บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาอิทธิพลของชนิด serum ต่อปริมาณ mRNA ของจีน IFN-τ และ BCL-2 ในการผลิตเอ็มบริโอของโค พบว่าปัจจัยด้านคุณภาพของโอโอไซต์มีผลต่อการมีชีวิตรอดของเอ็มบริโอระยะแรก การตั้งท้อง การพัฒนาของเอ็มบริโอ ตลอดจนถึงกระบวนการเจริญเต็มที่พร้อมปฏิสนธิภายนอกร่างกาย และการพัฒนาไปจนถึงเอ็มบริโอระยะบลาสโตซีส และสามารถที่จะเกิดการตั้งท้องได้ ทั้งนี้เป็นผลเนื่องมาจากคุณภาพของโอโอไซต์ที่นำมาเพาะเลี้ยง ในระหว่างกระบวนการเจริญเต็มที่พร้อมปฏิสนธิมีปริมาณ mRNA ของจีน IFN-τ และ BCL-2 ในช่วงการพัฒนาของเอ็มบริโอ โดยสามารถบ่งบอกถึงคุณภาพของเอ็มบริโอ และการฝังตัวของเอ็มบริโอจากเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงนอกร่างกาย

5.1 ผลของขนาดฟอลลิเคิลต่อความสามารถในการเก็บโอโอไซต์

ขนาดของฟอลลิเคิลบนรังไข่มีผลต่อคุณภาพของโอโอไซต์ (Krisher, 2004) พบว่าโอโอไซต์ที่เก็บได้จากฟอลลิเคิลที่อยู่ในระยะก่อนการเกิดช่องว่าง (preantral follicle) สามารถกลับเข้าสู่วัฏจักรของเซลล์และเจริญเต็มที่ได้เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงภายนอกร่างกาย แต่อย่างไรก็ตามอัตราการพัฒนาไปจนถึงเอ็มบริโอระยะบลาสโตซีสกลับลดลง โอโอไซต์ที่นำมาเพาะเลี้ยงให้เจริญเต็มที่จนพร้อมปฏิสนธิได้มาจากฟอลลิเคิลที่อยู่ในระยะกำลังมีการพัฒนา มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-8 มิลลิเมตร ถ้ามีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่านี้จะใช้ระยะเวลาที่เลี้ยงสั้นกว่า เนื่องจากว่ามีการเจริญของโอโอไซต์ไปแล้วบางส่วน (มงคล, 2543) จากการทดสอบผลของขนาดฟอลลิเคิลต่อความสามารถในการเก็บโอโอไซต์ พบว่าฟอลลิเคิลขนาดน้อยกว่า 3 และ 3-8 มิลลิเมตร มีเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการเก็บโอโอไซต์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าขนาดของฟอลลิเคิลมีผลต่อความสามารถในการเก็บโอโอไซต์ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Lonergan (1994) พบว่าขนาดของฟอลลิเคิลต่อความสามารถในการเก็บโอโอไซต์แตกต่างกัน นอกจากนี้ฟอลลิเคิลที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 8 มิลลิเมตร จะทำให้ใช้ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงสั้นกว่า เนื่องจากมีการเจริญของโอโอไซต์ไปแล้วบางส่วน

5.2 ผลของการเสริมชนิดของ serum ในสูตรน้ำยาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ TCM-199 ต่อการพัฒนาพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์โคในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอภายนอกร่างกาย

การเสริม FCS ECS และ BSA ในสูตรน้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ ในการศึกษาครั้งนี้ให้ผลต่อการพัฒนาการที่สมบูรณ์ของโอโอไซต์โคไม่แตกต่างกันในทางสถิติ แสดงให้เห็นว่า FCS และ ECS มีองค์ประกอบของสารต่าง ๆ ที่ส่งผลให้มีการพัฒนาการที่สมบูรณ์ของโอโอไซต์โคได้ไม่แตกต่างกัน ซึ่งผลการศึกษาที่ได้มีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Ocana et al., 1999 พบว่าการเสริม 20% ECS เปรียบเทียบกับ 20% FCS ส่งผลให้การพัฒนาการที่สมบูรณ์ของโอโอไซต์โดยการเสริมชนิดของ serum ในสูตรน้ำยาการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ส่งผลให้การพัฒนาของโอโอไซต์ และคุณภาพของโอโอไซต์ที่เพาะเลี้ยงภายนอกร่างกายสัตว์เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ทำการเสริม serum ซึ่งในน้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์จำเป็นต้องอาศัย serum เป็นแหล่งของโปรตีน นอกจากนี้ยังมีส่วนประกอบของฮอร์โมนที่ช่วยสนับสนุนการเจริญและพัฒนาของโอโอไซต์ โดยพบว่าใน FCS และ BSA มีส่วนประกอบที่สำคัญคือ growth factor เช่น IGF-I and IGF-II เป็นต้น (Gomez and Diez, 2000) ในการส่งผลให้การพัฒนาของเซลล์ของโอโอไซต์สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ทำการเสริม นอกจากนี้ยังพบว่า ECS ฮอร์โมน LH ในปริมาณสูงส่งผลให้การพัฒนาของโอโอไซต์ในระยะพร้อมปฏิสนธิได้

จากการรายงานของ Fukui et al. (1991) องค์ประกอบที่มีอยู่ใน serum นั้นส่งผลโดยทำให้การพัฒนาโอโอไซต์นอกจากสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ระดับของก๊าซคาร์บอนไดออกไซต์ที่อยู่ภายในตู้เพาะเลี้ยงโอโอไซต์แล้ว องค์ประกอบของน้ำยาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์มีความสำคัญอย่างยิ่ง โดย serum เป็นแหล่งของโปรตีนที่สำคัญในน้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ ทำให้การเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ไปจนถึงระยะที่สามารถปฏิสนธิได้ ซึ่งในแต่ละชนิดของ serum มีองค์ประกอบของ growth factor และฮอร์โมน แตกต่างกันไปทำให้โอโอไซต์มีความสมบูรณ์ในการพัฒนาของโอโอไซต์ จากนี้ยังส่งผลในการเพิ่มจำนวนเซลล์ และคุณภาพของโอโอไซต์ ตลอดจนการพัฒนาไปจนถึงเอ็มบริโอระยะบลาสโตซีส อย่างไรก็ตามความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ได้นั้นจะต้องมีองค์ประกอบด้วยปัจจัย คือ สภาพแวดล้อมภายในตู้เพาะเลี้ยง และน้ำยาในการเพาะเลี้ยง การปลอดเชื้อ ตลอดจนความชำนาญของผู้ปฏิบัติงาน

การประเมินความสมบูรณ์ของโอโอไซต์พร้อมปฏิสนธิโดยการประเมินทางสัณฐานวิทยาของโอโอไซต์ที่มีคิวมิวลัสเซลล์ล้อมรอบ (cumulus cell-oocyte complex; COC) ซึ่งเป็นตัวชี้วัดในการประเมินคุณภาพของโอโอไซต์จากการทดลองนี้พบว่าคุณภาพของโอโอไซต์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ที่ใช้โอโอไซต์คุณภาพดี และปานกลาง ส่งผลให้การเจริญและพัฒนาไปจนถึงระยะที่โอโอไซต์พร้อมปฏิสนธิได้สูงกว่าโอโอไซต์คุณภาพไม่ได้ ทำให้ผลของการคัดเลือกคุณภาพของโอโอไซต์ในการเพาะเลี้ยงทำให้ปริการพัฒนาพร้อมปฏิสนธิสูงขึ้นตามไปด้วย (Gordon, 1994) นอกจากนี้ยังส่งผลไปถึงการตายของโอโอไซต์ลดลง (Li et al., 2009)

5.3 ผลของการเสริมชนิดของ serum ในสูตรน้ำยาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอต่อการปฏิสนธิและการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอภายนอกร่างกาย

จากการศึกษาของ Leibfried-Rutledge et al. (1986) ทำการเสริม 10% FCS ในสูตรน้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ TCM-199 พบว่าให้เปอร์เซ็นต์การพัฒนาการที่สมบูรณ์ของโอโอไซต์โคเท่ากับ 73% นอกจากนี้การเสริม FCS และ ECS ยังส่งผลให้การพัฒนาของเอ็มบริโอถึงระยะบลาสโตซีส ที่ดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริม (Gandhi et al., 2000) ในขณะที่ Wang et al. (1997) ทำการเสริม FCS 5% ในสูตรน้ำยา TCM 199 ให้การพัฒนาของเอ็มบริโอในระยะบลาสโตซีส เท่ากับ 52% สอดคล้องกับการศึกษานี้ผลของชนิดของ serum ต่อการแบ่งตัวและพัฒนาการของเอ็มบริโอของโครระยะแรกไปจนถึงระยะพร้อมในการย้ายฝากเอ็มบริโอและสามารถฝังตัวในมดลูกของแม่โค (cleavage rate of embryos) พบว่าการเจริญและพัฒนาของเอ็มบริโอโคตั้งแต่ระยะการแบ่งเซลล์ 4-8 เซลล์ไปจนถึงระยะมอรูลา และระยะบลาสโตซีสสูงกว่ากลุ่มควบคุมโดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

การเสริมสารต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญและพัฒนาของโอโอไซต์ในสูตรน้ำยาเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ โดยใน serum เป็นแหล่งของโปรตีนที่สำคัญในน้ำยาเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ นอกจากนี้ยังประกอบด้วยสารที่ช่วยในการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอ หลายชนิดได้แก่ กรดอะมิโน ฮอร์โมน ไซโตไคน์ (cytokine) วิตามิน และสารกระตุ้นการเจริญและพัฒนาของเซลล์ (growth factor) สารที่พบในซีรัมที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง ได้แก่ สารฟิทูอิน (fetuin) สารชนิดนี้สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) ที่อยู่ในคอร์ติคอร์แกรนูล ทำให้ไม่สามารถออกมาสลายชั้นโซนา เพลลูซิดา ให้แข็งตัวได้ทำให้อัตราการพัฒนาในระยะมอรูลาและบลาสโตซีสของเอ็มบริโอด้วย (Wang et al., 1997) โดย serum แต่ละชนิดมีส่วนประกอบของฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตไม่เหมือนกัน ซึ่ง serum ดังกล่าวเมื่อทำการเสริมในน้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ และเอ็มบริโอ มีผลต่อการเจริญพร้อมปฏิสนธิ การเพิ่มจำนวนเซลล์ การเจริญเติบโตไปจนระยะบลาสโตซีส (Rizos et al., 2003)

5.4 ผลของการเสริมชนิดของ serum ในสูตรน้ำยาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอต่อปริมาณ mRNA ของ IFN-τ ในโค

เอ็มบริโอโคในระยะบลาสโตซีส มีการสร้าง interferon tau (INF-τ) จาก trophoblast และจะส่งสัญญาณไปกระตุ้นผนังมดลูกของแม่ชั้น endometrium ซึ่งในชั้นนี้มีตัวรับสัญญาณอยู่ เช่น Chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL10) Galectin-15 (LGALS15) เป็นต้น (Allison et al., 2006) ในการทดลองครั้งนี้ พบว่าการเสริมชนิดของ serum ในสูตรน้ำยาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอต่อปริมาณ mRNA ของจีน IFN-τ ในโคพบว่า ปริมาณ mRNA ของจีน IFN-τ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงปริมาณการแสดงออกของจีน พบว่า การเสริม ESC มีแนวโน้มปริมาณ mRNA ของจีน IFN-τ ที่สูง รองลงมาคือ FCS และ

BSA ตามลำดับ (1.39, 0.43 และ 0.09 ตามลำดับ) สอดคล้องกับรายงานของ Rizos et al. (2003) ได้ศึกษาการเสริมชนิดของ serum สองชนิด คือ FCS และ BSA ในน้ำยาเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอพบว่า ปริมาณ mRNA ของจีน IFN-τ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณ mRNA ของจีน IFN-τ ในกลุ่มของเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอในการเสริมชนิดของ serum มีปริมาณ mRNA ของจีน IFN-τ ที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้เสริม serum

จากการรายงานของ Takahashi et al. (2003) ปริมาณ mRNA ของจีน IFN-τ ด้วยวิธีการ reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยเปรียบเทียบการเสริมชนิดของ serum 2 ชนิด คือ BSA และ FCS ในการเพาะเลี้ยงโดยใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ (TCM-199) พบว่า ส่งผลต่อการพัฒนาของเอ็มบริโอระยะมอรูลาตอนท้าย และเอ็มบริโอระยะบลาสโตซีสในกลุ่มที่เสริมด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ BSA และ FCS มีปริมาณ mRNA ของจีน IFN-τ (31.1 และ 28.7) โดยเป็นปัจจัยสำคัญในการยอมรับการฝังตัวของเอ็มบริโอ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ (Allison et al., 2005) พบว่า IFN-τ มีผลไปยับยั้งการสังเคราะห์ $PGF_{2\alpha}$ และเป็นตัวสนับสนุนการคงอยู่ของ CL ซึ่ง CL จะสร้าง P4 เพื่อรักษาสภาพภายในมดลูกให้เหมาะสมต่อการฝังตัวของเอ็มบริโอ โดยในการเพาะเลี้ยงตัวออกภายนอกร่างกายสัตว์ปัจจัยที่ส่งผลให้ปริมาณ mRNA ของจีน IFN-τ นอกจากนี้ยังพบว่ามีบทบาทในการพัฒนาของเอ็มบริโอ โดยในเอ็มบริโอระยะบลาสโตซีสที่มีคุณภาพดี จะพบว่ามีปริมาณ mRNA ของจีน IFN-τ ที่สูงควบคู่กันไปด้วย (Takahashi et al., 2003) ซึ่งแย้งกับรายงานของ Rizos et al. (2003) ได้ทำการศึกษาปริมาณ mRNA ของจีน IFN-τ ในเอ็มบริโอระยะบลาสโตซีส โดยทำการเสริมชนิดของ serum คือ FCS และ ECS พบว่าปริมาณ mRNA ของจีน IFN-τ ไม่มีความแตกต่างกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มของโอโอไซต์ที่มีคุณภาพดี กับโอโอไซต์คุณภาพปานกลางปริมาณ mRNA ของจีน IFN-τ ในกลุ่ม FCS และ ECS สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ทำการเสริม serum แสดงให้เห็นว่าอิทธิพลของคุณภาพโอโอไซต์มีผลต่อปริมาณ mRNA ของจีน IFN-τ ($P<0.01$)

นอกจากนี้ Saadeldin et al. (2011) รายงานว่าปริมาณ mRNA ของจีน IFN-τ ส่งผลไปยังคุณภาพของเอ็มบริโอที่ผลผลิตภายนอกร่างกายสัตว์โดยสามารถประเมินได้ว่าเอ็มบริโอที่ผลิตภายนอกร่างกายมีปริมาณ mRNA ของจีน IFN-τ ที่สูงตามไปด้วย แต่จะมีปริมาณสูงเมื่อเอ็มบริโออยู่ในระยะที่พัฒนาเพิ่มเมื่อเอ็มบริโอพัฒนาไปจนถึงระยะที่หลุดออกมาจากชั้นโซนาเพลลูซิด้า จากการศึกษาครั้งนี้ใช้เอ็มบริโอที่เริ่มพัฒนาเป็นเอ็มบริโอระยะบลาสโตซีส (วันที่ 7) ซึ่งปริมาณ mRNA ของจีน IFN-τ ในเอ็มบริโอระยะดังกล่าวยังคงมีปริมาณค่อนข้างน้อย

5.5 ผลของการเสริมชนิดของ serum ในสูตรน้ำยาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอต่อปริมาณ mRNA ของ BCL-2 ในโค

จากการทดลองของ Yang et al. (2002) พบว่ามีปริมาณของ BCL-2 โปรตีนสูงในกลุ่มโอโอไซต์และเอ็มบริโอที่มีคุณภาพดีและมีการเกิดการตายของเอ็มบริโอในปริมาณที่น้อย ในทางตรงกันข้ามพบว่าปริมาณของจีน BAX โปรตีนมีปริมาณสูงในกลุ่มโอโอไซต์และเอ็มบริโอที่มีคุณภาพไม่ดี (Mann and Lamming, 2001) จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าปริมาณ mRNA ของจีน BCL-2 ไม่มีความแตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงปริมาณการแสดงออกของจีน พบว่า การเสริม ESC มีแนวโน้มปริมาณ mRNA ของจีน BCL-2 ที่สูง รองลงมาคือ FCS และ BSA

คุณภาพของโอโอไซต์ในการเพาะเลี้ยงภายนอกร่างกายสัตว์ในการทดลองครั้งนี้ใช้โอโอไซต์คุณภาพดี และปานกลาง ซึ่งมีชั้นของ cumulus cell หุ้มตั้งแต่ 2 ชั้นขึ้นไป ส่งผลให้การเจริญและพัฒนาไปจนถึงระยะที่โอโอไซต์พร้อมปฏิสนธิได้สูงกว่าโอโอไซต์คุณภาพไม่ได้ ทำให้ผลของการคัดเลือกคุณภาพของโอโอไซต์ในการเพาะเลี้ยงทำให้ปริมาณการพัฒนาพร้อมปฏิสนธิสูงขึ้นตามไปด้วย นอกจากนี้ยังส่งผลไปถึงการตายของโอโอไซต์ลดลง สอดคล้องกับการรายงานของ Vandaele et al. (2008) พบว่าปริมาณ mRNA ของจีน BCL-2 และ BAX มีความสัมพันธ์กับคุณภาพของโอโอไซต์และเอ็มบริโอ ตลอดจนการพัฒนาของเอ็มบริโอระยะบลาสโตซีส โดยกลุ่มของเอ็มบริโอที่มีปริมาณ mRNA ของจีน BCL-2 ที่สูงในเอ็มบริโอที่มีคุณภาพดี ในทางตรงกันข้ามกันปริมาณ mRNA ของจีน BAX สูงในเอ็มบริโอที่มีคุณภาพไม่ดี การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอภายนอกร่างกายสัตว์ นอกจากคุณภาพของโอโอไซต์ที่ส่งผลต่อปริมาณ mRNA ของจีน BCL-2 ยังพบว่าสูตรน้ำยาเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอที่มีองค์ประกอบของ serum ส่งผลให้ปริมาณ mRNA ของจีน BCL-2 มากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ทำการเสริม serum แต่ในระหว่างที่ทำการเสริม serum แต่ละชนิดไม่แตกต่างกัน

จากการศึกษาของ Brad et al. (2007) ศึกษาปริมาณ mRNA ของจีน BCL-2 ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ในเอ็มบริโอระยะการแบ่งตัว 2 เซลล์ พบว่าส่งผลในการยับยั้งการเกิดอะพอพโตซีส ได้ การตายแบบอะพอพโตซีสเกิดขึ้นที่โอโอไซต์ ซึ่งจะพบว่ามีปริมาณ mRNA ของจีน BCL-2 มากที่สุด โดยในระหว่างเอ็มบริโอที่มีการพัฒนา ปริมาณการแสดงออกในโอโอไซต์ อย่างไรก็ตามยังพบในโอโอไซต์ที่มีการเจริญและพัฒนาอย่างมากเกินในระยะการแบ่งเซลล์แบบไมโทสิส สอดคล้องกับ Matikainen et al. (2001) ได้ทำการศึกษาปริมาณ mRNA ของจีน BCL-2 พบว่าคุณภาพของโอโอไซต์ส่งผลต่อปริมาณ mRNA ของจีน BCL-2 นอกจากนี้ยังสามารถรายงานทำให้ทราบถึงการอยู่รอดของเอ็มบริโอที่มีการพัฒนาโดยมีความผันแปรไปในแต่ละสปีชีส์ของสัตว์ แต่ยังไม่ได้มีรายงานในการตายแบบอะพอพโตซีสในสัตว์ที่เจริญเติบโตเต็มวัย โดยในการทำการทดลองในสภาวะ in vitro และ in vivo สามารถเห็นการแสดงออกของปริมาณ DNA ที่ได้จากการเกิดความเสียหายจนก่อให้เกิดการตายของโอโอไซต์