สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 ผลของขนาดฟอลลิเคิลต่อความสามารถในการเก็บโอโอไซต์

จากการศึกษาพบว่าผลของขนาดของฟอลลิเคิลต่อความสามารถในการเก็บโอโอไซต์จากขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-8 มิลลิเมตรสูงกว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่า 3 มิลลิเมตร โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) ดังแสดงในตารางที่ 4-1

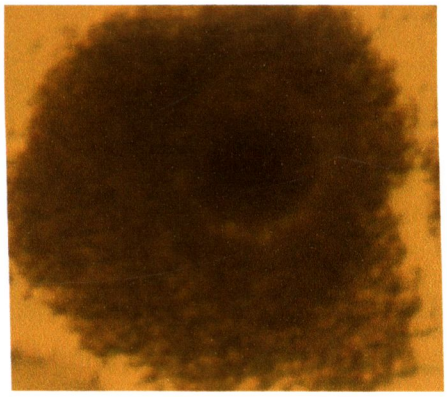
ตารางที่ 4-1 ผลของขนาดฟอลลิเคิลต่อความสามารถในการเก็บโอโอไซต์

ขนาดของฟอลลิเคิล (มม.)	จำนวนฟอลลิเคิล	จำนวนโอโอไซต์	เปอร์เซ็นต์ การเก็บโอโอไซต์
3-8	1,208	691	57.2[a]
เล็กกว่า 3	827	408	49.3[b]
รวม	2,035	1,099	

[a, b] ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.01$)

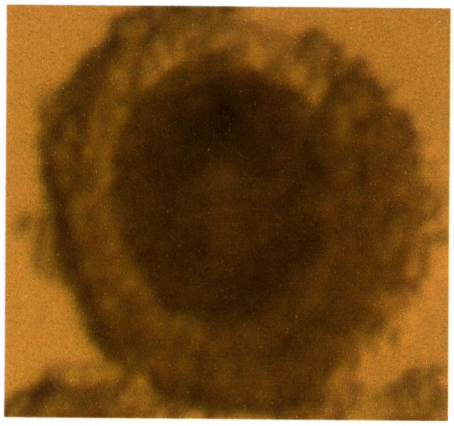
ทำการประเมินคุณภาพโอโอไซต์ก่อนเข้าการทดลอง โดยใช้การวัดจากชั้นของคิวมิวลัสเซลล์ (cumulus cell) ที่ล้อมรอบโอโอไซต์และไซโตพลาสซึมของโอโอไซต์ (มงคล, 2543) ดังนี้

1. โอโอไซต์คุณภาพดี (good) มีชั้นของคิวมิวลัสเซลล์หุ้มตั้งแต่ 3 ชั้นขึ้นไป และมีไซโตพลาสซึมเป็นเนื้อเดียวกัน (ภาพที่ 4-1)



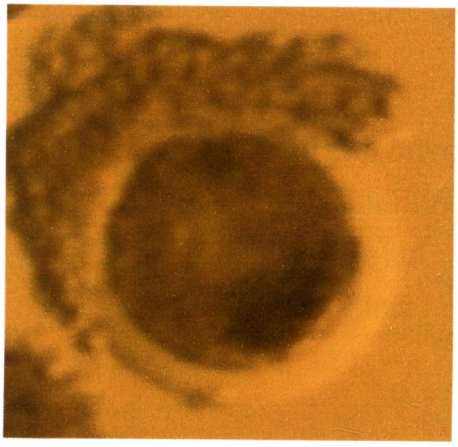
ภาพที่ 4-1 โอโอไซต์คุณภาพดี (good)

2. โอโอไซต์คุณภาพปานกลาง (fair) มีชั้นของคิวมิวลัสเซลล์หุ้ม 1-2 ชั้น และมีไซโตพลาสซึมเป็นเนื้อเดียวกัน (ภาพที่ 4-2)



