reference} - \text{Blank}} \times 100$$

หมายเหตุ Blank คือ ค่าการดูดกลืนแสงในกลุ่มที่ไม่มีการเพาะเลี้ยงเซลล์

Reference คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงภายในอาหารเพาะเลี้ยงเพียงอย่างเดียว (control)

Test คือ ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ถูกทดสอบด้วยสารหลังจากถูกใส่สู่กรที่ความเข้มข้นขนาดต่างๆ

สามารถทดสอบผลของการเจริญพัฒนาของเซลล์ได้โดยเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยตั้งให้ผลของกลุ่มควบคุมเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ หากผลการทดสอบมากกว่า 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าเซลล์มีการเจริญพัฒนาเพิ่มมากขึ้น แต่ในทางตรงข้ามหากผลการทดสอบได้ผลน้อยกว่า 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าเซลล์มีการเจริญพัฒนาลดลง

บทที่ 4

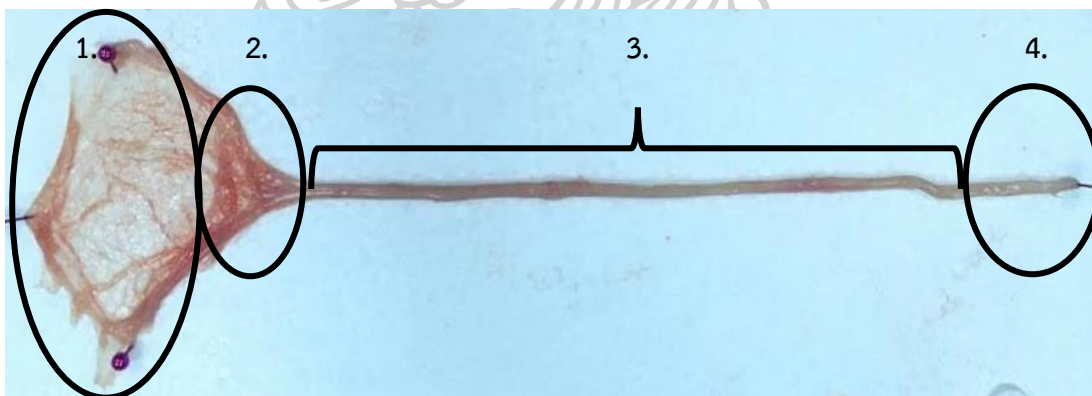
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษาผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดเล็ก ขนาดกลาง และขนาดใหญ่ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิของเซลล์บุผิวท่อนำไข่ (oviductal epithelial cells) และเซลล์แกรนูโลซา (granulosa cells)

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์บุผิวท่อนำไข่และเซลล์แกรนูโลซา

1.1 เซลล์บุผิวท่อนำไข่

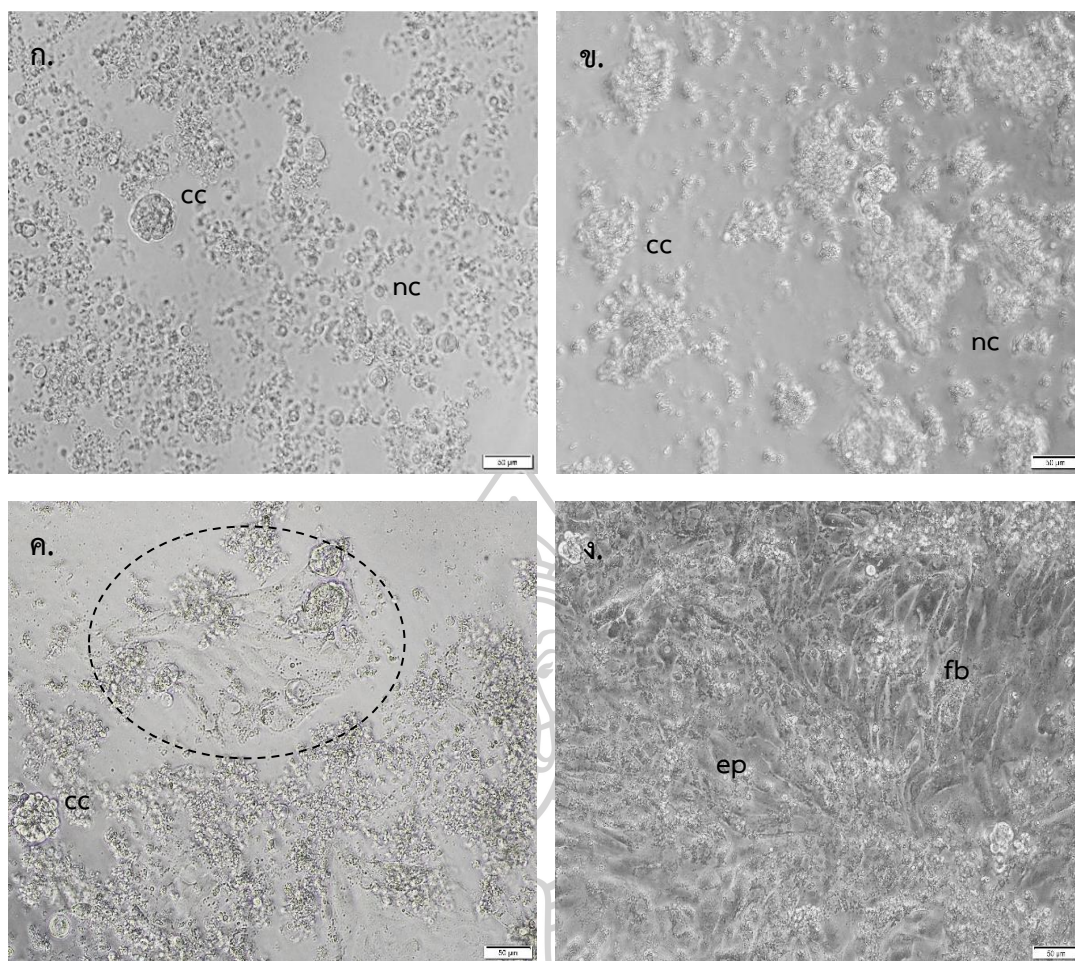
เซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรเป็นเซลล์ที่มีหน้าที่ในระบบสืบพันธุ์สุกร เป็นเซลล์ที่บุอยู่โดยรอบท่อนำไข่สุกร (oviduct) ในการศึกษาเก็บตัวอย่างท่อนำไข่สุกรแบบปลอดเชื้อจากโรงฆ่าสัตว์ ณ จังหวัดนครปฐม ท่อนำไข่มีลักษณะเป็นท่อต่อจากรังไข่ไปยังมดลูก ท่อนำไข่สุกรสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ส่วน ได้แก่ 1. อิสมัท (isthmus) 2. แอมพูลลา (ampulla) 3. ฟิมเบรีย (fimbriae) 4. อินฟันดิบูลัม (infundibulum) ดังภาพ 9



ภาพที่ 9 แสดงท่อนำไข่สุกรที่ได้จากการเก็บตัวอย่างจากโรงฆ่าสัตว์ ท่อนำไข่สุกรมีลักษณะเป็นท่อยาวสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ส่วน ได้แก่ 1. อิสมัท (isthmus) 2. แอมพูลลา (ampulla) 3. ฟิมเบรีย (fimbriae) 4. อินฟันดิบูลัม (infundibulum)

การศึกษานี้เก็บตัวอย่างจากท่อนำไข่สุกรในระยะ luteal phase ซึ่งระยะนี้เซลล์บุผิวท่อนำไข่มีความพร้อมในการรองรับเซลล์ไข่ที่ตก (ovulation) พบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวท่อนำไข่ในระยะสั้น (short-term culture) เป็นระยะเวลา 0-96 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ที่ได้จากการขูดท่อนำไข่สุกรหรือ

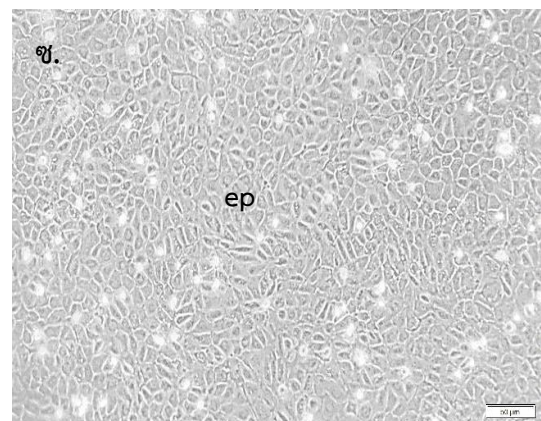
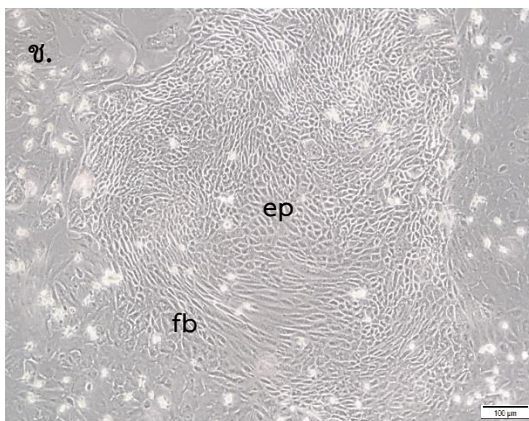
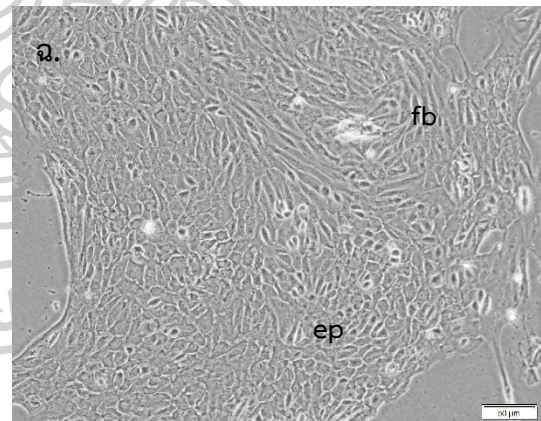
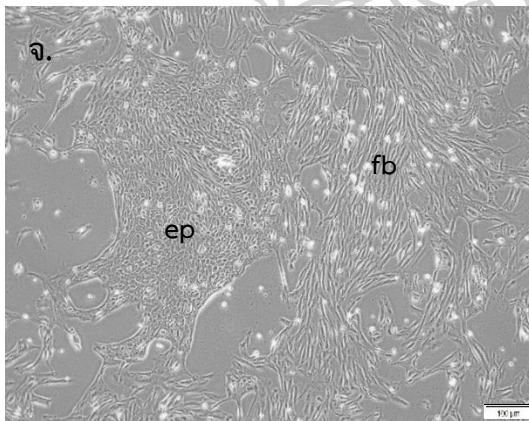
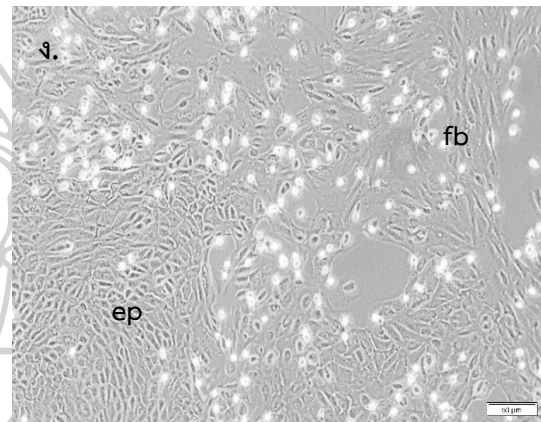
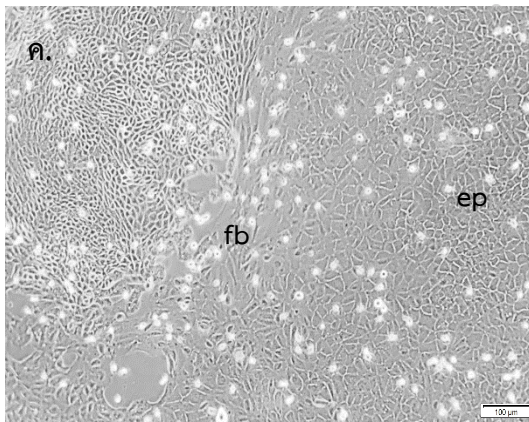
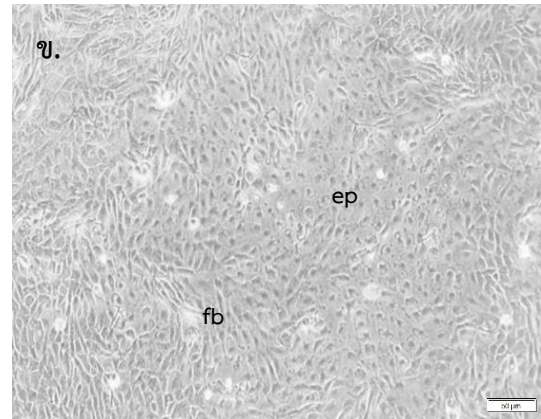
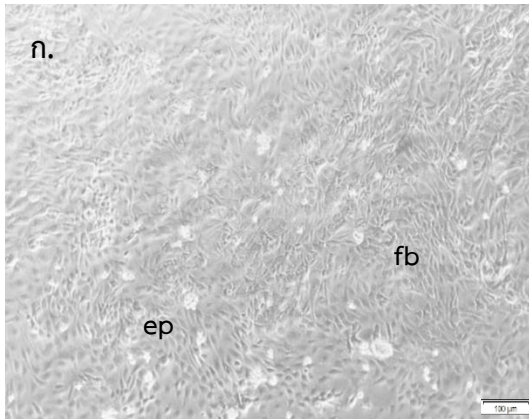
ที่เวลา 0 ชั่วโมง พบกลุ่มเซลล์ของทั้งเซลล์รูปทรงกระบอกที่มีซีเลีย (columnar ciliated cells; cc) ยังมีการขับเคลื่อนไหวได้อยู่เนื่องจากซีเลียที่อยู่ด้านบนของเซลล์มีการพัดโบกทำให้เซลล์เคลื่อนที่ได้ และพบเซลล์รูปร่างกลมที่ไม่มีซีเลีย (non-ciliated cells; nc) เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS, 2.2 mg/mL, NaHCO₃, 0.25 mM pyruvate, 50 µg/mL gentamycin sulfate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 21.5 ตารางเซนติเมตร พบเซลล์มีลักษณะรูปร่างกลม เป็นเซลล์แขวนลอยอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง โดยพบทั้งเซลล์ที่จับตัวเป็นกลุ่มและเซลล์เดี่ยว พบทั้งเซลล์รูปทรงกระบอกที่มีซีเลีย ยังมีการเคลื่อนไหวได้อยู่เนื่องจากซีเลียที่อยู่ด้านบนของเซลล์มีการพัดโบกทำให้เซลล์เคลื่อนที่ได้ และพบเซลล์รูปร่างกลมที่ไม่มีซีเลีย (ภาพที่ 10) ที่เวลา 48 ชั่วโมง พบเซลล์รูปร่างกลมที่ไม่มีซีเลีย และเซลล์รูปทรงกระบอกที่มีซีเลีย พบทั้งเซลล์ที่รวมตัวเป็นกลุ่มและเซลล์เดี่ยว (ภาพที่ 10) เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์นาน 72 ชั่วโมง พบว่าเซลล์บุผิวที่นำไขสุกรบางส่วนเริ่มยึดเกาะกับพื้นผิวของจานเพาะเลี้ยงประมาณ 30-50 เปอร์เซ็นต์ ของประชากรเซลล์ แสดงรูปร่างหัวแหลมท้ายแหลม (fibroblast-like cells) นอกจากนี้ยังพบเซลล์รูปร่างกลมที่ไม่มีซีเลียที่ไม่ยึดเกาะพื้นผิวลอยอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง และพบเซลล์รูปทรงกระบอกที่มีซีเลียรวมตัวเป็นกลุ่มเซลล์เคลื่อนที่ อยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 10) ต่อมาเพาะเลี้ยงเซลล์นาน 96 ชั่วโมง พบเซลล์ยึดเกาะที่พื้นผิว จานเพาะเลี้ยงเพิ่มมากขึ้นประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ ประชากรของเซลล์มีรูปร่างหัวแหลมท้ายแหลม กลางเซลล์พองออกลักษณะคล้ายรูปกระสวย (fibroblast-like morphology; fb) เป็นส่วนมากประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ และพบเซลล์ที่มีรูปร่างหลายเหลี่ยมเพียงส่วนน้อย (epithelial-like morphology; ep) ประมาณ 10-20 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้พบกลุ่มเซลล์รูปทรงกระบอกที่มีซีเลียเคลื่อนที่ในอาหารเพาะเลี้ยงประมาณ 5-10 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 10) ที่เวลาการเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิว-ที่นำไขสุกรนาน 96 ชั่วโมงนี้สามารถนำเซลล์ที่ได้ไปศึกษาต่อเพื่อทดสอบผลของสารหลังจากถูกไขสุกรได้

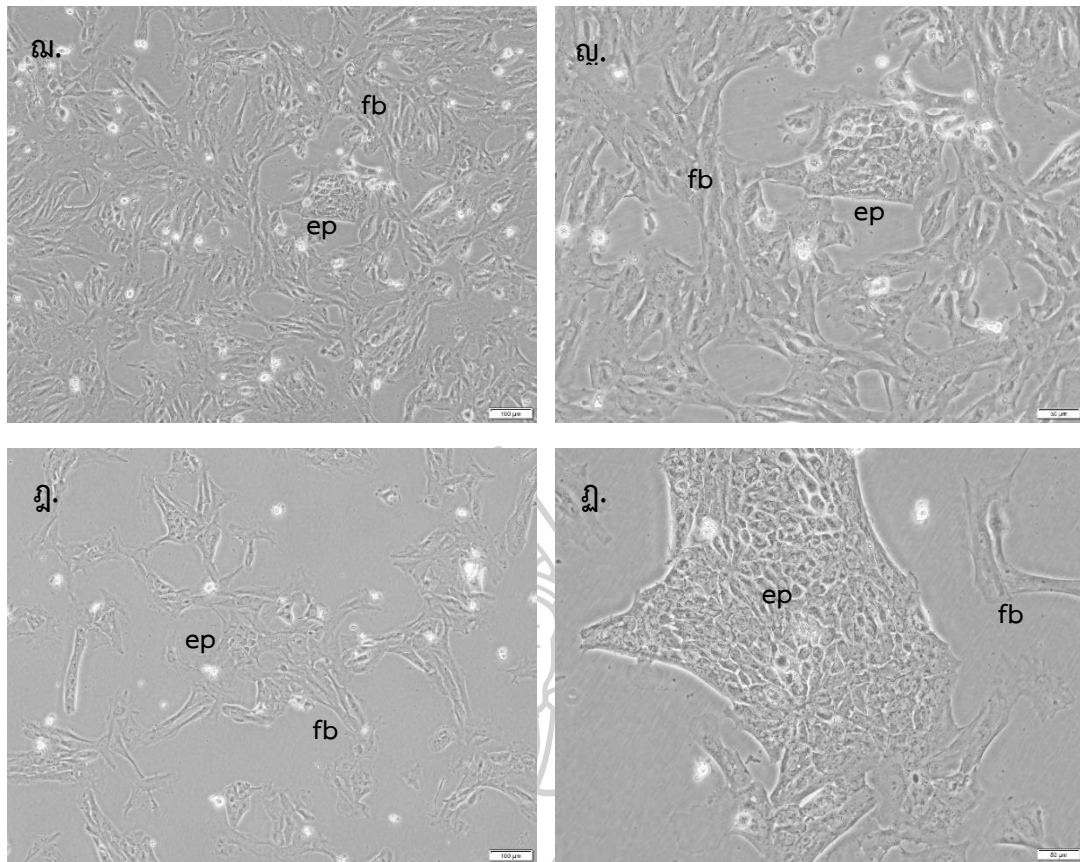


ภาพที่ 10 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดงเซลล์บุผิวที่นำไขสุกรเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง ก. พบเซลล์รูปทรงกระบอกที่มีซีเลีย (cc) เคลื่อนที่ในอาหารเพาะเลี้ยงได้และเซลล์รูปร่างกลมไม่มีซีเลีย (nc) พบเป็นเซลล์เดี่ยวและกลุ่ม เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง ข. พบเซลล์รูปทรงกระบอกที่มีซีเลียสามารถเคลื่อนที่ได้และเซลล์รูปร่างกลมไม่มีซีเลีย พบทั้งเซลล์เดี่ยวและกลุ่มเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง ค. พบเซลล์บางส่วนเริ่มยึดเกาะกับพื้นผิวของจานเพาะเลี้ยง (ในบริเวณวงกลม) และกลุ่มเซลล์รูปทรงกระบอกที่มีซีเลียสามารถเคลื่อนที่ในอาหารเพาะเลี้ยงได้ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 72 ชั่วโมง ง. เซลล์ยึดเกาะที่พื้นผิวจานเพาะเลี้ยงเพิ่มมากขึ้นประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ แสดงรูปร่าง 2 แบบคือ รูปร่างหัวแหลมท้ายแหลม (fb) และเซลล์ที่มีรูปร่างหลายเหลี่ยม (ep) เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 96 ชั่วโมง (แสดงภาพที่กำลังขยาย 200 เท่า)

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์บุผิวที่นำไขสุกรที่เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิในระยะยาว (long-term culture) คือการเพาะเลี้ยงแบบระยะยาวนานนับตั้งแต่วันที่ 96 ชั่วโมงเป็นต้นไป ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 21.5 ตารางเซนติเมตร เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบชั้นเดียว (monolayer) โดย

เซลล์ที่ตายแล้วจะมีหลุดลอยอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบระยะยาวนี้เปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 48 ชั่วโมง โดยศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงและสิ่งแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง เซลล์นี้สามารถคงการมีชีวิตของเซลล์ในระยะเวลานาน เซลล์ที่เพาะเลี้ยงแบบระยะยาวสามารถนำไปเพาะเลี้ยงต่อเพื่อพัฒนาต่อเป็นเซลล์ไลน์ได้ ผลการศึกษาพบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์บัพิวท่อนำไข่อสุกรที่เพาะเลี้ยงนาน 1 สัปดาห์ เซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้นจากการเพาะเลี้ยงเริ่มต้น เซลล์มีรูปร่างแหลมหัวแหลมท้ายหรือกระสวยประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ และพบเซลล์ที่มีลักษณะรูปร่างแบนหลายเหลี่ยมประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ ต่อมาที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์ เซลล์รูปร่างแหลมหัวแหลมท้ายหรือกระสวยพบประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์ลักษณะหลายเหลี่ยมพบประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ พบเซลล์มีลักษณะแบนหัวแหลมท้ายแหลมสานกันเป็นร่างแหแบบ ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และมีรูปร่างหลายเหลี่ยมประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ เช่นกัน เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ พบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์มีรูปร่างหลายเหลี่ยมประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ ของทั้งหมด และรูปร่างแบนหัวแหลมท้ายยึดเกาะผิวจานเพาะเลี้ยงประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่าเซลล์มีการยึดยาวมากกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์ โดยเซลล์ทั้งหมดสานกันเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีรูปร่างหลายเหลี่ยมจะอยู่ตรงกลางล้อมด้วยเซลล์รูปร่างหัวแหลมท้ายแหลม เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 5 สัปดาห์ และ 6 สัปดาห์ พบเซลล์รูปร่างหลายเหลี่ยมเป็นส่วนมากของประชากรเซลล์ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ โดยเซลล์รูปร่างหัวแหลมท้ายแหลมจะสานกันเป็นกลุ่มและพบเซลล์รูปร่างหลายเหลี่ยมอยู่ตรงกลางเช่นเดียวกับผลการศึกษาในสัปดาห์ที่ 4 ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์พบว่าเซลล์ยังสามารถคงลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ต่อไป



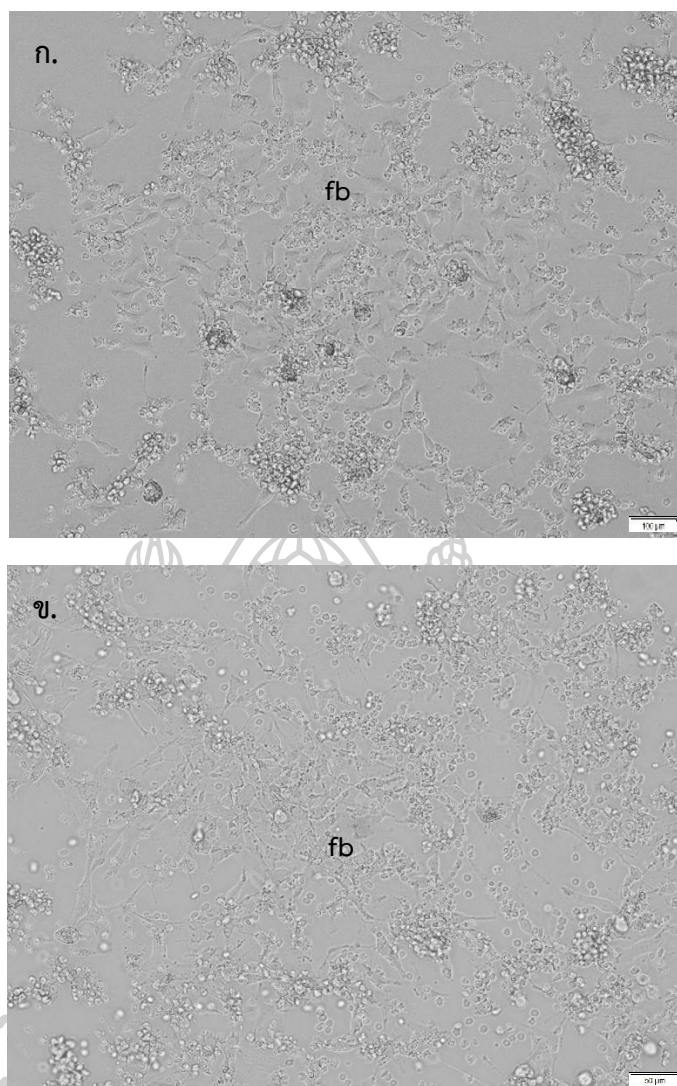


ภาพที่ 11 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดงเซลล์บุผิวที่นำไขสุกรเพาะเลี้ยงแบบระยะยาว พบเซลล์ 2 ลักษณะคือ รูปร่างหลายเหลี่ยม (ep) และรูปร่างหัวแหลมท้ายแหลม (fb) ก. และ ข. พบเซลล์มีรูปร่างแหลมหัวแหลมท้ายประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ และพบเซลล์ที่มีลักษณะรูปร่างแบบหลายเหลี่ยมประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 1 สัปดาห์ ค. และ ง. เซลล์มีรูปร่างแหลมหัวแหลมท้ายประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์ที่มีลักษณะรูปร่างแบบหลายเหลี่ยมประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 2 สัปดาห์ จ. และ ฉ. เซลล์มีรูปร่างแหลมหัวแหลมท้ายประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์ที่มีลักษณะรูปร่างแบบหลายเหลี่ยมประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์ ช. และ ซ. แสดงเซลล์เพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ ฉ. และ ญ. แสดงเซลล์เพาะเลี้ยงนาน 5 สัปดาห์ ฎ. และ ฏ. แสดงเซลล์เพาะเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์ เซลล์มีรูปร่างแหลมหัวแหลมท้ายประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์ที่มีลักษณะรูปร่างแบบหลายเหลี่ยมประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ โดยเซลล์รูปร่างหัวแหลมท้ายแหลมจะสานกันเป็นกลุ่มล้อมอยู่โดยรอบและพบเซลล์รูปร่างหลายเหลี่ยมอยู่ตรงกลาง (ภาพ ก. ค. จ. ช. ฉ. และ ฎ. แสดงภาพที่กำลังขยาย 100 เท่า และภาพ ข. ง. ฉ. ญ. และ ฏ. แสดงภาพที่กำลังขยาย 200 เท่า)

1.2 เซลล์แกรนูโลซา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์แกรนูโลซาสุกร ที่เพาะเลี้ยงแบบระยะสั้นโดยเก็บตัวอย่างเซลล์แกรนูโลซาจากถุงไข่ขนาดกลาง ที่เวลาเพาะเลี้ยง 0 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีรูปร่างกลมลอยอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงไม่ยึดเกาะพื้นผิว ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแกรนูโลซาเซลล์ที่เพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง ในอาหารสูตร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS, 15 $\mu\text{g/mL}$ FSH, 1 $\mu\text{g/mL}$ LH, 1 $\mu\text{g/mL}$ estradiol 2.2 mg/mL , NaHCO_3 , 0.25 mM pyruvate, 50 $\mu\text{g/mL}$ gentamycin sulfate พบเซลล์เริ่มยึดเกาะพื้นผิวและยึดยาวออก มีรูปร่างหัวแหลมท้ายแหลมและมีแฉกคล้ายดาวประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และยังพบเซลล์รูปร่างกลมที่ไม่ยึดเกาะพื้นผิวเป็นเซลล์แขวนลอยในอาหารเพาะเลี้ยงอยู่ ที่เวลา 48 ชั่วโมง พบเซลล์ยึดเกาะที่พื้นผิวจานเพาะเลี้ยงประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ โดยมีรูปร่างแหลมหัวแหลมท้ายและรูปร่างดาวแบบหลายแฉกมากขึ้น ซึ่งพบทั้งเซลล์เดี่ยวและเซลล์ที่เกาะกลุ่มรวมกันสานกันเป็นร่างแหกระจายทั่วจานเพาะเลี้ยง จึงนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมงนี้ไปทดสอบเพื่อศึกษาผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรต่อการมีชีวิตของเซลล์ได้ ดังภาพที่ 12

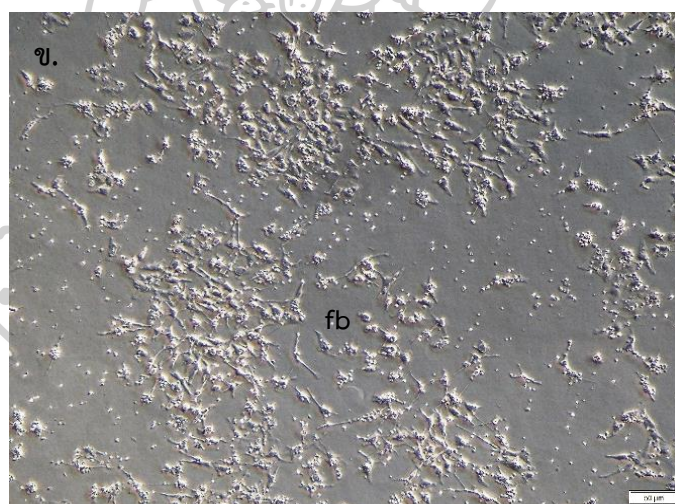
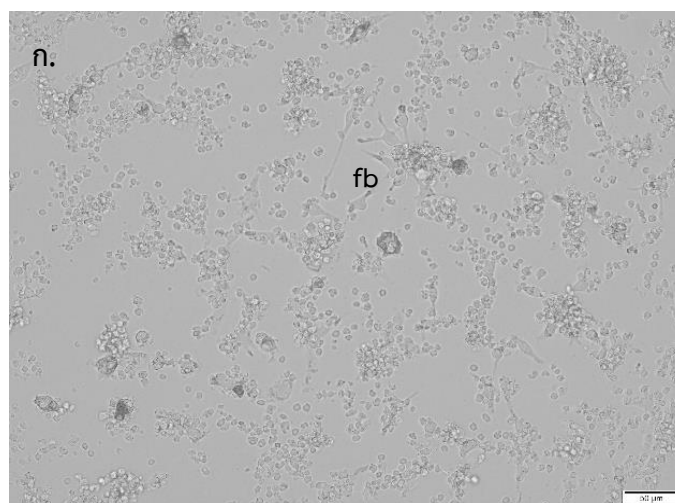




ภาพที่ 12 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดงเซลล์แกรนูโลซาสุกรที่เพาะเลี้ยงในอาหารเสริมด้วยฮอร์โมน (FSH, LH และ estradiol) ก. เซลล์รูปร่างหัวแหลมท้ายแหลมและมีแฉกคล้ายดาว (แทนด้วย fb) ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง ข. เซลล์การยึดเกาะที่พื้นผิวจานเพาะเลี้ยงประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ โดยมีรูปร่างแหลมหัวแหลมท้ายและรูปร่างดาวแบบหลายแฉกมากขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง

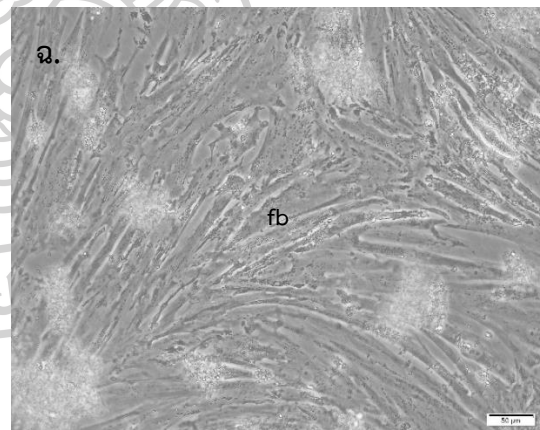
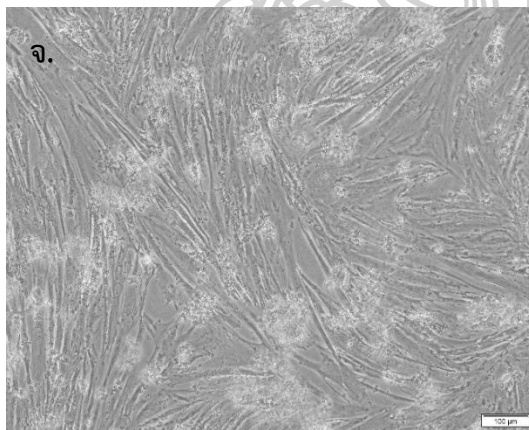
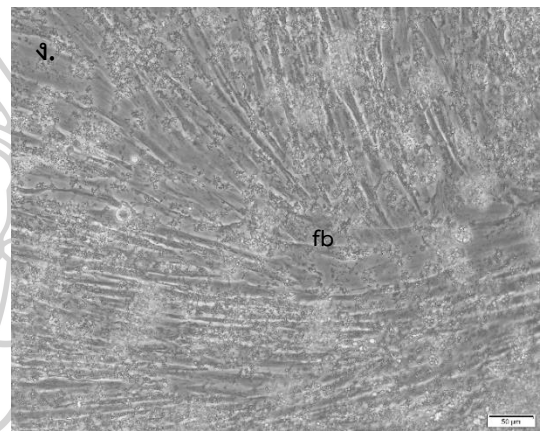
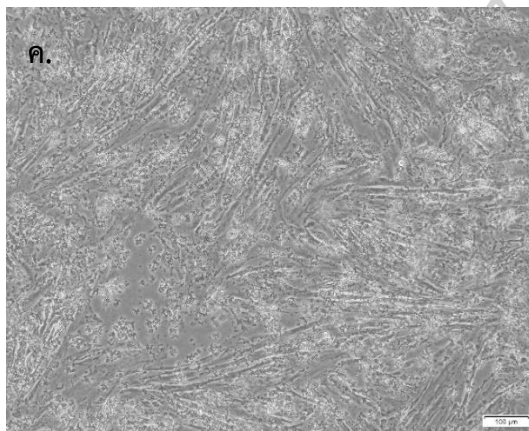
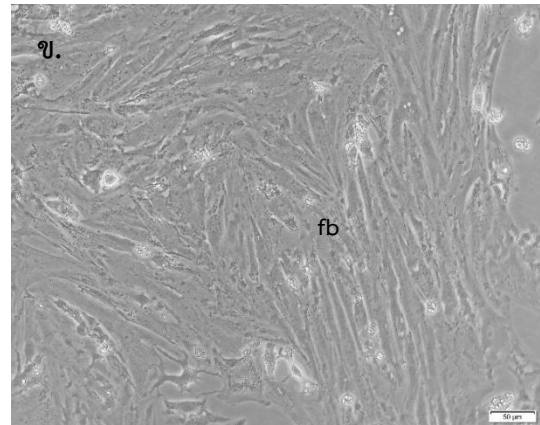
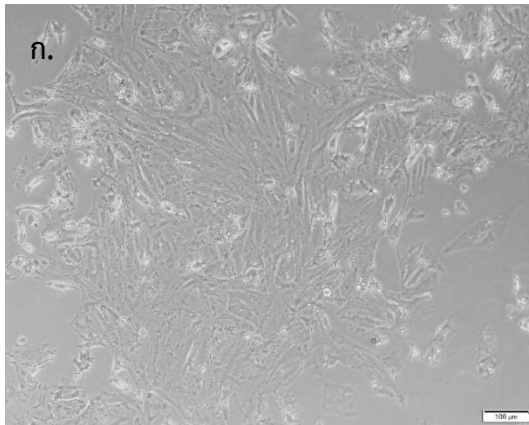
นอกจากนี้ได้ศึกษาเซลล์แกรนูโลซาสุกรที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เสริมฮอร์โมน (FSH, LH และ estradiol) พบว่าเซลล์เริ่มยึดเกาะที่พื้นผิวจานเพาะเลี้ยงที่ 24 ชั่วโมง พบเซลล์รูปร่างหัวแหลมท้ายแหลมแบบกระสวยกระจายทั่วจานเพาะเลี้ยง ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ และพบเซลล์กลมไม่ยึดเกาะพื้นผิว 60 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 48 ชั่วโมง พบเซลล์รูปร่างหัวแหลมท้ายแหลมและรูปร่างดาวหลาย

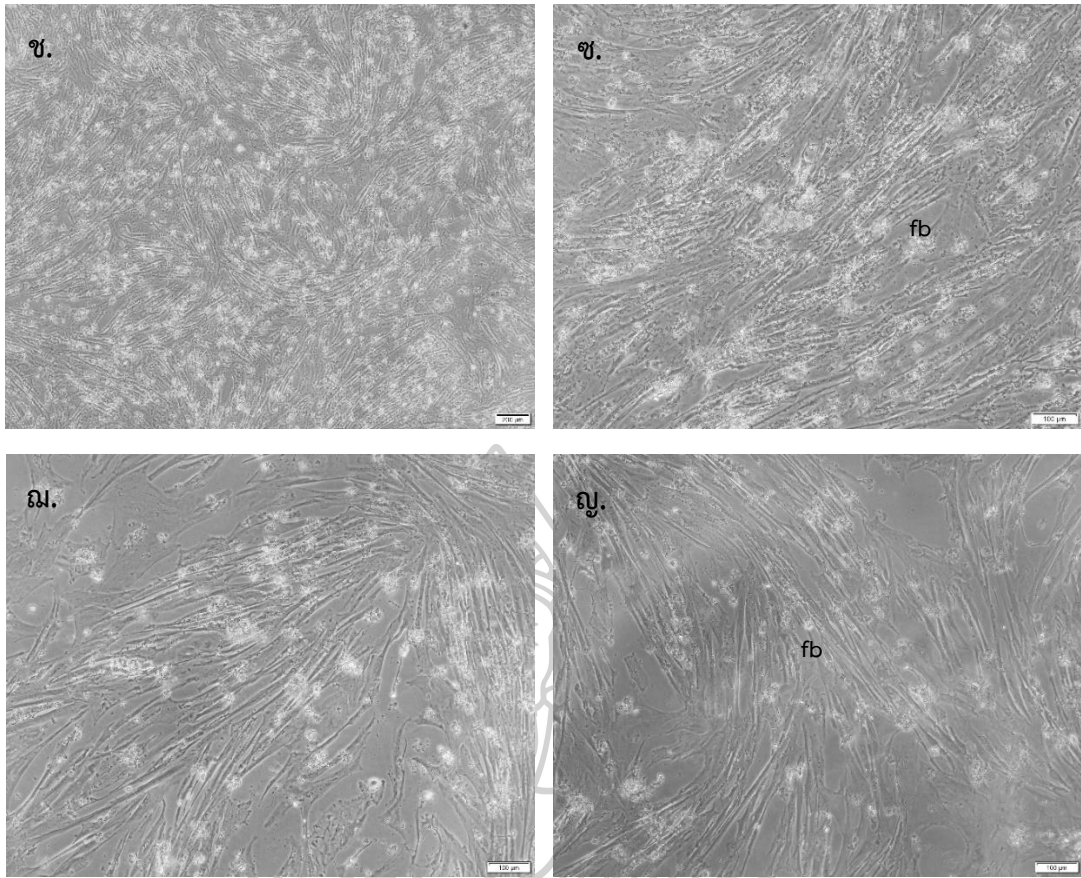
แฉกโดยเซลล์มีการเชื่อมต่อกันยึดเกาะพื้นผิวจานเพาะเลี้ยง ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ พบทั้งที่เกาะกลุ่มรวมกันและเป็นเซลล์เดี่ยว และเซลล์รูปร่างกลมไม่ยึดเกาะพื้นผิวประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์มีความคล้ายคลึงกับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เสริมฮอร์โมน แต่มีการเจริญของเซลล์ที่น้อยกว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เสริมฮอร์โมน ดังภาพที่ 13



ภาพที่ 13 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดงเซลล์แกรนูโลซาสุกอร์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารไม่เสริมฮอร์โมน (FSH, LH และ estradiol) ก. เซลล์แกรนูโลซามีรูปร่างหัวแหลมท้ายแหลมคล้ายกระสวย (fb) ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์รูปร่างกลมไม่ยึดเกาะพื้นผิวประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง ข. เซลล์แกรนูโลซาคายึดเกาะที่พื้นผิวจานเพาะเลี้ยงประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ โดยมีรูปร่างแหลมหัวแหลมท้ายและมีหลายแฉก และเซลล์รูปร่างกลมไม่ยึดเกาะพื้นผิวประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์แกรนูโลซาสุกุรที่เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิในระยะยาวนานกว่า 96 ชั่วโมงเป็นต้นไป เซลล์ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่เสริมฮอร์โมน ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 21.5 ตารางเซนติเมตร เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบชั้นเดียว โดยเซลล์ที่ตายแล้วจะมีหลุดลอยอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบระยะยาวนี้เปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 48 ชั่วโมง โดยศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงและสิ่งแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงเซลล์นี้สามารถคงการมีชีวิตของเซลล์ในระยะเวลานาน รวมทั้งการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในระยะยาวสามารถนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงต่อเพื่อพัฒนาต่อเป็นเซลล์ไลน์ได้ ผลการศึกษาพบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์แกรนูโลซาสุกุรที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าเซลล์ยืดยาวมากขึ้น มีรูปร่างหัวแหลมท้ายแหลมมีหลายแฉก 100 เปอร์เซ็นต์ สานกันเป็นร่างแหทั่วทั้งจานเพาะเลี้ยงที่เวลา 2 สัปดาห์ พบเซลล์มีรูปร่างเรียวแหลมและยืดยาวมากขึ้น เซลล์สานตัวกันเป็นร่างแหทั่วทั้งจานเพาะเลี้ยง ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ เซลล์เรียงตัวชิดติดกันแน่น เซลล์มีรูปร่างเรียวแหลมและยืดยาวมากขึ้นมากกว่าที่ 2 สัปดาห์ เช่นเดียวกับที่เวลา 4 สัปดาห์ และ 5 สัปดาห์ พบว่าเซลล์มีรูปร่างเรียวแหลมมากกว่าเซลล์ที่เวลา 3 สัปดาห์ ซึ่งเซลล์ยืดยาวออกคล้ายเส้นใย เรียงตัวชิดติดกันสานเป็นร่างแหแผ่ทั่วจานเพาะเลี้ยง เซลล์แกรนูโลซาสุกุรที่เพาะเลี้ยงแบบระยะยาวแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เป็นรูปร่างหัวแหลมท้ายแหลม ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 สัปดาห์พบว่าเซลล์ยังสามารถคงลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ต่อไป จากผลการศึกษาพบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่คล้ายคลึงกันของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงแบบระยะสั้นและแบบระยะยาว เพียงแต่เซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลายาวนานมากขึ้น เซลล์จะมีการยืดยาวและมีรูปร่างเรียวแหลมมากกว่าเซลล์ที่ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงน้อยกว่าดังภาพที่ 14





ภาพที่ 14 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดงเซลล์แกรนูโลซาสุกรเพาะเลี้ยงแบบระยะยาวมากกว่า 96 ชั่วโมง เซลล์แกรนูโลซามีรูปร่างหัวแหลมท้ายแหลม (fb) 100 เปอร์เซ็นต์ ก. และ ข. แสดงเซลล์เพาะเลี้ยงนาน 1 สัปดาห์ เซลล์มีรูปร่างแหลมหัวแหลมท้ายและมีหลายแฉก ค. และ ง. แสดงเซลล์เพาะเลี้ยงนาน 2 สัปดาห์ เซลล์มีรูปร่างแหลมหัวแหลมท้ายเรียวยาวมากขึ้น จ. และ ฉ. แสดงเซลล์เพาะเลี้ยงนาน 3 สัปดาห์ เซลล์มีรูปร่างแหลมหัวแหลมท้ายมีรูปร่างเรียวยาวและยืดยาวมากขึ้นสานกันเป็นร่างแห ช. และ ซ. แสดงเซลล์เพาะเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ เซลล์มีรูปร่างแหลมหัวแหลมท้ายมีรูปร่างเรียวยาวและยืดยาวมากขึ้นสานกันเป็นร่างแห ฅ. และ ญ. แสดงเซลล์เพาะเลี้ยงนาน 5 สัปดาห์ เซลล์รูปร่างหัวแหลมท้ายแหลมเรียวยาวคล้ายเส้นใยสานกันเป็นร่างแหทั่วจานเพาะเลี้ยง (ภาพ ก. ค. จ. ช. และ ฅ. แสดงภาพที่กำลังขยาย 100 เท่า และภาพ ข. ง. ฉ. ซ. และ ญ. แสดงภาพที่กำลังขยาย 200 เท่า)

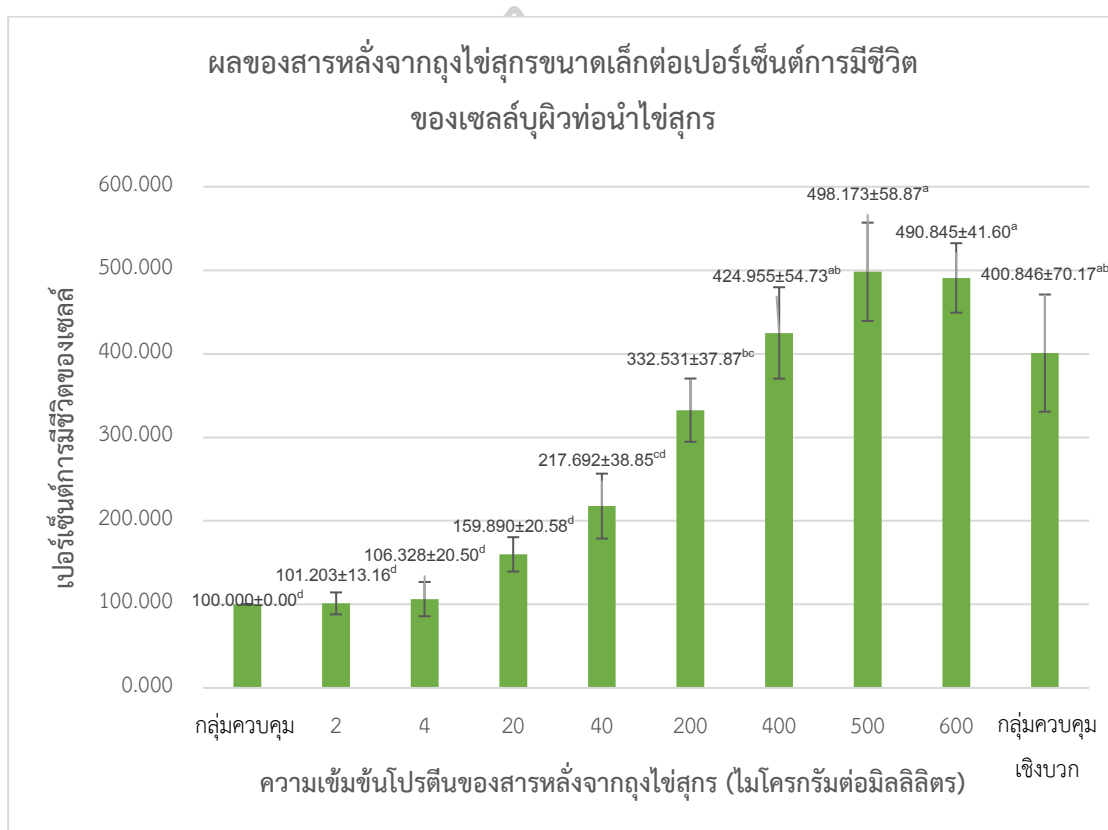
2. การทดสอบผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่ต่อการมีชีวิตของเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรและเซลล์แกรนูโลซาสุกรเพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิ

ผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรต่อการมีชีวิตของเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรและเซลล์แกรนูโลซาสุกรเพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิ แสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรเมื่อทดสอบกับสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็ก ถุงไข่ขนาดกลางและถุงไข่ขนาดใหญ่ โดยแกนแนวตั้ง (X) แสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรและเซลล์แกรนูโลซาสุกร เมื่อทดสอบกับสารหลังจากถุงไข่สุกรและแกนแนวนอน (Y) แสดงความเข้มข้นโปรตีนของสารหลังจากถุงไข่สุกร (ไม่โครกรัมต่อมิลลิลิตร) ได้ทำการทดสอบเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรและเซลล์แกรนูโลซาสุกรด้วยสารหลังจากถุงไข่ขนาดต่างๆ ที่ความเข้มข้นโปรตีน 0, 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตด้วยวิธี MTT assay ในกลุ่มควบคุม (control) คือเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เพียงอย่างเดียว และเซลล์แกรนูโลซาสุกร ในอาหาร M199 เสริมด้วย FSH, LH และ estradiol ในกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) คือเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS และเซลล์แกรนูโลซาสุกรที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS, FSH, LH และ estradiol จากผลการทดสอบทางสถิติด้วยวิธี one-way ANOVA, post hoc Duncan เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาของเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรและเซลล์แกรนูโลซาสุกรต่อความเข้มข้นโปรตีนของสารหลังจากถุงไข่สุกรที่ความเข้มข้นต่างๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยผลของแต่ละความเข้มข้นภายในกลุ่มของถุงไข่ขนาดต่างๆ แทนด้วยตัวอักษร a, b, c, d, e ในแต่ละกลุ่มที่ต่างกัน และความแตกต่างภายในแต่ละกลุ่มของความเข้มข้นแทนด้วยสัญลักษณ์ดอกจัน (*)

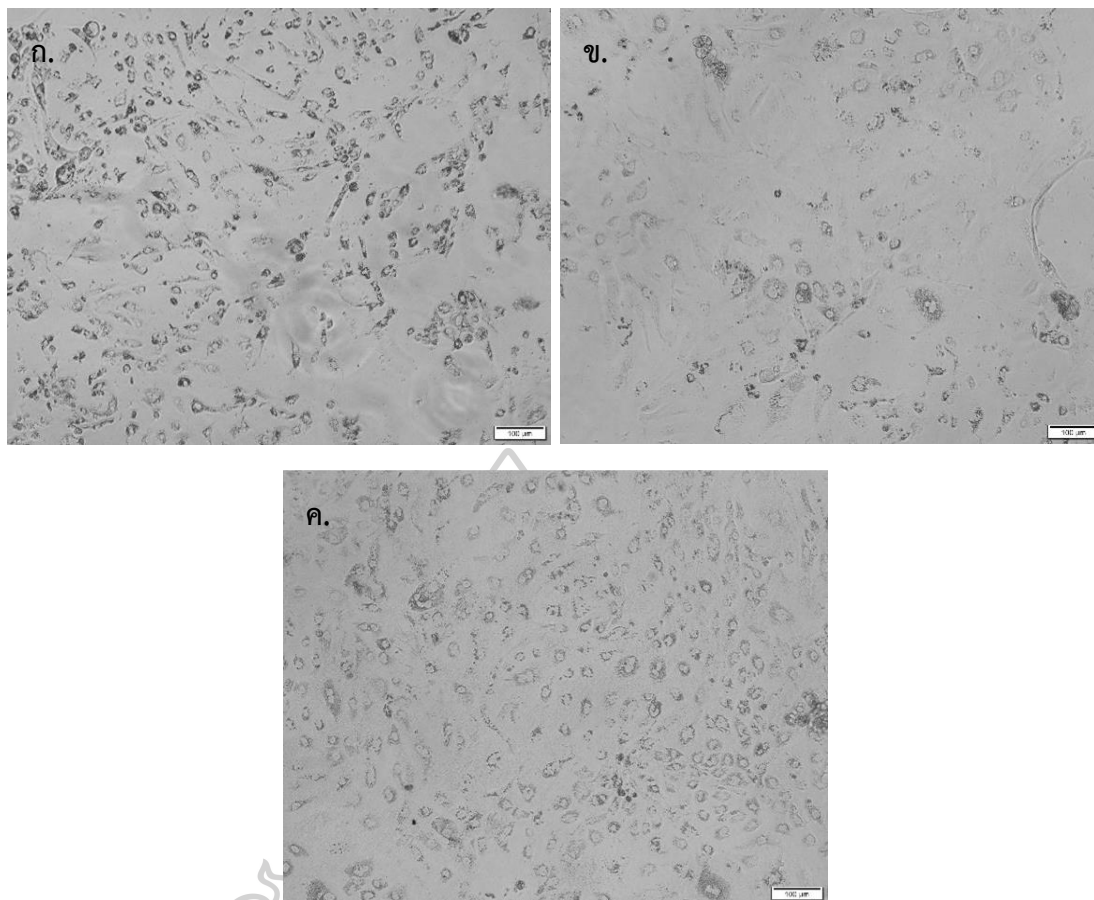
2.1 การทดสอบผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดเล็กต่อการมีชีวิตของเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกร

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวท่อนำไข่นาน 96 ชั่วโมง เซลล์มีการยึดเกาะพื้นผิวประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเหมาะสมในการนำมาทดสอบกับสารหลังจากถุงไข่ต่อการมีชีวิตของเซลล์ การมีชีวิตของเซลล์บุผิวท่อนำไข่ที่ถูกทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดเล็กพบว่าการเจริญพัฒนาของเซลล์บุผิวท่อนำไข่น้อยๆ เพิ่มสูงขึ้น และเพิ่มขึ้นอย่างมากที่ความเข้มข้นโปรตีน 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (332.531 ± 37.87 เปอร์เซ็นต์) และพบว่าเปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาของเซลล์สูงสุดเมื่อถูกทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็กที่ความเข้มข้นโปรตีน 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (498.173 ± 58.87 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และมีค่าสูงกว่า

กลุ่มควบคุมเชิงบวก (400.846 ± 70.17 เปอร์เซ็นต์) แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) นอกจากนี้ที่ความเข้มข้นโปรตีน 400 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (424.955 ± 54.73 เปอร์เซ็นต์ และ 490.845 ± 41.60 เปอร์เซ็นต์) มีเปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาของเซลล์สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) (ภาพที่ 15) ซึ่งพบว่าเซลล์เมื่อได้รับสารหลังจากถูกไข่สุกรที่ความเข้มข้นโปรตีน 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการแผ่ขยายตัวของเซลล์และผลานตัวกันเป็นกลุ่มแผ่ทั่วทั้งจานเพาะเลี้ยงมากกว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่พบเป็นเซลล์เดี่ยวรูปร่างเรียวยาวแหลมท้ายแหลม ในกลุ่มควบคุมเชิงบวกพบว่าเซลล์มีการแผ่ขยายและผลานตัวเป็นร่างแหเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 16)



ภาพที่ 15 กราฟแสดงผลของสารหลังจากถูกไข่สุกรขนาดเล็กที่เสริมในอาหารเพาะเลี้ยง M199 ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมงต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์บุท่อนำไข่สุกร (mean ± SE) โดยกลุ่มควบคุม (control) คือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เพียงอย่างเดียว และกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) คือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS พบว่าเปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาของเซลล์สูงสุดเมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นโปรตีน 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (498.173 ± 58.87 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งแตกต่างกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมเชิงบวก (400.846 ± 70.17 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

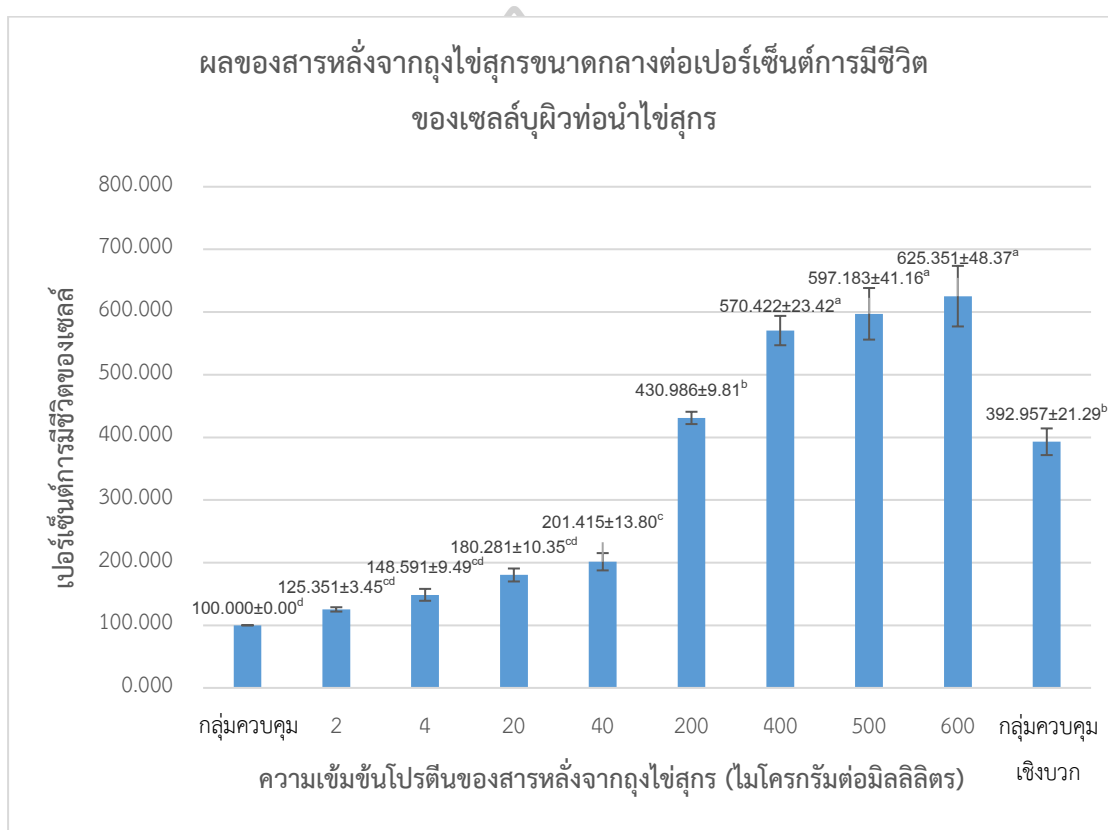


ภาพที่ 16 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดงเซลล์บุผิวท่อนำไข่อสุกรภายหลังการทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดเล็ก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก. แสดงเซลล์บุผิวท่อนำไข่อสุกรในกลุ่มควบคุม (อาหาร M199 เพียงอย่างเดียว) ข. แสดงเซลล์บุผิวท่อนำไข่อสุกรในกลุ่มควบคุมเชิงบวก (อาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS) และ ค. แสดงเซลล์บุผิวท่อนำไข่อสุกรที่ถูกทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็กที่ความเข้มข้นโปรตีน 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่กำลังขยาย 100 เท่า

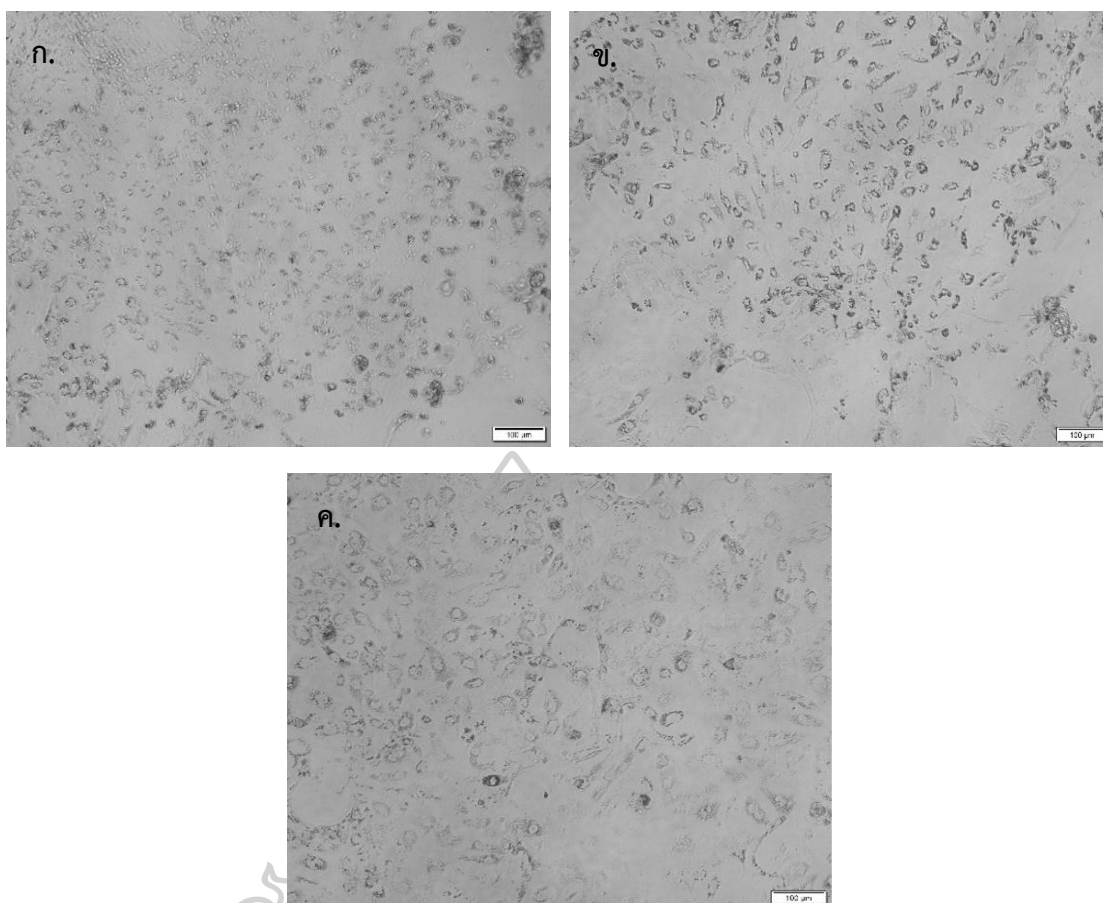
2.2 การทดสอบผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดกลางต่อการมีชีวิตของเซลล์บุผิวท่อนำไข่อสุกร

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวท่อนำไข่นาน 96 ชั่วโมง เซลล์มีการยึดเกาะพื้นผิวประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเหมาะสมในการนำมาทดสอบกับสารหลังจากถุงไข่ต่อการมีชีวิตของเซลล์ การมีชีวิตของเซลล์บุผิวท่อนำไข่อสุกรที่ทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดกลางพบว่าการเจริญพัฒนาของเซลล์บุผิวท่อนำไข่อสุกรค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้นและเพิ่มขึ้นอย่างมากที่ความเข้มข้นโปรตีน 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (430.986 ± 9.81 เปอร์เซ็นต์) และพบว่าเปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาของเซลล์สูงสุดเมื่อถูกทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่ขนาดกลางที่ความเข้มข้นโปรตีน 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

(625.351±48.37 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งแตกต่างกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมเชิงบวก (392.957±21.29 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และนอกจากนี้ที่ความเข้มข้นโปรตีน 40, 200, 400 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (201.415±13.80 เปอร์เซ็นต์ 430.986±9.81 เปอร์เซ็นต์ 570.422±23.42 เปอร์เซ็นต์ และ 597.183±41.16 เปอร์เซ็นต์) ยังมีเปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาของเซลล์สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 17) ซึ่งพบว่าเซลล์เมื่อได้รับสารหลังจากถูกไข่สุกรที่ความเข้มข้นโปรตีน 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการแผ่ขยายตัวของเซลล์และผลานตัวกันเป็นกลุ่มแผ่ขยายทั่วทั้งจานเพาะเลี้ยงมากกว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่และกลุ่มควบคุมเชิงบวก (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 17 กราฟแสดงผลของสารหลังจากถูกไข่สุกรขนาดกลางที่เสริมในอาหารเพาะเลี้ยง M199 ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมงต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์บุผิวที่นำเข้าสุกร (mean±SE) โดยกลุ่มควบคุม (control) คือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เพียงอย่างเดียว และกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) คือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS พบว่าเปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาของเซลล์ค่อยๆเพิ่มสูงขึ้นและมีเปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาของเซลล์สูงสุดเมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นโปรตีน 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (625.351±48.37 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งแตกต่างกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมเชิงบวก (392.957±21.29 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

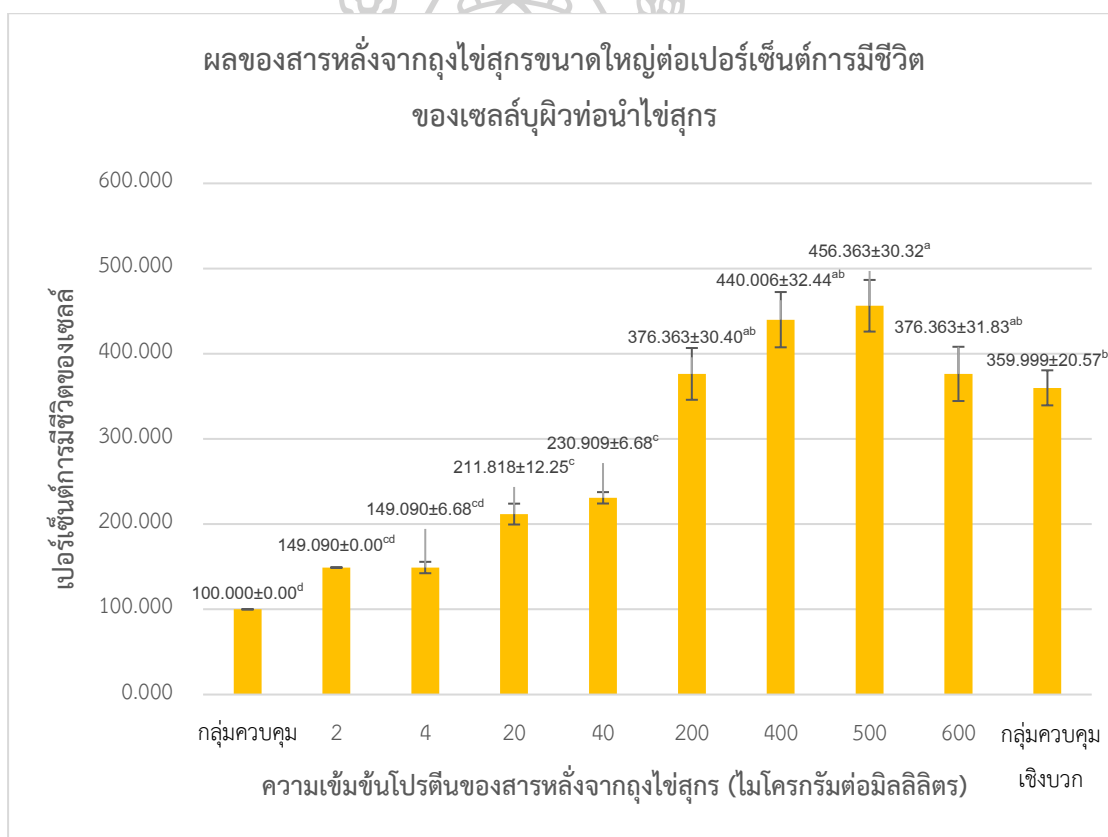


ภาพที่ 18 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดงเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรภายหลังการทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดกลาง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก. แสดงเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรในกลุ่มควบคุม (อาหาร M199 เพียงอย่างเดียว) ข. แสดงเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรในกลุ่มควบคุมเชิงบวก (อาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS) และ ค. แสดงเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรที่ถูกทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่ขนาดกลางที่ความเข้มข้นโปรตีน 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่กำลังขยาย 100 เท่า

2.3 การทดสอบผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดใหญ่ต่อการมีชีวิตของเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกร

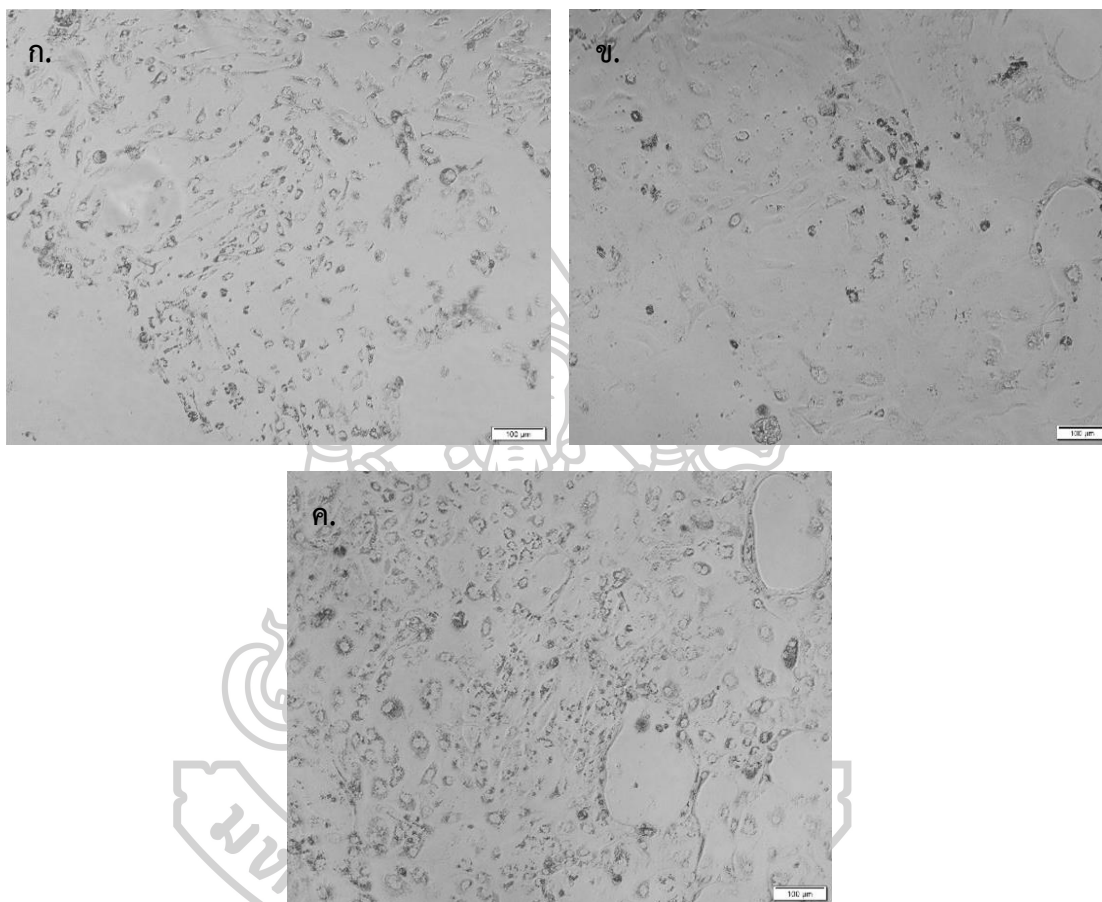
เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวท่อนำไข่ นาน 96 ชั่วโมง เซลล์มีการยึดเกาะพื้นผิวประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเหมาะสมในการนำมาทดสอบกับสารหลังจากถุงไข่ต่อการมีชีวิตของเซลล์ การมีชีวิตของเซลล์บุผิวท่อนำไข่ที่ถูกทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดใหญ่พบว่าการเจริญพัฒนาของเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรค่อยๆ เพิ่มขึ้นจากที่ความเข้มข้นโปรตีน 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (149.090 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์) และพบว่าเปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาของเซลล์สูงสุดเมื่อถูกทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่ขนาดใหญ่ที่ความเข้มข้นโปรตีน 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (456.363 ± 30.32

เปอร์เซ็นต์) ซึ่งแตกต่างกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญ (359.999 ± 20.57 เปอร์เซ็นต์) ($p < 0.05$) และนอกจากนี้ที่ความเข้มข้นโปรตีน 20, 40, 200, 400 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (211.818 ± 12.25 เปอร์เซ็นต์ 230.909 ± 6.68 เปอร์เซ็นต์ 376.363 ± 30.40 เปอร์เซ็นต์ 440.006 ± 32.44 เปอร์เซ็นต์ และ 376.363 ± 31.83 เปอร์เซ็นต์) ยังมีเปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาของเซลล์สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) (ภาพที่ 19) ซึ่งพบว่าเซลล์เมื่อได้รับสารหลังจากถูกไข่สุกรที่ความเข้มข้นโปรตีน 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการแผ่ขยายตัวของเซลล์และผลานตัวกันเป็นกลุ่มแผ่ทั่วทั้งจานเพาะเลี้ยงมากกว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่พบเป็นเซลล์เดี่ยวรูปร่างเรียวยาวแหลมท้ายแหลม ในกลุ่มควบคุมเชิงบวกพบว่าเซลล์มีการแผ่ขยายและผลานตัวเป็นร่างแหเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 20)



ภาพที่ 19 กราฟแสดงผลของสารหลังจากถูกไข่สุกรขนาดใหญ่ที่เสริมในอาหารเพาะเลี้ยง M199 ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมงต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์บุผิวที่นำเข้าสุกร (mean ± SE) โดยกลุ่มควบคุม (control) คือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เพียงอย่างเดียว และกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) คือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS พบว่าเปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาของเซลล์ค่อยๆ

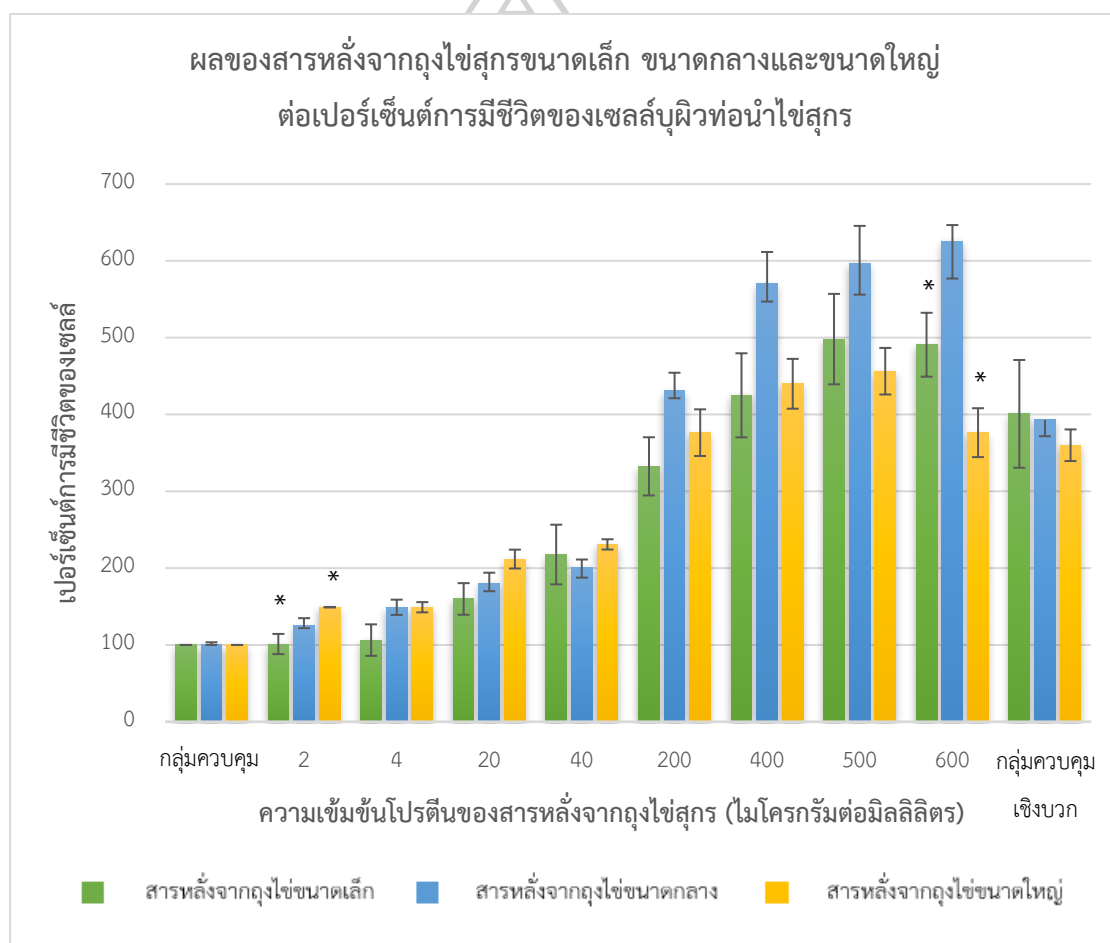
เพิ่มสูงขึ้นและพบว่าเปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาของเซลล์สูงสุดเมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นโปรตีน 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (456.363 ± 30.32 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งแตกต่างกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมเชิงบวก (359.999 ± 20.57 เปอร์เซ็นต์) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 20 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดงเซลล์บุผิวที่อาน้ำไข่มุกภายหลังการทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่มุกขนาดใหญ่ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก. แสดงเซลล์บุผิวที่อาน้ำไข่มุกในกลุ่มควบคุม (อาหาร M199 เพียงอย่างเดียว) ข. แสดงเซลล์บุผิวที่อาน้ำไข่มุกในกลุ่มควบคุมเชิงบวก (อาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS) และ ค. แสดงเซลล์บุผิวที่อาน้ำไข่มุกที่ถูกทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่มุกขนาดใหญ่ที่ความเข้มข้นโปรตีน 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่กำลังขยาย 100 เท่า

2.4 เปรียบเทียบผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่ต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกร

ทำการเปรียบเทียบผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่ต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกร พบว่าความเข้มข้นโปรตีนจากสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็กที่ความเข้มข้นโปรตีน 2 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์แตกต่างกับเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ที่ทดสอบด้วยโปรตีนจากสารหลังจากถุงไข่ขนาดใหญ่อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ที่ความเข้มข้นอื่นของโปรตีนไม่พบความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ที่ถูกทดสอบทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังภาพที่ 21



ภาพที่ 21 กราฟแสดงผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดเล็ก ผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดกลางและผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดใหญ่ที่เสริมในอาหารเพาะเลี้ยง M199 ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมงต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์บุผิวท่อนำไข่ (mean±SE) โดยกลุ่มควบคุม (control) คือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เพียงอย่างเดียว และกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) คือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงใน

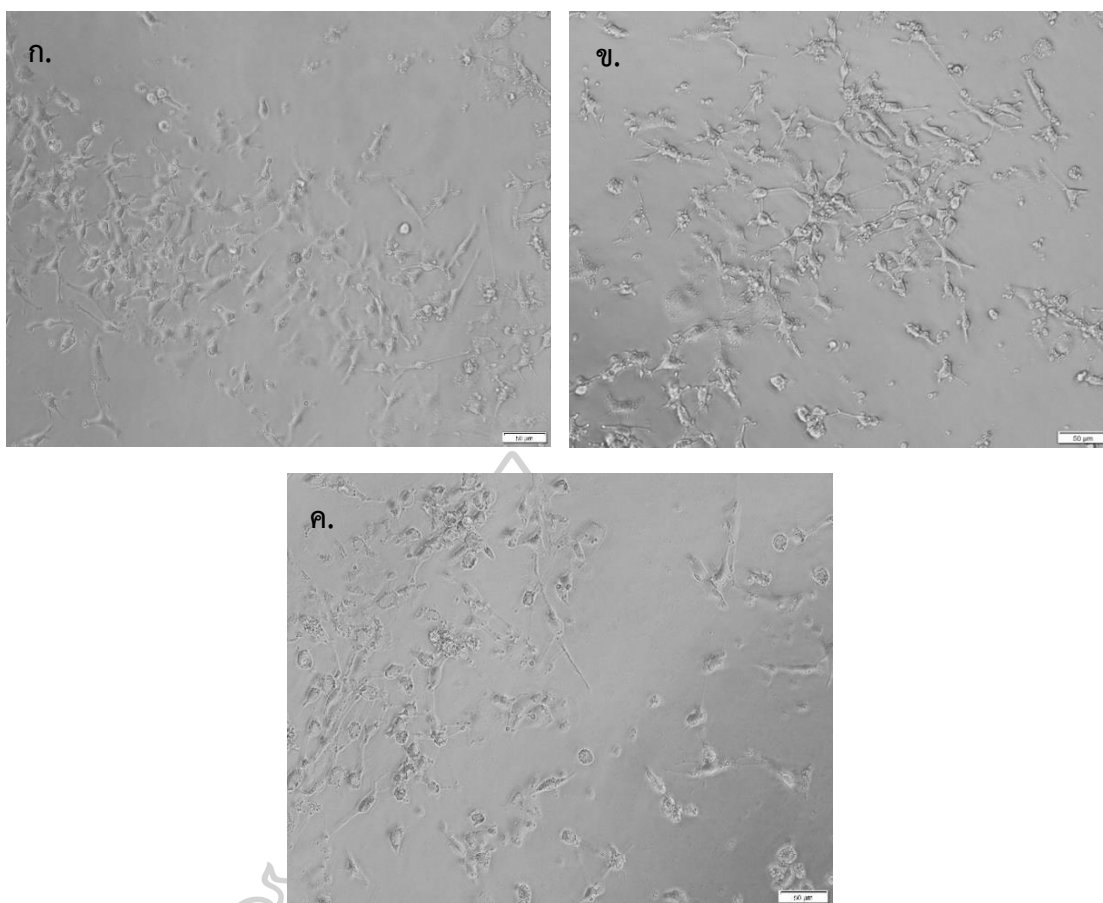
อาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS พบว่าที่ความเข้มข้นโปรตีน 2 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าค่าการมีชีวิตของเซลล์แตกต่างกับค่าการมีชีวิตของเซลล์ที่ทดสอบด้วยโปรตีนจากสารหลังจากถูกไข่ขนาดใหญ่อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

2.5 การทดสอบผลของสารหลังจากถูกไข่สุกรขนาดเล็กต่อการมีชีวิตของเซลล์แกรนูโลซาสูกร

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซานานาน 48 ชั่วโมง เซลล์มีการยึดเกาะพื้นผิวประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเหมาะสมในการนำมาทดสอบกับสารหลังจากถูกไข่ต่อการมีชีวิตของเซลล์ จากผลการทดสอบผลของสารหลังจากถูกไข่สุกรขนาดเล็กต่อการมีชีวิตของแกรนูโลซาเซลล์พบว่า ในทุกความเข้มข้นของโปรตีนจากสารหลังจากถูกไข่ขนาดเล็กมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (70.106 ± 2.76 เปอร์เซ็นต์ 65.344 ± 6.49 เปอร์เซ็นต์ 65.609 ± 3.70 เปอร์เซ็นต์ และ 60.582 ± 6.10 เปอร์เซ็นต์) มีค่าการมีชีวิตของเซลล์ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญ (229.894 ± 25.35 เปอร์เซ็นต์) ($p < 0.05$) แต่ที่ความเข้มข้นโปรตีน 200 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (117.460 ± 25.40 เปอร์เซ็นต์ และ 113.227 ± 6.76 เปอร์เซ็นต์) ค่าการมีชีวิตของเซลล์สูงกว่ากลุ่มควบคุมแต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) ที่ความเข้มข้นโปรตีน 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ลดลงและต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (84.391 ± 12.52 เปอร์เซ็นต์ และ 82.540 ± 3.75 เปอร์เซ็นต์) แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) (ภาพที่ 22) พบว่าเซลล์เมื่อได้รับสารหลังจากถูกไข่สุกรที่ความเข้มข้นโปรตีน 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์มีการแผ่ขยายตัวน้อยกว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุม ซึ่งพบเซลล์รูปร่างหัวแหลมท้ายแหลมปลายเซลล์มีหลายแฉกยืดยาวออกและเซลล์มีการสานตัวกันมากกว่าเซลล์ในกลุ่มที่ถูกทดสอบ (ภาพที่ 23)



ภาพที่ 22 กราฟแสดงผลของสารหลังจากถูกไข่สุกรขนาดเล็ก ที่เสริมในอาหารเพาะเลี้ยง M199 ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร นาน 24 ชั่วโมง ต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์แกรนูโลซาสูกร (mean±SE) โดยกลุ่มควบคุม (control) คือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เสริมด้วย FSH, LH และ estradiol และกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) คือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS, FSH, LH และ estradiol พบว่าที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร (70.106±2.76 เปอร์เซ็นต์ 65.344±6.49 เปอร์เซ็นต์ 65.609±3.70 เปอร์เซ็นต์ และ 60.582±6.10 เปอร์เซ็นต์) เปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาของเซลล์มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญ (229.894±5.35 เปอร์เซ็นต์) ($p < 0.05$)

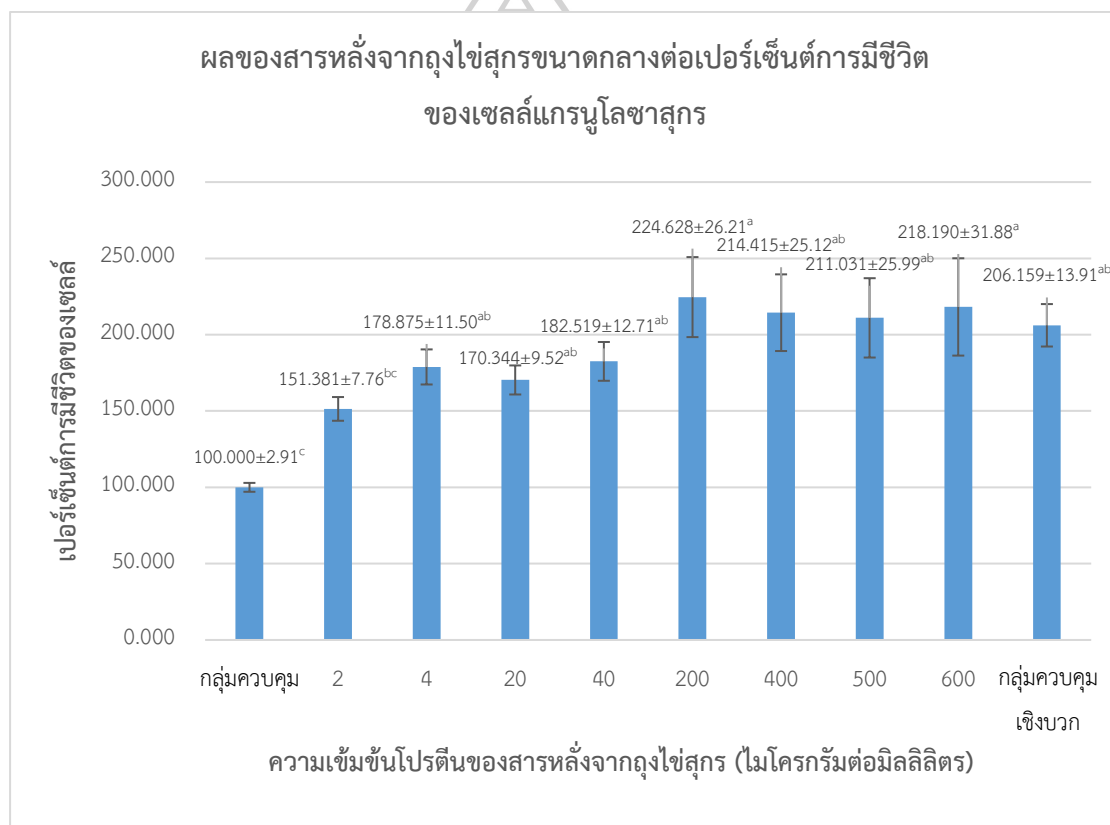


ภาพที่ 23 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดงเซลล์แกรนูโลซาสุกรเมื่อทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดเล็ก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก. แสดงเซลล์แกรนูโลซาสุกรในกลุ่มควบคุม (อาหาร M199 เสริมด้วย FSH, LH และ estradiol) ข. แสดงเซลล์แกรนูโลซาสุกรในกลุ่มควบคุมเชิงบวก (อาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS, FSH, LH และ estradiol) และ ค. แสดงเซลล์แกรนูโลซาสุกรที่ถูกทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็กที่ความเข้มข้นโปรตีน 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่กำลังขยาย 200 เท่า

2.6 การทดสอบผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดกลางต่อการมีชีวิตของเซลล์แกรนูโลซาสุกร

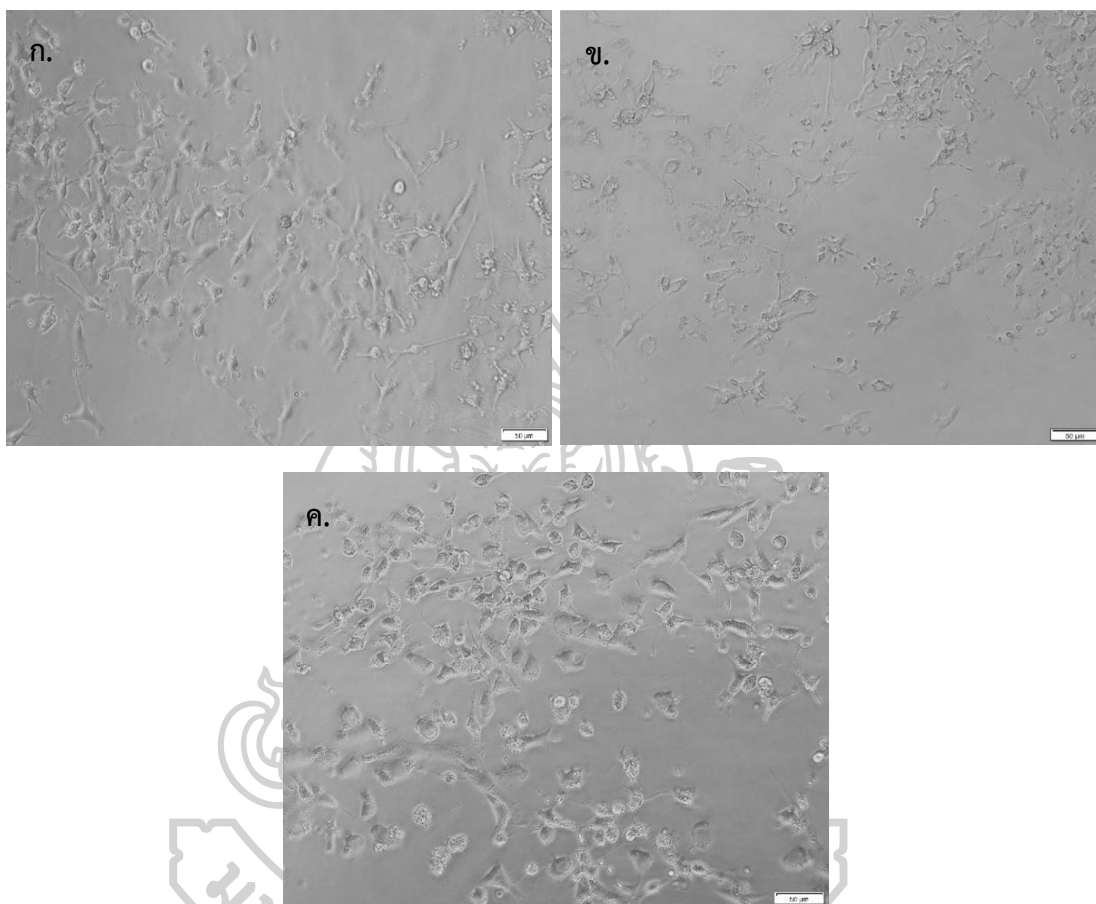
เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซานาน 48 ชั่วโมง เซลล์มีการยึดเกาะพื้นผิวประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเหมาะสมในการนำมาทดสอบกับสารหลังจากถุงไข่ต่อการมีชีวิตของเซลล์ จากผลการทดลองผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดกลางต่อการมีชีวิตของแกรนูโลซาเซลล์พบว่า โปรตีนจากสารหลังจากถุงไข่ขนาดกลางที่ความเข้มข้นโปรตีน 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (224.268 ± 26.21 เปอร์เซ็นต์) แสดงค่าการมีชีวิตของเซลล์สูงที่สุดซึ่งแตกต่างกับ กลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก (206.159 ± 13.91 เปอร์เซ็นต์) ทางสถิติ ($p > 0.05$) นอกจากนี้ที่ความเข้มข้นโปรตีน 4, 20, 40, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (178.875 ± 12.06 เปอร์เซ็นต์ 170.345 ± 10.53 เปอร์เซ็นต์ 182.519 ± 13.33 เปอร์เซ็นต์ 214.415 ± 26.21 เปอร์เซ็นต์ 211.031 ± 25.99 เปอร์เซ็นต์ และ 218.190 ± 31.88 เปอร์เซ็นต์) มีค่าการมีชีวิตของเซลล์สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมเชิงบวกทางสถิติ ($p > 0.05$) (ภาพที่ 24) และพบว่าเซลล์เมื่อได้รับสารหลังจากถูกไข่สุกรที่ความเข้มข้นโปรตีน 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์มีรูปร่างหัวแหลมท้ายแหลมปลายเซลล์มีหลายแฉกยืดยาวออกมีการยึดตัวแน่นทั่วทั้งงานเพาะเลี้ยงมากกว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 24 กราฟแสดงผลของสารหลังจากถูกไข่สุกรขนาดกลาง ที่เสริมในอาหารเพาะเลี้ยง M199 ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมงต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์แกรนูโลซาสุกร (mean ± SE) โดยกลุ่มควบคุม (control) คือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เสริมด้วย FSH, LH และ estradiol และกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) คือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS, FSH, LH และ estradiol พบว่าเปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาของเซลล์มีค่าเพิ่มมากขึ้น ที่ความเข้มข้นโปรตีน 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (224.268 ± 26.21 เปอร์เซ็นต์) แสดงค่าการมีชีวิตของเซลล์สูงที่สุดซึ่งแตกต่างกับกลุ่ม

ควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมเชิงบวกทางสถิติ (206.159 ± 13.91 เพอร์เซ็นต์) ($p > 0.05$)

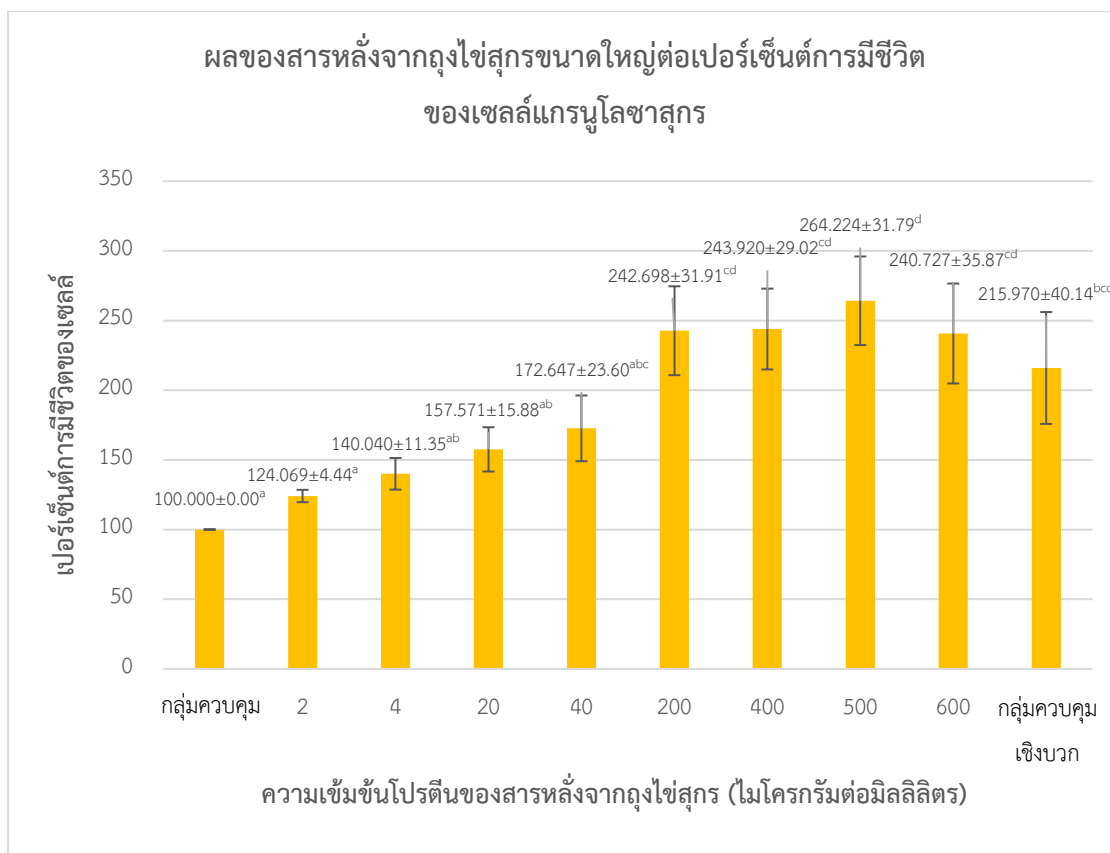


ภาพที่ 25 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดงเซลล์แกรนูโลซาสุกรเมื่อทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดกลาง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก. แสดงเซลล์แกรนูโลซาสุกรในกลุ่มควบคุม (อาหาร M199 เสริมด้วย FSH, LH และ estradiol) ข. แสดงเซลล์แกรนูโลซาสุกรในกลุ่มควบคุมเชิงบวก (อาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS, FSH, LH และ estradiol) และ ค. แสดงเซลล์แกรนูโลซาสุกรที่ถูกทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่ขนาดกลางที่ความเข้มข้นโปรตีน 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่กำลังขยาย 200 เท่า

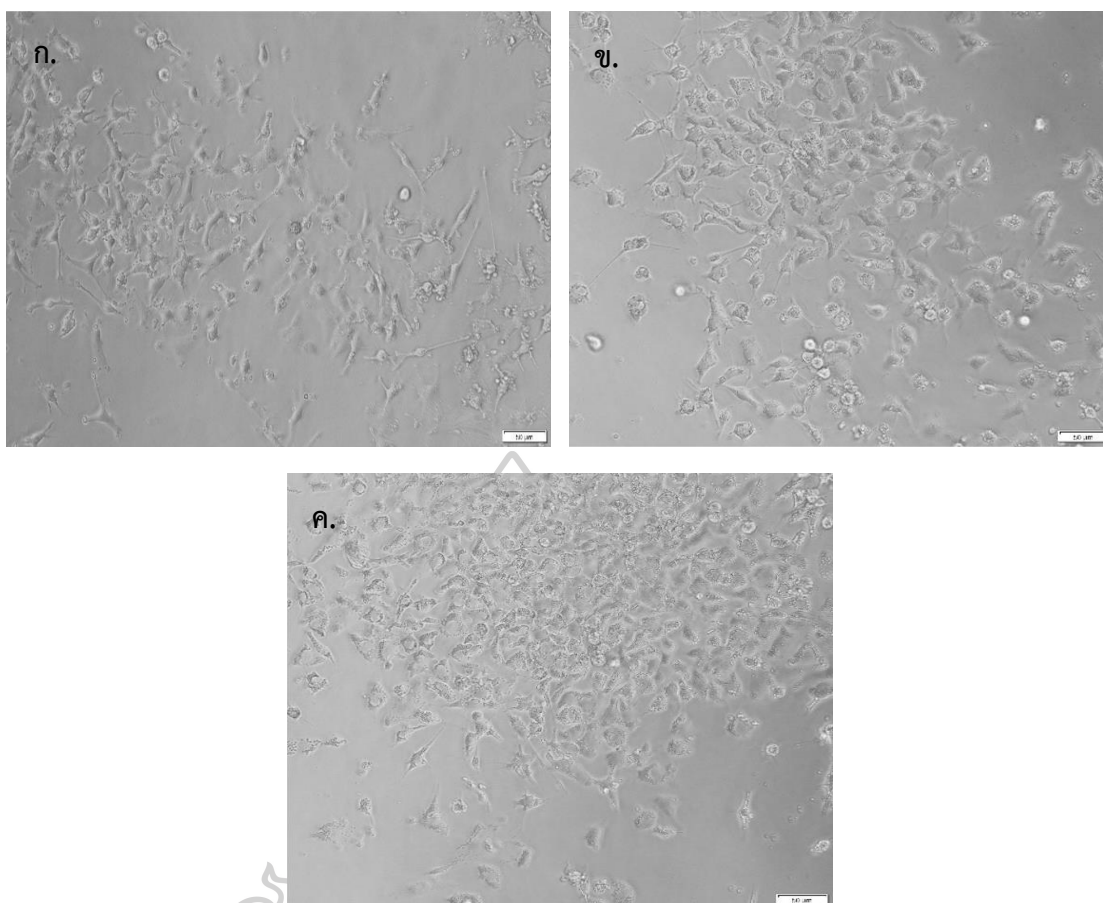
2.7 การทดสอบผลของสารหลังจากถูกไข่สุกรขนาดใหญ่ต่อการมีชีวิตของเซลล์แกรนูโลซาสุกร

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซานาน 48 ชั่วโมง เซลล์มีการยึดเกาะพื้นผิวประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเหมาะสมในการนำมาทดสอบกับสารหลังจากถูกไข่ต่อการมีชีวิตของเซลล์ จากผลการทดลองผลของสารหลังจากถูกไข่สุกรขนาดใหญ่ต่อการมีชีวิตของแกรนูโลซาเซลล์พบว่า เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ค่อยๆ เพิ่มขึ้นตั้งแต่ที่ความเข้มข้นของโปรตีนที่ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (124.069 ± 4.44 เปอร์เซ็นต์) และมีค่าการมีชีวิตของเซลล์สูงสุดที่ความเข้มข้นโปรตีน 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (264.224 ± 31.70 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และสูงกว่ากลุ่มควบคุมเชิงบวก (215.970 ± 40.14 เปอร์เซ็นต์) แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) นอกจากนี้พบว่าค่าการมีชีวิตของเซลล์ที่ความเข้มข้นของโปรตีน 200, 400 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (242.698 ± 31.91 เปอร์เซ็นต์, 243.920 ± 29.02 เปอร์เซ็นต์ และ 240.727 ± 35.87 เปอร์เซ็นต์) มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และสูงกว่ากลุ่มควบคุมเชิงบวกแต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) (ภาพที่ 26) ซึ่งพบว่าเซลล์เมื่อได้รับสารหลังจากถูกไข่สุกรที่ความเข้มข้นโปรตีน 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์มีการยึดขยายมีรูปร่างหัวแหลมท้ายแหลมปลายเซลล์มีหลายแฉกยึดยาวออกและเชื่อมต่อกับเซลล์อื่นๆ สานเป็นร่างแหแผ่ทั่วทั้งจานเพาะเลี้ยงมากกว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่เซลล์มีรูปร่างหัวแหลมท้ายแหลมและเซลล์ในกลุ่มควบคุมเชิงบวก (ภาพที่ 27)





ภาพที่ 26 กราฟแสดงผลของสารหลังจากถูกไข่สุกรขนาดใหญ่ ที่เสริมในอาหารเพาะเลี้ยง M199 ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 24 ชั่วโมง ต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์แกรนูโลซาสุกร (mean±SE) โดยกลุ่มควบคุม (control) คือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เสริมด้วย FSH, LH และ estradiol และกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) คือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS, FSH, LH และ estradiol พบว่าเปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนาของเซลล์มีค่าเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ และพบค่าการมีชีวิตของเซลล์สูงสุดที่ความเข้มข้นโปรตีน 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (264.224 ± 31.70 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และสูงกว่ากลุ่มควบคุมเชิงบวก (215.970 ± 40.14 เปอร์เซ็นต์) แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$)

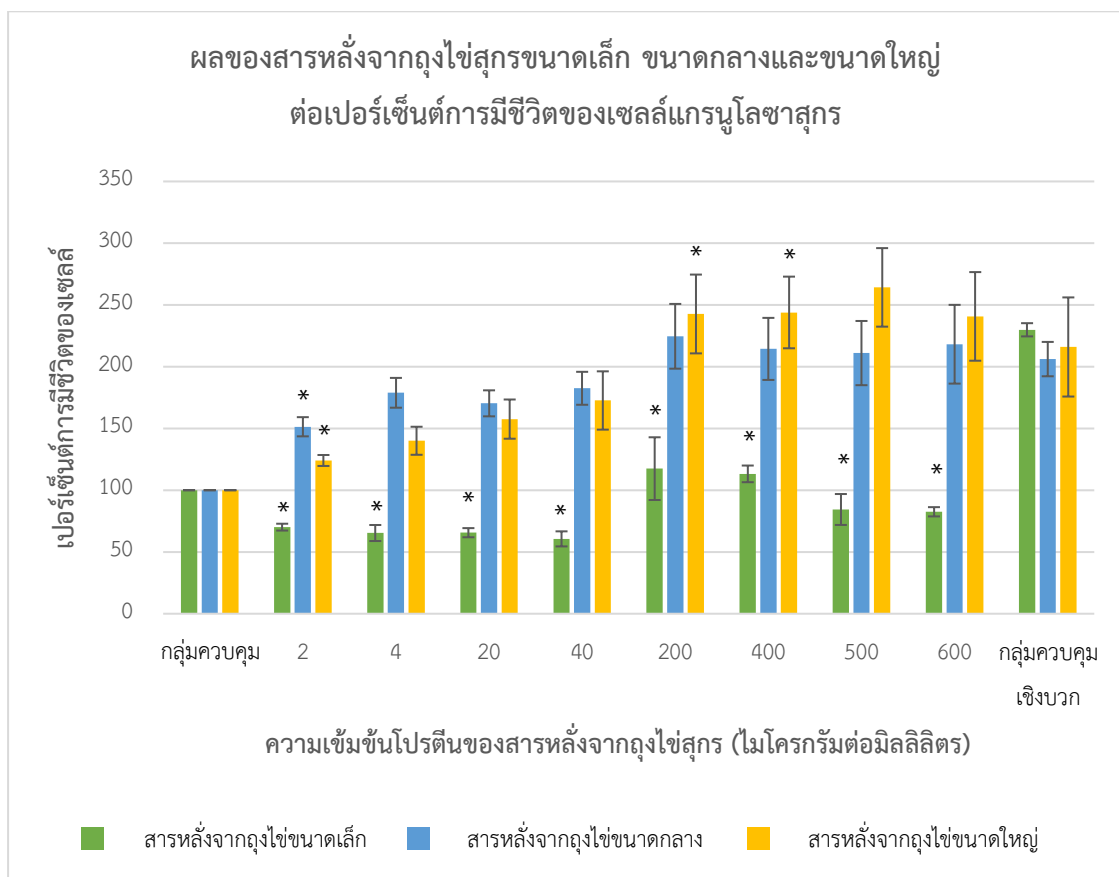


ภาพที่ 27 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับแสดงเซลล์แกรนูโลซาสุกรเมื่อทดสอบด้วยสารหลังจากถุงสุกรขนาดใหญ่ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก. แสดงเซลล์แกรนูโลซาสุกรในกลุ่มควบคุม (อาหาร M199 เสริมด้วย FSH, LH และ estradiol) ข. แสดงเซลล์แกรนูโลซาสุกรในกลุ่มควบคุมเชิงบวก (อาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS, FSH, LH และ estradiol) และ ค. แสดงเซลล์แกรนูโลซาสุกรที่ถูกทดสอบด้วยสารหลังจากถุงขนาดใหญ่ที่ความเข้มข้นโปรตีน 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่กำลังขยาย 200 เท่า

2.8 เปรียบเทียบผลของสารหลังจากถุงสุกรขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่ต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์แกรนูโลซาสุกร

เมื่อทำการเปรียบเทียบผลของสารหลังจากถุงสุกรขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่ต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์แกรนูโลซาสุกรพบว่า ความเข้มข้นของโปรตีนจากสารหลังจากถุงขนาดเล็กที่ความเข้มข้นโปรตีน 4, 20, 40, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าค่าการมีชีวิตของเซลล์ต่ำกว่าค่าการมีชีวิตของเซลล์ที่ทดสอบด้วยโปรตีนจากสารหลังจากถุงขนาดกลางและ

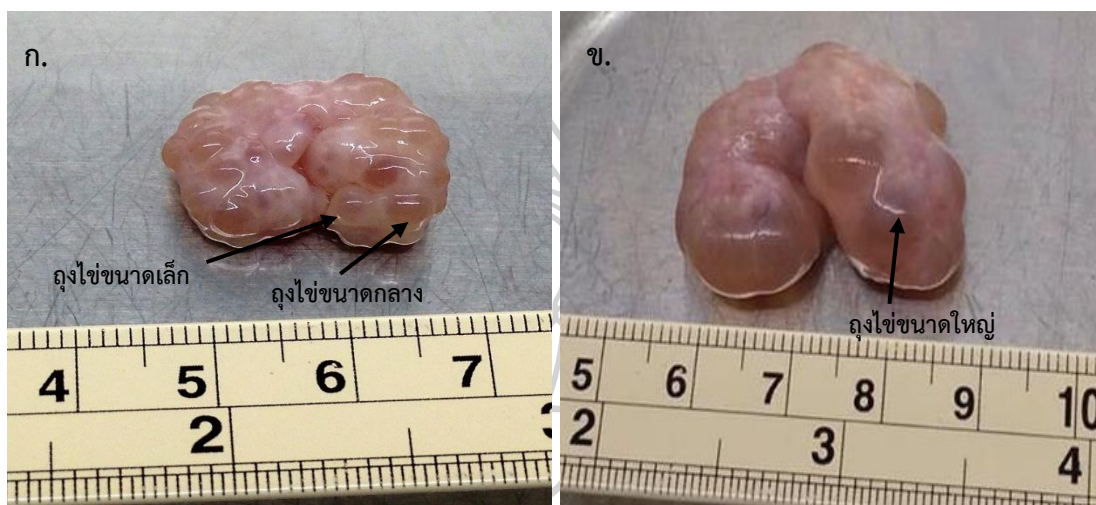
ขนาดใหญ่อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ที่ความเข้มข้นของโปรตีน 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์เมื่อทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่ มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) และที่ความเข้มข้นโปรตีน 200 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าค่าการมีชีวิตของเซลล์ที่ทดสอบด้วยโปรตีนจากสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็กมีค่าต่ำกว่าค่าการมีชีวิตของเซลล์ที่ทดสอบด้วยโปรตีนจากสารหลังจากถุงไข่ขนาดใหญ่อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังภาพ 28



ภาพที่ 28 กราฟแสดงผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดเล็ก สารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดกลางและสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดใหญ่ที่เสริมในอาหารเพาะเลี้ยง M199 ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ต่อการมีเจริญพัฒนาของเซลล์แกรนูโลซาสุกร (mean±SE) โดยกลุ่มควบคุม (control) คือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เสริมด้วย FSH, LH และ estradiol และกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) คือเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS, FSH, LH และ estradiol พบว่าที่ทุกความเข้มข้นโปรตีนของสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็กมีค่าการมีชีวิตของเซลล์ต่ำกว่าค่าการมีชีวิตของเซลล์ที่ทดสอบด้วยโปรตีนของสารหลังจากถุงไข่กลางและขนาดใหญ่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

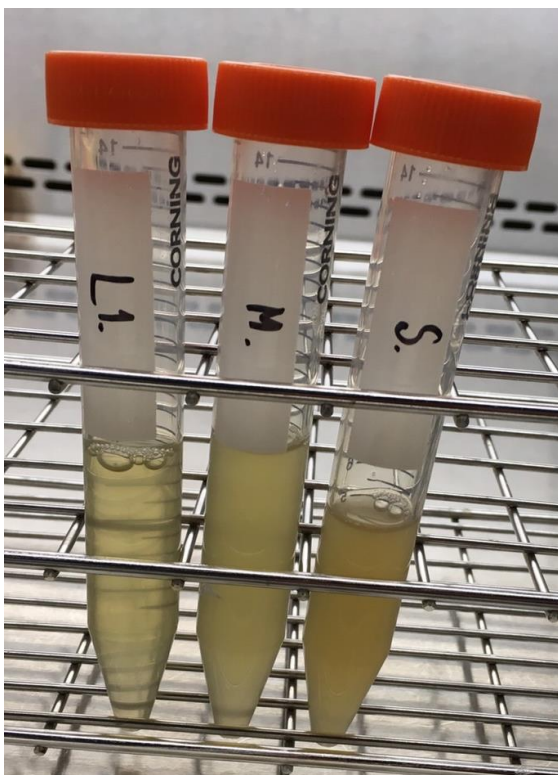
3. การศึกษาสารหลังโปรตีนจากถุงไข่สุกรขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่ ด้วยวิธี Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

ศึกษาผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรต่อการมีชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิ จากตัวอย่างสารหลังจากถุงไข่ขนาดต่างๆ แบ่งขนาดตามเส้นผ่านศูนย์กลางของถุงไข่ คือถุงไข่ขนาดเล็ก เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3 มิลลิเมตร ถุงไข่ขนาดกลาง เส้นผ่านศูนย์กลาง 4-6 มิลลิเมตร และถุงไข่ขนาดใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 7 มิลลิเมตร ดังภาพ 29



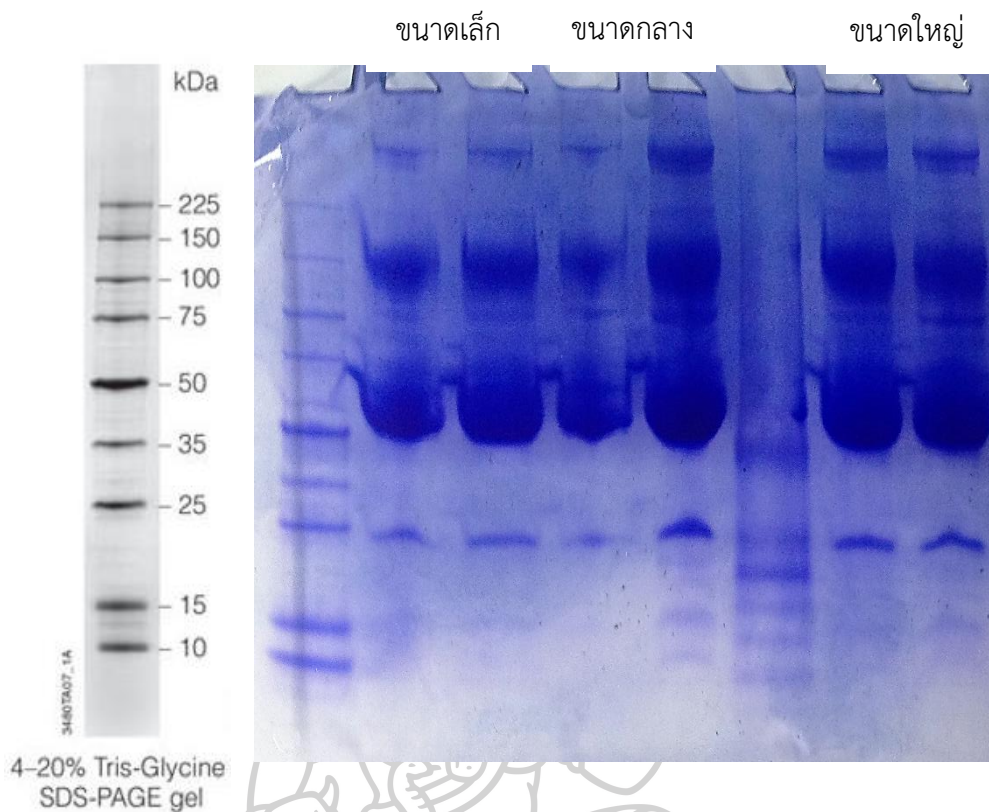
ภาพที่ 29 แสดงรังไข่สุกรที่ได้จากการเก็บตัวอย่างจากโรงฆ่าสัตว์ รังไข่สุกรมีลักษณะคล้ายพวงองุ่น ล้อมรอบด้วยถุงไข่ขนาดต่าง ภาพ ก. แสดงถุงไข่ขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3 มิลลิเมตร) และขนาดกลาง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 4-6 มิลลิเมตร) และ ภาพ ข. แสดงถุงไข่ขนาดใหญ่ (เส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 7 มิลลิเมตร)

การศึกษาพบว่าสีของสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่ พบว่าสารหลังจากถุงไข่ขนาดต่างกันมีสีที่แตกต่างกัน โดยพบว่าลักษณะสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็กมีความขุ่นและมีสีเข้มสุดเมื่อเทียบกับสารหลังจากถุงไข่ขนาดอื่นๆ ต่อมาคือลักษณะสารหลังจากถุงไข่ขนาดกลาง พบว่ามีความขุ่นน้อยกว่าสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็กและมีสีเหลืองอ่อนกว่าสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็ก และสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดใหญ่พบว่ามีลักษณะเป็นสีเหลืองใสกว่าสารหลังจากถุงไข่ขนาดอื่นๆ และมีความขุ่นของสารหลังน้อยที่สุด (ภาพที่ 30) เมื่อผสมสารหลังจากถุงไข่สุกรกับอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วนำไปตรวจสอบค่าความเป็นกรดเบส (pH) พบว่ามีค่าอยู่ที่ 7.4-7.8



ภาพที่ 30 แสดงสีของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดใหญ่ ขนาดกลางและขนาดเล็ก (เรียงจากซ้ายไปขวา) พบว่าสีของสารหลังจากถุงไข่ขนาดใหญ่มีสีเหลืองจางที่สุด สารหลังจากถุงไข่ขนาดกลางมีสีเหลืองเข้มมากขึ้น และในสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็กมีสีเหลืองเข้มมากที่สุด

ภายในสารหลังจากถุงไข่สุกรมีโปรตีนเป็นส่วนประกอบหลัก จากผลการศึกษาสารหลังโปรตีนจากถุงไข่สุกรขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่ ด้วยวิธี Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) จากผลในแถวที่ 2 และแถวที่ 3 แสดงผลของสารหลังโปรตีนจากถุงไข่สุกรขนาดเล็ก พบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 23 kDa 50 kDa 92 kDa 100 kDa 150 kDa และมากกว่า 225 kDa ในส่วนของแถวที่ 4 และแถวที่ 5 แสดงผลของสารหลังโปรตีนจากถุงไข่สุกรขนาดกลาง พบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 23 kDa 50 kDa 92 kDa 100 kDa 150 kDa และมากกว่า 225 kDa และในแถวที่ 7 และแถวที่ 8 แสดงผลของสารหลังโปรตีนจากถุงไข่สุกรขนาดใหญ่ พบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 12 kDa, 16 kDa, 23 kDa 50 kDa 92 kDa 100 kDa 150 kDa และมากกว่า 225 kDa (ดังภาพ 31)



ภาพที่ 31 แสดงแถบของสารหลังโปรตีนจากถุงสุกรขนาดเล็กเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน Broad Range Protein Molecular Weight Markers (Promega) โดยในแถวที่ 1 แสดง แถบของโปรตีนมาตรฐาน Broad Range Protein Molecular Weight Markers (Promega) แถวที่ 2 และแถวที่ 3 แสดงผลของสารหลังโปรตีนจากถุงสุกรขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3 มิลลิเมตร) แถวที่ 4 และแถวที่ 5 แสดงผลของสารหลังโปรตีนจากถุงสุกรขนาดกลาง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 4-6 มิลลิเมตร) และในแถวที่ 7 และแถวที่ 8 แสดงผลของสารหลังโปรตีนจากถุงสุกรขนาดใหญ่ (เส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 7 มิลลิเมตร)

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผล

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์บุผิวที่นำไขสุกรจากส่วน ampulla เพาะเลี้ยงในระยะสั้นแบบปฐมภูมินาน 96 ชั่วโมง โดยเริ่มแรกของการเพาะเลี้ยงเซลล์นาน 48 ชั่วโมง พบว่าเซลล์บุผิวที่นำไขสุกรแยกชนิดของเซลล์ได้เป็น 2 ชนิด คือ 1. เซลล์ที่ไม่มีซีเลีย (non-ciliated cells) เป็นเซลล์รูปร่างกลม ลอยอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้เนื่องจากไม่มีซีเลียพบ ทั้งเซลล์เดี่ยวและเซลล์ที่เกาะรวมกันเป็นกลุ่มและ 2. เซลล์ทรงกระบอกด้านบนมีซีเลีย (columnar ciliated cells) ซึ่งเซลล์ชนิดนี้ในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงที่ 48 ชั่วโมงนั้น เซลล์สามารถเคลื่อนที่ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ เช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Areekijserree and Vejaratpimol (2006) และการศึกษาของ Areekijserree and Veerapraditsin (2008) ที่ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์บุผิวที่นำไขสุกร ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวที่นำไขโดยใช้วิธีเพาะเลี้ยงเซลล์แบบชั้นเดียว (monolayer culture) พบเซลล์ 2 ชนิดคือเซลล์กลมที่ไม่มีซีเลียและเซลล์ทรงกระบอกที่มีซีเลียอยู่ ด้านบนเช่นเดียวกัน การศึกษาในครั้งนี้พบว่าเซลล์บุผิวที่นำไขเริ่มยึดเกาะพื้นผิวจานเพาะเลี้ยง เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 72 ชั่วโมง เช่นเดียวกับการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวที่นำไขของโค ที่เพาะเลี้ยงเซลล์แบบชั้นเดียว พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 72 ชั่วโมง เซลล์จึงเริ่มยึดเกาะพื้นผิว (Walter, 1995) ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Battut, Bezar, and Palmer (1991) ที่ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบปฐมภูมิของเซลล์บุผิวที่นำไขม้า พบว่าเซลล์เริ่มยึดเกาะจานเพาะเลี้ยงเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 5-8 วัน โดยพบว่าเซลล์บุผิวที่นำไขจะสูญเสียลักษณะเฉพาะตัวไปเช่น ไม่มีการจัดเรียงตัวแบบเซลล์ทรงกระบอกชั้นเดียว (simple columnar) และเกิดการสูญเสียซีเลีย เช่นเดียวกับการศึกษาของ Miessen et al. (2011) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวที่นำไขสุกรด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบชั้นเดียว เซลล์มีการยึดเกาะพื้นผิวและสูญเสียลักษณะเฉพาะตัวไป ตรงกับการศึกษาในเซลล์บุผิวที่นำไขโค ที่นำเซลล์ที่มีซีเลียมาเพาะเลี้ยงแบบชั้นเดียว พบว่าเซลล์สูญเสียการมีซีเลีย เนื่องจากเซลล์มีการยึดเกาะพื้นผิวเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 4-5 วัน (Joshi, 1995) นอกจากนี้มีการรายงานว่าเซลล์บุผิวที่นำไขสุกรที่นำมาเลี้ยงด้วยวิธี air-liquid interface ซึ่งเป็นอีกวิธีหนึ่งในการเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งแสดงถึงลักษณะที่คล้ายคลึงกับภายในสิ่งมีชีวิต นั่นคือพบเซลล์ที่จัดเรียงตัวแบบชั้นเดียวและพบเซลล์ที่มีซี-

เลี้ยงอยู่ด้านบน (Chen et al., 2013; Miessen et al., 2011) โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ air-liquid interface เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์จากระบบหายใจ (airway epithelia) เนื่องจากเซลล์แสดงให้เห็นถึงลักษณะเฉพาะตัว การจัดเรียงตัวและการทำงานของเซลล์ที่เหมือนกับภายในสิ่งมีชีวิต (Karp et al., 2002; Müller, Brighton, Carson, & Fischer, 2013) แต่วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ air-liquid interface นั้นเป็นวิธีที่ซับซ้อนและต้องใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีความจำเพาะในการเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งมีราคาสูง แตกต่างจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบชั้นเดียวซึ่งเป็นวิธีการที่สะดวกและง่าย อีกทั้งยังได้ผลผลิตของเซลล์เมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่มากกว่าซึ่งสามารถนำมาใช้เพื่อการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ในครั้งนี้ได้ โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์บุผิวที่นำเสนอไว้ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงสามารถสรุปจากรายงานก่อนหน้านี้นี้ได้ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวที่นำเสนอไว้และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์บุผิวที่นำเสนอไว้ภายหลังจากการเพาะเลี้ยง

ชนิดของเซลล์บุผิวที่นำเสนอ	วิธีการเพาะเลี้ยง		ชนิดอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์	ลักษณะรูปร่างทางสัณฐานวิทยาของเซลล์	อ้างอิง
	Monolayer culture	Air-liquid interface			
เซลล์บุผิวที่นำเสนอสุกร	✓		อาหาร M199 เสริมด้วย 10% fetal bovine serum	พบเซลล์ทรงกระบอก มีซีเลียด้านบน และเซลล์กลม ไม่มีซีเลีย เซลล์เริ่มยึดเกาะพื้นผิวเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 72 ชั่วโมง และแผ่ทั่วพื้นผิวที่ 96 ชั่วโมง	การศึกษาในครั้งนี้
เซลล์บุผิวที่นำเสนอสุกร	✓		อาหาร M199 เสริมด้วย 10% fetal calf	เพาะเลี้ยงเซลล์นาน 48 ชั่วโมง พบเซลล์ที่มีซีเลียด้านบนและ	Areekijsee and Vejaratpimol (2006)

ชนิดของ เซลล์บุผิว ที่นำไข	วิธีการเพาะเลี้ยง		ชนิดของ อาหาร เพาะเลี้ยง เซลล์	ลักษณะรูปร่าง ทางสัณฐาน วิทยาของเซลล์	อ้างอิง
	Monolayer culture	Air-liquid interface			
			serum	เซลล์ที่ไม่มีซีเลีย โดยพบทั้งเซลล์ รวมตัวเป็นกลุ่ม และแยกเป็น เซลล์เดี่ยว	
เซลล์บุผิว ที่นำไข สุกร	✓		อาหาร M199 เสริม ด้วย 10% fetal calf serum	เพาะเลี้ยงเซลล์ นาน 48 ชั่วโมง พบเซลล์ที่มีซีเลีย ด้านบนและเซลล์ ที่ไม่มีซีเลีย รวมตัวกันเป็น กลุ่มเซลล์และ แยกเป็นเซลล์ เดี่ยว	Areekijsee and Veerapraditsin (2008)
เซลล์บุผิว ที่นำไขโค	✓			เมื่อเพาะเลี้ยง นาน 72 ชั่วโมง เซลล์เริ่มยึดเกาะ พื้นผิวของจาน เพาะเลี้ยง	Walter (1995)
เซลล์บุผิว ที่นำไขโค	✓			เซลล์บุผิวที่นำ- ไขของโค เริ่มยึด เกาะพื้นผิวจาน เพาะเลี้ยงนาน 4-5 วัน	Joshi (1995)
เซลล์บุผิว ที่นำไข	✓			เซลล์บุผิวที่นำ- ไขของม้าจาก	Battut et al. (1991)

ชนิดของ เซลล์บุผิว ท่อไต	วิธีการเพาะเลี้ยง		ชนิดของ อาหาร เพาะเลี้ยง เซลล์	ลักษณะรูปร่าง ทางสัณฐาน วิทยาของเซลล์	อ้างอิง
	Monolayer culture	Air-liquid interface			
น้ำ				การศึกษาพบว่า เซลล์เริ่มยึดเกาะ เมื่อเพาะเลี้ยง นาน 5-8 วัน	
เซลล์บุผิว ท่อไต สุกร		✓	อาหาร Ham's F12 เสริมด้วย 10% fetal bovine serum	เซลล์บุผิวท่อไต- ไข่อสุกรมีการเรียง ตัวแบบ ทรงกระบอก ชั้นเดียว (simple columnar) พบ เซลล์ที่มีซีเลีย และเซลล์ที่ไม่มี ซีเลียเรียงสลับกัน ไปและสามารถ คงการมีชีวิตของ เซลล์ ได้นาน 6 สัปดาห์	Chen et al. (2013)
เซลล์บุผิว ท่อไต สุกร		✓	อาหาร Ham's F12 เสริมด้วย 10% fetal calf serum	พบการเรียงตัว ของเซลล์แบบ simple columnar พบ ทั้งเซลล์ที่มีซีเลีย และเซลล์ไม่มี ซีเลียเรียงตัว สลับกันไป	Miessen et al. (2011)

จากผลการศึกษาครั้งนี้เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวที่นำไขสุกรนาน 96 ชั่วโมง พบเซลล์มีการยึดเกาะเกือบทั่วทั้งจานเพาะเลี้ยงประมาณ 70-90 เปอร์เซ็นต์ แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เป็น 2 แบบคือ เซลล์รูปร่างหัวแหลมท้ายแหลม (fibroblast-like morphology) โดยพบเซลล์ชนิดนี้เป็นส่วนมากในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงและยังพบเซลล์ที่มีรูปร่างหลายเหลี่ยม (epithelial-like morphology) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Jung et al. (2011) ที่ทำการศึกษาดูเซลล์บุผิวที่นำไขของสัตว์ปีก พบว่าที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงนาน 5 วัน เซลล์แสดงรูปร่างลักษณะหลายเหลี่ยมและพบเซลล์รูปร่างหัวแหลมท้ายแหลมเช่นเดียวกับการศึกษาในครั้งนี้

ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาสุกรแบบปฐมภูมิที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบเซลล์แกรนูโลซารูปร่างกลมแบนลอยอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง และหัวแหลมท้ายแหลมคล้ายลูกรีบี้ (fusiform shape) ซึ่งยึดเกาะอยู่ที่ผิวจานเพาะเลี้ยง ต่อมาเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีรูปร่างยืดยาวมากขึ้น มีลักษณะหัวแหลมท้ายแหลมหรือมีรูปร่างคล้ายดาวหลายแฉก (multipolar shape) คล้ายกับการศึกษาของ Gutierrez, Campbell, and Webb (1997) รายงานการเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาของโคในอาหาร M199 นาน 48 ชั่วโมง พบเซลล์มีการยึดเกาะพื้นผิวและยืดยาวออกเป็นรูปร่างแบบหัวแหลมท้ายแหลม โดยพบทั้งเซลล์ที่เกาะรวมกันเป็นกลุ่มและเซลล์เดี่ยว สอดคล้องกับรายงานของ May and Schomberg (1981) ศึกษาเซลล์แกรนูโลซาจากสุกร ในอาหาร Ham F12 ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบชั้นเดียว 72 ชั่วโมง พบเซลล์รูปร่างหัวแหลมท้ายแหลมเช่นเดียวกับการศึกษาในครั้งนี้ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Duda, Knet, Tabarowski, and Slomczynska (2011) ที่เพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาสุกร พบว่าเซลล์แสดงรูปร่างหัวแหลมท้ายแหลมและมีหลายแฉกเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาโค เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง พบว่าเซลล์เกาะกลุ่มกันแน่น เซลล์มีรูปร่างยืดยาวยึดเกาะพื้นผิวจานเพาะเลี้ยง (Gutierrez et al., 1997) สอดคล้องกับการศึกษาของ Schmidt, Kendall, Dandekar, Quigley, and Schmidt (1984) ที่ทำการศึกษาดูเซลล์แกรนูโลซาจากมนุษย์ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน เซลล์แสดงรูปร่างคล้ายรูปดาว มีหลายแฉกและยืดยาวเกาะพื้นผิวจานเพาะเลี้ยง นอกจากนี้มีรายงานการเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาของหนู พบว่าเซลล์แสดงรูปร่างคล้ายรูปดาวหลายแฉกและยืดยาวยึดเกาะพื้นผิวจานเพาะเลี้ยง (Ben-Ze'ev & Amsterdam, 1987) รายงานการเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์บุผิวท่อลำไส้และเซลล์แกรนูโลซาเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แบบชั้นเดียว

ชนิดของเซลล์ที่เพาะเลี้ยง	ลักษณะรูปร่างทางสัณฐานวิทยาของเซลล์	อ้างอิง
เซลล์บุผิวท่อลำไส้สุกร	การเพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มต้น พบเซลล์ทรงกระบอกมีซีเลียด้านบนและเซลล์รูปร่างกลมไม่มีซีเลีย ต่อมาเซลล์ยึดเกาะพื้นผิวจานเพาะเลี้ยงที่แสดงรูปร่างแบบรูปร่างแบบหัวแหลมท้ายแหลมและรูปร่างหลายเหลี่ยม	การศึกษาในครั้งนี้
เซลล์บุผิวท่อลำไส้สุกร	เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 เสริมด้วย 10% fetal calf serum ที่การเพาะเลี้ยงเริ่มต้น พบเซลล์รูปร่างกลม	Areekijseere and Vejaratpimol (2006)
เซลล์บุผิวท่อลำไส้สุกร	เพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาสุกรในอาหาร M199 เสริมด้วย 5% fetal calf serum พบเซลล์รูปร่างหัวแหลมท้ายแหลมมีหลายแฉก	Duda et al. (2011)
เซลล์แกรนูโลซาของหนู	เพาะเลี้ยงในอาหารผสมของ F12 และ Ham's F10 ในอัตราส่วน 1:1 ที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง เซลล์แสดงรูปร่างคล้ายดาวหลายแฉก และยึดยาวยึดเกาะพื้นผิวจานเพาะเลี้ยง	Ben-Ze'ev and Amsterdam (1987)
เซลล์แกรนูโลซาของสุกร	เริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงพบเซลล์รูปร่างกลม ต่อมาพบเซลล์ยึดเกาะพื้นผิวเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง โดยเซลล์แสดงรูปร่างแบบกระสวย (fusiform shape) หรือรูปร่างแบบหัวแหลมท้ายแหลม ส่วนปลายเซลล์มีหลายแฉก (multipolar shape)	การศึกษาในครั้งนี้
เซลล์แกรนูโลซาของโค	เพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร McCoy's 5a พบเซลล์มีการรวมกลุ่มกัน เซลล์มีรูปร่างยึดยาว	Gutierrez et al. (1997)

ชนิดของเซลล์ที่เพาะเลี้ยง	ลักษณะรูปร่างทางสัณฐานวิทยาของเซลล์	อ้างอิง
	และยึดเกาะพื้นผิวจานเพาะเลี้ยง	
เซลล์แกรนูโลซาของมนุษย์	เพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร M199 เสริมด้วย 10% fetal calf serum เป็นเวลา 2 วัน เซลล์แสดงรูปร่างคล้ายดาว มีหลายแฉก และยึดเกาะพื้นผิวจานเพาะเลี้ยง	Schmidt et al. (1984)

ในการศึกษานี้พบว่าเซลล์บุผิวที่นำไขสุกรและเซลล์แกรนูโลซาสุกรที่เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิ มีชีวิตได้เป็นระยะเวลานาน (long-term culture) ถึง 6 สัปดาห์ ในการเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวที่นำไขสุกรและนานถึง 5 สัปดาห์ ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาสุกร ซึ่งการเพาะเลี้ยงแบบระยะยาวนี้มีประโยชน์อย่างยิ่งในการศึกษาการทำงาน โครงสร้างและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในระยะยาว หรือเพื่อทดสอบความเป็นพิษของสารในระยะยาวต่อเซลล์ได้ นอกจากนี้ยังช่วยลดปริมาณการใช้สัตว์ทดลองในการศึกษาลงได้ (Chen et al., 2013; Miessen et al., 2011) จากการเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวที่นำไขสุกรในระยะยาวพบว่าเซลล์บุผิวที่นำไขแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ 2 แบบคือ รูปร่างหัวแหลมท้ายแหลมและรูปร่างหลายเหลี่ยม ลักษณะแบบเซลล์บุผิว เช่นเดียวกับการศึกษาของ Kasperczyk et al. (2012) ที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวที่นำไขของไก่ พบว่าที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 12 วัน เซลล์แสดงรูปร่างทั้งสองแบบเช่นเดียวกัน การที่เซลล์แสดงลักษณะของรูปร่างที่แตกต่างกันนั้นเกิดจากการที่เซลล์มีการสร้างสารเคลือบเซลล์ (extracellular matrix) แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Chen et al. (2013) และ Miessen et al. (2011) ที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวที่นำไขสุกรโดยใช้วิธี air-liquid interface ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ พบว่าสามารถคงการมีชีวิตรอดและการทำงานของเซลล์ได้นานถึง 6 สัปดาห์ เช่นเดียวกับการศึกษาในครั้งนี้ แต่มีความแตกต่างที่วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบชั้นเดียว และสามารถคงการมีชีวิตรอดของเซลล์ได้นาน 6 สัปดาห์

นอกจากนี้ผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาสามารถคงการมีชีวิตรอดของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิได้นานเป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าเซลล์มีสัณฐานวิทยารูปร่างหัวแหลมท้ายแหลม (fibroblast-like morphology) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Gutierrez et al. (1997) ที่เพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร McCoy's 5a มีชีวิตได้เป็นนาน 144 ชั่วโมง หรือ 6 วัน เซลล์มีรูปร่างแบบหัวแหลมท้ายแหลม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Schmidt et al. (1984) และ Stewart and VandeVoort (1997) ที่ทำการศึกษาเซลล์แกรนูโลซาจากมนุษย์ โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ได้นาน 24 วัน

และ 20 วัน ตามลำดับ พบเซลล์จากทั้งสองรายงานว่ามีการแสดงรูปร่างแบบหัวแหลมท้ายแหลม เช่นเดียวกับการศึกษาในครั้งนี้

คือสภาวะแวดล้อมและวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบปฐมภูมิของเซลล์ทั้ง 2 ชนิดนี้ แสดงถึงความสามารถในการคงการมีชีวิตรอดของเซลล์ การทำหน้าที่ของเซลล์ได้ดีและการแสดงออกของรูปร่างลักษณะของเซลล์แต่ละชนิดที่ดี ซึ่งเซลล์ทั้ง 2 ชนิดที่ทำการเพาะเลี้ยงแบบระยะยาวนี้สามารถนำไปเพาะเลี้ยงต่อไปเพื่อพัฒนาเป็นเซลล์ไลน์ (cell line) ได้ ดังเช่นการศึกษาของ Hombach-Klonisch, Pocar, Kauffold, and Klonisch (2006) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ของเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกร โดยพัฒนามาจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิ จากนั้นนำมาทดสอบกับสาร polyhalogenated aromatic hydrocarbons (PHAH) ซึ่งเป็นสารที่มีผลต่อการทำงานของเซลล์ในระบบสืบพันธุ์และยังส่งผลทำให้เกิดการลดลงของอัตราการเกิดการปฏิสนธิ การศึกษาของ Schoen et al. (2008) ที่ทำการพัฒนาเซลล์บุผิวท่อนำไข่โคที่เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิไปเป็นเซลล์ไลน์ (aBOPEC-1) นอกจากนี้ยังพบการพัฒนาเซลล์แกรนูโลซาที่เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิไปเป็นแกรนูโลซาเซลล์ไลน์ (Chedrese, Rodway, Swan, & Gillio-Meina, 1998) สอดคล้องกับการศึกษาของ Sadowska et al. (2015) ที่พัฒนาเซลล์แกรนูโลซาสุกรที่เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิ โดยเก็บตัวอย่างเซลล์จากถุงไข่สุกรขนาดกลางไปเป็นแกรนูโลซาเซลล์ไลน์ (AVG-16) เพื่อนำไปศึกษากระบวนการในระดับโมเลกุลของเซลล์

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้เก็บตัวอย่างสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3 มิลลิเมตร) ขนาดกลาง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 4-6 มิลลิเมตร) และขนาดใหญ่ (เส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 7 มิลลิเมตร) จากโรงฆ่าสัตว์ในจังหวัดนครปฐม จากนั้นนำสารหลังที่ได้ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์แกรนูโลซาและเซลล์ไข่ออกจากสารหลังที่กำลังปั่นเหวี่ยง 1500 g เป็นเวลา 3-5 นาที จากนั้นนำสารหลังที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Bianchi et al. (2007) ที่ทำการศึกษาส่วนประกอบภายในสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดต่างๆ โดยทำการเก็บตัวอย่างสารหลังจากถุงไข่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์หรือประมาณ 10 วัน และจากรายงานของ Ducolomb et al. (2013) ที่เก็บตัวอย่างสารหลังจากถุงไข่สุกรแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากสารหลังที่กำลังปั่นเหวี่ยง 1500g แล้วนำสารหลังมากรองด้วยตัวกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาศึกษาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry et al. (1951) นอกจากนี้ยังมีผู้ศึกษาส่วนประกอบของสารหลังจากถุงไข่สุกร โดยทำการเก็บสารหลังจากถุงไข่สุกรไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

(Van de Wiel et al., 1983) และมีรายงานวิธีการเก็บตัวอย่างสารหลังจากถุงไข่สุกร โดยนำมากรองด้วยที่กรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ ก่อนนำมาศึกษา (Algriany et al., 2004; Dode & Graves, 2001; Ito et al., 2008; Jeong et al., 2008; Oberlender et al., 2013; Rath, Niemann, & Tao, 1995; Yoshida, Ishizaki, Kawagishi, Bamba, & Kojima, 1992) จากรายงานของ Pierce Biotechnology Inc. (2003) รายงานว่าอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษามีผลต่อการสลายตัวและระยะเวลาในการเก็บรักษาโปรตีน หากเก็บรักษาโปรตีนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะสามารถเก็บรักษาโปรตีนได้โดยไม่เกิดการสลายตัวได้ในระยะสั้น เป็นเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ ถึง 1 เดือน เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จะสามารถเก็บได้นานหลายเดือน แต่หากต้องการเก็บเป็นระยะเวลานานเป็นปีโดยไม่เกิดการสลายตัวของโปรตีนจะต้องเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส หรือไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)

ในปัจจุบันการเสริมสารหลังจากไข่ในอาหารเพาะเลี้ยงเป็นที่นิยมอย่างมาก เนื่องจากสารหลังจากไข่สามารถกระตุ้นการเจริญของเซลล์ไข่ภายในห้องปฏิบัติการได้เป็นอย่างดี โดยสารหลังจากไข่ถูกสร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์แกรนูโลซา (granulosa cells) และเซลล์ธีคา (theca cells) และบางส่วนของสารหลังจากไข่สร้างมาจากน้ำเลือด (blood plasma) (Revelli et al., 2009; Shabankareh, Kor, & Hajarian, 2013) ประโยชน์ของสารหลังจากไข่ที่นำมาใช้ภายในห้องปฏิบัติการนั้นสามารถนำมาใช้เพื่อส่งเสริมการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิและส่งเสริมกระบวนการทางกายภาพของเซลล์อสุจิอีกด้วย (Mondal, Takagi, Baba, & Hamano, 2017) การศึกษาของ Funahashi and Day (1993) กล่าวว่าสารหลังจากไข่ช่วยส่งเสริมการเกิดกระบวนการ capacitation และ acrosome reaction ของเซลล์อสุจิ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Areekijsee and Veerapraditsin (2008) รายงานถึงผลของสารหลังจากเซลล์แกรนูโลซาและเซลล์คิวมูลัสที่เสริมในอาหารเพาะเลี้ยง M199 โดยให้เป็น conditioned medium (CM) ต่อเซลล์อสุจิโค พบว่าเซลล์อสุจิโคแข็งแรงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร CM พบเปอร์เซ็นต์การเกิดกระบวนการ acrosome reaction มากกว่าเซลล์อสุจิที่เพาะเลี้ยงในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญและผลจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบว่าเซลล์อสุจิที่เพาะเลี้ยงในอาหาร CM พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของส่วนหัวของเซลล์อสุจิเพื่อให้เกิดกระบวนการ acrosome reaction ต่อไป นอกจากนี้สารหลังจากไข่ยังสามารถเสริมในอาหารที่ใช้ในการกระตุ้นไข่สุกภายในห้องปฏิบัติการ (IVM) และใช้เพื่อส่งเสริมการปฏิสนธิภายในห้องปฏิบัติการได้อีกด้วย (IVF)

(Areekijsee & Veerapraditsin, 2008; Funahashi & Day, 1993; Jeong et al., 2008; Oberlender et al., 2013; Revelli et al., 2009)

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิโดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์บิวทอนำไข่นาน 96 ชั่วโมง ในอาหารเพาะเลี้ยง M199 เสริมด้วย 2.2 mg/mL, NaHCO₃, 0.25 mM pyruvate, 50 µg/mL gentamycin sulfate และเซลล์แกรนูโลซานาน 48 ชั่วโมง ในอาหารเพาะเลี้ยง M199 เสริมด้วย 2.2 mg/mL, NaHCO₃, 0.25 mM pyruvate, 50 µg/mL gentamycin sulfate, 15 µg/mL FSH, 1 µg/mL LH, 1 µg/mL estradiol เนื่องจากตามธรรมชาติเซลล์แกรนูโลซาจะอยู่ในถุงไข่ซึ่งมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ไข่และมีฮอร์โมนหล่อเลี้ยงอยู่หลายชนิด (Hummitzsch et al., 2013; Manikkam et al., 2002) การศึกษานี้จึงเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาสุกรในอาหารเพาะเลี้ยงที่เสริมฮอร์โมน ก่อนทำการทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดต่างๆ เนื่องจากที่ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเซลล์เท่านี้มีผลต่อประชากรของเซลล์ที่มีการยึดเกาะพื้นผิวอยู่ที่ประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเหมาะสมต่อการนำมาใช้ทดสอบกับสารต่างๆ ภายหลังจากการทดสอบทำการศึกษาผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดต่างๆ จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ ผลการศึกษาผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิ ได้แสดงให้เห็นว่าเซลล์บิวทอนำไข่สุกรที่เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิและเซลล์แกรนูโลซาที่เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิ เมื่อถูกทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่ มีการส่งเสริมการเจริญพัฒนาของเซลล์ให้เพิ่มมากขึ้น โดยส่งผลให้เซลล์ก่อนการทดสอบที่มีรูปร่างหัวแหลมท้ายแหลมนั้น เมื่อถูกทดสอบเซลล์มีการยึดยาวเพิ่มมากขึ้นและยังคงมีรูปร่างแบบหัวแหลมท้ายแหลมอยู่ในเซลล์แกรนูโลซาสุกร ในส่วนของเซลล์บิวทอนำไข่สุกร เซลล์ที่ถูกทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่สุกรมีการขยายขนาดของเซลล์เพิ่มมากขึ้น จากผลการศึกษาพบว่าความเข้มข้นโปรตีนของสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็ก ขนาดกลาง และขนาดใหญ่ที่เหมาะสมต่อการมีชีวิตของเซลล์บิวทอนำไข่สุกรที่ความเข้มข้นโปรตีน 500-600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คล้ายคลึงกับผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดกลางและขนาดใหญ่ต่อการมีชีวิตของเซลล์แกรนูโลซาพบว่าความเข้มข้นโปรตีนที่เหมาะสมต่อการมีชีวิตของเซลล์อยู่ที่ความเข้มข้นโปรตีน 200-600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่พบว่าผลของสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็กส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์แกรนูโลซาให้มียาค่าลดลงต่ำกว่ากลุ่มควบคุมในทุกความเข้มข้น เซลล์ถูกทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่สุกรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกับในการศึกษาของ Battin and

diZerega (1985) ที่ทดสอบผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรต่อการสังเคราะห์โปรเจสเตอโรนของเซลล์แกรนูโลซาสุกรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากการศึกษาของ Revelli et al. (2009) ได้รายงานถึงสารที่เป็นส่วนประกอบของสารหลังจากถุงไข่ซึ่งส่งผลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเอ็มบริโอ นั่นคือ anti-mullerian hormone (AMH) ซึ่งการที่ AMH มีปริมาณสูงซึ่งส่งผลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเอ็มบริโอ ขณะที่อยู่ในระยะ 6 เซลล์ ซึ่งส่งผลต่อการทำปฏิสนธิภายในห้องปฏิบัติการได้สำเร็จเพิ่มมากขึ้น (Silberstein et al., 2005) อีกทั้งกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบของสารหลังจากถุงไข่ยังมีผลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ดีของเซลล์ไข่ ซึ่งส่งผลต่ออัตราการปฏิสนธิที่เพิ่มมากขึ้นในมนุษย์ (D'aniello et al., 2007) นอกจากนี้ส่วนประกอบอื่นๆ ของสารหลังจากถุงไข่เช่น สารส่งเสริมการเจริญ (growth factor) และฮอร์โมน เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้สามารถส่งผลต่อการเจริญของเซลล์ให้เพิ่มขึ้นได้อีกด้วย (Revelli et al., 2009) ดังจะเห็นได้ว่าสารหลังจากถุงไข่มีผลต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์ให้เพิ่มมากขึ้น ในการศึกษาครั้งนี้สามารถตรวจสอบการเจริญพัฒนาของเซลล์ได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่มีการเจริญเพิ่มมากขึ้น กล่าวคือเซลล์มีการยึดตัวและขยายตัวเพิ่มมากขึ้น และอีกวิธีคือ MTT assay เพื่อตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์ภายหลังการทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่

ผลของสารหลังจากถุงไข่ต่อเซลล์บุผิวท่อนำไข่และเซลล์แกรนูโลซาพบว่าสารหลังจากถุงไข่ขนาดกลางและจากถุงไข่ขนาดใหญ่ส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ที่เพิ่มมากขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่เสริมสารใดๆ เนื่องมาจากองค์ประกอบของสารหลังจากถุงไข่ขนาดกลางและขนาดใหญ่มีโปรตีนที่เป็นส่วนสำคัญในการช่วยกระตุ้นการเจริญของเซลล์ เช่นเซลล์ไข่ โดยสารหลังจากถุงไข่มีส่วนสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการตกไข่และการสุกของเซลล์ไข่ภายในห้องปฏิบัติการ (Ito et al., 2008; Shabankareh et al., 2013) เนื่องมาจากภายในสารหลังจากถุงไข่มีสารที่ส่งเสริมการเจริญและยังพบว่ามีฮอร์โมน follicular stimulating hormone (FSH) และฮอร์โมน luteinizing hormone (LH) อยู่มาก (Gupta, Ravindra, Kumar, Raghu, & Nandi, 2005; Shabankareh et al., 2013) ซึ่งฮอร์โมน FSH และ LH ที่เป็นองค์ประกอบของสารหลังจากถุงไข่ส่งผลต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์แกรนูโลซา จากการศึกษาของ Lawrence, Ginzberg, Gilula, and Beers (1979) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาในอาหารที่เสริมด้วยฮอร์โมน FSH และ LH พบว่าเซลล์แกรนูโลซานั้นมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์และพบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีผู้ทำการศึกษาผลของสารหลังจากถุงไข่ขนาดกลางต่อการสังเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (progesterone) ของเซลล์แกรนูโลซา พบว่า

เซลล์แกรนูโลซาที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง M199 ที่เสริมด้วยสารหลังจากถุงไข่ขนาดกลาง (2-5 มิลลิเมตร) ที่ความเข้มข้นของโปรตีน 167 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเซลล์มีการผลิตฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสูงที่สุดเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆ และแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ นั่นหมายถึงเซลล์มีการทำงานของเซลล์ได้ดีที่สุด แต่ที่ความเข้มข้นของโปรตีนจากสารหลังในถุงไข่ที่ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์แกรนูโลซามีการผลิตโปรเจสเตอโรนคงที่ (Battin & diZerega, 1985) คล้ายคลึงกับผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ที่ความเข้มข้นโปรตีน 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารหลังจากถุงไข่ขนาดกลางมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์บิวทอ์นาไข่และเซลล์แกรนูโลซาสูงที่สุดเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่นๆ และแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการศึกษาของ Brachova, Alvarez, Van Voorhis, and Christenson (2017) ที่ทำการศึกษาด้านเซลล์บิวทอ์นาไข่จากมนุษย์ในอาหารเพาะเลี้ยงที่เสริมด้วยสารหลังจากถุงไข่ของมนุษย์พบว่า สารหลังจากถุงไข่สามารถส่งเสริมการเจริญของเซลล์บิวทอ์นาไข่ให้มีการเจริญได้เพิ่มมากขึ้น คล้ายกับการศึกษานี้ที่พบว่าสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดกลางและขนาดใหญ่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ที่มากกว่าในกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Somigliana et al. (2001) ที่ทำการศึกษาผลของสารหลังจากถุงไข่ต่อเซลล์ในชั้น endometrial ของมดลูกมนุษย์ ซึ่งเซลล์นี้เพาะเลี้ยงในอาหาร Ham's F-10 ที่เสริมด้วยสารหลังจากถุงไข่มนุษย์ พบว่าสารหลังจากถุงไข่นั้นส่งเสริมการเจริญของเซลล์ให้เพิ่มมากกว่ากลุ่มควบคุม นอกจากนี้ผลของสารหลังจากถุงไข่ขนาดกลางและขนาดใหญ่สามารถส่งเสริมให้เกิดการสุกของไข่ภายในห้องปฏิบัติการได้อีกด้วย ดังเช่นการศึกษาของ Oberlender et al. (2013) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ในอาหารเพาะเลี้ยง NCSU-37 เสริมด้วยสารหลังจากถุงไข่ขนาดใหญ่ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 6-10 มิลลิเมตร) พบเปอร์เซ็นต์การสุกของไข่ภายในห้องปฏิบัติการสูงกว่าเซลล์ไข่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วยสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 2-5 มิลลิเมตร) แต่ผลของสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็กและขนาดใหญ่ต่อการปฏิสนธิภายในห้องปฏิบัติการไม่พบความแตกต่างกัน สอดคล้องกับการศึกษาของ Ito et al. (2008) ศึกษาผลของสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร) และขนาดใหญ่ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร) ต่อการสุกของเซลล์ไข่ภายในห้องปฏิบัติการโดยเสริมด้วยสารหลังจากถุงไข่ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ปริมาตร 10% (v/v) ผลของอาหารเพาะเลี้ยงที่เสริมด้วยสารหลังจากถุงไข่ขนาดใหญ่ต่อเปอร์เซ็นต์การสุกของไข่ภายในห้องปฏิบัติการมีค่าสูงกว่าเซลล์ไข่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วยสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็ก นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์คิวมูลัส (cumulus cells) ในอาหารเพาะเลี้ยงที่เสริมด้วยสารหลังจากถุงไข่ขนาดใหญ่ส่งผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์คิวมูลัสที่เพิ่ม

มากขึ้นอีกด้วย ผู้วิจัยคาดว่าอาจเป็นผลมาจากโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบภายในสารหลังจากถุงไข่ขนาดใหญ่ ที่มีมวลโมเลกุลอยู่ระหว่าง 30 ถึง 100 kDa ซึ่งส่งผลต่อการพัฒนาของเซลล์ไข่และการรอดชีวิตของเซลล์ตัวอ่อนที่เพิ่มมากขึ้น เช่นเดียวกับผลการศึกษาครีซิมส์ที่พบว่าผลของสารหลังจากถุงไข่ขนาดใหญ่ส่งผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์ทั้งสองชนิดเพิ่มมากขึ้น จากที่กล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่าผลของสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็กมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์สอดคล้องกับผลการศึกษาผลของสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็กต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์แกรนูโลซาสุกรที่แสดงให้เห็นถึงการเจริญพัฒนาที่ลดลงต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งแตกต่างกับผลของสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็กต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกร คาดว่าอาจเป็นผลมากจากการที่เซลล์แกรนูโลซาต้องการฮอร์โมนในการเพาะเลี้ยงเซลล์ภายในห้องปฏิบัติการและคาดว่าสารตัวหนึ่งที่พบมากในสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็กคือ oocyte maturation inhibitor หรือ OMI โดยสารนี้เป็นสารที่ส่งผลยับยั้งการเจริญพัฒนาของเซลล์ไข่ ซึ่งเซลล์แกรนูโลซามีส่วนเกี่ยวข้องในการสร้างสารนี้ (Channing et al., 1983; Tsafiriri et al., 1976; Van de Wiel et al., 1983) จึงคาดว่าอาจส่งผลยับยั้งเซลล์แกรนูโลซาซึ่งเป็นเซลล์ที่อยู่ในถุงไข่และอยู่ในสภาวะแวดล้อมเช่นเดียวกันกับเซลล์ไข่ คืออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ต้องการฮอร์โมนและสารต่างๆ คล้ายคลึงกับเซลล์ไข่ จึงอาจมีผลในการตอบสนองต่อสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดเล็กแตกต่างกับเซลล์บุผิวท่อนำไข่ที่ไม่เคยพบกับสารหลังจากถุงไข่มาก่อน จึงคาดว่าเพียงผลของสารส่งเสริมการเจริญและโปรตีนบางชนิดภายในสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็กก็สามารถส่งเสริมการเจริญของเซลล์ได้

จากการศึกษาของ Daen et al. (1994) ที่ทำการศึกษาค้นคว้าผลของสารหลังจากถุงไข่นำมาแยกเป็นส่วนๆ 4 ส่วนด้วยวิธี ultracentrifugation พบว่าสารหลังจากถุงไข่ในส่วนที่ 1 ช่วยส่งเสริมการเกิดการปฏิสนธิภายในห้องปฏิบัติการเพิ่มมากขึ้นและส่งเสริมให้เกิดการแผ่ของเซลล์ตัวอ่อนที่เพิ่มมากขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Ducolomb et al. (2013) ที่กล่าวว่าส่วนที่ 1 ที่ถูกแยกออกมาของสารหลังจากถุงไข่ มีโปรตีนที่ช่วยส่งเสริมการเจริญและการสุกของเซลล์ไข่ โดยโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบที่สามารถพบได้ในสารหลังจากถุงไข่เช่น โปรตีนกลุ่มที่เป็นสารส่งเสริมการเจริญเช่น epidermal growth factor และ insulin-like growth factors (IGF) เป็นโปรตีนอีกชนิดที่พบได้มากภายในสารหลังจากถุงไข่ ซึ่งมีผลช่วยในการส่งเสริมการเจริญของเซลล์ (cell proliferating) และการเปลี่ยนแปลงเพื่อไปทำหน้าที่ต่างๆ ของเซลล์ (cell differentiation) (Knight & Glistler, 2001; Oberlender et al., 2013; Revelli et al., 2009; Somigliana et al., 2001; Spitzer et al., 1996) จากการศึกษาของ Ito et al. (2008) กล่าวว่าภายในสารหลังจากถุงไข่ขนาดใหญ่พบการ-

ทำงานของโปรตีน IGF อยู่มาก ซึ่งส่งผลต่อการคงสภาพการทำงานและการมีชีวิตรอดของเซลล์
 คิวมูลัส ซึ่งโปรตีน IGF-I และ อินซูลิน (insulin) มีส่วนช่วยในการลดการเกิดกระบวนการตายของ
 เซลล์แบบ apoptosis ได้ (Fouladi-Nashta & Campbell, 2006) และพบโปรตีนในกลุ่ม cytokine
 เช่น interleukin และ immunoglobulin (Ducolomb et al., 2013; Günther et al., 2016;
 Somigliana et al., 2001; Spitzer et al., 1996) โดยโปรตีนบางชนิดมีหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่ง
 ส่งผลกระตุ้นให้เกิดกระบวนการอักเสบ (inflammation) (Revelli et al., 2009)
 กระบวนการพัฒนาของถุงไข่ภายในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและกระบวนการตกไข่สามารถเทียบได้กับ
 กระบวนการเกิดการอักเสบ นอกจากนี้ยังพบโปรตีนในกลุ่ม lysophospholipids เช่น inhibin
 activin protein kinase fibrinogen plasminogen follistatin ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นตัวช่วยในการ
 จับกันระหว่างโมเลกุล (binding protein) พบว่าโปรตีนบางชนิด (inhibin) มีส่วนช่วยในการกระตุ้น
 การเจริญของถุงไข่และพบ steroidogenesis-inducing protein ซึ่งโปรตีนชนิดต่างๆ เหล่านี้
 สามารถพบได้ในสารหลังจากถุงไข่ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม และโปรตีนต่างๆ เหล่านี้สามารถ
 กระตุ้นให้เกิดการเจริญของเซลล์ได้ (Ducolomb et al., 2013; Giudice, Chandrasekher, &
 Cataldo, 1993; Henderson, Franchimont, Charlet-Renard, & McNatty, 1984; Knight &
 Glistler, 2001; Revelli et al., 2009; Spitzer et al., 1996) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้

นอกจากนี้ยังพบองค์ประกอบของสารอื่นๆ ที่อยู่ภายในสารหลังจากถุงไข่ที่สามารถส่งผล
 กระตุ้นการเจริญของเซลล์ได้อีกด้วยได้แก่ ฮอร์โมน เช่น gonadotropin prolactin estrogen
 progesterone androgen corticoids และ growth hormone ยังพบสารในกลุ่ม reactive
 oxygen species (ROX) สาร anti-apoptotic factors สารในกลุ่ม prostanoid และยังพบไขมัน
 (lipids) น้ำตาล (glucose) กรดยูริก (uric acid) เอนไซม์ (enzyme) ลิพิด (lipid) cyclic AMP
 (cAMP) (Chang et al., 1976; Spitzer et al., 1996) จากรายงานของ Revelli et al. (2009)
 รายงานว่าพบสารที่ส่งเสริมการเจริญหลายชนิดในสารหลังจากถุงไข่ ตัวอย่างเช่น bone
 morphogenetic protein-15 (BMP-15) ซึ่งเป็นสารส่งเสริมการเจริญที่มีผลอย่างมากต่อการสุกของ
 เซลล์ไข่และคุณภาพของเซลล์ไข่ ซึ่งสารตัวนี้สามารถพบได้มากในสารหลังจากถุงไข่


ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจสอบผลของสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดเล็ก ขนาดกลาง
 และขนาดใหญ่ต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์ (cells viability) ที่เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิได้แก่เซลล์บุ-
 ผิวท่อหน้าไข่สุกรและเซลล์แกรนูโลซาสุกรโดยใช้วิธี MTT assay เป็นอีกวิธีหนึ่งในการตรวจสอบการมี-
 ชีวิตรอดของเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยง โดยวิธี MTT assay นี้เป็นวิธีการตรวจสอบการเจริญพัฒนาของ

เซลล์โดยการทำให้เกิดสี (Gerlier & Thomasset, 1986) tetrazolium salts เป็นส่วนประกอบหลักของการทำ MTT assay โดยสามารถวัดการเจริญพัฒนาของเซลล์ได้จากความสามารถในการเกิดกระบวนการ reduction ของไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ ซึ่งจะมีการเปลี่ยน tetrazolium salts ที่มีสีเหลือง ไปเป็นสีม่วงของ formazan crystal (van Meerloo et al., 2011) จากรายงานก่อนหน้าของ Ellington et al. (1998) รายงานถึงการใช่วิธี MTT assay ในการตรวจสอบความสามารถในการรอดชีวิตของเซลล์บุผิวท่อหน้าไข่มนุษย์ วานรและโค โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิแบบชั้นเดียว แล้วทำการวัดการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร สอดคล้องกับการศึกษาของ Peng et al. (2015) ที่ใช่วิธี MTT assay เพื่อตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์บุผิวท่อหน้าไข่มนุษย์ จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร เช่นเดียวกับการศึกษาในครั้งนี้

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษารหัสโปรตีนจากถุงไข่สุกรขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่ ด้วยวิธี Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) จากผลการศึกษารหัสโปรตีนจากถุงไข่สุกรขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่ ด้วยวิธี Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 23, 50, 92, 100 และ >225 kDa เป็นส่วนประกอบภายในสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่เหมือนกัน แต่พบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 12 และ 16 kDa ภายในสารหลังจากถุงไข่ขนาดใหญ่เท่านั้น โดยพบรายงานการศึกษาถึงชนิดของโปรตีนภายในถุงไข่สุกรตามขนาดของโมเลกุลซึ่งสามารถสรุปได้ดังตาราง 7

ตารางที่ 7 สรุปขนาดของสารหลังโปรตีนจากถุงไข่ขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่จากการศึกษาด้วยวิธี Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และแสดงชนิดและหน้าที่ของโปรตีนภายในสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดต่างๆ

ขนาดของโปรตีน (kDA)	โปรตีนจากสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดเล็ก	โปรตีนจากสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดกลาง	โปรตีนจากสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดใหญ่	หน้าที่ของโปรตีนจากสารหลังจากถุงไข่สุกร	อ้างอิง
>225				ส่งเสริมการเจริญของเซลล์ไข่และกระบวนการตกไข่	Corbin et al. (2003);
225	-			ส่งเสริมการเจริญของเซลล์ไข่และกระบวนการตกไข่	Ducolomb et al. (2013);
100				สามารถส่งเสริมการเจริญของเซลล์ได้การปฏิสนธิภายในห้องปฏิบัติการ	Gerard, Delpuech, Oxvig,
50				ส่งเสริมการเจริญของเซลล์ไข่	Overgaard, and Monget
23				กระตุ้นการเจริญพัฒนาของถุงไข่	(2004); Monget et
16	-	-		กระตุ้นการเจริญพัฒนาของถุงไข่	al. (2002)
12	-	-		กระตุ้นการทำงานของฮอร์โมน FSH จากเซลล์แกรนูโลซา	

หมายเหตุ  แสดงความเข้มของแถบโปรตีนที่พบจากน้อยไปมากตาม

จากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงผลของสารหลังจากถุงไข่ที่สามารถส่งเสริมการเจริญพัฒนาของทั้งเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกรและเซลล์แกรนูโลซาสุกรคาดว่าเป็นผลมาจากสารประกอบต่างๆ ที่อยู่ในสารหลังจากถุงไข่เช่น สารส่งเสริมการเจริญ ฮอร์โมนเพศหลายชนิดและโปรตีนหลายชนิดที่มี

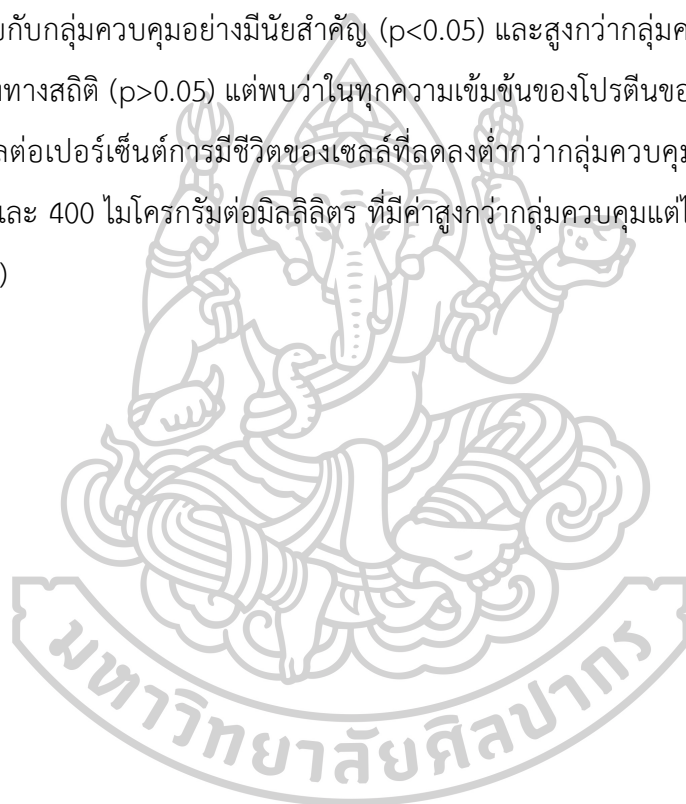
ผลส่งเสริมการเจริญของเซลล์ (Revelli et al., 2009) ในการศึกษาต่อไปจึงคาดว่าจะนำสารหลังจาก
ถลุงไข่สุกรเสริมในอาหารเพาะเลี้ยงแทนการใช้ซีรัมและฮอร์โมนเพื่อเป็นการลดค่าใช้จ่ายจากการใช้
สารเคมี นอกจากนี้ประโยชน์ของการศึกษาในครั้งนี้ยังช่วยลดของเสียหรือขยะที่เกิดจากโรงฆ่าสัตว์นั้น
คือท่อनाไขและรังไข่ของสุกร อีกทั้งการนำของเสียที่เหลือทิ้งจากโรงฆ่าสัตว์มาใช้เพื่อคัดแยกเซลล์มา
ใช้ในการศึกษานี้มีประโยชน์อย่างมากในการช่วยลดปริมาณการใช้สัตว์ทดลองลงได้และเมื่อเพาะเลี้ยง
เซลล์ให้เจริญพัฒนาได้แล้วสามารถพัฒนาต่อไปเป็นเซลล์ไลน์เพื่อเก็บรักษาไว้ใช้ในการศึกษาครั้ง
ต่อไปได้



สรุปผล

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์บุผิวที่นำเข้าสุกรเมื่อเพาะเลี้ยงแบบระยะสั้นนาน 48 ชั่วโมง พบเซลล์ทรงกระบอกมีซีเลียและเซลล์กลมไม่มีซีเลีย โดยเซลล์เริ่มยึดเกาะพื้นผิวเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 72 ชั่วโมง เซลล์แสดงรูปร่าง 2 แบบคือรูปร่างหัวแหลมท้ายแหลมและรูปร่างหลายเหลี่ยมและแผ่ทั่วจานเพาะเลี้ยง 70-80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 96 ชั่วโมง
2. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์แกรนูโลซาสุกรเมื่อเพาะเลี้ยงแบบระยะสั้น พบเซลล์กลมเมื่อเริ่มต้นการเพาะเลี้ยง เซลล์เริ่มยึดเกาะพื้นผิวเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง เซลล์แสดงรูปร่างหัวแหลมท้ายมีหลายแฉกและแผ่ทั่วจานเพาะเลี้ยง 70-80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง
3. เพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวที่นำเข้าสุกรแบบระยะยาว พบเซลล์รูปร่างหัวแหลมท้ายแหลมและรูปร่างหลายเหลี่ยม เซลล์มีการเจริญเติบโตโดยการแผ่ขยายตัวเพิ่มมากขึ้นและพบว่าเซลล์รูปร่างหลายเหลี่ยมมีเปอร์เซ็นต์การเจริญพัฒนามากขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานมากขึ้น พบเซลล์รูปร่างหลายเหลี่ยมเป็นส่วนมากของประชากรเซลล์ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์รูปร่างหัวแหลมท้ายแหลมประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ โดยเซลล์รูปร่างหัวแหลมท้ายแหลมจะสานกันเป็นกลุ่มและพบเซลล์รูปร่างหลายเหลี่ยมอยู่ตรงกลาง เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์
4. เพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาสุกรแบบระยะยาว พบเซลล์มีรูปร่างหัวแหลมท้ายแหลม 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ตั้งแต่ 1-5 สัปดาห์ เซลล์มีการยึดยาวเพิ่มมากขึ้นและสานตัวเป็นร่างแหทั่วจานเพาะเลี้ยงเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานมากขึ้น
5. เพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวที่นำเข้าสุกรในอาหาร M199 เสริมด้วยสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่ ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำค่าการมีชีวิตของเซลล์ไปวิเคราะห์ทางสถิติ one-way ANOVA พบว่าความเข้มข้นโปรตีนที่เหมาะสมของสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็กคือที่ความเข้มข้นโปรตีน 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (498.173 ± 58.87 เปอร์เซ็นต์) มีค่าสูงที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ขนาดกลางที่ความเข้มข้นโปรตีน 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (625.351 ± 48.37 เปอร์เซ็นต์) มีค่าสูงที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และขนาดใหญ่ที่ความเข้มข้นโปรตีน 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (456.363 ± 30.32 เปอร์เซ็นต์) มีค่าสูงที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

6. เพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาสุกรในอาหาร M199 เสริมด้วยสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่ ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำค่าการมีชีวิตของเซลล์ไปวิเคราะห์ทางสถิติ one-way ANOVA พบว่าความเข้มข้นโปรตีนที่เหมาะสมของสารหลังจากถุงไข่ขนาดกลางที่ความเข้มข้นโปรตีน 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (224.628 ± 26.21 เปอร์เซ็นต์) มีค่าสูงที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และสูงกว่ากลุ่มควบคุมเชิงบวกแต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) และขนาดใหญ่ที่ความเข้มข้นโปรตีน 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (264.224 ± 31.79 เปอร์เซ็นต์) มีค่าสูงที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และสูงกว่ากลุ่มควบคุมเชิงบวกแต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่พบว่าในทุกความเข้มข้นของโปรตีนของสารหลังจากถุงไข่สุกร ขนาดเล็กมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ที่ลดลงต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ยกเว้นที่ความเข้มข้นโปรตีน 200 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมแต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$)



รายการอ้างอิง

- Abe, H., & Hoshi, H. (1997). Bovine oviductal epithelial cells: their cell culture and applications in studies for reproductive biology. *Cytotechnology*, 23(1), 171-183.
- Adeldust, H., Zeinoaldini, S., Kohram, H., Roudbar, M. A., & Joupari, M. D. (2015). In vitro maturation of ovine oocyte in a modified granulosa cells co-culture system and alpha-tocopherol supplementation: effects on nuclear maturation and cleavage. *Journal of Animal Science and Technology*, 57(1), 27. doi:10.1186/s40781-015-0061-5
- Agung, B., Otoi, T., Fuchimoto, D.-i., Senbon, S., Onishi, A., & Nagai, T. (2013). In vitro Fertilization and development of porcine oocytes matured in follicular fluid. *Journal of Reproduction and Development*, 59(2), 103-106.
- Ainsworth, L., Tsang, B. K., Downey, B. R., Marcus, G. J., & Armstrong, D. T. (1980). Interrelationships Between Follicular Fluid Steroid Levels, GonadotropinC Stimuli, and Oocyte Maturation During Preovulatory Development of Porcine Follicles¹. *Biology of Reproduction*, 23(3), 621-627. doi:10.1095/biolreprod23.3.621
- Algriany, O., Bevers, M., Schoevers, E., Colenbrander, B., & Dieleman, S. (2004). Follicle size-dependent effects of sow follicular fluid on in vitro cumulus expansion, nuclear maturation and blastocyst formation of sow cumulus oocytes complexes. *Theriogenology*, 62(8), 1483-1497.
- Areekijserree, M., & Veerapraditsin, T. (2008). Characterization of porcine oviductal epithelial cells, cumulus cells and granulosa cells-conditioned media and their ability to induce acrosome reaction on frozen-thawed bovine spermatozoa. *Micron*, 39(2), 160-167. doi:<https://doi.org/10.1016/j.micron.2006.12.008>
- Areekijserree, M., & Vejaratpimol, R. (2006). In vivo and in vitro study of porcine oviductal epithelial cells, cumulus oocyte complexes and granulosa cells: A scanning electron microscopy and inverted microscopy study. *Micron*, 37(8), 707-716. doi:<https://doi.org/10.1016/j.micron.2006.03.004>
- Avilés, M., Gutiérrez-Adán, A., & Coy, P. (2010). Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs? *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 16(12),

896-906. doi:10.1093/molehr/gaq056

- Bassols, A., Costa, C., Eckersall, P. D., Osada, J., Sabrià, J., & Tibau, J. (2014). The pig as an animal model for human pathologies: A proteomics perspective. *PROTEOMICS – Clinical Applications*, 8(9-10), 715-731.
doi:10.1002/prca.201300099
- Battin, D. A., & diZerega, G. S. (1985). The effect of follicular fluid protein(s) on gonadotropin-modulated secretion of progesterone in porcine granulosa cell cultures. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 153(4), 432-438.
doi:[https://doi.org/10.1016/0002-9378\(85\)90082-1](https://doi.org/10.1016/0002-9378(85)90082-1)
- Battut, I., Bezar, J., & Palmer, E. (1991). Establishment of equine oviduct cell monolayers for co-culture with early equine embryos. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 44, 393-403.
- Ben-Ze'ev, A., & Amsterdam, A. (1987). In vitro regulation of granulosa cell differentiation. Involvement of cytoskeletal protein expression. *Journal of biological chemistry*, 262(11), 5366-5376.
- Bianchi, F., Careri, M., Mangia, A., Musci, M., Santini, S. E., & Basini, G. (2007). Porcine follicular fluids: Comparison of solid-phase extraction and matrix solid-phase dispersion for the GC-MS determination of hormones during follicular growth. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44(3), 711-717.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.03.013>
- Boncler, M., RóŻalski, M., Krajewska, U., Podędek, A., & Watala, C. (2014). Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 69(1), 9-16.
- Brachova, P., Alvarez, N. S., Van Voorhis, B. J., & Christenson, L. K. (2017). Cytidine deaminase Apobec3a induction in fallopian epithelium after exposure to follicular fluid. *Gynecologic oncology*, 145(3), 577-583.
- Campbell, J. R., Kenealy, M. D., & Campbell, K. L. (2003). *Animal Sciences: The Biology, Care, and Production of Domestic Animals* (4th ed.). Boston: McGraw-Hill.
- Chang, S. C. S., Jones, J. D., Ellefson, R. D., & Ryan, R. J. (1976). The Porcine Ovarian

- Follicle: I. Selected Chemical Analysis of Follicular Fluid at Different Developmental Stages. *Biology of Reproduction*, 15(3), 321-328.
doi:10.1095/biolreprod15.3.321
- Channing, C. P., Liu, C.-Q., Jones, G. S., & Jones, H. (1983). Decline of follicular oocyte maturation inhibitor coincident with maturation and achievement of fertilizability of oocytes recovered at midcycle of gonadotropin-treated women. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(13), 4184-4188.
- Chedrese, P. J., Rodway, M. R., Swan, C. L., & Gillio-Meina, C. (1998). Establishment of a stable steroidogenic porcine granulosa cell line. *Journal of molecular endocrinology*, 20(2), 287-292.
- Chen, S., Einspanier, R., & Schoen, J. (2013). Long-term culture of primary porcine oviduct epithelial cells: Validation of a comprehensive in vitro model for reproductive science. *Theriogenology*, 80(8), 862-869.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.07.011>
- Corbin, C., Moran, F., Vidal, J., Ford, J., Wise, T., Mapes, S., . . . Conley, A. J. (2003). Biochemical assessment of limits to estrogen synthesis in porcine follicles. *Biology of Reproduction*, 69(2), 390-397.
- D'aniello, G., Grieco, N., Di Filippo, M., Cappiello, F., Topo, E., D'aniello, E., & Ronsini, S. (2007). Reproductive implication of D-aspartic acid in human pre-ovulatory follicular fluid. *Human reproduction*, 22(12), 3178-3183.
- Daen, F. P., Sato, E., Naito, K., & Toyoda, Y. (1994). *The effect of pig follicular fluid fractions on cumulus expansion and male pronucleus formation in porcine oocytes matured and fertilized in vitro* (Vol. 101).
- Desantis, S., Zizza, S., Accogli, G., Acone, F., Rossi, R., & Resta, L. (2011). Morphometric and ultrastructural features of the mare oviduct epithelium during oestrus. *Theriogenology*, 75(4), 671-678.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.10.007>
- Dode, M. A. N., & Graves, C. (2001). Influence of hormones and follicular fluid on maturation of pig oocytes. *Ciência Rural*, 31(1), 99-104.
- Driancourt, M. A., & Thuel, B. (1998). Control of oocyte growth and maturation by follicular cells and molecules present in follicular fluid. A review. *Reprod Nutr*

Dev, 38. doi:10.1051/rnd:19980401

- Ducolomb, Y., González-Márquez, H., Fierro, R., Jiménez, I., Casas, E., Flores, D., . . . Betancourt, M. (2013). Effect of porcine follicular fluid proteins and peptides on oocyte maturation and their subsequent effect on in vitro fertilization. *Theriogenology*, 79(6), 896-904.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.01.024>
- Duda, M., Knet, M., Tabarowski, Z., & Slomczynska, M. (2011). Luteal macrophage conditioned medium affects steroidogenesis in porcine granulosa cells. *Reproductive biology*, 11(2), 117-134.
- Edwards, R. G. (1974). Follicular fluid. *Journal of reproduction and fertility*, 37(1), 189-219.
- Ellington, J., Jones, A., Davitt, C., Schneider, C., Brisbois, R., Hiss, G., & Wright, R. (1998). Human sperm function in co-culture with human, macaque or bovine oviduct epithelial cell monolayers. *Human reproduction*, 13(10), 2797-2804.
- Fotakis, G., & Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160(2), 171-177.
- Fouladi-Nashta, A., & Campbell, K. (2006). Dissociation of oocyte nuclear and cytoplasmic maturation by the addition of insulin in cultured bovine antral follicles. *Reproduction*, 131(3), 449-460.
- Funahashi, H., & Day, B. (1993). Effects of follicular fluid at fertilization in vitro on sperm penetration in pig oocytes. *Journal of reproduction and fertility*, 99(1), 97-103.
- Gandolfi, F., & Moor, R. M. (1987). Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *Journal of reproduction and fertility*, 81(1), 23-28.
- Gerard, N., Delpuech, T., Oxvig, C., Overgaard, M., & Monget, P. (2004). Proteolytic degradation of IGF-binding protein (IGFBP)-2 in equine ovarian follicles: involvement of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) and association with dominant but not subordinated follicles. *Journal of endocrinology*, 182(3), 457-466.
- Gerlier, D., & Thomasset, N. (1986). Use of MTT colorimetric assay to measure cell

- activation. *Journal of immunological methods*, 94(1-2), 57-63.
- Giudice, L. C., Chandrasekher, Y. A., & Cataldo, N. A. (1993). The potential roles of intraovarian peptides in normal and abnormal mechanisms of reproductive physiology. *Current opinion in obstetrics & gynecology*, 5(3), 350-359.
- Gosden, R. G., Hunter, R. H. F., Telfer, E., Torrance, C., & Brown, N. (1988). Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. *Journal of reproduction and fertility*, 82(2), 813-825.
- Gualtieri, R., Mollo, V., Braun, S., Barbato, V., Fiorentino, I., & Talevi, R. (2012). Long-term viability and differentiation of bovine oviductal monolayers: bidimensional versus three-dimensional culture. *Theriogenology*, 78(7), 1456-1464.
- Günther, V., Alkatout, I., Fuhs, C., Salmassi, A., Mettler, L., Hedderich, J., . . . Eckmann-Scholz, C. (2016). The Role of Interleukin-18 in Serum and Follicular Fluid during In Vitro Fertilization and Intracytoplasmic Sperm Injection. *BioMed research international*, 2016.
- Gupta, P., Ravindra, J., Kumar, V. G., Raghu, H., & Nandi, S. (2005). Stimulation of in vitro ovine oocyte maturation with a novel peptide isolated from follicular fluid of the buffalo (*Bubalus bubalis*). *Small Ruminant Research*, 59(1), 33-40.
- Gutierrez, C. G., Campbell, B. K., & Webb, R. (1997). Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biology of Reproduction*, 56(3), 608-616.
- Hafez, E. S. E. (1974). *Reproduction in farm animals* (3rd ed.). Philadelphia: Lea & Febiger.
- He, Y.-M., Deng, H.-H., Shi, M.-H., Bodinga, B. M., Chen, H.-L., Han, Z.-S., . . . Li, Q.-W. (2016). Melatonin modulates the functions of porcine granulosa cells via its membrane receptor MT2 in vitro. *Animal reproduction science*, 172, 164-172.
- Henderson, K., Franchimont, P., Charlet-Renard, C., & McNatty, K. (1984). Effect of follicular atresia on inhibin production by bovine granulosa cells in vitro and inhibin concentrations in the follicular fluid. *Journal of reproduction and fertility*, 72(1), 1-8.
- Hombach-Klonisch, S., Pocar, P., Kauffold, J., & Klonisch, T. (2006). Dioxin exerts anti-

- estrogenic actions in a novel dioxin-responsive telomerase-immortalized epithelial cell line of the porcine oviduct (TERT-OPEC). *Toxicological Sciences*, 90(2), 519-528.
- Hughes Jr, F., Lane, T., Chen, T., & Gorospe, W. (1990). Effects of cytokines on porcine granulosa cell steroidogenesis in vitro. *Biology of Reproduction*, 43(5), 812-817.
- Hummitzsch, K., Irving-Rodgers, H. F., Hatzirodos, N., Bonner, W., Sabatier, L., Reinhardt, D. P., . . . Rodgers, R. J. (2013). A new model of development of the mammalian ovary and follicles. *PloS one*, 8(2), e55578.
- Ito, M., Iwata, H., Kitagawa, M., Kon, Y., Kuwayama, T., & Monji, Y. (2008). Effect of follicular fluid collected from various diameter follicles on the progression of nuclear maturation and developmental competence of pig oocytes. *Animal reproduction science*, 106(3), 421-430.
- Jeong, Y. W., Hossein, M. S., Bhandari, D. P., Kim, Y. W., Kim, J. H., Park, S. W., . . . Lee, J. Y. (2008). Effects of insulin–transferrin–selenium in defined and porcine follicular fluid supplemented IVM media on porcine IVF and SCNT embryo production. *Animal reproduction science*, 106(1-2), 13-24.
- Jordaens, L., Arias-Alvarez, M., Pintelon, I., Thys, S., Valckx, S., Dezhkam, Y., . . . Leroy, J. (2015). Elevated non-esterified fatty acid concentrations hamper bovine oviductal epithelial cell physiology in three different in vitro culture systems. *Theriogenology*, 84(6), 899-910.
- Joshi, M. S. (1995). Isolation, cell culture, and characterization of oviduct epithelial cells of the cow. *Microscopy research and technique*, 31(6), 507-518.
- Jung, J. G., Park, T. S., Kim, J. N., Han, B. K., Lee, S. D., Song, G., & Han, J. Y. (2011). Characterization and application of oviductal epithelial cells in vitro in *Gallus domesticus*. *Biology of Reproduction*, 85(4), 798-807.
- Karp, P. H., Moninger, T. O., Weber, S. P., Nesselhauf, T. S., Launspach, J. L., Zabner, J., & Welsh, M. J. (2002). An in vitro model of differentiated human airway epithelia *Epithelial cell culture protocols* (pp. 115-137): Springer.
- Kasperczyk, K., Bajek, A., Joachimiak, R., Walasik, K., Marszalek, A., Drewa, T., & Bednarczyk, M. (2012). In vitro optimization of the *Gallus domesticus* oviduct epithelial cells culture. *Theriogenology*, 77(9), 1834-1845.

- Kidson, A., Schoevers, E., Langendijk, P., Verheijden, J., Colenbrander, B., & Bevers, M. (2003). The effect of oviductal epithelial cell co-culture during in vitro maturation on sow oocyte morphology, fertilization and embryo development. *Theriogenology*, *59*(9), 1889-1903.
- Knight, P. G., & Glister, C. (2001). Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction*, *121*(4), 503-512.
- Kobayashi, E., Hishikawa, S., Teratani, T., & Lefor, A. T. (2012). The pig as a model for translational research: overview of porcine animal models at Jichi Medical University. *Transplantation research*, *1*(1), 8.
- Kolesarova, A., Capcarova, M., Sirotkin, A. V., Medvedova, M., & Kovacik, J. (2011). In vitro assessment of silver effect on porcine ovarian granulosa cells. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, *25*(3), 166-170.
- Kor, N. M. (2014). The effect of corpus luteum on hormonal composition of follicular fluid from different sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, *7*, S282-S288.
- Kumar, A., & Mallick, B. N. (2016). Long-term primary culture of neurons taken from chick embryo brain: A model to study neural cell biology, synaptogenesis and its dynamic properties. *Journal of neuroscience methods*, *263*, 123-133.
- Lawrence, T. S., Ginzberg, R. D., Gilula, N. B., & Beers, W. H. (1979). Hormonally induced cell shape changes in cultured rat ovarian granulosa cells. *The Journal of cell biology*, *80*(1), 21-36.
- Ledwitz-Rigby, F., & Rigby, B. (1979). Follicular fluid stimulation of steroidogenesis in immature granulosa cells in vitro. *Molecular and cellular endocrinology*, *14*(1), 73-79.
- Leibfried, L., & First, N. L. (1980). Effect of bovine and porcine follicular fluid and granulosa cells on maturation of oocytes in vitro. *Biology of Reproduction*, *23*(4), 699-704.
- Lossi, L., D'Angelo, L., De Girolamo, P., & Merighi, A. (2016). Anatomical features for an adequate choice of experimental animal model in biomedicine: II. Small laboratory rodents, rabbit, and pig. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, *204*, 11-28.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, *193*(1), 265-275.
- Lu, N., Li, M., Lei, H., Jiang, X., Tu, W., Lu, Y., & Xia, D. (2017). Butyric acid regulates progesterone and estradiol secretion via cAMP signaling pathway in porcine granulosa cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*.
- Lyons, R., Saridogan, E., & Djahanbakhch, O. (2006). The reproductive significance of human Fallopian tube cilia. *Human reproduction update*, *12*(4), 363-372.
- Mahajan, D. K., & Little, B. A. (1978). Specific cortisol binding protein in porcine follicular fluid. *Biology of Reproduction*, *18*(5), 834-842.
- Manikkam, M., Li, Y., Mitchell, B. M., Mason, D. E., & Freeman, L. C. (2002). Potassium channel antagonists influence porcine granulosa cell proliferation, differentiation, and apoptosis. *Biology of Reproduction*, *67*(1), 88-98.
- Marchal, R., Vigneron, C., Perreau, C., Bali-Papp, A., & Mermillod, P. (2002). Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology*, *57*(5), 1523-1532.
- May, J. V., & Schomberg, D. W. (1981). Granulosa cell differentiation in vitro: effect of insulin on growth and functional integrity. *Biology of Reproduction*, *25*(2), 421-431.
- McGaughey, R. (1975). A comparison of the fluids from small and large ovarian follicles of the pig. *Biology of Reproduction*, *13*(2), 147-153.
- Meurens, F., Summerfield, A., Nauwynck, H., Saif, L., & Gerds, V. (2012). The pig: a model for human infectious diseases. *Trends in microbiology*, *20*(1), 50-57.
- Miessen, K., Sharbati, S., Einspanier, R., & Schoen, J. (2011). Modelling the porcine oviduct epithelium: a polarized in vitro system suitable for long-term cultivation. *Theriogenology*, *76*(5), 900-910.
- Mondal, M., Takagi, Y., Baba, S. A., & Hamano, K. i. (2017). Possible ability of bovine follicular fluid to attract migrating bull spermatozoa. *Reproductive medicine and biology*, *16*(2), 133-138.
- Monget, P., Fabre, S., Mulsant, P., Lecerf, F., Elsen, J.-M., Mazerbourg, S., . . . Monniaux, D. (2002). Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology*, *23*(1-2), 139-154.

- Müller, L., Brighton, L. E., Carson, J. L., & Fischer, W. A. (2013). Culturing of human nasal epithelial cells at the air liquid interface. *Journal of visualized experiments: JoVE*(80).
- Oberlender, G., Murgas, L. D. S., Zangeronimo, M. G., da Silva, A. C., de Alcantara Menezes, T., Pontelo, T. P., & Vieira, L. A. (2013). Role of insulin-like growth factor-I and follicular fluid from ovarian follicles with different diameters on porcine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology*, *80*(4), 319-327.
- Ogunranti, J. (1993). Oviduct model of technologies of reproduction-Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *6*(4), 469-481.
- Palma-Vera, S., Einspanier, R., & Schoen, J. (2014). Bovine oviductal epithelial cells: long term culture characterization and impact of insulin on cell morphology. *Reproductive biology*, *14*(3), 206-212.
- Patten, B. M. (1959). *Embryology of the pig* (3rd ed.). New York: McGraw-Hill.
- Peng, J., Gao, K., Gao, T., Lei, Y., Han, P., Xin, H., . . . Cao, B. (2015). Expression and regulation of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP1 and TIMP3) in goat oviduct. *Theriogenology*, *84*(9), 1636-1643.
- Pierce Biotechnology Inc. (2003). Protein stability and storage. In Pierce Biotechnology Inc. (Ed.). USA.
- Pond, W. G., & Houpt, K. A. (1978). *The biology of the pig*. Ithaca, NY: Cornell University Press.
- Ranzenigo, G., Caloni, F., Cremonesi, F., Aad, P. Y., & Spicer, L. J. (2008). Effects of Fusarium mycotoxins on steroid production by porcine granulosa cells. *Animal reproduction science*, *107*(1), 115-130.
- Rath, D., Niemann, H., & Tao, T. (1995). In vitro maturation of porcine oocytes in follicular fluid with subsequent effects on fertilization and embryo yield in vitro. *Theriogenology*, *44*(4), 529-538.
- Revelli, A., Delle Piane, L., Casano, S., Molinari, E., Massobrio, M., & Rinaudo, P. (2009). Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *7*(1), 40.
- Romar, R., Coy, P., Ruiz, S., Gadea, J., & Rath, D. (2003). Effects of oviductal and cumulus

- cells on in vitro fertilization and embryo development of porcine oocytes fertilized with epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, 59(3), 975-986.
- Sadowska, A., Nynca, A., Korzeniewska, M., Piasecka-Srader, J., Jablonska, M., Orłowska, K., . . . Ciereszko, R. (2015). Characterization of Porcine Granulosa Cell Line AVG-16. *Folia Biologica (Praha)*, 61, 184-194.
- Sanmanee, N., & Areekijserree, M. (2009). In vitro toxicology assessment of cadmium bioavailability on primary porcine oviductal epithelial cells. *Environmental toxicology and pharmacology*, 27(1), 84-89.
- Santos, R. R., Schoevers, E. J., & Roelen, B. A. (2014). Usefulness of bovine and porcine IVM/IVF models for reproductive toxicology. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(1), 117.
- Sauleau, P., Lapouble, E., Val-Laillet, D., & Malbert, C.-H. (2009). The pig model in brain imaging and neurosurgery. *Animal*, 3(8), 1138-1151.
- Schmidt, C. L., Kendall, J. Z., Dandekar, P. V., Quigley, M., & Schmidt, K. L. (1984). Characterization of long-term monolayer cultures of human granulosa cells from follicles of different size and exposed in vivo to clomiphene citrate and hCG. *Journal of reproduction and fertility*, 71(1), 279-287.
- Schoen, J., Bondzio, A., Topp, K., & Einspanier, R. (2008). Establishment and characterization of an adherent pure epithelial cell line derived from the bovine oviduct. *Theriogenology*, 69(5), 536-545.
- Serres, H. (1992). *Manual of pig production in the Tropics*. Wallingford, Oxon: CAB International.
- Shabankareh, H. K., Kor, N. M., & Hajarian, H. (2013). The influence of the corpus luteum on metabolites composition of follicular fluid from different sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Animal reproduction science*, 140(3-4), 109-114.
- Silberstein, T., MacLaughlin, D., Shai, I., Trimarchi, J., Lambert-Messerlian, G., Seifer, D., . . . Blazar, A. (2005). Müllerian inhibiting substance levels at the time of HCG administration in IVF cycles predict both ovarian reserve and embryo morphology. *Human reproduction*, 21(1), 159-163.
- Smida, A. D., Valderrama, X. P., Agostini, M. C., Furlan, M. A., & Chedrese, J. (2004).

- Cadmium stimulates transcription of the cytochrome p450 side chain cleavage gene in genetically modified stable porcine granulosa cells. *Biology of Reproduction*, 70(1), 25-31.
- Somigliana, E., Viganò, P., La Sala, G., Balasini, M., Candiani, M., Incerti, L., . . . Vignali, M. (2001). Follicular fluid as a favourable environment for endometrial and endometriotic cell growth in vitro. *Human reproduction*, 16(6), 1076-1080.
- Sordi, V., Ferri, A., Ceserani, V., Ciusani, E., Dugnani, E., Pellegrini, S., . . . Pascucci, L. (2017). Establishment, characterization and long-term culture of human endocrine pancreas-derived microvascular endothelial cells. *Cytotherapy*, 19(1), 141-152.
- Spicer, L., Klindt, J., Buonomo, F., Maurer, R., Yen, J., & Echternkamp, S. (1992). Effect of porcine somatotropin on number of granulosa cell luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors, oocyte viability, and concentrations of steroids and insulin-like growth factors I and II in follicular fluid of lean and obese gilts. *Journal of animal science*, 70(10), 3149-3157.
- Spitzer, D., Murach, K. F., Lottspeich, F., Staudach, A., & Illmensee, K. (1996). Different protein patterns derived from follicular fluid of mature and immature human follicles. *Human reproduction*, 11(4), 798-807.
- Stein, L. S., Stoica, G., Tilley, R., & Burghardt, R. C. (1991). Rat ovarian granulosa cell culture: a model system for the study of cell-cell communication during multistep transformation. *Cancer research*, 51(2), 696-706.
- Stewart, D. R., & VandeVoort, C. A. (1997). Simulation of human luteal endocrine function with granulosa lutein cell culture. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82(9), 3078-3083.
- Swindle, M. M., Makin, A., Herron, A. J., Clubb Jr, F. J., & Frazier, K. S. (2012). Swine as models in biomedical research and toxicology testing. *Veterinary pathology*, 49(2), 344-356.
- Telfer, E. (1998). In vitro models for oocyte development. *Theriogenology*, 49(2), 451-460.
- Tiemann, U., Tomek, W., Schneider, F., Müller, M., Pöhland, R., & Vanselow, J. (2009). The mycotoxins alternariol and alternariol methyl ether negatively affect

- progesterone synthesis in porcine granulosa cells in vitro. *Toxicology Letters*, 186(2), 139-145.
- Tsafri, A., Pomerantz, S. H., & Channing, C. P. (1976). Inhibition of oocyte maturation by porcine follicular fluid: partial characterization of the inhibitor. *Biology of Reproduction*, 14(5), 511-516.
- Van de Wiel, D., Bar-Ami, S., Tsafri, A., & De Jong, F. (1983). Oocyte maturation inhibitor, inhibin and steroid concentrations in porcine follicular fluid at various stages of the oestrous cycle. *Journal of reproduction and fertility*, 68(1), 247-252.
- van Meerloo, J., Kaspers, G. J., & Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Cancer cell culture: methods and protocols*, 237-245.
- Vatzias, G., & Hagen, D. R. (1999). Effects of porcine follicular fluid and oviduct-conditioned media on maturation and fertilization of porcine oocytes in vitro. *Biology of Reproduction*, 60(1), 42-48.
- Veldhuis, J. D., Kolp, L. A., Toaff, M. E., Strauss III, J. F., & Demers, L. M. (1983). Mechanisms subserving the trophic actions of insulin on ovarian cells. In vitro studies using swine granulosa cells. *Journal of Clinical Investigation*, 72(3), 1046.
- Walter, I. (1995). Culture of bovine oviduct epithelial cells (BOEC). *The Anatomical Record*, 243(3), 347-356.
- Watson, A. J., Watson, P. H., Warnes, D., Walker, S. K., Armstrong, D. T., & Seamark, R. F. (1994). Preimplantation development of in vitro-matured and in vitro-fertilized ovine zygotes: comparison between coculture on oviduct epithelial cell monolayers and culture under low oxygen atmosphere. *Biology of Reproduction*, 50(4), 715-724.
- Way, A. L. (2006). Isolation and culture of bovine oviductal epithelial cells for use in the anatomy and physiology laboratory and undergraduate research. *Advances in physiology education*, 30(4), 237-241.
- White, K., Hehnke, K., Rickords, L., Southern, L., Thompson Jr, D., & Wood, T. (1989). Early embryonic development in vitro by coculture with oviductal epithelial cells in pigs. *Biology of Reproduction*, 41(3), 425-430.
- Xu, K., Yadav, B., Rorie, R., Plante, L., Betteridge, K., & King, W. (1992). Development and

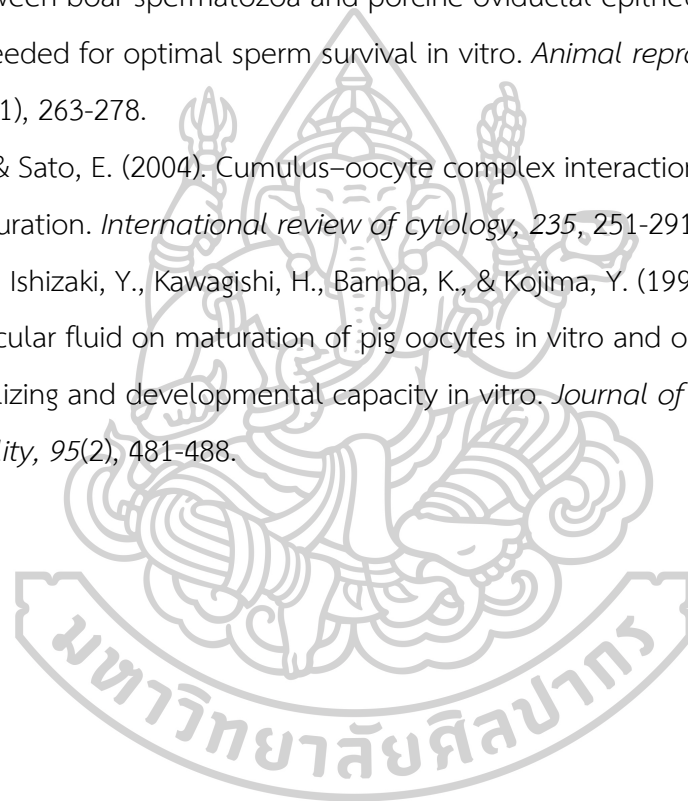
viability of bovine embryos derived from oocytes matured and fertilized in vitro and co-cultured with bovine oviducal epithelial cells. *Journal of reproduction and fertility*, 94(1), 33-43.

