

591.051

h 23410

ร 2

น้ำตาลเชิงเคี้ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเคี้ยวที่มีผล
ต่อการยับยั้งอะโกรซินของหนูแฮมสเตอร์

ปริญญานิพนธ์

ของ

นิตย์ แสงรุ่ง

สำนักหอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
สุขุมวิท 23 พระโขนง กรุงเทพฯ 11 โทร. 3921575, 3915058

ร.1 ก.พ. 2527

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประธานมิตร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาค้นคว้าหลักสูตร
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต
ตุลาคม 2526

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำตัวนิสิตและคณะกรรมการสอบ ได้พิจารณาปัญหานี้พบ
ฉบับนี้แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาค้นคว้าหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิตของ
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

คณะกรรมการที่ปรึกษา

..... สมชาย ธรรมานะ ประธาน

..... สมชาย ธรรมานะ กรรมการ

คณะกรรมการสอบ

..... สมชาย ธรรมานะ ประธาน

..... สมชาย ธรรมานะ กรรมการ

..... พริ้ง (กต) กรรมการ

นับเป็นพระมหากรุณาธิคุณล้นเกล้าล้นกระหม่อมที่ปรีดีอุยนิพนธ์ฉบับนี้ได้รับ
การคัดเลือกให้ได้รับพระราชทานทุน "ภูมิพล" ของพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว

ประกาศคุณูปการ

กราบขอพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปราณีต ชาญมานนท์ ภาควิชา
ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ
พรหมบุญ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ประสานมิตร อาจารย์ผู้ทรงคุณวุฒิทั้งสองท่าน ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ และ
สนับสนุนงานวิจัยนี้สำเร็จดังต่อไปนี้ ผู้วิจัยขอระลึกถึงพระคุณในความกรุณาและ
ขอจดจำความดีของท่านอาจารย์ทั้งสองไว้ตลอดไป

นิตย แสงรุ่ง

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย	3
ความสำคัญของการวิจัย	3
ขอบเขตของการวิจัย	3
ค่านิยมศัพท์เฉพาะ	3
2 เอกสารและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	9
สัตว์ทดลอง	9
การเตรียมอสุจิ	9
การเตรียมไข่	9
วิธีดำเนินการทดลอง	10
การวิเคราะห์ข้อมูล	12
4 ผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล	14
ข้อมูลที่น่ามาวิเคราะห์	14
สัญลักษณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล	14
ผลการทดลอง	16

บทที่	หน้า
5 สรุป อภิปรายและข้อเสนอแนะ	32
ความมุ่งหมายของการวิจัย	32
วิธีดำเนินการวิจัย	32
สรุปผลการวิจัย	33
อภิปรายผล	34
ข้อเสนอแนะ	36
บรรณานุกรม	38
ภาคผนวก	43

บัญชีตาราง

ตาราง

หน้า

1	ความแปรปรวนของการเกิด AR ของอสุจิ ระหว่างกลุ่มควบคุมและ กลุ่มทดลอง	21
2	เปรียบเทียบการเกิด AR ของอสุจิ ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ...	22
3	ความแปรปรวนของ MR ของอสุจิ ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ...	22
4	เปรียบเทียบ MR ของอสุจิ ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง	23
5	ความแปรปรวนของการปฏิสนธิ ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง	28
6	เปรียบเทียบการเกิดปฏิสนธิ ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง	29
7	ร้อยละของปฏิกิริยาอะโครซิน และทวีปซินที่ยับยั้งโดยน้ำตาสดสัตว์ชนิด	30

บันทึกภาพประกอบ

ภาพประกอบ

หน้า

1	อัตราการเกิด AR และ MR ของอสุจิเมื่ออยู่ในสารละลายไทโรคส์ ที่มี คี - ฟรุคโตสอยู่	17
2	อัตราการเกิด AR และ MR ของอสุจิเมื่ออยู่ในสารละลายไทโรคส์ ที่มี แอส - ฟูลิโคสอยู่	18
3	อัตราการเกิด AR และ MR ของอสุจิ เมื่ออยู่ในสารละลายไทโรคส์ ที่มี แอสฟา - เมทิล - คี - แมนโนไซค์อยู่	19
4	อัตราการเกิด AR และ MR ของอสุจิ เมื่ออยู่ในสารละลายไทโรคส์ที่มี คี - กาแลคโตสอยู่	20
5	รายละเอียดของการปฏิสนธิของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองในสารละลาย BWB ที่มีน้ำตาลสี่ชนิด ที่ความเข้มข้น 50 mM โดยให้การทดลองในสถานการณ์ ต่างกันสามอย่าง	25
6	ไข่ของหนูแฮมสเตอร์ที่เกิดปฏิสนธิหลังจากนำไปผสมกับอสุจิ	27

ภูมิหลัง

ปรากฏการณ์ที่น่าสนใจประการหนึ่งที่เกิดขึ้นในขบวนการปฏิสนธิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโดยทั่วไปคือ ปรากฏการณ์ที่อสุจิเมื่อหลังเข้าไปในอวัยวะสืบพันธุ์ตัวเมียแล้วนั้น ยังไม่สามารถเข้าปฏิสนธิไข่ได้ในทันที อสุจิเหล่านั้นต้องใช้เวลาอยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ตัวเมียช่วงหนึ่งเสียก่อน เพื่อจะปรับตัวให้เหมาะสมที่จะปฏิสนธิไข่ได้ ปรากฏการณ์เช่นนี้เรียกว่า คาแพซิเทชัน (Capacitation Austin, 1951 : 581)

ระยะเวลาที่อสุจิอยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ตัวเมียก่อนจะเข้าปฏิสนธิไข่นั้นแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ทดลองนั้น ๆ ตัวอย่างเช่น หนูแรท (Rat) ใช้เวลา 2 - 3 ชั่วโมง (Austin and Braden, 1954 : 193) ในขณะที่กระต่ายใช้เวลานานถึง 6 - 7 ชั่วโมง (Chang, 1955 : 1037) และใช้เวลา $1\frac{1}{2}$ ชั่วโมง (Mattner, 1963 : 733) ลิง (Rhesus) ใช้เวลา 6 ชั่วโมง (Marston and Kelly, 1968 : 1074) หนูใช้เวลา 2 ชั่วโมง (Hunter and Dziuk, 1968 : 206) หนูเมาส์ (Mouse) ใช้เวลา 2 ชั่วโมง (Iwamatsu and Chang, 1969 : 1074)

ขณะที่อสุจิอยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ของตัวเมียนั้น อสุจิจะมีการเปลี่ยนแปลงทั้งทางสรีระและชีวเคมี ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้เกิดต่อเนื่องกันไปจนถึงระยะหนึ่ง บริเวณที่เรียกว่า อะโครโซม (Acrosome) ซึ่งมีลักษณะคล้ายถุงหุ้มอยู่ส่วนหัวของอสุจิจะค่อย ๆ สลายออกไปเรียกการเปลี่ยนแปลงของส่วนหัวนี้ว่า อะโครโซม รีแอคชัน (Acrosome reaction : AR) ขณะเดียวกันเอนไซม์ที่อยู่ในอะโครโซม จะถูกปล่อยออกมาอย่างช้า ๆ (McRorie and Williams, 1974 : 778) เป็นผลให้อสุจิสามารถเจาะผ่านชั้นต่าง ๆ ที่หุ้มอยู่รอบไข่เข้าไปได้

อะโครซิน (Acrosin) เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่หลังจากอะโครโซมหลังจากเกิด AR แล้ว จักว่าเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในขบวนการปฏิสนธิ ทั้งนี้เชื่อว่าอะโครซินสามารถย่อยชั้นหุ้มไข่ ชั้นโชนา เพลูซิกา (Zona pellucida) ซึ่งเอนไซม์ชนิดอื่นที่หลังจากอะโครโซมไม่สามารถย่อยสลายชั้นหุ้มไข่ชั้นนี้ได้ (Schleuning and Fritz. 1974 : 129) ลักษณะสำคัญอีกประการหนึ่งของอะโครซินก็คือมีสมบัติคล้าย ทริปซิน (Trypsin) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จากตับอ่อนของสัตว์ (Stambaugh and Buckley . 1969 : 223 - 227) ดังนั้นจึงเป็นที่น่าคิดว่าการยับยั้งปฏิกิริยาของอะโครซิน จะสามารถยับยั้งการปฏิสนธิได้หรือไม่

จากการทดลองของ เคเรเคส (Kerekes . 1966 : 633) พบว่า สารประกอบพวกน้ำตาลเชิงเดี่ยว (Monosaccharide) สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของทริปซินได้ และจากรายงานการทดลองของ จาง (Chang. 1957 : 134 - 136) กล่าวว่า เมื่อนำน้ำเชื้อ (Seminal plasma) จากกระต่าย วัว และคนไปใส่ในอสุจิของกระต่ายที่เกิดละพะขึ้นแล้วควยความเข้มข้น 5% (V/V) มีผลในการยับยั้งการปฏิสนธิได้ จากการวิเคราะห์หาสารประกอบพวกน้ำตาลเชิงเดี่ยวในน้ำเชื้อของคน ปรากฏว่ามีสารประกอบน้ำตาลเชิงเดี่ยวหลายชนิด (Storset and others . 1978 : 356) จึงเป็นที่คาดหมายว่า น้ำตาลเชิงเดี่ยวในน้ำเชื้ออาจมีส่วนในการยับยั้งการปฏิสนธิได้

ในการวิจัยครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาผลของน้ำตาลเชิงเดี่ยว และอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวบางชนิดที่มีต่ออสุจิ โดยศึกษาในแง่ของการชักขวางไม่ให้อสุจิเข้าปฏิสนธิไข่ได้ ซึ่งอาจจะเป็นการยับยั้งการเกิด AR ของอสุจิโดยตรงหรือยับยั้งปฏิกิริยาของอะโครซินอันมีผลให้อสุจิไม่สามารถเจาะชั้นหุ้มไข่เขาไปได้ ทั้งนี้เพื่อจะช่วยให้เข้าใจขบวนการและกลไกของการปฏิสนธิได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังอาจนำไปประยุกต์ใช้ในด้านอื่น ๆ เช่น การคุมกำเนิด เป็นต้น

จุดมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวที่มีต่อการเกิดอะโครโซม รีแอคชันของอสุจิ
2. เพื่อศึกษาผลของน้ำตาลเชิงเดี่ยว และอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวที่มีต่อการปฏิสนธิ
3. เพื่อทดสอบปฏิกิริยาของอะโครโซมที่หลังจากอสุจิ หลังจากเกิดอะโครโซม รีแอคชัน เมื่อมีน้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวอยู่ด้วย

ความสำคัญของการวิจัย

1. ทำให้เกิดความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกของการปฏิสนธิ โดยเฉพาะเรื่องเกี่ยวกับสารประกอบเคมีที่มีผลต่อขบวนการปฏิสนธิ
2. สามารถใช้เป็นแนวทางในการศึกษากลไกการปฏิสนธิ และการคุมกำเนิดได้

ขอบเขตของการวิจัย

1. สัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาใช้หนูแฮมสเตอร์เพศผู้และเพศเมียอายุประมาณ 2 เดือน
2. น้ำตาลเชิงเดี่ยวที่นำมาศึกษามี 3 ชนิด ได้แก่ ดี-ฟรุคโตส (D-Fructose) แอล-ฟูโคส (L-Fucose) และดี-กาแลคโตส (D-Galactose) ส่วนอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวมีหนึ่งชนิดคือ แอลฟา-เมทิล-ดี-แมนโนไซด์ (α -methyl-D-Mannoside)

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. อะโครโซม รีแอคชัน (Acrosome reaction : AR) หมายถึง การเปลี่ยนแปลงของส่วนหัวของอสุจิที่เรียกว่า อะโครโซม เมื่อเลี้ยงอยู่ในสารละลาย

ไทโรดส์ (Tyrode's solution) ที่มีเซรัม (Serum) ของคนอยู่ด้วยหลังจาก
เอาเข้าตูบเป็นเวลา $4\frac{1}{2}$ ชั่วโมง ณ อุณหภูมิ 37°C

2. AR หมายถึง อะโครโซม รีแอกชัน

3. MR (Motility rate) หมายถึง อัตราการขยับของอสุจิ

4. น้ำตาล หมายถึง น้ำตาลเชิงเดี่ยว 3 ชนิด ได้แก่ ดี-ฟรุคโทส

แอล-ฟรุคโทส และดี-กาแลคโทส และอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวหนึ่งชนิดคือ แอลฟา-เมทิล-
ดี-แมนโนไซด์

5. ชั้นหุ้มไข่ หมายถึง ชั้นต่าง ๆ ที่หุ้มรอบไข่อยู่ได้แก่ ชั้นคมูลัส โอโอพอร์รัส
ซึ่งเป็นพอลิกลูลาเซลล์ที่หุ้มล้อมไข่อยู่ และชั้นโซนา เพลูซิกา ซึ่งเป็นชั้นใส ๆ อยู่ถัดจาก
คมูลัส โอโอพอร์รัสเข้าไป

6. การอบ หมายถึง การนำไข่ หรืออสุจิที่อยู่ในสารละลายเลี้ยงเซลล์ เข้าอบ
ในตูบรับอุณหภูมิ (Incubator) ที่ 37°C ภายในระยะเวลาที่กำหนด

7. U หมายถึง Unit ซึ่งเป็นหน่วยของเอนไซม์ อะโครซิน หรือทริปซิน
เอนไซม์ 1 U หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยสลายซับสเตรทได้จำนวน 1 M
ในเวลา 1 วินาที

เอกสารและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ก่อนที่อสุจิจะเข้าผสมกับไข่ไก่นั้น อสุจิจะต้องเจาะผ่านชั้นที่หุ้มอยู่รอบไข่ คือชั้นคูลล์ โอโอพอร์ต และโซนา เพลูซิกา เข้าไปหาไข่ จากการศึกษาของ ซานีเวลด์ และคนอื่น ๆ (Zaneveld and others. 1975 : 704) พบว่า อสุจิจะปล่อยเอนไซม์จากอะโครโซมออกมาอยู่ชั้นต่าง ๆ เหล่านี้ให้สลายไปก่อนขณะเจาะเข้าไปหาไข่ ซึ่งโดยธรรมชาติแล้วการปล่อยเอนไซม์ของอสุจิไม่เกิดขึ้นโดยทันที ยานากิมาคิ และโนดะ (Yanagimachi and Noda. 1970 : 492) รายงานจากการทดลองว่า อสุจิจะปล่อยเอนไซม์หลังจากเกิด AR ในขบวนการอะโครโซมิกแล้วโดยเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิ (Plasma membrane) จะหลอมรวมกับเยื่อหุ้มอะโครโซมชั้นนอก (Outer acrosomal membrane) หลังจากนั้นเอนไซม์จากส่วนหัวของอสุจิจะกระจายออกมาอยู่ชั้นต่าง ๆ เหล่านี้ให้สลายไป เมื่อเกิดการหลอมรวมระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มอะโครโซมชั้นนอกของอสุจิแล้ว อสุจิจะเหลือเฉพาะเยื่อหุ้มอะโครโซมชั้นใน (Inner acrosomal membrane) อยู่เนื่องจากเยื่อหุ้มชั้นนอกหลุดออกไป

เบดฟอร์ด (Bedford. 1968 : 357) เชื่อว่าบริเวณเยื่อหุ้มอะโครโซมชั้นในโดยเฉพาะที่ตำแหน่งอีควาโทเรียล เซกเมนต์ (Equatorial segment) มีอะโครซินอยู่มากกว่าส่วนอื่น ๆ ของอสุจิ ส่วนไฮอัลยูโรนิเดส (Hyaluronidase) ซึ่งเป็นเอนไซม์จากส่วนหัวของอสุจิอีกชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่ช่วยย่อยชั้นหุ้มไข่ ชั้นคูลล์ โอโอพอร์ต พบมากที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิ

จากการทดลองของสแตมบาค และบัคเคย์ (Stambaugh and Buckley. 1968 : 585 - 586) พบว่า ไฮอัลยูโรนิเดส เป็นเอนไซม์ประเภทมิวโคโพลิแซคคาไรเดส (Mucopolysaccharidase) ไม่สามารถย่อยชั้นโซนา เพลูซิกา

แต่สามารถย่อยสลายชั้นกึ่งไฮดรอกซีได้นี้ เพราะเซลล์ของกระดูกมีกรดไฮยาลูโรนิก (Hyaluronic acid) ซึ่งเป็นมิวโคโพลิแซ็กคาไรด์ยึดเหนี่ยวให้ความเหนียวแน่นแก่เซลล์จะถูกละลายได้ด้วยไฮยาลูโรนิกส สำหรับชั้นโชนาเพอซิทาซึ่งเป็นมิวโคโปรตีน (Mucoprotein) จะถูกละลายได้ด้วยอะโครซิน ทั้งนี้ เพราะอะโครซินเป็นสารประกอบพอลิโคโปรตีน (Glycoprotein) ที่มีสมบัติเป็นเอนไซม์ประเภทโปรตีนเนส (Proteinase) จึงสามารถย่อยโปรตีน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ โชนา เพอซิทาได้

บราวน์ และฮาร์ทรี (Brown and Hartree. 1978 : 237) พบว่า สารประกอบพอลิโคโปรตีนของอะโครซินมีสมบัติเป็นเอนไซม์ประเภทโปรตีนเนส ซึ่งคล้ายกับเอนไซม์ที่ได้จากคัมม่อน นอกจากนี้ปฏิกิริยาของอะโครซินยังถูกยับยั้งได้ด้วยสารยับยั้งปฏิกิริยาของทวีปซิน จากการทดลองของสแตมบอช และคนอื่น ๆ (Stambaugh and others . 1969 : 423 - 432) โดยใช้สารยับยั้งทวีปซินสามชนิดได้แก่ โอโวมูคอยด์ (Ovomucoid trypsin inhibitor) สารสกัดจากถั่วเหลือง (Soybean trypsin inhibitor) และสารสกัดจากถั่วลิมา (Limabean trypsin inhibitor) ไปยับยั้งปฏิกิริยาของอะโครซินพบว่า การปฏิกิริยาถูกยับยั้งร้อยละ 98 เมื่อใช้สารสกัดจากถั่วเหลือง และสารสกัดจากถั่วลิมา การปฏิกิริยาถูกยับยั้งร้อยละ 62 เมื่อใช้โอโวมูคอยด์

ในปี 1971 โปลาคอสกี และคนอื่น ๆ (Polakoski and others. 1971 : 381 - 386) ได้ทดลองสกัดอะโครซินจากอสุจิของหนูที่ได้จากอีพิไดมิส (Epididymis) และอสุจิที่ได้จากน้ำเชื้อที่หลังออกมาใหม่ ๆ แล้วนำไปไฮโดรไลส์ เอน - เบนโซอิล - แอล - อาร์จินิน เอสเทอร์ (N-Benzoyl-L-Arginine-ethyl ester : BAE) แล้ววัดปฏิกิริยาของอะโครซินด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ พบว่าปริมาณของอะโครซินที่ได้จากอสุจิในอีพิไดมิสสูงกว่าที่ได้จากอสุจิน้ำเชื้อที่หลังออกมา จึงสันนิษฐานว่า ในน้ำเชื้อควมมีสารบางอย่าง

ที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาของอะโครซินได้ นอกจากนั้นจาง (Chang. 1957 : 134 - 136) ยังพบว่า น้ำเชื้อยังมีผลต่ออสุจิของกระต่าย โดยเติมน้ำเชื้อของกระต่าย รว หรือคน ความเข้มข้น 5% (V/V) ลงในอสุจิของกระต่ายที่เกิดอะพอิเทชันแล้ว ปรากฏว่าการปฏิสนธิจะถูกยับยั้งได้ เบคฟอร์ด และจาง (Bedford and Chang . 1962 : 179 - 181) เรียกสารประกอบที่ยับยั้งอะพอิเทชันนี้ว่า ก็อะพอิเทชัน แฟกเตอร์ (Decapacitation factor : DF) จนกระทั่งในปี 1967 ฟินสเคอร์ และวิลเลียมส์ (Pinsker and Williams. 1967 : 176) รายงานว่า DF เป็นไกลโคโปรตีน แต่หน่วยที่ทำงาน (Active factor) ไม่ใช่โปรตีน แต่เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลขนาดเล็กจับอยู่กับหน่วยของโปรตีนอีกทีหนึ่ง ในปี 1966 ดุคคิลโลว์ และคนอื่น ๆ (Dukelow and others . 1966 : 396 - 396) สันนิษฐานว่า หน่วยที่ทำงานของ DF คือหน่วยคาร์โบไฮเดรต ทั้งนี้เพราะ DF ถูกยับยั้งปฏิกิริยาได้ อันเป็นผลให้อสุจิเกิดอะพอิเทชันได้ตามปกติ ถ้ามีเอนไซม์ บีอะมิเลส (B amylase) อยู่ด้วย จากการวิเคราะห์น้ำเชื้อของคนโดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatography) และแมส สเปกโตรเมตรี (Mas spectrometry) เพื่อหาปริมาณต่าง ๆ ของสารประกอบในน้ำเชื้อ พบว่ามีน้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวถึง 21 ชนิด เช่น ดี-ฟรุคโทส ดี-กลูโคส ดี-โรโบส ดี-ซูโคส กลูซิทอล และไมโอ-อินอซิทอล เป็นต้น โดยเฉพาะ ดี-ฟรุคโทส มีปริมาณความเข้มข้นค่อนข้างสูงกว่าน้ำตาลเชิงเดี่ยวชนิดอื่น ๆ (Storset and others . 1978 : 351 - 357)

ในปี 1979 แอนเดอร์สัน และคนอื่น ๆ (Anderson and others. 1979 : 1780 - 1782) ได้ทำการวิเคราะห์หาปริมาณของฟรุคโทสในน้ำเชื้อของสัตว์หลายชนิด พบว่าในสัตว์แต่ละชนิดมีปริมาณของฟรุคโทสแตกต่างกัน เช่น ในน้ำเชื้อของลิง (Cynomolgus monkey) วัดความเข้มข้นของฟรุคโทสได้ 108 mM

ของวัวไค้ 30 mM ของกระท่ายไค้ 13 mM ของคนไค้ 12 mM และของสุนัขไค้ 2 mM

การศึกษาค้นคว้าของน้ำคาลเซียมเคียวที่มีต่อปฏิกิริยาของทวีปซินนั้น เคอเรคส์ (Kerekcs. 1966 : 633) ได้ใช้น้ำคาลเซียมเคียวหลายชนิดมายับยั้งปฏิกิริยาของทวีปซิน พบว่า คี-กาแลคโทส และคี-ฟรุคโทส ยับยั้งปฏิกิริยาของทวีปซินได้ถึงร้อยละ 50 ส่วนคี-แมนโนส ยับยั้งปฏิกิริยาของทวีปซินได้ต่ำสุดเพียงร้อยละ 16 ส่วนการศึกษาค้นคว้าของน้ำคาลเซียมเคียวที่มีต่ออะโครซินนั้น แอนเดอร์สัน และคนอื่น ๆ (Anderson and others. 1980 : 1083 - 1088) ได้ทดลองสกัดอะโครซินจากอสุจิของคน แล้วนำไปทดสอบด้วยน้ำคาลเซียมเคียว และอนุพันธ์น้ำคาลเซียมเคียว 13 ชนิดพบว่า แอลฟา-เมทิล-คี-แมนโนไซด์ ยับยั้งปฏิกิริยาของอะโครซินได้ร้อยละ 90

อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ใช้หนูแฮมสเตอร์ (Mesocricetus auratus) เพศผู้และเพศเมีย อายุประมาณ 2 เดือน

การเตรียมอสุจิ

1. นำอัณฑะอสุจิจากส่วนคอคา อีพิคโตมิส นำมาเก็บในสารละลาย NaCl 0.15M แล้วปิดด้วยน้ำมันพาราฟิน (Paraffin oil) เพื่อป้องกันอสุจิแห้ง
2. ปรับความเข้มข้นของอสุจิโดยการวัดความเข้มข้นด้วย ฮีโมไซโทมิเตอร์ (Hemocytometer) ให้มีความเข้มข้นของอสุจิเท่ากับ 1.5×10^8 sperm / ml

การเตรียมไข่

1. ฉีดฮอร์โมน เพรกแนนท์ แมร์ ซีรัม โกลาโดโทรปิน (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin) ความเข้มข้น 25 IU เข้าช่องท้องของหนู ตัวเมียในวันที่หนึ่งของวงจรการตกไข่
2. ฉีดฮอร์โมน ฮิวแมน คอริออนิก โกลาโดโทรปิน (Human Chorionic Gonadotropin) ความเข้มข้น 25 IU เข้าช่องท้องของหนูหลังจากฉีด เพรกแนนท์ แมร์ ซีรัม โกลาโดโทรปิน 3 วัน
3. นำอัณฑะออกมาไขมาแยกเอาไข่ออกจากท่อนำไข่ หลังจากฉีด ฮิวแมน คอริออนิก โกลาโดโทรปิน 15 ชั่วโมง นำไข่ที่แยกได้มาขยายด้วยเอนไซม์

ไฮออสโตริเนส ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย บิ๊กเจอร์ วิทเทน
วิทคิงแฮม (Biggers Whitten Whittingham Soludion : BWW : Biggers
and other . 1971 : 86 - 116) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปล้าง
ด้วยสารละลาย BWB 3 ครั้ง จะไล้ไข่ที่พร้อมจะใช้ในการทดลองต่อไป

วิธีดำเนินการทดลอง

ตอนที่ 1 ผลของน้ำตาลที่มีต่อการเกิด AR ของอสุจิ

1.1 เตรียมสารละลายน้ำตาล โดยให้น้ำตาลแต่ละชนิดมีความเข้มข้นสี่
ระดับ คือ 10 25 50 และ 100 mM ละลายในสารละลายไทโรดส์ (Tyrode's
solution : Yanagimachi, 1964 : 193 - 196)

1.2 แบ่งกลุ่มการทดลองเป็นห้ากลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมหนึ่งกลุ่ม และ
กลุ่มทดลองอีกสี่กลุ่มตามชนิดของน้ำตาล

1.2.1 กลุ่มควบคุม ประกอบด้วยสารละลายไทโรดส์ 25 μ l
เซรัม 25 μ l และอสุจิ 5 μ l บรรจุในกระจกนาฬิกา (watch glass) แล้ว
ปิดด้วยน้ำมันพาราฟิน

1.2.2 กลุ่มทดลอง แต่ละกลุ่มประกอบด้วยสี่กลุ่มย่อยตามระดับ
ความเข้มข้นของน้ำตาล คือ 10 25 50 และ 100 mM ซึ่งกลุ่มทดลองแต่ละ
กลุ่มประกอบด้วย สารละลายไทโรดส์ที่ให้น้ำตาลเข้มข้นแต่ละระดับอยู่ 25 μ l
เซรัม 25 μ l และอสุจิ 5 μ l บรรจุในกระจกนาฬิกา แล้วปิดด้วยน้ำมันพาราฟิน

1.3 นำอสุจิที่เตรียมไว้ในข้อ 1.2.1 และ 1.2.2 เข้าดูอบเป็นเวลา
4 $\frac{1}{2}$ ชั่วโมง แล้วนำมาหาอัตราการเกิด AR ของอสุจิโดยตรวจนับจำนวนอสุจิที่เกิด AR
ต่ออสุจิที่ยังมีชีวิตอยู่จำนวน 100 ตัว ด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Phase contrast microscope)

ตอนที่ 2 ทดสอบผลของน้ำตาลที่มีต่อการปฏิสนธิ

2.1 เลือกความเข้มข้นของน้ำตาลแต่ละชนิดมาเพียงระดับเดียว โดยเลือกเอาความเข้มข้นของน้ำตาลระดับสูงสุดที่อสุจิยังเกิด AR ได้ดี อันเป็นผลจากการทดสอบน้ำตาลที่มีต่อการเกิด AR ของอสุจิในตอนที 1

2.2 การเตรียมอสุจิกระทำเช่นเดียวกับตอนที่ 1 คือ กลุ่มควบคุม ประกอบด้วย สารละลายไทโรคส์ $25\mu\text{l}$ เซรัม $25\mu\text{l}$ และอสุจิ $5\mu\text{l}$ ส่วนกลุ่มทดลองสี่กลุ่มประกอบด้วยสารละลายน้ำตาลแต่ละชนิดในไทโรคส์ จำนวน $25\mu\text{l}$ เซรัม $25\mu\text{l}$ และอสุจิ $5\mu\text{l}$ ปิดด้วยน้ำมันพาราฟิน แล้วนำเข้าตู้บ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2.3 เตรียมสารละลายน้ำตาลใน BWB โดยให้ความเข้มข้นของน้ำตาลแต่ละชนิดเท่ากับที่ใช้ในการเตรียมอสุจิในข้อ 2.1

2.4 แบ่งกลุ่มการทดลองการปฏิสนธิออกเป็นห้ากลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมหนึ่งกลุ่ม และกลุ่มทดลองอีกสี่กลุ่มตามชนิดของน้ำตาล

2.4.1 กลุ่มควบคุมประกอบด้วยใช้ในสารละลาย BWB $50\mu\text{l}$ ผสมกับอสุจิจากกลุ่มควบคุม ในข้อ 2.2. $5\mu\text{l}$

2.4.2 กลุ่มทดลองในแต่ละกลุ่มแบ่งออกเป็นสามกลุ่มย่อยดังนี้

2.4.2.1 ใช้ในสารละลาย BWB ที่มีน้ำตาลแต่ละชนิด $50\mu\text{l}$ ผสมกับอสุจิจากกลุ่มควบคุมในข้อ 2.2 $5\mu\text{l}$

2.4.2.2 ใช้ในสารละลาย BWB ที่มีน้ำตาลแต่ละชนิด $50\mu\text{l}$ ผสมกับอสุจิจากกลุ่มทดลองในข้อ 2.2 ที่มีน้ำตาลชนิดนั้นอยู่ $5\mu\text{l}$

2.4.2.3 ใช้ในสารละลาย BWB $50\mu\text{l}$ ผสมกับอสุจิจากกลุ่มทดลองในข้อ 2.2 $5\mu\text{l}$

2.5 นำไข่ที่เตรียมได้ปิดด้วยพาราฟิน แล้วนำไปบ่มเป็นเวลา 60 นาที

2.6 นำไข่มาล้างด้วยสารละลาย BWB สองครั้ง จากนั้นนำไปตรวจการปฏิสนธิด้วยกล้องจุลทรรศน์

ตอนที่ 3 ทดสอบปฏิกิริยาของทริปซินเพื่อหาปริมาณเปรียบเทียบอะโครซิน ปริมาณของทริปซินและอะโครซินทดสอบโดยปฏิกิริยาการไฮโดรไลส BAE ตามวิธีของโปลาคอสกี และคนอื่น ๆ (Polakoski and others . 1977 : 668 - 670) โดยเปรียบเทียบปฏิกิริยาของอะโครซินกับปฏิกิริยาของทริปซิน

3.1 เตรียมซับสเตรท (Substrate) ประกอบด้วย BAE 0.5 mM และ CaCl_2 50 mM ใน 50 mM ทริส-บัฟเฟอร์ (Triss - buffer) pH8

3.2 เตรียมสารละลายทริปซิน 0.0002 % ใน NaCl 0.15 M

3.3 เตรียมอสุจิทั้งกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับการทดลอง ในตอนที่ 2 แต่ใช้ปริมาณของสารละลายเพิ่มขึ้นคือ สารละลายไทโรกอส หรือ สารละลาย น้ำตาลในไทโรกอส 225 μl เซรัม 225 μl และอสุจิ 50 μl แล้วนำไปอบเป็นเวลา $4\frac{1}{2}$ ชั่วโมง

3.4 นำอสุจิที่อบไว้มานั่น (Centrifuge) ให้ตกตะกอนที่ 600 g เป็นเวลา 5 นาที แล้วแยกเอาของเหลวส่วนบน (Supernatant) ไว้หาปริมาณของอะโครซินต่อไป

3.5 ทดสอบปฏิกิริยาของทริปซิน และอะโครซิน โดยหยดสารละลายทริปซิน หรือของเหลวที่ปั่นแยกได้จากอสุจิ จำนวน 0.1 ml ลงในซับสเตรท จำนวน 2.9 ml แล้วนำไปวัดปฏิกิริยาของเอนไซม์ในการย่อยซับสเตรทจากการเปลี่ยนแปลงของ ออปติคัล เดนซิตี (Optical density: OD) ด้วย สเปคโตร โฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 253 nm แล้วนำค่า OD ที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณของทริปซิน หรืออะโครซิน จากสูตร $OD = aCl$ เมื่อ a เท่ากับ $1150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ C คือความเข้มข้น และ l เท่ากับ 1 cm (Polakoski and others, 1977 : 668 - 670)

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. วิเคราะห์ความแปรปรวน (One-way analysis of variance) ของข้อมูลต่อไปนี้

1.1 อัตราการเกิด AR ของอสุจิ

1.2 อัตราของ MR ของอสุจิ

1.3 อัตราการเกิดการปฏิสนธิ

2. ทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยหลังจากการทดสอบความแปรปรวน
เพื่อหาค่าเฉลี่ยคู่ใดที่ต่างกัน โดยใช้ T-method (วีเชียร เกตุสิงห์ 2523 :
100 - 108)

ผลการทดลอง และวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่นำมาวิเคราะห์

1. ผลของน้ำตาลที่มีต่อการเกิด AR ของอสุจิ
2. ผลของน้ำตาลที่มีต่อการปฏิสนธิ
3. ปฏิกริยาของอะโครโซมจากอสุจิที่เกิด AR แล้ว เมื่อมีน้ำตาลอยู่ด้วย

เปรียบเทียบกับปฏิกริยาของทวีปซิน

สัญลักษณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

$\bar{X}$	แทน ค่าเฉลี่ย
SS_w	แทน ผลบวกกำลังสองภายในกลุ่ม
SS_b	แทน ผลบวกกำลังสองระหว่างกลุ่ม
MS_w	แทน ค่าเฉลี่ยของผลบวกกำลังสองภายในกลุ่ม
MS_b	แทน ค่าเฉลี่ยของผลบวกกำลังสองระหว่างกลุ่ม
df	แทน ชั้นแห่งความเป็นอิสระ
F	แทน ค่าวิกฤตที่ใช้พิจารณาใน F - Distribution
Fr	แทน D - Fructose
Fu	แทน L - Fucose
M	แทน α - Methyl - D - Mannoside
G	แทน D - Galactose
C	แทน กลุ่มควบคุมที่มีอสุจิในสารละลายไทโรสผสมกับไข่ในสารละลาย

C _{Fr}	แทน กลุ่มทดลอง ที่มีสุจิในสารละลายไทโรคส์ผสมกับไข่ในสารละลาย BWW ที่มี Fr
FrFr	แทน กลุ่มทดลอง ที่มีสุจิในสารละลาย Fr ผสมกับไข่ในสารละลาย BWW ที่มี Fr
FrC	แทน กลุ่มทดลอง ที่มีสุจิในสารละลาย Fr ผสมกับไข่ในสารละลาย BWW
C _{Fu}	แทน กลุ่มทดลอง ที่มีสุจิในสารละลายไทโรคส์ผสมกับไข่ในสารละลาย BWW ที่มี Fu
FuFu	แทน กลุ่มทดลอง ที่มีสุจิในสารละลาย Fu ผสมกับไข่ในสารละลาย BWW ที่มี Fu
FuC	แทน กลุ่มทดลอง ที่มีสุจิในสารละลาย Fu ผสมกับไข่ในสารละลาย BWW
CM	แทน กลุ่มทดลอง ที่มีสุจิในสารละลายไทโรคส์ผสมกับไข่ในสารละลาย BWW ที่มี M
MM	แทน กลุ่มทดลอง ที่มีสุจิในสารละลาย M ผสมกับไข่ในสารละลาย BWW ที่มี M
MC	แทน กลุ่มทดลอง ที่มีสุจิในสารละลาย M ผสมกับไข่ในสารละลาย BWW
CG	แทน กลุ่มทดลอง ที่มีสุจิในสารละลายไทโรคส์ผสมกับไข่ในสารละลาย BWW ที่มี G
GG	แทน กลุ่มทดลอง ที่มีสุจิในสารละลาย G ผสมกับไข่ในสารละลาย BWW ที่มี G
GC	แทน กลุ่มทดลอง ที่มีสุจิในสารละลาย G ผสมกับไข่ในสารละลาย BWW
OD	แทน Optical density

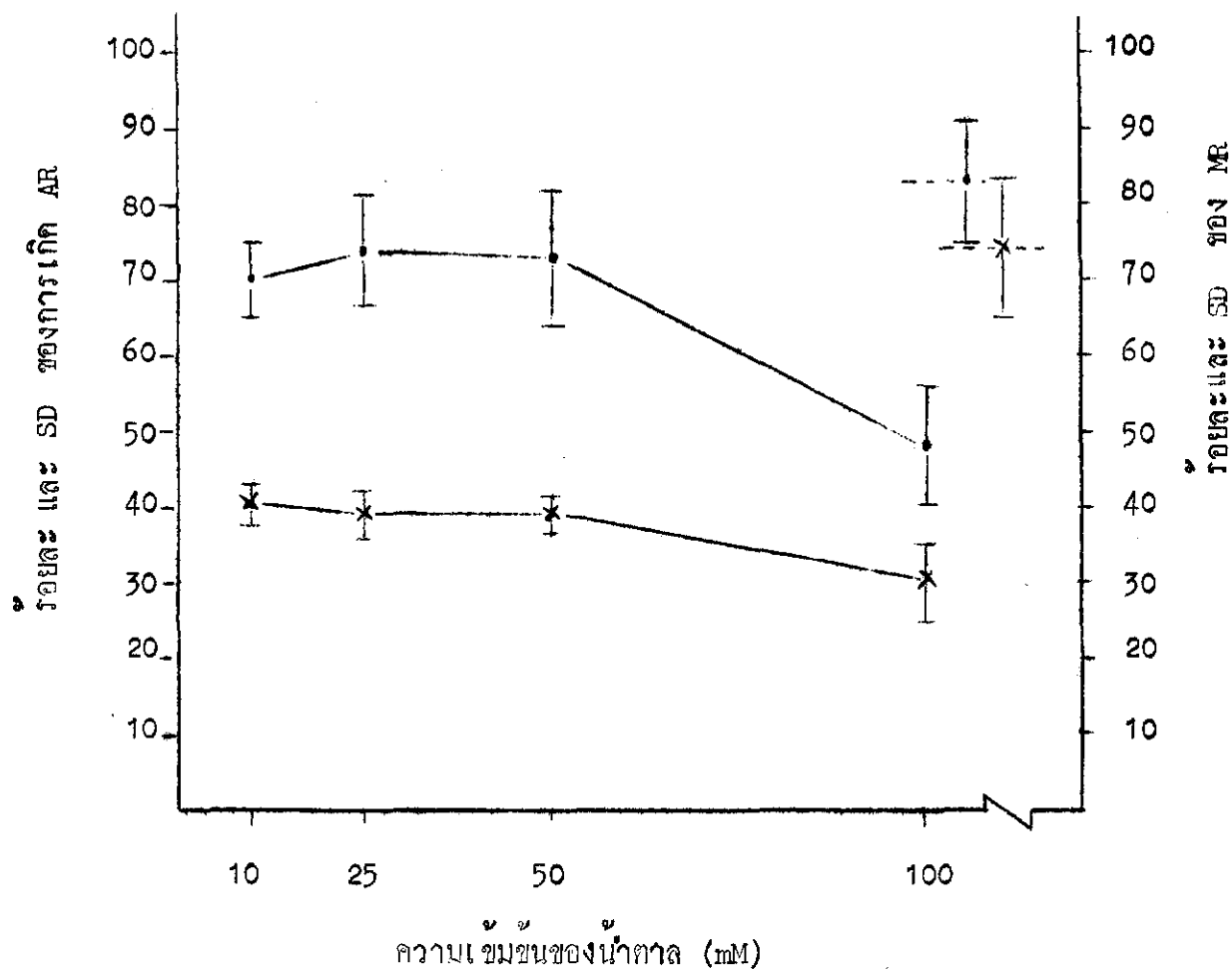
ผลการทดลอง

1. ผลของน้ำตาลที่มีต่อการเกิด AR ของอสุจิ

น้ำตาลสี่ชนิด คือ ดี - ฟรุคโทส แอล - ฟูโคส แอลฟา - เมทิล - ดี - แมนโนไซค์ และดี - กาแลคโตส ที่ใช้ทดสอบการเกิด AR ของอสุจิที่ความเข้มข้นของน้ำตาลสี่ระดับ คือ 10 25 50 และ 100 mM ปรากฏว่า อัตราการเกิด AR และ MR ของอสุจิในสารละลายไฮโดรอกซีที่มีน้ำตาลดี - ฟรุคโทส แอล - ฟูโคส และแอลฟา - เมทิล - ดี - แมนโนไซค์ เกิดได้ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม โดยเฉพาะเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลสูงถึง 100 mM (ภาพประกอบ 1, 2, 3) ส่วนอสุจิในสารละลายที่มีน้ำตาลดี - กาแลคโตส ที่ความเข้มข้นทุกระดับมีอัตราการเกิด AR และ MR ได้ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม (ภาพประกอบ 4)

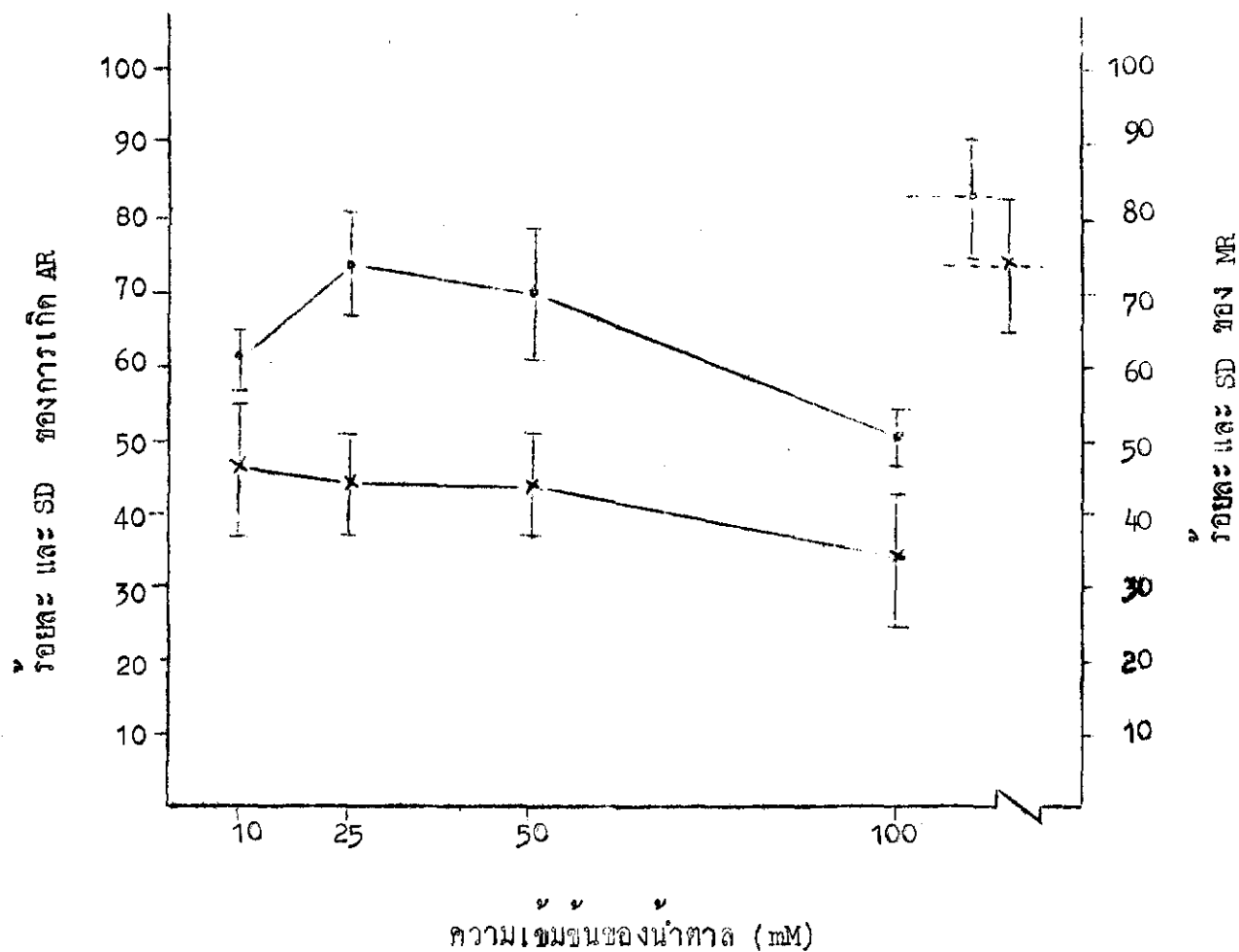
เมื่อพิจารณาถึงระดับความเข้มข้นของน้ำตาลที่มีต่ออัตราการเกิด AR ของอสุจิ แล้วพบว่า น้ำตาลทุกชนิดยกเว้นดี - กาแลคโตส ที่ความเข้มข้นสูงถึง 50 mM อสุจิยังสามารถเกิด AR ได้ใกล้เคียงกับอสุจิที่อยู่ในน้ำตาลระดับที่ต่ำกว่า แต่เมื่ออสุจิอยู่ในความเข้มข้นสูงกว่าระดับ 50 mM อัตราการเกิด AR ของอสุจิจะต่ำลง ส่วนอสุจิที่อยู่ในน้ำตาลดี - กาแลคโตส เกิด AR ได้ดีกว่าน้ำตาลอื่น ๆ กล่าวคือ อัตราการเกิด AR ในสารละลายดี - กาแลคโตส อยู่ 50 mM นั้นสูงถึงร้อยละ 75.2 ± 4.11 SD ไม่ต่างจากอัตราการเกิด AR ของกลุ่มควบคุม ($P < .05$) ซึ่งมีอัตราการเกิด AR ร้อยละ 83.2 ± 7.65 SD และ MR ของอสุจิในสารละลายที่มีดี - กาแลคโตสไม่ต่างจาก MR ของอสุจิในกลุ่มทดลองเช่นเดียวกัน ($P < .05$) ซึ่งเกิดได้ในอัตราร้อยละ 73.6 ± 7.31 SD และ 74 ± 9.38 SD ตามลำดับ (ภาพประกอบ 4)

น้ำตาลที่มีผลในการยับยั้งการเกิด AR ของอสุจินมากที่สุด คือ แอลฟา - เมทิล - ดี - แมนโนไซค์ อสุจิเกิด AR ได้เพียงร้อยละ 61 ± 2.65 SD เมื่อมีน้ำตาลอยู่ 50 mM (ภาพประกอบ 3) ส่วนอสุจิในสารละลายดี - ฟรุคโทส และแอล - ฟูโคส ในระดับความเข้มข้น 50 mM นั้น เกิด AR ได้ใกล้เคียงกันคือ ร้อยละ 72.6 ± 9.26 SD และ 70.4 ± 8.8 SD ตามลำดับ ($P < .05$) แต่เมื่อพิจารณา MR ของอสุจิในสารละลาย ดี - ฟรุคโทส



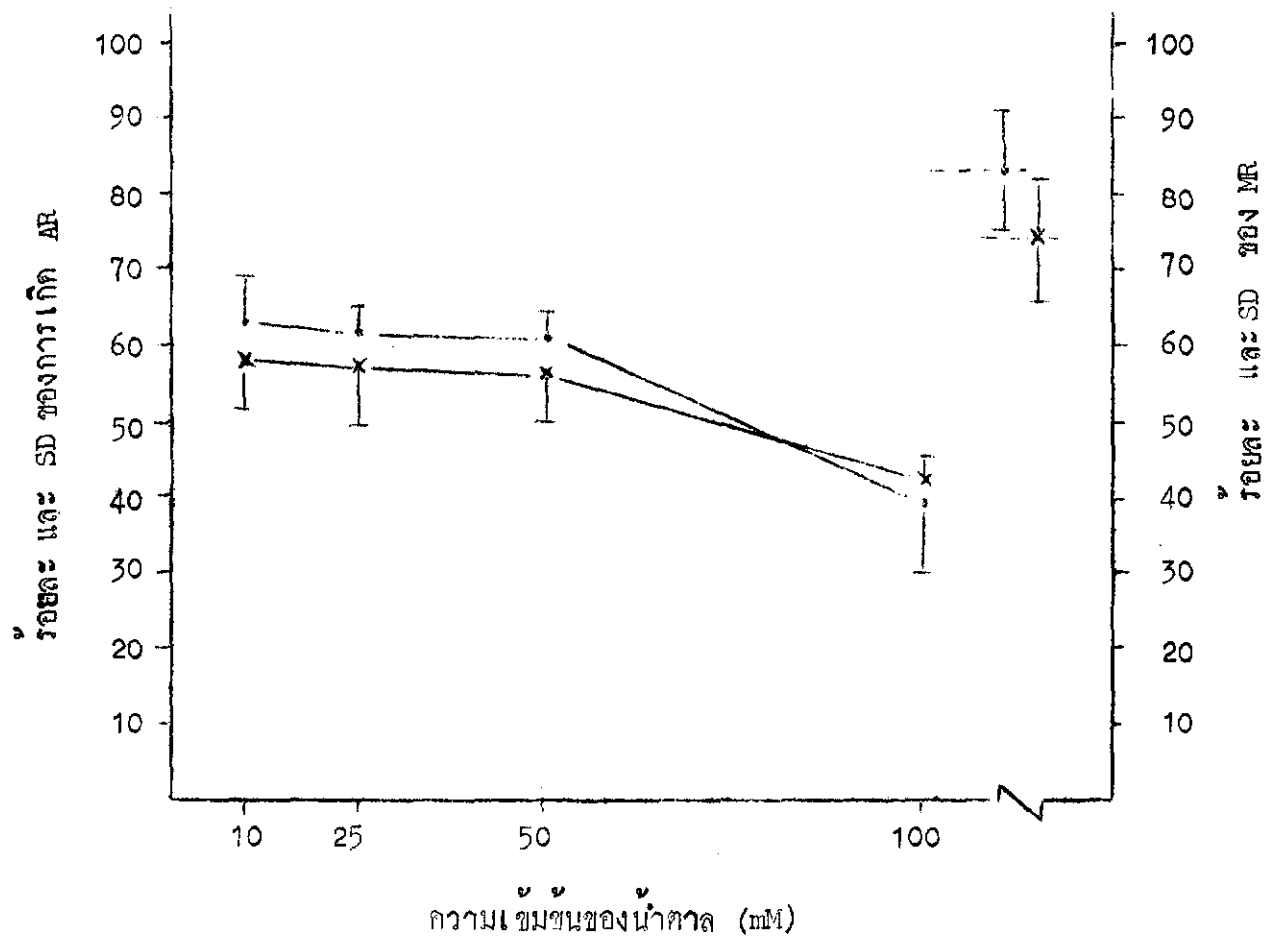
ภาพประกอบ 1 อัตราการเกิด AR และ MR ของอสุจิในสารละลายไทโรซอล ที่มี
คือ - ฟรุคโทส เข้มข้นสี่ระดับ

- AR ของกลุ่มควบคุม
- x--- MR ของกลุ่มควบคุม
- AR ของกลุ่มทดลอง
- x— MR ของกลุ่มทดลอง



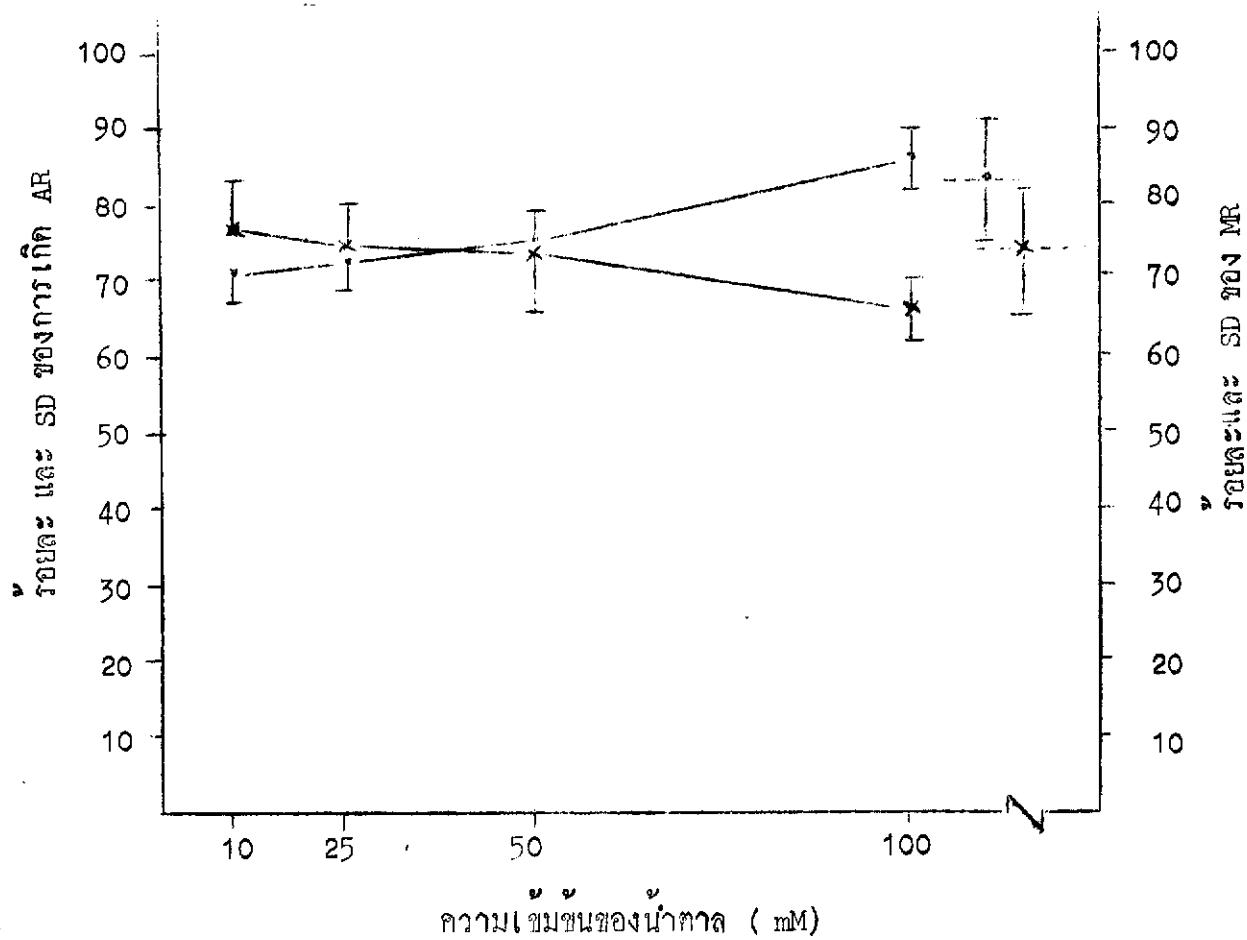
ภาพประกอบ 2 อัตราการเกิด AR และ MR ของอสุจิในสารละลายไทโรส ที่มี แอล - ฟิวโคสเข้มข้นต่างกัน

- AR ของกลุ่มควบคุม
- x--- MR ของกลุ่มควบคุม
- AR ของกลุ่มทดลอง
- x— MR ของกลุ่มทดลอง



ภาพประกอบ 3 อัตราการเกิด AR และ MR ของอสุจิในสารละลายไทโรกอสที่มี
แอลฟา - เมทิล - ดี - แมนโนไซด์เข้มข้นสี่ระดับ

- • --- AR ของกลุ่มควบคุม
- x --- MR ของกลุ่มควบคุม
- • — AR ของกลุ่มทดลอง
- x — MR ของกลุ่มทดลอง



ภาพประกอบ 4 อัตราการเกิด AR และ MR ของอสุจิในสารละลายไทโรคอสที่มี
คือ - กาแลคโตสเข้มข้นสี่ระดับ

- - - - - AR ของกลุ่มควบคุม
 - - x - - MR ของกลุ่มควบคุม
 - - - - - AR ของกลุ่มทดลอง
 - - x - - MR ของกลุ่มทดลอง

ตาราง 1 ความแปรปรวนของการเกิด AR ของอสุจิ ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองในสารละลายนำตาลี่ซินิก ที่ความเข้มข้น 50 mM วิเคราะห์โดย

One - way analysis of variance

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
ระหว่างกลุ่ม(b)	4	1401.44	350.36	5.92**
ภายในกลุ่ม(w)	20	1183.2	59.16	
รวม	24	2584.64		

** มีนัยสำคัญระดับ .01

แสดงว่า การเกิด AR ของอสุจิแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .01 ดังนั้น จึงใช้ T - method เพื่อหาค่าเฉลี่ยคู่ที่แตกต่างกัน

ตาราง 2 เปรียบเทียบการเกิด AR ของอสุจิ ระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง
สี่กลุ่ม

กลุ่ม						
		C	Fr	Fu	M	G
	$\bar{X}$	83.2	72.6	70.4	61	75.2
C	83.2	-	3.09	3.70	6.47*	2.33
Fr	72.6		-	0.64	3.38	0.75
Fu	70.4			-	2.74	1.39
M	61				-	4.13

* มีนัยสำคัญระดับ .05

ตาราง 3 ความแปรปรวนของ MR ของอสุจิ ระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองใน
สารละลายน้ำตาลสี่ชนิด ที่ความเข้มข้น 50 mM วิเคราะห์โดย One - way analysis
of variance

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
ระหว่างกลุ่ม (b)	4	5332.8	1333.2	23.73**
ภายในกลุ่ม (w)	20	1123.2	56.16	
รวม	24	6456		

** มีนัยสำคัญระดับ .01

แสดงว่า MR ของอสุจิแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .01 ดังนั้น
จึงใช้ T - method เพื่อหาค่าเฉลี่ยคู่ที่แตกต่างกัน

ตาราง 4 เปรียบเทียบ IR ของอสุจิ ระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองสี่กลุ่ม

กลุ่ม	$\bar{x}$	C	Fr	Fu	M	G
		74	38.8	44	55.6	73.6
C	74	—	10.5*	8.95*	5.49*	0.11
Fr	38.8		—	1.55	5.01*	10.38*
Fu	44			—	3.46	8.83*
M	55.6				—	5.37*

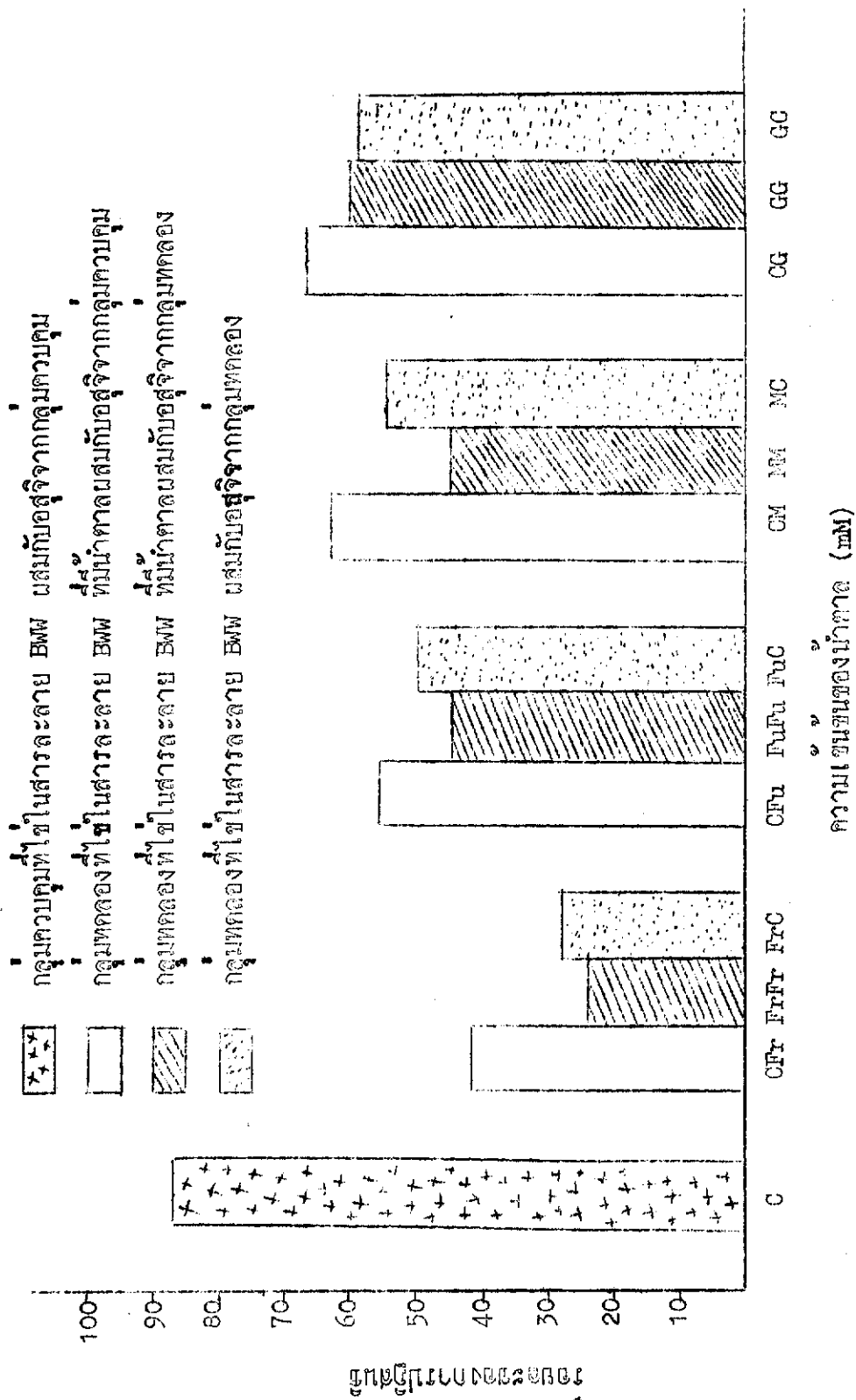
*มีนัยสำคัญระดับ .05

แอล - ฟรุคโตส และแอลฟา - เมทิล - คี - แมนโนไซด์ แล้วจะเห็นว่า MR ของอสุจิในสารละลายที่มีแอลฟา - เมทิล - คี - แมนโนไซด์ มีร้อยละ 55.6 ± 6.49 SD ในขณะที่ คี - ฟรุคโตส และแอล - ฟรุคโตส มี MR ของอสุจิเพียงร้อยละ 38.8 ± 2.03 SD และ 44 ± 7.04 SD ตามลำดับ

2. ผลของน้ำตาลที่มีต่อการปฏิสนธิ

ในการทดลองตอนที่ 2 นี้ แบ่งไข่ของกุ่มทดลองออกเป็นสามกลุ่มย่อย คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยไข่ในสารละลาย BWB ที่มีน้ำตาลอยู่ผสมกับอสุจิจากกุ่มควบคุมในสารละลายไทโรคัล ซึ่งได้แก่ กุ่มทดลอง CFr CFu CM CG (ภาพประกอบ 5) กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยไข่ในสารละลาย BWB ที่มีน้ำตาลอยู่ผสมกับอสุจิจากกุ่มทดลองในสารละลายไทโรคัลที่มีน้ำตาลน้อย ได้แก่ กุ่มทดลอง FrFr FuFu MM GG (ภาพประกอบ 5) กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยไข่ในสารละลาย BWB ผสมกับอสุจิจากกุ่มทดลองในสารละลายไทโรคัลที่มีน้ำตาลอยู่ ได้แก่ กุ่มทดลอง FrC FuC MC GC (ภาพประกอบ 5) จากการทดลองพบว่า กุ่มควบคุม C ซึ่งเป็นการปฏิสนธิของไข่ในสารละลาย BWB กับอสุจิจากกุ่มควบคุมในสารละลายไทโรคัล เกิดปฏิสนธิสูงสุกร้อยละ 82.2 ซึ่งสูงกว่ากุ่มทดลอง CFr FrFr FrC CFu FuFu FuC MM MC ($P > .05$) ส่วนกุ่มทดลอง CM CG GG GC ไม่แตกต่างจากกุ่มควบคุม ($P < .05$: ภาพประกอบ 5)

เมื่อเปรียบเทียบผลของน้ำตาลในสภาวะการทดลองที่แตกต่างกันสามแบบในน้ำตาลแต่ละกุ่ม ได้แก่ กุ่มทดลอง CFr FrFr FrC กุ่มทดลอง CFu FuFu FuC กุ่มทดลอง CM MM MC และกุ่มทดลอง CG GG GC ปรากฏว่าไม่พบความแตกต่างภายในกลุ่มของสภาวะการทดลองเช่นนี้ ($P < .05$) แต่พิจารณาถึงชนิดของน้ำตาลที่มีผลต่อการยับยั้งการปฏิสนธิแล้ว จะเห็นว่า คี - กาแลคโตส ไม่มีผลในการยับยั้งการปฏิสนธิเมื่อเทียบกับกุ่มควบคุม ($P < .05$) ส่วนน้ำตาลที่มีผลในการยับยั้งการปฏิสนธิสูงที่สุด คือ คี - ฟรุคโตส เกิดปฏิสนธิได้เพียงร้อยละ 23.8 ในกลุ่ม FrFr รองลงมาคือ แอลฟา - เมทิล - คี - แมนโนไซด์ และ แอล - ฟรุคโตส เกิดไกร้อยละ 45 และ 45.2 ใน MM และ FuFu ตามลำดับ (ภาพประกอบ 5)



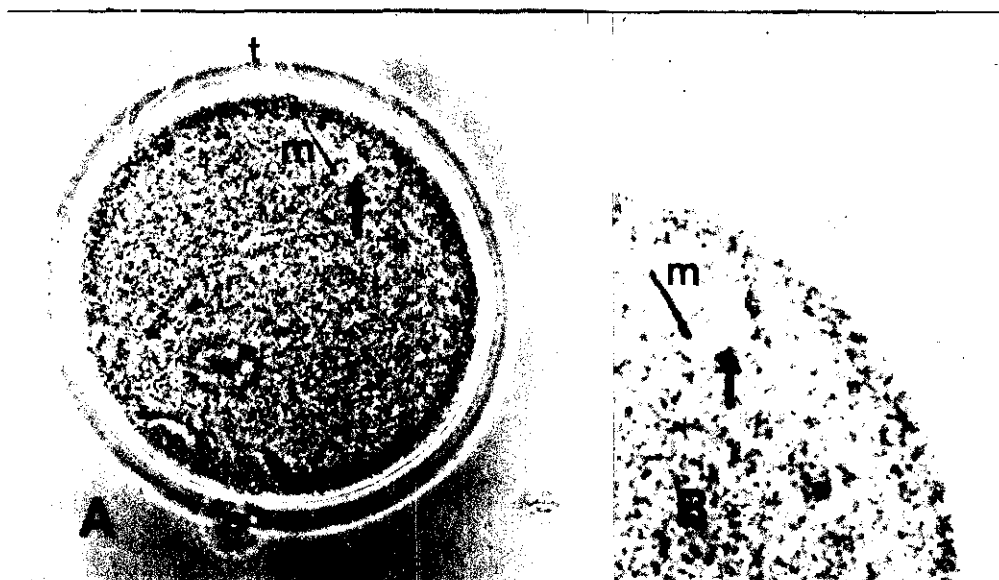
ภาพประกอบ 5 รอยตะขอยางการปฏิสนธิระหว่างกลุ่มความชื้น และกลุ่มทดลองในสภาวะแตกต่างกันสามอย่างในน้ำบาด
 สันนิษฐานความชื้น 50 mm

ภาพประกอบ 6A-6 C ใช้ของหนูแฮมสเตอร์ที่เกิดปฏิสนธิหลังจากนำไปผสมกับอสุจิในสารละลาย BWW เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

A ใช้ที่เกิดปฏิสนธิขยาย 600 เท่า ตรงลูกศรชี้จะเห็นนิวเคลียสที่อยู่ส่วนหัวของอสุจิกระจายออก (Dispersed sperm nucleus) ส่วนที่เป็นสีดำ (m) คือส่วนกลางของอสุจิ (Middle piece) และหาง (t) ยังคงอยู่

B ภาพ ขยาย 1,800 เท่า แสดงนิวเคลียสของส่วนหัวอสุจิกระจายออก (ลูกศรชี้)

C ใช้ที่เกิดปฏิสนธิจากอสุจิหลายตัวขยาย 1,800 เท่า บริเวณลูกศรชี้มีลักษณะกลมใสกว่าส่วนอื่นๆ เป็นส่วนหัวของอสุจิที่นิวเคลียสกระจายออกแล้วและจะเห็นส่วนกลางของอสุจิ (m) คงเหลืออยู่ ส่วนหางของอสุจิหลุดออกไปแล้ว



ตาราง 5 ความแปรปรวนของการปฏิสนธิ ระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองใน
 สาระละลาย BWW ที่มีน้ำตาลสัณนิทความเข้มข้น 50 mM ในสภาวะการทดลอง
 แยกต่างกันอย่าง วิเคราะห์โดย One - way analysis of variance

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
ระหว่างกลุ่ม (b)	12	16570.8	1380.9	** 9.17
ภายในกลุ่ม (w)	52	7827.2	150.52	
รวม	64	24398		

* มีนัยสำคัญระดับ .01

แสดงว่า การปฏิสนธิแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .01 ดังนั้น
 จึงใช้ T-method เพื่อหาค่าเฉลี่ยคู่ที่แตกต่างกัน

ตาราง 6 เปรียบเทียบการเกิดปฏิกิริยาระหว่างกลุ่มความเค็ม และกลุ่มพดของ ในสภาวะการพดของที่ต่างกันส่วนย่อย

กลุ่ม	ค่าเฉลี่ย													
	C	CPr	FrFr	FrC	CPr	FuFu	FuC	CM	MM	MC	CG	CG	CG	
$\bar{X}$	87.2	41.8	23.8	28	55.8	45.2	49.6	63.2	45	55.4	67.2	60	59.4	
C	87.2	—	6.86*	9.59*	10.80*	5.72*	6.35*	6.86*	4.37	7.70*	5.80*	3.64	4.96	5.07
CPr	41.8	—	3.28	2.51	2.55	0.62	1.42	3.90	0.58	2.48	4.63	3.32	3.21	
FrFr	23.8		—	0.76	5.83*	3.90	4.70	7.18*	3.86	5.76*	7.91*	6.60*	6.49*	
FrC	28			—	5.07	3.13	3.94	6.42*	3.10	5.00	7.15*	5.83*	5.72*	
CPr	55.8				—	1.93	1.13	1.35	1.97	0.07	2.08	0.76	0.65	
FuFu	45.2					—	0.80	3.28	0.30	1.86	4.01	2.07	2.59	
FuC	49.6						—	2.48	0.83	1.05	3.21	1.89	1.78	
CM	63.2							—	3.32	1.42	0.72	0.58	0.69	
MM	45								—	1.89	4.05	2.73	2.62	
MC	55.4									—	2.15	0.83	0.72	
CG	67.2										—	1.31	1.42	
GG	60											—	0.10	

* ค่ามีนัยสำคัญระดับ .05

ตาราง 7 ร้อยละของปฏิกิริยาอะโครซิน และทริปซิน ที่ยับยั้งโดยน้ำตาลที่ชนิดที่ความเข้มข้น 50 และ 100 mM

ชนิดของ น้ำตาล	ความเข้มข้น ของน้ำตาล (mM)	จำนวนร้อยละ ของทริปซิน	จำนวนร้อยละของ ทริปซินที่ถูกยับยั้ง	จำนวนร้อยละของ อะโครซิน
C	—	100	0	0
Fr	50	74	26	0
	100	72	28	0
Fu	50	84	16	0
	100	84	16	0
M	50	72	28	0
	100	70	30	0
G	50	80	20	0
	100	76	24	0

3. ผลของน้ำตาลในการยับยั้งปฏิกิริยาของอะโครซิน และทริปซิน

จากการทดลองใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นสองระดับ คือ 50 และ 100 mM เพื่อศึกษาผลในการยับยั้งปฏิกิริยาของทริปซิน พบว่า น้ำตาลที่ความเข้มข้นสองระดับนี้ไม่แสดงผลในการยับยั้งปฏิกิริยาแตกต่างกันอย่างชัดเจน แอลฟา - เมทิล - ดี - แมนโนไซด์ ที่ระดับความเข้มข้น 100 mM ยับยั้งปฏิกิริยาของทริปซินไครอยละ 30 ซึ่ง เป็นอัตราที่สูงสุดในจำนวนของน้ำตาลทั้งหมดที่นำมาใช้ในการทดลอง ส่วนน้ำตาลที่ยับยั้ง ปฏิกิริยาของทริปซินได้น้อยที่สุด คือ แอล - ซูโครส ยับยั้งได้เพียงร้อยละ 16 (ตาราง 7) ส่วน การวัดปฏิกิริยาของอะโครซินที่ได้จากการปั่นแยกส่วนจากอสุจิที่เกิด AR แล้วโดยสเปคโตร โฟโตมิเตอร์ เช่นเดียวกับการวัดปฏิกิริยาทริปซิน ปรากฏว่าไม่พบปฏิกิริยาของอะโครซิน (ตาราง 7)

สรุป อภิปรายผล และขอเสนอแนะ

จุดมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของน้ำตาลเชิงเดี่ยว และอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยว ที่มีต่อการเกิด AR ของอสุจิ
2. เพื่อศึกษาผลของน้ำตาลเชิงเดี่ยว และอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยว ที่มีต่อการปฏิสนธิ
3. เพื่อทดสอบปฏิกริยาของอะโครซินที่หลังจากอสุจิหลังจากเกิด AR เมื่อมีน้ำตาลเชิงเดี่ยว และอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวอยู่ด้วย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลองใช้หนูแฮมสเตอร์เพศผู้ และเพศเมีย อายุประมาณ 2 เดือน
2. วิธีการทดลอง
 - 2.1 ศึกษาผลของน้ำตาล ที่มีต่อการเกิด AR ของอสุจิ โดยเลี้ยงอสุจิในสารละลายที่มีน้ำตาลแตกต่างกันสี่ชนิด ซึ่งแต่ละชนิดมีน้ำตาลที่ระดับ คือ 10 25 50 และ 100 mM ในสารละลายเลี้ยงอสุจิ แล้วเลือกใช้ความเข้มข้นสูงสุดที่อสุจิยังเกิด AR ได้ดี และมี MR ของอสุจิสูง
 - 2.2 เลือกความเข้มข้นของน้ำตาลที่อสุจิยังเกิด AR ได้จากตอนที่ 1 มาทดสอบผลของน้ำตาล ที่มีต่อการยับยั้งการปฏิสนธิ โดยทำการผสมไข่ในสภาวะต่าง ๆ กับอสุจิจากกลุ่มที่เลี้ยงในสารละลายที่มีน้ำตาล และไม่มีน้ำตาล แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของการเกิดปฏิสนธิ
 - 2.3 ทดสอบปฏิกริยาของอะโครซินจากอสุจิที่เลี้ยงในสารละลายที่มีน้ำตาลในความเข้มข้นที่อสุจิยังเกิด AR ได้ดีจากตอนที่ 1 โดยปั่นแยกส่วนเอาสารละลายที่แยกไว้ไป

ยอัยขัณฑ์สเตรท แล้ววัดปฏิกิริยาของอะโครชินด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เปรียบเทียบกับปฏิกิริยาของทริปซินที่นำไปยอัยขัณฑ์สเตรท แล้ววัดด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เช่นเดียวกัน

สรุปผลการวิจัย

1. น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นต่างกัน คือ 10 25 50 และ 100 mM ที่ใช้ทดสอบคุณภาพที่มีต่อการเกิด AR ของอสุจินั้นปรากฏว่า ที่ความเข้มข้นสูงถึง 50 mM อสุจิยังสามารถเกิด AR ได้ และอัตราการเกิด AR ก็อยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกับ AR ของอสุจิในสารละลายที่มีน้ำตาลที่ต่ำกว่า ผลของน้ำตาลที่มีต่อการเกิด AR ที่ความเข้มข้นระดับ 50 mM ไม่แตกต่างจากการเกิด AR ของกลุ่มควบคุม ($P < .05$) ยกเว้นในกรณีที่มีอสุจิอยู่ในสารละลายที่มีแอลฟา - เมทิล - คี - แพนโนไซด์ อัตราการเกิดของอสุจิต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ($P > .05$) แม้จะมีน้ำตาลอยู่ในสารละลายเพียง 10 mM
2. เมื่อให้สภาวะการทดลองแตกต่างกันสามแบบในน้ำตาลแต่ละชนิด คือ ใช้ในสารละลาย BWB ที่มีน้ำตาลผสมกับอสุจิจากกลุ่มควบคุม ใช้ในสารละลาย BWB ที่มีน้ำตาลผสมกับอสุจิจากกลุ่มทดลอง และใช้ในสารละลาย BWB ผสมกับอสุจิจากกลุ่มทดลอง ปรากฏว่า ในน้ำตาลแต่ละชนิดที่ใช้วิธีการทดลองในสภาวะแตกต่างกัน สามแบบนี้ให้ผลของอัตราการเกิดปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน ($P < .05$) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแล้ว อัตราการปฏิสนธิของกลุ่มควบคุมสูงกว่ากลุ่มทดลอง ($P > .05$) ที่มีน้ำตาลคี - ฟรุคโตส แอล - ฟรุคโตส และแอลฟา - เมทิล - คี - แพนโนไซด์อยู่ แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มทดลองที่มีคี - กาแลคโตสอยู่ ($P < .05$) น้ำตาลที่มีผลในการยับยั้งการปฏิสนธิได้สูงสุด คือ คี - ฟรุคโตส เพราะเกิดปฏิสนธิได้เพียงร้อยละ 23.8 ในกลุ่มทดลอง FrFr รองลงมา คือ แอลฟา - เมทิล - คี - แพนโนไซด์ และ แอล - ฟรุคโตส ซึ่งเกิดปฏิสนธิได้ร้อยละ 45 และ 45.2 ในกลุ่มทดลอง MM และ FrFr ตามลำดับ ส่วนคี - กาแลคโตส มีผลในการปฏิสนธิเกิดได้สูงสุดในจำนวนน้ำตาลทั้งหมดที่นำมาทดลองคือ เกิดได้ร้อยละ 60 ในกลุ่มทดลอง GG

3. น้ำตาลที่นำมาทดลอง มีผลในการยับยั้งปฏิกิริยาของทรินค่อนข้างต่ำ การยับยั้งสูงสุดที่ทดสอบได้ คือ ร้อยละ 30 โดยแอลฟา - เมทิล - ดี - แคนโนไซด์ ที่ความเข้มข้น 50 mM ส่วน แอล - ฟรุคโตส ยับยั้งได้ต่ำสุดถึงแม้จะให้ความเข้มข้นของ น้ำตาลสูงถึง 100 mM แต่สามารถยับยั้งได้เพียงร้อยละ 16 เท่านั้น สำหรับผลของ น้ำตาลที่มีต่ออะโครซินที่ได้จากการปั่นแยกส่วนจากอสุจิที่เกิด AR แล้วนั้นไม่สามารถทดสอบ ปฏิกิริยาได้

อภิปรายผล

ในการศึกษาผลของน้ำตาลที่มีต่อการเกิด AR ของอสุจินั้น โรเจอร์ และยานากิมachi (Rogers and Yanaginachi. 1975 : 568 - 575) ได้ทดลองกับอสุจิของหนูตะเภา พบว่า ดี - ฟรุคโตส มีผลในการยับยั้ง AR ของอสุจิสูงกว่าน้ำตาลอื่น ๆ แต่จากการทดลอง ในครั้งนี้ โดยใช้อสุจิของหนูแฮมสเตอร์ ปรากฏว่า ที่ความเข้มข้น 50 mM ของแอลฟา - เมทิล - ดี - แคนโนไซด์ มีผลในการยับยั้งการเกิด AR สูงกว่าน้ำตาลชนิดอื่น ๆ ได้แก่ ดี - ฟรุคโตส แอล - ฟรุคโตส และดี - กาแลกโตส ซึ่งน้ำตาลสามชนิดหลังนี้ไม่มีผลในการ ยับยั้ง AR ของอสุจิแฮมสเตอร์ แต่เมื่อพิจารณาอัตรา MR ของอสุจิกลับเกิดได้ในอัตราที่ต่ำ ยกเว้น เมื่อมีดี - กาแลกโตสอยู่ ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นของน้ำตาลในระดับที่สูงเกินไป อาจทำให้คุณสมบัติทางออสโมติกของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิเปลี่ยนแปลงไป (Bedford. 1964 : 286) อันเป็นผลให้เยื่อเซลล์เสียสมบัติในการคัดเลือกลำเลียงเข้าออก (Summers and others. 1976 : 381 - 385) หรือไม่สามารถใช้ออกซิเจน (Oxygen uptake) ได้เพียงพอ (Iritani and others. 1969 : 77 - 82) จึงทำให้ MR ต่ำกว่ากลุ่ม ควบคุม แต่อสุจิในสารละลายที่มีดี - กาแลกโตสอยู่การเกิด AR และ MR สูงกว่าในน้ำตาล ชนิดอื่น ๆ ที่นำมาทดลอง ทั้งนี้เนื่องจากอสุจิสามารถใช้ดี - กาแลกโตสเป็นแหล่งพลังงาน ในกระบวนการเมตาบอลิซึมได้เช่นเดียวกับกลูโคส จากการทดลองของ นิวา และอิริทานิ (Niwa and Iritani. 1978 : 267 - 271) สรุปว่า กลูโคสอาจเป็นแหล่งพลังงาน

ของอสุจิหนูแรท ทั้งนี้เพราะถ้าไม่มีกลูโคสในสารละลายเลี้ยงอสุจิหนูแรทแล้ว อสุจิไม่สามารถเข้าปฏิกิริยาได้ คือ - กาแลคโตส ถือว่าเป็นไอโซเมอร์ (Isomer) ของกลูโคส และสามารถแสดงสมบัติการหมุนเวียน (Mutarotation) ได้เช่นเดียวกับกลูโคส (สุทธิ ภมรสมิต และประเสริฐ ศรีไพโรจน์ 2518 : 95 - 107) ดังนั้น คือ - กาแลคโตสจึงน่าจะเป็นแหล่งพลังงานได้เช่นเดียวกับกลูโคสในสารละลายเลี้ยงอสุจิ

ถึงแม้ว่าศาลจะไม่มีผลในการยับยั้งการเกิด AR ของอสุจิกก็ตาม แต่ศาลสามารถยับยั้งการปฏิสนธิได้ ในกลุ่มการทดลองทุกกลุ่มที่มีน้ำศาลอยู่การปฏิสนธิจะต่ำกว่ากลุ่มควบคุม แม้จะเลี้ยงอสุจิในสารละลายที่มีน้ำศาลก่อนนำมาผสมกับไข่ หรือเติมน้ำศาลขณะที่อสุจิผสมกับไข่ก็ตาม ผลที่ได้ไม่แตกต่างกัน แสดงว่า น้ำศาลไม่มีผลในการยับยั้ง AR ของอสุจิ แม้มีผลในการยับยั้งเอนไซม์ที่อสุจิปล่อยออกมาหลังจากเกิด AR แล้ว อันเป็นผลให้การปฏิสนธิถูกยับยั้งได้ ซึ่งปรากฏว่า คือ - ฟรุคโตสยับยั้งการปฏิสนธิได้สูงสุด แต่คือ - กาแลคโตสไม่มีผลในการยับยั้งการปฏิสนธิของหนูแฮมสเตอร์ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ คือ - กาแลคโตส อาจเป็นแหล่งพลังงานในขบวนการเมตาบอลิซึมของอสุจิกที่กล่าวไปแล้ว และอีกกรณีหนึ่ง เนื่องจากการจัดเรียงตัวของโมเลกุล (Configuration) ของน้ำศาลแตกต่างกัน อาจมีผลให้สารละลายที่มีน้ำศาลชนิดนั้นอยู่มีความหนืดแตกต่างกัน อันเป็นผลให้การปฏิสนธิเมื่อนำน้ำศาลเหล่านี้มาอยู่เกิดแตกต่างกันได้ ผลจากการทดสอบปฏิกริยาของอะโครซิน ปรากฏว่า ไม่สามารถวัดปฏิกริยาของอะโครซินได้ เพราะอะโครซินที่ป้อนแยกส่วนได้นั้น ได้เฉพาะอสุจิที่ยังรอคอยู่เท่านั้น ซึ่งเหลืออยู่ประมาณครึ่งหนึ่งของทั้งหมด ดังนั้น ปริมาณที่ได้จึงต่ำมาก และจากการวัดปฏิกริยาอะโครซินของอสุจิกระต่าย โคยอะครุก และคนอื่น ๆ (Akruk and others. 1979 : 1 - 13) โดยการไฮโครไลส์ BAEE ปรากฏว่า ไม่สามารถวัดปฏิกริยาของอะโครซินได้เช่นกัน แม้แต่ใช้วิธีการสกัดจากอสุจิโดยตรงปริมาณอะโครซินที่ได้ก็มีปริมาณต่ำ คือ 5×10^{-3} mU ต่ออสุจิล้านตัว (Meizel and Mukerji. 1975 : 83 - 93) กัดคัม - รอส และบลันด์ (Gaddum - Rosse and Blundau. 1977 : 427) อธิบายว่า การที่อะโครซินเสียประสิทธิภาพไปอย่างรวดเร็วนั้น อาจเนื่องมาจากชนิดของไอออนในสารละลาย และการเปลี่ยนแปลง pH ของสารละลายที่ใช้ในการทดลองก็อาจเป็นได้ ส่วนผลของน้ำศาลที่มีต่อ

ทริปซินนั้น ปรากฏว่า ปริมาณทริปซินที่วัดได้ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม แสดงว่า น้ำตาลยับยั้งปฏิกิริยาของทริปซินโคตา ซึ่งผลคล้ายกับ เคอเรคส์ (Kerakes. 1966 : 633) ที่ใช้น้ำตาลไปยับยั้งปฏิกิริยาของทริปซิน แม้จะใช้น้ำตาลเข้มข้นถึง 1M ผลการยับยั้งก็ต่ำเช่นเดียวกัน

อย่างไรก็ตาม แม่น้ำตาลจะยับยั้งปฏิกิริยาของทริปซินโคตา แต่ยังไม่แสดงให้เห็นว่า น้ำตาลสามารถยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ อันเป็นผลให้การปฏิสนธิถูกยับยั้งได้ แต่ผลที่มีต่อการยับยั้งปฏิกิริยาของทริปซินเท่านั้น อาจเนื่องจากสภาวะแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไป เช่น อุณหภูมิของเครื่องวัดจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อใช้ไประยะหนึ่ง ซึ่งจุดสูงสุดของอุณหภูมิในการวัดปฏิกิริยาทริปซินเพียง 25°C เท่านั้น อีกอย่างหนึ่งก็คือ pH ของสารละลายเปลี่ยนแปลงไ้รวดเร็วมาก ถ้าทิ้งไว้ในอากาศ และที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 25°C ถ้า pH ของสารละลายสูงกว่า 8 ขึ้นไปแล้ว ทริปซินสามารถย่อยสลายตัวเองได้ (อมรา มลิลดา และคนอื่น ๆ 2520 : 38) นอกจากนี้ ยังแสดงให้เห็นว่า ทริปซินกับอะโครซินคงมีสมบัติบางอย่างที่แตกต่างกันที่ถูกยับยั้งจากสารชนิดเดียวกันได้ไม่เท่ากัน

ข้อเสนอแนะทั่วไป

1. ในการทดลองสิ่งที่ควรคำนึงถึงมากที่สุดคือ อุณหภูมิ และ pH ของสารละลาย ทั้งนี้เพราะเป็นการศึกษาออกฤทธิ์ของสัตว์ทดลอง การควบคุมอุณหภูมิให้คงที่สม่ำเสมอเป็นสิ่งที่จะต้องคำนึงถึงอย่างสำคัญ ส่วน pH ของสารละลายนั้นจะเปลี่ยนเป็นเบสมากขึ้น เมื่อทิ้งไว้ในอากาศ การทดลองเกี่ยวกับเอนไซม์จึงต้องระวังเรื่อง pH เป็นอย่างมาก เพราะถ้า pH ของสารละลายเปลี่ยนไปปฏิกิริยาของเอนไซม์ก็เปลี่ยนไปเช่นเดียวกัน

2. การศึกษาเวลาของการเกิด AR และระยะเวลาของการผสมระหว่างไข่และอสุจิให้แน่ชัด เพราะอสุจิจะตายทันทีเมื่อเกิด AR แล้ว จึงต้องประมาณเวลาที่เหมาะสมตามอสุจิผสมกับไข่เข้าไปกว่าช่วงที่เกิด AR แล้วอัตราการผสมอาจลดลง ซึ่งอาจทำให้เกิดการทดลองผิดพลาดไปได้

ข้อเสนอแนะเพื่อการวิจัย

1. ควรศึกษาผลของน้ำคาลว่า มีต่อสุจิอย่างไร ในเมื่อสุจิเกิด AR ได้ แต่ผลของการปฏิสนธิกลับลดลง
2. ควรศึกษาในสัตว์ทดลองชนิดอื่น เพื่อเปรียบเทียบผลว่าคล้ายหรือต่างกันอย่างไร
3. ควรจะศึกษาการผสมในตัวสัตว์ และนอกตัวสัตว์ทดลอง เพื่อเปรียบเทียบผลว่าต่างกันอย่างไร ทั้งนี้เพื่อเป็นแนวทางที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในเรื่องอื่น ๆ เช่น การคุมกำเนิด เป็นต้น

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

วิเชียร เกตุสิงห์ สถิติวิเคราะห์สำหรับการวิจัย กองการวิจัยการศึกษา สำนักงาน

คณะกรรมการการศึกษาแห่งชาติ 2523, 181 หน้า

สุทธิ อมรสมิต และประเสริฐ ศรีไพโรจน์ ชีวเคมีพื้นฐาน โรงพิมพ์รุ่งเกียรติขอนแก่น

2518, 263 หน้า

อมรา มลิลดา พิพัฒน์ เจียรังสี และทวีศักดิ์ บุรณวุฒิ สรีรวิทยาเบื้องต้น อักษรเจริญทัศน์

2520, 240 หน้า

Akruk, S. R. and others. "Release of Acrosomal Enzyme Following In Vitro Capacitation of Ejaculated Rabbit Spermatozoa" Gamete Research. 2 : 1 - 13, 1979.

Anderson, R. A. and others. "Enzymic Determination of Fructose in Seminal Plasma by Initial Rat Analysis," Clinical Chemistry. 10 : 1780 - 1782, 1979.

Anderson, R.A. and others. "Inhibition of Human Acrosin by Fructose and Other Monosaccharides," Biology of Reproduction. 22 : 1083 - 1088, 1980.

Austin, C.R. "Observation on the Penetration of the Sperm into the Mammalian Egg," Australian Journal Scientific Research. 4 : 581 - 596, 1951.

Austin, C.R. and Braden, A.W.H. "Time Relations and Their Significance in the Ovulation and Penetration of Egg in Rats and Rabbits," Australian Journal Biological Science. 7 : 179 - 194, 1954.

Bedford, J.M. and Chang, M.C. "Removal of Decapacitation Factor From Seminal Plasma by High Speed Centrifugation," American Journal Physiology. 202 : 179 - 181, 1962.

Bedford, J.M. "Evidence of Change in the Sperm Head Plasma Membrane of Rabbit Uterine Spermatozoa," Proceeding International Congress Animal Reproduction. 5 : 286 - 288, 1964.

Bedford, J.M. "Ultrastructure Changes in the Sperm Head during Fertilization in the Rabbit," American Journal Anatomy. 123 : 329 - 357, 1968.

- Biggers, J.D. Whitten, W.K. and Whittingham, D.G. "The Culture of Mouse Embryos In Vitro," in : Methods of Mammalian Embryology. Freeman and Co. San Francisco. pp 86 - 116, 1971.
- Brown, C.R. and Hartree, E.F. "Studies on Ram Acrosin : Activation of Proacrosin Accompanying the Isolation of Acrosin from Spermatozoa and Purification of the Enzyme by Affinity Chromatography," Biochemistry Journal. 175 : 227 - 238, 1978.
- Chang, M.C. "Developmental of Fertilizing Capacity of Rabbit Spermatozoa in the Uterus," Nature. 175 : 1036 - 1037, 1957.
- Chang, M.C. "A Detrimental Effect of Rabbit Seminal Plasma on the Fertilizing Capacity of Sperm," Nature. 179 : 258 - 259, 1957.
- Dukelow, W.R., Chernoff, H.N. and Williams, W.L. "Enzymatic Characterisation of Decapacitation Factor," Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 121 : 396 - 398, 19
- Gaddum - Rosse, P. and Blandau, R.J. "Proteolytic Activity of Guinea Pig Spermatozoa after Induction of the Acrosomal Reaction In Vitro," American Journal of Anatomy. 149 : 423 - 429, 1977.
- Hunter, R.H.F. and Dziuk, F.J. "Sperm Penetration of Pig Eggs in Relation to Timing of Ovulation and Insemination," Journal of Reproduction and Fertility. 15 : 199 - 208, 1968.
- Iritani, A. Gomes, W.R. and Van Demark, N.L. "The Effect of Whole Dialyzed and Heated Female Genital Tract Fluids on Respiration of Rabbit and Ram Spermatozoa," Biology of Reproduction. 1 : 77 - 82, 1969.
- Iwamatsu, T. and Chang, M.C. "In Vitro Fertilization of Mouse Eggs in the Presence of Bovine Follicular Fluid," Nature. 224 : 919 - 920, 1969.
- Kerekes, M.F. "Inhibitory Action of Glusides on Trypsin Activity," Nature. 210 : 633, 1966.
- McRorie, R.A. and Williams, W.L. "Biochemistry of Mammalian Fertilization," Annual Review Biochemistry. 43 : 777 - 797, 1974.
- Marston, J.H. and Kelley, W.A. "Time Relationships of Spermatozoon Penetration into the Egg of the Rhesus Monkey," Nature. 217 : 1073 - 1074, 1968.
- Mattner, P.E. "Capacitation of Ram Spermatozoa and Penetration of the Ovine Egg," Nature. 199 : 772 - 773, 1963.

- Meizel, S. and Mukerji, S.K. "Proacrosin from Rabbit Epididymal Spermatozoa : Partial Purification and Initial Characterization," Biology of Reproduction. 13 : 93, 1975.
- Niwa, K. and Iritani, A. "Effect of Various Hexoses on Sperm Capacitation and Penetration of Rat Eggs In Vitro," Journal of Reproduction and Fertility. 53 : 267 - 271, 1978.
- Pinsker, M.C. and Williams, W.L. "Properties of a Spermatozoa in Anti - Fertility Factor," Arch. Biochem. Biophys. 122 : 111 - 177, 1967.
- Polakoski, K.L., Zaneveld, L.J.D. and Williams, W.L. "An Acrosin-Acrosin Inhibitor Complex in Ejaculated Boar Sperm," Biochemical Biophysic Research Communication. 45 : 381 - 386, 1971.
- Roger, B.J. and Yanagimachi, R. "Retardation of Guinea Pig Sperm Acrosome Reaction by Glucose," Biology of Reproduction. 13 : 568 - 575, 1975.
- Schleuning, W.D. and Fritz, H. "Some Characteristics of Highly Purified Boar Sperm Acrosin," Hoppe Seyler's Z. Physiology and Chemistry. 355 : 125 - 130, 1974.
- Stambaugh, R. Brackett, B.G. and Mastroianni, L. "Inhibition of InVitro Fertilization of Rabbit Ova by Trypsin Inhibitors," Biology of Reproduction. 1 : 223 - 227, 1969.
- Stambaugh, R. and Buckley, J. "Identification and Subcellular Localization of the Enzymes Effecting Penetration of the Zona Pellucida by Rabbit Spermatozoa," Journal of Reproduction and Fertility. 19 : 423 - 432, 1969.
- Storset, P., Stokke, O. and Jellum, E. "Monosaccharides and Monosaccharide Derivatives in Human Seminal Plasma," Journal of Chromatography, 145 : 351 - 357, 1978.
- Summers, R.G. and others. "Ionophore A 23187 Induces Acrosome Reactions in Sea Urchin and Guinea Pig Spermatozoa," Journal of Experimental Zoology. 196 : 381 - 385, 1976.
- Yanagimachi, R. "In Vitro Acrosome Reaction and Capacitation of Golden Hamster Spermatozoa with Bovine Follicular Fluid and Its Fraction," Journal of Experimental Zoology. 170 : 269 - 280, 1969.
- Yanagimachi, R. and Noda, Y.D. "Physiological Changes in the Postnuclear Cap Region of Mammalian Spermatozoa : A Necessary Preliminary to the Membrane Fusion Between Sperm and Egg Cells," Journal of Ultrastructure Research. 31 : 486 - 493, 1970.

Zaneveld, L.J.D., Polakoski, K.L. and Schumacher, G.F.B. "The Proteolytic Enzyme Systems of Mammalian Genital Tract Secretions and Spermatozoa," in : Proteases and Biological Control. 2 : 683 - 705, 1975.

การคำนวณ

ภาคนวค ก.

ส่วนประกอบของสารละลายไทโรซีนและ BWW

ส่วนประกอบของสารละลายไทโรดส์ และ BWB

สารเคมี	Modified Tyrode's g/100 ml	Modified BWB g/100 ml
NaCl	0.67	0.555
KCl	0.222	0.036
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.226	0.019
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.01	—
KH ₂ PO ₄	—	0.017
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0.005	—
Glucose	0.1	0.1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	—	0.03
NaHCO ₃	0.1	0.211
Sodium pyruvate	0.0028	0.0028
Sodium lactate	0.368 ml	0.368 ml
Bovine serum albumin	0.1	0.1

ภาคผนวก ข.

✓
รายละเอียดของการเกิด AR และ MR ของธุรกิจ

ร้อยละของการเกิด AR และ MR ของอสุจิที่เลี้ยงในสารละลายน้ำตาลสี่ชนิดที่มี
ความเข้มข้นต่างกันสี่ระดับ

ชนิด ของ น้ำตาล	ความเข้มข้น ของน้ำตาล (mM)	ร้อยละของการเกิด AR					S.D.	ร้อยละของ MR					S.D.		
		การทดลองครั้งที่						X̄	การทดลองครั้งที่					X̄	
		1	2	3	4	5			1	2	3	4			5
Fr	10	62	70	72	76	70	70	4.56	42	40	42	38	36	39.6	2.33
	25	64	68	72	80	84	73.8	7.41	44	36	38	40	38	39.2	2.71
	50	58	66	78	82	80	72.6	9.26	36	38	42	38	40	38.8	2.03
	100	42	40	54	42	60	47.8	7.93	30	24	38	30	26	29.6	4.80
Fu	10	64	62	54	62	72	61.2	3.70	50	40	38	38	62	45.6	9.32
	25	62	78	82	76	72	74	6.81	48	38	40	38	56	44	7.04
	50	60	78	68	74	56	70.4	8.8	46	36	44	40	54	44	7.04
	100	52	52	48	46	58	50.8	3.48	28	26	30	36	50	34	8.67
M	10	70	70	60	56	58	62.8	6.01	68	64	52	56	50	58	6.92
	25	64	68	58	60	56	61.2	4.30	64	68	52	54	48	57.2	7.80
	50	60	66	60	58	61	61	2.65	58	64	56	56	44	55.6	6.49
	100	48	44	26	48	30	39.2	9.34	40	38	44	43	45	42	2.60
G	10	76	68	64	72	74	70.8	4.30	84	82	74	72	66	75.6	6.62
	25	74	72	68	70	76	72	2.82	84	74	68	78	68	74.4	6.11
	50	80	76	74	78	68	75.2	4.11	86	76	64	72	70	73.6	7.31
	100	82	86	90	92	82	86.4	4.17	64	70	66	68	60	65.6	3.97
กลุ่มควบคุม		78	94	88	72	84	83.2	7.65	60	86	82	68	74	74	9.38

ภาคผนวก ก.

จำนวนไข่ที่เกิดการปฏิสนธิ และร้อยละของการปฏิสนธิ

จำนวนไขที่เกิดการปฏิสนธิระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง ในสภาวะที่แตกต่างกัน
สามอย่าง

การทดลอง ครั้งที่	จำนวน ไขที่ใช้ ทดลอง	จำนวนไขที่เกิดการปฏิสนธิ												
		ชนิดของน้ำคาล												
		C	CFr	FrFr	FrC	CFu	FuFu	FuC	CM	MM	MC	CG	GG	GC
1	17	15	5	3	4	7	4	7	13	5	9	11	12	11
2	16	14	9	4	4	9	6	7	8	8	9	12	12	11
3	17	15	7	4	5	6	5	6	9	5	7	10	9	9
4	10	9	5	2	3	8	7	7	7	5	6	7	6	6
5	12	10	4	4	4	8	8	7	8	8	8	8	5	6
เฉลี่ย	14.4	12.6	6	3.4	4	7.6	6	6.8	9	6.2	7.8	9.6	8.8	8.6

ร้อยละของการปฏิสนธิ ระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองในสภาวะที่แตกต่างกัน
 ตัวอย่าง

การทดลอง ครั้งที่	ร้อยละของการปฏิสนธิ												
	ชนิดของน้ำตา												
	C	CFr	FrFr	FrC	CFu	FuFu	FuC	CM	MM	MC	CG	GG	GC
1	88	29	18	23	41	23	41	76	29	53	65	70	65
2	87	56	25	25	56	37	44	50	50	56	75	75	69
3	88	41	23	29	35	29	35	53	29	41	59	53	53
4	90	50	20	30	80	70	70	70	50	60	70	60	60
5	83	33	33	33	67	67	58	67	67	67	67	42	50
เฉลี่ย	87.2	41.8	23.8	28	55.8	45.2	49.6	63.2	45	55.4	67.2	60	59.4

ภาคผนวก ง.

“ รอยละรอนงหริป^๑สิน^๑ที่^๑ถูก^๑ย^๑บ^๑ย^๑ง^๑ค^๑ว^๑ย^๑น^๑้ำ^๑ค^๑า^๑ล^๑ ”

ร้อยละของทวีปดินที่ถูกยับยั้งด้วยน้ำตาลกลีโคสิก ที่ความเข้มข้นสอง ระดับ

ชนิดของ น้ำตาล	ความเข้มข้น ของน้ำตาล (mM)	$\Delta OD /$ min.	ความเข้มข้นของ เอนไซม์ (M/mL/min.)	หน่วยของ เอนไซม์ (mU)	เฉลี่ย (mU)	จำนวนร้อยละ ของเอนไซม์	จำนวนร้อยละ ของการยับยั้ง เอนไซม์
C	0	.006	52×10^{-4}	5.2	5	100	0
		.0051	44×10^{-4}	4.4			
		.0062	54×10^{-4}	5.4			
Fr	50	.0042	36×10^{-4}	3.6	3.7	74	26
		.0046	40×10^{-4}	4.0			
		.0042	36×10^{-4}	3.6			
	100	.0040	34×10^{-4}	3.4	3.6	72	28
		.0044	38×10^{-4}	3.8			
		.0042	36×10^{-4}	3.6			
Fu	50	.0041	35×10^{-4}	3.5	4.2	84	16
		.0046	40×10^{-4}	4.0			
		.0058	50×10^{-4}	5.0			
	100	.0048	41×10^{-4}	4.1	4.2	84	16
		.0048	41×10^{-4}	4.1			
		.0051	44×10^{-4}	4.4			
M	50	.0042	36×10^{-4}	3.6	3.6	72	28
		.0036	31×10^{-4}	3.1			
		.0048	41×10^{-4}	4.1			
	100	.0044	38×10^{-4}	3.8	3.5	70	30
		.0041	35×10^{-4}	3.5			
		.0040	34×10^{-4}	3.4			
G	50	.0048	41×10^{-4}	4.1	4	80	20
		.0047	40×10^{-4}	4.0			
		.0046	40×10^{-4}	4.0			
	100	.0047	40×10^{-4}	4.0	3.8	76	24
		.0047	40×10^{-4}	4.0			
		.0038	33×10^{-4}	3.3			

น้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวที่มีผล
ต่อการยับยั้งอะโครซินของหนูแฮมสเตอร์

บทคัดย่อ

ของ

นิพนธ์ แสงรุ่ง

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต

ตุลาคม 2526

เมื่อเลี้ยงอสุจิของหนูแฮมสเตอร์ ความเข้มข้นประมาณ 1.5×10^7 sperm/ml ในสารละลายไทโรส ที่มีน้ำตาลเชิงเดี่ยวสามชนิดได้แก่ คี-ฟรุคโตส แอล-ฟูโคส คี-กาแลคโตส และอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวหนึ่งชนิดคือ แอลฟา-เมทิล-คี-แมนโนไซด์ ในความเข้มข้นของน้ำตาลชนิดละสี่ระดับคือ 10 25 50 และ 100 mM ปรากฏว่าอสุจิที่เลี้ยงในสารละลายที่มีน้ำตาลอื่น ๆ อยู่ นอกจากแอลฟา-เมทิล-คี-แมนโนไซด์ แล้ว ยังเกิด อะโครโซมรีแอคชันได้ ที่ความเข้มข้นระดับ 50 mM แต่อัตราการเกิด อะโครโซมรีแอคชันจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลสูงขึ้น

หลังจากนำอสุจิที่เกิดอะโครโซมรีแอคชันในสารละลายน้ำตาลแต่ละชนิดที่ ความเข้มข้น 50 mM นี้ ไปทดสอบการปฏิสนธิโดยผสมกับไข่ในสารละลาย BWW พบว่า คี-ฟรุคโตส ยับยั้งการปฏิสนธิได้สูงสุดคือ เกิดปฏิสนธิได้ร้อยละ 23.8 รองลงมา คือ แอลฟา-เมทิล-คี-แมนโนไซด์ แอล-ฟูโคส และคี-กาแลคโตส เกิดได้ร้อยละ 45 45.2 และ 60 ตามลำดับ แม้ว่าไม่สามารถวัดปฏิกิริยาของอะโครโซมได้ หลังจากที่มีสารละลายที่ปั่นแยกส่วนจากอสุจิไปวิเคราะห์โดยวิธีการย่อยสลาย เอน-เบนโซอิล-แอล-อาจีนีน-เอทิล-เอสเทอร์ แต่การทดลองพบว่า น้ำตาลมีผลลด ปฏิกิริยาของทรูปซิน และยับยั้งการปฏิสนธิได้ ซึ่งการยับยั้งการปฏิสนธินี้อาจเกิดจาก การยับยั้งปฏิกิริยาของอะโครโซมที่หลังจากออกมาจากอสุจิหลังจากเกิดอะโครโซมรีแอคชันแล้ว

INHIBITION OF HAMSTER ACROSIN BY MONOSACCHARIDES
AND MONOSACCHARIDE DERIVATIVE

AN ABSTRACT

BY

NIT SANGROONG

Presented in partial fulfillment of the requirements
for the Master of Education degree
at Srinakharinwirot University

October 1983

The effects of three monosaccharides, D-Fructose, L-Fucose, D-Galactose, and a monosaccharide derivative, α -methyl-D-Mannoside, on acrosome reaction and fertilization were examined in the present study. The sugars at concentration 10, 25, 50 and 100 mM were incubated with hamster spermatozoa (1.5×10^7 sperm/ml) in modified Tyrode's solution containing human blood serum to determine their effect on the acrosome reaction. All sugars tested, except α -methyl-D-Mannoside, at the concentration of 50 mM did not affect the acrosome reaction. But the percentage of the acrosome reaction decreased when the sugar concentration was higher. The eggs were inseminated with capacitated spermatozoa in BWB solution with the addition of 50 mM of each different sugar to determine the effect of sugars on fertilization. The fertilization rate was affected in the presence of D-Fructose. The percentage of fertilization was only 23.8% compared with 87.2% in the control. But the percentages were 45, 45.2 and 60 in the case of α -methyl-D-Mannoside, L-Fucose and D-Galactose, respectively. Although the supernatant of the spermatozoa showed no activity of acrosin after N-Benzoyl-L-Arginine-ethyl ester hydrolysis, the sugars decreased trypsin activity and inhibited fertilization of the hamster eggs. Therefore the inhibition of fertilization by the sugars might be the result of their effects on the acrosin which had been released after the acrosome reaction.