กระบวนการพัฒนาของตัวอ่อนระยะแรกระหว่างการปฏิสนธิภายนอกร่างกายในกระบือปลัก

The Dynamics of Early Embryo Development During *In Vitro* Fertilization In Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*)

วิบัณฑิตา จันทร์กิติสกุล[1] ธีรวัฒน์ ธาราศานิต[1] เกรียงศักดิ์ ทาศรีภู[2] และมงคล เตชะกำพุ[1]

Vibuntita Chankitisakul[1], Theerawat Tharasanit[1], Kriengsak Tasripoo[2] and Mongkol Techakumphu[1]

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการพัฒนาของตัวอ่อนระยะแรกระหว่างการปฏิสนธิภายนอกร่างกายในกระบือปลัก โดยดูผลการเปลี่ยนแปลงของโครมาตินและเซลล์โครงร่างซึ่งประกอบด้วยแอกตินไมโครฟิลาเมนต์ และไมโครทิวบูล ทำการเลี้ยงโอโอไซต์และปฏิสนธิภายนอกร่างกายจำนวน 118 ใบ จากนั้นนำโอโอไซต์ที่เลี้ยงนาน 12, 18, 24 และ 30 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิมาตรวจดูการเปลี่ยนแปลงของโครมาตินและเซลล์โครงร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์หลังการย้อมสีเรืองแสงฟลูออเรสซีนดังต่อไปนี้คือ ย้อมไมโครทิวบูลด้วย monoclonal-α-tubulin-TRIT C ย้อมแอกตินไมโครฟิลาเมนต์ด้วย Alexa 488 phalloidin และย้อมโครมาตินด้วย DAPI ผลการศึกษาพบว่าเส้นใยโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นจากไมโครทิวบูลบริเวณฐานของหัวอสุจิ หรือ sperm aster นั้นมีบทบาทสำคัญในการช่วยให้เกิดการเคลื่อนที่ของโปรนิวเคลียสของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมีย (male and female pronuclei) ขณะที่เส้นใยโปรตีนชนิดแอกตินไมโครฟิลาเมนต์น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ของตัวอ่อน

คำสำคัญ : แอกตินไมโครฟิลาเมนต์ ไมโครทิวบูล การพัฒนาของตัวอ่อน การปฏิสนธิ

ABSTRACT

The objective of this study was to examine the redistribution of cytoskeleton and chromatin configurations in swamp buffalo oocytes during fertilization and cleavage. A total of 118 cumulus oocyte complexs were collected and were used in this study. After *in vitro* fertilization, presumptive zygotes and embryos were fixed at various time points (12, 18, 24 and 30 h), and microtubules, microfilaments and chromatin were fluorescently labeled using monoclonal-α-tubulin, Phalloidin and DAPI, respectively. The redistribution pattern of cell cytoskeleton and chromosome of the zygotes and embryos was examined under epifluorescent microscopy. The results indicated that a dense network of

[1] ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330
Department of Obstetrics, Gynaecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

[2] ศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการปศุสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330
Research and Development Center for Livestock Production Technology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

microtubules or sperm aster in which radiating from the base of the decondensing sperm head plays a crucial role in the fertilization events about migration and apposition of male and female pronuclei in a normal fertilization process whereas microfilaments are considerably required for contractile ring formation during cleavage.

Keywords : microfilaments, microtubules, embryo development, fertilization

E mail : v_chankitisakul@hotmail.com

คำนำ

การปฏิสนธิคือกระบวนการที่เริ่มจากการรวมตัวกันระหว่างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย แล้วเกิดการกระตุ้นจนเกิดการแบ่งเซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 2n ทั้งนี้ปกติโอโอไซต์ที่เจริญพร้อมปฏิสนธิแล้วจะหยุดอยู่ที่ระยะ metaphase II จนกระทั่งมีการเจาะผ่านของตัวอสุจิทำให้กระตุ้นโอโอไซต์ที่เจริญพร้อมปฏิสนธิเกิดการแบ่งตัวต่อแบบ meiosis จนสมบูรณ์ ได้นิวเคลียสที่เรียกว่า female pronucleus ส่วนทางด้านของตัวอสุจิหลังจากเจาะผ่านเข้าไปในโอโอไซต์ได้แล้วจะเกิด chromatin decondensation จนกลายเป็น male pronucleus ขณะเดียวกันเซนโตรโซม ซึ่งประกอบด้วยไมโครทิวบูลที่อยู่บริเวณฐานของตัวอสุจิจะทำการสร้างเส้นใยโปรตีนขึ้นเรียกว่า sperm aster โดยเส้นใยโปรตีนดังกล่าวจะมีการเจริญยื่นยาวออกไปอย่างต่อเนื่อง เป็นผลให้ female pronucleus และ male pronucleus ถูกดึงเข้าสู่จุดศูนย์กลางของโอโอไซต์ ต่อมาเยื่อหุ้มโปรนิวเคลียสทั้งสองจะแตกออกทำให้โครโมโซมของทั้งโอโอไซต์และตัวอสุจิเกิดการประสานรวมตัวกัน หรือเรียกว่า syngamy ก่อนจะมีการจำลอง DNA และแบ่งตัวแบบ mitosis จนได้เป็นสองเซลล์ (cleavage) ทั้งนี้มีการรายงานในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิดว่าเซนโตรโซมจากตัวอสุจิมีบทบาทสำคัญในการเคลื่อนที่ของโปรนิวเคลียสและทำให้เกิดการแบ่งตัวเป็นสองเซลล์ (Long และคณะ, 1993; Sathananthan, 1998; Sathananthan และคณะ, 1999) แต่สำหรับสัตว์ตระกูลฟันแทะกลับพบว่า โครโมโซมของโอโอไซต์และตัวอสุจิเคลื่อนที่เข้ามาหากันและเกิดการประสานรวมตัวกันได้โดยอาศัยเซนโตรโซมจากโอโอไซต์ (Schatten และคณะ, 1985) ทั้งนี้กระบวนการดังกล่าวยังไม่มีรายงานในกระบือปลักมาก่อน จึงเป็นมูลเหตุจูงใจของผู้วิจัยในการนำเอาเทคนิคการย้อมสีเรืองแสงฟลูออเรสซีนและตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์มาใช้เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของทั้งโครมาติน และเซลล์โครงร่างซึ่งประกอบด้วยแอกตินไมโครฟิลาเมนต์และไมโครทิวบูลในช่วงการพัฒนาของตัวอ่อนระยะแรกในกระบือปลักซึ่งนับเป็นการสร้างองค์ความรู้ใหม่

อุปกรณ์และวิธีการ

สารเคมี

สารเคมีในการทดลอง มาจากบริษัท Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)

การเก็บรังไข่และการคัดเลือกโอโอไซต์

เก็บรังไข่กระบือจากโรงฆ่าสัตว์ท้องถิ่น โดยเก็บมาในสารละลาย 0.9% โซเดียมคลอไรด์ อุณหภูมิระหว่างขนส่งอยู่ที่ 28-35 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากมาถึงห้องปฏิบัติการ นำรังไข่ที่ได้มาล้างใน

แอลกอฮอล์ 70% และสารละลาย 0.9% โซเดียมคลอไรด์ (Das และคณะ, 1996) จากนั้นทำการเจาะดูดโอโอไซต์จากฟอลลิเคิลขนาด 2-8 มิลลิเมตร คัดเลือกโอโอไซต์ที่ล้อมรอบด้วยเซลล์คิวมูลัส สามชั้นขึ้นไป มีไซโตพลาซึมสม่ำเสมอกันเพื่อใช้ทดลอง

การเลี้ยงโอโอไซต์ในหลอดทดลอง

ทำการเลี้ยงโอโอไซต์ในน้ำยา TCM-199 ที่มีการเติมฮอรโมนและสารประกอบดังต่อไปนี้ 10% (v/v) fetal calf serum (FCS), 50 IU/ml human chorionic gonadotropin, 0.02 IU/ml follicle stimulating hormone, 1 μg/ml estradiol-17beta, 100 μM cysteamine, 20 ng/ml epidermal growth factor, 100 IU/ml penicillin G and 100 μg/ml streptomycin โดยเลี้ยงโอโอไซต์จำนวน 10 ใบ ในหยดน้ำยาขนาด 50 ไมโครลิตร ในตู้บ่มชนิด 5% CO_2 อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22 ชั่วโมง

การเตรียมตัวอสุจิสำหรับการปฏิสนธิในหลอดทดลอง

ใช้น้ำเชื้อแช่แข็งกระบือปลัก (Boonlert 30/01/04) ที่ได้มาจากศูนย์วิจัยการผสมเทียมราชบุรี กรมปศุสัตว์ ทำการละลายน้ำเชื้อดังกล่าวที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นล้างตัวอสุจิโดยการปั่นในน้ำยา Tyrode's-Albumin-Lactate-Pyruvate (TALP) ด้วยเครื่อง centrifuge 1800xg 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง ทำการคัดแยกตัวอสุจิที่แข็งแรงด้วยวิธี swim up 45 นาที ในน้ำยา TALP ที่เติม 6 mg/ml BSA และ 10 μg/ml heparin (Totey และคณะ, 1993)

การปฏิสนธิ และการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดทดลอง

หลังจากที่เลี้ยงโอโอไซต์ที่เจริญพร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลองแล้ว นำโอโอไซต์ดังกล่าวมาปฏิสนธิกับตัวอสุจิในหลอดทดลอง โดยใช้อสุจิที่มีความเข้มข้น 2×10^6 ต่อมิลลิลิตร ใส่ในหยดน้ำยา TALP 50 ไมโครลิตร ที่มีการเติม 20 μM penicillamine, 10 μM hypotaurine และ 1 μM epinephrine ต่อจำนวนโอโอไซต์ 10 ใบ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ในตู้บ่ม 5% CO_2 และ 5% O_2 อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส จากนั้น นำโอโอไซต์มาล้างเอาตัวอสุจิส่วนเกินออกในสารละลาย synthetic oviductal fluid (SOF) โดยใช้ pipette ดูดขึ้นๆลงๆ ให้ เซลล์คิวมูลัส รอบๆ และ ตัวอสุจิหลุดออก จึงนำไปเลี้ยงต่อไปในน้ำยา SOF ที่มีสารประกอบของ 1% fetal calf serum ในตู้บ่ม 5% CO_2 และ 5% O_2 อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส จนกระทั่งทำการประเมินตัวอ่อน

การประเมินตัวอ่อน

นำโอโอไซต์/ตัวอ่อนที่เลี้ยงนาน 12, 18, 24 และ 30 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ มาตรวจดูการเปลี่ยนแปลงของโครมาติน และเซลล์โครงร่างซึ่งประกอบด้วย แอกตินไมโครฟิลาเมนต์และไมโครทิวบูล ด้วยการย้อมสีเรืองแสงฟลูออเรสซีนตามวิธีการของ Simerly และ Schatten (1993) ดังต่อไปนี้คือ ย้อมไมโครทิวบูลด้วย monoclonal-α-tubulin-TRIT C, ย้อมแอกตินไมโครฟิลาเมนต์ด้วย Alexa 488 phalloidin (Molecular Probes, Invitrogen, OR, USA) และย้อมโครมาตินด้วย DAPI ทำการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (BX51, Olympus, Tokyo, Japan).

ผลการทดลองและวิจารณ์

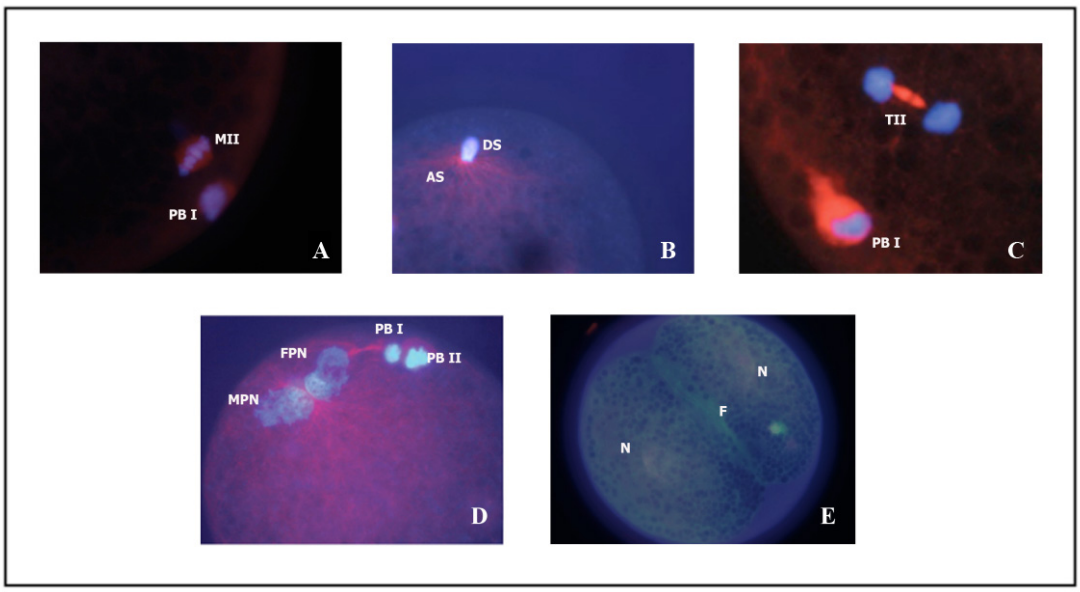
การศึกษาครั้งนี้ใช้โอโอไซต์จำนวน 118 ใบ เพื่อดูการพัฒนาของโอโอไซต์ที่ได้รับการปฏิสนธิไปเป็นตัวอ่อน โดยศึกษาจากการเปลี่ยนแปลงของโครมาติน และเซลล์โครงร่าง ซึ่งประกอบด้วย แอกตินไมโครฟิลาเมนต์และไมโครทิวบูล ดังแสดงดังรูปที่ 1 ทั้งนี้โอโอไซต์ที่เจริญพร้อมปฏิสนธิจะหยุดอยู่ที่ระยะ metaphase II มีลักษณะโครโมโซมเรียงกันอยู่ตรงกลาง ถูกตรึงด้วยเส้นใยโปรตีนชนิดไมโครทิวบูล มีลักษณะคล้ายรูปบาร์เรล (barrel shaped) และมี 1st polar body อยู่บริเวณ perivitelline space (รูปที่ 1A) บริเวณอื่นๆภายในไซโตพลาสซึมไม่พบเส้นใยโปรตีนชนิดไมโครทิวบูลกระจายอยู่

กระบวนการพัฒนาของตัวอ่อนภายหลังการปฏิสนธิ 12 ชั่วโมงพบว่า ตัวอสุจิที่เจาะผ่านเข้าไปในโอโอไซต์นั้นเริ่มมีการเปลี่ยนแปลง โดยในส่วนของหัวอสุจิมีการขยายใหญ่ขึ้นของโครมาติน หรือเรียกว่า chromatin decondensation และส่วนฐานของหัวอสุจิ เริ่มมีเส้นใยโปรตีนเจริญยื่นยาวออกมาจากไมโครทิวบูลบริเวณดังกล่าว เรียกว่า sperm aster (รูปที่ 1B) ขณะเดียวกันกับทางด้านของโอโอไซต์ พบว่า โครโมโซมมีการเจริญต่อจากระยะ metaphase II ไปเป็นระยะ anaphase II และ telophase II (รูปที่ 1C) และพบโอโอไซต์บางใบที่สามารถแบ่งตัวแบบ meiosis ต่อไปจนสมบูรณ์ มองเห็นเป็น female pronucleus ขนาดเล็ก พร้อมทั้ง 2nd polar body อยู่บริเวณ perivitelline space

ณ เวลา 18 ชั่วโมงภายหลังการปฏิสนธิ พบการเปลี่ยนแปลงของหัวอสุจิ จากที่เป็นเพียง chromatin decondensation เปลี่ยนไปเป็น male pronucleus โดยมีขนาดใกล้เคียงกันกับ female pronucleus นอกจากนั้นภายในไซโตพลาสซึมของโอโอไซต์พบว่า sperm aster แผ่ขยายออกจากส่วนฐานของหัวอสุจิเป็นวงกว้างขึ้น ไปทาง female pronucleus ซึ่งคาดว่าน่าจะมีส่วนช่วยในการดึงเอา female pronucleus เข้ามาใกล้กันกับ male pronucleus (Kim และคณะ, 1997)

หลังจากนั้น ณ เวลา 24 ชั่วโมงภายหลังการปฏิสนธิ พบว่ามีการเคลื่อนที่ของ male และ female pronuclei เข้ามาสู่จุดศูนย์กลางของโอโอไซต์ โดยเส้นใยโปรตีนหรือ sperm aster ดังกล่าวมารวมตัวกันหนาแน่นอยู่ตรงกลางระหว่าง male และ female pronuclei (รูปที่ 1D) หลังจากนั้นจะเกิดการรวมตัวกันของโปรนิวเคลียสทั้งสอง หรือเรียกว่า syngamy ซึ่งคล้ายคลึงกันกับในแกะ (Le Guen และ Crozet, 1989) แต่ทั้งนี้ในกระต่าย และหนูพบว่า หลังจากที่เส้นใยโปรตีนทำหน้าที่ในการดึงเอาโปรนิวเคลียสทั้งสองอันมาอยู่ตรงกลางไซโตพลาสซึมแล้ว เส้นใยดังกล่าวกลับกระจายตัวอยู่รอบๆโปรนิวเคลียสทั้งสองชัดเจนกว่า (Schatten และคณะ, 1985; Yllera-Fernandez และคณะ, 1992)

ณ เวลา 30 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิพบการแบ่งตัวแบบ mitosis ได้เป็นสองเซลล์ โดยระหว่างนี้พบเส้นใยโปรตีนชนิดแอกตินไมโครฟิลาเมนต์อยู่ระหว่างเซลล์ทั้งสองเซลล์ที่กำลังจะแบ่งตัว (รูปที่ 1E) ทั้งนี้จากการทดลองในสุกรของ Kim และคณะในปี 1997 พบว่า เส้นใยโปรตีนชนิดแอกตินไมโครฟิลาเมนต์มีบทบาทในเรื่องการรวมตัวกันของ male และ female pronuclei และการแบ่งตัวเป็นสองเซลล์ของตัวอ่อน



รูปที่ 1 แสดงการเปลี่ยนแปลงของโครมาติน และเซลล์โครงร่างซึ่งประกอบด้วยแอกตินไมโรฟิลาเมนต์ และไมโครทิวบูล ภายในโอโอไซต์กระบือปลักหลังเกิดการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย โดยการย้อมไมโครทิวบูลด้วย monoclonal-α-tubulin-TRIT C (สีแดง), ย้อมแอกตินไมโครฟิลาเมนต์ด้วย Alexa 488 phalloidin (สีเขียว) และย้อมโครมาตินด้วย DAPI (สีน้ำเงิน) และตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40x (MII= โครโมโซมระยะ metaphase II; PB I=1st polar body; TII=โครโมโซมระยะ telophase II; PB II=2nd polar body; DS= ส่วนของหัวอสุจิมีการขยายใหญ่ขึ้นของโครโมโซม; AS=เส้นใยโปรตีนที่สร้างจากไมโครทิวบูลที่อยู่ที่ฐานของหัวอสุจิ;FPN=โปรนิวเคลียสของโอโอไซต์; MPN=โปรนิวเคลียสของอสุจิ; N=นิวเคลียส; F= แอกตินไมโครฟิลาเมนต์)

สรุปผลและเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ถือเป็นครั้งแรกที่ทำการศึกษากระบวนการพัฒนาตัวอ่อนระยะแรกในกระบือปลัก โดยศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของโครมาติน และเซลล์โครงร่างซึ่งประกอบด้วย แอกตินไมโครฟิลาเมนต์และไมโครทิวบูล จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า เส้นใยโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นจากไมโครทิวบูลบริเวณฐานของหัวอสุจิ หรือ sperm aster นั้นมีบทบาทสำคัญในการช่วยให้เกิดการเคลื่อนที่ของโปรนิวเคลียสของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมีย (male and female pronuclei) เข้ามาใกล้กัน ขณะที่เส้นใยโปรตีนชนิดแอกตินไมโครฟิลาเมนต์น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์ของตัวอ่อน งานวิจัยนี้นอกจากจะทำให้ทราบถึงข้อมูลพื้นฐาน ในเรื่องการทำงานของส่วนประกอบต่างๆภายในเซลล์ที่มีความเกี่ยวข้องต่อการเกิดการปฏิสนธิของตัวอ่อนในกระบือปลักแล้วนั้น งานวิจัยนี้ยังได้บ่งชี้ถึงช่วงเวลาการเกิดการเปลี่ยนแปลงต่างๆในกระบวนการปฏิสนธิในกระบือปลักอีกด้วย ทั้งนี้เราสามารถนำความรู้และเทคนิคที่ได้รับไปเป็นส่วนประกอบในการศึกษาวิจัยด้านอื่นๆต่อไป ไม่ว่าจะเพื่อศึกษาถึงสาเหตุของความล้มเหลวของการปฏิสนธินอกร่างกาย อัตราการเจริญของตัวอ่อนที่ต่ำ รวมทั้งสามารถนำความรู้และเทคนิคที่ได้ไปประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือในการติดตามกระบวนการพัฒนาของตัวอ่อนด้วยวิธีการปฏิสนธิอื่นที่แตกต่างออกไป เช่น การฉีดอสุจิเข้าไปในโอโอไซต์ เป็นต้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ภายใต้โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. (MRG-WII515S056) สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ประจำปี 2551 และ "ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย" กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

เอกสารอ้างอิง

Das GK, Jain GC, Solanki VS, Tripathi VN, 1996: Efficacy of various collection methods for oocyte retrieval in buffalo. Theriogenology. 46, 1403-1411.

Kim NH, Chung KS, Day BN, 1997: The distribution and requirements of microtubules and microfilaments during fertilization and parthenogenesis in pig oocytes. J Reprod Fertil 111, 143-149.

Le Guen P, Crozet N, 1989: Microtubule and centrosome distribution during sheep fertilization. Eur J cell Biol 48, 239-249.

Long CR, Pinto-Correia C, Duby RT, Ponce de Leon FA, Boland MP, Roche JF, Robl JM, 1993: Chromatin and microtubule morphology during the first cell cycle in bovine zygotes. Mol Reprod Dev 36, 23-32.

Sathananthan AH, 1998: Paternal centrosomal dynamics in early human development and infertility. J Assist Reprod Genet 15, 129-139.

Sathananthan AH, Lyons G, Dhamawardena V, Pushett D, Lewis I, Trounson A, 1999: Centriolar dynamics in the bovine embryo: Inheritance and perpetuation of the sperm centrosome during fertilization and development. Protoplasma 206, 263-269.

Schatten G, Simerly C, Schatten H, 1985: Microtubule configurations during fertilization, mitosis, and early development in the mouse and the requirement for egg microtubule-mediated motility during mammalian fertilization. Proc Natl Acad Sci U S A. 82, 4152-4156.

Simerly C, Schatten G, 1993: Techniques for localization of specific molecules in oocytes and embryos. Methods Enzymol 225, 516-553.

Totey SM, Pawshe CH, Singh, GP, 1993: Effects of bull and heparin and sperm concentration on *in vitro* fertilization of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocyte matured *in vitro*. Theriogenology 39, 887–898.

Yllera-Fernandez MM, Crozet N, Ahmed-Ali M, 1992: Microtubule distribution during fertilization in the rabbit. Mol Reprod Dev 32, 271-276.