

ลักษณะของ zona pellucida ของโอโอไซต์สุกรที่เก็บในสารละลายเกลือไฮเพอร์โทนิกในระยะเวลาต่างกัน ศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

อดิศร อดิเรกถาวร<sup>1\*</sup> เกรียงยศ สัจจเจริญพงษ์<sup>1</sup> บังอร วัฒนาอำไพ<sup>3</sup>  
วิมล โพธิวงศ์<sup>1</sup> มงคล เตชะกำฟู<sup>2</sup>

Abstract

Adisorn Adirekthaworn<sup>1\*</sup> Kriengyot Sajjarengpong<sup>1</sup> Bangon Wattanaaumpi<sup>3</sup>  
Wimon Pothiwong<sup>1</sup> Mongkol Techakumphu<sup>2</sup>

**A SCANNING ELECTRON MICROSCOPE STUDY ON PORCINE ZONA PELLUCIDA STORED IN A SALT SOLUTION FOR DIFFERENT PERIODS OF TIME**

The scanning electron microscope features of the zona pellucida of immature porcine oocytes, preserved in hypertonic salt solution, for 7, 14, 28 and 56 days, were compared with the features of fresh immature oocytes. The outer zona pellucida layer showed two principal patterns. The first showed a network, with a spongy appearance and containing numerous pores, while the other had a more compact and smooth structure, with fewer pores. The diameter and the number of outer pores within a 100  $\mu\text{m}^2$  area was evaluated. The mean diameters were  $0.55\pm 0.40$ ,  $0.47\pm 0.32$ ,  $0.42\pm 0.26$ ,  $0.40\pm 0.26$  for the 7D, 14D, 28D and 56D salt-stored oocytes and  $0.42\pm 0.24$   $\mu\text{m}$  for the fresh ones. The outer pores of fresh immature oocytes were the widest ( $p < 0.05$ ). The mean number of outer pores (per 100  $\mu\text{m}^2$ ) were  $30.58\pm 7.15$ ,  $29.13\pm 4.46$ ,  $34.60\pm 1.52$ ,  $28.20\pm 5.40$  for the 7D, 14D, 28D and 56D salt-stored oocytes and  $36.01\pm 9.17$  for the fresh ones. There was no significant difference in the mean numbers between the groups of oocytes studied ( $p > 0.05$ ). These results suggest that immature oocytes could be preserved in hypertonic salt solution for 56 days without any change in the morphology of the outer zona pellucida. These preservation techniques can be possibly used during the procedure of oocyte collection in endangered animals and used to determine sperm penetrability in practical experiments.

**Keywords :** porcine, zona pellucida, salt-stored, scanning electron microscope

<sup>1</sup>Department of Anatomy, <sup>2</sup>Department of Obstetrics Gynaecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, 10330

<sup>3</sup>Scientific and Technological Research Equipment Centre, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330

\*Corresponding author

<sup>1</sup>ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ <sup>2</sup>ภาควิชาสูติศาสตร์ เภมวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

<sup>3</sup>ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

\*ผู้รับผิดชอบบทความ

## บทคัดย่อ

อดิศร อดิเรกถาวร<sup>1\*</sup> เกรียงยศ สัจจเจริญพงษ์<sup>1</sup> บังอร วัฒนาอำไพ<sup>3</sup> วิมล โพธิวงศ์<sup>1</sup> มงคล เตชะกำพุ<sup>2</sup>

### ลักษณะของ zona pellucida ของโอโอไซต์สุกรที่เก็บในสารละลายเกลือไฮเพอร์โทนิกในระยะเวลาต่างกัน ศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

ศึกษารูปร่างลักษณะภายนอกของ zona pellucida ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์สุกร โดยเก็บรักษาในสารละลายเกลือไฮเพอร์โทนิกในช่วงระยะเวลาแตกต่างกัน คือ 7, 14, 28 และ 56 วัน เปรียบเทียบกับโอโอไซต์สดชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด ลักษณะพื้นผิวภายนอกของผนัง zona pellucida โดยทั่วไปพบได้สองลักษณะ คือ ชนิดแรกมีการสานตัวคล้ายร่างแห พื้นผิวขรุขระ ภายในมีช่องว่างจำนวนมากกระจายอยู่ทั่วไป อีกชนิดมีลักษณะพื้นผิวค่อนข้างเรียบ ภายในมีช่องว่างจำนวนเล็กน้อยหรือไม่พบเลย เมื่อวัดเส้นผ่านศูนย์กลางและนับจำนวนช่องว่างที่กระจายบนพื้นผิวภายนอก พบว่ามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ  $0.55 \pm 0.40$ ,  $0.47 \pm 0.32$ ,  $0.42 \pm 0.26$ ,  $0.40 \pm 0.26$  และ  $0.42 \pm 0.24$  ไมโครเมตร และมีจำนวนช่องว่างต่อ 100 ตารางไมโครเมตรเท่ากับ  $30.58 \pm 7.15$ ,  $29.13 \pm 4.46$ ,  $34.60 \pm 1.52$ ,  $28.20 \pm 5.40$  และ  $36.01 \pm 9.17$  ช่องสำหรับโอโอไซต์ชนิดสด และโอโอไซต์ที่เก็บในสารละลายเกลือนาน 7, 14, 28 และ 56 วัน ตามลำดับ พบว่าโอโอไซต์ชนิดสดจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของช่องว่างมากที่สุด ( $p < 0.05$ ) ขณะที่จำนวนของช่องว่างต่อ 100 ตารางไมโครเมตร นั้นไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) จากการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่าการเก็บรักษาโอโอไซต์สุกรชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิในสารละลายเกลือไม่เกิน 56 วัน โดยทั่วไปไม่มีผลต่อการเสื่อมสลายของผนังชั้นนอกของ zona pellucida

คำสำคัญ: สุกร zona pellucida การเก็บรักษาในสารละลายเกลือ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

## บทนำ

Zona pellucida เป็นโครงสร้างภายนอกที่อยู่ล้อมรอบโอโอไซต์ช่วงที่กำลังเจริญ (growing oocyte) และในระยะตกไข่ (ovulated oocyte) รวมทั้งตัวอ่อนในระยะแรก (early embryo) (Yanagimachi, 1994) โครงสร้างนี้มีหน้าที่ช่วยให้โอโอไซต์สามารถเคลื่อนที่ภายในท่อนำไข่ได้ง่ายขึ้น เป็นบริเวณที่ยึดเกาะของตัวสุจิก่อนที่จะเข้าปฏิสนธิ ป้องกันการเกิดปฏิสนธิซ้อน และปกป้องความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับโอโอไซต์หรือตัวอ่อนในระยะต้น (Wassarman et al., 1999) เมื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างภายนอกของ zona pellucida ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscope; SEM) พบว่ามีลักษณะสานกันเป็นร่างแหประกอบด้วยช่องว่างมากมายคล้ายตาข่าย (mesh-like structure) โดยช่องว่างเหล่านี้จะมีขนาดและรูปร่างแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์และสภาวะของโอโอไซต์ (Yanagimachi, 1994) Riddell et al. (1993) พบว่าลักษณะภายนอกของ zona pellucida ของโอโอไซต์ที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิจะมีลักษณะค่อนข้างขรุขระ และพบช่องว่างเป็นจำนวนมากกระจายอยู่

ทั่วไป โดยช่องว่างเหล่านี้จะมีขนาดกว้างและลึกกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ zona pellucida ของโอโอไซต์ที่พร้อมปฏิสนธิ ช่องว่างนี้จะมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นคือมีขนาดเล็กลงจนมีลักษณะเรียบ เมื่อมีการปฏิสนธิจนเจริญเป็นตัวอ่อนระยะไซโกต ระยะ 8 เซลล์ และระยะมอรูล่า ตามลำดับ (Suzuki et al., 1994; Magerkurth et al., 1999; Funahashi et al., 2000; Vanroose et al., 2000)

ในช่วงที่ผ่านมาได้มีการนำโอโอไซต์ที่เก็บรักษาในสารละลายเกลือ (salt-stored oocyte) ทั้งชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิและชนิดพร้อมปฏิสนธิร่วมกับเทคนิคการปฏิสนธิภายนอก ร่างกาย มาใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการเกาะติด (sperm binding) ความสามารถในการเจาะผ่านของตัวสุจิ (sperm penetration) (Chian et al., 1991; Fazeli et al., 1995; Lynham and Harrison, 1998) โดยเทคนิคนี้ได้มีการพัฒนาใช้ในสัตว์หลายชนิดได้แก่ กระต่าย (Fayer-Hosken and Brackett, 1987) แสมสเตอร์ (Boatman et al., 1988) สุนัข (Ström Holst et al., 2000; Mastromonaco et al., 2002) แมว (Anderws et al., 1992; Herrick and Swanson, 2003) โค

(Chian et al., 1991) และสุกรี (Fazeli et al., 1995; Lynham and Harrison, 1998) ในการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการใช้ไอโอไซท์ที่เก็บรักษาในสารละลายเกลือในช่วงระยะเวลาต่างกันในการทดสอบตัวอสุจิในสัตว์หลายๆ ชนิด Andrews et al. (1992) ได้ใช้ไอโอไซท์สดเปรียบเทียบกับไอโอไซท์ที่เก็บในสารละลายเกลือที่มีส่วนประกอบของ  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $MgCl_2$ , Hepes,  $ZnCl_2$  และ Polyvinyl alcohol (PVA) เป็นเวลา 24 สัปดาห์ ในการตรวจสอบความสามารถในการเจาะผ่านของตัวอสุจิแมว ซึ่งผลที่ได้พบว่าความสามารถในการเจาะผ่านของตัวอสุจิไม่มีความแตกต่างกันในไอโอไซท์ทั้งสองชนิด โดยผลที่ได้นี้เหมือนกับการศึกษาเมื่อใช้ไอโอไซท์ของกระต่ายเมื่อเก็บรักษาในระยะเวลา 6 เดือน (Fayer-Hosken and Brackett, 1987) ในทางตรงกันข้าม Herrick และ Swanson (2003) ได้รายงานถึงการทดสอบโดยใช้ไอโอไซท์แมวที่เก็บรักษาในสารละลายเกลือนาน 2-3 สัปดาห์ พบว่าจำนวนอสุจิที่ผ่านเข้าไปในไอโอไซท์สดมีจำนวนมากกว่า ซึ่งเหมือนกับการศึกษาในสัตว์ชนิดอื่น (Chian et al., 1991; Ström Holst et al., 2000; Mastromonaco et al., 2002) จากผลการศึกษาที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่าเมื่อใช้ไอโอไซท์ที่เก็บรักษาในสารละลายเกลือเป็นเครื่องมือในการทดสอบตัวอสุจินั้นยังมีความแตกต่างกันออกไปในแต่ละการทดลอง การศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระดับโครงสร้างนี้สามารถใช้ในการประเมินการใช้ประโยชน์จากไอโอไซท์ที่เก็บรักษาในการสารละลายเกลือ รวมถึงความสัมพันธ์ของความสามารถในการเกาะติด และเจาะผ่านของตัวอสุจิได้ (Ström Holst et al., 2000) ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับผนัง zona pellucida ของไอโอไซท์สุกรีในระดับโครงสร้างเมื่อเก็บรักษาไอโอไซท์ในสารละลายเกลือในช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกันไป

### วัสดุและวิธีการ

#### การเก็บไอโอไซท์

ทำการเก็บรังไข่ของสุกรีจากโรงฆ่าสัตว์ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม โดยเก็บรังไข่แช่ในน้ำเกลือ 0.9% อุณหภูมิ 37°C. จากนั้นนำกลับมายังห้องปฏิบัติการภายใน 30 นาที ทำการล้างอีกครั้งด้วยน้ำเกลือ 0.9% ใช้เข็มพลาสติกเบอร์ 19 ค่อยๆ หลอดฉีดยาพลาสติกขนาด 5 มล. เจาะจุดของเหลวจากฟอลลิคูลขนาด 3-5 มม. แล้วเทของเหลวลงในจานพลาสติกที่บรรจุน้ำยาเลี้ยงไอโอไซท์ชนิด TCM 199 Hepes (sigma, USA) ทำการตรวจหาไอโอไซท์ด้วยกล้องสเตอริโอ

กำลังขยาย 10-40 เท่า เลือกอไอโอไซท์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มล้อมรอบ (compact cumulus oocyte: CCO) มาล้างในน้ำยา TCM 199 Hepes อีก 3 ครั้ง ก่อนที่จะนำไอโอไซท์ที่ได้ไปแยกเซลล์คิวมูลัสออกจากเปลือก (decoration) ด้วย 1% hyarulondase ใน TCM 199  $NaHCO_3$  ที่อุณหภูมิ 38.5°C. นาน 30 นาที จากนั้นนำไปเปิดที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใกล้เคียงกับขนาดไอโอไซท์ชุดเข้าออกหลายๆ ครั้งจนเซลล์คิวมูลัสที่อยู่ล้อมรอบหลุดออกมาจนหมด ไอโอไซท์ชนิดนี้เป็นไอโอไซท์ชนิดที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ

#### การเก็บรักษาไอโอไซท์ในสารละลายเกลือ

แบ่งไอโอไซท์ชนิดที่ได้มานี้มาเก็บรักษาไว้ในสารละลายเกลือที่มีส่วนประกอบของ  $(NH_4)_2SO_4$  0.5 M,  $MgCl_2$  0.75 M, Hepes 40 mM  $ZnCl_2$  0.2 mM และ PVA 0.1 มก./มล. (pH 7.4) บรรจุไว้ในจานพลาสติกชนิด 4 หลุม เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C. (Lynham and Harrison, 1998) ในระยะเวลาแตกต่างกัน คือ 7, 14, 28, 56 วัน และไอโอไซท์ชนิดสด โดยมีจำนวนไอโอไซท์ในแต่ละกลุ่ม 10-15 ไอโอไซท์ เมื่อครบกำหนดตามเวลาดังกล่าวแล้วนำไอโอไซท์มาล้างด้วยน้ำยา PBS (phosphate buffer saline; pH 7.2-7.4) จำนวน 2 ครั้ง ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนจะนำไอโอไซท์ที่ได้ไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดต่อไป

#### ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างไอโอไซท์เพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

นำไอโอไซท์มาคงสภาพครั้งแรกด้วย 2.5% glutaraldehyde ใน phosphate buffer 0.1 M โดยทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4°C. จากนั้นนำมาคงสภาพซ้ำด้วย 1%  $OsO_4$  นาน 60 นาที เมื่อครบกำหนดแล้วทำการจัดน้ำออกจากไอโอไซท์ด้วย ethanol ที่ระดับความเข้มข้น 30, 50, 70, 90 และ 100% ตามลำดับ และทำตัวอย่างให้แห้ง ณ จุดวิกฤต (critical point drying) หลังจากนั้นติดตัวอย่างลงบนแท่นวางตัวอย่างด้วยเทปสองหน้า และฉาบผิวตัวอย่างด้วยทองคำก่อนนำตัวอย่างเข้าศึกษาด้วยกล้อง SEM (JSM-5800 LV, JEOL, Japan) ที่ความต่างศักย์ 15 กิโลโวลต์ กำลังขยาย 1,000-5,000 เท่า

#### การศึกษา และวิเคราะห์รูปร่างลักษณะของไอโอไซท์

ศึกษารูปร่างลักษณะทั่วไป วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของช่องว่างที่พบ (ในกรณีที่มีช่องว่างมีลักษณะเป็นวงรี หรือมี

**ตารางที่ 1** ค่าเฉลี่ยของจำนวนช่องว่าง (ช่อง/100  $\mu\text{m}^2$ ) (A) และเส้นผ่านศูนย์กลางของช่องว่าง ( $\mu\text{m}$ ) (B) บนพื้นผิว zona pellucida ของโอโอไซตชนิดที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิของสุกร

ระยะเวลาของการเก็บ	A	B
0 วัน	30.58±7.15 (n=366)*	0.55±0.40 <sup>a</sup> (n=366)**
7 วัน	29.13±4.46 (n=243)	0.47±0.32 <sup>b</sup> (n=243)
14 วัน	34.60±1.52 (n=284)	0.42±0.26 <sup>b</sup> (n=284)
28 วัน	28.20±5.40 (n=276)	0.40±0.26 <sup>b</sup> (n=276)
56 วัน	36.01±9.17 (n=291)	0.42±0.24 <sup>b</sup> (n=291)

ตัวอักษรที่ต่างกัน (a, b) แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

\*จำนวนโอโอไซต์ \*\*จำนวนรูบนพื้นผิว zona pellucida

รูปร่างไม่แน่นอนจะวัดบริเวณที่มีความยาวที่สุด) และนับจำนวนของช่องว่าง (pore) บนผนัง zona pellucida (จำนวนช่อง/100  $\mu\text{m}^2$ ) ที่เก็บรักษาในสารละลายเกลือในช่วงเวลาต่างๆ เปรียบเทียบกับโอโอไซต์สดโดยใช้กล้อง SEM ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนชนิดทางเดียว (one-way ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

### ผล

รูปร่างของโอโอไซต์สุกรชนิดที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิของทั้งชนิดสด และที่เก็บรักษาในสารละลายเกลือในช่วงเวลาแตกต่างกัน พบว่ามีลักษณะใกล้เคียงกัน คือมีรูปร่างทรงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 70-90 ไมโครเมตร (รูปที่ 1a-5a) เมื่อศึกษาลักษณะพื้นผิวภายนอกของ zona pellucida ด้วยกล้อง SEM ในช่วงกำลังขยายที่สูงทั้งชนิดที่เก็บรักษาไว้ในสารละลายเกลือในระยะเวลาต่างๆ และชนิดสดนั้นไม่พบความแตกต่างกันอย่างเด่นชัด (รูปที่ 1b-5b) โดยลักษณะที่พบโดยทั่วไปของ zona pellucida มีอยู่สองลักษณะคือ ชนิดแรกมีการสานตัวกันคล้ายร่างแห พื้นผิวขรุขระ ภายในประกอบด้วยช่องว่างจำนวนมากกระจายอยู่ทั่วไป (รูปที่ 1b-5b) ช่องว่างนี้มีลักษณะรีหรือกลม ขนาดแตกต่างกันเรียงตัวหลายชั้น ชั้นนอกสุดมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางกว้างกว่าช่องว่าง ที่อยู่ภายในชั้นที่ลึกลงไปตามลำดับ พื้นผิวภายนอกของ zona pellucida อีกชนิดที่พบได้ คือ มีลักษณะค่อนข้างเรียบกว่า ประกอบด้วยช่องว่างจำนวนเพียงเล็กน้อย และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่าเมื่อเทียบกับพื้นผิวของลักษณะแรก นอกจากนี้ในบางบริเวณไม่สามารถพบช่องว่างบนของพื้นผิว zona pellucida (รูปที่ 6a, b) โดยพบลักษณะพื้นผิวทั้งสองชนิดในปริมาณใกล้เคียงกันในทุกระยะเวลาของการเก็บรักษา

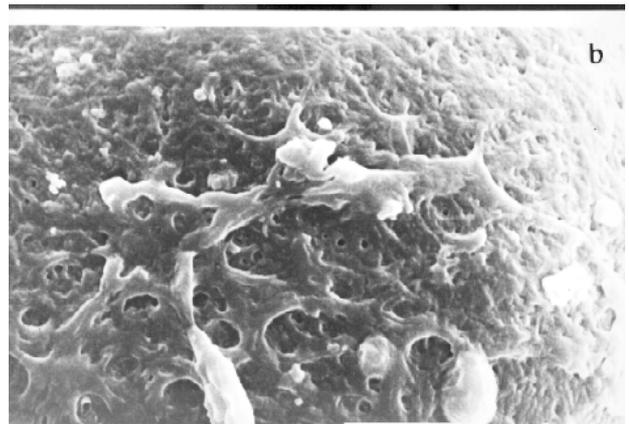
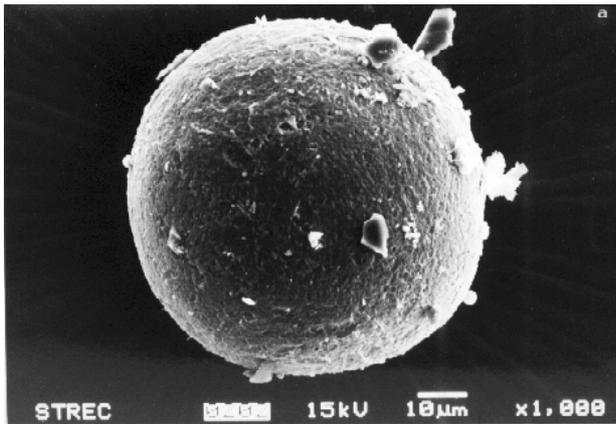
ในสารละลายเกลือ

เมื่อวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลาง และนับจำนวนของช่องว่างที่พบบนพื้นผิวของ zona pellucida พบว่าค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของช่องว่างบนพื้นผิว zona pellucida ที่ได้จากโอโอไซต์ที่เก็บรักษาในสารละลายเกลือในระยะเวลาที่แตกต่างกัน จะมีขนาดเล็กกว่าเมื่อเทียบกับโอโอไซต์ชนิดสด ( $p < 0.05$ ) โดยที่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของช่องว่างที่ได้จากโอโอไซต์ในสารละลายเกลือ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระยะเวลา 7, 14, 28 และ 56 วัน ในขณะที่ค่าเฉลี่ยของจำนวนช่องว่างต่อ 100  $\mu\text{m}^2$  ของ zona pellucida ที่ได้มาจากโอโอไซต์ชนิดสด และที่เก็บรักษาในสารละลายเกลือไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) (ตารางที่ 1)

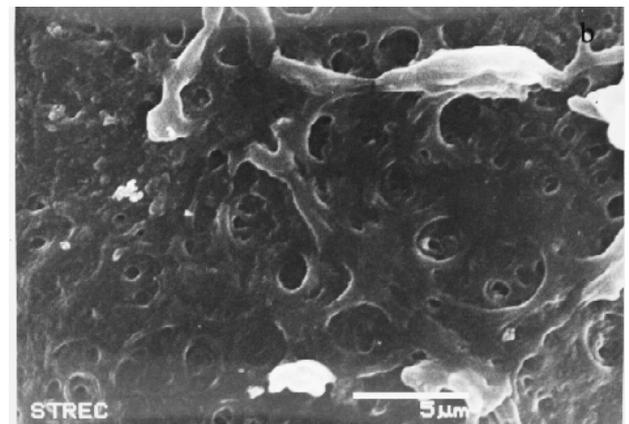
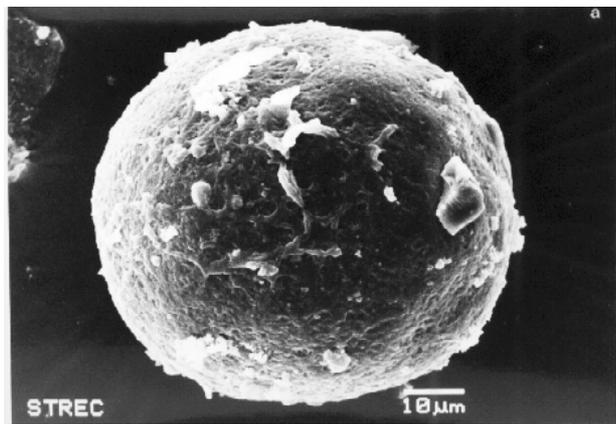
### วิจารณ์

การนำโอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิที่เก็บรักษาในสารละลายเกลือมาใช้ในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อโดยตรวจสอบจากความสามารถในการเจาะผ่านของตัวสุจินนั้นมีข้อดี เนื่องจากไม่ต้องเสียเวลาในการเลี้ยงโอโอไซต์จนถึงระยะพร้อมปฏิสนธิ ทำให้ประหยัดระยะเวลาในการตรวจสอบและค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงโอโอไซต์ (Martinez et al., 1993) นอกจากนี้ การเก็บรักษาโอโอไซต์ในสารละลายเกลือยังมีประโยชน์ในกรณีที่เป็นโอโอไซต์ของสัตว์ที่หายาก รวมถึงมีจำนวนน้อยในการเก็บจากรังไข่แต่ละครั้ง (Herrick and Swanson, 2003) ซึ่งโอโอไซต์เหล่านี้มีข้อดี คือ สามารถเก็บรักษาไว้ได้เป็นเวลานาน และไม่เกิดกลไกในการป้องกันการเข้าปฏิสนธิซ้อนของตัวสุจินได้ (Boatman et al., 1988)

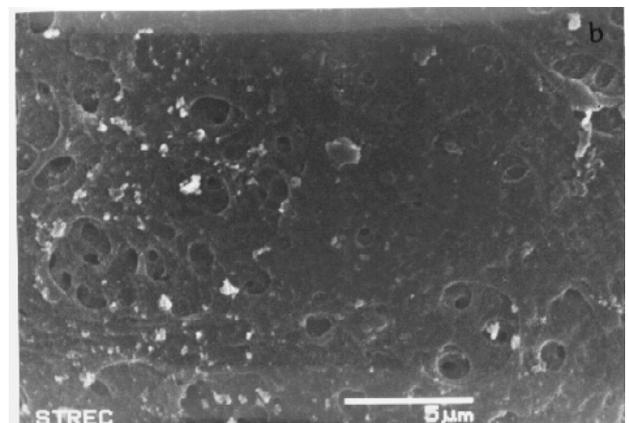
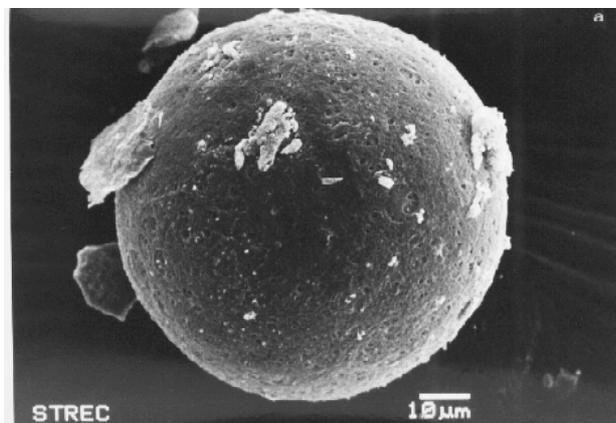
โครงสร้างของโอโอไซต์สุกรเมื่อใช้กล้อง SEM ใน



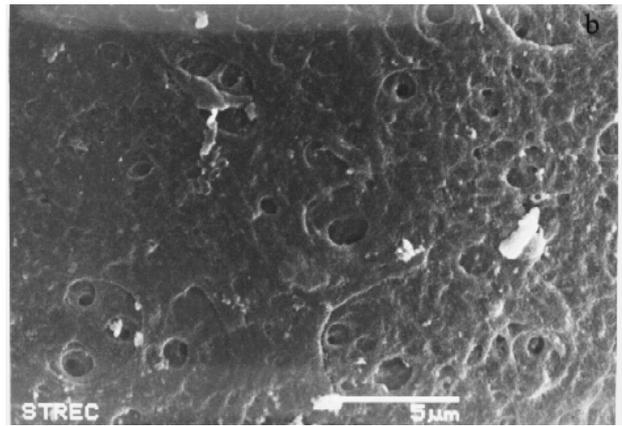
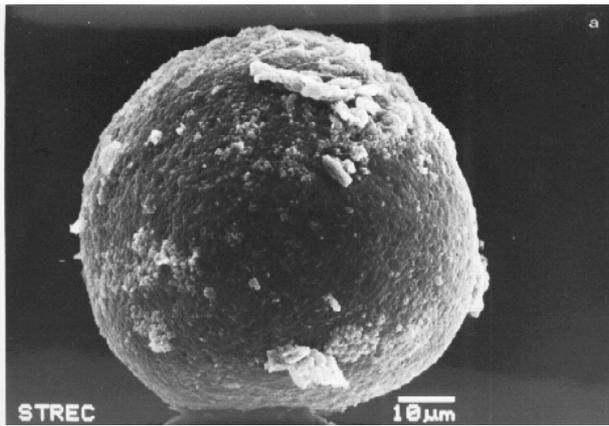
**รูปที่ 1** โอโอไซต์สุกรชนิดสด มีลักษณะขรุขระ ประกอบด้วยช่องว่างเป็นจำนวนมาก  
a) ทั้งใบ b) ส่วนขยายพื้นผิว



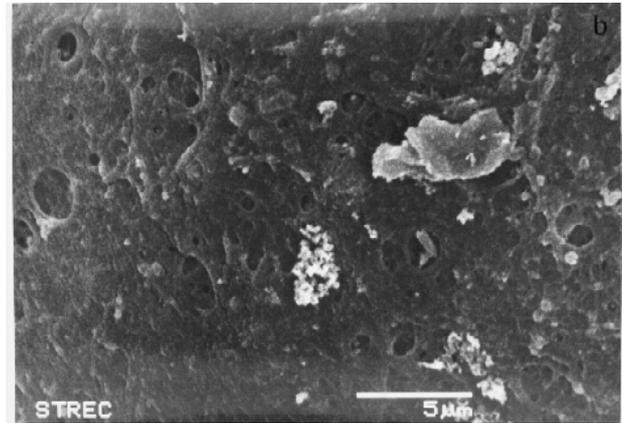
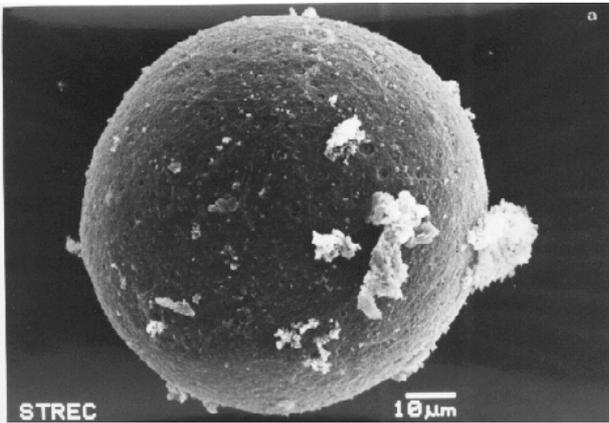
**รูปที่ 2** โอโอไซต์สุกรเมื่อเก็บรักษาในสารละลายเกลืออนาน 7 วัน มีลักษณะขรุขระ ประกอบด้วยช่องว่างเป็นจำนวนมาก  
a) ทั้งใบ b) ส่วนขยายพื้นผิว



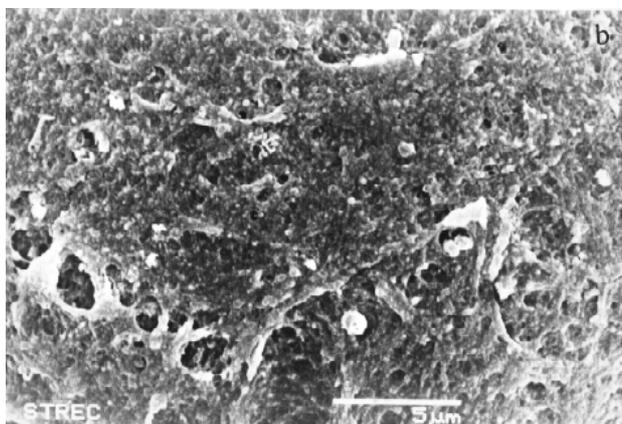
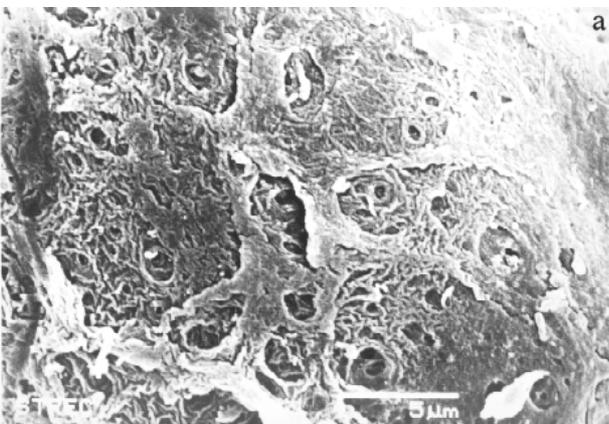
**รูปที่ 3** โอโอไซต์สุกรเมื่อเก็บรักษาในสารละลายเกลืออนาน 14 วัน มีลักษณะขรุขระ ประกอบด้วยช่องว่างเป็นจำนวนมาก  
a) ทั้งใบ b) ส่วนขยายพื้นผิว



**รูปที่ 4** โอโอไซต์สุกรเมื่อเก็บรักษาในสารละลายเกลืออนาน 28 วัน มีลักษณะขรุขระ ประกอบด้วยช่องว่างเป็นจำนวนมาก  
a) ทั้งใบ b) ส่วนขยายพื้นผิว



**รูปที่ 5** โอโอไซต์สุกรเมื่อเก็บรักษาในสารละลายเกลืออนาน 56 วัน มีลักษณะขรุขระ ประกอบด้วยช่องว่างเป็นจำนวนมาก  
a) ทั้งใบ b) ส่วนขยายพื้นผิว



**รูปที่ 6** ลักษณะพื้นผิวภายนอกของโอโอไซต์สุกร มีลักษณะค่อนข้างเรียบ พบช่องว่างเพียงเล็กน้อย  
a) โอโอไซต์ชนิดสด b) โอโอไซต์ที่เก็บรักษาในสารละลายเกลืออนาน 56 วัน

การตรวจสอบ พบว่าลักษณะพื้นผิวของ zona pellucida ในโอโอไซต์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมมีอยู่สองลักษณะ คือ ชนิดแรกจะมีลักษณะขรุขระมาก การเรียงตัวคล้ายตาข่ายสานกันไปมา ภายในมีช่องว่างจำนวนมากกระจายอยู่ทั่วไป โดยจะเป็นลักษณะที่พบได้มากในโอโอไซต์ที่พร้อมปฏิสนธิ (Funahashi et al., 2000; Vanroose et al., 2000) และอีกลักษณะ คือ ลักษณะที่ค่อนข้างเรียบ มีช่องว่างเพียงเล็กน้อย หรือไม่มีเลย ซึ่งเป็นลักษณะที่จะพบได้มากในโอโอไซต์ระยะที่มีการเสื่อมสลายของ zona pellucida หรือระยะที่มีการเจริญไปเป็นตัวอ่อนระยะต้น (Vanroose et al., 2000; Xia et al., 2001) โดยลักษณะดังกล่าวของพื้นผิวบน zona pellucida เป็นร่องรอยที่เหลืออยู่ของเซลล์คิวมูลัสและ corona radiata (Vanroose et al., 2000) รวมทั้งสามารถพบลักษณะของโอโอไซต์ทั้งสองชนิดได้ในสภาวะปกติ (Magerkurth et al., 1999; Funahashi et al., 2000; Vanroose et al., 2000) นอกจากนี้ลักษณะพื้นผิวของผนัง zona pellucida ยังไม่มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการเกาะติด การเจาะผ่าน รวมถึงการปฏิสนธิของตัวสุจิ กล่าวคือตัวสุจิสามารถเจาะผ่านได้ทั้งบริเวณที่มีพื้นผิวขรุขระ และพื้นผิวเรียบ (Magerkurth et al., 1999) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้โอโอไซต์สุกรชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิที่เก็บรักษาในสารละลายเกลือเป็นตัวอย่งในการศึกษารูปร่างลักษณะ และผลที่ได้พบลักษณะพื้นผิวของ zona pellucida ทั้งสองลักษณะเช่นเดียวกับการศึกษา zona pellucida ในโอโอไซต์มนุษย์ (Magerkurth et al., 1999) และในสัตว์อีกหลายชนิด (Riddell et al., 1993; Suzuki et al., 1994; Ström Holst et al., 2000)

Hammit et al. (1993) ได้สังเกตเห็นถึง ความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับโอโอไซต์ในมนุษย์เมื่อเก็บรักษาในสารละลายเกลือ โดยพบว่าลักษณะพื้นผิวของผนัง zona pellucida จะมีความเปราะบางมากขึ้นรวมถึงมีรูปร่างที่ผิดไปจากลักษณะเดิมซึ่งผลตรงกับการศึกษาในครั้งนี้พบว่าขนาดของ เส้นผ่านศูนย์กลางของช่องว่างบนผนัง zona pellucida ของโอโอไซต์ที่เก็บรักษาไว้ในสารละลายเกลือ มีขนาดเล็กลงเมื่อเทียบกับโอโอไซต์ชนิดสด ซึ่งการเปลี่ยนแปลง ดังกล่าวอาจเป็นผลเนื่องมาจากการเก็บรักษาโอโอไซต์ไว้ในสารละลายเกลือ โดยพบว่าสารละลายเกลือที่มีความเข้มข้นสูงไปมีผลทำให้เกิดการคั่งน้ำออกมาจากภายในโอโอไซต์ และองค์ประกอบที่มีอยู่ในสารละลายเกลือจะไปลดความสามารถในการยึดหยุ่นของผนัง zona pellucida (Chian et al., 1991) นอกจากนี้ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บ

รักษาโอโอไซต์ในสารละลายเกลือจะไปมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอีกด้วย กล่าวคือยิ่งเก็บรักษาโอโอไซต์ไว้เป็นระยะเวลานานเท่าใดความสามารถในการเจาะผ่านของตัวสุจิก็น้อยลงตามลำดับ (Lynham and Harrison, 1998; Ström Holst et al., 2000; Herrick and Swanson, 2003) ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ระยะเวลาในการเก็บรักษาในสารละลายเกลือ 7, 14, 28 และ 56 วัน พบว่าสภาพของ zona pellucida ของโอโอไซต์ตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษานั้นไม่มีลักษณะแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Lynham and Harrison (1998) ที่รายงานว่า การเก็บรักษาโอโอไซต์สุกรในสารละลายเกลือระยะเวลาไม่เกิน 2 เดือนนั้น ตัวสุจิจะยังคงสามารถเจาะผ่านผนัง zona pellucida เข้าไปในโอโอไซต์ได้ในระดับเดิม

การศึกษานี้สรุปได้ว่าสภาพพื้นผิวของ zona pellucida ในโอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิของสุกรที่เก็บรักษาในสารละลายเกลือในช่วงระยะเวลาไม่เกิน 2 เดือนนั้น โดยทั่วไปไม่มีผลต่อการเสื่อมสลายของผนัง zona pellucida พบได้เพียงการหดตัวของผนังภายนอกซึ่งต่างไปจากโอโอไซต์ชนิดสด ในขณะที่เปรียบเทียบลักษณะของโอโอไซต์ที่เก็บรักษาในสารละลายเกลือในช่วงระยะเวลาต่างๆ ตลอดระยะเวลาของการเก็บรักษาด้วยกันนั้น ไม่พบความแตกต่างของผนังชั้นนอกของ zona pellucida จากผลที่ได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการเก็บรักษาตัวอย่งโอโอไซต์โดยเฉพาะในสัตว์หายาก หรือสัตว์ที่เก็บตัวอย่งโอโอไซต์ได้ยาก เพื่อใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการเจาะผ่านของตัวสุจิต่อไป

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนพัฒนาอาจารย์ใหม่/นักวิจัยใหม่ กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปี 2544 ที่ให้การสนับสนุนการศึกษาในครั้งนี้ อ.น.สพ. ดร.ไพศาล เทียนไทย ที่ให้ความอนุเคราะห์เอกสารอ้างอิงต่างประเทศเพิ่มเติม และ รศ. น.สพ. ดร. วีระพงศ์ โกยกุล ในการตรวจทานแก้ไขบทคัดย่อภาษาอังกฤษ

### เอกสารอ้างอิง

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

- Boatman, D.E., Andrews, J.C. and Bavister, B.D. 1988. A quantitative assay for capacitation: evaluation on multiple sperm penetration through the zona pellucida of salt-stored hamster eggs. *Gamete Res.* 19: 19-29.
- Chian, R.C., Niwa, K. and Okuda, K. 1991. *In vitro* penetration of zona pellucida of salt-stored bovine oocytes before and after maturation by frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology* 36: 209-219.
- Fayrer-Hosken, R.A. and Brackett, B.G. 1987. Use of salt-stored zonae pellucidae for assessing rabbit sperm capacitation for *in vitro* fertilization. *Gamete Res.* 17: 191-201.
- Fazeli, A.R., Holt, C., Steenweg, W., Bevers, M.M., Holt, W.V. and Colenbrander, B. 1995. Development of a sperm hemizona binding assay for boar semen. *Theriogenology* 44: 17-27.
- Funahashi, H., Ekwall, H. and Rodriguez-Martinez, H. 2000. Zona reaction in porcine oocytes fertilized *in vivo* and *in vitro* as seen with scanning electron microscopy. *Biol. Reprod.* 63: 1437-1442.
- Hammit, D.G., Syrop, C.H., Walker, D.L. and Bennett, M.R. 1993. Conditions of oocyte storage and use of non-inseminated as compared with, inseminated, non-fertilized oocytes for hemizona assays. *Fertil. Steril.* 60: 131-136.
- Herrick, J.R. and Swanson, W.F. 2003. Gonadotropin exposure, salt storage and storage duration affect penetration of domestic cat oocytes by homologous spermatozoa. *Theriogenology* 59: 1503-1513.
- Lynham, J.A. and Harrison, R.A.P. 1998. The use of stored pig eggs to assess boar sperm fertilizing functions *in vitro*. *Biol. Reprod.* 58: 539-550.
- Magerkurth, C., Topfer-Petersen, E., Schwartz, P. and Michelmann, H.W. 1999. Scanning electron microscopy analysis of the human zona pellucida: influence of maturity and fertilization on morphology and sperm binding pattern. *Hum. Reprod.* 14: 1057-1066.
- Mastromonaco, G.F., Hay, M.A. and Goodrowe, K.L. 2002. The effect of oocyte storage and cumulus cell presence on canine zona penetration by domestic dog spermatozoa. *Theriogenology* 57: 1123-1134.
- Martinez, E., Vazquez, J.M., Matas, C., Roca, J., Coy, P. and Gadea, J. 1993. Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. *Theriogenology* 40: 547-557.
- Riddell, K.P., Stringfellow, D.A., Gray, B.W., Riddell, M.G., Wright, J.C. and Galik, P.K. 1993. Structural and viral association comparisons of bovine zonae pellucidae from follicular oocytes, day-7 embryos and day-7 degenerated ova. *Theriogenology* 40: 1281-1291.
- Suzuki, H., Yang, X. and Foote, R.H. 1994. Surface characteristics and size changes of immature, *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine oocytes. *Theriogenology* 41: 307. (abstr)
- Ström Holst, B., Larsson, B., Linde-Forsberg, C. and Rodriguez-Martinez, H. 2000. Sperm binding capacity and ultrastructure of the zona pellucida of stored canine oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 119: 77-83.
- Vanroose, G., Nauwynck, H., Soom, A.V., Ysebaert, M., Charlier, G., Oostveldt, P.V. and de Kruif, A. 2000. Structural aspects of zona pellucida of *in vitro*-produced bovine embryos: a scanning electron and confocal laser scanning microscopic study. *Biol. Reprod.* 62: 463-469.
- Wassarman, P., Chen, J., Cohen, N., Litscher, E., Liu, C., Qi, H. and Williams, Z. 1999. Structure and function of the mammalian egg zona pellucida. *J. Exp. Zool.* 285: 251-258.
- Xia, P., Wang, Z., Yang, Z., Tan, J. and Qin, P. 2001. Ultrastructural study of polyspermy during early embryo development in pigs, observed by scanning electron microscope and transmission electron microscope. *Cell Tissue Res.* 303: 271-275.
- Yanagimachi, R. 1994. Mammalian fertilization. In : *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil and J.D. Neill (eds.) New York: Raven Press. 189-317.