จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2538

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

บัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกร : บัจจัยที่เกี่ยวกับการเตรียมโอโอไซต์และการเตรียมตัวอสุจิ

(Factors influence the success of *in vitro* fertilization in pig : Oocyte and Sperm preparation)

โดย

มงคล เตชะกำพุ

วันเพ็ญ ศรีอนันต์

จฬ
ธพ 15
011208

มกราคม 2539

ภาควิชาสูติศาสตร์ เวชบาวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2538

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกร : ปัจจัยที่เกี่ยวกับการเตรียมโอโอไซต์และการเตรียมตัวอสุจิ

(Factors influence the success of *in vitro* fertilization in pig : Oocyte and Sperm preparation)

โดย

มงคล เตชะกำพุ
วันเพ็ญ ศรีอนันต์

มกราคม 2539

ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

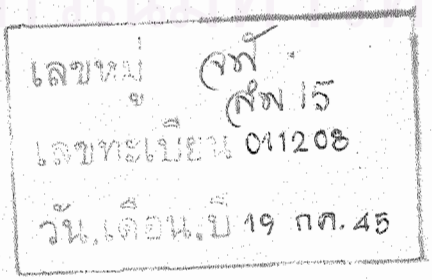
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

14 ธ.ค. 2547
I20167246

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2538
ของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ผู้วิจัยขอขอบคุณ
- คณาจารย์ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์
  คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- ศ. นพ. ประมวล วีรุตมเสน หัวหน้าภาควิชาสูติศาสตร์ นรีเวชวิทยา
  และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการปฏิสนธินอกร่างกาย คณะแพทยศาสตร์
  จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- อาจารย์ น.สพ. วิชัย ทันตศุภารักษ์ ที่ช่วยวิเคราะห์ข้อมูล
- คุณจินดา สิงห์ลอ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาฯ ที่ช่วยเตรียมสัตว์
  ทดลอง
- เจ้าหน้าที่ฝ่ายวิจัย ของคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ชื่อโครงการ ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกร:
ปัจจัยที่เกี่ยวกับการเตรียมโอโอไซต์และการเตรียมตัวอสุจิ

ชื่อผู้วิจัย มงคล เตชะกำพุ
วันเพ็ญ ศรีอนันต์

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ มกราคม 2539

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาปัจจัยของการเตรียมโอโอไซต์และการเตรียมตัวอสุจิในการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกร โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาปัจจัยของการเตรียมโอโอไซต์ ประกอบด้วย 3 การทดลองย่อย โดยใช้โอโอไซต์ทั้งหมด 1,086 ใบ เพื่อศึกษาปัจจัยของระยะเวลาในการเลี้ยงโอโอไซต์ให้พร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลอง ชนิดของโอโอไซต์และแหล่งของโอโอไซต์ระหว่างจากรังไข่ของแม่สุกรและสุกรสาว ผลการศึกษาพบว่าเวลาที่เหมาะสำหรับการเลี้ยงโอโอไซต์คือ 40-48 ชม. โดยโอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มหลายชั้นจะให้อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนสูงที่สุด และโอโอไซต์จากรังไข่ของแม่สุกรสามารถใช้สำหรับการปฏิสนธินอกร่างกายแต่อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนต่ำกว่าโอโอไซต์จากรังไข่ของสุกรสาว

การทดลองที่ 2 ศึกษาปัจจัยของการเตรียมตัวอสุจิ ประกอบด้วย 3 การทดลองย่อย โดยใช้โอโอไซต์ทั้งหมด 1,235 ใบ เพื่อศึกษาปัจจัยของชนิดของตัวอสุจิระหว่างชนิดที่เก็บจากท่ออิปิดิไดมีสกับที่หลั่งออกมา ระยะเวลาในการเลี้ยงตัวอสุจิในช่วง 1, 2 และ 4 ชม. และเปรียบเทียบระหว่างสารเร่งการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิชนิดรวมของเพนนิซิลามีน ไฮโปทอรีน และอิปิเนปฟริน (พี เอช อี) และชนิดคาเฟอีน ผลการศึกษาไม่พบความแตกต่างของอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนระหว่างตัวอสุจิจากท่ออิปิดิไดมีสและที่หลั่งออกมา เช่นเดียวกับผลการทดลองของสารพี เอช อี และคาเฟอีน ในขณะที่ระยะเวลาในการเลี้ยงตัวอสุจิที่ 1 ชม. ให้อัตราความสำเร็จสูงสุด

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าปัจจัยของการเตรียมโอโอไซต์และการเตรียมตัวอสุจิมีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกร

คำสำคัญ สุกร การปฏิสนธินอกร่างกาย การเตรียมโอโอไซต์ การเตรียมตัวอสุจิ
การแบ่งตัวของตัวอ่อน

Project Title: Factors influence the success of *in vitro* fertilization in pig: Oocyte and Sperm preparation

Name of Investigators: Mongkol Techakumphu
Wanpen Srianan

Year: January 1996

Abstract

The purpose of this study was to investigate the two major factors; oocyte and sperm preparation influencing the success of *in vitro* fertilization in pig. Two experiments were conducted:

Experiment I: Factors of oocyte preparation. It composed of three subfactors as: time of oocyte maturation, oocyte type and source of oocytes. A total of 1,086 oocytes were allocated for the experiments. The 40 to 48 hrs of oocyte culture time was suitable for a high rate of embryonic development. The complex cumulus oocytes (CCO) gave the highest rate of cleavage compared to the rate obtained from single layers and denude oocytes. Sow ovary can be used for a source of oocytes but the cleavage rate was lower than that of gilt's ovary.

Experiment II: Factors of sperm preparation. Three subfactors, by using 1,235 oocytes, were conducted in order to evaluate the type of sperm which was epididymal or ejaculated sperm, time of sperm capacitation and type of sperm motility-stimulating agents; Penicillamine Hypotarine Epinephrine (PHE) or Caffeine on the success of *in vitro* fertilization. It was found that the cleavage rate between epididymal and ejaculated sperm was not different as well as the results between PHE and Caffeine. Nevertheless, the highest of cleavage rate was found in the group of one hour capacitation compared to the groups of two and four hour capacitation.

This study showed some factors; oocyte and sperm preparation influenced on the success of *in vitro* fertilization in pig.

Key words: pig, *in vitro* fertilization, oocyte preparation, sperm preparation, cleavage of embryos

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	II
บทคัดย่อ	III
Abstract	IV
สารบัญ	V
รายการประกอบตาราง	VI
รายการรูปประกอบ	VII
รายสัญญลักษณ์และคำย่อ	VIII
คำนำ	IX
บทนำ	1,3,16
อุปกรณ์และวิธีการ	4,17
ผล	8,21
วิจารณ์	11,25
เอกสารอ้างอิง	27

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการประกอบตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	อัตราการเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลองหลังเลี้ยงนาน 24, 40 และ 48 ชม.	9
ตารางที่ 2	อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนจากโอโอไซต์ที่เลี้ยงนาน 24, 40 และ 48 ชม.	9
ตารางที่ 3	อัตราการแบ่งตัวของโอโอไซต์ชนิดต่าง ๆ	10
ตารางที่ 4	อัตราการแบ่งตัวระหว่างโอโอไซต์จากรังไข่แม่สุกรเปรียบเทียบกับสุกรสาว	11
ตารางที่ 5	ผลการปฏิสนธินอกร่างกายระหว่างน้ำเชื้อจากท่ออิปิดิไดมีสเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อที่หลั่งออกมา	21
ตารางที่ 6	ผลของระยะเวลาในการเลี้ยงตัวอสุจิต่ออัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อน	22
ตารางที่ 7	อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนระหว่างตัวอสุจิที่กระตุ้นด้วย PHE และ Caffeine	24

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการรูปประกอบ

		หน้า
รูปที่ 1	แผนการทดลอง	2
รูปที่ 2	ไดอะแกรมแสดงขั้นตอนการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกร	8
รูปที่ 3	อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนสุกรจากการปฏิสนธินอกร่างกาย จากโอโอไซต์ที่เลี้ยงนาน 24, 40 และ 48 ชม.	9
รูปที่ 4	อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนที่ได้จากโอโอไซต์ชนิดต่าง ๆ	10
รูปที่ 5	อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนระหว่างโอโอไซต์ที่เก็บได้จาก รังไข่แม่สุกรและสุกรสาว	11
รูปที่ 6	ไดอะแกรมแสดงการเก็บน้ำเชื้อจากท่ออิปิดิไดมีส	18
รูปที่ 7	อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนจากการปฏิสนธิด้วยตัวอสุจิ ที่เลี้ยงนาน 1, 2 และ 4 ชม.	23
รูปที่ 8	เปรียบเทียบอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อน (ก) และอัตราการ พัฒนาของตัวอ่อนเป็นระยะมอรูล่า (ข)	23
รูปที่ 9	อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนระหว่างกลุ่มที่ใช้สาร PHE เทียบกับ Caffeine	24

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการสัญญลักษณ์และคำย่อ

ภาษาไทย

กก. = กิโลกรัม

ชม. = ชั่วโมง

มล. = มิลลิลิตร

มม.= มิลลิเมตร

ภาษาอังกฤษ

CCO = complex cumulus oocyte

S = Single layers cumulus oocyte

P = Partial cumulus oocyte

EM = Early Morula

TCM = Tissue Culture Medium

FSH = Follicle Stimulating Hormone

LH = Luteinizing Hormone

^{0}C = degree celcius

µg/ml = microgram/millilitre

PHE = Penicillamine Hypotarine Epinephrine

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำนำ

จากความสำเร็จครั้งแรกในการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกร ซึ่งคณะผู้วิจัยจากภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ดำเนินการในเรื่องนี้ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2537 ด้วยการสนับสนุนทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ จนถึงปัจจุบัน พบว่าจากงานวิจัยขั้นที่สองนี้แสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ในการเพิ่มประสิทธิภาพของการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกร โดยต้องคำนึงถึงปัจจัยของการเตรียมโอโอไซต์และการเตรียมตัวอสุจิ เพื่อให้พร้อมปฏิสนธิ รายงานฉบับนี้ได้รวบรวมผลการทดลองในสองมุมมองดังกล่าว นอกจากนี้งานวิจัยบางส่วนได้เสนอในที่ประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ของสัตวแพทยสมาคม ประจำปี 2538 ด้วย

รศ. น.สพ. ดร. มงคล เตชะกำพุ
ผู้วิจัยหลัก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

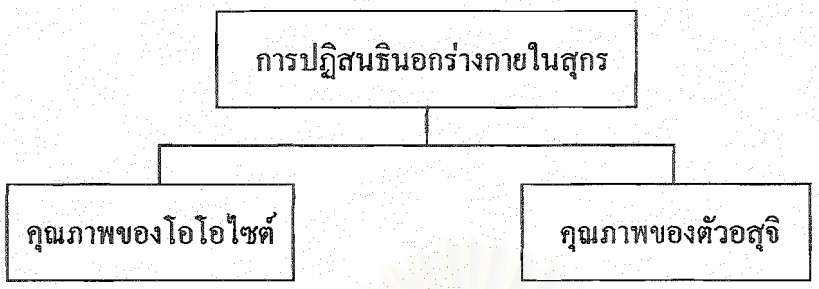
การปฏิสนธินอกร่างกายในสุกรมีข้อแตกต่างกับสัตว์เศรษฐกิจชนิดอื่น ๆ โดยเฉพาะในโค เนื่องจากอัตรารอดของตัวอสุจิขณะเลี้ยงนอกร่างกายอยู่ในระดับต่ำ และมีปัญหาการเข้าปฏิสนธิของตัวอสุจิหลายตัวในไซโตพลาสซึ่มของโอโอไซต์ ทำให้อัตราการปฏิสนธิและการพัฒนาของตัวอ่อนในน้ำยาเพาะเลี้ยง (*in vitro*) และหลังย้ายฝากในครรภ์ของสุกรตัวรับ (*in vivo*) อยู่ในเกณฑ์ต่ำ (Cheng *et al*., 1986; Yoshida, 1987)

การศึกษาการปฏิสนธินอกร่างกายของสุกรในประเทศไทยได้ประสบความสำเร็จโดย Techakumphu และคณะ (1993) พบว่ามีความเป็นไปได้ในการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกรจากเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (โอโอไซต์) ที่เก็บจากรังไข่ของสุกรหลังส่งโรงฆ่าสัตว์ โดยได้ศึกษาถึงวิธีการและเปรียบเทียบผลการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ของแม่สุกรและสุกรสาว รวมทั้งจากสุกรสาวที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปินเพื่อเพิ่มจำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้ต่อรังไข่ และยังได้รายงานอัตราเจริญพร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลอง (*in vitro* oocyte maturation) ซึ่งสูงถึง 80% หากทำการปรับสภาพในน้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้เหมาะสมโดยการเติมฮอร์โมนโกนาโดโทร-ปินร่วมกับเอสตราไดออล ซีรั่มและเซลล์กรานูโลซ่า งานวิจัยดังกล่าวยังได้ชี้ให้เห็นว่าการปรับวิธีการที่ทำให้ตัวอสุจิมีชีวิตรอดมากขึ้นในช่วงที่เลี้ยงในหลอดทดลองในระหว่างกระบวนการ capacitation มีผลทำให้ได้อัตราการปฏิสนธิและการพัฒนาของตัวอ่อนมากขึ้น รวมทั้งโอโอไซต์ที่เลี้ยงให้เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลองจะมีความสามารถในการพัฒนาเป็นตัวอ่อนในระดับเดียวกับโอโอไซต์ที่เกิดความพร้อมในฟอลลิเคิลเมื่อนำมาปฏิสนธินอกร่างกาย อย่างไรก็ตาม แม้อัตราความสำเร็จในการปฏิสนธินอกร่างกายโดยพิจารณาจากอัตราการแบ่งตัวเป็นระยะ 2 เซลล์จนถึงระยะมอรูล่า หลังเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงจะใกล้เคียงหรือสูงกว่าในบางรายงานในเอกสารอ้างอิง โดยอยู่ในระดับประมาณ 30% แต่หากเทียบกับในโคแล้วยังอยู่ในระดับต่ำกว่ามาก และเมื่อนำตัวอ่อนไปย้ายฝากในสุกรตัวรับแล้วตัวอ่อนแม้จะพัฒนาได้จนถึงระยะมอรูล่า แต่ตัวอ่อนส่วนมากมักเกิดการเสื่อมสลาย ดังนั้นการหาข้อมูลเพิ่มเติมต่อสภาวะที่เหมาะสมที่สุดเพื่อให้เกิดผลในการปฏิสนธินอกร่างกายสุกรสูงสุดจึงเป็นสิ่งจำเป็น งานวิจัยนี้ได้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการปฏิสนธินอกร่างกาย คือ

1) ปัจจัยของการเตรียมโอโอไซต์ (Oocyte Preparation)

2) ปัจจัยของการเตรียมอสุจิ (Sperm Preparation)

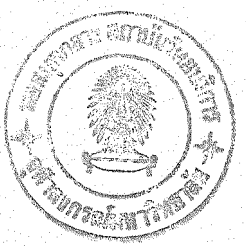
ปัจจัยทั้งสองยังประกอบด้วยปัจจัยย่อย ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกรนั้นแยกได้เป็นหัวข้อดังไดอะแกรมในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แผนการทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
ปัจจัยของการเตรียมโอโอไซต์ต่อการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกร



บทนำ

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมก่อนที่ฟอลลิเคิลจะแตกและเกิดการตกไข่เกิดขึ้น โอโอไซต์ที่โตเต็มที่ที่อยู่ในรังไข่จะมีการแบ่งตัวแบบมัยโอซีสต่อ (resumption of first meiotic division) จากระยะโปรเฟส (prophase) และไปหยุดตัวที่ระยะเมตาเฟสของการแบ่งตัวระยะที่สอง (second meiotic division) การเกิดกระบวนการนี้เรียกว่า "การเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ (oocyte maturation)" กระบวนการดังกล่าวเกิดขึ้นโดยอาศัยการทำงานของฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองโดยเฉพาะลูติไนซิ่งฮอร์โมน (Luteinising Hormone, LH) ซึ่งจะเกี่ยวข้องทั้งการตกไข่และการทำให้โอโอไซต์เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ

ในการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกร โอโอไซต์ที่เก็บจากรังไข่ส่วนมากจะเป็นชนิดที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ เรียกว่า "immature oocyte" (Techakumphu *et al.*, 1993) โอโอไซต์เหล่านี้จะต้องใช้เวลาส่วนหนึ่งในการเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลอง (*in vitro* maturation) เช่นเดียวกับโอโอไซต์ที่โตในฟอลลิเคิลขณะอยู่ในรังไข่ โอโอไซต์ที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิจะมีนิวเคลียสใหญ่ (germinal vesicle, GV) เมื่อโอโอไซต์เกิด maturation สภาพอย่างแรกที่พบคือการสลายตัวของ GV เรียก "Germinal Vesicle Breakdown (GVBD)" เช่นเดียวกับโอโอไซต์ที่เจริญในฟอลลิเคิล โดยจะพบว่าโอโอไซต์จะอยู่ในระยะเมตาเฟส ทู หากมีการปรับสภาวะของการเลี้ยงโอโอไซต์ให้เหมาะสม สภาวะที่ปรับให้เหมาะสมดังกล่าวจะมีผลต่อเนื่องต่อความสำเร็จในการปฏิสนธินอกร่างกายและการพัฒนาของตัวอ่อน พบว่ามีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้องต่ออัตราความสำเร็จในการเลี้ยงให้เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ

ปัจจัยแรกคือ สภาวะที่ทำให้โอโอไซต์เจริญพร้อมปฏิสนธิ (maturation) พบว่าหากเป็นโอโอไซต์ที่เจริญเติบโตในฟอลลิเคิลจนถึงตกไข่ (*in vivo* maturation) จะมีอัตรา maturation ที่สูงกว่าที่เกิดในหลอดทดลอง (*in vitro* maturation) อย่างไรก็ตามพบว่าในสุกรโอโอไซต์ที่เจริญในหลอดทดลองสามารถที่จะปฏิสนธิกับตัวอสุจิและแบ่งตัวในอัตราใกล้เคียงกับโอโอไซต์ที่เจริญในฟอลลิเคิล แต่มีอัตราของการเจริญเป็นตัวอ่อนระยะมอรูล่าน้อยกว่า (Techakumphu *et al.*, 1993)

ปัจจัยที่สองคือ ระยะเวลาของการเลี้ยงโอโอไซต์เพื่อให้เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลอง (*in vitro* maturation) มีรายงานเกี่ยวกับเวลาในการเลี้ยงโอโอไซต์ต่อการปฏิสนธินอก-

ร่างกาย โดยมีระยะเวลาการเลี้ยงที่ผันแปรตั้งแต่ 24, 36 จนถึง 48 ชม. (Iritani *et al.*, 1978: Nagai *et al.*, 1984: Nagai, 1988; Yoshida *et al.*, 1990; 1993 Eng *et al.*, 1986; Vajta *et al.*, 1991; Techakumphu *et al.*, 1993)

ปัจจัยที่สาม คือชนิดของโอโอไซต์ซึ่งมีส่วนสำคัญต่อการปฏิสนธินอกร่างกาย โอโอไซต์ที่เจาะจากรังไข่มีอย่างน้อย 4 ชนิดขึ้นไป โดยแบ่งตามลักษณะของเซลล์ที่ล้อมรอบเปลือกของโอโอไซต์ ซึ่งเป็นเซลล์คิวมูลัสและเซลล์กรานูโลซ่าของฟอลลิเคิล มีรายงานการทดลองในสัตว์อื่น ๆ เช่น โค (Mochizuki *et al.*, 1991; Kikuchi *et al.*, 1993) พบความแตกต่างของอัตราการปฏิสนธิและอัตราการแบ่งตัวระหว่างโอโอไซต์ชนิดต่าง ๆ หลังจากการทำการปฏิสนธินอกร่างกาย จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตตัวอ่อนด้วยการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกร คือ

1. ศึกษาระยะเวลาในการเลี้ยงโอโอไซต์ให้พร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลองต่อการปฏิสนธินอกร่างกาย
2. ศึกษาชนิดของโอโอไซต์ต่อการปฏิสนธินอกร่างกาย
3. ศึกษาความเป็นไปได้ในใช้โอโอไซต์ที่เก็บมาจากรังไข่ของแม่สุกร

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บโอโอไซต์

เก็บรังไข่ของสุกรสาวในการทดลองที่ 1 และ 2 และรังไข่ของแม่สุกรในการทดลองที่ 3 จากสุกรที่ส่งเข้าโรงฆ่าสัตว์ท้องถิ่นที่อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม คัดเฉพาะรังไข่ที่มีฟอลลิเคิลที่กำลังเจริญ (growing follicles) อยู่พอสมควร ล้างรังไข่ 1 ครั้งในน้ำยาฆ่าเชื้อชนิดควอเตอนารีแอมโมเนี่ยม คอมปาวน์ 1% แล้วเก็บในน้ำเกลือ 0.9% อุ่นอยู่ในกระติกน้ำร้อนที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 30°C นำรังไข่เข้าห้องปฏิบัติการตัวอ่อนของภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ ศูนย์ฝึกนิสิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ จังหวัดนครปฐม

ทำการล้างรังไข่อีก 3 ครั้ง ครั้งแรกใน แอลกอฮอลล์ 70% ครั้งที่สองและครั้งที่สามในน้ำเกลือ 0.9% ที่มียาปฏิชีวนะชนิดเพนนิซิลลินและสเตรปโตมัยซินอยู่ หลังจากนั้นซับรังไข่ให้แห้งด้วยกระดาษซับที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ดูดเก็บโอโอไซต์ภายในระยะเวลาไม่เกิน 1 ชม. หลังฆ่าสุกร วิธีการดูดเก็บได้เคยรายงานโดย Techakumphu และคณะ (1993) โดยการใช้เข็มเบอร์ 19 ต่อกับไซริงค์ขนาด 10 มล. ดูดโอโอไซต์จากฟอลลิเคิลที่มีขนาด 2-6 มม. ที่ละฟอลลิเคิล เก็บโอโอไซต์ที่ได้ในน้ำยา TCM 199 2.5 mM Hepes บน warm plate ที่ อุณหภูมิ 37°C

แบ่งการทดลองเป็น 3 การทดลองย่อย

1) ศึกษาระยะเวลาในการเลี้ยงโอโอไซต์ในหลอดทดลองต่อการปฏิสนธินอกร่างกาย

2) ศึกษาชนิดของโอโอไซต์ต่อการปฏิสนธินอกร่างกาย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3) ศึกษาความสามารถของโอโอไซต์จากรังไข่แม่สุกรเทียบกับโอโอไซต์ที่เก็บจากรังไข่ของสุกรสาวต่อการปฏิสนธินอกร่างกาย

การทดลองทั้งสามในเรื่องปัจจัยเกี่ยวกับโอโอไซต์ ใช้โอโอไซต์ทั้งหมด 1,086 ใบ

<u>การทดลองที่ 1</u>

แบ่งโอโอไซต์จำนวน 425 ใบ เป็น 3 กลุ่ม ตามระยะเวลาในการเลี้ยงโอโอไซต์ในหลอดทดลอง คือ

กลุ่มที่ 1 เลี้ยงนาน 24 ชม. จำนวน 150 ใบ

กลุ่มที่ 2 เลี้ยงนาน 44 ชม. จำนวน 130 ใบ

กลุ่มที่ 3 เลี้ยงนาน 48 ชม. จำนวน 145 ใบ

แต่ละกลุ่มทำการทดลองซ้ำ (replication) อย่างน้อย 5-6 ครั้ง โดยเมื่อได้โอโอไซต์มาแต่ละครั้งจะแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มในจำนวนที่ใกล้เคียงกัน

ล้างโอโอไซต์ที่เก็บได้ จำนวน 3 ครั้ง สองครั้งแรกในน้ำยา TCM 199 2.5mM Hepes และอีกครั้งหนึ่งในน้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์ชนิด TCM 199 $NaHCO_3$+20% fetal calf serum ที่มีฮอร์โมน FSH/LH (10 μg/ml) และ Estradiol-17β (1 μg/ml) เป็นส่วนประกอบอยู่ น้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์ดังกล่าวจะนำมาปรับความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิในตู้อบก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ที่ 5%CO_2 ที่อุณหภูมิ 38.5°C นานประมาณ 2-3 ชม. แล้วนำโอโอไซต์ใส่ลงในน้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์จำนวน 1 มล.ในถาดหลุมพลาสติกชนิด 4 หลุม (Nunc, Denmark) โดยแต่ละหลุมบรรจุโอโอไซต์ประมาณ 20-30 ใบ เติมเปลือกเซลล์กรานูโลซ่า (granulosa sheath) ประมาณ 30 ชิ้นต่อ 1 หลุม เปลือกเซลล์กรานูโลซ่าได้จากการดูดเก็บโอโอไซต์จากรังไข่และเป็นเปลือกเซลล์สดในแต่ละครั้งการเลี้ยงดังกล่าวเรียกว่า “co-culture” เพื่อหวังผลในการเกิด maturation ที่สมบูรณ์โดยอาศัยปัจจัยจากเปลือกเซลล์กรานูโลซ่า หลังครบกำหนดเวลานำโอโอไซต์บางส่วนในแต่ละกลุ่ม (n=97) มา fix ด้วย glacial acetic acid:methanol (1:3) นาน 14 วัน และย้อมสีดูสภาพของการเกิดเมตาเฟสทู (metaphase II) หลังย้อมสีด้วยอาซีโตออซีน ตรวจด้วยกล้อง phase contrast inverted microscope กำลังขยาย 100-400 เท่า โอโอไซต์ที่เหลือจำนวน 328 ใบนำมาปฏิสนธินอกร่างกาย

<u>การทดลองที่ 2</u>

แบ่งโอโอไซต์จำนวน 400 ใบ เป็น 3 กลุ่ม ดูจากลักษณะของโอโอไซต์หลังการเก็บ

กลุ่มที่ 1 โอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มหลายชั้น (Complex cumulus oocytes, CCO) จำนวน 136 ใบ

กลุ่มที่ 2 โอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มไม่มากชั้น (Single layers cumulus oocytes, S+P) จำนวน 152 ใบ

กลุ่มที่ 3 โอโอไซต์ที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มรอบ (Denude oocytes,D) จำนวน 112 ใบ

หมายเหตุ โอโอไซต์ในกลุ่มที่ 3 นั้นคัดเอาเฉพาะที่มีไซโตพลาสซึ่มปกติ

ภาพของโอโอไซต์ชนิดต่าง ๆ ได้เคยรายงานโดย Techakumphu และคณะ (1993)

นำโอโอไซต์ทั้งสามกลุ่มมาเลี้ยงในสภาวะเช่นเดียวกับโอโอไซต์ในการทดลองที่ 1 โดยเลี้ยงนาน 44 ชม. หลังจากนั้นนำมาทำการปฏิสนธินอกร่างกาย

<u>การทดลองที่ 3</u>

เก็บโอโอไซต์จากรังไข่ของแม่สุกรและของสุกรสาว เลือกเฉพาะโอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มรอบหลายชั้น (CCO) ในการทดลองจำนวนทั้งหมด 261 โอโอไซต์ แยกเป็นโอโอไซต์จากแม่สุกร 128 โอโอไซต์ และจากสุกรสาว 133 โอโอไซต์

การปฏิสนธินอกร่างกาย

นำโอโอไซต์แต่ละกลุ่มมาปฏิสนธิกับตัวอสุจิที่รีดจากพ่อสุกรที่ผ่านการทดสอบความสมบูรณ์พันธุ์ (fertility test) 2 ตัว และผ่านการเตรียมการดังที่รายงานโดย Techakumphu และคณะ (1993)

การเตรียมเซลล์ท่อบุนำไข่

ใช้เซลล์ท่อบุนำไข่เพื่อเลี้ยงร่วมกับตัวอ่อนหลังปฏิสนธิ โดยการคัดเลือกเอาท่อนำไข่จากสุกรสาวหรือแม่สุกรที่มีฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ใกล้ตกไข่ ตัดท่อนำไข่ออกจากตัวสัตว์แช่ในน้ำยาฆ่าเชื้อชนิดควอเตอนารี แอมโมเนี่ยม คอมปาวน์อย่างอ่อน แล้วแช่ในน้ำเกลือ 0.9% ขณะขนส่งหลังนำเข้าห้องปฏิบัติการ ทำการล้างท่อนำไข่ในแอลกอฮอลล์ 70% ในจานพลาสติกนาน 1 นาที แล้วล้างในน้ำเกลืออีก 2 ครั้ง เลาะพังผืดรอบ ๆ ท่อนำไข่ออก และยืดยาวออก ตัดบริเวณส่วนปากแตร ใช้กรรไกรที่ฆ่าเชื้อเปิดผ่าท่อนำไข่จากด้านปลายปากแตร ไปยังปลายที่ติดกับมดลูกจนสุด ใช้ใบมีดที่สะอาดขูดผิวในของท่อนำไข่เบา ๆ ล้างเซลล์ที่ติดกับใบมีดที่ฆ่าเชื้อในน้ำยา TCM 199 2.5 mM Hepes ที่บรรจุในจานพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 มม. เทน้ำยาพร้อมกับเซลล์ของท่อนำไข่ในหลอดขนาด 15 มล. ที่สะอาดและปลอดเชื้อ ปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 2000 g นาน 10 นาที ทำการปั่นล้างจำนวน 3 ครั้ง สองครั้งในน้ำยาข้างต้น และครั้งสุดท้ายในน้ำยา TCM 199 $NaHCO_3$+20% fetal calf serum แล้วเทส่วนใสครั้งสุดท้ายออก เติมน้ำยาชนิดหลังจำนวน 2 มล. ใช้ไปเปตดูดไปมาให้เข้ากัน แล้วเทในเพลทพลาสติกขนาด 10 มล. เลี้ยงไว้นาน 2 วัน จึงทำการเลือกเอาชิ้นเซลล์ท่อนำไข่ (oviductal aggregates) เลี้ยงร่วมกับตัวอ่อน สำหรับในกรณีใช้เซลล์บุท่อนำไข่ชนิดชั้นเดียว (oviductal monolayers) ก็ดำเนินวิธีการเช่นเดียวกันกับวิธี

ข้างต้น ยกเว้นก่อนปั่นล้างต้องทำให้เซลล์แยกจากกันโดยใช้ไซริงค์ดูดเซลล์พร้อมน้ำยาและให้ผ่านรูเข็มเบอร์ 22 หลาย ๆ ครั้ง เลี้ยงเซลล์ในถาด 4 หลุม นาน 2 วัน ก่อนนำตัวอ่อนมาเลี้ยงร่วมต้องทำการเปลี่ยนน้ำยาและเซลล์ที่ตายออกก่อน

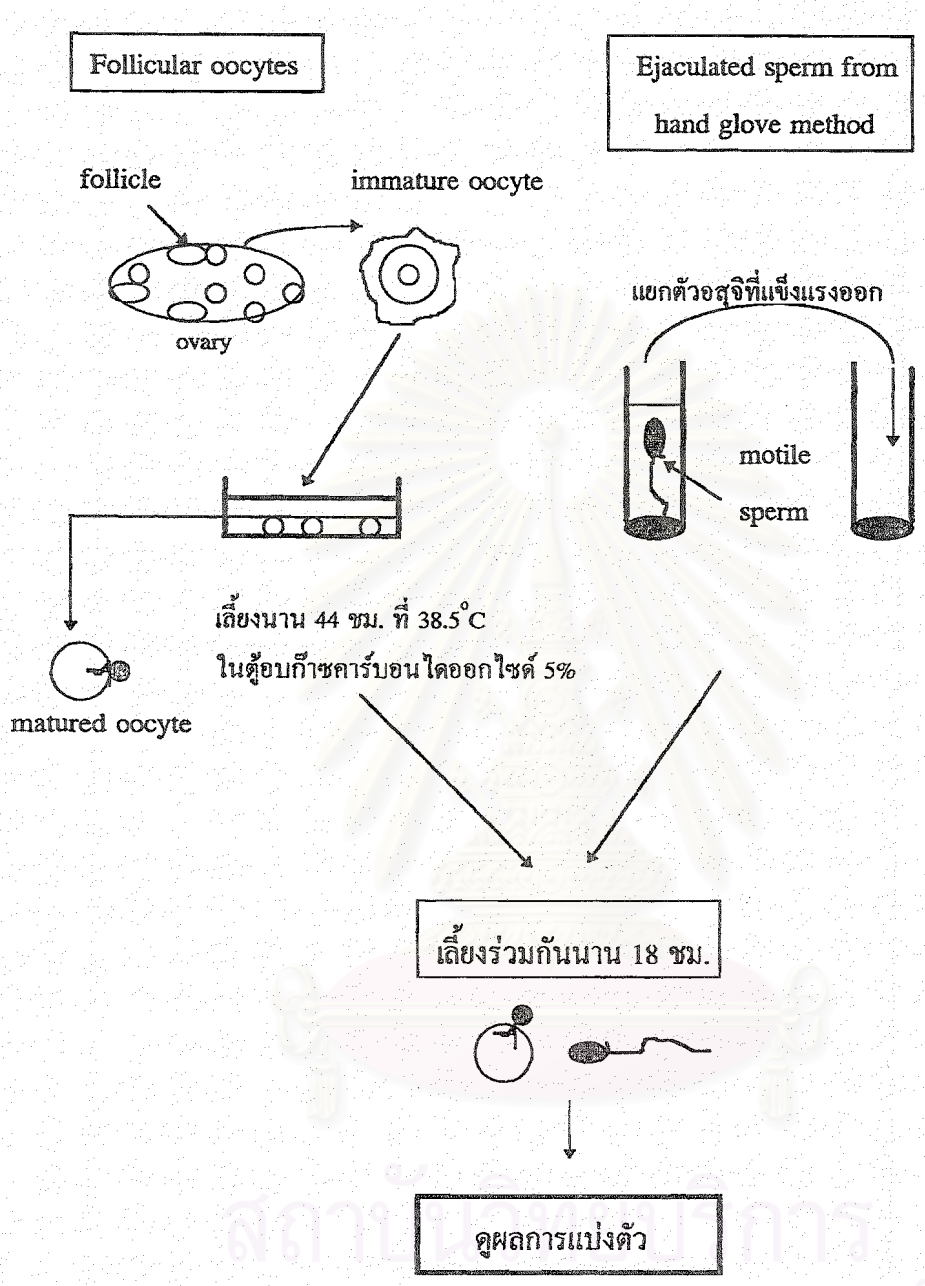
การเลี้ยงตัวอ่อน

เลี้ยงตัวอ่อนหลังปฏิสนธิ 18 ชม. ในน้ำยา TCM 199 $NaHCO_3$+20% fetal calf serum ร่วมกับเซลล์ของท่อบุท่อนำไข่ โดยใช้แผ่นของท่อบุท่อนำไข่ (oviductal aggregates) หรือเซลล์บุท่อนำไข่ (oviductal cells) ดังที่เตรียมด้วยวิธีการข้างต้น ภายใต้สภาวะเช่นเดียวกับการเลี้ยงโอโอไซต์ ตรวจการพัฒนาของตัวอ่อนหลังเลี้ยงนาน 5 วัน ขั้นตอนของการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกรแสดงในรูปที่ 2

การวิเคราะห์ข้อมูล

คำนวณอัตราการเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ และอัตราการพัฒนาของตัวอ่อน จากจำนวนโอโอไซต์เริ่มต้นที่เลี้ยงไว้ เปรียบเทียบอัตราดังกล่าวในกลุ่มทดลองต่าง ๆ ด้วยการทดสอบแบบ Student's t test และเปรียบเทียบอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนเป็นระยะต่าง ๆ คือ 2 ,4, 8-16 เซลล์ ในกลุ่มการทดลองต่าง ๆ โดยคิดจากฐานจากจำนวนตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2 ไดอะแกรมแสดงขั้นตอนการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกร

ผล

<u>การทดลองที่ 1</u>

ผลของการเลี้ยงโอโอไซต์ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กับอัตราการเกิดเมตาเฟส ทู พบว่า ที่ 24 ชม. มีอัตราต่ำที่สุดเท่ากับ 10.3%(3/29) ($p<0.01$) ในขณะที่เมื่อเลี้ยงไว้นาน 40 และ 48 ชม. ให้อัตราที่ไม่แตกต่างกันเท่ากับ 67.6%(23/34) และ 70.6%(24/34) ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 อัตราการเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลองหลังเลี้ยงโอโอไซต์นาน 24 ,40 และ 48 ชม.

ระยะเวลาในการเลี้ยง	จำนวนโอโอไซต์	โอโอไซต์ระยะเมตาเฟส ทู (%)
24 ชม.	29	3(10.3%)[ก]
40 ชม.	34	23(67.6%)[ข]
48 ชม.	34	24(70.6%)[ข]

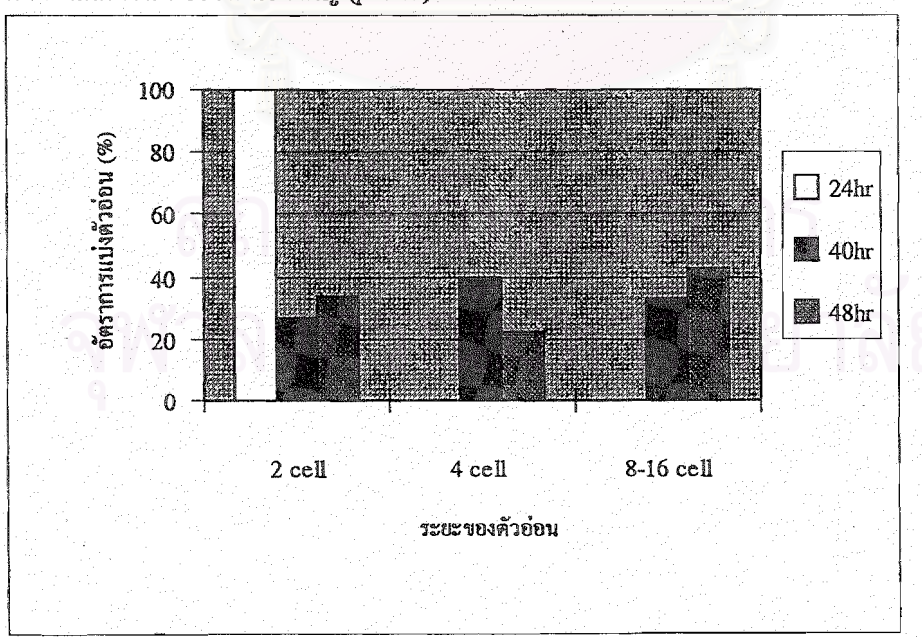
ก ข แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$)

ในส่วนที่เกี่ยวกับอัตราการแบ่งตัว (2-16 เซลล์) พบว่า อัตราการแบ่งตัวอ่อนในกลุ่มที่เลี้ยงนาน 24 ชม. แตกต่างกับกลุ่มที่เลี้ยงนาน 40 และ 48 ชม. ($p<0.05$) เท่ากับ 5% (6/121) เทียบกับ 45.5%(55/121) และ 37.6%(49/130) ตามลำดับ ตัวอ่อนที่ได้จากกลุ่มโอโอไซต์ 24 ชม. ทั้งหมดจะหยุดตัวที่ระยะ 2 เซลล์ ในขณะที่โอโอไซต์กลุ่มที่เลี้ยงนาน 40 และ 48 ชม. พัฒนาได้เป็นระยะ 4 ถึง 16 เซลล์ เท่ากับ 32.2%(39/121) และ 25.3%(33/131) (ตารางที่ 2, รูปที่ 3)

ตารางที่ 2 อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนจากโอโอไซต์ที่เลี้ยงนาน 24, 40 และ 48 ชม.

ระยะเวลาในการเลี้ยง	จำนวนโอโอไซต์	จำนวนตัวอ่อนที่แบ่งตัว ≥2 เซลล์ (%)	จำนวนตัวอ่อนระยะ 4-16 เซลล์ (%)
24 ชม.	121	6(5%)[ก]	0
40 ชม.	121	55(45.5%)[ข]	39(32.2%)
48 ชม.	130	49(37.6%)[ข]	33(25.3%)

ก ข แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)



รูปที่ 3 อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนระยะต่าง ๆ ของสุกรจากการปฏิสนธินอกร่างกายจากโอโอไซต์ที่เลี้ยงไว้นาน 24, 40 และ 48 ชม.

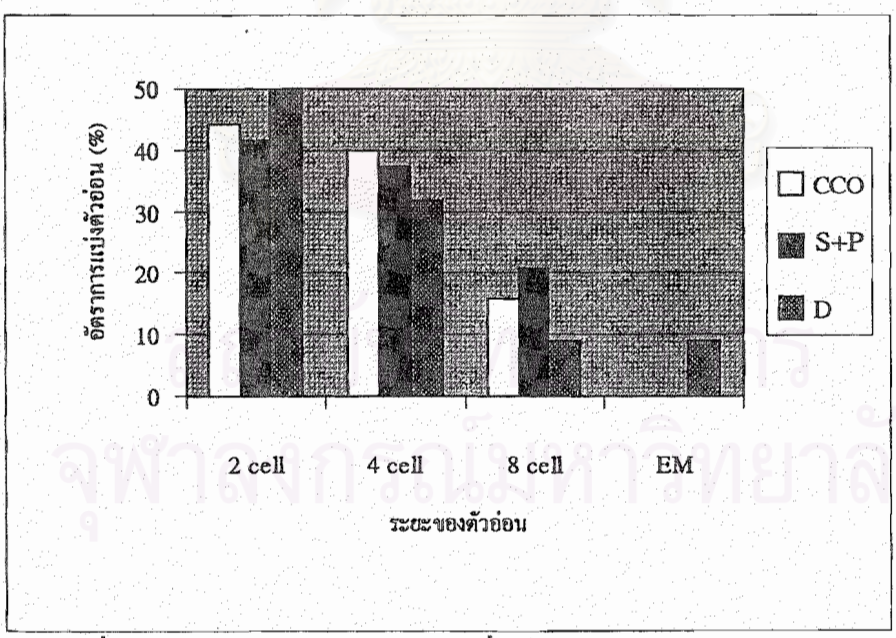
การทดลองที่ 2

ผลของชนิดของโอโอไซต์ต่ออัตราการแบ่งตัวในการปฏิสนธินอกร่างกาย พบว่าอัตราการแบ่งตัวจากระยะ 2-16 เซลล์ ในกลุ่ม denude ได้อัตราต่ำที่สุด เท่ากับ 19.6%(22/112) ($p<0.05$) เทียบกับอีก 2 กลุ่ม คือ single และ CCO เท่ากับ 31.6%(48/152) และ36.8%(50/136)และอัตราตัวอ่อนที่เจริญมากกว่าระยะ 2 เซลล์ ได้เท่ากับ 20.6%(28/136), 18.4%(28/152) และ 9.8% (11/112) ($p<0.05$) ในกลุ่มโอโอไซต์ชนิด CCO, S+P และ denude ตามลำดับ (ตารางที่ 3) อัตราส่วนของตัวอ่อนที่เจริญเป็นระยะต่าง ๆ ในโอโอไซต์ทั้งสามกลุ่มแสดงในรูปที่ 4

ตารางที่ 3 อัตราการแบ่งตัวของโอโอไซต์ชนิดต่าง ๆ

ชนิดของโอโอไซต์	จำนวนโอโอไซต์	จำนวนตัวอ่อนที่แบ่งตัว ≥2 เซลล์ (%)	จำนวนตัวอ่อนระยะ 4 เซลล์ - มอรูล่า (%)
CCO	136	50(36.8%)[ก]	28(20.6%)[ก]
S+P	152	48(31.6%)[ก]	28(18.4%)[ก]
Denude	112	22(19.6%)[ข]	11(9.8%)[ข]

ก ข แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)



รูปที่ 4 อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนที่ได้จากโอโอไซต์ชนิดต่าง ๆ

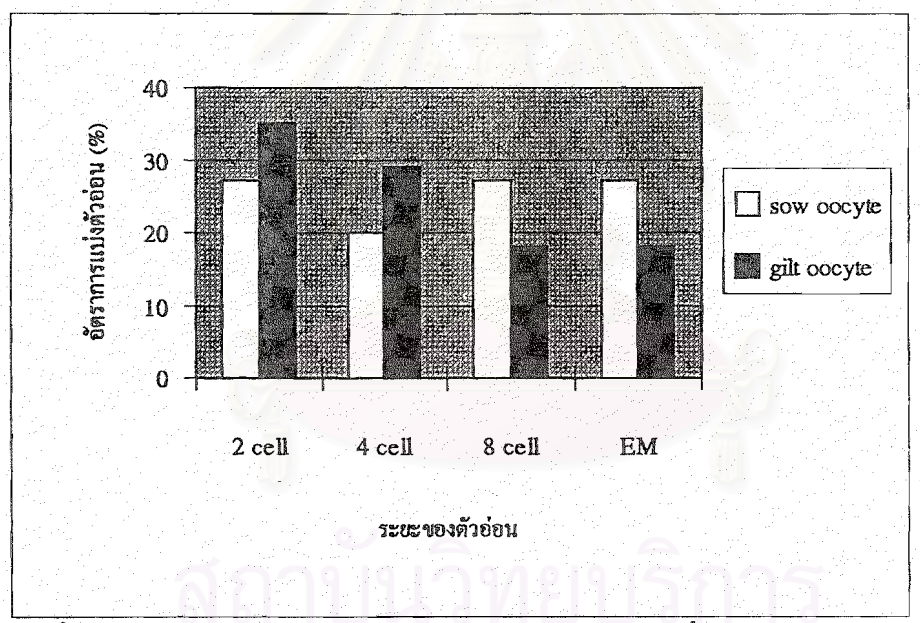
การทดลองที่ 3

จากตารางที่ 4 อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนจากโอโอไซต์ของแม่สุกรน้อยกว่าที่ได้รับจากรังไข่ของสุกรสาว 23.4%(30/128) เทียบกับ 48.1%(64/133) ($p<0.05$) โดยมีอัตราการแบ่งตัวมากกว่า 2 เซลล์เท่ากับ 17.1%(22/128) เทียบกับ 32.3%(43/133) ($p<0.05$, ตารางที่ 4) โอโอไซต์จากรังไข่ของแม่สุกรและสุกรสาวเจริญเป็นตัวอ่อนระยะต่าง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 5

ตารางที่ 4 อัตราการแบ่งตัวระหว่างโอโอไซต์จากรังไข่แม่สุกรเปรียบเทียบกับสุกรสาว

แหล่งของโอโอไซต์	จำนวนโอโอไซต์	จำนวนตัวอ่อนที่แบ่งตัว ≥2 เซลล์ (%)	จำนวนตัวอ่อนระยะ 4 เซลล์- มอรูล่า(%)
sow oocyte	128	30(23.4%)[ก]	22(17.1%)[ก]
gilt oocyte	133	64(48.1%)[ข]	43(32.3%)[ข]

ก ข แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)



รูปที่ 5 อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนระหว่างโอโอไซต์ที่เก็บได้จากรังไข่แม่สุกรและสุกรสาว

วิจารณ์

ความสำเร็จในการปฏิสนธินอกร่างกายส่วนหนึ่งขึ้นการเตรียมโอโอไซต์ จากการศึกษาพบว่าโอโอไซต์ในสุกรจำเป็นต้องเลี้ยงไว้นานอย่างน้อย 40-48 ชม. เพื่อให้เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ ซึ่งจะให้อัตราการแบ่งตัวอ่อนสูงสุด นอกนี้โอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบจะให้

อัตราความสำเร็จสูงสูง ในส่วนที่เกี่ยวกับแหล่งที่มาของโอโอไซต์พบว่าโอโอไซต์ที่เก็บจากรังไข่สุกรสาวหรือแม่สุกรมีความสามารถในการพร้อมปฏิสนธิและแบ่งตัวเช่นเดียวกัน

สุกรเป็นสัตว์ที่เหมาะสำหรับการศึกษาวิจัยทางการปฏิสนธินอกร่างกาย เนื่องจากยังมีสิ่งที่ต้องศึกษาอีกมาก เช่น ความสำเร็จในการปฏิสนธินอกร่างกายยังต่ำอยู่เมื่อเทียบกับในปศุสัตว์ชนิดอื่น ๆ โดยเฉพาะในโค ความแตกต่างอย่างหนึ่งคือ เวลาที่ใช้ในเลี้ยงโอโอไซต์จากระยะที่ยังไม่เจริญ (immature) จนถึงระยะที่เจริญพร้อมปฏิสนธิ (mature) แตกต่างกับในโคและกระบือ โดยมีรายงานว่าต้องใช้เวลานานถึง 48 ชม. (Hunter, 1990) ในขณะที่ในโคและกระบือ ใช้เวลาประมาณ 24 ชม. ผลของการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานข้างต้น เนื่องจากอัตราการเกิด maturation และการแบ่งตัวในกลุ่มที่เลี้ยงไว้นาน 40-48 ชม. อยู่ในอัตราที่สูงโดยทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่หากเลี้ยงโอโอไซต์เพียง 24 ชม. ในหลอดทดลองจะให้อัตราที่ต่ำเพียง 10% เท่านั้น โดยพบว่าโครโมโซมของโอโอไซต์ที่เลี้ยงไว้ 24 ชม. ยังคงอยู่ในระยะ GV (Germinal Vesicle) หรือเลยระยะนี้มาเล็กน้อยโดยสังเกตเห็นโครโมโซมระยะเมตาเฟส วัน ซึ่งบางโอโอไซต์ยังมีผนังเซลล์ล้อมรอบอยู่ การทดลองนี้สอดคล้องกับข้อมูลของ Yoshida และคณะ(1989) อัตราส่วนของโอโอไซต์ในฟอลลิเคิลที่เข้าสู่ระยะเมตาเฟส ทู จะเพิ่มขึ้นหลังฉีดฮอร์โมน เอส ซี จี ไปแล้ว 36 ชม. ในหลอดทดลอง Wang และคณะ (1994) พบว่าในสุกรเซลล์คิวมูลัสรอบ ๆ เปลือกของโอโอไซต์จะเริ่มกระจายตัวเล็กน้อยเมื่อเลี้ยงไว้ในช่วง 6 ชม. แรก และปานกลางประมาณ 24 ชม. และเต็มที่เมื่อเลี้ยงไว้ 36 ชม. ลักษณะของการกระจายของเซลล์คิวมูลัสดังกล่าวพอบ่งชี้ได้ถึงอัตราการเกิด maturation ลักษณะดังกล่าวสอดคล้องกับเมื่อนำโอโอไซต์มาย้อมสีในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ หลังเลี้ยงในหลอดทดลอง โดยมีเพียง 2% ของโอโอไซต์ที่เลี้ยงไว้นาน 24 ชม. ที่เจริญถึงระยะเมตาเฟส ทู และอัตราดังกล่าวจะเพิ่มเป็น 70% ที่ 36 ชม. ข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่าโอโอไซต์สุกรต้องใช้เวลาอย่างน้อย 36 ชม. ที่จะพัฒนาเป็นระยะเมตาเฟส ทู การเกิดสภาวะไม่พร้อมปฏิสนธิเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงโอโอไซต์ไม่พอเพียงอธิบายได้ถึงความล้มเหลวในการปฏิสนธิและการพัฒนาของตัวอ่อน โดยดูได้จากผลของการนำโอโอไซต์กลุ่มที่เลี้ยงไว้เพียง 24 ชม. มาปฏิสนธินอกร่างกายก็ให้อัตราปฏิสนธิเพียง 5% เท่านั้น เนื่องจากโอโอไซต์ยังไม่พร้อมที่จะรับการปฏิสนธิจากตัวอสุจิ การศึกษานี้สอดคล้องกับการทดลองของ Eng และคณะ (1986); Vajta และคณะ (1991) รวมทั้งของงานวิจัยของคณะผู้วิจัยเอง (Techakumphu *et al*., 1993) อย่างไรก็ตามข้อมูลนี้แตกต่างจากข้อมูลของ Wang และคณะ (1992) โดยพบว่าอัตราการแบ่งตัวเป็นระยะ 2-4 เซลล์ในสุกรนั้นสูงสุดเมื่อเลี้ยงโอโอไซต์ นาน 32-36 ชม. เมื่อเทียบกับกลุ่มที่เลี้ยงนาน 24-28 ชม. และ 40-42 ชม. โดยได้อัตราการแบ่งตัว (2-4 เซลล์) สูงสุด เท่ากับ 31.16% ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนชนิด m-TCM 199 และเท่ากับ 22.5% สำหรับน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนชนิด m-KRB

ชนิดของโอโอไซต์นั้นมีส่วนเกี่ยวข้องต่ออัตราความสำเร็จในการปฏิสนธินอกร่างกาย จากการศึกษานี้พบว่าโอโอไซต์ชนิด CCO จะให้อัตราการแบ่งตัวสูงสุด รองลงมาคือชนิด S+P ซึ่งสูงกว่าโอโอไซต์ที่ไม่เซลล์หุ้มเลย (ชนิด D) ที่มีเพียง 20% เท่านั้น การที่อัตราการแบ่งตัวของโอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มไม่มากชั้นน้อยกว่าชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มหลายชั้น อาจเนื่องจากโอโอไซต์ชนิด S+P เป็นโอโอไซต์ที่เก็บมาจากฟอลลิเคิลขนาดเล็กกว่าชนิด CCO เพราะตามปกติขณะที่ฟอลลิเคิลกำลังเจริญ ชั้นของเซลล์คิวมูลัสก็หนาตัวตามไปด้วย ในระยะเวลาเดียวกับการเจริญของโอโอไซต์ ดังนั้นเป็นไปได้ว่าโอโอไซต์ชนิด CCO น่าจะสมบูรณ์มากกว่าชนิด S+P อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติไม่สามารถเลือกโอโอไซต์ชนิด CCO เท่านั้น เพราะมีเพียง 20% ในขณะที่ชนิด S+P พบได้มากกว่าถึง 2 เท่า (Techakumphu *et al.*, 1993) Kikuchi และคณะ (1993) พบว่าโอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสและเซลล์กรานูโลซ่าล้อมรอบหรือปะปนในน้ำยาขณะทำการปฏิสนธินอกร่างกายจะช่วยให้ตัวอสุจิเจาะผ่านโอโอไซต์ได้ง่ายขึ้น และมีการสร้างโปรนิวเคลียสในไซโตพลาสซึ่มของโอโอไซต์ได้มากกว่าโอโอไซต์ที่ไม่มีเซลล์ดังกล่าวหุ้มอยู่ซึ่งการศึกษาในโคก็ให้ผลเช่นเดียวกัน โดยโอโอไซต์ที่มีเซลล์หุ้มรอบจะให้อัตราการพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสสูงสุด (Molchizuki *et al.*, 1991) นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการเกิด polyspermy ลดลงเนื่องจากเซลล์คิวมูลัสจะเป็นตัวกรอง (barrier) กั้นไม่ให้ตัวอสุจิเข้าไปมากเกินไป การทดลองของ Wang และคณะ (1994) พบว่าอัตราการเจาะไข่ (penetration) ของตัวอสุจิจะสูงถึง 69-84% เมื่อใช้โอโอไซต์ที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้ม (cumulus-free oocyte) เริ่มตั้งแต่เลี้ยงโอโอไซต์จาก 0 ชม. มีการเจาะของตัวอสุจิถึง 77% และ 6 ชม. ต่อมาประมาณ 70% และจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเวลาการเลี้ยงโอโอไซต์เพิ่มมากขึ้น เทียบกับในช่วง 0-6 ชม. แรกสำหรับโอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้ม (cumulus intact oocyte) จะมีการเจาะไข่น้อยมากกว่า 30% ข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์คิวมูลัสมีหน้าที่ป้องกันและกรองตัวอสุจิมิให้เข้าไปมากเกินไป นอกจากนี้รายงานนี้ยังแสดงให้เห็นว่าโอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสกระจายตัวอย่างดีรอบ ๆ เปลือกตัวอ่อนหลังเลี้ยงให้เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ ช่วยให้เกิดการพัฒนาของ male และ female pronuclei ได้อย่างปกติและอยู่ในระดับสูง โดยเป็นไปได้ว่าเซลล์คิวมูลัสดังกล่าวช่วยให้เกิดการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิดีขึ้นและยังช่วยรักษาคุณภาพของตัวโอโอไซต์ให้อยู่ในสภาวะพร้อมปฏิสนธิได้ การทดลองในโคพบว่าเซลล์คิวมูลัสมีส่วนช่วยให้ตัวอสุจิเคลื่อนไหวเข้าเจาะไซโตพลาสซึ่มของโอโอไซต์ได้ดีขึ้น โดยพบว่าอัตราการปฏิสนธิในโอโอไซต์กลุ่ม CCO จะสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม Denude oocyte รวมทั้งหากเมื่อนำเอาโอโอไซต์ที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มนี้เลี้ยงร่วมกับเซลล์คิวมูลัสที่แยกออกมา (isolated cumulus cells) จะเพิ่มอัตราการปฏิสนธิเมื่อเทียบกับโอโอไซต์ชนิดเดียวกันที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับเซลล์คิวมูลัส แต่ทั้งนี้ทั้งนั้นสภาวะของเซลล์คิวมูลัสจะเกี่ยวข้องด้วย โดยหากเป็น mature cumulus cells จะให้อัตราสูงกว่า immature cumulus cells (Saeki *et al.*, 1994) ส่วนเหตุผลนอกจากนี้ยังมีข้อสันนิษฐานอีกประการหนึ่งว่าตัวอสุจิจะเกิดกระบวนขั้นสุดท้ายของกระบวนการ

capacitation และ acrosome reaction ซึ่งจำเป็นสำหรับการปฏิสนธิอย่างยิ่ง ขณะผ่านชั้นคิวมูลัส ผลทำให้อัตราการปฏิสนธิดีขึ้น ซึ่ง Saeki และคณะ (1994) เสนอแนะว่าเซลล์คิวมูลัสไม่น่าจะช่วยให้ตัวอสุจิโคเกิดกระบวนการ capacitation และ acrosome reaction แต่น่าจะเกี่ยวกับการผ่านของตัวอสุจิเข้าไปในชั้น zona pellucida พร้อม ๆ กับการเกิด acrosome reaction โดยเซลล์คิวมูลัสในสภาวะที่มีฮอร์โมน เอฟ เอส เอช และฮอร์โมน แอล เอช อยู่ด้วยจะสังเคราะห์สารพิเศษ (factors) ที่ช่วยในการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ นอกจากเหตุผลอธิบายผลดังกล่าวข้างต้นแล้วพบว่าการที่โอโอไซต์ที่ไม่เซลล์หุ้มรอบให้อัตราต่ำสุดในการแบ่งตัวของตัวอ่อนนั้นเนื่องจากโอโอไซต์ชนิดนี้มักเป็นโอโอไซต์ที่เก็บได้จากฟอลลิเคิลที่กำลังเสื่อมสลายซึ่งมีผลต่อการขาดสารอาหารต่อโอโอไซต์และยังพบว่ามีโอโอไซต์จำนวนหนึ่งที่เป็นชนิด Denude และเซลล์ไซโตพลาสซึ่มเสื่อมสลายไปด้วย

ในส่วนของแหล่งที่มาของโอโอไซต์ พบว่าโอโอไซต์ที่เก็บมาจากแม่สุกรมีความสามารถในการปฏิสนธิเช่นเดียวกับโอโอไซต์ที่เก็บจากรังไข่ของสุกรสาว ในทางปฏิบัติรังไข่ของสุกรสาวจะเป็นแหล่งโอโอไซต์หลักในการทดลองนี้ เนื่องจากมีความสะดวกในการเก็บรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์ ซึ่งมีประชากรของสุกรสาวขุนส่งโรงฆ่าเป็นส่วนใหญ่ รวมทั้งปริมาณของโอโอไซต์ที่ได้จะสูงกว่า เนื่องจากมีประชากรของฟอลลิเคิลชนิด growing มากกว่ารวมทั้งอัตราการเก็บได้ก็มากกว่าด้วย (Techakumphu *et al*., 1993) ยังไม่มีการศึกษาเปรียบเทียบมาก่อนสำหรับแหล่งที่มาของโอโอไซต์ การศึกษาในโคพบว่ามีความแตกต่างระยะหว่างโอโอไซต์ที่เก็บมาจากแม่โคแต่ละตัว อย่างไรก็ตามไม่พบว่ามีความแตกต่างของอัตราการเจาะของตัวอสุจิในไซโตพลาสซึ่มและอัตราการปฏิสนธิ (Leibfried-Rutledge *et al*., 1985) แต่พบว่ามีอิทธิพลของช่วงระยะเวลาของวงจรการเป็นสัดต่ออัตราการพัฒนาของตัวอ่อนหลังทำการปฏิสนธินอกร่างกาย (Machatkova *et al*., 1991) โดยโอโอไซต์ที่เก็บจากรังไข่ที่อยู่ในช่วงลูเทียลจะมีอัตราความสำเร็จสูงกว่าในช่วงฟอลลิคูล่าร์ ในการเก็บรังไข่แม่สุกรนั้นจะพบรังไข่ชนิดต่าง ๆ ทั้งรังไข่ที่ผิดปกติ (รังไข่ไม่ทำงาน รังไข่เป็นถุงน้ำ) ซึ่งมักเป็นปัจจัยในการคัดทิ้งแม่สุกรเนื่องจากการไม่เป็นสัด รังไข่ประเภทนี้ไม่ได้นำมาใช้ในการทดลอง นอกจากนี้ยังพบรังไข่ในระยะต่าง ๆ ของช่วงวงจรการเป็นสัด ทั้งเพิ่งตกไข่หรือใกล้ตกไข่โดยมีฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ ประมาณ 10 มม. รังไข่ดังกล่าวยังสามารถใช้ในการทดลองเนื่องจากมีฟอลลิเคิลขนาดเล็ก ๆ อยู่บ้าง ส่วนฟอลลิเคิลที่ใกล้ไข่ตกจะไม่ใช้เนื่องจากจะได้โอโอไซต์ที่ใกล้ mature โดยมีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบแบบแผ่กระจาย ได้มีการทดลองตรวจสอบชนิดของโอโอไซต์ที่เก็บจากสุกรสาวหลังเป็นสัดครั้งแรกและสามครั้งโดยดูระยะของโครโมโซม พบว่าในกลุ่มสุกรสาวที่เพิ่งเป็นสัดครั้งแรกจะมีโอโอไซต์ที่มีโครโมโซมที่ยังคงอยู่ในระยะ immature มากกว่ากลุ่มสุกรสาวที่เคยเป็นสัดมาแล้วหลายครั้ง นอกจากนี้ยังอาจอธิบายได้ในส่วนที่เกี่ยวกับกับคุณภาพของโอโอไซต์จากการเป็นสัดครั้งแรกมีความผิดปกติสูงกว่าเป็นสัดมาแล้วสามครั้ง (Koenig and Stormshak, 1993) จากการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่สุกรสาวก็พบว่ามี

โอโอไซต์ชนิดที่ไม่มีเซลล์หุ้มรอบ (denude oocyte) มากถึง 40% เมื่อเทียบกับในแม่สุกรที่พบเพียง 23% (Techakumphu *et al.*, 1993) โอโอไซต์ดังกล่าวให้อัตราการปฏิสนธิที่ต่ำดังการทดลองในเรื่องของชนิดโอโอไซต์ อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้พบว่าโอโอไซต์ของสุกรสาวมีอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนที่ดีกว่าโอโอไซต์จากรังไข่ของแม่สุกร อาจเนื่องจากมีการคัดเลือกโอโอไซต์ก่อนการทดลองโดยเลือกเอาเฉพาะที่ดีเท่านั้นหรืออาจเนื่องจากโอโอไซต์จากรังไข่ของแม่สุกรมีความผิดปกติทางโครโมโซม ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาในรายละเอียดเพิ่มเติม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 20169246

บทที่ 2

ปัจจัยของการเตรียมตัวอสุจิต่อการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกร

บทนำ

แหล่งของตัวอสุจิที่ใช้ในการทำการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกรมาจาก 2 แหล่งด้วยกัน คือ ตัวอสุจิที่เก็บจากท่ออิปิดิไดมีสส่วนปลาย (cauda epididymis) และตัวอสุจิจากการรีดน้ำเชื้อ (ejaculation) ตัวอสุจิปกติจะถูกสร้างในลูกอัณฑะและถูกส่งออกมาทางท่อ ductus deferens เข้าไปในท่ออิปิดิไดมีสส่วนต้น (caput) ส่วนกลาง (corpus) และส่วนปลาย (cauda) ก่อนที่จะถูกหลั่งออกมาจากท่ออิปิดิไดมีสทางท่อ vas deferens ตัวอสุจิที่ออกจาก semineferous tubule ของลูกอัณฑะจะอยู่ในลักษณะไม่เคลื่อนไหว (non motile) และยังไม่สามารถปฏิสนธิได้ ความสามารถในการปฏิสนธิจะเกิดในช่วงที่ตัวอสุจิผ่านท่ออิปิดิไดมิส ซึ่งในสุกรต้องใช้เวลาประมาณ 9-14 วัน โดยมีการเปลี่ยนแปลงในระดับนิวเคลียส ผนังหุ้มตัวอสุจิ และส่วนประกอบทางชีวเคมี การเปลี่ยนแปลงนี้จะมีผลต่อความสามารถในการเจาะเข้าปฏิสนธิกับไซโตพลาสซึ่มของโอโอไซต์ และความทนทานต่อการขนส่งและการเก็บรักษาตัวอสุจิขณะอยู่ในตัวสัตว์ ตัวอสุจิที่พร้อมปฏิสนธิจะถูกเก็บในส่วน cauda epididymis เพื่อสำรองไว้ ตัวอสุจิเมื่อผ่านออกจากท่ออิปิดิไดมีสจะปะปนกับน้ำเลี้ยงเชื้อจากต่อมต่าง ๆ ที่อยู่รอบ ๆ ท่อทางเดินสืบพันธุ์เพศผู้ และเมื่อหลั่งออกมาจะมีปริมาณมากประมาณ 250-300 มล. ตัวอสุจิดังกล่าวจะเรียกว่า "ejaculated sperm" ได้มีการศึกษาในสุกรพบว่าตัวอสุจิที่ได้จากการหลั่งน้ำเชื้อ (ejaculation) จะมีความสามารถปฏิสนธิน้อยกว่าจากตัวอสุจิจากที่เก็บจากท่ออิปิดิไดมีส (Nagai *et al*., 1984) แต่อย่างไรก็ตามในการศึกษาเบื้องต้นของการปฏิสนธินอกร่างกายโดย Techakumphu และคณะ (1993) ได้ใช้ตัวอสุจิจากการหลั่งน้ำเชื้อ พบว่าได้ผลในการพัฒนาของตัวอ่อนประมาณ 30% ซึ่งก็ใกล้เคียงกับที่ได้จากการใช้ตัวอสุจิจากท่ออิปิดิไดมีส จุดประสงค์ข้อแรกของงานวิจัยในปัจจัยที่เกี่ยวกับตัวอสุจิเพื่อศึกษาการเพิ่มอัตราความสำเร็จในการปฏิสนธินอกร่างกาย โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างตัวอสุจิที่เก็บจากท่ออิปิดิไดมีสส่วนปลายและที่หลั่งออกมา

ในการปฏิสนธินอกร่างกายจำเป็นต้องรักษาชีวิตของตัวอสุจิเพื่อให้อยู่พอที่จะปฏิสนธิกับโอโอไซต์ ระยะเวลาในการเลี้ยงตัวอสุจิก่อนจะทำการปฏิสนธินอกร่างกายประมาณ 4 ชม. ซึ่งใกล้เคียงกับที่รายงานว่าตัวอสุจิต้องใช้เวลาอย่างน้อย 5-6 ชม. หลังผสมในการที่จะเพิ่มความสามารถในการปฏิสนธิ (capacitation process) ระยะเวลาดังกล่าวมากกว่าในโคประมาณ 4 เท่าตัว ระยะเวลาดังกล่าวจะมีผลอย่างมากต่อการเคลื่อนไหวและการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิเมื่อนำไป

ปฏิสนธิกับโอโอไซต์ โดยตัวอสุจิมีการเคลื่อนไหวช้าลงและมักมีตัวตายมากกว่าเมื่อเริ่มต้นก่อน swimup (สังเกตส่วนตัว) ซึ่งอาจมีผลต่ออัตราการปฏิสนธิได้ ดังนั้นจุดประสงค์ข้อที่สองของงานทดลองในส่วนนี้คือการศึกษาระยะเวลาของการเลี้ยงตัวอสุจิในช่วงขั้นตอน swimup ต่อการปฏิสนธินอกร่างกายเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในอัตราความสำเร็จในการปฏิสนธินอกร่างกายสุกร

นอกจากปัจจัยทั้งสองดังกล่าวข้างต้น เป็นที่ทราบกันดีว่าตัวอสุจิของสุกรจะมีความไวต่อสภาพแวดล้อมภายนอก และมักตายหลังจากทิ้งไว้นอกร่างกายเร็วกว่าเมื่อเทียบกับสัตว์เศรษฐกิจอื่น ๆ เช่น โค เป็นต้น การศึกษาของ Techakumphu และคณะ (1993) แสดงให้เห็นว่าการเจือจางตัวอสุจิสุกรด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่มีสารอาหารอยู่ในขณะเตรียมตัวอสุจิในขั้นตอนการคัดตัวอสุจิที่แข็งแรง (swimup) จะสามารถเพิ่มอัตราการปฏิสนธิได้ นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นแตกต่างจากรายงานทั่วไปในงานวิจัยด้านการปฏิสนธินอกร่างกายสุกร ตัวอสุจิสุกรสามารถเจาะโอโอไซต์และปฏิสนธิในน้ำยาปฏิสนธิที่ประกอบด้วยสารเร่งการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ (sperm motility-stimulating agent) ชนิด PHE (Penicillamine, Hypotaurine, Epinephrine) เช่นเดียวกับที่ใช้ในวิธีปฏิสนธินอกร่างกายในโค ในขณะที่รายงานอื่น ๆ ใช้สาร caffeine เป็นสารเร่งการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ รายงานในการปฏิสนธิโคพบว่าหากเติมสารดังกล่าวอย่างใดอย่างหนึ่งในน้ำยาปฏิสนธิจะช่วยเพิ่มจำนวนตัวอสุจิที่ผ่าน acrosome reaction และยังพบว่าเพิ่มการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิทำให้เจาะโอโอไซต์ได้ดีขึ้น (Leibfried and Bavister, 1981; Meizel and Working, 1980) จนถึงปัจจุบันยังไม่มีรายงานเปรียบเทียบระหว่างสาร PHE และ caffeine ในการปฏิสนธิในสุกร ดังนั้นจุดประสงค์ข้อที่สามของการทดลองนี้เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในน้ำยาปฏิสนธิที่มีส่วนประกอบของสาร PHE หรือสาร caffeine

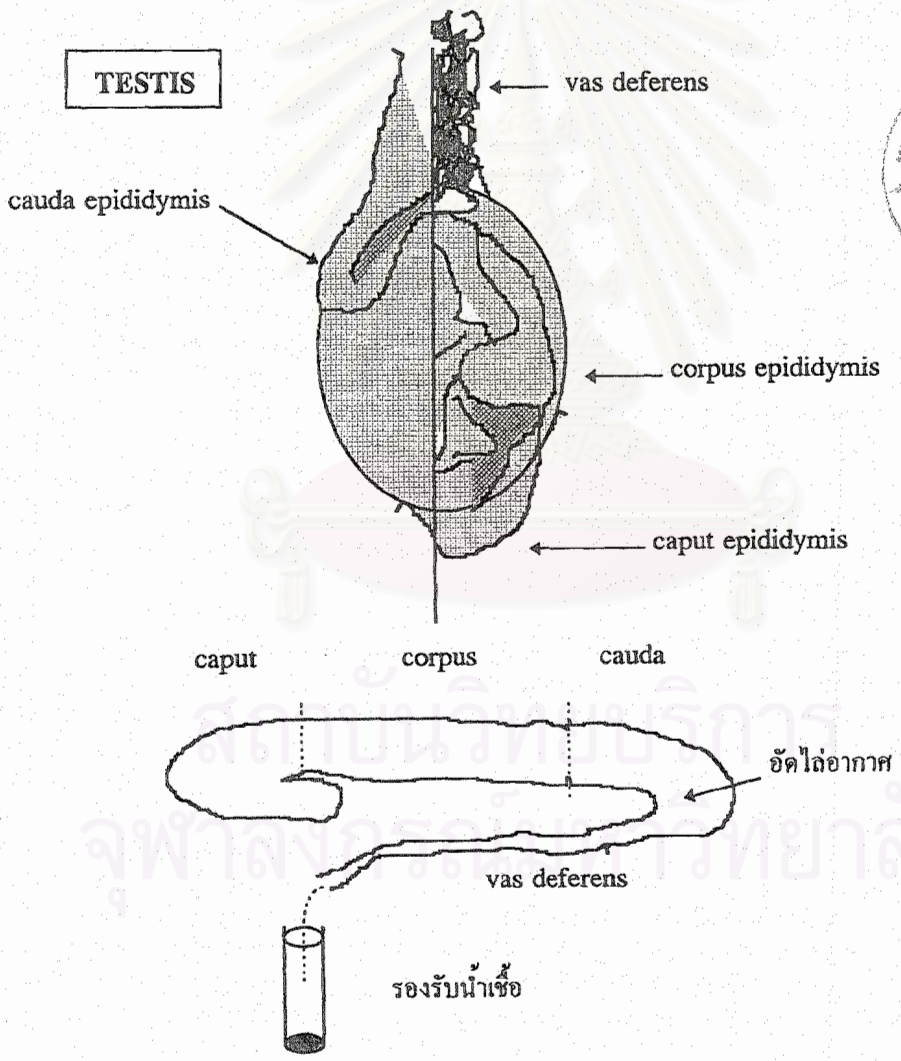
อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บน้ำเชื้อ

ในการทดลองที่ 1 2 และ 3 ใช้น้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ (BOAR A) โดยรีดน้ำเชื้อจากพ่อสุกรพันธุ์แลนเรซ อายุประมาณ 15 เดือน ที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพและการผสมติด (fertility test) แล้ว ทำการรีดด้วยมือ (hand-glove method) และเลือกเอาเฉพาะส่วนที่มีตัวอสุจิมาก (sperm rich fraction) โดยเป็นส่วนที่หลั่งออกมาเป็นส่วนที่สองหลังจากหลั่งน้ำเชื้อ ประมาณ 2-3 นาที น้ำเชื้อจะมีลักษณะข่นข้นขาว ทำการกรองน้ำเชื้อด้วยผ้าก๊อซที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เก็บน้ำเชื้อไว้ประมาณ 10 มล. หุ้มกระดาษรอบภาชนะเพื่อป้องกันแสงระหว่างนำจากจุดรีดน้ำเชื้อมายังห้องปฏิบัติการ นำน้ำเชื้อมาเตรียมเพื่อทำการปฏิสนธินอกร่างกาย ประมาณ 5 นาทีหลังรีดน้ำเชื้อ

ในการทดลองที่ 1 เปรียบเทียบอัตราการปฏิสนธิและการแบ่งตัวระหว่างตัวอสุจิที่เก็บจากท่ออิปิดิไดมีส และจากน้ำเชื้อชนิดหลั่งออกมา โดยน้ำเชื้อที่เก็บจากท่ออิปิดิไดมีสนั้นใช้พ่อสุกรทั้งหมด 4 ตัว คือ (BOAR B, C, D และ E) เก็บน้ำเชื้อจากท่ออิปิดิไดมีสโดยการนำลูกอัณฑะ

ที่เก็บจากพ่อพันธุ์หลังฆ่าทันทีจากโรงฆ่าสัตว์ท้องถิ่น จ. นครปฐม จำนวน 4 ตัว แช่ลูกอัณฑะในน้ำอุ่นที่อยู่ในกระติกน้ำร้อนขณะขนส่งไปยังห้องปฏิบัติการ รายละเอียดของการเก็บน้ำเชื้อทำโดยเปิดผนังหุ้มลูกอัณฑะ (tunica albuginea) หาส่วนปลายของท่ออิปิดิไดมีสโดยสังเกตจากปลายของท่อ vas deferens ใช้กรรไกรเปิดผ่านผนังหุ้มท่ออิปิดิไดมีส จะพบท่ออิปิดิไดมีสขดไปมา เลือกเอาบริเวณที่ห่างจากต้นท่อ vas deferens ประมาณ 5 ซม. ใช้ไซริงค์ขนาด 10 มล. ต่อกับเข็มเบอร์ 19 บรรจุอากาศไว้ประมากณ 10 มล. แทงเข็มเข้าไปในท่ออิปิดิไดมิสและไล่อากาศออกจากปลายท่อ vas deferens ในทิศทางจากท่ออิปิดิไดมีสส่วน cauda ไปยัง vas deferens (ดังรูปที่ 6) ทำซ้ำกันประมาณ 2-3 ครั้งจนน้ำเชื้อไหลออกมา รองรับด้วยหลอดพลาสติกปลอดเชื้อ และนำมาเตรียมการเช่นเดียวกับน้ำเชื้อที่รีดจากพ่อพันธุ์



รูปที่ 6 ไดอะแกรมแสดงการเก็บน้ำเชื้อจากท่ออิปิดิไดมีส

การเตรียมน้ำเชื้อ

บรรจุน้ำเชื้อทั้งหมดที่เก็บได้ในหลอดพลาสติกขนาด 15 มล. และปั่นด้วยความแรง 600 g นาน 5 นาที ดูดเอาส่วนใสออกเหลือเฉพาะตะกอนตัวอสุจิประมาณ 1 มล. ทำการเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อชนิด BTS ในอัตราส่วน 1:1 เขย่าให้เข้ากัน และดูดน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วจำนวน 100 ไมโครลิตร ใส่ในก้นหลอดขนาด 2 มล. ที่มีน้ำยา capacitation pH 7.2 อยู่ น้ำยา capacitation ประกอบด้วยสาร PHE* (Penicillamine Hypotaurine Epinephrine) เป็นสารเร่งการเคลื่อนไหว (sperm stimulating-motility factors) เพื่อเตรียมตัวอสุจิแบบ swim up ดังวิธีการที่ Techakumphu และคณะ (1993) ได้เคยรายงานไว้ น้ำยาดังกล่าวเตรียมแล้วทิ้งให้ปรับสภาพความเป็นกรดเป็นด่าง และอุณหภูมิในตู้อบ 5% CO_2 นานอย่างน้อย 2 ชั่วโมงก่อนใส่น้ำเชื้อ นำหลอดที่มีตัวอสุจิทิ้งไว้ในตู้อบก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์นาน 1 และ 4 ชม. หลังจากนั้นดูดเอาส่วนใสตอนบนประมาณ 800 ไมโครลิตร และนำมาปั่นเอาตะกอนตัวอสุจิด้วยความเร็ว 600 g นาน 5 นาที แยกเอาเฉพาะส่วนตะกอนตัวอสุจิโดยดูดเอาส่วนใสด้านบนประมาณ 700 ไมโครลิตร ออก ดูดน้ำเชื้อ 5 ไมโครลิตร มาตรวจจำนวนตัวโดยผสมกับน้ำเกลือเข้มข้น 3% จำนวน 45 ไมโครลิตร ทำการนับสองครั้งแล้วหาค่าเฉลี่ย มาคำนวณและปรับความเข้มข้นของตัวอสุจิให้เท่ากับ $1x10^6$ ตัว/มล. เพื่อใช้ในการปฏิสนธิ

การเตรียมโอโอไซต์

ใช้โอโอไซต์จากรังไข่ของสุกรสาวทั้งหมด โดยมีวิธีการเตรียมที่ได้กล่าวไปแล้วในการศึกษาปัจจัยเกี่ยวกับโอโอไซต์ ใช้โอโอไซต์ทั้งหมดเท่ากับ 1,235 ใบ ในการทดลองทั้งสามการทดลอง โดยคัดเฉพาะที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มเท่านั้น (complex cumulus oocyte and single layers cumulus oocytes)

แบ่งการทดลองเป็น 3 การทดลองย่อย

1) ศึกษาถึงชนิดของตัวอสุจิต่อการปฏิสนธินอกร่างกาย

2) ศึกษาระยะเวลาในการเลี้ยงตัวอสุจิต่อการปฏิสนธินอกร่างกาย

3) ศึกษาผลของสารเร่งการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิต่อการปฏิสนธินอกร่างกาย

การปฏิสนธินอกร่างกาย

มีวิธีการเตรียมที่ได้กล่าวไปแล้วในการศึกษาปัจจัยเกี่ยวกับโอโอไซต์ (Techakumphu *et al.*, 1993)

<u>การทดลองที่ 1</u>

แบ่งโอโอไซต์เป็น 4 กลุ่ม จำนวน 400 โอโอไซต์ ตามชนิดของตัวอสุจิ และระยะเวลาในการเตรียมตัวอสุจิในขั้นตอนการ swimup ดังนี้

ชนิดของตัวอสุจิ	*ระยะเวลาในการ swimup*	*จำนวนโอโอไซต์*
Epididymal sperm	1 ชม.	70
Epididymal sperm	4 ชม.	143
Ejaculated sperm	4 ชม.	187

ปฏิสนธิโอโอไซต์กับตัวอสุจิอย่างใดอย่างหนึ่ง ในน้ำยา fertilization ที่มีส่วนประกอบของสาร PHE อยู่ เลี้ยงร่วมกันนานประมาณ 18 ชม. หลังจากนั้นลอกเอาเซลล์คิวมูลัสและตัวอสุจิที่ติดรอบ ๆ ด้วยการดูดโอโอไซต์เข้าออกหลายครั้งด้วยไปเปตที่มีขนาดเล็กกว่าโอโอไซต์เล็กน้อย (pipetting) หรือด้วยวิธีเขย่าในน้ำยา TCM 199 2.5 mMHepes (vortexing) หลังจากนั้นนำตัวอ่อนที่ได้เลี้ยงในน้ำยา TCM199 $NaHCO_3$ +20% fetal calf serum นาน 5 วัน ในตู้อบ 5% CO_2 ที่อุณหภูมิ 39°C ภายใต้ความชื้นสัมพัทธ์เต็มที่

<u>การทดลองที่ 2</u>

ใช้โอโอไซต์จำนวน 471 ใบ แยกเป็น 3 กลุ่ม ตามระยะเวลาในการเลี้ยงตัวอสุจิก่อนนำไปปฏิสนธิกับโอโอไซต์

กลุ่มที่ 1 เลี้ยงนาน 1 ชม. จำนวน 119 ใบ

กลุ่มที่ 2 เลี้ยงนาน 2 ชม. จำนวน 203 ใบ

กลุ่มที่ 3 เลี้ยงนาน 4 ชม. จำนวน 149 ใบ

หลังเลี้ยงเสร็จตามระยะเวลาทำการปฏิสนธิกับโอโอไซต์ตามวิธีการที่ได้กล่าวไปแล้วในข้างต้น

<u>การทดลองที่ 3</u>

เติมสาร PHE* (n=199) หรือ สาร caffeine* (n=165) ขนาดความเข้มข้น 2.0 M ในน้ำยา fertilization ในขณะที่เลี้ยงตัวอสุจินาน 4 ชม. หลังจากนั้นทำการปฏิสนธิกับโอโอไซต์ตามวิธีที่ได้กล่าวข้างต้น ใช้โอโอไซต์ทั้งหมด 364 ใบ

การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบในอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนในแต่ละกลุ่มด้วย Student's t test

---

*Sigma, USA

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผล

<u>การทดลองที่ 1</u>

จากผลการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างน้ำเชื้อชนิด epididymal และชนิด ejaculated พบว่าให้อัตราการแบ่งตัวหลังการปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน แม้จะใช้เวลาในการเลี้ยงตัวอสุจิ (swimup) 1 ชม. หรือ 4 ชม. ดังแสดงในตารางที่ 5

ในกลุ่มระยะเวลา swimup 1 ชม. epididymal sperm ของพ่อพันธุ์ B ให้อัตราการแบ่งตัวเท่ากับ 40%(24/60) และพ่อพันธุ์ C เท่ากับ 37.3%(31/83) เฉลี่ยเท่ากับ 38.5%(55/143) เทียบกับ ejaculated sperm ของพ่อพันธุ์ C เท่ากับ 35.7%(25/70) อัตราของตัวอ่อนที่แบ่งตัวมากกว่า 2 เซลล์ สำหรับ epididymal sperm เฉลี่ยเท่ากับ 28.3%(40/143) และอัตราการเจริญเป็นตัวอ่อนระยะมอรูล่าเฉลี่ย 4.2%(6/143) เทียบกับ ejaculated sperm เท่ากับ 22.9%(16/70) และ 4.3% (3/70) ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลการปฏิสนธินอกร่างกายระหว่างน้ำเชื้อจากท่ออิปิดิไดมีสเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อที่หลั่งออกมา

ระยะเวลาในการ swimup	ชนิดของตัวอสุจิ	พ่อสุกร	จำนวนโอโอไซต์	จำนวนตัวอ่อนที่แบ่งตัว(%)	จำนวนตัวอ่อนที่ > 2 เซลล์ (%)	จำนวนตัวอ่อนระยะมอรูล่า (%)
1 ชม.	Epididymal	B	60	24(40%)	17(28.3%)	3(5.0%)
		C	83	31(37.3%)	23(27.7%)	3(3.6%)
	ค่าเฉลี่ย		**143**	**55(38.5%)**	**40(28.0%)**	**6(4.2%)**
	Ejaculated	A	70	25(35.7%)	16((22.9%)	3(4.3%)
4 ชม.	Epididymal	D	97	31(31.9%)	17(17.5%)	6(6.2%)
		E	88	30(34.1%)	24(27.2%)	11(12.5%)
	ค่าเฉลี่ย		**187**	**61(32.6%)**	**41(21.9%)**	**17(9.1%)**

สำหรับในกลุ่มที่ swimup นาน 4 ชม. สำหรับ epididymal sperm พบว่าอัตราการแบ่งตัว อัตราการแบ่งตัวเป็นตัวอ่อนระยะมากกว่า 2 เซลล์ และตัวอ่อนระยะมอรูล่า เฉลี่ยเท่ากับ 32.6% (61/187) 21.9%(41/187) และ 9.1%(17/187) รายละเอียดของข้อมูลระหว่าง Boar D และ Boar E แสดงในตารางที่ 5

การทดลองที่ 2

จากตารางที่ 6 แสดงผลของระยะเวลาในการเลี้ยงตัวอสุจิในหลอดทดลองก่อนนำไปปฏิสนธิสนธิกับโอโอไซต์ ผลพบว่าอัตราการแบ่งตัวของตัวอสุจิที่เลี้ยง 1 ชม. สูงกว่าที่เลี้ยงไว้นาน 2 ชม. และ 4 ชม. เท่ากับ 41.2%(49/119) เทียบกับ 25.6%(52/203) และ 26.8%(40/149) ($p<0.01$) ตามลำดับ เช่นเดียวกับอัตราของตัวอ่อนที่เจริญมากกว่าระยะ 2 เซลล์ เท่ากับ 24.9% (35/119) เทียบกับ 19.7%(40/203) และ 18.1%(27/149) ตามลำดับ ส่วนอัตราการเจริญของตัวอ่อนระยะมอรูล่านั้นที่ 1 ชม. จะสูงกว่าที่ 2 ชม. ($p<0.05$) เท่ากับ 15.1%(18/119) เทียบกับ 10.3%(21/203) ส่วนที่ 4 ชม. ไม่แตกต่างจากที่ 1 ชม. เท่ากับ 13.4%(20/149) รายละเอียดของการเจริญเป็นตัวอ่อนระยะต่าง ๆ แสดงในรูปที่ 7

นอกจากนี้พบว่าอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนจะสูงกว่าในกรณีที่มีการเลี้ยงตัวอ่อนร่วมกับเซลล์บุท่อนำไข่ (co-culture) เปรียบเทียบกับการเลี้ยงแบบไม่มีเซลล์บุท่อนำไข่ร่วมด้วย (culture) ในทุกกลุ่มศึกษา (ตารางที่ 6, รูปที่ 8ก, 8ข)

ตารางที่ 6 ผลของระยะเวลาในการเลี้ยงตัวอสุจิต่ออัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อน

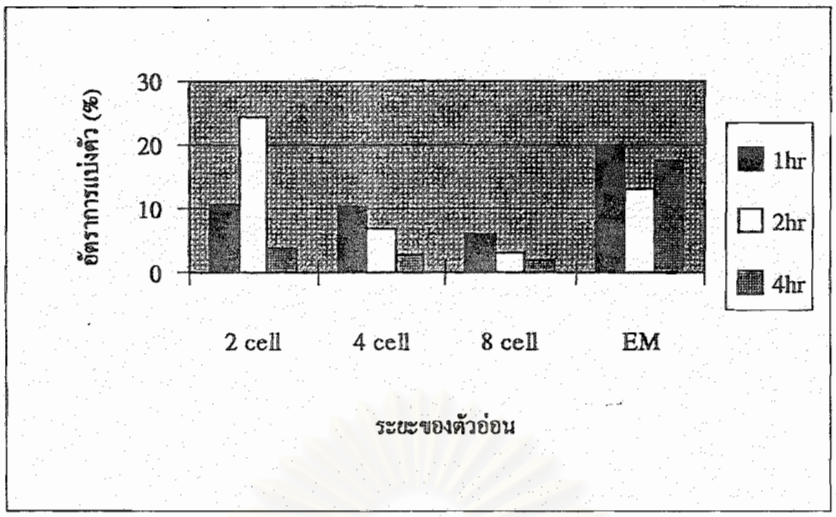
ระยะเวลาในการเลี้ยงตัวอสุจิ	สภาวะการเลี้ยง	จำนวนโอโอไซต์	จำนวนตัวอ่อนที่แบ่งตัว(%)	จำนวนตัวอ่อนที่ > 2 เซลล์ (%)	จำนวนตัวอ่อนระยะมอรูล่า (%)
1 ชม.	Co-culture	86	40(46.5%)[ก]	31(36.1%)[ก]	17(19.8%)[ก]
	Culture	33	9(27.2%)[ข]	4(12.1%)[ข]	1(3.0%)[ข]
	รวม	**119**	**49(41.2%)[ก]**	**35(29.4%)[ก]**	**18(15.1%)[ก]**
2 ชม.	Co-culture	162	45(27.7%)[ก]	37(22.8%)[ก]	21(13.0%)[ก]
	Culture	41	7(17.1%)[ข]	3(7.3%)[ข]	0[ข]
	รวม	**203**	**52(25.6%)[ง]**	**40(19.7%)[ง]**	**21(10.3%)[ข]**
4 ชม.	Co-culture	103	27(26.2%)	23(22.3%)[ก]	18(17.5%)[ก]
	Culture	46	13(28.3%)	4((8.7%)[ข]	2((4.3%)[ข]
	รวม	**149**	**40(26.8%)[ง]**	**27(18.1%)[ง]**	**20(13.4%)[ก]**

หมายเหตุ Co-culture = เลี้ยงร่วมกับเซลล์บุท่อนำไข่

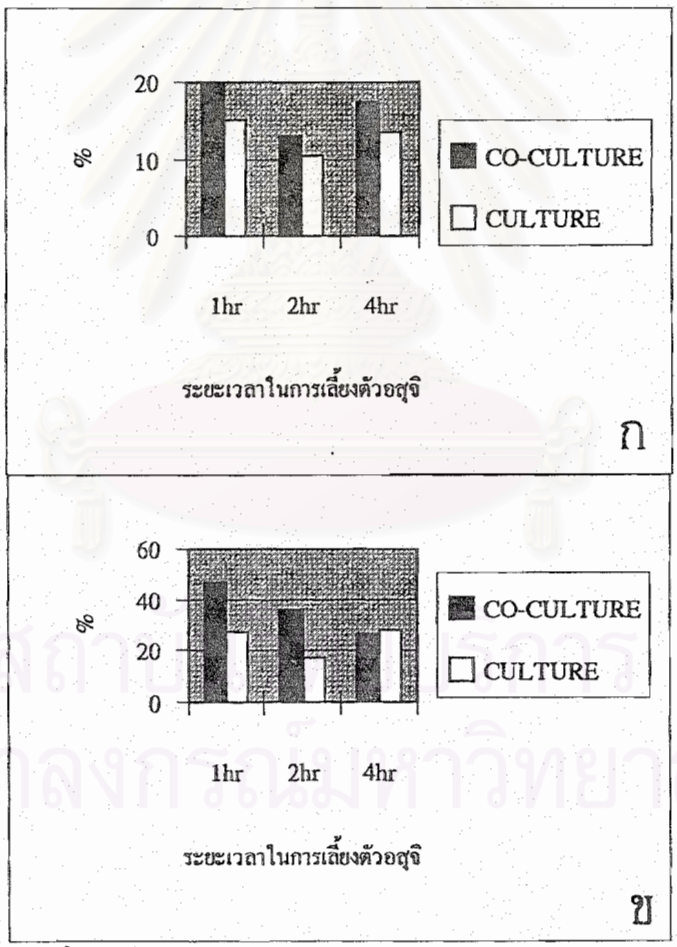
culture = ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับเซลล์บุท่อนำไข่

ก, ข แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ค, ง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$)



รูปที่ 7 อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนจากการปฏิสนธิ้วยตัวอสุจิที่เลี้ยงไว้นาน 1, 2 และ 4 ชม.



รูปที่ 8 เปรียบเทียบอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อน (ก)
และอัตรากพัฒนาของตัวอ่อนเป็นระยะมอรูล่า (ข)

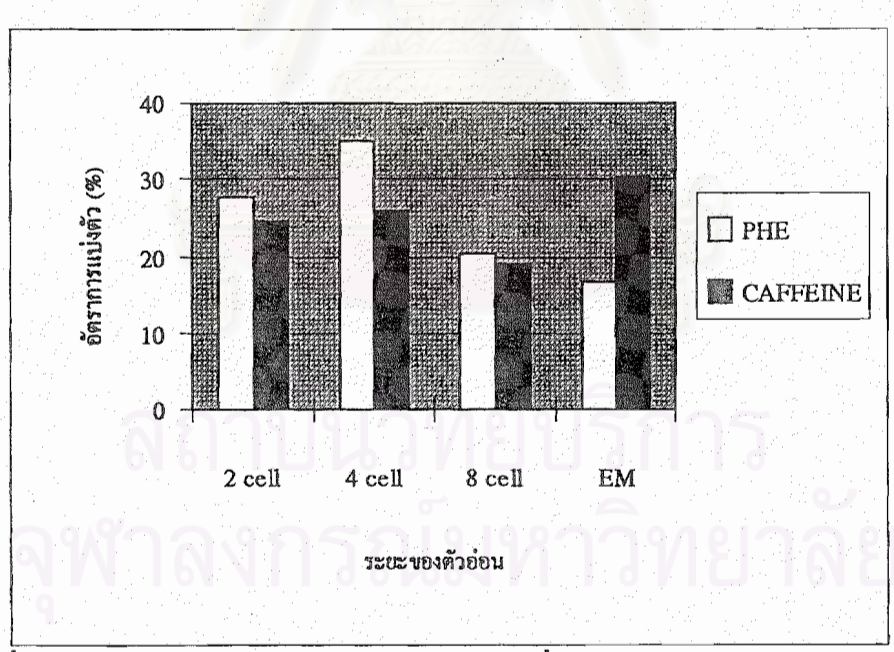
การทดลองที่ 3

อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนเท่ากับ 54%(108/199, 89/165) ไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่ใช้สารรวม PHE และ Caffeine เป็นสารเร่งการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ รวมทั้งอัตราการเจริญเป็นตัวอ่อนมากกว่าระยะ 2 เซลล์ ซึ่งเท่ากับ 63.2%(78/199) เทียบกับ 65.3%(67/165) ส่วนอัตราการเจริญเป็นตัวอ่อนระยะมอรูล่านั้นในกลุ่มที่ใช้ Caffeine สูงกว่ากลุ่มที่ใช้ PHE (30.3% เทียบกับ 16.7%, $p<0.01$, ตารางที่ 7, รูปที่ 9)

ตารางที่ 7 อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนระหว่างตัวอสุจิที่กระตุ้นด้วย PHE และ Caffeine

สารเร่งการเคลื่อนไหว	จำนวนโอโอไซต์	จำนวนตัวอ่อนที่แบ่งตัว (%)	จำนวนตัวอ่อนมากกว่าระยะ 2 เซลล์ (%)	จำนวนตัวอ่อนระยะมอรูล่า (%)
PHE	199	108(54%)	78(63.2%)	18(16.7%)[ก]
Caffeine	165	89(54%)	67(65.3%)	27(30.3%)[ข]

ก, ข แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$)



รูปที่ 9 อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนระหว่างกลุ่มที่ใช้สาร PHE เทียบกับ Caffeine

วิจารณ์

จากการศึกษานี้ไม่พบว่าการใช้ตัวอสุจิจากท่ออิปิดิไดมีสให้ผลดีกว่าการใช้น้ำเชื้อจากการหลั่งธรรมชาติ โดยที่อัตราการแบ่งตัวอ่อนไม่แตกต่างกัน แม้จะใช้ตัวอสุจิที่เลี้ยงนาน 1 ชม. หรือ 4 ชม. ก็ตาม ดังข้อมูลในตารางที่ 1 และข้อมูลที่ได้แสดงในการทดลองอื่น ๆ ข้างต้นในกรณีที่ใช้น้ำเชื้อชนิดหลั่งจากธรรมชาติ ข้อมูลนี้แตกต่างจาก Nagai และคณะ (1984) ที่พบว่าอัตราการปฏิสนธิ และการเจาะของตัวอสุจิในไซโตพลาสซึ่มของโอโอไซต์ดีกว่าในกรณีที่ใช้ตัวอสุจิจากท่ออิปิดิไดมีส โดยให้เหตุผลว่าในน้ำเลี้ยงเชื้อ (seminal plasma) ประกอบด้วยสาร decapacitation factors ที่ขัดขวางการเกิดกระบวนการ capacitation ในขณะที่ตัวอสุจิจากท่ออิปิดิไดมีสยังไม่สัมผัส (expose) ต่อสารดังกล่าว เหตุผลของความแตกต่างของผลการทดลองนี้อาจเกี่ยวกับวิธีการเตรียมตัวอสุจิก่อนการปฏิสนธิโดยส่วนใหญ่ของงานวิจัยในการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกรมักใช้วิธี incubation ตัวอสุจิหลังเก็บมา เรียกว่า "preincubation time" ซึ่งไม่ได้แยกเอาตัวอสุจิออกจาก seminal plasma ในขณะที่วิธีที่ใช้ในการทดลองนี้ได้ใช้วิธีปั่นแยกเอา seminal plasma ออก เจือจางด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อ และแยกเอาตัวอสุจิเฉพาะที่แข็งแรงที่ว่ายขึ้นสู่ผิวด้วยวิธี swimup ทั้ง epididymal และ ejaculated sperm ใช้วิธีดังกล่าวข้างต้น ดังนั้นจึงอาจไม่พบความแตกต่างในอัตราความสำเร็จในการปฏิสนธิและการแบ่งตัวของตัวอ่อน เนื่องจาก decapacitation factors ได้ถูกเจือจางไปแล้วในขณะผ่านขั้นตอนข้างต้น อย่างไรก็ตามจากการตรวจลักษณะของตัวอสุจิจากท่ออิปิดิไดมีส พบว่ามีจำนวนตัวอสุจิชนิด immature ชนิด distal droplets ผันแปรในสุกร 4 ตัว ประมาณ 10-15% ในขณะที่จากน้ำเชื้อที่หลั่งธรรมชาติพบประมาณ 1-2% สำหรับน้ำเชื้อสุกรที่ใช้ การใช้ epididymal sperm มีข้อเสียประการหนึ่ง คือไม่สามารถรู้ประวัติของพ่อสุกรเนื่องจากเป็นพ่อสุกรที่คัดเข้าโรงฆ่าสัตว์ และอาจมีความผิดปกติแฝงอยู่ ในการศึกษานี้ได้ตรวจคุณภาพของน้ำเชื้อก่อนการปฏิสนธิและได้ใช้พ่อพันธุ์ทั้งหมดจำนวน 4 ตัว เพื่อแก้ปัญหาข้างต้น และจากการทดลองไม่พบว่ามีความแตกต่างระหว่างความสำเร็จในการปฏิสนธิของน้ำเชื้อจากพ่อสุกรทั้ง 4 ตัว ยกเว้นในพ่อสุกร E ที่มีแนวโน้มของอัตราการเจริญของตัวอ่อนเป็นระยมอรูล่าสูงกว่าพ่อสุกร A B C และ D จากผลการทดลองดังกล่าวข้างตน จึงกล่าวได้ว่าในแง่ปฏิบัติการใช้ น้ำเชื้อที่รีดจากพ่อพันธุ์โดยตรงทางธรรมชาติ น่าจะสะดวกกว่าในการเก็บน้ำเชื้อจากท่ออิปิดิไดมีส ทั้งนี้เพราะสามารถตรวจคุณภาพน้ำเชื้อได้อย่างสม่ำเสมอ และกรณีสงสัยอาจนำไปทดสอบโดยการผสมธรรมชาติกับแม่สุกรจำนวนหนึ่ง ตามวิธีที่ Techakumphu และ Tantasuparuk (1994) ได้รายงานไว้

ปัจจัยของการเลี้ยงตัวอสุจิของสุกรขณะอยู่ในหลอดทดลองนั้นมีความสำคัญเช่นกัน จากการศึกษาในส่วนของระยะเวลาในการเลี้ยงตัวอสุจิก่อนการนำไปปฏิสนธิกับโอโอไซต์ พบความแตกต่างของระยะเวลาในการเลี้ยงต่ออัตราความสำเร็จในการปฏิสนธินอกร่างกาย โดยพบว่าหากเลี้ยงตัวอสุจิของสุกรเพียง 1 ชม. เท่านั้นจะสามารถเพิ่มอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนได้ประมาณ

10-15% และอัตราจะลดลงเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงตัวอสุจิเพิ่มขึ้นจาก 2 ชม. เป็น 4 ชม. จากการศึกษานี้นับว่าเป็นจุดที่น่าสนใจในการพัฒนาประสิทธิภาพของการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกร เพราะหากเปรียบเทียบกับอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนที่ได้เคยรายงานไว้ (Techakumphu *et al.*, 1993) พบว่าสูงกว่าเกือบ 75% เหตุผลนี้น่าจะเกี่ยวข้องกับความแข็งแรงของตัวอสุจิขณะที่อยู่ในหลอดทดลองขณะกำลังว่ายเข้าหาโอโอไซต์ หรือเริ่มเข้าปฏิสนธิ เพราะเท่าที่ตรวจพบก่อนการนำไปปฏิสนธิ พบว่าตัวอสุจิมีการเคลื่อนไหว (motility) ที่ดีกว่าเมื่อผ่านการเลี้ยงเพียง 1 ชม. เมื่อเปรียบเทียบกับ 2 ชม. หรือ 4 ชม. การทดลองนี้มีแนวโน้มเช่นเดียวกับการทดลองในส่วนของชนิดของตัวอสุจิในการทดลองแรก คำถามที่ว่าในช่วงระยะเวลาเพียง 1 ชม. นั้นจะพอเพียงต่อการเกิดกระบวนการ capacitation หรือไม่นั้น จากผลของการแบ่งตัวอ่อนพบว่ามีการเจริญเป็นระยะมอรูล่าสูงถึง 20% (ตารางที่ 6) เป็นคำตอบได้อย่างดี เพราะหากไม่พอเพียงการพัฒนาของตัวอ่อนมักจะหยุดในตัวอ่อนระยะ 2-4 เซลล์เท่านั้น ดังนั้นเป็นไปได้ว่าตัวอสุจิของสุกรจะใช้เวลาในขณะผ่านชั้นคิวมูลัสของโอโอไซต์ในการเกิดกระบวนการดังกล่าวให้สมบูรณ์ขึ้นก่อนเข้าไปปฏิสนธิ

จากผลการศึกษาของการเติมสารเพิ่มการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างสารรวม PHE และสาร Caffeine การทดลองในโคพบว่าหากเติมร่วมกันทั้งสามตัว (PHE; Penicillamine, Hypotaurine และ Epinephrine) จะให้ผลดีกว่าโดยเกิดการทำงานร่วมกัน (synergistic effect) ในการเป็น antioxidants ในน้ำยาปฏิสนธิ ที่จะไปลด O_2 free radicals ซึ่งมีผลต่อการเร่งการทำลายเซลล์ผ่านกระบวนการของ lipid peroxidation และ enzyme activation (Umaoka *et al.*, 1992) ดังนั้นหากปล่อยให้กระบวนการดังกล่าวเกิดขึ้นจะไปทำให้ผนังของเซลล์ตัวอสุจิเสียหายและการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิลดลง ผลทำให้การปฏิสนธิลดลงด้วย ได้มีการทดลองเปรียบเทียบกันระหว่างสาร 2 ชนิด เช่นการทดลองนี้ในโค พบว่าในน้ำยาที่เติมสารรวมของ PHE หรือ Caffeine จะให้ผลที่สูงกว่าไม่เติมอะไรเลย และสารรวม PHE จะให้ผลการแบ่งตัวสูงกว่าและอัตราการเกิดบลาสโตเมียร์ที่ผิดปกติต่ำกว่ากลุ่มที่เติม Caffeine (Vergos, 1990) ในทางปฏิบัติพบว่าการเตรียมสาร PHE จะยุ่งยากและเก็บรักษายากกว่า โดยเฉพาะ Epinephrine ต้องห่อหุ้มด้วยกระดาษฟลอยด์เพื่อป้องกันแสงมิให้เกิดกระบวนการ oxidation ดังนั้นจากผลการทดลองนี้หากใช้สาร Caffeine ทดแทนได้จะเป็นการสะดวกต่อการเตรียมมากกว่าสาร PHE

นอกจากปัจจัยข้างต้นที่ได้กำหนดแล้ว ยังพบว่ายังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง อาทิเช่น ความเข้มข้นของตัวอสุจิที่ใช้ ณ เวลาปฏิสนธิ ความแตกต่างของพ่อพันธุ์แต่ละตัว การศึกษาของ Foxcroft และคณะ (1995) การลดปัญหาการเกิด polyspermy ในสุกรทำได้โดยการเจือจางน้ำเชื้อให้มีความเข้มข้น จากเริ่มต้น $5x10^5$, $2.5x10^5$, $1.25x10^5$, $6.25x10^5$ และ $3.125x10^5$ พบว่าสามารถเพิ่มอัตราการเกิด monospermy จาก 0% เป็น 65-100% แต่อย่างไรก็ตามอัตราการเจาะไข่ (penetration rate) ก็ลดลงด้วย ซึ่งพ่อสุกรแต่ละตัวก็ให้ความแตกต่างของอัตราการเจาะไข่ การ

เกิด monospermy และการเกิด male pronucleus ดังนั้นการเลือกใช้น้ำเชื้อของพ่อสุกรแต่ละตัวจึงต้องคำนึงถึงด้วย

สรุปจากการศึกษางานวิจัยนี้นับว่ามีความสำคัญต่อการพัฒนาการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกร โดยสามารถเข้าใจถึงปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตตัวอ่อนด้วยการปฏิสนธินอกร่างกาย โดย ปัจจัยของการเตรียมโอโอไซต์ ไม่ว่าจะเกี่ยวข้องกับระยะเวลาในการเลี้ยงโอโอไซต์ให้พร้อมที่จะปฏิสนธิ ชนิดของโอโอไซต์ และรวมถึงความสามารถของโอโอไซต์ที่เก็บจากแม่พันธุ์ที่ถูกคัดทิ้งจากฝูง ก็ใช้เป็นแหล่งของเซลล์สืบพันธุ์เพื่อการปฏิสนธินอกร่างกายได้เช่นกัน นอกจากนี้ ปัจจัยการเตรียมตัวอสุจิ ให้พร้อมปฏิสนธิก็มีความสำคัญไม่ด้อยไปกว่ากัน โดยเฉพาะระยะเวลาในการเลี้ยงตัวอสุจิ โดยสามารถลดเวลาที่เคยใช้จาก 4 ชม. ลงมาเหลือเพียง 1 ชม. เท่านั้น ทำให้ได้อัตราความสำเร็จในการปฏิสนธินอกร่างกายสูงขึ้น การศึกษาถึงสารเร่งการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ Caffeine ก็สามารถนำมาทดแทนสาร PHE ได้ ทำให้สะดวกต่อการเตรียมและอาจเป็นแนวทางนำไปปรับใช้ในการผสมรวมกับน้ำเลี้ยงเชื้อเพื่อการผสมเทียบสุกร โดยมีจุดประสงค์ที่จะเพิ่มอัตราการผสมติดก็ได้ อย่างไรก็ตามแนวทางการเพิ่มอัตราความสำเร็จในการปฏิสนธินอกร่างกายโดยใช้ตัวอสุจิจากท่ออิปิดิไดมีส ไม่พบว่ามีความแตกต่างจากการที่ใช้ตัวอสุจิจากพ่อพันธุ์โดยตรง

เอกสารอ้างอิง

- Cheng, W.T.K., Polge, C. and Moor, R.M. 1986. *In vitro* fertilization of pig and sheep oocytes. Theriogenology. 25:146. (Abstr.)
- Eng, L.A., Kornegay, E.T., Huntington, J. and Wellman, T. 1986. Effects of incubation temperature and bicarbonate on maturation of pig oocytes *in vitro*. J. Reprod. Fert. 76:657-662.
- Hunter, R.H.F.1990. Fertilization of pig *in vivo* and *in vitro*. J. Reprod. Fert., Suppl. 40:211-226.
- Iritani, A., Niwa, K. and Imai, H. 1978. Sperm penetration *in vitro* of pig follicular oocytes matured in culture. J. Reprod. Fert. 54:379-383.
- Kikuchi, K., Nagai, T., Motlik, J., Shioya, Y. and Izaike, Y. 1993. Effect of follicle cells on *in vitro* fertilization of pig follicular oocytes. Theriogenology. 39:593-599.
- Koenig, J.L.F. and Stormshak, F. 1993. Cytogenic evaluation of ova from pubertal and third-estrous gilts. Biol. Reprod. 49:1158-1162.
- Leibfried-Rutledge, ML. and Bavister, BD. 1981. The effects of taurine and hypotarine on *in vitro* fertilization in the golden hamster. Gamete Res. 4:57-63.

- Leibfried-Rutledge, ML., Crister, E.S. and First, N.L. 1985. Fertilization potential of follicular oocytes classified by stage of cycle and size of follicle . Theriogenology. 23:753- 759.

- Meizel, S. and Working, PK. 1980. Further evidence suggesting the hormonal stimulation of hamster sperm acrosome rections by catecholamines *in vitro*. Biol. Reprod. 22:211- 216.

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

- Machatkova, M., Petelikova, J., Jokesova, E. and Horky, F. 1991. The relation between IVM-IVF-IVC development of bovine embryos and oestral cycle stage of oocyte donors. 7^{e} Reunion A.E.T.E, Cambridge, 14-15 September, p170. (Abstr.)

- Nagai, T., Niwa, K. and Iritani, A. 1984. Efffect of sperm concentration during preincubation in a defined medium on fertilization *in vitro* of pig follicular oocytes. J. Reprod. Fert. 70:271-275.

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

- Saeki, K., Nagao, Y. and Kainuma, H. 1994. Effects of cumulus cells on sperm penetration of bovine oocytes in protein-free medium. Theriogenology. 42:1115-1123.

- Techakumphu, M. Srianan, W., Singlor, J. and Tantasuparak, W. 1993. Embryo production in pigs by *in vitro* fertilization. Thai J. Vet. Med. 23(3):189-199.

- Techakumphu, M. and Tantasuparak, W. 1994. A preliminary study on boar semen quality and fertilization rate. 24(4): 294-304.

- Umaoka, Y., Noda, Y., Naimoto, K. and Mori, T. 1992. Effects of oxygen toxicity on early development of mous embryos. Mol. Reprod. Dev. 31:28:33.

- Vajta, G., Machty, Z., Baradi, Z.S., Soos, A. and Solti, L. 1991.Transfer of *in vitro* fertilized and cultivated swine embryo. Theriogenology. 35:1. (Abstr.)

- Vergos, E. 1990. *In vitro* fertilization and embryo culture in cattle PhD Thesis, National University of Ireland, Dublin. cited by Ian Gordon, In : Laboratory Production of Cattle Embryos. CAB INTERNATIONAL, Cambridge, UK.

- Wang, W-H., Abeydeera, L.R., Okuda, K. and Niwa, K. 1994. Penetration of porcine oocytes during maturation *in vitro* by cryopreserved, ejaculated spermatozoa. Biol. Reprod. 50:510-515.
- Yoshida, M., Bamba, K., Kojima, Y. 1989. Effect s of gonadotropins and estradiol-17β on the timing of nuclear maturation and cumulus expansion in pig oocytes cultured *in vitro*. Jpn. J. Anim. Reprod. 35:86-91.
- Yoshida, M. 1987. *In vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vivo*. Jpn. J. Vet. Sci. 49 (4):711-718.
- Yoshida, M., Ishizaki, Y. and Kawagishi, H. 1990. Blastocyst formation of pig embryo resulting from *in vitro* fertilization of oocytes mature *in vitro*. J. Reprod. Fert. 88:1-8.
- Yoshida, M., Mizoguchi, Y., Fushigaki, 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.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย