บทที่ 6

อภิปรายผลการศึกษา

การทดสอบเบื้องต้น

จากผลการทดสอบเบื้องต้นในตารางที่ 5.1 ของการวางรูปแบบน้ำยาเพาะเลี้ยงตามรูปแบบที่ 1, 2 และ 3 เมื่อใช้เฮปารินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที จะเห็นว่าเปอร์เซนต์ของการเกิดโปรนิวคลีไอสูงสุดอยู่ที่การหยดน้ำยาในรูปแบบที่ 3 ที่เวลา 30 นาที คือ 59.1 เปอร์เซนต์ และต่ำที่สุดคือในรูปแบบการหยดน้ำยาแบบที่ 2 คือ 2.7 เปอร์เซนต์ โดยมีค่าพิสัย 2.7 - 55.7 เมื่อหาค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานแล้ว จะเห็นว่าช่วงเวลาที่ให้โปรนิวคลีไอสูงสุดอยู่ที่ช่วงเวลา 30 นาที คือ 39.1 $\pm$ 22.7 เปอร์เซนต์ ช่วงเวลาที่ให้ผลต่ำสุด คือ 15 นาที (7.3 $\pm$6.6 เปอร์เซนต์) จะเห็นว่าช่วงเวลาที่นานขึ้น คือ 45 นาที และ 60 นาที ไม่ได้ทำให้เปอร์เซนต์โปรนิวคลีไอสูงขึ้น อย่างไรก็ตาม ในการทดลองนี้ เป็นเพียงการทดสอบเบื้องต้น ซึ่งมีปัจจัยหลายอย่างที่ทำให้การทดลองไม่สมบูรณ์เท่าที่ควร เช่น ความชำนาญของผู้ทำการทดลอง ตลอดจนความรวดเร็วในการตรวจสอบผล เนื่องจากสภาพแวดล้อมมีอิทธิพลสูงมาก ในการทำการปฏิสนธิในหลอดแก้ว เช่น สภาพแวดล้อมทางกายภาพ ในการใช้ขนาดของหยดน้ำยาขนาดเล็กที่ปิดทับด้วย mineral oil กับหยดน้ำยาขนาดใหญ่ ที่อยู่ในบรรยากาศที่มีความชื้นสูง โดยไม่มี oil (Bavister, 1981) ย่อมให้ผลต่างกัน อย่างไรก็ตาม ก็พอที่จะเป็นแนวทางได้ว่า ช่วงเวลา 30 นาที ในรูปแบบการหยดน้ำยาแบบที่ 3 น่าจะดีที่สุด ถึงแม้ว่าในรูปแบบการหยดน้ำยาแบบที่ 1 ก็ให้เปอร์เซนต์การเกิดโปรนิวคลีไอสูงถึง 55.7 เปอร์เซนต์ ในช่วงเวลา 30 นาที แต่การหยดน้ำยาในรูปแบบที่ 1 ก็ไม่เหมาะสมในการนำมาปฏิบัติ เนื่องจากมีปริมาตรถึง 200 ไมโครลิตร ทำให้ไม่เหมาะสมในการทดลอง เช่น โอกาสที่ไข่จะสัมผัสกับสภาพแวดล้อมภายในตู้บ่มเลี้ยงอาจไม่ทั่วถึง และทำให้สิ้นเปลืองในการตรวจสอบ เนื่องจากมีปริมาณขนาดใหญ่ จึงต้องทำการทดลองเพื่อหาความเหมาะสมต่อไป จากตารางที่ 5.1 เมื่อคิดปริมาณเฮปารินต่อโอโอไซต์ เมื่อทำอสุจิผสมกับไข่แล้ว จะเห็นว่าใน

การหยดน้ำยารูปแบบที่ 1 มีปริมาณเฮปาริน 277 นาโนกรัมต่อ 1 โอโอไซต์ ซึ่งสูงที่สุด ในรูปแบบที่ 2 166 นาโนกรัมต่อโอโอไซต์ และรูปแบบที่ 3 มีปริมาณของเฮปารินต่อโอโอไซต์เป็น 138, 166 และ 113 นาโนกรัมต่อโอโอไซต์ แต่ปริมาณของเฮปารินในช่วงนี้ อาจไม่มีผลในการเกิดการคาพาซิเตท เนื่องจากในน้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ จะมีกลูโคสอยู่ 5 mM ซึ่งกลูโคสจะยับยั้งหน้าที่ของเฮปาริน ในการชักนำให้เกิดการคาพาซิเตท (Parrish และคณะ, 1989)

ในการทดสอบเพื่อหาความเหมาะสมของหยดน้ำยา เมื่อใช้เฮปารินความเข้มข้น 10-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในช่วงเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที จากตารางที่ 5.2 จะเห็นว่าเปอร์เซนต์การเกิดโปรนิวคลีไอสูงสุดอยู่ที่การหยดน้ำยา รูปแบบที่ 3 เมื่อใช้เฮปารินความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเวลา 60 นาที (77.5 เปอร์เซนต์) ในขณะที่ เมื่อใช้เฮปารินความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม ในรูปแบบการหยดน้ำยาแบบที่ 4 ที่เวลา 30 นาที ได้เปอร์เซนต์โปรนิวคลีไอ 61.1 และในรูปแบบที่ 6 ได้ 68.5 เปอร์เซนต์ จะเห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการหยดน้ำยาแบบที่ 4 และแบบที่ 6 เมื่อใช้เฮปารินความเข้มข้นเท่ากัน คือ 10 ไมโครกรัม การหยดน้ำยาในรูปแบบที่ 6 ให้เปอร์เซนต์สูงถึง 68.5 เปอร์เซนต์ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการวางรูปแบบที่เหมาะสม จะเอื้ออำนวยให้สภาพแวดล้อมภายในตู้บ่มเลี้ยง เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ และความชื้น ได้สัมผัสกับโอโอไซต์ได้ดีกว่า สำหรับการวางรูปแบบน้ำยาแบบที่ 5 มีความหนาแน่นของหยดน้ำยามากเกินไป คือมีถึง 10 หยดต่อ 1 จานเพาะเลี้ยง ซึ่งอาจมีผลทำให้การสัมผัสกับสภาพแวดล้อมภายในตู้บ่มเลี้ยงไม่ดี ทำให้ได้เปอร์เซนต์โปรนิวคลีไอเพียง 57.6 เมื่อใช้เฮปาริน 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะเห็นได้ว่าเมื่อเฮปารินความเข้มข้นเพียง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก็ทำให้อสุจิเจาะได้ถึง 68.5 เปอร์เซนต์ ถ้าสภาพการหยดน้ำยาเหมาะสม อย่างไรก็ตามในการหยดน้ำยานั้นนักวิจัยหลายท่านต่างก็ใช้ในรูปแบบต่าง ๆ กัน และยังไม่มีการศึกษาเปรียบเทียบในเรื่องนี้ และจากการเปรียบเทียบปริมาณของเฮปารินต่อ 1 โอโอไซต์ เมื่อใส่อสุจิผสมเกับไข่แล้ว จะเห็นได้ว่าไม่มีความสำคัญในการเกิดโปรนิวคลีไอ ซึ่งอาจแสดงให้เห็นว่าเฮปารินที่มากเกินไปนั้นไม่ได้ทำให้เปอร์เซนต์การเกิดโปรนิวคลีไอสูงขึ้น จากตารางนี้ แสดงให้เห็นว่าเฮปารินไม่มีความจำเป็นต้องใช้ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถ้าหากจัดสภาพการวางหยดน้ำยาที่ดีใช้

เฮปารินเพียง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก็ให้ผลค่อนข้างสูงเพียงพอ

<u>การหาเวลาที่เหมาะสม</u>

จากตารางที่ 5.3 เมื่อใช้เฮปารินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซนต์โปรนิวคลิไอสูงสุดอยู่ที่ 30 นาที (46.5±19.7 เปอร์เซนต์) โดยมีค่าพิสัยของการทดลองนี้ 15.6-73 ในช่วงเวลา 45 และ 60 นาที ไม่ได้ทำให้เปอร์เซนต์การเกิดโปรนิวคลิไอสูงขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้เฮปารินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเวลาเพียง 30 นาที ก็เพียงพอ โดยไม่ดีเป็นต้องใช้เวลาถึง 45 นาที หรือ 60 นาที (รูปที่ 5.4)

จากตารางที่ 5.4 เมื่อใช้เฮปารินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปอร์เซนต์การเกิดโปรนิวคลิไอสูงสุด คือ ที่เวลา 45 นาที (45.4±2.3 เปอร์เซนต์) และต่ำสุดที่เวลา 0 นาที (13.4±1.8 เปอร์เซนต์) ในขณะที่เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นเป็น 60 นาที เปอร์เซนต์การเกิดโปรนิวคลิไอกลับลดลง (31.9±2.8 เปอร์เซนต์) (รูปที่ 5.5)

จากตารางที่ 5.5 เมื่อใช้เฮปารินความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ช่วงเวลาที่มีเปอร์เซนต์การเกิดโปรนิวคลิไอสูงสุด คือ 60 นาที ในรูปแบบการหยดน้ำยาแบบที่ 3 (77.5±2.8) และต่ำสุดที่เวลา 15 นาที (36.2±7.49 เปอร์เซนต์) โดยมีพิสัย 30-80 เปอร์เซนต์ (รูปที่ 5.6)

จากตารางที่ 5.6 เมื่อใช้เฮปารินความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามรูปแบบการหยดน้ำยาแบบที่ 4 เปอร์เซนต์การเกิดโปรนิวคลิไอสูงสุด คือ ที่เวลา 30 นาที คือมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 61.7±7.1 ในขณะที่เวลา 45 นาที และ 60 นาที เปอร์เซนต์การเกิดโปรนิวคลิไอกลับลดลงจากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า เมื่อใช้เฮปารินความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่จำเป็นต้องใช้เวลาถึง 1 ชั่วโมง (รูปที่ 5.7)

การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเฮปาริน

จากตารางที่ 5.7 เมื่อใช้เฮปารินความเข้มข้น 10, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะเห็นว่าเมื่อใช้เฮปารินความเข้มข้น 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะให้เปอร์เซนต์การเกิดโปรนิวคลิไอสูงสุด คือ 60 ± 19.8 เปอร์เซนต์ ในขณะที่เฮปารินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ผลต่ำสุด คือ 47.8 ± 20.8 เปอร์เซนต์ และเมื่อใช้เฮปารินความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ 48 ± 5.6 เปอร์เซนต์ และเฮปารินความเข้มข้น 25 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ผลใกล้เคียงกัน คือ 52.4 ± .6 และ 52.3 ± 8 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเฮปารินไม่มีความจำเป็นต้องใช้ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้เวลาบ่มเลี้ยงนาน 1 ชั่วโมง (รูปที่ 5.8)

การหาความเหมาะสมเมื่อใช้เฮปารินความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในรูปแบบที่ 6

จากตารางที่ 5.8 เมื่อใช้เฮปาริน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในรูปแบบการหยดน้ำยาแบบที่ 6 ช่วงเวลาที่ให้เปอร์เซนต์โปรนิวคลิไอสูงสุด คือ 45 นาที (73.3 ± 5.8 เปอร์เซนต์) ในขณะที่เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นเป็น 60 นาที เปอร์เซนต์การเกิดโปรนิวคลิไอกลับลดลง (65.6 ± 5.1 เปอร์เซนต์) ในขณะที่ช่วงเวลา 15 และ 30 นาที ก็ได้เปอร์เซนต์สูงถึง 69.2 ± 1.3 และ 66.7 ± 12.0 ตามลำดับ (รูปที่ 5.7) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้เฮปารินความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในรูปแบบที่ 6 แล้ว ในช่วงเวลา 15 นาที ถึง 45 นาที ให้ผลค่อนข้างดี ในขณะที่เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นเป็น 60 นาที กลับมีแนวโน้มลดลง

จากรูปที่ 5.7 เมื่อเปรียบเทียบการใช้เฮปาริน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในรูปแบบการหยดน้ำยาแบบที่ 4 และแบบที่ 6 จะเห็นว่า แบบที่ 6 ให้เปอร์เซนต์การเกิดโปรนิวคลิไอสูงกว่าในช่วงเวลา 15 นาที คือ 69.2 ± 1.3 เปอร์เซนต์ ในขณะที่แบบที่ 4 ได้ 43.3 เปอร์เซนต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ภายในตู้บ่มเลี้ยง เข้าไป

สัมผัสกับหยดน้ำ ได้ช้ากว่าแบบที่ 6 ในขณะที่เมื่อเวลาผ่านไปเป็น 30 นาที จะเห็นว่า เปอร์เซนต์โปรนิวคลิไอ ในรูปแบบการหยดน้ำยาทั้ง 2 แบบ มีค่าใกล้เคียงกัน คือ แบบที่ 4 ได้ 61.1 เปอร์เซนต์ และแบบที่ 6 ได้ 65.7 เปอร์เซนต์ ซึ่งในช่วงนี้สภาพแวดล้อมต่าง ๆ ภายในตู้บ่มเลี้ยงอาจเข้าไปมีอิทธิพลในหยดน้ำยาได้ใกล้เคียงกัน และเมื่อเวลาผ่านไปเป็น 45 นาที รูปแบบที่ 6 มีแนวโน้มได้เปอร์เซนต์โปรนิวคลิไอสูงขึ้นเป็น 73 เปอร์เซนต์ ในขณะที่แบบที่ 4 มีแนวโน้มลดลง คือ ได้ 58.3 เปอร์เซนต์ และในช่วงเวลาเพิ่มขึ้นเป็น 60 นาที เปอร์เซนต์การเกิดโปรนิวคลิไอในทั้งสองรูปแบบต่างก็ลดลง ในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน คือ แบบที่ 4 ได้ 48 เปอร์เซนต์ ขณะที่แบบที่ 6 ได้ 64.2 เปอร์เซนต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ไม่ควรจะเลี้ยงอสุจินานเกิน 45 นาที

<u>ความสำคัญของเฮปาริน</u>

เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าเฮปารินมีบทบาทสำคัญในการชักนำให้อสุจิเกิดการคาพาซิเตท และอะโครโซมรีแอ็คชั่น เฮปารินที่เสื่อมสภาพไม่สามารถชักนำให้อสุจิเกิดการคาพาซิเตทได้ จากตารางที่ 5.9 เมื่อใช้เฮปาริน ซึ่งเก็บสารละลายที่เป็น stock ไว้ที่อุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานเกิน 6 เดือน เมื่อนำมาใช้ จะได้ผลต่ำมาก (พิสัย 0-13.6 เปอร์เซนต์) จากการทดลองที่ผ่านมา พบว่า ความเข้มข้นของเฮปารินมีความสำคัญในการชักนำให้เกิดการคาพาซิเตท ในอสุจิของกระบือปลัก แต่ก็ไม่จำเป็นต้องใช้เฮปารินในความเข้มข้นมากเกินความจำเป็น เนื่องจาก เฮปารินมีราคาแพง ซึ่งจะเห็นว่าเมื่อใช้เฮปารินเพียง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเวลาเพียง 15 ถึง 45 นาที ถ้ามีการวางรูปแบบน้ำยาที่เหมาะสม ก็สามารถทำให้อสุจิปฏิสนธิได้ในเปอร์เซนต์ที่สูงเพียงพอ

รูปที่ 5.3 แสดงให้เห็นความสำคัญของเฮปาริน เมื่อใช้เฮปารินใหม่ และเฮปารินเก่า ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเท่ากัน

ในการทดลองครั้งนี้ อาจสรุปได้ว่า ในการคาพาซิเตทอสุจิกระบือปลักนั้น ใช้เฮปาริน ความเข้มข้น 10 ถึง 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเวลา 15 ถึง 45 นาที ก็เพียงพอในการชักนำให้เกิดการคาพาซิเตทได้ ซึ่งก็เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำไปใช้ในการทำการปฏิสนธิในหลอดแก้วของกระบือต่อไป เนื่องจากยังไม่มีผู้ใดทำการศึกษาเรื่องนี้มาก่อนในกระบือปลัก จึงจะเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้กับงานวิจัยทางด้านนี้ในโค Lu และ Gordon (1988) ได้ใช้เฮปาริน ความเข้มข้น 0, 10, 50, 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เสริมด้วย 10 μM hypotaurine และ 20 μM penicillamine เป็นเวลา 15 ถึง 30 นาที ได้เปอร์เซนต์การปฏิสนธิ 5.4, 50.5, 68.8, 83.5 และได้เปอร์เซนต์โปรนิวคลีไอ 2.2, 42.9, 50.5 และ 60.9 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าในโค เฮปาริน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้เปอร์เซนต์ในการเกิดปฏิสนธิสูงสุด ในการทดลองนี้ใช้อสุจิแช่แข็ง

Parrish และคณะ (1985) ได้ใช้อสุจิโคที่หลั่งออกมา ทำให้เกิดการคาพาซิเตทด้วยเฮปาริน ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วให้อสุจิเจาะไอโอไซต์โค ได้เปอร์เซนต์การปฏิสนธิ 76 เปอร์เซนต์

Fukui และคณะ (1990) ได้ศึกษาผลของปริมาณเฮปาริน และเวลาการคาพาซิเตทอสุจิ ในการปฏิสนธิในหลอดแก้วและการแบ่งเซลล์ในระยะ cleavage ของไอโอไซต์โค ที่เลี้ยงให้เจริญในหลอดแก้ว โดยใช้เฮปารินความเข้มข้น 0, 5, 10, 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้เวลาในการบ่มเลี้ยง 9 ช่วงเวลา คือ 0, 5, 15, 30, 45, 60, 120, 180 และ 240 นาที โดยใช้ไอโอไซต์ในการศึกษา 6,634 ไอโอไซต์ ค่าเฉลี่ยของไอโอไซต์ที่ปฏิสนธิในเฮปารินความเข้มข้น 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ 53 ถึง 59 เปอร์เซนต์ ซึ่งสูงกว่าค่าที่ได้จากเฮปารินความเข้มข้นอื่น ๆ ซึ่งได้ 3-44 เปอร์เซนต์ และการบ่มเลี้ยงอสุจิด้วยเฮปารินนานกว่า 60 นาที มีอัตราการปฏิสนธิต่ำ (20-36 เปอร์เซนต์) เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลาที่สั้นกว่า (38-49 เปอร์เซนต์) และจากการศึกษาการเกิด cleavage โดยใช้ไอโอไซต์ 2,098 ไอโอไซต์ โดยใช้เฮปารินเข้มข้น 25, 50, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเลี้ยงนาน 0, 15, 30 และ 50 นาที

พบว่า ช่วงเวลาในการบ่มเสี้ยงมีผลต่อการพัฒนาไปถึงระยะ 8 เซลล์ แต่ความเข้มข้นของเฮปารินไม่มีผลทำให้แตกต่างกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของเฮปารินและการคาพาซิเตทอสุจิ เป็นปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลต่อการปฏิสนธิในหลอดแก้ว และอัตราการแบ่งเซลล์ในระยะ cleavage และเฮปารินที่เหมาะสมในการคาพาซิเตทอสุจิโค มีช่วงระหว่าง25-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และช่วงเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเสี้ยง คือ 5-60 นาที

จากการทดลองดังกล่าว จะเห็นว่าสอดคล้องกับการทดลองของกระบือในครั้งนี้ คือ อสุจิที่บ่มเสี้ยงกับเฮปารินไม่ควรนานเกิน 1 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามก็ยังมีปัจจัยต่าง ๆ อีกมากที่เราเปรียบเทียบโคและกระบือไม่ได้ เนื่องจากโคและกระบือเป็นสัตว์คนละชนิด นอกจากนี้ อสุจิสด (fresh semen) และอสุจิแช่แข็ง (frozen semen) ก็มีความแตกต่างกันในด้านการเกิดการคาพาซิเตท และการมีชีวิตอยู่ในหลอดทดลอง เมื่อเสี้ยงเป็นเวลานาน กล่าวคือ อสุจิสดใช้เวลาในการคาพาซิเตทนานกว่าอสุจิแช่แข็ง แต่อสุจิที่แช่แข็ง จะเสื่อมสภาพเร็วกว่าอสุจิสด (Wheeler และ Seidel, 1986) Parrish และคณะ (1988) รายงานว่าการใช้เฮปารินกระตุ้นให้เกิดการคาพาซิเตทในอสุจิโคที่หลั่งออกมา ต้องใช้เวลาอย่างน้อย 4 ชั่วโมง ที่จะชักนำให้เกิดอะโครโซมรีแอ็คชั่น และประสบผลสำเร็จในการปฏิสนธิในหลอดแก้ว ในทางตรงกันข้ามการบ่มอสุจิแช่แข็งที่ละลายกับเฮปาริน เป็นเวลา 15 นาที ทำให้อัตราการปฏิสนธิในหลอดแก้วสูง (Parrish และคณะ, 1986) ในขณะที่อสุจิเริ่มที่จะเจาะไข่ หลังจากผสมไข่กับอสุจิ 6 ชั่วโมง ภายใต้สภาพเดียวกัน (Xu และ Greve, 1988)

ในปี 1989 Pavasuthipaisit และคณะ ใช้เฮปารินเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ในการชักนำให้อสุจิโคเกิดการคาพาซิเตท ซึ่งเป็นงานวิจัยการปฏิสนธิในหลอดแก้วของโคในประเทศไทย จะเห็นได้ว่า ผลการทดลองการใช้เฮปารินในโค และกระบือปลัก มีความแตกต่างกัน เนื่องจากความแตกต่างในด้านสรีรวิทยาการสืบพันธุ์ของสัตว์ทั้งสองชนิด ในอสุจิของกระบือ พบว่ามี เอนไซม์ อไมแลส 111.3 หน่วย (amylase unit) ซึ่งในโคมีถึง 236.6 หน่วย ซึ่งในสัตว์ทั้งสองชนิดนี้ พบว่า เอนไซม์ อไมแลส และความเข้มข้นของอสุจิตลอดจนส่วนของอสุจิที่มีชีวิตไม่มีความสัมพันธ์กัน แต่มีความสำคัญใน

ปฏิกิริยาเมตาโบลิซึม และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ (progressive sperm motility) (El-Guindi และ Abdou, 1978)

ในการคาพาซิเตทอสุจิกระบือด้วยเฮปารินในครั้งนี้ ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ใช้มีคาเฟอีน (cafeine) 10 mM อยู่ด้วย ซึ่งคาเฟอีน อาจไปมีบทบาทในการช่วยให้เกิดการคาพาซิเตท ซึ่งจะเห็นว่าในการทดลองครั้งนี้ ใช้เฮปารินเพียง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเวลาเพียง 15 นาที ก็ทำให้ได้การปฏิสนธิค่อนข้างสูง ซึ่งก็มีนักวิจัยหลายท่านได้ใช้คาเฟอีนร่วมกับเฮปารินเช่นกัน Niwa และคณะ (1988) ใช้อสุจิแช่แข็งโค บ่มเลี้ยงเป็นเวลา 5 ชั่วโมง โดยใช้คาเฟอีน 5-10 mM ในน้ำยาเพาะเลี้ยง modified Kreb's Ringer Bicarbonate ได้เปอร์เซนต์ปฏิสนธิ 35-45 เปอร์เซนต์ เปรียบเทียบกับเมื่อไม่ใส่คาเฟอีน ซึ่งได้เพียง 17-21 เปอร์เซนต์ ต่อมา Park และคณะ (1989) ได้ใช้อสุจิโคแช่แข็งผสมกับโอโอไซต์โค ที่เลี้ยงให้เจริญในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มี 5 mM คาเฟอีน และ เฮปาริน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อสุจิสามารถเกิดการคาพาซิเตท และอะโครโซม รีแอ็คชั่น ภายใน 1 ชั่วโมง เมื่อโอโอไซต์ถูกย่อยเอาคิวมูลัส และโคโรนาเซลล์ (corona cell) ออก

ในการตรวจสอบการปฏิสนธิในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีการดูจากโปรนิวเคลียสของอสุจิ เนื่องจากตรวจสอบได้สะดวกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เนื่องจากมีความจำเป็นต้องนำไข่ที่ศึกษาในขั้นตอนนี้ไปศึกษาต่อในขั้นตอนที่ 2 ซึ่งเป็นการศึกษาโครโมโซมจากอสุจิของกระบือปลัก ในการเกิด decondensation ของนิวเคลียส อสุจิไปเป็นโปรนิวเคลียสนั้น จำนวน disulfide bond ของนิวเคลียสอสุจิ ซึ่งมีมากในขณะที่อสุจิอยู่ในอิพิดิไดมิส จะถูกลดจำนวนลงเมื่ออสุจิอยู่ในไซโตพลาสซึมของไข่ ซึ่งจะทำให้นิวเคลียสของอสุจิเกิด decondensation และพัฒนาเป็น male pronucleus ต่อไป (Zirkin และคณะ, 1989) ในช่วงนี้จึงเป็นช่วงที่สำคัญอย่างยิ่ง อย่างไรก็ตามวิธีการนี้อาจมีข้อผิดพลาดได้บ้าง เนื่องจากไข่ที่ไปผ่านการปฏิสนธิ ก็สามารถถูกกระตุ้นให้พัฒนาต่อไปได้โดยวิธี parthenogenetic activation (Evans, 1987) แต่อย่างไรก็ตามโอกาสที่จะเกิดแบบนี้ได้นับว่าน้อยมาก (<10 เปอร์เซนต์) (Lu และ Gordon, 1988)

สิ่งสำคัญอีกอย่างหนึ่งที่ควรจะพิจารณา ก็คือ น้ำยาเพาะเลี้ยงที่ใช้ ซึ่งควรจะมีค่า osmolarity อยู่ระหว่าง 280-285 mOsmol/l (Braude,.987) การใช้ mineral oil ปิดทับหยดของน้ำยาเพาะเลี้ยง ก็เพื่อป้องกันการเปลี่ยน osmolarity ซึ่งเกิดขึ้นโดยการระเหยของน้ำในระหว่างบ่มเลี้ยง การที่หยดน้ำยามีขนาดเล็ก เช่นในรูปแบบการหยดน้ำยาแบบที่ 4, 5 และ 6 ทำให้คาร์บอนไดอ็อกไซด์ในตู้บ่มเลี้ยง ตลอดจนความชื้น และอุณหภูมิ ได้เข้าไปสัมผัสกับหยดน้ำยาได้ทั่วถึงมากขึ้น และในเวลาที่รวดเร็ว หยดน้ำยาที่มีขนาดใหญ่มากจะทำให้ต้องใช้เวลานานกว่า และไม่สะดวกในการปิดทับด้วย mineral oil นอกจากนี้ pH ของน้ำยาเพาะเลี้ยงก็มีบทบาทสำคัญในการเกิดการคาพาซิเตท pH ของอสุจิสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั้งหมดจะสูงกว่า 7 ในหนูตะเภา การเคลื่อนไหวของอสุจิจะลดลงอย่างมาก เมื่อ pH ลดลงที่ 6.1 แต่อสุจิจะยังคงมีชีวิตและยังคงแข็งแรง เมื่อนำกลับมาใส่ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มี pH สูงกว่า (Murphy และ Yanagimachi, 1984) pH ในอิพิดิไดมิสของอสุจิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมถูกเก็บไว้ค่อนข้างต่ำ คือ เท่ากับ 6.0 ซึ่งอสุจิจะเคลื่อนไหวไม่แข็งแรง จนกระทั่งอสุจิได้สัมผัสกับ seminal plasma ที่มี pH สูงขึ้น อสุจิจะเคลื่อนไหวมากขึ้น ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นในการดึงไฮโดรเจนอิออน (H^+) ออกนอกเซลล์ ทำให้ pH ภายในเซลล์อสุจิสูงขึ้น (Wong และคณะ,1981)ในอสุจิหนูถีบจักร แฮมสเตอร์สีทอง และหนูขาว ช่วง pH ที่เหมาะสมที่สุดในการปฏิสนธิ คือ 7.3-7.7, 6.8-8.2 และ 7.8 (Miyamoto และคณะ,1974) ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้น้ำยาเพาะเลี้ยง pH 7.4 ซึ่งก็เหมาะสมดีแล้ว

แคลเซี่ยมอิออน นับว่ามีความสำคัญในการเกิดอะโครโซม รีแอ็คชั่น และยังเพิ่มความสามารถในการปฏิสนธิของตัวอสุจิ (Singh และคณะ, 1978) นอกจากนี้ แคลเซียมยังมีส่วนส่งเสริมการเคลื่อนไหวของอสุจิด้วย (Breitbart และคณะ, 1985) ในการศึกษาครั้งนี้ใช้น้ำยา BWW ซึ่งมีแคลเซียมประมาณ 1.3 mM นอกจากแคลเซี่ยมอิออนแล้วอสุจิยังต้องการแมกนีเซี่ยมอิออน (Mg^{2+}) และ ATP เป็นตัวช่วยเร่งการเกิดการคาพาซิเตท และอะโครโซมรีแอ็คชั่น (Breitbart และคณะ, 1983; Roldan และ Fleming, 1989) Guerin และ Czyba (1979) พบว่าน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มี $Na^+ : K^+$ สูง (25:1) สามารถเพิ่มความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง BWW มี $Na^+ : K^+$ ประมาณ 19.2 : 1

สารประกอบที่ให้พลังงานอสุจิ Rogers และ Yanagimachi (1975) ศึกษาในหนูตะเภา พบว่า เมตาโบลิซึมของไพรูเวท และแลคเตท มีความจำเป็นในการเกิดการคาพาซิเฮท และอะโครโซม รีแอ็คชั่น ส่วนกลูโคสนั้น พบว่าทำให้การเกิดการคาพาซิเตท และอะโครโซม รีแอ็คชั่น ช้าลง โดยไปรบกวนการไหลเข้า (uptake) ของ แคลเซี่ยมอิออน ผ่านผนัง.ชลล์เมมเบรนอสุจิ

นอกจากนี้สารพวก ซีรัม อัลบูมิน ก็ชักนำให้เกิดอะโครโซม รีแอ็คชั่น (Lui และคณะ, 1977) สารกระตุ้นการเคลื่อนไหวของอสุจิ เช่น hypotaurine มีผลต่อการเคลื่อนไหวของอสุจิ และส่งเสริมการปฏิสนธิในหลอดแก้วของไข่แฮมสเตอร์ที่ไม่มีคิวมูลัส (Leibfried และ Bavister, 1981) Sidhu และคณะ, 1984 ได้ใช้สารประเภทนี้ในการชักนำให้เกิดการคาพาซิเตท และอะโครโซม รีแอ็คชั่น ในกระบือ ทำให้อสุจิกระบือมีเปอร์เซนต์การเคลื่อนไหวไปข้างหน้าเป็นเวลานาน และรักษาเปอร์เซนต์อสุจิที่มีชีวิตสูงขึ้น

ในการศึกษาครั้งนี้ ก็มีการใช้สารพวกนี้เช่นกัน คือ hypotaurine ความเข้มข้น 0.5 mM ทำให้เปอร์เซนต์การเคลื่อนไหวไปข้างหน้าของอสุจิสูงขึ้น และอสุจิมีชีวิตอยู่ได้นานขึ้น

เนื่องจากข้อมูลในการศึกษาทางด้านการคาพาซิเตทอสุจิของกระบือปลัก ด้วยเฮปาริน ยังไม่มีผู้ใดทำการศึกษามาก่อน แต่ในการทดสอบว่าอสุจิสามารถเกิดการคาพาซิเตทหรือไม่นั้น ก็ใช้วิธีการสังเกตุการเคลื่อนไหวของหางอสุจิ และดูว่าอสุจิเกิด อะโครโซม รีแอ็คชั่น หรือไม่ โดยการย้อมสีดูบริเวณอะโครโซม (sidhu และคณะ,1984) แต่ยังไม่มีรายงานในการใช้ไข่แฮมสเตอร์ที่ไม่มีโซนาเพลลูซิดา ทดสอบอสุจิของกระบือเลย ในการทดสอบอสุจิโดยการเจาะไข่แฮมสเตอร์นั้น ยังไม่มีค่าที่เป็นมาตรฐานเดียวกันในสัตว์แต่ละชนิดรวมทั้งมนุษย์ด้วย ทั้งนี้อาจเนื่องจากนักวิจัยแต่ละท่านต่างก็ใช้วิธีการศึกษาที่ต่างกัน และก็มีปัจจัยต่าง ๆ มากมาย ที่มีผลกระทบต่อการเจาะทะลุไข่แฮมสเตอร์ เช่น ความชำนาญของผู้ทดลอง น้ำยาเพาะเลี้ยง การควบคุมสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม และคุณภาพของไข่แฮมสเตอร์ เป็นต้น ไข่แฮมสเตอร์ที่เจริญในตัวสัตว์นานกว่า 4-10 ชั่วโมง ภายหลังตกไข่ จะทำให้อัตราการปฏิสนธิลดลง (Yanagimachi และ Chang, 1961)

ในการทดสอบอสุจิว่ามีความสมบูรณ์พอที่จะปฏิสนธิได้หรือไม่นั้น มีการศึกษากันครั้งแรกในมนุษย์ และก็มีการศึกษาในสัตว์อื่น ๆ ต่อมา ซึ่งในมนุษย์สามารถทำได้ 2 วิธีคือ ทดสอบความสามารถของอสุจิในการเจาะโซนาเพลลูซิดา โอโอไซต์ของมนุษย์ ที่ไม่มีชีวิตแล้ว (Overstreet และ Hembree, 1976) และใช้ไข่แฮมสเตอร์ที่เจริญวัย เพื่อศึกษาอสุจิในการเจาะผ่าน ooplasm (Yanagimachi และคณะ, 1976) ซึ่งทั้ง 2 วิธีนี้สามารถวัดกระบวนการทางสรีรวิทยาของอสุจิรวมทั้งการเกิดการคาพาซิเตท และอะโครโซมรีแอ็คชั่น ในสภาพหลอดทดลอง (Overstreet และคณะ, 1980) การยับยั้งไม่ให้อสุจิต่างชนิดเจาะผ่านเข้าไปไม่ได้อยู่ที่โซนาเพลลูซิดาเท่านั้น แต่ยังขึ้นอยู่กับ vitelline membrane อีกด้วย (Hanada และ Chang, 1976)

Hanada และ Chang (1976) พบว่า อสุจิของสัตว์ชนิดหนึ่ง สามารถเจาะผ่านโซนาเพลลูซิดาของสัตว์อีกชนิดหนึ่งได้ เช่น อสุจิของหนูถีบจักร สามารถเจาะผ่านไข่ของหนูขาวได้ 6% และสามารถพัฒนาเป็นโปรนิวคลิไอได้ 2% อสุจิของหนูขาวก็สามารถเจาะไข่ของหนูถีบจักรได้แต่ไม่พบการเกิดโปรนิวคลิไอ

Prasad (1984) ได้สรุป การใช้ไข่แฮมสเตอร์ทดสอบอสุจิ (sperm penetration assay) ว่า หนึ่ง อสุจิจะต้องเกิดอะโครโซม รีแอ็คชั่น สอง ผนังเมมเบรนของอสุจิต้องมีคุณสมบัติที่ปกติในการรวมกับ vitelline membrane และสาม นิวเคลียสของอสุจิจะต้อง decondense ไปเป็นโปรนิวเคลียส ในการศึกษาครั้งนี้ไม่เห็นหางอสุจิที่อยู่ใน oophasm ของไข่ เนื่องจากสังเกตุได้ยาก ด้วยการมองจากกล้องจุลทรรศน์ และในสัตว์พวกโค และลิง rhesus การมองเห็นหางของอสุจิในไซโตพลาสซึมของไข่ เป็นเรื่องยาก เนื่องจากมีสารพวกไขมันเป็นจำนวนมาก และหางของอสุจิก็สลายเร็ว (Bavister และคณะ, 1983)

ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้วิธีการแยกอสุจิ โดยการปั่นแยกในสารละลายเปอร์คอล 45 และ 30 เปอร์เซนต์ ซึ่งทำให้ได้ปริมาณของอสุจิที่เคลื่อนที่ได้มากกว่าใช้วิธีให้อสุจิว่ายขึ้น การใช้เปอร์คอลแยกอสุจิ ทำให้ได้การปฏิสนธิสูง และเปอร์เซนต์การเคลื่อนไหวของอสุจิสูงกว่า

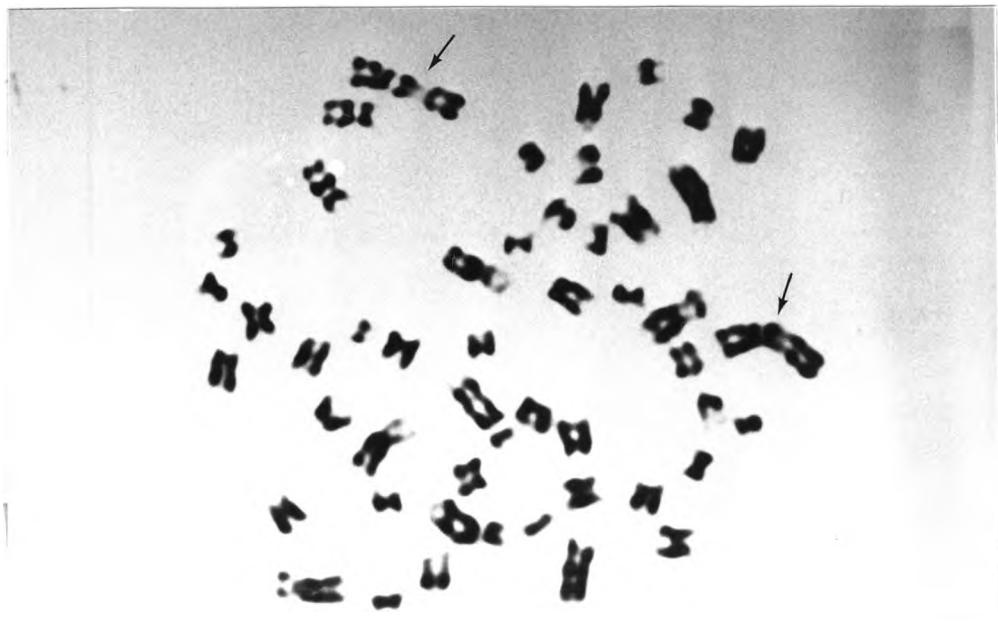
วิธีอื่น (Berger และคณะ, 1985) แต่อย่างไรก็ตามการใช้เบอร์คอลต้องใช้เวลาในการเตรียมคอนข้างนาน อาจไม่สะดวกเท่ากับการใช้วิธี swim up ในกรณีที่ไม่ ต้องการใช้อสุจิในปริมาณมาก

สรุปผลการศึกษาในการคาพาซิเตทอสุจิกระบือปลักแช่แข็งด้วยเฮปาริน ใช้ความเข้มข้นของเฮปาริน 10 ถึง 25 ไมโครกรัม เป็นเวลา 15 ถึง 45 นาที โดยการวางรูปแบบการหยดน้ำยาแบบที่6 สำหรับในการศึกษาต่อไปนั้น ควรจะศึกษาในด้านปริมาณของแคลเซี่ยมอิออน ที่เหมาะสมในน้ำยาเพาะเลี้ยง เพราะในการศึกษาครั้งนี้ใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงตามแบบที่ใช้ศึกษาในคน นอกจากนี้ การนำเอาอสุจิสดมาทำการศึกษาเปรียบเทียบ ก็เป็นเรื่องที่น่าสนใจสำหรับขนาดของหยดน้ำยาที่ใช้นั้นต้องดัดแปลงให้เหมาะสมกับงานที่ทำ เช่น ในการปฏิสนธิในหลอดแก้ว ที่ต้องใช้เวลาเลี้ยงไข่เป็นเวลานาน หยดน้ำยาที่เล็กเกินไปอาจไม่เหมาะสม การศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้น จำเป็นต้องมีการปรับปรุงอีกมาก เนื่องจากมีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลอย่างมากต่อการเกิดการคาพาซิเตท และอะโครโซม รีแอ็คชั่น

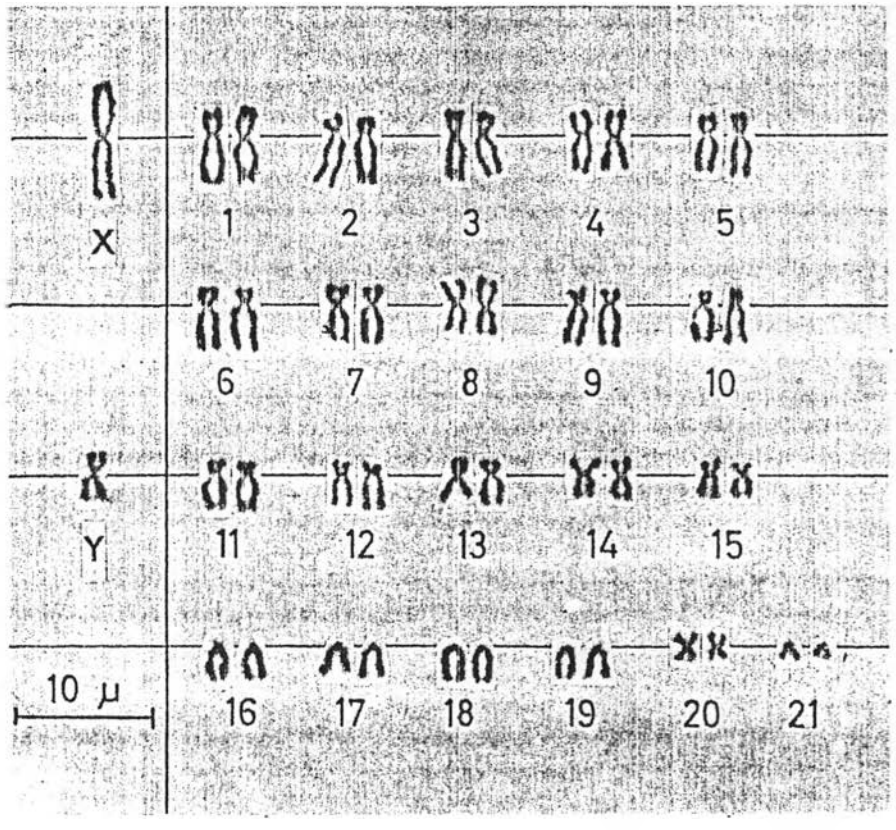
<u>การศึกษาโครโมโซมจากอสุจิของกระบือปลัก</u>

อสุจิที่นำมาปฏิสนธิกับไข่แฮมสเตอร์นั้น เมื่อผ่านการปั่นแยกในสารละลายเบอร์คอลที่ 500 g เป็นเวลา 10 นาที และปั่นล้างอีกครั้งหนึ่งในน้ำยาเพาะเลี้ยง BWW ที่ 500 g เป็นเวลา 10 นาที จากตารางที่ 5.10 จะเห็นว่าหลังการปั่นอสุจิจะมีเบอร์เซนต์การเคลื่อนไหวสูงขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากอสุจิที่ตายแล้วส่วนใหญ่จะถูกกรองอยู่ส่วนบน โดยสารละลายเบอร์คอล การคาพาซิเตทอสุจิโดยการใช้เฮปาริน ซึ่งมีความสะดวกในการเตรียมสาร ในการศึกษาครั้งนี้ใช้โอโอไซต์ทั้งหมด 3,722 โอโอไซต์ มีโอโอไซต์ที่ปฏิสนธิทั้งหมด 1,737 โอโอไซต์ (46.6%) ซึ่งจำนวนไข่ที่นำมา fix บนสไลด์นั้น ได้คัดเลือกเอาไข่ที่ผ่านการปฏิสนธิ และอยู่ในระยะเมตาเฟส 783 (21.0 เบอร์เซนต์) ซึ่งไข่บางส่วนได้หยุดพัฒนาในช่วงที่เห็นโปรนิวคลิไอ ไข่ที่พัฒนาจนถึงระยะเมตาเฟส จะไม่เห็นโปรนิวคลิไอเมื่อนำไข่มา fix บนสไลด์ โครโมโซมที่ตรวจสอบ ส่วนใหญ่ พบว่า เป็นโครโมโซมของแฮมสเตอร์เพียงอย่างเดียว ทั้งนี้อาจเป็นเพราะโปรนิวเคลียสของอสุจิไม่ได้พัฒนาต่อจนถึง

ระยะที่จะเห็นโครโมโซม ดังนั้นในจำนวนทั้งหมดที่ทำการศึกษา จึงพบเพียง 2 เมตาเฟส ที่มีโครโมโซม 2 กลุ่ม (รูปที่ 5.10) ซึ่งเมื่อนับจำนวนและดูรูปร่างของโครโมโซมแล้ว ในรูปที่ 5.10 ก. น่าจะเป็นโครโมโซมอสุจิของกระบือปลัก และในรูป 5.10 ข. น่าจะเป็นโครโมโซมของแฮมสเตอร์ เมื่อนับจำนวนดูจะได้ประมาณ 22 ปกติแฮมสเตอร์มีจำนวนโครโมโซมที่ไมโซมาติกเซลล์ 2n = 44 ซึ่งประกอบด้วย ออโตโซม 42 แท่ง เป็น เมตาเซนตริก และซับเมตาเซนตริก 34 แท่ง ที่เหลือ 8 แท่ง เป็น อะโครเซนตริก สำหรับโครโมโซมเพศ 2 แท่ง คือ โครโมโซมเอ็กซ์ เป็น ซับเมตาเซนตริกขนาดใหญ่ และวาย เป็น ซับเมตาเซนตริกค่อนข้างเล็ก (รูปที่ 6.2) ส่วนโครโมโซมของกระบือปลัก 2n = 48 ในกระบือปลักมีเมตาเซนตริกและซับเมตาเซนตริก เพียง 5 คู่ นอกนั้นเป็นอะโครเซนตริก ซึ่งในโครโมโซมที่เป็นอะโครเซนตริก จะสังเกตุได้ง่าย (รูปที่ 6.1) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับรูปที่ 5.10 ก. เท่าที่พอสังเกตุได้ A คือ เมตาเซนตริกโครโมโซมขนาดใหญ่ ซึ่งมี 2 โครมาติด B,C เป็นซับเมตาเซนตริก และ D,E เป็นอะโครเซนตริก โดยเฉพาะ D เป็นอะโครเซนตริก ซึ่งมีขนาดค่อนข้างใหญ่ ซึ่งในแฮมสเตอร์ไม่มีโครโมโซมที่เป็นอะโครเซนตริกขนาดใหญ่ อย่างไรก็ตามก็ยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัด จำเป็นต้องปรับปรุงเทคนิคการศึกษาโครโมโซมอสุจิต่อไป



รูปที่ 6.1 แสดงเมตาเฟสเพลท (metaphase plate) ของโครโมโซมกระบือปลัก 2n = 48 ที่เลี้ยงจากเม็ดเลือดขาว (กำลังขยาย 1.050 เท่า) โดยวิธี GTG banding (ศรชี้ คือ โครโมโซมคู่ที่ 4 ซึ่งเป็นเมตาเซนติกขนาดใหญ่ที่สุด)



รูปที่ 6.2 แสดงคารีโอไทป์ของแฮมสเตอร์สีทอง (กำลังขยาย 1,750 เท่า)
(จาก Lehman, 1963)

Martin (1983) ได้แนะนำว่าในการศึกษาโครโมโซมของอสุจินั้น จำเป็นต้องใช้เวลาในการฝึกฝนไม่ต่ำกว่า 1 ปี การตรวจสอบการปฏิสนธิของไข่เป็นเรื่องจำเป็น ส่วนใหญ่ไข่จะไม่พัฒนาต่อในระยะที่เกิดโปรนิวเคลียส ซึ่งไข่บางส่วนก็แตก หรือสูญหายไปในระหว่างการ fix นอกจากนี้เทคนิคในการทำให้โครโมโซมกระจายก็เป็นเรื่องจำเป็น การที่โครโมโซมกระจายไม่ดีนั้น อาจมีสาเหตุมาจาก pH ของน้ำยาเพาะเลี้ยงสูงเกินไปในระหว่างการเตรียมไข่ ซึ่งจะต้องปรับ pH ด้วยการพ่นก๊าซ คาร์บอนไดอ็อกไซด์ลงไป และไม่ควรนำไข่อยู่นอกตู้บ่มเลี้ยงนานเกิน 30 นาที

ในการศึกษาโครโมโซมจากอสุจิของโค Tateno และ Mikamo (1987) ได้เพิ่มความเข้มข้นของ vinblastine และ podophylloloxine และช่วงเวลาในการให้อสุจิเกิด condensation ของโครโมโซม โครโมโซมที่มีคุณภาพไม่ดีและซ้อนทับกัน อาจมีสาเหตุมาจากการเกิด condensation ของโครมาตินไม่เพียงพอ การปรับปรุงเทคนิคดังกล่าวทำให้ได้ผลดีในการศึกษาโครโมโซมจากอสุจิ ทำให้ได้จำนวนโครโมโซมอสุจิที่ตรวจสอบได้ถึง 55.6 เปอร์เซนต์ จากการใช้โอโอไซต์ แฮมสเตอร์ศึกษาทั้งหมด 732 โอโอไซต์ ซึ่งนับว่าประสบผลสำเร็จค่อนข้างสูง และจากการศึกษาในโคเช่นกัน โดย Kovacs และ Foote (1989) ใช้โอโอไซต์แฮมสเตอร์ 9,575 โอโอไซต์ พบว่ามีเพียง 90 โอโอไซต์ (0.96%) ที่เห็นโครโมโซมของอสุจิ และใน 90 โอโอไซต์นี้มีเพียง 25 โอโอไซต์เท่านั้นที่สามารถแยกเพศอสุจิได้ และพบว่าอสุจิจะหยุดพัฒนาในระยะที่เกิด decondensation ของนิวเคลียส

ในการศึกษาครั้งนี้ส่วนใหญ่ได้พัฒนาเทคนิคในการเพิ่มเปอร์เซนต์ในการปฏิสนธิให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด ซึ่งจำเป็นต้องมีการตรวจสอบไข่เป็นเวลานานในสภาพอุณหภูมิห้อง นิวเคลียสของอสุจิที่พัฒนาจนถึงระยะโปรนิวเคลียส จึงมักจะหยุดพัฒนาในช่วงนี้ ทำให้โอกาสที่จะได้โครโมโซมของอสุจิน้อยมาก อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ก็เป็นแนวทางหนึ่งที่เป็นพื้นฐานเพื่อที่จะได้ปรับปรุงเทคนิคต่อไป

สรุปผลการศึกษาโครโมโซมจากอสุจิกระบือปลักในครั้งนี้ พบว่า มี 2 เมตาเฟสที่เห็นโครโมโซม 2 กลุ่ม ซึ่งยังบอกไม่ได้แน่ชัด เนื่องจากโครโมโซมกระจายไม่ดี จำเป็นต้องพัฒนาเทคนิคต่อไป ซึ่งจะต้องให้ได้จำนวนโอโอไซต์ที่เกิดปฏิสนธิสูงที่สุด และต้องเลี้ยงโอโอไซต์ที่ปฏิสนธิแล้วอย่างต่อเนื่อง ไม่ควรเอาออกมาจากตู้บ่มเลี้ยงนานเกินไป นอกจากนี้การควบคุม pH ของน้ำยาเพาะเลี้ยง ตลอดจน osmolarity ของน้ำยาเพาะเลี้ยงก็เป็นสิ่งที่จำเป็น เพื่อที่จะได้โครโมโซมที่มีคุณภาพดีที่สุด

อนึ่งในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้วางแผนการทดลองโดยใช้สถิติ เนื่องจากไม่สามารถผลิตสัตว์ทดลองได้ตามเป้าหมายของการทดลองแต่ละครั้ง บางครั้งการกระตุ้นการตกไข่ไม่ได้ผล ทำให้ปริมาณไข่ไม่เพียงพอต่อการใช้สถิติวิเคราะห์