บทที่ 1

บทนำ

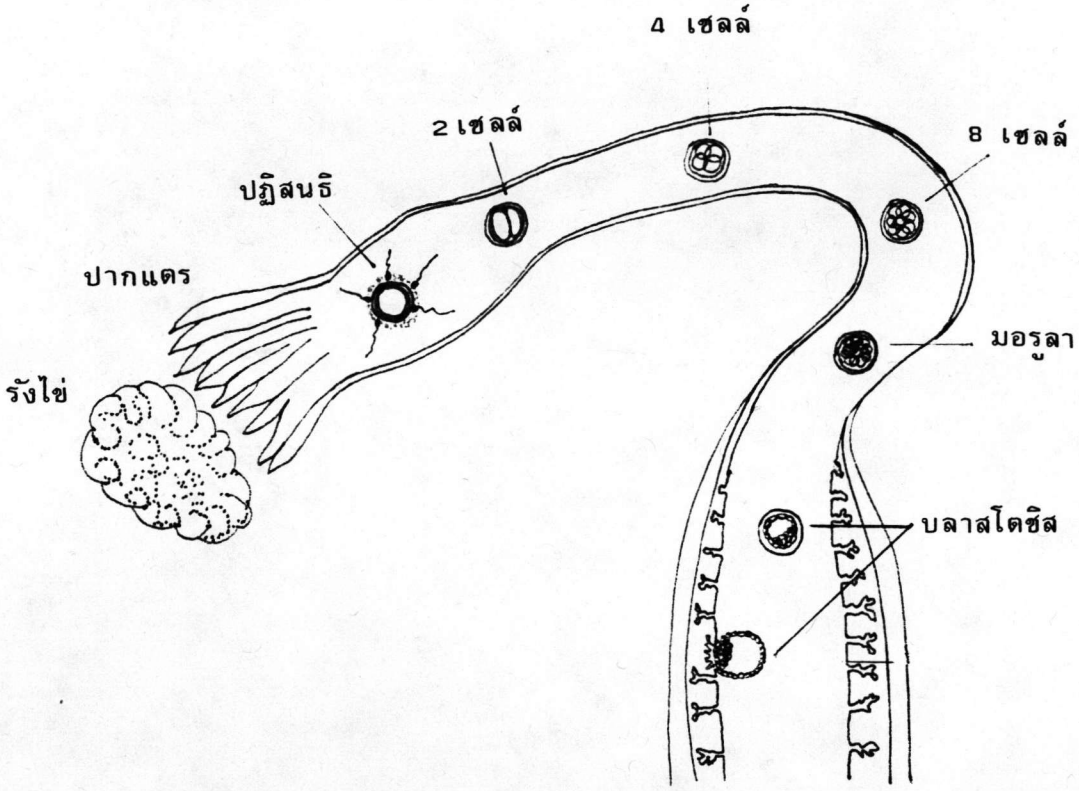
หนูเมาส์เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมที่นิยมใช้ในการทดลองต่าง ๆ ตามห้องปฏิบัติการทั่วไป เพราะมีการสืบพันธุ์ที่รวดเร็ว มีรอบการเป็นสัด (oestrous cycle) 4 วัน ระยะเวลาตั้งท้องเพียง 21 วัน และคลอดลูกได้ครั้งละหลายตัว

การสืบพันธุ์ของหนูเมาส์เริ่มจากการตกไข่ โดยไข่ที่ตกมาจากรังไข่จะมีชั้นของมิวโคโปรตีน (mucoprotein) ที่เรียก โซนาเพลลูซิดา (zona pellucida) ซึ่งผลิตโดย ฟอลลิคูลาเซล และส่วนของเซลล์ไข่ที่อยู่รอบ ๆ ล้อมถัดจากเยื่อหุ้มไข่ (vitelline membrane) ออกมา นอกจากนั้นยังมีกลุ่มเซลล์ คิวมูลัส โอโอฟอรัส (cumulus oophorus)ล้อมอยู่เป็นจำนวนมาก สารที่เชื่อมเซลล์เหล่านี้ไว้ด้วยกัน(intercellular matrix) ประกอบด้วย มิวโคโพลีแซคคาไรด์ (mucopolysaccharide), กรดไฮยาลูโรนิค (hyaluronic acid) และโปรตีน (Barden, 1962) Mintz (1962) เสนอแนะว่า โซนาเพลลูซิดา มีไว้เพื่อให้การแบ่งเซลล์ในระยะต้น ๆ (cleavage) เป็นไปโดยปกติและป้องกันการหลอมรวม (fusion) ของไข่ โดยพบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ย่อยสลายโซนาเพลลูซิดาออก จะทำให้เกิดการหลอมรวมกันของไข่ (Mintz, 1964, 1965) หนูเมาส์เพศเมียที่ได้รับการผสม การปฏิสนธิ (fertilization) ระหว่างเซลล์อสุจิกับไข่เกิดขึ้นที่บริเวณแอมพูลา (ampulla) ซึ่งเป็นส่วนต้นของท่อนำไข่ (oviduct หรือ Follopian tube) การปฏิสนธิตามปกติ พบว่ามีอสุจิเพียงตัวเดียวเท่านั้นที่สามารถเข้าผสมกับไข่ได้ โดยจะเกิดการเปลี่ยนแปลงที่เยื่อหุ้มไข่และโซนาเพลลูซิดาทันทีที่อสุจิตัวหนึ่งเข้าสู่ไข่แล้ว ทำให้อสุจิตัวอื่นเข้าผสมกับไข่นั้นไม่ได้ (Pincus, 1936) ไข่ที่ได้รับการผสมโดยอสุจิแล้วเรียกว่า ไซโกต หรือ เอมบริโอระยะ 1-เซลล์ ซึ่งจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์แบบไมโตซิสตลอดระยะเวลาที่เคลื่อนที่ผ่านท่อนำไข่และลงสู่มดลูก รูปแบบทั่วไปของการเจริญของเอมบริโอในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมจะคล้าย ๆ กัน

การแบ่งเซลล์ครั้งแรกจะเกิดขึ้นประมาณ 24 ชั่วโมง หลังจากผสม ตามด้วยการแบ่งเซลล์ครั้งที่ 2, 3, 4 ได้เอมบริโอที่มีจำนวนเซลล์ 4, 8, 16 เซลล์ตามลำดับ โดยการแบ่งเซลล์ส่วนใหญ่จะเกิดพร้อม ๆ กัน (synchronous) ในช่วงนี้เซลล์ของเอมบริโอยังเกาะรวมเป็นก้อน เรียกเอมบริโอในระยะนี้ว่ามอรุลา (morula) การเจริญจนถึงระยะนี้ใช้เวลาประมาณ 60 ชั่วโมงหลังจากเกิดการปฏิสนธิแล้ว ใน 6-12 ชั่วโมงต่อมาไข่จะเคลื่อนเข้าสู่มดลูก แต่อาจเปลี่ยนแปลงได้ Burckhard (1901) รายงานว่าอาจใช้เวลาถึง 4 วัน กว่าที่เอมบริโอจะเคลื่อนตัวเข้าสู่มดลูก หลังจากระยะมอรุลาแล้ว จะเกิดช่องว่างเล็ก ๆ ที่มีของเหลวแทรกอยู่ระหว่างเซลล์ของมอรุลา ช่องว่างนี้จะขยายตัวอย่างรวดเร็วจนรวมกันเกิดเป็นช่องว่างใหญ่ที่เรียกว่า บลาสโตซิล (blastocoel) ล้อมรอบด้วยเซลล์ชั้นเดียวที่เรียกว่า โทรเฟคโตเดิม (trophectoderm) โดยด้านหนึ่งมีเซลล์รวมอยู่เป็นกลุ่มเรียกว่าอินเนอร์เซลแมส (inner cell mass) เรียกเอมบริโอระยะนี้ว่า บลาสโตซิส (blastocyst) หลังจากนั้นเอมบริโอจะเข้าฝังตัวที่ผนังมดลูก ในหนูเมาส์การฝังตัวที่ผนังมดลูกจะเกิดขึ้นระหว่าง 4-5 วัน (Eaton และ Green, 1963)

มดลูกของหนูเมาส์มีลักษณะเป็นท่อที่แยกออกไป 2 ข้าง (uterine horns) เชื่อมต่อกันด้วยส่วนที่เรียกว่า คอร์ปัส ยูเทอไร (corpus uteri) ทางด้านหน้าเชื่อมต่อกับช่องคลอด (vagina) เรียกส่วนที่เชื่อมนี้ว่า ปากมดลูก (cervix) (Billet และ Wild, 1975) ซึ่งยึดกับผนังลำตัวด้วยเยื่อมีโซมีเทรียม (mesometrium) ที่มีเส้นเลือดและไขมันอยู่ด้วย ผนังมดลูกมีกล้ามเนื้อ 2 ชั้น ด้านนอกเป็นกล้ามเนื้อตามยาวและด้านในเป็นกล้ามเนื้อตามขวาง ถัดจากชั้นกล้ามเนื้อเข้าไปเป็นชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (mucosa) ที่เรียกว่า เอนโดมีเทรียม (endometrium) ด้านในสุดติดกับช่องว่างในมดลูกบุด้วยอิพิทีเลียม (epithelium) หลังจากเอมบริโอเข้าสู่มดลูกในวันที่ 4 และเจริญขึ้นเป็นบลาสโตซิส (blastocyst) ในวันที่ 5 หลังการผสมแล้ว เอมบริโอก็จะเข้าเกาะที่ผนังมดลูกและเริ่มฝังตัวเข้าในชั้นเอนโดมีเทรียมทางด้านล่างหรือ

แอนติมีโซมีเทรียม (antimesometrium) ของช่องว่างในมดลูก เกิดการเปลี่ยนแปลงของมดลูกบริเวณที่เอมบริโอเข้าฝังตัวโดยการเกาะกันของอินทีเลียมหลวมลง (loosen) และนิวเคลียสมีลักษณะของการเสื่อมสลาย (degenerate) ซึ่งต่อมาอินทีเลียมจะหลุดออกจากผนังมดลูก ขณะเดียวกันมิวโคซาในบริเวณนั้นจะมีลักษณะบวมขึ้นกว่าปกติ การฝังตัวของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมอาจใช้เวลาเพียงวันเดียวหรือหลายสัปดาห์ก็ได้ ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ (Whittingham, 1979) หลังจากนั้นเอมบริโอก็จะเจริญขึ้นเป็นฟีตัส (fetus) ที่มีอวัยวะครบสมบูรณ์และเจริญเติบโตจนครบกำหนดคลอด



รูปที่ 1.1 แผนภาพแสดงตำแหน่งของการเกิดปฏิสนธิและการแบ่งตัวของเอมบริโอระยะต่าง ๆ ในท่อนำไข่และการฝังตัวของบลาสโตซิสที่ผนังมดลูก

อาศัยความรู้จากการศึกษาถึงการเจริญต่างๆ ดังที่กล่าวมาแล้ว ได้มีการทดลองเพาะเลี้ยงเอมบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลายชนิดขึ้นในหลอดทดลอง และพบว่าสามารถเพาะเลี้ยงเอมบริโอหนูเมาส์ กระต่าย และสัตว์อื่นอีกหลายชนิดรวมทั้งคนด้วย โดยการเพาะเลี้ยงเอมบริโอระยะก่อนฝังตัวของหนูเมาส์ในหลอดทดลองได้เป็นผลสำเร็จครั้งแรกในปี ค.ศ. 1949 เป็นผลงานของ Hammond ซึ่งสามารถเพาะเลี้ยงเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ให้เจริญจนถึงระยะบลาสโตซิสได้โดยใช้สารเพาะเลี้ยง ที่มีส่วนผสมของไข่ขาว ซึ่งวิธีการดังกล่าวได้นำมาเป็นแนวทางศึกษาและพัฒนาโดยนักวิทยาศาสตร์อีกหลายท่าน

Brinster (1963) พบว่าเอมบริโอระยะ 2-เซลล์ของหนูเมาส์เจริญไปจนถึงระยะบลาสโตซิสในน้ำยาที่มีสารแลคเตท (lectate) ได้ 60-100 เปอร์เซนต์ ต่อมา Brinster และ Thomson (1966) รายงานว่าไพรูเวท (pyruvate), ออกซาโลอะซิเตต (oxaloacetate), กลูโคส (glucose) และ แอลฟา-คีโตกลูตาเรท (α-keto-glutarate) เป็นสารที่ช่วยสนับสนุนการเจริญของเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ไปเป็นบลาสโตซิสในหลอดทดลอง แต่ Hogan, Costantini และ Lacy (1986) รายงานว่าเอมบริโอในระยะมอรูลาช่วงท้ายๆ (late morula) ไม่ต้องการไพรูเวทและแลคเตท แต่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งพลังงาน Whitten (1956) สามารถเพาะเลี้ยงเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ของหนูเมาส์ไปจนถึงระยะบลาสโตซิส โดยใช้สารเพาะเลี้ยงที่มีกลูโคสและโบวายน์ ซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin , BSA)

สำหรับสารเพาะเลี้ยงที่ใช้และประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอหนูเมาส์มีหลายชนิด เช่น Medium 16 (M16), Minimum Essential Medium (MEM) และ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) เป็นต้น ถึงแม้สารเพาะเลี้ยงต่าง ๆ จะมีสารอาหารค่อนข้างครบถ้วนก็ตาม แต่การเจริญของเอมบริโออาจไม่ประสบความสำเร็จก็ได้ เนื่องจากยังมีปัจจัยอื่น ๆ อีกมากมาย

ที่มีผลต่อการเจริญโดยเฉพาะอย่างยิ่งสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ รวมทั้งการปนเปื้อน (contaminate) ที่อาจเกิดขึ้น

สำหรับการย้ายฝากเอมบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมจากแม่หนึ่งซึ่งเป็นตัวให้ (donor) ไปยังอีกแม่หนึ่งซึ่งเป็นตัวรับ (recipient) ประสบผลสำเร็จเป็นครั้งแรกโดย Heape (1890) ที่ได้ทำการย้ายฝากเอมบริโอระยะ 4-เซลล์จากกระต่ายพันธุ์แองโกลา (Angora rabbit) ไปยังกระต่ายเบลเยี่ยม (Belgian hare rabbit) ที่ตั้งท้องเพื่อศึกษาว่ามดลูกของสัตว์ที่รับการย้ายฝากมีผลต่อเอมบริโอที่ใส่เข้าไปอย่างไร ซึ่งพบว่าเอมบริโอสามารถมีชีวิตเจริญเติบโตและอยู่รอดได้ในมดลูกของแม่ตัวรับจนครบกำหนดคลอด

ในหนูเมาส์การย้ายฝากเอมบริโอครั้งแรก ๆ ใช้ในการวิจัยเรื่องของมะเร็ง (Fekete และ Little, 1942, Beatty, 1951) สำหรับในสัตว์อื่น ๆ ก็มีการศึกษาถึงการย้ายฝากเอมบริโอซึ่งประสบความสำเร็จแล้วตามที่ได้มีการรวบรวมไว้โดยวิทยา (2530) ดังแสดงในตาราง 1.1

ตารางที่ 1.1 แสดงการย้ายฝากตัวอ่อนที่ประสบความสำเร็จเป็นครั้งแรกในสัตว์ชนิดต่าง ๆ*

ค.ศ.	ชนิด	ผู้วิจัย
1890	กระต่าย	Heape
1933	หนูขาว	Nicholas
1934	แกะ	Warwick, Berry และ Horlacher
1942	หนูถีบจักร	Fekete และ Little
1949	แพะ	Warwick และ Berry
1951	โค	Willett, Black, Casida, Stone และ Buckner
1951	สุกร	Kvasnickii
1968	เฟอเรท	Chang
1972	แฮมสเตอร์	Sato และ Yanagimachi
1974	ม้า	Oguri และ Tsatsumi
1976	ลิงบาบูน	Kraemer, Moore และ Kramen
1978	มนุษย์	Steptoe และ Edwards
1978	แมว	Schriver และ Kraemer
1979	สุนัข	Kinney, Pennycook, Schriver, Templeton และ Kraemer
1983	กระบือ	Drost et al.

* วิทยา (2530)

ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการย้ายฝากมีหลายอย่าง เช่น ความสอดคล้อง (sychronization) ระหว่างอายุของเอมบริโอกับอายุของการตั้งท้องของตัวรับที่ตั้งท้องเทียม (pseudopregnant recipient) Whittingham (1979) รายงานว่าอายุของเอมบริโอที่นำมาย้ายฝากอาจเหลื่อมกับอายุการตั้งท้องได้ 1 วัน แต่โดยทั่วไปการย้ายฝากจะประสบผลสำเร็จมากที่สุดเมื่อมีการย้ายฝากเอมบริโอเข้าในสัตว์ตัวรับที่มีอายุการตั้งท้องเทียมสอดคล้องกับอายุของเอมบริโอ (Chang, 1950 ; Sato และ Yanagimachi, 1972)

ตำแหน่งของการย้ายฝากเป็นปัจจัยอีกอย่างหนึ่งที่มีผลต่อความสำเร็จในการย้ายฝากเอมบริโอ เอมบริโอระยะแรก ๆ ของการแบ่งตัว (1-8 เซลล์) มักจะพบที่ท่อนำไข่ เมื่อมีการย้ายฝากไปยังตัวรับ ก็ควรย้ายฝากไปที่ท่อนำไข่เช่นเดียวกัน เนื่องจากเอมบริโอของสัตว์แต่ละชนิดอาจตอบสนองต่อสารคัดหลั่งจากท่อนำไข่หรือมดลูกแตกต่างกัน ในหนูเมาส์เอมบริโอระยะ 1-2 เซลล์จะเสื่อมสลายภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากย้ายฝากเข้าสู่มดลูก ถึงแม้จะมีอายุการตั้งท้องที่สอดคล้องระหว่างตัวให้กับตัวรับก็ตาม (Noyes และคณะ, 1963)

อายุของสัตว์ตัวให้กับตัวรับก็อาจเป็นอีกปัจจัยหนึ่ง Gosden (1974) รายงานว่าถ้าอายุของสัตว์ตัวให้และตัวรับอยู่ระหว่าง 2-4 เดือน จะทำให้เปอร์เซนต์ความอยู่รอดของเอมบริโอมีมากกว่าในกรณีที่ตัวให้และตัวรับอยู่มีอายุระหว่าง 10-16 เดือน

การผ่าตัดก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความสำเร็จในการย้ายฝาก (Moler และคณะ, 1979) รายงานว่าการย้ายฝากโดยไม่ผ่าตัด (non-surgical transfer) ประสบผลสำเร็จสูงถึง 60% ซึ่งสูงกว่าการย้ายฝากโดยการผ่าตัด นอกจากนั้นยังไม่ทำให้เกิดบาดแผล (trauma) กับตัวรับอีกด้วย วิธีการคือใช้ modified capillary tube ย้ายฝากผ่านปากมดลูก เข้าสู่ตัวมดลูกโดยไม่ต้องผ่าตัด

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อความอยู่รอดของเอมบริโอภายหลังการย้ายฝาก ได้แก่ สภาพความเป็นกรดด่างของน้ำยาที่ใช้ในการย้ายฝาก (Whittingham และ Bavister, 1947) ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงเอมบริโอภายนอกร่างกาย (Yodyingyuad,1982) ตลอดจนความชำนาญของผู้ทำการย้ายฝากก็มีส่วนอย่างสำคัญด้วย

เลคติน (lectin) เป็นสารที่มีสมบัติเป็นโปรตีนหรือไกลโคโปรตีน (Goldstein และคณะ, 1980) พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น ในราก ใบ และเมล็ดของพืชโดยเฉพาะเมล็ดพืชตระกูลถั่ว แบคทีเรีย (Nuter, 1956) ราเมือก (Barondes และ Haywood, 1979) ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังบางชนิด เช่น ปูม้า หอย และกุ้ง เป็นต้น ในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำ เช่น ปลาไหล (Simpson, Thorn และ Loh, 1978) ในระยะแรก โปรตีนนี้รู้จักกันในลักษณะของ cell agglutinins แต่เนื่องจากเป็นโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับน้ำตาล (sugar-binding protein) Boyd และ Shapleigh (1954) จึงเรียกว่า เลคติน สมบัติที่สำคัญของเลคตินพืชคือการเก็บสะสมและการขนส่งคาร์โบไฮเดรตภายในเมล็ด (Kauss และ Glaser, 1974), จับกับ nitrogen-fixing bacteria ที่บริเวณ root hair (Hamblin และ Kent, 1973) ยับยั้งการเจริญของรา (Albersheim และ Anderson, 1971) หรือป้องกันการกัดกินของแมลง (insect feeding) (Janzen, Juster และ Liener, 1976) จากสมบัติในการจับของเลคตินกับน้ำตาล (saccharide binding capacity) ที่มีความจำเพาะทำให้สามารถแบ่งเลคตินออกเป็นกลุ่ม ๆ คือ

ตารางที่ 1.2 แสดงชนิดของเลคตินและความจำเพาะกับน้ำตาล

ชนิดของเลคติน	ความจำเพาะกับน้ำตาล
Concanavalin A (Con A) tomato lectin	D-mannose D-fructose D-glucose
Wheat germ agglutinin (WGA) pea lectin	N-acetylglucosamine (Glc NAc) N-acetylneuraminic acid (Neu NAc)
Soybean agglutinin	D-glucose N-acetylgalactosamine (Gla NAc)

(Schwarz และ Koechler, 1979; Donald และ Sheeler, 1987)

การศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบและลำดับของกรดอะมิโนในเลคตินพืช ส่วนใหญ่ได้มาจากการศึกษาในพืชตระกูลถั่ว (Leguminosae) ตัวแรกที่มีการศึกษาคือ Con A (Edelman และคณะ, 1972) โดย Sumner (1919) เป็นคนที่ทำการแยกสารนี้จากเมล็ดชนุน (Conavalia ensiformis) มีน้ำหนักโมเลกุล 25,500 (Wang และคณะ, 1971) โครงสร้างประกอบด้วยกรดอะมิโน 237 ตัว เป็น tetramer ที่ประกอบกันเป็นรูปโดม ขนาดของโมเลกุลประมาณ 42x40x39 อังสตรอม (Å) มีตำแหน่งการยึดเกาะ (binding site) สำหรับ Mn^{2+}, Ca^{2+} และคาร์โบไฮเดรตที่

จำเพาะ (Sumner และ Howell, 1936 ; Kalb และ Levitzki, 1968) มีบริเวณที่จับจำเพาะกับน้ำตาลอย่างน้อย 2 ตำแหน่ง สามารถเกิดการจับกลุ่ม (agglutinate) กับเซลล์พืชและเซลล์สัตว์ โดยเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดแดง (Goldstein, et al. 1980) โดยทั้งสองตำแหน่งจะสามารถจับกับน้ำตาลหรือโกลโคโปรตีนที่มีบริเวณปลายสาขา (branch terminal) เป็น non-reducing α-D-glucopyranosyl, α-D-mannopyranosyl หรือ β-D-fructofuranosyl residue Goldstein, Hollerman และ Smith (1965) รายงานว่า activity ของ Con A จะถูกยับยั้งด้วย D-galactose และอนุพันธ์ นอกจากนี้ยังพบว่าถ้าเอากรดอะมิโนตรงบริเวณที่จะจับกับอิออนที่เป็นโลหะออกจะทำลายความสามารถที่จะรวมกับคาร์โบไฮเดรตได้

Wheat germ agglutinin (WGA) จัดอยู่ใน Graminae family พบในพืชที่ไม่ใช่พืชตระกูลถั่ว (non-legume) เท่านั้น โมเลกุลเป็น dimer มีขนาด 40x40x70 A ประกอบด้วยกรดอะมิโน 171 ตัว ม้วน (fold) เป็น 4 กลุ่ม (domain) คือ A, B, C และ D (มีกรดอะมิโน 43, 43, 43 และ 42 ตัว ตามลำดับ) ซึ่งแต่ละกลุ่มเชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) และพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) โครงสร้างค่อนข้างจะเสถียรเนื่องจากมี ซิสตีน (cystine) และ ไกลซีน (glycine) มาก (Goldstein และ Hayes, 1978) การจับกับน้ำตาลไม่จำเพาะกับน้ำตาลกลูโคสและแมนโนส แต่จำเพาะกับน้ำตาล GlcNac และ Neu NAc

WGA มี 2 ชนิด (species) ได้แก่ WGA1 และ WGA2 WGA1 จะมี ไทโรซีน (Tyrosine) อยู่ที่ตำแหน่งที่ 66 ในขณะที่ WGA2 มี ฮิสติดีน (Histidine) อยู่ในตำแหน่งเดียวกันนี้ แต่อย่างไรก็ตาม ไม่มีความแตกต่างในการจับจำเพาะของ WGA ทั้งสองชนิด

การศึกษาเกี่ยวกับเลคตินเริ่มต้นโดย Stillmark (1868) ซึ่งได้ศึกษาปรากฏการณ์การตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง (Hemagglutination) ที่เกิดจากโปรตีนชนิดหนึ่งชื่อ Ricin ซึ่งเป็นสารที่ได้จากการผลิตน้ำมันละหุ่ง (castor oil) จากเมล็ดละหุ่ง (castor bean; Ricinus communis) พบว่า ricin สามารถจับตัวกับเม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์ได้ ต่อจากนั้นมาก็มีการค้นพบเลคตินอีกหลายชนิดและมีการศึกษาเรื่องราวเกี่ยวกับเลคตินเหล่านี้กันเรื่อยมา (Sharon และ Lis, 1972) มีการประยุกต์นำเอาเลคตินมาใช้ศึกษาค้นคว้าทั้งในสาขาชีวเคมีและชีววิทยาของเซลล์ เช่น ศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของผิวเซลล์ขณะเกิดการเจริญ (Sobel และ Nebel, 1976) ศึกษาตำแหน่งจับจำเพาะบนโปรตีน ใช้ในการแยกการทำให้บริสุทธิ์เพื่อศึกษาคาร์โบไฮเดรตที่มีในโพลิเมอร์ บอกชนิดของหมู่เลือดในระบบ ABO และ MN ชักนำให้เกิดการแบ่งตัวแบบไมโตซิส (Mitosis) ใน ลิมโฟไซต์ ทำให้ศึกษาโครโมโซมและตรวจสอบโครโมโซมที่ผิดปกติได้ ศึกษาเกี่ยวกับเซลล์มะเร็งโดยพบว่าเลคตินสามารถจับกับเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมที่เลี้ยงในหลอดทดลองที่ได้รับไวรัสก่อมะเร็งหรือสารก่อมะเร็งอื่น ๆ (Sharon และ Lis, 1972) เป็นต้น

Sumner และ Howell (1963) พบว่า Con A ที่สกัดจากเมล็ดชนุนที่มีความเข้มข้นเพียง 0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของม้าจับตัวกันโดยการเชื่อมต่อของเลคตินกับคาร์โบไฮเดรตใน Stroma membrane John และคณะ (1975) ใช้ fluorescent Con A เป็นเครื่องมือ (probe) ในการติดตามศึกษาผิวเซลล์ไข่ พบว่าผิวเซลล์ไข่ที่ยังไม่ได้รับการผสมจะเรืองแสงด้วย fluorescent Con A ยกเว้นบริเวณเหนือ second metaphase spindle ที่ไม่มีการเรืองแสงหรือมีเพียงเล็กน้อย แต่ถ้าไข่ได้รับการปฏิสนธิจะไม่มีการเรืองแสงบริเวณที่มีการขับ second polar body เขาสรุปว่า การศึกษานี้สัมพันธ์กับกลไลของปฏิกิริยาระหว่างอสุจิกับไข่ เพราะจะสังเกตเห็นว่า การปฏิสนธิในหลอดทดลอง พบอสุจิที่เกาะติดบริเวณที่ไม่เรืองแสงของไข่ที่ไม่มีโซนาเพลลูซิดาน้อยมาก ซึ่งอาจเป็นการป้องกัน

การเกาะและหลอมรวมของเซลล์ทั้งสองในบริเวณที่เกิดการขับ second polar body อันอาจจะนำไปสู่ความผิดปกติจากการปฏิสนธิได้

สำหรับการศึกษาผลของเลคตินที่มีต่อเซลล์ไข่ การปฏิสนธิ ไปจนถึงการตั้งท้อง มีการศึกษาโดย Gordon และ Dandekar (1976) รายงานว่าถ้าให้อสุจิที่ผ่านขั้นตอนการคาพาซิเตต (capacitate) มาแล้วผสมกับไข่ของกระต่ายที่ไม่มี โซนาเพลลูซิดา ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีเลคตินชนิด Con A และ WGA พบว่าอสุจิสามารถเข้าผสมกับไข่ได้ แต่ถ้าเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ของหนูแฮมสเตอร์ที่ยังมี โซนาเพลลูซิดา ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มี WGA พบว่าอสุจิไม่สามารถเข้าผสมกับไข่ได้ ถึงแม้จะใส่ทริปซิน(trypsin) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อย โซนาเพลลูซิดา ลงไปด้วยก็ตาม ทั้งนี้เพราะ WGA มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของบริเวณที่จำเพาะต่อการทำงานของเอนไซม์ ทำให้อสุจิไม่สามารถย่อยโซนาเพลลูซิดาได้ (Oikawa, Yanagimachi และ Nicolson, 1973) ในปี 1975 Nicolson, Yanagimachi และ Yanagimachi รายงานว่าบนเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) และโซนาเพลลูซิดา ของไข่หนูเมาส์ หนูแรท และแฮมสเตอร์ มีรีเซฟเตอร์ (receptor) สำหรับเลคตินหลายชนิดคือ Con A, Ricinus communis agglutinin 1 (RCA1) และ WGA ซึ่งสามารถจับกับไข่ได้ทั้งก่อนและหลังการปฏิสนธิ โดย RCA1 และ WGA มีรีเซฟเตอร์อยู่บริเวณด้านนอกสุดของโซนาเพลลูซิดา ส่วนรีเซฟเตอร์ของ Con A พบว่ามีอยู่ทั่วไปบนโซนาเพลลูซิดา Wu (1980) ใช้ [^{3}H] ซึ่งเป็นสารกัมมันตรังสีในการติดตามศึกษา พบว่าจำนวนโมเลกุลของ Con A ทั้งหมดที่จับเอมบริโอในระยะ late blastocyst จะมากกว่าเอมบริโอในระยะ early blastocyst และระยะสองเซลล์ ตามลำดับ Wu ให้เหตุผลว่าอาจจะเนื่องมาจากมีการเพิ่มพื้นที่ผิวหน้าเซลล์ (cell surface area) ความหนาแน่นและ lateral mobility ของ binding site ก็ได้ Hick และ Guzmán-González (1979) ทำการศึกษาโดยฉีด Con A เข้าในช่องว่างมดลูกของหนูเมาส์ พบว่าสามารถห้ามการฝังตัวได้ร้อยเปอร์เซนต์ เมื่อให้ Con A ในระดับความเข้มข้น 30

และ 60 ไมโครกรัมต่อน้ำเกลือ 5 ไมโครลิตร ในวันที่สามของการตั้งท้อง และความเข้มข้น 15, 20, 30 และ 60 ไมโครกรัมต่อน้ำเกลือ 5 ไมโครลิตร ในวันที่สี่ของการตั้งท้องหนูเมาส์ เขาให้เหตุผลว่าเป็นเพราะ Con A ไปปิดบังบริเวณที่จะมีการฝังตัวที่ผนังมดลูกชั้นใน (endometrium surface) ทำให้บลาสโตซิสไม่สามารถเข้าฝังตัวที่ผนังมดลูกได้ Wu และ Gu (1981) รายงานว่าเมื่อให้ Con A 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffered solution, PBS) 5 ไมโครลิตร ในวันที่สี่ของการตั้งท้องในหนูเมาส์ และ 200 ไมโครกรัมต่อ PBS 5 ไมโครลิตร ในวันที่ห้าของการตั้งท้องในหนูแรท อัตราการฝังตัวของเอมบริโอจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญต่างจากกลุ่มควบคุม และ deciduogenicity ของ Con A ขึ้นอยู่กับขนาด (dose) นอกจากนี้ Sretarugsa และคณะ (1987) ได้ศึกษาผลของเลคตินชนิด Con A และ WGA ต่อการฝังตัวของเอมบริโอหนูแฮมสเตอร์ พบว่า Con A ทำให้มดลูกเกิดอาการบวมน้ำ (edema) และทั้ง Con A และ WGA มีผลทำให้จำนวนเอมบริโอที่ฝังตัวที่มดลูกลดจำนวนลง และจากการศึกษาผลของเลคตินชนิด RCA1 และ Ulex europeus (UEA1) ต่อการฝังตัวในหนูแรท พบว่าถ้าให้ RCA1 0.78 และ UEA1 300 ไมโครกรัมต่อน้ำเกลือ 10 ไมโครลิตร โดยฉีดเข้าทางมดลูกในวันที่สี่ของการตั้งท้อง จะทำให้การฝังตัวลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และถ้าให้ RCA1 1.5 และ UEA1 400 ไมโครกรัมต่อน้ำเกลือ 10 ไมโครลิตร จะไม่พบมีการฝังตัวเลย และยังทำให้มดลูกเกิดช่องว่าง (vacuolization) รวมทั้งเกิดภาวะบวมน้ำในสโตรมา (stroma) ของผนังมดลูกชั้นเอนโดมีเทรียมด้วย (สถาพร และคณะ, 2532)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

จากผลงานวิจัยดังกล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่าเลคตินมีผลกระทบต่อการปฏิสนธิและการฝังตัวของเอมบริโอ จึงเป็นที่น่าสนใจว่าสาเหตุที่ทำให้เกิดการฝังตัวของเอมบริโอลดจำนวนลงเป็นเพราะเลคตินทำให้เอมบริโอไม่สามารถออกจากโซนาเพลลูซิดาเข้าฝังตัว

ที่ผนังมดลูกได้ หรือเลคตินมีผลต่อผนังมดลูกทำให้สรีรภาพเปลี่ยนแปลงไปจนเอมบริโอไม่สามารถฝังตัวได้ นอกจากนี้ยังเป็นที่น่าสนใจว่า เลคตินจะมีผลต่อการเจริญของเอมบริโอระยะก่อนฝังตัวด้วยหรือไม่ จึงตั้งวัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ไว้ดังต่อไปนี้

1. เพื่อศึกษาผลของเลคตินชนิด Con A และ WGA ต่อการเจริญของเอมบริโอระยะก่อนฝังตัวนอกร่างกาย
2. เพื่อศึกษาผลของเลคตินทั้งสองชนิด ต่อการหลุดออกจากโซนาเพลลูซิดาของบลาสโตซิสนอกร่างกาย
3. เพื่อศึกษาผลของเลคตินทั้งสองชนิด ต่อการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อมดลูกในระยะตั้งท้อง
4. เพื่อศึกษาผลของเลคตินทั้งสองชนิดต่อการฝังตัวและการอยู่รอดของเอมบริโอ

<u>ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ</u>

1. ทำให้ทราบผลของเลคตินชนิด Con A และ WGA ต่อการเจริญของเอมบริโอในระยะต้นก่อนฝังตัวที่ผนังมดลูก
2. ทำให้ทราบผลของเลคตินชนิด Con A และ WGA ต่อการหลุดออกจากโซนาเพลลูซิดาของบลาสโตซิส
3. ทำให้ทราบผลของเลคตินชนิด Con A และ WGA ต่อการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อมดลูกในระยะตั้งท้อง
4. ข้อมูลที่ได้อาจเป็นแนวทางในการประยุกต์นำเอาเลคตินมาใช้เป็นยาคุมกำเนิดในอนาคต ถ้าเลคตินมีผลต่อเอมบริโอ และไม่มีผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายต่อตัวแม่