ผลของการเก็บซ้ำและระดับความดันที่มีต่ออัตราการเก็บและคุณภาพของโอโอไซต์ในการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูในกระบือปลัก

เอกชาติ พรหมดิเรก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาการสืบพันธุ์สัตว์ ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544

ISBN 974 –03 –0640 -3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The Effect of Repeated Collections and Vacuum Pressure levels on Rate of Collection and Oocyte Quality by OPU method in Swamp Buffalo

Mr. Akachart Promdireg

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Theriogenology
Department of Obstetrics Gynaecology and Repoduction
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2001

ISBN 974 –03 –0640 –3

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของการเก็บซ้ำและระดับความดันที่มีต่ออัตราการเก็บและคุณภาพของโอโอไซต์ในการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูในกระบือปลัก
โดย	นาย เอกชาติ พรหมดิเรก
สาขาวิชา	วิทยาการสืบพันธุ์สัตว์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.น.สพ.ดร มงคล เตชะกำพุ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รศ.น.สพ.ดร. ชัยณรงค์ โลหชิต

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.ณรงค์ศักดิ์ ชัยบุตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ น.สพ.ดร. อรรณพ คุณาวงษ์กฤต)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร. มงคล เตชะกำพุ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร. ชัยณรงค์ โลหชิต)

.....กรรมการ
(ศาสตราจารย์ น.สพ. พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นพ.สมชาย สุวจนกรณ์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกชาติ พรหมดิเรก : ผลของการเก็บซ้ำและระดับความดันที่มีต่ออัตราการเก็บและคุณภาพของโอโอไซต์ในการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูในกระบือปลัก (THE EFFECT OF REPEATED COLLECTIONS AND VACUUM PRESSURE LEVELS ON RATE OF COLLECTION AND OOCYTE QUALITY BY OPU METHOD IN SWAMP BUFFALO)
อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.น.สพ.ดร. มงคล เตชะกำพุ , อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : รศ.น.สพ.ดร. ชัยณรงค์ โลหชิต,75 หน้า. ISBN 974 –03 –0640 -3

การศึกษาครั้งนี้มีจุดมุ่งหมาย เพื่อศึกษาผลของการเก็บโอโอไซต์ด้วยการใช้เข็มเจาะดูดร่วมกับเครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูงสอดผ่านทางช่องคลอด (โอพียู)ซ้ำหลายครั้ง ในลูกกระบือปลัก (การทดลองที่1) และศึกษาความดันสูญญากาศที่เหมาะสมในการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู (การทดลองที่ 2) การทดลองที่ 1 ใช้กระบือเพศเมียก่อนวัยเจริญพันธุ์ อายุ 8 – 10 เดือน จำนวน 9 ตัว ฝังฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ใบหู 7 วัน ก่อนทำการกระตุ้นด้วย ฟอลลิเคิล สติมูเลติงฮอร์โมน (เอฟเอสเอช) ขนาด 180 มิลลิกรัม แบ่งฉีดเช้าและเย็น 3 วัน (40x40,30x30,20x20) ร่วมกับโกนาโดโทรปิน รีลิสชิงฮอร์โมน(จีเอ็นอาร์เอช) ตรวจการตอบสนองของรังไข่หลังกระตุ้นและทำการดูดเก็บโอโอไซต์ด้วยแรงดูด 80 –100 mmHg หลังจากฉีดจีเอ็นอาร์เอช 24 ชั่วโมง โดยทำการเก็บห่างกันทุก ๆ 2 สัปดาห์ ทั้งหมด 5 ซ้ำ รวม 42 ครั้ง ผลการศึกษาพบว่า ลูกกระบือมีการตอบสนองต่อการกระตุ้น 88.1%(37/42) คิดเป็น 6.6 ± 3.6 ฟอลลิเคิลต่อตัว (n=256)โดยขนาดของฟอลลิเคิลที่พบหลังกระตุ้นเฉลี่ยเท่ากับ 5.0 ± 2.0 มิลลิเมตร ผลการเก็บโอโอไซต์ที่ได้ในลูกกระบือเท่ากับ 5.4 ± 3.7 โอโอไซต์ต่อตัว คิดเป็น 82.4%(212/256) จากผลการทดลองที่ 1 พบว่าการเก็บซ้ำไม่มีผลต่ออัตราการเก็บ โดยการเก็บโอโอไซต์ในครั้งที่ 1,2,3,4 และ 5 ให้อัตราการเก็บเท่ากับ 83.2%(43/50), 82.5%(54/66), 81.3%(42/52), 68.8%(27/36), 87.9%(46/52)ตามลำดับ และคุณภาพของโอโอไซต์แต่ละชนิดในการกระตุ้นแต่ละครั้งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ(P>0.05) ส่วนการทดลองที่ 2 ศึกษาในกระบือสาวที่ไม่เคยได้รับการผสมอายุ 2.5 ปี จำนวน 6 ตัว โดยทำการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอช ขนาด 280 มิลลิกรัม แบ่งฉีดเช้าและเย็น 3 วัน (60x60,50x50,30x30) ทำการศึกษาเปรียบเทียบแรงดันขนาด 60, 80 และ 100 mmHg จำนวน 2 รอบ ห่างกันรอบละ 1 เดือน ผลการศึกษาพบว่า กระบือสาวมีการตอบสนองต่อการกระตุ้น 100% (36/36) คิดเป็น 7.4 ± 3.6 ฟอลลิเคิลต่อตัว(n=36) ผลการเก็บพบว่าระดับ 60 mmHg ให้ผลอัตราการเก็บสูงสุดเท่ากับ 84.1%(93/108) เปรียบเทียบกับแรงดัน 80 และ 100 mmHg ซึ่งเท่ากับ 72.8%(53/70) , 72.6%(69/89) (P< 0.05) แต่คุณภาพโอโอไซต์ที่ได้ไม่แตกต่างกัน จากการศึกษาทั้ง 2 การทดลองพบว่าการเก็บโอโอไซต์ซ้ำ แบบโอพียูไม่มีผลต่ออัตราการเก็บและคุณภาพของโอโอไซต์ และระดับแรงดันที่เหมาะสมสำหรับการเก็บอยู่ในระดับ 60 mmHg

ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา วิทยาการสืบพันธุ์สัตว์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2544 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4175552731 : MAJOR THERIOGENOLOGY
KEY WORD: SWAMP BUFFALO / OPU / REPEAT COLLECTION / VACUUM PRESSURE / RATE OF COLLECTION / OOCYTE QUALITY
AKACHART PROMDIREG : THE EFFECT OF REPEATED COLLECTIONS AND VACUUM PRESSURE LEVELS ON RATE OF COLLECTION AND OOCYTE QUALITY BY OPU METHOD IN SWAMP BUFFALO. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. MONGKOL TECHAKUMPHU, Ph.D., THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. CHAINARONG LOHACHIT,Ph.D. 75 pp. ISBN 974-03-0640-3

The objectives of the studies were to investigate the effect of repeated oocyte collection by transvaginal ultrasound – guidance(OPU) in swamp buffalo calves (Experiment I) and the appropriate aspiration vacuum pressure for OPU (Experiment II) . In Exp I.,nine buffaloes, aged 8 – 10 mo were stimulated with 180 mg. Follicle Stimulating Hormone(FSH) twice a day for 3 days consecutively (40x40,30x30,20x20) 7 days after an ear implant with and GnRH 24 h later. Oocytes were collected from each animal of 2 wk interval in five repeated collection.The ovarian response and the oocytes were collected after 24 h of GnRH injection.The results showed 88.1%(37/42) of animal responded to treatment with the average of 6.6 ± 3.6 follicles per animal(n=256) with an average dimeter of 5.0 ± 2.0 mm.. The oocyte recovery rate was 5.4 ± 3.7 oocytes per animal(212/256) which were 83.2%(43/50), 82.5%(54/66), 81.3%(42/52), 68.8%(27/36) and 87.9%(46/52) in the 1^{st},2^{nd},3^{rd},4^{th} and 5^{th} collection ,respectively(P>0.05) .There were no differences in ovarian responses and recovery rates among the collections.In Exp II . Three vacuum pressure (60,80 and100 mmHg) were compared in 6 superstimulated buffalos heifers aged 2.5 yrs. The animals were treated with 280 mg.FSH (60x60,50x50,30x30) with the same protocol as mentioned above. Each animal was collected by any aspirated vacuum at 2 wk interval and one repeat collection was performed 2 mo later with all vacuum pressure.The results showed 100% (36/36) of buffalo responding to treatment with 7.4 ± 3.6 folllicles per animal(n=36).The recovery rate was highest in 60 mmHg 84.1%(93/108)compairing to 80 mmHg(72.8%)(53/70) and 100 mmHg(82.6%)(69/89)(P< 0.05).From this experiment, it can be concluded that no effect of repeat OPU on oocyte recovery rate and oocyte quality were concerned. The appropriate vacuum pressure to provide the highest collection rate was 60 mmHg.

Department of Obstetrics Gyneacology and Reproductio Student' s signature……

Field of study Theriogenology Advisor' s signature……

Academic year 2001 CO- advisor' s signature……

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะสำเร็จลุล่วงไม่ได้หากไม่ได้รับความกรุณา ช่วยเหลือและให้คำแนะนำในด้านต่าง ๆ เป็นอย่างดียิ่งจากรองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. มงคล เตชะกำพุ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ชัยณรงค์ โลหชิต อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

กราบขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่าน ที่กรุณาสละเวลาในการให้คำแนะนำต่างๆ ซึ่งทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีคุณค่า และมีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ สพ.ญ.นวเพ็ญ ภูติกนิษฐ์ ที่ให้ความช่วยเหลือในงานวิจัย ตลอดจนเจ้าหน้าที่ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอบคุณ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย บัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน 2544 ของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และกองทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนในการวิจัยครั้งนี้

ขอบคุณ กองบำรุงพันธุ์ กรมปศุสัตว์ ที่อนุเคราะห์กระบือทดลอง

ขอขอบพระคุณ คุณอุเทน พรหมดิเรก คุณสุรีย์พร พรหมดิเรก คุณปาลิกา เชื้อสงฆ์ และคุณอารีย์วรรณ พรหมดิเรก ที่คอยให้คำปรึกษา และให้การสนับสนุนในด้านต่างๆ อีกทั้งยังคอยเป็นกำลังใจอยู่เคียงข้างตลอดเวลาจนผู้วิจัยสำเร็จการศึกษา...ขอขอบพระคุณ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ซ

สารบัญภาพ..... ฌ

บทที่

1. บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2

1.3 ขอบเขตของการวิจัย..... 3

1.4 ข้อตกลงเบื้องต้น..... 3

1.5 ข้อจำกัดของการวิจัย..... 3

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย..... 3

1.7 วิธีดำเนินงานวิจัย..... 4

1.8 การสังเกตและการวัด..... 4

1.9 การรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล..... 5

1.10 ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย..... 5

2. เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 6

2.1 แนวเหตุผลและทฤษฎีที่สำคัญ..... 6

2.2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง..... 10

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู..... 10

3. วิธีดำเนินการวิจัย..... 19

3.1 คำถามของการวิจัย..... 19

3.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 19

3.3 สมมติฐานของการวิจัย..... 20

3.4 การทดลองที่ 1..... 20

3.5 การทดลองที่ 2..... 35

3.6 การรวบรวม และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ..... 36

3.7 ระยะเวลาในการศึกษา..... 36

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล..... 37
   4.1 การตรวจรังไข่ก่อนการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน..... 37
   4.2 การกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่..... 38
   4.3 การเก็บโอโอไซต์..... 39
   4.4 การย้อมสีโอโอไซต์ด้วยวิธี Rapid staining..... 41
5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ..... 50
   5.1 การตรวจรังไข่ก่อนการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน..... 50
   5.2 การกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่..... 51
   5.3 การเก็บโอโอไซต์..... 53
   5.4 การย้อมสีโอโอไซต์ด้วยวิธี Rapid staining..... 55

เอกสารอ้างอิง..... 57

ภาคผนวก

ก. วัสดุ และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย..... 64
ข. ฮอร์โมนที่ใช้ในโปรแกรมการกระตุ้นสร้างฟอลลิเคิล..... 67
ค. การเตรียมน้ำยาเพื่อใช้ในการทดลอง..... 68
ง. ผลงานตีพิมพ์จากวิทยานิพนธ์..... 70

ประวัติผู้เขียน..... 71

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงการเปรียบเทียบวิธีการต่าง ๆ ในการเก็บโอโอไซต์.....	8
2	แสดงผลของความแรงในการเจาะดูดต่ออัตราการเก็บและคุณภาพโอโอไซต์.....	11
3	แสดงจำนวนฟอลลิเคิลที่เจาะ จำนวนโอโอไซต์ที่ได้ อัตราการแบ่งตัว และอัตราการเจริญของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส จากการปฏิสนธิในหลอดทดลอง ของโอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มหลายชั้นจากการเก็บด้วยวิธีโอพียู ในแม่โคที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอช และไม่ได้รับการกระตุ้น.....	13
4	แสดงโปรแกรมการฉีดกระตุ้นลูกระบือด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน.....	21
5	แสดงผลการตรวจสอบรังไข่ก่อนการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอชในลูกกระบือปลัก.....	37
6	แสดงผลการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ หลังกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอชในลูกกระบือปลัก.....	38
7	แสดงขนาดของฟอลลิเคิลที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอช ในลูกกระบือปลัก.....	39
8	แสดงผลการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ลูกกระบือปลักที่ได้รับการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลและทำการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีการใช้เข็มเจาะดูด ร่วมกับเครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูง.....	41
9	แสดงผลการตรวจสอบลักษณะโครโมโซมของโอโอไซต์ลูกกระบือปลักที่เจาะเก็บด้วยวิธีโอพียูโดยจำแนกตามชนิดของโอโอไซต์.....	42
10	แสดงผลการตรวจสอบรังไข่ก่อนการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอชในกระบือสาว..... .	44
11	แสดงผลการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่หลังกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอช ในกระบือสาว.....	45
12	แสดงขนาดของฟอลลิเคิลที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอช ในกระบือสาว.....	46
13	แสดงผลการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่กระบือสาว ที่ได้รับการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลและทำการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีการใช้เข็มเจาะดูดร่วมกับเครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูง.....	48
14	แสดงผลการตรวจสอบลักษณะโครโมโซมของโอโอไซต์กระบือสาวที่เจาะเก็บด้วยวิธีโอพียูโดยจำแนกตามชนิดของโอโอไซต์.....	49

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ฮอร์โมนที่ใช้ในโปรแกรมการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่	22
2	ภาพอัลตราซาวด์แสดงระดับการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ก่อนการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอช	23
3	การทำ Caudal epidural nerve block ในกระบือก่อนทำการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู	25
4	การตรวจการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอชก่อนทำการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู	25
5	probe ของอัลตราซาวด์ ชนิดสอดผ่านช่องคลอด ขนาดความถี่ 5 เมกกะเฮิต์ซพร้อมเข็มที่ใช้ในการเจาะเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู	26
6	แสดงการสอด probe ผ่านทางช่องคลอดของกระบือเพื่อเก็บโอโอไซต์	26
7	ไดอะแกรมแสดงการเจาะโอโอไซต์จากรังไข่	27
8	ตำแหน่งรังไข่ขณะทำการเจาะ	27
9	แสดงเครื่องควบคุมระดับแรงดันสูญญากาศและ test tube heater ที่ใช้ในการทำโอพียู	28
10	ภาพของรังไข่ขณะเจาะ แนวประแสดงแนวของเข็ม	28
11	ภาพของรังไข่หลังเจาะแล้ว ไม่เห็นฟอลลิเคิลเหลืออยู่	29
12	แสดงของเหลวที่เก็บได้จากฟอลลิเคิล (follicular fluid) ด้วยวิธีโอพียู	29
13	โอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มหลายชั้น (Complex oocyte cumulus,coc)	31
14	โอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มเพียงบางส่วน(Partial oocyte cumulus,P)	31
15	โอโอไซต์ชนิดที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้ม(Denude oocyte,D)	32
16	โอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสแผ่กระจาย(Expand cumulus oocyte,EXP)	32
17	โอโอไซต์ชนิดที่มีการเสื่อมสลาย(Degenerate oocyte,DEG)	33
18	แสดงภาพระยะต่างๆ ของการเจริญของโอโอไซต์จากการย้อมสีด้วยวิธี Rapid staining	43

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในช่วงระยะเวลา 10 กว่าปีที่ผ่านมา มีแนวโน้มของการลดลงของประชากรกระบือ อย่างรวดเร็ว โดยสาเหตุที่สำคัญเนื่องจากการปล่อยให้กระบือผสมพันธุ์กันแบบเลือดชิด การตอนกระบือเพศผู้ การฆ่ากระบือเพื่อการบริโภคที่มากกว่าการผลิต การฆ่ากระบือเพศเมียและกระบืออุ้มท้อง ซึ่งในปัจจุบันปัญหาดังกล่าวยังไม่ได้รับการแก้ไขอย่างจริงจังและต่อเนื่อง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างเร่งด่วนที่ทุกฝ่ายจะต้องช่วยกันพิจารณา และดำเนินการเพื่อให้สถานภาพกระบือเป็นไปในทางที่ดีขึ้นได้มีการพัฒนานำเอาเทคโนโลยี ชีวภาพทาง วิทยาการสืบพันธุ์ อาทิเช่น เทคโนโลยีการผสมเทียม การย้ายฝากตัวอ่อน และเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องอื่น ๆ เพื่อช่วยในการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์กระบือปลักไทยมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2521 แต่อย่างไรก็ตามพบว่ายังมีการวิจัยน้อยมากในประเทศไทยและทั่วโลก เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่มีในโคนมและโคเนื้อ หนึ่งในเทคโนโลยีดังกล่าวพบว่า JIVET (Juvenile In Vitro Fertilization and Embryo Transfer) เป็นวิธีการผลิตตัวอ่อนจากโอโอไซต์ของลูกสัตว์ก่อนวัยเจริญพันธุ์ แล้วนำมาผลิตลูกด้วยการย้ายฝากตัวอ่อนในแม่ที่สมบูรณ์จะได้ลูกที่เกิดมาจากโอโอไซต์ของลูกสัตว์ ซึ่งการเก็บโอโอไซต์ที่จะนำมาใช้ในเทคโนโลยีดังกล่าวนั้นมีการเก็บได้หลายวิธี การเก็บโอโอไซต์ด้วยเทคนิคใช้เครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูงสอดเข้าทางปากช่องคลอด(Ovum pick up, OPU) เป็นหนึ่งในเทคนิคที่ใช้ในการเก็บโอโอไซต์ที่ได้มีการพัฒนาเพื่อนำมาเก็บ โอโอไซต์จากสัตว์ที่รู้ค่าทางพันธุกรรมและสามารถทำกับสัตว์ที่มีชีวิตซ้ำๆ กันหลายๆ ครั้งโดยไม่มีผลกระทบต่อการสืบพันธุ์ในอนาคตทำให้สัตว์ไม่บอบช้ำมาก หลังเสร็จสิ้นการเก็บด้วยวิธีโอพียูสามารถนำแม่สัตว์ไปผสมพันธุ์และตั้งท้องได้ปกติ เป็นเทคนิคใหม่ที่มีการพัฒนาใช้ในวงการสัตวแพทย์ โดยเฉพาะได้มีการนำมาใช้ในโคร่วมกับการปฏิสนธินอกร่างกายเพื่อผลิตตัวอ่อน รวมทั้งได้มีการศึกษาในลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์เพื่อจุดประสงค์เดียวกัน วิธีดังกล่าวนี้มีประโยชน์อย่างเห็นได้ชัดในการนำไปย้ายฝากในโคตัวรับและผลิตลูกสัตว์ออกมา ซึ่งเป็นการช่วยลดช่วงห่างระหว่างชีวิต (Generation Interval) ทำให้การปรับปรุงพันธุ์ได้เร็วขึ้น การศึกษาในหัวข้อเรื่องการเก็บด้วยเครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูงนี้มีเพียง 2-3 รายงานในแม่กระบือ โดยหนึ่งในสองรายงานทำในแม่กระบือปลัก ส่วนการศึกษาใน ลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์ยังไม่มีรายงานแต่อย่างใดทั้งในประเทศและต่างประเทศ การพัฒนาเทคนิคนี้ร่วมกับเทคนิคการปฏิสนธินอกร่างกายจึงอาจเป็นหนทางอีกหนทางหนึ่งในการนำไปเพื่อผลิตตัวอ่อนในกระบือปลักทดแทนการผลิต ตัวอ่อนด้วยการชะล้างจากแม่กระบือที่ได้รับการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ ซึ่งมีจำนวนตัวอ่อนเฉลี่ยไม่ถึงหนึ่งตัวต่อการเก็บจากแม่กระบือหนึ่งตัวหรือการใช้เพื่อเป็นเซลล์ไข่ตัวรับ(Oocyte recipient) ในการโคลนนิ่งด้วยการย้ายฝากนิวเคลียส (Nuclear transfer)

การปฏิสนธิในหลอดแก้วเป็นเทคโนโลยีการผลิตตัวอ่อนภายนอกตัวสัตว์โดยนำโอโอไซต์มาปฏิสนธิกับตัวอสุจิจนได้ตัวอ่อนแล้วจึงนำไปย้ายฝากในสัตว์เพศเมียตัวรับเพื่อได้ลูกสัตว์ ดังนั้นโอโอไซต์จึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อความสำเร็จในการผลิตตัวอ่อนดังกล่าว ลักษณะของโอโอไซต์ที่เก็บได้และระยะการเจริญแบ่งตัวของโอโอไซต์นั้นมีส่วนสัมพันธ์กับอัตราความสำเร็จในการผลิตตัวอ่อน โดยหากเป็นโอโอไซต์ที่สมบูรณ์มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบจำนวนมากมักจะให้ผลที่ดี ในขณะที่หากเป็นโอโอไซต์ที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบหรือเสื่อมสลายก็จะให้ตัวอ่อนที่ลดลง ซึ่งระดับของแรงดันในการดูดเก็บโอโอไซต์เป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่มีผลต่ออัตราการเก็บโอโอไซต์และคุณภาพของโอโอไซต์ที่ได้ สำหรับระยะการเจริญของโอโอไซต์นั้นต้องทำการตรวจสอบด้วยการย้อมสีและอ่านผลใต้กล้องจุลทรรศน์ งานวิจัยส่วนใหญ่มักทำในโคแต่ยังมีจำนวนจำกัดในกระบือ จากรายงานของ Kamonpatana และ Chuangsoongneon (1994) พบว่าโอโอไซต์ที่ดูดจากรังไข่ของกระบือปลักจากโรงฆ่าสัตว์จะอยู่ในระยะ Germinal Vesicle (GV) ทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานในโคโอโอไซต์ของกระบือปลักดังกล่าวต้องนำมาเลี้ยงให้อยู่ในสภาวะพร้อมปฏิสนธิ (maturation) นานอย่างน้อย 24 ชั่วโมง (มาลี, 2539) สำหรับงานวิจัยในการตรวจสอบโอโอไซต์ของกระบือปลักภายหลังการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเพิ่มการตกไข่ชนิดโกนาโดโทรปินนั้น ยังไม่มีรายงานแต่อย่างใด

วัตถุประสงค์การศึกษาครั้งนี้ เพื่อศึกษาเทคนิคการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีเข็มดูดเจาะต่อกับเครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูงสอดผ่านทางช่องคลอด และผลของการเก็บโอโอไซต์ซ้ำในลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์และกระบือสาวด้วยวิธีดังกล่าว รวมทั้งศึกษาชนิดของโอโอไซต์ที่เก็บได้ในลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์และกระบือสาว และระยะการเจริญของโอโอไซต์ของลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์และกระบือสาวที่ได้จากการเจาะเก็บ ตลอดจนผลของแรงดูดสูญญากาศต่ออัตราการเก็บโอโอไซต์และคุณภาพของโอโอไซต์ในกระบือสาวที่เก็บด้วยวิธีโอพียู ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในงานวิจัยเกี่ยวกับการปฏิสนธินอกร่างกายในการผลิตตัวอ่อนที่จะนำไปย้ายฝากตัวอ่อน หรือเพื่อใช้เป็นเซลล์ไข่ตัวรับในการโคลนนิ่งด้วยการย้ายฝากนิวเคลียสเพื่อให้ได้ลูกสัตว์ที่มีคุณค่าทางพันธุกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาเทคนิคการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีเข็มดูดเจาะต่อกับเครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูง
2. เพื่อศึกษาผลของการเก็บโอโอไซต์ซ้ำในลูกกระบือปลักและกระบือปลักสาวด้วยวิธีโอพียู
3. เพื่อศึกษาชนิดของโอโอไซต์ที่เก็บได้ในลูกกระบือปลักและกระบือปลักสาว
4. เพื่อศึกษาระยะการเจริญของโอโอไซต์ที่เก็บได้ด้วยวิธีโอพียู
5. เพื่อศึกษาผลของแรงดันในการดูดระดับต่างๆ ต่ออัตราการเก็บและคุณภาพของโอโอไซต์ที่ได้จากการเก็บด้วยวิธีโอพียูในกระบือสาว

ขอบเขตของการวิจัย

เป็นการวิจัยภาคสนาม (field trial) ในลูกกระบือปลักไทยหลังหย่านมและกระบือสาว กระบือเหล่านี้ได้ผ่านการเตรียมเป็นสัตว์ทดลองโดยได้รับอาหารข้น อาหารหยาบและน้ำเต็มที่ตลอดระยะเวลาที่ดำเนินการทดลองทำการเจาะเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี โอพียูเป็นจำนวน 5 ครั้งติดต่อกัน แต่ละครั้ง ห่างกัน 2 สัปดาห์ และสิ้นสุดการทดลองเมื่อทำการเก็บโอโอไซต์ครบตามจำนวนครั้งที่กำหนดไว้

ข้อตกลงเบื้องต้น

เป็นการทดลองที่ทดลองในลูกกระบือปลักเพศเมียหลังหย่านมอายุประมาณ 8 – 10 เดือน น้ำหนักประมาณ 150 กิโลกรัม จำนวน 9 ตัว ส่วนกระบือสาว อายุประมาณ 2.5 - 3 ปี น้ำหนักประมาณ 250 กิโลกรัม จำนวน 6 ตัว กระบือทั้งหมดได้รับความอนุเคราะห์จากกองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ นำมาเลี้ยงที่ศูนย์ฝึกนิสิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดนครปฐม

ข้อจำกัดของการวิจัย

หัวตรวจ(probe) ของเครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูงที่ใช้มีข้อจำกัดอยู่บางประการ คือ ความถี่ของคลื่นเสียงที่ใช้มีความถี่เพียง 5 เมกะเฮิร์ท ซึ่งจะให้ความละเอียดของภาพได้ไม่ชัดเจนเท่าที่ควรในฟอลลิเคิลที่มีขนาดเล็ก ๆ และความยาวของหัวตรวจอาจจะสั้นไปในการทดลองเก็บโอโอไซต์ในกระบือปลักสาวทำให้การเก็บเป็นไปด้วยความลำบาก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. พัฒนาการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู ในกระบือปลักไทย
2. เป็นวิธีหนึ่งในการทดแทนการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีการผ่าช่องท้อง
3. สามารถเก็บโอโอไซต์ได้จากลูกกระบือและกระบือสาวได้หลายครั้ง
4. เมื่อใช้เทคนิคนี้ร่วมกับการปฏิสนธินอกร่างกายและการย้ายฝากตัวอ่อนจะเป็นวิธีการผลิตตัวอ่อน และลูกกระบือที่มีคุณภาพ
5. สามารถนำไปปรับใช้กับลูกกระบือ กระบือสาวและแม่กระบือพันธุ์ดีที่เลี้ยงในศูนย์วิจัยระดับประเทศจะเป็นการพัฒนาด้านการปรับปรุงพันธุกรรม

วิธีดำเนินงานวิจัย

1.ประชากรและตัวอย่าง

1.1 การเตรียมตัวสัตว์เพื่อใช้ในการทดลอง

ลูกกระบือปลักน้ำหนักประมาณ 150 กิโลกรัม จำนวน 9 ตัว ที่ได้รับการอนุเคราะห์จากกองบำรุงพันธุ์ กรมปศุสัตว์ ได้นำมาเลี้ยงที่ศูนย์ฝึกนิสิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดนครปฐม ก่อนที่จะเริ่มดำเนินการทดลอง ส่วนกระบือสาวเป็นกระบือของภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์สัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยกระบือทั้งสองอายุได้มีการเตรียมตัวสัตว์เพื่อใช้ในการทดลอง โดยได้มีการให้อาหารข้นเสริม อาหารหยาบและน้ำเต็มที่ ตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลองจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง

1.2 การคัดเลือกกระบือเข้าสู่การทดลอง

คัดเลือกลูกกระบือเพศเมียหลังอย่านม และกระบือสาวที่มีมดลูกและรังไข่ที่ปกติ และสามารถที่จะกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ได้ ตลอดจนไม่มีความผิดปกติที่ส่งผลกระทบต่อการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู

2. วิธีการศึกษา

2.1 ลูกกระบือปลัก ทำการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูในลูกกระบือที่ผ่านการเตรียมตัวสัตว์เพื่อเข้าสู่การทดลอง โดยในลูกกระบือปลักจะทำการเก็บโอโอไซต์ซ้ำ จำนวน 5 ครั้ง ห่างกันทุก 2 สัปดาห์ โอโอไซต์ที่ได้ นำมาจำแนกชนิดและตรวจสอบระยะการเจริญของโอโอไซต์

2.2 กระบือสาว จะศึกษาผลของความดันสูญญากาศในการดูด ในระดับที่ต่างกันต่อผลของอัตราการเก็บและคุณภาพของโอโอไซต์ที่เก็บได้จากวิธีโอพียู โดยจะทำการเก็บด้วยความดันขนาด 60 ,80 และ 100 มิลลิเมตรปรอท โดยในกระบือแต่ละตัวจะทำการเก็บ ด้วยความดันดังกล่าวเป็นจำนวน 2 รอบ ดังนั้นกระบือแต่ละตัวจะถูกเก็บโอโอไซต์ จำนวน 6 ครั้ง ห่างกันทุก 2 สัปดาห์ โอโอไซต์ที่ได้นำมาจำแนกชนิดและตรวจสอบระยะการเจริญ

การสังเกตและการวัด

1. ตัวแปรหลัก คือ การเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูและระดับแรงดันสูญญากาศในการดูด
2. ตัวแปรตาม คือ อัตราการเก็บ (recovery rate) ชนิดของโอโอไซต์ (type of oocyte)

การรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล

1.รวบรวมค่าการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน ขนาดของฟอลลิเคิลที่พบ อัตราการเก็บโอโอไซต์ ชนิดของโอโอไซต์ที่ได้และระยะการเจริญ

2.เปรียบเทียบผลของการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลและอัตราการเก็บโอโอไซต์ในการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูซ้ำในการเก็บทั้ง 5 ครั้ง โดยใช้ ANOVA

3.เปรียบเทียบผลของระดับความดันในการดูดที่ 60, 80 และ 100 มิลลิเมตรปรอท ต่ออัตราการเก็บ และคุณภาพของโอโอไซต์ที่ได้จากการเก็บโดยใช้ ANOVA

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

เดือนที่	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
พ.ศ.25.....	43	43	43	43	43	43	43	43	43	44	44	44	44
เดือน	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4
ทบทวนเอกสาร	X	X											
วางแผนงานวิจัย		X	X										
ดำเนินการทดลอง				X	X	X	X	X	X	X	X		
วิเคราะห์และแปรผล											X	X	
เขียนรายงาน													X

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวเหตุผลและทฤษฎีที่สำคัญ

ในปัจจุบันเทคโนโลยีทางชีวภาพทางวิทยาการสืบพันธุ์ เป็นสาขาวิชาหนึ่งที่มีส่วนช่วยในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ ไม่ว่าจะเป็นเทคโนโลยีด้านการผสมเทียม การย้ายฝากตัวอ่อน และการปฏิสนธินอกร่างกาย เป็นต้น โดยเฉพาะในการผลิตตัวอ่อนด้วยการปฏิสนธินอกร่างกายนั้น เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถจะช่วยลดช่วงเวลาระหว่างรุ่น (generation interval) ลง โดยการเก็บโอโอไซต์นำมาทำการปฏิสนธินอกร่างกาย แล้วนำตัวอ่อนที่ได้ไปทำการย้ายฝากในโคตัวรับ และเกิดเป็นลูกสัตว์จนคลอดออกมาได้ ซึ่งจะทำให้ระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์โครวดเร็วขึ้น โดยเฉพาะโอโอไซต์ที่เก็บได้ในลูกโค การเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ของโคสามารถทำได้หลายวิธี เช่น จากการเจาะเก็บโดยตรงจากฟอลลิเคิลของรังไข่ที่มาจากโรงฆ่าสัตว์ โดยอาจมาจากการแยกฟอลลิเคิลออกเป็นแต่ละอัน (follicle dissection) หรือการดูดเจาะโดยตรง(follicle aspiration) ซึ่งมีข้อดีในแง่โอโอไซต์ที่เก็บได้มีจำนวนมาก แต่มีข้อเสีย คือ ไม่รู้คุณค่าทางพันธุกรรมของสัตว์ ดังนั้นการผลิตตัวอ่อนที่ได้จึงไม่เกิดการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ให้ดีขึ้นในการนำไปย้ายฝาก เนื่องจากลูกโคที่เกิดจะไม่รู้แหล่งพันธุกรรม การเก็บโอโอไซต์จากการตรวจผ่านช่องท้องด้วยกล้องลาปาโรสโคป (laparoscopy) โดยการสอดกล้องลาปาโรสโคปร่วมกับการจับรังไข่ด้วยฟอร์เซปอันหนึ่ง แล้วเจาะดูดด้วยปลายเข็มผ่านรูอีกอันหนึ่ง ก็เป็นวิธีเก็บโอโอไซต์ที่มีการนำมาใช้ แต่ผลที่ได้จากวิธีนี้ไม่ค่อยแน่นอน (Santl *et al*., 1998) นอกจากนี้ยังมีการเก็บโอโอไซต์จากการผ่าตัดเปิดช่องท้อง(lapalotomy) และทำการดูดโอโอไซต์โดยตรง วิธีนี้สามารถทำได้กับสัตว์ขนาดเล็ก เช่น แพะ แกะ สุกร ลูกโค หรือลูกกระบือ แต่มีข้อเสีย คือ ไม่สามารถทำได้มากครั้ง เพราะจะมีการติดยึดของอวัยวะภายในกับอวัยวะสืบพันธุ์ จากข้อจำกัดของวิธีการเก็บโอโอไซต์วิธีต่าง ๆ ข้างต้น จึงได้มีการนำเครื่องมือความถี่สูง หรือ อัลตราซาวด์ชนิดเรียลไทม์ บีโมด ร่วมกับการใช้เข็มเจาะดูด มาใช้ในการเก็บโอโอไซต์ ซึ่งเรียกวิธีการนี้ว่า “transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration“ หรือที่เรียกย่อ ๆ ว่า “ovum pick up (OPU,โอพียู)“ หรืออาจใช้คำว่า “In vivo oocyte recovery” ซึ่งวิธีการนี้ได้มีการประยุกต์ และพัฒนามาจากการเก็บโอโอไซต์ในสตรี วิธีโอพียูนี้สามารถที่จะทำได้โดยไม่ต้องมีการวางยาสลบสัตว์ สามารถทำได้ทั้งในท่านอนหรือท่ายืน โดยการใช้เข็มขนาดยาวสอดผ่านผนังช่องคลอดด้านบน แทงทะลุเข้าไปในช่องท้อง ซึ่งต้องใช้มืออีกข้างล้วงผ่านทาง ทวารหนัก เพื่อยึดรังไข่ที่จะเจาะไว้ ในการเจาะรังไข่นั้นจะถูกควบคุมโดยการผ่านหน้าจอมอนิตอร์

ข้อดีและข้อจำกัดของการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู

ข้อดี

1. เทคนิคการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู ร่วมกับเทคนิคการปฏิสนธินอกร่างกาย เป็นวิธีการผลิตตัวอ่อนที่อาจเป็นการทดแทนการผลิตตัวอ่อนจากการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ โดยอาจเก็บจากแม่โคที่ผสมไม่ติดแล้วได้
2. สามารถที่จะเก็บโอโอไซต์จากแม่โคที่รู้คุณค่าทางพันธุกรรมได้ ซึ่งเมื่อนำโอโอไซต์นั้นมาทำการผลิตตัวอ่อนจะได้ตัวอ่อนที่มีคุณค่าทางพันธุกรรมเอาไว้ย้ายฝากในโคตัวรับได้
3. สามารถทำได้หลายครั้ง โดยมีความถี่สัปดาห์ละครั้งหรือสองครั้ง ติดต่อกัน 5 เดือน โดยไม่มีผลกระทบของการทำงานของรังไข่ไม่ทำให้เกิดการยึดติดของรังไข่กับอวัยวะภายในเช่นที่พบในการเก็บจากการเปิดช่องท้อง (Kruip *et al.*,1994) ทำให้สัตว์ไม่บอบช้ำมาก
4. การฟื้นตัวของสัตว์ สัตว์สามารถที่จะฟื้นตัวได้หลังการเก็บโอโอไซต์ทันที และใช้เวลาในการปฏิบัติน้อยกว่ามาก โดยทั่วไปการเจาะด้วยวิธีโอพียู ในรังไข่ทั้งสองข้างจะใช้เวลาประมาณ 30 นาทีต่อตัว
5. หลังจากเสร็จสิ้นการเจาะเก็บโอโอไซต์แบบโอพียูแล้ว แม่พันธุ์มีการแสดงอาการเป็นสัดปกติ (Stubbing and Walton, 1995) สามารถนำไปผสมพันธุ์และตั้งท้องได้ปกติ
6. สามารถทำการเจาะเก็บโอโอไซต์ในแม่โคที่ตั้งท้องระยะแรกก่อน 3 เดือนได้ ทำให้เป็นการใช้ประโยชน์จากแม่โคอย่างเต็มที่
7. สามารถใช้กับแม่โคที่เคยมีประวัติการให้ตัวอ่อนดี แต่หลังกระตุ้นหลาย ๆ ครั้งแล้วมีการตอบสนองที่ต่ำ ให้คุณภาพตัวอ่อนที่ไม่ดี หรือเป็นแม่พันธุ์ที่ผสมไม่ติด อันเนื่องจากสาเหตุอื่นที่ไม่เกี่ยวกับการทำงานของรังไข่
8. ในกรณีของการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ของลูกโค และนำเอาโอโอไซต์มาทำไอวีเอฟ จะเป็นการช่วยลดช่วงห่างระหว่างรุ่นได้ และหลังจากทำการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูแล้ว ลูกโคก็ยังสามารถใช้เป็นแม่พันธุ์ได้ต่อไป

ข้อเสียเปรียบ

1. ต้องใช้เงินลงทุนสูงเรื่องเครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ทั้งเครื่องมือการเก็บ และเครื่องอัลตราซาวด์
2. ในการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีนี้ ต้องอาศัยความชำนาญในการปฏิบัติเป็นอย่างดี จึงจะให้ผลสำเร็จการปฏิบัติสูง
3. เมื่อเทียบกับการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่โดยตรง จะให้อัตราการเก็บโอโอไซต์ที่ต่ำกว่า

ดังนั้น เมื่อทราบถึงข้อดีและข้อเสียของการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูนี้แล้ว เมื่อนำข้อดีและข้อเสียดังกล่าว มาเปรียบเทียบกับวิธีการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีอื่น ๆ เพื่อนำมาพิจารณา ประกอบการเลือกใช้วิธีการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู ซึ่งได้แสดงการเปรียบเทียบวิธีการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีการต่าง ๆ ไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 : แสดงการเปรียบเทียบวิธีการต่าง ๆ ในการเก็บโอโอไซต์

รายละเอียดที่เปรียบเทียบ	การเก็บจากโรงฆ่าสัตว์	การตัดรังไข่	ลาปาโรสโคป	เปิดผ่าช่องท้อง	โอพียู
วิธีการเก็บโอโอไซต์	A,D,S	A,D,S	A	A	A
ระยะของโอโอไซต์	I(M)	I(M)	I/M	I/M	I/M
ระยะในท่อนำไข่	+	+	(+)	(+)	-
โอกาสที่จะเกิดการผสมไม่ติด	+	+	สูง	สูง	ต่ำ
ความยากของการปฏิบัติ	ง่าย	ต้องทำเป็นจำนวนมาก	ยาก	ง่าย	ง่าย
การสามารถทำซ้ำ	-	-	?	(?)	+

A = การเจาะดูด, D = การเลาะแยกเป็นแต่ละฟอลลิเคิล, S = การตัดย่อยเป็นชิ้นเล็ก ๆ

I = โอโอไซต์ที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ, M = โอโอไซต์ที่พร้อมปฏิสนธิ

+ = ทำได้, (+) = พอทำได้, - = ทำไม่ได้, ? = ยังเป็นที่สงสัย

ที่มา : Rath,1993

การนำวิธีการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูในโค

การเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูสามารถนำมาทำได้ในโค 4 ประเภท ดังนี้คือ

1. ในแม่โคที่มีวงจรการเป็นสัดปกติ ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน สามารถที่จะทำการเก็บสัปดาห์ละครั้งหรือสองครั้ง โดยอาจเป็นแม่โคที่เคยเป็นแม่โคที่ให้ตัวอ่อน (donor cow) และต่อมามีการตอบสนองน้อยลง หรือให้ตัวอ่อนที่มีคุณภาพด้วยลง รวมทั้งในกรณีที่แม่โคมีปัญหาผสมไม่ติด(problem cows) (Looney *et al.,* 1994)
2. แม่โคที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน เพื่อเพิ่มจำนวนและขนาดของฟอลลิเคิล (Ali dinar *et al.,1987* ; Bungartz *et al.,*1995)
3. แม่โคอุ้มท้องระยะแรก (Meintjes *et al.,*1995)
4. ลูกโคที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน เพื่อเพิ่มจำนวนและขนาดของฟอลลิเคิล (Nibart and Marquant, 1995 ; Brogliattti and Adams, 1996 ; Brogliattti *et al*., 1997)

การเก็บโอโอไซต์วิธีโอพียู มีข้อดีคือ ร่วมกับเทคนิคการปฏิสนธินอกร่างกาย เป็นวิธีการผลิตตัวอ่อน ซึ่งอาจเป็นการทดแทนการผลิตตัวอ่อนจากการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ โดยอาจเก็บจากแม่โคที่ผสมไม่ติดแล้วได้และสามารถเก็บจากรังไข่ของแม่โคที่รู้ทางพันธุกรรมได้ เมื่อนำมาผลิตตัวอ่อนจะได้ตัวอ่อนที่มีคุณค่าทางพันธุกรรมเอาไว้ย้ายฝากในโคตัวรับได้ (Kruip *et al.*, 1991;1994) โอกาสที่สามารถทำได้หลายๆครั้งจากโคตัวเดียวกัน ซึ่งจะแตกต่างจากการเก็บด้วยการเปิดผ่าช่องท้อง โดยมีความถี่สัปดาห์ละครั้งหรือสองครั้งติดต่อกัน 5 เดือน โดยไม่มีผลกระทบของการทำงานของรังไข่ ไม่ทำให้เกิดการยึดติดของรังไข่กับอวัยวะภายในเช่นที่พบในการเก็บจากการเปิดช่องท้อง (Kurip *et al.*, 1994) ทำให้สัตว์ไม่บอบช้ำมาก หลังเสร็จสิ้นการเก็บแบบโอพียู สามารถนำแม่โคไปผสมพันธุ์และตั้งท้องได้ปกติ นอกจากนี้กรณีของการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ของลูกโค และนำเอาโอโอไซต์มาทำ ไอวีเอฟ จะเป็นการช่วยลดช่วงห่างระหว่างรุ่นได้และหลังจากนั้นปล่อยให้ลูกโคเจริญเติบโตแล้วกลายเป็นแม่พันธุ์ได้ต่อไป

ปัจจุบันประชากรกระบือในประเทศไทยมีการลดจำนวนลงเป็นอย่างมาก โดยสาเหตุที่สำคัญเนื่องจากการปล่อยให้กระบือผสมพันธุ์กันแบบเลือดชิด การตอนกระบือเพศผู้ การฆ่ากระบือเพื่อการบริโภคที่มากกว่าการผลิต การฆ่ากระบือเพศเมียและกระบืออุ้มท้อง ซึ่งในปัจจุบันปัญหาดังกล่าวยังไม่ได้รับการแก้ไขอย่างจริงจังและต่อเนื่อง โดยแนวทางในการแก้ไขประการหนึ่งคือ การนำเอาเทคโนโลยีชีวภาพทางวิทยาการสืบพันธุ์ มาช่วยในการแก้ไขปัญหาดังกล่าวนับว่าเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์กระบือ โดยเฉพาะกระบือปลักไทย ซึ่งเทคนิคการเก็บโอโอไซต์โดยใช้เครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูงสอดผ่านทางช่องคลอดร่วมกับการใช้เข็มเจาะดูด เพื่อเก็บโอโอไซต์จากสัตว์ที่ยังมีชีวิต แล้วนำไปทำการปฏิสนธิในหลอดทดลอง เมื่อได้ตัวอ่อนที่ทราบคุณค่าทางพันธุกรรมนำไปย้ายฝากในแม่กระบือตัวรับจะได้ลูกกระบือที่มีคุณค่าทางพันธุกรรมต่อไป เมื่อกระบือที่เสร็จสิ้นจากการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีดังกล่าวยังสามารถนำไปผสมพันธุ์และให้ลูกต่อไปได้ นอกจากนั้นการเก็บโอโอไซต์จากลูกสัตว์ก่อนวัยเจริญพันธุ์แล้วนำไปปฏิสนธิในหลอดทดลอง แล้วนำตัวอ่อนไปย้ายฝากจะได้ลูกที่เกิดมาจากโอโอไซต์ของลูกสัตว์ ซึ่งการใช้เทคนิคการเก็บโอโอไซต์โดยใช้เครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูง ร่วมกับการใช้เข็มเจาะดูดในลูกสัตว์ก่อนวัยเจริญพันธุ์ ยังเป็นการช่วยลดช่วงห่างระหว่างชีวิตทำให้การปรับปรุงพันธุ์ได้เร็วขึ้น

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำวิธีการเก็บโอโอไซต์โดยการใช้เข็มเจาะดูดร่วมกับเครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูงมาใช้ในลูกกระบือปลักและกระบือสาว การตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลด้วยฮอร์โมนฟอลลิเคิล สติมูเลติ้งฮอร์โมน ตลอดจนคุณภาพของโอโอไซต์ที่เก็บได้และผลของการเก็บโอโอไซต์ซ้ำในลูกกระบือปลัก นอกจากนั้นยังศึกษาถึงผลของระดับความดูดสูญญากาศ ระดับต่าง ๆ ที่มีผลต่อคุณภาพของโอโอไซต์ที่เก็บได้

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การเพิ่มจำนวนการตกไข่และการย้ายฝากตัวอ่อน (Multiple Ovalation and Embryo Tranfer ; MOET)มีวัตถุประสงค์ในการผลิตตัวอ่อนจากแม่สัตว์ที่มีคุณค่าพันธุกรรม แต่อย่างไรก็ตามผลของการกระตุ้นการตกไข่จำนวนมากโดยฮอร์โมนโกนาโดโทรปินยังให้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจ เพราะมีรายงานถึงผลกระทบจากการใช้ฮอร์โมนกระตุ้นการทำงานของรังไข่ซึ่งทำให้มีการตอบสนองที่ต่ำและผันแปร ทำให้เกิดถุงน้ำที่รังไข่(Cystic ovarian follicle) นอกจากนั้นแม่โคที่มีการตกไข่หลายๆครั้งพบว่าการเจริญของโอโอไซต์และฟอลลิเคิลมักเกิดความผิดปกติ และมีแนวโน้มการผลิตโอโอไซต์ที่ลดลง ซึ่งทางหนึ่งที่อาจจะช่วยแก้ไขปัญหานี้ได้ด้วยการเก็บโอโอไซต์โดยใช้เข็มเจาะดูด ร่วมกับเครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูงสอดผ่านทางช่องคลอด (Roelofsen-Vendrig *et al*., 1994) เป็นวิธีการที่ทำให้สามารถเก็บโอโอไซต์ซ้ำได้หลายครั้งจากแม่โคตัวให้เพียงตัวเดียว แล้วนำมาผลิตตัวอ่อนในหลอดทดลองซึ่งจะทำให้ได้ผลผลิตลูกหลานจากแม่พันธุ์ได้มากยิ่งขึ้น โอโอไซต์ที่เก็บมาได้จะนำมาผ่านขบวนการที่ทำให้โอโอไซต์เจริญเติบโตเต็มที่จนพร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลองและนำไปปฏิสนธิกับ สเปิร์มในหลอดทดลอง หลังจากนั้นจึงนำตัวอ่อนที่ได้ไปฝากในมดลูกแม่โคตัวรับเพื่อเจริญเติบโตต่อไป

ปัจจัยที่มีผลต่อการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู

การเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู มีปัจจัยที่มีผลกระทบต่ออัตราการเก็บโอโอไซต์ ทั้งในด้านของจำนวนโอโอไซต์เฉลี่ยที่เก็บได้ และคุณภาพของโอโอไซต์ที่ได้จากการเก็บ โดยมีปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ดังนี้

ผลของหัวตรวจ(Transducer)และตัวนำเข็ม(Needle Guide)

หัวตรวจเป็นอุปกรณ์หนึ่งของเครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูง ปกติแล้วคลื่นความถี่ของหัวตรวจควรอยู่ที่ 6.5 เมกกะเฮิตซ์ แต่ในระดับความถี่ที่ 7.5 เมกกะเฮิตซ์ จะมองเห็นฟอลลิเคิลขนาดเล็ก ๆ ประมาณ 2 มิลลิเมตรได้ หัวตรวจที่ดีควรมีคุณสมบัติทางด้านรูปร่าง ขนาด และความถี่ที่เหมาะสม ซึ่งเป็นหลักการสำคัญในการเลือก หัวตรวจมาใช้ (Pieterse *et al*.,1990) ส่วนตัวนำเข็มจะเป็นตัวช่วยให้เข็มผ่านไปได้ง่ายและทำให้ช่องคลอดสะอาด โดยมักนำถุงหุ้มหรือแผ่นฟิล์มบาง ๆ สวมปิดก่อนสอดหัวตรวจและตัวนำเข็มเข้าปากช่องคลอด

ผลของแรงดูดสูญญากาศ (aspiration vacuum)

ความแรงของการดูดแบบสูญญากาศ (negative pressure) จะมีความสัมพันธ์กับอัตราการไหลของของเหลวในท่อ (มิลลิลิตร/นาที) (Bols *et al*., 1996) ปี ค.ศ.1994 Looney และคณะ รายงานว่า ความแรงของการดูดควรอยู่ในระดับที่เหมาะสมประมาณ 75-100 มิลลิเมตรปรอท โดยมีอัตราการไหลของน้ำยาที่เก็บได้ประมาณ 22 มิลลิลิตร /นาที ซึ่งใกล้เคียงกับระดับของแรงดูดที่ Gerber และคณะ(2000)ใช้ โดยให้อัตราการเก็บ 51% ในโค และ 45.3% ในกระบือแอฟริกัน

Bols และคณะ(1996) ได้ทดลองใช้ความแรงของการดูดที่แตกต่างกัน จาก 50, >70, 90, 110 และ 130 มิลลิเมตรปรอท ในการทดลองเจาะฟอลลิเคิลจากรังไข่ของโคจากโรงฆ่าสัตว์โดยใช้เข็มเจาะขนาด 18G, 19G และ 21G พบว่าเมื่อแรงดูดสูงขึ้นจะได้จำนวนของโอโอไซต์เพิ่มขึ้น ไม่ว่าจะใช้เข็มขนาดใด แต่เมื่อเพิ่มแรงดูดขึ้นจะทำให้สัดส่วนของโอโอไซต์คุณภาพดีที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มหลายชั้น (compact cumulus oocyte) ลดลง นอกจากนั้นความสามารถของโอโอไซต์ในการพัฒนาถึงระยะบลาสโตซีสยังลดลงเมื่อเพิ่มแรงดูดโดยเฉพาะแรงดูดในช่วง 70-130 มิลลิเมตรปรอท ซึ่งขัดแย้งกับการทดลองของ Looney และคณะ(1994) Lenz และคณะ(1987) อ้างถึงโดย Bols และคณะ(1996) รายงานว่า เมื่อเพิ่มแรงดูดมากเกินไปจะเป็นสาเหตุเกิดความผิดปกติของรูปร่างลักษณะของโอโอไซต์ได้

ในปี 1997 Fry และคณะ ได้ทำการศึกษาผลของระดับแรงดูดที่ต่างกัน ตั้งแต่ 25, 50, 75 และ 100 mmHg ในการทดลองเจาะฟอลลิเคิลจากรังไข่ของโคจากโรงฆ่าสัตว์ พบว่าอัตราการเก็บโอโอไซต์จะเพิ่มขึ้นจาก 46% เป็น 51, 53 และ 59% เมื่อความแรงในการดูดเพิ่มขึ้น แต่ในทางตรงกันข้ามหากเพิ่มความดันจาก 50 mmHg เป็น 100 mmHg จะมีผลต่อคุณภาพของโอโอไซต์เกรด เอ (มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มหลายชั้น) และโอโอไซต์ปกติที่เหมาะจะนำไปทำการปฏิสนธินอกร่างกาย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bols และคณะ(1996) โดยโอโอไซต์เกรด เอ จะลดลงจาก 18% เป็น 11, 6 และ 5% เท่านั้น และโอโอไซต์ปกติ ลดลงจาก 39% เป็น 45, 39 % เมื่อเพิ่มความดันจาก 25 เป็น 50, 75 และ 100 mmHg ตามลำดับ(ตารางที่ 2) ดังนั้นจากการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้น พบว่าหากแรงดันในการดูดหรืออัตราไหลเร็วเกินไปจะมีผลต่อคุณภาพของโอโอไซต์ โดยจะพบโอโอไซต์ที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้ม(denude oocyte)เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากแรงดูดที่มากเกินไปจะทำให้เซลล์คิวมูลัสหลุดออก ซึ่งโอโอไซต์ชนิดนี้เป็นโอโอไซต์ที่ให้อัตราการปฏิสนธิต่ำและยังส่งผลให้ได้ตัวอ่อนจำนวนน้อยจากการปฏิสนธิ

ตารางที่ 2 : **ผลของความแรงในการเจาะดูดต่ออัตราการเก็บและคุณภาพโอโอไซต์**

แรงดูด (mmHg)	จำนวน ฟอลลิเคิล	จำนวน โอโอไซต์	% การเก็บ โอโอไซต์	% โอโอไซต์ คุณภาพดีมาก	% โอโอไซต์ ปกติ
25	1650	755	46	18	39
50	1762	905	51	11	45
75	804	430	53	6	39
100	1611	943	59	5	31

(ดัดแปลงจาก Fry และคณะ, 1997)

ผลของการกระตุ้นรังไข่ด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน

การเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู มีการนำฮอร์โมนโกนาโดโทรปินมาใช้ในการกระตุ้น เพื่อเพิ่มจำนวนฟอลลิเคิลและขนาดของฟอลลิเคิลก็เพิ่มขึ้นโดยมีผลไปกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิล ทั้งนี้เนื่องจากสัตว์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นจะมีจำนวนโอโอไซต์น้อย ซึ่งฮอร์โมนโกนาโดโทรปินที่มีการนำมาใช้มีทั้ง ฮอร์โมนเอฟเอสเอช (Fricke *et al.*, 1994)และฮอร์โมน พีเอ็มเอสจี โดยทำการกระตุ้นก่อนการเจาะเก็บด้วยวิธีโอพียู

ปี 1991 Van der Schaans และคณะ อ้างถึงโดย Fry และคณะ (1994) ได้ทดลองใช้ฮอร์โมนพีเอ็มเอสจี ขนาด 550 IU ทุกๆ สัปดาห์ พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนโอโอไซต์สำหรับนำไปใช้ในการผลิตตัวอ่อนในหลอดทดลอง จากนั้นในปี 1994 Fry และคณะ ทดลองใช้ฮอร์โมนพีเอ็มเอสจี ขนาด 750 IU ฉีดเข้ากล้ามเพียงครั้งเดียว ทุกสัปดาห์ก่อนทำการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู โดยทดลองเป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าการกระจายของขนาดฟอลลิเคิล จำนวนของฟอลลิเคิลที่ทำการเจาะและจำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้ ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยน้ำยาทำละลายฮอร์โมน ความล้มเหลวในการกระตุ้นการเจริญของ ฟอลลิเคิลอาจเกิดเนื่องจากให้ฮอร์โมนในขนาดที่ไม่เพียงพอ

เอกชาติ และคณะ(2543) ได้ทดลองใช้ฮอร์โมน พีเอ็มเอสจี ขนาด 3000 IU ฉีดเข้ากล้ามเพียงครั้งเดียวในกระบือปลัก หลังจากนั้น 48 ชั่วโมง ทำการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู พบว่ามีจำนวนฟอลลิเคิล 6.6±1.1ฟอลลิเคิลต่อตัว(46/7) ส่วนจำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้เท่ากับ4.1±2.0โอโอไซต์ต่อตัว(29/7) คิดเป็นอัตราการเก็บเท่ากับ 63.0%(29/46)

สำหรับการนำฮอร์โมน เอฟเอสเอช มาใช้ในการกระตุ้นนั้น Bungartz และคณะ(1995) ได้ทำการทดลอง พบว่าการใช้ฮอร์โมน เอฟเอสเอช ในการกระตุ้นรังไข่ จะช่วยเพิ่มจำนวนโอโอไซต์ต่อตัวที่เก็บได้ โดยสอดคล้องกับการศึกษาของ Looney และคณะ(1994) ที่พบว่าการใช้ฮอร์โมน เอฟเอสเอช ขนาด 24-30 มิลลิกรัม แบ่งให้เช้าและเย็น ในวันที่ 3 ถึง 5 ของวงรอบการเป็นสัด สามารถเพิ่มจำนวนฟอลลิเคิลที่สามารถถูกเจาะได้จาก 8.9 เป็น 12.3 ฟอลลิเคิลต่อตัว และเพิ่มจำนวนโอโอไซต์ต่อตัวจาก 6.3 โอโอไซต์ เป็น 8.3 โอโอไซต์ อย่างไรก็ตามไม่พบว่ามีความแตกต่างของคุณภาพของโอโอไซต์ อัตราการแบ่งตัวหรืออัตราการเจริญเป็นตัวอ่อนระยะมอรูล่าหรือบลาสโตซีสระหว่างโคกลุ่มที่ให้ฮอร์โมนก่อนเก็บกับกลุ่มที่ไม่ได้ให้ฮอร์โมน (ตารางที่ 3) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Looney และคณะ(1994) ที่พบเช่นกันว่าคุณภาพของตัวอ่อนที่สามารถนำไปย้ายฝากได้ในแม่โคที่ได้รับการกระตุ้นนั้นสูงกว่าในแม่โคที่ไม่ได้รับการกระตุ้น (1.38 และ 0.96 ใบ ตามลำดับ) ซึ่งสอดคล้องกับ Ruigh และคณะ(2000) แต่ไม่มีผลต่อความแตกต่างของอัตราการตั้งท้อง (18.6 และ 16.3% ตามลำดับ)

นอกจากนั้นยังได้มีการนำฮอร์โมนเอฟเอสเอชมาใช้ในการผลิตโอโอไซต์ในโคเนื้อระยะแรกหลังคลอด โดยใช้ฮอร์โมนขนาด 32 มิลลิกรัม แบบลดขนาดลงเรื่อย ๆ โดยฉีดฮอร์โมนในวันที่ 15 หลังคลอดแล้วทำการเก็บโอโอไซต์ในวันที่ 25 และทำการเก็บซ้ำในวันที่ 35 หลังคลอด พบว่าแม่โคที่กระตุ้นรังไข่ด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอช ให้จำนวนฟอลลิเคิลที่สามารถเจาะได้ และจำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้สูงกว่าแม่โคที่ไม่ได้กระตุ้น

ตลอดจนคุณภาพของโอโอไซต์ที่เก็บได้ก็ดีกว่า ทั้งในการเก็บโอโอไซต์ในวันที่ 25 และ 35 หลังคลอด นอกจากนี้เมื่อนำโอโอไซต์ที่ได้ไปผลิตตัวอ่อน พบว่าแม่โคที่ฉีดกระตุ้นรังไข่นั้น ให้อัตราการแบ่งตัวที่สูงกว่าในแม่โคที่ไม่ได้กระตุ้น ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำฮอร์โมนนี้มาใช้ในการกระตุ้นรังไข่ในแม่โคหลังคลอด เพื่อเป็นแหล่งในการผลิตโอโอไซต์ สำหรับนำไปใช้ในการปฏิสนธินอกร่างกายเพื่อผลิตตัวอ่อนต่อไป ซึ่งสามารถทำการเก็บโอโอไซต์ได้ที่ 25 และ 35 วัน หลังคลอด

ตารางที่ 3 : จำนวนฟอลลิเคิลที่เจาะ จำนวนโอโอไซต์ที่ได้ อัตราการแบ่งตัว และอัตราการเจริญของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสจากการปฏิสนธิในหลอดทดลองของโอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มหลายชั้นจากการเก็บด้วยวิธีโอพียู ในแม่โคที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เอฟเอสเอช และไม่ได้รับการกระตุ้น

	กระตุ้นเอฟเอสเอช (n=4)	ไม่ได้กระตุ้นเอฟเอสเอช (n=4)
จำนวนครั้งของการเจาะ	48	48
จำนวนฟอลลิเคิลที่เจาะ	509	428
จำนวนฟอลลิเคิลที่เจาะเฉลี่ย/ครั้ง	10.6±0.7	8.9±0.5
จำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้เฉลี่ย/ครั้ง	7.0±0.6	5.8±0.5
อัตราการเก็บโอโอไซต์*(%)	66.0	65.4%
โอโอไซต์ปกติ*	169(52.1%)	175(56.8%)
อัตราการแบ่งตัว(%)	96(60.4%)	100(57.1%)
อัตราการเจริญเป็นตัวอ่อนระยะมอรูล่าและระยะบลาสโตซีส(%)	6(3.8%)	5(2.9%)

* โอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มหลายชั้น

ที่มา Bungartz *et al.*, 1995

มีการนำฮอร์โมนอื่นๆ มาใช้ร่วมกับการใช้ฮอร์โมนโกโนโดโทรปินในการกระตุ้นรังไข่ ดังเช่นการทดลองของ Irvine และคณะ(1994) ที่ได้มีการนำโปรเจสตาเจน และฮอร์โมน จีเอ็นอาร์เอช มาใช้ร่วมกับการฉีดกระตุ้นรังไข่ด้วยฮอร์โมน เอฟเอสเอช 25 มิลลิกรัม เข้าใต้ผิวหนังร่วมกับการฉีดฮอร์โมนพีเอ็มเอสจี 400 IU เข้ากล้าม พบว่าการฉีดหรือไม่ฉีดฮอร์โมน จีเอ็นอาร์เอช ไม่มีความแตกต่างของจำนวนฟอลลิเคิลที่มีขนาดใหญ่ แต่การนำเอาโปรเจสตาเจนที่สอดผ่านทางช่องคลอดออกจะมีผลเพิ่มจำนวนของฟอลลิเคิลที่สามารถเจาะได้ มากกว่าสองเท่าของกลุ่มที่ไม่เอาออก นอกจากนี้ Bousquet และคณะ (2000) ได้ทดลองใช้ลูติไนท์ซิ่งฮอร์โมนร่วมกับฮอร์โมน เอฟเอสเอช โดยฉีดฮอร์โมน เอฟเอสเอช ขนาด 50 มิลลิกรัม โดยแบ่งฉีดเช้าและเย็น เป็นเวลา 2 วัน แล้วจึงฉีดลูติไนท์ซิ่งฮอร์โมน 25 มิลลิกรัม เข้าหลอดเลือดดำ 6 ชั่วโมง ก่อนการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู พบว่าการฉีดลูติไนท์ซิ่งฮอร์โมนหรือไม่ฉีด ไม่มีความแตกต่างของจำนวน

โอโอไซต์ที่เก็บได้ อัตราการแบ่งตัว ตลอดจนการพัฒนาถึงระยะบลาสโตซีสแต่อย่างใด แต่จากการศึกษาพบว่าช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บโอโอไซต์หลังจากการฉีดฮอร์โมน เอฟเอสเอชเข็มสุดท้าย 48 ชั่วโมง เพราะมีฟอลลิเคิลที่มีขนาดตั้งแต่ 5 มิลลิเมตร ขึ้นไป มากกว่าฟอลลิเคิลที่มีขนาดเล็กๆ ไม่ว่าฉีดลูติไนท์ซิ่งฮอร์โมนหรือไม่ ซึ่งฟอลลิเคิลขนาดดังกล่าวจะง่ายต่อการเจาะเก็บ

จากงานทดลองดังกล่าวข้างต้นจะเห็นได้ว่ามีโปรแกรมการกระตุ้นที่แตกต่างกันออกไป อันจะมีผลกระทบต่อความสำเร็จของการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู ดังนั้นควรมีการเลือกใช้โปรแกรมที่เหมาะสมในการกระตุ้น จะเป็นการเพิ่มโอกาสของความสำเร็จในการทำโอพียู ซึ่งจากการศึกษาของ Brogliatti และ Adams(1996) รายงานว่าการให้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินในการกระตุ้นรังไข่ เพื่อเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูไม่มีผลต่อคุณภาพของโอโอไซต์ที่ได้ โดยสอดคล้องกับการศึกษาของ Looney และคณะ(1994)

ผลของสถานภาพทางระบบสืบพันธุ์สัตว์

การเก็บโอโอไซต์โดยวิธีโอพียู สามารถที่จะทำได้ในแม่สัตว์ที่อยู่ในสถานภาพทางระบบสืบพันธุ์ต่างๆ เช่น แม่โคกำลังให้นม หรือแม่โคหยุดรีดนม หรือแม่โคต้องท้องระยะแรก หรือโคสาวที่มีวงรอบการเป็นสัดปกติ ดังนั้น สถานภาพทางระบบสืบพันธุ์จึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อจำนวนฟอลลิเคิลที่สามารถเจาะได้และโอโอไซต์ที่ได้

Bungartz และคณะ(1995) ได้ทำการศึกษาผลของการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูในโคที่มีสภาพทางระบบสืบพันธุ์ที่ต่างกัน ทั้งในแม่โคให้นม แม่โคหยุดรีดนม แม่โคตั้งท้อง และแม่โคสาว พบว่าในแม่โครีดนมหรือแม่โคหยุดรีดนมจะมีจำนวนฟอลลิเคิลที่สามารถเจาะได้ และจำนวนโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้มากกว่าแม่โคตั้งท้องระยะแรก และโคสาว 10.6 $\pm$ 0.6 และ 9.3 $\pm$ 0.7 ฟอลลิเคิล เปรียบเทียบกับ 7.3 $\pm$ 0.5 และ 8.7 $\pm$ 0.5 ฟอลลิเคิลต่อตัว ส่วนโอโอไซต์ที่เก็บได้ เท่ากับ 7.2 $\pm$ 0.5 และ 6.9 $\pm$ 0.7 โอโอไซต์ต่อตัว เปรียบเทียบกับ 5.0$\pm$0.4 และ 5.7 $\pm$ 0.5 โอโอไซต์ต่อตัว

Eikelmann และคณะ(2000) ศึกษาถึงการทำโอพียูในโคท้อง รายงานว่าสาเหตุที่ทำให้อัตราความสำเร็จในการทำโอพียูในโคตั้งท้องน้อยนั้น มีผลเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคของรังไข่ และจำนวนฟอลลิเคิลที่มีแนวโน้มลดลงหลัง 3-5 เดือนของการตั้งท้อง โดยพบว่า โอพียูสามารถทำได้จนกระทั่งถึง 102 วัน (66-131) ของการตั้งท้อง ในแม่โคสาว และ142 วัน (117-189) ของการตั้งท้องในแม่โค จำนวนฟอลลิเคิลที่สามารถเจาะได้และอัตราการเก็บโอโอไซต์ไม่แตกต่างกันในระหว่างเดือนที่ 2, 3 และ 4 ของการตั้งท้องและระหว่างแม่โคสาวกับแม่โคท้อง แต่อย่างไรก็ตามจำนวนฟอลลิเคิลและจำนวนโอโอไซต์ที่เจาะได้จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญในเดือนที่ 5 เมื่อเทียบกับเดือนที่ 2, 3 และ 4 ในแม่โค ซึ่งจำนวนฟอลลิเคิลที่สามารถเจาะได้โดยรวมในโคท้อง เท่ากับ 7.4 ฟอลลิเคิล และเก็บโอโอไซต์ได้ เท่ากับ 3.9 โอโอไซต์ต่อตัว คิดเป็นอัตราการเก็บ 52.2% และพบว่าประมาณ 49.1% เหมาะที่จะนำไปผลิตตัวอ่อน ซึ่งค่าเฉลี่ยของตัวอ่อนที่เหมาะสมที่จะย้ายฝากเท่ากับ 0.41 ตัวอ่อนต่อการทำโอพียูแต่ละครั้ง และตัวอ่อนที่ได้ใกล้เคียงกันระหว่างแม่โคสาวท้อง และแม่โคท้อง ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า การทำโอพียูในโคท้องนั้นจะปลอดภัยและมี

ประสิทธิภาพ ตลอดจนมีการมีชีวิตรอดของตัวอ่อนในท้อง หากทำในช่วง 3 เดือนแรกของการตั้งท้องในโคสาว และช่วงครึ่งแรกของการตั้งท้องในแม่โค นอกจากนี้ Perez และคณะ (2000) ได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการนำวิธีโอพียูมาใช้ในการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ของแม่โคหลังคลอด พบว่ามีความเป็นไปได้ในการทำการเก็บด้วยวิธีดังกล่าว ทำให้แม่โคหลังคลอดนั้นเป็นอีกแหล่งหนึ่งที่จะได้มาซึ่งโอโอไซต์ที่ใช้สำหรับการผลิตตัวอ่อนต่อไป

ส่วนการทำโอพียูในลูกสัตว์ก่อนวัยเจริญพันธุ์ในประเทศไทยก็ได้มีการศึกษาทั้งในโคและกระบือ โดยในโคนั้น ชัยณรงค์ และคณะ (2539) ได้ทำการศึกษาแล้วพบว่ามีความเป็นไปได้ในการทำโอพียูในลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์หลังกระตุ้นซ้ำหลายครั้ง โดยสามารถเก็บโอโอไซต์ได้เฉลี่ย เท่ากับ 9.92±5.2 โอโอไซต์ต่อตัว ส่วนในกระบือ Pavasuthaipaisit และคณะ(1995) ได้ทำการศึกษา พบว่าจำนวนฟอลลิเคิลที่สามารถเจาะได้เฉลี่ย เท่ากับ 10.6±4.0 ฟอลลิเคิลต่อครั้งของการทำโอพียู และสามารถเก็บโอโอไซต์เฉลี่ยได้ เท่ากับ 6.0±2.4 โอโอไซต์ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาการเก็บในกระบือท้อง พบว่ามีจำนวนฟอลลิเคิลที่สามารถเจาะได้เฉลี่ย เท่ากับ 7.3±1.5 ฟอลลิเคิลต่อครั้งของการทำโอพียู และสามารถเก็บโอโอไซต์ได้ เท่ากับ 3.3±0.9 โอโอไซต์ ซึ่งเมื่อเทียบกับการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูในลูกกระบือแล้วพบว่าจำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้น้อยกว่าในแม่กระบืออย่างมีนัยสำคัญ จากข้างต้นที่กล่าวมาจะสังเกตได้ว่า การเลือกสถานภาพของสัตว์ที่จะทำการเก็บโอโอไซต์จึงเป็นสิ่งสำคัญประการหนึ่ง

ผลของระยะเวลานานของการเก็บและความถี่ในการเก็บ

Broadbent และคณะ(1997) ได้ทำการศึกษาการเก็บโอโอไซต์จากแม่โคที่ไม่ได้รับการกระตุ้น พบว่าหากทำการเก็บโอโอไซต์นาน 12 สัปดาห์ ๆ ละครั้ง จะมีผลต่ออัตราการเก็บโอโอไซต์ และจำนวนโอโอไซต์เฉลี่ยที่ได้เมื่อเทียบกับการเก็บนาน 4 และ 8 สัปดาห์ Boni และคณะ(1996) ได้ทำการศึกษาระยะเวลาในการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูในกระบือ รายงานว่าสามารถเก็บได้เป็นเวลาอย่างน้อย 4 เดือนโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนและคุณภาพของฟอลลิเคิลและประชากรโอโอไซต์ อีกทั้งยังไม่พบปัญหาความล้มเหลวทางระบบสืบพันธุ์ ส่วนความถี่ของการเก็บพบว่าการเก็บโอโอไซต์สัปดาห์ละครั้งหรือสัปดาห์ละสองครั้งไม่มีผลต่อการเก็บแต่อย่างใด โดยในการเก็บโอโอไซต์สัปดาห์ละครั้งได้โอโอไซต์เท่ากับ 1.7±0.27 โอโอไซต์ต่อตัว ส่วนการเก็บสองครั้งต่อสัปดาห์ ได้ 1.8±0.20 โอโอไซต์ต่อตัว แต่การเก็บสองครั้งต่อสัปดาห์มีข้อดี คือได้โอโอไซต์มากขึ้นประมาณเท่าตัวในช่วงการเก็บนาน 12 สัปดาห์

ผลของขนาดของเข็ม

เข็มที่ใช้ในการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูควรเป็นเข็มสแตนเลส ซึ่งจะง่ายในการทำให้ปราศจากเชื้อ ในปัจจุบันมีการนำซิลิโคนมาเคลือบอีกครั้ง ซิลิโคนจะช่วยลดการเสียดสีกับฟอลลิเคิลลง เข็มที่ใช้เจาะในการทำโอพียูมีราคาค่อนข้างแพงดังนั้นจึงได้มีการพยายามที่จะพัฒนาการผลิตเข็มแบบใช้ครั้งเดียวทิ้ง โดย

วิธีในการประดิษฐ์เข็มที่ใช้ในการทำโอพียูแบบใช้แล้วทิ้งนี้ เข็มจะถูกต่อเข้ากับหลอดซิลิโคนด้วยข้อต่อสแตนเลสและใส่เข้าไปในหลอดสแตนเลสอีกชั้นหนึ่งเพื่อเพิ่มความแข็งแรง โดยเข็มที่ใช้จะมีขนาดสั้นลงกว่าเข็มที่ผลิตมาสำหรับการทำโอพียูโดยตรง(Bols *et al.*,1995) เข็มที่ประดิษฐ์ขึ้นมานี้สามารถที่จะเก็บโอโอไซต์ ที่มีลักษณะปกติเท่ากับ 42%

ขนาดของเข็มที่ใช้ควรมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่ต่ำกว่า 1 มิลลิเมตร เพราะขนาดเข็มที่เล็กเกินไปอาจทำให้โอโอไซต์ไม่สามารถผ่านเข็มออกมาได้ ส่งผลให้จำนวนโอโอไซต์ที่ได้น้อยลง แต่จะมีเยื่อหุ้มคิวมูลัสที่สมบรูณ์ ในทางตรงกันข้ามเข็มที่มีขนาดใหญ่ จะทำให้ได้โอโอไซต์จำนวนมาก แต่โอโอไซต์ที่ได้ส่วนมากจะไม่มีคิวมูลัสหุ้ม และอาจส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อรอบ ๆ ฟอลลิเคิลหรือโอโอไซต์ โดยขนาดของรูเข็มจะแบ่งออกเป็นเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน (inner diameter) และเส้นผ่าศูนย์กลางภายนอก (outer diameter) โดยในการเจาะรังไข่ที่มีขนาดตั้งแต่ 2-15 มิลลิเมตร จะใช้เข็มที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายในเท่ากับ 0.8 มิลลิเมตร และเส้นผ่าศูนย์กลางภายนอกเท่ากับ 1 มิลลิเมตร (Bols *et al.*,1996 ; Bols *et al.*,1997)

เส้นผ่าศูนย์กลางภายในของเข็มมีผลต่อการไหลผ่านของโอโอไซต์ โดยเฉพาะโอโอไซต์ชนิดที่เจริญพร้อมปฏิสนธิที่มีเซลล์คิวมูลัสกระจายรอบ ๆ จะเป็นเมือกเหนียว การใช้เข็มขนาด 20G น่าจะเหมาะสมกว่า Bols และคณะ (1996)ได้ทำการศึกษาขนาดของเข็ม 18, 19 และ 21G ที่ระดับแรงดูดต่าง ๆ กัน จาก 50, >70, 90, 110 และ 130 mmHg พบว่าอัตราการเก็บโอโอไซต์จะมากที่สุดในเข็ม ขนาด 18G ซึ่งสอดคล้องกับข้อเสนอแนะของ Fry และคณะ(1997) ที่เสนอแนะว่าไม่ควรใช้เข็มที่มีขนาดใหญ่กว่า 17G ในการเก็บ โอโอไซต์จากฟอลลิเคิลที่มีขนาด 2-8 มิลลิเมตร และยังพบว่าหากเป็นเข็มที่มีปากฉลามมากเกินไป เมื่อแทงฟอลลิเคิลที่มีขนาดเล็กจะเกิดช่องว่างมีอากาศแทรก เวลาดูดโอโอไซต์อาจหลุดลอดออกไปได้ การนำเข็มชนิดเดียวกันไปเจาะฟอลลิเคิลที่มีขนาดใหญ่ อาจไม่เป็นปัญหา เพราะสามารถเข้าไปในฟอลลิเคิลได้หมด นอกจากนี้เข็มที่เป็นชนิด double lumen ยังให้อัตราการเก็บที่สูงกว่าชนิด single lumen ถึง 9% (Fry *et al.*, 1994)

นอกจากนี้คุณสมบัติของเข็มที่ดีควรมีคุณสมบัติการสะท้อนกลับที่ดี และจะต้องสอดคล้องกับเครื่องเพื่อส่งผลให้การมองเห็นเข็มจากเครื่องอัลตราซาวด์มีความชัดเจน ทำให้การปฏิบัติงานมีประสิทธิภาพมากขึ้น

ผลของความคมและมุมหน้าตัดของเข็ม

ความคมของเข็มเป็นอีกปัจจัยที่ควรคำนึงถึง ปลายของเข็มควรมีมุมที่มีความแหลมคมมากเพราะความคมที่ลดลงจะเพิ่มโอกาศที่จะทำให้ผนังของฟอลลิเคิลฉีกขาดได้ เข็มที่ใช้ครั้งแรกจะให้ความคมดี แต่ความคมจะลดลงในการใช้ครั้งต่อ ๆ มา เนื่องจากราคาของเข็มที่ใช้เจาะค่อนข้างสูง ดังนั้นในทางปฏิบัติจึงมีการนำเข็มมาลับให้คม เพื่อใช้ซ้ำอีก อันจะเป็นการประหยัด แต่ก็จะมีปัญหาเพราะความคมจะไม่เหมือนเดิม (Gerber *et al.*, 2000) โดยเฉพาะในกรณีที่เจาะมาแล้วหลายครั้งจะลำบากมากขึ้น โดยเฉพาะเมื่อ

เจาะผ่านผนังช่องคลอดด้านบนและเมื่อจะเจาะเข้าไปในฟอลลิเคิล ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการเกิดเป็นพังผืด (fibrosis) ของผนังเนื้อเยื่อบริเวณดังกล่าว จากเหตุผลดังกล่าว Bols และคณะ(1995) จึงได้คิดค้นเข็มเจาะที่ใช้ครั้งเดียว โดยใช้เข็มขนาด 19G ยาว 2 นิ้ว ที่ใช้ฉีดยาทั่วไป ต่อเข้ากับท่อเหล็กสแตนเลซที่ยาว 60 เซนติเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6มิลลิเมตร โดยใช้แล้วสามารถเปลี่ยนใหม่ได้ซึ่งให้อัตราการเก็บสูงถึง 42% ซึ่งใกล้เคียงกับการเก็บด้วยเข็มพิเศษ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Gerber และคณะ (2000) ที่ใช้เข็มขนาด 18G โดยมีอัตราการเก็บใกล้เคียงกัน การใช้เข็มแบบใช้แล้วทิ้งนี้จะช่วยลดปัญหาความคมของเข็มที่ลดลงในการเก็บครั้งต่อๆ ไป ซึ่งจะทำให้อัตราของจำนวนโอโอไซต์ปกติสูงขึ้น (Fry *et al.,1994)* และในอนาคตน่าจะมีราคาถูกลง ในการเจาะเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ที่มีขนาดตั้งแต่ 2-15 มิลลิเมตร มักใช้เข็มที่มีมุมเท่ากับ 25 องศา แต่ทั้งนี้ทั้งนั้นต้องขึ้นอยู่กับการพิจารณาใช้ของผู้ปฏิบัติงาน

ผลของประสบการณ์ของผู้ปฏิบัติ

เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญมากโดยเฉพาะเทคนิคการจับรังไข่เป็นสิ่งที่สำคัญมากที่ต้องจับไม่ให้รังไข่มีการเคลื่อนไหว เพราะเป็นการยากที่จะจับรังไข่ให้อยู่กับที่ในขณะแทงเข็ม เพราะเมื่อแทงเข็มเข้าไปรังไข่มักเลื่อนหลุด Meintjes และคณะ(1995) เสนอว่าอัตราการเก็บโอโอไซต์ในแม่โคมีความแตกต่างระหว่างผู้เก็บประมาณ 10-15% Brogliatti และคณะ(1995) ได้พยายามใช้วิธีการป้องกันไม่ให้รังไข่เลื่อนหลุด โดยใช้เครื่องควบคุมผ่านทางทวารหนักหรือใช้ laparoscopy forceps สอดเข้าทางหน้าของช่องคลอดไปจับขั้วรังไข่ แต่ก็ได้ผลไม่ดีและมักมีต่อการเห็นภาพของรังไข่จากจอ นอกจากนี้วิธีการแทงเข็มผ่านมุมบนของผนังช่องคลอดด้านบนก็มีความสำคัญ เพราะอาจแทงทะลุเข้าไปในทวารหนัก และทำให้เกิดการอักเสบของช่องท้องจากมูลที่ติดปลายเข็มได้ นอกจากนี้เข็มที่ใช้เจาะและท่อโปลีเอทีลีนที่ต่ออยู่ ควรเคลือบด้วยน้ำยาละลายด้วยสารละลายเฮปปารินก่อนทุกครั้ง เพื่อป้องกันการอุดตันของเลือดที่ดูดเข้ามาจากรังไข่

ผลของการบังคับสัตว์

การบังคับสัตว์เป็นสิ่งที่สำคัญมากในการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู เพราะหากสัตว์ดิ้นรนรังไข่ที่จับไว้อาจหลุดมือ หรือทิศทางการเจาะเคลื่อน เสียเวลา นิยมใช้ยากล่อมประสาทเพื่อควบคุมสัตว์ หรืออาจใช้เพียงการฉีดยาชา ชนิด 2% xylocaine HCl เข้าไขสันหลังก็อาจเพียงพอ (ชัยณรงค์ และคณะ, 2539) ทำให้ทำงานได้สะดวก โคไม่ดิ้นรน และเคลื่อนไหวบ่อย

การตรวจสอบระยะการเจริญของโอโอไซต์ด้วยวิธี Rapid staining

การปฏิสนธิในหลอดแก้วเป็นเทคโนโลยีการผลิตตัวอ่อนภายนอกตัวสัตว์ โดยนำโอโอไซต์มาปฏิสนธิกับตัวอสุจิจนได้ตัวอ่อนแล้วจึงนำไปย้ายฝากในสัตว์เพศเมียตัวรับเพื่อได้ลูกสัตว์ ดังนั้นโอโอไซต์จึง

เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อความสำเร็จในการผลิตตัวอ่อนดังกล่าว ลักษณะของโอโอไซต์ที่เก็บได้และระยะการเจริญแบ่งตัวของโอโอไซต์นั้นมีส่วนสัมพันธ์กับอัตราความสำเร็จในการผลิตตัวอ่อน โดยหากเป็นโอโอไซต์ที่สมบูรณ์มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบจำนวนมากมักจะให้ผลที่ดี ในขณะที่หากเป็นโอโอไซต์ที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบหรือเสื่อมสลายก็จะให้ตัวอ่อนที่ลดลง สำหรับระยะการเจริญของโอโอไซต์นั้นต้องทำการตรวจสอบด้วยการย้อมสีและอ่านผลใต้กล้องจุลทรรศน์ งานวิจัยส่วนใหญ่มักทำในโคแต่ยังมีจำนวนจำกัดในกระบือ จากรายงานของ Kamonpatana และ Chuangsoongneon (1994) พบว่าโอโอไซต์ที่ดูดจากรังไข่ของกระบือปลักที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์จะอยู่ในระยะ Germinal Vesicle (GV) ทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานในโค โอโอไซต์ดังกล่าวต้องนำมาเลี้ยงให้อยู่ในสภาวะพร้อมปฏิสนธิ (maturation) นานอย่างน้อย 24 ชั่วโมง (มาลี, 2539) สำหรับงานวิจัยในการตรวจสอบโอโอไซต์ภายหลังการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเพิ่มการตกไข่ชนิดโกนาโดโทรปินนั้นยังไม่มีรายงานแต่อย่างใด การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาการเจริญของโอโอไซต์ของลูกกระบือปลักและกระบือสาวที่ได้จากการเจาะเก็บด้วยวิธีโอพียู ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในงานวิจัยเกี่ยวกับการปฏิสนธินอกร่างกายในการผลิตตัวอ่อนที่จะนำไปย้ายฝากตัวอ่อน เพื่อให้ได้ลูกสัตว์ที่มีคุณค่าทางพันธุกรรมต่อไป

ผลกระทบของการเก็บโอโอไซต์แบบโอพียูต่อการทำงานของระบบสืบพันธุ์

. .Broadbent และคณะ(1997) รายงานว่าการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู ในแม่โคที่มีวงจรการเป็นสัดปกติสามารถทำการเก็บโอโอไซต์ในโคได้หลายครั้ง โดยไม่มีผลต่อการผสมติด หรือผลที่เกิดจากการกระตุ้นเพื่อเพิ่มการตกไข่ หลังจากที่ทิ้งช่วงห่างจากการเก็บโอโอไซต์ครั้งสุดท้ายประมาณ 7 สัปดาห์ โดยพบว่ามีแม่โคประมาณ 7% เท่านั้นที่มีช่วงการเป็นสัดยาวนานกว่าปกติ แต่ไม่พบปัญหาการเกิดถุงน้ำของรังไข่ และแม่โคมีการสร้างคอร์ปัส ลูเตียมปกติ ส่วนผลของการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ของแม่โคที่ส่วนมากทำในช่วง 3 เดือนแรกของการตั้งท้อง ร่วมกับการใช้ฮอร์โมน เอฟเอสเอช ขนาด 40 มิลลิกรัม เพื่อกระตุ้นให้ฟอลลิเคิลเจริญ พบว่า การเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีการนี้ไม่ทำให้เกิดการแท้งลูก และโอโอไซต์ที่เก็บได้มีลักษณะปกติและสามารถนำไปใช้ปฏิสนธินอกร่างกายได้ (Meintjes *et al*., 1995) และผลจากการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีการโอพียู ซ้ำหลาย ๆ ครั้ง เมื่อตามไปดูผลหลังจากส่งเข้าโรงฆ่าสัตว์ พบว่าอาจมีจุดเลือดออกบนรังไข่ และเนื้อของรังไข่หนาตัวขึ้น แต่ไม่พบปัญหาการยึดติดของรังไข่กับอวัยวะภายใน เหมือนอย่างเช่นที่สามารถพบได้จากการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีการเปิดผ่าช่องท้อง(Pieterse *et al*., 1991 ; Simon *et al*., 1993) นอกจากนี้ยังเป็นการลดการบอบช้ำจากการเก็บโอโอไซต์ ลดความเสี่ยงต่อการตายและข้อควรระวังที่เกิดจากการวางยาสลบ(Gonen *et al*.,1990) ดังนั้นเมื่อพิจารณาถึงประโยชน์และผลเสียที่มีต่อการทำงานของระบบสืบพันธุ์ที่พบได้น้อยแล้ว โอพียู จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งของการเก็บโอโอไซต์ที่น่าสนใจและน่าที่จะนำมาใช้ได้ดี

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

คำถามการวิจัย

คำถามหลัก :

1. การเก็บโอโอไซต์ด้วยเทคนิคการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีเข็มดูดเจาะต่อกับเครื่องมือคลื่นความถี่สูง สามารถที่จะนำมาใช้เก็บโอโอไซต์ในลูกกระบือปลักและกระบือปลักสาว
2. สามารถที่จะทำการเก็บโอโอไซต์ซ้ำในลูกกระบือปลักและกระบือปลักสาวด้วยวิธีโอพียู ได้หรือไม่
3. คุณภาพของโอโอไซต์จากลูกกระบือปลักและกระบือปลักสาวที่ได้จากการเก็บด้วยวิธีโอพียูมีคุณภาพเป็นอย่างไร

คำถามรอง :

1. โอโอไซต์ที่เก็บได้จากลูกกระบือปลักด้วยวิธีโอพียูมีระยะการเจริญของโอโอไซต์อยู่ในระยะใด
2. แรงดันในการดูดเก็บโอโอไซต์ในระดับใดเป็นระดับที่เหมาะสมที่จะใช้ในการเก็บโอโอไซต์ในกระบือปลักสาว และผลของแรงดันในระดับที่ต่างกันมีผลต่อคุณภาพ และความผิดปกติของโอโอไซต์หรือไม่

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาเทคนิคการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีเข็มดูดเจาะต่อกับเครื่องมือคลื่นความถี่สูง
2. เพื่อศึกษาผลของการเก็บโอโอไซต์ซ้ำในลูกกระบือปลักและกระบือปลักสาวด้วยวิธีโอพียู
3. เพื่อศึกษาชนิดของโอโอไซต์ที่เก็บได้ในลูกกระบือปลักและกระบือปลักสาว
4. เพื่อศึกษาระยะการเจริญของโอโอไซต์ที่เก็บได้ด้วยวิธีโอพียู
5. เพื่อศึกษาผลของระดับของแรงดูดในระดับต่างๆ ที่มีผลต่อคุณภาพและอัตราการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู

สมมุติฐานของการวิจัย

1. การเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีการใช้เข็มเจาะดูดร่วมกับเครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูงสามารถนำมาใช้ในลูกกระบือปลักและกระบือปลักสาวได้
2. คุณภาพของโอโอไซต์ที่เก็บได้จากวิธีการใช้เข็มเจาะดูดร่วมกับเครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูงมีคุณภาพดีพอที่จะสามารถนำมาใช้ในการปฏิสนธิในหลอดทดลองได้
3. สามารถทำการเก็บโอโอไซต์ซ้ำในลูกกระบือปลักและกระบือปลักสาว
4. โอโอไซต์ที่เก็บได้จากวิธีการใช้เข็มเจาะดูดร่วมกับเครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูงส่วนใหญ่อยู่ในระยะ Mature
5. แรงดันในการดูดในระดับที่ต่างกันมีผลต่อคุณภาพ และอัตราการเก็บโอโอไซต์

การทดลองที่ 1 การศึกษาการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูในลูกกระบือปลัก

1.1 ลูกกระบือทดลอง

เลี้ยงลูกกระบือทดลองเพศเมีย หลังหย่านม อายุประมาณ 8-10 เดือน น้ำหนักประมาณ 150 กิโลกรัม จำนวน 9 ตัว ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก จากกองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ นำมาเลี้ยงที่ศูนย์ฝึกนิสิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดนครปฐม โดยที่ให้อาหารข้นวันละ 2 กิโลกรัม อาหารหยาบและน้ำเต็มที่

1.2 การกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิล

ทำการฝังฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ชนิดฝังใบหู 7 วัน ก่อนเริ่มต้นโปรแกรมการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนฟอลลิเคิล สตีมูเลทติ้ง ฮอร์โมน (Follicle Stimulating Hormone,เอฟเอสเอช) โดยเปลี่ยนฮอร์โมนอันใหม่ ทุก ๆ 1 เดือน หลังจากนั้น ทำการกระตุ้นรังไข่ โดยใช้ฮอร์โมน เอฟเอสเอช ขนาด 180 มิลลิกรัม ฉีดเข้ากล้าม แบ่งฉีดวันละ 2 ครั้ง (เช้าและเย็น) แบบลดขนาด (40/40, 30/30, 20/20) โดยเริ่มการกระตุ้นหลังฝังฮอร์โมน โปรเจสเตอโรนไปแล้ว 7 วัน ก่อนการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูฉีดฮอร์โมนจีเอ็นอาร์เอช ขนาด 100 μg/ ตัว เข้ากล้ามเนื้อ หลังฉีดฮอร์โมน เอฟเอสเอช ครั้งสุดท้าย 24 ชั่วโมง ซึ่งฮอร์โมนที่ใช้ในโปรแกรมการกระตุ้นแสดงไว้ในรูปที่ 1

ตารางที่ 4 : แสดงโปรแกรมการฉีดกระตุ้นลูกกระบือด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน

วันที่	โปรแกรมฮอร์โมน
0	ฝังฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน(Progesterone)ใต้ผิวหนังด้านหลังของใบหูส่วนนอก
6	ตรวจสอบการเจริญของฟอลลิเคิล ด้วยเครื่องมืออัลตราซาวด์
7	ฉีด FSH 40/40 มิลลิกรัม เช้า/เย็น
8	ฉีด FSH 30/30 มิลลิกรัม เช้า/เย็น
9	ฉีด FSH 20/20 มิลลิกรัม เช้า/เย็น
10	ฉีดฮอร์โมน จีเอ็นอาร์เอช 100 ไมโครกรัม
11	เจาะเก็บโอโอไซต์

หมายเหตุ : ระยะห่างของการกระตุ้นแต่ละครั้ง 2 สัปดาห์

1.3 การตรวจรังไข่ก่อนการกระตุ้น

ก่อนเข้าสู่โปรแกรมการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิล ตรวจสอบผลการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นโดยทำการตรวจรังไข่ก่อนฉีดฮอร์โมนเอฟเอสเอช 48 ชั่วโมง ตรวจโดยการใช้อัลตราซาวด์ชนิดเรียลไทม์ บี-โมด และโปรปชนิดสอดผ่านทางช่องคลอด ความถี่ 5 เมกะเฮิร์ท ในการตรวจวัดระดับการตอบสนองของรังไข่ก่อนการกระตุ้นใช้เกณฑ์ในการแบ่งระดับของการตอบสนองดังนี้

ระดับ 0 คือ รังไข่ที่ไม่พบฟอลลิเคิล

ระดับ +1 คือ รังไข่ที่พบฟอลลิเคิลตั้งแต่ 1-5 ฟอลลิเคิล

ระดับ +2 คือ รังไข่ที่พบฟอลลิเคิลมากกว่า 5 ฟอลลิเคิล

เกณฑ์ในการจัดระดับการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ แสดงไว้ในรูปที่ 2

1.4 การตรวจการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้น

หลังจากฉีดฮอร์โมนกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลตามโปรแกรมข้างต้น ตรวจสอบผลการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นโดยทำการตรวจรังไข่หลังจากฉีดฮอร์โมนจีเอ็นอาร์เอช 24 ชั่วโมง ตรวจโดยการใช้อัลตราซาวน์ชนิด เรียลไทม์ บี-โมด และโปรปชนิดสอดผ่านทางช่องคลอด ความถี่ 5 เมกะเฮิร์ท (รูปที่ 5)

รูปที่ 1 ฮอร์โมนที่ใช้ในโปรแกรมการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่

ก. ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดฝังหู

ข. ฮอร์โมนเอฟเอสเอชเพื่อกระตุ้นรังไข่

ค. ฮอร์โมนจีเอ็นอาร์เอช

ระดับ 0 เท่ากับรังไข่ที่ตรวจไม่พบฟอลลิเคิล

ระดับ +1 เท่ากับรังไข่ที่ตรวจพบจำนวนของฟอลลิเคิล ตั้งแต่ 1-5 ฟอลลิเคิล

ระดับ +2 เท่ากับรังไข่ที่ตรวจพบจำนวนของฟอลลิเคิล มากกว่า 5 ฟอลลิเคิล

รูปที่ 2 ภาพอัลตราซาวด์แสดงระดับการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ก่อนการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลด้วยฮอร์โมน เอฟเอสเอช ; F (follicle)

1.5 การเตรียมตัวสัตว์ก่อนเก็บโอโอไซต์จากรังไข่

ทำการอดน้ำและอาหารลูกกระบือก่อนเก็บโอโอไซต์ประมาณ 24 ชั่วโมง นำลูกกระบือเข้าซองบังคับ ก่อนเริ่มการเก็บควบคุมสัตว์ด้วยการใช้ยากล่อมประสาท เช่น Xylazine HCl (Rompun®) หรือขนาด 10 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนัก 100 กิโลกรัม ร่วมกับการให้ยาชาเข้าไขสันหลังด้วย โดยฉีดยาชา 2% Xylocaine HCl จำนวน 1 มิลลิลิตร(รูปที่ 3) เพื่อลดการเคลื่อนไหวส่วนบั้นท้าย และความเจ็บปวดจากการเจาะรังไข่ด้วย แล้วทำความสะอาดบริเวณบั้นท้ายและปากช่องคลอดด้วยยาฆ่าเชื้อแล้วเช็ดด้วยแอลกอฮอล์

