บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

ผลของกรดอะมิโนต่อการเจริญของเอ็มบริโอโคในระยะการเพาะเลี้ยงที่ 2 ภายในจานทดลองตั้งแต่ 72 - 192 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ (เป็นเวลา 120 ชั่วโมง)

จากการศึกษาความสำคัญของกรดอะมิโนจำพวกไม่จำเป็นต่อร่างกาย 11 ชนิด ได้แก่ อะลานีน, กรดเอสปาติก, ไซตีน, กรดกลูตามิก, กลูตามีน, ไกลซีน, โปรลีน, ไซรีน, ไธโรซีน, ไฮดรอกซิโปรลีน ต่อการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอโคระยะที่ 1 ในจานทดลองในระยะเวลา 54 ชั่วโมง (หรือ 18-72 ชั่วโมง) หลังการปฏิสนธิ พบว่ากรด อะมิโนทั้ง 11 ชนิดในน้ำยา mHECM-3 ซึ่งเป็นน้ำยาเพาะเลี้ยงสำหรับเอ็มบริโอของแฮมสเตอร์ เจริญในจานทดลองจนถึงระยะบลาสโตซีสที่ไม่มีโปรตีน เรียกว่า modified hamster embryo cultured medium-3 (mHECM-3 แสดงในตารางที่ 3.1) (Schini และ Bavister, 1988b) มีผลต่อการเจริญของเอ็มบริโอโคในระยะที่ 1 อย่างชัดเจน เอ็มบริโอจำนวน 938 เอ็มบริโอ ในชุดแรก และ 347 เอ็มบริโอ ในชุดที่ 2 เจริญถึงระยะ ≥ 7-เซลล์ ได้เป็นจำนวนมาก(มี 54.90% และ 46.97% ตามลำดับ) เนื่องจากการเจริญของเอ็มบริโอโคนอกร่างกายขึ้นกับน้ำยาเพาะเลี้ยง mHECM-3 ที่ประกอบด้วยเกลือแร่และไอออนและสารจำพวกอะมิโนหรือแหล่งไนโตรเจน ซึ่งจัดเป็นสารให้พลังงาน มีการตรวจพบกรดอะมิโนในปริมาณสูงถึง 10 - 20 mM หรืออาจมากกว่านี้ในของเหลวภายในท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ และภายในไข่หรือภายในเอ็มบริโอ (Leese และคณะ, 1979; Schultz และคณะ, 1981; Miller และ Schultz, 1987; Kaye, 1986 และ Petters และคณะ, 1990) ภายในท่อนำไข่โคตรวจพบกรดอะมิโนมีจำนวน 20 ชนิด โดย 17 ชนิดพบในทุกระยะของวงรอบการสืบพันธุ์ แต่ไธโอนีน, เอสปาราจีน และกลูตามีน พบในบางระยะของวงรอบการสืบพันธุ์ (Cartson และคณะ, 1970; Loe และคณะ, 1970 และ Fahning และคณะ, 1967) จากผลการทดลองให้ผลสอดคล้องและสนับสนุนงานของ Gardner และ Lane (1993) ที่พบว่ากรดอะมิโน NEA และกลูตามีนมีส่วนช่วยส่งเสริมการแบ่งตัวของเอ็มบริโอของหนู (mouse) จากระยะ 1-เซลล์เจริญเป็นเอ็มบริโอระยะ> 8-เซลล์ ได้เพิ่มขึ้นกลูตามีน และกรดอะมิโนเหล่านี้ยังเป็นแหล่งให้พลังงานเป็นส่วนใหญ่ในการเจริญและแบ่งตัวของเอ็มบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมเกือบทุกชนิด (Eagle, 1955; Zeelker และคณะ, 1984) เช่นการเจริญของเอ็มบริโอโคในระยะ 1-เซลล์ถึงระยะมอรูลา (Takahashi และ First, 1992)

จากการศึกษาผลของกรดอะมิโน 2 จำพวก (non-essential amino acids , essential amino acids) ต่อการเจริญของเอ็มบริโอโคในระยะการเพาะเลี้ยง ที่ 2 ในน้ำยา mHECM-3 พบว่าเอ็มบริโอในกลุ่มที่เพาะเลี้ยงใน mHECM-3 + (NEA + EA) มีการเจริญถึงระยะ expanded blastocyst ได้ดีกว่ากลุ่มที่เพาะเลี้ยงใน mHECM-3 + NEA หรือ mHECM-3 + EA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานหลายฉบับที่ชี้ให้เห็นว่ากรดอะมิโนหลายชนิดที่ส่งเสริมการเจริญและการแบ่งเซลล์ของเอ็มบริโอเป็นกรดอะมิโนจำพวก essential amino acids (Gwatkin, 1966; Juurlink และ Fedorff, 1977) และมีรายงานของ Daniel และ Krishnan (1967) เสนอผลของกรดอะมิโนในน้ำยา Ham's F-10 ช่วยส่งเสริมการเจริญของเอ็มบริโอกระต่ายถึงระยะ expanded blastocyst ได้เพิ่มมากขึ้น ซึ่งมีกรดอะมิโน อาร์จีนนีน, ไลซีน, ฮีสติดีน, ทริปโตเฟรน, เมทไธโอนีน, ฟีนีลอะลานีน, ลูซีน, วารีน, ไธโอนีน และไซรีน ทุกกรดอะมิโนจัดเป็น non-essential amino acids ยกเว้นไซรีนซึ่งเป็น essential amino acids ต่อมายังพบว่ากรดอะมิโนสามารถกระตุ้นการเจริญของไข่ในจานทดลองและช่วยส่งเสริมอัตราการปฏิสนธิของไข่โคให้เพิ่มขึ้นและมีผลให้เอ็มบริโอโคเจริญถึงระยะบลาสโตซีส (Takahashi และ First, 1992; Kim และคณะ, 1993) กรดอะมิโนจำพวก essential amino acids ได้แก่ ฮีสติดีน, เมทไธโอนีน, ไธโอนีน, ทริปโตเฟรน, ไทโรซีน หรือ วารีน ในน้ำยาเพาะเลี้ยงมีผลกระตุ้นการเกิด hatching ของ blastocyst หนูเมาซ์เช่นเดียวกับกรดอะมิโนจำพวก non-essential amino acids (Spindle และ Pedersen, 1972)

มีรายงานของนักวิจัยหลายท่านพบว่า กรดอะมิโนทั้ง 20 ชนิด บางชนิดมีผลกระตุ้นและบางชนิดมีผลยับยั้งการเจริญของเอ็มบริโอ จากผลการศึกษาในเอ็มบริโอแฮมสเตอร์ พบว่ามีกรดอะมิโนที่ศึกษาให้ผลกระตุ้นการเจริญของเอ็มบริโอได้แก่ อะลานีน, ไธโอนีน, กลูตามีน, กรดเอสปาติก, ไซรีน, ฮีสติดีน, ไกลซีน, โปรลีน, กรดกลูตามิก, เมทไธโอนีน, ฟีนีลอะลานีน, และไอโซลูซีน แต่มีกรดอะมิโนบางตัวให้ผลยับยั้งการเจริญซึ่งขึ้นกับความเข้มข้นของกรดอะมิโนที่ใช้ในสัตว์ แต่ละชนิดมีไลทีอีน (ใช้ในความเข้มข้นที่สูง), ลูซีน, ไทโรซีน และ วารีน (Barnett และ Bavister, 1991; Bavister และ Arlotto, 1990; Bavister และคณะ, 1983 และ Carney และ Bavister, 1985) อาจเป็นสาเหตุของความแตกต่างของเอ็มบริโอในระยะ 8-เซลล์ และในระยะ 1-เซลล์ พบว่ามีความต่างกันของความไวในการรับรู้ ความทนทานต่อสิ่งแวดล้อมหรือความต้องการกรดอะมิโนที่แตกต่างกันต่อการเจริญของเอ็มบริโอ (Lan และ Gardner, 1994) หรือความแตกต่างของความเข้มข้นของกรดอะมิโนที่เหมาะสมต่อเอ็มบริโอ และพบว่าความเข้มข้นของกรดอะมิโนภายนอกเซลล์มีผลต่อระดับความเข้มข้นของกรดอะมิโนภายในเซลล์ ส่งผลให้มีระดับกรดอะมิโนเพิ่มสูงขึ้นแทนที่จะได้ประโยชน์จากกรดอะมิโนในด้านการเจริญของเอ็มบริโอ กลับส่งผลเป็นตัวควบคุมในกลไกย้อนกลับทำให้การใช้กรดอะมิโนภายในเซลล์ของเอ็มบริโอมีจำนวนลดลง (Patterson, 1972)

ความเข้มข้นของกรดอะมิโนในน้ำยาเพาะเลี้ยงมีผลต่อการผลิตและสะสมของแอมโมเนียม (NH_4^+) ซึ่งมีพิษต่อเอ็มบริโอ (Gardner และ Lane, 1993) แอมโมเนียมมีสมบัติเป็นด่างอ่อนมีผลให้ระดับ pH ในเอ็มบริโอ เปลี่ยนแปลงสูงขึ้น (Baltz และคณะ, 1990; 1991) ความเข้มข้นของกรดอะมิโนในน้ำยาเพาะเลี้ยงลดลงเป็นผลให้จำนวนของแอมโมเนียมจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของเอ็มบริโอมีจำนวนเพิ่มขึ้น พบกรดอะมิโน 0.077 mM ในจานทดลองซึ่งสามารถผลิตแอมโนเนียมเพิ่มสูงขึ้นเป็น 3 เท่าเมื่อเทียบกับปริมาณแอมโมเนียมของเอ็มบริโอที่เจริญภายในร่างกาย (พบ 0.025 mM) เนื่องจากการสลายตัวของกรดอะมิโนโดยธรรมชาติในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แอมโมเนียมในน้ำยาเพาะเลี้ยงมีผลต่อการเจริญของเอ็มบริโอในทุกทาง แอมโมเนียมสามารถลดความเข้มข้นของ α-ketoglutamate โดยเปลี่ยนเป็น glutamate ซึ่งมีผลต่อ TCA cycle โดยปริมาณ ATP จะลดลงภายในเซลล์ นอกจากนี้แอมโมเนียมสามารถกระตุ้น phosphofructokinase (Sugden และ Newsholme, 1975) ส่งผลต่อการทำงานของ glycolysis ได้สูงขึ้นซึ่งจะเป็นอันตรายต่อการแบ่งเซลล์ของเอ็มบริโอในระยะแรกและพบว่ากรด อะมิโนทั้งสองจำพวก (non-essential amino acids + essential amino acids ไม่รวมกลูตามีน) มีความสามารถสลายให้แอมโมเนียมได้ในปริมาณที่เท่ากัน (Sheshagire และ Bavister, 1991; Gardner และ Lane, 1993) จึงต้องมีการเปลี่ยนน้ำยาเพาะเลี้ยงใหม่ทุก ๆ 24 ชั่วโมง หรือให้กรดอะมิโนในความเข้มข้นที่ต่ำ (Gardner และ Lane, 1993) ดังนั้นการศึกษาผลของกรดอะมิโนต่อการเจริญของเอ็มบริโอโคในระยะการเพาะเลี้ยงที่ 2 จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจศึกษาให้ละเอียดต่อไปในภายหน้า

จากการทดลองครั้งนี้มุ่งหวังเพื่อที่จะศึกษาผลของกรดอะมิโนทั้ง 3 จำพวก มีผลกระตุ้นการเจริญของเอ็มบริโอโคในระยะการเพาะเลี้ยงที่ 2 ในน้ำยา mHECM-3 ซึ่งพบว่ากลุ่มทดลองที่มีกรดอะมิโนทั้ง 2 จำพวก (NEA + EA) ให้ผลต่อการเจริญของเอ็มบริโอโคดีที่สุด โดยเฉพาะในระยะ expanded blastocyst มีจำนวนสูงกว่าในกลุ่มทดลองที่มีกรดอะมิโนแต่ละจำพวก แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีกรดอะมิโนในน้ำยาเพาะเลี้ยง mHECM-3 และ TCM-199 ซึ่งมีแต่ 10% BCS พบว่าในกลุ่มทดลองที่มีกรดอะมิโนอยู่ การเจริญของเอ็มบริโอโคมีค่าต่ำกว่า ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของผลการทดลองที่ต้องการทราบว่าในน้ำยาเพาะเลี้ยง mHECM-3 ซึ่งปรับปรุงมาจากน้ำยา tyrode's medium ให้ผลกระตุ้นการเจริญของเอ็มบริโอโคจนถึงระยะบลาสโตซีสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ให้ผลใกล้เคียงกับน้ำยาเพาะเลี้ยง TCM-199

ผลของกลูโคสและฟอสเฟตต่อการเจริญของเอ็มบริโอโคในระยะการเพาะเลี้ยงที่ 2 ภายในจานทดลองตั้งแต่ 72 - 192 ชั่วโมงหลังได้รับการปฏิสนธิ (เป็นเวลา 120 ชั่วโมง)

จากผลการศึกษากลูโคสในปริมาณความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0.2 mM, 2.0 mM และ 5.56 mM ในน้ำยาที่มีกรดอะมิโนสองจำพวก (NEA + EA) และมี 0.35 mM NaH_2PO_4 พบว่าในทุกระยะเอ็มบริโอโค กลูโคสและฟอสเฟตให้ผลส่งเสริมการเจริญยังไม่ชัดเจน มีรายงานของ Robl และคณะ (1991) พบว่ากลูโคสมีผลส่งเสริมการเจริญของเอ็มบริโอโคที่ระยะมอรูลาและระยะบลาสโตซีส ซึ่งเกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของกลูโคส กับการกระตุ้นยีนของเอ็มบริโอ ในการสังเคราะห์เอนไซม์ในจำนวนหนึ่ง หรือมากกว่าในไกลโคไลซีส ซึ่งพบในเอ็มบริโอของแกะโค และของคน (Telford และคณะ, 1990) การเปลี่ยนแปลงเมตาบอลิซึมของกลูโคสในระหว่างการเจริญของเอ็มบริโอในระยะต่าง ๆ พบที่บริเวณ allosteric regulation ส่วนการทำงานของเอนไซม์จะมีผลต่อเมตาบอลิซึมของ กลูตามีนลดลงในระหว่างระยะ 4-เซลล์ และระยะ compact morula การลดลงของสารให้พลังงาน ATP ในเซลล์นำไปสู่การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ phosphofructokinase ซึ่งทำให้กระบวนการไกลโคไลซีสหยุดการทำงาน (Brinster, 1965 b; Barbehem และคณะ, 1974 และ 1978)

กลูโคสที่มีความเข้มข้น 0.56 - 5.56 mM พบว่าไม่มีผลต่อการเจริญของเอ็มบริโอโคในระยะ 1-เซลล์ ถึงระยะมอรูลา โดยเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่เติมกลูโคส เปอร์เซ็นเอ็มบริโอโคเจริญถึงระยะมอรูลาใกล้เคียงกับที่เคยมีรายงานว่ามีจำนวน 37% (Takahashi และ First, 1992) และยังพบว่าเอ็มบริโอโคระยะ 6- ถึง 16-เซลล์ มีระดับกลูโคสต่ำ แต่ช่วยส่งเสริมการเจริญของเอ็มบริโอหลังจากระยะมอรูลาถึงระยะบลาสโตซีส ซึ่งระดับกลูโคสเพิ่มสูงขึ้นอย่างมาก โดยผ่านกระบวนการไกลโคไลซีส (Javed และ Wright, 1991) และมีเมตาบอลิซึมสูงในระยะบลาสโตซีส ซึ่งต้องการพลังงานสำหรับ ion pump (Rieger และคณะ, 1992) ส่วนฟอสเฟตที่ระดับความเข้มข้น 0.35 mM มีรายงานว่ามีส่วนกระตุ้นการเจริญของเอ็มบริโอโคให้เจริญถึง ระยะบลาสโตซีสเช่นกันจากรายงานของนักวิจัยพบว่า ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีกรดอะมิโนและฟอสเฟตอยู่ 0.35 mM (ไม่มีกลูโคส) มีผลส่งเสริมการเจริญของเอ็มบริโอโคตั้งแต่ระยะ 8-เซลล์ ระยะมอรูลาและระยะ บลาสโตซีสมีอัตราการเจริญ 40(56%) 31(44%) และ 17(24%) ตามลำดับ แต่ในความเข้มข้นของฟอสเฟตที่สูงกว่า 0.35 mM จะมีผลไปยับยั้งการเจริญของเอ็มบริโอโค (Jong และคณะ, 1993) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Pinyopummintr และ Bavister (1991) พบว่าในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีฟอสเฟตไม่หยุดการเจริญของเอ็มบริโอโค แต่ทำให้เจริญถึงระยะ บลาสโตซีสในความเข้มข้นที่

ในไกลโคไลซิส ได้แก่ glucokinase phosphofuctokinase และ glyceraldehyde-3-phosphate dihydrogenase ทำให้กระบวนการไกลโคไลซิสดำเนินได้เพิ่มขึ้น (Wu, 1965)

นอกจากนั้นยังพบความต้องการฟอสเฟตต่อการเจริญของเอ็มบริโอโค แตกต่างจากความต้องการของเอ็มบริโอแฮมสเตอร์ (Schini และ Bavister, 1988a) และเอ็มบริโอหนู แรท (Miyoshi และ Niwa, unpublished data) ซึ่งการเจริญของเอ็มบริโอแฮมสเตอร์และหนู (rat) ในระยะ 8-เซลล์จนถึงระยะ blastocyst จะถูกยับยั้งโดยฟอสเฟตได้อย่างสมบูรณ์ การเติมกลูโคสที่มีความเข้มข้น 2.78 - 5.56 mM ในน้ำยาเพาะเลี้ยง mTLP-PVA ที่มีฟอสเฟตและกรดอะมิโน (120 ชั่วโมงหลังผสม) สามารถส่งเสริมการเจริญของเอ็มบริโอโคให้เจริญถึงระยะ blastocyst ระยะ expanded blastocyst และระยะ hatched blastocyst ซึ่งมีอัตราการเจริญเป็น 17(20%), 28(32%) และ 20(23%) ตามลำดับ (Jong และคณะ, 1993)

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหวังเพื่อศึกษาผลของกลูโคสและฟอสเฟตต่อการเจริญของเอ็มบริโอโคในระยะการเพาะเลี้ยงที่ 2 ในจานทดลองตั้งแต่ 72 - 192 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ (เป็นเวลา 120 ชั่วโมง) พบว่าในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีกรดอะมิโนในกลุ่มทดลองที่มีกลูโคสให้ผลการเจริญของ เอ็มบริโอโคไม่มีความแตกต่างจากเอ็มบริโอโคที่เจริญในน้ำยาเพาะเลี้ยง mHECM-3 ที่มี 10% BCS และน้ำยา TCM-199 ที่มี 10%BCS มีอัตราการเจริญของเอ็มบริโอใกล้เคียงกัน (จากตารางที่ 3.4) ในน้ำยาเพาะเลี้ยง mHECM-3 ที่มี 10% BCS เป็นน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เหมาะสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอโคให้เจริญถึงระยะ blastocyst ได้อย่างดี ส่วนผลของกลูโคสและฟอสเฟตที่มีต่อการเจริญของ เอ็มบริโอโค ผลที่ได้จากการทดลองนี้ยังไม่ชัดเจนเนื่องจากจำนวนเอ็มบริโอไม่มากพอ ดังนั้นการศึกษาผลของกลูโคสและฟอสเฟตต่อการเจริญของเอ็มบริโอโคในระยะการเพาะเลี้ยงที่ 2 ควรทดลองเพิ่มมากขึ้นและเพิ่มจำนวนของเอ็มบริโอในการทดลองเพื่อให้เห็นผลความแตกต่างในแต่ละกลุ่มการทดลองชัดเจนขึ้น และเป็นเรื่องที่น่าสนใจศึกษาให้ละเอียดต่อไปภายหน้า

การกำหนดเพศเอ็มบริโอของโคที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกายด้วยพอลิเมอเรสเชนรีแอ็กชันเทคนิค

จากผลการตรวจวิเคราะห์เพศในคนเพื่อชี้ให้เห็นความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อเอ็มบริโอโค จะเห็นว่า DNA ในส่วนของ zfy ของคนไม่มีการเพิ่มจำนวน เมื่อใช้ไพรเมอร์ทั้งสองชนิด คือ 5′, combined zfx, zfy และ 3′, combined zfx, zfy (braket primers) และ allele-specific primers

ทั้งสองคู่ ซึ่งอาจไปมีผลต่อการปนเปื้อนในบริเวณยีน zfx-specific primers หรือไพรเมอร์นี้ไม่สามารถเข้าจับกับตำแหน่งของยีน zfy ได้ เมื่อทำการตรวจสอบขนาดผลิตภัณฑ์โดยวิธี agarose gel electrophoresis จึงไม่พบแถบ DNA ที่ 179 base pair แสดงว่าไพรเมอร์ที่นำมาใช้วิเคราะห์ครั้งนี้มีความจำเพาะต่อสาย DNA ต้นแบบของเอ็มบริโอโค

จากตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ทาง PCR เพื่อทดสอบความแม่นยำและความแน่นอนของเทคนิค โดยใช้ DNA ของโคเพศผู้และเพศเมีย ที่สกัดได้จากเซลล์เม็ดเลือดขาว ผลการวิเคราะห์ขนาด base pair ของผลิตภัณฑ์ PCR พบว่า มีความแม่นยำและแน่นอนถึง 100%

เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์เพศเอ็มบริโอโอจำนวน 50 ตัว พบว่ามีผลการตรวจเพศที่แน่นอนสูง (เกือบเป็น 100 %) และมีเอ็มบริโอเพียง 2% ที่ตรวจไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากจำนวนบลาสโตเมียร์ 3 เซลล์ของ DNA เพียง 3 ชุดที่ถูกจำลอง เพื่อเพิ่มจำนวน DNA ครั้งแรก และมีปริมาณ DNA น้อยมากในการวิเคราะห์ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ PCR จำนวนน้อยมาก ไม่เพียงพอต่อการตรวจหาขนาดของผลิตภัณฑ์ หรือบลาสโตเมียร์ที่ได้จากการทำ biopsy อาจหายไปภายหลังจากการเก็บบลาสโตเมียร์ เพื่อวิเคราะห์ทาง PCR หรืออาจเกิดจากการหักเหของการ วิเคราะห์ทาง PCR หรือเกิดจากการปนเปื้อนของ DNA ในน้ำยาเพาะเลี้ยง หรือนักวิจัยในระหว่างการทำ biopsy ของเอ็มบริโอ

การตรวจวิเคราะห์เพศเอ็มบริโอโคด้วย PCR เป็นเทคนิคที่สำคัญ มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์เพศสูง และให้ผลการวิเคราะห์รวดเร็ว (ภายในเวลา 2 วัน) จัดเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์และสะดวกในการตรวจสอบเพศในเอ็มบริโอโคและรวมถึงสัตว์ชนิดอื่น ๆ เทคนิคนี้อาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการขยายพันธุ์ และพัฒนาสายพันธุ์สัตว์เศรษฐกิจได้ในอนาคต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย