บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการลดพันธะ disulfide ของหมู่ thiol ใน protamine ของอสุจิที่บ่มด้วย DTBA และ DTT โดยตรวจสอบการเกิด pronuclear การเจริญของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซีสหลังจากฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่โค (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) และอัตราการเกิด ploidy ในตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส การศึกษานี้แบ่งออกเป็น 5 การทดลอง

การทดลองที่ 1: เพื่อตรวจสอบความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมของ DTBA ต่อการลดระดับพันธะไดซัลไฟต์ นำน้ำเชื้อโคแช่แข็งมาทำละลาย แล้วทำ swim up ในน้ำยา TALP เพื่อคัดเลือกตัวอสุจิที่มีชีวิต จากนั้นนำตัวอสุจิมาบ่มใน 5 mM DTT หรือ DTBA ในความเข้มข้น 0, 2.5, 5 และ 10 mM ในช่วงเวลา 5, 20, 60 หรือ 120 นาที กลุ่มที่ไม่ได้บ่มตัวอสุจิในสารใดๆเป็นกลุ่มควบคุม ตรวจสอบอัตราการลดพันธะไดซัลไฟต์ด้วยวิธีการย้อม acridine orange จากการทดลองพบว่า ตัวอสุจิที่บ่มด้วย DTBA เพิ่มเปอร์เซ็นต์การลดพันธะไดซัลไฟต์ได้ในทุกความเข้มข้น และทุกระยะเวลา ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ประสิทธิภาพในการลดพันธะไดซัลไฟต์ของตัวอสุจิที่บ่มด้วย DTBA ไม่แตกต่างกับกลุ่มที่บ่มด้วย DTT ยกเว้นกลุ่มของตัวอสุจิที่บ่มด้วย 2.5 mM DTBA นาน 2 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการลดพันธะไดซัลไฟต์ต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การทดลองที่ 2: เพื่อตรวจสอบผลของ DTBA และ DTT ต่อคุณภาพ และความเป็นพิษของตัวอสุจิ เตรียมน้ำเชื้อโคเหมือนกับการทดลองที่ 1 แล้วนำอสุจิมาบ่มด้วย 5 mM DTT นาน 20 นาที และ 5 mM DTBA นาน 5 นาที กลุ่มที่ไม่ได้บ่มตัวอสุจิในสารใดๆเป็นกลุ่มควบคุม แล้วตรวจสอบอัตราการเพิ่มขึ้นของ free thiol ด้วยการย้อม monobromobimane (mBBr) ตรวจสอบความมีชีวิตของตัวอสุจิด้วยการย้อม Eosin และ Nigrosin และตรวจสอบ DNA fragmentation ด้วยวิธี TUNEL assay จากการทดลองพบว่า ตัวอสุจิที่บ่มด้วย DTBA และ DTT มีเปอร์เซ็นต์ free thiol ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เปอร์เซ็นต์ free thiol ของสองกลุ่มนี้สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตัวอสุจิที่มีชีวิตในกลุ่มที่บ่มด้วย DTBA ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนกลุ่มที่บ่มด้วย DTT ลดอัตราตัวอสุจิที่มีชีวิตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ตัวอสุจิที่มี DNA fragmentation ของกลุ่มที่บ่มด้วย DTBA และ DTT ไม่แตกต่างกัน และสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การทดลองที่ 3: ตรวจสอบผลของ DTBA และ DTT ต่อการเกิด pronuclear เตรียมน้ำเชื้อโคเหมือนกับการทดลองที่ 2 แล้วนำอสุจิไปไว้ในน้ำยา 10% polyvinylpyrrolidone (PVP) สำหรับการทำ ICSI เข้าในไข่โคที่นำมาเลี้ยงให้สุกในหลอดแก้ว หลังจากทำ ICSI 18 ชั่วโมง นำไข่ไป fix และย้อมด้วย aceto-orcein เพื่อตรวจดูการเกิด pronuclear จากการทดลองพบว่า อัตราของไข่ที่ถูก activated ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกกลุ่มที่บ่มตัวอสุจิด้วย DTBA และ DTT กลุ่มควบคุม และกลุ่มฉีดปลอม เปอร์เซ็นต์ของการสร้าง pronuclear ไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่บ่ม ด้วย DTBA, DTT และกลุ่มควบคุม การสร้าง 2 PN ของกลุ่มที่บ่มด้วย DTBA มีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มควบคุม

การทดลองที่ 4: ตรวจสอบผลของ DTBA และ DTT ต่อการเจริญของตัวอ่อนโคหลังทำ ICSI ทำการทดลองเหมือนการทดลองที่ 3 หลังจากทำ ICSI 12 ชั่วโมง นำไข่ไปเลี้ยงในหลอดแก้วนาน 7 วัน เพื่อตรวจสอบอัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซีส จากการทดลองพบว่า อัตราการเกิด second polar body ในกลุ่มที่บ่มด้วย DTT และ DTBA สูงกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มฉีดปลอมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อัตราตัวอ่อนเจริญถึงระยะบลาสโตซีสของกลุ่มที่บ่มด้วย DTBA สูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่กลุ่มที่บ่มด้วย DTT ได้ตัวอ่อนเจริญถึงระยะบลาสโตซีสไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

การทดลองที่ 5: ตรวจสอบผลของ DTBA และ DTT ต่อการเกิด ploidy ของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส ทำการทดลองเหมือนการทดลองที่ 4 นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสไป fix บนสไลด์แก้ว แล้วย้อมด้วย Hoechst 33342 จากนั้นนำไปส่องใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ จากการทดลองพบว่าตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสมีเปอร์เซ็นต์ของ diploid ลดลงในกลุ่มฉีดปลอมเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น นอกจากนี้กลุ่มฉีดปลอมเป็น haploid ที่สูงกว่ากลุ่ม DTBA DTT และกลุ่มควบคุมแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างของการเกิด haploid ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่บ่มตัวอสุจิด้วย DTT และ DTBA ไม่พบความแตกต่างของตัวอ่อนที่โครโมโซมผิดปกติ (mixoploidy และ polyploidy) ในทุกกลุ่มของการทดลอง

จากผลการทดลองทั้งหมด สรุปได้ว่าการบ่มตัวอสุจิด้วย DTT และ DTBA สามารถลดพันธะไดซัลไฟต์ในอสุจิได้ การบ่มอสุจิด้วย 5 mM DTBA นาน 5 นาที เพิ่มอัตราการเจริญไปเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสหลังการทำ ICSI

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

This study aimed to examine the effects of treating bovine spermatozoa with DTBA and DTT on the reducing disulfide bond of thiol group in protamine. The pronuclear formation, embryo development to blastocyst stage after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) into in vitro matured bovine oocytes and ploidy in blastocysts were investigated. This study divided in to 5 experiments.

Experiment 1: To examine the optimum concentration and duration of DTBA on reducing disulfide bond. Frozen-thawed bovine semen were swam-up in TALP medium for selecting motile sperm. After that incubated sperm in 5mM DTT or 0, 2.5, 5 and 10 mM DTBA for 5, 20, 60 or 120 min, the non-treating sperm was served as control group. The reducing of disulfide bond in spermatozoa was examined by staining with acridine orange. The results showed that incubated sperm in all concentration of DTBA and at all period of time increased the reducing of disulfide bond which were significantly difference from control group. The efficacy of reducing of disulfide bond of sperm in DTBA group was not difference with DTT group except incubated in 2.5 mM DTBA for 2 h was significant lower than the other groups.

Experiment 2: To examine the effects of DTBA and DTT on quality and toxicity of spermatozoa. The semen was prepared the same as experiment 1 and then incubated sperm in 5 mM DTT for 20 min and 5 mM DTBA for 5 min, the non-treating sperm was served as control group. The increasing of free thiol was examined by staining with monobromobimane (mBBr). The viability of sperm was examined by staining with Eosin and Nigrosin. The DNA fragmentation was examined by TUNEL assay. The results showed that the percentage of free thiol of sperm in DTBA and DTT groups were not significant difference but significantly higher than that in control group. The sperm viability of DTBA group was not significantly difference with control group. The sperm viability of DTT group was significantly lower than that in control group. The DNA fragmentation among DTBA and DTT groups was not different and significantly higher than that control group.

Experiment 3: To examine effects of DTBA and DTT on pronuclear formation. The semen was prepared the same as experiment 2 after that placed sperm in 10% polyvinylpyrrolidone (PVP) for ICSI into in vitro matured bovine oocytes. At 18 h after ICSI, oocytes were fixed and stained with aceto-orcein and examine pronuclear formation. The results showed that the rates of oocytes activated were not significant difference in DTBA, DTT, control and sham injection groups. The rates of pronuclear formation were not

significant difference in DTBA and DTT exposed and control groups. The formation of 2 PN in DTBA treatment tended to higher than control group.

Experiment 4: To examine the effects of DTBA and DTT on embryo development after ICSI. The semen was prepared the same as experiment 3. At 12 h after ICSI, the oocytes were cultured in vitro for 7 days for examine the embryo development to blastocyst stage. The results showed that the rates of second polar body formation in DTBA and DTT groups were significantly higher than that in control and sham injection groups. The blastocyst rates of DTBA group were significant higher than the other groups. Whereas the blastocyst rates in DTT group were not different with control group.

Experiment 5: To examine the effects of DTBA and DTT on ploidy of blastocysts. The semen was prepared the same as experiment 4. The blastocysts were fixed on glass slide and stained with Hoechst 33342 then examined under fluorescence microscope. The results showed that percentage of diploid in blastocysts decreased in sham injection group when compared with other groups. Furthermore, in sham injection group has haploid higher than DTBA, DTT and control group but did not significant difference. Whereas no difference of haploid among DTBA, DTT and control group. The abnormal chromosome (mixploidy and polyploidy) was not significant difference in all groups.

From all experiments can be concluded that treated sperm with DTBA and DTT could reduce disulfide bond. The development of embryos to blastocyst stage after ICSI was improved when treated sperm with 5 mM DTBA for 5 min.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี