



รายงานการวิจัย

ผลของสารบำบัดตัวอสุจิต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคที่ได้จากการฉีดตัวอสุจิ
เข้าไปในไซโทพลาซึมของไข่โค

Effect of sperm pre-treatment on the developmental competence
of bovine embryos derived from intracytoplasmic sperm injection

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความลับของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

ผลของสารบำบัดตัวอสุจิต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคที่ได้จากการฉีดตัวอสุจิ
เข้าไปในไซโทพลาซึมของไข่โค

Effect of sperm pre-treatment on the developmental competence
of bovine embryos derived from intracytoplasmic sperm injection

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รศ. ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

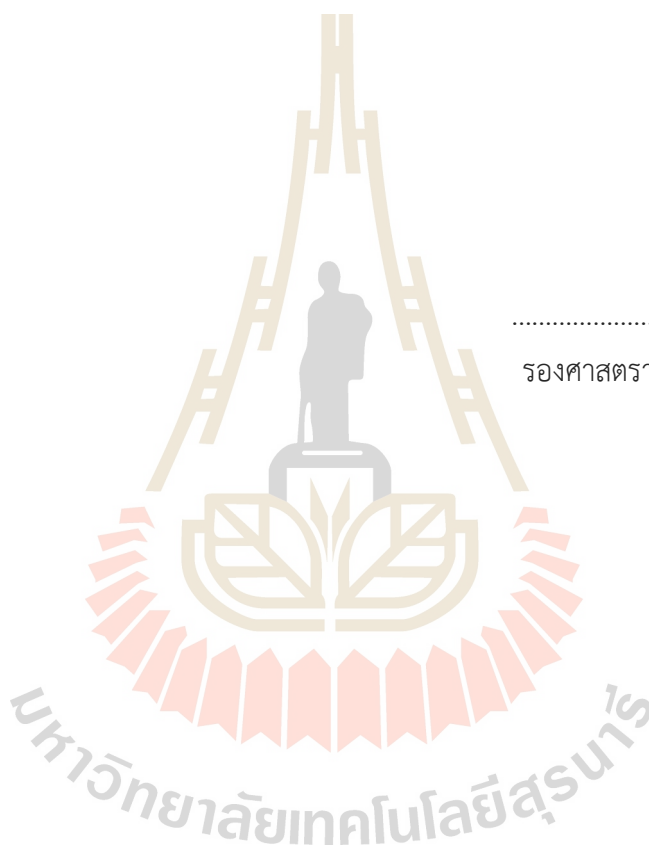
ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2556

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน 2561

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากการวิจัยจากมหาวิทยาลัยสุรนารี ปีงบประมาณ 2558-2559 คณะวิจัยขอขอบคุณสมาชิกศูนย์วิจัยเทคโนโลยีตัวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้รายงานการวิจัยนี้ดำเนินไปได้เป็นอย่างดี และสำเร็จลุล่วง ขอขอบคุณโรงพยาบาลสัตว์รังสิต อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี รวมทั้งโรงพยาบาลพระพุทธบาท จ.สระบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์รังไข่โค



.....
รองศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย

หัวหน้าโครงการ

กันยายน 2561

บทคัดย่อ

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

การทดลองที่ 1: เพื่อตรวจสอบความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมของ DTBA ต่อการลดระดับพันธะไดซัลไฟด์ นำน้ำเชื้อโคแ่งแข็งมาทำละลาย 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 ตรวจสอบอัตราการลดพันธะไดซัลไฟด์ด้วยวิธีการย้อม acridine orange จากการทดลองพบว่า ตัวอสุจิที่บ่มด้วย DTBA เพิ่มเปอร์เซ็นต์การลดพันธะไดซัลไฟด์ได้ในทุกความเข้มข้น และทุกระยะเวลา ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ประสิทธิภาพในการลดพันธะไดซัลไฟด์ของตัวอสุจิที่บ่มด้วย DTBA ไม่แตกต่างกับกลุ่มที่บ่มด้วย DTT ยกเว้นกลุ่มของตัวอสุจิที่บ่มด้วย 2.5 mM DTBA นาน 2 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการลดพันธะไดซัลไฟด์ต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

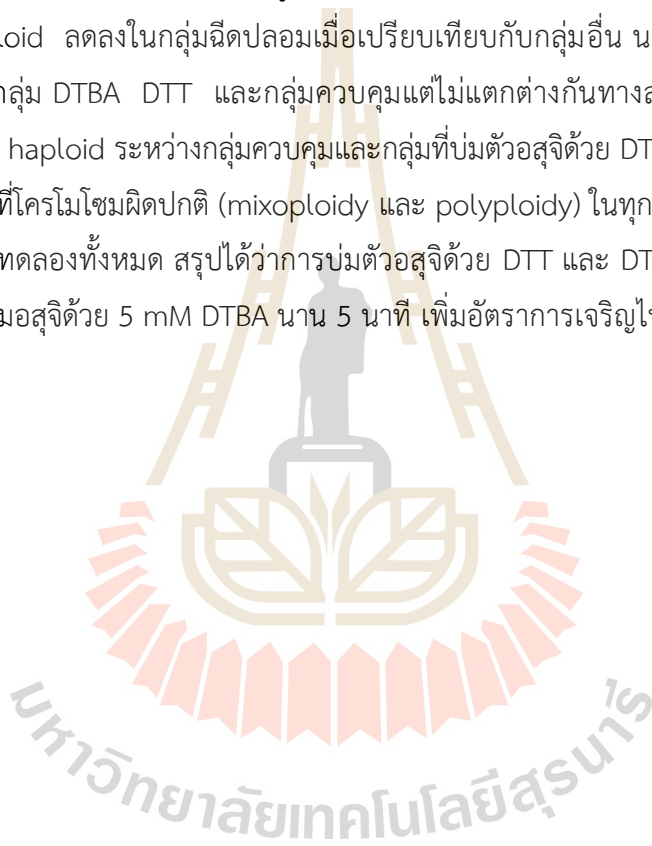
การทดลองที่ 2: เพื่อตรวจสอบผลของ DTBA และ DTT ต่อคุณภาพ และความเป็นพิษของตัวอสุจิ เตรียมน้ำเชื้อโคเหมือนกับการทดลองที่ 1 แล้วนำอสุจิมาบ่มด้วย 5 mM DTT นาน 20 นาที และ 5 mM DTBA นาน 5 นาที กลุ่มที่ไม่ได้บ่มตัวอสุจิในสารใดๆเป็นกลุ่มควบคุม แล้วตรวจสอบอัตราการเพิ่มขึ้นของ free thiol ด้วยการย้อม monobromobimane (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) สำหรับการทำให้ ICSI เข้าในไซโทที่นำมาเลี้ยงให้สุกในหลอดแก้ว 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 เพื่อตรวจสอบอัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซิสต์ จากการทดลองพบว่า อัตราการเกิด second polar body ในกลุ่มที่บ่มด้วย DTT และ DTBA สูงกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มฉีดปลอมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อัตราตัวอ่อนเจริญถึงระยะบลาสโตซิสต์ของกลุ่มที่บ่มด้วย DTBA สูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่กลุ่มที่บ่มด้วย DTT ได้ตัวอ่อนเจริญถึงระยะบลาสโตซิสต์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

การทดลองที่ 5: ตรวจสอบผลของ DTBA และ DTT ต่อการเกิด ploidy ของตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ ทำการทดลองเหมือนการทดลองที่ 4 นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ไป fix บนสไลด์แก้ว แล้วย้อมด้วย Hoechst 33342 จากนั้นนำไปส่องใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ จากการทดลองพบว่าตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์มีเปอร์เซ็นต์ของ diploid ลดลงในกลุ่มฉีดปลอมเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น นอกจากนี้กลุ่มฉีดปลอมเป็น haploid ที่สูงกว่ากลุ่ม DTBA DTT และกลุ่มควบคุมแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างของการเกิด haploid ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่บ่มตัวอ่อนด้วย DTT และ DTBA ไม่พบความแตกต่างของตัวอ่อนที่โครโมโซมผิดปกติ (mixoploidy และ polyploidy) ในทุกกลุ่มของการทดลอง

จากผลการทดลองทั้งหมด สรุปได้ว่าการบ่มตัวอ่อนด้วย DTT และ DTBA สามารถลดพันธะไดซัลไฟด์ในอสุจิได้ การบ่มอสุจิด้วย 5 mM DTBA นาน 5 นาที เพิ่มอัตราการเจริญไปเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์หลังการทำ ICSI



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.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	1
1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย	2
1.6 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย	2
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม	3
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	5
3.1 สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล	5
3.2 การทดลองที่ 1 ศึกษาหาความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมของ DTBA ต่อ พันธะไดซัลไฟด์	5
3.3 การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของสารลดพันธะไดซัลไฟด์ต่อคุณภาพและความเป็นพิษ ของตัวอสุจิ	5
3.4 การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของ DTBA และ DTT ต่อการฟอร์ม pronuclear	7
3.5 การทดลองที่ 4 ศึกษาผลของ DTBA และ DTT ต่อการเจริญของตัวอ่อนหลังจาก ฉีดอสุจิเข้าไปในไข่โค	8
3.6 การทดลองที่ 5 ศึกษาผลของ DTBA และ DTT ต่ออัตราการเกิด ploidy ของ บลาสโตซิส	8
3.7 สถิติที่ใช้ในการวิจัย	9

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลอง	10
4.1 ผลการทดลอง	10
4.1.1 ผลการทดลองที่ 1 ผลของการบ่มตัวอสุจิด้วย DTBA ที่ความเข้มข้นและระยะเวลา ต่างๆต่อพันธะไดซัลไฟด์	10
4.1.2 ผลการทดลองที่ 2 ผลของสารลดพันธะไดซัลไฟด์ต่อคุณภาพความเป็นพิษของตัว อสุจิ	10
4.1.3 ผลการทดลองที่ 3 ผลของการบ่มด้วยสารลดพันธะไดซัลไฟด์ต่อการสร้าง pronuclear	12
4.1.4 ผลการทดลองที่ 4 ผลของการบ่มตัวอสุจิด้วยสารลดพันธะไดซัลไฟด์ต่อการ เจริญเติบโตของตัวอ่อนโคหลังฉีดอสุจิเข้าไปในไข่โค	12
4.1.5 ผลการทดลองที่ 5 ผลการทดลองที่ 5 ผลของการบ่มตัวอสุจิด้วยสารลดพันธะ ไดซัลไฟด์ต่อ ploidy ของบลาสโตซิสหลังฉีดอสุจิเข้าไปในไข่โค	13
4.2 วิจารณ์ผลการทดลอง	17
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	20
บรรณานุกรม	21
ภาคผนวก ก	
ประวัติผู้วิจัย	23
ผลงานตีพิมพ์	35

สารบัญตาราง

เรื่อง	หน้า
ตารางที่ 1 ผลของสารบ่มอสุจิ 5 mM DTT นาน 20 นาที และ 5 mM DTBA นาน 5 นาที ต่อกลุ่ม free thiol อัตรารอดของอสุจิ และ DNA fragmentation ของอสุจิ	11
ตารางที่ 2 ผลของสารบ่มอสุจิของ 5 mM DTT นาน 20 นาที และ 5 mM DTB นาน 5 นาทีต่อการสร้าง pronuclear	12
ตารางที่ 3 ผลของสารบ่มอสุจิของ 5 mM DTT นาน 20 นาที และ 5 mM DTBA นาน 5 นาทีต่อการเจริญของตัวอ่อนโคหลังฉีดอสุจิเข้าไปในไข่	14
ตารางที่ 4 ผลของโครโมโซมของบลาสโตซิสหลังฉีดอสุจิเข้าไปในไข่โคเปรียบเทียบกับระหว่างกลุ่มที่บ่มด้วย 5 mM DTT นาน 20 นาที และ 5 mM DTBA นาน 5 นาที	15
ตารางที่ 5 ความสามารถในการ hatching ของบลาสโตซิสหลังบ่มด้วย 5 mM DTT นาน 20 นาที และ 5 mM DTBA นาน 5 นาทีและฉีดอสุจิเข้าไปในไข่โค	16
ตารางที่ 6 ผลของบ่มด้วย 5 mM DTT นาน 20 นาที และ 5 mM DTBA นาน 5 นาทีต่อจำนวนเซลล์ของบลาสโตซิส	16



สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 แสดงประสิทธิภาพในการลดพันธะไดซัลไฟด์ของสาร DTBA และ DTT ที่ความเข้มข้น และระยะเวลาต่างๆ	10
---	----



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่เป็นเทคโนโลยีการเจริญพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษากลไกของการปฏิสนธิและการเจริญเติบโตของตัวอ่อน ซึ่งมีการใช้อย่างแพร่หลายทั่วโลกในการแก้ปัญหาในระบบสืบพันธุ์ในมนุษย์ นอกจากนี้ยังมีการใช้แก้ไขปัญหาคอนดิชันนิ่งในปศุสัตว์ อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ยังมีข้อจำกัดบางประการ ประการแรกคือจำเป็นต้องมีการกระตุ้นไขโคหลังจากฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่จึงจะทำให้ไข่แบ่งตัวได้ ทำได้โดยการกระตุ้นด้วยสารเคมี และประการที่สองคือ การขาดตัวของโครมาตินในนิวเคลียสตัวอสุจิ ซึ่งทำได้โดยใช้สารเคมีเช่น Dithiothreitol (DTT) เพื่อลดพันธะ Disulfide ในโปรตามีน ซึ่งเป็นที่แพร่หลายในปัจจุบัน แต่ผลการทดลองยังไม่เป็นที่น่าพอใจ ต่อมามีการค้นพบสารเคมี Dithiothreitol (DTBA) ซึ่งมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับ DTT แต่มีประสิทธิภาพในการลดพันธะ Disulfide ได้มากกว่า แต่ยังไม่มียางานการทดลองใช้ DTBA ในการบ่มตัวอสุจิ จึงได้นำสารเคมี DTBA มาทำการทดลองเพื่อเปรียบเทียบกับ DTT

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1. เพื่อศึกษาความเป็นพิษของ DTBA และ DTT ต่อตัวอสุจิ
- 1.2.2. เพื่อศึกษาความแตกต่างในการลดพันธะ disulfide ของหมู่ thiol ใน protamine ระหว่างกลุ่มที่ทดสอบด้วย DTBA และ DTT
- 1.2.3. เพื่อศึกษาการเกิด DNA fragmentation ระหว่างกลุ่มที่ทดสอบด้วย DTBA และ DTT
- 1.2.4. เพื่อศึกษาผลของ DTBA ต่อการเกิด sperm decondensation และการสร้าง male pronucleus
- 1.2.5. เพื่อเปรียบเทียบผลของการเจริญเติบโตของตัวอ่อนจนถึงระยะบลาสโตซิส ระหว่างกลุ่มที่ทดสอบด้วย DTBA และ DTT
- 1.2.6. เพื่อแยกความแตกต่างของการ fertilization และการเกิด parthenogenesis ระหว่างกลุ่ม DTBA และ DTT ด้วยวิธีการ blastocyst karyotyping

1.3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

นำอสุจิที่บ่มใน DTBA หรือ DTT มาศึกษาการเกิด sperm decondensation และความเป็นพิษโดยการย้อมสี จากนั้นทำการฉีดอสุจิที่บ่มใน DTBA หรือ DTT เข้าไปในไขโคคุณภาพดีที่ถูกเลี้ยงให้สุกในหลอดแก้ว นำไข่ที่ถูกฉีดตัวอสุจิมาตรวจการปฏิสนธิโดยการย้อม pronucleus นอกจากนี้นำไข่ที่ถูกฉีดตัวอสุจิมาศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนจนถึงระยะบลาสโตซิสและคุณภาพของตัวอ่อนที่ได้

1.4. ทฤษฎี สมมติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย (Conceptual Framework)

อสุจิที่บ่มใน DTBA สามารถเกิด sperm decondensation ได้ดีเมื่อเทียบกับกลุ่มที่บ่มใน DTT นอกจากนี้การฉีดอสุจิที่บ่มใน DTBA สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้าง male pronucleus และการเจริญเติบโตของตัวอ่อนจนถึงระยะบลาสโตซิสได้ดีเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

1.5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมและระยะเวลาที่บ่มตัวอสุจิใน DTBA รวมทั้งได้ตัวอ่อนโคปริมาณมาก และคุณภาพดีจากการฉีดตัวอสุจิที่บ่มใน DTBA นำข้อมูลที่ได้ไปเสนอผลงานวิชาการในระดับนานาชาติ มีผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติอย่างน้อย 1 ฉบับ

1.6. แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

องค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาวิจัยนี้ จะสามารถนำไปถ่ายทอดให้ให้กับนักวิจัยในหน่วยงานต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการผลิตตัวอ่อนโค เช่น กรมปศุสัตว์ นักวิชาการในมหาวิทยาลัย และสถาบันวิจัยที่เกี่ยวข้องต่างๆ



บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม

การฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ (Intracytoplasmic sperm injection, ICSI) มีรายงานความสำเร็จ ครั้งแรกในหนูแฮมสเตอร์ (Uehara และ Yanagimachi, 1976) จากนั้นมีการนำมาใช้อย่างแพร่หลายจนประสบความสำเร็จได้เด็กเกิดมาตั้งแต่ปี 1992 (Palermo และคณะ, 1992) ปัจจุบันมีสัตว์หลายชนิดกำเนิดขึ้นด้วยเทคนิคนี้ เช่น กระต่าย (Hosoi และคณะ, 1988), หนูเม้าส์ (Kimura และ Yanagimachi, 1995), แกะ (Catt และคณะ, 1996), ลิง (Hewitson และคณะ, 1999), สุนัข (Martin, 2000), โค (Horiuchi และคณะ, 2002) เป็นต้น

การฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่โคเพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอต่อการกระตุ้นไข่ให้แบ่งตัวจึงมีการใช้สารเคมีในการกระตุ้นเช่น ethanol (Nagai, 1987; Hamano และคณะ, 1999; Fujinami และคณะ, 2004), Calcium ionophore (Goto, 1993), Ionomycin (Rho และคณะ, 1998), Cycloheximide (Suttner และคณะ, 2000) และ 6-dimethylaminopurine (Chung และคณะ, 2000) นอกจากนี้การขจัดตัวของโครมาตินในตัวอสุจิโดยเฉพาะในโคจะมีความคงตัวเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ชนิดอื่นๆ ซึ่งในตัวอสุจิจะมีโครมาตินขดกันแน่นด้วยพันธะ disulfide (Calvin และ Bedford, 1971; Calvin และคณะ, 1973) ดังนั้นจึงมีการทดลองต่างๆ เช่น การ immobilizing sperm (Dozortsev และคณะ, 1995) การทำให้เกิดความเสียหายต่อ membrane (การแช่แข็งและละลาย) (Kolbe และ Holtz, 1999; Horiuchi และคณะ, 2002) หรือการใช้สารเคมี DTT เพื่อลดพันธะ disulfide (Bedford และ Calvin, 1974) คุณสมบัติของ DTT นั้นจะลดลงเหลือประมาณ 1 % ที่ reactive เมื่ออยู่ใน pK_a 9.2 (Whitesides และคณะ, 1977) ดังนั้นการหาสารเคมีตัวใหม่มาทดแทน คือ DTBA ที่มี pK_a 8.2 (Lukesh และคณะ, 2012) จะมีประสิทธิภาพลดพันธะ disulfide ได้ดีกว่า DTT จากรายงานของ Lukesh และคณะ (2012) พบว่า DTBA สามารถลดพันธะ disulfide ได้ดีกว่า DTT เมื่อใช้ oxidized β -ME ที่ pH 7.0 ถึง 3 เท่า

การศึกษาที่ใช้ DTT ในการบ่มตัวอสุจินิยมทำในสุนัขและโค โดยพบว่าการบ่มตัวอสุจิจะเพิ่มอัตราการลดพันธะ disulfide ได้อย่างมีนัยสำคัญ (Watanabe และคณะ, 2009; Julianelli และคณะ, 2012; Sekhavati และคณะ, 2012) นอกจากนี้พบว่า DTT เพิ่มอัตราการแบ่งตัวและการเจริญเติบโตเป็นตัวอ่อนระยะ blastocyst ในโคได้เร็วขึ้น (Galli และคณะ, 2003) และช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์ของ 2 pronuclei (Rho และคณะ, 1998) ในกระป๋องปลักการบ่มตัวอสุจิด้วย DTT สามารถเพิ่มการสร้าง male pronucleus ได้ (Chankitisakul และคณะ, 2012) แต่การบ่มตัวอสุจิด้วย DTT นั้นส่งผลให้เกิด DNA fragmentation ในตัวอสุจิ (Sekhavati และคณะ, 2012) อย่างไรก็ตามในสุนัขนั้น การบ่มตัวอสุจิด้วย DTT ไม่เพิ่มอัตราการเจริญเติบโตสู่ระยะ blastocyst (Yong และคณะ, 2005; Tian และคณะ, 2006; Cheng และคณะ, 2009) แต่บางการศึกษาพบว่าการบ่มตัวอสุจิด้วย DTT ในสุนัขสามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนสู่ระยะ blastocyst ได้ (Watanabe และ Fukui, 2006; Watanabe และคณะ, 2009) การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1. สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

ใช้ห้องทดลองศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวอ่อนและเซลล์ต้นกำเนิด มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.2. การทดลองที่ 1 ศึกษาหาความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมของ DTBA ต่อพันธะไดซัลไฟด์

3.2.1 การเตรียมน้ำเชื้อสำหรับการศึกษาประสิทธิภาพในการลดพันธะไดซัลไฟด์

ใช้น้ำเชื้อแช่แข็งจากพ่อพันธุ์ที่มีประวัติให้อัตราการผสมติดสูง นำน้ำเชื้อโคแช่แข็งมาทำละลายโดยทิ้งในอากาศ 10 วินาที จากนั้นนำไปใส่ไว้ในน้ำอุณหภูมิ 37°C นาน 20 วินาที ตัดหลอดน้ำเชื้อใส่ในก้นหลอดที่มีน้ำยาสำหรับปฏิสนธิ (TALP) 2 ml เอียงหลอดทดลองทำมุม 45 องศาในตู้เลี้ยงตัวอ่อนนาน 30 นาที เพื่อแยกอสุจิที่ยังมีชีวิตออกจากอสุจิตาย แล้วใช้ปิเปตดูดน้ำยาส่วนบนที่มีอสุจิใส่ในหลอดที่มีน้ำยา TALP และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,100 รอบ นาน 5 นาที จากนั้นดูดน้ำยาด้านบนทิ้ง แล้วล้าง 2 รอบด้วยน้ำยา TALP 2 ml แล้วนำไปปั่นที่ 2,100 รอบ ครั้งละ 5 นาที จากนั้นนำน้ำยาที่มีอสุจิมาบ่มในสารละลาย DTT 5 mM หรือสารละลาย DTBA ในความเข้มข้นต่างๆ (0, 2.5, 5 และ 10 mM) ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน (5, 20, 60 และ 120 นาที) ล้างสารละลายออกจากอสุจิโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,100 รอบ นาน 5 นาที จากนั้นศึกษาอัตราการลดพันธะไดซัลไฟด์ด้วยวิธีการย้อม acridine orange

3.2.2 การย้อม Acridine orange

การย้อมสี Acridine orange ทำตามขั้นตอนของ Tateno และ Kamiguchi (1999) นำอสุจิที่บ่มและไม่บ่มด้วย DTT และ DTBA มาสเมียร์บนสไลด์จากนั้น fix ข้ามคืนด้วย Caynoy's solution (methanol: acetic acid, 3:1) จากนั้นนำสไลด์ขึ้นมาทิ้งไว้ให้แห้ง และย้อมด้วย 0.2% acridine orange นาน 5 นาที นำไปส่องใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ที่มีความยาวคลื่น 450-490 nm โดยสีเขียวและเหลือง แสดงถึงไม่มีการลดพันธะ disulfide ส่วนสีแดงแสดงถึงการลดพันธะ disulfide

3.3. การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของสารลดพันธะไดซัลไฟด์ต่อคุณภาพและความเป็นพิษของตัวอสุจิ

3.3.1 ศึกษาผลของสารลดพันธะไดซัลไฟด์ DTBA และ DTT ต่อกลุ่ม free thiol ของตัวอสุจิด้วยวิธี monobromobimane (mBBr)

3.3.1.1 การเตรียมน้ำเชื้อสำหรับการศึกษาประสิทธิภาพต่อกลุ่ม free thiol

ทดสอบการใช้สาร DTBA มาบ่มตัวอสุจิเพื่อลดพันธะ disulfide ในตัวอสุจิและศึกษาการเจริญเติบโตของตัวอ่อนที่เกิดจากการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่



ใช้วิธีการเดียวกับข้อ 3.2.1 หลังจากเตรียมน้ำเชื้อเสร็จ นำอสุจิมาบ่มด้วย 5 mM DTT นาน 20 นาที และ 5 mM DTBA นาน 5 นาที กลุ่มที่ไม่ได้บ่มตัวอสุจิกำหนดเป็นกลุ่มควบคุม จากนั้นศึกษาอัตราการเพิ่มของกลุ่ม free thiol ด้วยวิธี mBBr

3.3.1.2 การย้อม monobromobimane (mBBr)

นำอสุจิบ่มและไม่บ่มด้วย DTT และ DTBA มาสเมียร์บนสไลด์ จากนั้นทิ้งให้แห้ง และย้อมด้วย mBBr นาน 10 นาทีในห้องมืด จากนั้นล้างด้วย PBS 2 ครั้ง และนำไปส่องใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ที่มีความยาวคลื่น 450 nm (Shalgi และคณะ, 1989) สีฟ้า แสดงถึงการลดพันธะ disulfide

3.3.2 ศึกษาผลของสารลดพันธะไดซัลไฟด์ DTBA และ DTT ต่ออัตราการรอดของตัวอสุจิด้วยวิธี eosin and nigrosin

3.3.2.1 การเตรียมน้ำเชื้อสำหรับการศึกษาอัตราการรอดด้วยวิธี eosin and nigrosin

ใช้วิธีการเดียวกับข้อ 3.2.1 หลังจากเตรียมน้ำเชื้อเสร็จ นำอสุจิมาบ่มด้วย 5 mM DTT นาน 20 นาที และ 5 mM DTBA นาน 5 นาที กลุ่มที่ไม่ได้บ่มตัวอสุจิกำหนดเป็นกลุ่มควบคุม จากนั้นศึกษาอัตราการรอดด้วยวิธี eosin and nigrosin

3.3.2.2 การย้อม Eosin and Nigrosin (E & N)

การย้อมสี E&N ทำตามขั้นตอนของ WHO (Organization, 1999) นำอสุจิบ่มและไม่บ่มด้วย DTT และ DTBA มาผสมกับ EoNig solution ในอัตราส่วนที่เท่ากัน จากนั้นสเมียร์บนสไลด์และทิ้งให้แห้ง นำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ Eosin จะแทรกซึมเข้าไปในเซลล์ที่ตายแสดงเป็นสีชมพูเข้ม สีขาวและสีชมพูอ่อนแสดงถึงอสุจิที่รอดชีวิต

3.3.3 ศึกษาผลของสารลดพันธะไดซัลไฟด์ DTBA และ DTT ต่อ DNA fragmentation ของตัวอสุจิด้วยวิธี TUNEL assay

3.3.3.1 การเตรียมน้ำเชื้อสำหรับการศึกษา DNA fragmentation

ใช้วิธีการเดียวกับข้อ 3.2.1 หลังจากเตรียมน้ำเชื้อเสร็จ นำอสุจิมาบ่มด้วย 5 mM DTT นาน 20 นาที และ 5 mM DTBA นาน 5 นาที กลุ่มที่ไม่ได้บ่มตัวอสุจิกำหนดเป็นกลุ่มควบคุม จากนั้นศึกษา DNA fragmentation ของตัวอสุจิด้วยวิธี TUNEL assay

3.3.3.2 TUNEL assay

ศึกษาเซลล์ apoptotic โดยใช้ TUNEL assay kit (Promega, Germany) นำตัวอสุจิที่บ่มและไม่บ่มด้วย DTT และ DTBA มาสเมียร์บนสไลด์ ทิ้งให้แห้งและ fix ด้วย 4% paraformaldehyde นาน 25 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นล้างด้วย PBS และนำไปจุ่มลง 0.2% Triton X-100 นาน 5 นาที ล้างด้วย PBS 2 ครั้ง จากนั้นทำตามขั้นตอนของชุด kit

3.4. การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของ DTBA และ DTT ต่อการฟอร์ม pronuclear

3.4.1 การเตรียมไข่

เก็บรังไข่โคจากโรงฆ่าสัตว์ไว้ในน้ำเกลือ (0.9% NaCl) ขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ แล้วใช้เข็มเบอร์ 18G ต่อกับกระบอกฉีดยาขนาด 10 ซีซี ดูดไข่จากฟอลลิเคิลที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-8 mm ทำการคัดเลือกไข่ที่มีชั้นเซลล์คลุมล้อมอย่างน้อย 3 ชั้นไปเลี้ยงในน้ำยาในงานเลี้ยงเซลล์ซึ่งปิดคลุมน้ำยาด้วย mineral oil เลี้ยงในสัดส่วน 10 ใบ/50 μ l น้ำยาเลี้ยงไข่ประกอบด้วย TCM-199 ที่เติมด้วย 10% FCS, 50 IU/ml HCG, 0.02 AU/ml FSH และ 1 μ g/ml 17 β -estradiol นำไปเลี้ยงในตูบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂ นาน 23 ชั่วโมง

3.4.2 การเตรียมน้ำเชื้อสำหรับการการฉีดอสุจิเข้าในไข่โค

ใช้วิธีการเดียวกับข้อ 3.2.1 หลังจากเตรียมน้ำเชื้อเสร็จ นำอสุจิมาบ่มด้วย 5 mM DTT นาน 20 นาที และ 5 mM DTBA นาน 5 นาที กลุ่มที่ไม่ได้บ่มตัวอสุจิกำหนดเป็นกลุ่มควบคุม จากนั้นย้ายอสุจิไปไว้ในน้ำยา 10% polyvinylpyrrolidone (PVP) สำหรับการทำให้ ICSI

3.4.3 การฉีดอสุจิเข้าในไข่

นำไข่ระยะ MII จำนวนครั้งละ 10 ใบ ลงในหยดน้ำยาสำหรับฉีดอสุจิ (Injection drop; Emcare holding medium) หลังจากแยกอสุจิที่มีชีวิตออกจากที่ไม่มีชีวิตแล้วจะใส่อสุจิลงไป 1 μ l ในหยดน้ำยา 10% PVP ปริมาตร 5 μ l ทางอสุจิจะถูกปลายเข็ม ICSI (ICSI pipette) ติให้หักเพื่อไม่ให้อสุจิเคลื่อนที่ได้ จากนั้นดูดตัวอสุจิเข้ามาใน ICSI pipette โดยเริ่มดูดจากส่วนหางเข้ามาก่อน จากนั้นย้าย ICSI pipette ที่มีอสุจิเข้าไปยัง Injection drop แล้วใช้เข็มดูดจับไข่ (Holding pipette) จัดให้ตำแหน่ง 1st Polar body อยู่ที่ 6 หรือ 12 นาฬิกา จากนั้นใช้ ICSI pipette แทะทะลุผ่านเปลือกไข่ (Zona pellucida) ที่ตำแหน่ง 3 นาฬิกา แล้วดูด cytoplasm เข้ามาใน ICSI pipette เล็กน้อย จากนั้นจึงปล่อย cytoplasm และอสุจิเข้าไปในไข่ กลุ่มฉีดปลอม (sham injection) ก็ทำเช่นเดียวกัน แต่ไม่มีตัวอสุจิฉีดเข้าไปในไข่ นำไข่ที่ทำ ICSI ทั้งหมดไปกระตุ้นด้วยสารเคมีต่อไป ส่วนกลุ่มฉีดปลอม (sham injection) นั้นมีวิธีการเช่นเดียวกับการฉีดอสุจิเข้าในไข่แต่ไม่มีตัวอสุจิฉีดเข้าในไข่

3.4.4 การย้อมดู Pronucleus

หลังจาก การฉีดตัวอสุจิเข้าในไข่และการฉีดปลอม 18 ชั่วโมง นำไข่ไป fix ใน acetic acid: alcohol (1:3) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำไข่ไปย้อมใน 1% (w/v) aceto-orcein และล้างด้วย glycerol: acetic acid: water (1:1:3) และตรวจสอบการเกิด pronucleus ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ กำลังขยาย 200 เท่า ไข่ที่มี 1 male pronucleus และ 1 female pronucleus จัดอยู่ในกลุ่มที่ปฏิสนธิปกติ

3.5. การทดลองที่ 4 ศึกษาผลของ DTBA และ DTT ต่อการเจริญของตัวอ่อนหลังจากฉีดอสุจิเข้าไปในไข่โค

3.5.1 การเตรียมไข่

ใช้วิธีการเดียวกับข้อ 3.4.1

3.5.2 การเตรียมน้ำเชื้อสำหรับการการฉีดอสุจิเข้าไปในไข่โค

ใช้วิธีการเดียวกับข้อ 3.2.1 หลังจากเตรียมน้ำเชื้อเสร็จ นำอสุจิมาบ่มด้วย 5 mM DTT นาน 20 นาที และ 5 mM DTBA นาน 5 นาที กลุ่มที่ไม่ได้บ่มตัวอสุจิกำหนดเป็นกลุ่มควบคุม จากนั้นย้ายอสุจิไปไว้ในน้ำยา 10% PVP สำหรับการทำ ICSI

3.5.3 การฉีดอสุจิเข้าไปในไข่

ใช้วิธีการเดียวกับข้อ 3.4.3 หลังจากเลี้ยงไข่จนพร้อมปฏิสนธิแล้วให้นำมาฉีดอสุจิเข้าไปในไข่

3.5.4 การเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว

เมื่อครบ 12 ชั่วโมง นำไข่ที่ผ่านการทำ ICSI ไปล้างด้วยน้ำยา mSOFaa + 0.6% BSA 3 ครั้ง โดยใช้ปิเปตแก้วดูดไข่ขึ้นลงหลายๆครั้งเพื่อให้ตัวอสุจิและเซลล์คิวมูลัสที่อยู่รอบๆไข่ออกไป จากนั้นนำมาเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa + 0.6% BSA ในสัดส่วน 10-20 ใบ/100 μ l ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% O₂, 5% CO₂ และ 90% N₂ นาน 2 วัน แล้วคัดเลือกตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ ไปเลี้ยงแบบ co-culture กับเซลล์บุท่อนำไข่โค ในน้ำยา SOFaa + 0.6% BSA ในสัดส่วน 10 ใบ/100 μ l แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂ นาน 5 วัน เปลี่ยนน้ำยาทุกๆ วัน พร้อมทั้งบันทึกการเจริญเติบโตของตัวอ่อน

3.6. การทดลองที่ 5 ศึกษาผลของ DTBA และ DTT ต่ออัตราการเกิด ploidy ของตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์

3.6.1 การเตรียมไข่

ใช้วิธีการเดียวกับข้อ 3.4.1

3.6.2 การเตรียมน้ำเชื้อสำหรับการการฉีดอสุจิเข้าไปในไข่โค

ใช้วิธีการเดียวกับข้อ 3.2.1 หลังจากเตรียมน้ำเชื้อเสร็จ นำอสุจิมาบ่มด้วย 5 DTT นาน 20 นาที และ 5 mM DTBA นาน 5 นาที กลุ่มที่ไม่ได้บ่มตัวอสุจิกำหนดเป็นกลุ่มควบคุม จากนั้นย้ายอสุจิไปไว้ในน้ำยา 10% PVP สำหรับการทำ ICSI

3.6.3 การฉีดอสุจิเข้าไปในไข่

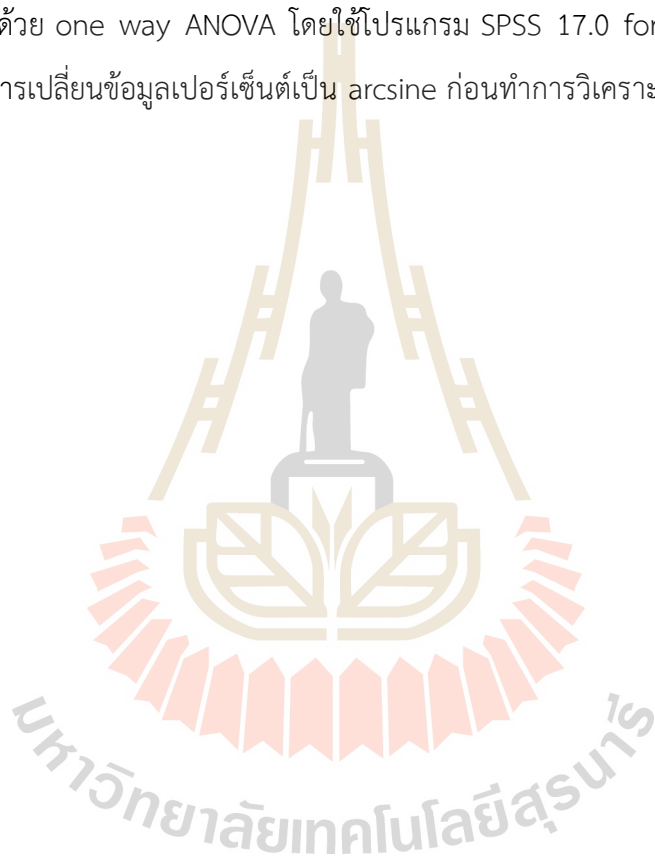
ใช้วิธีการเดียวกับข้อ 3.2.1

3.6.4 การย้อม blastocyst karyotyping

หลังจากเลี้ยงตัวอ่อนครบ 7-8 วัน นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสมาเลี้ยงในน้ำยา SOFaa + 0.6% BSA และ 100 ng/ml vinblastine sulfate นาน 17-20 ชั่วโมง จากนั้นบ่มบลาสโตซิสในน้ำยา 1% (w/v) sodium citrate นาน 15 นาที และนำตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสไปใส่ไว้ใน 0.2 ml ของน้ำยา sodium citrate ตามด้วยเติม acetic methanol ในอัตราส่วน 1:1 ลงไป 0.01 ml นำบลาสโตซิสไปวางบนสไลด์ และหยดน้ำยา acetic ลงไป 2-3 หยด ทิ้งไว้จนแห้งสนิทจึงใส่ 80% glycerol + 10 µg/ml Hoechst 33342 และปิดด้วย coverslip จากนั้นนำไปส่องใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ (405 nm excitation)

3.7 สถิติที่ใช้ในการวิจัย

วิเคราะห์ข้อมูลด้วย one way ANOVA โดยใช้โปรแกรม SPSS 17.0 for windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) ทำการเปลี่ยนข้อมูลเปอร์เซ็นต์เป็น arcsine ก่อนทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ เมื่อค่า P น้อยกว่า 0.05



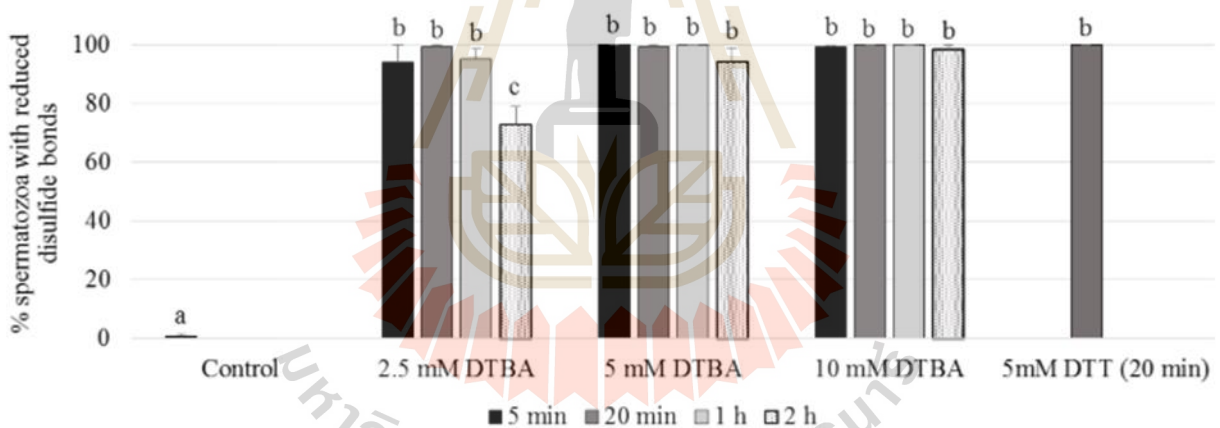
บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการทดลอง

4.1.1 ผลการทดลองที่ 1 ผลของการบ่มตัวอสุจิด้วย DTBA ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆต่อพันธะไดซัลไฟด์

จากผลการทดลองพบว่าตัวอสุจิที่บ่มด้วย DTBA เพิ่มเปอร์เซ็นต์การลดพันธะไดซัลไฟด์ได้ในทุกความเข้มข้น (2.5 mM, 5 mM และ 10 mM) ที่เวลาต่างๆ (5 นาที 20 นาที 1 ชั่วโมง และ 2 ชั่วโมง) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพในการลดพันธะไดซัลไฟด์ของตัวอสุจิที่บ่มด้วย DTBA ไม่แตกต่างกับกลุ่มตัวอสุจิที่บ่มด้วย DTT ยกเว้นกลุ่มของตัวอสุจิที่บ่มด้วย DTBA นาน 2 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 2.5 mM DTBA มีประสิทธิภาพในการลดพันธะไดซัลไฟด์ต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แสดงประสิทธิภาพในการลดพันธะไดซัลไฟด์ของสาร DTBA และ DTT ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ a, b, c ตัวอักษรบนกราฟที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)
DTT = dithiothreitol DTBA = dithiobutylamine

4.1.2 ผลการทดลองที่ 2 ผลของสารลดพันธะไดซัลไฟด์ต่อคุณภาพความเป็นพิษของตัวอสุจิ

จากผลการทดลอง 1 กลุ่มที่บ่มด้วย 5 mM DTBA นาน 5 นาทีถูกเลือกมาใช้ในการทดลองต่อไป เนื่องจากกลุ่มนี้เพิ่มเปอร์เซ็นต์ของตัวอสุจิที่ลดพันธะไดซัลไฟด์ได้และคงสถานะได้นาน 2 ชั่วโมงต่างจากกลุ่มที่

บ่มด้วย 2.5 mM DTBA ประสิทธิภาพในการลดพันธะไดซัลไฟด์จะค่อยๆลดลงเมื่อเวลาผ่านไป ในขณะที่กลุ่มที่บ่มด้วย 10 mM DTBA ส่งผลต่อความคงตัวของสารละลายซึ่งเปลี่ยนจากใสเป็นขุ่น (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

จากตารางที่ 1 ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของเปอร์เซ็นต์ที่ตัวอสุจิมียังมีกลุ่ม free thiol ของโปรตามีนเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่บ่มด้วย 5 mM DTBA และ 5 mM DTT (98.7% และ 91.7%) แต่เปอร์เซ็นต์ free thiol ของโปรตามีนของสองกลุ่มนี้สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Eosin and Nigrosin เปอร์เซ็นต์ของตัวอสุจิที่มีชีวิตในกลุ่มที่บ่มด้วย 5 mM DTBA ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (100% และ 100% ตามลำดับ) ในขณะที่กลุ่มที่บ่มด้วย 5 mM DTT ลดอัตราตัวอสุจิที่มีชีวิตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (94.7%) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$)

TUNEL assay เปอร์เซ็นต์ของตัวอสุจิที่มี DNA fragmentation ของกลุ่มที่บ่มด้วย DTBA และ DTT พบว่าไม่แตกต่างกัน (ช่วงระหว่าง 12-13.3%) และสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (0.0%, $P < 0.05$, ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลของสารบ่มอสุจิด้วย 5 mM DTT นาน 20 นาที และ 5 mM DTBA นาน 5 นาที ต่อกลุ่ม free thiol อัตรารอดของอสุจิ และ DNA fragmentation ของอสุจิ

Source of reducing agent used for pretreatment	No. of spermatozoa examined	No. (%) of spermatozoa with free thiol group (Mean \pm SEM)	No. (%) of live spermatozoa (Mean \pm SEM)	No. (%) of TUNEL-positive sperm (Mean \pm SEM)
Control (no-treatment)	300	0 (0.0 \pm 0.0 ^a)	300 (100.0 \pm 0.0 ^a)	0 (0.0 \pm 0.0 ^a)
DTT	300	275 (91.7 \pm 4.4 ^b)	284 (94.7 \pm 0.3 ^b)	36 (12.0 \pm 3.1 ^b)
DTBA	300	296 (98.7 \pm 0.7 ^b)	300 (100.0 \pm 0.0 ^a)	40 (13.3 \pm 0.9 ^b)

^{a, b, c} ตัวอักษรในแนวตั้งที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

DTT = dithiothreitol; DTBA = dithiobutylamine

4.1.3 ผลการทดลองที่ 3 ผลของการบ่มด้วยสารลดพันธะไดซัลไฟด์ต่อการสร้าง pronuclear

อัตราของไข่ที่ถูก activated ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกกลุ่มที่บ่มและไม่บ่มตัวอสุจิ และกลุ่มฉีดปลอม โดยเปอร์เซ็นต์อยู่ในช่วงระหว่าง 85.5-89.5% (ตารางที่ 2) เปอร์เซ็นต์ของการสร้าง pronuclear ไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่บ่มและไม่บ่มตัวอสุจิ อย่างไรก็ตาม การสร้าง 2 PN ของกลุ่มที่บ่มด้วย DTBA มีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P = 0.071$)

ตารางที่ 2 ผลของสารบ่มอสุจิด้วย 5 mM DTT นาน 20 นาที และ 5 mM DTB นาน 5 นาทีต่อการสร้าง pronuclear

Source of reducing agent used for pretreatment	No. of oocytes used for ICSI	No. of activated oocytes [#] (%Mean \pm SEM)	Activated oocytes with (%Mean \pm SEM)		
			2 PN	1 PN + sperm head	No sperm head visible
Control (no-treatment)	85	75 (88.2 \pm 1.2)	26 (34.5 \pm 5.5)	44 (58.7 \pm 3.3)	5 (6.8 \pm 2.8)
DTT	85	76 (89.5 \pm 1.8)	31 (40.9 \pm 2.4)	45 (59.1 \pm 2.4)	0 (0.0 \pm 0.0)
DTBA	82	70 (85.5 \pm 1.5)	35 (50.1 \pm 6.4)	33 (47.1 \pm 8.5)	2 (2.8 \pm 2.8)
*Sham injection	75	65 (86.7 \pm 1.1)	N/D	N/D	N/D

ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

[#] activated oocytes = oocytes with at least one PN

*Sham injection = the oocytes were injected without sperm.

2PN = oocytes with 2 pronuclei and no visible sperm; 1 PN +sperm = oocytes with 1 pronucleus and 1 condensed sperm.

N/D = not determined

PN = pronuclear; DTT = dithiothreitol; DTBA = dithiobutylamine

4.1.4 ผลการทดลองที่ 4 ผลของการบ่มตัวอสุจิด้วยสารลดพันธะไดซัลไฟด์ต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคหลังฉีดอสุจิเข้าไปในไซโก

จากตารางที่ 3 พบว่าอัตราการปลดปล่อย second polar body ในกลุ่มที่บ่มด้วย DTT และ DTBA สูงกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มฉีดปลอมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนี้ อัตราการแบ่งตัวของตัว

อ่อนในกลุ่มฉีดปลอม (53.0%) ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม กลุ่มที่บ่มด้วย DTT และ DTBA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (73.1%, 77.8% และ 84.1% ตามลำดับ, $P < 0.05$) ส่วนอัตราการเจริญไปเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสของ กลุ่มที่บ่มด้วย DTBA สูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในขณะที่กลุ่มที่บ่มด้วย DTT ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม และกลุ่มฉีดปลอม (8.5%) มีอัตราการเจริญไปเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต่ำที่สุด เพื่อศึกษาคุณภาพตัวอ่อนระยะบลาสโตซิส ได้มีการนับจำนวนเซลล์ และอัตราการ hatching ของแต่ละกลุ่ม การทดลองพบว่า จำนวนเซลล์และอัตราการ hatching ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 5 และ 6)

4.1.5 ผลการทดลองที่ 5 ผลของการบ่มตัวอสุจิด้วยสารลดพันธะไดซัลไฟด์ต่อ ploidy ของตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสหลังฉีดอสุจิเข้าไปในไข่โค

จากตารางที่ 4 พบว่าเปอร์เซ็นต์ของ diploid blastocyst มีจำนวนลดลงในกลุ่มฉีดปลอม (14.6%) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่บ่มและไม่ได้บ่มตัวอสุจิโดยตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสประมาณ 50% พอร์มเป็น diploid นอกจากนี้การพอร์ม haploid blastocyst ในกลุ่มฉีดปลอมมีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มควบคุม กลุ่มที่บ่มด้วย DTT และ DTBA ($P = 0.071, 0.051$ และ 0.078 , ตามลำดับ) ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่บ่มตัวอสุจิ และไม่พบความแตกต่างของตัวอ่อนที่ผิดปกติ (mixoploidy และ polyploidy) ในทุกกลุ่มของการทดลอง



ตารางที่ 3 ผลของสารป้อนสุจิด้วย 5 mM DTT นาน 20 นาที และ 5 mM DTBA นาน 5 นาทีต่อการเจริญของตัวอ่อนโคหลังฉีดอสุจิเข้าไปในไข่

Source of reducing agent used for pretreatment	No. of oocytes (%Mean±SEM)			No. of cultured oocytes cleaved (% Mean ± SEM)	No. of cultured oocytes developed to blastocyst on (% Mean ± SEM)		
	Injected	Extruded second PB	Cultured		day7	day8	day9
Control (no-treatment)	117	97 (83.0 ± 0.9 ^a)	97	71 (73.1 ± 2.7 ^a)	11 (11.4 ± 1.1 ^a)	16 (16.6 ± 2.2 ^a)	17 (17.7 ± 1.7 ^a)
DTT	117	104 (88.9 ± 0.8 ^b)	104	81 (77.8 ± 5.9 ^a)	14 (13.4 ± 1.0 ^{ab})	20 (19.2 ± 1.3 ^a)	20 (19.2 ± 1.3 ^a)
DTBA	122	108 (88.5 ± 1.7 ^b)	108	91 (84.1 ± 2.1 ^a)	22 (20.4 ± 0.5 ^b)	28 (26.0 ± 1.3 ^b)	29 (26.9 ± 1.4 ^b)
*Sham injection	125	103 (82.3 ± 2.9 ^a)	103	55 (53.0 ± 5.2 ^b)	4 (3.8 ± 1.4 ^c)	9 (8.5 ± 1.9 ^c)	9 (8.5 ± 1.9 ^c)

^{a, b, c} ตัวอักษรในแนวตั้งที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05)

*Sham injection = the oocytes were injected without sperm. Day 0 = the day of ICSI.

PB = polar body; DTT = dithiothreitol; DTBA = dithiobutylamine

ตารางที่ 4 ผลของโครโมโซมของตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสหลังฉีดอสุจิเข้าไปในไซโคเปรียบเทียบกับระหว่างกลุ่มที่บ่มด้วย 5 mM DTT นาน 20 นาที และ 5 mM DTBA นาน 5 นาที

Group	No. of blastocysts examined	No. (%) of blastocyst classified as (%Mean \pm SEM)			
		haploid	diploid	polyploid	mixoploid
Control (no-treatment)	13	3 (22.5 \pm 13.1)	6 (47.5 \pm 7.2 ^a)	1 (8.3 \pm 8.3)	3 (21.7 \pm 15.7)
DTT	14	2 (16.7 \pm 16.7)	6 (43.3 \pm 4.1 ^a)	2 (11.2 \pm 6.6)	4 (28.8 \pm 10.9)
DTBA	18	3 (24.0 \pm 11.1)	9 (50.2 \pm 10.5 ^a)	3 (14.6 \pm 8.6)	3 (11.2 \pm 6.6)
*Sham injection	10	5 (60.4 \pm 15.7)	2 (14.6 \pm 8.6 ^b)	0 (0.0 \pm 0.0)	3 (25.0 \pm 14.4)

^{a, b} ตัวอักษรในแนวตั้งที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

*Sham injection = the oocytes were injected without sperm.

DTT = dithiothreitol; DTBA = dithiobutylamine

ตารางที่ 5 ความสามารถในการ hatching ของตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสหลังบ่มด้วย 5 mM DTT นาน 20 นาที และ 5 mM DTBA นาน 5 นาทีและฉีดอสุจิเข้าไปในไข่โค

Source of reducing agent used for pretreatment	No. of blastocysts examined	Hatching on day 8 (%Mean \pm SEM)	Hatching on day 9 (%Mean \pm SEM)
Control (no-treatment)	17	7 (43.3 \pm 4.1)	11 (65.0 \pm 6.1)
DTT	20	8 (40.8 \pm 3.4)	14 (69.6 \pm 5.8)
DTBA	29	16 (56.7 \pm 2.6)	21 (71.4 \pm 9.1)
*Sham injection	9	4 (50.0 \pm 20.4)	6 (68.8 \pm 12.0)

ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

*Sham injection = the oocytes were injected without sperm.

DTT = dithiothreitol; DTBA = dithiobutylamine

Day 0 = the day of ICSI

ตารางที่ 6 ผลของการบ่มด้วย 5 mM DTT นาน 20 นาที และ 5 mM DTBA นาน 5 นาทีต่อจำนวนเซลล์ของตัวอ่อนระยะบลาสโตซิส

Source of reducing agent used for pretreatment	No. of blastocysts examined	Total cell number
Control (no-treatment)	14	120.2 \pm 16.1
DTT	15	139.3 \pm 10.6
DTBA	26	148.7 \pm 19.5
*Sham injection	8	119.0 \pm 20.9

ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

*Sham injection = the oocytes were injected without sperm.

DTT = dithiothreitol; DTBA = dithiobutylamine

4.2 วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่า การบ่มตัวอสุจิด้วยสารลดพันธะไดซัลไฟด์ DTBA เพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญของตัวอ่อนโคหลังฉีดอสุจิเข้าไปในไข่ โดยได้ทำการเปรียบเทียบความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมของการบ่มตัวอสุจิของ DTBA พบว่าที่ความเข้มข้น 5 mM DTBA บ่มนาน 5 นาที เป็นกลุ่มที่เหมาะสมที่สุดในการลดพันธะไดซัลไฟด์และมีความคงตัวเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นๆ นอกจากนี้กลุ่มที่บ่มด้วย DTT เพิ่มเปอร์เซ็นต์ของการลดพันธะไดซัลไฟด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ (Watanabe et al., 2009; Julianelli et al., 2012) จากการทดลองก่อนหน้านี้ สารลดพันธะไดซัลไฟด์ DTT ได้นำมาใช้ในขั้นตอนการบ่มตัวอสุจีก่อนฉีดอสุจิเข้าไปในไข่โคและสุกรเพื่อเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเกิด sperm decondensation (Rho et al., 1998; Tian et al., 2006; Cheng et al., 2009; Sekhavati et al., 2012; Galli et al., 2003) ของตัวอสุจิ อย่างไรก็ตาม การเกิด sperm decondensation ยังเป็นปัญหาหลักที่พบในการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่โค (Rho et al., 1998) นอกเหนือจากการ activation ของไข่ที่ไม่สมบูรณ์ ผลการทดลองนี้ยืนยันได้ว่าสาร DTBA มีประสิทธิภาพในการลดพันธะไดซัลไฟด์ได้เหมือนกับสาร DTT หลังจากบ่มตัวอสุจิ

เนื่องจากสาร DTBA เป็นสารใหม่ในการใช้เพื่อบ่มตัวอสุจิ จึงจำเป็นต้องมีการทดสอบผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นโดยทำการทดลองคุณภาพและความเป็นพิษของตัวอสุจิหลังบ่มด้วย DTBA หลังจากทำการบ่มด้วย DTT และ DTBA พบว่าตัวอสุจิส่วนใหญ่ยังมีชีวิตรอด ถึงแม้ว่าการบ่มอสุจิด้วย DTT จะเพิ่มอัตราการตายของตัวอสุจิอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่บ่มด้วย DTBA แต่พบว่าอสุจิที่รอดหลังจากบ่มด้วย DTT ยังคงสูงถึง 94.7% จากการทดลองนี้ยืนยันถึงความปลอดภัยในการใช้สารบ่มอสุจิด้วย DTT และ DTBA นอกจากนี้ยังทำการทดสอบระดับ DNA fragmentation หลังบ่มด้วย DTT และ DTBA มีรายงานว่า DNA damage ในอสุจิส่งผลต่อการปฏิสนธิและการเจริญของตัวอ่อน (Egozcue et al., 2000) อย่างไรก็ตาม การเจริญเติบโตของตัวอ่อนขึ้นกับจำนวนของ DNA damage (Borini et al., 2006; Wdowiak et al., 2015) การทดสอบด้วยวิธี TUNEL assay พบว่าการบ่มอสุจิด้วย DTT และ DTBA เพิ่มสัดส่วนของ DNA fragmentation อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sekhavati et al. (2012) อย่างไรก็ตามผลของการบ่มด้วย DTT เพิ่มเปอร์เซ็นต์ของ TUNEL positive ในอสุจิสูงถึง 90% เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองนี้ (12.0%) โดยอธิบายความแตกต่างนี้ได้จากระยะเวลาในการบ่มด้วย DTT Sekhavati et al. (2012) บ่มตัวอสุจิด้วย DTT นาน 1 ชั่วโมง ในขณะที่การทดลองนี้บ่มเพียง 20 นาทีแสดงให้เห็นว่าระยะเวลาการบ่มที่นานของ DTT ส่งผลให้ DNA fragmentation เพิ่มขึ้นซึ่งส่งผลต่อการเจริญของตัวอ่อน

ต่อมาได้ศึกษาผลของการบ่มตัวอสุจิต่อการเจริญของตัวอ่อน รายงานก่อนหน้านี้พบว่า การบ่มตัวอสุจิด้วย DTT ให้ผลที่แตกต่างกัน โดยการบ่มตัวอสุจิด้วย DTT ไม่ส่งผลต่อการเจริญของตัวอ่อนหลังฉีดอสุจิเข้าไปในไข่โคซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมา (Sekhavati et al., 2012; Galli et al., 2003) แต่ตรงข้ามกับผลของ Rho et al. (1998) นอกจากนี้การบ่มตัวอสุจิด้วย DTT ไม่สามารถเพิ่มอัตราการฟอรัม male pronuclear ซึ่งสอดคล้องกับผลรายงานของ Tian et al. (2006) แต่ตรงข้ามกับ Rho et al., (1998) และ Suttner et al. (2000) ในทางตรงกันข้ามการบ่มตัวอสุจิด้วย DTBA เพิ่มอัตราการเจริญไปเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเพิ่มแนวโน้มการปฏิสนธิที่ปกติโดยดูจากการปรากฏของ 2PN เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P = 0.071$) ถึงแม้ว่าการบ่มตัวอสุจิด้วย DTT และ DTBA จะลดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่มีกลุ่มการทดลองที่บ่มตัวอสุจิด้วย DTT และ DTBA สามารถเพิ่มการฟอรัม male pronuclear ได้ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Cheng et al. (2009) ที่พบว่าการเพิ่มขึ้นของอสุจิที่ลดพันธะไดซัลไฟด์หลังการบ่มไม่สัมพันธ์กับการสร้าง male pronuclear ซึ่งอาจอธิบายได้ว่าสารลดพันธะไดซัลไฟด์อาจส่งผลเสียต่อโครมาตินในตัวอสุจิและไม่สามารถสร้าง male pronuclear ได้ จึงอธิบายได้ว่าการสร้าง pronuclear ในวิธีฉีดอสุจิเข้าไปในไข่อาจเกิดจากกระบวนการของไข่หรือกระบวนการอื่นๆนอกเหนือไปจากพันธะไดซัลไฟด์ในตัวอสุจิ

เพื่อศึกษาการฟอรัม ploidy ของตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสหลังฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ จึงทำการย้อมด้วยวิธี chromosomal analysis พบว่าเปอร์เซ็นต์ของ haploid ของบลาสโตซิสไม่แตกต่างกันในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่บ่มตัวอสุจิ ยกเว้นกลุ่มฉีดปลอมที่มีเปอร์เซ็นต์ของ haploid บลาสโตซิสที่แนวโน้มต่ำกว่ากลุ่มอื่น นอกจากนี้ เปอร์เซ็นต์ของ diploid ของบลาสโตซิสในกลุ่มฉีดปลอมมีเปอร์เซ็นต์ต่ำกว่ากลุ่มการทดลองอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่พบว่าการบ่มด้วย DTT ไม่ส่งผลต่อ ploidy ในบลาสโตซิสของไข่โคหลังฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ (Rho et al., 1998) อย่างไรก็ตามผลการทดลองนี้ขัดแย้งกับรายงานของ Cheng et al. (2009) ที่รายงานการลดลงของ diploid บลาสโตซิสหลังบ่มตัวอสุจิด้วย DTT เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลการทดลองของโครโมโซมที่ผิดปกติ (polyploidy และ mixoploidy) พบว่าไม่แตกต่างในทุกกลุ่มการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ (Rho et al., 1998; Cheng et al., 2009) ที่พบว่าจำนวนของโครโมโซมที่ผิดปกติเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ฉีดอสุจิเข้าไปในไข่โค

จากผลการทดลองทั้งหมด สรุปได้ว่าการบ่มตัวอสุจิด้วย DTT และ DTBA สามารถลดพันธะ ไดซัลไฟด์ในอสุจิได้ และการบ่มด้วย 5 mM DTBA นาน 5 นาที เพิ่มอัตราการเจริญไปเป็นตัวอ่อนระยะ บลาสโตซิส หลังจากฉีดอสุจิเข้าไปในไข่โค นอกจากนี้ยังมีแนวโน้มเพิ่มเปอร์เซ็นต์ของการสร้าง 2 PN อย่างไรก็ตามกลไก

ของ DTBA นั้นยังไม่แน่ชัด การบ่มตัวสัจด้วย DTBA มีความปลอดภัยและใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการบ่มตัวสัจได้



บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

ในการทดลองนี้ สามารถใช้ DTBA ในการบ่มตัวอสุจีก่อนการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่โคได้เพื่อเพิ่มการพัฒนาของตัวอ่อนโคไปเป็นระยะบลาสโตซิส โดยพบว่าประสิทธิภาพในการลดพันธะไดซัลไฟด์ไม่ต่างจากสาร DTT ซึ่งเป็นที่นิยมใช้กันแพร่หลายในการบ่มอสุจิ รวมทั้งยังมีความปลอดภัยและไม่เป็นพิษต่อตัวอสุจิหลังจากการบ่มด้วย DTBA ตลอดจนคุณภาพของตัวอ่อนที่ได้หลังจากการบ่มด้วย DTBA ไม่แตกต่างจากกลุ่มการทดลองอื่นๆ การศึกษาในครั้งนี้เป็นการพัฒนาองค์ความรู้ในด้านการพัฒนาประสิทธิภาพของการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่โคได้เป็นอย่างดีและเป็นรายงานแรกที่มีการนำสาร DTBA มาใช้ในการบ่มตัวอสุจีก่อนฉีดเข้าไปในไข่โค

ผลการวิจัยนี้ได้ตีพิมพ์ในวารสาร Journal of Reproduction and Development ในปี 2016 ดังนี้ Suttirojpatana, T., Somfai, T.*, Matoba, S., Nagai, T., Parnpai, R.* and Geshi, M. 2016. Pretreatment of bovine sperm with dithiobutylamine (DTBA) significantly improves embryo development after ICSI. *J. Reprod. Dev.* 62: 577-585.

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาวิจัยต่อไปในเรื่อง

5.2.1 การย้ายฝากตัวอ่อนหลังทำการบ่มตัวอสุจิด้วยสาร DTBA และฉีดเข้าไปในไข่เพื่อศึกษาอัตราการตั้งท้อง และอัตราการคลอดจากตัวอ่อนที่ผลิตโดยการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่

5.2.2 ศึกษาอื่นที่เกี่ยวข้องกับการฝังตัวของตัวอ่อน และศึกษาความผิดปกติของยีนในกลุ่มที่ฉีดอสุจิเข้าไปในไข่ว่ามีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมหรือไม่

บรรณานุกรม

- Bedford, J. and Calvin, H. 1974. The occurrence and possible functional significance of-S-S-crosslinks in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals. *J. Exp. Zool.* 188: 137-155.
- Borini, A., Tarozzi, N., Bizzaro, D., Bonu, M.A., Fava, L., Flamigni, C., Coticchio, G. 2006. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum. Reprod.* 21: 2876-2881.
- Calvin, H. and Bedford, J. 1971. Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 13: Suppl 13: 65-75.
- Calvin, H., Yu, C. and Bedford, J. 1973. Effects of epididymal maturation, zinc (II) and copper (II) on the reactive sulfhydryl content of structural elements in rat spermatozoa. *Experimental cell research* 81: 333-341.
- Catt, S., Catt, J., Gomez, M., Maxwell, W. and Evans, G. 1996. Birth of a male lamb derived from an in vitro matured oocyte fertilised by intracytoplasmic injection of a single presumptive male sperm. *Vet. Rec.* 139: 494-495.
- Chankitisakul, V., Am-In, N., Tharasanit, T., Somfai, T., Nagai, T. and Techakumphu, M. 2012. Sperm pretreatment with dithiothreitol increases male pronucleus formation rates after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in swamp buffalo oocytes. *J. Reprod. Dev.* 59: 66-71.
- Cheng, W.M., An, L., Wu, Z.H., Zhu, Y.B., Liu, J.H., Gao, H.M., Li, X.H., Zheng, S.J., Chen, D.B., Tian, J.H. 2009. Effects of disulfide bond reducing agents on sperm chromatin structural integrity and developmental competence of *in vitro* matured oocytes after intracytoplasmic sperm injection in pigs. *Reproduction* 137: 633-643.
- Chung, J.T., Keefer, C. and Downey, B. 2000. Activation of bovine oocytes following intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Theriogenology* 53: 1273-1284.
- Dozortsev, D., Rybouchkin, A., De Sutter, P. and Dhont, M. 1995. Sperm plasma membrane damage prior to intracytoplasmic sperm injection: a necessary condition for sperm nucleus decondensation. *Hum. Reprod.* 10: 2960-2964.

- Egozcue, S., Vendrell, J.M., Garcia, F., Veiga, A., Aran, B., Barri, P.N., Egozcue, J. 2000. Increased incidence of meiotic anomalies in oligoasthenozoospermic males preselected for intracytoplasmic sperm injection. *J. Assisted. Reprod. Genet.* 17: 307-309.
- Fujinami, N., Hosoi, Y., Kato, H., Matsumoto, K., Saeki, K. and Iritani, A. 2004. Activation with ethanol improves embryo development of ICSI-derived oocytes by regulation of kinetics of MPF activity. *J. Reprod. Dev.* 50: 171-178.
- Galli, C., Vassiliev, I., Lagutina, I., Galli, A. and Lazzari, G. 2003. Bovine embryo development following ICSI: effect of activation, sperm capacitation and pre-treatment with dithiothreitol. *Theriogenology* 60: 1467-1480.
- Goto, K. 1993. Bovine microfertilization and embryo transfer. *Mol. Reprod. Dev.* 36: 288-290.
- Hamano, K., Li, X., Qian, X., Funauchi, K., Furudate, M. and Minato, Y. 1999. Gender preselection in cattle with intracytoplasmically injected, flow cytometrically sorted sperm heads. *Biol. Reprod.* 60: 1194-1197.
- Hewitson, L., Dominko, T., Takahashi, D., Martinovich, C., Ramalho-Santos, J., Sutovsky, P., Fanton, J., Jacob, D., Monteith, D. and Neuringer, M. 1999. Unique checkpoints during the first cell cycle of fertilization after intracytoplasmic sperm injection in rhesus monkeys. *Nat. Med.* 5: 431-433.
- Horiuchi, T., Emuta, C., Yamauchi, Y., Oikawa, T., Numabe, T. and Yanagimachi, R. 2002. Birth of normal calves after intracytoplasmic sperm injection of bovine oocytes: a methodological approach. *Theriogenology*. 57: 1013-1024.
- Hosoi, Y., Mitake, M., Utsumi, K. and Iritani, A. 1988. Development of rabbit oocytes after microinjection of a spermatozoa. *Proc. 11th Int. Congr. Anim. Reprod. Art. Insem.* 331.
- Julianelli, V., Farrando, B., Alvarez Sedo, C., Carvo, L., Romanato, M. and Calvo, J.C. 2012. Heparin enhances protamine disulfide bond reduction during in vitro decondensation of human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 27(7): 1930-1938.
- Kimura, Y. and Yanagimachi, R. 1995. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol. Reprod.* 52: 709-720.
- Kolbe, T. and Holtz, W. 1999. Intracytoplasmic injection (ICSI) of in vivo or in vitro matured oocytes with fresh ejaculated or frozen-thawed epididymal spermatozoa and additional calcium-ionophore activation in the pig. *Theriogenology* 52: 671-682.
- Liang, Y.Y., Ye, D.N., Laowthammathron, C., Phermthai, T., Nagai, T., Somfai, T. and Parnpai, R. 2011. Effect of chemical activation treatment on development of swamp buffalo

- (*Bubalus Bubalis*) oocytes matured in vitro and fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Reprod, Domes, Anim.* 46: 67-73.
- Lukesh, J.C., Palte, M.J. and Raines, R.T. 2012. A potent, versatile disulfide-reducing agent from aspartic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 134: 4057-4059.
- Martin, M.J. 2000. Development of in vivo-matured porcine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Biol. Reprod.* 63: 109-112.
- Nagai, T. 1987. Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes in vitro with ethanol. *Gam. Res.* 16: 243-249.
- Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., Van Steirteghem, A.C.. 1992. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *The Lancet* 340: 17-18.
- Rho, G.J., Wu, B., Kawarsky, S., Leibo, S. and Betteridge, K.J.. (1998). Activation regimens to prepare bovine oocytes for intracytoplasmic sperm injection. *Mol. Reprod. Dev.* 50: 485-492.
- Sekhavati, M.H., Shadanloo, F., Hosseini, M.S., Tahmoorespur, M., Nasiri, M.R., Hajian, M. and Nasr-Esfahani, M.H. 2012. Improved bovine ICSI outcomes by sperm selected after combined heparin-glutathione treatment. *Cell. Reprogram.* 14: 295-304.
- Shalgi, R., Seligman, J. and Kosower, N. 1989. Dynamics of the thiol status of rat spermatozoa during maturation: analysis with the fluorescent labeling agent monobromobimane. *Biol. Reprod.* 40: 1037-1045.
- Suttner, R., Zakhartchenko, V., Stojkovic, P., Müller, S., Alberio, R., Medjugorac, I., Brem, G., Wolf, E. and Stojkovic, M. 2000. Intracytoplasmic sperm injection in bovine: effects of oocyte activation, sperm pretreatment and injection technique. *Theriogenology* 54: 935-948.
- Tateno, H., and Kamigushi, Y. 1999. Dithiothreitol induces sperm nuclear decondensation and protect against chromosome damageduring male pronuclear formation in hybrid zygotes between Chinese hamster spermatozoa and Syrian hamster oocytes. *Zygote.* 7: 321-327.
- Thouas, G., Korfiatis, N., French, A., Jonesand, G., Trounson, A. 2001 Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. *Reprod. Biomed. Online* 3: 25-29.
- Tian, J.H., Wu, Z.H., Liu, L., Cai, Y., Zeng, S.M., Zhu, S.E., Liu, G.S., Li, Y. and Wu, C.X. 2006. Effects of oocyte activation and sperm preparation on the development of porcine

- embryos derived from in vitro-matured oocytes and intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*. 66: 439-448.
- Uehara, T. and Yanagimachi, R. 1976. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol. Reprod.* 15: 467-470.
- Watanabe, H. and Fukui, Y. 2006. Effects of dithiothreitol and boar on pronuclear formation and embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in pigs. *Theriogenology*. 65: 528-539.
- Watanabe, H., Akiyama, J., Uddin Bhuiyan, M.M. and Fukui, Y. 2009. Enhanced oocyte activation by intracytoplasmic injection of porcine spermatozoa pre-treated with dithiothreitol. *J. Mamm. Ova Res.* 26: 54-60.
- Whitesides, G.M., Lilburn, J.E. and Szajewski, R.P. 1977. Rates of thiol-disulfide interchange reactions between mono-and dithiols and Ellman's reagent. *J. Org. Chem.* 42: 332-338.
- World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interactions. 4th ed. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press; 1999.
- Yong, H.Y., Hong, J.Y., Kang, S.K., Lee, B.C., Lee, E.S. and Hwang, W.S. 2005. Sperm movement in the ooplasm, dithiothreitol pretreatment and sperm freezing are not required for the development of porcine embryos derived from injection of head membrane-damaged sperm. *Theriogenology*. 63: 783-794.

ประวัตินักวิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาย รังสรรค์ พาลพ่าย

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Rangsun Parnpai

2. วันเกิด 7 มีนาคม 2502

3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้

ที่ทำงาน: สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

111 ถ.มหาวิทยาลัย ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000

โทร. 044-224234 โทรสาร. 044-224154

ที่อยู่บ้าน: 51/31 หมู่ 6 ต.สุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000 โทร. 081-4706393

5. ประวัติการศึกษา

5.1. ปริญญาตรี สาขาวิชา ชีววิทยา ปีที่จบ 2523

สถาบัน มหาวิทยาลัยบูรพา ประเทศไทย

5.2. ปริญญาโท สาขาวิชา สัตววิทยา ปีที่จบ 2525

สถาบัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศไทย

Thesis title: Plasma progesterone and oestrone sulphate during early pregnancy in swamp buffalo.

5.3. ปริญญาเอก สาขาวิชา Animal Reproduction ปีที่จบ 2541

สถาบัน Kyoto University ประเทศ ญี่ปุ่น (ได้รับทุนรัฐบาลญี่ปุ่น)

Thesis title: Study on the establishment of bovine embryonic stem cells.

5.4. ฝึกอบรมสาขา Embryo transfer and *in vitro* fertilization in farm animals.

ด้วยทุน British Council สถาบัน Cambridge University, U.K. ระหว่าง ตุลาคม 2527 - กุมภาพันธ์ 2528.

5.5. สมาชิกสมาคมวิชาชีพ:

5.5.1. International Embryo Transfer Society (IETS) Since 1998

5.5.2. President International Buffalo Federation (2010-2013)

5.5.3. President Asian Buffalo Association (2010-2013)

6. ประวัติการทำงาน:

6.1 9 ธันวาคม 2525-31 ตุลาคม 2543 นักวิจัย โครงการวิจัยวิทยาศาสตร์ไทย-เนเธอร์แลนด์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ

6.2 1 พฤศจิกายน 2543-ปัจจุบัน อาจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชเทคโนโลยี การเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา

7. สาขาวิชาที่มีความเชี่ยวชาญพิเศษ

7.1 การโคลนนิ่งตัวอ่อนโค กระบือ สุกร แมว โดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบ

7.2 การย้ายฝากตัวอ่อนโค กระบือ แพะ

7.3 การปฏิสนธิในหลอดแก้วโค กระบือ

7.4 Embryonic and somatic stem cells

7.5 Cryopreservation of gametes and embryos

8. ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ ย้อนหลัง 5 ปี 2016

Suttirojattana, T., Somfai, T.*, Matoba, S., Nagai, T., **Parnpai, R.*** and Geshi, M. 2016. Pretreatment of bovine sperm with dithiobutylamine (DTBA) significantly improves embryo development after ICSI. *J. Reprod. Dev.* Accepted July 19, 2016. (IF=1.515; เป็น Correspondence)

Suttirojattana, T., Somfai, T.*, Matoba, S., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Geshi, M. 2016. Effect of medium additives during liquid storage on developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes. *Anim. Sci. J.* doi: 10.1111/asj.12623

Parnpai, R.*, Liang, Y., Ketudat-Cairns, M., Somfai, T. and Nagai, T. 2016. Vitrification of buffalo oocytes and embryos. *Theriogenology*. 86: 214-220. (IF=1.798; เป็น Correspondence)

Ye, D., Li, T., Heraud, P. and **Parnpai, R.*** 2016. Effect of chromatin-remodeling agents in hepatic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells *in vitro* and *in vivo*. *Stem Cell Intl.* 3038764. (IF=2.813; เป็น Correspondence)

Suttirojattana, T., Somfai, T.*, Matoba, S., Nagai, T., **Parnpai, R.*** and Geshi, M. 2016. The effect of temperature during liquid storage of *in vitro*-matured bovine oocytes on subsequent embryo development. *Theriogenology*. 85: 509-518. (IF=1.798; เป็น Correspondence)

2015

- Imsoonthornruksa, S., Pruksananonda, K., **Parnpai, R.**, Rungsiwiwut, R. and Ketudat-Cairns, M.* 2015. Expression and purification of recombinant human basic fibroblast growth factor fusion proteins and their uses in human stem cell culture. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 25: 372-380. (IF=2.104)
- Chasombat, J., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T.* 2015. Pretreatment of *in vitro* matured bovine oocytes with docetaxel before vitrification: Effects on cytoskeleton integrity and developmental ability after warming. *Cryobiology.* 71: 216-223. (IF=1.587)
- Khamlor, T., Pongpiachan, P., **Parnpai, R.**, Punyawai, K., Sangsritavong, and Chokesajjawatee, N.* 2015. Bovine embryo sex determination by multiplex loop-mediated isothermal amplification. *Theriogenology.* 83: 891-896. (IF=1.792)
- Punyawai, K., Anakkul, N., Srirattana, K., Aikawa, Y., Sangsritavong, S., Nagai, T., Imai K. and **Parnpai R.*** 2015. Comparison of Cryotop and micro volume air cooling methods for cryopreservation of bovine matured oocytes and blastocysts. *J. Reprod. Dev.* 61 : 431-437. (IF=1.515; เป็น Correspondence)
- Yoisungnern, T., Choi, Y.J., Woong, H.J., Kang, M.H., Das, J., Gurunathan, S., Kwon D.N., Cho, S.G., Park, C., Kyung Chang, W., Chang, B.S., **Parnpai R.** and Kim, J.H.* 2015. Internalization of silver nanoparticles into mouse spermatozoa results in poor fertilization and compromised embryo development. *Sci. Rep.* doi: 10.1038/srep11170. (IF=5.578)
- Yoisungnern, T., Das, J., Choi, Y.J., **Parnpai, R.** and Kim, J.H.* 2015. Effect of hexavalent chromium-treated sperm on *in vitro* fertilization and embryo development. *Toxicol. Ind. Health.* pii: 0748233715579805. (IF=1.859)

2014

- Carter, R.L., Chen, Y., Kunkanjanawan, T., Xu, Y., Moran, S.P., Putkhao, K., Yang, J., Huang, A.H.C., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S.* 2014. Reversal of cellular phenotypes in neural cells derived from Huntington's disease monkey-induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* 3: 1-9. (IF=5.365)
- Chasombat, J., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T.* 2014. Ovarian follicular dynamics and hormones throughout the estrous cycle in Thai native heifer. *Anim. Sci. J.* 85: 15-24. (IF=0.96)

- Parnpai, R.***, Liang, Y.Y., Paul, A.K., Ngersoungnern, A., Ngersoungnern, P. and Ketudat-Cairns, M. 2014. Cryopreservation of buffalo oocytes. *Thai J. Vet. Med* 44 (Supplement 1): 119-123. (IF=0.123; เป็น Correspondence)
- Paul, A.K., Liang, Y.Y., Nagai, T. and **Parnpai, R.*** 2014. Blastocysts hatchability following oocytes and blastocyst vitrification. *Thai J. Vet. Med* 44 (Supplement 1): 237-240. (IF=0.123; เป็น Correspondence)
- Paul, A.K., Liang, Y.Y., Nagai, T. and **Parnpai, R.*** 2014. *In vitro* development potentiality of expanded bovine blastocysts subsequent Cryotop vitrification. *Thai J. Vet. Med.* 44: 513-521. (IF=0.123; เป็น Correspondence)
- Punyawai, K., Sangsritavong, S., Liang, Y.Y., Sripunya, N. and **Parnpai, R.*** 2014. Effect of thawing solutions on survival of bovine blastocyst using in-straw vitrification method. *Thai J. Vet. Med* 44 (Supplement 1): 241-243. (IF=0.123; เป็น Correspondence)
- Putkhao, K.*, Chan, A.W.S.*, Yuksel, A. and **Parnpai, R.*** 2013. Cryopreservation of transgenic Huntington's disease rhesus macaque sperm: A case report. *Cloning and Transgenesis* 2: 1000116.
- Sripunya, N., Liang, Y., Panyawai, K., Srirattana, K., Ngersoungnern, A., Ngersoungnern, P., Ketudat-Cairns, M. and **Parnpai, R.*** 2014. Cytochalasin B efficiency in the cryopreservation of immature bovine oocytes by Cryotop and solid surface vitrification methods. *Cryobiology* 69: 496-499. (IF=1.587; เป็น Correspondence)
- Srirattana, K., Ketudat-Cairns, M., Nagai, T., Kaneda, M.* and **Parnpai, R.*** 2014. Effects of Trichostatin A on *in vitro* development and DNA methylation level of the satellite I region of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) cloned embryos. *J. Reprod. Dev.* 60: 336-341. (IF=1.515; เป็น Correspondence)

2013

- Chasombat, J., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T.* 2013. Ovarian follicular dynamics, ovarian follicular growth, oocyte yield, *in vitro* embryo production and repeated oocyte pick up in Thai native heifers undergoing superstimulation. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 26: 488-500. (IF=0.541)
- Chasombat, J., Sakhong, D., Nagai, T., **Parnpai, R.** and Vongpralub, T*. 2012 Superstimulation of follicular growth in Thai native heifers by a single administration of follicle stimulating hormone dissolved in polyvinylpyrrolidone. *J. Reprod. Dev.* 59: 214-218. (IF=1.515)

- Kaewmungskun, K., Srirattana, K., Panyawai, K., Sripunya, N., Liang, Y., Sangsritavong, S. and **Parnpai, R.*** 2013. Influence of growth factors on survival and development of swamp buffalo early antral follicle cultured *in vitro*. *Buffalo Bulletin* 32: (Special Issue 2): 617-621. (IF=0.027; เป็น Correspondence)
- Liang, Y.Y., Somfai, T., Nagai, T. and **Parnpai, R.*** 2013. Vitrification of buffalo oocytes: Current status and perspectives. *Buffalo Bulletin* 32 (Special Issue 1): 196-203. (IF=0.027; เป็น Correspondence)
- Phongnimitr, T., Liang, Y., Srirattana, K., Panyawai, K., Sripunya, N., Treetampinich, C. and **Parnpai, R.*** 2013. Effects of L-carnitine supplemented in maturation medium on the maturation rate of swamp buffalo oocytes. *Buffalo Bulletin* 32: (Special Issue 2): 613-616. (IF=0.027; เป็น Correspondence)
- Phongnimitr, T., Liang, Y.Y., Srirattana, K., Panyawai, K., Sripunya, N., Treetampinich, C.* and **Parnpai, R.*** 2013. Effect of L-carnitine on maturation, cryo-tolerance and embryo developmental competence of bovine oocytes. *Anim. Sci. J.* 84: 719-725. (IF=0.96; เป็น Correspondence)
- Srirattana, K., Sripunya, N., Sangmalee, A., Imsoonthornruksa, S., Liang, Y.Y., Ketudat-Cairns M.K. and **Parnpai, R.*** 2013. Developmental potential of vitrified goat oocytes following somatic cell nuclear transfer and parthenogenetic activation. *Small Rum. Res.* 112: 141-146. (IF=1.125; เป็น Correspondence)
- 2012**
- Imsoonthornruksa, S., Srirattana, K., Phewsoi, W., Tunwattana, W., **Parnpai, R.*** and Ketudat-Cairns, M*. 2012. Segregation of donor cell mitochondrial DNA in gaur-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos, fetuses and an offspring. *Mitochondrion* 12: 506-513. (IF=3.249; เป็น Correspondence)
- Imsoonthornruksa, S., Sangmalee, A., Srirattana, K., **Parnpai, R.***, Ketudat-Cairns, M*. 2012. Development of intergeneric and intrageneric somatic cell nuclear transfer (SCNT) cat embryos and the determination of telomere length in cloned offspring. *Cell. Reprogram.* 14: 79-87. (IF=1.788; เป็น Correspondence)
- Liang, Y.Y., Srirattana, K., Phermthai, T., Somfai, T., Nagai, T. and **Parnpai, R.*** 2012. Effects of vitrification cryoprotectant treatment and cooling method on the viability and development of buffalo oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Cryobiology* 65: 151-156. (IF=1.587; เป็น Correspondence)

- Liang, Y., Rakwongrit, D., Phermthai, T., Somfai, T., Nagai, T., and **Parnpai, R.*** 2012. Cryopreservation of immature buffalo oocytes: Effects of cytochalasin B pretreatment on the efficiency of cryotop and solid surface vitrification methods. *Anim. Sci. J.* 83: 630-638. (IF=0.96; เป็น Correspondence)
- Putkhao, K., Kocerha, J., Cho, I.K., Yang, J.J., **Parnpai, R.** and Chan, A.W.S*. 2012. Pathogenic cellular phenotypes are germline transmissible in a transgenic primate model of Huntington's Disease. *Stem Cell Dev.* 22: 1198-1205. (IF=3.727)
- Srirattana, K., Imsoonthornruksa, S., Laowtammathron, C., Sangmalee, A., Tunwattana, W., Thongprapai, T., Chaimongkol, C., Ketudat-Cairns, M*. and **Parnpai, R*.** 2012. Full-term development of gaur-bovine interspecies somatic cell nuclear transfer embryos: effect of trichostatin a treatment. *Cell Reprogram.* 14: 248-257. (IF=1.788; เป็น Correspondence)
- Takeda, K*, Srirattana, K., Matsukawa, K., Akagi, S., Kaneda, M., Tasai, M., Nirasawa, K., Pinkert, C.A., **Parnpai, R.** and Nagai, T. 2012. Influence of intergeneric/interspecies mitochondrial injection; parthenogenetic development of bovine oocytes after injection of mitochondria derived from somatic cells. *J. Reprod. Dev.* 58: 323-329. (IF=1.515)
- Ye, D.N., Tanthanuch, W., Thumanu, K., Sangmalee, A., **Parnpai, R*.** and Heraud, P*. 2012. Discrimination of functional hepatocytes derived from mesenchymal stem cells using FTIR microspectroscopy. *Analyst* 135: 4774-4784. (IF=4.107; เป็น Correspondence)

2011

- Imsoonthornruksa, S., Lorthongpanich, C., Sangmalee, A., Srirattana, K., Laowtammathron, C., Tunwattana, W., Somsa, W., Ketudat-Cairns, M., Nagai, T. and **Parnpai, R*.** 2011. The effects of manipulation medium and recipient cytoplasm on *in vitro* development of intraspecies and intergeneric felid embryos. *J. Reprod. Dev.* 57: 385-392. (IF=1.515; เป็น Correspondence)
- Imsoonthornruksa, S., Noisa, P., **Parnpai, R.** and Ketudat-Cairns, M*. 2011. A simple method for production and purification of soluble and biological activity recombinant human leukemia inhibitory factor (hLIF) fusion protein in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 151: 295-302. (IF=2.871)

- Kunkanjanawan, T., Noisa, P*. and **Parnpai, R***. 2011. Modeling neurological disorders by human induced pluripotent stem cells. *J. Biomed. Biotechnol.* 350131. (IF=3.169; เป็น Correspondence)
- Liang, Y., Phermthai, T., Nagai, T., Somfai, T. and **Parnpai, R***. 2011. *In vitro* development of vitrified buffalo oocytes following parthenogenetic activation and intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 75: 1652-1660. (IF=1.798; เป็น Correspondence)
- Liang Y.Y., Ye, D.N., Laowtammathron, C., Phermthai, T., Nagai, T., and **Parnpai, R***. 2011. Effects of chemical activation treatment on development of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes matured *in vitro* and fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Reprod. Domestic Anim.* 46: e67-e73. (IF=1.515; เป็น Correspondence)
- Lorthongpanich, C*, Chuti Laowtammathron, C. and **Parnpai, R***. 2011. From microsurgery to single blastomere culture: conventional and novel methods for ES cell establishment. *Thai J. Vet. Med.* 41: 11-22. (IF=0.123; เป็น Correspondence)
- Parnpai, R.**, Srirattana, K., Imsoonthornruksa, S. and Ketudat-Cairns, M. 2011. Somatic cell cloning for livestock and endangered species. *Thai J. Vet. Med* Suppl. 41: 77-85. (IF=0.123; เป็น Correspondence)
- Rattanasuk, S., **Parnpai, R.** and Ketudat-Cairns, M*. 2011. Multiplex polymerase chain reaction used for bovine embryo sex determination. *J. Reprod. Dev.* 57: 539-542. (IF=1.515)
- Srirattana, K., Matsukawa, K., Akagi, S., Tasai, M., Tagami, T., Nirasawa, K., Nagai, T., Kanai, Y., **Parnpai, R.** and Takeda, K*. 2011. Constant transmission of mitochondrial DNA in intergeneric cloned embryos reconstructed from swamp buffalo fibroblasts and bovine ooplasm. *Anim. Sci. J.* 82: 236-243. (IF=0.96)
- Thumanu, K., Tanthanuch, W., Ye, D., Sangmalee, A., Lorthongpanich, C., **Parnpai, R***. and Heraud, P*. 2011. Spectroscopic signature of mouse embryonic stem cells derived hepatocytes using Synchrotron FTIR microspectroscopy. *J. Biomed. Optics* 16: 057005-1. (IF = 2.859; เป็น Correspondence)

9. การเขียนตำรา-หนังสือ

- รังสรรค์ พาลพ่าย. 2530. การเร่งการตกไข่เพื่อทำออีทีในโค. มณีวรรณ กมลพัฒนา (บรรณาธิการ), *การปฏิสนธิในหลอดแก้วและการย้ายฝากตัวอ่อน*. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, หน้า 41-77.

รังสรรค์ พาลพ่าย และ สรรเพชญ์ โสภณ. 2530. เทคนิคการย้ายฝากตัวอ่อนในโคโดยวิธีไม่ผ่าตัด. มณีวรรณ กมลพัฒนา (บรรณาธิการ), *การปฏิสนธิในหลอดแก้วและการย้ายฝากตัวอ่อน* โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, หน้า 133-158.

รังสรรค์ พาลพ่าย สรรเพชญ์ โสภณ มณีวรรณ กมลพัฒนา กำธร มีบำรุง กิตติยา ศรีศักดิ์วิวัฒนะ ประชุม อินทรโชติ ธวัชชัย สุวรรณกำจาย ประภากร วัฒนโธธร พงษ์ภูมิ เกิดชูชื่น และ สมสวัสดิ์ ต้นตระกูล. 2530. ผลสำเร็จการย้ายฝากตัวอ่อนโคนมลูกผสมในประเทศไทย. มณีวรรณ กมลพัฒนา (บรรณาธิการ), *การปฏิสนธิในหลอดแก้วและการย้ายฝากตัวอ่อน* โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ, หน้า 273-288.

รังสรรค์ พาลพ่าย 2549. เทคโนโลยีการโคลนนิ่งโค. เอกสารคำสอนวิชา 304 553 Animal Cloning Technology และ 304 554 Selected Research in Animal Cloning Technology. 389 หน้า.

รังสรรค์ พาลพ่าย 2553. เซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อน. เอกสารคำสอนวิชา 314 533 Stem Cell Technology. 238 หน้า.

Parnpai, R., Minami, N. and Yamada, M. 1998. Current status of research for the establishment of bovine embryonic stem (ES) cells. In: Miyamoto, H. and Manabe, N. (eds.), *Reproductive Biology Update: Novel Tools for Assessment of Environmental Toxicity*. Nakanishi Printing, Kyoto, pp. 383-388.

10. ผลงานวิจัยที่ประสบความสำเร็จ

10.1. ประสบผลสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนโคนม ได้ลูกแฝดเพศเมียเกิดมาเมื่อวันที่ 8 กันยายน 2529 นับเป็นรายแรกในประเทศไทย (ขณะทำงาน ณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ)

10.2. ประสบผลสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนแพะ ได้ลูกแพะเกิดมาเมื่อปี 2532 นับเป็นรายแรก of ประเทศไทย (ขณะทำงาน ณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ)

10.3. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งโค โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งเกิดมาเมื่อวันที่ 6 มีนาคม 2543 นับเป็นรายแรกของเอเชียอาคเนย์ และรายที่ 6 ของโลก (ขณะทำงาน ณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ)

10.4. ประสบความสำเร็จการโคลนนิ่งตัวอ่อนกระบือปลักโดยใช้เซลล์ร่างกายลูกอ่อนโคและเซลล์แกรนูโลซาเป็นเซลล์ต้นแบบ นับเป็นรายแรกของโลกที่ทำและตีพิมพ์ผลงานใน *Buffalo Journal* 1999, 15: 371-384. (ขณะทำงาน ณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ)

10.5. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งโคบราห์มันเพศผู้ชื่อ “ตุ้มตาม” โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งจากเซลล์ต้นแบบตัวเดียวกัน 7 ตัวเกิดมา ลูกโคทุกตัวผ่านการตรวจสอบดีเอ็นเอแล้วพบว่าดีเอ็นเอเหมือน “ตุ้มตาม” เจ้าของเซลล์ต้นแบบทุกประการ และมีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงดีมาก

10.6. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งแมวพันธุ์โคราช โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ ต้นแบบ ได้ลูกแมวโคลนนิ่งเกิดมา 2 ตัว รายแรกของประเทศไทย เมื่อวันที่ 25 ธันวาคม 2549

10.7. ประสบความสำเร็จในการโคลนนิ่งแมวบ้าน โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ ได้ลูกแมวคลอดออกมามีชีวิต 2 ตัว ในวันที่ 25 ธันวาคม 2549 แต่ลูกแมวเสียชีวิต 2 และ 5 วัน หลังคลอด ขณะนี้ยังคงทำโคลนนิ่งแมวบ้าน และแมวป่า อย่างต่อเนื่อง

10.8. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งโคพันธุ์ชาวลำพูนเพศผู้ชื่อ “อินทนนท์” โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ ต้นแบบ ได้ลูกโคโคลนนิ่งเกิดมารายแรกของประเทศไทย เมื่อวันที่ 21 มี.ค. 2550 ได้รับการตั้งชื่อว่า “ขาวมงคล”

10.9. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งแพะพันธุ์บอร์เพศผู้ โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ ต้นแบบ ได้ลูกแพะโคลนนิ่งเกิดมารายแรกของประเทศไทย เมื่อวันที่ 27 พ.ค. 2550 1 ตัว และ วันที่ 4 ก.ค. 2550 1 ตัว

10.10. ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งกระทิงเพศผู้ โดยใช้เซลล์ร่างกายส่วนใบหูเป็นเซลล์ ต้นแบบ ได้ลูกกระทิงโคลนนิ่งเกิดมารายที่ 2 ของโลก เมื่อวันที่ 4 มี.ค. 2551 จำนวน 1 ตัว แต่ลูกกระทิงเสียชีวิต 12 ชั่วโมง หลังคลอด

11. รางวัลที่ได้รับ

11.1. จากผลงานวิจัยการย้ายฝากตัวอ่อนโคนมจนประสบผลสำเร็จ ได้ลูกแฝดโคนมเกิดมาครั้งแรกของประเทศไทยเมื่อวันที่ 8 กันยายน 2529 ทำให้งานวิจัยนี้ถูกยกย่องให้เป็น 1 ใน 10 ขาวเด่นของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11.2. รางวัลผลงานวิจัยดี (อันดับ 1 สาขาสัตว์) ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง “ความเป็นไปได้ในการผลิตโคพันธุ์ดีด้วยเทคโนโลยีโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์เป็นเซลล์ต้นแบบ” ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 พ.ศ. 2543

11.3. รางวัลผลงานวิจัยดี สาขาวิทยาศาสตร์ ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง “การทดสอบค่ากระแสไฟฟ้าที่เหมาะสมสำหรับการทำโคลนนิ่งตัวอ่อนแมวโดยใช้เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ” ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 พ.ศ. 2546

11.4. รางวัลนักวิจัยดีเด่น จากสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย ได้รับเชิญเป็นผู้ปาฐกถาอายุโนะโมะโตะ เรื่อง “Somatic cell cloning in bovine using ear fibroblast as donor cells” ในการประชุมประจำปีของสมาคมปี พ.ศ. 2547

11.5. รางวัลผลงานวิจัยดี (อันดับ 1 สาขาสัตว์) ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง “การใช้เทคโนโลยีโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดี” ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42 พ.ศ. 2547

11.6. รางวัลบุคลากรสายวิชาการที่มีผลงานดีเด่นด้านการวิจัย ประจำปี 2548 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

11.7. รางวัลแทนคุณแผ่นดิน สาขาวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2550 จากเครือข่ายเนชั่น

11.8. รางวัลผลงานวิจัยดี (อันดับ 1 สาขาสัตว์) ในการเสนอผลงานวิจัยเรื่อง “การอนุรักษ์โคพันธุ์ชาวลำพูนโดยการทำโคลนนิ่ง” ในการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46 พ.ศ. 2551

11.9. ศิษย์เก่าดีเด่น คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พ.ศ. 2555

11.10 รางวัลบุคลากรสายวิชาการที่มีผลงานดีเด่นด้านการบริการวิชาการ ประจำปี 2558 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

12. การจดสิทธิบัตร

12.1. รังสรรค์ พาลพ่าย วิศิษฐ์พร สุขสมบัติ อาวุธ อินทรชี่น อุดมวิทย์ มณีวรรณ คมสัน ภาษยเดช แสงเพชร งอนชัยภูมิ ป้องภัยรี มีสมบัติ สมิง เต็มพรมราช “อุปกรณ์ควบคุมการเคลื่อนที่ก้านสูบของไมโครไซริงท์” ยื่นคำขอเมื่อวันที่ 11 มิถุนายน 2547 ได้รับสิทธิบัตรเมื่อเดือน เมษายน 2550

12.2. รังสรรค์ พาลพ่าย วิศิษฐ์พร สุขสมบัติ อาวุธ อินทรชี่น อุดมวิทย์ มณีวรรณ คมสัน ภาษยเดช แสงเพชร งอนชัยภูมิ ป้องภัยรี มีสมบัติ สมิง เต็มพรมราช ชูติ เหล่าธรรมธร จันท์เจ้า ล้อทองพานิชย์ วิชัย ศรีสุรภัย “เครื่องเชื่อมเซลล์ด้วยไฟฟ้ากระแสตรง” ยื่นคำขอเมื่อวันที่ 11 มิถุนายน 2547

12.3. สุรัชย์ รัตนสุข รังสรรค์ พาลพ่าย มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ “ผลิตภัณฑ์ไมโนโคลนัลแอนติบอดีต่ออสุจิเพศผู้ของโค และกระบวนการผลิตไมโนโคลนัลแอนติบอดีต่ออสุจิเพศผู้ของโคดังกล่าว” ยื่นคำขอเมื่อวันที่ 27 กรกฎาคม 2555

12.4. สุรัชย์ รัตนสุข รังสรรค์ พาลพ่าย มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ “กระบวนการแยกเพศอสุจิโคด้วย ไมโนโคลนัลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่ออสุจิเพศผู้ของโค และการใช้อสุจิที่ผ่านกระบวนการดังกล่าวในการปฏิสนธิในหลอดทดลอง” ยื่นคำขอเมื่อวันที่ 27 กรกฎาคม 2555

12.5. รังสรรค์ พาลพ่าย ศิวัช สังศรีทวงษ์ กาญจนา ปัญญาไว “ภาชนะบรรจุตัวอ่อนแช่แข็งด้วยวิธีลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วที่มีการเจือจางสารแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและการใช้ภาชนะบรรจุดังกล่าว” เลขทะเบียน 9367 อนุมัติวันที่ 28 พ.ย. 2557

—Original Article—

Pretreatment of bovine sperm with dithiobutylamine (DTBA) significantly improves embryo development after ICSI

Tayita SUTTIROJPATTANA^{1, 2)}, Tamas SOMFAI²⁾, Satoko MATOBA²⁾, Takashi NAGAI³⁾, Rangsun PARNPAI¹⁾ and Masaya GESHI^{2, 4)}

¹⁾Embryo Technology and Stem Cell Research Center, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

²⁾Animal Breeding and Reproduction Research Division, Institute of Livestock and Grassland Science, National Agriculture and Food Research Organization (NARO), Tsukuba 305-0901, Japan

³⁾International Cooperation Section, National Agriculture and Food Research Organization (NARO), Tsukuba 305-0901, Japan

⁴⁾Division of Animal Sciences, Institute of Agrobiological Sciences, National Agriculture and Food Research Organization (NARO), Tsukuba 305-0901, Japan

Abstract. We assessed the effect of pretreating sperm with dithiobutylamine (DTBA) to improve embryo development by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in cows. Acridine Orange staining revealed that when applied at different concentrations (2.5, 5, and 10 mM) and exposure times (5 min, 20 min, 1 h, and 2 h), DTBA reduced disulfide bonds in spermatozoa with the highest efficacy at 5 mM for 5 min. DTBA enhanced the percentage of spermatozoa with free protamine thiol groups compared with untreated spermatozoa (control) ($P < 0.05$); however, this result did not differ from that of dithiothreitol (DTT) treatment. The percentage of live spermatozoa after DTBA treatment was identical to that in the control, but significantly higher than that after DTT treatment ($P < 0.05$). After ICSI, DTBA treatment tended to improve male pronuclear formation rate ($P = 0.071$) compared with non-treated sperm injection. Blastocyst formation rate was significantly improved by DTBA treatment compared with that in DTT, control, and sham injection groups ($P < 0.05$). Blastocyst quality in terms of cell numbers and ploidy was not different among these groups. In conclusion, DTBA increases the efficacy of blastocyst production by ICSI even if DTT treatment does not work.

Key words: Bovine, Dithiobutylamine, Dithiothreitol, Intracytoplasmic sperm injection (ICSI)

(J. Reprod. Dev. 62: 577–585, 2016)

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is an important assisted reproductive technique for overcoming low male fertility in humans [1], livestock, and especially endangered species. Moreover, this technique provides an opportunity to study the mechanisms of fertilization and early embryo development [2]. Since the first successful report of ICSI in hamsters [3], this technique has been applied to produce offspring in several species such as rabbits [4], cats [5], cattle [6], mouse [7], sheep [8], horses [9], pigs [10], and monkeys [11]. Oocytes from different mammalian species seem to differ in their response to the ICSI procedure. In humans [5], mice [7], and rabbits [4], injection of the spermatozoon into the cytoplasm is sufficient for activating the oocyte, and the sperm undergoes decondensation, resulting in the formation of the male pronucleus (PN) which later unites with the female PN to form the embryonic genome. However, in cattle, sperm microinjection alone is not

sufficient for activating oocytes, which often results in the failure of male PN formation and thus low embryo developmental rates [6]. Therefore, in cattle, additional oocyte activation is essential after ICSI to ensure embryo development [12–15].

In mammalian spermatozoa, DNA is tightly packed by protamine disulfide bonds. After penetration into the oocyte, the sperm undergoes decondensation by the replacement of sperm protamines with oocyte histones, leading to chromatin relaxation [16]. In bovine oocytes, decondensation of spermatozoa to form the PN is often insufficient after ICSI [12, 17]. To solve this problem, various sperm pretreatment methods have been applied, including immobilizing sperm [18, 19], damaging sperm membranes by freezing and thawing [19, 20], treatment with Triton X-100, an anionic detergent that induces membrane damage and dissolves nuclear proteins [21, 22], or using agents to enhance decondensation of spermatozoa DNA such as heparin-glutathione [23, 24] and dithiothreitol (DTT) [12, 14, 23, 25–28]. DTT is a reducing agent frequently used to reduce disulfide bonds in bovine spermatozoa. Although many studies have determined the optimal DTT concentration for spermatozoa pretreatment to improve the developmental competence of bovine oocytes after ICSI, the results are still controversial [12, 24, 26]. Dithiobutylamine (DTBA) is another reducing agent that reduces disulfide bonds. Its structure is closely related to DTT; the primary amine group is present in DTBA, as opposed to the two hydroxyl

Received: May 25, 2016

Accepted: July 19, 2016

Published online in J-STAGE: August 14, 2016

©2016 by the Society for Reproduction and Development

Correspondence: T Somfai (e-mail: somfai@affrc.go.jp), R Parnpai (e-mail: rangsun@g.sut.ac.th)

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial No Derivatives (by-nc-nd) License <<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>>.

groups of DTT, leading to a lower ionization constant of an acid (pK_a) values. Under identical pH conditions, the reducing ability of DTBA is more effective than that of DTT [29]. To the best of our knowledge, the efficacy of pretreating sperm with DTBA to improve ICSI efficiency has not been reported to date in any species. Thus, in the present study, we investigated the effects of pretreating sperm with DTBA on the quality of treated spermatozoa, PN formation, blastocyst development, and karyotype of resultant embryos after ICSI of bovine oocytes.

Materials and Methods

Chemicals and reagents

All chemicals and reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), unless otherwise stated.

Oocyte collection and *in vitro* maturation (IVM)

Collection and IVM of bovine cumulus oocyte complexes (COCs) were performed as previously described [30]. Briefly, bovine ovaries were collected from a slaughterhouse, transported to the laboratory, washed, and kept in phosphate buffered saline (PBS) supplemented with 100 U/ml penicillin (Meiji Seika Pharma, Tokyo, Japan) and 100 μ g/ml streptomycin (Meiji Seika Pharma) at 15°C for approximately 15 h. COCs were aspirated from small follicles (2–8 mm in diameter) using a 10-ml syringe with an 18 gauge needle. The maturation medium was HEPES-buffered TCM 199 medium (Medium 199, 12340-030, GIBCO Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) supplemented with 5% newborn calf serum (NCS, S0750-500; Biowest SAS, Nuaille, France) and 0.2 IU/ml follicle stimulating hormone (FSH; Antrin R10; Kyoritsu Seiyaku, Tokyo, Japan). Only COCs with compacted cumulus cells were selected, washed twice with IVM medium, then cultured in IVM medium under paraffin oil (Paraffin liquid, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) (20 COCs per 100 μ l droplet) in 35-mm culture dishes (Nunc Multidishes; Nalge Nunc International, Roskilde, Denmark) under a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 38.5°C for 20–21 h. The IVM COCs were gently denuded by repeated pipetting in 0.1% (w/v) hyaluronidase. The oocytes that extruded the first polar body (PB) (known as the metaphase II stage) were selected for these experiments.

Sperm preparation and pre-treatment

A straw of frozen Japanese Black bull semen was thawed by immersion in water at 37°C for 40 sec and then centrifuged in 3 ml of 90% Percoll solution at 740 \times g for 10 min. The pellet was re-suspended in 5.5 ml of IVF 100 medium (Research Institute for Functional Peptides, Yamagata, Japan) and centrifuged at 540 \times g for 5 min. The pellet was re-suspended in IVF 100 medium to adjust the final sperm concentration to 6 \times 10⁶ sperm/ml. Sperm suspensions were subjected to one of following treatments: (1) 5 mM DTT for 20 min or (2) various concentrations (2.5, 5, and 10 mM) of DTBA for various durations according to experimental design. Following each treatment, spermatozoa were washed twice with IVF 100 medium by centrifugation at 740 \times g for 5 min. Then, sperm pellets were re-suspended in IVF 100 medium and used for experiments.

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI)

ICSI was performed according to a previous report [31] with modifications. Briefly, 3 droplets were prepared on the lid of a 60-mm culture dish; the first was a 10% polyvinylpyrrolidone (PVP; MW = 360,000) solution (FertiCult Flushing medium; Fertipro, 8730 Beemem, Belgium) into which 2 μ l of sperm suspension was transferred. The second droplet contained 0.25% trypsin and 1 mM EDTA (for washing the injection and holding pipette), and the third droplet was HEPES-buffered TCM 199 supplemented with 10% NCS for the ICSI procedure. A single spermatozoon was immobilized by pressing the tail against the bottom of the dish with the injection pipette, and then the sperm was loaded tail first into the injection pipette. An oocyte was fixed at the position where the first PB was located at 6 or 12 o'clock, and then an immobilized sperm was injected into the ooplasm at the 3 o'clock position. Sham injections applied the same method as sperm injection but no sperm was loaded into the injection pipette.

Oocyte activation

Within 1 h of injection, oocytes were activated by exposure to 7% ethanol in HEPES TCM 199 supplemented with 10% NCS for 5 min and then subsequently cultured in TCM 199 supplemented with 5% NCS for 3 h to allow extrusion of the second PB. The oocytes showing extrusion of the second PB at 3 h after activation were selected and incubated in Charles Rosenkrans 1 (CR1) medium [32] supplemented with 10 μ g/ml cycloheximide under a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 38.5°C for 5 h.

In vitro embryo culture (IVC)

After oocyte activation, the presumptive zygotes (20 zygotes per 100 μ l droplet) were cultured in CR1 medium supplemented with amino acids (CR1aa) [33] and 5% NCS under a humidified atmosphere of 5% CO₂, 5% O₂, and 90% N₂ at 38.5°C for up to 9 days. The day of ICSI was considered as day 0.

Assessment of reduced disulfide bonds in spermatozoa by Acridine Orange (AO) staining

The disulfide bond integrity in sperm nuclei was assayed by Acridine Orange (AO) staining according to the method of Tateno and Kamiguchi [25]. Briefly, spermatozoa were smeared on glass slides and fixed overnight in methanol:acetic acid (3:1). Slides were removed from the fixative and allowed to dry for a few minutes before staining. Then, slides were stained with 0.2% AO (Calbiochem, San Diego, CA, USA) (10 ml 1 g/l AO in distilled water, 40 ml 0.1 M citric acid, 2.5 ml 0.3 M Na₂HPO₄) for 5 min and examined with an excitation wavelength of 450–490 nm under an epifluorescent microscope (Olympus, Tokyo, Japan). The sperm nuclei with rich or reduced disulfide bonds fluoresced green or red, respectively. The sperm nuclei of intermediate status fluoresced yellow. In this study, sperm nuclei with green and yellow colors were classified as disulfide bond intact and red colored sperm nuclei were classified as disulfide bond reduced.

Labeling thiol groups in spermatozoa with monobromobimane (mBBr)

To quantify the amount of free thiols in protamines, spermatozoa

were placed on glass slides, air-dried, and labeled with thiol reagent mBBR. A working solution of 0.5 mM mBBR was freshly prepared by diluting a 50 mM stock solution [34] with PBS, and this solution was added to slides and kept in the dark for 10 min at 25°C. Then, the slides were washed twice with PBS, covered with coverslips, and examined under an epifluorescent microscope (Olympus) using a 340–380 excitation filter and an emission filter over 450 nm. The proportion of fluorescence in spermatozoa was determined by Image J (v. 1.40) software [35].

Evaluation of live-dead status of spermatozoa by eosin and nigrosin staining

Eosin and nigrosin staining was carried out according to WHO standards [36]. Briefly, eosin and nigrosin solution was prepared by dissolving 0.2 g of eosin and 2 g of nigrosin in PBS (153 mM NaCl and 9.65 mM NaH₂PO₄, pH 7.4), followed by mixing for 2 h at room temperature and filtration to obtain the staining solution. After washing sperm samples in saline (154 mM NaCl) at 37°C, a drop of the sperm was placed on glass slides, which was mixed with one drop of eosin and nigrosin solution. The mixture was smeared on the glass slides and air dried. The samples were observed under a light microscope. Eosin penetrates into non-viable cells, making them appear red. Nigrosin offers a dark background, facilitating the detection of viable non-stained cells.

Assessment of apoptotic spermatozoa by TUNEL assay

The terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end-labeling (TUNEL) assay was performed to evaluate DNA fragmentation (a marker of apoptosis) in sperm using a TUNEL assay kit (Apoptosis Detection System Fluorescein; Promega, Mannheim, Germany) according to manufacturer's instructions. Sperm suspensions were centrifuged for 10 min at 300 × g at 4°C. The supernatant was discarded and the remaining pellet was washed in PBS, pH 7.4. A droplet of this sperm suspension was smeared on the slides, air-dried, and fixed by immersion in freshly prepared 4% methanol-free formaldehyde in PBS for 25 min at 4°C. Then, the slides were washed in fresh PBS for 5 min at room temperature, then treated with 0.2% Triton X-100 in PBS for 5 min, and rinsed twice in PBS for another 5 min at room temperature. Excess liquid was removed by tapping the slides and samples were covered with coverslips. The spermatozoa were then incubated in 50 µl of a mixture containing 5 µl of nucleotide mix, 1 µl of TdT enzymes, and 45 µl of Equilibration Buffer (DeadEnd Fluorometric TUNEL System Promega) in humidified chamber for 60 min at 37°C. The reaction was blocked with 2 × SSC for 15 min and then washed 3 times in PBS, 5 min each. To visualize all nuclei, a 1 µg/ml propidium iodide solution in PBS was used. In this assay, apoptotic cells are detected as green whereas PI-stained nuclei are seen as red. The percentage of spermatozoa with fragmented DNA was determined by direct observation of 100 randomly selected spermatozoa using an epifluorescent microscope (Olympus) with the appropriate filters (460–470 nm) at 40 × magnification.

Assessment of PN formation in oocytes after ICSI

At 14–18 h post ICSI, oocytes were fixed with acetic and alcohol (acetic acid:ethanol = 1:3) for at least 3 days, then stained with 1% (w/v) orcein in acetic acid, then rinsed in glycerol:acetic acid:water

(1:1:3) and examined under a phase-contrast microscope with 40 × and 100 × objectives. Oocytes with at least one PN were considered to be activated whereas those with two PN without an intact sperm head inside were considered to be normally fertilized. Activated oocytes containing an intact sperm head were considered parthenogenetically activated.

Evaluation of blastocyst cell number

Blastocysts on day 9 were fixed in 99.5% ethanol supplemented with 10 µg/ml Hoechst 33342 (Calbiochem) overnight at 4°C. The total nuclei were counted under UV light with excitation at 330–385 nm and emission at 420 nm under an epifluorescence microscope (Nikon Eclipse E600, Tokyo, Japan).

Blastocyst karyotyping

Chromosomal samples of embryos were prepared and examined as described by Somfai *et al.* [37] with modifications. Briefly, after IVC for 7–8 days, blastocysts were cultured in CR1aa medium containing 5% NCS and 100 ng/ml vinblastine sulfate (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) for 17–20 h followed by incubation in 1% (w/v) sodium citrate solution for 15 min. Each blastocyst was fixed by pouring 0.01 ml acetic methanol (acetic acid:methanol = 1:1) into 0.2 ml of a hypotonic solution of sodium citrate. A blastocyst was placed on glass slide, immediately dropped with acetic acid to separate each embryonic cell and then re-fixed with 2–3 drops of methanol:acetic acid (3:1). After drying completely, blastocyst chromosome samples were overlaid with 80% glycerol (dissolved with ultrapure water) supplemented with 10 µg/ml Hoechst 33342 and covered with a coverslip. Chromosome spreads were observed directly under UV light (405 nm excitation) with a 40 × plain objective.

Experimental design

Experiment 1 investigated the effect of DTBA applied at different concentrations (2.5, 5, and 10 mM) for various exposure times (5 min, 20 min, 1 h, and 2 h) on sperm disulfide bond integrity. Sperm suspensions were treated as described above. Then, the percentages of spermatozoa with intact or reduced disulfide bonds were determined after AO staining. Spermatozoa without any treatment were classified as a control group. Experiments were performed in triplicate.

Experiment 2 investigated the effects of disulfide reducing agents on the quality of and toxicity toward spermatozoa. In Experiment 2-1 the effects of DTBA and DTT on free thiol groups in spermatozoa were investigated by mBBR. Experiment 2-2 investigated the effect of the reducing agents DTBA and DTT on the live/dead status of spermatozoa by Eosin and Nigrosin assay. Experiment 2-3 investigated the effect of DTBA and DTT on DNA fragmentation in spermatozoa by TUNEL assay. In experiments, spermatozoa were pretreated with 5 mM DTBA and 5 mM DTT [28] for 5 min and 20 min, respectively as described above, based on the result of Experiment 1. Spermatozoa without any treatment were used as the control group. Experiments were performed in triplicate.

Experiment 3 investigated the effects of DTBA and DTT on PN formation. After IVM, oocytes were subjected to ICSI using spermatozoa pretreated with 5 mM DTBA and 5 mM DTT for 5 min and 20 min, respectively, as described above. Fourteen to 18 h post ICSI, the oocytes were fixed and stained with orcein. The

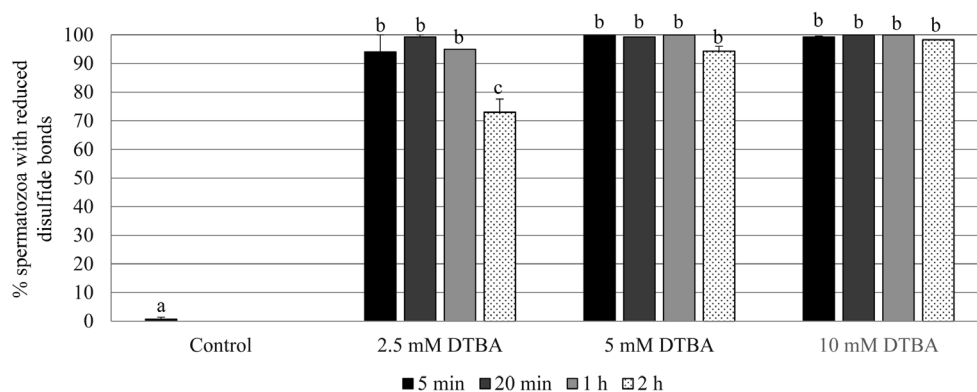


Fig. 1. Reducing effect of DTBA treatment at various concentrations and times on disulfide bonds in spermatozoa assayed using Acridine Orange. Experiments were performed in triplicate. Bars with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$). DTBA: dithiobutylamine.

percentages of oocyte activation and PN formation were compared between treated and non-treated (control) spermatozoa. Experiments were performed in triplicate.

Experiment 4 investigated the effect of sperm pretreatment with DTBA and DTT on embryo development after ICSI. IVM oocytes were subjected to ICSI using spermatozoa pretreated with either 5 mM DTBA or 5 mM DTT for 5 min and 20 min, respectively, as described above. The spermatozoa without any treatment were classified as a control group. Oocytes subjected to injection without spermatozoa were used as a sham injection group. After ICSI, oocytes were subjected to IVC as described above. The cleavage rates, blastocyst formation rates, hatching rates of blastocysts, and blastocyst cell numbers were compared among DTBA, DTT, sham injected, and control groups on day 2, days 7–9, days 8–9, and day 9, respectively. Experiments were performed in quadruplicate.

Experiment 5 investigated the effect of the reducing agents DTBA and DTT on ploidy of the resultant blastocysts. The spermatozoa were pretreated with 5 mM DTBA and 5 mM DTT for 5 min and 20 min, respectively. After IVM, the oocytes were subjected to ICSI and IVC as described above. Karyotyping of blastocysts was performed on days 7 and 8 as described above. Ploidy of embryos in DTBA and DTT groups was compared with those of sham injected and control groups. Experiments were performed in quadruplicate.

Statistical analysis

All data are presented as mean \pm SEM. The percentage data were arcsine transformed before analysis. The data were analyzed by one-way ANOVA using software SPSS 17.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA) and differences were compared by a post-hoc Fisher's protected least significant difference test. Differences were deemed statistically significant when P values were less than 0.05.

Results

Experiment 1: Effect of DTBA treatment at various concentrations and exposure times of spermatozoa on their disulfide bond integrity

The DTBA pretreatment significantly increased the percentage of

sperm with reduced disulfide bonds at all concentrations (2.5 mM, 5 mM, and 10 mM) and exposure time (5 min, 20 min, 1 h, and 2 h) compared with the control group ($P < 0.05$) (Fig. 1). After 2 h of exposure, the percentage of sperm with reduced disulfide bonds in the 2.5 mM DTBA treated group was significantly lower than other sperm pretreatment groups incubated at the same time ($P < 0.05$) (Fig. 1).

Experiment 2: The effects of disulfide reducing agents on the quality and toxicity of spermatozoa

2-1. mBBR: In Experiment 2, treatment with DTBA was performed using 5 mM for 5 min, because in Experiment 1 this treatment increased the percentage of sperm with reduced disulfide bonds and maintained this status for 2 h, and the efficiency of reducing disulfide bonds in the 2.5 mM DTBA-treated group was gradually decreased with increased incubation time, while the higher concentration (10 mM) of DTBA affected the stability of sperm suspension which turned cloudy (data not shown). As shown in Table 1, there was no significant difference in the percentage of spermatozoa with free thiol groups in protamine between 5 mM DTBA and 5 mM DTT pretreatments (98.7% vs. 91.7%) but both of these values were significantly increased compared with that of the control (0.0%, $P < 0.05$).

2-2. Eosin and nigrosin: The 5 mM DTBA sperm pretreatment group was not significantly different than the control group in terms of the percentage of live spermatozoa (100% and 100%, respectively) whereas the 5 mM DTT sperm pretreatment group showed a significantly reduced rate of live spermatozoa (94.7%) compared with other groups ($P < 0.05$) (Table 1).

2-3. TUNEL assay: The percentage of sperm with DNA fragmentation following DTBA and DTT pretreatment were similar (ranging between approximately 12–13.3%) and these values were significantly higher than that recorded in the control group (0.0%, $P < 0.05$, Table 1).

Experiment 3: Effect of pretreating sperm with disulfide bond reducing agents on PN formation

The mean percentage of activated oocytes was similar among

Table 1. Effects of sperm pretreatment with 5 mM DTT for 20 min and 5 mM DTBA for 5 min on free thiol groups, live/dead status, and DNA fragmentation in spermatozoa

Source of reducing agent used for pretreatment	No. of spermatozoa examined	No. (%) of spermatozoa with free thiol group (Mean \pm SEM)	No. (%) of live spermatozoa (Mean \pm SEM)	No. (%) of TUNEL-positive sperm (Mean \pm SEM)
Control (no treatment)	300	0 (0.0 \pm 0.0 ^a)	300 (100.0 \pm 0.0 ^a)	0 (0.0 \pm 0.0 ^a)
DTT	300	275 (91.7 \pm 4.4 ^b)	284 (94.7 \pm 0.3 ^b)	36 (12.0 \pm 3.1 ^b)
DTBA	300	296 (98.7 \pm 0.7 ^b)	300 (100.0 \pm 0.0 ^a)	40 (13.3 \pm 0.9 ^b)

Experiments were performed in triplicate. Different superscript letters within a column indicate significant differences ($P < 0.05$). DTT: dithiothreitol; DTBA: dithiobutylamine.

Table 2. Effects of pretreating sperm with 5 mM DTT for 20 min or 5 mM DTBA for 5 min on the developmental competence of bovine embryos after ICSI

Source of reducing agent used for pretreatment	No. of oocytes used for ICSI	No. of activated oocytes [#] (%Mean \pm SEM)	Activated oocytes with (%Mean \pm SEM)		
			2 PN	1 PN + sperm head	No sperm head visible
Control (no treatment)	85	75 (88.2 \pm 1.2)	26 (34.5 \pm 5.5)	44 (58.7 \pm 3.3)	5 (6.8 \pm 2.8)
DTT	85	76 (89.5 \pm 1.8)	31 (40.9 \pm 2.4)	45 (59.1 \pm 2.4)	0 (0.0 \pm 0.0)
DTBA	82	70 (85.5 \pm 1.5)	35 (50.1 \pm 6.4)	33 (47.1 \pm 8.5)	2 (2.8 \pm 2.8)
* Sham injection	75	65 (86.7 \pm 1.1)	N/D	N/D	N/D

Experiments were performed in triplicate. No significant difference was detected among the treatment groups at $P < 0.05$. [#] activated oocytes = oocytes with at least one PN. * Sham injection = the oocytes were injected without sperm. 2 PN = oocytes with 2 pronuclei and no visible sperm; 1 PN + sperm = oocytes with 1 pronucleus and 1 condensed sperm. N/D: not determined. PN: pronucleus; DTT: dithiothreitol; DTBA: dithiobutylamine; ICSI: intracytoplasmic sperm injection.

all groups, ranging between 85.5–89.5%, and was not significantly different among treated spermatozoa, non-treated spermatozoa, and sham injection groups (Table 2). The percentage of PN formation was not significantly different between treated and non-treated spermatozoa. However, the DTBA-treated group showed a tendency toward a higher 2 PN formation rate compared with the control group ($P = 0.071$).

Experiment 4: Effect of pretreating sperm with disulfide bond reducing agents on embryo development after ICSI of bovine oocytes

As shown in Table 3, the rates of oocytes with extruded second PB in DTT- and DTBA-treated groups were significantly higher than those in the control and sham injection groups ($P < 0.05$). The lowest cleavage rate was observed in the sham injection group (53.0%), which was significantly lower than rates in the control, DTT, and DTBA sperm pretreatment groups (73.1, 77.8, and 84.1%, respectively, $P < 0.05$). The percentages of blastocyst formation on days 8 and 9 in the DTBA sperm pretreatment group (26.0% and 26.9%, respectively) were significantly higher than those in other groups ($P < 0.05$). In contrast, blastocyst formation rates on days 7–9 in the DTT sperm pretreatment group did not differ from those of the control group. In the sham injection group, only 8.5% of oocytes developed to the blastocyst stage, which was significantly lower than blastocyst rates of other groups ($P < 0.05$). No significant differences ($P > 0.05$) were found for hatching ability or total cell numbers of blastocysts among all groups (Supplementary Tables 1 and 2: online only).

Experiment 5: Effect of pretreating sperm with disulfide bond reducing agents on ploidy of blastocysts derived from ICSI

As shown in Table 4, the percentage of diploid blastocysts was greatly decreased in the sham injection group (14.6%) compared with the other treatment and non-treatment groups in which approximately 50% of the blastocysts formed were diploid ($P < 0.05$). The percentage of haploid blastocyst formation in the sham injection group had a tendency to be increased compared with control oocytes, DTT-treated and DTBA-treated groups ($P = 0.071$, 0.051, and 0.078, respectively); whereas the differences were not significantly different between the control and treatment groups. There was no significant difference in the percentages of embryos with other abnormalities (mixoploidy and polyploidy) among those produced in the control, sperm pretreatment, and sham injection groups.

Discussion

Our study demonstrated for the first time that the efficiency of bovine ICSI could be improved by pretreating sperm with the disulfide-reducing agent DTBA. In this study, DTBA was tested at different concentrations and various treatment intervals, and incubation with 5 mM DTBA for 5 min was found to be the optimal pretreatment method for bovine sperm. This treatment maintained spermatozoa disulfide bonds in a reduced state and maintained the stability of the sperm suspension. Previous studies showed that pretreating sperm with the disulfide reducing agent DTT significantly increased the percentage of reduced disulfide bonds in sperm heads [38, 39], which was similar to the results we obtained with DTBA in the current study.

In previous studies, DTT, a disulfide reducing agent, was applied

Table 3. Effects of pretreating sperm with 5 mM DTT for 20 min and 5 mM DTBA for 5 min on the developmental competence of bovine oocytes after ICSI

Source of reducing agent used for pretreatment	No. of oocytes (%Mean ± SEM)			No. of cultured oocytes cleaved (% Mean ± SEM)	No. of cultured oocytes developed to blastocyst on (% Mean ± SEM)		
	Injected	Extruded second PB	Cultured		day 7	day 8	day 9
Control (no-treatment)	117	97 (83.0 ± 0.9 ^a)	97	71 (73.1 ± 2.7 ^a)	11 (11.4 ± 1.1 ^a)	16 (16.6 ± 2.2 ^a)	17 (17.7 ± 1.7 ^a)
DTT	117	104 (88.9 ± 0.8 ^b)	104	81 (77.8 ± 5.9 ^a)	14 (13.4 ± 1.0 ^{ab})	20 (19.2 ± 1.3 ^a)	20 (19.2 ± 1.3 ^a)
DTBA	122	108 (88.5 ± 1.7 ^b)	108	91 (84.1 ± 2.1 ^a)	22 (20.4 ± 0.5 ^b)	28 (26.0 ± 1.3 ^b)	29 (26.9 ± 1.4 ^b)
* Sham injection	125	103 (82.3 ± 2.9 ^a)	103	55 (53.0 ± 5.2 ^b)	4 (3.8 ± 1.4 ^c)	9 (8.5 ± 1.9 ^c)	9 (8.5 ± 1.9 ^c)

Experiments were performed in quadruplicate. Different superscript letters within a column indicate significant differences ($P < 0.05$). * Sham injection = the oocytes were injected without sperm. Day 0 = the day of ICSI. PB: polar body; DTT: dithiothreitol; DTBA: dithiobutylamine; ICSI: intracytoplasmic sperm injection.

Table 4. Chromosomal analysis of bovine blastocysts derived from ICSI with sperm pretreated with 5 mM DTT for 20 min or 5 mM DTBA for 5 min

Group	No. of blastocysts examined	No. (%) of blastocyst classified as (%Mean ± SEM)			
		haploid	diploid	polyploid	mixoploid
Control (no-treatment)	13	3 (22.5 ± 13.1)	6 (47.5 ± 7.2 ^a)	1 (8.3 ± 8.3)	3 (21.7 ± 15.7)
DTT	14	2 (16.7 ± 16.7)	6 (43.3 ± 4.1 ^a)	2 (11.2 ± 6.6)	4 (28.8 ± 10.9)
DTBA	18	3 (24.0 ± 11.1)	9 (50.2 ± 10.5 ^a)	3 (14.6 ± 8.6)	3 (11.2 ± 6.6)
* Sham injection	10	5 (60.4 ± 15.7)	2 (14.6 ± 8.6 ^b)	0 (0.0 ± 0.0)	3 (25.0 ± 14.4)

Experiments were performed in quadruplicate. Different superscript letters within a column indicated significant difference ($P < 0.05$). * Sham injection = the oocytes were injected without sperm. DTT: dithiothreitol; DTBA: dithiobutylamine; ICSI: intracytoplasmic sperm injection.

to bovine and porcine spermatozoa during ICSI to improve the incidence of sperm decondensation [12, 22–24, 26]. However, sperm head decondensation failure is still a major problem in bovine ICSI [12] besides the incomplete oocyte activation. The reason for this problem might be related to the type of protamine, which can be classified as Type I or Type II. Bovine spermatozoa contain only Type I protamine [40], which is rich in cysteine. Each cysteine sulfhydryl is oxidized to form an intra- or intermolecular disulfide bridge [41] which makes bovine Type I protamine more stable compared with human, mouse, and rabbit protamine [17] because most of them contain Type II protamine (containing less cysteine and more histidine) [41]. Our results suggest that DTBA has the same efficiency as DTT in reducing these disulfide bonds in bovine spermatozoa.

Since DTBA is considered a novel agent for application in bovine assisted reproduction, we decided to further test the possible side effects of pretreatment with DTBA in terms of toxicity and resulting sperm quality. The type of sperm injected into the ooplasm during ICSI has been known to affect subsequent embryo development [19, 42]. According to previous reports, immobilization of sperm by scoring its tail could increase the success rate of fertilization during ICSI [43–45]. This phenomenon is attributed to the damage of the plasma membrane of spermatozoa, which enhances nuclear decondensation of the sperm head after ICSI [44]. Furthermore, Yanagida *et al.* [46] reported that immobilized sperm could induce the timing of Ca^{2+} oscillations and release sperm factors which initiate oocyte activation. Moreover, ICSI with immobilized sperm resulted in significantly higher blastocyst development rates compared with ICSI using sperm killed by repeating freeze-thaw cycles without cryoprotectant (0.8%,

20.3%, respectively) [19]. Dead or damaged sperm release substances that are harmful to live sperm and generate reactive oxygen species (ROS) [47, 48], causing DNA fragmentation and suppressing embryo development [48]. In the present study, pretreatment with DTT and DTBA did not reduce sperm viability dramatically. After pretreatment with DTT and DTBA, most spermatozoa were still alive. Although the viability of spermatozoa in the DTT-treated group was significantly reduced compared with the control and DTBA-treated groups, the percentage of live spermatozoa in the DTT-treated group was still very high. This result confirms the safety of sperm pretreatment with DTT and DTBA.

In the present study, we also measured the frequencies of spermatozoa with DNA fragmentation after pretreatment with DTT or DTBA. DNA damage in spermatozoa impairs fertilization and embryo development [49]. However, its impact on embryo development may depend on the proportion of damage [50, 51]. TUNEL assays revealed that pretreating sperm with DTT and DTBA significantly increased the proportion of sperm DNA fragmentation compared with the control group. This result was in concordance with the findings of Sekhavati *et al.* [24] on DTT; however, in that study, the percentage of TUNEL-positive spermatozoa in the DTT-treated group was notably higher (90%) compared with our result (12.0%). This difference may be due to different incubation times with DTT. Sekhavati *et al.* [24] pretreated sperm with DTT for 1 h, whereas we incubated sperm in reducing agents for only 20 min. This discordant result between protocols suggests that longer DTT incubation time is likely increases the percentage of spermatozoa with fragmented DNA, possibly affecting embryo development.

In this study, pretreatment of sperm with DTT had no effect on developmental competence of bovine ICSI oocytes, which is in agreement with several previous reports [14, 24, 26] but in contrast with the study of Rho *et al.* [12]. Our study found that DTT did not significantly increase the percentage of male PN formation, which was in agreement with the findings of Tian *et al.* [22] but contradicted with the reports of Rho *et al.* [12] and Suttner *et al.* [14]. On the other hand, sperm pretreatment with DTBA significantly increased the blastocyst formation rate of bovine ICSI oocytes. Furthermore, DTBA treatment was associated with a tendency to increase normal fertilization as characterized by the presence of 2 PN compared with the control group ($P = 0.071$). Although, DTT and DTBA treatment significantly reduced the disulfide bonds in sperm as demonstrated by red Acridine Orange fluorescence, none of these treatments improved the male PN formation rate. This result is in agreement with that of Cheng *et al.* [23] who reported that reduction of disulfide bonds after sperm pretreatment did not correlate with male PN formation in pigs. These discrepancies may be explained by the fact that reducing agents may elicit harmful effects on bovine sperm chromatin, which in turn causes negative effects on male PN formation. Therefore, we speculate that PN formation in the current ICSI system may be affected by an ooplasmic mechanism(s) other than S-S reduction in the sperm nucleus. Moreover, a significant relationship between the disulfide-rich and free thiol groups and the sperm decondensation rate could not be detected [39]. Previously, an abnormal pattern of sperm decondensation was observed after ICSI in rhesus monkeys [52]. Additionally, Sekhavati *et al.* [24] reported the altered expression of developmentally important genes in the DTT-treated group, which lead to improper embryo formation.

In the present study, sperm pretreatment with DTBA resulted in a higher blastocyst formation rate after ICSI, compared with pretreatment with DTT; however, the reason underlying this difference is unclear. It has been verified that DTT at a concentration of 5 mM for 20 min exerts more toxic effects on sperm than DTBA at a concentration of 5 mM for 5 min (Table 1). This toxic effect on sperm may have been manifested after ICSI, thus lowering embryo development to a level where the advantages of disulfide bond reduction could not be detected, which could be related to the pK_a value. The reactivity of a dithiol depends on the pK_a value. In the reduction of disulfide bonds, the maximum apparent rate of a thiol-disulfide interchange is observed for a thiol whose pK_a is approximately equal to the pH of the solution [53, 54]. The pH of the fertilization medium is approximately 7.8, which is lower than the pK_a of DTT (9.0), whereas the thiol pK_a value of DTBA is approximately 8.2. Thus, the active form of DTT is easily converted to its inactive form. Alternatively, because DTBA has an amino group unlike DTT, DTBA may be retained within the sperm for longer, which may prevent reoxidation of sperm and lead to efficient PN formation. Further research will be required for clarification of this issue. Alternatively, the DTBA-treated group tended to show increased PN formation compared with the control group. Thus, we speculated that the high blastocyst formation rate in the DTBA-treated group may be due to the increased percentage of PN formation. Regarding the efficacy of activation stimuli following ICSI on oocyte activation, no significant difference was observed in the incidence of oocyte activation after ICSI among the treated, non-treated, and sham injection groups.

Additionally, some activated oocytes in the sham injection group could develop to the blastocyst stage. According to Li *et al.* [55], such blastocysts may develop owing to parthenogenetic activation caused by the injection and activation protocol. Without blockade of the second PB extrusion, parthenogenetic bovine oocytes can develop into haploid blastocysts, which are characterized by low cell numbers [56]. Because insufficient male PN formation is still frequent in bovine ICSI, the possibility that ICSI-derived blastocysts are a result of parthenogenetic development cannot be excluded.

In this study, to monitor the formation of haploid embryos, blastocysts derived from ICSI were subjected to chromosomal analysis. The percentages of diploid and haploid blastocysts were similar among sperm-injected groups irrespective of pre-treatment, whereas the percentage of diploid blastocysts was significantly lower in sham injection group than in the sperm-injected groups. This result is in agreement with that of a previous study using DTT [12] and suggests that sperm pretreatment with reducing agents does not affect embryo ploidy in bovine ICSI. Nevertheless, the results disagree with the findings of Cheng *et al.* [23] who reported greatly decreased diploid blastocyst formation rates after DTT treatment compared with those in the control group. It was only in the sham injection group that the reduced frequency of diploid embryo formation was associated with an increased tendency towards haploidy, which can be explained by the lack of the fertilizing sperm head. The frequency of blastocysts with other chromosomal abnormalities (such as polyploidy and mixoploidy) was not significantly different among treated, non-treated and sham injection groups. Previous studies have reported that the percentage of chromosomal anomalies were dramatically increased in ICSI blastocysts [12, 23], which was in accordance with the findings of this study that showed a relatively high proportion of mixoploid and polyploid blastocysts. When oocytes are fertilized monospermiacally, polyploid embryos can be generated by the failure of the second PB extrusion [57], whereas mixoploidy may occur when karyokinesis is not associated with cytokinesis in some blastomeres during early development [58]. Chromosome abnormalities such as polyploidy and haploidy compromise embryo development and may result in pregnancy failure [59, 60]. Nevertheless, mixoploid embryos containing diploid blastomeres may have the potential to develop to term as polyploid cells normally contribute to the formation of the trophectoderm [61, 62].

In conclusion, DTBA pretreatment could reduce disulfide bonds in sperm. Treatment of spermatozoa with 5 mM DTBA for 5 min prior to ICSI significantly enhanced the blastocyst formation rate after ICSI and IVC in bovine oocytes, which was associated with a tendency towards increased percentage of normal fertilization; however, the precise mechanism of action of DTBA is unknown. Although DTT treatment was not effective, DTBA treatment could still improve the embryonic development. DTBA-pretreated sperm could be considered safe and could be used as an alternative for application in bovine ICSI. Further experiments involving embryo transfer into surrogates are required to elucidate whether the pretreatment of sperm with DTBA before ICSI manifests its positive effects on offspring production.

Acknowledgements

The study was financed by the NARO Institute of Livestock and Grassland Science, Japan (N32G4126), Suranaree University of Technology (SUT) and by the Office of the Higher Education Commission under NRU project of Thailand. T Suttirojpatana and R Parnpai were supported by Royal Golden Jubilee-PhD scholarship (2.B.TS/53/F.2).

References

- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; **340**: 17–18. [Medline] [CrossRef]
- Neri QV, Lee B, Rosenwaks Z, Machaca K, Palermo GD. Understanding fertilization through intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Cell Calcium* 2014; **55**: 24–37. [Medline] [CrossRef]
- Uehara T, Yanagimachi R. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol Reprod* 1976; **15**: 467–470. [Medline] [CrossRef]
- Hosoi Y, Mitake M, Utsumi K, Iritani A. Development of rabbit oocytes after intracytoplasmic of spermatozoa. *Proc 11th Congr Anim Reprod Artificial Insem* 1988; 331–333.
- Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smits J, Wisanto A, Devroey P. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1993; **8**: 1061–1066. [Medline]
- Goto K, Kinoshita A, Takuma Y, Ogawa K. Fertilisation of bovine oocytes by the injection of immobilised, killed spermatozoa. *Vet Rec* 1990; **127**: 517–520. [Medline]
- Kimura Y, Yanagimachi R. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol Reprod* 1995; **52**: 709–720. [Medline] [CrossRef]
- Catt SL, Catt JW, Gomez MC, Maxwell WMC, Evans G. Birth of a male lamb derived from an *in vitro* matured oocyte fertilised by intracytoplasmic injection of a single presumptive male sperm. *Vet Rec* 1996; **139**: 494–495. [Medline] [CrossRef]
- Cochran R, Meintjes M, Reggio B, Hylan D, Carter J, Pinto C, Paccamonti D, Godke RA. Live foals produced from sperm-injected oocytes derived from pregnant mares. *J Equine Vet Sci* 1998; **18**: 736–740. [CrossRef]
- Pope CE, Johnson CA, McRae MA, Keller GL, Dresser BL. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of cat oocytes. *Anim Reprod Sci* 1998; **53**: 221–236. [Medline] [CrossRef]
- Hewitson L, Dominko T, Takahashi D, Martinovich C, Ramalho-Santos J, Sutovsky P, Fanton J, Jacob D, Monteith D, Neuringer M, Battaglia D, Simerly C, Schatten G. Unique checkpoints during the first cell cycle of fertilization after intracytoplasmic sperm injection in rhesus monkeys. *Nat Med* 1999; **5**: 431–433. [Medline] [CrossRef]
- Rho GJ, Kawarsky S, Johnson WH, Kochhar K, Betteridge KJ. Sperm and oocyte treatments to improve the formation of male and female pronuclei and subsequent development following intracytoplasmic sperm injection into bovine oocytes. *Biol Reprod* 1998; **59**: 918–924. [Medline] [CrossRef]
- Chung JT, Keefer CL, Downey BR. Activation of bovine oocytes following intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Theriogenology* 2000; **53**: 1273–1284. [Medline] [CrossRef]
- Suttner R, Zakhartchenko V, Stojkovic P, Müller S, Alberio R, Medjugorac I, Brem G, Wolf E, Stojkovic M. Intracytoplasmic sperm injection in bovine: effects of oocyte activation, sperm pretreatment and injection technique. *Theriogenology* 2000; **54**: 935–948. [Medline] [CrossRef]
- Fujinami N, Hosoi Y, Kato H, Matsumoto K, Saeki K, Iritani A. Activation with ethanol improves embryo development of ICSI-derived oocytes by regulation of kinetics of MPF activity. *J Reprod Dev* 2004; **50**: 171–178. [Medline] [CrossRef]
- Jenkins TG, Carrell DT. Dynamic alterations in the paternal epigenetic landscape following fertilization. *Front Genet* 2012; **3**: 143. [Medline] [CrossRef]
- Perreault SD, Barbee RR, Elstein KH, Zucker RM, Keefer CL. Interspecies differences in the stability of mammalian sperm nuclei assessed *in vivo* by sperm microinjection and *in vitro* by flow cytometry. *Biol Reprod* 1988; **39**: 157–167. [Medline] [CrossRef]
- Wei H, Fukui Y. Effects of bull, sperm type and sperm pretreatment on male pronuclear formation after intracytoplasmic sperm injection in cattle. *Reprod Fertil Dev* 1999; **11**: 59–65. [Medline] [CrossRef]
- Horiuchi T, Emuta C, Yamauchi Y, Oikawa T, Numabe T, Yanagimachi R. Birth of normal calves after intracytoplasmic sperm injection of bovine oocytes: a methodological approach. *Theriogenology* 2002; **57**: 1013–1024. [Medline] [CrossRef]
- Kolbe T, Holtz W. Intracytoplasmic injection (ICSI) of *in vivo* or *in vitro* matured oocytes with fresh ejaculated or frozen-thawed epididymal spermatozoa and additional calcium-ionophore activation in the pig. *Theriogenology* 1999; **52**: 671–682. [Medline] [CrossRef]
- Lee JW, Yang X. Factors affecting fertilization of porcine oocytes following intracytoplasmic injection of sperm. *Mol Reprod Dev* 2004; **68**: 96–102. [Medline] [CrossRef]
- Tian JH, Wu ZH, Liu L, Cai Y, Zeng SM, Zhu SE, Liu GS, Li Y, Wu CX. Effects of oocyte activation and sperm preparation on the development of porcine embryos derived from *in vitro*-matured oocytes and intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 2006; **66**: 439–448. [Medline] [CrossRef]
- Cheng WM, An L, Wu ZH, Zhu YB, Liu JH, Gao HM, Li XH, Zheng SJ, Chen DB, Tian JH. Effects of disulfide bond reducing agents on sperm chromatin structural integrity and developmental competence of *in vitro* matured oocytes after intracytoplasmic sperm injection in pigs. *Reproduction* 2009; **137**: 633–643. [Medline] [CrossRef]
- Sekhaviati MH, Shadanloo F, Hosseini MS, Tahmoorespur M, Nasiri MR, Hajian M, Nasr-Esfahani MH. Improved bovine ICSI outcomes by sperm selected after combined heparin-glutathione treatment. *Cell Reprogram* 2012; **14**: 295–304. [Medline]
- Tateno H, Kamiguchi Y. Dithiothreitol induces sperm nuclear decondensation and protects against chromosome damage during male pronuclear formation in hybrid zygotes between Chinese hamster spermatozoa and Syrian hamster oocytes. *Zygote* 1999; **7**: 321–327. [Medline] [CrossRef]
- Galli C, Vassiliev I, Lagutina I, Galli A, Lazzari G. Bovine embryo development following ICSI: effect of activation, sperm capacitation and pre-treatment with dithiothreitol. *Theriogenology* 2003; **60**: 1467–1480. [Medline] [CrossRef]
- Yong HY, Hong JY, Kang SK, Lee BC, Lee ES, Hwang WS. Sperm movement in the ooplasm, dithiothreitol pretreatment and sperm freezing are not required for the development of porcine embryos derived from injection of head membrane-damaged sperm. *Theriogenology* 2005; **63**: 783–794. [Medline] [CrossRef]
- Chankitisakul V, Am-In N, Tharasanit T, Somjai T, Nagai T, Techakumphu M. Sperm pretreatment with dithiothreitol increases male pronucleus formation rates after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in swamp buffalo oocytes. *J Reprod Dev* 2013; **59**: 66–71. [Medline]
- Lukesh JC 3rd, Palte MJ, Raines RT. A potent, versatile disulfide-reducing agent from aspartic acid. *J Am Chem Soc* 2012; **134**: 4057–4059. [Medline] [CrossRef]
- Imai K, Tagawa M, Yoshioka H, Matoba S, Narita M, Inaba Y. The efficiency of embryo production by ovum pick-up and *in vitro* fertilization in cattle. *J Reprod Dev* 2006; **52**: 19–29.
- Liang YY, Ye DN, Laowtammathron C, Phermthai T, Nagai T, Somjai T, Parnpai R. Effects of chemical activation treatment on development of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes matured *in vitro* and fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Domest Anim* 2011; **46**: e67–e73. [Medline] [CrossRef]
- Rosenkrans CF Jr, Zeng GQ, McNamara GT, Schoff PK, First NL. Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. *Biol Reprod* 1993; **49**: 459–462. [Medline] [CrossRef]
- Imai K, Matoba S, Dochi O, Shimohira I. Different factors affect developmental competence and cryotolerance in *in vitro* produced bovine embryo. *J Vet Med Sci* 2002; **64**: 887–891. [Medline] [CrossRef]
- Shalgi R, Seligman J, Kosower NS. Dynamics of the thiol status of rat spermatozoa during maturation: analysis with the fluorescent labeling agent monobromobimane. *Biol Reprod* 1989; **40**: 1037–1045. [Medline] [CrossRef]
- Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ. Image processing with ImageJ. *Biophoton Int* 2004; **11**: 36–42.
- World Health Organization WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interactions. 4th ed. University of Cambridge Press, United Kingdom; 1999.
- Somjai T, Inaba Y, Aikawa Y, Ohtake M, Kobayashi S, Konishi K, Imai K. Relationship between the length of cell cycles, cleavage pattern and developmental competence in bovine embryos generated by *in vitro* fertilization or parthenogenesis. *J Reprod Dev* 2010; **56**: 200–207. [Medline] [CrossRef]
- Watanabe H, Akiyama J, Bhuiyan MMU, Fukui Y. Enhanced oocyte activation by intracytoplasmic sperm injection of porcine spermatozoa pre-treated with dithiothreitol. *J Mamm Ova Res* 2009; **26**: 54–60. [CrossRef]
- Julianelli V, Farrando B, Alvarez Sedó C, Calvo L, Romanato M, Calvo JC. Heparin enhances protamine disulfide bond reduction during *in vitro* decondensation of human spermatozoa. *Hum Reprod* 2012; **27**: 1930–1938. [Medline] [CrossRef]
- Calvin HI. Comparative analysis of the nuclear basic proteins in rat, human, guinea pig, mouse and rabbit spermatozoa. *Biochim Biophys Acta* 1976; **434**: 377–389. [Medline] [CrossRef]
- Balhorn R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol* 1982; **93**: 298–305. [Medline] [CrossRef]
- Vanderzwalmen P, Bertin G, Lejeune B, Nijs M, Vandamme B, Schoysman R. Two essential steps for a successful intracytoplasmic sperm injection: injection of immobilized spermatozoa after rupture of the oolema. *Hum Reprod* 1996; **11**: 540–547. [Medline] [CrossRef]

43. **Van den Bergh M, Bertrand E, Biramane J, Englert Y.** Importance of breaking a spermatozoon's tail before intracytoplasmic injection: a prospective randomized trial. *Hum Reprod* 1995; **10**: 2819–2820. [Medline]
44. **Dozortsev D, Rybouchkin A, De Sutter P, Dhont M.** Sperm plasma membrane damage prior to intracytoplasmic sperm injection: a necessary condition for sperm nucleus decondensation. *Hum Reprod* 1995; **10**: 2960–2964. [Medline]
45. **Palermo GD, Schlegel PN, Colombero LT, Zaninovic N, Moy F, Rosenwaks Z.** Aggressive sperm immobilization prior to intracytoplasmic sperm injection with immature spermatozoa improves fertilization and pregnancy rates. *Hum Reprod* 1996; **11**: 1023–1029. [Medline] [CrossRef]
46. **Yanagida K, Katayose H, Hirata S, Yazawa H, Hayashi S, Sato A.** Influence of sperm immobilization on onset of Ca^{2+} oscillations after ICSI. *Hum Reprod* 2001; **16**: 148–152. [Medline] [CrossRef]
47. **Aitken RJ, Jones KT, Robertson SA.** Reactive oxygen species and sperm function—in sickness and in health. *J Androl* 2012; **33**: 1096–1106. [Medline] [CrossRef]
48. **Roca J, Martínez-Alborcia MJ, Gil MA, Parrilla I, Martínez EA.** Dead spermatozoa in raw semen samples impair *in vitro* fertilization outcomes of frozen-thawed spermatozoa. *Fertil Steril* 2013; **100**: 875–881. [Medline] [CrossRef]
49. **Egozcue S, Vendrell JM, García F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Egozcue J.** Increased incidence of meiotic anomalies in oligoasthenozoospermic males preselected for intracytoplasmic sperm injection. *J Assist Reprod Genet* 2000; **17**: 307–309. [Medline] [CrossRef]
50. **Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, Cotichio G.** Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod* 2006; **21**: 2876–2881. [Medline] [CrossRef]
51. **Wdowiak A, Bakalczuk S, Bakalczuk G.** The effect of sperm DNA fragmentation on the dynamics of the embryonic development in intracytoplasmic sperm injection. *Reprod Biol* 2015; **15**: 94–100. [Medline] [CrossRef]
52. **Hewitson LC, Simerly CR, Tengowski MW, Sutovsky P, Navara CS, Haavisto AJ, Schatten G.** Microtubule and chromatin configurations during rhesus intracytoplasmic sperm injection: successes and failures. *Biol Reprod* 1996; **55**: 271–280. [Medline] [CrossRef]
53. **Whitesides GM, Lilburn JE, Szajewski RP.** Rates of thiol-disulfide interchange reactions between mono- and dithiols and Ellman's reagent. *J Org Chem* 1977; **42**: 332–338. [CrossRef]
54. **Singh R, Whitesides GM.** Reagents for rapid reduction of native disulfide bonds in proteins. *Bioorg Chem* 1994; **22**: 109–115. [CrossRef]
55. **Li X, Hamano K, Qian XQ, Funauchi K, Furudate M, Minato Y.** Oocyte activation and parthenogenetic development of bovine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Zygote* 1999; **7**: 233–237. [Medline] [CrossRef]
56. **Van De Velde A, Liu L, Bols PEJ, Ysebaert MT, Yang X.** Cell allocation and chromosomal complement of parthenogenetic and IVF bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 1999; **54**: 57–62. [Medline] [CrossRef]
57. **King WA, Verini Supplizi A, Diop HEP, Bousquet D.** Chromosomal analysis of embryos produced by artificially inseminated superovulated cattle. *Genet Sel Evol* 1995; **27**: 189–194. [CrossRef]
58. **De La Fuente R, King WA.** Developmental consequences of karyokinesis without cytokinesis during the first mitotic cell cycle of bovine parthenotes. *Biol Reprod* 1998; **58**: 952–962. [Medline] [CrossRef]
59. **King WA, Guay P, Picard L.** A cytogenetical study of 7-day-old bovine embryos of poor morphological quality. *Genome* 1987; **29**: 160–164. [Medline] [CrossRef]
60. **King WA.** Chromosome abnormalities and pregnancy failure in domestic animals. *Adv Vet Sci Comp Med* 1990; **34**: 229–250. [CrossRef]
61. **Kawarsky SJ, Basur PK, Stubbings RB, Hansen PJ, King WA.** Chromosomal abnormalities in bovine embryos and their influence on development. *Biol Reprod* 1996; **54**: 53–59. [Medline] [CrossRef]
62. **Long SE, Williams CV.** A comparison of the chromosome complement of inner cell mass and trophoblast cells in day-10 pig embryos. *J Reprod Fertil* 1982; **66**: 645–648. [Medline] [CrossRef]

