

การตอบสนองต่อความร้อนของเซลล์เยื่อผิววุ้นนำไข่
และการพัฒนาของเซลล์ไข่สุกร



สุพัฒน์ เชื้อนวัง

วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตวศาสตร์

สิงหาคม 2562

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

การตอบสนองต่อความร้อนของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่
และการพัฒนาของเซลล์ไข่สุกร



วิทยานิพนธ์เสนอมหาวิทยาลัยพะเยา เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตวศาสตร์
สิงหาคม 2562
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยพะเยา

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การตอบสนองต่อความร้อนของเซลล์เยื่อบุผิวที่อ่อนนุ่มและการพัฒนาของตัวอ่อนสุกร

ของ สุพัฒน์ เชื้อนวัง

ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์

ของมหาวิทยาลัยพะเยา

.....ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทศพล มุลมณี)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.โชค โสรัจกุล)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พญงค์ศักดิ์ อินทะวิชา)

.....กรรมการ

(ดร.พันธภรณ์ สุภักคกาญจน์กุล)

.....กรรมการ

(ดร.สุรียพร แสงวงศ์)

อนุมัติ

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุญฤทธิ์ สิ้นค้างาม)

คณบดีคณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ

สิงหาคม 2562

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พยุงค์กิติ อินตะวิชา อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำ ค่าใช้จ่ายต่าง ๆ และแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ รวมไปถึงความเอาใจใส่ในทุกขั้นตอนที่ทำให้ งานวิจัยฉบับนี้สมบูรณ์ที่สุด ผู้วิจัยตระหนักถึงความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของอาจารย์ และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.โชค ไสร์จกุล, ดร.สุรีย์พร แสงวงศ์ และดร.พันธภรณ์ สุภักดาณกุล ที่ให้คำแนะนำ และช่วยแก้ไขข้อบกพร่องในเรื่องต่าง ๆ ที่ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทศพล มุลมณี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปรธาน กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ช่วยตรวจแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ให้เกิดความสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.อนุชา สธนวงศ์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้ให้ความรู้ เกี่ยวกับเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ และการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดทดลอง

ขอขอบคุณ โรงฆ่าสัตว์ อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา ที่อนุญาตให้เก็บตัวอย่างรังไข่สุกร และยังช่วยเหลือให้ความสะดวกในด้านต่าง ๆ ที่ช่วยให้งานวิจัยได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณบิดามารดาที่ให้กำลังใจ และให้โอกาสแก่ข้าพเจ้าได้เล่าเรียน สู้ดทำวันนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยพะเยา สถาบันการศึกษาที่ข้าพเจ้าเล่าเรียน ให้สถานที่ และทรัพยากรในการทำวิจัย

คุณค่าและคุณประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ทางผู้วิจัยขอมอบและอุทิศแด่ ผู้มีพระคุณทุกท่าน ผู้วิจัยหวังว่างานวิจัยนี้ จะเป็นประโยชน์แก่ผู้ที่สนใจในงานวิจัยนี้ จึงขอพระคุณมา ณ ที่นี้

สุพัฒน์ เชื้อนวัง

เรื่อง: การตอบสนองต่อความร้อนของเซลล์เยื่อหุ้มตัวอ่อนและการพัฒนาเซลล์ไข่สุกร

ผู้วิจัย: สุพัฒน์ เชื้อนวัง, วิทยานิพนธ์: วท.ม. (สัตวศาสตร์), มหาวิทยาลัยพะเยา, 2562

ประธานที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พญงค์ดี อินตะวิชา, **กรรมการที่ปรึกษา:** รองศาสตราจารย์ ดร.โชค ไสรัจกุล,
ดร.สุรีย์พร แสงวงศ์

คำสำคัญ: เซลล์เยื่อหุ้มตัวอ่อน, อุณหภูมิสูง, การเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ในหลอดทดลอง, สุกร

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อหุ้มตัวอ่อน และเซลล์ไข่ที่ได้รับอุณหภูมิร้อน (Exposed Heat Shock; EHS) ในหลอดทดลอง การศึกษาที่ 1 ศึกษาอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อหุ้มตัวอ่อน โดยใช้เซลล์เยื่อหุ้มตัวอ่อนที่ถูกเก็บจากสุกรสาวทั้งหมด 18 ตัว แบ่งออกเป็น 6 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 EHS 38.5 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (Control) กลุ่มที่ 2 EHS 38.5 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Control) กลุ่มที่ 3 EHS 40 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง กลุ่มที่ 4 EHS 40 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กลุ่มที่ 5 EHS 42 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และกลุ่มที่ 6 EHS 42 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลพบว่า กลุ่มที่ 1 มีอัตราการมีชีวิตรอดเท่ากับ $99.09 \pm 0.68\%$ สูงกว่ากลุ่มที่ 4 ($97.45 \pm 1.43\%$) กลุ่มที่ 5 ($95.90 \pm 2.29\%$) และกลุ่มที่ 6 ($95.88 \pm 1.89\%$) ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) แต่ไม่แตกต่างกันกับ กลุ่มที่ 2 ($98.95 \pm 0.56\%$) และกลุ่มที่ 3 ($97.59 \pm 1.31\%$) ($P > 0.01$) การศึกษาที่ 2 ศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ร่วมกับเซลล์เยื่อหุ้มตัวอ่อนที่ได้รับอุณหภูมิที่แตกต่างกัน รังไข่ถูกเก็บจากสุกรสาวทั้งหมด 382 ตัว ผลพบว่า มีการขยายของเซลล์คิวมูลัส (Cumulus) เมื่อเลี้ยงไปถึงชั่วโมงที่ 44 ในกลุ่มที่ 1 ($6.12 \pm 0.90 \mu\text{m}$) มากกว่ากลุ่มที่ 3 ($5.80 \pm 0.88 \mu\text{m}$) กลุ่มที่ 4 ($5.79 \pm 0.90 \mu\text{m}$) กลุ่มที่ 5 ($5.80 \pm 0.95 \mu\text{m}$) และกลุ่มที่ 6 ($5.65 \pm 1.09 \mu\text{m}$) ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) แต่ไม่แตกต่างกันกับ กลุ่มที่ 2 ($6.08 \pm 0.93 \mu\text{m}$) ($P > 0.01$) และผลของอัตราการพัฒนาของเซลล์ไข่ไปจนถึงระยะ Metaphase II ในกลุ่มที่ 1 (65.85%) มีค่ามากกว่ากลุ่มที่ 2 (64.30%) กลุ่มที่ 3 (61.88%) กลุ่มที่ 4 (60.82%) กลุ่มที่ 5 (61.88%) และกลุ่มที่ 6 (61.82%) ดังนั้นสรุปได้ว่า อุณหภูมิสูงส่งผลต่ออัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อหุ้มตัวอ่อน การขยายของเซลล์คิวมูลัส และการพัฒนาของเซลล์ไข่

Title: HEAT RESPONSES OF OVIDUCT EPITHELIAL CELLS AND DEVELOPMENT OF OOCYTES IN SWINE

Author: Supat Kuanwang, Thesis: M.Sc. (Animal Science), University of Phayao, 2018.

Advisor: Assistant Professor Dr.Payungsak Intawicha, **Co–advisor :** Associate Professor Dr.Choke Sorachakula,
Dr.Sureeporn Saengwong

Keywords: Oviduct epithelium cell, High temperature, *In vitro* oocytes maturation, Porcine

ABSTRACT

The experiments aims 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 18 gilts at local 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 282 gilts. The results showed that after culture for 44 h in group 1 ($6.12 \pm 0.90\mu\text{m}$) was expanded cumulus cells higher than group 3 ($5.80 \pm 0.88 \mu\text{m}$), group 4 ($5.79 \pm 0.90 \mu\text{m}$), group 5 ($5.80 \pm 0.95 \mu\text{m}$) and group 6 ($5.65 \mu\text{m}$) with statistical significance ($P < 0.01$), but not significance with group 2 ($6.08 \pm 0.93 \mu\text{m}$); ($P > 0.01$). Development rate of oocytes to metaphase II stage in group 1 (65.85%) is higher than group 2 (64.30%), group 3 (61.88%), group 4 (60.82%), group 5 (61.80%) 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. Therefore, we conclude that high temperature affects the viability rate of oviduct epithelial cell, development of oocytes and expanded of cumulus cell.

อักษรย่อ

ABAM	=	Antibiotic–Antimitotic
COC	=	Cumulus oocyte complexes
CL	=	Corpus luteum
CRD	=	Complete randomized design
CO ₂	=	Carbon dioxide
Di	=	Water–Deionized water
DMEM	=	Dulbecco modified eagle medium
EVAP	=	Evaporative cooling system
EGF	=	Epidermal growth factor
EHS	=	Exposed heat shock
FGFs	=	Fibroblast growth factors
FBS	=	Fetal bovine serum
GC	=	Granulosa cell
HCG	=	Human chorionic gonadotropin
HSP70	=	Heat shock protein 70
IVM	=	In <i>vitro</i> oocytes maturation
IVF	=	In <i>vitro</i> fertilization
IGF	=	Insulin–like growth factor
LH	=	Luteinizing hormone
KCL	=	Potassium chloride
M–199	=	Medium 199
MII	=	Metaphase II
Na ₂ HPO ₄	=	Di–Sodium hydrogen phosphate
NaCL	=	Sodium chloride
OEC	=	Oviduct epithelial cell
PBS	=	Phosphate buffer saline
TCM199	=	The complex culture medium 199
TGF	=	Transforming growth factor

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	แสดงกายวิภาควิทยาาระบบสืบพันธุ์ของสุกร	10
2	แสดง (A) ท่อนำไข่ รังไข่ และฟอลลิเคิลของสุกรเพศเมียในระยะไม่เป็นสัด(ลูกครีชีส์ดำ) (B) ท่อนำไข่ รังไข่ และฟอลลิเคิลของสุกรเพศเมียในระยะเป็นสัด (ลูกครีชีส์ดำ).....	11
3	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของฟอลลิเคิล โซนาเพลลูซิตา (Z) เซลล์ไข่ (O) เซลล์คิวมูลัส (COC ₅) และเซลล์แกรนูโลซ่า (GC).....	12
4	แสดงฟอลลิเคิลระยะที่สามพบช่องน้ำภายในเซลล์แกรนูโลซ่าที่มีการเจริญเบซัลลามินา (Basal lamina: BL) ที่กำชั้นใน (Theca internal: TI) ที่กำชั้นนอก (Theca external: TE).....	13
5	แสดงโครงสร้างภายในรังไข่แสดงระยะการพัฒนาของเซลล์ไข่	14
6	แสดงโครงสร้างภายในรังไข่แสดงระยะการพัฒนาของเซลล์ไข่	15
7	แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของท่อนำไข่ส่วนแอมพูล่า และอีสมัทัส ของสุกรเพศเมีย	16
8	แสดงลักษณะภายในของเยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่ส่งภายใต้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด ประกอบด้วย Non ciliated round shape epithelial cells (สีม่วง), Ciliated columnar epithelial cells (สีเขียว).....	17
9	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่อุณหภูมิ 0, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 10 เท่า	33
10	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่มีซีเลียต่อหุ้มบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (ลูกครีชีส์แดง) ที่กำลังขยาย 40 เท่า.....	34
11	อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ในงานเพาะเลี้ยงได้รับอุณหภูมิ 38.5, 40 และ 42 องศาเซลเซียส	35
12	แสดงลักษณะของ Cumulus oocytes complexes ที่ได้จากรังไข่ในสุกรสาว ที่กำลังขยาย 40 เท่า	37
13	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ไข่ที่เลี้ยงร่วมกับเยื่อบุผิวท่อนำไข่ ที่ได้รับอุณหภูมิที่ต่างกันในหลอดทดลอง ที่กำลังขยาย 40 เท่า	38

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ	หน้า
14 แสดงข้อมูลแสดงการวิเคราะห์อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ ในการทดลองที่ 1.....	61
15 แสดงข้อมูลแสดงการวิเคราะห์อัตราการตายของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ ในการทดลองที่ 1.....	61
16 แสดงข้อมูลแสดงการวิเคราะห์อัตราการขยายของเซลล์ควมูลัสที่ล้อมรอบ เซลล์ไข่ในชั่วโมงที่ 22 ในการทดลองที่ 2.....	84
17 แสดงข้อมูลแสดงการวิเคราะห์อัตราการขยายของเซลล์ควมูลัสที่ล้อมรอบ เซลล์ไข่ ในชั่วโมงที่ 44ในการทดลองที่ 2.....	84
18 แสดงข้อมูลแสดงการวิเคราะห์อัตราการพัฒนาของเซลล์ไข่ไปจนถึงระยะ Metaphase II ในการทดลองที่ 3	86
19 แสดงข้อมูลแสดงการวิเคราะห์อัตราการเสียชีวิตของเซลล์ไข่ในการทดลองที่ 3 .	87
20 แสดงรูปภาพขณะปฏิบัติการในการทดลองที่ 1	88
21 แสดงรูปภาพขณะปฏิบัติการในการทดลองที่ 2.....	89

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการผลิตสุกรขุนระหว่างโรงเรือนระบบปิดและโรงเรือนระบบเปิด.....	6
2 แสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อสุกรในระยะต่าง ๆ	8
3 แสดงอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนสุกรในระยะ Blastocyst หลังจากปฏิสนธิในหลอดทดลอง	23
4 แสดงอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่ได้รับอุณหภูมิที่แตกต่างกัน .	36
5 แสดงอัตราการขยายของเซลล์คิวมูลัสที่ล้อมรอบเซลล์ไข่ที่ได้รับอุณหภูมิที่แตกต่างกัน.....	39
6 แสดงการพัฒนาของเซลล์ไข่ที่เลี้ยงร่วมกับเยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่ได้รับอุณหภูมิที่ต่างกัน.....	40
7 แสดงการมีชีวิตรอด และการตายของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ในสุกร	55
8 แสดงความหนาของเซลล์คิวมูลัสในกลุ่มที่ฮีทช็อคที่อุณหภูมิ 38.5 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตามลำดับ	62
9 แสดงการพัฒนาของเซลล์ไข่จนถึงระยะ Metaphase II	85

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	แสดงกายวิภาควิทยาาระบบสืบพันธุ์ของสุกร	10
2	แสดง (A) ท่อนำไข่ รังไข่ และฟอลลิเคิลของสุกรเพศเมียในระยะไม่เป็นสัด(ลูกครีชีส์ดำ) (B) ท่อนำไข่ รังไข่ และฟอลลิเคิลของสุกรเพศเมียในระยะเป็นสัด (ลูกครีชีส์ดำ).....	11
3	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของฟอลลิเคิล โซนาเพลลูซิตา (Z) เซลล์ไข่ (O) เซลล์คิวมูลัส (COC ₅) และเซลล์แกรนูโลซ่า (GC).....	12
4	แสดงฟอลลิเคิลระยะที่สามพบช่องน้ำภายในเซลล์แกรนูโลซ่าที่มีการเจริญเบซัลลามินา (Basal lamina: BL) ที่กำชั้นใน (Theca internal: TI) ที่กำชั้นนอก (Theca external: TE).....	13
5	แสดงโครงสร้างภายในรังไข่แสดงระยะการพัฒนาของเซลล์ไข่	14
6	แสดงโครงสร้างภายในรังไข่แสดงระยะการพัฒนาของเซลล์ไข่	15
7	แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของท่อนำไข่ส่วนแอมพูล่า และอีสมัทัส ของสุกรเพศเมีย	16
8	แสดงลักษณะภายในของเยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่ส่งภายใต้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด ประกอบด้วย Non ciliated round shape epithelial cells (สีม่วง), Ciliated columnar epithelial cells (สีเขียว).....	17
9	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่อุณหภูมิ 0, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 10 เท่า	33
10	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่มีซีเลียต่อหุ้มบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (ลูกครีชีส์แดง) ที่กำลังขยาย 40 เท่า.....	34
11	อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ในงานเพาะเลี้ยงได้รับอุณหภูมิ 38.5, 40 และ 42 องศาเซลเซียส	35
12	แสดงลักษณะของ Cumulus oocytes complexes ที่ได้จากรังไข่ในสุกรสาว ที่กำลังขยาย 40 เท่า	37
13	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ไข่ที่เลี้ยงร่วมกับเยื่อบุผิวท่อนำไข่ ที่ได้รับอุณหภูมิที่ต่างกันในหลอดทดลอง ที่กำลังขยาย 40 เท่า	38

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ	หน้า
14 แสดงข้อมูลแสดงการวิเคราะห์อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ ในการทดลองที่ 1.....	61
15 แสดงข้อมูลแสดงการวิเคราะห์อัตราการตายของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ ในการทดลองที่ 1.....	61
16 แสดงข้อมูลแสดงการวิเคราะห์อัตราการขยายของเซลล์ควมูลัสที่ล้อมรอบ เซลล์ไข่ในชั่วโมงที่ 22 ในการทดลองที่ 2.....	84
17 แสดงข้อมูลแสดงการวิเคราะห์อัตราการขยายของเซลล์ควมูลัสที่ล้อมรอบ เซลล์ไข่ ในชั่วโมงที่ 44ในการทดลองที่ 2.....	84
18 แสดงข้อมูลแสดงการวิเคราะห์อัตราการพัฒนาของเซลล์ไข่ไปจนถึงระยะ Metaphase II ในการทดลองที่ 3	86
19 แสดงข้อมูลแสดงการวิเคราะห์อัตราการเสียชีวิตของเซลล์ไข่ในการทดลองที่ 3 .	87
20 แสดงรูปภาพขณะปฏิบัติการในการทดลองที่ 1	88
21 แสดงรูปภาพขณะปฏิบัติการในการทดลองที่ 2.....	89

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สุกรเป็นที่ลัทธินิยมเลี้ยงและบริโภคกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย ซึ่งมีทั้งแบบอุตสาหกรรม และแบบรายย่อย โดยแบบอุตสาหกรรมจะเลี้ยงในโรงเรือนแบบปิด (Evaporative cooling system; EVAP) ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิและความชื้นภายในโรงเรือนให้ต่ำกว่าอุณหภูมิภายนอกโรงเรือน ส่งผลให้สุกรไม่เกิดความเครียดจากความร้อน ทำให้มีอัตราการตั้งท้อง และการให้ลูกต่อครอกสูง แต่ในระบบนี้ต้องใช้เงินลงทุนสูง และไม่เหมาะกับเกษตรกรรายย่อย (กุศล บุญยะวรรณ และคณะ, 2546) ทำให้เกษตรกรรายย่อยนิยมเลี้ยงสุกรระบบโรงเรือนแบบเปิด ซึ่งระบบนี้มีการลงทุนที่ต่ำกว่าระบบปิด แต่ระบบนี้ไม่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ ประกอบกับสภาพอากาศแบบร้อนชื้นของประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงฤดูร้อน ซึ่งบางวันอุณหภูมิสูงถึง 42 องศาเซลเซียส ส่งผลกระทบต่อสุกร ทำให้เกิดความเครียดเนื่องจากความร้อน ทำให้กินอาหารได้น้อยลง น้ำหนักตัวลดลง ยิ่งไปกว่านั้นยังส่งผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ เช่น ความสามารถในการแสดงอาการเป็นสัดลดลง อัตราการตั้งท้องลดลง ตัวอ่อนมีความสามารถในการพัฒนาต่ำ เกิดการตายของตัวอ่อนในระยะต้นก่อนฝังตัว จำนวนลูกต่อครอก และน้ำหนักแรกคลอดต่ำ (อรรณพ สุริยสมบุรณ์ และมงคล เตชะกำพูน, 2551)

Areekijseere and Vejaratpimol (2005) ได้รายงานไว้ว่า รังไข่และท่อนำไข่สามารถนำมาศึกษาเกี่ยวกับเทคโนโลยีในการปรับปรุงทางระบบสืบพันธุ์ และจากผลการวิจัย พบว่า เซลล์ไข่และเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ สามารถนำมาเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง เช่น การเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ในหลอดทดลอง (*in vitro* oocytes maturation; IVM) และการปฏิสนธิในหลอดทดลอง (*in vitro* fertilization; IVF) ซึ่งเทคโนโลยีเหล่านี้เป็นวิธีที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ในสัตว์ ช่วยในการเจริญพันธุ์ในสัตว์ และยังสามารถแก้ปัญหาในสัตว์ที่มีความผิดปกติทางระบบสืบพันธุ์ได้ เช่น ท่อนำไข่อุดตัน ผสมติดยาก ได้อีกด้วย

ปัจจุบันการปรับปรุงประสิทธิภาพของตัวอ่อนให้เพิ่มสูงขึ้น สามารถทำได้โดยนำเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ (oviduct epithelial cell; OEC) มาเป็นเซลล์พี่เลี้ยง (feeder cells) เพื่อเสริมในอาหารเพาะเลี้ยง ทั้งในขั้นตอนของการทำ IVM และ IVF ทำให้อัตราการมีชีวิตรอดเซลล์ไข่ (Chen, Li and Huang, 2007) และตัวอ่อนเพิ่มสูงขึ้น จากผลการวิจัย พบว่า เซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ จะหลั่งสารจำพวกโปรตีนที่จำเป็นต่อการพัฒนาของตัวอ่อน และ growth factor ต่าง ๆ ช่วยใน

การปรับปรุงคุณภาพเซลล์ไข่และตัวอ่อนเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ เซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ยังสามารถทำให้เซลล์ cumulus มีการขยายที่เพิ่มขึ้น และยังมีส่วนในการปรับปรุงคุณภาพของตัวอ่อนจนถึงระยะ blastocyst ให้มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น (Kidson, et al., 2003)

จากการรายงานของ Bloemhof, et al. (2013) พบว่า ความผันแปรของอุณหภูมิอากาศส่งผลกระทบต่อการทำงานของรังไข่และการค้าในโรงเรือนระบบเปิด ซึ่งอุณหภูมิอากาศภายในโรงเรือนสามารถผันแปรไปตามอุณหภูมิอากาศแวดล้อม การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอากาศภายในโรงเรือนในช่วงฤดูร้อน มีอิทธิพลต่อการให้ผลผลิตของแม่สุกรในช่วงแรกคลอด เช่น เกิดการแท้ง จำนวนลูกสุกรในระยะต้นของการตั้งท้อง และจำนวนลูกสุกร มีอัตราการตายที่เพิ่มสูงขึ้น ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของอุณหภูมิร้อนต่ออัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ การขยายของเซลล์คิวมูลัส และการพัฒนาของเซลล์ไข่ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่ได้รับอุณหภูมิร้อนในหลอดทดลอง เพื่อใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงคุณภาพของเซลล์ไข่ในขั้นตอนการทำ IVF

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยา และอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่ได้รับอุณหภูมิร้อน
2. เพื่อศึกษาการพัฒนาของเซลล์ไข่ และการขยายของเซลล์คิวมูลัสที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่ได้รับอุณหภูมิร้อน

สมมติฐานของการวิจัย

1. เซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่มีอัตราการมีชีวิตรอดลดลงเมื่อได้รับอุณหภูมิร้อน
2. เซลล์ไข่ และเซลล์คิวมูลัสที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่ได้รับอุณหภูมิร้อนสามารถพัฒนาได้

ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา อัตราการมีชีวิตรอด และการตอบสนองต่อความร้อน ในเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่ได้รับอุณหภูมิร้อน (Exposed Heat Shock; EHS) และการพัฒนาของเซลล์ไข่ และการขยายของเซลล์คิวมูลัส ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่ได้รับอุณหภูมิร้อน โดยแบ่งออกเป็น 2 การศึกษา ดังนี้

การศึกษาที่ 1 ศึกษาอัตราการมีชีวิตรอด และลักษณะทางสัณฐานของเซลล์เยื่อบุผิวท่อ นำไข่ที่ได้รับอุณหภูมิร้อน โดยแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 OEC + EHS 38.5 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (กลุ่ม Control)
- กลุ่มที่ 2 OEC + EHS 38.5 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (กลุ่ม Control)
- กลุ่มที่ 3 OEC + EHS 40 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (กลุ่มได้รับอุณหภูมิร้อนต่ำ)
- กลุ่มที่ 4 OEC + EHS 40 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (กลุ่มได้รับอุณหภูมิร้อนต่ำ)
- กลุ่มที่ 5 OEC + EHS 42 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (กลุ่มได้รับอุณหภูมิร้อนสูง)
- กลุ่มที่ 6 OEC + EHS 42 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (กลุ่มได้รับอุณหภูมิร้อนสูง)

การศึกษาที่ 2 ศึกษาการพัฒนาของเซลล์ไข่ และการขยายของเซลล์คิวมูลัสที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์บุผิวท่อ นำไข่ที่ได้รับอุณหภูมิร้อน โดยแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 COC + OEC + EHS 38.5 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (กลุ่ม Control)
- กลุ่มที่ 2 COC + OEC + EHS 38.5 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (กลุ่ม Control)
- กลุ่มที่ 3 COC + OEC + EHS 40 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (กลุ่มได้รับอุณหภูมิร้อนต่ำ)
- กลุ่มที่ 4 COC + OEC + EHS 40 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (กลุ่มได้รับอุณหภูมิร้อนต่ำ)
- กลุ่มที่ 5 COC + OEC + EHS 42 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (กลุ่มได้รับอุณหภูมิร้อนสูง)
- กลุ่มที่ 6 COC + OEC + EHS 42 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (กลุ่มได้รับอุณหภูมิร้อนสูง)

นิยามศัพท์เฉพาะ

การเจริญเติบโตของเซลล์ไข่นอกร่างกาย (*In vitro* oocytes maturation) เซลล์คิวมูลัส (Cumulus cell) เซลล์เยื่อบุผิวในท่อ นำไข่ (Oviduct epithelial cell) การพัฒนาการของเซลล์ไข่ (Oocytes development) สุกร (Swine)

ประโยชน์ที่จะได้รับการวิจัย

1. ทราบถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยา และอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุผิวท่อ นำไข่ที่ได้รับอุณหภูมิร้อน
2. สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของเซลล์ไข่ในหลอดทดลอง โดยเฉพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุผิวท่อ นำไข่

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

อุตสาหกรรมการผลิตสุกรในประเทศไทย

ในอุตสาหกรรมการผลิตสุกรในประเทศไทยปัจจุบันสามารถจำแนกรูปแบบของการเลี้ยงสุกร ออกเป็น 2 ระบบ คือ หนึ่งระบบโรงเรือนแบบปิด ในระบบนี้พบมากในอุตสาหกรรมผลิตสุกรในองค์กรใหญ่ ๆ ซึ่งจะมีการเลี้ยงสุกรในโรงเรือนแบบปิด หรือเรียกว่า Evaporative Cooling System (EVAP) หลักการทำงาน คือ ทำให้น้ำไหลผ่าน Cooling pad ซึ่งจะอยู่ด้านหน้าโรงเรือน โดยมีพัดลมที่อยู่ตรงข้ามกับ Cooling pad ทำหน้าที่ดูดอากาศที่อยู่ภายในโรงเรือนออก ทำให้อุณหภูมิในโรงเรือนลดลงต่ำกว่าอุณหภูมิที่อยู่ภายนอกโรงเรือน และยังสามารถเพิ่มความชื้นในอากาศ ซึ่งข้อดีของระบบโรงเรือนแบบปิด คือ สามารถลดอุณหภูมิภายในโรงเรือนได้ (ณัฐวุฒิ คุชฎี, 2551, สื่อออนไลน์) ลดความเสี่ยงในการแพร่ระบาดของโรคติดต่อ ลดจำนวนวันในการเลี้ยงต่อการเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนลูกแรกเกิดทั้งหมดต่อครอก จำนวนลูกแรกเกิดมีชีวิตต่อครอก ของสุกรที่เลี้ยงในระบบปิดสูงกว่าสุกรที่เลี้ยงในระบบเปิด (สมพงษ์ ชำนาญทองไพวัลย์ และอธิฏ นันทประเสริฐ, 2541)

