บทที่ 1

บทนำ

ในบรรดาสัตว์เศรษฐกิจที่เลี้ยงกันอยู่ในปัจจุบัน กระบือ (Bubalus bubalis L.) นับว่าเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญกับมนุษย์มาช้านาน กระบือเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้อง (ruminant animal) เช่นเดียวกับโค แพะ และแกะ สามารถใช้อาหารหยาบ เช่น หญ้า ที่อยู่ตามไร่นา ซึ่งมีคุณภาพไม่ดีนักเปลี่ยนมาเป็น เนื้อ หนัง และผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อมนุษย์ ซึ่งรวมทั้งแรงงานด้วย ในสภาพความเป็นจริงแล้ว ถ้าพิจารณาในด้านความทนทานต่อสภาพแวดล้อม กระบือมีความเหมาะสมที่จะเลี้ยงมากกว่าโค ถึงแม้ว่าในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้หันมาสนใจ ที่จะศึกษาวิจัยเรื่องของกระบือมากขึ้น แต่วิทยาการด้านกระบือก็มีสิ่งที่ต้องการศึกษาค้นคว้าอีกมาก เพราะการเลี้ยงกระบือส่วนมากอยู่ทางแถบเอเชีย งานวิจัยของกระบือจึงมีน้อยเมื่อเทียบกับโค เนื่องจากงานวิจัยส่วนใหญ่มาจากประเทศทางตะวันตก ซึ่งนิยมเลี้ยงโคมาเป็นเวลานาน

สำหรับประเทศไทย สัตว์จำพวกโคกระบือ นับว่ามีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศเป็นอย่างมาก ในปัจจุบันจำนวนโคกระบือไม่เพิ่มขึ้นเท่าที่ควร เมื่อเทียบกับจำนวนของประชากร เนื่องจากกระบืออุ้มท้องนานกว่าโคประมาณ 35 วัน และอายุการเป็นหนุ่มสาวช้ากว่าโคประมาณ 6 เดือน (ประสบ บูรณมานัส, 2520) นอกจากนี้จากการศึกษาทางต่อมไร้ท่อเรื่องฮอร์โมนเพศ พบว่า กระบือปลัก มีวงจรสัด (oestrus cycle) ไม่สม่ำเสมอ และมีระยะเวลาเป็นสัดยาวนานกว่าโค คือ เป็นได้ตั้งแต่ 24-72 ชั่วโมง (มณีวรรณ กมลพัฒนะ และสรรเพชญ โสภณ, 2530) จึงทำให้การเพิ่มจำนวนของกระบือทำได้ช้ากว่าโค ทั้ง ๆ ที่กระบือมีความเหมาะสมที่จะเลี้ยงในประเทศไทยได้ง่ายกว่าโค การศึกษาการปฏิสนธิในหลอดแก้วของกระบือ จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่จะได้พัฒนาการเพิ่มปริมาณของกระบือ โดยใช้เทคนิคขั้นสูง

เป็นที่ทราบกันแล้วว่าในบรรดาสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมนั้น การที่อสุจิจะสามารถปฏิสนธิกับไข่ได้จะต้องผ่านกระบวนการที่เรียกว่า การคาพาซิเตท (capacitation)(Austin,1951; Chang,1951) โดยที่อสุจิจะต้องผ่านขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ หลายอย่างเช่น เซลล์อสุจิมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง เพื่อให้สามารถเข้าปฏิสนธิกับไข่ได้ นอกจากนี้โครงสร้างของอสุจิยังเปลี่ยนแปลงต่อไปอีก เมื่อเกิดอะโครโซม รีแอ็คชั่น (acrosome reaction) โดยอสุจิจะปล่อยเอ็นไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (hyaluronidase) และอะโครซิน (acrosin) เพื่อสลายคิวมูลัส (cumulus) ของไข่ (Yanagimachi,1981)

ในสภาพในตัวสัตว์ (in vivo) อสุจิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทุกชนิดก่อนจะเป็นตัวที่สมบูรณ์ จะมีการเปลี่ยนแปลงที่ผนังของ plasma membrane และไซโตพลาสซึมในส่วนท่อเก็บอสุจิ (epididymis) เช่น มีการเปลี่ยนแปลงของประจุบนผิวเซลล์ของอสุจิ ทำให้มีการดูดซึมสารพวกไขมันเป็นต้น การที่อสุจิจะสามารถปฏิสนธิในสภาพในตัวสัตว์ได้อสุจิต้องได้รับสารซึ่งอยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ของเพศเมีย เช่น ฮอร์โมนของเพศเมีย จึงจะทำให้อสุจิเข้าปฏิสนธิได้ (Yanagimachi,1981) แต่อย่างไรก็ตามนักวิทยาศาสตร์ก็ยังไม่สามารถอธิบายถึงกลไกเหล่านี้อย่างแน่ชัด

ในสภาพหลอดทดลอง (in vitro) อสุจิสามารถปฏิสนธิกับไข่ได้ โดยการใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม และอสุจิต้องผ่านกระบวนการ คาพาซิเตท ส่วนไข่จะต้องอยู่ในสภาพที่เหมาะสม โดยการสลายคิวมูลัสเซลล์ (cumulus cell) ออก ในสภาพนี้อสุจิจะต้องเกิดอะโครโซม รีแอ็คชั่น บริเวณผิวของไซนาเพลลูซิดาของไข่ หลังจากนั้นอสุจิจึงสามารถเจาะทะลุไข่ได้ในกระต่าย สุกร โค และลิง อสุจิของสัตว์เหล่านี้เมื่อนำมาเลี้ยงในน้ำยาที่เตรียมขึ้นก็ไม่สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า อสุจิของสัตว์เหล่านี้ต้องการสารบางอย่างจากท่อระบบทางเดินสืบพันธุ์ของเพศเมียเสียก่อน จึงจะปฏิสนธิได้ แต่อสุจิของสัตว์พวก หนูถีบจักร (mouse) หนูขาว (rat) หนูตะเภา (guinea pig) และมนุษย์ จะสามารถเข้าปฏิสนธิกับไข่ได้เมื่อนำมาบ่มเลี้ยงในน้ำยาสังเคราะห์ (Rogers,1978)

ในสภาพหลอดทดลองมีการค้นพบสารเคมีชนิดหนึ่งชื่อว่า ไกลโคซามิโนไกลแคน (glycosaminoglycans) เป็นสารที่ส่งเสริมการเกิดอะโครโซม รีแอ็คชั่น สูงขึ้น (Parrish และคณะ,1980) ในปี ค.ศ. 1984 Lee และ Ax ได้พยายามแยกสกัดสารนี้จากท่อนำไข่ มดลูกและปากมดลูกของโค จำนวน 104 ตัว พบว่า ความเข้มข้นของสารนี้จะลดลงไปตามลำดับ จากท่อนำไข่ไปยังปากมดลูกอย่างมีนัยสำคัญ ต่อมาในปี 1985 Lee และคณะ ได้รายงานเพิ่มเติมว่าการกระตุ้นกระบวนการเกิด อะโครโซมรีแอ็คชั่น ของสารนี้ให้ดีขึ้นจะต้องมีเซมินัล พลาสม่า (seminal plasma) ร่วมอยู่ด้วย โดยเขาได้เสนอว่า เซมินัล พลาสม่า จะไปเปลี่ยนแปลงความสามารถของอสุจิในการตอบสนองต่อสารไกลโคซามิโนไกลแคน และความเข้มข้นที่สูงของสารทั้งสองชนิดนี้ อาจจะไปขัดขวางกระบวนการเริ่มต้นที่จำเป็นต่อการเกิดอะโครโซมรีแอ็คชั่น

ในปี 1982 Handrow และคณะ ได้รายงานว่า เฮปาริน (heparin) เป็นสารไกลโคซามิโนไกลแคน ที่มีชัลเฟตสูงที่สุด และสามารถชักนำให้เกิดอะโครโซม รีแอ็คชั่นได้สูงที่สุดในวัว ต่อมาก็ได้มีการใช้เฮปารินกันอย่างแพร่หลาย ในการชักนำให้อสุจิเกิดอะโครโซม รีแอ็คชั่น (Lee และคณะ,1985; Parrish และคณะ,1985; Lu และคณะ,1987; Fukui และ Ono,1983, 1990; Miller และ Ax,1990)

ดังนั้นในการศึกษาวิธีการคาพาซิเตทอสุจิกระบือในหลอดแก้ว เพื่อหาสภาพที่เหมาะสมที่สุด จึงเป็นความรู้พื้นฐานที่จำเป็นในการนำไปใช้การศึกษาวิจัย การปฏิสนธิของกระบือในหลอดแก้ว (in vitro fertilization) และการย้ายฝากตัวอ่อน (embryo transfer) เพื่อที่จะได้ผลิตกระบือ โดยอาศัยเทคนิคนี้ต่อไป ในทางปฏิบัตินั้นการศึกษาความสามารถในการเจาะทะลุไข่ในสัตว์เศรษฐกิจ เช่น กระบือเป็นสิ่งที่ทำได้ยาก เพราะสัตว์เหล่านี้มีวงจรการเป็นสัดที่ยาวนาน และจำนวนไข่ก็มีน้อย การที่จะนำไข่ของสัตว์เหล่านี้มาทดลองโดยตรงเป็นจำนวนมาก ๆ จึงเป็นสิ่งที่ลำบากและไม่คุ้มในการลงทุน จึงได้มีแนวความคิดที่จะใช้ไข่ของสัตว์ทดลองแทน นั่นก็คือไข่ของแฮมสเตอร์สีทองที่ไม่มีชั้นโซนาเพลลูซิดา ซึ่งเรียกว่า zona-free hamster egg เมื่อปี ค.ศ. 1976 Yanagimachi และคณะ ได้พบว่า อสุจิของมนุษย์

สามารถเจาะผ่านไข่ของแฮมสเตอร์สีทองที่ไม่มีชั้นไซนาเพลลูซิดาได้ เมื่ออสุจิได้ผ่านกระบวนการคาพาซิเตท และอะโครโซม รีแอ็คชั่นแล้ว ต่อมาจึงได้มีการนำเอาเทคนิคนี้มาพัฒนาใช้กับสัตว์ชนิดอื่นอย่างแพร่หลาย เพื่อทดสอบการคาพาซิเตท และ อะโครโซมรีแอ็คชั่น เช่น โค (Hanada และ Nagase,1981; Graham และคณะ,1987) สุกร (Imai และคณะ,1977; Pavlok,1981) แต่ในกระบือยังไม่มีผู้รายงานการศึกษา

การปฏิสนธิในหลอดแก้วนั้น เมื่ออสุจิเจาะทะลุไข่เข้าไปแล้วจะมีการเปลี่ยนแปลงที่นิวเคลียสของอสุจิเกิดเป็นโปรนิวคลีไอ (pronuclei) ถ้านำเอาไข่นี้ไปเลี้ยงต่อจนถึงการแบ่งเซลล์ในระยะ first cleavage ก็จะสามารถเห็นโครโมโซมของอสุจิได้ ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งที่จะนำไปสู่การศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ (fertility) ของพ่อพันธุ์ และนอกจากนี้ยังสามารถทราบเพศของอสุจิด้วยโดยดูที่โครโมโซมเพศ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการปฏิสนธิในหลอดแก้วและการย้ายฝากตัวอ่อน ในปี ค.ศ. 1978 Rudak และคณะ ได้ประสบผลสำเร็จในการศึกษาโครโมโซมจากอสุจิของมนุษย์เป็นครั้งแรก ต่อมาก็มีการนำเอาเทคนิคนี้ไปใช้ในสัตว์อื่น ๆ บ้าง แต่ไม่เป็นที่แพร่หลายนัก อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ยังมีห้องปฏิบัติการเพียงไม่กี่แห่งเท่านั้นที่ประสบผลสำเร็จ

<u>วัตถุประสงค์</u>

- เพื่อศึกษาการคาพาซิเตทอสุจิของกระบือปลักโดยใช้เฮปาริน
- เพื่อศึกษาขั้นตอนและวิธีการในการเตรียมโครโมโซม จากอสุจิกระบือปลักภายหลังปฏิสนธิกับไข่แฮมสเตอร์ที่ไม่มีชั้นไซนาเพลลูซิดา

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- ทราบถึงวิธีการที่เหมาะสมในการคาพาซิเตทอสุจิกระบือปลัก โดยใช้เฮปาริน
- ทราบขั้นตอนและวิธีการในการศึกษาโครโมโซมจากอสุจิของกระบือปลัก
- ทราบถึงความสมบูรณ์พันธุ์ของกระบือปลักพ่อพันธุ์โดยดูจากความสามารถของอสุจิในการเจาะไข่หนูแฮมสเตอร์ที่ไม่มีชั้นโซนาเพลลูซิดา
- ความรู้ที่ได้สามารถนำมาเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้กับสัตว์เศรษฐกิจชนิดอื่นต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

ในการศึกษาโครโมโซมจากอสุจิของกระบือนั้น จำเป็นต้องอาศัยพื้นฐานของการคาพาซิเตท และต้องใช้เทคนิคที่อาศัยความชำนาญในการทดลอง ในขั้นนี้จึงเป็นเพียงแนวทางเบื้องต้นเท่านั้น จำเป็นจะต้องมีการฝึกฝนต่อไป ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาพอสมควร

ข้อจำกัดในการวิจัย

เนื่องจากการวิจัยต้องใช้สัตว์ทดลองเป็นจำนวนมาก จึงต้องทำการผลิตสัตว์ทดลองเอง ระยะเวลาในการวิจัยจึงยาวนาน การศึกษาโครโมโซมของอสุจิต้องอาศัยเทคนิคและความชำนาญโดยเฉพาะ และไม่สามารถจะศึกษาโครโมโซมของอสุจิโดยตรงได้ ต้องอาศัยไข่จากแฮมสเตอร์ที่ผ่านการปฏิสนธิเป็นจำนวนมาก ซึ่งในจำนวนเหล่านี้มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้น ที่สามารถพัฒนาไปเป็นโครโมโซมของอสุจิได้

การตรวจสอบเอกสาร

ในปี ค.ศ. 1951 Austin และ Chang ได้พบว่า การที่อสุจิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะสามารถปฏิสนธิไข่ได้ เซลล์อสุจิจะต้องผ่านกระบวนการที่สำคัญอย่างหนึ่งที่เรียกว่า การคาพาซิเตท ซึ่งหมายถึงความต้องการ เพื่อความพร้อมของอสุจิที่จะปฏิสนธิกับไข่ อสุจิมีการเปลี่ยน

แปลงหลายอย่างในระหว่าง การคาพาซิเตท เพื่อเข้าปฏิสนธิกับไข่ได้ การเปลี่ยนแปลงนี้มีทั้งทางด้านโครงสร้างของอสุจิ (Austin,1952) และเปลี่ยนแปลงทางด้านเมตาโบลิซึม เช่น อสุจิมีการใช้ออกซิเจนมากขึ้น (Murdoch และ White,1967)

กระบวนการ คาพาซิเตท เกิดขึ้นไม่เฉพาะเจาะจงสำหรับสัตว์แต่ละชนิด (non species specific interaction) หากแต่กระบวนการนี้สามารถชักนำให้เกิดได้ในหลอดทดลองที่มีน้ำยาเพาะเลี้ยงอยู่ มีผู้รายงานว่า กระบวนการคาพาซิเตท เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสองอย่างในเซลล์อสุจิ คือ หนึ่ง ความสามารถในการเกิดอะโครโซมริแอ็คชั่นในการตอบสนองต่อระดับที่เหมาะสมของ แคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) (Yanagimachi และ Usui, 1974) และสอง การเปลี่ยนแปลงรูปแบบการพัดโบกของหางอสุจิ (flagella beat) ที่เรียกว่า hyperactivated motility เพื่ออสุจิจะว่ายเข้าผสมกับไข่ (Yanagimachi, 1981)

การคาพาซิเตท อาจเกิดขึ้นโดยไม่เฉพาะเจาะจงต่ออวัยวะ เช่น อสุจิของกระต่ายสามารถเกิดการคาพาซิเตทได้ใน ลำไส้ใหญ่ และกระเพาะปัสสาวะ (Noyes และคณะ,1985) แต่ก็เกิดขึ้นเพียงบางส่วนมากกว่าที่จะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ (Bedford,1970)

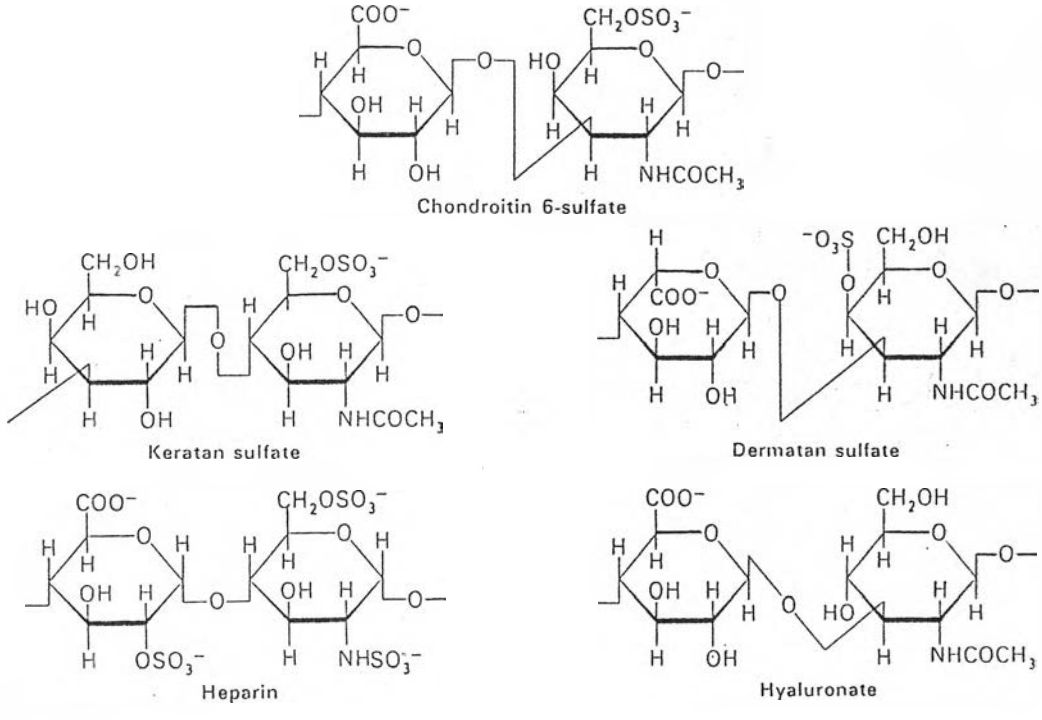
จากที่กล่าวมาแล้วว่า คุณสมบัติอย่างหนึ่งของการเกิดคาพาซิเตชั่น ก็คือ ความสามารถในการเกิดอะโครโซม รีแอ็คชั่น ในการตอบสนองต่อระดับแคลเซียมอิออน อะโครโซมรีแอ็คชั่นเป็นกระบวนการขั้นแรกที่สำคัญก่อนที่อสุจิจะเจาะเข้าไปในไข่ การชักนำให้เกิดกระบวนการนี้ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง จะขึ้นอยู่กับสารที่อยู่ที่เปลือกไข่ ในพวกปลาดาว และหอยเม่น สารดังกล่าวนี้ก็คือ ฟูโคสซัลเฟต ริชโพลีแซคคาไรด์ (fucose sulfate rich polysaccharide) ที่จะเกิดปฏิกิริยากับอสุจิ ในการที่จะยินยอมให้แคลเซียมอิออน ไหลเข้ามา (Dar,1956) ในไข่ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมก็มีการสร้างสารบางอย่างที่ชักนำให้เกิดอะโครโซมรีแอ็คชั่น

ในปี 1985 Meizel ได้รายงานว่า สามารถกระตุ้นให้เกิดอะโครโซม รีแอ็คชั่นได้ โดยใช้สารดังต่อไปนี้คือ ซีรัม อัลบูมิน (serum albumin), ไฮโดรไลติก เอนไซม์ (hydrolytic enzyme),เอสตาไดออล (estadiol), ซัลเฟตคอนเทนนิง เบตาอมิโนแอซิด (sulfate containing β amino acid) และไกลโคซามิโนไกลแคน พบว่าสารชีวโมเลกุลดังกล่าว จำเป็นในการกระตุ้นให้เกิดอะโครโซม รีแอ็คชั่นในหลอดทดลอง และในปีเดียวกัน Lee และคณะ (1985) ก็ได้ศึกษาพบว่าสารพวกไกลโคซามิโนไกลแคน เช่น heparin, heparan sulfate, chondroitinsulfate, keratan sulfate, dermatan sulfate และ hyaluronic acid สามารถชักนำให้เกิดอะโครโซมรีแอ็คชั่นในอสุจิของโคในหลอดทดลอง นอกจากสารดังกล่าวยังพบว่าสารไลโซฟอสฟาติดิลโคลีน (lysophosphatidyl choline) ก็สามารถทำให้เกิดอะโครโซมรีแอ็คชั่นได้เหมือนกัน (Graham และคณะ,1986; Parrish และคณะ,1989) สูตรโครงสร้างของสารไกลโคซามิโนไกลแคน แสดงในรูปที่ 1.1

Lee (1985) ได้รายงานว่า เฮปาริน สามารถกระตุ้นให้เกิดอะโครโซม รีแอ็คชั่นในโค ได้มากกว่าไกลโคซามิโนไกลแคนตัวอื่น ๆ และพบว่า คอนดรอยติน ซัลเฟต (chondroitin sulfate) ให้ผลในระดับกลาง ไฮยาลูโรนิค แอซิด (hyaluronic acid) ให้ผลในระดับต่ำที่สุด อย่างไรก็ตามเฮปารินในความเข้มข้นสูง ๆ (มากกว่า 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ไม่สามารถชักนำให้เกิดอะโครโซมรีแอ็คชั่นได้ การใช้สารดังกล่าวนี้ กระตุ้นให้เกิดอะโครโซมรีแอ็คชั่นในอสุจิของสัตว์ต่าง ๆ มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย เช่น ในแฮมสเตอร์ (Meizel และ Tuner,1986) ในมนุษย์ (Delgado และคณะ,1988) โดยเฉพาะในโคมีการใช้สาร เฮปารินกันมาก (Parrish และคณะ,1988,1989; Lee และ Ax,1983; Graham และคณะ,1986)

กลไกในระดับอณูของการคาพาซิเตท โดยการกระตุ้นของไกลโคซามิโนไกลแคน เช่น เฮปาริน อะโครโซม จะมีการปล่อยสารออกมา โดยวิธีเอคโซไซโตซิส (exocytosis) เข้ามาเชื่อมกับโซนาเพลลูซิดา (Wassaman,1988) การรวมของอสุจิกับโซนา เพลลูซิดา จะเกี่ยวข้องกับแกแลคโตซิลทรานเฟอเรส (galactosyl transferase) และ เอนไซม์ที่อยู่บนผิวของอสุจิ (Lopez และคณะ,1985) จากนั้นไกลโคโปรตีนชนิด ZP_3 ที่อยู่บนชั้นโซนาเพลลู

ชิดา จะเริ่มรวมกับอสุจิ และเหนี่ยวนำให้เกิดอะโครโซมรีแอ็คชั่น โดยทำปฏิกิริยากับแกแลคโตซิลทรานเฟอเรส (Wassaman,1988) อะโครโซม ประกอบด้วย ไลติคเอนไซม์ มากมาย เช่น อะโครซิน (acrosin) เซรีนโปรตีเอส (serine protease) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นในการแทรกตัวผ่านชั้นโซนาเพลลูซิดา การเชื่อมกันของหัวอสุจิกับเมมเบรนของไข่ เป็นสัญญาณจำเพาะ (recognition) ระหว่างโปรตีนกับคาร์โบไฮเดรท (Garbers,1989)



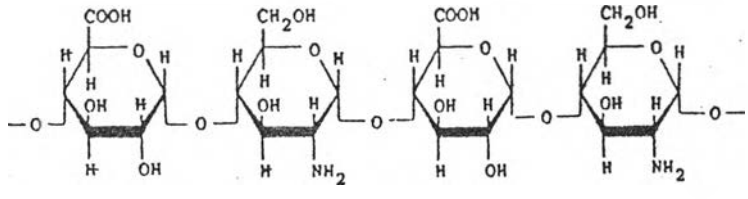
รูปที่ 1.1 แสดงสูตรโครงสร้างของสารพวกไกลโคซามิโนไกลแคน ซึ่งเป็นหน่วยที่ซ้ำกันของน้ำตาลโมเลกุลคู่ (จาก Stryer,1988)

ที่เปลือกไข่ในหอยเม่น (sea urchin) พบว่า มีคาร์โบไฮเดรท โมเลกุลร่วมระหว่าง jelly กับ fucose sulfate ที่เกี่ยวข้องกับการรวมของอสุจิกับไข่ ซึ่งสารตัวนี้เมื่อมีแคลเซี่ยม จะชักนำให้เกิดอะโครโซมรีแอ็คชั่นได้ และฤทธิ์จะลดลงเมื่อมีการดึงซัลเฟตออกไปหรือดึงโปรตีนออก (Garbers และคณะ,1983) การเกิดอะโครโซมรีแอ็คชั่นนั้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในเซลล์ โดยมีการดึงแคลเซี่ยมเข้าสู่เซลล์ของอสุจิมากขึ้น และกระตุ้นเอนไซม์อะดีนีเลท ไซเคลส (adenylate cyclase) ทำให้ระดับของไซคลิก เอเอ็มพี (c AMP) ในอสุจิมาขึ้น (Kopf และ Garbers,1980) ตัวที่สองคือ คาร์โบไฮเดรท ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ซึ่งพบในชั้น vitelline ของไข่ หลังจากที่สารในกลุ่มแรกชักนำให้เกิดอะโครโซมรีแอ็คชั่นแล้ว โปรตีนบินดิน (bindin) ที่อยู่บนหัวของอสุจิก็จะเข้าไปจับกับ vitelline layer (Vacquier และ Moy,1977) บินดินจะจับกับสารคาร์โบไฮเดรทที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง และมีคุณสมบัติเป็นโปรตีโอไกลแคน (Rossignol และคณะ,1984)

ผลกระทบของโปรตีโอไกลแคน (proteoglycans) และไกลโคซามิโนไกลแคน ที่มีบทบาทในการปฏิสนธิ ได้มีการศึกษากันมากโดยใช้อสุจิของโค Lenz และคณะ (1982) เป็นผู้ที่แสดงให้เห็นว่า คอนดรอยติน ซัลเฟต โปรตีโอไกลแคน (chondroitin sulfate proteoglycans) ที่สกัดจาก bovine folliculur fluid สามารถชักนำให้เกิดอะโครโซมรีแอ็คชั่นในอสุจิจากอิพิดิไดมิสภายใน 22 ชั่วโมง แต่ถ้าอสุจิที่หลั่งออกมาแล้ว ใช้เวลาเพียง 9 ชั่วโมง ความสามารถในการชักนำให้เกิดนี้จะลดลงถ้าบ่มสารตัวนี้กับคอนดรอยติแนส เอบีซี (chondroitinase-ABC) ทั้งนี้เพราะว่า เอนไซม์ตัวนี้จะไปย่อย side chain ของไกลโคซามิโนไกลแคน คอนดรอยติน ซัลเฟต จะกระตุ้นอัตราการปฏิสนธิและเป็นผลทางสรีรวิทยาของเซลล์ไม่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ (Lenz และคณะ,1983)

ความสำคัญของซัลเฟต จากการศึกษาเอาซัลเฟตออกจากเฮปาริน Miller และ Ax (1989) พบว่า เฮปารินที่ไม่มีซัลเฟต (รูปที่ 1.2) จะไม่สามารถจับกับอสุจิและชักนำให้เกิดการคาพาซิเตทมีหลักฐานที่บอกให้ทราบว่าเฮปารินจะออกฤทธิ์ระหว่างการคาพาซิเตท และก่อนจะเกิดอะโครโซมรีแอ็คชั่น ในอสุจิของโค เมื่อบ่มเสี้ยงอสุจิด้วยเฮปาริน เป็นเวลา 4 ชั่วโมง อสุจิสามารถปฏิสนธิกับไข่ของโค (Parrish และคณะ,1988) การบ่มเสี้ยงอสุจิโคด้วยเฮปาริน

เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จะทำให้เซลล์ง่ายต่อการที่สารไลโซฟอสฟาติดิลโคลีน ชักนำให้เกิดอะโครโซมรีแอ็คชั่น (Parrish และคณะ,1988; Florman และ First,1988) เฮปารินจะไปกระตุ้นโดยให้เกิดการสูญเสียแอนติเจนในเซลล์เมมเบรนของอสุจิใน 4 ชั่วโมง ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเกิดการคาพาซิเตท (Miller และ Hunter,1986) ถ้าอสุจิที่หลั่งออกมาถูกบ่มเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีแคลเซี่ยมต่ำและมีเฮปารินอยู่ด้วย อะโครโซม รีแอ็คชั่นจะเกิดขึ้นทันทีเมื่อเติมแคลเซี่ยมลงไป และอสุจิที่บ่มเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีแคลเซี่ยมอยู่น้อยและไม่มีเฮปารินอยู่ด้วยจะไม่เกิดอะโครโซม รีแอ็คชั่นเลย (Lee และ Ax,1983)



desulfated heparin

รูปที่ 1.2 แสดงสูตรโครงสร้างของเฮปาริน ที่ไม่มีซัลเฟต
(Windholz และ คณะ, 1976)

Lenz และคณะ (1983) พบว่าถ้าเสี้ยงอสุจิของกระต่ายที่หลั่งออกมากับเฮปาริน คอนดรอยติน-4-ซัลเฟต คอนดรอยติน-6-ซัลเฟต เดอมาแตนซัลเฟต และไฮยาลูโรนิคแอซิค จะเพิ่มการเกิดอะโครโซม รีแอ็คชั่นหลังจาก 9 ชั่วโมง ถ้าเสี้ยงอสุจิโคกับเฮปารินจะให้อัตราการเกิดอะโครโซม รีแอ็คชั่นสูงที่สุด คอนดรอยตินซัลเฟตระดับกลาง และไฮยาลูโรนิคแอซิคต่ำที่สุด

บทบาทของเฮปารินในการให้อสุจิมีความสามารถเข้าผสมกับไข่ และการจับของเฮปารินกับอสุจิเป็นบทบาทสำคัญมากในการชักนำให้เกิดการคาพาซิเตท Delgado และคณะ (1982) พบว่า เฮปารินที่ติดฉลากด้วย ^{3}H (heparin tritium) จะจับกับอสุจิของมนุษย์ในระดับ pH สูง และมีอิออนมาก หลังจากนี้ Handrow (1984) พบว่า ^{3}H-เฮปาริน จะจับกับอสุจิของโค สิง กระต่าย ^{3}H-เฮปาริน จะแยกออก เมื่อความเข้มข้นเป็น 100 nM เฮปารินที่เอาซัลเฟตออกไปแล้ว เมื่อใส่ซัลเฟตเข้าไปใหม่มันจะจับกับอสุจิได้ แต่ไม่สามารถจะเกิดการคาพาซิเตทอสุจิได้ จากหลักฐานนี้เป็นเครื่องชี้ให้เห็นว่า การจับกันอย่างเดียวไม่เพียงพอสำหรับการคาพาซิเตท (Miller และ Ax,1989) การจับกันนี้ไวต่อการเปลี่ยนแปลงมากเมื่อความเป็นกรดด่าง แคลเซี่ยม และอุณหภูมิเปลี่ยนไป ดังนั้นลักษณะการจับของเฮปาริน จึงเป็น แบบ typical receptor ligand interaction (Handrow และคณะ,1984) เฮปารินจะจับกับส่วนหัวของอสุจิเป็นส่วนใหญ่และจะเกี่ยวกับการแทรกตัวผ่านชั้นไซนาเพลลูซิดา และการเชื่อมกันกับเมมเบรนของไข่ สิ่งเหล่านี้เป็นตัวชี้ให้เห็นบทบาทของไกลโคซามิโนไกลแคนในการคาพาซิเตท

<u>โปรตีนที่จับกับเฮปารินที่อยู่ในเซลล์เมมเบรนอสุจิ</u> **(Heparin-Binding Proteins on Sperm Plasma Membranes)**

Miller และคณะ,1990 ได้ทำการศึกษาพบว่าอสุจิของโคที่ผ่านเซมินัลพลาสม่าแล้วจะมีตำแหน่งที่จะจับกับเฮปารินมากกว่าอสุจิจากคอดาอิพิดิไดมิส (cauda epididymis) ซึ่งยังไม่ได้สัมผัสกับของเหลวจากต่อมผลิตน้ำกาม (seminal vesicle) และพบว่า เซลล์เมมเบรนของอสุจิที่ผ่านเซมินัล พลาสม่า ในตัวสัตว์ หรือในหลอดแก้ว มีโปรตีนขนาด 15-17 กิโลดาลตัน (15-17 k Da) ซึ่งโปรตีนนี้ไม่พบในอสุจิของโคจากอิพิดิไดมิส จากการใช้เทคนิค Western blot พบว่าโปรตีน 15-17 กิโลดาลตันนี้จะจับกับเฮปาริน ซึ่งติดฉลากด้วย ^{125}I (^{125}I-heparin) และจากการศึกษาของ Nass และคณะ(1990) ในหนูขาว และโค ด้วยวิธี liquid chromatography พบว่า โปรตีนจับกับเฮปารินอยู่ในต่อมผลิตน้ำกาม ต่อมลูกหมาก (prostates) และต่อม bulbourethral แต่ของโคนั้นพบอยู่มากในต่อมผลิตน้ำกาม

การชักนำให้เกิดการคาพาซิเตทในอสุจิของโคโดยใช้เฮปาริน

บทบาทของเฮปารินในการชักนำให้เกิดการคาพาซิเตท จะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของระดับแคลเซี่ยมอิออน และความเป็นกรดเป็นด่างภายในเซลล์ เฮปารินจะกระตุ้นแคลเซี่ยมให้ผ่านเซลล์เข้ามา ทำให้เกิดสภาพความเป็นด่างในอสุจิของโค (Parrish และคณะ 1989; Handrow และคณะ,1986) แคลโมดูลิน (calmodulin) อาจจะเกี่ยวข้องกับเฮปารินในการกระตุ้นให้เกิดการสูญหายของโปรตีน ที่จับกับแคลโมดูลินในอสุจิของโค (LeClerc และคณะ,1988) สารที่ยับยั้งแคลโมดูลิน เช่นไตรฟลูออโรเพราซิน (trifluoroperacine) จะยับยั้งการคาพาซิเตทที่ถูกชักนำโดยสารไกลโคซามิโนไกลแคน (Lenz และคณะ,1982) ดังนั้นกลไกอันหนึ่งที่ชักนำให้เกิดการคาพาซิเตทโดยเฮปาริน อาจจะเกี่ยวข้องกับการจับกับอสุจิและการเปลี่ยนแปลงโปรตีนที่เซลล์เมมเบรนของอสุจิโดยไปกระตุ้นทางผ่านของอิออน แล้วทำให้มีการเพิ่มแคลเซียมและความเป็นกรดเป็นด่างในเซลล์ อะโครโซมรีแอ็คชั่นที่ถูกกระตุ้นโดยฟูโคส ซัลเฟตไกลโคคอนจูเกต (FSG) ในอสุจิหอยเม่นจะเกี่ยวข้องกับการไหลผ่านของแคลเซียมเข้าสู่เซลล์และผลักโปรตอนออกจากเซลล์เมมเบรนของอสุจิ (Shapiro และคณะ,1981)

สรุปแล้วกระบวนการชักนำให้เกิดการคาพาซิเตทโดยเฮปารินมีอยู่สองปัจจัยคือ การเพิ่มขึ้นของระดับความเป็นกรดด่างและการไหลผ่านของแคลเซียมภายในเซลล์อสุจิ จากนั้นผลที่ได้เหมือนกับการถูกชักนำโดยโซนาเพลลูซิดาในตัวสัตว์ คือ เมื่อเกิดการคาพาซิเตทแล้วก็เกิดอะโครโซมรีแอ็คชั่นตามมา

การคาพาซิเตทอสุจิกระบือ

Sidhu และคณะ (1984) ได้ศึกษาการคาพาซิเตทอสุจิกระบือ โดยใช้น้ำยาเพาะเลี้ยง BWW (Bigger Whitten Whittingham) ที่เสริมด้วย bovine serum albumin และสารที่สกัดจากต่อมหมวกไต (adrenal glands) ของหนูขาว ซึ่งเป็นปัจจัยช่วยในการเคลื่อนไหวของอสุจิ และชักนำให้เกิดอะโครโซมรีแอ็คชั่นโดยแคลเซียมอิออน ความเข้มข้น 5

มิลลิโมลาร์ ตรวจสอบการเกิดการคาพาซิเตท โดยสังเกตการเคลื่อนไหวของอสุจิจากการพัดโบกของหาง (whisplash flagella movement) และสังเกตการเกิดอะโครโซมรีแอ็คชั่น โดยการเลี้ยงอสุจิเป็นเวลา 8 ชั่วโมง เมื่อคัดเลือกอสุจิที่เกิดการคาพาซิเตทแล้ว ก็นำมาใส่ในสารละลายที่มีแคลเซียมอิออน (ความเข้มข้นสุดท้าย 5 มิลลิโมลาร์) เป็นเวลา 5-10 นาที หลังจากนั้นเก็เอาอสุจิไป เกลี่ยบาง ๆ บนสไลด์และย้อมสี Giemsa ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อดูอะโครโซม พบว่าสาร ที่สกัดจากต่อมหมวกไตช่วยให้เปอร์เซนต์ของอสุจิมีชีวิตสูงขึ้น และสามารถอยู่ในน้ำยาเพาะเลี้ยงได้นานขึ้น

Singh และคณะ (1989) ได้ศึกษา การปฏิสนธิในหลอดแก้วของกระบือ โดยนำอสุจิกระบือที่แช่แข็งมาแยกอสุจิที่มีชีวิตด้วยวิธีให้อสุจิว่ายต้านแรงดึงดูดของโลก (swim up) และใช้เฮปาริน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการชักนำให้เกิดการคาพาซิเตท เมื่อเติมด้วย 10% fetal calf serum และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของ follicle stimulating hormone (FSH) ลงในน้ำยาเพาะเลี้ยง ทำให้ได้เปอร์เซนต์การปฏิสนธิสูงถึง 80%

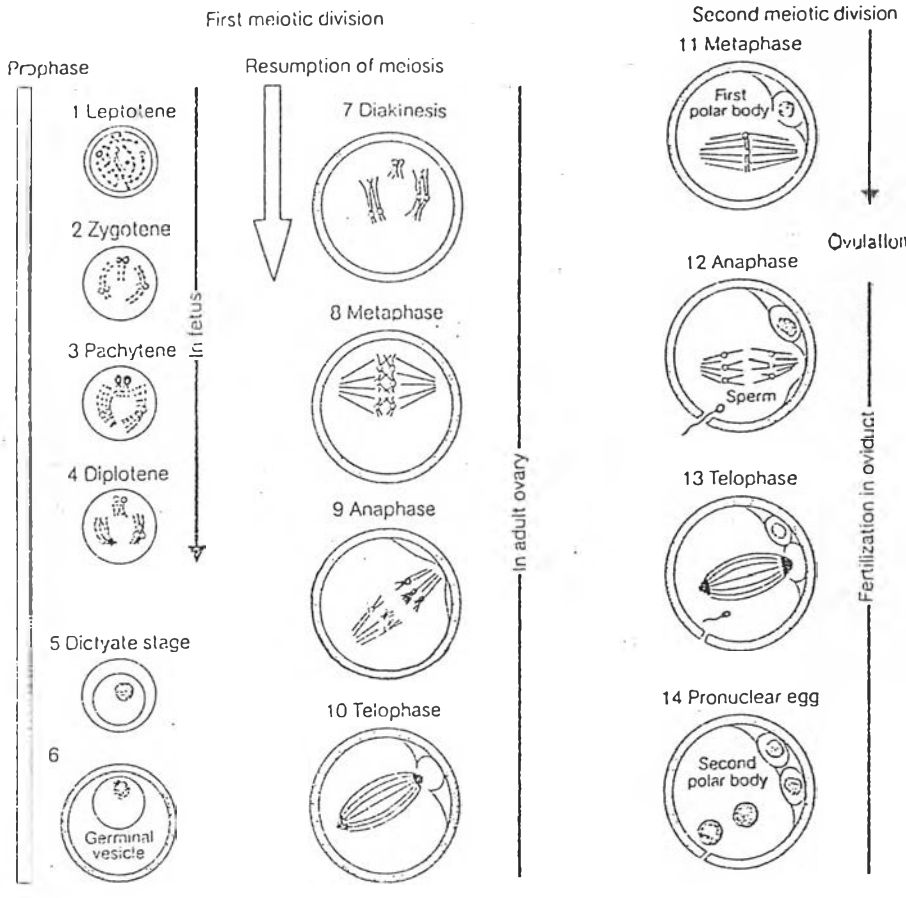
<u>การใช้ไข่ของแฮมสเตอร์ที่ไม่มีชั้นโซนาเพลลูซิดาทดสอบอสุจิ</u>

หลังจากที่ Yanagimachi และคณะ (1976) ได้พบว่า ไข่ของแฮมสเตอร์ที่ไม่มีโซนาเพลลูซิดาสามารถที่จะปฏิสนธิกับอสุจิของมนุษย์ที่ผ่านกระบวนการคาพาซิเตท และอะโครโซมรีแอ็คชั่น ข้อสังเกตอันนี้ก็ถูกนำมาใช้ในการศึกษาขั้นพื้นฐานสำหรับวิเคราะห์ความสามารถในการปฏิสนธิของอสุจิในสัตว์ต่าง ๆ เช่น มนุษย์ (Baros และคณะ,1979; Rogers และคณะ, 1979; Binor และคณะ,1980; Hall,1981; Dor และคณะ,1981; Aitken และคณะ, 1983; Eerger และคณะ,1983; Mortimer และคณะ,1986; Serafini และคณะ,1986) ในแพะ (Berger,1988) ในโคและสุกร (Hanada และ Nagase,1981) ในสุกร (Berger และ Parker,1989) ในโค (Bousquet และ Brackett, 1982; Brachkett และคณะ,1982; Bousquet และคณะ,1983; Graham และคณะ,1986; Bird และคณะ,1988) การใช้ไข่ของแฮมสเตอร์ทดสอบนั้นสามารถบ่งบอกได้ว่าอสุจิมีความ

ผิดปกติในหน้าที่หรือไม่ และอสุจิเกิดการคาพาซิเตท และอะโครโซมรีแอ็คชั่นหรือไม่ สำหรับในกระบือยังไม่มีการรายงานในการใช้ไข่แฮมสเตอร์ทดสอบอสุจิเลย

<u>การปฏิสนธิ</u>

การปฏิสนธิเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นทั้งในระดับเซลล์และระดับโมเลกุล เป็นผลจากการรวมกันของโครโมโซมที่เป็นแฮปลอยด์สองชุด เกิดเป็นดิปลอยด์โครโมโซม ดังกล่าวมาแล้วว่าอสุจิจะสามารถปฏิสนธิได้ จะต้องผ่านขั้นตอนการเกิดการคาพาซิเตทและอะโครโซมรีแอ็คชั่นก่อนทั้งในสภาพหลอดทดลอง หรือในตัวสัตว์ และอสุจิของสัตว์หลายชนิดสามารถปฏิสนธิกับไข่ของแฮมสเตอร์ที่ไม่มีชั้นโซนาเพลลูซิดาได้ (Yanagimachi,1981) นอกจากอสุจิแล้ว โอโอไซต์ก็ต้องมีความพร้อมด้วยเช่นกัน จึงจะสามารถเกิดปฏิสนธิกับอสุจิได้ ความสามารถในการปฏิสนธิของโอโอไซต์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมนั้น จะบรรลุผลสำเร็จได้หลังจากช่วงระยะเวลาที่ยาวนานในการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลง ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั้งหมดการปฏิสนธิจะเกิดขึ้นที่ระยะเมตาเฟส II ของการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิส (second meiotic division) ซึ่งในสัตว์พวกนี้โอโอไซต์ที่พัฒนาไม่ถึงในระยะนี้จะไม่สามารถให้อสุจิเจาะผ่านเข้าไปได้หรือถ้าเจาะเข้าไปได้นิวเคลียสของอสุจิก็ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นโปรนิวเคลียสได้ (Barros และ Munoz,1973;Iwamatsu และ Chang,1972; Niwa และ Chang,1975; Usui และ Yanagimachi,1976) (รูปที่ 1.3)



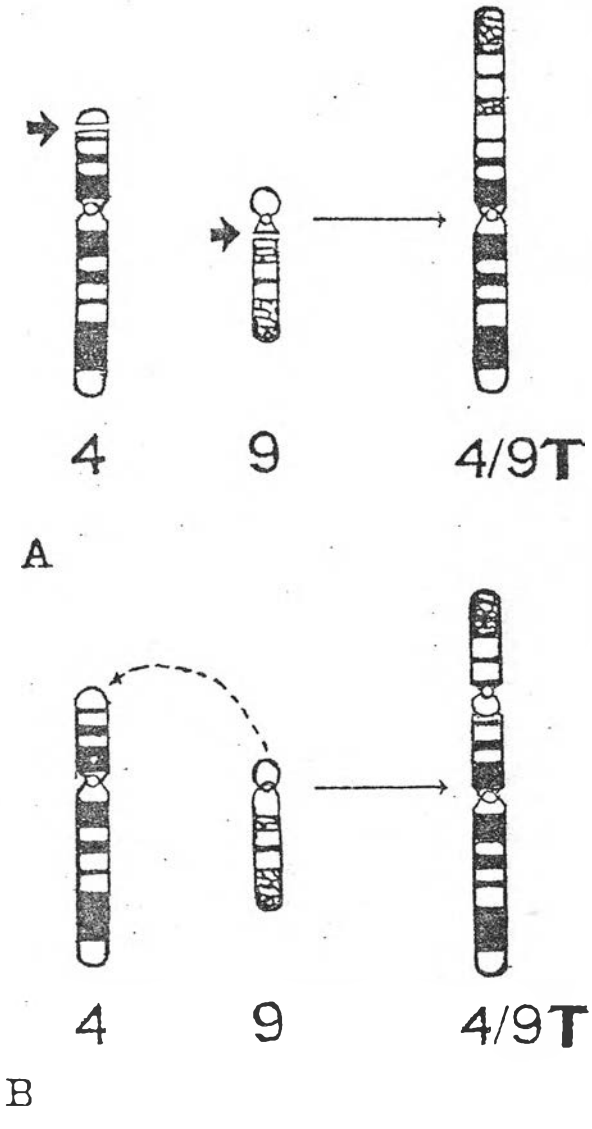
รูปที่ 1.3 แสดง oocyte meiosis (2n = 6)

1-4 เป็นระยะ prophase ของ first meiotic division ซึ่งเกิดขึ้นในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั้งหมดในช่วงที่เป็นทารก การแบ่งแบบ meiosis จะมาถึงระยะ diplotene (first meiotic arrest) และโอโอไซต์จะเข้าสู่ระยะ dictyate (5-6) เมื่อมีการแบ่งแบบ meiosis สมบูรณ์อีกครั้งในช่วงที่เป็นผู้ใหญ่ (7-11) การตกไข่จะเกิดขึ้นในระยะ metaphase II (11) และเกิด second meiotic division (12-14) จะเกิดขึ้นใน oviduct เมื่ออสุจิเจาะเข้าไป (Tsafriri และคณะ, 1983)

017535

เซลล์พันธุศาสตร์ของกระบือ

Mc Gregor (1941) ได้แบ่งกระบือออกเป็น 2 อย่างด้วยกันคือ กระบือปลัก (swamp buffalo) และกระบือแม่น้ำ (water buffalo) โดยอาศัยลักษณะการเป็นอยู่และการนำไปใช้ประโยชน์ กล่าวคือ กระบือปลักชอบอยู่ตามปลักที่มีโคลน และใช้ประโยชน์ในด้านแรงงานและเนื้อเป็นอาหาร ส่วนกระบือแม่น้ำชอบอยู่ตามแม่น้ำที่สะอาดและใช้ประโยชน์ส่วนใหญ่เป็นกระบือนม กระบือ 2 พวกนี้มีจำนวนโครโมโซมแตกต่างกัน กระบือปลักมีจำนวนโครโมโซม 2n = 48 ส่วนกระบือแม่น้ำมีจำนวนโครโมโซม 2n = 50 (Fischer และ Ulbrich,1968) คารีโอไทป์ (karyotype) ของกระบือแม่น้ำประกอบด้วยซับเมตาเซนตริกโครโมโซม (submetacentric chromosome) 5 คู่ อะโครเซนตริก โครโมโซม (acrocentric chromosome) 19 คู่ และโครโมโซมเพศที่เป็นอะโครเซนตริก 1 คู่ สำหรับคารีโอไทป์ของกระบือปลักประกอบด้วยเมตาเซนตริก โครโมโซม ขนาดใหญ่ 1 คู่ ซับเมตาเซนตริกโครโมโซม 4 คู่ อะโครเซนตริก โครโมโซม 18 คู่ และโครโมโซมเพศ ซึ่งเป็นอะโครเซนตริก 1 คู่ เช่น เดียวกับกระบือแม่น้ำ เมื่อดูจากคารีโอไทป์ พบว่าเมตาเซนตริกโครโมโซม ขนาดใหญ่ 1 คู่ ที่อยู่ในกระบือปลัก เกิดขึ้นจากการรวมกันของอะโครเซนตริกโครโมโซม คู่ที่ 9 กับแขนสั้นของซับเมตาเซนตริก โครโมโซม คู่ที่ 4 ของกระบือแม่น้ำ (Bongso และ Helmi,1982) จะเห็นได้ว่ากระบือปลักโครโมโซมหายไป 1 คู่ แต่มีโครโมโซม 1 คู่ ที่เป็นเมตาเซนตริกที่มีขนาดใหญ่ แทนที่จะเป็นซับเมตาเซนตริกเหมือนกระบือแม่น้ำการรวมกันของโครโมโซมดังกล่าว เรียกว่า แทนเดม ฟิวชั่น (tandem fusion) (รูปที่ 1.4) ซึ่งหมายถึงการรวมกันของเซนโตร์เมียร์ (centromere) และเทโลเมียร์ (telomere) ของโครโมโซม การที่เป็นเช่นนี้ได้ทำให้ปริมาณสารที่อยู่บนโครโมโซมในกระบือปลักและกระบือแม่น้ำคล้ายคลึงกันมาก กระบือทั้ง 2 พวกนี้ มีโครโมโซมเพศที่เหมือนกัน คือ โครโมโซมเอ็กซ์ เป็นแบบอะโครเซนตริก ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด ส่วนโครโมโซมวาย เป็นแบบอะโครเซนตริกที่มีขนาดเล็กที่สุด (Mason,1974)



รูปที่ 1.4 แสดงการเกิด tandem fusion ของโครโมโซมคู่ที่ 4 และ 9 ของกระบือแม่น้ำ

แบบ A (Bongso และ Helmi,1982)

แบบ B (Di Berrardino และ Iannuzzi,1981)

Chowdhary และคณะ (1989) ได้ใช้เทคนิคการย้อมแถบโครโมโซมแบบต่าง ๆ เพื่อยืนยันถึงการรวมกันของโครโมโซมดังกล่าว การรวมกันแบบนี้มีการขาดหายไปของเซนโตเมียร์ และเซนโตรเมริค เฮตเตอโรโครมาติน (centromeric heterochromatin) ของแขนข้างหนึ่งของโครโมโซมคู่ที่ 9 และมีการขาดหายไปของนิวคลีโอลาร์ ออแกไนเซอร์รีเจียน (nucleolar organizer region) ทั้ง 2 แขน สั้นในโครโมโซมคู่ที่ 4 และ 9 ของกระโอปลัก

เมื่อเทคนิคในการศึกษาโครโมโซมของกระบือมีการพัฒนาขึ้น ได้มีการย้อมแถบของโครโมโซม ทำให้ตรวจสอบรายละเอียดของโครโมโซมกระบือได้มากขึ้น ในสายดีเอ็นเอ (DNA) ที่อยู่บนโครโมโซมบางตำแหน่งมีคู่ของเบส adenine-thymine (A-T) และ guanine-cytosine (G-C) มาก เมื่อใช้เอนไซม์ทริปซินย่อย จะทำให้เกิดรูปแบบของแถบโครโมโซมในแต่ละคู่ที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะ ซึ่งไม่เหมือนกันกับโครโมโซมคู่อื่น ๆ แต่โครโมโซมที่เป็นคู่กันจะมีแถบเหมือนกัน (Bongso,1986)

การย้อมแถบโครโมโซมของกระบือสามารถทำได้หลายแบบขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการใช้ เช่น จีทีจีแบนด์ (GTG-band; G-banding by trypsin using Giemsa) ซี-แบนด์ (C-band; consititutive heterochromatin banding) อาร์แบนด์ (R-band; reverse G-banding) และนอร์แบนด์ (NOR-band; nucleolar organiser region banding) การย้อมแถบโครโมโซมที่กล่าวมาทั้งหมดนี้ล้วนเป็นเทคนิคที่สามารถใช้ศึกษาโครโมโซมของกระบือได้ (DiBerardino และ Ianuzzi,1981; Bongso และ Hilmi, 1982)

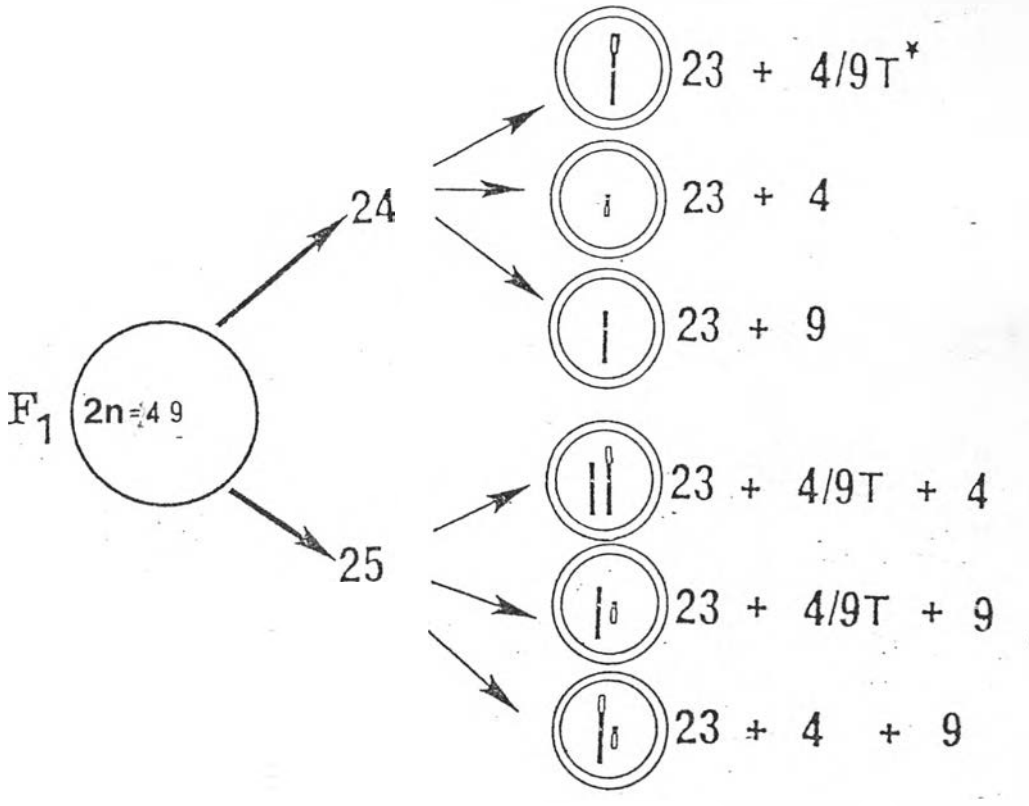
การย้อมแถบโครโมโซมแบบ ซี-แบนด์ มีประโยชน์มากในการตรวจสอบโครโมโซมเพศของกระบือทั้งสอง เนื่องจากโครโมโซมเพศของกระบือที่ย้อมแถบแบบนี้ จะติดสีต่างจากออโตโซม กล่าวคือ ออโตโซมที่เป็นอะโครเซนตริกจะเห็นสีติดทึบบริเวณเซนโตรเมียร์ชัด ในขณะที่เซนโตเมียร์ของซับเมตาเซนตริกออโตโซมติดสีไม่ชัดเจน สำหรับโครโมโซมเพศเอ็กซ์และวายโครโมโซมนั้น โครโมโซมวายไม่มีแถบ ส่วนโครโมโซมเอ็กซ์ซึ่งมีรูปร่างแบบอะโคร

เซนตริกโครโมโซมที่ใหญ่ที่สุดนั้น บริเวณเซนโตรเมียร์จะติดสีชัดเจนมาก เมื่อย้อมแบบ ซี-แบนส์ โครโมโซมวายจะไม่ติดสีที่เซนโตรเมียร์ ทำให้สามารถแยกโครโมโซมเอ็กซ์และวายได้ (Bongso และ Helmi,1982)

Chuanchai (1986)ได้ให้ข้อสังเกตุว่า โครโมโซมวายของกระบือปลักพื้นเมืองของไทยสั้นกว่าโครโมโซมวายของกระบือมูราห์ที่นำเข้ามา

การย้อมแถบโครโมโซมแบบ ซิลเวอร์สเตนนอร์ (silver stained NOR) เป็นการย้อมดูบริเวณนิวคลีโอลาร์ รีเจียน ซึ่งเป็นที่อยู่ของยีน 28s rRNA และยีน 8s rRNA ในกระบือแม่น้ำพบได้ที่บริเวณส่วนปลาย (telomic) ของโครโมโซมคู่ที่ 3p, 4p, 8, 21, 23 และ 24 ส่วนในกระบือปลักพบได้ในบริเวณแขนสั้นของโครโมโซม คู่ 3 (3p), 8, 21, 23 และ 24 (Di Berardino และคณะ,1979)

เนื่องจากจำนวนโครโมโซมที่แตกต่างกันของกระบือปลักและกระบือแม่น้ำ ทำให้รุ่นลูกผสม F1 ระหว่างกระบือทั้งสอง มีจำนวนโครโมโซม 2n = 49 ถึงแม้ว่าลูกผสมจะมีอัตราการเจริญเติบโตดีและมีคุณภาพซากดี แต่เนื่องจากมีโครโมโซม 49 แท่ง ในการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิส เพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์โครโมโซมที่เป็นซับเมตาเซนตริก แท่งที่ใหญ่ที่สุด ที่ได้รับมาจากกระบือปลักจะจับคู่ (synapsis) กับโครโมโซมคู่ที่ 4 และ 9 ที่ได้มาจากกระบือแม่น้ำทำให้เป็นไตรวาเลนท์ (trivalent) การจับของโครโมโซมทำให้มีผลต่อการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งเป็นปัญหาทางด้านการสืบพันธุ์ และความสมบูรณ์พันธุ์ของลูกผสม (Bongso และคณะ,1983) ในกระบือลูกผสมเพศเมียจะมีการแยกตัว (segregation) ของโครโมโซม ในกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ถึง6แบบ ดังแสดงในรูปที่ 1.5 สำหรับไมโอซิสในกระบือลูกผสมตัวผู้พบว่า มีการกระจายของจำนวนโครโมโซมในเซลล์สืบพันธุ์อยู่ระหว่าง 22 ถึง 26 ในขั้นไพรแมรี สเปอร์มาโตไซต์ (primary spermatocytes) และช่วงที่พบมากที่สุดคือ 24 และ 25 (Bongso และคณะ,1983)



รูปที่ 1.5 แสดงการแยกตัวของโครโมโซมในกระบวนการ oogenesis ของกระบือ F1 เพศเมีย 4/9T เป็นผลมาจาก tandem fusion ระหว่างโครโมโซมแห่งที่ 4 และ 9 ของกระบือแม่น้ำ (Basrur และคณะ,1988)

ถึงแม้ว่าการศึกษาทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์ของกระบือจะพัฒนาไปมากแล้วก็ตาม แต่ยังไม่มีการรายงานถึงการศึกษาโครโมโซมจากอสุจิของกระบือ ถ้าหากพัฒนาเทคนิคนี้ขึ้นมาได้สำเร็จเป็นที่น่าพอใจแล้วก็จะเป็นประโยชน์อย่างมากในการศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมในอสุจิของกระบือ โดยเฉพาะในกระบือลูกผสม เพื่อจะเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ และเพิ่มประสิทธิภาพในการสืบพันธุ์ของกระบือ นอกจากนี้ยังเป็นประโยชน์ในด้านการคัดเลือกเพศจากอสุจิเพื่อที่จะได้นำไปผสมในหลอดแก้วและย้ายฝากตัวอ่อน เพื่อเพิ่มปริมาณของกระบือต่อไป

<u>การศึกษาโครโมโซมจากอสุจิ</u>

สเปอร์มาโตไซต์หลังจากที่แบ่งตัวแบบไมโอซีสจนกระทั่งได้อสุจิแล้ว จะไม่ปรากฏเห็นโครโมโซม หลังจากอสุจิเข้าปฏิสนธิกับไข่แล้วจะเกิดเป็นโปรนิวคลีไอ (pronuclei) ของอสุจิและไข่เพื่อที่จะแบ่งตัวในระยะ first cleavage ต่อไป (Rudak, Jacobs และ Yanagimachi,1978) อสุจิอาศัยองค์ประกอบบางอย่างที่อยู่ในไข่ เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดดีคอนเดนเซชั่น (decondensation) ของโครมาตินในการสังเคราะห์ดีเอนเอ

ในปี ค.ศ. 1976 Yanagimachi และคณะ ได้ใช้อสุจิของมนุษย์เจาะไข่ของแฮมสเตอร์ที่ไม่มีชั้นโซนาเพลลูซิดา เพื่อที่จะให้สภาพแวดล้อมภายในไข่กระตุ้นให้นิวเคลียสของอสุจิเกิดดีคอนเดนเซชั่นของโครมาตินดังกล่าว นับว่าเป็นการเริ่มแรกของการใช้ไข่แฮมสเตอร์ที่ไม่มีชั้นโซนาเพลลูซิดาทดสอบอสุจิและศึกษาโครโมโซมจากอสุจิ ซึ่งต่อมาในปี 1978 Rudak, Jacob และ Yanagimachi ก็ได้ประสบผลสำเร็จในการศึกษาโครโมโซมจากอสุจิของมนุษย์เป็นครั้งแรก โดยใช้น้ำยา modified Krebs-Ringer's (BWW) ซึ่งพัฒนาในปี 1971 โดย Biggers, Whitten และ Whittingham ใช้วิธีการย้อมแถบบนโครโมโซมแบบคิว-แบนด์ (Q-bands; quinacrine mustard banding) ต่อมาก็มีการศึกษาโครโมโซมจากอสุจิของมนุษย์กันอีก แต่มีเพียงห้องปฏิบัติการบางแห่งเท่านั้นที่ได้โครโมโซมที่มีคุณภาพสูง คือ

ที่ประเทศอังกฤษ Rudak และคณะ (1978) ศึกษาโครโมโซม โดยใช้เทคนิคการย้อมแถบโครโมโซมแบบคิว-แบนด์ และ ซี-แบนด์

ที่ประเทศแคนาดา Martin และคณะ (1982) ศึกษาโครโมโซมจากอสุจิของมนุษย์ โดยใช้เทคนิคการย้อมแถบโครโมโซมแบบคิว-แบนด์

ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา Brandiff และคณะ (1985) ศึกษาโครโมโซม โดยใช้เทคนิคการย้อมแถบโครโมโซมแบบคิว-แบนด์

ที่ประเทศสเปน Benet และคณะ (1986) ได้ศึกษาโครโมโซม โดยใช้เทคนิคการย้อมแถบโครโมโซมแบบจี-แบนด์

เหตุผลที่ทุกห้องปฏิบัติการที่กล่าวมาทั้งหมดใช้ไข่ของแฮมสเตอร์ ในการศึกษานั้นเนื่องจากเซลล์เมมเบรนของไข่แฮมสเตอร์สามารถให้อสุจิของสัตว์ต่างชนิดกันเจาะเข้าไปได้ (Yanagimachi,1981)

เท่าที่ตรวจสอบเอกสารพบว่ายังไม่มีการนำเทคนิคนี้มาใช้ศึกษาโครโมโซมของอสุจิในสัตว์ทดลอง สำหรับในทางปศุสัตว์ได้มีการศึกษาเรื่องนี้กันพอสมควร โดยเฉพาะในโค ซึ่งก็ได้ใช้เทคนิคที่ดัดแปลงมาจากการศึกษาโครโมโซมของอสุจิมนุษย์

ในปี ค.ศ. 1987 Tateno และ Mikamo ได้รายงานถึงความสำเร็จในการเตรียมโครโมโซมของโค ที่เลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง modified BWW โดยเพิ่มปริมาณของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เป็น 5938.8 มิลลิกรัม/ลิตร ปริมาณของโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต เป็น1500 มิลลิกรัม/ลิตร ใช้อสุจิที่แช่แข็งในการทดสอบแยกอสุจิออกจาก cryoprotective medium โดยการปั่นในน้ำยา modified BWW ที่มี 0.3% BSA ที่ 550 g เป็นเวลา 5 นาที และคัดเลือกอสุจิที่เคลื่อนไหวโดยวิธีให้อสุจิว่ายต้านแรงดึงดูดของโลก จากนั้นก็ใช้ ionophore A23187 เพื่อให้อสุจิเกิดการคาพาซิเตท สังเกตได้โดยดูรูปแบบการเคลื่อนไหวของอสุจิ จากนั้นจึงนำอสุจิไปผสมกับไข่ของแฮมสเตอร์ที่ไม่มีโซนาเพลลูซิดา เมื่อไข่ปฏิสนธิแล้วก็จะย้ายไปเลี้ยงในน้ำยา TC199 ที่มี 10% FBS และ podophyllotoxin กับ vinblastine จนกระทั่งแบ่งตัวถึงระยะ first cleavage metaphase จึงเตรียมโครโมโซมโดยวิธี gradual fixation-air drying method พบว่าจำนวนไข่ที่ใช้ศึกษา 56% สามารถตรวจสอบโครโมโซมได้ และจากการวิเคราะห์อสุจิ 1,116 เซลล์ พบว่า มีอสุจิที่นำ

เอ็กซ์โครโมโซม และวายโครโมโซมเป็นอัตราส่วน 542 : 574 ซึ่งประสบความสำเร็จในการเตรียมโครโมโซมสูงมาก ต่อมาก็มีผู้ศึกษาเรื่องนี้ในโคอีก (Bird และ Houghton, 1988; Kovac และ Foote,1989) แต่ก็ประสบความสำเร็จไม่ดีเท่าที่ควร

ในปี ค.ศ. 1987 Crighton และ Houghton ก็ได้ประสบผลสำเร็จในการเตรียมโครโมโซมจากอสุจิของสุกรโดยวิธีการเดียวกัน แต่ใช้ bovine follicular fluid และเปอร์คอล ในการคาพาซิเตทอสุจิ ซึ่งได้อัตราการเจาะของอสุจิ 80.1% และได้ผลสำเร็จของโครโมโซมจากอสุจิในระยะเมตาเฟส 16.8% จากการวิเคราะห์อสุจิ 20 เซลล์ พบว่ามีเอ็กซ์โครโมโซม 10 เซลล์ วายโครโมโซม 9 เซลล์ และมีทั้งเอ็กซ์และวาย 1 เซลล์

สำหรับในกระบือยังไม่มีรายงานในการศึกษาเรื่องนี้