

ผลการใช้น้ำเชื้อแยกโครโมโซมเพศต่อการพัฒนาตัวอ่อนระยะถ่ายฝากในโคนม

นายธนธิป พูลเพิ่ม 5712402661

ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

บทคัดย่อ

สัมนานี้ได้ทำการศึกษาค้นคว้าเอกสารงานวิจัยให้ทราบถึงผลการใช้น้ำเชื้อโคนมแยกโครโมโซมเพศของอสุจิต่อการพัฒนาตัวอ่อนจากการทำปฏิสนธิในห้องปฏิบัติการและจากการผสมเทียมพบว่าการทำปฏิสนธิในห้องปฏิบัติการระหว่างน้ำเชื้อที่ทำการแยกโครโมโซมเพศของอสุจิมีผลให้ได้ตัวอ่อนที่สมบูรณ์สำหรับการถ่ายฝาก (transferable embryo) ต่ำกว่ากลุ่มที่ใช้น้ำเชื้อปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (44-45% vs 70% ตามลำดับ; $P<0.001$) ตลอดจนมีอัตราการฟ่อของตัวอ่อน (degenerated embryo) สูงกว่ากลุ่มที่ใช้น้ำเชื้อปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (18-22% vs 10.6% ตามลำดับ; $P<0.05$) อย่างไรก็ตามผลการศึกษาเกี่ยวกับร้อยละของตัวอ่อนที่สมบูรณ์สำหรับการถ่ายฝากการปฏิสนธิระหว่างน้ำเชื้อที่ทำการแยกโครโมโซมเพศของอสุจิมีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ใช้น้ำเชื้อปกติ (9.4-25.3% vs 3.8% ตามลำดับ) และมีอัตราการฟ่อของตัวอ่อนหลังปฏิสนธิ (degenerated) ต่ำกว่ากลุ่มที่ใช้น้ำเชื้อปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (6.5-14.7% vs 3.8% ตามลำดับ; $P<0.001$)

คำสำคัญ: น้ำเชื้อแยกโครโมโซมเพศ การพัฒนาตัวอ่อน โคนม

บทนำ

ในปัจจุบันการผสมเทียมโดยเลือกใช้น้ำเชื้อแยกโครโมโซมเพศตัวอสุจิในโคนมช่วยให้ได้ลูกโคเพศเมียซึ่งเป็นที่ต้องการของเกษตรกร และเป็นประโยชน์ต่อการขยายขนาดฟาร์มหรือทดแทนแม่โคในฟาร์มได้อย่างไรก็ตาม ตัวอสุจิที่ผ่านกระบวนการคัดแยกเพศก่อนนำมาผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพบว่าตัวอสุจิที่ถูกแยกโครโมโซมเพศต่อหลอดตัวอสุจิมีความอ่อนแอมากและในน้ำเชื้อมีปริมาณตัวอสุจิต่อหลอดน้อยมากเมื่อเทียบกับน้ำเชื้อปกติถึง 10 เท่า (Johnson and Welch, 1999; Seidel and Garder, 2002) ซึ่งส่งผลให้การใช้น้ำเชื้อแยกเพศตัวอสุจิในการผสมเทียมมีอัตราการตั้งท้องต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งปกติและการผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อแยกเพศตัวอสุจิก็น่าสนใจในทางปฏิบัติทั่วไปการพิจารณาน้ำเชื้อแยกเพศตัวอสุจิไปใช้ประโยชน์โดยการปฏิสนธินอกร่างกาย (in vitro fertilization: IVF) และเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อน (embryo transfer technology) เป็นทางเลือกเพื่อที่จะเพิ่มประสิทธิภาพการใช้งานของน้ำเชื้อแยกเพศตัวอสุจิให้สูงที่สุดโดยเป็นการผลิตตัวอ่อนในและนอกร่างกายจนได้ตัวอ่อนในระยะบลาสโตซิส จากนั้นจึงทำการย้ายฝากตัวอ่อนเข้าสู่แม่โคตัวรับด้วยเทคนิคดังกล่าวน้ำเชื้อแยกเพศตัวอสุจิ 1 หลอด สามารถกระจายพันธุ์กรรมหรือผลิตตัวอ่อนเพศเมียคราวละหลายตัว (เปรียบเทียบกับ การผสมเทียมแล้วขอมดีกว่ามาก เนื่องจากการผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อ 1 หลอด ผลิตลูกโคได้เพียง 1 ตัว) ดังนั้นการพัฒนาระบบการผลิตตัวอ่อนภายในและนอกร่างกายภายในห้องปฏิบัติการด้วยการประยุกต์ใช้น้ำเชื้อแยกโครโมโซมเพศจึงเป็นสิ่งที่ผู้ทำวิจัยสนใจศึกษาจากงานวิจัยในอดีตยังพบว่าอัตราการสำเร็จในการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกายโดยการใช้น้ำเชื้อแยกเพศมีความหลากหลายอยู่มาก (Galli et al., 2003)

ดังนั้นสัมมนาฉบับนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเอกสารงานวิจัยให้ทราบถึงผลการใช้น้ำเชื้อแยกโครโมโซมเพศต่อการพัฒนาตัวอ่อนระยะถ่ายฝากในโคนม

น้ำเชื้อแยกโครโมโซมเพศ (sexed semen) คือการกำหนดเพศโดยโครโมโซมเอ็กซ์ (X) และวาย (Y) โดยโครโมโซมเพศเมียคือ XX และโครโมโซมเพศผู้คือ XY อสุจิแต่ละตัวมีโครโมโซม X หรือ Y ดังนั้นต้องแยกกลุ่มอสุจิที่มีโครโมโซม X และ Y ออกจากกันได้ จะเป็นประโยชน์ในการคัดเลือกเพศ ซึ่งความแตกต่างของโครโมโซมทั้งสองที่แตกต่างกันคือ มวลของอสุจิ ความสามารถในการเคลื่อนที่ ดีเอ็นเอ (DNA) ประจุไฟฟ้าที่ผิวอสุจิ และคุณสมบัติแอนติเจน

วิธีการ flow cytometry โดยใช้ flow cytometric separation ใช้หลักการว่าโครมาติน (chromatin) ในหัวของอสุจิสามารถติดสีย้อมได้ดีเมื่อย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent) แล้วให้อสุจิผ่านช่องแคบของ flow cytometer ที่มีลำแสงที่ทำให้อสุจิที่ติดสีย้อมเรืองแสง ทั้งนี้อสุจิ X มีดีเอ็นเอมากกว่า จึงควรเรืองแสงได้ดีกว่าอสุจิที่มีโครโมโซม Y วิธีนี้แยกเพศได้ถูกต้องถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ในโคนมเป็นวิธีที่แยกเพศอสุจิได้ดีที่สุด แต่มีจุดอ่อนคืออัตราการคัดแยกอสุจิได้น้อย ประมาณ 1 ล้านตัวใน 5 ชม. ไม่เหมาะในการนำไปใช้ผสมเทียม

แต่คุ้มกับการนำไปใช้ปฏิสนธินอกร่างกาย (IVF) อุปกรณ์ที่ใช้ราคาแพงสุดที่ได้ผ่อนแอ็ดรารอดต่ำความ
สมบูรณ์พันธุ์ต่ำ (สุนิรัตน์ เอี่ยมละมัย, 2557)

การผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย (In vitro fertilization; IVF)

ปัจจุบันมีการผลิตตัวอ่อนจากห้องปฏิบัติการนำไปฝากแม่ตัวให้ตั้งท้องคลอดลูกที่มีพันธุกรรม
ดีเด่นตามต้องการปัจจุบันมีข้อจำกัดมากในอนาคตน่าจะถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางมากขึ้นการผลิตตัวอ่อน
ภายนอกร่างกายประกอบด้วยการเลี้ยงไขภายนอกร่างกาย การปฏิสนธิภายนอกร่างกาย และการเลี้ยงตัวอ่อน
ภายนอกร่างกายการเลี้ยงเซลล์ไขภายนอกร่างกายทำโดยนำไข่ (oocytes) มาเลี้ยงให้สมบูรณ์จนพร้อม
ปฏิสนธิไข่ที่ได้นำมาจากรังไข่โคจากโรงฆ่าสัตว์ หรือเก็บไข่จากโคที่มีชีวิต อาจเป็นลูกโคหรือโคระยะ
สืบพันธุ์ โดยใช้เข็มดูดผ่านผนังช่องคลอด ด้วยแกนตรวจของเครื่องอัลตราซาวด์ที่ติดเข็มดูด (trans vaginal
ultrasound-guides aspiration technique หรือเรียกเทคนิคนี้ว่า ovum pick up) นำไข่ที่ได้มาเลี้ยงด้วยน้ำยา
เฉพาะภายใต้สภาพคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ความชื้น 99 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 38.5 ถึง 39.0 องศา
เซลเซียส ลักษณะไข่ที่นำมาเลี้ยงควรมีขนาดประมาณ 2 ถึง 6 มิลลิเมตร มีคิวมูลัส (cumulus) หุ้มล้อมอย่าง
สมบูรณ์จะดีที่สุด หรือมีหุ้มบางส่วน ในโคใช้เวลาเลี้ยงประมาณ 24 ถึง 30 ชม. ไข่มีการพัฒนาแบ่งตัวไปถึง
ระยะเมตาเฟส 2 (metaphase II) และพบโพลาร์ดี (first polar body) การเตรียมอสุจิ เพื่อให้พร้อมปฏิสนธิ
(capacitation) จะต้องเลี้ยงอสุจิในน้ำยาที่กระตุ้นให้อสุจิมีการคาปาซิเตชันโดยเป็นสาร ไอออนสูงบ่มอสุจิใน
น้ำยาเฉพาะนี้ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วปั่นที่ 330 จี 5 นาที คัดน้ำทิ้งและเจือจางน้ำเชื้อ
และเลี้ยงร่วมกับรังไข่ 5-23 ชม. นำตัวอ่อนมาประเมินคุณภาพเพื่อถ่ายฝากหรือเลี้ยงต่อไป นอกจากนี้แล้ว
การปฏิสนธินอกร่างกายอาจทำโดยการฉีดอสุจิเข้าไข่ไมโครฟัลซิซึมของไข่ (micro-fertilization) การเลี้ยงตัว
อ่อนภายนอกร่างกาย จะเลี้ยงถึงระยะเหมาะสมสำหรับการย้ายฝาก โดยในโคสามารถเลี้ยงจากระยะไข่โกท
(zygote)จนถึงระยะบลาสโตซิสต์ โดยใช้ น้ำยาเลี้ยงได้หลายชนิด เช่น TCM-199, CZB, HECM, SOFM (สุนิ
รัตน์ เอี่ยมละมัย, 2557)

เทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อน (embryo transfer technology) เป็นเทคโนโลยีขั้นสูงที่ช่วย ในการปรับปรุง
พันธุ์สัตว์ได้เป็นอย่างดีและรวดเร็วขึ้น และยังช่วยป้องกัน โรคติดต่อทางระบบสืบพันธุ์เทคโนโลยี การย้าย
ฝากตัวอ่อน คือ การนำตัวอ่อน (embryo) ในระยะก่อนการฝังตัวออกมาจากมดลูกของแม่ตัวหนึ่ง ซึ่งจะ
เรียกว่าแม่โคตัวให้ (donor) แล้วนำไปฝากให้กับแม่ตัวอีกตัวหนึ่ง ซึ่งเป็นสัตว์ชนิดเดียวกัน

เรียกว่า แม่ตัวรับ (recipient) ตัวอ่อนจะฝังตัวในปีกมดลูกของแม่ตัวรับและเจริญเติบโตเป็นลูกสัตว์ต่อไป
ลูกสัตว์ที่เกิดขึ้นนี้ จะได้ลักษณะพันธุกรรมครึ่งหนึ่งจากพ่อพันธุ์และอีกครึ่งหนึ่งจากแม่ตัวให้ การย้ายฝาก
ตัวอ่อนเลือกได้ 2 วิธีคือนำไปฝากในปีกมดลูกของแม่ตัวรับเลย เรียก ฝากสด หรือ นำไปแช่แข็งเก็บเอาไว้
คล้ายๆกับการเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวได้นานนับสิบปี เรียก การแช่แข็งตัวอ่อน

ผลการใช้น้ำเชื้อแยกโครโมโซมเพศต่อการพัฒนาตัวอ่อนระยะถ่ายฝากตัวอ่อนในโคนม

ตารางที่ 1 ผลของการปฏิสนธิโดยการใช้น้ำเชื้อชนิดต่างๆ

Treatment	Transferable	Degenerated	unfertilized ova (UFO)	All structures	อ้างอิง
Sex-sorted	5.4 (44)	2.3 (18)	4.8 (38)	12.5 (100)	Mikkola and Taponen (2017)
Conventional	8.6 (70)	1.4 (11)	2.3 (19)	12.3 (100)	
P-value	<0.001	<0.003	<0.001	ns	
Sex-sorted	4.9 (45)	2.4 (22)	3.6 (33)	10.9 (100)	Kaimio et al. (2013)
Conventional	9.1 (70)	1.5 (11)	2.5 (19)	13.0 (100)	
P-value	<0.001	<0.05	<0.01	ns	
NonSx	0.3 (3.8)	4.6 (58.2)*	3 (38)	7.9 (100)	Monteiro jr P.L.J. et al. (2016)
Sx12&24	1.0 (9.4)	0.7 (6.5)**	9 (84.1)	10.7(100)	
Sx24&36	2.4 (25.3)	1.4 (14.7)**	5.7 (60)	9.5(100)	
P-value	ns		ns		

หมายเหตุ : **= $P < 0.01$, *= $P < 0.05$, N.S. ไม่แตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$)

NonSx หมายถึงน้ำเชื้อปกติ

Sx12&24 หมายถึงน้ำเชื้อแยกโครโมโซมเพศที่ฉีดLH ที่เวลา12-24ชั่วโมง

Sx24&36 หมายถึงน้ำเชื้อแยกโครโมโซมเพศที่ฉีดLH ที่เวลา24-36ชั่วโมง

ผลการศึกษา

Mikkola and Taponen (2017) ได้ทำการทดลองโดยใช้น้ำเชื้อปกติเป็นกลุ่มควบคุมผสมเทียมโคเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลองคือน้ำเชื้อแยกโครโมโซมเพศ ทำการเก็บตัวอ่อนหลังการผสมเทียม 7 วันโดยวิธีการชะล้างตัวอ่อนFlushing ตัวอ่อนที่ได้จะถูกนำไปจัดประเภท โดยสมาคมย้ายฝากตัวอ่อนนานาชาติ (Embryo Transfer Society) ผลที่ได้ใช้น้ำเชื้อปกติมีการปฏิสนธิของไข่และอสุจิเป็นตัวอ่อนสูงกว่าน้ำเชื้อแยกโครโมโซมเพศอย่างมีนัยสำคัญ($P < 0.001$) จำนวนของตัวอ่อน(degenerated)ที่ฟ่อไปของน้ำเชื้อแยกโครโมโซมเพศสูงกว่า น้ำเชื้อปกติอย่างมี นัยสำคัญ($P < 0.003$) มีจำนวนของไข่(unfertilized ova)ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิจากน้ำเชื้อแยกโครโมโซมเพศสูงกว่าน้ำเชื้อปกติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) และทำการทดลองโดยนำไข่และอสุจิมาปฏิสนธิในหลอดทดลอง In vitro fertilization แบ่งออกเป็นสองกลุ่มคือน้ำเชื้อปกติ

ผสมกับไข่กลุ่มสองคือน้ำเชื้อแยกโครโมโซมเพศผสมกับไข่ ผลที่ได้คือน้ำเชื้อปกติมีการปฏิสนธิได้มากกว่า น้ำเชื้อแยกโครโมโซมเพศและมีการพัฒนาของตัวอ่อนได้เร็วกว่า เมื่อเปรียบเทียบการปฏิสนธิสองแบบคือ การผสมเทียมกับการปฏิสนธิในหลอดทดลอง In vitro fertilization การผสมเทียมจะมีการพัฒนาของตัวอ่อนที่เร็วกว่ามีจำนวนของตัวอ่อนมากกว่า

Kaimio et al. (2013) ได้ทดลองการผสมเทียมโคใช้น้ำเชื้อปกติเป็นกลุ่มควบคุมและผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อแยกโครโมโซมเพศเป็นกลุ่มทดลองหลังการผสมเทียม 7 วันตัวอ่อนจะถูกเก็บโดยการชะล้างตัวอ่อน Flushing ตัวอ่อนที่ได้จะถูกนำไปจำแนกประเภทโดยสมาคมย้ายฝากตัวอ่อนนานาชาติ (Embryo Transfer Society) ผลที่ได้ การปฏิสนธิของไข่และอสุจิน้ำเชื้อปกติสูงกว่าน้ำเชื้อแยกโครโมโซมเพศอย่างมีนัยสำคัญ($P<0.001$) การใช้น้ำเชื้อปกติมีจำนวนการฟ่อตัวของตัวอ่อน(degenerated))น้อยกว่าน้ำเชื้อแยกโครโมโซมเพศอย่างมีนัยสำคัญ($P<0.05$) มีจำนวนไข่ (unfertilized ova) ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ น้ำเชื้อแยกโครโมโซมเพศสูงกว่าน้ำเชื้อปกติ($P<0.001$)

Monteiro jr P.L.J. et al.(2016) ได้ทำการทดลองโดยการแยกโคออกเป็น3กลุ่ม ผสมเทียมโคผสมรอบคือ12 และ 24 ชั่วโมงหลังจากที่ฉีด LH ให้แม่โคโดยใช้น้ำเชื้อปกติเป็นกลุ่มควบคุม กลุ่มที่2คือ น้ำเชื้อแยกโครโมโซมเพศจะผสม 12 และ 24 ชั่วโมงหลังการฉีดให้ LH ให้แม่โค กลุ่มที่3คือน้ำเชื้อแยกโครโมโซมเพศจะผสม 24 และ 36 ชั่วโมงหลังการฉีดให้ LH ให้แม่โคเป็นกลุ่มทดลองตัวอ่อนจะถูกเก็บหลังการผสมเทียม 7 วันโดยการชะล้างตัวอ่อน Flushing ตัวอ่อนจะถูกจำแนกประเภทโดยสมาคมย้ายฝากตัวอ่อนนานาชาติ (Embryo Transfer Society) ผลการใช้น้ำเชื้อปกติ, น้ำเชื้อแยกโครโมโซมเพศที่มีการฉีดLH ในเวลา12และ24 ชั่วโมงและน้ำเชื้อแยกโครโมโซมเพศที่มีการฉีด LH ในเวลา 24 และ36 ชั่วโมงปฏิสนธิมีผลไม่แตกต่างกัน, ใช้น้ำเชื้อปกติมีการฟ่อของตัวอ่อน (degenerated)) แตกต่างกับกับน้ำเชื้อแยกโครโมโซมเพศที่ผสมหลังฉีด LH 12และ24ชั่วโมงและโครโมโซมเพศที่ผสมหลังฉีด LH 24และ36 ชั่วโมงที่($P<0.05$) มีจำนวนไข่(unfertilized ova) ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน

งานวิจัยของ (Mikkola and Taponen, 2017) ได้กล่าวไว้ว่าน้ำเชื้อแบบปกติจะมีการปฏิสนธิสูงกว่าน้ำเชื้อแยกโครโมโซมเพศ มีอัตราการฟ่อของตัวอ่อนต่ำกว่าน้ำเชื้อแยกโครโมโซมเพศและมีไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิต่ำกว่าซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Kaimio et al., 2013) อาจเป็นน้ำเชื้อแยกโครโมโซมเพศของทั้งสองงานวิจัยผ่านกระบวนการแยกเพศวิธีการเดียวกัน flow cytometry ส่วน (Monteiro jr P.L.J. et al., 2016) บอกว่าการใช้น้ำเชื้อแยกโครโมโซมเพศนั้นให้ไม่แตกต่างกับกับน้ำเชื้อปกติมีตัวอ่อนที่ฟ่อแตกต่างกัน มีไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิไม่แตกต่างกันอาจเป็นผลมาจากการผสมสองรอบหลังฉีดLHในระยะเวลา 12และ24 ชั่วโมง, ผสมหลังฉีดLH เวลา 24และ36 ชั่วโมง จึงทำให้มีการกระตุ้นให้ไข่ตกและพร้อมที่จะปฏิสนธิได้ดีกว่า

สรุป

การใช้น้ำเชื้อแยกโครโมโซมเพศในการปฏิสนธิก่อนการย้ายฝากมีผลคือการปฏิสนธิสำเร็จพร้อมจะถ่ายฝากได้มีปริมาณน้อยกว่าน้ำเชื้อปกติเพราะเกิดจากระบวนการในการแยกเพศของตัวสุจินั้นทำให้ตัวสุจิอ่อนแอจึงทำให้ประสิทธิภาพในการปฏิสนธิลดลง การฝ่อตัวของตัวอ่อนอาจมีผลมาจากตัวสุจิที่อ่อนแอจึงทำให้การแบ่งเซลล์หยุดชะงักหรือไม่พัฒนาต่อ น้ำเชื้อแยกโครโมโซมเพศตัวสุจิอาจจะไม่แข็งแรงเท่าน้ำเชื้อปกติจึงทำให้การเจาะเข้าไปปฏิสนธิกับไข่ได้น้อยกว่า

ดังนั้นการใช้น้ำเชื้อแยกโครโมโซมเพศนั้นให้ผลไม่ดีเท่าน้ำเชื้อแบบปกติในการพัฒนาตัวอ่อนระยะถ่ายฝากในโคนม มีการปฏิสนธิของตัวอ่อนน้อยการฝ่อของตัวอ่อนสูงและมีไข่ที่ไม่การปฏิสนธิสูงจึงไม่เหมาะสำหรับการนำมาปฏิสนธิย้ายฝากตัวอ่อน

เอกสารอ้างอิง

วิบัณฑิตา จันทร์กิตติสกุล และ วุฒิไกร บุญคุ้ม. 2561. “อิทธิพลของพ่อพันธุ์และความเข้มข้นของน้ำเชื้อแยกเพศต่อการพัฒนาของตัวอ่อนภายนอกร่างกายในโคนม”. *แก่นเกษตร*.46(1);617-621

สุนิรัตน์ เอี่ยมละมัย. 2557. “การผสมเทียมโค (ตอนที่ 6)”. *วารสารโคนม*. 24

Kaimio, I. et al. 2013. Embryo production with sex-sorted semen in superovulated dairy heifers and cows. *Theriogenology*. 80 :950-954.

Mikokola, M. and Taponen J. 2017. Quality and developmental rate of embryos produced with sex-sorted and conventional semen from superovulated dairy cattle. *Theriogenology*, 87 :135-140.

Monteiro, jr P.L.J et al. 2016 .Fertilization rate and embryo production of superovulated dairy cows after insemination with non-sorted and sex-sorted semen. *Anim.Reprod.*, Belo Horizonte, 13(2) :112-116.