ลักษณะโรงเรือนระบบปิด (Evaporative cooling system, EVAP)

โรงเรือนระบบปิดแบบควบคุมอุณหภูมิด้วยการระเหยน้ำ สำหรับการเลี้ยงสัตว์ เป็นโรงเรือนเลี้ยงสัตว์แบบปิด ที่ใช้ระบบการระบายอากาศร่วมกับการทำความเย็นด้วยการระเหยน้ำ เป็นการนำเอาหลักการระบายอากาศแบบอุโมงค์ลม (Tunnel Ventilation) การทำความเย็นด้วยวิธีระเหยน้ำ อุณหภูมิที่เกิดจากความเร็วลม (Effective Cooling) และหลักวิชาการสัตวบาล (Animal Husbandry) มาใช้ร่วมกันอย่างเหมาะสม เป็นการเปลี่ยนความร้อนให้กลายเป็นความร้อนแฝง (Latent Heat) ในการเพิ่มไอน้ำเพื่อลดอุณหภูมิในอากาศจากการเพิ่มขึ้นของความชื้นสัมพัทธ์และไอน้ำในอากาศ เพื่อปรับปรุงสภาวะอากาศที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์ ตามชนิดเพศ พันธุ์ และอายุสัตว์ ให้มีความสุขสบายมากกว่าสภาวะอากาศตามธรรมชาติ เพื่อให้สัตว์มีสุขภาพดี ให้ผลผลิตสูง และมีความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ (ดิฉันท์ พงษ์พิพัฒน์, 2554)

ขนาดของโรงเรือนที่มาตรฐาน คือ กว้าง 12 เมตร ยาว 120 เมตร โครงสร้างทั้งหมดทำด้วยเหล็กฉาก วัสดุที่นำมาใช้คลุมหลังคาโรงเรือน ทำด้วยแผ่นสังกะสีฉาบด้วยกาลวาโนส ภายใต้หลังคามุงด้วยฉนวนใยแก้วกันความร้อน ด้านใต้ใยแก้วบุด้วยแผ่นพลาสติกไวนิล

เพื่อป้องกันการแผ่รังสีความร้อนจากหลังคา ถัดลงมาจากแผ่นกันความร้อน จะมีแผ่นชิงลม ติดเป็นระยะทุก ๆ 12 เมตร เพื่อป้องกันลม ด้านบนทำให้พัดลมพัดผ่านอย่างสม่ำเสมอ ศิษย์พงษ์พิพัฒน์ (2554) รายงานว่า ผนังโรงเรือนด้านหน้าและท้ายโรงเรือนปิดทึบ ส่วนผนังด้านข้าง ทั้งสองก่อด้วยอิฐสูง ประมาณ 60 เซนติเมตร เปิดช่องลมและปิดด้วยผ้าม่านพลาสติกขนาด 1.20 เมตร และมีตาข่ายอย่างดีล้อมรอบผนังด้านข้าง เปิดประตูหน้า-หลัง และด้านกลาง ของโรงเรือนด้วย นอกจากนี้ แผ่นรังผึ้งเป็นส่วนสำคัญที่ปรับให้อุณหภูมิลดลง ซึ่งทำด้วย กระดาษสังเคราะห์พิเศษ มีความทนทาน มีความหนาสองขนาด คือ ขนาดหนา 10 เซนติเมตร และ 15 เซนติเมตร ความสูงของแผ่นรังผึ้ง 180 เซนติเมตร ความยาวประมาณ 15 เมตร และ 21.6 เมตรต่อโรงเรือน การติดแผ่นรังผึ้งจะติดด้านเดียวหรือสองด้านก็ได้ แต่การติดสองด้านนั้น การไหลเวียนของอากาศจะทั่วถึงและสม่ำเสมอดีกว่าติดด้านเดียว (ศรีสุวรรณ สมชัย, 2543)

พัดลมที่ใช้จะติดตั้งอยู่ในโรงเรือนด้านหลังตรงข้ามกับแผ่นรังผึ้ง ควรมีขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง 48 นิ้ว จำนวน 8 เครื่อง โดยมีตัวควบคุมอุณหภูมิอยู่ ถ้าโรงเรือนมีพัดลม 10 เครื่อง จะมีตัวควบคุมอุณหภูมิ 11 ตัว เพราะอีก 1 ตัวนั้น สำหรับควบคุมอุณหภูมิการเปิดปิดน้ำ ของเครื่องปั้มน้ำ โดยในสภาพที่อุณหภูมิทั่วไปพัดลมจะเปิดทำงาน 1 เครื่อง อยู่ตลอดเวลา และพัดลมที่เหลือจะทำงานเมื่ออุณหภูมิสูงกว่าที่เครื่องควบคุมอุณหภูมิกำหนดไว้ เมื่ออุณหภูมิ สูงกว่า 15°C พัดลมเครื่องที่ 2 จะทำงาน เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 22°C พัดลมเครื่องที่ 3 จะทำงาน เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 23°C พัดลมเครื่องที่ 4 จะทำงาน เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 24°C พัดลมเครื่องที่ 5 จะทำงาน เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 25°C พัดลมเครื่องที่ 6 จะทำงานเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 26°C พัดลมเครื่องที่ 7 จะทำงาน และเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 27°C พัดลมเครื่องที่ 8 จะทำงาน (มานิตย์ เทวรักษ์พิทักษ์, 2536)

สมรรถภาพการให้ผลผลิตของสัตว์ที่เลี้ยงในโรงเรือนระบบปิด

ศรีสุวรรณ สมชัย (2543) รายงานว่า ปัจจุบันฟาร์มสุกรบางส่วนได้เริ่มมีการใช้ โรงเรือนระบบปิดสุกรขุนเป็นส่วนใหญ่ และยังใช้กับสุกรแม่พันธุ์ในทุกช่วงของการผลิต คือ ตั้งแต่ ขั้นตอนของการเลี้ยงสุกรสาว แม่สุกรอุม้ท้อง ตลอดจนแม่สุกรคลอด และลูกสุกรหย่านม ซึ่งการใช้โรงเรือนระบบปิดนี้ คาดว่ามีผลกระทบต่อสมรรถภาพทางระบบสืบพันธุ์ของแม่สุกร ในระบบโรงเรือนระบบปิด จะมีอัตราการผลิตที่ดีกว่าระบบโรงเรือนแบบเปิด (ตาราง 1)

ตาราง 1 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการผลิตสุกรขุนระหว่างโรงเรือนระบบปิด และโรงเรือนระบบเปิด

ลักษณะ	โรงเรือนระบบเปิด	โรงเรือนระบบปิด
ดัชนีการผลิตสุกรขุน PI (Swine Performance Index: PI)	19.60	25.78
ค่าเฉลี่ยน้ำหนัก กก./พื้นที่ ตร.ม	125.12 กก./ตร.ม	135.65 กก./ตร.ม
ปริมาณการผลิตสุกร กก./ฟาร์ม	1,281,933 กก.	3,805,268 กก.
ค่าเฉลี่ยต้นทุนบาท/น้ำหนัก กก.	42.27 บาท/กก.	41.06 บาท/กก.
ค่าเฉลี่ยผลตอบแทน (กำไร)	7.86 บาท	9.03 บาท

ที่มา: ศรีสุวรรณ สมชัย, 2543

นอกจากนี้ สมโภชน์ ทับเจริญ (2555) รายงานว่า สัตว์ที่เลี้ยงในโรงเรือนระบบปิดให้ผลผลิตมากกว่าสัตว์ที่เลี้ยงในโรงเรือนระบบเปิด และสามารถลดปริมาณการกินอาหารลดจำนวนวันในการเลี้ยง และอัตราณพ สุริยสมบูรณ์ และมงคล เตชะกำพู (2551) รายงานว่า แม่สุกรสาวตั้งท้องที่เลี้ยงในระบบโรงเรือนแบบปิดมีผลต่อแม่สุกรในระยะต้น ๆ ซึ่งจะมีความอ่อนไหวต่อการเปลี่ยนแปลงของความชื้น และอุณหภูมิ มากกว่าแม่สุกรที่เคยให้ลูกมาแล้ว และยังพบว่า ความสัมพันธ์ของอุณหภูมิกับความชื้นต่อระบบสืบพันธุ์ของแม่สุกร นอกจากนี้แผ่นกระดาษรังผึ้งที่เปียกชื้น หรือเรียกว่า Cooling pad ซึ่งจะคอยดักจับฝุ่น ช่วยลดการแพร่ของเชื้อโรคที่ปนมากับฝุ่นได้ และเชื้อโรคจะไม่สามารถติดไปตามการระเหยของน้ำ และการหมุนเวียนอากาศภายในโรงเรือนมีความสม่ำเสมอจากอากาศภายนอก ผ่าน Cooling pad เข้าไปยังภายในโรงเรือน และมีพัดลมระบายเอาอากาศที่เสียภายในโรงเรือนออกไปภายนอกโรงเรือน และยังสามารถลดปัญหาในระดับของแอมโมเนียในโรงเรือนได้ (ศิษฐ์ พงษ์พิพัฒน์, 2554)

ในปัจจุบันผู้คนในสังคมให้ความสนใจเกี่ยวกับการบริโภคอาหารที่มีความปลอดภัยต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม เช่น สุกรที่เลี้ยงแบบอินทรีย์ ซึ่งเป็นการผลิตโดยทำให้สัตว์เกิดความเครียดที่น้อยที่สุด เลี้ยงสัตว์ให้มีสุขภาพที่ดี หลีกเลี่ยงการใช้ยาและสารเคมีในกระบวนการผลิต อย่างไรก็ตาม สุกรที่เลี้ยงแบบอินทรีย์จะถูกเลี้ยงในระบบโรงเรือนแบบเปิดและยังพบในเกษตรกรที่เลี้ยงสุกรรายย่อย เช่น สุกรที่เลี้ยงไว้หลังบ้าน ซึ่งข้อดีของระบบโรงเรือนแบบเปิด คือ มีต้นทุนในการก่อสร้างโรงเรือนที่ต่ำ สามารถใช้วัสดุที่หาได้ตามท้องถิ่น และก่อสร้างได้ง่ายไม่ซับซ้อน แต่ข้อเสีย คือ มีโอกาสเสี่ยงต่อการแพร่ระบาดของโรคติดต่อ

ที่ค่อนข้างสูง และไม่สามารถควบคุมอุณหภูมิภายในโรงเรือนได้เหมือนกับระบบโรงเรือนแบบปิด ซึ่งอุณหภูมิภายในโรงเรือนจะเหมือนกับภายนอกโรงเรือน โดยต้องอาศัยอุณหภูมิตามธรรมชาติเท่านั้น หากเป็นช่วงฤดูร้อนจะทำให้สุกรได้รับความร้อนสูง (อรรถนพ สุริยสมบุรณ์ และมงคล เตชะกำฟู, 2551)

แต่อย่างไรก็ตาม ความผันแปรของอุณหภูมิอากาศส่งผลกระทบต่อการผลิตปศุสัตว์ในเขตร้อนชื้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเลี้ยงสุกรเชิงการค้าในโรงเรือนระบบเปิด ซึ่งอุณหภูมิอากาศภายในโรงเรือน สามารถผันแปรไปตามอุณหภูมิอากาศแวดล้อม การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอากาศภายในโรงเรือน ทำให้เกิดความเครียดที่เกิดจากความร้อนในช่วงฤดูร้อน มีอิทธิพลต่อการให้ผลผลิตของแม่สุกรในช่วงแรกคลอด เช่น จำนวนลูกสุกรแรกคลอดมีชีวิต และจำนวนลูกสุกรที่สูญเสียอีกด้วย (Bloemhof, et al., 2013)

ความเครียดเนื่องจากความร้อนในสุกร

โดยปกติสุกรเป็นสัตว์ที่ไม่ทนต่อสภาพอุณหภูมิที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ต่างชนิด โดยสุกรมีวิธีการระบายความร้อน คือ การถ่ายเทความร้อนโดยอาศัยการระเหยของน้ำผ่านการหายใจเป็นหลัก (Evaporation) อันเนื่องมาจากสุกรเป็นสัตว์ที่มีต่อมเหงื่อค่อนข้างน้อยมาก ในขณะที่สุกรอาศัยอยู่ภายใต้บรรยากาศที่ร้อนจนเกินไป ทำให้เกิดความเครียดอย่างฉับพลัน (Acute heat stress) จากสภาวะอากาศร้อน ส่งผลทำให้สุกรตอบสนองต่อความเครียดจากความร้อน โดยการเปลี่ยนแปลงทางพฤติกรรม หรือการตอบสนองทางสรีรวิทยา โดยการตอบสนองอาจเป็นแบบชั่วคราว หรือแบบถาวรได้ ขึ้นอยู่กับการเพิ่มการระบายความร้อน (สมโภชน์ ทับเจริญ, 2555)

สภาพอากาศในประเทศไทย โดยเฉพาะในช่วงฤดูร้อน ซึ่งมีอุณหภูมิสูงถึง 42 องศาเซลเซียส ส่งผลให้สุกรเกิดความเครียด เนื่องจากความร้อนทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตสุกรลดลง ซึ่งก่อนหน้านี้ จากรายงานของ ภรณ์ โอฟาริกชาติ (2522) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมกับตัวสุกรนั้น ขึ้นอยู่กับอายุ และน้ำหนักตัวของสุกร โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในสุกรรุ่นต่าง ๆ จะต่างกัน ซึ่งถ้าเกินอุณหภูมิวิกฤตไปจะส่งผลกระทบต่อระบบการผลิตสุกร และส่งผลต่อระบบสืบพันธุ์ของสุกรด้วย (ตาราง 2)

ตาราง 2 แสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อสุกรในระยะต่าง ๆ

ชนิดสุกร	ช่วงอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
----------	-----------------------------

ระยะ	อายุ (สัปดาห์)	อุณหภูมิที่เหมาะสม	อุณหภูมิเริ่มวิกฤต
ลูกสุกรตัวนม	1-4	30-35	40
ลูกสุกรหย่านม	5-8	24-29	38
สุกรเล็ก-ขุน	9-21	18-23	36
พ่อ-แม่พันธุ์	-	15-20	36
แม่สุกรเลี้ยงลูก	-	15-20	36

ที่มา: ภรณ์ ไอบ์ฟาริกชาติ, 2522

การตอบสนองต่อความเครียดจากอุณหภูมิสูง

สภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า ระดับอุณหภูมิพอเหมาะที่สุกรต้องการ สุกรจะแสดงพฤติกรรมนอนสุ่มกันและมีอาการตัวสั่น กินอาหารมากขึ้น แต่อาหารจะถูกนำไปใช้ในการสร้างพลังงานความร้อนให้แก่ร่างกาย และเมื่ออุณหภูมิต่ำลงมาก สุกรอาจกินอาหารลดลง เพราะจะไม่สามารถเคลื่อนไหวลุกเดินไปกินอาหาร หรือทำกิจกรรมใด ๆ ในทางตรงกันข้ามเมื่อสภาพแวดล้อมมีอุณหภูมิสูงกว่าระดับอุณหภูมิพอเหมาะที่สุกรต้องการ สุกรจะแสดงพฤติกรรมการอยู่กระจ่ายกัน และหาที่เย็นนอน เล่นน้ำ กินอาหารลดลง และกินน้ำเพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพการใช้อาหารไม่ดี หากอุณหภูมิยังสูงขึ้น สุกรจะไม่กินอาหารเพื่อลดความร้อนของร่างกาย อาจทำให้สุกรหอบและอาจตายได้ในที่สุด (สมโภชน์ ทับเจริญ, 2555)

การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาต่อสภาพแวดล้อมที่ร้อน ทำให้สัตว์ตอบสนองโดยการเปลี่ยนแปลงการขับเหงื่อ และการเปลี่ยนแปลงในระบบหมุนเวียนเลือด สุกรเป็นสัตว์ที่ขับเหงื่อไม่ได้ เนื่องจากรูต่อมเหงื่อของสุกรมีคราตินอุดอยู่ แต่จะตอบสนองโดยวิธีอื่น ๆ เช่น การลดปริมาณของอาหารที่กินอย่างรวดเร็ว และลดอัตราการเมตาบอลิซึมในช่วงที่ได้รับความร้อน และยังสอดคล้องกับการรายงานของ Wegner, Lambertz and Gauly (2016) ที่รายงานว่า อุณหภูมิมีส่วนสำคัญต่อการจัดการภายในฟาร์ม หากจัดการได้ไม่ดีจะส่งผลให้สุกรเกิดความเครียดจากความร้อน และก่อให้เกิดความรุนแรงมากขึ้น ถ้ามีความชื้นในอากาศสูงตามไปด้วย หากสุกรได้รับอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม จะส่งผลกระทบต่อสุกร ทำให้สุกรกินอาหารได้น้อย น้ำหนักตัวลดลง แม่สุกรให้น้ำนมลดลง จำนวนลูกต่อครอกและน้ำหนักแรกคลอดต่ำ

อรรณพ คุณาวงกต (2545) รายงานว่า อุณหภูมิมีผลต่อการกินทุก ๆ 1 องศาเซลเซียสที่สูงขึ้นเกินกว่าอุณหภูมิพอเหมาะที่สุกรต้องการ สุกรจะกินอาหารลดลง 170 กรัมต่อวัน ซึ่งมีผลทำให้อัตราการเจริญเติบโตลดลง 25 กรัมต่อวัน อุณหภูมิยังมีผลต่อสุขภาพของสุกร และเกิดโรคแทรกซ้อนได้ง่าย กล่าวคือ ในสภาพอากาศร้อนชื้นของประเทศไทย สุกรจะแสดง

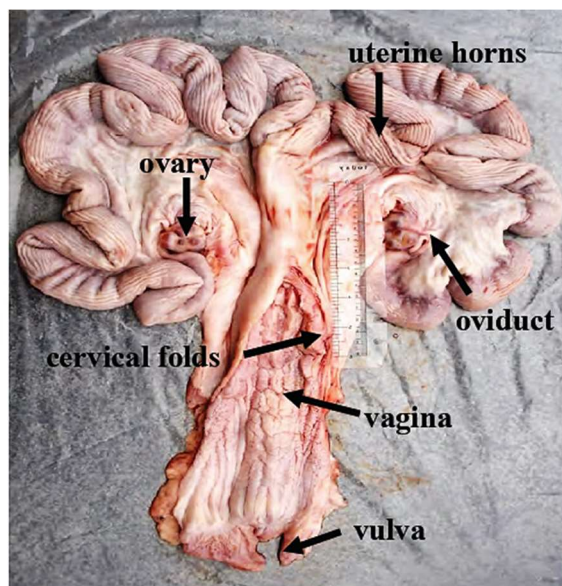
อาการหอบเพื่อระบายความร้อนออกจากร่างกาย ซึ่งส่งผลกระทบต่อสุขภาพและความเป็นอยู่ของสุกร เป็นที่ยอมรับกันทั่วไปว่า สุกรกินอาหารเพื่อให้ได้รับพลังงานให้เพียงพอกับความต้องการของร่างกาย และการกินอาหารจะเพิ่มขึ้นตามน้ำหนักตัว อย่างไรก็ตามอุณหภูมิของสภาพแวดล้อมจะมีอิทธิพลต่อค่าพลังงานที่สุกรได้รับเข้าไป และมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของสุกรด้วย โดยพบว่า เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นทำให้สุกรกินอาหารลดลง ซึ่งทำให้สุกรลดการผลิตความร้อนและเพิ่มกลไกการระบายความร้อนส่วนเกินออกจากร่างกาย นั่นคือ เป็นผลทำให้สุกรได้รับพลังงานลดลง ในขณะที่เดียวกันก็มีการใช้พลังงานเพื่อการดำรงชีพเพิ่มขึ้นส่วนหนึ่ง ทำให้อัตราการเจริญเติบโตของสุกรลดลง (Lopes, et al., 2003)

นอกจากนี้ Prunier, Dourmad and Etienne (1994) รายงานว่า ความเครียดจากความร้อนยังส่งผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ของสุกรอีกด้วย เช่น ส่งผลให้แม่สุกรสาวมีความสมบูรณ์ต่ำ อัตราการมีชีวิตรอดของลูกสุกรลดลง ภูมิคุ้มกันต่ำ อัตราการการพัฒนาดังกล่าวของตัวอ่อนลดลง ความสามารถในการปฏิสนธิลดลง ปริมาณการหลั่งอสุจิลดลง และยังส่งผลให้เกิดการตายของตัวอ่อนในระยะแรกของการตั้งท้องเป็นจำนวนมาก

เมื่อสัตว์อยู่ในสภาวะภายใต้ความเครียดที่เกิดจากความร้อน จะมีการตอบสนองทางสรีระวิทยาในสัตว์แต่ละสายพันธุ์ สัตว์แต่ละตัวที่แตกต่างกัน (Hansen, 2004) การรักษาสมาดุลของอุณหภูมิภายในร่างกาย ทำได้โดยวิธีการระบายความร้อนออกจากร่างกาย ได้แก่ อัตราการเต้นของหัวใจ และอัตราการขับเหงื่อเพิ่มขึ้น หากสัตว์เผชิญกับสภาวะความเครียดเนื่องจากความร้อนแล้ว สามารถปรับอุณหภูมิของร่างกายให้กลับเข้าสู่สภาวะปกติได้เร็ว แสดงว่าสัตว์นั้นมีความทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดี (Lopes, et al., 2003) รวมไปถึงกลไกการปรับตัวในระดับเซลล์ภายใต้ความเครียดเนื่องจากความร้อน พบว่า กลุ่มเซลล์มีการสร้างโปรตีนกลุ่ม Chaperones ที่เรียกว่า ฮีทช็อกโปรตีน (heat shock protein) โดยเฉพาะกลุ่มของฮีทช็อกโปรตีน 70 เพื่อรักษาโครงสร้างของโปรตีนภายในเซลล์ ทำให้โปรตีนในเซลล์ที่เสียหายม้วนพับให้กลับสู่สภาพปกติ และช่วยยับยั้งการตายของเซลล์ (Basirico, et al., 2011) หากเซลล์มีการสร้างฮีทช็อกโปรตีนในปริมาณมาก จะแสดงถึงความสามารถในการนำเซลล์กลับเข้าสู่สภาวะปกติ และทำให้ทนต่อความร้อนได้ดี (Kregel, 2002)

กายวิภาคของระบบสืบพันธุ์ในสุกรเพศเมีย

กายวิภาคของระบบสืบพันธุ์ในสุกรเพศเมีย ประกอบไปด้วย รังไข่ (ovary) ท่อนำไข่ (oviducts) ตั้วมดลูก (uterine body) ปีกมดลูก (uterine horn) คอมดลูก (cervix) ช่องคลอด (vagina) (ภาพ 1)

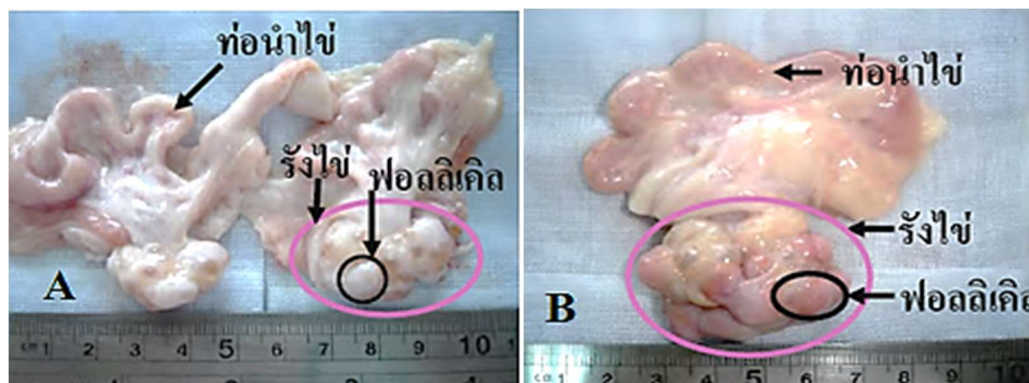


ภาพ 1 แสดงกายวิภาควิทยาของระบบสืบพันธุ์ของสุกร

ที่มา: วรณา เมธศาสตร์, 2552

รังไข่ (Ovary)

รังไข่เป็นอวัยวะที่สำคัญของเพศเมียในสุกร มีลักษณะคล้ายพวงองุ่น ซึ่งตั้งอยู่บริเวณด้านข้างของกระดูกเชิงกราน (pelvic inlet) สามารถขยับได้ตามพังพืด (broad ligament) ที่เชื่อมติดบริเวณภายในช่องท้อง (ภาพ 2) ซึ่งรังไข่จะมีทั้งหมด 2 ข้าง ซึ่งทำหน้าที่ในการผลิตเซลล์สืบพันธุ์หรือเรียกว่า เซลล์ไข่ หรือโอโอไซต์ (oocytes) และผลิตฮอร์โมนเพศ ซึ่งประกอบไปด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) โปรเจสเตอโรน (progesterone) และแอนโดรเจน (androgen) ซึ่งฮอร์โมนเหล่านี้มีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการสร้างเซลล์ไข่ การเจริญเติบโตเต็มที่ของเซลล์ไข่ และการตกไข่ (ovulation) (อรรรณพ คุณาวงกฤต, 2545)



ภาพ 2 แสดง (A) ท่อนำไข่ รังไข่ และฟอลลิเคิลของสุกรเพศเมียในระยะไม่เป็นสัด (ลูกศรชี้สีดำ) (B) ท่อนำไข่ รังไข่ และฟอลลิเคิลของสุกรเพศเมียในระยะเป็นสัด (ลูกศรชี้สีดำ)

ที่มา: วรณนา เมธศาสตร์, 2552

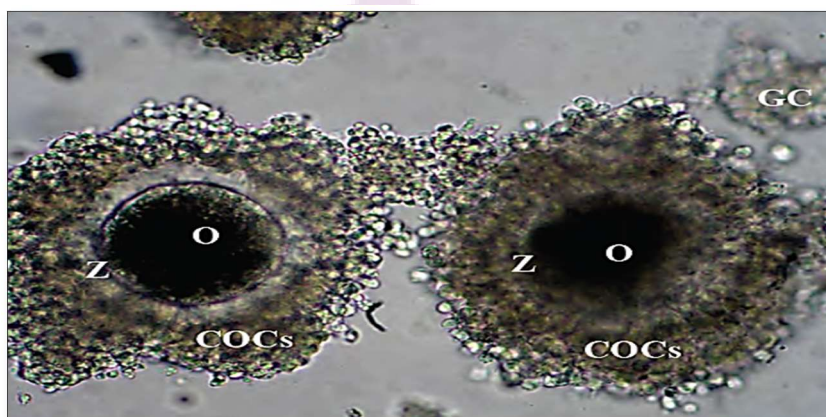
ลักษณะขนาดของรังไข่จะเปลี่ยนแปลงไปตามระยะ จำนวน และสภาพของถุงน้ำหุ้มไข่ และคอร์ปูลูเทีย (Corpola lutea) ตามปกติรังไข่มีลักษณะคล้ายวงอุ้งน (อรุณพ คุณาวงกต, 2545) ขนาดและน้ำหนักของรังไข่นั้นจะผันแปรได้ ขึ้นอยู่กับระยะของวงจรการสืบพันธุ์ Kunavongkrit, et al. (1987) รายงานว่า จากการสำรวจรังไข่ของสุกรสาวจากโรงฆ่าสัตว์ จำนวน 1,000 ตัว รังไข่ซ้ายมีขนาดใหญ่และมีน้ำหนักมากกว่าด้านขวา แสดงถึงการทำงานมากกว่าด้านขวา การศึกษาในสุกรสาวที่ไม่เคยเป็นสัดจะมีรังไข่หนักในช่วง 3.00 ถึง 3.30 กรัม โดยมีขนาด $1.8 \times 2.5 \times 1.1$ เซนติเมตร และสุกรที่เคยเป็นสัดจะมีรังไข่หนัก 6.20 ถึง 6.50 กรัม รอบรังไข่จะมีถุงหุ้มรังไข่โดยเฉพาะช่วงเป็นสัดถุงหุ้มจะคลุมรังไข่เอาไว้ รังไข่ทำหน้าที่หลักด้วยกัน 2 อย่าง คือ

1. ผลิตเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (gametogenic function) ที่เรียกว่าโอโอไซด์ หรือเซลล์ไข่ โดยกระบวนการสร้างโอโอไซด์ (oogenesis) รังไข่เป็นแหล่งสะสมของเซลล์ไข่ตั้งแต่แรกเกิดรวมทั้งการสร้างถุงไข่หรือฟอลลิเคิลด้วย

2. ผลิตฮอร์โมนเพศ (Endocrine function) ที่สำคัญ คือ ฮอร์โมนเอสโตรเจน (Estrogen) โปรเจสเตอโรน (Progesterone) และแอนโดรเจน (Androgen) ฮอร์โมนเหล่านี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างฟอลลิเคิล (Folliculogenesis) การเจริญของเซลล์ไข่พร้อมการปฏิสนธิ ซึ่งอยู่ระยะ Secondary oocyte การตกไข่ (Ovulation) และการปฏิสนธิ

เซลล์ไข่ซึ่งอยู่ในฟอลลิเคิลเมื่อเจริญเต็มที่ จะเกิดการตกไข่ ฟอลลิเคิลจะกลายเป็นคอร์ปอร่าลูเทีย ซึ่งผลิตฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน สำหรับเตรียมผนังมดลูกและควบคุมการตั้งท้อง ส่วนเซลล์ไข่ที่ตกจากรังไข่จะเข้าสู่ท่อนำไข่เพื่อรอการปฏิสนธิต่อไป

บริเวณเปลือกนอกกรอบเซลล์ไข่ เป็นสารพวกไกลโคโปรตีน ที่เรียกว่า โซน่า เพลลูซิด่า (zona pellucida) และมีเซลล์ล้อมรอบเซลล์ไข่หลายชั้น เรียกว่า เซลล์คิวมูลัส ซึ่งในสุกรเมื่อเซลล์ไข่อยู่ในระยะเซกันดารีฟอลลิเคิล จะมีเซลล์คิวมูลัสหนาประมาณ 10 ชั้น มีขนาดเท่ากับ 300 ไมโครเมตร ส่วนเซลล์ที่อยู่ล้อมรอบไข่ เรียกว่า เซลล์แกรนูโลซ่า ซึ่งสามารถผลิตฮอร์โมนเอสโตรเจนได้ (ภาพ 3) (มงคล เตชะกำพู, 2543)



ภาพ 3 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของฟอลลิเคิล โซน่าเพลลูซิด่า (Z) เซลล์ไข่ (O) เซลล์คิวมูลัส (COCs) และเซลล์แกรนูโลซ่า (GC)

ที่มา: วรณา เมธศาสตร์, 2552

การเจริญของฟอลลิเคิล

การเจริญของฟอลลิเคิลแบ่งเป็น 5 ระยะ ดังนี้

1. โพรมอดีล ฟอลลิเคิล (primordial follicles) ภายในฟอลลิเคิลชนิดนี้มี โพรแมรีโอไอไซต์ ซึ่งถูกรอบด้วยเซลล์ฟอลลิเคิลแบบเซลล์แบน ๆ ชั้นเดียว

2. ฟอลลิเคิลระยะแรก (primary follicles) เป็นฟอลลิเคิลที่พบมากที่สุดจากรังไข่ ประกอบด้วย เซลล์ไข่อ่อน คือ โพรแมรีโอไอไซต์ ที่ล้อมรอบด้วยเซลล์ฟอลลิเคิลแบบเซลล์รูปลูกบาศก์ หรือเซลล์รูปทรงกระบอกชั้นเดียว

3. ฟอลลิเคิลระยะที่สอง (secondary follicles หรือ maturing follicles) พัฒนาจากฟอลลิเคิลระยะแรก พบว่า ภายในประกอบด้วยเซลล์ไข่ที่มีไซโทพลาซึมเพอรินิวเคลียส ถัดออกมาจะมีเซลล์ฟอลลิเคิลแบบเซลล์หลายชั้นล้อมรอบเซลล์ไข่อยู่

4. ฟอลลิเคิลระยะที่สาม (tertiary follicles) ระยะนี้พบว่า มีการเจริญของฟอลลิเคิลโดยการเพิ่มจำนวนเซลล์แกรนูโลซาสร้างน้ำในถุงไข่ ทำให้มีช่องน้ำที่เรียกว่า แอนตรัม (antrum) ปรากฏขึ้น เมื่อฟอลลิเคิลมีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 200 ถึง 400 ไมโครเมตร ช่องว่างภายในฟอลลิเคิลเป็นผลของการหลั่งของเหลวจากเซลล์แกรนูโลซา ทำให้แยกเซลล์แกรนูโลซาเป็น 2 ส่วน คือ ชนิดแรกอยู่รอบ ๆ ผนังด้านในฟอลลิเคิล เป็นเซลล์แกรนูโลซาที่แท้จริง (true granulosa cells) และชนิดที่สองอยู่รอบ ๆ เซลล์ไข่ เรียกว่า คิวมูลัส โอโอพอรัส (cumulus oophorus) นอกจากนี้ยังมีเซลล์ชั้นรอบนอก เรียกว่า เซลล์ที่กำ (theca cells) แบ่งออกเป็น ที่กำชั้นใน (theca internal) และที่กำชั้นนอก (theca external) หุ้มรอบเซลล์แกรนูโลซาอีกที (แสดงภาพ 4) (มงคล เตชะกำฟู, 2543)

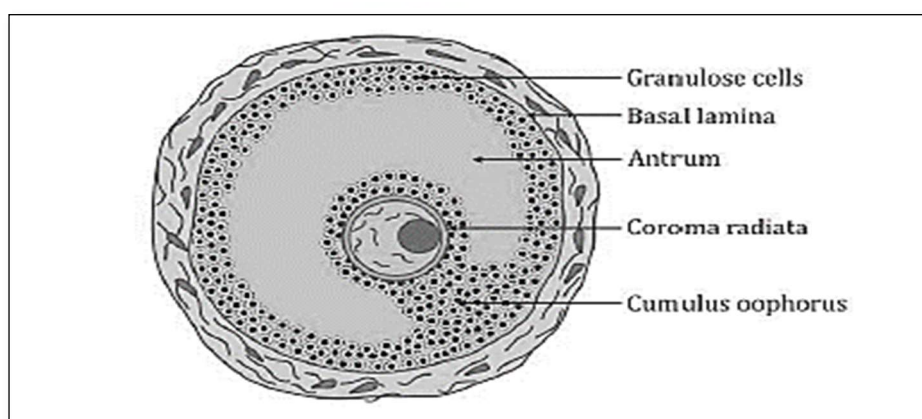


ภาพ 4 แสดงฟอลลิเคิลระยะที่สามพบช่องน้ำภายในเซลล์แกรนูโลซาที่มีการเจริญเบซัลลามิना (Basal lamina: BL) ที่กำชั้นใน (Theca internal: TI) ที่กำชั้นนอก (Theca external: TE)

ที่มา: วรรรณา เมธศาสตร์, 2552

5. กราเฟียน ฟอลลิเคิล (graafian follicle) หรือ ฟอลลิเคิลที่เจริญเต็มที่ (mature follicle) เป็นฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ และมีช่องว่างอยู่ภายในซึ่งเจริญเติบโตเต็มที่จนใกล้จะตก โดยฟอลลิเคิลนี้จะอยู่บริเวณริมส่วนขอบของรังไข่ เป็นฟอลลิเคิลระยะที่สามที่ได้รับอิทธิพลจากฮอร์โมน FSH และ LH จากต่อมใต้สมองส่วนหน้า ทำให้ฟอลลิเคิลระยะที่สาม พัฒนาไปเป็นกราฟเฟียนฟอลลิเคิล

ซึ่งเซลล์ไข่ระยะแรกภายในขณะพัฒนาเป็นเซลล์ไข่ระยะที่สองโดยการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส 1 พร้อมที่จะตกไข่ ขณะที่เซลล์ membrane granulosa ทำหน้าที่หลั่งเอสโตรเจนสู่น้ำในถุงไข่เพิ่มมากขึ้น และยังส่งผ่านสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย คือ ionnucleotides และกรดอะมิโนไปสู่เซลล์ไข่ ระยะแรกของสัตรีเพศเมียที่ยังไม่เจริญพันธุ์ สารนี้มีผลยับยั้งการสุกของเซลล์ไข่ จึงถูกเรียกว่า oocyte maturation inhibitor (OMI) ผลคือ เซลล์ไข่จะหยุดการแบ่งเซลล์ในระยะไมโอซิส กล่าวคือ เซลล์ไข่หยุดการพัฒนาอยู่ที่ระยะ diplotene ของโปรเฟส 1 มีผลทำให้เซลล์ไข่ไม่สามารถพัฒนาสู่เซลล์ระยะที่สองได้ (มงคล เตชะกำฟู, 2543) (ภาพ 5)

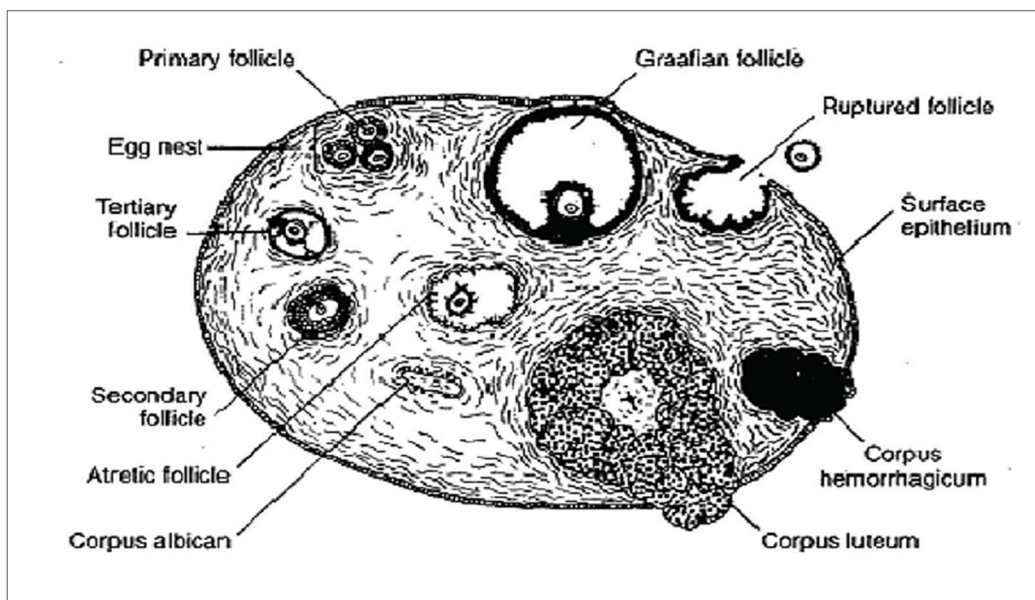


ภาพ 5 แสดงเซลล์ไข่ระยะกร่าเฟียล ฟอลลิเคิล

ที่มา: มงคล เตชะกำฟู, 2543

การเจริญของฟอลลิเคิลในสุกร ใช้เวลาประมาณ 84 วัน จากระยะไพรมอดีลฟอลลิเคิล จนถึงระยะแอนทรัลฟอลลิเคิล และอีกประมาณ 21 วัน จึงได้ขนาดของไข่พร้อมที่จะตก (มงคล เตชะกำฟู, 2543) ซึ่งฟอลลิเคิลระยะที่สอง พบว่า ขนาดของเซลล์ไข่จะเพิ่มมากขึ้น ในสุกรมีขนาด 90 ไมโครเมตร การเจริญของฟอลลิเคิลเหล่านี้นอกจากมีการเพิ่มจำนวนของ เซลล์แกรนูโลซ่า และการสะสมน้ำในถุงไข่แล้ว โครงสร้างของเซลล์ต่าง ๆ ยังถูกสร้างเพิ่มขึ้น รวมทั้งมีการสร้างเปลือกไซนาเพลลูซิด้าหุ้มเซลล์ไข่อีกด้วย หลังจากเกิดการตกไข่ เซลล์แกรนูโลซ่า ภายในแอนทรัลฟอลลิเคิลจะกลายเป็นเซลล์ลูเตียล เปลี่ยนลักษณะของฟอลลิเคิลเป็นคอร์ปัสฮีโม ราจิกัม (corpus haemorrhagicum) ในเวลาต่อมากลายเป็นคอร์ปัสลูเตียม และคอร์ปัสอัลบิแคน (corpus albicans) โดยเฉพาะคอร์ปัสลูเตียม หรือที่เรียกว่า ก้อนเนื้อเหลือง มีความสำคัญต่อ

ช่วงฤดูเตรียม ของวงจรกิจการเป็นสัดและการตั้งท้อง โดยทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (ภาพ 6) (มงคล เตชะกำพูน, 2543)



ภาพ 6 แสดงโครงสร้างภายในรังไข่แสดงระยะการพัฒนาของเซลล์ไข่

ที่มา: วรณนา เมธศาสตร์, 2552

ท่อนำไข่ (Oviduct)

ท่อนำไข่ (oviduct) ของสุกร มีความยาวประมาณ 15 ถึง 30 เซนติเมตร ท่อนำไข่เป็นอวัยวะคู่ที่แขวนอยู่ในช่องท้อง โดยมีเยื่อ mesosalpinx ยึดท่อนำไข่กับผนังลำตัว ท่อนำไข่จะถูกขดเป็นวง โดย mesosalpinx ทำให้เกิดกระพุ้งของเยื่อยึด เรียกว่า ovarian bursa โดยมีรังไข่อยู่ที่ปากกระพุ้ง ซึ่งท่อนำไข่ทำหน้าที่นำเซลล์ไข่ที่ตกจากรังไข่และอสุจิมาพบกันที่ท่อนำไข่ ในทิศทางที่ตรงกันข้ามกัน ฟริมเบรีย หรือกรวยปากแตร จะเป็นส่วนที่โอบกอดให้เซลล์ไข่ตกลงในอินฟันดิบูลัม จากนั้นไข่จะถูกส่งต่อไปยังแอมพูลล่าซึ่งเป็นส่วนที่ต่อกับฮิสทามัส และจะเกิดการปฏิสนธิกับอสุจิที่ส่วนแอมพูลล่า ซึ่งท่อนำไข่สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ส่วน คือ (ภาพ 7)

1. อินฟันดิบูลัม (Infundibulum) เป็นส่วนที่มีผนัง tunica mucosa หนาที่สุด ด้านปลายเป็นฟริมเบรีย (frimbriae) หรือปากแตร มีลักษณะคล้ายนิ้วมือเปิดอยู่เป็นทางเข้าใหญ่

และมีส่วนแคบติดอยู่กับปลายของปีกมดลูกในปลายอีกด้านหนึ่ง ซึ่งทำหน้าที่พับโบกให้เซลล์ไข่ ระยะกราวเพียน ฟอลลิเคิล ตกลงสู่ช่องว่างของท่อนำไข่

2. แอมพูล่า (ampulla) มีลักษณะค่อนข้างตรง เป็นส่วนที่มี tunica mucosa หนา และยาวมากที่สุด ด้านปลายติดกับอิสมัส เรียกส่วนนี้ว่า แอมพูลาริอิสมัสจังก์ชัน (Ampulla isthmus junction) การปฏิสนธิเกิดขึ้นที่ส่วนนี้

3. อิสมัส (isthmus) เป็นส่วนที่ต่อจากแอมพูล่าโดยมีปลายอีกด้านเชื่อมกับปีกมดลูก ตรงส่วนที่เรียกว่า uterotubal junction ท่อมีขนาดเล็ก และมีผนัง tunica muscularis ที่หนา ท่อส่วนนี้เป็นทางผ่านของตัวอ่อนหลังจากที่ได้รับการปฏิสนธิแล้ว ผ่านปีกมดลูกไปยังมดลูก (ไพศาล เทียนไทย, 2547)



ภาพ 7 แสดงลักษณะสัญญาณของท่อนำไข่ส่วนแอมพูล่า และอิสมัส ของสุกรเพศเมีย

นอกจากนี้ องค์ประกอบของท่อนำไข่ยังสามารถแบ่งออกเป็น 3 ชั้น ดังนี้

1. ผนังชั้นนอก (serous membrane)

2. ผนังชั้นกลาง (muscular layer)

3. ผนังชั้นใน (mucous membrane) ผนังด้านในของท่อนำไข่ ประกอบด้วย เซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ (oviductal epithelial cells) ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด

ชนิดแรก คือ ชนิดของเซลล์ที่มี ลักษณะรูปร่างคล้ายทรงกลม และไม่มีซีเลีย (non ciliated round shape epithelial cells) ซึ่งทำหน้าที่ในการหลั่งของเหลว และปรับสภาพแวดล้อมภายในท่อนำไข่ให้เหมาะสมสำหรับการปฏิสนธิ

ชนิดที่สอง คือ ชนิดของเซลล์ที่มีลักษณะเป็นทรงกระบอกที่มีซีเลีย (ciliated columnar epithelial cells) ซึ่งพบว่า เซลล์ชนิดนี้ทำหน้าที่คอยโบกพัดเซลล์ไข่และตัวอสุจิที่ผ่านไปยังส่วน ของ ท่อนำไข่ และช่วยในการขนส่งตัวอ่อนไปยังมดลูกเพื่อทำการฝังตัวต่อไป (ไพศาล เทียนไทย, 2547) (ภาพ 8)



ภาพ 8 แสดงลักษณะภายในของเยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่ส่องภายใต้กล้องอิเล็กตรอน แบบส่องกราด ประกอบด้วย Non ciliated round shape epithelial cells (สีม่วง), Ciliated columnar epithelial cells (สีเขียว)

ที่มา: ไพศาล เทียนไทย, 2547

ถ้าหากมีการอุดตันของท่อนำไข่หรือเกิดการงอและปิดกั้นทางส่งผ่านแล้ว อาจจะทำให้ การผสมติดต่ำ (Kunavongkrit, et al., 1987) รายงานความผิดปกติของท่อนำไข่จากสุกรสาว จากโรงฆ่า จำนวน 1,000 ตัว พบว่า ร้อยละ 4 มีความผิดปกติพบถึง ร้อยละ 3.9 มีการงอ และติดกันของท่อนำไข่ และร้อยละ 0.1 ท่อนำไข่มีสภาพเป็นถุงน้ำ ใน 2 กรณีดังกล่าว จะทำให้เกิดการผสมติดต่ำลงด้วย

มดลูก (Uterine)

มดลูกสุกร ประกอบด้วยสองส่วน ส่วนแรกตัวมดลูก (uterine body) มีลักษณะยาว ประมาณ 5 เซนติเมตร และส่วนที่สอง ปีกมดลูกมีลักษณะยึดหยุ่น และขดกันอยู่ในลักษณะ ที่คล้ายกับลำไส้ และมีความยาวประมาณ 1 ถึง 1.5 เมตร ซึ่งด้านนอกของของมดลูกจะเชื่อมติด กับพังพืดบริเวณช่องท้อง ซึ่งมีหลอดเลือดดำและแดงขนาดเล็กมากมาย ซึ่งหน้าที่ของมดลูก เป็นบริเวณที่ตัวอ่อนใช้ในการฝังตัว (Kunavongkrit and Larsson, 1983)

คอมมดลูก (Cervix)

เป็นส่วนที่เชื่อมต่อกับตัวมดลูก ซึ่งมีความยาวประมาณ 10 ถึง 15 เซนติเมตร และอีกด้านหนึ่งเชื่อมต่อกับบริเวณของช่องคลอด ซึ่งทำหน้าที่ในการเป็นตัวปิดปลายสิ่งค้ำของสุกรเพศผู้ขณะทำการผสมพันธุ์ ทำให้เพศผู้สามารถหลังน้ำเชื้อได้ โดยมักจะพบในช่วงระยะเวลาการเป็นสัดเท่านั้น ซึ่งเป็นอิทธิพลจากฮอร์โมนเอสโตรเจน (Kunavongkrit and Larsson, 1983) และยังทำหน้าที่ ในการป้องกันเชื้อโรคไม่ให้เข้าไปยังมดลูก และยังเป็นจุดที่ปล่อยน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์สุกร และเป็นที่ยกเก็บน้ำเชื้อไม่ให้น้ำเชื้อเกิดการไหลออกขณะที่พ่อพันธุ์ทำการผสมพันธุ์

ช่องคลอด (Vagina)

เป็นส่วนที่เชื่อมต่อกับคอมดลูก ซึ่งมีความยาวประมาณ 10 เซนติเมตร ซึ่งประกอบไปด้วยกล้ามเนื้อ 2 ชั้น ชั้นแรกส่วนผนังด้านในเป็นเยื่อเมือก (mucous membrane) ซึ่งเป็นประเภทที่ไม่มีต่อม โดยพบว่า ช่องคลอดทำหน้าที่เป็นอวัยวะที่ใช้รองรับอวัยวะของสุกรเพศผู้ขณะทำการผสมพันธุ์ และเป็นทางออกของลูกสุกรขณะคลอด (อรรณพ คุณนางกฤต, 2545)

วงจรการสืบพันธุ์ของสุกร

วงจรการสืบพันธุ์ของสุกรเพศเมีย เริ่มมีการพัฒนาโดยรังไข่ของลูกสุกรจะสร้างถุงหุ้มไข่เป็นแบบปฐมภูมิตั้งแต่ออยู่ในท้องแม่ หลังจากนั้น 70 วัน รังไข่จะเป็นแบบทุติยภูมิ หลังจากคลอดลูกสุกรที่มีอายุ 2 เดือน รังไข่จะเป็นแบบทุติยภูมิ และจะเริ่มพัฒนาอย่างรวดเร็ว เมื่อลูกสุกรอายุได้ 70 ถึง 100 วัน แต่ถุงหุ้มไข่ยังมีขนาดเล็ก 1 ถึง 3 มิลลิเมตร และจะมีการเจริญเติบโตอย่างช้า ๆ เป็นสัดส่วนกับน้ำหนักตัว จนกระทั่งโตเต็มวัย ขนาดของมดลูกจะใหญ่ขึ้นตามอายุ ภายหลังจากสุกรเจริญเติบโตเต็มที่จนเข้าสู่การเป็นหนุ่มเป็นสาวแล้ว จะถูกควบคุมโดยการทำงานของฮอร์โมนจากสมองส่วนไฮโปทาลามัส ซึ่งผลิตฮอร์โมนเอฟเอสเอชและแอลเอช ในขณะที่ สัตว์ยังเล็กอยู่ สมองส่วนนี้จะมีการพักตัว เมื่อร่างกายเจริญเติบโตขึ้น และอายุเข้าเกณฑ์ สมองส่วนนี้จะผลิตฮอร์โมนทั้งสองตัวเข้าควบคุมการทำงานของต่อมใต้สมองส่วนหน้า ทำให้การผลิตฮอร์โมนเอฟเอสเอชและแอลเอชเพิ่มขึ้น ซึ่งฮอร์โมนทั้งสองตัวนี้จะเข้าควบคุมการทำงานของรังไข่และลูกอัณฑะทันที ซึ่งฮอร์โมนเอฟเอสเอชจะกระตุ้นให้มีการสร้างถุงหุ้มไข่และการตกของไข่ในที่สุด การเพิ่มของฮอร์โมนแอลเอช จะเพิ่มตั้งแต่ 4 สัปดาห์ก่อนการเป็นสัด (heat) ครั้งแรกอย่างต่อเนื่องที่ละน้อยจนกระทั่งเป็นสัด (Anderson, Einarsson and Edqvist 1983) และระดับของเอสโตรเจน จะเพิ่มขึ้นในช่วง 5 ถึง 6 วันก่อนเป็นสัดครั้งแรกเท่านั้น ซึ่งไม่มีการขึ้นลงของฮอร์โมนเอสโตรเจนมาก่อน ถ้ามีการผสมพันธุ์จะทำให้รังไข่ผลิตฮอร์โมนเพศเมีย เพื่อแสดงอาการเป็นสัด และเตรียมมดลูกให้พร้อมตามปกติ

สุกรเพศเมียจะเริ่มมีการตกไข่และเป็นสัด รวมทั้งมีการยอมรับการผสมพันธุ์จากเพศผู้เมื่อโตเต็มวัยอายุประมาณ 180 ถึง 200 วัน หรือ 6 ถึง 7 เดือน แต่ไม่ควรทำการผสมก่อนอายุ 6 เดือน เพราะการเป็นสัดครั้งที่ 2 และ 3 จะมีการตกไข่เพิ่มขึ้นกว่าครั้งแรก หลังจากนั้นจะคงที่ (16 ถึง 18 ฟอง) ในระยะนี้ถ้ามีการสังเกตดูอวัยวะภายนอกของระบบสืบพันธุ์ สำหรับเพศเมียจะพบว่า มีความสมบูรณ์ของอวัยวะสืบพันธุ์ภายนอก และเต้านมมีขนาดโตได้รูปร่างและสัดส่วน แสดงว่ามีการทำงานของฮอร์โมนในการสืบพันธุ์เป็นไปโดยปกติ ส่วนแม่สุกรมักจะเป็นสัดภายใน 1 สัปดาห์หลังหย่านมลูก สำหรับรอบการเป็นสัด (estrous cycle) ของสุกรเฉลี่ย 21 วัน อรรถนพ คุณาวงกฤต (2545) รายงานว่า มีสุกรบางตัวแสดงการเป็นสัดเจียบหรือไม่เป็นสัดในฤดูกาลที่ร้อน การให้อาหาร และการจัดการที่ไม่สามารถย่นระยะวงจรการเป็นสัดลงได้ ในรอบการเป็นสัดจะพบว่า มีการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนเพศ พบว่า รังไข่ผลิตฮอร์โมนที่แตกต่างกันในแต่ละช่วง ซึ่งฮอร์โมนเพศที่เกี่ยวข้องมีโปรเจสเทอโรน เอสโตรเจน เอพเอสเอช แอลเอส และโปรสตาแกลนดิน ฮอร์โมนเหล่านี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในรังไข่แต่ละช่วงของการเป็นสัด

ระยะการเป็นสัดในสุกรนั้นขึ้นอยู่กับว่าเป็นสุกรสาวหรือแม่สุกร ในสุกรสาวมักจะสั้น คือประมาณ 1 วันเท่านั้น ส่วนในแม่สุกรประมาณ 2 ถึง 3 วัน (Wrothall, 1980) แม่สุกรอาจจะแสดงอาการเป็นสัดหลังคลอด โดยไม่มีการตกไข่ ซึ่งพบหลังคลอด 2 ถึง 5 วัน การเป็นสัดหลังคลอดนี้เนื่องจากการลดระดับของโปรเจสเทอโรน ในขณะที่ระดับของเอสโตรเจนในกระแสเลือดเพิ่งจะลดลงเนื่องจากการขับรกออก (Kunavongkrit, Karlberg and Einarsson, 1983)

กรณีผสมไม่ติดสุกรจะกลับเป็นสัดใหม่ทุก 21 วัน เรียกว่า วงรอบของการเป็นสัด ถ้าตั้งท้องหลังคลอดแล้วประมาณ 9 วัน จะเริ่มวงรอบของการเป็นสัดใหม่ ในการผสมพันธุ์สุกรเพศเมียต้องการน้ำเชื้อสูงถึง 50 มิลลิลิตร เป็นอย่างน้อยต่อการผสมหนึ่งครั้ง เนื่องจากปีกมดลูกของสุกรเพศเมียใหญ่และยาว รวมทั้งมีการตกไข่คราวละมาก ๆ และทำให้อัตราการผสมติดสูง ไม่ควรใช้พ่อพันธุ์ผสมมากกว่าสัปดาห์ละ 2 ถึง 3 ครั้ง เพราะจะทำให้น้ำเชื้อลดปริมาณลง รวมทั้งความหนาแน่นด้วย

วงจรการเป็นสัดแบ่งเป็นระยะต่าง ๆ มีการเจริญของฟอลลิเคิล ตามลำดับ ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนชนิดในกระแสเลือดที่สร้างมาจากต่อมใต้สมอง ได้แก่ ฮอร์โมนเอสโตรเจน เอพเอสเอช และแอลเอส ทำให้การเจริญของฟอลลิเคิล แบ่งเป็น 2 ระยะ

1. ระยะฟอลลิคูลาร์ (follicular phase) เป็นช่วงที่โกสัตกไข่คอร์ปัสลูเตียมสลายทำให้ฮอร์โมนโปรเจสเทอโรนอยู่ในระดับต่ำ ฮอร์โมนแอลเอสมีการหลั่งออกมาในลักษณะของความถี่

สูงมาก ช่วยให้ออกฤทธิ์เร็วขึ้นจนเกิดการตกไข่ได้ นอกจากนี้ระดับของฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ผลิตจากฟอลลิเคิลมีขนาดเพิ่มขึ้น มีผลต่อการกระตุ้นให้เกิดการตกไข่

2. ระยะลูเตียล (luteal phase) จะมีฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ที่ปรากฏตัวขึ้นมาแต่ไม่สามารถเจริญต่อไปจนตกไข่จึงเกิดการเสื่อมลง เนื่องจากฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่หลั่งจากคอร์ปัสลูเตียมในระดับสูง ในระยะลูเตียลไปลดความถี่ของ LH pulses และ GnRH pulses ทำให้ไม่มีฮอร์โมนแอลเอสในความถี่ที่สูงเพียงพอที่จะกระตุ้นให้เกิดการตกไข่ได้

วงรอบการเป็นสัด (Estrous Cycle)

วงรอบการเป็นสัด (Estrous Cycle) แบ่งเป็น 4 ระยะ

1. ระยะก่อนการเป็นสัด (proestrous) มีระยะเวลาประมาณ 4 วัน โดยที่คอร์ปัสลูเตียลจะสลายตัว ระดับโปรเจสเตอโรนลดลง เอพเอสเอส และแอลเอสมีการหมุนเวียนมากขึ้น ทำให้เซลล์ไข่เจริญเติบโตซึ่งอยู่กับฮอร์โมนสองตัวนี้ เซลล์ที่กำกวมนี้จะผลิตฮอร์โมนเพศเมียมากขึ้น ทำให้สุนัขเข้าสู่ระยะที่ 2

2. ระยะเป็นสัด (estrous or heat) มีระยะเวลาประมาณ 2 ถึง 4 วัน เนื่องจากอิทธิพลของฮอร์โมนเอสโตรเจนต่อระบบประสาท ทำให้เพศเมียแสดงอาการยอมรับเพศผู้ในการผสมพันธุ์ อวัยวะเพศบวมแดง เนื่องจากการเจริญเติบโตของเซลล์และการตั้งของโลหิตเกิดการตกไข่ในตอนปลาย ๆ ของการเป็นสัด ในการผสมควรผสม 2 ครั้งห่างกัน 12 ถึง 24 ชั่วโมง

3. ระยะหลังการเป็นสัด (metestrous) มีระยะเวลานานประมาณ 5 ถึง 7 วัน เป็นระยะเวลาที่เกิดการขยายตัวของคอร์ปัสลูเตียล การผลิตฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและเอสโตรเจนลดระดับลง ทำให้อวัยวะเพศหายบวมแดง แต่มีการเจริญของเซลล์เยื่อผนังมดลูกภายในโดยอิทธิพลของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเพื่อเตรียมรับตัวอ่อน และการบีบตัวของมดลูกลดลง

4. ระยะพักตัว (diestrous) มีระยะเวลาไม่ต่ำกว่า 10 วัน คอร์ปัสลูเตียลคงอยู่ในระยะต้น ๆ เมื่อไข่ไม่ได้รับการผสม คอร์ปัสลูเตียลจะสลายตัวในวันที่ 15 ถึง 16 ของวงรอบ และภายหลังจากนั้นวงรอบใหม่จะเริ่มขึ้น ถ้าไม่มีการผสมพันธุ์ ถ้าตัวอ่อนมีการเจริญเติบโตคอร์ปัสลูเตียลจะคงสภาพอยู่ซึ่งเป็นผลมาจากการเจริญเติบโตของรกและตัวอ่อน ตัวอ่อนก็สามารถพัฒนาตัวเองต่อไป เซลล์ไข่ที่ไม่ได้รับการผสมจะตายภายใน 8 ชั่วโมงหลังการตกไข่ และสลายตัวไปในที่สุด (อรรถนพ คุณาวางกฤต, 2545)

การตกไข่

ในสุนัขเป็นการตกไข่ตามธรรมชาติซึ่งเกิดขึ้นก่อนหมดการเป็นสัด ประมาณช่วงปลายของการเป็นสัด ประมาณ 24 ถึง 30 ชั่วโมง เวลาในการตกไข่มีความสำคัญมากต่อการผสมพันธุ์

การผสมในช่วงที่ไม่เหมาะสมทำให้เกิดการผสมไม่ติดหรือตัวอ่อนที่ได้คุณภาพไม่ดี (มงคล เดชะกำพุ, 2543) การตกไข่จะเกิดขึ้นหลังจากที่มีการผลิตฮอร์โมนเอสโตรเจนออกมาจากฟอลลิเคิลในปริมาณสูง จะไปกระตุ้นให้เกิดปริมาณแอลเอสสูง พบได้ประมาณ 36 ถึง 42 ชั่วโมง ก่อนที่จะเกิดการตกไข่เกิดขึ้น ช่วงระยะเวลาทั้งหมดตั้งแต่เกิดการตกไข่ใบแรกจนถึงใบสุดท้ายใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง ระยะเวลาในการตกไข่เริ่มตั้งแต่สุกรเริ่มยืนนิ่งจนถึงการตกไข่ มีความแตกต่างกันระหว่างสุกรสาวและแม่สุกร คือ ในสุกรสาวจะใช้เวลาประมาณ 32 ชั่วโมง และแม่สุกรใช้เวลาประมาณ 40 ชั่วโมง นอกจากนี้ระยะเวลาในการตกไข่ในแต่ละรอบของวงจรการเป็นสัดจะมีค่าใกล้เคียงกัน แต่โดยทั่วไปประมาณกันว่าการตกไข่เกิดขึ้น 2 ใน 3 ของระยะเวลาทั้งหมดที่สุกรแสดงอาการยืนนิ่ง (duration of estrous) (กัมพล แก้วเกษ, 2548) และระยะเวลาทั้งหมดที่สุกรแสดงอาการยืนนิ่งนั้น แปรผันตามระยะเวลาตั้งแต่หย่านมจนถึงสุกรเริ่มแสดงอาการยืนนิ่ง กล่าวคือ สุกรตัวใดมีอาการนี้ (ประมาณ 3 วัน) จะแสดงอาการเป็นสัดนาน และทำให้ระยะเวลาในการตกไข่นานกว่ากลุ่มสุกรที่มีอาการนี้ยาว (5 ถึง 7 วัน) ดังนั้นจะเห็นว่าระยะเวลาในการตกไข่มีความสำคัญมาก เนื่องจากเซลล์ไข่มีอายุสั้น เพียง 8 ถึง 12 ชั่วโมงหลังการตกไข่ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอสุจิที่มีอายุได้ประมาณ 24 ชั่วโมงหลังจากเข้าไปในโพรงมดลูก เพราะฉะนั้นถ้าระยะเวลาที่ทำการผสมสุกรไม่เหมาะสม จะทำให้ไม่เกิดการปฏิสนธิ หรือเกิดขึ้นได้แต่ตัวอ่อนไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้ หลังจากนั้นจะค่อย ๆ ตายไป ดังนั้นเวลาจะผสมสุกรควรทำการผสมอย่างน้อยหนึ่งครั้งก่อนที่จะเกิดการตกไข่ เนื่องจากตัวอสุจิของสุกรต้องใช้เวลาประมาณ 3 ถึง 6 ชั่วโมง จึงจะมีความสามารถในการปฏิสนธิกับโอโอไซด์ได้ อัตราการตกไข่ของสุกรเป็นปัจจัยสำคัญในการกำหนดขนาดของครอก (litter size) ในรังไข่ของสุกรมีฟอลลิเคิลหลายร้อยใบในวงรอบของการเป็นสัด แต่มีฟอลลิเคิลเพียง 10 ถึง 20 ใบเท่านั้นที่จะเติบโตไปเป็น pre-ovulatory follicles ในสุกรสาวจะมีอัตราการตกไข่น้อยกว่าแม่สุกร (8 ถึง 10 และ 10 ถึง 20) (อรธณพ คุณาวงกต, 2545) ซึ่งสอดคล้องกับ Anderson, Einarsson and Edqvist (1983) รายงานว่า สภาพการตกไข่ไม่เท่ากัน โดยการตกไข่มีมากขึ้นเมื่อเป็นสัดครั้งหลัง ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับการตกไข่ครั้งแรก

พัฒนาการของฟอลลิเคิลในรังไข่

หลังการปฏิสนธิตัวอ่อนจะมีการพัฒนาก้าวหน้าเป็นลำดับ มีการสร้างเนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ อย่างต่อเนื่อง ในตัวอ่อนสุกรเพศเมีย ส่วนที่พัฒนาไปเป็นรังไข่จะประกอบด้วยเซลล์และเนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น จะมีส่วนที่เป็นฟอลลิเคิลในระยะแรกตั้งแต่เป็นตัวอ่อนเรียกว่า primordial follicle ซึ่งจะมีการพัฒนาต่อเนื่องกันไปเรื่อย ๆ จนระยะก่อนคลอด หลังคลอดและวัยเจริญพันธุ์ ในระยะวัยเจริญพันธุ์โดยธรรมชาติเป็นระยะที่โอโอไซด์ ในฟอลลิเคิลจะสามารถ

ปฏิสนธิกับอสุจิได้ในหนึ่งช่วงชีวิตของสุกรเพศเมีย รังไข่จะมีฟอลลิเคิลเป็นจำนวนมาก ขนาดและน้ำหนักของรังไข่นั้นจะผันแปรได้ขึ้นอยู่กับระยะของวงจรการสืบพันธุ์

จากการสำรวจรังไข่ของสุกรสาวจากโรงฆ่าสัตว์ จำนวน 1,000 ตัว รังไข่ด้านซ้ายมีขนาดใหญ่และมีน้ำหนักมากกว่าด้านขวา แสดงถึงการทำงานมากกว่าด้านขวา ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Einarsson and Gustafsson (1970) ฟอลลิเคิลประกอบด้วยเซลล์ต่าง ๆ thecal cell เป็นเซลล์ที่อยู่รอบ ๆ ฟอลลิเคิลสามารถผลิตฮอร์โมน testosterone ซึ่งเป็นฮอร์โมนเพศผู้ โดยเป็นการตอบสนองต่อฮอร์โมน Luteinizing hormone (LH) จากต่อมใต้สมอง เมื่อตกไข่แล้ว เซลล์นี้จะเปลี่ยนไปเป็น thecal lutein cells เป็นเซลล์ที่อยู่ด้านในของฟอลลิเคิลขณะเจริญเติบโต granulosa cells จะเปลี่ยน testosterone ที่ผลิตจาก thecal cells ไปเป็น estradiol หลังการตกไข่ granulosa cells จะเปลี่ยนสภาพเซลล์ไปเป็น luteinized granulosa cells หรือ antral luteum (CL) ซึ่งจะทำหน้าที่ผลิต progesterone เมื่อฟอลลิเคิลเจริญขึ้นมีช่องว่างภายใน หรือ antral follicle granulosa cells ที่หุ้มโอโอไซต์ จะเห็นเป็นดิ่งยื่นเข้าไปภายในช่องว่างฟอลลิเคิล กลุ่มเซลล์ส่วนนี้เรียกว่า cumulus oophorus การเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลจนถึงขั้นตกไข่ จะมีการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ทั้งในระดับเซลล์และโมเลกุลของเซลล์ต่าง ๆ ที่ประกอบเป็นฟอลลิเคิล เหตุการณ์เหล่านี้ถูกควบคุมด้วยปัจจัยต่าง ๆ ทั้งจากรังไข่ฟอลลิเคิล และฮอร์โมน (อรรถนพ คุณาวงกฤต, 2545)

เทคโนโลยีระบบสืบพันธุ์

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ในหลอดทดลอง (*In vitro* oocytes maturation)

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ในหลอดทดลอง (*in vitro* maturation; IVM) เป็นพื้นฐานในการผลิตตัวอ่อนในหลอดทดลอง และช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ทำได้เร็วขึ้น ซึ่งวิธีนี้เป็นที่ยอมรับจากนักวิจัย (Lim, Fukui and One, 1992; Kidson, et al., 2003) ทำได้โดยการนำเซลล์ไข่จากแม่สุกรซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี ไม่ว่าจะเป็นการนำเซลล์ไข่ของสุกรที่มาจากโรงเชือด หรือทำการกระตุ้นการตกไข่หลายใบให้ไข่ที่มากกว่าธรรมชาติ โดยนำมาเลี้ยงในอาหารในหลอดทดลอง จนได้ไข่ที่มีการพัฒนาไปจนถึงระยะ metaphase II ซึ่งเป็นระยะเหมาะสมที่สุดต่อการปฏิสนธิกับอสุจิ โดยมีจุดประสงค์เพื่อเพิ่มจำนวนในการผลิตตัวอ่อน เพิ่มอัตราการตั้งท้อง หรือทำการแช่แข็งเพื่อรักษาพันธุกรรมไว้ใช้ประโยชน์ในอนาคต จากรายงานก่อนหน้าของ Kidson, et al. (2003) รายงานว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ในหลอดทดลอง เปรียบเทียบกับไข่ในร่างกาย พบว่า การทำ IVM ในหลอดทดลอง ทำให้ไข่มีลักษณะและคุณภาพที่ดีกว่า โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของไข่ที่ทำ IVM ($149.43 \pm 0.60 \mu\text{m}$) มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ไข่ที่ได้จากร่างกาย ($146.96 \pm 0.60 \mu\text{m}$) และยังพบว่าขนาดของ perivitelline space มีขนาดที่หนากว่า ($4.25 \pm 0.21 \mu\text{m}$) ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อเปรียบเทียบกับไข่ในร่างกาย ($2.60 \pm 0.23 \mu\text{m}$) ซึ่งจะนำไปสู่อัตราการปฏิสนธิกับอสุจิที่เพิ่มขึ้นในขั้นตอนของการปฏิสนธิในหลอดทดลองต่อไป

การปฏิสนธิในหลอดทดลอง (*In vitro fertilization*)

การปฏิสนธิในหลอดทดลอง เป็นเทคโนโลยีที่ช่วยในการเจริญพันธุ์ และประสบความสำเร็จแล้วในสัตว์หลายชนิด เช่น สุนัข (Biswas, et al., 2011; Kim, et al., 2017) กระบือ (Saikhun, et al., 2008) และโค (Ellington, et al., 1990; Lim, et al., 1992) และสามารถช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ทำได้เร็วขึ้น ทำได้โดยการนำเซลล์ไข่จากสุกรโดยวิธีกระตุ้นการตกไข่หลายใบหรืออาจทำการเก็บไข่มาจากโรงเชือด จากนั้นนำเซลล์ไข่มาเลี้ยงในหลอดทดลอง จนไข่มีการเจริญเติบโตพร้อมปฏิสนธิ แล้วนำอสุจิมาปฏิสนธิกับไข่ในหลอดทดลอง แล้วทำการเลี้ยงจนตัวอ่อนมีการพัฒนาจนถึงระยะ blastocyst ซึ่งเป็นระยะที่พร้อมฝังตัว จากนั้นนำไปย้ายฝากไปยังแม่ตัวรับ หรือทำการแช่แข็งเก็บไว้เพื่อใช้ในอนาคตต่อไป (Biswas, et al., 2011; Kim, et al., 2017) ซึ่งวิธีนี้สามารถปรับปรุงประสิทธิภาพของระบบสืบพันธุ์ในสุกรได้ และยังช่วยแก้ปัญหาในแม่สุกรที่มีความบกพร่องทางระบบสืบพันธุ์ เช่น ความบกพร่องในการตกไข่และการปฏิสนธิในระบบสืบพันธุ์สัตว์เพศเมีย แต่อย่างไรก็ตามจากรายงานก่อนหน้า พบว่า การปฏิสนธิในหลอดทดลองในสุกรยังมีผลสำเร็จค่อนข้างต่ำ (ตาราง 3)

ตาราง 3 แสดงอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนสุกรในระยะ Blastocyst หลังจากปฏิสนธิในหลอดทดลอง

เอกสารอ้างอิง	อัตราการพัฒนาของตัวอ่อนในระยะ blastocyst
Wright et al., 1995	22 %
Kidson et al., 2003	24 %
Chen et al., 2007	25 %
Biswas et al., 2011	34.32 %
Kim et al., 2017	40 %

ที่มา: Wright, et al., 1995; Kidson, et al., 2003; Chen, et al., 2007; Biswas, et al., 2011; Kim, et al., 2017

การเพิ่มอัตราการพัฒนาของเซลล์ไข่ และตัวอ่อนที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ในหลอดทดลอง

ปัจจุบันสามารถปรับปรุงประสิทธิภาพของการทำ IVM และ IVF โดยนำเยื่อบุผิวท่อนำไข่มาเลี้ยงร่วมกับไข่และตัวอ่อน จากรายงานก่อนหน้า (Kidson, et al., 2003) พบว่า เยื่อบุผิวท่อนำไข่

มีหน้าที่ในกลไกการพัฒนาของตัวอ่อนหลาย ๆ อย่าง ในระบบสืบพันธุ์เพศเมีย เช่น การขนส่งของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมีย (Fazeli, et al., 1999) มีการหลั่งของเหลวที่ช่วยเตรียมความพร้อมของสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับการปฏิสนธิระหว่างอสุจิกับเซลล์ไข่ (Romar, et al., 2001) ช่วยในการขนส่งตัวอ่อนไปยังมดลูก (Georgiou, et al., 2005) และเพิ่มการพัฒนาของตัวอ่อน โดยเยื่อหุ้มตัวอ่อนนำไข่จะผลิตโปรตีน และปัจจัยที่ช่วยในการเจริญเติบโตให้กับตัวอ่อน เช่น growth factors insulin-like growth factor (IGF), epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor (TGF) และ fibroblast growth factors (FGFs) ที่ทำหน้าที่กระตุ้นการพัฒนาของตัวอ่อนในระยะแรกของการตั้งท้อง (Chen, et al., 2007) และช่วยกระตุ้นการพัฒนาของตัวอ่อนก่อนฝังตัวไปยังมดลูก จากการศึกษาก่อนหน้านี้ Kidson, et al. (2003) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเยื่อหุ้มตัวอ่อนนำไข่ที่เลี้ยงร่วมกับไข่ในหลอดทดลอง เปรียบเทียบกับเซลล์ไข่ที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีการเสริมเยื่อหุ้มตัวอ่อนนำไข่ พบว่า ขนาดของเซลล์ไข่ที่เลี้ยงร่วมกับเยื่อหุ้มตัวอ่อนนำไข่ ($150.43 \pm 0.64 \mu\text{m}$) มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ไข่ที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีการเสริมเยื่อหุ้มตัวอ่อนนำไข่ ($149.60 \pm 0.30 \mu\text{m}$) และยังพบว่า ความหนาของ perivitelline space ของเซลล์ไข่ที่เลี้ยงร่วมกับเยื่อหุ้มตัวอ่อนนำไข่ ($4.40 \pm 0.30 \mu\text{m}$) มีความหนามากกว่าเซลล์ไข่ที่ไม่เสริมเยื่อหุ้มตัวอ่อนนำไข่ ($4.25 \pm 0.21 \mu\text{m}$) และได้ทำการศึกษาการพัฒนาของตัวอ่อนที่เลี้ยงร่วมกับเยื่อหุ้มตัวอ่อนนำไข่ พบว่า ตัวอ่อนที่เลี้ยงร่วมกับเยื่อหุ้มตัวอ่อนนำไข่ในระยะ blastocyst (27%) มีอัตราการพัฒนาที่ดีกว่าตัวอ่อนที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีการเสริมเยื่อหุ้มตัวอ่อนนำไข่ (19%) และเมื่อนำตัวอ่อนในระยะ blastocyst มาแยกดูจำนวนเซลล์ พบว่า ตัวอ่อนในระยะ blastocyst ที่เลี้ยงร่วมกับเยื่อหุ้มตัวอ่อนนำไข่ (47%) มีจำนวนเซลล์ที่มากกว่าตัวอ่อนที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีการเสริมเยื่อหุ้มตัวอ่อนนำไข่ (40%) นอกจากนี้ยังพบว่า ลักษณะของคิวมูลัสเซลล์ (cumulus cell) มีลักษณะติดกันแน่นแบนแผ่กระจาย ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เซลล์ไข่ที่มีการล้อมของเซลล์ที่เลี้ยงมากเท่าไร ก็แสดงถึงความแข็งแรงของไข่มากเท่านั้น

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

แผนการทดลอง ขั้นตอน และวิธีการในการเก็บรวบรวมข้อมูล

1. สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง

สุกรที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ เป็นสุกรสายพันธุ์ที่ใช้ทางการค้า จากโรงฆ่าสัตว์ของเทศบาลท้องถิ่น จังหวัดพะเยา

2. หมายเลขสัตว์ทดลอง

เลขที่คำขอรับใบอนุญาตใช้สัตว์ UP-AE60-01-01-002 วันที่ 23 กุมภาพันธ์ 2560

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลลักษณะทางสัณฐานวิทยา และอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุผิวในท่อหน้าไขที่ได้รับอุณหภูมิร้อนที่แตกต่างกัน

1. สถานที่

- 1.1 โรงฆ่าสัตว์ อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา
- 1.2 ห้องปฏิบัติการคณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ

2. ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

- 2.1 ท่อนำไขสุกร
- 2.3 เซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- 3.1 กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereo microscope)
- 3.2 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)
- 3.3 เครื่องกรองน้ำระบบดีไอ (Deionization system)
- 3.4 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Balance)
- 3.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
- 3.6 ขวด Duran ขนาด 200 ml และ 1000 ml
- 3.7 จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 mm. (Cell culture dish 60 mm.)
- 3.8 ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (laminar air flow cabinet)

- 3.9 ชุดเครื่องมือผ่าตัด (Surgical tool set)
- 3.10 กล้องถ่ายภาพที่เชื่อมต่อก้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ
- 3.11 ฮีโมไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer)
- 3.12 เครื่องนึ่งความดัน (Autoclave machine)
- 3.13 พาสเจอร์ปิเปต (Pasteur pipette)
- 3.14 แผ่นกรองเชื้อโรคแบคทีเรีย (Filter membrane)
- 3.15 ตู้เย็น (Refrigerator)
- 3.16 พาสเจอร์ปิเปตแก้ว (Glass pasture pipettes)
- 3.17 Tube cattish mouth piece
- 3.18 Conical tube ขนาด 15 ml และ 20 ml
- 3.19 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
- 3.20 กระดาษทิชชู (Tissue paper)
- 3.21 ไส้ริงค์ขนาด 20 ml (Syring 20 ml)

4. สารเคมีและสารตั้งต้นที่ใช้ในการทดลอง

- 4.1 น้ำกลั่น Distilled water
- 4.2 Normal saline 0.9%
- 4.3 Phosphate buffer saline
- 4.4 Ethyl alcohol 70%
- 4.5 DMEM medium
- 4.6 ABAM
- 4.7 10% fetal bovine serum
- 4.8 Sodium bicarbonate
- 4.9 Trypan blue stain
- 4.10 Fetal bovine serum
- 4.11 Trypsin EDTA

**การทดลองที่ 2 ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ไข่ และการขยายของเซลล์
ตัวมดที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุผิวในท่อนำไข่ที่ได้รับอุณหภูมิแตกต่างกัน**

1. สถานที่

- 1.1 โรงงานสัตว์ อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา
- 1.2 ห้องปฏิบัติการคณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ

2. ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

- 2.1 ท่อนำไข่อสุกร
- 2.2 รังไข่อสุกร
- 2.3 เซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่
- 2.4 เซลล์ไข่

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

- 3.1 กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereo Microscope)
- 3.2 เครื่องกรองน้ำระบบดีไอ (Deionization system)
- 3.3 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Balance)
- 3.4 ขวดแก้ว Duran ขนาด 1000 ml และ 200 ml
- 3.5 จานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 mm (Cell culture dish 60 mm)
- 3.6 Cell culture dish 4 well
- 3.7 ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (laminar air flow cabinet)
- 3.8 ชุดเครื่องมือผ่าตัด (Surgical tool set)
- 3.9 กล้องถ่ายภาพที่เชื่อมต่อกับกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ
- 3.10 เครื่องนึ่งความดัน (Autoclave machine)
- 3.11 พาสเจอร์ปิเปต (Pasteur pipette)
- 3.12 แผ่นกรองเชื้อโรคแบคทีเรีย (Filter membrane)
- 3.13 ตู้เย็น (Refrigerator)
- 3.14 พาสเจอร์ปิเปตแก้ว (Glass pasture pipettes)
- 3.15 สายดูดไข่ (Tube cattish mouth piece)
- 3.16 Conical tube ขนาด 15 ml และ 20 ml
- 3.17 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
- 3.18 กระดาษทิชชู (Tissue paper)
- 3.19 เข็มฉีดยาเบอร์ 18 (Needle 18)
- 3.20 ไซริงค์ขนาด 10 และ 20 ml (Syringe 10 and 20 ml)

4. สารเคมีและสารตั้งต้นที่ใช้ในการทดลอง

- 4.1 น้ำกลั่น Distilled water
- 4.2 Normal saline 0.9%
- 4.3 Phosphate buffer saline

- 4.4 Ethyl alcohol 70%
- 4.5 M199 + Hepes
- 4.6 Penicilin–Streptomycin
- 4.7 10% fetal bovine serum
- 4.8 Sodium bicarbonate
- 4.9 Trypan blue stain
- 4.10 0.2% Hyaluronidase
- 4.11 Human Chorionic gonadotropin (hCG)
- 4.12 Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG)
- 4.13 Pyruvate
- 4.14 β -ME
- 4.15 Cyclic AMP (cAMP)
- 4.16 Epidermal growth factor (EGF)
- 4.17 Porcine follicular fluid (PFF)

การวางแผนการทดลอง

ทำการศึกษาดัวอย่างรังไข่และท่อไข่ ในสุกรทั้งหมด 300 ตัว โดยจัดการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design; CRD) โดยมีทั้งหมด 3 กลุ่มการทดลอง (Treatment) แต่ละการทดลองแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มมี 3 ซ้ำ (Replication) โดยการทดลองที่ 1 ใช้ตัวอย่างท่อไข่จากสุกรทั้งหมด 16 ตัว และการทดลองที่ 2 ใช้ตัวอย่างรังไข่จากสุกรทั้งหมด 286 ตัว

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลลักษณะทางสัณฐานวิทยา และอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุผิวท่อไข่ที่ได้รับอุณหภูมิร้อน (Expose heat shock; EHS) ที่แตกต่างกัน โดยแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มทดลอง (Treatment) ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 เซลล์เยื่อบุผิวท่อไข่ EHS 38.5 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (Control)
- กลุ่มที่ 2 เซลล์เยื่อบุผิวท่อไข่ EHS 38.5 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Control)
- กลุ่มที่ 3 เซลล์เยื่อบุผิวท่อไข่ EHS 40 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง
- กลุ่มที่ 4 เซลล์เยื่อบุผิวท่อไข่ EHS 40 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- กลุ่มที่ 5 เซลล์เยื่อบุผิวท่อไข่ EHS 42 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง
- กลุ่มที่ 6 เซลล์เยื่อบุผิวท่อไข่ EHS 42 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลพื้นฐานทำการใช้โปรแกรม R เวอร์ชัน 3.2.5 โดยอัตราการมีชีวิตรอดของเยื่อบุผิวท่อนำไข่ มาทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ least significant difference (LSD) โดยกำหนดความเชื่อมั่นที่ 99% ($P\text{-value} \leq 0.01$)

การทดลองที่ 2 ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ไข่ และการขยายของเซลล์คิวมูลัสที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่ได้รับอุณหภูมิแตกต่างกัน โดยแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มทดลอง (Treatment) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เซลล์ไข่เลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ EHS 38.5 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (Control)

กลุ่มที่ 2 เซลล์ไข่เลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ EHS 38.5 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Control)

กลุ่มที่ 3 เซลล์ไข่เลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ EHS 40 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 4 เซลล์ไข่เลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ EHS 40 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 5 เซลล์ไข่เลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ EHS 42 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 6 เซลล์ไข่เลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ EHS 42 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลพื้นฐานทำการใช้โปรแกรม R เวอร์ชัน 3.2.5 โดยอัตราการพัฒนาของเซลล์ไข่ และความหนาของเซลล์คิวมูลัส มาทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบ least significant difference (LSD) โดยกำหนดความเชื่อมั่นที่ 95% ($P\text{-value} \leq 0.05$)

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลลักษณะทางสัณฐานวิทยา และอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่ได้รับด้วยอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

1. ขั้นตอนการเก็บและเตรียมตัวอย่าง

ทำการประสานไปยังโรงฆ่าสัตว์ในจังหวัดพะเยา จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างท่อนำไข่จากสุกรสาวทั้งหมด 18 ตัว อายุประมาณ 3-4 เดือน น้ำหนักประมาณ 90-100 กิโลกรัม โดยทำการเก็บท่อนำไข่และรังไข่ของสุกรสาว ด้วยการสวมถุงมือที่สะอาด และใช้ใบมีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้ว ตัดรังไข่และท่อนำไข่จากซากของสุกรสาวที่เพิ่งตายใหม่ จากนั้นนำท่อนำไข่และรังไข่ มาล้างด้วย Normal saline ที่ประกอบด้วย Sodium chloride ที่ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ ที่มีการเสริม Antibiotic-Antimycotic (AB-AM) 1 ครั้ง และนำท่อนำไข่และรังไข่ แช่ใน Normal saline

ในกระดิกที่ปรับอุณหภูมิไว้ที่ประมาณ 35–38 องศาเซลเซียส และนำตัวอย่างกลับไปห้องปฏิบัติการ ภายใน 1 ชั่วโมง

2. การเตรียม Phosphate buffer saline (PBS)

เตรียมสารละลาย PBS ซึ่งประกอบไปด้วย NaCl 8.0 กรัม, KCl 0.2 กรัม, Na₂HPO₄ 1.25 กรัม และ KH₂PO₄ 0.2 กรัม ทำได้โดยนำมาละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน (Deionized water) 1 ลิตร จากนั้นนำไป Autoclave ที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งใช้งาน

3. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุผิวท่อหน้าไข

เตรียมอาหารเลี้ยงเยื่อบุผิวท่อหน้าไขในตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow hood) ซึ่งในงานวิจัยนี้ ใช้อาหารเลี้ยงเยื่อบุผิวท่อหน้าไข คือ Medium-199 ที่มี Earle's salts และ L-glutamine (Sigma company, St Louis MO) ที่มีการเสริม Fetal bovine serum (FBS) 10 เปอร์เซ็นต์ และ Antibiotic-Antimycotic (AB-AM) โดยทำการกรองอาหารเพาะเลี้ยงผ่าน filter และปรับค่าความเป็น กรด-ด่าง ประมาณ 7.2 ถึง 7.4 จากนั้นทำการแบ่งอาหารเพาะเลี้ยงออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ยังไม่ได้ใช้นำไปเก็บไว้ในตู้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และส่วนที่จะนำมาใช้เพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุผิวท่อหน้าไข นำมาแบ่งใส่ Cap tube 2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อทำการตรวจดูว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้ นั้น มีความชุ่มหรือมีการตกตะกอนหรือไม่ ซึ่งถ้ามีการตรวจสอบพบแสดงว่ามีสิ่งปนเปื้อนเกิดขึ้นในอาหาร แสดงว่าไม่ควรนำอาหารนั้นมาเลี้ยงเซลล์

4. วิธีการเตรียมเซลล์เยื่อบุผิวท่อหน้าไข

เมื่อรังไข่มาถึงยังห้องปฏิบัติการของสาขาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา นำท่อหน้าไขที่เตรียมในจานเพาะเลี้ยงที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วภายในตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow hood) จากนั้นล้างท่อหน้าไขด้วย Normal saline ที่ประกอบ ด้วย Sodium chloride ที่มีความเข้มข้น 0.9% ที่เสริมด้วย Antibiotic-Antimycotic (AB-AM) 1 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นใช้กรรไกรที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้ว ตัดแยกท่อหน้าไขในส่วนแอมพูลลา (Ampullar) และอิสมัส (Isthmus) ออกจากส่วนของกรวยปากแตร (Infundibulum) และนำมาล้างด้วย Phosphate buffer saline (PBS) 3 ครั้ง ทำการตัดเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และไขมันที่ไม่เกี่ยวข้องออก จากนั้นใช้ใบมีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้วผ่าท่อหน้าไขตามแนวยาว ตั้งแต่ส่วน Ampullar ไปจนถึงส่วนของ Isthmus จากนั้นขูดเยื่อบุผิวท่อหน้าไขโดยใช้กระจกไลด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้ว และทำการล้างเยื่อบุผิวท่อหน้าไขที่ติดกับกระจกไลด์ด้วย PBS 3 ครั้ง แล้วใช้ปิเปตดูดเยื่อบุผิวท่อหน้าไขใส่ลงใน Conical tube ขนาด 15 ml จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง

ที่ 300 rpm เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้เยื่อบุผิวท่อนำไข่ตกตะกอน และทำการดูดของเหลวที่อยู่เหนือตะกอนทิ้ง และทำซ้ำกันสองครั้ง จากนั้นนำเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่เป็นตะกอนย้ายมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ M-199 และถูกนำไปเลี้ยงในตู้ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ความชื้นสัมพัทธ์ที่ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเยื่อบุผิวท่อนำไข่ส่วนหนึ่งถูกนำกระตุ้นด้วยอุณหภูมิแตกต่างกันที่อุณหภูมิ 38.5, 40 และ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสแตเรียโอ และศึกษาอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ด้วยสไลด์ Hemacytometer

5. การนับเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่บนอุปกรณ์ Hemacytometer

นำเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่เพาะเลี้ยงแล้ว 42 ชั่วโมง จากนั้นถูกกระตุ้นด้วยอุณหภูมิ 38.5, 40 และ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ จากนั้นใช้ pasture pipette ดูดของเหลวในจานเพาะเลี้ยง และนำมาย้ายลงในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 ml นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1100 rpm เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้เซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่เกิดการตกตะกอน แล้วทำการดูดของเหลวเหนือตะกอนทิ้ง จากนั้นเติม Trypsin EDTA และนำไปปั่นในตู้เพาะเลี้ยงตัวอ่อน ที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม DMEM medium 1 ml และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1500 rpm เป็นเวลา 3 นาที และดูดของเหลวเหนือตะกอนทิ้ง ทำการเติมสารย้อม Trypan blue stain แล้วใช้ Pasture pipette ดูดในปริมาตร 10 μ l ต่อเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ 10 μ l จากนั้นนำมานับบนสไลด์ Hemacytometer ซึ่งถ้าเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่มีชีวิต จะไม่มีการย้อมติดสี ส่วนเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่ตายแล้วจะมีการย้อมติดสีของสารย้อม Trypan blue stain

การทดลองที่ 2 ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ไข่ และการขยายของเซลล์ตัวมดลูกที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุผิวในท่อนำไข่ที่ได้รับอุณหภูมิแตกต่างกัน

1. ขั้นตอนการเก็บและเตรียมตัวอย่างรังไข่

ประสานไปยังโรงเชือดในจังหวัดพะเยา จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างท่อนำไข่จากสุกรสาวทั้งหมด 300 ตัว อายุประมาณ 3-4 เดือน น้ำหนักประมาณ 90-100 กิโลกรัม โดยทำการเก็บท่อนำไข่และรังไข่ของสุกรสาว ด้วยการสวมถุงมือที่สะอาด และใช้ใบมีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้วตัดรังไข่และท่อนำไข่จากซากของสุกรสาวที่เพิ่งตายใหม่ จากนั้นนำท่อนำไข่และรังไข่มาล้างด้วย Normal saline ที่ประกอบด้วย Sodium chloride 0.9 % ที่มีการเสริม Antibiotic-Antimycotic (AB-AM) และนำท่อนำไข่และรังไข่แช่ใน Normal saline ในกระติกที่ปรับอุณหภูมิไว้ที่ประมาณ 35-38 องศาเซลเซียส และนำตัวอย่างกลับไปห้องปฏิบัติการภายใน 1 ชั่วโมง

2. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ในหลอดทดลอง

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อบัพิวท่อนำไข่ในตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow hood) ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อบัพิวท่อนำไข่ คือ Medium-199 ที่มีการเสริม NaHCO_3 9 ml, PFF 1 ml, Pyruvate 100 μl , β -ME 100 μl , EGF 10 μl , P-S 100 μl , PMSG 100 μl , hCG 100 μl และ cAMP 100 μl โดยทำการกรองอาหารเพาะเลี้ยงผ่าน filter และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 7.2 ถึง 7.4 นำไปเก็บไว้ในตู้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

3. การเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ในหลอดทดลอง

เมื่อตัวอย่างมาถึงยังห้องปฏิบัติการ จากนั้นมาล้างด้วย NaCl 0.9% 2 ครั้ง และใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 18 ต่อกับกระบอกฉีดยาขนาด 15 ซีซี เจาะน้ำในรังไข่ และนำมาวางบนจานเพาะเลี้ยง จากนั้นใช้หลอดดูดไข่คัดเอาแต่ไข่ที่มีลักษณะของคิวมูลัสตั้งแต่ 3 ชั้นขึ้นไป จากนั้นย้ายมาเลี้ยงในอาหาร Medium-199 และนำมาเลี้ยงร่วมกับเยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่ได้รับอุณหภูมิที่ต่างกันเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำบันทึกอัตราการพัฒนาของเซลล์ไข่จนถึงระยะ และความหนาของเซลล์คิวมูลัส Metaphase II ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ



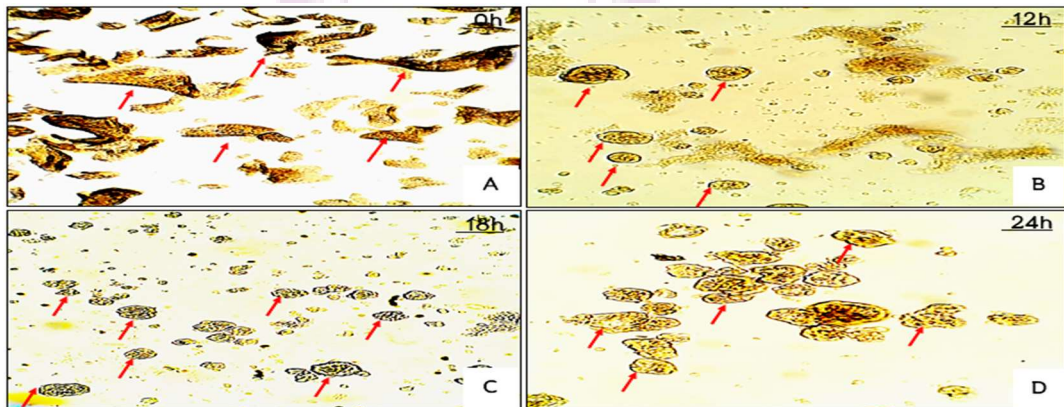
บทที่ 4

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเยื่อบุผิวท่อนำไข่

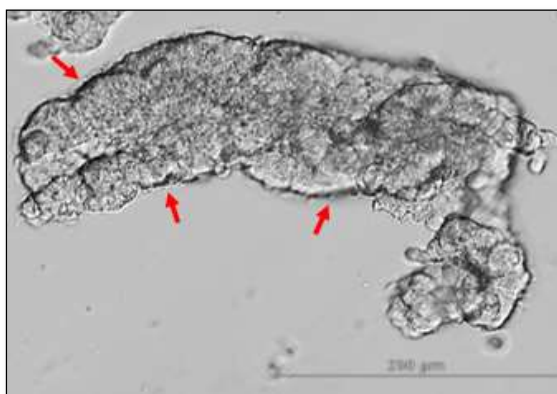
จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ พบว่า ชั่วโมงที่ 0 ของการเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ในหลอดทดลอง มีลักษณะเป็นแผ่น รูปร่างที่ไม่แน่นอน (ภาพ 1A) ชั่วโมงที่ 12 เริ่มสังเกตเห็นเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ แต่ยังไม่ค่อยชัดเจน ซึ่งมีลักษณะอยู่ติดกันกับเซลล์จำพวกเซลล์ไขมันและเซลล์ที่ไม่เกี่ยวข้อง (ภาพ 1B) ชั่วโมงที่ 18 เริ่มสังเกตเห็นเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ มีรูปร่างไม่แน่นอน และพบว่า มีขนเส้นเล็ก ๆ หรือเรียกว่า ซีเลีย (Cilia) อยู่บริเวณรอบ ๆ เซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ และเคลื่อนที่ได้ (ภาพ 1C) และในชั่วโมงที่ 24 สามารถสังเกตเห็นเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ได้อย่างชัดเจน (ภาพ 1D) (ภาพ 1)



ภาพ 9 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่อุณหภูมิ 0, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 10 เท่า

หมายเหตุ: (ภาพ 1A) การเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ในหลอดทดลองในชั่วโมงที่ 0
(ภาพ 1B) การเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ในหลอดทดลองในชั่วโมงที่ 12
(ภาพ 1C) การเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ในหลอดทดลองในชั่วโมงที่ 18
(ภาพ 1D) การเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ในหลอดทดลองในชั่วโมงที่ 24

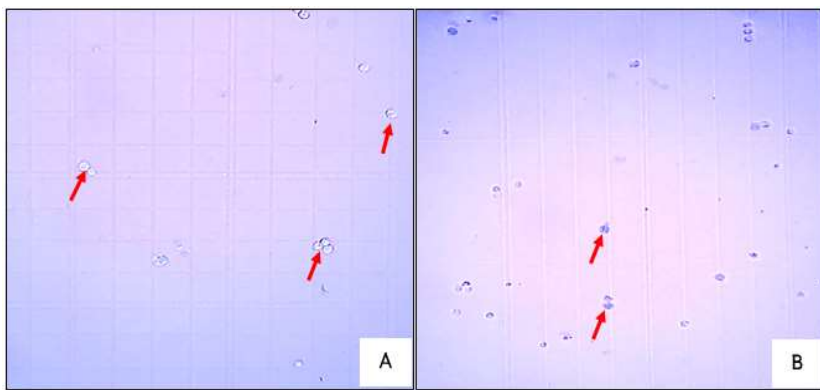
หลังจากนั้นนำเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่เพาะเลี้ยงมาแล้ว 24 ชั่วโมง มาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereo Microscope) ที่กำลังขยายขนาด 40 เท่า พบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่มีซีเลีย (Cilia) ห่อหุ้มบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่เป็นจำนวนมาก และยังพบว่า ซีเลียสามารถเคลื่อนไหวได้ตลอดเวลา (ภาพ 2)



ภาพ 10 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่มีซีเลียห่อหุ้มบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (ลูกศรชี้สีแดง) ที่กำลังขยาย 40 เท่า

2. การตรวจสอบการมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่

หลังจากนำเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ของสุกรสาวที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้ว จากนั้นนำเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่ได้รับอนุพันธุ์ 38.5, 40 และ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นนำมาตรวจสอบอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่โดยนำเอนไซม์ Trypsin EDTA ในการย่อยเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวมาย้อมด้วยสี Trypan blue stain และนำมานับเซลล์บนสไลด์ Hemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ผลพบว่า เซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่มีชีวิต เมื่อนำตัวอย่างเซลล์ไปตรวจนับบนสไลด์ Hemacytometer และประเมินการมีชีวิตรอด โดยย้อมด้วยน้ำยาย้อมสี Trypan blue พบว่า เซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่จะไม่ย้อมติดสีน้ำเงิน (ภาพ 3A) และในทางตรงกันข้ามกับเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่ตายแล้ว เมื่อนำมาย้อมด้วยสี Trypan blue stain พบว่า เซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่จะมีการย้อมสี Trypan blue stain (ภาพ 3B) (ภาพ 3)



ภาพ 11 อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ในจานเพาะเลี้ยง
ได้รับอนุมูล 38.5, 40 และ 42 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ: (A) ลักษณะการลอยของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่มีชีวิตที่ได้รับที่อนุมูล 38.5, 40 และ 42 องศาเซลเซียส (ลูกศรชี้สีแดง)
(B) ลักษณะการติดสีของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่ตายหลังจากที่ได้รับอนุมูล 38.5, 40 และ 42 องศาเซลเซียส (ลูกศรชี้สีแดง)

3. อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่

จากการศึกษาอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ในสุกรสาว หลังจากได้รับอนุมูล 38.5, 40 และ 42 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ พบว่า เมื่อนำเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่นำมาเลี้ยงที่อนุมูล 38.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ($99.09 \pm 0.68\%$) มีอัตราการมีชีวิตรอดที่สูงกว่ากลุ่มที่ 2 ($98.95 \pm 0.56\%$) กลุ่มที่ 3 ($97.59 \pm 1.31\%$) กลุ่มที่ 4 ($97.45 \pm 1.43\%$) ($P < 0.01$) กลุ่มที่ 5 ($95.90 \pm 2.29\%$) และกลุ่มที่ 6 ($95.88 \pm 1.89\%$) ตามลำดับ ($P < 0.01$) นอกจากนี้ยังพบว่า อัตราการตายของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ในกลุ่มที่ 1 ($0.88 \pm 0.66\%$) มีอัตราการตายน้อยกว่ากลุ่มที่ 2 ($1.06 \pm 0.55\%$) กลุ่มที่ 3 ($2.44 \pm 1.33\%$) และกลุ่มที่ 4 ($2.57 \pm 1.47\%$) ($P < 0.01$) กลุ่มที่ 5 ($3.77 \pm 2.41\%$) และกลุ่มที่ 6 ($4.14 \pm 1.88\%$) ตามลำดับ ($P < 0.01$) (ตาราง 4)

ตาราง 4 แสดงอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่ได้รับอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

กลุ่มการทดลอง	จำนวนของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ (n)	อัตราการมีชีวิตรอด % (Mean ± SEM)	อัตราการตาย% (Mean ± SEM)
OEC + EHS 38.5 °C at 12 h	1660	99.09 ± 0.68 ^c	0.88 ± 0.66 ^a
OEC + EHS 38.5 °C at 24 h	1659	98.95 ± 0.56 ^{bc}	1.06 ± 0.55 ^{ab}
OEC + EHS 40 °C at 12 h	1616	97.59 ± 1.31 ^{bc}	2.44 ± 1.33 ^{ac}
OEC + EHS 40 °C at 24 h	1663	97.45 ± 1.43 ^b	2.57 ± 1.47 ^{bcd}
OEC + EHS 42 °C at 12 h	1627	95.90 ± 2.29 ^a	3.77 ± 2.41 ^{cd}
OEC + EHS 42 °C at 24 h	1646	95.88 ± 1.89 ^a	4.14 ± 1.88 ^d

หมายเหตุ: Different superscripts (^{a, b, c}) with in the same column are significantly different (P ≤ 0.01).

SEM: Standard error of mean

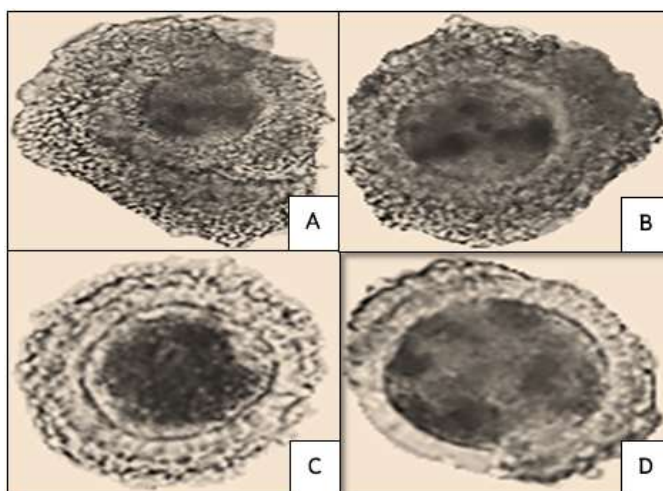
OEC: Oviduct epithelial cell

EHS: Exposed heat shock

การทดลองที่ 2

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่ได้รับอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

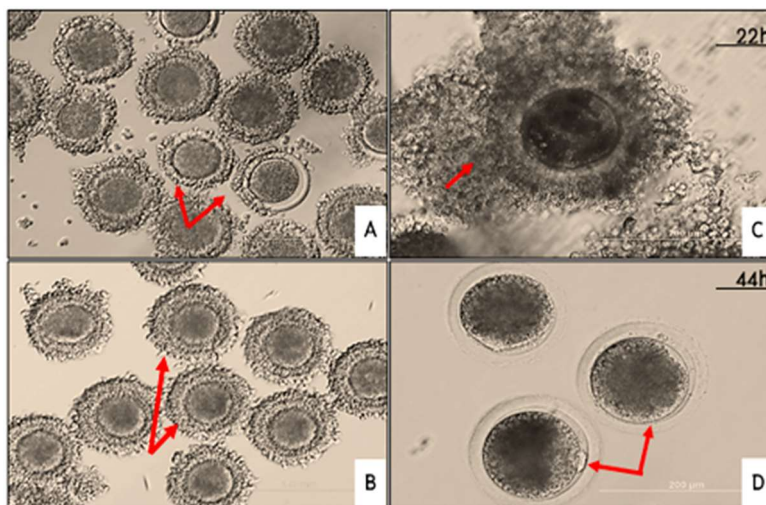
รังไข่ของสุกรสาวที่ถูกเก็บจากโรงเชือดทั้งหมด 264 ตัว จากนั้นทำการเลือกเซลล์ไข่ในจานเพาะเลี้ยง โดยพบว่า เซลล์ไข่สามารถจำแนกออกได้ทั้งหมด 4 เกรด คือ เกรด A มีลักษณะของเซลล์คิวมูลัสที่หนาและหุ้มมากกว่า 4 ชั้น และ Ooplasm ภายในของเซลล์ไข่มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน หรือเรียกว่า Homogenous (Compact Cumulus Oocytes Complexes) (ภาพ 4A) เกรด B มีเซลล์คิวมูลัสที่หนาและหุ้มมากกว่า 3 ชั้น ภายในของเซลล์ไข่มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน (ภาพ 4B) เกรด C มีเซลล์คิวมูลัสที่มีลักษณะบางและหุ้มเซลล์ไข่ไม่เกิน 2 ชั้น Ooplasm ภายในของเซลล์ไข่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน (ภาพ 4C) และ เกรด D มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มไม่เกิน 2 ชั้น หรือไม่มีหุ้มเลย เรียกว่า Denude Oocytes และ Ooplasm ภายในของเซลล์ไข่ที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน (ภาพ 4D) (ภาพ 4)



ภาพ 12 แสดงลักษณะของ Cumulus oocytes complexes ที่ได้จากรังไข่ในสุกรสาว
ที่กำลังขยาย 40 เท่า

หมายเหตุ: (A) Cumulus oocytes complexes เกรด A
(B) Cumulus oocytes complexes เกรด B
(C) Cumulus oocytes complexes เกรด C
(D) Cumulus oocytes complexes เกรด D

หลังจากเจาะรังไข่ของสุกรสาวด้วยเข็มเบอร์ 18 ที่ต่อกับกระบอกฉีดขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเลือกเซลล์ไข่ในจานเพาะเลี้ยงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นทำการตัดทิ้ง Cumulus Oocytes Complexes เกรด C และ D (ภาพ 5A) และทำการคัดเลือกเอาแต่ Cumulus Oocytes Complexes เกรด A และ B (ภาพ 5B) ที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ จากนั้นนำมาเลี้ยงร่วมกับเยื่อบุผิวท่อนำไข่ และนำไปเลี้ยงด้วยอุณหภูมิ 38.5, 40 และ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ผลพบว่า หลังจากเพาะเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ในผ่านไป 22 ชั่วโมง ผลปรากฏว่า เซลล์คิวมูลัส (Cumulus cell) ที่ห่อหุ้มรอบเซลล์ไข่เกิดการขยายแผ่ขยายออกเป็นวงกว้าง (ภาพ 5C) จากนั้นเลี้ยงไปจนถึง 44 ชั่วโมง และนำเซลล์ไข่ไปกำจัดเซลล์คิวมูลัสออกด้วยเอนไซม์ Hyaluronidase ที่ความเข้มข้น 0.2% เพื่อดูการพัฒนาของเซลล์ไข่ ผลพบว่า เซลล์ไข่มีลักษณะเป็น Pbody ซึ่งแสดงว่า เซลล์ไข่นั้นเกิดการพัฒนาจนถึงระยะ Metaphase II (ภาพ 5D)



ภาพ 15 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ไข่ที่เลี้ยงร่วมกับเยื่อหุ้มตัวอ่อนนำไข่ที่ได้รับอุณหภูมิที่ต่างกันในหลอดทดลอง ที่กำลังขยาย 40 เท่า

- หมายเหตุ: (A) Cumulus oocytes complexes ที่เก็บจากรังไข่สุกรสาว (ลูกศรชี้สีแดง)
 (B) Cumulus oocytes complexes ใช้ในการทดลอง (ลูกศรชี้สีแดง)
 (C) Cumulus oocytes complexes ที่ตัดทิ้ง (ลูกศรชี้สีแดง)
 (D) Cumulus oocytes complexes ระยะ Metaphase II (ลูกศรชี้สีแดง)

2. การขยายของตัวมูลเซลล์ที่ล้อมรอบเซลล์ไข่ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อหุ้มตัวอ่อนนำไข่ที่ได้รับอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ในหลอดทดลองที่เลี้ยงร่วมกับเยื่อหุ้มตัวอ่อนนำไข่พบว่า เมื่อนำเซลล์เยื่อหุ้มตัวอ่อนนำไข่ที่ได้รับอุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมงพบว่า หลังจากเลี้ยงเซลล์ไข่ผ่าน 22 ชั่วโมง ในกลุ่มที่ 1 (3.683 ± 0.64) มีการขยายของเซลล์ตัวมูลได้ดีกว่ากลุ่มที่ 3 (3.423 ± 0.59) กลุ่มที่ 4 (3.396 ± 0.59) กลุ่มที่ 5 (3.370 ± 0.62) และกลุ่มที่ 6 (3.449 ± 0.62) ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) นอกจากนี้ในชั่วโมงที่ 44 พบว่า ในกลุ่มที่ 1 (6.124 ± 0.90) และกลุ่มที่ 2 (6.088 ± 0.93) มีการขยายจำนวนของเซลล์ตัวมูลที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติ ($P < 0.01$) กับกลุ่มที่ 3 (5.803 ± 0.88) กลุ่มที่ 4 (5.795 ± 0.90) กลุ่มที่ 5 (5.804 ± 0.95) และกลุ่มที่ 6 (5.650 ± 1.09) (ตาราง 5)

ตาราง 5 แสดงอัตราการขยายของเซลล์คิวมูลัสที่ล้อมรอบเซลล์ไข่ที่ได้รับอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

กลุ่มทดลอง	จำนวนเซลล์ไข่	การขยายของเซลล์คิวมูลัส ($\mu\text{m} \pm \text{SEM}$)		
		ชั่วโมงที่ 0	ชั่วโมงที่ 22	ชั่วโมงที่ 44
COCs + OEC EHS 38.5 °C 12 h	159	2.143 \pm 0.15	3.683 \pm 0.64 ^b	6.124 \pm 0.90 ^b
COCs + OEC EHS 38.5 °C 24 h	156	2.173 \pm 0.15	3.570 \pm 0.71 ^{ab}	6.088 \pm 0.93 ^{ab}
COCs + OEC EHS 40 °C 12 h	161	2.153 \pm 0.18	3.423 \pm 0.59 ^a	5.803 \pm 0.88 ^a
COCs + OEC EHS 40 °C 24 h	158	2.131 \pm 0.16	3.396 \pm 0.59 ^a	5.795 \pm 0.90 ^a
COCs + OEC EHS 42 °C 12 h	160	2.142 \pm 0.14	3.370 \pm 0.62 ^a	5.804 \pm 0.95 ^a
COCs + OEC EHS 42 °C 24 h	160	2.137 \pm 0.16	3.449 \pm 0.62 ^a	5.650 \pm 1.09 ^a

หมายเหตุ: Different superscripts (^{a, b, c}) with in the same column are significantly different ($P \leq 0.01$).

SEM: Standard error of mean

EHS: Exposed heat shock

OEC: Oviduct epithelial cell

COCs: Cumulus oocytes complexes

3. การพัฒนาของเซลล์ไข่ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่ได้รับอุณหภูมิที่ต่างกัน

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ร่วมกับเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่ได้รับอุณหภูมิที่ต่างกัน พบว่า เซลล์ไข่นำมาเลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่ได้รับอุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส เป็นระยะ เวลา 12 ชั่วโมง มีอัตราการพัฒนาของเซลล์ไข่ไปจนถึงระยะ Metaphase II ถึงร้อยละ 68.85 (107/159) ซึ่งมีอัตราการพัฒนาที่มากกว่ากลุ่มที่ 2 ร้อยละ 64.30 (103/156) กลุ่มที่ 3 ร้อยละ 61.88 (101/161) กลุ่มที่ 4 ร้อยละ 60.82 (97/158) กลุ่มที่ 5 ร้อยละ 61.80 (99/160) และกลุ่มที่ 6 ร้อยละ 61.82 (96/160) ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ($P < 0.01$) นอกจากนี้ยังพบว่า ในกลุ่มที่ 6 มีอัตราการ Degenerate ของเซลล์ไข่ที่สูงถึงร้อยละ 38.17 (64/160) ซึ่งมากกว่ากลุ่มที่ 1 ร้อยละ 33.79 (52/159) กลุ่มที่ 2 ร้อยละ 34.14 (53/156) กลุ่มที่ 3 ร้อยละ 35.69 (60/161) กลุ่มที่ 4 ร้อยละ 39.17 (61/158) และกลุ่มที่ 5 ร้อยละ 38.19 (64/160) ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ($P < 0.01$) (ตาราง 6)

ตาราง 6 แสดงการพัฒนาของเซลล์ไข่ที่เลี้ยงร่วมกับเยื่อหุ้มตัวอ่อนนำไข่ที่ได้รับอุณหภูมิ
ที่ต่างกัน

กลุ่มทดลอง	อัตราการเจริญเติบโตเต็มที่ของเซลล์ไข่ (Mean ± SEM)		
	เซลล์ไข่ (n)	MII (%)	Degenerate (%)
COCs + OEC EHS 38.5 °C 12 h	159	65.855 ± 9.792 (107/159)	34.144 ± 9.792 (52/159)
COCs + OEC EHS 38.5 °C 24 h	156	64.303 ± 5.917 (103/156)	35.696 ± 5.917 (53/156)
COCs + OEC EHS 40 °C 12 h	161	61.811 ± 4.842 (101/161)	38.118 ± 4.842 (60/161)
COCs + OEC EHS 40 °C 24 h	158	60.820 ± 4.431 (97/158)	39.179 ± 4.431 (61/158)
COCs + OECEHS 42 °C 12 h	160	61.808 ± 4.761 (99/160)	38.191 ± 4.761 (64/160)
COCs + OEC EHS 42 °C 24 h	160	61.829 ± 8.128 (96/160)	38.170 ± 8.128 (64/160)

หมายเหตุ: Different superscripts (^{a, b, c}) with in the same column are significantly different (P ≤ 0.01).

SEM: Standard error of mean

COCs: Cumulus oocytes complexes

OEC: Oviduct epithelial cell

EHS: Exposed heat shock

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ในหลอดทดลอง พบว่า เซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่พบส่วนใหญ่จะแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ ชนิดที่ 1 มีรูปร่างคล้ายทรงกระบอกและมีไมโครวิลไลล้อมรอบ และชนิดที่ 2 มีรูปร่างคล้ายทรงกลม และมีไมโครวิลไลล้อมรอบ

ความร้อนมีผลต่ออัตราการมีชีวิตรอดสูงมีผลต่ออัตราการรอดชีวิต โดยพบว่า กลุ่มเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่ได้รับอุณหภูมิ 40 และ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง มีอัตราการมีชีวิตรอดต่ำกว่า เซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่ได้รับอุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส ทั้ง 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง

เซลล์คิวมูลัสเซลล์ที่ล้อมรอบเซลล์ไข่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง มีการขยายน้อยกว่ากลุ่มเซลล์บุผิวท่อนำไข่ที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง

ความร้อนมีผลต่อการพัฒนาของเซลล์ไข่ที่เลี้ยงในหลอดทดลองจนถึงระยะ Metaphase II พบว่า กลุ่มที่ได้รับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง มีอัตราการพัฒนาน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับอุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

อภิปรายผลการวิจัย

การทดลองที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ และอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่ได้รับอุณหภูมิร้อนที่ต่างกัน

จากศึกษาครั้งนี้ พบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่หลังได้รับอุณหภูมิร้อนที่ต่างกัน พบว่า ในชั่วโมงที่ 0 เซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง มีลักษณะรูปร่างแบบเรียบเป็นแผ่น มีขนาดต่างกัน ชั่วโมงที่ 12 เริ่มสังเกตเห็นว่ามีเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ ซึ่งมีลักษณะอยู่ติดกันกับเซลล์ชนิดอื่น ชั่วโมงที่ 24 เริ่มสังเกตเห็นเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ มีรูปร่างคล้ายทรงกระบอก และทรงกลม สามารถแยกออกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ และเศษเนื้อเยื่ออื่น ๆ ได้อย่างชัดเจน โดยสามารถจำแนกออกเป็น 2 ชนิด ชนิดแรก เยื่อบุผิวท่อนำไข่

ชนิดแรกคล้ายทรงกระบอก และมีไมโครวิลไลล้อมรอบ ชนิดที่สองมีลักษณะเป็นทรงกลม และมีไมโครวิลไลล้อมรอบ โดยกลุ่มเซลล์จะลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ และสามารถเคลื่อนไหวได้ สอดคล้องกับ Areekijseere and Vejaratpimol (2006) ศึกษาความแตกต่างของสัณฐานวิทยา และโครงสร้างของเซลล์เยื่อผิวท่อนำไข่สุกรภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า ผิวท่อนำไข่มี 2 ชนิด คือเยื่อผิวท่อนำไข่รูปทรงกระบอก ที่มีซีเลีย (ciliated columnar epithelial cells) และเซลล์เยื่อผิวท่อนำไข่รูปร่างกลมไม่มีซีเลีย (non-ciliated round shape epithelial cells) แต่มีไมโครวิลไล (microvilli) สั้น ๆ ล้อมรอบอยู่ บริเวณผิวเซลล์ ทำให้สามารถเคลื่อนที่ไปมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้

การศึกษาของ Yaniz, Lopez and Hunter (2009) รายงานว่า ลักษณะของเซลล์เยื่อผิวท่อนำไข่ของสุกรในแต่ละระยะจะมีไม่เท่ากัน ซึ่งในระยะฟอลลิคูลาร์ หรือช่วงที่ไข่กำลังเจริญเติบโตก่อนการตกไข่ เซลล์เยื่อผิวท่อนำไข่มีไมโครวิลไลมากกว่าระยะลูเตียล หรือระยะที่แผลที่เกิดจากการตกไข่พัฒนาเป็นคอร์ปัสลูเทียม (corpus luteum) ซึ่งเซลล์เยื่อผิวท่อนำไข่ยังมีหน้าที่หลั่งสารไกลโคโปรตีน (glycoprotein) เมื่อระดับเอสโตรเจนในร่างกายสูงขึ้น เซลล์ที่มีซีเลียนี้ช่วยในการเคลื่อนที่ของเซลล์ไข่ที่สุก (Yaniz, Lopez and Hunter, 2009) เซลล์เยื่อผิวท่อนำไข่ยังมีหน้าที่สร้างและหลั่งสารไกลโคโปรตีน (Murray, 1992; Desouza and Murry, 1995)

Desantis, et al. (2004) รายงานว่า โครงสร้างของเซลล์เยื่อผิวท่อนำไข่บริเวณแอมพูล่า (ampulla) และอิซทิมัส (isthmus) เป็นส่วนที่สำคัญในกระบวนการสืบพันธุ์ เพราะเมื่อเกิดการตกไข่ เซลล์ไข่จะเคลื่อนเข้าสู่ท่อนำไข่ผ่านบริเวณอินฟันดิบูลัม (infundibulum) เพื่อรอการปฏิสนธิกับเซลล์อสุจิ หลังบริเวณแอมพูล่าเป็นส่วนที่เกิดการปฏิสนธิและการพัฒนาของตัวอ่อนในระยะเริ่มแรก (Leese, 1988; Desantis, et al., 2004)

การทดลองที่ 2 ศึกษาเกี่ยวกับอัตราการพัฒนาของเซลล์ไข่ และเซลล์คิวมูลัสที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อผิวท่อนำไข่ที่ได้รับอุณหภูมิร้อน

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ในหลอดที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อผิวท่อนำไข่ที่ได้รับอุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงไป 22 ชั่วโมง ในกลุ่มที่ 1 (3.758 ± 0.64) มีการขยายของคิวมูลัสได้ดีกว่ากลุ่มที่ 3 (3.458 ± 0.59) กลุ่มที่ 4 (3.429 ± 0.59) กลุ่มที่ 5 (3.403 ± 0.62) และกลุ่มที่ 6 (3.402 ± 0.62) ($P < 0.01$) สอดคล้องกับ Chen, Li and Huang (2007) รายงานว่า ลักษณะของเซลล์คิวมูลัส (Cumulus cell) ที่มีลักษณะติดกันแน่นแบนแผ่กระจายหลายชั้น เป็นตัวแสดงถึงความสมบูรณ์และแข็งแรงของเซลล์ไข่ และมีโอกาสพัฒนาไปจนถึงระยะ Metaphase II ได้ดีกว่าเซลล์ไข่ที่มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบ

แบบไม่หนา และการพัฒนาของเซลล์ไข่ที่นำมาเลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ ที่ได้รับอุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง มีอัตราการพัฒนาของเซลล์ไข่ไปจนถึงระยะ Metaphase II ถึงร้อยละ 67.21 (107/159) ซึ่งมีอัตราการพัฒนาที่มากกว่า กลุ่มที่ 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) แสดงให้เห็นว่า แม้เซลล์ไข่จะได้รับอุณหภูมิร้อนแต่เซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ยังสามารถปรับปรุงคุณภาพของเซลล์ไข่ให้มีการเจริญเติบโตไปจนถึงระยะ Metaphase II สอดคล้องกับ Kidson, et al. (2003) รายงานว่า เซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ไข่สามารถปรับปรุงคุณภาพเซลล์ไข่และตัวอ่อนได้ ขนาดของเซลล์ไข่ที่เลี้ยงร่วมกับเยื่อบุผิวท่อนำไข่มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ไข่ที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีการเสริมเยื่อบุผิวท่อนำไข่ และความหนาของ perivitelline space ของเซลล์ไข่ที่เลี้ยงร่วมกับเยื่อบุผิวท่อนำไข่มีความหนากว่า เซลล์ไข่ที่ไม่เสริมเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ และสาเหตุที่ทำให้เซลล์ไข่มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นมาจากเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่ที่ซีเลีย ซึ่งเซลล์ชนิดนี้สร้างและหลั่งสารไกลโคโปรตีน พบที่ต่อมหลัง growth factor จำพวก growth factors insulin-like growth factor (IGF), epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor (TGF) และ fibroblast growth factors (FGFs) ซึ่งสารเหล่านี้ มีหน้าที่ช่วยกระตุ้นการพัฒนาของไข่และตัวอ่อนในระยะแรก



บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

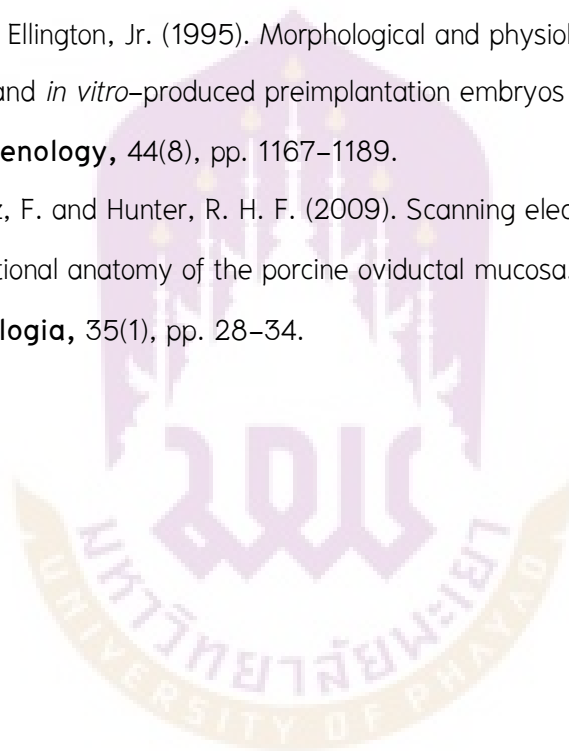
- กัมพล แก้วเกษ. (2548). **การจัดการฟาร์มสุกรพันธุ์ (ความรู้พื้นฐาน)**. นครปฐม: พัชรภรณ์.
กุศล บุญยะวรรณ, อนุชา พรหมวังชา, ประดิษฐ์ เทิดทูล และประเสริฐ ฤกษ์เกรียงไกร.
(2546). **การศึกษาสมรรถนะของแผงระเหยน้ำทำความเย็นและแบบจำลอง
สภาพโรงเรือนเลี้ยงสุกร (The Study of Evaporative Cooling Pads Performance
and Simulation of a Swine House)**. วิทยานิพนธ์ วศ.ม., มหาวิทยาลัยเชียงใหม่,
เชียงใหม่.
- ณัฐวุฒิ ดุษฎี. (2551). **วิเคราะห์สมรรถนะระบบทำความเย็นแบบระเหยน้ำเมื่อใช้ระบบดึง
ความเย็นกลับคืนร่วมกับระบบน้ำร้อนและน้ำเย็นในโรงเรือนเลี้ยงสัตว์.**
สืบค้นเมื่อ 12 มกราคม 2561, จาก http://librae.mju.ac.th/goverment/20111119104834_librae/File_20121107095619256_42.pdf
- ไพศาล เทียนไทย. (2547). บทบาทของท่อระบายน้ำกับการขนส่งและการคาปาซิเตชันของตัวอสุจิ
ในสุกร. **เวชศาสตร์สัตวแพทย์**, 34(2), 31-40.
- มานิตย์ เทวรัศมีพิทักษ์. (2536). **การจัดการฟาร์มสัตว์ปีก (พิมพ์ครั้งที่ 4)**. เชียงใหม่:
ดาวคอมพิวกราฟิก.
- ภรณ์ ไชยศิริ. (2522). หลักเบื้องต้นในการก่อสร้างโรงเรือนสุกร. **สุกรสาร**, 5(20), 13-39.
- มงคล เตชะกำพุ. (2543). **เทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ในปศุสัตว์.**
กรุงเทพฯ: ด่านสุทธา.
- วรรณ เมธาจารย์. (2552). **เซลล์โปรตีนที่หลังจากท่อระบายน้ำ และรังไข่สุกรในรอบการเป็นสัด.**
วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาลัยศิลปากร, กรุงเทพฯ.
- ศิษย์พงษ์พัฒน์. (2554). เทคนิคและการจัดการระบบ Evaporative cooling สำหรับ
โรงเรือนเลี้ยงสัตว์. **วารสารสัตว์บาล**, 21(97), 7-15
- ศรีสุวรรณ สมชัย. (2543). โรงเรือนปิดควบคุมโดยระบบระเหยไอน้ำ. **วารสารสัตว์บาล**, 8(90),
115-130.
- สมพงษ์ ชำนาญทองไพวัลย์ และอติภา นันทประเสริฐ. (2541). **การควบคุมผลผลิต
และการดูแลสุขภาพสุกร (Controlled production and health in pig).**
กรุงเทพฯ: ม.ป.พ..

- สมโภชน์ ทับเจริญ. (2555). การจัดการฟาร์มสุกรเลี้ยงสุกรในช่วงรอยต่อของฤดูกาล. **วารสารปศุสัตว์เกษตรศาสตร์สุกรสาส์น**, 38(151), 15–19.
- สุวรรณา พรหมทอง. (2544). **หลักสัตวศาสตร์**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง.
- อรุณพ คุณาวงกฤต. (2545). **วิทยาการสืบพันธุ์สุกร** (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อรุณพ สุริยสมบุรณ์ และมงคล เตชะกำฟู. (2551). **ผลกระทบของอุณหภูมิและความชื้นที่มีต่อประสิทธิภาพการผลิตของแม่สุกรอุ้มท้องภายใต้ระบบการเลี้ยงในโรงเรือนที่ต่างกันในประเทศไทย**. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
- Anderson, A. M, Einarsson, S and Edqvist, L. E. (1983). Prepubertal LH, oestradiol-17 β and progesterone pattern in gilt. **Zentralblatt fur Veterinarmedizin, Reihe A**, 30(6), pp. 436–438.
- Areekijsee, M. and Vejaratpimol, R. (2005). Characterization of porcine oviductal epithelial cells, cumulus oocyte complexes and granulosa cells: A scanning electron microscopy and inverted microscopy study. **Micron**, 37, pp. 707–716.
- Basirico, L., Morera, P., Primi, V., Lacetera, N., Nardone, A. and Bernabucci, U. (2011). Cellular thermotolerance is associated with heat shock protein 70.1 genetic polymorphisms in Holstein lactating cows, **Cell Stress Chaperones**. 16(4), pp. 441–448.
- Biswas, D., Jung, E. M., Jeung, E. B. and Hyun, S. H. (2011). Effects of vascular endothelial growthfactor on porcine preimplantation embryos produced by *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. **Theriogenology**, 75(2), pp. 256–267.
- Bloemhof, S., Mathur, P. K., Knol, E. F., Vander and Waaij E. H. (2013). Effect of daily environmental temperature on farrowing rate and total born in dam line sows. **Journal of Animal Science**, 91(6), pp. 2667–2679.
- Chen, X.Y., Li, Q. W. and Huang, J. (2007). Effects of ovarian cortex cell co-culture during *in vitro* maturation on porcine oocytes maturation, fertilization and embryo development. **Animal reproduction science**, 99(3), pp. 306–316.

- Desantis, S., Ventriglia, G., Zubani, D., Corriero, A., Deflorio, M., Acone, F., et al. (2005). Differential lectin binding patterns in the oviductal ampulla of the horse during oestrus. **European Journal of Histochemistry**, 49(2), pp. 33–44.
- Desouza, M. and Murray, M. K. (1995). An estrogen-dependent secretory protein, which shares identity with chitinases, is expressed in a temporally and regionally specific manner in the sheep oviduct at the time of fertilization and embryo development. **Endocrinology**, 136(6), pp. 2485–2496.
- Einarsson, S. and Gustafsson, B. (1970). Development abnormalities of female sexual organs in genital tract in 1,000 gilt. **Acta veterinaria Scandinavica**, 11(3), pp. 427–442.
- Ellington, J. E., Carney, E. W., Farrell, P. B., Simkin, M. E. and Foote, R. H. (1990). Bovine 1–2–cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell coculture systems. **Biology of reproduction**, 43(1), pp. 97–104.
- Fazeli, A., Duncan, A. E. and Holt, W. V. (1999). Sperm–oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species. **Biology of reproduction**, 60(4), pp. 879–886.
- Georgiou, A. S., Sostaric, E. and Moore, H. D. (2005). A gametes alter the oviductal secretory proteome. **Mol Cell Proteomics**, 4(11), pp. 1785–1796.
- Hansen, P. J. (2004). Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal Reproductive Science**, 82, pp. 349–360.
- Kidson, A., Schoevers, E., Langendijk, P., Verheijden, J., Colenbrander, B. and Bevers, M. (2003). The effect of oviductal epithelial cell co–culture during in vitro maturation on sow oocyte morphology, fertilization and embryo development. **Theriogenology**, 59(9), pp. 1889–1903.
- Kim, D. H., Lee, H. R., Kim, M. G., Lee, J. S., Jin, S. J. and Lee, H. T. (2017). The effect of poly (ADP–ribosyl)ation inhibition on the porcine cumulus–oocyte complex during *in vitro* maturation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 483(1), pp. 752–758.

- Kregel, K. C. (2002). Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. **Journal of applied physiology**, 92(5), pp. 2177–2186.
- Kunavongkrit, A., Chantaraprateep, P., Prateep, P. and Poomsuwan, P. (1987). Ovarian activities and abnormalities in slaughtered gilt. **Thai Journal of Health Research**, 1(2), pp. 9–14.
- Kunavongkrit, A., Karlberg, K. and Einarsson, S. (1983). The relationship between plasma levels estradiol-17 β , progesterone and the consistency of the cervix in the sow. **Theriogenology**, 20(1), pp. 61–66.
- Lim, J. M., Fukui, Y. and One, H. (1992). Developmental competence of bovine oocytes frozen at various maturation stages followed by in vitro maturation and fertilization. **Theriogenology**, 37(2), pp. 351–361.
- Leese, H. J. (1988). The formation and function of oviduct fluid. **Journal of Reproduction Fertility**, 82(2), pp. 843–856.
- Murray, M. K. (1992). Biosynthesis and immunocytochemical localization of an estrogen-dependent glycoprotein and associated morphological alterations in the sheep ampulla oviduct. **Biology of Reproduction**, 47(5), pp. 889–902.
- Paula-Lopes, F. F., Chase, C. C., Al-Katanani, Y. M., Kringer, C. E., Rivera, R. M., Tekin, S., et al. (2003). Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. **Reproduction**, 125(2), pp. 285–294.
- Prunier, A., Dourmad, J. Y. and Etienne, M. (1994). Effect of light regimen under various ambient temperatures on sow and litter performance. **Journal of Animal Science**, 72(6), pp. 1461–1466.
- Romar, R., Coy, P. and Ruiz, S. (2001). Effect of co culture of porcine sperm and oocytes with porcine oviductal epithelial cells on in vitro fertilization. **Anim. Reprod. Sci**, 68(1), pp. 85–98.

