จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี ๒๕๓๙

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาผลของคุณภาพน้ำเชื้อและระยะเวลาในการเก็บน้ำเชื้อต่อความสำเร็จในการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกร

(The Effect of Semen Quality and Time of Semen Preservation on *In Vitro* Fertilization in The Pig)

โดย

มงคล เตชะกำพุ
จงกลวรรณ มุสิกทอง
วิชัย ทันตศุภารักษ์
วันเพ็ญ ศรีอนันต์

จท
สพ 15
011092

ตุลาคม ๒๕๓๙

ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี ๒๕๓๙

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาผลของคุณภาพน้ำเชื้อและระยะเวลาในการเก็บน้ำเชื้อต่อความสำเร็จในการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกร

(The Effect of Semen Quality and Time of Semen Preservation on *In Vitro* Fertilization in The Pig)

โดย

มงคล เตชะกำพุ

จงกลวรรณ มุสิกทอง

วิชัย ทันตศุภารักษ์

วันเพ็ญ ศรีอนันต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตุลาคม ๒๕๓๙

ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

16 พ.ย. 2548

I20121908

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2539
ของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ผู้วิจัยขอขอบคุณ
- เล่งเค็ง ฟาร์ม ที่อนุเคราะห์น้ำเชื้อสุกรในการทดลอง
- ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อัจฉรา ธวัชสิน ที่ช่วยวิเคราะห์ข้อมูล
- บุคคลากรของภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการปฏิสนธินอกร่างกาย
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่ วส
สพ. 15
เลขทะเบียน 011092
วัน,เดือน,ปี 24 พ.ค. 45

ชื่อโครงการ: การศึกษาผลของคุณภาพน้ำเชื้อและระยะเวลาในการเก็บน้ำเชื้อต่อความสำเร็จในการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกร

ชื่อผู้วิจัย มงคล เตชะกำพุ จงกลวรรณ มุสิกทอง
วิชัย ทันตศุภารักษ์ วันเพ็ญ ศรีอนันต์

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ ตุลาคม 2539

บทคัดย่อ

จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อนำวิธีการปฏิสนธินอกร่างกายมาทดสอบความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อสุกร (การทดลองที่ 1) และเพื่อศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บน้ำเชื้อสดเจือจางที่อุณหภูมิ 15°ซ, 5°ซ และน้ำเชื้อแช่แข็งที่ -196°ซ นาน 0, 2, 4 และ 6 วัน ต่ออัตราความสำเร็จในการปฏิสนธิภายนอกร่างกายของสุกร (การทดลองที่ 2)

การทดลองที่ 1: นำน้ำเชื้อที่รีดจากพ่อสุกรพันธุ์ดูร็อค ลาร์จไวท์ และแลนด์เรซ จำนวนสายพันธุ์ละ 3 ตัว ที่ใช้อยู่ในฟาร์มสุกรพ่อแม่พันธุ์ มาปฏิสนธิกับโอโอไซต์ที่เก็บมาจากรังไข่ของสุกรสาวและนำมาเลี้ยงเพื่อให้พร้อมปฏิสนธิ (นาน 40-44 ชม.) โดยเลี้ยงรวมกันนาน 18 ชม. ที่อุณหภูมิ 39°ซ ในบรรยากาศ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ แล้วนำตัวอ่อนที่ได้ไปเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนชนิด ทีซีเอ็ม 199 หรือน้ำยา บี ทู +20% ฟีตัล คาร์ฟ ซีรั่ม นาน 5 วัน เพื่อตรวจดูการแบ่งตัวของตัวอ่อน จากการศึกษาพบว่าพ่อพันธุ์สุกรแต่ละตัวในแต่ละพันธุ์ มีอัตราความสำเร็จในการปฏิสนธิ คืออัตราการแบ่งตัวและอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนเป็นระยะมอรูล่าแตกต่างกัน ($P<0.001$), ($P<0.05$) ในกรณีที่ไม่พบความแตกต่างของอัตราการแบ่งตัวในระยะแรกระหว่างพ่อสุกรแต่ละตัว การใช้อัตราการพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะมอรูล่าจะเป็นตัวตัดสินได้

การทดลองที่ 2: รีดน้ำเชื้อจากพ่อสุกร 2 ตัว (สุกร เอ และสุกร บี) ที่มีคุณภาพดีเพื่อนำไปปฏิสนธิภายนอกร่างกายกับโอโอ-ไซต์ วิธีการปฏิสนธิและการเลี้ยงตัวอ่อนใช้เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 นำตัวอ่อนประมาณ 10% ในกลุ่มที่ได้จากการปฏิสนธิด้วยน้ำเชื้อที่เก็บที่อุณหภูมิ 15°ซ ตามระยะเวลาต่าง ๆ มาย้อมสีอาซิโต-ออซิน เพื่อสังเกตอัตราการปฏิสนธิ และที่เหลือนำมาเลี้ยงในน้ำเพาะเลี้ยงเพื่ออัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนเช่นเดียวกับกลุ่ม 5°ซ และ -196°ซ ผลการวิจัยพบว่าเมื่อเก็บน้ำเชื้อเป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6 วัน ที่อุณหภูมิ 15°ซ อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนลดลงตามระยะเวลาที่เก็บรักษาน้ำเชื้อ ($P<0.05$, $P<0.01$ และ $P<0.001$) โดยอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนเมื่อใช้น้ำเชื้อจากสุกร บี มีแนวโน้มสูงกว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อจากสุกร เอ แต่ผลนี้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อนำน้ำเชื้อจากสุกร บี มาเก็บที่ อุณหภูมิ 5°ซ เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6 วันพบว่าอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนต่ำกว่าเมื่อเก็บน้ำเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 15 °ซ ($P< 0.01$) โดยระยะเวลาในการเก็บน้ำเชื้อไม่มีผลต่ออัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนเมื่อเก็บน้ำเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 5 °ซ เช่นเดียวกับที่พบในกรณีของน้ำเชื้อแช่แข็ง

ผลการวิจัยทั้งสองการทดลองนี้สรุปได้ว่าสามารถนำวิธีการปฏิสนธินอกร่างกายไปทดสอบคุณภาพของน้ำเชื้อในแง่ความสมบูรณ์พันธุ์ และระยะเวลาการเก็บน้ำเชื้อของสุกรที่อุณหภูมิ 15°ซ มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย แต่ผลดังกล่าวไม่พบในกรณีที่เก็บน้ำเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 5°ซ และ - 196 °ซ

คำสำคัญ: การปฏิสนธินอกร่างกาย คุณภาพของน้ำเชื้อ การเก็บรักษาน้ำเชื้อ ตัวอ่อน สุกร

Project Title: The effect of semen quality and time of semen preservation on *in vitro* fertilization in the pig

Name of Investigators: Mongkol Techakumphu Jongkonwon Musikthong
Wichai Tantasuparuk Wanpen Srianan

Year: October 1996

Abstract

The objectives of the studies were to apply the *in vitro* fertilization technique for testing boar semen quality (experiment I) and to examine the effect of the length of semen preservation time (0, 2, 4, 6 days) at 15°C, 5°C and frozen semen at -196°C on the success of *in vitro* fertilization (experiment II). *In experiment I,* ejaculate semen from 3 different breeds, actually used in a breeder farm; Duroc, Large White and Landrace, 3 boar from each breed. After sperm preparation, the spermatozoa were co-incubated with 40-44 h-IVM porcine follicular oocytes. The processes were performed at 39°C under 5%CO_2 in air. After 18h of sperm-oocyte incubation, the embryos were cultivated in TCM 199 or B2 medium+20% fetal calf serum for 5 days to observe embryo development. The result of culture showed that the cleavage rate and the morula formation rate were significantly different among 3 boars in each breed ($P<0.001$, $P<0.05$). The rate of morula formation can finally used to differentiate the quality of semen in case of no diffence of early cleavage from boars ($P<0.05$) was found. In *Experiment II,* semen was collected from 2 mature boars (Boar A and Boar B). The processes of IVF were similar to the above experiment. After IVF, 10% of embryos in 15°C group were fixed and stained by aceto-orcein to evaluate the fertilization. The embryos in all groups of treatment were cultured for 3 days to assess the fertilization and cleavage rate. The results showed that the fertilization and cleavage rates at 15°C reduced significantly ($P< 0.05$, $P< 0.01$ and $P < 0.001$) when the time of preservation was prolonged from 0 to 2, 4, 6 days. No difference of IVF success was found between Boar A and Boar B although it seemed that Boar B' s was better than Boar A's. Semen preservation at 5°C reduced the success rate compared to 15°C ($P<0.01$). However, the effect of the length of the time preservation was not found at 5°C and -196°C.

In conclusion, these two studies showed that the technique of *in vitro* fertilization can be used for testing the boar semen quality in term of fertilizing ability and the success of IVF was affected by the length of the time of semen preservation at 15°C while they were not in case of 5°C and -196°C preservation.

Key words: *In vitro* fertilization, semen quality, semen preservation, embryo, pig

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	II
บทคัดย่อ	III
Abstract	IV
สารบัญ	V
รายการประกอบตาราง	VI
รายการรูปประกอบ	VII
รายการสัญญลักษณ์และคำย่อ	VIII
คำนำ	IX
บทนำ	1
อุปกรณ์และวิธีการ	4
ผล	9
วิจารณ์	21
เอกสารอ้างอิง	28

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการประกอบตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนจากน้ำเชื้อของพ่อสุกรพันธุ์ดูร็อค	10
ตารางที่ 2	ตัวอ่อนระยะต่าง ๆ ที่เลี้ยงไว้หลังจากการปฏิสนธิกับน้ำเชื้อของพ่อสุกรพันธุ์ดูร็อค	10
ตารางที่ 3	อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนจากน้ำเชื้อของพ่อสุกรพันธุ์ลาร์จไวท์	11
ตารางที่ 4	ตัวอ่อนระยะต่าง ๆ ที่เลี้ยงไว้หลังจากการปฏิสนธิกับน้ำเชื้อของพ่อสุกรพันธุ์ลาร์จไวท์	11
ตารางที่ 5	อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนจากน้ำเชื้อของพ่อสุกรพันธุ์แลนด์เรซ	12
ตารางที่ 6	ตัวอ่อนระยะต่าง ๆ ที่เลี้ยงไว้หลังจากการปฏิสนธิกับน้ำเชื้อของพ่อสุกรพันธุ์แลนด์เรซ	12
ตารางที่ 7	ผลการตรวจการปฏิสนธิของโอโอไซต์ด้วยการย้อมสีหลังจากผสมด้วยน้ำเชื้อจากพ่อสุกร เอ และพ่อสุกร บี ที่อุณหภูมิ 15°ซ เป็นระยะเวลา 0, 2, 4 และ 6 วัน ต่ออัตราการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย	13
ตารางที่ 8	ผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อจากพ่อสุกร เอ และพ่อสุกร บี ที่อุณหภูมิ 15°ซ เป็นระยะเวลา 0, 2, 4 และ 6 วัน ต่ออัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อน	14
ตารางที่ 9	ผลของการตรวจการปฏิสนธิของโอโอไซต์ด้วยการย้อมสีหลังจากการผสมด้วยน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 5°ซ เป็นระยะเวลา 0, 2, 4 และ 6 วัน ต่ออัตราการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย	16
ตารางที่ 10	ผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 5°ซ เป็นระยะเวลา 0, 2, 4 และ 6 วัน ต่ออัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อน	16
ตารางที่ 11	ผลของการตรวจการปฏิสนธิของโอโอไซต์ด้วยการย้อมสีหลังจากการผสมด้วยน้ำเชื้อที่เก็บที่อุณหภูมิ -196°ซ เป็นระยะเวลา 0, 2, 4 และ 6 วัน ต่ออัตราการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย	17
ตารางที่ 12	ผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ -196°ซ เป็นระยะเวลา 0, 2, 4 และ 6 วัน ต่ออัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อน	17

รายการรูปประกอบ

		หน้า
รูปที่ 1	เปรียบเทียบอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนสุกรหลังการปฏิสนธินอกร่างกายเมื่อใช้น้ำเชื้อจากพ่อสุกร เอ และสุกร บี ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15°ซ นาน 0, 2, 4 และ 6 วัน	15
รูปที่ 2	อัตราการแบ่งตัวหลังการปฏิสนธินอกร่างกายด้วยน้ำเชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15°ซ, 5°ซ และ -196°ซ นาน 0, 2, 4 และ 6 วัน	19
รูปที่ 3	ตัวอ่อนสุกรหลังการปฏิสนธินอกร่างกายระยะ 1 เซลล์ (A) และมีตัวอสุจิเกาะรอบ ๆ โอโอไซต์ (ลูกศรชี้) และ 2 เซลล์ (B), 4 เซลล์(C), ประมาณ 16 เซลล์ (D)	20
รูปที่ 4	ตัวอ่อนสุกรระยะมอรูล่าหลังปฏิสนธินอกร่างกาย	21

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการสัญญลักษณ์และคำย่อ

ภาษาไทย	ภาษาอังกฤษ
กก. = กิโลกรัม	D =Duroc Jersey
ชม. = ชั่วโมง	Y = Yorkshire or Large White
มล. = มิลลิลิตร	L = Land Race
มม.= มิลลิเมตร	BTS = Beltville Thawing Solution
°ซ = องศาเซลเซียส	TCM = Tissue Culture Medium
บี ที เอส = Beltville Thawing Solution	TALP = Tyrode medium
ฟีตัล คาร์ฟ ซีรั่ม = fetal calf serum	FCS = fetal calf serum
	GES = Gilt estrus serum
	FSH = Follicle Stimulating Hormone
	LH = Luteinzing Hormone
	µg/ml = microgram/millilitre
	µg/ml = microgram/millitre
	mM = millimole
	PHE = Penicillamine, Hypotaurine, Epinephrine
	$NaHCO_3$ = Sodium bi Carbonate
	CO_2 = Carbondioxide gas
	W/V = Weight/Volume
	V/V = Volume/Volume

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำนำ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ โดยเป็นขั้นที่สามของงานวิจัยเรื่อง "การปฏิสนธิภายนอกร่างกายในสุกร (*In vitro* fertilization)" ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ดำเนินวิจัยอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ปี พ.ศ. ๒๕๓๗ ในขั้นแรกของการศึกษาความเป็นไปได้ของวิธีการนี้ ต่อมาในปี พ.ศ. ๒๕๓๘ ได้ศึกษาในขั้นที่สองเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกร ทั้งในด้านปัจจัยของการเตรียมความพร้อมของโอโอไซต์และความพร้อมของตัวอสุจิ งานวิจัยนี้ในปี พ.ศ. ๒๕๓๙ ได้ชี้ให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ในการนำเอาเทคนิคการปฏิสนธินอกร่างกายไปใช้ในทางปฏิบัติโดยสามารถทดสอบความสมบูรณ์พันธุ์ของน้ำเชื้อของพ่อสุกรในหลอดทดลองได้ รวมทั้งยังทดสอบระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บน้ำเชื้อเพื่อใช้ในงานการผสมเทียมสุกร ซึ่งจะเป็นประโยชน์ของวงการผลิตสุกรในด้านการคัดเลือกพ่อพันธุ์ และด้านการผสมเทียม โดยสามารถย่นทั้งระยะเวลาและประหยัดในการลดขั้นตอนในการเตรียมสัตว์ทดลองเพื่อใช้ในการผสม ตลอดจนลดความแปรปรวนอันเกิดการผสมพันธุ์ของแม่สุกรได้ และเช่นเดียวกับงานวิจัยในรายงานสองฉบับแรก ทางคณะผู้วิจัยได้ดำเนินการเผยแพร่ในรูปบทความและการประชุมวิชาการในประเทศและต่างประเทศเสมอมา

รศ. น.สพ. ดร. มงคล เตชะกำพุ
ผู้วิจัยหลัก
๓๑ ตุลาคม ๒๕๓๙

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

ในสุกรเช่นเดียวกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น ๆ ที่คุณภาพของน้ำเชื้อมีส่วนสำคัญต่อความสำเร็จในการผสมติดและการตั้งท้อง ปกติการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อทำโดยการตรวจด้วยตาเปล่า (macroscopic examination) เช่น ดูจากปริมาตร สี ความหนืด ความเป็นกรดเป็นด่าง เป็นต้น หรือจากการตรวจอย่างละเอียดเพิ่มขึ้นโดยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ (microscopic examination) เช่น การตรวจการเคลื่อนไหวเฉพาะตัว อัตราของตัวอสุจิเป็นและตัวอสุจิตาย หรือลักษณะความผิดปกติของตัวอสุจิและเซลล์แปลกปลอมต่าง ๆ (อรรณพ, 2522) วิธีดังกล่าวเป็นวิธีเบื้องต้นที่สามารถบ่งชี้ถึงคุณภาพของน้ำเชื้อได้ โดยทั่วไปสุกรที่มีความผิดปกติของตัวอสุจิมาก ๆ จะมีผลทำให้การผสมติดต่ำ แต่ในขณะเดียวกันสุกรที่มีคุณภาพของน้ำเชื้อดีก็ไม่ได้หมายความว่าสุกรตัวนั้นจะให้อัตราการผสมติดสูงเสมอไป เนื่องจากวิธีการตรวจข้างต้นไม่ได้บ่งชี้ถึงความสามารถทางการปฏิสนธิของตัวอสุจิ (fertilizing capacity) ดังนั้นได้มีการศึกษาเกี่ยวกับคุณภาพของน้ำเชื้อด้วยการตรวจสอบความสามารถในการปฏิสนธิ โดยตรวจสอบจากไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิและการพัฒนาของตัวอ่อนก่อนการฝังตัวหลังจากการผสมธรรมชาติ (*in vivo*) (Waberski *et al.*, 1994) หรือ การตรวจจากการปฏิสนธินอกร่างกาย (*in vitro*) ในมนุษย์ได้มีการตรวจสอบคุณภาพของน้ำเชื้อด้วยการประเมินสมรรถภาพในการปฏิสนธิจากการให้ตัวอสุจิผสมกับโอโอไซต์ของหนูแฮมสเตอร์ที่เอาชั้นเปลือกนอก (zona pellucida) ออก แล้วตรวจว่ามีการเจาะของตัวอสุจิ (sperm penetration) ในไซโตพลาสซึ่มของโอโอไซต์หรือไม่ รวมทั้งนับจำนวนของตัวอสุจิที่เข้าปฏิสนธิด้วย เรียกวิธีนี้ว่า "Zona-Free Hamster Egg Test (HEPT)" (Yamagimachi, 1984) ในสัตว์พบว่ามีการใช้วิธีการปฏิสนธินอกร่างกายโดยใช้ตัวอสุจิและโอโอไซต์ของสัตว์ชนิดเดียวกันมาตรวจสอบความสมบูรณ์พันธุ์ โดยในโคพบว่าอัตราการปฏิสนธินอกร่างกาย (Hillery *et al.*, 1990; Shi *et al.*, 1990) การแบ่งตัวของตัวอ่อนระยะแรก (early cleavage) การพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะ 8-16 เซลล์ จนเป็นตัวอ่อนระยะมอรูล่าและระยะบลาสโตซีส (Otoi *et al.*, 1993) จะแตกต่างกันเมื่อใช้น้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์แต่ละตัวและแต่ละสายพันธุ์ โดยมีความผันแปรตั้งแต่ 0-60% (Lacalandra *et al.*, 1992) นอกจากนี้จากการศึกษาของสถาบัน UNCEIA ซึ่งเป็นหน่วยงานของกระทรวงเกษตร ที่รับผิดชอบการผสมเทียมของประเทศฝรั่งเศส ได้พบว่าความสัมพันธ์ในเชิงบวก (สหสัมพันธ์, r, ในระดับ 0.80) ระหว่างอัตราการเจริญเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสหลังทำการปฏิสนธินอกร่างกายกับอัตราการไม่กลับเป็นสัด (non return rate) และอัตราการตั้งท้องของโคที่ทำการผสมเทียมทั่วประเทศ โดยการทดสอบด้วยการนำเอาน้ำเชื้อจากพ่อโคที่ใช้รีดเก็บน้ำเชื้อ

แต่ละตัวมาปฏิสนธิกับโอโอไซต์ พบว่าน้ำเชื้อที่ให้อัตราของการเจริญเป็นระยะบลาสโตซีสต่ำจะสัมพันธ์กับอัตราการผสมติดต่ำด้วย แต่ในขณะเดียวกันหากน้ำเชื้อจากพ่อโคนั้น ๆ ให้อัตราการเจริญเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสสูงกับจะให้ความสำเร็จในการผสมติดและตั้งท้องสูงด้วย (Marquant Le Guienne *et al.*, 1980: Marquant Le Guienne *et al.*, 1992) สำหรับในสุกร รายงานการวิจัยที่ลงในวารสาร Pig International (Anon, 1995) แสดงให้เห็นว่าการใช้โอโอไซต์ที่ตายแล้ว (killed oocyte) สามารถใช้ทดสอบดูการเจาะผ่านชั้นเปลือกของตัวอสุจิได้ ซึ่งเป็นข้อมูลเพิ่มเติมในทดสอบความสามารถของการปฏิสนธิในขั้นแรกได้ รวมทั้งได้มีการใช้โอโอไซต์ชนิดที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ (immature oocytes) มาทดสอบการเจาะผ่านของตัวอสุจิ (Matas *et al.*, 1996) และหากได้ใช้วิธีการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกรก็จะเป็นวิธีวัดผลได้เพิ่มเติมโดยดูจากอัตราความสามารถของตัวอ่อนที่แบ่งตัวหลังการปฏิสนธิได้

อนึ่งวิธีการตรวจสอบดังกล่าวน่าจะสามารถนำมาปรับใช้เพื่อประโยชน์ต่องานการผสมเทียม โดยปกติน้ำเชื้อจากพ่อสุกรหนึ่งตัวจะสามารถนำมาเจือจางและนำไปผสมกับแม่สุกรหลาย ๆ ตัวในคราวเดียวกันได้ ซึ่งอัตราการผสมติดนอกจากจะขึ้นกับความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อพันธุ์แต่ละตัวแล้วยังขึ้นกับระยะเวลาในการเก็บรักษาหลังเจือจางน้ำเชื้อ การวิเคราะห์ผลของการผสมเทียมในเวลาที่เก็บรักษาต่างกันนั้นมักใช้วิธีการตรวจสอบหลังจากทำการผสมพันธุ์กับแม่พันธุ์จำนวนหนึ่ง แล้วดูจากอัตราการผสมติดและรอจนถึงคลอดเพื่อดูอัตราการคลอดและจำนวนลูกสุกรแรกเกิด ซึ่งมีข้อจำกัดคือ ข้อหนึ่งต้องใช้จำนวนแม่สุกรจำนวนมากในการผสมหากต้องการทดสอบความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อพันธุ์ตัวหนึ่ง ๆ ข้อสองแม่สุกรแต่ละตัวจะมีความแปรปรวนโดยเฉพาะในเรื่องเวลาในการตกไข่ โดยบางตัวอาจตกไข่เร็ว บางตัวอาจตกไข่ช้า ทำให้ผลที่ได้ไม่แน่นอน (Waberski *et al.*, 1994) ดังนั้นหากนำเอาวิธีการปฏิสนธินอกร่างกายมาปรับใช้กับการตรวจสอบผลของการเก็บน้ำเชื้อจะเป็นประโยชน์ต่อการผสมเทียมสุกร เพื่อสามารถตรวจสอบคุณภาพของน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ สภาวะและความสามารถในการเก็บน้ำเชื้อ อาทิเช่น เวลา ชนิดของน้ำยาละลาย ซึ่งวิธีนี้จะเป็นวิธีการประเมินผลที่รวดเร็วและลดความแปรปรวนจากการใช้น้ำเชื้อไปผสมกับสัตว์จริงได้ น้ำเชื้อสุกรหลังจากเจือจางด้วยสารละลายเจือจางมีวิธีการเก็บรักษา 2 วิธี คือ การเก็บในรูปน้ำเชื้อสด (fresh preserved semen) และการเก็บในรูปน้ำเชื้อแช่แข็ง (frozen semen) โดยจุดประสงค์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อ คือ เพื่อให้ตัวอสุจิสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้นานหลังจากการรีดเก็บน้ำเชื้อ ลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการรีดเก็บน้ำเชื้อโดยไม่ต้องรีดเก็บน้ำเชื้อบ่อยครั้งและสามารถนำไปผสมกับแม่พันธุ์ในที่ต่าง ๆที่มีระยะทางห่างกันได้

การเก็บน้ำเชื้อในรูปน้ำเชื้อสดเป็นการนำน้ำเชื้อที่รีดเก็บได้มาเจือจางด้วยน้ำยาละลายเจือจางแล้วนำไปเก็บไว้ในที่เย็นซึ่งอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษามีตั้งแต่ 5°ซ ถึง 20°ซ ขึ้นอยู่กับสูตรของน้ำยาละลายเจือจางน้ำเชื้อว่าเป็นชนิดใด การเก็บน้ำเชื้อแบบนี้ข้อดีคือ น้ำเชื้อยังมีคุณภาพดีและยังมีตัวอสุจิที่ยังแข็งแรงเคลื่อนไหวอยู่เป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ยังง่ายต่อการเตรียมและประหยัดค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษา ส่วนข้อเสียคือ สามารถเก็บน้ำเชื้อได้เพียง 3 - 4 วัน เท่านั้นที่จะให้อัตราการผสมติดที่ดี ส่วนการเก็บน้ำเชื้อในรูปน้ำเชื้อแช่แข็งเป็นการนำน้ำเชื้อที่รีดเก็บได้มาเจือจางด้วยสารเจือจางที่มีสารป้องกันการแช่แข็ง (cryoprotectants) อยู่ด้วย แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ในภาพที่เย็นจัดจนแข็งโดยเก็บผ่านการแช่แข็งในน้ำแข็งแห้งที่มีอุณหภูมิ -79°ซ และเก็บในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196°ซ ซึ่งรูปแบบการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งมี 3 รูปแบบ คือ แบบหลอดแก้ว (tube) แบบเม็ด (pellet) และแบบหลอดฟาง (straw) โดยการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในสุกรนิยมใช้รูปแบบเม็ด (pellet) การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบนี้มีทั้งข้อดีและข้อเสียเช่นกัน ข้อดีคือสามารถเก็บน้ำเชื้อไว้ได้นานแม้ว่าพ่อพันธุ์จะตายไปแล้วนอกจากนี้ยังใช้เนื้อที่น้อยในการเก็บรักษาและสะดวกแก่การขนส่งไปยังที่ต่าง ๆ ส่วนข้อเสียคือจะมีตัวอสุจิที่มีชีวิตรอดเคลื่อนไหวอยู่น้อย

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ต้องการนำเอาเทคนิคการปฏิสนธินอกร่างกายซึ่งทางคณะผู้วิจัยได้ดำเนินการศึกษามาตั้งแต่ปี 2537 (มงคล และคณะ, 2537: 2538) เพื่อ

1) ทดสอบคุณภาพของน้ำเชื้อของพ่อสุกรต่อความสามารถในการปฏิสนธิ (fertilizing ability) ในการทดลองที่ 1

2) เปรียบเทียบอัตราความสำเร็จในการปฏิสนธิโดยใช้น้ำเชื้อสดซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ 15°ซ, 5°ซ และน้ำเชื้อแช่แข็งซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ - 196°ซ เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6 วัน ในการทดลองที่ 2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์และวิธีการ

การตรวจสอบความสามารถในการปฏิสนธิประกอบด้วยขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. การเตรียมน้ำเชื้อ
2. การเตรียมโอโอไซต์
3. การปฏิสนธิในหลอดทดลอง

การเตรียมน้ำเชื้อ

1. การรีดน้ำเชื้อ

ในการทดลองที่ 1 รีดน้ำเชื้อจากพ่อสุกรสามสายพันธุ์ ที่ใช้เป็นพ่อพันธุ์ในฟาร์มสุกรพ่อแม่พันธุ์แห่งหนึ่งในจังหวัดนครปฐม คือ

ก) พ่อสุกรพันธุ์ดูร็อค (D) จำนวน 3 ตัว คือ D0663 D0930 และ D9403

ข) พ่อสุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ (Y) จำนวน 3 ตัว คือ Y7388 Y7293 และ Y3960

ค) พ่อสุกรพันธุ์แลนด์เรซ (L) จำนวน 3 ตัว คือ L9048 L9582 และ L9865

โดยแต่ละครั้งของการทดลองทำการรีดเก็บจากพ่อสุกรทั้งสามตัวจากแต่ละสายพันธุ์ คัดพ่อสุกรดังกล่าวโดยพิจารณาคัดจากประวัติการผสมพันธุ์ และดูจากคุณภาพของน้ำเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยมีอัตราการเคลื่อนไหวไปข้างหน้าของตัวอสุจิประมาณ 75% ขึ้นไป

ทำการรีดน้ำเชื้อด้วยการรีดด้วยมือ (Gloved-Hand Method) ใส่น้ำเชื้อในกระบอกที่หุ้มกระดาษกันแสงและใช้ผ้าก๊อสปิดปากกระบอกเพื่อกรองเม็ดสาดูที่ได้จากการรีดน้ำเชื้อ และเก็บน้ำเชื้อทุกส่วนที่รีดได้ (whole semen) นำน้ำเชื้อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 17°ซ ในกล่องเทอร์โมสที่ควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติตลอดการขนส่งจากฟาร์มมายังห้องปฏิบัติการ

สำหรับการทดลองที่ 2 ทำการรีดน้ำเชื้อจากพ่อสุกรที่โตเต็มที่ อายุประมาณ 2 ปี จำนวน 2 ตัว คือ สุกร เอ สายพันธุ์ดูร็อค และสุกร บี สายพันธุ์ลาร์จไวท์ ซึ่งเลี้ยงไว้ในคอกสุกรของภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดนครปฐม การเตรียมรีดน้ำเชื้อและการเตรียมการใช้วิธีเดียวกับข้างต้น

ณ ห้องปฏิบัติการ ดูดน้ำเชื้อมา 10 มล. ปั่นแยกน้ำเชื้อด้วยความเร็ว 1000 g นาน 4 นาที ดูดส่วนบน (supernatant) ทิ้ง เก็บตะกอนน้ำเชื้อไว้ในส่วนของการเก็บน้ำเชื้อสุกรนั้นสามารถแบ่งออกเป็นสองวิธีคือ การเก็บในรูปเจือจาง ที่อุณหภูมิประมาณ 15-20 °ซ และการเก็บในรูปน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยมีจุดประสงค์คือพยายามให้ตัวอสุจิมีชีวิตรอดได้นาน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การเจือจางน้ำเชื้อและการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ

นำสารเจือจางน้ำเชื้อชนิด บี ที เอส (BTS, Glove Center) ซึ่งอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °ซ แล้วมาเจือจางน้ำเชื้อในอัตราส่วน 1:1 เขย่าให้เข้ากันเบา ๆ แบ่งน้ำเชื้อหลังเจือจางเป็น 3 หลอด แล้วนำมาตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ โดยดูการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสง (phase contrast) และใช้เกณฑ์การตัดสินอัตราการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ โดยตัดสินเอาเฉพาะตัวอสุจิที่มีการเคลื่อนไหวไปข้างหน้าเท่านั้น ในอัตราไม่น้อยกว่า 75%

สำหรับการตรวจความเข้มข้นของตัวอสุจิโดยใช้ฮีโมไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) เมื่อตรวจคุณภาพน้ำเชื้อเรียบร้อยแล้วนำน้ำเชื้อแต่ละหลอดไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15°ซ เพื่อเริ่มต้นทำการเก็บน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 5°ซ และ - 196°ซ ต่อไป สำหรับการทดลองที่ 2 หรือนำไปทำการเตรียมเพื่อการปฏิสนธิเลยในการทดลองที่ 1 โดยตรง

3. การเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ ณ อุณหภูมิที่แตกต่างกัน

3.1 การเก็บน้ำเชื้อสดไว้ที่อุณหภูมิ 15°ซ

3.1.1 เมื่อทำการรีดเก็บน้ำเชื้อตามข้อ 1 เจือจางน้ำเชื้อพร้อมทั้งตรวจคุณภาพน้ำเชื้อตามข้อ 2 แล้วนำน้ำเชื้อไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15°ซ เป็นเวลา 2 ชม. แบ่งน้ำเชื้อมาตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ (วันที่ 0) ในด้านการเคลื่อนไหวโดยใช้เกณฑ์ตัดสินอัตราการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิดังที่กล่าวแล้วข้างต้นและตรวจความเข้มข้นของตัวอสุจิหลังทำการ swim up ในน้ำยา capacitation แล้วด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์ แล้วนำไปปฏิสนธิภายนอกร่างกายกับโอโอไซต์ที่เตรียมไว้ และเก็บน้ำเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 15°ซ ต่ออีก 2, 4 และ 6 วัน ซึ่งขั้นตอนการ swim up ทำได้โดยดูดน้ำเชื้อมา 200 ไมโครลิตร แล้วค่อย ๆ ใส่น้ำเชื้อลงในน้ำยา capacitation ซึ่งปรับความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 7.2 แล้วเก็บไว้ในตู้อบที่ 5 % CO_2 อุณหภูมิ 39°ซ ภายใต้บรรยากาศที่มีความชื้นเต็มที่ประมาณ 4 ชม. เพื่อให้ตัวอสุจิที่แข็งแรงว่ายขึ้นสู่ผิวน้ำยา capacitation (swim up)

กระบวนการในการเตรียมน้ำเชื้อเพื่อการปฏิสนธินอกร่างกายใช้วิธีเดียวกับการทดลองที่ 2 ยกเว้นขั้นตอนในการทำ swim up ใช้เวลาเพียง 1 ชม.

3.1.2 เมื่อเก็บน้ำเชื้อไว้เป็นระยะเวลา 2, 4 และ 6 วัน นำน้ำเชื้อมาตรวจคุณภาพน้ำเชื้อในด้านการเคลื่อนไหวและความเข้มข้นของตัวอสุจิหลัง swim up ก่อนนำไปผสมกับโอโอไซต์ โดยเขย่าน้ำเชื้อให้เข้ากันเบา ๆ ดูดน้ำเชื้อมา 5 ไมโครลิตร หยดลงบนกระจกสไลด์ซึ่งอุ่นด้วย warm plate แล้ว ตรวจดูอัตราการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิวันที่ 2, 4, 6

ด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้เกณฑ์ดังที่กล่าวแล้วข้างต้น และนำน้ำเชื้อที่ตรวจคุณภาพเรียบร้อยแล้วมาปฏิสนธิภายนอกร่างกายกับโอโอไซต์ที่เตรียมไว้ในวันที่ 2, 4, 6

3.2 การเก็บน้ำเชื้อสดไว้ที่อุณหภูมิ 5°ซ

3.2.1 นำน้ำเชื้อซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15°ซ ประมาณ 2 ชม. (หลอดที่ 2) มาปั่นแยกด้วยความเร็ว 1000 g นาน 4 นาที ดูดส่วนบน (supernatant) ทิ้งแล้วเติมสารเจือจางน้ำเชื้อซึ่งประกอบด้วย บี ที เอส + 1% กลีเซอรอลและไข่แดง (ประมาณ 1 ซีซีต่อสารเจือจางน้ำเชื้อ 10 ซีซี) ลงไปเจือจางน้ำเชื้อในอัตราส่วน 1:1 เขย่าให้เข้ากันเบา ๆ และค่อย ๆ ลดอุณหภูมิลงอย่างช้า ๆ จนถึง 5°ซ แล้วเก็บไว้ประมาณ 4 ชม. แบ่งน้ำเชื้อมาตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ (วันที่ 0) ในด้านการเคลื่อนไหวและตรวจดูความเข้มข้นของตัวอสุจิที่มีชีวิตรอดหลัง swim up ด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์ แล้วนำไปปฏิสนธิภายนอกร่างกายกับโอโอไซต์ที่เตรียมไว้และเก็บน้ำเชื้อส่วนที่เหลือไว้ที่อุณหภูมิ 5°ซ ต่ออีก 2, 4, 6 วัน

3.2.2 เมื่อเก็บน้ำเชื้อไว้เป็นระยะเวลา 2, 4 และ 6 วันแล้ว นำน้ำเชื้อมาตรวจคุณภาพน้ำเชื้อก่อนนำไปปฏิสนธิกับโอโอไซต์ โดยผสมน้ำเชื้อให้เข้ากันเบา ๆ ดูดน้ำเชื้อ มา 5 ไมโครลิตร หยดลงบนกระจกสไลด์ซึ่งอุ่นด้วย warm plate แล้ว ตรวจดูอัตราการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ และนำน้ำเชื้อที่ตรวจคุณภาพแล้วมาปฏิสนธิภายนอกร่างกายกับโอโอไซต์ที่เตรียมไว้ในวันที่ 2, 4 , 6

3.3 การเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ - 196°ซ

3.3.1 นำน้ำเชื้อซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15°ซ ประมาณ 2 ชม.(หลอดที่ 3) มาปั่นแยกด้วยความเร็ว 1000 g นาน 4 นาที ดูดส่วนบนทิ้ง แล้วเติมสารเจือจางน้ำเชื้อซึ่งประกอบด้วย บี ที เอส + 1 % กลีเซอรอล และ ไข่แดง (ประมาณ 1 ซีซี ต่อสารเจือจางน้ำเชื้อ 10 ซีซี) ลงไปเจือจางน้ำเชื้อในอัตราส่วน 1:1 เขย่าให้เข้ากันเบา ๆ และค่อย ๆ ลดอุณหภูมิลงอย่างช้า ๆ จนถึง 5°ซ เก็บไว้นานประมาณ 4 ชม.

3.3.2 หยดน้ำเชื้อลงบนท่อนน้ำแข็งแห้งซึ่งเจาะเป็นรูแล้วประมาณ 2 หยด (100 ไมโครลิตร) ต่อหลุม ทิ้งไว้ประมาณ 2 - 3 นาที น้ำเชื้อจะแข็งเป็นเม็ด บรรจุน้ำเชื้อเป็นเม็ดลงในหลอด (cryo tube) ทำรหัสพ่อพันธุ์, วันที่ผลิตและสถานที่ผลิตแล้วใส่ลงในไนโตรเจนเหลวเก็บที่อุณหภูมิ - 196°ซ ประมาณ 4 ชม. หลังจากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งส่วนหนึ่งมาทำให้ละลายในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด บี ที เอส แบ่งน้ำเชื้อมาตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ (วันที่ 0) ในด้านการเคลื่อนไหวตามขั้นตอนดังที่กล่าวแล้วข้างต้น นำน้ำเชื้อที่ตรวจคุณภาพแล้วไปปฏิสนธิภายนอกร่างกายกับโอโอไซต์ที่เตรียมไว้ (วันที่ 0)

3.3.3 เมื่อเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งไว้เป็นระยะเวลานาน 2, 4 และ 6 วัน ตรวจคุณภาพน้ำเชื้อทั้งในด้านการเคลื่อนไหวก่อนการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย

4. <u>การเตรียมตัวอสุจิสำหรับการปฏิสนธินอกร่างกาย</u>

4.1 ดูดน้ำเชื้อหลังเจือจางประมาณ 200 ไมโครลิตร แล้วค่อย ๆ ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำยาแคพปาซิเตชั่น (capacitation) ชนิด TALP ที่มีความเป็นกรด-ด่าง 7.2 ปริมาตร 1 มล. เพื่อให้ตัวอสุจิที่แข็งแรงว่ายขึ้นสู่ผิวน้ำยาแคพปาซิเตชั่น (swim up) นาน 1-4 ชม. ในตู้อบที่อุณหภูมิ 39°ซ ภายใต้บรรยากาศที่มี 5 %CO_2 และความชื้นเต็มที่

4.2 ดูดแยกตัวอสุจิที่บริเวณส่วนบนของน้ำยาแคพปาซิเตชั่น แล้วนำมาปั่นแยกด้วยความเร็ว 1000 g นาน 4 นาที หลังจากนั้นดูดน้ำยาส่วนบนทิ้ง

4.3 แยกเอาเฉพาะส่วนที่ตกตะกอนไปตรวจดูการเคลื่อนไหวอีกครั้งและคำนวณปริมาณให้ได้ความเข้มข้นของตัวอสุจิ $1x10^6$ ตัวต่อมิลลิลิตร โดยจะใช้น้ำเชื้อ 20 ไมโครลิตร สำหรับน้ำเชื้อสดเจือจางซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ 15°ซ และ 5°ซ ส่วนน้ำเชื้อแช่แข็งซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ - 196°ซ จะใช้น้ำเชื้อที่มีความเข้มข้น $2x10^6$ ตัวต่อมิลลิลิตรในการผสมกับโอโอไซต์ในจานหลุมพลาสติกชนิด 4 หลุม แต่ละหลุมมีโอโอไซต์อยู่ประมาณ 10-20 ใบ

<u>การเตรียมโอโอไซต์</u>

1. <u>การเก็บโอโอไซต์</u>

1.1 เก็บรังไข่ของสุกรสาวจากโรงฆ่าสัตว์ท้องถิ่น อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม แต่ละครั้งประมาณ 10 รังไข่ แล้วล้างรังไข่ด้วยน้ำเกลือ 0.9 % อุ่นที่อุณหภูมิ 32°ซ และนำกลับไปยังห้องปฏิบัติการภายใน 2 ชม.

1.2 เจาะฟอลลิเคิลขนาด 3 - 5 มล. โดยใช้ไซริงค์ขนาด 5 มล. และเข็มเบอร์ 19 เพื่อดูดโอโอไซต์ออกมาใส่ในน้ำยา TCM - 199 2.5mMHepes ประมาณ 2 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดทดลอง

1.3ตรวจหาโอโอไซต์และคัดคุณภาพของโอโอไซต์จากของเหลวที่ได้จากการเจาะฟอลลิเคิลในน้ำยา TCM-199 2.5mMHepes ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ กำลังขยาย 10-40 เท่า เลือกเอาเฉพาะโอโอไซต์ชนิดที่ มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบ (partial cumulus oocytes and compact cumulus oocytes) มาเลี้ยงในหลอดทดลองเพื่อให้เกิดความพร้อมที่จะปฏิสนธิ โดยจากการกระจายตัวของเซลล์คิวมูลัส เป็นโอโอไซต์ชนิด expand cumulus oocyte ในน้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์รวมกับเซลล์แกรนูโลซ่า

2. การเตรียมเซลล์แกรนูโลซ่า

2.1 นำน้ำยาเก็บโอโอไซต์ที่เหลือจากการตรวจหาโอโอไซต์ออกแล้ว มาปั่นแยกเอาเซลล์แกรนูโลซ่า ออกด้วยความเร็ว 1500 g นาน 10 นาที

2.2 ล้างเซลล์แกรนูโลซ่าอีก 1 - 2 ครั้งด้วยน้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์ ทำมาปั่นซ้ำ เช่นเดียวกับข้อ 2.1

2.3 ดูดเอาส่วนที่ตกตะกอนจำนวน 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในน้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์เพื่อพร้อมปฏิสนธิร่วมกับโอโอไซต์ ทิ้งไว้นาน 30 นาทีก่อนใส่โอโอไซต์ลงไป

3. การเลี้ยงโอโอไซต์เพื่อให้เกิดสภาวะพร้อมที่จะปฏิสนธิ

3.1 ล้างโอโอไซต์ที่ได้จากการเจาะฟอลลิเคิล 2 ครั้งในน้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์ชนิด TCM - 199 $NaHCO_3$ + 10 μg / ml FSH / LH + 10 μg / ml Estradiol-17β + 10 % ซีรั่มจากสุกรสาวที่เป็นสัด (Gilt estrus serum) หรือ +10% ฟีตัล คาร์ฟ ซีรั่ม (fetal calf serum, Gibco, USA)

3.2 เลี้ยงโอโอไซต์ในน้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ดังกล่าวข้างต้น ร่วมกับเซลล์แกรนูโลซ่านาน 40-44 ชม. ในตู้อบที่อุณหภูมิ 39 °ซ ภายใต้บรรยากาศที่มี 5 % CO_2 และความชื้นเต็มที่ เพื่อให้โอโอไซต์เจริญพร้อมที่จะปฏิสนธิ

การปฏิสนธิภายนอกร่างกาย

นำโอโอไซต์ที่เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์เพื่อให้พร้อมปฏิสนธิครบ 40-44 ชม.ล้างในน้ำยาสำหรับทำการปฏิสนธินอกร่างกาย ซึ่งมีสาร PHE (Penicillamine 25 mg/ml + Hypotaurine 25 mg/ml + Epinephrine 10 mg/ ml) และ Heparin 10 mg/ml ที่มีความเป็นกรด-ด่าง 7.6 เติมตัวอสุจิที่เตรียมไว้ ในความเข้มข้น $1x10^6$ ล้านตัวต่อมิลลิลิตร ลงในจานหลุมพลาสติกชนิด 4 หลุม ที่มีโอโอไซต์อยู่ประมาณ 10-20 ใบต่อหลุม นำจานหลุมพลาสติกใส่ในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 39 °ซ ภายใต้บรรยากาศที่มี 5 % CO_2 และความชื้นเต็มที่เป็นเวลานาน 18 ชม.

ในการทดลองที่ 2 สุ่มตัวอ่อนโอโอไซต์หลังเลี้ยงร่วมกับตัวอสุจิมาประมาณ 10% ในแต่ละครั้งของการทดลอง เพื่อตรวจการปฏิสนธิและความผิดปกติหลังทำการปฏิสนธินอกร่างกายด้วยการตรึง (Fixed) ด้วยน้ำยา acetic acid:absolute alcohol (1:3) เป็นเวลานานประมาณ 10 - 20 วัน แล้วย้อมด้วยสี aceto - orcein {1 % orcein (W/V) ใน 45 % acetic acid (V/ V)} แล้วส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสง (phase contrast) กำลังขยาย 400 เท่า ในกรณีที่มีการปฏิสนธิปกติจะพบหัวอสุจิและหางอสุจิในโอโอพลาสซึม และโปรนิวคลีไอ 2 อันในโอโอพลาสซึม (male and female pronuclei)

<u>การเลี้ยงตัวอ่อนหลังปฏิสนธิภายนอกร่างกาย</u>

หลังการผสมกับตัวอสุจิ 18 ชม. นำโอโอไซต์มาลอกเอาเซลล์คิวมูลัสและตัวอสุจิส่วนเกินออกไปโดยใช้ปิเปตขนาดเล็กกว่าขนาดโอโอไซต์เล็กน้อยดูดเข้าออกหลาย ๆ ครั้ง (decoronization) และนำมาเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อนชนิด TCM199 $NaHCO_3$+20% fetal calf serum(FCS) หรือน้ำยาชนิด B2 (Menezo, IFFA Merieux, France) + 20 % FCS(fetal calf serum) ในตู้อบที่อุณหภูมิ 39 °ซ ภายใต้บรรยากาศที่มี 5 % CO_2 และความชื้นเต็มที่ เพื่อดูการแบ่งตัวและการพัฒนาของตัวอ่อนทุก 24 ชม. เป็นเวลา 3 -5 วัน จนได้อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อน เป็นระยะ 2, 4, 8, 16 เซลล์และระยะมอรูล่า

<u>สถิติวิเคราะห์</u>

ในการทดลองที่ 1 ใช้การทดสอบความแตกต่างของอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนที่ได้จากการใช้น้ำเชื้อของพ่อสุกรแต่ละตัว ด้วย Student t' test โดยกำหนดความเชื่อมั่น $P<0.05$, $P<0.01$ และ $P<0.001$

ส่วนการทดลองที่ 2 ใช้วิธีการวิเคราะห์ทางสถิติชนิด Paired t - test ทดสอบความแตกต่างของคุณภาพ น้ำเชื้อสดหลังเจือจางและน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6 วัน และใช้วิธีการวิเคราะห์ทางสถิติชนิด Chi square ทดสอบความแตกต่างของอัตราความสำเร็จในการปฏิสนธิภายนอกร่างกายจากอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อน ตามระยะเวลาที่เก็บน้ำเชื้อสดหลังเจือจางและเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งเป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6 วัน โดยกำหนดความเชื่อมั่น $P<0.05$, $P<0.01$ และ $P<0.001$

ผลการทดลอง

1) ผลของการทดสอบคุณภาพน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ต่อการปฏิสนธิ (ตารางที่ 1-6)

จากตารางที่ 1 ถึง 6 แสดงให้เห็นอัตราการแบ่งตัวของโอโอไซต์หลังปฏิสนธิด้วยพ่อสุกรแต่ละตัว จากตารางที่ 1 แสดงผลการปฏิสนธินอกร่างกายด้วยการใช้น้ำเชื้อจากพ่อสุกรดูร็อคโดยพ่อสุกร D0663 มีอัตราเท่ากับ 50, 35, 40 และ 32% จากการทดลอง 4 ครั้ง โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 39% ส่วนพ่อสุกร D0930 มีอัตราเท่ากับ 44, 30, 33 และ 30% ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 36% และพ่อสุกร D9403 มีอัตราการแบ่งตัวเท่ากับ 24, 18, 24 และ 30% ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 22% ซึ่งต่ำกว่าพ่อสุกรสองตัวแรกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.001$)

ตารางที่ 1 อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนจากน้ำเชื้อของพ่อสุกรพันธุ์ดูร็อค

พ่อสุกร	ครั้งของการทดลอง				อัตรา
	1	2	3	4	การแบ่งตัว (%)
D0663	20/40 (50%)	6/17 (35%)	18/45 (40%)	20/62 (32%)	64/164 (39%)[ก]
D0930	22/50 (44%)	3/10 (30%)	13/39 (33%)	12/40 (30%)	50/139 (36%)[ก]
D9403	12/50 (24%)	6/39 (18%)	6/25 (24%)	7/23 (30%)	31/137 (22%)[ข]

ก และ ข ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.001)

ตารางที่ 2 แสดงการแบ่งตัวเป็นตัวอ่อนระยะต่าง ๆ ที่ได้หลังจากปฏิสนธิจากน้ำเชื้อของพ่อสุกรทั้งสามตัว โดยอัตราการแบ่งตัวเป็นระยะ 2-4 เซลล์ เท่ากับ 59.4, 60.0 และ 61.3% ตัวอ่อนระยะ 8-16 เซลล์ เท่ากับ 28.1, 38.0 และ 35.4% ซึ่งตัวอ่อนทั้งสองกลุ่ม (2-4 และ 8-16 เซลล์) มีอัตราที่ไม่แตกต่างกัน ส่วนอัตราการแบ่งตัวเป็นตัวอ่อนระยะมอรูล่านั้นพบว่าพ่อสุกร D0663 ให้อัตราสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับพ่อสุกรเบอร์ D0930 และ D9403 ซึ่งเท่ากับ 12.5% เทียบกับ 2.0% และ 3.2% (P<0.05)

ตารางที่ 2 ตัวอ่อนระยะต่าง ๆ ที่เลี้ยงไว้หลังจากการปฏิสนธิกับน้ำเชื้อของพ่อสุกรพันธุ์ดูร็อค

พ่อสุกร	จำนวน ตัวอ่อนที่แบ่งตัว	ระยะของตัวอ่อน		
		2-4 เซลล์	8-16 เซลล์	มอรูล่า
D0663	64	38(59.4%)	18(28.1%)	8(12.5%)[ก]
D0930	50	30(60%)	19(38%)	1(2%)[ข]
D9403	31	19(61.3%)	11(35.4%)	1(3.2%)[ข]

ก และ ข ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ตารางที่ 3 และ 4 แสดงผลของการปฏิสนธินอกร่างกายด้วยน้ำเชื้อของพ่อสุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ ทั้งสามตัว คือ Y7388, Y7293 และ Y3960 โดยอัตราความสำเร็จในพ่อสุกร Y7388 อยู่ในระดับต่ำสุดเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อของพ่อสุกรอีกสองตัวที่เหลือ 29% เปรียบเทียบกับ 42 และ

41% ตามลำดับ โดยมีความผันแปรของอัตราการแบ่งตัว ดังนี้ คือ 50, 36, 38, 47% สำหรับพ่อสุกรเบอร์ Y7293 43, 44, 38 และ 39% สำหรับพ่อสุกรเบอร์ Y3960 และ 50, 37, 20 และ 24% สำหรับพ่อสุกรเบอร์ Y7388

ตารางที่ 3: อัตราการแบ่งตัวหลังจากปฏิสนธินอกร่างกายด้วยน้ำเชื้อพ่อสุกรพันธุ์ลาร์จไวท์

พ่อสุกร	การทดลอง				อัตราการแบ่งตัว(%)
	1	2	3	4	
Y7293	24/49 (50%)	18/50 (36%)	14/37 (38%)	15/32 (47%)	71/168 (42%)[ก]
Y3960	17/40 (43%)	7/39 (44%)	9/24 (38%)	16/41 (39%)	59/144 (41%)[ก]
Y7388	15/30 (50%)	11/30 (37%)	10/53 (20%)	12/50 (24%)	48/163 (29%)[ข]

ก และ ข ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

อัตราการแบ่งตัวอ่อนเป็นระยะต่าง ๆ ของพ่อสุกรลาร์จไวท์ มีค่าใกล้เคียงกันในส่วนของระยะ 2-4 เซลล์ และ 8-16 เซลล์ แต่ต่างกันในระยะมอรูล่า โดยน้ำเชื้อจากพ่อสุกร Y7388 ให้อัตราสูงที่สุด 8.3% ซึ่งต่างกันน้ำเชื้อจากพ่อสุกร Y3960 อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4 ตัวอ่อนระยะต่าง ๆ ที่เลี้ยงไว้หลังจากการปฏิสนธิกับน้ำเชื้อของพ่อสุกรพันธุ์ลาร์จไวท์

พ่อสุกร	จำนวนตัวอ่อนที่แบ่งตัว	ระยะของตัวอ่อน		
		2-4 เซลล์	8-16 เซลล์	มอรูล่า
Y7293	71	45(63.4%)	23(32.4%)	3(4.2%)
Y3960	59	38(64.4%)	20(33.9%)	1(1.7%)[ก]
Y7388	48	32(66.7%)	12(25%)	4(8.3%)[ข]

ก และ ข ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 5 และ 6 แสดงผลการปฏิสนธิของน้ำเชื้อจากพ่อสุกรแลนด์เรซ พบว่าน้ำเชื้อจากพ่อสุกรแต่ละตัวไม่มีความแตกต่างกันในด้านอัตราการแบ่งตัว 32, 37 และ 32% สำหรับพ่อสุกรเบอร์ L9048, L9582 และ L9865 เช่นเดียวกับอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนเป็นระยะต่าง ๆ

ตารางที่ 5 อัตราการแบ่งตัวหลังจากปฏิสนธินอกร่างกายด้วยน้ำเชื้อพ่อสุกรพันธุ์แลนด์เรซ

พ่อสุกร	การทดลอง				อัตรา
	1	2	3	4	การแบ่งตัว(%)
L9048	12/37 (32%)	7/23 (30%)	14/40 (35%)	10/35 (28%)	43/135 (32%)
L9582	21/54 (38%)	13/35 (37%)	10/25 (40%)	6/20 (30%)	50/134 (37%)
L9865	16/50 (32%)	8/27 (29%)	11/32 (34%)	12/40 (30%)	47/149 (32%)

ตารางที่ 6 ตัวอ่อนระยะต่าง ๆ ที่เลี้ยงไว้หลังจากการปฏิสนธิกับน้ำเชื้อของพ่อสุกรพันธุ์แลนเรซ

พ่อสุกร	จำนวน ตัวอ่อนที่แบ่งตัว	ระยะของตัวอ่อน 2-4 เซลล์	8-16 เซลล์	มอรูล่า
L9048	43	33(76.7%)	11(25.6%)	1(2.3%)
L9582	50	33(66.0%)	15(30.0%)	2(4.0%)
L9865	47	29(61.8%)	18(38.2%)	0

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าคุณภาพของน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์แต่ละตัว ในแต่ละสายพันธุ์มีผลต่อการปฏิสนธิและการแบ่งตัวของตัวอ่อนหลังการปฏิสนธินอกร่างกาย โดยพิจารณาถึงอัตราการแบ่งตัวจนถึงระยะมอรูล่าเป็นเกณฑ์การตัดสินในกรณีที่ไม่พบความแตกต่างระหว่างน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ในอัตราการแบ่งตัว

2) <u>ผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรต่อการปฏิสนธินอกร่างกาย</u>

2.1) ผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อจากพ่อสุกร เอ และพ่อสุกร บี ที่อุณหภูมิ 15°ซ เป็นระยะเวลา 0 , 2 , 4 , 6 วันต่ออัตราการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย (ตารางที่ 7 และ 8)

จากตารางที่ 7 และ 8 พบว่าเมื่อนำโอโอไซต์จากสุกรสาวซึ่งเตรียมให้พร้อมสำหรับการปฏิสนธิภายนอกร่างกายมาปฏิสนธิกับน้ำเชื้อสดหลังเจือจางจากสุกรแต่ละตัว ตามระยะเวลาการเก็บน้ำเชื้อจะให้อัตราความสำเร็จในการปฏิสนธิโดยดูจากการตรวจพบหัวอสุจิ และหางอสุจิในโอโอพลาสซึมและตรวจพบ 2 โปรนิวคลีไอ ในโอโอพลาสซึมหลังการปฏิสนธิภายนอก

ร่างกายลดลงเมื่อเก็บน้ำเชื้อไว้เป็นระยะเวลานานขึ้น ในพ่อสุกร เอ พบว่าอัตราการตรวจพบหัวอสุจิ หางอสุจิและการตรวจพบ 2 โปรนิวคลีไอในโอโอพลาสซึมที่มีการปฏิสนธิหลังใช้ตัวอสุจิที่เก็บไว้นาน 0, 2, 4, 6 มีค่าเท่ากับ 42%(10/24), 29%(7/24) , 8%(2/24), 8%(2/24) ตามลำดับ ส่วนในพ่อสุกร บี พบว่าอัตราการปฏิสนธิหลังเก็บตัวอสุจินาน 0, 2, 4, 6 มีค่าเท่ากับ 42%(10/24), 25%(6/24), 17%(4/24), 13%(3/24) ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

ส่วนในด้านอัตราการแบ่งตัวและการพัฒนาของตัวอ่อนหลังการปฏิสนธิจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามลำดับ เมื่อใช้น้ำเชื้อที่เก็บไว้เป็นระยะเวลานานขึ้น คือในพ่อสุกร เอ พบว่าหลังเก็บน้ำเชื้อไว้นาน 0, 2, 4 และ 6 วัน อัตราการแบ่งตัวและการพัฒนาของตัวอ่อนมีค่าลดลงจาก 50%(120/240) เป็น 39%(94/240), 21%(51/240), 12%(29/240) ตามลำดับ เช่นเดียวกับในพ่อสุกร บี พบว่าอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนหลังวันที่ 0, 2, 4 และ 6 มีค่าเท่ากับ 59% (142/240), 42%(102/240), 26 % (62/240), 17%(41/240) ตามลำดับ (ตารางที่ 8) พบว่าเมื่อเปรียบเทียบอัตราความสำเร็จในการปฏิสนธิภายนอกร่างกายและอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนหลังปฏิสนธิที่ได้จากการใช้น้ำเชื้อจากพ่อสุกร บี จะสูงกว่าพ่อสุกร เอ แต่ผลนี้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างสุกร 2 ตัว

ตารางที่ 7 ผลการตรวจการปฏิสนธิของโอโอไซต์ด้วยการย้อมสีหลังจากผสมด้วยน้ำเชื้อจากพ่อสุกร เอ และพ่อสุกร บี ที่อุณหภูมิ 15°ซ เป็นระยะเวลา 0, 2, 4 และ 6 วัน ต่ออัตราการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย

พ่อสุกร	ระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ (วัน)	อัตราการปฏิสนธินอกร่างกาย (%)			
		จำนวนโอโอไซต์	H & T*	M&F*	รวม
สุกร เอ	0	24	8(33%)	2(8%)	10(42%)
	2	24	6(25%)	1(4%)	7(29%)
	4	24	2(8%)	0	2(8%)
	6	24	2(8%)	0	2(8%)
สุกร บี	0	24	8(33%)	2(8%)	10(42%)
	2	24	5(21%)	1(4%)	6(25%)
	4	24	3(13%)	1(4%)	4(17%)
	6	24	2(8%)	1(4%)	3(13%)

H&T = Head and Sperm tail in ooplasm, M&F = Male and Female Pronuclei in ooplasm

ตารางที่ 8 ผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อจากพ่อสุกร เอ และพ่อสุกร บี ที่อุณหภูมิ 15°ซ เป็นระยะเวลา 0, 2, 4 และ 6 วันต่ออัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อน

พ่อสุกร	ระยะเวลาในการเก็บน้ำเชื้อ (วัน)	จำนวนโอโอไซต์	จำนวนตัวอ่อนที่มีการแบ่งตัวและการพัฒนาหลังปฏิสนธิ (%)			
			2 เซลล์	4 เซลล์	>4 เซลล์	รวม
สุกร เอ	0	240	50(42%)	40(33%)	30(25%)	120(50%)[ก]
	2	240	42(45%)	32(34%)	20(21%)	94(39%)[ข]
	4	240	28(55%)	15(29%)	8(16%)	51(21%)[ค]
	6	240	18(62%)	8(28%)	3(10%)	29(12%)[ง]
สุกร บี	0	240	60(42%)	48(34%)	34(24%)	142(59%)[ก]
	2	240	46(45%)	34(33%)	22(21%)	102(42%)[ข]
	4	240	32(52%)	19(31%)	11(18%)	62(26%)[ค]
	6	240	23(56%)	12(29%)	6(15%)	41(17%)[ง]

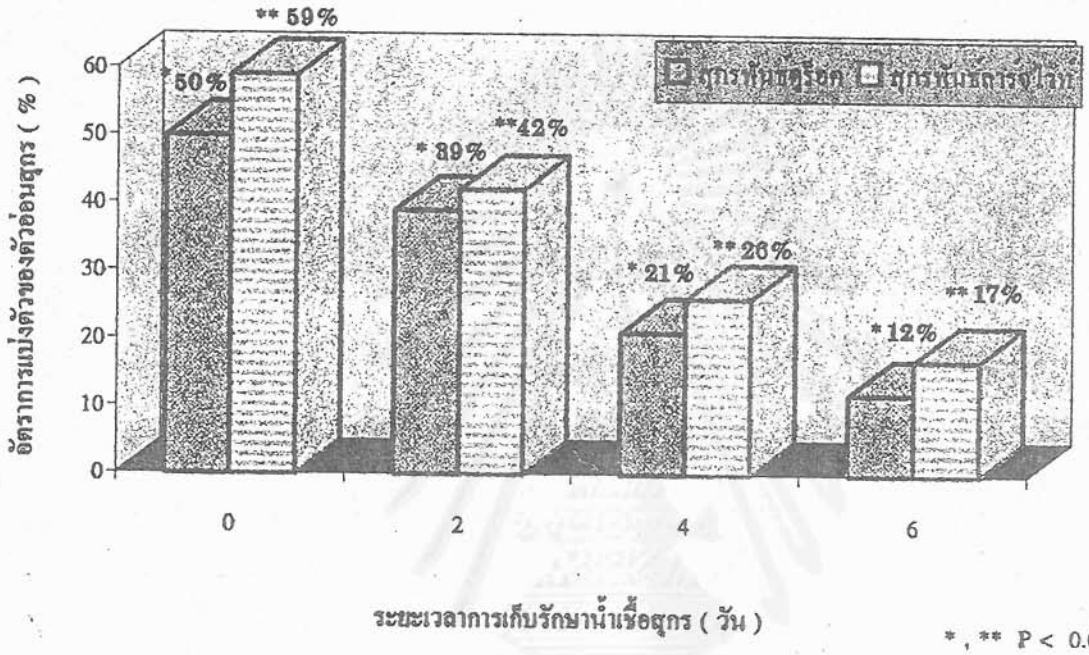
ก, ข แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในระดับ $P<0.05$

ก, ค แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในระดับ $P<0.01$

ก, ง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในระดับ $P<0.001$

อัตราการแบ่งตัวหลังการปฏิสนธินอกร่างกายด้วยน้ำเชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15°ซ ระหว่างพ่อสุกร เอ และพ่อสุกร บี แสดงในรูปที่ 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 เปรียบเทียบอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนสุกรหลังการปฏิสนธินอกร่างกายเมื่อใช้น้ำเชื้อจากพ่อสุกร เอ และสุกร บี ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15°ซ นาน 0, 2, 4 และ 6 วัน

2.2) ผลการเก็บรักษาน้ำเชื้อสดหลังเจือจางที่อุณหภูมิ 5°ซ เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6วัน ต่ออัตราการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย (ตารางที่ 9 และ 10)

จากตารางที่ 9 จากการใช้น้ำเชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5°ซ ในระยะเวลาต่าง ๆ กัน พบว่าอัตราการตรวจพบหัวอสุจิ หางอสุจิและตรวจพบ 2 โปรนิวคลีไอในโอโอพลาสซึมหลังวันที่ 0, 2, 4, 6 มีค่าเท่ากับ 42%(10/24), 25% (6/24), 16%(4/24), 12%(3/24) ตามลำดับ ส่วนในด้านอัตราการแบ่งตัวและการพัฒนาของตัวอ่อนหลังปฏิสนธิจะใกล้เคียงกันแม้จะเก็บน้ำเชื้อไว้นานขึ้น คือหลังวันที่ 0 , 2 , 4 , 6 มีค่าเท่ากับ 22%(43/200), 20%(38/190), 24%(46/190), 26% (52/200) ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 9 ผลของการตรวจการปฏิสนธิของโอโอไซต์ด้วยการย้อมสีหลังจากผสมด้วยน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 5 °ซ เป็นระยะเวลา 0, 2, 4 และ 6 วัน ต่ออัตราการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย

ระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ (วัน)	อัตราการปฏิสนธินอกร่างกาย (%)			
	จำนวนโอโอไซต์	H & T*	M&F*	รวม
0	24	8(33%)	2(8%)	10(42%)
2	24	5(21%)	1(4%)	6(25%)
4	24	3(12%)	1(4%)	2(16%)
6	24	2(8%)	1(4%)	3(12%)

H&T = Head and Sperm tail in ooplasm, M&F = Male and Female Pronuclei in ooplasm

ตารางที่ 10 ผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 5 °ซ เป็นระยะเวลา 0, 2,4 และ 6 วัน ต่ออัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อน

ระยะเวลาในการเก็บน้ำเชื้อ (วัน)	จำนวนโอโอไซต์	จำนวนตัวอ่อนที่มีการแบ่งตัวและการพัฒนาหลังปฏิสนธิ (%)			
		2 เซลล์	4 เซลล์	>4 เซลล์	รวม
0	240*	19(44%)	15(35%)	9(21%)	43(22%)
2	240	18(47%)	12(31%)	8(21%)	38(20%)
4	240	23(50%)	16(35%)	7(15%)	46(24%)
6	240	21(40%)	20(38%)	11(21%)	52(26%)

*จำนวนการทดลองเท่ากับ 10 ครั้ง

2.3 ผลการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรแช่แข็ง (-196°ซ) ตามระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ 0, 2, 4 และ 6 วันต่ออัตราการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย (ตารางที่ 11, 12)

จากตารางที่ 11 การใช้น้ำเชื้อแช่แข็งจะให้อัตราความสำเร็จในการปฏิสนธิลดลง เมื่อเก็บน้ำเชื้อไว้เป็นเวลานาน 0, 2, 4 และ 6 วัน คือ มีค่าเท่ากับ 20%(4/20), 10%(2/20), 15%(3/20), 5%(1/20) ตามลำดับ ส่วนในด้านอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนจะใกล้เคียงกันแม้จะเก็บน้ำเชื้อไว้เป็นเวลานานขึ้น คืออัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนเมื่อเก็บน้ำเชื้อไว้เป็นเวลา 0, 2, 4 และ 6 วันมีค่าเท่ากับ 20%(43/210), 21%(40/190), 24%(46/190), 24%(48/200) ตามลำดับ

ตารางที่ 11 ผลของการตรวจการปฏิสนธิของโอโอไซต์ด้วยการย้อมสีหลังจากผสมด้วยน้ำเชื้อที่เก็บที่อุณหภูมิ -196 °ซ เป็นระยะเวลา 0, 2, 4 และ 6 วัน ต่ออัตราการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย

ระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ (วัน)	อัตราการปฏิสนธินอกร่างกาย (%)			
	จำนวนโอโอไซต์	H & T*	M&F*	รวม
0	20	3(15%)	1(5%)	4(20%)
2	20	2(10%)	0	2(10%)
4	20	2(10%)	1(5%)	3(15%)
6	20	1(5%)	0	1(5%)

H&T = Head and Sperm tail in ooplasm, M&F = Male and Female Pronuclei in ooplasm

ตารางที่ 12 ผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อจากที่อุณหภูมิ -196°ซ เป็นระยะเวลานาน 0, 2, 4 และ 6 วันต่ออัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อน

ระยะเวลาในการเก็บน้ำเชื้อ (วัน)	จำนวนโอโอไซต์	จำนวนตัวอ่อนที่มีการแบ่งตัวและการพัฒนาหลังปฏิสนธิ (%)			
		2 เซลล์	4 เซลล์	>4 เซลล์	รวม
0	210*	18(42%)	14(33%)	11(26%)	43(20%)
2	190	17(43%)	13(33%)	10(25%)	40(21%)
4	190	19(41%)	15(33%)	12(26%)	46(24%)
6	200	22(46%)	17(35%)	14(29%)	48(24%)

*จำนวนการทดลองเท่ากับ 10 ครั้ง

2.4) ผลเปรียบเทียบอัตราความสำเร็จในการปฏิสนธิภายนอกร่างกายในด้านอัตราการแบ่งตัวและการพัฒนาของตัวอ่อนหลังปฏิสนธิขณะเก็บน้ำเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 15°ซ , 5°ซ และ -196 °ซ เป็นระยะเวลา 0 , 2 , 4 และ 6 วัน

จากรูปที่ 2 พบว่าอัตราการแบ่งตัวและการพัฒนาของตัวอ่อนหลังปฏิสนธิเมื่อเก็บน้ำเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 15 °ซ จะสูงกว่าเมื่อเก็บน้ำเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 5°ซ และ -196°ซ ทั้งในวันที่ 0 และวันที่ 2 หลังเก็บรักษาน้ำเชื้อ โดยผลนี้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตามลำดับ คือ

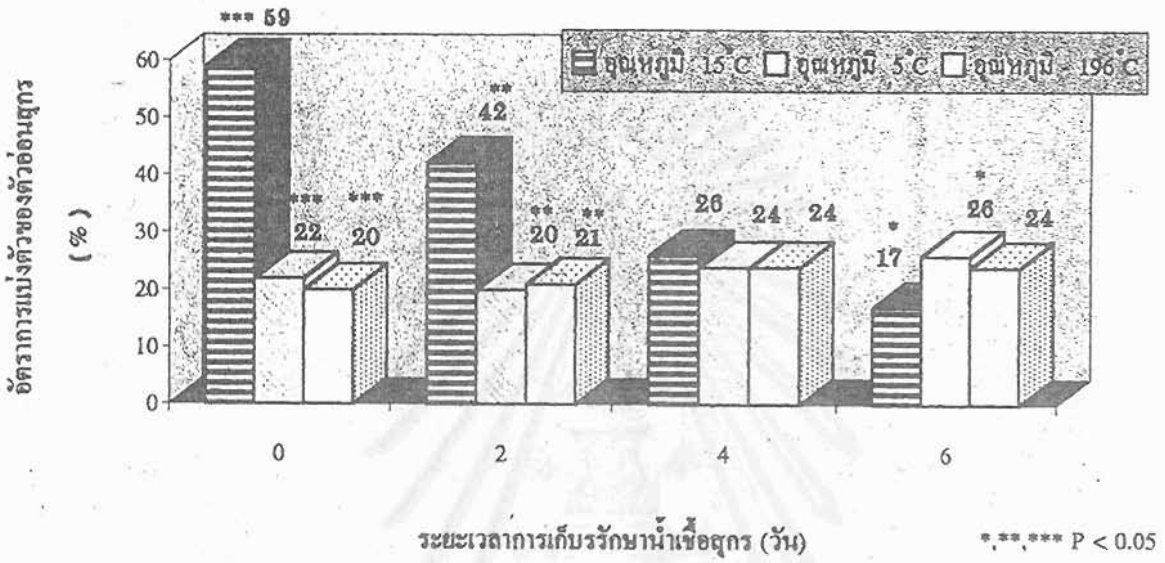
วันที่ 0: อัตราที่ได้เมื่อใช้น้ำเชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15°ซ เปรียบเทียบกับ 5°ซ มีค่าเท่ากับ 59% และ 22% และเมื่อใช้น้ำเชื้อซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15°ซ จะให้อัตราที่สูงกว่า ($P<0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับ -196°ซ , 59% และ 20%

วันที่ 2: อัตราการพัฒนาของตัวอ่อนเมื่อใช้น้ำเชื้อซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15°ซ เปรียบเทียบกับ 5°ซ มีค่าเท่ากับ 42% และ 20% และเมื่อใช้น้ำเชื้อซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15°ซ มีอัตราสูงกว่า ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ -196°ซ มีค่าเท่ากับ 42% และ 21% ตามลำดับ

วันที่ 4: อัตราการแบ่งตัวและการพัฒนาของตัวอ่อนหลังทำการปฏิสนธิภายนอกร่างกายจะใกล้เคียงกันแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ มีค่าเท่ากับ 26%, 24% และ 24% เมื่อใช้น้ำเชื้อซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15°ซ, 5°ซ และ -196°ซ ตามลำดับ

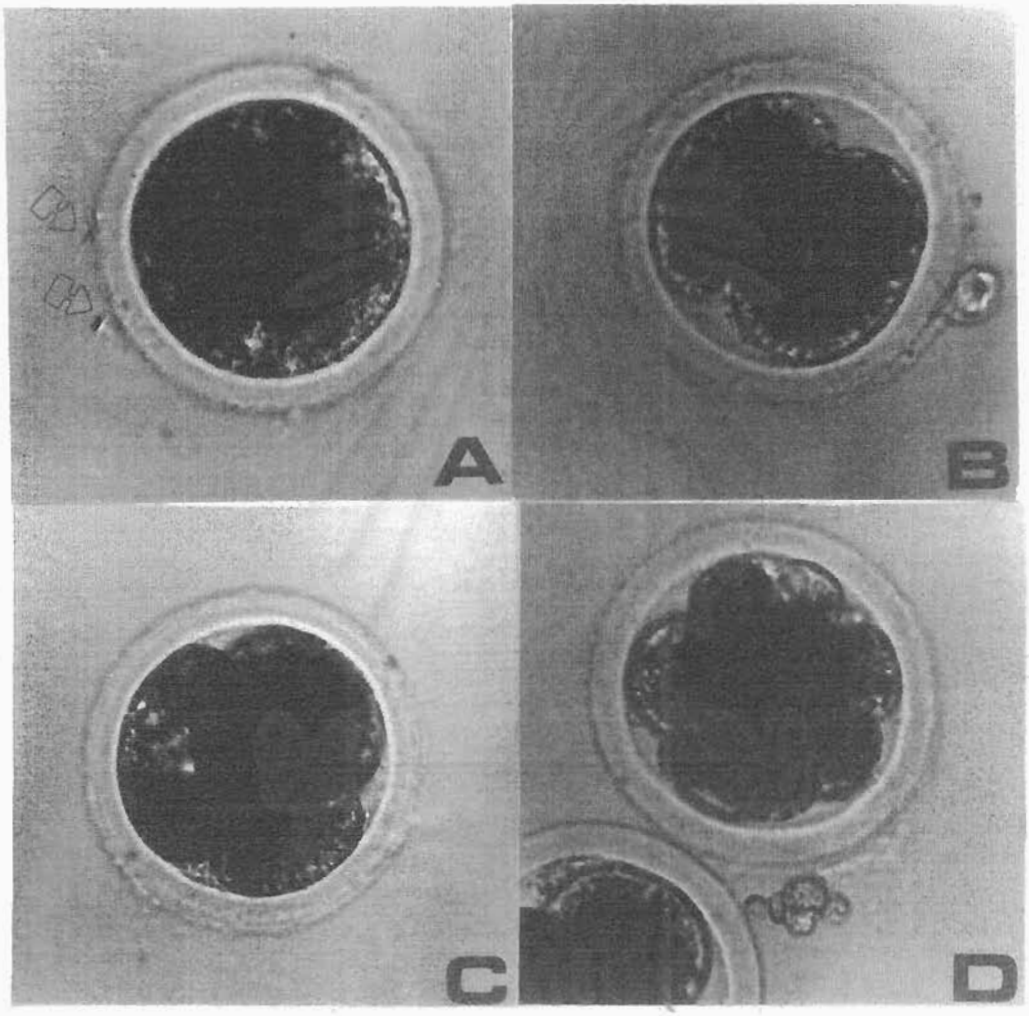
วันที่ 6: อัตราการพัฒนาของตัวอ่อนหลังปฏิสนธิภายนอกร่างกายเมื่อใช้น้ำเชื้อซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15°ซ มีแนวโน้มที่ต่ำกว่า ($P>0.05$) เมื่อใช้น้ำเชื้อซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5°ซ และ -196°ซ คือ ที่อุณหภูมิ 15°ซ เปรียบเทียบกับ 5°ซ และ -196°ซ มีค่าเท่ากับ 17, 26% และ 24% ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2 อัตราการแบ่งตัวหลังการปฏิสนธินอกร่างกายด้วยน้ำเชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15°ซ, 5°ซ และ -196 °ซ นาน 0, 2, 4 และ 6 วัน

ภาพของตัวอ่อนระยะต่าง ๆ หลังการปฏิสนธินอกร่างกายตั้งแต่ระยะ 1, 2, 4, 16 เซลล์ จนถึงระยะมอรูล่า แสดงในรูปที่ 3 และ 4



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3 ตัวอ่อนสุกรหลังการปฏิสนธินอกร่างกายระยะ 1 เซลล์ (A) และมีตัวอสุจิเกาะรอบ ๆ อโอไซต์ (ลูกศรชี้) และ 2 เซลล์ (B), 4 เซลล์ (C) และประมาณ 16 เซลล์ (D)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4 ตัวอ่อนสุกรระยะมอรูล่าหลังปฏิสนธินอกร่างกาย

วิจารณ์

ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคการปฏิสนธิภายนอกร่างกายมาใช้ตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อสุกรในสองแง่มุม มุมที่หนึ่งในด้านการนำไปตรวจสอบสมรรถภาพทางการสืบพันธุ์ หรือความสามารถในการปฏิสนธิของน้ำเชื้อของสุกรพ่อพันธุ์แต่ละตัว มุมที่สองในแง่การนำเอามาใช้เพื่อวัดผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อต่อความสำเร็จในทางการสืบพันธุ์ซึ่งในที่นี้ตรวจในหลอดทดลองจากอัตราการปฏิสนธิและอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนระยะต้น (2-4 เซลล์)

ในแง่มุมที่หนึ่งนั้น จากการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าพ่อสุกรแต่ละตัวซึ่งปกติใช้งานเป็นพ่อพันธุ์ภายในฟาร์มสุกรพ่อแม่พันธุ์ แม้จะมีคุณภาพของน้ำเชื้อจากการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยเฉพาะอัตราการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิที่ใกล้เคียงกัน คือประมาณ 75-80% แต่พบว่าจะมีความแตกต่างกันในแง่ของอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนหลังนำมาปฏิสนธิกับโอโอไซต์ในหลอดทดลองอย่างมีนัยสำคัญ อัตราการแบ่งตัวดังกล่าวเป็นตัวบ่งชี้ที่ดีตัวหนึ่งในเรื่องความสามารถในการปฏิสนธิ (fertilizing ability) การศึกษาในโคพบว่าพ่อโคแต่ละตัวจะมีความสามารถในการให้อัตรการปฏิสนธิและการแบ่งตัวของตัวอ่อนหลังการปฏิสนธินอกร่างกายต่างกัน (Lacalandra *et al.* 1992) Parrish และคณะ (1986) พบว่าปัจจัยของน้ำเชื้อที่ใช้ในการปฏิสนธิจากพ่อโคต่าง ๆ จะให้อัตราการปฏิสนธิที่ต่างกัน ±12% โดยผลของพ่อพันธุ์ไม่สามารถลดได้ด้วยวิธีการเตรียมตัวอสุจิขณะทำการ swim up เพื่อคัดเลือกเอาตัวอสุจิที่เคลื่อนไหวได้ดี (motile sperm)

นอกจากนี้การศึกษาในโค (Marquant-Le Guienne *et al.*, 1992) ด้วยการใช้น้ำเชื้อจากพ่อโคที่นำไปใช้ในงานผสมเทียมระดับประเทศแล้วนำข้อมูลการผสมติด (การตั้งท้อง) มาเปรียบเทียบกับผลของการปฏิสนธินอกร่างกาย พบว่ามีความสัมพันธ์ (correlation) ในเชิงบวก (r=0.81) ระหว่างอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนกับอัตราการผสมติด (bull fertility) ในการผสมธรรมชาติ โดยน้ำเชื้อจากพ่อโคที่ให้อัตราการพัฒนาของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสสูงหลังการปฏิสนธินอกร่างกายนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลการผสมจริง ก็พบว่าเป็นพ่อโคที่มีอัตราการผสมติดสูงเช่นกัน แต่ในขณะเดียวกันน้ำเชื้อจากพ่อโคที่มีอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสต่ำลงมา ข้อมูลจริงในทางการผสมจริงก็จะเป็นพ่อโคที่ให้อัตราการผสมติดต่ำลงมาด้วย ซึ่งก็หมายความว่าข้อมูล *in vitro* จะสอดคล้องกับ *in vivo* งานวิจัยในทำนองเดียวกันนี้ในสุกรยังไม่มีรายงานมาก่อน Techakumphu และ Tantasuparak (1994) ได้เสนอวิธีการตรวจสมรรถภาพในการปฏิสนธิของน้ำเชื้อพ่อสุกรด้วยการนำน้ำเชื้อไปผสมธรรมชาติหรือผสมเทียมกับสุกรเพศเมียจำนวนหนึ่ง ทิ้งไว้จนเกิดการแบ่งตัวประมาณ 4-5 วัน แล้วเก็บตัวอ่อนด้วยการชะล้างจากท่อนำไข่และมดลูกเพื่อมาตรวจประเมินคุณภาพ พบว่าน้ำเชื้อพ่อสุกรที่ดีจะให้อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนในท่อนำไข่และมดลูก (*in vivo*) ได้ดีเช่นกัน ส่วนการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อด้วยจากการปฏิสนธิในหลอดทดลอง (*in vitro*) ได้เสนอให้มีการใช้โอโอไซต์ที่ตายแล้ว (killed eggs) (Anon, 1995) หรือโอโอไซต์ที่ยังไม่เจริญเต็มที่ (immature) ที่เจาะมาจากฟอลลิเคิลของรังไข่โดยตรง (Matas *et al.*, 1996) หรือเก็บแช่ไว้ในน้ำเกลือความเข้มข้นสูง (Mattioli *et al.*, 1990) แล้วนำมาเลี้ยงรวมกับน้ำเชื้อ หลังจาก 6-7 ชม. ทำการตรวจดูการเจาะชั้นเปลือกโซน่าของตัวอสุจิ (sperm penetration) วิธีดังกล่าวมีข้อดีคือสามารถเก็บโอโอไซต์ได้นานหลายเดือน ไม่ต้องนำมาเลี้ยงให้เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ (*in vitro* maturation) รวมทั้งไม่ต้องยุ่งยากในเรื่องการปฏิสนธินอกร่างกายซึ่งมีความซับซ้อนในวิธีการพอสมควร แต่อย่างไรตามวิธีการใช้โอโอไซต์ที่ตายแล้วก็มีข้อจำกัดคือ ไม่สามารถตรวจการปฏิสนธิ

ได้ (fertilization) ไม่มีตัวอ่อนแบ่งตัว (cleavage) ไม่มีตัวอ่อนที่พัฒนา (developed embryo) เมื่อเปรียบเทียบกับโอโอไซต์ที่เลี้ยงให้พร้อมและนำมาปฏิสนธิ จากงานวิจัยนี้พบว่าสามารถใช้อัตราการแบ่งตัวเพื่อดูความแตกต่างของคุณภาพของน้ำเชื้อระหว่างพ่อสุกรทั้งสามตัวในแต่ละสายพันธุ์ได้อย่างคร่าว ๆ ว่ามีความแตกต่างในแง่ของความสามารถในการปฏิสนธิหรือไม่ ตัวอย่างในสุกรพันธุ์ดูร็อคและพ่อสุกรลาร์จไวท์ โดยพ่อสุกรดูร็อคตัวที่หนึ่งและที่สอง (D0663 และ D0930) จะมีคุณภาพน้ำเชื้อในเชิงปฏิสนธิสูงกว่าพ่อสุกรตัวที่สาม (D9403) เช่นเดียวกับพ่อสุกร Y7293 และ Y3960 ที่มีคุณภาพน้ำเชื้อในการปฏิสนธิสูงกว่าพ่อสุกร Y7388 อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าอัตราการแบ่งตัวเป็นระยะ 2 เซลล์ถึง 4 เซลล์มักไม่แตกต่างกันในพ่อสุกรที่ทำการศึกษาไม่ว่าจะเป็นสายพันธุ์ใดก็ตาม อัตราการเจริญเป็นตัวอ่อนระยะท้าย เช่น ระยะมอรูล่าน่าจะเป็นตัวบ่งชี้ที่สามารถแยกแยะในกรณีที่อัตราการแบ่งตัวโดยรวมไม่แตกต่างกันในช่วงต้น ตัวอย่างที่เห็นคือ น้ำเชื้อของพ่อสุกรดูร็อค พบว่าคุณภาพของน้ำเชื้อของพ่อสุกร D0663 กับ D0930 จะแตกต่างกันก็ต่อเมื่อพิจารณาถึงอัตราการแบ่งตัวเป็นตัวอ่อนระยะมอรูล่า 12.5% เปรียบเทียบกับ 2% เช่นเดียวกับพ่อสุกรลาร์จไวท์ระหว่าง Y7293 และ Y3960 ที่พ่อพันธุ์ตัวแรก Y7293 มีแนวโน้มในการให้ตัวอ่อนระยะมอรูล่าสูงกว่าพ่อพันธุ์ตัวที่สอง Y3960 การศึกษาในโค Aoyagi และคณะ (1988) ได้เสนอว่าผลแตกต่างของพ่อโคแต่ละตัวจะไม่เห็นเด่นชัดนักในแง่ของอัตราการปฏิสนธิและการแบ่งตัวครั้งแรก (1st cleavage) แต่จะเห็นชัดขึ้นในอัตราการเกิด โปรนิวคลีไอ โดยผันแปรตั้งแต่ 36% ถึง 75% ของไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิ และอัตราการเกิดตัวอ่อนระยะ ≥4 เซลล์ ซึ่งผันแปรระหว่าง 39-71% ผลการศึกษาของ Aoyagi และคณะ สอดคล้องกับการทดลองนี้ ดังนั้นการวิเคราะห์ด้วยการดูอัตราการเจริญเป็นตัวอ่อนระยะมอรูล่านั้นน่าจะใช้ได้เช่นกันในกรณีของพ่อสุกรแลนด์เรซซึ่งจากทั้งสามตัวไม่แตกต่างกันในแง่ของอัตราการแบ่งตัว แต่มีแนวโน้มว่าคุณภาพของพ่อสุกร L9582 จะดีกว่าน้ำเชื้อจาก L9048 และ L9865 ซึ่งให้ค่าเท่ากับ 4.0% เปรียบเทียบกับ 2.3% และ 0%

สำหรับเหตุผลในเรื่องความแตกต่างของความสามารถในการปฏิสนธิ Aoyagi และคณะ (1988) เสนอแนะว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับความแตกต่างของช่วงเวลาจากการเจาะไข่จนถึงการสร้างโปรนิวคลีไอของตัวอสุจิของพ่อสัตว์แต่ละตัว หรืออาจมาจากความสามารถของการเจาะไข่ (penetration capacity of spermatozoa) ทั้งช่วงผ่านเปลือกโซน่าและโอโอพลาสซึ่มที่ต่างกัน การศึกษาของ Matas และคณะ (1996) ได้ทดสอบความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อสุกรแต่ละตัวด้วยการดูอัตราการเจาะไข่ที่ยังไม่เจริญ (immature oocyte) พบว่าพ่อพันธุ์ที่ทดลองจำนวน 4 ตัว มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และผันแปรในแต่ละครั้งของการทดลองเช่นเดียวกับที่พบในการศึกษานี้ เหตุผลของความแตกต่างในการเจาะไข่ของตัวอสุจิจากพ่อพันธุ์แต่ละตัวยังไม่เป็นที่ทราบกัน รวมทั้งอัตราที่ผันแปรในแต่ละครั้งของการทดลอง แต่คาดว่าน่าจะเกิดในขั้นเตรียมการ

ของตัวอสุจิ หากตัวอสุจิได้รับผลกระทบมากก่อนการผสมก็จะทำให้อัตราการเจาะและการผสม สำเร็จ การผสมเทียมสามารถแก้ไขปัญหาเรื่องความสามารถในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ เคมีที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการ capacitation ขณะทำ swim up ในหลอดทดลอง อาทิเช่น การเติมสาร caffeine, C-AMP, chondroitin sulfate, bovine follicular fluid ฯลฯ (Aoyagi *et al.*, 1988) อย่างไรก็ตามผลการทดลองนี้ในหลอดทดลอง (*in vitro*) ไม่ได้ทำการศึกษาย้อนหลัง (retrospective study) ด้วยการเปรียบเทียบกับอัตราการผสมติดในการผสมกับแม่พันธุ์ (*in vivo*) ที่เกิดขึ้น เนื่องจากการศึกษานี้ทำในฟาร์มสุกรพ่อแม่พันธุ์ ซึ่งมีความผันแปรในเรื่องจำนวนแม่ผสมต่อพ่อสุกรสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่ง โดยพ่อสุกรบางสายพันธุ์อาจผสมแม่สุกรเพียงไม่กี่แม่ ในขณะที่พ่อสุกรอีกตัวหนึ่งอาจผสมแม่สุกรจำนวนมาก ๆ ดังนั้นหากนำมาเปรียบเทียบกันจะได้ข้อมูลที่ผิดพลาดได้ ตรงกันข้ามกับการทดลองในโคนั้น น้ำเชื้อจากพ่อโคตัวหนึ่ง ๆ อาจทำการผสมกับแม่โคเป็นจำนวนหลายร้อย หลายพันตัว ด้วยการใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง ซึ่งในสุกรน้ำเชื้อแช่แข็งยังไม่มีการพัฒนา

สรุปการใช้โอโอไซต์ที่ผ่านการเลี้ยงให้พร้อมปฏิสนธิ และการนำเอามาปฏิสนธินอกร่างกายและตรวจดูอัตราแบ่งตัวของตัวอ่อนจะเป็นวิธีที่ช่วยวิเคราะห์ความแตกต่างของคุณภาพน้ำเชื้อของพ่อสุกรแต่ละตัวโดยควรตรวจอัตราการแบ่งตัว และอัตราการเจริญเป็นตัวอ่อนระยะต่าง ๆ โดยเฉพาะระยะมอรูล่าเพื่อแยกคุณภาพของน้ำเชื้อได้ ผลการทดลองนี้จะเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกรโดยเฉพาะวงการผสมเทียมเพราะสามารถตรวจคุณภาพน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ได้ง่ายขึ้นโดยดูจากผลการปฏิสนธินอกร่างกาย ทำให้ได้ที่ใช้น้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ที่มีคุณภาพน้ำเชื้อดีเก็บไว้ หรือนำมาไว้คัดเลือกพ่อพันธุ์ที่ให้น้ำเชื้อที่ให้การปฏิสนธิดีซึ่งจะเหมาะสำหรับระบบการผสมแบบไขว้พ่อ (alternate mating) ซึ่งมักจะเป็นการแฝงเอาพ่อพันธุ์ที่มีปัญหาไว้ในฟาร์มโดยไม่รู้ตัว เนื่องจากพ่อหลายตัวผสมแม่ตัวเดียว ดังนั้นตัวใดที่ผิดปกติของน้ำเชื้อก็ไม่สามารถรู้ได้ (Kunavongkrit *et al.*, 1988)

ในส่วนของผลของระยะเวลาต่ออัตราความสำเร็จในการปฏิสนธินอกร่างกายนั้นโดยเปรียบเทียบความสำเร็จในการปฏิสนธินอกร่างกายระหว่างน้ำเชื้อสดหลังเจือจางซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 °ซ และ 5 °ซ กับน้ำเชื้อแช่แข็ง (-196 °ซ) จากการศึกษาครั้งนี้ เฉพาะน้ำเชื้อสดสุกรเก็บไว้ ณ อุณหภูมิ 15 °ซ เป็นระยะเวลา 0, 2 , 4 และ 6 วัน ที่เวลาในการเก็บรักษาตัวอสุจิจะส่งผลกระทบต่ออัตราการปฏิสนธิและอัตราการแบ่งตัวอ่อนหลังปฏิสนธิ โดยมีอัตราที่ลดลงทั้งในพ่อสุกร เอ และ บี การเก็บน้ำเชื้อไว้เป็นเวลานานอาจมีผลทำให้แหล่งอาหารของตัวอสุจิลดลง ลดกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) ผลทำให้เกิดการคั่งของกรดแลคติคที่เกิดจากการเผาผลาญพลังงาน กรดแลคติดนี้หากสะสมมาก ๆ ก็จะเป็นอันตรายต่อตัวอสุจิ ทำให้การเคลื่อน

ไหวของตัวอสุจิลดลงและจำนวนตัวตายของตัวอสุจิเพิ่มขึ้น จากการทดลองนี้พบว่าอัตราการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิลดลงประมาณ 15-20% ทุก ๆ 48 ชม. ที่เวลาในการเก็บรักษานานขึ้น โดยเมื่อเก็บน้ำเชื้อไว้นานถึง 8 วัน จะมีอัตราการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิเพียง 20% เท่านั้น ทั้งในพ่อสุกร เอ และ บี จากอัตราการเคลื่อนไหวที่ลดลงดังกล่าวส่งผลต่อการเคลื่อนไหวสู่ผิวระหว่างการทำ swim up ทำให้ความเข้มข้นของตัวอสุจิต่อมิลลิลิตร ลดลงด้วย และทำให้มีตัวอสุจิที่มีชีวิตรอดสำหรับนำมาใช้ทำการปฏิสนธิภายนอกร่างกายกับโอโอไซต์น้อยลงตามมา ส่งผลให้อัตราความสำเร็จในการปฏิสนธิภายนอกร่างกายลดลงตามระยะเวลาการเก็บน้ำเชื้อ ข้อมูลนี้ตรงกับข้อมูลจากการผสมจริง (*in vivo*) โดยหากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15°ซ นานเกินกว่า 3 วันจะมีผลต่อจำนวนตัวอสุจิที่เกาะรอบเปลือกชั้นโซน่า และอัตราการปฏิสนธิ (Pursel *et al.*, 1973a) Weiberski และคณะ (1994) พบว่าผลของการตั้งท้องจะลดลงอย่างมากหากใช้น้ำเชื้อสุกรที่เก็บไว้นานกว่า 87 ชม อย่างไรก็ตามการมีชีวิตรอดของตัวอสุจินั้นอาจขึ้นกับน้ำยาละลายที่ใช้ก็ได้ จากงานวิจัยของ Pursel และคณะ (1973a) เสนอแนะว่าความสามารถในการผสมติดในแม่สุกรโดยใช้น้ำเชื้อพ่อสุกรซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ 15°ซ และใช้ Beltsville L1 (BL 1) เป็นสารเจือจางน้ำเชื้อ แล้วเก็บน้ำเชื้อไว้ 1, 3 และ 5 วันจะสูงเมื่อเก็บน้ำเชื้อไว้นานขึ้น (วันที่ 1: 87.2%, วันที่ 3: 91.4%, วันที่ 5: 92.6%) การที่อัตราการปฏิสนธิหลังจากเก็บน้ำเชื้อถึงวันที่ 5 สูงกว่าวันที่ 1 และวันที่ 3 เนื่องจากมีตัวอสุจิหลายตัวที่สามารถเจาะทะลุผ่านโอโอไซต์เข้าไปได้ (polyspermy)

จากผลการศึกษาในครั้งนี้อาจกล่าวได้ว่าอัตราความสำเร็จในการปฏิสนธิขึ้นกับคุณภาพน้ำเชื้อในด้านการเคลื่อนไหวของพ่อสุกรทั้งสองตัว เนื่องจากถ้าเก็บน้ำเชื้อไว้เป็นระยะเวลานานจะลดอัตราการเคลื่อนไหวและความเข้มข้นของตัวอสุจิที่มีชีวิตรอด ซึ่งมีผลไปลดอัตราความสำเร็จในการปฏิสนธินอกร่างกาย อย่างไรก็ตามผลการตรวจสอบน้ำเชื้อในด้านการเคลื่อนไหวจากกล้องจุลทรรศน์อาจไม่สัมพันธ์กับอัตราความสำเร็จในการปฏิสนธิภายนอกร่างกายก็ได้ซึ่งจะเห็นได้จากงานวิจัยในตอนแรก แม้ว่าน้ำเชื้อจากพ่อสุกร บี ซึ่งมีคุณภาพน้ำเชื้อในด้านการเคลื่อนไหวพอ ๆ กับพ่อสุกร เอ แต่อัตราความสำเร็จในการปฏิสนธินอกร่างกายของพ่อสุกร บี มีค่าสูงกว่าพ่อสุกร เอ จึงเป็นไปได้ว่าการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อของพ่อสุกรก่อนนำมาทำการปฏิสนธิภายนอกร่างกายไม่สามารถยืนยันความสามารถในการปฏิสนธิได้ จากข้อมูลความสำเร็จในการปฏิสนธิของพ่อสุกร บี เมื่อเปรียบเทียบกับพ่อสุกร เอ จึงได้เลือกเอาเฉพาะน้ำเชื้อของพ่อสุกร บี มาทำการศึกษาผลของการแช่เย็นที่ 5°ซ และการแช่แข็ง (-196°ซ) ในการศึกษาขั้นต่อไป

ในส่วนของผลการทำการปฏิสนธินอกร่างกายด้วยน้ำเชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5°ซ พบว่าระยะเวลาการเก็บน้ำเชื้อไม่มีผลต่ออัตราความสำเร็จในการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย เมื่อนำน้ำเชื้อมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5°ซ เป็นระยะเวลา 0, 2, 4 และ 6 วัน จะให้อัตราความสำเร็จใน

การปฏิสนธิภายนอกร่างกายในด้านอัตราการแบ่งตัว และการพัฒนาของตัวอ่อนหลังปฏิสนธิใกล้เคียงกัน แสดงว่าเมื่อเก็บน้ำเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 5°ซ แม้ระยะเวลาในการเก็บน้ำเชื้อจะนานขึ้นเท่าไรก็ตาม ตัวอสุจิจะมีการปรับสภาพเข้ากับอุณหภูมิ 5°ซ ได้ มีการลดหรือชลอการเผาผลาญอาหารเพื่อนำพลังงาน (metabolism) ที่ใช้ไปในการเคลื่อนไหวมาก นอกจากนี้ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ (BTS) ได้ใส่สารป้องกันการแช่แข็งพวกกลีเซอรอลและไข่แดงลงไปด้วย ทำให้มีจำนวนตัวอสุจิที่มีชีวิตรอดอยู่มากเมื่อนำไปทำการปฏิสนธิภายนอกร่างกายกับโอโอไซต์ที่เตรียมไว้ จึงไม่ทำให้อัตราการแบ่งตัวและการพัฒนาของตัวอ่อนหลังปฏิสนธิลดลงมากตามระยะเวลาการเก็บน้ำเชื้อที่นานขึ้น

จากผลการศึกษาผลการศึกษาของการเก็บน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 15°ซ และ 5°ซ ครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ถ้าต้องการเก็บน้ำเชื้อสุกรสดหลังเจือจางไว้เป็นระยะเวลานานเกิน 2 วัน ควรเก็บน้ำเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 5°ซ โดยต้องใส่สารที่ช่วยป้องกันสภาวะช็อคจากความเย็นหรือสารป้องกันการแช่แข็งลงไปด้วย ตรงกันข้ามถ้าต้องการเก็บน้ำเชื้อสดของสุกรไว้ไม่เกิน 2 วันก็สามารถเก็บน้ำเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 15°ซ ได้โดยไม่มีผลต่ออัตราความสำเร็จในการปฏิสนธิภายนอกร่างกายในด้านอัตราการแบ่งตัวและการพัฒนาของตัวอ่อน

ส่วนผลการวิจัยที่เกี่ยวกับการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -196°ซ เช่นเดียวกับผลการศึกษาในส่วนของน้ำเชื้อที่เก็บไว้ที่ 5°ซ คือระยะเวลาไม่มีผลต่อความสำเร็จในการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย โดยมีอัตราการแบ่งตัวใกล้เคียงกันไม่ว่าเก็บไว้ที่ 0, 2, 4 และ 6 วันก็ตาม เช่นเดียวกับผลในด้านการตรวจพบจำนวนตัวอ่อนที่มีการแบ่งตัวและการพัฒนาหลังปฏิสนธิ ทั้งนี้อธิบายได้ว่าระหว่างแช่แข็งน้ำเชื้อในไนโตรเจนเหลว ตัวอสุจิไม่ได้ใช้พลังงานในการเคลื่อนไหวเลย เพราะฉะนั้นไม่ว่าจะเก็บน้ำเชื้อไว้นานแค่ไหนคุณภาพน้ำเชื้อในด้านการเคลื่อนไหวที่ได้ก็จะใกล้เคียงกัน ซึ่งส่งผลให้อัตราความสำเร็จในการปฏิสนธิภายนอกร่างกายใกล้เคียงกันด้วย อย่างไรก็ตามหากเปรียบเทียบผลสำเร็จของการปฏิสนธิของน้ำเชื้อที่ 5°ซ และ -196°ซ มีอัตราที่ต่ำกว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อที่เก็บไว้ 15°ซ เหตุผลเนื่องจากการลดอุณหภูมิต่ำกว่า 15°ซ จะไปลดการเคลื่อนไหวและความเข้มข้นของตัวอสุจิที่มีชีวิตรอดหลังทำการ swim up ก่อนการนำไปปฏิสนธิ (ข้อมูลไม่ได้แสดงผล) การศึกษาของ Pursel และคณะ (1973b) พบว่าการเก็บน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 5°ซ มีส่วนเกี่ยวข้องกับคุณภาพน้ำเชื้อในด้านการเคลื่อนไหว และรูปร่างลักษณะของตัวอสุจิ ที่ระยะเวลา 24 ชม. ทำให้การเคลื่อนไหวของตัวอสุจิลดลง และทำให้เกิดความเสียหายต่ออะโครโซมของตัวอสุจิ 20% และเมื่อเก็บไว้นานเป็น 48 ชม. จะเพิ่มขึ้นเป็น 80% ความเสียหายดังกล่าวอาจมีผลต่อเนื่องต่อการปฏิสนธิต่อไปแสดงว่าตัวอสุจิสุกรมีความไวต่ออุณหภูมิมาก โดยตัวอสุจิอาจจะเกิดภาวะช็อคจากความเย็น (cold shock) ขณะทำการแช่แข็งได้ ในช่วงใส่สารป้องกันการแช่แข็ง หรือลดอุณหภูมิก่อนทำการแช่แข็งน้ำเชื้อเร็วเกินไป และอาจจะ

เกิดภาวะ warm shock ในช่วงทำการละลายน้ำเชื้อ ทั้งภาวะช็อคจากความเย็นและภาวะช็อคจากความร้อนจะทำให้เกิดอันตรายและความเสียหายต่อเซลล์เมมเบรนรวมทั้งส่วนประกอบอื่น ๆ ภายในเซลล์ด้วย รายงานการวิจัยของ Bamba และ Cran (1985) พบว่าความเสียหายของอะโครโซมตัวอสุจิจะพบได้หลังจากเจือจางน้ำเชื้อและขณะทำการละลายน้ำเชื้ออย่างรวดเร็วประมาณ 15 วินาที ซึ่งความเสียหายดังกล่าวจะพบมากที่สุดที่เวลา 60 วินาที โดยช่วงอุณหภูมิที่ทำให้เกิดความเสียหายต่ออะโครโซมของตัวอสุจิมากที่สุดขณะทำการละลายน้ำเชื้อคือจากอุณหภูมิ 15°ซ ถึงอุณหภูมิ 25°ซ และพบว่าสารที่ช่วยป้องกันการแช่แข็งพวกกลีเซอรอล ไดเมทิลซัลพอกไซด์ และพรอพิลีนไกลคอลมีประสิทธิภาพน้อยในการป้องกันภาวะ warm shock หลังทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง นอกจากนี้ Bamba และ Cran (1988) ยังพบอีกว่าการเจือจางน้ำเชื้ออย่างรวดเร็วและใช้สารป้องกันการแช่แข็ง เช่น กลีเซอรอลที่มีความเข้มข้นเท่ากับหรือมากกว่า 7.5% ขึ้นไป จะทำให้เกิดความเสียหายต่ออะโครโซมของตัวอสุจิมากกว่าที่ความเข้มข้นน้อย ๆ คือ เมื่อใช้กลีเซอรอลที่มีความเข้ม 1%, 5% และ 7.5% ทำให้ลักษณะอะโครโซมของตัวอสุจิที่มีลักษณะปกติลดลงจาก 89.2% เป็น 81.1% และเป็น 52.6% ตามลำดับ ในด้านผลการศึกษาอัตราความสำเร็จในการปฏิสนธิภายนอกร่างระหว่างน้ำเชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5°ซ กับเมื่อใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง (-196°ซ) โดยเก็บไว้เป็นระยะเวลา 0, 2, 4 และ 6 วัน จะให้ใกล้เคียงกัน คือ อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนมีค่าเท่ากับ 22, 20, 24 และ 26% เทียบกับ 20, 21, 24 และ 24% ตามลำดับ (ตารางที่ 10 และ 12) แสดงว่าการลดอุณหภูมิในการเก็บน้ำเชื้อต่ำกว่า 15°ซ จะมีผลต่อการปฏิสนธิ ดังเหตุผลที่ได้กล่าวในข้างต้น

จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า มีความเป็นไปได้ในการนำเทคนิคการปฏิสนธิภายนอกร่างกายที่ทางคณะผู้วิจัยได้พัฒนาจนสำเร็จในปี 2537 มาประเมินผลคุณภาพของน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์สุกรที่ใช้งานในฟาร์มสุกร และผลของระยะเวลารวมทั้งอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อในรูปน้ำเชื้อสดหลังเจือจาง ในรูปน้ำเชื้อแช่เย็น และในรูปน้ำเชื้อแช่แข็ง ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้ช่วยให้สามารถคัดเลือกน้ำเชื้อของพ่อสุกรพันธุ์ ช่วงระยะเวลาและช่วงอุณหภูมิการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการผสมธรรมชาติหรืองานผสมเทียมต่อไป และที่สำคัญคือช่วยให้ตรวจสอบความสามารถในการผสมติดของพ่อสุกรได้รวดเร็วขึ้นโดยดูผลอัตราความสำเร็จในการปฏิสนธิในหลอดทดลองเป็นเกณฑ์ตัดสินคุณภาพน้ำเชื้อซึ่งย่นระยะเวลาแทนที่จะนำน้ำเชื้อไปผสมกับแม่สุกรจริง จากงานวิจัยนี้จึงอาจนำไปศึกษาครั้งต่อไปในอนาคตในแง่มุมต่าง ๆ อีกมากมาย อาทิเช่น ชนิดของน้ำยาละลายน้ำเชื้อที่เหมาะสม วิธีและขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อ ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารป้องกันการแช่แข็ง และอัตราเร็วในการทำการแช่แข็งเป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

- มงคล เตชะกำพุ วันเพ็ญ ศรีอนันต์ จินดา สิงห์ลอ และวิชัย ทันตศุภารักษ์ 2537 (1994) การผลิตตัวอ่อนโดยการปฏิสนธินอกร่างกาย รายงานทุนวิจัยฉบับสมบูรณ์ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ 23 หน้า
- มงคล เตชะกำพุ และวันเพ็ญ ศรีอนันต์ 2538 (1995) ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกร: ปัจจัยที่เกี่ยวกับการเตรียมโอโอไซต์และการเตรียมตัวอสุจิ รายงานทุนวิจัยฉบับสมบูรณ์ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ 29 หน้า
- อรรณพ คุณาวงษ์กฤต 2522 (1979) วิทยาแอนโดร ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 112 หน้า
- Anon, 1995. Testing semen on killed eggs. Pig International. 25(6): 9-10.
- Aoyagi, Y., Fujii, K., Iwazumi, Y., Furudate, M., Fukui, Y. and Ono, H. 1988. Effects of two treatments of semen from different bulls on *in vitro* fertilization results of bovine oocytes. Theriogenology. 30:973-985.
- Bamba, K . and Cran, D.G. 1985. Effect of rapid warming of boar semen on sperm morphology and physiology. J. Reprod. Fert. 75:133 - 138.
- Bamba,K. and Cran, D.G. 1988. Further studies on rapid dilution and warming of boar semen. J. Reprod. Fert. 82:609 - 618.
- Hillery, F.L., Parrish, J.J. and First, N.L. 1990. Bull specific effect on fertilization and embryonic development *in vitro*. Theriogenology. 33:489-491.
- Kunavongkrit, A., Chantaraprateep, P. and Prateep, P. 1988. Incidence of boar infertility problem in the farms using alternative mating system. Thai J. Vet. Med. 18(2):143-150.
- Lacalandra, G.M., Dell'Aquila, M.E., Fusco, S., Sciorsci, R.L., Perrone, P. and Minola. P. 1992. *In vitro* fertility test of bull semen. 12th Int. Congr. Anim. Reprod, 23-27 August , 1992. Hague, Netherlands. p 656-658.
- Marquant-Le Guienne, B., Humblot, P., Thibier, M. and Thibault, C. 1990. Evaluation of bull semen fertility by homologous *in vitro* fertilization tests. Reprod. Nutr. Dev. 30:259-266.

- Marquant Le-Guienne, B., Humblot, P., Guillon, N., Gerard, O. and Thibier, M. 1992. *In vitro* fertilization as a tool to evaluate fertility in the bovine. 12th Int. Congr. Anim. Reprod, 23-27 August , 1992. Hague, Netherlands. p 662-664.

- Mattioli, M. , Galeati, G., and Moretti, M. 1990. Use of stored zonae pellucidae for the assesment of the fertilizing capacity of boar semen. Proc. 11th Intnl Pig Vet Soc. p 478. (Abstr)

- Otoi, T., Tachikawa, S., Kondo, S and Sukuki, T. 1993. Effects of different lots of semen from the same bull on *in vitro* development of bovine oocytes fertilized *in vitro*. Theriogenology. 39: 713-718.

- Parrish, J.J. Susko-Parrish, J.L., Leibfried-Rutledge, M.L., Crister, E.S., Eyestone, W.H. and First, N.L. 1986. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. Theriogenology. 25:591-600.

- Pursel, V.G., Johnson, L.A. and Schulman, L.L. 1973a. Fertilizing capacity of boar semen stored at 5°C. J. Anim. Sci. 37:532 - 535 .

- Pursel, V.G. , Johnson, L.A. and Schulman, L.L. 1973b. Effect of dilution seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. J. Anim. Sci. 17:528 - 531.

- Shi, D.S., Lu, K.H., Gordon, I. 1990. Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development *in vitro* Theriogenology. 33:324. (Abstr)

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

- Waberski, D., Weitze, K.E., Lietmann, C., Lubbert zur Lage, W., Bortolozzo, F.P., Willmen, T. and Petzoldt. R. 1994. The initial fertilizing capacity of longterm-stored liquid boar semen following pre- and postovulatory insemination. Theriogenology. 41:1367-1377.

- Yamagimachi, R. 1994. Zona-free hamster eggs their use in assessing fertilizing capacity and exmamining chromosomes of human spermatozoa. Gamete Research 10:187-232.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย