การเปรียบเทียบการใช้โอโอไซต์ที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิทั้งชนิดสด แช่สารละลายเกลือและแช่แข็ง ในการทดสอบการเจาะผ่านของตัวอสุจิสุกร

นายอดิศร อดิเรกถาวร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาการสืบพันธุ์สัตว์ ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544
ISBN 974-03-0306-4
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

COMPARISON OF USING FRESH, SALT-STORED AND FROZEN IMMATURE AND MATURE PIG OOCYTES ON SPERM-ZONA PENETRATION

Mr.Adisorn Adirekthaworn

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Theriogenology
Department of Obstetrics Gynaecology and Reproduction
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2001

ISBN 974-03-0306-4

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเปรียบเทียบการใช้โอโอไซต์ที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิทั้งชนิดสด แช่สารละลายเกลือและแช่แข็งในการทดสอบการเจาะผ่านของตัวอสุจิสุกร
โดย	นายอดิศร อดิเรกถาวร
สาขาวิชา	วิทยาการสืบพันธุ์สัตว์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.มงคล เตชะกำพุ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.สุดสรร ศิริไวทยพงศ์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.อรรณพ คุณาวงษ์กฤต)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาตราจารย์ น.สพ.ดร.มงคล เตชะกำพุ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.สุดสรร ศิริไวทยพงศ์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.วิชัย ทันตศุภารักษ์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.สุมลยา กาญจนะพังคะ)

อดิศร อดิเรกถาวร: การเปรียบเทียบการใช้โอโอไซต์ที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิและพร้อมปฏิสนธิทั้งชนิดสด แช่สารละลายเกลือและแช่แข็งในการทดสอบการเจาะผ่านของตัวอสุจิสุกร (COMPARISON OF USING FRESH, SALT-STORED AND FROZEN IMMATURE AND MATURE PIG OOCYTES ON SPERM-ZONA PENETRATION) อาจารย์ที่ปรึกษา: รศ.น.สพ.ดร.มงคล เตชะกำพุ, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.น.สพ.ดร.สุดสรร ศิริไวทยพงศ์; 67 หน้า. ISBN 974-03-0306-4

จุดประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบการเจาะผ่านของตัวอสุจิของพ่อสุกรสายพันธุ์แลนด์เรซ 3 ตัว (A B และ C) โดยนำไปตรวจการเจาะผ่านกับโอโอไซต์ชนิดที่ไม่พร้อมปฏิสนธิ (การทดลองที่ 1) และชนิดพร้อมปฏิสนธิ (การทดลองที่ 2) โดยใช้โอโอไซต์ 3 ชนิด คือชนิดสด ชนิดแช่สารละลายเกลือ และชนิดแช่แข็ง ในการทดลองที่ 1 เมื่อนำโอโอไซต์ที่ไม่พร้อมปฏิสนธิชนิดต่างๆ มาทำการตรวจสอบการเจาะผ่านของตัวอสุจิสุกร A อัตราการเจาะผ่านมีค่า 59.6% , 78.1% และ 77.8% และมีจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ 2.79±0.42, 2.97±0.29 และ 2.29±0.26 สำหรับโอโอไซต์สด แช่สารละลายเกลือ และแช่แข็งตามลำดับ พบว่าตัวอสุจิสามารถเจาะผ่านโอโอไซต์ชนิดสดน้อยกว่าโอโอไซต์อีกสองชนิดที่เหลือ ($p<0.05$) ขณะที่จำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.05$) สำหรับสุกร B พบว่าอัตราการเจาะผ่านมีค่า 65.3%, 76.8% และ 67.0% ตามลำดับและมีจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ 2.25±0.28, 3.63±0.42 และ 2.57±0.36 สำหรับโอโอไซต์สด แช่สารละลายเกลือ และแช่แข็งตามลำดับ พบว่าอัตราการเจาะผ่าน และจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์สูงสุดในโอโอไซต์ชนิดแช่สารละลายเกลือ ($p<0.05$) สำหรับสุกร C อัตราการเจาะผ่านมีค่า 51.5%, 58.2% และ 53.2% ตามลำดับ มีจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ 1.00±0.13, 1.39±0.18 และ 1.44±0.20 อัตราการเจาะผ่านและจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ในโอโอไซต์สด แช่สารละลายเกลือและแช่แข็งตามลำดับซึ่งไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.05$) ในการทดลองที่ 2 ทำการเลี้ยงโอโอไซต์ในพร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลองก่อนที่จะนำไปเก็บรักษาในสารละลายเกลือและแช่แข็ง เมื่อนำโอโอไซต์ดังกล่าวมาทำการตรวจสอบพบว่าในสุกร A อัตราการเจาะผ่านมีค่า 85.1%, 86.1% และ 89.1% สำหรับจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ 13.87±1.45, 17.69±2.61 และ14.45±1.75 สำหรับโอโอไซต์สด แช่สารละลายเกลือและแช่แข็งตามลำดับพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.05$) ในสุกร B อัตราการเจาะผ่านมีค่าน้อยที่สุดในกลุ่มโอโอไซต์สด 52.6% เปรียบเทียบกับชนิดแช่สารละลายเกลือและแช่แข็ง 67.3% และ 67.0% ($p<0.05$) และมีจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ต่ำที่สุดเท่ากับ 1.55±0.31, 2.80±0.35 และ 2.87±0.40 ตัว ($p<0.05$) ตามลำดับ ในสุกร C อัตราการเจาะผ่านในโอโอไซต์ชนิดแช่สารละลายเกลือมีค่าสูงสุดคือมีค่า 76.8% ($p< 0.05$) เทียบกับชนิดสดคือ 65.3% และ 67.0% สำหรับชนิดแช่แข็ง และมีจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ชนิดแช่สารละลายเกลือสูงสุดคือ 3.63±0.42 เทียบกับที่เหลือคือ 2.25±0.28 และ 2.57±0.36 ตามลำดับ จากการศึกษาสรุปว่าพ่อสุกรและวิธีการเก็บรักษาโอโอไซต์มีผลทำให้อัตราการเจาะผ่านและจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์สูงขึ้น และมีความเป็นไปได้ในการนำวิธีนี้ไปใช้ตรวจสอบความแตกต่างของความสามารถในการปฏิสนธิของพ่อสุกรได้

ภาควิชา สูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์ ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา วิทยาการสืบพันธุ์สัตว์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2544 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4275563731 : MAJOR THERIOGENOLOGY

KEY WORD : PIG / PENETRATION/ OOCYTE / SPERM / OOCYTE PRESERVATION

ADISORN ADIREKTHAWORN : COMPARISON OF USING FRESH, SALT-STORED AND FROZEN IMMATURE AND MATURE PIG OOCYTES ON SPERM-ZONA PENETRATION.

THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF.MONGKOL TECHAKUMPHU, Ph.D.,

THESIS CO-ADVISOR: ASST.PROF.SUDSON SIRIVAIDYPONG, Ph.D., 67 pp.

ISBN 974-03-0306-4

The objective of this study is to compare the penetration ability of spermatozoa from three Landrace boars (A, B and C) to either immature or mature oocytes that devided into three groups ; fresh, salt-stored and frozen. The first experiment used immature oocytes showed that the penetration rates of sperm from Boar A to the fresh, salt-stored and frozen oocytes were 59.6%, 78.1% and 77.8% (respectivelly; $p<0.05$). The number of sperms per oocyte from those 3 groups were 2.79 ± 0.42, 2.97 ± 0.29 and 2.29 ± 0.26 (mean$\pm$SEM ; $p>0.05$). Moreover, the penetration rate of sperm from Boar B and Boar C to those 3 groups of oocytes were 65.3%, 76.8%, 77.8% and 51.5%, 58.2%, 53.2% while the number of sperms per oocyte were 2.25 ± 0.28, 3.63 ± 0.42, 2.57 ± 0.36 and 1.00 ± 0.13, 1.39 ± 0.18,1.44 ± 0.20, respectively. In this experiment, there is no significant difference among groups using sperm from Boar C. The mature oocytes were used in the second experiment which found that there was no difference on sperm penetration rate and number of sperm per oocyte in all groups of oocyte (85.1%, 86.1%, 89.1% and 13.87 ± 1.45, 17.69 ± 2.61,14.45 ± 1.75 respectively) using sperm from Boar A. However, the sperm from Boar B demonstrated lowest rate of sperm penetration and number of sperm per oocyte when using fresh oocyte (52.6% and 1.55 ± 0.31) compared to those using salt-stored and frozen oocytes (67.3%, 69.1% and 2.80 ± 0.35 ,2.87 ± 0.40 respectively). The similar figures were found using sperm from Boar C to 3 groups of oocyte which were 65.3%, 76.8%, 67% and 2.25 ± 0.28, 3.63 ± 0.42, 2.57 ± 0.36 (sperm penetration rate and number of sperms per oocyte, respectively.) Morover, the remarkable high penetration ability was found when using salt-stored mature oocyte. In conclusion, sperm penetration ability is vary among boars and it is affected by oocytes (immature and mature) and their preservation techniques (fresh, salt-stored and frozen). This *in vitro* sperm penetration assay can be possibly used to determine boar semen fertility in practice.

Department of Obstetrics Gynaecology and Reproduction Student 's signature Adisorn Adirekthaworn

Field of study Theriogenology Advisor 's signature M. Techakumphu

Academic 2001 Co-advisor 's signature Sudson Sirivaidyong

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลือ และสนับสนุนเป็นอย่างดีจากรองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.มงคล เตชะกำพุ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.สุดสรร ศิริไวทยพงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและแนะนำ ตลอดจนตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ อย่างดียิ่ง

กราบขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่กรุณาสละเวลาและให้คำแนะนำต่าง ๆ ซึ่งทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีคุณค่า และความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ น.สพ.พยัตรา ตันติลีปีกร หัวหน้าภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้โอกาสในการศึกษาต่อ รวมไปถึงคณาจารย์และบุคลากร ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณวันเพ็ญ อดุลยานุภาพ รวมไปถึงเจ้าหน้าที่ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ รวมถึงเจ้าหน้าที่โรงพยาบาลปศุสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณอาจารย์น.สพ.ดร.เผด็จ ธรรมรักษ์ในการให้คำแนะนำปรึกษาการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ขอขอบคุณ คุณอวยชัย พรประเสริฐศรี ที่ได้อนุเคราะห์ตัวอย่างน้ำเชื้อสุกร และข้อมูลการผสมกับแม่สุกรในฟาร์มสุกร สำหรับการศึกษาในครั้งนี้

ขอขอบคุณคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่สนับสนุนทุนสำหรับการทำวิจัย

ท้ายสุดนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ-คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาในครั้งนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ฌ
สารบัญภาพ.....ญ

บทที่

1. บทนำ.....1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย.....2
1.3 คำถามในการวิจัย.....2
1.4 คำสำคัญ.....2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย.....2
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....3
2.1 ปฏิกิริยาระหว่างตัวอสุจิกับโอโอไซต์.....5
2.2 การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิผ่านเข้าไประหว่างเซลล์คิวมูลัส.....5
2.3 การเกาะติดของตัวอสุจิและเคลื่อนที่ผ่าน zona pellucida.....6
2.4 ปฏิกิริยาอะโครโซม.....7
2.5 การเจาะผ่านผนัง zona pellucida.....8
2.6 การเชื่อมกันของตัวอสุจิกับนิวเคลียสโอโอไซต์.....9
2.7 การป้องกันการเข้าปฏิสนธิซ้อน.....11
2.8 การสร้างโปรนิวเคลียสของตัวอสุจิและโอโอไซต์.....12
2.9 การปฏิสนธิภายนอกร่างกาย.....12
2.10 การนำเทคนิคการปฏิสนธิภายนอกไปใช้ในการตรวจความสามารถในการปฏิสนธิของตัวอสุจิ.....16

3. ระเบียบวิธีวิจัย.....24
3.1 การเก็บโอโอไซต์.....24
3.2 การเลี้ยงโอโอไซต์ให้พร้อมปฏิสนธิ.....24
3.3 การเก็บรักษาโอโอไซต์ในสารละลายเกลือ.....25
3.4 การแช่แข็งโอโอไซต์.....28
3.5 การแบ่งกลุ่มโอโอไซต์.....28
3.6 การเตรียมตัวอสุจิ.....28
3.7 การเลี้ยงตัวอสุจิร่วมกับโอโอไซต์.....29
3.8 การวัดผล.....29
3.9 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ.....30
4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....32
5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....42

รายการอ้างอิง.....48
ภาคผนวก.....55
ประวัติผู้เขียน.....67

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 วิธีการแช่แข็งโอโอไซต์ในสัตว์ชนิดต่างๆ 20

2 การเจาะผ่านของตัวอสุจิจากสุกร A เมื่อใช้โอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิ.....32

3 การเจาะผ่านของตัวอสุจิจากสุกร A เมื่อใช้โอโอไซต์ชนิดพร้อมปฏิสนธิ.....35

4 การเจาะผ่านของตัวอสุจิจากสุกร B เมื่อใช้โอโอไซต์ชนิดที่ไม่พร้อมปฏิสนธิ.....36

5 การเจาะผ่านของตัวอสุจิจากสุกร B เมื่อใช้โอโอไซต์ชนิดพร้อมปฏิสนธิ.....37

6 การเจาะผ่านของตัวอสุจิจากสุกร C เมื่อใช้โอโอไซต์ชนิดที่ไม่พร้อมปฏิสนธิ.....38

7 การเจาะผ่านของตัวอสุจิจากสุกร C เมื่อใช้โอโอไซต์ชนิดพร้อมปฏิสนธิ.....38

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่ หน้า

1 การเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วของตัวอสุจิในสัตว์ชนิดต่างๆ
A-F ก่อนเกิดคาร์ปาซิเตชัน ; A'-F' หลังเกิดกระบวนการคาร์ปาซิเตชัน.....4

2 ความสัมพันธ์ระหว่างตัวอสุจิกับ zona pellucida ในหนูเม้าส์.....7

3 การเกิดปฏิกิริยาอะโครโซม; (A) ก่อนเกิดปฏิกิริยา; (B) ขณะเกิด
ปฏิกิริยามีการเชื่อมกันผนังหุ้มอะโครโซมชั้นนอกกับเยื่อหุ้มตัวอสุจิ ;
(C-D) ปฏิกิริยาเกิดเสร็จสมบูรณ์ AC = acrosomal cap;
IAM = inner acrosomal membrane ; Eq= equatorial segment.....8

4 ขั้นตอนการเกิดปฏิสนธิหลังจากที่ตัวอสุจิผ่านเข้าไปในโอโอไซต์;
a) ตัวอสุจิเกาะติดที่ผนัง zona pellucida; b) ตัวอสุจิเจาะผ่านผนังเข้ามา;
c-h) ส่วนหัวของตัวอสุจิเชื่อมกับส่วนไซโทพลาสซึมของโอโอไซต์ และเริ่มมี
การสร้างโพลาร์ บอดีที่ 2; i-j) เกิดการสร้างโปรนิวเคลียสของตัวอสุจิ
และโอโอไซต์; k-n) เกิดการรวมตัวของโปรนิวเคลียสทั้งสอง 10

5 ขั้นตอนขณะที่ตัวอสุจิมีการเชื่อมกับผนังโอโอไซต์ ; A) ส่วน eq เชื่อมกับ
เยื่อหุ้มเซลล์ไข่ B-D) ไซโทพลาสซึมของเซลล์ไข่มาโอบล้อมตัวอสุจิ; iam=inner
acrosomal membrane; eq = equatorial segment ; cg= cortical granules.....11

6 ขั้นตอนในการปฏิสนธิภายนอก.....13

7 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตั้งท้องที่ 60-90 วัน กับอัตราการพัฒนา
ของตัวอ่อนจากการปฏิสนธิด้วยน้ำเชื้อพ่อโค.....18

8 รังไข่ของสุกรที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ทั้ง 2 ข้างแสดงฟอลลิเคิลจำนวนมากบนรังไข่.....25

9 โอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิ (รูปซ้าย); และชนิดพร้อมปฏิสนธิ
(รูปขวา) ลูกศรชี้ที่โพลาร์บอดีที่ 1 (x400).....26

10 โอโอไซต์ที่เก็บรักษาในสารละลายเกลือ มีไซโทพลาสซึมหดตัว (x400).....26

11 โอโอไซต์ที่วางบนตะแกรงทองแดงก่อนที่ทำการแช่แข็งด้วยวิธี
ultra-rapid freezing (x400).....27

12 โอโอไซต์ภายหลังการแช่แข็งด้วยวิธี ultra-rapid freezing
ไม่พบการเปลี่ยนแปลงใด (x200).....27

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูปที่

13 สรุปขั้นตอนการทดลอง cap = capacitation ; F = fresh oocyte ; S=salt-stored oocyte ; Fz= frozen oocyte.....31

14 การเกาะของตัวอสุจิรอบ ๆ เปลือก zona pellucida และมีตัวอสุจิ (sp) บางส่วนที่เจาะผ่านชั้นเปลือก ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (x 400).....33

15 ภาพการเกาะติด และการเจาะผ่านของตัวอสุจิในโอโอไซต์ชนิดสด ภายหลังทำการย้อมด้วยสีสะท้อนแสง Hoechst 33342 จะพบตัวอสุจิอยู่รอบๆ (x400).....33

16 ภาพการเกาะติด และการเจาะผ่านของตัวอสุจิในโอโอไซต์ชนิดแช่ สารละลายเกลือ ภายหลังทำการย้อมด้วยสีสะท้อนแสง Hoechst 33342 พบตัวอสุจิอยู่รอบๆ (X 400).....34

17 ภาพการเกาะติด และการเจาะผ่านของตัวอสุจิในโอโอไซต์ชนิดแช่แข็ง ภายหลังทำการ ย้อมด้วยสีสะท้อนแสง Hoechst 33342 จะพบตัวอสุจิอยู่รอบๆ (x 400).....34

18 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจาะผ่านในโอโอไซต์ชนิดต่างๆ ของพ่อสุกร A.....35

19 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจาะผ่านในโอโอไซต์ชนิดต่างๆ ของพ่อสุกร B.....37

20 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจาะผ่านในโอโอไซต์ชนิดต่างๆ ของพ่อสุกร C.....39

21 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจาะผ่านของตัวอสุจิในพ่อสุกรทั้ง 3 ตัว เมื่อใช้โอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิที่เก็บรักษาด้วยวิธีการต่างๆ 40

22 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจาะผ่านของตัวอสุจิในพ่อสุกรทั้ง 3 ตัว เมื่อใช้โอโอไซต์ชนิดพร้อมปฏิสนธิที่เก็บรักษาด้วยวิธีการต่างๆ 40

23 กราฟเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวอสุจิต่อโอโอไซต์จากพ่อสุกรทั้ง 3 ตัว เมื่อใช้โอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิที่เก็บรักษาด้วยวิธีการต่างๆ 41

24 กราฟเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวอสุจิต่อโอโอไซต์จากพ่อสุกรทั้ง 3 ตัว เมื่อใช้โอโอไซต์ชนิดพร้อมปฏิสนธิที่เก็บรักษาด้วยวิธีการต่างๆ 41

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ในปัจจุบันการผลิตสุกรได้มีการนำวิธีการผสมเทียมมาใช้งานกันแพร่หลายมากขึ้น เนื่องจากมีข้อดีหลายประการ เช่น สามารถเลือกพ่อพันธุ์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมดีมีคุณภาพน้ำเชื้อสูง ลดค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงสุกรพ่อพันธุ์ ลดความเสี่ยงในการติดโรคจากการผสมพันธุ์ และสามารถกระจายสายพันธุ์สุกรได้อย่างรวดเร็ว ก่อนที่จะนำน้ำเชื้อจากพ่อสุกรตัวใดไปใช้งานจำเป็นต้องมีการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นก่อนเสมอเพื่อให้แน่ใจได้ว่าพ่อสุกรเหล่านั้นมีคุณภาพน้ำเชื้อดี การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อในปัจจุบันจะดูจากลักษณะน้ำเชื้อทางกายภาพ เช่น สี ความขุ่น ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เช่น การเคลื่อนไหว รูปร่างลักษณะภายนอก (อรรณพ, 2537; Althouse, 1997a) ซึ่งการตรวจสอบในลักษณะนี้จะไม่สามารถบ่งบอกความสามารถในการปฏิสนธิ (Fertilizing ability) และความสำเร็จในการผสมพันธุ์ได้ Flowers (1998) ได้ชี้ให้เห็นว่าอัตราเข้าคลอด และจำนวนลูกต่อครอกจะแตกต่างกันหากใช้น้ำเชื้อที่มีระดับการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิต่ำกว่า 70% แต่ดัชนีทั้งสองจะไม่แตกต่างกันหากมีระดับการเคลื่อนไหวอยู่ที่ 70-90% การตรวจสอบด้วยการนำน้ำเชื้อไปผสมเทียมดังกล่าวมีข้อจำกัดเพราะเสียค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงแม่สุกรที่ทำการทดสอบและใช้เวลารอผลการทดสอบนาน ได้มีการพัฒนาการตรวจสอบความสามารถในการปฏิสนธิดังกล่าวในหลอดทดลอง จากงานวิจัยของมงคล และคณะ (2539a) ได้ทำการศึกษาพบว่ามีความสัมพันธ์ของคุณภาพน้ำเชื้อในพ่อสุกรแต่ละตัว ระยะเวลาและอุณหภูมิที่เก็บรักษาต่อความสำเร็จในการปฏิสนธินอกร่างกาย (in *vitro* fertilization) แต่วิธีดังกล่าวมีขั้นตอนที่ค่อนข้างสลับซับซ้อน รวมถึงมีความจำเป็นต้องใช้เวลาในการเลี้ยงตัวอ่อนที่ได้เพื่อดูอัตราการแบ่งตัวไปจนถึงระยะมอรูล่า (morula) หรือระยะบลาสโตซีส (blastocyst)

ในช่วงที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาโอโอไซต์แช่แข็งด้วยวิธีการต่างๆ (ธวัชชัย และคณะ, 2542 ; Vajta, 2000) และการเก็บรักษาโอโอไซต์ในสารละลายเกลือ (salt solution) (Mattioli et al., 1990 ; Lynham and Harrison, 1998) ซึ่งวิธีการเหล่านี้จะมีข้อดี เนื่องจากสามารถเก็บรักษาโอโอไซต์ไว้ได้ และมีประโยชน์อย่างมากเมื่อนำโอโอไซต์เหล่านี้มาใช้ตรวจสอบความสามารถในการปฏิสนธิโดยเฉพาะในศูนย์ผลิตน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ และในฟาร์มขนาดใหญ่ที่ต้องการปรับปรุงพันธุ์ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงได้ทำการพัฒนาการตรวจสอบความสามารถในการปฏิสนธิโดยนำโอโอไซต์ที่เก็บ

รักษาด้วยการแช่แข็งและที่เก็บรักษาด้วยวิธีการแช่ในสารละลายเกลือมาใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการปฏิสนธิในพ่อพันธุ์สุกร ซึ่งการพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบดังกล่าวจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในการผลิตสุกรต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อเปรียบเทียบการเจาะผ่านของตัวอสุจิต่อชนิดของโอโอไซต์ที่เก็บรักษาในสารละลายเกลือและแช่แข็งกับโอโอไซต์สด
2. เพื่อเปรียบเทียบผลการเจาะผ่านที่ได้จากการใช้โอโอไซต์ในสภาวะที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิและพร้อมปฏิสนธิในการตรวจสอบ
3. เพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อโดยดูจากการเจาะผ่านของตัวอสุจิในโอโอไซต์

คำถามสำหรับการวิจัย

1. โอโอไซต์ที่เก็บรักษาในสารละลายเกลือ หรือแช่แข็งจะสามารถใช้ในการตรวจสอบการเจาะผ่านของตัวอสุจิได้หรือไม่ เมื่อเปรียบเทียบกับโอโอไซต์ที่เก็บมาใหม่
2. โอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิและพร้อมปฏิสนธิ สามารถใช้ในการตรวจสอบการเจาะผ่านของตัวอสุจิได้เหมือนกันหรือไม่

คำสำคัญ

Pig	Penetration	Oocyte	Sperm	Oocyte preservation
สุกร	การเจาะผ่าน	โอโอไซต์	ตัวอสุจิ	การเก็บรักษาโอโอไซต์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. พัฒนาการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อพ่อสุกรเพิ่มเติมจากการตรวจปกติ โดยวัดความสามารถในการปฏิสนธิของตัวอสุจิ
2. สามารถนำโอโอไซต์ที่เก็บรักษาไว้ไปใช้ในการทดสอบความสามารถในการปฏิสนธิได้เพื่อย่นระยะเวลาในตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ
3. นำไปตรวจสอบความปกติและผิดปกติของน้ำเชื้อพ่อสุกรในศูนย์ผสมเทียมหรือในฟาร์มสุกรได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

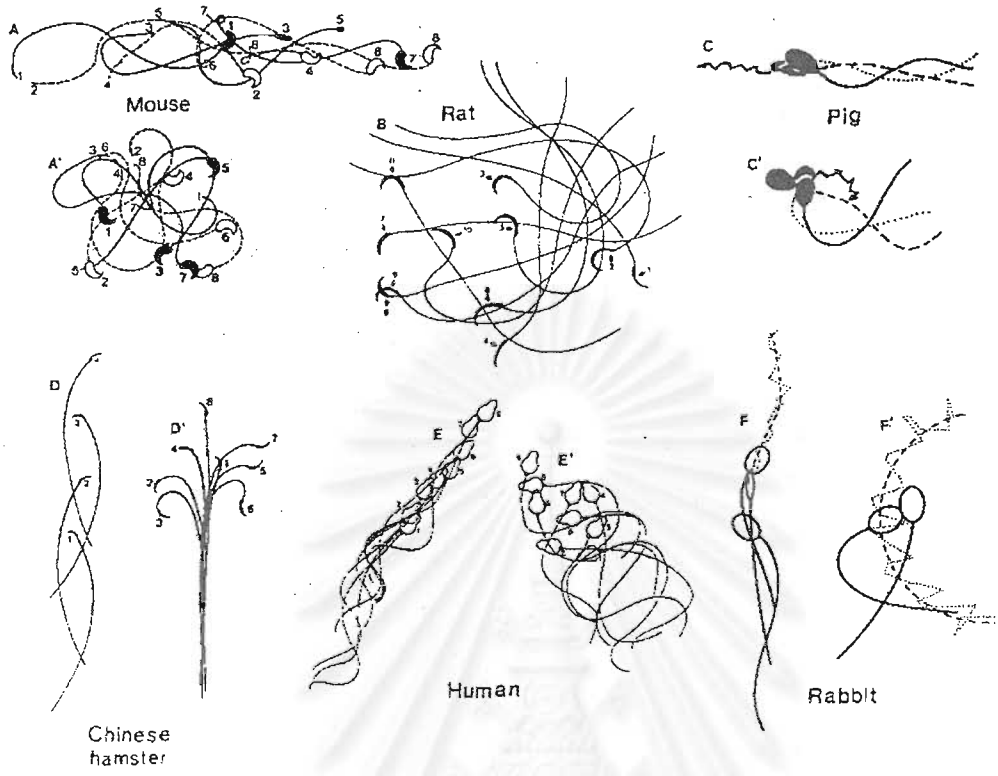
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วนใหญ่หลังจากที่มีการผสมพันธุ์เกิดขึ้น ตัวอสุจิจะถูกปล่อยที่บริเวณปากมดลูกก่อนที่จะมีการกระจายตัวออกไป ส่วนหนึ่งจะเคลื่อนที่ผ่านไปในมดลูกผ่านส่วนต่างๆ ของมดลูกจนถึงท่อนำไข่ การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิในมดลูกนอกจากอาศัยการโบกพัดของส่วนหาง (flagella) ของตัวอสุจิ แล้วยังอาศัยการบีบตัวของกล้ามเนื้อมดลูกซึ่งเป็นผลมาจากฮอร์โมนออกซิโตซิน (oxytocin) หรือสารโปรสตาแกลนดินอีทู และเอฟทูอัลฟา (prostaglandin E_2, $F_{2\alpha}$) (Hunter, 1982) จากนั้นตัวอสุจิจะเคลื่อนที่ผ่านส่วนต่างๆ ของท่อนำไข่ (isthmus, ampulla, infundibulum และ fimbria) โดยใช้เวลาประมาณ 15-30 นาทีหลังจากผสมพันธุ์ (Baker and Degan, 1972)

แม้ว่าปริมาณน้ำเชื้อที่เข้าไปในทางเดินสืบพันธุ์เพศเมียบริเวณท่อนำไข่ส่วนปลาย (isthmus) จะมีจำนวนตัวอสุจิประมาณ 1,000 ถึง 10,000 ตัว และเหลือเพียง 10 ถึง 100 ตัวเมื่อตรวจบริเวณท่อนำไข่ส่วนกลาง (ampulla) ภายใน 4-12 ชั่วโมงหลังการผสมพันธุ์ (Bazer et al., 1993) การที่มีจำนวนอสุจิลดน้อยลงนั้นไม่ได้เกิดจากการเคลื่อนที่ช้าลงของตัวอสุจิ แต่เกิดจากมีการควบคุมจำนวนของอสุจิที่เคลื่อนที่ผ่านเข้าไปในส่วนแอมพูล่าอันเนื่องมาจากการกั้นผ่านบริเวณ utero-tubal junction (UTJ) และในท่อนำส่วนปลาย ซึ่งกลไกต่างๆ เหล่านี้เป็นการป้องกันการเข้าปฏิสนธิหลายตัว (polyspermy)

เมื่อตัวอสุจิเคลื่อนที่มาถึงท่อนำไข่ส่วนปลายตัวอสุจิจะมีการเปลี่ยนแปลงที่เรียกว่า "คาร์ปาซิเตชัน" (capacitation) กระบวนการนี้เป็นการเปลี่ยนแปลงของตัวอสุจิเพื่อให้มีความสามารถในการเกาะติด (binding) และเจาะผ่าน (penetration) ผนังของโอโอไซต์ได้ กระบวนการนี้เป็นชนิดที่เปลี่ยนกลับไปมาได้ซึ่งส่งผลให้เกิดการลดประจุลบบนผิวของตัวอสุจิและมีการไหลออกของคลอเรสเตอรอล นอกจากนี้ยังมีการไหลเข้าของแคลเซียมไอออนระหว่างผนังพลาสมาและผนังอะโครโซมชั้นใน การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้เกิดขึ้นในทางเดินสืบพันธุ์เพศเมีย หรือภายใต้สภาวะที่จัดขึ้นในหลอดทดลอง (Boatman et al., 1988; Parrish et al.,1988 ; Trounson et al., 1994; Fazeli et al., 1997; Januskauskas et al., 2000) ในกระบวนการคาร์ปาซิเตชันของตัวอสุจิจะมีการเปลี่ยนแปลงได้แก่ 1)การเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของโปรตีนที่ผนังเซลล์ของตัวอสุจิ 2) การเปลี่ยนแปลงระดับของไอออนภายในเซลล์โดยเฉพาะมีการเพิ่มของระดับแคลเซียมไอออน และคลอเรสเตอรอลจะถูกกำจัดออกจากผนังเซลล์ของตัวอสุจิเพื่อให้การเข้าออกของสารต่างๆ ได้ง่ายขึ้น รวมไปถึงมีการเปลี่ยนแปลงกระบวนการเมทาบอลิซึม (Yanagimachi, 1994)



รูปที่ 1 การเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วของตัวอสุจิในสัตว์ชนิดต่างๆ ;A-F ก่อนเกิดกระบวนการคาร์ปาซิเตชั่น ; A'-F' หลังเกิดกระบวนการคาร์ปาซิเตชัน (Yanagimachi, 1994)

ตัวอสุจิที่ผ่านกระบวนการคาร์ปาซิเตชันแล้วจะมีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว (hyperactivation) โดยที่ตัวอสุจิจะเปลี่ยนการเคลื่อนไหวในแนวเส้นตรงเป็นการเคลื่อนไหวแบบสบัดหางคล้ายแส้ม้า (whiplash movement) ดังรูปที่ 1

ในปัจจุบันได้มีวิธีการต่างๆ ในการเหนี่ยวนำให้อสุจิเกิดคาร์ปาซิเตชันในหลอดทดลองหลายวิธี ทั้งในมนุษย์ (Trounson et al., 1994) และในสัตว์ต่าง ๆ เช่น แฮมสเตอร์ (Boatman et al., 1988) สุกร (Barboni et al., 1995; Fazeli et al., 1997) โค (Parrish et al., 1988; Januskauskas et al., 2000) และม้า (Cheng, 1997) วิธีการเหล่านี้ได้แก่การใช้น้ำยาที่มีความเข้มข้นสูง (high ionic strength) เพื่อช่วยให้เกิดปฏิกิริยากับโปรตีนที่ผนังเซลล์ของตัวอสุจิทำให้หลุดออกมาได้ การเติมซีรั่มอัลบูมิน (Bovine serum albumin) (Boatman et al., 1988) การใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Barboni et al., 1995)

รวมไปถึงการใช้แคลเซียมไอโอโนฟอร์ (Cheng, 1997) หรือการใช้สารเฮปาริน (Parrish et al.,1988) รวมไปถึงการใช้ modified tyrode's medium ร่วมกับเฮปาริน (Henault et al.,1995) มีรายงานถึงการใช้สารเคมีบางชนิดในการเหนี่ยวนำการเกิดคาร์ปาซิเตชันได้แก่ lysophosphatidyl serine, caffeine, liposomes of phosphatidyl choline และ penicillamine / hypotaurine / epinephrine (PHE) ซึ่งมีการปรับไปใช้ในม้าถึงแม้ว่าผลที่ได้จะยังไม่ดีเท่าที่ควร (Cheng, 1997)

ปฏิกิริยาระหว่างตัวอสุจิกับโอโอไซต์ (sperm–oocyte interaction)

การปฏิสนธิในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะเกิดขึ้นต้องประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 3 ขั้นตอนคือ (Bazer et al., 1993)

1) การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิผ่านเข้าไประหว่างโคโรน่าเรดิเอต้า (corona radiata)
2) การเกาะติดของตัวอสุจิ และการเคลื่อนที่ผ่านผนัง zona pellucida (zona pellucida binding and zona pellucida penetration)
3) การรวมกันของนิวเคลียสของตัวอสุจิกับนิวเคลียสของโอโอไซต์ (gamete fusion)

การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิผ่านเข้าไประหว่างเซลล์คิวมูลัส

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วนมากโอโอไซต์จะมีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบ หากเป็นโอโอไซต์ระยะที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิเซลล์คิวมูลัสจะรวมตัวกันแน่น แต่ถ้าเป็นโอโอไซต์ในระยะพร้อมปฏิสนธิเซลล์คิวมูลัสจะกระจายตัวออกมีช่องว่างพอที่ตัวอสุจิสามารถผ่านเข้าไปได้ ตามธรรมชาติจะมีอสุจิเพียงไม่กี่ตัวเท่านั้นที่สามารถแทรกผ่านชั้นเซลล์คิวมูลัสจนไปถึงผิว zona pellucida ได้ ซึ่งต่างจากสภาพในหลอดทดลองที่จะพบตัวอสุจิเกาะอยู่รอบเซลล์คิวมูลัสเป็นจำนวนมาก (Yanagimachi, 1994)

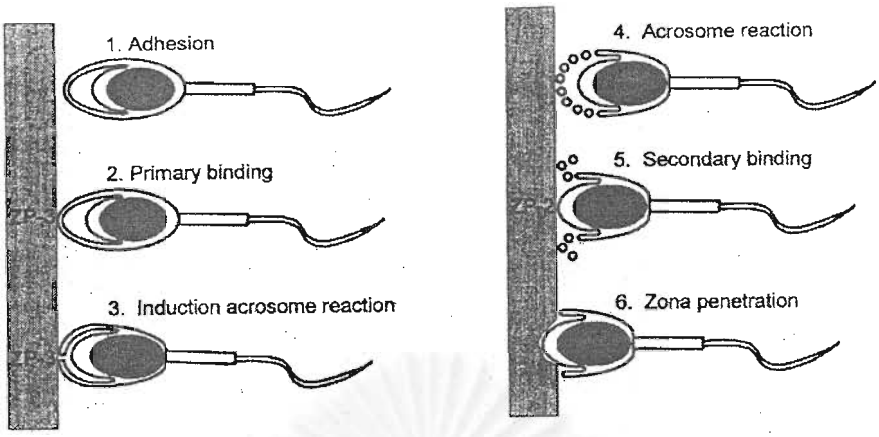
ตัวอสุจิก่อนที่จะผ่านชั้นคิวมูลัสจำเป็นต้องผ่านกระบวนการคาร์ปาซิเตชันมาแล้ว รวมไปถึงมีส่วนของอะโครโซมติดอยู่ (acrosome intact) เมื่อตัวอสุจิจะผ่านเข้าไปในชั้นคิวมูลัสและชั้นโคโรน่าที่อยู่รอบ zona pellucida ตัวอสุจิจะปล่อยเอนไซม์ชนิด hyarulonidase และชนิด corona penetration ออกมาจาก อะโครโซมเพื่อช่วยในการเจาะผ่านอีกทั้งละลายชั้นของเซลล์แกรนูโลซา และเซลล์โคโรน่ารวมไปถึงช่วยย่อยสารต่างๆ ที่ยึดติดกับเซลล์เหล่านั้นก่อนที่ตัวอสุจิจะผ่านถึงชั้น zona pellucida เอนไซม์ hyarulonidase นี้จะพบอยู่ที่ผนังเซลล์ของเยื่อหุ้มอสุจิ (sperm plasma membrane) นอกจากนี้พบว่าตัวอสุจิของแฮมสเตอร์สามารถเจาะผ่านเซลล์คิวมูลัสได้โดยไม่ต้องเกิดปฏิกิริยาอะโครโซม หรือตัวอสุจิ

ของหอยเม่น และกบที่ไม่มีเอนไซม์ hyarulonidase ก็สามารถเจาะผ่านเซลล์คิวมูลัสที่หุ้มล้อมรอบโอโอไซต์ของแฮมสเตอร์ได้ (Yanagimachi, 1994)

การเกาะติดของตัวอสุจิและการเคลื่อนที่ผ่านผนัง zona pellucida

zona pellucida มีคุณสมบัติเป็นไกลโคโปรตีนทำหน้าที่ในการปกป้องความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับโอโอไซต์หรือตัวอ่อน มีความหนามากน้อยแตกต่างกันไปในสัตว์แต่ละชนิด เช่นในสุกรมีความหนา 16 ไมโครเมตร ประกอบด้วยเยื่อหุ้ม 2 ชั้น ชั้นนอกมีลักษณะเป็นร่างแหคล้ายฟองน้ำ (fenestrated spongelike structure) ชั้นในมีลักษณะเนื้อผิวละเอียด (fine granular appearance) (Yanagimachi, 1994) ในหนูเม้าส์ zona pellucida สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิดคือ ZP1, ZP2 และ ZP3 ซึ่งโครงสร้างเหล่านี้พบได้ในโอโอไซต์ที่พร้อมปฏิสนธิ zona pellucida ทั้ง 3 ชนิดนี้จะทำหน้าที่แตกต่างกันไป เริ่มต้นที่ ZP3 จะทำหน้าที่เป็นตัวรับเริ่มต้นเพื่อให้ตัวอสุจิที่มีส่วนของอะโครโซมติดอยู่มาเกาะก่อนที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาอะโครโซม ดังรูปที่ 2 (Kupker et al., 1998) ตัวอสุจิที่มาเกาะนั้นจะทำปฏิกิริยากับ o-linked oligosaccharide ที่อยู่บน ZP3 White และคณะ (2000) พบว่าในหนูเม้าส์ยังมีสารประกอบที่เรียกว่า "sulfogalactosylglycerolipid" ที่มีส่วนช่วยให้ตัวอสุจิเกาะติดกับผนังzona pellucida ได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์บางชนิดได้แก่ glycosyl transferase, proteinase และ glycosidase ที่ปกคลุมอยู่บนเยื่อหุ้มอสุจิ เอนไซม์เหล่านี้จะเป็นตัวช่วยให้ตัวอสุจิสามารถเกาะกับ ZP3 ได้แน่นหนาขึ้น (Bazer et al., 1993) จากนั้น ZP2 จะทำหน้าที่เกาะติดกับตัวอสุจิภายหลังเกิดปฏิกิริยาอะโครโซมก่อนที่ตัวอสุจิจะเจาะผ่านผนัง zona pellucida เข้าไป (Cheng, 1997)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

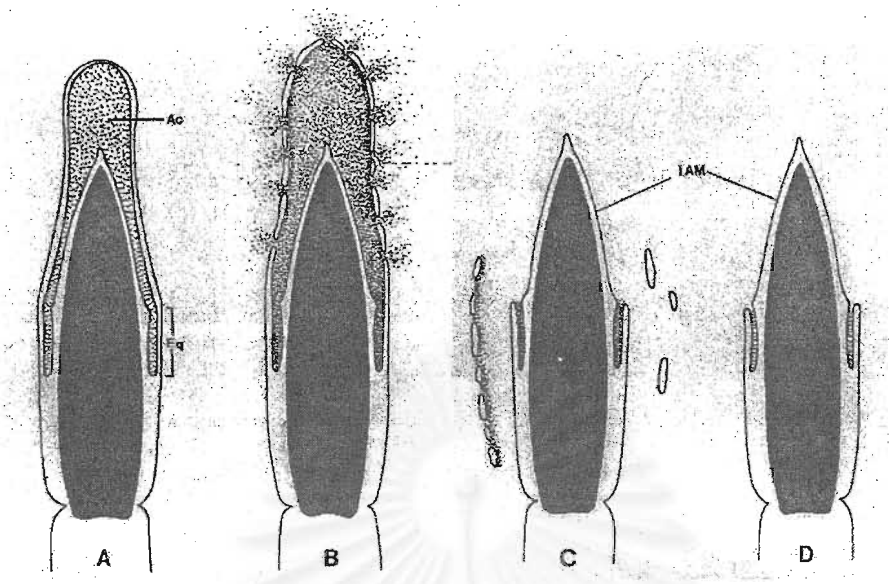


รูปที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างตัวอสุจิกับ zona pellucida ในหนูเม้าส์ (Cheng, 1997)

ปฏิกิริยาอะโครโซม

ขั้นตอนนี้จะเกิดขึ้นหลังจากที่ตัวอสุจิไปเกาะติดกับผนัง zona pellucida แล้ว ตามธรรมชาติจะมีเซลล์คิวมูลัส และ follicular fluid เป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาอะโครโซมนี้ได้ ปฏิกิริยานี้จะเกี่ยวข้องกับการรวมตัวของเยื่อหุ้มอะโครโซมชั้นนอกกับเยื่อหุ้มตัวอสุจิ และมีการสร้าง vesicle ขึ้นดังรูปที่ 3 การรวมตัวกันนี้เกิดขึ้นในเวลาอันสั้น ในช่วงเวลาดังกล่าวมีการไหลเข้าของแคลเซียมไอออนซึ่งจะทำให้คุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง สภาพความเป็นกรดด่างในเซลล์เปลี่ยนแปลงไป มีการรั่วไหลของเอนไซม์ที่อยู่ในอะโครโซม (Kupker et al., 1998)

ปฏิกิริยาอะโครโซมสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นในหลอดทดลองได้ มีการศึกษาถึงการเกิดปฏิกิริยาอะโครโซมในมนุษย์ โค สุกร ม้า และในสุนัข (Sirivaidyapong, 2000) โดยการนำตัวอสุจิมาเลี้ยงใน follicular fluid ซึ่งภายในของเหลวนี้จะมีฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนอยู่ ฮอร์โมนนี้จะไปมีผลต่อตัวรับ (progesterone receptor) ที่อยู่บนผิวของตัวอสุจิก่อนที่จะเกิดปฏิกิริยาอะโครโซมตามมา ตัวอสุจิที่หลั่งออกมาจากสัตว์นั้น ตัวรับจะถูกปกคลุมด้วยโปรตีน และไกลโคโปรตีน จากน้ำเลี้ยงอสุจิ สารเหล่านี้จะถูกกำจัดออกไปจากพื้นผิวตัวอสุจิในขณะเกิดกระบวนการคาร์ปาซิเตชัน (Yanagimachi, 1994)



รูปที่ 3 การเกิดปฏิกิริยาอะโครโซม; (A) ก่อนเกิดปฏิกิริยา; (B) ขณะเกิดปฏิกิริยามีการเชื่อมกันผนังหุ้มอะโครโซมชั้นนอกกับเยื่อหุ้มตัวอสุจิ ; (C-D) ปฏิกิริยาเกิดเสร็จสมบูรณ์
AC = acrosomal cap; IAM = inner acrosomal membrane
Eq = equatorial segment (Yanagimachi, 1994)

การเจาะผ่านผนัง zona pellucida

ตัวอสุจิมีการเจาะผ่านผนัง zona pellucida ภายในเวลา 5-15 นาทีหลังจากไปเกาะติดกับผนัง zona pellucida ก่อนที่จะมีการเกิดปฏิกิริยาอะโครโซมตามมา เมื่อปฏิกิริยานี้เสร็จสิ้นจะมีการหลั่ง zona lysin ออกมาเพื่อให้ตัวอสุจิสามารถผ่านผนัง zona pellucida ไปจนถึงชั้น vitelline membrane ได้ ภายในอะโครโซมของตัวอสุจิจะมีเอนไซม์อยู่หลายชนิดได้แก่ hyarulonidase, proacrosin, esterases phospholipase A2 , acid phosphatase, arylsulfatase, β-N-acetylglucosaminidase, arylamidase และ acid proteinase เอนไซม์ต่างๆ เหล่านี้จะมีปริมาณและความสำคัญแตกต่างกันไปตามชนิดของสัตว์ (Bazer et al., 1993)

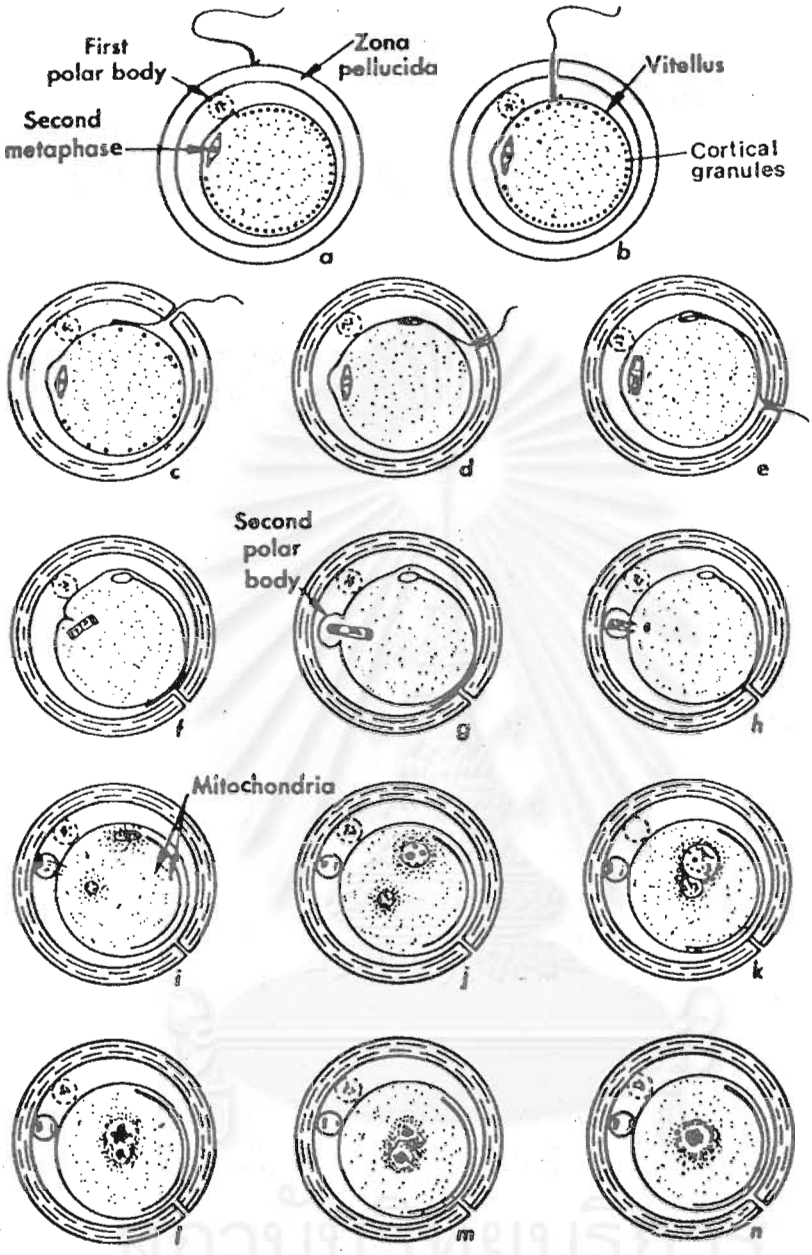
Acrosin เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการละลายผนัง zona pellucida ทำให้ตัวอสุจิสามารถเจาะผ่านเข้าไปได้ โดยปกติแล้วเอนไซม์นี้จะอยู่ในรูปของ proacrosin ซึ่งไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ จนกระทั่งเกิดปฏิกิริยาอะโครโซมขึ้น proacrosin จะถูกหลั่งออกมาสู่ภายนอก โดยจะพบได้ทั้งที่ผนังหุ้มอะโครโซมชั้นใน และที่ผนัง zona pellucida ทำให้เกิดการคงสภาพของตัวอสุจิในขณะที่สัมผัสกับผนัง

ของ zona pellucida ก่อนที่จะถูกกระตุ้นให้เปลี่ยนเป็น acrosin สามารถออกฤทธิ์ได้ acrosin จะทำให้ผนังของ zona pellucida อ่อนนุ่มขึ้นเพื่อให้ตัวอสุจิสามารถแทรกผ่านผนังเข้าไปได้ ในขณะเดียวกันบริเวณใกล้เคียงกันนั้นจะมีการสร้างทางเดินอสุจิ (sperm track) ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับทางผ่านของตัวอสุจิเกิดขึ้น (Yanagimachi, 1994) ในการเจาะผ่านผนัง zona pellucida นั้นนอกจากจะใช้เอนไซม์เป็นตัวช่วยย่อยแล้ว การเคลื่อนไหวของตัวอสุจิเองก็มีส่วนสำคัญโดยเฉพาะส่วนหาง เพื่อให้ตัวอสุจิสามารถเจาะผ่านเข้าไปได้เช่นกัน (Bazer et al., 1993)

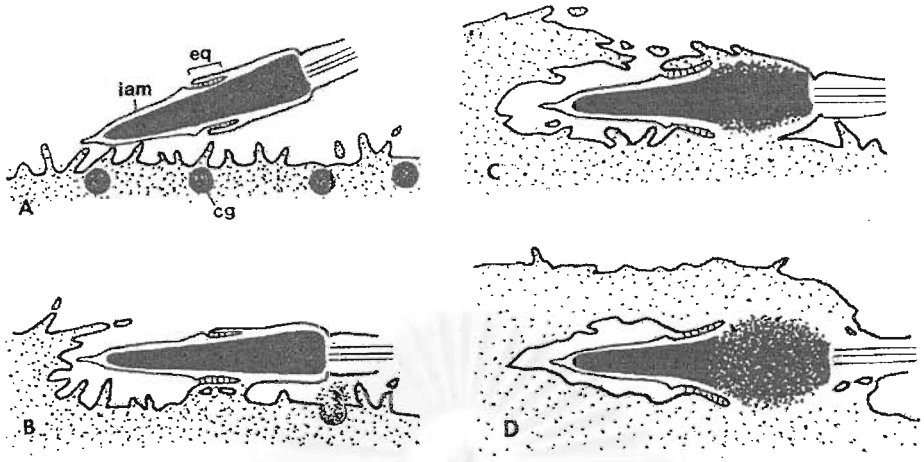
ในสภาพปกติผนัง zona pellucida จะมีความจำเพาะในสัตว์ชนิดเดียวกันทั้งนี้เพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอสุจิที่มาจากสัตว์ต่างชนิดกันเจาะผ่านเข้ามาได้นอกจากจะมีการนำเปลือก zona pellucida ออกซึ่งมีผลทำให้ความจำเพาะลดลงได้ในบางกรณี เช่นการนำโอโอไซต์ที่ได้มาจากหนูแฮมสเตอร์มาแยกเปลือก zona pellucida ออกซึ่งโอโอไซต์ที่ได้นี้เรียกว่า "zona-free oocyte" แล้วนำโอโอไซต์ชนิดนี้มาใช้ในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อของสัตว์ชนิดต่างๆ รวมทั้งในมนุษย์ นอกจากนี้ยังใช้ในการตรวจโครโมโซมในมนุษย์อีกด้วย (Yanagimachi, 1984)

การเชื่อมกันของตัวอสุจิกับนิวเคลียสของโอโอไซต์

ตัวอสุจิจะผ่านผนัง zona pellucida เข้ามาจนถึงชั้น perivitelline space และชั้นเยื่อ vitelline ในเวลาอันสั้น เยื่อ vitelline นี้ถูกปกคลุมไปด้วย microvilli มีการเรียงตัวกันอย่างหนาแน่นยกเว้นบริเวณที่เกิดโพลาร์บอดีที่สองซึ่งมีการหลุดออกหลังจากมีการปฏิสนธิเกิดขึ้น (Bazer et al., 1993) เมื่อตัวอสุจิมาถึงชั้นนี้แล้วส่วนหัวของตัวอสุจิจะเกาะติดกับผนังเซลล์ไข่ (oolemma) และเข้าไปในไซโทพลาสซึมของเซลล์ไข่ดังรูปที่ 4 การเชื่อมกันของตัวอสุจิกับเซลล์ไข่นั้นจะอาศัยเยื่อหุ้มบริเวณ equatorial segment และ postacrosomal region ที่อยู่บนตัวอสุจิ เมื่อตัวอสุจิทำการเชื่อมกับผนังเซลล์ไข่นั้นจะเริ่มต้นโดยตัวอสุจิจะเรียงตัวในแนวขนานกับเซลล์ไข่ จากนั้นส่วน equatorial segment จะเชื่อมไปกับเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ดังรูปที่ 5A จากนั้นเซลล์ไข่จะมีการเคลื่อนที่เข้ามาโอบล้อมรอบตัวอสุจิในลักษณะคล้ายการโอบล้อม (phagocytosis) ดังรูปที่ 5 B-D ก่อนที่จะมีการสลัดส่วนหางทิ้งไป (Yanagimachi, 1994)



รูปที่ 4 ขั้นตอนการเกิดปฏิสนธิหลังจากที่ตัวอสุจิผ่านเข้าไปในโอโอไซต์ ; a) ตัวอสุจิเกาะติดที่ผนัง zona pellucida ; b) ตัวอสุจิเจาะผ่านผนังเข้ามา; c-h) ส่วนหัวของตัวอสุจิเชื่อมกับส่วนไซโตพลาสซึมของโอโอไซต์ และเริ่มมีการสร้างโพลาร์บอดีที่ 2 ; i-j) เกิดการสร้างโปรนิวเคลียสของตัวอสุจิ และโอโอไซต์; k-n) เกิดการรวมตัวของโปรนิวเคลียสทั้งสอง (Yanagimachi, 1994)



รูปที่ 5 ขั้นตอนขณะที่ตัวอสุจิมีการเชื่อมกับผนังโอโอไซต์ ; A) ส่วน eq เชื่อมกับเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ ; B-D) ไซโทพลาสซึมของเซลล์ไข่มาโอบล้อมตัวอสุจิ ; iam=inner acrosomal membrane eq = equatorial segment ; cg= cortical granules (Yanagimachi, 1994)

การป้องกันการเข้าปฏิสนธิของอสุจิหลายตัว (polyspermy block)

หลังจากที่ตัวอสุจิตัวแรกผ่านเข้าไปในไซโทพลาสซึมของโอโอไซต์แล้วจะเกิดการป้องกันไม่ให้ตัวอสุจิอื่นๆ สามารถเจาะผ่านเข้ามาอีกได้ กลไกที่ว่านี้ได้แก่ "cortical reaction" และ "polyspermy block" โดยตามธรรมชาติแล้วโอกาสที่จะเกิดการปฏิสนธิซ้อนกันมีน้อยมาก เนื่องจากมีกระบวนการต่างๆ ในการกรองตัวอสุจิตามบริเวณต่างๆ เช่นที่ utero-tubal junction หรือในขณะที่ตัวอสุจิผ่านชั้นเซลล์คิวมูลัสเป็นต้น ซึ่งต่างจากการปฏิสนธิในหลอดทดลอง (*in vitro* fertilization) ที่จะมีโอกาสพบตัวอสุจิในโอโอไซต์ได้มากกว่าหนึ่งตัว (Yanagimachi, 1994) ปฏิกิริยาในการป้องกันการผ่านของตัวอสุจิอื่นๆ นั้นถ้าเกิดการล้มเหลวขึ้นมีผลทำให้ตัวอสุจิผ่านเข้ามาได้หลายตัวจะไปมีผลทำให้ตัวอ่อนมีโครโมโซมหลายชุดซึ่งจะเกิดการตายของตัวอ่อนในระยะแรกตามมา หรือมีการเจริญของตัวอ่อนที่ผิดปกติไป การป้องกันการผ่านเข้ามาปฏิสนธิของตัวอสุจิพบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั่วไป เช่น สุกร แกะ รวมไปถึงมีกลไกป้องกันเพิ่มขึ้นอีกชั้นในสัตว์บางชนิด เช่น กระต่าย การป้องกันการเจาะผ่านนั้นยังต้องอาศัยปฏิกิริยาจาก cortical granule ที่มีการหลั่งสารเข้าไปใน perivitelline space เสียก่อน สารที่หลั่งออกมานั้นจะไปมีผลทำให้ผนัง zona pellucida และพื้นผิวของ vitelline มีการจัดเรียงตัวใหม่ปรากฏการณ์เหล่านี้เรียกว่า "cortical reaction" เมื่อปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นแล้วจะมีผลทำให้ผนัง zona pellucida เพิ่มความแข็งขึ้น ทำให้ ZP3 อยู่ในรูปที่ไม่ออกฤทธิ์ รวมไปถึงมีเอนไซม์ที่ไปย่อย o-linked oligosaccharide บน ZP3

ทำให้ตัวอสุจิไม่สามารถมายึดเกาะได้ นอกจากนี้ยังมีการย่อยโปรตีนที่อยู่บน ZP2 ทำให้ลักษณะทางกายภาพของ zona pellucida เปลี่ยนแปลงไปเพื่อป้องกันการเจาะผ่านของตัวอสุจิเข้ามาได้ (Bazer et al., 1993)

การสร้างโปรนิวเคลียสของตัวอสุจิและโอโอไซต์

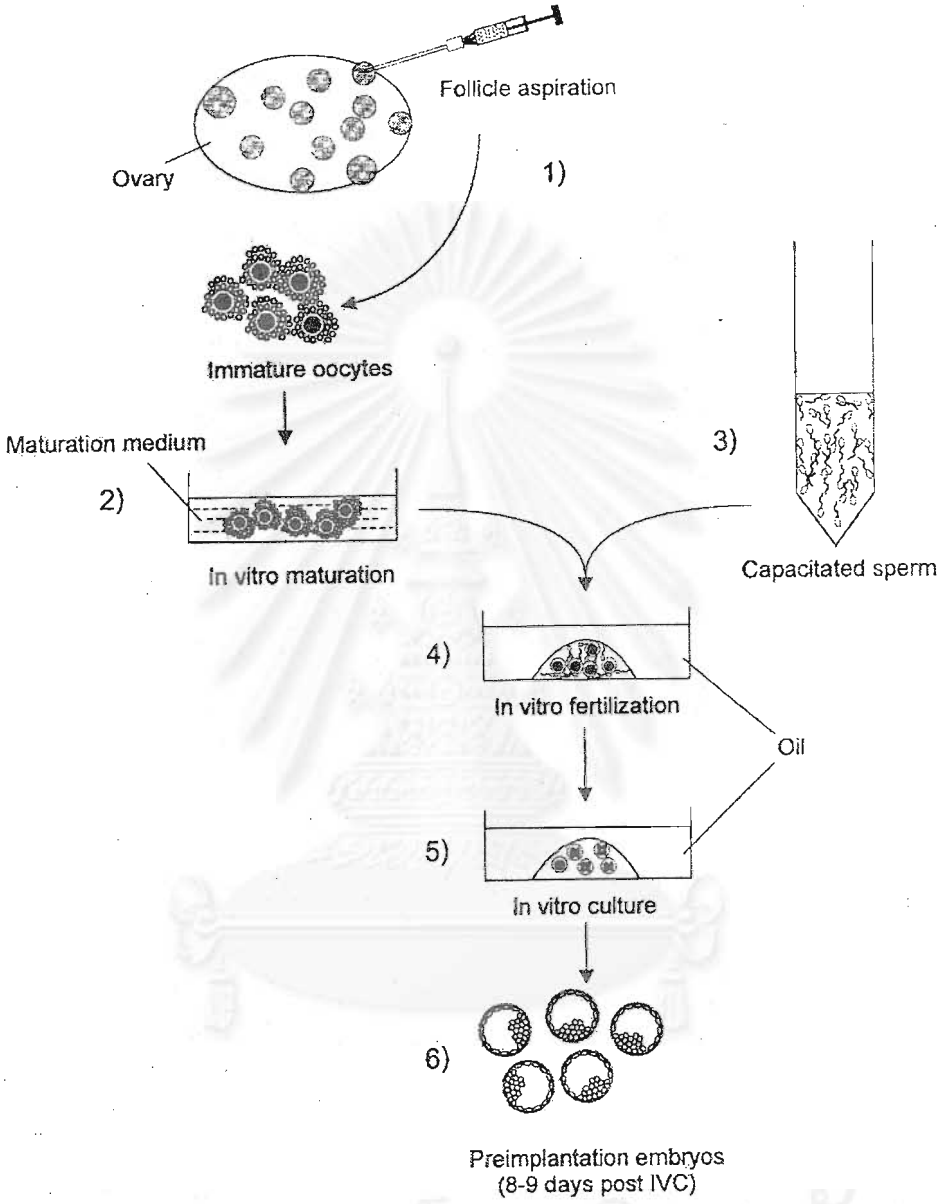
เมื่อตัวอสุจิผ่านเข้ามาสู่ไซโทพลาสซึมของเซลล์ไข่แล้วผนังเยื่อหุ้มนิวเคลียสของตัวอสุจิจะมีการสลายตัวไป นิวเคลียสของตัวอสุจิมีการหดตัวลงแน่น (sperm decondensation) จากนั้นโครมาตินจะมีการกระจายตัวออกไป ในขณะเดียวกันนิวเคลียสของโอโอไซต์จะสลายตัวของเช่นกัน ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า "Germinal vesicle breakdown" (GVBD) และมีการสร้างโปรนิวเคลียสเกิดขึ้น จากนั้นโปรนิวเคลียสทั้งสองจะเคลื่อนที่ไปตรงกลาง แล้วรวมตัวกันเพื่อแลกเปลี่ยนโครมาติน (ดังรูปที่ 4k-n) เกิดเป็นเซลล์ที่มีโครโมโซม 2n หลังจากนั้นจะมีการแบ่งตัวแบบไมโทซิสเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ตัวอ่อนในท่อนำไข่จนถึงระยะตัวอ่อนเข้าไปในมดลูกก่อนที่จะมีการฝังตัวต่อไป (Yanagimachi, 1994)

การปฏิสนธิภายนอกร่างกาย (*In Vitro* Fertilization; IVF)

การปฏิสนธิภายนอกร่างกายเป็นการนำตัวอสุจิ และโอโอไซต์มาปฏิสนธิภายในหลอดทดลอง โดยมีการจัดสภาวะแวดล้อมให้ใกล้เคียงกับธรรมชาติมากที่สุด เมื่อเกิดการปฏิสนธิจนได้ตัวอ่อนแล้วจึงนำตัวอ่อนมาเลี้ยงไว้ภายนอกจนถึงระยะเวลาที่เหมาะสม ก่อนที่จะนำตัวอ่อนไปย้ายฝากในครรภ์ของสัตว์อีกตัวหนึ่งเพื่อให้เกิดการตั้งท้อง ดังนั้นจึงอาจวิธีนี้ได้อีกว่า *"In vitro* embryo production" (IVP; Jainudeen et al., 2000) วิธีนี้จะเกี่ยวข้องกับการเก็บโอโอไซต์จากฟอลลิเคิลของรังไข่ ก่อนที่จะนำไปผ่านขั้นตอนต่างๆ ได้แก่ การเลี้ยงให้เกิดภาวะพร้อมปฏิสนธิ (in *vitro* maturation; IVM) การปฏิสนธิภายนอก (IVF) และการเลี้ยงตัวอ่อน (in *vitro* culture; IVC) ดังรูปที่ 6

ขั้นตอนการของการปฏิสนธิภายนอกร่างกายได้แก่

1. การเก็บโอโอไซต์
2. การเลี้ยงโอโอไซต์ให้พร้อมปฏิสนธิ
3. การเก็บน้ำเชื้อ และทำให้ตัวอสุจิพร้อมปฏิสนธิ
4. การปฏิสนธิในหลอดทดลอง
5. การเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดทดลอง



รูปที่ 6 ขั้นตอนในการปฏิสนธิภายนอก ; 1) การเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ ; 2) การเลี้ยงโอโอไซต์ให้พร้อมปฏิสนธิ ;3) การเตรียมตัวอสุจิให้พร้อมปฏิสนธิ ; 4) การเลี้ยงร่วมกันระหว่างตัวอสุจิและโอโอไซต์ ; 5) การเลี้ยงตัวอ่อนหลังปฏิสนธิ; 6) ตัวอ่อนที่ได้ก่อนนำไปย้ายฝากในสัตว์ตัวรับ (Jainudeen et al., 2000)

1. การเก็บโอโอไซต์

วิธีในการเก็บโอโอไซต์ที่ใช้ในการปฏิสนธิภายนอกนั้นสามารถเก็บมาได้หลายวิธี ได้แก่การเจาะดูดเก็บโอโอไซต์ (oocyte aspiration) หรือการสับ (crop) รังไข่เพื่อให้ได้โอโอไซต์ที่มาจากสัตว์ในโรงฆ่าสัตว์โดยวิธีนี้เป็นที่นิยมใช้กัน (มงคล และคณะ, 2536; Hillery et al., 1990; Ivanova and Mollova, 1993; Lynham and Harrison, 1998; Larsson and Rodriguez-Martinez, 2000) การเปิดผ่าเก็บโอโอไซต์จากในช่องท้อง (Luvoni and Pellizzali, 2000 ; Strom Holst et al., 2000) การเก็บผ่านช่องท้องโดยใช้ลาปาโรสโคป์ (laparoscopy; Lambert et al., 1983) การเก็บโอโอไซต์โดยใช้เครื่องตรวจอวัยวะภายในด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (ovum pick up) (Pieterse et al., 1991; Brogliatti and Adams, 1996) โอโอไซต์ที่สามารถใช้แบบสดนี้สามารถนำไปเก็บแช่แข็งได้ (Otoi et al.,1995; Otoi et al., 1998;Hurtt et al., 2000; Luvoni and Pellizzali, 2000; Vajta, 2000) ซึ่งแต่ละวิธีจะมีข้อจำกัดที่แตกต่างกันไป นอกจากการเจาะดูดเก็บโอโอไซต์แล้วยังสามารถเก็บโอโอไซต์โดยการตัดรังไข่ออกเป็นชิ้นๆ (Jainudeen et al., 2000) โดยโอโอไซต์ที่เก็บได้ใน 3 ลักษณะแตกต่างกันไปคือ (มงคล, 2543)

1. จากฟอลลิเคิลขนาดใหญ่มีขนาดมากกว่า 5 มิลลิเมตร จะมีโอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสแผ่ขยายหุ้มรอบเปลือกของโอโอไซต์ เป็นโอโอไซต์ที่เจริญพร้อมปฏิสนธิ
2. จากฟอลลิเคิลที่กำลังพัฒนาเป็นฟอลลิเคิลที่กำลังเจริญคือขนาดน้อยกว่า 5 มิลลิเมตรจะได้โอโอไซต์อย่างน้อย 3 แบบคือ ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มรอบหลายชั้น (compacted cumulus oocyte, CCO) ชนิดที่มีเพียง 2-3 ชั้น หรือบางส่วน (single layers หรือ partial cumulus oocyte) และชนิดที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มรอบเลย (denude oocyte) ซึ่งโอโอไซต์เหล่านี้เป็นชนิดที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ
3. จากการชะล้างท่อนำไข่ภายหลังการตกไข่เพียงเล็กน้อย โอโอไซต์ที่ได้จะเป็นชนิดที่เจริญพร้อมปฏิสนธิมีลักษณะเดียวกับโอโอไซต์ที่มาจากฟอลลิเคิลขนาดใหญ่

2. การเลี้ยงโอโอไซต์ให้พร้อมปฏิสนธิ

เมื่อได้โอโอไซต์มาแล้วหากเป็นโอโอไซต์ที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิจะต้องนำมาเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์ร่วมกับ 10% fetal calf serum ซึ่งมีส่วนประกอบของฮอร์โมน FSH , LH และเอสโตรเจน โดยทำการเลี้ยงในถาดพลาสติก หรือทำเป็นหยดขนาดเล็กๆ (microdrop) และปกคลุมด้วย mineral oil (Jainudeen et al., 2000) จากนั้นทำการเลี้ยงในตู้อบอุณหภูมิ 39 ^{o}ซ ใน 5% CO_2 ความชื้นเต็มที่นาน 40-44 ชั่วโมงในสุกร (มงคล และคณะ, 2536) 20-30 ชั่วโมง ในโค และกระบือ (Jainudeen et al., 2000) เพื่อให้โอโอไซต์เจริญพร้อมปฏิสนธิโดยจะพบว่ามีการหลุดของโพลาร์บอดีที่ 1 บริเวณขอบผิวของโอโอไซต์

3. การเก็บน้ำเชื้อ และเตรียมตัวอสุจิให้พร้อมปฏิสนธิ

แหล่งของตัวอสุจิที่ใช้ในการปฏิสนธิภายนอกนั้นสามารถนำมาได้จากหลายแหล่งด้วยกัน เช่น การเก็บมาจากน้ำเชื้อสด หรือน้ำเชื้อแช่แข็ง รวมไปถึงการเก็บน้ำเชื้อที่ได้มาจากท่อ epididymis (Henault et al.,1995; Sirivaidyapong et al., 1999) น้ำเชื้อเหล่านี้ยังไม่สามารถนำมาใช้งานได้ทันทีต้องไปผ่านกระบวนการคาร์ปาซิเตชั่นเสียก่อน เพื่อให้สามารถพร้อมปฏิสนธิได้เช่นเดียวกับที่เกิดตามธรรมชาติในท่อทางเดินสืบพันธุ์ ในหลอดทดลองนั้นโดยทั่วไปตัวอสุจิจะใช้เวลาประมาณ 4-6 ชั่วโมง (มงคล, 2543) ซึ่งมีวิธีในการเตรียมอย่างน้อย 2 วิธีได้แก่

1. การทำให้ตัวอสุจิว่ายขึ้น (swim up technique)

วิธีการนี้เป็นวิธีที่คัดเลือกตัวอสุจิ และแยกตัวอสุจิออกมาจากน้ำเลี้ยงเชื้อโดยปล่อยให้ตัวอสุจิเคลื่อนตัวสู่ผิวของน้ำยา ตัวอสุจิที่ว่ายขึ้นจะเป็นตัวอสุจิที่มีความแข็งแรง และมีลักษณะการเคลื่อนตัวเป็นแบบสะบัดแส้ม้า

2. การใช้น้ำยา percoll ที่มีความเข้มข้นต่างกัน

วิธีนี้เป็นการเตรียมตัวอสุจิวิธีหนึ่งที่ใช้การปั่นแยกเฉพาะตัวอสุจิที่มีชีวิตโดยใช้น้ำยา percoll ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เช่น 50% และ 70% เป็นต้นวางเป็นชั้นแยกกัน วิธีนี้ส่วนมากนิยมใช้ในการเตรียมอสุจิของมนุษย์แต่ก็มีรายงานในสัตว์เช่นกัน (มงคล, 2543)

4. การปฏิสนธิในหลอดทดลอง

นำโอโอไซต์ และตัวอสุจิที่มีความพร้อมปฏิสนธิแล้ว ใส่ลงไปในน้ำยาปฏิสนธิ (fertilization medium) ในตู้อบที่อุณหภูมิ 39^{o}ซ ใน 5%CO_2 ความชื้นเต็มที่จากนั้นทิ้งไว้นาน 18 ชั่วโมง เมื่อครบ

กำหนดแล้วนำตัวอ่อนที่ได้มาทำการลอกเอาเซลล์คิวมูลัสออกโดยการใช้ไปเปตดูดเข้าออกหลายๆ ครั้ง หรือการใช้เครื่อง vortex จนเซลล์คิวมูลัสที่อยู่รอบๆ ลอกหลุดออกมา จากนั้นทำการตรวจการปฏิสนธิโดยดูได้จาก (Jainudeen et al., 2000)

1. การตรวจพบตัวอสุจิเจาะผ่านเข้าไปในไซโทพลาสซึมของโอโอไซต์
2. มีการบวมของหัวอสุจิ มีการสร้างโปรนิวเคลียส และอาจพบโพลาร์บอดีที่ 2
3. มีการแบ่งตัวของตัวอ่อนเข้าสู่ระยะคลีเวท (clevage)
4. มีการแตกออกของ cortical granule
5. ตรวจพบส่วนหางของตัวอสุจิในไซโทพลาสซึมของโอโอไซต์

การนำเทคนิคการปฏิสนธิภายนอกไปใช้ตรวจความสามารถในการปฏิสนธิของตัวอสุจิ

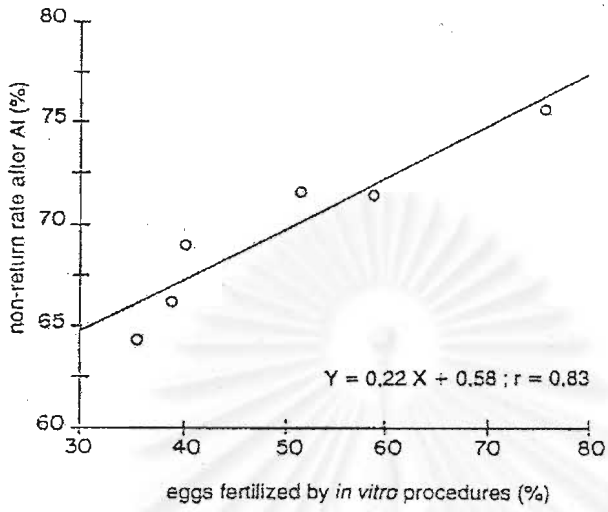
คุณภาพน้ำเชื้อมีส่วนสำคัญต่อความสำเร็จในการผสมติดและการตั้งท้อง โดยเฉพาะในพ่อพันธุ์ที่จะนำน้ำเชื้อไปใช้ในการผสมเทียม ประโยชน์ที่ได้จากการตรวจสอบนี้ได้แก่ รู้ถึงความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อพันธุ์แต่ละตัว ความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับระบบสืบพันธุ์เพศผู้ โดยทั่วไปการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อนิยมใช้วิธีการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์อันได้แก่ การเคลื่อนไหว (motility) รูปร่างลักษณะ (morphology) ความเข้มข้นของตัวอสุจิ (Althouse, 1997a ; Ax et al., 2000) การตรวจนับจำนวนตัวเป็นตัวตาย ใช้การย้อมสีด้วยวิธีการต่างๆ (Althouse and Hopkins,1995; Ax et al., 2000) รวมไปถึงการตรวจสอบความแข็งแรงของผนังเยื่อหุ้มส่วนหางของตัวอสุจิ (sperm tail membrane integrity) (Nagy et al., 1999) นอกจากวิธีดังกล่าวแล้วในปัจจุบันยังได้พัฒนาเทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้ในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อในหลอดทดลอง (*in vitro* assessment) ได้แก่ ความแข็งแรงของผนังเซลล์ (cell membrane integrity) การบวมของตัวอสุจิ (hypoosmotic swelling test) การตรวจสอบการใช้พลังงานในการเกิดเมทาบอลิซึมของอสุจิที่มีชีวิต (Resazurin test) (Althouse,1997b) ความสามารถในการเกิดคาร์ปาซิเตชัน (Januskauskas et al., 2000) การเกิดปฏิกิริยาอะโครโซม (Sirivaidyapong et al., 2000 ; Sirivaidyapong et al., 1999) รวมไปถึงการใช้เทคนิคการปฏิสนธินอกร่างกาย (*in vitro* fertilization : IVF) (Larsson and Rodriguez-Martinez, 2000)

การปฏิสนธินอกร่างกายได้มีการพัฒนาและใช้ในการผลิตสัตว์กันเป็นจำนวนมาก รวมไปถึงใช้ในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อในสัตว์หลายชนิด (Larsson and Rodriguez-Martinez, 2000) เทคนิคนี้ทำได้โดยการนำตัวอสุจิมาปฏิสนธิกับโอโอไซต์ภายนอกท่อนำไข่ โดยจัดสภาวะแวดล้อมให้ใกล้เคียงตามธรรมชาติมากที่สุด ก่อนที่จะนำตัวอ่อนที่ได้ทำการย้ายฝากในแม่สัตว์ตัวรับต่อไป วิธีการเหล่านี้เกี่ยวข้อง

กับการเลี้ยงโอโอไซต์ในหลอดทดลอง (*in vitro* maturation: IVM) การปฏิสนธินอกร่างกายและการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดทดลอง (*in vitro* culture: IVC) ได้มีการนำเทคนิคเหล่านี้มาใช้ในการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อในมนุษย์ด้วยการประเมินความสามารถในการปฏิสนธิของตัวอสุจิกับโอโอไซต์ของหนูแฮมสเตอร์ที่เอาชั้นเปลือกนอกออก (zona-free hamster oocyte) แล้วทำการตรวจหาจำนวนตัวอสุจิที่เข้าไปในไซโทพลาสซึม (sperm penetration) รวมไปถึงทำการนับจำนวนอสุจิที่เข้าปฏิสนธิด้วย วิธีการนี้เรียกว่า "zona- free hamster test" วิธีนี้นอกจากมีการใช้ในมนุษย์แล้วยังสามารถนำมาดัดแปลงใช้ในสัตว์ได้หลายชนิด (Yanagimachi, 1984; Berger and Horton, 1988)

การใช้โอโอไซต์ชนิดพร้อมปฏิสนธิ

นอกเหนือจากการใช้โอโอไซต์ของแฮมสเตอร์ในการทดสอบแล้วในสัตว์ชนิดอื่น ๆ ได้มีการนำโอโอไซต์ และตัวอสุจิของสัตว์ชนิดเดียวกันมาใช้ในการทดสอบความสมบูรณ์พันธุ์ และตรวจสอบจากอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนในระยะแรก ตัวอ่อนที่พัฒนาเป็นระยะ 8-16 เซลล์ จนเป็นตัวอ่อนระยะมอรูล่าและระยะบลาสโตซีส (Hillery et al., 1990 ; มงคล และคณะ, 2539b) ซึ่งผลที่ได้พบว่าความสามารถในการปฏิสนธิแตกต่างกันเมื่อใช้น้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์สุกรคนละตัวกัน (มงคล และคณะ, 2539b) โดยความ แตกต่างของคุณภาพน้ำเชื้อที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกายนี้ สามารถนำไปศึกษาถึงความสัมพันธ์กับการปฏิสนธิในร่างกายสัตว์ได้ (*in vivo* fertilization) จากการทดลองในโค Marquant-Le Guienne และคณะ (1990) พบว่ามีความสัมพันธ์ในเชิงบวก (สหสัมพันธ์, r =0.83 ; รูปที่ 7) ระหว่างอัตราการเจริญเป็นตัวอ่อนในระยะบลาสโตซีสหลังทำการปฏิสนธินอกร่างกายกับอัตราการไม่กลับเป็นสัด (non return rate) โดยพบว่าถ้าใช้น้ำเชื้อพ่อโคตัวหนึ่งมาปฏิสนธิแล้วให้อัตราการเจริญเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสสูงพบว่าผลในการปฏิบัติจริงพ่อโคตัวนั้นจะให้อัตราผสมติดและอัตราการตั้งท้องสูงด้วย แต่ถ้าอัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังจากทำปฏิสนธินอกร่างกายต่ำก็จะมีอัตราการผสมติด และอัตราการตั้งท้องต่ำด้วย ซึ่งในโคนั้นสามารถวิเคราะห์ผลการปฏิสนธิในภาคสนามได้เนื่องจากใช้การผสมพันธุ์กับพ่อโคเพียงตัวเดียวซึ่งต่างจากในสุกรที่มีการใช้พ่อสุกรหลายตัวในการผสมพันธุ์แต่ละครั้ง นอกเหนือไปจากตรวจสอบด้วยการดูอัตราการเจริญของตัวอ่อนแล้วยังสามารถประเมินโดยดูจากการเจาะผ่านของตัวอสุจิ (penetration test) ที่ผ่านเข้าไปในชั้นของ zona pellucida และไซโทพลาซึมของโอโอไซต์ วิธีการนี้ Liu และ Baker (1994) ได้รายงานถึงการนำโอโอไซต์ที่พร้อมปฏิสนธิ (mature oocyte) ในมนุษย์มาใช้ในการทดสอบคุณภาพน้ำเชื้อ โดยดูถึงสัดส่วนของโอโอไซต์ที่ถูกเจาะผ่านและนับจำนวนตัวอสุจิที่ผ่านเข้าไปในแต่ละโอโอไซต์ โดยพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการปฏิสนธินอกร่างกาย (IVF) กับสัดส่วนของการเจาะผ่านเข้าไปใน zona pellucida มีค่า 0.608 (r) และกับจำนวนอสุจิที่ผ่านเข้าไปในโอโอไซต์



รูปที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตั้งท้องที่ 60-90 วัน กับอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนจากการปฏิสนธิด้วยน้ำเชื้อพ่อโค (Marquant - Le Guienne, 1990)

มีค่า 0.513 ($p<0.001$) Ivanova และ Mollova (1993) ได้รายงานถึงการใช้โอโอไซต์ที่พร้อมปฏิสนธิในสุกรเพื่อตรวจสอบความสามารถในการเจาะผ่านโอโอไซต์ของตัวอสุจิที่ได้มาจากพ่อสุกรที่มีความสมบูรณ์พันธุ์แตกต่างกันไป พบว่าพ่อสุกรที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ (fertile) สูงมีอัตราการเจาะผ่านของตัวอสุจิที่ได้เท่ากับ 66.03% ในขณะที่พ่อสุกรที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ด้อยกว่า (subfertile) มีอัตราการเจาะผ่านเพียง 25.08% ผลที่ได้นี้บ่งชี้ว่าสามารถนำข้อมูลที่ได้จากอัตราการเจาะผ่านไปทำนายความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อสุกรได้ โดยพ่อสุกรที่มีความสมบูรณ์พันธุ์สูงจะมีความสามารถในการเจาะผ่านมากกว่า พ่อสุกรที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำกว่า

การใช้โอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิ

นอกจากการใช้โอโอไซต์ที่พร้อมปฏิสนธิในการทดสอบคุณภาพน้ำเชื้อแล้ว ยังได้มีรายงานถึงการใช้โอโอไซต์ที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิในการทดสอบเช่นกัน โดย Martinez และคณะ (1993) เสนอแนะให้ใช้โอโอไซต์ที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิหรือที่อยู่ในระยะ germinal vesicle ซึ่งได้จากการเจาะ ฟอลลิเคิลของ

รังไข่โดยเลือกเอาโอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มล้อมรอบมาทำการทดสอบหาอัตราการเจาะผ่าน และจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ ผลที่ได้พบว่าอัตราเจาะผ่านมีในโอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิมีค่าเท่ากับ 88.82% ในขณะที่อัตราการเจาะผ่านในโอโอไซต์ชนิดพร้อมปฏิสนธิมีค่า 90.97% เมื่อทำการนับจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์พบว่าในโอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิและพร้อมปฏิสนธิมีค่า 7.42±0.41 และ 7.95±0.34 ตามลำดับ ผลที่ได้พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ Matas และคณะ (1996) ได้รายงานว่าโอโอไซต์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางที่มากกว่า 120 ไมโครเมตรจะให้อัตราการเจาะผ่าน และจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์มากที่สุด คือ 95.6% และ 21.9±1.2 ตามลำดับ เมื่อใช้โอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิ ในขณะที่ใช้โอโอไซต์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางต่ำกว่า 105 ไมโครเมตรจะให้อัตราการเจาะผ่าน และจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ต่ำที่สุดคือ 75.6% และ 4.8±0.7 ตามลำดับ สำหรับการเลือกโอโอไซต์ที่นำมาใช้ในการทดสอบพบว่ามีการใช้เทคนิคการย้อมสีที่เรียกว่า "Brilliant cresyl blue test" (Roca et al., 1998) โดยผลที่ได้พบว่าเมื่อใช้ โอโอไซต์ที่เลือกมาด้วยวิธีนี้จะให้อัตราการเจาะผ่าน และจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์สูงกว่าเมื่อไม่ได้ใช้เทคนิคนี้ในการเลือกโอโอไซต์มาใช้ในการทดสอบ Gadea และคณะ (1998) ได้ใช้โอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิในการทำนายความสามารถในการปฏิสนธิของสุกร ซึ่งผลที่ได้พบว่าจำนวนอสุจิที่ผ่านเข้าไปในแต่ละโอโอไซต์ และสัดส่วนของโอโอไซต์ที่มีการเจาะผ่านเข้าไปจะผันแปรไปตามความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อสุกรซึ่งผลที่ได้เหมือนกับในรายงานของ Ivanova และ Mollova (1993) นอกจากนี้จำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ยังมีความสัมพันธ์กับขนาดลูกต่อครอก (litter size) ที่ระดับ r=0.388 (p<0.001) (Gadea et al., 1998) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าวิธีดังกล่าวมีข้อดีตรงที่ไม่ต้องเสียเวลาในการเลี้ยงโอโอไซต์ให้พร้อมปฏิสนธิ (maturation) ทำให้ประหยัดเวลาในการตรวจสอบ และค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงโอโอไซต์ (Martinez et al.,1993; Matas et al.,1996)

สำหรับวิธีการอื่นๆ ที่ใช้นอกเหนือไปจากดูการเจริญเป็นตัวอ่อน และการเจาะผ่านของตัวอสุจิแล้วยังตรวจสอบได้จากความสามารถในการเกาะติดของตัวอสุจิ (sperm binding) กับโอโอไซต์ที่มาจากสัตว์ชนิดเดียวกัน (homologous) หรือที่ได้มาจากต่างชนิดกัน (heterologous) โดยผลที่ได้จากการใช้วิธีนี้สามารถแสดงได้โดยการใช้จำนวนของอสุจิทั้งหมดที่มาเกาะติดกับผนัง zona pellucida (Larsson and Rodriguez-Martinez, 2000) และทำการคำนวณจากค่าดัชนี (ZP-binding index) ซึ่งได้มาจากความสามารถในการเกาะติดของตัวอสุจิที่ต้องการทดสอบเปรียบเทียบกับตัวอย่างอสุจิในกลุ่มควบคุม การทดสอบวิธีนี้จะมีความผันแปรมากเนื่องจากโอโอไซต์ที่ใช้มาจากแหล่งที่แตกต่างกันไป แต่สามารถลดความแปรปรวนได้โดยการใช้โอโอไซต์ในจำนวนมากต่อการทดลองหรือเพิ่มจำนวนครั้งในการทดลอง หรือใช้เทคนิคที่เรียกว่า Hemi-zona assays (HZA) ซึ่งเป็นการนำโอโอไซต์ที่ได้แต่ละใบมาตัดแบ่งครึ่งก่อนที่จะนำไปใช้ในการทดสอบกับนำเชื้อในกลุ่มทดลองที่ไม่รู้ความสมบูรณ์พันธุ์ครึ่งหนึ่งกับกลุ่มควบคุมอีกครึ่งหนึ่ง (Fazeli et al.,1995 ; Ivanova et al.,1999)

ตารางที่ 1 วิธีการแช่แข็งโอโอไซต์ในสัตว์ชนิดต่างๆ (Parks and Ruffing, 1992; Martino et al., 1996 ; Luvoni and Pellizzari, 2000)

ชนิดสัตว์	ระยะโอโอไซต์	วิธีในการแช่แข็ง
หนูเม้าส์	mature	slow
		rapid
		vitrification
		ultrarapid
	immature	slow
		vitrification
		ultrarapid
หนูแรท	immature	rapid
แฮมสเตอร์	mature	slow
		rapid
		vitrification
		ultrarapid
กระต่าย	mature	slow
		rapid
มนุษย์	mature	slow
		ultrarapid
โค	mature	rapid
	immature	rapid
		ultrarapid
แกะ	immature	slow
สุกร	immature	rapid
		vitrification
แมว	mature	slow
	immature	slow

การใช้โอโอไซต์ชนิดแช่แข็ง

การทดลองในงานวิจัยส่วนมากใช้โอโอไซต์ชนิดสดทั้งชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิ ซึ่งการใช้โอโอไซต์เหล่านี้พบว่ามีปัญหาสำคัญคือไม่สามารถเก็บรักษาไว้ได้นานจึงจำเป็นต้องใช้ในทันทีก่อนที่โอโอไซต์จะมีการเสื่อมสลายไป ดังนั้นการใช้โอโอไซต์ที่เก็บรักษาไว้ไม่ว่าจะเป็นชนิดแช่เย็นหรือแช่แข็งจะช่วยแก้ปัญหาการใช้โอโอไซต์โดยไม่ต้องคำนึงถึงช่วงเวลาในการใช้งาน ในช่วงที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาโอโอไซต์ในสัตว์ต่างๆ โดยการแช่แข็ง (ตารางที่1) ซึ่งวิธีการแช่แข็งที่ให้ความสำเร็จสูงคือการใช้เทคนิคที่เรียกว่า " Vitrification" (Vajta, 2000) ซึ่งเป็นการลดอุณหภูมิเร็ว (rapid cooling) โดยใช้สารป้องกันการแช่แข็งที่มีความเข้มข้นสูงเพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิดร่วมกัน ตัวอย่างเช่นการใช้ ethylene glycol (EG) ร่วมกับ dimethyl sulphoxide (DMSO) (Dhali et al., 2000) หรือใช้ EG ในสารละลายที่มีส่วนประกอบของ EG 2.5 โมลาร์ +18% Ficoll + sucrose 0.5 โมลาร์ (Hurtt et al., 2000) หรือใช้ EG ร่วมกับ sucrose หรือ trehalose (Rayos et al., 1994) เป็นต้น ก่อนจะทำการบรรจุโอโอไซต์ที่ต้องการในหลอดขนาด 0.25 มิลลิลิตร (Rayos, et al., 1994; Otoi et al., 1995) รวมไปถึงการใช้เทคนิค Open Pulled Straw (OPS) ในการบรรจุโอโอไซต์วิธีนี้จะลดปริมาตรของสารป้องกันการแช่แข็งให้เหลือเพียง 1-2 มิลลิลิตร (Hurtt, et al., 2000) ซึ่งจะลดปริมาตรของน้ำยาต่อพื้นผิวสัมผัสของตัวอ่อนซึ่งเชื่อว่าหากอัตราส่วนระหว่างปริมาตรต่อพื้นผิวสูงจะทำให้เกิดความเสียหายขึ้นได้ วิธีการแช่แข็งแบบนี้ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ที่มีราคาแพง ไม่ต้องใช้ทักษะมากนักและใช้เวลาในการแช่แข็งสั้นมาก (Vajta, 2000) เทคนิค vitrification นี้ได้มีการนำมาใช้แช่แข็งโอโอไซต์ที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ (Otoi et al., 1995; Isachenko et al., 1998; Dhali et al., 2000; Hurtt et al., 2000) และโอโอไซต์ที่พร้อมปฏิสนธิ (Otoi et al., 1995; Otoi et al., 1998; Hurtt et al., 2000) ซึ่งผลที่ได้หลังจากทำการปฏิสนธินอกร่างกายพบว่ามีการพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสสำหรับโอโอไซต์ที่ไม่พร้อมปฏิสนธิและพร้อมปฏิสนธิ 0-1% และ 1.7-4.9% ตามลำดับ (Otoi et al., 1995; Otoi et al., 1998)

นอกจากการใช้วิธี vitrification ในการแช่แข็งโอโอไซต์แล้ว Luvoni และ Pellizzari (2000) ได้รายงานถึงการใช้วิธีแช่แข็งอย่างช้าๆ (slow freezing) ในการแช่แข็งโอโอไซต์ทั้งชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิ โดยใช้ EG และ DMSO ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ โดยเพิ่มความเข้มข้นของสารป้องกันการแช่แข็งขึ้นตามลำดับ (0.5, 1.0, 1.5 โมลาร์) และทำการตรวจสอบโดยใช้วิธีการปฏิสนธินอกร่างกาย โดยผลที่ได้พบว่าโอโอไซต์ที่พร้อมปฏิสนธิที่ใช้ EG จะมีอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนสูงกว่าโอโอไซต์ที่ไม่พร้อมปฏิสนธิ (38.7% vs 6.8%) ในขณะที่ใช้ DMSO ไม่พบความแตกต่างกันในอัตราแบ่งตัวของตัวอ่อนอันเนื่องมาจากโอโอไซต์ทั้งสองชนิด

อีกวิธีที่มีใช้ในการแช่แข็งโอโอไซต์ในสัตว์คือวิธีการแช่แข็งด้วยความเร็วสูง (ultrarapid freezing) โอโอไซต์ที่ต้องการแช่แข็งจะถูกวางลงบนแผ่นทองแดง (copper grid) ก่อนที่จะสัมผัสกับสารป้องกันการแช่แข็งโดยตรง (Martino et al., 1996; Arav and Zeron, 1997) วิธีนี้มักจะใช้สารป้องกันการแช่แข็งอย่างน้อยสองชนิด โดยเป็นชนิดที่แทรกผ่านเข้าไปในเซลล์ในระดับความเข้มข้น 2-3.5 โมลาร์ ร่วมกับสารชนิดที่ไม่แทรกผ่านเซลล์ เช่นซูโครสหรือกลูโคสเป็นต้น และในระดับความเข้มข้น 0.25-0.5 โมลาร์ โดยอาศัยคุณสมบัติการดึงเอาน้ำออกมาจากเซลล์ก่อนทำการแช่แข็ง วิธีนี้จะพบเกล็ดน้ำแข็งเกิดขึ้นทั้งภายในและภายนอกเซลล์ (Niemann, 1991) Martino และคณะ (1996) ทำการแช่แข็งโอโอไซต์โคชนิดพร้อมปฏิสนธิด้วยวิธีนี้ และตรวจสอบอัตราการรอดด้วยการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย พบว่าอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนอยู่ที่ระดับ 30% และครึ่งหนึ่งของตัวอ่อนที่เจริญเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสได้ นอกจากนี้ ธวัชชัย และคณะ (2542) ได้ใช้เทคนิคนี้ในการแช่แข็งโอโอไซต์สุกรชนิดที่ไม่พร้อมปฏิสนธิ ผลที่ได้พบว่าโอโอไซต์สุกรมีอัตราการเจริญไปเป็นระยะ metaphase II อยู่ที่ระดับ 23-30% ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคนี้ในการแช่แข็งโอโอไซต์สุกร

การใช้โอโอไซต์ชนิดแช่สารละลายเกลือ

นอกจากการใช้โอโอไซต์ในรูปแบบแช่แข็งแล้วยังสามารถใช้โอโอไซต์ที่แช่ในสารละลายเกลือ 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; Sirivaidyapong et al., 1999) โดยโอโอไซต์ที่ใช้ในการเก็บรักษามีทั้งโอโอไซต์ที่ไม่พร้อมปฏิสนธิ (Chian et al., 1991; Lynham and Harrison, 1998; Strom Holst et al., 2000) และโอโอไซต์ที่พร้อมปฏิสนธิ (Boatman et al., 1988; Chian et al.,1991; Andrews et al., 1992) ทั้งนี้พบว่าระยะเวลาในการเก็บรักษาจะแตกต่างกันไปตั้งแต่นาน 56 วัน (Boatman et al., 1988) หรืออาจนานถึง 6 เดือน (Fayrer-Hosken and Brackett, 1987) โดยผลที่ได้จากการทดสอบโอโอไซต์ชนิดนี้มีความแตกต่างกันออกไป Chian และคณะ (1991) ทำการเปรียบเทียบความสามารถในการเจาะผ่านของตัวอสุจิระหว่างโอโอไซต์ที่ไม่พร้อมปฏิสนธิกับโอโอไซต์ที่พร้อมปฏิสนธิผลที่ได้พบว่าเปอร์เซ็นต์ในการเจาะผ่านในโอโอไซต์ที่พร้อมปฏิสนธิจะมากกว่าโอโอไซต์ที่ไม่พร้อมปฏิสนธิ ในขณะที่ความยืดหยุ่น (elasticity) ของผนัง zona pellucida ในโอโอไซต์ทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกันเมื่อเก็บรักษาในน้ำเกลือ นอกจากนี้ Andrews และคณะ (1992) ได้ทำการทดสอบโอโอไซต์ที่เก็บรักษาในสารละลายเกลือเปรียบเทียบกับโอโอไซต์สด พบว่าความสามารถในการเจาะผ่านของตัวอสุจิในโอโอไซต์ทั้งสองชนิดนี้ไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งผลที่ได้เหมือนกับผลที่ได้รายงานไว้ในกระต่าย (Fayrer-Hosken and

Brackett, 1987) ในขณะที่ Strom Holst และคณะ (2000) ได้รายงานถึงการทดสอบในสุนัขพบว่าโอโอไซต์ที่เก็บในสารละลายเกลือจะตรวจพบจำนวนอสุจิที่เจาะผ่านเข้าไปได้น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับโอโอไซต์สดโดยผลที่ได้เหมือนกันกับงานทดลองของ Chian และคณะ (1991) ที่ได้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ในโค

จากรายงานดังกล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่า การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อโดยใช้เทคนิคการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย เป็นวิธีที่สามารถบ่งบอกถึงความสามารถในการปฏิสนธิของตัวอสุจิได้รวดเร็วซึ่งจะย่นระยะเวลาลงเมื่อเทียบกับการตรวจสอบจากการปฏิสนธิกับแม่สุกร (*in vivo*) เทคนิคนี้ได้มีการพัฒนาไปอย่างต่อเนื่องรวมไปถึงมีการเก็บรักษาโอโอไซต์ด้วยวิธีการต่างๆ ซึ่งมีข้อดีคือสามารถเก็บไว้ได้นานและจะมีประโยชน์อย่างมากเมื่อนำมาใช้ในการทดสอบคุณภาพน้ำเชื้อ ทั้งนี้สามารถใช้เป็นพื้นฐานงานวิจัยในประเทศได้แก่

1. มีการพัฒนาเทคนิคการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย และการเลี้ยงตัวอ่อนในสุกร (มงคล และคณะ, 2536 ; มงคล และคณะ, 2539a,b)
2. มีการศึกษาการใช้เทคนิคการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย ในการประเมินความสามารถในการปฏิสนธิโดยใช้โอโอไซต์สด ซึ่งขั้นตอนเหล่านี้มีความยุ่งยาก (มงคล และคณะ, 2539a,b) ดังนั้นจุดประสงค์ของงานวิจัยมุ่งหวังจะพัฒนาเทคนิคที่ง่ายขึ้นเพื่อวัดความสามารถในการปฏิสนธิ (fertilizing ability) ในสุกร ซึ่งในปัจจุบันมีแนวโน้มในการใช้น้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์สุกรที่มีคุณภาพสูงทั้งผลิตในประเทศ และจากต่างประเทศมาทำการผสมเทียมกันมากขึ้น หากพัฒนาเทคนิคนี้ได้จะเป็นประโยชน์ต่อวงการอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรและต่อศูนย์ผสมเทียมสุกรทั้งภาครัฐ และเอกชน

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

สถานที่ทำการศึกษา

ศูนย์ฝึกนิสิตคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ต.บ่อพลับ อ.เมือง จ.นครปฐม

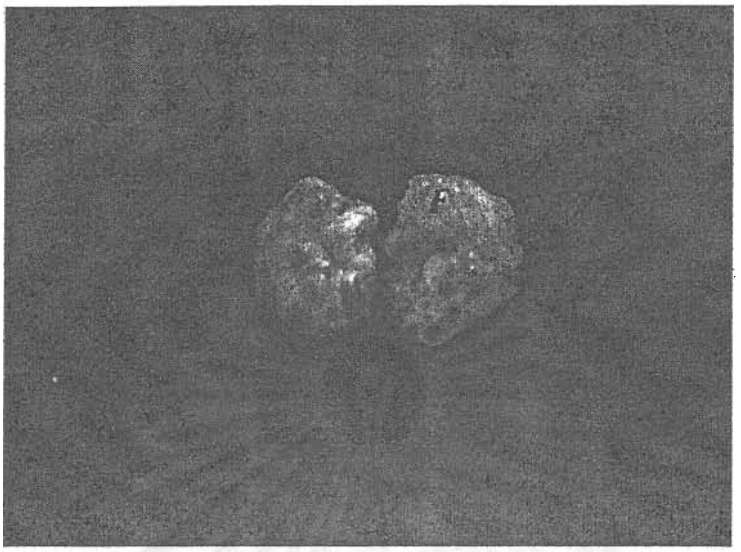
วิธีการดำเนินการวิจัย

การเก็บโอโอไซต์

ทำการเก็บรังไข่ของสุกรจากโรงฆ่าสัตว์ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม โดยเก็บรังไข่ลงในน้ำเกลือ 0.9% อุณหภูมิ 37 °ซ จากนั้นนำกลับมายังห้องปฏิบัติการภายใน 30 นาที ทำการล้างอีกครั้งด้วยน้ำเกลือ 0.9% ใช้เข็มพลาสติกเบอร์ 19 ต่อกับไซริงค์พลาสติกขนาด 5 มิลลิเมตร เจาะดูดของเหลวจากฟอลลิเคิลเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-5 มิลลิเมตร (รูปที่ 8) แล้วเทของเหลวลงในจานพลาสติกที่บรรจุน้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์ชนิด TCM 199 Hepes ตรวจหาโอโอไซต์ด้วยกล้องสเตอริโอกำลังขยาย 10-40 เท่า จากนั้นเลือกโอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มล้อมมาล้างในน้ำยา TCM 199 Hepes จากนั้นนำโอโอไซต์ที่ได้มาแยกเซลล์คิวมูลัสออกจากเปลือกหลังเก็บไว้ใน 1%hyarulonidase ในน้ำยาเลี้ยงชนิด TCM 199 $NaHCO_3$ ที่อุณหภูมิ 38.5 °ซ นาน 30 นาที ด้วยการใช้ไปเปตที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใกล้เคียงกับขนาดโอโอไซต์ดูดเข้าออกหลายๆ ครั้งจนเซลล์คิวมูลัสที่อยู่ล้อมรอบหลุดออกมาจนหมด โอโอไซต์ดังกล่าวจัดเป็นโอโอไซต์ชนิดที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ (รูปที่ 9)

การเลี้ยงโอโอไซต์ให้พร้อมปฏิสนธิ

นำโอโอไซต์ชนิดมีเซลล์คิวมูลัสหุ้มล้อมรอบมาเลี้ยงในน้ำยา TCM 199 $NaHCO_3$+10% fetal calf serum ที่มีส่วนประกอบของ FSH/LH 10 ไมโครกรัม/มล. และ Estradiol-17β 1 ไมโครกรัม/มล. ในจานทดลอง 4 หลุม ในตู้อบก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีความเข้มข้น 5% ความชื้นเต็มที่ และที่อุณหภูมิ 38.5 °ซ นาน 44 ชั่วโมง จากนั้นนำมาลอกเอาเซลล์คิวมูลัสออกหลังแช่ในน้ำยา 1%hyarulonidase ใน TCM 199 $NaHCO_3$ โอโอไซต์ที่ได้จะเป็นโอโอไซต์ที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัส และมีโพลาร์บอดีที่ 1 ที่ผิว (รูปที่ 9)



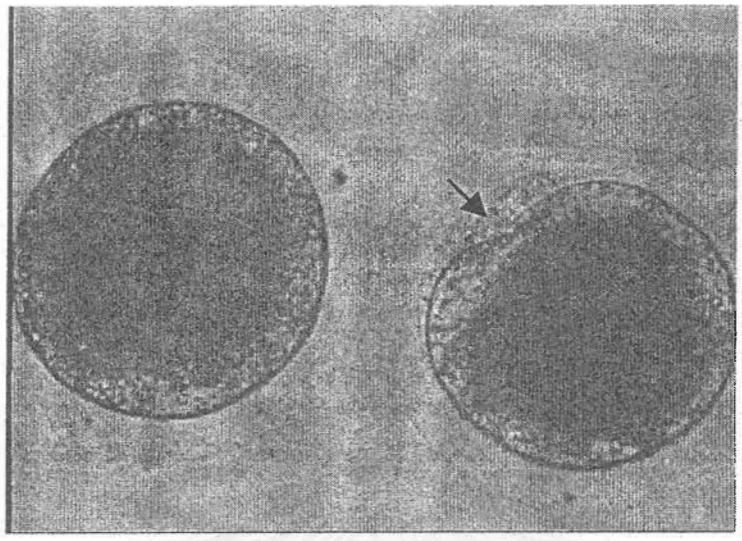
รูปที่ 8 แสดงรังไข่ของสุกรที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ข้างซ้าย และข้างขวา แสดงฟอลลิเคิลจำนวนมากบนรังไข่ (F)

การเก็บรักษาโอโอไซต์ในสารละลายเกลือ

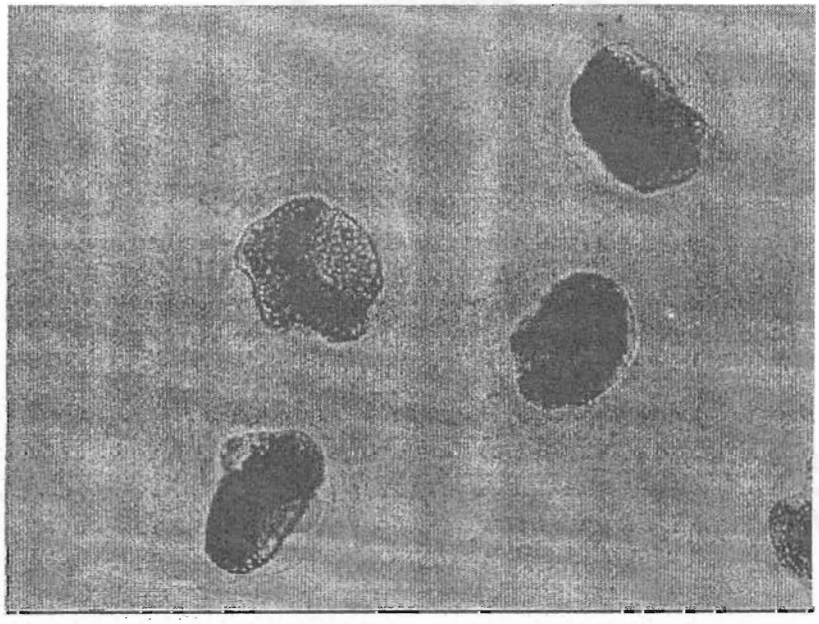
แบ่งโอโอไซต์ชนิดที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิที่ได้ มาเก็บรักษาไว้ในสารละลายเกลือที่มีส่วนประกอบของ $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 โมลาร์, $MgCl_2$ 0.75 โมลาร์, Hepes 40 มิลลิโมลาร์ จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างให้ได้เท่ากับ 7.4 ด้วย NaOH ร่วมกับ $ZnCl_2$ 0.2 มิลลิโมลาร์, PVA 0.1 มิลลิกรัม/มล.* บรรจุไว้ในจานพลาสติกชนิด 4 หลุม โดยเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 7 วัน (Lynham and Harrison, 1998) เมื่อครบกำหนดแล้วนำโอโอไซต์มาล้างด้วยน้ำยา PBS* (phosphate buffer saline) จำนวน 2 ครั้งที่อุณหภูมิห้อง โอโอไซต์ที่ได้นี้จัดเป็นโอโอไซต์ที่เก็บรักษาในน้ำเกลือ (รูปที่ 10)

---

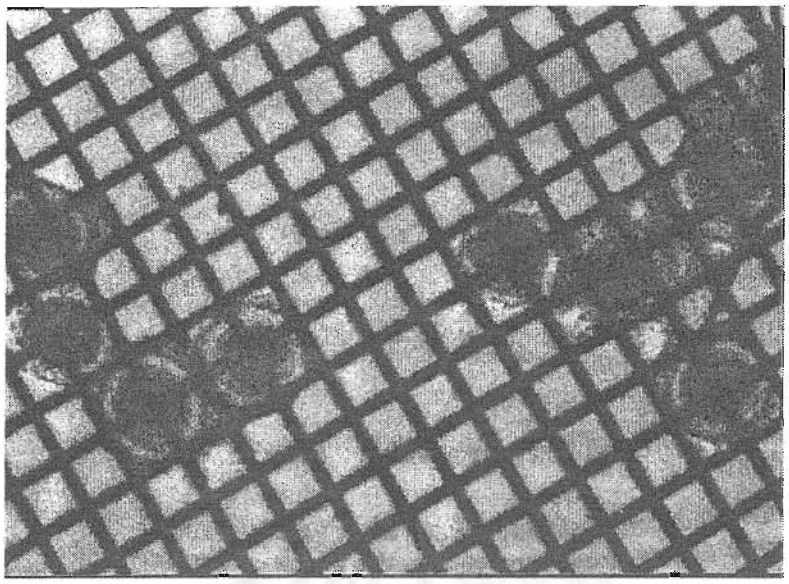
* วิธีเตรียมในภาคผนวก ก.



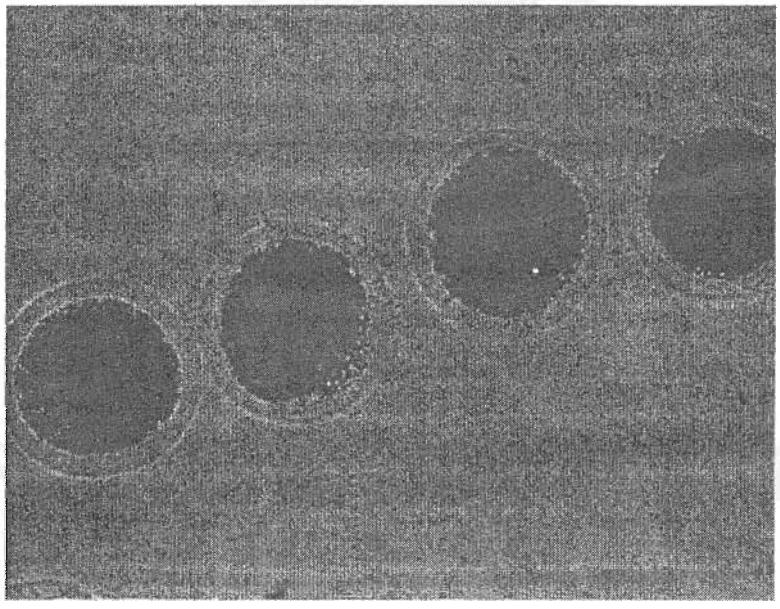
รูปที่ 9 โอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิ (รูปซ้าย); และชนิดพร้อมปฏิสนธิ (รูปขวา) ลูกศรชี้ที่โพลาร์บอดีที่ 1 (x400)



รูปที่ 10 โอโอไซต์ที่เก็บรักษาในสารละลายเกลือ มีไซโทพลาสซึมหดตัว (X200)



รูปที่ 11 โอโอไซต์ที่วางบนตะแกรงทองแดงก่อนที่ทำการแช่แข็งด้วยวิธี ultra-rapid freezing (X100)



รูปที่ 12 โอโอไซต์ภายหลังการแช่แข็งด้วยวิธี ultra-rapid freezing และหลังจากการละลายด้วยซูโครสความเข้มข้นต่างๆ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงใด (X200)

การแช่แข็งโอโอไซต์

แบ่งโอโอไซต์ที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ และชนิดพร้อมปฏิสนธิที่ได้มาแช่แข็ง ด้วยวิธี ultra-rapid freezing บนตะแกรงทองแดง (copper grid) (รูปที่ 11) (ธวัชชัย และคณะ, 2543) โดยนำโอโอไซต์ทั้งสองชนิดมาล้างในน้ำยา PBS ที่มี 10% fetal calf serum นาน 5 นาที หนึ่งครั้งก่อนที่จะใส่ลงในสารป้องกันการแช่แข็งชนิด ethylene glycol ความเข้มข้น 5.0 โมลาร์ นาน 30 วินาที หลังจากนั้นนำโอโอไซต์วางลงบนตะแกรงทองแดงและใช้ watchmaker forceps คีบตะแกรงทองแดงจุ่มลงไปในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ –196 °ซ ทิ้งไว้ 1 นาที เมื่อครบกำหนดระยะเวลาแล้วนำมาละลายในสารละลายซูโครสความเข้มข้น 0.5 โมลาร์, 0.25 โมลาร์ และ 0.125 โมลาร์ และน้ำยา PBS + 10% fetal calf serum นานขั้นตอนละ 1 นาที ที่อุณหภูมิ 37 °ซ โดยโอโอไซต์ที่ได้จัดเป็นโอโอไซต์ชนิดแช่แข็ง (รูปที่ 12)

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 4 โอโอไซต์ชนิดสด (fresh mature oocyte)

กลุ่มที่ 5 โอโอไซต์ชนิดแช่สารละลายเกลือ (salt stored mature oocyte)

กลุ่มที่ 6 โอโอไซต์ชนิดแช่แข็ง (frozen mature oocyte)

ทำการทดลองทีละการทดลอง และเก็บข้อมูลในแต่ละกลุ่มจำนวน 5 ครั้ง (replication) แต่ละครั้งใช้โอโอไซต์แต่ละชนิดในจำนวนใกล้เคียงกัน

การเตรียมตัวอสุจิ

ทำการรีดน้ำเชื้อจากพ่อสุกรพันธุ์แลนเรซที่ทราบประวัติการผสมกับแม่สุกรในฟาร์มเอกชนจังหวัดนครปฐม อายุประมาณ 1.5-2.0 ปี น้ำหนัก 150-200 กิโลกรัม จำนวน 3 ตัว คือสุกร A, B และ C ด้วยการรีดด้วยมือ (hand glove method) แล้วนำมาเจือจางในน้ำยาละลายน้ำเชื้อชนิด Beltville

Thawing Solution (BTS) จากนั้นนำน้ำเชื้อเจือจางที่ผ่านการตรวจสอบว่ามีคุณภาพน้ำเชื้อปกติทางกายภาพและภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คือ มีอัตราการเคลื่อนไหวไม่ต่ำกว่า 70% จำนวนอสุจิปกติไม่ต่ำกว่า 80% (อรรณพ, 2537) มาผ่านขั้นตอนดังนี้

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

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

การเลี้ยงตัวอสุจิร่วมกับโอโอไซต์

นำโอโอไซต์แต่ละชนิดที่ได้จากการเตรียมด้วยวิธีต่าง ๆ ข้างต้นมาทำการล้างใน Fertilization medium* อีกครั้งก่อนที่จะนำไปใส่ในหลุมของจานพลาสติกชนิด 4 หลุมที่มีน้ำยา Fertilization medium บรรจุอยู่จำนวน 20 ใบต่อหลุม จากนั้นนำตัวอสุจิมาปรับความเข้มข้นให้ได้เท่ากับ $1x10^6$ ตัว/มิลลิลิตร และใส่ลงในหลุมของจานพลาสติกชนิด 4 หลุม ที่มีโอโอไซต์แต่ละชนิดบรรจุอยู่นาน 18 ชั่วโมง ในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5 °ซ ภายใต้บรรยากาศ 5% CO_2 และความชื้นเต็มที่ (มงคล และคณะ, 2536)

การวัดผล

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* ขนาด 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นาน 3-5 นาที ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Pursel และคณะ (1985) แล้วนำไปส่องเพื่อตรวจนับจำนวนตัวอสุจิที่เจาะผ่านผนัง zona pellucida และที่เข้าไปในไซโทพลาซึม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนต์ ทำการถ่ายภาพเก็บบันทึกไว้

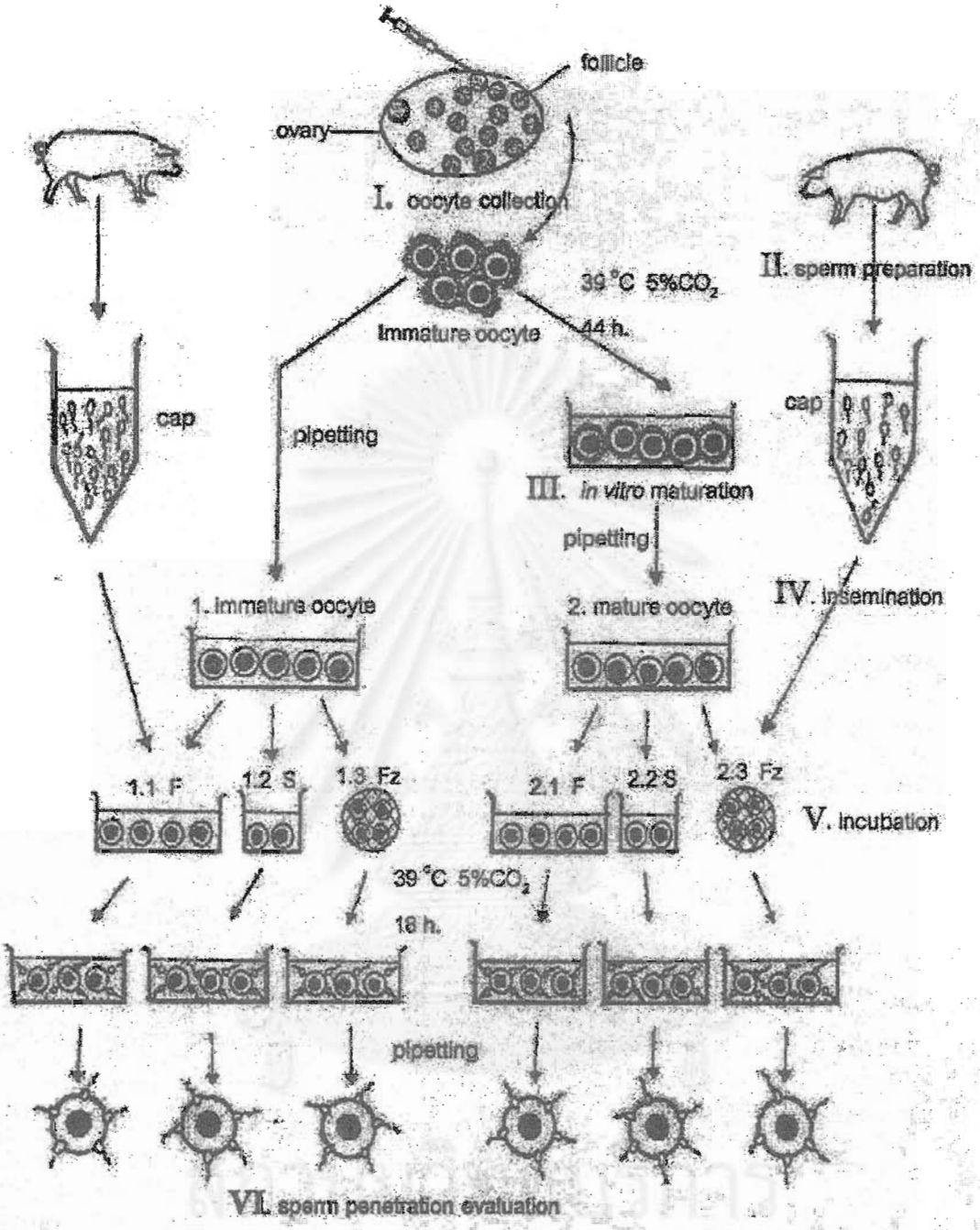
---

* วิธีเตรียมในภาคผนวก ก.

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการนับจำนวนอสุจิที่เจาะผ่านผนังzona pellucida และที่เข้าไปในไซโทพลาซึม ในแต่ละกลุ่มการทดลองหาค่าเฉลี่ย (mean±SEM) แล้วนำมาเปรียบเทียบในแต่ละกลุ่มโดยใช้วิธี analysis of variance (ANOVA) ชนิดทางเดียว และเปรียบเทียบสัดส่วนจำนวนโอโอไซต์แต่ละชนิดที่ถูกเจาะผ่านโดยใช้วิธี Chi-square ซึ่งจะใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 9.05 ในการคำนวณ (ศิริชัย, 2540)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 13 สรุปขั้นตอนในการทดลอง

cap = capacitation; F = Fresh oocyte S = Salt-stored oocyte;

Fz = Frozen oocyte ; โดยกลุ่มที่ 1.1-1.3 เป็นกลุ่มของโอโอไซต์ที่ไม่พร้อมปฏิสนธิ ทั้งชนิดสด แช่สารละลายเกลือและแช่แข็ง; กลุ่มที่ 2.1-2.3 โอโอไซต์ที่พร้อมปฏิสนธิ ทั้งชนิดสด แช่สารละลายเกลือและแช่แข็ง

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

หลังจากเลี้ยงโอโอไซต์ร่วมกับตัวอสุจิแล้วจะพบว่ามีตัวอสุจิจำนวนมากอยู่รอบ ๆ เปลือกหุ้ม zona pellucida (รูปที่ 14) และมีบางส่วนที่เจาะผ่านเปลือกเข้าไปในไซโทพลาสซึม ซึ่งสามารถตรวจหลังย้อมด้วยสี Hoechst 33342

จากผลการศึกษาการเจาะผ่านของตัวอสุจิพ่อสุกรตัวที่ 1 (สุกร A) โดยใช้โอโอไซต์ชนิดที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิทั้งชนิดสด แช่สารละลายเกลือ และแช่แข็ง (รูปที่ 15, 16 และ 17) ผลที่ได้พบว่าอัตราการเจาะผ่านของตัวอสุจิในโอโอไซต์ที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิมีค่าเท่ากับ 59.6%, 78.1% และ 77.8% สำหรับโอโอไซต์ชนิดสด แช่สารละลายเกลือ และแช่แข็ง ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบค่าทางสถิติพบว่าอัตราการเจาะผ่านของอสุจิในโอโอไซต์ชนิดสดมีค่าน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับโอโอไซต์ที่เหลืออีก 2 ชนิด (ตารางที่ 2) 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 2

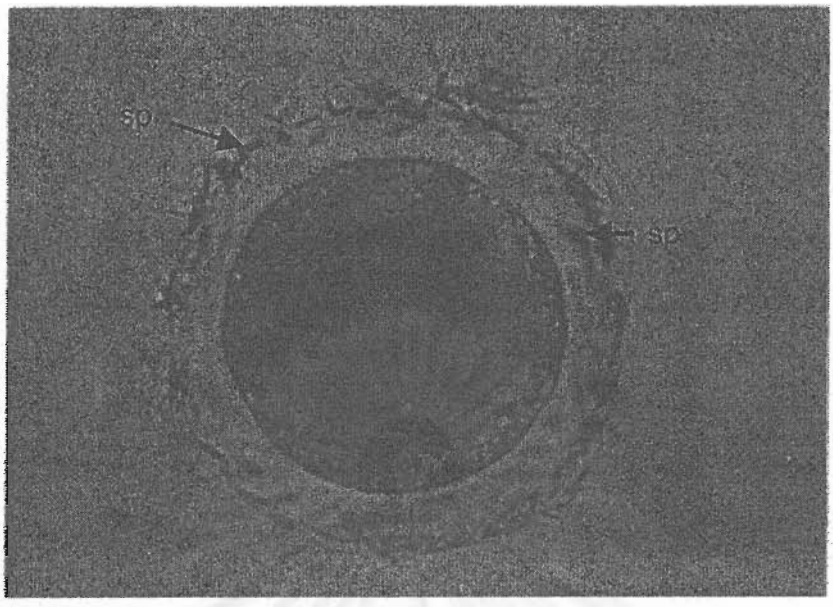
ตารางที่ 2 ผลการเจาะผ่านของตัวอสุจิจากสุกร A เมื่อใช้โอโอไซต์ชนิดที่ไม่พร้อมปฏิสนธิ

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

ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (a, b) แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

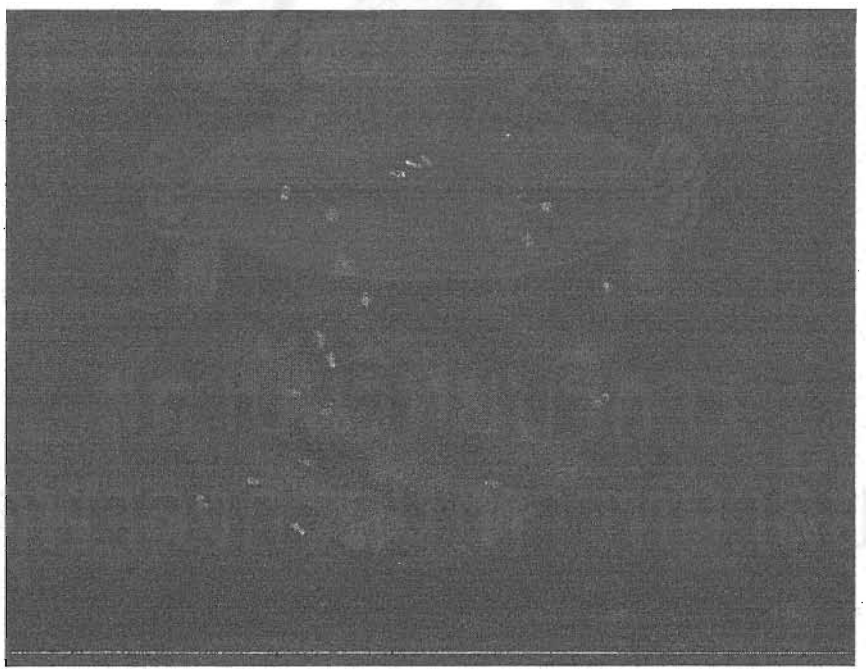
เมื่อทำการทดสอบการเจาะผ่านของตัวอสุจิของพ่อสุกร A โดยใช้โอโอไซต์ชนิดที่พร้อมปฏิสนธิทั้งชนิดสด แช่สารละลายเกลือและแช่แข็ง พบว่าอัตราการเจาะผ่านของตัวอสุจิในโอโอไซต์ทั้ง 3 ชนิดมีค่าเท่ากับ 85.1%, 86.2% และ 89.8% สำหรับโอโอไซต์ชนิดสด แช่สารละลายเกลือและแช่แข็ง ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบทางสถิติพบว่าอัตราการเจาะผ่านของโอโอไซต์ทั้ง 3 ชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมี



รูปที่ 14 การเกาะของตัวอสุจิรอบ ๆ เปลือก zona pellucida และมีตัวอสุจิ (sp) บางส่วนที่เจาะผ่านชั้นเปลือก ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (X 400)

รูปที่ 15 ภาพการเกาะติด และการเจาะผ่านของตัวอสุจิในโอโอไซต์ชนิดสด ภายหลังทำการย้อมด้วยสีสะท้อนแสง Hoechst 33342 จะพบตัวอสุจิอยู่รอบๆ (X 400)

รูปที่ 16 ภาพการเกาะติด และการเจาะผ่านของตัวอสุจิในโอโอไซต์ชนิดแช่สารละลายเกลือ ภายหลังทำการย้อมด้วยสีสะท้อนแสง Hoechst 33342 จะพบตัวอสุจิอยู่รอบๆ (X 400)



รูปที่ 17 ภาพการเกาะติด และการเจาะผ่านของตัวอสุจิในโอโอไซต์ชนิดแช่แข็ง ภายหลังทำการย้อมด้วยสีสะท้อนแสง Hoechst 33342 จะพบตัวอสุจิอยู่รอบๆ (X 400)

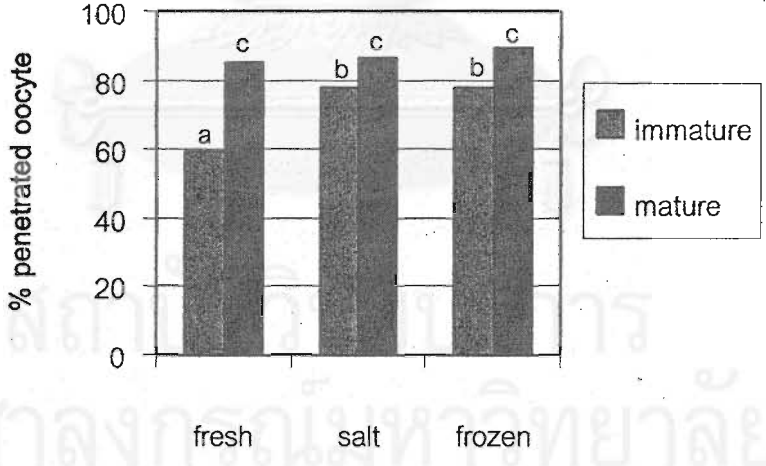
นัยสำคัญ ($p>0.05$) ดังตารางที่ 3 ในขณะที่ค่าเฉลี่ยของจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์มีค่าเท่ากับ 13.87±1.45, 17.69±2.61 และ 14.45±1.75 ตัว สำหรับโอโอไซต์ชนิดสด แช่สารละลายเกลือและแช่แข็งตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบค่าทางสถิติพบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 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 18



รูปที่ 18 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจาะผ่านในโอโอไซต์ชนิดต่างๆ ของพ่อสุกร A

ในการทดสอบการเจาะผ่านของตัวอสุจิจากพ่อสุกรตัวที่ 2 (สุกร B) โดยใช้โอโอไซต์ชนิดที่ไม่พร้อมปฏิสนธิทั้งชนิดสด แช่สารละลายเกลือ และแช่แข็ง พบว่าอัตราการเจาะผ่านของตัวอสุจิในโอโอไซต์ทั้ง 3 ชนิดมีค่าเท่ากับ 65.3%, 76.8 % และ 67% สำหรับโอโอไซต์ชนิดสด แช่สารละลายเกลือและแช่แข็งตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบทางสถิติพบว่าอัตราการเจาะผ่านในโอโอไซต์ชนิดแช่สารละลายเกลือจะมีค่าสูงสุด ($p<0.05$) ในขณะที่ค่าเฉลี่ยของจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์มีค่าเท่ากับ 2.25 ± 0.28, 3.63 ± 0.42 และ 2.57 ± 0.36 ตัว สำหรับโอโอไซต์ชนิดสด แช่สารละลายเกลือและแช่แข็งตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบค่าทางสถิติพบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ที่แช่ในสารละลายเกลือมีค่ามากที่สุด ($p<0.05$) ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 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 $\pm$ SEM

ตัวอักษรที่แตกต่างกัน(a, b) และ (c, d) แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

เมื่อทำการทดสอบการเจาะผ่านของตัวอสุจิของพ่อสุกร B โดยใช้โอโอไซต์ชนิดที่พร้อมปฏิสนธิทั้งชนิดสด แช่สารละลายเกลือ และแช่แข็ง พบว่าอัตราการเจาะผ่านของตัวอสุจิในโอโอไซต์ทั้ง 3 ชนิดมีค่าเท่ากับ 52.6%, 67.3% และ 69.1% สำหรับโอโอไซต์ชนิดสด แช่สารละลายเกลือและแช่แข็ง ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบทางสถิติพบว่าอัตราการเจาะผ่านในโอโอไซต์ชนิดสดจะมีค่าน้อยสุด ($p<0.05$) ดังตารางที่ 5 ในขณะที่ค่าเฉลี่ยของจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์มีค่าเท่ากับ 1.55 ± 0.31, 2.80 ± 0.35 และ 2.87 ± 0.40 ตัว สำหรับโอโอไซต์ชนิดสด แช่สารละลายเกลือและแช่แข็งตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบค่าทางสถิติพบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ชนิดสดมีค่าน้อยสุดเช่นเดียวกัน ($p<0.05$) ตารางที่ 5

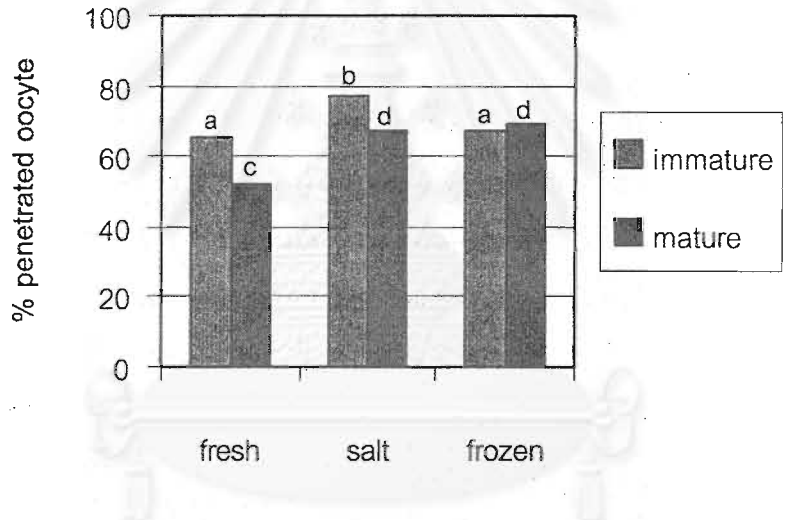
ตารางที่ 5 การเจาะผ่านของตัวอสุจิจากสุกร B เมื่อใช้โอโอไซต์ชนิดที่พร้อมปฏิสนธิ

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

ตัวอักษรที่แตกต่างกัน(a, b) และ (c ,d) แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ผลเปรียบเทียบการเจาะผ่านของโอโอไซต์ชนิดที่ไม่พร้อมปฏิสนธิและชนิดพร้อมปฏิสนธิของพ่อสุกร B แสดงในรูปที่ 19



รูปที่ 19 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจาะผ่านในโอโอไซต์ชนิดต่างๆ ของพ่อสุกร B

ในการทดสอบการเจาะผ่านของตัวอสุจิจากพ่อสุกรตัวที่ 3 (สุกร C) โดยใช้โอโอไซต์ชนิดที่ไม่พร้อมปฏิสนธิทั้งชนิดสด แช่สารละลายเกลือ และแช่แข็ง พบว่าอัตราการเจาะผ่านของตัวอสุจิในโอโอไซต์ทั้ง 3 ชนิดมีค่าเท่ากับ 51.5%, 58.2 % และ 53.2% สำหรับโอโอไซต์ชนิดสด แช่สารละลายเกลือ และแช่แข็งตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบทางสถิติพบว่าอัตราการเจาะผ่านในโอโอไซต์แต่ละชนิดไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.05$) ในขณะที่ค่าเฉลี่ยของจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์มีค่าเท่ากับ 1.00±0.30, 1.39±0.18 และ 1.44±0.20 ตัว สำหรับโอโอไซต์ชนิดสด แช่สารละลายเกลือและแช่แข็งตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบค่า

ทางสถิติพบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ในโอโอไซต์แต่ละชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การเจาะผ่านของตัวอสุจิจากสุกร C เมื่อใช้โอโอไซต์ชนิดที่ไม่พร้อมปฏิสนธิ

ชนิดของโอโอไซต์	จำนวนโอโอไซต์ที่ตรวจสอบ	จำนวนโอโอไซต์ที่ถูกเจาะผ่าน (%)	ค่าเฉลี่ยจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ [1]	ช่วงของจำนวนตัวอสุจิ
ชนิดสด	97	50 (51.5)	1.00 ± 0.13	0 – 5
ชนิดแช่สารละลายเกลือ	98	57 (58.2)	1.39 ± 0.18	0 – 10
ชนิดแช่แข็ง	94	50 (53.2)	1.44 ± 0.20	0 – 8

[1] mean ± SEM

เมื่อทำการทดสอบการเจาะผ่านของตัวอสุจิของพ่อสุกร C โดยใช้โอโอไซต์ชนิดที่พร้อมปฏิสนธิทั้งชนิดสด แช่สารละลายเกลือ และแช่แข็ง พบว่าอัตราการเจาะผ่านของตัวอสุจิในโอโอไซต์ทั้ง 3 ชนิดมีค่าเท่ากับ 65.3%, 76.8% และ 67.0% สำหรับโอโอไซต์ชนิดสด แช่สารละลายเกลือและแช่แข็ง ตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบทางสถิติพบว่าอัตราการเจาะผ่านในโอโอไซต์ชนิดแช่สารละลายเกลือมีค่ามากที่สุด ($p<0.05$) ดังตารางที่ 7 ในขณะที่ค่าเฉลี่ยของจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์มีค่าเท่ากับ 2.25 ± 0.28, 3.63±0.42 และ 2.57±0.36 ตัว สำหรับโอโอไซต์ชนิดสด แช่สารละลายเกลือและแช่แข็งตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบค่าทางสถิติพบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ชนิดแช่สารละลายเกลือมีค่ามากที่สุดเช่นกัน ($p<0.05$) ดังตารางที่ 7

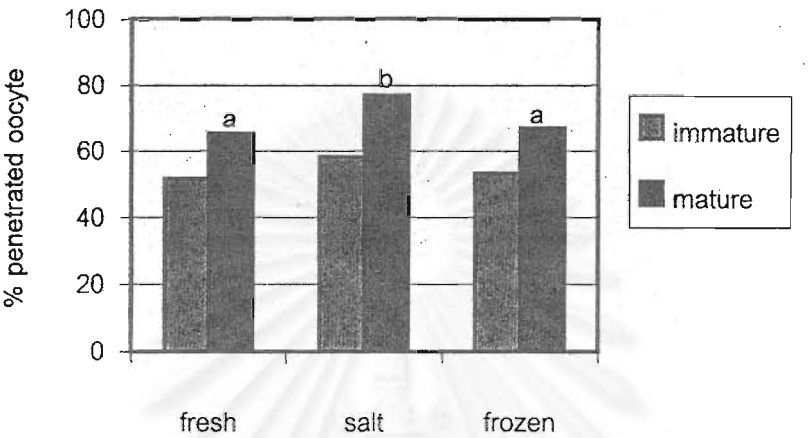
ตารางที่ 7 การเจาะผ่านของตัวอสุจิจากสุกร C เมื่อใช้โอโอไซต์ชนิดที่พร้อมปฏิสนธิ

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

ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (a, b) และ (c, d) แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

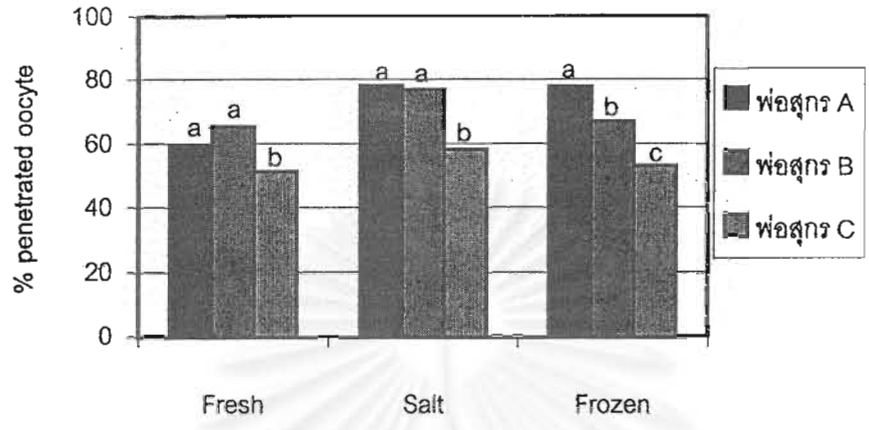
ผลเปรียบเทียบการเจาะผ่านของโอโอไซต์ชนิดที่ไม่พร้อมปฏิสนธิและชนิดพร้อมปฏิสนธิของพ่อสุกร C แสดงในรูปที่ 20



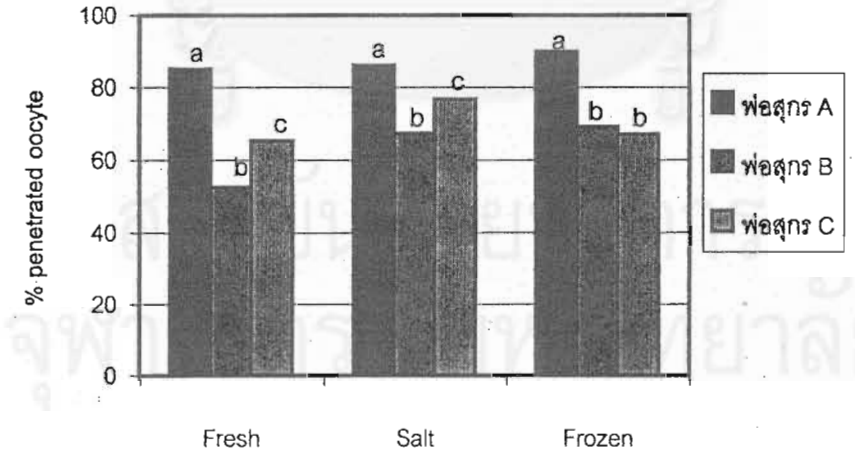
รูปที่ 20 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจาะผ่านในโอโอไซต์ชนิดต่างๆ ของพ่อสุกร C

ทำการเปรียบเทียบความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อสุกรทั้ง 3 ตัว โดยใช้อัตราการเจาะผ่านของตัวอสุจิและค่าเฉลี่ยของตัวอสุจิต่อโอโอไซต์ ผลที่ได้พบว่าเมื่อใช้โอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิ พ่อสุกร A จะมีความสามารถในการเจาะผ่านสูงในโอโอไซต์ทั้ง 3 ชนิด และมีค่าใกล้เคียงกับพ่อสุกร B (รูปที่ 21) ในขณะที่ใช้โอโอไซต์ชนิดพร้อมปฏิสนธิในการทดสอบ ผลที่ได้พบว่าพ่อสุกร A ยังคงมีอัตราการเจาะผ่านในโอโอไซต์ชนิดต่างๆ สูงสุดเมื่อเทียบกับพ่อสุกรทั้งสองตัว ในขณะที่พ่อสุกร B และพ่อสุกร C มีอัตราการเจาะผ่านในโอโอไซต์ทั้ง 3 ชนิดไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 22)

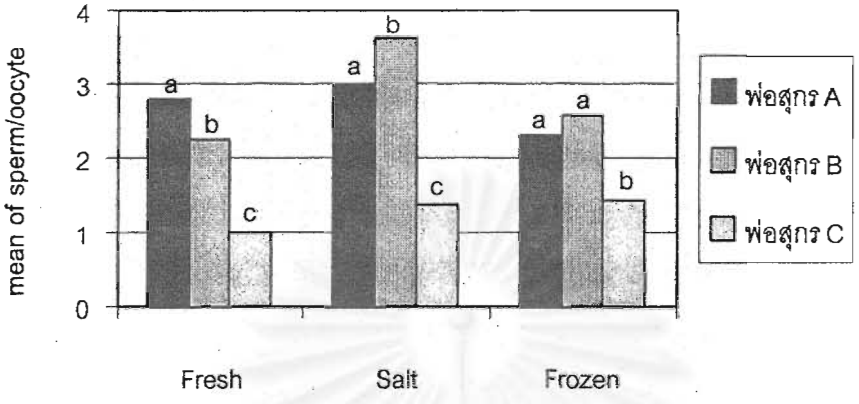
เมื่อใช้ค่าเฉลี่ยของตัวอสุจิต่อโอโอไซต์ในการเปรียบเทียบความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อสุกรทั้ง 3 ตัว ผลที่ได้พบว่าพ่อสุกร B มีค่าเฉลี่ยของตัวอสุจิต่อโอโอไซต์มากสุดในโอโอไซต์ชนิดแช่สารละลายเกลือ และแช่แข็ง ในขณะที่จำนวนอสุจิของพ่อสุกร B ในโอโอไซต์สดถึงแม้ว่าจะต่ำกว่าค่าที่ได้จากพ่อสุกร A แต่ก็ไม่ต่างกันมากนัก (รูปที่ 23) ตรงกันข้ามกับเมื่อใช้โอโอไซต์ชนิดพร้อมปฏิสนธิ ผลที่ได้พบว่าพ่อสุกร A มีค่าเฉลี่ยของตัวอสุจิต่อโอโอไซต์มากที่สุดในโอโอไซต์ทั้ง 3 ชนิด (รูปที่ 24)



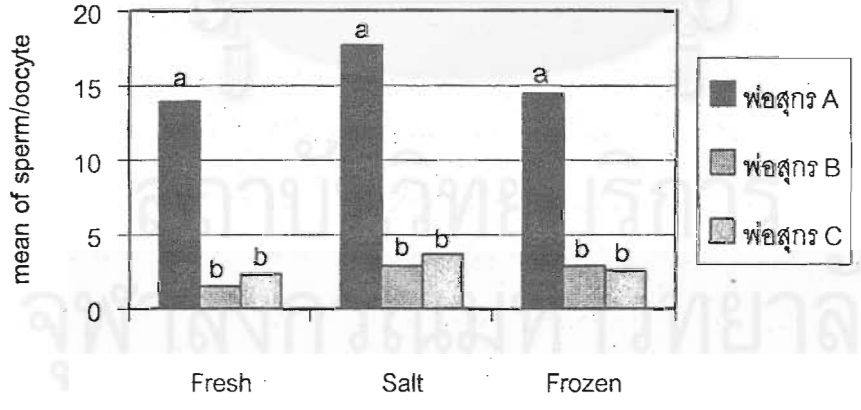
รูปที่ 21 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจาะผ่านของตัวอสุจิในพ่อสุกรทั้ง 3 ตัว เมื่อใช้โอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิที่เก็บรักษาด้วยวิธีการต่างๆ



รูปที่ 22 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจาะผ่านของตัวอสุจิในพ่อสุกรทั้ง 3 ตัว เมื่อใช้โอโอไซต์ชนิดพร้อมปฏิสนธิที่เก็บรักษาด้วยวิธีการต่างๆ



รูปที่ 23 กราฟเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวอสุจิต่อโอโอไซต์จากพ่อสุกรทั้ง 3 ตัว เมื่อใช้โอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิที่เก็บรักษาด้วยวิธีการต่างๆ



รูปที่ 24 กราฟเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวอสุจิต่อโอโอไซต์จากพ่อสุกรทั้ง 3 ตัว เมื่อใช้โอโอไซต์ชนิดพร้อมปฏิสนธิที่เก็บรักษาด้วยวิธีการต่างๆ

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การนำเทคนิคการปฏิสนธิภายนอกร่างกายมาประยุกต์ใช้กับการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อโดยดูจากการเจาะผ่านของตัวอสุจิพบว่ามีประโยชน์อย่างมาก เนื่องจากการตรวจจากเพียงรูปร่างลักษณะภายนอก และอัตราการเคลื่อนไหวไม่สามารถบ่งถึงความสามารถในการปฏิสนธิ และผลที่ได้หลังจากนำไปผสมพันธุ์กับแม่สุกรได้ โดยมงคลและคณะ (2539b) พบว่าน้ำเชื้อสุกรแม้จะมีอัตราการเคลื่อนไหวใกล้เคียงกันคือประมาณ 70-80% แต่จะให้ความแตกต่างกันในแง่ของอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนหลังนำน้ำเชื้อไปปฏิสนธิกับตัวอสุจิในหลอดทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอัตราการแบ่งตัวดังกล่าวเป็นวิธีหนึ่งที่บ่งชี้ถึงความสามารถในการปฏิสนธิ นอกจากนี้การตรวจสอบในหลอดทดลองจะช่วยย่นระยะเวลาในการทดสอบรวมไปถึงเสียค่าใช้จ่ายในการทดสอบน้อยลง (Larsson and Rodriguez-Martinez, 2000)

การศึกษาในครั้งนี้พบว่าอัตราการเจาะผ่านของตัวอสุจิในโอโอไซต์ที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิที่เก็บรักษาไว้ในสารละลายเกลือจะมีค่าสูงเมื่อเทียบกับอัตราการเจาะผ่านในโอโอไซต์สด ทั้งนี้เป็นไปได้ว่าส่วนประกอบของสารละลายเกลือและแซ่แข็งมีผลในการทำลายกลไกในการป้องกันการเข้าปฏิสนธิของตัวอสุจิหลายตัวได้ (Boatman et al., 1988; Yanagimachi, 1994) ทำให้ความสามารถในการเจาะผ่านโอโอไซต์ที่เก็บรักษาในสารละลายเกลือมีค่ามากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับที่ Andrew และคณะ (1992) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบจำนวนอสุจิของแมวดาว (leopard cat) ที่ผ่านเข้าไปใน perivitelline space ของโอโอไซต์ที่เก็บรักษาไว้ในสารละลายเกลือ พบว่ามีค่ามากกว่าโอโอไซต์ชนิดสด ในขณะที่ความสามารถในการเจาะผ่านของตัวอสุจิแมวบ้าน (domestic cat) ในโอโอไซต์ทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกัน (Andrew et al., 1992) อย่างไรก็ตามเมื่อทำการวัดความเร็วของตัวอสุจิที่เจาะผ่านผนัง zona pellucida ของโอโอไซต์ที่เก็บรักษาในสารละลายเกลือพบว่าตัวอสุจิใช้เวลาในการเจาะผ่านเร็วกว่าโอโอไซต์ชนิดสด (Stewart-Savage, 1993)

ผลการศึกษาในครั้งนี้เมื่อทำการเปรียบเทียบจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์นั้นพบว่าผลที่ได้มีความแตกต่างกันออกไปทั้งชนิดของการเก็บรักษาโอโอไซต์ทั้งชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิ รวมไปถึงความแตกต่างของผลที่ได้จากพ่อสุกร A , B และ C ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่ชี้ให้เห็นว่าพ่อสุกรที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ที่แตกต่างกันจะให้ผลในการเจาะผ่านโอโอไซต์ และอัตราการปฏิสนธิที่แตกต่างกันออกไป

(มงคล และคณะ, 2539b ; Ivanova and Mollova, 1993; Fazeli et al., 1995; Gadea et al., 1998) รวมไปถึงพ่อสุกรที่มีภาพลักษณ์ของการเคลื่อนไหวและเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่ปกติ แต่จะมีความสามารถในการเจาะผ่านและการปฏิสนธิที่แตกต่างกันออกไป ดังรายงานของ Techakumphu และคณะ (1999) ที่พบว่าอัตราการแบ่งตัว และอัตราการเจริญของตัวอ่อนเป็นระยะมอรูล่าจะแตกต่างกันในพ่อสุกรแต่ละตัว หลังจากนำน้ำเชื้อไปปฏิสนธินอกร่างกาย นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำเชื้อของพ่อสุกรแต่ละตัวจะมีความทนทานต่อการเก็บแช่เย็นที่อุณหภูมิ 15 °ซ และการแช่แข็งแตกต่างกันไป (จงกลวรรณ และคณะ, 2542) อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเปรียบเทียบจำนวนอสุจิที่ผ่านเข้าเจาะต่อโอโอไซต์แต่ละใบที่ได้จากผลการศึกษาในครั้งนี้ ผลที่ได้พบว่ามีจำนวนน้อยกว่าผลการศึกษาที่ได้จากรายงานอื่นๆ (Martinez et al., 1993; Ivanova and Mollova, 1993; Matas et al., 1996; Gadea et al., 1998) สืบเนื่องมาจากความเข้มข้นของตัวอสุจิที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีความเข้มข้นน้อยกว่าการศึกษาดังกล่าวข้างต้นคือใช้ความเข้มข้นในขนาด 1x 10^6 ตัว/มิลลิลิตร ในขณะที่การศึกษาอื่นใช้ความเข้มข้นในขนาดประมาณ 1 x10^7 ถึง 2x10^8 ตัว/มิลลิลิตร คำอธิบายนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Martinez และคณะ (1993) และ Xu และคณะ (1996) ที่กล่าวไว้ว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของตัวอสุจิมากขึ้นจะทำให้อัตราการเจาะผ่าน และจำนวนตัวอสุจิต่อโอโอไซต์เพิ่มสูงขึ้น ความแตกต่างดังกล่าวนี้นอกจากความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อสุกรแล้วความผันแปรสามารถเกิดจากโอโอไซต์ได้อีกด้วย อันได้แก่ คุณภาพของโอโอไซต์ที่แตกต่างกัน (Fazeli et al., 1993) โดยโอโอไซต์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางไม่เท่ากันจะมีความสามารถในการเจาะผ่านต่างกัน โดย Matas และคณะ (1996) รายงานไว้ว่าโอโอไซต์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 105 ไมโครเมตรจะมีจำนวนอสุจิที่เจาะผ่านต่อโอโอไซต์สูงขึ้น และมีจำนวนมากที่สุดเมื่อใช้โอโอไซต์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 116 ไมโครเมตร นอกจากนี้โอโอไซต์ที่ได้มาจากแม่สุกรที่มีอายุต่างกันจะมีผลต่อความสามารถในการปฏิสนธิที่แตกต่างกัน โดย O'Brien และคณะ (2000) ทำการศึกษาเปรียบเทียบถึงความสามารถในการเจริญของโอโอไซต์จนพร้อมปฏิสนธิ และความสามารถในการปฏิสนธิระหว่างโอโอไซต์ที่เก็บมาจากสุกรสาวและแม่สุกร ผลที่ได้พบว่าการเข้าปฏิสนธิของตัวอสุจิหลายตัวในโอโอไซต์ที่มาจากสุกรสาวมีค่า 82.4% และในแม่สุกรมีค่า 53.6 % ซึ่งจะเห็นว่าอัตราการเจาะผ่านในโอโอไซต์ที่มาจากสุกรสาวมีค่ามากกว่าโอโอไซต์ที่ได้มาจากแม่สุกร

ในสภาพธรรมชาติโอโอไซต์ชนิดพร้อมปฏิสนธิหลังการตกไข่จะมีการกระจายตัวของเซลล์คิวมูลัสให้มีลักษณะที่ฟูกระจายออกไปเพื่อเปิดโอกาสให้ตัวอสุจิผ่านเข้ามาถึงชั้น zona pellucida ได้ รวมทั้งมีการเจริญของนิวเคลียส และไซโทพลาสซึมเพื่อเกิดความพร้อมที่จะรับการเจาะผ่านรวมไปถึงการปฏิสนธิกับตัวอสุจิที่มีการผ่านเข้ามา (มงคล, 2543) จากผลการศึกษาเมื่อทำการเปรียบเทียบความสามารถในการเจาะผ่านของตัวอสุจิสุกรต่อโอโอไซต์ทั้งชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์พบว่าในพ่อสุกร A และ C อัตราการเจาะผ่านของตัวอสุจิ และจำนวนตัวอสุจิต่อโอโอไซต์

ในโอโอไซต์ชนิดพร้อมปฏิสนธิมีค่ามากกว่าโอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิ (ตารางที่ 2, 3, 6 และ 7) ซึ่งต่างจากการเจาะผ่านของพ่อสุกร B ซึ่งพบว่าอัตราการเจาะผ่านของตัวอสุจิและจำนวนตัวอสุจิต่อโอโอไซต์ในโอโอไซต์ชนิดพร้อมปฏิสนธิมีค่าน้อยกว่าโอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิ (ตารางที่ 4 และ 5 รูปที่ 22) โดยค่าที่ได้มีความผันแปรกันไปตามชนิดของโอโอไซต์ทั้งที่ไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิ อันเนื่องมาจากพ่อสุกร หรือจากคุณภาพของโอโอไซต์ดังที่ได้กล่าวไปข้างต้น หรือเป็นผลเนื่องมาจากในการศึกษาครั้งนี้ใช้น้ำเชื้อจากพ่อสุกรทดสอบกับโอโอไซต์ทั้งชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิในช่วงเวลาที่แตกต่างกันทำให้ผลที่ได้จากการทดสอบในโอโอไซต์ทั้งสองชนิดนี้แตกต่างกันไปด้วย

เมื่อทำการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของโอโอไซต์ที่เก็บรักษาไว้ในสารละลายเกลือ พบว่าเกิดการหดตัวของไซโทพลาสซึม โดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงของผนัง zona pellucida ลักษณะนี้สามารถพบได้ในโอโอไซต์ของโคเช่นเดียวกัน (Chian et al., 1991) Strom Holst และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาถึงระดับโครงสร้าง (ultrastructure) ของโอโอไซต์สุนัขที่เก็บรักษาไว้ในสารละลายเกลือพบว่าผนังของ zona pellucida มีความหนาลดน้อยลงเมื่อเทียบกับโอโอไซต์สด นอกจากนี้ Chian และคณะ (1991) ยังได้รายงานไว้ว่าสารละลายเกลือที่มีส่วนประกอบที่แตกต่างกัน และระยะเวลาในการเก็บรักษาโอโอไซต์ในสารละลายเกลือจะไม่มีผลต่อความสามารถในการเจาะผ่านของตัวอสุจิ รวมไปถึงความเร็วในการเจาะผ่านผนัง zona pellucida ก็ไม่มีความแตกต่างกันอีกด้วย (Stewart-Savage, 1993)

การเก็บรักษาโอโอไซต์โดยวิธีการแช่แข็งสามารถทำได้หลายวิธี (Niemann, 1991; Parks and Ruffing, 1992) โดยเฉพาะในปัจจุบันได้มีความพยายามในการพัฒนาเทคนิค vitrification มาใช้ในการแช่แข็งโอโอไซต์กันอย่างแพร่หลาย (Vajta, 2000) แต่การศึกษาในครั้งนี้ได้เลือกใช้วิธี ultra-rapid freezing มาใช้ในการแช่แข็งโอโอไซต์ทั้งนี้เนื่องจากการแช่แข็งด้วยวิธีนี้มีอัตราการเกิดสภาพพร้อมปฏิสนธิและอัตราการแบ่งตัวถึงระยะบลาสโตซีสสูงกว่าการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ (Martino et al., 1996) เนื่องจากมีการทำลายอันเนื่องมาจากความเย็นน้อย ด้วยเหตุผลที่โอโอไซต์แขวนลอยอยู่ในสารละลายที่มีสารป้องกันการแช่แข็งในปริมาณน้อยและใช้ระยะเวลาในการแช่แข็งสั้นมาก การที่อัตราของการลดอุณหภูมิเร็วมากเป็นการช่วยลดการเกิดเกล็ดน้ำแข็งที่จะทำลายเซลล์ได้ (Vajta, 2000; Shaw et al., 2000) เมื่อทำการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของโอโอไซต์ที่เกิดขึ้นจากการแช่แข็งด้วยวิธี ultra-rapid freezing พบว่าในบางโอโอไซต์จะเกิดการบิดเบี้ยวของผนัง zona pellucida หรือเกิดการรั่วของไซโทพลาสซึมออกมาภายนอกเซลล์ซึ่งพบลักษณะนี้ได้เช่นกันในรายงานของ Dhali และคณะ (2000) ที่ทำการศึกษาในกระบือ Fuku และคณะ(1995) ได้ศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงระดับโครงสร้างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในโอโอไซต์ทั้งชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิและชนิดพร้อมปฏิสนธิเมื่อผ่านการแช่แข็งในโค พบว่าเกิดการเปลี่ยนของ microvilli , cortical granules และการเจริญของ vesicle

ภายในโอโอไซต์ นอกจากนี้ผนังของ zona pellucida จากโอโอไซต์ชนิดพร้อมปฏิสนธิเกิดการเสียหายเพิ่มขึ้นอันเนื่องมาจากการลดลงของ cortical granules

สารป้องกันการแช่แข็งเป็นสารที่ช่วยป้องกันการทำลายของเซลล์ตัวอ่อน และเซลล์โอโอไซต์ขณะลดอุณหภูมิลงรวมไปถึงขณะที่ตัวอ่อนหรือโอโอไซต์ถูกเก็บลงในไนโตรเจนเหลว สารป้องกันการแช่แข็งมีมากมายหลายชนิดได้แก่ชนิดที่ผ่านเข้าเซลล์ได้ง่าย เช่น ethylene glycol, propylene glycol, glycerol และ dimethyl sulphoxide (DMSO) และชนิดที่ผ่านเข้าเซลล์ได้ยากเช่น sucrose, polyvinyl alcohol เป็นต้น สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ได้เลือกใช้ ethylene glycol ความเข้มข้น 5.0 โมลาร์เป็นสารป้องกันการแช่แข็งโอโอไซต์สุกร โดยผลที่ได้จากการศึกษาพบว่าโอโอไซต์สุกรมีอัตราการเจริญไปเป็นระยะ metaphase II ที่ระดับ 23-30% เมื่อใช้ ethylene glycol 4.0-6.0 โมลาร์ (ธวัชชัย และคณะ, 2542 ; อนุชา และคณะ, 2543) นอกจากนี้ ethylene glycol ยังเป็นสารป้องกันการแช่แข็งที่มีแนวโน้มใช้กันมากขึ้นในการแช่แข็งตัวอ่อน และโอโอไซต์ในสัตว์หลายชนิด เมื่อพิจารณาจากน้ำหนักโมเลกุลของ ethylene glycol จะพบว่ามีคุณสมบัติผ่านเข้าออกจากเซลล์ได้ดีกว่าและยังมีความเป็นพิษน้อยกว่าสารป้องกันการแช่แข็งตัวอื่นเมื่อใช้ในความเข้มข้นสูงๆ โดยใช้ ethylene glycol ชนิดเดียวหรือใช้ร่วมกันสารป้องกันการแช่แข็งตัวอื่น หรือสารที่มีน้ำโมเลกุลขนาดใหญ่ (macromolecule) เช่น sucrose เป็นต้น (Bautista and Kanagawa,1998)

การใช้ ethylene glycol เป็นสารป้องกันการแช่แข็งชนิดเดียวนั้นมักได้ผลหลังจากการเจือจางและละลายหลังการแช่แข็งไม่ดีนักเมื่อใช้ ethylene glycol ความเข้มข้น 6.0 โมลาร์ (Kasai et al., 1990) หรือที่ Saha และคณะ (1996) ได้ทำการเปรียบเทียบผลของการใช้ ethylene glycol ชนิดเดียวหรือใช้ร่วมกับสารตัวอื่นๆ ในการแช่แข็งตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส ผลที่ได้พบว่าเมื่อใช้ ethylene glycol ในขนาด 6.0 โมลาร์อย่างเดียวจะให้ผลต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสได้ต่ำสุด หรือที่ Hotamisligil และคณะ (1996) ได้ทำการศึกษาผลของ ethylene glycol ต่อความคงทนของผนังเซลล์โอโอไซต์ ไมโครฟิลาเมนท์ และความสามารถในการเจริญต่อไปของโอโอไซต์หนูเมาส์โดยใช้ ethylene glycol ในความเข้มข้นแตกต่างกัน ผลที่ได้พบว่าเมื่อนำโอโอไซต์สัมผัสกับ ethylene glycol ความเข้มข้น 0.5- 2.0 โมลาร์ โอโอไซต์เกิดการบิดเบี้ยวถึง 55.5% ในช่วงเวลา 1 นาทีแรกหลังจากสัมผัสกับ ethylene glycol ในขณะการศึกษาในครั้งนี้ได้เลือกใช้ ethylene glycol 5.0 โมลาร์ เป็นสารป้องกันการแช่แข็งเพียงชนิดเดียว ผลที่ได้พบว่าเกิดความเสียหายต่อผนังของ zona pellucida และเกิดการรั่วไหลของไซโทพลาสซึมไม่มากนักเมื่อสังเกตใต้กล้องสเตอริโอ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการแช่แข็งด้วยวิธี ultra-rapid freezing โอโอไซต์เกิดการสัมผัสกับสารป้องกันการแช่แข็งในปริมาณน้อยคือน้อยกว่า 1 ไมโครลิตร และใช้เวลาในการแช่แข็งสั้นมาก (Martino et al., 1996)

การนำผลที่ได้ไปใช้ในการทำนายความสามารถในการปฏิสนธินั้น Tardif และคณะ (1999) ได้บ่งชี้ว่าค่าพารามิเตอร์ที่ใช้ในการทำนายความสามารถในการปฏิสนธิของพ่อสุกรนั้นจำเป็นต้องอาศัยอัตราการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ อัตราการอยู่รอดของตัวอสุจิในการประกอบการทำนายความสมบูรณ์พันธุ์ ในขณะที่ความเข้มข้นของตัวอสุจิไม่สามารถบ่งบอกถึงความสามารถในการปฏิสนธิเมื่อนำน้ำเชื้อมาผสมกับแม่สุกรได้ เช่นเดียวกับที่ Flowers (1998) ได้รายงานไว้ว่าอัตราการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิใช้เป็นตัวชี้วัดได้ดีที่สุด แต่อย่างไรก็ตามพบว่าไม่มีความแตกต่างกันในแง่ของอัตราการเข้าคลอดและจำนวนลูกแรกเกิดในน้ำเชื้อที่มีอัตราการเคลื่อนไหวมากกว่า 70% โดยอัตราดังกล่าวคงที่นั่นหมายความว่าเมื่ออัตราการเคลื่อนไหวน้อยกว่า 70% อัตราการเคลื่อนไหวจะสัมพันธ์กับอัตราการเข้าคลอด ซึ่งนอกจากอัตราการเคลื่อนไหวแล้วอัตราของตัวอสุจิที่ปกติและอัตราของอะโครโซมที่ปกติ สามารถใช้เป็นพารามิเตอร์ในการตรวจความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อสุกรได้ แต่เกณฑ์ดังกล่าวก็ไม่สามารถใช้บ่งบอกถึงอัตราการเข้าคลอดและจำนวนลูกแรกคลอดดีเสมอไป

การนำผลที่ได้จากการทดสอบในห้องปฏิบัติการไปเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากฟาร์มสุกรนั้นมีปัจจัยหลายอย่างที่ควรคำนึงถึงได้แก่ น้ำเชื้อที่ใช้ในการผสมจริงกับแม่สุกรกับน้ำเชื้อที่ใช้ในการทดสอบเป็นน้ำเชื้อชุดเดียวกัน รวมไปถึงน้ำเชื้อที่รีดได้จากพ่อพันธุ์ในแต่ละครั้งจะมีคุณภาพแตกต่างกันไป เทคนิคการผสมเทียมในแต่ละครั้ง ความสามารถในการตรวจการเป็นสัดของแม่สุกร การจัดการดูแลแม่สุกรในระยะต่างๆ ของการตั้งท้องเป็นต้น นอกจากนี้การทดสอบความสามารถในการเจาะผ่านหรือความสามารถในการปฏิสนธิควรใช้ในฟาร์มที่มีการผลิตสุกรพันธุ์แท้เพียงอย่างเดียว (GGP) เนื่องจากมีการใช้พ่อพันธุ์ผสมเพียงตัวเดียว รวมไปถึงทำการเก็บข้อมูลย้อนหลังที่ได้จากการใช้งานพ่อพันธุ์แต่ใช้ในการเปรียบเทียบกับผลผลิตที่ได้ อย่างไรก็ตามเทคนิคการปฏิสนธิภายนอกร่างกายยังคงต้องพัฒนาต่อไปเพื่อที่จะสามารถนำผลที่ได้ในห้องปฏิบัติการมาใช้ในการทำนายความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อพันธุ์ให้เกิดความแม่นยำมากขึ้นตามลำดับ (Larsson and Rodriguez-Martinez, 2000)

สรุป

การศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่าโอโอไซต์ที่เก็บรักษาไว้ในสารละลายเกลือและแช่แข็งให้ความสามารถในการเจาะผ่าน และจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ของตัวอสุจิพ่อสุกรได้มากกว่าเมื่อเทียบกับโอโอไซต์ชนิดสด อีกทั้งสามารถนำโอโอไซต์ทั้งชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิที่เก็บรักษาไว้ในสารละลายเกลือ และแช่แข็งมาใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการเจาะผ่านของตัวอสุจิได้

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยขั้นต่อไปเพื่อนำวิธีการนี้ไปปรับใช้กับฟาร์มสุกร ควรมีการศึกษาโดยใช้น้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์สุกรที่มีประวัติการผสมติดต่ำ ให้ลูกต่อครอกต่ำในฟาร์มผลิตสุกรพันธุ์แท้มาทำการเปรียบเทียบเพิ่มเติมโดยอาจใช้เทคนิคที่เรียกว่า "Hemi-zona assay" หรืออาจหาค่ามาตรฐานของจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ที่ได้จากพ่อสุกรที่มีประวัติการผสมติดสูงกับแม่สุกรในฟาร์มเพื่อมาใช้ในการเปรียบเทียบ การศึกษาความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์สุกรที่ใช้ในการเลี้ยง นอกจากนี้ในการหาความสัมพันธ์ของความสามารถในการปฏิสนธิทั้งในห้องปฏิบัติกับในตัวแม่พันธุ์ควรเป็นน้ำเชื้อชุดเดียวกันเพื่อลดความแปรปรวนที่เกิดขึ้นอันเนื่องมาจากน้ำเชื้อพ่อพันธุ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

จงกลวรรณ มุสิกทอง มงคล เตชะกำพุ จินดา สิงห์ลอ 2542 ผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อต่อความสำเร็จในการปฏิสนธิภายนอกร่างกายในสุกร เวชชสารสัตวแพทย์ 29(3) : 61-70

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

มงคล เตชะกำพุ 2543 เทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ในปศุสัตว์. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 712 หน้า

มงคล เตชะกำพุ จงกลวรรณ มุสิกทอง วิชัย ทันตศุภารักษ์ และวันเพ็ญ ศรีอนันต์ 2539a การศึกษาผลของคุณภาพน้ำเชื้อและระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อต่อความสำเร็จในการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกร รายงานทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2539 29 หน้า

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

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

ศิริชัย พงษ์วิชัย 2540 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยคอมพิวเตอร์ สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 556 หน้า

อนุชา สธนวงศ์ อภิสิทธิ์ กิจถาวรรัตน์ รัฐพงศ์ รัตนภุมมะ นวเพ็ญ ภูติกนิษฐ์ มงคล เตชะกำพุ และวันเพ็ญ อดุลยานุภาพ 2543 ผลของความเข้มข้นของสารเอทีลีน ไกลคอล ต่อการแช่แข็งโอโอไซต์สุกรด้วยวิธี ultra-rapid freezing โครงการเสริมทักษะการวิจัยประจำปีการศึกษา 2543 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 21 หน้า

อรรณพ คุณาวงษ์กฤต 2537 การเก็บน้ำเชื้อ การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อและการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกร วิทยาการสืบพันธุ์สุกร สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ : 241-264

ภาษาอังกฤษ

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 leopard (*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 conditions. Theriogenology 47: 341 (abstr.)

Ax, R.L., Dally, M., Didion, B.A., Lenz, R.W., Love, C.C., Varner, D.D., Hafez, B. and Bellin, M.E. 2000. Semen evaluation. In : Reproduction in farm animal . 7th ed. E.S.E. Hafez and B. Hafez ed. Lippincott Williams & Wilkins: p. 365-375.

Baker, R.D. and Degan, A.A. 1972. Transport of live and dead boar spermatozoa within the reproductive tract of gilts. J. Reprod. Fert. 28: 369-377.

Barboni, B., Matioli, M. and Seren, E. 1995. Influence of progesterone on boar sperm capacitation. J. Endocrinol. 144 : 13-18.

Bautista, J.A.N. and Kanagawa, H. 1998. Current status of vitrification of embryos and oocytes in domestic animals : Ethylene glycol as an emerging cyroprotectant of choice. Jpn. J. Vet. Res. 45:183-191.

Bazer, F.W., Geisert, R.D. and Zavy, M.T. 1993. Fertilization, clevage and implanttion. In : Reproduction in farm animals. E.S.E. Hafez ed. 6th edit. Philadelphia. Lea & Febiger : 188-212.

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 asay for capacitation: Evaluation on multiple sperm penetration through the zona pellucida of salt-stored hamster eggs. Gamete Res. 19 : 19-29.

Brogliatti, G.M. and Adams, G.P. 1996. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. Theriogenology 45 : 1163-1176.

Cheng, F. 1997. The acrosome reaction in stallion spermatozoa. Utrecht, The Netherlands: Utrecht University. Thesis : 97p.

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.

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., Hage, J.W., Cheng, F.P., Voorhout, W.F., Marks, A., Bevers, M.M. and Colenbrander, B. 1997. Acrosome intact boar spermatozoa initiate binding to the homologous zona pellucida *in vitro*. Biol. Reprod. 56 : 430-438.

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

Flowers, W.L. 1998. Boar fertility and artificial insemination. Proc. 15 th IPVS Congress Birmingham, England, 5-9 July , 45-52.

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.

Henault, M.A., Killian, G.J., Kavanaugh, J.F. and Griel, L.C. 1995. Effect of accessory sex gland fluid from bulls of differing fertilities on the ability of cauda epididymal sperm to penetrate zona-free bovine oocyte. Biol. Reprod. 52 : 390-397.

Hillery , F.L., Parrish, J.J. and First, N.L. 1990. Bull specific effect on fertilization and embryo development *in vitro*. Theriogenology 33 : 489-491.

Hotamisligil, S., Toner, M. and Douglas, P. R. 1996. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification with ethylene glycol. Biol.Reprod. 55: 161-168.

Hunter, R.H.F. 1982. Functional relationships between boar spermatozoa, the female reproductive tract and the egg investments. The Pig J. 9: 127-135.

Hurtt, A.E., Landim-Alvarenga, F., Seidel, G.E. and Squires, E.L. 2000. Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open–pulled straws. Theriogenology 54: 119-128.

Isachenko, V., Soler, C., Isachenko, E., Perez-Sanchez, F. and Grishchenko, V. 1998. Vitrification of immature porcine oocytes : Effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton and addition and removal of cryoprotectant. Cryobiology 36: 250-253.

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

Ivanova, M., Mollova, M., Ivanova-Kicheva, M.G., Petrov, M., Djarkova, Ts. and Somlev, B. 1999. Effect of cryopreservation of zona-binding capacity of canine spermatozoa *in vitro*. Theriogenology 52: 163-170.

Jainudeen, M.R., Wahid, H. and Hafez, E.S.E. 2000. Ovulation induction, embryo production and transfer. In : Reproduction in farm animal . 7th ed. E.S.E. Hafez and B. Hafez eds. Lippincott Williams & Wilkins: p. 405-430.

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.

Kasai, M., Komi, J.H., Takakamo, A., Tsudera, H., Sakurai, T. and Machida, T. 1990. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. J.Reprod. Fertil. 89 : 91-97.

Kupker, W., Diedrich, K. and Edwards, R.G. 1998. Principles of mammalian fertilization. Hum.Reprod.13 (suppl) 1 : 20-32.

Lambert, R.D., Bernard, C., Rioux, J.E., Beland, R.D., Aours, D. and Treouil, A. 1983. Endoscopy in cattle by the paralumbar route technique for ovarian examination and Follicular aspiration. Theriogenology 20 : 149-161.

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.

Liu, D.Y. and Baker, H.W.G. 1994. A new test for the assessment of sperm-zona pellucida penetration : relationship with of other sperm tests and fertilization *in vitro*. Hum. Reprod. 9(3) : 489-496.

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.

Marquant-Le Guienne, B., Humblot, P., Thibier, M. and Thibault, C. 1990. Evaluation of bull semen fertility by homologous *in vitro* fertilization tests. Reprod. Nutr. Dev.30: 259-266.

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.

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

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.

Otoi, T., Yamamoto, K., Koyama, N. and Suzuki, T. 1995. *In vitro* fertilization and development of immature and mature bovine oocytes cryopreserved by ethylene glycol with sucrose. Cryobiology 32: 455-460.

Otoi, T., Yamamoto, K., Koyama, N., Tachikaoa, S. and Suzuki, T. 1998. Cryopreservation of mature oocytes by vitrification in straws. Cryobiology 37: 77-85.

Parks, J.E. and Ruffing, N.A. 1992. Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes. Theriogenology 37: 59-73.

Parrish, J.J., Susko-Parrish, J., Winer, M.A. and First, N.L. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. Biol. Reprod. 38: 1171-1180.

Pieterse, M.C., Vos, P.L.A.M., Druip, Th.A.M., Wurth, Y.A., van Beneden, Th.H., Wilmense, A.H. and Taverne, M.A.M. 1991. Transvaginal ultrasound-guide follicular aspiration of bovine oocytes. Theriogenology 35: 19-24.

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.

Rayos, A.A., Takahashi, Y., Hishinuma, M. and Kanagana, H. 1994. Quick freezing of unfertilized oocytes using ethylene glycol with sucrose or trehalose. J. Reprod. Fert. 100: 123-129.

Roca, J., Martinez, E., Vazquez, M. and Lucas, X. 1998. Selection of immature pig oocytes for *in vitro* penetration assays with the brilliant cresyl blue test. Reprod. Fertil. Dev. 10: 479-485.

Saha, S., Rajamahendran, R., Boediono, A., Sumantri, C. and Suzuki, T. 1996. Viability of bovine blastocysts obtained after 7, 8 or 9 days of culture *in vitro* following vitrification and one- step redydration. Theriogenology 46 : 331-343.

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

Sirivaidyapong, S. 2000. Assessment of dog sperm functional capacity. Utrecht, The Netherlands: Utrecht University. Thesis : 120 p.

Sirivaidyapong, S., Bevers, M.M. and Colenbrander, B. 1999. Acrosome reaction in dog sperm is induced by a membrane localized progesterone receptor. J. Androl. 20: 537-544.

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.

Stewart-Savage, J. 1993. Sperm penetration through the zona pellucida of salt-stored hamster eggs is delays. Mol Reprod.Dev. 36: 328-330.

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.

Tardif, S., Laforest, J.P., Cormier, N. and Bailey, J.L. 1999. The importance of porcine sperm parameters on fertility *in vivo*. Theriogenology 52: 447-459.

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.

Trounson, A., Pushett, D., Maclellan, L.J., Lewis, I. and Gardner, D.K. 1994. Current status of IVM/IVF and embryo culture in human and farm animals. Theriogenology 41: 57-66.

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

White, D., Weerachatyanukul, W., Gadella, B., Kamolvarin, N., Attar, M. and Tanphaichitr, N. 2000. Role of sperm sulfogalactosylglycerolipid in mouse sperm-zona binding. Biol. Reprod. 63: 147-155.

Xu, X., Seth, P.C., Harbison, D.S., Cheung, A.P. and Foxcroft, G.R. 1996. Semen dilution for assessment of boar ejaculate quality in pig IVM and IVF systems. Theriogenology 46: 1325-1337.

Yanagimachi, R. 1994. Mammalian fertilization. In : The physiology of reproduction. E. Knobil J.D Neill eds. New York. Raven Press : p. 189-317.

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

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก.

วิธีเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง (stock solution)

1. Heparin : sigma H3393

   ใช้ 1 mg. ของ heparin ละลายในน้ำกลั่น 1 ml. แล้วแบ่งใส่ vial ละ 150 µl. เก็บที่ –20 °C (เมื่อเตรียม IVF media final จะได้ความเข้มข้นของ heparin เป็น 10 µg/ml.)

2. Hypotaurine : sigma H1384

   ใช้ 1.09 mg. (0.0011 g) Hypotaurine ละลายใน 0.9% NaCl 10 ml. แบ่งใส่ vial ละ 300 µl. เก็บที่ –20 °C

3. Penicillamine : Sigma P4875

   ใช้ 3 mg. ของ Penicillamine ละลายใน 0.9% NaCl 10 ml. แบ่งใส่ vial ละ 300 µl. เก็บที่ –20 °C

4. Normal saline : 0.9% NaCl

   แบ่งใส่ vial ละ 500 µl. เก็บที่ –20 °C

5. Epinephrine : sigma E4250

   เตรียมตัวทำละลายโดยใช้น้ำกลั่น 50 ml.+ 150 µl. Sodium lactate+ 50 mg. Sodium metabisulfate ปรับ pH 4.0 ละลาย epinephrine 1.83 mg. ในตัวทำละลาย 40 ml. แบ่งใส่ vial ละ 150 µl. เก็บที่ –20 °C

6. Pyruvate : sigma P2256

   ใช้ 2.2 pyruvate ละลายใน 0.9% NaCl 10 ml. แบ่งใส่ vial ละ 1 ml. เก็บที่ –20 °C

7. Gentamicin : sigma G3632

   ใช้ 50 mg. Gentamicin ละลายใน 0.9% NaCl 100 ml. แบ่งใส่ vial ละ 300 µl. เก็บที่ –20 °C

8. 1% Hyarulonidase : sigma H3506

   เตรียม 1% Hyarulonidase+ TCM 199 $NaHCO_3$ สำหรับ decolonized . แบ่งใส่ vial ละ 1 ml. เก็บที่ –20 °C เมื่อจะนำมาใช้ให้ทำการ incubate ที่ 39 °C 5% CO_2 ก่อนใช้ 30 นาที

9. FSH/LH : สำหรับ IVM-media

   IVM –media ใช้ความเข้มข้นของ FSH/LH เท่ากับ 10 µg/ml.

   FSH/LH 1 ขวดมี 10 mg ของ FSH ละลายด้วย 0.9% NaCl 10 ml. . แบ่งใส่ vial ละ 100 µl. เก็บที่ –20 °C

10. Estradiol : (E_2-17β) สำหรับ IVM-media : sigma E2758

IVM – media ใช้ความเข้มข้นเท่ากับ 1 µg./ml. ใช้ Estradiol 0.1 mg. ละลายใน 95% Ethyl alcohol 1 ml. ดังนั้น 100 µg./1000 ml. แบ่งใส่ vial ละ 500 µl. เก็บที่ –20 °C

11. Penicillin-Streptomycin : Pegemex

ใช้ Penicilling-G (Pegemex) 5,000,000 IU ละลายในน้ำกลั่น 10 ml.

ดังนั้น 1 ml=500,000 IU

นำสารละลายที่ผสมแล้วมา 2 ml.(1,000,000 IU) + น้ำกลั่น 8 ml.+ 0.5 g. Streptomycin

ดังนั้นใน 10 ml. จะประกอบด้วย Penicillin 1,000,000 IU และ Streptomycin 500 mg.

จากนั้นแบ่งใส่ vial ละ 50 µl. เก็บที่ –20 °C

12. Ethylene glycol : (H9C236, UNILAB)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>การเตรียมสารละลายเกลือ</u> (Salt-stored solution)

ส่วนประกอบ

Polyvinyl alcohol (PVA)	0.01	g
Hepes (sigma, H33375)	0.95	g/100 ml
Phenol red	0.001	g/100 ml
$(NH_4)_2SO_4$	6.6	g/100 ml
$MgCl_2$ $6H_2O$	15.25	g/100 ml
$ZnCl_2$ (sigma, Z0152)	0.00272	g/100 ml

การเตรียมสารละลาย

1. ละลาย PVA และ Hepes ในน้ำกลั่น (sterile water) 30 มล. คนให้เข้ากันอย่างช้าๆ
2. เติม phenol red และปรับค่า pH เป็น 7.4
3. เติม $(NH_4)_2SO_4$ และปรับค่า pH เป็น 7.4
4. เติม $MgCl_2$ $6H_2O$ และปรับค่า pH เป็น 7.4
5. เติม $ZnCl_2$
6. เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มล.
7. นำไปกรองด้วยหัวกรองขนาด 0.25 μ และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C ได้นาน 6 เดือน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Fertilization Media (IVF-media)

ส่วนประกอบ :

Sodium chloride (NaCl)	0.6662	g/100 ml.
Sodium di-hydrogen phosphate (NaH_2PO_4)	0.0048	g/100 ml.
Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$)	0.21	g/100 ml.
Potassium chloride (KCl)	0.0235	g/100 ml.
Calcium chloride ($CaCl_2$)	0.0294	g/100 ml.
Magnesium chloride ($MgCl_2$)	0.0101	g/100 ml.
Sodium lactate 60%	0.186	g/100 ml.
Phenol		

ละลายสารเคมีทั้งหมดในน้ำกลั่น 100 ml. กรองด้วยหัวกรองขนาด 0.25 μ เก็บรักษาที่ 4 °C ได้นาน 1 เดือน สารละลายที่ได้เป็น stock solution

Working solution : นำ stock solution มา 15 ml. มาเติม

BSA without fatty acid	0.09 g
Pen-strep	15 μl.
Pyruvate (2.2 mg/ml)	150 μl.

จากนั้นทำการปรับ pH เป็น 7.6 กรองด้วยหัวกรองขนาด 0.25 μ นำไป incubate ที่ 39 °C 5% CO_2 นาน 2 ชั่วโมงก่อนใช้

เตรียม Heparine solution : นำ stock solution ของ heparine 100 μl. + 900 μl. ของ working solution ปริมาตร 1 ml. กรองด้วยหัวกรองขนาด 0.25 μ

เตรียม PHE solution : นำ stock solution ของ Penicillamine 250 μl. + Hypotaurine 250 μl. + epinephrine 100 μl. + 0.9% NaCl 400 μl. ปริมาตรรวมเป็น 1 ml. กรองด้วยหัวกรองขนาด 0.25 μ

Final IVF-media :

นำ working solution 430 μl.+ PHE 20 μl.+ Heparine 50 μl. ปริมาตรรวม 500 μl. นำไป incubate ที่ 39 °C 5% CO_2 นาน 2 ชั่วโมงก่อนใช้

Capacitaition media

(TALP media)

ส่วนประกอบ :

Sodium chloride (NaCl)	0.582	g/100 ml.
Sodium di-hydrogen phosphate (NaH_2PO_4)	0.0048	g/100 ml.
Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$)	0.21	g/100 ml.
Potassium chloride (KCl)	0.0235	g/100 ml.
Calcium chloride ($CaCl_2$)	0.0294	g/100 ml.
Magnesium chloride ($MgCl_2$)	0.0223	g/100 ml.
Sodium lactate 60%	0.368	g/100 ml.
Hepes	0.238	g/100 ml.
Phenol		

ละลายสารเคมีทั้งหมดในน้ำกลั่น 100 ml. กรองด้วยหัวกรองขนาด 0.25 µ เก็บรักษาที่ 4 °C ได้นาน 1 เดือน สารละลายที่ได้เป็น stock solution

Working solution :

นำ stock solution จำนวน 14.2 ml. มาเติม

BSA fraction V	0.09 g
Gentamicin (0.5 mg/ml)	150 µl.
Pyruvate	750 µl.

จากนั้นปรับ pH เป็น 7.2 กรองด้วยหัวกรองขนาด 0.25 µ นำไป incubate ที่ 39 °C 5% CO_2 นาน 2 ชั่วโมงก่อนทำการ swim up ตัวอสุจิ

Maturation media

(IVM media)

Content : TCM 199 $NaHCO_3$

+ 10% Fetal Calf Serum (FCS)

+ 10 µl/ml E_2 (จาก stock solution ของ E_2/FSH+LH)

+ 10 µl/ml FSH+LH

Working solution : เตรียม IVM media จำนวน 10 ml. จะต้องใช้

TCM 199 $NaHCO_3$ 9 ml. + 1 ml ของ FCS

+ 100 µl E_2 (นำไประเหยที่ 37 °C 30 นาทีก่อนใช้)

+ 100 µl FSH/LH

จากนั้นกรองด้วย 0.25 µ นำไป incubate ที่ 39 °C 5% CO_2 นาน 2 ชั่วโมงก่อนใช้งาน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีเตรียม Tissue Culture Media 199 Hepes

(TCM 199 Hepes media)

Solution 1 :	ผสม TCM-199 powder (Gibco BRL 071-01100 A)	1	ซอง
	Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$)	0.35	g/l
	Penicillin G	0.06	g/l
	Streptomycin	0.05	g/l

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น 500 ml.

Solution 2 : ละลาย Hepes 4.766 g/l ในน้ำกลั่น 100 ml.

Working solution : ผสม solution 1 และ solution 2 เข้าด้วยกันอย่างช้าๆ แล้วปรับปริมาตรรวมเป็น 1000 ml. จากนั้นปรับ pH เป็น 7.35 กรองด้วยกระดาษ 0.25 μ เก็บรักษาที่ 4 °C ได้นาน 1 เดือน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีเตรียม Tissue Culture Media 199 $NaHCO_3$

(TCM 199 bicarbonate media)

ส่วนประกอบ :

ผสม TCM-199 powder (Gibco BRL 071-01100 A)	1	ซอง
Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$)	2.2	g/l
Penicillin G	0.06	g/l
Streptomycin	0.05	g/l

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น 1000 ml. จากนั้นปรับ pH เป็น 7.2 กรองด้วย35 กรองด้วยกระดาษ 0.25 μ เก็บรักษาที่ 4 °C ได้นาน 1 เดือน ก่อนใช้นำไป incubate ที่ 39 °C 5% CO_2 นาน 2 ชั่วโมงก่อนใช้งาน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียม Phosphate Buffer Saline

(PBS complex)

ส่วนประกอบ :

Potassium chloride (KCl)	0.02 g/100 ml.
Potassium di-hydrogen phosphate (KH_2PO_4)	0.02 g/100 ml.
Magnesium dhloride ($MgCl_2 . 6H_2O$)	0.01 g/100 ml.
Sodium chloride (NaCl)	0.8 g/100 ml.
di-Sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	0.12 g/100 ml.
Calcium chloride ($CaCl_2.2H_2O$)	0.01 g/100 ml.
Sodium pyruvate	0.0036 g/100 ml.
Glucose	0.1 g/100 ml.
Penicillin-G	0.006 g/100 ml.
Streptomycin	0.005 g/100 ml.

ละลายสารเคมีทั้งหมดในน้ำกลั่นยกเว้น Magnesium chloride และ Calcium chloride ให้ละลายแยกต่างหาก แล้วค่อยๆ รินใส่รวมกับสารอื่นๆ (ห้ามรินเร็วจะเกิดเป็นตะกอน) จากนั้นปรับปริมาตรตามที่ต้องการ แล้วปรับ pH เป็น 7.2-7.4 แล้วกรองด้วย 0.25 μ ห้ามนำไป autoclave เก็บรักษาที่ 4 °C ได้นาน 1 เดือน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมสีย้อม Hoechst 33342

Stock solution :

สีย้อม Hoechst 33342 1 mg. ละลายในน้ำกลั่น 1000 µl

Working solution :

นำ stock solution มา 10 µl ใส่ลงในสารละลายที่มีส่วนประกอบของ

2.3 % sodium citrate	750 µl
95 % ethyl alcohol	250 µl

ดังนั้นจะได้สารละลายของ Hoechst 33342 ในขนาด 10 µg/ml

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับวิทยานิพนธ์

1. อดิศร อดิเรกถาวร มงคล เตชะกำพุ และสาโรช งามขำ 2544 การใช้โอโอไซต์ชนิดสด แช่สารละลายเกลือ และแช่แข็งที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิเพื่อตรวจสอบความสามารถในการปฏิสนธิของตัวอสุจิพ่อสุกร เวชชสารสัตวแพทย์ (กำลังพิจารณา)
2. อดิศร อดิเรกถาวร มงคล เตชะกำพุ และสาโรช งามขำ 2544 การใช้โอโอไซต์ชนิดสด แช่สารละลายเกลือ และแช่แข็งที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิเพื่อตรวจสอบความสามารถในการปฏิสนธิของตัวอสุจิพ่อสุกร งานประชุมวิชาการสัตวแพทย์สมาคมแห่งประเทศ ครั้งที่ 27 ประจำปี 2544 ระหว่างวันที่ 24-26 ตุลาคม 2544 โรงแรมโซฟิเทล เซ็นทรัลพลาซ่า กรุงเทพฯ (บทคัดย่อ และโปสเตอร์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายอดิศร อดิเรกถาวร เกิดวันที่ 21 สิงหาคม พ.ศ. 2516 ที่จังหวัดกรุงเทพ ฯ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปี 2539 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิทยาการสืบพันธุ์สัตว์ ที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2542 ปัจจุบันรับราชการในตำแหน่งอาจารย์ระดับ 5 สังกัดภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยา