บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

ขั้นตอนในการผลิตแอนติบอดีมีความสำคัญมากจำเป็นที่จะต้องมีการผลิตแอนติบอดีให้ได้จำนวนมากและมีความเข้มข้นสูงเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ การเลี้ยงเซลล์โดยใช้อุปกรณ์สำเร็จรูป Celline AD 1000 สะดวกต่อการทำงานเพราะสามารถเลี้ยงเซลล์ได้จำนวนมากในภาชนะเดียว แต่การเลี้ยงด้วยอุปกรณ์ดังกล่าวจำเป็นที่จะต้องใช้อาหารเลี้ยงเซลล์จำนวน 1 ลิตรต่อสัปดาห์ซึ่งถือว่าเป็นปริมาณที่มาก ปริมาณน้ำเลี้ยงเซลล์ที่นำไปสกัดแอนติบอดีต่อได้เพียง 20 มิลลิลิตรต่อสัปดาห์ซึ่งเมื่อเทียบกับปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ถือว่าเป็นการสิ้นเปลืองอย่างมาก เมื่อนำมาสกัดแอนติบอดีให้บริสุทธิ์ (ในอาหารเลี้ยงเซลล์มีทั้งโปรตีนที่ใช้สำหรับเลี้ยงเซลล์และโปรตีนที่เซลล์ผลิต) พบว่าให้ค่า O.D. ที่ตอบสนองต่อแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสเปิร์ม 0.53 ซึ่งไม่สูงมากนัก หลังจากที่เลี้ยงไปเป็นระยะเวลานานพบว่าเซลล์ไม่มีการผลิตแอนติบอดีต่อสเปิร์มอันเนื่องมาจากเซลล์ที่ตายไม่สามารถผลิตแอนติบอดีได้อีก ส่วนเซลล์ที่ยังมีชีวิตไม่สามารถเจริญได้เต็มที่เพราะมีเซลล์ตายปนอยู่และถูกเททิ้งไปเมื่อทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ จากปัญหาดังกล่าวจึงได้มีการเลี้ยงเซลล์ใน Petridish ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าแต่ทำการเลี้ยงจำนวนหลายๆ ภาชนะ การเลี้ยงใช้อาหารเลี้ยงเซลล์จำนวน 200 มิลลิลิตรต่อสัปดาห์ ปริมาณน้ำเลี้ยงเซลล์ที่นำไปสกัดแอนติบอดีต่อได้ 100 มิลลิลิตรต่อสัปดาห์ซึ่งเมื่อเทียบกับปริมาณอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ถือว่าไม่สิ้นเปลืองทั้งอาหารเลี้ยงเซลล์และแรงงานในการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ เมื่อนำมาสกัดแอนติบอดีให้บริสุทธิ์พบว่าให้ค่า O.D. ที่ตอบสนองต่อแอนติบอดีที่จำเพาะต่อสเปิร์ม 1.67 ซึ่งสูงมาก เมื่อเลี้ยงไประยะเวลานานเซลล์ สามารถดูดเซลล์ตายที่ปนอยู่ทิ้งได้โดยเลือกดูดเฉพาะเซลล์ตายที่ลอยอยู่ด้านบนและดูดเซลล์ที่มีชีวิตมาเลี้ยงใน Petridish อันใหม่ทำให้สามารถเลี้ยงเซลล์ไปได้เรื่อยๆ โดยเซลล์สามารถผลิตแอนติบอดีอย่างสม่ำเสมอ ดังนั้นในขั้นตอนการผลิตแอนติบอดีการใช้ Petridish ในการเลี้ยงเซลล์จึงให้ผลผลิตที่คุ้มค่ากว่า

ผลการวัดความแม่นยำของแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเพศผู้ด้วยเทคนิค Immunofluorescence microscopy พบว่าแอนติบอดีมีความจำเพาะเจาะจงต่อเพศผู้ 80.91±2.99 % ซึ่งในการศึกษาของวิวัฒน์ (2547) พบว่าแอนติบอดีมีความจำเพาะเจาะต่อเพศผู้ 98±1.90 % จากผลที่แตกต่างกันเนื่องมาจากแอนติบอดีที่นำมาใช้เป็นแอนติบอดีที่ผลิตมาจากโคฟรีเชียนเพศผู้ เมื่อนำมาใช้ตรวจความจำเพาะในโคขาวลำพูนจึงมีค่าแตกต่างกัน แสดงว่าในโค 2 พันธุ์มีโปรตีน (แหล่งของแอนติเจน) ที่คล้ายคลึงกันแต่ไม่ทั้งหมด แต่ยังคงมีประสิทธิภาพในการตรวจสอบความจำเพาะต่อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เพศผู้แม้ว่าจะใช้ในโคที่ต่างสปีชีส์กัน (Species) โดยมีข้อผิดพลาด 2.56 % เท่านั้น ดังนั้นการนำเอชวายแอนติบอดีจากโคฟรีเชียนมาประยุกต์ใช้กับสเปิร์มของโคขาวลำพูนจึงสามารถทำได้ คล้ายกับการศึกษาความคล้ายคลึงกันของเอชวายแอนติเจนในสัตว์ต่างชนิดกันเช่น การศึกษาของ Ramalho *et al*. (2004) และ Gardon *et al*. (2004) ได้มีการใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเอชวายแอนติเจนของหนูมาตรวจสอบตัวอ่อนของโคได้ แสดงว่าแอนติเจนบนผิวสเปิร์มของหนูมีความคล้ายคลึงกับแอนติเจนบนผิวสเปิร์มของโค จึงสามารถนำเอชวายแอนติบอดีที่ผลิตในหนูมาตรวจสอบตัวอ่อนของโคได้ ส่วนการศึกษาของ Wachtel *et al.* (1974) ได้พิสูจน์ว่าเอชวายแอนติเจนของหนูตัวเล็กมีความคล้ายคลึงกับของมนุษย์เนื่องมาจากเอชวายแอนติบอดีที่ผลิตจากหนูตัวเล็กสามารถจับกับเอชวายแอนติเจนของมนุษย์ (แหล่งเอชวายแอนติเจนคือเม็ดเลือดขาว) ได้ แสดงว่าในหนูและคนมีเอชวายแอนติเจนที่คล้ายกันบางส่วน

น้ำเชื้อโคขาวลำพูนที่นำมาใช้ในการศึกษาเป็นน้ำเชื้อที่เก็บภายในครั้งเดียวกัน โดยน้ำเชื้อที่นำมาศึกษาเมื่อทำการตรวจสเปิร์มที่มีชีวิตรอดก่อนแช่แข็งมีเปอร์เซ็นต์การรอดสูงกว่า 70 % จึงนำมาทำน้ำเชื้อแช่แข็งต่อได้ เพราะถ้าเปอร์เซ็นต์การรอดก่อนการแช่แข็งต่ำเมื่อนำไปทำการแช่แข็งแล้วจะมีจำนวนสเปิร์มที่รอดชีวิตน้อยไม่เพียงพอสำหรับการนำไปผสมเทียมต่อ เพราะการผสมเทียมในแต่ละครั้งต้องมีจำนวนสเปิร์มอย่างน้อย 8 ล้านตัวต่อหลอดน้ำเชื้อ 1 หลอดจึงจะมีประสิทธิภาพ บรรจุน้ำเชื้อจำนวน 30 ล้านตัวต่อหลอด หลังจากแช่แข็งแล้วนำมาละลาย (Thaw) เพื่อดูเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดพบว่าโคทุกตัวมีอัตราการรอดสูงกว่า 35 % ซึ่งสามารถนำไปศึกษาต่อในปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ เมื่อนำข้อมูลน้ำเชื้อของโคขาวลำพูนมาเทียบกับน้ำเชื้อโคชาร์โรเลย์และโคฟรีเชียน พบว่ามีปริมาตรน้ำเชื้อใกล้เคียงกัน คือ 9.23, 10.6 และ 6.5 มล. แต่น้ำเชื้อโคขาวลำพูนมีความเข้มข้นของสเปิร์มน้อยที่สุด ในขณะที่โคฟรีเชียนมีความเข้มข้นของสเปิร์มมากที่สุดเนื่องมาจากเป็นโคพ่อพันธุ์ของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อดอยอินทนนท์ สเปิร์มของโคขาวลำพูนมีการเคลื่อนไหวหมู่ปานกลาง-ดี ส่วนสเปิร์มของโคชาร์โรเลย์มีการเคลื่อนไหวหมู่ปานกลางและสเปิร์มของโคฟรีเชียนมีการเคลื่อนไหวหมู่ดี ในโคทุกพันธุ์มีจำนวนสเปิร์มที่มีชีวิตก่อนทำการแช่แข็งและหลังการแช่แข็งใกล้เคียงกัน

ก่อนทำปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ขั้นตอนในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งมีความสำคัญมาก หากใช้อุณหภูมิไม่เหมาะสมสเปิร์มจะไม่สามารถทำปฏิกิริยาความเป็นพิษได้ดี ถ้าอุณหภูมิสูงไปสเปิร์มจะตายก่อนที่ปฏิกิริยาความเป็นพิษจะเสร็จสมบูรณ์ ถ้าต่ำไปสเปิร์มจะวิ่งไม่ดีเท่าที่ควรทำให้การดึงสเปิร์มเข้าไปใช้ในการทดลองต่ำ ต้องทำการเพิ่มจำนวนหลอดน้ำเชื้อในการทำปฏิกิริยาซึ่งทำให้สิ้นเปลืองเพิ่มอีก ดังนั้นจึงต้องหากระบวนการที่เหมาะสมในการละลายน้ำเชื้อก่อน จากการศึกษาครั้งนี้ ได้ศึกษาการละลายน้ำเชื้อโคขาวด้วยน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

30 วินาที น้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ น้ำอุ่นอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที พบว่าการใช้น้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ดีและสามารถทำปฏิกิริยาจนเสร็จให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของสเปิร์มโคเบอร์ 862, 863 และ RJ888 เท่ากับ 51.92, 44.12 และ 35.30 ส่วนกลุ่มที่ใช้น้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ดีแต่เมื่อทำปฏิกิริยาจนเสร็จเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของสเปิร์มต่ำ และกลุ่มที่ใช้น้ำอุ่นอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ดีที่สุดแต่ไม่สามารถทำปฏิกิริยาจนเสร็จสมบูรณ์ได้

หลังจากนั้นต้องทดสอบระดับของคอมพลีเมนต์และแอนติบอดีที่เหมาะสมในปฏิกิริยา พบว่าเมื่อใช้คอมพลีเมนต์ที่ระดับ 1:50 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของสเปิร์มเท่ากับ 99.42 % ซึ่งใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมและถือว่าเป็นระดับที่เหมาะสมในการทำงานเพราะบ่งบอกว่าโปรตีนคอมพลีเมนต์มีการทำงานได้อยู่ จากเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่สูงของสเปิร์มแสดงว่าแทบไม่มีการทำงานของระบบ Alternative pathway ซึ่งไม่ต้องการให้เกิดขึ้นเนื่องจากเป็นการทำงานที่ไม่มีแอนติบอดีในการทำลายสเปิร์ม การศึกษาครั้งนี้ต้องการเฉพาะการทำงานของระบบ Classical pathway ในปฏิกิริยาความเป็นพิษเพื่อดูผลของแอนติบอดีซึ่งทำงานร่วมกับโปรตีนคอมพลีเมนต์ในการทำลายสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายอย่างจำเพาะเจาะจง ส่วนแอนติบอดีที่ระดับ 1:500 มีเปอร์เซ็นต์การย้อมติดสี FITC goat anti-mouse IgG ที่สูงสุดสามารถเห็นได้ชัดเจนและไม่ลดต่ำลงถือว่าเป็นระดับที่เหมาะสมในการทำงาน

เมื่อทำปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ จะนำน้ำเชื้อออกมาละลายและทำการ Swim up โดยปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วินาที ถ้าปั่นเหวี่ยงที่แรงมากกว่านี้สเปิร์มจะอัดแน่นเกินไปและไม่สามารถว่ายขึ้นมาได้แม้ว่าจะเป็นสเปิร์มที่มีชีวิต ถ้าปั่นเหวี่ยงที่แรงน้อยกว่านี้สเปิร์มที่ตายหรือไม่แข็งแรงจะปะปนมาด้วย ดังนั้นจึงต้องหาแรงและเวลาที่เหมาะสมในการทำงานหลังจากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที ขั้นตอนนี้ทำเพื่อให้สเปิร์มที่มีชีวิตรอดและแข็งแรงว่ายขึ้นมาด้านบน ส่วนสเปิร์มที่ตายหรือไม่แข็งแรงจะตกตะกอนอยู่ด้านล่าง แล้วจึงนำเฉพาะสเปิร์มที่ว่ายขึ้นมาด้านบนไปทำการทดลองต่อ การทำปฏิกิริยาในครั้งแรกจะใช้คอมพลีเมนต์ 1:50 ร่วมกับแอนติบอดีที่ระดับ 0, 1:10, 1:100, 1:1,000, 1:2,000 และ 1:3,000 พบว่าแอนติบอดี 1:100 และ 1:1,000 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของสเปิร์มเท่ากับ 35.06 และ 39.95 % เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งถือว่ามีการทำงานที่เหมาะสม ดังนั้นจึงต้องหาระดับแอนติบอดีเพิ่มเติมสำหรับนำมาใช้ในปฏิกิริยาในช่วงแอนติบอดี 1:100 ถึง 1:1,000 ในปฏิกิริยาครั้งต่อมาใช้คอมพลีเมนต์ 1:50 ร่วมกับแอนติบอดีที่ระดับ 0, 1:100, 1:300, 1:900 และ 1:2,700 พบว่าโคเบอร์ 862 และ 863 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของสเปิร์มที่เหมาะสมที่ระดับแอนติบอดี 1:300 (25.11 % และ 21.87 %)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ส่วนโคเบอร์ RJ 888 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของสเปิร์มที่เหมาะสมที่ระดับแอนติบอดี 1:900 (34.38 %) ซึ่งเมื่อมีการใช้ระดับแอนติบอดีมากเกินไปแอนติบอดีจับกับสเปิร์มลดลงทำให้สเปิร์มมีการรอดชีวิตสูงหรือเมื่อใช้ระดับแอนติบอดีน้อยเกินไปแอนติบอดีก็ไม่เพียงพอในการทำปฏิกิริยาทำให้สเปิร์มรอดชีวิตสูง โดยโคทั้ง 3 ตัวมีระดับของแอนติบอดีที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาที่แตกต่างกันเล็กน้อยเนื่องมาจากโปรตีนบนผิวสเปิร์มของแต่ละตัวแตกต่างกัน สอดคล้องกับการศึกษาของ Manca et al. (1991) ที่ศึกษาสัดส่วนของแอนติเจนและแอนติบอดีต่อการกระตุ้นทีเซลล์ พบว่าการใช้แอนติบอดีที่มากเกินไปหรือน้อยเกินไปทำให้มีการกระตุ้นการทำงานของทีเซลล์น้อยกว่าการใช้ที่ระดับเหมาะสม และแอนติเจนปริมาณน้อยจะใช้ระดับแอนติบอดีน้อยกว่าแอนติเจนที่ปริมาณมาก สเปิร์มถูกทำลายเนื่องมาจากมีการสร้าง Membrane attack complex (MAC) ผ่านระบบ Classical pathway มีการแพร่ของ MAC และแทรกเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ของเสปิร์ม ทำให้เกิดรูบริเวณผนังสเปิร์ม ทำให้สเปิร์มแตก (Koffler *et al.*, 1983) ผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาของ Rooney *et al.* (1992) ที่ศึกษาการทำลายสเปิร์มของมนุษย์จาก MAC พบว่าทำให้มีจำนวนสเปิร์มที่ไม่มีการเคลื่อนที่เนื่องจากถูกทำลายมากกว่ากลุ่มควบคุม 30 % และยอมให้สารผ่านเข้าสู่เซลล์เพิ่มขึ้น 30 % เนื่องจาก MAC ทำให้เกิดรูพรุนบริเวณผนังสเปิร์มจึงทำให้สารสามารถเข้าสู่สเปิร์มได้มากขึ้นทำให้สเปิร์มถูกทำลาย

เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของสเปิร์มของโคทั้ง 3 ตัวเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมจะน้อยกว่ากลุ่มควบคุม 16-28 % ส่วนเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีโครโมโซมวายเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมจะน้อยกว่ากลุ่มควบคุม 16-38 % ส่วนต่างที่เพิ่มขึ้นคาดว่าสเปิร์มบางส่วนที่ถูกทำลายด้วยปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ยังสามารถเคลื่อนที่ได้แต่ช้าลงเมื่อย้อมสีจึงติดสีเขียว (สเปิร์มรอดชีวิต) จึงทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูง (การรอดชีวิตน้อยกว่ากลุ่มควบคุมเล็กน้อย) ในขณะที่เมื่อดูเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีโครโมโซมวาย ต้องทำการ Swim up สเปิร์มโดยนำเฉพาะสเปิร์มที่แข็งแรงสามารถว่ายขึ้นมาด้านบนไปทำการตรวจ สเปิร์มที่ถูกทำลายด้วยปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ที่เคลื่อนที่ได้ช้าจะไม่สามารถเคลื่อนที่มาด้านบนได้ ดังนั้นเปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมจึงสูงกว่าเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ในสภาวะการผสมพันธุ์จริงภายในระบบสืบพันธุ์ของเพศเมียจะมีการทำลายสเปิร์มบางส่วนซึ่งคล้ายคลึงกับเทคนิค Swim up โดยคัดเฉพาะสเปิร์มที่แข็งแรง เช่นการศึกษาของ Matthijs *et al.* (2000) ศึกษาการกิน (Phagocytosis) สเปิร์มสุกรจากการทำงานของเม็ดเลือดขาว Neutrophils ของแม่สุกรพบว่าสเปิร์มถูกทำลายด้วยเซลล์เม็ดเลือดขาวแม้ว่าจะไม่มีคอมพลีเมนต์ 80 % เมื่อบ่มเป็นเวลา 90 นาที และเมื่อมีคอมพลีเมนต์สเปิร์มจะถูกทำลายใกล้เคียงกันคือ 85 % เมื่อบ่มเป็นเวลา 90 นาที แสดงว่าผนังสเปิร์มมีตำแหน่งสำหรับจับกับเม็ดเลือดขาว Neutrophils ทำให้เกิดการกินสเปิร์มโดยไม่ต้องอาศัยคอมพลีเมนต์ ซึ่งบ่งบอกว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภายในระบบสืบพันธุ์ของแม่สุกรจะมีกระบวนการทำลายสเปิร์มปกติบางส่วนเพื่อให้มีจำนวนสเปิร์มเข้าผสมพันธุ์น้อยลงเพื่อลดความเสี่ยงจากการสร้างภูมิคุ้มกันต่อสเปิร์มในเพศเมีย และ Troedsson *et al.* (2005) ศึกษาพบว่าภายในน้ำคัดหลั่งของม้า (Seminal plasma) มีสารที่ช่วยให้เม็ดเลือดขาว Neutrophils กินสเปิร์มน้อยลง โดยสเปิร์มที่มีน้ำคัดหลั่งจะมีสเปิร์มที่ถูกกินด้วยเม็ดเลือดขาวเพียง 15 % เมื่อเทียบกับสเปิร์มที่ไม่มีน้ำคัดหลั่งจะมีสเปิร์มถูกกินด้วยเม็ดเลือดขาว 70 % แสดงว่าภายในระบบสืบพันธุ์เพศเมียมีการทำลายสเปิร์มบางส่วน ดังนั้นภายในน้ำคัดหลั่งของสเปิร์มจึงต้องมีสารที่ช่วยลดการทำลายเพื่อให้มีสเปิร์มเข้าผสมกับไข่ นอกจากนั้นบนผิวของสเปิร์มของมนุษย์ยังมีโปรตีน CD59 เพื่อช่วยยับยั้งการทำลายสเปิร์มด้วย MAC พบว่าเมื่อเติมแอนติบอดีที่ต่อต้านโปรตีน CD59 สเปิร์มจะมีการไม่เคลื่อนไหวและยอมให้สารผ่านเข้าเซลล์เพิ่มขึ้น 50 และ 45 % ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงว่าโปรตีนดังกล่าวมีบทบาทในการยับยั้งการทำลายสเปิร์มด้วย MAC (Rooney *et al*., 1992)

เมื่อดูสัดส่วนของสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายหลังการทำปฏิกิริยาที่เป็นพิษระยะเวลาในการบ่ม FITC goat anti-mouse IgG มีความสำคัญอย่างมาก ถ้าระยะเวลาน้อยเกินไปสีเรืองแสงจะไม่ชัดเจนพร้อมทั้งไม่สามารถอยู่ได้นานทำให้การทดลองไม่สม่ำเสมอ เนื่องจากต้องทำการถ่ายรูปสเปิร์มเพื่อดูสัดส่วนการติดสีเรืองแสง สีเรืองแสงในกลุ่มท้ายๆ จะหายไปไม่สามารถเก็บข้อมูลได้ โดยระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มประมาณ 15-16 ชั่วโมง สเปิร์มจะติดสีเรืองแสงชัดเจนและสามารถอยู่ได้นานประมาณ 1 ชั่วโมงครึ่งซึ่งเพียงพอต่อการถ่ายรูปสเปิร์มทุกกลุ่ม ทำให้สามารถเก็บข้อมูลได้อย่างถูกต้อง ในการดูสัดส่วนของสเปิร์มใช้คอมพลีเมนต์ 1:50 ร่วมกับแอนติบอดีที่ระดับ 0, 1:100, 1:300, 1:900 และ 1:2,700 เช่นเดียวกับการสังเกตเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของสเปิร์ม พบว่าโคทั้ง 3 ตัวมีระดับการลดลงของสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายมากที่สุดที่ระดับแอนติบอดี 1:900 โดยมีสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายของโคเบอร์ 862, 863 และ RJ888 เท่ากับ 24.99, 11.84 และ 34.11 % ตามลำดับ (กลุ่มควบคุมเท่ากับ 50 %) แต่แอนติบอดีสามารถจับกับสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายได้เพียงบางส่วน (เนื่องมาจากค่าสังเกตจริงที่ได้จากการทดลองของกลุ่มควบคุมไม่ถึง 50 %) อันเนื่องมาจากแอนติบอดีมาจากโคฟรีเชียนดังนั้นจึงมีความคล้ายคลึงกันของสเปิร์ม (โปรตีนบนผิวสเปิร์ม) เพียงส่วนหนึ่งเท่านั้น แต่แอนติบอดียังคงมีประสิทธิภาพในการลดสัดส่วนของสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายในโคขาวลำพูนได้

การติดสี FITC goat anti-mouse IgG ของเซลล์เม็ดเลือดกับสเปิร์มแตกต่างกัน คือ 80.91 และ 16.61 % ตามลำดับ โดยเปอร์เซ็นต์การติดสีของเซลล์เม็ดเลือดสูงกว่าสเปิร์ม อาจเนื่องมาจากเซลล์เม็ดเลือดมีขนาดใหญ่กว่าสเปิร์ม ดังนั้นจึงมีพื้นที่ให้ FITC goat anti-mouse IgG เข้าไปจับกับแอนติเจนบนผิวเซลล์มากกว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อทำการยืนยันผลของการลดสัดส่วนของสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยศึกษายีน BOVM 97 (จำเพาะต่อโครโมโซมวาย), PLP (จำเพาะต่อโครโมโซมเอ็กซ์) และ Beta-actin (ยีนที่มีการแสดงออกในทั้งโครโมโซมเอ็กซ์และวาย) ในโคเบอร์ 862 กลุ่มแอนติบอดี 1:300 มีปริมาณยีน BOVM 97 น้อยกว่ากลุ่มควบคุม 6 เท่า แสดงว่ามีจำนวนสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายน้อยกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนปริมาณยีน PLP มากกว่ากลุ่มควบคุม 6 เท่า แสดงว่ามีจำนวนสเปิร์มที่มีโครโมโซมเอ็กซ์มากกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนปริมาณยีน Beta-actin ใกล้เคียงกัน แสดงว่ามีปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นในการทดลองใกล้เคียงกัน ในโคเบอร์ 863 กลุ่มแอนติบอดี 1:900 มีปริมาณยีน BOVM97 น้อยกว่ากลุ่มควบคุม 5 เท่า แสดงว่ามีจำนวนสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายน้อยกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนปริมาณยีน PLP มากกว่ากลุ่มควบคุม 4 เท่า แสดงว่ามีจำนวนสเปิร์มที่มีโครโมโซมเอ็กซ์มากกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนปริมาณยีน Beta-actin ใกล้เคียงกันแสดงว่ามีปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นในการทดลองใกล้เคียงกัน และโคเบอร์ RJ888 กลุ่มแอนติบอดี 1:900 มีปริมาณยีน BOVM97 น้อยกว่ากลุ่มควบคุม 5 เท่า แสดงว่ามีจำนวนสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายน้อยกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนปริมาณยีน PLP มากกว่ากลุ่มควบคุม 5 เท่า แสดงว่ามีจำนวนสเปิร์มที่มีโครโมโซมเอ็กซ์มากกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนปริมาณยีน Beta-actin ใกล้เคียงกันแสดงว่ามีปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นในการทดลองใกล้เคียงกัน ซึ่งแนวโน้มเหมือนกับการตรวจวัดด้วยวิธี Immunofluorescense microscopy 2 ตัว ส่วนโคเบอร์ 862 มีผลไม่ตรงกับการตรวจวัดด้วยวิธี Immunofluorescense ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องมีการยืนยันผลด้วยการทำ Real-time PCR อีกครั้งเพื่อความแม่นยำ

เมื่อนำตัวอย่างสเปิร์มไปถ่ายด้วยเครื่อง SEM พบว่าขนาดของสเปิร์มโคขาวลำพูนมีขนาดหัวสเปิร์มกว้างที่สุดและความยาวของสเปิร์มน้อยที่สุด เมื่อดูตัวอย่างที่กำลังขยาย 4,300 เท่าพบว่าในสเปิร์มโคขาวลำพูนจะมีลักษณะหัวสเปิร์มอ้วนสั้น หางมีลักษณะเป็นเกลียวอย่างชัดเจน ในขณะที่โคฟรีเชียนและโคชาร์โรเลย์ หัวสเปิร์มจะเล็กยาว หางไม่เห็นลักษณะเป็นเกลียว แต่เมื่อส่องด้วยกำลังขยายที่เพิ่มขึ้นจะมองเห็นหางมีลักษณะเป็นเกลียว สำหรับวิการที่เกิดขึ้นในกลุ่มที่ผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์จะมีวิการเกิดขึ้นมากกว่าและหัวสเปิร์มจะมีลักษณะแตกและมีลักษณะเหมือนผิวเซลล์ลอกซึ่งเกิดจากการทำงานของแอนติบอดีร่วมกับโปรตีนคอมพลีเมนต์ทำให้มีการทำลายผิวสเปิร์ม บริเวณด้านบนของหัวสเปิร์มเป็นส่วนที่มีวิการเกิดขึ้นมากที่สุด คือตำแหน่ง 1, 5 และ 9 โดยเฉพาะในบริเวณช่วงกลางของหัวสเปิร์มคือตำแหน่ง 2, 6 และ 10 ซึ่งมีการทำลายเกิดขึ้นจะไม่พบในกลุ่มควบคุม ซึ่งแสดงว่าเป็นการทำลายจากปฏิกิริยาที่เป็นพิษและเป็นบริเวณของ Acrosome สอดคล้องกับการศึกษาในหนูของ Koo *et al.* (1973) ที่พบว่าเอชวายแอนติเจนโดยส่วนใหญ่แล้วจะอยู่บริเวณ Acrosome ของสเปิร์ม ทำให้พบวิการในส่วนบนของหัวสเปิร์มมากกว่าส่วนอื่นๆ ในขณะที่กลุ่มควบคุมโดยส่วนใหญ่มีสเปิร์มที่สภาพสมบูรณ์ ขอบสเปิร์มเรียบ มี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บางส่วนที่ขอบมีการแตกบิ่นเล็กน้อยซึ่งโดยส่วนใหญ่จะเป็นส่วนขอบด้านบนของหัวสเปิร์ม เนื่องมาจากเวลาปั่นเหวี่ยงใช้แรงปั่นเหวี่ยงสูงดังนั้นจึงมีการแตกของขอบหัวสเปิร์มได้ แต่บริเวณส่วนอื่นจะไม่พบวิการ เมื่อผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์แล้วสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายจะถูกทำลายไปส่วนหนึ่ง ซึ่งสเปิร์มส่วนที่ถูกทำลายบางครั้งยังสามารถเคลื่อนไหวได้แต่เนื่องจากส่วน Acrosome ของสเปิร์มได้ถูกทำลาย ดังนั้นสเปิร์มจึงเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าและสเปิร์มปฏิสนธิกับไข่ไม่ได้เนื่องมาจากบริเวณ Acrosome จะเป็นส่วนที่มีเอนไซม์สำหรับการเจาะไข่เพื่อปฏิสนธิ เมื่อส่วน Acrosome ถูกทำลายเอนไซม์จะถูกปลดปล่อยก่อนที่สเปิร์มจะว่ายไปถึงไข่ เพราะฉะนั้นน้ำเชื้อที่ผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ย่อมมีอัตราการผสมติดต่ำกว่าน้ำเชื้อปกติ สอดคล้องกับการศึกษาของ Grossfeld *et al.* (2005) ที่ศึกษาการผลิตลูกสุกรด้วยน้ำเชื้อที่ผ่านการคัดสเปิร์มด้วย Flow cytometry พบว่าหลังผ่านการคัดสเปิร์มมีจำนวนสเปิร์มที่สามารถเคลื่อนที่ได้ลดลง 14.1 % ($p<0.05$) จำนวนสเปิร์มที่ถูกทำลายบริเวณ Acrosome และสเปิร์มที่ถูกทำลายจนมีลักษณะไม่ปกติเพิ่มขึ้น 27.0 ($p<0.05$) และ 20.7 % ($p<0.05$) ตามลำดับ ส่งผลให้อัตราการตั้งท้องเปลี่ยนไปจากปกติ คือ 54.5 % เป็น 33.3 %