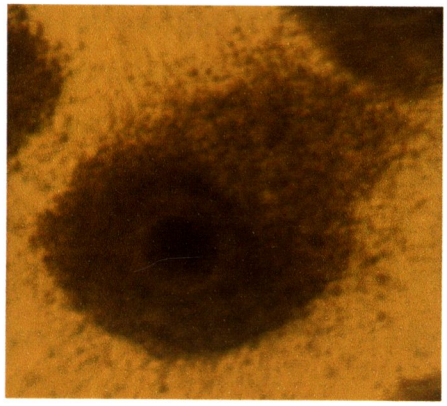
ภาพที่ 4-2 โอโอไซต์คุณภาพปานกลาง (fair)

3. โอโอไซต์คุณภาพต่ำ (poor) ไม่มีชั้นของคิวมิวลัสเซลล์ล้อมรอบ หรือมีไซโตพลาสซึมบิดเบี้ยวไม่คงรูป (ภาพที่ 4-3)



ภาพที่ 4-3 โอโอไซต์คุณภาพไม่ดี (poor)

4. เมื่อประเมินคุณภาพของโอโอไซต์โค จากนั้นสุ่มเอาโอโอไซต์คุณภาพดีและปานกลางเพื่อนำโอโอไซต์มาเพาะเลี้ยงภายนอกร่างกาย เมื่อครบ 24 ชั่วโมงแล้วโอโอไซต์ที่มีการพัฒนาการที่สมบูรณ์ มีการแผ่กระจายของชั้นคิวมิวลัสเซลล์ หรือที่เรียกว่า expansion (ภาพที่ 4-4) ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดคุณภาพของโอโอไซต์ที่มีการพัฒนาการที่สมบูรณ์ได้



ภาพที่ 4-4 โอโอไซต์ที่มีการพัฒนาการที่สมบูรณ์

4.2 ผลของการเสริมชนิดของ serum ในสูตรน้ำยาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอต่อการพัฒนาพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์ของการผลิตเอ็มบริโอภายนอกร่างกาย

การศึกษาพบว่าผลของการเสริมชนิดของ serum ในสูตรน้ำยาในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอภายนอกร่างกาย โดยเสริม serum คือ FCS, ECS, BSA, และกลุ่มควบคุมต่อการพัฒนาพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์ มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P>0.05$) แต่อย่างไร ก็ตามการพัฒนาพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์ในกลุ่มที่เสริมด้วย BSA สูงที่สุด รองลงมา คือ ECS, FCS และกลุ่มควบคุม ตามลำดับ (54.7, 51.2, 50.0, และ 42.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ดังแสดงในตารางที่ 4-2

ตารางที่ 4-2 ผลของการเสริมชนิดของ serum ในสูตรน้ำยาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอต่อการพัฒนาพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์ของการผลิตเอ็มบริโอภายนอกร่างกาย

ชนิด serum	จำนวนโอโอไซต์	จำนวนโอโอไซต์พร้อมปฏิสนธิ	เปอร์เซ็นต์โอโอไซต์พร้อมปฏิสนธิ
ควบคุม	256	110	42.9
TCM-199+ 10% BSA	256	140	54.7
TCM-199+10% FCS	256	128	50.0
TCM-199+10% ECS	256	131	51.2

4.3 ผลของการเสริมชนิดของ serum ในสูตรน้ำยาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอต่อการปฏิสนธิและการเจริญเติบโตของการผลิตเอ็มบริโอภายนอกร่างกาย

การศึกษาการผลของเสริมชนิดของ serum ในสูตรน้ำยาในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอภายนอกร่างกาย โดยเสริม serum 3 ชนิด พบว่า การปฏิสนธินอกร่างกายในสูตรน้ำยาแพะเลี้ยงเอ็มบริโอที่เสริม FCS, ECS, BSA, และกลุ่มควบคุม มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P>0.05$) แต่อย่างไรก็ตามการปฏิสนธินอกร่างกายในกลุ่มที่เสริมด้วย FCS และ ECS สูงที่สุด รองลงมา คือ BSA และกลุ่มควบคุม ตามลำดับ (41.2, 41.2, 41.1, และ 38.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ดังแสดงในตารางที่ 4-3

ตารางที่ 4-3 ผลการเสริมชนิดของ serum ในสูตรสารเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอต่อการปฏิสนธิและการเจริญเติบโตของการผลิตเอ็มบริโอภายนอกร่างกาย

ชนิด serum	เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิของเอ็มบริโอ	เปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโต		
		ระยะ 4-8 เซลล์	ระยะมอรูลา	ระยะบลาสโตซีส
ควบคุม	38.2 (42/110)	35.7[b] (15/42)	9.5[b] (4/42)	0.0 (0/42)
10%BSA	41.2 (58/140)	98.3[a] (57/58)	37.9[a] (22/58)	8.6 (5/58)
10%FCS	41.1 (53/128)	94.3[a] (50/53)	24.5[a] (13/53)	5.7 (3/53)
10%ECS	41.2 (54/131)	100.0[a] (54/54)	31.5[a] (17/54)	7.4 (4/54)

[a, b, c] ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.01$)

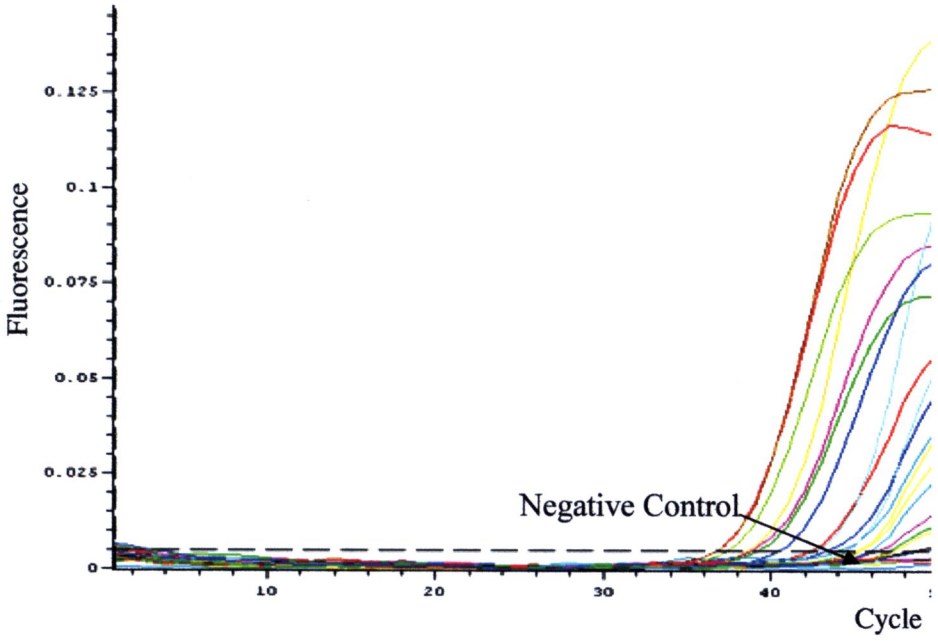
จากตารางที่ 4-3 ผลการเสริมชนิดของ serum ต่อการเจริญและพัฒนาของเอ็มบริโอโคที่ได้จากการผลิตเอ็มบริโอภายนอกร่างกาย ระยะแรกไปจนถึงระยะพร้อมในการย้ายฝากเอ็มบริโอและสามารถฝังตัวในเยื่อบุโพรงมดลูกของโคลูกผสมพื้นเมือง (cleavage rate of embryos) โดยทำการศึกษาการเจริญและพัฒนาของเอ็มบริโอของโคในระยะ 4-8 เซลล์ ระยะมอรูลา และระยะบลาสโตซีส พบว่าการเจริญและพัฒนาของเอ็มบริโอของโคในระยะ 4-8 เซลล์ ในกลุ่มที่เสริมด้วย FCS, BSA, และ ECS สูงกว่ากลุ่มควบคุม โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) แต่อย่างไรก็ตามการเจริญและพัฒนาของเอ็มบริโอของโคในระยะ 4-8 เซลล์ ในกลุ่มที่เสริมด้วย ECS สูงที่สุด รองลงมา คือ BSA, FCS, และกลุ่มควบคุม ตามลำดับ (100.0, 98.3,

94.3, และ 35.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ส่วนการเจริญและพัฒนาของเอ็มบริโอของโคในระยะมอรูลา ในกลุ่มที่เสริมด้วย FCS, BSA, และ ECS สูงกว่ากลุ่มควบคุม โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) แต่อย่างไรก็ตามการเจริญและพัฒนาของเอ็มบริโอของโคในระยะมอรูลา ในกลุ่มที่เสริมด้วย BSA สูงที่สุด รองลงมา คือ ECS, FCS, และกลุ่มควบคุม ตามลำดับ (37.9, 31.5, 24.5 และ 9.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และการเจริญและพัฒนาของเอ็มบริโอของโคในระยะบลาสโตซีส ในกลุ่มที่เสริมด้วย FCS, BSA, ECS, และกลุ่มควบคุม มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญยิ่ง ($P>0.05$) แต่อย่างไรก็ตามการเจริญและพัฒนาของเอ็มบริโอของโคในระยะบลาสโตซีส ในกลุ่มที่เสริมด้วย BSA สูงที่สุด รองลงมา คือ ECS, FCS, และกลุ่มควบคุม ตามลำดับ (8.6, 7.4, 5.7, และ 0.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ)

4.4 ผลของการเสริมชนิดของ serum ในสูตรน้ำยาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอต่อปริมาณ mRNA ของจีน IFN-τ ในโค

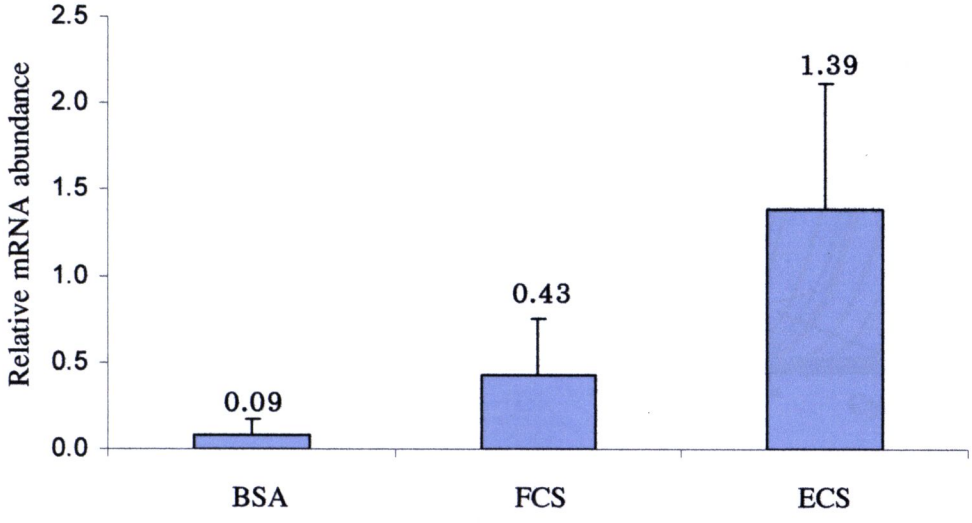
จากการศึกษาผลของการเสริมชนิดของ serum ในสูตรน้ำยาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอต่อการแสดงออกของจีน IFN-τ ในโค จากภาพการส่งสัญญาณของ mRNA เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีการ Quantitative Real-time RT-PCR จำนวนวงรอบในการทำปฏิกิริยา 50 รอบ โดยการนำ cDNA จากเอ็มบริโอในกลุ่มที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยเสริมด้วย serum คือ BSA, FCS, ECS และควบคุม ซึ่งไม่มี cDNA ใด ๆ เป็นส่วนประกอบ (negative control) รวมทั้ง cDNA มาตรฐาน (ความเข้มข้น 56.25, 28.125, 5.625, 2.812, และ 0.281 ng/μl) โดยมีการส่งสัญญาณจากการวิเคราะห์ Quantitative Real-time RT-PCR แสดงในภาพที่ 4-5

เมื่อพิจารณาผลของสัญญาณที่ปรากฏจากเครื่องวิเคราะห์ Chromo4™ Four-Color Real-Time Detector (Bio-Rad, Laboratories Inc. USA) พบว่ามีสัญญาณของตัวอย่างมาตรฐาน (standard) และตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (unknown samples) เกิดขึ้นในขณะที่ไม่มีสัญญาณเกิดขึ้นในตัวอย่าง negative control ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสัญญาณที่เกิดมาจากการทำ quantitative real time RT-RCR ที่เป็นผลมาจาก cDNA กับปฏิกิริยาใน PCR เท่านั้น



ภาพที่ 4-5 การแสดงออกของจีน IFN-τ จากการวิเคราะห์ Quantitative Real-time RT-PCR

การเปรียบเทียบผลของการเสริมชนิดของ serum ต่อปริมาณ mRNA ของ IFN-τ ในสูตรน้ำยาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอโคที่ผลิตแบบนอกตัวสัตว์ พบว่า การแสดงออกของจีน เมื่อทำการเสริม serum ทั้งสามชนิด คือ BSA, FCS, และ ECS มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P>0.05$) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงปริมาณการแสดงออกของจีนพบว่า การเสริม ESC มีปริมาณ mRNA ของ IFN-τ สูงสุด รองลงมาคือ FCS และ BSA ตามลำดับ (1.39, 0.43, และ 0.09 ตามลำดับ) ดังแสดงในภาพที่ 4-6

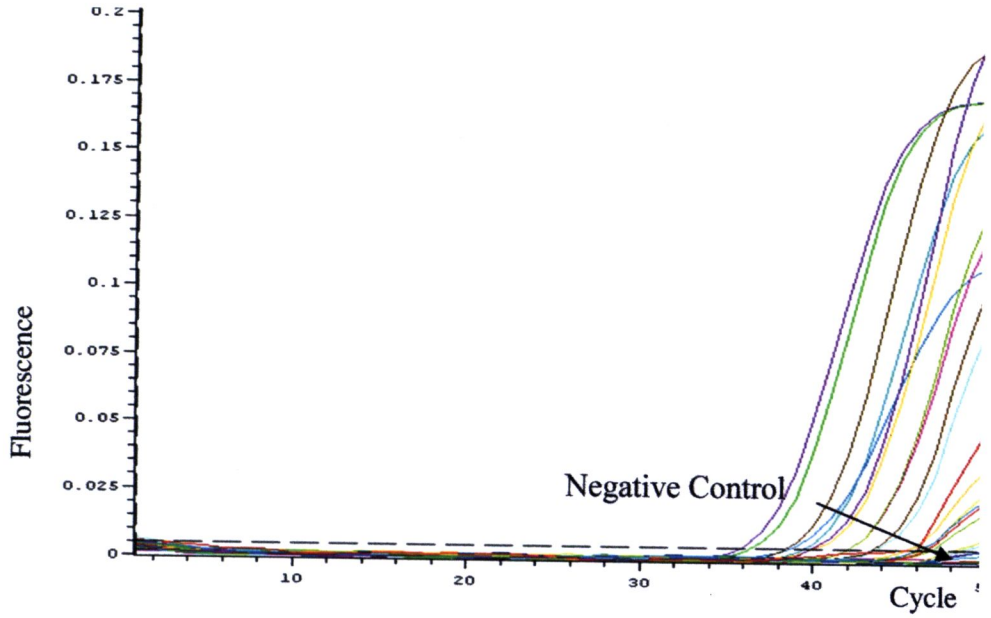


ภาพที่ 4-6 ผลการเสริมชนิดของ serum ในสูตรน้ำยาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอต่อปริมาณ mRNA ของ IFN-τ ในโค

4.5 ผลของการเสริมชนิดของ serum ในสูตรน้ำยาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอต่อปริมาณ mRNA ของจีน BCL-2 ในโค

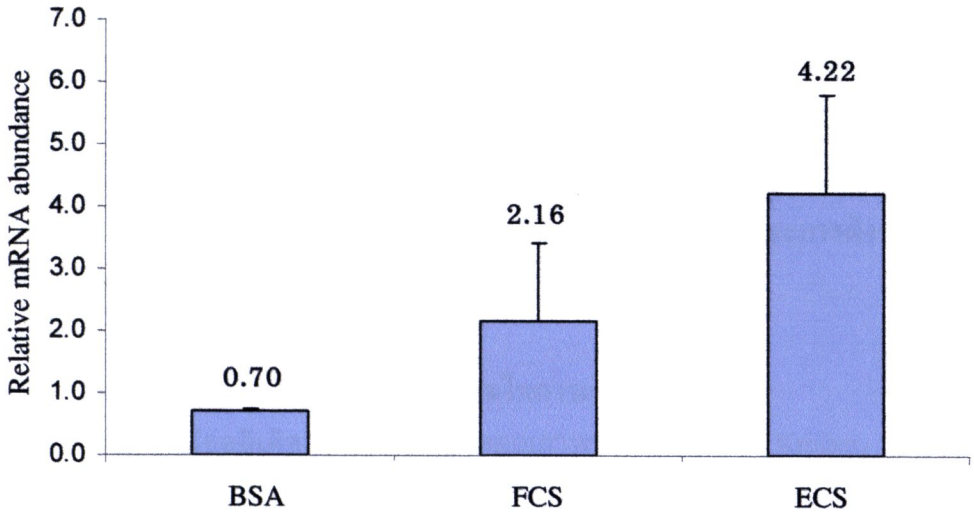
จากการศึกษาการเสริมชนิดของ serum ในสูตรน้ำยาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอต่อการปริมาณ mRNA ของ BCL-2 ในโค จากภาพการส่งสัญญาณของ mRNA เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีการ Quantitative Real-time RT-PCR จำนวนวงรอบในการทำปฏิกิริยา 50 รอบ โดยการนำ cDNA จากเอ็มบริโอในกลุ่มที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยเสริมด้วยชนิดของ serum 3 กลุ่ม คือ BSA, FCS, ECS, และควบคุม ซึ่งไม่มี cDNA ใดๆ เป็นส่วนประกอบ (negative control) รวมทั้ง cDNA มาตรฐาน (ความเข้มข้น 56.25, 28.125, 5.625, 2.812, 0.281, และ 0.056 ng/µl) ดังรายละเอียดในภาคผนวก ง โดยมีการส่งสัญญาณจากการวิเคราะห์ Quantitative Real-time RT-PCR แสดงใน ภาพที่ 4-7

เมื่อพิจารณาผลของสัญญาณที่ปรากฏ จากเครื่องวิเคราะห์ Chromo4™ Four-Color Real-Time Detector (Bio-Rad, Laboratories Inc. USA) พบว่ามีสัญญาณของตัวอย่างมาตรฐาน (standard) และตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ (unknown samples) เกิดขึ้นในขณะที่ไม่มีสัญญาณเกิดขึ้นในตัวอย่าง negative control ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสัญญาณที่เกิดมาจากการทำ quantitative real time RT-RCR ที่เป็นผลมาจาก cDNA กับปฏิกิริยาใน PCR เท่านั้น



ภาพที่ 4-7 การแสดงออกของจีน BCL-2 จากการวิเคราะห์ Quantitative Real-time RT-PCR

การศึกษาการเปรียบเทียบผลของการเสริมชนิดของ serum ต่อปริมาณ mRNA ของ BCL-2 ในสูตรน้ำยาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอที่ผลิตแบบนอกร่างกาย พบว่า ปริมาณ mRNA ของจีน เมื่อทำการเสริม serum ทั้งสามชนิด คือ BSA, FCS, และ ECS มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P>0.05$) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงปริมาณ mRNA ของ พบว่า การเสริม ESC มีการแสดงออกของจีน BCL-2 สูงสุด รองลงมาคือ FCS และ BSA ตามลำดับ (4.22, 2.16, และ 0.70 ตามลำดับ) ดังแสดงในภาพที่ 4-8



ภาพที่ 4-8 ผลการเสริมชนิดของ serum ในสูตรน้ำยาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอต่อการแสดงออกของจีน BCL-2 ในโค