Yanagishita, M., Rodbard, D., & Hascall, V. C. (1979). Isolation and characterization of proteoglycans from porcine ovarian follicular fluid. *Journal of biological chemistry*, 254(3), 911-920.

Yeste, M., Lloyd, R., Badia, E., Briz, M., Bonet, S., & Holt, W. (2009). Direct contact between boar spermatozoa and porcine oviductal epithelial cell (OEC) cultures is needed for optimal sperm survival in vitro. *Animal reproduction science*, 113(1), 263-278.

Yokoo, M., & Sato, E. (2004). Cumulus-oocyte complex interactions during oocyte maturation. *International review of cytology*, 235, 251-291.

Yoshida, M., Ishizaki, Y., Kawagishi, H., Bamba, K., & Kojima, Y. (1992). Effects of pig follicular fluid on maturation of pig oocytes in vitro and on their subsequent fertilizing and developmental capacity in vitro. *Journal of reproduction and fertility*, 95(2), 481-488.





ภาคผนวก ก

การเตรียมสาร

ภาคผนวก ก

การเตรียมสาร

1. การเตรียมน้ำยาสำหรับล้างรังไข่ ท่อนำไข่ เซลล์ไข่ และเซลล์บุผิวท่อนำไข่ (วิธีการสำหรับเตรียมน้ำยาปริมาตร 1000 มิลลิลิตร)

- ชั่งสาร

Penicillin-G 0.06 กรัม

Streptomycin 0.10 กรัม

Amphoterracin-B 0.0025 กรัม

- นำสารที่ชั่งเตรียมไว้เทลงในน้ำเกลือ ผสมให้เข้ากันจนสารละลายเป็นเนื้อเดียว

2. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์สูตร TCM-199 (วิธีการสำหรับเตรียมน้ำยาปริมาตร 10 มิลลิลิตร)

- ชั่งสารเคมีดังนี้

TCM-199 0.099 มิลลิกรัม

NaHCO₃ 0.022 มิลลิกรัม

Pyruvate 0.25 มิลลิโมลาร์

Gentamycin sulfate 10 ไมโครลิตร

Heat-treated fetal calf serum (HTFCS) 1 มิลลิลิตร

- นำ TCM-199 และ NaHCO₃ ที่ชั่งเตรียมไว้ผสมกับน้ำบริสุทธิ์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

- นำ pyruvate ที่ชั่งเตรียมไว้ผสมกับน้ำเกลือปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อเก็บเป็น

Stock solution

- นำอาหาร TCM-199 ที่เตรียมไว้มาปริมาตร 9 มิลลิลิตรผสมกับ pyruvate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร คนให้เข้ากัน

- เติม Gentamycin sulfate 10 ไมโครลิตรลงในสารละลายที่เตรียมไว้

- นำสารละลายที่เตรียมไว้ผสมกับ Heat-treated fetal calf serum (HTFCS) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

- นำสารละลายทั้งหมดไปกรองผ่าน Membrane filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ภายในตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow) เพื่อป้องกันการปนเปื้อน
- เก็บอาหารในขวดเตรียมสารที่ปลอดเชื้อ และนำอาหารที่เตรียมไว้เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการใช้นำไปใส่ตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 10-12 ชั่วโมงก่อนทำปฏิบัติการ

3. การเตรียมสารหลังจากถุงไข่สุกเพื่อทดสอบการเจริญพัฒนาของเซลล์เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิ ที่ความเข้มข้นต่างๆ

1. เตรียมหลอดทดลองจำนวน 8 หลอด สำหรับการเตรียมสารหลังจากถุงไข่
2. นำอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้
3. คำนวณความเข้มข้นของสารหลังจากถุงไข่สุกด้วยสูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

หมายเหตุ C_1 คือ ความเข้มข้นตั้งต้นของสารหลังจากถุงไข่

C_2 คือ ความเข้มข้นของสารหลังจากถุงไข่ที่ต้องการ

V_1 คือ ปริมาตรของสารละลายที่เตรียม

V_2 คือ ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

4. ผสมสารหลังจากถุงไข่สุกขนาดเล็กและขนาดกลางต่ออาหารเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองในอัตราส่วนดังตารางที่ 8 และ ตารางที่ 9 และอัตราส่วนของปริมาตรสารหลังจากถุงไข่สุกขนาดใหญ่ต่อปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยง

ตารางที่ 8 แสดงอัตราส่วนของปริมาณสารหลังจากถุงไซสุกรขนาดเล็กและขนาดกลางต่อปริมาณอาหารเพาะเลี้ยง

ความเข้มข้นของสารหลังจากถุงไซสุกร ($\mu\text{g/ml}$)	ปริมาณของสารหลังจากถุงไซสุกร (ml)	ปริมาณของอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ (ml)	ปริมาตรรวม (ml)
600	1.1	0.4	1.5
500	1	0.2	1.2
400	0.8	0.2	1.0
200	0.4	0.4	0.8
40	0.2	0.8	1.0
20	0.4	0.4	0.8
4	0.2	0.8	1.0
2	0.4	0.4	0.8

ตารางที่ 9 แสดงอัตราส่วนของปริมาณสารหลังจากถุงไซสุกรขนาดใหญ่ต่อปริมาณอาหารเพาะเลี้ยง

ความเข้มข้นของสารหลังจากถุงไซสุกร ($\mu\text{g/ml}$)	ปริมาณของสารหลังจากถุงไซสุกร (ml)	ปริมาณของอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ (ml)	ปริมาตรรวม (ml)
600	1.2	0.3	1.5
500	1	0.2	1.2
400	0.8	0.2	1.0
200	0.4	0.4	0.8
40	0.2	0.8	1.0
20	0.4	0.4	0.8
4	0.2	0.8	1.0
2	0.4	0.4	0.8

4. การเตรียมสารเคมีสำหรับใช้ศึกษาโปรตีนของสารหลังจากถูกใส่สุกรขนาดต่างๆ ด้วยวิธี SDS-PAGE (ที่มา: Lowry และคณะ, 1951)

4.1 การวัดปริมาณโปรตีน

- เตรียม BSA จาก Stock 1 โดยละลาย BSA 1 กรัม ด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร
Stock 2 คูดสารละลายจาก Stock 1 มา 0.05 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA และเจือจางสำหรับการทำกราฟมาตรฐาน (Standard curve) ดังนี้

หลอดที่	ปริมาณ BSA (1mg/ml) (μ l)	น้ำกลั่น (μ l)	ความเข้มข้นโปรตีน (μ g)
Blank	-	100	-
1	10	90	10
2	20	80	20
3	30	70	30
4	40	60	40
5	50	50	50
6	60	40	60
7	80	20	80
8	100	-	100
9 สารตัวอย่างที่เก็บได้จากถุงขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3 มิลลิเมตร) 100 ไมโครลิตร (μ l)	-	-	?
10 สารตัวอย่างที่เก็บได้จากถุงขนาดกลาง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 4-6 มิลลิเมตร) 100 ไมโครลิตร (μ l)	-	-	?
11 สารตัวอย่างที่เก็บได้จากถุงขนาดใหญ่ (เส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 7 มิลลิเมตร) 100 ไมโครลิตร (μ l)	-	-	?

2 เติม alkaline copper ลงในแต่ละหลอดทดลอง โดยสามารถเตรียมสารได้ดังนี้

- 2.1 ชั่ง NaOH 4 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นในขวดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร
- 2.2 ละลาย Na_2CO_3 10 กรัม ใน 0.1M NaOH 500 มิลลิลิตร ----- สาร A
- 2.3 ละลาย $\text{CuSO}_4 \cdot 5(\text{H}_2\text{O})$ 1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ----- สาร B
- 2.4 ละลาย Na tartrate $\cdot 2(\text{H}_2\text{O})$ 1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ----- สาร C
- 2.5 ผสมสารทั้ง 3 ชนิดให้เข้ากัน ในอัตราส่วน

สาร A 100 มิลลิลิตร ต่อ สาร B 1 มิลลิลิตร ต่อ สาร C 1 มิลลิลิตร

2.6 นำสารละลายผสม ABC เติมลงในหลอดทดลองทั้งหมดที่เตรียมไว้ทุกหลอด
หลอดละ 3 มิลลิลิตร

2.7 นำสารละลายผสมไปปั่น (vortex) เพื่อให้เป็นเนื้อเดียวกัน

2.8 ตั้งสารละลายทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

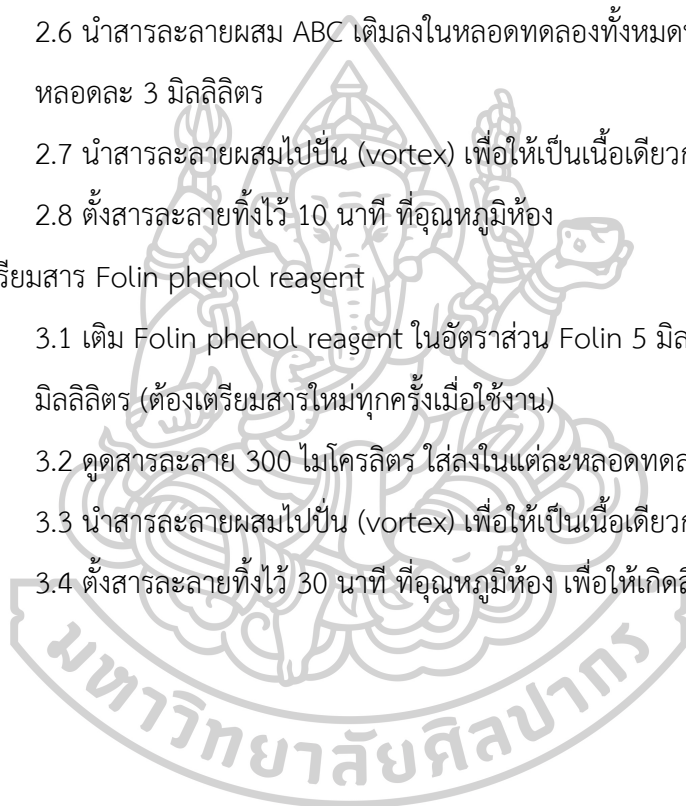
3. เตรียมสาร Folin phenol reagent

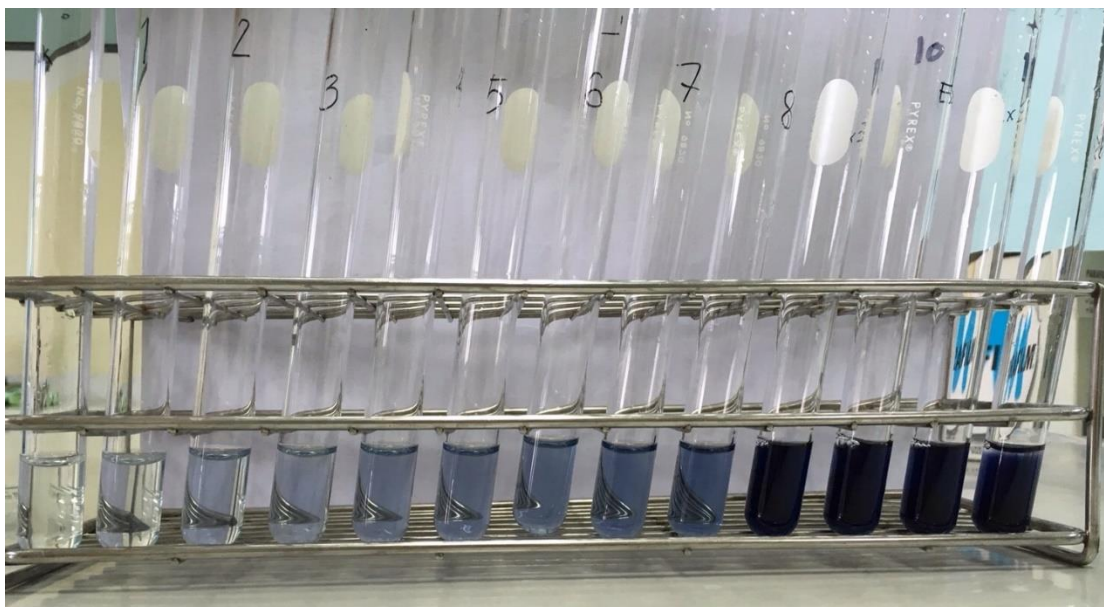
3.1 เติม Folin phenol reagent ในอัตราส่วน Folin 5 มิลลิลิตร ต่อ น้ำกลั่น 6
มิลลิลิตร (ต้องเตรียมสารใหม่ทุกครั้งเมื่อใช้งาน)

3.2 ดูดสารละลาย 300 ไมโครลิตร ใส่ลงในแต่ละหลอดทดลอง

3.3 นำสารละลายผสมไปปั่น (vortex) เพื่อให้เป็นเนื้อเดียวกัน

3.4 ตั้งสารละลายทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เกิดสี (ภาพที่ 32)





ภาพที่ 32 แสดงการเกิดสีของสารละลายเมื่อตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

4. เมื่อครบเวลาให้นำหลอด Blank ไปปรับศูนย์ (0) และวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (nm) ในแต่ละหลอด ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ นำมาเขียนกราฟมาตรฐาน โดยสารละลายตัวอย่างให้บันทึกค่าที่ได้ แล้วนำมาเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณหาปริมาณโปรตีนตัวอย่าง
6. การศึกษาด้วยวิธี SDS-PAGE

4.2 การศึกษาด้วยวิธี SDS-PAGE

1. เตรียม staining solution ปริมาตร 200 มิลลิลิตร
2. เตรียม Destaining solution ปริมาตร 400 มิลลิลิตร
3. การเตรียม Running buffer ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร
4. ทำขั้นตอนกระบวนการอิเล็กโตรโฟรีซิส (Run-gel electrophoresis)



ภาคผนวก ข

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ 10 ผลการวิเคราะห์ One-way ANOVA ของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์บุผิวท่อนำไข่สุกร ภายหลังจากทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดเล็กที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ANOVA

viability

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1458985.932	9	162109.548	15.823	.000
Within Groups	512272.793	50	10245.456		
Total	1971258.724	59			

viability

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
0	6	100.00000			
2	6	101.20267			
4	6	106.32767			
20	6	159.88950			
40	6	217.69167	217.69167		
200	6		332.53100	332.53100	
10	6			400.84633	400.84633
400	6			424.95517	424.95517
600	6				490.84483
500	6				498.17283
Sig.		.077	.055	.141	.135

ตารางที่ 11 ผลการวิเคราะห์ One-way ANOVA ของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ยิวที่นำไข่สุกร ภายหลังจากทดสอบด้วยสารหลังจากไข่สุกรขนาดกลาง ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ANOVA

viability

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1190090.889	9	132232.321	39.843	.000
Within Groups	66377.409	20	3318.870		
Total	1256468.298	29			

viability

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
0	3	100.00000		
2	3	125.35133		
4	3	148.59133		
20	3	180.28100		
40	3	201.41500		
100	3		392.95733	
200	3		430.98567	
400	3			570.42200
500	3			597.18267
600	3			625.35067
Sig.		.065	.428	.283

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ตารางที่ 12 ผลการวิเคราะห์ One-way ANOVA ของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์บูผิวท่อนำไข่สุกร ภายหลังจากทดสอบด้วยสารหลังจากไข่สุกรขนาดใหญ่ ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ANOVA

viability

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	465483.647	9	51720.405	18.857	.000
Within Groups	54853.996	20	2742.700		
Total	520337.644	29			



viability

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
0	3	100.00000		
2	3	149.09000	149.09000	
4	3	149.09033	149.09033	
20	3		211.81800	
40	3		230.90867	
10	3			359.99933
200	3			376.36333
600	3			376.36333
400	3			440.00633
500	3			456.36333
Sig.		.291	.093	.055

ตารางที่ 13 ผลการวิเคราะห์ One-way ANOVA ของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์บุผิวท่อนำไข่อสุกร ภายหลังจากทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่ขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่ เปรียบเทียบที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
two	Between Groups	4737.175	2	2368.588	3.990	.057
	Within Groups	5342.265	9	593.585		
	Total	10079.440	11			
four	Between Groups	5422.486	2	2711.243	1.716	.234
	Within Groups	14220.729	9	1580.081		
	Total	19643.215	11			
twenty	Between Groups	5414.510	2	2707.255	1.543	.265
	Within Groups	15791.483	9	1754.609		
	Total	21205.993	11			
fourty	Between Groups	1311.836	2	655.918	.123	.886
	Within Groups	48094.216	9	5343.802		
	Total	49406.052	11			
twohundred	Between Groups	19659.592	2	9829.796	1.601	.254
	Within Groups	55262.158	9	6140.240		
	Total	74921.750	11			
fourhundred	Between Groups	44836.890	2	22418.445	1.850	.212
	Within Groups	109085.033	9	12120.559		
	Total	153921.924	11			
fivehundred	Between Groups	32199.036	2	16099.518	1.071	.383
	Within Groups	135320.345	9	15035.594		
	Total	167519.380	11			
sixhundred	Between Groups	93292.769	2	46646.384	4.556	.043
	Within Groups	92147.257	9	10238.584		
	Total	185440.026	11			

two

Duncan^{a,b}

group	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1	6	101.20267	
2	3	125.35133	125.35133
3	3		149.09000
Sig.		.216	.224

four

Duncan^{a,b}

group	N	Subset for alpha = 0.05
		1
1	6	106.32767
2	3	148.59137
3	3	149.09033
Sig.		.201

twentyDuncan^{a,b}

group	N	Subset for alpha = 0.05
		1
1	6	159.88950
2	3	180.28100
3	3	211.81800
Sig.		.146

fourtyDuncan^{a,b}

group	N	Subset for alpha = 0.05
		1
2	3	201.41500
1	6	217.69167
3	3	230.90867
Sig.		.617

twohundredDuncan^{a,b}

group	N	Subset for alpha = 0.05
		1
1	6	332.53100
3	3	376.36333
2	3	430.98567
Sig.		.141

fourhundredDuncan^{a,b}

group	N	Subset for alpha = 0.05
		1
1	6	424.95517
3	3	440.00633
2	3	570.42200
Sig.		.124

fivehundredDuncan^{a,b}

group	N	Subset for alpha = 0.05
		1
3	3	456.36333
1	6	498.17283
2	3	597.18267
Sig.		.174

sixhundredDuncan^{a,b}

group	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
3	3	376.36333	
1	6	490.84483	490.84483
2	3		625.35067
Sig.		.163	.108

ตารางที่ 14 ผลการวิเคราะห์ One-way ANOVA ของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์แกรนูโลซาสุกกร ภายหลังจากทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดเล็กที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ANOVA

viability

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	68160.733	9	7573.415	25.482	.000
Within Groups	5944.060	20	297.203		
Total	74104.794	29			



viability

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha =0.05				
		1	2	3	4	5
40	3	60.58200				
4	3	65.34400				
20	3	65.60867				
2	3	70.10567	70.10567			
600	3	82.53967	82.53967	82.53967		
500	3	84.39133	84.39133	84.39133		
0	3		100.00000	100.00000	100.00000	
400	3			113.22733	113.22733	
200	3				117.46000	
10	3					229.89400
Sig.		.148	.064	.058	.254	1.000

ตารางที่ 15 ผลการวิเคราะห์ One-way ANOVA ของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์แบคทีเรียโกลิชาสุกร ภายหลังจากทดสอบด้วยสารหลังจากใส่สุกรขนาดกลางที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ANOVA

viability

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	165615.756	9	18401.751	4.070	.000
Within Groups	479238.940	106	4521.122		
Total	644854.696	115			



viability

Duncan^{a,b}

concentration	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
0	13	100.00000		
2	12	151.38167	151.38167	
20	10		170.34500	170.34500
4	11		178.87545	178.87545
40	11		182.52000	182.52000
10	11		206.16000	206.16000
500	12		211.03083	211.03083
400	12		214.41417	214.41417
600	12			218.19083
200	12			224.63000
Sig.		.069	.053	.102

ตารางที่ 16 ผลการวิเคราะห์ One-way ANOVA ของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์แกรนูโลซาสุกกร ภายหลังจากทดสอบด้วยสารหลังจากถุงไข่สุกรขนาดใหญ่ที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ANOVA

viability

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	282662.153	9	31406.906	5.165	.000
Within Groups	486447.186	80	6080.590		
Total	769109.339	89			



viability

Duncan^a

concentration	N	Subset for alpha =0.05			
		1	2	3	4
0	9	100.00000			
2	9	119.16222			
4	9	140.04222	140.04222		
20	9	157.57111	157.57111		
40	9	172.64778	172.64778	172.64778	
100	9		215.97000	215.97000	215.97000
600	9			240.72667	240.72667
200	9			242.69778	242.69778
400	9			243.92000	243.92000
500	9				264.22444
Sig.		.081	.061	.087	.250

ตารางที่ 17 ผลการวิเคราะห์ One-way ANOVA ของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์แกรนูโลซาสุกกร ภายหลังจากทดสอบด้วยสารหลังจากอุณหภูมิ ขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่ เปรียบเทียบที่ความเข้มข้นโปรตีน 2, 4, 20, 40, 200, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
two	Between Groups	16541.661	2	8270.830	18.445	.000
	Within Groups	9416.679	21	448.413		
	Total	25958.340	23			
four	Between Groups	32397.165	2	16198.583	12.608	.000
	Within Groups	26980.199	21	1284.771		
	Total	59377.364	23			
twenty	Between Groups	26702.694	2	13351.347	9.281	.001
	Within Groups	30209.657	21	1438.555		
	Total	56912.352	23			
fourty	Between Groups	36870.468	2	18435.234	6.280	.007
	Within Groups	61648.020	21	2935.620		
	Total	98518.488	23			
twohundred	Between Groups	36342.178	2	18171.089	2.274	.128
	Within Groups	167836.307	21	7992.205		
	Total	204178.485	23			
fourhundred	Between Groups	38491.482	2	19245.741	2.803	.083
	Within Groups	144174.165	21	6865.436		
	Total	182665.646	23			
fivehundred	Between Groups	73171.807	2	36585.903	4.716	.020
	Within Groups	162897.598	21	7757.028		
	Total	236069.405	23			
sixhundred	Between Groups	58038.263	2	29019.132	2.686	.091
	Within Groups	226884.893	21	10804.043		
	Total	284923.157	23			

two

Duncan^{a,b}

group	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1	3	70.10567		
3	9		124.06889	
2	12			151.38167
Sig.		1.000	1.000	1.000



four

Duncan^{a,b}

group	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1	3	65.34400	
3	9		140.04222
2	12		178.87500
Sig.		1.000	.082

twentyDuncan^{a,b}

group	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1	3	65.60867	
3	9		157.57111
2	12		170.34417
Sig.		1.000	.576

fourtyDuncan^{a,b}

group	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1	3	60.58200	
3	9		172.64778
2	12		182.52000
Sig.		1.000	.762

TwohundredDuncan^{a,b}

group	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1	3	117.46000	
2	12	224.63000	224.63000
3	9		242.69778
Sig.		.056	.737

fourhundredDuncan^{a,b}

group	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1	3	113.22733	
2	12	214.41417	214.41417
3	9		243.92000
Sig.		.052	.555

fivehundredDuncan^{a,b}

group	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1	3	84.39133	
2	12		211.03083
3	9		264.22444
Sig.		1.000	.320

sixhundredDuncan^{a,b}

group	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1	3	82.53967	
2	12		218.19083
3	9		240.72667
Sig.		1.000	.718

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวชนิกานต์ ศรีนาค
วัน เดือน ปี เกิด	5 กันยายน 2535
สถานที่เกิด	เพชรบุรี
วุฒิการศึกษา	ปี พ.ศ. 2553 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนเบญจมเทพอุทิศ จังหวัดเพชรบุรี ปี พ.ศ. 2557 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา จากมหาวิทยาลัยศิลปากร ปี พ.ศ. 2558 ศึกษาต่อระดับปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา จากมหาวิทยาลัยศิลปากร
ที่อยู่ปัจจุบัน	609 หมู่ 4 ตำบลบ้านหม้อ อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบุรี 76000
ผลงานตีพิมพ์	บทความวิจัยในวารสารทางวิชาการ Areekiseree, M., Bunyakitjinda, V., Euawong, N., Srinark, C. (2016). “Effect of cadmium accumulation on Purple Heart, (Tradescantia pallida): An investigation by SEI/EDX smiling program X-ray images”. Veridian E-Journal, Science and Technology Silpakorn University, 3(6), 252-264. Youngsabanant-Areekiseree, M., Tungkasen, H., Srinark, C., Chuen-Im, T. (2017). "Determination of porcine oocyte and follicular fluid proteins from small, medium, and large follicles for used as cell biotechnology research". Songklanakarin Journal of Science and Technology (SJST). Accept การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการ Proceedings Srinark, C., Buranathanasin, N., Kerdkriangkrai, S., Sengsai, S., Gumlungpat, N., Youngsabanat-Areekiseree, M. (2017). “Characteristic of long-term primary cells culture of pOEC and pGC”. In Proceedings of The 34th Annual Conference of The

Microscopy Society of Thailand (MST 34) (pp. 175-179). May 31st - June 2nd, 2017, Bangkok, Thailand.

Wisuthseriwong, P., Tungkasen, H., Namsongsan, S., Srinark, C., Youngsabanant-Areekijserree, M. (2016). "Cumulus-Oocyte complexes and follicular fluid proteins of pig during folliculogenesis". In Proceedings of The 18th International Conference on Advances in Bioscience and Biotechnology (pp. 1654-1657). November 21st-22nd, 2016, Singapore, SG

Poster presentation

Srinark, C., Buranathanasin, N., Gumlungpat, N., Youngsabanant-Areekijserree, M. (2017). "The advantage of porcine follicular fluid protein from small size follicle on porcine oviductal epithelial cell viability and growth". Poster session presented at Regional Conference on Materials & ASEAN Microscopy Conference 2017 (RCM & AMC 2017), December 12th-13th, 2017, Penang, Malaysia.

Srinark, C., Buranathanasin, N., Youngsabanant-Areekijserree, M. (2017). "Effect of porcine follicular fluid (pFF) protein of large size follicle on granulosa cell (GC) viability". Global Biotechnology Congress 2017 (GBC 2017), July 10th – 13th, 2017, Boston, USA.

Abstract

Youngsabanant-Areekijserree, M., Srinark, C., Sengsai, S., Kerdkriangkrai, S., Gumlungpat, N., Pumipaiboon, M. (2018). "In vitro Effects of Porcine Follicular Fluid Proteins (pFF) on Cell Culture Growth in Luteal Phase Porcine Oviductal Epithelial Cells (pOEC)". Abstract in The 20th International Conference on Applied Biology and Biotechnology (ICABB 2018), January 15th-16th, 2018, Zurich, Switzerland.

Youngsabanant-Areekijserree, M., Srinark, C., Sengsai, S., Kerdkriangkrai, S., Gumlungpat, N. (2017). "Optimize

concentration of porcine follicular fluid protein (pFF) of medium size follicle on primary granulosa cell growth". Abstract in Academics World 73rd International Conference, July 26th-27th, 2017, Taipei, Taiwan.

Buranathanasin, N., Srinark, C., Youngsabanat-Areekijserree, M. (2017). "Luteal phase of porcine follicular fluid secretion protein effect on primary oviductal epithelium cell viability". Abstract in the Global Biotechnology Congress 2017 (GBC 2017), July 10th – 13th, 2017, Boston, USA.

Youngsabanat-Areekijserree, M., Srinark, C., Sengsai, S., Pumipaiboon, M. (2017). "Follicular fluid proteins and cells study on Large White Pig form small, medium, and large follicles". Abstract in The 19th International Conference on Biology (ICB 2017), March 23rd-24th, 2017, Prague, Czech Republic.

รางวัลที่ได้รับ

ได้รับรางวัล "Best Poster Award" จากการนำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ (Poster) เรื่อง The advantage of porcine follicular fluid protein from small size follicle on porcine oviductal epithelial cell viability and growth ในงานประชุมวิชาการ Regional Conference on Materials & ASEAN Microscopy Conference 2017 (RCM & AMC 2017) ในวันที่ 12-13 ธันวาคม 2560 ณ เมืองป็นัง ประเทศมาเลเซีย