การผลิตเชิงการค้าตัวอ่อนโคนอกตัวโดยใช้โอโอไซท์จากลูกโคนมก่อนวัยเจริญพันธุ์

Commercial Production of Bovine Embryos *In Vitro* from Prepubertal Dairy Cattle Oocytes

*มงคล โปร่งเจริญ (Mongkol Prongcharoen)[1]**
วีระศักดิ์ วงศ์ศรีแก้ว (Weerasak Wongseekaew)[2]
ศักดิ์ศิริ ศิริเสถียร (Saksiri Sirisathean)[3]
อดิศักดิ์ สังข์แก้ว (Adisak Sangkaew)[4]

บทคัดย่อ

ลูกโคนมเพศเมียอายุ 4-6 เดือน จำนวน 10 ตัว ถูกกระตุ้นการเจริญรังไข่ด้วยฮอร์โมน follicular stimulating hormone (FSH) ในปริมาณ 50 มิลลิกรัมต่อตัว หลังจากฉีดฮอร์โมนเข็มสุดท้าย 24 ชั่วโมง ทำการผ่าเปิดช่องท้อง จำนวนฟอลลิเคิลที่ได้ ขนาด 1-2, 3-4, 5-6 และ 7-8 มม. จำนวน 58, 62, 17 และ 6 ใบ ตามลำดับ และทำการเจาะฟอลลิเคิลดูดเก็บไข่ได้ทั้งหมด 60 ใบ (34 cumulus oocyte complexes, 3 partial cumulus oocyte, 2 expanded cumulus oocyte, 1 nuded cumulus oocyte และ 20 degenerated oocyte) และนำไข่คุณภาพดีไปเพาะเลี้ยงในสารละลาย TCM-199, FSH 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, LH 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ estradiol -17- 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นาน 18-24 ชั่วโมง ในตู้อบ 39 °ซ, CO_2 5% ในอากาศ ได้ตัวอ่อนในระยะ 2, 4 และ 8 เซลล์ จำนวน 7, 7 และ 10 ใบ ตามลำดับ หลังจากนั้นอีก 24 ชั่วโมงต่อมา ตัวอ่อนหยุดการเจริญเติบโตและเสื่อมสลายเสียสภาพไป ผลจากการทดลองครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าโอโอไซท์ใช้ไข่ที่ได้จากลูกโคอายุ 4-6 เดือน ไม่เหมาะสมสำหรับนำมาผลิตตัวอ่อนบลาสโตซีสท์

Abstract

This experiment was carried out to explore the possibility of utilizing prepubertal calf oocytes as a source to produce bovine blastocysts in vitro. Ten female calves (age 4-6 months old) received follicle stimulating hormone (FSH) at the dose of 50 mg/calf. At 24 h after the last FSH injection, laparotomy was performed to collect immature oocytes from ovarian follicles. The total number of follicles identified with diameter of 1-2 mm, 3-4 mm, 5-6 mm, and 7-8 mm were 58, 62, 17 and 6 respectively. Follicular aspiration was conducted to collect the immature oocytes. A total of 60 oocytes was recovered and classified as 34 complete cumulus oocyte complexes, 3 incomplete cumulus oocyte complexes, 3 oocytes with cumulus expansion, 1 nuded oocyte and 20 degenerated oocytes. Only good quality oocytes were selected for further culture to complete the maturation process. For in vitro maturation, oocytes were cultured in TCM-199 medium supplemented with FSH 0.5 ug/ml, LH 10 ug/ml and estradiol 17- 1 ug/ml under 5% CO_2 in air at 39 °C for 18-24 h. After in vitro fertilization, the numbers of embryos that developed to the 2 - cell stage, 4 - cell stage, and 8 - cell stage were 7, 7 and 10 respectively. None of these embryos were able to develop beyond the 16 cell stage. The results of this study show that, under our conditions, oocytes recovered from prepubertal calves (4-6 month old) were not suitable for producing bovine blastocyst in vitro.

คำสำคัญ: โอโอไซท์ ลูกโค การผลิตตัวอ่อน

Keywords: oocyte, calf, embryo production

[1]*ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาศัลยศาสตร์และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[2]*รองศาสตราจารย์ ภาควิชาศัลยศาสตร์และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[3]*อาจารย์ ภาควิชาศัลยศาสตร์และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[4]*นักวิชาการสัตวบาล ภาควิชาศัลยศาสตร์และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
**corresponding author, e-mail: prongcharoen@yahoo.com*

บทนำ

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อผลสำเร็จของการปฏิสนธินอกตัว (In Vitro Fertilization, IVF) พอแยกออกได้ดังนี้ แหล่งที่มาของโอโอไซท์ คุณภาพโอโอไซท์ สารอาหารในการเจริญของโอโอไซท์ การปฏิสนธินอกตัว และการเจริญของตัวอ่อนหลังจากการปฏิสนธิ (Greve et al., 1993, Gordon and Lu, 1990)

การเจริญของโอโอไซท์

แหล่งที่มาของโอโอไซท์ ส่วนมากแล้วในการศึกษาการปฏิสนธินอกตัวจะใช้โอโอไซท์จากรังไข่ที่ได้มาจากโรงฆ่าสัตว์เนื่องมาจากหาง่ายราคาถูก และไม่สนใจว่าสายพันธุ์จะมีคุณภาพอย่างไร การเก็บรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์มานั้นระยะเวลาในการเก็บมาถึงห้องทดลองและอุณหภูมิในการเก็บก็มีผลต่อความสำเร็จในการศึกษาด้วย พบว่าถ้าเก็บที่ 37 °ซ หรือที่ 4 °ซ จะทำให้อัตราการปฏิสนธิลดลงไปเมื่อเทียบกับการเก็บรังไข่ไว้ที่ 25 °ซ นาน 8 ชั่วโมง (Yang et al., 1990) สำหรับลูกโคที่มีการทดลองโดยใช้ฮอร์โมน ฟอลลิคูลาร์ สติมูเลติง (Follicular Stimulating Hormone, FSH) ประมาณ 140 มิลลิกรัม และให้ฮอร์โมน ลูทีไนซิง (Luteinizing Hormone, LH) 4.5 มิลลิกรัม เข้าทางเส้นเลือดหลังจากนั้นอีก 60 ชั่วโมงหลังจากเริ่มให้ FSH และทำการเจาะดูดโอโอไซท์ผ่านทางช่องท้องอีก 24-26 ชั่วโมงต่อมา พบว่าได้จำนวนโอโอไซท์สูงถึง 23 ใบ (Irvin et al., 1993)

ชนิดและอายุของโอโอไซท์ ได้มีรายงานว่าโอโอไซท์ที่มีคูมูลัส (cumulus) ล้อมรอบ และ เนื้อไข่ (ooplasm) รูปร่างสมบูรณ์ไม่แตกสลาย หรือรูปร่างผิดปกติไปจะให้ผลดีต่อการปฏิสนธิดีกว่าในกลุ่มที่ไม่มีคูมูลัส และรูปร่างไม่สม่ำเสมอ (49% VS 16%) (Mochizuki et al., 1991; Brackett and Zuelke, 1993; Looney et al., 1994)

สารอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงโอโอไซท์ ที่นิยมและได้ผลดีเป็น TCM-199 ซึ่งมี bicarbonate หรือ HEPES เป็นตัวปรับกรดด่าง (Brackett and Zuelke, 1993)

การปฏิสนธินอกตัว

การเตรียมน้ำเชื้อ ตัวอสุจิที่นำมาใช้ในการปฏิสนธินอกตัวต้องผ่านขบวนการ capacitation และเกิดผลต่อเนื่องถึง acrosome reaction ก่อนการปฏิสนธิกับโอโอไซท์ จะใช้สารละลาย Tyrode's (Parrish et al., 1986) เป็นการเลือกตัวอสุจิที่เคลื่อนไหวโดยวิธี swim up และนำตัวอสุจิที่ได้มาเติมสารละลาย heparin ก่อนนำไปปฏิสนธิ (Xu et al., 1987)

เพาะเลี้ยงโอโอไซท์ร่วมกับตัวอสุจิ วิธีการที่ใช้จะเหมือนกับ Leibfriendge-Rutledge และคณะ (1989) โดยใช้สารละลาย IVF-TALP ที่มี heparin อยู่ มีความเข้มข้นของตัวอสุจิประมาณ $1x10^6$/มิลลิลิตร โดยเลี้ยงรวมกับโอโอไซท์นาน 16-22 ชั่วโมง ที่ 39 °ซ ใน 5% CO_2 ในอากาศ

การเจริญของตัวอ่อน:

ตัวอ่อนที่ได้หลังจากการปฏิสนธิแล้วมักจะพบว่าหยุดการเจริญเติบโต (block stage) ซึ่งเป็นไปได้อาจเนื่องมาจากขนาดโครงสร้างโมเลกุลของ m-RNA จากแม่หรือการเปลี่ยนแปลงยีนตัวอ่อน (Techakumphu, 1992) ดังนั้นจึงได้มีการใช้วิธีเพาะเลี้ยงร่วมกับเซลล์อื่น เช่น Cumulus cells (Goto et al., 1988)

ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จะใช้ลูกโคนมก่อนวัยเจริญพันธุ์มาเป็นแหล่งผลิตโอโอไซท์ และนำโอโอไซท์ที่ได้ไปปฏิสนธินอกตัวและเพาะเลี้ยงตัวอ่อนให้เจริญต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

สัตว์ทดลอง

คัดเลือกลูกโคนมเพศเมียอายุ 3 และ 5 เดือน ที่รู้ประวัติการคลอดจากพ่อและแม่พันธุ์ที่ให้ปริมาณน้ำนมไม่ต่ำกว่า 4,000 กิโลกรัมต่อระยะการให้น้ำนมจำนวน 10 ตัว ทำการกระตุ้นรังไข่โดยใช้ฮอร์โมน FSH-P ในปริมาณ 50 มิลลิกรัม ต่อตัว แบ่ง ฉีดเช้าและเย็นเป็นเวลา 4 วัน ติดต่อกัน ทำการวางยาสลบและผ่าเปิดช่องท้องอีก 24 ชั่วโมงหลังจากฉีดฮอร์โมนเข็มสุดท้าย นับจำนวนฟอลลิเคิล ที่เกิดขึ้นและใช้เข็มเบอร์ 20 เจาะดูดโอโอไซท์จากฟอลลิเคิล และเย็บปิดช่องท้อง

นับจำนวนโอโอไซท์ที่ได้ แล้วนำโอโอไซท์มาล้างในสารละลาย TCM-199 3-4 ครั้ง และประเมินคุณภาพของโอโอไซท์ และนำมาเพาะเลี้ยงในสารละลาย TCM-199, FSH 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, LH 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ estradiol-17-1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นาน 18-24 ชั่วโมง ในตู้อบ 39 °ซ, CO_2 5 % ในอากาศ

ปฏิสนธิกับน้ำเชื้อคุณภาพดี

เตรียมน้ำเชื้อก่อนการปฏิสนธิ นำน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายที่ 37 °ซ นาน 30 วินาที และนำน้ำเชื้อนี้มาแยกเอาตัวอสุจิเคลื่อนที่โดยวิธี swimp-up ตามวิธีของ Parrish et al. (1986) แยกตัวอสุจิที่ได้มาเติมในสารละลาย TALP ที่มี heparin 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เลี้ยงโอโอไซท์และตัวอสุจิร่วมกันในสารละลาย IVF-TALP ที่มี heparin โดยใช้ความเข้มข้นของตัวอสุจิประมาณ $1x10^6$ ตัว/มิลลิลิตร ในตู้อบ CO_2 5 %, 39 °ซ นาน 16-22 ชั่วโมง

เพาะเลี้ยงตัวอ่อน หลังจากที่ปฏิสนธิแล้วจะนำ zygotes ที่ได้มาเลี้ยงรวมกับเยื่อบุท่อนำไข่ (BOEC)ในสารละลาย TCM-199 +20 % CS เลี้ยงจนถึงระยะมอรูลาเพื่อรอการนำไปทำตัวอ่อนแช่แข็ง

ผลการศึกษา

จากการใช้ฮอร์โมน FSH ปริมาณ 50 มิลลิกรัม ต่อตัว โดยแบ่งฉีดติดต่อกันนาน 4 วัน พบว่ารังไข่ของลูกโคตอบสนองต่อฮอร์โมน โดยมีฟอลลิเคิลขนาด 1-2 มม., 3-4 มม, 5-6 มม, 7-8 มม, 9-10 มม และมากกว่า 10 มม. จำนวน 58 ใบ, 62 ใบ, 17 ใบ, 6 ใบ, 0 ใบ และ 0 ใบ ตามลำดับ และจำนวนโอโอไซท์ที่เก็บได้ โดยวิธีการเจาะดูดทั้งหมด 60 ใบ เป็นชนิดโอโอไซท์คุณภาพดี (cumulus oocyte complex, COC) 21 ใบ, Partial cumulus oocyte (partial) 3 ใบ, Expanded cumulus oocyte (expand) 2 ใบ, Nude cumulus oocyte (nude) 1 ใบ และ Degenerated cumulus oocyte (degen) 20 ใบ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 และลักษณะโอโอไซท์คุณภาพดี (COC), Partial cumulus oocyte และ Nude cumulus oocyte รูปที่ 1 และลักษณะโอโอไซท์ Expanded cumulus oocyte หลังจากเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง แสดงในรูปที่ 2

ผลจากการนำโอโอไซท์คุณภาพดี (COC) ไปเพาะเลี้ยงและปฏิสนธินอกตัว จำนวน 34 ใบ พบว่ามีการปฏิสนธิและแบ่งตัวต่อไปถึงระยะ 2 เซลล์ จำนวน 7 ใบ, ระยะ 4 เซลล์ 7 ใบ และ ระยะ 8 เซลล์ 10 ใบ หลังจากนั้นตัวอ่อนหยุดการเจริญเติบโตและตายหมด ลักษณะตัวอ่อนระยะ 2, 4 และ 8 เซลล์ แสดงไว้ในรูปที่ 3, 4 และ 5 ตามลำดับ สำหรับโอโอไซท์ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิแสดงไว้ในรูปที่ 6

วิจารณ์ผลการศึกษา

จากการทดลองใช้ลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์ กระตุ้นการเจริญของรังไข่ด้วยฮอร์โมน FSH 50 มก./ตัว พบว่าลูกโคตอบสนองต่อฮอร์โมนดี แต่ว่าขนาดของฟอลลิเคิลที่ได้มีขนาดเล็ก (1-2 มิลลิเมตร) จำนวนมาก 40.55 % ซึ่งขนาดของฟอลลิเคิลมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกโดยตรงกับคุณภาพของโอโอไซท์ ทำให้โอโอไซท์ที่ได้จึงมีคุณภาพต่ำ (Blondin and Sirard, 1995; Motlik and Fulka, 1986; Crozet, 1989; Levesque and Sirard, 1994) และหลังจากนำมาเพาะเลี้ยง และปฏิสนธิกับไข่ พบว่ามีการเจริญเติบโตต่อไปถึงระยะ 8 เซลล์น้อย (30.3%) และหลังจากนั้นตัวอ่อนหยุดการเจริญเติบโตและตายหมด ซึ่งสอดคล้องกับงานทั่วไปที่พบว่า โอโอไซท์ของลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์นำมาปฏิสนธินอกตัวมีอัตราการรอดต่ำ เป็นผลมาจากโอโอไซท์ที่ได้จากลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์นั้นมีการเจริญเติบโตที่ยังไม่สมบูรณ์ กล่าวคือ ปริมาณฮอร์โมน estradiol และ LH ในของเหลวของฟอลลิเคิล ของลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์มีปริมาณน้อยกว่าฟอลลิเคิลของแม่โค จึงมีผลทำให้โอโอไซท์เจริญต่อไปไม่ดีเท่าที่ควร (Marchal et al., 2001) และอาจมีผลจากปริมาณโปรตีนที่พบในโอโอไซท์ของลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์แตกต่างจากโอโอไซท์ของแม่โค และมีผลต่อการเจริญเติบโตและปฏิสนธิด้วย (Levesque and Sirard, 1994; Palma et al., 2001)

จากการทดลองนี้ที่ใช้โอโอไซท์ลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์นำมาปฏิสนธินอกตัวเพื่อผลิตตัวอ่อน ไม่สามารถผลิตตัวอ่อนโคได้ ดังนั้นในการผลิตตัวอ่อนนอกตัว ควรใช้โอโอไซท์จากแม่โคหรือโคสาวที่ถึงวัยเจริญพันธุ์แล้ว จะให้ผลดีกว่าโอโอไซท์ที่ได้จากลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่สนับสนุนทุนการวิจัยครั้งนี้ และบริษัท ฟาร์ม ดี เจ จำกัด จังหวัดสระแก้ว ที่สนับสนุนให้ลูกโคนมในการทดลอง และผู้ที่เกี่ยวข้องทุกท่านที่ทำให้การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ดี

เอกสารอ้างอิง

Blondin, P. and Sirard, M.A. 1995. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Mol. Reprod. Dev.** 41(1): 54-62.

Brackett, B.G. and Zuelke, K.A. 1993. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. **Theriogenology** 39: 43-64.

Crozet, N. 1989. Nucleolar structure and RNA synthesis in mammalian oocyte. **J. Reprod. Fert.** 38: 9-16.

Gordon, I. and Lu, K.H. 1990. Production of embryos in vitro and its impact on livestock production. **Theriogenology** 33(1): 77-87.

Goto, K., Kajihara, Y., Kosaka, S., Koba, M., Nakanishi, Y. and Ogawa, K.1988. Pregnancies after in vitro fertilized of cow follicular oocytes, their incubation in vitro and their transfer to the cow uterus. **Theriogenology** 29: 251.

Greve, T., Madison, V., Avery, B., Callesen, H. and Hyttel, P. 1993. In vitro production of bovine embryos: A progress report and the consequences on the genetic upgrading of cattle populations. **Anim. Reprod. Sci.** 33: 1-69.

Irvin, B., Armstrong, D.T., Earl, C., Mclearn, D. and Seamark, R.F. 1993. Follicle development and oocyte recovery from calves with repeated gonadotropin stimulation and follicular aspiration. **Theriogenology** 39: 237.

Leibfried-Rutledge, E.C., Critser, J.J., Parish, J.J. and Frist, N.L. 1989. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. **Theriogenology** 31(1): 61-74.

Levesque, J.T., Sirard, M.A. 1994. Proteins in oocytes from calves and adult cows before maturation: relationship with their development capacity. **Reprod. Nutr. Dev.** 34(2): 133-139.

Looney, C.R., Lindsey, B.R., Gonseth, C.L. and Johnson, D.L. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. **Theriogenology** 41: 67-72.

Marchal, R. , Feugang, J.M., Perreau, C., Venturi, E., Terqui, M. and Mermillod, P. 2001. Meiotic and developmental competence of prepubertal and adult swine oocytes. **Theriogenology** 56: 17-29.

Motlik, J. and Fulka, J. 1986. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. **Theriogenology** 25: 87-96.

Mochizuki, H., Fukui, Y. and Ono, H. 1991. Effect of the number of granulosa cell add to culture medium for in vitro maturation, fertilization and development of bovine oocytes. **Theriogenology** 36(6): 973-986.

Palma, G.A., Tortonese, D.J. and Sinowatz, F. 2001. Developmental capacity in vitro of prepubertal oocytes. **Anat. Histol. Embryol.** 30(5): 295-300.

Parrish, J.J., Susko-Parrish, J., Leibfriend-Rutledge, M.L., Crister, E.S., Eyestone, W.H. and First, N.L. 1986. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology** 25: 591-600.

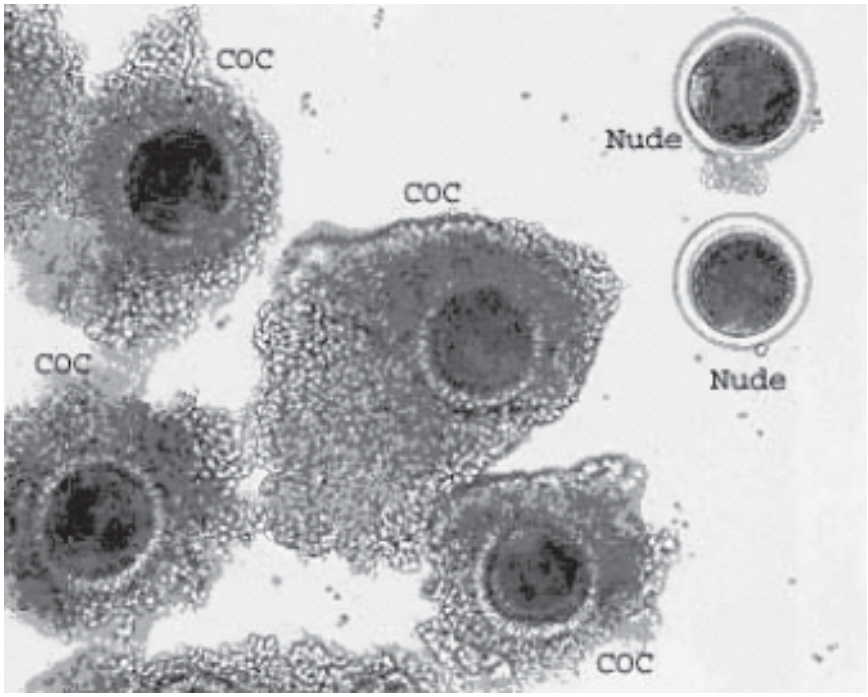
Techakumphu, M. 1992. Bovine in vitro fertilization factors affecting success rate. **J. Thai. Vet. Med. Assoc.** 43(3): 13-27.

Xu, K.P., Greve, T., Callesen, H. and Hytted, P. 1987. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized in vitro. **J. Reprod. Fert.** 81: 501-504.

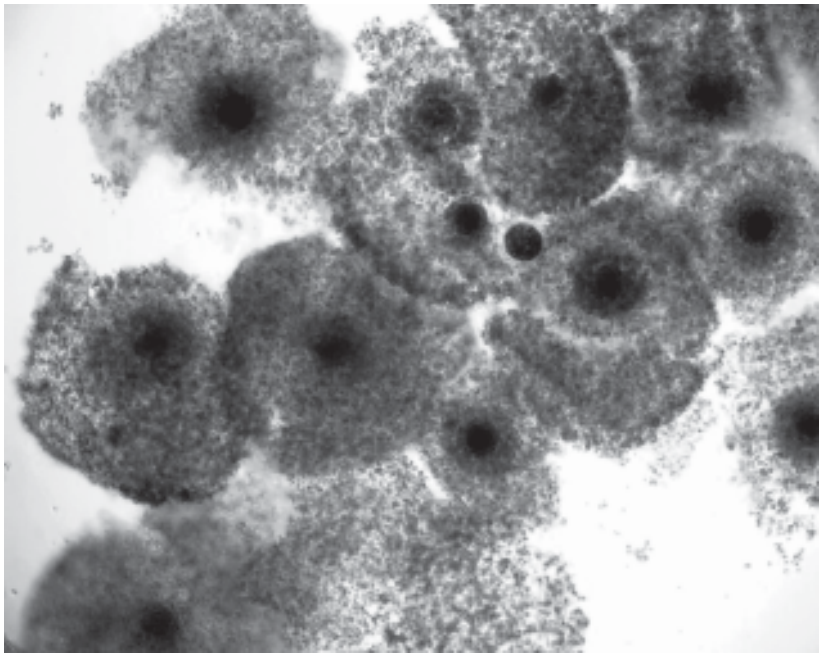
Yang, N.S., Lu, K.H. and Gordon, I. 1990. In vitro fertilization (IVF) and culture (IVC) bovine oocytes from stored ovaries. **Theriogenology** 33: 352.

ตารางที่ 1 ผลการทดลอง จากการใช้ฮอร์โมน FSH กระตุ้นการเจริญรังไข่ของลูกโค

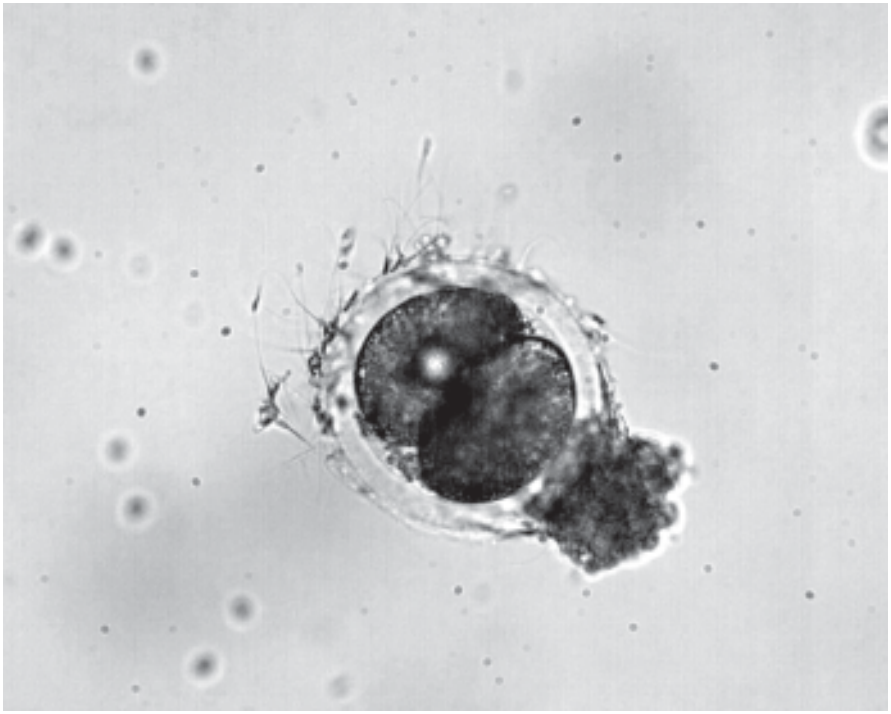
เบอร์ลูกโค	ขนาด และจำนวนฟอลลิเคิล บนรังไข่ ด้านซ้าย (มิลลิเมตร)						ขนาด และจำนวนฟอลลิเคิล บนรังไข่ ด้านขวา (มิลลิเมตร)						จำนวนของโอโอไซท์	ชนิดของโอโอไซท์
	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	>10	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	>10		
C4132	2	2	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	0	-
C1460	1	2	2	-	-	-	1	1	1	2	-	-	4	COC 3, Degen 1
C1463	1	1	2	1	-	-	-	3	2	1	-	-	6	COC 3, Partial 2, Degen 1
C1464	5	7	1	-	-	-	3	3	-	1	-	-	7	COC 3, Partial 1, Degen 3
C1508	-	5	1	-	-	-	5	2	1	-	-	-	7	COC 5, Nude 1, Degen 1
C1509	1	5	1	-	-	-	2	1	-	-	-	-	4	Degen 4
C1507	3	3	1	1	-	-	2	3	-	-	-	-	8	COC 5, Degen 3
C1511	3	-	1	-	-	-	-	2	1	-	-	-	4	COC 1 degen 3
C1512	10	8	-	-	-	-	9	14	1	-	-	-	17	COC 13, Expand 2, Degen 2
C1506	2	-	1	-	-	-	3	-	1	-	-	-	3	COC 1, Degen 2
Total	28	33	10	2	0	0	30	29	7	4	0	0	60	COC 34, Partial 3, Exapnd 2, Nude 1, Degen 20



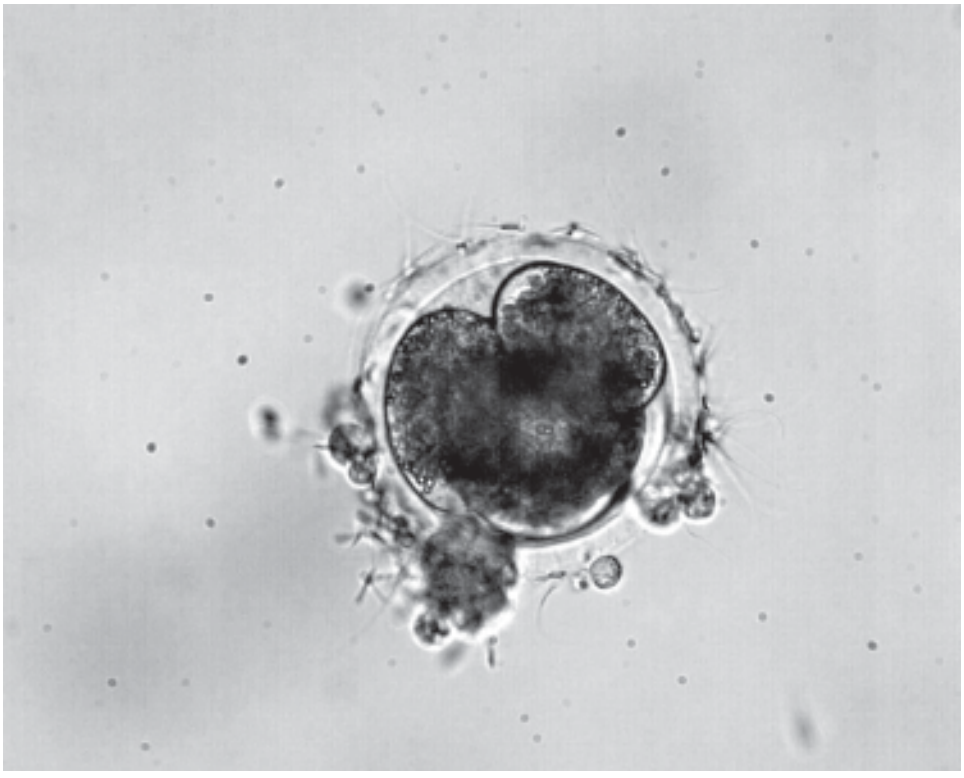
รูปที่ 1 โอโอไซท์ที่เจาะดูดจากฟอลลิเคิลก่อนเพาะเลี้ยง (โอโอไซท์คุณภาพดี (COC) และ Nude cumulus oocyte, Nude)



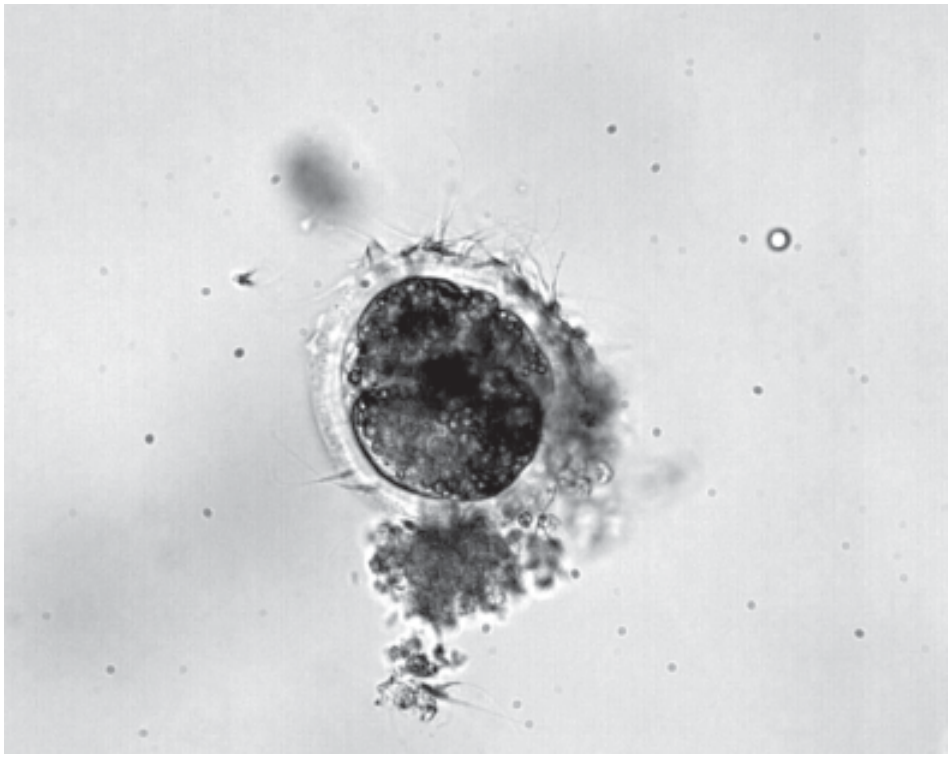
รูปที่ 2 โอโอไซท์หลังจากที่เพาะเลี้ยงในสารละลายนาน 24 ชั่วโมง (Expanded cumulus oocyte)



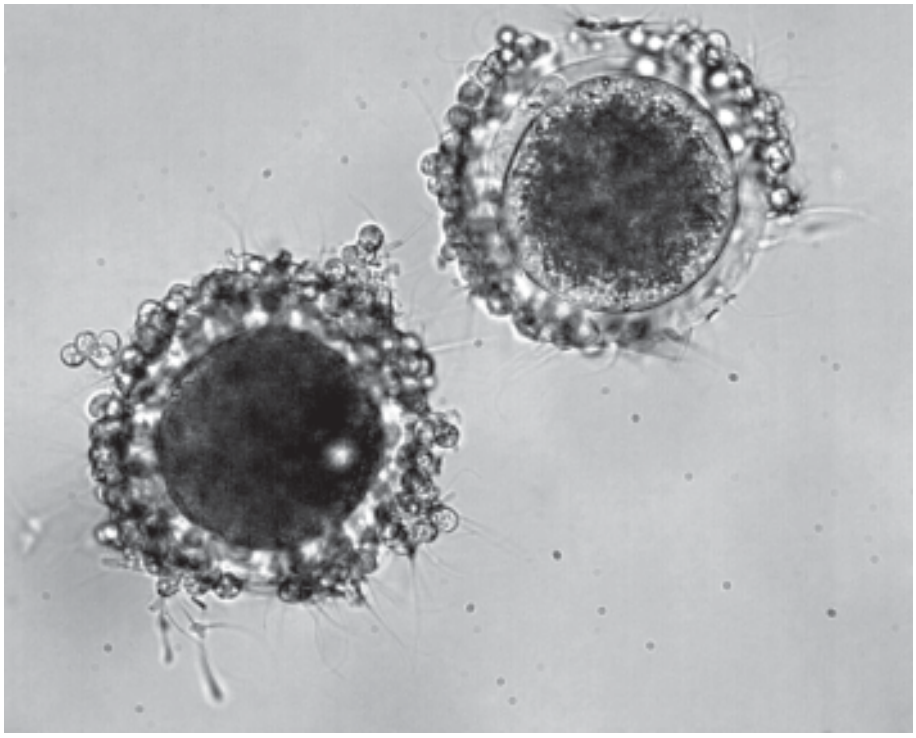
รูปที่ 3 ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์



รูปที่ 4 ตัวอ่อนระยะ 4 เซลล์



รูปที่ 5 ตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์



รูปที่ 6 โอโอไซท์ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