

ผลของการเสริม Extracellular Vesicles (EVs) จากน้ำยาเลี้ยงเซลล์บุผิวท่อนำไข่โคแบบผิวชั้นเดียว และแบบเวสิเคิลต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนโคที่ผลิตโดยวิธี parthenogenetic activation
Effects of Supplementation with Extracellular Vesicles (EVs) from *in Vitro* Derived Conditioned Media of BOECs Monolayer and Vesicle on Developmental Rates of Bovine Embryos Produced by Parthenogenetic Activation

อภิสิทธิ์ พลราชขม¹ ธัญญา ประนอมพนธ์¹ กมลชนก โทนคำ¹ ญาณกร อันทะเกตุ¹ ราตรี มุระวงษ์¹ มารินา เกตุทัต-คาร์นส์² และ รังสรรค์ พาลพ่าย^{1*}
Apisit Polrachom¹, Thanya Pranomphon¹, Kamolchanok Tonekam¹, Yanapon Anthakat¹, Ratri Moorawong¹,
Mariena Ketudat-Cairns² and Rangsun Parnpai^{1*}

¹ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
²สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

¹ Embryo Technology and Stem Cell Research Center, School of Biotechnology Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology

²School of Biotechnology Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology

*E-mail: rangsun@g.sut.ac.th

บทคัดย่อ

ของเหลวในท่อนำไข่มีส่วนประกอบของสารอาหารหลายอย่างที่ช่วยให้ตัวอ่อนที่เดินทางในท่อนำไข่ในช่วง 3-4 วันเจริญถึงระยะบลาสโตซิส อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังมีข้อมูลไม่มากเกี่ยวกับความเข้มข้นและบทบาทของสารอาหารเหล่านี้ที่ทำให้ตัวอ่อนระยะแรกมีการเจริญเติบโต ในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบผลของสิ่งที่หลั่งออกมาจากเยื่อท่อนำไข่โค (BOECs) ที่เลี้ยงในหลอดแก้ว โดยเรียกว่า Extracellular Vesicles (EVs) ซึ่งจะเลียนแบบสิ่งที่เกิดขึ้นกับของเหลวในท่อนำไข่ในตัวโคและทำให้ตัวอ่อนเจริญได้ เราประสบความสำเร็จในการคัดแยก EVs จากน้ำยาเลี้ยงเซลล์บุผิวท่อนำไข่โคแบบผิวชั้นเดียว (BOEC monolayer, BOEC-M-EVs) และแบบเวสิเคิล (BOEC vesicle, BOEC-V-EVs) EVs ทั้งสองชนิดนี้มีขนาดระหว่าง 30-150 nm มีความเข้มข้น 2.9×10^8 particles/ml และมีการแสดงออกของ CD9 ซึ่งเป็นโปรตีนที่จำเพาะต่อ exosomes การเติม BOEC-M-EVs และ BOEC-V-EVs ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้วที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5% สามารถเพิ่มอัตราการเจริญของตัวอ่อนที่ผลิตโดยวิธี parthenogenetic activation (PA) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และการเติม EVs ทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้น 3% ให้อัตราตัวอ่อนเจริญถึงระยะบลาสโตซิสสูงสุด อีกทั้งจำนวนเซลล์ TE, ICM และเซลล์ทั้งหมดสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน และการเติม EVs 3% ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว ให้จำนวนเซลล์ TE, ICM และเซลล์ทั้งหมดของตัวอ่อน PA สูงที่สุด การศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่า BOEC-V-EVs มีศักยภาพเทียบเท่า BOEC-M-EVs ในการเพิ่มจำนวนตัวอ่อนเจริญถึงระยะบลาสโตซิส รวมถึงเพิ่มคุณภาพของตัวอ่อนที่ได้จากการนับจำนวนเซลล์ TE, ICM และเซลล์ทั้งหมด ควรมีการวิจัยต่อในเรื่องการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ Reactive Oxygen Species (ROS), การแตกหักของ DNA และยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของตัวอ่อน

คำสำคัญ: โค Extracellular Vesicles ท่อนำไข่ Parthenogenetic Activation

Abstract

Oviduct fluid is enriched by a wide variety of nutrients that guide the 3-4 days journey of pre-implantation embryo through the oviduct as it develops into a blastocyst (BL). However, little is known about the specific requirement and role of these nutrients that orchestrate the early stages of embryonic development. In this study, we aimed to characterize the effect of *in vitro*-derived bovine oviduct epithelial cells (BOECs) secretion, named Extracellular Vesicles (EVs), that mimics the *in vivo* oviduct microfluid like environment, which allows embryonic development. We successfully isolated EVs from *in vitro*-derived conditioned media of BOECs monolayer (BOEC-M-EVs) and vesicle (BOEC-V-EVs). Both types of EVs have 30-150 nm in size and average concentration 2.9×10^8 particles/ml, and expressed CD9 which is specific marker of exosome. The addition of BOEC-M-EVs and BOEC-V-EVs into *in vitro* culture medium at concentration of 1, 3 and 5% significantly increased development of BL produced by parthenogenetic activation (PA) and supplemented 3% of both types EVs showed highest blastocyst rates when compared with control group. Also, TE, ICM and total cell numbers of EVs supplemented in *in vitro* culture medium significantly higher than control group. The highest TE, ICM and total cell numbers was found in 3% supplemented group. This study can be concluded that BOEC-V-EVs has similar activity to BOEC-M-EVs by enhancing blastocyst formation rate and quality of embryos in term of TE, ICM and total cell numbers. Further research needs to study more on level of gene expression relating to Reactive Oxygen Species (ROS), DNA damage and embryo developmental genes.

Keywords: Bovine, Extracellular Vesicles, Oviduct, Parthenogenetic Activation

บทนำ

ตามธรรมชาติเมื่อไข่ตกลงมาจากรังไข่แล้วได้รับการปฏิสนธิ โดยเซลล์บุผิวท่อหน้าไข่ (Oviduct Epithelial Cells (BOECs) ที่มี cilia โบกพัดทำให้ตัวอ่อนเคลื่อนตัวไปยังมดลูก BOECs จะหลั่งสารที่มีผลต่อการเจริญของตัวอ่อน (Embryotrophic factors) ซึ่งทำให้ตัวอ่อนมีการเจริญ และแบ่งตัวจากระยะไซโกต (Zygote) จนถึงระยะมอรูลา (Morula) เดินทางเข้าสู่มดลูก เจริญต่อเป็นระยะบลาสโตซิส และฟักตัวออกจากชั้น zona pellucida ก่อนฝังตัวที่ผนังมดลูก

Mermillod et al. (1993) รายงานการศึกษานำน้ำยาเลี้ยงเซลล์ BOECs (Conditioned medium) มาเติมในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนโคพบว่า ไม่มีผลต่อลักษณะทางกายภาพของตัวอ่อน และจำนวนเซลล์ทั้งหมด แต่เพิ่มอัตราการตั้งท้องมากกว่ากลุ่มที่ไม่เติม ต่อมา Théry et al. (2006) ได้รายงานวิธีการคัดแยก exosomes จากเซลล์ นับว่าเป็นจุดเริ่มต้นแรกในการคัดแยก exosomes เพื่อนำไปใช้ในการเลี้ยงไข่ และตัวอ่อน

นอกจากการศึกษานำ BOECs มาใช้เลี้ยงร่วมกับตัวอ่อนแล้ว การเติม Extracellular Vesicles (EVs) ยังเป็นที่สนใจ การศึกษาในปัจจุบัน EVs เป็นตัวกลางในการสื่อสารระหว่างเซลล์ เนื่องจาก EVs เก็บสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพไว้ภายใน เช่น ไขมัน โปรตีน mRNA และ miRNA ที่สามารถถ่ายโอนไปยังเซลล์เป้าหมาย (Bastos et al., 2022) ในการสื่อสารระหว่างตัวอ่อนและแม่ EVs มีบทบาทสำคัญในกระบวนการดังกล่าว พบว่า EVs ที่แยกได้จากท่อหน้าไข่ช่วยเพิ่มจำนวนของเซลล์โทรเฟคโตเดอริมเพิ่มอัตราการรอดของไข่ การเจริญของตัวอ่อนในระยะแรก คุณภาพของตัวอ่อนระยะบลาสโตซิส และเพิ่มอัตราการคลอดหลังย้ายฝากตัวอ่อน ในขณะที่เดียวกัน EVs ที่แยกได้จากมดลูกบรรจุสารจำพวก histotroph ซึ่งเป็นอาหารที่ทำให้ตัวอ่อนเจริญเติบโต ตัวอ่อนใช้สารเหล่านี้ในการสื่อสารกับแม่ เพื่อให้แม่รับรู้ และสร้างสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม

ต่อการตั้งท้อง รวมถึงควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการหลังฮอโมน เช่น โพรเจสเตอโรน และ FSH สามารถกระตุ้นการเปลี่ยนแปลง การหลังของฮอโมนเหล่านี้ในเยื่อโพรงมดลูก ซึ่งมีผลต่อการตั้งท้อง แสดงให้เห็นว่า EVs มีบทบาทสำคัญในการสื่อสารระหว่างแม่และตัวอ่อนให้รับรู้การตั้งท้อง และรักษาการตั้งท้อง (Bridi et al., 2020)

นอกจากนี้ จากการทดลองของ Sidrat et al. (2022) ศึกษาการเติม EVs ที่ได้จาก BOECs พบว่า EVs ที่เติมในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนช่วยเพิ่มอัตราการฟักตัวของตัวอ่อนหลังการแช่แข็งโดยวิธี vitrification อัตราการรอดชีวิต อัตราการ hatching สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่เติม EVs ในการเลี้ยงตัวอ่อน ซึ่งให้ผลการทดลองในทิศทางเดียวกับการทดลองของ Leal et al. (2022) ที่พบว่าการเติม EVs ที่ได้มาจาก Oviduct Fluid (OF) และ Uterus Fluid (UF) ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนนั้นมีผลต่อความทนทานต่อการแช่แข็ง ในขณะที่เดียวกันการทดลองของ Almiñana et al. (2017) ศึกษาความแตกต่างของโปรตีนต่อการเจริญของตัวอ่อนใน *in vivo* และ *in vitro* ซึ่งโปรตีนเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการจับกันของสเปิร์มและไข่ และการเจริญของตัวอ่อนพบว่า การเติม EVs ที่ได้จาก *in vivo* ทั้งแบบสดและแช่แข็ง ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนที่ผ่านการผลิตในหลอดแก้ว มีอัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ และอัตราการ hatching เพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถบ่งบอกได้ถึงคุณภาพของตัวอ่อน

จากรายงานของ Pavani et al. (2020) ทำการแยก EVs 3 วิธี ได้แก่ (1) Differential Ultra Centrifugation (DU), (2) OptiPrep™ Density Gradient Ultracentrifugation (ODG) และ (3) Size-Exclusion Chromatography (SEC) พบว่าการแยกด้วยวิธี ODG สามารถแยกได้ดีที่สุด โดยสามารถแยกขนาดของ EVs ตั้งแต่ขนาดเล็กจนถึงใหญ่ได้ประสิทธิภาพสูงที่สุด มีรายงาน การเติม EVs ที่แยกได้จากท่อไข่ และมดลูก ในโค และสุกร พบว่าการเติม EVs ที่ได้จากท่อไข่โค เปรียบเทียบผลระหว่าง EVs ที่ได้จากท่อไข่ส่วน ampulla และ isthmus โดยการคัดแยกทุกกลุ่มด้วยแรงปั่นเหวี่ยงที่ต่างกัน ในส่วน ampulla มีความเข้มข้น EVs สูงกว่า isthmus จากนั้นทำการเติม EVs ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน พบว่าการเจริญของตัวอ่อน และคุณภาพของตัวอ่อน ที่ผลิตในหลอดแก้ว อัตราการเจริญถึงระยะบลาสโตซิสต์ ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อทดสอบในกลุ่มตัวอ่อนแช่แข็ง พบว่า หลังการละลายตัวอ่อนและนำเข้าเลี้ยงที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง EVs ที่แยกได้จากท่อไข่ส่วน isthmus ที่ถูกปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 100,000xg มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด และยังพบว่ามีแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ water channel (AQP3, DNMT3A และ SNRPN) และยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับ Lipid Receptor (LDLR) สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่มีการเติม Fetal Calf Serum (FCS) (Lopera-Vasquez et al., 2017)

การศึกษการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของฟอสโฟลิปิดของตัวอ่อนโคที่เลี้ยงในหลอดแก้ว พบว่า EVs ที่แยกได้จากท่อไข่ (Oviduct Fluid Extracellular Vesicles, oEVs) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่เติม oEVs ไม่มีผลต่อจำนวนตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ แต่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของฟอสโฟลิปิดในตัวอ่อน ทั้งก่อนและหลังการ hatching (Banliat et al., 2020) ซึ่งให้ผลลัพธ์ในทิศทางเดียวกับการเติม EVs จากท่อไข่ในสุกร โดยพบว่าการเติม EVs จากท่อไข่มีศักยภาพในการปรับปรุงการผลิตตัวอ่อนในหลอดแก้ว เพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของตัวอ่อน (*S100A11*, *GABARAPL1* และ *ANXA2*) และลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความเครียดของเซลล์ (*HSPA5*, *WARS* และ *SIRT1*) (de-Alcântara-Neto et al., 2022)

มีรายงานการศึกษาล่าสุดถึงอิทธิพลของ EVs จากท่อไข่ของมนุษย์ต่อการเจริญของตัวอ่อนโดยใช้ oEVs ที่แยกได้เติมในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนหนูเมาส์ พบว่าอัตราการได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ และ hatching จำนวนเซลล์ทั้งหมดเพิ่มขึ้น ไม่มีผลต่อสัดส่วน ICM: TE และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ ROS ลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่า oEVs ในมนุษย์สามารถใช้เลี้ยงตัวอ่อนของหนูเมาส์ที่เลี้ยงในหลอดแก้วได้ (Li et al., 2023) นับว่าเป็นต้นแบบแรกในการพัฒนา เพื่อที่จะนำ oEVs ในมนุษย์ ไปใช้ในงานชั้นคลินิก นับถึงปัจจุบันยังไม่มียานการศึกษาคัดแยก BOEC-V-EVs แล้วนำ EVs ที่แยกได้ไปเติมใน

น้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว จึงทำให้คณะผู้วิจัยสนใจศึกษาเปรียบเทียบผลของ BOEC-V-EVs เปรียบเทียบกับ BOEC-M-EVs ต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนที่ผลิตโดยวิธี PA ในการทดลองนี้

วิธีการวิจัย

ใช้ห้องทดลองศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สารเคมีที่ใช้ในการทดลองซื้อจากบริษัท Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA) ถ้าไม่ใช่จะระบุไว้

1. การเตรียม EVs-depleted fetal bovine serum (FBS)

FBS จะถูกกระตุ้นด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 56°C นาน 30 นาที ใน water bath (Major Science, Saratoga, USA) จากนั้นนำ FBS ที่กระตุ้นด้วยความร้อนแล้วไปปั่นด้วยเครื่องปั่นแยกสารความเร็วสูงยิ่งยวด (Ultracentrifugation, Hitachi, Japan) ที่ความเร็ว 120,000 xg นาน 90 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C จำนวน 2 รอบ หลังจากปั่น เก็บเฉพาะของเหลวเหนือตะกอนโดยแบ่งเก็บใส่หลอด ที่ตู้ -20 °C เพื่อไว้ใช้งานต่อไป (Aswad et al., 2016)

2. การเตรียมเซลล์บุผิวท่อไขโค (BOEC)

ทำการตัดเก็บท่อไขโคเฉพาะด้านที่มีการตกไข่จากรังไข่ของโคที่มีสุขภาพดีและมีการตกไขมาแล้ว 1-5 วัน (Almiñana et al., 2017) สังเกตได้จากที่รังไข่จะปรากฏ corpus hemorrhagicum ซึ่งเป็นสีแดงสด ท่อไขโคจะถูกชะล้างทำความสะอาดด้วยสารละลาย 0.9% NaCl และถูกบรรจุในขวดพลาสติกที่มีสารละลาย 0.9% NaCl โดยเก็บไว้ที่ 4°C ขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ ทำความสะอาดท่อไขโคด้วย 0.9% NaCl แช่ใน PBS และจุ่มใน 70% ethanol 1 รอบเพื่อทำความสะอาดภายนอกท่อ จากนั้นจุ่มท่อไขโคใน PBS อีก 1 รอบเพื่อล้างเอา 70% ethanol ออก ทำการตัดแยกเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและเส้นเลือดออก โดยทำภายในตู้ปลอดเชื้อ (Biosafety cabinet) แล้วแช่ไว้ในน้ำยา TCM199 Hepes ที่เติม 0.2% Bovine Serum Albumin (BSA) ตัดท่อไขโคออกเป็นท่อนที่มีความยาว 5 cm จาก infundibulum ถึง isthmus และทำการเก็บรวบรวมเซลล์บุผิวท่อไขโคโดยใช้ปากคีบชุดเซลล์จากภายในท่อไขโคออกมา ต่อมาใช้เข็มเบอร์ 21G และ 25G ต่อเข้ากับกระบอกฉีดยาขนาด 1 ml ดูดเซลล์ที่ดูดออกมาขึ้นลงอย่างละ 10 ครั้ง เพื่อให้เซลล์มีขนาดเล็กลง ล้างด้วยน้ำยา TCM199 Hepes ที่เติม 0.2% BSA 3 ครั้ง ครั้งละ 10 ml เพื่อกำจัดเศษตะกอนที่ไม่ใช่เซลล์บุผิวท่อไขโค จากนั้นเติม TCM199 ที่มี 10% FBS ปริมาตร 10 ml ลงในหลอดที่มีเซลล์ 100 μ l ย้ายเซลล์ลงเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 100 mm ก่อนนำเข้าเลี้ยง ในตู้อบเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂ นาน 48 ชั่วโมง

2.1 การเตรียมเซลล์บุผิวท่อไขโคแบบผิวชั้นเดียว (BOEC-M)

เมื่อครบ 48 ชั่วโมงของการเลี้ยง ดูดน้ำยาเลี้ยงเซลล์พร้อมกับเซลล์แขวนลอยออก เติมน้ำยา TCM199 ที่มี 10% FBS ปริมาตร 10 ml เปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ครั้งหนึ่งทุก 2 วัน จนเซลล์บุผิวท่อไขโคแบบผิวชั้นเดียวที่เกาะยึดกับพื้นจานเลี้ยงเซลล์ หนาแน่นเต็มจานเลี้ยงเซลล์ แล้วเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ด้วย TCM199 ที่เติม 10% EVs-depleted FBS เก็บน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน จำนวน 3 ครั้ง (วันที่ 2, 4 และ 6 ของการเลี้ยงหลังจากเริ่มเลี้ยงด้วย TCM199 ที่เติม 10% EVs-depleted FBS) โดยจะเติมน้ำยาเลี้ยงเซลล์ใหม่ลงไปในวันที่ทำการเก็บน้ำยาเลี้ยงเซลล์เดิม เก็บน้ำยาเลี้ยงเซลล์ไว้ที่ -20°C จนกว่าจะทำการคัดแยก EVs

2.2 การเตรียมเซลล์บุผิวท่อไขโคแบบเวสิเคิล (BOEC-V)

เมื่อครบ 48 ชั่วโมงของการเลี้ยง ดูดน้ำยาเลี้ยงเซลล์พร้อมกับเซลล์แขวนลอย ย้ายลงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 100 mm จานใหม่ คัดเลือกเฉพาะเซลล์แขวนลอย ย้ายลงเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 mm ที่มี TCM199 ที่เติม 10% FBS ปริมาตร 5 ml เมื่อครบ 96 ชั่วโมง คัดเลือกเฉพาะเซลล์บุผิวท่อไขโคที่เป็นเวสิเคิล ล้าง 2 ครั้งใน TCM199 ที่เติม 10% EVs-depleted FBS ก่อนที่จะย้ายลงเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 mm ที่มี TCM199 ที่เติม 10% EVs-depleted FBS

ปริมาตร 5 ml จากนั้นทำการเก็บน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน จำนวน 3 ครั้ง (วันที่ 2, 4 และ 6 ของการเลี้ยงหลังจากย้ายลงเลี้ยงใน TCM199 ที่เติม 10% EVs-depleted FBS) โดยจะเติมน้ำยาเลี้ยงเซลล์ใหม่ลงไปในวันที่ทำการเก็บน้ำยาเลี้ยงเซลล์เดิม เก็บน้ำยาเลี้ยงเซลล์ไว้ที่ -20°C จนกว่าจะทำการคัดแยก EVs

3. การคัดแยก EVs

EVs จะถูกคัดแยกจากน้ำยาเลี้ยงเซลล์บูผิวท่อหน้าไซโคแบบผิวชั้นเดียวและแบบเวสิเคิล ที่ได้รับมาจากท่อหน้าไซโคอย่างน้อย 80 เส้น ในแต่ละชนิดของเซลล์บูผิวท่อหน้าไซโค (BOEC-M หรือ BOEC-V) โดยใช้เครื่องปั่นแยกสารความเร็วสูงยิ่งยวด ตามวิธีของ Théry et al., (2006) เริ่มจากปั่นน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่ความเร็ว 300 xg นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อแยกเซลล์ ซึ่งจะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอดออกไป เก็บเฉพาะของเหลวเหนือตะกอน ปั่นที่ความเร็ว 2,000 xg นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อแยกเซลล์ตาย ที่ตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอดออกไป เก็บเฉพาะของเหลวเหนือตะกอน ปั่นที่ความเร็ว 12,000 xg นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อแยกเศษเซลล์ ซึ่งจะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอดออกไป จากนั้นปั่นที่ความเร็ว 100,000 xg นาน 90 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C จำนวน 2 ครั้ง เพื่อตกตะกอน EVs โดยแยกของเหลวเหนือตะกอนทิ้งไป

4. การตรวจสอบคุณสมบัติของ EVs ที่คัดแยกได้

EVs จะถูกทำให้เป็นสารแขวนลอยอีกครั้งโดยการเติม PBS 500 μl ลงไปในตะกอน EVs และนำ 400 μl ไปกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.22 μm และแบ่งใส่ cryotube 50 μl /หลอด เก็บที่ -80°C เพื่อไว้ใช้เลี้ยงร่วมกับตัวอ่อน ส่วนที่เหลืออีก 100 μl จะเก็บที่ -20°C เพื่อร่อนนำไปตรวจสอบคุณสมบัติด้วยวิธีต่าง ๆ ดังนี้

4.1 การตรวจสอบการกระจายตัวของขนาดอนุภาค (Particle size distribution) ด้วยเครื่อง Nano Particle Size and Zeta Potential Analyzer (Delsa™ Nano C) เจือจาง EVs จาก stock ปริมาตร 10 μl ด้วย PBS ปริมาตร 1 ml (สัดส่วนการเจือจาง = 1:100) จากนั้นดูดย้าย EVs ที่อยู่ในรูปสารแขวนลอยลงใน glass cuvette นำ glass cuvette ใส่ลงในเครื่อง Nano Particle Size and Zeta Potential Analyzer เพื่อทำการวิเคราะห์

4.2 การตรวจสอบขนาดและรูปร่างลักษณะด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบทรานสมิSSION

แบ่ง EVs จาก stock เจือจางด้วย PBS แล้วดูดย้าย EVs ที่อยู่ในรูปสารแขวนลอยปริมาตร 3 μl ลงบน formvar carbon-coated grid ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที จากนั้น ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 30 วินาที และทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง สำหรับ negative contrast ย้อมตัวอย่างด้วย 2% uranyl acetate นาน 1 นาที จากนั้น ทำให้แห้งโดยการผึ่งลม (Air dry) ทำการส่องตรวจตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบทรานสมิSSION (JEOL, Japan) (Almiñana et al., 2018)

4.3 การตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน exosomes โดย western blot

ทำการสกัดโปรตีนจาก EVs และเซลล์บูผิวท่อหน้าไซโค ด้วย non-reducing Laemmli loading buffer (2 x buffer) ซึ่งประกอบด้วย 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 20% glycerol, 4% sodium dodecyl sulfate และ 10% Tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) หลังจากนั้นทำการวัดความเข้มข้นของโปรตีน โดยวิธี micro-bicinchoninic acid assay (4.2) ทำการแยกโปรตีนบน 10% SDS-PAGE ด้วยกระแสไฟฟ้า (Electrophoresis) โปรตีนจะถูกย้ายไปยัง nitrocellulose membrane (BioRad, USA) ล้าง membrane ด้วยน้ำกลั่น แล้วแช่ใน blocking buffer ซึ่งประกอบด้วย 0.5% Tween-20 และ 5% skim milk ใน Tris-buffered saline (TBS), นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นบ่ม membrane ด้วยแอนติบอดีปฐมภูมิ (primary antibody) ซึ่งจำเพาะต่อ exosomes ได้แก่ CD9 (1:200, Abcam, Cambridge, USA) นาน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C แล้วบ่มด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิ (Secondary antibody) ที่จับอยู่กับเอนไซม์ Horseradish Peroxidase (HRP) ได้แก่ HRP-conjugated goat anti-mouse IgG ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นทำตรวจสอบการปรากฏแถบของโปรตีน (Protein bands) โดย chemiluminescence (Almiñana et al., 2018)

5. การเลี้ยงไขให้สุกในหลอดแก้ว (*In Vitro* Maturation, IVM)

ทำการเก็บรังไข่โคนมจากโรงฆ่าสัตว์ไว้ใน 0.9% NaCl ที่อุณหภูมิห้องระหว่างขนส่งเข้าห้องปฏิบัติการ ทำความสะอาดรังไข่ด้วย 0.9% NaCl จากนั้นใช้เข็มเบอร์ 18G ต่อกับกระบอกฉีดยาขนาด 10 ml ดูดไข่จากฟอลลิเคิลที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-8 mm ทำการคัดเลือกไข่ที่มีชั้นเซลล์คลุมล้อมอย่างน้อย 3 ชั้นไปเลี้ยงในน้ำยา ในจานเลี้ยงเซลล์ซึ่งปิดคลุมด้วย mineral oil เลี้ยงในสัดส่วน 20 ใบ/100 μ l น้ำยาเลี้ยงไขประกอบด้วย TCM199 ที่เติมด้วย 10% FBS, 50 IU/ml HCG (Intervet, Netherlands, CDN781851), 0.02 AU/ml FSH (Antrin®, Denka Pharmaceutical, Japan) และ 1 μ g/ml 17 β -estradiol นำไปเลี้ยงในตู้บัพที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂ นาน 22 ชั่วโมง

6. การผลิตตัวอ่อนด้วยวิธี Parthenogenetic activation (PA)

นำไข่ที่ผ่านการเลี้ยงให้สุกในหลอดแก้วมาแล้ว 22 ชั่วโมง (วิธีการเดียวกับข้อ 5) มาย่อยเซลล์คลุมล้อมด้วย 0.2 % hyaluronidase คัดเลือกโอโอไซท์ที่สุกแล้ว (มี first polar body) ไปกระตุ้นด้วย 7% ethanol นาน 5 นาที แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยา TCM199 + 10% FCS ที่เติมด้วย 10 μ g/ml cycloheximide (CHX) และ 1.25 μ g/ml cytochalasin D (CD) ในตู้บัพที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂ นาน 5 ชั่วโมง

7. การเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว (*In vitro* Culture, IVC)

สำหรับตัวอ่อน PA นำไข่ที่ผ่านการกระตุ้นแล้วไปเลี้ยงในน้ำยา CR1aa ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของ EVs เป็น 1, 3 และ 5% (กลุ่มควบคุมไม่เติม EVs) และเติมด้วย 5% EVs-depleted FBS ซึ่งปิดคลุมด้วย mineral oil เลี้ยงในสัดส่วน 20 ใบ/100 μ l ในตู้บัพที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂ นาน 8 วัน เปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนครั้งหนึ่ง ในวันที่ 2 และวันที่ 5 ของการเลี้ยง โดยจะเติม EVs ที่ความเข้มข้นเดิมในวันที่เปลี่ยนน้ำยา การเจริญเติบโตของตัวอ่อนจะถูกบันทึกในวันที่ 2 และ 8 ตามลำดับ แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 7 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม, กลุ่มที่เสริม BOEC-M-EVs และกลุ่มที่เสริม BOEC-V-EVs ที่ความเข้มข้น 1, 3 และ 5% ตามลำดับ ทำการทดลอง 7 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีตัวอ่อน 20 ใบ รวมทั้งหมด 140 ตัวอ่อน

8. การย้อมสีตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์

นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์วันที่ 8 จากการทดลองทั้ง 7 กลุ่ม มาย้อมด้วย 0.1 mg/ml Propidium Iodide (PI) และ 0.2% Triton X-100 ในน้ำยา modified Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (mDPBS) ที่มี 0.1% Polyvinyl Pyrrolidone (PVP) นาน 1 นาที จากนั้นนำตัวอ่อนย้ายไปไว้ในน้ำยา 25 μ g/ml Hoechst 33342 ในน้ำยา 99.5% ethanol นาน 5 นาที และย้ายตัวอ่อนไปวางบนสไลด์ในน้ำยา glycerol ทำการนับจำนวนเซลล์ Trophectoderm (TE) และ Inner Cell Mass (ICM) ภายใต้แสงยูวีกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ เซลล์ ICM จะแสดงสีฟ้าของ Hoechst และ เซลล์ TE จะแสดงสีแดงหรือชมพูของทั้ง PI และ Hoechst

9. การวิเคราะห์ทางสถิติ

อัตราการเจริญของตัวอ่อน จำนวน Trophectoderm (TE) และ Inner Cell Mass (ICM) ของตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ของแต่ละกลุ่มการทดลอง วิเคราะห์โดยหาค่าความแตกต่างทางสถิติ โดยใช้ One way ANOVA แล้วตามด้วย t-Test โดยค่า P < 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิตินำมาสร้างเป็นแผนภูมิโดย โปรแกรมสำเร็จรูป GraphPad Prism version 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)

ผลการวิจัย

1. ผลการคัดแยก EVs

จากการเก็บท่อน้ำไขโคจากโรงฆ่าสัตว์ แล้วนำมาแยกเซลล์บุผิวท่อน้ำไข เพื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบผิวชั้นเดียว (BOEC-M) และแบบเวสิเคิล (BOEC-V) แล้วทำการเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 ชนิดเพื่อเก็บน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน จำนวน 3 ครั้ง ได้น้ำยาจากการเลี้ยงแบบผิวชั้นเดียวจำนวน 200 ml และแบบเวสิเคิล จำนวน 200 ml เก็บแช่แข็งไว้ แล้วนำไปคัดแยก EVs ด้วยการปั่นแยกสารความเร็วสูงยิ่งยวด EVs จากการเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 ชนิดจะถูกทำให้เป็นสารแขวนลอยอีกครั้งโดยการเติม PBS ปริมาตร 500 μ l และน้ำ 400 μ l ไปกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.22 μ M และแบ่งใส่ cryotube 50 μ l/หลอด เก็บที่ตู้ -80 °C เพื่อไว้ใช้เลี้ยงร่วมกับตัวอ่อน ส่วนที่เหลืออีก 100 μ l จะเก็บที่ตู้ -20 °C เพื่อรอการนำไปตรวจสอบ

2. ผลการตรวจสอบคุณสมบัติของ EVs ที่คัดแยกได้

2.1 ผลการตรวจสอบการกระจายตัวของขนาดอนุภาค (Particle size distribution) ด้วยเครื่อง Nano Particle Size and Zeta Potential Analyzer และตรวจสอบขนาดและรูปร่างลักษณะด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบทรานสมิSSION

จากการตรวจสอบการกระจายตัวของขนาดอนุภาค พบว่า BOEC-M-EVs และ BOEC-V-EVs ที่แยกได้ มีขนาดระหว่าง 30-150 nm และมีจำนวน particle เฉลี่ย 2.9×10^8 /ml

2.2 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน exosomes โดย western blot

จากการนำ EVs ไปตรวจสอบการแสดงออกของ CD9 ซึ่งเป็นโปรตีนที่เฉพาะของ exosomes พบว่ามีการแสดงออกของ CD9 ของ EVs ทั้งที่แยกได้จากการเลี้ยงเซลล์เยื่อบุท่อน้ำไขแบบผิวชั้นเดียวและแบบเวสิเคิล

3. ผลของการเติม EVs ลงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนโคที่ผลิตจากการทำ PA ต่อการเจริญถึงระยะบลาสโตซิสต์

เมื่อนำตัวอ่อนโคที่ผลิตจากการทำ PA ไปเลี้ยงในน้ำยา CR1aa ที่เติม BOEC-M-EVs และ BOEC-V-EVs ในปริมาณ 1, 3 และ 5% (กลุ่มควบคุมไม่เติม EVs) พบว่า EVs ทั้งสองชนิดมีผลเชิงบวกต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซิสต์ โดยสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยในระหว่างกลุ่มที่เติม EVs ทั้งสองชนิด ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่การเติม EVs ปริมาณ 3% ให้อัตราการเจริญถึงระยะบลาสโตซิสต์มากกว่ากลุ่มอื่น (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลของการเติม EVs ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนโคที่ผลิตจากการทำ PA ต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อน

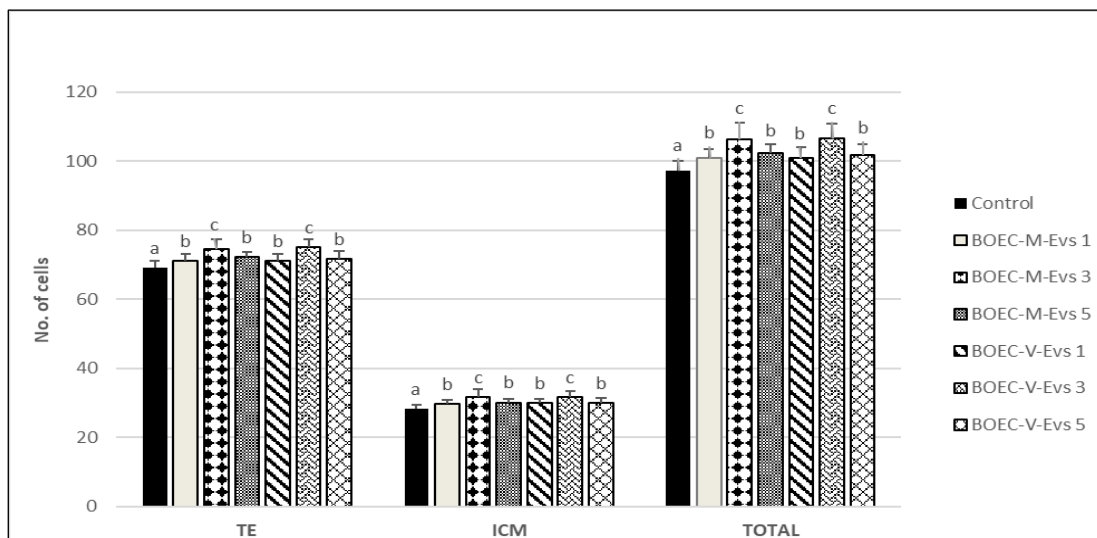
EVs ที่เติมในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน	ปริมาณ EVs ที่เติม ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน (%)	จำนวน ตัวอ่อน เข้าเลี้ยง	จำนวน (%) ตัวอ่อนแบ่งตัว	จำนวน (%) ตัวอ่อนเจริญถึงระยะ	
				Morula	Blastocyst
Control	0	140	89/140 (63.6)	57/140 (40.7)	46/140 ^a (32.8)
BOEC-M-EVs	1	140	88/140 (62.8)	59/140 (42.1)	49/140 ^{ab} (35.0)
	3	140	93/140 (66.4)	65/140 (46.4)	60/140 ^b (42.8)
	5	140	89/140 (63.6)	59/140 (42.1)	50/140 ^{ab} (35.7)

EVs ที่เติมในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน	ปริมาณ EVs ที่เติมในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน (%)	จำนวนตัวอ่อนเข้าเลี้ยง	จำนวน (%) ตัวอ่อนแบ่งตัว	จำนวน (%) ตัวอ่อนเจริญถึงระยะ	
				Morula	Blastocyst
	1	140	90/140 (64.3)	60/140 (42.8)	50/140 ^{ab} (35.7)
BOEC-V-EVs	3	140	94/140 (67.1)	66/140 (47.1)	61/140 ^b (43.5)
	5	140	90/140 (64.2)	60/140 (42.8)	51/140 ^{ab} (36.4)

*ทำการทดลอง 7 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีตัวอ่อน 20 ใบ รวมทั้งหมด 140 ตัวอ่อน a, b ภายใน Column เดียวกัน, ความแตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.05$ Control: ไม่เติม EVs BOEC - M - EVs: EVs ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่แบบผิวชั้นเดียว BOEC - V - EVs: EVs ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่แบบเวสิเคิล

4. ผลการย้ายสัตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์

จากการนำตัวอ่อนโคระยะบลาสโตซิสต์วันที่ 8 หลังจากการเลี้ยงในหลอดแก้ว ในกลุ่มที่ผลิตจากการทำ PA ไปย้ายตรวจสอบเซลล์ TE และ ICM พบว่าการเติม EVs ทั้งสองกลุ่มในทุกความเข้มข้น มีจำนวนเซลล์ TE, ICM และ เซลล์ทั้งหมดสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้เติม EVs อย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และการเติม EVs ทั้งสองกลุ่มที่ความเข้มข้น 3% มีจำนวนเซลล์ TE, ICM และ เซลล์ทั้งหมด สูงกว่ากลุ่มที่เติม EVs ที่ความเข้มข้น 1 และ 5% อย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แสดงผลการย้ายตรวจเซลล์ TE และ ICM ตัวอ่อนที่ผลิตจากการทำ PABOEC-M-Evs: EVs ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่แบบผิวชั้นเดียว ที่เติมลงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน 1, 3 และ 5%, BOEC-V-Evs: EVs ที่ได้จากการเลี้ยงเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่แบบเวสิเคิลที่เติมลงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน 1, 3 และ 5% , Control ไม่เติม EVs

*หมายเหตุ a, b, c ภายในกราฟ, แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.05$

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

อภิปรายผลการวิจัย

ในการทดลองครั้งนี้พบว่า BOEC-M-EVs และ BOEC-V-EVs ที่คัดแยกได้ มีขนาดระหว่าง 30-150 nm และมีจำนวน particle เฉลี่ย 2.9×10^9 /ml การคัดแยก EVs จากน้ำยาเลี้ยง BOECs แบบเวสิเคิลในครั้งนี้นับเป็นรายงานแรก ซึ่งมีขนาดและจำนวน particle ไม่แตกต่างจากน้ำยาเลี้ยง BOECs แบบผิวชั้นเดียวซึ่งเป็นแบบดั้งเดิม จากรายงานของ Lopera-Vasquez et al. (2016) ที่คัดแยก EVs จากของเหลวในท่อนำไข่โค มีขนาดระหว่าง 150-200 nm และมีจำนวน particle ระหว่าง $1.5-3.0 \times 10^5$ EVs/ml จากรายงานของ Sidrat et al. (2020) พบว่า EVs จากน้ำยาเลี้ยง BOECs แบบผิวชั้นเดียว มีขนาดระหว่าง 80-150 nm และมีจำนวน particle เฉลี่ย 3×10^8 EVs/ml ส่วนรายงานของ Almiñana et al. (2018) ที่คัดแยก EVs จากของเหลวในท่อนำไข่พบว่า มีขนาด 30-100 nm และรายงานของ Leal et al. (2022) คัดแยก EVs จากของเหลวในท่อนำไข่โค ได้ EVs ขนาดเฉลี่ย 177.5 nm และมีจำนวน particle 2.97×10^{10} EVs/ml มีรายงานการคัดแยก EVs จากน้ำในถุงฟอลลิเคิลของมนุษย์มีขนาดเฉลี่ย 220 nm และมีจำนวน particle 2.7×10^6 EVs/ml (Burns et al., 2014) ส่วน EVs ที่คัดแยกได้จากของเหลวในมดลูกแกะ มีขนาดเฉลี่ย 148 nm และมีจำนวน particle 200×10^9 EVs/ml (Burns et al., 2014) จากข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่า EVs ที่คัดแยกได้จากของเหลวในท่อนำไข่ ของเหลวในมดลูก ของเหลวในถุงฟอลลิเคิล และจากน้ำยาเลี้ยง BOECs เป็น nanoparticle ข้อมูลรายงานของห้องทดลองที่แตกต่างกันพบว่า มีขนาดของ EVs ที่แตกต่างกันนั้น Lopera-Vasquez et al. (2017) รายงานว่าความแรงของการปั่นแยก EVs ที่ ทำให้ได้ขนาดและจำนวนที่ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ วิธีการคัดแยกมีผลต่อขนาดและจำนวนของ EVs ที่ได้ด้วย (Pavani et al., 2020) การแสดงออกของ CD9 ของ BOEC-M-EVs และ BOEC-V-EVs ซึ่งเป็นโปรตีนที่จำเพาะต่อ exosomes ในการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานที่มีมาก่อนหน้านี้ (Lopera-Vasquez et al., 2016; Lopera-Vasquez et al., 2017; Leal et al., 2022; Sidrat et al., 2020)

ในการทดลองครั้งนี้ BOEC-M-EVs และ BOEC-V-EVs ที่เติมลงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว ที่ผลิตจากการทำ PA สามารถเพิ่มอัตราการเจริญของตัวอ่อน PA ซึ่งพบว่าการเติม exosomes ที่คัดแยกได้จากน้ำยาเลี้ยง BOECs แบบผิวชั้นเดียว ในปริมาณ 3% ให้อัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะ บลาสโตซิสสูงกว่ากลุ่มอื่น ส่วนรายงานของ Lopera-Vasquez et al. (2016, 2017) พบว่า EVs ที่แยกได้จากของเหลวในท่อนำไข่ ที่นำไปเติมลงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนโคในหลอดแก้ว ไม่ช่วยให้ตัวอ่อนเจริญถึงระยะ บลาสโตซิสสูงขึ้น แต่ช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อนหลังจากแช่แข็งโดยวิธี vitrification ส่วนรายงานของ Leal et al. (2022) พบว่า การเติม EVs ที่คัดแยกจากของเหลวในท่อนำไข่ ไม่มีผลต่อการเพิ่มอัตราการเจริญในหลอดแก้วของตัวอ่อนโคถึงระยะบลาสโตซิส แต่ช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อนหลังจากแช่แข็งโดยวิธี vitrification

ในการทดลองครั้งนี้ BOEC-M-EVs และ BOEC-V-EVs ที่เติมลงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว ที่ผลิตจากการทำ PA สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ TE, ICM และเซลล์ทั้งหมดในตัวอ่อนระยะบลาสโตซิส ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทำให้เพิ่มจำนวนเซลล์ TE และจำนวนเซลล์ทั้งหมดในตัวอ่อนระยะบลาสโตซิส

เป็นที่ทราบกันดีว่าการเจริญของตัวอ่อนจากระยะมอรูลาถึงระยะบลาสโตซิส สารอาหารในท่อนำไข่มีผลต่อเมแทบอลิซึมของตัวอ่อนผ่านการสื่อสารระหว่างท่อนำไข่และตัวอ่อน exosomes ที่อยู่ในของเหลวในท่อนำไข่เป็นสิ่งสำคัญในการสื่อสารระหว่างท่อนำไข่และตัวอ่อน และช่วยให้ตัวอ่อนสามารถมีเมแทบอลิซึมเป็นของตัวเอง (Bridi et al., 2020) ดังนั้น การเติม EVs ที่คัดแยกได้จากน้ำยาเลี้ยง BOECs ในการทดลองนี้ จึงมีผลช่วยเพิ่มการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซิสในหลอดแก้ว

สรุปผลการวิจัย

1. สามารถคัดแยก EVs จากน้ำยาเลี้ยง BOECs แบบผิวชั้นเดียว (BOEC-M-EVs) และแบบเวสิเคิล (BOEC-V-EVs) อย่างมีประสิทธิภาพ และจากการตรวจสอบคุณสมบัติต่าง ๆ พบว่าเป็น nanoparticle และ มีการแสดงออกของ CD9 ซึ่งเฉพาะต่อโปรตีนของ exosomes
2. BOEC-M-EVs และ BOEC-V-EVs ที่เติมลงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว ที่ผลิตจากการทำ PA สามารถเพิ่มอัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซิสต์สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
3. BOEC-M-EVs และ BOEC-V-EVs ที่เติมลงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว ที่ผลิตจากการทำ PA สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ TE, ICM และเซลล์ทั้งหมด ในตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาผลของ BOEC-V-EVs และ BOEC-M-EVs ต่อการเจริญในหลอดแก้วของตัวอ่อนโคที่ได้จากการทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว
2. ควรศึกษาผลของ BOEC-M-EVs และ BOEC-V-EVs ต่อการแสดงออกของยีนในตัวอ่อน ที่เกี่ยวข้องกับ ROS ความเครียด และการเจริญเติบโต

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ 2565

เอกสารอ้างอิง

- Almiñana, C., Corbin, E., Tsikis, G., Alcántara-Neto, A. S., Labas, V., Reynaud, K., Galio, L., Uzbekov, R., Garanina, A. S., Druart, X. and Mermillod, P. (2017). Oviduct extracellular vesicles protein content and their role during oviduct-embryo cross-talk. *Reproduction*, 154, 153-168. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0054>.
- Almiñana, C., Tsikis, G., Labas, V., Uzbekov, R., da Silveira, J. C., Bauersachs, S. and Mermillod, P. (2018). Deciphering the oviductal extracellular vesicles content across the estrous cycle: implications for the gametes-oviduct interactions and the environment of the potential embryo. *BMC Genomics*, 19, 622-622.
- Aswad, H., Jalabert, A. and Rome, S. (2016). Depleting extracellular vesicles from fetal bovine serum alters proliferation and differentiation of skeletal muscle cells in vitro. *BMC Biotechnology*, 16, 1-16.
- Banliat, C., Le Bourhis, D., Bernardi, O., Tomas, D., Labas, V., Salvetti, P., Guyonnet, B., Mermillod, P. and Saint-Dizier, M. (2020). Oviduct fluid extracellular vesicles change the phospholipid composition of bovine embryos developed *in vitro*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(15), 5326. <https://doi.org/10.3390/ijms21155326>.
- Bastos, N. M., Ferst, J. G., Goulart, R. S. and da-Silveira, J. C. (2022). The role of the oviduct and extracellular vesicles during early embryo development in bovine. *Animal Reproduction*, 19(1), e20220015. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-ar2022-0015>.
- Bridi, A., Percin, F. and Silveira, J. C. D. (2020). Extracellular vesicles mediated early embryo-maternal interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 1163.

- Burns, G., Brooks, K., Wildung, M., Navakanitworakul, R., Christenson, L. K. and Spencer, T. E. (2014). Extracellular vesicles in luminal fluid of the ovine uterus. *PLoS ONE*, *9*, e90913.
- de-Alcântara-Neto, A. S., Cuello, C., Uzbekov, R., Bauersachs, S., Mermillod, P. and Almiñana, C. (2022). Oviductal extracellular vesicles enhance porcine *in vitro* embryo development by modulating the embryonic transcriptome. *Biomolecules*, *12*, 1300.
- Leal, C. L. V., Cañón-Beltrán, K., Cajas, Y. N., Hamdi, M., Yaryes, A., Millán de la Blanca, M. G., Beltrán-Breña, P., Mazzarella, R., da Silveira, J. C., Gutiérrez-Adán, A., González, E. M. and Rizos, D. (2022). Extracellular vesicles from oviductal and uterine fluids supplementation in sequential *in vitro* culture improves bovine embryo quality. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, *13*(116). <https://doi.org/10.1186/s40104-022-00763-7>.
- Li, Y., Liu, C., Guo, N., Cai, L., Wang, M., Zhu, L., Li, F., Jin, L. and Sui, C. (2023). Extracellular vesicles from human Fallopian tubal fluid benefit embryo development *in vitro*. *Human Reproduction Open*, *2023*(2). <https://orcid.org/0000-0002-6927-4339>.
- Lopera-Vasquez, R., Hamdi, M., Fernandez-Fuertes, B., Maillo, V., Beltran-Brena, P., Calle, A., Redruello, A., Lopez-Martin, S., Gutierrez-Adan, A. and Yañez-Mó, M. (2016). Extracellular vesicles from BOEC in *in vitro* embryo development and quality. *PLoS one*, *11*(2), e0148083.
- Lopera-Vasquez, R., Hamdi, M., Maillo, V., Gutierrez-Adan, A., Bermejo-Alvarez, P., Ramirez M. Á., Yañez-Mó, M., Rizos, D. (2017). Effect of bovine oviductal extracellular vesicles on embryo development and quality *in vitro*. *Reproduction*. *153*(4), 461-470. doi: 10.1530/REP-16-0384. Epub 2017 Jan 19. PMID: 28104825.
- Mermillod, P., Vansteenbrugge, A., Wils, C., Mourmeaux, J., Massip, A. and Dessy, F. (1993). Characterization of the embryotrophic activity of exogenous protein-free oviduct-conditioned medium used in culture of cattle embryos. *Biology of Reproduction*, *49*, 582-587.
- Pavani, K. C., Lin, X., Hamacher, J., Broeck, W. V. D., Couck, L., Peelman, L., Hendrix, A. and Van Soom, A. (2020). The separation and characterization of extracellular vesicles from medium conditioned by bovine embryos. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(8), 2942. <https://doi.org/10.3390/ijms21082942>.
- Sidrat, T., Khan, A. A., Joo, M. D., Xu, L., El-Sheikh, M., Ko, J. H. and Kong, I. K. (2022). Extracellular vesicles improve embryo cryotolerance by maintaining the tight junction integrity during blastocoele re-expansion. *Reproduction (Cambridge, England)*, *163*(4), 219-232. doi: 10.1530/REP-21-0320.
- Sidrat, T., Khan, A. A., Joo, M. D., Wei, Y., Lee, K. L., Xu, L. and Kong, I. K. (2020). Bovine oviduct epithelial cell-derived culture media and exosomes improve mitochondrial health by restoring metabolic flux during pre-implantation development. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*, 7589.
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G. and Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, *30*, 3-22.