บทที่ 4

ระบบการเลี้ยงโอโอไซต์ให้สุก และ การปฏิสนธินอกร่างกาย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสของโอโอไซต์ที่เลี้ยงในมีเดียม M199B
2. เพื่อศึกษาผลของน้ำเชื้อสด จากพ่อสุกรต่างตัวกันต่ออัตราการปฏิสนธินอกร่างกาย
3. เพื่อคัดเลือกระบบการเลี้ยงโอโอไซต์และการปฏิสนธินอกร่างกายที่ใช้เป็น บรรทัดฐาน ในการวัดผลการทดลองในบทต่อไป

วิธีการทดลอง

วิธีการทดลองแบ่งออกเป็น 2 แผนการทดลอง ดังจะกล่าวต่อไปข้างล่างนี้ โดยใช้โอโอไซต์จากแหล่งที่กล่าวไว้ในบทที่ 3 หน้า 27 และเลี้ยงใน IVM มีเดียม ตามวิธีการที่กล่าวไว้ในบทที่ 3 หน้า 24 และปฏิสนธินอกร่างกาย ใน IVF มีเดียม ด้วยน้ำเชื้อที่เตรียมตามวิธีการที่กล่าวไว้ใน บทที่ 3 หน้า 28 และ 30-31

แผนการทดลองที่ 1 ทำการเลี้ยงโอโอไซต์ใน IVM มีเดียม นาน 12 16 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 42 44 46 หรือ 48 ชม. โดยเลี้ยงไข่นานเป็นระยะเวลาดังกล่าว ระยะละ 30-50 ใบ เมื่อครบเวลาที่กำหนดแล้ว จะนำโอโอไซต์ออกมาทำการตรึงให้คงสภาพและย้อมสี ตามวิธีการในบทที่ 3 หน้า 38-40 แล้วนำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 200 เท่า เพื่อดูระยะการเจริญของนิวเคลียสของโอโอไซต์ ที่เปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลาที่เลี้ยงว่าจะเจริญถึงระยะ M II เมื่อเลี้ยงไปนานเท่าใด และเลี้ยงนานเท่าไหร่จึงจะมีเปอร์เซนต์ไข่สุกสูงสุด

แผนการทดลองที่ 2 ทำการเลี้ยงโอโอไซต์ ใน IVM มีเดียม นาน 40 ชม. แล้ว ทำการปฏิสนธิกับน้ำเชื้อจากพ่อสุกรต่างตัวกัน จำนวน 7 ตัว แล้วใช้เวลาเลี้ยงหลังจากเติมอสุจิเป็นเวลานาน 48 ชม. แล้วตรวจนับจำนวนเอ็มบริโอที่เจริญถึงระยะ 2 หรือ 4 เซลล์ และนับจำนวนไข่ที่ไม่มีการแบ่งตัวแต่มีโพลาร์บอดีด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวกลับกำลังขยาย 100 และ 320 เท่า เพื่อดูผลของพ่อพันธุ์ต่อการปฏิสนธิจนเกิดการแบ่งตัว โดยคิดเปอร์เซนต์เอ็มบริโอที่แบ่งตัวต่อจำนวนโอโอไซต์เริ่มเลี้ยง และต่อจำนวนไข่ที่สุก โดยถือว่าเอ็มบริโอและไข่ที่มีโพลาร์บอดีมาจากไข่สุก

ผลการทดลอง

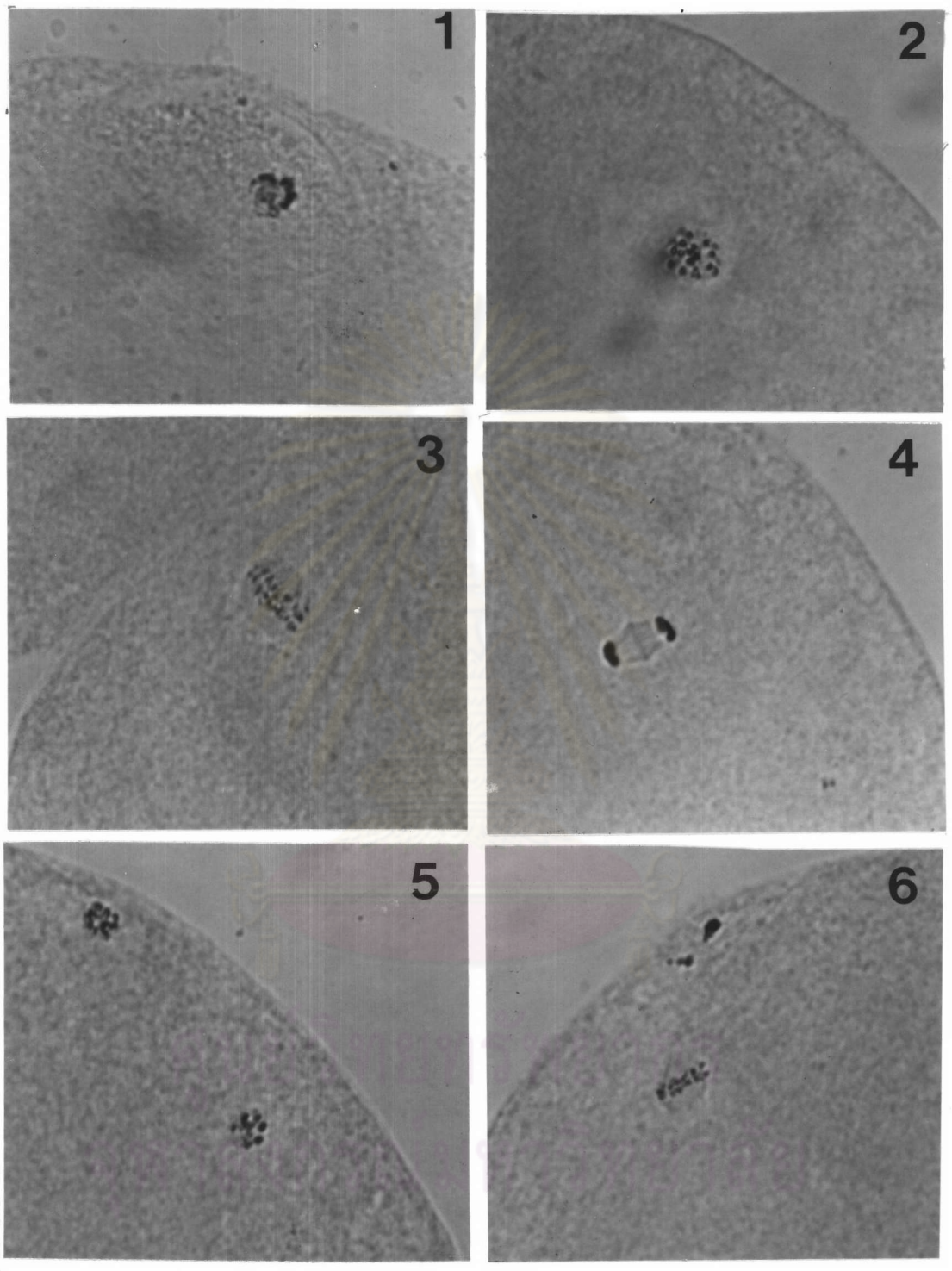
ผลการทดลองที่ 1

ผลการเจริญของโอโอไซต์ทั้งหมด 687 ใบ ที่เลี้ยงใน IVM มีเดียมนานตั้งแต่ 12 ชม. จนถึง 48 ชม. แสดงเป็นเปอร์เซนต์ของโอโอไซต์ที่นิวเคลียสเจริญถึงระยะต่างๆ(รูปที่ 9) ในตารางที่ 1 และรูปที่ 10 โอโอไซต์ที่เจาะได้ทั้งหมด นิวเคลียสจะอยู่ในระยะ GV และนิวเคลียสเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะ PM เมื่อเลี้ยงไปได้ประมาณ 16 ชม. ระหว่างชั่วโมงที่ 20-22 เริ่มมีโอโอไซต์เจริญถึงระยะ M I ชั่วโมงที่ 26 เริ่มมีโอโอไซต์ที่นิวเคลียสเจริญถึงระยะ ANA I นิวเคลียสจะเจริญถึงระยะ TEL I ในระหว่าง ชั่วโมงที่ 30-32 และนิวเคลียสเริ่มเจริญถึงระยะ M II เมื่อเลี้ยงถึง 32 ชม. ใน ชั่วโมงที่ 34 นิวเคลียสของไข่เจริญถึงระยะ M II 66.6% และตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 เป็นต้นไป จนถึง ชั่วโมงที่ 48 นิวเคลียสเจริญถึงระยะ M II 80.5-97.9%

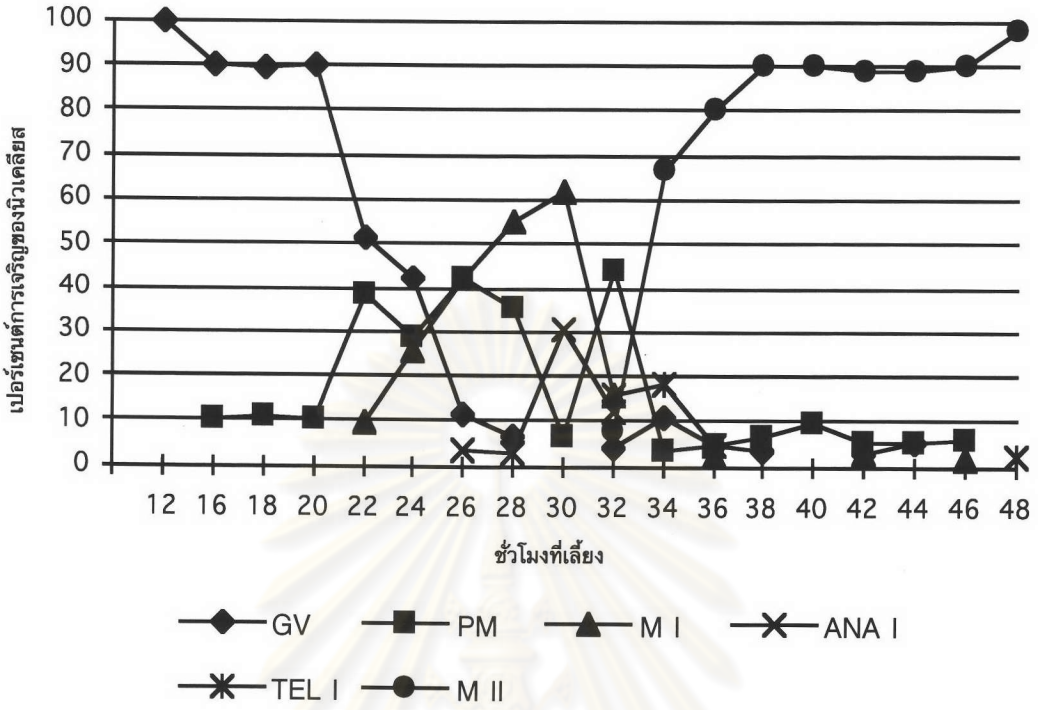
จากการสังเกตการเจริญของโอโอไซต์ที่เลี้ยงในหยด IVM มีเดียม พบว่าคูมูลัสเซลล์เริ่มเปลี่ยนรูปจากทรงกลมเป็นรูปกระบอกในชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยง และคูมูลัสเซลล์ชั้นนอกเริ่มแผ่กระจายออกมาเปลี่ยนเป็นรูปกระสวยและเริ่มเกาะที่พื้นจานเลี้ยง (รูปที่ 11) และคูมูลัสเซลล์ชั้นในแผ่ออกมาเกือบหมดและกระจายเกาะผิวจานเลี้ยงมาก ในชั่วโมงที่ 18 (รูปที่ 12) ในชั่วโมงที่ 24 คูมูลัสเซลล์แผ่ออกมาและเปลี่ยนในรูปกระสวยเกือบทั้งหมด และเกาะที่พื้นจานเลี้ยง (รูปที่ 13) ในโอโอไซต์ที่มีคูมูลัสเซลล์หุ้มอย่างหนาแน่นในชั่วโมงที่ 24 คูมูลัสเซลล์ แผ่ออกมากว้างมาก แต่ไม่เกาะกับพื้นจานเลี้ยง (รูปที่ 14)

ตารางที่ 1 เปอร์เซนต์การเจริญของนิวเคลียสของโอโอไซต์ในระยะต่าง ๆ ระหว่าง 12-48 ชม. ที่เลี้ยงในมีเดียม IVM

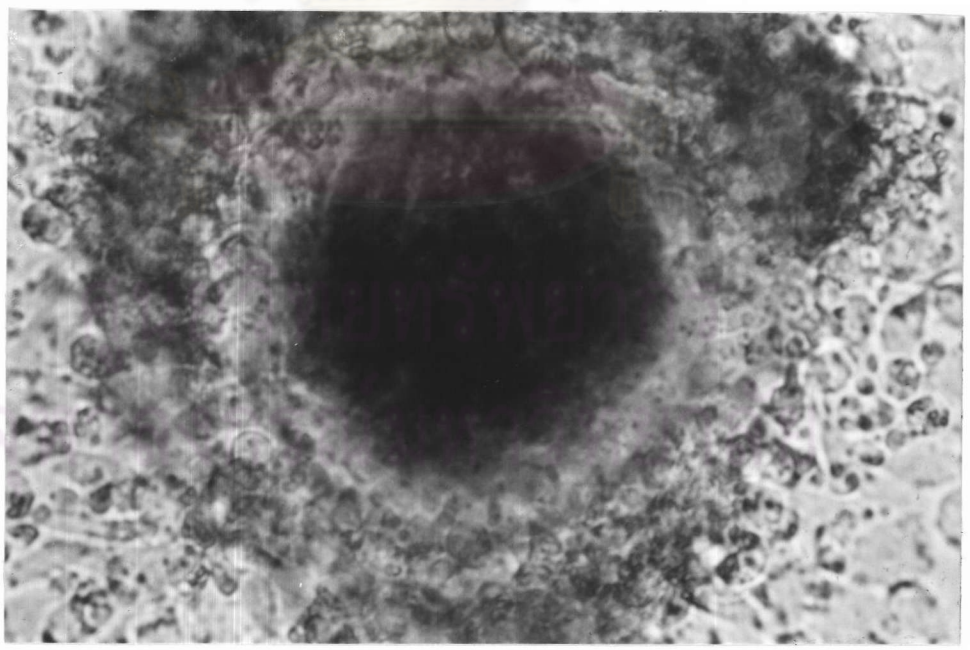
จำนวน ชม.	ระยะการเจริญของนิวเคลียสของโอโอไซต์						
	จำนวน โอโอไซต์	GV	PM	M I	ANA I	TEL I	M II
12	24	100.0	-	-	-	-	-
16	30	90.0	10.0	-	-	-	-
18	28	89.3	10.7	-	-	-	-
20	30	90.0	10.0	-	-	-	-
22	31	51.6	38.7	9.7	-	-	-
24	31	42.2	29.0	25.8	-	-	-
26	26	11.5	42.3	42.3	3.8	-	-
28	31	6.4	35.5	54.8	3.2	-	-
30	26	-	6.9	61.5	30.8	-	-
32	25	4.0	44.0	16.0	12.0	16.0	8.0
34	27	11.1	3.7	-	-	18.5	66.6
36	41	4.9	4.9	2.4	2.4	4.9	80.5
38	29	3.4	6.9	-	-	-	89.7
40	31	-	9.7	-	-	-	90.3
42	35	2.8	5.7	2.8	-	-	88.6
44	35	5.7	5.7	-	-	-	88.6
46	49	-	6.1	2.0	-	-	89.8
48	47	-	-	-	-	2.1	97.9



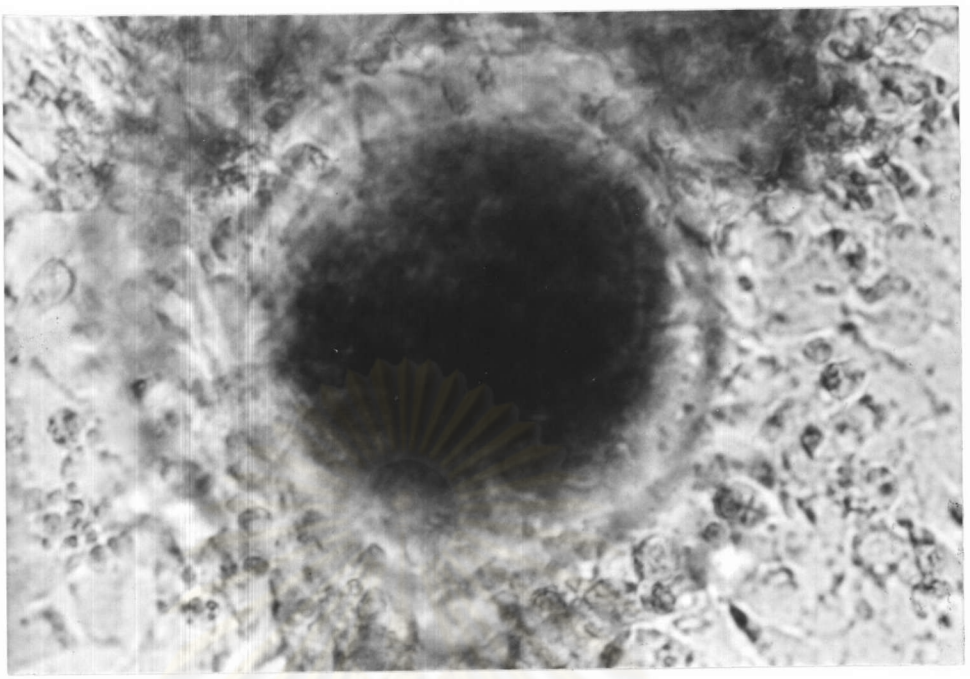
รูปที่ 9 แสดงภาพโครโมโซมของไข่สุกรในระยะการเจริญต่าง ๆ 1). ระยะเจอมินอลเวสิเคิล (GV) 2). ระยะโปรเมตาเฟส (PM) 3). ระยะเมตาเฟส I (M I) 4). ระยะอนาเฟส I (ANA I) 5). ระยะทีโลเฟส I (TEL I) 6). ระยะเมตาเฟส II (MII)



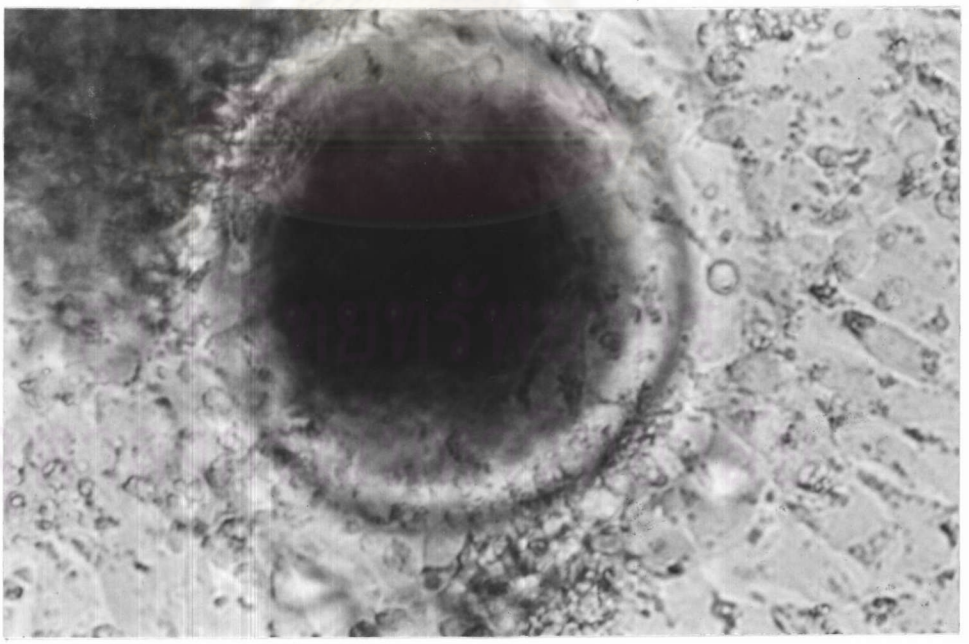
รูปที่ 10 เปอร์เซนต์การเจริญของนิวเคลียสของโอโอไซต์ใน IVM มีเดียม ระหว่างการเลี้ยง 12-48 ชม.



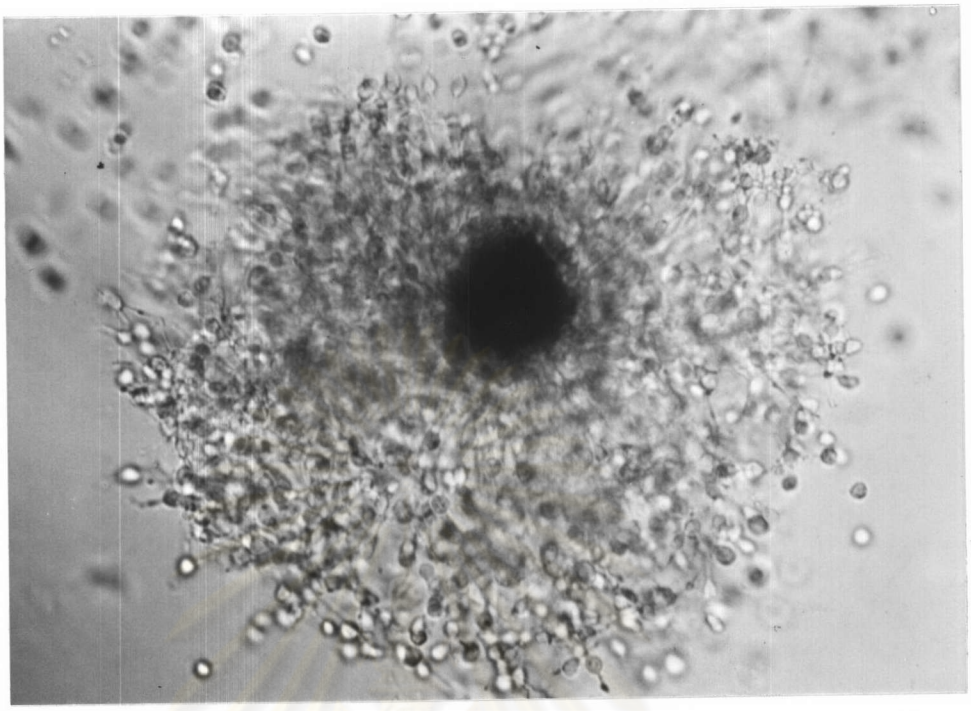
รูปที่ 11 ลักษณะการเจริญของคูมูลัสเซลล์ เมื่อทำการเลี้ยงโอโอไซต์นอกร่างกายใน IVM มีเดียม ที่ 39°ซ ในบรรยากาศที่มี คาร์บอนไดออกไซด์ 5% นาน 12 ชม. คูมูลัสเซลล์ชั้นนอกเริ่มแผ่ออกมาเปลี่ยนเป็นรูปกระสวย และเกาะที่พื้นจานเลี้ยง (กำลังขยาย 320 เท่า)



รูปที่ 12 ลักษณะการเจริญของคูมูลัสเซลล์ เมื่อทำการเลี้ยงนอกร่างกายใน IVM มีเดียม ที่ 39°ซ ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นาน 18 ชม. คูมูลัสเซลล์ชั้นในแผ่ออกมาเกือบหมด และกระจายเกาะผิวจานเลี้ยงมาก (กำลังขยาย 320 เท่า)



รูปที่ 13 ลักษณะการเจริญของคูมูลัสเซลล์ เมื่อทำการเลี้ยงนอกร่างกายใน IVM มีเดียม ที่ 39°ซ ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นาน 24 ชม. คูมูลัสเซลล์ ชั้นนอกเริ่มแผ่ออกมาเปลี่ยนเป็นรูปกระสวย และเกาะที่พื้นจานเลี้ยง (กำลังขยาย 320 เท่า)



รูปที่ 14 ลักษณะการเจริญของคูมูลัสเซลล์ เมื่อทำการเลี้ยงนอกร่างกายใน IVM มีเดียม ที่ 39^{o}ซ ในบรรยากาศที่มี คาร์บอนไดออกไซด์ 5% เลี้ยงนาน 24 ชม. จากโอโอไซต์เริ่มต้น มีคูมูลัสเซลล์หุ้มอย่างหนาแน่น (กำลังขยาย 100 เท่า) คูมูลัสเซลล์จะแผ่กระจายออกมากว้างมาก เมื่อเทียบกับขนาดไข่

ผลการทดลองที่ 2

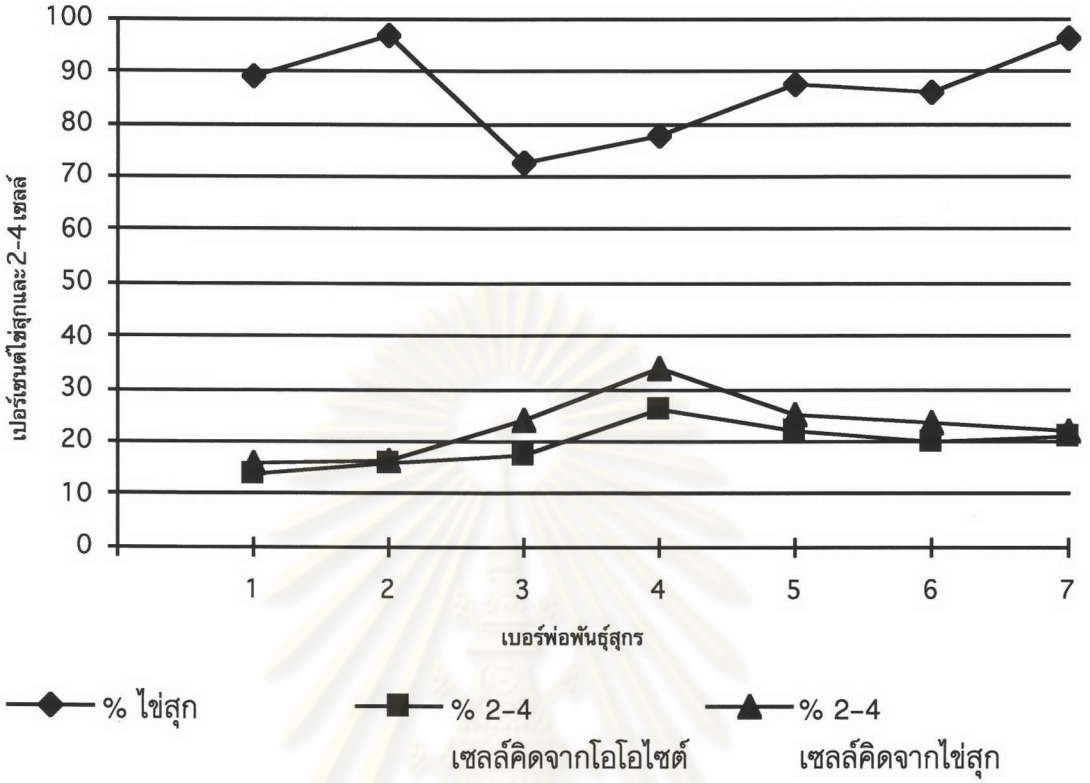
จากผลการปฏิสนธิจนมีการเจริญถึงระยะ 2-4 เซลล์ ในตารางที่ 2 และรูปที่ 15 พบว่า น้ำเชื้อพ่อพันธุ์ตัวที่ 4 ทำให้เกิดการปฏิสนธินอกร่างกาย จนมีการแบ่งเซลล์ถึงระยะ 2-4 เซลล์ ในเปอร์เซนต์สูงสุด 26.2% เมื่อคิดจากจำนวนโอโอไซต์ที่นำเข้าเลี้ยง หรือ 33.9% เมื่อคิดจากจำนวน ไข่ที่สุก และน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ตัวที่ 1 ทำให้เกิดการปฏิสนธินอกร่างกายจนมีการแบ่งเซลล์ถึงระยะ 2-4 เซลล์ ในเปอร์เซนต์ต่ำที่สุด 14.0% เมื่อคิดจากจำนวนโอโอไซต์ที่นำเข้าเลี้ยง หรือ 15.8% เมื่อคิดจากจำนวนไข่สุก เมื่อเปรียบเทียบกันทีละคู่แล้วพบว่า น้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ตัวที่ 1 และ ตัวที่ 2 ให้เปอร์เซนต์การปฏิสนธิจนมีการแบ่งเซลล์ถึงระยะ 2-4 เซลล์ ที่คิดเทียบกับจำนวนไข่สุก แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.01$) แต่ต่างจากน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ตัวที่ 4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) และทั้งน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ตัวที่ 1 และ ตัวที่ 2 ให้ผลแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.01$) กับน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ตัวที่ 3, 5, 6 และ 7

ตารางที่ 2 ผลของพ่อพันธุ์สุกรต่อเปอร์เซนต์การปฏิสนธินอกร่างกาย และเจริญถึง 2-4 เซลล์ หลังจากการเติมอสุจินาน 48 ชม. ใน IVF มีเดียมของโอโอไซต์ที่เลี้ยงใน IVM มีเดียมมาแล้ว นาน 40 ชม.

พ่อพันธุ์	จำนวนโอโอไซต์	เปอร์เซนต์ไข่สุก	เปอร์เซนต์ 2-4 เซลล์	
			คิดจากโอโอไซต์	คิดจากไข่สุก
1	107	88.8	14.0	15.8^{b}
2	100	97.0	16.0	16.5^{b}
3	40	72.5	17.5	24.1^{ab}
4	80	77.5	26.2	33.9^{a}
5	64	87.5	21.9	25.0^{ab}
6	99	85.8	20.2	23.5^{ab}
7	52	96.1	21.1	22.0^{ab}

ตัวอักษรกำกับในคอลัมน์ต่างกัน แสดงว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 15 แสดงเปอร์เซนต์ไข่สุกและเปอร์เซนต์การปฏิสนธินอกร่างกาย จนเจริญถึง 2-4 เซลล์ ของพ่อพันธุ์สุกรทั้ง 7 ตัว โดยคิดจากจำนวนโอโอไซต์ที่เข้าปฏิสนธิ และคิดจากจำนวนไข่สุก

วิจารณ์ผล

จากผลการเจริญของนิวเคลียสของโอโอไซต์เมื่อเลี้ยงใน IVM มีเดียม นานตั้งแต่ 12 ชม. ถึง 48 ชม. ที่แสดงในตารางที่ 1 จะเห็นได้ โอโอไซต์ที่นำเข้าเลี้ยงใน IVM มีเดียม มีการเจริญของนิวเคลียสไม่พร้อมกัน โดยจะพบว่า นิวเคลียสของโอโอไซต์ จะเริ่มแตกตัวจากระยะ GV เข้าสู่ระยะ PM เมื่อเลี้ยงไปได้ 16-20 ชม. และในช่วง 22-24 ชม. โอโอไซต์บางส่วน นิวเคลียสเจริญถึงระยะ M I และ เริ่มเจริญถึงระยะ ANA I ในชั่วโมงที่ 26 และเพิ่มจำนวนขึ้น จนถึงชั่วโมงที่ 32 จึงเริ่มมีโอโอไซต์เจริญจาก ANA I เป็น TEL I และเจริญเป็นไข่สุกที่ระยะ M I ในชั่วโมงเดียวกัน ซึ่งในช่วงชั่วโมงที่ 32 ถึง ชั่วโมงที่ 36 ถ้าเลี้ยงโอโอไซต์เป็นจำนวนมากพร้อม ๆ กัน จะพบ

โอโอไซต์เจริญอยู่ในทุกระยะของการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียส นับแต่ชั่วโมงที่ 38 เป็นต้นไป จะเห็นว่าเกือบ 90% ของไข่ที่เข้าเลี้ยงจะเจริญถึงระยะ M II ส่วนที่เหลือคงจะเป็นโอโอไซต์ที่ไม่สมบูรณ์ จึงไม่สามารถจะพัฒนาการเจริญของนิวเคลียสขึ้นมาได้ ซึ่งประมาณ 10% จะตกค้างอยู่ที่ระยะ GV ถึง M I ซึ่งจะมีการตกค้างมากหรือน้อย คงเป็นเพราะการคัดเลือกโอโอไซต์เข้าเลี้ยงตั้งแต่เริ่มต้น ดังนั้น หากมีความชำนาญและประสบการณ์ในการคัดเลือกโอโอไซต์เข้าเลี้ยงใน IVM มีเดียมนี้ ก็จะทำให้เลี้ยงไข่ได้สุกเป็นเปอร์เซนต์สูงมาก

การศึกษาการเจริญของนิวเคลียสของโอโอไซต์สุกรในครั้งนี้ ได้ผลใกล้เคียงกับการทดลองของ Ocampo และคณะ (1990) ซึ่งรายงานว่า โอโอไซต์สุกรที่เลี้ยงในมีเดียม 199 เสริมด้วย FSH 10 ไอ.ยู/มล. hCG 10 ไอ.ยู/มล. และ กลูโคซามิน นาน 48 ชม. จะมีการเจริญถึงระยะ GV จนถึงชั่วโมงที่ 17.6 และเจริญถึงระยะ GV แตกตัวในช่วง 17.6-26.7 ชม. ถึงระยะ M I ในช่วง 26.4-30.9 ชม. ถึงระยะ ANA I ในช่วง 30.9-33.4 ชม. ถึงระยะ TEL I ในช่วง 33.4-34.4 ชม. และถึงระยะ M I ในช่วง 34.4-48.0 ชม. ทั้งนี้การเจริญของนิวเคลียสในการทดลองนี้ ถึงระยะต่างๆ เร็วกว่าประมาณ 2 ชม. อาจจะเป็นผลของ LH และเอสตราไดออล ที่ช่วยเร่งให้มีการเจริญของทั้งในส่วนของไซโตพลาสซึมและนิวเคลียส รูปแบบการพัฒนาการสุกของไข่ภายนอกร่างกายในการทดลองนี้ คล้ายคลึงกับการทดลองการกระตุ้นการสุกของไข่ภายในตัวสัตว์ด้วย hCG (Hunter and Polge, 1966) เมื่อเทียบเวลาเริ่มต้นเลี้ยงไข่กับเวลาเริ่มฉีด hCG เข้าตัวสัตว์ ไข่จะสุกในเปอร์เซนต์สูงที่ชั่วโมงที่ 36 เช่นเดียวกัน แต่ในการทดลองของ Nagai et al. (1990) แตกต่างไปบ้างเล็กน้อยกล่าวคือ ในการเลี้ยงโอโอไซต์สุกรให้สุก โดยใช้ของเหลวจากถุงน้ำคร่ำสุกรที่เสริมด้วย LH 10 มคก./มล. และ E_2 1 มคก./มล. เป็นมีเดียมในการเลี้ยง พบว่า โอโอไซต์จะเริ่มสุก (33%) เมื่อเลี้ยงได้ 28 ชม. แต่สุกสูงสุดเมื่อเลี้ยงได้ 48 ชม. และแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ จากการเลี้ยงเมื่อถึง 36 ชม. (74%) จะเห็นได้ว่า ทั้งจากการทดลองนี้และรายงานอื่น ๆ ไม่ว่าจะเลี้ยงในมีเดียมระบบใด โอโอไซต์ที่เข้าเลี้ยงจะมีเปอร์เซนต์สุกสูงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 ของการเลี้ยงเป็นต้นไป การกำหนดเวลาการเลี้ยงโอโอไซต์ที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับระบบงานการปฏิสนธินอกร่างกาย หรือระบบงานที่จะใช้ไข่สุกในการศึกษาต่อไป และเวลาที่เหมาะสมสำหรับการปฏิบัติงาน

ระบบการปฏิสนธิที่ใช้ในการทดลองที่ 2 ให้ผลการปฏิสนธิจนมีการแบ่งเซลล์ถึงระยะ 2-4 เซลล์ ในเปอร์เซนต์ใกล้เคียงกับงานทดลองอื่น ๆ ที่ เคยรายงานไว้ (Nagashima et al.,

1993; Yoshida et al., 1990; Techakumphu et al., 1994) การปฏิสนธินอกร่างกายจนมีการแบ่งเซลล์ถึงระยะ 2-4 เซลล์ ในสุกรยังประสบผลสำเร็จในอัตราต่ำเมื่อเทียบกับความสำเร็จในโค ทั้งนี้อาจเป็นเพราะโอโอไซต์ เริ่มทยอยสุกมาตั้งแต่ ชั่วโมงที่ 31 จนมีเปอร์เซนต์สูงนับแต่ชั่วโมงที่ 36 และได้เลือกใช้ระยะเวลาเลี้ยงโอโอไซต์นาน 40 ชม. จึงทำให้ 80% ของไข่ที่สุกแล้วต้องรออีก 4 ชม. จึงมีโอกาสพบกับอสุจิ และจากการสังเกตระหว่างการทดลองพบว่า หลังจากผสมอสุจิรวมกับไข่และบ่มในตู้บ่มที่ 39^{o}ซ นาน 2 ชม. อสุจิมีอัตราการเคลื่อนไหวลดลงกว่าครึ่งหนึ่งของเมื่อเริ่มต้นเติมอสุจิลงไป ซึ่งคาดว่าเวลา 2 ชม. ของการผสมรวมกันระหว่างอสุจิกับไข่สุกจะเป็นเวลาที่อสุจิมีโอกาสมากที่สุดที่จะเข้าไปปฏิสนธิกับไข่ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Nagai และคณะ (1993) ที่ว่าอสุจิสุกรที่ผ่านการคาพาซิเตชัน แล้วจะมีความสามารถที่จะผสมกับไข่สุกรภายนอกร่างกายได้ภายใน 2.5 ชม. นับแต่ไข่รวมกับอสุจิ และ Mori และคณะ (1995) ได้รายงานถึงความสามารถของอสุจิสุกรว่า สามารถทำให้เกิดการปฏิสนธิได้มากกว่า 50% ในการเติมอสุจิลงไปรวมกับไข่สุกเพียงแค่ 2 ชม. เท่านั้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย