



ศึกษารังไข่ เซลล์ไข่ น้ำในถุงไข่และสารหลังเซลล์แกรนูโลซาสุกรที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่องาน
เทคโนโลยีชีวภาพ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา แบบ 1.1 ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2563

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ศึกษารังไข่ เซลล์ไข่ น้ำในถุงไข่และสารหลังเซลล์แกรนูโลซาสุกรที่เพาะเลี้ยงใน
ห้องปฏิบัติการเพื่อนงานเทคโนโลยีชีวภาพ



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา แบบ 1.1 ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

STUDY ON PORCINE OVARIES FOLLICULAR FLUID AND IN VITRO
GRANULOSA CELLS SECRETION FOR BIOTECHNOLOGY RESEARCH



By

MISS Hatairuk TUNGKASEN

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for Doctor of Philosophy BIOLOGY

Department of BIOLOGY

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2020

Copyright of Graduate School, Silpakorn University

หัวข้อ	ศึกษารังไข่ เซลล์ไข่ น้ำในถุงไข่และสารหลังเซลล์แกรมูโลซาสุกรที่เพาะเลี้ยงใน ห้องปฏิบัติการเพื่องานเทคโนโลยีชีวภาพ
โดย	หทัยรัก ตุงคะเสน
สาขาวิชา	ชีววิทยา แบบ 1.1 ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. มยุวา ยงทรัพย์อนันต์

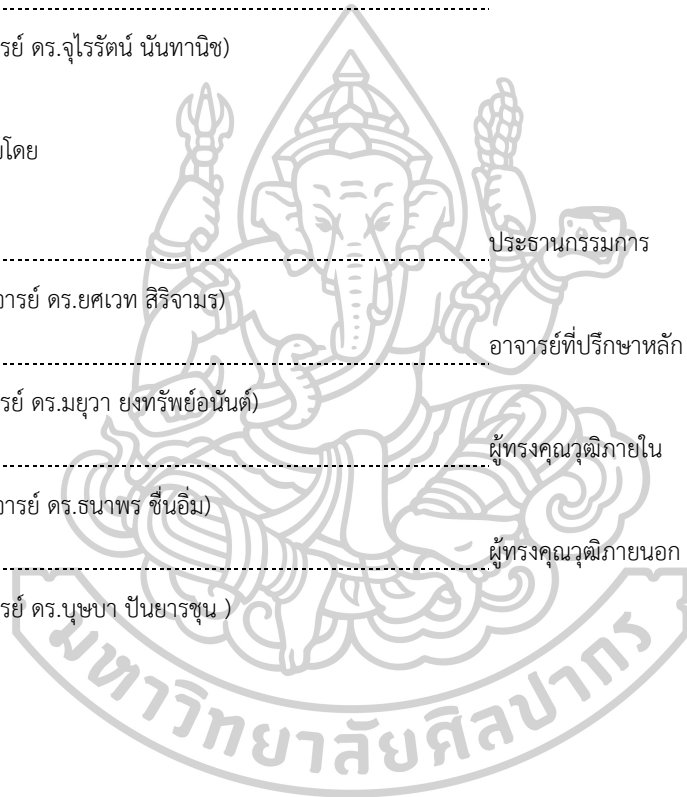
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)

พิจารณาเห็นชอบโดย

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยศเวท สิริจามร)
..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.มยุวา ยงทรัพย์อนันต์)

..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนาพร ชื่นอ้อม)
..... ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(รองศาสตราจารย์ ดร.บุษบา ปันยารชุน)



58303801 : ชีววิทยา แบบ 1.1 ปรัชญาชุมชนบัณฑิต

คำสำคัญ : สารที่เซลล์แกรนูโลซาหลั่งสู่อาหารเพาะเลี้ยง, เซลล์ไข่สุกรที่มีเซลล์คูมูลัสล้อมรอบ, น้ำในถุงไข่, โพรตีน, สุกร, รังไข่

นางสาว ททัยรัก ตุงคะเสน: ศึกษารังไข่ เซลล์ไข่ น้ำในถุงไข่และสารหลังเซลล์แกรนูโลซาสุกรที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่องานเทคโนโลยีชีวภาพ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รองศาสตราจารย์ ดร. มยุภา ยงทรัพย์อนันต์

ระบบสืบพันธุ์ของสุกรเป็นส่วนที่กินไม่ได้ แต่เป็นแหล่งฮอร์โมนและปัจจัยในการเจริญเติบโตที่มีคุณค่าสำหรับเซลล์ การศึกษาเซลล์ไข่สุกรที่มีเซลล์คูมูลัสล้อมรอบ (pCOCs) เซลล์แกรนูโลซาและรูปแบบโปรตีนของน้ำในถุงไข่จากสุกรพันธุ์ผสม Large White x Landrace x Duroc (6 เดือน -2 ปี และน้ำหนักระหว่าง 100-150 กิโลกรัม) โดยการเก็บรังไข่ 64 รังไข่ จากโรงฆ่าสัตว์ในพื้นที่จังหวัดนครปฐม ประเทศไทย พบว่ามีเซลล์ไข่ทั้งหมด 1,675 เซลล์ไข่ซึ่งเซลล์ไข่จะมีขนาดแตกต่างกันไปตามขนาดของถุงไข่ คือ ถุงไข่ขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร จำนวน 1,208 เซลล์ไข่) ถุงไข่ขนาดกลางแบ่งออกเป็นสองกลุ่มคือ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร จำนวน 372 เซลล์ไข่ และเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร จำนวน 72 เซลล์ไข่) และถุงไข่ขนาดใหญ่ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 7-8 มิลลิเมตร จำนวน 23 เซลล์ไข่) เซลล์ไข่สามารถแบ่งได้เป็น 5 แบบ คือ แบบที่ 1 คือ เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่น แบบที่ 2 คือ เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้น แบบที่ 3 คือ เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เพียงบางส่วน แบบที่ 4 คือ เซลล์ไข่ที่ไม่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ และแบบที่ 5 คือ เซลล์ไข่ที่เสื่อมสลาย พบว่าเซลล์ไข่แบบที่ 1 และแบบที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์สูงและมีศักยภาพในการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง M199 ที่เสริมด้วย Earle's salts (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA), 10% heat-treated fetal bovine serum (HTFBS), 2.2 mg/mL NaHCO₃, 1 M HEPES (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA), 0.25 mM pyruvate, 15 µg/mL porcine FSH, 1 µg/mL LH, 1 µg/mL estradiol, 50 µg/mL gentamycin sulfate พบว่าสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ไข่ที่เจริญได้หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 44-48 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาของสุกรที่ความเข้มข้น 5x10⁵ เซลล์/มิลลิลิตร ในอาหารเพาะเลี้ยง M199 ที่เสริมด้วย 10% HTFBS, 15 µg/mL NaHCO₃, 0.25 mM pyruvate, 50 µg/mL gentamycin sulfate พบว่าเมื่อเริ่มต้นเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาจะมีรูปร่างกลม หลังจากผ่านไป 24 ชั่วโมง เซลล์จึงยึดออกและยึดติดกับพื้นผิวของภาชนะเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 และ 96 ชั่วโมง เซลล์จะขยายตัวและขยายออกไปทั่วทั้งพื้นผิว จนกระทั่งเวลา 144 ชั่วโมง เซลล์แกรนูโลซาทั้งหมดจะยึดติดกับภาชนะและมีเป็นรูปร่างแหลมตั้งแต่หัวจรดปลายเป็นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ทั่วทั้งภาชนะ โดยเก็บอาหารที่เพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาทุกๆ 2 วัน ผลการวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนของน้ำในถุงไข่และสารหลังจากเซลล์แกรนูโลซาสู่อาหารเพาะเลี้ยง (condition medium) ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าน้ำในถุงไข่ขนาดเล็กมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 27, 30, 35, 40, 50, 58, 65, 70, 79, 85, 90, 100, 115, 120, 150, 170, 180, >180 และ >220 กิโลดาลตัน ถุงไข่ขนาดกลาง คือ กลุ่มที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร มีน้ำหนักโมเลกุล 27, 30, 35, 58, 65, 70, 79,

85, 90, 100, 115, 120, 150, 170, 180, >180 และ >220 กิโลดาลตัน และกลุ่มที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร มีน้ำหนักโมเลกุล 27, 30, 35, 58, 65, 70, 79, 85, 90, 100, 115, 120, 150, 170, 180, >180 และ >220 กิโลดาลตัน ส่วนถุงไซขนาดใหญ่น้ำหนักโมเลกุล 30, 35, 58, 65, 70, 79, 90, 100, 115, 150, 180 และ >220 กิโลดาลตัน และสารหลังจากเซลล์แกรนูโลซาสู่อาหารเพาะเลี้ยงมีน้ำหนักโมเลกุล 25, 40, 50, 60, 115, 120 และ >250 กิโลดาลตัน การวิเคราะห์แถบโปรตีนด้วยเทคนิค LC/MS/MS พบว่าน้ำหนักโมเลกุลที่ 65 กิโลดาลตัน คือ ซีรัมอัลบูมิน น้ำหนักโมเลกุลที่ 70 กิโลดาลตัน คือ hemopexin, serum albumin และ vitronectin น้ำหนักโมเลกุลที่ 79 กิโลดาลตัน คือ serotransferrininhibitorcarbonic anhydrase prothrombin และ thyroxine-binding globulin น้ำหนักโมเลกุลที่ 115 กิโลดาลตัน ที่พบจากน้ำในถุงไซทุกขนาด คือ แสปีโตโกลบิน โปรตีนทั้งหมดมีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมและควบคุมการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเซลล์ในระบบสืบพันธุ์ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าระบบสืบพันธุ์ของสุกรเป็นแหล่งที่มีคุณค่าสำหรับเซลล์เทคโนโลยี โดยเซลล์ไข่สุกรที่มีเซลล์คูมูลัสล้อมรอบ (pCOCs) และเซลล์แกรนูโลซานั้นสามารถใช้เป็นแบบจำลองสำหรับการศึกษาเทคโนโลยีชีวภาพ ส่วนการศึกษาโปรตีนจากน้ำในถุงไซและสารหลังจากเซลล์แกรนูโลซาสู่อาหารเพาะเลี้ยงอาจใช้เป็นอาหารเสริมทดแทน fetal bovine serum ในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตและการพัฒนาในด้านเซลล์เทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การเจริญเติบโตของเซลล์ไข่และเซลล์ต่างๆ ในหลอดทดลองและการพัฒนาของตัวอ่อนในสัตว์ได้



58303801 : Major BIOLOGY

Keyword : condition medium/ porcine cumulus-oocyte complexes (pCOCs)/ follicular fluid/ protein/ pig/ ovary

MISS HATAIRUK TUNGKASEN : STUDY ON PORCINE OVARIES FOLLICULAR FLUID AND IN VITRO GRANULOSA CELLS SECRETION FOR BIOTECHNOLOGY RESEARCH THESIS ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR MAYUVA YOUNGSABANANT, Ph.D.

Porcine reproductive system is an un-eatable part but being valuable source of hormones and growth factors for cell maturation. In this study, porcine cumulus-oocyte complexes (pCOCs), granulosa cells, protein patterns of follicular fluid in the ovaries of Large White x Landrace x Duroc (6 months -2 years and weight between 100-150 kg), and condition medium from granulosa cell culture were investigated. Sixty-four pig ovaries were collected from local slaughterhouses in Nakhon Pathom Province, Thailand, yielding in a total of (n=1,675) oocytes. The oocytes were varied in sizes as small size follicles (1-2 mm in diameters; n=1,208), medium size follicles, (divided into two groups: 3-4 mm in diameters; n=372 and 5-6 mm in diameters; n=72), and large size follicles (7-8 mm in diameters; n=23). The oocytes can be categorized into intact-cumulus cell layer oocytes, multi-cumulus cell layer oocytes, partial-cumulus cell layer oocytes, complete-denuded oocytes, and degenerated oocytes. Of which, high percentages of intact- and multi-cumulus cell layers, where they have high potential for culture in M199 with Earle's salts (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA) with 10% heat-treated fetal bovine serum (HTFBS), 2.2 mg/mL NaHCO₃, 1 M HEPES (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA), 0.25 mM pyruvate, 15 µg/mL, porcine FSH, 1 µg/mL LH, 1µg/mL estradiol, 50 µg/mL gentamycin sulfate were developed into mature oocytes in 44-48 h in vitro. To study property of porcine granulosa cells in culture condition, cells at concentration of 5x10⁵cells/mL were cultured in M199 with 10% HTFBS, 15 µg/mL NaHCO₃, 0.25 mM pyruvate, 50 µg/mL gentamycin sulfate. At the beginning, granulosa cells were round-shaped, then extended and adhered to the surface of the plate. After 24 h, the cells proliferated and extended covering all over the surface. As cultured for 48 and 96 h, they expanded more, and for 144 h, all granulosa cells were adhered to the plate and appeared in sharp-pointed shape from head to bottom, fibroblastic and reticulated over the entire dish. The condition medium from granulosa cell culture was collected every 2 days for protein pattern

analysis. Determination of protein patterns of follicular fluid and condition medium using SDS-PAGE technique revealed that the follicular fluid in small follicles proteins at molecular weights of 27, 30, 35, 40, 50, 58, 65, 70, 79, 85, 90, 100, 115, 120, 150, 170, 180, >180 and >220 kDa. Medium follicles with diameters of 3-4 mm were found protein at molecular weights of 27, 30, 35, 58, 65, 70, 79, 85, 90, 100, 115, 120, 150, 170, 180, >180 and >220 kDa whereas those with 5-6 mm diameters exhibited proteins at molecular weights of 27, 30, 35, 58, 65, 70, 79, 85, 90, 100, 115, 120, 150, 170, 180, >180 and >220 kDa. Large follicles contained proteins at molecular weights of 30, 35, 58, 65, 70, 79, 90, 100, 115, 150, 180 and >220 kDa. Finally, the condition medium contained proteins at molecular weights of 25, 40, 50, 60, 115, 120 and >250 kDa. Analysis of proteins by LC/MS/MS indicated that the 65 kDa protein was serum albumin, the 70 kDa proteins were hemopexin, serum albumin and vitronectin. For the 79 kDa proteins, they were serotransferrin, inhibitor of carbonic anhydrase, prothrombin, and thyroxine-binding globulin, and for 115 kDa protein that was present in all follicular fluid samples were haptoglobin. All identified proteins play important roles in promotion and regulation on growth and development of reproductive cells. In conclusion, the results of this study demonstrated that porcine reproductive system is valuable source in cell technology. Porcine cumulus-oocyte complexes (pCOCs) and granulosa cells could be used as a model for biotechnology study. The follicular fluid and condition medium proteins could be used as supplement replacing hormones and fetal bovine serum in culture medium to promote all cell growth and development in biotechnological fields such as in vitro oocyte maturation and embryonic development in animals.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ เรื่อง ศึกษาวิจัย เซลล์ไข่ น้ำในถุงไข่และสารหลังเซลล์แกรนูโลซาสุกรที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่องานเทคโนโลยีชีวภาพ ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี โดยได้รับความกรุณาจากรองศาสตราจารย์ ดร.มยุภา ยงทรัพย์อนันต์ ที่ปรึกษา ที่ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุนและให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อผู้วิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยศเวท สิริจามร ประธานคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.บุษบา ปันยารชุน และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนาพร ชื่นอ้อม กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิที่กรุณาแนะนำและให้ข้อคิดเห็นเพื่อนำมาปรับปรุงเล่มวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในความกรุณาของท่านเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ คณะอาจารย์สาขาวิชาชีววิทยาทุกท่าน ที่ให้ความรู้คำแนะนำและประสบการณ์อันมีค่ายิ่งแก่ผู้วิจัย ขอขอบพระคุณบิดา มารดาและครอบครัวสำหรับกำลังใจและการสนับสนุนในทุกด้าน ขอขอบคุณกัลยาณมิตรทุกคนสำหรับมิตรภาพที่ให้กำลังใจช่วยเหลือซึ่งกันและกันเสมอมา คุณค่าและประโยชน์ที่เกิดจากการวิทยานิพนธ์เล่มนี้ผู้วิจัยขอน้อมบูชาแต่ คุณบิดา มารดา ครอบครัว ครูบาอาจารย์ ที่อบรมสั่งสอนแนะนำให้การสนับสนุนและให้กำลังใจอย่างดีเสมอมา

หทัยรัก ตุงคะเสน



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1. ความสำคัญของปัญหาและที่มาของโครงการวิจัย.....	1
2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
3. สมมติฐานของงานวิจัย.....	3
4. ขอบเขตการศึกษาวิจัย.....	4
5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
1. ระบบสืบพันธุ์ในสุกรเพศเมีย.....	5
2. ฮอรโมนจากรังไข่และวงรอบการเป็นสัดของสุกร.....	6
3. การเจริญพัฒนาของเซลล์ไข่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม.....	13
4. การศึกษาขนาดของถุงไข่เซลล์ไข่และคุณภาพของเซลล์ไข่.....	17
5. น้ำในถุงไข่.....	19
6. การเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่และเซลล์แกรนูโลซาในห้องปฏิบัติการ.....	30
7. สารหลังของเซลล์แกรนูโลซาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ.....	32
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	34

อุปกรณ์และสารเคมี	34
วิธีการศึกษาการวิจัย	36
การทดลองที่ 1: ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรังไข่และเนื้อเยื่อของรังไข่สุกรสด	37
การทดลองที่ 2: การเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาและการเก็บสารที่เซลล์หลังสู้อาหารเพาะเลี้ยง พร้อมการศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ไข่และเซลล์แกรนูโลซาสุกรที่เพาะเลี้ยงใน ห้องปฏิบัติการ	38
การทดลองที่ 3: ศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนของน้ำในถุงไข่สดและสารที่เซลล์แกรนูโลซาหลังสู้อาหาร เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ	41
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	46
ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรังไข่และเนื้อเยื่อของรังไข่สุกร	46
ผลการศึกษาเนื้อเยื่อของรังไข่.....	53
ผลการศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ไข่สุกรและเซลล์แกรนูโลซาที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ....	59
ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์และการศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ไข่.....	70
ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาและการเก็บสารที่เซลล์หลังสู้อาหารเพาะเลี้ยง	74
ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์เซลล์แกรนูโลซาภายใต้กล้องจุลทรรศน์	85
ศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนของน้ำในถุงไข่สดและสารที่เซลล์แกรนูโลซาหลังสู้อาหารเพาะเลี้ยงใน ห้องปฏิบัติการ.....	86
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย.....	112
รายการอ้างอิง	126
ภาคผนวก.....	136
ประวัติผู้เขียน.....	142

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ตารางแสดงระยะเวลา วงรอบการเป็นสัปดาห์และการตกไข่ของสัตว์ชนิดต่างๆ	11
ตารางที่ 2 สาร ฮอร์โมนและแพกเตอร์ต่างๆ ที่พบในน้ำในถุงไข่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม.....	21
ตารางที่ 3 โปรตีนที่พบในถุงไข่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม	25
ตารางที่ 4 เส้นผ่านศูนย์กลางของรังไข่ทั้งหมด 64 รังไข่.....	46
ตารางที่ 5 น้ำหนักของรังไข่ทั้งหมด 64 รังไข่	48
ตารางที่ 6 การจำแนกรังไข่สุกรตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาแบ่งออกเป็น 5 แบบ	49
ตารางที่ 7 จำนวนและเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ไข่จากรังไข่ 64 รังไข่ ที่มีถุงไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2, 3-4, 5-6 และ 7-8 มิลลิเมตร	64
ตารางที่ 8 สรุบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่พบจากน้ำในถุงไข่สุกรระยะฟอลลิคูล่า	100
ตารางที่ 9 สรุบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่พบจากของเหลวในระยะลูเตียลของถุงไข่สุกร.....	102
ตารางที่ 10 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนขนาด 65 กิโลดาลตัน	104
ตารางที่ 11 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนขนาด 70 กิโลดาลตัน	105
ตารางที่ 12 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนขนาด 79 กิโลดาลตัน.....	106
ตารางที่ 13 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนขนาด 115 กิโลดาลตัน.....	107
ตารางที่ 14 ความยาวของเซลล์แกรนูโลซาสุกรที่เพาะเลี้ยงนาน 0, 24, 48, 96, 120 และ 144 ชั่วโมง.....	108
ตารางที่ 15 แสดงปริมาตรสารหลังที่เก็บจากเซลล์แกรนูโลซาสุกรเพาะเลี้ยง (condition medium)	110
ตารางที่ 16 แสดงรายงานการศึกษาแถบโปรตีนจากน้ำในถุงไข่ขนาดต่างๆ.....	118

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ส่วนประกอบรังไข่และมดลูกของสุกร มีส่วนประกอบ คือ มดลูกสุกร.....	6
ภาพที่ 2 แสดงวงรอบการเป็นสัด 4 ระยะ	8
ภาพที่ 3 ฮอร์โมนในระบบสืบพันธุ์เพศเมียและอวัยวะเป้าหมาย (Waugh และ Grant, 2014).....	10
ภาพที่ 4 แสดงระยะการเจริญของรังไข่ ตั้งแต่รังไข่ระยะแรกพัฒนาจนไข่ตก (Ross และ Pawlina, 2006).....	14
ภาพที่ 5 (ก) แสดงรังไข่ระยะแรก (primary follicle) มีลักษณะแบนเป็นชั้นเดียวล้อมรอบ และ (ข) รังไข่ระยะที่สอง (secondary follicle).....	15
ภาพที่ 6 (ก) แสดงการเจริญพัฒนาของรังไข่ (ข) รังไข่ระยะกราฟิเยน	16
ภาพที่ 7 แสดงปริมาณเลือดที่ไหลเวียนมาเลี้ยงรังไข่	52
ภาพที่ 8 แสดงลักษณะสีของของเหลวที่เจาะดูดจากรังไข่ขนาดต่างๆ	53
ภาพที่ 9 แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของรังไข่สุกรส่วนรังไข่ระยะเริ่มต้น.....	54
ภาพที่ 10 แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของรังไข่สุกรส่วนรังไข่ระยะแรก	55
ภาพที่ 11 แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของรังไข่สุกรส่วนรังไข่ระยะที่สอง	56
ภาพที่ 12 แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของรังไข่สุกรส่วนรังไข่ระยะกราฟิเยน	57
ภาพที่ 13 แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของรังไข่ระยะคอร์ปัสลูเทียม	58
ภาพที่ 14 แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของรังไข่ระยะคอร์ปัสอัลบีแคน	59
ภาพที่ 15 ภาพเซลล์ไข่แบบที่ 1 เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่นจากรังไข่ขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่.....	61
ภาพที่ 16 ภาพเซลล์ไข่แบบที่ 2 เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้นจากรังไข่ขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่.....	62
ภาพที่ 17 ภาพแสดงเซลล์ไข่ที่จำแนกตามเซลล์คูมูลัสที่ล้อมรอบ (ก) แบบที่ 3 (ข) แบบที่ 4 (ค) แบบที่ 5	63

ภาพที่ 18 กราฟแสดงการเปรียบเทียบจำนวนและเปอร์เซ็นต์เซลล์ไข่แต่ละชนิดที่พบในถุงไข่ขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร) ที่เจาะเก็บได้จากเซลล์ไข่ 1,208 เซลล์	65
ภาพที่ 19 กราฟแสดงการเปรียบเทียบจำนวนและเปอร์เซ็นต์เซลล์ไข่แต่ละชนิดที่พบในถุงไข่ขนาดกลาง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร) ที่เจาะเก็บได้จากเซลล์ไข่ 372 เซลล์	66
ภาพที่ 20 กราฟแสดงการเปรียบเทียบจำนวนและเปอร์เซ็นต์เซลล์ไข่แต่ละชนิดที่พบในถุงไข่ขนาดกลาง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร) ที่เจาะเก็บได้จากเซลล์ไข่ 72 เซลล์	67
ภาพที่ 21 กราฟแสดงการเปรียบเทียบจำนวนและเปอร์เซ็นต์เซลล์ไข่แต่ละชนิดที่พบในถุงไข่ขนาดใหญ่ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 7-8 มิลลิเมตร) ที่เจาะเก็บได้จากเซลล์ไข่ 23 เซลล์.....	68
ภาพที่ 22 กราฟแสดงการเปรียบเทียบจำนวนของเซลล์ไข่ที่พบในถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2, 3-4, 5-6 และ 7-8 มิลลิเมตร	69
ภาพที่ 23 เซลล์ไข่สุกรที่เพาะเลี้ยงเริ่มต้น 0 ชั่วโมง.....	71
ภาพที่ 24 เซลล์ไข่สุกรที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	72
ภาพที่ 25 เซลล์ไข่สุกรที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง	73
ภาพที่ 26 เซลล์แกรนูโลซาสุกรที่เริ่มเพาะเลี้ยง 0 ชั่วโมง	75
ภาพที่ 27 เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์แกรนูโลซาในการเพาะเลี้ยงที่ 0 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง.....	75
ภาพที่ 28 ภาพเซลล์แกรนูโลซาที่เพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง	76
ภาพที่ 29 ภาพเซลล์แกรนูโลซาที่เพาะเลี้ยงนาน 72 ชั่วโมง	77
ภาพที่ 30 ภาพเซลล์แกรนูโลซาที่เพาะเลี้ยงนาน 96 ชั่วโมง	78
ภาพที่ 31 ภาพเซลล์แกรนูโลซาที่เพาะเลี้ยงนาน 120 ชั่วโมง.....	79
ภาพที่ 32 ภาพเซลล์แกรนูโลซาที่เพาะเลี้ยงนาน 144 ชั่วโมง.....	80
ภาพที่ 33 ภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดของเซลล์ไข่ที่มีเซลล์คูมูลัสล้อมรอบแบบติดแน่นก่อนการเพาะเลี้ยง.....	81
ภาพที่ 34 ภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด แสดงภาพขยายเซลล์คูมูลัสที่ล้อมรอบเซลล์ไข่มีลักษณะค่อนข้างกลมซ้อนติดแน่น.....	81

ภาพที่ 35 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงเซลล์แกรนูโลซาเพาะเลี้ยงเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมง	82
ภาพที่ 36 (ก) และ (ข) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยายสูงขึ้น	83
ภาพที่ 37 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์แกรนูโลซาสุกรที่เพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง	83
ภาพที่ 38 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์แกรนูโลซาที่เพาะเลี้ยงนาน 72 ชั่วโมง	84
ภาพที่ 39 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านแสดงเซลล์คมูลัสที่เพาะเลี้ยงในช่วงเริ่มต้น 0 ชั่วโมง	85
ภาพที่ 40 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนไฮยาลูโรแนนซินเทส (Hyaluronansynthase 2: Has2).....	86
ภาพที่ 41 ผลการศึกษาการแสดงออกของน้ำในถุงไข่ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ในถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2, 3-4, 5-6 มิลลิเมตร และถุงไข่ที่มีซิสต์ 50 เปอร์เซ็นต์.....	88
ภาพที่ 42 ผลการศึกษาการแสดงออกของน้ำในถุงไข่ ในระยะฟอลลิคูล่าของถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2, 3-4, 5-6 และ 7-8 มิลลิเมตร และระยะลูเตียลของถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 และ 5-6 มิลลิเมตร	89
ภาพที่ 43 ผลการศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนจากน้ำในถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2, 3-4 และ 5-6 มิลลิเมตร	91
ภาพที่ 44 ผลการศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนจากน้ำในถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2, 3-4, 5-6 และ 7-8 มิลลิเมตร	93
ภาพที่ 45 ผลการศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนจากน้ำในถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีซิสต์ 50 เปอร์เซ็นต์ 94	
ภาพที่ 46 ผลการศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนจากน้ำในถุงไข่ระยะลูเตียลที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4, 5-6 มิลลิเมตร.....	96
ภาพที่ 47 ผลการศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนจากน้ำในถุงไข่ระยะลูเตียลที่มีซิสต์ 50 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์ โดยเจาะถุงไข่ปกติที่อยู่ในรังไข่เดียวกับซิสต์ของถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 และ 5-6 มิลลิเมตร.....	98

ภาพที่ 48 ผลการศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนจากน้ำในถุงไข่ในระยะฟอลลิคูล่าของถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2, 3-4 และ 5-6 มิลลิเมตร..... 99

ภาพที่ 49 แสดงแถบของสารหลังโปรตีนจากถุงไข่สุกร ที่เพาะเลี้ยงนาน 48, 96 และ 144 ชั่วโมง 111



บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญของปัญหาและที่มาของโครงการวิจัย

สุกรเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทยที่มีการเลี้ยงอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นสัตว์ที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว ให้ลูกจำนวนมากและการเลี้ยงสุกรเป็นกิจการที่ให้กำไรดีซึ่งคนนิยมนำส่วนต่างๆ ของสุกรมาบริโภค ซึ่งจังหวัดนครปฐมเป็นจังหวัดหนึ่งที่มีฟาร์มเลี้ยงสุกรอยู่หลายแห่งทำให้มีโรงฆ่าและสุกร เพื่อนำเนื้อและอวัยวะภายในส่งออกจำหน่ายสำหรับการบริโภค นอกจากนี้ยังมีอวัยวะของสุกรที่ไม่สามารถนำไปบริโภคหรือใช้ประโยชน์ทางการค้าได้ เช่น รังไข่ (ovary) ที่ถูกตัดทิ้งและอาจก่อให้เกิดปัญหาขยะเน่าเหม็นที่ต้องกำจัดทิ้ง จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการนำอวัยวะที่ไม่เกิดประโยชน์ทางการค้านำมาศึกษา เพื่อเพิ่มคุณค่าในงานด้านชีววิทยา ซึ่งการศึกษาเกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์ของสุกรเป็นพื้นฐานสำคัญสำหรับการพัฒนางานด้านเทคโนโลยีชีวภาพ (Denning และ Priddle, 2003; Li และคณะ, 2003; Shang และคณะ, 2007; Xu และคณะ, 2007) รายงานวิจัยพบว่าสุกรมีประโยชน์ในการใช้เป็นสัตว์ต้นแบบที่ใช้เป็นแบบจำลอง (model) เนื่องจากสุกรเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ที่มีความใกล้เคียงกับมนุษย์ทั้งทางด้านพันธุศาสตร์ กายวิภาคและสรีรวิทยา เช่น สมอ ระบบเลือด ระบบย่อยอาหาร ผิวหนังและระบบสืบพันธุ์ เป็นต้น (Bode และคณะ, 2010; Squier และคณะ, 2008; Turk และคณะ, 2005)

นอกจากนี้มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ ยังอยู่ใกล้กับโรงฆ่าสุกร จึงสามารถเก็บรังไข่และปีกมดลูกสุกรและนำมาศึกษาในห้องปฏิบัติการได้ในระยะเวลาอันรวดเร็ว ซึ่งจะส่งผลดีต่อคุณภาพของเซลล์ในระบบสืบพันธุ์ที่นำมาศึกษา เนื่องจากในงานวิจัยพบว่าระยะเวลาในการนำตัวอย่างรังไข่มาศึกษาในห้องปฏิบัติการนั้นส่งผลกระทบต่อคุณภาพของเซลล์ไข่ ซึ่งมีรายงานในสัตว์หลายชนิด เช่น การศึกษาในเซลล์ไข่ม้า (Guignot และคณะ, 1999) เซลล์ไข่โค (Yang และคณะ, 1990; Solano และคณะ, 1994) รังไข่แมว (Evecen และคณะ, 2009) และในเซลล์ไข่สุกร (Lin และคณะ, 2010) ภายในรังไข่จะมีถุงไข่มีขนาดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับระยะการเจริญของถุงไข่ซึ่งจะส่งผลต่อการเจริญของเซลล์ไข่ภายในถุงไข่ด้วย เมื่อถุงไข่มีการเจริญพัฒนาเพิ่มขึ้นตั้งแต่ระยะเริ่มต้นจนถึงระยะ กราเฟียนจะเกิดช่องว่างในถุงไข่ เรียกว่า แอนทรม ซึ่งจะมีน้ำในถุงไข่ (follicular fluid) ที่มีสารต่างๆ กระตุ้นให้เซลล์ไข่สุกและเซลล์ไข่ตก หรือพร้อมที่จะปฏิสนธิได้

จากรายงานการศึกษาน้ำในถุงไข่พบว่าโปรตีนที่ช่วยในการส่งเสริมการเจริญพัฒนาของเซลล์ไข่หรือโปรตีนที่ช่วยในการยับยั้งการเจริญพัฒนาของเซลล์ไข่ เช่น รายงานการศึกษาเกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์ในโคพบว่าเซลล์ไข่ในถุงไข่มีขนาดตั้งแต่ 1-3 มิลลิเมตร และหยุดอยู่ในระยะเมตาเฟส

ครั้งที่สอง (Führer และคณะ, 1989) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5 มิลลิเมตร พบเซลล์ไข่สุกรที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 110-120 ไมโครเมตร ซึ่งหยุดการแบ่งเซลล์อยู่ในระยะเมตาเฟสครั้งที่สองได้เช่นเดียวกัน (Fair และคณะ, 1996) นอกจากนี้ยังมีรายงานการทำงานของ oocyte-secreted factors ซึ่งทำหน้าที่ในการควบคุมคุณภาพของเซลล์ไข่โดยพบว่าการศึกษาเซลล์แกรนูโลซาและเซลล์ที่กาที่แยกจากถุงไข่สุกรขนาด 2-6 มิลลิเมตร มีการทำงานของ oocyte-secreted factors คือ stem cell factor (SCF) และ insulin-like growth factor-1 (IGF-1) ที่มีการทำงานทั้งในเซลล์แกรนูโลซาและเซลล์ที่กา รายงานการศึกษาของน้ำในถุงไข่สุกร 3 ขนาด คือ ขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 3 มิลลิเมตร) ขนาดกลาง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 3-6 มิลลิเมตร) และขนาดใหญ่ (เส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 6 มิลลิเมตร) พบสารที่หลั่งจากเซลล์คมูลล์ที่ล้อมรอบเซลล์ไข่ คือ สารที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ไข่ (oocyte maturation inhibitor; OMI) อินฮิบิน (inhibin) ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน และ oestradiol-17 β ที่วิเคราะห์จากความเข้มข้นที่ตรวจได้ในวันที่ 5, 10, 15 และ 18 ของรอบการเป็นสัด และ 24 ชั่วโมง หลังการเป็นสัด พบว่าความเข้มข้นของสารที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ไข่ และอินฮิบินจะลดลงเมื่อขนาดของเซลล์ไข่เพิ่มขึ้นแสดงว่าน้ำในถุงไข่ที่ได้จากถุงขนาดเล็กมีอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์ไข่ มากกว่าในถุงขนาดกลางและขนาดใหญ่ ตามลำดับ โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงในฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน และ estradiol-17 β (Van de Wiel และคณะ, 1983) นอกจากนี้มีรายงานการศึกษาถุงไข่สุกรระยะเริ่มแรกของวงรอบการเป็นสัดมีประมาณ 30-40 ถุง ซึ่งส่วนใหญ่มีขนาดเล็กกว่า 3 มิลลิเมตร จากนั้นจะเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น ในช่วงกึ่งกลางของระยะลูเตียล (mid-luteal phase) เป็นประมาณ 80 ถุง โดย 50 ถุงมีขนาดเล็กและอีก 30 ถุงเป็นขนาดกลาง คือ มีขนาดตั้งแต่ 3.0-6.9 มิลลิเมตร ซึ่งอาจมีบางส่วนที่ผิดปกติจากการเสื่อมและการสลายของถุงน้ำในรังไข่ก่อนที่จะครบกำหนดระหว่างวันที่ 7 และ 15 รอบของการเป็นสัด โดยมีสัดส่วนระหว่าง 12-73 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในเวลานั้นไม่พบถุงไข่ขนาดใหญ่มากกว่า 7 มิลลิเมตร เนื่องจากถุงไข่มีการหลั่งสารยับยั้ง ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Schwarz และคณะ, 2008) เป็นต้น

จากข้อมูลทั้งหมดผู้วิจัยจึงสนใจนำเซลล์ในระบบสืบพันธุ์ที่อยู่ในอวัยวะที่ไม่ได้ใช้ประโยชน์ของสุกรมาศึกษา โดยเริ่มจากการนำรังไข่สุกรที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ มาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของรังไข่ เซลล์ไข่ รวมทั้งน้ำในถุงไข่ที่เก็บจากสุกรในธรรมชาติด้วยเทคนิคปลอดเชื้อและศึกษาเซลล์แกรนูโลซาของสุกรที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่องานทางเทคโนโลยีชีวภาพ สำหรับเปรียบเทียบผลการศึกษาน้ำในถุงไข่ที่ได้จากการเจาะเก็บจากถุงไข่สุกรสด (in vivo) เปรียบเทียบกับสารที่เซลล์แกรนูโลซาสุกรหลังสู้อาหารเพาะเลี้ยง (in vitro) ซึ่งเรียกว่า condition medium โดยเปรียบเทียบว่าจะมีสารที่เซลล์หลั่งหรือโปรตีนที่เหมือนหรือแตกต่างกันอย่างไร ซึ่งคาดว่าการศึกษาครั้งนี้จะได้ข้อมูลที่ทำให้เกิดความเข้าใจเรื่องบทบาทและหน้าที่ของ รังไข่ น้ำในถุงไข่สดและเซลล์แกรนูโลซาสุกรใน

อาหารเพาะเลี้ยง รวมทั้งข้อมูลในการเลือกน้ำในถุงไข่ขนาดต่างๆ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์สำหรับ การศึกษากับเซลล์สืบพันธุ์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม หรือการพัฒนาวิธีการนำน้ำในถุงไข่สุกรมาใช้ให้ เกิดประโยชน์ ซึ่งอาจนำน้ำในถุงไข่สุกรมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่างๆ เช่น เซลล์ปฐมภูมิ (primary cell culture) เซลล์เพาะเลี้ยงแบบยาวนาน (long-term culture) และเซลล์ไลน์ (cell line) ซึ่งหาก สามารถใช้น้ำในถุงไข่แทนฮอร์โมน เช่น เอสโตรเจนและโกรทฮอร์โมนได้ ตลอดจนใช้แทน fetal bovine serum ที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่างๆ ซึ่งมีราคาแพงมากและต้องใช้เวลาารอนานใน การสั่งซื้อ เนื่องจากต้องสั่งเข้ามาจากต่างประเทศ นอกจากนี้หากการเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่และเซลล์ แกรนูโลซาจากรังไข่สุกรในห้องปฏิบัติการประสบผลสำเร็จ จะสามารถใช้เซลล์เหล่านี้เป็นต้นแบบเพื่อ ใช้ทดสอบสารต่างๆ แทนสัตว์ทดลองได้ ซึ่งจะทำให้ถูกต้องตามหลักจริยธรรมด้วย

2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

2.1 เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาของรังไข่และเนื้อเยื่อของรังไข่สุกรสด

2.2 เพื่อศึกษา เซลล์ไข่ การเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาและเก็บสารที่เซลล์แกรนูโลซาหลังสู้อาหารเพาะเลี้ยง (condition medium) พร้อมศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ไข่และเซลล์แกรนูโลซาสุกรที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

2.3 เพื่อศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนของน้ำในถุงไข่สดและสารที่เซลล์แกรนูโลซาหลังสู้อาหารเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

3. สมมติฐานของงานวิจัย

การศึกษาสัณฐานวิทยาของรังไข่และเซลล์ไข่สุกรจะทำให้สามารถเลือกไข่ตัวอย่างเซลล์ที่เหมาะสมในการนำไปเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้ เช่น เซลล์ไข่ เซลล์แกรนูโลซา ส่วนการวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างน้ำในถุงไข่สุกรสดและสารหลังจากเซลล์แกรนูโลซาสุกรสู้อาหารเพาะเลี้ยง หากพบโปรตีนที่มีลักษณะเหมือนหรือต่างกัน จะสามารถเลือกไปใช้ประโยชน์ต่างๆ เช่น การผลิตสารที่ส่งเสริมหรือยับยั้งการเจริญของเซลล์ไข่และเซลล์เพาะเลี้ยงต่างๆ เป็นต้น หากพบสารที่มีประโยชน์ลักษณะเดียวกันจะสามารถเลือกสารที่ต้องการจากเซลล์เพาะเลี้ยงไปใช้ประโยชน์ทางเทคโนโลยีชีวภาพ ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการโดยที่ไม่ต้องเก็บตัวอย่างรังไข่สุกรใหม่ทุกครั้ง

4. ขอบเขตการศึกษาวิจัย

4.1 การศึกษานี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการแบบปลอดเชื้อ

4.2 ตัวอย่างการศึกษานี้ใช้รังไข่สุกรพันธุ์ผสม (Large White x Landrace x Duroc) อายุ 6 เดือน ถึง 2 ปี และน้ำหนักระหว่าง 100-150 กิโลกรัม ที่เก็บตัวอย่างแบบปลอดเชื้อ

4.3 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรังไข่ศึกษาเนื้อเยื่อของรังไข่ด้วยวิธีพาราฟินเทคนิค และศึกษาลักษณะเซลล์ไข่และเซลล์แกรนูโลซาสุกรที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

4.4 ศึกษาวิเคราะห์น้ำในถุงไข่สุกรและสารที่เซลล์แกรนูโลซาที่เพาะเลี้ยงหลังสู้อาหารเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบย้อนกลับ (Reverse transcription polymerase chain reaction: RT-PCR) เทคนิคโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (Sodiumdodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE) และเทคนิค LC/MS/MS (Liquid chromatography/Mass spectrometer/Mass spectrometer)

5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

5.1 สามารถศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรังไข่และเซลล์แกรนูโลซาสุกรที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการและเนื้อเยื่อของรังไข่เพื่อนำข้อมูลมาศึกษาพัฒนางานวิจัยด้านเทคโนโลยีชีวภาพได้ เช่นการเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ให้สุกและเซลล์แกรนูโลซาในห้องปฏิบัติการ

5.2 สามารถใช้เซลล์ไข่และเซลล์แกรนูโลซาสุกรที่เพาะเลี้ยงและแช่แข็งได้ เพื่อใช้เป็นเซลล์ที่ทดสอบกับสารต่างๆ ในห้องปฏิบัติการแทนการใช้สัตว์ทดลอง

5.3 สามารถศึกษาและทราบชนิดโปรตีนหรือสารหลังของน้ำในถุงไข่สุกรและสารหลังที่เซลล์แกรนูโลซาเพาะเลี้ยงหลังสู้อาหารเพาะเลี้ยง ในห้องปฏิบัติการเพื่อนำน้ำในถุงไข่สุกรสดและสารหลังที่เซลล์แกรนูโลซาเพาะเลี้ยงหลังสู้อาหารเพาะเลี้ยง มาใช้เสริมในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อใช้ส่งเสริมหรือยับยั้งการเจริญพัฒนาในการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่างๆ ต่อไปได้ เพื่อใช้ทดแทนฮอร์โมนและ fetal bovine serum ที่นิยมใช้เสริมในการเพาะเลี้ยงเซลล์

บทที่ 2

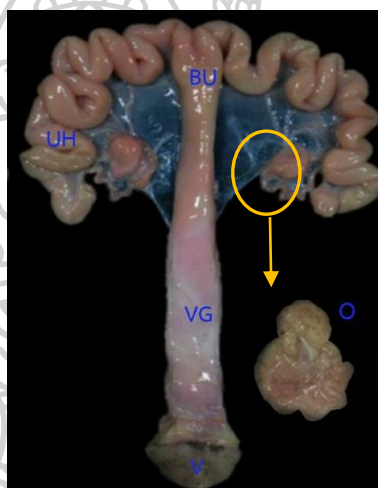
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สุกรเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมที่ใช้เป็นแบบจำลอง (model) เนื่องจากมีสรีรวิทยาและกายวิภาคศาสตร์ คล้ายคลึงกับมนุษย์ (Bode และคณะ, 2010; Squier และคณะ, 2008; Turk และคณะ, 2005) โดยเฉพาะการศึกษารังไข่และเซลล์ไข่ในระบบสืบพันธุ์ของสุกร เช่น การพัฒนาของเซลล์ไข่ คุณภาพของเซลล์ไข่และการสุกของเซลล์ไข่จะช่วยอธิบายลักษณะของเซลล์ไข่และปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ในระหว่างการเจริญเติบโต ในระบบร่างกายและในห้องทดลอง รวมทั้งสามารถศึกษากระบวนการอื่นๆ ของการช่วยการเจริญพันธุ์ด้วย นอกจากนี้ยังมีรายงานการสุกของเซลล์ไข่ซึ่งเกิดผลจากปฏิกิริยาของเซลล์ไข่และเซลล์ล้อมรอบหรือเซลล์คัมมูลัส (Memili และคณะ, 2007) ในระหว่างการพัฒนาของเซลล์ไข่โดยเฉพาะเซลล์แกรนูโลซานั้นมีความสำคัญต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์ไข่ ซึ่งการเจริญของถุงไข่จะล้อมรอบด้วยเส้นเลือดฝอยที่ส่งผลต่อการเจริญของเซลล์คัมมูลัสและมีความสำคัญในการปกป้องเซลล์ไข่และน้ำในถุงไข่อีกด้วย (Siu และ Cheng, 2012)

1. ระบบสืบพันธุ์ในสุกรเพศเมีย

ระบบสืบพันธุ์ในสุกรเพศเมียประกอบด้วย รังไข่ (ovaries) ท่อนำไข่ (oviduct) ปีกมดลูก (uterine horns) ปากมดลูก (cervix) ช่องคลอด (vagina) และปากช่องคลอด (vulva) รังไข่ของสุกรเพศเมียมี 2 ข้าง อยู่ตรงปลายสุดของท่อนำไข่ มีลักษณะคล้ายกับพวงองุ่น มีถุงหุ้มรังไข่ และมีผนังยึดระหว่างรังไข่กับมดลูก ภายในรังไข่มีถุงไข่ (follicle) ที่อยู่ในระยะของการเจริญเติบโต ขนาดต่างๆ น้ำหนักของรังไข่แต่ละข้างประมาณ 3-7 กรัม และมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 มิลลิเมตร รังไข่ทำหน้าที่สำคัญ 2 ประการ คือ เป็นที่อยู่ของถุงไข่ ซึ่งภายในมีเซลล์ไข่ เป็นที่พัฒนาเซลล์ไข่และผลิตฮอร์โมนเพศเมีย คือ โพรเจสเตอโรนและเอสโตรเจน นอกจากนี้ยังสร้างคอร์ปัสลูเทียม (corpus luteum) ซึ่งผลิต ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน เพื่อควบคุมการตั้งครรภ์ โดยถุงไข่จะเริ่มขยายตัวใหญ่ขึ้นจนมีการตกไข่ สู่ท่อนำไข่ที่มีความยาวประมาณ 20 เซนติเมตร โดยมีผนังด้านในประกอบด้วยเซลล์บุท่อนำไข่ (oviductal epithelial cells) 2 ชนิด โดยชนิดแรก คือ เซลล์ทรงกลมที่ไม่มีซีเลีย (non-ciliated round shape epithelial cells) ทำหน้าที่ในการหลั่งของเหลวและปรับสภาพแวดล้อมภายในให้เหมาะสมเพื่อการปฏิสนธิ ชนิดที่สอง คือ เซลล์รูปทรงกระบอกที่มีซีเลีย (ciliated columnar epithelial cells) ทำหน้าที่คอยพัดโบกเซลล์ไข่และเซลล์อสุจิที่ผ่านในท่อนำไข่ และส่งผ่านตัวอ่อนไปยังท่อนำไข่ซึ่งสามารถยึดและหอดตัวได้ (Areekijserree และคณะ, 2012)

มดลูกประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ปีกมดลูกหรือท่อหน้าไข่ ตัวมดลูกและคอมมดลูก โดยมีผนังยึดมดลูก เรียกว่า broad ligaments of uterus ส่วนแรก คือ ปีกมดลูก (uterine horns) มีความยาวและยืดหยุ่นได้ มีอยู่ 2 ข้าง ปลายข้างหนึ่งติดกับท่อหน้าไข่ อีกข้างติดกับตัวมดลูก ปีกมดลูกของสุกรจะยาวและคดเคี้ยว มีความยาวประมาณ 1 เมตร ส่วนที่ 2 ตัวมดลูก มีลักษณะแข็ง ขนาดเล็ก ความยาวประมาณ 5 เซนติเมตร ทำหน้าที่เป็นทางผ่านของอสุจิและตัวอ่อนเมื่อคลอด ส่วนที่ 3 คอมมดลูกหรือปากมดลูก (cervix) เป็นกล้ามเนื้อวงแหวน (circular ring) มีผนังหนาแข็งแรง เป็นโพรงแคบภายในมีก้อนเนื้อนูนยื่นออกมา มีลักษณะวน เป็นเกลียวสว่าน (cervical fold) มีหน้าที่รับการผสมของเพศผู้และป้องกันสิ่งแปลกปลอมผ่านเข้าช่องคลอดสุกรที่ผสมตามธรรมชาติอวัยวะเพศผู้จะเข้าไปภายในคอมมดลูก 2-3 เกลียว (Karin, 2009) ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ส่วนประกอบรังไข่และมดลูกของสุกร มีส่วนประกอบ คือ มดลูกสุกร (body of uterus: BU) ปากมดลูก (cervix: CV) ปีกมดลูก (uterine horn: UH) ปากช่องคลอด (valva: V) ช่องคลอด (vagina: VG) ภาพที่ขยายแสดงส่วนของรังไข่ (ovary: O) (Vicencio และคณะ 2017)

2. ฮอร์โมนจากรังไข่และวงรอบการเป็นสัดของสุกร

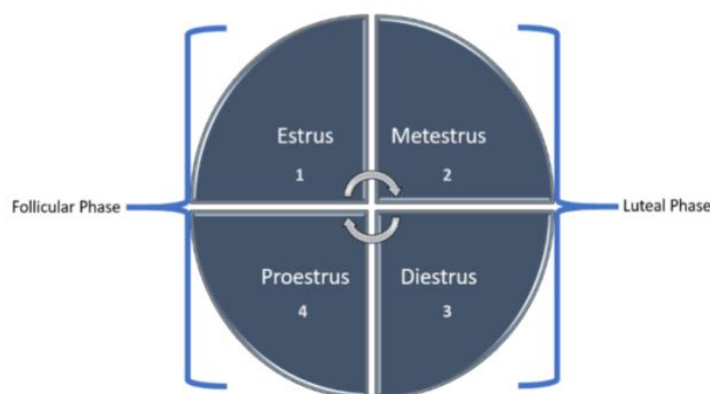
ฮอร์โมนจากรังไข่ รังไข่ผลิตฮอร์โมนเพศเมียหลายชนิดที่สำคัญ คือ ฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรน ฮอร์โมนทั้งสองชนิดนี้เป็นสารประกอบสเตียรอยด์ มีไขมันเป็นส่วนประกอบและเป็นฮอร์โมนที่มีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับการเจริญและการทำงานของอวัยวะต่างๆ ในระบบสืบพันธุ์ ตลอดถึงลักษณะความเป็นเพศเมีย ฮอร์โมนเอสโตรเจนเป็นฮอร์โมนเพศเมียที่สร้างขึ้นจากถุงไข่ในรังไข่แล้วจะหลั่งเข้าสู่กระแสเลือด เพื่อทำหน้าที่ส่งเสริมการเจริญของอวัยวะต่างๆ ในระบบสืบพันธุ์

เพศเมียและเตรียมให้อยู่ในลักษณะที่พร้อมจะทำการสืบพันธุ์คือกระตุ้นการเจริญของเยื่อบุมดลูกและกล้ามเนื้อมดลูกโดยมีการเจริญของเซลล์ต่างๆ ในชั้นเยื่อบุมดลูกมากขึ้น เพื่อรอรับการฝังตัวของตัวอ่อนที่ได้รับการผสมแล้วและที่ชั้นกล้ามเนื้อของมดลูกที่สะสมสารโปรตีนโดยเฉพาะแอคตินและไมโอซิน ซึ่งเป็นตัวสำคัญที่ใช้ในกลไกการหดตัวของกล้ามเนื้อเพื่อเตรียมไว้ใช้ในการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบที่มดลูกให้มดลูกบีบตัวได้แรงขึ้น เอสโตรเจนช่วยให้กล้ามเนื้อเรียบนี้บีบตัวเป็นจังหวะช่วยในการเคลื่อนที่ของอสุจิหากไข่ไม่ได้รับการผสมกับตัวอสุจิเยื่อบุมดลูกที่หนาตัวขึ้นจะลอกหลุดออกไปในภายหลัง กระตุ้นการเจริญของเนื้อเยื่อต่างๆ ในท่อนำไข่โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อมซึ่งทำหน้าที่หลั่งสารอาหารสำหรับเลี้ยงไข่ที่ตกออกมาจากรังไข่และช่วยกระตุ้นให้เซลล์ซึ่งทำหน้าที่พัดโบกในทิศทางจากปากแตรไปยังส่วนคอคอดและกระตุ้นท่อนำไข่ให้บีบตัวทำให้ไข่เดินทางไปได้สะดวกขึ้น ทำให้เกิดการหลั่งน้ำเมือกออกจากคอมดลูกในขณะที่เกิดการเป็นสัดหากมีปริมาณมากจะออกมาสะสมอยู่ที่บริเวณช่องคลอดและเมื่อมีการสะสมมากขึ้นก็จะไหลย้อนออกมาจากช่องคลอดอยู่ที่บริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ส่วนนอก ช่วยให้เกิดการเป็นสัดและทำให้สัตว์แสดงพฤติกรรมต่างๆ ในกระบวนการสืบพันธุ์ เช่น มีอาการแสดงออกถึงการเป็นสัดอวัยวะเพศจะบวมแดงหรือสีชมพูในสุกรสาวจะชอบปีนป่ายตัวอื่นหรือยอมให้ตัวอื่นปีน มีอาการกระวนกระวาย กินอาหารน้อยลงกว่าปกติ หรือชอบเอาปากกัดแฉะสิ่งอื่น มีการปัสสาวะบ่อย ถ้าเจอสุกรเพศผู้จะหยุดนิ่งไม่เคลื่อนไหวและยอมรับการผสมพันธุ์ซึ่งช่วยส่งเสริมให้เกิดการกระตุ้นทางเพศในกระบวนการสืบพันธุ์ของสัตว์การทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจนทำให้เส้นเอ็นเชิงกรานเกิดการหย่อนตัวช่วยให้คลอดลูกง่าย รวมถึงการกระตุ้นให้เต้านมขยายใหญ่ขึ้นมีไขมันมาสะสมมากและแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นที่บริเวณต่อมน้ำมนนอกจากนี้ยังมีผลต่อการสลายตัวของคอร์ปัสลูเทียมที่รังไข่โดยเอสโตรเจนจะกระตุ้นให้เกิดการสร้างฮอร์โมนโปรสตาแกลนดินขึ้นที่ผนังมดลูกแล้วจะทำให้คอร์ปัสลูเทียมสลายตัว กระบวนการนี้เกิดขึ้นในวงจรการเป็นสัดซึ่งหากไม่ได้รับการผสมกับตัวอสุจิคอร์ปัสลูเทียมจะสลายตัวไป (Elizabeth, 2021)

ฮอร์โมนในกลุ่มโปรเจสเตอโรนส่วนใหญ่สร้างขึ้นในคอร์ปัสลูเทียม มีบางส่วนที่สร้างจากต่อมหมวกไตส่วนนอก ส่วนใหญ่โปรเจสเตอโรนจะทำงานร่วมกับเอสโตรเจน โดยทำหน้าที่ส่งเสริมการเจริญของผนังมดลูกชั้นในทำให้เซลล์ต่างๆ ในชั้นเนื้อเยื่อบุมดลูกหนาขึ้นมีการเจริญของเซลล์ต่อมต่างๆ มากขึ้นและหลั่งสารออกมามากขึ้นเตรียมพร้อมที่จะรับการฝังตัวของตัวอ่อนรวมถึงทำหน้าที่ลดบทบาทของเอสโตรเจนทำให้ส่วนต่างๆ ของมดลูกมีการบีบตัวน้อยลงเพื่อให้ไข่ที่ได้รับการผสมกับตัวอสุจินั้นสามารถฝังตัวในมดลูกและอยู่จนถึงเวลาคลอดโปรเจสเตอโรนจะทำหน้าที่รักษาสภาพการตั้งท้องให้คงอยู่ไปจนถึงการคลอดโดยในช่วงแรกของการตั้งท้องเป็นการทำงานของโปรเจสเตอโรนจากรังไข่และในช่วงหลังจะได้โปรเจสเตอโรนจากรกนอกจากนี้ยังส่งเสริมการเจริญของเต้านมและต่อมน้ำนมให้เจริญเต็มที่พร้อมที่จะสร้างและหลั่งน้ำนมเลี้ยงลูกอ่อนโดยกระตุ้นให้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ซึ่งทำหน้าที่ในการผลิตน้ำมนนอกจากนี้ยังยับยั้งการสร้างฮอร์โมนโกนาโดโทรปี ครีลิสซิงของ

ไฮโปทาลามัสและยับยั้งการสร้างฮอร์โมน Follicle Stimulating Hormone (FSH) และ Luteinizing hormone (LH) ของต่อมใต้สมองส่วนหน้าทำให้ไม่มีการเจริญของถุงไข่ซึ่งจะไปมีผลควบคุมการสร้างเอสโตรเจนทำให้สัตว์ไม่เป็นสัดและไม่มีการตกไข่

วงรอบการเป็นสัดของสุกรมักจะใช้เวลาประมาณ 18-21 วัน โดยเริ่มจากการสังเกตพฤติกรรมการเป็นสัดและสิ้นสุดด้วยการการเป็นสัดครั้งต่อไป ในระหว่างรอบนี้ระดับฮอร์โมนจะมีการเปลี่ยนแปลงทั้งเพิ่มขึ้นและลดลงในการเจริญเติบโตของเซลล์และการพัฒนาของอวัยวะ การเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนเหล่านี้จะควบคุมวงรอบการเป็นสัด 4 ระยะ คือ ระยะก่อนการเป็นสัด (proestrus) ระยะเป็นสัด (estrus) ระยะคลายการเป็นสัด (metestrus) และระยะหมดการเป็นสัด (diestrus) ซึ่งวงรอบการเป็นสัดนั้นแบ่งการเจริญของรังไข่ออกเป็น 2 ระยะ คือ ระยะฟอลลิคูล่าและระยะลูเตียล โดยระยะฟอลลิคูล่าเป็นการเพิ่มการหลั่งฮอร์โมนเอสโตรเจนเมื่อเซลล์ไข่และถุงไข่เจริญเต็มที่สำหรับการตกไข่ ซึ่งประกอบด้วยระยะก่อนการเป็นสัด (proestrus) และระยะเป็นสัด (estrus) ส่วนระยะลูเตียลเป็นการเพิ่มฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจากการพัฒนาของคอร์ปัสลูเทียม ซึ่งประกอบด้วยระยะคลายการเป็นสัด (metestrus) และระยะหมดการเป็นสัด (diestrus) (Elizabeth, 2021) ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แสดงวงรอบการเป็นสัด 4 ระยะ

ซึ่งแบ่งการเจริญของรังไข่ออกเป็น 2 ระยะ คือ ระยะฟอลลิคูล่า ประกอบด้วยระยะก่อนการเป็นสัด (proestrus: 4) และระยะเป็นสัด (estrus: 1) และระยะลูเตียล ประกอบด้วยระยะคลายการเป็นสัด (metestrus: 2) และระยะหมดการเป็นสัด (diestrus: 3) (Elizabeth, 2021)

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของวงจรการเป็นสัตว์ ได้แก่ ฮอร์โมน พันธุกรรม โภชนาการและสิ่งแวดล้อม รายละเอียด (Tortora และคณะ 2009) ดังนี้

1. ฮอร์โมน การทำงานร่วมกันของฮอร์โมนหลายชนิดจากไฮโปทาลามัสและต่อมใต้สมองช่วยกระตุ้นให้รังไข่ทั้ง 2 ข้าง ทำการผลิตไข่ ทำให้เกิดความต้องการทางเพศและอวัยวะในระบบสืบพันธุ์เจริญเติบโต เนื่องจากอิทธิพลของฮอร์โมนเอสโตรเจน ที่รังไข่ผลิตขึ้น ซึ่งลูกสัตว์นั้นสามารถสร้างฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน คือ FSH และ LH ได้ตั้งแต่ยังอยู่ในท้องแม่ ต่อมาเมื่อถึงกำหนดคลอดฮอร์โมนนี้จะมีระดับลดลง โดยลูกสุกรจะสร้างฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน ได้ก่อนคลอดและระดับฮอร์โมนจะลดลงก่อนคลอด 1 เดือน เมื่อระดับฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน ในลูกสัตว์ลดลงแล้วจะคงสภาพอยู่ในระดับต่ำ เนื่องจากระบบประสาทส่วนกลางไปยับยั้งไฮโปทาลามัส ไม่ให้หลั่งฮอร์โมนโกนาโดโทรปินรีลีสซิ่ง จนกว่าร่างกายสัตว์จะเจริญเติบโตจนถึงรอบการเป็นสัตว์ซึ่งในสุกรใช้เวลา 1 เดือน ก่อนเริ่มเข้าสู่รอบการเป็นสัตว์

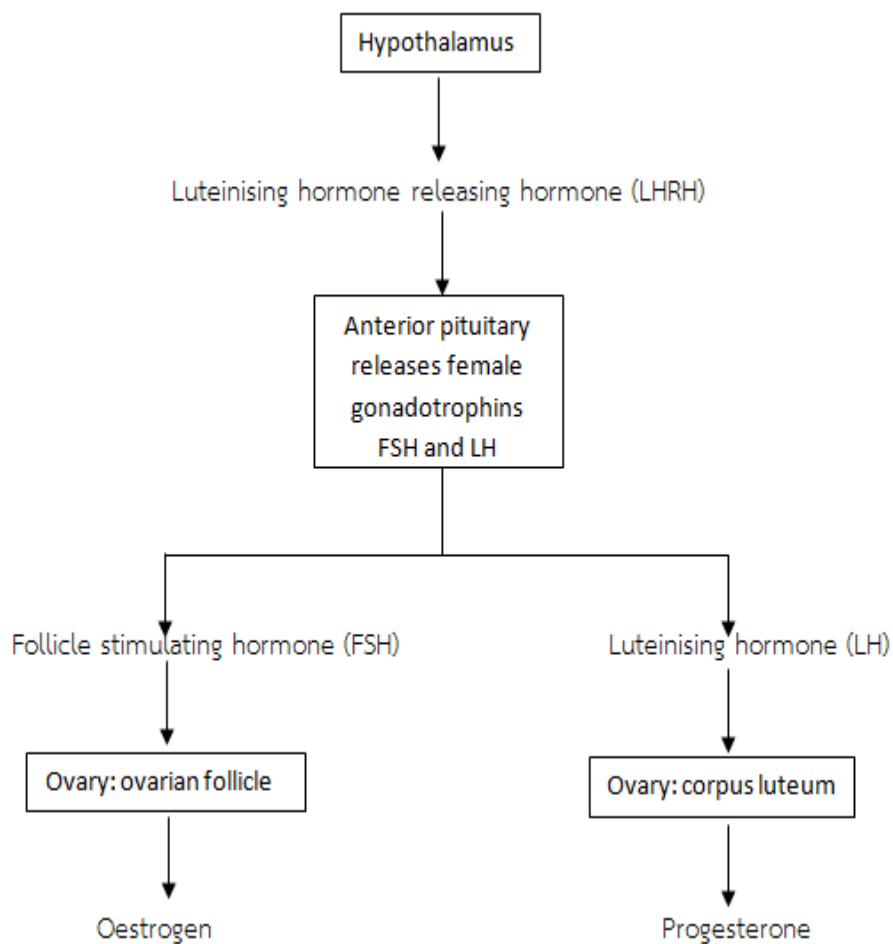
2. พันธุกรรม อิทธิพลของพันธุกรรมต่ออายุที่เริ่มเข้าสู่รอบการเป็นสัตว์นั้น สังกัดได้จากความแตกต่างระหว่างอายุที่เริ่มเข้าสู่รอบการเป็นสัตว์ของสัตว์พันธุ์แท้กับสัตว์ลูกผสม โดยสุกรพันธุ์แท้ที่มีขนาดใหญ่กว่าจะเข้าสู่วัยสาวช้ากว่าพันธุ์ที่มีขนาดเล็กและเจริญเติบโตเต็มที่ไ้เร็วกว่าพันธุ์ที่มีขนาดเล็ก

3. โภชนาการ อิทธิพลของโภชนาการต่ออายุที่เริ่มเข้าสู่การเป็นสัตว์นั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น หากสัตว์ได้รับอาหารไม่เพียงพอจะเริ่มเข้าสู่การเป็นสัตว์ช้าลงและหากได้รับอาหารมากเกินไปเกินความต้องการจะช่วยเร่งให้เข้าสู่รอบการเป็นสัตว์ได้เร็วขึ้น แต่การตอบสนองต่อโภชนาการนี้ขึ้นอยู่กับศักยภาพของพันธุกรรมด้วย

4. สิ่งแวดล้อม สภาพความเครียดต่างๆ ซึ่งอาจเกิดจากอุณหภูมิ ความชื้นหรือโภชนาการไม่เหมาะสมจะทำให้สัตว์เข้าสู่ภาวะการเป็นสัตว์ได้ช้าลง เช่น สุกรในประเทศหนาว ซึ่งคลอดในฤดูใบไม้ร่วง มีแนวโน้มที่จะเข้าสู่วัยสาวเร็วกว่าสุกรที่คลอดในฤดูใบไม้ผลิ เป็นต้น

โดยเริ่มจากสมองส่วนไฮโปทาลามัส (Hypothalamus) จะสร้างและหลั่งฮอร์โมนโกนาโดโทรปินรีลีสซิ่ง (Gonadotropin releasing hormone) ออกมาซึ่งจะไปกระตุ้นให้ต่อมใต้สมองส่วนหน้าสร้างและหลั่งฮอร์โมนฟอลลิเคิลสติมูเลตติ้ง ซึ่งจะกระตุ้นให้รังไข่หลัง Follicle stimulating hormone (FSH) และฮอร์โมนลูทีไนซิ่ง (Luteinizing hormone) จะส่งผลต่อรังไข่ โดยกระตุ้นให้เซลล์ไข่สุกและมีการผลิตฮอร์โมนเอสโตรเจน โดยในโคจะถูกระตุ้นระหว่างวันที่ 16-18 ของวงรอบการเป็นสัตว์และในสุกรและแกะจะถูกกระตุ้นประมาณวันที่ 15 โดยระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือดจะลดลง ในขณะที่เดียวกันระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดจะสูงขึ้นโดยการทำงานผ่านทางไฮโปทาลามัสซึ่งจะมีผลทำให้เกิดการแสดงอาการเป็นสัตว์โดยผ่านทาง

ระบบประสาทและเกิดการเพิ่มสูงขึ้นของฮอร์โมนลูทีไนซิงซึ่งกระตุ้นเซลล์แกรนูโลซาของถุงไข่ให้เจริญและผลิตโปรเจสเตอโรน ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ฮอร์โมนในระบบสืบพันธุ์เพศเมียและอวัยวะเป้าหมาย (Waugh และ Grant, 2014)

ในช่วงเวลาเดียวกันจะมีเอนไซม์ย่อยคอลลาเจน ซึ่งมีผลต่อผนังของถุงไข่ทำให้เกิดการอ่อนและเปราะบางมากขึ้น ซึ่งง่ายต่อการแตกของถุงไข่โดยแรงดันของของเหลวภายในกลไกนี้ทำให้เกิดการตกไข่ ในโคจะเกิดการตกไข่ประมาณ 12 ชั่วโมง หลังหมดการเป็นสัด ในแกะประมาณ 30 ชั่วโมง หลังเริ่มการเป็นสัด ในสุกรประมาณ 44 ชั่วโมงหลังจากเริ่มการเป็นสัด และในม้าประมาณ 1-2 วัน ก่อนหมดการเป็นสัด ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตารางแสดงระยะเวลา วงรอบการเป็นสัดและการตกไข่ของสัตว์ชนิดต่างๆ

ชนิดสัตว์	ระยะเวลาการเป็นสัด (วันหรือชั่วโมง)		วงรอบการเป็นสัด (วัน)		ช่วงเวลาการตกไข่
	เฉลี่ย	ช่วง	เฉลี่ย	ช่วง	
โค	12 ชม.	6-27 ชม.	21	19-23	30 ชั่วโมงหลังจากเริ่มเป็นสัด
แกะ	30 ชม.	20-24 ชม.	17	14-19	26 ชั่วโมงหลังจากเริ่มเป็นสัด
ม้า	6 วัน	1-37 วัน	21	10-37	1 วันก่อนสิ้นสุดการเป็นสัด
สุกร	44 ชม.	1-4 วัน	21	19-23	30-38 ชั่วโมงหลังจากเริ่มเป็นสัด
แพะ	39 ชม.	20-28 ชม.	17	12-27	วันที่สองของการเป็นสัด
แมว	5 วัน	4-7 วัน	10	8-14	24 ชั่วโมงหลังจากผสมพันธุ์
สุนัข	9 วัน	4-13 ชม.	-	-	24-48 ชั่วโมงเริ่มการเป็นสัด 40-50 ชั่วโมงหลังจากผสมพันธุ์
มิงค์	2 วัน	ผสมพันธุ์เป็นฤดูกาล (มีนาคม)			

หมายเหตุ: สุนัขไม่มีวงรอบการเป็นสัด แต่จะเป็นสัด 2 ครั้งต่อปี
ที่มา: กฤตพล, 2543

วงรอบการเป็นสัดหมายถึงช่วงเวลาระหว่างการเริ่มต้นการเป็นสัดครั้งหนึ่งกับการเริ่มต้นการเป็นสัดครั้งต่อไป (Karin, 2009) ดังนี้

1. ระยะก่อนการเป็นสัด (proestrus) (1-3 วัน)

เป็นระยะที่เกิดก่อนสัตว์จะแสดงอาการเป็นสัดเล็กน้อยเป็นระยะเตรียมก่อนการตกไข่และการผสมพันธุ์ คอร์ปัสลูเทียม เกิดการสลายตัวทำให้ระดับของโปรเจสเตอโรน ต่ำลงเกิดการเริ่มของวงรอบการเป็นสัดในระยะนี้จะมีการเจริญและเกิดความตื่นตัวของอวัยวะสืบพันธุ์ขึ้นอย่างเห็นได้ชัด เริ่มมีการเจริญของถุงไข่อย่างรวดเร็ว มดลูกขยายตัวขึ้นในชั้นเยื่อเมือก เริ่มมีเลือดมาคั่งและมีการบวมน้ำ ส่วนช่องคลอดมีอาการบวมแดงขึ้นที่ชั้นเยื่อเมือกมีการหลั่งน้ำคืดหลังมากขึ้นในสุกรนานประมาณ 24-72 ชั่วโมง ระดับฮอร์โมนเอสโตรเจน ที่เพิ่มขึ้นจากถุงไข่ที่กำลังพัฒนาจะนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของการหลั่งและสัญญาณภายนอกทั่วไปของระยะการเป็นสัดที่ใกล้เข้ามา

2. ระยะเวลาเป็นสัด (estrus) (1-3 วัน)

เป็นระยะแสดงอาการเป็นสัด ในระยะนี้สัตว์จะยอมให้ตัวผู้ขึ้นทับและผสมพันธุ์ต่อมต่างๆ ที่อยู่ในส่วนมดลูก คอมดลูก และช่องคลอด จะหลั่งสารคัดหลั่งออกมาเป็นจำนวนมาก อวัยวะเพศบวมแดง ช่วงนี้สัตว์จะพยายามร้องหรือแสดงอาการกระวนกระวาย และแสดงอาการอื่น ๆ ให้ตัวผู้ขึ้นผสม ในส่วนคอมดลูกจะมีน้ำเมือกเหนียว และช่องเปิดของคอมดลูกจะเปิดเพื่อให้เป็นทางผ่านของตัวอสุจิหรือลึงค์แล้วแต่ชนิดสัตว์ระยะนี้ถุงไข่เจริญจนสุกแก่เต็มที่ของเหลวภายในถุงไข่มีฮอร์โมนเอสโตรเจนสูงและส่งไปตามกระแสเลือดทำให้ตัวเมียมีพฤติกรรมเป็นสัดทำให้ออมน้ำและเพิ่มการหลั่งของเมือก ในสุกรนานประมาณ 24-72 ชั่วโมง

3. ระยะเวลาการเป็นสัดหรือหลังเป็นสัด (metestrus) (2-3 วัน)

เป็นระยะต่อจากรยะเป็นสัด คือ ระยะสั้นๆ หลังการตกไข่ ในระยะนี้จะมีการเจริญของถุงไข่ที่ตกไข่แล้วอย่างรวดเร็วเกิดเป็นคอร์ปัสลูเทียมขึ้น พบว่าระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนลดลงและระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเพิ่มขึ้นสำหรับการตั้งท้อง ส่วนที่มดลูกจะมีการเจริญของต่อมต่างๆ และเส้นเลือดต่างๆ ในชั้นเยื่อเมือกอย่างเห็นได้ชัด เพื่อเตรียมตัวรองรับการฝังตัวของลูกอ่อน ส่วนที่ช่องคลอดมีน้ำเมือกที่เกิดขึ้นลดน้อยลงภายในน้ำเมือกนั้นจะมีเซลล์เม็ดเลือดขาวและเยื่อบุผิวปะปนอยู่ในสุกรนานประมาณ 24-72 ชั่วโมง

4. ระยะเวลาการเป็นสัดหรือระยะสงบ (diestrus) (13-18 วัน)

สัตว์จะไม่แสดงอาการทางเพศใดๆ ซึ่งระยะนี้ใช้เวลายาวที่สุดมีลักษณะเด่น คือ คอร์ปัสลูเทียม มีการเจริญเต็มที่สร้างฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนช่วยกระตุ้นการหลั่งจากต่อมมดลูก มีการเจริญของต่อมต่างๆ ที่มดลูก มดลูกถูกเตรียมไว้สำหรับการติดฝังตัวของตัวอ่อนในครรภ์ กล้ามเนื้อมดลูกหย่อนตัว ส่วนที่คอมดลูกมีการหดตัวปากมดลูกจะปิดลง ระยะนี้ถ้าสัตว์ไม่ตั้งท้อง คอร์ปัสลูเทียมจะเริ่มสลายไป นานประมาณ 312-432 ชั่วโมง

นอกจากนี้เมื่อตกไข่แล้ว รังไข่ส่วนที่เคยมีถุงไข่อยู่จะเป็นแอ่งจากนั้นเซลล์จะเปลี่ยนเป็นลูเตียลแล้วเจริญต่อไปเป็น คอร์ปัส ฮีโมราจิกัม (corpus hemorrhagicum) ซึ่งเป็นสีเหลืองแดง ต่อมาเซลล์นี้จะเจริญมากขึ้นเรื่อยๆ จนกลายเป็นคอร์ปัสลูเทียมประมาณวันที่ 5 หลังการตกไข่ คอร์ปัสลูเทียม จะสร้างโปรเจสเตอโรนซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ควบคุมการตั้งท้อง ถ้าไข่ที่ตกจากรังไข่ได้รับการผสมกับอสุจิ เรียกว่า เกิดการปฏิสนธิตัวอ่อนจะฝังตัวที่ปีกมดลูกเกิดการตั้งท้อง เมื่อตัวอ่อนมีการฝังตัวที่ปีกมดลูกคอร์ปัสลูเทียมก็จะคงอยู่ต่อไปเพื่อสร้างฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ตลอดระยะเวลาการตั้งท้องและฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน นี้จะไปยับยั้งการสร้างและหลั่งฮอร์โมนโกนาโดโทรปินรีลีสซิ่ง ทำให้ไม่มีวงจรรอบการเป็นสัดรอบต่อไปเกิดขึ้นแต่ถ้าไข่ที่ตกลงที่ออมน้ำไม่ได้รับการผสมหรือผสมไม่ติด ในประมาณวันที่ 16-18 ของวงรอบการเป็นสัด เยื่อบุด้านในของมดลูกจะสร้างฮอร์โมนโพลสตราแกลนดินไปสลายคอร์ปัสลูเทียมทำให้ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน

ลดลง สมอส่วนไฮโปทาลามัสจะสร้างและหลั่งฮอร์โมนโกนาโดโทรปินรีลีซซึ่งออกมาใหม่และมีผลต่อกระบวนการสร้างและการตกไข่ ซึ่งจะวนเป็นวงรอบ เรียกว่า วงรอบการเป็นสัด ใช้เวลา 17-24 วันเฉลี่ย 21 วัน

วงรอบการเป็นสัดของสุกรแบ่งได้เป็น 2 ระยะใหญ่ คือ

1. ระยะฟอลลิคูล่า (follicular phase) ซึ่งเป็นระยะที่มีการเจริญของฟอลลิเคิลจนกระทั่งมีการตกไข่ ประกอบด้วยระยะก่อนการเป็นสัด (proestrus) และระยะเป็นสัด (estrus) ในโคและสุกร ใช้เวลา 3-6 วัน

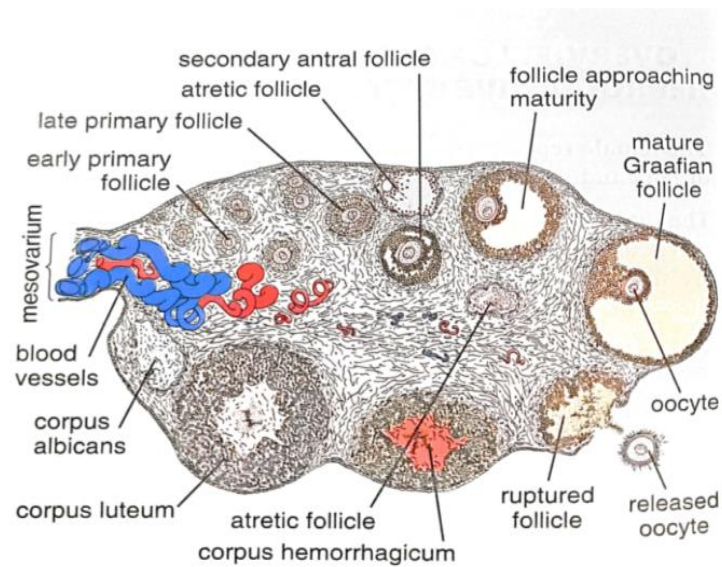
2. ระยะลูทีล (luteal phase) ซึ่งเป็นระยะการเจริญและการทำงานของคอร์ปัสลูเทียม ประกอบด้วยระยะคลายการเป็นสัด (metestrus) และระยะหมดการเป็นสัด (diestrus) ซึ่งในสุกรจะใช้เวลาประมาณ 16-17 วัน

การเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนที่มีผลต่อการทำงานของรังไข่ในรอบวงจรการเป็นสัด ดังนี้

1. หลังการสลายตัวของคอร์ปัสลูเทียม จากการทำงานของฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ ซึ่งต่อมใต้สมองส่วนหน้าจะหลั่ง FSH เพิ่ม LH เพิ่มขึ้น เนื่องจากอิทธิพลการยับยั้งจากโปรเจสเทอโรน หมดไป
2. LH และ FSH กระตุ้นให้ฟอลลิเคิลสร้างฮอร์โมนเอสโตรเจน ทำให้ปริมาณเอสโตรเจนสูงขึ้น
3. FSH กระตุ้นการทำงานของ LH receptor บนเซลล์แกรนูโลซา
4. ความเข้มข้นของฮอร์โมนเอสโตรเจน ที่สูงขึ้นจะกระตุ้นให้ต่อมใต้สมองส่วนหน้าหลั่ง LH ในระดับสูง เรียกว่า LH surge
5. LH surge กระตุ้นให้เซลล์ไข่พัฒนาการแบ่งตัวแบบไมโอซิสจนถึงระยะที่เกิด first polar body และเตรียมความพร้อมสำหรับการตกไข่
6. LH surge ทำให้จำนวน FSH receptor บนเซลล์แกรนูโลซาลดลง ดังนั้นการผลิตฮอร์โมนเอสโตรเจนจึงลดลง

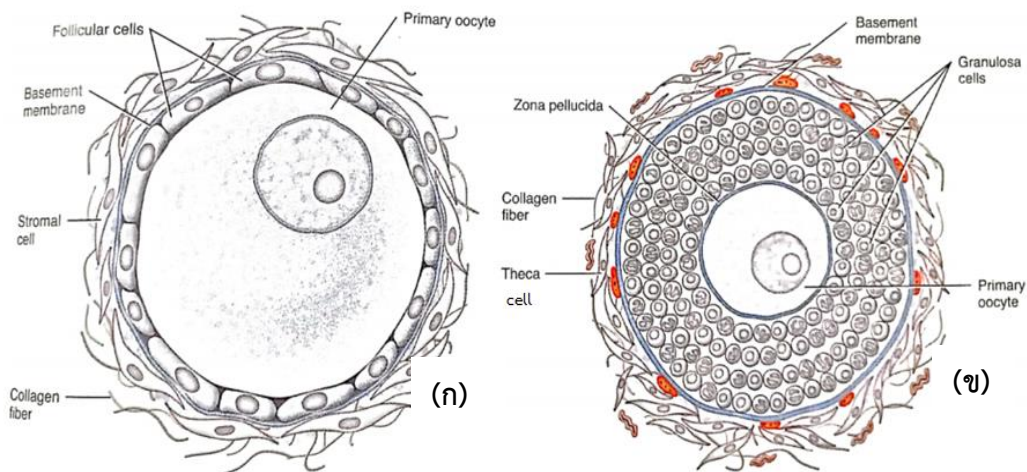
3. การเจริญพัฒนาของเซลล์ไข่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

การเจริญของถุงไข่ (folliculogenesis) ภายในถุงไข่จะมีเซลล์ไข่ ซึ่งจะเจริญพัฒนาจนกลายเป็นเซลล์ไข่ที่สมบูรณ์ และถูกปล่อยออกมา เรียกว่า การตกไข่ ดังภาพที่ 4 แสดงให้เห็นการเจริญพัฒนาของถุงไข่เริ่มตั้งแต่ถุงไข่ระยะแรก (early primary follicle) ซึ่งจะมีขนาดของ ถุงไข่และเซลล์ไข่โตขึ้นจนเซลล์ไข่เจริญพัฒนาสมบูรณ์เต็มที่และพร้อมที่จะถูกปล่อยออกมา เซลล์ไข่จะถูกขับออกมาจากถุงไข่หลังจากปล่อยไข่ (released oocyte) ออกมาแล้วถุงไข่จะกลายเป็นคอร์ปัสลูเทียม ซึ่งจะมีหน้าที่ผลิตฮอร์โมนโปรเจสเทอโรน



ภาพที่ 4 แสดงระยะการเจริญของถุงไข่ ตั้งแต่ถุงไข่ระยะแรกพัฒนาจนไข่ตก (Ross และ Pawlina, 2006)

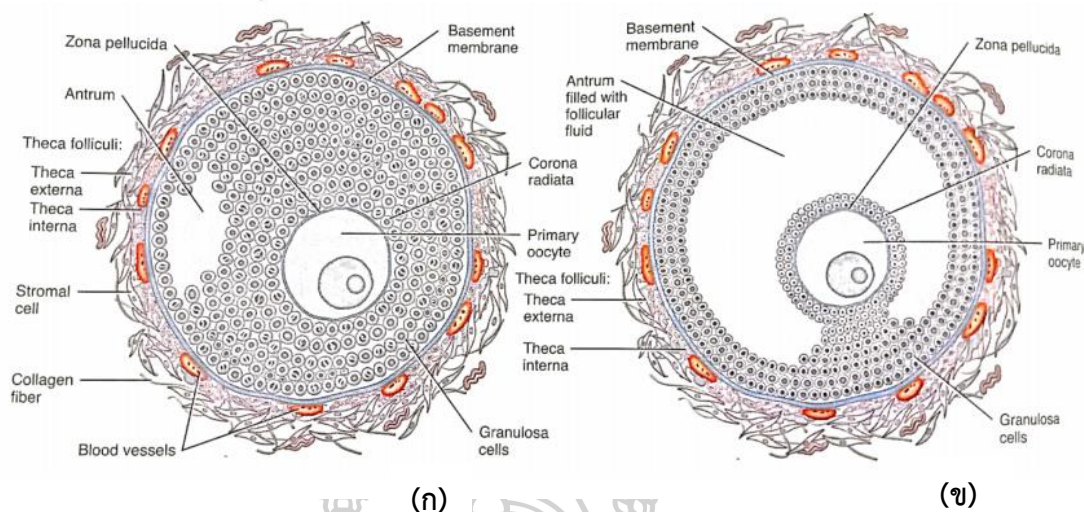
ในการพัฒนาระยะแรกขนาดของเซลล์ไข่จะมีเซลล์แกรนูโลซาซึ่งมีลักษณะแบนเป็นชั้นเดียวล้อมรอบ เรียกว่า ถุงไข่ระยะแรก (primary follicle หรือ follicle cell) ดังภาพที่ 5 (ก) หลังจากนั้นเซลล์แกรนูโลซาจะแบ่งตัวและหลั่งสารไกลโคโปรตีน คือ โซนา เพลลูซิตา ออกมาหุ้มเซลล์ไข่ไว้ จากนั้นระดับ FSH และ LH จะเพิ่มสูงขึ้นซึ่ง FSH จะกระตุ้นให้ถุงไข่ระยะแรกเจริญเติบโต จากนั้นเซลล์แกรนูโลซาจะแบ่งตัวอย่างรวดเร็วเป็นเซลล์หลายชั้นและมีเซลล์รูปกระสวยรวมเป็นกลุ่มล้อมรอบเซลล์แกรนูโลซา เรียกว่า เซลล์ทีกา (theca cells) ดังภาพที่ 5 (ข)



ภาพที่ 5 (ก) แสดงถุงไข่ระยะแรก (primary follicle) มีลักษณะแบนเป็นชั้นเดียวล้อมรอบ และ (ข) ถุงไข่ระยะที่สอง (secondary follicle)

เซลล์แกรนูโลซาจะแบ่งตัวและหลั่งสารไกลโคโปรตีน คือ โชนา เพลลูซิตา ซึ่งเซลล์แกรนูโลซาจะแบ่งตัวอย่างรวดเร็วเป็นเซลล์หลายชั้นและมีเซลล์รูปกระสวยรวมเป็นกลุ่มล้อมรอบเซลล์แกรนูโลซา เรียกว่า เซลล์ทีกา (theca cells) (Tortora และคณะ 2009)

หลังจากนั้นเซลล์ไข่อ่อนและถุงไข่จะค่อยๆ เจริญพัฒนาเกิดมีช่องว่าง เรียกว่า แอนทรัม (antrum) ล้อมรอบ ซึ่งในช่องว่างจะมีของเหลวหรือน้ำในถุงไข่ เป็นสารที่สร้างมาจากเซลล์แกรนูโลซาและเซลล์ทีกา ประกอบด้วยฮอร์โมนและสารต่างๆ สำหรับไข่ตลอดจนเอนไซม์ที่ช่วยย่อยเซลล์ถุงไข่ เซลล์แกรนูโลซาจะทำหน้าที่สร้างฮอร์โมนเอสโตรเจนและอินฮิบิน ส่วนเซลล์ทีกาจะสร้างฮอร์โมนแอนโดรเจนซึ่งจะเปลี่ยนเป็นฮอร์โมนเอสโตรเจนที่เซลล์แกรนูโลซาด้วยเอนไซม์อะโรมาเทส (aromatase) นอกจากนี้เซลล์ทีกาจะกลายเป็นเปลือกหุ้มของถุงไข่ซึ่งจะเจริญภายใต้การทำงานของ FSH ฮอร์โมนเอสโตรเจนจะมีผลเพิ่มตัวรับ LH ที่เซลล์แกรนูโลซา ขณะที่ทั้งฮอร์โมนเอสโตรเจนที่หลั่งออกมาและ FSH จะกระตุ้นตัวรับ LH ของเซลล์แกรนูโลซาให้หลั่งของเหลวมากขึ้น ซึ่งฮอร์โมนเอสโตรเจนที่เพิ่มขึ้นและ LH จะทำให้เซลล์ทีกาแบ่งตัวและหลั่งของเหลวทำให้ถุงไข่โตอย่างรวดเร็ว ในขณะที่ถุงไข่ขยายโตขึ้นนี้เซลล์ไข่ยังถูกตรึงอยู่กับส่วนของเซลล์คมูลัสที่ขั้วด้านหนึ่งเรียกไข่ที่ถูกเซลล์แกรนูโลซาหุ้มรอบอยู่ด้วยกันนี้ว่า cumulus oophorus หลังจากนั้นจะมีถุงไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่เรียกว่า ถุงไข่ระยะกราเฟียน (graafian follicle) เป็นระยะที่เจริญสมบูรณ์เต็มที่ใกล้จะตกไข่ มีการขยายของถุงน้ำเพิ่มมากที่สุด คือ แอนทรัม เซลล์ไข่พร้อมที่จะตก ดังภาพที่ 6



(ก)

(ข)

ภาพที่ 6 (ก) แสดงการเจริญพัฒนาของถุงไข่ (ข) ถุงไข่ระยะกราฟาเฟียน

(ก) ถุงไข่ซึ่งมีช่องว่าง เรียกว่า แอนทรีม (antrum) ล้อมรอบ ซึ่งในช่องว่างจะมีของเหลวหรือน้ำในถุงไข่ (follicle fluid) (ข) ถุงไข่ระยะกราฟาเฟียน เป็นระยะที่เจริญสมบูรณ์เต็มที่ใกล้จะตกไข่ มีการขยายของถุงน้ำเพิ่มมากที่สุดคือแอนทรีม เซลล์ไข่พร้อมที่จะตกออกมา (Tortora และคณะ, 2009)

Areekjseree และคณะ (2015) ศึกษาความสัมพันธ์ทางด้านรูปร่างของเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ของสุกรในหลอดทดลอง ตรวจสอบโดยศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและแบบส่องผ่าน พบเซลล์ไข่ 1,923 เซลล์ เซลล์ไข่มีรูปร่างกลมและมีชั้นของโซนา เพลลูซิดาและชั้นของเซลล์คมูลัสล้อมรอบโดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ระหว่าง 59.29-202.14 ไมโครเมตร ซึ่งสามารถจำแนกชั้น เซลล์คมูลัสที่ล้อมรอบเซลล์ไข่ได้เป็น intact cumulus cells layer oocyte, multi cumulus cells layer oocyte, partial cumulus cells layer oocyte และ completely denuded oocyte มีเปอร์เซ็นต์การพบเท่ากับ 22.80 32.70 18.60 และ 25.90 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยสามารถนำเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ (pCOCs) มาเพาะเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส 5 เปอร์เซ็นต์ CO₂, 95 เปอร์เซ็นต์ ของชั้นบรรยากาศและมีความชื้นสูงเป็นเวลา 44 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร M199 ใน 10 เปอร์เซ็นต์ HTFCS, 22 mg/ml NaHCO₃, 1 M Hepes, 0.25 มิลลิเมตร pyruvate, 15 µg/mL FSH, 1 µg/mL LH, 1 µg/mL estradiol, 50 µg/mL gentamycin sulfate ทำการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในช่วงแรกของการบ่มเลี้ยง

พบว่าเซลล์คัมมูลัสติดแน่นกับไข่เพื่อที่จะหลังสารจากปลายถุงไข่ไปยังโซนา เพลลูซิดาของไข่ และส่งไปยังเซลล์ข้างเคียงทางไมโครวิลโลแสดงว่าเซลล์คัมมูลัสมีการติดต่อสื่อสารกับเซลล์ไข่ โดยการแทรกไมโครวิลโลไปยังช่องว่างในไซโตพลาสซึมของเซลล์ไข่ ก่อนที่จะหลังสารจากปลายถุงของไมโครวิลโลเพื่อยับยั้งการพัฒนาเป็นระยะ prophase I ของเซลล์ไข่ระยะแรก (primary oocyte) การเปลี่ยนแปลงทางด้านรูปร่างสังเกตหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง พบว่า 100 เปอร์เซ็นต์ ของชั้นเซลล์คัมมูลัส จะแผ่และขยายออกแยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ จากผิวไข่ นอกจากนี้เซลล์คัมมูลัส ที่รูปร่างกลมจะเปลี่ยนเป็นเซลล์ที่ยืดยาวหรือเป็นเซลล์ทรงกระบอก (columnar cells) หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 44 ชั่วโมง พบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของไข่ที่ถูกล้อมรอบด้วย เซลล์คัมมูลัสจะมีขนาดกว้างขึ้นมากกว่าก่อนนำไปบ่มเลี้ยง และพบว่ารูปร่างของเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เปลี่ยนไปหลังจากได้รับฮอร์โมน ซึ่งทำให้ไข่เกิดการเจริญพัฒนา การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าฮอร์โมนในอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร M199 ช่วยกระตุ้นถุงไข่สุกรใน 44 ชั่วโมง ในห้องปฏิบัติการโดยสามารถใช้ประโยชน์จากการศึกษานี้ในการควบคุมให้ถุงไข่เกิดการเจริญพัฒนาได้เร็วขึ้น เป็นประโยชน์ทางด้านเซลล์เทคโนโลยี

4. การศึกษาขนาดของถุงไข่เซลล์ไข่และคุณภาพของเซลล์ไข่

การศึกษารังไข่ประกอบด้วยถุงไข่ ที่สร้างมาล้อมรอบเซลล์ไข่ โดยถุงไข่จะประกอบด้วยเซลล์ไข่ที่มีลักษณะแบนล้อมรอบด้วยเซลล์ชั้นเดียว เรียกว่า เซลล์แกรนูโลซา จึงคาดว่าถุงไข่ที่มีขนาดแตกต่างกันจะส่งผลต่อการเจริญของเซลล์ไข่และทำให้ลักษณะของเซลล์ไข่แตกต่างกันด้วย รายงานการศึกษาเซลล์ไข่ที่เจาะได้จากสุกรเพศเมียพันธุ์ ลาร์จไวท์ (Large White pig) พบว่าเซลล์ไข่มีรูปร่างกลมและมีขนาดอยู่ในช่วง 89.16-144.68 ไมโครเมตร เซลล์ไข่ถูกหุ้มด้วยสารไกลโคโปรตีน เรียกว่า โซนา เพลลูซิดา ซึ่งถัดจากชั้นโซนา เพลลูซิดา จะเป็นชั้นของเซลล์คัมมูลัส โดยเซลล์ไข่แบ่งตามลักษณะเซลล์ล้อมรอบได้ 4 แบบ คือ เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่น เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่หลายชั้น เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เพียงบางส่วน และเซลล์ไข่ที่ไม่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ (Areekijseeree และ Vejaratpimol, 2006) การศึกษาในเซลล์ไข่ที่เจาะจากสุกรสาวก่อนวัยเจริญพันธุ์ทั้งหมด 921 เซลล์ไข่จากทั้งหมด 20 รังไข่ คิดเป็นค่าเฉลี่ย 46 เซลล์ไข่ต่อรังไข่ มีลักษณะเป็นรูปทรงกลมล้อมรอบด้วยโซนา เพลลูซิดา และชั้นของเซลล์คัมมูลัสมีเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 89.16 และ 144.68 ไมโครเมตร แบ่งเซลล์ไข่ตามลักษณะเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ได้เป็น 5 แบบ คือ 1. เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่น 2. เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้น 3. เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แผ่ขยายหลายชั้น 4. เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เพียงบางส่วน และ 5. เซลล์ไข่ที่ไม่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ (Areekijseeree และคณะ, 2012)

การศึกษาที่อธิบายถึงความสำคัญของเซลล์แกรนูโลซา จำนวนถุงไข่และความสามารถของน้ำในถุงไข่ต่อการเจริญของเซลล์ไข่ โดยศึกษาจากการเติมน้ำในถุงไข่ลงในอาหารเพาะเลี้ยง คือ เซลล์ไข่สุกรที่มีเซลล์แกรนูโลซาจำนวนมาก เปรียบเทียบกับเซลล์ไข่สุกรที่มีเซลล์แกรนูโลซาจำนวนน้อย เพาะเลี้ยงเซลล์ในห้องปฏิบัติการ จากนั้นวิเคราะห์การเจริญและคุณภาพของเซลล์ไข่ที่ได้จาก early antral follicles พบว่าเซลล์ไข่สุกรที่มีเซลล์แกรนูโลซาจำนวนมากช่วยเสริมการเจริญของเซลล์ไข่และการเปลี่ยนแปลงของโครมาตินและปริมาณไขมันของเซลล์ไข่เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ไข่ที่มีเซลล์แกรนูโลซาจำนวนน้อย การศึกษาเซลล์ไข่สุกรที่มีเซลล์แกรนูโลซาจำนวนมากที่เสริมด้วยน้ำในถุงไข่ลงในอาหารเพาะเลี้ยงยังช่วยให้เซลล์ไข่ที่ได้จากถุงไข่ขนาดกลาง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 3-5 มิลลิเมตร) สามารถเข้าสู่ ระยะบลาสโตซิสต์ได้สูงขึ้น นอกจากนี้การเสริมน้ำในถุงไข่สุกรทั้งกลุ่มที่มีเซลล์แกรนูโลซาจำนวนมากและจำนวนน้อยจะช่วยเสริม histone acetylation ในการเจริญของเซลล์ไข่ด้วย จึงสรุปได้ว่าการเสริมน้ำในถุงไข่สุกรที่มีเซลล์แกรนูโลซาจำนวนมากนั้นมีบทบาทสำคัญในการเสริมการเจริญของเซลล์ไข่ในห้องปฏิบัติการด้วย (Shibahara และคณะ, 2019)

คุณภาพของถุงไข่มีความสำคัญในการศึกษาเซลล์ไข่เพื่อไปใช้ในเทคโนโลยีชีวภาพอื่นๆ ถุงไข่สุกรจะพัฒนาในระยะฟอลลิคูล่า ซึ่งการเจริญเติบโตของถุงไข่นั้นมีน้ำในถุงไข่ ที่มีส่วนสำคัญในการพัฒนาเซลล์ไข่ ซึ่งจะนำสารต่างๆ เช่น ฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมและปัจจัยที่ทำให้เจริญเติบโตหลังจากเซลล์แกรนูโลซา (Fortune, 1994) สารจากน้ำในถุงไข่อาจมีปัจจัยที่ส่งผลต่อสภาวะการเจริญพันธุ์จึงศึกษาด้วยการเก็บตัวอย่างน้ำในถุงไข่ที่มีขนาดมากกว่า 8 มิลลิเมตร โดยศึกษาร่วมกับการเก็บตัวอย่างซีรัมของเลือดจากวัวที่ให้ผลผลิตสูง 9 ตัว ระหว่าง 7 วันก่อนคลอดวันที่ 14 หลังการคลอดและ 46 วันหลังจากคลอด จากนั้นนำมาวิเคราะห์กลูโคส β -ไฮดรอกซีบิวทิเรต (β -OHB) ยูเรีย (urea) โปรตีน (total protein) ไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides) กรดไขมันอิสระ (non-esterified fatty acids) และโคเลสเตอรอล (total cholesterol) ผลการศึกษาพบว่า น้ำในถุงไข่มีปริมาณกลูโคสสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับซีรัมของเลือด ขณะที่ปริมาณของโปรตีน ไตรกลีเซอไรด์ กรดไขมันอิสระและโคเลสเตอรอลต่ำลงเมื่อเปรียบเทียบกับซีรัมของเลือด เมื่อเวลาผ่านไปพบว่าปริมาณของกลูโคส β -ไฮดรอกซีบิวทิเรต ยูเรีย ไตรกลีเซอไรด์ในซีรัมของเลือดและน้ำในถุงไข่มีการเปลี่ยนแปลง แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของเมแทบอลิซึมเหล่านี้ในซีรัมของเลือดมีผลการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกับน้ำในถุงไข่ โดยเฉพาะกลูโคส β -ไฮดรอกซีบิวทิเรตและยูเรียมีการเปลี่ยนแปลงสูงมากการศึกษานี้จึงสรุปได้ว่าเมแทบอลิซึมเหล่านี้พบในซีรัมของวัวหลังคลอดและมีผลกับน้ำในถุงไข่ด้วย ดังนั้นจึงส่งผลต่อคุณภาพของเซลล์ไข่และเซลล์แกรนูโลซา (Leroy และคณะ, 2004) นอกจากนี้รอบการเป็นสัดหรือสารอาหารนั้นจะส่งผลต่อการพัฒนาขนาดของถุงไข่หรือการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของน้ำในถุงไข่และเซลล์คมูลัสซึ่งจะส่งผลต่ออัตราการเจริญของเซลล์ไข่และการพัฒนาของตัวอ่อนด้วย (Mohammed และคณะ, 2005; Spacek และ Carnevale, 2018,

Mohammed 2011, Mohammed และ Attaai 2011, Mohammed และคณะ, 2012, Mohammed และ Kassab 2015, Sinclair และคณะ, 2008, Mohammed 2006; Mohammed 2008; Mohammed และคณะ, 2008; Mohammed และคณะ, 2010)

5. น้ำในถุงไข่

น้ำในถุงไข่เป็นสารประกอบโปรตีนที่สร้างโดยเซลล์ที่อยู่ล้อมรอบการศึกษาน้ำในถุงไข่ของมนุษย์ได้รับการพิสูจน์แล้วว่ามิโมเลกุลและโปรตีนที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งอาจส่งผลต่อการเจริญเติบโตของถุงไข่และการปฏิสนธิของไข่ ตามแนวคิดนี้การศึกษาลักษณะเฉพาะของโปรตีนจากน้ำในถุงไข่จึงเป็นเป้าหมายในการประเมินคุณภาพของไข่และอาจใช้ในการส่งเสริมการปฏิสนธิในร่างกาย (IVF) (Bianchi และคณะ, 2013) คือ เซลล์แกรนูโลซาซึ่งมีการหลั่งโปรตีนออกมาภายในถุงไข่ (Mahajan และ Little, 1978) และบางส่วนถูกสร้างมาจากน้ำเลือดแล้วถูกขนส่งมายัง blood follicular barrier (Revelli และคณะ, 2009) ซึ่งโปรตีนนี้ส่งผลต่อถุงไข่และมีผลต่อกระบวนการสุกของเซลล์ไข่ (Ducolomb และคณะ, 2013) การศึกษาโปรตีนของน้ำในถุงไข่มนุษย์ จากกลุ่มตัวอย่าง 10 คน พบโปรตีน 7 ชนิด คือ ทรานสเฟอริน (transferrin) ซีรัมอัลบูมิน (serum albumin) แอลฟา 1 แอนตีทริปซิน (α 1-antitrypsin) แฮพโทโกลบูลิน 1 (haptoglobin-1) immunoglobulin Ig-K chain C region apolipoprotein A-I และ subunit หรือ fragment ของ serum albumin แสดงให้เห็นว่า โปรตีนของน้ำในถุงไข่มีผลต่อสรีรวิทยาของถุงไข่ (Spitzer และคณะ, 1996)

การศึกษาโปรตีนต่างๆ ในถุงไข่ คือ การศึกษาในโคพบว่ามีโปรตีนพรีอัลบูมิน (prealbumin) อัลบูมิน (albumin) GC-globulin β 2-glycoprotein III อิมมูโนโกลบูลินจี (IgG) α 1-lipoprotein α 2-macroglobulin และอิมมูโนโกลบูลินเอ็ม (IgM) (Mette และคณะ, 1976) การศึกษาในสุกรพบสารที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ไข่ (oocyte maturation inhibitor) (Tsafiri และ Pomerantz, 1986) ซึ่งมีรายงานว่า FSH-binding inhibitor ในสุกร สามารถยับยั้งเปปไทด์จากของเหลวในถุงไข่ได้ (Furukawa และคณะ, 1994) นอกจากนี้มีรายงานพบว่าในสุกร พบโปรตีนอิมมูโนโกลบูลินแลมดาเซน (immunoglobulin lambda-chain), Cytokeratin-14 type I cytoskeletal, Keratin type II cytoskeletal 1, immunoglobulin gamma-chain เป็นต้น (Ducolomb และคณะ, 2013) และมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับ Growth differentiation factor 8 (GDF8) เรียกว่า myostatin อยู่ในกลุ่มของ transforming growth factor- β (TGF- β) โดย GDF8 ตรวจพบในระบบสืบพันธุ์ คือ รกและมดลูกของมนุษย์ ผู้วิจัยจึงได้สังเกตผลของ GDF8 ระหว่างการศึกษากการเจริญพัฒนาของเซลล์ไข่สุกรในหลอดแก้ว เพื่อวิเคราะห์คุณภาพของเซลล์ไข่สุก พบว่าการให้ GDF8 ในอาหารเลี้ยงเซลล์จะช่วยเสริมการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสและการเจริญพัฒนาของไซโตพลาสซึมทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ transcriptional patterns ของ Sma- และ Mad-related protein 2/3

(SMAD2/3) นอกจากนี้ยังมีการยับยั้งการทำงานของ GDF8-induced Smad 2/3 ส่งผลให้คุณภาพของเซลล์ไข่มดลูกลดลง (Yoon และคณะ, 2019) นอกจากนี้จากการศึกษาในผู้ป่วยที่มีภาวะมีบุตรยากเกี่ยวกับเยื่อบุโพรงมดลูกเจริญผิดปกติที่เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี จากการศึกษาในไข่มดลูกพบว่ามีการทำงานของ IL-6, IL-10, IL-1 β (Pellicer และคณะ, 1998) และซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase: SOD) (Prieto และคณะ, 2012) การศึกษาสารหลังจากไข่มดลูกด้วยเทคนิค SDS-PAGE และวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี LC/MS/MS จากน้ำในไข่มดลูก ระยะฟอลลิคูลาร์ในไข่มดลูกขนาด 3-5 มิลลิเมตร พบว่าแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 27 กิโลดาลตัน คือ immunoglobulin 45 กิโลดาลตัน คือ haptoglobin complement component 3 และ apolipoprotein A-IV 140 กิโลดาลตัน คือ ceruloplasmin และน้ำหนักโมเลกุลที่มากกว่า 220 กิโลดาลตัน คือ fibronectin และ keratin 1 ส่วนน้ำในไข่มดลูกระยะลูทีนพบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 220 กิโลดาลตัน คือ โปรตีน alpha-2-macroglobulin และพบโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันบางตัวที่สำคัญ เช่น HPS84 TRAP-1 และ p60 เป็นต้น (วรรณ, 2552) นอกจากนี้ การศึกษาในหลอดทดลองจะช่วยให้เข้าใจกระบวนการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาไข่มดลูกซึ่งส่งผลต่อการเจริญของเซลล์ไข่ เช่น การเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซามีการทำงานของ FGF (fibroblast growth factor) และ EGF (epidermal growth factor) และตัวรับ FGF กับ EGF (Wandji, 1992) เป็นต้น

ซึ่งจากการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสาร ฮอรโมนและแฟกเตอร์ต่างๆ ที่พบในไข่มดลูกตัวเมีย ดังตารางที่ 2 และโปรตีนที่พบในไข่มดลูกตัวเมีย ดังตารางที่ 3 รายงานวิจัยที่ผ่านมานักวิทยาศาสตร์พบว่าเซลล์คุมมีส่วนสำคัญในการส่งสารบางชนิด เช่น โปรตีน เอนไซม์ และฮอรโมนที่จำเป็นเข้าสู่ในเซลล์ไข่ อีกทั้งยังสร้างสารเคมีหรือโปรตีนบางตัวที่มีประโยชน์ในการทำให้เกิดการคงสภาพของเซลล์ไข่ทำให้ผู้วิจัยคาดหมายว่าการศึกษาสัญญาณวิทยาของรังไข่ เนื้อเยื่อของรังไข่สุกสุด เซลล์ไข่ การเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาและวิเคราะห์โปรตีนของน้ำในไข่มดลูกและสารที่เซลล์แกรนูโลซาหลังสู้อาหารเพาะเลี้ยง (condition medium) ในห้องปฏิบัติการนั้นจะสามารถทำให้เกิดความเข้าใจมากขึ้นในเรื่องบทบาทและหน้าที่ของสารหลังในเซลล์ไข่ และคาดหวังว่าจะนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านงานวิจัยต่างๆ ได้ในอนาคต

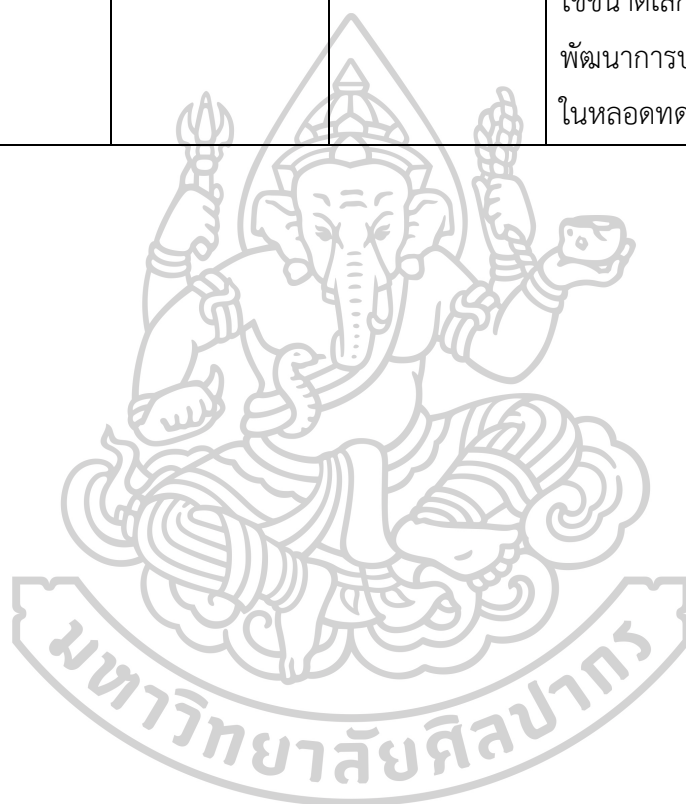
ตารางที่ 2 สาร ฮอริโมนและแฟกเตอร์ต่างๆ ที่พบในน้ำในถุงไข่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

สาร ฮอริโมนและแฟกเตอร์ต่างๆ	ขนาดของถุงไข่	สัตว์ทดลอง	ผลที่เกิดขึ้น	เอกสารอ้างอิง
1. สารที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ไข่ (oocyte maturation inhibitor)	ขนาดเล็ก (น้อยกว่า 3 มิลลิเมตร)	สุกร (Dutch Landrace x Great	การศึกษาอัตราการยับยั้งการเจริญของเซลล์ไข่ในวันที่ 5 10 15 และ 18	Van de Wiel และคณะ, 1983
2. อินฮิบิน (inhibin)	ขนาดกลาง (3-6 มิลลิเมตร)	Yorkshire gilts)	ของรอบการเป็นสัด	
3. ฮอริโมนโปรเจสเตอโรน	ขนาดใหญ่ (มากกว่า 6 มิลลิเมตร)		และ 24 ชั่วโมงหลังการเป็นสัด พบว่า	
4. oestradiol-17 β			ความเข้มข้นของ OMI และอินฮิบิน จะลดลงเมื่อขนาดของเซลล์ไข่เพิ่มขึ้น แสดงว่าของเหลวที่ได้จากถุงไข่ขนาดเล็กมีอัตรายับยั้งการเจริญของเซลล์	
1. สารที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ไข่ (oocyte maturation inhibitor: OMI)	ขนาดเล็ก (น้อยกว่า 3 มิลลิเมตร)	สุกร (Dutch Landrace x	(ต่อ) ไข่ มากกว่าขนาด	Van de Wiel และคณะ, 1983
2. อินฮิบิน (inhibin)	ขนาดกลาง (3-6 มิลลิเมตร)	Great	กลางและขนาดใหญ่ โดยไม่การ	
3. ฮอริโมนโปรเจสเตอโรน	ขนาดใหญ่ (มากกว่า 6 มิลลิเมตร)	Yorkshire gilts)	เปลี่ยนแปลงทั้งฮอริโมน	
4. oestradiol-17 β			โปรเจสเตอโรนและ oestradiol-17 β	

สาร ฮอร์โมนและแฟกเตอร์ต่างๆ	ขนาดของถุงไข่	สัตว์ทดลอง	ผลที่เกิดขึ้น	เอกสารอ้างอิง
<p>1. โกรทดิฟเฟอเรนทีเอชันแฟกเตอร์ 9 (growth differentiation factor 9)</p> <p>2. โบนมอร์โฟเจเนติกโปรตีน 15 (bone morphogenetic protein 15)</p>	ไม่ระบุขนาด	หนูและแกะเพศเมียที่ GDF 9 บกพร่องและแกะที่ BMP15 บกพร่อง	เซลล์ไข่จะส่งสัญญาณผ่านเซลล์แกรนูโลซาและเซลล์คมูลัสโดยโกรทดิฟเฟอเรนทีเอชันแฟกเตอร์ 9 และโบนมอร์โฟเจเนติกโปรตีน 15 เป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญพัฒนาของเซลล์ไข่	Robert และคณะ, 2006; Dong และคณะ, 1996; Hanrahan และคณะ, 2004
1. กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (glucose-6 phosphate	ขนาดเล็ก (น้อยกว่า 3 มิลลิเมตร) ขนาดกลาง (3-5 มิลลิเมตร)	สุกรพันธุ์ (แลนเรซ)	พบว่ามีการทำงานของกลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนสและการทำงานของ	Antosik และคณะ, 2009
<p>dehydrogenase: G6PDH)</p> <p>2. โซนา เพลลูซิดา ไกลโคโปรตีน (zona pellucida glycoproteins: pZP1, pZP2, pZP3, pZP 3 alpha)</p> <p>3. อินทิกรัลเบตา1</p>	(ต่อ) ขนาดใหญ่ (มากกว่า 5 มิลลิเมตร)	สุกรพันธุ์ (แลนเรซ)	(ต่อ) โซนา เพลลูซิดา ไกลโคโปรตีน pZP1, pZP3 อินทิกรัลเบตา 1 และเบตา 2 มีการแสดงออกสูงขึ้นในถุงไข่ขนาดกลางมากกว่าขนาดเล็กและมีการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอในถุงไข่	Antosik และคณะ, 2009

สาร ฮอร์โมนและ แฟกเตอร์ต่างๆ	ขนาดของถุงไข่	สัตว์ทดลอง	ผลที่เกิดขึ้น	เอกสารอ้างอิง
และเบตา 2 (integrins beta 1 และ beta 2)			ขนาดใหญ่มากกว่า ขนาดเล็กแสดงว่า โปรตีนนี้มีส่วนใน การปฏิสนธิและ ขนาดของถุงไข่	
1. อินฮิบินเบตาเอ (INH β A) 2. อินฮิบินเบตาบี (INH β B)	ขนาดเล็ก (น้อยกว่า 3 มิลลิเมตร) ขนาดกลาง (3-5 มิลลิเมตร) ขนาดใหญ่ (มากกว่า 5	สุกรพันธุ์ แลนเรช	ศึกษาพบว่ามีการ แสดงออกของ อินฮิบิน เบตาบีใน เซลล์ไข่ขนาดใหญ่ และขนาดกลาง มากกว่าเซลล์ไข่ ขนาดเล็กทั้งก่อน	Kempisty และ คณะ, 2013
1. อินฮิบินเบตาเอ (INH β A) 2. อินฮิบินเบตาบี (INH β B)	(ต่อ) มิลลิเมตร) ทั้ง ก่อนและหลัง การเพาะเลี้ยง เซลล์ไข่ให้สุก (in vitro maturation)	สุกรพันธุ์ แลนเรช	(ต่อ) และหลังการ เพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ ให้สุกพบว่า การ ทำงานของอินฮิบิน มีความสัมพันธ์กับ การเจริญและ พัฒนาของถุงไข่ สุกร	Kempisty และ คณะ, 2013
3. อินซูลินไลค์โกรท แฟกเตอร์-1 (insulin- like growth factor, IGF-I) ปริมาณ 0 60 120 180 และ 240 นาโน กรัมต่อมิลลิลิตร	ขนาดเล็ก (2-5 มิลลิเมตร) ขนาดใหญ่ (6-10 มิลลิเมตร) ด้วยการเลี้ยง เซลล์ไข่ให้สุก (in vitro	สุกร	อาหารเลี้ยงเชื้อที่ เลี้ยงเซลล์ไข่ให้สุก สำหรับถุงไข่ขนาด เล็กให้ผลเหมือนกับ ถุงไข่ขนาดใหญ่ที่ ไม่ได้ใส่อินซูลินไลค์ โกรทแฟกเตอร์-1	Oberlender และคณะ, 2013

สาร ฮอร์โมนและ แฟกเตอร์ต่างๆ	ขนาดของถุงไข่	สัตว์ทดลอง	ผลที่เกิดขึ้น	เอกสารอ้างอิง
	maturation) และการปฏิสนธิ ในหลอดทดลอง (in vitro fertilization)		แสดงให้เห็นว่าการ เติมอินซูลินไลค์ โกรทแฟกเตอร์-1 ในอาหารเลี้ยงจะ เพิ่มการสุกของถุง ไข่ขนาดเล็กและ พัฒนาการปฏิสนธิ ในหลอดทดลอง	



ตารางที่ 3 โปรรตีนที่พบในถุงไข่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

โปรรตีน	น้ำหนัก โมเลกุล (กิโลดาลตัน)	สัตว์ทดลอง	หน้าที่	เอกสารอ้างอิง
1. FSH-binding inhibitor	178	สุกร	ยับยั้งเปปไทด์ จากน้ำในถุงไข่	Furukawa และ คณะ, 1994
2. พรือัลบูมิน (prealbumin)	55	โค	ขนส่งฮอร์โมน ไทรอกซินจาก ต่อมไทรอยด์ รวมถึงยังช่วย ขนส่งวิตามินเอ ร่วมกับ retinol- binding protein	Mette และ คณะ, 1976
3. อัลบูมิน (albumin)	68	โค	สร้างเม็ดเลือด และซ่อมแซม ส่วนต่าง ๆ ของ ร่างกายให้มี ความแข็งแรง	Mette และ คณะ, 1976
4. GC-globulin	68	โค	ทำหน้าที่ใน ระบบภูมิคุ้มกัน	Mette และ คณะ, 1976
5. β 2-glycoprotein III	145	โค	ทำหน้าที่ใน ระบบภูมิคุ้มกัน	Mette และ คณะ, 1976
6. อิมมูโนโกลบูลินจี (IgG)	160	โค	กำจัดแบคทีเรีย ไวรัส และ สารพิษในเลือด และน้ำเหลือง	Mette และ คณะ, 1976

โปรตีน	น้ำหนัก โมเลกุล (กิโลดาลตัน)	สัตว์ทดลอง	หน้าที่	เอกสารอ้างอิง
			IgG จะอยู่ในรูป โมโนเมอร์	
7. α 1-lipoprotein	260	โค	ทำให้ร่างกาย ขนส่งไขมันไปใน น้ำ เช่น เลือด และของเหลว ภายนอกเซลล์ได้	Mette และ คณะ, 1976
8. α 2- macroglobulin	820	โค	ลำเลียง thyroxine จาก กระแสน้ำไป สมอง	Mette และ คณะ, 1976
9. อิมมูโนโกลบูลิน เอ็ม (IgM)	1,000	โค	ลำเลียง thyroxine จาก กระแสน้ำไป สมอง	Mette และ คณะ, 1976
10. สารที่ยับยั้งการ เจริญของเซลล์ไข่ (oocyte maturation inhibitor: OMI)	30-100	สุกร	ยับยั้งการเจริญ ของเซลล์ไข่	Tsafiriri และ Pomerantz, 1986
11. ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (superoxide dismutase: SOD)	130	มนุษย์	เปลี่ยนซูเปอร์ ออกไซด์เป็น ไฮโดรเจนเปอร์ ออกไซด์และ ออกซิเจน	Prieto และ คณะ, 2012

โปรตีน	น้ำหนัก โมเลกุล (กิโลดาลตัน)	สัตว์ทดลอง	หน้าที่	เอกสารอ้างอิง
12. อินเตอร์ลิวคิน (IL-6, IL-10 และ IL-1 β)	น้ำหนัก โมเลกุลของ IL-6, IL-10 และ IL-1 β คือ 23.18 37 และ 30.7	มนุษย์	หน้าที่ในระบบ ภูมิคุ้มกันที่ แตกต่างกันในแต่ ละเซลล์	Pellicer และ คณะ, 1998
13. immunoglobulin lambda chain	19.32	สุกร	เสริมการเลี้ยง เซลล์ไข่ให้สุก (in vitro maturation)	Ducolomb และคณะ, 2013
13. immunoglobulin lambda chain	19.32	สุกร	(ต่อ) และการปฏิสนธิ ในหลอดทดลอง (in vitro fertilization)	Ducolomb และคณะ, 2013
14. Cytokeratin-14 type I cytoskeletal	52.68	สุกร	เสริมการเลี้ยง เซลล์ไข่ให้สุก (in vitro maturation) และการปฏิสนธิ ในหลอดทดลอง (in vitro fertilization)	Ducolomb และคณะ, 2013
15. keratin type II cytoskeletal 1	65.48	สุกร	เสริมการเลี้ยง เซลล์ไข่ให้สุก (in vitro	Ducolomb และคณะ, 2013

โปรตีน	น้ำหนัก โมเลกุล (กิโลดาลตัน)	สัตว์ทดลอง	หน้าที่	เอกสารอ้างอิง
			maturation) และการปฏิสนธิ ใน	
15. keratin type II cytoskeletal 1	65.48	สุกร	(ต่อ) หลอดทดลอง (in vitro fertilization)	Ducolomb และคณะ, 2013
16. อิมมูโนโกลบูลิน- ลินแกมมาเซิน (immunoglobulin gamma-chain)	52.21	สุกร	เสริมการเลี้ยง เซลล์ไข่ให้สุก (in vitro maturation) และการปฏิสนธิ ในหลอดทดลอง (in vitro fertilization)	Ducolomb และคณะ, 2013

การศึกษาพบว่า การส่งสัญญาณผ่านเซลล์แกรนูโลซาและเซลล์คุมูลัสโดยมีโกรทดิฟเฟอเรน-
ทิเอซันแฟกเตอร์ 9 และโบนมอร์โฟเจเนติกโปรตีน 15 เป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญพัฒนาของเซลล์
ไข่ (Robert และคณะ, 2006) นอกจากนี้พบว่ามีการทำงานของกลูโคส-6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนสและ
การทำงานของโซนา เพลลูซิตา ไกลโคโปรตีน pZP1, pZP3 อินทิกรัลเบตา 1 และเบตา 2 มีการ
แสดงออกสูงขึ้นในถุงไข่ขนาดกลาง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 3-5 มิลลิเมตร) มากกว่าขนาดเล็ก
(เส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 3 มิลลิเมตร) นอกจากนี้ยังมีการแสดงออกของเอ็มอาร์เอ็นเอทุกตัวใน
ถุงไข่ขนาดใหญ่ (เส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 5 มิลลิเมตร) มากกว่าขนาดเล็กแสดงให้เห็นว่าโปรตีน
เหล่านี้มีส่วนในการปฏิสนธิและเกี่ยวข้องกับขนาดของถุงไข่ด้วย (Antosik และคณะ, 2009) และยัง
พบการแสดงออกของโปรตีนอินฮิบินเบตาเอ (INH β A) และอินฮิบินเบตาบี (INH β B) ทั้งก่อนและหลัง
การเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ให้สุก (in vitro maturation) ศึกษาด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอตพบว่ามีการ
แสดงออกของอินฮิบินเบตาบีในเซลล์ไข่ขนาดใหญ่ (เส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 5 มิลลิเมตร) และ

ขนาดกลาง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 3-5 มิลลิเมตร) มากกว่าเซลล์ไซไซขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 3 มิลลิเมตร) ทั้งก่อนและหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์ไซไซให้สุกแสดงให้เห็นว่าการทำงานของอินฮิบิเตอร์มีความสัมพันธ์กับการเจริญและพัฒนาของถุงไซไซ (Kempisty และคณะ, 2013) การศึกษาสารหลังจากสุกรด้วยเทคนิคโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-PAGE) และวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี LC/MS/MS พบว่าน้ำในถุงไซไซระยะฟอลลิคูล่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-5 มิลลิเมตร มีแถบโปรตีนหลายแถบเมื่อวิเคราะห์โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 27 กิโลดาลตัน คือ อิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) แถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 45 กิโลดาลตัน คือ Haptoglobin, Complement component 3 และ Apolipoprotein A-IV แถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 140 กิโลดาลตัน คือ Ceruloplasmin และน้ำหนักโมเลกุลที่มากกว่า 220 กิโลดาลตัน คือ Fibronectin และ Keratin 1 นอกจากนี้วิเคราะห์น้ำในถุงไซไซระยะลูติลีส เลือกแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 220 กิโลดาลตัน คือ โปรตีน Alpha-2-macroglobulin และพบโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันบางตัวที่สำคัญ เช่น HPS84, TRAP-1 และ p60 เป็นต้น (วรรณ, 2552) รายงานการศึกษาการเลี้ยงเซลล์ไซไซให้สุก (in vitro maturation) และการปฏิสนธิในหลอดทดลอง (in vitro fertilization) โดยทำการเพาะเลี้ยงและเสริมด้วยอินซูลินไลค์โกรทแฟกเตอร์-1 (insulin-like growth factor, IGF-I) ปริมาณ 0, 60, 120, 180 และ 240 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงเซลล์ไซไซให้สุก สำหรับถุงไซไซขนาดเล็ก (2-5 มิลลิเมตร) ให้ผลเหมือนกับถุงไซไซขนาดใหญ่ (6-10 มิลลิเมตร) ที่ไม่ได้ใส่อินซูลินไลค์โกรทแฟกเตอร์-1 แสดงว่าการเติม อินซูลินไลค์โกรทแฟกเตอร์-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงจะเพิ่มการสุกได้ในถุงไซไซขนาดเล็กและสามารถพัฒนาให้เกิดการปฏิสนธิในหลอดทดลองได้ (Oberlender และคณะ, 2013)

Areekijseer และคณะ (2015) ศึกษาแถบโปรตีนจากสารหลังจากถุงไซไซขนาดกลางและขนาดใหญ่ โดยได้รังไข่จากระบบสืบพันธุ์เพศเมียของสุกรที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ในจังหวัดนครปฐม นำสารหลังจากถุงไซไซขนาดกลาง ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร และถุงไซไซขนาดใหญ่ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7-8 มิลลิเมตร มาทำการทดลอง โดยใช้เทคนิคที่ปลอดเชื้อและวิเคราะห์แถบของโปรตีนจากถุงไซไซขนาดกลางและขนาดใหญ่ ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าแถบของโปรตีนทั้งสองไม่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (standard protein) ดังนั้น จึงเลือกแถบโปรตีนที่มีมวลโมเลกุล (MW) 52, 65, 76, 90, 110, 120, 160, 190 และมากกว่า 220 กิโลดาลตัน มาวิเคราะห์ด้วยวิธี LC/MS/MS ซึ่งผลแสดงให้เห็นว่าที่ 50 กิโลดาลตัน พบโปรตีน immunoglobulin gamma chain 65 กิโลดาลตัน คือ keratin 76 กิโลดาลตัน คือ transferrin 90 กิโลดาลตัน คือ heat shock protein/plasminogen และที่มากกว่า 120 กิโลดาลตัน คือ glycogen phosphate protein kinase โปรตีนจากถุงไซไซขนาดใหญ่ที่มากกว่า 220 กิโลดาลตัน เป็น protease ซึ่งโปรตีนทุกชนิดมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นและควบคุมการเจริญเติบโตการพัฒนาของ

เซลล์ในระบบสืบพันธุ์ ผลการศึกษาพบว่ามิโปรตีนบางชนิดที่มีประโยชน์และสำคัญในการเพาะเลี้ยง เซลล์ไข่ให้เจริญพัฒนาเป็นตัวอ่อนในเซลล์เทคโนโลยี ซึ่งการศึกษาในอนาคตอาจใช้สารหลังโปรตีน จากถุงไข่ขนาดกลางและขนาดใหญ่มาเป็น สารใช้เสริมในสภาพเพาะเลี้ยงเพื่อกระตุ้นให้ไข่และ ตัวอ่อนเจริญพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย

จากรายงานพบว่าน้ำในถุงไข่จะส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เพาะเลี้ยงแบบปฐมภูมิ จากระบบสืบพันธุ์ให้มีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น เนื่องจากพบว่าน้ำในถุงไข่ไม่มีโปรตีนต่างๆ ที่ส่งผล ต่อ การ เจริญ เช่น trypsin precursor beta-actin, albumin, keratin และ fibronectin (Alavi และคณะ, 2008)

6. การเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่และเซลล์แกรนูโลซาในห้องปฏิบัติการ

Ledwitz-Rigby และคณะ (1979) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาในอาหารเพาะเลี้ยง M199 ที่เสริมด้วยน้ำในถุงไข่ขนาด 1-2 มิลลิเมตร น้ำในถุงไข่ขนาด 6-12 มิลลิเมตร และซีรัมของสุกร เพศเมียวัยเจริญพันธุ์ (puberty) ที่มีหรือไม่มีน้ำในถุงไข่ปริมาตร 100 นาโนกรัม เป็นระยะเวลา 6 วัน พบว่าหลังการเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซา 4 วัน เซลล์มีการเจริญเติบโตเป็นชั้นเดียว (monolayer) โดยเซลล์ที่เสริมด้วยน้ำในถุงไข่จะส่งเสริมการหลั่งฮอร์โมนโปรเจสโตโรน มากกว่า เซลล์ที่เสริมด้วยถุงไข่ขนาดเล็กและเซลล์ที่เสริมด้วยซีรัมของสุกร จากการศึกษาครั้งนี้จึงพบว่าการ เจริญเติบโตของเซลล์แกรนูโลซา พบมากขึ้นตามน้ำในถุงไข่และขนาดของถุงไข่

Areekijseeree และ Vejaratpimol (2006) ศึกษาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเซลล์สัณฐาน วิทยาและชนิดของโปรตีนที่หลังจากเซลล์ท่อน้ำไข่และเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่สุกร พบว่าการ เพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร M199, RPMI 1640 และ DMEM ที่เสริมด้วยฮอร์โมน FSH, LH และ เอสโตรเจน ให้ผลการเพาะเลี้ยงที่ดีและเซลล์มีเปอร์เซ็นต์การรอดสูง

Ito และคณะ (2008) ศึกษาผลของสารหลังโปรตีนในถุงไข่ที่เจาะเก็บได้จากถุงไข่ขนาดกลาง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร) และถุงไข่ขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร) ต่อ กระบวนการ nuclear maturation อัตราการปฏิสนธิและประสิทธิภาพในการเจริญพัฒนาของเซลล์ ไข่สุกร เมื่อทำการเสริมสารในถุงไข่ทั้งสองขนาดลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ โดยพบว่า เซลล์ไข่ที่เจริญในอาหารเพาะเลี้ยงที่เสริมด้วยสารในถุงไข่ที่ได้จากถุงไข่ขนาดใหญ่ ส่งผลกระตุ้น กระบวนการ nuclear maturation ได้ดีกว่าและเซลล์ไข่มีอัตราการปฏิสนธิและมีประสิทธิภาพใน การเจริญพัฒนาดีกว่าเซลล์ไข่ที่เจริญในอาหารเพาะเลี้ยงที่เสริมด้วยสารในถุงไข่ที่ได้จากถุงไข่ ขนาดเล็ก นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ไข่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่เสริมด้วยสารในถุงไข่ที่ได้จากถุง ไข่ขนาดใหญ่มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ

Maria และคณะ (2014) ศึกษาผลจากการนำน้ำในถุงไข่ช่วยเสริมในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนของโคในท้องปฏิบัติการ โดยผู้วิจัยใช้น้ำในถุงไข่ของกระป๋องขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-8 มิลลิเมตร พบว่าสามารถใช้ในการเลี้ยงเซลล์ในท้องปฏิบัติการได้และน้ำในถุงไข่ส่งผลให้การแบ่งตัวของตัวอ่อนที่เลี้ยงในอาหาร TCM-199 ลดลง เนื่องจากส่งผลยับยั้งการทำงานของ cortical granules ให้ทำงานช้าลงและยับยั้งการเจริญของไซโตพลาสซึม อีกทั้งยังส่งผลให้ cumulus-oocyte complexes (COCs) ยึดติดกันแน่นมากขึ้นทำให้ยับยั้งการเจริญของเซลล์ไข่ (Damiani และคณะ, 1996) โดยการทำงานของน้ำในถุงไข่นี้คล้ายคลึงกับออกฤทธิ์ของฮอร์โมนต่างๆ ในร่างกาย เช่น steroids และ gonadotrophins ที่มีหน้าที่ในการเจริญของเซลล์ไข่ตามธรรมชาติ

Lee และคณะ (2021) ศึกษาผลของกรดกลูโคโรนิก (glucuronic acid) และ N-acetyl-D-glucosamine (AG) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของกรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid) ระหว่างการสุกของไข่สุกรในหลอดทดลอง (in vitro maturation) โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของไข่ ความหนาของช่องว่างระหว่างไซโตพลาสซึมของไข่และโซนา เพลลูซิดา ระดับอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species: ROS) และการขยายตัวของเซลล์คมูลัสและยีนที่เกี่ยวข้องกับ ROS และตรวจสอบปฏิกิริยาของ CG (cortical granule) ของเซลล์ไข่ พบว่าการเติม กรดกลูโคโรนิก 0.05 มิลลิลิตร และ N-acetyl-D-glucosamine 0.05 มิลลิลิตร ในช่วง 22 ชั่วโมง แรกของการเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ ทำให้เซลล์ไข่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ มีเส้นผ่านศูนย์กลางและขนาดช่องว่างระหว่างไซโตพลาสซึมของไข่และโซนา เพลลูซิดา เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุม การเพิ่มกรดกลูโคโรนิกและ N-acetyl-D-glucosamine สามารถลดระดับของ ROS ภายในเซลล์ไข่และ เพิ่มการแสดงออกของ CD44 และ CX43 ในเซลล์คมูลัสและ PRDX1 และ TXN2 ในเซลล์ไข่ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่ผสมกับน้ำในถุงไข่สุกร เซลล์ไข่ที่เสริมด้วยกรดกลูโคโรนิกและ N-acetyl-D-glucosamine มีอัตราการเกิดบลาสโตซิสต์สูงกว่ากลุ่มควบคุม สรุปได้ว่าการเพิ่มกรดกลูโคโรนิกและ N-acetyl-D-glucosamine ระหว่าง in vitro maturation ในเซลล์ไข่สุกรมีผลดีต่อเซลล์ไข่ในระยะแรก

Kimura และคณะ (2002) ไฮยาลูโรแนน เป็นองค์ประกอบส่วนหนึ่งของเซลล์คมูลัส ทำให้เกิดการขยายตัวของ cumulus-oocyte complexes (COCs) จึงศึกษาการแสดงออกของ mRNA จาก Hyaluronan synthase 2 (Has2) Hyaluronan synthase 3 (Has3) และ CD44 รวมทั้งการตอบสนองต่อ gonadotropin และน้ำในถุงไข่สุกร ของยีนเหล่านี้ใน COCs, oocyctectomized และการพัฒนาของเซลล์ไข่ในระหว่างการสุกในหลอดทดลอง ด้วยวิธีการวิเคราะห์ Immunolocalization ของ CD44 ใน COCs หลังจากเพาะเลี้ยงด้วย M199 ที่เสริมด้วยสาร 2 ชนิดร่วมกัน คือ โภนาโดโทรปิน 10 IU/mL และ pFF 10% (v/v) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าเซลล์คมูลัสสามารถแผ่ขยายได้อย่างมีนัยสำคัญมากกว่าโภนาโดโทรปิน หรือน้ำในถุงไข่สุกรเพียงอย่างเดียว การ

วิเคราะห์ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบย้อนกลับ RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction) พบว่ามีการทำงานของ Hyaluronan synthase 3 ในเซลล์ไข่ ในขณะที่เซลล์คมูลีสมีการแสดงออกของ mRNA ทั้ง Has2 และ CD44 ซึ่งมีการแสดงออกเพิ่มขึ้น ในการเพาะเลี้ยงที่เสริมด้วยโกนาโดโทรปิน และน้ำในถุงไข่สุกรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการศึกษานี้ แสดงให้เห็นว่าเซลล์ไข่สุกรสามารถแผ่ขยายตัวได้เพิ่มขึ้นจาก gonadotropin และการทำงานของ mRNA จาก Has 2 ในเซลล์คมูลีส

7. สารหลังของเซลล์แกรนูโลซาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

สารหลังของเซลล์แกรนูโลซาเพาะเลี้ยง (condition medium) คือ สารที่เก็บจากอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์นาน 2 วัน (โดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 48 ชั่วโมง) โดยคาดว่าจะมีการหลั่งสารลงสู่อาหารเลี้ยงเซลล์ มีรายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้อง ดังนี้

McElroy และคณะ (2008) ศึกษาการเพาะเลี้ยง somatic cell nuclear transfer (SCNT) ของสุกรในระยะ blastocyst ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ M199 ที่เสริมด้วยสารอาหารที่แตกต่างกัน คือ 10% fetal bovine serum (FBS) เปรียบเทียบกับกลุ่มที่เสริมด้วย 10% FBS ร่วมกับ calcium 1.0 mM พบการทำงานของโปรตีน heat shock protein 70.2 integrin beta1 (ITGB1) phosphoglycerate kinase 1 (PGK1) BAX และ insulin-like growth factor 2 receptor (IGF2R) สรุปว่าสารอาหารที่แตกต่างกันมีผลต่อการทำงานของโปรตีนและการเจริญพัฒนาของตัวอ่อนสุกรในระยะ blastocyst

Zhang และคณะ (2020) เซลล์แกรนูโลซา เป็นองค์ประกอบหลักของ ถุงไข่ ซึ่งปฏิกริยาระหว่างเซลล์แกรนูโลซาต่อการเจริญเติบโตของถุงไข่ยังไม่เป็นที่แน่ชัด จึงศึกษาสารหลังของเซลล์แกรนูโลซาของกระปือในการเพาะเลี้ยง (granulosa cells condition medium; GCCM) พบว่า GCCM ที่เก็บเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ส่งเสริมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโดรเจน คือ CYP11A1, CYP17A1, 3 β -HSD และ Star จึงเป็นพื้นฐานสำหรับการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่าง เซลล์แกรนูโลซาและการสร้าง สเตียรอยด์ ในรังไข่

Mohammad และคณะ (2021) การศึกษาสารหลังของเซลล์แกรนูโลซาในการเพาะเลี้ยงของหนู โดยการนำรังไข่ของหนูเมาส์อายุ 1 วัน มาเพาะเลี้ยงในสารต่างๆ 4 ชนิด ได้แก่ CON (กลุ่มควบคุม มี GGCM เท่านั้น) PYR (GCCM กับไพรูเวต) ITS (GCCM กับ ITS (transferrin และ selenium) หรือ TES (GCCM กับฮอร์โมนเพศชาย คือ เทสโทสเตอโรน) เป็นเวลา 11 วัน ด้วยการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาถุงไข่ โดยใช้การตรวจเนื้อเยื่อและเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบย้อนกลับ (RT-PCR) ในวันที่ 5 และ 11 พบว่าการเพาะเลี้ยงด้วย

ไฟรูเวตช่วยกระตุ้นการพัฒนาของถุงไข่ไปเป็นถุงไข่ระยะแรก กลุ่ม ITS ไม่มีการเปลี่ยนแปลงและจำนวนถุงไข่ลดลงในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ ITS ลดการควบคุม Pi3k, Gdf9, Bmp15 และ Cx37 ($P < 0.05$) พบว่าการเสริมด้วยไฟรูเวตและฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนร่วมกัน สามารถเพิ่มอัตราการพัฒนาของถุงไข่ในระยะเริ่มต้นในรังไข่ของหนูเม้าส์อายุ 1 วันที่เพาะเลี้ยงได้



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์

1. ปีกเกอร์ (beaker) ขนาด 50, 100, 250 และ 1,000 มิลลิลิตร
2. จานแก้ว (petri dish)
3. เซ็มเบอร์ 18
4. หลอดฉีดยา (syringe)
5. หลอดทดลอง (test tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร
6. กรวยแก้ว (glass funnel)
7. เครื่องดูดจ่ายสารละลายด้วยไฟฟ้าขนาด 1-10 มิลลิลิตร
8. ปิเปต (pipette) ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
9. ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 10, 20, 100, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
10. กระจกปิดสไลด์ (cover slide)
11. สไลด์ (slide)
12. กรรไกร (scissors)
13. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 125 และ 250 มิลลิลิตร
14. ผ้ากอซ (gauze)
15. ปากคีบ (forceps)
16. ด้ามมีด และใบมีดผ่านตัด (scalpel handle, blade)
17. ถุงซิปล็อก (zip lock bag)
18. พาสเจอร์ปิเปต (pasteur pipette)
19. ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture flask)
20. เตาไฟฟ้า (hot plate)
22. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter)
23. เครื่องชั่งสาร (analytical)
24. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
25. ตู้ดูดความชื้น (desiccator)
26. เครื่องตัดตัวอย่างให้บาง (ultramicrotome)
27. เตาอบไมโครเวฟ (microwave oven)

28. กล้องดิจิทัล (digital camera)
29. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscopes)
30. กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo microscope)
31. ตู้อบแห้ง (hot air oven)
32. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
33. ตู้บ่มเซลล์ (incubator)
34. เครื่องทำแห้งตัวอย่าง ณ จุดวิกฤต (critical point drier, CPD)
35. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow)
36. NuPAGE gel
37. เครื่อง Ion sputter coater
38. เครื่อง UV-transilluminator
39. เครื่องวิเคราะห์มวลสาร (mass spectrometer)
40. เครื่องหมุนเหวี่ยงสุญญากาศ
41. เครื่อง LC/MS/MS
42. เครื่อง XcellSureLock™ Mini-Cell Electrophoresis
43. เครื่อง Nanodrop spectrophotometer
44. เครื่อง Thermal cycler
44. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope: SEM)

2. สารเคมี

1. เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol)
2. กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (trifluoroacetic acid)
3. น้ำกลั่น (distilled water)
4. น้ำปราศจากไอออน (deionized water)
5. น้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ (0.9% normal saline solution)
6. แอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B)
7. เพนนิซิลิน จี โซเดียม (penicillin G sodium)
8. สเตรปโตไมซิน (streptomycin)
9. สารกลูทาทิโอนีน 2.5 เปอร์เซ็นต์
10. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

11. ออสเมียม เตตรอกไซด์
12. ยูรานิล อาซิเตท
13. เลดซีเตท
14. ไซลีน
15. Loading dye
16. บัฟเฟอร์ NuPAGE reagent
17. โปรตีนมาตรฐาน Benchmark protein ladder และ Benchmark pre-stain protein ladder
18. Coomassie brilliant blue R-250
19. Detaining solution
20. อะซิโตไนไตรล์
21. แอมโมเนียมไบคาร์บอเนต
22. ทริปซิน
23. ฟอลลินซีโอแคลคูลรีเอเจนต์ (Follin-Ciocalteu reagent)
24. เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide)
25. อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile: ACN) 50 เปอร์เซ็นต์
26. แอมโมเนียมไบคาร์บอเนต (Ammonium bicarbonate: NH_4HCO_3)
27. กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (trifluoroacetic acid: TFA) 5 เปอร์เซ็นต์
28. ฟอสโฟโมลิบเดตฟอสเฟต (Phosphomolybdate phosphotungstate)

วิธีการศึกษาการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง การเตรียม และเพาะเลี้ยงเซลล์ จากรังไข่สุกร (มยุรา, 2551)

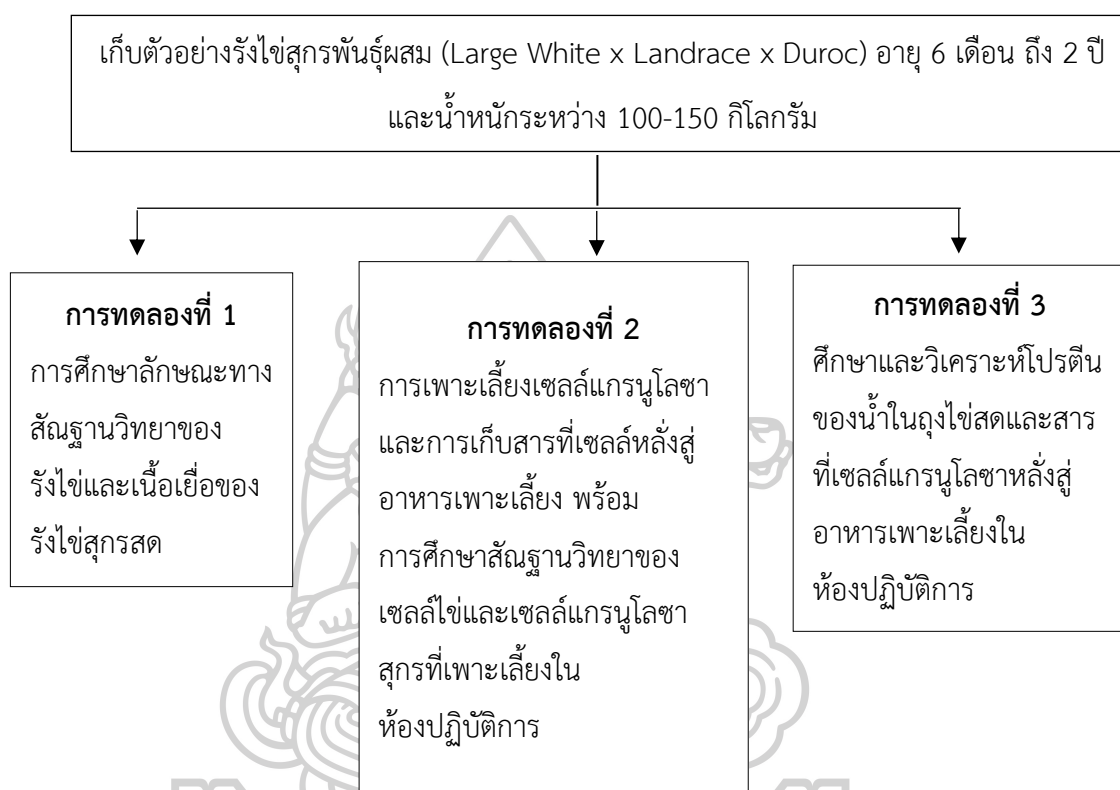
1.1 การเก็บตัวอย่างรังไข่สุกร

1.1.1 เก็บตัวอย่างรังไข่สดของสุกรพันธุ์ผสม (Large White x Landrace x Duroc) อายุ 6 เดือน ถึง 2 ปี และน้ำหนักระหว่าง 100-150 กิโลกรัม ที่ถูกฆ่าและไม่เกิน 30 นาที ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อจากโรงฆ่าสัตว์ จังหวัดนครปฐม

1.1.2 ล้างรังไข่และปีกมดลูกด้วยน้ำเกลือมีความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ ที่ผสมยาปฏิชีวนะ เพนนิซิลิน 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สเตรปโทมาซิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แอมโฟเทอริซิน บี

250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นบรรจุในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ เก็บในภาชนะที่มีการรักษาอุณหภูมิที่ 30-35 องศาเซลเซียส โดยรับน้ำหนักห้องปฏิบัติการภายใน 1 ชั่วโมง

การศึกษาแบ่งออกเป็น 3 การทดลอง



การทดลองที่ 1: ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรังไข่และเนื้อเยื่อของรังไข่สุกรสด

1.1 ศึกษาโครงสร้างภายนอกของรังไข่และเนื้อเยื่อของรังไข่สุกร โดยวัดขนาดรังไข่และชั่งน้ำหนัก การศึกษาความสัมพันธ์ของเส้นเลือดที่เยื่อยึดปีกมดลูกกับรังไข่สุกร

1.2 ศึกษาเนื้อเยื่อของรังไข่สุกรด้วยวิธีพาราฟินเทคนิค (paraffin technique) โดยนำรังไข่มาตัดให้มีขนาดเล็กลงด้วยใบมีดโกน นำมาแช่ในสารละลายรักษาสภาพเนื้อเยื่อ Bouin's fluid จากนั้นล้าง Bouin's fluid ออกจากเนื้อเยื่อด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ หลายๆ ครั้ง จนกระทั่งหมดสีเหลืองของ picric acid

1.3 นำตัวอย่างเปลี่ยนมาแช่ใน แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 1 ชั่วโมง แล้วแช่ใน แอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 1 ชั่วโมง เพื่อดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ จากนั้นนำไปแช่ในไซลีน จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 1 ชั่วโมง เพื่อทำให้เนื้อเยื่อใส

1.4 นำเนื้อเยื่อใสในพาราฟินเหลวในตู้อบอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน (embedding) ตัดแต่งและติดบล็อกพาราฟินตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่อง

rotary microtome ให้เป็นแผ่นบางๆ ขนาดความหนาของเนื้อเยื่อ 7-10 ไมโครเมตร ย้อมเนื้อเยื่อด้วยสีฮีมาทอกไซลินและอีโอซิน

1.5 นำสไลด์ไปศึกษาสัณฐานวิทยาของเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและถ่ายภาพ

การทดลองที่ 2: การเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาและการเก็บสารที่เซลล์หลั่งสู่อาหารเพาะเลี้ยง พร้อมการศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ไข่และเซลล์แกรนูโลซาสุทธที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

2.1 การเก็บตัวอย่างรังไข่ เซลล์ไข่ เซลล์แกรนูโลซาจากรังไข่สุกรและเพาะเลี้ยงเซลล์

2.1.1 ตัวอย่างรังไข่สุกรระยะฟอลลิคูล่าและระยะลูเตียลโดยแบ่งออกเป็น 4

กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 คือ รังไข่ขนาดเล็กที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร รังไข่ขนาดกลาง 2 กลุ่ม แบ่งตามขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง โดยกลุ่มที่ 2 คือ รังไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร และกลุ่มที่ 3 รังไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร และกลุ่มที่ 4 คือ รังไข่ขนาดใหญ่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7-8 มิลลิเมตร

2.1.2 นำรังไข่มาล้างด้วยน้ำเกลือที่ผสมยาปฏิชีวนะ เพื่อทำความสะอาดรังไข่ ชั้รังไข่สุกรให้แห้งด้วยผ้าก๊อชปลอดเชื้อ จึงตัดรังไข่ออกจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทำในตู้ปลอดเชื้อ

2.1.3 การเตรียมเซลล์ไข่สุกรที่มีเซลล์คัมมูลัสล้อมรอบ (ตามวิธีการทดลอง Areekijseeree และ Vejaratpimol, 2006) โดยนำรังไข่มาเจาะน้ำในรังไข่ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดต่างๆ เจาะด้วยเข็มเบอร์ 18 ที่ต่อกับกระบอกฉีดยา 5-10 มิลลิลิตร โดยจำแนกรังไข่ตามขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง คือ กลุ่มที่ 1 รังไข่ขนาดเล็กเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1-2 มิลลิเมตร รังไข่ขนาดกลางมี 2 กลุ่ม แบ่งตามขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง คือ กลุ่มที่ 2 รังไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร และกลุ่มที่ 3 รังไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร กลุ่มที่ 4 คือรังไข่ขนาดใหญ่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7-8 มิลลิเมตร จะได้น้ำในรังไข่ที่มีเซลล์ไข่และเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่และเซลล์แกรนูโลซาอยู่รวมกัน

2.1.4 เมื่อเจาะรังไข่แล้วจะได้น้ำในรังไข่และเซลล์แกรนูโลซาซึ่งอยู่ภายในรังไข่ ใช้ปิเปตขนาด 220-240 ไมโครเมตร แยกเซลล์ไข่ออกจากเซลล์แกรนูโลซาและน้ำในรังไข่ โดยศึกษาเซลล์ไข่แบ่งตามลักษณะของเซลล์คัมมูลัสที่ล้อมรอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

2.1.5 นำเซลล์ไข่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง M199 ที่ประกอบด้วย Earle's salts (Sigma Company, St Louis MO) เสริมด้วย 10% heat treated bovine serum, NaHCO_3 2.2 mg/mL (Sigma Company, St Louis MO), 1 M Hepes (Sigma, St Louis MO),

0.25 mM pyruvate, 15 µg/mL ที่ เส ริ ม ฮ อ ร์ โ ม น porcine FSH, 1 µg/mL LH, 1 µg/mL estradiol และ 50 µg/mL gentamycin sulfate โดยกรองอาหารเพาะเลี้ยงและปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.2-7.4 (Areekijseer และคณะ 2006) ในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เสริมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ มีความชื้นสัมพัทธ์ที่ 95 เปอร์เซ็นต์

2.1.6 นำน้ำในถุงไข่ที่เจาะจากถุงไข่ปกติขนาดต่างๆ และเจาะน้ำจากถุงไข่ปกติในรังไข่เดียวกับที่มีซิสต์เพื่อศึกษาแถบของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

2.1.7 จากนั้นนำน้ำในถุงไข่ไปปั่นเหวี่ยง 1,500 รอบต่อนาทีเพื่อแยกเซลล์ แกรนูโลซาให้ตกตะกอนที่ก้นหลอดออกจากน้ำในถุงไข่ โดยดูน้ำในถุงไข่ที่อยู่บริเวณด้านบน เก็บรักษาแยกเป็นหลอดละ 1 มิลลิลิตร แล้วไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

2.1.8 นำเซลล์แกรนูโลซาที่ตกตะกอนที่ก้นหลอดมาล้างด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ ผสมยาปฏิชีวนะ 7 ครั้ง โดยในแต่ละครั้งต้องทิ้งเซลล์ให้ตกตะกอนหรือปั่นเหวี่ยง และเมื่อล้างเสร็จแล้วให้ดูค่าน้ำเกลือด้านบนที่ไม่มีเซลล์ทิ้งไปโดยการดูของเหลวที่ติดปลายปิเปต เพื่อให้สามารถดูดเซลล์ได้ดี ครบการล้างครั้งที่ 7 แล้วให้เจือจางเซลล์แกรนูโลซาด้วยอาหารเพาะเลี้ยง M199 เสริมด้วย 10% heat treated bovine serum แล้ว นับจำนวนเซลล์แกรนูโลซาเป็นเซลล์ตายก่อนการเพาะเลี้ยง โดยการย้อมสี 0.4 เปอร์เซ็นต์ trypan blue ในอัตราส่วน 1:1 นับเซลล์แกรนูโลซาด้วย hemocytometer

2.1.9 จากนั้นเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาภายในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ใน well-plate ที่มีอาหารเพาะเลี้ยง ให้เขย่าเบาๆ เพื่อให้เซลล์มีการกระจายตัวทั่วทั้งจานเพาะเลี้ยง จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงที่มีเซลล์แกรนูโลซาใส่ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เสริมด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่ความชื้นสูง เพื่อเก็บสารที่เซลล์แกรนูโลซาหลั่งสู่ออาหารเพาะเลี้ยง (condition medium) ทุก 48 ชั่วโมง

2.2 การเก็บสารที่เซลล์หลั่งสู่ออาหารเพาะเลี้ยง

2.2.1 เก็บสารหลั่งของเซลล์แกรนูโลซาสุกรเพาะเลี้ยงสู่ออาหารเพาะเลี้ยง เมื่อเพาะเลี้ยง 0, 48, 96, 120 และ 144 ชั่วโมง โดยดูอาหารเพาะเลี้ยงเดิมออกมา 50 เปอร์เซ็นต์ แล้วเติมอาหารเพาะเลี้ยงใหม่เข้าไป 50 เปอร์เซ็นต์

2.2.2 จากนั้นนำอาหารเพาะเลี้ยงเดิมมาปั่นแยกเซลล์กับสารหลั่งของเซลล์แกรนูโลซาสุกรเพาะเลี้ยงสู่ออาหารเพาะเลี้ยง ที่ 1,500 รอบต่อนาที

2.2.3 ดูดสารหลั่งด้านบนแยกใส่หลอดแช่แข็ง หลอดละปริมาณ 1 ไมโครลิตร แล้วนำสารหลั่งไปแช่แข็งที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์โปรตีน

2.3 ศึกษาสัญญาณวิทยาของเซลล์ไข่และเซลล์เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

2.3.1 แยกเซลล์ตัวอย่างกลุ่มหนึ่งมาศึกษาสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope: SEM) โดยนำตัวอย่างแช่ในน้ำยารักษาสภาพ (primary fixative) คือ สารกลูทารอลดีไฮด์ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ มีค่าความเป็นกรด-เบส 7.2-7.4 นาน 24 ชั่วโมง

2.3.2 นำเซลล์ตัวอย่างล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ มีค่าความเป็นกรด-เบส 7.2-7.4 นาน 10 นาที จำนวน 3 ครั้งจากนั้นดึงน้ำออกจากตัวอย่างด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 30, 50, 70, 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นละ 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที

2.3.3 ทำเซลล์ตัวอย่างให้แห้งด้วยเครื่องทำตัวอย่างให้แห้ง ณ จุดวิกฤต (critical point dryer) นำตัวอย่างที่แห้งไปเคลือบทองด้วยเครื่อง Ion sputter coater จากนั้นศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่ 15-20 กิโลโวลต์ (kV) พร้อมบันทึกภาพ

2.3.4 แยกเซลล์ตัวอย่างอีกกลุ่มหนึ่งมาศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope: TEM) โดยนำเซลล์ตัวอย่างรักษาสภาพโปรตีนในน้ำยารักษาสภาพชนิดที่ 1 (primary fixative) คือ กลูทารอลดีไฮด์ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.2-7.4 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.3.5 ใช้ปิเปตดูดน้ำยาคงสภาพเดิมทิ้ง แล้วปั่นล้างตัวอย่างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.2-7.4 ที่ความเร็ว 900 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จำนวน 3 ครั้ง

2.3.6 นำตัวอย่างรักษาสภาพไขมันในไซลีนน้ำยารักษาสภาพชนิดที่ 2 (secondary fixative) ด้วยออสเมียมเตตรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.2-7.4 ต้องทำในที่มืดและทำในตู้ดูดไอสารเคมี แช่ชิ้นตัวอย่างในน้ำยาคงสภาพนาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้ใช้ปิเปตดูดออสเมียมเตตรอกไซด์ออก จากนั้นปั่นล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที จากนั้นดึงน้ำออกจากตัวอย่างด้วยแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 30, 50, 70, 80, 90 และ 95 เปอร์เซ็นต์ ทำขั้นตอนละ 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที ตามลำดับ จากนั้นจึงแทนที่แอลกอฮอล์ ด้วยไซลีนต่อเรซิน (resin) อัตราส่วน 2:1 ทิ้งไว้ข้ามคืน ผสมไซลีนต่อเรซิน อัตราส่วน 1:2 นาน 8 ชั่วโมง

2.3.7 ดูดตัวอย่างใส่ลงในเรซิน โดยใช้เรซินบริสุทธิ์ (pure resin) เป็นครั้งที่ 1 ทิ้งไว้ข้ามคืนดูดตัวอย่างใส่ในเรซินบริสุทธิ์เป็นครั้งที่ 2 ทิ้งไว้ 8 ชั่วโมงจากนั้นเขียนตัวอย่างนำมาฝัง (embedding) ในเรซินบริสุทธิ์ที่อยู่ในบีม แคปซูล (beam capsule) ทำตัวอย่างให้แข็งในตู้อบที่

อุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง เมื่อเรซินบริสุทธิ์แข็งตัว ให้แกะชิ้นตัวอย่างในแม่พิมพ์ ออกและตัดแต่งบล็อก (block) ให้ได้ขนาด จึงนำตัวอย่างไปตัดให้บาง

2.3.8 นำบล็อกตัวอย่างไปตัดด้วยเครื่องตัดตัวอย่างให้บางด้วยเครื่องตัด ultramicrotome บาง 60-90 นาโนเมตร แล้ววางชิ้นตัวอย่างที่ตัดบนตะแกรงโลหะวางตัว (grid) จากนั้นย้อมชิ้นตัวอย่างเพื่อเพิ่มความเปรียบต่าง (contrast) ด้วยยูรานิล อาซิเตท 5 เปอร์เซ็นต์ และเลดซิเตท 0.4 เปอร์เซ็นต์ ทำในที่มีดโดยตัดพาราฟิล์มวางในจานแก้วกดให้แน่น ใช้กระดาษกรอง กรองสารยูรานิลอาซิเตท ให้เป็นหยดเล็กบนพาราฟิล์ม แล้วจึงวางด้านที่มีตัวอย่างบนหยดของยูรานิล อาซิเตท ทิ้งไว้ 1-2 นาที

2.3.9 นำตะแกรงวางตัวอย่างซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นต้ม กรอง 2 ปีกเกอร์ แต่ละปีกเกอร์จุ่มขึ้นลง 20 ครั้ง ซับด้วยกระดาษกรอง ล้างส่วนที่เกินออกด้วยน้ำ กลั่นต้มกรองโดยจุ่มขึ้นลง ประมาณ 20 ครั้ง ซับให้แห้ง จากนั้นจุ่มตัวอย่างลงใน เลดซิเตทนาน 10-15 นาที แล้ววางส่วนที่เกินออกด้วยน้ำกลั่นต้มกรองโดยจุ่มขึ้นลง ประมาณ 20 ครั้ง (ให้จุ่มขึ้นลง) จากนั้นซับให้ตะแกรงตัวอย่างให้แห้งแล้วเก็บในกล่องเก็บตะแกรงวางตัวอย่างเพื่อศึกษาชิ้นตัวอย่าง ภายใต้อ่างจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

การทดลองที่ 3: ศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนของน้ำในถุงไข่สดและสารที่เซลล์แกรนูโลซาหลังสู้อาหารเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

3.1 ศึกษาการแสดงออกของยีนไฮยาลูโรแนนซินเทส 2 (Hyaluronan synthase 2: *Has2*) ของน้ำของถุงไข่สุกร ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบย้อนกลับ (RT-PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณของ อาร์เอ็นเอ ที่สามารถวัดการแสดงออกของยีนซึ่งปฏิกิริยาลูกโซ่ พอลิเมอเรส แบบย้อนกลับนั้น ตัวอย่าง อาร์เอ็นเอ จะจับกับไพรเมอร์และคัดลอกเป็นลำดับของซีดีเอ็นเอ (cDNA) โดย เอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริปเทส และทำปฏิกิริยาปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสต่อโดยใช้สาย ซีดีเอ็นเอ ที่สร้างขึ้น จากนั้นจึงนำไปตรวจสอบด้วย อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งการสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA) จากน้ำในถุงไข่สุกรสดด้วยการแยกสกัดอาร์เอ็นเอครั้งนี้ใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอ สำเร็จรูป (RNeasy Kit ของ QIAGEN) มีขั้นตอนดังนี้

3.1.1 นำน้ำในถุงไข่ใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมบัฟเฟอร์ RLT ที่เติม Beta mercaptoethanol (10 ไมโครลิตรต่อ 1 มิลลิลิตร RLT) 450 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำหลอดไปรักษาอุณหภูมิที่ 56 องศาเซลเซียส นาน 1-3 นาที จากนั้นดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ใน QIA shredder spin column (สีม่วง) นำคอลัมน์ซ้อนบนหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยง

ตะกอนที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที น้ำใสจะผ่านคอลัมน์ลงในหลอดที่รองรับขนาด 2 มิลลิลิตร ส่วนเศษชิ้นส่วนต่างๆ ติดอยู่ด้านบนคอลัมน์

3.1.2 ให้เติมเอทานอลบริสุทธิ์ในหลอดที่รองรับน้ำใส ปริมาตร 0.5 เท่า (225 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลง แล้วจึงดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงใน RNeasy mini column (สีชมพู) และวางซ้อนบนหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงตะกอนที่ 1,200 รอบต่อนาที นาน 15 วินาที

3.1.3 เทส่วนที่ผ่านคอลัมน์แล้วเติมสารละลาย RW1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงตะกอนที่ 1,200 รอบต่อนาที นาน 15 วินาที แล้วจึงเททิ้งส่วนที่ผ่านคอลัมน์แล้วล้างคอลัมน์ด้วย RPE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงตะกอนที่ 1,200 รอบต่อนาที นาน 15 วินาที

3.1.4 ย้ายคอลัมน์ซ้อนบนหลอดไมโครเซนทริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำ (RNase-free water) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ในคอลัมน์เพื่อชะล้างอาร์เอ็นเอจากคอลัมน์ 1 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 1,200 รอบต่อนาที นาน 1 นาที อาร์เอ็นเอ ที่ได้ในน้ำผ่านคอลัมน์และเก็บไว้ในหลอดรองรับ และเติม DNase (Sigma, USA) วิเคราะห์หาปริมาณและคุณภาพของ อาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.2 เทคนิคลูกโซ่พอลิเมอเรสแบบย้อนกลับ

3.2.1 นำตัวอย่าง ซีดีเอ็นเอ (cDNA) ที่สกัดจากอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัด อาร์เอ็นเอสำเร็จรูป (RNeasy Kit ของ QIAGEN) จากน้ำในถุงไขไปเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

-ซีดีเอ็นเอต้นแบบ 100 นาโนกรัม

-เพิ่มปริมาณยีน *GAPDH* เป็นยีนควบคุม และยีน *Has2* ที่ต้องการศึกษา ด้วย

ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ดและรีเวิร์ส (forward and reverse primer) 0.2 ไมโครโมลาร์

Has2 F คือ TTACAATCCTCCTGGGTGGT

R คือ TCAAGCACCATGTCGTA CTG

GAPDH F คือ GTCGGTTGTGGATCTGACCT

R คือ TTGACGAAGTGGTCGTTGAG

- dNTP 200 ไมโครโมลาร์

- Taq polymerase ความเข้มข้น 1 หน่วย

- MgCl₂ 2.5 มิลลิโมลาร์

- น้ำกลั่น

- ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 25 ไมโครลิตร

4.2.2 ทำปฏิกิริยาด้วยเครื่อง Thermal cycler โดยมีขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
ทำปฏิกิริยา 40 รอบ

ขั้นตอนที่ 2 annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
ทำปฏิกิริยา 40 รอบ

ขั้นตอนที่ 3 extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
ทำปฏิกิริยา 40 รอบ

ก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยาให้คงอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้
เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่อย่างสมบูรณ์ (final extension)

4.2.3 เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาจะได้ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสซึ่งสามารถ
ตรวจสอบโมเลกุลดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสหรือเก็บผลิตภัณฑ์ไว้ที่
-20 องศาเซลเซียส

4.3 ตรวจสอบขนาดโมเลกุลดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

การตรวจวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ โดยนำเอาผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่
พอลิเมอเรส ผสม loading dye หยดในหลุมหัวเพื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอบน 1 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรส
เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า จากนั้นย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์
(ethidium bromide) โดยใช้ 100 DNA ladder เป็นมาร์คเกอร์ เพื่อเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอ
ที่เกิดขึ้นกับ ดีเอ็นเอมาตรฐาน

4.3.1 เตรียมถาดสำหรับเทเจลในแนวราบและหัวให้เรียบร้อยจากนั้นซึ่งผงอะกาโรส
1 กรัม เติมนั้บัฟเฟอร์สำหรับทำอิเล็กโตรโฟรีซิส (10xTBE) 100 มิลลิลิตร

4.3.2. หลอมเจลอะกาโรสให้ละลายกับบัฟเฟอร์โดยใช้ไมโครเวฟ เขย่าเป็นครั้งคราวให้
ละลายเป็นเนื้อเดียวกันจากนั้นเทเจลอะกาโรสลงบนถาดที่เตรียมไว้โดยระวังจับตัวกันเป็นก้อน

4.3.3 เสียบหัวตามตำแหน่งหัวบนถาดเทเจลเพื่อทำให้เกิดหลุมสำหรับหยดตัวอย่างดีเอ็นเอ
จากนั้นปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้วจึงค่อยๆ ดึงหัวออก

4.3.4 นำเจลใส่ลงในเครื่องสำหรับทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่มีบัฟเฟอร์ท่วมเจล โดยให้สูง
กว่าผิวเจลประมาณ 2-3 มิลลิลิตร

4.3.5 ดูดสารละลายดีเอ็นเอหรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่
พอลิเมอเรสปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับสีติดตาม (loading dye) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จากนั้น
หยดลงไปบนหลุมเจลที่เตรียมไว้ ใส่บัฟเฟอร์ให้ท่วมเจล

4.3.6 เปิดกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิสสังเกตการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ โดยระวังอย่าให้สีเคลื่อนลงมาจนตกขอบเจล จากนั้นจึงปิดเครื่องทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

4.3.7 นำเจลมาข้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำกลั่นหรือเปิดน้ำก๊อกให้ไหลเบาๆ เป็นเวลา 10 นาทีนำไปส่องใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ด้วยเครื่อง UV-transilluminator

4.4 การศึกษาโปรตีนจากน้ำในถุงไข่สุกรและสารที่เซลล์หลังสู้อาหารเพาะเลี้ยง (condition medium)

เพื่อศึกษาและหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน โดย SDS ซึ่งเป็น detergent ที่มีประจุลบจะเกาะกับโปรตีนอย่างแน่นหนาทำให้โปรตีนทั้งหมดมีประจุลบ

4.4.1 นำของเหลวที่เจาะจากถุงไข่สุกรและสารที่เซลล์หลังสู้อาหารเพาะเลี้ยง มาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของลาวรี (Lowry, 1951) ซึ่งเป็นวิธีที่วัดปริมาณโปรตีนได้ตั้งแต่ความเข้มข้นน้อยๆ จนถึง 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา 2 ชนิด คือ ไบยูเรทและรีดักชันของกรดอะมิโนไทโรซีนและทริปโตเฟนด้วยฟอลินซีโอแคลตอรีเอเจนต์ (Follin-Ciocalteu reagent) ซึ่งมีส่วนผสมของฟอสโฟโมลิบเดตฟอสเฟตทั้งสแตต (Phosphomolybdate-phosphotungstate) โดยตั้งทิ้งไว้ 40-60 นาที จะเกิดสีน้ำเงินเข้ม จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ได้ที่ 650 นาโนเมตร เมื่อนำค่าที่ได้เทียบกับกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (calibration curve) จะทราบค่าความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายได้ หลังจากคำนวณหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนจากกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน แล้วเตรียมสารตัวอย่างให้มีปริมาณโปรตีนคงที่เท่ากันก่อนจะหยดลงเจลโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต พอลิอะครีลิไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

4.4.2 เตรียมเจล NuPAGE Novex Bis-Tris gel ประกอบเข้ากับเครื่อง XcellSureLock™ Mini-Cell Electrophoresis ในบัฟเฟอร์ NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20X) สำหรับการวิเคราะห์โปรตีนที่ได้จากของเหลวในถุงไข่ขนาดต่างๆ

4.4.3 ผสมโปรตีนตัวอย่างกับสีติดตาม (loading dye) จากนั้นให้ความร้อนสารตัวอย่างที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หยอดสารตัวอย่างลงในหลุมหัวโดยมีปริมาตร 10 ไมโครลิตร

4.4.4 หยอดสารตัวอย่างที่ได้ในแต่ละหลุมหัวในเจล โดยหยอดโปรตีนมาตรฐาน Benchmark protein ladder หรือ Benchmark pre-stain protein ladder เพื่อเปรียบเทียบสารตัวอย่างกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล จากนั้นใส่บัฟเฟอร์ NuPAGE reagent ให้ท่วมเจลและเปรียบเทียบสารตัวอย่างกับโปรตีนมาตรฐาน Benchmark protein ladder หรือ

Benchmark prestain protein ladder เป็นมาร์คเกอร์ จากนั้นรันเจลที่ 200 โวลต์ นานประมาณ 50 นาที

4.4.4 นำเจลที่ได้ไปล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วทำการย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R-250 เขย่าเบาๆ ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นทำการล้างสีส่วนเกินออก (destain) ด้วย destaining solution ถ่ายภาพด้วยกล้องดิจิตอล ก่อนนำมาวิเคราะห์โปรตีน

4.5 ศึกษาโปรตีนหรือสารหลังจากน้ำในถุงไข่สุกรด้วยเทคนิค LC/MS/MS

LC/MS/MS เป็นเครื่องมือสำหรับแยกวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของเหลวหรือโปรตีนโดยใช้ตัวตรวจวัด (detector) เป็นแบบเครื่องวิเคราะห์มวลสาร (mass spectrometer)

4.5.1 นำแถบโปรตีนขนาดที่สนใจมาย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินให้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ ล้างด้วยอะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile) 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่อแอมโมเนียม ไบคาร์บอเนต (Ammonium bicarbonate: NH_4HCO_3) ปริมาตร 25 ไมโครโมลาร์ 2 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4.5.2 จากนั้นล้างสารละลายด้วยอะซิโตไนไตรล์ 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที หรือจนกระทั่งเจลเป็นสีขาว

4.5.3 ล้างอะซิโตไนไตรล์ด้วยทริปซิน 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในแต่ละหลอด แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

4.5.4 ดูดส่วนบนของสารละลายใส่หลอดใหม่ จากนั้นสกัดสารละลายเปปไทด์ ครั้งที่ 2 ด้วยอะซิโตไนไตรล์ 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 15-25 ไมโครลิตร และกรดไตรฟลูออโรอะซิติก (trifluoroacetic acid: TFA) 5 เปอร์เซ็นต์ ใส่แต่ละหลอดเป็นเวลา 15 นาที

4.5.5 จากนั้นนำสารละลายเปปไทด์มารวมกับส่วนบนของสารละลายใส่หลอดใหม่และเปปไทด์ที่สกัดได้ทำให้แห้งด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงสุญญากาศ จากนั้นวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC/MS/MS

บทที่ 4
ผลการวิจัย

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรังไข่และเนื้อเยื่อของรังไข่สุกร

จากการเก็บตัวอย่างรังไข่ของสุกรเพศเมียพันธุ์ผสม (Large White x Landrace x Duroc) อายุ 6 เดือน ถึง 2 ปี และน้ำหนักระหว่าง 100-150 กิโลกรัม มาวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและชั่งน้ำหนักรังไข่ โดยรังไข่ที่ใช้ในการศึกษาอยู่ในระยะฟอลลิคูลาร์ทั้งหมด 64 รังไข่ โดยแบ่งตามถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2, 3-4, 5-6 และ 7-8 มิลลิเมตร พบว่ารังไข่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 2.54 ± 0.19 เซนติเมตร ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 เส้นผ่านศูนย์กลางของรังไข่ทั้งหมด 64 รังไข่

รังไข่	ความยาว (ซม.)	รังไข่	ความยาว (ซม.)	รังไข่	ความยาว (ซม.)	รังไข่	ความยาว (ซม.)
1	2.2	17	2.4	33	2.5	49	2.6
2	2.9	18	2.4	34	2.9	50	2.5
3	2.4	19	2.2	35	2.4	51	2.5
4	2.8	20	2.5	36	2.8	52	2.7
5	2.8	21	2.5	37	2.8	53	2.5
6	2.5	22	2.3	38	2.5	54	2.6
7	2.2	23	2.9	39	2.7	55	2.4
8	2.6	24	3.0	40	2.5	56	2.3
9	2.3	25	2.5	41	2.6	57	2.7
10	2.8	26	2.7	42	2.5	58	2.6

รังไข่	ความยาว (ซม.)	รังไข่	ความยาว (ซม.)	รังไข่	ความยาว (ซม.)	รังไข่	ความยาว (ซม.)
11	2.5	27	2.5	43	2.6	59	2.5
12	2.5	28	2.6	44	2.4	60	2.8
13	2.5	29	3.0	45	2.5	61	2.5
14	2.5	30	2.5	46	2.4	62	2.7
15	2.3	31	2.8	47	2.5	63	2.5
16	2.0	32	2.4	48	2.6	64	2.4

ผลการศึกษาจากการชั่งน้ำหนักของรังไข่ 64 รังไข่ นำไปหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการเก็บรวบรวมข้อมูล พบว่ามีน้ำหนักเฉลี่ย 3.35 ± 0.52 กรัม ดังตารางที่ 5




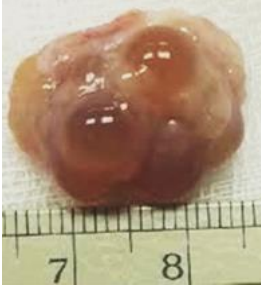
ตารางที่ 5 น้ำหนักของรังไข่ทั้งหมด 64 รังไข่



รังไข่	น้ำหนัก (กรัม)	รังไข่	น้ำหนัก (กรัม)	รังไข่	น้ำหนัก (กรัม)	รังไข่	น้ำหนัก (กรัม)
1	4.16	17	3.49	33	4.57	49	3.21
2	3.35	18	3.32	34	3.29	50	2.89
3	2.96	19	2.93	35	3.02	51	3.23
4	4.50	20	3.26	36	2.84	52	3.41
5	3.90	21	2.49	37	3.41	53	3.49
6	3.66	22	3.21	38	3.37	54	2.93
7	3.77	23	2.69	39	2.84	55	3.24
8	2.75	24	3.13	40	3.22	56	3.59
9	3.75	25	2.74	41	4.04	57	4.05
10	3.17	26	3.91	42	3.59	58	3.47
11	2.28	27	3.07	43	3.45	59	3.54
12	2.54	28	2.64	44	3.57	60	3.38
13	4.37	29	3.42	45	3.37	61	4.12
14	2.58	30	4.24	46	3.19	62	3.28
15	3.49	31	2.89	47	3.22	63	3.34
16	2.57	32	4.65	48	2.94	64	3.56

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกของรังไข่สุกร ระยะฟอลลิคูล่าช่วงแรก (early follicular) พบถุงไข่ขนาด 1-2 มิลลิเมตร 100 เพอร์เซ็นต์ ไม่พบคอร์ปัส ฮีโมราจิกัม (corpora hemorrhagicum) คอร์ปัสลูเทียม (corpora lutea) หรือคอร์ปัส อัลบิแคนส์ (corpora albican) ระยะฟอลลิคูล่าช่วงหลัง (late follicular) พบถุงไข่ขนาด 3-4 มิลลิเมตร 90 เพอร์เซ็นต์ และพบถุงไข่ขนาด 1-2 มิลลิเมตร 10 เพอร์เซ็นต์ ไม่พบคอร์ปัส ฮีโมราจิกัม คอร์ปัสลูเทียมหรือคอร์ปัส อัลบิแคน ส่วนระยะลูเตียลช่วงแรก (early luteal) พบถุงไข่ขนาด 5-6 มิลลิเมตร 80 เพอร์เซ็นต์ พบถุงไข่ขนาด 3-4 มิลลิเมตร 10 เพอร์เซ็นต์ และพบถุงไข่ขนาด 1-2 มิลลิเมตร 10 เพอร์เซ็นต์ พบคอร์ปัสลูเทียม เสื่อมสภาพไม่มีหลอดเลือดบนพื้นที่ผิว ส่วนระยะลูเตียลช่วงหลัง (late luteal) พบถุงไข่ขนาด 7-8 มิลลิเมตร 85 เพอร์เซ็นต์ พบถุงไข่ขนาด 5-6 มิลลิเมตร 10 เพอร์เซ็นต์ พบถุงไข่ขนาด 3-4 มิลลิเมตร 5 เพอร์เซ็นต์ พบคอร์ปัส อัลบิแคนส์ นอกจากนี้อาจพบถุงไข่ขนาด 3-4 มิลลิเมตร 60 เพอร์เซ็นต์ และพบถุงไข่ขนาด 1-2 มิลลิเมตร 20 เพอร์เซ็นต์ ถุงไข่ไม่มีเลือดและน้ำเหลืองมาเลี้ยงมากจึงมีสีแดงเรียกว่า คอปัส ฮีโมราจิกัม พบประมาณ 20 เพอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การจำแนกรังไข่สุกรตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาแบ่งออกเป็น 5 แบบ

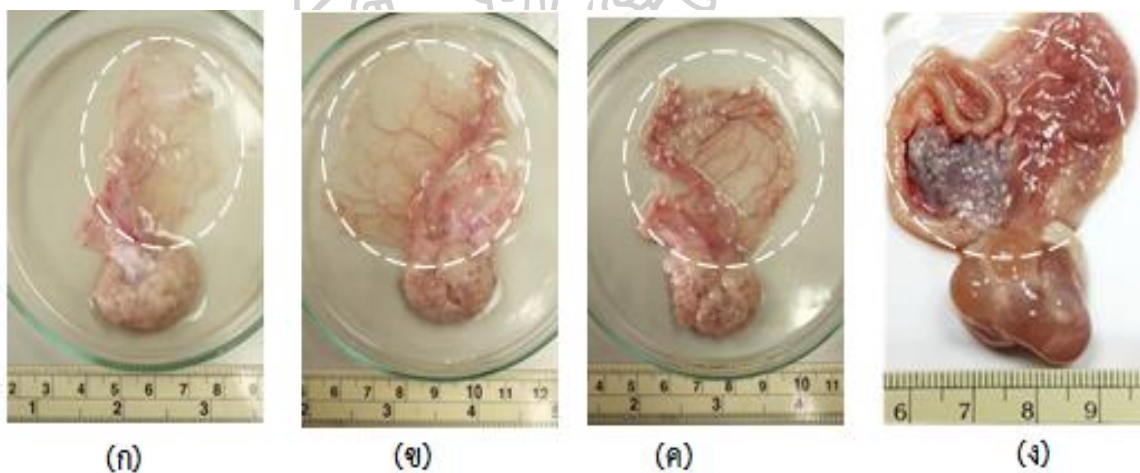
รังไข่สุกร	รังไข่สุกรในระยะต่างๆ	รอบการเป็นสัด	สัณฐานวิทยาของรังไข่
ระยะฟอลลิคูล่า 	early follicular	ถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร	พบถุงไข่ขนาด 1-2 มิลลิเมตร 100 เพอร์เซ็นต์ ไม่พบคอร์ปัส ฮีโมราจิกัม คอร์ปัสลูเทียมหรือคอร์ปัส อัลบิแคน

รังไข่สุกร	รังไข่สุกรในระยะต่างๆ	รอบการเป็นสัด	สัญญาณวิทยาของรังไข่
ระยะฟอลลิคูล่า 	late follicular	ถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร	พบถุงไข่ขนาด 3-4 มิลลิเมตร 90 เปอร์เซ็นต์ และพบถุงไข่ขนาด 1-2 มิลลิเมตร 10 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบคอร์ปัส ฮีโมราจิกัม คอร์ปัสลูเทียมและคอร์ปัส อัลบีแคน
ระยะลูเตียล 	early luteal	ถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร	พบถุงไข่ขนาด 5-6 มิลลิเมตร 80 เปอร์เซ็นต์ พบถุงไข่ขนาด 3-4 มิลลิเมตร 10 เปอร์เซ็นต์ และพบถุงไข่ขนาด 1-2 มิลลิเมตร 10 เปอร์เซ็นต์ พบคอร์ปัสลูเทียม เสื่อมสภาพไม่มีหลอดเลือดบนพื้นผิว

รังไข่สุกร	รังไข่สุกรในระยะ ต่างๆ	รอบการเป็นสัด	สัณฐานวิทยาของรังไข่
<p data-bbox="284 454 427 495">ระยะลูเตียล</p> 	late luteal	<p data-bbox="853 454 1082 622">ถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7-8 มิลลิเมตร</p>	<p data-bbox="1110 454 1353 1014">พบถุงไข่ขนาด 7-8 มิลลิเมตร เปอร์เซ็นต์ พบถุงไข่ขนาด 5-6 มิลลิเมตร 10 เปอร์เซ็นต์ พบถุงไข่ขนาด 3-4 มิลลิเมตร 5 เปอร์เซ็นต์ พบคอร์ปัส อัลบีแคน</p>
<p data-bbox="284 1339 523 1447">ถุงไข่มีคอปัส ฮีโมราจิกัม</p> 	late luteal	<p data-bbox="853 1339 1082 1507">ถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร</p>	<p data-bbox="1110 1339 1361 1944">พบถุงไข่ขนาด 3-4 มิลลิเมตร 60 เปอร์เซ็นต์ และพบถุงไข่ขนาด 1-2 มิลลิเมตร 20 เปอร์เซ็นต์ ถุงไข่มีเลือดและน้ำเหลืองมาเลี้ยงมากจึงมีสีแดงเรียกว่า คอปัส ฮีโมราจิกัม พบ 20 เปอร์เซ็นต์</p>

ศึกษาปริมาณเส้นเลือดที่มาเลี้ยงถุงไข่และเปรียบเทียบสีของน้ำในถุงไข่ทั้ง 4 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 คือ ถุงไข่ขนาดเล็กที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร ถุงไข่ขนาดกลาง 2 กลุ่ม แบ่งตามขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง โดยกลุ่มที่ 2 คือ ถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร และกลุ่มที่ 3 ถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร และกลุ่มที่ 4 คือ ถุงไข่ขนาดใหญ่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7-8 มิลลิเมตร

พบว่าลักษณะของจำนวนหลอดเลือดและปริมาณเส้นเลือดที่มาเลี้ยงรังไข่ รวมทั้งสีของของเหลวที่ได้จากการเจาะถุงไข่ทั้ง 4 กลุ่ม ตามขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางพบว่ามีความสัมพันธ์กับการเจริญของรังไข่โดยเส้นเลือดที่มาเลี้ยงนั้นจะแปรผันตรงกับขนาดของถุงไข่ คือ ถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร มีปริมาณเส้นเลือดมาเลี้ยงน้อยกว่าถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร ถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร และถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7-8 มิลลิเมตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าถุงไข่ขนาดเล็กมีปริมาณเส้นเลือดมาเลี้ยงน้อยกว่าถุงไข่ขนาดกลางและถุงไข่ขนาดใหญ่ ตามลำดับ ดังภาพที่ 7

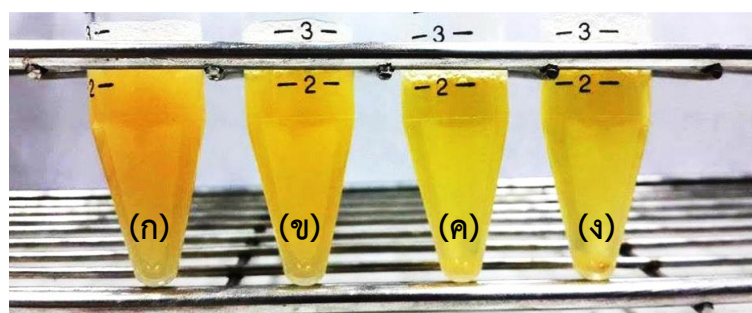


ภาพที่ 7 แสดงปริมาณหลอดเลือดที่มาเลี้ยงรังไข่

(ก) ถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร (ข) ถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร (ค) ถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร (ง) ถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7-8 มิลลิเมตร

ผลการศึกษาเปรียบเทียบสีของน้ำในถุงไข่ที่ได้จากการเจาะถุงไข่ทั้ง 4 กลุ่ม คือ ถุงไข่ขนาดเล็กที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร ถุงไข่ขนาดกลาง 2 กลุ่ม แบ่งตามขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง คือ ถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร และถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง

5-6 มิลลิเมตร กลุ่มสุดท้าย คือ ถุงไข่ขนาดใหญ่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7-8 มิลลิเมตร พบว่า น้ำในถุงไข่ขนาดเล็กมีสีเหลืองเข้มกว่าน้ำในถุงไข่ขนาดกลางและขนาดใหญ่ ซึ่งสีของน้ำในถุงไข่จะใสขึ้นเมื่อถุงไข่มีขนาดใหญ่ขึ้น เนื่องจากถุงไข่ขนาดใหญ่นั้นมีช่องว่างที่เต็มไปด้วยของเหลวหรือแอนทรัม (antrum) น้ำในถุงไข่ (follicular fluid) นั้นประกอบด้วยน้ำ อิเล็กโทรไลต์ โปรตีนในซีรัม และฮอร์โมนสเตียรอยด์ที่มีความเข้มข้นสูงซึ่งหลั่งออกมาจากเซลล์แกรนูโลซาที่อยู่รอบๆ เซลล์ไข่ จึงทำให้น้ำจากถุงไข่ขนาดใหญ่นั้นใสกว่าน้ำจากถุงไข่ขนาดเล็ก ดังภาพที่ 8



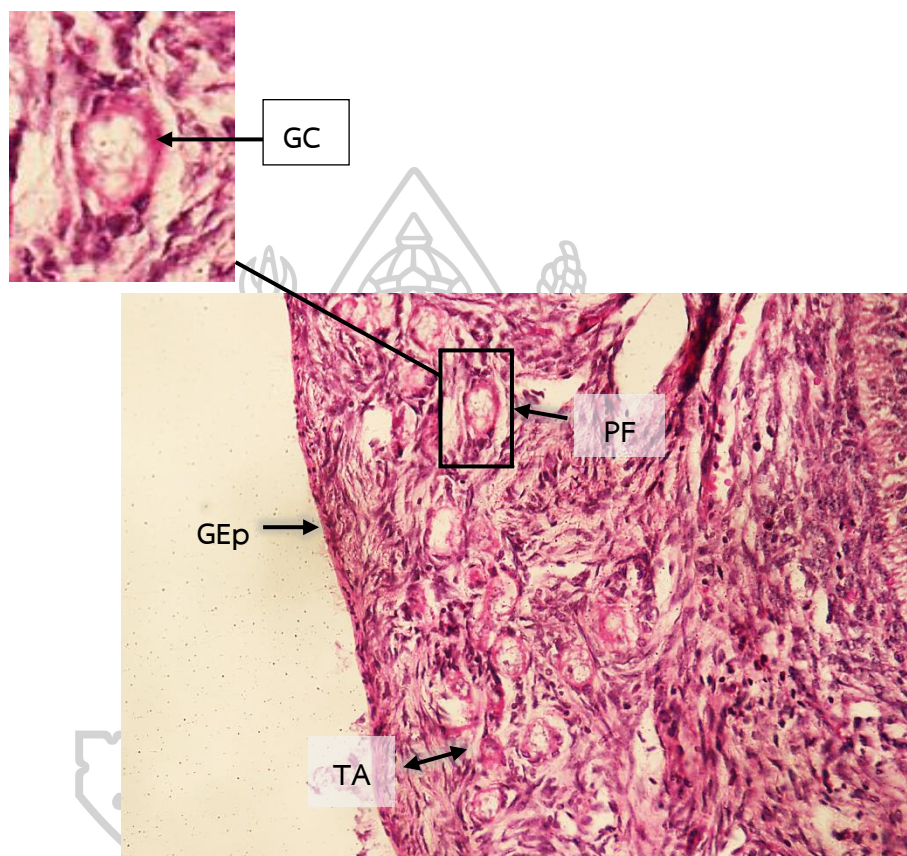
ภาพที่ 8 แสดงลักษณะสีของของเหลวที่เจาะดูดจากถุงไข่ขนาดต่างๆ

(ก) ถุงไข่ขนาดเล็กที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร (ข) ถุงไข่ขนาดกลางที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร (ค) ถุงไข่ขนาดกลางที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร (ง) ถุงไข่ขนาดใหญ่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7-8 มิลลิเมตร

ผลการศึกษาเนื้อเยื่อของรังไข่

การศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อของรังไข่สุกรด้วยพาราฟินเทคนิคพบว่าโครงสร้างของรังไข่สุกรแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนนอกเรียกว่า คอร์เท็กซ์ (cortex) และชั้นในเรียกว่า เมดัลลา (medulla) ซึ่งคอร์เท็กซ์ประกอบด้วยเซลล์ไข่และชั้นของเนื้อเยื่อต่างๆ ประกอบด้วยถุงไข่ที่เจริญพัฒนา ดังนี้ ถุงไข่ระยะเริ่มต้น (primordial follicle) ถุงไข่ระยะแรก (primary follicle) ถุงไข่ระยะที่สอง (secondary follicle) ถุงไข่ระยะกราเฟียน (graafian follicle) ถุงไข่ระยะคอร์ปัสลูเทียม (corpus luteum) และถุงไข่ระยะคอร์ปัสอัลบิแคน (corpus albican) โดยถุงไข่จะฝังตัวแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อ corpora lutea และชั้นเมดัลลาซึ่งเป็นชั้นที่มีเส้นประสาทเส้นเลือดและท่อน้ำเหลืองมาหล่อเลี้ยง โครงสร้างของถุงไข่ซึ่งเป็นที่อยู่ของเซลล์ไข่ภายในรังไข่ พบว่า ถุงไข่มีการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างตามระยะการเจริญ การศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อของรังไข่ด้วยพาราฟินเทคนิคภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงรายละเอียด ดังภาพที่ 9-14

1. ถุงไข่ระยะเริ่มต้น (primordial follicle) ของรังไข่ระยะฟอลลิคูล่า ประกอบด้วยเซลล์ไข่ระยะเริ่มต้น ที่ล้อมรอบด้วยเซลล์แกรนูโลซา ลักษณะเซลล์แบบแบนบางเพียงชั้นเดียว (single layer of flattened follicular cells) โดยมีเนื้อเยื่อผิวในระบบสืบพันธุ์ (germinal epithelium) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทunica อัลบูจิเนีย (tunica albuginea) ดังภาพที่ 9

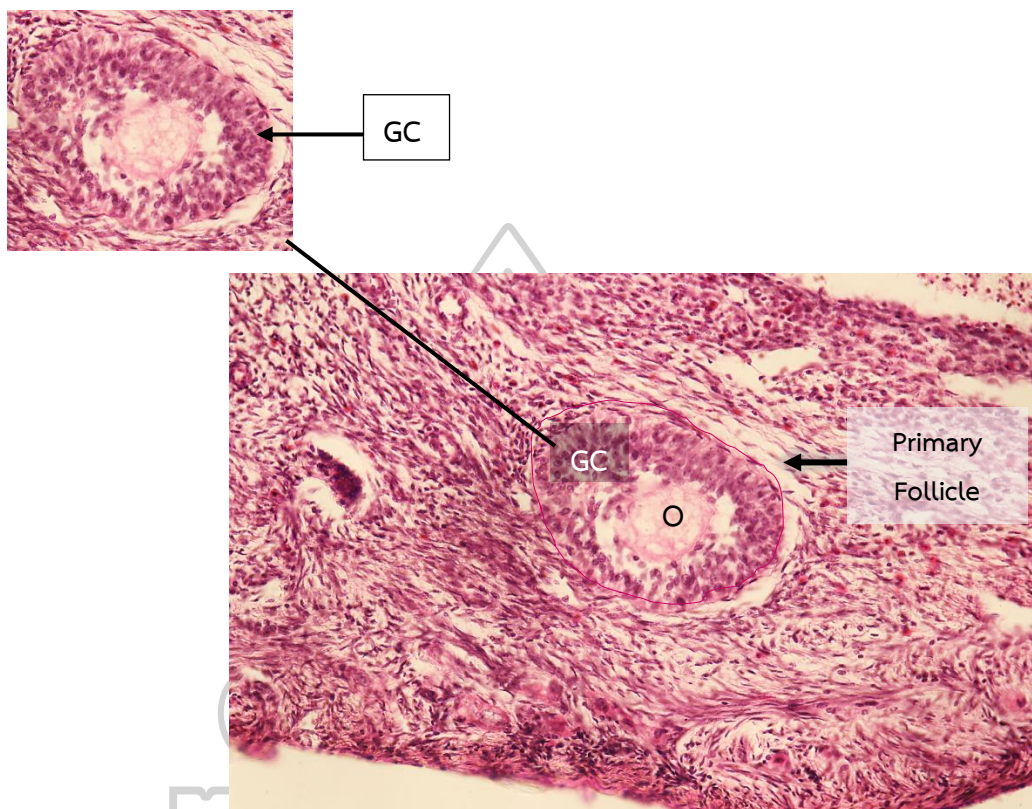


ภาพที่ 9 แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของรังไข่สุกรส่วนถุงไข่ระยะเริ่มต้น

แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของรังไข่สุกรส่วนถุงไข่ระยะเริ่มต้น (primordial follicle: PE) ที่กำลังขยาย 40X จากภาพพบเซลล์แกรนูโลซา ลักษณะเซลล์แบบแบนบางเพียงชั้นเดียว เนื้อเยื่อผิวในระบบสืบพันธุ์และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทunica อัลบูจิเนีย (เซลล์แกรนูโลซา (granulosa cell: GC), เนื้อเยื่อผิวในระบบสืบพันธุ์ (germinal epithelium: GEp), เนื้อเยื่อเกี่ยวพันทunica อัลบูจิเนีย (tunica albuginea: TA)

2. ถุงไข่ระยะแรก (primary follicle) จากรังไข่ระยะฟอลลิคูล่า โดยถุงไข่ระยะแรกจะพบมากที่สุดในการไขโดยเจริญพัฒนามาจากถุงไข่ระยะเริ่มต้น ประกอบด้วยเซลล์ไข่ระยะแรก (primary oocyte) มีขนาดใหญ่ขึ้นล้อมรอบด้วยเซลล์แกรนูโลซา รูปทรงลูกบาศก์ (cuboidal) หรือเซลล์รูป

ทรงกระบอก (columnar) แต่จะมีถุงไข่ระยะแรกเพียงบางส่วนเท่านั้นที่สามารถพัฒนาจนกระทั่งเกิดการตกไข่ได้ ส่วนถุงไข่ที่ฝ่อตัวหรือพัฒนาแล้วแต่ไม่สามารถอยู่รอดจนเกิดการตกไข่ได้ เรียกว่า ถุงไข่เสื่อม (atresia follicle) หมายเหตุ: ลูกศรชี้แสดงฟอลลิเคิลระยะแรก ดังภาพที่ 10

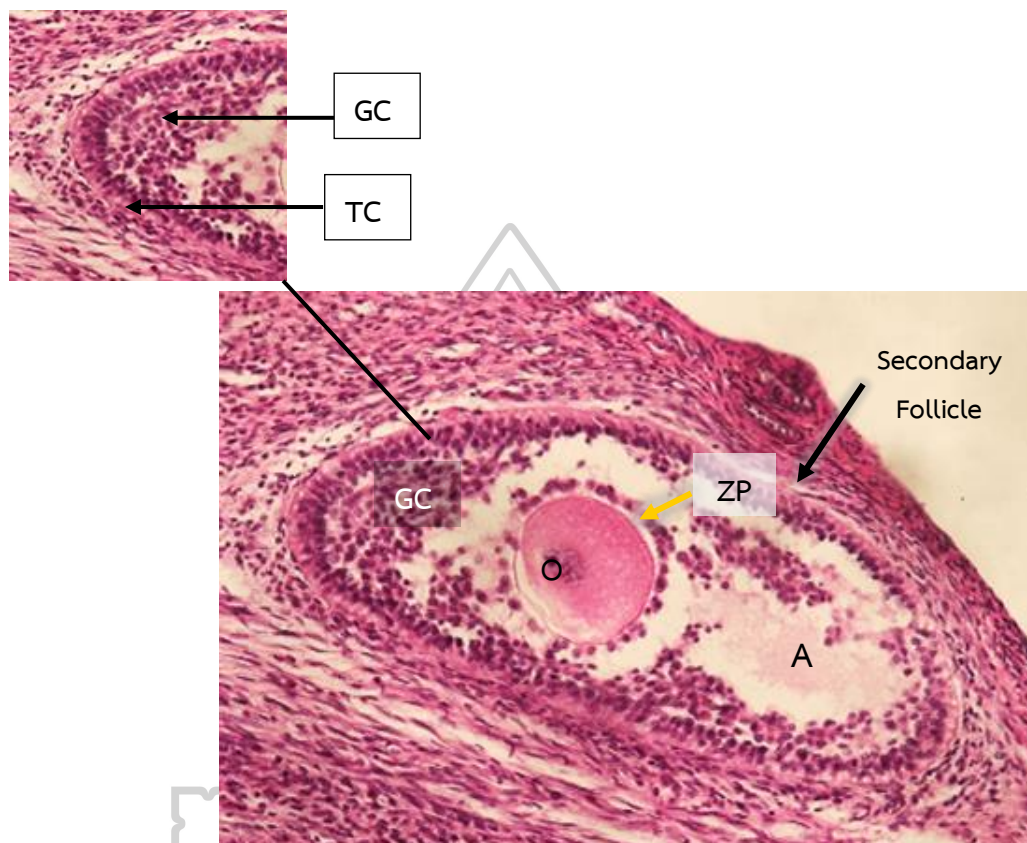


ภาพที่ 10 แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของรังไข่สุกรส่วนถุงไข่ระยะแรก

แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของรังไข่สุกรส่วนถุงไข่ระยะแรก (primary follicle) ที่กำลังขยาย 40X มีเซลล์ไข่ระยะแรก (primary oocyte) ล้อมรอบด้วยเซลล์แกรนูโลซา รูปทรงลูกบาศก์ (cuboidal) หรือเซลล์รูปทรงกระบอก (columnar) (เซลล์ไข่ระยะแรก (primary oocyte หรือ oocyte: O) เซลล์แกรนูโลซา (granulosa cell: GC)

3. ถุงไข่ระยะที่สอง (secondary follicle) จากรังไข่ระยะฟอลลิคูล่า ถุงไข่ระยะนี้เกิดจากการพัฒนาจากถุงไข่ระยะแรกที่ล้อมรอบด้วยเซลล์แกรนูโลซา ซึ่งจะแบ่งตัวเป็นหลายชั้นล้อมรอบเซลล์ไข่ โดยเซลล์แกรนูโลซา จะมีสารจำพวกไกลโคโปรตีนมาหุ้มเซลล์ไข่ เรียกว่า โชนา เพลลูซิดา ล้อมรอบเป็นชั้นห่อหุ้มเซลล์ไข่ และมีเซลล์ที่กา (thaca cell) ซึ่งเป็นเซลล์รูปกระสวยล้อมรอบเซลล์แกรนูโลซา แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ theca internal และ theca external ซึ่งจะกระตุ้นและ

หลังสเต็มเซลล์ เช่น แอนโดรเจน และเอสโตรเจน และสารอื่นๆ เพื่อใช้ในการพัฒนาของถุงไข่ และเซลล์ไข่และถุงไข่เจริญเติบโตขึ้นเริ่มมีการขยายของถุงน้ำเกิดเป็นช่องว่าง เรียกว่า แอนทรีม ภายในจะมีน้ำในถุงไข่ ซึ่งประกอบด้วยสาร ฮอโมนและเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการเจริญของเซลล์ไข่ ดังภาพที่ 11

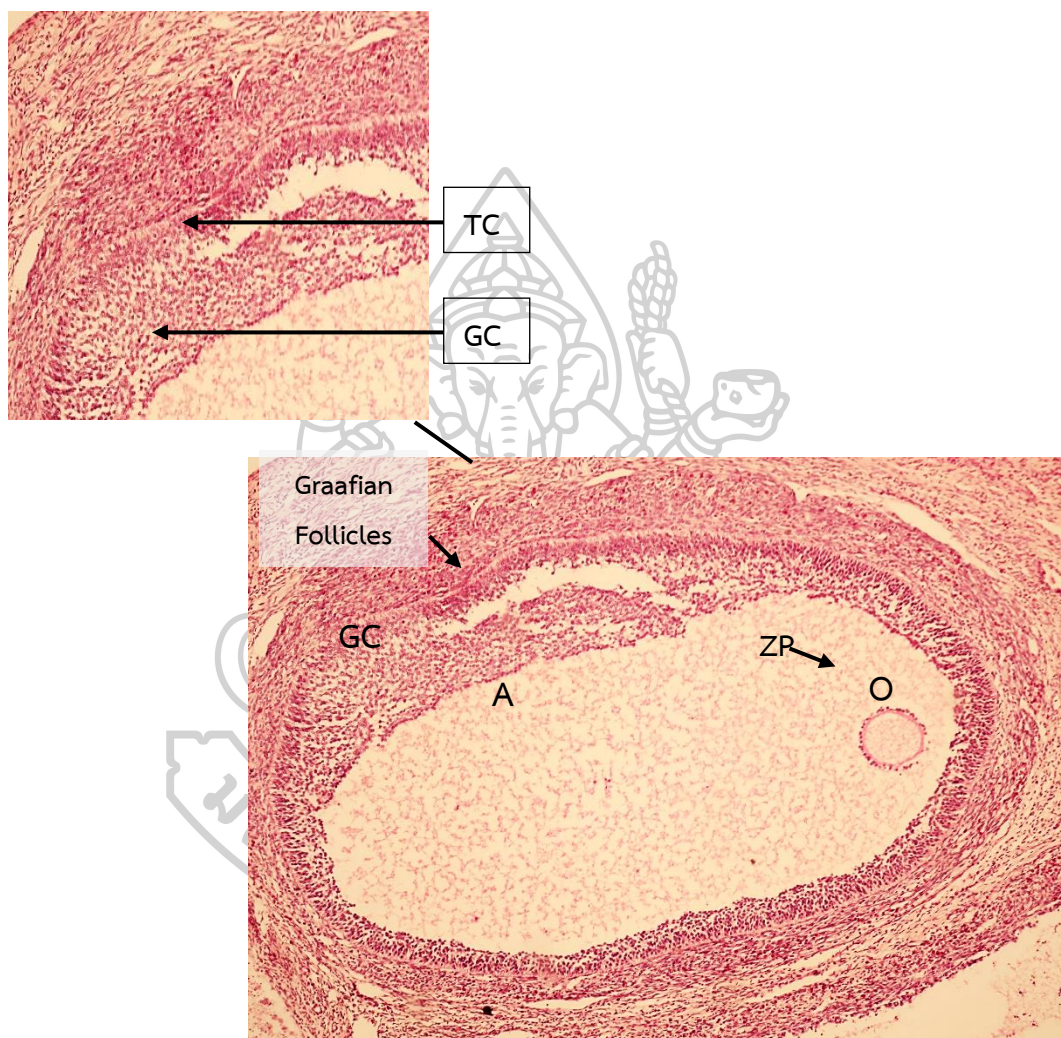


ภาพที่ 11 แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของรังไข่สุกรส่วนถุงไข่ระยะที่สอง

แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของรังไข่สุกรส่วนถุงไข่ระยะที่สอง (secondary follicle) ที่กำลังขยาย 40X ภายในมีเซลล์ไข่ระยะที่สอง (secondary oocyte) ที่อยู่ในถุงไข่ระยะที่สอง (secondary follicle) ล้อมรอบด้วยเซลล์แกรนูโลซาหลายชั้นล้อมรอบเซลล์ไข่ มีสารจำพวกไกลโคโปรตีนมาหุ้มเซลล์ไข่ เรียกว่า โซนา เพลลูซิดา และเซลล์ที่กา พบถุงน้ำเป็นช่องว่าง เรียกว่า แอนทรีม (เซลล์ไข่ (oocyte: O) เซลล์แกรนูโลซา (granulosa cell: GC) โซนา เพลลูซิดา (zona pellucida: ZP) เซลล์ที่กา (thaca cells: TC) แอนทรีม (antrum: A)

4. ถุงไข่ระยะกราเฟียน (graafian follicle) จากรังไข่ระยะฟอลลิคูล่าเป็นถุงไข่ระยะที่เจริญสมบูรณ์เต็มที่ใกล้จะตกไข่ มีการเพิ่มของเซลล์แกรนูโลซาและมีเซลล์ที่กา ล้อมรอบเซลล์แกรนูโลซาหลายชั้น โดยจะมีสารจำพวกไกลโคโปรตีนมาหุ้มเซลล์ไข่ เรียกว่า โซนา เพลลูซิดา ซึ่งพบว่ามีการ

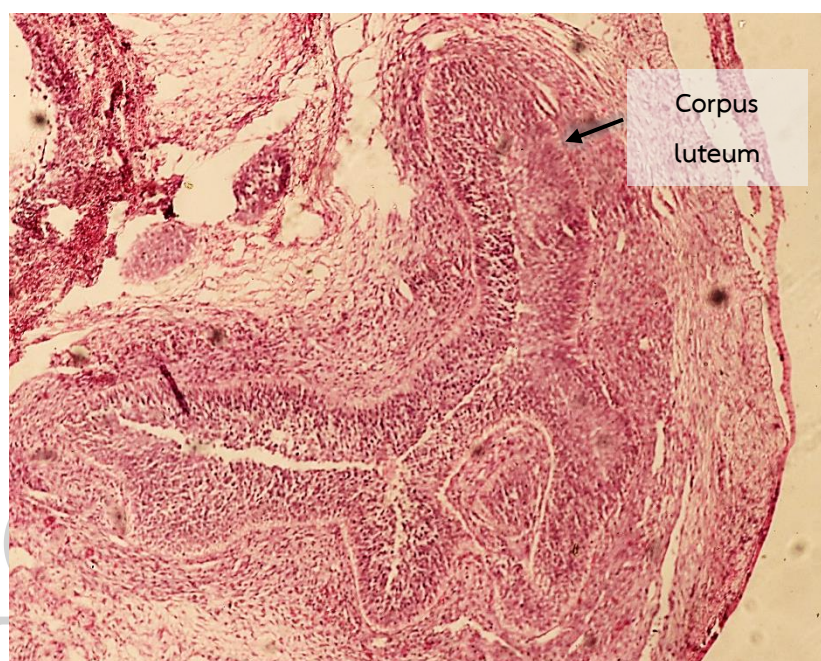
ขยายของถุงน้ำเพิ่มมากขึ้น คือ แอนทรีม มีขนาดใหญ่กว่า มีการสะสมของน้ำในถุงไข่ ประกอบด้วย โปรตีน ฮอริโมนชนิดเปปไทด์ และเอนไซม์ต่างๆ ซึ่งเซลล์ไข่เจริญจนพร้อมที่จะตกออกมา ถุงไข่ โดยเซลล์ไข่ในถุงไข่ระยะกราฟาเฟียนจะแบ่งตัวแบบไมโอซิสถึงระยะเมทาเฟส 2 โดยจะไม่เจริญต่อ จนกว่า จะได้รับการผสมกับเชื้ออสุจิ ดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของรังไข่สุกรส่วนถุงไข่ระยะกราฟาเฟียน

แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของรังไข่สุกรส่วนถุงไข่ระยะกราฟาเฟียนที่กำลังขยาย 40X เซลล์ไข่ระยะนี้มีการเพิ่มของเซลล์แกรนูโลซาและเซลล์ทีกาหลายชั้น มีสารจำพวกไกลโคโปรตีนมาหุ้มเซลล์ไข่ เรียกว่า โซนา เพลลูซิตา พบว่ามีการขยายของช่องว่างภายในถุงไข่เพิ่มมากขึ้น คือ ช่องว่างภายในถุงไข่หรือแอนทรีม (เซลล์ไข่ (oocyte: O), เซลล์แกรนูโลซา (granulosa cell: GC), เซลล์ทีกา (thaca cells: TC), โซนา เพลลูซิตา (zona pellucida: ZP), แอนทรีม (antrum: A)

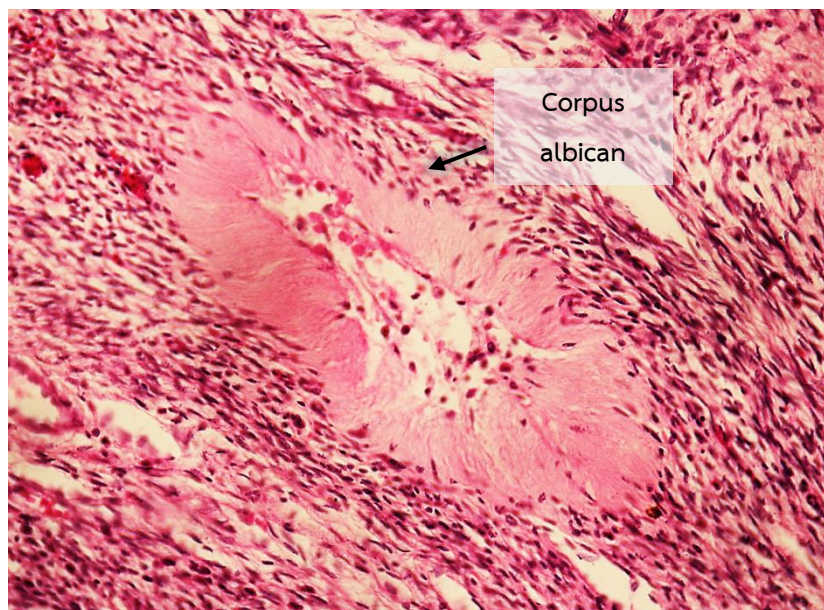
5. ถุงไข่ระยะคอร์ปัสลูเทียม จากรังไข่ ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่เจริญเปลี่ยนแปลงมาจากถุงไข่ระยะกรากาเพียนหลังตกไข่ ผนังของฟอลลิเคิลจะยุบตัวลง เรียกว่า คอร์ปัส ลูเทียม และขยายตัวขึ้นมาอีก ภายหลัง เนื่องจากมีเลือดและน้ำเหลืองมาเลี้ยงมากจึงมีสีแดง รังไข่บริเวณนั้นจะมีเลือดออก กลายเป็นก้อนสีแดง เรียกว่า คอปัส ฮีโมราจิกัม (corpus hemorrhagicum) และเซลล์แกรนูโลซาจะมีขนาดใหญ่ขึ้น ก้อนเลือดจะถูกแทนที่ด้วยไขมันสีเหลืองจะเป็นเซลล์ลูเตียล (luteal cell) ซึ่งจะมีการหลั่งสารสีเหลืองออกมาจากเซลล์นี้ เรียกกระบวนการนี้ว่า Luteinization ดังภาพที่ 13



ภาพที่ 13 แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของถุงไข่ระยะคอร์ปัสลูเทียม

จากรังไข่สุกรที่กำลังขยาย 40X ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่เจริญเปลี่ยนแปลงมาจากถุงไข่ระยะกรากาเพียนหลังตกไข่ ซึ่งผนังของฟอลลิเคิลจะยุบตัวลง เรียกว่า คอร์ปัส ลูเทียม และขยายตัวขึ้นมาอีก ภายหลัง

6. ถุงไข่ระยะคอร์ปัส อัลบิแคน เกิดเมื่อเซลล์ไข่ไม่ได้รับการผสม คอร์ปัสลูเทียมจะเจริญต่อไปเปลี่ยนเป็นคอร์ปัสอัลบิแคน (corpus albican) เป็นเนื้อเยื่อที่กำลังสลายตัว เซลล์จะตายมีเนื้อเยื่อสีขาว เรียกว่า คอร์ปัส อัลบิแคน ที่ไม่ได้สร้างฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน เยื่อบุมดลูกจึงสลายเกิดเป็นเลือดประจำเดือน ดังภาพที่ 14



ภาพที่ 14 แสดงลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของถุงไข่ระยะคอร์ปัสอัลบิแคน
จากรังไข่สุกรที่กำลังขยาย 40X

ผลการศึกษาลักษณะวิทยาของเซลล์ไข่สุกรและเซลล์แกรนูโลซาที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

ผลการศึกษาลักษณะเซลล์ไข่สุกรด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงจำแนกเซลล์ไข่ได้ทั้งหมด 5
แบบ ดังนี้

แบบที่ 1 เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่น (intact cumulus cell layer oocytes)

แบบที่ 2 เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้น (multi cumulus cells layer oocytes)

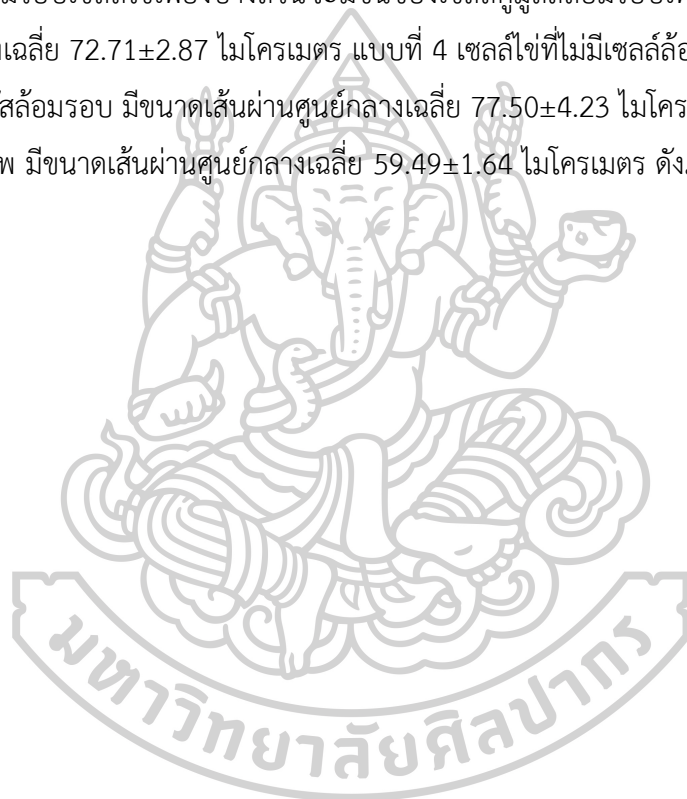
แบบที่ 3 เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เพียงบางส่วน (partial cumulus cells layer oocytes)

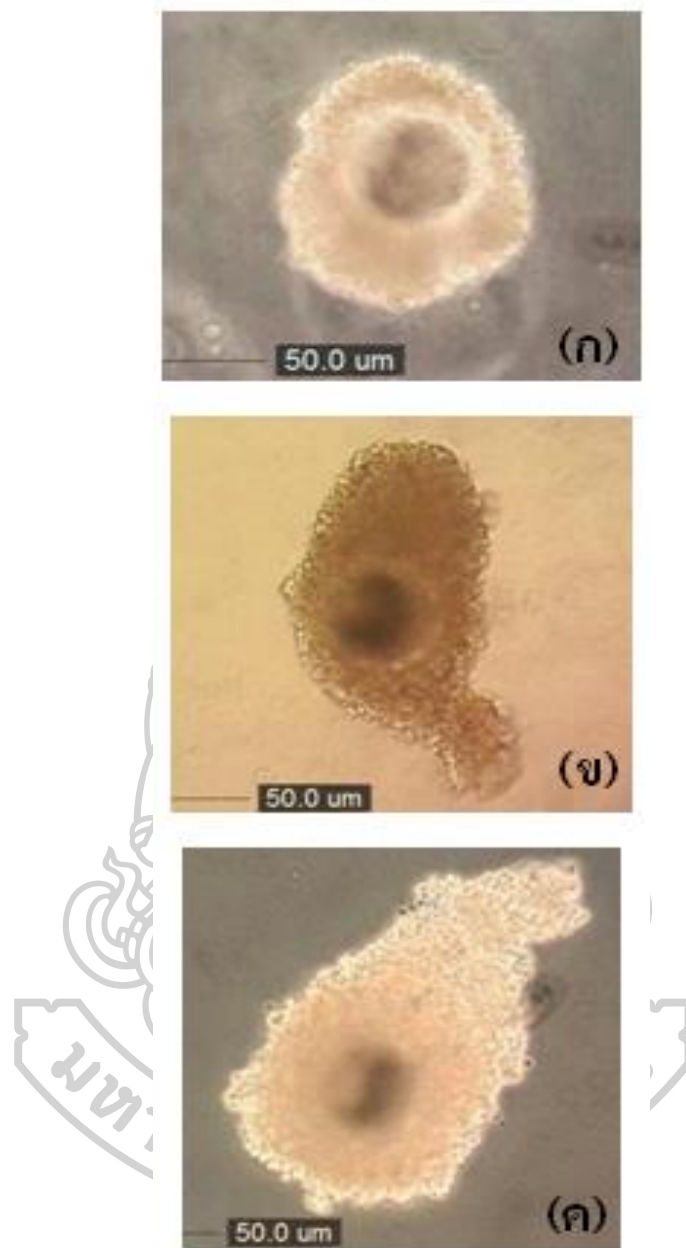
แบบที่ 4 เซลล์ไข่ที่ไม่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ (completely denuded oocytes)

แบบที่ 5 เซลล์ไข่ที่เสื่อมสภาพ (degenerated oocytes)

เซลล์ไข่จากถุงไข่ขนาดเล็กที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางต่างๆ จะมีรูปร่างกลมและล้อมรอบด้วย โชนา เพลลูซิดาที่มีชั้นของเซลล์คมูลัส เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงพบว่าสามารถแบ่งออกเป็น 5 แบบ ตามจำนวนของชั้นเซลล์คมูลัสที่อยู่โดยรอบเซลล์ไข่ โดยแบบที่ 1 เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่นจะมีชั้นของเซลล์คมูลัสล้อมรอบ 5 ชั้น มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง

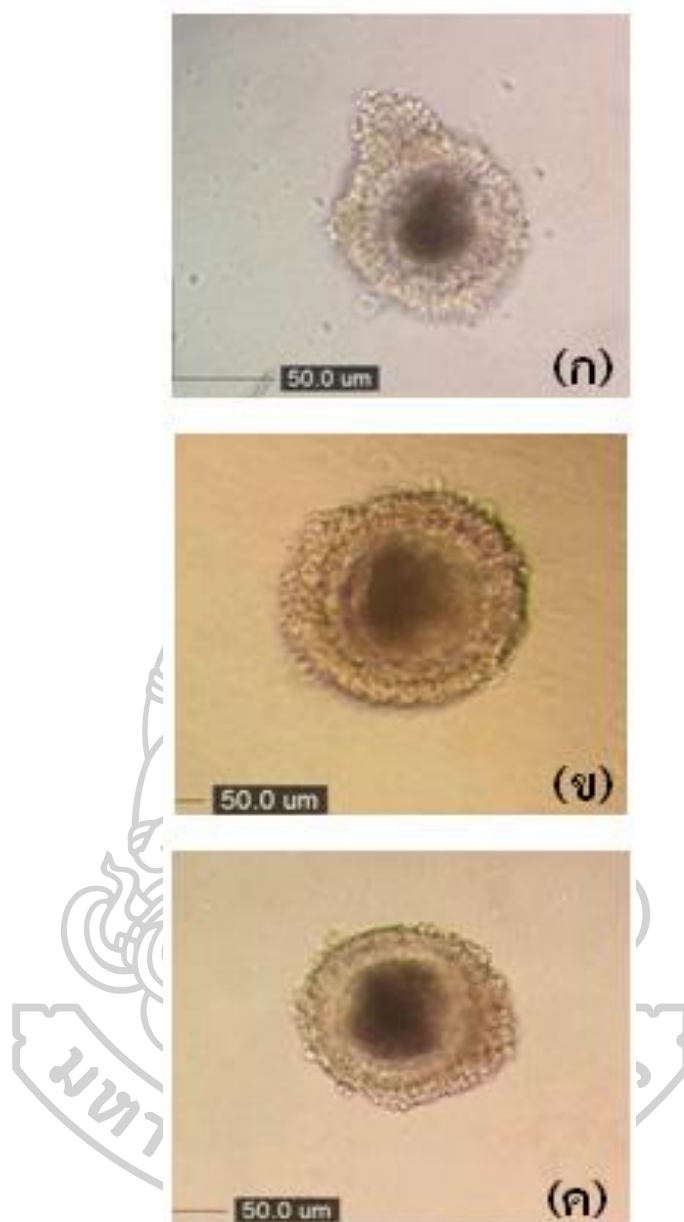
เฉลี่ย 149.47 ± 3.72 ไมโครเมตร แบบที่ 2 เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้น จะมีชั้นของเซลล์คัมมูลัสล้อมรอบ 2-3 ชั้น มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 108.20 ± 14.60 ไมโครเมตร โดยแสดงภาพของเซลล์ไข่เปรียบเทียบกับเซลล์ไข่ที่ได้จากถุงไข่ขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่ ของเซลล์ไข่แบบที่ 1 เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่น (intact cumulus cell layer oocytes) และเซลล์ไข่แบบที่ 2 เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้น (multi cumulus cells layer oocytes) พบว่าจำนวนชั้นของเซลล์คัมมูลัสที่ล้อมรอบเซลล์ไข่จากถุงไข่ขนาดเล็กน้อยกว่าถุงไข่ขนาดกลางและขนาดใหญ่ ตามลำดับ ดังภาพที่ 15-16 และภาพของเซลล์ไข่แบบที่ 3 เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เพียงบางส่วนจะมีชั้นของเซลล์คัมมูลัสล้อมรอบเพียงบางส่วน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 72.71 ± 2.87 ไมโครเมตร แบบที่ 4 เซลล์ไข่ที่ไม่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่จะไม่มีชั้นของเซลล์คัมมูลัสล้อมรอบ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 77.50 ± 4.23 ไมโครเมตรและแบบที่ 5 เซลล์ไข่ที่เสื่อมสภาพ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 59.49 ± 1.64 ไมโครเมตร ดังภาพที่ 15





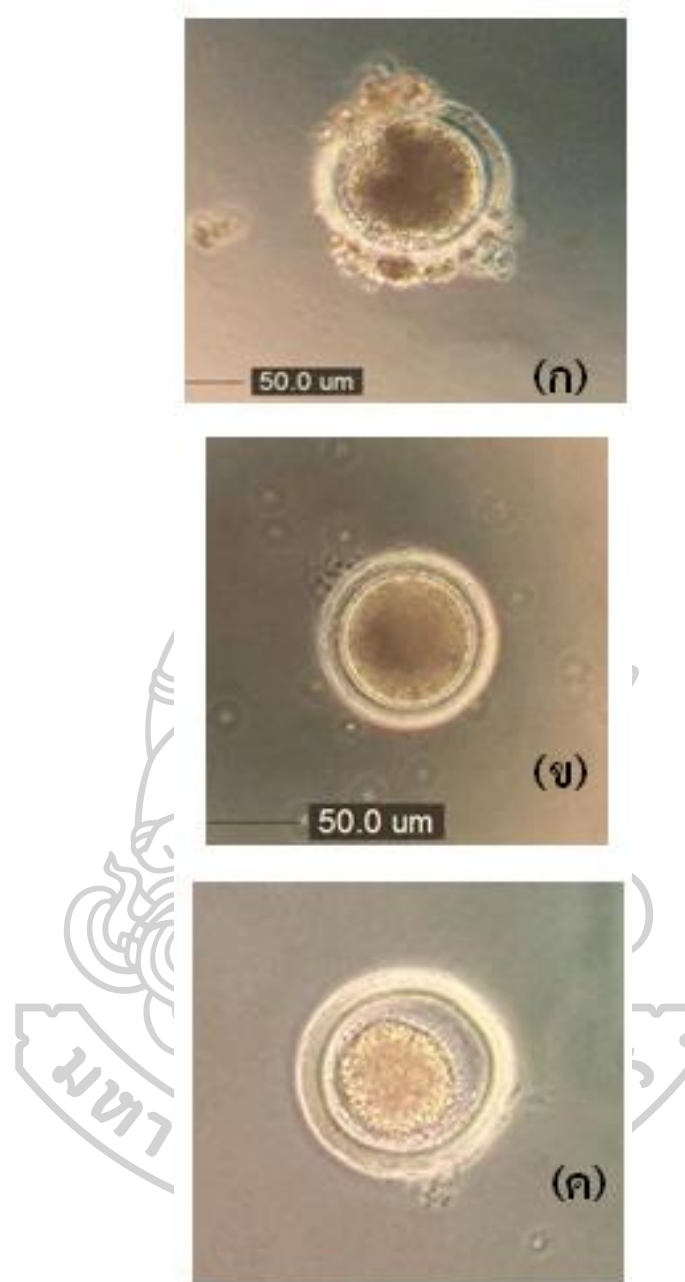
ภาพที่ 15 ภาพเซลล์ไข่แบบที่ 1 เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่นจากถุงไข่ขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่

(ก) แสดงภาพเซลล์ไข่แบบที่ 1 เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่นจากถุงไข่ขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร) (ข) แสดงภาพเซลล์ไข่แบบที่ 1 เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่นจากถุงไข่ขนาดกลาง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร) (ค) แสดงภาพเซลล์ไข่แบบที่ 1 เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่นจากถุงไข่ขนาดใหญ่ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 7-8 มิลลิเมตร)



ภาพที่ 16 ภาพเซลล์ไ้แบบที่ 2 เซลล์ไ้ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไ้แบบหลายชั้นจากถุงไ้ขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่

(ก) แสดงภาพเซลล์ไ้แบบที่ 2 เซลล์ไ้ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไ้แบบหลายชั้นจากถุงไ้ ขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร) (ข) แสดงภาพเซลล์ไ้แบบที่ 2 เซลล์ไ้ที่มีเซลล์ ล้อมรอบเซลล์ไ้แบบหลายชั้นจากถุงไ้ขนาดกลาง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร) (ค) แสดง ภาพเซลล์ไ้แบบที่ 2 เซลล์ไ้ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไ้แบบหลายชั้นจากถุงไ้ขนาดใหญ่ (เส้นผ่าน ศูนย์กลาง 7-8 มิลลิเมตร)



ภาพที่ 17 ภาพแสดงเซลล์ไข่ที่จำแนกตามเซลล์คูลมูลัสที่ล้อมรอบ (ก) แบบที่ 3 (ข) แบบที่ 4 (ค) แบบที่ 5

ภาพแสดงเซลล์ไข่ที่จำแนกตามเซลล์คูลมูลัสที่ล้อมรอบ (ก) แบบที่ 3 เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เพียงบางส่วน (ข) แบบที่ 4 เซลล์ไข่ที่ไม่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ (ค) แบบที่ 5 เซลล์ไข่ที่เสื่อมสภาพ การศึกษาถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางต่างๆ ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่าสามารถแบ่งออกเป็น 5 แบบ ตามจำนวนของชั้นเซลล์คูลมูลัสที่อยู่โดยรอบเซลล์ไข่ พบจำนวน

เซลล์ไข่และเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ไข่แบบที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ดังตารางที่ 7 เซลล์ไข่ส่วนใหญ่จะเป็นแบบที่ 1 และ 2 โดยเรียงตามถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร ถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร ถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร และถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7-8 มิลลิเมตร พบร้อยละ 53.84, 55.92, 56.94 และ 56.52 ตามลำดับ

ตารางที่ 7 จำนวนและเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ไข่จากรังไข่ 64 รังไข่ ที่มีถุงไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2, 3-4, 5-6 และ 7-8 มิลลิเมตร

ขนาดถุงไข่ (มิลลิเมตร)	จำนวน เซลล์ไข่ที่ เจาะได้	จำนวนชนิดเซลล์ไข่ที่พบ				
		แบบที่ 1	แบบที่ 2	แบบที่ 3	แบบที่ 4	แบบที่ 5
1-2	1,208	162 (13.41%)	484 (40.07%)	207 (17.14%)	275 (22.76%)	80 (6.62%)
3-4	372	71 (19.09%)	137 (36.83%)	73 (19.62%)	68 (18.28%)	23 (6.18%)
5-6	72	24 (33.33%)	17 (23.61%)	11 (15.28%)	13 (18.06%)	7 (9.72%)
7-8	23	6 (26.09%)	7 (30.43%)	6 (26.09%)	1 (4.35%)	3 (13.04%)

หมายเหตุ

แบบที่ 1 คือ เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่น (intact cumulus cell layer oocytes)

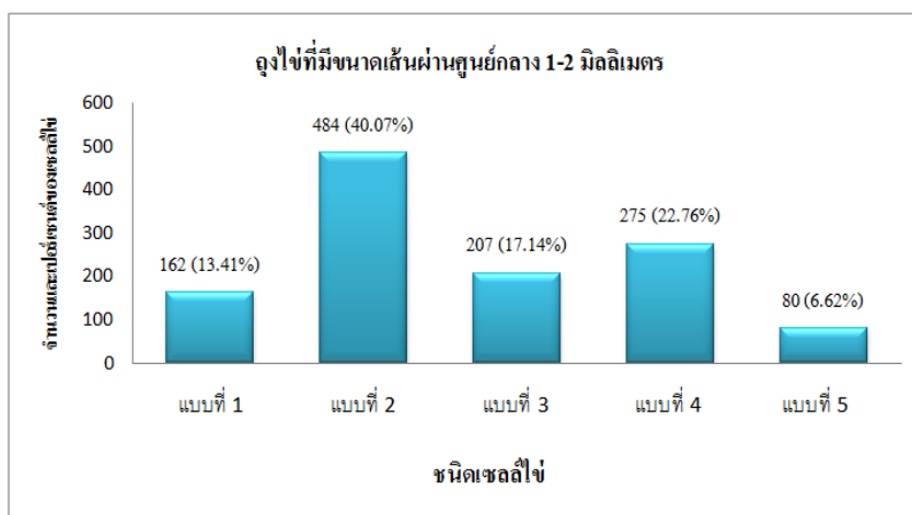
แบบที่ 2 คือ เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้น (multi cumulus cells layer oocytes)

แบบที่ 3 คือ เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เพียงบางส่วน (partial cumulus cells layer oocytes)

แบบที่ 4 คือ เซลล์ไข่ที่ไม่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ (completely denuded oocytes)

แบบที่ 5 คือ เซลล์ไข่ที่เสื่อมสลาย (degenerated oocytes)

จากข้อมูลจำนวนและเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ไข่ที่พบในถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 3-4, 5-6 และ 7-8 มิลลิเมตร นำมาวิเคราะห์ที่เป็นกราฟแสดงการเปรียบเทียบจำนวนและเปอร์เซ็นต์เซลล์ไข่แต่ละชนิดที่พบในถุงไข่ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางต่างๆ ดังภาพที่ 18-21



ภาพที่ 18 กราฟแสดงการเปรียบเทียบจำนวนและเปอร์เซ็นต์เซลล์ไข่แต่ละชนิดที่พบในถุงไข่ขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร) ที่เจาะเก็บได้จากเซลล์ไข่ 1,208 เซลล์

หมายเหตุ

แบบที่ 1 คือ เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่น (intact cumulus cell layer oocytes)

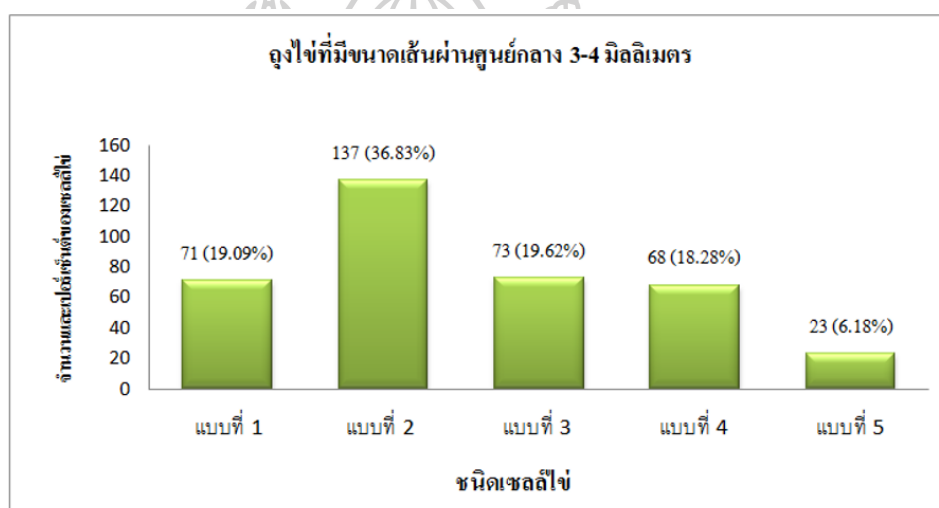
แบบที่ 2 คือ เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้น (multi cumulus cells layer oocytes)

แบบที่ 3 คือ เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เพียงบางส่วน (partial cumulus cells layer oocytes)

แบบที่ 4 คือ เซลล์ไข่ที่ไม่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ (completely denuded oocytes)

แบบที่ 5 คือ เซลล์ไข่ที่เสื่อมสลาย (degenerated oocytes)

จากภาพที่ 18 พบว่าถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร มีจำนวนเซลล์ไข่แบบที่ 1 เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้นมากที่สุด คือ จำนวน 484 เซลล์ไข่ เท่ากับ 40.07 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ แบบที่ 4 เซลล์ไข่ที่ไม่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ จำนวน 275 เซลล์ไข่ เท่ากับ 22.76 เปอร์เซ็นต์ แบบที่ 3 เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เพียงบางส่วน จำนวน 207 เซลล์ไข่ เท่ากับ 17.14 เปอร์เซ็นต์ แบบที่ 1 เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่น จำนวน 162 เท่ากับ 13.41 เปอร์เซ็นต์ และแบบที่ 5 เซลล์ไข่ที่เสื่อมสลาย จำนวน 80 เซลล์ไข่ เท่ากับ 6.62 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 19 กราฟแสดงการเปรียบเทียบจำนวนและเปอร์เซ็นต์เซลล์ไข่แต่ละชนิดที่พบในถุงไข่ขนาดกลาง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร) ที่เจาะเก็บได้จากเซลล์ไข่ 372 เซลล์

หมายเหตุ

แบบที่ 1 คือ เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่น (intact cumulus cell layer oocytes)

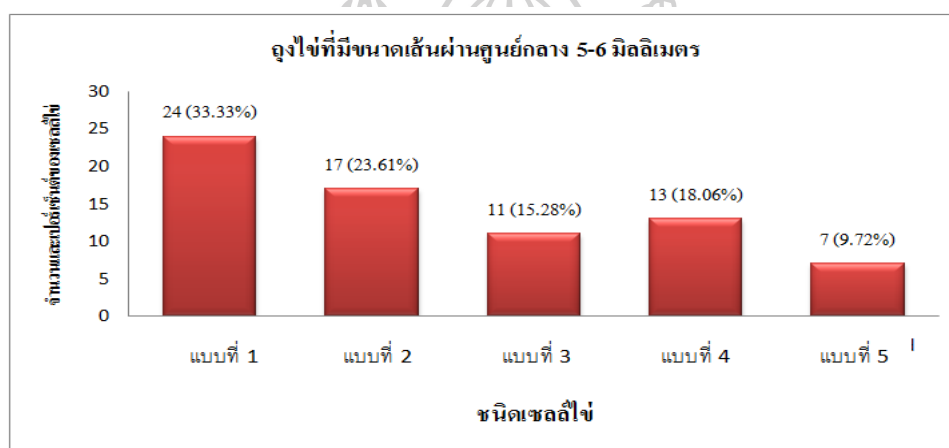
แบบที่ 2 คือ เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้น (multi cumulus cells layer oocytes)

แบบที่ 3 คือ เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เพียงบางส่วน (partial cumulus cells layer oocytes)

แบบที่ 4 คือ เซลล์ไข่ที่ไม่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ (completely denuded oocytes)

แบบที่ 5 คือ เซลล์ไข่ที่เสื่อมสลาย (degenerated oocytes)

จากภาพที่ 19 พบว่าถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร มีจำนวนเซลล์ไข่แบบที่ 2 เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้นมากที่สุด คือ จำนวน 137 เซลล์ไข่ เท่ากับ 36.83 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ แบบที่ 3 เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เพียงบางส่วน คือ จำนวน 73 เซลล์ไข่ เท่ากับ 19.62 เปอร์เซ็นต์ แบบที่ 1 เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่น จำนวน 71 เซลล์ไข่ เท่ากับ 19.09 เปอร์เซ็นต์ แบบที่ 4 เซลล์ไข่ที่ไม่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ จำนวน 68 เท่ากับ 18.28 เปอร์เซ็นต์ และแบบที่ 5 เซลล์ไข่ที่เสื่อมสลาย 23 เซลล์ไข่ เท่ากับ 6.18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 20 กราฟแสดงการเปรียบเทียบจำนวนและเปอร์เซ็นต์เซลล์ไข่แต่ละชนิดที่พบในถุงไข่ขนาดกลาง (เส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร) ที่เจาะเก็บได้จากเซลล์ไข่ 72 เซลล์
หมายเหตุ

แบบที่ 1 คือ เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่น (intact cumulus cell layer oocytes)

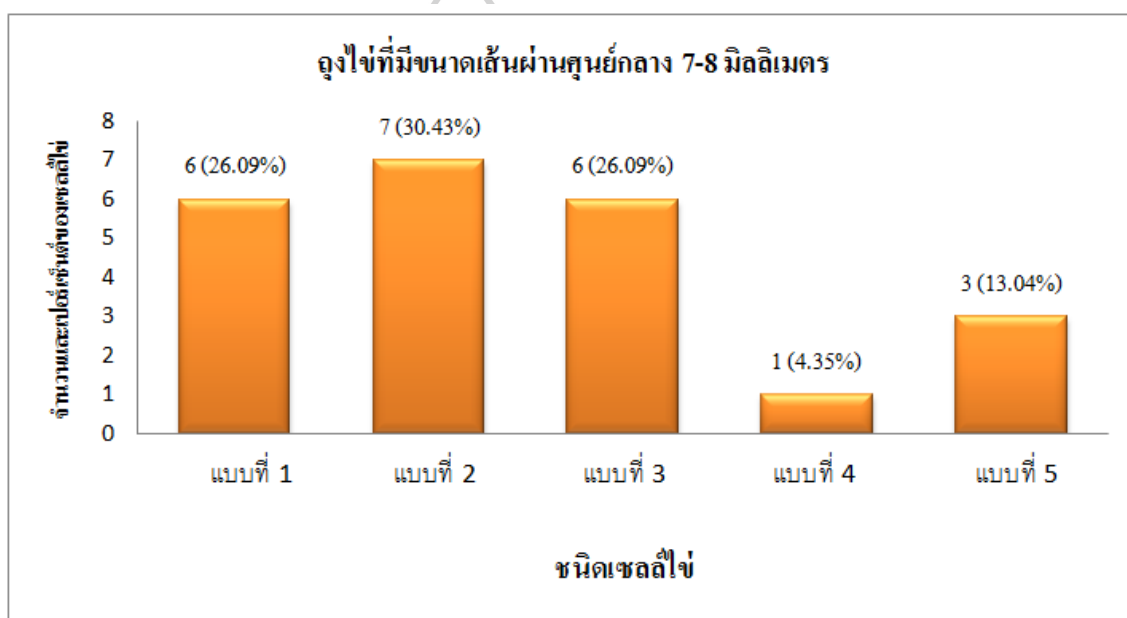
แบบที่ 2 คือ เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้น (multi cumulus cells layer oocytes)

แบบที่ 3 คือ เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เพียงบางส่วน (partial cumulus cells layer oocytes)

แบบที่ 4 คือ เซลล์ไข่ที่ไม่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ (completely denuded oocytes)

แบบที่ 5 คือ เซลล์ไข่ที่เสื่อมสลาย (degenerated oocytes)

จากภาพที่ 20 พบว่าถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร มีจำนวนแบบที่ 1 เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่นมากที่สุด คือ 24 เซลล์ไข่ เท่ากับ 33.33 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือแบบที่ 2 เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้น จำนวน 17 เซลล์ไข่เท่ากับ 23.61 เปอร์เซ็นต์ แบบที่ 4 เซลล์ไข่ที่ไม่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ จำนวน 13 เซลล์ไข่ เท่ากับ 18.06 เปอร์เซ็นต์ แบบที่ 3 เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เพียงบางส่วนจำนวน 11 เซลล์ไข่ เท่ากับ 15.28 เปอร์เซ็นต์ และแบบที่ 5 เซลล์ไข่ที่เสื่อมสลายจำนวน 7 เซลล์ไข่และ 9.72 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าเซลล์ไข่ทั้ง 5 ชนิด ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



ภาพที่ 21 กราฟแสดงการเปรียบเทียบจำนวนและเปอร์เซ็นต์เซลล์ไข่แต่ละชนิดที่พบในถุงไข่ขนาดใหญ่ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 7-8 มิลลิเมตร) ที่เจาะเก็บได้จากเซลล์ไข่ 23 เซลล์

หมายเหตุ

แบบที่ 1 คือ เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่น (intact cumulus cell layer oocytes)

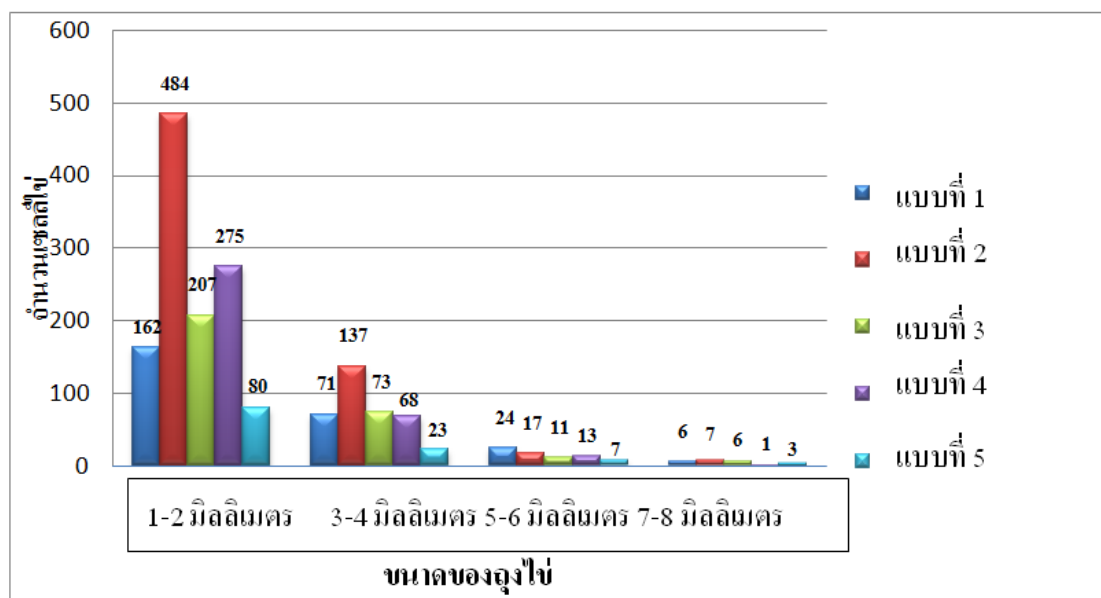
แบบที่ 2 คือ เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้น (multi cumulus cells layer oocytes)

แบบที่ 3 คือ เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เพียงบางส่วน (partial cumulus cells layer oocytes)

แบบที่ 4 คือ เซลล์ไข่ที่ไม่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ (completely denuded oocytes)

แบบที่ 5 คือ เซลล์ไข่ที่เสื่อมสลาย (degenerated oocytes)

จากภาพที่ 21 พบว่าถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7-8 มิลลิเมตร มีแบบที่ 2 เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้นมากที่สุด คือ จำนวน 7 เซลล์ไข่ เท่ากับ 30.43 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ แบบที่ 1 เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่น จำนวน 6 เซลล์ไข่ เท่ากับ 26.09 เปอร์เซ็นต์ แบบที่ 3 เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เพียงบางส่วน จำนวน 6 เซลล์ไข่ เท่ากับ 26.09 เปอร์เซ็นต์แบบที่ 5 เซลล์ไข่ที่เสื่อมสลายจำนวน 3 เซลล์ไข่ เท่ากับ 13.04 เปอร์เซ็นต์ และแบบที่ 4 เซลล์ไข่ที่ไม่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ จำนวน 1 เซลล์ไข่ เท่ากับ 4.35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าเซลล์ไข่ทั้ง 5 แบบ ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



ภาพที่ 22 กราฟแสดงการเปรียบเทียบจำนวนของเซลล์ไข่ที่พบในถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2, 3-4, 5-6 และ 7-8 มิลลิเมตร

หมายเหตุ

แบบที่ 1 คือ เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่น (intact cumulus cell layer oocytes)

แบบที่ 2 คือ เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้น (multi cumulus cells layer oocytes)

แบบที่ 3 คือ เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เพียงบางส่วน (partial cumulus cells layer oocytes)

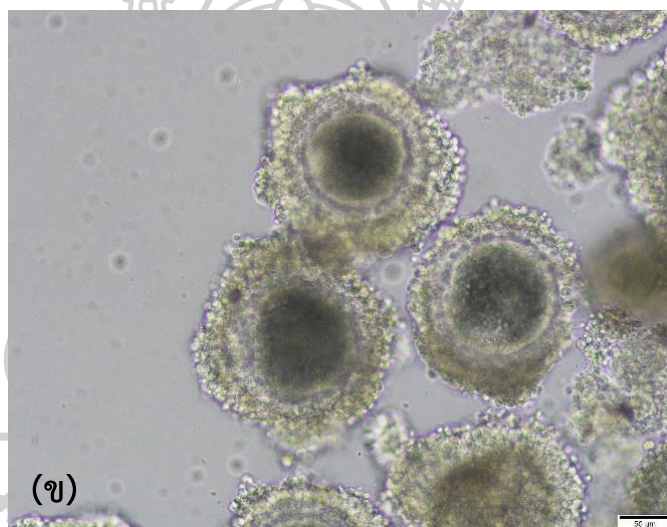
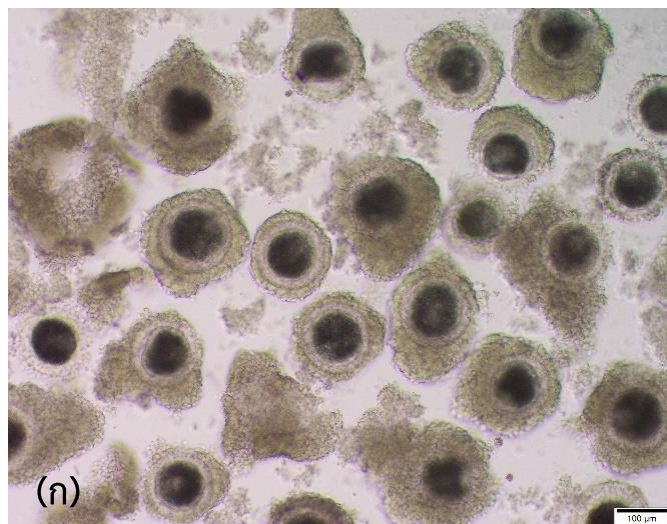
แบบที่ 4 คือ เซลล์ไข่ที่ไม่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ (completely denuded oocytes)

แบบที่ 5 คือ เซลล์ไข่ที่เสื่อมสลาย (degenerated oocytes)

จากภาพที่ 22 พบว่าถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2, 3-4 และ 7-8 มิลลิเมตร พบเซลล์ไข่แบบที่ 2 เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบแบบหลายชั้นมากที่สุด ในขณะที่ถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร พบแบบที่ 1 เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบแบบติดแน่นมากที่สุด นอกจากนี้พบว่าจำนวนเซลล์ไข่ที่พบในถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร มีจำนวนมากกว่าถุงไข่ขนาดอื่นๆ รองลงมาเป็นถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4, 5-6 และ 7-8 มิลลิเมตร ตามลำดับ

ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์และการศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ไข่

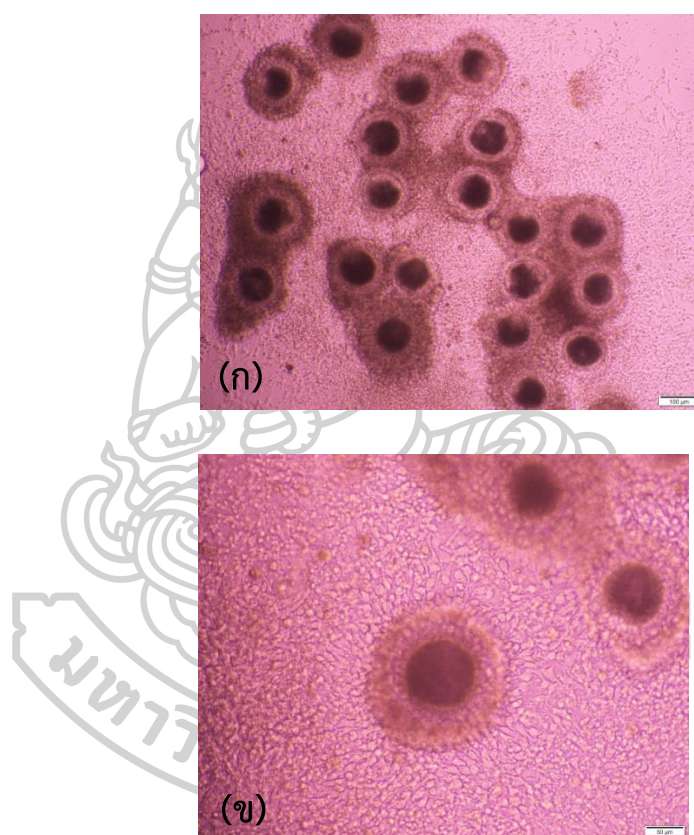
ตัวอย่างเซลล์ไข่จากรังไข่สุกรที่เก็บด้วยเทคนิคแบบปลอดเชื้อ ที่เพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ในอาหาร M199 with Earle's salts (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA) ที่เสริมด้วย 10% heat-treated fetal bovine serum (HTFBS), 2.2 mg/mL NaHCO₃, 1 M HEPES (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA) 0.25 mM pyruvate 15 µg/mL ที่เสริมฮอร์โมน porcine FSH 1 µg/mL LH 1 µg/mL estradiol และ 50 µg/mL gentamycin sulfate ในสภาวะความชื้นสูงที่คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ในระยะเริ่มต้น 0 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ไข่สุกรมีรูปร่างกลมล้อมด้วย โชนา เพลลูซิตา พบเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่หรือเซลล์คมูลัส เซลล์ล้อมรอบติดแน่นมาก พบเซลล์ล้อมรอบประมาณ 5-7 ชั้น มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 187.5±43.67 ไมโครเมตร ดังภาพที่ 23



ภาพที่ 23 เซลล์ไข่สุกรที่เพาะเลี้ยงเริ่มต้น 0 ชั่วโมง

เพาะเลี้ยงในอาหาร M199 ที่มี Earle's salts (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA) ที่เสริมด้วย 10% HTFBS, 2.2 mg/mL NaHCO_3 , 1 M HEPES (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA), 0.25 mM pyruvate 15 $\mu\text{g/mL}$ ที่เสริมฮอร์โมน porcine FSH 1 $\mu\text{g/mL}$ LH, 1 $\mu\text{g/mL}$ estradiol และ 50 $\mu\text{g/mL}$ gentamycin sulfate ในสภาวะความชื้นสูงที่คาร์บอน-ไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ก) ภาพเซลล์ไข่สุกรที่กำลังขยาย 100 เท่า พบเซลล์ไข่สุกรรูปร่างกลมและมีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ (หรือเซลล์คัมมูลัส) 5-7 ชั้น แบบติดแน่นมาก (ข) เซลล์ไข่สุกรที่กำลังขยาย 400 เท่า พบเซลล์ไข่สุกรรูปร่างกลมล้อมรอบด้วยโซนาเพลลูซิดา

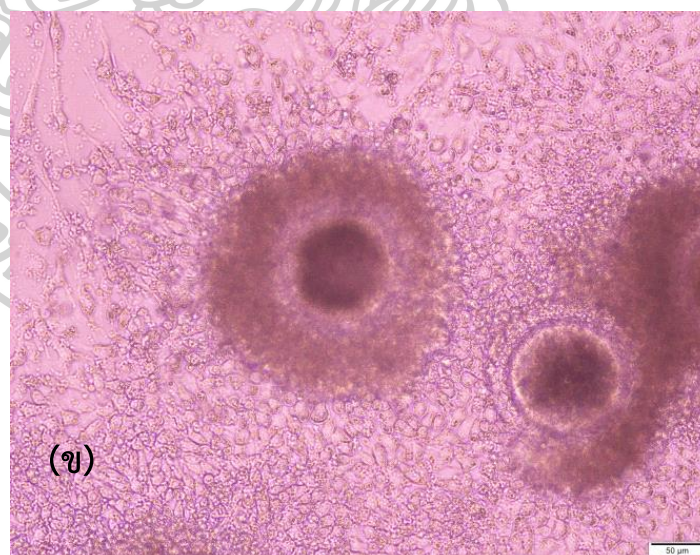
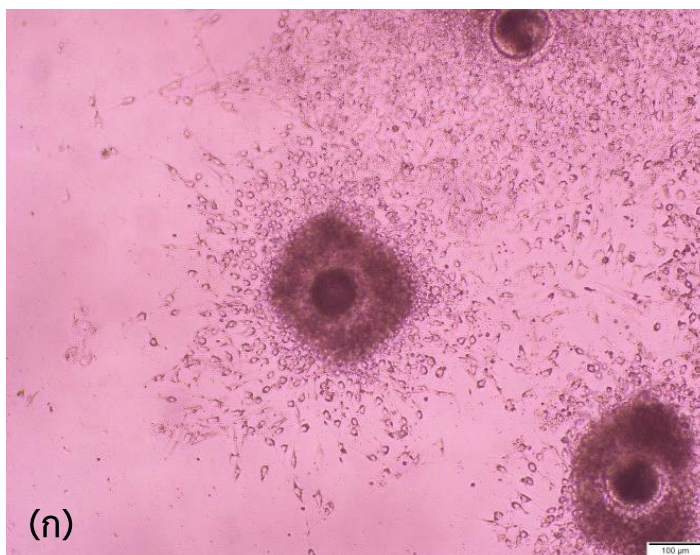
หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่สุกรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบลักษณะของเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ที่มีรูปร่างกลม จะขยายตัวแผ่ออกจากชั้นโซนา เพลลลูซิดา จากนั้นวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบแผ่ขยายออกเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการเริ่มต้นในเวลาเพาะเลี้ยงเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมง พบว่ามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 120.66 ± 17.09 ไมโครเมตร ดังภาพที่ 24 ต่อมาเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่นาน 48 ชั่วโมง พบลักษณะของเซลล์คัมมูลัส ขยายตัวยืดยาวแยกออกจากเซลล์ไข่และชั้นโซนา เพลลลูซิดา เมื่อเทียบกับเซลล์เริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงเวลา 0 ชั่วโมง พบว่ามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 143.33 ± 20.81 ไมโครเมตร ดังภาพที่ 24



ภาพที่ 24 เซลล์ไข่สุกรที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ในอาหาร M199 ที่มี Earle's salts (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA) ที่เสริมด้วย 10% HTFBS, 2.2mg/mL NaHCO_3 1 M HEPES (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA), 0.25 mM pyruvate 15 $\mu\text{g/mL}$ ที่ เส ริ ม ฮ อ ร် โ ม น porcine FSH 1 $\mu\text{g/mL}$ LH, 1 $\mu\text{g/mL}$ estradiol และ 50 $\mu\text{g/mL}$ gentamycin sulfate ในสภาวะความชื้นสูงที่คาร์บอน-ไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ก) แสดงเซลล์ไข่สุกรเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่สุกรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 100 เท่า พบเซลล์ไข่สุกรรูปร่างกลมล้อมรอบด้วยโซนา เพลลลูซิดา

และมีเซลล์คุมมูลี่เริ่มยึดตัวออก (ข) เซลล์ไข่สุกรที่เพาะเลี้ยงเซลล์ไข่สุกรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง กำลังขยาย 400 เท่า เซลล์คุมมูลี่เริ่มยึดตัวออกและเกาะติดพื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยง 50 เปอร์เซ็นต์ ยังพบเซลล์รูปร่างกลมเล็กน้อย



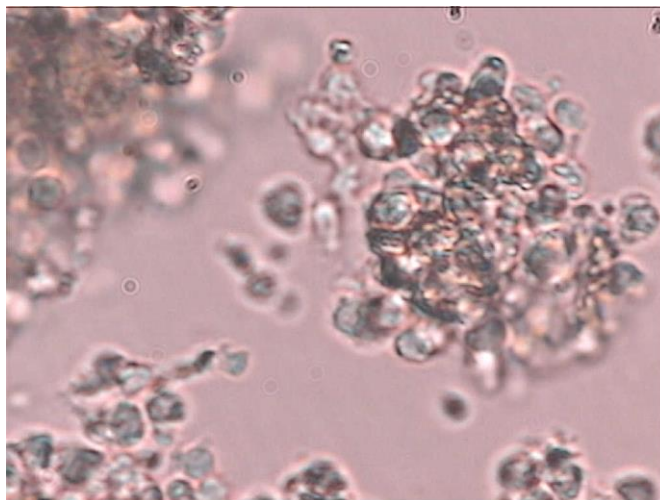
ภาพที่ 25 เซลล์ไข่สุกรที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ในอาหาร M199 ที่มี Earle's salts (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA) ที่เสริมด้วย 10% HTFBS, 2.2 mg/mL NaHCO_3 , 1 M HEPES (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA) 0.25 mM pyruvate 15 $\mu\text{g/mL}$ ที่เสริมฮอร์โมน porcine FSH 1 $\mu\text{g/mL}$ LH 1 $\mu\text{g/mL}$ estradiol และ 50 $\mu\text{g/mL}$ gentamycin sulfate ในสภาวะความชื้นสูงที่

คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ก) เซลล์ไข่สุกรที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 100 เท่า พบเซลล์ไข่สุกรรูปร่างกลมล้อมรอบด้วยโซนา เพลลลูซิดาและมีเซลล์คมูลัสที่ล้อมรอบเซลล์ไข่ 5-7 ชั้น เริ่มยืดยาวออกเพิ่มขึ้นเป็นรูปหยดน้ำตา (ข) เซลล์ไข่สุกรที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง กำลังขยาย 400 เท่า เซลล์คมูลัสยืดขยายออกจากเซลล์ไข่และเกาะติดพื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยง 60-70 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าเซลล์ไข่ไม่มีการเจริญพัฒนาจากการยืดขยายของเซลล์คมูลัส

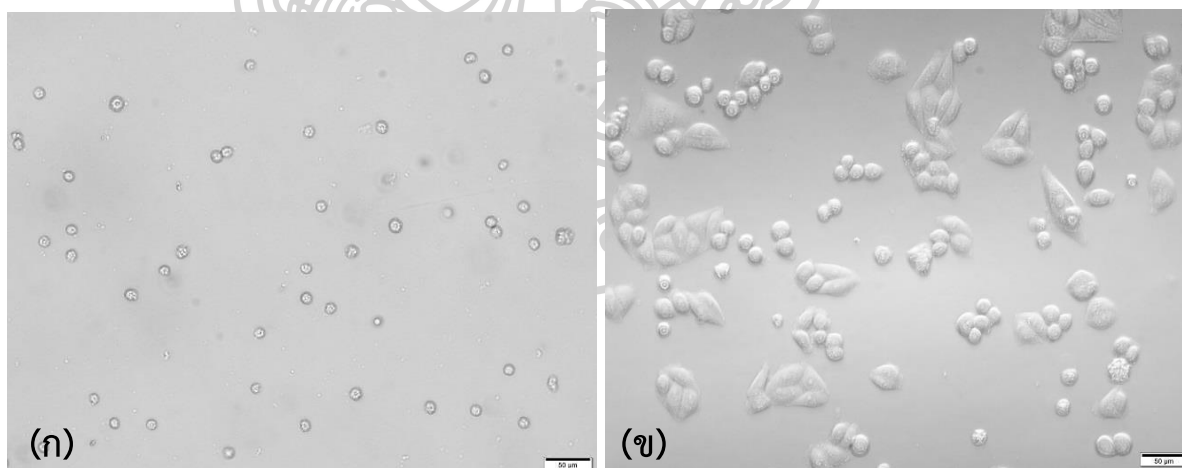
ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาและการเก็บสารที่เซลล์หลั่งสู่อาหารเพาะเลี้ยง

การศึกษาสัณฐานวิทยาเซลล์แกรนูโลซาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาสุกรในอาหารเพาะเลี้ยง M199 เสริมด้วย 10% HTFBS, 15 $\mu\text{g/mL}$ NaHCO_3 , 0.25 mM pyruvate, 50 $\mu\text{g/mL}$ gentamycin sulfate เวลา 0, 24, 48, 72, 96, 120 และ 144 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เสริมด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ในความชื้นสูง เวลาเริ่มต้น 0 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีลักษณะรูปร่างกลม ไม่มีซีเลีย ดังภาพที่ 26 นอกจากนั้นพบเซลล์ลอยอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง เซลล์ไม่ยึดเกาะพื้นผิวภาชนะที่เพาะเลี้ยง พบได้ทั้งเซลล์เดี่ยวๆ (single cell) และพบเซลล์ที่เกาะกลุ่มรวมกัน (cluster cells) เซลล์แกรนูโลซามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 6.4 ± 19.41 ไมโครเมตร ดังภาพที่ 27 (ก) หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบลักษณะของเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่ที่มีรูปร่างกลม จะขยายตัวแผ่ออกจากชั้นโซนา เพลลลูซิดา เริ่มยึดเกาะพื้นผิว 50 เปอร์เซ็นต์ โดยพบลักษณะเซลล์มีการแผ่ตัวขยายยืดยาวรูปกระสวย (fusiform shape) จากนั้นนำมาวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบแผ่ขยายออกเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการเริ่มต้นในเวลาเพาะเลี้ยง 0 ชั่วโมง พบว่ามีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 37.0 ± 13.03 ไมโครเมตร ดังภาพที่ 26 (ข)



ภาพที่ 26 เซลล์แกรนูโลซาสุกรที่เริ่มเพาะเลี้ยง 0 ชั่วโมง

ในอาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NaHCO_3 , 0.25 มิลลิเมตร pyruvate, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin sulfate บ่มในตู้บ่มความชื้นที่คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะความชื้นสูง พบเซลล์รูปร่างกลม ไม่มีซิเลีย

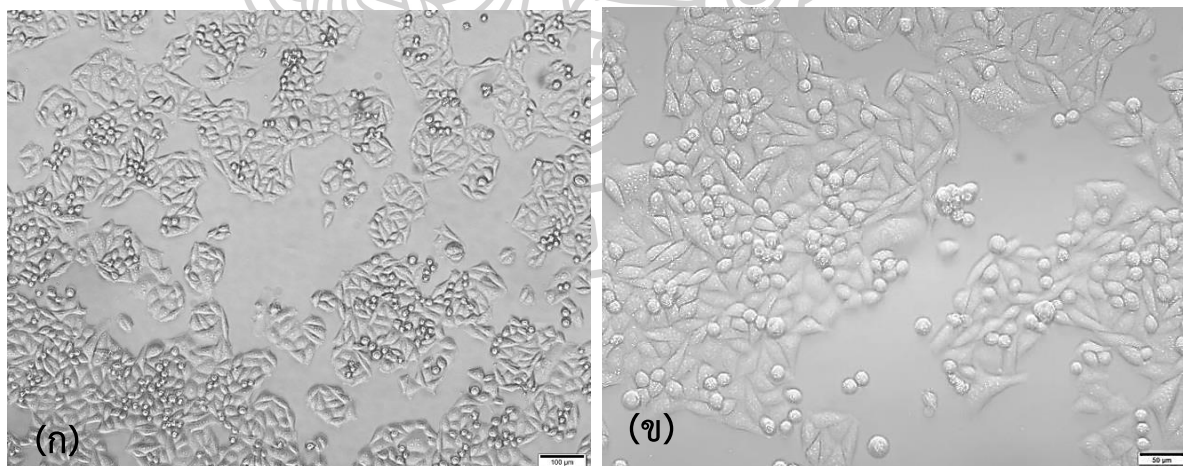


ภาพที่ 27 เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์แกรนูโลซาในการเพาะเลี้ยงที่ 0 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง

(ก) แสดงเซลล์แกรนูโลซาเมื่อเริ่มเพาะเลี้ยง 0 ชั่วโมง ในอาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NaHCO_3 , 0.25 mM pyruvate, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin sulfate โดยเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เสริมด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ใน

ความชื้นสูง พบว่าเซลล์มีลักษณะรูปร่างกลม ลอยอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงยังไม่ยึดเกาะพื้นผิวภาชนะที่เพาะเลี้ยง (ข) แสดงเซลล์แกรนูโลซาที่เพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง พบลักษณะเซลล์มีการแผ่ขยายยึดยาว รูปร่างสวย (fusiform shape) พบว่าเซลล์แกรนูโลซาเริ่มยึดเกาะพื้นผิว 50 เปอร์เซ็นต์ มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 37.0 ± 13.03 ไมโครเมตร และเซลล์ยังมีรูปร่างเป็นทรงกลมยึดเกาะกับพื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยงอยู่

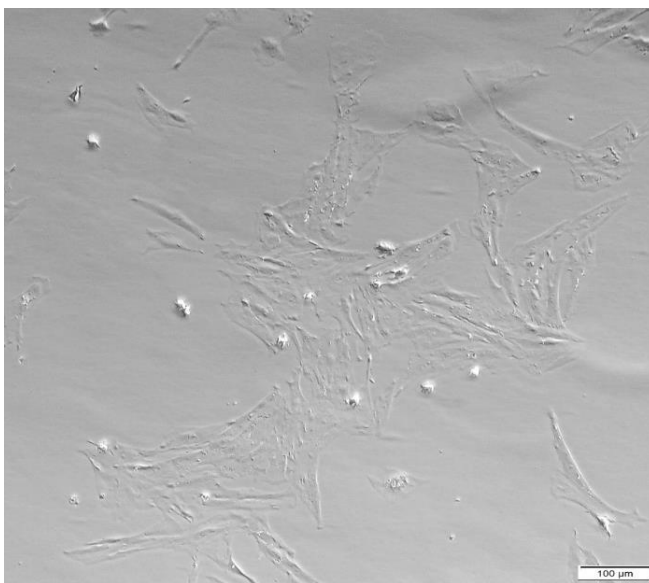
เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในอาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS, $15 \mu\text{g/mL}$ NaHCO_3 , 0.25 mM pyruvate, $50 \mu\text{g/mL}$ gentamycin sulfate โดยเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เสริมด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ในความชื้นสูง พบว่าเซลล์แกรนูโลซามีการยึดเกาะที่พื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยงประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ โดยพบลักษณะเซลล์มีการแผ่ขยายยึดยาวเพิ่มขึ้น มีขนาดความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 52.85 ± 9.68 ไมโครเมตร และบางเซลล์ยังมีรูปร่างเป็นทรงกลมยึดเกาะกระจายทั่วพื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยง ดังภาพที่ 28 เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 72 ชั่วโมง พบว่าเซลล์แกรนูโลซามีการยึดเกาะที่พื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยงประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ โดยพบลักษณะเซลล์มีการแผ่ขยายยึดยาวเพิ่มขึ้น มีขนาดความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 79.9 ± 6.58 ไมโครเมตร และบางเซลล์ยังมีรูปร่างเป็นทรงกลมยึดเกาะกระจายทั่วพื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยงพบเซลล์กลมน้อยลง ดังภาพที่ 28



ภาพที่ 28 ภาพเซลล์แกรนูโลซาที่เพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง

ในอาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS, $15 \mu\text{g/mL}$ NaHCO_3 , 0.25 mM pyruvate, $50 \mu\text{g/mL}$ gentamycin sulfate โดยเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เสริมด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ในความชื้นสูง (ก) แสดงเซลล์แกรนูโลซาที่กำลังขยาย 100 เท่า

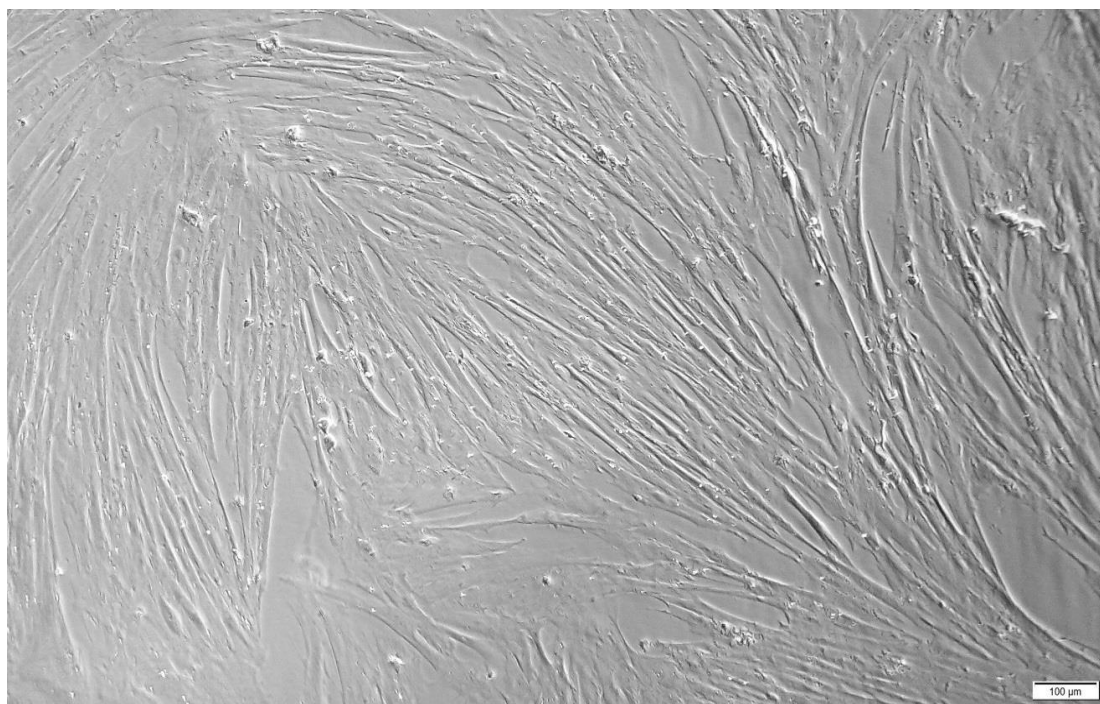
และ (ข) แสดงเซลล์แกรนูโลซาที่กำลังขยาย 50 เท่า พบว่าเซลล์แกรนูโลซามีการยึดเกาะที่พื้นผิวขวดเพาะเลี้ยงประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ โดยพบลักษณะเซลล์มีการแผ่ขยายยึดยาวเพิ่มขึ้น และบางเซลล์ยังมีรูปร่างเป็นทรงกลมยึดเกาะกระจายทั่วพื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยง มีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 52.85 ± 9.68 ไมโครเมตร



ภาพที่ 29 ภาพเซลล์แกรนูโลซาที่เพาะเลี้ยงนาน 72 ชั่วโมง

ในอาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NaHCO_3 , 0.25 mM pyruvate, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin sulfate โดยเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เสริมด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ในความชื้นสูง พบว่าเซลล์แกรนูโลซามีการยึดเกาะที่พื้นผิวขวดเพาะเลี้ยงประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ โดยพบลักษณะเซลล์มีการแผ่ขยายยึดยาวเพิ่มขึ้นโดยส่วนที่ยึดยาวออกมาลักษณะหัวแหลมท้ายแหลม พบเซลล์กลมน้อยลง มีขนาดความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 79.9 ± 6.58 ไมโครเมตร

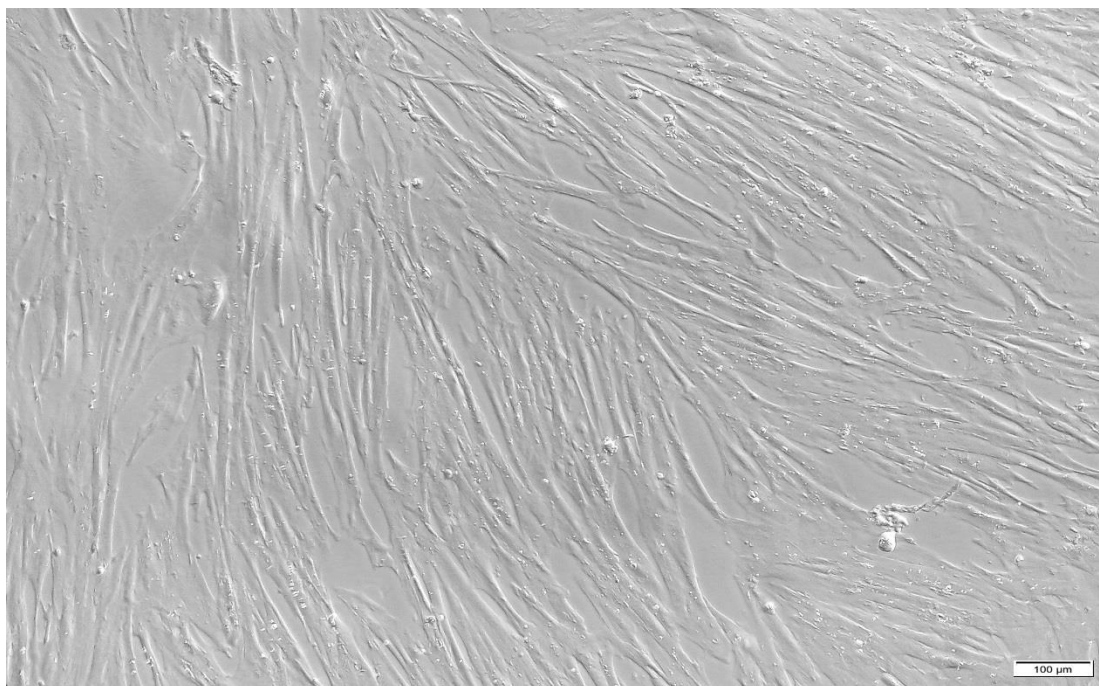
เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาในเวลา 96 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเซลล์ M199 เสริมด้วย 10% HTFBS, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NaHCO_3 , 0.25 mM pyruvate, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin sulfate โดยเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เสริมด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ในความชื้นสูง พบว่าเซลล์มีการยึดเกาะที่พื้นผิวของภาชนะเลี้ยงเซลล์ทั้งหมด การยึดยาวของเซลล์เพิ่มมากขึ้นจนมีรูปร่างแบบไฟโบรบลาส (fibroblast) ที่มีลักษณะแหลมหัวท้ายขึ้น โดยเซลล์ยึดยาวมากขึ้นถึง 90 เปอร์เซ็นต์ เซลล์มีการแผ่ขยายจนเกือบเต็มพื้นที่ มีขนาดความยาว 129.87 ± 23.51 ไมโครเมตร ดังภาพที่ 30



ภาพที่ 30 ภาพเซลล์แกรนูโลซาที่เพาะเลี้ยงนาน 96 ชั่วโมง

ในอาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NaHCO_3 , 0.25 mM pyruvate, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin sulfate โดยเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เสริมด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ในความชื้นสูง พบว่าเซลล์แกรนูโลซามีการยึดเกาะที่พื้นผิวของภาชนะเลี้ยงเซลล์ทั้งหมด การยึดยาวของเซลล์เพิ่มมากขึ้นจนมีรูปร่างแบบไฟโบรบลาสต์ ที่มีลักษณะหัวท้ายแหลม มีขนาดความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 153.91 ± 21.99 ไมโครเมตร

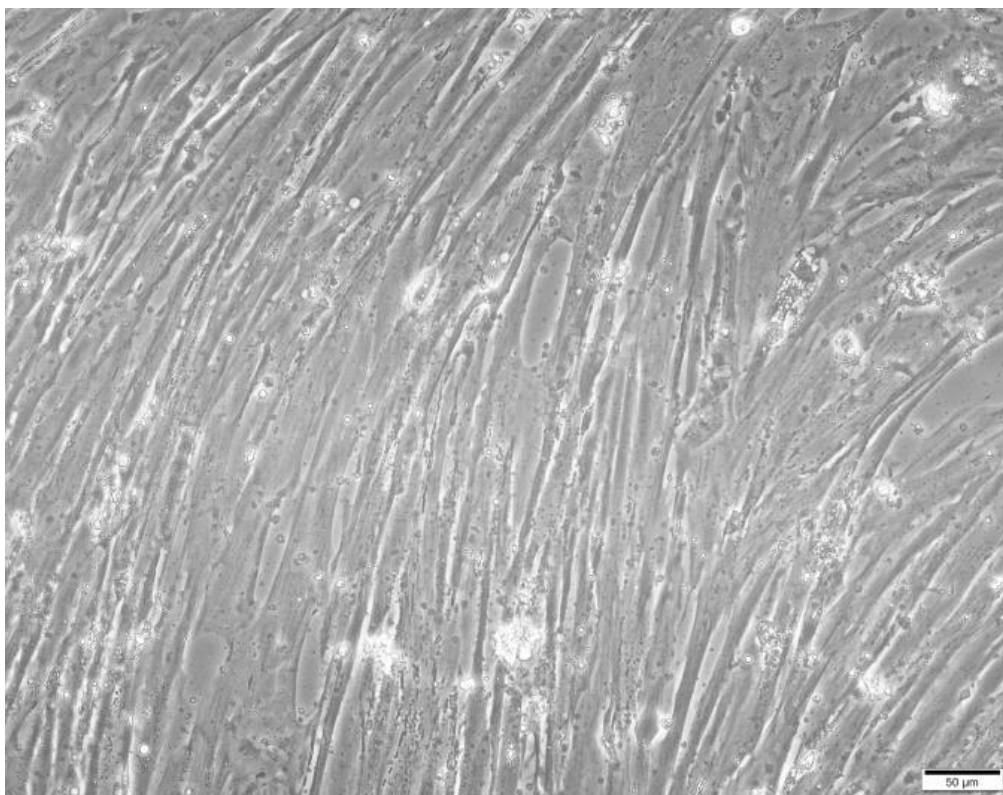
เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซานาน 120 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเซลล์ M199 เสริมด้วย 10% HTFBS, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NaHCO_3 , 0.25 mM pyruvate, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin sulfate โดยเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เสริมด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ในความชื้นสูง พบว่าเซลล์แกรนูโลซามีการแผ่ขยายยึดยาวเพิ่มขึ้น เซลล์แกรนูโลซามีการยึดเกาะที่พื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยงกันอย่างหนาแน่นประมาณ 80-90 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 153.91 ± 21.99 ไมโครเมตร ดังภาพที่ 31



ภาพที่ 31 ภาพเซลล์แกรนูโลซาที่เพาะเลี้ยงนาน 120 ชั่วโมง

ในอาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NaHCO_3 , 0.25 mM pyruvate, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin sulfate โดยเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เสริมด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ในความชื้นสูง พบว่าเซลล์มีการแผ่ขยายยืดยาวเพิ่มขึ้นเซลล์แกรนูโลซามีการยึดเกาะที่พื้นผิวขวดเพาะเลี้ยงกันอย่างหนาแน่นประมาณ 80-90 เปอร์เซ็นต์ มีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 153.91 ± 21.99 ไมโครเมตร

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซานาน 144 ชั่วโมง ในอาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NaHCO_3 , 0.25 mM pyruvate, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin sulfate โดยเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เสริมด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ในความชื้นสูง พบว่าเซลล์แกรนูโลซาสุกมีลักษณะยืดยาวมากขึ้นเป็นรูปกระสวย (fusiform shape) เซลล์แกรนูโลซาสุกมีการยึดเกาะติดที่พื้นผิวจานเพาะเลี้ยงกันอย่างหนาแน่นประมาณ 90-100 เปอร์เซ็นต์ ขนาดของเซลล์มีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 165.45 ± 13.25 ไมโครเมตร ดังภาพที่ 32



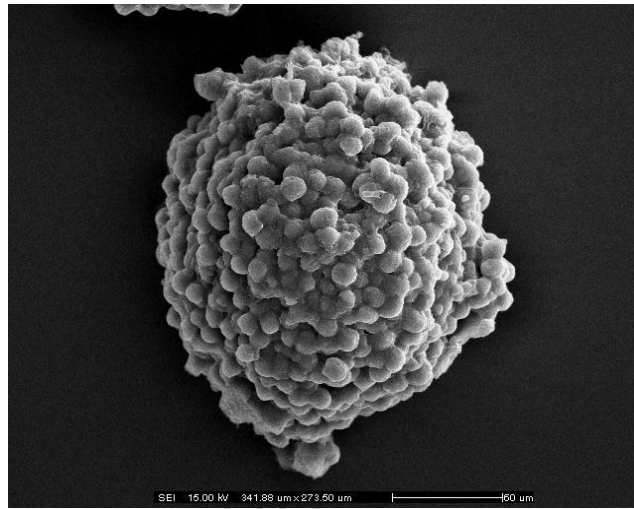
ภาพที่ 32 ภาพเซลล์แกรนูโลซาที่เพาะเลี้ยงนาน 144 ชั่วโมง

ในอาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NaHCO_3 , 0.25 mM pyruvate, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin sulfate โดยเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เสริมด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ในความชื้นสูง พบว่าลักษณะเซลล์แกรนูโลซามีการแผ่ขยายยึดยาวเพิ่มขึ้น เซลล์แกรนูโลซามีการยึดเกาะที่พื้นผิวขวดเพาะเลี้ยงกันอย่างหนาแน่น 100 เปอร์เซ็นต์ มีความยาว 165.45 ± 13.25 ไมโครเมตร

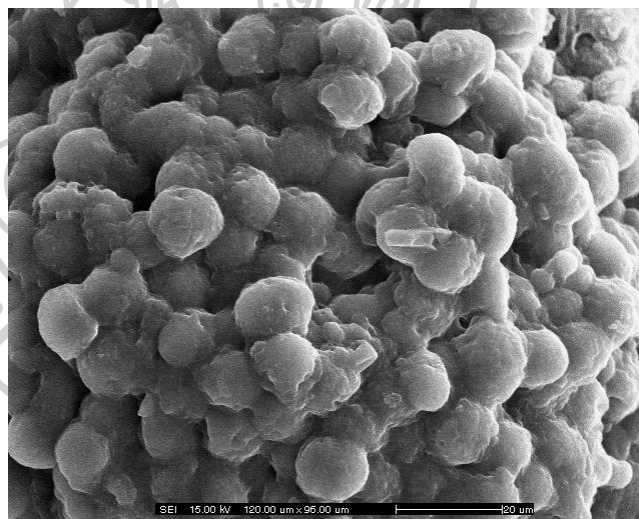
สัณฐานวิทยาของเซลล์ไข่และเซลล์แกรนูโลซาสุกรที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

สัณฐานวิทยาของเซลล์ไข่

ผลการศึกษาเซลล์ไข่ที่มีเซลล์คูมูลัสล้อมรอบแบบติดแน่นก่อนการเพาะเลี้ยง ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าเซลล์คูมูลัสล้อมรอบซ้อนติดแน่นจำนวนมาก โดยเซลล์มีลักษณะกลมและเซลล์มีขนาด 5 ไมโครเมตร ดังภาพที่ 33 และ ภาพที่ 34



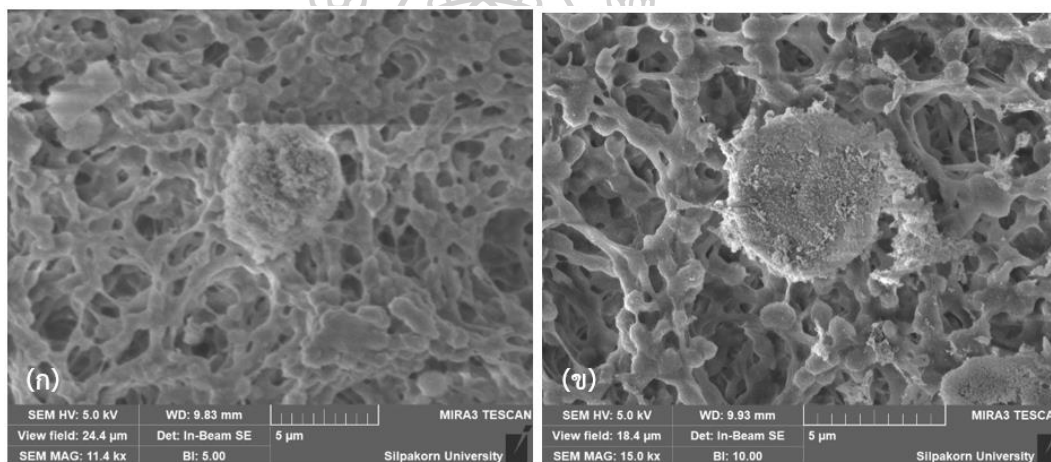
ภาพที่ 33 ภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดของเซลล์ไข่ที่มีเซลล์คูมูลัสล้อมรอบแบบติดแน่น ก่อนการเพาะเลี้ยง



ภาพที่ 34 ภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด แสดงภาพขยายเซลล์คูมูลัสที่ล้อมรอบเซลล์ไข่มีลักษณะค่อนข้างกลมซ้อนติดแน่น

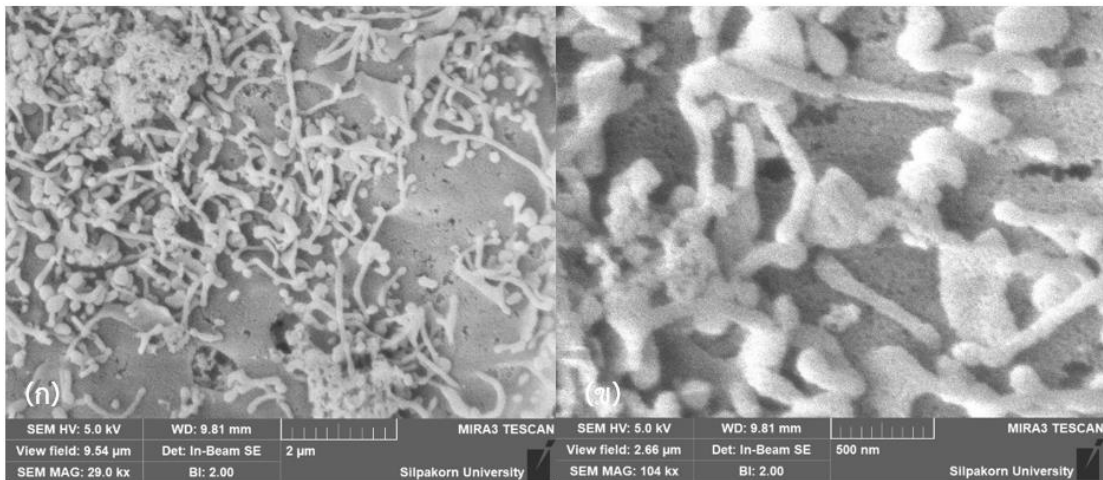
เซลล์แกรนูโลซาสุกร

การเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาสุกรมาเพาะเลี้ยง ในอาหาร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NaHCO_3 , 0.25 mM pyruvate, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin sulfate นาน 0, 24, 48, 72, 96 120, 144 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เสริมด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ในความชื้นสูง พบว่าเซลล์แกรนูโลซาที่เพาะเลี้ยง 0 ชั่วโมง มีขนาด 5 ไมโครเมตร ลักษณะรูปร่างกลม ไม่มีซิเลีย ดังภาพที่ 35 เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยายสูงขึ้น แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์แกรนูโลซาสุกรและพบไมโครวิลไล (microvilli) มีขนาด 1-2 ไมโครเมตร ดังภาพที่ 36 จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เซลล์แกรนูโลซาสุกรมีรูปร่างยืดยาว เป็นรูปหยดน้ำตา (tear drop) ดังภาพที่ 35

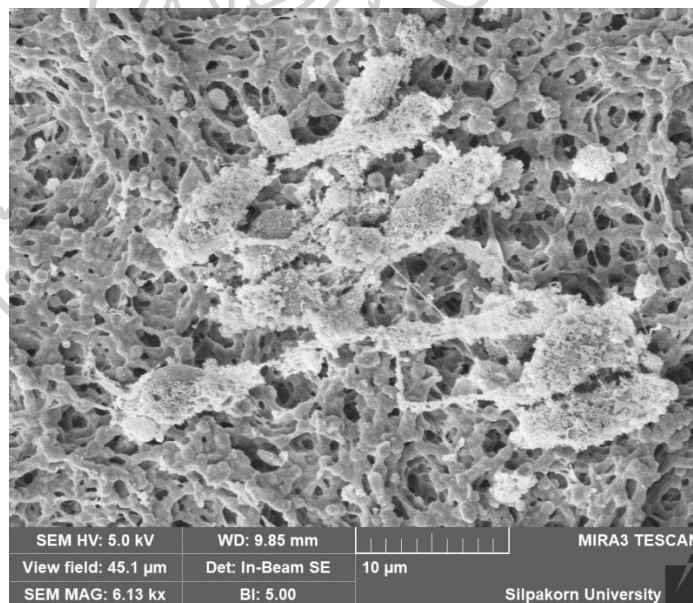


ภาพที่ 35 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงเซลล์แกรนูโลซาเพาะเลี้ยงเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมง

ในอาหารเพาะเลี้ยง M199 เสริมด้วย 10% HTFBS, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NaHCO_3 , 0.25 mM pyruvate, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin sulfate โดยเพาะเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เสริมด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ในความชื้นสูง พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาเซลล์แกรนูโลซาสุกรเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างกลม ผิวเซลล์ไม่เรียบ ไม่มีซิเลียและไม่พบไมโครวิลไล



ภาพที่ 36 (ก) และ (ข) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่กำลังขยายสูงขึ้น แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์แกรนูโลซาสุกร พบผิวเซลล์แกรนูโลซาสุกรมีลักษณะเป็นไมโครวิลไล

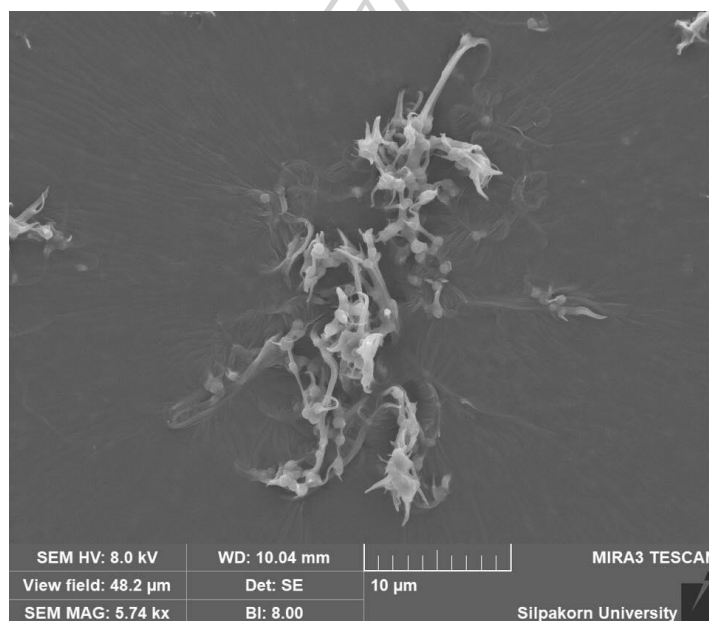


ภาพที่ 37 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์แกรนูโลซาสุกรที่เพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง

ในอาหารสูตร M 199 ที่เสริมด้วย 10% HTFBS, 15 $\mu\text{g/mL}$ NaHCO_3 , 0.25 มิลลิเมตร pyruvate, 50 $\mu\text{g/mL}$ gentamycin sulfate ในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เสริม 5

เปอร์เซ็นต์ แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และมีความชื้นสูง พบเซลล์แกรนูโลซาสุกรมี่ลักษณะรูปร่างยืดยาวรูปหยดน้ำตา

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์แกรนูโลซาที่เพาะเลี้ยงนาน 72 ชั่วโมง ในอาหารสูตร M199 เสริมด้วย 10% HTFBS, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NaHCO_3 , 0.25 มิลลิเมตร pyruvate 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin sulfate ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เสริมด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ และความชื้นสูง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าเซลล์มีลักษณะรูปร่างเรียวยาวหัวแหลมท้ายแหลมรูปกระสวย (fusiform shape) และเซลล์พบสานกันเป็นร่างแห ดังภาพที่ 38

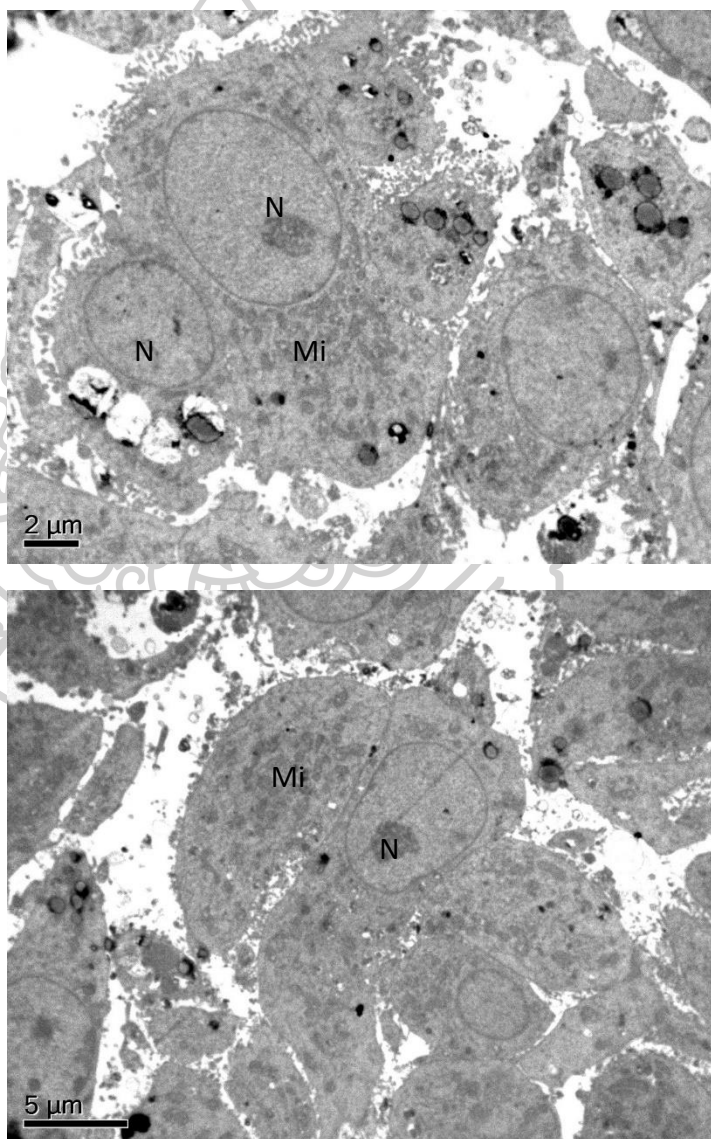


ภาพที่ 38 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์แกรนูโลซาที่เพาะเลี้ยงนาน 72 ชั่วโมง

ในอาหารสูตร M 199 ที่เสริมด้วย 10% HTFBS, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NaHCO_3 , 0.25 มิลลิเมตร pyruvate, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin sulfate ในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เสริมด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ และมีความชื้นสูง พบเซลล์แกรนูโลซา รูปร่างเรียวยาวหัวแหลมท้ายแหลมรูปกระสวย และเซลล์สานกันเป็นร่างแห

ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์เซลล์แกรนูโลซาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เซลล์แกรนูโลซาจำนวนมากที่ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านแสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในช่วงเริ่มต้น 0 ชั่วโมง ในอาหารสูตร M 199 ที่เสริมด้วย 10% HTFBS, 15 $\mu\text{g/mL}$ NaHCO_3 , 0.25 มิลลิเมตร pyruvate, 50 $\mu\text{g/mL}$ gentamycin sulfate ในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เสริม 5 เปอร์เซ็นต์ แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และมีความชื้นสูง พบเซลล์แกรนูโลซามีรูปร่างกลม มีนิวเคลียสภายใน ที่ไซโตพลาสซึมพบไมโทคอนเดรียจำนวนมาก ด้านขอบไซโตพลาสซึมของเซลล์แกรนูโลซามีไมโครวิลไลจำนวนมากยื่นสัมผัสกับเซลล์ข้างเคียงเพื่อสื่อสารระหว่างเซลล์ ดังภาพที่ 39

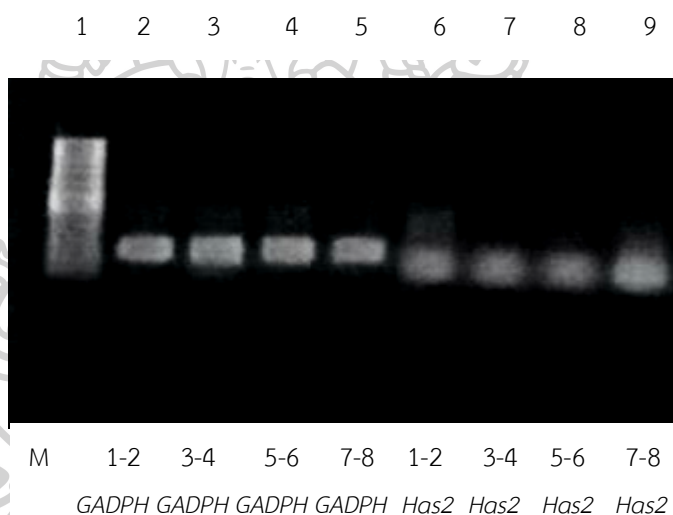


ภาพที่ 39 จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านแสดงเซลล์กลุ่มที่เพาะเลี้ยงในช่วงเริ่มต้น 0 ชั่วโมง

ในอาหารสูตร M 199 ที่เสริมด้วย 10% HTFBS, 15 $\mu\text{g/mL}$ NaHCO_3 , 0.25 มิลลิเมตร pyruvate, 50 $\mu\text{g/mL}$ gentamycin sulfate ในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เสริม 5 เปอร์เซ็นต์ แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และมีความชื้นสูง พบเซลล์แกรนูโลซามีรูปร่างกลม มีนิวเคลียส นิวเคลียส (Nucleus: N) ภายใน ที่ไซโตพลาสซึมพบไมโทคอนเดรีย (Mitochondria: Mi) ด้านขอบไซโตพลาสซึมของเซลล์แกรนูโลซามีไมโครวิลไลจำนวนมากยื่นสัมผัสกับเซลล์ข้างเคียง

ศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนของน้ำในถุงไข่สดและสารที่เซลล์แกรนูโลซาหลังสู้อาหารเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

ผลศึกษาการแสดงออกของยีนไฮยาลูโรแนนซินเทส 2 (Hyaluronan synthase 2; *Has2*) ของน้ำในถุงไข่สด ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสแบบย้อนกลับ (RT-PCR) ดังภาพที่ 40



ภาพที่ 40 ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนไฮยาลูโรแนนซินเทส (Hyaluronansynthase 2: *Has2*).

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder)

ช่องที่ 2 ถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร และไพรเมอร์ *GADPH* พบดีเอ็นเอขนาด 207 คู่เบส

ช่องที่ 3 ถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร และไพรเมอร์ *GADPH* พบดีเอ็นเอขนาด 207 คู่เบส

ช่องที่ 4 ถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร และไพรเมอร์ *GADPH* พบดีเอ็นเอขนาด 207 คู่เบส

ช่องที่ 5 ของถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7-8 มิลลิเมตร และไพรเมอร์ *GAPDH* พบดีเอ็นเอขนาด 207 คู่เบส

ช่องที่ 6 ถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร และไพรเมอร์ *Has2* พบดีเอ็นเอขนาด 199 คู่เบส

ช่องที่ 7 ถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร และไพรเมอร์ *Has2* พบดีเอ็นเอขนาด 199 คู่เบส

ช่องที่ 8 ถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร และไพรเมอร์ *Has2* พบดีเอ็นเอขนาด 199 คู่เบส

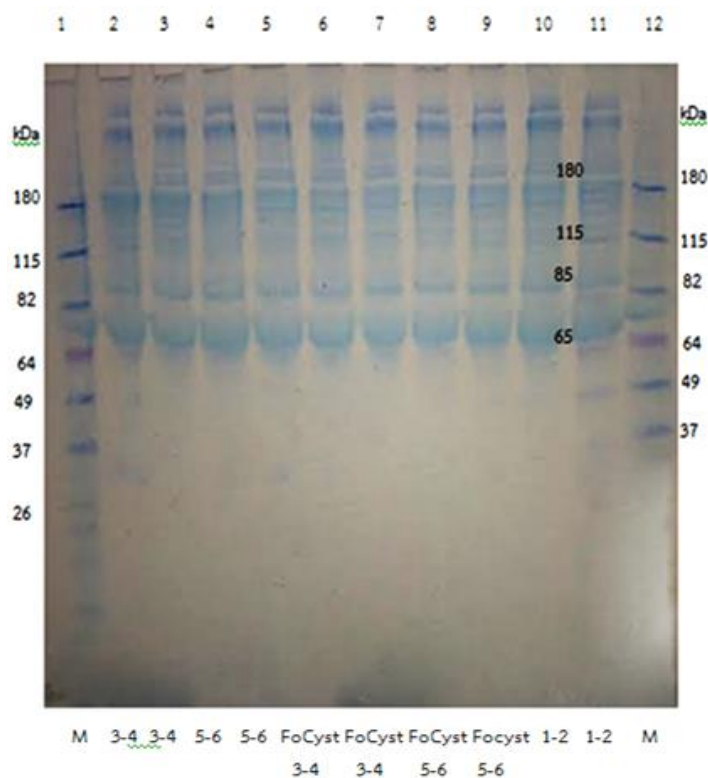
ช่องที่ 9 ถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7-8 มิลลิเมตร และไพรเมอร์ *Has2* พบดีเอ็นเอขนาด 199 คู่เบส

จากภาพที่ 40 การศึกษาการแสดงออกของยีนไฮยาลูโรแนนซินเทส 2 (Hyaluronan synthase 2: *Has2*) ของน้ำในถุงไข่สุกในระยะฟอลลิคูล่าในถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2, 3-4, 5-6 และ 7-8 มิลลิเมตร ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแบบย้อนกลับ (RT-PCR) พบว่ามีการแสดงออกของ ยีนไฮยาลูโรแนนซินเทส 2 (*Has2*) ที่ขนาด 199 คู่เบสและ *GAPDH* ที่ขนาด 207 คู่เบส

3.2 เทคนิคโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโพลีซิส

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

ผลการศึกษาการแสดงออกของน้ำในถุงไข่ด้วยเทคนิคโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโพลีซิส (SDS-PAGE) ในถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2, 3-4 5-6 มิลลิเมตร และถุงไข่ที่มีซิสต์ 50 เปอร์เซ็นต์ ของถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 และ 5-6 มิลลิเมตร พบว่ามีขนาดโปรตีน 65, 85, 115, 180 กิโลดาลตัน ดังภาพที่ 41



ภาพที่ 41 ผลการศึกษาการแสดงผลของน้ำในถุงไข่ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ในถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2, 3-4, 5-6 มิลลิเมตร และถุงไข่ที่มีซิสต์ 50 เปอร์เซ็นต์

โดยเจาะน้ำจากถุงไข่ปกติที่อยู่รังไข่เดียวกันที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 และ 5-6 มิลลิเมตร

ช่องที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน Benchmark prestain protein ladder

ช่องที่ 2 และ 3 น้ำในถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร

ช่องที่ 4 และ 5 น้ำในถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร

ช่องที่ 6 และ 7 น้ำในถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 3-4 มิลลิเมตร

ช่องที่ 8 และ 9 น้ำในถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีซิสต์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร โดย

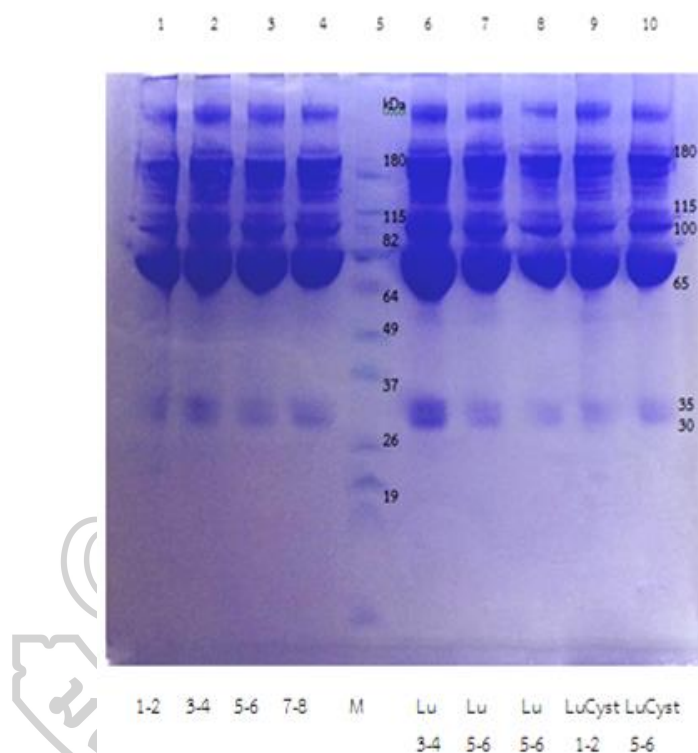
เจาะถุงไข่ปกติที่อยู่รังไข่เดียวกับซิสต์

ช่องที่ 10 และ 11 น้ำในถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร

ช่องที่ 12 โปรตีนมาตรฐาน Benchmark prestain protein ladder

หมายเหตุ: M คือ โปรตีนมาตรฐาน Benchmark prestain protein ladder FoCyst คือ ถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีซิสต์ 50 เปอร์เซ็นต์

ผลการศึกษาการแสดงออกของน้ำในถุงไข่ด้วยเทคนิคโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟลิซิส (SDS-PAGE) ในระยะฟอลลิคูลาร์ของถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2, 3-4, 5-6 และ 7-8 มิลลิเมตร และระยะลูเตียลของถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4, 5-6 มิลลิเมตร นอกจากนั้นยังศึกษาในระยะลูเตียลที่มีซิสต์ 50 เปอร์เซ็นต์ จากถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 และ 5-6 มิลลิเมตร ตามลำดับ พบว่าแถบโปรตีนที่ปรากฏเป็นแถบขนาดใหญ่ไม่สามารถแยกได้ชัดเจนมีขนาดโปรตีน 30, 35, 65, 100, 115, 180 กิโลดาลตัน ดังภาพที่ 42



ภาพที่ 42 ผลการศึกษาการแสดงออกของน้ำในถุงไข่ ในระยะฟอลลิคูลาร์ของถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2, 3-4, 5-6 และ 7-8 มิลลิเมตร และระยะลูเตียลของถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 และ 5-6 มิลลิเมตร

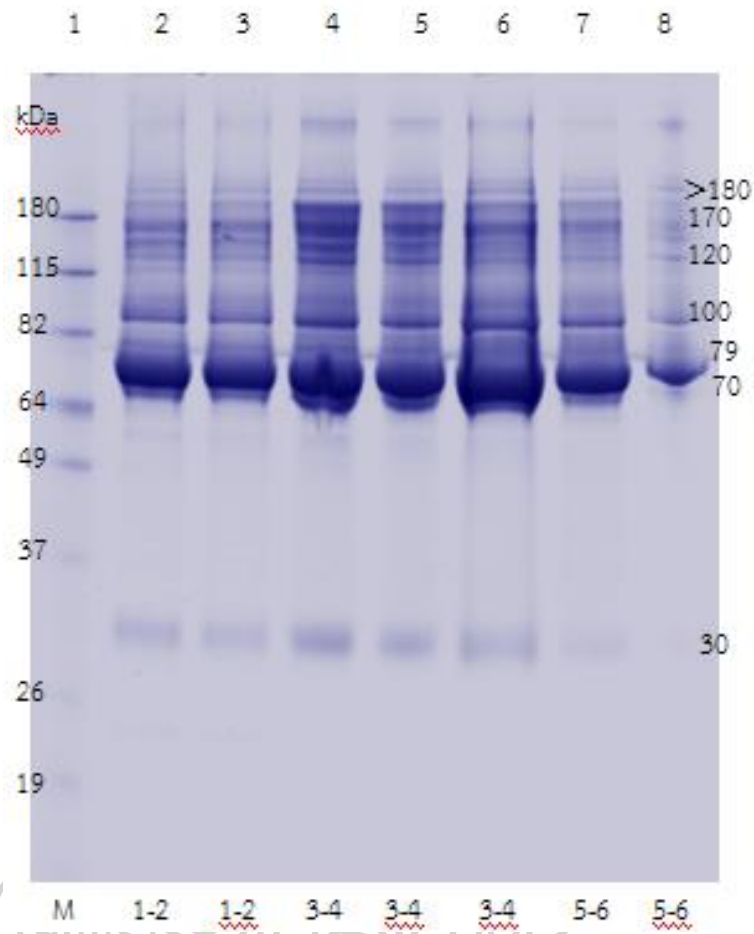
- ช่องที่ 1 ถุงไข่ระยะฟอลลิคูลาร์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร
- ช่องที่ 2 ถุงไข่ระยะฟอลลิคูลาร์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร
- ช่องที่ 3 ถุงไข่ระยะฟอลลิคูลาร์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร
- ช่องที่ 4 ถุงไข่ระยะฟอลลิคูลาร์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7-8 มิลลิเมตร
- ช่องที่ 5 โปรตีนมาตรฐาน Benchmark prestain protein ladder
- ช่องที่ 6 ของถุงไข่ระยะลูเตียลที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร
- ช่องที่ 7 ของถุงไข่ระยะลูเตียลที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร

- ช่องที่ 8 ของถุงไข่ระยะลูติเยลที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร
- ช่องที่ 9 ถุงไข่ระยะลูติเยลที่มีซิสต์ 50 เพอร์เซ็นต์ โดยเจาะถุงไข่ปกติที่อยู่ในรังไข่เดียวกับซิสต์ของถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร
- ช่องที่ 10 ระยะลูติเยลที่มีซิสต์ 50 เพอร์เซ็นต์ โดยเจาะถุงไข่ปกติที่อยู่ในรังไข่เดียวกับซิสต์ของถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร
- หมายเหตุ: M คือ โปรตีนมาตรฐาน Benchmark prestain protein ladder Lu คือ ถุงไข่ระยะลูติเยล LuCyst คือ ถุงไข่ระยะลูติเยลที่มีซิสต์ 50 เพอร์เซ็นต์

ผลการศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนจากน้ำในถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 3-4 และ 5-6 มิลลิเมตร

พบว่า มีแถบโปรตีนจางๆ น้ำหนักโมเลกุล 30 กิโลดาลตัน จากน้ำในถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร เข้มกว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 และ 5-6 มิลลิเมตร พบแถบโปรตีนเข้มน้ำหนักโมเลกุล 70 และ 79 กิโลดาลตัน จากน้ำในถุงไข่ทุกขนาด ส่วนแถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 100, 120 และ 170 กิโลดาลตัน พบว่ามีความเข้มจากน้ำในถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร มากกว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 และ 5-6 มิลลิเมตร ในขณะที่พบแถบโปรตีนจางๆ ที่มีน้ำหนักโมเลกุล มากกว่า 180 กิโลดาลตัน จากน้ำในถุงไข่ทุกขนาด คือ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2, 3-4, 5-6 มิลลิเมตร ดังภาพที่ 43





ภาพที่ 43 ผลการศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนจากน้ำในถุงไข่ระยะพอลลิคูล่าที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2, 3-4 และ 5-6 มิลลิเมตร

ช่องที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน Benchmark prestain protein ladder

ช่องที่ 2 และ 3 น้ำในถุงไข่ระยะพอลลิคูล่าที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร

ช่องที่ 4 5 และ 6 น้ำในถุงไข่ระยะพอลลิคูล่าที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร

ช่องที่ 7 และ 8 น้ำในถุงไข่ระยะพอลลิคูล่าที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร

ผลการศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนจากน้ำในถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2, 3-4, 5-6 และ 7-8 มิลลิเมตร

ผลการศึกษาและวิเคราะห์พบว่า มีแถบโปรตีนทั้งหมด คือ แถบโปรตีนจาก น้ำหนักโมเลกุล 27 กิโลดาลตัน ในถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร และ 3-4 มิลลิเมตร เข้มกว่าแถบโปรตีนจากน้ำในถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร และ 7-8 มิลลิเมตร

พบแถบโปรตีนจาก น้ำหนักโมเลกุล 30 กิโลดาลตัน จากน้ำในถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร และ 3-4 มิลลิเมตร

พบแถบโปรตีนจาก น้ำหนักโมเลกุล 40 และ 50 กิโลดาลตัน จากน้ำในถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร

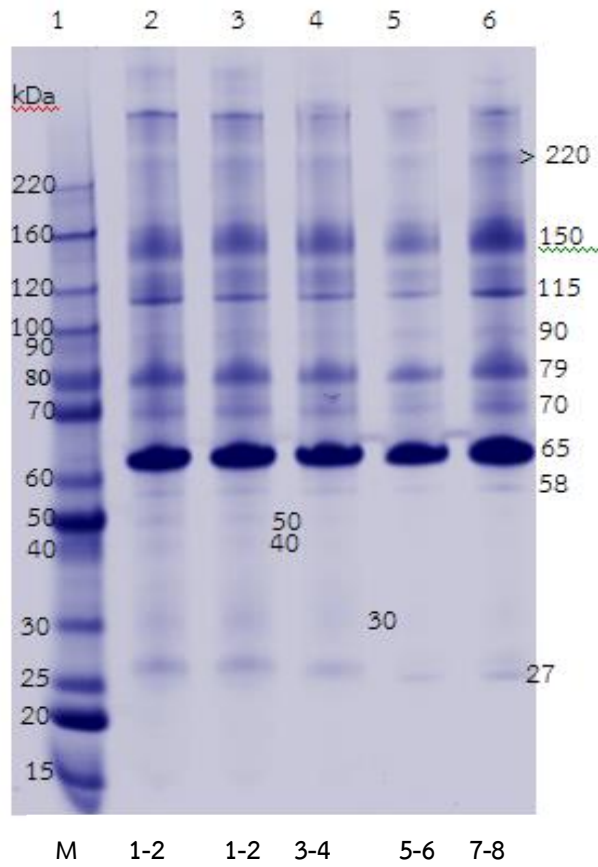
พบแถบโปรตีนจาก น้ำหนักโมเลกุล 58 และ 90 กิโลดาลตัน จากน้ำในถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2, 3-4 มิลลิเมตร และ 7-8 มิลลิเมตร ซึ่งแถบที่พบนั้น เข้มกว่าน้ำในถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร

พบแถบโปรตีนเข้ม น้ำหนักโมเลกุล 65 กิโลดาลตัน จากน้ำในถุงไข่ทุกขนาด คือขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2, 3-4, 5-6 และ 7-8 มิลลิเมตร

พบแถบโปรตีนเข้ม น้ำหนักโมเลกุล 79 และ 150 กิโลดาลตัน จากน้ำในถุงไข่ทุกขนาด

พบแถบโปรตีนจาก น้ำหนักโมเลกุล 70 กิโลดาลตัน จากน้ำในถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2, 3-4 และ 6-8 มิลลิเมตร ซึ่งแถบที่พบนั้น เข้มกว่าน้ำในถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร

พบแถบโปรตีนจาก น้ำหนักโมเลกุล 115 และมากกว่า 220 กิโลดาลตัน จากน้ำในถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2, 3-4 และ 7-8 มิลลิเมตร ซึ่งแถบที่พบนั้น เข้มกว่าน้ำในถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร ดังภาพที่ 44



ภาพที่ 44 ผลการศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนจากน้ำในถุงไข่ระยะพอลลิคูล่าที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2, 3-4, 5-6 และ 7-8 มิลลิเมตร

ช่องที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน Benchmark protein ladder

ช่องที่ 2 และ 3 น้ำในถุงไข่ระยะพอลลิคูล่าที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร

ช่องที่ 4 น้ำในถุงไข่ระยะพอลลิคูล่าที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร

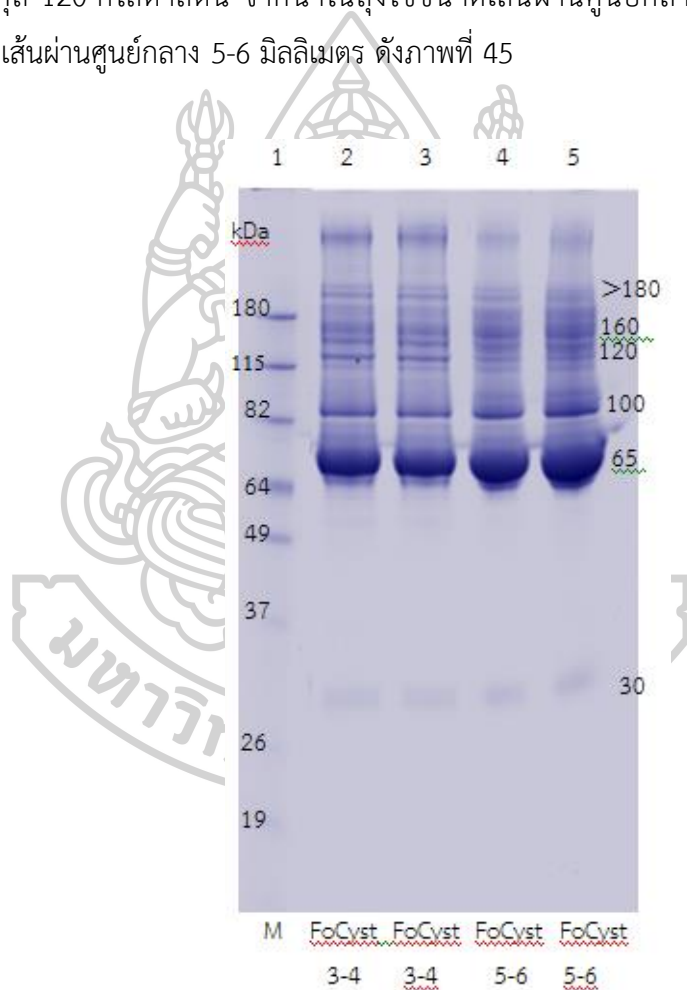
ช่องที่ 5 น้ำในถุงไข่ระยะพอลลิคูล่าที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร

ช่องที่ 6 น้ำในถุงไข่ระยะพอลลิคูล่าที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7-8 มิลลิเมตร

การศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนจากน้ำในถุงไข่ระยะฟอลลิคูลาร์ที่มีซิสต์ 50 เปอร์เซ็นต์

ผลการศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนจากน้ำในถุงไข่ระยะฟอลลิคูลาร์ที่มีซิสต์ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยเจาะน้ำจากถุงไข่ปกติที่อยู่รังไข่เดียวกับซิสต์ 50 เปอร์เซ็นต์ จากถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 และ 5-6 มิลลิเมตร พบว่ามีแถบโปรตีน คือ

พบแถบโปรตีนจางๆ น้ำหนักโมเลกุล 30 กิโลดาลตัน พบแถบโปรตีนเข้ม น้ำหนักโมเลกุล 65, 100, 160 และมากกว่า 180 กิโลดาลตัน จากการเจาะน้ำจากถุงไข่ปกติที่อยู่รังไข่เดียวกับซิสต์ 50 เปอร์เซ็นต์ จากถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 และ 5-6 มิลลิเมตร โดยพบแถบโปรตีนเข้ม น้ำหนักโมเลกุล 120 กิโลดาลตัน จากน้ำในถุงไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร สีเข้ม มากกว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร ดังภาพที่ 45



ภาพที่ 45 ผลการศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนจากน้ำในถุงไข่ระยะฟอลลิคูลาร์ที่มีซิสต์ 50 เปอร์เซ็นต์ จากถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร และ 5-6 มิลลิเมตร

ช่องที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน Benchmark prestain protein ladder

ช่องที่ 2 และ 3 น้ำในถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีซิสต์ 50 เพอร์เซ็นต์ โดยเจาะถุงไข่ปกติที่อยู่ในรังไข่เดียวกับซิสต์ 50 เพอร์เซ็นต์ จากถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร

ช่องที่ 4 และ 5 น้ำในถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีซิสต์ 50 เพอร์เซ็นต์ โดยเจาะถุงไข่ปกติที่อยู่ในรังไข่เดียวกับซิสต์ 50 เพอร์เซ็นต์ จากถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร

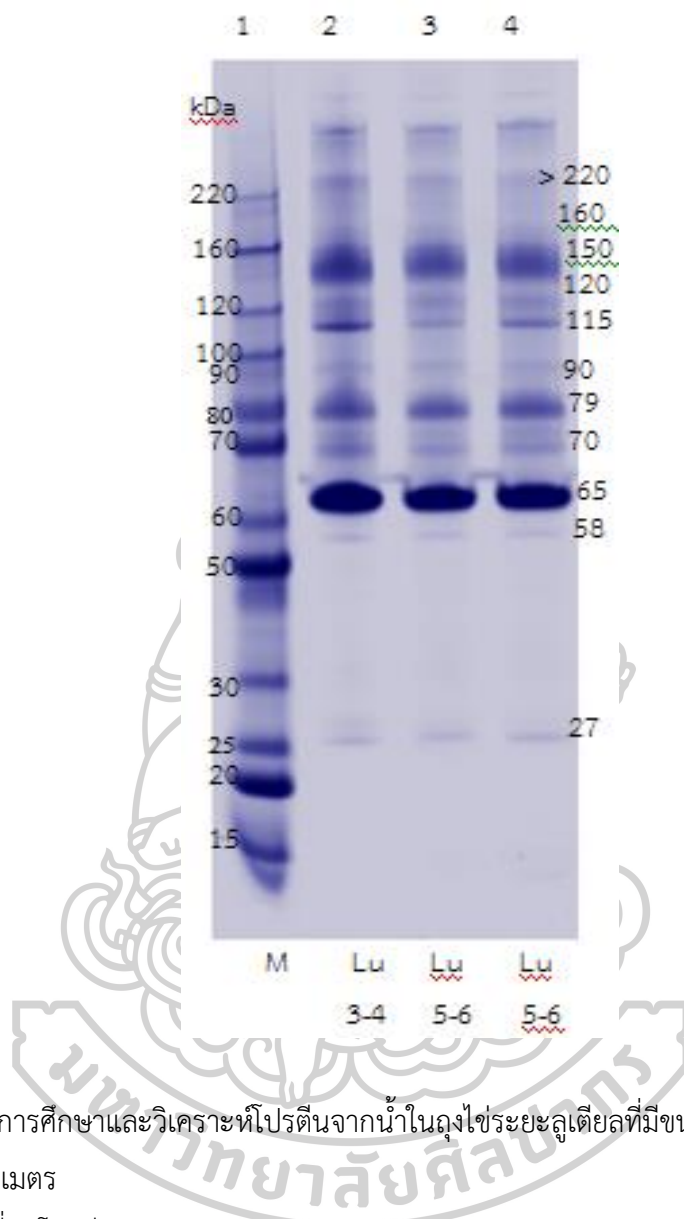
หมายเหตุ: M คือ โปรตีนมาตรฐาน Benchmark prestain protein ladder FoCyst คือ ถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีซิสต์ 50 เพอร์เซ็นต์

การศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนจากน้ำในถุงไข่ระยะลูเตียล

ผลการศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนจากน้ำในถุงไข่ระยะลูเตียลจากถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 และ 5-6 มิลลิเมตร พบว่ามีแถบโปรตีนจางๆ น้ำหนักโมเลกุล 27, 58, 90 และ 120 กิโลดาลตัน น้ำหนักโมเลกุล 65 และ 79 กิโลดาลตัน จากน้ำในถุงไข่ทุกขนาด พบแถบโปรตีน 65 เข้มที่สุด

พบแถบโปรตีนจาง น้ำหนักโมเลกุล 70 และมากกว่า 220 กิโลดาลตัน และพบแถบโปรตีนเข้มน้ำหนักโมเลกุล 150 และ 160 กิโลดาลตัน จากน้ำในถุงไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร มีสีเข้มกว่าน้ำในถุงไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร

พบแถบโปรตีนจาง น้ำหนักโมเลกุล 115 กิโลดาลตัน จากน้ำในถุงไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร มีสีเข้มกว่าน้ำในถุงไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร ดังภาพที่ 46



ภาพที่ 46 ผลการศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนจากน้ำในถุงไข่ระยะลูเตียลที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4, 5-6 มิลลิเมตร

ช่องที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน Benchmark protein ladder

ช่องที่ 2 น้ำในถุงไข่ระยะลูเตียลที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร

ช่องที่ 3 และ 4 น้ำในถุงไข่ระยะลูเตียลที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร

หมายเหตุ; M คือ โปรตีนมาตรฐาน Benchmark protein ladder Lu คือ ถุงไข่ระยะลูเตียล

การศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนจากน้ำในถุงไข่ระยะลูติเยลที่มีที่มีซิสต์ 50 เพอร์เซ็นต์

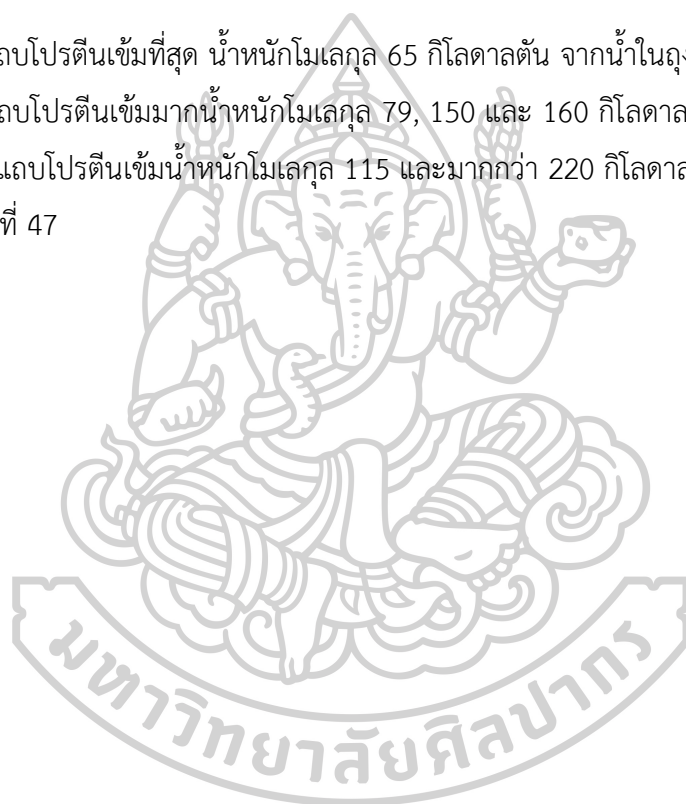
ผลการศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนจากน้ำในถุงไข่ระยะลูติเยลที่มีที่มีซิสต์ 50 เพอร์เซ็นต์ โดยเจาะน้ำจากถุงไข่ปกติที่อยู่รังไข่เดียวกันของถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 และ 5-6 มิลลิเมตร พบว่ามีแถบโปรตีนทั้งหมด คือ แถบโปรตีนจางน้ำหนักโมเลกุล 27, 70, 90, 120 และมากกว่า 220 กิโลดาลตัน

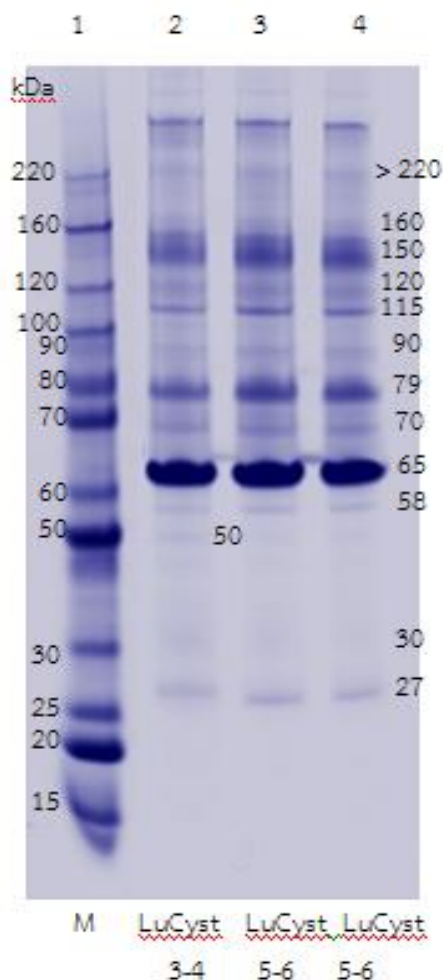
พบแถบโปรตีนจาง น้ำหนักโมเลกุล 30 และ 58 กิโลดาลตัน จากน้ำในถุงไข่ทั้ง 2 ขนาด

พบแถบโปรตีนจาง น้ำหนักโมเลกุล 50 กิโลดาลตัน จากน้ำในถุงไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร

พบแถบโปรตีนเข้มที่สุด น้ำหนักโมเลกุล 65 กิโลดาลตัน จากน้ำในถุงไข่ทั้ง 2 ขนาด

พบแถบโปรตีนเข้มมากน้ำหนักโมเลกุล 79, 150 และ 160 กิโลดาลตัน จากน้ำในถุงไข่ทั้ง 2 ขนาดและพบแถบโปรตีนเข้มน้ำหนักโมเลกุล 115 และมากกว่า 220 กิโลดาลตัน จากน้ำในถุงไข่ทั้ง 2 ขนาด ดังภาพที่ 47





ภาพที่ 47 ผลการศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนจากน้ำในถุงไข่ระยะลูเตียลที่มีซิสต์ 50 เพอร์เซ็นต์ เพอร์เซ็นต์ โดยเจาะถุงไข่ปกติที่อยู่ในรังไข่เดียวกับซิสต์ของถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 และ 5-6 มิลลิเมตร

ช่องที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน BenchMark protein ladder

ช่องที่ 2 น้ำในถุงไข่ระยะลูเตียลที่มีที่มีซิสต์ 50 เพอร์เซ็นต์ โดยเจาะถุงไข่ปกติที่อยู่ในรังไข่เดียวกับซิสต์ของถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร

ช่องที่ 3 และ 4 น้ำในถุงไข่ระยะลูเตียลที่มีที่มีซิสต์ 50 เพอร์เซ็นต์ โดยเจาะถุงไข่ปกติที่อยู่ในรังไข่เดียวกับซิสต์ของถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร

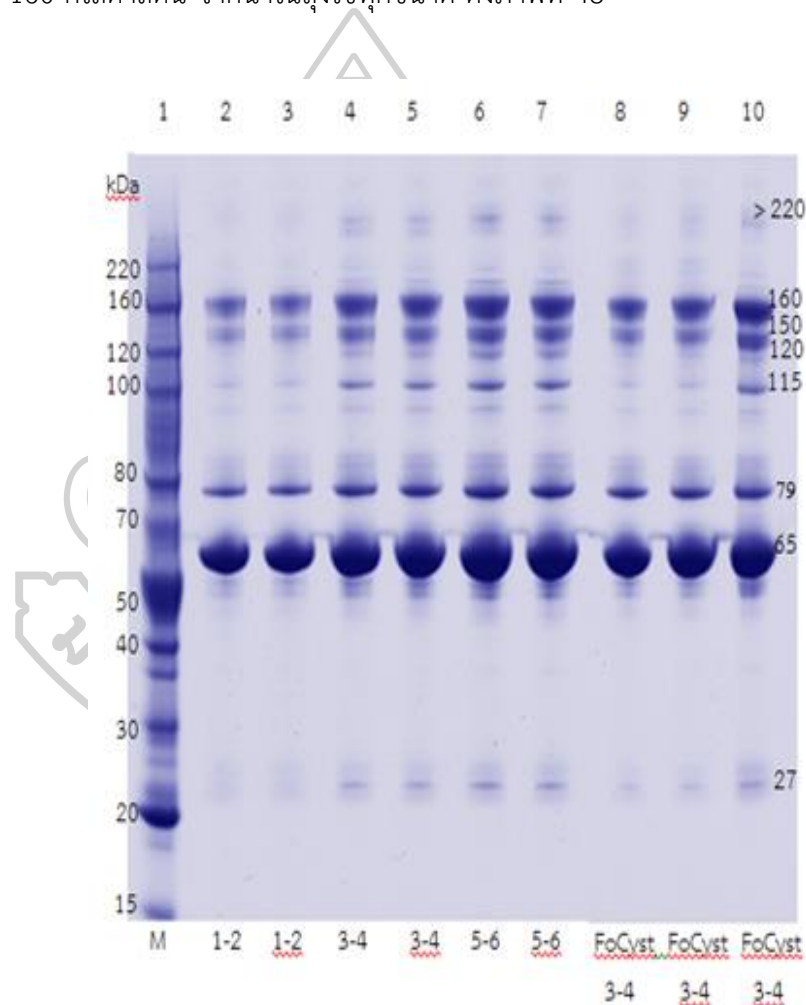
หมายเหตุ; M คือ โปรตีนมาตรฐาน Benchmark protein ladder LuCyst คือ ถุงไข่ระยะลูเตียลที่มีที่มีซิสต์ 50 เพอร์เซ็นต์

การศึกษาผลการศึกษาและวิเคราะห์น้ำในถุงไข่ที่แช่ไนต์ -80 องศาเซลเซียส

ผลการศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนจากน้ำในถุงไข่ในระยะฟอลลิคูล่าของถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2, 3-4 และ 5-6 มิลลิเมตร ถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีซิสต์ 50 เพอร์เซ็นต์ โดยเจาะ

ถุงไข่ปกติที่อยู่ในรังไข่เดียวซิสต์กับของถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร ตามลำดับ พบว่ามีแถบโปรตีนทั้งหมด คือ พบแถบโปรตีนจางๆ น้ำหนักโมเลกุล 27, 115, 120 และมากกว่า 220 กิโลดาลตัน จากน้ำในถุงไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร และถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีซิสต์ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยเจาะถุงไข่ปกติที่อยู่ในรังไข่เดียวกับซิสต์ของถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร นอกจากนี้ยังพบแถบโปรตีนเข้มข้นจากน้ำในถุงไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 และ 5-6 มิลลิเมตร

พบแถบโปรตีนเข้มที่สุด น้ำหนักโมเลกุล 65 กิโลดาลตัน และแถบโปรตีนเข้มข้นน้ำหนักโมเลกุล 79, 125 และ 160 กิโลดาลตัน จากน้ำในถุงไข่ทุกขนาด ดังภาพที่ 48



ภาพที่ 48 ผลการศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนจากน้ำในถุงไข่ในระยะฟอลลิคูล่าของถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2, 3-4 และ 5-6 มิลลิเมตร

ถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีซิสต์ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยเจาะถุงไข่ปกติที่อยู่ในรังไข่เดียวกับซิสต์ของถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร

ช่องที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน Benchmark protein ladder

ช่องที่ 2 และ 3 น้ำในถุงไข่ในระยยะฟอลลิคูล่าของถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร

ช่องที่ 4 และ 5 น้ำในถุงไข่ในระยยะฟอลลิคูล่าของถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร

ช่องที่ 6 และ 7 น้ำในถุงไข่ในระยยะฟอลลิคูล่าของถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร

ช่องที่ 8, 9 และ 10 ระยยะฟอลลิคูล่าที่มีซิสต์ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยเจาะถุงไข่ปกติที่อยู่ในรังไข่

เดียวกับซิสต์ของถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร

หมายเหตุ: M คือ โปรตีนมาตรฐาน Benchmark protein ladder Cyst คือ ถุงไข่ระยยะลูเตียลที่มีซิสต์ 50 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาแถบโปรตีนทั้งในระยยะฟอลลิคูล่า ระยยะฟอลลิคูล่าที่มีซิสต์ 50 เปอร์เซ็นต์ ระยยะลูเตียลและระยยะลูเตียลที่มีซิสต์ 50 เปอร์เซ็นต์ ของถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดต่างๆ สรุปรูปได้ดังตารางที่ 8 และ 9

ตารางที่ 8 สรุบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่พบจากน้ำในถุงไข่สุกรระยยะฟอลลิคูล่า

1-2 มม.	3-4 มม.	5-6 มม.	7-8 มม.	เอกสารอ้างอิง
27	27	27		วรรณา, 2552
30	30	30	30	Besnard และคณะ, 1997; และ Ducolomb และคณะ, 2013
35	35	35	35	Duolomb และคณะ, 2013
50				
58	58	58	58	Duolomb และคณะ, 2013
65	65	65	65	Duolomb และคณะ, 2013
70	70	70	70	Gupta และคณะ, 1996 และ Duolomb และคณะ, 2013
79	79	79	79	
85	85	85		Duolomb และคณะ, 2013

1-2 มม.	3-4 มม.	5-6 มม.	7-8 มม.	เอกสารอ้างอิง
90	90	90		
100	100	100	100	Kiczak และคณะ, 2013
115	115	115	115	
120	120	120		Nagyova, 20
150	150	150	150	
180	180	180	180	
>180	>180	>180		
>220	>220	>220	>220	วรรณ, 2552
3-4 มม. ที่มีซิสต์		5-6 มม. ที่มีซิสต์		เอกสารอ้างอิง
30		30		Besnard และคณะ, 1997; และ Ducolomb และคณะ, 2013
65		65		Duclomb และคณะ, 2013
85		85		
100		100		Duclomb และคณะ, 2013
120		120		Nagyova, 2018
160		160		
>180		>180		

ตารางที่ 9 สรุบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่พบจากของเหลวในระยะลูติเยลของงูไข่สุกร

3-4 มม.	5-6 มม.	5-6 มม.	1-2 มม.	5-6 มม.	เอกสารอ้างอิง
			ที่มีซิสต์	ที่มีซิสต์	
27	27	27	27	27	วรรณ, 2552
			30	30	Besnard และคณะ,1997 และ Ducolomb และคณะ, 2013
			50		Ducolomb และคณะ, 2013
			58	58	Ducolomb และคณะ, 2013
65	65	65	65	65	Ducolomb และคณะ, 2013
70	70	70	70	70	Gupta และคณะ, 1996 และ Ducolomb และคณะ, 2013
79	79	79	79	79	Ducolomb และคณะ, 2013
			90	90	Ducolomb และคณะ, 2013
100	100	100			Kiczak และคณะ, 2013
115	115	115	115	115	Nagyova, 2018
120	120	120	120	120	
150	150	150	150	150	
160	160	160	160	160	
>220	>220	>220			

ผลการศึกษาและวิเคราะห์พบว่าน้ำในถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าขนาดเล็กมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร พบแถบโปรตีน คือ 27, 30, 35, 40, 50, 58, 65, 70, 79, 85, 90, 100, 115, 120, 150, 170, 180, >180 และ >220 กิโลดาลตัน น้ำในถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีขนาดกลาง แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ถุงไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร พบแถบโปรตีน คือ 27, 30, 35, 58, 65, 70, 79, 85, 90, 100, 115, 120, 150, 170, 180, >180 และ >220 กิโลดาลตัน และถุงไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร พบแถบโปรตีน คือ 27, 30, 35, 58, 65, 70, 79, 85, 90, 100, 115, 120, 150, 170, 180, >180 และ >220 กิโลดาลตัน น้ำในถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าขนาดใหญ่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7-8 มิลลิเมตร พบแถบโปรตีน คือ 30, 35, 58, 65, 70, 79, 90, 100, 115, 150, 180 และ >220 กิโลดาลตัน การศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนจากน้ำในถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีซิสต์ 50 เพอร์เซ็นต์ โดยเจาะน้ำจากถุงไข่ปกติที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 และ 5-6 มิลลิเมตร พบแถบโปรตีน คือ 30, 65, 79, 85, 100, 115, 120, 150, 160, 180 และ >180 กิโลดาลตัน

การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่พบจากน้ำในถุงไข่สุกระยะลูเตียล คือ 27, 58, 65, 70, 79, 90, 115, 120, 150, 160 และ >220 กิโลดาลตัน น้ำในถุงไข่ระยะลูเตียลที่มีซิสต์ 50 เพอร์เซ็นต์ โดยเจาะน้ำจากถุงไข่ปกติที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร พบแถบโปรตีน คือ 30, 35, 65, 100, 115, และ 180 กิโลดาลตัน น้ำในถุงไข่ระยะลูเตียลที่มีซิสต์ 50 เพอร์เซ็นต์ โดยเจาะน้ำจากถุงไข่ปกติที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร พบแถบโปรตีน คือ 27, 30, 50, 58, 65, 70, 79, 90, 115, 120, 150, 160 และ >220 กิโลดาลตัน น้ำในถุงไข่ระยะลูเตียลที่มีซิสต์ 50 เพอร์เซ็นต์ โดยเจาะน้ำจากถุงไข่ปกติที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร พบแถบโปรตีน คือ 27, 30, 58, 65, 70, 79, 90, 115, 120, 150, 160 และ >220 กิโลดาลตัน

นอกจากนี้การศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนจากน้ำในถุงไข่ที่แช่ในตู้ -80 องศาเซลเซียส จากถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าขนาดเล็กมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร น้ำในถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีขนาดกลาง ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ถุงไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร และถุงไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร และน้ำในถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีซิสต์ 50 เพอร์เซ็นต์ โดยเจาะน้ำจากถุงไข่ปกติที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร พบแถบโปรตีน คือ 27, 65, 79, 115, 120, 150, 160 และ >220 กิโลดาลตัน

2.3.3 เทคนิค Liquid chromatography/Mass spectrometer/Mass spectrometer (LC/MS/MS)

ผลการศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Liquid chromatography/Mass spectrometer/Mass spectrometer (LC/MS/MS) พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนขนาด 65 กิโลดาลตัน คือ ซีรัมอัลบูมิน (Serum albumin) น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนขนาด 70 กิโลดาลตัน คือ ฮีโมเพกซิน (Hemopexin) ซีรัมอัลบูมิน (Serum albumin) น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนขนาด 79 กิโลดาลตัน คือ ซีโรทรานส์เฟอริน (Serotransferrin), Inhibitor of carbonic anhydrase, โพรทรอมบิน (Prothrombin) และ Thyroxine-binding globulin น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนขนาด 115 กิโลดาลตัน คือ แฮปโตโกลบิน (Haptoglobin) ดังตารางที่ 10-13

ตารางที่ 10 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนขนาด 65 กิโลดาลตัน

ชนิดของโปรตีน	Database ของสิ่งมีชีวิต
ซีรัมอัลบูมิน (Serum albumin)	สุกร (<i>Sus scrofa</i>) สุนัข (<i>Canis familiaris</i>) หนูหริ่ง (<i>Mus musculus</i>) แมวบ้าน (<i>Feliscatus</i>) หนูเจอร์บิลหรือหนูทะเลทราย (<i>Meriones unguiculatus</i>) มนุษย์ (<i>Homo sapiens</i>)
อิมมูโนโกลบูลิน (Ig heavy chain V region)	หนูหริ่ง (<i>Mus musculus</i>)
ATP synthase subunit delta	แบคทีเรีย (<i>Legionella pneumophila</i> : strain Paris)
อัลฟาฟีโตโปรตีน (Alpha-fetoprotein)	สุนัข (<i>Canis familiaris</i>)

ชนิดของโปรตีน	Database ของสิ่งมีชีวิต
เอนไซม์ฟอสโฟไรโบซิลทรานส์เฟอเรส (ATP phosphoribosyl transferase)	แบคทีเรีย (<i>Clostridium kluveri</i> : strain NBRC 12016)

ตารางที่ 11 นำหนักโมเลกุลของโปรตีนขนาด 70 กิโลดาลตัน

ชนิดของโปรตีน	Database ของสิ่งมีชีวิต
ฮีโมเพกซิน (Hemopexin)	สุกร (<i>Sus scrofa</i>)
ซีรัมอัลบูมิน (Serum albumin)	สุนัข (<i>Canis familiaris</i>)
ไวโทรเนคติน (Vitronectin)	สุกร (<i>Sus scrofa</i>)
Sphingoid long chain base kinase	ยีสต์ที่ทำขนมปัง (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> : strain ATCC 204508/S288c)
Transcriptional regulator of yeast form adherence	ยีสต์ (<i>Candida albicans</i> : strain SC5314/ATCC MYA-2876)
Nucleotide exchange factor SIL1	ยีสต์ที่ทำขนมปัง (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> : strain ATCC 204508/S288c)
cystine import ATP-binding protein	แบคทีเรีย (<i>Bacillus subtilis</i> : strain 168)
Carbamoyl-phosphate synthase pyrimidine-specific large chain	แบคทีเรียแกรมบวก (<i>Bacillus halodurans</i> : strain ATCC BAA-125/DSM 18197/FERM 7344/JCM 9153/C-125)

ชนิดของโปรตีน	Database ของสิ่งมีชีวิต
GTPase	<i>Buchneraaphidicola subsp.</i> <i>Schizaphisgraminum</i> (strain Sg)

ตารางที่ 12 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนขนาด 79 กิโลดาลตัน

ชนิดของโปรตีน	Database ของสิ่งมีชีวิต
ซีโรทรานส์เฟอริน (Serotransferrin)	สุกร (<i>Sus scrofa</i>) ม้า (<i>Equus caballus</i>) หนูสีน้ำตาล (<i>Rattus norvegicus</i>) กระต่ายยุโรป (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)
เซอปีน (Serpine)	โคยุโรป (<i>Bos Taurus</i>)
Inhibitor of carbonic anhydrase	สุกร (<i>Sus scrofa</i>)
แลคโตทรานส์เฟอริน (Lactotransferrin)	อูฐหนกเดียว (<i>Camelus dromedaries</i>)
โปรทรอมบิน (Prothrombin)	สุกร (<i>Sus scrofa</i>)
การสังเคราะห์โปรตีนอาร์จินิน (Arginine biosynthesis bifunctional protein)	แบคทีเรียแกรมลบ (<i>Gluconobacteroxydans</i> : strain 621H)
Thyroxine-binding globulin	สุกร (<i>Sus scrofa</i>)

ตารางที่ 13 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนขนาด 115 กิโลดาลตัน

ชนิดของโปรตีน	Database ของสิ่งมีชีวิต
แฮบโตโกลบิน (Haptoglobin)	สุกร (<i>Sus scrofa</i>)
โปรติเอส (Lon protease)	แบคทีเรีย (<i>Campylobacter concisus</i> : strain 13826)
อิมมูโนโกลบูลิน (Ig heavy chain V region)	หนูหริ่ง (<i>Mus musculus</i>)
viral cyclin homolog	เชื้อไวรัสในมนุษย์ (<i>Human herpesvirus 8</i> type P : isolate GK18)
DNA mismatch repair protein	แบคทีเรียแกรมบวก (<i>Enterococcus faecalis</i> : strain ATCC 700802/V583)
Protocadherin ga มิลลิเมตร	มนุษย์ (<i>Homo sapiens</i>)
Ig ga มิลลิเมตร chain C region	กระต่ายยุโรป (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)
Ribonuclease	<i>Gramellaforsetii</i> (strain KT0803)
Probable septum site-determining protein	<i>Buchneraaphidicola</i> subsp. <i>Schizaphisgraminum</i> (strain Sg)
Formamidopyrimidine-DNA glycosylase	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>

สารที่เซลล์แกรนูโลซาหลังสู้อาหารเพาะเลี้ยง (condition medium) ในห้องปฏิบัติการ

ผลการศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์แกรนูโลซาสุกรที่เพาะเลี้ยงนาน 0, 24, 48, 96, 120 และ 144 ชั่วโมง ได้ทำการสุ่มวัดขนาดของเซลล์แกรนูโลซาสุกรในระยะการเพาะเลี้ยงต่างๆ จำนวน 20 เซลล์ ดังตารางที่ 14 ขนาดของเซลล์แกรนูโลซาสุกรที่เพาะเลี้ยงนาน 0, 24, 48, 96, 120 และ

144 ชั่วโมง มีค่าเฉลี่ยความยาวเซลล์เท่ากับ 20.1 ± 3.38 , 30.8 ± 3.01 , 52.85 ± 9.68 , 113.30 ± 21.95 , 129.95 ± 12.75 และ 161.5 ± 13.72 ไมโครเมตร ตามลำดับ

ตารางที่ 14 ความยาวของเซลล์แกรนูโลซาสุกกรที่เพาะเลี้ยงนาน 0, 24, 48, 96, 120 และ 144 ชั่วโมง

เซลล์แกรนู- โลซา	เซลล์เพาะเลี้ยง นาน 0 ชั่วโมง (ไมโครเมตร)	เซลล์เพาะเลี้ยง นาน 24 ชั่วโมง (ไมโครเมตร)	เซลล์เพาะเลี้ยง นาน 48 ชั่วโมง (ไมโครเมตร)	เซลล์เพาะเลี้ยง นาน 96 ชั่วโมง (ไมโครเมตร)	เซลล์เพาะเลี้ยงนาน 120 ชั่วโมง (ไมโครเมตร)	เซลล์เพาะเลี้ยง นาน 144 ชั่วโมง (ไมโครเมตร)
1	5	29	50	125	109	142
2	6	30	58	83	125	163
3	7	32	75	108	135	154
4	5	33	54	125	124	172
5	6	28	46	129	127	179
6	7	27	42	133	132	188
7	8	29	54	146	142	163
8	6	35	71	92	137	172
9	5	34	54	83	129	163
10	6	30	46	92	118	154
11	4	27	63	125	107	167
12	5	29	42	129	112	154
13	6	28	46	83	126	146
14	7	32	42	96	145	154
15	5	34	63	92	136	159

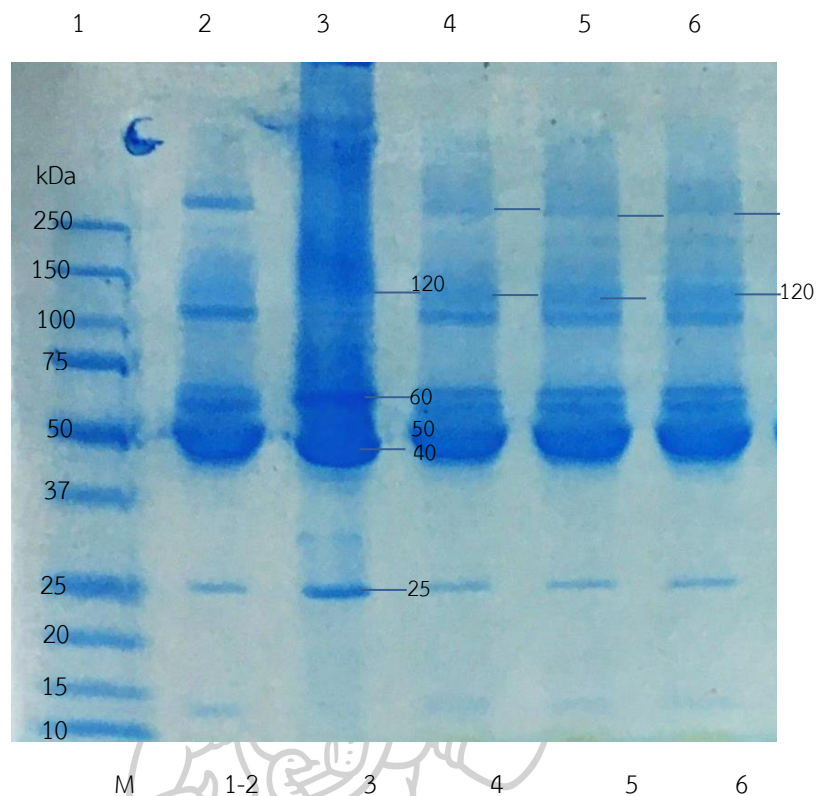
เซลล์แกรนู- โลซา	เซลล์เพาะเลี้ยง นาน 0 ชั่วโมง (ไมโครเมตร)	เซลล์เพาะเลี้ยง นาน 24 ชั่วโมง (ไมโครเมตร)	เซลล์เพาะเลี้ยง นาน 48 ชั่วโมง (ไมโครเมตร)	เซลล์เพาะเลี้ยง นาน 96 ชั่วโมง (ไมโครเมตร)	เซลล์เพาะเลี้ยงนาน 120 ชั่วโมง (ไมโครเมตร)	เซลล์เพาะเลี้ยง นาน 144 ชั่วโมง (ไมโครเมตร)
16	4	36	63	113	151	183
17	6	29	54	104	136	188
18	5	31	46	154	146	179
19	7	36	42	146	115	175
20	6	27	46	108	147	154
เฉลี่ย ($\bar{x} \pm S.D.$)	5.81 \pm 1.05	30.8 \pm 3.01	52.85 \pm 9.68	113.30 \pm 21.95	129.95 \pm 12.75	165.45 \pm 13.25

การเก็บสารหลังจากการเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซาสุกรในอาหาร สูตร M199 เสริมด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ Heat-treated fetal bovine serum (HTFBS) สามารถเก็บ condition medium ได้ทั้งหมด 3 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 เก็บ condition medium ได้ทั้งหมด 27,000 ไมโครลิตร ครั้งที่ 2 เก็บ condition medium ได้ทั้งหมด 27,000 ไมโครลิตร โดยครั้งที่ 3 เก็บ condition medium ได้ทั้งหมด 27,000 ไมโครลิตร นำไปแช่แข็งเพื่อรักษาสภาพโปรตีนในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 แสดงปริมาณสารหลังที่เก็บจากเซลล์แกรนูโลซาสุกรเพาะเลี้ยง (condition medium)

เวลาในการเพาะเลี้ยงเซลล์ แกรนูโลซาสุกร	ปริมาณสารหลังจากเซลล์ เพาะเลี้ยงที่เก็บ (ไม่โครลิตร) ครั้งที่ 1	ปริมาณสารหลังจาก เซลล์เพาะเลี้ยงที่เก็บ (ไม่โครลิตร) ครั้งที่ 2	ปริมาณสารหลังจาก เซลล์เพาะเลี้ยงที่เก็บ (ไม่โครลิตร) ครั้งที่ 3
0 ชั่วโมง	2,000	2,000	2,000
24 ชั่วโมง	5,000	5,000	5,000
48 ชั่วโมง	5,000	5,000	5,000
96 ชั่วโมง	5,000	5,000	5,000
120 ชั่วโมง	5,000	5,000	5,000
144 ชั่วโมง	5,000	5,000	5,000
รวม	27,000	27,000	27,000

ผลการศึกษาน้ำในถุงไข่และสารหลังโปรตีนด้วยวิธี Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) จากน้ำในถุงไข่สุกรสดขนาดเล็กเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร เปรียบเทียบกับสารที่เซลล์แกรนูโลซาหลังสู้อาหารเพาะเลี้ยง ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48, 96 และ 144 ชั่วโมง และอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ M199+10% HTFBS พบว่ามีแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25, 40, 50, 60, 115, 120 และมากกว่า 250 กิโลดาลตัน เหมือนกันในทุกกลุ่ม ซึ่งพบว่าแถบโปรตีนที่เพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง ที่น้ำหนักโมเลกุล 25, 40, 50 และ 60 สีจางกว่าแถบโปรตีนของน้ำในถุงไข่สุกรสดขนาดเล็กอาจเกิดเนื่องจากโปรตีนถูกนำไปใช้ ในขณะที่แถบโปรตีนที่เพาะเลี้ยงนาน 96 และ 144 ชั่วโมง เข้มกว่าแถบโปรตีนที่เพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง ซึ่งอาจเกิดจากเซลล์แกรนูโลซาสุกรหลังสารโปรตีนออกมา จากผลการศึกษาพบว่า การเปรียบเทียบระหว่าง M199+10% HTFBS น้ำในถุงไข่สุกรสดขนาดเล็กและสารที่เซลล์แกรนูโลซาหลังสู้อาหารเพาะเลี้ยง พบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25, 40, 50, 60, 115, 120 และมากกว่า 250 กิโลดาลตัน เหมือนกัน แสดงว่าเซลล์มีการหลั่งสารโปรตีนเหมือนกับที่อยู่ในธรรมชาติ ดังภาพที่ 49



ภาพที่ 49 แสดงแถบของสารหลังโปรตีนจากถุงไข่สุกร ที่เพาะเลี้ยงนาน 48, 96 และ 144 ชั่วโมง

ช่องที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน Benchmark protein ladder

ช่องที่ 2 อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ M199+10% HTFBS

ช่องที่ 3 น้ำในถุงไข่สุกรสดขนาดเล็กเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร

ช่องที่ 4 สารที่เซลล์แกรนูโลซาหลังสู้อาหารเพาะเลี้ยง เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 48 ชั่วโมง

ช่องที่ 5 สารที่เซลล์แกรนูโลซาหลังสู้อาหารเพาะเลี้ยง เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 96 ชั่วโมง

ช่องที่ 6 สารที่เซลล์แกรนูโลซาหลังสู้อาหารเพาะเลี้ยง เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 144 ชั่วโมง

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรังไข่ในระยะฟอลลิคูล่าทั้งหมด 64 รังไข่ โดยแบ่งตามถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2, 3-4, 5-6 และ 7-8 มิลลิเมตร พบว่ามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 2.54 ± 0.19 มิลลิเมตร และมีน้ำหนักเฉลี่ย 3.35 ± 0.52 กรัม เมื่อสังเกตลักษณะปริมาณเส้นเลือดและน้ำในถุงไข่พบว่าแปรผันตรงกับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของถุงไข่ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Antosik และคณะ (2009) ที่ศึกษาในถุงไข่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่า 3 มิลลิเมตร ถุงไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-5 มิลลิเมตร และถุงไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่มากกว่า 5 มิลลิเมตร พบว่ามีการทำงานของ กลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส โซนา เพลลูซิดา โกลโคโพรตีน (zona pellucida glycoproteins: pZP1, pZP2, pZP3, pZP 3 alpha) และอินทิกรัลเบตา 1 และเบตา 2 (integrins beta 1 และ beta 2) ในถุงไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ใหญ่ มีปริมาณมากกว่าในถุงไข่ขนาดกลางและถุงไข่ขนาดเล็ก และเส้นเลือดและโปรตีนต่างๆ มาหล่อเลี้ยงรังไข่มากขึ้น ตามขนาดของรังไข่ส่งผลต่อการเจริญของถุงไข่ที่พัฒนา ซึ่งจะมีการหลั่งสารหรือโปรตีนที่น้ำในถุงไข่ (follicular fluid) ทำให้เซลล์ไข่เกิดการเจริญพัฒนาได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Van de wiel และคณะ (1983) ที่ศึกษาในถุงไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่า 3 มิลลิเมตร ถุงไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-6 มิลลิเมตร และถุงไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่กว่า 6 มิลลิเมตร พบว่าความเข้มข้นของสารที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ไข่และอินฮิบินจะลดลงเมื่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ไข่ที่มีเซลล์คลุมล้อมรอบใหญ่ขึ้น ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีพาราฟินเทคนิคภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่าเนื้อเยื่อของรังไข่มีถุงไข่ระยะต่างๆ ดังนี้ 1. ถุงไข่ระยะเริ่มต้น ประกอบด้วยเซลล์ไข่ล้อมรอบด้วยเซลล์แกรนูโลซาแบบบางบางเพียงชั้นเดียว 2. ถุงไข่ระยะแรก ประกอบด้วยเซลล์ไข่ล้อมรอบด้วยเซลล์แกรนูโลซาที่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นทรงลูกบาศก์หรือทรงกระบอก 3. ถุงไข่ระยะที่สอง ล้อมรอบด้วยเซลล์แกรนูโลซาที่มีหลายชั้นล้อมรอบเซลล์ไข่ และเริ่มมีการขยายของถุงน้ำเกิดเป็นช่องว่างหรือแอนทรัม 4. ถุงไข่ระยะกราเฟียน ซึ่งเป็นระยะที่เจริญสมบูรณ์เต็มที่ใกล้จะตกไข่ (ovulation) มีการขยายของถุงน้ำเพิ่มมากขึ้น 5. ถุงไข่ระยะคอร์ปัสลูเทียม จากรังไข่ ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่เจริญเปลี่ยนแปลงมาจากถุงไข่ระยะกราเฟียนหลังตกไข่ 6. ระยะถุงไข่ระยะคอร์ปัส อัลบีแคน จากรังไข่ ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่กำลังสลายตัว เรียกว่า คอร์ปัส อัลบีแคน ซึ่งการพัฒนาของถุงไข่นั้นพบว่ามีเกิดการเกิดช่องหรือแอนทรัมเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Revelli และคณะ (2009) พบว่าน้ำในถุงไข่ มีฮอร์โมน เช่น FSH, LH, gonadotropin, estrogen, progesterone, growth hormone, prolactin,

inhibin เป็นต้น เช่นเดียวกับการศึกษาของ Robert และคณะ (2006) ที่พบว่ามีการทำงานของ GDF9 และ BMP15 ส่งสัญญาณผ่านเซลล์แกรนูโลซาและเซลล์คัมมูลัส จากการศึกษาที่สังเกตได้ว่าเมื่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของถุงไข่ใหญ่ขึ้น พบว่ามีเส้นเลือดและปริมาณน้ำในถุงไข่มากขึ้น ทำให้สีของน้ำในถุงไข่จางลงเพราะถุงไข่ที่ใหญ่ขึ้นมีน้ำในถุงไข่ที่ประกอบด้วยฮอร์โมนและโปรตีนต่างๆ ที่เซลล์ภายในถุงไข่หลังช่องแอนทรีมเพิ่มมากขึ้นนั่นเอง ดังนั้นการเจริญพัฒนาของถุงไข่จึงมีส่วนช่วยให้เซลล์ไข่ภายในเจริญได้อย่างสมบูรณ์

การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ไข่สุกรพบว่าสามารถจำแนกเซลล์ไข่ได้ทั้งหมด 5 แบบ ดังนี้ แบบที่ 1 เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบติดแน่น (intact cumulus cell layer oocyte) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 149.47 ± 3.72 ไมโครเมตร แบบที่ 2 เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่แบบหลายชั้น มีชั้นของเซลล์คัมมูลัสล้อมรอบ 2-3 ชั้น มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 108.20 ± 14.60 ไมโครเมตร แบบที่ 3 เซลล์ไข่ที่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่เพียงบางส่วนจะมีชั้นของเซลล์คัมมูลัสล้อมรอบเพียงบางส่วน มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 72.71 ± 2.87 ไมโครเมตร แบบที่ 4 เซลล์ไข่ที่ไม่มีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่จะไม่มีชั้นของเซลล์คัมมูลัสล้อมรอบเลย มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 77.50 ± 4.23 ไมโครเมตร และแบบที่ 5 เซลล์ไข่ที่เสื่อมสภาพ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 59.49 ± 1.64 ไมโครเมตร นอกจากนี้การศึกษาเซลล์ไข่ในถุงไข่ที่มีขนาดต่างๆ ทั้ง 5 แบบ พบว่าเซลล์ไข่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเซลล์ไข่แบบที่ 1 รวมกับแบบที่ 2 โดยเรียงตามถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร ถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร ถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร และถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7-8 มิลลิเมตร พบมี 53.84 55.92 56.94 และ 56.52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kwak และคณะ (2014) ที่พบว่าเซลล์ไข่ที่มาจากถุงไข่ขนาดใหญ่ (เส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 8 มิลลิเมตร) สามารถพัฒนาเป็นไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ (mature oocyte) ได้เมื่อถูกเพาะเลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วย FSH, LH และฮอร์โมนแอสโตรเจน เมื่อศึกษา รายงานของ Areekijseere และ Chuen-Im (2012) พบว่าเซลล์คัมมูลัสแบบที่ 1 จากถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4-6 มิลลิเมตร มีศักยภาพสูงที่จะพัฒนาเป็นไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Mori และคณะ (2000) Chen และคณะ (2007) และ McElroy และคณะ (2008) พบว่าเซลล์ไข่แบบที่ 2 จากถุงไข่ขนาดกลางและขนาดใหญ่สามารถพัฒนาเป็นเซลล์ไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ได้ เช่นเดียวกับ Pongsawat (2014) พบว่าเซลล์ไข่สุกรที่มีเซลล์คัมมูลัสล้อมรอบ (porcine cumulus oocyte complexes: pCOCs) แบบที่ 1 และ 2 นั้นสามารถพัฒนาเป็นเซลล์ไข่ที่เจริญเต็มที่ได้ ดังนั้นจึงเป็นข้อมูลในการเลือกเซลล์ไข่แบบที่ 1 แบบที่ 2 และเซลล์แกรนูโลซาที่เหมาะสมกับการพัฒนาเป็นไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ได้ดีเพื่อศึกษาลักษณะเซลล์ไข่สุกร พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่สุกรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่หรือเซลล์คัมมูลัสที่มีรูปร่างกลมจะยืดยาวและขยายตัวแผ่ออกจากเซลล์ไข่แสดงว่าเซลล์ไข่มีการเจริญพัฒนา เมื่อนำเซลล์แกรนูโลซา

สุกรเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยง M199 ที่ช่วงเวลาที่แตกต่างกัน คือ เวลา 0, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่าเซลล์เริ่มยึดเกาะที่พื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยงที่ 24 ชั่วโมง จากนั้นเซลล์มีการเกาะพื้นผิวเซลล์ยึดยาวออกมีรูปร่างหัวแหลมท้ายแหลมจนมีรูปร่างแบบไฟโบรบลาส (fibroblast) จนกระทั่งเวลา 120 ชั่วโมง เซลล์แกรนูโลซามีการยึดเกาะที่พื้นผิวขวดเพาะเลี้ยงกันอย่างหนาแน่นประมาณ 80-90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อศึกษาสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของเซลล์ไข่สุกรพบว่าเซลล์มีลักษณะรูปร่างกลม ผิวเซลล์ไม่เรียบ ส่วนเซลล์แกรนูโลซาสุกรพบได้ทั้งเซลล์เดี่ยวๆ (singer cell) และเซลล์ที่เกาะกลุ่มรวมกัน (cluster cells) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-10 ไมโครเมตร ที่ผิวเซลล์แกรนูโลซาสุกรพบลักษณะเป็นไมโครวิลไล เมื่อเพาะเลี้ยงแกรนูโลซาสุกรในอาหารเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง เซลล์มีลักษณะรูปร่างยึดยาวรูปหยดน้ำตา (tear drop) เซลล์มีขนาดยาวมากกว่า 10 ไมโครเมตร โดยพบว่าเซลล์แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นรูปร่างแบบหัวแหลมท้ายแหลม (fibroblast-like morphology) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Gutierrez และคณะ (1997) ที่เพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร M199 สามารถคงการมีชีวิตรอดของเซลล์ได้เป็นระยะเวลา 144 ชั่วโมง หรือ 6 วัน รูปร่างของเซลล์เป็นแบบหัวแหลมท้ายแหลมสอดคล้องกับการศึกษาของ Schmidt และคณะ (1984) และ Stewart และ Vandevort (1997) ที่ทำการศึกษาเซลล์แกรนูโลซาจากมนุษย์ โดยสามารถเพาะเลี้ยงเซลล์ได้นานเป็นระยะเวลา 20 วัน และ 24 วัน ตามลำดับ จากรายงานการศึกษาที่พบลักษณะรูปร่างเซลล์แบบหัวแหลมท้ายแหลม เช่นเดียวกับการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสภาวะแวดล้อมและวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบปฐมภูมิของเซลล์นี้สามารถพัฒนาให้เซลล์แกรนูโลซาเจริญได้ดีและมีชีวิตรอดได้ ดังนั้นอาจพัฒนาการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบระยะยาวหรือพัฒนาเป็นเซลล์ไลน์ (cell line) สำหรับการศึกษาทดลองในด้านเทคโนโลยีชีวภาพได้

การศึกษาน้ำในถุงไข่สดด้วยการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนไฮยาลูโรแนนซินเทส 2 (hyaluronan synthase 2: *Has2*) ของน้ำในถุงไข่สุกรระยะฟอลลิคูลาร์ในถุงไข่ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2, 3-4, 5-6 และ 7-8 มิลลิเมตร ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสแบบย้อนกลับ (RT-PCR) พบว่ามีการแสดงออกของยีนไฮยาลูโรแนนซินเทส 2 ที่ขนาด 199 คู่เบสและ *GAPDH* ที่ขนาด 207 คู่เบส ในถุงไข่ทุกขนาด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kimura และคณะ (2002) พบการแสดงออกของ *Has2* ในเซลล์คมูลัส แสดงให้เห็นว่า *Has2* สามารถตรวจพบได้ในถุงไข่ทุกขนาด ดังนั้นจากงานวิจัยครั้งนี้จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานที่อาจนำไปประยุกต์ในงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพหรือการศึกษาการทำงานของปัจจัยต่างๆ ในการเจริญของเซลล์ไข่ เช่น รายงานของ Sugiura และคณะ (2009) ศึกษาประสิทธิภาพในการทำงานของยีน *Has2* ด้วยการวิเคราะห์ mRNA ในเซลล์ไข่หนูด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi) ต่อการเจริญของเซลล์คมูลัสที่มีเซลล์ไข่ล้อมรอบ (cumulus cell-oocyte complexes: COCs) พบว่าการยับยั้งการทำงานของ *Has2* ทำให้การขยายของเซลล์

คุณสมบัติของหนูลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากการศึกษาการทำงานของ *Has2* แสดงว่าเซลล์ภูมิคุ้มกันหลังสารหรือโปรตีนสู่น้ำในถุงไข่ที่ส่งผลต่อการเจริญของเซลล์ไข่ ซึ่งการศึกษากการ แสดงออกของน้ำในถุงไข่ด้วยเทคนิคโซเดียมโดเดซิล ซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโพลีซิส (SDS-PAGE) พบว่าน้ำในถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าขนาดเล็กมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร พบแถบโปรตีน คือ 27, 30, 35, 40, 50, 58, 65, 70, 79, 85, 90, 100, 115, 120, 150, 170, 180, > 180 และ >220 กิโลดาลตัน น้ำในถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีขนาดกลาง แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ถุงไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร พบแถบโปรตีน คือ 27, 30, 35, 58, 65, 70, 79, 85, 90, 100, 115, 120, 150, 170, 180, >180 และ >220 กิโลดาลตัน และถุงไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร พบแถบโปรตีน คือ 27, 30, 35, 58, 65, 70, 79, 85, 90, 100, 115, 120, 150, 170, 180, >180 และ >220 กิโลดาลตัน น้ำในถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าขนาดใหญ่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7-8 มิลลิเมตร พบแถบโปรตีน คือ 30, 35, 58, 65, 70, 79, 90, 100, 115, 150, 180 และ >220 กิโลดาลตัน การศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนจากน้ำในถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีซิสต์ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยเจาะน้ำจากถุงไข่ปกติที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 และ 5-6 มิลลิเมตร พบแถบโปรตีน คือ 27, 30, 65, 79, 85, 100, 115, 120, 150, 160, 180, >180 และ >220 กิโลดาลตัน

การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่พบจากน้ำในถุงไข่สุกรระยะลูเตียล คือ 27, 58, 65, 70, 79, 90, 115, 120, 150, 160 และ >220 กิโลดาลตัน น้ำในถุงไข่ระยะลูเตียลที่มีซิสต์ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยเจาะน้ำจากถุงไข่ปกติที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร พบแถบโปรตีน คือ 30, 35, 65, 100, 115 และ >180 กิโลดาลตัน น้ำในถุงไข่ระยะลูเตียลที่มีซิสต์ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยเจาะน้ำจากถุงไข่ปกติที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร พบแถบโปรตีน คือ 27, 30, 50, 58, 65, 70, 79, 90, 115, 120, 150, 160 และ >220 กิโลดาลตัน

นอกจากนี้การศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนจากน้ำในถุงไข่ที่แช่ในตู้ -80 องศาเซลเซียส จากถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าขนาดเล็กมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร น้ำในถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีขนาดกลาง ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ถุงไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร และถุงไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 มิลลิเมตร และน้ำในถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าที่มีซิสต์ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยเจาะน้ำจากถุงไข่ปกติที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 มิลลิเมตร พบแถบโปรตีน คือ 27, 65, 79, 115, 120, 150, และ 160 กิโลดาลตัน

จากการศึกษาน้ำในถุงไข่สุกรสดที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่ต่างกันจึงนำน้ำในถุงไข่สุกรสดขนาดเล็กเปรียบเทียบกับสารที่เซลล์แกรนูโลซาหลังสู้อาหารเพาะเลี้ยง ผลการวิเคราะห์โปรตีนจากการเปรียบเทียบระหว่าง M199+ 10% HTFBS น้ำในถุงไข่สุกรสดขนาดเล็กและสารที่เซลล์แกรนูโลซาหลังสู้อาหารเพาะเลี้ยง พบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25, 40, 50, 60, 115, 120

และ >250 กิโลดาลตัน ซึ่งให้แถบของน้ำหนักโมเลกุลที่เหมือนกัน แสดงว่าน้ำในอาหารเพาะเลี้ยง เซลล์แกรนูโลซามีการหลั่งสารหรือโปรตีนเช่นเดียวกับถุงไข่สดที่ได้จากธรรมชาติ ซึ่งพบว่าแถบโปรตีนของถุงไข่สดนั้นสีเข้มกว่าแถบโปรตีนจากสารหลั่งที่เซลล์แกรนูโลซาหลั่งสู่อาหารเพาะเลี้ยงจึงเป็นที่น่าสังเกตว่าปริมาณโปรตีนอาจมากกว่าในสารหลั่งที่ได้จากห้องปฏิบัติการ แสดงให้เห็นว่าน้ำในถุงไข่สุกรสดและสารที่เซลล์แกรนูโลซาหลั่งสู่อาหารเพาะเลี้ยงมีปัจจัยที่ช่วยให้เกิดการเจริญพัฒนาของเซลล์ทั้งเซลล์ไข่และเซลล์แกรนูโลซา ทั้งในธรรมชาติและในห้องปฏิบัติการ ดังนั้นอาจนำน้ำในถุงไข่หรือสารหลั่งจากเซลล์แกรนูโลซาหลั่งสู่อาหารเพาะเลี้ยงมาใช้ในเพาะเลี้ยงเซลล์ปฐมภูมิหรือการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบยาวนาน (long term culture) ได้

จากนั้นเลือกศึกษาและวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Liquid chromatography/Mass spectrometer/Mass spectrometer (LC/MS/MS) จากแถบโมเลกุลของโปรตีนขนาด 65, 70, 79 และ 115 กิโลดาลตัน งานวิจัยครั้งนี้ได้วิเคราะห์ด้วยวิธี LC/MS/MS ในถุงไข่ระยะฟอลลิคูล่าของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนขนาด 65 กิโลดาลตัน คือ ซีรัมอัลบูมิน สอดคล้องกับรายงานแถบของ Ducolomb และคณะ (2013) โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 65.48 กิโลดาลตัน คือ เคราตินชนิดที่ 2 (keratin type II cytoskeletal 1) ซึ่งมีบทบาทในการส่งเสริมการสลายของเยื่อหุ้มนิวเคลียสและส่งเสริมการเจริญพัฒนาของเซลล์ไข่โปรตีนเหล่านี้ช่วยเสริมการเลี้ยงเซลล์ไข่ให้สุก (in vitro maturation) และการปฏิสนธิในหลอดทดลอง (in vitro fertilization) นอกจากนี้ยังพบรายงานการศึกษาของโปรตีนขนาดต่างๆ ที่สอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ ดังนี้ ผลการวิเคราะห์ LC/MS/MS ครั้งนี้พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนขนาด 79 กิโลดาลตัน คือ ซีโรทรานส์เฟอริน inhibitor of carbonic anhydrase prothrombin และ thyroxine-binding globulin ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย แถบของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 79 กิโลดาลตัน สอดคล้องกับรายงานการศึกษาว่า คือ porcine inhibitor of carbonic anhydrase ซึ่งมีผลทำให้การเจริญเข้าสู่ระยะ metaphase I ลดลง Ducolomb และคณะ (2013) และมีรายงานของ Gupta และคณะ (1996) น้ำหนักโมเลกุล 79 กิโลดาลตัน คือ โซนา เพลลูซิดา1 ซึ่งเป็นสารจำพวกไกลโคโปรตีนที่ช่วยป้องกันอันตรายของเซลล์ไข่และป้องกันการเข้าผสมของอสุจิมากกว่า 1 ตัว รายงานของ Kiczak และคณะ (2013) พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนขนาด 115 กิโลดาลตัน คือ แสบโตโกลบิน ซึ่งมีรายงานการศึกษาแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 115 กิโลดาลตัน ว่าเป็น Matrix metalloproteinase 9 (MMP 9) คือ เอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม endopeptidase ทำหน้าที่ย่อยโปรตีนและเป็นส่วนสำคัญสำหรับ extracellular matrix

นอกจากนี้แถบโปรตีนที่พบในการศึกษาครั้งนี้ยังมีความสอดคล้องกับรายงานการศึกษาต่างๆ เช่น รายงานการศึกษาของวรรณ (2552) ที่พบแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 27 กิโลดาลตัน คือ

อิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin (Ig)) ทำหน้าที่เป็นภูมิคุ้มกันหรือภูมิต้านทานโรค มีทั้งหมด 5 กลุ่ม คือ IgG, IgA, IgM, IgD และ IgE ซึ่งแต่ละกลุ่มจะมีหน้าที่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าการทำงานของ Ig นั้นมีการแสดงออกในถุงไข่ขนาดเล็กมากกว่าขนาดกลางและขนาดใหญ่เนื่องจากโปรตีนนี้ทำหน้าที่ผลิตน้ำเมือกหรือสารสารเคมีเพื่อป้องกันเซลล์ไข่จากสิ่งแปลกปลอมต่างๆ ให้เซลล์ไข่สามารถเจริญเติบโตและพัฒนาได้

แถบของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 30 กิโลดาลตัน สอดคล้องกับรายงานการศึกษา Besnard และคณะ (1997) ว่าเป็น insulin like growth factor binding protein (IGFBP-5) ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการอยู่รอดของเซลล์ การเกิด apoptosis รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ด้วย ขณะที่ Ducolomb และคณะ (2013) พบว่าแถบของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 30 กิโลดาลตัน คือ ซีรัมอัลบูมิน ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญที่สุดที่สร้างจากตับ เนื่องจากมีปริมาณมากในเลือด คิดเป็น 50-60 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักจากโปรตีนทั้งหมดและมีหน้าที่หลากหลาย คือ ลำเลียงฮอร์โมน กรดไขมันและสารอาหารต่างๆ ไปกับกระแสเลือดเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย นอกจากนี้ อัลบูมินยังทำหน้าที่ควบคุมแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ในกระแสเลือดให้อยู่ในภาวะสมดุล ทำให้ของเหลวและของแข็งในกระแสเลือดรวมตัวอยู่ในเส้นเลือดได้ตามปกติ แถบของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 50 กิโลดาลตัน สอดคล้องกับรายงานการศึกษาว่าพบ Cytokeratin-14 type 1 ซึ่งมีการทำงานในผิวหนังชั้นที่ลึกที่สุดติดกับ basement membrane ประกอบด้วยเซลล์ที่เรียงตัวกันชั้นเดียว ชื่อว่า basal cells ซึ่งเป็น germinative cell ก่อให้เกิดการพัฒนาและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและพบว่าเป็น immunoglobulin gamma chain (Ig) ซึ่งเป็นโปรตีนทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันเพื่อตรวจจับและทำลายฤทธิ์ของสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย แถบของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 100 กิโลดาลตัน สอดคล้องกับรายงานการศึกษาว่า คือซีรัมอัลบูมิน และ Keratin 1 โดยซีรัมอัลบูมินเป็นโปรตีนที่สร้างจากตับและมีปริมาณมากในเลือด 50-60 เปอร์เซ็นต์ ทำหน้าที่ลำเลียงฮอร์โมน กรดไขมัน และสารอาหารต่างๆ ไปกับกระแสเลือด ส่วน Keratin 1 ทำหน้าที่สร้างความยืดหยุ่นให้หนังหลอดเลือด มีส่วนช่วยในการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ด้วย รายงาน Nagyova (2018) พบว่าแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 120 กิโลดาลตัน คือ TNFAIP6-HC (Tumor necrosis factor a induced protein 6 and heavy chain) แสดงให้เห็นว่าน้ำในถุงไข่มีสารหลังโปรตีนที่ส่งผลต่อการเจริญพัฒนาของถุงไข่และรังไข่

รายงานของ วรรณ (2552) พบว่าแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 220 กิโลดาลตัน เป็น protease ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยย่อยโปรตีน

จากผลการศึกษาพบว่าโปรตีนที่มีความสำคัญในการควบคุมการทำงานของเซลล์ไข่ เช่น ทำหน้าที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์ การสร้างหลอดเลือดใหม่รวมทั้งการอยู่รอดของเซลล์ไข่ จะปรากฏแถบโปรตีนเข้มจากน้ำในถุงไข่ทุกขนาด คือ 30, 50, 65, 79, 100 และ 150 กิโลดาลตัน

ส่วนการทำงานของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยโปรตีนและการเจริญของเซลล์ไข่นั้นจะปรากฏแถบโปรตีนเข้มข้นตามขนาดของถุงไข่ คือ 115 และ >220 กิโลดาลตัน นอกจากนี้โปรตีนที่ทำให้การเจริญเข้าของเซลล์เข้าสู่ระยะ metaphase I ลดลง คือ 70 กิโลดาลตัน พบแถบโปรตีนที่มีสีเข้มเท่ากันจากน้ำในถุงไข่ทุกขนาด ส่วนแถบโปรตีนขนาด 27 กิโลดาลตัน คือ โปรตีนในระบบภูมิคุ้มกัน พบแถบโปรตีนเข้มจากน้ำในถุงไข่ขนาดเล็กและจางลงจากน้ำในถุงไข่ขนาดกลางและขนาดใหญ่ แสดงให้เห็นว่าการปรากฏแถบโปรตีนที่มีสีเข้มจางแตกต่างกันตามขนาดของถุงไข่นี้เป็นการแสดงออกถึงการทำงานของโปรตีนที่หลั่งออกมาจากถุงไข่แต่ละขนาดซึ่งมีปริมาณโปรตีนไม่เท่ากันดังนั้นข้อมูลเหล่านี้จึงเป็นพื้นฐานในการศึกษาการทำงานของโปรตีนที่หลั่งจากน้ำในถุงไข่แต่ละขนาดเพื่อให้เข้าใจการทำงานของระบบสืบพันธุ์ได้มากขึ้น โดยสรุปรายงานการศึกษาแถบโปรตีนจากน้ำในถุงไข่ขนาดต่างๆ ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 แสดงรายงานการศึกษาแถบโปรตีนจากน้ำในถุงไข่ขนาดต่างๆ

ขนาดของ ถุงไข่	ถุงไข่ ขนาดเล็ก	ถุงไข่ขนาดกลาง		ถุงไข่ ขนาดใหญ่	หน้าที่	อ้างอิง
	1-2 มม.	3-4 มม.	5-6 มม.	7-8 มม.		
น้ำหนักโมเลกุล	1-2 มม.	3-4 มม.	5-6 มม.	7-8 มม.		
มากกว่า 220 kDa	✓	✓	✓	✓	โปรตีนที่พบ คือ protease ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยย่อย โปรตีนที่หุ้มรอบถุงไข่ ทำ ให้ผนังอ่อนตัวลง ซึ่งเป็นสาเหตุของ การตกไข่ (+)	วรรณ, 2552
120 kDa					โปรตีนที่พบคือ TNFAIP6-HC (Tumor necrosis factor α - induced protein 6 and	Nagyova, 2018

ขนาดของ ถุงไข่	ถุงไข่ ขนาดเล็ก	ถุงไข่ขนาดกลาง		ถุงไข่ ขนาดใหญ่	หน้าที่	อ้างอิง
	1-2 มม.	3-4 มม.	5-6 มม.	7-8 มม.		
น้ำหนักโมเลกุล	✓	✓	✓	-	heavy chain) เป็น intermediate complex ที่ช่วยในการทำงานไฮยาลูโรแนนซึ่งมีส่วนช่วยในการสุกของเซลล์ไข่และการปฏิสนธิ (+)	
115kDa	✓	✓	✓	-	พบ 115 กิโลดาลตัน โปรตีนที่พบคือ Matrix metalloproteinase 9 (MMP 9) เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม endopeptidase ที่ทำหน้าที่ย่อยโปรตีนและเป็นส่วนสำคัญสำหรับ extracellular matrix (-)	Kiczak และคณะ, 2013
100 kDa	✓	✓	✓	✓	โปรตีนที่พบ คือ ซีรัมอัลบูมิน เป็นโปรตีนที่สร้างจากตับและมีปริมาณมากในเลือด 50-60 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักจาก protein ทั้งหมด มีหน้าที่ลำเลียง	Ducolomb และคณะ, 2013

ขนาดของ ถุงไข่	ถุงไข่ ขนาด เล็ก	ถุงไข่ขนาดกลาง		ถุงไข่ ขนาด ใหญ่	หน้าที่	อ้างอิง
	1-2 มม.	3-4 มม.	5-6 มม.	7-8 มม.		
น้ำหนักโมเลกุล	✓	✓	✓	✓	ฮอริโมน กรดไขมันและ สารอาหารต่างๆ ไปกับ กระแสเลือดเพื่อนำไปใช้ ส่วนต่างๆ ของร่างกายและ พบโปรตีน Keratin 1 ซึ่งมี หน้าที่สร้างความยืดหยุ่นให้ ผนังหลอดเลือด มีส่วนช่วย ในการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ ด้วย (+)	
79 kDa	✓	✓	✓	✓	โปรตีนที่พบ คือ porcine inhibitor of carbonic anhydrase มีผลทำให้การ เจริญเข้าสู่ระยะ metaphase I ลดลง และ โปรตีนที่พบ คือ transferrin ทำหน้าที่ใน การลำเลียงเหล็กในกระแส เลือดไปใช้ตามอวัยวะต่างๆ โซนา เพลลูซิดา 1 (zona pellucida 1) เป็นสาร จำพวก ไกลโคโปรตีน ห่อหุ้มป้องกันอันตรายของ เซลล์ไข่และป้องกันการเข้า	Ducolomb และคณะ, 2013 Gupta และ คณะ, 1996

ขนาดของ ถุงไข่	ถุงไข่ ขนาด เล็ก	ถุงไข่ขนาดกลาง		ถุงไข่ ขนาด ใหญ่	หน้าที่	อ้างอิง
	1-2 มม.	3-4 มม.	5-6 มม.	7-8 มม.		
น้ำหนักโมเลกุล						
					ผสมของอสุจิมากกว่า 1 ตัว (+)	
70 kDa	✓	✓	✓	✓	โปรตีนที่พบ คือ coagulation factor เป็น ปัจจัย (Factor) ที่ทำงาน ร่วมกับเกล็ดเลือดทำหน้าที่ ให้เลือดแข็งตัวเพื่อเป็นตัว ทำให้เลือดหยุดไหลเมื่อมี เลือดออก นอกจากนี้ยังมี บทบาททำให้การเจริญของ เซลล์ไข่เข้าสู่ระยะ metaphase I ลดลง (-)	Ducolomb และคณะ, 2013
65 kDa	✓	✓	✓	✓	โปรตีนที่พบ คือ keratin ซึ่งมีบทบาทในการส่งเสริม การสลายของเยื่อหุ้ม นิวเคลียสและส่งเสริมการ เจริญพัฒนาของเซลล์ไข่ (+)	Ducolomb และคณะ, 2013
50kDa					โปรตีนที่พบคือ	Ducolomb

ขนาดของ ถุงไข่	ถุงไข่ ขนาด เล็ก	ถุงไข่ขนาดกลาง		ถุงไข่ ขนาด ใหญ่	หน้าที่	อ้างอิง
	1-2 มม.	3-4 มม.	5-6 มม.	7-8 มม.		
น้ำหนักโมเลกุล	✓	✓	✓	✓	<p>Cytokeratin-14 type 1 cytoskeletal ซึ่งมีการทำงานในผิวหนังชั้นที่ลึกที่สุดติดกับ basement membrane ประกอบไปด้วยเซลล์ที่เรียงตัวกันชั้นเดียว ชื่อว่า basal cells ซึ่งเป็น germinative cell ก่อให้เกิดการพัฒนาและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน</p> <p>โปรตีนอีกชนิดที่พบคือ immunoglobulin gamma chain (Ig) เป็นโปรตีนทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันเพื่อตรวจจับและทำลายฤทธิ์ของสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย</p> <p>(+)</p>	และคณะ, 2013
30 kDa	✓	✓	✓	✓	<p>โปรตีนที่พบ คือ insulin like growth factor binding protein (IGFBP-5) ทำหน้าที่ควบคุม</p>	Besnard และคณะ, 1997

ขนาดของ ถุงไข่	ถุงไข่ ขนาด เล็ก	ถุงไข่ขนาดกลาง		ถุงไข่ ขนาด ใหญ่	หน้าที่	อ้างอิง
	1-2 มม.	3-4 มม.	5-6 มม.	7-8 มม.		
น้ำหนักโมเลกุล	✓	✓	✓	✓	<p>กระบวนการอยู่รอดของเซลล์ การเกิด apoptosis และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์</p> <p>โปรตีนที่พบ คือ ซิรั้มอัลบูมิน เป็นโปรตีนที่สำคัญที่สุดที่สร้างจากตับ เนื่องจากมีปริมาณมากในเลือด คิดเป็น 50-60% โดยน้ำหนักจาก protein ทั้งหมด และมีหน้าที่หลากหลาย คือ ลำเลียงฮอร์โมน กรดไขมัน และสารอาหารต่างๆ ไปกับกระแสเลือดเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย นอกจากนี้ อัลบูมินยังทำหน้าที่ควบคุมแรงดันออสโมติก (Osmotic pressure) ในกระแสเลือดให้อยู่ในภาวะสมดุล ทำให้ของเหลวและ</p>	Ducolomb และคณะ, 2013

ขนาดของ ถุงไข่	ถุงไข่ ขนาด เล็ก	ถุงไข่ขนาดกลาง		ถุงไข่ ขนาด ใหญ่	หน้าที่	อ้างอิง
	1-2 มม.	3-4 มม.	5-6 มม.	7-8 มม.		
น้ำหนักโมเลกุล					ของแข็งในกระแสเลือด รวมตัวอยู่ในเส้นเลือดได้ ตามปกติ (+)	
		✓	✓	✓	โปรตีนที่พบคือ immunoglobulin (Ig) ทำ หน้าที่เป็นภูมิคุ้มกันหรือภูมิ ต้านทานโรคมะเร็งทั้งหมด 5 กลุ่ม คือ IgG, IgA, IgM, IgD และ IgE ซึ่งแต่ละกลุ่ม จะมีหน้าที่แตกต่างกัน ออกไป (+)	วรรณ, 2552
27 kDa						

จากการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่ารังไข่สุกรมีผลต่อการเจริญของเซลล์ไข่ที่บรรจุอยู่ภายในถุงไข่ จากการศึกษากลุ่มเซลล์ไข่ที่มีขนาดเล็ก กลางและใหญ่นั้นมีการเจริญของเซลล์ไข่ที่ล้อมรอบด้วยเซลล์คมูลล์ที่ติดแน่นแตกต่างกัน คือ เซลล์ไข่น้ำขนาดเล็กนั้นมีจำนวนชั้นของเซลล์คมูลล์น้อยกว่าเซลล์ไข่น้ำขนาดกลางและขนาดใหญ่ เมื่อนำเซลล์ไข่น้ำมาเพาะเลี้ยงพบว่าเมื่อเวลาผ่านไปเกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์คมูลล์ที่ยืดขยายออกแสดงให้เห็นว่าเซลล์ไข่น้ำมีการเจริญพัฒนา เช่นเดียวกับน้ำในถุงไข่ซึ่งเซลล์ไข่น้ำขนาดเล็กนั้นแม้จะมีปริมาณมากในรังไข่แต่มีน้ำในถุงไข่น้อยกว่าขนาดกลางและขนาดใหญ่ เมื่อนำมาศึกษาแถบของโปรตีนพบว่าในถุงไข่น้ำขนาดเล็กมีแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 30 กิโลดาลตัน ซึ่งมีรายงานการวิจัยของ Besnard และคณะ (1997) ว่าเป็น insulin like growth

factor binding protein (IGFBP-5) ทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการอยู่รอดของเซลล์ การเกิด apoptosis และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ ขณะที่ Ducolomb และคณะ (2013) รายงานว่าโปรตีนที่พบ คือ ซีรัมอัลบูมิน เป็นโปรตีนที่สำคัญที่สุดที่สร้างจากตับ มีหน้าที่ลำเลียงฮอร์โมน กรดไขมัน และสารอาหารต่างๆ ไปกับกระแสเลือด ซึ่งโปรตีนทั้ง 2 ชนิด คือ โปรตีนที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของเซลล์ไข่ เมื่อศึกษาถุงไข่ที่เป็นซิสต์เปรียบเทียบกับถุงไข่ระยะลูเตียลที่มีซิสต์ 50 เปอร์เซนต์ พบว่าถุงไข่ที่เป็นซิสต์นั้นมีโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 30 กิโลดาลตัน ซึ่งไม่พบโปรตีนชนิดนี้ในถุงไข่ลูเตียลปกติ แสดงให้เห็นว่าโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุล 30 กิโลดาลตัน นั้นมีหน้าที่ในการส่งเสริมการเจริญของเซลล์ไข่ นอกจากนี้การศึกษาค่าการเพาะเลี้ยงเซลล์แกรนูโลซานั้นสามารถเลี้ยงให้เกิดการเจริญพัฒนาแบบปฐมภูมิได้ เมื่อนำสารหลังจากเซลล์แกรนูโลซาสู่อาหารเพาะเลี้ยงมาศึกษา แลพบโปรตีนพบว่าปรากฏแลบโปรตีนใกล้เคียงกับน้ำในถุงไข่สุกรสด ดังนั้นอาจนำข้อมูลเหล่านี้ต่อยอด โดยเลี้ยงเซลล์ไข่สุกรและเซลล์แกรนูโลซาด้วยการเพาะเลี้ยงแบบยาวนานซึ่งอาจนำมาทำเป็นต้นแบบของการศึกษาเซลล์ ทดสอบสารและอาจเสริมด้วยน้ำในถุงไข่โดยพิจารณาได้จากแลบโปรตีนที่วิเคราะห์มาได้ว่าต้องการเลือกเซลล์ไข่หรือน้ำในถุงไข่จากขนาดเล็ก กลางหรือใหญ่เพื่อศึกษางานด้านเทคโนโลยีชีวภาพได้ต่อไป



รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กฤตพล สมมาตย์. (2543). **วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการผลิตสัตว์เบื้องต้น: หลักการผลิตโค – กระบือ**. ขอนแก่น: ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- มยุรา อารีกิจเสรี. (2551). การเตรียมเซลล์สืบพันธุ์และการผลิตตัวอ่อนสัตว์ในจานแก้ว. นครปฐม: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์.
- เวคิน นพนิตย์. (2524). เทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา (Histologic techniques) . พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : ห้างขายยาตรานกยูง แม่เลื่อน
- วรรณมา เมษศาสตร์. (2552). **เซลล์และโปรตีนที่หลังจากท่อนำไข่และรังไข่สุกรในรอบการเป็นสัด**. วิทยานิพนธ์. สาขาวิชาชีววิทยา. บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- Antosik, P., Kempisty, B., Bukowska, D., Jackowska, M., Włodarczyk, R., Budna, J., Brüssow, K. P., Lianeri, M., Jagodziński, P. P., Jaśkowski, J. M. (2009). Follicular size is associated with the levels of transcripts and proteins of selected molecules responsible for the fertilization ability of oocytes of puberal gilts. **J. Reprod. Dev.** 55, 6 (August): 588-593.
- Areekijsee, M. and 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 microscopystudy. **Micron.** 37, 8 (March): 707-716.
- Areekijsee, M., and Chuen-Im, T. (2012). Effects of porcine follicle stimulating hormone, luteinizing hormone and estradiol supplementation in culture medium on ultrastructures of porcine cumulus oocyte complexes (pCOCs). **Micron.** 43, 2-3 : 251-257.
- Areekijsee, M., Pongsawat, W., Pumipaiboon, M., Thepsithar, C., Sengsri, S., Chuen-Im, T. (2015). Morphological interaction of porcine oocyte and cumulus cells study on in vitro oocyte maturation using electron microscopy. **International science index international journal of biological, biomolecular, agricultural, food and biotechnological engineering.** 9, 4: 367-370.
- Besnard, N., Pisselet, C., Monniaux, D., Monget, P. (1997). Proteolytic Activity

- Degrading Insulin-like Growth Factor-Binding Protein-2, -3, -4, and -5 in Healthy Growing and Atretic Follicles in the Pig Ovary. **Biology of reproduction**. 56 (April): 1050-1058.
- Bianchi, L., Gagliardi, A., Campanella, G., Landi, C., Capaldo, A., Carleo, A., Armini, A., Leo, D., Piomboni, P., Focarelli, R., Bini, L. (2013). A methodological and functional proteomic approach of human follicular fluid en route for oocyte quality evaluation. **Journal of Proteomics**. 90, 2 (September): 61-76
- Bode, G., Clausing, P., Gervais, F., Loegsted, J., Luft, J., Nogues, V., Sims, J. (2010). The utility of the minipig as an animal model in regulatory toxicology.’’ **J. Pharmacol. Toxicol Methods**. 62, 3 (November-December): 196–220.
- Bozzola, J.J. and Russell, L.D. (1999). *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists*. Jones and Bartlett, Boston, 670.
- Chen, X., Li, Q., Zhang, S., Han, Z., Zhao, R., Wu, S., Huang, J. (2007). Effects of ovarian cortex cell coculture during in vitro maturation on porcine oocytes maturation, fertilization and embryo development. **Animal Reproduction Science**. 99, 3-4, (June): 306-316.
- Damiani, P., Fissore, R. A., Cibelli, J. B., Long, C. R., Balise, J. J., Robl, J. M., Duby, R. T. (1996). Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. **Molecular Reproduction and Development**. 45: 521—534.
- Denning, C. and Priddle. H. (2003). New frontiers in gene targeting and cloning; success, application and challenges in domestic animals and human embryonic stem cells. **Reprod**. 126, 1 (July): 1-11.
- Dong, J., Albertini, D. F., Nishimori, K., Kumar, T. R., Lu, N., Matzuk, M. M. (1996). Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. **Nature**., 383: 531–535.
- Ducolomb, Y., González-Márquez, H., Fierro, R., Jiménez, I., Casas, E., Flores, D., Bonilla, E., Salazar, Z., 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 (April): 896-904.
- Elizabeth, H., (2021). “Reproduction in Swine – Understanding the Estrous Cycle for

- Herd Management.’’ **The U.S. Center for Pork Excellence offers the National Swine Reproduction Guide: A Troubleshooting and Management Tool.** 1-3.
- Evecen, M., Cirit, U., Demir, K., Karaman, E., Hamzaoglu, A.I. and Bakirer, G. (2009). Developmental Competence of Domestic Cat Oocytes from Ovaries Stored at Various Durations at 4°C Temperature.’’ **Animal Reproduction Science** 116: 169-172.
- Fair T., Hyttel, P., Greve, T., (1996). Bovine oocyte diameter in relation of maturational competence and transcriptional activity. **Mol. Reprod. Dev.** 42, 4 (December): 437-442.
- Fiihrer, F., Mayr, B., Schellander, K., Kalat, M., Schleger, W., (1989). Maturation competence and chromatinbehaviour in growing and fully-growncattle oocytes, **J. Vet. Med.** 36, 4 (April): 285-291.
- Fortune, J. E. (1994). Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biol Reprod.** 50, 2 (Feb): 225-32.
- Furukawa, K., Yamoto, M., Kokawa, N., Nakano, R. (1994). Purification of high-molecular-weight folliclestimulating hormone binding inhibitor in porcine follicular fluids. **Eur J Endocrinol.** 130: 625-33.
- Guignot, F., Bezard, J. and Palmer, E. (1999). Effect of Time during Transport of Excised Mare Ovaries on Oocyte Recovery Rate and Quality after in Vitro Maturation. **Theriogenology.** 52, 5: 757-766.
- Gupta, S. K., Chadha, K., Harris, J. D., Yurewicz, E. C., Sacco, A. G., Kolluri, S. K., and Afzalpurkar. A., (1996). Mapping of epitopes on porcine zona pellucida-3 α by monoclonal antibodies inhibiting oocyte-sperm interaction. **Biology of Reproduction.** 55, 2 (August): 410-415.
- Gutiérrez, C. G., Campbell, B. K., Robert, W. (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 (1 March): 608-616.
- Hanrahan, J. P., Gregan, S. M., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, G. H., Powell, R., Galloway, S. M. (2004). Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors

- GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (Ovaries). **Biol Reprod.** 70, 4 (April): 900–909.
- 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, 3-4 (July): 421-430.
- Karin Edström (2009). The porcine cervix morphological changes and infiltration of immune cells during oestrus and dioestrus in the sow. **Swedish University of Agricultural Sciences Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences Veterinary Medicine Programme.** 2009, 27,1-26.
- Kempisty, B., Piotrowska, H., Rybska, M., Woźna, M., Antosik, P., Bukowska, D., Zawierucha, P., Ciesiółka, S., Jaśkowski, J. M., Nowicki, M., Brüssow, K. P., Zabel, M. (2013). Expression of INH β A and INH β B proteins in porcine oocytes cultured in vitro is dependent on the follicle size. **Zygote.** 18 (October): 1-7.
- Kiczak, L., Alicja T., Jacek B., Urszula P., Maciej Z., Agnieszka N. N., Adrian J. Piotr, S., Hossein, A., Ewa A. J., Piotr, P. (2013). Expression and Complex Formation of MMP9, MMP2, NGAL, and TIMP1 in Porcine Myocardium but Not in Skeletal Muscles in Male Pigs with Tachycardia-Induced Systolic Heart Failure. **BioMed Research International.** 1-12.
- Kwak, S. S., Yoon, J. D., Cheong, S. A., Jeon, Y., Lee, E., & Hyun, S. H. (2014). The new system of shorter porcine oocyte in vitro maturation (18 hours) using ≥ 8 mm follicles derived from cumulus-oocyte complexes. **Theriogenology.** 81, 2 (January): 291-301.
- Kimura, N., Konno, Y., Miyoshi, k., Matsumoto, H., Sato, E. (2002). Expression of Hyaluronan Synthases and CD44 Messenger RNAs in Porcine Cumulus-Oocyte Complexes During In Vitro Maturation. **Biology of Reproduction.** 66, 3 (March): 707–717.
- Lee, J., Kim, E., Hwang, S-U., Cai, L., Kim, M., Choi, H., Oh, D., Lee, E., Hyun, S-H. (2021). Effect of D-Glucuronic Acid and N-acetyl-D-Glucosamine Treatment during In Vitro Maturation on Embryonic Development after Parthenogenesis

- and Somatic Cell Nuclear Transfer in Pigs. **Animals**. 11: 1034-1048
- Li, M., Zhang, D., Hou, Y., Jiao, L., Zheng, X., Wang, W. H. (2003). Isolation and culture of embryonic stem cells from porcine blastocysts. **Mol. Reprod. Dev.** 65, 4 (August):429-434.
- Lin, Y. A., Tsai, H. B., Liao, M. H., Chen, M. C. (2010). Effect of Preserving Condition of Porcine Ovaries on the Development of in Vitro Matured Oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**. 46, 2 (March): 333-337.
- Ledwitz-Rigby, F., Rigby, B. W. (1979). Follicular fluid stimulation of steroidogenesis in immature granulosa cells in vitro. **Mol Cell Endocrinol**. 14,1 (April): 73-9.
- Leroy, J., L., M., R., Vanholde, T., Delanghe, J., R., Opsomer, G., Soom, A., V., Bols, P., E., J., Dewulf, J., Kruif, A., D. (2004). Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. **Theriogenology**. 62, 6 (September): 1131-1143
- 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 (November): 265-275,
- Mahajan, D., K., and Little, A., B. (1978). Specific cortisol binding protein in porcine follicular fluid. **Biology of reproduction**. 17: 834-842.
- Maria, H. C. C., Naiara, Z. S., Jurandir F. da C., Clara S. O., Maite D. C., Hugo, F., Fernanda, C. de C., Joaquim, M. G. (2014). Effect of follicular fluid supplementation during in vitro maturation on total cell number in bovine blastocysts produced in vitro. **R. Bras. Zootec**. 43(3): 120-126
- McElroy, S. L., Kim, J. H., Kim, S., Jeong, Y. W., Lee, E. G., Park, S. M., Hwang, W. S. (2008). Effects of culture conditions and nuclear transfer protocols on blastocyst formation and mRNA expression in preimplantation porcine embryos. **Theriogenology**. 69, 4 (March): 416-425
- Mette, M., Andersen, J., Krøll, A. G., Byskov and Faber, M. (1976). Protein composition in the fluid of individual bovine follicles. **J. Reprod. Fert.** 48, 1 (September): 109-118.
- Mohammed, A. A., Karasiewicz, J., Papis, K., Modlinski, J. A. (2005). Oocyte maturation in the presence of randomly pooled follicular fluid increases bovine

- blastocyst yield in vitro. **J. Anim. Feed. Sci.** 14, 3: 501-512.
- Mohammed, A. A. (2006). Developmental competence of mouse oocytes reconstructed with G2/M somatic nuclei. **Biotechnol.** 1117-1120.
- Mohammed, A. A. (2008). Contributions of cumulus cells on timing of oocytes maturation and developmental potential. Assiut. **J. Agric. Sci.** 39: 43-50.
- Mohammed, A. A. (2011). Total protein, urea, glucose, triglycerides and cholesterol concentrations of ruminant follicular fluid in relation to follicle size and estrous stage. **Afr. J. Anim. Biomed. Sci.** 6: 127-132.
- Mohammed, A. A. and Attaai, A. H. (2011). Effects of Dietary Urea on timing of embryo cleavages and blood components in Mice. **Vet. World.** 4, 8: 360-363.
- Mohammed, A. A, Abd El-Hafiz, G. A., Ziyadah, H. M. S. (2012). Effect of dietary urea on ovarian structures in Saidi ewes during follicular and luteal phases. **Egyptian J. Anim. Prod.** 49, 1: 29-35.
- Mohammed, A. A., Kassab, A. Y. (2015). Metabolic changes in blood and ovarian follicular fluid in baladi goats as affected by storage time duration. **Egyptian J. Anim. Prod.** 52, 1 (January): 47- 54.
- Mohammed, A. A., Karasiewicz, J., Kubacka, J., Greda, P., Modlinski, J. A. (2010). Enucleated GV oocytes as recipients of embryonic nuclei in the G1, S, or G2 stages of the cell cycle. **Cell. Reprogram,** 12, 4 (July): 427-435.
- Mohammed, A. A., Karasiewicz, J., Modlinski, J. A. (2008). Developmental potential of selectively enucleated immature mouse oocytes upon nuclear transfer. **Mol. Reprod. Dev.** 75, 8 (August): 1269-1280.
- Mohammad, J. A., Alborzi, J., Akbarinejad, V., Fathi, R. (2021). Supplementation of granulosa cells conditioned medium with pyruvate and testosterone could improve early follicular development in cultured 1-day-old mouse ovaries. **Zygote.** 29: 1-8.
- Mori, T., Amano, T., & Shimizu, H. (2000). Roles of gap junctional communication of cumulus cells in cytoplasmic maturation of porcine oocytes cultured in vitro. **Biology of Reproduction.** 62, 1 (April): 913-919.
- Nagyova, E. (2018). The biological role of hyaluronan-rich oocyte-cumulus extracellular matrix in female reproduction. **Int. J. Mol. Sci.** 19, 1 (January): 74-

87.

- Neil, G. V., Virgilio, D. V. Jr., Lerma, C. O., Marlon, B. O. (2017). Gross anatomy of the female reproductive organs of Philippine native pig (*Sus scrofa* L.). **International Journal of Agricultural Technology**. 13, 7.2: 1627-1638.
- Oberlender, G., Murgas, L. D., Zangeronimo, M.G., da Silva, A. C., Menezes Tde, A., Pontelo, T. P., and 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 (May): 319-327.
- Pellicer, A., Albert, C., Mercader, A., Bonilla-Musoles, F., Remohí, J., and Simón, C. (1998). The follicular and endocrine environment in women with endometriosis: local and systemic cytokine production. **FertilSteril**. 70, 3 (September): 425-431.
- Prieto, L., Quesada, J. F., Cambero, O., Pacheco, A., Pellicer, A., Codoceo, R., and Garcia-Velasco, J. A. (2012). Analysis of follicular fluid and serum markers of oxidative stress in women with infertility related to endometriosis. **FertilSteril**. 98, 1 (July): 126-130.
- Pongsawat, W. (2014). In vitro assessment of the toxicity of cadmium and copper in cumulus oocyte complexes cells and follicular cells. Ph.D., dissertation, Silpakorn University.
- Revelli, A., Piane, L. D., Casano, S., Molinari, E., Massobrio, M., Rinaudo, P. (2009). Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. **Reprod Biol Endocrinol**. 7 (May): 40.
- Reynolds, L. P., Ireland, J. J., Caton, J., Bauman, D. E. (2009). Commentary on Domestic Animals in Agricultural and Biomedical Research: An Endangered Enterprise. **Journal of Nutrition**. 139, 3(February): 427-428.
- Robert, B. G., Lesley, J. R., Samu, M., Noora, K., Rebecca, A. D., Theresa, E. H., Olli, R. and David, G. M. (2006). Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. **Cell Sci**. 119 (August): 3811-3821.
- Ross, M., H., and Pawlina, W. (2006). Female reproductive system. **Histology A Text and Atlas with correlated cell and molecular biology**., 773-783.
- Schmidt, C. L., June, Z. K., Pramila, V. D., Quigley M. M., Karmen, L. S. (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. **J. Reprod. Fert.** 71: 279-287.
- Schwarz, T., Kopyra, M. and Nowicki, J. (2008). Physiological mechanisms of ovarian follicular growth in pigs—a review. **Acta.Veterinaria.Hungarica.** 56, 3 (October): 369–378
- Shibahara, H., Ishiguro, A., Shirasuna, K., Kuwayama, T., Iwata, H. (2019). Follicular factors determining the developmental competence of porcine oocyte. **Reprod Med Biol.** 18, 3 (July):256-262.
- Sinclair, K. D., Lunn, LA., Kwong, W. Y., Wonnacott, K., Linforth, R. S. T., Craigon, J. (2008). Amino acid and fatty acid composition of follicular fluid as predictors of invitro embryo development. **Reprod. Bio. Med.** 16, 6 (June): 859-868.
- Siu, M. K., Cheng, C. Y. (2012). The blood-follicle barrier (BFB) in disease and in ovarian function. **Adv Exp Med Biol.** 763: 186–92.
- Shang, J. H., Xu, R. X., Jiang, . X. D., Zou, Y. X., Qin, L. S., Cai, Y. Q., Yang, Z. J., Zheng, X., Cui, S. (2007). Somatic cell nuclear transfer of oocytes aspirated from postovulatory ovarian follicles of superovulated rabbits. **Asian-Aust. J. Anim. Sci.** 20: 1354-1360.
- Spacek, S. G. and Carnevale, E. M. (2018). Impact of equine and bovine oocyte maturation in follicular fluid from young and old mares on embryo production in vitro. **J. Equine. Vet. Sci.** 68 (June): 94-100.
- Spitzer, D., Murach, K. F., Lottspeich, R., Staudach, A., Umensee, K. J. (1996). Different protein patterns derived from follicular fluid of mature and immature human follicles. **Human Reproduction.** 11 (4): 798-807.
- Squier, C. A., Mantz, M. J., Schlievert, P. M., Davis, C.C. (2008). Porcine vagina ex vivo as a model for studying permeability and pathogenesis in mucosa. **J Pharm Sci.** 97, 1 (January): 9–21.
- Solano, R., De Armas, R., Pupo, C. and Castro, F. (1994). Short Term Preservation of Intrafollicular Oocytes at 4 C. **Theriogenology.** 41, 299.
- Sugiura, K., Su, Y-Q., Eppig, J. J. (2009). Targeted suppression of Has2 mRNA in mouse cumulus cell-oocyte complexes by adenovirus-mediated short-hairpin RNA

- expression. **Mol Reprod Dev.** 76, 6: 537-547.
- Spurr, A. R. (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **Journal of Ultra-structural Research.** 26: 31-43.
- Tortora., G., J., and Derrickson, B., H. (2009). The reproductive systems. In Short stories: **Principles of anatomy and physiology.** 1098-1102.
- Tsafri, A., and Pomerantz, S. H. (1986). 8 Oocyte maturation inhibitor. **Clinics in Endocrinology and Metabolism.** 15, 1 (February): 157-170.
- Turk, J. R., Henderson, K. K., Vanvickle, G. D., Watkins, J., Laughlin, M. H. (2005). Arterial endothelial function in a porcine model of early stage atherosclerotic vascular disease. **Int J Exp Pathol.** 86, 5 (October): 335–345.
- Van de Wiel, Bar-Ami, S., Tsafri, A., and De Jong, F. H. (1983). Oocyte maturation inhibitor, inhibin and steroid concentrations in porcine follicular fluid at various stages of the oestrous cycle. **Reprod. Fertil.** 86 (growth factor and epidermal growth factor binding sites in ovaries from bovine 1): 247-252.
- Vicencio, N. G., Vienes Jr., V. D., Ocampo, L. C., Ocamp, M. B. (2017). Gross Anatomy of the Female Reproductive Organs of Philippine Native Pig (*Sus scrofa* L.) **International Journal of Agricultural Technology.** 13, 7.2: 1627-1638.
- Wandji, S. A., Pelletier, G., and Sirard, M. A. (1992). Ontogeny and cellular localization of 125I labelled basic fibroblast fetuses and neonatal calves. **Biol. Reprod.** 47: 807-813.
- Waugh, A., and Grant, A. (2014). The reproductive system. In Short stories: **Ross and Wilson Anatomy & Physiology in Health and Illness.** 455-458.
- Xu, X. M., Hua, J. L., Jia, W. W., Huang, W., Yang C. R., and Dou, Z. Y. (2007). Parthenogenetic activation of porcine oocytes and isolation of embryonic stem cells-like derived from parthenogenetic blastocysts. **Asian-Aust. J. Anim. Sci.** 20, (October): 1510-1516.
- Yang, N., Lu, K. and Gordon, I. (1990). In Vitro Fertilization (IVF) and Culture (IVC) of Bovine Oocytes from Stored Ovaries. **Theriogenology.** 33: 352.
- Yoon, Y. D., Hwang, S. U., Kim, M, Jeon, Y., and Hyun, S. H. (2019). Growth differentiation factor 8 regulates SMAD2/3 signaling and improves oocyte quality during porcine oocyte maturation in vitro. **Biology of Reproduction.** 101, 1

(July): 63–75

Zhang, J., Deng, Y., Xu, J., Yang, X., Wang, H., Shi, D., Lu, F. (2020). Granulosa cell-conditioned medium enhances steroidogenic competence of buffalo (*Bubalus bubalis*) theca cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. 56, 9(September): 799–807.



ภาคผนวก

1. การเตรียมน้ำเกลือผสมยาปฏิชีวนะ (สำหรับเตรียมน้ำเกลือ 1,000 มิลลิลิตร) (มยุวา, 2551)

1.1 เตรียมยาปฏิชีวนะ 3 ชนิด คือ penicillin-G 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร streptomycin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ amphotericin-B 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.2 นำสารที่ชั่งเตรียมไว้เทลงในน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจนสารละลายเป็นเนื้อเดียว

2. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ สูตร M199 (Earle's salts) (มยุวา, 2551)

2.1 เตรียมอาหาร M199 เสริมด้วย fetal bovine serum 10 เปอร์เซ็นต์ NaHCO_3 2.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไพรูเวท 0.25 มิลลิโมลาร์ และ gentamycin sulfate 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2 นำสารละลายทั้งหมดไปกรองผ่าน membrane filter ที่มีขนาด 0.22 ไมโครเมตร ภายในตู้ปลอดเชื้อเพื่อป้องกันการปนเปื้อนแล้วเก็บอาหารเพาะเลี้ยงในขวดที่ปลอดเชื้อ โดยเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อต้องการใช้ศึกษาจึงนำไปใส่ตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เสริมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่มีความชื้นสูง นาน 10-12 ชั่วโมง ก่อนทำปฏิบัติการ

3. การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (มยุวา, 2551)

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

3.2 นำสารที่เตรียมไว้เทลงในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันจนสารละลายเป็นเนื้อเดียว ปรับค่าความเป็นกรดต่างด้วย HCL หรือ NaOH เพื่อให้ได้ค่า pH 7.2-7.4

3.3 กรองสารละลายด้วยเครื่องกรอง membrane filter ที่มีขนาดรู 0.22 ไมโครเมตร

3.4 เก็บสารละลายในขวดแก้วและเก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

4. การเตรียมสารเคมีเพื่อเตรียมตัวอย่างสำหรับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

การเตรียม phosphate buffers solution (Sorenson's buffer) (เวคิน นพนิทย์, 2524)

เตรียม stock solutions:

4.1 Solution A: 0.2M sodium phosphate monobasic

ชั่ง NaH_2PO_4 27.80 กรัม

ชั่ง $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ 27.60 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น เติมน้ำกลั่นให้ถึงขีด 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล

4.2 Solution B: 0.2 M sodium phosphate dibasic

ชั่ง Na_2HPO_4 28.40 กรัม

ชั่ง $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.65 กรัม

ชั่ง $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.70 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น เติมน้ำกลั่นให้ถึงขีด 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล

4.3 เตรียม Working 0.2 M buffer solution

Working solution ทำโดยการผสม stock solution ทั้ง A และ B ตามสัดส่วนในตาราง เพื่อให้ได้ pH ตามต้องการ (pH 7.2-7.4)

Solution A (mL)	Solution B (mL)	pH
28	72	7.2
23	77	7.3
19	81	7.4

5. เตรียม 0.1 M phosphate buffer (washing buffer) (Bozzola และ Russell, 1999)

5.1 ผสม 0.2 M buffer solution จาก (3) 1 ส่วน

5.2 น้ำกลั่น 1 ส่วน

6. กลูทารอลดีไฮด์ 5 เปอร์เซ็นต์ (5% Glutaraldehyde) (Bozzola และ Russell, 1999)

- | | |
|-----------------------------------|--------------|
| 6.1 กลูทารอลดีไฮด์ 50 เปอร์เซ็นต์ | 10 มิลลิลิตร |
| 6.2 น้ำกลั่น | 90 มิลลิลิตร |

วิธีการ ล้างขวดกลูทารอลดีไฮด์ให้สะอาดเช็ดให้แห้ง ตัดคอขวดแล้วใช้ปิเปตดูดลงในน้ำกลั่นคนให้เข้ากัน ปิดฝาให้สนิท เก็บในขวดสีชา เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. การเตรียม Working solution สารกลูทารอลดีไฮด์ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (Bozzola และ Russell, 1999)

นำกลูทารอลดีไฮด์ 5 เปอร์เซ็นต์ผสมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ปริมาณเท่ากัน (1:1) เก็บในขวดสีชา เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8. ออสเมียม เตตรอกไซด์ 4 เปอร์เซ็นต์ (4% Osmium tetroxide) (Bozzola และ Russell, 1999)

- | | |
|-------------------------|--------------|
| 8.1 ออสเมียม เตตรอกไซด์ | 1 กรัม |
| 8.2 น้ำกลั่น | 25 มิลลิลิตร |

วิธีการ ใช้ออสเมียม เตตรอกไซด์ 1 กรัม ล้างหลอดที่บรรจุให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นเช็ดให้แห้งแล้วห่อหลอดด้วยกระดาษเช็ดเลนส์ ทาบให้หลอดแตก ถ่ายลงในขวดแก้วเติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ค้างคืนในตู้ควั่นให้ออสเมียม เตตรอกไซด์ ละลายเองซึ่งมีสีเหลืองอ่อน กรองด้วยกระดาษกรอง

9. การเตรียม ออสเมียม เตตรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (Bozzola และ Russell, 1999)

วิธีการ ให้ผสมออสเมียม เตตรอกไซด์ 4 เปอร์เซ็นต์ ในสัดส่วน 1 ต่อ 3 ส่วนของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ควรนำสารละลายมาใช้ให้หมดโดยเร็ว ไม่ควรเก็บไว้นาน เพราะสารละลายจะเสื่อมคุณภาพกลายเป็นสีดำ

10. การเตรียมพลาสติกสูตร สเปนอร์ เรซิน (Spurr, 1969)

10.1 เรซิน VCD (vinyl cyclohexene dioxide)	10	กรัม
10.2 เฟลกซีบิไลเซอร์ DER 736 (diglycidyl ether polypropylene glycol)	7	กรัม
10.3 สารที่ช่วยให้พลาสติกแข็ง NSA (nonenyl succinic anhydride)	26	กรัม
10.4 ตัวเร่งการแข็งตัวของพลาสติก DMAE (dimethylamine ethanol)	0.3	กรัม

วิธีการ ในการเตรียมสารเคมีจะทำการชั่งน้ำหนัก โดยเอาบีกเกอร์แบบแก้วหรือพลาสติกวางบนแท่งของเครื่องชั่งน้ำหนัก แล้วชั่งส่วนผสมชนิดต่างๆ ใส่ลงในบีกเกอร์ตามลำดับผสมให้เข้ากันด้วย magnetic bar ทำให้แข็งโดยนำไปอบที่อุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมง หรือ 80 องศาเซลเซียส นาน 7 ชั่วโมง ผสมก่อนใช้อย่างน้อย 1 คืน เก็บในห้องแช่แข็งเมื่อใช้ต้องนำออกจากตู้เย็นให้เท่าอุณหภูมิห้องก่อน

11. การเตรียมเลดซิเตรท 0.4 เปอร์เซ็นต์ (0.4 Lead citrate) (Reynolds, 2009)

11.1 เลดซิเตรท	0.04	กรัม
11.2 น้ำปราศจากไอออน	9.0	มิลลิลิตร
11.3 โซเดียมไฮดรอกไซด์	10.0	นอร์มอล

วิธีการ ละลายเลดซิเตรทในน้ำปราศจากไอออนที่กรองแล้วต้มจนเดือดและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องปริมาณ หลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10.0 นอร์มอล จนกว่าจะใส

12. การเตรียมยูรานิล อาซิเตท 5 เปอร์เซ็นต์ (5 % Uranyl acetate) (Bozzola และ Russell, 1999)

12.1 ยูรานิล อาซิเตท	1.0	กรัม
12.2 เมทานอล	20.0	มิลลิลิตร

วิธีการ ละลายยูรานิล อาซิเตท ใน เมทานอล เมื่อละลายเข้ากันดีปรับปริมาตรให้ได้ 20.0 มิลลิลิตร

13. วิธีการหาปริมาณโปรตีนมาตรฐาน โดยวิธีของ Lowry (Lowry, 1951)

13.1 นำสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA (Bovine serum albumin) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม มี 9 หลอด ทำตัวอย่างละ 2 หลอด รวมทั้งหมด 18 หลอด ใช้อัตราส่วน 1:20 และ 1:40 โดยมีวิธีการเตรียมสาร ดังนี้

หลอดที่	ปริมาณ BSA (mg/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

13.2 สารละลายฟีนอล (Folin phenol reagent) เจือจางเท่าตัวก่อนใช้

13.3 สารละลาย alkaline cupper เตรียมจากสารละลาย 3 ชนิด สารละลาย A, B และ C

13.4 สารละลาย A ซึ่ง sodium carbonate 20 กรัม ในสารละลาย NaOH ที่ความเข้มข้น 0.1 M (10 มิลลิลิตร) จนมีปริมาตรครบ 1 ลิตร

13.5 สารละลาย B 1% w/v CUSOA

13.6 สารละลาย C 1% w/v potassium หรือ sodium tartrate

สารละลาย alkaline cupper เตรียมโดยใช้อัตราส่วนของ B:C:A เป็น 1:1:100 โดยปริมาตร การเตรียมต้องผสม สารละลาย B และ C ก่อน แล้วจึงเติมสารละลาย A ผสมให้เข้ากัน สารนี้เตรียมทันทีก่อนทำการทดลอง

วิธีการ นำสารละลายในข้อ 13.1 ทั้งหมด 18 หลอด มาหาปริมาณโปรตีน โดยเติมสารละลาย alkaline

cupper 3 มิลลิลิตรต่อหลอด เขย่าตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

เติมสารละลายฟีนอล หลอดละ 300 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดสีที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นวัดค่า

การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร เทียบกับหลอดที่เป็น blank

นำค่าที่ได้เขียนกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง A_{650} และความเข้มข้นของโปรตีน

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่างโดยวิธีของ Lowry

เตรียมสารตัวอย่างให้มีปริมาณคงที่เท่ากัน คือ 15 ไมโครกรัมต่อ หลุม โดยผสมสารตัวอย่าง ดังนี้

สารตัวอย่าง	X	ไมโครลิตร
NuPAGE" LSD Sample buffer (4X)	3.75	ไมโครลิตร
NuPAGE" Reducing Agent (10X)	1.50	ไมโครลิตร
น้ำ deionized	X	ไมโครลิตร
รวม	15.00	ไมโครลิตร

14. การเตรียม staining solution COOMASSIE BRILLIANT BLUE R-250) 100 มิลลิลิตร

14.1 COOMASSIE BRILLIANT BLUE R-250	0.214	กรัม
14.2 Methyl alcohol	50.00	มิลลิลิตร
14.3 น้ำ deionized	50.00	มิลลิลิตร
14.4 Acetic acid	7.00	มิลลิลิตร
ผสมแล้วกรองด้วยกระดาษกรอง		

15. การเตรียม Destaining solution 200 มิลลิลิตร

15.1 Methyl alcohol	14	มิลลิลิตร
15.2 Acetic acid	10	มิลลิลิตร
15.3 น้ำ deionized	176	มิลลิลิตร

16. สารละลายโทลูอิดีน บลู 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1 เปอร์เซ็นต์โบเร็กซ์ (Toluidine blue ใน 1

เปอร์เซ็นต์ Borax tetra, sodium borate) (Bozzola และ Russell, 1999)

16.1 โทลูอิดีน บลู	1	กรัม
16.2 โบเร็กซ์ (Borax)	1	กรัม
16.3 น้ำกลั่น		

วิธีการ ละลายโบเร็กซ์ด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร จากนั้นละลายโทลูอิดีน บลู ในน้ำ 50 มิลลิลิตร แล้วเทโบเร็กซ์ผสมลงไป

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวหทัยรัก ตุงคะเสน
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2556 ประกาศนียบัตรหลักสูตรบัณฑิตวิชาชีพครู คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา พ.ศ. 2549 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เภสัชวิทยา) บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2546 วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ที่อยู่ปัจจุบัน	398 ดิคอนโดแคมป์ส จรัญ 13 แขวงบางแกว เขตภาษีเจริญ กรุงเทพฯ 10160
ผลงานตีพิมพ์	Areekjseree, M., Tungkasen, H., Srinarkand, C., Chuen-Im, T. (2019). 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)., 41(1): 192-198. (ฐานข้อมูล Scopus) งานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ Tungkasen, H., Youngsabanant, M. (2019). Porcine follicular fluid proteins analysis. Proceedings of an International Conference Science, Technology, Engineering and Management (ICSTEM-2019). Osaka, Japan. Srinark, C., Buranathanasin, N., Tungkasen, H., Youngsabanat- Areekjseree, M. (2017). The advantage of porcine follicular fluid protein from small size follicle on porcine oviductal epithelial cell viability and growth. Abstract in Regional Conference on Material and ASEAN Microscopy Conference 2017 (RCM & AMC 2017) Penang, Malasia, 12-13 December 2017. Tungkasen, H., Yoomak, S., Jaidee, S., Phetchrid, S., Sengsai, S., Charoenpanich, A., Areekjseree, M. (2016). Characterizing the oocytes and protein patterns of small and medium porcine follicles.

The 5th Burapha University International Conference Harmonization of Knowledge towards the Betterment of Society. Proceedings of the Burapha University International Conference., 28-29 July 2016, Bangsaen, Chonburi, Thailand.

Wisuthseriwong, P., Tungkasen, H., Namsongsan, S., Srinark, C., Youngsabanant- Areekijsee, M. (2016). Cumulus-Oocyte complexes and follicular fluid proteins of pig during folliculo genesis. 18th International Conference on Advances in Bioscience and Biotechnology., 3 (11): 1654-1657. November 21-22, 2016. Singapore.

Areekijsee, M., Tungkasen, H., Pongsawat, W., Phetchrid, S., Jaidee, S., Yoomak, S. (2016). Characterization of oocyte, follicle cells and follicular fluid proteins from porcine follicles. Abstract of the Microscopy Society and Anatomy Association of Thailand (APMC11/MST33/AAT39 Conference). Phuket, Thailand. May 23-27, 2016.

Tungkasen, H., Kankamol, C., Sengsai, S., Chuen-Im, T., Phetchrid, S., Jaidee, S., Yoomak, S., Areekijsee, M. (2015). Porcine oocyte and follicular fluid proteins from small, medium, and large follicles analysis. Abstract on Sakon Nakhon Rajabhat University International Conference. 24 July 2015, Sakon Nakhon, Thailand.

Areekijsee, M., Tungkasen, H., Kankamol, C., Phetchrid, S., Jaidee, S., Yoomak, S., Thepsithar, C., Charoenpanich, A., Sengsai, S., Pumipai boon, M. (2015). Investigation on porcine oocytes and follicular fluid protein bands from medium and large follicles. Abstract of the Kuala Lumpur International Conference on "Engineering & Technology, Computer, Basic & Applied Sciences" (ECBA- 2015) Pearl International Hotel, Kuala Lumpur Malaysia. 14-15 December 2015.