บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง

ใช้หนูแฮมสเตอร์สีทอง (Mesocricetus auratus) เพศเมีย อายุ 6-8 สัปดาห์ น้ำหนัก 60-100 กรัม ซึ่งได้พ่อพันธุ์และแม่พันธุ์จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นำมาเลี้ยงในห้องปรับอากาศของศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยควบคุมอุณหภูมิห้องประมาณ 70-75 องศาฟาเรนไฮซ์ แสงสว่างวันละ 14 ชั่วโมง (06:00-20:00 น.) และความมืด 10 ชั่วโมง (20:00-06:00 น.) ให้ดื่มน้ำและกินอาหารสัตว์ทดลองสำเร็จรูป (CP.082) ได้โดยไม่จำกัดตลอดเวลา ก่อนนำมาใช้ทำการทดลองจะตรวจวงจรการเป็นสัด (Oestrous cycle) ให้อยู่ในเกณฑ์ปกติ (4 วัน) ติดต่อกันอย่างน้อย 2 วงจร

Ovarian cycle of hamster

แฮมสเตอร์สีทองเป็นสัตว์ประเภทเดียวกับหนูแรท, หนูเมาซ์ และหนูตะเภา (Polyoestrus species) ซึ่ง ovarian cycle ของสัตว์พวกนี้จะไม่เปลี่ยนแปลง นอกจากเกิดการตั้งท้อง (Pregnancy) หรือการตั้งท้องเทียม (Pseudopregnancy) พบว่าแฮมสเตอร์สีทองมี ovarian cycle ที่สม่ำเสมอมีการตกไข่ (ovulation) ทุก ๆ 4 วัน แต่อาจจะเปลี่ยนแปลงได้เล็กน้อยขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งได้แก่ แสงสว่าง, อุณหภูมิ, อาหาร และความสัมพันธ์ทางสังคมของสัตว์ การเจริญเติบโตของ follicles และการตกไข่ถูกควบคุมโดยฮอร์โมน gonadotropins (FSH และ LH) จากต่อมใต้สมองส่วนหน้า (Anterior pituitary gland)

วงจรสัด (Oestrous cycle) ของแฮมสเตอร์สีทอง แบ่งออกเป็น 4 ระยะ ดังแสดงในตารางที่ 2.1 การตกไข่จะเกิดขึ้นระหว่าง 24:00-01:00 น. ในตอนกลางคืนของวันที่เกิด heat จำนวนไข่ที่ตกจากรังไข่ทั้งสองข้างเฉลี่ยครั้งละประมาณ 10 ใบ (3-17 ใบ)

ตารางที่ 2.1 แสดงระยะเวลาของ Reproductive cycle ของแฮมสเตอร์สีทองเพศเมีย (จาก Kent, 1968)

Day of cycle	Stage of cycle	Time of day	Conditions
1	Late dioestrus	A.M.	มี leucocytes เล็กน้อย
	Proestrus	P.M.	เป็นระยะก่อนเกิด heat ซึ่งเป็นช่วงสั้น ๆ ภายในรังไข่จะมี mature follicles จำนวนมาก
	Oestrus		ตัวเมียจะเกิด heat ในตอนกลางคืน และมักจะมีการตกไข่หลังเที่ยงคืน vaginal smear จะพบ nucleated epithelial cells จำนวนมาก.
2	Oestrus	A.M.	พบเยื่อมูกที่มีลักษณะเหนียวสีขาวขุ่น ตัวเมียจะยินยอมผสมพันธุ์กับตัวผู้ ถ้าทำ vaginal smear จะพบ oval epithelial cells
	Metaoestrus		
	Early dioestrus	P.M.	ยังคงพบเยื่อมูกปากมดลูก แต่ตัวเมียจะไม่ยอมผสมพันธุ์กับตัวผู้ vaginal smear จะพบ leucocytes และ oval epithelial cells.
3	Middle dioestrus		ช่วงนี้ถ้าทำ vaginal smear จะพบ leucocytes เป็นส่วนใหญ่ และมี equamous epithelial cells เล็กน้อย
4	Late dioestrus	A.M.	ลักษณะเซลล์ที่พบจะเหมือนวันที่ 3
		P.M.	จำนวนของ leucocytes เริ่มลดลง ตัวเมียจะไม่ยินยอมผสมพันธุ์

(Austin, 1956) ไข่จะเข้าไปอยู่ในส่วนของ ampulla ของท่อนำไข่ภายหลังการตกไข่ประมาณ 3 ชั่ว-โมง (Strauss, 1956)และมี fertilizable life ประมาณ 6 ชั่วโมง (สูงสุด 13 ชั่ว-โมง) (Yanagimachi and Chang, 1961) การตรวจ ovarian cycle จากลักษณะภายนอก โดยทำการตรวจดูช่องคลอดของแฮมสเตอร์เพศเมียทุกเช้า (08.00 น.) ถ้าพบว่ามีเยื่อมูก (mucous discharge) ที่มีลักษณะเหนียว สีขาวขุ่นและมีกลิ่น ออกมาจาก vagina ขณะที่ใช้มือบีบช่องคลอดเบา ๆ ให้นับเป็นวันที่ 1 ของวงจรสัด ซึ่งตรงกับระยะ late estrus ซึ่งในช่วงนี้ยังยินยอมให้มีการผสมพันธุ์ได้

การกระตุ้นการตกไข่ (Superovulation) ในหนูแฮมสเตอร์นี้ ใช้วิธีของ Yanagimachi และคณะ(1976) ซึ่งให้ผลการตอบสนองสูงมาก โดยการฉีด PMSG 30 ยูนิต ในน้ำกลั่น 0.3 มล. เข้าช่องท้อง (Intraperitoneal injection) ในวันที่พบ post ovulatory discharge ที่เวลา 8.00-10.00 น. 56-58 ชั่วโมง ต่อมาคือในวันที่ 3 ที่เวลา 16.00-18.00 น. ฉีด HCG 30 ยูนิตในน้ำกลั่น 0.3 มล. เข้าช่องท้องเช่นกัน การใช้ช่วงเวลาระหว่างการฉีด PMSG และ HCG ที่ยาวนานนี้ Wolf และ Sokoloski (1982) พบว่าสัตว์ทดลองมีการตอบสนองสูงและได้จำนวนไข่ที่เจริญเต็มที่มากกว่าการใช้ช่วงเวลาสั้น

ห้องปฏิบัติการ

ใช้ห้องปฏิบัติการ Human In Vitro Fertilization ของหน่วยชีววิทยาการสืบพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์

1. Tri-gas processor incubator : Model 3192, Forma Scientific, Marietta, Ohio, U.S.A.
2. Laminar Flow hood : Pravit Engineering Ltd. Part. Bangkok, Thailand.

3. Stereomicroscope	: Wild M.3Z Heerbrugg Switzerland.
4. Inverted microscope	: Diaphot-TMD, Nikon, Tokyo Japan.
5. Osmometer	: Model 3WZ, Advanced instruments inc. Massachusetts, U.S.A.
6. PH meter	: Model SA 520, Orion Research incorporated Laboratory products, Boston, U.S.A.
7. เครื่อง centrifuge	: Model EBA 3S, Hettich-Zentrifugen Tuttlingen, Germany.
8. เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียด	: Model 2004 MP, Sartorius, West Germany.
9. Sperm counting chamber	: Makler, Sefi-Medical Instrument, Haifa, Israel.
10. เครื่องกรองน้ำ Milli-R04 และ Milli-Q	: Millipore corporation, Bedford, Massashusetts, U.S.A.
11. Sterile plastic filter	: Sterive G.S., Millipore Corp. Bedrord, Massashusetts, U.S.A.
12. Laboratory counter	: Clay Adams, Div. Becton, Dickinson, N.J., U.S.A.
13. Embryological watchglass	: 4 cm-square glass block with a 3 mm. diameter cavity Griffin & George Co, HJL. -630-S.

14. Plastic tissue culture dish : 3001, Falcon Div. Becton, Dickinson and Co., California, U.S.A.

15. Plastic tussue culture tube : 2063, Falcon Div. Becton. Dickinson and Co., California, U.S.A.

16. Plastic 4-well multidish : Nunclon, Roskilde, Denmark.

17. Plastic syringe 1 ml : Nipro Medical Instrument, Japan.

18. Conical centrifuge tube : Kimax, Kemble, Illenois, U.S.A.

19. eppendorf sterile tips (1-100 l : Kimax, Kemble, Illenois U.S.A.

20. Mouth pieces

21. Pasteur pipette

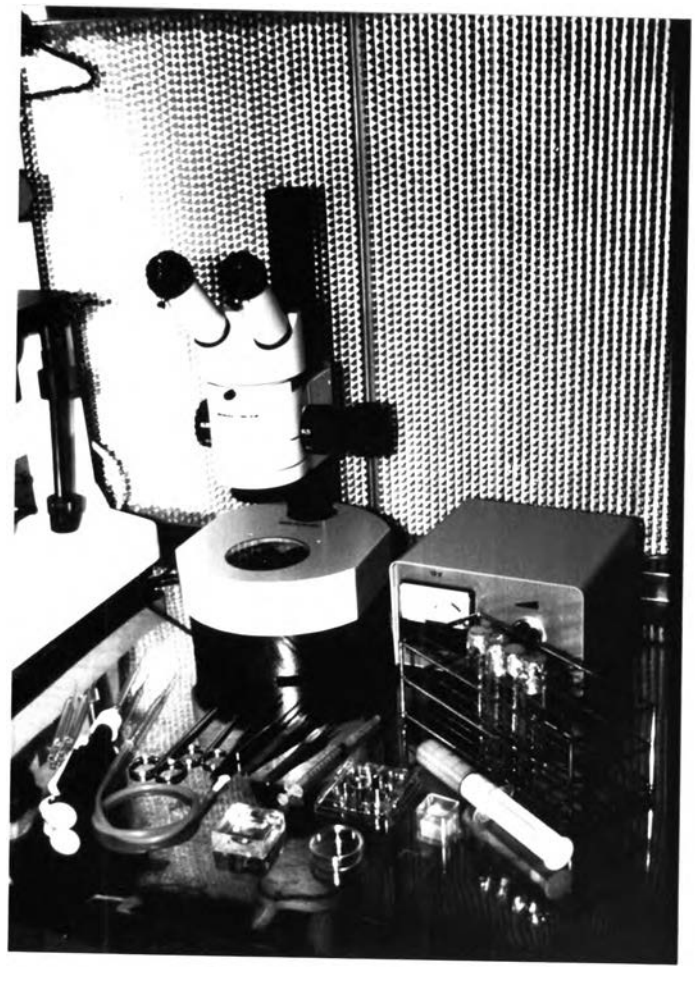
22. glass slide และ cover slip.

23. ตะเกียงแอลกอฮอล์

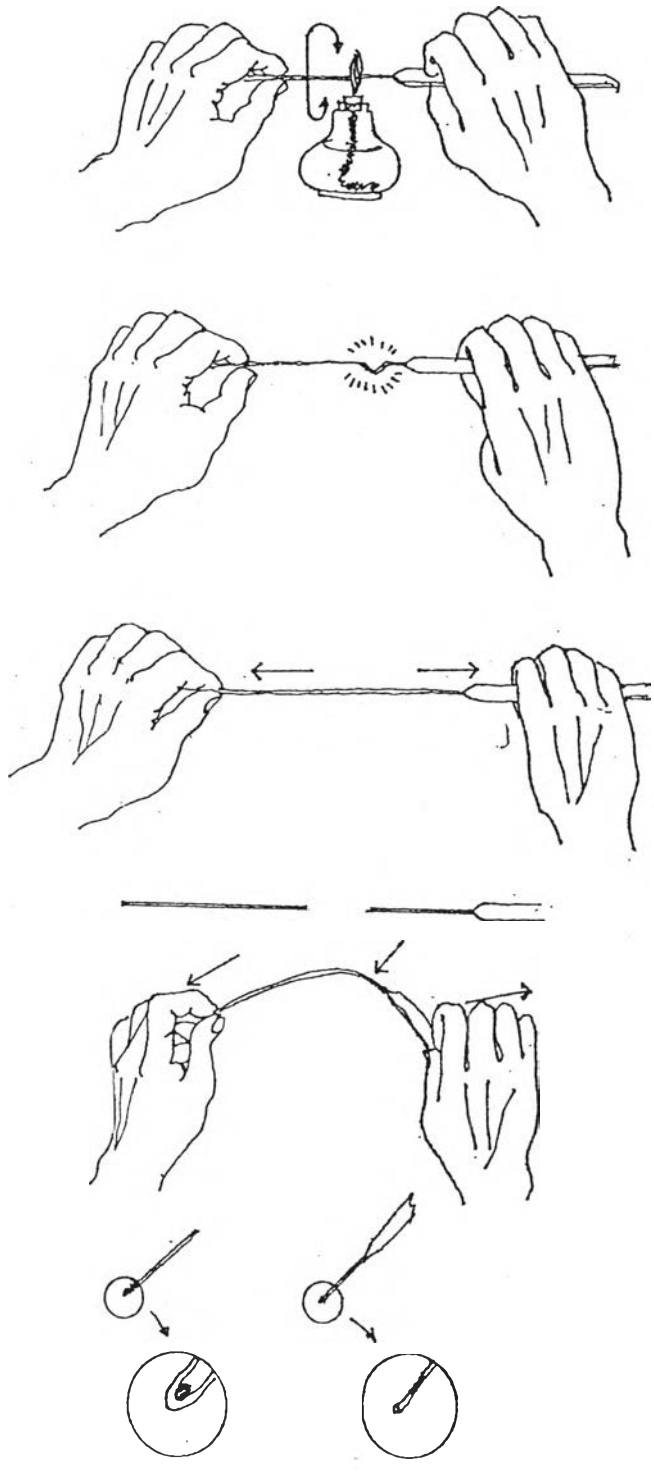
24. เครื่องมือผ่าตัดสัตว์ทดลอง ประกอบด้วย

- กรรไกรปลายมน 1 อัน
- กรรไกรปลายโค้ง 1 อัน
- Tooth forceps 1 อัน
- Arterial fine forceps 2 อัน

หมายเหตุ เครื่องมือผ่าตัดและเครื่องแก้วทุกชนิด ทำความสะอาดโดยแช่ในสารละลาย 7X 2% นาน 24 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แช่ในน้ำกลั่น 24 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 3 ครั้ง อบให้แห้ง และนึ่งฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ นาน 30 นาที รูปที่ 2.1 แสดงอุปกรณ์และเครื่องมือผ่าตัด ส่วนวิธีเตรียม capittary pipette ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.1 แสดงเครื่องมือผ่าตัดและอุปกรณ์ในการเตรียมไข่แฮมสเตอร์



รูปที่ 2.2 แสดงวิธีการดึง plasteur pipette ให้ปลายเรียวเล็ก

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้เตรียมน้ำเพาะเลี้ยง BWW และ TMPA

    1.1 Sodium Chloride (NaCl)

    1.2 Potassium Chloride (KCl)

    1.3 Calcium Chloride 2-hydrat krist ($CaCl_2 2H_2O$)

    1.4 Magnesium Sulfate 7-hydrat reinst ($MgSo_4 7H_2O$)

    1.5 Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)

    1.6 Sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4)

    1.7 Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)

    1.8 Magnesium Chloride krist. reinst. ($MgCl_2 . 6H_2O$)

    1.9 Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)

    1.10 D-Glucose

    1.11 Sodium lactate (Na lactate 60% syrup)

    1.12 Sodium pyruvate (Na pyruvate)

    1.13 Calcium lactate (Ca lactate)

    1.14 Penicillin G. sodium

    1.15 Streptomycin sulphate

    1.16 Phenol red

2. Bovine testicular hyaluronidase

3. Bovine pancreatic trypsin

4. Lacmoid

5. Glycerol

6. Mineral oil

7. Ham's F-10 powder : Flow laboratories, McLean, Verginia, U.S.A.

8. Acetic acid (Gracial): BDH chemical Ltd., Poole, England.

9. Alcohol 95% : E.Merck, Darmstadt, Germany.

10. ฮอร์โมนที่ใช้กระตุ้นการตกไข่ของสัตว์ทดลอง

10.1 Gonadotropin (Pregnant mare's serum)

10.2 Chorionic gonadotropin (Human pregnancy urine, HCG)

: Ayerst Laboratory, N.Y. U.S.A.

หมายเหตุ 1-6 และ 10.1 เป็นสารเคมีจาก Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo. U.S.A.

น้ำเพาะเลี้ยง (Culture medium)

เพื่อเปรียบเทียบความเหมาะสมของน้ำเพาะเลี้ยงต่อการทดสอบการเจาะทะลุไข่แฮมส-เตอร์ จึงเลือกใช้น้ำเพาะเลี้ยง 3 ชนิด ที่นักวิจัยหลายท่านใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับการทำ in vitro fertilization และ การเพาะเลี้ยงเอมบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ดังนี้

1. Ham's F-10 medium เป็น complex medium ที่เพิ่มโปรตีนและวิตามินต่างๆ เข้าไปจำนวนมาก ปัจจุบันเป็นที่นิยมใช้ในการศึกษา in vitro fertilization ของคนกันมาก (Lopata และคณะ, 1980; Sokoloski และ Wolf, 1984; Boldt และคณะ, 1987; Wood และคณะ, 1985;Sher และคณะ, 1986) รวมทั้งใช้ในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอในสัตว์ชนิดอื่น ๆ อีกหลายชนิดได้แก่ เอมบริโอของหนูเมาซ์ (Saito และคณะ, 1984; Shirley และคณะ, 1985; Silverman และคณะ, 1987) เอมบริโอของกระต่าย (Kane, 1985) และเอมบริโอของแกะ (Shea และคณะ, 1976; Newcomb และคณะ, 1978) นอกจากนี้ยังใช้ Ham's F-10 ในการศึกษากระบวนการ Capacitation และ acrosome reaction ของตัวอสุจิในหลอดทดลอง (Sher และคณะ, 1984) และการผสมเทียมในคน (Artificial insemination) (Goldfarb และคณะ 1984; Quagliarello และ Arny, 1986; Hugches และคณะ, 1987) และใช้ในการทดสอบการเจาะทะลุไข่แฮมสเตอร์ (Berger และคณะ, 1983)

2. BWW medium (Modified Krebs-Ringer's bicarbonate buffer, Bigger, Whitten and Whittingham, 1971) ใช้ในการศึกษา in vitro

fertilization ของหนูเมาซ์ (Fukuda และคณะ, 1987), แฮมสเตอร์ (Hanada และ Chang, 1976 a; Niwa และคณะ, 1980), กระต่าย (Brackett, 1970) และหนูแรท (Toyoda และ Chang, 1974) รวมทั้งใช้ศึกษากระบวนการ capacitation และ acrosome reaction ของตัวอสุจิคน (Perreault และ Rogers, 1982; Lambert และคณะ, 1985; Nagae และคณะ, 1986; Lees และคณะ, 1987)

3. Tyrode's modified with pyruvate and albumin (TMPA) Tyrode's medium เป็นน้ำเพาะเลี้ยงที่ดัดแปลงมาจาก krebs-Ringer's solution เป็นน้ำเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหลายชนิด แต่มีการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบบางส่วนไป สำหรับ TMPA นี้ Barros และคณะ (1979) เป็นกลุ่มแรกที่นำมาใช้ศึกษาการเจาะทะลุไข่แฮมสเตอร์โดยตัวอสุจิของคน

<u>การเตรียมน้ำเพาะเลี้ยง</u>

ส่วนประกอบของน้ำเพาะเลี้ยงสำหรับใช้ในการศึกษานี้ทั้ง 3 ชนิด แสดงในตารางที่ 2.1 BWW medium และ TMPA medium เป็น Krebs-Ringer's bicarbonate-based media สามารถเตรียมขึ้นเองได้ในห้องทดลอง ส่วน Ham's F-10 นั้นเป็น complex media ซึ่งทางบริษัท Flow Laboratiries เตรียมไว้ลักษณะเป็นผง นำมาเติม Calcium lactate, Sodium bicarbonate, Penicillin และ Streptomycin น้ำเพาะเลี้ยงทั้ง 3 ชนิดนี้ เตรียมด้วยน้ำกรองจากเครื่องกรองน้ำบริสุทธิ์ (conductivity 18 MΩ-cm) ปรับความเข้มข้นของสารสลาย (osmolality) ให้ได้ประมาณ 280+5 mOsm/kg โดยการใช้น้ำกรองบริสุทธิ์ โดยคำนวนตามสูตร ที่ sokoloski และ wolf (1984) ให้ไว้ดังนี้

<u>initial Osmolality-280</u> x 1,000 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องเอา
initial Osmolality ออกและเติมด้วยน้ำกรองบริสุทธิ์

ส่วนระดับของ pH ประมาณ 7.3-7.5 โดยนำไป equilibrate ด้วยกาซผสมที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ก่อนนำไปใช้นำมาทำให้ปลอดเชื้อด้วยการกรองด้วย millipore fillters. ขนาดเส้นผ่าสูนย์กลางของรูกรอง 0.2 ไมครอน บรรจุลงในภาชนะที่สะอาดผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและเติม Heat-inactivated human preovulatory serum ร้อยละ 20

ตารางที่ 2.2 แสดงส่วนประกอบของน้ำเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการทดสอบการเจาะทะลุไข่แฮมสเตอร์ มิลลิกรัม/ลิตร (mM)

Component	Ham's F-10	BWW	TMPA
Salt			
NaCl	7400 (126.63)	5540 (94.78)	8000 (136.90)
KCl	285.0 (3.82)	350.0 (4.77)	200.0 (2.68)
$CaCl_2 . 2H_2O$	44.1 (0.3)	189.0 (1.29)	260.0 (1.77)
KH_2PO_4	83.0 (0.61)	162.0 (1.19)	-
$Na_2 HPO_4 . 7H_2O$	290.0 (1.08)	-	-
$MgSO_4 7H_2O$	152.7 (0.62)	294.0 (1.19)	-
$MgCl_2 . 6H_2O$	-	-	212.0 (1.05)
$FeSO_4 . 7H_2O$	0.8346($3x10^{-3}$)	-	-
$CuSO_4 . 5H_2O$	0.0025(10^{-5})	-	-
$ZnSO_4 . 7H_2O$	0.0288(10^{-4})	-	-
Buffer			
$NaHCO_3$	2106 (25.06)	2106 (25.06)	3000
Phenol red	12.0	50.0	-
Energy			
Glucose	1100 (6.10)	1000 (5.55)	1008 (5.59)
Na lactate (60% syrup)	-	3.7(19.65)	-
Na Pyruvate	100.0 (1.0)	28.0(0.25)	36.0 (0.33)
Hypoxanthine	4.08 (0.03)	-	-
Lipoic acid	0.206(0.001)	-	-
Thymidine	0.727(0.001)	-	-

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

Component	Ham's F-10	BWW	TMPA
Amino acids		-	-
L-Alanine	8.91 (0.1)	-	-
L-Arginine HCl	210.7 (1.0)	-	-
L-Asparagine.H_2O	15.01 (0.1)	-	-
L-Aspartic acid	13.31 (0.1)	-	-
L-Cysteine HCl	31.53 (0.2)	-	-
L-Glutamic acid	14.71 (0.2)	-	-
L-Glutamine	146.2 (1.0)	-	-
Glycine	7.51 (0.1)	-	-
L-Histidine HCl H_2O	20.96 (0.1)	-	-
L-Isoleucine	2.62 (0.02)	-	-
L-Leucine	13.12 (0.1)	-	-
L-Lysine HCl	29.30 (0.2)	-	-
L-Methionine	4.48 (0.03)	-	-
L-Phenylalamine	4.96 (0.03)	-	-
L-Proline	11.51 (0.1)	-	-
L-Serine	10.51 (0.1)	-	-
L-Threonine	3.57 (0.03)	-	-
L-Tryptophane	0.61 (0.003)	-	-
L-Tyrosine	2.25 (0.01)	-	-
L-Valine	3.51 (0.03)	-	-
Vitamin			
Biotin	0.024(0.001)	-	-

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

Component	Ham's F-10	BWW	TMPA
D-Calcium Panto-	0.715 (0.002)	-	-
thenate		-	-
Choline Chloride	0.698 (0.005)	-	-
Folic acid	1.32 (0.003)	-	-
i-Inositol	0.541 (0.003)	-	-
Niacinamide	0.611 (0.005)	-	-
Pyridorine HCl	0.206 (0.005)	-	-
Riboflavin	0.376 (0.001)	-	-
Thiamine HCl	1.012 (0.003)	-	-
Vitamin B12	1.36 (0.001)	-	-
Penicillin	75.0	100,00 units.	50.0
Streptomycin sulfate	50.0	100,000 gm.	50.0
Human Preovulatory	20%	20%	20%
serum			
Human serum albumin	-	0.3%	-
pH	7.4-7.6	7.4-7.5	7.3-7.5
Osmolality (mOsm/kg)	280±5	285±5	280±5

และเก็บไว้ในตู้อบ (incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีความเข้มข้นของกาซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 นานประมาณ 12-24 ชั่วโมง เก็บน้ำยาที่เหลือจากการเตรียมไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสน้ำเพาะเลี้ยงที่เตรียมขึ้นนี้จะเก็บไว้ใช้ภายใน 10-14 วันเท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากขณะที่เก็บน้ำเพาะเลี้ยงไว้จะเกิด spontaneous decarboxylation ของสารไพรูเวท ทำให้น้ำยาเสียเร็ว (Wales และ Whittingham, 1971)

การเตรียม Heat-inactivated human preovulatory serum

เจาะเลือดจากหญิงที่มาเข้าโครงการ in vitro fertilization ของ รพ.จุฬาลงกรณ์ และได้รับยากระตุ้นการตกไข่ด้วย hMG (human menopausal gonadotropin) และ hCG โดยเจาะเลือดประมาณ 15-20 ม.ล. 36 ชั่วโมงก่อนการเก็บไข่ ใส่ใน conical centrifuge tube วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำไปปั่นที่ 500 g. นาน 10 นาที ใช้ pasteur pipette ดูดส่วนที่เป็นน้ำเหลือง ใส่ขวด sterile นำไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 30-45 นาที (Quinn และคณะ, 1984)

การแบ่งกลุ่มตัวอย่างน้ำอสุจิ แบ่งเป็น 3 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างน้ำอสุจิที่ได้จากชายที่มีสุขภาพแข็งแรงสมบูรณ์ อายุระหว่าง 20-40 ปีโดยกำหนดให้มีปริมาตรน้ำอสุจิ 2.0-60 ม.ล., ความหนาแน่นของตัวอสุจิมากกว่า $50x10^6$ ตัว/ม.ล. เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวมากกว่าร้อยละ 50, เปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิเป็นมากกว่าร้อยละ 55 และเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่มีรูปร่างปกติมากกว่าร้อยละ 55 จำนวน 15 คน

กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างน้ำอสุจิที่ได้จากชายที่ภรรยากำลังตั้งครรภ์ และอายุครรภ์ไม่เกิน 12 สัปดาห์ จำนวน 15 คน

กลุ่มที่ 3 ตัวอย่างน้ำอสุจิที่ได้จากชายที่ไม่มีบุตรหรือมีบุตรยาก โดยกำหนดให้มีความเข้มข้นของตัวอสุจิน้อยกว่าหรือเท่ากับ $40x10^6$ ตัว/มล. จำนวน 15 คน

การเก็บตัวอย่างน้ำอสุจิ

เก็บตัวอย่างน้ำอสุจิจากกลุ่มศึกษาโดยวิธีช่วยเหลือตนเอง (Masturbation) ภายหลังงดเว้นการหลั่งน้ำอสุจิอย่างน้อย 48 ชั่วโมง ใส่ในขวดที่สะอาดผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30-60 นาที ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเกิดการเหลวตัวของน้ำอสุจิ (Liquifaction) พบว่าช่วงเวลาที่สั้นหรือยาวกว่านี้ จะทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว (motility) และเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิเป็น (viability) ลดลง (Hall, 1981) รวมทั้งอัตราการเจาะทะลุไข่แฮมสเตอร์ก็ลดลงด้วย (Rogers และคณะ, 1980, 1983; Sokoloski และ Wolf, 1983) การที่อัตราการเจาะทะลุไข่ลดลงด้วย อาจเนื่องจากมีการรบกวนการเกิดกระบวนการ acrosome reaction ของตัวอสุจิ (Kanwar และคณะ, 1979)

การวิเคราะห์น้ำอสุจิ (Semen analysis)

เทตัวอย่างน้ำอสุจิที่เหลวตัวแล้ว ใส่ในหลอดทดลองวัดดูปริมาตร และนำไปตรวจวิเคราะห์ความหนาแน่นของตัวอสุจิ (sperm density), เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ (motility) และ ระดับความเร็วของการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (grade of forward progression) ด้วย Makler counting chamber (Makler, 1978, 1980) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 200 เท่า (รูป 2.3) ตารางที่ 2.3 แสดงการให้คะแนนระดับความเคลื่อนไหว

ส่วนการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิเป็น (Sperm viability) และเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิรูปร่างปกติ (normal morphology) ใช้วิธีมาตรฐานของ WHO (1980) พบว่า ตัวอสุจิที่ไม่มีการเคลื่อนไหวนั้นบางตัวก็มีชีวิต บางตัวก็ตาย ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องทราบจำนวนของตัวอสุจิเป็น และจากคุณสมบัติของสี Eosin Y ที่สามารถซึมเข้าไปใน membrane ที่ถูกทำลายได้ จึงมีการนำสี Eosin Y มาใช้ในการแยกตัวอสุจิเป็นและตัวอสุจิตาย (Blom, 1950) โดยหยดน้ำอสุจิ 1 หยด ตามด้วย 1% Eosin Y 1 หยด ลงในถาดหลุม ทิ้งไว้ 30 วินาที แล้วหยด 10% Nigrosin 2 หยด คนให้เข้ากันทาบนแผ่น slide ทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า ตัวอสุจิเป็นจะไม่ติดสี ส่วนตัวอสุจิตายจะติดสีแดงของ Eosin

ตารางที่ 2.3 แสดงการให้คะแนนระดับความเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ

Score	mean (Indication)
0	indicates absence of forward progression
1	indicates weak forward progression
2	indicates moderate forward progression
3	indicates very active forward progression.

จาก WHO, 1980.

รูปที่ 2.3 แสดงการวิเคราะห์น้ำอสุจิด้วย Makler counting chamber

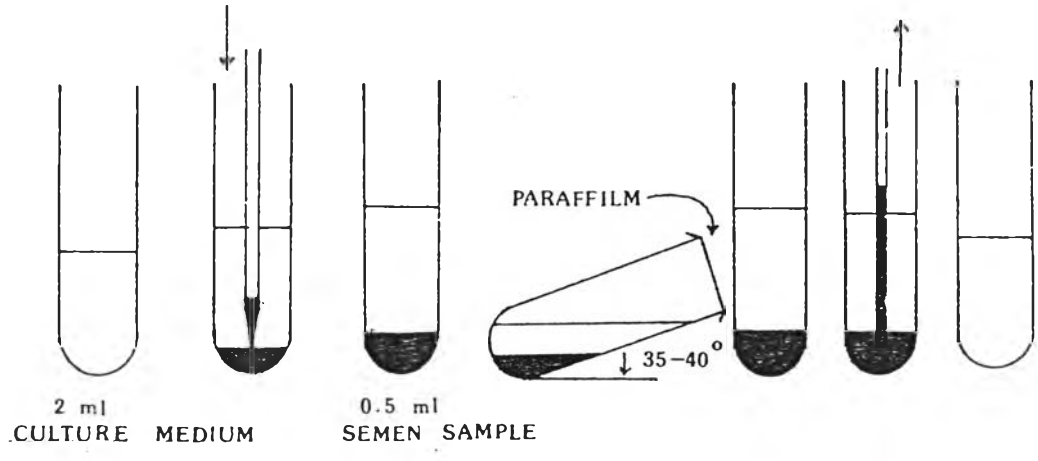
Y นอกจากนี้การย้อมสีด้วย Eosin Y-Nigrosin ยังสามารถใช้ประเมินเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิรูปร่างปกติได้ด้วย

<u>การศึกษาน้ำเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจาะทะลุไข่แฮมสเตอร์โดยอสุจิที่ได้จากอาสาสมัครกลุ่มที่ 1</u>

วิธีการแยกตัวอสุจิออกจากน้ำอสุจิ (Semen) เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาความสามารถในการปฏิสนธิของตัวอสุจิ และการปฏิสนธิในหลอดทดลอง ที่ใช้กันมากมี 2 วิธี คือ

1. Repeated centrifugation and resuspension in medium ภายหลังที่น้ำอสุจิเหลวตัวแล้ว นำไปเทใส่หลอดทดลองก้นรูปกรวย ผสมด้วยน้ำเพาะเลี้ยง 3-9 เท่าของน้ำอสุจินำไปปั่นที่ 300-600 g นาน 5-10 นาที เทส่วนที่เป็นน้ำทิ้ง นำส่วนที่ตกตะกอนมาเจือจางด้วยน้ำเพาะเลี้ยงใหม่และปั่นอีก ทำเช่นเดียวกันนี้ 2-3 ครั้ง นำส่วนที่ตกตะกอนครั้งสุดท้ายมาเจือจางด้วยน้ำเพาะเลี้ยงที่มี Albumin ผสมอยู่ด้วย ประมาณ 0.5-1.0 มล. ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย นักวิจัยหลายท่านจึงนิยมใช้วิธีนี้กันมาก (Yanagimachi, 1978; Rogers และคณะ, 1979; Aitken และคณะ, 1982 b; Wolf และ Sokoloski, 1982; Binor และคณะ 1980) แต่อย่างไรก็ตามวิธี centrifugation นี้ ไม่สามารถแยกตัวอสุจิที่เคลื่อนไหวได้ออกจากตัวอสุจิที่เคลื่อนไหวไม่ได้หรือตัวอสุจิตาย (Quinn และคณะ, 1982; Cohen และคณะ, 1982; Tyler และคณะ, 1981)

2. Swim-up technique โดยแบ่งน้ำอสุจิที่เหลวตัวแล้ว ใส่หลอดทดลองหลอดละ 0.5 มล. ค่อย ๆ หยดน้ำเพาะเลี้ยง 2 มล. ลงในหลอดทดลองเหนือชั้นของน้ำอสุจิเพื่อให้เกิดเป็นชั้นของน้ำเพาะเลี้ยงแยกออกมาชัดเจน วางหลอดทดลองเอียง 30-45 องศา ไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มีกาซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง ตัวอสุจิที่สามารถเคลื่อนที่ได้จะว่ายขึ้นมาในน้ำเพาะเลี้ยงแล้วดูดเอาน้ำเพาะเลี้ยงส่วนบนในแต่ละหลอดใส่รวมกันในหลอดแก้วก้นรูปกรวย นำไปปั่นที่ 500 g นาน 10 นาที นำส่วนที่ตกตะกอนมาเจือจางด้วยน้ำเพาะเลี้ยงและนำไปปั่นอีกครั้ง นำส่วนที่ตกตะกอนครั้งสุดท้ายมาเจือจางด้วยน้ำเพาะเลี้ยงในปริมาณตามความหนาแน่นของตัวอสุจิที่ต้องการ (รูปที่ 2.4) วิธีนี้สามารถแยกตัวอสุจิที่เคลื่อนไหวได้ออกจากตัวอสุจิที่เคลื่อนไหวไม่ได้ และเซลล์อื่น ๆ ที่อยู่ในน้ำอสุจิ (Debris) ถึงแม้ว่า วิธี swim-up จะได้จำนวนของตัวอสุจิต่ำกว่าวิธีแรกก็ตาม



รูปที่ 2.4 แสดงการแยกตัวอสุจิออกจากน้ำอสุจิโดยวิธี swim-up

(Overstreet, และคณะ1980) Wolf และ Sokoloski (1982) ศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการปฏิสนธิ (Fertilizing ability) ของตัวอสุจิจากอาสาสมัคร 4 คน โดยใช้ ทั้ง 2 วิธี พบว่าตัวอสุจิที่เตรียมโดยวิธี swim-up มีอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าตัวอสุจิที่เตรียมโดยวิธี centrifugation อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงใช้วิธีการคัดเลือกตัวอสุจิด้วยวิธี swim-up ตลอดการทดลอง ในการศึกษาความเหมาะสมของน้ำเพาะเลี้ยงต่อการเจาะทะลุไข่แฮมสเตอร์จะแบ่งตัวอย่างน้ำอสุจิจากอาสาสมัครคนเดียวกันเป็น 3 ส่วนคือ

ส่วนที่ 1 ใช้น้ำเพาะเลี้ยง Ham's F-10 ในการ swim-up

ส่วนที่ 2 ใช้น้ำเพาะเลี้ยง BWW ในการ swim-up

ส่วนที่ 3 ใช้น้ำเพาะเลี้ยง TMPA ในการ swim-up

แล้วนำส่วนที่ตกตะกอนของแต่ละส่วน มาเจือจางด้วยน้ำเพาะเลี้ยงแต่ละชนิด ให้ได้ความเข้มข้นของตัวอสุจิประมาณ 5-10x10^6 ตัว/มล. ใส่ในหลอดทดลองพลาสติก ปิดผาไว้หลวม ๆ อบเลี้ยงไว้ในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของกาซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลานาน 18-20 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ศึกษาการเจาะทะลุไข่แฮมสเตอร์

<u>การเตรียมไข่และการทดสอบการเจาะทะลุไข่แฮมสเตอร์</u>

ฆ่าแฮมสเตอร์ที่ได้รับการกระตุ้นให้มีการตกไข่ภายหลังจากฉีด hCG 15-17 ชั่วโมง โดยวิธีดึงคอต่อ (Cervical dislocation) ผ่าตัดเปิดหน้าท้อง ตัดแยกท่อนำไข่ออกจากรังไข่ โดยการตัดเยื่อหุ้มรังไข่ (Ovarian bursa) และตัดที่บริเวณช่วงต่อระหว่างท่อนำไข่กับมดลูก (Utero-tubal junction) (รูปที่ 2.5) นำท่อนำไข่ทั้ง 2 ข้างใส่ใน Embryological watchglass ที่มีน้ำเพาะเลี้ยง BWW + 0.3% Human Serum Albumin (HSA) นำมาดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ dissecting กำลังขยาย 15-20 เท่า ใช้ปลายเข็มเบอร์ 27 ที่สวมติดกับ plastic syringe 1 ml กรีดผนังของท่อนำไข่ให้ฉีกขาด cumulus masses ที่มีไข่อยู่ข้างใน (รูปที่ 2.6 a) จะไหลทะลักออกมาจากท่อนำไข่ ใช้ปลายเข็มเขี่ยให้แยกออกจากกัน ดูด cumulus masses ใส่ plastic petri dish ที่มี 0.1% Bovine testicular hyaluronidase ปล่อยทิ้งไว้นาน 10-15 นาทีเพื่อย่อยสลาย cumulus cells ออก ใช้

รูปที่ 2.5 แสดงการแยกท่อนำไข่ออกจากรังไข่และมดลูก

pasteur pipette ที่ลนไฟและดึงปลายให้เรียวเล็ก ดูดไข่ที่มี zona pellucida (รูปที่ 2.6 b) มาล้างในน้ำเพาะเลี้ยง BWW 2-3 ครั้ง แล้วนำไปใส่ใน petri dish ที่มี 0.1% Bovine pancreatic trypsin นาน 2-3 นาทีเพื่อย่อย zona pellucida แล้วดูดไข่ที่ไม่มี zona pellucida (รูปที่ 2.6 c) มาล้างในน้ำเพาะเลี้ยง BWW 2-3 ครั้ง นำตัวอสุจิที่อบเลี้ยงในน้ำเพาะเลี้ยงทั้ง 3 ชนิด หยดใส่ 4-well multidish ชนิดละ 2 หลุม หลุมละ 0.2 มล. (ความหนาแน่นของตัวอสุจิ 0.5-1.0x10^6 ตัว/มล.) คลุมด้วย mineral oil ดูดไข่ใส่หลุม ๆละ 20-25 ใบ นำไปอบเลี้ยงในตู้อบนาน 3-5 ชั่วโมง จากนั้นดูดไข่มาล้างในน้ำเพาะเลี้ยง BWW เพื่อล้างเอาตัวอสุจิที่เกาะอยู่รอบ ๆ ไข่ออก ดูดไข่ 5-10 ใบ หยดบน glass slide (มีน้ำเพาะเลี้ยงประมาณ 10 ไมโครลิตร) ปิดด้วย cover slip ที่มีขี้ผึ้ง (vaseline; paraffin 15:1) ติดที่มุมทั้ง 4 เพื่อป้องกันไม่ให้มีแรงกดลงบนไข่มากเกินไป (Wolf และ Sokoloski, 1984) หรือนำไป fixed ใน Ethyloacetic acid (Acetic acid : Alcohol 95% = 1:3) นาน 15-60 นาที นำไปจุ่มใน 95% Alcohol นาน 10-15 นาที แล้วนำมาย้อมด้วย 1% Acetolacmoid (Margalioth และคณะ, 1986) แล้วนำมาตรวจดูจำนวนของไข่ที่ถูกตัวอสุจิเจาะทะลุเข้าไปใน ooplasm ด้วยกล้องจุลทรรศน์ phase-contrast กำลังขยาย 400 เท่า ซึ่งจะสังเกตเห็นเป็นลักษณะของ swollen sperm head หรือ male pronuclei จำนวนตั้งแต่ 1 ตัวขึ้นไป (รูปที่ 2.7 a และ b) (Wolf และ Sokoloski, 1984) บันทึกอัตราการเจาะทะลุไข่ของตัวอสุจิในน้ำเพาะเลี้ยงแต่ละชนิด ว่ามีอัตราการเจาะทะลุไข่แฮมสเตอร์ในน้ำเพาะเลี้ยงชนิดใดมากที่สุด นำน้ำเพาะเลี้ยงชนิดนั้นไปใช้ศึกษาความสามารถในการเจาะทะลุไข่แฮมสเตอร์ โดยตัวอสุจิที่ได้จากตัวอย่างน้ำอสุจิกลุ่มที่ 2 และ 3 ต่อไป โดยทำการทดลองเช่นเดียวกันกับกลุ่มที่ 1 บันทึกอัตราการเจาะทะลุไข่แฮมส-เตอร์โดยตัวอสุจิที่ได้จากกลุ่มที่ 2 เปรียบเทียบกับอัตราการเจาะทะลุโดยตัวอสุจิที่ได้จากกลุ่มที่ 3

<u>การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจาะทะลุไข่แฮมสเตอร์กับลักษณะของตัวอสุจิ</u>

โดยการนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาการเจาะทะลุไข่แฮมสเตอร์และการวิเคราะห์ลักษณะต่าง ๆ ของตัวอสุจิในน้ำอสุจิจากกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 มาวิเคราะห์ทางสถิติ

ต้นฉบับ หน้าขาดหาย

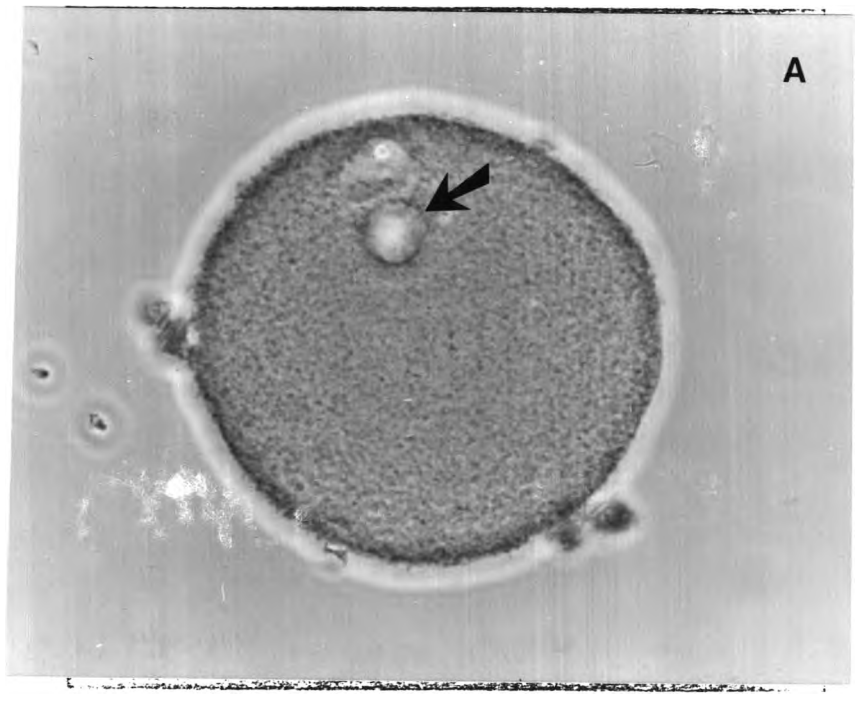
รูปที่ 2.6 แสดงลักษณะของไข่แฮมสเตอร์ก่อนผสมกับตัวอสุจิคน

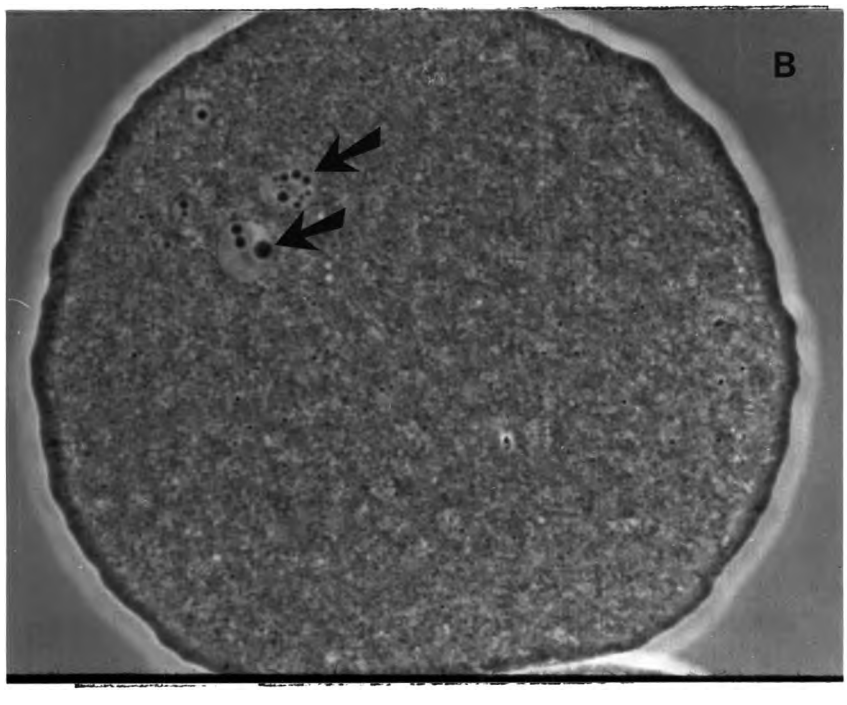
A. cumulus masses ที่มีไข่อยู่ข้างใน

B. ไข่แฮมสเตอร์ที่มีโซนาเพลลูซิดา ภายหลังย่อย cumulus cells ด้วย 0.1% hyaluronidase

C. ไข่แฮมสเตอร์ที่ไม่มีโซนาเพลลูซิดา ภายหลังย่อยสลาย zona-pellucida ด้วย 0.1% Trypsin

(ภาพกำลังขยาย x 200)


A


B

รูปที่ 2.7 แสดงลักษณะไข่แฮมสเตอร์ภายหลังผสมกับตัวอสุจิคน

A. Swallen sperm head และหางของตัวอสุจิที่เจาะเข้าไปในไซโตพลาสซึมของไข่แฮมสเตอร์ (ศรชี้)

B. Male pronuclei ในไข่แฮมสเตอร์ภายหลังผสมแล้วอบเลี้ยงไว้นาน 5 ชั่วโมง (ศรชี้)

(ภาพกำลังขยาย x 400)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การเปรียบเทียบผลของน้ำเพาะเลี้ยงแต่ละชนิด เพื่อหาน้ำเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจาะทะลุไข่แฮมสเตอร์ ใช้ one-way analysis of variance (F-test) และ Least Significant Different (LSD) เป็นค่าสถิติในการทดสอบ และใช้ student's unpair t-test ในการเปรียบเทียบความสามารถในกาาเจาะทะลุไข่แฮมสเตอร์ของตัวอสุจิจากตัวอย่างน้ำอสุจิกลุ่มที่ 2 และ 3

ส่วนการหาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจาะทะลุไข่กับลักษณะของตัวอสุจิที่ได้จากการตรวจวิะคราะห์น้ำอสุจิใช้ Correlation-regression analysis เป็นค่าสถิติ ในการทดสอบความสัมพันธ์