

## บทที่ 5

### ผลการศึกษา

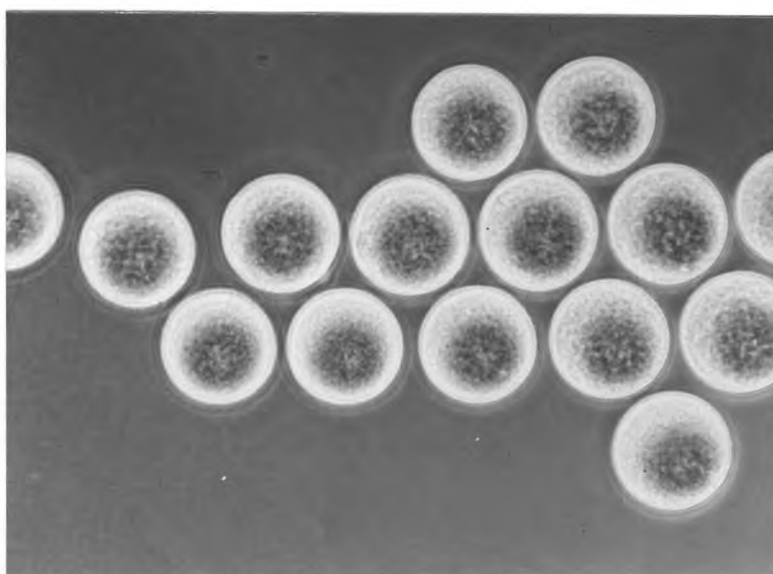
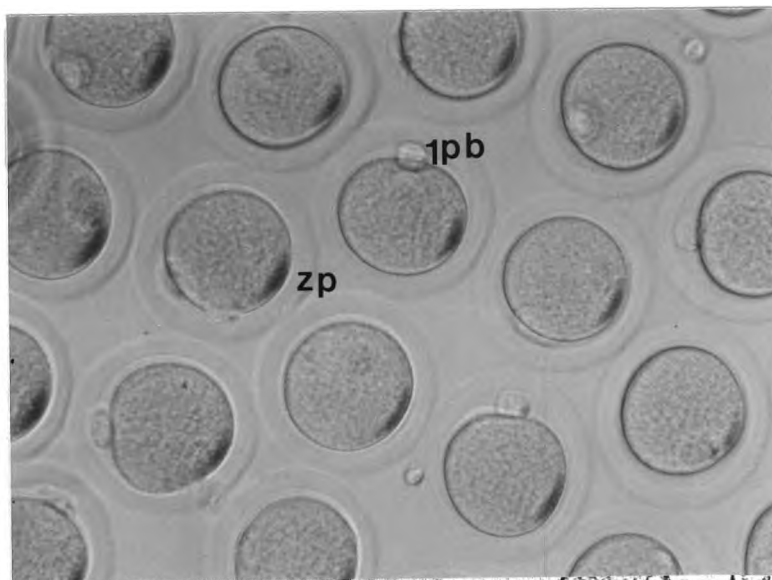
ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ไข่แฮมสเตอร์ในการศึกษาทั้งหมด 6,949 ไข่แฮมสเตอร์ แบ่งชั้น  
ตอนการศึกษาออกเป็น 2 ตอนด้วยกัน คือ

ตอนที่ 1 เป็นการทดสอบความเข้มข้นของเฮปาริน และเวลาที่ใช้ในการคาพาซิเตท  
อุสจิกระบือปลักแช่แข็งตลอดจนสภาพการทดลองที่เหมาะสมให้มีประสิทธิภาพ  
สูงสุด ซึ่งตรวจสอบความสำเร็จในการคาพาซิเตทอุสจิ โดยการนำอุสจิที่  
ผ่านการคาพาซิเตทแล้วเจาะไข่แฮมสเตอร์ที่ไม่มีโซนาเพลลูลิดา (รูปที่ 5.1)  
โดยดูจาก male pronuclei (รูปที่ 5.2) เมื่อเลี้ยงไข่ที่ผ่านการผสม  
กับอุสจิแล้วเป็นเวลา 8 ชั่วโมง วัดเป็นเปอร์เซ็นต์ คือ

$$\text{เปอร์เซ็นต์โปรนิวเคลียส} = \frac{\text{จำนวนไข่ที่เห็นโปรนิวเคลียส}}{\text{จำนวนไข่ที่ทดสอบ}} \times 100$$

