

ผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรต่อการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย

นางสาวจงกลวรรณ มุสิกทอง



วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสารีรวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2539

ISBN 974 - 633 - 312 - 7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 1731818X

**EFFECT OF BOAR SEMEN PRESERVATION ON
IN VITRO FERTILIZATION**

Miss Jongkonwan Musikthong

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement
for the Degree of Master of Science**

Inter - Department of Physiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1996

ISBN 974 - 633 - 312 - 7

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรต่อการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย

โดย

นางสาวจงกลวรรณ มุสิกทอง

ภาควิชา

สัตววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา

รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. มงคล เตชะกำพูน

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อรรถนพ คุณาวงษ์กฤต

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

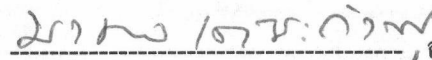
(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ อุสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



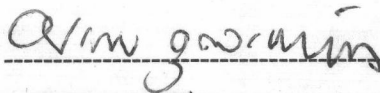
ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ดร. บังอร ชมเดช)



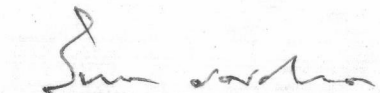
อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.มงคล เตชะกำพูน)



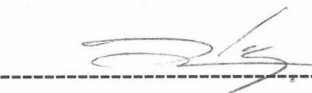
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อรรถนพ คุณาวงษ์กฤต)



กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. วิทยา ยศยิ่งยวด)



กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ประสงค์ ศิริวิริยะกุล)

พิมพ์ฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมเพียงแผ่นเดียว

จงกลวรรณ มุสิกทอง : ผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรต่อการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย
(EFFECT OF BOAR SEMEN PRESERVATION ON IN VITRO FERTILIZATION)

อ. ที่ปรึกษา : รศ. น. สพ. ดร. มงคล เตชะกำพูน

อ. ที่ปรึกษาร่วม : ศ.น.สพ. ดร. อรรถพร คุณาวงษ์กฤต, 82 หน้า. ISBN 974-633-312-7

จุดมุ่งหมายของการวิจัยนี้เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บน้ำเชื้อสดเจือจางที่อุณหภูมิ 15 และ 5 องศาเซลเซียส และการเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสต่ออัตราการความสำเร็จในการปฏิสนธิภายนอกร่างกายของสุกร และศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อสดเจือจางกับน้ำเชื้อแช่แข็งตามระยะเวลาการเก็บน้ำเชื้อต่ออัตราการความสำเร็จในการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย โดยการรีดน้ำเชื้อจากพ่อสุกร 2 ตัว (สุกรเอและสุกรบี) ที่มีคุณภาพดีเพื่อนำไปปฏิสนธิภายนอกร่างกายกับโอโอไซท์ หลังจากนั้นนำมาเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิด บี ทู+ 20% ที่ดัดคาร์ฟูริรัม สังเกตอัตราการปฏิสนธิและอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนหลังทำการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย

ผลการวิจัยพบว่าเมื่อเก็บน้ำเชื้อเป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6 วัน ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส มีผลต่ออัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนลดลงตามระยะเวลาที่เก็บรักษาน้ำเชื้อ ($p < 0.05$, $p < 0.01$ และ $p < 0.001$) โดยอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนเมื่อใช้น้ำเชื้อจากสุกรบีมีแนวโน้มสูงกว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อจากสุกรเอ แต่ผลนี้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อนำน้ำเชื้อจากสุกรบีมาเก็บที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6 วันพบว่าอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนต่ำกว่าเมื่อเก็บน้ำเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ($p < 0.01$) โดยระยะเวลาในการเก็บน้ำเชื้อไม่มีผลต่ออัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนเมื่อเก็บน้ำเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสเช่นเดียวกับที่พบในกรณีของน้ำเชื้อแช่แข็ง

ผลการวิจัยครั้งนี้สรุปได้ว่าระยะเวลาการเก็บน้ำเชื้อของสุกรที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสมีผลต่ออัตราการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย แต่ผลดังกล่าวไม่พบในกรณีที่เก็บน้ำเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสและ -196 องศาเซลเซียส (น้ำเชื้อแช่แข็ง)

ภาควิชา สหสาขาเสรีวิทยา

สาขาวิชา เสรีวิทยา

ปีการศึกษา 2538

ลายมือชื่อนิสิต จงกลวรรณ มุสิกทอง

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ดร. มงคล เตชะกำพูน

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อ. อรรถพร คุณาวงษ์กฤต

พิมพ์ต้นฉบับบทความวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมเพียงแผ่นเดียว

C 645647 : MAJOR PHYSIOLOGY

KEY WORD : IVF / BOAR / FRESH SEMEN / FROZEN SEMEN / SEMEN PRESERVATION
JONGKONWAN MUSIKTHONG : EFFECT OF BOAR SEMEN PRESERVATION
ON IN VITRO FERTILIZATION

THESIS ADVISOR : ASSO.PROF.DR. MONGKOL TECHAKUMPHU, Ph.D.

THESIS CO-ADVISOR : PROF.DR. ANNOP KUNAVONGKRIT, Ph.D. 82 pp.

ISBN 974 - 633 - 312 - 7

The objective of this study was to examine the effect of time of fresh semen preservation at 15°C, 5°C and frozen semen at -196°C on the success of *in vitro* fertilization (IVF) in pig. And to compare the quality of fresh and frozen semen follow to the time of semen preservation on the success of IVF. The semen was collected from two fertile boars (BoarA and Boar B). After IVF the embryos were subsequently cultured in B2 medium + 20 % fetal calf serum to assess the fertilization and cleavage rate.

The results showed that the fertilization and cleavage rate at 15°C reduced significantly ($p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$) when the time of preservation was prolonged from 0 day to 2, 4, 6 days. No difference of IVF success was found between Boar A and Boar B although it tended to increase in Boar B than Boar A. Semen preservation at 5°C reduced the success rate compared to 15°C ($p < 0.01$). However, the effect of time preservation was not found at 5°C and -196°C.

This study may prove that the time of boar semen preservation at 15°C was affected the success of IVF. These results were not found when preservation at 5°C and -196°C.

ภาควิชา สหสาขาสรีรวิทยา

สาขาวิชา สรีรวิทยา

ปีการศึกษา 2538

ลายมือชื่อนิสิต _____ จงกอนวาน มุสิกทอง

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา อ.ดร. กว

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษารวม อ.ดร. กว

กิตติกรรมประกาศ



วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาของ รศ. น. สพ. ดร. มงคล เตชะกำพูน อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์และ รศ. สพ.ญ.ดร. ดวงนฤมล ประชัญญคดีอาจารย์ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งได้ให้คำแนะนำและช่วย ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้มาโดยตลอดจนสำเร็จลุล่วงด้วยดี นอกจากนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ศ. น. สพ. ดร. อรรถนพ คุณาวงษ์กฤต อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมการทำวิทยานิพนธ์ และ อาจารย์ น. สพ. วิชัย ทันทศุภารักษ์ ที่กรุณาให้ข้อเสนอแนะบางประการเกี่ยวกับการทำวิจัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาสัตวศาสตร์ ไร่เวฬุวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์และเจ้าหน้าที่รพ. ปศุสัตว์ ที่ศูนย์ฝึกนิสิตคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ต. บ่อพลับ อ. เมือง จ. นครปฐมทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมือช่วยเหลือมาตลอดขณะทำการวิจัย โดยเฉพาะ คุณจินดา สิงห์ล่อ และคุณบุญส่ง รมโพธิ์ดี ที่ช่วยรีดน้ำเชื้อพ่อสุกรและช่วยเก็บรังไข่สุกรสาว ขอขอบพระคุณภาควิชาสัตวศาสตร์-ไร่เวฬุวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อน้ำกลั่นสำหรับใช้ในการเตรียมน้ำยาเคมีและน้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อนที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ทำให้การวิจัยสะดวกยิ่งขึ้น

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา - มารดา , พี่ชาย , พี่สาว ที่ให้ความสนับสนุนและเป็นกำลังใจ ขอขอบคุณทุนวิจัยของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่กรุณาเอื้อเฟื้อทุนบางส่วนในการทำวิจัยครั้งนี้ และท้ายที่สุดขอขอบคุณ พี่ ๆ เพื่อน ๆ ทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจตลอดจนให้ความช่วยเหลือด้วยดีตลอดมา

จงกลวรรณ มุสิกทอง

ความหมายของคำย่อ

มม.	มิลลิเมตร
มล.	มิลลิลิตร
ชม.	ชั่วโมง
mg	มิลลิกรัม
mm	มิลลิเมตร
ml	มิลลิลิตร
ul	ไมโครลิตร
mM	มิลลิโมล
ug / ml	ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร
gm / l	กรัม ต่อ ลิตร
e.g.	อาทิเช่น
p	ค่าความเข้มข้นทางสถิติ
W / V	น้ำหนัก ต่อ ปริมาตร
V / V	ปริมาตร ต่อ ปริมาตร
°C	องศาเซลเซียส
VS	เทียบกับ
D	วันที่

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
ความหมายคำย่อ	ฅ
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ
บทที่	
1. บทนำ	1
- การปฏิสนธิ	2
- การปฏิสนธิภายนอก	7
- การรีดเก็บน้ำเชื้อพ่อสุกร และการตรวจคุณภาพ น้ำเชื้อ พ่อสุกร	12
- การเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกร (น้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็ง)	13
- สารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันการแช่แข็ง	16
- น้ำยาเพาะเลี้ยงสำหรับตัวอ่อนสุกร	22
- วัตถุประสงค์ในการวิจัย และประโยชน์ที่คาดว่าจะได้ รับจากการวิจัย	23
2. วัสดุอุปกรณ์, ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย	24
- การเตรียมน้ำเชื้อ	26
- การเตรียมโอโอไซต์	30
- การทำการปฏิสนธิภายนอก	31
- การเลี้ยงตัวอ่อนหลังปฏิสนธิภายนอก	32
- สถิติวิเคราะห์	34

บทที่	หน้า
3. ผลการทดลอง	38
4. วิจัยและสรุปผล	63
รายการอ้างอิง	71
ภาคผนวก	80
ประวัติผู้เขียน	82

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 แสดงคุณภาพน้ำเชื้อสุกรหลังเจือจางจากสุกรเอ และสุกรบี ตามระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อ ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส	39
3.2 แสดงการเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนสุกรหลังปฏิสนธิ ในน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิดธรรมดา (mKRB 's medium) และ น้ำยาเพาะเลี้ยงชนิดซับซ้อน (B2 medium) ต่ออัตราการแบ่ง ตัวของตัวอ่อนนอกร่างกาย	42
3.3 แสดงผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรเอและสุกรบีตามระยะเวลาการเก็บน้ำเชื้อ 0, 2, 4, 6 วัน ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ต่ออัตราการปฏิสนธิภายนอกในร่างกายในด้านการตรวจพบหัว อสุจิและหางอสุจิในโอโอพลาสซึม	44
3.4 แสดงผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรเอและสุกรบีตามระยะเวลาการเก็บน้ำเชื้อ 0, 2, 4, 6 วัน ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ต่ออัตราการปฏิสนธิภายนอกในร่างกายในค่านอัตราการแบ่งตัว ของตัวอ่อนหลังปฏิสนธินอกร่างกาย	45
3.5 แสดงคุณภาพน้ำเชื้อสุกรบีตามระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อ 0, 2, 4, 6 วัน ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส	47
3.6 แสดงผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรบีตามระยะเวลา การเก็บ น้ำเชื้อ 0, 2, 4, 6 วัน ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ต่ออัตรา การปฏิสนธิภายนอกในร่างกาย	48
3.7 แสดงคุณภาพน้ำเชื้อสุกรบีตามระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อ 0, 2, 4, 6 วัน ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสหลังทำการ ละลายน้ำเชื้อ	49
3.8 แสดงผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรบีตามระยะเวลาการเก็บ รักษาน้ำเชื้อ 0, 2, 4, 6 วัน ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส (น้ำเชื้อแช่แข็ง) ต่ออัตราการปฏิสนธิภายนอกในร่างกาย	50

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.1 แสดงขั้นตอนที่นำไปสู่ขบวนการปฏิสนธิ	4
1.2 แสดงขบวนการหรือกลไก การปฏิสนธิ	5
2.1 แสดงลักษณะรังไข่จากสุกรสาว	35
2.2 แสดงลักษณะโอโอไซตชนิด compact cumulus oocyte.....	36
2.3 แสดงลักษณะโอโอไซตชนิด expand cumulus oocyte	36
2.4 แสดงลักษณะตัวอสุจิหลังรีดเก็บน้ำเชื้อ	37
2.5 แสดงรูปแบบน้ำเชื้อแช่แข็งแบบเม็ดและอุปกรณ์ที่เก็บน้ำเชื้อ แช่แข็ง	37
3.1 แสดงการเปรียบเทียบการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิระหว่าง สุกร เอและสุกรบี เมื่อเก็บน้ำเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 วัน	40
3.2 แสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของตัวอสุจิหลัง swim up ระหว่างพ่อสุกรเอ และสุกรบีเมื่อเก็บน้ำเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 วัน	41
3.3 แสดงการเปรียบเทียบอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนหลังทำการ ปฏิสนธิในอกร่างกาย เมื่อใส่น้ำเชื้อจากสุกรเอและสุกรบีซึ่งเก็บ ไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6 วัน	46
3.4 แสดงการเปรียบเทียบการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิจากพ่อสุกรบี ซึ่งเก็บน้ำเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส, 5 องศาเซลเซียส และ - 196 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6 วัน	52
3.5 แสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของตัวอสุจิหลัง swim up จากสุกรบีซึ่งเก็บน้ำเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส, 5 องศา เซลเซียสและ - 196 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6 วัน...	54

3.6 แสดงการเปรียบเทียบอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนหลังทำการ ปฏิสนธิในอกร่างกาย เมื่อไข่น้ำเชื้อจากสุกรลารังไข่ที่ซึ่งเก็บ ไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส, 5 องศาเซลเซียส และ -196 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6 วัน	56
3.7 แสดงการตรวจพบหัวและหางอสุจิในโอโอพลาสซึม	57
3.8 แสดงการตรวจพบ 2 โพรนิวเคลียสในโอโอพลาสซึม	57
3.9 แสดงการตรวจพบระยะเมตาเฟส II ในโอโอไซต์	58
3.10 แสดงลักษณะตัวของตัวอ่อนหลังปฏิสนธิในอกร่างกายระยะ 1 เซลล์	58
3.11 แสดงการแบ่งตัวและการพัฒนาของตัวอ่อนสุกรหลังปฏิสนธิ นอกร่างกายระยะ 2 เซลล์, 4 เซลล์ เมื่อไข่น้ำเชื้อซึ่งเก็บ ไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส, 5 องศาเซลเซียส และ -196 องศาเซลเซียส	59
3.12 แสดงการแบ่งตัวและการพัฒนาของตัวอ่อนสุกรหลังปฏิสนธิ นอกร่างกายระยะมากกว่า 4 เซลล์ เมื่อไข่น้ำเชื้อซึ่งเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส, 5 องศาเซลเซียส และ -196 องศาเซลเซียส	60
3.13 แสดงการเสื่อมสลายของตัวอ่อนสุกรระยะ 2 เซลล์, 4 เซลล์ หลังเพาะเลี้ยงตัวอ่อนไว้ในอกร่างกาย	61
3.14 แสดงการเสื่อมสลายของตัวอ่อนสุกรระยะ 4 เซลล์หลังเพาะ เลี้ยงตัวอ่อนไว้ในอกร่างกาย	62
3.15 แสดงการเสื่อมสลายของตัวอ่อนสุกรระยะมากกว่า 4 เซลล์ หลังเพาะเลี้ยงตัวอ่อนไว้ในอกร่างกาย	62