วิทยานิพนธ์

ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์สุนัขให้พัฒนาถึงระยะพร้อมปฏิสนธิ

FACTORS AFFECTING IN VITRO MATURATION OF CANINE OOCYTES

นางสาวศิริญญา ศรีอัษฎาพร

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์สุนัขให้พัฒนาถึงระยะพร้อมปฏิสนธิ

Factors Affecting In Vitro Maturation of Canine Oocytes

โดย

นางสาวศิริญญา ศรีอัษฎาพร

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)
พ.ศ. 2551

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์อนุชัย ภิญโญภูมิมินทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์จำเนียร สายขุน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และศาสตราจารย์ยินดี กิติยานันท์ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัย รวมทั้งตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณฝ่ายควบคุมโรคพิษสุนัขบ้ากรุงเทพมหานคร เขตดินแดง กรุงเทพมหานคร และ สัตวแพทย์ทุกท่าน ที่เอื้อเฟื้อและอำนวยความสะดวก รวมทั้งให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างรังไข่สุนัขเพื่อใช้ในการวิจัย

ขอขอบพระคุณอาจารย์ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และโครงการวิจัยชีววิทยาระบบสืบพันธุ์ของสัตว์บกเศรษฐกิจ สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความช่วยเหลือในระหว่างทำการวิจัย

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โดยงบประมาณของโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภายใต้โครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และโครงการวิจัยชีววิทยาระบบสืบพันธุ์ของสัตว์บกเศรษฐกิจ สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์ และ เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล ที่สนับสนุนเงินทุน และเอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำงานวิจัย

สุดท้ายขอขอบพระคุณอาจาย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน รวมทั้งขอขอบพระคุณ คุณแม่ สมาชิกในครอบครัวทุกคน และมิตรทุกท่านที่สนับสนุน และเป็นกำลังใจมาโดยตลอด ทำให้การทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงได้

ศิริญญา ศรีอัยฎาพร

เมษายน 2551

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	17
อุปกรณ์	17
วิธีการ	19
ผลและวิจารณ์	26
ผล	26
วิจารณ์	35
สรุปและข้อเสนอแนะ	39
สรุป	39
ข้อเสนอแนะ	39
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	40
ภาคผนวก	49

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ระยะการพัฒนาของนิวเคลียสที่พบภายหลังการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน 4 ชนิด เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	27
2	ระยะการพัฒนาของนิวเคลียสที่พบภายหลังการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์โดยเปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ	30
3	ระยะการพัฒนาของนิวเคลียสที่พบภายหลังการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์โดยเปรียบเทียบชนิดและผลของการกระตุ้นของสารเคมีสองชนิดที่ใช้ในการกระตุ้นให้โอโอไซต์แบ่งเซลล์ที่ระยะเวลาต่างกัน	32
4	อัตราการแบ่งเซลล์ของตัวอ่อนภายหลังการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ และการปฏิสนธิภายนอกร่างกายหลังจากทำการเพาะเลี้ยงตัวอ่อน 7 วัน ระหว่างในน้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อน SOF และน้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อน TCM 199 ที่มี BRL-cell	33

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงลักษณะกายวิภาคระบบสืบพันธุ์สุนัขเพศเมีย	3
2	แสดงความเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมภายในโอโอไซต์ขณะที่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีส	5
3	แสดงส่วนประกอบภายในฟอลลิเคิล	9
4	แสดงรังไข่สุนัขที่มีฟอลลิเคิล	9
5	แสดงส่วนของรังไข่และมดลูกสุนัข ขณะทำการผ่าตัดทำหมัน (Ovariohysterectomy)	19
6	แสดงลักษณะของโอโอไซต์สุนัข	21
7	แสดงโอโอไซต์ภายหลังการเพาะเลี้ยงและทำให้เซลล์คิวมูลัสหลุดออกจนหมด (Denude)	24
8	เปรียบเทียบลักษณะของโอโอไซต์ก่อนและหลังทำการเพาะเลี้ยง	27
9	แสดงโอโอไซต์ระยะเมทาเฟสทูภายหลังการเพาะเลี้ยงและทำให้เซลล์คิวมูลัสหลุดออกจนหมด (Denude)	28
10	โอโอไซต์ที่ย้อมด้วยสี Hoechst 33342 เพื่อดูการพัฒนาของนิวเคลียสและโครโมโซม ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง	28
11	ตัวอ่อนระยะต่างๆที่เกิดจากการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย	34

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

BRL	=	Buffalo rat liver
BSA	=	Bovine serum albumin
COC	=	Cumulus oocyte complex
CEF	=	Canine embryonic fibroblast
DAG	=	1,2 diacylglyceral
Deg	=	Degenerated
EBS	=	Estrous bitch serum
ECG	=	Equine chorionic gonadotropin
ECS	=	Estrous cow serum
EGF	=	Epidermal growth factor
FBS	=	Fetal bovine serum
GV	=	Germinal vesicle
GVBD	=	Germinal vesicle breakdown
HCG	=	Human chorionic gonadotropin
IGF-II	=	Insulin-like growth factor II
IP_3	=	Inosital triphosohase
IP_3R	=	Inosital triphosphase receptor
IVC	=	*In vitro* culture
IVF	=	*In vitro* fertilization
IVM	=	*In vitro* maturation
MAPK	=	Mitogen Activated Protein Kinase
MEF	=	Mouse embryonic fibroblast
MPF	=	Maturation Promoting Factor
MI	=	Metaphase I หรือ เมทาเฟสวัน
MII	=	Metaphase II หรือ เมทาเฟสทู
NCSU	=	North Carolina State University
OMI	=	Oocyte maturation inhibitor
PIP_2	=	Phosphatidyl inosital biphosphase

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

PLC = Phospholipase C

ROS = Reactive oxygen species

SOF = Synthetic oviductal fluid

SCF = Stem cell factor

TCM = Tissue culture medium

TGF = Transforming growth factor

Un = Undetermined

βME = Beta-mercaptoethanol

ปัจจัยที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์สุนัขให้พัฒนาถึงระยะพร้อมปฏิสนธิ

Factors Affecting In Vitro Maturation of Canine Oocytes

คำนำ

ในการผลิตตัวอ่อนสุนัขด้วยวิธีการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย จำเป็นต้องเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้ถึงระยะที่พร้อมจะปฏิสนธิหรือเมทาเฟสทู (Metaphase II หรือ MII) เนื่องจากโอโอไซต์ที่เก็บได้จากรังไข่ส่วนมากจะอยู่ในระยะที่ยังไม่พร้อมสำหรับการปฏิสนธิ (Immature oocyte) โดยโอโอไซต์จะอยู่ในระยะโปรเฟสวัน (Prophase I หรือ Germinal vesicle) ซึ่งโอโอไซต์ของสุนัขแตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นโดยโอโอไซต์ที่เกิดจากการตกไข่ตามธรรมชาติ จะยังอยู่ในระยะที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ และจะใช้เวลาประมาณ 48-72 ชั่วโมง ภายในท่อนำไข่ในการเจริญเป็นระยะเมทาเฟสทู ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์สุนัขภายนอกร่างกายให้ถึงระยะเมทาเฟสทูและพร้อมจะปฏิสนธิยังอยู่ในมีอัตราที่ต่ำมาก เมื่อเทียบกับสัตว์ชนิดอื่น มีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่ออัตราความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ภายนอกร่างกาย ทั้งปัจจัยที่เกิดจากระยะของรังไข่ รวมทั้งโอโอไซต์เอง ได้แก่ ขนาด และคุณภาพของโอโอไซต์ และปัจจัยที่เกิดจากการเพาะเลี้ยง ได้แก่ ชนิดน้ำยาที่ใช้เลี้ยง, ปริมาณซีรัม, ฮอร์โมนที่เติมใน น้ำยาเพาะเลี้ยง หรือ ระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยง เป็นต้น จากการศึกษาในสุนัขที่ผ่านมายังไม่พบข้อสรุปที่ชัดเจนทั้งในเรื่องการใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงรวมทั้งสภาวะที่เหมาะสม หรือสารต่างๆที่มีผลในการช่วยกระตุ้นให้โอโอไซต์พัฒนาถึงระยะเมทาเฟสทู

การศึกษานี้ทำการศึกษาถึงปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการพัฒนาโอโอไซต์สุนัขภายนอกร่างกาย เพื่อให้สามารถเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญถึงระยะเมทาเฟสทูได้มากขึ้น ซึ่งจะเป็นพื้นฐานของการพัฒนาเทคโนโลยีด้านการเจริญพันธุ์ในสุนัข เช่นการปฏิสนธินอกร่างกาย หรือการโคลนนิ่ง โดยได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบชนิดของน้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ ผลของสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) และ การกระตุ้นการเจริญของโอโอไซต์ (Activation) รวมทั้งการปฏิสนธิและพัฒนาของตัวอ่อนภายนอกร่างกาย (In vitro fertilization and in vitro development)

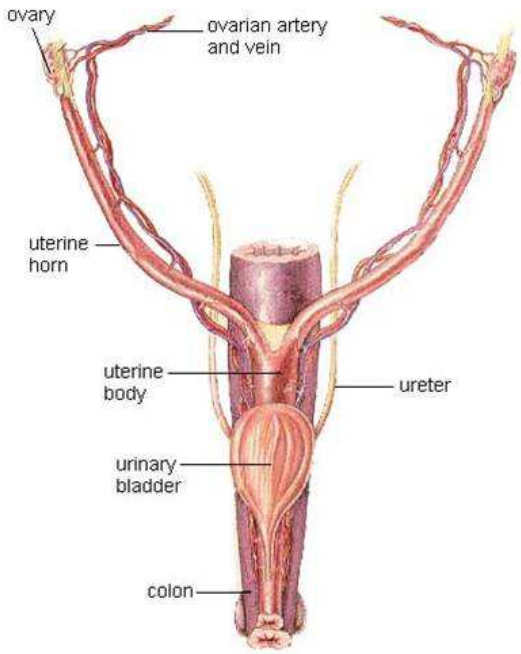
วัตถุประสงค์

เพื่อเปรียบเทียบชนิดของน้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ ผลของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) และ สารที่ใช้ในการกระตุ้นการเจริญของโอโอไซต์ (activating agent) ต่อการเจริญของโอโอไซต์ การปฏิสนธิและพัฒนาของตัวอ่อนภายนอกร่างกาย (*In vitro* fertilization and *In vitro* development) ทั้งนี้เพื่อเป็นพื้นฐานของการพัฒนาเทคโนโลยีด้านการเจริญพันธุ์ของสุนัขต่อไป

การตรวจเอกสาร

ระบบสืบพันธุ์ในสุนัขเพศเมีย (Reproductive System in Female Dogs)

กายวิภาคของระบบสืบพันธุ์ในสุนัขเพศเมีย (ภาพที่1) คล้ายกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น คือ มีรังไข่ 2 ข้าง รูปร่างเป็นรูปไข่ ขนาดยาวประมาณ 2 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5 เซนติเมตร และขนาดอาจเปลี่ยนแปลงไปตามพันธุ์ขึ้นกับว่าเป็นสุนัขพันธุ์เล็ก หรือพันธุ์ใหญ่



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะกายวิภาคระบบสืบพันธุ์สุนัขเพศเมีย

ที่มา: \http://www.vetmed.wsu.edu/ClientED/anatomy/dog_ug.aspx#female

วัยเจริญพันธุ์ของสุนัขเพศเมียโดยปกติอยู่ที่อายุประมาณ 7-12 เดือน ระยะเร็วที่สุดประมาณ 6 เดือน และช้าที่สุดประมาณ 24 เดือน การแสดงอาการเป็นสัดจะเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับน้ำหนักของสุนัข โดยน้ำหนักสุนัขมากพอในช่วงอายุที่เหมาะสมกับสายพันธุ์ก็จะเป็นสัดเร็ว โดยสุนัขพันธุ์เล็กจะแสดงอาการเป็นสัดครั้งแรกเร็วกว่าสุนัขพันธุ์ใหญ่ โดยเฉลี่ยสุนัขจะแสดงอาการเป็นสัดปีละ1-2 ครั้ง ไม่ขึ้นอยู่กับฤดูกาล และมีช่วงห่างของแต่ละวงรอบการเป็นสัดนานประมาณ 5-12 เดือน

การแสดงอาการเป็นสัด (Estrus cycle)

ในสุนัขจะแสดงอาการเป็นสัด 4 ระยะ คือ

1. ระยะที่ 1 ระยะก่อนยอมรับการผสม (Proestrus)

เป็นระยะที่สุนัขเริ่มแสดงอาการเป็นสัด อวัยวะเพศบวมขยายใหญ่ มีเลือดออกจากช่องคลอดสีแดงสด ซึ่งออกมาจากเยื่อบุผนังมดลูกที่มีการเจริญหนาตัวขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องมาจากอิทธิพลของฮอร์โมนเอสโตรเจนจากฟอลลิเคิลที่รังไข่ โดยระยะนี้สุนัขเพศเมียจะมีกลิ่นที่จะดึงดูดสุนัขเพศผู้ให้มาสนใจแต่ยังไม่ยอมให้ตัวผู้เข้ามาใกล้หรือผสมได้ มีระยะเวลาเฉลี่ยประมาณ 9 วัน

2. ระยะที่ 2 ระยะที่ยอมรับการผสม (Estrus)

เป็นระยะที่มีการตกไข่โดยสุนัขเพศเมียเริ่มให้สุนัขเพศผู้เข้ามาผสมโดยระยะตกไข่ยาวประมาณ 12-72 ชั่วโมง และการตกไข่เกิดขึ้นที่ประมาณ 1-3 วัน หลังจากยอมรับการผสมครั้งแรกจากตัวผู้ โดยเฉลี่ยมักจะตกไข่ประมาณวันที่12 ของการเป็นสัด นับจากวันแรกที่สุนัขมีเลือดสีแดงออกจากช่องคลอด วันที่เหมาะสมในการผสม คือ วันที่ 14 ของการเป็นสัด (2 วัน ภายหลังการตกไข่) โดยเฉลี่ยจะตกไข่ครั้งละประมาณ 4-6 ใบ ระยะนี้จะนานประมาณ 9 วัน และสุนัขจะตั้งท้องประมาณ 63±1 วัน นับจากวันตกไข่

3. ระยะที่ 3 ระยะหลังยอมรับการผสม (Diestrus)

ระยะนี้มีระยะเวลาประมาณ 2 เดือน เริ่มหลังการตกไข่ 6 วัน เป็นระยะที่สุนัขจะมีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Progesterone) สูง ไม่ว่าจะได้รับการผสมหรือไม่ก็ตาม โดยปริมาณฮอร์โมนอาจขึ้นอยู่กับจำนวน corpus luteum ในรังไข่ สุนัขที่ตั้งท้องจะคลอดในช่วงท้ายของระยะนี้

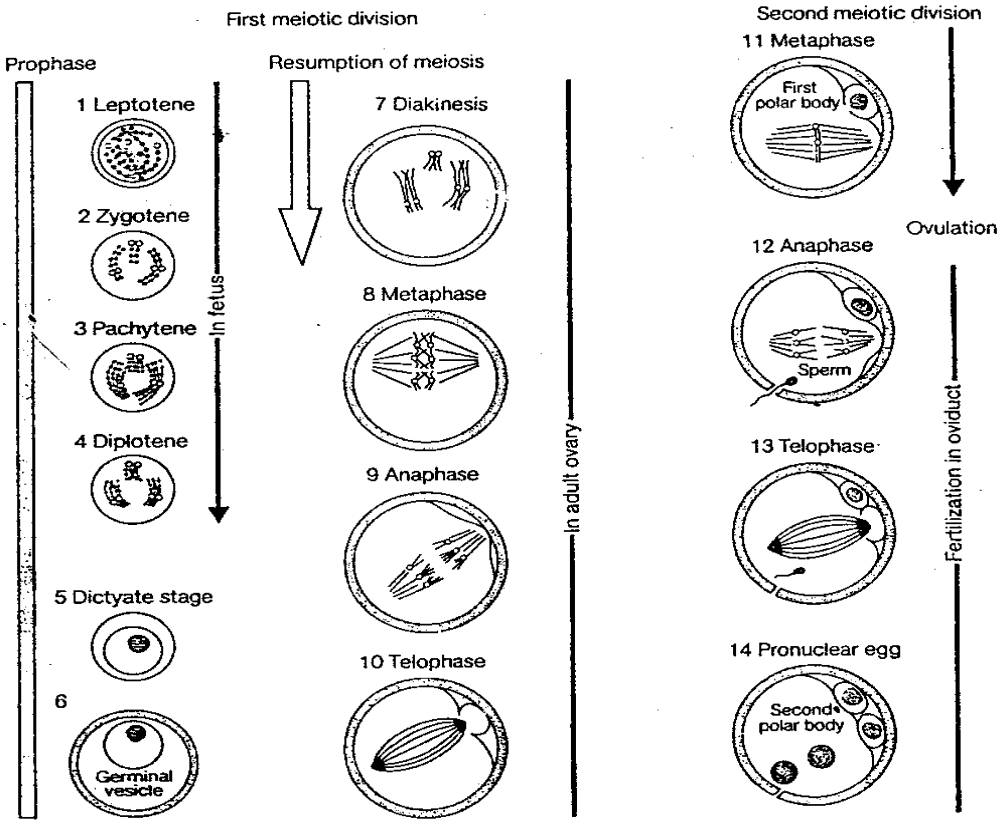
4. ระยะที่ 4 ระยะพักของระบบสืบพันธุ์ (Anestrus)

ระยะนี้ระบบสืบพันธุ์ของสุนัขเพศเมียจะไม่ทำงาน และไม่พบอิทธิพลของฮอร์โมนของระบบสืบพันธุ์มาเกี่ยวข้อง มีระยะเวลาประมาณ 4-5 เดือน

ช่วงอายุที่สุนัขเพศเมียมีความสมบูรณ์พันธุ์สูงสุดทางระบบสืบพันธุ์ คือ อายุไม่เกิน 4-5 ปี โดยเมื่อสุนัขมีอายุมากขึ้นจะพบระยะห่างของวงรอบการเป็นสัดยาวนานขึ้น เมื่ออายุมากกว่า 8 ปี จะพบว่ามีอัตราการผสมติดที่ต่ำ จำนวนลูกต่อครอกน้อย และพบลูกแรกคลอดตายสูงขึ้น (เกษกนก, 2548)

การพัฒนาของโอโอไซต์

การแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสของโอโอไซต์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จะเกิดขึ้นในช่วงที่ยังเป็นฟีตัส และจะหยุดการแบ่งเซลล์ครั้งแรกภายหลังคลอดที่ระยะโปรเฟสวัน เรียกว่า first meiotic arrest หรือ ระยะพักตัวที่ 1 หลังจากนั้นจะเริ่มมีการแบ่งเซลล์อีกครั้งก่อนหน้าที่มีการตกไข่ โดยอาศัยอิทธิพลของฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน และเมื่อโอโอไซต์เจริญถึงระยะเมทาเฟสทูและเกิดการตกไข่ โอโอไซต์จะเข้าสู่ระยะหยุดการแบ่งเซลล์ครั้งที่สอง เรียกว่า second meiotic arrest



ภาพที่ 2 แสดงความเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมภายในโอโอไซต์ขณะที่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีส (Tsafriri and Pomerantz, 1986)

จากภาพที่ 2 แสดงกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีส เริ่มจาก prophase (1-4) ซึ่งเกิดในช่วงก่อนคลอด ประกอบด้วย ระยะ leptotene (1), zygotene (2), pachytene (3) และ diplotene (4) โดยจะหยุดการแบ่งเซลล์ครั้งแรกที่ระยะ dictyate stage (5) จะพบลักษณะนิวเคลียสของโอโอไซต์จะมีขนาดใหญ่เรียกว่า germinal vesicle และช่วงหลังคลอดกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสจะเกิดขึ้นหลังจากได้รับอิทธิพลของฮอร์โมนโกนาโดโทรปินจากไฮโปทาลามัส ซึ่งมีผลกระตุ้นให้ต่อมใต้สมองส่วนหน้ามีการหลั่งลูทีอิไนซิ่งฮอร์โมนเพิ่มมากขึ้น จนเกิด LH surge ทำให้โอโอไซต์มีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสต่อเข้าสู่ระยะ diakinesis (7), Metaphase I (8), anaphase I (9), telophase I (10) และจะหยุดการแบ่งเซลล์อีกครั้งที่ระยะ metaphase II (11) ซึ่งเมื่อมีการตกไข่ (ovulation) และมีตัวอสุจิมาเข้ามาผสม จะมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสครั้งที่สองต่อ และเกิด pronuclei (12-14)

โอโอไซต์ของสุนัขแตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ โดยโอโอไซต์ที่เกิดจากการตกไข่เป็น Primary oocyte ซึ่งการตกไข่เกิดที่ประมาณ 24-72 ชั่วโมงภายหลัง LH Peak ตามธรรมชาติ Primary oocyte ใช้เวลาประมาณ 48-72 ชั่วโมง ในการเจริญเป็น Secondary oocyte ซึ่งเป็นระยะที่พร้อมจะผสมกับตัวอสุจิ ซึ่งนานกว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นถึง 12-36 ชั่วโมง ส่วนในการปฏิสนธิภายนอกร่างกายสุนัข โอโอไซต์ที่เก็บได้จากรังไข่จะเป็นชนิดที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ ซึ่งเป็น Primary oocyte โดยโอโอไซต์เหล่านี้ต้องใช้เวลาการเพาะเลี้ยงนาน 48-72 ชั่วโมงในการเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ (*In vitro* maturation) เช่นเดียวกับโอโอไซต์ที่โตในฟอลลิเคิลขณะอยู่ที่รังไข่ ซึ่งจะพบจำนวนโอโอไซต์โดยเฉลี่ย 15-20 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่จะเจริญถึงขั้นปฏิสนธิ หรือ เมทาเฟสทู ทำให้ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานถึงความสำเร็จของลูกสุนัขที่เกิดจากตัวอ่อนที่ผลิตขึ้นในห้องปฏิบัติการ

In Vitro Maturation

การเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้พร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลอง (*In vitro* maturation) เป็นวิธีการพื้นฐานในการผลิตโอโอไซต์ให้เจริญสมบูรณ์พร้อมปฏิสนธิเพื่อใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น การปฏิสนธิภายนอกร่างกาย (*In vitro* fertilization), การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ หรือการทดสอบความสามารถในการปฏิสนธิ (fertilizing ability) รวมถึงการผลิตตัวอ่อนสำหรับย้ายฝาก (Embryo transfer) ซึ่งปัจจุบันนี้การเลี้ยงโอโอไซต์ได้มีการศึกษาในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด (Luvoni *et al*., 2005) โดยพบการศึกษาการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์สุนัขให้พร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลอง และการปฏิสนธิภายนอกร่างกายในครั้งแรกมานานกว่า 30 ปีแล้ว โดย Mahi and Yanagimachi (1976) ซึ่ง

สามารถเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้พัฒนาถึงระยะเมทาเฟสวัน และระยะเมทาเฟสทู ภายหลังการเลี้ยงนาน 48-72 ชั่วโมง รวมจำนวน 25 เปอร์เซ็นต์ พบว่าอัตราการประสบความสำเร็จที่จะได้โอโอไซต์ที่ถึงระยะเมทาเฟสทู หรือ มีการพัฒนาส่วนของนิวเคลียสอย่างสมบูรณ์มีเพียงแค่ 20 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น (Songsasen and Wildt, 2007)

นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Otoi *et al*. (2000); Rodrigues *et al*. (2004); Songsasen and Apimeteetumrong (2002) พบการแบ่งตัวของตัวอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ และปฏิสนธิภายนอกร่างกายอยู่ระหว่าง 8-37 เปอร์เซ็นต์ และพบเพียงหนึ่งรายงานเท่านั้น ที่พบการแบ่งเซลล์ของตัวอ่อนถึงระยะมอรูล่า (Otoi *et al*., 2004) และจากการทดลองปฏิสนธิโอโอไซต์ภายนอกร่างกาย (*In vitro* fertilization) พบการแบ่งเซลล์ของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซิส (blastocyst) เพียงหนึ่งตัวอ่อนเท่านั้น จากโอโอไซต์จำนวน 217 ใบ (Otoi *et al*.,2000) ผลที่ได้มีอัตราการประสบความสำเร็จที่ต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ในกลุ่มกินเนื้อประเภทอื่นๆ เช่นในแมว ซึ่งพบการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์จนถึงระยะพร้อมปฏิสนธิ และมีการแบ่งเซลล์ถึงระยะบลาสโตซีส จำนวนถึง 50 เปอร์เซ็นต์ (Gomez *et al*., 2003)

โอโอไซต์ที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิจะมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ (Germinal vesicle, GV) เมื่อโอโอไซต์เกิด maturation การเปลี่ยนแปลงอย่างแรกที่พบคือ การสลายตัวของเยื่อหุ้มนิวเคลียส เรียกว่า “Germinal Vesicle Breakdown (GVBD)” เช่นเดียวกับโอโอไซต์ที่อยู่ในฟอลลิเคิล โดยพบว่าโอโอไซต์จะพัฒนาถึงระยะเมทาเฟสทู (Metaphase II) หากมีการปรับสภาวะการเลี้ยงโอโอไซต์ให้เหมาะสม ซึ่งสภาวะที่ปรับให้เหมาะสมดังกล่าวจะมีผลต่อความสำเร็จในการปฏิสนธินอกร่างกายและการพัฒนาของตัวอ่อน ทั้งนี้มีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้องต่ออัตราความสำเร็จในการเลี้ยงให้เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ

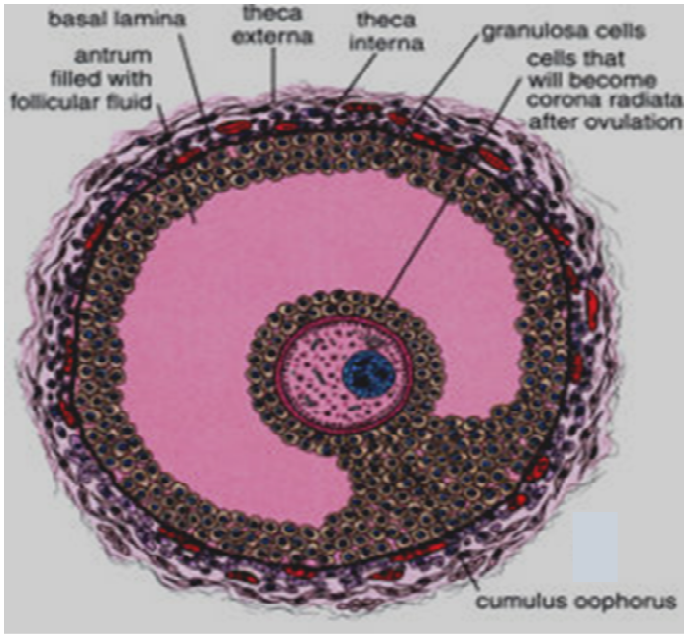
ปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อความสำเร็จในการเลี้ยงโอโอไซต์ให้พร้อมปฏิสนธิในสุนัข

1. ลักษณะของโอโอไซต์และขนาดของฟอลลิเคิล

Luvoni *et al*. (2005) ศึกษาลักษณะของโอโอไซต์แบบต่างๆที่มีผลต่ออัตราการเจริญจนถึงระยะพร้อมที่จะปฏิสนธิ และได้ให้ข้อเสนอแนะว่า วิธีการคัดเลือกชนิดของโอโอไซต์ ทำได้จากการดูขนาด ลักษณะของเซลล์คิวมูลัสที่อยู่โดยรอบโอโอไซต์และลักษณะของไซโทพลาสซึมที่สามารถมองเห็นได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ โอโอไซต์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 100 ไมครอน และเซลล์คิวมูลัสห่อหุ้มอย่างหนาแน่นหลายชั้น หรือ อย่างน้อย 2 ชั้น (Cumulus oocyte complex: COC) รวมทั้งมีไซโทพลาสซึมที่เนียนเรียบจะมีอัตราการเจริญเติบโตจนถึงระยะเมทาเฟสทู สูงกว่าโอโอไซต์ที่มีขนาดเล็กกว่า และไม่มีเซลล์คิวมูลัสห่อหุ้ม หรือที่มีคิวมูลัสห่อหุ้มบางส่วน เนื่องจากเซลล์คิวมูลัสเป็นแหล่งผลิตพลังงานสำหรับใช้ในกระบวนการเจริญพร้อมปฏิสนธิ โดยสารไพรูเวท (pyruvate) ที่เกิดจากการกระบวนการไกลโคไลซีส (Glycolysis) ภายในเซลล์คิวมูลัส สามารถเคลื่อนที่จากเซลล์คิวมูลัสไปยังโอโอไซต์และเป็นแหล่งของสารตั้งต้นในกระบวนการหายใจของโอโอไซต์ นอกจากนี้พลังงานที่ได้จากกระบวนการไกลโคไลซีส จะถูกส่งไปยังโอโอไซต์เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญพร้อมปฏิสนธิอีกด้วย อย่างไรก็ตาม การศึกษาของ Otoi *et al*. (2001) พบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโอโอไซต์ที่มีขนาดมากกว่า 120 ไมครอน มีผลต่ออัตราการเจริญของโอโอไซต์ถึงระยะเมทาเฟสทู สูงกว่าโอโอไซต์ที่มีขนาดเล็กกว่า 110 ไมครอน นอกจากนี้ ในสุนัขที่มีอายุ 1-3 ปี จะพบลักษณะโอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสห่อหุ้มหลายชั้น หรือ COC มากกว่าสุนัขที่มีอายุมากกว่า 4 ปีขึ้นไป แต่ไม่พบความแตกต่างของจำนวน COC ในแต่ละช่วงของการเป็นสัดในสุนัข

ในเซลล์คิวมูลัสจะมีปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดกระบวนการพัฒนาของโอโอไซต์หลังจากหยุดพักในระหว่างไมโอซิสวัน คือ Maturation Promoting Factor (MPF) ซึ่งพบว่า Mitogen Activated Protein Kinase หรือ MAPK pathway มีบทบาทที่สำคัญในการทำงานของ MPF นี้ โดยจะพบปริมาณของ MAPK น้อยในระยะ GV และ GVBD แต่จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อโอโอไซต์พัฒนาถึงระยะเมทาเฟสวัน และเมทาเฟสทู เนื่องจากเซลล์แกรนูโลซาจะผลิตและหลั่งสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของโอโอไซต์ (Oocyte maturation inhibitor: OMI) ซึ่งเป็นสารพวกเพปไทด์ (Peptide) โดยสารนี้จะถูกส่งไปยังโอโอไซต์ผ่านทางเซลล์คิวมูลัสที่อยู่รอบโอโอไซต์ทางgab junction ทำให้โอโอไซต์คงสภาพอยู่ในระยะ GV แต่เมื่อมีการกระจายตัวของเซลล์คิวมูลัส หรือมีปัจจัยที่ทำให้เกิดการเจริญพร้อมปฏิสนธิ จะเป็นผลทำให้ gab junction ระหว่างเซลล์ทั้งสองชนิดลดลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้นสาร

ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของโอโอไซต์ที่ถูกส่งไปจะลดลง ทำให้โอโอไซต์เกิดการเจริญพร้อมปฏิสนธิต่อไปได้



ภาพที่ 3 แสดงส่วนประกอบภายในฟอลลิเคิล

ที่มา: \http://www.answers.com/topic/theca-folliculi-1?cat=health

ภาพที่ 4 แสดงรังไข่สุนัขที่มีฟอลลิเคิล (Reynaud *et al*., 2006)

ขนาดของฟอลลิเคิลสำหรับเก็บโอโอไซต์มีส่วนสำคัญในการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญถึงระยะเมทาเฟสทู จากการศึกษาพบว่าฟอลลิเคิลที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 2 มิลลิเมตร (ภาพที่ 4) จะได้โอโอไซต์ที่มีศักยภาพในการเจริญถึงระยะเมทาเฟสทู สูงกว่าโอโอไซต์จากฟอลลิเคิลขนาด 0.5 ถึง น้อยกว่า 2 มิลลิเมตร (Songsasen and Wildt, 2005) นอกจากนี้พบว่าโอโอไซต์สุนัขที่เก็บจากแต่ช่วงระยะวงรอบการเป็นสัดก็ส่งผลต่อการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญถึงระยะเมทาเฟสทู เช่นกัน จากการศึกษาของ Willingham-Rocky *et al*. (2003) โอโอไซต์ที่คัดเลือกจากสุนัขที่อยู่ในระยะ estrus และ diestus จะมีอัตราการพัฒนาถึงระยะเมทาเฟสทู สูงกว่าโอโอไซต์ที่ได้จากสุนัขที่อยู่ในระยะ proestrus และ anestrus รวมทั้งโอโอไซต์ที่ได้จากสุนัขที่อยู่ในระยะ diestrus พบว่ามีอัตราการพัฒนาถึงระยะเมทาเฟสทู สูงกว่าโอโอไซต์ที่ได้จากสุนัขที่อยู่ในระยะ proestrus แต่การศึกษาของ Rodrigues and Rodrigues (2003) ไม่พบความแตกต่างกันของอัตราการเจริญของโอโอไซต์ถึงระยะเมทาเฟสทู ในระยะการเป็นสัดทั้งในช่วง follicular phase, ระยะ diestrus และระยะ anestrus รวมทั้งสุนัขที่อยู่ในระยะตั้งท้อง หรือเกิดภาวะมดลูกเป็นหนอง (Pyometra) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปัจจัยของการเลี้ยงมีผลสำคัญมากกว่าระยะวงรอบการเป็นสัดของตัวสุนัขที่ทำการเก็บตัวอย่าง

2. น้ำยาเพาะเลี้ยง (Culture media)

น้ำยาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์มีผลต่ออัตราการเจริญของโอโอไซต์ถึงระยะเมทาเฟสทู เนื่องจากเป็นแหล่งอาหารที่จำเป็นต่อการพัฒนาและการเจริญของโอโอไซต์ รวมทั้งยังมีผลต่อการพัฒนาการของตัวอ่อนภายหลังการปฏิสนธิอีกด้วย ดังนั้นองค์ประกอบของน้ำยาเพาะเลี้ยงควรคล้ายคลึงกับของเหลวที่ในฟอลลิเคิล โดยคล้ายคลึงกับของเหลวภายในท่อนำไข่และของเหลวภายในโพรงมดลูก ซึ่งทุกครั้งที่โอโอไซต์ต้องปรับตัวเพื่อให้อยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมจะเกิดความเครียดเพิ่มมากขึ้น และความสามารถในการปรับตัวของโอโอไซต์มีจำกัด ทางที่ดีจึงควรพยายามป้องกันไม่ให้เกิดภาวะเครียด โดยทั่วไปน้ำยาเพาะเลี้ยงทุกชนิดจะมีลักษณะคล้ายคลึงกัน คือปราศจากเชื้อและสารพิษต่างๆ มีความเป็นกรด-ด่าง ประมาณ 7.2-7.45 มีค่า osmolarity อยู่ระหว่าง 275-295 mOsm/kg มีส่วนของบัฟเฟอร์เพื่อช่วยให้ความเป็นกรดด่างคงที่ เช่น bicarbonate buffer และมีอุณหภูมิใกล้เคียงกับภายในร่างกาย โดยเฉพาะโอโอไซต์มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิมาก เพราะเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น meiotic spindle มีแนวโน้มเกิด depolarization และถูกทำลายได้ง่าย นอกจากนี้ยังมีองค์ประกอบที่สามารถเกื้อกูลให้โอโอไซต์เจริญ เช่น เกลือแร่ต่างๆคล้ายที่พบในพลาสมา เช่น โซเดียม โปแตสเซียม แมกนีเซียม คลอไรด์ รวมทั้ง

สารที่ให้พลังงาน เช่น ไพรูเวต โปรตีน และ กรดอะมิโน รวมทั้งสารอื่นๆ เช่น ยาปฏิชีวนะหรือวิตามินต่างๆ โดยทั่วไปน้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

2.1 น้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีส่วนผสมไม่ซับซ้อน (Simple media) ประกอบด้วยสารละลายเกลือพื้นฐาน (Basic physiological saline), ไพรูเวท (pyruvate), แลคเตท (lactate) และกลูโคส (glucose) โดยมีสารไบคาร์บอเนต (bicarbonate) เป็นบัฟเฟอร์ เช่น น้ำยาเพาะเลี้ยง Synthetic Oviductal Fluid (SOF)

2.2 น้ำยาเพาะเลี้ยงชนิดมีส่วนผสมซับซ้อน (Complex media) ประกอบด้วยสารจำเป็นขั้นพื้นฐานเหมือนใน simple media และมีสารประกอบอื่นด้วย ได้แก่ กรดอะมิโน และวิตามิน เช่น น้ำยาเพาะเลี้ยง Tissue culture medium 199 (TCM 199) และ Ham's F10

น้ำยาเพาะเลี้ยงชนิดซับซ้อนที่นิยมใช้ในการเลี้ยงโอโอไซต์สุนัข เป็นน้ำยาที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คือ TCM199 (Tissue culture medium 199) ซึ่งประกอบด้วย Earle's salt, สารที่ใช้เป็นบัฟเฟอร์ ได้แก่ N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N-(2-ethanesulphonic acid: HEPES) และ sodium bicarbonate นอกจากนี้ยังมีสารอื่นๆ เช่น ไพรูเวท, แลคแตท, กรดอะมิโน, วิตามิน และพิวรีน ในปริมาณที่พบในซีรั่ม ซึ่งน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิดนี้นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ในสัตว์หลายชนิด เช่น โค กระบือ แมว แม้ว่านักวิจัยส่วนใหญ่จะใช้ TCM199 ในการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์สุนัข แต่ยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่าน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิดนี้ เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ในสุนัขมากที่สุด เพราะอัตราการพัฒนาของโอโอไซต์ถึงระยะเมทาเฟสทูยังต่ำมาก

Hewitt and England (1999) ได้เปรียบเทียบผลของ TCM 199 กับ SOF พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้ถึงระยะเมทาเฟสทู ในขณะที่ Rota and Cabianca (2004) พบว่า TCM 199 ให้ผลในการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ดีกว่า SOFโดยเมื่อใช้น้ำยาเลี้ยง SOF พบว่าโอโอไซต์ส่วนใหญ่จะสิ้นสุดการพัฒนาอยู่ที่ระยะ GVBD และความสามารถในการพัฒนาถึงระยะเมทาเฟสวัน และเมทาเฟสทูลดลง แต่ไม่มีผลแตกต่างกันทางสถิติ นอกจากนี้ยังได้มีการเปรียบเทียบการน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิดซับซ้อนจำนวน 2 ชนิด คือ TCM 199 และ CMRL 1066 พบว่า TCM 199 ให้ผลการเพาะเลี้ยงดีกว่า เนื่องจาก TCM 199 ประกอบด้วยวิตามิน และมีส่วนประกอบของ cysteine และ ascorbic acid มากกว่า CMRL 1066 ซึ่งจะเป็นส่วนที่ช่วยในการป้องกันเซลล์จากการเกิด Oxidative stress และช่วยให้โอโอไซต์เกิดการเจริญพร้อมปฏิสนธิได้ดีขึ้น (Songsasen and Apimeteetumrong, 2002)

นอกจากนี้มีรายงานการใช้น้ำยาเพาะเลี้ยง NCSU (North Carolina State University) ซึ่งเป็นน้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ในสุกรมาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์สุนัข โดยเสริม Epidermal growth factor (EGF) และ Bovine serum albumin (BSA) ลงในน้ำยาเพาะเลี้ยงซึ่งพบว่ามีผลทำให้โอโอไซต์เกิดการเจริญถึงระยะเมทาเฟสทู ได้ดีขึ้น (Cui *et al*., 2006)

3. ระยะเวลาที่ใช้เลี้ยง (Maturation time)

ตามธรรมชาติโอโอไซต์สุนัขจะใช้เวลา 48-72 ชั่วโมง ภายหลังจากการตกไข่ เพื่อพัฒนาให้เกิด nuclear maturation ในท่อนำไข่ ในห้องปฏิบัติการพบว่าโอโอไซต์จะเจริญถึงระยะเมทาเฟสทูเร็วที่สุดที่ 24 ชั่วโมง และเพิ่มมากขึ้น เมื่อทำการเลี้ยงต่อไปถึง 48 ชั่วโมง (Otoi *et al*., 2004) แต่พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงโอโอไซต์ต่อไปจะพบโอโอไซต์มีการเสื่อมสลายมากขึ้น (Luvoni *et al*., 2003) การเลี้ยงโอโอไซต์นาน 48 ชั่วโมงจะทำให้ได้ตัวอ่อนที่ดีภายหลังการปฏิสนธินอกร่างกายมากกว่าการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์นาน 72 ชั่วโมง ทั้งที่จำนวนของโอโอไซต์ที่เจริญถึงระยะเมทาเฟสทู จากการเพาะเลี้ยงนาน 72 ชั่วโมง จะมีจำนวนมากกว่าก็ตาม (Otoi *et al*., 2004) ซึ่งการใช้โอโอไซต์ที่มีอายุการเลี้ยงนานเกินไปจะมีผลเสียต่อการป้องกันการเข้าปฏิสนธิของตัวอสุจิในระดับเปลือกโซน่าเพลลูซิด้า (zona pellucida) และในระดับไซโทพลาสซึม ซึ่งคาดว่าอาจเกิดความผิดปกติในระดับการหลั่งสารจากคอร์ติคอลแกรนูล (Cortical reaction)ที่ป้องกันการเข้าปฏิสนธิของตัวอสุจิตัวอื่นๆ ซึ่งผลของการปฏิสนธิของตัวอสุจิหลายตัวจะทำให้เกิดความล้มเหลวของการแบ่งเซลล์ตามมา

4. ซีรัมและแหล่งโปรตีน

ซีรัมจากลูกอ่อนโค (Fetal bovine serum: FBS) หรือซีรัมจากแม่โคที่กำลังเป็นสัด (Estrous cow serum: ECS) นิยมนำมาใช้เป็นแหล่งโปรตีนหลักในการศึกษาการเจริญของโอโอไซต์และตัวอ่อนที่เลี้ยงนอกร่างกาย นอกจากนี้ยังมีสารที่นิยมใช้กันอีก คือ Bovine serum albumin (BSA) และซีรัมจากสุนัขที่กำลังเป็นสัด (Estrous bitch serum: EBS) พบว่าน้ำยาเลี้ยงที่เสริมด้วย FBS ให้ผลการเจริญของโอโอไซต์ถึงระยะเมทาเฟสทู สูงกว่าน้ำยาเลี้ยงที่เสริมด้วย EBS และ ECS โดยสารที่อยู่ในซีรัมลูกโคอ่อนมีความสำคัญต่อการกระจายของเซลล์คิวมูลัสที่เกิดจากการเหนี่ยวนำโดยฮอร์โมน FSH ทำให้เพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเซลล์คิวมูลัส เป็นผลให้ nuclear maturation เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ และมีส่วนสำคัญในการป้องกันการแข็งตัวของชั้นเปลือกนอกของตัวอ่อนในช่วงที่กำลังเจริญ ทำให้เพิ่มอัตราการปฏิสนธิโดยจะไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีน (Robertson *et al*., 1992) แต่จากรายงานของ Songsasen and Wildt (2005) พบว่าการ

เลี้ยงโอโอไซต์ถึงระยะเมทาเฟสทูนาน 48 ชั่วโมง โดยไม่มีการเสริมสารโปรตีน (Protein-free medium) ให้ผลดีกว่า และพบโอโอไซต์จำนวน 30 เปอร์เซ็นต์สามารถพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนได้

Yamada *et al*. (1993) ได้ศึกษาฮอร์โมน Human chorionic gonadotropin (HCG) พบมีส่วนช่วยทำให้โอโอไซต์เจริญถึงระยะเมทาเฟสทูเพิ่มมากขึ้น โดย HCG มีส่วนช่วยทำให้โอโอไซต์พัฒนาไปสู่การเกิด GVBD เพิ่มมากขึ้น ทำให้สามารถพัฒนาเข้าสู่ระยะเมทาเฟสทูได้เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ Estradiol 17β จะให้ผลของโอโอไซต์เข้าสู่ระยะเมทาเฟสทูได้ดีในกรณีที่เก็บโอโอไซต์จากในระยะ Follicular phase แต่พบว่าจะให้ผลน้อยในกรณีที่เก็บโอโอไซต์ในระยะ Anestrous หรือ Luteal phase (Kim *et al*., 2005) แต่การใช้ฮอร์โมน Progesterone กลับไม่มีผลในการกระตุ้นการพัฒนาของโอโอไซต์ให้ถึงระยะเมทาเฟสทู (Willingham-Rocky, 2003) และจากการศึกษาของ Rota *et al*. (2004) พบว่าเมื่อใช้น้ำยาเพาะเลี้ยง TCM ที่เสริมด้วย ITS (Insulin, transferin และ selenium) พบว่าจำนวนโอโอไซต์ที่พัฒนาถึงระยะเมทาเฟสวัน และเมทาเฟสทูเพิ่มมากขึ้น เมื่อเทียบกับการใช้น้ำยาเพาะเลี้ยง TCM ที่เสริมด้วย EGF (Epidermal growth factor) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Willingham-Rocky *et al*. (2003) ที่พบว่าการใช้ EGF ไม่มีผลในการที่จะช่วยกระตุ้นให้โอโอไซต์พัฒนาถึงระยะเมทาเฟสทู

5. การเลี้ยงร่วมกับเซลล์อื่น (Co-culture)

เนื่องจากการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ในน้ำยาเพาะเลี้ยงเพียงอย่างเดียว อาจไม่เพียงพอในการที่จะทำให้โอโอไซต์เจริญถึงระยะเมทาเฟสทู เนื่องจากโอโอไซต์สุนัขที่ทำการเก็บตัวอย่างส่วนใหญ่ยังอยู่ในระยะ Primary oocyte ซึ่งตามธรรมชาติต้องอาศัยการเจริญภายในท่อนำรังไข่ เพื่อเจริญเป็น Secondary oocyte เพื่อพร้อมสำหรับการปฏิสนธิ Hewilt and England (1999) จึงศึกษาการเลี้ยงโอโอไซต์สุนัขร่วมกับเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ (Oviduct epithelial cells) เพื่อให้คล้ายคลึงตามธรรมชาติ แต่พบว่าการเลี้ยงโอโอไซต์สุนัขร่วมกับเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ไม่มีผลต่อการพัฒนาของโอโอไซต์ ในขณะที่ Luvoni *et al*. (2003) พบว่าเมื่อเลี้ยงโอโอไซต์ร่วมกับเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่จากสุนัขที่อยู่ในระยะการเป็นสัดจะช่วยกระตุ้นให้โอโอไซต์เจริญถึงระยะเมทาเฟสทูเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ตัวอสุจิ (Spermatozoa) เลี้ยงร่วมกับโอโอไซต์ เพื่อกระตุ้นการเจริญของโอโอไซต์พร้อมปฏิสนธิเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ทั้งนิวเคลียสและไซโทพลาสซึม โดยโอโอไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับตัวอสุจินาน 48 ชั่วโมง สามารถพัฒนาถึงระยะเมทาเฟสทู จำนวน 4 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เมื่อเลี้ยงโอโอไซต์นาน 78 ชั่วโมง แล้วกระตุ้นการเจริญด้วยตัวอสุจิ พบว่ามีโอโอไซต์ถึง 24 เปอร์เซ็นต์ ที่ถูกปฏิสนธิเกิด pronuclei และ 13 เปอร์เซ็นต์ สามารถพัฒนาไปเป็นตัวอ่อน 4-8 เซลล์ (Rodrigus *et al*.,

2004) ซึ่งการกระตุ้นด้วยตัวอสุจิจะไปมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของแคลเซียมไอออนภายในโอโอไซต์ จะทำให้โอโอไซต์เกิดการพร้อมปฏิสนธิอย่างสมบูรณ์ (Whitetaker and Partel, 1990)

6. การใช้สารต้านอนุมูลอิสระและสารกระตุ้น

นอกจากนี้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น รวมถึงในคนยังมีการศึกษาโดยการใช้สารประเภทอื่นอีกหลายชนิดที่เติมลงในน้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ เพื่อช่วยให้การเพาะเลี้ยงโอโอไซต์มีประสิทธิภาพมากขึ้น รวมถึงทำให้โอโอไซต์ถึงระยะเมทาเฟสทู เพิ่มมากขึ้น เช่น การใช้สารต้านอนุมูลอิสระ(Antioxidant) เช่น เมลาโทนิน (Park *et al*., 2006), วิตามินซี และวิตามินอี (Dalvit *et al*., 2005) เป็นต้น รวมทั้งสารเคมีที่มีส่วนช่วยในการกระตุ้น (Activating agent) การเจริญของโอโอไซต์ เช่น Ionomycin (Loi *et al*., 1998), Ethanol (Vignon *et al*., 1998), Cycloheximine (Grabiec *et al*., 2007) และ Calcium ionophore A23187 (Grabiec *et al*., 2007) เป็นต้น

สารต้านอนุมูลอิสระช่วยป้องกันการเสียหายของเซลล์โอโอไซต์ ซึ่งในกรณีที่มีการเลี้ยงโอโอไซต์นานพบว่าจะทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (Free Radicals) เพิ่มขึ้น จากปฏิกิริยาออกซิเดชันซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในกระบวนการเมตาบอลิสมของสิ่งมีชีวิตโดยมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็คตรอนตัวสุดท้ายในระบบขนส่งอิเล็คตรอนเพื่อสร้างสารพลังงานสูง (ATP) ซึ่งในกระบวนการดังกล่าวมักพบว่า มีการปล่อยอนุมูลของออกซิเจนที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเรียกว่า reactive oxygen species (ROS) ออกมา ซึ่งอนุมูลอิสระของออกซิเจนที่เกิดขึ้น เมื่อมีปริมาณมากเกินจะเกิดภาวะที่เรียกว่า oxidative stress และจะส่งผลกระทบต่างต่อเซลล์สิ่งมีชีวิต มีการทำลายเซลล์จะทำให้เซลล์ทำงานไม่ได้ และสร้างตัวใหม่ได้ไม่เหมือนเดิม เกิดเสื่อมสภาพขึ้นได้ จากการศึกษาพบว่า สารต้านอนุมูลอิสระสามารถจับคู่อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระเหล่านี้ ทำให้สามารถแก้ไขหรือจำกัดความเสียหายของเซลล์ได้ ซึ่งในสุนัขได้มีการศึกษาโดยใช้ Beta-mercaptoethanol (βME) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นสารเริ่มต้นของ glutathione ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พบได้ตามปกติของเซลล์ เพิ่มในเข้าในส่วนของน้ำยาเลี้ยงเซลล์ แต่ไม่พบว่าสารนี้มีส่วนช่วยเพิ่มอัตราการเจริญของโอโอไซต์ (Kim *et al*., 2004) ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาในการเลี้ยงโอโอไซต์ของสุกร และโค ภายหลังจากมีการเพิ่มสารที่มีส่วนประกอบของ glutathione ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ พบว่ามีผลทำให้อัตราการเพาะเลี้ยงของโอโอไซต์ถึงระยะเมทาเฟสทูสูงขึ้น (Songsasen *et al*., 2002) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาโดยเพิ่มสาร cysteine และ cysteamine ลงในน้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีส่วนประกอบของ Thiol พบว่ามีส่วนช่วยเพิ่มอัตราการเจริญของโอโอไซต์ให้ถึงพร้อมปฏิสนธิเพิ่มมากขึ้น (Hossein *et al*., 2007)

นอกจากนี้ยังพบการใช้สารต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่น เพื่อช่วยเพิ่มอัตราการเจริญของโอโอไซต์ โดยจากรายงานของ Ishizuka *et al*. (2000) พบว่า เมลาโทนิน (Melatonin; N-Acetyl-5-methoxytryptamine) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระตัวหนึ่ง มีผลช่วยเพิ่มผลการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย และการพัฒนาของตัวอ่อนในหนูได้ รวมถึงจากการทดลองของ Park *et al*. (2006) ได้มีการเติมสารเมลาโทนินลงในน้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์ของคนพบว่าเมลาโทนินมีส่วนช่วยให้โอโอไซต์ถึงระยะเมทาเฟสทู และมีอัตราการปฏิสนธินอกร่างกายสูงขึ้นเช่นกัน

การใช้สารที่ช่วยในการกระตุ้น (Activating agent) การเจริญของโอโอไซต์เป็นขั้นตอนหนึ่งที่มีความสำคัญ เนื่องจากโอโอไซต์จะมีการหยุดแบ่งเซลล์ครั้งแรกที่ระยะ Prophase I หรือ GV หลังจากนั้นจะมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสต่อทำให้เกิด GVBD และผ่านเข้าระยะ MI, AnaphaseI และTelophaseI จนถึงระยะ MII ตามลำดับ ซึ่งการกระตุ้นให้โอโอไซต์มีความสามารถในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสต่อ (GVBD - MII) จึงเป็นส่วนสำคัญ ซึ่งส่วนใหญ่การกระตุ้นโอโอไซต์ให้มีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสที่สมบูรณ์มักนิยมใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับ Parthenogenesis การโคลนนิ่ง หรือการย้ายฝากนิวเคลียส และเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพื่อเลียนแบบการกระตุ้นของโอโอไซต์ให้มีการแบ่งเซลล์เหมือนการกระตุ้นโดยตัวอสุจิในการสืบพันธุ์ตามธรรมชาติ ซึ่งสามารถทำได้โดยใช้สารเคมี เช่น Ethanol, Ionomycin, Calcium ionophore, Cycloheximide หรือ Ca-EDTA (Calcium ethylenediamine tetra-acetic acid) และใช้กระแสไฟฟ้า (Electrical shock) เป็นต้น

มีการใช้ Ethanol ในการ activation ในสัตว์หลายชนิด เช่น โค (Vignon *et al*., 1998; Alberio *et al*., 2001), สุกร (Petr *et al*., 1996) และแกะ (Loi *et al*., 1998) จากการศึกษาของ Grabiec *et al*. (2007) โดยการใช้ Ethanol, Calcium ionophore, Cycloheximide กระตุ้นการเจริญของโอโอไซต์ โดยที่โอโอไซต์ไม่ได้รับการผสมกับตัวอสุจิ (Parthenogenesis) ร่วมกับการกระตุ้นด้วยสนามแม่เหล็ก (Magnetic field) ในแมวบ้าน พบว่าการใช้ Ethanol ร่วมกับการใช้สนามแม่เหล็กจะช่วยเพิ่มการเกิด Pathenogenetic activation ได้มากขึ้น นอกจากนี้สาร Ethanol ยังถูกนำมาใช้ในการกระตุ้นการเจริญของโอโอไซต์อย่างได้ผลดีในการผลิตตัวอ่อนแพะ จากโอโอไซต์ ที่เจริญพร้อมปฏิสนธิภายนอกตัวสัตว์ (Ongeri *et al*., 2001, Ongeri and Krisher, 2001) โดยได้อัตราการเจริญของตัวอ่อนจนถึงระยะ บลาสโตซีสต์ถึง 27.4 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้จากการศึกษาของ Lee *et al*. (2007a) ได้มีการใช้ Ca-EDTA ในกระตุ้นโอโอไซต์สุนัขให้เกิด parthenogenesis พบว่าสามารถพัฒนาให้โอโอไซต์เกิด Pronucleus ได้ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษาผลของการใช้สารเคมีที่มีส่วนช่วยในการกระตุ้นในการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์สุนัขให้เจริญพร้อมปฏิสนธิ

ดังนั้นจะเห็นว่ามีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้องกับการเจริญพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์ในสุนัข ซึ่งสรุปได้ดังนี้ คือ

1. ปัจจัยที่เกิดจากโอโอไซต์เอง ได้แก่ ขนาดของฟอลลิเคิล, ระยะของวงรอบการเป็นสัด รวมทั้งคุณภาพของโอโอไซต์

2. ปัจจัยที่เกิดจากการเลี้ยง ได้แก่ ชนิดน้ำยาที่ใช้เลี้ยง, ปริมาณซีรัม, ฮอร์โมนที่เติมในน้ำยาที่ใช้เพาะเลี้ยง หรือ ระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยง เป็นต้น

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1.วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1.1 วัสดุอุปกรณ์

1.1.1 กรรไกรผ่าตัดยาว 7 นิ้ว สำหรับตัดรังไข่ออกจากตัวสัตว์

1.1.2 คีมคีบโลหะที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

1.1.3 ใบมีดโกนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

1.1.4 ขวดพลาสติกขนาด 60 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วสำหรับเก็บรังไข่

1.1.5 จานทดลองพลาสติกขนาด 100 ×15 มิลลิเมตร ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

1.1.6 จานทดลองพลาสติกขนาด 35 ×10 มิลลิเมตร ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

1.1.7 ปิเปตต์ผ่านการฆ่าเชื้อ ยืดปลายด้วยความร้อนจนมีขนาดประมาณ 200 ไมครอน

1.1.8 ท่อยางซิลิโคน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร ปลายต่อกับ pipette tip

1.1.9 ผ้าก๊อซผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

1.1.10 จานเพาะเลี้ยงพลาสติกชนิด 4 หลุม

1.1.11 แผ่นสไลด์แก้วขนาด 1×3 นิ้ว พร้อมด้วย cover slips

1.1.12 Paraffin wax

1.1.13 กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (Stereo microscope)

1.1.14 กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (Fluorescence microscope)

1.1.15 ตู้ปลอดเชื้อสำหรับเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยง

1.2 สารเคมี

1.2.1 สารละลายน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์

1.2.2 ยาปฏิชีวนะเพนนิซิลิน 100 IU/ml (Gibco Laboratories; Grand Island, NY, USA)

1.2.3 ยาปฏิชีวนะเจนต้ามัยซิน 100 IU/ml (Gibco, Grand Island, NY, USA)

1.2.4 น้ำยาสำหรับเก็บ และล้างโอโอไซต์ TCM199-HEPES

1.2.5 น้ำยาเพาะเลี้ยง SOF

1.2.6 น้ำยาเพาะเลี้ยง TCM199 (M4530; Sigma, St Louis, MO, USA)

1.2.7 น้ำยาเพาะเลี้ยง Ham F10 (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemak, Israel)

1.2.8 น้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM/F12 (Invitrogen)

1.2.9 0.6 เปอร์เซ็นต์ glucose (Sigma, St Louis, MO, USA)

1.2.10 60 mM putrescine (Sigma, St Louis, MO, USA)

1.2.11 20 nM progesterone (Sigma, St Louis, MO, USA)

1.2.12 30 nM sodium selenite (Sigma, St Louis, MO, USA)

1.2.13 25 mg/mL insulin (Sigma, St Louis, MO, USA)

1.2.14 100 mg/mL apo-transferrin (Sigma, St Louis, MO, USA)

1.2.15 สารละลาย 40 ng/mL epidermal growth factor (Sigma, St Louis, MO, USA)

1.2.16 Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid; Sigma, St Louis, MO, USA)

1.2.17 Melatonin (N-Acetyl-5-methoxytryptamine; Sigma, St Louis, MO, USA)

1.2.18 Ionomycin (M4530; Sigma, St Louis, MO, USA)

1.2.19 Ethanol (Merck, Darmstadt, Germany)

1.2.20 สารละลาย PBS (Dulbecco's Phosphate-buffered saline)

1.2.21 สารละลาย 0.5 เปอร์เซ็นต์ Hyarulonidase (Sigma, St Louis, MO, USA)

1.2.22 สารละลาย Fixative ประกอบด้วย PBS supplement, 1%(v/v) Triton-X 100 และ 3.7% (w/v) Paraformaldehyde (Sigma, St Louis, MO, USA)

1.2.23 สีย้อม Bisbenzimide (Hoechst 33342; Sigma, St Louis, MO, USA)

1.2.24 สารละลาย Sp-TALP

1.2.25 สารละลาย Percoll (Sigma, St Louis, MO, USA)

1.2.26 น้ำยา Glucose Free Fert-TALP

1.2.27 น้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อน SOF

1.2.28 น้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อน TCM 199 ที่มี BRL-cell (Buffalo rat liver cells; BRL3A, American type culture collection Rockville, MD, USA)

วิธีการ

1. การเก็บรังไข่

1.1 ตัดรังไข่ออกจากถุงเยื่อคลุมรังไข่ (Ovarian bursa) ด้วยกรรไกรผ่าตัดโดยปฏิบัติการทันทีหลังสุนัขผ่าตัดทำหมัน (Ovariohysterectomy) จากฝ่ายควบคุมโรคพิษสุนัขบ้า กรุงเทพมหานคร โดยเก็บจากสุนัขที่มีสุขภาพดี และมีอายุมากกว่า 6 เดือน ทั้งนี้ไม่เฉพาะเจาะจงต่อระยะการเป็นสัดและสายพันธุ์ของสุนัขที่ทำการเก็บตัวอย่าง

1.2 นำรังไข่ที่ได้แช่ในสารละลายน้ำเกลือที่มียาปฏิชีวนะเพนนิซิลิน 100 IU/ml โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และนำกลับมายังห้องปฏิบัติการภายใน 3-5 ชั่วโมง

ภาพที่ 5 แสดงส่วนของรังไข่และมดลูกสุนัข ขณะทำการผ่าตัดทำหมัน (Ovariohysterectomy)

2. การเก็บโอโอไซต์

2.1 นำรังไข่ที่ได้มาล้าง 3 ครั้ง ด้วยสารละลายน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์ที่มียาปฏิชีวนะเจนต้ามัยซิน 100 IU/ml และ ซับรังไข่ให้แห้งด้วยผ้ากอซ

2.2 เก็บโอโอไซต์ที่อยู่ภายในรังไข่โดยใช้ใบมีดเฉือนรังไข่ออกเป็นชิ้นบางๆ (Slicing) บนจานทดลองที่มีน้ำยาสำหรับเก็บโอโอไซต์ TCM199-HEPES

2.3 นำไปตรวจหาโอโอไซต์ และคัดเลือกโอโอไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอขนาดกำลังขยาย 10-20 เท่า

3. การคัดเลือกโอโอไซต์ก่อนนำไปเพาะเลี้ยง

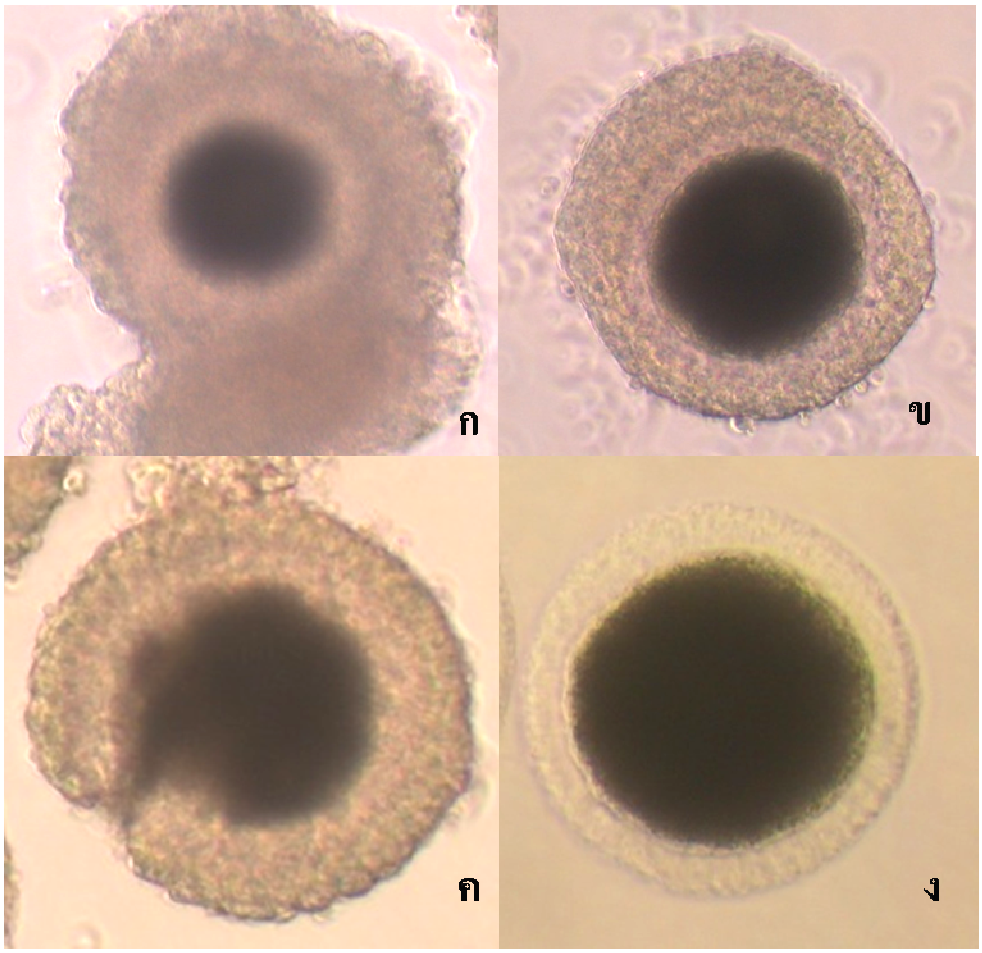
3.1 คัดเลือกโอโอไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ โดยแบ่งออกเป็น 4 แบบ ตามวิธีของ Hewitt *et al*. (1998) ดังภาพที่ 6

3.1.1 โอโอไซต์แบบที่มีไซโทพลาสซึมสีเข้มสม่ำเสมอ(Darkly Pigment) และมีเซลล์คิวมูลัสห่อหุ้มอยู่อย่างหนาแน่น มากกว่า 5 ชั้น (Complete Cumurus Oocyte Complex; COCs) จัดเป็นโอโอไซต์ที่มีคุณภาพดีมาก สามารถนำไปเพาะเลี้ยงได้

3.1.2 โอโอไซต์แบบที่มีไซโทพลาสซึมสีเข้มสม่ำเสมอ(Darkly Pigment) และมีเซลล์คิวมูลัสห่อหุ้มอยู่ 2-5 ชั้น จัดเป็นโอโอไซต์ที่มีคุณภาพดี สามารถนำไปเพาะเลี้ยงได้

3.1.3 โอโอไซต์แบบที่มีไซโทพลาสซึมสีจางไม่สม่ำเสมอ (Lightly Pigment) และมีเซลล์คิวมูลัสห่อหุ้มไม่สมบูรณ์ (Incomplete Cumerus Oocyte) จะไม่นำไปเพาะเลี้ยง

3.1.4 โอโอไซต์แบบที่มีลักษณะรูปร่างผิดปกติทั้งในด้านขนาดและสีของไซโทพลาสซึม จัดถือเป็นโอโอไซต์ที่มีการเสื่อมสลายแล้ว (Degenerate oocyte) จะไม่นำไปเพาะเลี้ยง



ภาพที่ 6 แสดงลักษณะของโอโอไซต์สุนัข ก.ลักษณะของโอโอไซต์ชนิด Complete Cumurus Oocyte Complex (COCs) ซึ่งมีเซลล์คิวมูลัวล้อมรอบหลายชั้นจัดเป็นโอโอไซต์ที่มีคุณภาพดีมาก, ข.ลักษณะของโอโอไซต์ที่มีคุณภาพดีซึ่งมีเซลล์คิวมูลัสห่อหุ้มอยู่, ค. ลักษณะของโอโอไซต์ที่มีการเสื่อมสลายแล้ว (Degenerate oocyte) และ ง. ลักษณะของโอโอไซต์ที่ไม่มีคิวมูลัสห่อหุ้ม (Denude)

4 การเพาะเลี้ยงโอโอไซต์และการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย

นำโอโอไซต์ที่คัดเลือกแล้วล้างในสารละลาย TCM199-Hepes 3 ครั้งแล้วแบ่งกลุ่มทดลองดังนี้

4.1 การทดลองที่ 1 ผลของชนิดน้ำยาเพาะเลี้ยงต่อการพัฒนาของโอโอไซต์

นำโอโอไซต์ที่ได้นำมาเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง 4 ชนิด ได้แก่ น้ำยาเพาะเลี้ยงSOF, TCM199, Ham F10 และ DMEM/F12 โดยมีการเติมสาร 0.6 % glucose, 60 mM putrescine, 20 nM progesterone, 30 nM sodium selenite, 25 mg/mL insulin, 100 mg/mL apo-transferrin และ 40 ng/mL epidermal growth factor (EGF) ในน้ำยาเพาะเลี้ยงทั้ง 4 ชนิด ทำการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ในตู้เพาะเลี้ยง ที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียล และมีคาร์บอนไดออกไซต์ในบรรยากาศ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 48 ชั่วโมง โดยเมื่อได้โอโอไซต์มาแต่ละครั้งจะแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ในจำนวนใกล้เคียงกัน โดยแต่ละกลุ่มจะทำการทดลองซ้ำ (replication) อย่างน้อย 4-5 ครั้ง

4.2 การทดลองที่ 2 ชนิดและความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระต่อการพัฒนาของโอโอไซต์

ใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญเติบโตจนถึงขั้นพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์จากการทดลองที่ 1 โดยเปรียบเทียบสารต้านอนุมูลอิสระ 2 ชนิด คือ วิตามินอีชนิดละลายในน้ำ (Trolox) ที่ความเข้มข้น 50, 100, 250 และ 500 ไมโครโมล และ Melatonin ที่ความเข้มข้น 50, 100, 250 และ 500 ไมโครโมล จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ในตู้เพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง โดยเมื่อได้โอโอไซต์มาแต่ละครั้งจะแบ่งออกเป็น 9 กลุ่ม ในจำนวนใกล้เคียงกัน โดยแต่ละกลุ่มจะทำการทดลองซ้ำ (replication) อย่างน้อย 4-5 ครั้ง

4.3 การทดลองที่ 3 ชนิดของสารกระตุ้น (Activating agent) ต่อการพัฒนาของโอโอไซต์

ใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญเติบโตจนถึงขั้นพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์จากการทดลองที่ 1 โดยเปรียบเทียบสารกระตุ้น 2 ชนิด คือ Ionomycin ที่ความเข้มข้น 5 ไมโครโมล และ Ethanol ที่ความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ โดยกระตุ้นโอโอไซต์ ที่ 0 และ 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ในตู้เพาะเลี้ยงต่อจนครบ 48 ชั่วโมง โดยเมื่อได้

โอโอไซต์มาแต่ละครั้งจะแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ในจำนวนใกล้เคียงกัน โดยแต่ละกลุ่มจะทำการทดลองซ้ำ (replication) อย่างน้อย 4-5 ครั้ง

4.4 การทดลองที่ 4 การปฏิสนธินอกร่างกายและการเพาะเลี้ยงตัวอ่อน

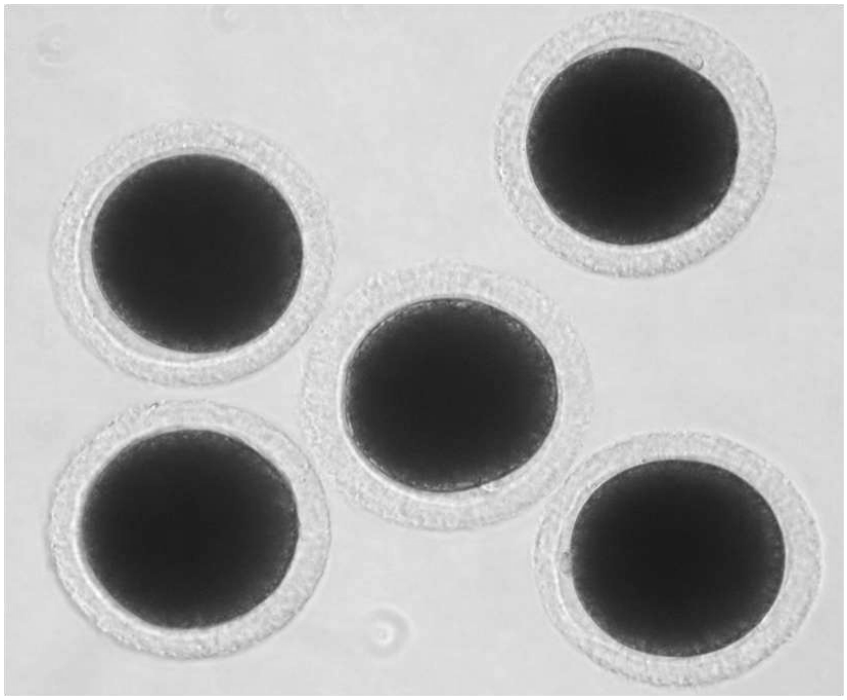
นำน้ำเชื้อสุนัขที่ผ่านการแช่แข็งมาอุ่นละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียล แล้วทำการคัดเลือกตัวอสุจิโดยการปั่นเหวี่ยงแยกเอาตะกอนตัวอสุจิผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ (Two-layered Percoll Density Gradient Centrifugation) ที่ 45% และ 90% ด้วยความเร็ว 700 g นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นดูดเอาส่วนใสทิ้งไปและล้างตะกอนตัวอสุจิด้วย Sp-TALP โดยปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 700g นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำตะกอนที่ได้มาละลายในน้ำยา Glucose Free Fert-TALP ที่ประกอบด้วยเฮพาริน (Heparin) 10 μg/ml และปรับความเข้มข้นของตัวอสุจิให้ได้ 2.5×10^{7} cell/ml

นำตัวอสุจิที่ผ่านการเตรียมแล้วในน้ำยา Glucose Free Fert-TALP มาใส่ลงในหยดน้ำยาที่มีโอโอไซต์ที่ได้ผ่านการเพาะเลี้ยงแล้วนาน 48 ชั่วโมง จำนวน 10-15 ใบต่อหยด โดยตัวอสุจิมีความเข้มข้นสุดท้าย 5×10^{6} cell/ml ทำการเลี้ยงตัวอสุจิร่วมกับโอโอไซต์ ที่ตู้เพาะเลี้ยงอุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียล และมีคาร์บอนไดออกไซต์ในบรรยากาศ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 18-20 ชั่วโมง

หลังจากเลี้ยงตัวอสุจิร่วมกับโอโอไซต์นาน 18-20 ชั่วโมงแล้ว ใช้ปิเปตต์ดูดโอโอไซต์ขึ้นลงหลายๆครั้งเพื่อกำจัดอสุจิที่เกาะอยู่กับโอโอไซต์ออกแล้วย้ายตัวอ่อนที่ได้มาเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน 2 ชนิด คือ น้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อน SOF และ น้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อน TCM 199 ที่มี 10 % FBS และเลี้ยงร่วมกับ BRL-cell (Buffalo rat liver cells) โดยทำการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนที่ตู้เพาะเลี้ยงอุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียล และมีคาร์บอนไดออกไซต์ในบรรยากาศ 5 เปอร์เซ็นต์ และทำการเปลี่ยนน้ำยาเพาะเลี้ยงทุก 48 ชั่วโมง โดยดูการแบ่งตัวและการพัฒนาของตัวอ่อนทุก 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 7 วัน

5. การประเมินการพัฒนาของโอโอไซต์ภายหลังจากการเพาะเลี้ยง

นำโอโอไซต์มาทำให้เซลล์คิวมูลัสหลุดออก (Denude) โดยแช่ในสารละลาย 0.5 เปอร์เซ็นต์ Hyarulonidase แล้วใช้ปิเปตต์ที่ยืดปลายแล้วดูดขึ้นลงเพื่อค่อยๆกำจัดเอาส่วนของเซลล์คิวมูลัสออกจนหมด ภาพที่ 7 แล้วนำโอโอไซต์ที่ลอกเอาเซลล์คิวมูลัสออกจนหมดแล้ว (Denude) มาทำให้เซลล์คงตัวโดยแช่ในสารละลาย PBS ที่มี 3.7 เปอร์เซ็นต์ (w/v) Paraformaldehyde และ 1 เปอร์เซ็นต์(v/v) Triton-X 100 นาน 10-15 นาที นำโอโอไซต์ที่ได้มาล้างในสารละลาย PBS 2- 3 ครั้ง แล้วนำโอโอไซต์ที่ผ่านการล้างแล้วมาใส่ในหยด 95 เปอร์เซ็นต์ glycerol ที่มี Hoechst 33342 ที่ความเข้มข้น 1.9 ไมโครโมล ลงบนแผ่นสไลด์และปิดด้วย cover slip ซึ่งยึดด้วย Paraffin wax ทั้ง 4 มุม ดูผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง



ภาพที่ 7 แสดงโอโอไซต์ภายหลังการเพาะเลี้ยงและทำให้เซลล์คิวมูลัสหลุดออกจนหมด (Denude) ที่กำลังขยาย 200 เท่า

ลักษณะนิวเคลียสของโอโอไซต์จะจำแนกออกเป็น 5 ลักษณะตามการพัฒนาของโอโอไซต์ ดังนี้

5.1 Germinal Vesicle (GV) หมายถึง ลักษณะของนิวเคลียสที่อยู่ในระยะยังไม่เจริญ โดยชั้น nuclear membrane ของนิวเคลียสโอโอไซต์ยังไม่สลายไป โครโมโซมภายในนิวเคลียสยังไม่เกิด decondensaion

5.2 Germinal Vesicle Breakdown (GVBD) หมายถึง ลักษณะของนิวเคลียสที่อยู่ในระยะเริ่มเจริญ โดยมีการสลายตัวของเยื่อหุ้มนิวเคลียส และเริ่มเกิด decondensaion

5.3 Metaphase I (MI) หมายถึง ระยะที่โอโอไซต์ผ่านการเจริญไประยะหนึ่งแล้วแต่ยังไม่เจริญถึงขั้นพร้อมปฏิสนธิ เป็นระยะที่เรียกว่า ระยะ intermediate maturity จะเห็นโครโมโซมกลุ่มเดียวหรือกำลังจะแบ่งเซลล์ออกไป

5.4 Metaphase II (MII) หมายถึง ระยะที่โอโอไซต์มีการเจริญถึงขั้นพร้อมปฏิสนธิ ซึ่งจะเห็นลักษณะโครโมโซมแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มหนึ่งเป็นโพลาร์บอดีที่หนึ่ง (First polar body) อีกกลุ่มเป็นโครโมโซมที่มีการหดตัว และพร้อมจะแบ่งตัวต่อไปเมื่อมีตัวอสุจิเข้ามาผสม

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน Analysis of Variance (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มการทดลอง (mean ± standard deviation) โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS ในการวิเคราะห์

ผลและวิจารณ์

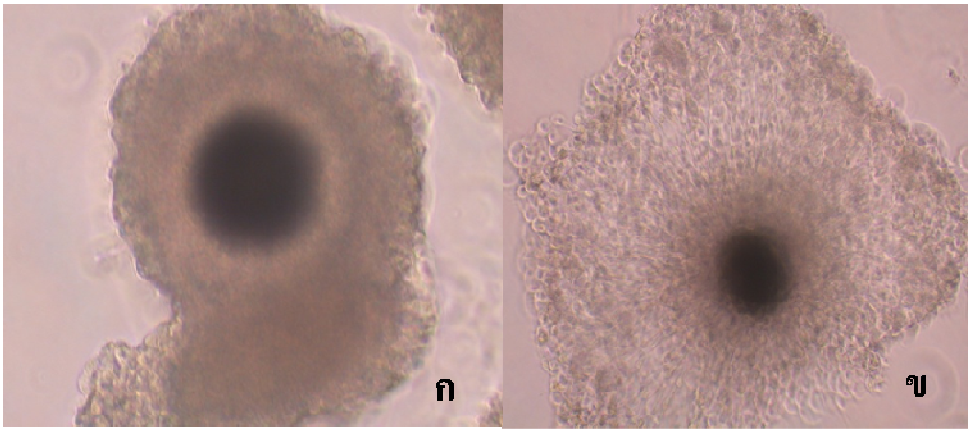
ผล

การทดลองที่ 1 ผลของชนิดน้ำยาเพาะเลี้ยงต่อการพัฒนาของโอโอไซต์

เมื่อนำโอโอไซต์สุนัขจำนวน 296 ใบมาเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง 4 ชนิด พบว่า ความสามารถของโอโอไซต์ในการเกิดกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีส (GVBD- MII) หลังการเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมงในน้ำยาเพาะเลี้ยง SOF, TCM199, Ham F10 และ DMEM/F12 เป็น 88.9±11.0 เปอร์เซ็นต์ 74.4± 20.0 เปอร์เซ็นต์, 76.8±20.7 เปอร์เซ็นต์ และ 75.2±19.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง ที่ 1 ขณะที่อัตราการเจริญของโอโอไซต์จนถึงระยะพร้อมปฏิสนธิ หรือระยะเมทาเฟสทู เป็น 18.6±7.6 เปอร์เซ็นต์, 18.3± 4.5เปอร์เซ็นต์, 13.9±8.2 เปอร์เซ็นต์ และ 11.9±4.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับโดยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในการเกิดกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสและการเจริญถึงขั้นพร้อมปฏิสนธิในน้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ที่แตกต่างกันทั้ง 4 ชนิด แต่พบว่าโอโอไซต์ที่เพาะเลี้ยงใน SOF และ TCM199 มีแนวโน้มที่อัตราการเจริญถึงระยะเมทาเฟสทู ดีกว่าโอโอไซต์ที่เพาะเลี้ยงใน Ham F10 และ DMEM/F12

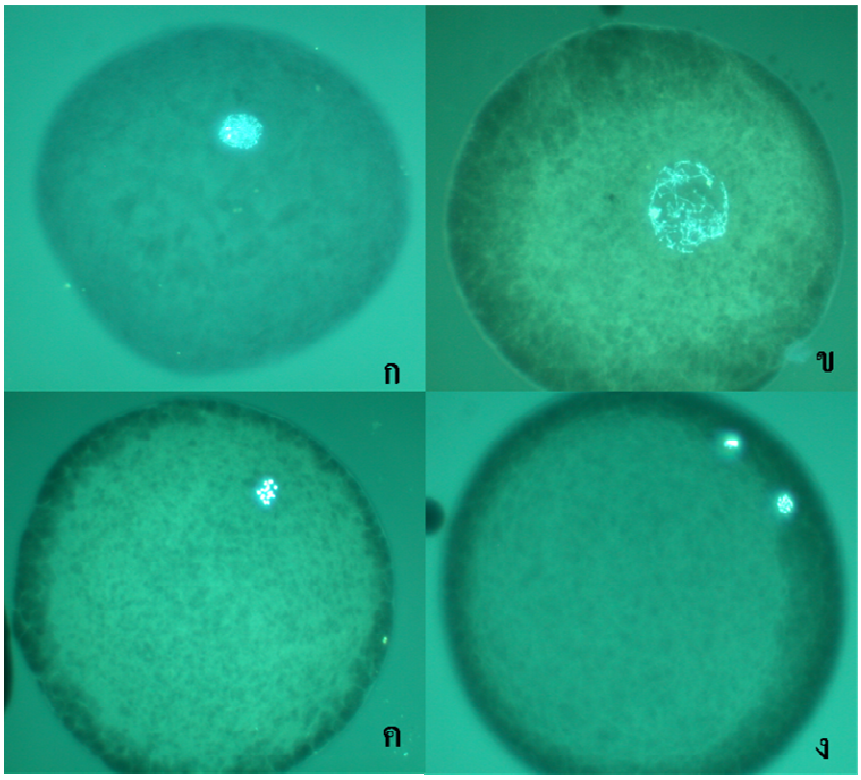
ตารางที่ 1 ระยะการพัฒนาของนิวเคลียสที่พบภายหลังการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน 4 ชนิด เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

น้ำยาเพาะเลี้ยง	จำนวนโอโอไซต์	เปอร์เซ็นต์ (ค่าเฉลี่ย ±ค่าความแปรปรวน) ของระยะการพัฒนาของนิวเคลียส				
		GV	GVBD	MI	MII	GVBD-MII
SOF	70	11.1±7.6	31.9±9.7	38.4±13.7	18.6±7.6	88.9±11.0
TCM199	76	25.6±7.8	32.6±11.2	23.5±8.4	18.3±4.5	74.4±20.0
Ham-F10	77	23.2±9.3	38.6±8.7	24.2±13.2	13.9±8.2	76.8±20.7
DMEM/F12	73	24.8±11.4	34.7±10.2	28.5±8.1	11.9±4.2	75.2±19.1



ภาพที่ 8 เปรียบเทียบลักษณะของโอโอไซต์ก่อนและหลังทำการเพาะเลี้ยง ก.ลักษณะของโอโอไซต์ก่อนทำการเพาะเลี้ยงพบว่ามีเซลล์คิวมูลัสห่อหุ้มล้อมรอบเปลือกหลายชั้น; ข.ลักษณะของโอโอไซต์ภายหลังการเพาะเลี้ยง พบมีการกระจายตัวของเซลล์คิวมูลัสรอบๆเปลือกหุ้มโอโอไซต์ (Expanded Cumulus Oocyte) ที่กำลังขยาย 200 เท่า

ภาพที่ 9 แสดงโอโอไซต์ระยะเมทาเฟสทูภายหลังการเพาะเลี้ยงและทำให้เซลล์คิวมูลัสหลุดออกจนหมด (Denude) พบลักษณะของโพลาร์บอดี้ที่ 1 (First polar body) อยู่ที่ขอบผิวของไซโทพลาสซึม (ที่กำลังขยาย 200 เท่า)



ภาพที่10 โอโอไซต์ที่ย้อมด้วยสี Hoechst 33342 เพื่อดูการพัฒนาของนิวเคลียส และโครโมโซมภายหลังการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก. GV; ข. GVBD; ค.MI และ ง. MII (กำลังขยาย 400 เท่า)

การทดลองที่ 2 ชนิดและความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระต่อการพัฒนาของโอโอไซต์

ผลของสารต้านอนุมูลอิสระ Trolox และ Melatonin ต่ออัตราการเกิดกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีส (GVBD-MII) และการพัฒนาของโอโอไซต์จนถึงระยะเมทาเฟสทู ดังตารางที่ 2 เมื่อเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ในน้ำยา SOF ที่มี Trolox หรือ Melatonin ที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน คือ 50, 100, 250 และ 500 ไมโครโมล เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสารต้านอนุมูลอิสระ Trolox หรือ Melatonin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ไม่สามารถเพิ่มอัตราการเกิดกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีส (GVBD-MII) และอัตราการเจริญของโอโอไซต์จนถึงระยะเมทาเฟสทูได้ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม การใช้ Trolox ที่มีความเข้มข้นต่างกันให้ผลการเกิดกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีส (GVBD-MII) และอัตราการเจริญของโอโอไซต์จนถึงระยะเมทาเฟสทูได้ไม่แตกต่างกัน แต่การใช้ Melatonin ที่มีความเข้มข้น 500 ไมโครโมล สามารถกระตุ้นการเกิดกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีส (GVBD-MII) ได้มากกว่าการใช้ Melatonin ที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครโมล แต่อัตราการเจริญของโอโอไซต์จนถึงระยะเมทาเฟสทูได้ ไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 2 ระยะการพัฒนาของนิวเคลียสที่พบภายหลังการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์โดยเปรียบเทียบชนิดและความเข้มข้นของสารต้านอนุมูลอิสระ

ชนิดสารต้านอนุมูลอิสระ (ความเข้มข้นไมโครโมล)	จำนวนโอโอไซต์	เปอร์เซ็นต์ (ค่าเฉลี่ย ± ค่าความแปรปรวน) ของระยะการพัฒนาของนิวเคลียส				
		GV	GVBD	MI	MII	GVBD-MII
SOF	89	23.7±6.4[ก, ข]	27.0±6.0	41.0±9.3	8.3±3.2	76.3±5.9[ก, ข]
SOF+T50	61	16.2±5.0[ก, ข]	26.5±8.4	45.9±9.5	11.4±1.9	88.9±7.2[ก, ข]
SOF+T100	85	24.0±7.0[ก, ข]	19.3±5.2	45.3±8.2	11.4±4.4	83.8±8.1[ก, ข]
SOF+T250	86	19.2±13.3[ก, ข]	33.9±13.2	36.2±3.5	10.6±0.7	80.2±9.2[ก, ข]
SOF+T500	77	24.9±10.8[ก, ข]	24.0±2.9	37.5±2.2	10.5±3.8	75.1±7.5[ก, ข]
SOF+M50	55	35.8±6.9[ก]	22.4±2.5	34.5±3.1	7.3±1.5	64.2±5.3[ก]
SOF+M100	93	14.9±10.5[ก, ข]	27.0±1.4	47.1±6.3	10.9±5.6	85.1±4.6[ก, ข]
SOF+M250	85	23.0±12.1[ก, ข]	25.8±2.4	36.1±3.8	15.1±8.9	77.0±6.5[ก, ข]
SOF+M500	89	11.2±4.4[ข]	32.8±8.9	48.2±12.1	7.8±1.4	88.8±5.4[ข]

กและข ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

การทดลองที่ 3 ชนิดของสารกระตุ้น (Activating agent) ต่อการพัฒนาของโอโอไซต์

การกระตุ้นโอโอไซต์ด้วย Ethanol หรือ Ionomycin หลังจากเพาะเลี้ยงมาแล้ว 24 ชั่วโมง ดังตารางที่ 3 พบว่า เปอร์เซ็นต์โอโอไซต์ที่เกิดกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีส (GVBD- MII) ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่การกระตุ้นโอโอไซต์ด้วย Ethanol หรือ Ionomycin ก่อนการเพาะเลี้ยง (0 ชั่วโมง) จะทำให้ลดเปอร์เซ็นต์โอโอไซต์ที่เกิดกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีส เมื่อเทียบกับการกระตุ้น หลังจากเพาะเลี้ยงมาแล้ว 24 ชั่วโมงและกลุ่มควบคุม นอกจากนี้พบว่าการกระตุ้นโอโอไซต์ด้วย Ethanol หลังจากเพาะเลี้ยงมาแล้ว 24 ชั่วโมง ทำให้เพิ่มเปอร์เซ็นต์โอโอไซต์ที่พัฒนาถึงระยะเมทาเฟสทูอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มทดลองอื่นๆและกลุ่มควบคุม แต่การกระตุ้นโอโอไซต์ด้วย Ethanol หรือ Ionomycin ก่อนการเพาะเลี้ยง (0 ชั่วโมง) ทำให้ลดเปอร์เซ็นต์โอโอไซต์ที่พัฒนาถึงระยะ เมทาเฟสทูอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 3 ระยะการพัฒนาของนิวเคลียสที่พบภายหลังการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์โดยเปรียบเทียบชนิดและผลของการกระตุ้นของสารเคมีสองชนิด ที่ใช้ในการกระตุ้นให้โอโอไซต์แบ่งเซลล ระยะเวลาต่างกัน

Activating agent (ชั่วโมงที่ทำการกระตุ้น)	จำนวนโอโอไซต์	จำนวนเปอร์เซ็นต์ (ค่าเฉลี่ย ± ค่าความแปรปรวน) ของระยะการพัฒนาของนิวเคลียสและโครโมโซม				
		GV	GVBD	MI	MII	GVBD-MII
Control	101	22.1±8.1^{ก}	36.4±6.5	29.2±6.1	12.3±2.5^{ก}	77.9±10.2^{ก}
Iomomycin						
0 ชั่วโมง	95	51.4±7.2^{ข}	25.4±5.4	21.04±8.1	3.1±1.1^{ข}	48.6±9.8^{ข}
24 ชั่วโมง	102	32.3±5.8^{ก,ข}	20.6±6.3	38.7±9.2	8.4±4.5^{ก,ข}	67.7±11.5^{ก}
Ethanol						
0 ชั่วโมง	96	41.1±5.6^{ข}	19.1±9.2	34.6±11.7	5.1±5.6^{ข}	58.8±14.2^{ข}
24 ชั่วโมง	114	8.5±3.1^{ค}	33.5±8.6	35.2±7.4	22.8±6.8^{ค}	91.4±8.6^{ค}

ก ข และค ในสดมภ์ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

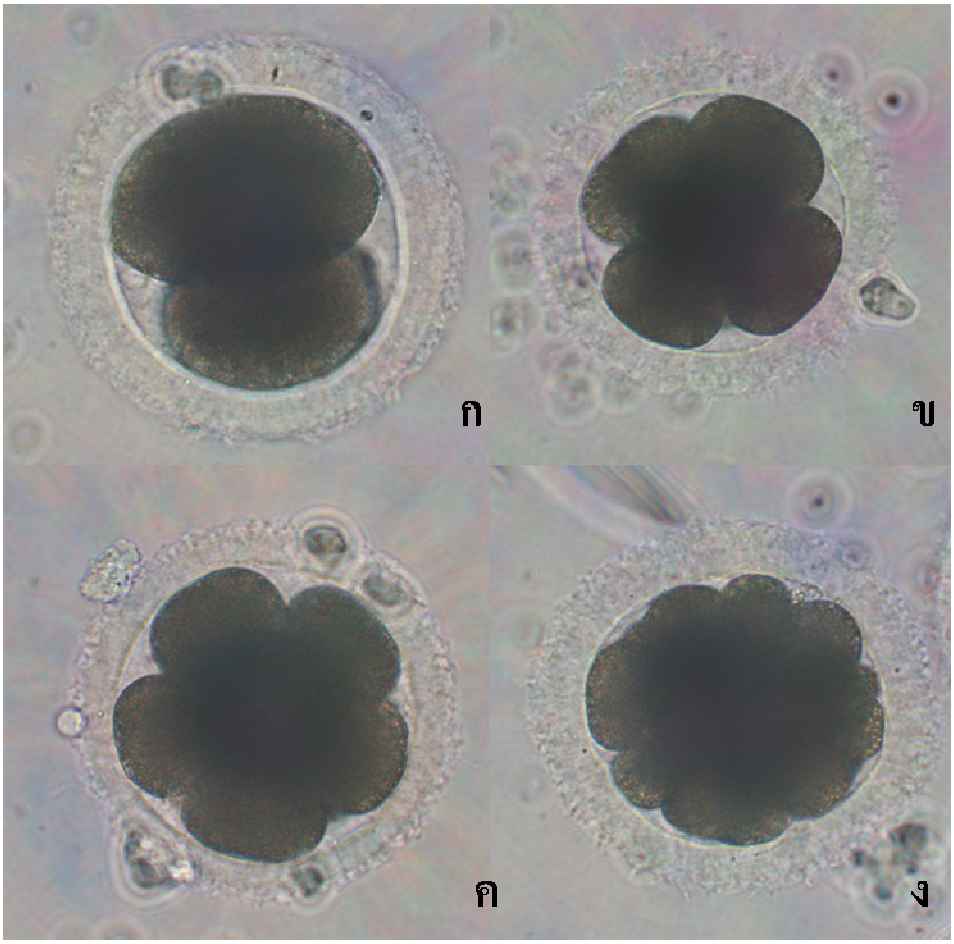
การทดลองที่ 4 การศึกษาการปฏิสนธิภายนอกร่างกายและการเพาะเลี้ยงตัวอ่อน

ดังภาพที่ 11 พบว่าหลังจากการปฏิสนธิตัวอ่อนเริ่มมีการแบ่งเซลล์ครั้งแรก หรือ แบ่งเป็น 2 เซลล์ และพัฒนาการแบ่งเป็น 3-4 เซลล์, 5-7 เซลล์และ 8-16 เซลล์ หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 48-72 ชั่วโมง, 72-96 ชั่วโมง และ 96 -120 ชั่วโมง ตามลำดับ ในตารางที่ 4 แสดงผลการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยา SOF และน้ำยา TCM199 ที่มีเซลล์ BRL เมื่อเพาะเลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยา SOF ตัวอ่อนมีอัตราการแบ่ง เซลล์เป็นระยะ 2 เซลล์ 3-4 เซลล์ และ 5-7 เซลล์ ที่สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในน้ำยา TCM199 ที่มีเซลล์ BRL อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (33.16±1.2% กับ 13.7±1.2%, 24.7±0.5% กับ 8.7±1.1% และ 15.1±2.2% กับ 4.3±1.3% ตามลำดับ) ส่วนการพัฒนาของตัวอ่อนถึงระยะ 8-16 เซลล์ พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แม้ว่าการเลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยาเพาะเลี้ยง SOF จะมีอัตราการแบ่งเซลล์ถึงระยะ 8-16 เซลล์สูงกว่า คือ 4.1±2.1% เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยา TCM199 ที่มีเซลล์ BRL ซึ่งมีอัตราการแบ่งเซลล์พียง 1.4±1.1%

ตารางที่ 4 อัตราการแบ่งเซลล์ของตัวอ่อนภายหลังการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ และการปฏิสนธิภายนอก ร่างกายหลังจากทำการเพาะเลี้ยงตัวอ่อน 7 วัน ระหว่างในน้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อน SOF น้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อน TCM 199 ที่มี BRL-cell

น้ำยาเพาะเลี้ยง	จำนวนโอโอไซต์	จำนวนเปอร์เซ็นต์ (ค่าเฉลี่ย ± ค่าความแปรปรวน) ของระยะของตัวอ่อนที่พัฒนา			
		2 เซลล์	3-4 เซลล์	5-7 เซลล์	8-16 เซลล์
SOF	146	33.6±1.2 ก	24.7±0.5 ก	15.1±2.2 ก	4.1±2.1
TCM199+BRL cells	138	13.7±1.2 ข	8.7±1.1 ข	4.3±1.3 ข	1.4±1.1

กและข ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 11 ตัวอ่อนระยะต่างๆที่เกิดจากการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย ก. ระยะ 2 เซลล์; ข.ระยะ 4 เซลล์; ค.ระยะ 5-7 เซลล์ และ ง; ระยะ 8-16 เซลล์ (ที่กำลังขยาย 200 เท่า)

วิจารณ์

การศึกษาถึงปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อคุณภาพโอโอไซต์นั้นจำเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะการเลี้ยงภายในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากต้องเลียนแบบให้เหมือนกับสภาพภายในร่างกายของสัตว์ ซึ่งปัจจัยความแตกต่างของพันธุ์สัตว์ ความสมบูรณ์ของระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ อายุของสัตว์ สภาพแวดล้อม และอิทธิพลจากอาหารที่สัตว์ได้รับล้วนแต่ส่งผลต่อคุณภาพของโอโอไซต์ ทำให้โอโอไซต์ที่ได้มีคุณภาพที่แตกต่างกัน (Hunter, 2000)

การผลิตตัวอ่อนนอกร่างกายนั้น ปัจจัยที่มีผลอย่างมาก คือ น้ำยาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ เนื่องจากเป็นแหล่งอาหารต่างๆที่จำเป็นต่อการพัฒนา และการเจริญของโอโอไซต์ เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาการเจริญของเซลล์ได้ จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าสอดคล้องกับการศึกษาของ Hewitt and England (1999) และ Rota and Cabianca (2004) ที่ไม่พบความแตกต่างในการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ในน้SOF และ TCM 199 ในขณะที่ Martins *et al*. (2006) ได้เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ในน้ำยาเพาะเลี้ยง SOF และ TCM ในสุนัขที่อยู่ในระยะเป็นสัด (estrus) พบว่าลักษณะของโอโอไซต์ที่เกิด GVBD ในน้ำยาเพาะเลี้ยงทั้งสองชนิดไม่ต่างกัน แต่พบลักษณะของโอโอไซต์ที่พัฒนาถึงระยะเมทาเฟสวัน ในน้ำยาเพาะเลี้ยง SOF (55.8%) สูงกว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงใน TCM (25%) และจากการศึกษาของ Bogliolo *et al.* (2001) ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์แมว พบว่าอัตราการเกิดเมทาเฟสทูของโอโอไซต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง SOF สูงกว่าในน้ำยาเพาะเลี้ยง TCM 199 นอกจากนี้ยังพบว่ามีการใช้น้ำยาเพาะเลี้ยง SOF ในการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนโค และแกะ ได้ถึงระยะ 16 เซลล์ (Tervit *et al.*, 1972) แต่ยังไม่มีรายงานความสำเร็จในการใช้น้ำยาเพาะเลี้ยง SOF ในการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนสุนัขให้ถึงระยะเมทาเฟสทู (Hewitt and England, 1999; Bolamba *et al*., 2002; Rota and Cabianca, 2004; Tas *et al*., 2006) นอกจากนี้ยังมีการใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ชนิดอื่น ได้แก่ น้ำยาเพาะเลี้ยง NCSU37 ซึ่งนิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ในสุกร (Cui *et al*., 2006) น้ำยาเพาะเลี้ยง DMEMF/12 (Bolamba *et al*, 2006) และ น้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM (Lee *et al*., 2007b) สามารถใช้เพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญถึงระยะเมทาเฟสทูได้ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำยาเพาะเลี้ยง SOF และ น้ำยาเพาะเลี้ยง TCM และจากการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าน้ำยาเพาะเลี้ยง Ham's F10 ซึ่งเป็นน้ำยาที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ในแมว และหนู สามารถนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์สุนัขให้เจริญถึงระยะเมทาเฟสทูได้เช่นเดียวกัน

จากการศึกษาผลของสารอนุมูลอิสระเมลาโทนิน และ Trolox พบว่าอัตราการพัฒนาของโอโอไซต์ไม่มีความแตกต่างกันเมื่อทำการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์สุนัขในน้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์

SOF ที่เติมสาร เมลาโทนิน หรือ Trolox แต่จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ของคนพบว่าเมื่อเติมสารเมลาโทนินลงในน้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์จะมีส่วนช่วยให้โอโอไซต์ถึงระยะเมทาเฟสทูและมีอัตราการปฏิสนธินอกร่างกายสูงขึ้น (Park *et al*., 2006) และจากการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์สุกรพบว่าเมื่อเติมเมลาโทนินในน้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ จะช่วยลดปริมาณของสารอนุมูลอิสระ (ROS) ทำให้โอโอไซต์พัฒนาถึงระยะเมทาเฟสทูเพิ่มขึ้น (Kang *et al*., 2008) และพบว่าเมลาโทนินยังทำให้อัตราการแบ่งเซลล์ของตัวอ่อนในสุกรเพิ่มมากขึ้นอีกด้วย (Rodriguez-Osorio *et al*., 2007) นอกจากนี้การศึกษาของ Ishizuka *et al*. (2000) พบว่า เมลาโทนนิน มีผลช่วยเพิ่มผลการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย และการพัฒนาของตัวอ่อนในหนูได้

ในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสของโอโอไซต์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบว่าโอโอไซต์จะมีการหยุดแบ่งเซลล์ครั้งแรกที่ระยะ Prophase I หรือ GV หลังจากนั้นจะมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสต่อเกิดลักษณะของ GVBD และผ่านเข้าระยะ MI, AnaphaseI และTelophaseI จนถึงระยะ MII ตามลำดับ ซึ่งการกระตุ้นให้โอโอไซต์มีความสามารถในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสต่อ (GVBD - MII) ภายหลังการเข้าสู่ระยะพักจึงเป็นส่วนสำคัญ จากการศึกษาของ Sedmikova *et al*. (2003) พบว่าโอโอไซต์ของสุกร ภายหลังการเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง ส่วนใหญ่จะหยุดการแบ่งเซลล์ที่ระยะเมทาเฟสวัน จำนวน 68 เปอร์เซ็นต์ และพบว่ามีการแบ่งเซลล์ถึงระยะเมทาเฟสทู เพียง 26 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อทำการกระตุ้นโอโอไซต์ด้วย Calcium ionophore A23187 พบว่าโอโอไซต์สามารถพัฒนาถึงระยะเมทาเฟสทู ได้ถึง 66 เปอร์เซ็นต์ และทำการกระตุ้นอีกครั้งเพื่อให้เกิด parthenogenesis พบว่าโอโอไซต์สามารถมีการพัฒนา และมีการพัฒนาได้ถึงระยะบลาสโตซีส และจากการศึกษาในแมว พบว่าเมื่อทำการกระตุ้นโอโอไซต์ด้วย ethanol ร่วมกับการใช้สนามแม่เหล็กจะให้ผลในการกระตุ้นโอโอไซต์แมวให้มีการแบ่งเซลล์ถึงระยะเมทาเฟสทู และตัวอ่อนมีการแบ่งเซลล์ได้ถึง 6 เซลล์ (Grabiec *et al*., 2007) นอกจากนี้ยังมีการใช้ ethanol ในการกระตุ้นโอโอไซต์โคให้เกิด parthenogenesis พบว่าโอโอไซต์สามารถพัฒนาและมีการแบ่งเซลล์ได้ถึงระยะ บลาสโตซีสสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ (Minamihashi *et al*., 1993) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการกระตุ้นการเกิด parthenogenesis ในสุนัขโดยการใช้ Ca-EDTA ในการกระตุ้นพบว่า สามารถกระตุ้นให้โอโอไซต์พัฒนาถึงการเกิด pronucleus เท่านั้น (Lee *et al*., 2007a) ซึ่งผลที่ได้แตกต่างกันมากอาจเนื่องจากในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นๆ ซึ่งโอโอไซต์ที่ตกจากฟอลลิเคิลมักเป็นโอโอไซต์ที่อยู่ในระยะพร้อมที่จะปฏิสนธิ หรือ เมทาเฟสทูแล้ว รวมทั้งในสัตว์แต่ละชนิดจะมีความไวต่อสารที่ใช้การกระตุ้นที่แตกต่างกัน (Grabiec *et al*., 2007)

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเมื่อทำการกระตุ้นโอโอไซต์ด้วย ethanol ภายหลังการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ 24 ชั่วโมงสามารถทำให้โอโอไซต์มีการพัฒนาผ่านจากระยะพักการแบ่งเซลล์ที่ GV เข้า

สู่การเซลล์เซลล์แบบไมโอซีสต่อจนถึงระยะเมทาเฟสทูเพิ่มมากขึ้นกว่าโอโอไซต์ที่ไม่ได้กระตุ้นหรือกระตุ้นด้วย ionomycin เนื่องจากการกระตุ้นด้วยสารเคมีจะส่งผลการเปลี่ยนแปลงระดับแคลเซียมภายในไซโทพลาสซึมของโอโอไซต์ คล้ายในตามธรรมชาติที่เมื่อมีตัวอสุจิเข้ามาผสมจะกระตุ้นให้ส่วนของโอโอไซต์มีการหลั่งแคลเซียมภายในเซลล์มากขึ้น และชักนำให้ MPF ไม่สามารถทำหน้าที่ได้เนื่องจากโปรตีนไซคลินถูกทำลาย ซึ่งจำเป็นสำหรับการเปลี่ยนแปลงจากระยะเมทาเฟสวัน เข้าสู่ระยะเมทาเฟสทู (Hample and Eppig, 1995) นอกจากนี้เมื่อแคลเซียมภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้นจะไปกระตุ้นการหลั่งของเอนไซม์ Phospholipase C (PLC) ที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ด้านในให้เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลาย Phosphatidyl inosital biphosphase (PIP_2) ที่เยื่อหุ้มเซลล์กลายเป็น Inosital triphosohase (IP_3) และ 1,2 diacylglyceral (DAG) หลังจากนั้น IP_3 จะถูกปล่อยออกมาสู่ไซโทพลาสซึม และไปจับที่ตัวรับ หรือ Inosital triphosphase receptor (IP_3R) บนเยื่อหุ้มเอนโดพลาสมิก เรคติคูลัม ทำให้ช่องว่างสำหรับแคลเซียมไอออนเปิด ดังนั้นแคลเซียมไอออนจะถูกปล่อยสู่ไซโทพลาสซึม และอาจไปรวมกับ DAG ที่ยังคงอยู่ที่เยื่อหุ้มโดยการกระตุ้นเอนไซม์ไคเนสซึ่งทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ต่อแต่ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด นอกจากนี้แคลเซียมอาจจะเข้าจับกับโปรตีนแคลโมดูลิน (Calmodulin) ทำให้โปรตีนแคลโมดูลินเปลี่ยนแปลงรูปร่างที่สามารถกระตุ้นให้โปรตีนไคเนสต่างๆ เร่งปฏิกิริยาภายในเซลล์ ทำให้โอโอไซต์สามารถมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสต่อจนสมบูรณ์ เกิดโพลาร์บอดี้ที่สอง เกิด pronuclei และมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อการแบ่งเซลล์ของตัวอ่อนตามมา (Boni *et al*., 2007)

จากการศึกษาการผลิตตัวอ่อนสุนัขจากการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ การปฏิสนธิและการเพาะเลี้ยงตัวอ่อน (IVM/IVF/IVC) ภายในห้องปฏิบัติการ พบเพียงรายงานเดียวจาก Otoi *et al.* (2000) เท่านั้นที่สามารถผลิตตัวอ่อนสุนัขได้หนึ่ง blastocyst จากจำนวนโอโอไซต์ที่ทำการศึกษา 217 ใบ และจากการศึกษาของ Hatoya *et al.* (2006) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนภายหลังการทำ IVM/IVF ในสุนัขร่วมกับการใช้ Mouse embryonic fibroblast (MEF) ตัวอ่อนสามารถพัฒนาจนถึงระยะ morula ขณะที่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนร่วมกับ Canine embryonic fibroblast (CEF) ตัวอ่อนสามารถถึงระยะ 16 เซลล์เท่านั้น

มีรายงานการใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อน SOF ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด เช่น ในโค (Keskintepe and Brackett, 1996; Holm *et al*.,1999) แกะ (Walker et al.,1996) แมว (Freisted *et al*., 2001) และในกระบือ (Gasparrini *et al*., 2007) และจากการศึกษาของ Rodrigue *et al.* (2000,2004) สามารถใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อน SOF ในการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนสุนัขได้ถึงระยะ 6-8 เซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ที่เมื่อใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อน SOF จะให้ผลอัตราการเจริญ

และการแบ่งตัวของตัวอ่อนในระยะแรก (2-8 เซลล์) ได้ดีกว่าการใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อน TCM ที่มีเซลล์ BRL โดยพบว่าเมื่อใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อน SOF สามารถให้ผลการพัฒนาของตัวอ่อนโคก่อนการฝังตัว (preimplantation development) ดีกว่าการใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อน TCM (Wrenzycki *et al*., 2001) แต่เหตุผลที่น้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อน SOF ให้การพัฒนาของตัวอ่อนที่ดีกว่าน้ำยาเพาะเลี้ยง TCM ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่มีรายงานว่าส่วนประกอบของน้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อน TCM 199 ที่ประกอบด้วย glucose, hypoxantine และ nicotinamide สามารถช่วยในการพัฒนาของตัวอ่อนในโค (Takahashi and First, 1992) และในคน (Bastias *et al*.,1992)ได้

เมื่อใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อน TCM199 ร่วมกับเซลล์ BRL สามารถเพาะเลี้ยงตัวอ่อนได้ถึงระยะ blastocyst ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด ได้แก่ ในหนู (Okada *et al*., 2005) ในโค (Van Inzer *et al*., 1995; Reed et al.,1996) ในกระบือ (Saikhun *et al*., 2004) รวมถึงในคนด้วย (Hu *et al*., 1998) โดยในส่วนของเซลล์ BRL พบว่าสามารถกระตุ้นให้มีการสร้างสารต่างๆ เช่น Transforming growth factor (TGF beta), Insulin-like growth factor II (IGF-II) และ SCF (Stem cell factor) ซึ่งจำเป็นในการพัฒนาของตัวอ่อน (Massague *et al*., 1985; Zesbo *et al*., 1990; Fukui and Matsuyama, 1994) แต่จากการศึกษาในสุนัขพบว่ายังไม่ประสบความสำเร็จ อาจเนื่องจากความแตกต่างกันของชนิดสัตว์ ระยะเวลาและชนิดของไข่ที่แตกต่างกัน รวมทั้งคุณภาพของโอโอไซต์และปัจจัยในการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์แตกต่างกันจึงจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาปัจจัยต่างๆที่เหมาะสมในการพัฒนาการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ การปฏิสนธิภายนอกร่างกาย และ การพัฒนาของตัวอ่อนจนถึงระยะ blastocyst ในสุนัขต่อไป

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การศึกษาครั้งนี้พบว่าความสามารถของโอโอไซต์ในการเกิดกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีส (GVBD- MII) และการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญถึงระยะเมทาเฟสทูในน้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ SOF, TCM199, Ham F10 และ DMEM/F12 หลังการเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างกัน แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ในน้ำยาเพาะเลี้ยง SOF และ TCM199 มีแนวโน้มที่โอโอไซต์เจริญถึงระยะเมทาเฟสทูได้สูงขึ้น

สารต้านอนุมูลอิสระ Trolox หรือ Melatonin ที่ความเข้มข้นต่างๆไม่สามารถเพิ่มอัตราการเกิดกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีส และอัตราการเจริญของโอโอไซต์จนถึงระยะเมทาเฟสทูได้ การใช้ Melatonin ที่มีความเข้มข้น 500 ไมโครโมล สามารถกระตุ้นการเกิดกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีส (GVBD-MII) ได้มากกว่าการใช้ Melatonin ที่มีความเข้มข้น 50 ไมโครโมล แต่อัตราการเจริญของโอโอไซต์จนถึงระยะเมทาเฟสทูได้ไม่แตกต่างกัน

การกระตุ้นโอโอไซต์ด้วย ethanol หลังผ่านการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ทำให้เพิ่มเปอร์เซ็นต์โอโอไซต์ที่พัฒนาถึงระยะเมทาเฟสทู แต่การกระตุ้นโอโอไซต์ด้วย ethanol หรือ ionomycin ก่อนการเพาะเลี้ยง (0 ชั่วโมง) ทำให้ปอร์เซ็นต์โอโอไซต์ที่พัฒนาถึงระยะเมทาเฟสทูลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

นอกจากนี้น้ำยาเพาะเลี้ยง SOF ยังสามารถใช้ในการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนได้ถึงระยะ 8-16 เซลล์ ทำให้เกิดความเป็นไปได้ในการที่จะผลิตตัวอ่อนสุนัขด้วยวิธีการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย

ข้อเสนอแนะ

เทคโนโลยีด้านการเจริญพันธุ์ในสุนัขด้านการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์และการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกายยังมีอัตราความสำเร็จที่ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น โดยเฉพาะขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้ถึงระยะพร้อมปฏิสนธิ ซึ่งหากสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จแล้ว อาจช่วยทำให้ตัวอ่อนสามารถพัฒนาถึงระยะ blastocyst ได้มากขึ้น ซึ่งน่าจะมีการศึกษาต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

เกษกนก ศิรินฤมิตร. 2548. วิทยาระบบสืบพันธุ์สุนัขเพศเมีย. ครั้งที่ 1, กรุงเทพฯ.

Alberio, R., A. Brero, J. Motlk, T. Cremer, E. Wolf and V. Zakhartchenko. 2001. Remodeling of donor nuclei, DNA- synthesis, and ploidy of bovine cumulus cell nuclear transfer embryos:effect of activation protocol. **Mol. Reprod. Dev.** 59: 371-379.

Bastias, M.C., S.T. McGee-Belser, S.H. Bryan and J.M. Vasquez. 1993. In vitro deleterious effect of hypoxanthine in Ham's Nutrient Mixture F-10 culture medium on human oocyte fertilization and early embryonic development. **Fertil. Steril.** 60: 876-880.

Bogliolo, L., G. Leoni, S. Ledda, S. Naitana, M. Zedda, A. Carluccio and S. Pau. 2001. Intracytoplasmic sperm injection of in vitro matured oocytes of domestic cats with frozen-thawed epididymal spermatozoa. **Theriogenology** 6: 955-967.

Bolamba, D., K.D. Russ, M.A. Olson, J.L. Sandler, and B.S. Durran. 2002. In vitro maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicle in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential. **Theriogenology** 58: 1689-1703.

_____, _____, _____, _____, and _____. 2006. Effects of epidermal growth factor and hormones on granulosa expansion and nuclear maturation of dog oocytes in vitro. **Theriogenology** 65: 1037- 1047.

Boni, R., R. Gualtieri, R. Talevi and E. Tosti. 2007. Calcium and other ion dynamics during gamete maturation and fertilization. **Theriogenology** 68: 156-164.

Cui, X.S., Y.X. Jin, X .H. Shen, J.Y. Lee, H.S. Lee, X.J. Yin, I.K. Kong and N.H. Kim. 2006. Epidermal growth factor enhances meiotic resumption of canine oocytes in the presence of BSA. **Theriogenology** 66: 267-274.

Dalvit, G., S.P. Llane, A. Descalzo, M. Insani, M. Beconi and P. Cetica. 2005. Effect of alpha- tocopheron and ascorbic acid in bovine oocyte in vitro maturation. **Reprod. Dom. Anim**. 40: 93-97

Freistedt, P., M. Stojkovic and E. Wolf. 2001. Efficient in vitro production of cat embryos in modified synthetic oviduct fluid medium: effects of season and ovarian status. **Biol. Reprod.** 65: 9-13.

Fukui, Y. and K. Matsuyama. 1994. Development of in vitro matured and fertilized bovine embryos cultured in media containing human leukemia inhibitory factor. **Theriogenology** 42: 663-673.

Gasparrini, B., A. De Rosa, L. Attanasio, L. Boccia, R. Di palo, G. Campanile and L. Zicarelli. 2008. Influence of the duration of in vitro maturation and gamete co-incubation on the efficiency of in vitro embryo development in Italian Mediterranean buffalo (*Bubalus bubalis*). **Anim. Reprod. Sci.** 105: 354-364.

Grabiec, A., A. Max, and M. Tischnrer. 2007. Parthenogenetic activation of domestic cat oocytes using ethanol, calcium ionophore, cycloheximide and a magnetic field. **Theriogenology** 67: 795-800.

Gomez, M.C., E. Pope, R. Harris, S. Mikota and B.L. Dresser. 2003. Development of in vitro matured, in vitro fertilized domestic cat embryos following cryopreservation, culture and transfer. **Theriogenology** 60: 239-251.

Hample, A .and J.J. Eppig**.** 1995. Analysis of the mechanism(s) of metaphase I arrest in maturing mouse oocytes**. Development** 121: 925-933.

Hatoya, S., Y. Sugiyama, R. Torii, V. Wijewardana, D. Kumagai, K. Sugiura, K. Kida, N. Kawate, H. Tamada, T. Sawada and T. Inaba. 2006. Effect of co-culturing with embryonic fibroblasts on IVM, IVF and IVC of canine oocytes. **Theriogenology** 66: 1083-1090.

Hewitt, D.A. and G.C.W. England. 1998. The effect of oocyte size and bitch age upon oocyte nuclear maturation *in vitro*. **Theriogenology** 49: 957–966.

_____ and _____. 1999. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation *in vitro*. **Anim. Reprod. Sci.** 55: 63–75.

Holm, P., P.J. Booth, M.H. Schmidt, T. Greve and H. Callesen. 1999. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology** 52: 683-700.

Hossein, M.S., M.K. Kim, H.J. Oh, O. Koo, J.J. Kim, S.K. Kang, B.C. Lee and W.S. Hwang. 2007. Effects of thiol compounds on in vitro maturation of canine oocytes collected from different reproductive stages. **Mol. Reprod. Dev.** 74: 1213–1220.

Hu, Y., W. Maxson, D. Hoffman, S. Ory, S. Eager, J. Dupre and K. Worrilow. 1998. Co-culture with assisted hatching of human embryos using Buffalo rat liver cells. **Hum. Reprod.** 13: 165-168.

Hunter, M.G. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. **J. Reprod. Fertil.** 5: 122-130.

Ishizuka, B., Y. Kuribayashi, K. Murai, A. Amemiya and T.I. Masanori. 2000. The effect of melatonin on *in vitro* fertilization and embryo development in mice. **J. Pineal. Res.** 28: 48-51.

Kang, J. K., O. J. Koo, D. K. Kwon, G. Jang, S. K. Kang, D. Y. Kim and B. C. Lee. 2008. Effects of melatonin on the in vitro oocyte maturation of porcine cumulus-oocyte complexs. **Reprod. Ferti. Dev.** 20: 202.

Keskintepe, L. and B.G. Brackett. 1996. In vitro developmental competence of in vitro-matured bovine oocytes fertilized and cultured in completely defined media. **Biol. Reprod.** 55: 333-339.

Kim, M.K., Y.H. Fibrianto, H.J. Oh, G. Jang, H.J. Kim, K.S. Lee, S.K. Kang, B.C. Lee and W.S. Hwang. 2004. Effect of β-mercaptoethanol or epidermal growth factor supplementation on *in vitro* maturation of canine oocyte collected from dogs with different stage of the estrus cycle. **J. Vet. Sci.** 5: 253–258.

_____, _____, _____, _____, _____, _____, _____, _____, and _____. 2005. Effects of estradiol-17β and progesterone supplementation on *in vitro* nuclear maturation of canine oocytes. **Theriogenology** 63: 1342–1353.

Kitiyanant, Y., J. Saikhun and K. Pavasuthipaisit. 2003. Somatic cell nuclear transfer in domestic cat oocytes treated with IGF-I for in vitro maturation**. Theriogenology** 59: 1775-1786.

Lee, S., J. Kim, B. Kim, M. Kim, S. Kim, D. Yoo, M. Shin, S. Lee, Y. Park and Y. Park. 2007a. The parthenogenetic activation of canine oocytes with Ca-EDTA by various culture periods and concentrations. **Theriogenology** 67: 698-707.

_____, S.R., M.O. Kim, S.H. Kim, B.S. Kim, D.H. Yoo, Y.S. Park, Y.B. Park, J.H. Ha and Z.Y. Ryo. 2007b. Effect of conditioned medium of mouse embryonic fibroblasts produced from EC-SOD transgenic mice in nuclear maturation of canine oocytes in vitro. **Anim. Reprod. Sci.** 99:106-116.

Loi, P., S. Ledda, J. Fulka, P. Cappai and R.M. Moor. 1998. Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols. **Biol. Reprod.** 58: 1177-1187.

Luvoni, G.C., S. Chigioni, E. Allievi and D. Macis. 2003. Meiosis resumption of canine oocytes cultured in the isolated oviduct. **Reprod. Dom. Anim.** 38: 410–414.

_____, _____, _____ and _____. 2005. Factors involved *in vivo* and *in vitro* maturation of canine oocytes. **Theriogenology** 63: 41–59.

Mahi, C.A. and R. Yanagimachi. 1976. Maturation and sperm penetration of canine ovarian oocytes *in vitro*. **J. Exp. Zool.** 196: 189–196.

Martins, L.R., C.B. Ponchirolli, S.L. Beier, F.C. Landim-Alvarenga and M.D. Lopes. 2006. Analysis of nuclear maturation in *in vitro* matured oocytes from estrous and anestrous bitches. **Anim. Reprod**. 3: 49-54.

Massague, J., B. Kell and C. Mottola. 1985. Stimulation by insulin-like growth factors is required for cellular transformation by type beta transforming growth factor. **J. Biol. Chem.** 264: 551-554.

Minamihashi, A., A. J. Watson, P. H. Watson, R. B. Church and G. A. Schultz. 1993. Bovine parthenogenetic blastocysts following in vitro maturation and oocyte activation with ethanol. **Theriogenology** 40: 63-76.

Okada, H., M. Ito, Y. Hirose, A. Uda, K. Terao, T. Yoshida and T. Sankai. 2005. Buffalo rat liver cells product factors that support preimplantation development of mouse embryos cultured in vitro. **Comp. Med.** 55: 61-66.

Ongeri, E. M., C.L. Bormann, R.E. Butler, D. Melican, W.G. Gavin, Y. Echelard, R.L. Krisher and E. Behboodi. 2001. Development of goat embryos after *in vitro* fertilization and parthenogenetic activation by different methods. **Theriogenology** 55: 1933-1945.

_____ and R. L. Krisher. 2001. Glucose and pyruvate metabolism of preimplantation goat blastocysts following *in vitro* fertilization and parthenogenetic activation. **Cloning Stem Cells**. 3: 115-123.

Otoi, T., M. Fujii, M. Tanaka, A. Ooka and T. Suzuki. 2000. Canine oocyte diameter in relation to meiotic competence and sperm penetration. **Theriogenology** 54: 535–542.

_____, A. Ooka, M. Murakami, N.W. Kurnianikarja and T. Suzuki. 2001. Size distribution and meiotic competence of oocytes obtained from bitch ovaries at various stages of the oestrous cycle. **Reprod. Ferti. Dev.** 13: 151–155.

_____, T. Shin, D.C. Kraemer and M.E. Westhusin. 2004. Influence of maturation culture period on the development of Canine oocytes after *in vitro* maturation and fertilization. **Reprod. Nutr. Dev.** 44: 631–637.

Park, E., D. Lee, J. Cho, J. Han, K. Cha and T. Yoon. 2006. Addition of melatonin *in vitro* maturation (IVM) medium increase maturation and fertilization of immature human oocytes. **Fertil. Steril.** 86: 168.

Petr, J., R. Grocholova, J. Rozinek and F. Jílek. 1996. Activation of in vitro matured pig oocytes by combined treatment of ethanol and cycloheximide**. Theriogenology** 45: 1473 – 1478.

Reed, W.A., T.K. Suh, T.D. Bunch and K.L. White. 1996. Culture of in vitro fertilized bovine embryos with bovine oviductal epithelial cells, Buffalo rat liver (BRL) cells or BRL-cell-conditioned medium. **Theriogenology** 45: 439-449.

Reynaud, K., A. Fontbonne, N. Marseloo, C. Viaris de Lesegno, M. Saint-Dizier and S. Chastant-Maillard. 2006. In vivo canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis: A review. **Theriogenology** 66: 1685 – 1693.

Robertson, J.B., V. Srsen and W.A. King. 1992. Cytogenetic and ultrastructural analysis of canine oocytes cultured *in vitro*. **The 12th International Congress in Animal Reproduction.The Hague**, **The Netherland**: 1808–1810.

Rodrigues, B.A. and J.L. Rodrigues. 2003. Influence of reproductive status on *in vitro* oocyte maturation in dogs. **Theriogenology** 60: 59–66.

_____, L.C. Dos Santos and J.L. Rodrigues. 2004. Embryonic development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized dog oocytes. **Mol. Reprod. Dev.** 67: 215–223.

Rodriguez-Osorio, N., I. J. Kim, H. Wang, A. Kaya, and E. Memili. 2007. Melatonin increases cleavage rate of porcine preimplantation embryos in vitro. **J. Pineal. Res**. 43: 283-288.

Rota, A. and G. Cabianca. 2004. *In vitro* maturation rates of canine oocytes from anoestrous bitches in simple media. **Reprod. Nutr. Dev.** 44: 105–109.

Saikhun, J., H. Sritanaudomchai, K. Pavasuthipaisit, Y. Kitiyanant. 2004. Telomerase activity in swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes and embryos derived from in vitro fertilization, somatic cell nuclear transfer and parthenogenetic activation. **Reprod. Domest. Anim.** 39: 162-167.

Sedmikova, M., J. Burdova, J. Petr, M. Etrych, J. Rozinek and F. Jilek. 2003. Induction and activation of meiosis and subsequent parthenogenetic development of growing pig oocytes using calcium ionophore A23187. **Theriogenology** 60: 1609-1620.

Songsasen, N., and D.E. Wildt. 2005. Size of the donor follicle, but not stage of reproductive cycle or seasonality, influences meiotic competency of selected domestic dog oocyte. **Mol. Reprod. Dev.** 72: 113–119.

_____ and D.E. Wildt. 2007. Oocyte biology and challenges in developing *in vitro* maturation system in domestic dog. **Anim. Reprod. Sci.** 98: 2–22.

_____, I. Yu and S.P. Leibo. 2002. Nuclear maturation of canine oocytes cultured in protein-free media. **Mol. Reprod. Dev.** 62: 407–415.

_____ and M. Apimeteetumrong. 2002. Effect of _β-mercaptoethanol on formation of pronuclei and developmental competence of swamp buffalo oocytes. **Anim. Reprod. Sci.** 72: 193–202.

Takahash, Y. and N.L. First. 1992. In vitro development of bovine one-cell embryos: Influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. **Theriogenology** 37: 963-978.

Tas, M., M. Evecen, O.B. Ozdas, U. Cirit, K. Demir, S. Birler and S. Pabuccuoglu. 2006. Effect of transport and storage temperature of ovaries on in vitro maturation of bitch oocytes. **Anim. Reprod. Sci.** 96: 30-34.

Tatham, B. 2000. Increasing Buffalo production using reproduction technology. **A report for the Rural industries Research and Development Corporation.** 40.

Tervit, H.R., D.G. Whittingham and L.E. Rowson, 1972. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. **J. Reprod. Fertil.** 30: 493-497.

Tesfriri,A. and S.M. Pomerantz. 1986. Oocyte Maturation Inhibitor. **Clin. Endocrinol. Metab.** 15: 157-170.

Theca folliculi**. http://www.answers.com/topic/theca-folliculi-1?cat=health**. April 8, 2008.

Urogenital of the dog**. http://www.vetmed.wsu.edu/ClientED/anatomy/dog_ug.aspx#female**. March 27, 2007.

Vignon, X., P. Chesne, D. LeBourhis, J.E. Flechon, Y. Heyman and J.P. Renard. 1998. Developmental potential of bovine embryos reconstructed from enucleated matured oocytes. **C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sci.** 321: 735-745.

van Inzen, WG., A.E. van Stekelenburg-Hamers, S.M. Weima, T.A. Kruip, M.M. Bevers and C.L. Mummery. 1995. Culture of bovine embryos to the blastocyst stage using Buffalo rat liver (BRL) cells. **Theriogenology** 43: 723-738.

Walker, S.K., J.L. Hill, D.O. Kleemann and C.D. Nancarrow. 1996. Development of ovine embryos in synthetic oviductal fluid containing amino acids at oviductal fluid concentrations. **Biol. Reprod.** 55: 703-708.

Whitetaker, M. and R. Partel. 1990. Calcium and cell cycle control. **Development** 108: 525–542.

Willingham-Rocky, L.A., K. Hinrichs, M.E. Westhusin and D.C. Kraemer. 2003. Effects of stage of oestrous cycle and progesterone supplemention during culture on maturation of canine oocytes *in vitro*. **Reproduction** 126: 501–508.

Wrenzycki, C., D. Herrmann, L. Keskintepe, A. Martins, J. Sirisathien, S.B. Brackett and H. Niemann. 2001. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. **Hum. Reprod.** 16: 893-901.

Yamada, S., Y. Shimazu, Y. Kawano, M. Nakazawa, K. Naito and Y. Toyoda. 1993. In vitro maturation and fertilization of preovulatory dog oocytes. **J. Reprod. Fertil.** 47: 227–229.

Zsebo, K.M., J. Wypych, I.K. McNiece, H.S. Lu, K.A Smith, S.B. Karkare, R.K., Sachdev, V.N. Yuschenkoff, N.C Birkett and L.R. Williams. 1990. Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver-conditioned medium. **Cell** 63: 195-201.

ภาคผนวก

ส่วนประกอบของน้ำยาและสารละลายที่ใช้ในการทดลอง

1. น้ำยา TCM-HEPES สำหรับเก็บและล้างโอโอไซต์ ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

TCM-199	0.95	กรัม
Sodium Bicarbonate	0.22	กรัม
Pyruvate	0.0011	กรัม
Hepes	0.0238	กรัม
Gentamicin	100	ไมโครลิตร
ค่า Osmolarity	280-290 mOsm/kg	
ค่า pH	7.4	

2. น้ำยา TCM199 สำหรับเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ และตัวอ่อน ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

TCM-199	0.95	กรัม
Sodium Bicarbonate	0.22	กรัม
Streptomycin Sulfate	0.050	กรัม
Penicillin G, Potassium salt	0.059	กรัม
ค่า Osmolarity	280-290 mOsm/kg	
ค่า pH	7.4	

3. น้ำยา SOF สำหรับเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ และตัวอ่อน ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

NaCl	0.294	กรัม
KCl	0.534	กรัม
KH_2PO_4	0.162	กรัม
$MgCl_2.6H_2O$	0.100	กรัม
$NaHCO_3$	2.106	กรัม
Na pyruvate	0.033	กรัม

$CaCl2.\ 2H_2O$	0.251	กรัม
Phenol red	0.005	กรัม
Streptomycin Sulfate	0.050	กรัม
Penicillin G, Potassium salt	0.059	กรัม
Sodium lactate	0.471	มิลลิลิตร
ค่า Osmolarity	280-290 mOsm/kg	
ค่า pH	7.4	

ที่มา: Bolamba *et al*., 2002

4. น้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM/F12 สำหรับเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

NaHCO3	0.245	กรัม
DMEM/F12	1.20	กรัม
Streptomycin Sulfate	0.050	กรัม
Penicillin G, Potassium salt	0.059	กรัม
ค่า Osmolarity	280-290 mOsm/kg	
ค่า pH	7.4	

ที่มา: Kitiyanant *et al*., 2003

5. น้ำยาเพาะเลี้ยง HAM F10 สำหรับเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Ham F10	1.08	กรัม
$NaHCO_3$	0.12	กรัม
Na Pyruvate	0.044	กรัม
L glutamine	0.011	กรัม

Streptomycin Sulfate	0.050	กรัม
Penicillin G, Potassium salt	0.059	กรัม
FBS	5	มิลลิลิตร
ค่า Osmolarity	280-290 mOsm/kg	
ค่า pH	7.4	

ที่มา: Kitiyanant *et al*., 2003

6. น้ำยา Fert-TALP สำหรับการปฏิสนธิอสุจิกับโอโอไซต์ ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Nacl	0.666	กรัม
KCl	0.0239	กรัม
$NaHCO_3$	0.210	กรัม
NaH_2PO_4. H_2O	0.0055	กรัม
$CaCl_2$. $2H_2O$	0.0294	กรัม
$MgCl_2$. $6H_2O$	0.0101	กรัม
Na Pyruvate	0.0022	กรม
BSA	0.6	กรัม
Sodium lactate	18.6	กรัม
Gentamicin	100	ไมโครลิตร

ที่มา: Tatham *et al*., 2000

7. น้ำยา Sperm-TALP สำหรับเตรียมอสุจิ ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

NaCl	0.5844	กรัม
KCl	0.0231	กรัม
$NaHCO_3$	0.21	กรัม
$NaH_2PO_4.H_2O$	0.0041	กรัม
HEPES	0.2380	กรัม

$CaCl_2.2H_2O$	0.0081	กรัม
Na pyruvate	0.011	กรัม
BSA	0.6	กรัม
Sodium lactate	36.8	กรัม
Gentamicin	100	ไมโครลิตร

7. สารละลาย Hyaluronidase ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับทำให้เซลล์คิวมูลัสออก ประกอบด้วย

PBS	10	มิลลิลิตร
Hyaluronidase	0.05	กรัม

9. สารละลาย PBS ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

NaCl	1	กรัม
KCl	0.024	กรัม
$NaH_2PO_4.12\ H_2O$	0.056	กรัม
KH_2PO_4	0.024	กรัม