

547.7813

ค ๒๓๘๓

ร 3

บทบาทของน้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวบางชนิดในการบีตจับ
ของสเปิร์มบนผิวไข่หนูแฮมสเตอร์

ปริญญานิพนธ์

ของ

วิสุทธิ์ ลิทธิการ

๒๒ พค ๒๕๓๕

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต

กุมภาพันธ์ ๒๕๒๗

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

178813

บทบาทของน้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวบางชนิดในการยึดจับ
ของสเปิร์มบนผิวไขหนูแฮมสเตอร์

บทคัดย่อ

ของ

วิสุทธิ์ ลิทธิการ

๖

เสนอต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต

กุมภาพันธ์ 2527

การทดสอบอิทธิพลของน้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวรวม 5 ชนิดคือ แอล-ฟูโกส ดีแวนโนส คี-กาแลคโทส เอ็น-อะซีทิล-คี-กลูโคซามีน ความเข้มข้น 10 25 50 และ 100 mM และกรกไชอะคิก ความเข้มข้น 0.5 2 5 และ 10 mM ต่อการยึดจับระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ของหนูแฮมสเตอร์ ปรากฏว่า การยึดจับของอะพะซิเตเทคสเปิร์มกับไข่ที่มีโซนาเพลูซิกานั้นน้ำตาลทั้ง 5 ชนิดมีผลในการยับยั้งการยึดจับระหว่างเซลล์สืบพันธุ์โดยเฉพาะ เอ็น-อะซีทิล-คี-กลูโคซามีนและกรกไชอะคิกมีผลในการยับยั้งการยึดจับระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ตั้งแต่ความเข้มข้นต่ำสุดและปริมาณการยึดจับลดลงตามลำดับเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงขึ้น โดยเฉพาะ เอ็น-อะซีทิล-คี-กลูโคซามีน มีความสามารถในการยับยั้งมากที่สุดเมื่อเทียบกับน้ำตาลชนิดอื่น ๆ สำหรับกรณีของอะพะซิเตเทคสเปิร์มกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูซิกานั้นพบว่า น้ำตาลทั้ง 5 ชนิดมีความสามารถในการยับยั้งการยึดจับระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ตั้งแต่ความเข้มข้นต่ำสุดทั้งสิ้น โดยเฉพาะ เอ็น-อะซีทิล-คี-กลูโคซามีน สามารถลดปริมาณการยึดจับของสเปิร์มกับไข่ได้สูงสุด

สำหรับการทดสอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด คือ เบตา-กาแลคโตซิเลส ความเข้มข้น 1 U เบตา-เอ็น-อะซีทิล-คี-กลูโคซามินิเลส ความเข้มข้น 0.5 U และนิวรามินิเลส ความเข้มข้น 0.5U กับไข่ที่มีโซนาเพลูซิกา พบว่าไข่ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ เบตา-เอ็น-อะซีทิล-คี-กลูโคซามินิเลส และนิวรามินิเลส มีอัตราการยึดจับของสเปิร์มลดลงโดยเฉพาะไข่ที่ถูกย่อยด้วย เบตา-เอ็น-อะซีทิล-คี-กลูโคซามินิเลส มีอัตราการยึดจับลดลงต่ำสุดแก่ไข่ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์เบตา-กาแลคโตซิเลส นั้น อัตราการยึดจับของสเปิร์มไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม ส่วนกรณีของไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูซิกานั้น พบว่าไข่ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เบตา-เอ็น-อะซีทิล-คี-กลูโคซามินิเลส และนิวรามินิเลสมีอัตราการยึดจับของสเปิร์มกับไข่ลดลง โดยเฉพาะไข่ที่ถูกย่อยด้วย เบตา-เอ็น-อะซีทิล-คี-กลูโคซามินิเลสมีอัตราการยึดจับลดลงมากที่สุด ส่วนไข่ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ เบตา-กาแลคโตซิเลส มีอัตราการยึดจับของสเปิร์มเพิ่มขึ้นสูงกว่ากลุ่มควบคุม

แสดงว่า น้ำตาลต่าง ๆ 5 ชนิดที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ เป็นส่วนประกอบของไกลโคโปรตีนบนโซนาเพลูซิกาและพลาสมาเมมเบรนต่างก็พบบทบาทในการยึดจับของเซลล์สืบพันธุ์ ของหนูแฮมสเตอร์ทั้งสิ้น โดยเฉพาะ เอ็น-อะซีทิล-คี-กลูโคซามีนพบบทบาทในการยึดจับกันของไข่กับอะพะซิเตเทคสเปิร์มมากที่สุด

THE ROLE OF MONOSACCHARIDES AND DERIVATIVES ON HAMSTER EGG
SURFACES IN SPERM BINDING

AN ABSTRACT

BY

WISUT SITTHINAN

Present in partial fulfillment of the requirements
for the Master of Education degree
at Srinakharinwirot University
February 1984

The binding of capacitated hamster sperm with zona-intact hamster egg in BWB medium in the presence of 10mM D-Galactose, 10 mM N-acetyl-D-glucosamine and 0.5mM Sialic acid was decreased. And the binding was decrease further when the concentrations of sugars were higher. Among all sugars tested, N-acety 1-D-glucosamine was most effective. In the case of binding of capacitated sperm with zona-free hamster eggs, all sugars tested reduced sperm binding significantly even at low concentrations. Pretreatment of zona-intact hamster eggs with 0.5 U β -N-acetyl-D-glucosaminidase and 0.5 U Neuraminidase decreased sperm binding. And the binding was greatly reduced in those treated with β -N-acety 1-D-glucosaminidase, where as pretreatment of zona-intact hamster eggs with 1 U β -galactosidase did not decrease sperm binding. Furthermore, pretreatment of zona-free hamster eggs with β -N-acety 1-D-glucosaminidase and Neuraminidase at the same concentration also reduced sperm binding. Especially sperm binding with zona-free eggs pretreated with β -N-acety 1-D-glucosaminidase was greatly reduced. But pretreatment with 1 U β -galactosidase enhanced sperm binding slightly. This experiment suggested that some monosaccharides and their derivatives is necessary for sperm binding to egg surfaces both on zona pellucida and the plasmamembranes and N-acetyl-D-glucosamine seems to play an important role in such binding.

คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำตัวนิติ คณะกรรมการสอบ ได้พิจารณาปัญหานี้พบข้อ
ฉบับนี้แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิตของ
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒได้

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....อ.กมล คุ้มดวง..... ประธาน

.....สมชาย คุ้มดวง..... กรรมการ

คณะกรรมการสอบ

.....อ.กมล คุ้มดวง..... ประธาน

.....สมชาย คุ้มดวง..... กรรมการ

.....พิเชษฐ์ เกตุคำ..... กรรมการ

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้โดยได้รับความช่วยเหลือและแนะนำเป็นอย่างดียิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปราณีศ การงผล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธดา พรหมบุญ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณท่านผู้ทรงคุณวุฒิทั้งสองไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบรำลึกถึงพระคุณของ บิดา มารดา ที่ได้ให้การสนับสนุนการศึกษาข้าพเจ้ามาโดยตลอด และขอขอบคุณ คุณนิศย์ แสงรุ่ง และเพื่อน ๆ ทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือจนปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จด้วยดี

วิสุทธิ์ สิทธิการ

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนา	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายในการศึกษาครั้งนี้	2
ความสำคัญของการศึกษาครั้งนี้	3
ขอบเขตของการศึกษา	3
คานียามศัพท์เฉพาะ	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
3 อุปกรณ์และวิธีการในการวิจัย	9
การเตรียมกะพะชิเตเตกสเปิร์ม	9
การเตรียมไข่ที่มีโซนาเพดูชิคาหุ่ม	9
การเตรียมไข่ที่ไม่มีโซนาเพดูชิคาหุ่ม	10
วิธีทดลอง	11
การวิเคราะห์ข้อมูล	13
4 ผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูล	15
ข้อมูลที่น่ามาวิเคราะห์	15
สัญลักษณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์	15
ผลการทดลอง	15
5 สรุป อภิปรายผล และขอเสนอแนะ	46
จุดมุ่งหมายของการวิจัย	46
วิธีดำเนินการวิจัย	46

บทที่	หน้า
สรุปผลการวิจัย	48
อภิปรายผล	49
ข้อเสนอแนะ	53
บรรณานุกรม	54
ภาคผนวก	59

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 ความแปรปรวนของปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่มีโซนาเพลูซิกา ระหว่าง กลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองในสารละลาย BWw ที่มีน้ำตาล เอ็น-อะซิทิล-ดี-กลูโคซามีน ความเข้มข้น 4 ระบุ	17
2 เปรียบเทียบปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่มีโซนาเพลูซิกา ระหว่างกลุ่ม ควบคุมและกลุ่มทดลองที่มีน้ำตาล เอ็น-อะซิทิล-ดี-กลูโคซามีน	18
3 ความแปรปรวนของปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่มีโซนาเพลูซิกา ระหว่าง กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองในสารละลาย BWw ที่มีน้ำตาล ดี-แมนโนส ความเข้มข้น 4 ระบุ	18
4 เปรียบเทียบปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่มีโซนาเพลูซิกา ระหว่างกลุ่ม ควบคุมและกลุ่มทดลองที่มีน้ำตาล ดี-แมนโนส	19
5 ความแปรปรวนของปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่มีโซนาเพลูซิกา ระหว่าง กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองในสารละลาย BWw ที่มีน้ำตาล ดี-กาแลคโทส ความเข้มข้น 4 ระบุ	19
6 เปรียบเทียบปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่มีโซนาเพลูซิกา ระหว่างกลุ่ม ควบคุมและกลุ่มทดลองที่มีน้ำตาล ดี-กาแลคโทส	20
7 ความแปรปรวนของปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่มีโซนาเพลูซิกา ระหว่าง กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองในสารละลาย BWw ที่มีน้ำตาล แอล-ฟูโรส ความเข้มข้น 4 ระบุ	20
8 เปรียบเทียบปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่มีโซนาเพลูซิกา ระหว่างกลุ่ม ควบคุมและกลุ่มทดลองที่มีน้ำตาล แอล-ฟูโรส	21
9 ความแปรปรวนของปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่มีโซนาเพลูซิกา ระหว่าง กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ในสารละลาย BWw ที่มีน้ำตาล กรดไฮอะลิก ความเข้มข้น 4 ระบุ	21

- 10 เปรียบเทียบปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูซิกา ระหว่างกลุ่ม
ควบคุมและกลุ่มทดลองที่มีน้ำตาล กรดไขมันอิสระ 22
- 11 ความแปรปรวนของปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูซิกา
ระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง ในสารละลาย BWw ที่มีน้ำตาล
เอ็น-อะซิทีล-ดี-กลูโคซามีน ความเข้มข้น 4 ระดับ 22
- 12 เปรียบเทียบปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูซิกา ระหว่างกลุ่ม
ควบคุมและกลุ่มทดลองที่มีน้ำตาล เอ็น-อะซิทีล-ดี-กลูโคซามีน 24
- 13 ความแปรปรวนของปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูซิกา
ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ในสารละลาย BWw ที่มีน้ำตาล
ดี-แมนโนส ความเข้มข้น 4 ระดับ 24
- 14 เปรียบเทียบปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูซิกา ระหว่าง
กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่มีน้ำตาล ดี-แมนโนส 25
- 15 ความแปรปรวนของปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูซิกา
ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองในสารละลาย BWw ที่มีน้ำตาล
ดี-แมนโนส ความเข้มข้น 4 ระดับ 25
- 16 เปรียบเทียบปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูซิกา ระหว่าง
กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่มีน้ำตาล ดี-กาแลคโทส 26
- 17 ความแปรปรวนของปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูซิกา ระหว่าง
กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ในสารละลาย BWw ที่มีน้ำตาล
แอล-ฟูโรส ความเข้มข้น 4 ระดับ 26
- 18 เปรียบเทียบปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูซิกา ระหว่าง
กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ที่มีน้ำตาล แอล-ฟูโรส 27

19	ความแปรปรวนของสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่ไม่มีโชนาเพลูซิกา ระหว่าง กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ในสารละลาย BWB ที่มีน้ำตาลกรด ไซอะลิก ความเข้มข้น 4 ระบุ	27
20	เปรียบเทียบปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่ไม่มีโชนาเพลูซิกา ระหว่าง กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่มีน้ำตาล กรดไซอะลิก	28
21	ค่าเฉลี่ยการยึดจับของสเปิร์มกับไข่ที่มีโชนาเพลูซิกากายหลังจากไข่อูก ยอยควยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ และกลุ่มควบคุม	42
22	ค่าเฉลี่ยการยึดจับของสเปิร์มกับไข่ที่ไม่มีโชนาเพลูซิกากายหลังจากไข่อูก ยอยควยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ และกลุ่มควบคุม	43

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 ปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่มีโซนาเพลูซิกาของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่มีน้ำตาล เอ็น-อะซิทิล-ดี-กลูโคซามีน	29
2 ปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่มีโซนาเพลูซิกาของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่มีน้ำตาล ดี-แมนโนส	30
3 ปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่มีโซนาเพลูซิกาของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่มีน้ำตาล ดี-กาแลคโตส	31
4 ปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่มีโซนาเพลูซิกาของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่มีน้ำตาล แอล-ฟูโคส	32
5 ปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่มีโซนาเพลูซิกาของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่มีน้ำตาลกรดไชอะลิก	33
6 ปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูซิกาของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่มีน้ำตาล เอ็น-อะซิทิล-ดี-กลูโคซามีน	34
7 ปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูซิกาของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่มีน้ำตาล ดี-แมนโนส	35
8 ปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูซิกาของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่มีน้ำตาล ดี-กาแลคโตส	36
9 ปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูซิกาของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่มีน้ำตาล แอล-ฟูโคส	37
10 ปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูซิกาของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่มีน้ำตาลกรดไชอะลิก	38

- 11 แสดงการบีบจับของสเปิร์มกับไข่ที่มีโซนาเพลูซิกา และกับไข่ที่ไม่มี
โซนาเพลูซิกาของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่มีน้ำตาล
เอ็น-อะซิทิล-ดี-กลูโคซามีน ความเข้มข้น 10 mM 40
- 12 แสดงการบีบจับของสเปิร์มกับไข่ที่มีโซนาเพลูซิกา และกับไข่ที่ไม่มี
โซนาเพลูซิกาของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ไข่ถูกย่อยด้วย
เอนไซม์ เบตา-เอ็น-อะซิทิล-ดี-กลูโคซามินิเดส ความเข้มข้น
0.5 U 45

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

การปฏิสนธิระหว่างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียมีกลไกที่ซับซ้อนมาก ต้องอาศัยปัจจัยหลายประการเพื่อที่นิวเคลียสของเซลล์ทั้งสองหลอมรวมกันได้ มีการศึกษาเกี่ยวกับการปฏิสนธิกันอย่างกว้างขวางในหลายแง่มุม ทั้งยังศึกษาในสิ่งมีชีวิตหลายประเภท ตั้งแต่ในพวกสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น แม่นทะเล จนถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น หนูแฮมสเตอร์ (Hamster) หนูตะเภา (Guinea pig) และคน เป็นต้น

ปฏิสัมพันธ์ (Interaction) ขั้นแรกระหว่างเซลล์สืบพันธุ์จะนำไปสู่การปฏิสนธิ นั่นคือ การยึดจับ (Binding) ระหว่างไข่กับอะโครโซม (Acrosome) (Capacitated sperm) ซึ่งเป็นสเปิร์มที่มีความสามารถในการเจาะเข้าสู่ไข่ ดังนั้นกลไกสำคัญที่เกิดปฏิสัมพันธ์กันจึงอยู่ที่ผิวชั้นนอกสุดของเซลล์สืบพันธุ์ทั้งสอง ซึ่งผิวเหล่านั้นต่างก็มีไกลโคโปรตีน (Glycoproteins) เป็นส่วนประกอบสำคัญอยู่ด้วยทั้งสิ้น

(Hartmann and Hutchison. 1977 : 383 - 390, Dunbar and others, 1980 . 356 - 365, Hartmann and others, 1981 . 171a, Hedrick and Wardrip. 1981 . 177b, Poterson and others. 1981 . 144 - 156) จากการค้นคว้าที่ผ่านมามีความเข้าใจเกี่ยวกับ (Monosaccharides) บางชนิดที่เป็นส่วนประกอบของไกลโคโปรตีนที่ผิวของเซลล์สืบพันธุ์มีอิทธิพลต่อการยึดจับของเซลล์สืบพันธุ์ (Hartmann and Hutchison . 1977 : 383 - 390, 1981 : 171a, Huang . 1981 : 108a) เหตุที่การปฏิสนธิจากท่อระหว่างสิ่งมีชีวิตในสปีชีส์เดียวกัน ก็เชื่อว่ากลไกสำคัญอยู่ที่ผิวของเซลล์สืบพันธุ์เช่นกัน (Swenson and others. 1981 : 183) จึงสันนิษฐานกันว่ามีรีเซปเตอร์สำหรับสเปิร์ม (Sperm receptor) อยู่บนผิวไข่และมีรีเซปเตอร์สำหรับไข่ (Egg receptor) อยู่บนผิวของสเปิร์ม

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า โชนาเพลูซิกา (Zone pellucida) ของไข่มุ ประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 71 และ คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 19 คาร์โบไฮเดรตประกอบ ด้วยน้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวประเภทต่าง ๆ ซึ่งเป็นประเภทเดียวกับ ที่พบบนเยื่อหุ้มเซลล์ทั่ว ๆ ไปของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คือ เอ็น-อะซีทิล-ดี-กลูโคซามีน (N-acetyl-D-glucosamine) ดี-แมนโนส (D-mannose) ดี-กาแลคโตส (D-galactose) แอล-ฟูโคส (L-fucose) และกรดไซอะลิก (Sialic acid) (Dunbar and others . 1980 : 356 - 365, Hedrick and Wardrip. 1981 : 117a) และจากการวิเคราะห์ทางเคมีพบว่า ในชั้นโชนาเพลูซิกาของไข่มุ มี ดี-กาแลคโตสปริมาณมากเมื่อเทียบกับน้ำตาลเชิงเดี่ยวชนิดอื่น ๆ นอกจากนี้ยังพบว่า มันอยู่รอบนอกของชั้นโชนาเพลูซิกา (Dunbar and others . 1980 . 356 - 365) ดังนั้น ดี-กาแลคโตสอาจมีบทบาทสำคัญในกระบวนการระหว่างเซลล์สัมพันธ์ ของไข่มุ

การวิจัยครั้งนี้จะศึกษาการยึดจับระหว่าง อะเซทิลเทตสเปิร์มกับไข่ของหนู แฮมสเตอร์ โดยศึกษาเกี่ยวกับน้ำตาลเชิงเดี่ยวที่ประกอบเป็นส่วนคาร์โบไฮเดรตของ โกลโคโปรตีน ทั้งในชั้นโชนาเพลูซิกาและ พลาสมาเมมเบรนของไข่ เพื่อตรวจสอบ ว่าน้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวชนิดใดมีบทบาทสำคัญต่อการยึดจับและ จัดได้ว่าเป็นส่วนหนึ่งของรีเซปเตอร์สำหรับอสุจิ

จุดมุ่งหมายในการศึกษาครั้งนี้

1. เพื่อศึกษาอิทธิพลของน้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวรวม 5 ชนิดคือ ' เอ็น-อะซีทิล-ดี-กลูโคซามีน (N-acetyl-D-glucosamine) ดี-แมนโนส (D-mannose) ดี-กาแลคโตส (D-galactose) แอล-ฟูโคส (L-fucose) และกรดไซอะลิก (Sialic acid) ซึ่งมีความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ต่อการยึดจับ ระหว่างเซลล์สัมพันธ์

2. เพื่อหาชนิดของน้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวที่จัดว่าเป็นส่วนหนึ่งของรีเซปเตอร์สำหรับสเปิร์ม
3. เพื่อดูความแตกต่างของรีเซปเตอร์สำหรับสเปิร์มบนชั้นโซนาเพลูซิกาและชั้นพลาสมาเมมเบรนของไข่

ความสำคัญของการศึกษาก่อนหน้า

1. ทำให้ทราบถึงโมเลกุลที่สำคัญบนผิวไข่ซึ่งมีบทบาทต่อการยึดจับอันเป็นขั้นตอนแรกที่จะนำไปสู่การปฏิสนธิระหว่างไข่กับสเปิร์ม
2. ทำให้เข้าใจถึงกลไกที่เกี่ยวกับการปฏิสนธิของเซลล์สืบพันธุ์ที่จำกัอยู่ระหว่างสิ่งมีชีวิตในสปีชีส์เดียวกัน
3. เป็นงานวิจัยชีววิทยาพื้นฐานอันจะนำไปสู่ความรู้เรื่องภาวะการเจริญพันธุ์

ขอบเขตของการศึกษา

1. กลุ่มสัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษา คือ หนูแฮมสเตอร์พันธุ์ Mesocritus auratus อายุประมาณ 2 เดือน
2. ศึกษาการยึดจับระหว่าง คัพพีเทเคตสเปิร์มกับโซนาเพลูซิกา และพลาสมาเมมเบรนของไข่
3. ศึกษาอิทธิพลของน้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวที่เป็นหน่วยสำคัญบนไกลโคโปรตีนของผิวไข่ คือ เอ็น-อะซิetyl-ดี-กลูโคซามีน (N-acetyl-D-glucosamine) ดี-แมนโนส (D-mannose) ดี-กาแลคโตส (D-galactose) แอล-ฟูโคส (L-Fucose) และ กรดไซอะลิก (Sialic acid)

นิยามศัพท์เฉพาะ

น้ำตาล หมายถึง น้ำตาลเชิงเดี่ยว 3 ชนิด คือ คี-แมนโนส คี-กาแลคโตส และ แอล-ฟูโคส และอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยว 2 ชนิด คือ เอ็น-อะซิทิล-คีกลูโคซามีนและกรด ไฮอะลิก

อัตราการยึดจับ หมายถึง จำนวนอนุจุที่ยึดจับกับไซ 1 ใบ

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การปฏิสนธิของสัตว์แต่ละชนิดนั้นมีขบวนการโดยละเอียดที่แตกต่างกันไป ในพวกไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น เม่นทะเล เมื่อสเปิร์มพบกับชั้นนูนของไข่จะเกิดปฏิกิริยาอะโครโซม (Acrosome reaction) มีการสร้างอะโครโซมอลฟิลาเมนต์ (Acrosomal filament) ซึ่งรอบปลายฟิลาเมนต์จะมีสารพอกบายนิน (Bindin) เป็นโปรตีนซึ่งช่วยในการยึดจับของสเปิร์มกับผิวชั้นวิทเทลิน (Vitelline membrane) ของไข่ (Vacquier and Moy, 1977 : 2456 - 2460) สำหรับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม การที่จะเกิดปฏิสนธิได้นั้นสเปิร์มจะมีการเปลี่ยนแปลงทางค่านชีวเคมีและสรีระเรียกว่าการเกิดกะพะชิเคชั่น (Capacitation) ทำให้อสุจิสามารถเจาะผ่านผิวไข่เข้าไปได้ (Austin, 1951 : 581 - 591, Chang, 1951 : 197) ซึ่งในธรรมชาติสเปิร์มจะเกิดกะพะชิเคชั่นในท่อสืบพันธุ์ของเพศเมีย กลไกของการเปลี่ยนแปลงจนเกิดกะพะชิเคชั่น คาแท่งและเวลาที่เกิดในธรรมชาติ เป็นสิ่งที่นักวิทยาศาสตร์ยังคงศึกษากันอยู่อย่างกว้างขวาง

สำหรับลำดับขั้นของกริยาร่วมระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ในการปฏิสนธิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยทั่วไปพบว่ามี 2 ขั้นตอนคือ (1) การเกาะกัน (Attachment) ของสเปิร์มกับโซนาเพลูซิกา (2) เกิดการยึดจับกัน (Binding) ของสเปิร์มกับโซนาเพลูซิกา (Bleil and Wassarman, 1983 : 317 - 324) ในกรณีของหนูแฮมสเตอร์ก็เชื่อว่าเป็นไป 2 ขั้นตอนเช่นกัน ในขั้นตอนแรก ซึ่งเป็นการเกาะกันระหว่างเซลล์สืบพันธุ์เป็นลักษณะที่ไม่จำกัคอยู่ระหว่างสิ่งมีชีวิตในสปีชีส์เดียวกัน (Hartmann and others, 1972 : 2767 - 2769) และกริยานี้สามารถเปลี่ยนแปลงได้คือ อาจมีการหลุดจากกันและเกาะกันใหม่ได้ ขั้นตอนมาเป็นการยึดจับระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ การยึดจับนี้เป็นกริยาที่จำเพาะในสปีชีส์เดียวกันและเป็นการยึดจับกันอย่างถาวร (Hartmann and Hutchison, 1974 : 49 - 57) ซึ่งนำไปสู่การปฏิสนธิ

สเปิร์มในแต่ละสปีชีส์ไม่สามารถยึดจับหรือเจาะผ่านโซนาเพลูติคาของไข่ต่างสปีชีส์กันได้ เนื่องจากชั้นของโซนาเพลูติคาของไข่ต่างชนิดกันมีไกลโคโปรตีนที่แตกต่างกัน (Yanagimachi. 1978 : 83 - 105) และจากการศึกษาโซนาเพลูติคาของหนูแฮมสเตอร์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าสเปิร์มของสิ่งมีชีวิตสปีชีส์เดียวกันจะยึดจับเฉพาะก้านนอกของโซนาเพลูติคาเท่านั้น (Phillips and Shalgi. 1980 : 1 - 8) แต่ถ้าเป็นสเปิร์มของสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน เช่น จากการศึกษาระหว่างโซนาเพลูติคาของหนูกับสเปิร์มของกระต่ายพบว่าสเปิร์มของกระต่ายสามารถสัมผัสทั้งก้านนอกและก้านในของโซนาเพลูติคา (Swenson and Dunbar. 1982 : 97 - 104) ดังนั้นจึงสันนิษฐานได้ว่าโซนาเพลูติคาของไข่เป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดความจำเพาะในสปีชีส์เดียวกันในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

จากการศึกษาลำดับชั้นของกริยาวรรณะระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ก่อนที่จะเกิดการปฏิสนธิในหนูแฮมสเตอร์ พบว่าเมื่อสเปิร์มเกิดกะพะชิเตชันแล้วจะไขว่เมมเบรนด้านข้างบริเวณตอนกลางของหัวส่วนหัว (Equatorial segment) ยึดจับกับโซนาเพลูติคาของไข่ แล้วจึงเจาะผ่านเข้าสู่ชั้นพลาสมาเมมเบรน จึงเกิดการหลอมรวมกันระหว่างนิวเคลียสของเซลล์สืบพันธุ์ทั้งสอง (Yanagimachi and Noda. 1970 : 465 - 485) จากการศึกษาโดยใช้ไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูติคาพบว่าสเปิร์มที่เกิดปฏิกริยาอะโครโซมแล้วสามารถหลอมรวมกับพลาสมาเมมเบรนของไข่ได้ แต่สเปิร์มที่ยังไม่เกิดปฏิกริยาอะโครโซมนั้นแม้จะเกาะติดกับพลาสมาเมมเบรนของไข่แต่ไม่สามารถหลอมรวมกันได้ (Yanagimachi. 1978 : 83 - 105) ถึงแม้ว่ากะพะชิเตเตสสเปิร์มของกนสามารถเจาะผ่านเข้าผสมกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูติคาของหนูแฮมสเตอร์ได้ (Yanagimachi. and others. 1976 : 471) และจากการศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าสเปิร์มของคนที่เกิดปฏิกริยาอะโครโซมแล้วเท่านั้นที่สามารถยึดจับกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูติคาของหนูแฮมสเตอร์ได้ (Talbot and Chacon. 1982 : 240 - 248)

ในกรณีของไข่หนูเมาส์และไข่หนูพบว่าสเปิร์มยึดจับกับชั้นโซนาเพลูติคาของไข่ตั้งแต่ไม่เกิดปฏิกริยาอะโครโซม (Salling and Storey. 1979 : 544 - 555, Peterson. and others. 1981 : 144 - 156) และเมื่อเกิดปฏิกริยาอะโครโซมที่ผิวโซนาเพลูติคาแล้ว

สเปิร์มจึงจะเจาะผ่านเข้าไป (Sailing and others. 1979 : 229 - 238) ส่วน
อสุจิที่ไม่ได้เกิดปฏิกิริยาอะโครโซมที่ผิวของโซนาเพอซิคาจะไม่สามารถเจาะผ่านเข้าผสมได้
(Florman and Storey. 1982 : 121 - 130)

อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าส่วนที่ยึดจับกันระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ก็คือ ผิวชั้นนอกของเซลล์
สืบพันธุ์นั่นเอง เมื่อศึกษาผิวชั้นโซนาเพอซิคาของไข่มุพบว่ามีไกลโคโปรตีนซึ่งประกอบด้วย
คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 19 และโปรตีนร้อยละ 71 (Dunbar and others. 1980 :
356 - 365) และจากการตรวจสอบไกลโคโปรตีนพวกนี้พบว่าน้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์
น้ำตาลเชิงเดี่ยวพวก ดี-กาแลคโตส เอ็น-อะซิทิล-ดี-กลูโคซามีน ดี-แมนโนส และกรดไขมัน
อยู่ด้วย (Hedrick and Wardrip. 1981 : 177) ส่วนไกลโคโปรตีนของโซนาเพอซิคา
ของไข่มุเมาส์พบว่ามีไกลโคโปรตีนแบ่งออกเป็น 3 ชนิด โดยแต่ละชนิดมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่าง
กันคือ 200 k 120 k และ 83 k ตามลำดับ (Bleil and Wassarman. 1980 :
185 - 202) และพบว่าชนิดสุดท้ายที่มีน้ำหนัก 83 k เป็นตัวที่มีบทบาทในการกระตุ้นสเปิร์มให้
เกิดปฏิกิริยาอะโครโซมและเป็นตัวยึดจับกับสเปิร์ม (Bleil and Wassarman. 1983 :
317 - 324)

สำหรับการศึกษาที่แสดงถึงบทบาทโดยตรงของน้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยว
ที่เป็นองค์ประกอบของไกลโคโปรตีนต่อการยึดจับระหว่างเซลล์สืบพันธุ์นั้นยังมีการศึกษากันน้อยมาก
จากการศึกษาในพวกเพรียงหัวหอม Ciona intestinalis โดยใช้สารเลคติน (Lectins)
พบว่าน้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวของหน่วยคาร์โบไฮเดรตบนไข่ประกอบด้วย
ดี-กลูโคส ดี-แมนโนส แอล-ฟูโรส เอ็น-อะซิทิล-ดี-กลูโคซามีน และเอ็น-อะซิทิล-ดี-
กาแลคโตซามีน และจากการทดลองพบว่า แอล-ฟูโรส มีบทบาทสำคัญในการยึดจับกับสเปิร์ม
(Rosati and Santis. 1980 : 762 - 764)

ในเม่นทะเล พบว่า รีเซปเตอร์ของอสุจิซึ่งอยู่บนผิวไข่ชั้นวิทเทส ก็คือ ไกลโคโปรตีน
น้ำหนักโมเลกุลสูงซึ่งมีน้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวเป็นองค์ประกอบอยู่มาก
(Rossignol and others. 1981 : 347 - 358) นอกจากนี้ คินซี และเลนนาส

พบว่าไกลโคโปรตีนนี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 6000 คาลตัน ประกอบด้วยน้ำตาลเชิงเดี่ยวประมาณร้อยละ 20 อนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวประมาณร้อยละ 15 และโปรตีนประมาณร้อยละ 65 (Kinsey and Lennarz, 1981 : 325 - 331) และจากการวิเคราะห์น้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวพบว่าประกอบด้วย ฟิวโคส ไฮโดรไลส กาแลคโตส กลูโคส กลูโคซามีน กาแลคโซามีน และเมื่อเทียบปริมาณน้ำตาลเหล่านี้เป็นโมลเปอร์เซ็นต์พบว่าฟิวโคส มีปริมาณมากที่สุด (Glebe and Lennarz, 1981 : 387 - 394) และในพวกแมงดาทะเล Limulus Polyphemus L. พบว่า แอล-ฟิวโคสมีบทบาทสำคัญในการเกาะกันของเซลล์สืบพันธุ์ (Barnum and Brown, 1983 : 352 - 359)

สำหรับพวกสัตว์เลื้อยคลาน จากการศึกษาในหนูเม้าส์ของ เซอร์ และฮอลล์ เชื่อว่า เอ็น-อะซิติก- α -กลูโคซามีนบนผิวไข่ และเอนไซม์กาแลคโตซิล ทรานสเฟอเรส (Galactosyl transferase) ที่ผิวของสเปิร์มจะเป็นตัวการสำคัญในการทำให้เกิดการยึดจับกันระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ (Shur and Hall, 1982 : 567 - 573, 1982 : 574 - 579)

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมอะซอสเปิร์ม

1.1 นำอัณฑะและท่อแอสเปิร์มจากส่วน คอคา เอปิดิไดมิส (Cauda epididymis) เก็บในน้ำเกลือ 0.9% แล้วปิดทับด้วยน้ำมันพาราฟิน (Parafin oil) เพื่อป้องกันการระเหยของน้ำเกลือ

1.2 นำสเปิร์มที่นำมาปรับความเข้มข้นให้ได้ $1 - 2 \times 10^8$ สเปิร์ม/มิลลิลิตร โดยการวัดด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer)

1.3 เตรียมสารละลายที่กระตุ้นสเปิร์มให้เกิดอะซอสเปิร์มซึ่งประกอบด้วย โมดิฟายด์ไทโรดส์ (Modified Tyrode's solution : Yanagimachi, 1964 : 193 - 196) ปริมาตร 45 μ l และเซรัมของกบซึ่งผ่านการอุ่นด้วยความร้อน 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปริมาตร 45 μ l ในกระจกนาฬิกา (watch glass) แล้วปิดทับด้วยน้ำมันพาราฟิน

1.4 นำสเปิร์มที่เตรียมไว้ปริมาตร 10 μ l หยดลงในสารละลายในข้อ 1.3 ดังนั้นความเข้มข้นของอสุจิเท่ากับ 1.2×10^7 สเปิร์ม/มิลลิลิตร

1.5 นำสเปิร์มที่เตรียมจากข้อ 1.4 เข้าอบที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจนับอัตราการเกิดปฏิกิริยาอะโครโซม (Acrosome reaction ; AR) และการเคลื่อนที่ (Motility) ด้วยกล้องจุลทรรศน์

2. การเตรียมไข่ที่มีโซนาเพอริคาหุ้ม

2.1 ฉีดฮอร์โมนแพรคแมนท์แมร์ซีรัม โกลาโคโทรปิน (Pregnent mare's serum

gonadotrophin ; PMSG) ขนาด 25 - 30 IU แก่หนูแฮมสเตอร์ตัวเมียในวันที่ 1 ของวงจรการตกไข่ เพื่อกระตุ้นให้ไข่สุก

2.2 ฉีดฮิวแมน chorionic gonadotrophin ; HCG) ขนาด 25 - 30 IU ในวันที่ 3 ของวงจรการตกไข่ เพื่อกระตุ้นให้ไข่ตก

2.3 หลังฉีดฮิวแมน HCG 14 - 18 ชั่วโมง ทำการผ่าตัดเอาท่อนาไข่ทั้งสองข้างออกมาเก็บในสารละลายเลี้ยงเซลล์ BW (Bigger, Whitten and Whittingham's medium : Bigger and others, 1971 : 86 - 116)

2.4 ไข่เข็มเย็บท่อนำไข่ให้ทะลุภายใต้กล้องจุลทรรศน์ผ่าตัด (Dissecting microscope) เพื่อแยกเอาถุงมุลล์ (Cumulus mass) ซึ่งมีไข่อยู่ภายในออกจากท่อนำไข่แล้วใช้ปิเปตดูดเอาถุงเซลล์มุลล์แยกออกจากสารละลายเคมีใส่ลงในสารละลายเลี้ยงเซลล์ BW ใหม่

2.5 นำถุงมุลล์ที่ไปย่อยด้วยเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (Hyaluronidase) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายเลี้ยงเซลล์ BW เป็นเวลา 5 นาที เพื่อย่อยมุลล์เซลล์ที่ล้อมรอบเซลล์ไข่ให้เหลือแต่ชั้นโซนาเพลูซิกาหุ้มรอบเซลล์ไข่

2.6 ใช้ไมโครปิเปตดูดไข่ของมาด่างในสารละลายเลี้ยงเซลล์ BW โดยไข่ไมโครปิเปตดูดเพื่อย้ายไข่ที่ละใบไปใส่ในสารละลายเลี้ยงเซลล์ BW ใหม่ ทำเช่นนี้จนครบ 3 ครั้ง ก็จะได้อไข่ที่มีโซนาเพลูซิกาหุ้มพร้อมสำหรับการทดลองต่อไป

3. การเตรียมไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูซิกาหุ้ม

3.1 นำไข่ที่เตรียมได้ตามข้อ 2.6 ไปย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน (Bovine Pancreatic trypsin) ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายเลี้ยงเซลล์ เพื่อย่อยชั้นโซนาเพลูซิกาออกไปจะได้ไข่ที่ไม่มีชั้นโซนาเพลูซิกาหุ้ม

3.2 นาโซที่ไคโปล้างในสารละลายเบี่ยงเซลล์ BWB 3 ครั้ง ตามวิธีการในข้อ 2.6 ก็จะได้นาโซที่ไม่มีโซนาเพอริคาหุ้ม พร้อมสำหรับการทดลองต่อไป

4. วิธีทดลอง

4.1 การทดสอบอิทธิพลของน้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวต่อการบีบจับระหว่างเซลล์สืบพันธุ์

เตรียมสารละลายน้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวรวม 5 ชนิดคือ แอล-ฟูโคส ดี-แมนโนส ดี-กาแลคโตส เอ็น-อะซิติด-ดี-กลูโคซามีน และกรดไซอะลิก ในสารละลายเบี่ยงเซลล์ BWB โดยที่น้ำตาล 4 ชนิดแรกแต่ละชนิดประกอบด้วยความเข้มข้น 4 ระดับคือ 10 25 50 และ 100 mM ตามลำดับ และกรดไซอะลิกที่ความเข้มข้น 4 ระดับคือ 0.5 2 5 และ 10 mM ตามลำดับ

4.1.1 ใช้สารละลายเบี่ยงเซลล์ BWB ที่มีน้ำตาลเชิงเดี่ยวหรืออนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ กัน ปริมาตร 45 μ l ใส่ในกระเจกนาฬิกาแต่ละอัน

4.1.2 ใส่โซที่มีโซนาเพอริคาหุ้มลงในสารละลาย BWB ที่มีน้ำตาลเชิงเดี่ยวหรืออนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยว แต่ละระดับความเข้มข้นที่เตรียมไว้ แล้วปิดทับด้วยน้ำมันพาราฟิน

4.1.3 หยดกะพะชีเตเตคสเปิร์มที่เตรียมไว้ปริมาตร 5 μ l ลงในสารละลายที่มีโซอยู่ ดังนั้นความเข้มข้นของอสุจิเป็น $1 - 2 \times 10^6$ สเปิร์ม/มิลลิลิตร

4.1.4 หลังจากเขย่าบottle ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที นำมาล้างในสารละลายเบี่ยงเซลล์ BWB 3 ครั้ง โดยการดูดโซขึ้นลงด้วยไมโครปิเปต จากนั้นนำไปตรวจนับสเปิร์มที่บีบจับกับโซนาเพอริกาของโซแต่ละใบด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ

4.1.5 กลุ่มควบคุม เตรียมขึ้นตอนตามลำดับตั้งแต่ข้อ 4.1.1 ถึง 4.1.4

4.1.6 ขั้นตอนการทดลองในกรณีที่ไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูซิกาหุ้มคล้ายคลึงกับของไข่ที่มีโซนาเพลูซิกา แต่แตกต่างกันเพียงความเข้มข้นของอสุจิ และเวลาในการเข้าอบ ดังนั้นเตรียมน้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวรวม 5 ชนิดในสารละลายยั้งเซลล์ BWw ทั้งระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังกล่าวแล้วในข้อ 4.1 ปริมาตร 100 μl ใส่ในกระจกนาให้หายคละพระชิตเตคอสเปิร์ม 1 μl ความเข้มข้นของอสุจิทดลองเป็น $1 - 2 \times 10^5$ สเปิร์ม/มิลลิลิตร จากนั้นเข้าอบที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนับจำนวนสเปิร์มที่ยึดจับกับพลาสมาเมมเบรนของไข่ตามวิธีการในข้อ 4.1.4

4.2 การตรวจหาชนิดของน้ำตาลเชิงเดี่ยวบนโซนาเพลูซิกา และพลาสมาเมมเบรนของไข่ที่มีบทบาทต่อการยึดจับระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ควยเอนไซม์

เอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มี 3 ชนิดคือ เบตา-กาแลคโตซิเดส (β -galactosidase) เบตา-เอ็น-อะซิทิล-ดี-กลูโคซามิไนเดส (β -N-acetyl-D-glucosaminidase) และนิวรามิไนเดส (Nouraminidase)

4.2.1 เตรียมเอนไซม์ เบตา-กาแลคโตซิเดส ความเข้มข้น 1 U ใน 0.1M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.3 นิวรามิไนเดส ความเข้มข้น 0.5 U ใน 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5 และ เบตา-เอ็น-อะซิทิล-ดี-กลูโคซามิไนเดส ความเข้มข้น 0.5 U ใน 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH5

4.2.2 ใช้เอนไซม์แต่ละชนิดย่อยหน่วยของน้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวของไข่ที่มีโซนาเพลูซิกาหุ้มและไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูซิกาหุ้ม โดยนำไข่แต่ละชนิดใส่ลงในเอนไซม์ที่เตรียมไว้ในข้อ 4.2.1 แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไข่ที่ใส่ไปล้างในสารละลายยั้งเซลล์ BWw 3 ครั้ง ตามวิธีการในข้อ 2.6

4.2.3 นำไข่ที่ได้จากข้อ 4.2.2 ใส่ลงในสารละลายยั้งเซลล์ BWw บริสุทธิ์ ปริมาตร 45 μl และปริมาตร 100 μl ในกระจกนาชีกา สำหรับไข่ที่มีโซนาเพลูซิกาและไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูซิกา ตามลำดับ

4.2.4 หยดคะพะซีเคเทคสเปิร์มที่เตรียมไว้ปริมาตร $5 \mu\text{l}$ สำหรับไข่ที่มี
 โชนาเพลูซิกา และปริมาตร $1 \mu\text{l}$ สำหรับไข่ที่ไม่มีโชนาเพลูซิกา ดังนั้นความเข้มข้นของ
 สเปิร์มสำหรับไข่ที่มีโชนาเพลูซิกาตกลงเป็น $1 - 2 \times 10^6$ สเปิร์ม/มิลลิลิตร และ
 $1 - 2 \times 10^5$ สเปิร์ม/มิลลิเมตรสำหรับไข่ที่ไม่มีโชนาเพลูซิกา จากนั้นนำเข้าอบที่อุณหภูมิ 37°C
 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีสำหรับไข่ที่มีโชนาเพลูซิกา และ 5 นาทีสำหรับไข่ที่ไม่มี
 โชนาเพลูซิกา

4.2.5 ทำการตรวจนับสเปิร์มที่ยึดจับกับโชนาเพลูซิกา และพลาสมาเมมเบรน
 ภายหลังการย่อยด้วยเอนไซม์ตามวิธีการในข้อ 4.1.4

4.2.6 กลุ่มควบคุม นำไข่ที่มีโชนาเพลูซิกา และไข่ที่ไม่มีโชนาเพลูซิกาหุ้ม
 ใส่ลงในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.3 และ pH 5 แล้วแช่ชนิดของเอนไซม์ที่เป็นกลุ่มทดลอง
 แล้วดำเนินการทดลองควบคู่กับกลุ่มทดลองตามขั้นตอนตั้งแต่ 4.2.2 ถึง 4.2.5

การวิเคราะห์ข้อมูล

† 1. วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบมีองค์ประกอบเดียว (One-way analysis of
 variance) ของข้อมูลต่อไปนี้

ก. อัตราการยึดจับของสเปิร์มกับไข่ที่มีโชนาเพลูซิกาในสารละลายเลี้ยงเซลล์
 BWB ที่มีน้ำตาลเชิงเดี่ยวหรืออนุพันธ์เชิงเดี่ยวแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ข. อัตราการยึดจับของสเปิร์มกับไข่ที่ไม่มีโชนาเพลูซิกาหุ้มในสารละลายเลี้ยง
 เซลล์ BWB ที่มีน้ำตาลเชิงเดี่ยวหรืออนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

→ เมื่อพบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจะทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละคู่
 โดยใช้ Least Significance Difference (LSD)

† 2. ใช้ t - test ทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมแต่ละคู่
 ต่อไปนี้

2.1 อัตราการบีบจับของสเปิร์มกับไข่ที่มีโซนาเพลูซิกาหลังจากมีการย่อย
เอนไซม์

ก. นิรรามินิเอส

ข. เบตา-กาแลคโตสิเอส

ค. เบตา-เอ็น-อะซิทิล-จี-กลูโคซามินิเอส

2.2 อัตราการบีบจับของสเปิร์มกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูซิกาหุ้ม หลังจากมีการย่อย
เอนไซม์ ตามข้อ 2.1

บทที่ 4

ผลการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลจะกระทำตามลำดับต่อไปนี้

1. เปรียบเทียบอิทธิพลของน้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวรวม 5 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 4 ระดับที่มีผลต่ออัตราการยักจับของสเปิร์มกับไข่ที่มีโซนาเพอริคา
2. วิเคราะห์อิทธิพลของเอนไซม์ 3 ชนิดที่มีผลต่อการยักจับของสเปิร์มกับไข่ที่มีโซนาเพอริคาและไข่ที่ไม่มีโซนาเพอริคาหุ้ม

สัญลักษณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

เมื่อ	df	แทน	ชั้นแห่งความเป็นอิสระ
	SS	แทน	ผลบวกกำลังสอง
	MS	แทน	ค่าเฉลี่ยของผลบวกกำลังสอง
	F	แทน	ค่าวิกฤตที่ใช้พิจารณาใน F - Distribution

ผลของการทดลอง

1. อิทธิพลของน้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวต่อการยักจับของสเปิร์มกับไข่
 - 1.1 อิทธิพลของน้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวต่อการยักจับของสเปิร์มกับไข่ที่มีโซนาเพอริคา

จากการศึกษาปริมาณการบีบตัวของสเปิร์มกับไข่ที่มีโซนาเพลูทิกา ในสารละลาย BWW ที่มีน้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวรวม 5 ชนิด ชนิดละ 4 ความเข้มข้น ปรากฏว่าปริมาณการบีบตัวระหว่างสเปิร์มกับไข่ที่มีโซนาเพลูทิกาในสารละลาย BWW ที่มีน้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวทั้ง 5 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดคือ 100 mM ในน้ำตาล 4 ชนิดแรกคือ เอ็น-อะซิทิล-ดี-กลูโคซามีน ดี-แมนโนส ดี-กาแลคโตส และ แอล-ฟูโรส และที่ 10 mM ของกรดไขมันอะลิคมีอัตราการบีบตัวมากเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพประกอบ 1 2 3 4 และ 5)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการบีบตัวของสเปิร์มกับไข่ที่มีโซนาเพลูทิกาในน้ำตาลแต่ละชนิด ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันกับกลุ่มควบคุม พบว่าปริมาณสเปิร์มที่บีบตัวกับไข่มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมตั้งแต่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำตาลทั้ง 5 ชนิด คือ เอ็น-อะซิทิล-ดี-กลูโคซามีน ที่ 10 mM ปริมาณการบีบตัวของสเปิร์มเท่ากับ 9.16 ± 2.00 SD (ภาพประกอบ 11 b) ซึ่งต่างจากกลุ่มควบคุม ($P > .01$) ที่มีปริมาณสเปิร์มเป็น 28.04 ± 4.27 SD (ภาพประกอบ 1 และ 11 a) ดี-แมนโนส ปริมาณการบีบตัวของสเปิร์มกับไข่ที่ 10 mM เท่ากับ 20.73 ± 4.54 SD ซึ่งต่างจากกลุ่มควบคุม ($P > .01$) ซึ่งมีปริมาณการบีบตัวของสเปิร์มเท่ากับ 29.85 ± 3.36 SD (ภาพประกอบ 2) ดี-กาแลคโตส ปริมาณของสเปิร์มที่บีบตัวกับไข่ที่ 10 mM เท่ากับ 15.20 ± 3.35 SD ซึ่งต่างจากกลุ่มควบคุม ($P > .01$) ที่มีปริมาณการบีบตัวของสเปิร์มเป็น 23.19 ± 3.76 SD (ภาพประกอบ 3) สำหรับแอล-ฟูโรส ปริมาณการบีบตัวของสเปิร์มที่ 10 mM เท่ากับ 21.80 ± 4.07 SD ซึ่งต่างจากกลุ่มควบคุม ($P > .01$) ซึ่งมีปริมาณการบีบตัวของสเปิร์ม เท่ากับ 28.46 ± 2.37 SD (ภาพประกอบ 4) และในน้ำตาลชนิดสุดท้ายคือ กรดไขมันอะลิคที่ความเข้มข้น 0.5 mM ปริมาณการบีบตัวของสเปิร์มเท่ากับ 10.96 ± 2.91 SD ต่างจากกลุ่มควบคุม ($P > .01$) ซึ่งมีปริมาณการบีบตัวของสเปิร์มเท่ากับ 27.89 ± 3.57 SD (ภาพประกอบ 5) แต่ในกรณีของแอล-ฟูโรสนั้นแม้ที่ความเข้มข้น 50 mM ปริมาณการบีบตัวของสเปิร์มกับไข่ก็ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P < .01$) คือปริมาณเท่ากับ 27.09 ± 2.57 SD

ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีปริมาณเท่ากับ 28.46 ± 2.37 SD (ภาพประกอบ 4) และ คี-แมนโนสก็เช่นกันที่ความเข้มข้น 50 μ M ปริมาณการยึดจับของสเปิร์มก็ไม่แตกต่างกับ กลุ่มควบคุม ($P < .01$) คือมีปริมาณการยึดจับของสเปิร์มกับไข่เท่ากับ 26.77 ± 4.28 SD และกลุ่มควบคุมปริมาณการยึดจับของสเปิร์มกับไข่เท่ากับ 29.85 ± 3.63 SD (ภาพประกอบ 2)

ตาราง 1 ความแปรปรวนของปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่โชนาเพลูซิดาระหว่าง กลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลองในสารละลาย BWB ที่มีน้ำตาล เอ็น-อะซิทีล-ดี-กลูโคซามีน ความเข้มข้น 4 ระบุว่า วิเคราะห์โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบมี องค์ประกอบเดียว

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
ระหว่างกลุ่ม	4	10509.65	2627.41	111.23**
ภายในกลุ่ม	131	3094.38	23.62	
รวม	135	13604.03		

**

มีนัยสำคัญ .01

แสดงว่าปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติที่ระดับ .01 ดังนั้น จึงใช้วิธีการ LSD เพื่อหาจุดเฉลี่ยที่แตกต่างกัน

ตาราง 2 เปรียบเทียบปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่มีโซนาเพลูติการะหว่างกลุ่มทดลอง
ที่นี้ เอ็น-อะซิติด-ดี-กลูโคซามีน และกลุ่มควบคุม

กลุ่ม	10 mM 25 mM 50 mM 100 mM กลุ่มควบคุม					
	$\bar{X}$	9.16	6.15	4.57	2	28.04
10 mM	9.16	—	3.01	4.59 [*]	7.06 ^{**}	18.88 ^{**}
25 mM	6.15		—	1.58	4.58	21.89 ^{**}
50 mM	4.57			—	2.57	23.47 ^{**}
100mM	2.00				—	26.04 ^{**}
กลุ่มควบคุม	28.04					—

* มีนัยสำคัญ .05 ** มีนัยสำคัญ .01

ตาราง 3 ความแปรปรวนของปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่มีโซนาเพลูติการะหว่างกลุ่ม
ควบคุมกับกลุ่มทดลองในสารละลายเลี้ยงเซลล์ BWB ที่มีน้ำตาล ดี-แมนโนส ความเข้มข้น
4 ระดับ วิเคราะห์โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน แบบมีองค์ประกอบเดียว

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
ระหว่างกลุ่ม	4	4413.10	1103.27	23.61**
ภายในกลุ่ม	103	4811.15	46.71	
รวม	107	9224.25		

** มีนัยสำคัญ .01

แสดงว่าปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .01
ดังนั้น จึงใช้วิธีการ LSD เพื่อหาความแตกต่าง

ตาราง 4 เปรียบเทียบปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่มีโซนาเพลูซิคาระหว่างกลุ่มทดลองที่มี
คี-แมนโนส และกลุ่มควบคุม

กลุ่ม	10 mM 25 mM 50 mM 100 mM กลุ่มควบคุม					
	$\bar{X}$	20.73	23.08	26.77	10.36	29.85
10 mM	20.73	—	2.35	6.04	10.37**	9.12**
25 mM	23.08		—	3.69	12.72**	6.77*
50 mM	26.77			—	16.41**	3.08
100 mM	10.63				—	19.49**
กลุ่มควบคุม	29.85					—

* มีนัยสำคัญ .05

** มีนัยสำคัญ .01

ตาราง 5 ความแปรปรวนของปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่มีโซนาเพลูซิคาระหว่างกลุ่ม
ทดลองกับกลุ่มควบคุมในสารละลาย BWW ที่มีน้ำตาล คี-กาแลคโตส ที่ความเข้มข้น 4
ระดับ วิเคราะห์โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบมีองค์ประกอบเดียว

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
ระหว่างกลุ่ม	4	4746.96	118.74	117.95**
ภายในกลุ่ม	119	1197.65	10.06	
รวม	123	5944.61		

** มีนัยสำคัญ .01

แสดงว่าปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่มีโซนาเพลูซิกาแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ
ทางสถิติที่ระดับ .01 ดังนั้นจึงใช้วิธีการ LSD เพื่อหาค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกัน

ตาราง 6 เปรียบเทียบปริมาณสเปิร์มที่จับกับไข่ที่มีโซนาเพลูติการะหว่างกลุ่ม
ทดลองที่มี คี-กาแลคโตส และกลุ่มควบคุม

กลุ่ม	X̄	10mM	25mM	50mM	100mM	กลุ่มควบคุม
		15.20	12.65	12.25	4.34	23.19
10mM	15.20	—	2.55	2.95 [*]	10.86 ^{**}	7.99 ^{**}
25mM	12.65		—	0.40	8.31 ^{**}	10.54 ^{**}
50mM	12.25			—	7.91 ^{**}	10.94 ^{**}
100 mM	4.34				—	18.85 ^{**}
กลุ่มควบคุม	23.19					—

* มีนัยสำคัญ .05

** มีนัยสำคัญ .01

ตาราง 7 ความแปรปรวนของปริมาณสเปิร์มที่จับกับไข่ที่มีโซนาเพลูติการะหว่าง
กลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมในสารละลาย BWW ที่มีน้ำตาล แอล-ฟรุคโตส ที่
ความเข้มข้น 4 ระดับ วิเคราะห์โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบมี
องค์ประกอบเดียว

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
ระหว่างกลุ่ม	4	4761.06	1190.26	56.06 ^{**}
ภายในกลุ่ม	116	2463.64	21.23	
รวม	120	7224.70		

** มีนัยสำคัญ .01

แสดงว่าปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่มีโซนาเพลซิกาแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .01 ดังนั้นจึงใช้วิธีการ LSD เพื่อหาจุดเฉลี่ยที่แตกต่างกัน

ตาราง 8 เปรียบเทียบปริมาณและสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่มีโซนาเพลซิการะหว่างกลุ่มทดลองที่มี แอล-ฟิวอส และกลุ่มควบคุม

กลุ่ม	$\bar{X}$	10 mM	25 mM	50 mM	100 mM	กลุ่มควบคุม
		21.80	21.50	27.09	11.07	28.46
10 mM	21.80	—	0.30	5.29*	10.73**	6.66**
25 mM	21.50		—	5.59**	10.43**	6.96**
50 mM	27.09			—	16.02**	1.37
100 mM	11.07				—	17.39**
กลุ่มควบคุม	28.46					—

* มีนัยสำคัญ .05

** มีนัยสำคัญ .01

ตาราง 9 ความแปรปรวนของปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่มีโซนาเพลซิการะหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลองในสารละลาย BWB ที่มีน้ำตาลกรดยาลูคอส ที่ความเข้มข้น 4 ไร่กับ วิเคราะห์โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน แบบมีองค์ประกอบเดียว

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
ระหว่างกลุ่ม	4	7777.08	1944.27	131.90**
ภายในกลุ่ม	138	2034.28	14.74	
รวม	142	9811.36		

** มีนัยสำคัญ .01

แสดงว่าปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่มีโซนาเพลซิกาแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .01 ดังนั้นจึงใช้วิธีการ LSD เพื่อหาจุดเฉลี่ยที่แตกต่างกัน

ตาราง 10 เปรียบเทียบปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูซิดาระหว่างกลุ่มทดลอง
กรก ไชอะลิด และกลุ่มควบคุม

กลุ่ม	$\bar{X}$	0.5 mM	2 mM	5 mM	10 mM	กลุ่มควบคุม
		10.96	11.72	10.04	6.92	27.89
0.5 mM	10.96	—	0.76	0.92	4.04*	16.95**
2 mM	11.72		—	1.68	4.80**	16.17**
5 mM	10.04				3.12	17.85**
10 mM	6.92				—	20.97**
กลุ่มควบคุม	27.89					

* มีนัยสำคัญ .05

** มีนัยสำคัญ .01

ตาราง 11 ความแปรปรวนของปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูซิดาระหว่างกลุ่มทดลอง
และกลุ่มควบคุมในสารละลาย BWW ที่มี เอ็น-อะซิทิล-ดี-กลูโคซามีน ที่ความเข้มข้น 4 ระบุ
วิเคราะห์โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบมีองค์ประกอบเดียว

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
ระหว่างกลุ่ม	4	5683.08	1420.77	179.16**
ภายในกลุ่ม	155	1229.30	7.93	
รวม	159	6912.38		

** มีนัยสำคัญ .01

แสดงว่าปริมาณของสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูซิดามีความแตกต่างกันอย่าง
มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .01 ดังนั้นจึงใช้วิธีการ LSD เพื่อหาคู่เฉลี่ยที่แตกต่างกัน

1.2 อิทธิพลของน้ำตาลเชิงเดี่ยว และอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวต่อการยึดจับของสเปิร์มกับไข่ไม่มีโซนาเพลูซิกาหุ้ม

จากการศึกษาปริมาณการยึดจับของสเปิร์มกับไข่ในสารละลาย BWW ที่มีน้ำตาลเชิงเดี่ยว และอนุพันธ์ น้ำตาลเชิงเดี่ยวรวม 5 ชนิด ชนิดละ 4 ความเข้มข้น ปรากฏว่าปริมาณการยึดจับระหว่างสเปิร์มกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูซิกาในสารละลาย BWW ที่มีน้ำตาลเชิงเดี่ยวทั้ง 5 ชนิด มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุม ตั้งแต่ความเข้มข้นระดับค่าสุดท้ายขึ้น โดย เอ็น-อะซิติก-ดี-กลูโคซามีน ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด คือ 10 mM ปริมาณการยึดจับของสเปิร์มกับไข่เป็น 10.31 ± 1.58 SD (ภาพประกอบ 11c) ซึ่งต่างจากกลุ่มควบคุม ($P > .01$) ซึ่งมีปริมาณการยึดจับของสเปิร์มเท่ากับ 20.24 ± 2.53 SD (ภาพประกอบ 6 และ 11 d) ที-แมนโนส ปริมาณการยึดจับของสเปิร์มที่ความเข้มข้น 10 mM เท่ากับ 8.72 ± 2.72 SD ต่างจากกลุ่มควบคุม ($P > .01$) ซึ่งมีปริมาณการยึดจับของสเปิร์มเท่ากับ 22.74 ± 1.78 SD (ภาพประกอบ 7) สำหรับ ดี-กาแลคโตส ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด คือ 10 mM ปริมาณการยึดจับของสเปิร์มเท่ากับ 17.19 ± 2.55 SD ซึ่งต่างจากกลุ่มควบคุม ($P > .01$) ซึ่งมีปริมาณการยึดจับของสเปิร์มเป็น 24.45 ± 3.33 SD (ภาพประกอบ 8) ส่วน แอล-ฟูโรส ที่ 10 mM ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดในการทดลองครั้งนี้ปริมาณการยึดจับของสเปิร์มเท่ากับ 24.55 ± 2.94 SD (ภาพประกอบ 9) และน้ำตาลชนิดสุดท้าย คือ กรดไซอะลิกที่ความเข้มข้นระดับต่ำสุด คือ 0.5 mM ปริมาณการยึดจับของสเปิร์มเท่ากับ 16.47 ± 2.03 SD ซึ่งต่างจากกลุ่มควบคุม ($P > .01$) ซึ่งมีปริมาณการยึดจับของสเปิร์มกับไข่เป็น 23.71 ± 2.03 SD (ภาพประกอบ 10)

ตาราง 12 เปรียบเทียบปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่ไม่มีไขมันเพศผู้ระหว่างกลุ่ม
ทดลองที่มี เอ็น-อะซิทีล-จี-กลูโคซามีน

กลุ่ม		10 mM	25 mM	50 mM	100 mM	กลุ่มควบคุม
	$\bar{X}$	10.31	9.75	5.05	2.65	20.24
10 mM	10.31	—	0.56	5.26**	7.66**	9.93**
25 mM	9.75		—	4.70**	7.10**	10.49**
50 mM	5.05			—	2.40	15.19**
100 mM	2.65				—	17.59**
กลุ่มควบคุม	20.24					—

** มีนัยสำคัญ .01

ตาราง 13 ความแปรปรวนของปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่ไม่มีไขมันเพศผู้ระหว่างกลุ่ม
ทดลอง และกลุ่มควบคุมในสารละลาย BW ที่ 10 mM เอ็น-อะซิทีล-จี-กลูโคซามีน ความเข้มข้น 4 ระดับ
วิเคราะห์โดย ANOVA ผลการวิเคราะห์ปรากฏว่ามีความแปรปรวนอย่างมีนัยสำคัญ

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
ระหว่างกลุ่ม	4	3856.13	964.03	68.46**
ภายในกลุ่ม	154	2196.17	14.08	
รวม	158	6025.30		

** มีนัยสำคัญ .01

แสดงว่าปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่ไม่มีไขมันเพศผู้มีความแตกต่างกัน
อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .01 ดังนั้นจึงใช้วิธีการ ISD เพื่อหาจุดเฉลี่ยที่แตกต่างกัน

ตาราง 14 เปรียบเทียบปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพอซิทารระหว่างกลุ่มทดลอง ที่มี กี-แมนโนส และกลุ่มควบคุม

กลุ่ม	10 mM 25 mM 50 mM 100 mM กลุ่มควบคุม					
	X	8.72	10.26	9.12	7.12	22.74
10 mM	8.72	—	1.54	0.40	1.60	14.02**
25 mM	10.26		—	1.14	3.14	12.48**
50 mM	9.12			—	2.00	13.62**
100 mM	7.12				—	15.62**
กลุ่มควบคุม	22.74					

** มีนัยสำคัญ .01

ตาราง 15 ความแปรปรวนของปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพอซิทารระหว่างกลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุมในสารละลายBWW ที่มี กี-กาแลคโตส ความเข้มข้น 4 ระดับ วิเคราะห์โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบมีองค์ประกอบเดียว

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
ระหว่างกลุ่ม	4	4720.22	1180.05	75.45**
ภายในกลุ่ม	161	2518.43	15.64	
รวม	165	7238.65		

** มีนัยสำคัญ .01

แสดงว่าปริมาณการยึดจับของสเปิร์มกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพอซิทามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .01 ดังนั้นจึงใช้วิธีการ LSD เพื่อหาจุดเฉลี่ยที่แตกต่างกัน

ตาราง 16 เปรียบเทียบปริมาณสเปิร์มที่ติดจับกับไข่ที่ไม่มีโนนาเพลูซิการะหว่างกลุ่มทดลอง ที่มี ดี-กาแลคโทส และกลุ่มควบคุม

กลุ่ม	10 mM 25 mM 50 mM 100 mM					กลุ่มควบคุม
	$\bar{X}$	17.19	14.16	11.34	8.41	24.45
10 mM	17.19	—	5.03	5.82 ^{**}	8.78 ^{**}	7.26 ^{**}
25 mM	14.16		—	2.82	5.75 ^{**}	10.29 ^{**}
50 mM	11.34			—	2.93	13.11 ^{**}
100 mM	8.41				—	16.04 ^{**}
กลุ่มควบคุม	24.45					—

^{**}มีนัยสำคัญ .01

ตาราง 17 ความแปรปรวนของปริมาณสเปิร์มที่ติดจับกับไข่ที่ไม่มีโนนาเพลูซิการะหว่างกลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุมในสารละลาย BWB ที่มี แอล-ฟิวโคส ที่ความเข้มข้น 4 ระบุ วิเคราะห์โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบมีองก์ประกอบเดียว

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
ระหว่างกลุ่ม	4	3033.98	758.49	^{**} 45.25
ภายในกลุ่ม	159	2665.96	16.76	
รวม	163	5699.94		

มีนัยสำคัญ .01

แสดงว่าปริมาณสเปิร์มที่ติดจับกับไข่ที่ไม่มีโนนาเพลูซิการมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .01 ดังนั้นจึงใช้วิธีการ LSD เพื่อทดสอบหาจุดเฉลี่ยที่แตกต่างกัน

ตาราง 18 เปรียบเทียบปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูซิดาระหว่างกลุ่มทดลอง ที่มี แอล-ฟิวโคส และกลุ่มควบคุม

กลุ่ม	10 mM 25 mM 50 mM 100 mM					กลุ่มควบคุม
	$\bar{X}$	15.26	15.52	14.75	11.86	24.55
10 mM	15.26	—	0.26	0.51	3.40	9.29 ^{**}
25 mM	15.52		—	0.77	3.66 [*]	9.03 ^{**}
50 mM	14.75			—	2.89	9.80 ^{**}
100 mM	11.86				—	12.96 ^{**}
กลุ่มควบคุม	24.55					—

* มีนัยสำคัญ .05

** มีนัยสำคัญ .01

ตาราง 19 ความแปรปรวนของปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูซิดาระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองในสารละลาย BSA ที่มีกรดไฮดรอลิก ความเข้มข้น 4 ระดับ วิเคราะห์โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบมีองค์ประกอบเดียว

แหล่งความแปรปรวน	df	SS	MS	F
ระหว่างกลุ่ม	4	6277.99	1556.99	121.73 ^{**}
ภายในกลุ่ม	143	1829.66	12.79	
รวม	147	8057.65		

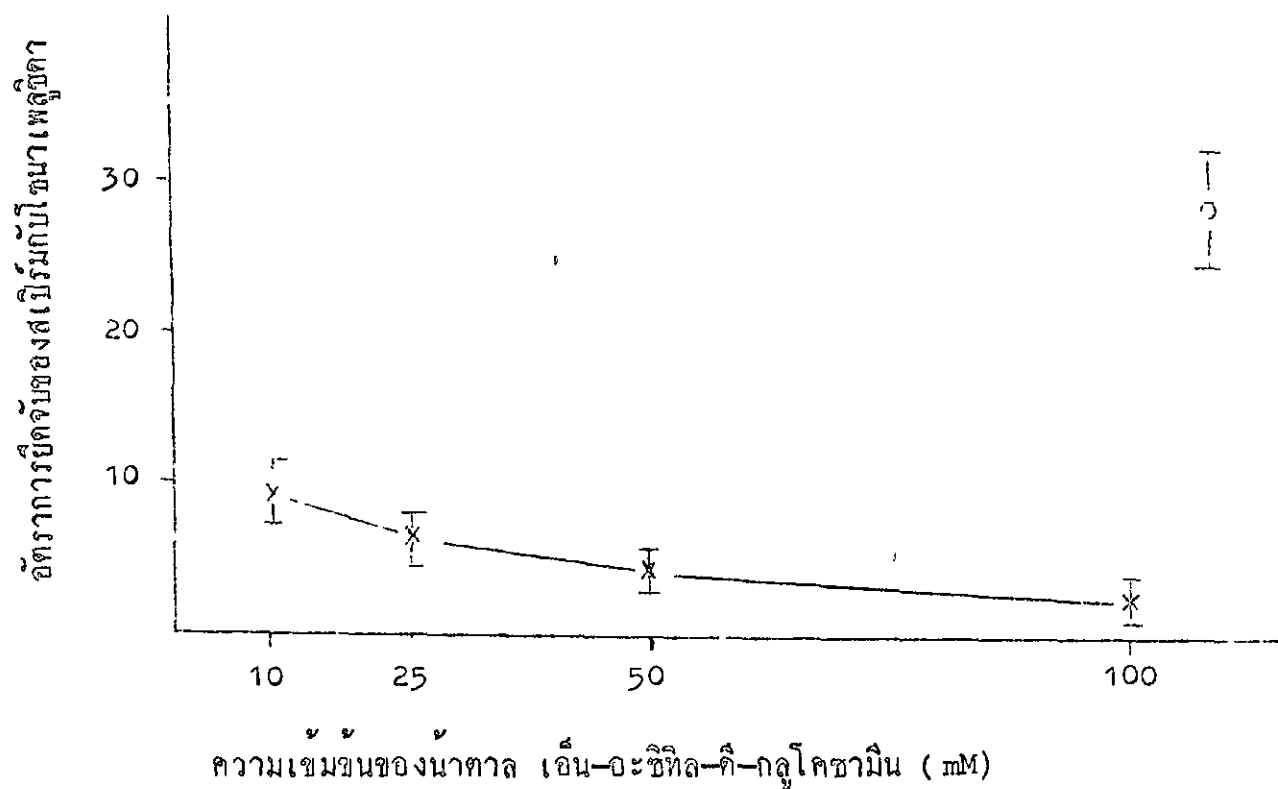
** มีนัยสำคัญ .01

แสดงว่าปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูซิดามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .01 ดังนั้นจึงใช้วิธีการ LSD เพื่อหาค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกัน

ตาราง 20 เปรียบเทียบปริมาณสเปิร์มที่จับกับไข่ที่ไม่มีไซนาเพลซิดาระหว่างกลุ่มทดลอง
ที่มีกรดไขมันอิสระ และกลุ่มควบคุม

กลุ่ม		0.5 mM	2 mM	5 mM	10 mM	กลุ่มควบคุม
	$\bar{X}$	16.47	14.48	6.76	4.53	23.71
0.5 mM	16.47	—	1.99	9.71 ^{**}	11.94 ^{**}	7.24 ^{**}
2 mM	14.48		—	7.72 ^{**}	9.95 ^{**}	9.23 ^{**}
5 mM	6.76			—	2.23	16.95 ^{**}
10 mM	4.63				—	19.18 ^{**}
กลุ่มควบคุม	23.71					—

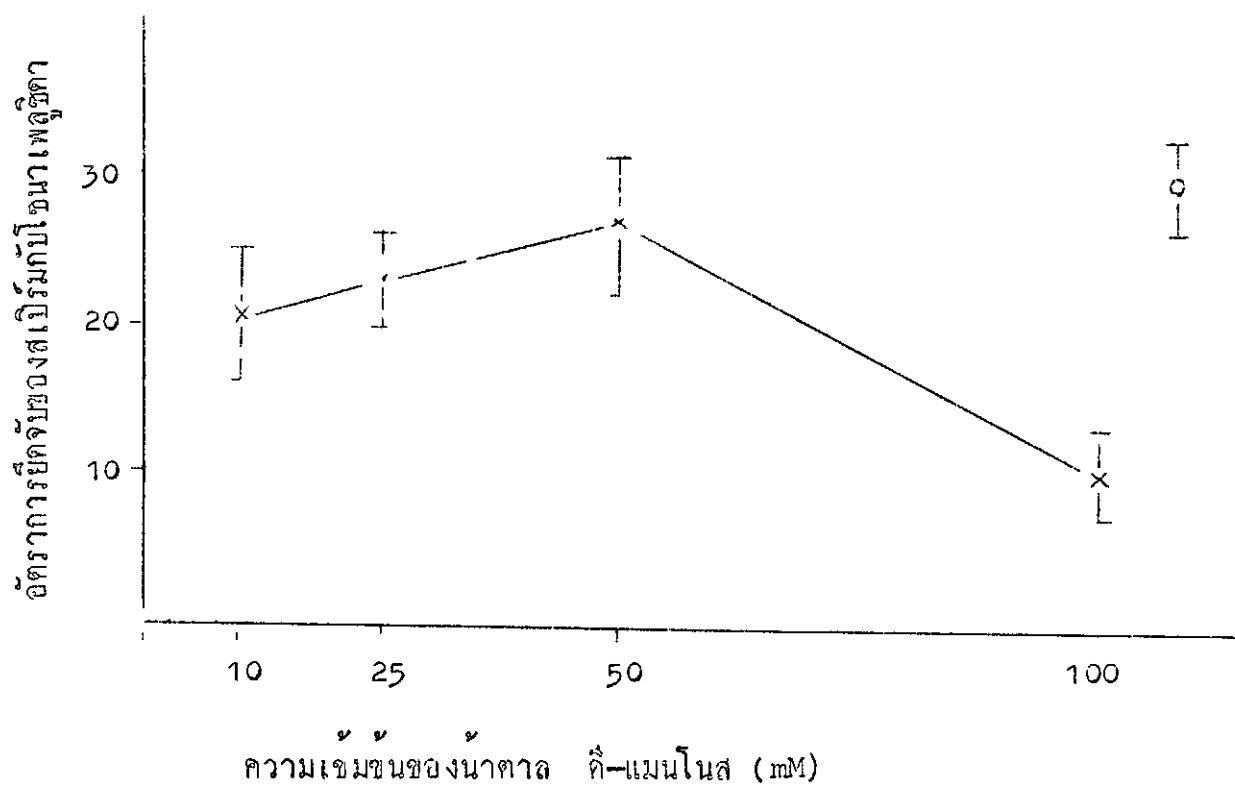
** มีนัยสำคัญ .01



ภาพประกอบ 1 ปริมาณสเปิร์มที่จับกับไฮดรอกซีเบนซีนในสารละลายที่มีน้ำตาล เอ็น-อะซิไทล-ดี-กลูโคซามีน ความเข้มข้น 4 ระดับ แต่ละจุดเป็นค่าจำนวนสเปิร์ม $\pm$ SD

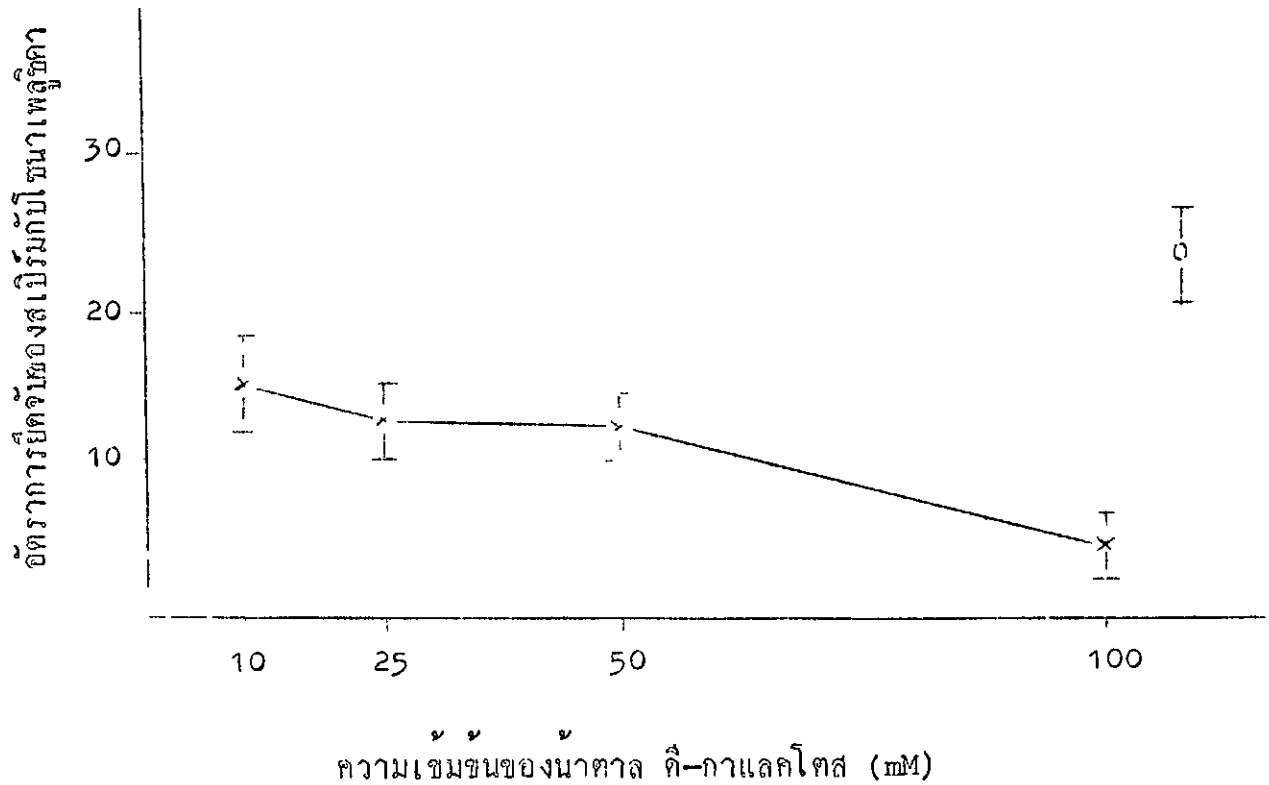
x จำนวนสเปิร์มของกลุ่มทดลอง

o จำนวนสเปิร์มของกลุ่มควบคุม



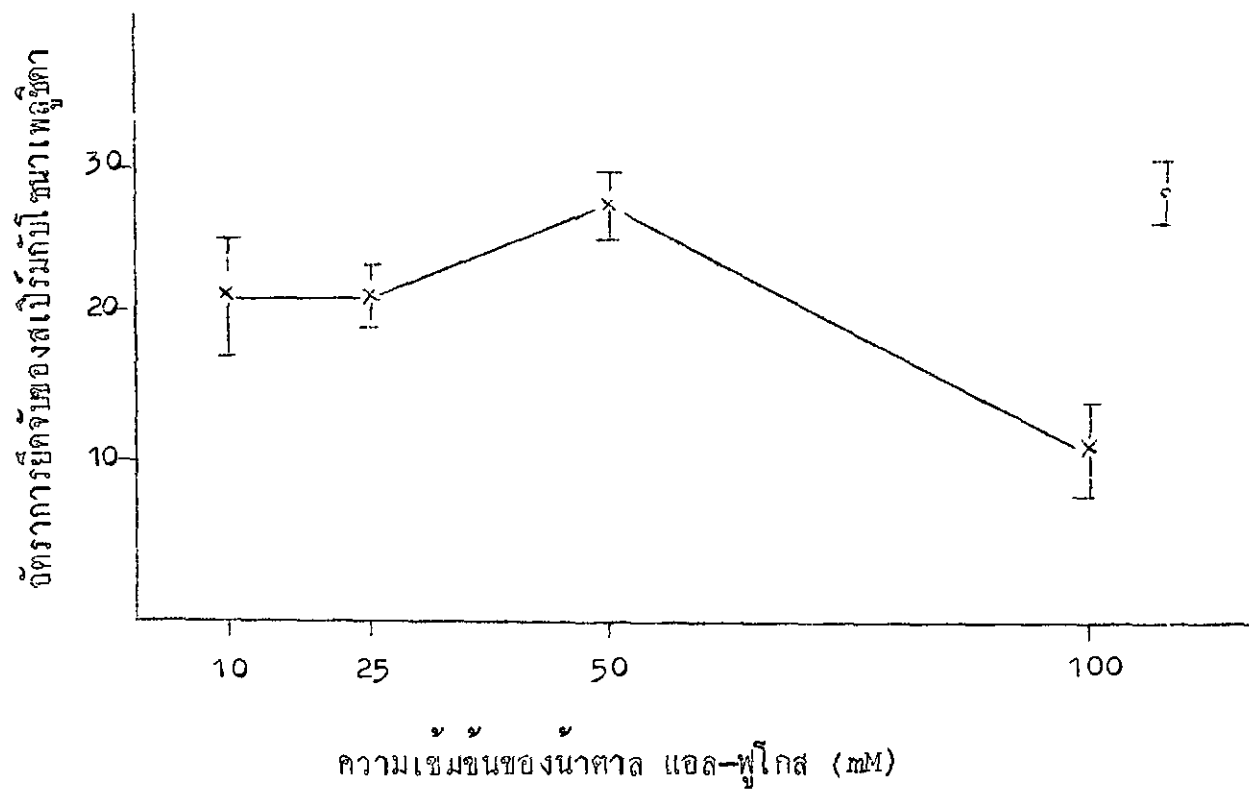
ภาพประกอบ 2 ปริมาณสเปิร์มที่จับกับโซนาเพลูจิกในสารละลาย BWB ที่มีน้ำตาล คี-แมนโนส ความเข้มข้น 4 ระดับ แต่ละจุดเป็นจำนวนค่าสเปิร์ม $\pm$ SD

- x จำนวนสเปิร์มของกลุ่มทดลอง
- o จำนวนสเปิร์มของกลุ่มควบคุม



ภาพประกอบ 3 ปริมาณของสเปิร์มที่จับกับไข่ที่มีโชนาเพอูชิตาในสารละลาย BWB ที่มีน้ำตาล ดี-กาแลคโทส ความเข้มข้น 4 ระดับ แต่ละจุดเป็นจำนวนค่าสเปิร์ม $\pm$ SD

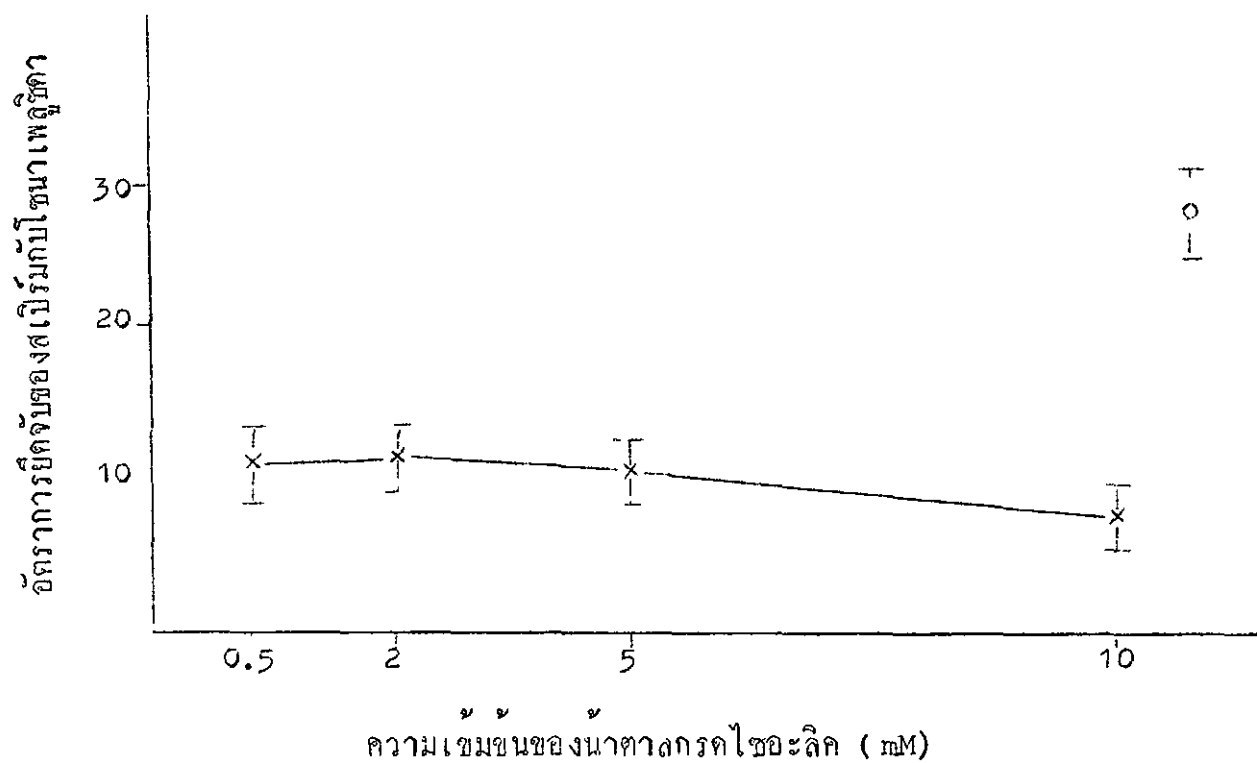
- x จำนวนสเปิร์มของกลุ่ทดลอง
- o จำนวนสเปิร์มของกลุ่ควบคุม



ภาพประกอบ 4 ปริมาณสเปิร์มที่จับกับโซนาเพอซิดาในสารละลาย BWB ที่มีน้ำตาล แอล-ฟูโกส ความเข้มข้น 4 ระดับ แต่ละจุดเป็นจำนวนค่าสเปิร์ม $\pm$ SD

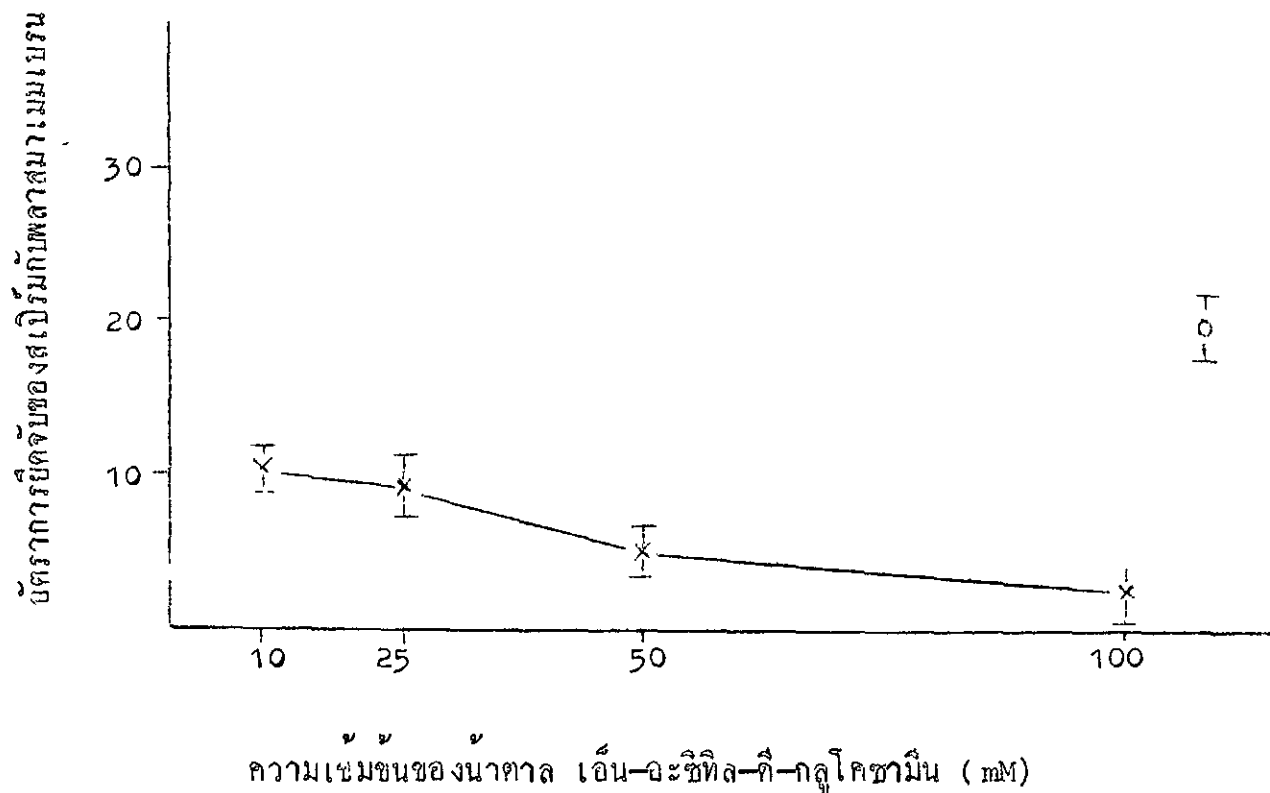
x จำนวนสเปิร์มของกลุ่มทดลอง

o จำนวนสเปิร์มของกลุ่มควบคุม



ภาพประกอบ 5 ปริมาณสเปิร์มที่จับกับโซนาเพอริคัล ในสารละลาย BWB ที่มีน้ำตาล กรดไชอะลิต ความเข้มข้น 4 ระดับ แต่ละจุดเป็นจำนวนค่าสเปิร์ม $\pm$ SD

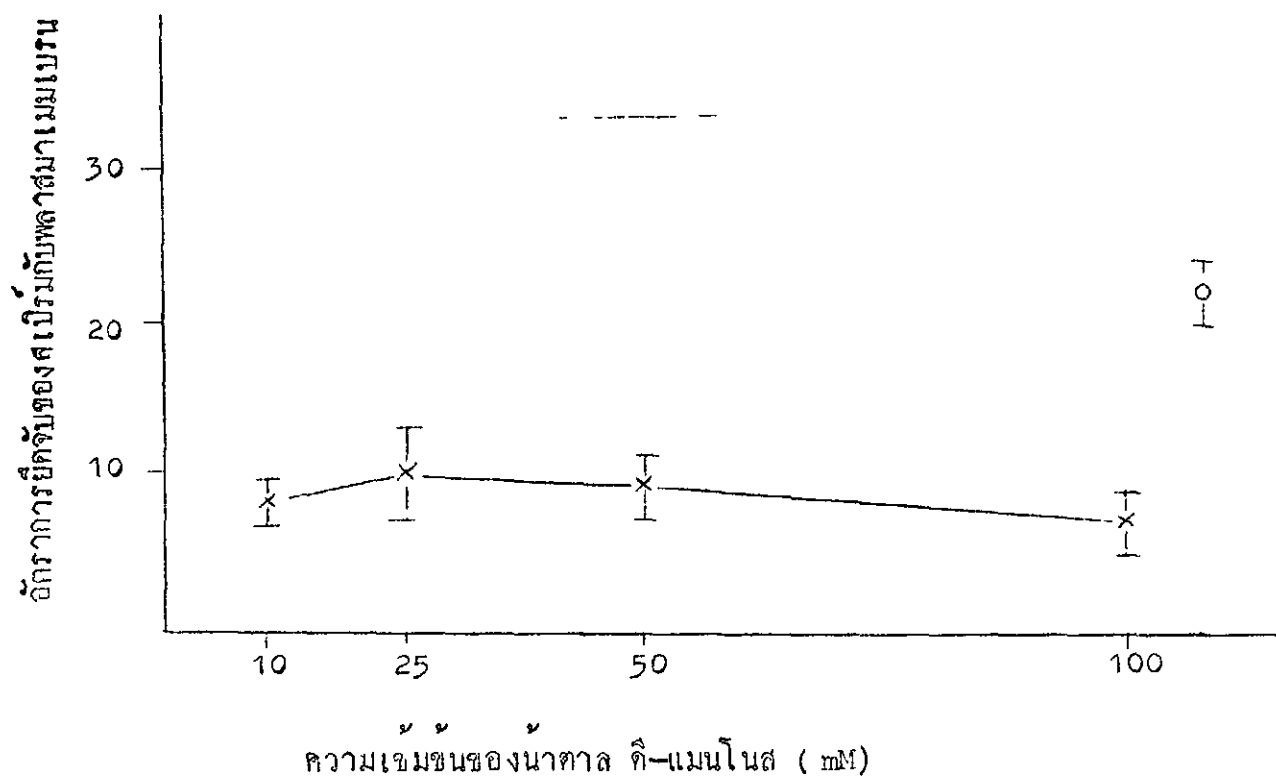
x จำนวนสเปิร์มของกลุ่มทดลอง
o จำนวนสเปิร์มของกลุ่มควบคุม



ภาพประกอบ 6 ปริมาณโปรตีนที่ถูกดูดซับกับไซโตโครม P-450 ในสารละลาย BWW ที่มีน้ำตาล เอ็น-อะซิทิล-ดี-กลูโคซามีน ความเข้มข้น 4 ระดับ แต่ละจุดเป็นจำนวนค่าโปรตีน $\pm$ SD

x จำนวนโปรตีนของกลุ่มทดลอง

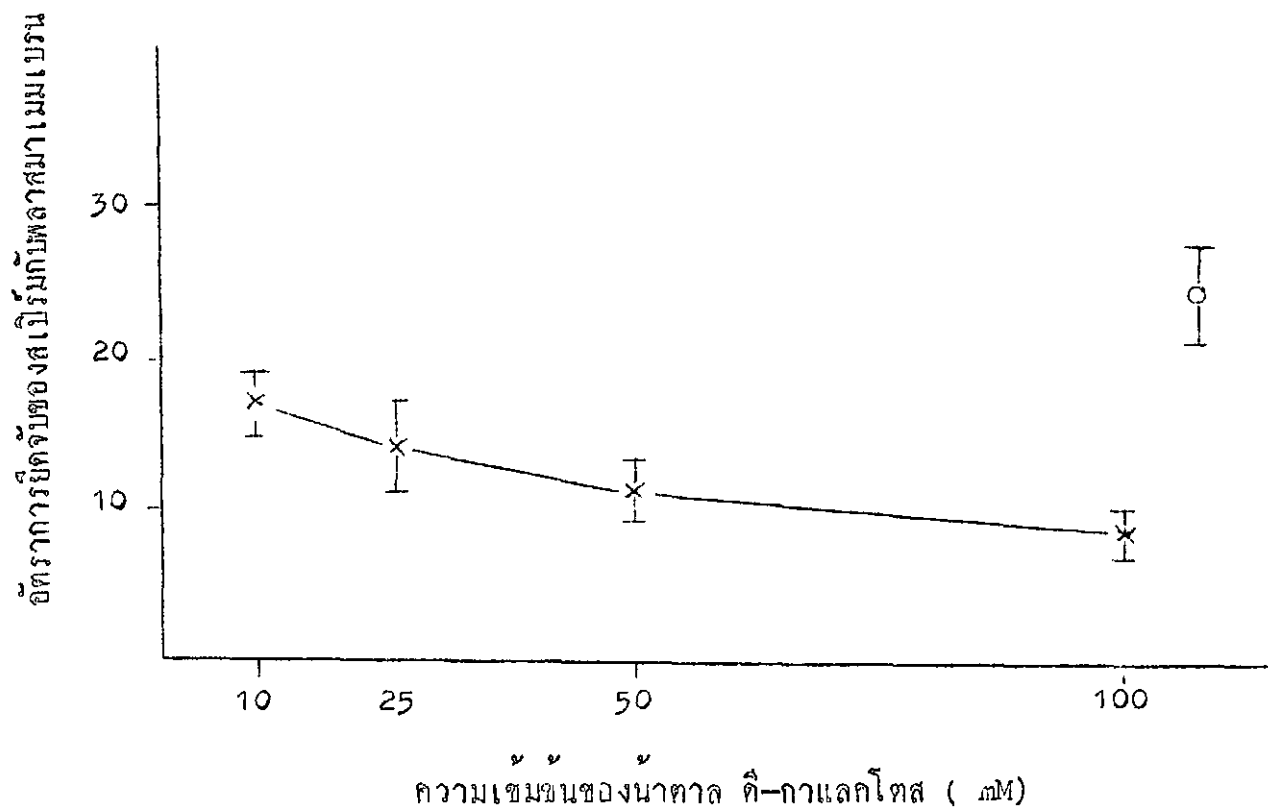
o จำนวนโปรตีนของกลุ่มควบคุม



ภาพประกอบ 7 ปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูซิดาในสารละลาย BWW ที่มีน้ำตาล คี-แมนโนส ความเข้มข้น 4 ระดับ แต่ละจุดเป็นจำนวนค่าสเปิร์ม $\pm$ SD

x จำนวนสเปิร์มของกลุ่มทดลอง

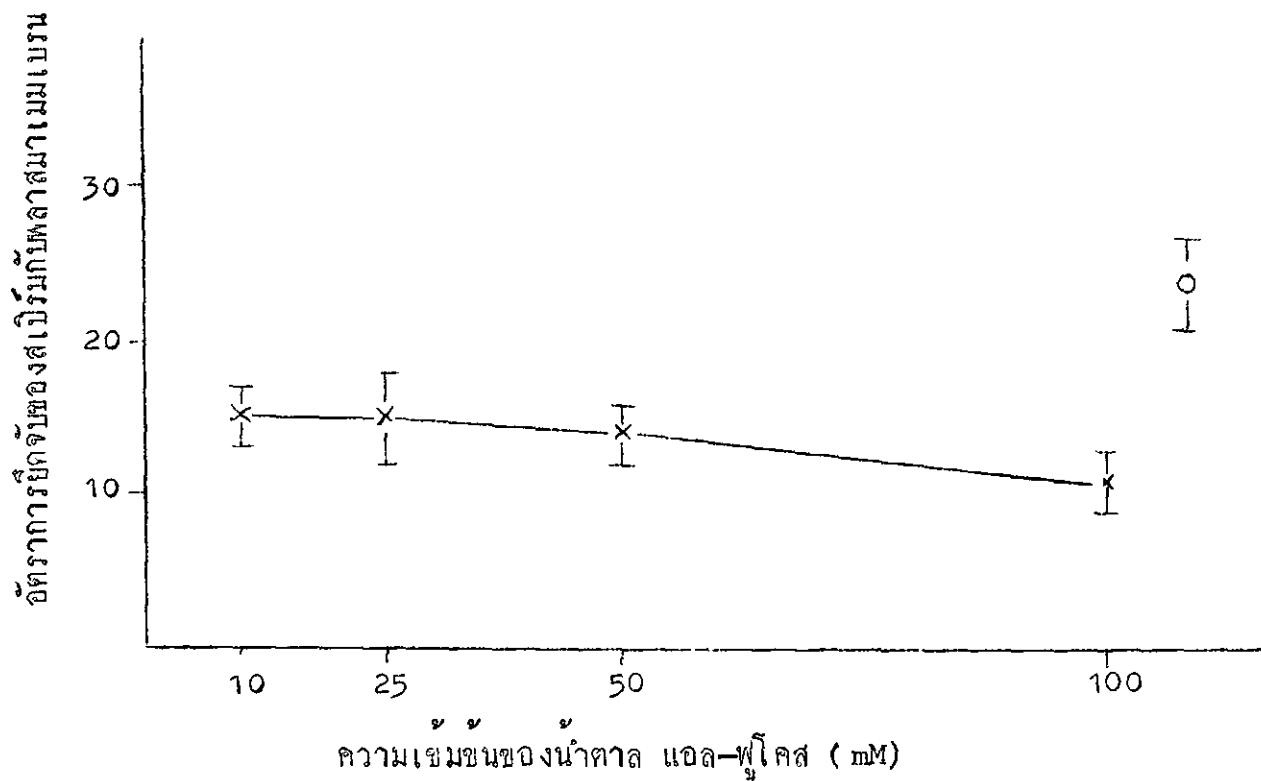
o จำนวนสเปิร์มของกลุ่มควบคุม



ภาพประกอบ 8 ปริมาณสเปิร์มที่ติดกับกับไข่ที่ไม่มีโซนาเซลล์ในสารละลาย BWB ที่มีความเข้มข้น ดี-กลูโคส 4 ระดับ แต่ละจุดเป็นจำนวนค่าสเปิร์ม $\pm$ SD

x จำนวนสเปิร์มของกลุ่มทดลอง

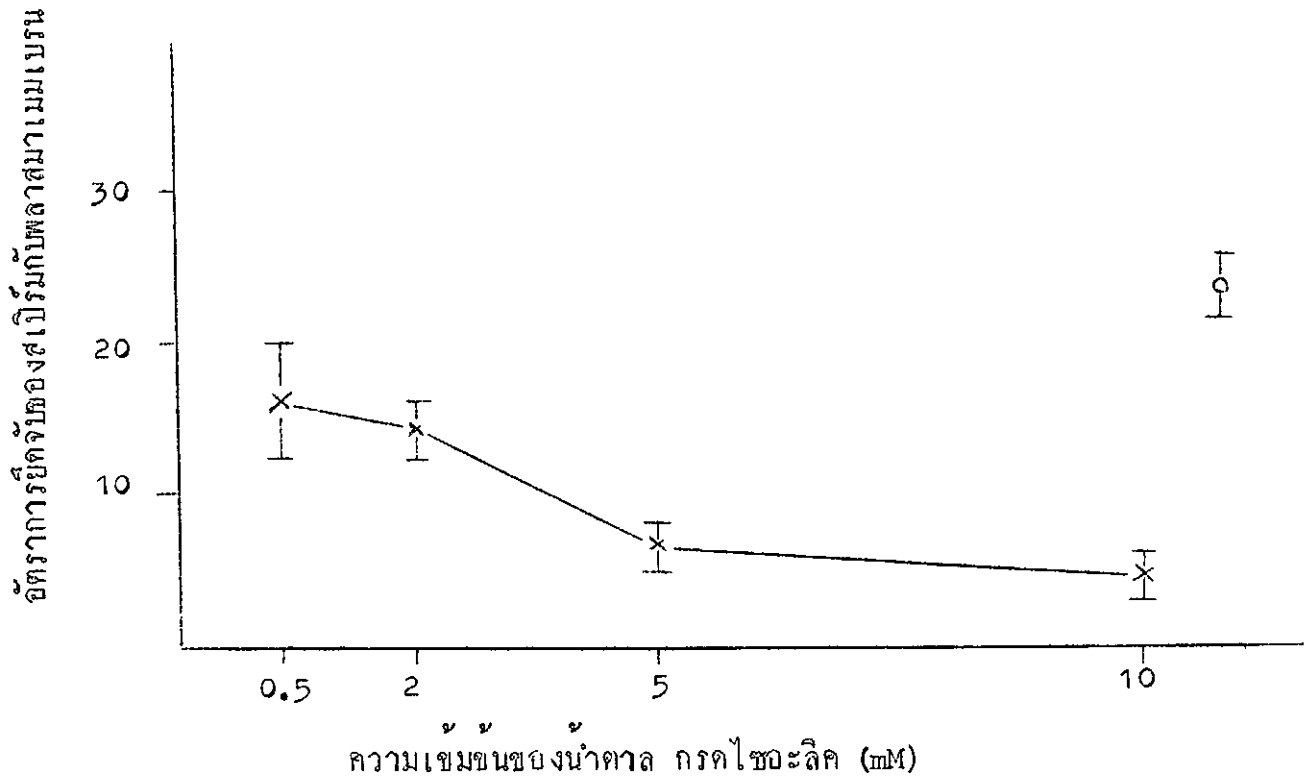
o จำนวนสเปิร์มของกลุ่มควบคุม



ภาพประกอบ 9 ปริมาณสเปิร์มที่ผลิตกับไขที่ไม่มีโซนาเพลูซิดาในสารละลาย BPF ที่มีน้ำตา แอล-ฟูโรส ความเข้มข้น 4 ระดับ แต่ละจุดเป็นจำนวนค่าสเปิร์ม $\pm$ SD

x จำนวนสเปิร์มของกลุ่มทดลอง

o จำนวนสเปิร์มของกลุ่มควบคุม



ภาพประกอบ 10 ปริมาณสเปิร์มที่ติดจับกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพอคูติกาในสารละลาย BWW ที่มีน้ำตาล กรดไซอะลิก ความเข้มข้น 4 ระดับ แต่ละจุดเป็นจำนวนค่าสเปิร์ม $\pm$ SD

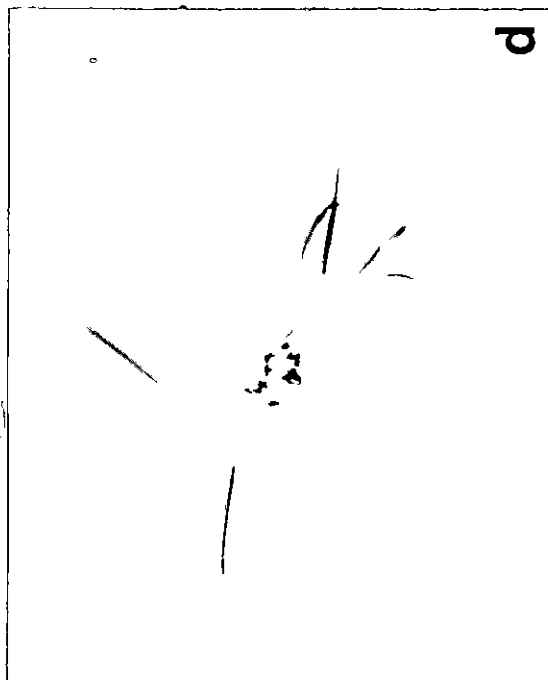
x จำนวนสเปิร์มของกลุ่มทดลอง

o จำนวนสเปิร์มของกลุ่มควบคุม

ภาพประกอบ 11 a - 11 d แสดงการยึดจับกันของไข่ที่มีโซนาเพอูซิดาและไข่ที่ไม่มีโซนาเพอูซิดากับคะพะนิเตเตคสเปิร์มของหนูแฮมสเตอร์ในสารละลายบริสุทธิ์ (กลุ่มควบคุม) และในสารละลาย BWV ที่มีเอ็น-อะซิทีล-ดี-กลูโคซามีน ความเข้มข้น 10 mM

- a ภาพขยาย 400 เท่า ของคะพะนิเตเตคสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่มีโซนาเพอูซิดาในสารละลาย BWV บริสุทธิ์ ซึ่งมีอัตราการยึดจับของสเปิร์มเท่ากับ 28.04 ± 4.27 SD
- b ภาพขยาย 400 เท่า ของคะพะนิเตเตคสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่มีโซนาเพอูซิดาในสารละลาย BWV ที่มีเอ็น-อะซิทีล-ดี-กลูโคซามีน ความเข้มข้น 10 mM อัตราการยึดจับของสเปิร์มเท่ากับ 9.16 ± 2.00 SD
- c ภาพขยาย 400 เท่า ของคะพะนิเตเตคสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพอูซิดาในสารละลาย BWV บริสุทธิ์ อัตราการยึดจับของสเปิร์มเท่ากับ 20.24 ± 2.53 SD
- d ภาพขยาย 400 เท่า ของคะพะนิเตเตคสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพอูซิดาในสารละลาย BWV ที่มี เอ็น-อะซิทีล-ดี-กลูโคซามีน ความเข้มข้น 0.5 M อัตราการยึดจับของสเปิร์มเท่ากับ 10.31 ± 1.58 SD

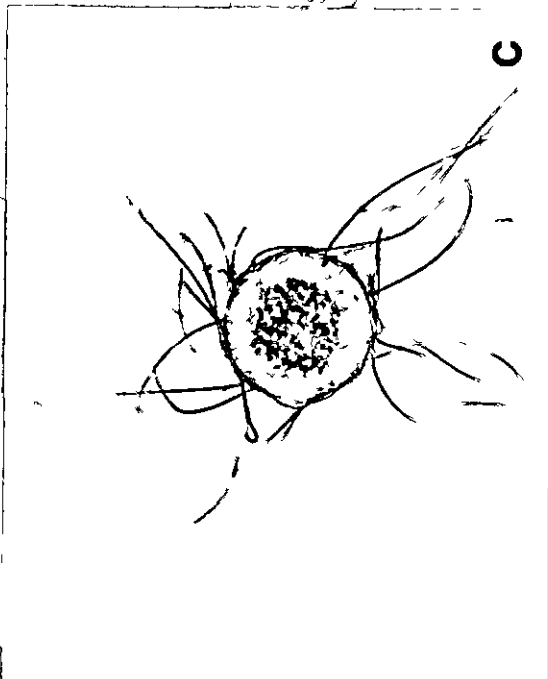
d



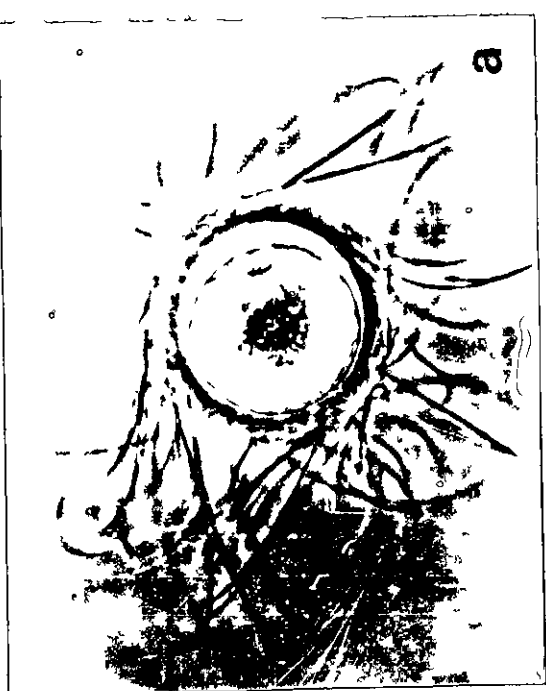
b



c



a



2. ผลของเอนไซม์ 3 ชนิด ที่มีต่อปริมาณการยึดจับของสเปิร์มกับไข่

2.1 ผลของเอนไซม์นิวรามินิเนส ความเข้มข้น 0.5 U

เบตา-กาแลคโตซิเนส ความเข้มข้น 1 U และ เบตา-เอ็น-อะซิทิล-ดี-กลูโคซามิเนส ความเข้มข้น 0.5 U ที่มีต่อปริมาณการยึดจับของสเปิร์มกับไข่ที่มีโซนาเพลูติคา

จากการเปรียบเทียบปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่หลังจากถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดกับกลุ่มควบคุมของเอนไซม์แต่ละชนิดโดยใช้ t -test ผลปรากฏว่าปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่หลังจากถูกย่อยด้วยเอนไซม์นิวรามินิเนส เท่ากับ 13.52 ± 2.88 SD ซึ่งแตกต่างกับปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ในกลุ่มควบคุม ($P > .01$) ซึ่งเท่ากับ 25.64 ± 2.63 SD (ตาราง 21) ส่วนปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ภายหลังจากถูกย่อยด้วยเอนไซม์ เบตา-กาแลคโตซิเนส เท่ากับ 16.91 ± 2.31 SD พบว่าไม่แตกต่างกับปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ในกลุ่มควบคุม ($P < .01$) ซึ่งเท่ากับ 17.20 ± 2.21 SD (ตาราง 21) และปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ภายหลังจากไข่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์

เบตา-เอ็น-อะซิทิล-ดี-กลูโคซามิเนส เท่ากับ 8.96 ± 1.96 SD (ภาพประกอบ 11b) ซึ่งแตกต่างกับกลุ่มควบคุม ($P > .01$) ที่มีปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่เท่ากับ 25 ± 2.36 SD (ภาพประกอบ 11a : ตาราง 21)

2.2 ผลของเอนไซม์ นิวรามินิเนส ความเข้มข้น 0.5 U

เบตา-กาแลคโตซิเนส ความเข้มข้น 1 U และเบตา-เอ็น-อะซิทิล-ดี-กลูโคซามิเนส ความเข้มข้น 0.5 U ที่มีต่อปริมาณการยึดจับของสเปิร์มกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูติคาหุ้ม

จากการเปรียบเทียบปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ภายหลังจากย่อยด้วยเอนไซม์ 3 ชนิดกับกลุ่มควบคุมของเอนไซม์แต่ละชนิดโดยใช้ t -test พบว่าปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ภายหลังจากย่อยด้วยเอนไซม์นิวรามินิเนสแตกต่างกับปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ในกลุ่มควบคุม ($P > .01$) คือ ปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์นิวรามินิเนสเท่ากับ 4.07 ± 2.41 SD ในขณะที่ปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ในกลุ่มควบคุมเท่ากับ 7.60 ± 1.98 SD (ตาราง 22)

ส่วนปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับไข่ภายหลังจากถูกย่อยด้วยเอนไซม์เบตา-กาแลคโตซิเดส มีปริมาณมากกว่าปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ในกลุ่มควบคุม ($P > .01$) โดยปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ภายหลังจากถูกย่อยด้วยเอนไซม์เบตา-กาแลคโตซิเดส เท่ากับ 19.35 ± 3.91 SD และปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ในกลุ่มควบคุมเท่ากับ 14.52 ± 3.31 SD (ตาราง 22) ส่วนปริมาณสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ภายหลังจากถูกย่อยด้วยเอนไซม์เบตา-เอ็น-อีพิทาล-จี-กลูโคซามินิเดส เท่ากับ $1.58 - 1.36$ (ภาพประกอบ 12 d) แตกต่างกับกลุ่มควบคุม ($P > .01$) ซึ่งมีปริมาณการยึดจับของสเปิร์มกับไข่เท่ากับ 8.85 ± 2.09 SD (ภาพประกอบ 12 c : ตาราง 22)

ตาราง 21 ค่าเฉลี่ยการยึดจับของสเปิร์มกับไข่ที่มีโซนาเพลูซิกาภายหลังจากไข่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ และกลุ่มควบคุม

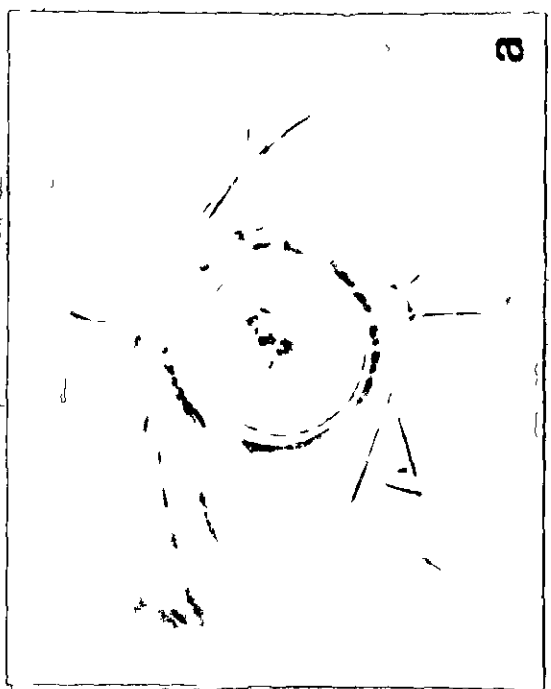
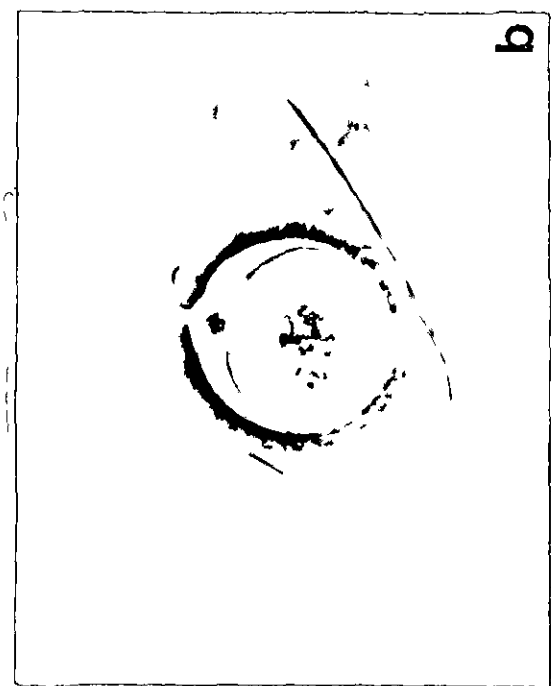
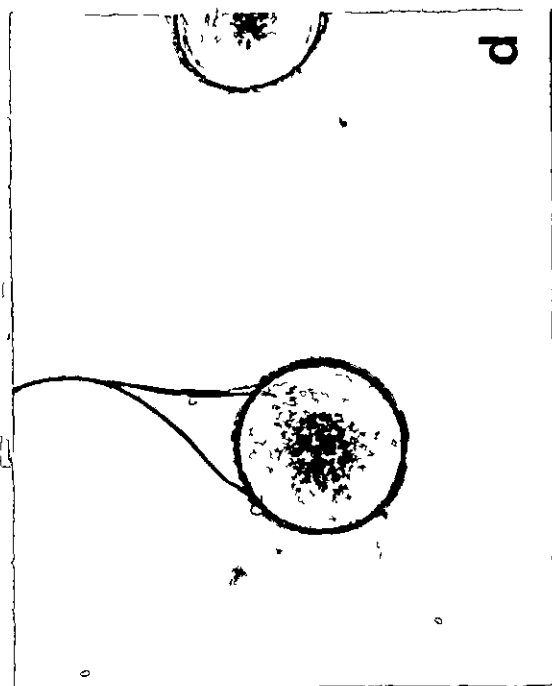
ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์	ค่าเฉลี่ยปริมาณการยึดจับของสเปิร์มกับไข่	
	กลุ่มทดลอง	กลุ่มควบคุม
β -N-acetyl-D-glucosaminidase 0.5 U	8.96	25
Neuraminidase 0.5 U	13.52	25.64
β -Galactosidase 1 U	16.91	17.20

ตาราง 22 ค่าเฉลี่ยการยึดจับของสเปิร์มกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูทิกาลภายหลังจากไข่
ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ และกลุ่มควบคุม

ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์	ค่าเฉลี่ยปริมาณการยึดจับของสเปิร์มกับไข่	
	กลุ่มทดลอง	กลุ่มควบคุม
B-N-acetyl-D-glucosaminidase 0.5 U	1.58	8.85
Neuraminidase 0.5 U	4.07	7.60
B-Galactosidase 1 U	19.35	14.52

ภาพประกอบ 12 a – 12 d แสดงการยึดจับกันของไข่ที่มีโนนาเพลูซิดา และไข่ที่ไม่มีโนนาเพลูซิดากับคะพะฉิเตเตคสเปิร์มของหนูแฮมสเตอร์ในสารละลายBWW บริษัท (กลุ่มควบคุม) และการยึดจับกันของไข่ทั้ง 2 ชนิดที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์เบตา-เอน-อะซิติด-ดี-กลูโคซามิเนส ความเข้มข้น 0.5U กับคะพะฉิเตเตคสเปิร์ม

- a ภาพขยาย 400 เท่าของคะพะฉิเตเตคสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่มีโนนาเพลูซิดาในสารละลาย BWW บริษัท อัตราการยึดจับของสเปิร์มเท่ากับ 25 ± 2.36 SD
- b ภาพขยาย 400 เท่า ของคะพะฉิเตเตคสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่มีโนนาเพลูซิดาที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์เบตา-เอน-อะซิติด-ดี-กลูโคซามิเนส ความเข้มข้น 0.5 U อัตราการยึดจับของสเปิร์มเท่ากับ 8.96 ± 1.96 SD
- c ภาพขยาย 400 เท่า ของคะพะฉิเตเตคสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่ไม่มีโนนาเพลูซิดาในสารละลาย BWW บริษัท อัตราการยึดจับของสเปิร์มเท่ากับ 8.85 ± 2.09 SD
- d ภาพขยาย 400 เท่า ของคะพะฉิเตเตคสเปิร์มที่ยึดจับกับไข่ที่ไม่มีโนนาเพลูซิดาที่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์เบตา-เอน-อะซิติด-ดี-กลูโคซามิเนส ความเข้มข้น 0.5 U อัตราการยึดจับของสเปิร์มเท่ากับ 1.58 ± 1.36 SD



บทที่ 5

สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จุดมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาอิทธิพลของน้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวรวม 5 ชนิด คือ เอ็น-อะซิทีล-ที-กลูโคซามีน ที-แมนโนส ที-กาแลคโตส แอล-ฟูโรส และ กรดไซอะลิก ณ ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ต่อการบีบอัดระหว่างเซลล์สืบพันธุ์
2. เพื่อหาชนิดของน้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวที่จัดว่าเป็นส่วนหนึ่งของรีเซปเตอร์สำหรับสเปิร์มบนผนังไข่
3. เพื่อดูความแตกต่างของรีเซปเตอร์สำหรับสเปิร์มบนชั้นโซนาเพลูซิกาและชั้นพลาสมาเมมเบรนของไข่

วิธีการในการวิจัย

สัตว์ทดลองใช้หนูแฮมสเตอร์พันธุ์ Mesocritus auratus อายุประมาณ 2 เดือน

วิธีการทดลอง

1. เตรียมอะพอธีเทคอสเปิร์มในโมดิฟายด์ไทโรคัส ความเข้มข้น $1 - 2 \times 10^7$ สเปิร์ม/มิลลิลิตร
2. เตรียมไข่ที่มีโซนาเพลูซิกาหุ้มและไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูซิกาหุ้ม ในสารละลายเจียงเซลล์ BW
3. การทดสอบอิทธิพลของน้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวต่อการบีบอัดระหว่างเซลล์สืบพันธุ์
 - 3.1 การทดสอบอิทธิพลของน้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวต่อการ

ปฏิกิริยาระหว่างกะเพรชที่สกัดได้กับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยศึกษาในน้ำตาล 5 ชนิด คือ เอน-อะซิโกล-ดี-กลูโคซามีน ดี-แมนโนส ดี-กาแลคโตส และ กรดไซอะลิก โดย 4 ชนิดแรก แต่ละชนิดประกอบด้วยความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 10 25 50 และ 100 mM ในสารละลาย BWW และกรดไซอะลิกที่มีความเข้มข้น 0.5 2 5 และ 10 mM ตามลำดับในสารละลาย BWW

3.2 ใส่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงในสารละลาย BMM ที่มีน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ตามข้อ 3.1 แล้วหยดกะเพรชที่สกัดได้ลงในสารละลายที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยให้ความเข้มข้นของสเปิร์มลดลงเป็น $1 - 2 \times 10^6$ สเปิร์ม/มิลลิลิตร

3.3 นำเข้าอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาล้างในสารละลาย BWW 3 ครั้ง

3.4 ตรวจนับจำนวนสเปิร์มที่ยึดจับกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสารละลาย BWW ที่มีน้ำตาลแต่ละชนิดและความเข้มข้นเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

3.5 การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวต่อการยับยั้งปฏิกิริยาระหว่างกะเพรชที่สกัดได้กับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยศึกษากันน้ำตาล 5 ชนิด แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 4 ระดับเช่นเดียวกับการทดสอบกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ตามขั้นตอนตั้งแต่ ข้อ 3.1 ถึง 3.4 แต่แตกต่างกันที่ความเข้มข้นของสเปิร์มสำหรับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นของสเปิร์มเท่ากับ $1 - 2 \times 10^5$ สเปิร์ม/มิลลิลิตร

4. การตรวจหาชนิดของน้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวบนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และพลาสมาเมมเบรนของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ผลิตจากการยับยั้งปฏิกิริยาระหว่างเซลล์สืบพันธุ์กับเอนไซม์

เอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษามี 3 ชนิด คือ เบตา-เอน-อะซิโกล-ดี-กลูโคซามินิเดส ความเข้มข้น 0.5 U ใน 0.1 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5 เบตา-กาแลคโตซิเดส ความเข้มข้น 1 U ใน 0.1 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.3 และนิวรามินิเดส ความเข้มข้น 0.5 U ใน 0.1 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5

4.1 ใส่เอนไซม์แต่ละชนิดย่อยหน่วยน้ำตาลบนชั้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ พลาสมาเมมเบรนของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

4.2 ล้างไข่ทั้ง 2 ชนิดในสารละลายเบี่ยงเซลล์ BWw 3 ครั้ง

4.3 นำไข่ทั้ง 2 ชนิดมาผสมกับกะเพราเทคอสเปิร์มโดยให้ความเข้มข้นของสเปิร์มสำหรับไข่ที่มีโซนาเพลูทิกาเท่ากับ $1 - 2 \times 10^6$ สเปิร์ม/มิลลิลิตร และสำหรับไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูทิกาเท่ากับ $1 - 2 \times 10^5$ สเปิร์ม/มิลลิลิตร

4.4 นำเข้าอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สำหรับไข่ที่มีโซนาเพลูทิกา และ 5 นาที สำหรับไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูทิกา

4.5 ล้างไข่ทั้ง 2 ชนิดในสารละลายเบี่ยงเซลล์ BWw บริสุทธิ์ 3 ครั้ง

4.6 ตรวจสอบจำนวนสเปิร์มที่ยึดจับกับโซนาเพลูทิกา และ พลาสมาเมมเบรนเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

สรุปผลการวิจัย

1. นำกาลชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 10 25 50 และ 100 mM ในนำกาล 4 ชนิดแรก คือ เอ็น-อะซิทีล-ที-กลูโคซามีน ที-แมนโนส ที-กาแลคโตส แอล-ฟูโรส และกรดไฮอะลิก ความเข้มข้น 0.5 2 5 และ 10 mM ตามลำดับ ที่ใช้ในการศึกษาอัตราการยึดจับของเซลล์สืบพันธุ์ พบว่าในกรณีของไข่ที่มีโซนาเพลูทิกาปริมาณการยึดจับของเซลล์สืบพันธุ์ลดลงอย่างเห็นได้ชัด ($P > .01$) ทั้งแต่ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 10 mM ของ เอ็น-อะซิทีล-ที-กลูโคซามีน ปริมาณการยึดจับลดลงตามลำดับอย่างเด่นชัดเมื่อความเข้มข้นของนำกาลสูงขึ้นตามลำดับ (ภาพประกอบ 1)

ในกรณีของไข่ที่ไม่มีโซนาเพลูทิกา ปริมาณการยึดจับกันของเซลล์สืบพันธุ์ลดลงอย่างเห็นได้ชัด ($P > .01$) ทั้งแต่ความเข้มข้นระดับต่ำสุดของนำกาลทั้ง 5 ชนิด คือ 10 mM ของ เอ็น-อะซิทีล-ที-กลูโคซามีน ที-กาแลคโตส ที-แมนโนส แอล-ฟูโรส และ 0.5 mM ของ กรดไฮอะลิก โดยเฉพาะ เอ็น-อะซิทีล-ที-กลูโคซามีน แอล-ฟูโรส และกรดไฮอะลิก ปริมาณการยึดจับของสเปิร์มลดลงในอัตราที่สูงมากและลดลงตามลำดับของความเข้มข้นที่สูงขึ้นอย่างเด่นชัด (ภาพประกอบ 6 และ 10)

2. จากการทดสอบหาชนิดของน้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยวที่มีบทบาทต่อการบีบอัดระหว่างเซลล์สืบพันธุ์โดยใช้เอนไซม์ 3 ชนิด คือ เบตา-กาแลคโตซิเดส ความเข้มข้น 1U นิรามินิเดส ความเข้มข้น 0.5 U และ เบตา-เอ็นอะซิทิล-ที-กลูโคซามินิเดส ความเข้มข้น 0.5 U สำหรับไข่ที่มีไซนาเพลูทิกาพบว่า ภายหลังจากถูกย่อยด้วย นิรามินิเดส ความเข้มข้น 0.5 U และเบตา-เอ็นอะซิทิล-ที-กลูโคซามินิเดส ความเข้มข้น 0.5 U แล้วปริมาณการบีบอัดของสเปิร์มกับไซลลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P > .01$) แต่ภายหลังจากไข่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์เบตา-กาแลคโตซิเดสเมื่อนำไปผสมกับสเปิร์มอัตราการบีบอัดกันของเซลล์สืบพันธุ์ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม ($P < .01$)

ในกรณีของไข่ที่ไม่มีไซนาเพลูทิกา จากการทดสอบด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกัน ที่ความเข้มข้นเดียวกันทั้ง 3 ชนิด คือ เบตา-กาแลคโตซิเดส ความเข้มข้น 1U นิรามินิเดส ความเข้มข้น 0.5 U และเบตา-เอ็นอะซิทิล-ที-กลูโคซามินิเดส ความเข้มข้น 0.5 U พบว่าไข่ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ นิรามินิเดสและเบตา-เอ็นอะซิทิล-ที-กลูโคซามินิเดส ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าว เมื่อนำมาผสมกับสเปิร์ม อัตราการบีบอัดของสเปิร์มกับไซลลดลงทั้งสิ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P > .01$) แต่ไข่ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์เบตา-กาแลคโตซิเดส อัตราการบีบอัดของสเปิร์มกลับเพิ่มขึ้นในอัตราที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P > .01$)

อภิปรายผล

จากการศึกษาไซนาเพลูทิกาของพวกสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ผ่านมาพบว่าประกอบด้วยไกลโคโพรตีนซึ่งมีพวกน้ำตาลเชิงเดี่ยวและอนุพันธ์น้ำตาลเชิงเดี่ยว คือ เอ็นอะซิทิล-ที-กลูโคซามิน-ที-กาแลคโ แอล-ฟูโคส และ กรดไซอะลิกเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย (Dunbar, 1980 : 356-365, Hearick and Wardrip, 1981:17) หรือแม้แต่ผนังชั้นวิหิตเส้นของไข่พวกสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น เม่นทะเลก็พบว่าประกอบด้วยไกลโคโพรตีนซึ่งมีน้ำตาลเหล่านี้เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วยเช่นกัน (Ressignol and others, 1981 : 347 - 358, Glabe and Lennarz, 1981 : 387-394)

เช่นเดียวกับพลาสมาเมมเบรนของเซลล์ทั่วไปที่ต่างก็ประกอบด้วยไกลโคโพรตีนที่มีน้ำตาลเหล่านี้เป็นองค์ประกอบ (Lehinger, 1975:273-275, Bohinski, 1979 : 310-313) และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าน้ำตาลที่ประกอบเป็นไกลโคโพรตีนเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการยึดเกาะกันของเซลล์ทั่วไป (Vacquier and Moy, 1977 ; 2456-2460) และจากการวิจัยครั้งนี้ทำให้เข้าใจถึงหน่วยที่เป็นรีเซปเตอร์สำหรับสเปิร์มบนโซนาเพลูซิกาและพลาสมาเมมเบรนของหนูแฮมสเตอร์ ซึ่งพบว่าในกรณีของโซนาเพลูซิกานั้นน้ำตาลที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ คือ เอ็น-อะซิทิล-ที-กลูโคซามีน ที-แมนโนส ที-กาแลคโตส แอล-ฟูโรส และ กรดไฮอะลิก ต่างก็มีผลในการลดอัตราการบดจับของเซลล์สืบพันธุ์ด้วยกันทั้งสิ้นเมื่อน้ำตาลเหล่านี้ในสารละลายเลี้ยงเซลล์เมื่อมีการผสมกันของเซลล์สืบพันธุ์โดยเฉพาะ เอ็น-อะซิทิล-ที-กลูโคซามีน มีผลต่อการลดอัตราการบดจับกันของเซลล์สืบพันธุ์สูงสุดทั้งในความเข้มข้นต่ำสุดคือ 10 μM แต่จากการศึกษาการบดจับของสเปิร์มที่ยังไม่เกิดคะพะซี เซ้นกับไข่ที่มีโซนาเพลูซิกาหุ้มของหนูแฮมสเตอร์พบว่าถ้าสารละลายเลี้ยงเซลล์มี กรดกลูโคโรนิกทั้งในความเข้มข้น 5 μM สามารถลดอัตราการบดจับของเซลล์สืบพันธุ์ลงได้ถึง 0 และถ้าสารละลายเลี้ยงเซลล์มีน้ำตาล เอ็น-อะซิทิล-ที-กลูโคซามีน แอล-ฟูโรส และ เอ็น-อะซิทิล-ที-กาแลคโตซามีน จะสามารถลดอัตราการบดจับของเซลล์สืบพันธุ์ได้ถึง 50% (Hartmann and Hutchison, 1977:383-390) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าหน่วยน้ำตาลที่มีบทบาทมากในการบดจับกันของไข่กับคะพะซี เคเตดสเปิร์มและไข่กับสเปิร์มที่ยังไม่เกิดคะพะซี เซ้นนั้นแตกต่างกัน

ตามความเห็นของฮาร์ทแมนน์ และกวอทกินส์ เชื่อว่าเมื่อสเปิร์มเกิดคะพะซี เซ้นทำให้สมบัติทางเคมีของผิวสเปิร์มเปลี่ยนไป ทำให้หน่วยน้ำตาลที่เป็นตัวบดจับแตกต่างกัน (Hartmann and Gwatkin, 1971:479-481) และจากการศึกษาสเปิร์มของหนูเมาส์พบว่าเอนไซม์บนผิวคะพะซี เคเตดสเปิร์มช่วยทำให้เกิดการบดจับกันของเซลล์สืบพันธุ์ คือ การแลคโตซิลทรานสเฟอเรส (Galactosyltransferase) ซึ่งทำให้เกิดการบดจับกันกับ เอ็น-อะซิทิล-ที-กลูโคซามีน บนผิวโซนาเพลูซิกา (Shur and Hall, 1982: 574-579) และสเปิร์มของหนูเมาส์ที่มีความผิดปกติ คือ มีกาแลคโตซิลทรานสเฟอเรสมากกว่าปกติจะมีความสามารถในการบดจับ

กับโซนาเพทริคามากกว่าปกติ (Shur and Hall 1982;567-578) และจากการศึกษากับหนูแฮมสเตอร์ครั้งนี้พบว่าน้ำตาลที่มีผลต่อการล่อการบิ่กจับกันของเซลล์สืบพันธุ์มากที่สุด คือ เอ็น-อะซีทิล-ดี-กลูโคซามีน แม้ เมื่อสารละลายเลี้ยงเซลล์มีน้ำตาลชนิดนี้อยู่ตั้งแต่ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 10 mM จึงเชื่อว่าหน่วยน้ำตาลนี้มีผลต่อการบิ่กจับของเซลล์สืบพันธุ์มากที่สุดเมื่อเทียบกับน้ำตาลชนิดอื่น ๆ ที่ทำการทดลองทั้งหมดและอาจเป็นไปได้ว่าหน่วย เอ็น-อะซีทิล-ดี-กลูโคซามีนบนโซนาเพทริคานี้เป็นหน่วยที่จับกับกาแลคโตสบนอะซีเทคเตสเปิร์ม และจากการศึกษาด้วยเอนไซม์ของเซอร์และฮอลล์เช่นกัน พบว่าเมื่อนำไข่ไปย่อยด้วยเอนไซม์ที่สามารถย่อยน้ำตาลเอ็น-อะซีทิล-ดี-กลูโคซามีน คือ เบตา-เอ็น-อะซีทิล-ดี-กลูโคซามินิเดส ความเข้มข้น 1U ก่อนนำไปผสมกับสเปิร์มจะสามารถยับยั้งการบิ่กจับของเซลล์สืบพันธุ์ได้ถึง 86% ในขณะที่ยากันถ้าย่อยไข่ด้วย เบตา-กาแลคโตซิเดส ซึ่งจะย่อยน้ำตาล คือ-การแลกโตสบนผนังไข่ ความเข้มข้น 1U จะทำให้จำนวนสเปิร์มที่บิ่กจับกับโซนาเพทริคเพิ่มขึ้นถึง 55% และในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดลองกับเอนไซม์ 3 ชนิด คือ นิวรามินิเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยน้ำตาลกรโคโซลิก ความเข้มข้น 0.5 U เบตา-กาแลคโตซิเดส ความเข้มข้น 1 U และ เบตา-เอ็น-อะซีทิล-ดี-กลูโคซามินิเดส ความเข้มข้น 0.5U พบว่าไข่ที่ถูกย่อยด้วย นิวรามินิเดส และ เบตา-เอ็น-อะซีทิล-ดี-กลูโคซามินิเดสก่อนนำมาผสมกับสเปิร์มอัตราการบิ่กจับของเซลล์สืบพันธุ์จะลดลง เมื่อไข่ที่ถูกย่อยด้วย เบตา-กาแลคโตซิเดส แล้วนำมาผสมกับสเปิร์มอัตราการบิ่กจับของสเปิร์มกับไข่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ซึ่งถ้าศึกษาถึงลำดับการเรียงตัวของน้ำตาลบนไกลโคโปรตีนของพลาสมาเมมเบรนในพวงสั้วเลี้ยงดูด้วยนมแม่จะเป็นลำดับจากหน่วยในสู่หน่วยนอกดังนี้ คือ กรโคโซลิก-เอ็น-อะซีทิล-ดี-กลูโคซามีน-เอ็น-อะซีทิล-ดี-กลูโคซามีน-แมนโนส-เอ็น-อะซีทิล-ดี-กลูโคซามีน - กาแลคโตส - กรโคโซลิก (Lehinger. 1975 : 273 - 275) ดังนั้นในกรณีที่ไข่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ เบตา-กาแลคโตซิเดสแล้วปริมาณการบิ่กจับอาจเพิ่มขึ้นหรือมีปริมาณเทียบเท่ากับกลุ่มควบคุมอาจเป็นไปได้เพราะถ้าพิจารณาลำดับน้ำตาลบนไกลโคโปรตีนแล้วจะเห็นว่าถ้ากาแลคโตสถูกย่อยออกไปหน่วยน้ำตาลที่เหลืออยู่เป็นอันดับแรก คือ เอ็น-อะซีทิล-ดี-กาแลคโตซามีน จึงเท่ากับเป็นการเพิ่มรีเซพเตอร์บนผนังโซนาเพทริคให้กับสเปิร์ม ส่วนกรโคโซลิกนั้นถ้าพิจารณาตามลำดับของน้ำตาลที่ประกอบเป็นไกลโคโปรตีนจะเห็นว่า

เป็นน้ำตาลที่อยู่ปลายนอกสุด ดังนั้นจึงน่าจะเป็นน้ำตาลหน่วยแรกที่มีการยึดจับกันระหว่าง เซลล์สืบพันธุ์ และจากการทดลองทั้งโดยการใช้น้ำตาลและเอนไซม์ พบว่า เมื่อในสารละลายเลี้ยงเซลล์มีน้ำตาลชนิดนี้อยู่หรือนำไซมาเยยด้วยเอนไซม์นิวรามินิเดสก่อนผสมกับ สเปิร์มอัตราการยึดจับของเซลล์สืบพันธุ์จะลดลง จึงสันนิษฐานว่ากรดไซอะลิกอาจเป็น น้ำตาลอีกชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญต่อการยึดจับของสเปิร์มกับไข่

ดังนั้นจากงานวิจัยที่ผ่านมาและการวิจัยครั้งนี้พอเป็นหลักฐานเชื่อได้ว่าน้ำตาลที่ ประกอบเป็นไลโคโปรตีนที่โซนาเพลูซิกาเป็นส่วนหนึ่งของรีเซปเตอร์สำหรับสเปิร์มบนผิว โซนาเพลูซิกา โดยเฉพาะน้ำตาล เอ็น-อะซิทิล-ดี-กลูโคซามีน และกรด ไซอะลิก

จากการศึกษาหน่วยรีเซปเตอร์สำหรับสเปิร์มบนพลาสมาเมมเบรนในลักษณะเดียวกับการศึกษากับโซนาเพลูซิกา พบว่าน้ำตาลทุกชนิดตั้งแต่ความเข้มข้นระดับต่ำสุดทำให้ ปริมาณการยึดจับของ เซลล์สืบพันธุ์ลดลงและจากการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกันทั้ง 3 ชนิด พบว่าทุกชนิดทำให้อัตราการยึดจับกันของสเปิร์มกับไข่ลดปริมาณลงแสดงว่าน้ำตาลเหล่านี้ มีบทบาทในการยึดจับกับสเปิร์มเช่นเดียวกับในชั้นโซนาเพลูซิกา และจากการเปรียบเทียบ ความสามารถในการยับยั้งการยึดจับของน้ำตาลทั้ง 5 ชนิดและเอนไซม์ 3 ชนิดดังกล่าวพบว่า น้ำตาล เอ็น-อะซิทิล-ดี-กลูโคซามีน กรดไซอะลิก ดี-แมนโนส มีความสามารถในการยับยั้งจับของสเปิร์มกับไข่ได้สูงกว่า ดี-กาแลคโตส และ แอล-ฟูโคส ในกรณีของ เอนไซม์นั้น เอนไซม์เบตา-เอ็น-อะซิทิล-ดี-กลูโคซามิเดสและนิวรามินิเดสมีความ สามารถในการยับยั้งการยึดจับของสเปิร์มกับไข่ได้ ในขณะที่ไข่ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์กาแลคโตซิเดสแล้วนั้นทำให้อัตราการยึดจับของสเปิร์มกับไข่สูงขึ้น และจากผลการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าผนังชั้นโซนาเพลูซิกา และพลาสมาเมมเบรนของไข่หนู แฮมสเตอร์มีความแตกต่างกัน เพราะจากการทดลองโดยใช้น้ำตาลและเอนไซม์ชนิดเดียวกันและที่ความเข้มข้นระดับเดียวกัน แต่มีผลต่อการลดอัตราการยึดจับของเซลล์สืบพันธุ์แตกต่างกัน

ข้อเสนอแนะ

1. จากการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าปัญหาที่ควรคำนึงถึง คือ ระยะเวลาในแต่ละขั้นตอนของการทดลอง ซึ่งจะต้องแน่นอนในทุกขั้นตอนมิฉะนั้นจะทำให้การทดลองผิดพลาดได้ จึงควรมีการวางแผนเกี่ยวกับเวลาในแต่ละขั้นตอนให้รัดกุมก่อนทำการทดลอง
2. pH ของสารละลายเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในการทดลองเป็นสิ่งที่ต้องระมัดระวัง เพราะสารละลายเหล่านี้ pH เปลี่ยนแปลงได้ง่ายเมื่อสัมผัสกับอากาศ ดังนั้นควรเตรียมสารละลายเลี้ยงเซลล์ทั้ง 2 ชนิดใหม่ทุกครั้งที่ทำการศึกษาทดลอง เช่นเดียวกัน เอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองก็ต้องระมัดระวังเรื่อง pH เช่นกัน เพราะถ้า pH เปลี่ยนไป ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ก็เปลี่ยนไปเช่นกัน
3. ทำการศึกษาว่าตำแหน่งหรือลำดับของน้ำตาลบนไกลโคโปรตีนบนผิวไขมันอิทธิพลต่อการยึดจับของเซลล์สืบพันธุ์หรือไม่
4. ทำการทดลองต่อการวิจัยครั้งนี้โดยศึกษาหน่วยน้ำตาลหรือเอนไซม์บางชนิดบนผิวของอะไมโอไซเตสเปิร์ม ที่มีบทบาทต่อการยึดจับของเซลล์สืบพันธุ์
5. ควรมีการทดลองศึกษาการยึดจับของเซลล์สืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตต่างสปีชีส์กัน โดยทำการทดลองในลักษณะเดียวกันนี้ เพื่อยืนยันว่า รีเซปเตอร์สำหรับสเปิร์มบนผิวไข่ของสิ่งมีชีวิตต่างสปีชีส์กันแตกต่างกันจริงหรือไม่เพราะถ้าแตกต่างกัน หน่วยของน้ำตาลที่เป็นรีเซปเตอร์บนผิวไข่ต้องแตกต่างกัน
6. ควรมีการศึกษาเซลล์สืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตที่เป็นหมันโดยวิเคราะห์หาชนิดของปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ บนผนังเซลล์สืบพันธุ์แล้วนำมาเปรียบเทียบกับเซลล์สืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตที่ปกติพวกเดียวกัน เพื่อยืนยันว่าน้ำตาลบนผนังไข่เป็นสาเหตุหนึ่งของการเป็นหมันหรือไม่

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- Austin, C.R. "Observation on the Penetration of the Sperm into the Mammalian Egg" Australian Journal Scientific Reaesron Series. 4 : 581 - 591, 1951.
- Barnum, S.R. and Brown, G.G. "Effect of Lectins and Sugars on Primary Sperm Attachment in Hoursehoe Crab Limulus polyphemusL." Developmental Biology. 95 : 352 - 359, 1983.
- Biggers, J.D. Whitten, W.K. and Whittingham, D.G. "The Culture of Mouse Embryos In Vitro" Method of Mammalian Embryology. Freeman and Co. San Francisco. p 86 - 116, 1971.
- Bleil, J.D. and Wassarman, P.M. "Sturcture and Function of the Zona Pellucida · Identification and characteristic of the Protein of Mouse Oocyte's Zona Pellucida" Developmental Biology. 76 : 185 - 202, 1980
- Bleil J.D. and Wassarman, P.M. "Sperm-Egg Interaction in the Mouse : Sequence of Events and Induction of the Acrosome Reaction by Zona Pellucida Glycoprotein" Developmental Biology 95 : 317 - 324, 1983.
- Bohinski, R.C. Modern Concepts in Biochemistry 3th ed. Boston Allgn and Bacon 1979 600 p.
- Chang, M.C. "Fertilization Capacity of Spermatozoa Deposited into the Follopian tubes" Nature. 168 : 697, 1959.
- Dunbar, B.S. Wardrip, N.J. and Hedrick, J.L. "Isolation Physico chemical Properties, and Molecular Composition of Zona Pellucida from Porcine Oocytes" Biochemistry. 19 : 356 - 365, 1980.
- Florman, H.M. and Storey, B.T. "Mouse Gamete Interactions The Zona Pellucida Is the Site of the Acrosome Reaction Leading to Fertilization In Vitro" Developmental Biology. 91 : 121 - 130, 1982.

- Glabe, C.G. and Lennarz, W.J. "Isolation of a High Molecular Weight Glycoconjugate Derived from the Surface of *S. purpuratus* Eggs that is Implicated in Sperm Adhesion" Journal Supramolecular of Structural and Cellular Biochemistry. 15 : 387 - 394, 1981
- Hartmann, J.F. and Gwatkin, R.B.L. "Alteration of Sites on the Mammalian Sperm Surface Following Capacitation" Nature. 234 : 479 - 481, 1971.
- Hartmann, J.F. Gwatkin, R.B.L. and Hutchison, C.F. "Early Contact Interactions Between Mammalian Gametes In Vitro Evidence That the Vitellus Influence Between Sperm and Zona Pellucida" Proceedings Natural Academic Science U S A 69 . 2767 - 2769, 1972.
- Hartmann, J.F. and Hutchison, C.F. "Involvement of Two Carbohydrate-Containing Components in the Binding of Uncapacitated Spermatozoa to Egg of the Golden Hamster In Vitro" Journal Experimental Zoology. 201 : 383 - 390, 1977.
- Hartmann, J.F. and Hutchison, C.F. "Nature of the Pre-Penetration Contact Interactions Between Hamster Gametes In Vitro" Journal Reproduction Fertilization. 36 : 49 - 57, 1974.
- Hartmann, J.F. Hutchison, C.F. and Vandlen, R. "Control of Gamete Surface Interactions by the Vitellus After Apparent Interaction with Peptides Released Through Hamster Sperm - Zona Pellucida Contact" Journal Cell Biology. 91 . 171 a, 1981
- Hedrick, J.L. and Wardrip, N. "Microheterogeneity in the Glycoprotein of the Zona Pellucida is Due to the Carbohydrate Moiety" Journal Cell Biology. 91 177a, 1981.
- Huang, T. "On the Nature of Sperm Zona Zona Pellucida Recognition in the Guinea Pig" Biology of Reproduction. 24 : 108a, 1981.
- Kinsey, W.H. and Lennarz, W.J. "Isolation of a Glycopeptide Fraction From Surface of the Sea Urchin Egg that Inhibits Sperm-Egg Binding and Fertilization" Journal of Cell Biology. 91 . 325 - 331, 1981.

Lehinger, A.L. Biochemistry 2nd ed. New York Worth 1975 110 p.

Peterson, R.N. and others. "The Interaction of Living Boar Sperm and Sperm Plasma Membrane Vesicle with the Porcine Zona - Pellucida" Developmental Biology. 84 : 144 - 156, 1981.

Philips, D.M. and Shalgi, R.M. "Surface Properties of the Zona Pellucida" The Journal of Experimental Zoology. 213 : 1 - 8, 1980.

Rossignol, D.P. Roschelle A.J. and Lennarz, W.J. "Sperm - Egg Binding : Identification of a Species-Specific Sperm Receptor From Strongylocentrotus purpuratus" The Journal of Supramolecular Structure and Cellular Biochemistry. 15 : 347 - 358, 1981.

Rosati, F. and Santos, R.D. "Role of the Surface Carbohydrates in Sperm-Egg Interaction in Ciona intestinalis" Nature. 283 . 762 - 764, 1980.

Sailing, P.M. Sowinski, J. and Storoy, B.T. "An Ultrastructural Study of Epididymal Mouse Spermatozoa Binding to Zona Pellucida In Vitro Sequential Relationship to the Acrosome Reaction" Journal Experimental Zoology. 209 . 229 - 238, 1979.

Sailing, P.M. and Storoy, B.T. "Mouse Gamete Interaction During Fertilization In Vitro" Journal Cell Biology. 83 544 - 555, 1979.

Shur, B.D. and Hall, N.G. "Sperm Surface Galactosyltransferase Activities During In Vitro Capacitation" The Journal of Cell Biology. 95(2) . 567 - 573, 1982.

Shur, B.D. and Hall, N.C. "A Role For Sperm Surface Galactosyltransferase in Sperm Binding to the Egg Zona Pellucida" The Journal of Cell Biology. 95 . 574 - 579, 1982.

Steel, R.G.D. and Torrie, J.H. Principles and Procedures of Statistics Mc Graw-Hill Book Co. London, 1960, 481 p.

- Swenson, C.E. and Dunbar, B.S. "Specificity of Sperm Zona Interaction" The Journal of Experimental Zoology. 219 : 97 - 104, 1982.
- Swenson, C.E. Wood, D.M. and Dunbar, B.S. "Intraspecies Variation of Sperm-Zona Interaction in Vitro Scanning Electron Microscopy, Zona Radiolabelling and Two Dimensional Gel Electrophoresis Studies." Journal Cell Biology. 91 : 183a, 1981.
- Talbot, P. and Chacon, R.S. "Ultrastructure Observation on Binding and Membrane Fusion Between Human Sperm and Zona Pellucida-Free Hamster Oocytes" Fertility and Sterility. 37(2) : 240 - 248, 1982.
- Vacquier, V.D. and Moy, G.W. "Isolation of Bindin . The Protein Responsible for Adhesion of Sperm to Sea Urchin Egg" Proceeding Natural Academic Science U S A. 74 : 2456 - 2460, 1977.
- Yanagimachi, R. "Sperm - Egg Association in Mammals" Current Topics in Developmental Biology. 12 : 83 - 105, 1978.
- Yanagimachi, R. and Noda, Y.D. "Ultrastructure Changes in the Hamster Sperm Head During Fertilization" Journal Ultrastructural Research. 31 : 465 - 485, 1970.
- Yanagimachi, R. Yanagimachi, H. and Rogers, B.J. "The Use of Zona-Free Animal Ova a Test System for the Assessment of Fertilizing Capacity of Human Spermatozoa" Biology of Reproduction. 15 : 471, 1976.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ส่วนประกอบของสารละลายไทโรคส์และ BWW

ส่วนประกอบของสารละลายไทโรกส์ และ BWB

สารเคมี	โมติฟายน์ ไทโรกส์ g/100 ml	โมติฟายน์ BWB g/100 ml
NaCl	0.67	0.555
KCl	0.222	0.036
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.226	0.019
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.01	—
KH_2PO_4	—	0.017
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.005	—
Glucose	0.1	0.1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	—	0.03
NaHCO_3	0.1	0.211
Sodium Pyruvate	0.0028	0.0028
Sodium lactate	0.368	0.368
Bovine serum albumin	0.1	0.1

ภาคผนวก ข

อัตราการปิดจับของสเปิร์มกับไข่ที่มีโซนาเพอซิทาในสารละลาย BWW ที่มีน้ำตาลชนิดต่าง ๆ
5 ชนิด ที่ความเข้มข้น 4 ระดับ

อัตราการยึดจับของสเปิร์มกับไข่ที่มีโซนาเพลูซิกา ในสารละลาย BWB ที่มีน้ำตาลชนิดต่าง ๆ 5 ชนิด ที่ความเข้มข้น 4 ระดับ และกลุ่มควบคุม

ชนิดของน้ำตาล	ความเข้มข้น (mM)	จำนวนไข่	$\bar{X}$ ของการยึดจับของสเปิร์มต่อไข่ 1 ใบ	SD
เอ็น-อะซิติด-ดี-กลูโคซามีน	10	30	9.16	2.00
	25	26	6.15	1.77
	50	28	4.57	1.36
	100	29	2.00	1.32
กลุ่มควบคุม	—	23	28.04	4.27
ดี-แมนโนส	10	23	20.73	4.54
	25	23	23.08	3.25
	50	22	26.77	4.28
	100	19	10.36	3.07
กลุ่มควบคุม	—	21	29.85	3.36
ดี-กาแลคโทส	10	25	15.20	3.35
	25	23	12.65	2.69
	50	24	12.25	2.76
	100	26	4.34	1.97
กลุ่มควบคุม	—	26	23.19	3.76
แอล-ฟูโรส	10	25	21.80	4.07
	25	22	21.50	2.88
	50	22	27.09	2.57
	100	26	11.07	3.01
กลุ่มควบคุม	—	26	28.46	2.37
กรกไซอะลิก	0.5	33	10.96	2.91
	2	29	11.72	2.17
	5	25	10.04	1.98
	10	27	6.92	2.47
กลุ่มควบคุม	—	29	27.89	3.57

ภาคผนวก ค

อัตราการบีบจับของสเปิร์มกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพอซิทิกา ในสารละลาย BWW ที่มีน้ำตาล
ชนิดต่าง ๆ 5 ชนิด ที่ความเข้มข้น 4 ระดับ

อัตราการยึดจับของสเปิร์มกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพลกติก ในสารละลาย BW
ที่มีน้ำตาลชนิดต่าง ๆ 5 ชนิด ที่ความเข้มข้น 4 ระดับ และกลุ่มควบคุม

ชนิดของน้ำตาล	ความเข้มข้น (mM)	จำนวนไข่	$\bar{X}$ ของการยึดจับของสเปิร์มต่อไข่ 1 ใบ	SD
เอ็น-อะซิทิล-ดี-กลูโคซามีน	10	32	10.31	1.58
	25	29	9.75	2.34
	50	35	5.05	1.86
	100	29	2.65	2.25
กลุ่มควบคุม	—	29	20.24	2.53
ดี-แมนโนส	10	33	8.72	1.76
	25	30	10.26	3.30
	50	33	9.12	2.67
	100	32	7.12	2.38
กลุ่มควบคุม	—	31	22.74	2.72
ดี-กาแลคโทส	10	36	17.19	2.55
	25	30	14.16	3.57
	50	35	11.34	2.62
	100	34	8.41	1.95
กลุ่มควบคุม	—	31	24.45	3.33
แอล-ฟูโรส	10	34	15.26	2.70
	25	34	15.52	3.47
	50	32	14.75	2.70
	100	30	11.86	2.37
กลุ่มควบคุม	—	34	24.55	2.91
กรโคไซอะลิก	0.5	36	16.47	4.72
	2	27	14.48	2.99
	5	25	6.76	1.76
	10	32	4.53	1.86
กลุ่มควบคุม	—	28	23.71	2.03

ภาคผนวก ง

อัตราการยึดจับของสเปิร์มกับไข่ที่มีโซนาเพอซิทาในสารละลาย BWW ภายหลังจากไข่
ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ 3 ชนิด

อัตราการบีดจับของสเปิร์มกับไข่ที่มีโซนาเพลูซิกา ในสารละลาย BWB
 ภายหลังจากไข่อุทกย่อยด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด และกลุ่มควบคุม

ชนิดของเอนไซม์	ความเข้มข้น (U)	จำนวนไข่	$\bar{X}$ ของการบีดจับ	SD
เบตา-เอิน-อะซิทิล- คิกลูโคซามินิเดส	0.5	36	8.96	1.96
กลุ่มควบคุม	—	36	25.00	2.36
นิวรามินิเดส	0.5	38	13.52	2.88
กลุ่มควบคุม	—	42	25.64	2.63
เบตา-กาแลคโตซิเดส	1	57	16.91	2.31
กลุ่มควบคุม	—	40	17.20	2.21

ภาคผนวก จ

อัตราการยืักจับของสเปิร์มกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพดูชิตา ในสาร์ละลาย BWFW ภายหลังจาก
ไข่ถูกบ่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ 3 ชนิด

อัตราการยักจับของสเปิร์มกับไข่ที่ไม่มีโซนาเพอคูริกา ในสารละลาย BWB
 ภายหลังจากไข่อุก่อด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ 3 ชนิด และกลุ่มควบคุม

ชนิดของเอนไซม์	ความเข้มข้น (U)	จำนวนไข่	$\bar{X}$ ของการยักจับ	SD
เบตา-เอ็น-อะมิเลส- ดี-กลูโคซามินิเลส	0.5	34	1.58	1.36
กลุ่มควบคุม	—	27	8.85	2.09
นิวรามินิเลส	0.5	26	4.07	2.41
กลุ่มควบคุม	—	28	7.60	1.98
เบตา-กาแลคโตซิเลส	1	37	19.35	3.91
กลุ่มควบคุม	—	25	14.52	3.31