

## การประเมินสภาพตัวอสุจิที่อยู่ในท่อนำไข่แม่สุกรตลอดระยะสัดหนึ่ง โดยวิธีโพลัวไซโตเมทรี

ไพศาล เทียนไทย<sup>1\*</sup> และ เสริเบอโต โรดริเกวซ-มาร์ตินเนซ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

<sup>2</sup>ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางคลินิก คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์แห่งสวีเดน เมืองอุปซาลา สวีเดน

\*ผู้รับผิดชอบบทความ โทรศัพท์ 02-2189699 โทรสาร 02-2189657 E-mail: paisan.t@chula.ac.th

### บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินสถานภาพ และการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิที่อยู่ในท่อนำไข่แม่สุกรในบริเวณที่กักเก็บตัวอสุจิ (utero-tubal junction, UTJ กับ caudal isthmus) และบริเวณที่เกิดการปฏิสนธิ (ampullary-isthmic junction, AIJ) ในระยะก่อนตกไข่ ระหว่างตกไข่ และระยะหลังตกไข่ ย้อมตัวอสุจิด้วย Merocyanine-540 และ Yo-Pro-1 แล้ววิเคราะห์โดยใช้เครื่องโพลัวไซโตเมทรี พบว่ากลุ่มตัวอสุจิส่วนใหญ่ใน UTJ ยังคงมีชีวิตอยู่ (78-83%) และไม่เกิดการคาปาซิเตชัน (70-78%) ตลอดการเป็นสัดหนึ่ง ขณะที่อัตราการมีชีวิตรอดของกลุ่มตัวอสุจิใน AIJ มีปริมาณลดลง ( $P>0.05$ ) เปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอสุจิในบริเวณที่กักเก็บตัวอสุจิ สำหรับตัวอสุจิใน UTJ มีแนวโน้มเกิดการคาปาซิเตชันเพิ่มขึ้น ( $P>0.05$ ) หลังตกไข่ เมื่อเปรียบเทียบกับระยะก่อนตกไข่และระหว่างตกไข่ ขณะที่กลุ่มตัวอสุจิที่อยู่ใน AIJ ระยะหลังตกไข่ มีอัตราการเกิดคาปาซิเตชันเพิ่มสูงขึ้น ( $P<0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับระยะอื่นๆ ผลการทดลองระบุว่าตัวอสุจิส่วนใหญ่ที่อยู่ใน UTJ จะไม่เกิดการคาปาซิเตชันในระยะก่อนตกไข่แต่จะเริ่มในระยะหลังตกไข่ แต่กระบวนการนี้เกิดขึ้นอย่างเห็นได้ชัดกับตัวอสุจิใน AIJ ระยะหลังตกไข่ สนับสนุนหน้าที่ของท่อนำไข่ส่วน UTJ ในการรักษาการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิ และมีกลไกชะลอการคาปาซิเตชันในระยะก่อนตกไข่ รวมทั้งหน้าที่ของท่อนำไข่ส่วน AIJ ในการเตรียมสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับการคาปาซิเตชันของกลุ่มตัวอสุจิให้พร้อมสำหรับการปฏิสนธิในระยะหลังตกไข่

คำสำคัญ : การเป็นสัดหนึ่ง การคาปาซิเตชัน บริเวณกักเก็บตัวอสุจิ ท่อนำไข่ สุกร

## บทนำ

การปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียในกระบวนการปฏิสนธิ เป็นกลไกที่มีความซับซ้อน ตัวอสุจิและโอโอไซต์ต้องผ่านขั้นตอนสำคัญๆ ที่ทำให้เกิดความสมบูรณ์พร้อม ซึ่งต้องใช้เวลาและสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดผลสำเร็จเมื่อเซลล์ดังกล่าวเคลื่อนที่ไปถึงบริเวณที่มีการปฏิสนธิ (Yanagimachi, 1994) สภาพแวดล้อมและปัจจัยต่างๆ ในการเตรียมให้ตัวอสุจิและโอโอไซต์มีความพร้อมสำหรับการปฏิสนธิที่ใช้ในห้องปฏิบัติการกับสภาพที่อสุจิอยู่ภายในอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียมีความแตกต่างกันอย่างมาก (Rodriguez-Martinez *et al.*, 1998) ดังนั้น การปรับปรุงสารที่ใช้ในการเตรียมเซลล์สืบพันธุ์เพื่อประยุกต์ใช้ใน กระบวนการปฏิสนธินอกร่างกายต้องอาศัยความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับขั้นตอนและกลไกต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างที่เซลล์สืบพันธุ์อยู่ภายในอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย โดยเฉพาะในท่อนำไข่ซึ่งเป็นบริเวณที่นำตัวอสุจิและโอโอไซต์มาพบกันและเกิดการปฏิสนธิขึ้น (Hunter and Rodriguez-Martinez, 2004)

หลังการผสมพันธุ์ ตัวอสุจิสุกรจะเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วผ่านปีกมดลูกซึ่งเป็นบริเวณที่ตัวอสุจิส่วนใหญ่ตายไปเป็นจำนวนมาก แต่จะพบตัวอสุจิจำนวนหนึ่งที่รอดชีวิตไปรวมกันอยู่ที่ utero-tubal junction (UTJ) และ caudal isthmus ซึ่งเป็นที่กักเก็บตัวอสุจิ (sperm reservoir) ของสุกรในช่วงเวลาหนึ่ง ก่อนที่จะปล่อยตัวอสุจิเหล่านั้นเคลื่อนที่ไปยัง ampullary-isthmic junction (AIJ) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการปฏิสนธิเกิดขึ้น (Hunter, 1981; 1984) หน้าที่ของที่กักเก็บตัวอสุจิตามที่ได้พยายามศึกษาในเบื้องต้น คือการรักษาสภาพโครงสร้างปกติและความสามารถในการปฏิสนธิของตัวอสุจิในช่วงก่อนตกไข่โดยไม่เกิดการคาปาซิเตชัน (Rodriguez-Martinez *et al.*, 1990; Mburu *et al.*, 1996; 1997) ขณะที่รายงานบางฉบับได้ศึกษาผลของเซลล์เยื่อท่อนำไข่ที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ต่อการเปลี่ยนแปลงของตัวอสุจิ ระบุว่าเกิดการคาปาซิเตชันของตัวอสุจิเกิดขึ้นในที่กักเก็บตัวอสุจิ (Grippio *et al.*, 1995; Lefebvre and Suarez, 1996) ข้อสังเกตคือ ถ้าตัวอสุจิส่วนใหญ่ในที่กักเก็บตัวอสุจิเกิดการคาปาซิเตชัน จะมีชีวิตอยู่ได้ไม่นาน เนื่องจากกระบวนการนี้ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ (sperm plasma membrane) เปลี่ยนแปลง นำไปสู่การเคลื่อนที่แบบ hyperactivation และเกิดปฏิกิริยาอะโครโซม (acrosomal reaction) ซึ่งเป็นกลไกที่ผันกลับไม่ได้ (Harrison *et al.*, 1996) ในเมื่อกลไกของท่อนำไข่ในการรักษาสภาพและการคาปาซิเตชันของตัวอสุจิยังไม่มีความชัดเจน จึงต้องมีการศึกษาและประเมินสภาพของตัวอสุจิสุกรที่อยู่ในท่อนำไข่สุกร ซึ่งสัมพันธ์กับกระบวนการต่างๆ ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติภายในท่อนำไข่ตลอดระยะเวลาการเป็นสัดนั้น

การศึกษาสภาพสมบูรณ์และการเปลี่ยนแปลงของตัวอสุจิสุกรที่ผ่านมาส่วนใหญ่ จะใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด การย้อมด้วยคลอโรเตตราไซคลิน การตรวจดูคุณสมบัติการยึดเกาะและการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิซึ่งศึกษากับเซลล์เยื่อท่อนำไข่ของสุกรที่ยังไม่เจริญพันธุ์จากโรงฆ่าสัตว์วิธีเหล่านี้ใช้ได้ผลดีกับกลุ่มตัวอสุจิจำนวนน้อย และไม่สามารถพิสูจน์สถานภาพที่เกิดขึ้นจริงกับตัวอสุจิซึ่งอยู่ในที่กักเก็บตัวอสุจิหรือในบริเวณที่เกิดการปฏิสนธิได้ ปัจจุบันนี้ มีการพัฒนาสารฟลูออเรสเซนต์ที่ย้อมติด ส่วนประกอบต่างๆของเซลล์อสุจิซึ่งสามารถบอกถึงสถานภาพและการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับตัวอสุจิในสถานะต่างๆ ได้ โดยการประเมินต้องใช้ร่วมกับเครื่องโฟลว์ไซโตเมทรี ซึ่งสามารถ

วิเคราะห์ตัวอสุจิได้เป็นจำนวนมาก ใช้เวลารวดเร็วและให้ผลการประเมินที่เชื่อถือแม่นยำ ได้เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ (Graham, 2001) สารย้อมฟลูออเรสเซนต์ที่นิยมคือ Merocyanine-540 ซึ่งใช้ทดสอบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิซึ่งถือเป็นขั้นแรกของการคาปาซิเตชัน (Langner and Hui, 1993) การใช้ Merocyanine-540 ร่วมกับ Yo-Pro-1 สามารถประเมินสภาพการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์และการมีชีวิตของตัวอสุจิได้ในเวลาเดียวกัน ได้มีการศึกษาสี่ข้อทั้งสองชนิดอย่างได้ผลดีกับตัวอสุจิของม้า (Kavak *et al.*, 2003) และสุกร (Harrison *et al.*, 1996; Tienthai *et al.*, 2004) ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินสถานภาพในการมีชีวิต และการเกิดคาปาซิเตชันตัวอสุจิสุกรที่ได้จากการชะล้างท่อนำไข่บริเวณที่กักเก็บตัวอสุจิและที่เกิดการปฏิสนธิในระยะก่อนตกไข่ ระหว่างตกไข่ และหลังตกไข่ โดยย้อมตัวอสุจิด้วย Merocyanine-540 และ Yo-Pro-1 และประเมินผลที่ได้ด้วยเครื่องโฟลว์ไซโตเมทรี

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การตรวจคัดและการผสมเทียม

ใช้แม่สุกรสุขภาพสมบูรณ์สายพันธุ์ Swedish Landrace x Swedish Yorkshire อายุประมาณ 1.5-2.5 ปี น้ำหนัก 200-250 กก. ลำดับครอกที่ 2-5 จำนวน 15 ตัว รับซื้อมาจากฟาร์มในวันที่หย่านมและนำมาเลี้ยงที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางคลินิก คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์แห่ง สวีเดน แม่สุกรทุกตัวได้รับอาหารและน้ำตามมาตรฐานการเลี้ยงแม่สุกรของประเทศสวีเดน และเลี้ยงไว้ใกล้ชิดกับสุกรพ่อพันธุ์ตลอด เวลา ตรวจคัดของแม่สุกรด้วยวิธี back pressure วันละ 3 ครั้ง ทำการผสมเทียมสุกรทุกตัวหลังจากแสดงอาการเป็นสัดนิ่ง (standing estrus) ประมาณ 12 ชั่วโมง โดยการใช้น้ำเชื้อที่รีดเก็บได้จากสุกรพ่อพันธุ์ ซึ่งมีคุณภาพน้ำเชื้อตามมาตรฐาน (มีจำนวนตัวอสุจิมากกว่า 60,000 ล้านตัวต่อปริมาณน้ำเชื้อที่รีด ตัวอสุจิมีการเคลื่อนไหวแบบ progressive motility มากกว่า 70% และพบตัวอสุจิที่ผิดปกติน้อยกว่า 15%)

### 2. การตรวจระยะตกไข่ และการเก็บตัวอย่างจากแม่สุกร

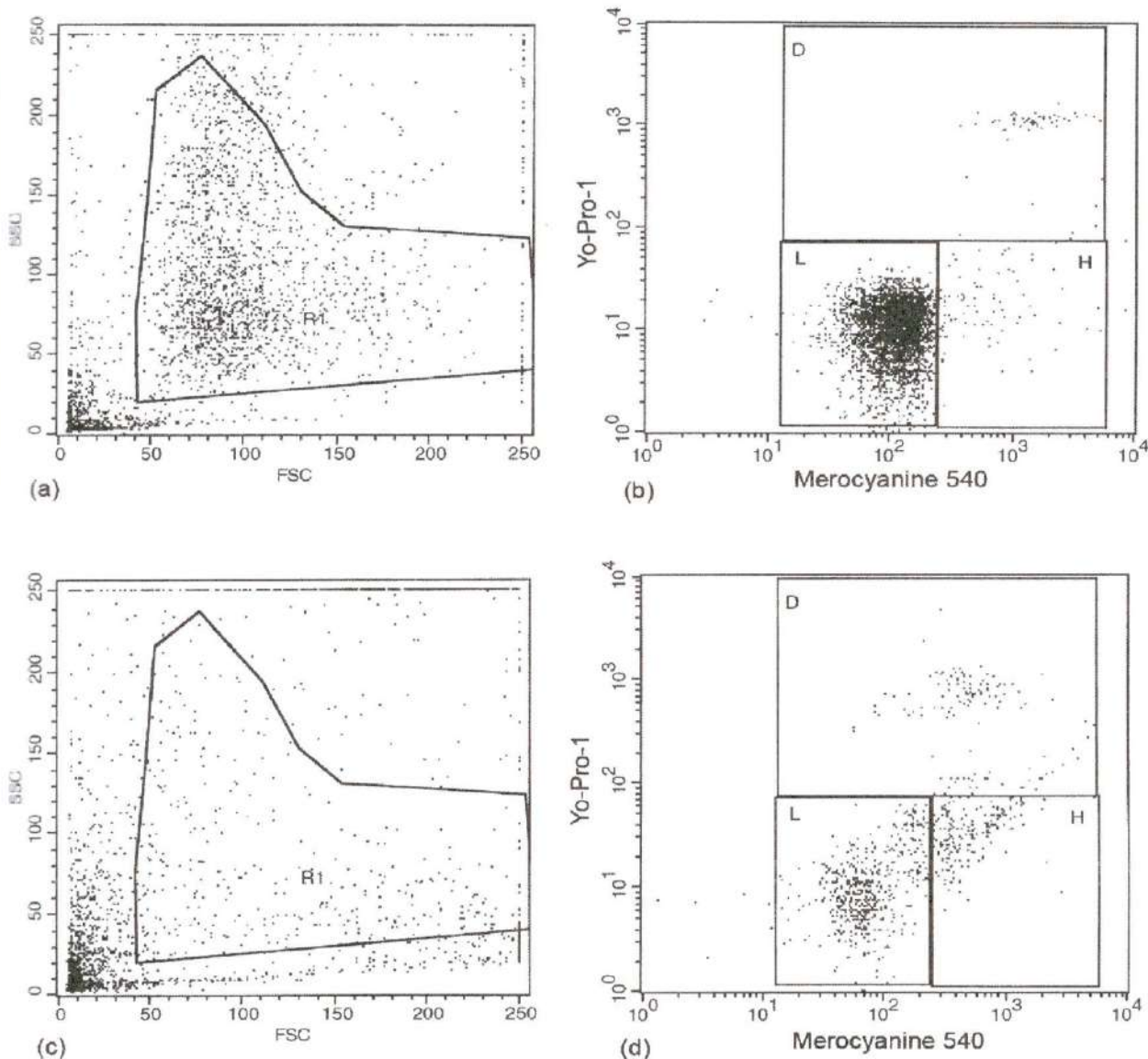
เมื่อแม่สุกรแสดงอาการเป็นสัดนิ่ง จะใช้เครื่องอัลตราซาวด์แบบเรียลไทม์ บีโหมด (Scanner 250, Pie Medical, Maastricht, The Netherlands) ตรวจการตกไข่ของแม่สุกรผ่านทางทวารหนัก (Mburu *et al.*, 1995) โดยตรวจทุก 4 ชั่วโมง หลังแสดงอาการเป็นสัด จนกระทั่งเห็นถุงฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ (ประมาณ 0.8 มม. ถึง 1 ซม.) เริ่มหายไปบางส่วนถือว่าเป็นระยะตกไข่ แม่สุกรที่ผ่านการผสมเทียมทั้ง 3 ระยะ คือ ก่อนตกไข่ (ก่อนการตกไข่ประมาณ 12 ชั่วโมง จำนวน 5 ตัว) ระหว่างตกไข่ (ถุงฟอลลิเคิลขนาดใหญ่เริ่มหายไป จำนวน 5 ตัว) และหลังตกไข่ (หลังการตกไข่ประมาณ 12 ชั่วโมง จำนวน 5 ตัว) ถูกทำให้ตายอย่างสงบโดยการฉีดยา เปิดผ่าเพื่อเก็บอวัยวะสืบพันธุ์ใส่ในภาชนะที่มีอุณหภูมิ 39°C ก่อนนำไปที่ห้องปฏิบัติการเพื่อแยกท่อนำไข่ การวิจัยในครั้งนี้ได้ผ่านการรับรองจาก The Ethical Committee for Experimentation with Animals จากเมืองอุปซาลา ประเทศสวีเดน

### 3. การชะล้างตัวอสุจิ และขั้นตอนการประเมินด้วยโฟลว์ไซโตเมทรี

ตัดท่อหน้าไข่ทั้งสองข้างจากแม่สุกรตรงบริเวณที่กักเก็บตัวอสุจิ คือ UTJ/caudal isthmus และบริเวณที่เกิดการปฏิสนธิคือ AIJ ซึ่งแต่ส่วนมีความยาวประมาณ 3 ซม. และชะล้างด้วยสารที่ไม่เหนียวน้ำให้เกิดการคาปาซิเตชันซึ่งไม่มีส่วนผสมของไบคาร์บอเนต แคลเซียม และคาเฟอีน (Brackett and Oliphant, 1975) ปริมาณ 2 มล. ของเหลวและตัวอสุจิที่ได้จากท่อหน้าไข่ซึ่งอยู่ในหลอดทดลองที่มีอุณหภูมิ 39°C จะนำไปประเมินด้วยเครื่องโฟลว์ไซโตเมทรี (Facstar Plus flow cytometer, Becton Dickinson Immunochemistry Systems, San José, CA, USA) เริ่มจากย้อมตัวอสุจิด้วย 2.7  $\mu\text{M}$  ของ Merocyanine-540 (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) และ 25 nM ของ Yo-Pro-1 (Molecular Probes Inc.) ในขณะที่ย้อมจะต้องเตรียมเครื่องโฟลว์ไซโตเมทรีให้พร้อมประมาณ 15 นาทีก่อนทำการประเมิน อัตราการประเมินผลของเครื่องอยู่ที่ 15,000-25,000 เหตุการณ์/ตัวอย่าง ข้อมูลฟลูออเรสเซนซ์จะบันทึกในรูปแบบของ logarithmic mode ประกอบด้วย forward light scatter (FSC) และ sideway light-scatter (SSC) เครื่องจะวัดค่าของ Merocyanine-540 ฟลูออเรสเซนซ์ผ่านทาง 575/30 nm band-pass filter และ Yo-Pro-1 ฟลูออเรสเซนซ์ผ่านทาง 530/30 nm band-pass filter ข้อมูล FSC และ SSC จะแสดงออกมาเป็นจุด (dot-plots) โดยแต่ละจุดเป็นการวัดค่าตัวอสุจิแต่ละตัวซึ่งอยู่ในพื้นที่ L-shape (รูปที่ 1a และ c) และเครื่องจะวิเคราะห์กลุ่มตัวอสุจิที่อยู่ในพื้นที่ L-shape อีกครั้งโดยแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยจำนวน 3 กลุ่ม (รูปที่ 1b และ d) คือ 1) กลุ่มตัวอสุจิที่ไม่ติดสี Yo-Pro-1 และไม่ก่อดูดสี Merocyanine-540 แสดงการมีชีวิตและไม่เกิดคาปาซิเตชัน (L) กลุ่มที่ 2) กลุ่มตัวอสุจิที่ไม่ติดสี Yo-Pro-1 แต่ติดสี Merocyanine-540 ชัดเจน แสดงการมีชีวิตและการคาปาซิเตชันของตัวอสุจิ (H) กลุ่มที่ 3) กลุ่มตัวอสุจิที่ติดสี Yo-Pro-1 และไม่ติดสี Merocyanine-540 แสดงถึงการตายของตัวอสุจิ (D) สำหรับจุดที่อยู่นอกเหนือพื้นที่ L-shape จะเป็นเศษเซลล์อื่นๆ ที่ไม่ใช่ตัวอสุจิ

### 4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการทดลองที่ได้เป็นเปอร์เซ็นต์ (Mean  $\pm$  S.E.M.) โดยใช้โปรแกรม SAS (SAS institute Inc., Cary, NC, USA) ด้วยวิธี one-way factorial ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของแต่ละกลุ่มด้วยวิธี Student's t-test กำหนดระดับความเชื่อมั่นอย่างมีนัยสำคัญที่ 95% ( $P < 0.05$ )



**รูปที่ 1** แสดงภาพ dot-plots จากเครื่องโฟลว์ไซโตเมทรี หลังการวิเคราะห์กลุ่มตัวอสุจิที่ได้จากการชะล้างที่กักเก็บตัวอสุจิ (a และ b) และที่เกิดการปฏิสนธิ (c และ d) จากท่อนำไข่แม่สุกร ในระยะก่อนตกไข่ ด้วยสารที่ไม่เหนียวนาให้เกิดการคาปาซิเตชัน และย้อมด้วย Merocyanine-540 และ Yo-Pro-1 โดย R1 คือพื้นที่ L-shape แต่ละจุดแสดงถึงตัวอสุจิแต่ละตัว; L คือกลุ่มตัวอสุจิที่ยังมีชีวิตแต่ไม่เกิดการคาปาซิเตชัน; H คือกลุ่มตัวอสุจิที่ยังมีชีวิตและเกิดการคาปาซิเตชัน; D คือกลุ่มตัวอสุจิที่ตายแล้ว

## ผลการทดลอง

### การสังเกตทางคลินิก

ใช้แม่สุกรในการศึกษาครั้งนี้จำนวน 15 ตัว มีระยะเวลาตั้งแต่หย่านมจนถึงการเป็นสัดที่  $4.1 \pm 0.6$  วัน (Mean  $\pm$  S.D.) ระยะเวลาการตกไข่ที่เกิดขึ้นหลังจากการเป็นสัดนี้อยู่ที่  $41.7 \pm 1.8$  ชั่วโมง และระยะเวลาที่ตัวอสุจิรวมตัวกันอยู่ในทางเดินสืบพันธุ์ของแม่สุกร ตั้งแต่ผสมพันธุ์จนถึงการชะล้างจาก UTJ/caudal isthmus และ AIJ อยู่ที่  $16.4 \pm 3.2$  ชม. (ระยะก่อนตกไข่)  $28.2 \pm 3.6$  ชม. (ระยะตกไข่) และ  $40.4 \pm 2.4$  ชม. (ระยะหลังตกไข่)

### สถานภาพของตัวอสุจิที่ได้จากบริเวณที่กักเก็บตัวอสุจิและบริเวณที่เกิดการปฏิสนธิ

ผลของค่าเฉลี่ยในการประเมินสภาพของตัวอสุจิที่ชะล้างได้จากบริเวณ UTJ/caudal isthmus และ AIJ ของท่อหน้าไข่ทั้ง 3 ระยะดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2 พบว่ากลุ่มตัวอสุจิส่วนใหญ่ที่อยู่ใน UTJ/caudal isthmus ในทุกระยะของการเป็นสัดนี้ยังคงมีชีวิต (78-83%) ในอัตราที่สูงกว่า ( $P > 0.05$ ) กลุ่มตัวอสุจิที่ได้จาก AIJ ในทุกระยะ (62-76%) และเห็นได้ชัดเจนจากภาพโฟลว์ไมโครเมทรี (รูปที่ 1) การคาปาซิเตชัน ของตัวอสุจิ ซึ่งเป็นผลจากการติดสี Merocyanine-540 จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นในกลุ่มตัวอสุจิใน UTJ/caudal isthmus ระยะหลังตกไข่ (7%) ซึ่งสูงกว่า ( $P > 0.05$ ) ระยะก่อนตกไข่ (4%) และระหว่างตกไข่ (4%) ขณะที่กระบวนการนี้เกิดเพิ่มขึ้นกับกลุ่มตัวอสุจิใน AIJ ระยะหลังตกไข่ (19%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับระยะก่อนตกไข่และหลังตกไข่ (6-7%) สำหรับตัวอสุจิที่ตายหลังจากการชะล้างท่อหน้าไข่ทั้งสองบริเวณในทุกระยะของการเป็นสัดนี้อยู่ที่ 13-25%

**ตารางที่ 1** เปอร์เซนต์ของกลุ่มตัวอสุจิสุกร (Mean  $\pm$  S.E.M.) จากการชะล้าง UTJ/caudal isthmus ของท่อหน้าไข่แม่สุกรในระยะก่อนตกไข่ ระหว่างตกไข่ และระยะหลังตกไข่ ซึ่งปรากฏในพื้นที่ L, H และ D หลังการวิเคราะห์ด้วยโฟลว์ไมโครเมทรี

ระยะต่างๆ ของการเป็นสัดนี้	กลุ่มตัวอสุจิใน UTJ/caudal isthmus (%)		
	มีชีวิต/ไม่เกิดการคาปาซิเตชัน	มีชีวิต/คาปาซิเตชัน	ตาย
ก่อนตกไข่	$78.48 \pm 3.64^a$	$4.48 \pm 2.49^a$	$12.84 \pm 3.89^a$
ระหว่างตกไข่	$74.94 \pm 0.92^a$	$4.65 \pm 2.58^a$	$15.06 \pm 2.48^a$
หลังตกไข่	$71.87 \pm 1.71^a$	$7.68 \pm 2.95^a$	$14.40 \pm 2.38^a$

ตัวอักษรที่แตกต่างกัน a,b,c ที่ปรากฏในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ  $P < 0.05$

**ตารางที่ 2** เปอร์เซนต์ของกลุ่มตัวอสุจิสุกร (Mean  $\pm$  S.E.M.) จากการชะล้างบริเวณ AIJ ของท่อนำไข่ แม่สุกรในระยะก่อนตกไข่ ระหว่างตกไข่ และหลังตกไข่ ซึ่งปรากฏในพื้นที่ L, H และ D หลังการวิเคราะห์ด้วยโฟลว์ไซโตเมทรี

ระยะต่างๆ ของการเป็นสัดนิ่ง	กลุ่มตัวอสุจิใน AIJ (%)		
	มีชีวิต/ไม่เกิดการคาปาซิเตชัน	มีชีวิต/คาปาซิเตชัน	ตาย
ก่อนตกไข่	68.80 $\pm$ 4.90 <sup>a</sup>	6.30 $\pm$ 2.54 <sup>a</sup>	16.92 $\pm$ 2.73 <sup>a</sup>
ระหว่างตกไข่	54.82 $\pm$ 7.11 <sup>a</sup>	7.54 $\pm$ 3.04 <sup>a</sup>	24.88 $\pm$ 7.02 <sup>a</sup>
หลังตกไข่	53.90 $\pm$ 4.18 <sup>a</sup>	18.96 $\pm$ 4.41 <sup>b</sup>	23.45 $\pm$ 4.27 <sup>a</sup>

ตัวอักษรที่แตกต่างกัน a,b,c ที่ปรากฏในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ P<0.05

## วิจารณ์

จากผลการทดลองพบว่ากลุ่มตัวอสุจิโดยส่วนใหญ่ที่ชะล้างได้จาก UTJ/caudal isthmus ตลอดระยะการเป็นสัดนิ่งยังคงมีชีวิตและไม่เกิดการคาปาซิเตชัน (70-78%) ผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาซึ่งระบุว่า 65-74% ของกลุ่มตัวอสุจิใน UTJ มีสภาพเยื่อหุ้มเซลล์ที่สมบูรณ์เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Mburu *et al.*, 1996) และ 69-73% ของกลุ่มตัวอสุจิจาก UTJ เช่นกันยังมีชีวิตอยู่ในระยะก่อนตกไข่และระหว่างตกไข่เมื่อย้อมด้วยคลอโรเตตราไซคลินและใช้วิธีโฟลว์ไซโตเมทรีในขั้นต้น (Tienthai *et al.*, 2004) มีหลายเหตุผลที่กล่าวว่าการไม่กลุ่มตัวอสุจิที่อยู่ในที่กักเก็บตัวอสุจิถึงได้คงอยู่ในบริเวณนี้ในระยะเวลาหนึ่ง โดยไม่เคลื่อนที่เข้าสู่ infundibulum ทันทีหลังการผสมพันธุ์ เหตุผลแรกที่เป็นไปได้คือ ที่กักเก็บตัวอสุจิของท่อนำไข่ซึ่งเป็นบริเวณแรกที่ตัวอสุจิซึ่งรอดมาจากการปีกมดลูกเคลื่อนที่มาพบ มีลักษณะเป็นท่อแคบคดเคี้ยวไปมาและมีหีบลิ้งซึ่งเกิดจากการยื่นของ endosalpinx รวมทั้งมีของเหลวที่คั่งหลังจากเย็บของ UTJ ลักษณะชั้นเหนียวโดยเฉพาะในช่วงที่สุกรเป็นสัด (Flechon and Hunter, 1981; Johansson *et al.*, 2000) โครงสร้างดังกล่าวประกอบรวมกันเป็นกลไกทางกายภาพที่ทำให้ตัวอสุจิเคลื่อนที่ไปข้างหน้าได้ช้าลง และเพิ่มโอกาสให้ตัวอสุจิได้ยึดเกาะกับผิวของเย็บของท่อนำไข่มากขึ้น (Suarez *et al.*, 1997) ยืนยันได้จากการพบกลุ่มตัวอสุจิกลุ่มใหญ่ที่รวมกันอยู่ในบริเวณหีบลิ้งของรอยพับเย็บของจะใช้ส่วนหัวของตัวอสุจิสัมผัสกับพื้นผิวของเย็บของท่อนำไข่ และส่วนหางของตัวอสุจิเหล่านั้นค่อนข้างเหยียดตรงหรือโค้งเล็กน้อย (Flechon and Hunter, 1981) การศึกษาดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า นอกจากโครงสร้างทางกายภาพที่ประกอบกันเป็นที่กักเก็บ ตัวอสุจิแล้วยังพบว่ากลไกในระดับโมเลกุลที่เกิดจากการสัมผัสโดยตรงของตัวอสุจิกับเย็บและของเหลวบนเย็บของท่อนำไข่ในบริเวณนี้ มีผลต่อการมีชีวิตของตัวอสุจิ ซึ่งของเหลวที่คั่งหลังภายใน UTJ/caudal isthmus ประกอบด้วยไฮยาลูโรแนนเป็นส่วนใหญ่ รวมทั้งมีไกลโคโปรตีนที่สำคัญบางชนิดในระยะก่อนตกไข่ (Tienthai *et al.*, 2000) สารดังกล่าวมีผลในการควบคุมสภาพปกติของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ (Tienthai *et al.*, 2003)

นอกจากนี้ สารอาหารและพลังงานที่จำเป็นซึ่งเซลล์เยื่อบุท่อหน้าไข่เตรียมไว้สำหรับตัวอสุจิ (Hunter, 1998) เป็นองค์ประกอบสำคัญทำให้ที่กักเก็บตัวอสุจิของท่อหน้าไข่มีประสิทธิภาพรักษาการมีชีวิตรอดของกลุ่มตัวอสุจิที่อยู่ใน บริเวณนี้ได้ตลอดระยะเวลาการเป็นสัดหนึ่ง

เมื่อพิจารณาถึงตัวอสุจิที่ตายในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งมีประมาณ 13-25% ของกลุ่มตัวอสุจิใน UTJ/caudal isthmus และ AIJ ในทุกระยะของการเป็นสัดหนึ่ง เมื่อตรวจสอบด้วยการติดสี Yo-Pro-1 มีความเป็นไปได้ว่าตัวอสุจิที่ตายเหล่านี้ ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มตัวอสุจิที่อยู่ภายในช่องว่าง (lumen) ของท่อหน้าไข่ ซึ่งไม่สามารถเกาะยึดกับพื้นผิวของเยื่อบุท่อหน้าไข่ได้ (Mburu *et al.*, 1997) ทำให้ได้รับพลังงานและสารอาหารน้อยกว่าตัวอสุจิที่เกาะยึดกับเซลล์เยื่อบุ และบางครั้งพบว่าเศษของเซลล์เยื่อบุที่ลอกหลุดในขณะเป็นสัดไปขัดขวางการได้รับสารอาหาร พลังงานหรือปัจจัยอื่นๆ เมื่อตัวอสุจิไปเกาะติดอยู่ (Smith and Yanagimachi, 1990) นอกจากนี้ การตายของตัวอสุจิอาจเกิดขึ้นในช่วงเวลาที่ล้อมตัวอสุจิด้วย Merocyanine-540 และ Yo-Pro-1 ซึ่งใช้เวลาประมาณ 10-15 นาที เนื่องจากอาจมีกลุ่มตัวอสุจิที่ไม่แข็งแรงที่ไม่สามารถทนต่อสภาพในหลอดทดลองได้ เหตุผลประการสุดท้ายคือ กระบวนการคาปาซิเตชันที่อาจเกิดขึ้นกับตัวอสุจิบางกลุ่มก่อนกำหนด อาจเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ตัวอสุจิตายได้ ดังที่กล่าวข้างต้นแล้วว่าการคาปาซิเตชันเป็นกระบวนการที่ผันกลับไม่ได้ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์เกิดขึ้นจะทำให้ตัวอสุจิมีอายุอยู่ได้ไม่นานและพร้อมที่จะตายได้ (Yanagimachi, 1994)

จากผลการทดลอง พบว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดคาปาซิเตชันเกิดขึ้นกับกลุ่มตัวอสุจิที่ได้จาก AIJ ในระยะหลังตกไข่ (19%) ในสัดส่วนที่สูงกว่า ( $P < 0.05$ ) ตัวอสุจิที่พบใน AIJ ทั้งในระยะก่อนตกไข่ (6%) และระหว่างตกไข่ (7%) ขณะที่สถานภาพของกลุ่มตัวอสุจิจาก UTJ/caudal isthmus ในทุกระยะของการเป็นสัดอยู่ในสภาพที่ไม่เกิดคาปาซิเตชัน แต่มีแนวโน้มในการเกิดกระบวนการนี้ระยะหลังตกไข่ แม้ว่ากลไกการเกิดคาปาซิเตชันในท่อหน้าไข่ของสุกรยังไม่เป็นที่เข้าใจกันดีนัก แต่รายงานการวิจัยส่วนหนึ่งตั้งสมมติฐานว่ากลไกนี้มีความเกี่ยวข้องกับระดับฮอร์โมนเพศเมียที่เปลี่ยนแปลงในวงรอบการเป็นสัด โดยเฉพาะในช่วงที่มีการตกไข่ จะส่งสัญญาณไปกระตุ้นให้เกิดการสร้างสารโมเลกุลขนาดเล็กที่จำเป็นสำหรับกระบวนการนี้ซึ่งผลิตได้จากเซลล์เยื่อบุท่อหน้าไข่ (Hunter, 1998; Suarez, 2001) การศึกษาในช่วงก่อนตกไข่ พบว่าที่กักเก็บตัวอสุจิสามารถควบคุมการคาปาซิเตชันได้โดยการชะลอกระบวนการนี้จนกระทั่งมีการตกไข่เกิดขึ้น (Smith, 1998) รายงานดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษานี้ที่ว่ากระบวนการคาปาซิเตชันยังไม่เกิดในระยะก่อนตกไข่ แต่จะเกิดขึ้นหลังตกไข่ เมื่อกล่าวถึงกระบวนการคาปาซิเตชันของตัวอสุจิสุกร พบว่ามีการศึกษาอย่างกว้างขวางในห้องปฏิบัติการเกี่ยวกับปัจจัยที่ทำให้เกิดกระบวนการนี้ โดยระบุว่าไบคาร์บอเนตทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นหลักในการเกิดคาปาซิเตชันผ่านการทำงานของ adenylyl cyclase และระดับที่เพิ่มขึ้นของ cyclic adenosine monophosphate (Harrison, 1996; Harrison *et al.*, 1996) การย้อมทางฮิสโตเคมีเพื่อศึกษาการปรากฏของไบคาร์บอเนตโดยตรงไม่สามารถทำได้ แต่สามารถศึกษาทางอ้อมโดยวัดความสามารถในการทำงานของ carbonic anhydrase พบว่าสารดังกล่าวปรากฏเห็นเด่นชัดที่เซลล์เยื่อบุของ AIJ และ ampulla ในระยะที่เป็นสัด (Rodriguez-Martinez *et al.*, 1991) ได้มีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อวัดระดับความเข้มข้นของไบคาร์บอเนตในท่อหน้าไข่ของแม่สุกรมีชีวิต โดยการผ่าตัดและสอดเครื่องมือวัดในส่วนต่างๆ ของท่อหน้าไข่พบว่า ระดับไบคาร์บอเนตที่วัดจาก



ของเหลวภายในท่อนำไข่ส่วน AIJ และ ampulla สูงกว่าของเหลวในท่อนำไข่ส่วนอื่น (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2001) นอกจากนี้ ได้มีการนำของเหลวจาก AIJ ไปทดสอบกับตัวอสุจิสุกรพบว่าตัวอสุจิมีการเคลื่อนที่แบบ hyperactivation เพิ่มมากขึ้น (Nichol *et al.*, 1997) ซึ่งลักษณะการเคลื่อนที่แบบนี้เป็นขั้นตอนหนึ่งของกระบวนการคาปาซิเตชัน (Suarez and Ho, 2003) การศึกษาดังกล่าวชี้แนะได้ว่าตัวอสุจิสุกรบางกลุ่มจาก UTJ/caudal isthmus สามารถเคลื่อนที่ขึ้นไปยัง AIJ ในระยะหลังตกไข่และมีความพร้อมทันทีในการเกิดคาปาซิเตชัน ดังปรากฏในการศึกษานี้เมื่อย้อมตัวอสุจิด้วย Merocyanine-540 ทั้งนี้เป็นลักษณะที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ ที่จะยอมให้มีตัวอสุจิในจำนวนที่ไม่มากซึ่งพร้อมจะปฏิสนธิกับโอโอไซต์ในสัดส่วนที่เหมาะสมเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิด polyspermy ผลการทดลองทั้งหมดสนับสนุนหน้าที่ทางสรีรวิทยาของท่อนำไข่ในส่วนที่ทำหน้าที่กักเก็บตัวอสุจิซึ่งรักษาสภาพการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิ และท่อนำไข่ส่วนที่เกิดการปฏิสนธิซึ่งจะมีตัวอสุจิจำนวนหนึ่งที่พร้อมในการเกิดการคาปาซิเตชันเพื่อเข้าปฏิสนธิกับโอโอไซต์

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ STINT foundation ประเทศสวีเดนที่ได้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยครั้งนี้ และ Dr. Andreas Johannisson ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องโฟลว์ไซโตเมทรีของภาควิชากายวิภาคศาสตร์และสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์แห่งสวีเดน เมืองอุปซาลา ประเทศสวีเดน

### เอกสารอ้างอิง

- Brackett, B.G. and Oliphant, G. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.* 12: 260-274.
- Flechon, J.E. and Hunter, R.H. 1981. Distribution of spermatozoa in the utero-tubal junction and isthmus of pigs, and their relationship with the luminal epithelium after mating: a scanning electron microscopy. *Tissue Cell* 13: 127-139.
- Graham, J.K. 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim. Reprod. Sci.* 68: 239-247.
- Grippe, A.A., Way, A.L. and Killian, G.J. 1995. Effect of bovine ampullary and isthmic oviductal fluid on motility, acrosome reaction and fertility of bull spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 105: 57-64.
- Harrison, R.A. 1996. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Repro. Fertil. Dev.* 8: 581-594.

- Harrison, R.A., Ashworth, P.J. and Miller, N.G. 1996. Bicarbonate/CO<sub>2</sub>, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membrane. *Mol. Reprod. Mol.* 45: 378-391.
- Hunter, R.H. 1981. Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation. *J. Reprod. Fertil.* 63: 109-117.
- Hunter, R.H. 1984. Pre-ovulatory arrest and peri-ovulatory redistribution of competent spermatozoa in the isthmus of the pig oviduct. *J. Reprod. Fertil.* 72: 203-211.
- Hunter, R.H.. 1998. Sperm-epithelial interactions in the isthmus and ampulla of the Fallopian tubes and their ovarian control. In: Gametes: development and function, edited by Lauria, A., Gandolfi, F., Enne, G., Gianaroli, L. Serono Symposia, Italy. p. 355-367.
- Hunter, R.H. and Rodriguez-Martinez, H. 2004. Capacitation of spermatozoa *in vivo*, with a specific focus on events in the Fallopian tubes. *Mol. Reprod. Dev.* 67: 243-250.
- Johansson, M., Tienthai, P. and Rodriguez-Martinez, H. 2000. Histochemistry and ultrastructure of the intraluminal mucus in the sperm reservoir of the pig oviduct. *J. Reprod. Dev.* 46: 183-192.
- Kavak, A., Johannisson, A., Lundeheim, N., Rodriguez-Martinez, H., Aidnik, M. and Einarsson, S. 2003. Evaluation of cryopreserved stallion semen from Tori and Estonian breeds using CASA and flow cytometry. *Anim. Reprod. Sci.* 76: 205-216.
- Langner, M. and Hui, S.W. 1993. Merocyanine interaction with phosphatidylcholine bilayer. *Biochim. Biophys. Acta.* 1149: 175-179.
- Lefebvre, R. and Suarez, S.S. 1996. Effect of capacitation on bull sperm binding to homologous oviductal epithelium. *Biol. Reprod.* 56: 575-582.
- Mburu, J.N., Einarsson, S., Dalin, A.M. and Rodriguez-Martinez, H. 1995. Ovulation as determined by transrectal ultrasonography in multiparous sows: relationship with oestrous symptoms and hormonal profiles. *J. Vet. Med. A.* 42: 285-292.
- Mburu, J.N., Einarsson, S., Lundeheim, N. and Rodriguez-Martinez, H. 1996. Distribution number and membrane integrity of spermatozoa the pig oviduct in relation to spontaneous ovulation. *Anim. Reprod. Sci.* 45: 109-121.
- Mburu, J.N., Rodriguez-Martinez, H. and Einarsson, S. 1997. Changes in sperm ultrastructure and localization in the porcine oviduct around ovulation. *Anim. Reprod. Sci.* 47: 137-148.
- Nichol, R., Hunter, R.H., de Lamirande, E., Gagnon, C. and Cooke, G.M. 1997. Motility of spermatozoa in hydrosalpingeal and follicular fluid of pigs. *J. Reprod. Fertil.* 110: 79-86.

- Rodriguez-Martinez, H., Nicander, L., Viring, S., Einarsson, S. and Larsson, K. 1990. Ultrastructure of the uterotubal junction in pre-ovulatory pigs. *Anat. Histol. Embryol.* 19: 16-36.
- Rodriguez-Martinez, H., Ekstedt, E. and Ridderstrale, Y. 1991. Histochemical localization of carbonic anhydrase in the femal genitalia of pigs during the oestrus cycle. *Acta. Anat. (Basel)* 140: 41-47.
- Rodriguez-Martinez, H., Larsson, B., Pertoft, H. and Kjellen, L. 1998. GAGs and spermatozoon competence *in vivo* and *in vitro*. In: Gametes: development and function, edited by Lauria, A., Gandolfi, F., Enne, G., Gianaroli, L. Sero Symposia, Italy. p. 239-274.
- Rodriguez-Martinez, H., Tienthai, P., Suzuki, K., Funahashi, H., Ekwall, H. and Johannisson, A. 2001. Involvement of oviduct in sperm capacitation and oocyte development in pigs. *Reprod. Suppl.* 58: 129-145.
- Smith, T.T. and Yanagimachi, R. 1990. The viability of hamster spermatozoa stored in the isthmus of the oviduct: the importance of sperm epithelium contact for sperm survival. *Biol. Reprod.* 42: 450-457.
- Smith, T.T. 1998. The modulation of sperm function by the oviductal epithelium. *Biol. Reprod.* 58: 1102-1104.
- Suarez, S.S., Brockman, K. and Lefebvre, R. 1997. Distribution of mucus and sperm in bovine oviducts after insemination: the physical environment of the oviductal sperm reservoir. *Biol. Reprod.* 56: 447-453.
- Suarez, S.S. 2001. Carbohydrate-mediated formation of sperm reservoir in mammals. *Cells Tissues Organs* 168: 105-112.
- Suarez, S.S. and Ho, H.C. 2003. Hyperactivation of mammalian sperm. *Cell. Mol. Biol.* 49: 351-356.
- Tienthai, P., Kjellen, L., Pertoft, H. Suzuki, K. and Rodriguez-Martinez, H. 2000. Localization and quantitation of hyaluronan and sulfated glycosaminoglycans in the tissues and intraluminal fluid of the pig oviduct. *Reprod. Fertil. Dev.* 12: 173-182.
- Tienthai, P., Yokoo, M., Kimura, N., Heldin, P. Sato, E. and Rodriguez-Martinez, H. 2003. Immunohistochemical localization and expression of the receptor CD44 in the epithelium of the pig oviduct during oestrus. *Reproduction* 125: 119-132.
- Tienthai, P., Johannisson, A. and Rodriguez-Martinez, H. 2004. Sperm capacitation in the porcine oviduct. *Anim. Reprod. Sci.* 80: 131-146.
- Yanagimachi, R. 1994. Mammalian fertilization. In: The Physiology of Reproduction. 2<sup>nd</sup> ed., edited by E. Knobil and J.D. Neill. Raven Press, New York, USA. p. 189-317.

## Flow cytometric evaluation of boar spermatozoa recovered from sow oviduct during estrus

Paisan Tienthai<sup>1\*</sup> and Heriberto Rodriguez-Martinez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok 10330

<sup>2</sup>Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden

\* Corresponding author Tel. 02-2189699 Fax. 02-2189657 E-mail: paisan.t@chula.ac.th

---

### Abstract

The purpose of this study was to assess the integrity and viability of boar spermatozoa retrieved from the site of sperm reservoir or SR (utero-tubal junction, UTJ/caudal isthmus) and the site of fertilization (ampullary isthmic junction, AIJ) of sow oviducts at pre-, peri- and post-ovulation using flow cytometry with Merocyanine-540/Yo-Pro-1 staining. The flushing of SR-spermatozoa were largely viable (78-83%) and non-capacitated (70-78%) throughout the stages of standing estrus. In the mean time, the relative percentages of viable AIJ-spermatozoa were lower than ( $P>0.05$ ) those found in the SR. The SR-spermatozoa underwent capacitation in minor proportion during pre- and peri-ovulation but the tendency of this process was higher ( $P>0.05$ ) during post-ovulation. Whereas the AIJ-capacitated sperm subpopulation significantly ( $P<0.05$ ) increased during post-ovulation compared to pre- and peri-ovulation. The results suggest that most capacitated spermatozoa do not occur in the SR during standing estrus but gradually changes at post-ovulation. While the spermatozoa found in AIJ were clearly capacitated at post-ovulation. The present study supports the functions of porcine SR in maintenance of sperm viability and delaying capacitation before ovulation as well as the AIJ can provide the specific environments for minority of sperm subpopulation to be capacitated after ovulation.

**Keywords:** standing estrus, capacitation, sperm reservoir, oviduct, pig