

ผลของความร้อนต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ และเซลล์ไข่สุกร Effect of Heat Shock on Viability of Oviductal Epithelial Cell and Porcine Oocytes

สุพัตน์ เชื้อนวัง และพยุงค์ศักดิ์ อินตะวิชา*

Supat Kuanwang and Payungsuk Intawicha*

สาขาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา พะเยา 56000

Division of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Phayao University, Phayao, Thailand 56000

*Corresponding author: payungsuk@up.ac.th

Received: November 02, 2018

Revised: January 30, 2019

Accepted: February 08, 2019

Abstract

The experiments aimed to study viability rate of oviduct epithelial cell (OEC) and oocytes after exposed heat shock (EHS) *in vitro* culture. **Study 1**, to study on the viability rate of OEC after EHS different temperatures. Oviducts were collected from ovaries 18 gilts slaughterhouse. Completely randomized design was used. There were 6 groups (group 1 EHS 38.5°C 12 h, group 2 EHS 38.5°C 24 h, group 3 EHS 40°C 12 h, group 4 EHS 40°C 24 h, group 5 EHS 42°C 12 h and group 6 EHS 42°C 24 h). The results showed that group 1 ($99.09 \pm 0.68\%$) had viability rate than group 4 ($97.45 \pm 1.43\%$), group 5 ($95.90 \pm 2.29\%$) and group 6 ($95.88 \pm 1.89\%$) with statistical significance ($P < 0.01$) but not different from with group 2 ($98.95 \pm 0.56\%$), group 3 ($97.59 \pm 1.31\%$) ($P < 0.01$). **Study 2**, study on cumulus-oocyte complexes (COCs) co-culture OEC, EHS with the different temperature was determined *in vitro* culture system. Ovaries were collected from 300 gilts. The results showed that after culture for 44 h in group 1 ($6.23 \pm 0.90 \mu\text{m}$) was expanded of cumulus cells higher than group 3 ($5.86 \pm 0.88 \mu\text{m}$), group 4 ($5.85 \pm 0.90 \mu\text{m}$), group 5 ($5.86 \pm 0.95 \mu\text{m}$) and group 6 ($5.70 \pm 1.09 \mu\text{m}$) with statistical significance ($P < 0.01$) but not significance with group 2 ($6.21 \pm 0.93 \mu\text{m}$) ($P > 0.01$). Development rate of oocytes to metaphase II stage in group 1 (67.21%) was higher than group 2 (66.13%), group 3 (62.40%), group 4 (61.81%), group 5 (62.10%) and group 6 (61.82%). It was concluded that high temperature decreases viability rate of OEC, expanded of cumulus cells COCs and development rate of oocytes to metaphase II stage.

Keywords: oviduct epithelial cell, oocyte, oviduct, porcine

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ และเซลล์ไข่ที่ได้รับอุณหภูมิร้อน (Exposed Heat Shock; EHS) ในหลอดทดลอง

การศึกษาที่ 1 ศึกษาอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ โดยใช้ท่อนำไข่ที่ถูกเก็บจากสุกรสาวทั้งหมด 18 ตัว แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 EHS 38.5°ซ. 12 ซม., กลุ่มที่ 2 EHS 38.5°ซ. 24 ซม., กลุ่มที่ 3 EHS 40°ซ. 12 ซม., กลุ่มที่ 4 EHS 40°ซ. 24 ซม., กลุ่มที่ 5 EHS 42°ซ. 12 ซม. และกลุ่มที่ 6 EHS 42°ซ. 24 ซม. ผลพบว่า กลุ่มที่ 1 ($99.09 \pm 0.68\%$) มีอัตราการมีชีวิตรอดสูงกว่า กลุ่มที่ 4 ($97.45 \pm 1.43\%$) กลุ่มที่ 5 ($95.90 \pm 2.29\%$) และกลุ่มที่ 6 ($95.880 \pm 1.89\%$) ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ 2 ($98.95 \pm 0.56\%$) และกลุ่มที่ 3 ($97.59 \pm 1.31\%$) ($P > 0.01$)

การศึกษาที่ 2 ศึกษาการเพาะเลี้ยง COCs ร่วมกับเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่ถูกฮีทช็อก ด้วยอุณหภูมิที่แตกต่างกัน รังไข่ถูกเก็บจากสุกรสาวทั้งหมด 300 ตัว ผลการทดลอง พบว่า มีการขยายของคิวมูลัส (Cumulus) เมื่อเลี้ยงไปถึงชั่วโมงที่ 44 ในกลุ่มที่ 1 ($6.237 \pm 0.90 \mu\text{m}$) มีค่ามากกว่ากลุ่มที่ 3 ($5.86 \pm 0.88 \mu\text{m}$) กลุ่มที่ 4 ($5.853 \pm 0.90 \mu\text{m}$) กลุ่มที่ 5 ($5.862 \pm 0.95 \mu\text{m}$) และกลุ่มที่ 6 ($5.707 \pm 1.09 \mu\text{m}$) ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ 2 ($6.210 \pm 0.93 \mu\text{m}$) ($P > 0.01$) และผลของอัตราการพัฒนาของเซลล์ไข่ไปจนถึงระยะ Metaphase II ในกลุ่มที่ 1 (67.21%) มีค่ามากกว่ากลุ่มที่ 2 (66.13%) กลุ่มที่ 3 (62.40%) กลุ่มที่ 4 (61.81%) กลุ่มที่ 5 (62.10%) และกลุ่มที่ 6 (61.82%) ดังนั้นสรุปได้ว่า อุณหภูมิสูงส่งผลต่ออัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ และการขยายของเซลล์คิวมูลัส และการพัฒนาของเซลล์ไข่

คำสำคัญ: เยื่อบุผิวท่อนำไข่ เซลล์ไข่ ท่อนำไข่ สุกร

คำนำ

อุณหภูมิมีส่วนสำคัญต่อการจัดการภายในฟาร์ม หากจัดการไม่ดีจะส่งผลให้สุกรเกิดความเครียดจากความร้อน (Wegner *et al.*, 2016) ทำให้สุกรกินอาหารได้น้อย น้ำหนักตัวลดลง แม่สุกรให้น้ำนมลดลง จำนวนลูกต่อครอก และน้ำหนักแรกคลอดต่ำ นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ เช่น ทำให้แม่สุกรมีความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำ อัตราการมีชีวิตรอดของลูกสุกรลดลง (Prunier *et al.*, 1994) มีรายงานเกี่ยวกับเทคโนโลยีการเจริญของไข่ในหลอดทดลอง *In Vitro* Maturation (IVM) และการปฏิสนธิในหลอดทดลอง *In Vitro* Fertilization (IVF) สามารถศึกษาผลกระทบจากความร้อนต่อการเจริญของไข่และตัวอ่อนได้ โดยนำเยื่อบุผิวท่อนำไข่มาเลี้ยงร่วมกับเซลล์ไข่และตัวอ่อน Kidson *et al.* (2003) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่มีหน้าที่สำคัญในระบบสืบพันธุ์เพศเมีย เช่น ช่วยในการขนส่งเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมีย (Fazeli *et al.*, 1999) หลังของเหลวที่ช่วยในการปฏิสนธิระหว่างอสุจิกับเซลล์ไข่ (Romar *et al.*, 2001) ช่วยขนส่งตัวอ่อนที่ปฏิสนธิแล้วไปฝังตัวยังมดลูก (Georgiou *et al.*, 2005) และผลิตโปรตีนที่สำคัญต่อการพัฒนาของตัวอ่อนในระยะแรก เช่น Insulin-like Growth Factor (IGF), Epidermal Growth Factor (EGF), Transforming Growth Factor (TGF) และ Fibroblast Growth Factors (FGFs) (Chen *et al.*, 2007) จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Kidson *et al.* (2003) ที่ศึกษาการเพาะเลี้ยงเยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่เลี้ยงร่วมกับไข่ในหลอดทดลอง เปรียบเทียบกับเซลล์ไข่ที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีการเสริมเยื่อบุผิวท่อนำไข่ พบว่าขนาดของเซลล์ไข่ที่เลี้ยงร่วมกับเยื่อบุผิวท่อนำไข่ ($150.43 \pm 0.64 \mu\text{m}$) มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ไข่ที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีการเสริมเยื่อบุผิวท่อนำไข่ ($149.60 \pm 0.30 \mu\text{m}$) และพบว่าความหนาของ Perivitelline space ของเซลล์ไข่ที่เลี้ยงร่วมกับเยื่อบุผิวท่อนำไข่ ($4.40 \pm 0.30 \mu\text{m}$) มากกว่าเซลล์ไข่ที่ไม่เสริมเยื่อบุผิวท่อนำไข่ ($4.25 \pm 0.21 \mu\text{m}$) นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอ่อนที่เลี้ยงร่วมกับเยื่อบุผิว

ท่อนำไข่ สามารถพัฒนาไปถึงระยะ Blastocyst ได้สูงถึง 47% ซึ่งมากกว่าตัวอ่อนที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีการเสริมเยื่อหุ้มท่อนำไข่ (40%) อย่างไรก็ตามยังมีข้อมูลอยู่จำกัดเกี่ยวกับผลของความร้อนต่อ COCs และสามารถพัฒนาของไข่ จึงเป็นที่มาของการศึกษานี้เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้เป็นแนวทางในการเพิ่มอัตราการพัฒนาของเซลล์ไข่ในระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ในหลอดทดลองต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การวางแผนการทดลอง

การศึกษานี้ใช้ตัวอย่าง ท่อนำไข่ และรังไข่ของสุกรสาวสายพันธุ์ทางการค้า (แลนด์เรซ × ลาร์จไวท์ × ดุริโอก) จำนวนทั้งหมด 318 ตัว โดยจัดกลุ่มทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) แบ่งออกเป็น 2 การทดลองดังนี้ การทดลองที่ 1 ใช้สุกรสาวทั้งหมด 18 ตัว ซึ่งแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว ดังนี้ กลุ่มที่ 1 EHS 38.5°C. 12 ชม. กลุ่มที่ 2 EHS 38.5°C. 24 ชม. กลุ่มที่ 3 EHS 40°C. 12 ชม. กลุ่มที่ 4 EHS 40°C. 24 ชม. กลุ่มที่ 5 EHS 42°C. 12 ชม. และกลุ่มที่ 6 EHS 42°C. 24 ชม. และการทดลองที่ 2 ใช้สุกรสาวทั้งหมด 300 ตัว ซึ่งแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว ดังนี้ กลุ่มที่ 1 OEC+EHS 38.5°C. 12 ชม. กลุ่มที่ 2 OEC+EHS 38.5°C. 24 ชม. กลุ่มที่ 3 OEC+EHS 40°C. 12 ชม. กลุ่มที่ 4 OEC+EHS 40°C. 24 ชม. กลุ่มที่ 5 OEC+EHS 42°C. 12 ชม. และกลุ่มที่ 6 OEC+EHS 42°C. 24 ชม.

จรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง

การใช้สัตว์ทดลองในงานวิจัยนี้ปฏิบัติตามข้อกำหนดในจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทดลองทางวิทยาศาสตร์ สภาวิจัยแห่งชาติ และภายใต้คำแนะนำของคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลอง ศูนย์สัตว์ทดลองมหาวิทยาลัยพะเยา เลขที่ UP-AE60-01-01-002

การเก็บตัวอย่างและการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ทำการศึกษา

เก็บตัวอย่างท่อนำไข่และรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์ โดยสวมถุงมือที่สะอาด และใช้ใบมีดผ่าตัดทำการตัดรังไข่และท่อนำไข่จากซากของสุกร จากนั้นนำมาล้างด้วย Sodium chloride ความเข้มข้น 0.9% และนำไปแช่ในภาชนะที่ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 35-38°C. และนำกลับไปยังห้องปฏิบัติการภายใน 1 ชั่วโมง ตามวิธีของ Kidson *et al.* (2003)

การเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อหุ้มท่อนำไข่

นำรังไข่และท่อนำไข่มาล้างด้วย Sodium chloride ความเข้มข้น 0.9% และใช้ใบมีดผ่าตัด ตัดแยกท่อนำไข่ในส่วนแอมพูลลา (Ampullar) และอิสมัส (Isthmus) ออกจากส่วนของกรวยปากแตร (Infundibulum) และนำมาล้างด้วย Phosphate Buffer Saline (PBS) 2 ครั้ง ใช้ใบมีดผ่าตัดผ่าท่อนำไข่ตามแนวยาวและขูดเยื่อหุ้มท่อนำไข่โดยใช้กระจกสไลด์ และทำการล้างเยื่อหุ้มท่อนำไข่ด้วย PBS 2 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 300 × g เป็นเวลา 3 นาที และทำการดูดของเหลวที่อยู่เหนือตะกอนทิ้ง ทำซ้ำกันสองครั้ง และย้ายมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ M199 จากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ CO₂ incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำเยื่อหุ้มท่อนำไข่ส่วนหนึ่งมาแบ่งตามกลุ่มทดลองที่อุณหภูมิ 38.5, 40 และ 42°C. เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำมาตรวจสอบอัตราการมีชีวิตรอดด้วยอุปกรณ์ Hematocytometer ตามวิธีของ Kidson *et al.* (2003)

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อหุ้มท่อนำไข่ในหลอดทดลอง

นำรังไข่มาล้างด้วย PBS 2 ครั้ง จากนั้นนำเข็มฉีดยาเบอร์ 18 ต่อกับกระบอกฉีดยาขนาด 15 ซีซี เพื่อทำการเจาะดูดเอา Cumulus-oocyte Complexes (COCs) ในรังไข่แล้วทำการคัดเลือกในงานเพาะเลี้ยงภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ที่กำลังขยาย 10X โดยทำการตัดไข่ที่มีชั้นเซลล์คิวมูลัส (Cumulus cell) ที่ล้อมรอบเซลล์ไข่ตั้งแต่ 3 ชั้นขึ้นไป และนำมาเลี้ยงร่วมกับเยื่อบุผิวท่อนำไข่ ตามวิธีของ Chen *et al.* (2007) แล้วนำไปศึกษาผลกระทบจากอุณหภูมิที่ 38.5, 40 และ 42°C. เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการบันทึกอัตราการพัฒนาของเซลล์ไข่จนถึงระยะ Metaphase II

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลพื้นฐานถูกวิเคราะห์โดยโปรแกรม R เวอร์ชัน 3.2.5 โดยอัตราการมีชีวิตรอดของเยื่อบุผิวท่อนำไข่ และอัตราการพัฒนาของเซลล์ไข่ ถูกเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ Least Significant Difference (LSD) โดยกำหนดความเชื่อมั่นที่ 99% ($P\text{-value} < 0.01$)

ผลการวิจัย

การศึกษาที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเยื่อบุผิวท่อนำไข่ในสุกรสาว

สัณฐานวิทยาของเยื่อบุผิวท่อนำไข่เมื่อนำมาเลี้ยงในหลอดทดลองในชั่วโมงที่ 0 พบว่าเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่มีลักษณะเป็นแผ่นมีรูปร่างหลายลักษณะไม่แน่นอน (Figure 1A) เมื่อทำการเลี้ยงถึงชั่วโมงที่ 12 พบว่ากลุ่มเซลล์ที่อยู่รวมกันเป็นแผ่นเริ่มเปลี่ยนรูปเป็นแผ่นวงกลม (Figure 1B) ชั่วโมงที่ 18 เริ่มสังเกตเห็นแผ่นวงกลมมีเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่มีขนเส้นเล็ก (Cilia) อยู่รอบๆ และเคลื่อนที่ได้ (Figure 1C) ชั่วโมง 24 สามารถแยกเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ได้ออกจากเซลล์ชนิดอื่นได้จากการเคลื่อนที่อย่างชัดเจน (Figure 1D)

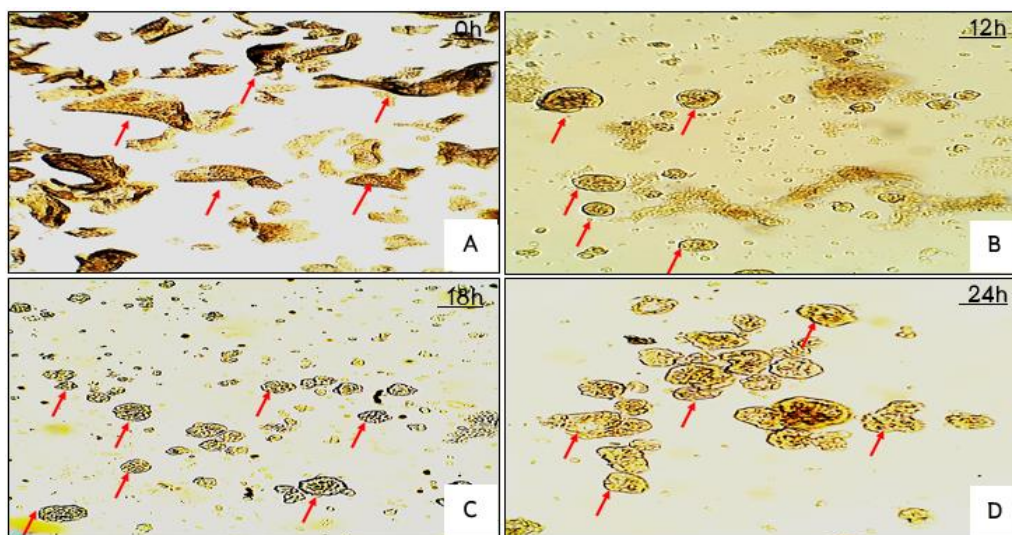


Figure 1 Morphology of oviduct epithelial cell after culture for 0, 12, 18 and 24 h (A) uncertainty shape of cultured oviduct epithelial cell at 0 h (B) round shape after culture of 12 h (C) cilia on epithelial cell at 18 h (D) movement of oviduct epithelial cell in culture medium at 24 h

การตรวจสอบอัตราการมีชีวิตของเซลล์เยื่อบุผิว ท่อนำไข่

ทำได้โดยนำเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่มาเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่ปรับอุณหภูมิระดับ 38.5, 40, และ 42°C. เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วตรวจสอบอัตรา

การมีชีวิตรอดด้วยน้ำย้อมสี Trypan blue พบว่าเซลล์ที่มีชีวิตไม่มีการย้อมติดสี (Figure 2A) และเซลล์ที่ตายมีการย้อมติดน้ำเงิน Trypan blue ดังแสดงใน (Figure 2B)

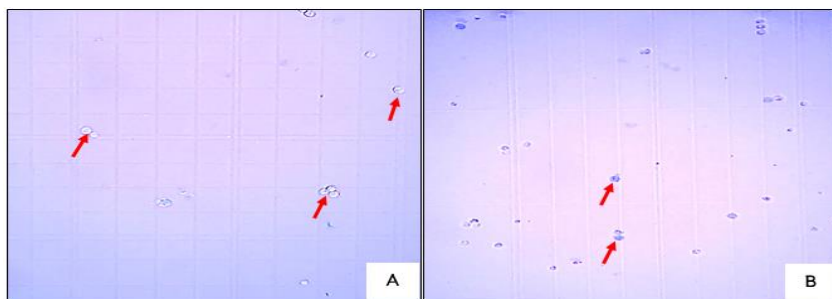


Figure 2 Morphology of living cells (A) and dead cells (B) after stained with Trypan blue

เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 38.5, 40 และ 42°C. เป็นระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่าในกลุ่มที่ 1 มีอัตราการมีชีวิตรอด (99.09±0.68%) สูงกว่ากลุ่มที่ 4 (97.45±1.43%) กลุ่มที่ 5 (95.90±2.29%) และกลุ่มที่ 6 (95.88±1.89%) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ 2 (98.95±0.56%)

($P>0.01$) กลุ่มที่ 3 (97.59±1.31%) ($P>0.01$) นอกจากนี้ กลุ่มที่ 2 (98.95±0.56%) และกลุ่มที่ 3 (97.59±1.31%) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ 4 (97.45±1.43%) กลุ่มที่ 5 (95.90±2.29%) และกลุ่มที่ 6 (95.88±1.89%) ($P<0.01$) และกลุ่มที่ 5 (95.90±2.29%) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ 6 (95.88±1.89%) ($P>0.01$) ดังแสดงใน Table 1

Table 1 The viability rate of oviduct epithelial cell after exposed to different temperature

Treatment	Number of oviduct epithelial cell (n)	Viability rate (%) (mean±SD)	Mortality rate (%) (mean±SD)
OEC+EHS 38.5°C at 12 h	1,660	99.09±0.68 ^c (1,645/1,660)	0.88±0.66 ^a (15/1,660)
OEC+EHS 38.5°C at 24 h	1,659	98.95±0.56 ^{bc} (1,642/1,659)	1.06±0.55 ^{ab} (17/1,659)
OEC+EHS 40°C at 12 h	1,616	97.59±1.31 ^{bc} (1,576/1,616)	2.44±1.33 ^{bc} (40/1,616)
OEC+EHS 40°C at 24 h	1,663	97.45±1.43 ^b (1,621/1,663)	2.57±1.47 ^{bcd} (42/1,663)
OEC+EHS 42°C at 12 h	1,627	95.90±2.29 ^a (1,562/1,627)	3.77±2.41 ^{cd} (65/1,627)
OEC+EHS 42 °C at 24 h	1646	95.88±1.89 ^a (1571/1,646)	4.14±1.88 ^d (75/1,646)

Different superscripts (^{a, b, c}) with in same column are significantly different ($P<0.01$).

OEC: Oviduct epithelial cell, EHS: Exposed heat shock, SD: Standard deviation

การศึกษาที่ 2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อหุ้มตัวอ่อนไข่ที่ถูกฮีทช็อคด้วยอุณหภูมิที่แตกต่างกันในสุกรสาว

รังไข่ของสุกรสาวถูกเก็บจากโรงเชือดทั้งหมด 300 ตัว จากนั้นคัดทิ้งเซลล์ไข่ในจานเพาะเลี้ยงที่มี Cumulus cell หุ้มน้อยกว่า 3 ชั้น (Figure 3A) แล้วทำการคัดเลือกเอาแต่เซลล์ไข่ที่มี Cumulus cell ตั้งแต่ 3 ชั้นขึ้นไป (Figure 3B) สำหรับใช้ในการทดลอง จากนั้นนำเซลล์ไข่มา

เลี้ยงร่วมกับเยื่อหุ้มตัวอ่อนไข่และนำไปฮีทช็อคในตู้เพาะเลี้ยงที่มีอุณหภูมิต่างกัน หลังจากเพาะเลี้ยงผ่านไป 22 ชั่วโมง ทำการประเมินคุณภาพของเซลล์ไข่เลี้ยงที่ห่อหุ้มรอบเซลล์ไข่ โดยดูจากการเกิดการแผ่ขยายออกเป็นวงกว้างของ Cumulus cell (Figure 3C) จากนั้นเลี้ยงจนถึง 44 ชั่วโมง และนำเซลล์ไข่ไปกำจัดเซลล์ไข่เลี้ยงออกด้วยเอนไซม์ Hyaluronidase เพื่อดูการพัฒนาของเซลล์ไข่ พบว่าเซลล์ไข่เกิดการพัฒนายังถึงระยะ Metaphase II (Figure 3D)

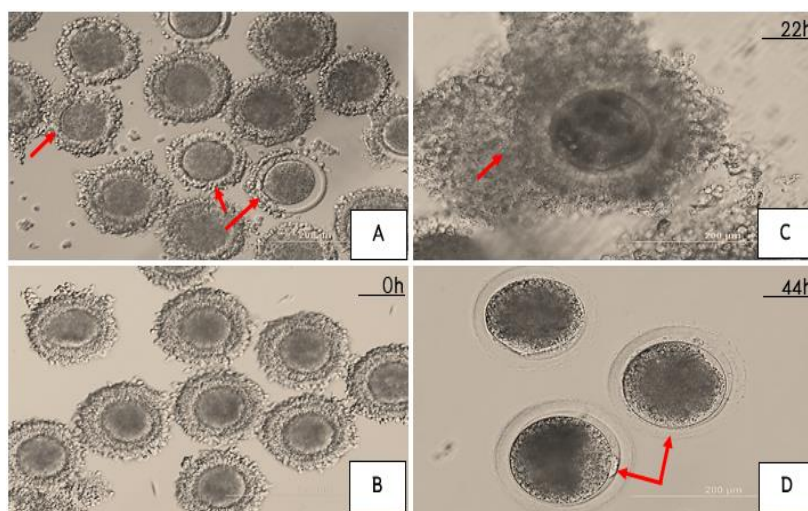


Figure 3 Morphology of oocytes during in vitro culture; (A) the remove the oocyst with layer of cumulus with less than 3 layers (Pointing red arrows), (B) selected oocytes with were used for culture its appearance of cumulus layers of oocytes covering 3 or more layers, (C) characteristics of the cumulus layer encapsulated around the oocytes expansion (Pointing red arrows). and (D) development of oocytes in Metaphase II stage

การขยายตัวของคิวมูลัสเซลล์ที่ล้อมรอบเซลล์ไข่หลังจากเลี้ยงด้วยอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

ผลของความร้อนต่อการขยายตัวของคิวมูลัสเซลล์ที่รอบเซลล์ไข่หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ผ่านไป 22 ชั่วโมง ในกลุ่มที่ 1 ($3.75 \pm 0.64 \mu\text{m}$) ซึ่งมีการขยายตัวของคิวมูลัสเซลล์สูงกว่ากลุ่มที่ 3 ($3.45 \pm 0.59 \mu\text{m}$) กลุ่มที่ 4 ($3.42 \pm 0.59 \mu\text{m}$) กลุ่มที่ 5 ($3.403 \pm 0.62 \mu\text{m}$) และกลุ่มที่ 6 ($3.40 \pm 0.62 \mu\text{m}$) ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มที่ 2 ($3.45 \pm 0.59 \mu\text{m}$)

($P > 0.01$) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไปถึงชั่วโมงที่ 44 พบว่าการขยายตัวของคิวมูลัสเซลล์ใน กลุ่มที่ 1 ($6.23 \pm 0.90 \mu\text{m}$) กลุ่มที่ 2 (6.21 ± 0.93) มีการขยายตัวของคิวมูลัสเซลล์สูงกว่ากลุ่มที่ 3 ($5.86 \pm 0.88 \mu\text{m}$) กลุ่มที่ 4 ($5.853 \pm 0.90 \mu\text{m}$) กลุ่มที่ 5 ($5.86 \pm 0.95 \mu\text{m}$) และกลุ่มที่ 6 ($5.70 \pm 1.09 \mu\text{m}$) ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ 2 ($6.21 \pm 0.93 \mu\text{m}$) ($P > 0.01$) ดังแสดงใน Table 2

Table 2 Development rate of cumulus cells of COCs co-culture with oviduct epithelial cells from different heat shocked

Treatment	Number of oocytes cultured (n)	Development of cumulus cell		
		0 h ($\mu\text{m}\pm\text{SD}$)	22 h ($\mu\text{m}\pm\text{SD}$)	44 h ($\mu\text{m}\pm\text{SD}$)
COCs+OEC 38.5°C at 12 h	159	2.14 $\pm$ 0.15	3.75 $\pm$ 0.64 ^b	6.23 $\pm$ 0.90 ^b
COCs+OEC 38.5°C at 24 h	156	2.17 $\pm$ 0.15	3.64 $\pm$ 0.71 ^{ab}	6.21 $\pm$ 0.93 ^b
COCs+OEC 40°C at 12 h	161	2.15 $\pm$ 0.18	3.45 $\pm$ 0.59 ^a	5.86 $\pm$ 0.88 ^a
COCs+OEC 40°C at 24 h	158	2.13 $\pm$ 0.16	3.42 $\pm$ 0.59 ^a	5.85 $\pm$ 0.90 ^a
COCs+OEC 42°C at 12 h	160	2.14 $\pm$ 0.14	3.40 $\pm$ 0.62 ^a	5.86 $\pm$ 0.95 ^a
COCs+OEC 42°C at 24 h	160	2.13 $\pm$ 0.16	3.40 $\pm$ 0.62 ^a	5.70 $\pm$ 1.09 ^a

Different superscripts (^{a, b}) with in same column are significantly different ($P<0.01$).

COCs: Cumulus oocytes complexes, OEC: Oviduct epithelial cell, SD: Standard deviation

การพัฒนาของเซลล์ไข่ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุผิว ท่อนำไข่ด้วยอุณหภูมิที่ต่างกัน

ผลของการเลี้ยงเซลล์ไข่ร่วมกับเยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่ถูกฮีทช็อคด้วยความร้อน พบว่าการพัฒนาของเซลล์ไข่ในระยะ MII กลุ่มที่ 1 มีค่าเท่ากับ 67.21% กลุ่มที่ 2 มีค่า

เท่ากับ 66.13% กลุ่มที่ 3 มีค่าเท่ากับ 62.40% กลุ่มที่ 4 มีค่าเท่ากับ 61.81% กลุ่มที่ 5 มีค่าเท่ากับ 62.10% และกลุ่มที่ 6 มีค่าเท่ากับ 61.82% ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ดังแสดงใน Table 3

Table 3 Development rate of oocytes co-culture oviduct epithelium cell by heat shocked at different temperatures

Treatment	Number of oocytes cultured (n)	Development of oocytes	
		MII (%)	Degenerate (%)
IVM+OEC 38.5°C at 12 h	159	67.21 (107/159)	33.79 (52/159)
IVM+OEC 38.5°C at 24 h	156	66.13 (103/156)	33.87 (53/156)
IVM+OEC 40°C at 12 h	161	62.40 (101/161)	37.60 (60/161)
IVM+POEC 40°C at 24 h	158	61.81 (97/158)	38.19 (61/158)
IVM+POEC 42°C at 12 h	160	62.10 (99/160)	37.90 (64/160)
IVM+POEC 42°C at 24 h	160	61.82 (96/160)	38.17 (64/160)

IVM: *In vitro* maturation, OEC: Oviduct epithelial cell, SD: Standard deviation

วิจารณ์ผลการวิจัย

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เยื่อใบโพธิ์ที่นำไข่ในหลอดทดลองที่พบจากการศึกษาในครั้งนี้ มีลักษณะทรงกระบอกและมีไมโครวิลไลล้อมรอบ ส่วนอีกชนิดหนึ่งมีลักษณะเป็นทรงกลม มีไมโครวิลไลล้อมรอบ และสามารถเคลื่อนไหวได้ ความร้อนมีผลต่ออัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อใบโพธิ์ที่นำไข่ โดยผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อเซลล์ยังได้รับอุณหภูมิสูงเป็นระยะเวลานาน ทำให้อัตราการมีชีวิตรอดลดลง และการศึกษาอัตราการพัฒนาของเซลล์ไข่ที่เลี้ยงร่วมกับเยื่อใบโพธิ์ที่นำไข่ที่ถูกกระตุ้นด้วยอุณหภูมิร้อนที่ต่างกันในหลอดทดลอง Chen *et al.* (2007) ได้รายงานว่าคุณสมบัติของ Cumulus cell ที่มีลักษณะติดกัน

แน่นแบนแผ่กระจายหลายชั้น เป็นดัชนีที่แสดงถึงความสมบูรณ์และแข็งแรงของเซลล์ไข่ และมีโอกาสพัฒนาไปจนถึงระยะ Metaphase II ได้ดีกว่าเซลล์ไข่ที่มีเซลล์ฟิเลียลล้อมรอบแบบไม่หนา ซึ่งในการทดลองนี้พบว่า กลุ่มที่ได้รับความร้อนสูงและเป็นระยะเวลานานมีอัตราการขยายจำนวนของ Cumulus cell ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ Kidson *et al.* (2003) รายงานว่า สาเหตุที่ทำให้เซลล์ไข่มีประสิทธิภาพในการพัฒนาเพิ่มขึ้น มาจากเซลล์เยื่อใบโพธิ์ที่นำไข่ที่ซื้อซีเลียล ซึ่งเซลล์ชนิดนี้สร้างและหลั่งสารไกลโคโปรตีนซึ่งพบที่ต่อมหลั่งสาร (Secretory granule) และ Growth factor จำพวก Insulin-like Growth Factor (IGF), Epidermal Growth Factor (EGF), Transforming Growth Factor (TGF) และ Fibroblast Growth Factors

(FGFs) ซึ่งสารเหล่านี้มีหน้าที่ช่วยกระตุ้นการพัฒนาของไข่และตัวอ่อนในระยะแรก และจากการศึกษาเกี่ยวกับการพัฒนาของเซลล์ไข่ที่นำมาเลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่ถูกยึดติดด้วยอุณหภูมิ 38.5°C. เป็นเวลา 12 ชั่วโมง มีอัตราการพัฒนาของเซลล์ไข่ไปจนถึงระยะ Metaphase II ถึงร้อยละ 67.21 (107/159) ซึ่งมีอัตราการพัฒนาที่มากกว่ากลุ่มที่ 2 ร้อยละ 66.13 (103/156) กลุ่มที่ 3 ร้อยละ 62.40 (101/161) กลุ่มที่ 4 ร้อยละ 61.81 (97/158) กลุ่มที่ 5 ร้อยละ 62.10 (99/160) และกลุ่มที่ 6 ร้อยละ 61.81 (96/160) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแม้เซลล์ไข่จะถูกยึดติดด้วยอุณหภูมิร้อนแต่เซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ยังสามารถปรับปรุงคุณภาพของเซลล์ไข่ให้มีการเจริญเติบโตไปจนถึงระยะ Metaphase II ได้ ซึ่งมีเหตุผลสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Kidson *et al.*, (2003)

สรุปผลการวิจัย

การได้รับความร้อนสูงส่งผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ การขยายตัวของคิวมูลัสเซลล์ที่ล้อมรอบเซลล์ไข่ที่เลี้ยงในหลอดทดลองลดลง และการพัฒนาของเซลล์ไข่ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ด้วยอุณหภูมิสูงมีแนวโน้มการพัฒนาลดลง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. รั้งสรรค์ พาลพ่าย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ. ดร.อนุชา สอนวงศ์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้ให้ความรู้คำแนะนำเกี่ยวกับเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ในหลอดทดลอง และการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดทดลอง และขอขอบคุณโรงเชือดอำเภอมะเมือง จังหวัดพะเยา ที่ได้อนุเคราะห์การเก็บตัวอย่างรังไข่สุกร

เอกสารอ้างอิง

- Chen, X.Y., Q.W. Li and J. Huang. 2007. Effects of ovarian cortex cell co-culture during *in vitro* maturation on porcine oocytes maturation, fertilization and embryo development. **Anim. Reprod. Sci.** 99(3-4): 306-316.
- Fazeli, A., A.E. Duncan and W.V. Holt. 1999. Sperm-oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. **Biol. Reprod.** 60(4): 879-886.
- Georgiou, A.S., E. Sostaric and H.D. Moore. 2005. A gametes alter the oviductal secretory proteome. **Mol Cell Proteomics.** 4(11): 1785-1796.
- Kidson, A., E. Schoevers and M. Bevers. 2003. The effect of oviductal epithelial cell co-culture during in maturation on sow oocyte morphology, fertilization and embryo development. **Theriogenology** 59(9): 1889-1903.
- Prunier, A., J.Y. Dourmad and M. Etienne. 1994. Effect of light regimen under various ambient temperatures on sow and litter performance. **J. Anim Sci.** 72(6): 1461-1466.

Romar, R., P. Coy and S. Ruiz. 2001. Effect of co-culture of porcine sperm and oocytes with porcine oviductal epithelial cells on *in vitro* fertilization. **Anim. Reprod. Sci.** 68(1-2): 85-98.

Wegner, K., C. Lambertz and M. Gauly. 2016. Effects of temperature and temperature-humidity index on the reproductive performance of sows during summer months under a temperate climate. **J. Anim. Sci.** 87(11): 1334-1339.