ตอนที่ 2 เป็นการศึกษาโครโมโซมของอุสจิ โดยใช้ไข่แฮมสเตอร์ 3,722 ไข่แฮมสเตอร์

การศึกษานตอนที่ 1 และตอนที่ 2 เป็นการศึกษาที่ต่อเนื่องกัน



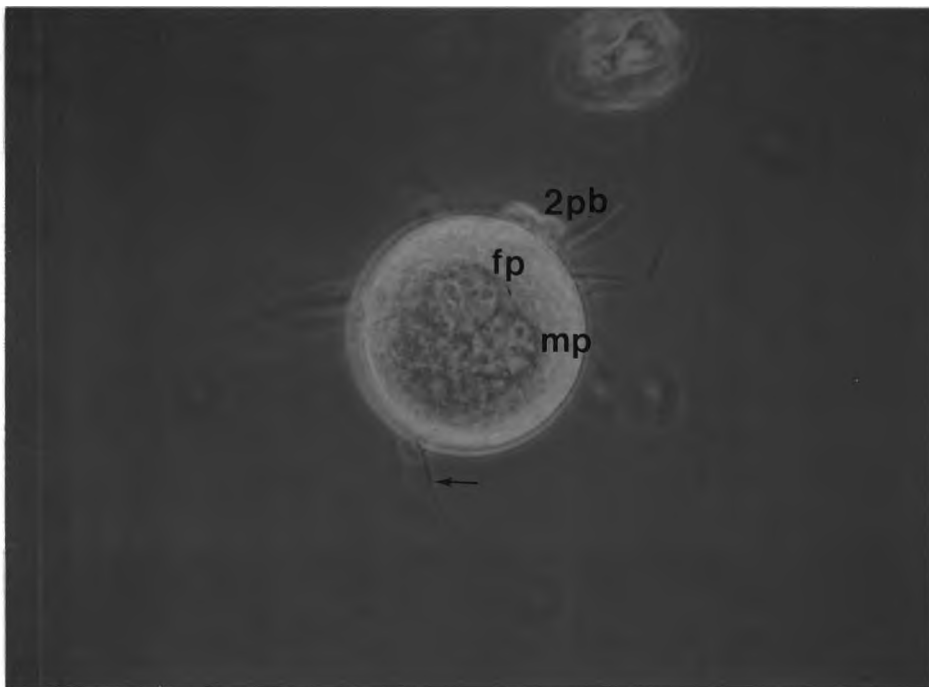
รูปที่ 5.1 บน แสดงไข่ของแฮมสเตอร์ที่มีโซนาเพลลูซิดา

1 Pb คือ first polar body (กำลังขยาย 100 เท่า)

ZP คือ zona pellucida

ล่าง แสดงไข่ของแฮมสเตอร์ที่ย่อยโซนาเพลลูซิดาออกแล้วด้วยทริปซิน

(zona-free hamster egg) (กำลังขยาย 100 เท่า)



รูปที่ 5.2 แสดงไข่ที่ผ่านการปฏิสนธิและเลี้ยงต่ออีก 8 ชั่วโมง ซึ่งจะเห็น male pronucleus (mp) และ female pronucleus (fp) และมีการขับ second polar body ออกมา (2pb) (กำลังขยาย 200 เท่า) สังเกตเห็นหางอสุจิอยู่รอบ ๆ ไข่ (ตามลูกศรชี้)

ผลการศึกษาคอนที่ 1

1. จากการวางรูปแบบการหยดน้ำยาเพาะเลี้ยง

ก. ผลการทดสอบเบื้องต้น

ตารางที่ 5.1 แสดงเปอร์เซ็นต์โปรนิวคลีโอ เมื่อใช้ความเข้มข้นของเฮปาริน 100 ไมโครกรัม/มล. เป็นเวลา 15, 30, 45, 60 นาที ตามรูปแบบการหยดน้ำยา แบบที่ 1, 2 และ 3

รูปแบบการหยดน้ำยา	เปอร์เซ็นต์โปรนิวคลีโอ เมื่อใส่เฮปารินเป็นเวลา (นาที)				จำนวนไข่ที่ทดสอบ	ความเข้มข้นของเฮปาริน (มคก./มล.)	ปริมาณเฮปารินต่อ 1 โอโอไซต์ (นนก.)
	15	30	45	60			
1	-	55.7	-	-	70	100	277
2	2.7	-	8.3	14.2	107	100	138
3	-	10.8	-	-	120	100	166
3	-	30.9	-	-	268	100	138
3	-	59.1	-	-	240	100	166
3	11.9	-	16.6	32.5	263	100	113
X±SE*	7.3 ±6.5	39.1 ±22.7	12.4 ± 5.8	23.4 ± 5.8	1,068		

\* Standard error of the mean

ข. ผลการทดสอบเพื่อหาความเหมาะสมของหยดน้ำยา เมื่อใช้เฮปารินความเข้มข้น 10 - 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที

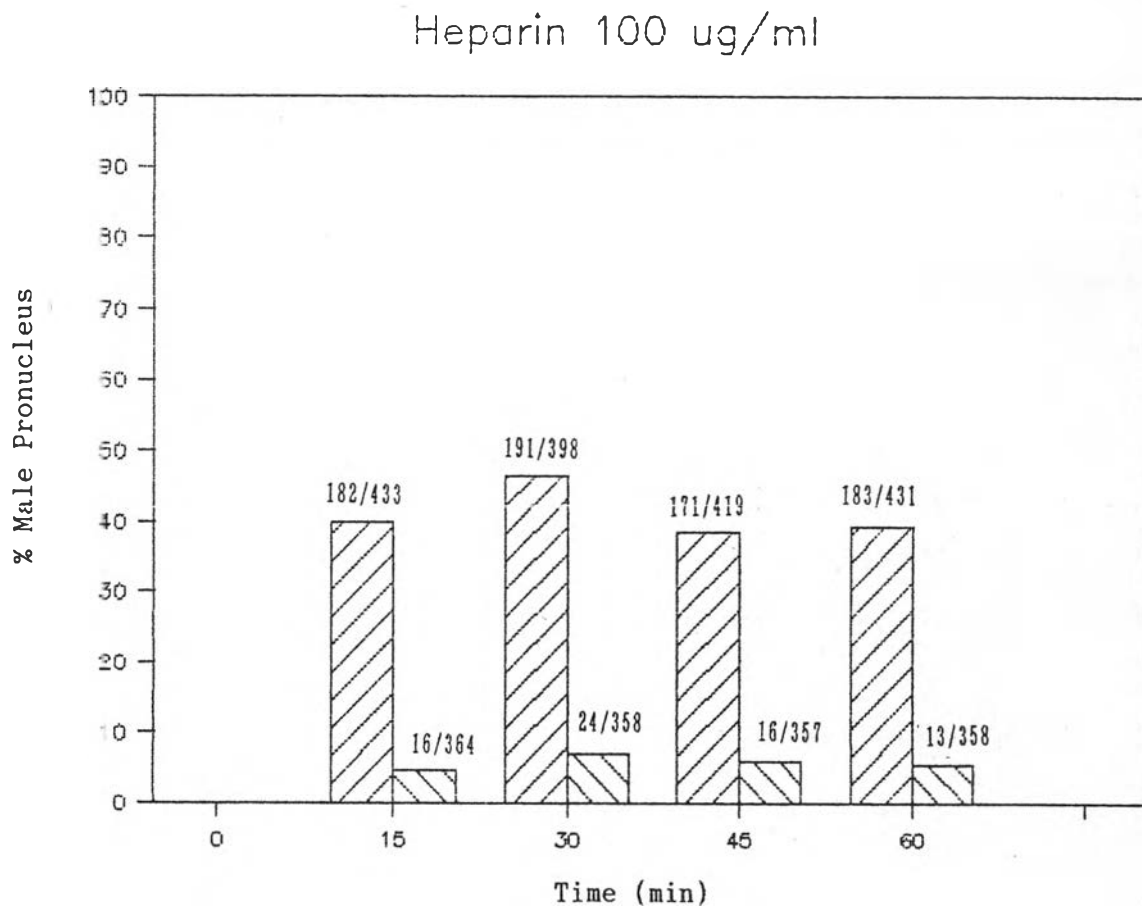
ตารางที่ 5.2 แสดงเปอร์เซ็นต์โปรนิวคลีโอสูงสูดในการหยดน้ำยารูปแบบต่าง ๆ เมื่อใช้เฮปารินความเข้มข้น และเวลาที่ต่างกัน

รูปแบบการหยดน้ำยา	จำนวนไข่ต่อหยด	ความเข้มข้นของเฮปาริน (มคก./มล)	เปอร์เซ็นต์โปรนิวคลีโอเมื่อใส่เฮปารินเป็นเวลา (นาที)				จำนวนไข่ที่ทดสอบ	ปริมาณเฮปารินต่อ 1 โอโอไซต์ (หนก.)
			15	30	45	60		
1	18	100	-	55.7	-	-	70	277
2	18	100	-	-	-	14.2	107	138
3	18	50	-	-	47.1	-	513	69.4
3	15	25	-	-	-	77.5	320	41.6
4	5	10	-	61.1	-	-	230	12.5
5	5	12.5	-	-	-	57.6	85	15.6
6	5	10	68.5	-	-	-	280	12.5



## 2. ผลการหาเวลาที่เหมาะสม

ตารางที่ 5.3 แสดงเปอร์เซ็นต์โปรตีนคลีโอ เมื่อใช้ความเข้มข้นของเฮปาริน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที ตามรูปแบบการหยดน้ำยาแบบที่ 3

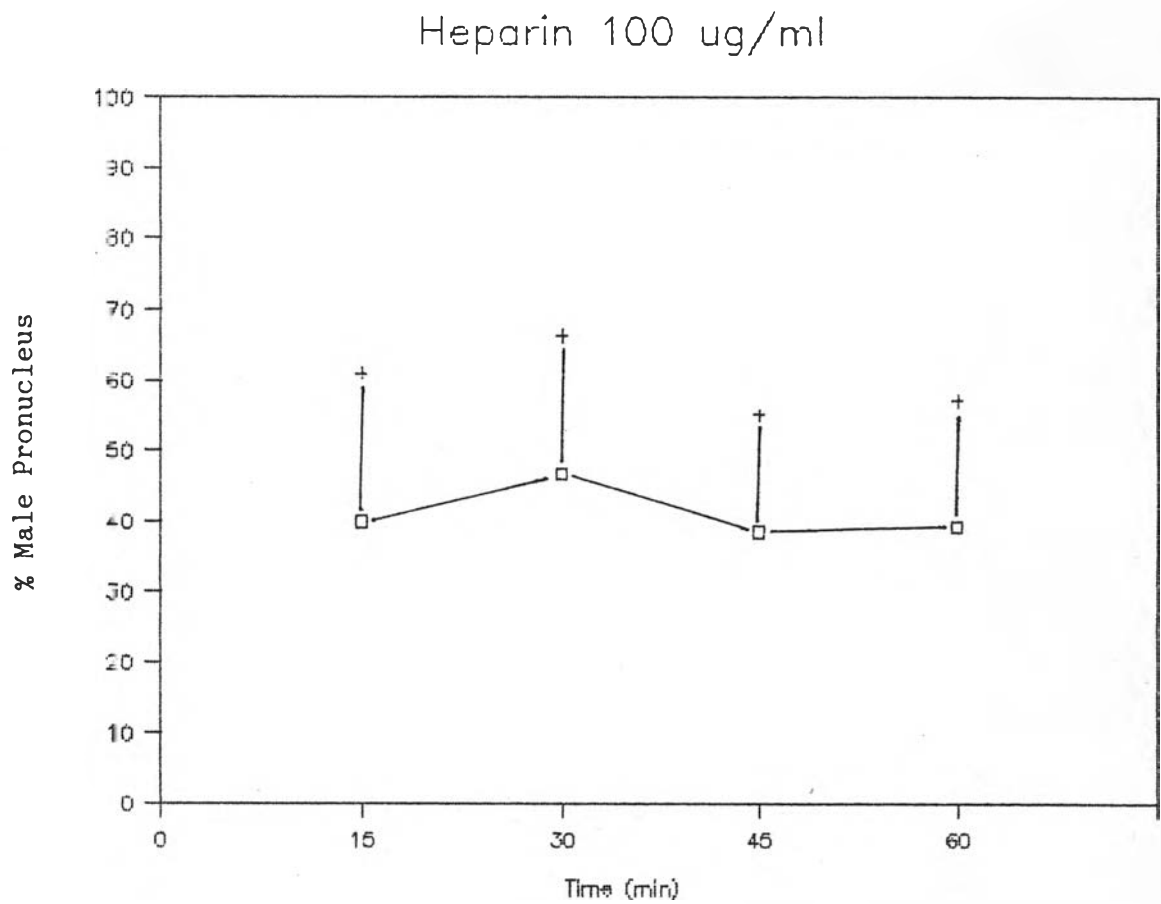
เปอร์เซ็นต์โปรตีนคลีโอ เมื่อใส่ เฮปารินเป็นเวลา (นาที)				จำนวนไข่ ที่ทดสอบ
15	30	45	60	
18.2	30.6	30.3	38.8	309
48.8	73.0	61.3	46.8	333
65.7	69.5	53	53	321
24.5	30.1	24.1	15.6	210
21.7	33.3	20.0	20.8	188
60.5	42.5	42.5	60.5	320
$X \pm SE$	$X \pm SE$	$X \pm SE$	$X \pm SE$	
39.9±21	46.5±19.7	38.5±16.5	39.2±17.9	1,681



รูปที่ 5.3 แสดงเปอร์เซ็นต์โปรนิวเคลียสไอ เมื่อใช้เฮปารินเข้มข้น 100 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที เปรียบเทียบ เฮปารินเก่าและเฮปารินใหม่

 เฮปารินเก่า  
 เฮปารินใหม่

หมายเหตุ 182/433 หมายถึงอัตราส่วนของจำนวนไข่ที่ปฏิสนธิ (ที่เห็นโปรนิวเคลียสไอ) กับจำนวนไข่ที่ศึกษา



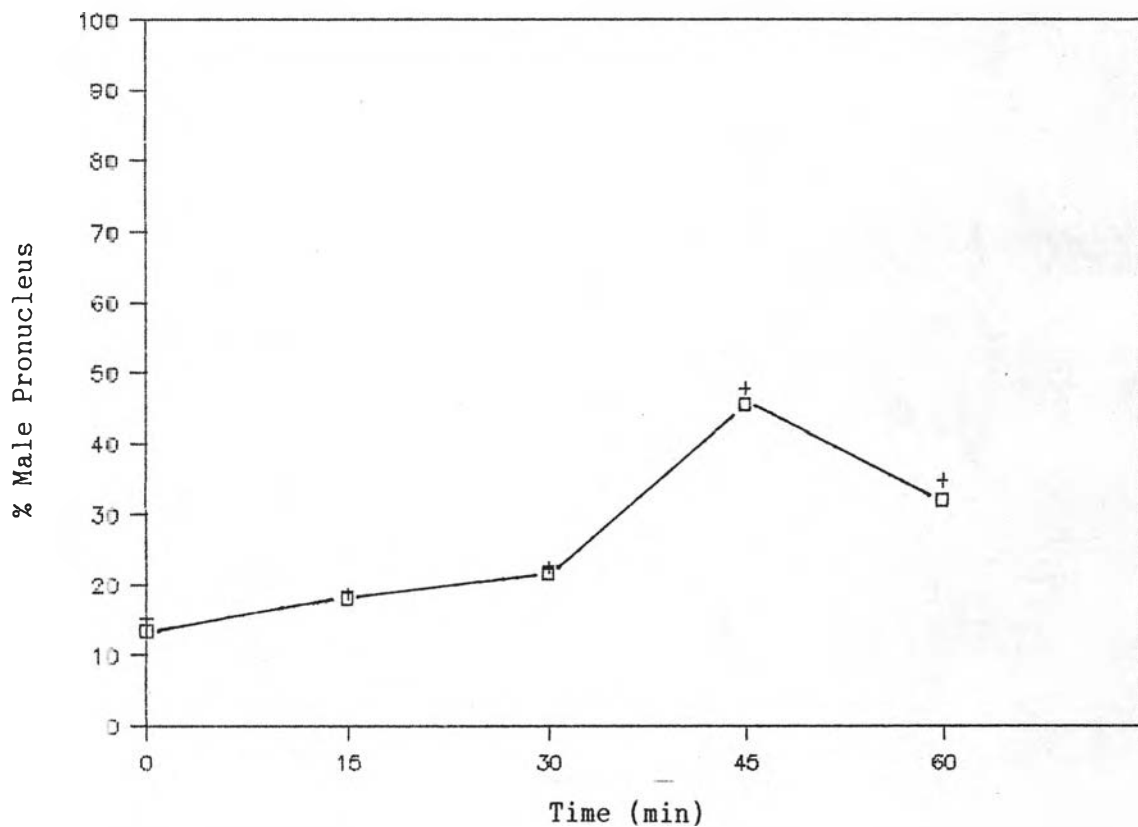
รูปที่ 5.4 แสดงเปอร์เซ็นต์โปรนิวเคลียสไอ เมื่อใช้เฮปารินเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที รูปแบบการหยดน้ำยาแบบที่ 3



ตารางที่ 5.4 แสดงเปอร์เซ็นต์โปรตีนคลีไอ เมื่อใช้ความเข้มข้นของ  
เฮปาริน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 0, 15,  
30, 45 และ 60 นาที ตามรูปแบบการหยดน้ำยาแบบที่ 3

เปอร์เซ็นต์โปรตีนคลีไอ เมื่อใส่เฮปารินเป็นเวลา (นาที)					จำนวนไข่ ที่ทดสอบ
0	15	30	45	60	
14.7	17.8	22.3	47.1	33.9	513
12.1	18.6	21.0	43.8	30.0	499
$X \pm SE$	$X \pm SE$	$X \pm SE$	$X \pm SE$	$X \pm SE$	
13.4 $\pm$ 1.8	18.2 $\pm$ 0.6	21.6 $\pm$ 0.9	45.4 $\pm$ 2.3	31.9 $\pm$ 2.8	1,012

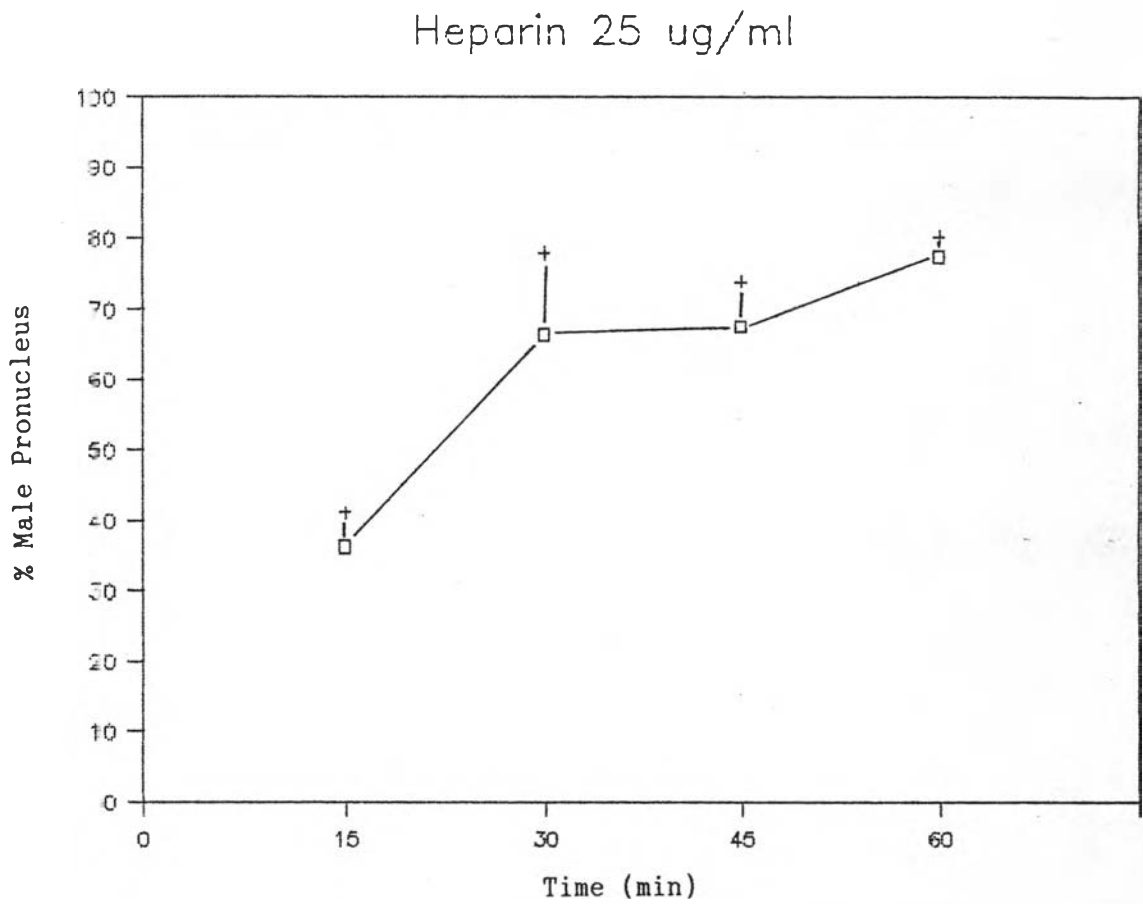
Heparin 50 ug/ml



รูปที่ 5.5 แสดงเปอร์เซ็นต์โปรนิวเคลียสไอ เมื่อใช้ความเข้มข้นเฮปาริน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที ตามรูปแบบการหยดน้ำยาแบบที่ 3

ตารางที่ 5.5 แสดงเปอร์เซ็นต์โปรตีนคลีไอ เมื่อใช้ความเข้มข้นของ  
เฮปาริน 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15,  
30, 45 และ 60 นาที ตามรูปแบบการหยดน้ำยา  
แบบที่ 3

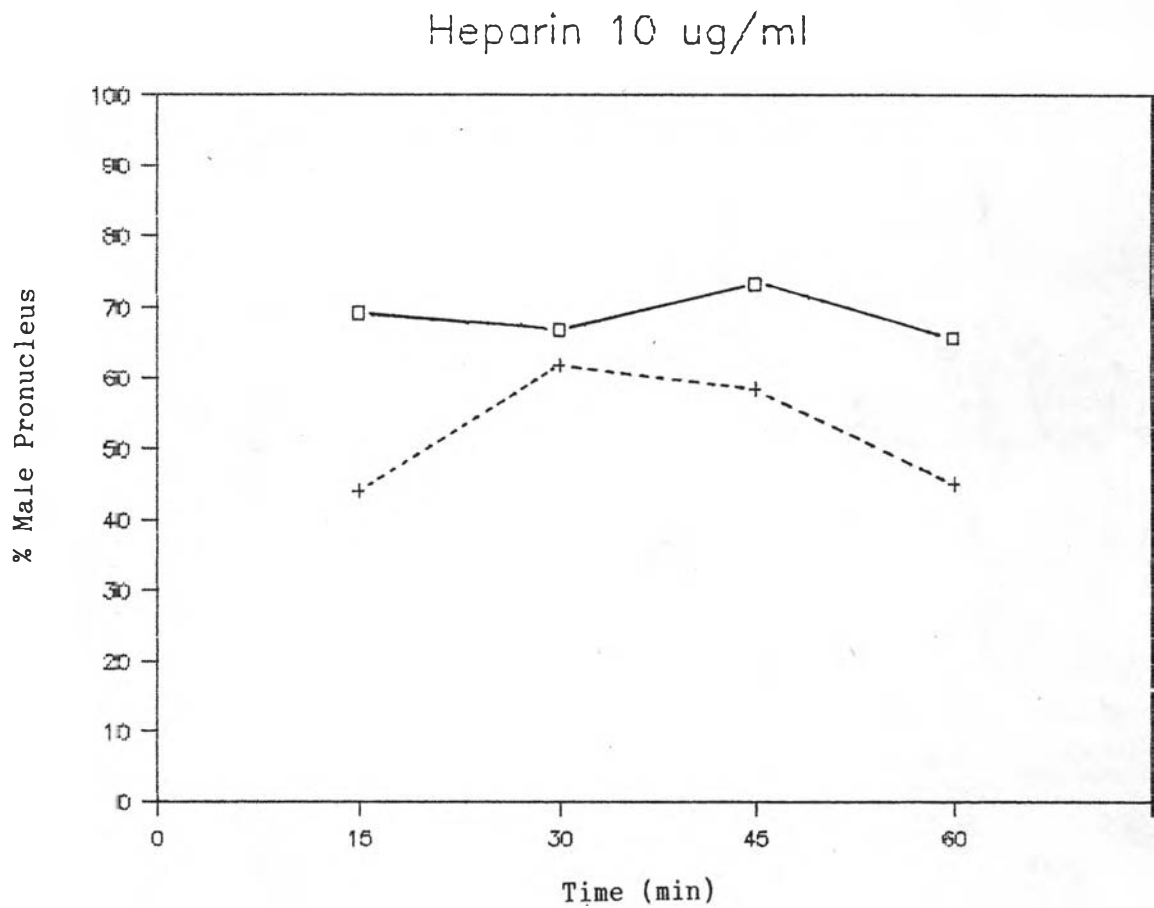
เปอร์เซ็นต์โปรตีนคลีไอ เมื่อใส่เฮปาริน (นาที)				จำนวนไข ที่ทดสอบ
15	30	45	60	
35	75	65	80	80
40	75	70	75	80
40	50	60	75	80
30	65	75	80	80
$X \pm SE$ 36.25±7.49	$X \pm SE$ 66.25±11.81	$X \pm SE$ 67.5±6.45	$X \pm SE$ 77.5±2.88	320



รูปที่ 5.6 แสดงเปอร์เซ็นต์โปรนิวเคลียสเมื่อใช้เฮปารินความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที

ตารางที่ 5.6 แสดงเปอร์เซ็นต์โปรนิวคลีโอ เมื่อใช้เฮปารินเข้มข้น  
10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15, 30, 45  
และ 60 นาที ตามรูปแบบการหยดน้ำยาแบบที่ 4

เปอร์เซ็นต์โปรนิวคลีโอ เมื่อใช้เฮปาริน (นาที)				จำนวนไข ที่ทดสอบ
15	30	45	60	
46.7	56.7	63.3	60	115
40	66.7	53.3	30	115
X ± SE 44±4.7	X ± SE 61.7±7.1	X ± SE 58.3±7.1	X ± SE 45±21.2	230



รูปที่ 5.7 แสดงเปอร์เซ็นต์โบรนิวคลีไอ เมื่อใช้เฮปาริน 10 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15, 30, 45, 60 นาที เปรียบเทียบ การหยดน้ำยาแบบที่ 4 และแบบที่ 6

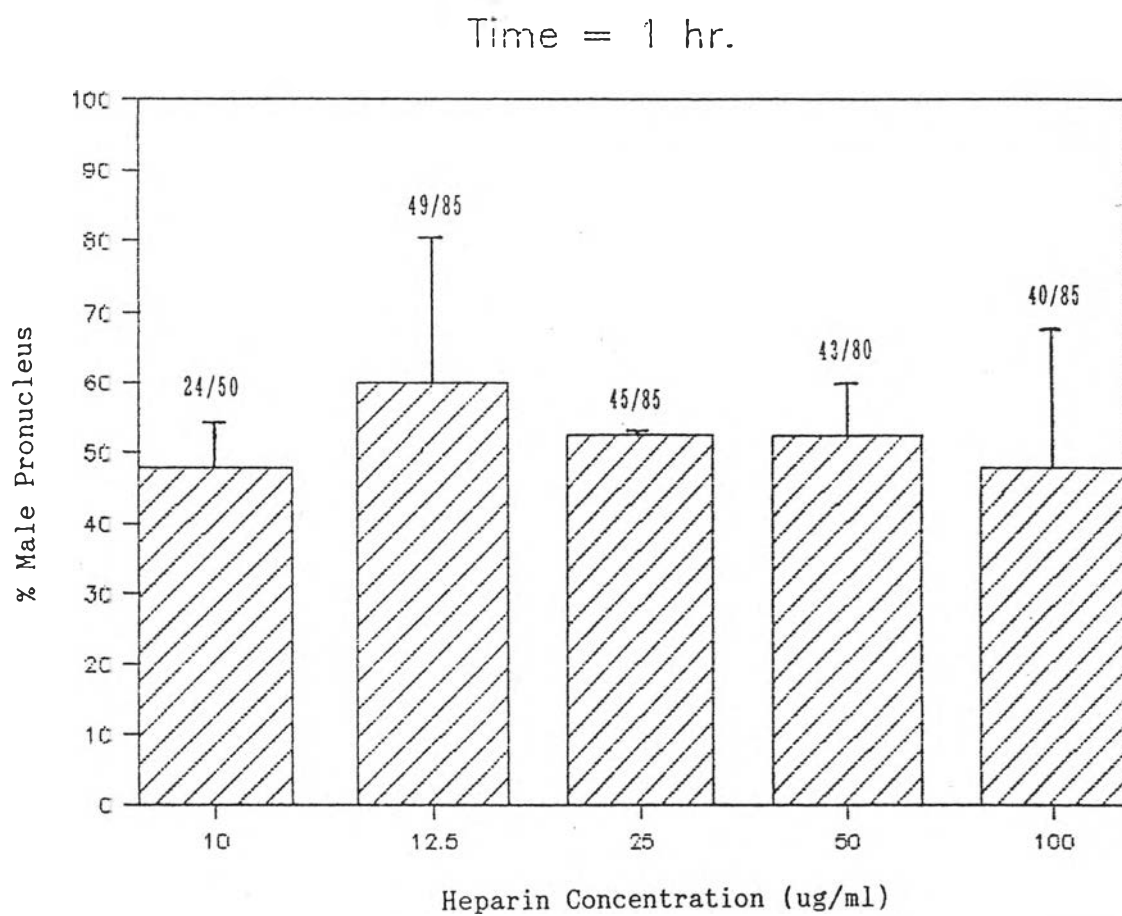
----- รูปแบบที่ 4

————— รูปแบบที่ 6

### 3. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเฮปาริน

ตารางที่ 5.7 แสดงเปอร์เซ็นต์ปริมาตรฮีโมโกลิน เมื่อใช้เฮปารินความเข้มข้น 10, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อใช้รูปแบบการหยดน้ำยาแบบที่ 5

เปอร์เซ็นต์ปริมาตรฮีโมโกลิน เมื่อใช้เฮปารินเข้มข้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)					จำนวนไข
10	12.5	25	50	100	ที่ทดลอง
44	46	52	58	33	220
52	74	52.9	46.6	62.5	165
$X \pm SE$ 48±5.6	$X \pm SE$ 60±19.8	$X \pm SE$ 52.4±.6	$X \pm SE$ 52.3±8	$X \pm SE$ 47.8±20.8	385



รูปที่ 5.8 แสดงเปอร์เซ็นต์โปรนิวคลีไอ เมื่อใช้เฮปารินความเข้มข้น 10, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

หมายเหตุ 24/50 หมายถึง อัตราส่วนของจำนวนไข่ที่ปฏิสนธิ (ที่เห็นโปรนิวคลีไอ) กับจำนวนไข่ที่ศึกษา



4. ความเหมาะสม เมื่อใช้เฮปาริน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในรูปแบบที่ 6

ตารางที่ 5.8 แสดงเปอร์เซ็นต์โปรนิวคลีโอ เมื่อใช้เฮปารินความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลานาน 15, 30, 45 และ 60 นาที ตามการหยดน้ำยาแบบที่ 6

เปอร์เซ็นต์โปรนิวคลีโอ เมื่อใช้เฮปารินเป็นเวลา (นาที)				จำนวนไข่ ที่ทดสอบ
15	30	45	60	
67.7	53.3	70	66.7	120
70	76.7	80	60	120
70	70	70	70	40
$X \pm SE$ 69.2 $\pm$ 1.3	$X \pm SE$ 66.7 $\pm$ 12.0	$X \pm SE$ 73.3 $\pm$ 5.8	$X \pm SE$ 65.6 $\pm$ 5.1	280

ความสำคัญของเฮปาริน

ตารางที่ 5.9 แสดงเปอร์เซ็นต์โปรนิวคลีโอ เมื่อใช้เฮปารินที่เสื่อมสภาพ (เก็บไว้ที่ -10 องศาเซลเซียส นานเกิน 6 เดือน) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15, 30, 45, 60 นาที

เปอร์เซ็นต์โปรนิวคลีโอ เมื่อใส่เฮปาริน (นาที)				จำนวนไข่ ที่ทดสอบ
15	30	45	60	
6.8	3.4	3.4	6.8	440
2.2	13.6	10.2	1.1	440
2.7	5.5	1.3	0	360
6.2	1.5	0	3.1	320
5.5	11.1	8.5	11.1	143
$X \pm SE$	$X \pm SE$	$X \pm SE$	$X \pm SE$	
4.7+2.1	7.0+5.1	5.8+4.2	5.5+4.4	1,703

## ผลการศึกษารุ่นตอนที่ 2

จากการใช้ไฮโอไซด์ในการศึกษาโครโมโซมจากอสุจิทั้งหมด 3,722 ไฮโอไซด์พบว่า มีโครโมโซมที่คาดว่าน่าจะเป็นโครโมโซมของอสุจิกระป๋องปลัก และโครโมโซมของแฮมสเตอร์ จำนวน 2 เมตาเฟส (.05%) แต่ไม่สามารถนำมาจัด คาร์รโอไทป์ได้ เนื่องจากโครโมโซมไม่กระจาย (clumped chromosome) (รูปที่ 5.10) ข้อมูลทางเทคนิคแสดงในตารางที่ 5.11

ตารางที่ 5.10 แสดงเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิในการทดลองบางส่วนก่อนที่จะนำมาผสมกับไข่

จำนวน อสุจิ แช่แข็ง (หลอด)	ปริมาตร อสุจิหลัง ละลาย (มล.)	ปริมาตร อสุจิหลัง ปั่นแยก ด้วย เปอร์คอล (ไมโคร ลิตร)	% การเคลื่อนไหว		ความเข้มข้น ของอสุจิ $\times 10^6$ ตัว/มล	% การเคลื่อนไหวของอสุจิ					ความเข้มข้น ของเฮปาริน ไมโครกรัม/ มล.
			ก่อนปั่น	หลังปั่น* (2 ครั้ง)		ก่อน ใส่เฮ ปาริน	หลังใส่เฮปาริน(นาที่)				
							15	30	45	60	
6	1.3	75	75	80	120	80	-	80	-	-	100
6	1.4	75	80	85	90	85	85	-	80	-	100
5	1.4	60	60	70	100	70	70	70	70	75	100
7	1.6	80	75	80	180	80	80	-	85	80	100
4	1.4	60	80	85	100	85	85	90	90	90	100
7	1.5	90	75	80	80	80	85	85	85	85	100
7	1.5	90	75	80	100	80	80	80	80	85	100
7	1.2	70	70	80	120	80	80	80	75	70	100
10	2.0	90	70	80	160	80	85	85	85	80	100
8	1.8	90	75	70	128	70	70	70	70	60	100
14	2.4	160	70	75	200	75	75	75	75	70	100
15	2.4	160	70	75	200	75	75	75	70	70	100
14	2.4	160	70	75	168	70	70	70	70	70	100
16	3.2	180	75	80	176	80	75	75	75	65	100
14	2.4	150	70	75	204	75	70	70	70	65	25
5	1.4	60	75	80	208	80	75	75	75	70	25
17	3.4	180	70	80	150	80	80	85	80	80	10
16	3.2	180	70	80	176	80	75	75	70	65	10
			72.5	78.3		78.0	77.35	77.5	76.76	73.75	
			+4.61	+4.2		+4.58	+5.62	+6.3	+6.6	+8.66	

\* ปั่นไข่สารละลายเปอร์คอล 500  $\mu$  10 นาที 1 ครั้ง และปั่นใน BPF 500  $\mu$  อีก 1 ครั้ง• ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

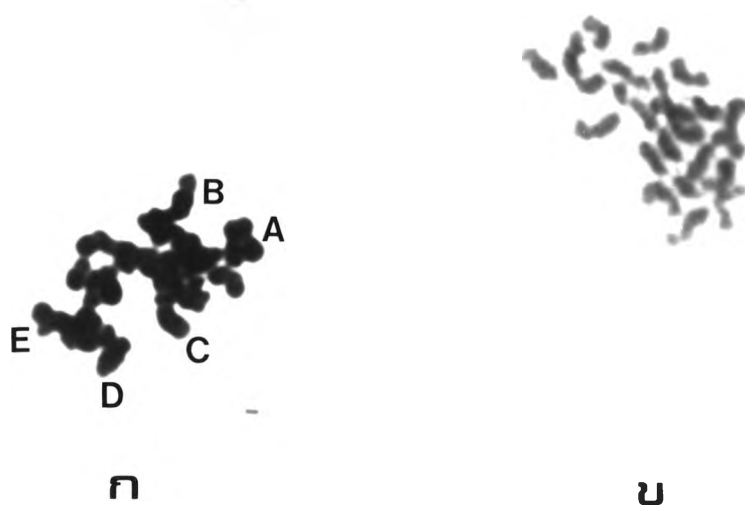
ตารางที่ 5.11 แสดงข้อมูลเกี่ยวกับการศึกษาโครโมโซมจากอสุจิของกระบือปลัก

การทดลอง ครั้งที่	จำนวนโอโอไซต์ ที่ไข่ (%)	จำนวนโอโอไซต์ ที่ปฏิสนธิ (%)	จำนวนไข่ ที่อยู่ในระยะ Metaphase (%)	โครโมโซม ของไข่ที่เห็น (%)	โครโมโซม ของไข่และ อสุจิ
1	268 (100)	83 (30.9)	40 (14.9)	20 (7.4)	-
2	240 (100)	142 (59.1)	65 (27.0)	25 (10.4)	-
3	263 (100)	54 (20.5)	20 (7.6)	12 (4.5)	-
4	309 (100)	100 (32.3)	46 (14.8)	24 (7.7)	-
5	333 (100)	185 (54.9)	87 (26.1)	40 (12.0)	-
6	321 (100)	193 (60.1)	92 (28.6)	35 (10.9)	-
7	398 (100)	95 (23.8)	40 (10.0)	18 (4.5)	-
8	240 (100)	98 (40.8)	45 (18.7)	22 (9.1)	-
9	400 (100)	242 (60.5)	105(26.2)	50 (12.5)	-
10	320 (100)	198 (61.8)	90 (28.1)	30 (9.3)	-
11	240 (100)	97 (40.4)	40 (16.6)	18 (7.5)	1*
12	110 (100)	59 (53.6)	28 (25.4)	12 (10.9)	-
13	280 (100)	191 (68.2)	85 (30.3)	35 (12.5)	1*
รวม	3,722(100.0)	1,737 (46.6)	783(21.0)	341 (9.2)	2 (.05)

\* ยังตรวจสอบไม่ได้ เนื่องจากโครโมโซมไม่กระจาย



รูปที่ 5.9 แสดงโครโมโซมของไข่แฮมสเตอร์ ซึ่งไม่เกิดปฏิสนธิ (ลูกศรชี้)  
(กำลังขยาย 450 เท่า)



รูปที่ 5.10 แสดงโครโมโซมสองกลุ่มที่พบในเซลล์เดียวกัน ก (กระป๋องปลัก) และ ข (แฮนสเตอร์  $n \sim 22$ ) (กำลังขยาย 1,050 เท่า)  
 A คือ เมตาเซนตริก โครโมโซม ขนาดใหญ่ (คู่อี 4)  
 B, C คือ ซับเมตาเซนตริก โครโมโซม  
 D, E คือ อะโครเซนตริก โครโมโซม