- Saikhun, J., Sriussadaporn, S., Thongtip, N., Pinyopummin, A. and Kitiyanant, Y. (2008). Nuclear maturation and development of IVM/IVF canine embryos in synthetic oviductal fluid or in co-culture with buffalo rat liver cells. **Theriogenology**, 69(9), pp. 1104–1110.
- Wegner, K., Lambertz, C. and Gauly, M. (2016). Effects of temperature and temperature–humidity index on the reproductive performance of sows during summer months under a temperate climate. **Journal of Animal Science**, 87(11), pp. 1334–1339.
- Wrathall, A. E. (1980). Ovarian disorder in the sow. **Vet Bull**, 50, pp. 253–272.
- Wright, R. W. and Ellington, Jr. (1995). Morphological and physiological differences between *in vivo*–and *in vitro*–produced preimplantation embryos from livestock species. **Theriogenology**, 44(8), pp. 1167–1189.
- Yaniz, J. L., Lopez, F. and Hunter, R. H. F. (2009). Scanning electron microscopic study of the functional anatomy of the porcine oviductal mucosa. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, 35(1), pp. 28–34.





ภาคผนวก

ภาคผนวก ก วิธีการเก็บตัวอย่างรังไข่ และท่อหน้าไข่, การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์
เยื่อบุผิวท่อหน้าไข่ และการเตรียม Medium IVM I และ IVM II

วิธีการเก็บตัวอย่างรังไข่ และท่อหน้าไข่

วิธีการเก็บตัวอย่างรังไข่ และท่อหน้าไข่ (ตามวิธีของศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวอ่อน
และเซลล์ต้นกำเนิดมหาวิทยาลัยและเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา)

1. ใช้มีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้ว ตัดรังไข่ และท่อหน้าไข่ จากซากของสุกรที่เพิ่งตาย
ล้างด้วย 0.9% NaCl 1 ครั้ง
2. นำรังไข่ และท่อหน้าไข่ใส่ในกระติกที่มี NaCl ความเข้มข้น 0.9 % ที่อุณหภูมิประมาณ
35-38 องศาเซลเซียส
3. นำไปยังห้องปฏิบัติการภายใน 1 ชั่วโมง

วิธีการเตรียมเซลล์เยื่อบุผิวท่อหน้าไข่

1. นำท่อหน้าไข่มาล้างด้วย NaCl ความเข้มข้น 0.9 % (หรือล้างจนกว่าเลือดที่ติดท่อหน้าไข่
ออกให้หมด)
2. ใช้มีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้ว ตัดแยกท่อหน้าไข่ออกจากรังไข่ และล้างท่อหน้าไข่
ด้วย NaCl ความเข้มข้น 0.9 % 2 ครั้ง
3. ใช้มีดผ่าตัด ตัดแยกส่วนเนื้อเยื่อ และไขมันที่ไม่เกี่ยวข้องออกจากท่อหน้าไข่ และล้างด้วย
NaCl ความเข้มข้น 0.9 % 1 ครั้ง และใช้กรรไกรผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วผ่าท่อหน้าไข่ตามแนวยาว
และล้างด้วย Phosphate Buffer Saline 2 ครั้ง
4. ใช้ใบมีดผ่าตัดขูดบริเวณภายในของท่อหน้าไข่ และนำมาย้ายลงใน Phosphate Buffer
Saline
5. นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 500 rpm เป็นเวลา 2 นาที และใช้ Pipette ดูดน้ำที่อยู่เหนือ
ตะกอนทิ้ง และทำแบบนี้ซ้ำอีก 2 รอบ
6. ใช้ Pipette ดูดตะกอนบริเวณก้นหลอด Centrifuge มาเลี้ยงในอาหาร Dulbecco's
Modified Eagle's medium ใน Tissue culture dishes 60 mm
7. นำไปเลี้ยงในตู้บ่ม (Incubator) เป็นตู้ที่ควบคุมอุณหภูมิ และปริมาณของ CO₂
ได้เวลา 12 ชั่วโมง
8. ใช้ Pipette ดูดน้ำใน Tissue culture dishes 60 mm ย้ายลงใน Centrifuge tube
และดูดขึ้นลง ๆ ประมาณ 10 ครั้ง

9. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 500 rpm เป็นเวลา 1 นาที และทำแบบนี้ซ้ำอีก 1 ครั้ง และใช้ Pipette ดูดตะกอนที่อยู่ก้นหลอด Centrifuge tube ย้ายมาเลี้ยงใน Eagle's medium ใน Tissue culture dishes 60 mm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

การเตรียม Cumulus oocytes complexes (COCs)

1. นำรังไข่มาล้างด้วย NaCl 0.9% 2 ครั้ง และตัดแยกรังไข่ออกจากท่อนำไข่ ล้างด้วย NaCl 0.9% ครั้ง
2. สวมถุงมือ และใช้กระดาษทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้ว ซับน้ำที่ติดมากับรังไข่ให้แห้ง
3. ใช้เข็มเบอร์ 18 ต่อกับกระบอกลีดขนาด 10 ซีซี และเจาะรังไข่บริเวณที่เป็น Dominant follicle
4. นำของเหลวที่เจาะได้ย้ายลงใน Snap tube และนำไปพักประมาณ 5 นาที เพื่อรอการตกตะกอนของเซลล์ไข่
5. ใช้ Pipette ดูดตะกอนที่ตกบริเวณก้นหลอด ย้ายลงใน Tissue culture dishes 60 mm
6. นำไปส่งภายใต้กล้อง Stereo Microscope และทำการคัดเลือก Cumulus oocytes complexes (COCs)
7. ใช้ Tube cattish mouth piece ดูดคัดเลือกเอา COCs ที่มีชั้นของ Cumulus หุ้มตั้งแต่ 3 ชั้นขึ้นไป (เกรด A-B)
8. จากนั้นใช้ Tube cattish mouth มาล้างใน Phosphate Buffer Saline 2 ครั้ง ใน Drop และนำมาพักใน Medium-199 ใน drop และย้ายไปเลี้ยงในอาหาร IVM I เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และย้ายมาเลี้ยงในอาหาร IVM II เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
9. ใช้ Tube cattish mouth piece ดูดเอาแต่ COCs มาหยอด้วยเข็มใน Hyaluronidase 0.2% เป็นเวลา 30 วินาที และย้ายไปล้างใน PBS
10. ใช้ Tube cattish mouth piece ดูดเอาแต่ Oocytes มาส่งภายใต้กล้อง Stereo Microscope เพื่อทำการสังเกตดู Polar body

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อหุ้มตัวอ่อน

1. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเยื่อหุ้มตัวอ่อน โดยมีส่วนผสม ดังนี้
 - 1.1 Medium-199 ที่มี Earle's salts และ L-glutamine
 - 1.2 Fetal bovine serum (FBS) 10 เปอร์เซ็นต์
 - 1.3 Antibiotic-Antimycotic (AB-AM)

2. นำ Medium199 ที่มี Earle's salts และL-glutamine ชนิดผงมาละลายในน้ำ Deionized ที่ผ่านการ autoclave 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ที่อัตราส่วน 1 ซองต่อ 1000 มิลลิลิตร ในขวด Duran

3. นำ Fetal bovine serum (FBS) โดยนำไปอุ่นใน Water bath ที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และเติมลงใน M-199 จำนวน 10 เปอร์เซ็นต์ ต่อปริมาณ Medium 199 ที่อยู่ในขวด Duran

4. นำ Antibiotic-Antimycotic (AB-AM) โดยนำไปอุ่นใน Water bath ที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และเติมลงในอาหาร M-199 ที่มีการเติม Fetal bovine serum (FBS) มาแล้ว

5. นำ M-199 มากรองใน Minisart filters pore size 0.2 μm ในขวด Duran ขนาด 1000 ml ที่ผ่านการ Autoclave มาแล้ว

6. นำไปเก็บรักษาไว้ในตู้ที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการใช้งาน

การเตรียม Medium IVM I และ IVM II ตามวิธีของห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนของคณะสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

1. การเตรียมอาหาร IVM I

1.1 สารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของ Medium IVM I

1.1.1 TCM-199 (NaHCO ₃)	9 ml
1.1.2 PFF	1 ml
1.1.3 Pyruvate	100 μl
1.1.4 β -ME	100 μl
1.1.5 EGF	10 μl
1.1.6 P-S	100 μl
1.1.7 PMSG	100 μl
1.1.8 hCG	100 μl
1.1.9 cAMP	100 μl

2. นำ TCM-199 ที่มีส่วนประกอบของ NaHCO₃ ชนิดน้ำปริมาณ 9 มิลลิลิตร จากนั้นเติม PFF ปริมาณ 1 มิลลิลิตร

3. จากนั้นเติม Pyruvate 100 μl , β -ME 100 μl , EGF 10 μl , P-S 100 μl , cAMP 100 μl และนำมากรองผ่าน Minisart filters pore size 0.2 μm

4. เติม PMSG 100 μ l และ hCG 100 μ l นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอใช้งาน

2. การเตรียมอาหาร IVM II

2.1 สารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของ Medium IVM II

2.1.1 TCM-199 (NaHCO ₃)	9 ml
2.1.2 PFF	1 ml
2.1.3 Pyruvate	100 μ l
2.1.4 β -ME	100 μ l
2.1.5 EGF	10 μ l
2.1.6 P-S	100 μ l
2.1.7 cAMP	100 μ l

2.2 นำ TCM-199 ที่มีส่วนประกอบของ NaHCO₃ ชนิดน้ำปริมาณ 9 มิลลิลิตร จากนั้นเติม PFF ปริมาณ 1 มิลลิลิตร

2.3 จากนั้นเติม Pyruvate 100 μ l, β -ME 100 μ l, EGF 10 μ l, P-S 100 μ l, cAMP 100 μ l และนำมากรองผ่าน Minisart filters pore size 0.2 μ m

2.4 นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอใช้งาน



ภาคผนวก ข จำนวนของเซลล์เยื่อบุผิวที่นำไขที่มีชีวิตรอด และเซลล์ตาย ที่นำมาวิเคราะห์ อัตราการมีชีวิตรอดและอัตราการตาย, ความหนาของคิวมูลัสเซลล์ และการพัฒนาของเซลล์ไขจนถึงระยะ Metaphase II

ตาราง 7 แสดงการมีชีวิตรอด และการตายของเซลล์เยื่อบุผิวที่นำไขในสุกร

กลุ่มการทดลอง	การมีชีวิตรอด	การตาย	อัตราการมีชีวิตรอด (%)	อัตราการตาย (%)
T1	102	2	98.04	1.61
T1	96	1	98.96	1.04
T1	110	1	99.09	0.91
T1	87	0	100.00	0.00
T1	115	1	99.13	0.87
T1	98	1	98.98	1.02
T1	109	2	98.17	2.00
T1	127	1	99.21	0.93
T1	91	0	100.00	0.00
T1	104	1	99.04	0.96
T1	121	0	100.00	0.00
T1	92	2	97.83	2.17
T1	123	1	99.19	0.81
T1	113	1	99.12	0.83
T1	80	1	98.75	1.03
T1	92	0	100.00	0.00

ตาราง 7 (ต่อ)

กลุ่มการทดลอง	การมีชีวิตรอด	การตาย	อัตราการมีชีวิตรอด (%)	อัตราการตาย (%)
T2	107	1	99.07	0.93
T2	112	0	100.00	0.00
T2	86	1	98.84	1.16
T2	95	1	98.95	1.05
T2	102	0	100.00	0.00
T2	130	1	99.23	0.99
T2	124	1	99.19	1.28
T2	96	1	98.96	1.09
T2	102	2	98.04	1.96
T2	113	1	99.12	0.88
T2	96	1	98.96	1.04
T2	104	2	98.08	1.92
T2	100	1	99.00	1.00
T2	107	1	99.07	0.76
T2	79	1	98.73	1.04
T2	106	2	98.11	1.89

ตาราง 7 (ต่อ)

กลุ่มการทดลอง	การมีชีวิตรอด	การตาย	อัตราการมีชีวิตรอด (%)	
			อัตราการมีชีวิตรอด (%)	อัตราการตาย (%)
T3	97	1	98.97	1.03
T3	102	3	97.06	2.94
T3	114	2	98.25	1.75
T3	121	5	95.87	4.13
T3	97	1	98.97	1.03
T3	105	4	96.19	3.81
T3	89	1	98.88	1.12
T3	110	4	96.36	4.08
T3	94	1	98.94	1.27
T3	87	3	96.55	3.45
T3	109	2	98.17	1.83
T3	101	1	99.01	0.99
T3	78	1	98.72	1.28
T3	92	2	97.83	2.17
T3	104	5	95.19	4.81
T3	116	4	96.55	3.45

ตาราง 7 (ต่อ)

กลุ่มการทดลอง	การมีชีวิตรอด	การตาย	อัตราการมีชีวิตรอด (%)	อัตราการตาย (%)
T4	91	2	97.80	2.20
T4	94	3	96.81	2.42
T4	113	4	96.46	4.26
T4	132	3	97.73	3.45
T4	96	1	98.96	0.78
T4	106	2	98.11	1.89
T4	85	1	98.82	1.18
T4	103	4	96.12	3.88
T4	112	1	99.11	0.89
T4	124	3	97.58	2.42
T4	117	3	97.44	2.65
T4	92	4	95.65	3.92
T4	108	2	98.15	1.85
T4	98	0	100.00	0.00
T4	79	4	94.94	5.06
T4	113	5	95.58	4.42

ตาราง 7 (ต่อ)

กลุ่มการทดลอง	การมีชีวิตรอด	การตาย	อัตราการมีชีวิตรอด (%)	อัตราการตาย (%)
T5	104	4	96.15	3.67
T5	97	2	97.94	2.06
T5	82	6	92.68	7.32
T5	102	2	98.04	2.08
T5	88	1	98.86	0.96
T5	119	3	97.48	2.52
T5	112	4	96.43	3.57
T5	124	6	95.16	4.48
T5	94	2	97.87	2.13
T5	87	7	91.95	8.05
T5	129	5	96.12	3.88
T5	116	1	99.14	0.86
T5	98	7	92.86	3.88
T5	101	7	93.07	0.86
T5	90	4	95.56	7.14
T5	84	4	95.24	6.93

ตาราง 7 (ต่อ)

กลุ่มการทดลอง	การมีชีวิตรอด	การตาย	อัตราการมีชีวิตรอด (%)	อัตราการตาย (%)
T6	113	5	95.58	4.44
T6	102	7	93.14	4.76
T6	127	2	98.43	4.42
T6	87	3	96.55	6.86
T6	98	5	94.90	1.57
T6	107	4	96.26	3.45
T6	109	4	96.33	5.10
T6	132	7	94.70	3.74
T6	113	8	92.92	3.67
T6	96	2	97.92	5.30
T6	104	1	99.04	7.08
T6	118	6	94.92	2.08
T6	127	8	93.70	0.96
T6	134	2	98.51	5.08
T6	79	4	94.94	6.30
T6	82	3	96.34	1.49

```

> summary(AnovaModel.7)
              Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Treatment     5  157.1   31.409   14.03 3.91e-10 ***
Residuals    90   201.5    2.239
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> with(Dataset, numSummary(Viability...., groups=Treatment, statistics=c("mean", "sd")))
      mean      sd data:n
T1 99.09437 0.6842316    16
T2 98.95937 0.5627962    16
T3 97.59437 1.3179123    16
T4 97.45375 1.4318746    16
T5 95.90937 2.2962040    16
T6 95.88625 1.8946059    16

- - -
T1  T2  T3  T4  T5  T6
"c" "bc" "bc" "b" "a" "a"

```

ภาพ 14 แสดงข้อมูลแสดงการวิเคราะห์อัตราการผลิตของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่
ในการทดลองที่ 1

```

> summary(AnovaModel.6)
              Df Sum Sq Mean Sq F value      Pr(>F)
Treatment     5  144.1   28.818   12.26 0.00000000453 ***
Residuals    90   211.6    2.351
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> with(Dataset, numSummary(Death...., groups=Treatment, statistics=c("mean", "sd")))
      mean      sd data:n
T1 0.886250 0.6650000    16
T2 1.061875 0.5593832    16
T3 2.446250 1.3363077    16
T4 2.579375 1.4724785    16
T5 3.774375 2.4180708    16
T6 4.143750 1.8841687    16

T1  T2  T3  T4  T5  T6
"a" "ab" "ac" "bcd" "cd" "d"

```

ภาพ 15 แสดงข้อมูลแสดงการวิเคราะห์อัตราการตายของเซลล์เยื่อบุผิวท่อนำไข่
ในการทดลองที่ 1

ตาราง 8 แสดงความหนาของเซลล์ชีวมวลในกลุ่มที่สี่ที่ช็อคที่อุณหภูมิ 38.5 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตามลำดับ

กลุ่มการทดลอง	COCs	ชั่วโมงที่ 0 (μm)	ชั่วโมงที่ 22 (μm)	ชั่วโมงที่ 44 (μm)
1	1	2	3.2	5.016
1	2	2.059	3.672	5.459
1	3	1.97	5.314	7.088
1	4	1.8	3.606	7.422
1	5	2.209	4.427	5.215
1	6	2.01	3.6	6.478
1	7	2.341	3.606	5.465
1	8	2	4.127	6.12
1	9	2	3.608	7.088
1	10	2.01	3.406	7.22
1	11	2.2	2.807	7.424
1	12	2.01	3.2	4.817
1	13	2.123	4.405	6.017
1	14	2.059	4.243	6
1	15	1.811	3.225	6.648
1	16	2.209	2.884	6.627
1	17	1.879	2.684	6.277
1	18	1.97	3.97	4.606
1	19	1.98	3.561	7.032
1	20	2.259	3.94	4.545
1	21	2.025	3.394	5.934
1	22	1.998	3.124	6.675
1	23	2.209	3.001	6.966
1	24	2.2	3.124	5.922
1	25	2.209	3.96	6.03
1	26	1.889	2.884	6.088

ตาราง 8 (ต่อ)

กลุ่มการทดลอง	COCs	ชั่วโมงที่ 0 (μm)	ชั่วโมงที่ 22 (μm)	ชั่วโมงที่ 44 (μm)
1	27	2.2	3.807	5.415
1	28	2.154	3.225	3.677
1	29	2.126	4.88	5.122
1	30	2.2	3.205	6.708
1	31	1.8	2.807	6.119
1	32	2.21	3.2	5.906
1	33	2.088	4.405	6.403
1	34	2.145	4.243	5.814
1	35	2.204	3.329	8.438
1	36	2.154	4.608	5.632
1	37	2.209	3.4	5.295
1	38	2.04	2.973	6.428
1	39	2	2.8	6.2
1	40	2.04	2.284	5.016
1	41	1.98	2.608	5.855
1	42	2.263	4.708	6.229
1	43	2	5.45	5.823
1	44	2.236	4.8	6.612
1	45	2.474	3.975	5
1	46	2.312	4.4	5.145
1	47	2.163	3.828	4.72
1	48	2.174	3.2	6.403
1	49	2.332	3.406	5.814
1	50	2.009	3.13	8.438
1	51	2.28	4.864	4.545
1	52	1.789	4.567	5.934
1	53	2.332	4.604	6.675
1	54	1.821	4.4	6.478

ตาราง 8 (ต่อ)

กลุ่มการทดลอง	COCs	ชั่วโมงที่ 0 (μm)	ชั่วโมงที่ 22 (μm)	ชั่วโมงที่ 44 (μm)
1	55	2.025	3.206	5.465
1	56	1.998	3.256	6.12
1	57	2.209	3.06	7.088
1	58	2.2	3.2	5.96
1	59	2.209	3.4	4.982
1	60	1.889	3.007	6.9
1	61	2.2	3.453	7.124
1	62	2.088	4.833	6.5
1	63	2.145	3.493	5.85
1	64	2.28	3	5.855
1	65	2.132	3.688	6.229
1	66	1.98	4.02	6.708
1	67	2.154	4.045	6.119
1	68	2.126	4.683	5.145
1	69	2.2	3.027	5.465
1	70	1.8	3.578	6.12
1	71	2.21	4.252	7.088
1	72	2.088	4.005	7.22
1	73	2.236	3.328	7.088
1	74	2.474	3.688	7.422
1	75	2.312	3.406	5.215
1	76	1.821	4.252	8.438
1	77	2.025	3.821	5.632
1	78	1.998	3.046	5.295
1	79	2.209	3.406	4.545
1	80	1.85	3.2	6.4
1	81	2.205	3.672	5.82
1	82	1.8	3.314	8.739

ตาราง 8 (ต่อ)

กลุ่มการทดลอง	COCs	ชั่วโมงที่ 0 (μm)	ชั่วโมงที่ 22 (μm)	ชั่วโมงที่ 44 (μm)
1	83	1.97	3.606	5.65
1	84	2.18	4.427	5.2
1	85	2.25	3.6	6.48
1	86	2.025	2.608	6.2
1	87	1.972	3.406	5.017
1	88	2.25	3.606	5.855
1	89	2.275	4.427	6.2
1	90	2.332	3.314	5.87
1	91	1.821	4.472	6.678
1	92	2.025	3.94	4.982
1	93	1.998	3.394	6.9
1	94	2.209	3.124	7.124
1	95	2.2	3.96	6.5
1	96	2.209	4.02	5.8
1	97	1.889	4.045	5.89
1	98	2.2	4.683	6.2
1	99	2.088	3.027	6.79
1	100	2.145	3.578	6.119
1	101	2.263	4.4	6.59
2	1	2.341	3.2	5.814
2	2	2	3.672	8.438
2	3	2	5.314	4.545
2	4	2.01	3.606	5.934
2	5	2.2	4.427	6.675
2	6	2.01	3.6	6.478
2	7	2.123	3.606	5.465
2	8	2.154	4.127	6.12

ตาราง 8 (ต่อ)

กลุ่มการทดลอง	COCs	ชั่วโมงที่ 0 (μm)	ชั่วโมงที่ 22 (μm)	ชั่วโมงที่ 44 (μm)
2	9	2.126	3.608	7.088
2	10	2.2	3.406	5.96
2	11	1.8	2.807	4.982
2	12	2.21	3.2	6.9
2	13	2.088	4.405	7.124
2	14	2.145	4.243	6.5
2	15	2.204	3.225	5.85
2	16	2	2.884	5.855
2	17	2.236	2.684	6.229
2	18	2.474	3.97	6.708
2	19	2.312	3.561	6.119
2	20	2.163	3.94	5.145
2	21	2.174	3.394	5.465
2	22	2.332	3.124	6.12
2	23	2.009	3.001	7.088
2	24	2.2	3.124	7.22
2	25	2.209	3.96	7.088
2	26	1.889	2.884	7.422
2	27	2.2	3.807	5.215
2	28	2.088	3.225	8.438
2	29	2.145	4.88	5.632
2	30	2.28	3.205	5.295
2	31	2.132	2.807	4.545
2	32	2.474	3.2	6.4
2	33	2.312	4.405	5.82
2	34	1.821	4.243	8.739
2	35	2.025	3.329	5.65
2	36	2.154	4.608	5.2

ตาราง 8 (ต่อ)

กลุ่มการทดลอง	COCs	ชั่วโมงที่ 0 (μm)	ชั่วโมงที่ 22 (μm)	ชั่วโมงที่ 44 (μm)
2	37	2.126	3.4	6.48
2	38	2.2	2.973	6.2
2	39	1.8	2.8	5.017
2	40	2.21	2.284	5.855
2	41	2.088	2.608	6.2
2	42	2.145	4.708	5.87
2	43	1.972	5.45	6.678
2	44	2.25	4.8	4.982
2	45	2.275	3.975	6.9
2	46	2.332	4.4	7.124
2	47	1.821	3.828	6.5
2	48	2.025	3.2	5.8
2	49	1.998	3.406	5.89
2	50	2.209	3.13	6.2
2	51	2.2	4.864	6.79
2	52	2.209	4.567	6.119
2	53	1.889	3.78	6.59
2	54	2.2	3.606	5.17
2	55	2.088	4.127	5.016
2	56	2.145	3.608	5.459
2	57	2.263	3.406	7.088
2	58	2.025	2.807	7.422
2	59	2.154	3.2	5.215
2	60	2.126	4.405	6.478
2	61	2.145	3.65	5.465
2	62	1.972	4.12	6.12
2	63	2.25	3.798	7.088
2	64	2.025	3	7.22

ตาราง 8 (ต่อ)

กลุ่มการทดลอง	COCs	ชั่วโมงที่ 0 (μm)	ชั่วโมงที่ 22 (μm)	ชั่วโมงที่ 44 (μm)
2	65	1.998	3.329	7.424
2	66	2.209	4.608	4.817
2	67	2.2	3.4	6.017
2	68	1.8	2.8	6
2	69	2.21	4.88	6.648
2	70	2.088	3.205	6.627
2	71	2	2.807	6.277
2	72	2.01	3.2	4.606
2	73	2.2	4.405	7.032
2	74	2.312	4.243	4.545
2	75	2.163	3.329	5.934
2	76	2.174	4.608	6.675
2	77	2.332	3.4	6.966
2	78	2.009	2.973	5.922
2	79	2.145	2.8	6.03
2	80	2.263	2.284	6.088
2	81	2.025	3.56	5.415
2	82	2.154	3.79	6.627
2	83	2.126	2.884	6.277
2	84	2.145	2.684	4.606
2	85	1.98	3.97	7.032
2	86	2.154	3.2	4.545
2	87	2.126	4.405	5.934
2	88	2.2	2.284	6.119
2	89	1.8	3.97	6.59
2	90	2.46	3.329	5.17
2	91	2.332	4.608	5.016
2	92	1.821	3.4	5.459

ตาราง 8 (ต่อ)

กลุ่มการทดลอง	COCs	ชั่วโมงที่ 0 (μm)	ชั่วโมงที่ 22 (μm)	ชั่วโมงที่ 44 (μm)
2	93	2.025	4.4	5.215
2	94	1.998	3.828	8.438
2	95	2.209	3.2	5.632
2	96	2.132	2.8	5.295
2	97	1.98	2.284	4.405
2	98	2.154	2.8	4.472
2	99	2.126	2.284	4.4
2	100	1.998	2.608	7.032
2	101	2.209	3.807	5.934
2	102	2.74	3.225	5.6
3	1	2.341	4.127	4.72
3	2	2	3.608	6.403
3	3	2	3.406	5.814
3	4	2.01	2.65	8.438
3	5	2.2	3.2	4.545
3	6	2.01	3.96	5.934
3	7	2.123	3.65	6.675
3	8	2.154	4.37	6.478
3	9	2.126	3.798	5.465
3	10	2.2	3	6.12
3	11	1.8	3.329	5.088
3	12	2.21	4	5.96
3	13	2.088	3.4	4.982
3	14	2.145	2.8	6.9
3	15	2.204	4.88	6.124
3	16	2	3.205	6.5
3	17	2.236	2.807	5.85
3	18	2.474	3.2	5.855

ตาราง 8 (ต่อ)

กลุ่มการทดลอง	COCs	ชั่วโมงที่ 0 (μm)	ชั่วโมงที่ 22 (μm)	ชั่วโมงที่ 44 (μm)
3	19	2.312	4.405	6.229
3	20	2.163	4.243	6.708
3	21	2.174	3.329	5.119
3	22	1.811	4.21	6.9
3	23	2.209	3.4	2.124
3	24	1.879	2.973	6.5
3	25	1.97	2.8	5.85
3	26	1.98	2.284	5.855
3	27	2.259	3.56	8.438
3	28	2.025	3.79	4.545
3	29	1.998	2.884	5.934
3	30	2.209	2.684	6.675
3	33	2.132	4.005	6.12
3	34	2.474	2.284	6.088
3	35	2.312	3.97	5.96
3	36	1.821	3.329	4.982
3	37	2.263	4.408	6.9
3	38	2	3.4	6.124
3	39	2.236	4.4	6.5
3	40	2.474	3.828	5.85
3	41	2.312	3.2	5.855
3	42	2.163	2.8	6.229
3	43	2.174	2.284	6.708
3	44	2.332	2.8	6.119
3	45	2.009	2.284	5.145
3	46	2.28	2.608	5.465
3	47	2.25	3.807	6.12
3	48	2.275	4.4	6.088

ตาราง 8 (ต่อ)

กลุ่มการทดลอง	COCs	ชั่วโมงที่ 0 (μm)	ชั่วโมงที่ 22 (μm)	ชั่วโมงที่ 44 (μm)
3	49	2.332	3.828	6.22
3	50	2.236	3.2	5.088
3	51	1.998	3.406	6.422
3	52	2.209	3.13	5.215
3	53	2.2	2.884	5.438
3	54	2.76	2.684	5.632
3	55	2.21	3.97	5.295
3	56	2.088	3.2	4.545
3	57	2.236	4.127	6.4
3	58	2.474	3.608	5.82
3	59	2.312	3.406	8.739
3	60	1.821	2.807	5.65
3	61	2.025	3.2	5.2
3	62	1.998	4.4	6.48
3	63	2.209	3.828	6.2
3	64	1.85	3.2	5.017
3	65	2.205	3.406	5.855
3	66	2.025	3.13	6.2
3	67	2.154	3.2	5.87
3	68	2.126	3.4	5.678
3	69	2.2	3.007	4.982
3	70	2.332	3.453	6.9
3	71	1.821	4.833	5.124
3	72	2.275	3.493	6.5
3	73	2.332	3	5.8
3	74	1.821	3.688	5.89
3	75	2.025	4.02	6.2
3	76	1.998	4.045	5.79

ตาราง 8 (ต่อ)

กลุ่มการทดลอง	COCs	ชั่วโมงที่ 0 (μm)	ชั่วโมงที่ 22 (μm)	ชั่วโมงที่ 44 (μm)
3	77	2.209	4.683	6.119
3	78	2.2	3.027	6.59
3	79	2.209	3.578	5.17
3	80	1.889	2.807	5.016
3	81	2.2	3.2	5.459
3	82	1.972	4.405	5.088
3	83	2.25	3.65	5.422
3	84	2.275	3.65	5.215
3	85	2.332	3.406	5.478
3	86	1.821	3.606	5.465
3	87	2.025	3.427	6.12
3	88	1.998	3.314	6.088
3	89	2.209	3.472	7.22
3	90	2.2	3.94	5.424
3	91	1.809	3.4	4.817
3	92	1.889	3.4	5.017
3	93	1.805	3.828	6
3	94	1.8	3.2	4.648
3	95	1.97	2.8	5.627
3	96	2.18	2.284	4.277
3	97	2.25	2.8	4.606
3	98	1.889	2.284	5.032
3	99	2.2	3.4	4.545
3	100	1.972	2.973	4.934
3	101	2.25	2.8	5.675
4	1	2.332	4.243	8.438
4	2	2.009	3.329	6.545
4	3	2.28	4.608	5.934

ตาราง 8 (ต่อ)

กลุ่มการทดลอง	COCs	ชั่วโมงที่ 0 (μm)	ชั่วโมงที่ 22 (μm)	ชั่วโมงที่ 44 (μm)
4	4	2.25	3.4	6.675
4	5	2.275	2.973	6.478
4	6	2.332	2.8	5.465
4	7	2.236	2.284	6.12
4	8	1.998	3.56	6.088
4	9	2.209	3.5	5.96
4	10	2.2	2.884	4.982
4	11	2.76	2.684	6.9
4	12	2.21	3.97	6.124
4	13	2.088	3.2	6.5
4	14	2.236	3.405	5.85
4	15	2.474	2.284	5.855
4	16	2.312	3.97	6.229
4	17	1.821	3.329	6.708
4	18	2.025	2.8	5.119
4	19	1.998	2.284	6.9
4	20	2.209	3.4	2.124
4	21	1.85	4.608	6.5
4	22	2.205	3.4	5.85
4	23	2.025	2.973	4.65
4	24	2.154	2.8	6.088
4	25	2.126	2.284	5.01
4	26	2.2	3.65	4.54
4	27	2.332	3.65	5.016
4	28	1.821	3.406	5.459
4	29	2.275	3.606	7.088
4	30	2.332	4.427	7.422

ตาราง 8 (ต่อ)

กลุ่มการทดลอง	COCs	ชั่วโมงที่ 0 (μm)	ชั่วโมงที่ 22 (μm)	ชั่วโมงที่ 44 (μm)
4	31	1.821	3.314	5.215
4	32	2.025	4.472	6.478
4	33	1.998	3.94	5.465
4	34	2.209	3.4	6.12
4	35	2.2	4.4	7.088
4	36	2.209	3.828	7.22
4	37	1.889	3.2	7.424
4	38	2.2	2.8	4.817
4	39	1.972	2.284	6.017
4	40	2.25	2.8	6
4	41	2.275	2.284	6.648
4	42	2.332	3.4	6.627
4	43	1.821	2.973	6.277
4	44	2.025	3.2	4.606
4	45	1.998	3.405	7.032
4	46	2.209	2.284	4.545
4	47	2.2	3.97	5.934
4	48	2.209	3.329	6.675
4	49	1.889	3.2	6.966
4	50	2.205	3.672	5.922
4	51	1.8	2.807	6.03
4	52	1.97	3.606	6.088
4	53	2.18	2.807	5.415
4	54	2.25	3.6	3.677
4	55	1.889	3.606	5.122
4	56	2.2	4.127	6.708
4	57	1.972	3.608	6.119
4	58	2.25	3.406	5.906

ตาราง 8 (ต่อ)

กลุ่มการทดลอง	COCs	ชั่วโมงที่ 0 (μm)	ชั่วโมงที่ 22 (μm)	ชั่วโมงที่ 44 (μm)
4	59	2	2.807	6.403
4	60	2.059	3.2	5.814
4	61	1.97	4.405	5.438
4	62	1.8	4.243	5.632
4	63	2.209	3.225	5.295
4	64	2.01	2.884	6.428
4	65	2.341	2.684	6.2
4	66	2	3.97	5.016
4	67	2	3.561	4.855
4	68	2.01	3.94	4.229
4	69	2.2	3.394	5.823
4	70	2.01	3.124	6.612
4	71	2.123	3.001	5
4	72	2.059	3.124	5.145
4	73	1.811	3.96	4.72
4	74	2.209	2.884	6.403
4	75	1.879	3.807	5.814
4	76	1.97	3.225	5.438
4	77	1.98	3.88	4.545
4	78	2.259	3.205	5.934
4	79	2.025	2.807	6.675
4	80	1.998	3.2	6.478
4	81	2.209	4.405	5.465
4	82	2.2	4.243	5.12
4	83	2.209	3.329	5.088
4	84	1.889	4.608	5.96
4	85	2.2	3.4	4.982
4	86	2.154	2.973	6.9

ตาราง 8 (ต่อ)

กลุ่มการทดลอง	COCs	ชั่วโมงที่ 0 (μm)	ชั่วโมงที่ 22 (μm)	ชั่วโมงที่ 44 (μm)
4	87	2.126	3.001	4.124
4	88	2.2	3.124	6.5
4	89	1.8	3.96	5.85
4	90	2.21	2.884	4.855
4	91	2.088	3.807	5.229
4	92	2.145	3.225	5.708
4	93	2.204	4.88	6.119
4	94	2.01	3.205	5.145
4	95	2.341	2.807	5.465
4	96	2	3.2	6.12
4	97	2	3.405	5.088
4	98	2.01	3.243	5.22
4	99	2.2	3.329	5.088
4	100	2.01	4.608	5.422
4	101	2.01	3.4	5.215
5	1	2	3.5	4.627
5	2	2.059	2.98	5.277
5	3	1.97	3.27	4.606
5	4	1.8	3.6	6.032
5	5	2.209	3.39	4.545
5	6	2.01	4.148	5.934
5	7	2.341	4.133	6.675
5	8	2	2.8	5.966
5	9	2	2.284	5.922
5	10	2.01	3.65	6.03
5	11	2.2	3.65	6.088
5	12	2.01	3.406	5.415
5	13	2.123	3.606	6.627

ตาราง 8 (ต่อ)

กลุ่มการทดลอง	COCs	ชั่วโมงที่ 0 (μm)	ชั่วโมงที่ 22 (μm)	ชั่วโมงที่ 44 (μm)
5	14	2.059	4.427	6.277
5	15	2.402	3.314	4.606
5	16	2.209	4.472	7.032
5	17	1.879	3.94	4.545
5	18	1.97	3.4	5.934
5	19	1.98	4.4	6.119
5	20	2.259	3.828	6.59
5	21	2.025	3.2	5.17
5	22	1.998	2.8	5.855
5	23	2.209	2.284	6.229
5	24	2.2	2.8	6.708
5	25	2.209	2.284	6.119
5	26	1.889	3.4	5.145
5	27	2.2	2.973	5.465
5	28	2.154	3.2	6.12
5	29	2.126	3.405	7.088
5	30	2.2	2.284	7.22
5	33	2.088	3.2	5.215
5	34	2.145	3.672	8.438
5	35	2.204	2.807	5.632
5	36	2.01	3.64	5.295
5	37	2.341	3.973	5.96
5	38	2	3.433	4.982
5	39	2	2.98	6.9
5	40	2.01	2.973	6.124
5	41	2.2	2.8	6.5
5	42	2.01	2.284	5.85
5	43	2.01	3.56	5.855

ตาราง 8 (ต่อ)

กลุ่มการทดลอง	COCs	ชั่วโมงที่ 0 (μm)	ชั่วโมงที่ 22 (μm)	ชั่วโมงที่ 44 (μm)
5	44	2.126	2.973	6.229
5	45	2.145	3.672	6.708
5	46	1.98	2.807	5.119
5	47	2.154	3.64	6.9
5	48	2.126	3.973	2.124
5	49	2.2	3.406	6.5
5	50	2	3.828	5.85
5	51	2.46	3.2	4.65
5	52	2.332	2.8	6.088
5	53	1.821	2.284	5.01
5	54	2.025	2.8	4.54
5	55	1.998	2.284	5.016
5	56	1.972	2.608	5.459
5	57	2.25	3.807	6.088
5	58	2.275	2.284	5.422
5	59	2.332	2.608	5.215
5	60	2.3	3.807	6.478
5	61	2.025	3.225	5.465
5	62	1.998	3.4	6.12
5	63	2.209	2.65	7.088
5	64	2.2	3.2	6.12
5	65	2.209	3.96	4.72
5	66	2.22	3.65	6.403
5	67	2.205	4.37	5.814
5	68	2.163	3.798	8.438
5	69	2.174	3	4.545
5	70	2.332	3.329	5.934
5	71	2.009	4	5.675

ตาราง 8 (ต่อ)

กลุ่มการทดลอง	COCs	ชั่วโมงที่ 0 (μm)	ชั่วโมงที่ 22 (μm)	ชั่วโมงที่ 44 (μm)
5	72	2.28	4.427	6.478
5	73	1.789	3.314	5.465
5	74	2.332	4.472	5.12
5	75	1.821	3.94	5.088
5	76	2.025	3.394	5.96
5	77	1.998	3.124	4.982
5	78	2.209	3.96	6.9
5	79	2.2	4.02	6.124
5	80	2.209	4.045	6.5
5	81	1.889	4.683	5.85
5	82	2.2	3.2	5.855
5	83	2.088	4.405	5.229
5	84	2.145	4.243	6.708
5	85	2.332	3.329	5.119
5	86	2.303	4.608	6.9
5	87	2.025	3.4	2.124
5	88	1.998	2.973	6.5
5	89	2.209	2.8	5.85
5	90	2.2	2.284	5.855
5	91	2.209	3.56	5.438
5	92	2.45	3.79	4.545
5	93	2.2	2.884	5.934
5	94	2.088	2.684	5.465
5	95	2.145	3.97	6.12
5	96	2.263	3.405	5.088
5	97	2.025	2.284	5.22
5	98	1.998	3.97	5.088
5	99	2.209	3.329	5.422

ตาราง 8 (ต่อ)

กลุ่มการทดลอง	COCs	ชั่วโมงที่ 0 (μm)	ชั่วโมงที่ 22 (μm)	ชั่วโมงที่ 44 (μm)
5	100	2.2	2.8	6.42
5	101	2.209	2.284	5.982
6	1	2.18	2.884	6.088
6	2	2.25	3.807	6.22
6	3	1.889	3.225	5.088
6	4	1.998	3.88	6.422
6	5	1.789	3.205	5.215
6	6	2.332	2.807	5.438
6	7	1.821	3.2	5.632
6	8	2.025	2.807	5.295
6	9	1.998	3.2	4.545
6	10	2.209	3.405	6.4
6	11	2.2	3.243	5.82
6	12	2.209	3.329	8.739
6	13	1.889	3.97	5.017
6	14	2.2	3.561	5.855
6	15	2.088	3.94	6.2
6	16	2.145	3.394	6.428
6	17	2.28	3.124	6.2
6	18	2.132	3.001	5.016
6	19	1.98	3.124	4.855
6	20	2.154	3.96	5.295
6	21	2.126	2.884	5.438
6	22	2.2	3.807	5.632
6	23	1.8	3.225	5.295
6	24	2.21	4.88	4.545
6	25	2.088	3.205	3.927
6	26	2.236	2.807	4.5

ตาราง 8 (ต่อ)

กลุ่มการทดลอง	COCs	ชั่วโมงที่ 0 (μm)	ชั่วโมงที่ 22 (μm)	ชั่วโมงที่ 44 (μm)
6	27	2.474	3.2	4.372
6	28	2.312	4.005	3.98
6	29	1.821	4.243	4
6	30	2.025	3.329	5.111
6	31	1.998	4.608	4.104
6	32	2.209	3.4	2.408
6	33	1.85	2.973	3.499
6	34	2.205	2.8	3.688
6	35	1.8	2.284	5.65
6	36	1.97	2.608	5.2
6	37	2.18	3.708	6.48
6	38	2.25	4.45	6.2
6	39	2.025	4.8	5.017
6	40	1.972	3.975	5.855
6	41	2.25	4.4	6.2
6	42	2.275	3.828	3.72
6	43	2.332	3.2	4.408
6	44	1.821	3.406	4.341
6	45	2.025	3.13	3.432
6	46	1.998	4.864	4.668
6	47	2.209	3.567	6.277
6	48	2.2	3.78	4.606
6	49	2.209	3.606	7.032
6	50	1.889	4.127	4.545
6	51	2.2	3.608	5.934
6	52	2.088	3.406	6.675
6	53	2.145	2.807	6.966
6	54	2.263	3.2	5.922

ตาราง 8 (ต่อ)

กลุ่มการทดลอง	COCs	ชั่วโมงที่ 0 (μm)	ชั่วโมงที่ 22 (μm)	ชั่วโมงที่ 44 (μm)
6	55	2.01	4.405	6.03
6	56	2.2	3.65	6.088
6	57	2.01	4.12	5.415
6	58	2.123	3.798	6.627
6	59	2.154	3	3.677
6	60	2.126	3.329	5.122
6	61	2.2	4.608	6.708
6	62	1.8	3.4	6.478
6	63	2.21	2.8	5.465
6	64	2.088	4.88	5.12
6	65	2.145	3.205	5.088
6	66	2.204	2.807	6.03
6	67	2	3.2	6.088
6	68	2.236	4.405	5.415
6	69	2.474	4.243	3.677
6	70	2.312	3.329	5.122
6	71	2.163	3.608	6.708
6	72	2.174	3.4	6.119
6	73	2.332	2.973	5.906
6	74	2.009	2.8	6.403
6	75	2.2	2.284	5.814
6	76	2.209	3.56	5.438
6	77	1.889	3.79	5.632
6	78	2.2	2.884	5.295
6	79	2.088	2.684	6.428
6	80	2.145	3.97	6.2
6	81	2.28	3.2	5.016
6	82	2.132	4.405	5.855

ตาราง 8 (ต่อ)

กลุ่มการทดลอง	COCs	ชั่วโมงที่ 0 (μm)	ชั่วโมงที่ 22 (μm)	ชั่วโมงที่ 44 (μm)
6	83	2.474	2.284	5.229
6	84	2.312	3.97	5.823
6	85	1.821	3.329	6.612
6	86	2.025	4.608	6.708
6	87	2.154	3.4	6.119
6	88	2.126	3.406	6.145
6	89	2.2	3.828	7.465
6	90	1.8	3.2	6.12
6	91	2.21	2.8	7.088
6	92	2.088	2.284	7.22
6	93	2.145	2.8	7.088
6	94	1.972	2.284	8.422
6	95	2.25	2.608	6.215
6	96	2.275	3.807	5.438
6	97	2.332	3.225	6.632
6	98	1.821	3.4	6.295
6	99	2.025	2.8	7.545
6	100	1.998	3.2	6.4
6	101	2.209	3.205	7.82

```

AnovaModel.4 <- aov(X22h ~ Treatment, data=Dataset)

> summary(AnovaModel.4)
          Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Treatment   5    7.36   1.4725     3.65 0.00291 **
Residuals  600 242.43   0.4034
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> with(Dataset, numSummary(X22h, groups=Treatment, statistics=c("mean", "sd")))
      mean      sd data:n
treatment 1 3.683703 0.6455010    101
treatment 2 3.570314 0.7144071    102
treatment 3 3.423921 0.5953347    101
treatment 4 3.396030 0.5982026    101
treatment 5 3.370228 0.6269613    101
treatment 6 3.449119 0.6219687    101

treatment 1 treatment 2 treatment 3 treatment 4 treatment 5 treatment 6
      "b"      "ab"      "a"      "a"      "a"      "a"

```

ภาพ 16 แสดงข้อมูลแสดงการวิเคราะห์อัตราการขยายของเซลล์ควมูลัส
ที่ล้อมรอบเซลล์ไข่ในช่วงโม่งที่ 22 ในการทดลองที่ 2

```

> AnovaModel.5 <- aov(X44h ~ Treatment, data=Dataset)

> summary(AnovaModel.5)
          Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
Treatment   5    17.7   3.535     3.932 0.00162 **
Residuals  600  540.3   0.899
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

> with(Dataset, numSummary(X44h, groups=Treatment, statistics=c("mean", "sd")))
      mean      sd data:n
treatment 1 6.124752 0.9038920    101
treatment 2 6.088461 0.9348563    102
treatment 3 5.803228 0.8825690    101
treatment 4 5.795228 0.9020769    101
treatment 5 5.804693 0.9542552    101
treatment 6 5.650921 1.0953032    101

treatment 1 treatment 2 treatment 3 treatment 4 treatment 5 treatment 6
      "b"      "ab"      "a"      "a"      "a"      "a"

```

ภาพ 17 แสดงข้อมูลแสดงการวิเคราะห์อัตราการขยายของเซลล์ควมูลัส
ที่ล้อมรอบเซลล์ไข่ ในช่วงโม่งที่ 44ในการทดลองที่ 2

ตาราง 9 แสดงการพัฒนาของเซลล์ไข่จนถึงระยะ Metaphase II

กลุ่มการทดลอง	COCs (n)	Metaphase II	Degenerate
1	42	30	12
1	22	12	10
1	37	21	16
1	18	13	5
1	36	22	14
1	43	34	9
2	37	25	12
2	28	19	9
2	12	7	5
2	29	17	12
2	22	16	6
2	28	17	11
3	40	25	15
3	32	21	11
3	37	20	17
3	25	17	8
3	18	11	7
3	20	12	8
4	40	25	15
4	37	21	16
4	25	16	9
4	18	12	6
4	30	18	12
4	20	11	9

ตาราง 9 (ต่อ)

กลุ่มการทดลอง	COCs (n)	Metaphase II	Degenerate
5	35	20	15
5	30	17	13
5	28	19	9
5	17	11	6
5	22	13	9
5	26	17	9
6	22	12	8
6	35	20	15
6	20	15	5
6	15	9	6
6	38	24	14
6	30	16	14

```

> with(Dataset, numSummary(MII...., groups=Treatment, statistics=c("mean",
+ "sd")))
      mean      sd data:n
t1 65.85565 9.792085      6
t2 64.30338 5.917130      6
t3 61.88169 4.842207      6
t4 60.82057 4.431096      6
t5 61.80801 4.761543      6
t6 61.82938 8.128226      6

      t1 t2 t3 t4 t5 t6
"a" "a" "a" "a" "a" "a"

```

ภาพ 18 แสดงข้อมูลแสดงการวิเคราะห์อัตราการพัฒนาของเซลล์ไข่
ไปจนถึงระยะ Metaphase II ในการทดลองที่ 3

```

> with(Dataset, numSummary(Degenerate...., groups=Treatment
+  statistics=c("mean", "sd")))
      mean      sd data:n
t1 34.14435 9.792085      6
t2 35.69662 5.917130      6
t3 38.11831 4.842207      6
t4 39.17943 4.431096      6
t5 38.19199 4.761543      6
t6 38.17062 8.128226      6

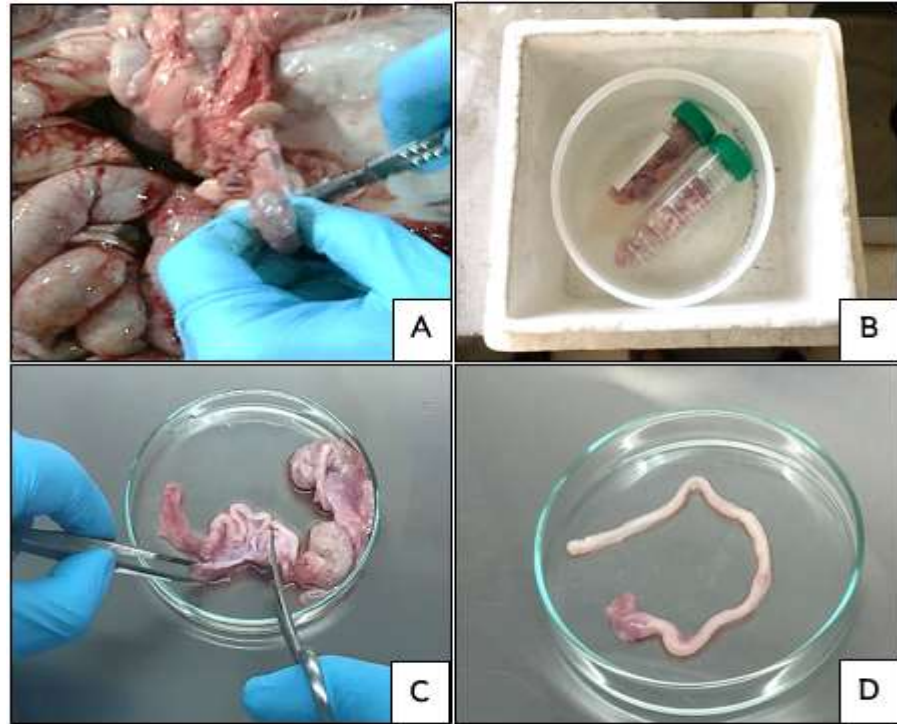
      t1  t2  t3  t4  t5  t6
      "a" "a" "a" "a" "a" "a"

```

ภาพ 19 แสดงข้อมูลแสดงการวิเคราะห์อัตราการเสียหายของเซลล์ไข่
ในการทดลองที่ 3

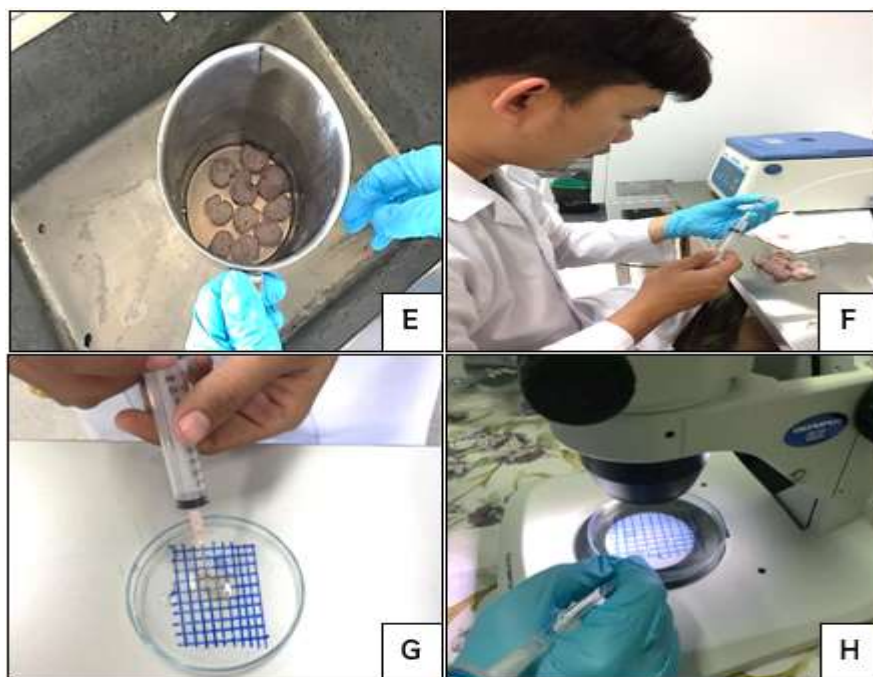


ภาคผนวก ค รูปภาพขณะปฏิบัติการทดลอง



ภาพ 20 แสดงรูปภาพขณะปฏิบัติการในการทดลองที่ 1

- หมายเหตุ: ภาพ A การเก็บตัวอย่างรังไข่ และท่อนำไข่ ในโรงฆ่าสัตว์ ขณะปฏิบัติการ
ภาพ B การเก็บตัวอย่างรังไข่ และท่อนำไข่ในหลอดในหลอดทดลอง ขณะปฏิบัติการ
ภาพ C การตัดแยกท่อนำไข่ ออกจากรังไข่ ขณะปฏิบัติการ
ภาพ D ภาพท่อนำไข่ ขณะปฏิบัติการ



ภาพ 21 แสดงรูปภาพขณะปฏิบัติการในการทดลองที่ 2

หมายเหตุ: ภาพ E ภาพการล้างรังไข่ขณะปฏิบัติการ

ภาพ F ภาพการเจาะรังไข่ ขณะปฏิบัติการ

ภาพ G ภาพการรวบรวมเซลล์ไข่ขณะปฏิบัติการ

ภาพ H ภาพการคัดเลือกเซลล์ไข่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอขณะปฏิบัติการ



ประวัติผู้วิจัย

