จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2538

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การเพิ่มประสิทธิภาพการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อ : ใช้สีเรืองแสงบ่งบอกปฏิกริยาอโครโซมที่เกิดขึ้นจริง

TECHNIQUE TO A MORE ACCURATE SEMEN EVALUATION: FLUOROCHROME TO DIFFERENTIATE THE TRUE ACROSOME REACTION

โดย

สุมลยา กาญจนะพังคะ
ศิลป์ชัย เพียรชอบ
จงกล เจียรสุวรรณ์

จิยัย
SF91
.ส784
2541

กันยายน 2541
ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

B 14987958

การเพิ่มประสิทธิภาพการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อ : ใช้สีเรืองแสงบ่งบอกปฏิกิริยาอโครโซมที่เกิดขึ้นจริง

สุมลยา กาญจนะพังคะ [1] ศิลป์ชัย เพียรชอบ [1] จงกล เจียรสุวรรณ์ [1]

[1] ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

ประเมินสถานภาพเชื้อตัวผู้จากน้ำเชื้อโคและกระบือแช่แข็ง และน้ำเชื้อสดสุกรโดยใช้สารเรืองแสงทั้งวิธีแห้งและเปียก เพื่อแยกเชื้อตัวผู้ที่เป็น/ตายออกจากกัน พร้อมทั้งแยกพวกที่มีสันอโครโซมปกติ(มีศักยภาพในการจะเกิดปฏิกิริยาอโครโซมได้) ออกจากพวกที่เกิดปฏิกิริยาอโครโซมจริงและพวกที่มีอโครโซมเสียหายหรือลอกหลุดด้วย ในการประเมินสถานภาพโดยใช้วิธีแห้งนั้นต้องใช้ความเข้มข้นของสารเรืองแสงเป็น 5 μg/ml เท่านั้น จึงสามารถพบเชื้อตัวผู้ที่ยังมีชีวิตอยู่ได้ ถ้าประเมินสถานภาพหลังจากนั้น 7 วัน (D7) พบเชื้อตัวผู้ตายมากขึ้น (โค 41.3%กระบือ 24.4% และสุกร 18.5%) หากทิ้งไว้ 14 วันจะไม่สามารถประเมินสถานภาพเชื้อตัวผู้จากน้ำเชื้อแช่แข็ง (โคและกระบือ) ได้ เพราะเชื้อตัวผู้ตายทั้งหมด ส่วนน้ำเชื้อสด (สุกร) 14 วันหลังการทดลองพบมีตัวตายเพิ่มขึ้นจากวันที่ทำการทดลอง 16.5 %

สำหรับการประเมินสถานภาพโดยวิธีเปียกที่ใช้ความเข้มข้นของสารเรืองแสงต่างกัน (10 และ 20 μg/ml) พบว่าจำนวนเชื้อตัวผู้เป็นที่มีสันอโครโซมปกติ และจำนวนเชื้อตัวผู้ตายทั้งหมดเปลี่ยนแปลงไปน้อยมากในทุกช่วงเวลา (D0, D7 และ D14) ผลจากการทดลองครั้งนี้ชี้แนะว่าควรใช้ความเข้มข้นของสารเรืองแสง 5 μg/ml ในวิธีแห้ง และ 10 หรือ 20 μg/ml ในวิธีเปียก เมื่อสารเรืองแสงจับกับ DNA ของเชื้อตัวผู้แล้ว ตรวจได้ด้วยกล้องจุลทัศน์ phase contrast แต่จะไม่สามารถจำแนกสถานภาพของอโครโซมได้อย่างสมบูรณ์ ต้องใช้กล้องจุลทัศน์ฟลูออเรสเซนตรวจร่วมด้วย สำหรับการจำแนกสถานภาพของอโครโซมนั้นขอแนะนำให้ใช้กล้องจุลทัศน์ dark field และการเตรียมน้ำเชื้อโดยวิธีเปียกทำให้สามารถแยกตัวเป็น/ตายออกจากกันได้ รวมทั้งสามารถจำแนกเชื้อตัวผู้ที่มีศักยภาพในการจะเกิดปฏิกิริยาอโครโซม ออกจากพวกที่เกิดปฏิกิริยาอโครโซมแล้ว และพวกที่มีอโครโซมเสียหายหรือลอกหลุด

คำสำคัญ : สารเรืองแสง สถานภาพอโครโซม การย้อมขณะมีชีวิต น้ำเชื้อ

ห้องสมุด
คณะสัตวแพทยศาสตร์
ได้รับความเอื้อเฟื้อจาก
ฝ่ายวิจัย คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ
เลขที่รับ 648
วันที่ 3 พฤศจิกายน 2541.

SF81
.ส784
2541

TECHNIQUE TO A MORE ACCURATE SEMEN EVALUATION : FLUOROCHROME TO DIFFERENTIATE THE TRUE ACROSOME REACTION

SUMOLYA KANCHANAPANGKA [1] SILPCHAI PIENCHOB [1] CHONGKOL JIANSUWAN [1]

[1] Department of Veterinay Anatomy , Faculty of Veterinary Science,

Chulalongkorn University , Bangkok 10330

Abstract

Boar, bulls and buffalo bulls fresh and frozen semen are differentiated for viability/non viability and also for the true acrosome reaction using fluorochrome. The living and damaged or altered membrane spermatozoa are also measured. Normal , living spermatozoa are only noted when using 5 µg/ml fluorochrome in the dry preparation. Evaluation 7 days afterward (D7) reveals an increase in damaged spermatozoa (bull 41.3% buffalo bull 24.4% and boar 18.5%). Determination is irrelevant after 14 days (D14) using dry preparation in bull and buffalo bull semens (frozen semen). All sperms are fluorescence on D14 . Damaged or altered membrane of the unfixed sperm allow the dye to penetrate into the cell where it binds strongly to DNA. Boar semen (fresh) on day 14 has16.5 % more fluorescence sperms than D0.

Fluorochrome concentrations (10 or 20 µg/ml) using in wet preparation do not have a drastic effect on viability of spermatozoa. Number of viable sperms with normal acrosomal ridge (having potential to develop acrosome reaction) and all the nonviable sperms are about the same at D0 , D7 and D14 . Concentration of fluorochrome should be reduced to 5 µg/ml in dry preparation and either 10 or 20 µg/ml in wet preparation. Binding with the sperm DNA, fluorochrome concentrations used in our study can be examined incompletely through phase contrast microscope. To be able to differentiate between true acrosome reaction and degenerative postmortem loss of acrosomal membrane, microscope equipped with UV-excitation has to be employed. In addition, we find that the dark field microscope gives the best result in differentiating acrosome status and reaction.

Key words : Fluorochrome , acrosome evaluation , fix - vital staining , semen

บทนำ

อโครโซมเชื้อตัวผู้ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วนใหญ่มีขนาดเล็กมาก (Yunagimachi,1981) ถึงแม้ใช้กล้องจุลทัศน์ชนิด phase-contrast ศึกษาก็ยังยากที่จะตรวจสถานภาพอโครโซมได้ ได้มีการศึกษามากมาย (Saacke and Marshall,1968 Wells and Awa,1970 Chacarov and Molkova, 1976 Bongso,1983 และ Lee and Storey, 1985) พยายามหาวิธีการย้อมเพื่อให้อโครโซมติดสีเห็นชัดเจนรวมทั้งใช้ Differential interference contrast microscopy (Saacke and Marshall,1968) indirect immunofluorescence (Wolf *et al.*1985) และ direct fluoresceinated lecitins (Talbot and Chacon 1980 และ Cross *et al.*,1986) เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างของอโครโซม แต่วิธีที่กล่าวมาทั้งหมดนี้ไม่สามารถแยกปฏิกิริยาอโครโซมที่เกิดขึ้นจริงในเชื้อตัวผู้ที่ยังมีชีวิตอยู่ออกจากการลอกหลุดของเยื่ออโครโซมและผนังหุ้มเซลล์ทั้งสองชั้นของเชื้อตัวผู้ที่เกิดขึ้นหลังจากเชื้อตัวผู้ตายได้ (degenerative acrosome reaction) de Leeuw *et al.* (1991) ได้ทดลองใช้สาร fluorochrome คือ bisbenzimide 33258[@] เป็นตัวแยกเชื้อตัวผู้ที่ตายแล้วออกจากพวกที่มีชีวิตอยู่ได้ โดย bisbenzimide จะซึมผ่านผนังเซลล์ของเชื้อตัวผู้ที่เสียหายหรือตายแล้วเข้าไปจับกับ DNA (de Leeuw and den Dass ,1992) ทำให้เชื้อตัวผู้เรืองแสงขึ้นเมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทัศน์ชนิด phase-contrast ที่มีอุปกรณ์ร่วมเป็นแหล่งกำเนิดแสง ultraviolet แสงเรืองที่เกิดจาก fluorochrome ไปจับ DNA นี้มีความเข้มสูงมาก อาจศึกษาด้วยกล้องจุลทัศน์ชนิด phase-contrast ธรรมดาก็ได้

การศึกษานี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อในภาคสนามซึ่งต้องการความรวดเร็ว มีวิธีการปฏิบัติและใช้เครื่องมือที่ไม่ซับซ้อน จึงเน้นถึงการตรวจเชื้อตัวผู้ที่ยังมีชีวิตอยู่พร้อมกับมีสันอโครโซมซึ่งแสดงถึงศักยภาพในการที่จะเกิดปฏิกิริยาอโครโซมได้ ตามสมมุติฐานที่ว่าเชื้อตัวผู้ที่มีอโครโซมที่สมบูรณ์ (ยังไม่เกิดปฏิกิริยาอโครโซม) เท่านั้นจึงจะเกิด capacitation ในทางเดินระบบสืบพันธุ์ของตัวเมียได้ (Cummin *et al.*, 1991) จุดมุ่งหมายอีกประการคือ การศึกษาความสามารถติดสีเรืองแสงของเชื้อตัวผู้ในสัตว์ 3 ชนิด (สุกร โค และกระบือ) เพื่อหาข้อมูลว่า ความเข้มของสีเรืองแสงมากพอที่จะตรวจด้วยกล้องจุลทัศน์ชนิด phase-contrast ธรรมดาได้หรือไม่ และหากไม่สามารถประเมินคุณภาพน้ำเชื้อได้ทันทีควรจะใช้วิธีใดเตรียมน้ำเชื้อ

@ Sigma Chemical Company

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่างแยกเป็นน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยเก็บน้ำเชื้อสดจากสุกรพ่อพันธุ์ที่ใช้ตัวเมียล่อ 1 ตัวอย่าง และน้ำเชื้อแช่แข็งโคและกระบือพ่อพันธุ์ชนิดละ 2 ตัวอย่าง การทดลองแบ่งเป็น 2 วิธี คือ แห้งและเปียกดังนี้

1. <u>วิธีแห้ง</u>

1. นำน้ำเชื้อสดมาทำให้เจือจางด้วย Tris buffer จนมีเชื้อตัวผู้ 50-100 ล้านตัว/มล. หากเป็นน้ำเชื้อแช่แข็งนำหลอดจุ่มลงในน้ำอุ่น 35° – 37° C นาน 30 วินาที

2. เติมสี bisbenzimide (5 หรือ 10 ug/ml) 50 ul ลงในน้ำเชื้อตาม 1 จำนวน 50 ul เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

3. หยดน้ำเชื้อที่ย้อมแล้ว 10 ul ลงบนแผ่นสไลด์ ใช้ปลายปิเปตเกลี่ยให้มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 ซม. ทำ 2 ชุด/ตัวอย่าง ทิ้งให้แห้งในอากาศ

4. ประเมินสถานภาพเชื้อตัวผู้ทันที(D0) โดยใช้กล้องจุลทัศน์ phase contrast ที่มี fluorescence optics และ dark field ติดร่วม โดยใช้กำลังขยาย 100x และเลือกตรวจบริเวณกลางหยดตัวอย่าง จัดเชื้อตัวผู้ที่ตรวจเข้ากลุ่มต่าง ๆ ตามเกณฑ์ที่ตั้งไว้ ตรวจเชื้อตัวผู้สไลด์ละ 200 ตัว หากไม่สามารถตรวจประเมินคุณภาพน้ำเชื้อได้ทันทีหลังเตรียมแล้วให้เก็บสไลด์ในกล่องที่มีสารดูดความชื้นและไม่ให้โดนแสงสว่างที่ 4° C

5. ตรวจประเมินสถานภาพเชื้อตัวผู้อีก 2 ครั้ง 7 และ 14 วันหลังจากนี้ (D7 และ D14)

สำหรับวิธีแห้งนี้จะใช้ประเมินตัวเป็น (viable) หรือตาย (non-viable) เท่านั้น ไม่สามารถใช้ประเมินสถานภาพของอโครโซมได้ ดังมีเกณฑ์การจัดกลุ่มเชื้อตัวผู้และการประเมินสถานภาพดังนี้

1.1 **เกณฑ์การจัดกลุ่มเชื้อตัวผู้ที่เตรียมด้วยวิธีแห้ง**

จัดเชื้อตัวผู้ที่ตรวจตามความเรืองแสงให้เข้ากลุ่ม 2 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่1 ส่วนหัวเป็นสีเข้มไม่ติดสีเรืองแสงเลย หรือพวกที่ติดสีเรืองแสงเฉพาะตรงรอยต่อระหว่างส่วนหัวและหางของเชื้อตัวผู้

กลุ่มที่ 2 ส่วนหัวติดสีเรืองแสง

1.2 **การประเมินสถานภาพเชื้อตัวผู้ที่เตรียมด้วยวิธีแห้ง**

กลุ่มที่ 1 เชื้อตัวผู้เป็น

กลุ่มที่ 2 เชื้อตัวผู้ตาย

2. **วิธีเปียก**

1. เตรียมน้ำเชื้อสดหรือน้ำเชื้อแช่แข็งวิธีเดียวกันกับวิธีแห้ง

2. เตรียมสารละลาย 2 % glutaraldehyde 50 ul เติมลงในน้ำเชื้อตาม 1 จำนวน 50 ul ผสม ให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเติม 250 ul phosphate buffered saline (PBS) หากยังประเมินสถานภาพของอโครโซมทันทีให้เติม PBS อีก 250 ul ลงในน้ำเชื้อเก็บในที่มืดและแห้งที่ 4° C

3. เติมสี bisbenzimide (10 หรือ 20 ug/ml) 50 ul ลงผสมกับน้ำเชื้อ 50 ulตาม 2 ตั้งทิ้งไว้ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

4. หยดน้ำเชื้อที่ย้อมแล้ว 5 ul ลงบนแผ่นสไลด์ ปิดด้วยกระจกบาง ทำ 2 ซุด/ตัวอย่าง

5. ประเมินสถานภาพของเชื้อตัวผู้และอโครโซมโดยใช้กล้องจุลทัศน์ ทันที (D0) ตามวิธีการเช่นเดียวกับวิธีแห้ง

6. ตรวจประเมินสถานภาพเชื้อตัวผู้อีกครั้ง 7 และ 14 วันหลังจากนี้ (D7 และ D14)

2.1 เกณฑ์การจัดกลุ่มสถานภาพเชื้อตัวผู้ที่เตรียมด้วยวิธีเปียก

จัดเชื้อตัวผู้ที่ตรวจตามความเรืองแสงและสถานภาพของสันอโครโซม (acrosomal apical ridge) ให้เข้ากลุ่มต่าง ๆ ดังนี้

กลุ่ม 1a) ส่วนหัวเป็นสีเข้มไม่ติดสีเรืองแสงเลย หรือพวกที่ติดสีเรืองแสงเฉพาะตรงรอยต่อ ระหว่างส่วนหัว และหางของเชื้อตัวผู้ และมีสันอโครโซมอยู่ในสภาพเรียบร้อย

กลุ่ม 1b) ส่วนหัวเป็นสีเข้มไม่ติดสีเรืองแสงเลย หรือพวกที่ติดสีเรืองแสงเฉพาะตรงรอยต่อ ระหว่างส่วนหัวและหางของเชื้อตัวผู้ แต่ไม่มีสันอโครโซม

กลุ่ม 2a) ส่วนหัวติดสีเรืองแสงจ้าหรือจาง มีสันอโครโซมอยู่ในสภาพเรียบร้อย

กลุ่ม 2b) ส่วนหัวติดสีเรืองแสงจ้าหรือจาง แต่ไม่มีสันอโครโซม

2.2 การประเมินสถานภาพเชื้อตัวผู้ที่เตรียมด้วยวิธีเปียก

กลุ่ม 1a) เชื้อตัวผู้มีชีวิตและมีสันอโครโซมปกติ มีศักยภาพในการจะเกิดปฏิกิริยาอโครโซมต่อไป

กลุ่ม 1b) เชื้อตัวผู้มีชีวิต และเกิดปฏิกิริยาอโครโซมแล้ว (reacted acrosome , true acrosome reaction)

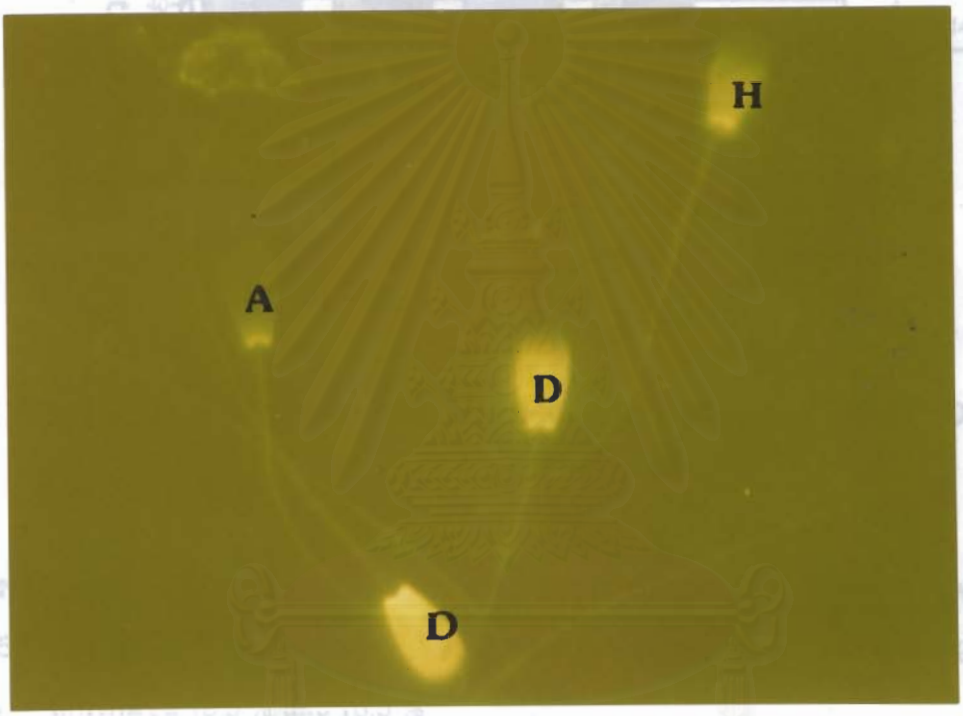
กลุ่ม 2a) เชื้อตัวผู้ไม่มีชีวิต แต่มีสันอโครโซมปกติ

กลุ่ม 2b) เชื้อตัวผู้ไม่มีชีวิต และอโครโซมเสียหายหรือลอกหลุด (false acrosome reaction)

ผลการทดลอง

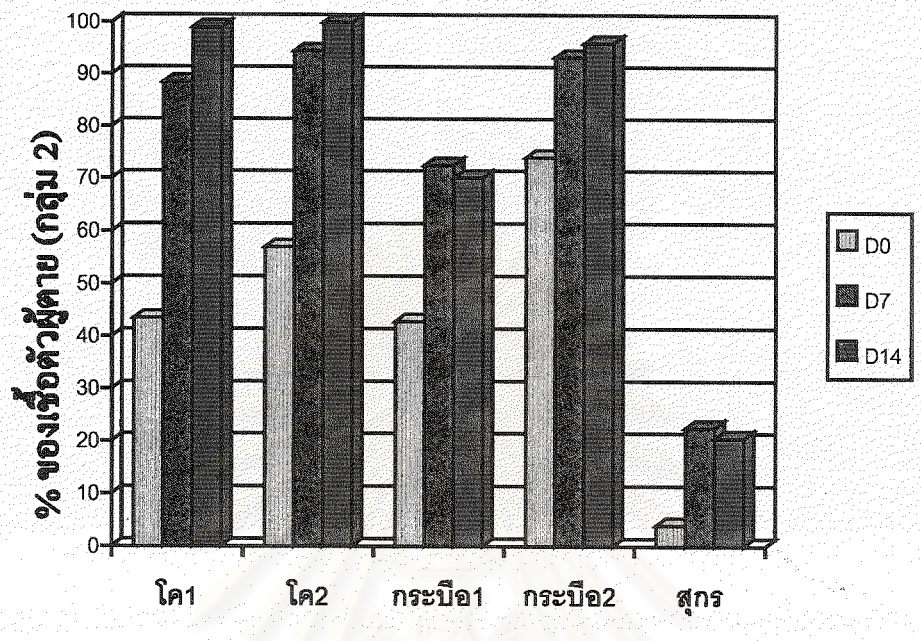
<u>วิธีแห้ง</u>

เนื่องจากเมื่อใช้ bisbenzimide ความเข้มข้น 10 µg/ml จะพบเชื้อตัวผู้ตายมาก คือจะติดแสงเรืองจ้า(fluororescence) แต่พบเชื้อตัวผู้ที่ไม่ติดสีเรืองแสง หรือติดสีเรืองแสงเฉพาะตรงรอยต่อระหว่างส่วนหัวและหางของเชื้อตัวผู้น้อยมาก นอกจากนี้ยังพบเซลล์ที่ติดสีเรืองแสงเกินครึ่งเซลล์จำนวนมาก (รูปที่ 1) จึงลดความเข้มข้นของสีเรืองแสงลงเป็น 5 µg/ml สำหรับวิธีแห้งตลอดการทดลอง



<u>รูปที่ 1</u> เตรียมน้ำเชื้อโคด้วยวิธีแห้งใช้สีเรืองแสงความเข้มข้น 10 µg/ml **พบเชื้อตัวผู้ตาย(D)มาก** และตัวที่ติดสีเรืองแสงเกินครึ่งเซลล์ (H)มาก สำหรับเซลล์ที่ติดสีเรืองแสงเฉพาะรอยต่อระหว่างส่วนหัวและหางจะถือว่ามีชีวิต (A) พบน้อยมาก (fluorescence 100x)

เมื่อใช้สารเรืองแสงเข้มข้น 5 µg/ml ตรวจน้ำเชื้อตัวผู้โค (แช่แข็ง) กระบือ (แช่แข็ง) และสุกร (สด) หาจำนวนเซลล์ที่ติดสีสารเรืองแสง (กลุ่ม 2a และ 2b) ตามเกณฑ์การจัดกลุ่มในข้อ 1.1 และ1.2 ในวัสดุและวิธีการในวันที่ทำการทดลอง 7 และ 14 วันหลังการทดลอง (D0 , D7, D14) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 2



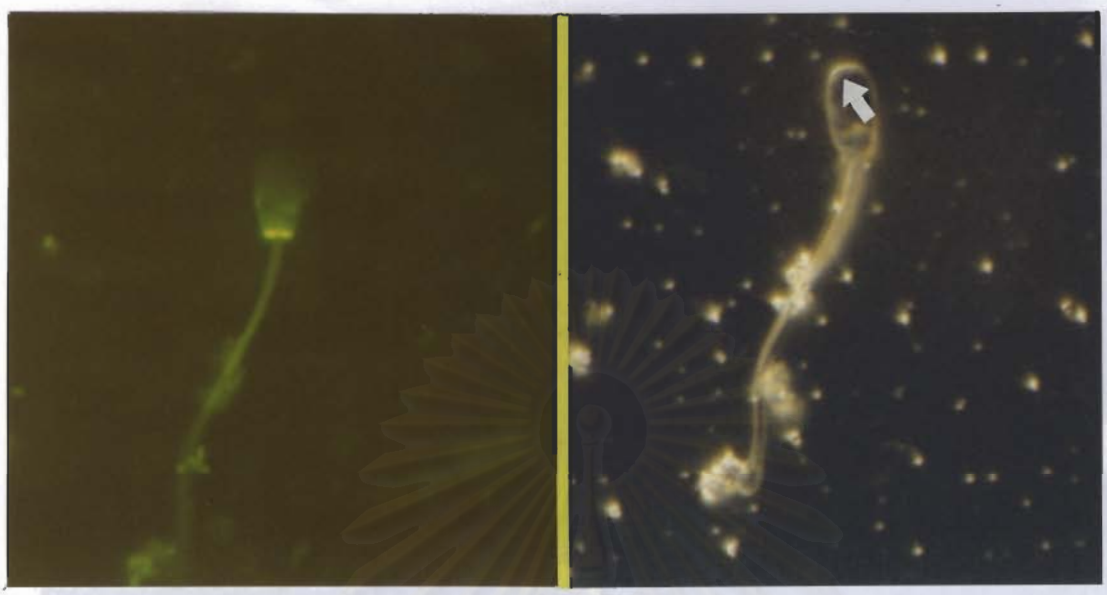
รูปที่ 2 กราฟแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์ของเชื้อตัวผู้ที่ตาย (กลุ่ม 2)ใน โค , กระบือ และสุกร ที่ D0 , D7 และ D14 เมื่อเตรียมน้ำเชื้อด้วยวิธีแห้ง

การตายของเชื้อตัวผู้ที่เพิ่มขึ้นที่ D7 และ D14 คือ โค 1 เพิ่มขึ้น 45 % และ 55.5 % โค 2 เพิ่มขึ้น 37.5 % และ 43 % กระบือ 1 เพิ่มขึ้น 29.7 % และ 27.2 % กระบือ 2 เพิ่มขึ้น 19 % และ 21.7 % สุกรเพิ่มขึ้น 18.5 % และ 16.5 %

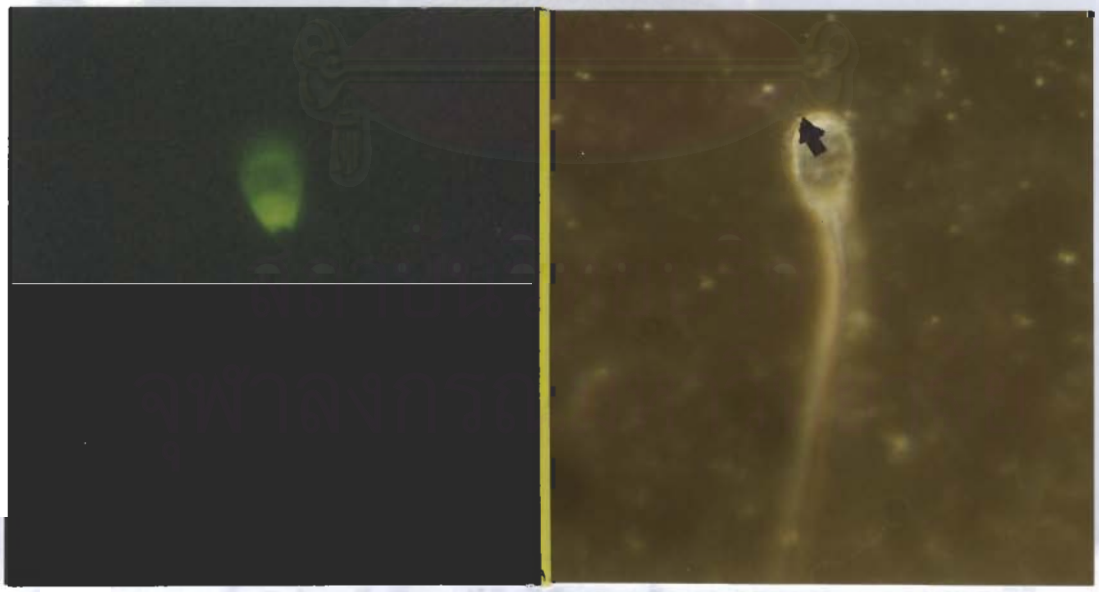
วิธีเปียก

กล้องจุลทัศน์ที่มีอุปกรณ์ phase contrast ตรวจสัน acrosome ในบางกรณีได้ไม่ชัดเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อตัวผู้ที่หันสันอโครโซมลงติดกับแผ่นสไลด์ แต่เมื่อใช้กล้องจุลทัศน์ที่มีอุปกรณ์ dark field ติดร่วมด้วย สามารถเห็นสันอโครโซมและจำแนกเชื้อตัวผู้ตามกลุ่มและเกณฑ์ในข้อ2.1 และ 2.2 ในวัสดุและวิธีการได้ชัดเจนขึ้น

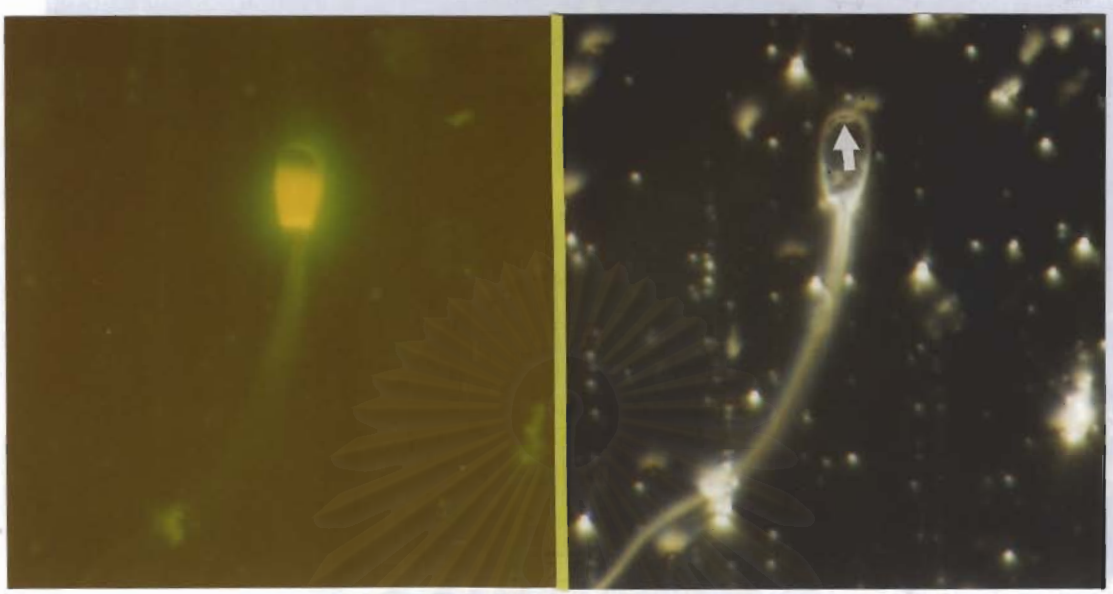
ใช้สารเรืองแสงที่ความเข้มข้น 10 และ 20 μg/ml ตรวจเชื้อตัวผู้หาจำนวนเซลล์ที่ติดสีเรืองแสงและสถานภาพของสันอโครโซม (รูปที่ 3) รูปที่ 4 แสดงการติดสีเรืองแสงและสถานภาพของสันอโครโซมในน้ำเชื้อสุกรซึ่งมีขนาดใหญ่เห็นได้ชัดเจน



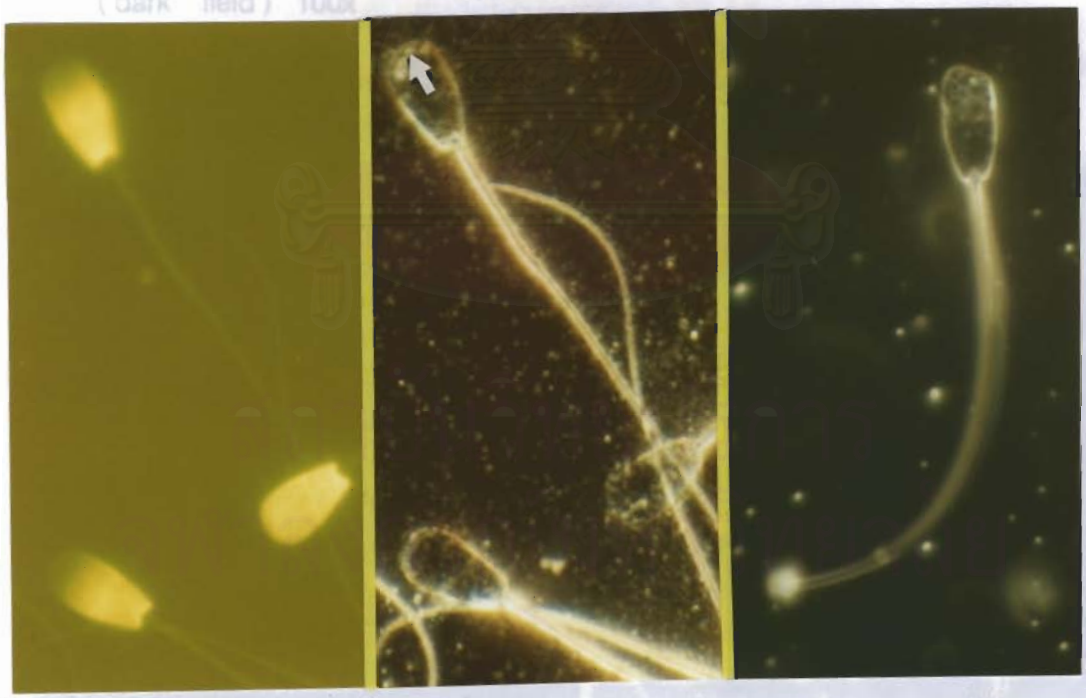
รูปที่ 3 ก. กลุ่ม 1a เชื้อตัวผู้กระบือที่ส่วนหัวเป็นสีเข้มติดสีเรืองแสงเฉพาะตรงรอยต่อระหว่างส่วนหัวและหางเท่านั้น(fluorescence) สังเกตเห็นสัน(ลูกศร)อโครโซมปกติได้ที่ภาพขวา (dark field) 100x



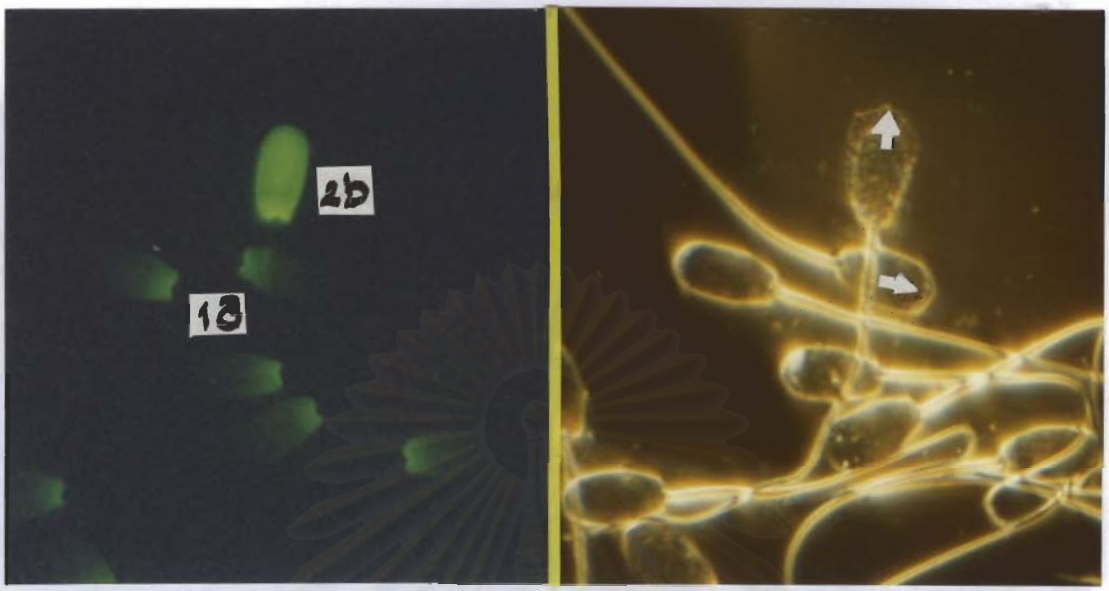
รูปที่ 3 ข. กลุ่ม 1b เชื้อตัวผู้กระบือที่ส่วนหัวเป็นสีเข้ม ติดสีเรืองแสงครึ่งเซลล์ (fluorescence) ลูกศรชี้ที่อโครโซมพอง (reacted acrosome) เห็นชัดเจน (dark field) 100x



รูปที่ 3 ค กลุ่ม 2a เชื้อตัวผู้กระบือ ส่วนหัวติดสีเรืองแสงเกินครึ่ง (fluorescence) สันอโครโซม ปกติ (ลูกศร) เห็นได้จาก dark field ทางขวา 100x

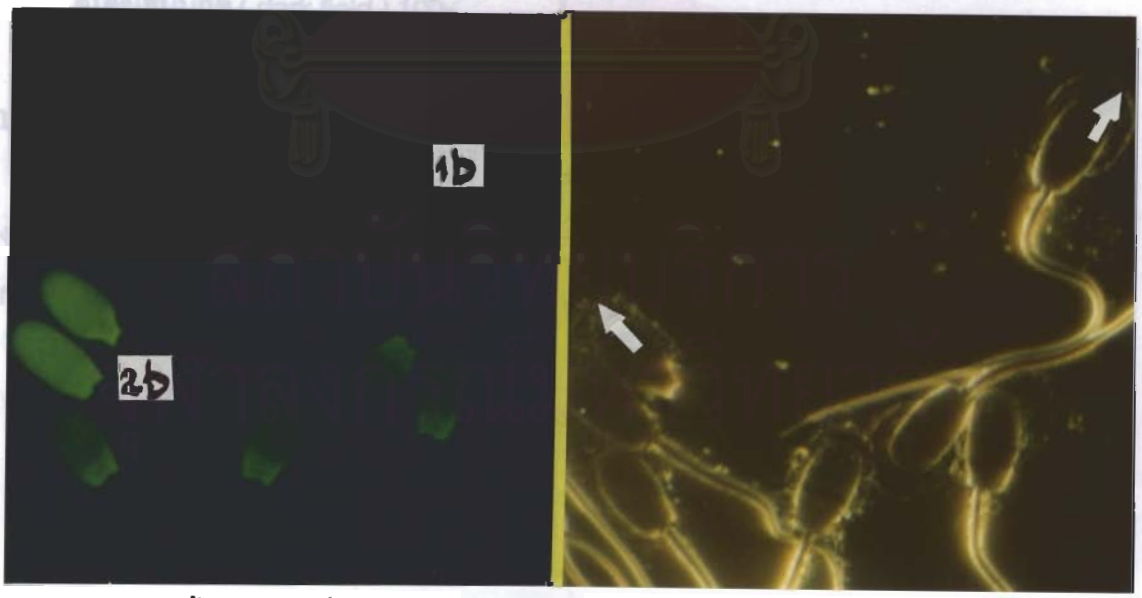


รูปที่ 3 ง กลุ่ม 2b เชื้อตัวผู้กระบือที่ส่วนหัวติดสีเรืองแสงทั้งหมด (fluorescence) ลูกศรชี้ที่ อโครโซมบวมพอง (dark field) ภาพขวามือสุดเป็นเชื้อตัวผู้ที่อโครโซมลอกหลุดไปแล้ว (false acrosome reaction) 100x

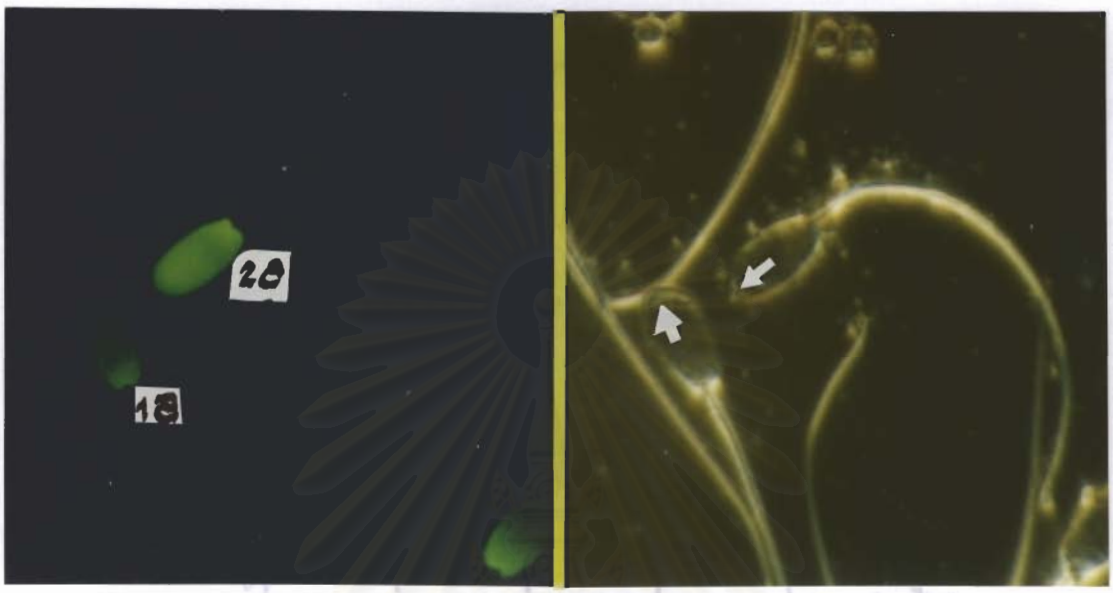


รูปที่ 4 ก. กลุ่ม 1a เชื้อตัวผู้สุกรที่มีส่วนหัวเป็นสีเข้มติดสีเรืองแสงเฉพาะตรงรอยต่อระหว่างส่วนหัวและหาง (fluorescence) สังเกตเห็นสันอโครโซมปกติ (ลูกศร) ได้ที่ภาพขวามือ (dark field) 100x

กลุ่ม 2b เชื้อตัวผู้สุกรส่วนหัวติดสีเรืองแสงทั้งหมด (fluorescense) อโครโซมบวมพอง (ลูกศร) เกิด false acrosome reaction (dark field) 100x



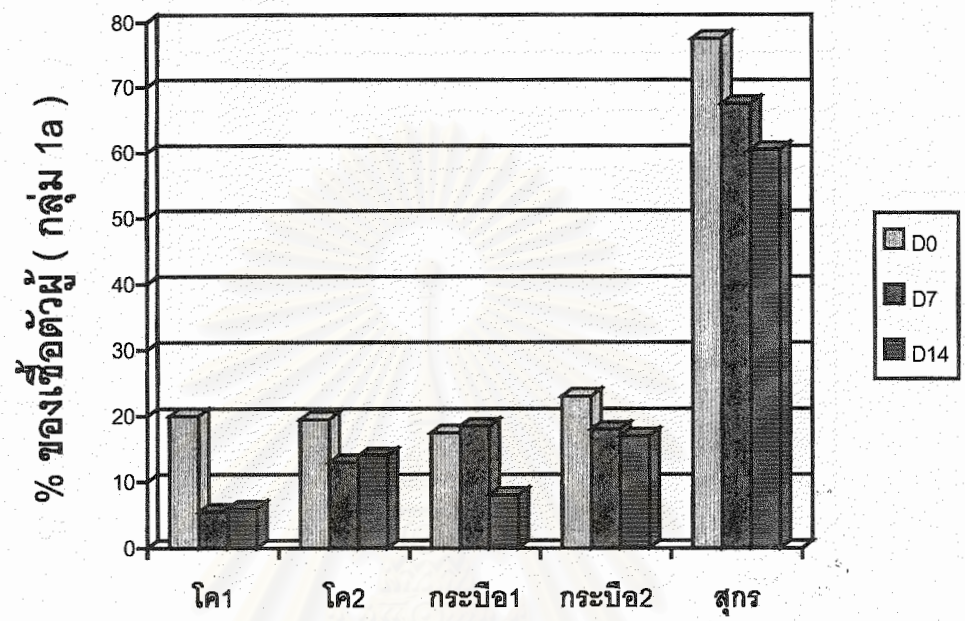
รูปที่ 4 ข. กลุ่ม 1b เชื้อตัวผู้สุกรที่ส่วนหัวเป็นสีเข้ม ติดสีเรืองแสง ¼ เซลล์(fluorescence) ลูกศรชี้ที่อโครโซมบวมพอง (reacted acrosome) เห็นชัดเจน (dark field) 100x



<u>รูปที่ 4</u> ค. <u>กลุ่ม 2a</u> เชื้อตัวผู้สุกร ส่วนหัวติดสีเรืองแสงทั้งหมด (fluorescence) ลูกศรชี้ที่สัน อโครโซมปกติ (dark field) 100x

<u>1. ความเข้มข้นของสารเรืองแสง 10 µg/ml</u>

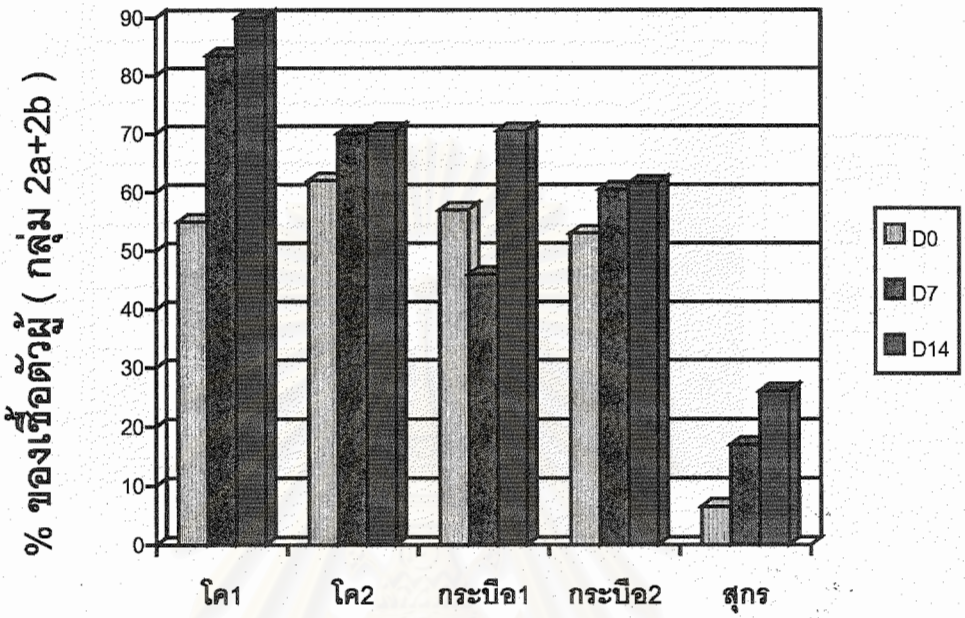
1.1 จำนวนเชื้อตัวผู้ (โค , กระบือ และสุกร) ที่ส่วนหัวเป็นสีเข้ม สีเรืองแสงติดเฉพาะรอยต่อระหว่างส่วนหัวและหาง และมีสันอโครโซม (กลุ่ม 1a) ที่ D0 , D7 และ D14(รูปที่ 5) แสดงผลเฉพาะกลุ่ม 1a เนื่องจากเชื้อตัวผู้กลุ่มนี้เท่านั้นที่มีศักยภาพในการจะเกิดปฏิกิริยาอโครโซมต่อไป



รูปที่ 5 กราฟแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์ของเชื้อตัวผู้ (โค , กระบือ และสุกร) ในกลุ่ม 1a เมื่อเตรียมน้ำเชื้อด้วยวิธีเปียกและใช้สารเรืองแสงความเข้มข้น 10 μg/ml ย้อมที่ D0 ,D7 และ D14

เชื้อตัวผู้ที่ใช้สีเรืองแสงความเข้มข้น 10 μg/ml ย้อมตามวิธีเปียก มีจำนวนเชื้อตัวผู้ กลุ่ม 1a เมื่อ D7และ D14 ต่างจาก D0 ดังนี้ โค 1 ลดลง 14.5 % และ 14 % โค 2 ลดลง 6.5 % และ 5.5 % กระบือ 1 เพิ่มขึ้น 1 % ที่ D7 แต่ลดลง 9.5 % ที่ D14 กระบือ 2 ลดลง 5% และ 9 %ที่ D14 กระบือ 2 ลดลง 5% และ 9% สุกรลดลง 10 % และ 17 % ตามลำดับ

1.2 จำนวนเชื้อตัวผู้ (โค , กระบือ และสุกร) ที่ติดสีเรืองแสง (กลุ่ม2a และ 2b) D0 , D7 และ D14 (รูปที่ 6)

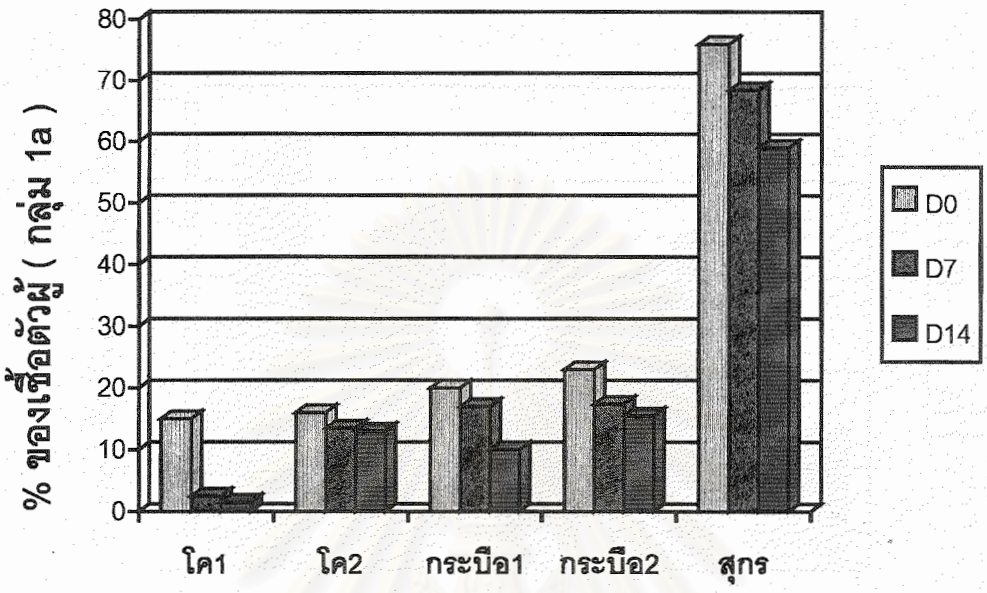


รูปที่ 6 กราฟแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์ของเชื้อตัวผู้ที่ตายทั้งหมด (กลุ่ม 2a+2b) ในโค ,กระบือ และสุกร เมื่อเตรียมน้ำเชื้อด้วยวิธีเปียกและ ใช้สีเรืองแสงความเข้มข้น 10 µg /ml ที่ D0,D7 และ D 14

เชื้อตัวผู้ที่ใช้สีเรืองแสงความเข้มข้น 10 µg/ml ย้อมตามวิธีเปียก มีจำนวนเชื้อตัวผู้ตายทั้งหมด (กลุ่ม 2a + 2b) เมื่อ D7 และ D14 ต่างจาก D0 ดังนี้ โค 1 เพิ่มขึ้น 28.5% และ 35% โค 2 เพิ่มขึ้น 8% และ 8.5% กระบือ1 ลดลง 11% ที่ D7 แต่เพิ่มขึ้น 13.5% ที่ D14 กระบือ 2 เพิ่มขึ้น 7.5% และ 8.5% สุกรเพิ่มขึ้น 10.5% และ 19.5% ที่ D7 และ D14 ตามลำดับ

2. ความเข้มข้นของสารเรืองแสง 20 µg/ml

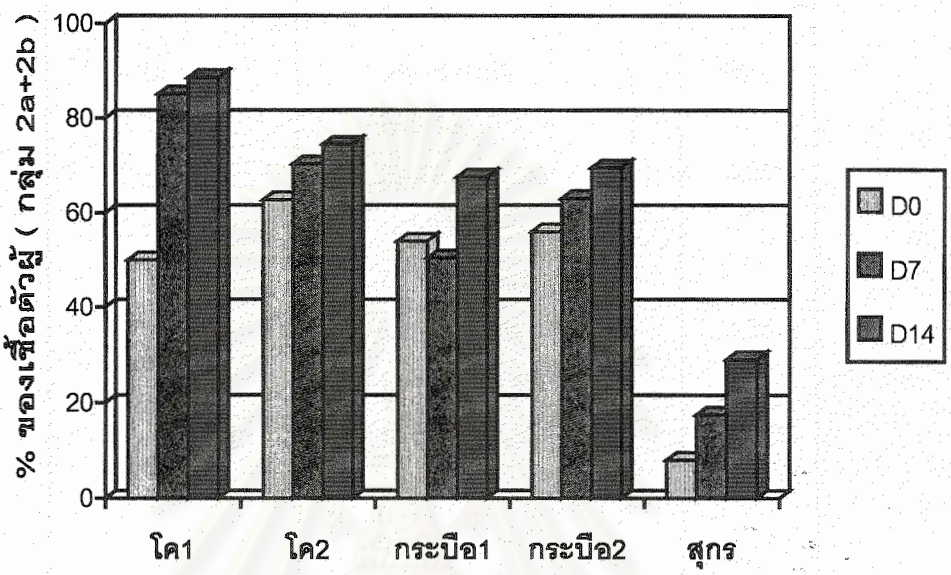
2.1 จำนวนเชื้อตัวผู้ (โค , กระบือ และสุกร) ที่ส่วนหัวเป็นสีเข้ม สีเรืองแสงติดเฉพาะรอยต่อระหว่างส่วนหัวและหาง และมีสันของอโครโซม (กลุ่ม 1a) ที่ D0 , D7 และ D14 (รูปที่ 7) แสดงผลเฉพาะกลุ่ม 1a เนื่องจากเชื้อตัวผู้กลุ่มนี้เท่านั้นที่มีศักยภาพในการจะเกิดปฏิกิริยาอโครโซมต่อไป



รูปที่ 7 กราฟแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์ของเชื้อตัวผู้ (โค , กระบือ และสุกร) ในกลุ่ม 1a เมื่อเตรียมน้ำเชื้อด้วยวิธีเปียกและใช้สารเรืองแสงเข้มข้น 20 μg/ml ย้อมที่ D0 ,D7 และ D 14

เชื้อตัวผู้ที่ใช้สีเรืองแสงความเข้มข้น 20 μg/ml ย้อมตามวิธีเปียก มีจำนวนเชื้อตัวผู้กลุ่ม 1a เมื่อ D7 และ D14 ต่างจาก D0 ดังนี้ โค 1 ลดลง 12.5 % และ 13.5 % โค 2 ลดลง 2.5 % และ 3 % กระบือ 1 ลดลง 3 %และ 10 % กระบือ 2 ลดลง 5.4 % และ 7.5 % สุกรลดลง 7.5 % และ 17 % ตามลำดับ

2.2 จำนวนเชื้อตัวผู้ (โค , กระบือ และสุกร) ที่ติดสีเรืองแสง (กลุ่ม 2a และ 2b) ที่ D0, D7 และ D14 (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 กราฟแท่งแสดงเปอร์เซ็นต์ของเชื้อตัวผู้ที่ตายทั้งหมด (กลุ่ม 2a+2b)ในโค , กระบือ และสุกร เมื่อเตรียมน้ำเชื้อด้วยวิธีเปียกและ ใช้สีเรืองแสงความเข้มข้น 20 μg /ml ที่ D0 , D7 และ D 14

เชื้อตัวผู้ที่ใช้สีเรืองแสงความเข้มข้น 20 μg/ml ย้อมตามวิธีเปียก มีจำนวนเชื้อตัวผู้ตายทั้งหมด (กลุ่ม 2a + 2b) เมื่อ D7 และ D14 ต่างจาก D0 ดังนี้ โค1 เพิ่มขึ้น 35% และ 38.5% โค2 เพิ่มขึ้น7.6% และ 11.8% กระบือ1 ลดลง 3.5% ที่ D7 แต่เพิ่มขึ้น 13.5% ที่ D14 กระบือ2 เพิ่มขึ้น 7 % และ 13.5% สุกรเพิ่มขึ้น 9.5 ที่ D7 และ 21% ที่ D14

ความแตกต่างกันของจำนวน % เชื้อตัวผู้กลุ่ม 1a เมื่อใช้ความเข้มข้นสีเรืองแสง 10 และ 20 μg/ml แสดงโดย ตารางที่ 1

ที่	ตัวอย่างน้ำเชื้อ	% เชื้อตัวผู้กลุ่ม 1a ที่ต่างกัน	$\bar{X}$
D0	โค 1	20-15 = 5%	4%
	โค 2	19.5-16 = 3%	
	กระบือ 1	20-17.5 = 2.5%	1.25%
	กระบือ 2	23-23 =0	
	สุกร	77.5-76 =1.5%	
D7	โค1	5.5-2.5 = 3%	1.75%
	โค 2	13.5-13 = 0.5%	
	กระบือ 1	18.5-17 = 1.5%	1.05%
	กระบือ 2	18-17.4 =0.6	
	สุกร	68.5- 67.5 =1%	
D14	โค1	6-1.5 =4.5%	2.75%
	โค 2	14-13 = 1%	
	กระบือ 1	10-8 = 2%	1.75%
	กระบือ 2	17-15.5 =1.5	
	สุกร	60.5- 59 =1.5%	

ตารางที่ 1 ความแตกต่างกันของจำนวน % เชื้อตัวผู้กลุ่ม 1a เมื่อใช้ความเข้มข้นสีเรืองแสง 10 และ 20 µg/ml

ความแตกต่างกันของจำนวนเชื้อตัวผู้กลุ่ม 2a+2b เมื่อใช้ความเข้มข้นสีเรืองแสง 10 และ 20 µg/ml แสดงโดยตารางที่ 2

ที่	ตัวอย่างน้ำเชื้อ	% เชื้อตัวผู้กลุ่ม 2a +2b ที่ต่างกัน	$\bar{x}$
D0	โค1	62.7-62 = 0.7%	2.85%
	โค 2	55-50 = 5%	
	กระบือ 1	57-54 = 3%	3%
	กระบือ 2	56-53 =3%	
	สุกร	8-6.5 =1.5%	
D7	โค1	70-70.3 =0.3%	0.9%
	โค 2	85-83.5 = 1.5%	
	กระบือ 1	50.5-46 = 4.5%	3%
	กระบือ 2	63-60.5 =1.5%	
	สุกร	17.5- 17 =0.5%	
D14	โค1	74.5-70.5 =4.%	2.75%
	โค 2	90-88.5 = 1.5%	
	กระบือ 1	70.5-67.5 = 3%	5.05%
	กระบือ 2	69.5-61.5 =8%	
	สุกร	29- 26 =3%	

ตารางที่ 2 ความแตกต่างกันของจำนวนเชื้อตัวผู้กลุ่ม 2a+2b เมื่อใช้ความเข้มข้นสีเรืองแสง 10 และ 20 µg/ml

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิจารณ์

วิธีแห้ง

เมื่อเตรียมเชื้อตัวผู้ด้วยวิธีแห้ง โดยใช้สารเรืองแสงความเข้มข้น 10 μg/ml พบเชื้อตัวผู้ตายมาก คือส่วนหัวทั้งหมดติดสีเรืองแสงจ้า (fluororescence) แต่พบเชื้อตัวผู้ที่ไม่ติดสีเรืองแสง หรือติดสีเรืองแสงเฉพาะตรงรอยต่อระหว่างส่วนหัวและหางของเชื้อตัวผู้น้อยมาก นอกจากนี้ยังพบเซลล์ที่ติดสีเรืองแสงเกินครึ่งเซลล์จำนวนมาก ซึ่งขัดแย้งกับ de Leeuw and den Daas (1991)ที่รายงานว่า H33258 ไม่เป็นอันตรายอย่างไรทั้งสิ้นต่อเชื้อตัวผู้ เมื่อลองลดความเข้มข้นของสารเรืองแสงลงเป็น 5 μg/ml พบว่าเซลล์ที่ติดสีเรืองแสงเกินครึ่งเซลล์ลดจำนวนลง จึงปรับใช้ความเข้มข้นของสารเรืองแสงเป็น 5 μg/ml สำหรับการเตรียมน้ำเชื้อด้วยวิธีแห้ง

จำนวนเชื้อตัวผู้ตาย (กลุ่ม 2) (รูปที่ 2) ที่ D7 และ D14 เพิ่มขึ้นมากผิดปกติในสัตว์ทุกตัว (D7 เพิ่มขึ้น 18.5%-45% และ D14 เพิ่มขึ้น 16.5%-55.5%) พบเชื้อตัวผู้ในโคและกระบือตาย 70-100% ที่ D7 และ D14 โดยตัวตายเชื้อตัวผู้โคจะเพิ่มมากที่สุดทั้งที่ D7 และ D14 ส่วนตัวตายของสุกรเพิ่มขึ้นน้อยที่สุดที่ D7 และ D14 อาจสะท้อนให้เห็นถึงผลกระทบของคุณภาพน้ำเชื้อที่เตรียมโดยการแช่แข็ง (โคและกระบือ) และ/หรือ ความแตกต่างของความทนทานของเชื้อตัวผู้ของสัตว์ชนิดต่าง ๆ เมื่อน้ำเชื้ออยู่นอกร่างกาย การที่จำนวนเชื้อตัวผู้ตายเพิ่มขึ้นมากที่ D7 และ D14 ในสัตว์ทุกชนิดเป็นเพราะ การปิดผนึกกล่องกันแสงด้วยเทปผ้าและสารดูดความชื้นที่ใส่ในกล่องไม่สามารถกันมิให้ความชื้นแทรกเข้าไปในกล่องได้ จึงเกิดการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์ เชื้อตัวผู้ทำให้สีเรืองแสงซึมเข้าไปในเซลล์ได้ (10,11) ต้องปรับปรุงวิธีการเก็บตัวอย่างเมื่อเตรียมน้ำเชื้อด้วยวิธีแห้ง กล่าวคือ ควรใช้โถกันแสงที่ดูดความชื้นออกให้หมด และภายในโถมีสารดูดความชื้นอยู่ด้วยเป็นภาชนะเก็บตัวอย่างที่ 4 °C ผลการศึกษาในส่วนนี้จึงสรุปเพียงว่า หากเตรียมน้ำเชื้อด้วยวิธีแห้งควรตรวจประเมินเชื้อตัวผู้ทันที

วิธีเปียก

ความแตกต่างของคุณภาพน้ำเชื้อเมื่อประเมินที่ D0 , D7 และ D14 ที่ความเข้มข้นของสารเรืองแสง 10 และ 20 (μg/ml)

ความเข้มสารเรืองแสง 10 μg/ml

จำนวนเชื้อตัวผู้เป็น ที่มีสันอโครโซม (กลุ่ม 1a)ที่ D7 และ D14 ในสัตว์ทั้ง 3 ชนิด ลดลง 5%-17% (รูปที่ 5) และเชื้อตัวผู้ตายทั้งหมด (กลุ่ม 2a+2b) ที่ D7 และ D14 ในสัตว์ทั้ง 3 ชนิดเพิ่มขึ้น 7.5%-35% (รูปที่ 6)

เมื่อใช้ความเข้มข้นสารเรืองแสง 20 μg/ml

จำนวนเชื้อตัวผู้เป็น ที่มีสันอโครโซม (กลุ่ม 1a)ที่ D7 และ D14 ในสัตว์ทั้ง 3 ชนิด ลดลง 2.5%-17% (รูปที่ 7) และเชื้อตัวผู้ตายทั้งหมด (กลุ่ม 2a+2b) ที่ D7 และ D14 ในสัตว์ทั้ง 3 ชนิดเพิ่มขึ้น 7%-38.5% (รูปที่ 8)

กลุ่ม1a ของกระบือ 1 เพิ่มขึ้น 1% (รูปที่5) และกลุ่ม 2a+2b ลดลง 11% (รูปที่ 6) ที่ D7 เมื่อใช้สารเรืองแสง 10 μg/ml และเมื่อใช้สารเรืองแสง 20 μg/ml กลุ่ม 1a ของกระบือ1 ลดลง 3% (รูปที่ 7) และกลุ่ม 2a+2b ก็ลดลง 3.5%(รูปที่ 8) ที่ D7 เหตุที่จำนวนเชื้อตัวผู้ที่ลดลงในกลุ่ม 1a และเพิ่มขึ้นในกลุ่ม 2a+2b มีความแปรปรวนมากเมื่อใช้สารเรืองแสงที่ความเข้มข้น 10 และ 20 μg/ml เพื่อหาความแตกต่างที่ตรวจประเมินที่ D7 และ D14 แสดงให้เห็นถึงข้อมูลที่ได้จากตัวอย่างน้ำเชื้อจำนวนน้อย ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถให้คำตอบว่าการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อที่ D0 , D7 และ D14 เมื่อเตรียมน้ำเชื้อด้วยวิธีเปียก (ความเข้มข้นสารเรืองแสง 10 และ 20 μg/ml) จะได้ผลแตกต่างทางสถิติหรือไม่

<u>ความแตกต่างกันของจำนวนเชื้อตัวผู้กลุ่ม 1a (ตารางที่ 1) และกลุ่ม 2a+2b(ตารางที่ 2) เมื่อใช้ความเข้มข้นสีเรืองแสง 10 และ 20 μg/ml</u>

ในกลุ่ม 1a ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อตัวผู้เป็น ที่มีสันอโครโซมปกติ (ตารางที่ 1) (มีศักยภาพในการจะเกิดปฏิกิริยาอโครโซมได้) ที่ D0 แตกต่างกัน 4% ในโค 1. 25% ในกระบือ และ 1.5% ในสุกร ที่ D7 แตกต่างกันดังนี้ โค 1.75% กระบือ 1.05% และสุกร 1% ที่ D14 ต่างกัน 2.75% ในโค 1.75% ในกระบือ และ 1.5% ในสุกร จะเห็นได้ว่าที่ D0 , D7 และ D14 มีความแตกต่างของเชื้อตัวผู้ที่มีศักยภาพในการเกิดปฏิกิริยาอโครโซมได้ไม่มากกว่า 4%

เมื่อใช้สารเรืองแสงที่มีความเข้มข้นต่างกัน (10 และ 20 μg/ml) จำนวนเชื้อตัวผู้ที่ตายทั้งหมด (กลุ่ม 2a+2b) (ตารางที่ 2) แตกต่างกันในสัตว์ทั้ง 3 ชนิด ดังนี้ ที่ D0 โค 2.85% กระบือ 3% และสุกร 1.5% ที่ D7 โค 0.9% กระบือ 3% และสุกร 0.5% ที่ D14 โค 2.75% กระบือ 5.05% และสุกร 3% จะพบว่าที่ D0 , D7 และ D14 มีความแตกต่างของ%เชื้อตัวผู้ตายทั้งหมดไม่เกิน 5.1% จึงอาจสรุปได้ว่าความเข้มข้นของสารเรืองแสง 10 หรือ 20 μg/ml ให้ผลในการตรวจเชื้อตัวผู้เป็น ที่มีสันอโครโซม และจำนวนเชื้อตัวผู้ตายทั้งหมดใกล้เคียงกัน

สรุปผล

การศึกษานี้บ่งชี้ว่า 1) เชื้อตัวผู้ของสัตว์ทั้ง 3 ชนิด มีความสามารถในการติดสีเรืองแสงได้ และเมื่อเตรียมน้ำเชื้อด้วยวิธีเปียกสามารถใช้ความเข้มข้นสารเรืองแสงเพียง 10 μg/ml ได้ เนื่องจากจำนวนเชื้อตัวผู้เป็นที่มีสันอโครโซม(กลุ่ม 1a) และจำนวนเชื้อตัวผู้ตายทั้งหมด (กลุ่ม2a+2b) มีจำนวนใกล้เคียงกัน และควรลดความเข้มข้นของสารเรืองแสงเป็น 5 μg/ml เมื่อเตรียมน้ำเชื้อโดยวิธีแห้ง

2) ยังไม่สามารถยืนยันจำนวนเชื้อตัวผู้ตายทั้งหมด (กลุ่ม 1) ในวิธีแห้ง เมื่อตรวจประเมินที่ D0 D7 และ D14 ว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ ต้องปรับปรุงเครื่องมือและวิธีการเก็บสไลด์ที่ป้ายน้ำเชื้อที่ย้อมสีเรืองแสงเสียก่อน รวมทั้งต้องเพิ่มจำนวนตัวอย่างที่ทำการทดลองด้วย

3) การเตรียมน้ำเชื้อโดยวิธีเปียกที่ใช้ความเข้มข้นของสารเรืองแสง (bisbenzimide) 10 และ 20 μg/ml สามารถประเมินเชื้อตัวผู้ในกลุ่ม 2a และ 2b ได้เมื่อใช้อุปกรณ์ phase contrast แต่ควรย้ำตรวจโดยใช้กล้องจุลทัศน์ fluorescence อีกครั้งหนึ่ง เพราะเชื้อตัวผู้ในกลุ่ม 1a และ 1b อาจไม่ติดสีเรืองแสงเลยหรือติดเฉพาะตรงรอยต่อส่วนหัวและหางเท่านั้น การใช้ phase contrast ไม่สามารถประเมินสันอโครโซมปกติในกลุ่ม 1a ได้ชัดเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่เชื้อตัวผู้หันสันอโครโซมลงติดกับแผ่นสไลด์ แต่สามารถเห็นสันอโครโซมในกรณีนี้ได้เมื่อใช้กล้องจุลทัศน์ที่มีอุปกรณ์ dark field ติดร่วมด้วย

4) การเตรียมน้ำเชื้อโดยวิธีเปียกทำให้สามารถแยกตัวเป็น/ตายได้ และสามารถจำแนกเชื้อตัวผู้ที่มีศักยภาพในการจะเกิดปฏิกิริยาอโครโซมได้ ออกจากพวกที่เกิดปฏิกิริยาอโครโซมแล้ว และพวกที่มีอโครโซมเสียหายหรือลอกหลุด

5) จำนวนเชื้อตัวผู้ตายทั้งหมด คือ กลุ่ม 1 ที่ตรวจประเมินที่ D0 ในวิธีแห้งต่างจากกลุ่ม 2a+2b ในวิธีเปียกมีความแตกต่างกัน แต่ยังไม่สามารถยืนยันว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ เนื่องจากจำนวนตัวอย่างน้ำเชื้อในการทดลองครั้งนี้น้อยมาก

6) กระบวนการและสารที่ใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อ อาจมีผลต่อความสามารถของเชื้อตัวผู้ในการเข้าผสมกับไข่ของตัวเมีย กล่าวคือน้ำเชื้อแช่แข็งที่นำมาละลาย มีเชื้อตัวผู้ที่มีศักยภาพในการจะเกิดปฏิกิริยาอโครโซมได้มีจำนวนลดลง

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ทุนงบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ 2538 ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการศึกษานี้ กองผสมเทียม กรมปศุสัตว์ และภาควิชาสูติเธนุเวช ฯ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ ที่กรุณาเอื้อเฟื้อน้ำเชื้อโค , กระบือ และสุกร ดร.นงนุช อินปันบุตร Department of Veterinary Biosciences Ohio State University สหรัฐอเมริกา ที่กรุณาช่วยดำเนินการจัดซื้อสารเคมี และคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาในด้านสถานที่ เครื่องมือ และบุคลากร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

Bongso, TA. 1983. Comparative silver staining of water buffalo, goat and pig spermatozoa. *Arc. of Andro.* 11: 13-17

Chacarov EL and Molkova MV. 1976 . A one-act differential stain of the acrosome with active dyes. *J Repard. Fertil.* 48 : 245-246.

Cross NL, Morales PM, Overstreet JW and Hanson FW,1986. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Res.* 15:213-226

Cummin JM, Pember SM, Jequier AM,Yovich JL and Hartman PE. 1991. A test of human sperm acrosome reaction following ionophore challenge : Relationship to fertility and other seminal parameters. *J of Andro.* 12(2) : 98-103

de Leeuw AM , den Dass JHG and Woelders H.1991. The fix vital stain method : Simutaneous determimnation of viability and acrosomal status of bovine spermatozoa. *J of Andro.* 12(2) : 112-118.

de Leeuw J and den Dass N. 1992. The Hoechst stain viability assay for bovine spermatozoa.

Lee MA and Storey BT. 1985. Evidence for plasma membrane impermeability to small ions in acrosome intact mouse spermatozoa bound to mouse zonae pellucidae, using an amino acridine fluorescent pH probe : Time course of the zona induced acrosome reaction monitored by both chlortetracycline and pH probe. *Biol. Reprod.* 33 : 235-246.

Saacke RG and Marshall CE. 1968 . Observations on the acrosomal cap of fixed and unfixed bovine spermatozoa. *J Reprod Fertil.*16 : 511-514

Talbot P and Chacon RS. 1980. A new procedure for rapidly scoring acrosome reactions of human sperm. *Gamete Res.* 3 :211-216

Wells ME and Awa OA.1970. New technique for assessing acrosomal characteristics of spermatozoa. *J Dairy Sci.* 53 : 227-232

Wolf DP, Boldt J, Byrd W and Bechtol KB. 1985. Acrosomal status evaluation in human ejaculated sperm with monoclonal antibodies. *Biol Reprod.* 32:1157-1162.

Yunagimachi R. 1981 . Mechanism of fertilization in mammals. In : *Fertilization and Embryonic Development in Vitro.* Edited by Mastroianni C,Biggers JD.New York Plenum Press. p 81- 88.