หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

การปฏิสนธินอกร่างกาย (*In vitro* fertilization) ในสัตว์เป็นวิธีการผลิตตัวอ่อนจำนวนมากเพื่อประโยชน์ทางด้านการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเทคโนโลยีชีวภาพทางวิทยาการสืบพันธุ์ และเทคนิคนี้ได้มีการศึกษาอย่างแพร่หลายในสัตว์หลายชนิด ตามรายงานการวิจัยของ Hunter (1990) พบว่าได้มีการศึกษาในสุกรมานานประมาณ 20 ปี แต่พึ่งมาประสบความสำเร็จในการผลิตลูกสุกรด้วยวิธีนี้โดย Cheng และคณะ (1986) ส่วนในประเทศไทยได้มีรายงานการศึกษาเรื่องการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกร (มงคล , 2536) โดยมีการศึกษาพื้นฐานในส่วนที่เกี่ยวกับการย้ายฝากตัวอ่อนในสุกรมาก่อน (Chantaraprateep et al. , 1987 ; Techakumphu et al., 1987) หรือเลี้ยงตัวอ่อนสุกรนอกร่างกาย (Techakumphu et al. , 1989) และนำไปย้ายฝากจนสำเร็จ (Techakumphu and Tantasuparuk , 1991) โดยผลการวิจัยดังกล่าวใช้น้ำเชื้อสดหลังเจือจางมาทำการปฏิสนธินอกร่างกาย ส่วนการใช้น้ำเชื้อสดซึ่งเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และ 5 องศาเซลเซียส และการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 196 องศาเซลเซียส ยังไม่มีรายงานการศึกษามาก่อนการวิจัยครั้งนี้จึงได้เลือกศึกษาผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรทั้งน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งต่อการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย ทั้งนี้เนื่องจากการผสมเทียมในสุกรโดยทั่วไปนิยมใช้น้ำเชื้อสดในรูปเจือจาง (fresh semen) เพราะให้อัตราการผสมติดใกล้เคียงกับการผสมตามธรรมชาติ แต่ผลของการใช้น้ำเชื้อสดหลังเจือจางขึ้นกับระยะเวลาด้วย หากเก็บไว้นานจะทำให้อัตราการผสมติดและจำนวนลูกต่อครอกต่ำ นอกจากนี้อาจใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง (frozen semen) ในการผสมเทียมสุกรได้ แต่มักให้อัตราการผสมติดและจำนวนลูกต่อครอกต่ำกว่าการผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อสดในรูปเจือจางแสดงว่าการใช้น้ำเชื้อสดในรูปเจือจางหรือน้ำเชื้อแช่แข็งมีผลต่ออัตราความสำเร็จในการสืบพันธุ์ ซึ่งเราสามารถทดสอบคุณภาพของน้ำเชื้อได้โดยนำน้ำเชื้อไปผสมกับแม่สุกรจำนวนหนึ่ง แต่เนื่องจากวิธีดังกล่าวต้องใช้ปริมาณของน้ำเชื้อจำนวนมากในการผสมครั้งหนึ่ง ๆ และต้องใช้เวลาในการรอดูผลการผสมติดลูกนาน ผู้วิจัยจึงเลือกวิธีทดสอบคุณภาพน้ำเชื้อต่ออัตราความสำเร็จใน การสืบพันธุ์ด้วยเทคนิค ไอ วี เอฟ (IVF) โดยนำเอาตัวอสุจิที่ได้จากการเก็บน้ำเชื้อสดในรูปเจือจาง และน้ำเชื้อแช่แข็งมาปฏิสนธิภายนอกร่างกายกับโอโอไซต์จากสุกรสาว และจัดสภาวะแวดล้อมให้ใกล้เคียงกับสภาพธรรมชาติมากที่สุด เทคนิคนี้ใช้ปริมาณน้ำเชื้อค่อนข้างน้อย และสามารถตรวจสอบผลอัตราความสำเร็จในการสืบพันธุ์ได้รวดเร็ว โดยสังเกตจากการแบ่งตัวของตัวอ่อนตั้งแต่ 24 ชั่วโมงเป็นต้นไป ซึ่งจะช่วยลด

ระยะเวลาและค่าใช้จ่ายเป็นอย่างมากต่างจากการทดสอบคุณภาพน้ำเชื้อด้วยวิธีการผสมเทียมซึ่งต้องรอดูผล การผสมติดและจำนวนลูกต่อครอกนาน

ดังนั้นข้อมูลที่จะต้องทราบเกี่ยวกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อพ่อสุกร และการทดสอบคุณภาพน้ำเชื้อพ่อสุกรทั้งน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งต่ออัตราการปฏิสนธิภายนอกร่างกายก่อนทำการศึกษาวิจัยครั้ง นี้ได้แก่

1. การปฏิสนธิ
2. การปฏิสนธิภายนอกร่างกาย
3. การรีดเก็บน้ำเชื้อพ่อสุกรและการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ
4. การเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกร
    4.1 น้ำเชื้อสด (fresh semen)
    4.2 น้ำเชื้อแช่แข็ง (frozen semen)
5. การใช้สารเจือจางน้ำเชื้อ และสารป้องกันการแช่แข็ง
6. การใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อนหลังปฏิสนธินอกร่างกาย

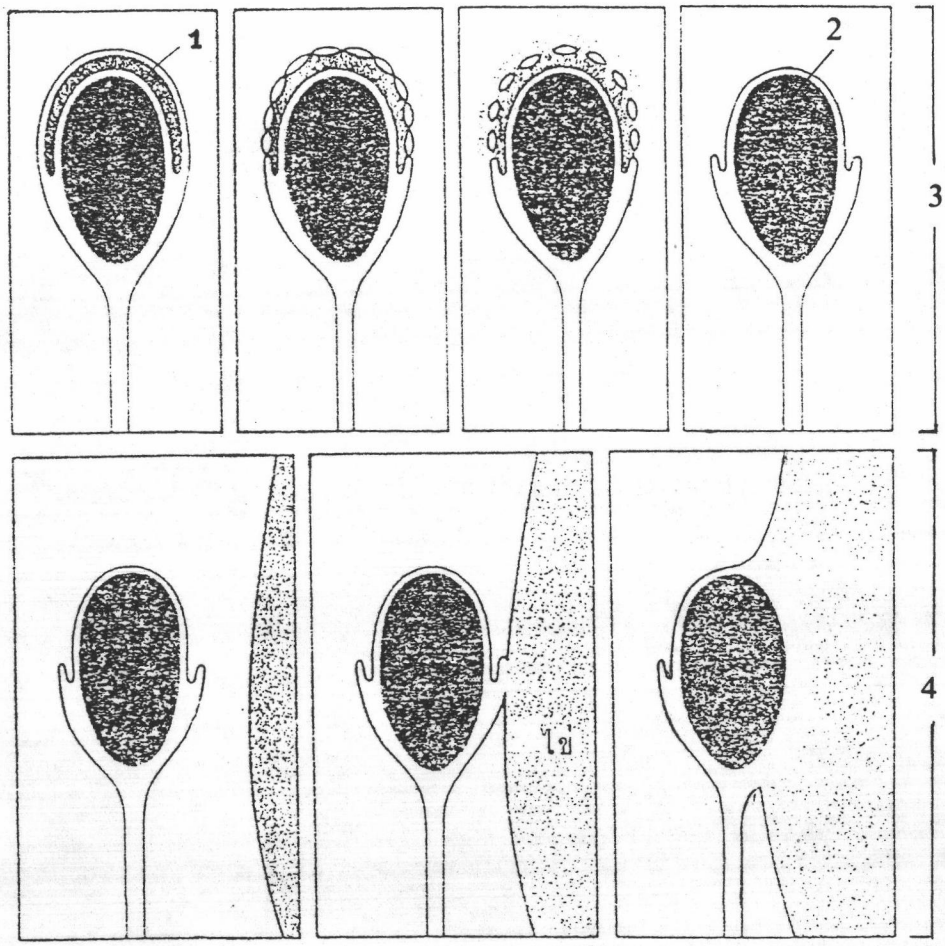
<u>การปฏิสนธิ (Fertilization)</u>

การปฏิสนธิคือการที่เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (ตัวอสุจิ) และเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย(โอโอไซต์) มารวมกันเกิดเป็นเซลล์ที่เรียกว่า ไซโกต (zygote) ผลของการปฏิสนธิทำให้เกิดเอมบริโอ (embryo) และมีการถ่ายทอดทางกรรมพันธุ์ด้วย

<u>กระบวนการปฏิสนธิ (Mechanism of fertilization)</u>

ไข่ที่ได้จากการตกไข่จะผสมกับตัวอสุจิ เมื่ออยู่ในระยะเมตาเฟสของการแบ่งตัวในระยะที่ 2 ของการแบ่งตัวแบบไมโอซิสแล้วจะผ่านเข้ามายังอินฟันดิบูลัมและเข้าสู่ท่อนำไข่อย่างรวดเร็ว โดยอาศัยการโบกพัดของเซลล์ขนและการบีบตัวของท่อนำไข่ ซึ่งไข่ที่ตกมาจะถูกหุ้มด้วยเซลเมมเบรนของไข่ (vitelline membrane) , โซนา เพลลูซิดา (zona pellucida), โคโรนา ราเดียตา (corona radiata) และคิวมูลัส โอโอโฟลัส (cumulus oophorus) ภายในคิวมูลัส โอโอโฟลัส จะมีกรดฮายอะลูโรนิค (hyaluronic acid) ปนอยู่ ซึ่งขณะที่ตัวอสุจิเข้าผสมกับไข่จะต้องไชผ่านทะลุกลุ่มเซลล์คิวมูลัส โดยอาศัยเอนไซม์พวกฮายอะลูโรนิเดส (hyalyronidase) และอะโครซิน (acrosin) ซึ่งอยู่ที่ส่วนหัวของตัวอสุจิ เวลาเดียวกันตัวอสุจิจะเกิด อะโครโซม รีแอคชั่น (acrosome reaction) ขึ้นซึ่งอะโครโซม รีแอคชั่น จะเกี่ยวข้องกับการที่เมมเบรนขาดเป็นช่วง ๆ

และเกิดการรวมตัวของพลาสมาเมมเบรนกับเมมเบรนชั้นนอกของอะโครโซม การที่เมมเบรนขาดเป็นช่วง ๆทำให้เอนไซม์จากอะโครโซมไหลออกมา ต่อมาเมมเบรนจะสลายตัวไปเหลือแต่เมมเบรนชั้นในของอะโครโซม โดยกระบวนการอะโครโซม รีแอคชั่นจะสิ้นสุดลงก่อนหรือภายหลังที่สัมผัสกับโซนา เพลลูซิดา ต่อมาโคโรนา พีนีเทรติ้ง เอนไซม์ (corona penetrating enzyme) จะย่อยชั้นโคโรนา ราเดียตา ทำให้ตัวอสุจิเจาะทะลุผ่านระหว่างเซลล์ของชั้นนี้เข้าไปได้ ทำให้ตัวอสุจิสัมผัสกับผิวนอกของโซนา เพลลูซิดา โดยโซนา เพลลูซิดามีคุณสมบัติเฉพาะในการที่จะให้ตัวอสุจิของสัตว์ชนิดเดียวกันผ่านเข้าไปได้ ถ้าต่างชนิดกันจะผ่านเข้าไปไม่ได้ เมื่อตัวอสุจิตัวแรกสามารถผ่านชั้นโซนา เพลลูซิดาจนถึงเซลล์เมมเบรนของไข่ จะทำให้เกิดปฏิกริยารอบๆผิวหนังของไข่ ซึ่งเรียกว่า โซนา รีแอคชั่น (zona reaction) โดยคอร์ติคอล แกรนูล (cortical granules) ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ไข่รวมกับเมมเบรนของเซลล์ไข่ และทำลายจุดรับของตัวอสุจิในชั้นโซนา เพลลูซิดา ซึ่งเป็นการป้องกันไม่ให้ตัวอสุจิตัวอื่นเข้ามาผสมกับไข่ เมื่อตัวอสุจิฝังตัวเข้าไปในผนังเซลล์เมมเบรนของไข่แล้วจะทำให้การซึมผ่านของเกลือ , แร่ธาตุ และของเหลวตลอดจนเอนไซม์ที่ช่วยในการเข้าผสมของตัวอสุจิที่จะมาผสมใหม่หมดไปนั่นคือป้องกันไม่ให้ตัวอสุจิอื่นๆผ่านเข้าไปอีก เรียกว่า วิเทลลีน บล็อค (vitelline block) การเกิดโซนา รีแอคชั่น และวิเทลลีนบล็อค เป็นการป้องกันการมีตัวอสุจิหลายตัวเข้าผสมกับไข่ (polyspermy) เนื่องจากขณะที่ตัวอสุจิเข้าผสมกับไข่ ไข่อยู่ในระยะการแบ่งตัวแบบไมโอซิสระยะที่ 2 และจะมีการสร้างนิวเคลีย์เมมเบรนขึ้นด้วย ทำให้เกิดเป็นโพรนิวเคลียสของตัวเมีย (female pronucleus) ซึ่งการรวมตัวของตัวอสุจิเข้าไปในไซโตพลาสซึมของไข่เกิดขึ้นจากการที่ส่วนหัวของตัวอสุจิมาพบกับเซลล์เมมเบรนของเซลล์ไข่ ทำให้เกิดการรวมตัวกันระหว่างเมมเบรนของตัวอสุจิกับไข่ไซโตพลาสซึมของไข่บริเวณนี้ขยายใหญ่ขึ้น และล้อมรอบหัวของตัวอสุจิไว้ ส่วนหางของตัวอสุจิจะหลุดออกอยู่ภายนอก นิวเคลียร์เมมเบรนของตัวอสุจิเองจะหายไปทำให้โครมาตินกระจายออกและเริ่มมีนิวเคลียร์เมมเบรนที่จะคล้ายกับนิวเคลียสของเซลล์ธรรมดา เรียกว่า โพรนิวเคลียส ของตัวผู้ (male pronucleus) ในช่วงที่ส่วนหัวของตัวอสุจิเข้าไปและขยายตัวในไข่ เซลล์เมมเบรนของไข่จะหดตัวทำให้เกิดช่องว่างระหว่างไซโตพลาสซึมกับเซลล์เมมเบรนของไข่ เรียกว่า ช่องว่างเพอริวิเทลลีน (perivitelline space) และจะมีการหลุดโพลาบอดี้ที่ 2 เมื่อโพรนิวเคลียสของตัวผู้ และโพรนิวเคลียสของตัวเมียมีการพัฒนาเต็มที่แล้วจะเคลื่อนเข้ามาติดกัน หลังจากนั้นจะเริ่มหดตัวลงและขณะเดียวกันก็จะรวมตัวกัน ผนังนิวคลียร์เมมเบรนจะสลายตัวไป หลังจากที่นิวคลียสของตัวอสุจิและไข่รวมกันแล้วจะได้เซลล์ใหม่เกิดขึ้นเรียกว่า ไซโกต (zygote) มีจำนวนโครโมโซมเป็น 2n (รูปที่ 1.1 และ 1.2) (พีระศักดิ์ และคณะ , 2534)



รูปที่ 1.1 แสดงขั้นตอนที่นำไปสู่การปฏิสนธิ

1 - อะโครโซมของตัวอสุจิ

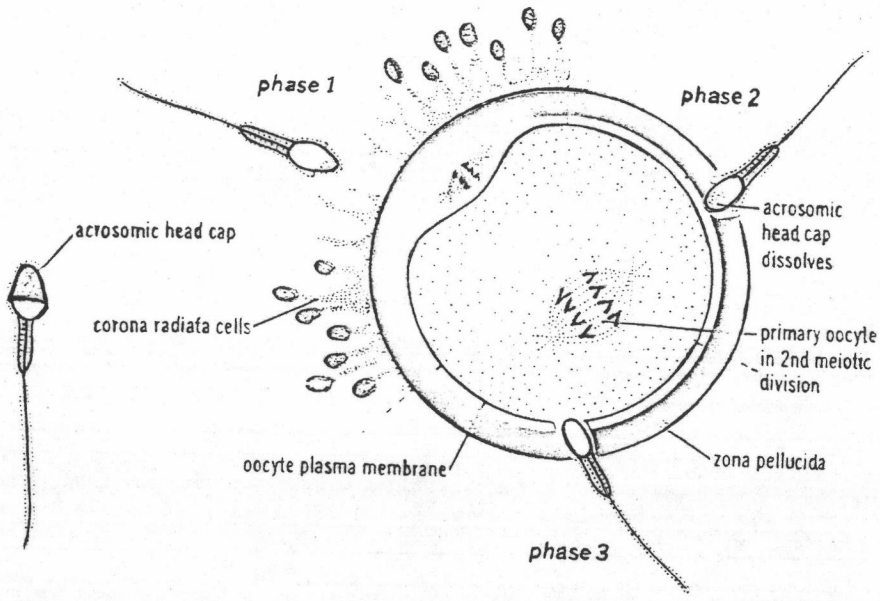
2 - นิวเคลียสของตัวอสุจิ

3 - ลักษณะของอะโครโซม รีแอคชั่น (แถวบน)

4 - ขั้นตอนระยะแรกของการรวมตัวของตัวอสุจิกับไข่

(พีระศักดิ์ และคณะ , 2534)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



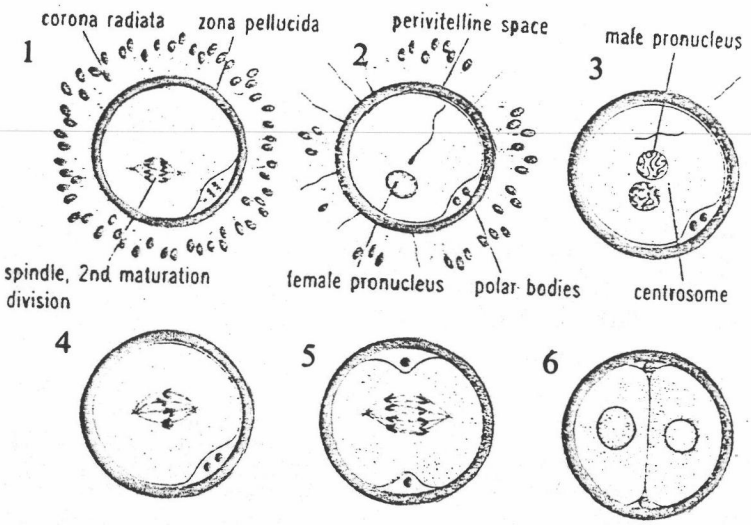
รูปที่ 1.2 แสดงขบวนการหรือกลไกการปฏิสนธิ
แสดงระยะต่างๆของตัวอสุจิที่ผ่านเข้าสู่โอโอไซต์

ระยะที่ 1 (phase 1) - ตัวอสุจิผ่านทะลุชั้นโคโรนา ราเดียตา

ระยะที่ 2 (phase 2) - ตัวอสุจิ 1 ตัวหรือมากกว่าผ่านโซนา เพลลูซิดาเข้าไป

ระยะที่ 3 (phase 3) - ตัวอสุจิ 1 ตัวผ่านเซลล์เมมเบรนของไข่เข้าไปได้

(พีระศักดิ์ และคณะ , 2534)



รูปที่ 1.2 แสดงกระบวนการหรือกลไกการปฏิสนธิ

แสดงขั้นตอนขณะเกิดการปฏิสนธิและภายหลังการปฏิสนธิ

1. หลังการตกไข่ โอโอไซต์ซึ่งมีการแบ่งตัวแบบไมโอซิสระยะที่ 2 จะหลุดออกมาพร้อมกับโซนา เพลลูซิดา และคิวมูลัส โอโอโฟลรัส ซึ่งรวมเรียกว่า โคโรนา ราเดียตา

2. ตัวอสุจิผ่านเข้าไปในโอโอไซต์ ซึ่งเป็นการสิ้นสุดการแบ่งตัวแบบไมโอซิสระยะที่ 2 และโพลา บอดี้แยกเป็น 2 เซลล์ โดยนิวเคลียสของโอโอไซต์เรียกว่า ฟีเมล โพรนิวเคลียส (female pronucleus) หลังจากนั้นเซลล์ของโคโรนา ราเดียตาส่วนหนึ่งจะแยกออก และหัวของตัวอสุจิเป็นจำนวนมากจะติดแน่นอยู่ในโซนา เพลลูซิดา

3. อยู่ในระยะเกิดโพรนิวเคลียสของตัวผู้ (male pronucleus)

4. และ 5. โครโมโซมแยกจากกันตามยาวและเคลื่อนไปอยู่ในขั้วตรงกันข้าม

6. ตัวอ่อนแยกออกเป็น 2 เซลล์ได้ 2 บลาสโตเมียร์ ซึ่งมีขนาดของนิวเคลียสแตกต่างกัน

(พีระศักดิ์ และคณะ , 2534)

การปฏิสนธิภายนอกร่างกาย (*In vitro* fertilization)

การปฏิสนธิภายนอกร่างกาย คือการนำเอาตัวอสุจิ (sperm) มาปฏิสนธิกับโอโอไซต์ (oocyte) ภายนอกร่างกายโดยต้องจัดสภาวะแวดล้อมในการปฏิสนธิให้ใกล้เคียงกับสภาวะธรรมชาติมากที่สุด ซึ่งขั้นตอนการปฏิสนธิภายนอกร่างกายประกอบด้วย

1. การเตรียมตัวอสุจิ (sperm preparation)
2. การเก็บไข่หรือโอโอไซต์ (oocyte recovery)
3. การทำให้ตัวอสุจิพร้อมที่จะปฏิสนธิ (sperm capacitation)
4. การทำให้โอโอไซต์เจริญพร้อมที่จะปฏิสนธิ (oocyte maturation)
5. การปฏิสนธิ (fertilization)
6. การย้ายฝากตัวอ่อน (embryo transfer)

งานด้านการปฏิสนธิภายนอกร่างกายในสุกรนั้น ได้มีการศึกษาจนเป็นผลสำเร็จทั้งใช้โอโอไซต์สุกรที่เจริญเต็มที่แล้วทั้งในฟอลลิเคิล (*in vivo*) หรือในหลอดทดลอง (*in vitro*) (Iritani et al.,1978 ; Nagai et al., 1984 ; Cheng et al.,1986 ; Yoshida , 1987 ; Naito et al., 1988 ; Mattioli et al., 1988 ; Naito and Moor , 1990 ; Yoshida et al., 1990 ,1992 ; Wang et al., 1991 ; Zheng andSirard , 1992) และประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนสุกรระยะ 1 เซลล์ให้พัฒนาไปสู่ระยะบลาสโตซีสได้นอกร่างกาย (Beckmann et al.,1990 ; Petters et al. , 1990 ; Beckmann and Day , 1991 ; Hagen et al. , 1991 ; Misener et al. , 1991 ; Petters and Reed , 1991 ; Reed et al., 1992) อย่างไรก็ตามการปฏิสนธิภายนอกร่างกายในสุกรมักเกิดปัญหามีตัวอสุจิหลายตัวเจาะทะลุผ่านโอโอไซต์เข้าไปได้ (Nagai et al., 1984 ; Cheng et al., 1986 ; Mattioli et al. , 1988a ; Nagaiand Moor, 1990 ; Wang et al., 1991 ; Zheng and Sirard , 1992) ซึ่งความผิดปกตินี้เป็นปัญหาหลักที่ยังแก้ไขไม่ได้ โดย Hunter (1990) เชื่อว่าปัญหาการมีตัวอสุจิหลายตัวเข้าผสมกับโอโอไซต์ (polyspermy) อาจเป็นเพราะความไม่เหมาะสมของคอร์ติคอลรีแอคชั่นเนื่องจากอายุของโอโอไซต์ หรือมีจำนวนตัวอสุจิที่มีรูปร่างลักษณะผิดปกติสูงขณะมาถึงตำแหน่งที่จะปฏิสนธิ ต่อมา Nagai and Moor (1990) เสนอแนะว่าสารที่หลั่งจากเยื่อบุเซลล์ของท่อรังไข่สุกร (pig oviductal epithelial cells) อาจจะ

ช่วยลดอุบัติการณ์ของการมีตัวอสุจิหลายตัวเข้าผสมกับโอโอไซต์หลังการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย (Hunter and Hall , 1974 ; Yanagimachi , 1981 ; Hunter , 1990) อย่างไรก็ตามกลไกการหลั่งสารจากท่อนำไข่ซึ่งช่วยป้องกันการมีตัวอสุจิหลายตัวเข้าผสมกับโอโอไซต์สุกรก็ยังไม่แน่ชัด เพียงแต่เป็นที่ทราบกันดีว่า สารคัดหลั่งจากฟอลลิเคิล (follicular fluid) จะช่วยส่งเสริมความพร้อมของตัวอสุจิในสัตว์หลายชนิดก่อนการปฏิสนธิ และอะโครโซมรีแคชั่นนอกร่างกายมากกว่า สารคัดหลั่งจากท่อนำไข่ (oviductal fluid) (Barrors and Austin ,1967 ; Gwatkin and Anderson , 1969 ; Iwamatsu and Chang , 1969 ; Yanagimachi , 1969 ; Lenz et al., 1982) นอกจากนี้ก็มีผู้วิจัยหลายท่านพบว่า ในสัตว์ทดลองสารคัดหลั่งจากฟอลลิเคิลที่ใส่ลงในน้ำยาสำหรับทำการปฏิสนธินอกร่างกายจะช่วยส่งเสริมการเจาะทะลุผ่านของตัวอสุจิเข้าไปในโอโอไซต์ (Gwatkin and Anderson , 1969 ; Iwamatsu and Chang , 1969 ; Yanagimachi , 1969) แม้ Hanzen และคณะ (1991) จะพบว่าสารคัดหลั่งจากฟอลลิเคิลจะช่วยกระตุ้นอะโครโซม รีแอคชั่นของตัวอสุจิที่บริเวณท่อนำไข่ส่วน แอมพูลลาร์ (ampullar) แต่ก็ยังไม่แน่ใจว่าสารคัดหลั่งจากฟอลลิเคิลจะช่วยควบคุมการเจาะทะลุผ่านของตัวอสุจิเข้าผสมกับโอโอไซต์ขณะปฏิสนธิหรือไม่ ต่อมา Funahashi และ Day (1993) พบว่าสารคัดหลั่งจากฟอลลิเคิลของสุกร(porcine follicular fluid : PFF) ที่ดูดจากฟอลลิเคิลซึ่งเจริญเต็มที่ (mature follicles) และฟอลลิเคิลซึ่งยังเจริญไม่เต็มที่ (immature follicles) แล้วเติมลงในน้ำยาสำหรับทำการปฏิสนธินอกร่างกายด้วยความเข้มข้นที่เหมาะสมจะลดอัตราการเจาะทะลุผ่านของตัวอสุจิเข้าสู่เซลล์เมมเบรนของไข่ (sperm penetration rate) และลดอุบัติการณ์ของการที่ตัวอสุจิหลายตัวจะเข้าผสมกับโอโอไซต์โดยก่อนหน้านี้ Naito และคณะ (1988) พบว่าการเติม สารคัดหลั่งจากฟอลลิเคิลของสุกร (pig follicular fluid) ในน้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์ จะส่งเสริมความพร้อมของโอโอไซต์ในการปฏิสนธิ (oocyte maturation) และการปฏิสนธินอกร่างกายเช่นเดียวกับ Eppig และ Schroeder (1986) พบว่าการเติมสาร คัดหลั่งจากฟอลลิเคิลของสุกรในน้ำยาสำหรับทำการปฏิสนธิ จะส่งเสริมความพร้อมในการปฏิสนธินอกร่างกายของหนูเมาซ์ด้วย โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yoshida และคณะ (1992) ที่พบว่าการเติมสารคัดหลั่งจากฟอลลิเคิลของสุกรในน้ำยาสำหรับทำการปฏิสนธินอกร่างกาย หรือน้ำยาเพาะ เลี้ยงตัวอ่อน จะเพิ่มอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนที่ปกติหลังทำการ

ปฏิสนธิภายนอกร่างกายด้วย Sato และคณะ (1987,1990) เสนอแนะว่าไกลโคซามิโนไกลแคน (glycosaminoglycans) ซึ่งแยกจากสารคัดหลั่งของโคหรือสุกร จะช่วยเพิ่มความอยู่รอดของโอโอไซต์สุกรและโอโอไซต์ของหนูเมาซ์ ต่อมาYoshida และคณะ (1992) พบว่าโอโอไซต์สุกรที่ลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง mKRB ร่วมกับ สารคัดหลั่งจากฟอลลิเคิลของสุกรหรือเซลล์แกรนูโลซา เพื่อให้โอโอไซต์เจริญพร้อมที่จะปฏิสนธิ และทำการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนหลังปฏิสนธิต่อในน้ำยาเพาะเลี้ยง BMOC - 2 จะให้ผลการพัฒนาตัวอ่อนไปสู่ระยะ 2 - 4 เซลล์เท่ากับ 35.6 % ในขณะที่ถ้าเลี้ยงโอโอไซต์สุกรให้พร้อมปฏิสนธิในน้ำยาเพาะเลี้ยง mKRB อย่างเดียวจะให้ผลการพัฒนาตัวอ่อนไปสู่ระยะ 2 - 4 เซลล์เพียง 13 % ส่วนการศึกษาในโค พีระศักดิ์ และคณะ (2534) พบว่า สารคัดหลั่งจากฟอลลิเคิลของโคที่ดูดออกมาจากฟอลลิเคิลซึ่งเจริญเติบโตเต็มที่แล้วมีประโยชน์ในการกระตุ้นกระบวนการที่ทำให้ตัวอสุจิพร้อมที่จะปฏิสนธิและอะโครโซม รีแอคชั่น ทำให้เมื่อใช้ตัวอสุจิที่ผ่านการเลี้ยงในสารคัดหลั่งจากฟอลลิเคิลจะให้อัตราการปฏิสนธิสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ใช้ แสดงว่าผลของสารคัดหลั่งจากฟอลลิเคิล ต่อการปฏิสนธิภายนอกร่างกายเกี่ยวข้องกับความพร้อมของตัวอสุจิที่จะปฏิสนธิร่วมกับการเจาะทะลุผ่านของตัวอสุจิเข้าสู่เซลล์เมมเบรนของไข่ นอกจากนี้ในส่วนที่เกี่ยวกับผลของการเลี้ยงตัวอ่อนร่วมกับเซลล์ (co - culture) Bavister และคณะ (1992) และ Voelkel (1992) ยังพบว่าหลังปฏิสนธินอกร่างกายตัวอ่อนของโคสามารถพัฒนาการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นได้ถ้าเพาะเลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยาซึ่งมีโทรโฟลบลาสติค เวสซิเคิล (trophoblastic vesicles) , เซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ (oviductal cells), เซลล์ไฟโบรบลาสของมดลูก (uterine fibroblast cells) และเซลล์แกรนูโลซา (granulosa cells) โดยเซลล์ดังกล่าวจะช่วยเพิ่มการพัฒนาไปสู่ระยะบลาสโตซีส (blastocyst) และช่วยเพิ่มคุณภาพรวมทั้งความอยู่รอดของตัวอ่อนหลังจากปฏิสนธิและต้องเพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงนอกร่างกาย โดย Fukuda และคณะ (1989) ; Goto และคณะ (1992) และ Zhang และคณะ (1992) พบว่าเซลล์คิวมูลัส (cumulus cells) หรือเซลล์แกรนูโลซา จะเพิ่มความสามารถของการแบ่งตัวของตัวอ่อนในโค นอกจากนี้ Plachot และคณะ(1993)พบว่ามีการใช้เซลล์คิวมูลัสและเซลล์แกรนูโลซาในการทำการปฏิสนธิภายนอกร่างกายในมนุษย์ด้วย โดยใช้เซลล์คิวมูลัสและเซลล์แกรนูโลซาจากโอโอไซต์ของผู้ที่จะเป็นคนตั้งครรภ์ ซึ่งปัจจัยที่ช่วยเพิ่มความพร้อมของโอโอไซต์ในการปฏิสนธิและช่วยเพิ่มการพัฒนาของตัวอ่อนหลังปฏิสนธินอกจากการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์และตัวอ่อนร่วมกับเซลล์คิวมูลัส ,

เซลล์แกรนูโลซา หรือใส่สารคัดหลั่งจากฟอลลิเคิลลงในน้ำยาเพาะเลี้ยงแล้ว Mattioli และคณะ (1991) ยังพบอีกว่าการเติมฮอร์โมนพวก เอฟ เอส เอช (FSH) หรือ แอล เอช (LH) จะช่วยเพิ่มการพัฒนาของโอโอไซต์ให้เข้าสู่การแบ่งตัวระยะไมโอซิส (meiosis) เร็วขึ้น โดยเฉพาะแอล เอช จะช่วยเพิ่มความพร้อมของโอโอไซต์ในการปฏิสนธิช่วยให้เกิด male pronuclei หลังการปฏิสนธินอกร่างกายเร็วขึ้นนอกจากนี้การเติมฮอร์โมนตัวอื่นๆ ลงในน้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์สุกร เช่น พี เอ็ม เอส จี (PMSG)+ เอช ซี จี (hCG) และเอสตราไดออล (estradiol) (Yoshida et al., 1990,1991 ; Wang et al , 1992) , เอฟ เอส เอช (FSH) + แอล เอช (LH)+ โปรแลคติน (prolactin) และเอสตราไดออล (Zheng and Sirard , 1992) , เอฟ เอส เอช + แอล เอช และโปรแลคติน (Mattioli et al., 1988b ; Nagai and Moor , 1990) , เอฟ เอส เอช และ แอล เอช (Galeati et al., 1991) , แอล เอช (LH) และเอสตราไดออล (Nagai et al. , 1988) ฮอร์โมนเหล่านี้จะช่วยเพิ่มความพร้อมของการเกิดนิวเคลียร์เมมเบรน (nuclear maturation) เช่น เกิด male pronuclei อย่างสมบูรณ์ และช่วยให้เซลล์คิวมูลัสรอบๆ โอโอไซต์ขยายตัวดีขึ้น

ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การทำการปฏิสนธิภายนอกร่างกายโดยทำการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์หรือตัวอ่อนหลังปฏิสนธินอกร่างกายร่วมกับเซลล์แกรนูโลซา , เซลล์คิวมูลัสและฟอลลิคูลาร์ ฟลูอิด ช่วยเพิ่มความพร้อมของโอโอไซต์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิ และช่วยเพิ่มอัตราการปฏิสนธินอกร่างกายในด้านการแบ่งตัวของตัวอ่อนด้วย นอกจากนี้ยังช่วยลดอุบัติการณ์ของการที่มีตัวอสุจิหลายตัวเข้าผสมกับโอโอไซต์ได้ด้วย และการเติมฮอร์โมนพวก แอล เอช , เอฟ เอส เอช และเอสตราไดออล ลงในน้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ จะช่วยให้โอโอไซต์เข้าสู่สภาวะพร้อมในการปฏิสนธิเร็วขึ้น

ดังนั้นการศึกษาวิจัยครั้งนี้ จึงเลือกใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์จากสุ กรสาวให้เจริญพร้อมปฏิสนธิในน้ำยาที่มีฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (เอฟ เอส เอช + แอล เอช) ซึ่งมีฮอร์โมนเอฟ เอส เอช + แอล เอชและเอสตราไดออล เป็นส่วนประกอบเพื่อเป็นแหล่งอาหารให้โอโอไซต์โดยเลี้ยงร่วมกับเซลล์แกรนูโลซาและเซลล์คิวมูลัสซึ่งการแสดงถึงความสำเร็จในการปฏิสนธิภายนอกร่างกายนอกจากดูอัตราการแบ่งตัว และการพัฒนาของตัวอ่อนหลังปฏิสนธิเป็นเกณฑ์หลักแล้ว เรายังสามารถดูได้จากการตรวจพบหัวอสุจิและหางอสุจิในโอโอพลาสซึม หรือตรวจพบ 2 pronuclei (male and female pronuclei) ในโอโอพลาสซึมจากจำนวนโอโอไซต์ที่มี

การปฏิสนธิด้วย โดย Nagai และคณะ (1991) พบว่าหลังปฏิสนธินอกร่างกาย 6 ชั่วโมง โอโอไซต์ที่มีการปฏิสนธิยังอยู่ในระยะเมตาเฟส I -74 % และอีก 12 ชั่วโมงต่อมาจึงจะเข้าสู่ระยะเมตาเฟส II -50 % ส่วนที่เวลา 20 - 28 ชั่วโมง จะมีส่วนหัวของตัวอสุจิเจาะทะลุผ่านโอโอไซต์เข้าไปในไซโตพลาสซึม 70 - 80 % และเมื่อเพาะเลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยาเพาะเลี้ยงต่อ 22 ชั่วโมง จะพบ male pronuclei - 93 % และ female pronuclei - 96 % แสดงให้เห็นว่าช่วงหลังการปฏิสนธิตั้งแต่ 20 ชั่วโมงเป็นต้นไป เราสามารถตรวจพบหัวอสุจิหรือหางอสุจิในโอโอพลาสซึมของโอโอไซต์ และสามารถตรวจพบ male และ female pronuclei จากจำนวนโอโอไซต์ที่มีการปฏิสนธิได้ด้วย ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นการแสดงถึงความสำเร็จในการปฏิสนธิภายนอกร่างกายได้ด้วยเช่นกัน

การรีดเก็บน้ำเชื้อพ่อสุกรและการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ

การรีดเก็บน้ำเชื้อพ่อสุกรควรรีดเก็บเมื่อสัตว์มีอายุ 7 - 8 เดือน ไปแล้ว โดยสุกรที่มีอายุต่ำกว่า 9 เดือน มักรีดเก็บน้ำเชื้อ 1 - 2 ครั้งต่อสัปดาห์ ถ้าอายุมากกว่า 18 เดือนรีดเก็บน้ำเชื้อ 2 - 3 ครั้งต่อสัปดาห์ เนื่องจากพ่อสุกรใช้เวลาในการหลั่งน้ำเชื้อค่อนข้างนานประมาณ 3 - 20 นาที ดังนั้นน้ำเชื้อที่หลั่งออกมาตอนแรกจึงมีลักษณะใส และอาจมีเม็ดสาคูปะปนออกมา ซึ่งเรียกส่วนนี้ว่า พรีสเปิร์ม แฟลคชั่น (presperm fraction) ต่อมาเป็นส่วนที่มีลักษณะขาวขุ่น ซึ่งมีตัวอสุจิอยู่เป็นจำนวนมาก เรียกส่วนนี้ว่า สเปิร์มริช แฟลคชั่น (spermrich fraction) และส่วนสุดท้ายเป็นของเหลวใสมีเม็ดสาคูปะปนออกมาด้วยเรียกส่วนนี้ว่าโพสสเปิร์มแฟลคชั่น (postsperm fraction) (เตือนตา , 2533) การรีดเก็บน้ำเชื้อสุกรโดยทั่วไปมีหลายวิธี เ ช่น การใช้ช่องคลอดเทียมและการรีดด้วยมือเป็นต้น โ ดยการศึกษาวิจัยครั้งนี้เลือกใช้วิธีการรีดด้วยมือ เนื่องจากสะดวก ง่าย รวดเร็วและ เป็นที่นิยม น้ำเชื้อที่รีดเก็บได้แต่ละครั้ง ต้องนำไปตรวจคุณภาพน้ำเชื้อก่อนนำไปใช้ เพราะการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อสามารถบอกถึงความสมบูรณ์ของพ่อพันธุ์แต่ละตัวได้แต่มีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อหลังการรีดเก็บ เ ช่น แสงสว่าง , ความร้อน และความเย็นเป็นต้น ดังนั้นน้ำเชื้อที่รีดเก็บได้ควรอุ่นไว้ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และรีบนำไปตรวจคุณภาพน้ำเชื้อโดยเร็ว ซึ่งการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อโดยทั่วไปมี 2 วิธี คือ การตรวจด้วยตาเปล่า และการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้เลือกใช้ทั้งวิธีการตรวจด้วยตาเปล่า และการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยการตรวจด้วยตาเปล่าจะดูปริมาตรของน้ำเชื้อ เนื่องจากปริมาตรของน้ำเชื้อที่หลั่งแต่ละครั้งจะผันแปรไปตามสายพันธุ์ , อายุ , ความถี่ในการรีดน้ำเชื้อและวิธีในการรีดน้ำเชื้อ (ปริมาตรของน้ำเชื้อสุกรต่อการหลั่งน้ำเชื้อแต่ละครั้งประมาณ 120 - 250 มิลลิลิตร) และดูสีของน้ำเชื้อ ปกติสีของน้ำเชื้อสุกรมักมีสีขาวขุ่นคล้ายน้ำนม ซึ่งสามารถใช้ประมาณความเข้มข้นของตัวอสุจิได้คร่าว ๆ คือ น้ำเชื้อที่มีสีขาวขุ่นมากแสดงว่า มีจำนวนตัวอสุจิอยู่มาก ส่วนการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะดู การเคลื่อนไหวเฉพาะตัว (motility) ของตัวอสุจิ เพราะวิธีนี้ใช้ตรวจน้ำเชื้อของสัตว์ที่มีเซมินอลพลาสมามากเช่นน้ำเชื้อสุกร หรือใช้ตรวจน้ำเชื้อที่เจือจาง และดูความเข้มข้นของตัวอสุจิ เนื่องจากความเข้มข้นของตัวอสุจิแตกต่างกันไปในสัตว์แต่ละชนิด แต่ละตัว ซึ่งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น อาหาร , พันธุ์ ,อายุและความถี่ในการรีดเก็บน้ำเชื้อ ดังนั้นในการตรวจความเข้มข้น

ของตัวอสุจิ จึงมีประโยชน์ในการช่วยตัดสินหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการเจือจางน้ำเชื้อสำหรับผสมเทียม หรือใช้ทำการปฏิสนธินอกร่างกาย (ความเข้มข้นปกติของตัวอสุจิพ่อสุกรต่อการหลั่งน้ำเชื้อใน แต่ละครั้งมีค่าประมาณ 2 - 3 ร้อยล้านตัว)

การเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกร

น้ำเชื้อสุกรที่รีดเก็บได้ก่อนนำไปใช้ใ นการผสมเทียมควรเจือจางน้ำเชื้อด้วยสารเจือจางเสียก่อนเพื่อสามารถแบ่งไปผสมกับแม่พันธุ์ได้จำนวนมากขึ้น น้ำเชื้อหลังจากเจือจางด้วยสารเจือจางมีวิธีการเก็บรักษา 2 วิธี คือการเก็บในรูปน้ำเชื้อสด และการเก็บในรูปน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยจุดประสงค์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อคือ เพื่อให้ตัวอสุจิสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้นาน หลังจากการรีดเก็บน้ำเชื้อ ลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการรีดเก็บน้ำเชื้อโดยไม่ต้องรีดเก็บน้ำเชื้อบ่อยครั้งและสามารถนำไปผสมกับแม่พันธุ์ในที่ต่าง ๆที่มีระยะทางห่างกันได้

การเก็บน้ำเชื้อในรูปน้ำเชื้อสด เป็นการนำน้ำเชื้อที่รีดเก็บได้มาเจือจางด้วยสารเจือจางแล้วนำไปเก็บไว้ในที่เย็นซึ่งอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษามีตั้งแต่ 5 องศาเซลเซียสถึง 20 องศาเซลเซียสขึ้นอยู่กับสูตรของสารเจือจางน้ำเชื้อว่าเป็นชนิดใด น้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้เรียกว่า น้ำเชื้อสด (fresh semen) การเก็บน้ำเชื้อแบบนี้ข้อดีคือ น้ำเชื้อยังมีคุณภาพดีและยังมีตัวอสุจิที่ยังแข็งแรงเคลื่อนไหวอยู่เป็นจำนวนมาก นอกจากนี้วิธีการเตรียมก็ง่ายและค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษาถูก ส่วนข้อเสียคือ สามารถเก็บน้ำเชื้อได้เพียง 3 - 4 วันเท่านั้นที่จะให้อัตราการผสมติดที่ดี

การเก็บน้ำเชื้อในรูปน้ำเชื้อแช่แข็ง เป็นการนำน้ำเชื้อที่รีดเก็บได้มาเจือจางด้วยสารเจือจางที่มีสารป้องกันการแช่แข็ง (cryoprotectants) อยู่ด้วย แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ในภาพที่เย็นจัดจนแข็งโดยเก็บผ่านการแช่แข็งในน้ำแข็งแห้งที่มีอุณหภูมิ - 79 องศาเซลเซียส และเก็บในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส น้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้เรียกว่า น้ำเชื้อแช่แข็ง (frozen semen) ซึ่งรูปแบบการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งมี 3 รูปแบบ คือแบบหลอดแก้ว (tube) แบบเม็ด (pellet) และแบบหลอดฟาง (straw) โดยการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในสุกรนิยมใช้รูปแบบเม็ด (pellet) การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบนี้มีทั้งข้อดีและข้อเสียเช่นกัน ข้อดีคือ สามารถเก็บน้ำเชื้อไว้ได้นานแม้ว่าพ่อพันธุ์จะตายไปแล้วนอกจากนี้ยังใช้เนื้อที่น้อยในการเก็บรักษา และสะดวกแก่การขนส่งไปยังที่ต่าง ๆ ส่วนข้อเสียคือ จะมีตัวอสุจิที่มีชีวิตรอดเคลื่อนไหวอยู่น้อย

สำหรับหลักการในการเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งไม่ว่าจะเป็นการเก็บในรูปแบบไหนจะมีหลักการคล้ายคลึงกันคือ

1. การเจือจางน้ำเชื้อด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อที่เหมาะสม เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชั่วโมง แล้วค่อย ๆ ลดอุณหภูมิลงจนถึง 5 องศาเซลเซียส และเก็บไว้นานประมาณ 4 ชั่วโมงก่อนทำน้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อให้ตัวอสุจิมีการปรับสภาพ

2. การเติมสารป้องกันการแช่แข็ง (cryoprotectant) ลงในสารเจือจางน้ำเชื้อก่อนทำการแช่แข็ง เนื่องจากตัวอสุจิจะเกิดการช็อคจากความเย็น เมื่อตัวอสุจิกระทบความเย็นโดยทันทีทำให้การเคลื่อนไหวของตัวอสุจิลดลง จำนวนตัวตายของตัวอสุจิเพิ่มขึ้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องใส่สารป้องกันการแช่แข็ง เช่น หางนม, เคซีน , ไข่แดงและกลีเซอรอลลงไปด้วยในความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยพวกหางนม , เคซีน และไข่แดง จะทำให้เกิดการคงที่ของเซลล์เมมเบรนทำให้ลดความสามารถในการซึมผ่านเข้าออกของสารต่างๆ ส่วนกลีเซอรอลที่เติมลงไปในสารเจือจางน้ำเชื้อจะทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ของเกลือ โดยไปรวมตัวกับน้ำทำให้จุดเยือกแข็งของสารละลายลดลง ผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นจะน้อยกว่าในสภาพที่ไม่ได้เติมกลีเซอรอลที่อุณหภูมิเท่ากัน

Pursel และ Johnson (1975), Paquiqnon และ Courot (1976) และ Larsson และคณะ (1977) ได้ค้นพบและพัฒนาวิธีการทำการแช่แข็งน้ำเชื้อสุกรโดยทำในรูปแบบเม็ด (pellet) บนน้ำแข็งแห้ง (Nagase and Niwa , 1963) แล้วกำหนดขั้นตอนการแช่แข็งไว้ 3 ประการคือ

1. ต้องปรับสภาวะสมดุลในเซมินอล พลาสมา หรือในสารเจือจางน้ำเชื้อโดยการเซนตริฟิวท์ (centrifuge) ระหว่างทำให้เย็นจนถึง 15 องศาเซลเซียส (Pursel and Johnson , 1975 ; Larsson et al., 1977) หรือขณะ เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส (Paquiqnon and Courot , 1976) เนื่องจากเวลาในการปรับสภาวะสมดุลจะช่วยส่งเสริมความสามารถในการอยู่รอดของตัวอสุจิขณะทำการแช่แข็งและภายหลังการละลายน้ำเชื้อซึ่งเวลาที่ใช้ในการปรับสภาวะสมดุลที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสประมาณ 4.5 ชั่วโมง

2. ควรตรวจความเข้มข้นของตัวอสุจิจากน้ำเชื้อ ก่อนนำน้ำเชื้อไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส โดยจะต้องใส่ตัวอสุจิที่มีความเข้มข้นมากพอในสารเจือจางที่มีปริมาตรน้อยสำหรับทำการแช่แข็ง ซึ่งความเข้มข้นของตัวอสุจิที่ใช้ระหว่างทำการแช่แข็งควรอยู่ระหว่าง 0.45 ถึง 1 ร้อยล้านตัวต่อมิลลิลิตร (Graham and Crabo , 1972)

3. ควรเติมกลีเซอรอลที่มีความเข้มข้นประมาณ 1 - 5 % ลงไป ก่อนทำการแช่แข็ง (Mazur , 1977)

ในส่วนที่เกี่ยวกับการใช้น้ำเชื้อสดเจือจาง และน้ำเชื้อแช่แข็งมาทำการปฏิสนธินอกร่างกาย Johnson และคณะ (1981) พบว่า อัตราการเกิดของลูกสุกรโดยใช้น้ำเชื้อสดในรูปเจือจางที่แช่เย็นจะสูงกว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อแช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญ (79.1 % เทียบกับ 10. 6 %) แสดงว่าการแช่แข็งมีผลกระทบต่ออัตราการเกิดของลูกสุกร

การศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงต้องการเปรียบเทียบอัตราความสำเร็จในการปฏิสนธิโดยใช้น้ำเชื้อสดซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส , 5 องศาเซลเซียสและใช้น้ำเชื้อแช่แข็งซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ - 196 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 2, 4, 6 วัน เพื่อปรับวิธีการตรวจสอบผลของระยะเวลาและอุณหภูมิการเก็บรักษาน้ำเชื้อต่ออัตราความสำเร็จในการปฏิสนธิให้รวดเร็วด้วยเทคนิค ไอ วี เอฟ โดยการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อจากพ่อสุกรแต่ละตัวก่อนใช้ เพื่อคัดเลือกน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีโดยเฉพาะในด้านการเคลื่อนไหวมาใช้ก่อนทำการปฏิสนธิ นอกร่างกาย ผลการวิจัยของ Pursel และ Johnson (1975) พบว่าอัตรการผสมติดหลังปฏิสนธิ เมื่อใช้น้ำเชื้อแช่แข็งจากพ่อสุกรคนละตัวจะใกล้เคียงกับอัตราการผสมติดหลังปฏิสนธิเมื่อใช้น้ำเชื้อแช่แข็งจากพ่อสุกร 2 ตัวที่เอาน้ำเชื้อมารวมกัน (85 % เทียบกับ 87 % ตามลำดับ) แสดงว่าการใช้น้ำเชื้อจากพ่อสุกรแต่ละตัว ไม่มีผลต่ออัตราการผสมติดหลังปฏิสนธิ แต่ต่อมา Pursel และ Johnson (1975)พบว่าอัตราการเกิดของลูกสุกรจากแม่สุกรโดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งจากพ่อสุกรพันธุ์ Dutch Large White (DLW) ต่างจากพ่อสุกรพันธุ์ Dutch Landrace (DL) (58.6 % เทียบกับ 40.9 % ตามลำดับ) แสดงว่าการใช้น้ำเชื้อพ่อสุกรแต่ละตัวจากแต่ละสายพันธุ์มีผลต่ออัตราการเกิดของลูกสุกร

การศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงเลือกใช้พ่อสุกร 2 ตัว (สุกรเอ และสุกรบี) เพื่อตรวจสอบความแตกต่างในด้านอัตราความสำเร็จในการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย ตามระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อ 0, 2, 4, 6 วัน

สารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันการแช่แข็ง

สารเจือจางน้ำเ ชื้อ (diluter) มักใช้เจือจางน้ำเชื้อหลังจากรีดเก็บน้ำเชื้อมาใหม่ ๆ (น้ำเชื้อสด) เพื่อทำให้ตัวอสุจิมีชีวิตรอดอยู่นอกร่างกายได้นานหลังการรีดเก็บน้ำเชื้อ และ ความสามารถในการเข้าผสมของตัวอสุจิกับโอโอไซต์ก็ยังคงสภาพเดิม โดยสารเจือจางน้ำเชื้อมักมีส่วนประกอบ ที่คล้ายคลึงกัน เช่น

1. น้ำตาลพวกกลูโคส (glucose) ฟรุคโตส (fructose)ทำหน้าที่เป็นแหล่อาหารของตัวอสุจิเพื่อหล่อเลี้ยงตัวอสุจิให้มีชีวิตอยู่รอด

2. โซเดียมซิเตรด โซเดียมฟอสเฟต ทำหน้าที่ปรับสภาพความเป็นกรด - ด่าง เพื่อป้องกันอันตรายแก่ตัวอสุจิจากการเกิดกรดแลคติค (lactic acid) เนื่องจากการเผาผลาญพลังงานของตัวอสุจิ

3. ยาปฏิชีวนะ เช่น เพนนิซิลิน สเตปโตมัยซิน เพื่อหยุดหรือยับยั้งกาเจริญของแบคทีเรีย

ส่วนการทำการแช่แข็งน้ำเชื้อหลังจากทำน้ำเชื้อแช่เย็นแล้วต้องใส่สารป้องกันการแช่แข็ง พวกไข่แดง น้ำนมและกลีเซอรอลลงไปในสารเจือจางน้ำเชื้อด้วย เพื่อป้องกันอันตรายแก่ตัวอสุจิในขณะที่อุณหภูมิเย็นลง หรือมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างกระทันหันในขณะผ่านกระบวนลดอุณหภูมิเพื่อเก็บรักษา

Crabo และ Einarsson (1971) พบว่าการผสมติดหลังปฏิสนธิมีส่วนเกี่ยวข้องกับชนิดของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อด้วย และในกรณีน้ำเชื้อแช่แข็งจะต้องใส่สารป้องกันการแช่แข็ง เช่น กลีเซอรอล หางนม ไข่แดงลงไปด้วย เนื่องจากตัวอสุจิมีความไวต่อความเข้มข้นของกลีเซอรอลแตกต่างกัน ซึ่งความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่ใช้แล้วทำให้ลักษณะของอะโครโซมตัวอสุจิยังไม่ถูกทำลายอยู่ในช่วง 1 - 7.5 % โดยความเข้มข้นของกลีเซอรอล1 % ให้ลักษณะอะโครโซมตัวอสุจิปกติ 89.2 % เทียบกับเมื่อใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 7.5 % จะให้ลักษณะอะโครโซมตัวอสุจิที่ปกติเพียง 52. 6 % (Bamba and Cran , 1988) เนื่องจาก Pursel และ Johnson (1975) พบว่า บี ที เอส (BTS ; Beltsville Thawing Solution) เป็นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มความสามารถของการผสมติดหลังปฏิสนธิมากกว่าน้ำเลี้ยงตัวอสุจิคือ seminal plasma (Crabo and Einarsson , 1971) เคซีน (Einarsson et al., 1972) เมื่อใช้ร่วมกับ

กลีเซอรอลในปริมาณที่เหมาะสม โดยก่อนหน้านี้ Pursel และ Johnson (1975) พบว่าการทนต่อสภาวะช็อคจากความเย็นของตัวอสุจิเพิ่มตามอัตราการเจือจางที่เพิ่มขึ้น คือ ตัวอสุจิที่มีการเจือจางหลังการรีดน้ำเชื้อจะทนต่อสภาวะช็อคจากความเย็นได้ดีกว่าตัวอสุจิที่ไม่ได้เจือจางหลังการรีดน้ำเชื้อ การศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของกลีเซอรอลเพียง 1 % เติมลงในสารเจือจางน้ำเชื้อชนิด บี ที เอส เพื่อป้องกันสภาวะช็อคจากความเย็นเมื่อเก็บน้ำเชื้อสดไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสและเก็บน้ำเชื้อในรูปน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ - 196 องศาเซลเซียส

จากปี 1971 ถึงปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งโดยพยายามทำเทคนิคให้ง่ายต่อการปฏิบัติมากขึ้น รวมทั้งลดระยะเวลาและขั้นตอนต่างๆในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งให้สั้นลง ซึ่งเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อจะประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

1. การใส่สารป้องกันการแช่แข็ง (addition of cryoprotectant)
2. การแช่แข็ง (freezing)
3. การเก็บในไนโตรเจนเหลว (conservation in liquid nitrogen)
4. การละลาย (thawing)
5. การประเมินผลการแช่แข็ง (evaluation of frozen thawed spermatozoa)

<u>กลไกหรือทฤษฎีการแช่แข็ง</u>

กลไกหรือทฤษฎีการแช่แข็งสามารถอธิบายได้ดังนี้ คือจากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาโดย Polge และคณะ (1949) ได้ประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาเซลล์ตัวอสุจิในรูปแช่แข็งเป็นครั้งแรกแต่น้ำเชื้อนั้นยังไม่สามารถนำมาใช้ในการปฏิสนธิภายนอกร่างกายได้ ต่อมา Polge ได้พยายามหาวิธีการเก็บรักษาเซลล์ต่างๆรวมทั้งเนื้อเยื่ออื่น ๆ เช่นไข่ (ova), ตัวอ่อน (embryo) ที่ได้หลังการปฏิสนธิในรูปแช่แข็งด้วยและพบว่าเซลล์จำเป็นต้องรักษาสภาพความปกติของโครงสร้างภายในเซลล์ตลอดกระบวนการแช่แข็ง และปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความอยู่รอดของตัวอ่อนแช่แข็ง ได้แก่ระยะการพัฒนาของตัวอ่อน, ชนิดของสารป้องกันการแช่แข็งและวิธีการแช่แข็ง ต่อมา Mazur (1980) พบว่าช่วงเวลาที่จะเป็นอันตรายต่อความอยู่รอดของเซลล์ระหว่างทำการแช่แข็งคือระยะเวลาที่เริ่มต้นทำให้เย็นลงจนถึงช่วงที่อุณหภูมิต่ำมากๆ (cold shock) และช่วงที่ทำให้เซลล์กลับไปสู่อุณหภูมิปกติ (warm shock) ซึ่งที่อุณหภูมิสูงกว่า - 80 องศาเซลเซียส เซลล์ส่วนใหญ่จะสูญเสียความอยู่รอดแต่ที่อุณหภูมิต่ำกว่า - 130 องศาเซลเซียสจะมีพลังงานไม่เพียงพอ

สำหรับปฏิกริยาใดๆ และที่อุณหภูมิเหล่านี้เซลล์จะสูญเสียน้ำออกจากเซลล์ สำหรับอันตรายของการเก็บรักษาเซลล์หรือตัวอ่อนที่อุณหภูมิ - 196 องศาเซลเซียส คือ เกิดการแตกสลายของดีออกซีไรโบนิวคลีอิค เอซิด (deoxyribonucleic acid ; DNA) โดย Mazur (1984) ได้สรุปเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นระหว่างการแช่แข็งดังนี้คือ เมื่อเซลล์ถูกทำให้เย็นลงถึงอุณหภูมิ - 5 องศาเซลเซียส และ -15 องศาเซลเซียสจะมีผลึกน้ำแข็งเกิดขึ้นเป็นอันดับแรกในน้ำยาเพาะเลี้ยงนอกเซลล์ (extracellular medium) โดยผลึกน้ำแข็งนั้นจะยังไม่สามารถข้ามเซลล์เมมเบรนไปได้เนื่องจากมีผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ (intracellular) ป้องกันไว้ โดยไซโตพลาสซึมเกิดความเย็นสูง(supercooling) ด้วยตัวของมันเองทำให้มีศักยภาพทางเคมี (chemical potential) มากกว่าสารละลายที่เป็นน้ำแข็งภายนอกเซลล์ ต่อมาน้ำจะเคลื่อนออกนอกเซลล์จากด้านที่มีศักยภาพทางเคมีสูงไปยังเซลล์ส่วนที่มีศักยภาพทางเคมีต่ำกว่า และเคลื่อนออกจากส่วนที่เป็นน้ำแข็งในที่สุด ถ้าเซลล์ถูกทำให้เย็นลงช้าเพียงพอ การเคลื่อนย้ายมวลของน้ำออกจากเซลล์จะลดความแตกต่างของศักยภาพทางเคมีส่งผลให้น้ำเคลื่อนออกจากเซลล์เร็วขึ้น ทำให้ไม่เกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ (intracellular ice formation) มากเกินไป ในทางตรงกันข้ามถ้าเซลล์ถูกทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วก็อาจจะไม่มีเวลาเพียงพอสำหรับการเคลื่อนย้ายน้ำออกจากเซลล์ ส่งผลให้ส่วนประกอบภายในเซลล์เกิดความเย็นสูงเป็นผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ได้ซึ่งจะพบได้เมื่อลดอุณหภูมิลงมากกว่า - 15 องศาเซลเซียส โดยกลไกการเกิด cold shock และ warm shock นี้คล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Leibo (1977) ที่พบว่าอันตรายที่สำคัญอย่างหนึ่งของการแช่แข็งคือการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์มากเกินไปซึ่งปัญหานี้เกิดจากน้ำในเซลล์ไหลออกไม่เพียงพอจึงเกิดการแข็งตัวภายในเซลล์ (cold shock) น้ำแข็งที่แข็งตัวภายในเซลล์ดังกล่าวจะขยายตัวอย่างมากเมื่อเวลาทำการละลายจนทำลายยูนิตต่าง ๆ ของเซลล์ได้ (warm shock) ดังนั้นจึงต้องพยายามดึงน้ำออกจากเซลล์ให้มากที่สุดก่อนเซลล์จะถูกแช่แข็ง วิธีที่สำคัญคือการใช้อัตราเร็วของการแช่แข็งที่ช้ามากประมาณ 0.2 - 2.0 องศาเซลเซียสต่อนาที สำหรับวิธีการแช่แข็งนั้นอาจกล่าวได้ว่ามี 2 วิธีคือ วิธีช้าและวิธีเร็ว วิธีช้าหมายถึง การลดอุณหภูมิขั้นสุดท้ายก่อนใส่ในไนโตรเจนเหลวจนถึง - 80 องศาเซลเซียสและถึง - 110 องศาเซลเซียส ซึ่งจะมีการไหลออกของน้ำในเซลล์เกิดขึ้นอย่างมากจนเกือบหมด ส่วนวิธีเร็วใช้เวลาสั้นกว่าโดยลดอุณหภูมิจนถึงประมาณ - 30 องศาเซลเซียสและถึง - 40 องศาเซลเซียส ซึ่งน้ำยังออกจากเซลล์ไม่หมดดังนั้นจะมีน้ำบาง

ส่วนที่ยังเหลืออยู่ในเซลล์และแข็งตัวอยู่ภายในเซลล์ แต่ทั้ง 2 วิธีก็ต้องใช้อัตราเร็วของการแช่แข็งที่ช้ามากดังกล่าวข้างต้น เพราะอุณหภูมิต่ำสุดก่อนใส่ในไนโตรเจนเหลวจะมีผลต่ออัตราเร็วตอนละลายด้วย โดยก่อนหน้านี้ Merymann (1968) เคยพบว่าความเสียหายที่เกิดขึ้นจากการแช่แข็งอาจจะเป็นผลจากการเพิ่มความเข้มข้นของอิเลคโตรไลค์ทั้งภายในและภายนอกเซลล์ จึงเป็นสาเหตุให้ลดความคงตัวของเซลล์เมมเบรน นอกจากนี้ Lovelock (1953) ยังพบว่าสารป้องกันการแช่แข็งช่วยลดความเข้มข้นของอิเลคโตรไลค์ในสารละลายที่ยังไม่แข็งตัว ซึ่งจะช่วยป้องกันเซลล์ไม่ให้เกิดความเสียหายจากความเย็นขณะทำการแช่แข็งโดยสารป้องกันการแช่แข็งจะทำให้ความเข้มข้นของตัวถูกละลายในสภาวะของเหลวทั้งภายในเซลล์ และภายนอกเซลล์คงที่สำหรับอุณหภูมิที่ได้รับในขณะนั้น ซึ่งการเพิ่มความเข้มข้นของสารป้องกันการแช่แข็ง เช่น กลีเซอรอลขนาดน้อย ๆ จะให้ผลเหมือนเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมที่แต่ละช่วงอุณหภูมิและเนื่องจากกลีเซอรอลมีผลเสียน้อยกว่าโซเดียม จึงช่วยป้องกันเซลล์ไม่ให้เกิดอันตรายจากความเย็นได้ ดังรายงานการวิจัยของ Fiser และFairful (1986) ที่พบว่าความเสียหายของอะโครโซมตัวอสุจิเป็นผลจากการลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งเกี่ยวข้องกับอัตราเร็วในการลดอุณหภูมิและอุณหภูมิสุดท้ายก่อนทำการแช่แข็งน้ำเชื้อ และนอกจากนี้ Watson (1981) กับ Amann และ Pickett (1987) เสนอว่าอัตราเร็วในการละลายมีส่วนเกี่ยวข้องกับความเสียหายที่จะเกิดกับอะโครโซมของตัวอสุจิด้วย อย่างไรก็ตาม Bamba และ Cran (1985) ได้แสดงให้เห็นว่าตัวอสุจิสุกรจะได้รับความเสียหายอย่างรุนแรงจากภาวะ warm shock เป็นต้น ดังนั้นการแช่แข็งเซลล์ตัวอสุจิเรามักจะใส่สารที่ช่วยป้องกันการแช่แข็งในขนาดความเข้มข้นน้อย ๆ เพื่อไม่ให้เป็นอันตรายต่อเซลล์ทำให้เซลล์ตัวอสุจิไม่ไวต่อสภาวะช็อคจากแรงดันออสโมติค (osmotic shock) จากการที่ภายในเซลล์มีสารป้องกันการแช่แข็งขนาดความเข้มข้นสูงมากเกินไป โดยทั่วไปสารป้องกันการแช่แข็งจะทำหน้าที่ป้องกันผนังเซลล์จากการที่อุณหภูมิลดต่ำลงได้ จึงได้มีการแบ่งสารป้องกันการแช่แข็งออกเป็น 2 ประเภทคือ

1. ชนิดที่ซึมผ่านผนังเซลล์ได้ ได้แก่ กลีเซอรอล (glycerol), เอททิลลีนไกลโคล (ethylene glycol), ไดเมททิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide ; DMSO), โพรพานีไดโอล (propanidiol ; PROH) สารพวกนี้ค่อนข้างเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อใช้ในขนาดความเข้มข้นสูง ๆ

2. ชนิดที่ไม่ซึมผ่านผนังเซลล์ ได้แก่ ซูโครส (sucrose) กลูโคส (glucose)

แมนนิทอล (mannitol) โพลีไวนิลไพโรลิโดน (polyvinyl pyrolidone ; PVP) และอัลบูมิน (albumin) สารพวกนี้มีพิษน้อยกว่าพวกแรก

ซึ่งโดยทั่วไปในการแช่แข็งมักใช้สารป้องกันการแช่แข็งชนิดซึมผ่านผนังเซลล์ได้ เช่น ดี เอ็ม เอส โอ (DMSO), กลีเซอรอลขนาดความเข้มข้นระหว่าง 1.0 - 2.0 โมล่าร์ (Molar ; M) เนื่องจาก Mazur (1974) พบว่าพื้นผิวเซลล์หรือผนังเซลล์เป็นตำแหน่งที่จะเกิดความเสียหายขณะทำการแช่แข็ง นอกจากนี้ Rall และคณะ (1983) ก็พบว่าการเติมสารป้องกันการแช่แข็งชนิดซึมผ่านเซลล์ได้เช่นกลีเซอรอลจะช่วยป้องกันความเสียหายจากผลึกน้ำแข็งซึ่งจะเกิดภายในเซลล์ที่อุณหภูมิ - 40 องศาเซลเซียสลงไป โดย Leibo (1977) พบว่าไข่ซึ่งทำให้เย็นลงอย่างช้าๆ จะมีผลึกน้ำแข็งเกิดขึ้นภายในเซลล์เพียงเล็กน้อย และมีการหดตัวของเซลล์เกิดขึ้นระหว่างขั้นตอนการแช่แข็งทำให้มีอัตรารอดสูง อย่างไรก็ตามเซลล์ไข่ซึ่งทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วจะไม่มีการเสียน้ำและไม่มีการหดตัวของเซลล์ จึงเป็นสาเหตุให้เกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์และทำให้เซลล์ตายตามมา ส่วนสารป้องกันการแช่แข็งชนิดที่ไม่ซึมผ่านผนังเซลล์ได้รายงานไว้เป็นครั้งแรกโดย Kasai และคณะ (1981)ซึ่งพบว่าสารกลุ่มนี้เป็นพวกโมโนแซคคาไรด์(monosaccharides) เช่น กลูโคส และพวกไดแซคคาไรด์ (disaccharides) เช่น ซูโครส สารกลุ่มนี้จะส่งเสริมให้มีการสูญเสียน้ำออกจากเซลล์ (cell dehydration) ทำให้ไม่เกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์

สำหรับการประเมินผลการแช่แข็งเซลล์ตัวอสุจิสามารถประเมินได้จาก

1. รูปร่างลักษณะของตัวอสุจิ (ทั้งหัวอสุจิและหางอสุจิ) โดยการย้อมสี eosin nigrosin หรือดูจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสง (phase contrast) กำลังขยาย 10 - 40 เท่า

2. คุณภาพของน้ำเชื้อ โดยอาจจะตรวจดูด้วยตาเปล่าหรือใช้กล้องจุลทรรศน์ก็ได้

3. อัตราความสำเร็จในการปฏิสนธิ ในรูปแบบการผสมเทียมหรือการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย

ซึ่งในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้เลือกประเมินผลการแช่แข็งน้ำเชื้อสุกรจาก

1. คุณภาพน้ำเชื้อ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ตรวจดูในด้านการเคลื่อนไหวเฉพาะตัวของตัวอสุจิและความเข้มข้นของตัวอสุจิ

2. อัตราความสำเร็จในการผสมติด ในรูปแบบการปฏิสนธิภายนอกร่างกายเป็นเกณฑ์ เนื่องจากเทคนิคนี้สามารถตรวจสอบผลอัตราความสำเร็จหลังการปฏิสนธิได้รวดเร็วโดยดูจากอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนตั้งแต่ 24 ชั่วโมงเป็นต้นไป

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำหรับเกณฑ์การตัดสินการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อโดยตรวจดูการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ ตัดสินเอาเฉพาะตัวอสุจิที่มีการเคลื่อนไหวไปข้างหน้าเท่านั้น และแบ่งอัตราการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิเป็นเปอร์เซนต์ ซึ่งจะกล่าวไว้ในวิธีทำการทดลองต่อไป

สำหรับการตรวจความเข้มข้นของตัวอสุจิทั้งก่อนและหลังทำการ swim up ได้เลือกใช้วิธีฮีโมไซโตมิเตอร์ (haemocytometer)เนื่องจากวิธีนี้นิยมใช้กันและให้ผลที่ถูกต้อง เครื่องมือนี้ประกอบด้วยสไลด์นับเม็ดเลือด , กระจกบางปิดทับ , ปิเปต และสายยางดูด การใช้เครื่องมือนี้ต้องมีการเจือจางน้ำเชื้อเสียก่อน โดยใช้ 3 % NaCL ซึ่งจะทำให้ตัวอสุจิไม่เคลื่อนไหวสะดวกแก่การนับ โดยอัตราส่วนในการเจือจางน้ำเชื้อสุกรมักใช้อัตราส่วน 1 : 200 (เตือนตา , 2533) สำหรับขั้นตอนการตรวจความเข้มข้นของตัวอสุจิจะได้กล่าวในวิธีทำการทดลองต่อไป

น้ำยาเพาะเลี้ยงสำหรับเพาะเลี้ยงตัวอ่อนสุกรนอกร่างกาย

Beckmann และ Day (1991) พบว่าตัวอ่อนสุกรระยะ 1 - 2 เซลล์ สามารถผ่านระยะ 4 เซลล์เข้าสู่ระยะบลาสโตซีสได้โดยเพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิดธรรมดา(simple medium) เช่น น้ำยา mKRB (Kreb ' s Ringer Bicarbonate medium), น้ำยา Whitten ส่วนน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิดซับซ้อน (complex medium) เช่น น้ำยาบีทู (B_2 medium) จะช่วยให้ตัวอ่อนของแม่โคเจริญเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสได้ โดยมงคล (2536) พบว่าตัวอ่อนสุกรหลังปฏิสนธิที่เลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิดซับซ้อน B_2 + 10 % FCS (fetal calf serum) จะช่วยให้ตัวอ่อนสุกรพัฒนาเข้าสู่ระยะ 2 เซลล์ 39 % และพัฒนาเข้าสู่ระยะ 4 - 8 เซลล์ 25 % ตามลำดับ ซึ่งสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของตัวอ่อนในการเพาะเลี้ยงระยะแรกจะมีการเปลี่ยนแปลงความต้องการสารให้พลังงาน คือ ก่อนระยะ 8 เซลล์ แหล่งให้พลังงานที่สำคัญคือออกซาโลอะซิเตท (oxaloacetate) หรือไพรูเวท (pyluvate) (Bigger et al., 1967) โดยเริ่มแรกโอโอไซต์ต้องได้รับไพรูเวท หรือออกซาโลอะซีเตทในน้ำยาเพาะเลี้ยง เมื่อเข้าสู่ระยะ 2 เซลล์ แหล่งให้พลังงานอาจเป็นแลคเตท (lactate), ออกซาโลอะซิเตท , ไพรูเวท หรือฟอสโฟอีนอล ไพรูเวท (phosphoenol pyluvate) Brinster (1965) เชื่อว่าการใช้แลคเตท ไพรูเวท ซึ่งเป็นแหล่งให้พลังงานร่วมกันในน้ำยาเพาะเลี้ยง ช่วยให้เอมบริโอสามารถปรับตัวอยู่ในสภาวะแวดล้อมของน้ำยาเพาะเลี้ยงได้ดีขึ้น ส่วนกลูโคสจะเป็นแหล่งพลังงานที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตระยะ 2 - 6 เซลล์ เมื่อเอมบริโอเจริญจนถึงระยะบลาสโตซีส หรือช่วงที่กำลังฝังตัวความต้องการที่จะใช้พลังงานในการเผาผลาญจะคล้ายคลึงกับเซลล์ที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้ว

ดังนั้นการศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงต้องทำการศึกษาเกี่ยวกับการเลือกใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อนก่อนทำการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนสุกรนอกร่างกายระหว่างน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิดธรรมดา (mKRB ' s medium)และน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิดซับซ้อน (B_2 medium) เพื่อเลือกน้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อนสุกรที่เหมาะสมมาใช้ในการทำวิจัยครั้งนี้ เนื่องจากเคยมีรายงานว่าไพรูเวทซึ่งเป็นส่วนประกอบใน B_2 medium ยับยั้งการเจริญของเอมบริโอสุกรระยะ 4 เซลล์ (Davis and Day ., 1978)

วัตถุประสงค์ในการวิจัย

1. ศึกษาผลของระยะเวลาและอุณหภูมิในการเก็บน้ำเชื้อแช่เย็น และน้ำเชื้อแช่แข็งต่ออัตราความสำเร็จในการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย

2. เปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อสดเจือจางระหว่างน้ำเชื้อแช่เย็นและน้ำเชื้อแช่แข็งต่ออัตราความสำเร็จในการปฏิสนธิภายนอกร่างกายสุกร

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ช่วยลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการเลือกน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีมาใช้ในการผสมเทียมสุกร เนื่องจากสามารถตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อหลังเจือจางทั้งในรูปน้ำเชื้อแช่เย็นและน้ำเชื้อแช่แข็งได้รวดเร็วกว่าการผสมเทียม โดยดูความสามารถหรืออัตราความสำเร็จในการปฏิสนธิภายนอกร่างกายเป็นเกณฑ์

2. ทำให้ทราบถึงช่วงระยะเวลาและระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเก็บรักษาน้ำเชื้อสดเจือจางของสุกร เพื่อนำไปใช้ในการปฏิสนธิภายนอกร่างกายหรือการผสมเทียม