คณะสัตวแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนสนับสนุนการวิจัยคณะสัตวแพทยศาสตร์ 2543

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การใช้โอโอไซต์ชนิดสด แช่สารละลายเกลือ และแช่แข็งที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิเพื่อตรวจสอบความสามารถในการปฏิสนธิของตัวอสุจิพ่อสุกร

(Use of fresh, salted-stored and frozen immature and mature oocyte to assess boar semen fertility)

โดย

อดิศร อดิเรกถาวร

มงคล เตชะกำพุ

สาโรช งามขำ

มิถุนายน 2544

ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

b 16416 08

การใช้โอโอไซต์ชนิดสด แช่สารละลายเกลือ และแช่แข็งที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิเพื่อตรวจสอบความสามารถในการปฏิสนธิของตัวอสุจิพ่อสุกร

อดิศร อดิเรกถาวร [1] มงคล เตชะกำพุ [2] สาโรช งามขำ [3]

บทคัดย่อ

จุดประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบการเจาะผ่านของตัวอสุจิของพ่อสุกรสายพันธุ์แลนด์เรซ 2 ตัว (A และ B) โดยนำไปปฏิสนธิกับโอโอไซต์ชนิดที่ไม่พร้อมปฏิสนธิ (การทดลองที่ 1) และชนิดพร้อมปฏิสนธิ (การทดลองที่ 2) โดยเป็นโอโอไซต์ 3 ชนิด คือชนิดสด ชนิดแช่สารละลายเกลือ และชนิดแช่แข็ง

การทดลองที่ 1 เมื่อนำโอโอไซต์ที่ไม่พร้อมปฏิสนธิชนิดต่างๆ มาทำการตรวจสอบการเจาะผ่านของตัวอสุจิสุกร A พบว่าอัตราการเจาะผ่านมีค่า 59.6% (59/99), 78.1% (75/96) และ 77.8%(77/99) สำหรับโอโอไซต์สด แช่สารละลายเกลือ และแช่แข็ง ตามลำดับ พบว่าโอโอไซต์ชนิดสดมีอัตราการเจาะผ่านน้อยกว่าโอโอไซต์อีกสองชนิดที่เหลือ ($p<0.05$) และมีจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ 2.79±0.42, 2.97±0.29 และ 2.29±0.26 ตัว สำหรับโอโอไซต์สด แช่สารละลายเกลือ และแช่แข็งตามลำดับ ซึ่งพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.05$) สำหรับสุกร B พบว่าอัตราการเจาะผ่านมีค่า 65.3% (62/95), 76.8% (73/95) และ 67.0%(65/97) ตามลำดับ และมีจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ 2.25±0.28, 3.63±0.42 และ 2.57±0.36 ตัว สำหรับโอโอไซต์สด แช่สารละลายเกลือ และแช่แข็งตามลำดับ พบว่าโอโอไซต์ชนิดแช่สารละลายเกลือจะมีอัตราการเจาะผ่าน และจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์สูงสุด ($p<0.05$)

การทดลองที่ 2 ทำการเลี้ยงโอโอไซต์ในพร้อมปฏิสนธิในน้ำยาพร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลองก่อนที่จะนำไปเก็บรักษาในสารละลายเกลือและแช่แข็ง เมื่อนำโอโอไซต์ดังกล่าวมาทำการตรวจสอบการเจาะผ่านของตัวอสุจิสุกร A พบว่าอัตราการเจาะผ่านมีค่า 85.1%(74/87), 86.1%(56/65) และ 89.1%(79/88) และจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ 13.87±1.45, 17.69±2.61 and 14.45±1.75. ตัว สำหรับโอโอไซต์สด แช่สารละลายเกลือ และแช่แข็งตามลำดับ ซึ่งพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.05$) สำหรับสุกร B พบว่าอัตราการเจาะผ่านมีค่าน้อยที่สุดในกลุ่มโอโอไซต์สด 52.6.3%(50/95) เปรียบเทียบกับโอโอไซต์ที่แช่สารละลายเกลือและแช่แข็ง 67.3%(64/95) และ 67.0%(65/97) ($p<0.05$) และมีจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ต่ำที่สุด เท่ากับ 1.55±0.31, 2.80±0.35 และ 2.87±0.40 ตัว ($p<0.05$) ตามลำดับ จากการศึกษานี้สรุปว่าพ่อสุกรและวิธีการเก็บรักษาโอโอไซต์มีผลต่ออัตราการเจาะผ่านและจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ และมีความเป็นไปได้ในการนำวิธีนี้ไปใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างของความสามารถในการปฏิสนธิของพ่อสุกรได้

คำสำคัญ: โอโอไซต์ พ่อสุกร การเจาะผ่านของตัวอสุจิ การเก็บรักษาโอโอไซต์

---

[1] ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

[2] ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

[3] ศูนย์ผสมเทียม กรมปศุสัตว์ จ.ราชบุรี

ห้องสมุด
คณะสัตวแพทยศาสตร์
ได้รับความอนุเคราะห์จาก
ฝ่ายวิจัยและบริการวิชาการ
เลขที่รับ 907
วันที่ 28 ต.ค. 2545

SF81
.ฉ 128
2543

บทนำ

การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อมีความสำคัญมากโดยเฉพาะในพ่อพันธุ์ที่จะนำน้ำเชื้อไปใช้ในการผสมเทียม ประโยชน์ที่ได้จากการตรวจสอบนี้คือทราบถึงความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อพันธุ์แต่ละตัว ความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับระบบสืบพันธุ์เพศผู้หรือโรคติดต่อ โดยทั่วไปการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อนิยมใช้วิธีการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อันได้แก่ อัตราการเคลื่อนไหว (motility) รูปร่างลักษณะ (morphology) ความเข้มข้นของตัวอสุจิ (Althouse, 1997a ; Hafez, 1993) การตรวจนับตัวเป็นตัวตาย โดยใช้การย้อมสีด้วยวิธีการต่างๆ (Althouse and Hopkins,1995; Hafez, 1993) รวมไปถึงการตรวจสอบความแข็งแรงของผนังเยื่อหุ้มส่วนหางของตัวอสุจิ (sperm tail membrane integrity; Nagy et al., 1999) นอกจากวิธีดังกล่าวแล้วในปัจจุบันยังได้พัฒนาเทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้ในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อในหลอดทดลอง (*in vitro* assessment) อันได้แก่ ความแข็งแรงของผนังเซลล์ (cell membrane integrity) การบวมของตัวอสุจิ (hypoosmotic swelling test) การตรวจสอบการใช้พลังงานในการเกิดเมทาบอลิซึมของอสุจิที่มีชีวิต (Resazurin test; Althouse, 1997b) ความสามารถในการเกิดคาร์ปาร์ซิเตชั่น (Januskauskas et al., 2000) การเกิดปฏิกิริยาอะโครโซม (Sirivaidyapong et al., 2000) รวมไปถึงการใช้เทคนิคการปฏิสนธินอกร่างกาย (*in vitro* fertilization : IVF ; Larsson and Rodriguez-Martinez, 2000)

การปฏิสนธินอกร่างกายได้มีการพัฒนาและใช้ในการผลิตสัตว์กันเป็นจำนวนมาก รวมไปถึงใช้ในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อในสัตว์หลายชนิด (Larsson and Rodriguez-Martinez, 2000) เทคนิคนี้ทำได้โดยการนำตัวอสุจิมาปฏิสนธิกับโอโอไซต์ภายนอกท่อนำไข่ โดยจัดสภาวะแวดล้อมให้ใกล้เคียงตามธรรมชาติมากที่สุด ก่อนที่จะนำตัวอ่อนที่ได้ทำการย้ายฝากในแม่สัตว์ตัวรับต่อไป วิธีการเหล่านี้จะเกี่ยวข้องกับการเลี้ยงโอโอไซต์นอกร่างกาย (*in vitro* maturation: IVM) การปฏิสนธินอกร่างกายและการเลี้ยงตัวอ่อน (*in vitro* culture: IVC) ได้มีการนำเทคนิคเหล่านี้มาใช้ในการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อในมนุษย์ด้วยการประเมินความสามารถในการปฏิสนธิของตัวอสุจิกับโอโอไซต์ของหนูแฮมสเตอร์ที่เอาชั้นเปลือกนอกออก (zona-free hamster oocyte) แล้วทำการตรวจหาการเจาะผ่านของตัวอสุจิ (sperm penetration) ที่เข้าไปในไซโทพลาสซึมของโอโอไซต์ รวมไปถึงทำการนับจำนวนอสุจิที่เข้าปฏิสนธิด้วย วิธีการนี้เรียกว่า "Zona-free hamster test" นอกจากใช้ในมนุษย์แล้วยังสามารถนำมาใช้ในสัตว์ได้หลายชนิด (Yanagimachi, 1984; Berger and Horton, 1988)

ในช่วงที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาเทคนิคต่างๆในการเก็บรักษาโอโอไซต์ที่อุณหภูมิต่ำ ๆ อันได้แก่ การแช่แข็งด้วยการลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ (slow freezing; Luvoni and Pellizzari, 2000) การแช่แข็งแบบวิทรีฟิเกชั่น (Vitrification; Vajta, 2000) รวมไปถึงการแช่แข็งด้วยความเร็วสูง ๆ (ultrarapid freezing) ซึ่งวิธีหลังนี้โอโอไซต์จะถูกวางลงบน electron microscopic copper grid ก่อนที่จะสัมผัสกับสารป้องกันการแช่แข็งโดยตรง (Martino et al., 1996; Arav and Zeron, 1997) โดยอาศัยการแทรกผ่านของสารป้องกัน

การแช่แข็ง และการดึงเอาน้ำออกมาจากเซลล์ก่อนทำการแช่แข็ง วิธีการนี้จะพบเกล็ดน้ำแข็งขึ้นทั้งภายในและภายนอกเซลล์ (Niemann, 1991) ซึ่งวิธีการแช่แข็งด้วยความเร็วสูงได้มีรายงานถึงความสำเร็จในการเก็บรักษาโอโอไซต์ในโค (Martino et al., 1996; Arav and Zeron, 1997) และในสุกร (ธวัชชัย และคณะ, 2543; อนุชา และคณะ, 2544)

การเก็บรักษาโอโอไซต์นอกจากการแช่แข็งแล้วเรายังสามารถใช้สารละลายเกลือในการเก็บรักษา วิธีนี้ได้มีการพัฒนาใช้ในสัตว์หลายชนิดได้แก่ แฮมสเตอร์ (Boatman et al., 1988) กระต่าย (Fayrer-Hosken and Brackett, 1987) สัตว์ตระกูลแมว (Andrews et al., 1992; Donoghue et al., 1992) โค (Chian et al.,1991) สุกร (Mattioli et al., 1990; Fazeli et al., 1995; Lynham and Harrisson, 1998) และสุนัข (Strom Holst et al., 2000) โดยระยะเวลาในการเก็บรักษาจะแตกต่างกันไปตั้งแต่นาน 56 วัน (Boatman et al., 1988) หรืออาจนานถึง 6 เดือน (Fayrer-Hosken and Brackett, 1987) การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ และทำการเปรียบเทียบการเจาะผ่านของตัวอสุจิสุกร โดยใช้โอโอไซต์ที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิที่เก็บรักษาไว้ด้วยวิธีการแช่สารละลายเกลือ แช่แข็งกับโอโอไซต์สด

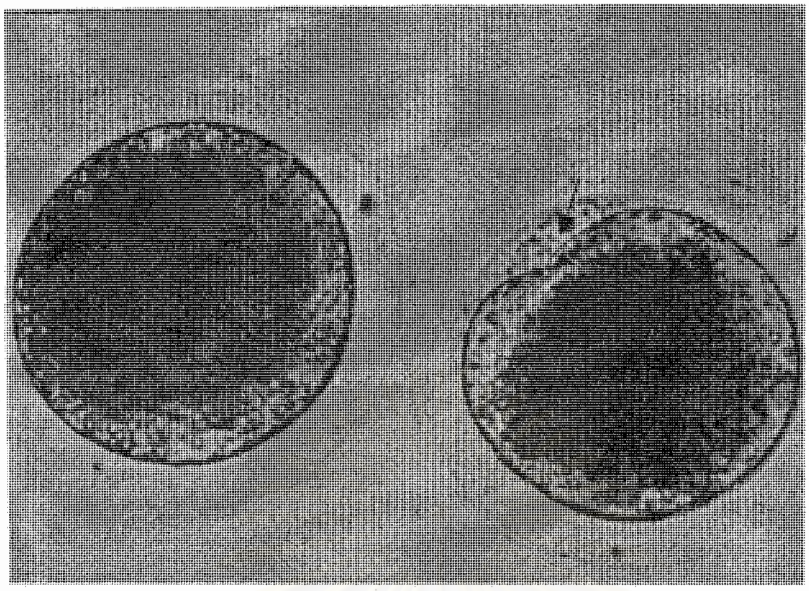
อุปกรณ์และวิธีการ

1. **การเก็บโอโอไซต์**

ทำการเก็บรังไข่ของสุกรจากโรงฆ่าสัตว์ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม โดยเก็บรังไข่ลงในน้ำเกลือ 0.9% อุณหภูมิ 37 °ซ จากนั้นนำกลับมายังห้องปฏิบัติการภายใน 30 นาที ทำการล้างอีกครั้งด้วยน้ำเกลือ 0.9% ใช้เข็มพลาสติกเบอร์ 19 ต่อกับไซริงค์พลาสติกขนาด 5 มล. เจาะดูดของเหลวจากฟอลลิเคิลขนาด 3-5 มล. แล้วเทของเหลวลงในจานพลาสติกที่บรรจุน้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์ชนิด TCM 199 Hepes ทำการตรวจหาโอโอไซต์ด้วยกล้องสเตอริโอกำลังขยาย 10-40 เท่า ทำการเลือกโอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มล้อมรอบ (compact cumulus oocyte : CCO) มาล้างในน้ำยา TCM 199 Hepes อีก 3 ครั้ง จากนั้นนำโอโอไซต์ที่ได้มาแยกเซลล์คิวมูลัสออกจากเปลือก (decoronization) หลังเก็บไว้ใน 1%hyarulonidase (Sigma, USA) ใน TCM 199 $NaHCO_3$ ที่อุณหภูมิ 38.5 °ซ นาน 30 นาที ด้วยการใช้ไปเปตที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใกล้เคียงกับขนาดโอโอไซต์ ดูดเข้าออกหลายๆ ครั้งจนเซลล์คิวมูลัสที่อยู่ล้อมรอบหลุดออกมาจนหมด โอโอไซต์ดังกล่าวจัดเป็นโอโอไซต์ชนิดที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ (รูปที่ 1)

2. **การเก็บรักษาโอโอไซต์ในสารละลายเกลือ**

แบ่งโอโอไซต์ชนิดที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิที่ได้จากข้อ 1 มาเก็บรักษาไว้ในสารละลายเกลือที่มีส่วนประกอบของ $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 โมลาร์, $MgCl_2$ 0.75 โมลาร์, Hepes 40 มิลลิโมลาร์ จากนั้นปรับค่า pH 7.4 ด้วย NaOH ร่วมกับ $ZnCl_2$ 0.2 มิลลิโมลาร์, PVA 0.1 มิลลิกรัม/มล. บรรจุไว้ในจานพลาสติกชนิด 4 หลุม โดยเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 7 วัน (Lynham and Harrison, 1998) เมื่อครบกำหนดแล้ว



รูปที่ 1 โอโอไซต์ชนิดสดที่ผ่านการลอกเอาเซลล์คิวมูลัสออก (ซ้าย เป็นชนิดที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ; ขวา เป็นชนิดที่พร้อมปฏิสนธิ โดยมีเซลล์ polar body หลุดออกมาที่ผิวศรชี้)

นำโอโอไซต์มาล้างด้วยน้ำยา PBS (phosphate buffer saline) จำนวน 2 ครั้งที่อุณหภูมิห้อง โอโอไซต์ที่ได้นี้จัดเป็นโอโอไซต์ที่เก็บรักษาในน้ำเกลือ (รูปที่ 2)

3. การแช่แข็งโอโอไซต์

แบ่งโอโอไซต์ที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิที่ได้จากข้อ 1 และชนิดพร้อมปฏิสนธิที่ได้จากข้อ 2 มาแช่แข็งด้วยวิธี ultrarapid freezing บน microscopic copper grid (รูปที่ 3) (ธวัชชัย และคณะ, 2543) โดยนำโอโอไซต์ทั้งสองชนิดมาล้างในน้ำยา PBS ที่มี 10% fetal calf serum นาน 5 นาที หนึ่งครั้งก่อนที่จะใส่ลงในสารป้องกันการแช่แข็งชนิด ethylene glycol ความเข้มข้น 5 โมลาร์ นาน 30 วินาที หลังจากนั้นนำโอโอไซต์วางลงบน microscopic copper grid และจุ่มลงไปในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ –196 °ซ ทิ้งไว้ 3-5 นาที แล้วนำมาทำให้ละลายในสารละลายซูโครสความเข้มข้น 0.5 โมลาร์, 0.25 โมลาร์ และ 0.125 โมลาร์ และน้ำยา PBS + 10% fetal calf serum นานขั้นตอนละ 1 นาที โดยโอโอไซต์ที่ได้จัดเป็นโอโอไซต์ชนิดแช่แข็ง (รูปที่ 4)

4. การเลี้ยงโอโอไซต์ให้พร้อมปฏิสนธิ

นำโอโอไซต์ชนิด CCO มาเลี้ยงในน้ำยา TCM 199 $NaHCO_3$+10% fetal calf serum ที่มีส่วนประกอบของ FSH/LH 10 ไมโครกรัม/มล. Estradiol-17β 1 ไมโครกรัม/มล. ในจานทดลอง 4 หลุม ในตู้อบก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีความเข้มข้น 5% ความชื้นเต็มที่ และที่อุณหภูมิ 38.5 °ซ นาน 44 ชั่วโมง หลังเลี้ยงเสร็จ นำมาลอกเอาเซลล์คิวมูลัสออกหลังแช่ในน้ำยา 1% hyarulonidase ใน TCM199 $NaHCO_3$ โอโอไซต์ที่ได้จะเป็นโอโอไซต์ที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัส และมี polar body ที่ผิว (รูปที่ 1)

รูปที่ 2 โอโอไซต์ที่แช่ในสารละลายน้ำเกลือ มีไซโทพลาสซึมหดตัว

5. การแบ่งกลุ่มโอโอไซต์

ในแต่ละกลุ่มประกอบด้วยกลุ่มทดลองย่อย 3 กลุ่มดังนี้

<u>การทดลองที่ 1</u> โอโอไซต์ชนิดที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ (immature oocyte)

กลุ่มที่ 1 โอโอไซต์ชนิดสด (fresh immature oocyte)

กลุ่มที่ 2 โอโอไซต์ชนิดแช่สารละลายเกลือ (salt stored immature oocyte)

กลุ่มที่ 3 โอโอไซต์ชนิดแช่แข็ง (frozen immature oocyte)

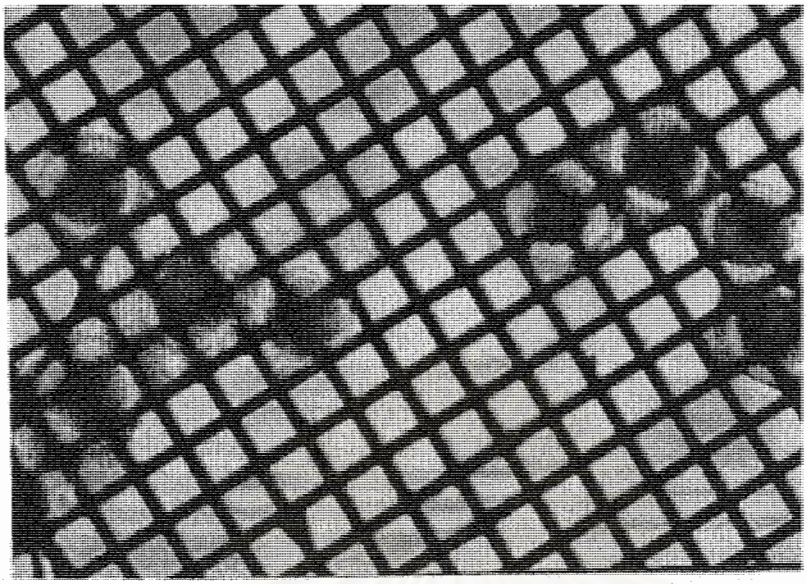
<u>การทดลองที่ 2</u> โอโอไซต์ชนิดที่พร้อมปฏิสนธิ (mature oocyte)

กลุ่มที่ 1 โอโอไซต์ชนิดสด (fresh mature oocyte)

กลุ่มที่ 2 โอโอไซต์ชนิดแช่สารละลายเกลือ (salt stored mature oocyte)

กลุ่มที่ 3 โอโอไซต์ชนิดแช่แข็ง (frozen mature oocyte)

ทำการทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 5 ครั้ง (replication) แต่ละครั้งใช้โอโอไซต์แต่ชนิดในจำนวนใกล้เคียงกัน



รูปที่ 3 โอโอไซต์ที่วางบน electron microscope grid ก่อนทำการแช่แข็งด้วยวิธี ultrarapid freezing

6. การเตรียมตัวอสุจิ

ทำการรีดน้ำเชื้อจากพ่อสุกรพันธุ์แลนเรซอายุประมาณ 1.5-2.0 ปี น้ำหนัก 150-200 กิโลกรัม จำนวน 2 ตัว ด้วย Hand glove method แล้วนำมาเจือจางในน้ำยาละลายน้ำเชื้อชนิด Beltville Thawing Solution (BTS, UK) นำน้ำเชื้อเจือจางที่ผ่านการตรวจสอบว่ามีคุณภาพน้ำเชื้อปกติทางกายภาพและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตามเกณฑ์ของ Crabo (1997) มาผ่านขั้นตอนคือ

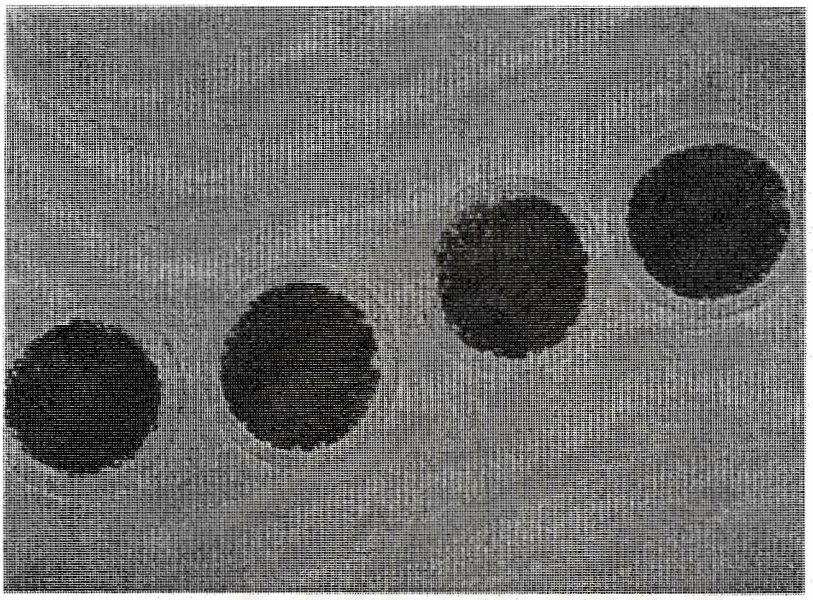
6.1. ปั่นแยกเอาตะกอนตัวอสุจิด้วยความเร็ว 1000g นาน 5 นาที แล้วดูดเอาส่วนใสทิ้งไปเหลือแต่ตะกอน เติมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อชนิด BTS (Minitub®, Germany) ที่มีอุณหภูมิ 37 °ซ ลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตรวจอัตราการเคลื่อนไหว จากนั้นดูดเอาสารละลายที่มีตัวอสุจิมา 200 ไมโครลิตรใส่ลงไปในน้ำยาคาร์ปาซิเตชั่นชนิด TALP ที่มี bovine albumin 0.006 กรัม/มล. และมีความค่า pH 7.2 จำนวน 1 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5 °ซ ภายใต้บรรยากาศ 5% CO_2 และความชื้นเต็มที่ ปล่อยให้ตัวอสุจิว่ายขึ้นสู่ผิวนาน 4 ชั่วโมง

6.2. เมื่อครบกำหนดแล้ว ทำการดูดแยกตัวอสุจิส่วนบนประมาณ 800 ไมโครลิตร มาปั่นอีกครั้งที่ 1000g นาน 5 นาที แยกเอาเฉพาะตัวอสุจิที่นอนก้น ตรวจการเคลื่อนไหวและจำนวนอสุจิ

7. การเลี้ยงตัวอสุจิร่วมกับโอโอไซต์

นำโอโอไซต์แต่ละชนิดที่ได้จากการเตรียมด้วยวิธีต่าง ๆ ข้างต้นมาทำการล้างใน Fertilization medium อีกครั้งก่อนที่จะนำไปใส่ในหลุมของจานพลาสติกชนิด 4 หลุมที่มีน้ำยา Fertilization medium บรรจุอยู่จำนวน 20 ใบต่อหลุม จากนั้นนำตัวอสุจิมาปรับความเข้มข้นให้ได้เท่ากับ $1x10^6$ ตัว / มล. และ

ใส่ลงในหลุมของจานพลาสติกชนิด 4 หลุม ที่มีโอโอไซต์แต่ละชนิดบรรจุอยู่นาน 18 ชั่วโมง ในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5 °ซ ภายใต้บรรยากาศ 5% CO_2 และความชื้นเต็มที่ (มงคล และคณะ, 2536)



รูปที่ 4 โอโอไซต์ภายหลังการแช่แข็งด้วยวิธี ultrarapid freezing

8. การตรวจสอบผล

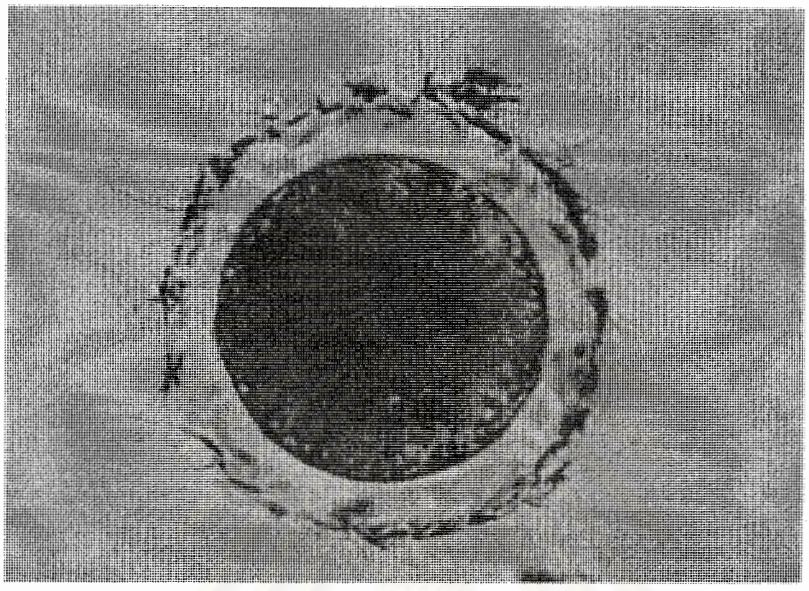
หลังจากเลี้ยงตัวอสุจิร่วมกับโอโอไซต์ครบ 18 ชั่วโมง แล้ว นำโอโอไซต์มาล้างในน้ำยา TCM 199 Hepes จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นทำการลอกตัวอสุจิส่วนเกินที่ติดกับผนังของ zona pellucida ออกโดยการผ่านเข้าออกในไปเปตที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใกล้เคียงกับโอโอไซต์หลาย ๆ ครั้ง จากนั้นทำการตรึง (fixation) ใน 0.1% formaldehyde นาน 5-10 นาที ก่อนที่จะทำการล้างด้วย PBS จำนวน 2 ครั้ง ทำการย้อมด้วย Hoechst 33342 (No. B-2261, Sigma) ขนาด 10 ไมโครกรัม/มล. นาน 3-5 นาที ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Pursel และคณะ (1985) แล้วนำไปส่องเพื่อตรวจนับจำนวนตัวอสุจิที่เจาะผ่านผนัง zona pellucida และที่เข้าไปในไซโทพลาซึม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent microscope) ทำการถ่ายภาพเก็บบันทึกไว้

9. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการนับจำนวนอสุจิที่เจาะผ่านผนังโซน่าเพลลูซิด้า และที่เข้าไปในไซโทพลาซึม ในแต่ละกลุ่มการทดลองหาค่าเฉลี่ย ($\bar{X}\pm$SEM) แล้วนำมาเปรียบเทียบในแต่ละกลุ่มโดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA)ชนิดทางเดียว และเปรียบเทียบจำนวนของโอโอไซต์แต่ละชนิดที่ถูกเจาะผ่านโดยใช้วิธี chi-square ซึ่งจะใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 9.05 ในการคำนวณ

ผลการทดลอง

หลังจากเลี้ยงโอโอไซต์ร่วมกับตัวอสุจิแล้วจะพบว่ามีตัวอสุจิจำนวนมากอยู่รอบ ๆ เปลือกหุ้ม zona pellucida (รูปที่ 5) และมีบางส่วนที่เจาะผ่านเปลือก เข้าไปในไซโทพลาสซึม ซึ่งสามารถตรวจหลังย้อมสี



รูปที่ 5 การเกาะของตัวอสุจิรอบ ๆ เปลือก zona pellucida และมีตัวอสุจิบางส่วนที่เจาะผ่านชั้นเปลือก ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (x500)

จากผลการศึกษาการเจาะผ่านของตัวอสุจิสุกรพันธุ์แลนเรซ (สุกร A) โดยใช้โอโอไซต์ชนิดที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิทั้งชนิดสด แช่สารละลายเกลือ และแช่แข็ง (รูปที่ 6, 7 และ 8) ผลที่ได้พบว่าอัตราการเจาะผ่านของตัวอสุจิในโอโอไซต์ที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิมีค่าเท่ากับ 59.6%, 78.1% และ 77.8% สำหรับโอโอไซต์ชนิดสด แช่สารละลายเกลือ และแช่แข็งตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบค่าทางสถิติพบว่าอัตราการเจาะผ่านของอสุจิในโอโอไซต์ชนิดสดมีค่าน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับโอโอไซต์ที่เหลืออีก 2 ชนิด (ตารางที่ 1) ในขณะที่ค่าเฉลี่ยของตัวอสุจิต่อโอโอไซต์ทั้ง 3 ชนิดมีค่า 2.79 ± 0.42, 2.97 ± 0.29 และ 2.29 ± 0.26 ตัว สำหรับโอโอไซต์ชนิดสด แช่สารละลายเกลือและแช่แข็งตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบค่าทางสถิติพบว่าค่าเฉลี่ยของตัวอสุจิที่ผ่านเข้าไปในโอโอไซต์ทั้ง 3 ชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ดังตารางที่ 1

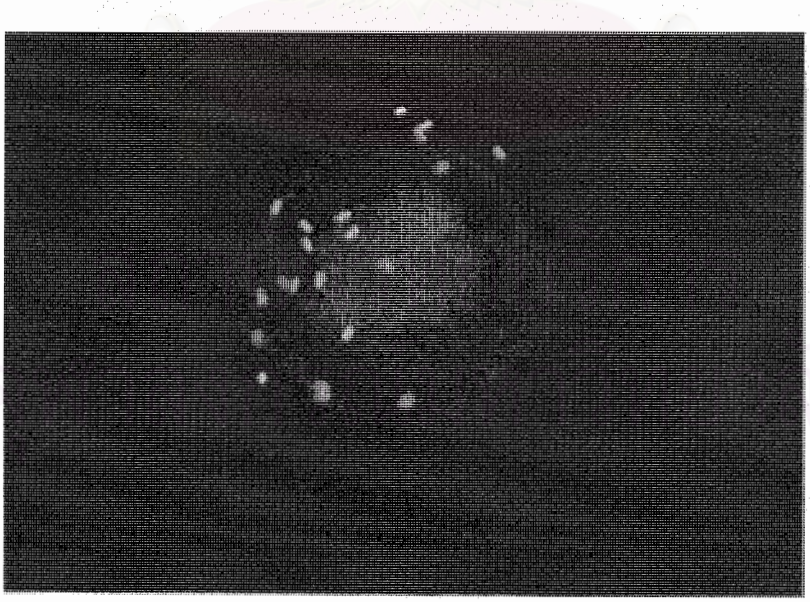
ตารางที่ 1 ผลการเจาะผ่านของตัวอสุจิจากสุกร A เมื่อใช้โอโอไซต์ชนิดที่ไม่พร้อมปฏิสนธิ

ชนิดของโอโอไซต์	จำนวนโอโอไซต์ที่ตรวจสอบ	จำนวนโอโอไซต์ที่ถูกเจาะผ่าน(%)	ค่าเฉลี่ยจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ [1]	ช่วงของจำนวนตัวอสุจิ
ชนิดสด	99	59 (59.6)[a]	2.79 ± 0.42	0 – 21
ชนิดแช่สารละลายเกลือ	96	75 (78.1) [b]	2.97 ± 0.29	0 – 15
ชนิดแช่แข็ง	99	77 (77.8)[b]	2.29 ± 0.26	0 – 14

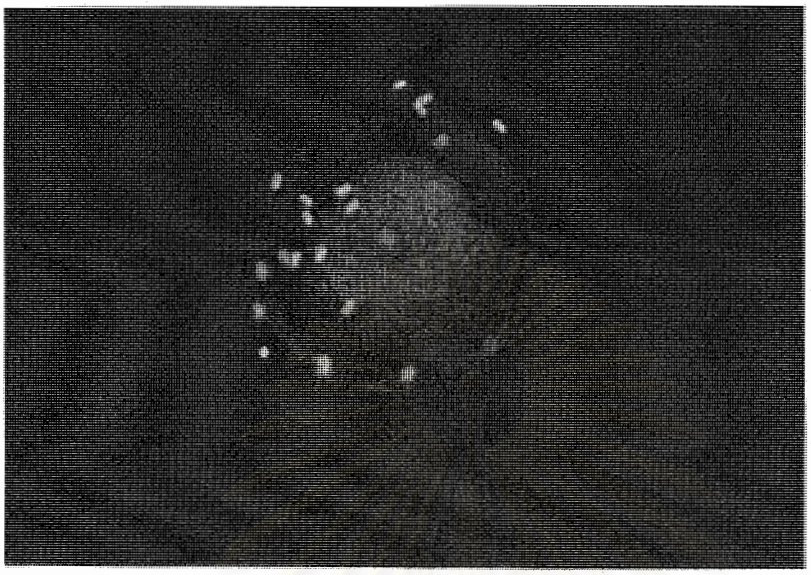
[1] mean ± SEM

ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

เมื่อทำการทดสอบการเจาะผ่านของตัวอสุจิ (สุกร A) โดยใช้โอโอไซต์ชนิดที่พร้อมปฏิสนธิทั้งชนิดสด แช่สารละลายเกลือและแช่แข็ง พบว่าอัตราการเจาะผ่านของตัวอสุจิในโอโอไซต์ทั้ง 3 ชนิดมีค่า เท่ากับ 85.1%, 86.2% และ 89.8% สำหรับโอโอไซต์ชนิดสด แช่สารละลายเกลือและแช่แข็งตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบทางสถิติพบว่าอัตราการเจาะผ่านขอโอโอไซต์ทั้ง 3 ชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ดังตารางที่ 2 ในขณะที่ค่าเฉลี่ยของจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์มีค่าเท่ากับ 13.87±1.45, 17.69±2.61 และ 14.45±1.75 ตัว สำหรับโอโอไซต์ชนิดสด แช่สารละลายเกลือและแช่แข็งตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบค่าทางสถิติพบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 2



รูปที่ 6 ผลการย้อมตรวจการเจาะผ่านของโอโอไซต์ชนิดสด พบตัวอสุจิที่ติดสีสะท้อนแสง (x500)



รูปที่ 7 ผลการย้อมตรวจการเจาะผ่านของโอโอไซต์ชนิดแช่ในน้ำเกลือx500)

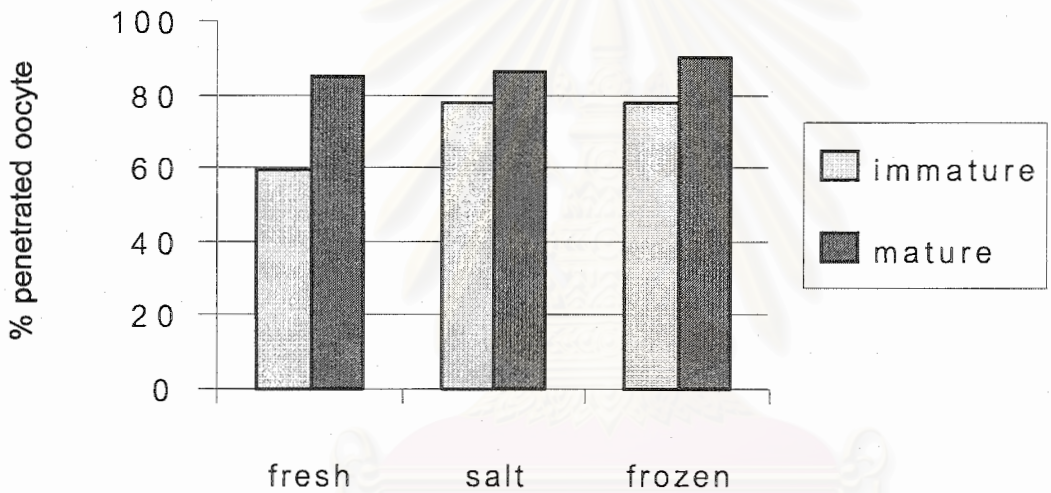
รูปที่ 8 ผลการย้อมตรวจการเจาะผ่านของโอโอไซต์ชนิดแช่แข็ง (x500)

ตารางที่ 2 ผลของการเจาะผ่านของตัวอสุจิจากสุกร A เมื่อใช้โอโอไซต์ชนิดที่พร้อมปฏิสนธิ

ชนิดของโอโอไซต์	จำนวนโอโอไซต์ที่ตรวจสอบ	จำนวนโอโอไซต์ที่ถูกเจาะผ่าน (%)	ค่าเฉลี่ยจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ [1]	ช่วงของจำนวนตัวอสุจิ
ชนิดสด	87	74 (85.1)	13.87± 1.45	0 – 43
ชนิดแช่สารละลายเกลือ	65	56 (86.1)	17.69± 2.61	0 – 80
ชนิดแช่แข็ง	88	79 (89.8)	14.45± 1.75	0 - 70

[1] mean ± SEM

ผลเปรียบเทียบการเจาะผ่านของโอโอไซต์ชนิดที่ไม่พร้อมปฏิสนธิและชนิดพร้อมปฏิสนธิของพ่อสุกร A แสดงในรูปที่ 9



รูปที่ 9 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจาะผ่านในโอโอไซต์ชนิดต่างๆ ทั้งที่ไม่พร้อมปฏิสนธิและพร้อมปฏิสนธิของพ่อสุกร A

ในการทดสอบการเจาะผ่านของตัวอสุจิอีกตัวหนึ่ง(สุกร B) โดยใช้โอโอไซต์ชนิดที่ไม่พร้อมปฏิสนธิทั้งชนิดสด แช่สารละลายเกลือ และแช่แข็ง พบว่าอัตราการเจาะผ่านของตัวอสุจิในโอโอไซต์ทั้ง 3 ชนิดมีค่าเท่ากับ 65.3%, 76.8 % และ 67% สำหรับโอโอไซต์ชนิดสด แช่สารละลายเกลือ และแช่แข็งตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบทางสถิติพบว่าอัตราการเจาะผ่านในโอโอไซต์ชนิดแช่สารละลายเกลือจะมีค่าสูงสุด ($p<0.05$) ในขณะที่ค่าเฉลี่ยของจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์มีค่าเท่ากับ 2.25 ± 0.28, 3.63±0.42 ตัว และ 2.57±0.36 ตัว สำหรับโอโอไซต์ชนิดสด แช่สารละลายเกลือและแช่แข็งตามลำดับเมื่อทำการทดสอบค่าทางสถิติพบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ที่แช่ในสารละลายเกลือมีค่ามากที่สุด($p<0.05$) ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การเจาะผ่านของตัวอสุจิจากสุกร B เมื่อใช้โอโอไซต์ชนิดที่ไม่พร้อมปฏิสนธิ

ชนิดของโอโอไซต์	จำนวนโอโอไซต์ที่ตรวจสอบ	จำนวนโอโอไซต์ที่ถูกเจาะผ่าน (%)	ค่าเฉลี่ยจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ [1]	ช่วงของจำนวนตัวอสุจิ
ชนิดสด	95	62 (65.3) [a]	2.25 ± 0.28 [c]	0 – 11
ชนิดแช่สารละลายเกลือ	95	73 (76.8) [b]	3.63 ± 0.42 [d]	0 – 20
ชนิดแช่แข็ง	97	65 (67.0) [a]	2.57 ± 0.36 [c]	0 – 21

[1] mean ± SEM

ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

เมื่อทำการทดสอบการเจาะผ่านของตัวอสุจิ (สุกร B) โดยใช้โอโอไซต์ชนิดที่พร้อมปฏิสนธิทั้งชนิดสด แช่สารละลายเกลือ และแช่แข็ง พบว่าอัตราการเจาะผ่านของตัวอสุจิในโอโอไซต์ทั้ง 3 ชนิดมีค่าเท่ากับ 52.6%, 67.3% และ 69.1% สำหรับโอโอไซต์ชนิดสด แช่สารละลายเกลือและแช่แข็งตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบทางสถิติพบว่าอัตราการเจาะผ่านในโอโอไซต์ชนิดสดจะมีค่าน้อยสุด ($p<0.05$) ดังตารางที่ 4 ในขณะที่ค่าเฉลี่ยของจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์มีค่าเท่ากับ 1.55 ± 0.31, 2.80±0.35 และ 2.87±0.40 ตัว สำหรับโอโอไซต์ชนิดสด แช่สารละลายเกลือและแช่แข็งตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบค่าทางสถิติพบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ชนิดสดมีค่าน้อยสุดเช่นเดียวกัน ($p<0.05$) ดังตารางที่ 4

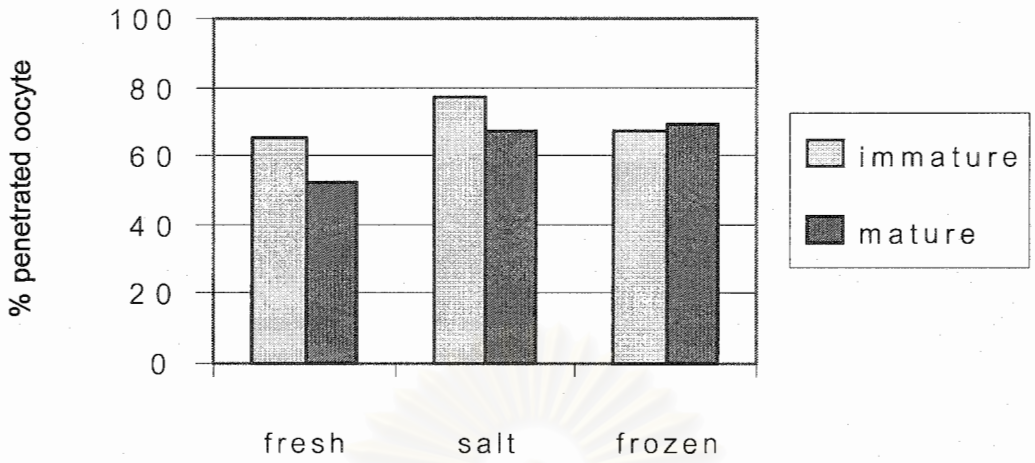
ตารางที่ 4 การเจาะผ่านของตัวอสุจิจากสุกร B เมื่อใช้โอโอไซต์ชนิดที่พร้อมปฏิสนธิ

ชนิดของโอโอไซต์	จำนวนโอโอไซต์ที่ตรวจสอบ	จำนวนโอโอไซต์ที่ถูกเจาะผ่าน (%)	ค่าเฉลี่ยจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ [1]	ช่วงของจำนวนตัวอสุจิ
ชนิดสด	95	50 (52.6) [a]	1.55 ± 0.31 [c]	0 – 20
ชนิดแช่สารละลายเกลือ	95	64 (67.3) [b]	2.80 ± 0.35 [d]	0 – 13
ชนิดแช่แข็ง	97	67 (69.1) [b]	2.87 ± 0.40 [d]	0 – 24

[1] mean ± SEM

ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ผลเปรียบเทียบการเจาะผ่านของโอโอไซต์ชนิดที่ไม่พร้อมปฏิสนธิและชนิดพร้อมปฏิสนธิของพ่อสุกร B แสดงในรูปที่ 10



รูปที่ 10 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจาะผ่านในโอโอไซต์ชนิดต่างๆ สุกร B

วิจารณ์

การนำเทคนิคการปฏิสนธิภายนอกร่างกายมาประยุกต์ใช้ในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อโดยดูจากการเจาะผ่านของตัวอสุจิพบว่ามีประโยชน์อย่างมาก เนื่องจากการตรวจจากเพียงรูปร่างลักษณะภายนอกและอัตราการเคลื่อนไหวไม่สามารถบ่งถึงความสามารถในการปฏิสนธิ และผลที่ได้หลังจากนำไปผสมพันธุ์กับแม่สุกรได้ โดยมงคลและคณะ (2539) พบว่าน้ำเชื้อสุกรแม้จะมีอัตราการเคลื่อนไหวใกล้เคียงกันคือประมาณ 70-80% แต่จะให้ความแตกต่างกันในแง่ของอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนหลังนำน้ำเชื้อนั้นไปปฏิสนธิกับตัวอสุจิในหลอดทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอัตราการแบ่งตัวดังกล่าวเป็นวิธีหนึ่งที่บ่งชี้ถึงความสามารถในการปฏิสนธิ นอกจากนี้การตรวจสอบในหลอดทดลองจะช่วยย่นระยะเวลาในการทดสอบ รวมไปถึงเสียค่าใช้จ่ายในการทดสอบน้อยลง (Larsson and Rodriguez-Martinez, 2000)

การศึกษาในครั้งนี้พบว่าอัตราการเจาะผ่านของตัวอสุจิในโอโอไซต์ที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิที่เก็บรักษาไว้ในสารละลายเกลือจะมีค่าสูงเมื่อเทียบกับอัตราการเจาะผ่านในโอโอไซต์สด ทั้งนี้ เนื่องจากส่วนประกอบของสารละลายเกลือมีผลในการทำลายกลไกในการป้องกันการเกิดตัวอสุจิหลายตัว (polyspermy) ได้ (Boatman et al.,1988) ทำให้ความสามารถในการเจาะผ่านโอโอไซต์ที่เก็บรักษาในสารละลายเกลือมีค่ามากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับที่ Andrew และคณะ (1992) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบจำนวนอสุจิของแมวป่า (leopard cat) ที่ผ่านเข้าไปในชั้นของ perivitelline space ของโอโอไซต์ที่เก็บรักษาไว้ในสารละลายเกลือมีค่ามากกว่าโอโอไซต์ชนิดสด ในขณะที่ความสามารถในการเจาะผ่านของตัวอสุจิแมวบ้าน (domestic cat) ในโอโอไซต์ทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกัน (Andrew et al., 1992)

ผลการศึกษาในครั้งนี้เมื่อทำการเปรียบเทียบจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างวิธีในการเก็บรักษาของโอโอไซต์ทั้งชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิสำหรับสุกร A ในขณะ

ที่มีความแตกต่างขึ้นสำหรับสุกร B ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่าพ่อสุกรที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ที่แตกต่างกันจะให้ผลในการเจาะผ่านและอัตราการปฏิสนธิที่แตกต่างกันไป (มงคล และคณะ, 2539; Fazeli et al.,1995; Gadea et al., 1998) เมื่อทำการเปรียบเทียบจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ที่ได้จากผลการศึกษา ผลที่ได้พบว่ามีจำนวนน้อยกว่าผลการศึกษาที่ได้จากรายงานอื่นๆ (Martinez et al., 1993; Ivanova and Mollova, 1993; Matas et al., 1996; Gadea et al., 1998) เนื่องมาจากความเข้มข้นของตัวอสุจิที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีจำนวนน้อยกว่าการศึกษาดังกล่าวข้างต้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Martinez และคณะ (1993) ที่กล่าวไว้ว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของตัวอสุจิมากขึ้นจะทำให้อัตราการเจาะผ่าน และจำนวนตัวอสุจิต่อโอโอไซต์สูงขึ้น ความแตกต่างดังกล่าวนี้นอกจากความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อสุกรแล้ว ความผันแปรสามารถเกิดจากโอโอไซต์ได้อีกด้วย เช่นคุณภาพของโอโอไซต์ที่แตกต่างกัน (Fazeli et al., 1993) โดยโอโอไซต์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางไม่เท่ากันจะมีความสามารถในการเจาะผ่านต่างกัน โดย Matas และคณะ (1996) รายงานไว้ว่าโอโอไซต์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 105 ไมโครเมตรจะมีจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์สูงขึ้น และมีจำนวนมากที่สุดเมื่อใช้โอโอไซต์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 116 ไมโครเมตร นอกจากนี้โอโอไซต์ที่ได้มาจากแม่สุกรที่มีอายุต่างกันจะมีผลต่อความสามารถในการปฏิสนธิที่แตกต่างกัน โดย O'Brien และคณะ (2000) ทำการศึกษาเปรียบเทียบถึงความสามารถในการเจริญของโอโอไซต์จนพร้อมปฏิสนธิ และความสามารถในการปฏิสนธิระหว่างโอโอไซต์ที่เก็บมาจากสุกรสาวและแม่สุกร ผลที่ได้พบว่าการเข้าปฏิสนธิของตัวอสุจิหลายตัวในสุกรสาวจะมีมากกว่าโอโอไซต์ที่ได้มาจากแม่สุกร

เมื่อทำการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของโอโอไซต์ที่เก็บรักษาไว้ในสารละลายเกลือ พบว่าเกิดการหดตัวของไซโทพลาสซึม โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงของผนัง zona pellucida ลักษณะนี้สามารถพบได้ในโอโอไซต์ของโคเช่นเดียวกัน (Chian et al., 1991) Strom Holst และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาถึงระดับโครงสร้าง (ultrastructure) ของโอโอไซต์สุนัขที่เก็บรักษาไว้ในสารละลายเกลือพบว่าผนังของ zona pellucida มีความหนาลดน้อยลงเมื่อเทียบกับโอโอไซต์สด นอกจากนี้ Chian และคณะ (1991) ยังได้รายงานไว้ว่าสารละลายเกลือที่มีส่วนประกอบที่แตกต่างกันจะไม่มีผลต่อความสามารถในการเจาะผ่านของตัวอสุจิ

การเก็บรักษาโอโอไซต์โดยวิธีการแช่แข็งสามารถทำได้หลายวิธี (Niemann, 1991) การศึกษาในครั้งนี้ได้ใช้วิธี ultra-rapid freezing เนื่องจากการแช่แข็งวิธีนี้มีอัตราการเกิดสภาพพร้อมปฏิสนธิและการแบ่งตัวถึงระยะบลาสโตซีสสูงกว่าการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิช้าๆ (Martino et al., 1996) มีการทำลายอันเนื่องมาจากความเย็นน้อย ด้วยเหตุผลที่โอโอไซต์แขวนลอยอยู่ในสารละลายที่มีสารป้องกันการแช่แข็งในปริมาณน้อย และใช้ระยะเวลาในการแช่แข็งสั้นมาก เพราะอัตราของการลดอุณหภูมิเร็วมาก จึงเป็นการช่วยลดการเกิดเกล็ดน้ำแข็งที่จะทำลายเซลล์ได้ (Vajta, 2000 ; Shaw et al., 2000) เมื่อทำการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของโอโอไซต์ที่เกิดขึ้นพบว่าในบางโอโอไซต์จะเกิดการบิดเบี้ยวของผนัง zona pellucida หรือเกิดการรั่วของไซโทพลาสซึมออกมาภายนอกเซลล์ ซึ่งพบได้เช่นกันในรายงานของ Dhali และคณะ

(2000) ที่ได้ทำการศึกษาในกระบือ Fuku และคณะ (1995) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในโอโอไซต์ทั้งชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิเมื่อทำการแช่แข็งในโคพบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงของ microvilli, cortical granules และ การเจริญของ vesicle ภายในโอโอไซต์ นอกจากนี้ผนังของ zona pellucida จากโอโอไซต์ชนิดพร้อมปฏิสนธิเกิดการเสียหายเพิ่มขึ้นอันเนื่องมาจากการลดลงของ cortical granules

จากการศึกษาครั้งนี้จะเห็นความแตกต่างระหว่างจำนวนตัวอสุจิที่เจาะผ่านโอโอไซต์ระหว่างพ่อพันธุ์สุกร A และ B ในกรณีของโอโอไซต์ชนิดพร้อมปฏิสนธิที่แสดงในตารางที่ 2 และ 4 แสดงว่าพ่อสุกรแต่ละตัวแม้จะมีภาพลักษณ์ของการเคลื่อนไหวและเปอร์เซนต์ตัวอสุจิที่ปกติ แต่จะมีความสามารถในการเจาะผ่านที่ต่างกันออกไป ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Techakumphu และคณะ (1999) ที่พบว่าอัตราการแบ่งตัวและอัตราการเจริญของตัวอ่อนเป็นระยะมอรูล่าจะแตกต่างกันในพ่อสุกรแต่ละตัวหลังนำเอาน้ำเชื้อไปปฏิสนธินอกร่างกาย นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำเชื้อของพ่อสุกรแต่ละตัวจะมีความทนทานต่อการเก็บแช่เย็นที่ 15 °ซ และแช่แข็งแตกต่างกัน ซึ่งเมื่อนำไปปฏิสนธินอกร่างกายก็จะให้อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนที่แตกต่างกัน (Musikthong et al., 1999) ดังนั้นงานวิจัยขั้นต่อไปเพื่อนำวิธีการนี้ไปปรับใช้กับฟาร์มสุกรจึงควรมีการศึกษาโดยใช้น้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์สุกรที่มีประวัติการผสมติดต่ำ ให้ลูกต่อครอกต่ำ ในฟาร์มผลิตสุกรพันธุ์แท้มาทำการเปรียบเทียบเพิ่มเติม รวมทั้งศึกษาความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์สุกรที่ใช้ในการเลี้ยง นอกจากนี้ควรนำข้อมูลในหลอดทดลอง (*in vitro*) ไปเปรียบเทียบกับที่ได้จากการนำน้ำเชื้อไปผสมกับแม่สุกรในฟาร์ม (*in vivo*) เปรียบเทียบกับผลที่ได้ในหลอดทดลอง (*in vitro*) ซึ่งพบว่าอิทธิพลจากแม่พันธุ์สุกรและสิ่งแวดล้อมในการเลี้ยงจะมีผลต่อความสามารถในการปฏิสนธิเช่นกัน (Larsson and Rodriguez-Martinez, 2000)

จากการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่าสามารถนำโอโอไซต์ทั้งชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิที่เก็บรักษาไว้ในสารละลายเกลือ และแช่แข็งมาใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการเจาะผ่านของตัวอสุจิแทนโอโอไซต์สดได้

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาในครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปี 2543 ขอขอบคุณ รองศาตราจารย์ น.สพ. ดร. ปราจีน วีรกุล ที่แนะนำฟาร์มสุกรสำหรับเก็บน้ำเชื้อ ฟาร์มสุกร อวยชัยที่ให้ความร่วมมือในการบริจาคน้ำเชื้อพ่อสุกร

เอกสารอ้างอิง

ธวัชชัย สลับศรี พยุงศักดิ์ พานิชยิ่ง วิสูตร นวลขาว มงคล เตชะกำพุ และนวเพ็ญ ภูติกนิษฐ์ 2543 การศึกษาการแช่แข็งโอโอไซต์สุกรโดยวิธี ultra-rapid freezing ด้วย microscopic copper grid ด้วยสารป้องกันการแช่แข็งที่ต่างกัน โครงการเสริมทักษะการวิจัยประจำปีการศึกษา 2542 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 18 หน้า

มงคล เตชะกำพุ วันเพ็ญ ศรีอนันต์ จินดา สิงห์ลอ และวิชัย ทันตศุภารักษ์ 2536 การผลิตตัวอ่อนสุกรด้วยวิธีการปฏิสนธินอกร่างกาย เวชชสารสัตวแพทย์ 23(3) : 189-199

มงคล เตชะกำพุ วันเพ็ญ ศรีอนันต์ และวิชัย ทันตศุภารักษ์ 2539b การทดสอบความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อสุกรพันธุ์ดูร็อคด้วยวิธีการปฏิสนธินอกร่างกาย ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ครั้งที่ 23, สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย โรงแรมเรดิสัน กรุงเทพฯ , 27-29 พฤศจิกายน 2539 : 51-61

อนุชา สธนวงศ์ อภิสิทธิ์ กิจถาวรรัตน์ รัฐพงศ์ รัตนภุมมะ นวเพ็ญ ภูติกนิษฐ์ และมงคล เตชะกำพุ 2544 ผลของความเข้มข้นของสารเอธิลีนไกลคอลต่อการแช่แข็งโอโอไซต์สุกรด้วยวิธี ultra-rapid freezing โครงการเสริมทักษะการวิจัยประจำปีการศึกษา 2543 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 21 หน้า

Althouse, G.C. and Hopkins, S.M. 1995. Assessment of boar sperm viability using a combination of two flurophores. Theriogenology 43: 595-602.

Althouse, G.C. 1997a. Evaluation porcine semen for artificial insemination. Part I. Standard tests. Compen. Contin. Ed. Pract. Vet. (Suppl) 19 : 30-35.

Althouse, G.C. 1997b. . Evaluation porcine semen for artificial insemination. Part II. Assessment of cell membranes and viability. Compen. Contin. Ed. Pract. Vet. 19: 400-404.

Andrews, J.C., Howard, J.G., Bavister, B.D. and Wildt, D.E. 1992. Sperm capacitation in the domestic cat (*Felis catus*) and leopad (*Felis bengalensis*) as studied with a salt-stored zona pellucida penetration assay. Mol. Repred. Dev. 31 : 200-207.

Arav, A. and Zeron, Y. 1997. Vitrification of bovine oocytes using modified minimum drop size tichnique (MDS) is effected by the composition and the concentration of the vitrification solution and by the cooling comditions. Theriogenology 47: 341 (abstr.)

Berger, T. and Horton, M.B. 1988. Evaluation of assay conditions for the zona-free hamster ova bioassay of boar sperm fertility. Gamete Res. 19: 101-111.

Boatman, D.E., Andrews, J.C. and Bavister, B.D. 1988. A quantitative assay for capacitation: Evaluation on multiple sperm penetration through the zona pellucida of salt-stored Hamster eggs. Gamete Res. 19 : 19-29.

Chian, R.C., Niwa, K. and Okuda, K. 1991. *In vitro* penetration of zona pellucida of salt-stored bovine oocytes before and after maturation by frozen-thawed spermatozoa. Theriogenology 36 : 209-219.

Crabo, B.G. 1997. Reproductive examination and evaluation of the boar. In : Current Therapy in Large Animal Theriogenology. R.S. Youngquist ed. WB Saunders Company . Philadelphia , p664-670.

Dhali, A., Manik, R.S., Das, S.K., Singla, S.K. and Palta, P. 2000. Post –vitrification survival and *in vitro* maturation rate of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocyte: effect of ethylene glycol concentration and exposure time. Anim. Reprod. Sci. 63: 159-165.

Donoghue, A. M., Johnston, L.A., Seal, U.S., Armstrong, D.L., Simmons, L.G., Gross, T., Tilson, R.L. and Wildt, D.E. 1992. Ability of thawed tiger (*Panther tigris*) spermatozoa to fertilize Conspecific eggs and bind and penetrate domestic cat eggs *in vitro.* J. Reprod. Fert. 96 : 555-564.

Fayrer-Hosken, R.A. and Brackett, B.G. 1987. Use of salt-stored zonae pellucidae for assessing rabbit sperm capacitation for *in vitro* fertilization. Gamete. Res. 17 : 191-201.

Fazeli, A.R., Holt, C., Steenweg, W., Bevers, M.M., Holt, W.V., Colenbrander, B. 1995. Development of a sperm hemizona binding assay for boar semen. Theriogenology 44: 17-27

Fazeli, A.R., Steenweg, W., Bevers, M.M., de Loos , F.A.M., van den Broek, J. and Colenbrander, B. 1993. Development of a sperm zona pellucida binding assay for bull semen. Vet.Rec. 132 : 14-16.

Fuku, E., Xia, L. and Downey, B.R. 1995. Ultrastructural changes in bovine oocytes Cryopreserved by vitrification. Cryobiology 32 : 139-156.

Gadea, J., Matas, C. and Lucas, X. 1998. Prediction of porcine semen fertility by homologous *in vitro* penetration (hIVP) assay. Anim. Reprod. Sci. 56: 95-108.

Hafez, E.S.E. 1993. Semen evaluation. In : Reproduction in farm animals. 6th ed. E.S.E. Hafez Editor. Lea& Febiger. Philadelphia :p 405-423.

Ivanova, M. and Mollova, M . 1993. Zona-penetration *in vitro* test for evaluating boar sperm fertility. Theriogenology 40: 397-410.

Januskauskas, A., Johannisson, A., Soderquist, L. and Rodriguez-Martinez, H. 2000.Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bull. Theriogenology 53: 859-875.

Larsson, B. and Rodriguez-Martinez, H. 2000. Can we use *in vitro* fertilization tests to predict semen fertility ? Anim. Reprod. Sci. 60-61 : 327-336.

Luvoni, G.C. and Pellizzari, P. 2000. Embryo development *in vitro* of cat oocytes cryopreserved at different maturation stages. Theriogenology 53: 1529-1540.

Lynham, J.A. and Harrison, R.A.P. 1998. The use of stored pig eggs to assess boar sperm fertilizing functions *in vitro*. Biol. Reprod. 58 : 539-550.

Mattioli, G., Galeati, G. and Moretti, M. 1990. Use of stored zonae pellucidae for the assessment of the fertilizing capacity of boar semen. Proc. 11th IPVS Congress. Lausanne, Switzerland, 1-5 July : 478 (abstr.)

Martinez, E., Vazquez, J.M., Matas, C., Roca, J., Coy, P. and Gadea, J. 1993. Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. Theriogenology 40 : 547-557.

Martino, A., Songsasen, N. and Leibo, S.P. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. Biol. Reprod. 54 : 1059-1069.

Matas, C., Martinez, E., Vazquez, J.M., Roca, J. and Gadea, J. 1996. *In vitro* penetration assay of boar sperm fertility : effect of various factors on the penetrability of immature pig oocytes. Theriogenology 46: 503-513.

Musikthong, J., Techakumphu, M. and Singlor, J. 1999. The effect of the length of time pig semen has been preserved on *in vitro* fertilizaton success. Thai J. Vet Med.29(3): 61-70.

Nagy, Sz., Hazas, G., Balipapp, A., Ivancsics, J., Szasz, F., Szasa Jr, F., Kovacs, A. and Foote, R.H. 1999. Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy. Therigenology 52 : 1153-1159.

Niemann, H. 1991. Cryopreservation of ova and embryos from livestock : Current status and research needs. Theriogenology 35: 109-124.

O'Brien, J.K., Dwarte, D., Ryan, J.P., Maxwell, W.M.C. and Evans, G. 2000. Comparison of *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization, metabolism and ultrastructure of oocytes from prepubertal and adult pigs. Reprod. Dom. Anim. 35 : 101-107.

Pursel, V.G., Wall, R.J., Rexroad, C.E., Hammer, R.E. and Brinster, R.L. 1985. A rapid whole mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. Theriogenology 24: 687-691.

Shaw, J.M., Oranratnachai, A. and Trounson, A.O. 2000. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. Theriogenology 53 : 59-72.

Sirivaidyapong, S., Cheng, F.P., Marks, A., Voorhout, W.F., Bevers, M.M. and Colenbrander, B. 2000. Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm.Theriogenology 53 :789-802.

Strom Holst, B., Larsson, B., Linde-Forsberg, C. and Rodriguez-Martinez, H. 2000. Sperm capacity and ultrastructure of the zona pellucida of stored canine oocytes. J. Reprod. Fert. 119 : 77-83.

Techakumphu, M., Tantasuparuk , W. and Adulyanubab, W. 1999. The use of *in vitro* fertilization to evaluate boar semen fertilizing ability. Thai J. Vet Med .29(4): 31-40.

Vajta, G. 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. Anim. Reprod. Sci. 60-61 : 357-364.

Yanagimachi, R. 1984. Zona-free hamster eggs: Their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. Gamete Res. 10: 187-232.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Use of fresh, salted-stored and frozen immature and matured oocytes to assess penetration ability in boar

Adisorn Adirekthaworn[1] Mongkol Techakumphu[2] and Saroj Gnamkum[3]

Abstract

The objective of this study was to compare the penetration rate of sperm, collected from Landrace Boar A and Landrace Boar B, in fresh, salt-stored and frozen immature and matured oocytes. The first experiment, performing in immature oocyte, were found that the penetration rates among the three groups of oocytes from Boar A were following 59.6% (59/99), 78.1%(75/96) and 77.8%(77/99) ($p<0.05$) and the number of sperm per oocyte were 2.79±0.42, 2.97±0.29 and 2.29±0.26 respectively ($p>0.05$). While in Boar B, the percentages among the groups were 65.3%(62/95), 76.8%(73/95) and 77.8%(77/99) and the sperm per oocyte were 2.25±0.28, 3.63±0.42 and 2.57±0.36. The highest value was found in salted-stored group ($p<0.05$). The second experiment involved the sperm penetration in *in vitro* matured oocytes. It was found that no difference has been found for the sperm penetration rate and the number of sperm per oocyte in Boar A which were 85.1%(74/87), 86.1%(56/65) and 89.1%(79/88); 13.87±1.45, 17.69±2.61 and 14.45±1.75. While in Boar B, the lowest penetration rate was found in fresh oocyte compared to the two other group; 52.6%(50/95), 67.3%(64/95) and 69.1%(67/97)($p<0.05$). The sperm per oocyte was also inferior in fresh oocyte than salted-stored and frozen; 1.55±0.31, 2.80±0.35 and 2.87±0.40 ($p<0.05$) respectively. It can be drawn from the experiment that a) there are significant different of sperm penetration ability among the boar used and b) the type of oocytes; immature v/s matured and fresh v/s salted-stored v/s frozen influenced the result obtained. It is possible to apply this *in vitro* penetration assay to determine the boar semen fertility in field.

Key words: oocyte, boar, sperm penetration, oocyte preservation

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

[1] Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University
[2] Department of Obstetrics Gynaecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University
[3] Department of Livestock Development , Ministry of Agriculture and Cooperatives