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สรุปผลการทดลอง

1. การเลี้ยงเซลล์ใน Petridish ให้ค่า O.D. ตอบสนองต่อสเปิร์ม 1.67 ส่วนการเลี้ยงในอุปกรณ์สำเร็จรูปให้ค่า O.D. ตอบสนองต่อสเปิร์ม 0.53 เมื่อเทียบการเลี้ยงด้วย Petridish กับชุดอุปกรณ์ พบว่าการเลี้ยงด้วย Petridish ให้ผลผลิตแอนติบอดีที่ดีกว่าและใช้อาหารเลี้ยงเซลล์น้อยกว่าชุดอุปกรณ์สำเร็จรูป 800 มิลลิลิตรต่อสัปดาห์ และได้น้ำเลี้ยงเซลล์ไปสกัดแอนติบอดีมากกว่าชุดอุปกรณ์สำเร็จรูป 80 มิลลิลิตรต่อสัปดาห์
2. โมโนโคลนอลแอนติบอดีมีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวเพศผู้ของโคขาวลำพูน 80.91±2.99 % ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานปฏิกิริยาที่เป็นพิษต่อเซลล์ได้
3. โคเบอร์ 862, 863 และ RJ888 ใช้คอมพลีเมนต์เจือจางที่ 1:50 และแอนติบอดี 1:300, 1:300, 1:900 ตามลำดับ ทำให้สเปิร์มมีชีวิตรอด 25.11±2.72, 21.87±3.45 และ 34.38±1.23 % ตามลำดับ
4. การทำปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์สามารถลดสัดส่วนสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายได้ โดยพบว่าโคเบอร์ 862, 863 และ RJ888 มีสัดส่วนสเปิร์มที่มีโครโมโซมวายลดลงจาก 50 % เป็น 24.99±0.56, 11.84±0.47 และ 34.11±2.12 % ตามลำดับ
5. การทำ Real-time PCR ของสเปิร์มที่ผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ในโคเบอร์ 862, 863 และ RJ888 มีจำนวนดีเอ็นเอของยีน BOVM97 น้อยกว่ากลุ่มควบคุม 5,5 และ 6 เท่า และมีจำนวนดีเอ็นเอของยีน PLP มากกว่ากลุ่มควบคุม 5, 4 และ 5 เท่า
6. ลักษณะสเปิร์มของโคขาวลำพูนมีความแตกต่างจากโคชาร์โรเลย์และโคฟรีเชียน โดยมีหัวกว้างกว่า คือ 3.6 ไมครอน และมีความยาวน้อยกว่า คือ 7.14 ไมครอน นอกจากนี้หางจะมีลักษณะเป็นเกลียวเห็นได้ชัดเจนที่กำลังขยาย 4,300 เท่า ในขณะที่โคอีก 2 พันธุ์ไม่เห็นเกลียว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข้อเสนอแนะ

1. ระดับของแอนติบอดีที่ใช้ในการทำงานของแต่ละโคแตกต่างกัน ดังนั้นก่อนการทำปฏิกิริยาในโคตัวใหม่ จึงจำเป็นที่จะต้องหาช่วงความเหมาะสมของระดับแอนติบอดีทุกครั้งเพื่อให้ได้ระดับแอนติบอดีที่เหมาะสมในการทำงาน
2. การดูสัดส่วนของสเปิร์มจำเป็นที่จะต้องมีการยืนยันผลของ Immunofluorescense ด้วย Real-time PCR เพื่อความแม่นยำ
3. ควรศึกษา Parameter ของสเปิร์มเพิ่มเติม เช่น Osmotic resistance, Morphologically damage และ Acrosomal damage เพื่อให้การตรวจการเกิดวิการของสเปิร์มเนื่องมาจากปฏิกิริยาที่เป็นพิษต่อเซลล์สมบูรณ์มากขึ้น
4. ควรหาวิธีการในการวัดปริมาณแอนติเจนบนผิวสเปิร์มของโคแต่ละตัว เช่นการวัดปริมาณ mRNA ของ H-Y receptor
5. นำสเปิร์มที่ผ่านปฏิกิริยาความเป็นพิษต่อเซลล์ไปทดสอบความแม่นยำในการคัดเพศด้วยเทคนิคผสมเทียมในห้องทดลอง (*In vitro* fertilization) ก่อนนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งในภาคสนาม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved