The Thai Journal of Veterinary Medicine

Volume 31
Issue 1 *March, 2001*

Article 2

3-1-2001

THE USE OF FRESH, SALT-STORED AND FROZEN, IMMATURE AND MATURE OOCYTES, TO ASSESS THE PENETRATION ABILITY OF PORCINE SPERMATOZOA

Adisorn Adirekthaworn

Mongkol Techakumphu

Sudson Sirivaidyapong

Saroch Gnamkum

Follow this and additional works at: https://digital.car.chula.ac.th/tjvm

Part of the Veterinary Medicine Commons

Recommended Citation

Adirekthaworn, Adisorn; Techakumphu, Mongkol; Sirivaidyapong, Sudson; and Gnamkum, Saroch (2001) "THE USE OF FRESH, SALT-STORED AND FROZEN, IMMATURE AND MATURE OOCYTES, TO ASSESS THE PENETRATION ABILITY OF PORCINE SPERMATOZOA," *The Thai Journal of Veterinary Medicine*: Vol. 31: Iss. 1, Article 2.
DOI: https://doi.org/10.56808/2985-1130.1840
Available at: https://digital.car.chula.ac.th/tjvm/vol31/iss1/2

This Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in The Thai Journal of Veterinary Medicine by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

นิพนธ์ต้นฉบับ

การใช้โอโอไซต์ชนิดสด แช่สารละลายเกลือ และแช่แข็งที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิเพื่อตรวจสอบความสามารถในการเจาะผ่านของตัวอสุจิพ่อสุกร

อดิศร อดิเรกถาวร* มงคล เตชะกำพุ**
สุดสรร ศิริไวทยพงศ์ สาโรช งามขำ*****

Abstract

Adisorn Adirekthaworn* Mongkol Techakumphu** Sudson Sirivaidyapong** and Saroch Gnamkum***

THE USE OF FRESH, SALT-STORED AND FROZEN, IMMATURE AND MATURE OOCYTES, TO ASSESS THE PENETRATION ABILITY OF PORCINE SPERMATOZOA

The objective of this study was to compare the penetration rate of sperm, collected from two Landrace Boars A and B, into fresh, salt-stored and frozen, immature and matured oocytes. The first experiment, performed on immature oocytes, revealed that the penetration rates for the three groups of oocytes was from Boar A 59.6%(59/99), 78.1%(75/96) and 77.8%(77/99) ($p<0.05$) and the number of sperm penetration each oocyte was 2.79±0.42, 2.97±0.29 and 2.29±0.26 respectively ($p>0.05$). While for Boar B, the percentages were 65.3%(62/95), 76.8%(73/95) and 77.8%(77/99) with the number of sperm per oocyte being 2.25±0.28, 3.63±0.42 and 2.57±0.36. The highest values were found in the salt-stored group ($p<0.05$). The second experiment involved sperm penetration into *in vitro* mature oocytes. No differences were found for the sperm penetration rate and the number of sperm per oocyte using semen from Boar A which were 85.1%(74/87), 86.1%(56/65) and 89.1%(79/88) and 13.87±1.45, 17.69±2.61 and 14.45±1.75. While for Boar B, the lowest penetration rate was found when using fresh oocyte, lower than the two other groups; 52.6%(50/95), 67.3%(64/95) and 69.1%(67/97)($p<0.05$). The number of sperm entering each oocyte was also inferior in the fresh oocytes than in salt-stored and frozen ones; 1.55±0.31, 2.80±0.35 and 2.87±0.40 ($p<0.05$) respectively. The conclusion that can be drawn from the experiment is that a) there are significant differences in the sperm penetration ability of different the boars used and b) the type of oocytes; immature vs. mature and fresh vs. salt-stored vs. frozen influenced the results that were obtained. It maybe possible to apply such an *in vitro* penetration assay to determine boar semen fertility under field conditions.

Keywords : oocyte, boar, sperm penetration, oocyte preservation

* **Department of Anatomy**
** **Department of Obstetrics Gynaecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University Bangkok 10330**
*** **Artificial Insemination Division. Department of Livestock Development, Bangkok**

* ภาควิชากายวิภาคศาสตร์
** ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330
*** กองผสมเทียม กรมปศุสัตว์ กรุงเทพฯ

บทคัดย่อ

อดิศร อดิเรกถาวร* มงคล เตชะกำพุ** สุดสรร ศิริไวทยพงศ์** สาโรช งามขำ***

การใช้โอโอไซต์ชนิดสด แช่สารละลายเกลือ และแช่แข็งที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิเพื่อตรวจสอบความสามารถในการเจาะผ่านของตัวอสุจิพ่อสุกร

จุดประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบการเจาะผ่านของตัวอสุจิของพ่อสุกรสายพันธุ์แลนด์เรซ 2 ตัว (A และ B) โดยนำไปปฏิสนธิกับโอโอไซต์ชนิดที่ไม่พร้อมปฏิสนธิ (การทดลองที่ 1) และชนิดพร้อมปฏิสนธิ (การทดลองที่ 2) โดยเป็นโอโอไซต์ 3 ชนิด คือชนิดสด ชนิดแช่สารละลายเกลือ และชนิดแช่แข็ง

การทดลองที่ 1 นำโอโอไซต์ที่ไม่พร้อมปฏิสนธิชนิดต่างๆ มาทำการตรวจสอบการเจาะผ่านของตัวอสุจิสุกร A พบว่าอัตราการเจาะผ่านมีค่า 59.6% (59/99), 78.1% (75/96) และ 77.8%(77/99) สำหรับโอโอไซต์สด แช่สารละลายเกลือ และแช่แข็ง ตามลำดับ พบว่าโอโอไซต์ชนิดสดมีอัตราการเจาะผ่านน้อยกว่าโอโอไซต์อีกสองชนิด ($p<0.05$) และมีจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ 2.79±0.42, 2.97±0.29 และ 2.29±0.26 ตัว สำหรับโอโอไซต์สด แช่สารละลายเกลือ และแช่แข็งตามลำดับ ซึ่งพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.05$) สำหรับสุกร B พบว่าอัตราการเจาะผ่านมีค่า 65.3% (62/95), 76.8% (73/95) และ 67.0%(65/97) ตามลำดับ และมีจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ 2.25±0.28, 3.63±0.42 และ 2.57±0.36 ตัว สำหรับโอโอไซต์สด แช่สารละลายเกลือ และแช่แข็งตามลำดับ พบว่าโอโอไซต์ชนิดแช่สารละลายเกลือจะมีอัตราการเจาะผ่าน และจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์สูงสุด ($p<0.05$)

การทดลองที่ 2 ทำการเลี้ยงโอโอไซต์ในพร้อมปฏิสนธิในน้ำยาพร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลองก่อนที่จะนำไปเก็บรักษาในสารละลายเกลือและแช่แข็ง เมื่อนำโอโอไซต์ดังกล่าวมาทำการตรวจสอบการเจาะผ่านของตัวอสุจิสุกร A พบว่าอัตราการเจาะผ่านมีค่า 85.1%(74/87), 86.1%(56/65) และ 89.1%(79/88) และจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ 13.87±1.45, 17.69±2.61 และ 14.45±1.75 ตัว สำหรับโอโอไซต์สด แช่สารละลายเกลือ และแช่แข็งตามลำดับ ซึ่งพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$) สำหรับสุกร B พบว่าอัตราการเจาะผ่านมีค่าน้อยที่สุดในกลุ่มโอโอไซต์สด 52.6.3%(50/95) เปรียบเทียบกับโอโอไซต์ที่แช่สารละลายเกลือและแช่แข็ง 67.3%(64/95) และ 67.0% (65/97) ($p < 0.05$) และมีจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ต่ำที่สุด เท่ากับ 1.55±0.31, 2.80±0.35 และ 2.87±0.40 ตัว ($p<0.05$) ตามลำดับ จากการศึกษานี้สรุปว่าพ่อสุกรและวิธีการเก็บรักษาโอโอไซต์มีผลต่ออัตราการเจาะผ่านและจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ และมีความเป็นไปได้ในการนำวิธีนี้ไปใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างของความสามารถในการเจาะผ่านของตัวอสุจิพ่อสุกรได้

คำสำคัญ : โอโอไซต์ พ่อสุกร การเจาะผ่านของตัวอสุจิ การเก็บรักษาโอโอไซต์

บทนำ

การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อมีความสำคัญมาก โดยเฉพาะในพ่อพันธุ์ที่จะนำน้ำเชื้อไปใช้ในการผสมเทียม ประโยชน์ที่ได้จากการตรวจสอบนี้ คือ ทราบถึงความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อพันธุ์แต่ละตัว ความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับระบบสืบพันธุ์เพศผู้ โดยทั่วไปการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อนิยมใช้วิธีการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ อันได้แก่ การเคลื่อนไหว (motility) รูปร่างลักษณะ (morphology) ความเข้มข้นของตัวอสุจิ การตรวจนับตัวเป็นตัวตาย โดยใช้การย้อมสีด้วยวิธีการต่างๆ (Hafez, 1993) รวมไปถึงการตรวจสอบความแข็งแรงของผนังเยื่อหุ้มส่วนหางของตัวอสุจิ (sperm tail membrane integrity; Nagy et al., 1999) นอกจากวิธีดังกล่าวแล้ว ในปัจจุบันยังได้พัฒนาเทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้ในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อในหลอดทดลอง (*in vitro* assessment) อันได้แก่ ความแข็งแรงของผนังเซลล์ (cell membrane integrity) การบวมของตัวอสุจิ (hypoosmotic swelling test) การตรวจสอบการใช้พลังงานในการเกิดเมทาบอลิสมของอสุจิที่มีชีวิต (Resazurin test) ความสามารถในการเกิดคาร์ปาร์ซิเตชั่น (Januskauskas et al., 2000) การเกิดปฏิกิริยาอะโครโซม (Sirivaidyapong et al., 2000) รวมไปถึงการใช้เทคนิคการปฏิสนธินอกร่างกาย (*in vitro* fertilization : IVF ; Larsson and Rodriguez-Martinez, 2000)

การปฏิสนธินอกร่างกายได้มีการพัฒนาและใช้ในการผลิตสัตว์กันเป็นจำนวนมาก รวมไปถึงใช้ในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อในสัตว์หลายชนิด (Larsson and Rodriguez-Martinez, 2000) เทคนิคนี้ทำได้โดยการนำตัวอสุจิมาปฏิสนธิกับโอโอไซต์ภายนอกท่อนำไข่ โดยจัดสภาวะแวดล้อมให้ใกล้เคียงตามธรรมชาติมากที่สุด ก่อนที่จะนำตัวอ่อนที่ได้ทำการย้ายฝากในแม่สัตว์ตัวรับต่อไป วิธีการเหล่านี้จะเกี่ยวข้องกับการเลี้ยงโอโอไซต์นอกร่างกาย (*in vitro* maturation: IVM) การปฏิสนธินอกร่างกายและการเลี้ยงตัวอ่อน (*in vitro* culture: IVC) ได้มีการนำเทคนิคเหล่านี้มาใช้ในการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อในมนุษย์ด้วยการประเมินความสามารถในการปฏิสนธิของตัวอสุจิกับโอโอไซต์ของหนูแฮมสเตอร์ที่เอาชั้นเปลือกนอกออก (zona-free hamster oocyte) แล้วทำการตรวจหาการเจาะผ่านของตัวอสุจิ (sperm penetration) ที่เข้าไปในไซโตพลาสมของโอโอไซต์ รวมไปถึงทำการนับจำนวนอสุจิที่เข้าปฏิสนธิด้วย วิธีการนี้เรียกว่า "Zona-free hamster test" นอกจากใช้ในมนุษย์แล้วยังสามารถนำมาใช้ในสัตว์ได้หลายชนิด (Yanagimachi, 1984)

ในช่วงที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาเทคนิคต่างๆในการเก็บรักษาโอโอไซต์ที่อุณหภูมิต่ำ อันได้แก่ การแช่แข็งด้วยการลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ (slow freezing; Luvoni and Pellizzari, 2000) การแช่แข็งแบบวิทรีฟิเกชั่น (Vitrification; Vajta, 2000) รวมไปถึงการแช่แข็งด้วยความเร็วสูง ๆ (ultrarapid freezing) ซึ่งวิธีหลังนี้โอโอไซต์จะถูกวางลงบนตะแกรงทองแดง (electron microscopic copper grid) ก่อนที่จะสัมผัสกับสารป้องกันการแช่แข็งโดยตรง (Martino et al., 1996; Arav and Zeron, 1997) โดยอาศัยการแทรกผ่านของสารป้องกันการแช่แข็ง และการดึงเอาน้ำออกมาจากเซลล์ก่อนทำการแช่แข็ง วิธีการนี้จะพบเกล็ดน้ำแข็งขึ้นทั้งภายในและภายนอกเซลล์ (Niemann, 1991) ซึ่งวิธีการแช่แข็งด้วยความเร็วสูงได้มีรายงานถึงความสำเร็จในการเก็บรักษาโอโอไซต์ในโค (Martino et al., 1996) และในสุกร (ธวัชชัย และคณะ, 2543; อนุชา และคณะ, 2544)

การเก็บรักษาโอโอไซต์นอกจากการแช่แข็งแล้ว เรายังสามารถใช้สารละลายเกลือในการเก็บรักษา วิธีนี้ได้มีการพัฒนาใช้ในสัตว์หลายชนิดได้แก่ แฮมสเตอร์ (Boatman et al., 1988) กระต่าย (Fayrer-Hosken and Brackett, 1987) สัตว์ตระกูลแมว (Andrews et al.,

1992; Donoghue et al., 1992) โค (Chian et al.,1991) สุกร (Mattioli et al., 1990; Fazeli et al., 1995; Lynham and Harrisson, 1998) และสุนัข (Strom Holst et al., 2000) โดยระยะเวลาในการเก็บรักษาจะแตกต่างกันไปตั้งแต่นาน 56 วัน (Boatman et al., 1988) หรืออาจนานถึง 6 เดือน (Fayrer-Hosken and Brackett, 1987) การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ และทำการเปรียบเทียบการเจาะผ่านของตัวอสุจิสุกร โดยใช้โอโอไซต์ที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิที่เก็บรักษาไว้ด้วยวิธีการแช่สารละลายเกลือ แช่แข็งกับโอโอไซต์สด

วัสดุและวิธีการ

การเก็บโอโอไซต์

ทำการเก็บรังไข่ของสุกรจากโรงฆ่าสัตว์ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม โดยเก็บรังไข่ลงในน้ำเกลือ 0.9% อุณหภูมิ 37°ซ. จากนั้นนำกลับมายังห้องปฏิบัติการภายใน 30 นาที ทำการล้างอีกครั้งด้วยน้ำเกลือ 0.9% ใช้เข็มเบอร์ 19 ต่อกับไซริงค์ขนาด 5 มล. เจาะดูดของเหลวจากฟอลลิเคิลขนาด 3-5 มม. แล้วเทของเหลวลงในจานพลาสติกที่บรรจุน้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์ชนิด TCM 199 Hepes ทำการตรวจหาโอโอไซต์ด้วยกล้องสเตอริโอกำลังขยาย 10-40 เท่า ทำการเลือกโอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มล้อมรอบ (compact cumulus oocyte : CCO) มาล้างในน้ำยา TCM 199 Hepes อีก 3 ครั้ง จากนั้นนำโอโอไซต์ที่ได้มาแยกเซลล์คิวมูลัสออกจากเปลือก (decoronization) หลังจากแช่ใน 1% hyarulonidase (Sigma, USA) ใน TCM 199 $NaHCO_3$ ที่อุณหภูมิ 38.5°ซ นาน 30 นาที ด้วยการใช้ไปเปตดูดเข้าออกหลายๆ ครั้งจนเซลล์คิวมูลัสที่อยู่ล้อมรอบหลุดออกมาจนหมด โอโอไซต์ดังกล่าวจัดเป็นโอโอไซต์ชนิดที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ

การเลี้ยงโอโอไซต์ให้พร้อมปฏิสนธิ

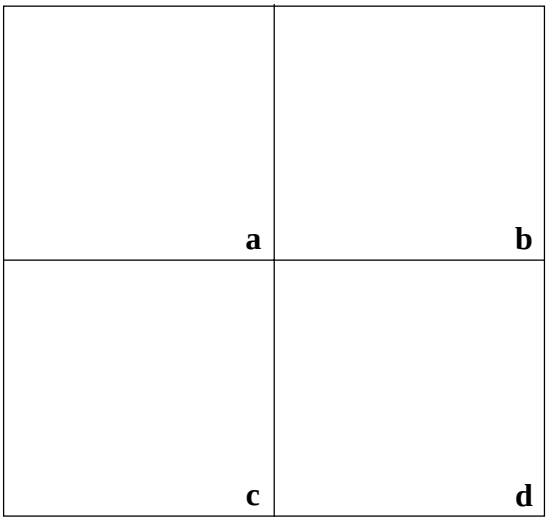
นำโอโอไซต์ชนิด CCO มาเลี้ยงในน้ำยา TCM 199 $NaHCO_3$+10% FCS ที่มีส่วนประกอบของ FSH/LH10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ Estradiol-17β 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในจานทดลอง 4 หลุม ในตู้ 5%CO_2 ความชื้นเต็มที่ และที่อุณหภูมิ 38.5°ซ. นาน 44 ชม. หลังเลี้ยงเสร็จ นำมาลอกเอาเซลล์คิวมูลัสออกหลังแช่ในน้ำยา 1%hyarulonidase ใน TCM199 $NaHCO_3$ โอโอไซต์ที่ได้จะเป็นโอโอไซต์ที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัส และมี polar body ที่ผิว (รูปที่ 1a)

การเก็บรักษาโอโอไซต์ในสารละลายเกลือ

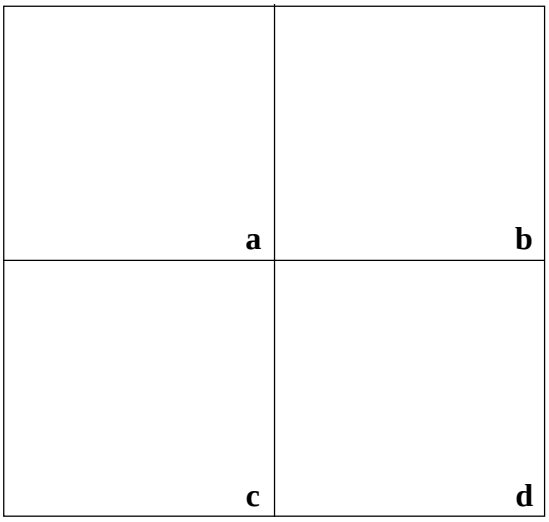
แบ่งโอโอไซต์ชนิดที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิที่ได้จากข้อ1 มาเก็บรักษาไว้ในสารละลายเกลือที่มีส่วนประกอบของ $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 M $MgCl_2$ 0.75 M Hepes 40 mM ปรับ pH เป็น 7.4 ร่วมกับ $ZnCl_2$ 0.2 mM PVA 0.1 มก./มล. บรรจุ ไว้ในจานพลาสติกชนิด 4 หลุม โดยเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ. นาน 7 วัน (Lynham and Harrison, 1998) เมื่อครบกำหนดแล้วนำโอโอไซต์มาล้างด้วยน้ำยา phosphate buffer saline (PBS) จำนวน 2 ครั้งที่อุณหภูมิห้อง โอโอไซต์ที่ได้นี้จัดเป็นโอโอไซต์ที่เก็บรักษาในน้ำเกลือ (รูปที่ 1b)

การแช่แข็งโอโอไซต์

แบ่งโอโอไซต์ที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิที่ได้จากข้อ1 และชนิดพร้อมปฏิสนธิที่ได้จากข้อ 2 มาแช่แข็ง ด้วยวิธีแช่แข็งด้วยความเร็วสูงบนตะแกรงทองแดง (Marivac, Canada) (รูปที่ 1d) (ธวัชชัย และคณะ, 2543) โดยนำโอโอไซต์ทั้งสองชนิด มาล้างในน้ำยา PBS ที่มี 10% FCS นาน 5 นาที หนึ่งครั้งก่อนที่จะใส่ลงในสารป้องกันการแช่แข็งชนิด ethylene glycol ความเข้มข้น 5 M นาน 30 วินาที หลังจากนั้นนำโอโอไซต์วางลงบนตะแกรงทองแดงและจุ่มในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ



รูปที่ 1 a. โอโอไซต์ชนิดสดที่ผ่านการลอกเอาเซลล์คิวมูลัสออก; b. โอโอไซต์ที่แช่ในสารละลายเกลือ; c. โอโอไซต์ภายหลังการแช่แข็งด้วยวิธีด้วยความเร็วสูง (x200); d. โอโอไซต์ที่วางบนตะแกรงทองแดงก่อนทำ การแช่แข็งด้วยวิธีด้วยความเร็วสูง (x100)



รูปที่ 2 a. การเกาะของตัวอสุจิรอบๆ เปลือก zona pellucida และมีตัวอสุจิบางส่วนที่เจาะผ่านชั้นเปลือก ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์; b. ผลการย้อมตรวจการเจาะผ่านของโอโอไซต์ชนิดสด พบตัวอสุจิที่ติดสีสะท้อนแสง; c. ผลการย้อมตรวจการเจาะผ่านของโอโอไซต์ชนิดแช่ในน้ำเกลือ d. ผลการย้อมตรวจการเจาะผ่านของโอโอไซต์ชนิดแช่แข็ง (x400)

-196°ซ. ทิ้งไว้ 1-2 นาที แล้วนำมาทำให้ละลายในสารละลายซูโครสความเข้มข้น 0.5 M 0.25 M และ 0.125 M และน้ำยา PBS + 10% FCS นานขั้นตอนละ 1 นาที โดยโอโอไซต์ที่ได้จัดเป็นโอโอไซต์ชนิดแช่แข็ง (รูปที่ 1c)

การแบ่งกลุ่มโอโอไซต์

ในแต่ละกลุ่มประกอบด้วยกลุ่มทดลองย่อย 3 กลุ่มดังนี้

การทดลองที่ 1 โอโอไซต์ชนิดที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ (immature oocytes) แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 โอโอไซต์ชนิดสด (fresh immature oocytes) กลุ่มที่ 2 โอโอไซต์ชนิดแช่สารละลายเกลือ (salt stored immature oocytes) กลุ่มที่ 3 โอโอไซต์ชนิดแช่แข็ง (frozen immature oocytes)

การทดลองที่ 2 โอโอไซต์ชนิดที่พร้อมปฏิสนธิ (mature oocytes) แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 4 โอโอไซต์ชนิดสด (fresh mature oocytes) กลุ่มที่ 5 โอโอไซต์ชนิดแช่สารละลายเกลือ (salt-stored mature oocytes) กลุ่มที่ 6 โอโอไซต์ชนิดแช่แข็ง (frozen mature oocytes) ทำการทดลองในแต่ละกลุ่มจำนวน 5 ครั้ง (replication) แต่ละครั้งใช้โอโอไซต์แต่ละชนิดในจำนวนใกล้เคียงกัน

การเตรียมตัวอสุจิ

ทำการรีดน้ำเชื้อจากพ่อสุกรพันธุ์แลนเรซอายุประมาณ 1.5-2.0 ปี น้ำหนัก 150-200 กก. จำนวน 2 ตัว ด้วย hand glove method แล้วนำมาเจือจาง ในน้ำยาละลายน้ำเชื้อชนิด Beltville thawing solution (BTS) นำน้ำเชื้อเจือจางที่ผ่านการตรวจสอบว่ามีคุณภาพ น้ำเชื้อ (Crabo, 1997) มาผ่านขั้นตอนคือ

1. ปั่นแยกเอาตะกอนตัวอสุจิด้วยความเร็ว 1000g นาน 5 นาที แล้วดูดเอาส่วนใสทิ้งไปเหลือแต่ตะกอน เติมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อชนิด BTS ที่มีอุณหภูมิ 37°ซ. ลงไป 1 มล. เขย่าให้เข้ากัน ตรวจอัตราการเคลื่อนไหว จากนั้นดูดเอาสารละลายที่มีตัวอสุจิมา 200 ไมโครลิตรใส่ลงไปในน้ำยาคาร์ปาซิเตชั่นชนิด TALP (bovine albumin 0.006 ก./มล. pH 7.2) จำนวน 1 มล. นำไปเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°ซ. ภายใต้บรรยากาศ 5% CO_2 ปล่อยให้ตัวอสุจิว่ายขึ้นสู่ผิวนาน 4 ชั่วโมง

2. เมื่อครบกำหนดแล้วทำการดูดแยกตัวอสุจิส่วนบนประมาณ 800 ไมโครลิตร มาปั่นอีกครั้งที่ 1000g นาน 5 นาที แยกเอาเฉพาะตัวอสุจิที่นอนก้นตรวจการเคลื่อนไหวและจำนวนอสุจิ

การเลี้ยงตัวอสุจิร่วมกับโอโอไซต์

นำโอโอไซต์แต่ละชนิดที่ได้จากการเตรียมด้วยวิธีต่าง ๆ ข้างต้นมาทำการล้างใน Fertilization medium อีกครั้งก่อนที่จะนำไปใส่ในหลุมของจานพลาสติกชนิด 4 หลุมที่มีน้ำยา Fertilization medium บรรจุอยู่จำนวน 20 ใบต่อหลุม จากนั้นนำตัวอสุจิมาปรับความเข้มข้นให้ได้เท่ากับ $1x10^b$ ตัว/มล. และใส่ลงในหลุมของจานพลาสติกชนิด 4 หลุม ที่มีโอโอไซต์แต่ละชนิดบรรจุอยู่นาน 18 ชั่วโมง ในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°ซ. ภายใต้บรรยากาศ 5% CO_2 และความชื้นเต็มที่ (มงคล และคณะ, 2536)

การตรวจสอบผล

หลังจากเลี้ยงตัวอสุจิร่วมกับโอโอไซต์ครบ 18 ชั่วโมง แล้ว นำโอโอไซต์มาล้างในน้ำยา TCM 199 Hepes จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นทำการลอกตัวอสุจิส่วนเกินที่ติดกับผนังของ zona pellucida ออกโดยการผ่านเข้าออกในไปเปตที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใกล้เคียงกับโอโอไซต์หลาย ๆ ครั้ง จากนั้นทำการตรึง (fixation) ใน 0.1% formaldehyde นาน 5-10 นาที ก่อนที่จะทำการล้างด้วย PBS จำนวน 2 ครั้ง ทำการย้อมด้วย Hoechst 33342 (Sigma, USA) ขนาด 10 ไมโครกรัม/มล. นาน

3-5 นาที ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Pursel และคณะ (1985) แล้วนำไปส่องเพื่อตรวจนับจำนวนตัวอสุจิที่เจาะผ่านผนัง zona pellucida และที่เข้าไปในไซโตพลาสม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนต์ ทำการถ่ายภาพเก็บบันทึกไว้

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการนับจำนวนอสุจิที่เจาะผ่านผนังโซน่าเพลลูซิด้า และที่เข้าไปในไซโตพลาสม ในแต่ละกลุ่มการทดลองหาค่าเฉลี่ย (mean±SEM) แล้วนำมาเปรียบเทียบในแต่ละกลุ่มโดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) ชนิดทางเดียว และเปรียบเทียบจำนวนของโอโอไซต์แต่ละชนิดที่ถูกเจาะผ่านโดยใช้วิธี Chi-square ใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 9.05

ผล

หลังจากเลี้ยงโอโอไซต์ร่วมกับตัวอสุจิแล้วจะพบว่ามีตัวอสุจิจำนวนมากอยู่รอบ ๆ เปลือกหุ้ม โซน่าเพลลูซิด้า (รูปที่ 2a) และมีบางส่วนที่เจาะผ่านเปลือกเข้าไปในไซโตพลาสม ซึ่งสามารถตรวจหลังย้อมสี

จากผลการศึกษาการเจาะผ่านของตัวอสุจิสุกรพันธุ์แลนเรซ (สุกร A) โดยใช้โอโอไซต์ชนิดที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิทั้งชนิดสด แช่สารละลายเกลือ และแช่แข็ง (รูปที่ 2b, c และ d) ผลที่ได้พบว่าอัตราการเจาะผ่านของตัวอสุจิในโอโอไซต์ที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิมีค่าเท่ากับ 59.6%, 78.1% และ 77.8% สำหรับโอโอไซต์ชนิดสด แช่สารละลายเกลือ และแช่แข็งตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบค่าทางสถิติพบว่าอัตราการเจาะผ่านของอสุจิในโอโอไซต์ชนิดสดมีค่าน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับโอโอไซต์ที่เหลืออีก 2 ชนิด (ตารางที่ 1) ในขณะที่ค่าเฉลี่ยของตัวอสุจิต่อโอโอไซต์ทั้ง 3 ชนิดมีค่า 2.79 ± 0.42, 2.97 ± 0.29 และ 2.29 ± 0.26 ตัว สำหรับโอโอไซต์ชนิดสด แช่สารละลายเกลือและแช่แข็งตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบค่าทางสถิติพบว่าค่าเฉลี่ยของตัวอสุจิที่ผ่านเข้าไปในโอโอไซต์ทั้ง 3 ชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ดังตารางที่ 1

เมื่อทำการทดสอบการเจาะผ่านของตัวอสุจิ (สุกร A) โดยใช้โอโอไซต์ชนิดที่พร้อมปฏิสนธิทั้งชนิดสด

ตารางที่ 1 ผลการเจาะผ่านของตัวอสุจิจากสุกรA

ชนิดของโอโอไซต์		จำนวนโอโอไซต์ที่ตรวจสอบ	จำนวนโอโอไซต์ที่ถูกเจาะผ่าน (%)	ค่าเฉลี่ยจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ [1]	จำนวนตัวอสุจิ (ต่ำสุด-สูงสุด)
ไม่พร้อมปฏิสนธิ	ชนิดสด	99	59 (59.6)[a]	2.79 ± 0.42	0-21
	ชนิดแช่สารละลายเกลือ	96	75 (78.1)[b]	2.97 ± 0.29	0-15
	ชนิดแช่แข็ง	99	77 (77.8)[b]	2.29 ± 0.26	0-14
พร้อมปฏิสนธิ	ชนิดสด	87	74 (85.1)	13.87 ± 1.45	0-43
	ชนิดแช่สารละลายเกลือ	65	56 (86.1)	17.69 ± 2.61	0-80
	ชนิดแช่แข็ง	88	79 (89.8)	14.45 ± 1.75	0-70

[1]mean ± SEM

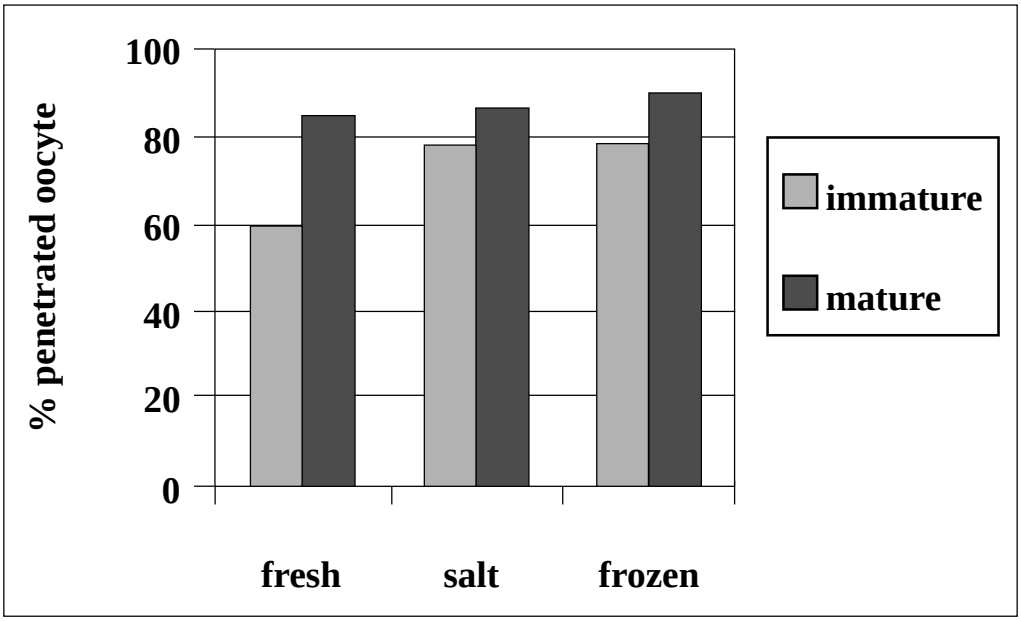
ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 2 การเจาะผ่านของตัวอสุจิจากสุกร B

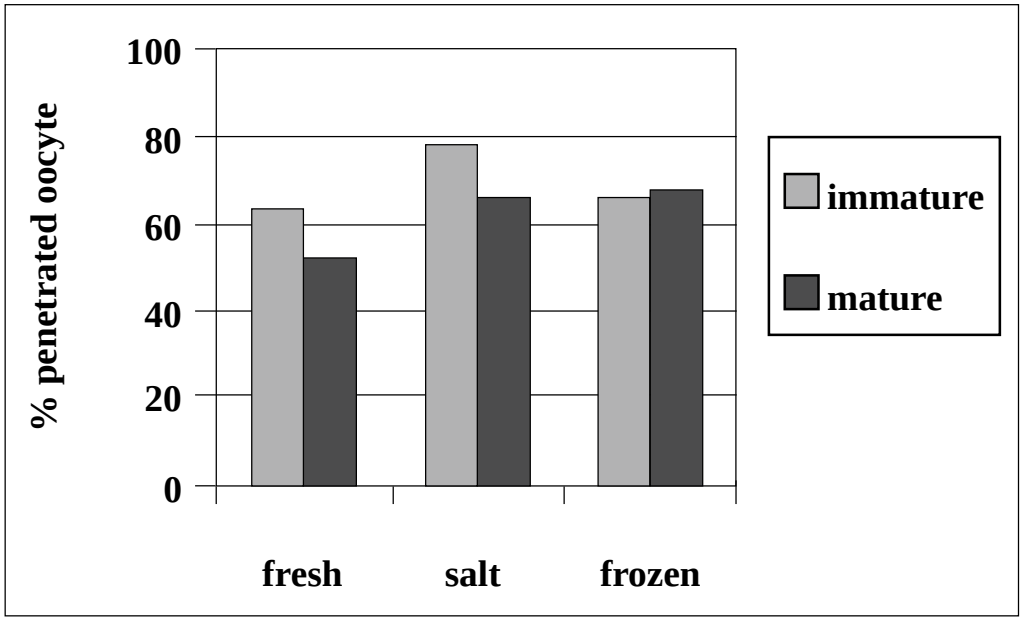
ชนิดของโอโอไซต์		จำนวนโอโอไซต์ที่ตรวจสอบ	จำนวนโอโอไซต์ที่ถูกเจาะผ่าน (%)	ค่าเฉลี่ยจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์[1]	จำนวนตัวอสุจิ (ต่ำสุด-สูงสุด)
ไม่พร้อมปฏิสนธิ	ชนิดสด	95	62 (65.3)[a]	2.25 ± 0.28[c]	0-11
	ชนิดแช่สารละลายเกลือ	95	73 (76.8)[b]	3.63 ± 0.42[d]	0-20
	ชนิดแช่แข็ง	97	65 (67.0)[b]	2.57 ± 0.36[c]	0-21
พร้อมปฏิสนธิ	ชนิดสด	95	50 (52.6)[a]	1.55 ± 0.31[c]	0-20
	ชนิดแช่สารละลายเกลือ	95	64 (67.3)[b]	2.80 ± 0.35[d]	0-13
	ชนิดแช่แข็ง	97	67 (69.1)[b]	2.87 ± 0.40[d]	0-24

[1]mean ± SEM

ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



รูปที่ 3 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจาะผ่านในโอโอไซต์ชนิดต่างๆ ในพ่อสุกร A



รูปที่ 4 กราฟเปรียบเทียบอัตราการเจาะผ่านในโอโอไซต์ชนิดต่างๆ ในสุกร B

แช่สารละลายเกลือและแช่แข็ง พบว่าอัตราการเจาะผ่านของตัวอสุจิในโอโอไซต์ทั้ง 3 ชนิดมีค่า เท่ากับ 85.1%, 86.2% และ 89.8% สำหรับโอโอไซต์ชนิดสด แช่สารละลายเกลือและแช่แข็งตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบทางสถิติพบว่าอัตราการเจาะผ่านของโอโอไซต์ทั้ง 3 ชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ดังตารางที่ 1 ในขณะที่ค่าเฉลี่ยของจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์มีค่าเท่ากับ 13.87±1.45, 17.69±2.61 และ 14.45±1.75 ตัว สำหรับโอโอไซต์ชนิดสด แช่สารละลายเกลือและแช่แข็งตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบค่าทางสถิติพบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 1 ผลเปรียบเทียบการเจาะผ่านของโอโอไซต์ชนิดที่ไม่พร้อมปฏิสนธิและชนิดพร้อมปฏิสนธิของพ่อสุกร A แสดงในรูปที่ 3

ในการทดสอบการเจาะผ่านของตัวอสุจิอีกตัวหนึ่ง (สุกร B) โดยใช้โอโอไซต์ชนิดที่ไม่พร้อมปฏิสนธิทั้งชนิดสด แช่สารละลายเกลือ และแช่แข็ง พบว่าอัตราการเจาะผ่านของตัวอสุจิในโอโอไซต์ทั้ง 3 ชนิดมีค่าเท่ากับ 65.3%, 76.8 % และ 67% สำหรับโอโอไซต์ชนิดสด แช่สารละลายเกลือ และแช่แข็งตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบทางสถิติพบว่าอัตราการเจาะผ่านในโอโอไซต์ชนิดแช่สารละลายเกลือจะมีค่าสูงสุด ($p < 0.05$) ในขณะที่ค่าเฉลี่ยของจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ มีค่าเท่ากับ 2.25±0.28, 3.63±0.42 ตัว และ 2.57±0.36 ตัว สำหรับโอโอไซต์ชนิดสด แช่สารละลายเกลือและแช่แข็งตามลำดับเมื่อทำการทดสอบค่าทางสถิติพบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ที่แช่ในสารละลายเกลือมีค่ามากที่สุด ($p < 0.05$) ดังตารางที่ 2

เมื่อทำการทดสอบการเจาะผ่านของตัวอสุจิ (สุกร B) โดยใช้โอโอไซต์ชนิดที่พร้อมปฏิสนธิทั้งชนิดสด แช่สารละลายเกลือ และแช่แข็ง พบว่าอัตราการเจาะผ่านของตัวอสุจิในโอโอไซต์ทั้ง 3 ชนิดมีค่าเท่ากับ 52.6%, 67.3% และ 69.1% สำหรับโอโอไซต์ชนิดสด แช่สารละลายเกลือและแช่แข็งตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบทางสถิติพบว่าอัตราการเจาะผ่านในโอโอไซต์ชนิดสดจะมีค่าน้อยสุด ($p < 0.05$) ดังตารางที่ 2 ในขณะที่ค่าเฉลี่ยของจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์มีค่าเท่ากับ 1.55±0.31, 2.80±0.35 และ 2.87±0.40 ตัว สำหรับโอโอไซต์ชนิดสด แช่สารละลายเกลือและแช่แข็งตามลำดับ เมื่อทำการทดสอบค่าทางสถิติพบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ชนิดสดมีค่าน้อยสุดเช่นเดียวกัน ($p < 0.05$) ดังตารางที่ 2

ผลเปรียบเทียบการเจาะผ่านของโอโอไซต์ชนิดที่ไม่พร้อมปฏิสนธิและชนิดพร้อมปฏิสนธิของพ่อสุกร B แสดงในรูปที่ 4

วิจารณ์

การนำเทคนิคการปฏิสนธิภายนอกร่างกายมาประยุกต์ใช้ในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อโดยดูจากการเจาะผ่านของตัวอสุจิพบว่ามีประโยชน์อย่างมาก เนื่องจากการตรวจรูปร่างลักษณะภายนอก และอัตราการเคลื่อนไหวไม่สามารถบ่งถึงความสามารถในการปฏิสนธิ และผลที่ได้หลังจากนำไปผสมพันธุ์กับแม่สุกรได้ โดยมงคลและคณะ (2539) พบว่าน้ำเชื้อสุกรแม้จะมีอัตราการเคลื่อนไหวใกล้เคียงกัน คือ ประมาณ 70-80% แต่จะให้ความแตกต่างกันในแง่ของอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนหลังนำน้ำเชื้อนั้นไปปฏิสนธิกับตัวอสุจิในหลอดทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอัตราการแบ่งตัวดังกล่าวเป็นวิธีหนึ่งที่บ่งชี้ถึงความสามารถในการปฏิสนธิ นอกจากนี้การตรวจสอบในหลอดทดลองจะช่วยย่นระยะเวลาในการทดสอบ รวมไปถึงเสียค่าใช้จ่ายในการทดสอบน้อยลง (Larsson and Rodriguez-Martinez, 2000)

การศึกษาในครั้งนี้พบว่าอัตราการเจาะผ่านของตัวอสุจิในโอโอไซต์ที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิที่เก็บรักษาไว้ในสารละลายเกลือจะมีค่าสูงเมื่อเทียบกับอัตราการเจาะผ่านในโอโอไซต์สด ทั้งนี้ เนื่องจากส่วนประกอบของสารละลายเกลือมีผลในการทำลายกลไกในการป้องกันการเกิดตัวอสุจิหลายตัว (polyspermy) ได้ (Boatman et al.,1988) ทำให้ความสามารถในการเจาะผ่านโอโอไซต์ที่เก็บรักษาในสารละลายเกลือมีค่ามากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับที่ Andrew และคณะ (1992) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบจำนวนอสุจิของแมวดาว (leopard cat) ที่ผ่านเข้าไปในชั้นของ perivitelline space ของโอโอไซต์ที่เก็บรักษาไว้ในสารละลายเกลือมีค่ามากกว่าโอโอไซต์ชนิดสด ในขณะที่ความสามารถในการเจาะผ่านของตัวอสุจิแมวบ้าน (domestic cat) ในโอโอไซต์ทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกัน (Andrew et al., 1992)

ผลการศึกษาในครั้งนี้เมื่อทำการเปรียบเทียบจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างวิธีในการเก็บรักษาของโอโอไซต์ทั้งชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิสำหรับสุกร A ในขณะที่มีความแตกต่างในสุกร B ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่าพ่อสุกรที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ที่แตกต่างกันจะให้ผลในการเจาะผ่านและอัตราการปฏิสนธิที่แตกต่างกันไป (มงคลและคณะ, 2539; Fazeli et al.,1995; Gadea et al., 1998) เมื่อทำการเปรียบเทียบจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์ที่ได้จากผลการศึกษา ผลที่ได้พบว่ามีจำนวนน้อยกว่าผลการศึกษาที่ได้จากรายงานอื่นๆ (Martinez et al., 1993; Ivanova and Mollova, 1993; Matas et al., 1996; Gadea et al., 1998) เนื่องมาจากความเข้มข้นของตัวอสุจิที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีจำนวนน้อยกว่าการศึกษาดังกล่าวข้างต้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Martinez และคณะ (1993) ที่กล่าวไว้ว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของตัวอสุจิมากขึ้นจะทำให้อัตราการเจาะผ่าน

และจำนวนตัวอสุจิต่อโอโอไซต์สูงขึ้น ความแตกต่างดังกล่าวนี้นอกจากความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อสุกรแล้ว ความผันแปรสามารถเกิดจากโอโอไซต์ได้อีกด้วย เช่น คุณภาพของโอโอไซต์ที่แตกต่างกัน (Fazeli et al., 1993) โดยโอโอไซต์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางไม่เท่ากันจะมีความสามารถในการเจาะผ่านต่างกัน โดย Matas และคณะ (1996) รายงานไว้ว่าโอโอไซต์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 105 ไมโครเมตรจะมีจำนวนอสุจิต่อโอโอไซต์สูงขึ้น และมีจำนวนมากที่สุดเมื่อใช้โอโอไซต์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 116 ไมโครเมตร นอกจากนี้โอโอไซต์ที่ได้มาจากแม่สุกรที่มีอายุต่างกันจะมีผลต่อความสามารถในการปฏิสนธิที่แตกต่างกัน โดย O'Brien และคณะ (2000) ทำการศึกษาเปรียบเทียบถึงความสามารถในการเจริญของโอโอไซต์จนพร้อมปฏิสนธิ และความสามารถในการปฏิสนธิระหว่างโอโอไซต์ที่เก็บมาจากสุกรสาวและแม่สุกร ผลที่ได้พบว่าการเข้าปฏิสนธิของตัวอสุจิหลายตัวในสุกรสาวจะมีมากกว่าโอโอไซต์ที่ได้มาจากแม่สุกร

เมื่อทำการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของโอโอไซต์ที่เก็บรักษาไว้ในสารละลายเกลือ พบว่าเกิดการหดตัวของไซโตพลาสมโดยไม่พบการเปลี่ยนแปลงของผนัง zona pellucida ลักษณะนี้สามารถพบได้ในโอโอไซต์ของโคเช่นเดียวกัน (Chian et al., 1991) Strom Holst และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาถึงระดับโครงสร้างของโอโอไซต์สุนัขที่เก็บรักษาไว้ในสารละลายเกลือพบว่าผนังของ zona pellucida มีความหนาลดน้อยลงเมื่อเทียบกับโอโอไซต์สด นอกจากนี้ Chian และคณะ (1991) รายงานไว้ว่าสารละลายเกลือที่มีส่วนประกอบที่แตกต่างกันจะไม่มีผลต่อความสามารถในการเจาะผ่านของตัวอสุจิ

การเก็บรักษาโอโอไซต์โดยวิธีการแช่แข็งสามารถทำได้หลายวิธี (Niemann, 1991) การศึกษาในครั้งนี้ได้ใช้วิธี ultra-rapid freezing เนื่องจากการแช่แข็งวิธีนี้มีอัตราการเกิดสภาพพร้อมปฏิสนธิและการแบ่งตัวถึงระยะบลาสโตซีสสูงกว่าการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิช้าๆ (Martino et al., 1996) มีการทำลายอันเนื่องมาจากความเย็นน้อย ด้วยเหตุผลที่โอโอไซต์แขวนลอยอยู่ในสารละลายที่มีสารป้องกันการแช่แข็งในปริมาณน้อย และใช้ระยะเวลาในการแช่แข็งสั้นมาก เพราะอัตราของการลดอุณหภูมิเร็วมากจึงเป็นการช่วยลดการเกิดเกล็ดน้ำแข็งที่จะทำลายเซลล์ได้ (Shaw et al., 2000; Vajta, 2000) เมื่อทำการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของโอโอไซต์ที่เกิดขึ้นพบว่าในบางโอโอไซต์จะเกิดการบิดเบี้ยวของผนัง zona pellucida หรือเกิดการรั่วของไซโตพลาสมออกมาภายนอกเซลล์ ซึ่งพบได้เช่นกันในรายงานของ Dhali และคณะ (2000) ที่ได้ทำการศึกษาในกระบือ Fuku และคณะ (1995) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในโอโอไซต์ทั้งชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิเมื่อทำการแช่แข็งในโคพบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงของ microvilli, cortical granules และ การเจริญของ vesicle ภายในโอโอไซต์ นอกจากนี้ผนังของ zona pellucida จากโอโอไซต์ชนิดพร้อมปฏิสนธิเกิดการเสียหายเพิ่มขึ้นอันเนื่องมาจากการลดลงของ cortical granules

จากการศึกษาครั้งนี้จะเห็นความแตกต่างระหว่างจำนวนตัวอสุจิที่เจาะผ่านโอโอไซต์ระหว่างพ่อพันธุ์สุกร A และ B ในกรณีของโอโอไซต์ชนิดพร้อมปฏิสนธิที่แสดงในตารางที่ 2 และ 4 แสดงว่าพ่อสุกรแต่ละตัวแม้จะมีภาพลักษณ์ของการเคลื่อนไหวและเปอร์เซนต์ตัวอสุจิที่ปกติ แต่จะมีความสามารถในการเจาะผ่านที่ต่างกันออกไป ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Techakumphu และคณะ (1999) ที่พบว่าอัตราการแบ่งตัวและอัตราการเจริญของตัวอ่อนเป็นระยะมอรูล่าจะแตกต่างกันในพ่อสุกรแต่ละตัวหลังนำเอาน้ำเชื้อไปปฏิสนธินอกร่างกาย นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำเชื้อของพ่อสุกรแต่ละตัวจะมีความทนทานต่อการเก็บแช่เย็นที่ 15°ซ และแช่แข็งแตกต่างกัน ซึ่งเมื่อนำไปปฏิสนธินอกร่างกายก็จะให้อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนที่แตกต่างกัน

(จงกลวรรณ และคณะ, 2542) ดังนั้นงานวิจัยขั้นต่อไปเพื่อนำวิธีการนี้ไปปรับใช้กับฟาร์มสุกรจึงควรมีการศึกษาโดยใช้น้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์สุกรที่มีประวัติการผสมติดต่ำ ให้ลูกต่อครอกต่ำ ในฟาร์มผลิตสุกรพันธุ์แท้มาทำการเปรียบเทียบเพิ่มเติม รวมทั้งศึกษาความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์สุกรที่ใช้ในการเลี้ยง นอกจากนี้ควรนำข้อมูลในหลอดทดลองไปเปรียบเทียบกับที่ได้จากการนำน้ำเชื้อไปผสมกับแม่สุกรในฟาร์ม พบว่าอิทธิพลจากแม่พันธุ์สุกร และสิ่งแวดล้อมในการเลี้ยงจะมีผลต่อความสามารถในการปฏิสนธิเช่นกัน (Larsson and Rodriguez-Martinez, 2000)

จากการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่าสามารถนำโอโอไซต์ทั้งชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิที่เก็บรักษาไว้ในสารละลายเกลือ และแช่แข็งมาใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการเจาะผ่านของตัวอสุจิแทนโอโอไซต์สดได้

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาในครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปี 2543 ขอขอบคุณ รศ. น.สพ. ดร. ปราจีน วีรกุล ที่แนะนำฟาร์มสุกรสำหรับเก็บน้ำเชื้อฟาร์มสุกรอวยชัยที่ให้ความร่วมมือในการบริจาคน้ำเชื้อพ่อสุกร

เอกสารอ้างอิง

จงกลวรรณ มุสิกทอง มงคล เตชะกำพุ จินดา สิงห์ลอ 2542 ผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อต่อความสำเร็จในการปฏิสนธิภายนอกร่างกายในสุกร เวชชสารสัตวแพทย์ 29(3): 61-70

ธวัชชัย สลับศรี พยุงศักดิ์ พานิชยิ่ง วิสูตร นวลขาว มงคล เตชะกำพุ และนวเพ็ญ ภูติกนิษฐ์ 2543 การศึกษาการแช่แข็งโอโอไซต์สุกรโดยวิธี ultra-rapid freezing ด้วย microscopic copper grid ด้วยสารป้องกันการแช่แข็งที่ต่างกัน โครงการเสริมทักษะการวิจัยประจำปีการศึกษา 2542 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 18 หน้า

มงคล เตชะกำพุ วันเพ็ญ ศรีอนันต์ จินดา สิงห์ลอ และวิชัย ทันตศุภารักษ์ 2536 การผลิตตัวอ่อนสุกร ด้วยวิธีการปฏิสนธินอกร่างกาย เวชชสาร-สัตวแพทย์ 23(3): 189-199

มงคล เตชะกำพุ วันเพ็ญ ศรีอนันต์ และวิชัย ทันต-ศุภารักษ์ 2539 การทดสอบความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อสุกรพันธุ์ดูร็อคด้วยวิธีการปฏิสนธินอกร่างกาย ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 23, สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย โรงแรมเรดิสัน กรุงเทพฯ, 27-29 พฤศจิกายน 2539: 51-61

อนุชา สธนวงศ์ อภิสิทธิ์ กิจถาวรรัตน์ รัฐพงศ์ รัตนภุมมะ นวเพ็ญ ภูติกนิษฐ์ และมงคล เตชะกำพุ 2544 ผลของความเข้มข้นของสารเอธิลีนไกลคอลต่อการแช่แข็งโอโอไซต์สุกรด้วยวิธี ultra-rapid freezing โครงการเสริมทักษะการวิจัยประจำปีการศึกษา 2543 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์-มหาวิทยาลัย 21 หน้า

Andrews, J.C., Howard, J.G., Bavister, B.D. and Wildt, D.E. 1992. Sperm capacitation in the domestic cat (*Felis catus*) and leopad (*Felis bengalensis*) as studied with a salt-stored zona pellucida penetration assay. Mol. Repred. Dev. 31: 200-207.

Boatman, D.E., Andrews, J.C. and Bavister, B.D. 1988. A quantitative assay for capacitation: Evaluation on multiple sperm penetration through the zona pellucida of salt-stored Hamster eggs. Gamete Res. 19: 19-29.

Chian, R.C., Niwa, K. and Okuda, K. 1991. *In vitro* penetration of zona pellucida of salt-stored bovine oocytes before and after maturation

by frozen-thawed spermatozoa. Theriogenology 36: 209-219.

Crabo, B.G. 1997. Reproductive examination and evaluation of the boar. In : Current Therapy in Large Animal Theriogenology. R.S. Youngquist (ed). WB Saunders Company . Philadelphia 664-670.

Dhali, A., Manik, R.S., Das, S.K., Singla, S.K. and Palta, P. 2000. Post-vitrification survival and *in vitro* maturation rate of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocyte: effect of ethylene glycol concentration and exposure time. Anim. Reprod. Sci. 63: 159-165.

Donoghue, A. M., Johnston, L.A., Seal, U.S., Armstrong, D.L., Simmons, L.G., Gross, T., Tilson, R.L. and Wildt, D.E. 1992. Ability of thawed tiger (*Panther tigris*) spermatozoa to fertilize conspecific eggs and bind and penetrate domestic cat eggs *in vitro*. J. Reprod. Fert. 96: 555-564.

Fayrer-Hosken, R.A. and Brackett, B.G. 1987. Use of salt-stored zonae pellucidae for assessing rabbit sperm capacitation for *in vitro* fertilization. Gamete. Res. 17: 191-201.

Fazeli, A.R., Holt, C., Steenweg, W., Bevers, M.M., Holt, W.V., Colenbrander, B. 1995. Development of a sperm hemizona binding assay for boar semen. Theriogenology 44: 17-27

Fazeli, A.R., Steenweg, W., Bevers, M.M., de Loos , F.A.M., van den Broek, J. and Colenbrander, B. 1993. Development of a sperm zona pellucida binding assay for bull semen. Vet. Rec. 132: 14-16.

Fuku, E., Xia, L. and Downey, B.R. 1995. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. Cryobiology 32: 139-156.

Gadea, J., Matas, C. and Lucas, X. 1998. Prediction of porcine semen fertility by homologous *in vitro* penetration (hIVP) assay. Anim. Reprod. Sci. 56: 95-108.

Hafez, E.S.E. 1993. Semen evaluation. In : Reproduction in farm animals. 6th ed. E.S.E. Hafez (ed.) Lea & Febiger. Philadelphia 405-423.

Ivanova, M. and Mollova, M . 1993. Zona-penetration *in vitro* test for evaluating boar sperm fertility. Theriogenology 40: 397-410.

Januskauskas, A., Johannisson, A., Soderquist, L. and Rodriguez-Martinez, H. 2000. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bull. Theriogenology 53: 859-875.

Larsson, B. and Rodriguez-Martinez, H. 2000. Can we use *in vitro* fertilization tests to predict semen fertility? Anim. Reprod. Sci. 60-61: 327-336.

Luvoni, G.C. and Pellizzari, P. 2000. Embryo development *in vitro* of cat oocytes cryopreserved at different maturation stages. Theriogenology 53: 1529-1540.

Lynham, J.A. and Harrison, R.A.P. 1998. The use of stored pig eggs to assess boar sperm fertilizing functions *in vitro*. Biol. Reprod. 58: 539-550.

Mattioli, G., Galeati, G. and Moretti, M. 1990. Use of stored zonae pellucidae for the assessment of the fertilizing capacity of boar semen. Proc. 11th IPVS Congress. Lausanne, Switzerland, 1-5 July : 478 (abstr.)

Martinez, E., Vazquez, J.M., Matas, C., Roca, J., Coy, P. and Gadea, J. 1993. Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. Theriogenology 40 : 547-557.

Martino, A., Songsasen, N. and Leibo, S.P. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. Biol. Reprod. 54 : 1059-1069.

Matas, C., Martinez, E., Vazquez, J.M., Roca, J. and Gadea, J. 1996. *In vitro* penetration assay of boar sperm fertility: effect of various factors on the penetrability of immature pig oocytes. Theriogenology 46: 503-513.

Nagy, Sz., Hazas, G., Balipapp, A., Ivancsics, J., Szasz, F., Szasa Jr, F., Kovacs, A. and Foote, R.H. 1999. Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy. Therigenology 52: 1153-1159.

Niemann, H. 1991. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: Current status and research needs. Theriogenology 35: 109-124.

O'Brien, J.K., Dwarte, D., Ryan, J.P., Maxwell, W.M.C. and Evans, G. 2000. Comparison of *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization, metabolism and ultrastructure of oocytes from prepubertal and adult pigs. Reprod. Dom. Anim. 35: 101-107.

Pursel, V.G., Wall, R.J., Rexroad, C.E., Hammer, R.E. and Brinster, R.L. 1985. A rapid whole mount staining procedure for nuclei of mammalian embryos. Theriogenology 24: 687-691.

Shaw, J.M., Oranratnachai, A. and Trounson, A.O. 2000. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. Theriogenology 53 : 59-72.

Sirivaidyapong, S., Cheng, F.P., Marks, A., Voorhout, W.F., Bevers, M.M. and Colenbrander, B. 2000. Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm.Theriogenology 53: 789-802.

Strom Holst, B., Larsson, B., Linde-Forsberg, C. and Rodriguez-Martinez, H. 2000. Sperm capacity and ultrastructure of the zona pellucida of stored canine oocytes. J. Reprod. Fert. 119: 77-83.

Techakumphu, M., Tantasuparuk, W. and Adulyanubab, W. 1999. The use of *in vitro* fertilization to evaluate boar semen fertilizing ability. Thai J. Vet Med .29(4): 31-40.

Vajta, G. 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. Anim. Reprod. Sci. 60-61: 357-364.

Yanagimachi, R. 1984. Zona-free hamster eggs: Their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. Gamete Res. 10: 187-232.