จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานผลการวิจัย

ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2537

การผลิตตัวอ่อนสุกรโดยการปฏิสนธินอกร่างกาย

(Production of pig embryos by *in vitro* fertilization)

โดย

มงคล เตชะกำพุ

วันเพ็ญ ศรีอนันต์

จินดา สิงห์ลอ

วิชัย ทันตสุภารักษ์

636.089
8178
ร1491

ตุลาคม 2537

ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2537

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การผลิตตัวอ่อนสุกรโดยการปฏิสนธินอกร่างกาย

(Production of pig embryos by *in vitro* fertilization)

โดย

มงคล เตชะกำพุ

วันเพ็ญ ศรีอนันต์

จินดา สิงห์ลอ

วิชัย ทันตศุภารักษ์

ตุลาคม 2537

ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I16707047

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ปี 2537 ของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ

- คณาจารย์ของภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์
- รศ. น.สพ. บุญมี สัญญสุจจารี รองคณบดีฝ่ายวิจัยและบริการวิชาการ
- รศ. สพ.ญ. ดร. สุวรรณี นิธิอุทัย
- ภาควิชาสัตวบาล
- บริษัท แอ็ดว๊านซ์ฟาร์ม่า จำกัด ที่สนับสนุนฮอร์โมน PG 600®
- บริษัท โซลเวย์ (ประเทศไทย) จำกัด ที่สนับสนุนยาปฏิชีวนะในการทดลอง

และเจ้าหน้าที่ของภาควิชาสูติ-เธนุเวชวิทยาฯ ที่ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ การผลิตตัวอ่อนสุกรโดยการปฏิสนธินอกร่างกาย

ชื่อผู้วิจัย มงคล เตชะกำพุ

วันเพ็ญ ศรีอนันต์

จินดา สิงห์ลอ

วิชัย ทันตศุภารักษ์

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ ตุลาคม 2537

บทคัดย่อ

ศึกษาความไปได้ของการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกร โดยมีขอบเขตของการศึกษา คือ

- วิธีการและผลการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ชนิดไม่ถูกกระตุ้นและถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน
- อัตราการเจริญพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์ในหลอดทดลอง
- วิธีการเตรียมอสุจิต่อการปฏิสนธินอกร่างกาย
- การเปรียบเทียบอัตราการปฏิสนธิระหว่างโอโอไซต์ชนิดที่เลี้ยงให้พร้อมปฏิสนธิจากหลอดทดลองและชนิดเจริญในฟอลลิเกิล
- อัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังทำการปฏิสนธินอกร่างกายในหลอดทดลองและหลังย้ายฝากในสุกรตัวรับ

จากการศึกษาพบว่ามีความเป็นไปได้ในการผลิตตัวอ่อนสุกรด้วยการปฏิสนธินอกร่างกาย โดยมีปัจจัยที่สำคัญทั้งด้านการเตรียมโอโอไซต์ให้พร้อมปฏิสนธิและการเตรียมตัวอสุจิ

คำสำคัญ สุกร การปฏิสนธินอกร่างกาย การพัฒนา

Project title : Production of pig embryos by *in vitro* fertilization

Name of Investigators : Mongkol Techakumphu

Wanpen Srianan

Jinda Singlor

Wichai Tantasuparak

Year: October 1994

Abstract

The possibility of *in vitro* fertilization in pigs was studied in areas of:

a) oocyte collection from non gonadotropin and gonadotropin-treated animals

b) *in vitro* oocyte maturation

c) sperm preparation

d) comparative study on fertilization of *in vitro* matured oocytes and *in vivo* matured oocytes

e) *in vivo* development of IVF embryos

The study indicated that it is possible to produce a number of embryos by *in vitro* fertilization. Two majors ; oocyte and sperm preparation were concerned.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Keywords: pig, *in vitro* fertilization, development

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	II
บทคัดย่อ	III
Abstract	IV
สารบัญ	V
รายการประกอบตาราง	VI
รายการรูปประกอบ	VII
รายการสัญญลักษณ์และคำย่อ	VIII
คำนำ	IX
บทนำ	1
อุปกรณ์และวิธีการ	2
ผล	10
วิจารณ์	15
เอกสารอ้างอิง	21

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการประกอบตาราง

ตารางที่ 1	ผลการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่แม่สุกรและสุกรสาวที่ไม่ได้รับกระตุ้นด้วย ฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน
ตารางที่ 2	ค่าเฉลี่ยของการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ที่ถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน
ตารางที่ 3	ผลเปรียบเทียบการเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลอง *(in vitro* oocyte maturation)
ตารางที่ 4	ผลเปรียบเทียบอัตราการเจริญเป็นตัวอ่อนระหว่างโอโอไซต์จาก *in vitro* maturation และ *in vivo* maturation
ตารางที่ 5	อัตราการแบ่งตัวหลังการปฏิสนธินอกร่างกายระหว่างตัวอสุจิไม่เจือจางและเจือจาง
ตารางที่ 6	อัตราการเก็บตัวอ่อนจากสุกรตัวรับ
ตารางที่ 7	อัตราการพัฒนาของตัวอ่อนหลังฝากในสุกรตัวรับ
ตารางที่ 8	ผลการฝากตัวอ่อนในสุกรตัวรับนาน 7 และ 21 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการรูปประกอบ

รูปที่ 1 โปรแกรมการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเกิลเพื่อเก็บโอโอไซต์

รูปที่ 2 ขั้นตอนของการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกรและการทดลอง

รูปที่ 3 แสดงตำแหน่งและรายละเอียดของการฝากตัวอ่อนในท่อนำไข่และมดลูก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการสัญญลักษณ์และคำย่อ

<u>ภาษาไทย</u>

กก = กิโลกรัม

ซม = เซนติเมตร

มล = มิลลิลิตร

ชม = ชั่วโมง

ไมโครกรัม = ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ไอยู = อินเตอร์เนชั่นแนล ยูนิต

<u>ภาษาอังกฤษ</u>

mM = milli Molar

FSH = Follicular Stimulating Hormone

E2 = Estradiol

μg/ml = microgram/ml

LH = Luteinizing Hormone

TCM= Tissue Culture Medium

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำนำ

การศึกษาการปฏิสนธินอกร่างกายเป็นงานวิจัยต่อเนื่องของการศึกษาทางเทคโนโลยีชีวภาพทางวิทยาการสืบพันธุ์ด้านตัวอ่อนของสุกร ซึ่งคณะผู้วิจัยจากภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ดำเนินการมาตั้งแต่ปีพุทธศักราช 2530 โดยได้รับการสนับสนุนจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ ปี 2534 ในการศึกษานี้คณะผู้วิจัยได้ดำเนินการเผยแพร่งานวิจัยทั้งในการประชุมของสมาคม IETS (International Embryo Transfer Society) ประจำปี 1994 ณ เมือง Melbourne AUSTRALIA การเผยแพร่ในเวชชสารสัตวแพทย์ การประชุมวิชาการประจำปี 2537 ของสัตวแพทยสมาคม แห่งประเทศไทย กรุงเทพฯ รวมทั้งได้มีโอกาสนำงานวิจัยบางส่วนไปเผยแพร่ในรายการโทรทัศน์ "ความรู้คือประทีป" รายการวิทยุ "สัตวแพทยสนทนา" และในหนังสือพิมพ์อีกด้วย

รศ. น.สพ. ดร. มงคล เตชะกำพุ

ผู้วิจัยหลัก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การผลิตตัวอ่อนสุกรโดยการปฏิสนธินอกร่างกาย

(Production of pig embryos by *in vitro* fertilization)

มงคล เตชะกำพุ วันเพ็ญ ศรีอนันต์ จินดา สิงห์ลอ และวิชัย ทันตศุภารักษ์
ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

การปฏิสนธินอกร่างกายในสุกร แม้มีการศึกษามานานเกือบ 20 ปี ตามรายงานของ Hunter (1990) แต่เพิ่งจะประสบความสำเร็จโดยสามารถผลิตลูกสุกรหลังการปฏิสนธินอกร่างกายได้เมื่อประมาณ 7-8 ปี ที่ผ่านมา (Cheng *et al.*, 1986) วิธีการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกรมีหลักการคล้ายคลึงกับในสัตว์ชนิดอื่น ๆ ประกอบด้วยการเก็บเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียที่เรียกว่า "โอโอไซต์" จากรังไข่ ชนิดที่ยังไม่เจริญแต็มที่หรือชนิดที่พร้อมปฏิสนธิแล้ว มาปฏิสนธิกับตัวอสุจิในหลอดทดลอง ซึ่งตัวอสุจิดังกล่าวต้องผ่านการเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนไหวให้รวดเร็วขึ้นที่เรียกว่า "hyperactivity" และการเปลี่ยนแปลงในส่วนหัวที่บริเวณ acrosome เรียกทั้งกระบวนการว่า "capacitation" หลังจากเกิดการปฏิสนธิแล้วจึงนำมาเลี้ยงในจานทดลองเพื่อประเมินผลการเจริญเติบโต จึงเรียกการปฏิสนธินอกร่างกายในสัตว์รวม ๆ กัน ว่า "ไอ วี เอ็ม ไอ วี เอฟ และ ไอ วี ซี (*in vitro* maturation *in vitro* fertilization *in vitro* culture)" อย่างไรก็ตามแม้วิธีการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกรจะมีความคล้ายคลึงกับในสัตว์ชนิดอื่น ๆ แต่ในส่วนรายละเอียดปลีกย่อยนั้นจะแตกต่างกัน อาทิเช่น เวลาในการเลี้ยงโอโอไซต์จากระยะที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิจนถึงระยะพร้อมปฏิสนธิ ซึ่งต้องใช้เวลาประมาณ 40-48 ชม ในขณะที่ในโคใช้เวลาเพียง 24 ชม เช่นเดียวกับเวลาที่ใช้ในกระบวนการ capacitation ของตัวอสุจิ ในสุกรต้องใช้เวลามากกว่าในโคถึง 4 เท่า เป็นต้น

สถานภาพของงานวิจัยด้านการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกรยังไม่มีมากนักเมื่อเทียบกับในโค และจากเอกสารอ้างอิงพบว่าอัตราความสำเร็จทั้งตัวอ่อนที่ได้ในหลอดทดลองและลูกสุกรหลังฝากในสุกรตัวรับค่อนข้างต่ำและผันแปร โดยมีสาเหตุหลัก ๆ คือ ตัวอสุจิของสุกรขณะอยู่นอกร่างกายจะมีอัตรารอดต่ำ และหลังการปฏิสนธินอกร่างกายมัก

พบปัญหาการเข้าผสมของตัวอสุจิหลายตัวในไข่ใบเดียวที่เรียกกันว่า "polyspermy" ซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการพัฒนาของตัวอ่อน ดังนั้นจากความแตกต่างของการปฏิสนธินอกร่างกายระหว่างโคและสุกร รวมทั้งสถานภาพงานวิจัยด้านนี้ยังมีไม่มากนัก กอร์ปกับพื้นฐานทางด้านวิทยาการสืบพันธุ์และงานวิจัยด้านตัวอ่อนของสุกรของคณะผู้วิจัย จึงเป็นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ในการศึกษาความเป็นไปได้ในการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกร โดยประกอบด้วยวัตถุประสงค์ย่อย ๆ คือ

1) ศึกษาวิธีการและผลการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ชนิดไม่ถูกกระตุ้นและถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน
2) ศึกษาอัตราการเจริญพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์ในหลอดทดลอง
3) ศึกษาวิธีการเตรียมอสุจิต่อการปฏิสนธินอกร่างกาย
4) เปรียบเทียบอัตราการปฏิสนธิระหว่างโอโอไซต์ชนิดที่เลี้ยงให้พร้อมปฏิสนธิจากหลอดทดลองและชนิดเจริญในฟอลลิเกิล
5) ศึกษาอัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังทำการปฏิสนธินอกร่างกายในหลอดทดลองและหลังย้ายฝากในสุกรตัวรับ

อุปกรณ์และวิธีการ

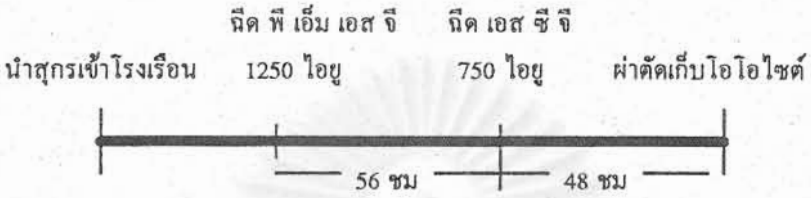
การเก็บโอโอไซต์

ทำการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ 2 ประเภท คือ

ก) รังไข่ของสุกรสาวก่อนวัยเจริญพันธุ์และของแม่สุกร จากโรงฆ่าสัตว์ท้องถิ่นอำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม

ทำการล้างรังไข่ด้วยน้ำเกลือ 0.9% ที่อุ่น แล้วใส่รังไข่ในน้ำเกลือที่มียาปฏิชีวนะชนิดเพนนิซิลลินและสเตรปโตมัยซิน จำนวน 1 ล้าน ไอยู โดยให้รังไข่อยู่ในอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสในกระติกควบคุมอุณหภูมิขณะทำการขนส่งเข้าสู่ห้องปฏิบัติการ ระยะเวลาตั้งแต่เก็บรังไข่จากตัวสุกรจนถึงเริ่มเก็บโอโอไซต์ ใช้เวลาประมาณ 1 ชม ในแต่ละการทดลองใช้รังไข่ประมาณ 10-15 อัน เจาะโอโอไซต์จากฟอลลิเกิลขนาดประมาณ 3-6 มม ที่ปรากฏบนผิวของรังไข่

ข) รังไข่หลังทำการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน พี เอ็ม เอส จี[1] จำนวน 1250 ไอยู และ ฮอร์โมน เอส ซี จี[2] จำนวน 750 ไอยู เข้ากล้ามเนื้อบริเวณหลังใบหู ดังโปรแกรมในรูปที่ 1



รูปที่ 1 โปรแกรมการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเกิล เพื่อเก็บโอโอไซต์

ทำการกระตุ้นรังไข่ในสุกรสาวสามสายพันธุ์ (ดูร็อคxลาร์จไวท์xแลนด์เรซ) ก่อนวัยเจริญพันธุ์ น้ำหนักประมาณ 90 กก จำนวน 12 ตัว ทำการเก็บโอโอไซต์โดยการผ่าตัดเปิดช่องท้องหลังวางยาสลบทั่วตัว หลังฉีด ฮอร์โมน เอส ซี จี ประมาณ 48 ชม เจาะโอโอไซต์จากฟอลลิเกิลที่เจริญเต็มที่ที่มีขนาด $\geq$ 1 ซม และจากการชะล้างท่อนำไข่

วิธีการเจาะรังไข่เพื่อเก็บโอโอไซต์ในรังไข่ทั้ง 2 ประเภท ทำโดยใช้เข็มเบอร์ 19 ต่อกับไซริงค์ขนาด 5 มล นำโอโอไซต์ที่เจาะได้ไปแขวนลอยในน้ำยา TCM 199[3] 2.5 mM HEPES จำนวน 2 มล ที่บรรจุในหลอดพลาสติกขนาด 15 มล ตั้งทิ้งไว้นาน 15 นาที ณ อุณหภูมิห้อง เทน้ำยาดังกล่าวในจานพลาสติก ส่องตรวจหาโอโอไซต์ด้วยกล้องสเตริโอ กำลังขยาย 10-40 เท่า เก็บโอโอไซต์ในน้ำยา TCM 199 ใน 10% fetal calf serum[4] นำโอโอไซต์มาแยกออกเป็น 4 ชนิด คือ

---

1) พี เอ็ม เอส จี = Folligon®, Intervet, Netherlands

2) เอส ซี จี = Chorulon®, Intervet, Netherlands

3) TCM 199 , Gibco, USA

4) fetal calf serum, Seromed, Germany

ก) ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มหลายชั้น (compact cumulus oocyte)

ข) ชนิดทีมีเซลล์คิวมูลัสหุ้มไม่มากชั้น (partial cumulus oocyte)

ค) ชนิดที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้ม (denude oocyte)

ง) ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสแผ่ขยาย (expand cumulus oocyte)

ล้างโอโอไซต์ 1 ครั้งในน้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์ชนิด TCM 199 $NaHCO_3$ ใน 10% FCS ที่มี 10 ไมโครกรัม/มล FSH/LH และ 1 ไมโครกรัม/มล Estradiol-17β เป็นส่วนประกอบ ทำการเลี้ยงโอโอไซต์ในน้ำยาดังกล่าวร่วมกับเซลล์กรานูโลซ่าและเซลล์คิวมูลัส นาน 40 ชม

การเตรียมเซลล์กรานูโลซ่า

เซลล์กรานูโลซ่าได้จากการปั่นแยกเอาจากน้ำยาส่วนที่เหลือจากการเก็บโอโอไซต์ แล้วนำมาปั่นแยกเอาตะกอนด้วยความเร็ว 1500 g นาน 10 นาที ทำการล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยน้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์ ดูดเอาตะกอนจำนวน 200 ไมโครลิตร นำไปใส่ร่วมกับโอโอไซต์ โดยใส่ในน้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์ก่อนใส่โอโอไซต์ลงในจานทดลองประมาณ 30 นาที

การเตรียมตัวอสุจิ

รีดน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์สุกรที่ผ่านการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ และการทดสอบความสมบูรณ์พันธุ์โดยดูจากอัตราการปฏิสนธิหลังผสมธรรมชาติในสุกรเพศเมีย พ่อพันธุ์ดังกล่าวเป็นพ่อพันธุ์ดูร็อค จำนวน 1 ตัว และพ่อพันธุ์ลาร์จไวท์ จำนวน 1 ตัว รีดเอาเฉพาะส่วนที่มีตัวอสุจิมาก (sperm rich fraction) จำนวน 10 มล ตรวจการเคลื่อนไหวและนำมาปั่นแยกเอาเฉพาะตัวอสุจิด้วยความเร็ว 1000 g นาน 5 นาที

ทดลองเตรียมตัวอสุจิ 2 แบบ คือ

ก) ชนิดไม่เจือจาง (non diluted sperm) โดยดูดเอาส่วนตะกอนของตัวอสุจิจำนวน 200 ไมโครลิตร หลังปั่นแยกจากน้ำเลี้ยงเชื้อแล้ว ใส่ในหลอดแก้วขนาด 2 มล ที่มีน้ำยาเลี้ยงตัวอสุจิ (capacitation medium) อยู่ 1 มล

ข) ชนิดเจือจาง (diluted sperm) นำเอาตะกอนตัวอสุจิมาเจือจางในน้ำยาละลายน้ำ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เชื้อ ชนิด BTS[5] ดูดน้ำเชื้อมาจำนวน 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดแก้วขนาด 2 มล ที่มีน้ำยาเลี้ยงตัวอสุจิอยู่ 1 มล เช่นเดียวกับการเตรียมตัวอสุจิชนิด non diluted ทำการตรวจการเคลื่อนไหวหลังทำการเจือจางแล้ว

น้ำยาเลี้ยงตัวอสุจิ (capacitation medium) เป็นชนิด TALP ที่มี bovine serum albumin 0.006 กรัม/มล เป็นส่วนประกอบอยู่ และปรับความเป็นกรด-ด่างที่ 7.2

ปล่อยให้ตัวอสุจิที่แข็งแรงว่ายขึ้นสู่ผิว (swim up preparation) นาน 4 ชม ในตู้อบที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ และความชื้นสัมพัทธ์เต็มที่ ดูดแยกตัวอสุจิเหนือตะกอนประมาณ 800-900 ไมโครลิตร และนำมาปั่นอีกครั้งหนึ่งด้วยความเร็ว 1000 g นาน 5 นาที แยกเอาเฉพาะตะกอนตัวอสุจิที่นอนก้นตรวจการเคลื่อนไหวและนับจำนวนตัวอสุจิต่อมิลลิลิตร

การปฏิสนธินอกร่างกาย

นำโอโอไซต์หลังเลี้ยงนาน 40 ชม มาล้าง 2 ครั้งก่อนทำการปฏิสนธิ ครั้งแรกด้วยน้ำยา TCM199 2.5 mM HEPES และครั้งที่ 2 ในน้ำยา IVF ที่มี bovine serum albumin 0.006 กรัม/มล และมีสาร PHE[6] และ 10 μg/ml heparin ที่มีความเป็นกรด-ด่าง ที่ 7.6

นำตัวอสุจิที่เตรียมไว้ ปรับให้มีความเข้มข้นเท่ากับ $1x10^6$ ตัว/มล ใส่ในหลุมของจานพลาสติกชนิด 4 หลุม[7] ที่มีโอโอไซต์อยู่ประมาณ 15-20 ใบต่อหลุม เลี้ยงตัวอสุจิร่วมกับโอโอไซต์นาน 18 ชม ที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ หลังจากนั้นลอกเอาเซลล์ตัวอสุจิที่อยู่รอบ ๆ ชั้นเปลือก zona pellucida และเซลล์คิวมูลัสออก (decoronization)

การเลี้ยงตัวอ่อน

ทำการทดสอบผลการปฏิสนธินอกร่างกายโดยนำตัวอ่อนมาเลี้ยงในน้ำยา B2[8] ใน

---

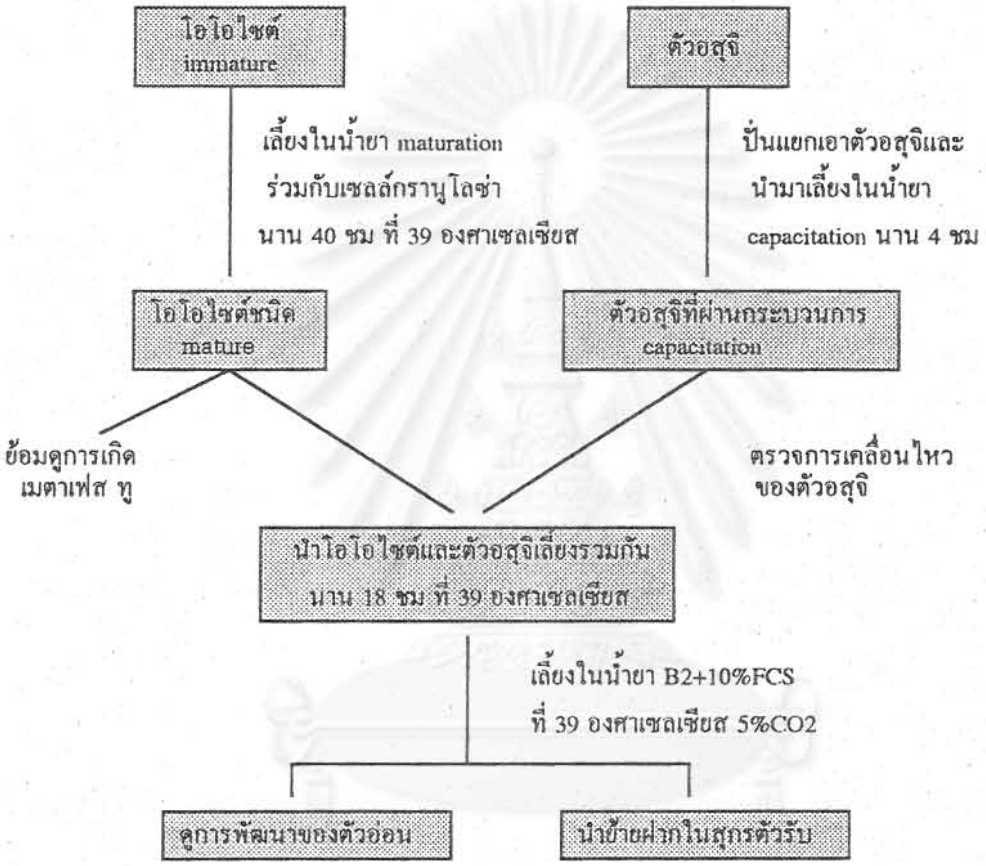
5) Glove center, UK

6) Penicillamine, Hypotaurine, Epinephrine

7) Nunc, USA, 8) Menezo, France

10% fetal calf serum ที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ นาน 5 วัน เพื่อตรวจการแบ่งตัวและการพัฒนาตัวอ่อน ทุก ๆ 24 ชม

ขั้นตอนของการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกรและการทดลองแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 ขั้นตอนของการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกรและการทดลอง

การตรวจการเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ (*in vitro* maturation)

นำเอาโอโอไซต์ที่ผ่านการเลี้ยงนาน 40 ชม มา fix ในน้ำยาเคมี ชนิด gracial acetic acid : methanol (1:3) นาน 14 วัน ดูดเอาโอโอไซต์ จำนวน 4-5 ใบมาหยดบนสไลด์ โดยให้มีน้ำยาดังกล่าวน้อยที่สุด วางโอโอไซต์ตรงกลางสไลด์ระหว่างเส้นพาราฟินผสมวาสซาลีน แล้ววางแผ่น cover glass ระหว่างเส้นดังกล่าว กดลงจนโอโอไซต์ไม่เคลื่อนไหว หยดสีย้อม aceto-orcein ลงบนช่องว่างจากปลายข้างหนึ่งจนถึงปลายอีกข้างหนึ่ง วิธีการดังกล่าวทำใต้กล้องสเตอริโอเพื่อป้องกันการแตกของโอโอไซต์ และการไหลของโอโอไซต์หายไป

ทำการศึกษาสภาวะในการทำให้เกิดการพร้อมปฏิสนธิ 4 สภาวะ คือ

กลุ่มที่ 1 ในน้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์ที่มีเพียงส่วนประกอบของ 10 μg/ml FSH/LH + 1 μg/ml E_2-17β

กลุ่มที่ 2 ในน้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์ที่มีส่วนประกอบของ 10 μg/ml FSH/LH + 1 μg/ml E_2-17β+ 10% EGS(estrus gilt serum)

กลุ่มที่ 3 ในน้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์ที่มีส่วนประกอบของ 10 μg/ml FSH/LH + 1μg/ml E_2-17β + granulosa cells

กลุ่มที่ 4 ในน้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์ที่มีส่วนประกอบของ 10 μg/ml FSH/LH + 1μg/ml E_2-17β + 10% EGS+ granulosa cells

เปรียบเทียบสภาวะการเกิด เมตาเฟส ทู (metaphase II) ในไซโตพลาสซึ่มของโอโอไซต์

<u>หมายเหตุ</u> EGS เตรียมจากเลือดสุกรสาวที่แสดงอาการเป็นสัด โดยแยกเฉพาะซีรั่มและนำมา inactivate ที่ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วผ่านการกรองด้วยกระดาษกรอง 45 ไมครอน แยกเก็บในหลอดพลาสติกหลอดละ 1 มล แช่แข็งไว้ ก่อนนำมาใช้ทำการละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

การฝากตัวอ่อนในสุกรตัวรับ

สุกรตัวรับ เป็นสุกรสาวสามสายพันธุ์ (ดูร็อคxลาร์จไวท์xแลนด์เรซ) น้ำหนักประมาณ 90 กก นำมาเลี้ยงรวมกันประมาณครั้งละ 2-3 ตัว หลังจากนำเข้า 3 วัน ฉีด

กระตุ้นการเป็นสัดด้วยฮอร์โมน พี เอ็ม เอส จี และเอส ซี จี (400:200)[9] สังเกตการเป็นสัดเช้าและเย็น และทำการคัดเลือกสุกรตัวที่แสดงอาการเป็นสัดใกล้เคียงกับอายุตัวอ่อนมากที่สุดเป็นสุกรตัวรับ

ในการศึกษาผลการพัฒนาของตัวอ่อนจากการปฏิสนธินอกร่างกาย ได้ทำการศึกษาเป็น 3 ระยะ คือ

ก) ศึกษาอัตราการเก็บตัวอ่อนและการพัฒนาของตัวอ่อนระยะ 1 เซลล์ หลัง decoronization หลังฝากนาน 5 วัน

ข) ศึกษาการพัฒนาของตัวอ่อนในสุกรตัวรับนาน 7 วันโดยเป็นตัวอ่อนระยะเดียวกับข้อ ก

ค) ศึกษาการพัฒนาของตัวอ่อนในสุกรตัวรับนาน 21 วัน โดยเป็นตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ จนถึงระยะมอรูล่า (ตัวอ่อนอายุ 5 วัน)

การย้ายฝากตัวอ่อนในสุกรตัวรับ

ฝากตัวอ่อนในสุกรตัวรับด้วยวิธีการผ่าตัด โดยการอดอาหารและน้ำสุกร ก่อนทำการผ่าตัดประมาณ 24 ชม ฉีดยากล่อมประสาทชนิด Azaperone[10] เข้ากล้ามเนื้อหลังใบหู จำนวน 200 มก/ตัว หลังจากนั้นประมาณ 15 นาที ฉีดยาชาชนิด 2% Xylocaine Hydrochrolide เข้าไขสันหลังจำนวน 6 มล หลังจากนั้นให้ยาสลบชนิด 20% Thiopentone Sodium จำนวน 0.8 มล เข้าเส้นเลือดดำของใบหู และต่อน้ำเกลือ 0.9% ปล่อยให้หยดช้า ๆ ขณะทำการผ่าตัด

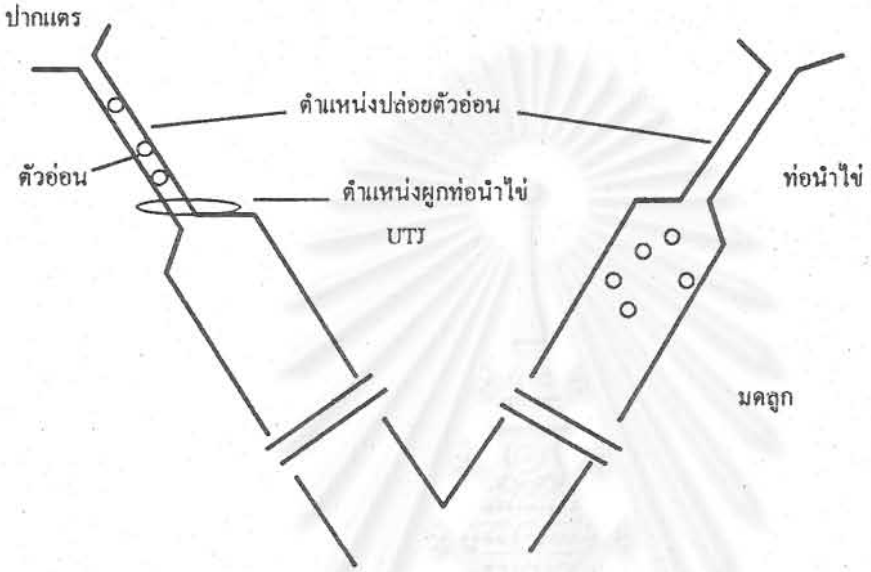
ทำการเปิดช่องท้อง และล้วงเอามดลูก ท่อนำไข่และรังไข่ สอดท่อโปลีเอทีลีนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มม พร้อมด้วยตัวอ่อน ผ่านทางปากแตรของท่อนำไข่ ทำการหนีบท่อนำไข่และสายโปลีเอทีลีนด้วยคีมหนีบเส้นเลือดอย่างอ่อนเพื่อป้องกันการหลุดของสาย ขณะทำการปล่อยตัวอ่อน ปล่อยตัวอ่อนประมาณ 4-5 ซม จากปากแตร โดยพยายามให้

---

9) PG 600®, Intervet, Netherlands)

10) Stresnil®, Belgium

มีอากาศเข้าไปในท่อนำไข่ให้น้อยที่สุด วิธีการฝากตัวอ่อนได้รายงานโดย มงคล และคณะ (2536ข) ในการทดลองข้อ ก ทำการผูกท่อนำไข่ข้างหนึ่งไว้ ณ บริเวณรอยต่อระหว่างท่อนำไข่และมดลูก (utero-tubal junction, UTJ) และอีกข้างหนึ่งไม่ได้ผูก ดังรูปที่ 3 แล้วชะล้างตัวอ่อนออกมา ตรวจระยะของการพัฒนา



รูปที่ 3 แสดงตำแหน่งและรายละเอียดของการฝากตัวอ่อนในท่อนำไข่และมดลูก

การชะล้างตัวอ่อน

ในกรณีศึกษาข้อ ก และ ข ทำการชะล้างตัวอ่อน

ก) จากท่อนำไข่ โดยตัดท่อนำไข่ข้างที่ผูกออกจากตัวสุกรและนำมาชะล้างในห้องปฏิบัติการ โดยสอดเข็มจากปากแตรและไล่น้ำยา TCM 199 HEPES จำนวน 20 มล

ข) จากมดลูก โดยสอดท่อโฟเลย์ เบอร์ 20 เข้าไปในมดลูกผ่านทางรูเปิดเล็กห่างจากรอยต่อของมดลูกและท่อนำไข่ประมาณ 15 ซม ในกรณีเลี้ยงนาน 5 วัน และ 30 ซม ในกรณีเลี้ยงนาน 7 วัน แล้วชะล้างโดยปล่อยน้ำยาจากปลายท่อนำไข่ด้านปากแตร รองรับน้ำยาแล้วนำมาตรวจในห้องปฏิบัติการ วิธีการชะล้างตัวอ่อนได้เคยรายงานไว้โดย มงคล และคณะ (2530)

ในกรณีศึกษาข้อ ค ตรวจการกลับเป็นสัดหลังฝากนาน 21 วัน

การคำนวณทางสถิติ

เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มศึกษาโดยการทดสอบด้วย chi-square analysis

ผล

1) ผลการเก็บโอโอไซต์

1.1) <u>ผลการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่แม่สุกรและสุกรสาวที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน</u>

จำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้จากรังไข่แม่สุกรและสุกรสาวเท่ากับ 7.0 และ 13.2 ใบต่อรังไข่ ($p>0.05$) คิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 10.4 ใบต่อรังไข่ โดยพบอัตราส่วนของโอโอไซต์ชนิดต่าง ๆ คือ ในแม่สุกรพบ 29% เป็นโอโอไซต์ชนิดที่มีเซลลคิวมูลัสหุ้มหลายชั้น 41% เป็นชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มไม่มากชั้น 23% เป็นชนิดไม่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มรอบชั้น zona pellucida และ 7% เป็นชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสแผ่กระจาย อัตราส่วนดังกล่าวพบในเปอร์เซนต์พอ ๆ กัน จากรังไข่สุกรสาว ซึ่งเท่ากับ 15, 44, 41% ในโอโอไซต์ชนิดที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ คิดเป็นค่าเฉลี่ยอัตราส่วนของโอโอไซต์แต่ละชนิดเท่ากับ 19, 43, 35% และ 2% ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่แม่สุกรและสุกรสาวที่ไม่ได้รับกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน

ชนิดรังไข่	จำนวนรังไข่	จำนวนโอโอไซต์	ค่าเฉลี่ยโอโอไซต์/รังไข่	ชนิดของโอโอไซต์			
				C	S	D	EXP
แม่สุกร	103	716	7.0[ก]	204(29%)	291(41%)	168(23%)	53(7%)
สุกรสาว	127	1677	13.2[ข]	253(15%)	743(44%)	681(41%)	-
ทั้งหมด	230	2393	10.4	457(19%)	1034(43%)	849(35%)	53(2%)

C = Multi-layers compacted cumulus oocytes; S = Single layer cumulus oocytes;

D = Denuded oocytes; Exp = Expanded cumulus oocytes;

ก, ข แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

1.2) ผลการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่แม่สุกรและสุกรสาวที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน

ผลการผลิตโอโอไซต์จากการกระตุ้นรังไข่ด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน โดยจากการชะล้างท่อนำไข่ซึ่งเป็นโอโอไซต์ที่ตกแล้วจากรังไข่ ได้เท่ากับ 10.2 ใบต่อตัว (ข้างซ้าย = 6.0, ข้างขวา = 4.2) ส่วนจากการดูดเจาะรังไข่ได้เท่ากับ 23.8 ใบต่อตัว (ข้างซ้าย = 11.5, ข้างขวา = 12.3) คิดเป็นจำนวนโอโอไซต์ที่ได้ต่อการกระตุ้นเท่ากับ 34 ใบต่อตัว (ข้างซ้าย = 17.5, ข้างขวา = 16.5) โอโอไซต์ที่เก็บได้ทั้งจากการชะล้างท่อนำไข่และจากการดูดเจาะ มากกว่า 90% เป็นชนิดที่มีคิวมูลัสชนิดแผ่ขยาย (expanded cumulus oocyte) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยของการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ที่ถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน

การเก็บโอโอไซต์	ข้างซ้าย (n)	ข้างขวา (n)	ทั้งหมด (n)
จากการชะล้าง	6.0(72)	4.2(50)	10.2(122)
จากการเจาะ	11.5(138)	12.3(148)	23.8(286)
ทั้งหมด	210	198	408
ค่าเฉลี่ย/รังไข่	17.5	16.5	34.0

(n) = จำนวนโอโอไซต์ทั้งหมด

2) การศึกษาการเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลอง *(in vitro* oocyte maturation)

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิด oocyte maturation พบว่าโอโอไซต์ในกลุ่มที่ 1 มีการหยุดตัวที่ meiosis I (ระยะ telophase I) ประมาณ 32%(38/119) ในขณะที่กลุ่มทดลองอื่น ๆ เข้าสู่ระยะ meiosis II โดยกลุ่มที่ 2 พบโอโอไซต์ในระยะ prophase II อยู่ 30%(30/100) ในส่วนของโอโอไซต์ที่อยู่ในระยะ metaphase II พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) ระหว่าง 4 กลุ่มซึ่งได้อัตราเท่ากับ 19% (23/119) 60%(60/100) 71%(70/98) และ 82%(86/105) สำหรับกลุ่มที่ 1 2 3 และ 4 ตามลำดับ สำหรับโอโอไซต์ที่ไม่สามารถระบุสถานภาพของโครโมโซมและ/หรือ มีความผิดปกติของนิวเคลียสในกลุ่ม undetermined พบ 35%(41/119) ในกลุ่มที่ 1 10%(10/100) ในกลุ่มที่ 2 29%(28/98) ในกลุ่มที่ 3 และ 18%(19/105) ในกลุ่มที่ 4 (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลเปรียบเทียบการเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลอง (*in vitro* oocyte maturation)

กลุ่ม	โ อ โ อ ไซต์	Meiosis I	Meiosis II		Undeter mined
		Telo I (%)	Pro II (%)	Meta II (%)	(%)
1	119	38 (32%)	17 (14%)	23 (19%)[ก]	41 (35%)
2	100	-	30 (30%)	60 (60%)[ข]	10 (10%)
3	98	-	-	70 (71%)[ค]	28 (29%)
4	105	-	-	86 (82%)[ง]	19 (18%)

Telo I = Telophase I, Pro II = Prophase II, Meta II = Metaphase II

Undetermined = ไม่สามารถระบุสถานภาพของโครโมโซมและ/หรือ นิวเคลียสที่ผิดปกติ

ก, ข, ค, ง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$)

3) ผลเปรียบเทียบอัตราการเจริญเป็นตัวอ่อนระหว่างโอโอไซต์จาก *in vitro* maturation และ *in vivo* maturation

อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกายของโอโอไซต์ที่เลี้ยงให้เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลอง (*in vitro* maturation) เท่ากับ 28%(92/329) เปรียบเทียบกับโอโอไซต์ที่เจริญในฟอลลิเกิล (*in vivo* maturation) เท่ากับ 35%(34/98) (ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ) ส่วนอัตราการแบ่งตัวเป็นระยะ 2-8 เซลล์ อยู่ในอัตราใกล้เคียงกัน คือ 27%(89/329) ในกลุ่ม *in vitro* และ 29%(28/98) ในกลุ่ม *in vivo* ในขณะที่อัตราการเจริญเป็นตัวอ่อนระยะมอรูล่าในกลุ่ม *in vitro* น้อยกว่า *in vivo* คือ 1%(3/329) เทียบกับ 6.0%(6/98) ($p<0.01$) (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลเปรียบเทียบอัตราการเจริญเป็นตัวอ่อนระหว่างโอโอไซต์จาก *in vitro* maturation และ *in vivo* maturation

สภาวะการเกิด maturation	จำนวนโอโอไซต์	จำนวนตัวอ่อนที่แบ่งตัว (%)	ตัวอ่อนระยะ 2-8 เซลล์ (%)	ตัวอ่อนระยะมอรูล่า (%)
in vitro	329	92(28%)	89(27%)	3(1%)ก
in vivo	98	34(35%)	28(29%)	6(6%)ข

ก และ ข แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$)

4) ผลการปฏิสนธินอกร่างกายระหว่างตัวอสุจิไม่เจือจางและเจือจาง

ผลการแบ่งตัวของโอโอไซต์หลังจากการปฏิสนธินอกร่างกาย พบว่า 15% ของโอโอไซต์ที่ถูกปฏิสนธิด้วยตัวอสุจิชนิดไม่เจือจางเกิดการแบ่งตัวเป็นระยะ 2 เซลล์ เทียบกับ 39% ที่พบเมื่อใช้ตัวอสุจิชนิดเจือจาง ($p<0.05$) เช่นเดียวกับอัตราการเจริญเป็นระยะ 4-8 เซลล์ ในโอโอไซต์ที่ถูกปฏิสนธิด้วยตัวอสุจิชนิดไม่เจือจาง จะต่ำกว่าชนิดที่ใช้ตัวอสุจิชนิดเจือจาง (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 อัตราการแบ่งตัวหลังการปฏิสนธินอกร่างกายระหว่างตัวอสุจิไม่เจือจางและเจือจาง

การเตรียมตัวอสุจิ	จำนวนโอโอไซต์	ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์	ตัวอ่อนระยะ 4-8 เซลล์
ตัวอสุจิชนิดไม่เจือจาง	456	69(15%)ก	54(12%)ก
ตัวอสุจิชนิดเจือจาง	208	81(39%)ข	52(25%)ข

ก, ข แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

5) ผลการฝากในสุกรตัวรับ

ในการฝากตัวอ่อนระยะ 1 เซลล์ในสุกรตัวรับนาน 5 วัน จำนวน 3 ตัว พบว่าอัตราการเก็บตัวอ่อนจากสุกรตัวรับเท่ากับ 69%(162/236) โดยแบ่งเป็นด้านที่เก็บจากท่อนำไข่ข้างที่ผูกเท่ากับ 77%(91/118) และข้างที่ไม่ผูกเท่ากับ 60%(71/118) (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 อัตราการเก็บตัวอ่อนจากสุกรตัวรับ

	จำนวนโอโอไซต์	จำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้(%)
ข้างที่ผูกท่อนำไข่	118	91(77%)
ข้างไม่ผูกท่อนำไข่	118	71(60%)
รวม	236	162(69%)

อัตราการแบ่งตัวอ่อน คิดเป็นร้อยละ 51%(82/162) โดยข้างที่ผูกท่อนำไข่เท่ากับ 55%(50/91) และด้านที่ไม่ผูกท่อนำไข่เท่ากับ 45%(32/71) ในส่วนรายละเอียดของการแบ่งตัว พบว่าอัตราการแบ่งตัวเป็นตัวอ่อนระยะ 2-6 เซลล์ เท่ากับ 66%(54/162) ระยะ 8-16 เซลล์ เท่ากับ 15%(12/162) และตัวอ่อนระยะมอรูล่าเท่ากับ 20%(16/162) โดยมีรายละเอียดของการแบ่งตัวระหว่างข้างที่ผูกกับไม่ผูกแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 อัตราการพัฒนาของตัวอ่อนหลังฝากในสุกรตัวรับ

	อัตราการ	อัตราการเจริญเป็นตัวอ่อนระยะต่าง ๆ (%)*		
	แบ่งตัว (%)	2-6 เซลล์	8-16 เซลล์	มอรูล่า
ข้างที่ผูกท่อ	50/91	32	12	6
นำไข่	(55%)	(64%)	(24%)	(12%)
ข้างไม่ผูกท่อ	32/71	22	-	10
นำไข่	(45%)	(69%)		(31%)
รวม	82/162	54	12	16
	(51%)	(66%)	(15%)	(20%)

* เปรียบเทียบจากตัวอ่อนที่เก็บได้

ในส่วนผลการฝากนาน 7 วันพบตัวอ่อนตัวอ่อนเพียง 27 %(14/52) จากสุกรตัวรับ 1 ตัว ตัวอ่อนที่ได้มีลักษณะเป็นตัวอ่อนเซลล์เดียว ส่วนการฝากในสุกรตัวรับนาน 21 วัน พบว่าสุกรทั้ง 2 ตัวแสดงอาการกลับเป็นสัด รายละเอียดการฝากแสดงในตารางที่ 8

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 ผลการฝากตัวอ่อนในสุกรตัวรับนาน 7 และ 21 วัน

เวลาในการฝาก	ระยะของตัวอ่อน	จำนวนตัวอ่อน (n)	ผลการศึกษา
นาน 7 วัน	1 เซลล์	104 (2)	อัตราการเก็บตัวอ่อน = 14/52 = 27% (จากสุกร 1/2 ตัว)
นาน 21 วัน	2 เซลล์-มอรูล่า	60 (2)	กลับเป็นสัดทั้ง 2 ตัว ที่ 21 วัน

(n) จำนวนสุกรตัวรับ

วิจารณ์

การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ในการผลิตตัวอ่อนสุกรด้วยการปฏิสนธินอกร่างกาย ซึ่งนับเป็นรายงานครั้งแรกในประเทศไทยสำหรับสุกร จากการศึกษานี้แสดงข้อมูลพื้นฐานของการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ชนิดที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ ซึ่งไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน และจากรังไข่ชนิดที่เก็บหลังทำการกระตุ้นรังไข่ด้วยฮอร์โมน ในกรณีแรกพบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของจำนวนโอโอไซต์ระหว่างของรังไข่จากแม่สุกรที่ผ่านรอบการเป็นสัดมาแล้วกับสุกรสาวที่ยังไม่มีรอบการเป็นสัดมาก่อน (prepubertal gilts) จำนวนโอโอไซต์ที่ได้จากรังไข่ของแม่สุกรมีค่าน้อยกว่าของสุกรสาว ทั้งนี้เนื่องจากหลังวัยเจริญพันธุ์จะมีการเจริญของฟอลลิเกิลและโอโอไซต์มากกว่าก่อนวัยเจริญพันธุ์ ฟอลลิเกิลและโอโอไซต์นี้จะเจริญจนถึงช่วงตกไข่ในแต่ละรอบของวงจรการเป็นสัด โดยจะสูญเสียไปส่วนหนึ่งและอีกส่วนหนึ่งจะเจริญจนถึงช่วงตกไข่ ในแต่ละรอบของการเป็นสัดจะพบจุดที่เกิดการตกไข่ (corpus luteum) ประมาณ 14-21 ใบ (14 ใบในสุกรสาวและ 21 ใบในแม่สุกร โดยประมาณ; Huges and Varley, 1980) ดังนั้นจำนวนของโอโอไซต์ที่ได้จากรังไข่ของสุกรสาวจึงมากกว่าที่ได้จากรังไข่ของแม่สุกร เพราะยังไม่มีการสูญเสียโอโอไซต์จากการตกไข่ อย่างไรก็ตามพบว่าจำนวนโอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มหลายชั้นหรือไม่มากชั้น มีค่าใกล้เคียงกันในรังไข่ทั้งสองชนิด ประมาณ 60-70% ซึ่งโอโอไซต์ดังกล่าวตามปกติจะคัดไว้ใช้ในการปฏิสนธินอกร่างกาย เนื่องจากให้อัตราการปฏิสนธิและการเจาะของตัวอสุจิ (sperm penetration) ต่ำ เมื่อเทียบกับโอโอไซต์ชนิดที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้ม (Kikuchi *et al.*, 1993)

I16707047

การผลิตโอโอไซต์จากการกระตุ้นจะได้โอโอไซต์มากกว่าการเจาะจากรังไข่ที่ไม่ได้ทำการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน ดังนั้นการกระตุ้นรังไข่จึงเป็นวิธีการผลิตโอโอไซต์ที่สำคัญวิธีหนึ่ง แต่อย่างไรก็ตามการผลิตโอโอไซต์ด้วยวิธีการดังกล่าวมีข้อเสียคือราคาแพงกว่าการเก็บจากรังไข่ธรรมดาจากโรงฆ่าสัตว์ และมักได้ระยะของ maturation ที่แตกต่างกัน เนื่องจากฟอลลิเกิลแต่ละใบจะตอบสนองต่อฮอร์โมนโกนาโดโทรปินต่างกัน แต่หากเก็บจากรังไข่ธรรมดาสามารถมีโอกาสเลือกโอโอไซต์ที่มากจากฟอลลิเกิลขนาดพอ ๆ กันและมีลักษณะใกล้เคียงกันซึ่งหมายถึงน่าจะมีระยะ maturation ที่ใกล้เคียงกัน ปัจจุบันมีความเป็นไปได้ในการเลี้ยงโอโอไซต์ในหลอดทดลองจนถึง maturation ได้ (Mattioli *et al.*, 1989) แต่มีรายงานว่าการเลี้ยงโอโอไซต์ในหลอดทดลองอาจมีผลทำให้เกิดความผิดปกติในกระบวนการเจริญพร้อมปฏิสนธิได้ (Sato *et al.*, 1978; Yoshida *et al.*, 1989) และจะต่อเนื่องจนถึงขั้นปฏิสนธิ อาทิเช่น เกิดปัญหา polyspermy หรือ polygyny เป็นต้น (Yoshida *et al.*, 1990) ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของการหยุดพัฒนาตัวของตัวอ่อนหรือการเกิด early embryonic death ได้ ในการศึกษาเกี่ยวกับการเกิด maturation นี้ได้พบความผิดปกติของโอโอไซต์ที่เลี้ยงในหลอดทดลอง ซึ่งอยู่ประมาณ 10-35% ขึ้นกับสภาวะในการทำให้เกิด maturation ความผิดปกตินี้สามารถพบได้เช่นกันในโอโอไซต์ที่เจริญเต็มที่ในฟอลลิเกิลแต่น้อยกว่า ดังนั้นจึงอาจเป็นสาเหตุที่อธิบายอัตราการการเจริญเป็นตัวอ่อนระยะมอรูล่าที่ต่ำกว่าในกรณี *in vitro* maturation เมื่อเปรียบเทียบกับ *in vivo* maturation จากการศึกษาครั้งนี้

จากการศึกษาการเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลองพบว่ามีปัจจัยอย่างน้อย 3 ปัจจัยที่เกี่ยวข้อง คือ ฮอร์โมน ซีรั่มและเซลล์กรานูโลซ่า บทบาทของฮอร์โมนโดยเฉพาะฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน มีส่วนช่วยให้เกิด resumption ของ meiosis จากระยะหยุดตัวที่ dictyate stage ของ prophase I โดยทำให้เกิดการหลุดลอกของเซลล์กรานูโลซ่าจากตัวโอโอไซต์ ผลทำให้เซลล์กรานูโลซ่าไม่สามารถส่งปัจจัยห้ามการเกิด maturation ที่เรียกว่า "oocyte maturation inhibitors (OMI)" (Tsafriri and Pomerantz, 1986) ในส่วนของซีรั่ม พบว่าเป็นแหล่งโปรตีนหรือ growth factors ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการเกิด oocyte

maturation โดยอาจเป็น bovine serum albumin หรือซีรั่ม Zheng and Sirard (1992) ได้ศึกษาเปรียบเทียบระหว่างแหล่งโปรตีนที่ใส่ในน้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์ พบว่าการใช้ bovine serum albumin จะยับยั้งการแผ่กระจายตัวของเซลล์คิวมูลัสและลดอัตราการเกิด oocyte maturation เมื่อเทียบกับการเติมซีรั่ม และซีรั่มแบบ fetal calf serum สามารถใช้แทน estrus gilt serum ได้

ในส่วนของเซลล์กรานูโลซ่า Ding and Foxcroft (1992) เสนอแนะว่าการเลี้ยงโอโอไซต์ร่วมกับผนังฟอลลิเกิลจะช่วยเพิ่มคุณภาพของการเกิด cytoplasmic maturation และส่งผลให้อัตราการสร้าง male pronucleus หลังปฏิสนธิเพิ่มขึ้น (Mattioli *et al.*, 1988; Ding *et al.*, 1988) อย่างไรก็ตาม Tsafriri and Chaning (1975) เสนอแนะว่าหากเติมเซลล์กรานูโลซ่ามากเกินไปถึง 10^7เซลล์ จะมีผลไปยับยั้งและลดการเกิด maturation แต่หากลดจำนวนเซลล์กรานูโลซ่าเป็น 10^4 เซลล์ จะกลายเป็นผลดี นอกจากนี้เซลล์กรานูโลซ่ายังสังเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและเอสตราไดออล ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการเกิด oocyte maturation (Mochizuki *et al.*, 1991) นอกจากประโยชน์ของเซลล์กรานูโลซ่าต่อการเกิด oocyte maturation แล้ว พบว่าการเติมเซลล์กรานูโลซ่าร่วมในน้ำยาในระหว่างเกิดการปฏิสนธิจะช่วยเพิ่มอัตราการปฏิสนธิและลดปัญหาการเข้าผสมของตัวอสุจิหลายตัวได้ (Kikuchi *et al.*, 1993) ดังนั้นจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า การเติมเซลล์กรานูโลซ่าและซีรั่มไปในน้ำยาขณะเลี้ยงโอโอไซต์นอกร่างกายสัตว์ จะช่วยให้อัตราการเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิได้ดีขึ้น

ปัจจัยของการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิเป็นสิ่งสำคัญต่อการเกิดปฏิสนธิทั้งในร่างกายและนอกร่างกาย ในการทดลองนี้ได้ชี้ให้เห็นว่าวิธีการทำให้ตัวอสุจิมีชีวิตรอดมากขึ้นในช่วงที่เลี้ยงในหลอดทดลองมีความสำคัญต่อผลสำเร็จในการผลิตตัวอ่อนจากการปฏิสนธินอกร่างกายสุกร จากการเปรียบเทียบระหว่างการเตรียมอสุจิชนิดไม่เจือจางและชนิดเจือจางพบว่ากรณีหลังให้อัตราการพัฒนาของตัวอ่อนได้ดีกว่า โดยพบว่าอัตรารอดหรือที่สังเกตจากการเคลื่อนไหวรายตัว (motility) ดีขึ้นเมื่อมีการเจือจางน้ำเชื้อก่อนการทำ swim up โดยปกติในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อจะมีส่วนประกอบของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เช่น น้ำตาลกลูโคลส แลคโตส หรือ ฟรุ้กโตส โปรตีนและไลโปโปรตีน ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญ

ของตัวอสุจิขณะทำการเก็บรักษานอกร่างกาย การมีสารพลังงานในน้ำเลี้ยงเชื้อขณะทำการ capacitation ในหลอดทดลอง จึงจำเป็นสำหรับการรอดของตัวอสุจิ อย่างไรก็ตามพบว่าหลังการเลี้ยงตัวอสุจิในหลอดทดลองนานถึง 4 ชม จะพบว่าตัวอสุจิที่มีการเคลื่อนไหวแบบ hyperactive (whipsplash) บ้างแต่ไม่มากเช่นที่พบหลังทำการ swim up ในตัวอสุจิโคและกระบือ (สังเกตส่วนตัว)

อัตราการแบ่งตัวสูงสุดของตัวอ่อนที่เกิดจากการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกรได้ประมาณ 30-40% สำหรับระยะ 2 เซลล์ และเหลือประมาณ 20-25% สำหรับตัวอ่อนระยะ 4-8 เซลล์ และเหลือเป็นตัวอ่อนระยะมอรูล่าประมาณ 5% ส่วนตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสไม่พบในการทดลองนี้แม้จะเลี้ยงในน้ำยาไว้นานมากกว่า 5 วัน อัตราดังกล่าวใกล้เคียงกับที่พบในเอกสารอ้างอิง (24%, Yoshida *et al.*, 1990; 1991; 28%, Wang *et al.*, 1992; 28-32%, Funahashi *et al.*, 1994 สำหรับการแบ่งตัวเป็นตัวอ่อนระยะ 2-8 เซลล์) ซึ่งจัดว่าอยู่ในเกฑณ์ต่ำเมื่อเทียบกับอัตราความสำเร็จในการปฏิสนธิในโค ซึ่งปกติจะได้ตัวอ่อนระยะ 2-4 เซลล์ประมาณมากกว่า 50% และอัตราการผลิตตัวอ่อนระยะมอรูล่าและบลาสโตซีสประมาณ 10-20% (INRA, 1992) ความแตกต่างนี้สามารถอธิบายได้จากปัจจัยหลัก 2 ปัจจัย คือ อัตรารอดของตัวอสุจิของสุกรต่ำมากหลังจากรีดเก็บจากพ่อพันธุ์ (Nagai *et al.*, 1988) และปัญหาการเข้าผสมของตัวอสุจิหลายตัวในโอโอไซต์ใบเดียว (polyspermy) Kikuchi *et al.* (1993) พบอัตราการเกิด polyspermy ระหว่าง 48-73% และรายงานล่าสุดของ Funahashi *et al.* (1994) พบว่าอัตราของโอโอไซต์ที่เป็น monospermic penetration พบเพียง 25% และที่เป็น monospermy แท้จริงที่มีเพียง male pronucleus และ female pronucleus อย่างละหนึ่งอัน พบเพียง 8% เท่านั้น ดังนั้นแสดงว่าการเกิด polyspermy ในการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกรอาจเกิดความผิดปกติการป้องกันการเข้าปฏิสนธิในระดับชั้น zona pellucida หรือการปล่อย cortical granules ก็ได้ เป็นที่ทราบกันดีว่าการเกิดปัญหา polyspermy ทำให้เกิด early embryonic death ดังนั้นจึงเป็นเหตุผลอธิบายความสำเร็จในการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกรที่มีค่าไม่สูงนักได้

ในการศึกษาการเจริญของตัวอ่อนในสุกรตัวรับ พบว่าหากใช้ตัวอ่อนระยะ 1 เซลล์หลังทำการ decoronization ทันที จะได้อัตราการเก็บตัวอ่อนประมาณ 70% โดยไม่พบความแตกต่างระหว่างอัตราการเก็บตัวอ่อนระหว่างข้างที่ผูกท่อนำไข่และข้างที่ไม่ผูกท่อนำไข่ ในกรณีที่ผูกท่อนำไข่ไว้นั้นตัวอ่อนจะยังคงอยู่ในท่อนำไข่ในขณะที่หากไม่ผูกท่อนำไข่ไว้

ตัวอ่อนจะไหลเข้าไปในมดลูกซึ่งตัวอ่อนมีโอกาสเจริญถึงระยะบลาสโตซีสได้หากทิ้งไว้นานพอควร แต่ตรงข้ามหากทิ้งตัวอ่อนให้คงอยู่ในท่อนำไข่โอกาสที่จะพัฒนาเป็นระยะบลาสโตซีสเป็นไปได้ยากและตัวอ่อนมักเกิดการเสื่อมสลาย (Adams, 1973) มงคล และคณะ (2536ข) ได้ศึกษาการเลี้ยงตัวอ่อนสุกรหลังปฏิสนธิ (1-4 เซลล์) ในท่อนำไข่กระต่าย พบว่าไม่พบระยะบลาสโตซีสหากเลี้ยงตัวอ่อนไว้นานถึง 5 วัน

ในส่วนของอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนพบถึง 51% ซึ่งสูงกว่าเมื่อเทียบกับตัวอ่อนจากการทำ ไอ วี เอฟ ที่เลี้ยงในหลอดทดลอง โดยทั่วไปจะอยู่ประมาณ 30-40% ซึ่งแสดงว่าสภาพแวดล้อมในท่อนำไข่หรือมดลูกเหมาะสมกับการพัฒนาของตัวอ่อนมากกว่าในหลอดทดลอง Hyttel and Niemann (1990) ได้รายงานว่าการเลี้ยงตัวอ่อนสุกรในหลอดทดลอง จะทำให้เกิดความผิดปกติในส่วนของโครโมโซมและภายในไซโตพลาสซึม ซึ่งน่าจะเป็นเหตุผลของอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนสุกรที่ต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง นอกจากนี้เป็นที่น่าสังเกตจากการศึกษานี้ พบว่าตัวอ่อนส่วนใหญ่จะหยุดตัวที่ระยะ 2-6 เซลล์ ทั้งที่เลี้ยงไว้ในท่อนำไข่ที่ผูกไว้ และที่อยู่ในมดลูก ซึ่งกรณีหลังสามารถพัฒนาได้จนถึงระยะมอรูล่าถึง 30 เปอร์เซนต์ อย่างไรก็ตามจากการศึกษานี้พบว่าหากฝากตัวอ่อนนานขึ้นเป็น 7 วัน พบอัตราการเก็บตัวอ่อนน้อยมาก และเมื่อไว้ถึง 21 วัน สุกรตัวรับเกิดการกลับสัดหมด ซึ่งแสดงว่าตัวอ่อนสุกรที่เกิดการปฏิสนธินอกร่างกายเกิดการตายในระยะแรกเป็นจำนวนมาก ซึ่งสอดคล้องกับที่พบในการเจริญของตัวอ่อนในหลอดทดลองและในช่วงเลี้ยงไว้ 5 วัน จากการศึกษาทางเอกสารอ้างอิงพบว่ามีรายงานการเกิดลูกสุกรจากการปฏิสนธินอกร่างกายประมาณ 3-4 รายเท่านั้น นับตั้งแต่ Cheng และคณะ (1986) ได้รายงานความสำเร็จเป็นครั้งแรก โดยทำการฝากตัวอ่อน ไอ วี เอฟ จากโอโอไซต์ที่ได้จาก *in vivo* maturation จำนวน 206 ตัวอ่อน ระยะ 2-4 เซลล์ ในสุกรตัวรับจำนวน 15 ตัว ได้สุกรตั้งท้อง 6 ตัว และลูกสุกรเพียง 19 ตัว คิดเป็นอัตราความสำเร็จเพียง 9.2 เปอร์เซนต์เท่านั้น ซึ่งใกล้เคียงกับที่รายงานโดย Yoshida (1987) ที่รายงานไว้ 4.1% (4/98) จากสุกรตั้งท้อง 1/4 ตัว และล่าสุด Yoshida *et al.*(1993) ได้อัตราความสำเร็จในการผลิตลูกสุกรปกติจากตัวอ่อนที่ได้จากการทำ ไอ วี เอ็ม ไอ วี เอฟ เท่ากับ 4% (3/75) ซึ่งได้เสนอว่าเหตุผลของการเกิดลูกสุกรต่ำจากตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกายมาจาก 3 ประเด็นหลัก คือ หนึ่งคุณภาพของตัวอ่อนจาก ไอ วี เอฟ ไม่ดีเหมือนตัวอ่อนจากการปฏิสนธิภายในร่างกาย สองสภาวะของการเลี้ยงตัวอ่อนทำให้เกิดการตายขณะอยู่ในหลอดทดลอง และสาม

อัตราการผลิตลูกสุกรในกรณีการทำการย้ายฝากตัวอ่อนอยู่ในเกณฑ์ต่ำอยู่แล้ว ดังนั้นเมื่อประมวลผลการศึกษาและเอกสารที่เกี่ยวข้องโดยคำนึงถึงสถานภาพของงานวิจัยในปัจจุบัน พบว่าวิธีการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกรเป็นวิธีการที่ยังต้องให้ความสนใจและน่าศึกษาอีกมาก โดยเฉพาะการวิจัยขั้นมูลฐานถึงสาเหตุการตายของตัวอ่อนจากการปฏิสนธินอกร่างกายในระยะต้น การเกิดปัญหาความผิดปกติของการปฏิสนธิ การวิจัยหาปัจจัยที่เกี่ยวข้องเพื่อเพิ่มอัตราความสำเร็จให้มากกว่าที่เป็นอยู่ เพื่อให้เทคนิคนี้เป็นประโยชน์ต่อการผลิตสัตว์ในอนาคต Seamark (1994) กล่าวไว้ในที่ประชุม IPVS ครั้งที่ 13 ว่า การทำการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกรมีประโยชน์อย่างน้อย 4 ข้อ คือ

1) เพื่อเป็นแหล่งผลิตตัวอ่อนที่มีคุณภาพและต้นทุนต่ำ

2) ใช้ทดแทนการย้ายฝากตัวอ่อนปกติ

3) เพื่อปรับปรุงพันธุกรรมให้รวดเร็วยิ่งขึ้น

4) เพื่อการเก็บพันธุกรรมที่ดีในฝูงแม่พันธุ์อายุมากไว้จำนวนมาก ๆ

นอกจากประโยชน์เหล่านี้ การนำเอาวิธีการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกรน่าจะเป็นประโยชน์ต่อการใช้ตรวจคุณภาพของพ่อพันธุ์สุกรซึ่งจะเป็นวิธีการช่วยวัดสมรรถภาพทางการปฏิสนธิของตัวอสุจิได้ดีทีเดียว วิธีการดังกล่าวนี้ได้มีผู้ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อในศูนย์ผลิตและทดสอบน้ำเชื้อโค (Marquant-Le Guienne *et al.*, 1992)

เอกสารอ้างอิง

- มงคล เตชะกำพุ อังสนา ฮ้อเจริญ บุญญิตา รุจฑิฆัมพร นิภาภรณ์ รักอาริยะธรรม ศิริพงษ์ จึงธนาเจริญเลิศ และวิเชียร พวงศิลป์. 2530. การศึกษาเบื้องต้นของการย้ายฝากตัวอ่อนในฟาร์ม เวชชสารสัตวแพทย์ 17(3): 227-242.
- มงคล เตชะกำพุ วันเพ็ญ ศรีอนันต์ จินดา สิงห์ลอ และวิชัย ทันตศุภารักษ์. 2536ก. การผลิตตัวอ่อนสุกรด้วยวิธีการปฏิสนธินอกร่างกาย เวชชสารสัตวแพทย์ 23(3):189-199.
- มงคล เตชะกำพุ วิชัย ทันตศุภารักษ์ วันเพ็ญ ศรีอนันต์ และจินดา สิงห์ลอ. 2536ข. การศึกษาการเจริญของตัวอ่อนสุกรภายหลังฝากชั่วคราวในท่อนำไข่กระต่ายและนำฝากในสุกรตัวรับ. รายงานผลการวิจัยทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2536 สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ 32 หน้า.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- Adams, C.E. 1973. The development of rabbit eggs in the ligated oviduct and their viability after re-transfer to recipient rabbits. J. Embryo. exp. Morph., 29:133-144.

- Cheng, W.T.K. , Polge, C., & Morr, R.M., 1986. *In vitro* fertilization of pig and sheep oocytes. Theriogenology 25:146, abstr.

- Ding, J., Nagai, T. and Moor, R.M. 1988. Effects of follicle cells and hormone on maturation and fertilization *in vitro* of oocytes from immature gilts. J. Reprod. Fert., Abstract Series No. 2, Abstract. 42.

- Ding, J. and Foxcroft, G.R. 1992. Follicular heterogeneity and oocyte maturation *in vitro* in pigs. Biol. Reprod. 47:648-655.

- Funahashi, H., Stumpf, T, T., Terlouw, S.L. , Cantley, T.C., Rieke, A. and Day, N. 1994. Developmental ability of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. Theriogenology. 41:1425-1433.

- Huges, P.E. and Varley, M.A. 1980. Ovulation rate. Chapter 5 In : Reproduction in the pig. Butterworth & Co (Publishers) Ltd. London, p 66.

- Hunter, R.H.F 1990. Fertilization of pig eggs *in vivo* and *in vitro*. J. Reprod. Fert., Suppl. 40:211-226.

- Hyttel, P. and Niemann, H. 1990. Ultrastructure of porcine embryos following development *in vitro* versus *in vivo*. Mol. Reprod. Dev., 27:136-144.

- INRA, 1992. Results of *in vitro* fertilization in bovine. INRA, Biologie du Development, Jouy-en-Josas, France (unpublished data).

- Kikuchi, K., Nagai, T., Motlik, J., Shioya, Y. and Izaike, Y. 1993. Effect of follicle cells on *in vitro* fertlization of pig follicular oocytes. Theriogenology. 39:593-599.

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

- Mattioli, M., Galeati, G. and Seren, E. 1988. Effect of follicular cells during pig oocyte maturation on egg penetrability and male pronuclear formation. Gamete Res. 21:289-295.

- Mattioli, M., Bacci, M.L., Galeuti, G. and Seren, E. 1989. Cytogenetic analysis of pig oocytes matured *in vitro*. J. Exp. Zoo., 176:383-396.

- Mochizuki, H., Fukui, Y. and Ono, H. 1991. Effect of the number of granulosa cell added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization and development of bovine oocytes. Theriogenology. 36(6): 973-986.

- Nagai, T., Takahashi, T., Masuda, H., Shioya, Y. Kuwayama, M., Fukushima, J., Iwasaki, S. and Hanaka, A. 1988. *In vitro* fertilization on pig oocytes by frozen by boar spermatozoa. J. Reprod. Fert., 84:585-591.

- Sato, E., Iritani, A., and Nishikawa, Y. 1978. Rate of maturation division of pig follicular oocytes cultured *in vitro*. Jpn. J. Zoo. Sci., 49:400-405.

- Seamark, R.F. 1994. Recent advances in pig reproduction technology: A critical *overview. Proceeding of 13th IPVS Congress, Bangkok, Thailand, 26-30 June* 1994. p 21-22.

- Tsafriri, A. and Channing, C.P. 1975. An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis *in vitro*. Endocrinology. 96:922-927.

- Tsafriri, A. and Pomerantz, S.H. 1986. Oocyte maturation inhibitor. Clinics in Endocrinology and Metabolism. 15(1): 157-170.

- Wang , Z.K., Wei, P.H., Wang, J.Z., Lei, C. ad Kou, M.Q. 1992. Maturation and fertilization of porcines oocytes *in vitro*. Theriogenology. 37:733-739.

- Yoshida, M. 1987. *In vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vivo*. Jpn. J. Vet. Sci., 49(4):711-718.

- Yoshida, M., Bamba, K. and Kojima, Y. 1989. Effects of gonadotropins and estradiol-17β on the timing of nuclear maturation and cumulus mass expansion of pig oocytes cultured *in vitro*. Jpn. J. Ani. Reprod., 35:86-91.

- Yoshida, M., Ishizaki, Y. and Kawagishi, H. 1990. Blastocyst formation of pig embryos resulting from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. J. Reprod. Fert., 88:1-8.
- Yoshida, M., Myzoguchi, Y., Ishigaki, K., Kojima, T. and Nagai, T. 1993. Birth of piglets derived from *in vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vitro*. Theriogenology. 39:1303-1311.
- Zheng, Y.S. and Sirard, M.A. 1992. The effect of sera, bovine serum albumin and follicular cells on *in vitro* maturation and fertilization of porcine. Theriogenology. 37:779-790.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย