# บทที่ 2

## วัสดุอุปกรณ์ ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย

<u>วัสดุที่ใช้ในงานวิจัย</u>

1. สารเคมีสำหรับเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิภายนอกร่างกาย ( *In vitro* maturation media ) ( สารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของน้ำยาเคมีอยู่ในภาคผนวก )

2. สารเคมีสำหรับเตรียมน้ำยาเพื่อทำการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย ประกอบด้วย

2.1 Fecondation media ( สูตรการเตรียมน้ำยาเคมีอยู่ในภาคผนวก )

2.2 *In vitro* fertilization media ประกอบด้วย

- Fecondation media ( ยังไม่ได้ปรับ pH )
- Fecondation media pH 7.6
- น้ำยา PHE ( penicillamine, hypotaurine, epinephrine ) + heparin ( สารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของน้ำยาเคมีอยู่ในภาคผนวก )

3. สารเคมีสำหรับเตรียมน้ำยาเลี้ยงตัวอสุจิให้พร้อมก่อนปฏิสนธิ ( capacitation media ) ประกอบด้วย

- Capacitation media ( ยังไม่ได้ปรับ pH )
- Capacitation media pH 7.2 ( สูตรการเตรียมน้ำยาเคมีอยู่ในภาคผนวก )

4. สารเจือจางน้ำเชื้อ

- BTS ( Beltsville Thawing Solution ) ( Ref. 2A 854 )

5. สารป้องกันการแช่แข็ง

- Glycerol ( Merck Lot. No. 210 K 17537994 )
- Egg Yolk

6. สารเคมีสำหรับเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อนหลังปฏิสนธิภายนอกร่างกาย

- $B_2$ medium ( C.C.D. Lab. Lot. Ch. B 704015 A )
- Fetal calf serum ( FCS )

**อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย**

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บรังไข่
   - กระปุกพลาสติก
   - กรรไกรและปากคีบ ( forceps )
2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเจาะดูดโอโอไซต์จากรังไข่และตรวจหาโอโอไซต์
   - ไซริงค์พลาสติกขนาด 5 ซีซี และเข็มเบอร์ 19
   - จานแก้ว , จานหลุมแก้วและหลอดทดลองแก้ว
   - ยีมาโตคริคทิว และสายยางดูดโอโอไซต์
   - ไมโครปิเปตและหัวทิปพลาสติก
   - กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอสโคป ( inverted microscope )
3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการรีดเก็บน้ำเชื้อและตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ
   - กระบอก ( flask ) และถุงมือยางสำหรับรีดน้ำเชื้อ
   - กล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสง ( phase contrast microscope )
   - ปิเปตพร้อมสายยางดูดและไซริงค์พลาสติกขนาด 5 ซีซี
   - สไลด์และกระจกปิดสไลด์
   - สไลด์นับตัวอสุจิ ( haemocytometer )
   - เครื่องมืออุ่นสไลด์ ( warm plate )
4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ( water bath )
5. เครื่องปั่นสารและเครื่องปั่นแยกตะกอน ( centrifuge )
6. เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง ( pH meter )
7. เครื่องมือที่ใช้ปั่นรวมสารให้เข้ากัน ( manetic stirrer )
8. ตู้อบชนิด $CO_2$ หรือตู้เพาะเลี้ยงตัวอ่อน
9. ลามินาร์โฟล ( laminar flow )

**ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย ( การทดลอง )**

การตรวจสอบความสามารถในการปฏิสนธิประกอบด้วยขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. การเตรียมน้ำเชื้อ
2. การเตรียมโอโอไซต์
3. การปฏิสนธิในหลอดทดลอง

**การเตรียมน้ำเชื้อ**

1. การรีดน้ำเชื้อ รีดน้ำเชื้อจากพ่อสุกรอายุ ประมาณ 2 ปี จำนวน 2 ตัว คือสุกรเอ ( Boar A ) และสุกรบี ( Boar B ) ซึ่งเลี้ยงไว้ในคอกสุกรของภาควิชาสูติศาสตร์เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ จังหวัดนครปฐม ใส่ในกระบอก ( flask ) ที่หุ้มกระดาษกันแสงและใช้ผ้าก็อสปุปากกระบอกเพื่อกรองเม็ดสาคูที่ได้จากการรีดน้ำเชื้อ และเก็บน้ำเชื้อทุกส่วนที่รีดได้ ( whole semen ) ไปปั่นแยกด้วยความเร็ว 1000 g นาน 4 นาทีดูดส่วนบน ( supernatant ) ทิ้ง แบ่งตะกอนน้ำเชื้อใส่หลอดทดลอง 3 หลอด หลอดละ 2 มิลลิลิตร แต่ละหลอดนำไปใช้ในข้อ 3

2. การเจือจางน้ำเชื้อและการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ

2.1 นำสารเจือจางน้ำเชื้อชนิดบี ที เอส ซึ่งอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส แล้วมาเจือจางน้ำเชื้อในอัตราส่วน 1 : 1 เขย่าให้เข้ากันเบา ๆ

2.2 แบ่งน้ำเชื้อหลังเจือจางมาตรวจคุณภาพน้ำเชื้อหลังจากรีดเก็บน้ำเชื้อ ( รูปที่ 2.4 ) โดยดูการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสง ( phase contrast ) และใช้เกณฑ์การตัดสินอัตราการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิแบบระบบอเมริกา โดยตัดสินเอาเฉพาะตัวอสุจิที่มีการเคลื่อนไหวไปข้างหน้าเท่านั้นและแบ่งอัตราการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิเป็นเปอร์เซนต์ดังนี้

1. ตัวอสุจิที่มีอัตราการเคลื่อนไหวอยู่ระหว่าง 0 - 20 % : ไม่มีการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิไปข้างหน้าเลย

2. ตัวอสุจิที่มีอัตราการเคลื่อนไหวอยู่ระหว่าง 20 - 40 % : มีการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิไปข้างหน้าบ้างเล็กน้อย

3. ตัวอสุจิที่มีอัตราการเคลื่อนไหวอยู่ระหว่าง 40 - 60 % : มีการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิไปข้างหน้าบ้างพอสมควร

4. ตัวอสุจิที่มีอัตราการเคลื่อนไหวอยู่ระหว่าง 60 - 80 % : มีการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิไปข้างหน้ามากพอสมควร

5. ตัวอสุจิที่มีอัตราการเคลื่อนไหวอยู่ระหว่าง 80 - 100 % : มีการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิไปข้างหน้าดีมาก

สำหรับการตรวจความเข้มข้นของตัวอสุจิได้เลือกใช้วิธี haemocytometer ซึ่งขั้นตอนในการตรวจหาความเข้มข้นของตัวอสุจิมีดังนี้คือ

- เตรียมสไลด์นับเม็ดเลือด ( haemocytometer ) โดยวางกระจกบางปิดทับบนตารางทั้ง 2 ด้าน
- เขย่าน้ำเชื้อเบา ๆ เพื่อให้น้ำเชื้อผสมเข้ากัน
- ใช้ปิเปตสำหรับเม็ดเลือดแดงต่อกับสายยางดูด แล้วดูดน้ำเชื้อขึ้นมาจนถึงขีด 0.5
- ดูดสารละลาย 3 % NaCl เข้าไปจนถึงขีด 101 ทำให้อัตราการเจือจางเท่ากับ 1 : 200
- ปิดปลายปิเปตแต่ละด้านด้วยหัวแม่มือและนิ้วชี้แล้วเขย่า เพื่อให้น้ำเชื้อและสารเจือจางผสมเข้ากันดี
- หลังจากเขย่า หยดส่วนผสมทิ้งไป 2 - 3 หยด
- แตะปลายปิเปตเข้ากับขอบของสไลด์นับเม็ดเลือด ปล่อยน้ำเชื้อที่เจือจางให้ไหลเข้าใต้แผ่นกระจกบางปิดทับ ระวังอย่าให้มีฟองอากาศหรืออย่าปล่อยจนล้น
- ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า
- นับจำนวนตัวอสุจิทั้งหมดใน 5 ช่องใหญ่ ซึ่งแต่ละช่องมี 16 ช่องเล็กโดยนับช่องมุมทั้งสี่และช่องกลาง ( สำหรับฮีโมไซโตมิเตอร์แบบนอยบราวเออร์ ซึ่งเป็นที่นิยมใช้กัน ) และนับจำนวนตัวอสุจิทั้งหมดอีกด้านหนึ่งของสไลด์นับเม็ดเลือดแล้วนำจำนวนตัวอสุจิที่นับได้ทั้งหมดจาก 2 ด้านของสไลด์นับเม็ดเลือดมาหาค่าเฉลี่ย และนำค่าเฉลี่ยที่ได้มาคูณด้วย $10^7$ จะเป็นค่าความเข้มข้นของตัวอสุจิมีหน่วยเป็น จำนวนตัวอสุจิต่อมิลลิลิตร ( เตือนตา , 2533 )

เมื่อตรวจคุณภาพน้ำเชื้อเรียบร้อยแล้วนำน้ำ เชื้อไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อเริ่มต้นทำการเก็บน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส และ - 196 องศาเซลเซียสต่อไป

3. การเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ ณ อุณหภูมิที่แตกต่างกัน

3.1 การเก็บน้ำเชื้อสดไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

3.1.1 เมื่อทำการรีดเก็บน้ำเชื้อตามข้อ 1, เจือจางน้ำเชื้อพร้อมทั้งตรวจคุณภาพน้ำเชื้อตามข้อ 2 แล้วนำน้ำเชื้อไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมงแบ่งน้ำเชื้อมาตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ ( วันที่ 0 ) ในด้านการเคลื่อนไหวโดยใช้เกณฑ์ตัดสินอัตราการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิดังที่กล่าวแล้วข้างต้นและตรวจความเข้มข้นของตัวอสุจิหลังทำการ swim up ในน้ำยา capacitation แล้วด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์ แล้วนำไปปฏิสนธิภายนอกร่างกายกับโอโอไซต์ที่เตรียมไว้ และเก็บน้ำเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสต่ออีก 2 , 4 และ 6 วัน ซึ่งขั้นตอนการ swim up ทำได้โดยดูดน้ำเชื้อมา 200 ไมโครลิตร แล้วค่อย ๆ ใส่น้ำเชื้อลงในน้ำยา capacitation ซึ่งปรับความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 7.2 แล้วเก็บไว้ในตู้อบ ( incubator ) ที่ 5 % $CO_2$ อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มีความชื้นเต็มที่ประมาณ 4 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวอสุจิที่แข็งแรงว่ายขึ้นสู่ผิวน้ำยา capacitation ( swim up )

3.1.2 เมื่อเก็บน้ำเชื้อไว้เป็นระยะเวลา 2, 4 และ 6 วันแล้วต้องนำน้ำเชื้อมาตรวจคุณภาพน้ำเชื้อในด้านการเคลื่อนไหวและความเข้มข้นของตัวอสุจิหลัง swim up ก่อนนำไปผสมกับโอโอไซต์ โดยเขย่าน้ำเชื้อให้เข้ากันเบา ๆ ดูดน้ำเชื้อมา 5 ไมโครลิตร หยดลงบนกระจกสไลด์ซึ่งอุ่นด้วย warm plate แล้ว ตรวจดูอัตราการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิวันที่ 2 , 4 , 6 ด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เกณฑ์ดังที่กล่าวแล้วข้างต้นและตรวจความเข้มข้นของตัวอสุจิหลังทำการ swim up แล้วด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์วันที่ 2, 4, 6 และนำน้ำเชื้อที่ตรวจคุณภาพเรียบร้อยแล้วมาปฏิสนธิภายนอกร่างกายกับโอโอไซต์ที่เตรียมไว้ในวันที่ 2, 4 , 6

3.2 การเก็บน้ำเชื้อสดไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

3.2.1 นำน้ำเชื้อซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสประมาณ 2 ชม.( หลอดที่ 2 ) มาปั่นแยกด้วยความเร็ว 1000 g นาน 4 นาที ดูดส่วนบน ( supernatant ) ทิ้งแล้วเติมสารเจือจางน้ำเชื้อซึ่งประกอบด้วย บี ที เอส + 1 % กลีเซอรอลและ ไข่แดง ( ประมาณ 1 ซีซี ต่อสารเจือจางน้ำเชื้อ 10 ซีซี ) ลงไปเจือจางน้ำเชื้อในอัตราส่วน 1 : 1 เขย่าให้เข้ากันเบา ๆ และค่อย ๆ ลดอุณหภูมิลงอย่างช้า ๆ จนถึง 5 องศาเซลเซียสแล้วเก็บไว้ประมาณ 4 ชม. แบ่งน้ำเชื้อมาตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ ( วันที่ 0 ) ในด้านการเคลื่อนไหวและตรวจดูความเข้มข้นของ

ตัวอสุจิที่มีชีวิตรอดหลัง swim up ด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์ แล้วนำไปปฏิสนธิภายนอกร่างกายกับโอโอไซต์ที่เตรียมไว้และเก็บน้ำเชื้อส่วนที่เหลือไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสต่ออีก 2, 4, 6 วัน

3.2.2 เมื่อเก็บน้ำเชื้อไว้เป็นระยะเวลา 2, 4 และ 6 วันแล้วต้องนำน้ำเชื้อมาตรวจคุณภาพน้ำเชื้อก่อนนำไปปฏิสนธิกับโอโอไซต์ โดยผสมน้ำเชื้อให้เข้ากันเบา ๆ ดูดน้ำเชื้อ มา 5 ไมโครลิตรหยดลงบนกระจกสไลด์ซึ่งอุ่นด้วย warm plate แล้ว ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ตรวจดูอัตราการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิวันที่ 2 , 4 , 6 และตรวจความเข้มข้นของตัวอสุจิที่มีชีวิตรอดหลัง swim up ด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์ วันที่ 2, 4, 6 นำน้ำเชื้อที่ตรวจคุณภาพแล้วมาปฏิสนธิภายนอกร่างกายกับโอโอไซต์ที่เตรียมไว้ในวันที่ 2, 4 , 6

3.3 <u>การเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ - 196 องศาเซลเซียส</u>

3.3.1 นำน้ำเชื้อซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชม.( หลอดที่ 3 ) มาปั่นแยกด้วยความเร็ว 1000 g นาน 4 นาที ดูดส่วนบนทิ้ง แล้วเติมสารเจือจางน้ำเชื้อซึ่งประกอบด้วยบี ที เอส + 1 % กลีเซอรอล และ ไข่แดง ( ประมาณ 1 ซีซี ต่อสารเจือจางน้ำเชื้อ 10 ซีซี ) ลงไปเจือจางน้ำเชื้อในอัตราส่วน 1 : 1 เขย่าให้เข้ากันเบา ๆ และค่อย ๆ ลดอุณหภูมิลงอย่างช้า ๆ จนถึง 5 องศาเซลเซียส เก็บไว้นานประมาณ 4 ชม.

3.3.2 หยดน้ำเชื้อลงบนท่อนน้ำแข็งแห้งซึ่งเจาะเป็นรูแล้วประมาณ 2 หยด ( 100 ไมโครลิตร ) ต่อหลุม ทิ้งไว้ประมาณ 2 - 3 นาที น้ำเชื้อจะแข็งเป็นเม็ด บรรจุน้ำเชื้อเป็นเม็ดลงในหลอด ( cryo tube ) ทำรหัสพ่อพันธุ์, วันที่ผลิตและสถานที่ผลิตแล้วใส่ลงในไนโตรเจนเหลว เก็บที่อุณหภูมิ - 196 องศาเซลเซียส ประมาณ 4 ชม. หลังจากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งส่วนหนึ่งมาทำให้ละลาย ( thawing ) ในสารเจือจางน้ำเชื้อชนิด บี ที เอส แบ่งน้ำเชื้อมาตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ ( วันที่ 0 ) ในด้านการเคลื่อนไหวและความเข้มข้นของตัวอสุจิที่มีชีวิตรอดหลัง swim up ตามขั้นตอนดังที่กล่าวแล้วข้างต้น นำน้ำเชื้อที่ตรวจคุณภาพแล้วไปปฏิสนธิภายนอกร่างกายกับโอโอไซต์ที่เตรียมไว้ ( วันที่ 0 )

3.3.3 เมื่อเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งไว้เป็นระยะเวลา 2, 4 , 6 วันแล้ว ก่อนนำเชื้อไปปฏิสนธิกับโอโอไซต์ต้องนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาทำให้ละลายในสารเจือจางน้ำเชื้อชนิด บี ที เอส ก่อน และตรวจคุณภาพน้ำเชื้อทั้งในด้านการเคลื่อนไหวและความเข้มข้นของตัวอสุจิที่มี

ชีวิตรอดหลัง swim up วันที่ 2, 4, 6 แล้วจึงนำไปปฏิสนธิภายนอกร่างกายกับโอโอไซต์ที่เตรียมไว้

4. <u>การเตรียมตัวอสุจิสำหรับทำการปฏิสนธินอกร่างกาย</u>

4.1 ดูดน้ำเชื้อหลังเจือจางประมาณ 200 ไมโครลิตร แล้วค่อย ๆ ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำยาแคพปาซิเตชั่น ( capacitation ) ชนิด TALP ที่มีความเป็นกรด - ด่าง 7.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อให้ตัวอสุจิที่แข็งแรงว่ายขึ้นสู่ผิวน้ำยาแคพปาซิเตชั่น ( swim up ) นาน 4 ชั่วโมงในตู้อบที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มี 5 % $CO_2$ และความชื้นเต็มที่

4.2 ดูดแยกตัวอสุจิที่บริเวณส่วนบนของน้ำยาแคพปาซิเตชั่น แล้วนำมาปั่นแยกด้วยความเร็ว 1000 g นาน 4 นาที หลังจากนั้นดูดน้ำยาส่วนบนทิ้ง

4.3 แยกเอาเฉพาะส่วนที่ตกตะกอนไปตรวจดูการเคลื่อนไหวอีกครั้งและคำนวณปริมาณให้ได้ความเข้มข้นของตัวอสุจิ 1 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร โดยจะใช้น้ำเชื้อ 20 ไมโครลิตร สำหรับน้ำเชื้อสดเจือจางซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสและ 5 องศาเซลเซียส ส่วนน้ำเชื้อแช่แข็งซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ - 196 องศาเซลเซียส จะใช้น้ำเชื้อ 30 - 40 ไมโครลิตร ในการผสมกับโอโอไซต์ในจานหลุมพลาสติกชนิด 4 หลุมที่มีโอโอไซต์อยู่ประมาณ 10 ใบต่อหลุม

**<u>การเตรียมโอโอไซต์</u>**

1. <u>การเก็บโอโอไซต์</u>

1.1 เก็บรังไข่ของสุกรสาว ( รูปที่ 2.1 ) จากโรงฆ่าสัตว์ท้องถิ่น อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐมแต่ละครั้งประมาณ 10 รังไข่ แล้วล้างรังไข่ด้วยน้ำเกลือ 0.9 % อุ่นที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และนำกลับไปยังห้องปฏิบัติการภายใน 2 ชั่วโมง

1.2 เจาะฟอลลิเคิลขนาด 3 - 5 มิลลิเมตร โดยใช้ไซริงค์ขนาด 5 ซีซีและเข็มเบอร์ 19 เพื่อดูดโอโอไซต์ออกมาใส่ในน้ำยา TCM - 199 2.5 mMHepes ประมาณ 2 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดทดลอง

1.3 ตรวจหาโอโอไซต์และคัดคุณภาพของโอโอไซต์จากของเหลวที่ได้จากการเจาะฟอลลิเคิลในน้ำยา TCM-199 2.5 mMHepes ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอสโคปกำลังขยาย 10 - 40 เท่า เลือกเอาเฉพาะโอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบ ( partial cumulus oocytes and compact cumulus oocytes ) ( รูป 2.2 ) มาเลี้ยงในหลอดทดลองเพื่อ

ให้เกิดความพร้อมที่จะปฏิสนธิโดยจากการกระจายตัวของเซลล์คิวมูลัส เรียกโอโอไซต์ระยะนี้ว่า expand cumulus oocytes ( รูปที่ 2.3 ) ในน้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์รวมกับเซลล์แกรนูโลซา

2. <u>การเตรียมเซลล์แกรนูโลซา</u>

2.1 นำน้ำยาเก็บโอโอไซต์ที่เหลือจากการตรวจหาโอโอไซต์ออกแล้ว มาปั่นแยกเอาเซลล์แกรนูโลซาและเซลล์คิวมูลัสออกด้วยความเร็ว 1500 g นาน 10 นาที

2.2 ล้างเซลล์แกรนูโลซาอีก 1 - 2 ครั้งด้วยน้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์

2.3 ดูดเอาส่วนที่ตกตะกอนจำนวน 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในน้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์เพื่อพร้อมปฏิสนธิร่วมกับโอโอไซต์ ทิ้งไว้นาน 30 นาทีก่อนใส่โอโอไซต์ลงไป

3. <u>การเลี้ยงโอโอไซต์เพื่อให้เกิดสภาวะพร้อมที่จะปฏิสนธิ</u>

3.1 ล้างโอโอไซต์ที่ได้จากการเจาะฟอลลิเคิล 2 ครั้งในน้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์ชนิด TCM - 199 $NaHCO_3$ + 10 *u*g / ml FSH / LH + 10 *u*g / ml Estradiol-17$_B$ + 10 % Gilt Estrous Serum ( GES ) ซึ่งใช้ซีรั่มจากสุกรสาวที่เป็นสัด

3.2 ทำการเลี้ยงโอโอไซต์ในน้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ดังกล่าวข้างต้น ร่วมกับเซลล์แกรนูโลซานาน 40 ชั่วโมงในตู้อบที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มี 5 % $CO_2$ และความชื้นเต็มที่ เพื่อให้โอโอไซต์เจริญพร้อมที่จะปฏิสนธิ

<u>การทำการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย</u>

1. นำโอโอไซต์ที่เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์เพื่อให้พร้อมปฏิสนธิครบ 40 ชั่วโมงมาประมาณ 40 ใบ ล้างในน้ำยาสำหรับทำการปฏิสนธินอกร่างกาย ( IVF media ) ซึ่งมีสาร PHE ( Penicillamine 25 ug / ml + Hypotaurine 25 ug / ml + Epinephrine 10 ug / ml ) และ Heparin 10 ug / ml ที่มีความเป็นกรด-ด่าง 7. 6 ผสมกับตัวอสุจิที่เตรียมไว้ ( ประมาณ 20 ไมโครลิตร สำหรับน้ำเชื้อสดซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส และ ประมาณ 30 - 40 ไมโครลิตรสำหรับน้ำเชื้อแช่แข็ง ซึ่งมีอัตราการเคลื่อนไหว 70 - 100 % สำหรับน้ำเชื้อสดและมีการเคลื่อนไหวประมาณ 50 - 70 % สำหรับน้ำเชื้อแช่แข็ง ) ในจานหลุมพลาสติกชนิด 4 หลุมที่มีโอโอไซต์อยู่ประมาณ 10 ใบต่อหลุม

2. นำจานหลุมพลาสติกใส่ในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียสภายใต้บรรยากาศที่มี 5 % $CO_2$ และความชื้นเต็มที่เป็นเวลานาน 20 ชั่วโมง

3. ตรวจการปฏิสนธิและความผิดปกติหลังทำการปฏิสนธินอกร่างกาย โดยสุ่มตัวอย่างโอโอไซต์หลังการผสมกับอสุจิ 20 ชั่วโมงมาประมาณ 10 % ( 4 ใบจาก 40 ใบ ) ทำการ Fixed ด้วยน้ำยา acetic acid : absolute alcohol ( 1 : 3 ) เป็นเวลานานประมาณ 10 - 20 วันแล้วย้อมด้วยสี aceto - orcein ( 1 % orcein ) ( W / V ) ใน ( 45 % acetic acid ) ( V / V ) แล้วส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสง ( phase contrast ) กำลังขยาย 400 เท่าในการปฏิสนธิปกติจะพบ

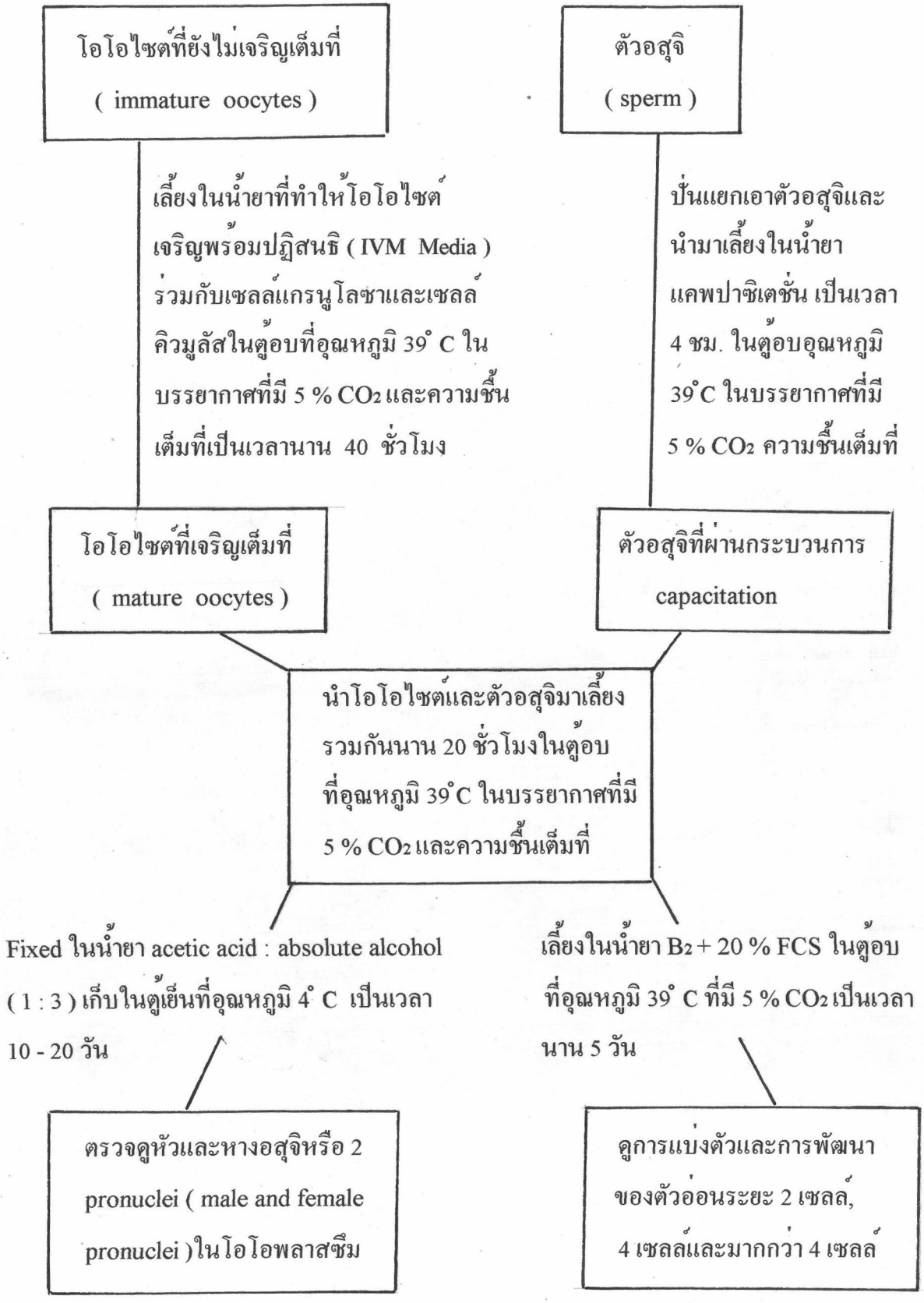
3.1 หัวอสุจิและหางอสุจิในโอโอพลาสซึม

3.2 โพรนิวคลีอายด์ 2 อันในโอโอพลาสซึม ( male and female pronuclei )

<u>การเลี้ยงตัวอ่อนหลังปฏิสนธิภายนอกร่างกาย</u>

หลังการผสมกับตัวอสุจิ 20 ชั่วโมง นำโอโอไซต์มาลอกเอาเซลล์คิวมูลัสและตัวอสุจิส่วนเกินออกไปโดยใช้ปิเปตขนาดเล็กกว่าขนาดโอโอไซต์เล็กน้อยดูดเข้าออกหลายๆ ครั้งซึ่งเราเรียกว่า decoronization และนำมาเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อน $B_2$ medium + 20 % FCS ( fetal calf serum ) ในตู้อบที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มี 5 % $CO_2$ และความชื้นเต็มที่ เพื่อดูการแบ่งตัวและการพัฒนาของตัวอ่อนทุก 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 3 -5 วันจนได้อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนเป็น 2 เซลล์และมีการพัฒนาการแบ่งตัวเข้าสู่ระยะ 4 เซลล์ ไปจนถึงระยะมากกว่า 4 เซลล์

สรุปขั้นตอนของการทำการปฏิสนธิภายนอกร่างกายโดยแสดงในรูปไดอะแกรมได้ดังต่อไปนี้

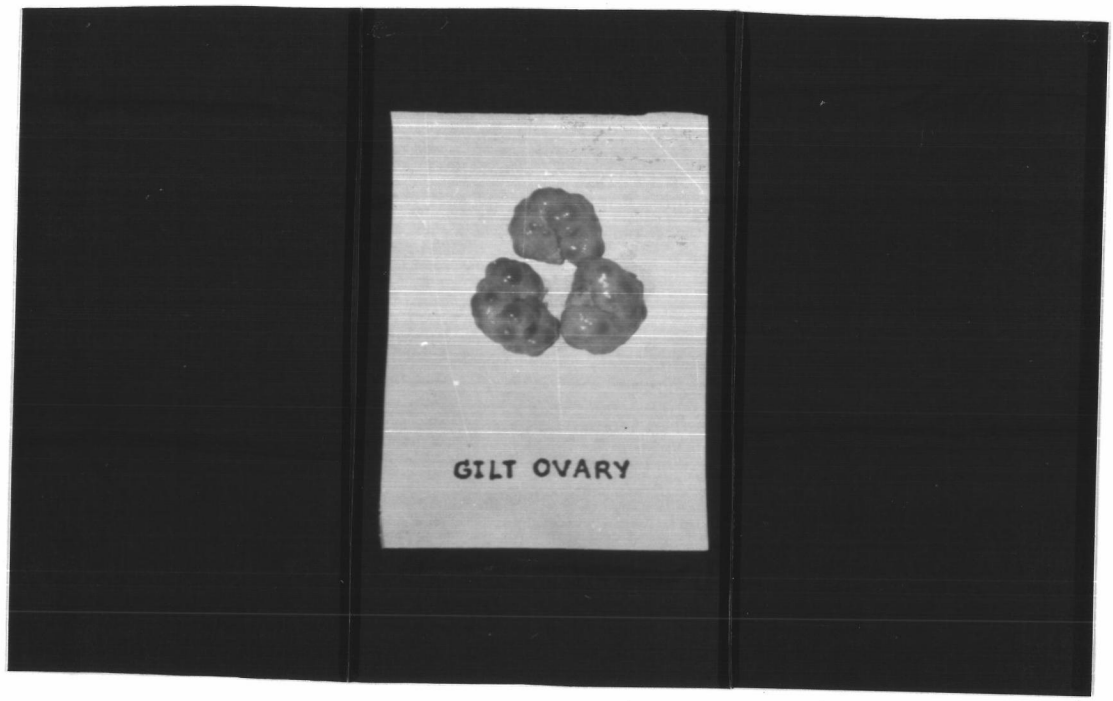


<u>สถิติวิเคราะห์</u>

ใช้วิธีการวิเคราะห์ทางสถิติชนิด Paired t - test ทดสอบความแตกต่างของคุณภาพน้ำเชื้อสดหลังเจือจางและน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 0 , 2 , 4 , 6 วัน ในด้านการเคลื่อนไหวและความเข้มข้นของตัวอสุจิ

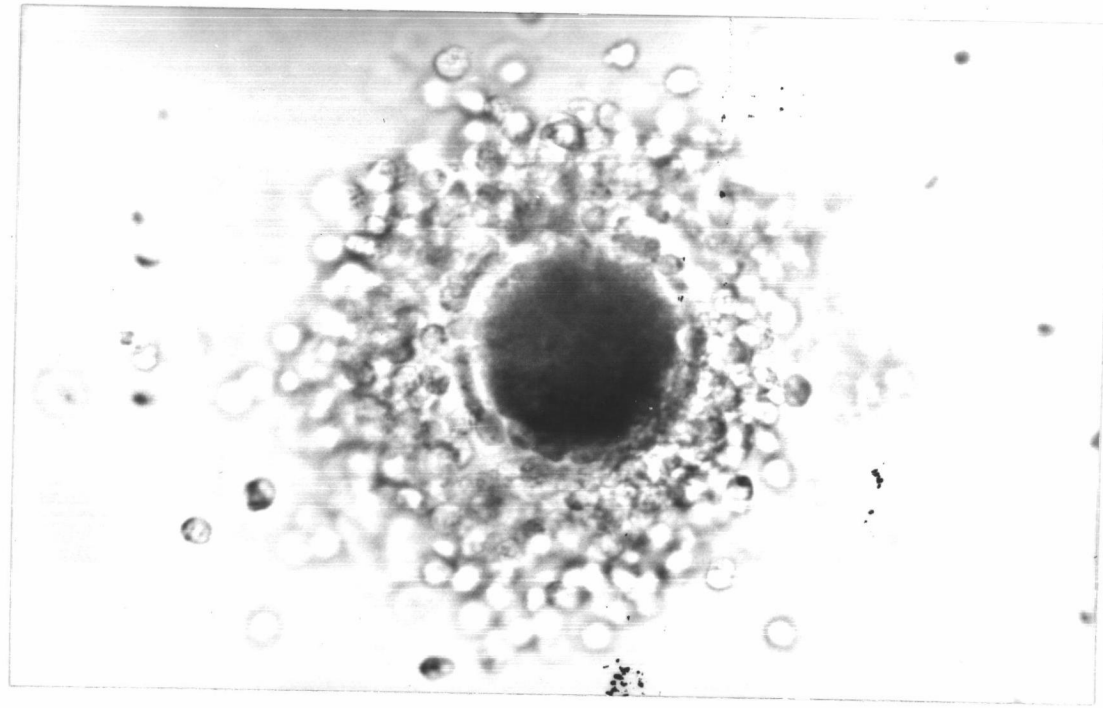
ใช้วิธีการวิเคราะห์ทางสถิติชนิด Chi square ทดสอบความแตกต่างของอัตราความสำเร็จในการปฏิสนธิภายนอกร่างกายจากอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อน ตามระยะเวลาที่เก็บน้ำเชื้อสดหลังเจือจางและเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งเป็นระยะเวลา 0 , 2 , 4 , 6 วันโดยกำหนดความเชื่อมั่น $p < 0.05$ , $p < 0.01$ และ $p < 0.001$

---

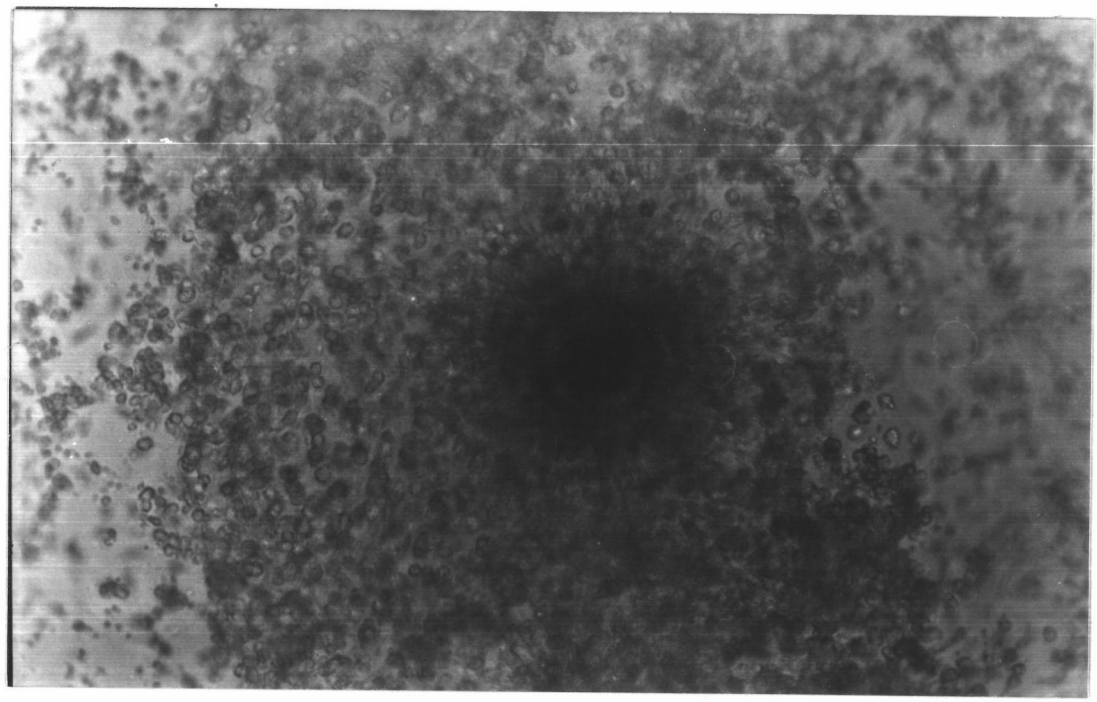



รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะรังไข่จากสุกรสาว

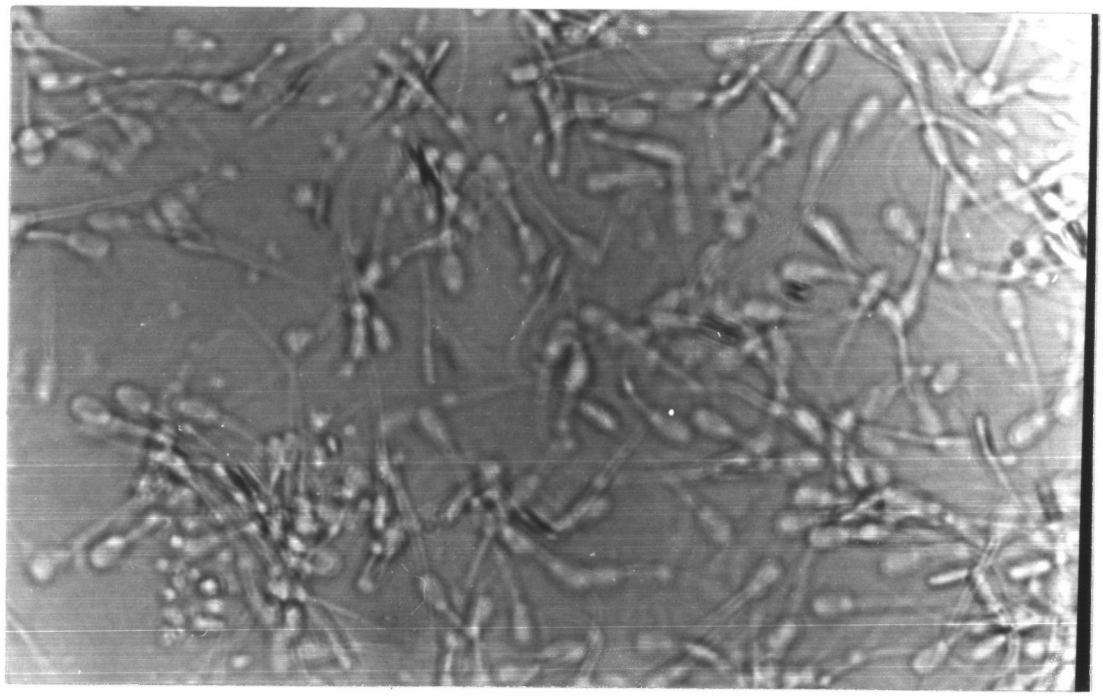
I๑๗๓๑๘๑๘X



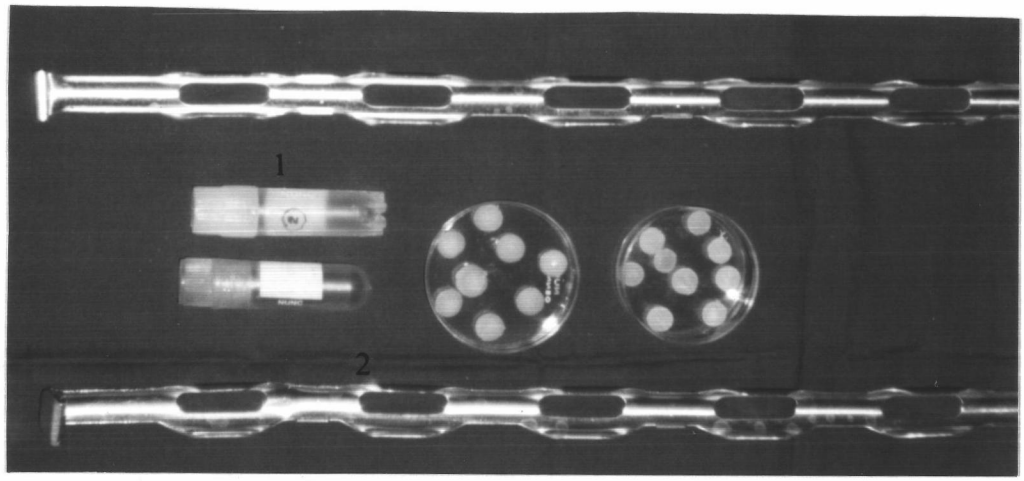
รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะโอโอไซต์ที่ยังไม่เจริญเต็มที่ชนิด compact cumulus oocytes ( กำลังขยาย 40 เท่า )



รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะโอโอไซต์ที่เจริญเต็มที่แล้ว ( expand cumulus oocytes ) ( กำลังขยาย 40 เท่า )



รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะตัวอสุจิหลังรีดเก็บน้ำเชื้อ




รูปที่ 2.5 แสดงรูปแบบน้ำเชื้อแช่แข็งแบบเม็ดและอุปกรณ์ที่ใช้เก็บน้ำเชื้อแช่แข็ง

1. Cryo tube 2. แท่งสแตนเลทใส่ Cryo tube