การทดลองที่ 6 Effect of various growth factors on *in vitro* development of swamp buffalo early antral follicle

ผลของโกรทแฟ็กเตอร์ต่อการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลขนาดเล็กในกระบือปลัก

บทนำ

รังไข่ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประกอบด้วยฟอลลิเคิลและไข่จำนวนมากแต่หลังจากคลอดจำนวนของไข่ภายในรังไข่จะสูญเสียไปในระหว่างกระบวนการเจริญและพัฒนาของไข่และฟอลลิเคิล กระบวนการที่ทำให้เกิดการสูญเสียหรือการตายของไข่และฟอลลิเคิลภายในรังไข่คือการเกิด apoptosis ซึ่งเกิดขึ้นกับไข่ในตัวอ่อนระยะฟีตัสและเกิดขึ้นกับเซลล์แกรนูโลซา (granulosa cell) ของฟอลลิเคิลของวัยเจริญพันธุ์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด จำนวนของไข่สุกที่สามารถตกไข่และผสมพันธุ์ได้มีน้อยกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ในระหว่างวงรอบการเป็นสัดของกระบือปลักพบว่ามีฟอลลิเคิลตายหรือฝ่อสลายไป 92-95 เปอร์เซ็นต์ การตายของฟอลลิเคิลในระหว่างวงรอบการเป็นสัดอาจจะเกิดจากปริมาณของฮอร์โมน FSH ภายในรังไข่ลดลง หรืออาจเกิดจากการที่ฟอลลิเคิลที่มีขนาดใหญ่ไปยับยั้งการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลที่มีขนาดเล็ก อย่างไรก็ตามความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลยังมีน้อยมาก ในระหว่างการเจริญพัฒนาของฟอลลิเคิลอาจจะต้องการโกรทแฟ็กเตอร์ ฮอร์โมน หรือสารอาหารต่างๆเพื่อช่วยในการเจริญเติบโต ดังนั้นการเลี้ยงฟอลลิเคิลภายในห้องทดลองจะช่วยให้เข้าใจกลไกการเจริญเติบโตและการพัฒนาของฟอลลิเคิลได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเพิ่มปริมาณไข่สุกเพื่อสามารถนำมาใช้ในการปฏิสนธิหรือนำมาใช้ในงานวิจัยอื่นๆ เช่น การปฏิสนธิในหลอดแก้ว การฉีดตัวอสุจิ เข้าในไข่ และการทำโคลนนิ่ง ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้คือการศึกษาผลของโกรทแฟ็กเตอร์ที่มีต่อการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลขนาดเล็กในกระบือปลัก

วิธีการทดลอง

การคัดแยกฟอลลิเคิล

เก็บรังไข่กระบือปลักจากโรงฆ่าสัตว์ แช่ไว้ในน้ำเกลือ (0.9% NaCl) ที่อุณหภูมิห้องระหว่างนำเข้าห้องปฏิบัติการ ล้างรังไข่ด้วย 70% ethanol นาน 1 นาที แล้วล้างในน้ำเกลือ 1 ครั้ง จากนั้นใช้ใบมีดตัดเอาเฉพาะชั้นคอร์เทคออกเป็นชิ้นเล็กๆ ให้มีขนาดหนาประมาณ 1-2 มิลลิเมตร นำชิ้นของรังไข่ที่ได้ล้าง 3 ครั้ง ในน้ำเกลือ จากนั้นใส่ในจานเลี้ยงเซลล์ที่มีน้ำยา HEPES-buffered TCM 199 ที่เติมด้วย 0.1% collagenase type IV และ 40 units/mL DNase จากนั้นนำไปไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นใช้พลาสเจอร์ปิเปตดูดเอนไซม์ทิ้ง แล้วเติม HEPES-buffered TCM 199 ที่เติมด้วย 300 IU/mL pencillin G และ 0.3 mg/mL streptomycin ลงไปเพื่อล้างเอนไซม์ออก จะล้างด้วย HEPES-buffered TCM 199 จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเติม HEPES-buffered TCM 199 ลงในจานเลี้ยงเซลล์ และนำเนื้อเยื่อรังไข่ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ไปคัดแยกเอาเฉพาะฟอลลิเคิลโดยใช้ปากคีบปลายแหลมช่วยในการแยก หลังจากแยกเสร็จแล้วจะทำการวัดขนาดของฟอลลิเคิลโดยทำภายใต้กล้อง inverted microscope ซึ่งต่อกับกล้อง CCD แบ่งฟอลลิเคิลออกเป็น 3 กลุ่ม ตาม

ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางคือ กลุ่มที่ 1 ขนาด 200-399 ไมโครเมตร กลุ่มที่ 2 ขนาด 400-599 ไมโครเมตร และ กลุ่มที่ 3 ขนาด 600-799 ไมโครเมตร

การเลี้ยงฟอลลิเคิล

นำฟอลลิเคิลทั้ง 3 กลุ่มมาเลี้ยงในสภาวะที่ตรึงด้วยคอลลาเจนเจล ใน 4-well dish ด้วยน้ำยาเลี้ยงฟอลลิเคิล 500 µL ซึ่งประกอบด้วย TCM 199 ที่เติมด้วย 10 µg/mL FSH, 2 mM glutamate, 0.23 mM sodium pyruvate, 2 mM hypoxanthine, 1% ITS, 0.1 mg/mL streptomycin และ 100 IU/mL penicillin ทำการเปลี่ยนน้ำยาทุกๆ 2 วัน โดยดูดน้ำยาเก่าออก 250 µL แล้วเติมน้ำยาใหม่ลงไป 250 µL โดยเลี้ยงฟอลลิเคิลนาน 14 วัน จะวัดอัตราการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลวันที่ 7 และ 14 ภายใต้กล้อง inverted microscope ซึ่งต่อกับกล้อง CCD ในการเลี้ยงฟอลลิเคิลจะแบ่งการทดลองออกเป็น 8 กลุ่ม คือ ทรีทเม้นท์ 1 ไม่มีการเติมโกรทแฟ็กเตอร์ (กลุ่มควบคุม) ทรีทเม้นท์ 2 เติม 50 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF) ทรีทเม้นท์ 3 เติม 100 ng/mL insulin-like growth factor-I (IGF-I) ทรีทเม้นท์ 4 เติม 50 ng/mL epidermal growth factor (EGF) ทรีทเม้นท์ 5 เติม 50 ng/mL bFGF+100 ng/mL IGF-I ทรีทเม้นท์ 6 เติม 50 ng/mL bFGF+50 ng/mL EGF ทรีทเม้นท์ 7 เติม 100 ng/mL IGF-I+50 ng/mL EGF และ ทรีทเม้นท์ 8 เติม 50 ng/mL bFGF+100 ng/mL IGF-I+50 ng/mL EGF การตรวจสอบการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลทำโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของฟอลลิเคิลในวันที่ 7 และ วันที่ 14 ของการเลี้ยง

การตรวจสอบการมีชีวิตของไข่

หลังจากเลี้ยงฟอลลิเคิลครบ 14 วัน จะใช้ปากคีบปลายแหลมขนาดเล็กแยกไข่ออกมาจากฟอลลิเคิล แล้วนำไข่ไปตรวจสอบการมีชีวิตด้วยการนำไปไว้ใน 2.5 µg/mL FDA ซึ่งละลายใน PBS+5 mg/mL BSA ที่ 38.5 °C นาน 2 นาทีในที่มืด แล้วนำไปล้าง 3 ครั้งด้วย PBS+5 mg/mL BSA แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ fluorescence ภายใต้แสง UV ไข่ที่เรืองแสงสีเขียวแสดงว่ามีชีวิตรอด

ผลการทดลอง

จากการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของฟอลลิเคิลในวันที่ 7 และ 14 พบว่าฟอลเคิลในกลุ่มที่ 1 (Figure 1) ซึ่งเลี้ยงในน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ bFGF, IGF-I, bFGF+IGF-I, bFGF+EGF, IGF-I+EGF และ bFGF+IGF-I+EGF สามารถเพิ่มขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของฟอลลิเคิลในวันที่ 7 ได้ แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ส่วนผลการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางในวันที่ 14 พบว่าฟอลลิเคิลที่เลี้ยงในน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ bFGF และ bFGF+IGF-I สามารถเพิ่มขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของฟอลลิเคิลได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) การวัดขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของฟอลลิเคิลในกลุ่มที่ 2 (Figure 2) วันที่ 7 และ14 พบว่าฟอลลิเคิลที่เลี้ยงในน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ bFGF และ bFGF+IGF-I สามารถเพิ่มขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของฟอลลิเคิลได้มากกว่าฟอลลิเคิลที่เลี้ยงในทรีทเม้นท์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ผลการวัดอัตราการเจริญเติบโตของ

ฟอลลิเคิลในกลุ่มที่ 3 (Figure 3) วันที่ 7 พบว่าน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ bFGF IGF-I และ bFGF+IGF-I สามารถเพิ่มขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของฟอลลิเคิลได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) อย่างไรก็ตาม ผลการวัดอัตราการเจริญของฟอลลิเคิลในวันที่ 14 พบว่ามีเพียงน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ bFGF เท่านั้นที่สามารถเพิ่มขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของฟอลลิเคิลได้ ($P<0.05$) การศึกษาอัตราการมีชีวิตรอดของไข่พบว่า โกรทแฟ็กเตอร์ bFGF มีอัตราการรอดชีวิตของไข่มากกว่าทรีทเม้นท์อื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่าระยะเวลาในการเลี้ยงมีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของไข่ โดยฟอลลิเคิลในกลุ่มที่ 1 ต้องการระยะเวลาในการเลี้ยงมากกว่า 14 วัน ซึ่งเห็นได้จาก meiotic stage หยุดอยู่ที่ระยะ GV ฟอลลิเคิลในกลุ่มที่ 2 เหมาะสมกับการเลี้ยงในระยะเวลา 14 วัน โดยเห็นได้จาก meiotic stage ของไข่สามารถเจริญได้จนถึงระยะ MI ในขณะที่ฟอลลิเคิลในกลุ่มที่ 3 ต้องการระยะเวลาในการเลี้ยงน้อยกว่า 14 วัน โดยเห็นได้จากอัตราการมีชีวิตรอดของไข่มีน้อยมาก ซึ่งพบว่าไข่จำนวนมากตายเนื่องจากระยะเวลาในการเลี้ยงนานเกินไป จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโกรทแฟ็กเตอร์ bFGF, IGF-I และ bFGF+IGF-I ช่วยให้ฟอลลิเคิลมีขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางเพิ่มขึ้นแต่ในทางกลับกันโกรทแฟ็กเตอร์ EGF นั้นไม่ช่วยให้ฟอลลิเคิลมีขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางเพิ่มขึ้น และยังอาจส่งผลให้มีการยับยั้งการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลในกระบือปลักอีกด้วย

ขณะนี้กำลังอยู่ระหว่างวิเคราะห์ข้อมูล เพื่อเตรียมเขียน manuscript ส่งไปตีพิมพ์ยังวารสารนานาชาติที่มีค่า impact factor ต่อไป

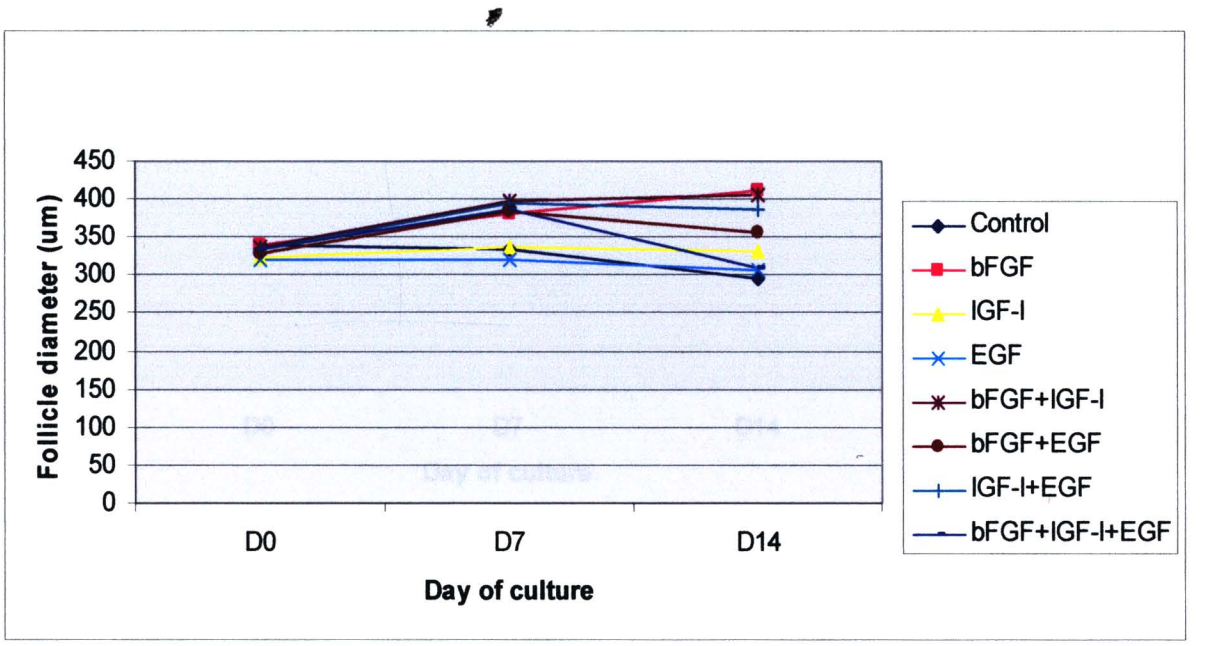

Figure 1 Growth of buffalo early antral follicles group I (Ø 200-399 μm) after cultured in various growth factors.

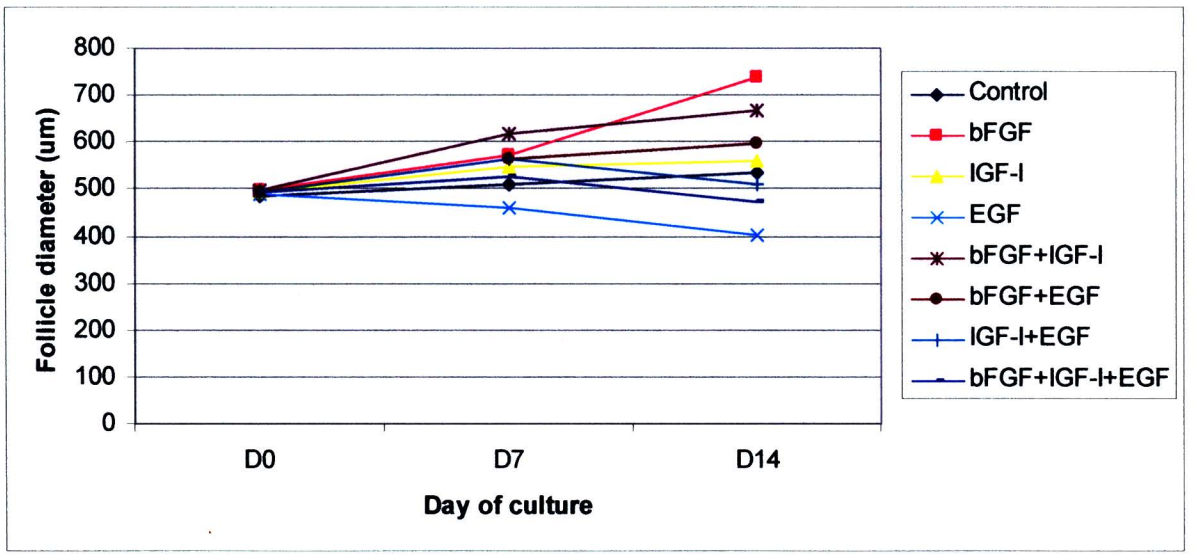

Figure 2 Growth of buffalo early antral follicles group II (Ø 400-599 μm) after cultured in various growth factors.

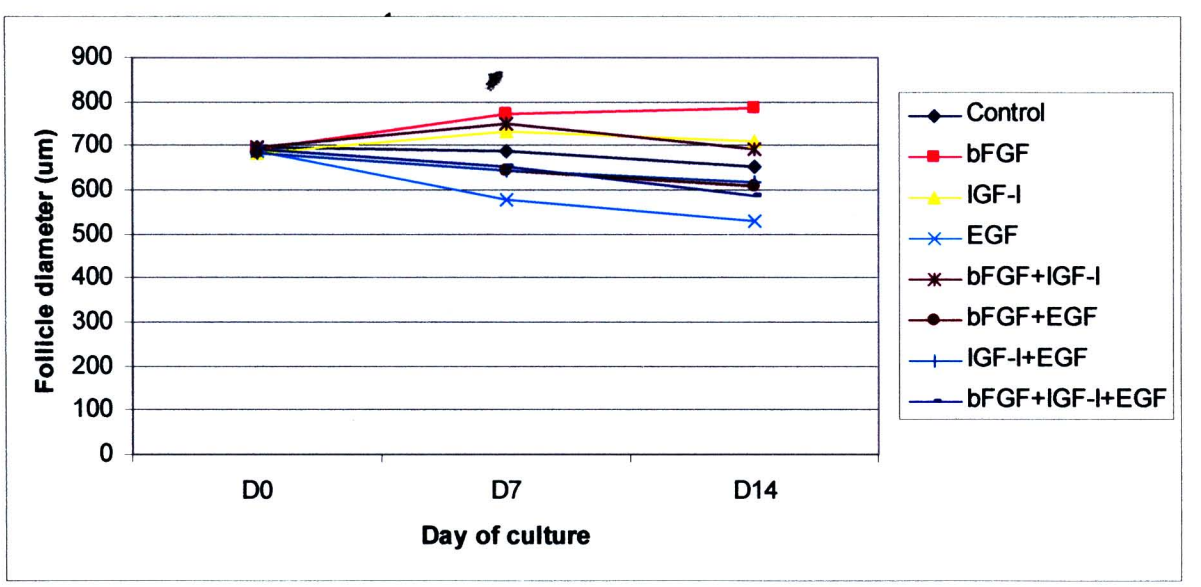

Figure 3 Growth of buffalo early antral follicles group III (Ø 600-799 μm) after cultured in various growth factors.