1.6 การเจาะเก็บโอโอไซต์จากรังไข่

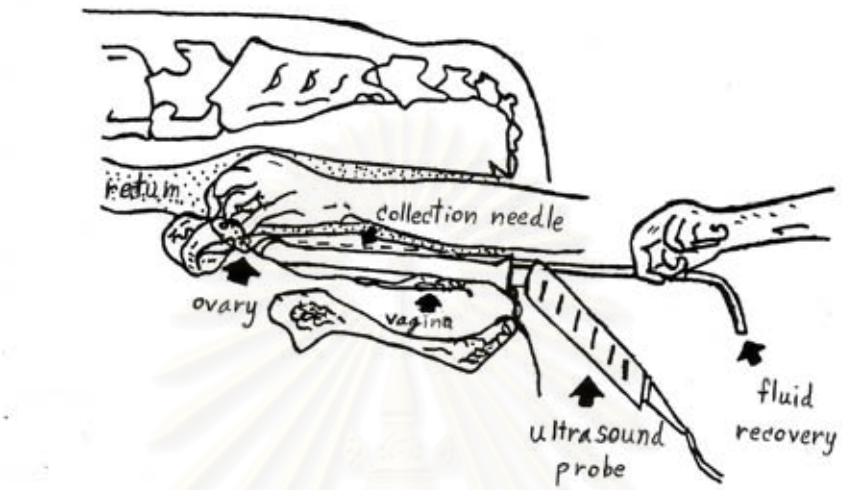
สอด tranvaginal probe ที่ทาปลายด้วย acoustic gel โดยสวมหุ้มโปรปด้วยถุงยางอนามัย แล้วทำการสอดเข็มเข้าไปในท่อนำโลหะ ดันปลายโปรปเข้าด้านบนช่องคลอด และให้สุดจนถึงคอมดลูก จากนั้นใช้มืออีกมือหนึ่งล้วงผ่านทางทวารหนัก(รูปที่ 6) หารังไข่แล้วดึงมาให้อยู่ในแนวหน้าตัดของโปรป ดังไดอะแกรมแสดงในรูปที่ 7 และ 8 (รูปที่ 5) ภาพของรังไข่จะปรากฏอยู่บนจอรับภาพ (รูปที่ 9) โดยปลายของตัวโปรปสามารถเคลื่อนลงในแนวต่าง ๆ ทั้งรอบแกนโปรป แนวตั้ง แนวด้านหน้า ด้านหลัง และแนวนอน ติดตัวโปรปด้วยเข็มเจาะโอโอไซต์ แทงเข็มทะลุมุมบนของช่องคลอด เมื่อเข็มถูกแทงผ่านผนังช่องคลอดจะเห็นปลายเข็มได้ โดยสามารถดูและควบคุมได้ผ่านจอภาพของเครื่องอัลตราซาวด์ ปลายเข็มจะปรากฏเป็นแนวเส้นประของเข็ม(รูปที่ 9) ดันเข็มทะลุฟอลลิเคิลอย่างช้า ๆ ขณะดูดต้องกดทำ negative pressure อยู่ตลอด(รูปที่ 10) ด้วยการควบคุมแรงดูดด้วยการกดที่ปลายเท้า (foot pedal lump) เมื่อปลายเข็มเข้าไปในฟอลลิเคิล ดูดโอโอไซต์พร้อมของเหลวในฟอลลิเคิลด้วยความแรง 80-100 มิลลิเมตรปรอท(ชัยณรงค์ และคณะ, 2539 ; Fry *et al*., 1997) กด foot pedal pump เพื่อให้ดูดของเหลวเข้ามาอย่างต่อเนื่อง ผนังฟอลลิเคิลจะแฟบลงทันที ของเหลวที่ถูกดูดไหลเข้าไปในท่อโปลีเอทีลีนที่เคลือบด้วยสารเฮปารีน ลงในหลอดพลาสติกปลอดเชื้อที่มีน้ำเกลือ 0.9% จำนวน 1 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ ทำการดูดทีละฟอลลิเคิล โดยใช้มือที่ล้วงในทวารหนักจับรังไข่พลิกไปมาให้ฟอลลิเคิลที่จะเจาะอยู่ในแนวปลายเข็ม เจาะฟอลลิเคิลให้ครบทุกฟอลลิเคิลที่สังเกตเห็น หลังจากทำการเจาะรังไข่ด้านหนึ่งเสร็จให้ทำการเจาะฟอลลิเคิลในรังไข่อีกข้างด้วยวิธีเดียวกัน หลังจากทำการดูดเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ทั้งสองข้างแล้ว (รูปที่ 12) ฉีดยาปฏิชีวนะชนิดเพนนิซิลลินและสเรตปโตมัยซิน 100,000 IU เพื่อป้องกันการติดเชื้อ หลังจากนั้นพักลูกกระบือเป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงเริ่มทำการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลและเก็บโอโอไซต์ซ้ำโดยลูกกระบือแต่ละตัวทำการเก็บโอโอไซต์ซ้ำติดต่อกันจำนวน 5 ครั้ง

รูปที่ 3 การทำ Cuadal epidural nerve block ในกระบือก่อนทำการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู

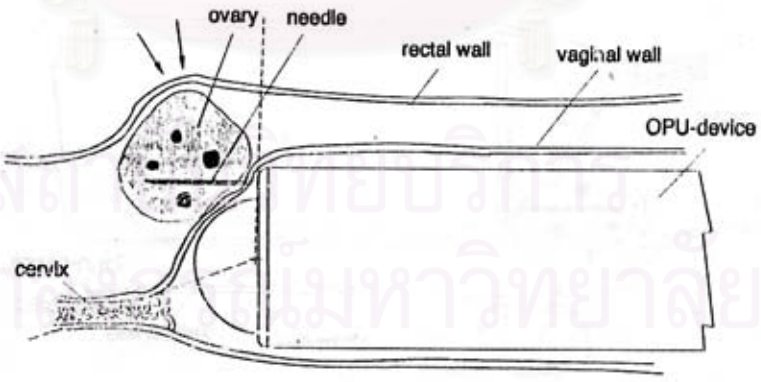
รูปที่ 4 การตรวจการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอชก่อนทำการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู อ่านผลจากหน้าจอมอนิเตอร์

รูปที่ 5 probe ของอัลตราซาวด์ ชนิดสอดผ่านช่องคลอด ขนาดความถี่ 5 เมกกะเฮิร์ซ พร้อมเข็มที่ใช้ในการเจาะเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู

รูปที่ 6 แสดงการสอด probe ผ่านทางช่องคลอดของกระบือ เพื่อเก็บโอโอไซต์



รูปที่ 7 ไดอะแกรมแสดงการเจาะโอโอไซต์จากรังไข่ (ดัดแปลงจาก Rath, 1995)

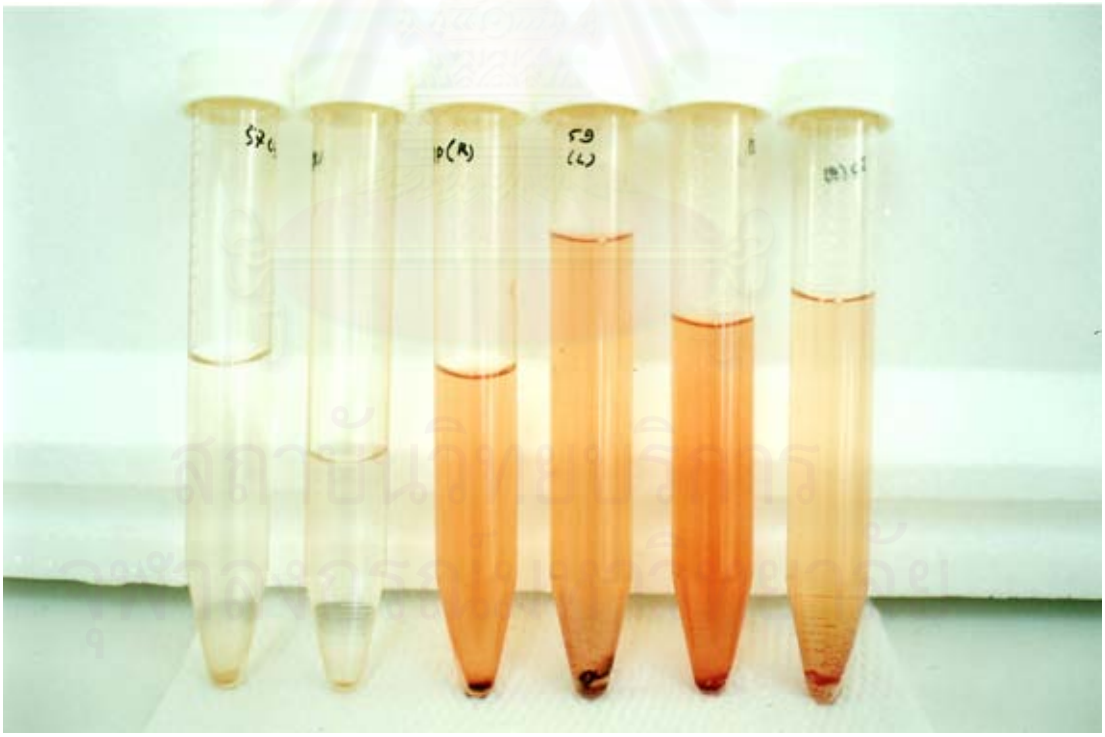


รูปที่ 8 ตำแหน่งรังไข่ขณะทำการเจาะ (Bols et al., 1995)

รูปที่ 9 ภาพของรังไข่ขณะเจาะ แนวประแสดงแนวของเข็ม

รูปที่ 10 แสดงเครื่องควบคุมระดับความดันสูญญากาศและ test tube heater ที่ใช้ในการทำโอพียู

รูปที่ 11 ภาพของรังไข่หลังเจาะแล้ว ไม่เห็นฟอลลิเคิลเหลืออยู่



รูปที่ 12 แสดงของเหลวที่เก็บได้จากฟอลลิเคิล (follicular fluid) ด้วยวิธีโอพียู

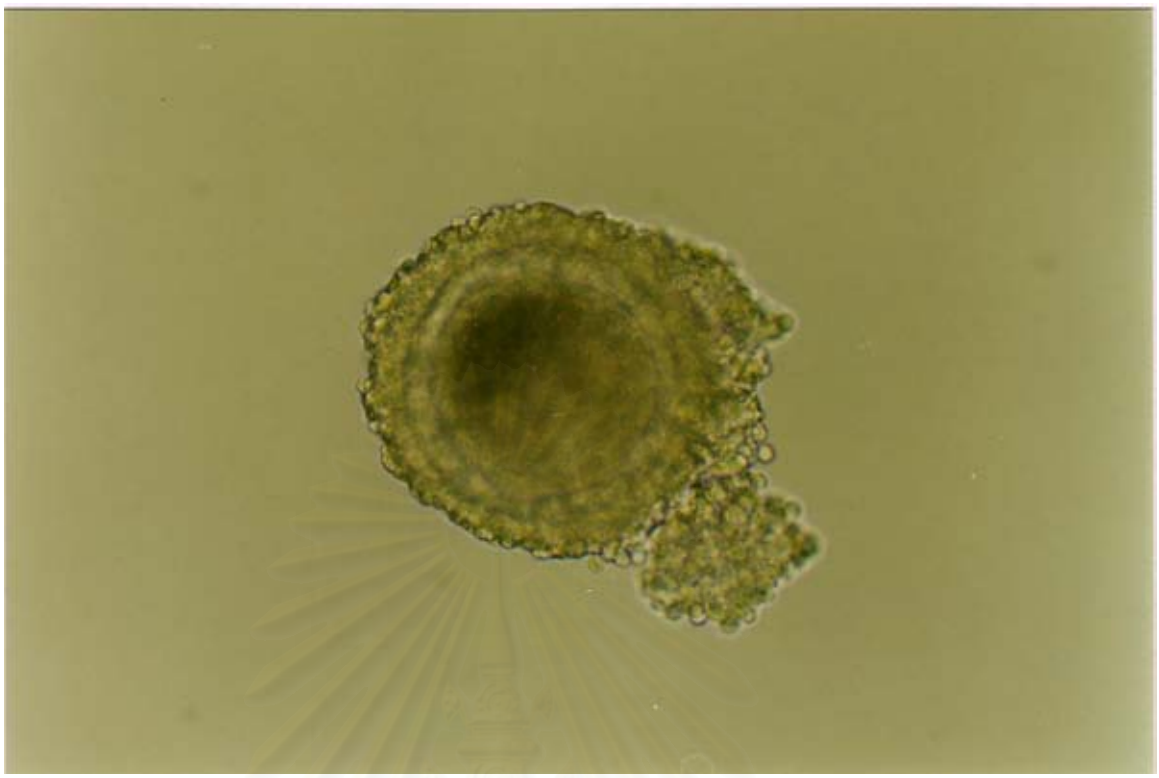
1.7 การตรวจหาและจำแนกชนิดของโอโอไซต์

ในการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูนี้ ตามปกติของเหลวที่ดูดออกมาจะมีเลือดปนด้วย (รูปที่ 12) เพราะช่วงที่เจาะผ่านผนังฟอลลิเคิลอาจไปทิ่งแทงในส่วนของเนื้อรังไข่ได้ ดังนั้นจึงต้องนำของเหลวที่เจาะได้เทใส่ในกรวยกรองตัวอ่อนขนาด 4.5 ไมครอน เม็ดเลือดจะผ่านรูกรองได้ ส่วนโอโอไซต์จะไม่สามารถผ่านได้ ชะล้างด้วยน้ำเกลือ 0.9% เทลงตามเพื่อล้างเลือด โดยให้ของเหลวไหลผ่านช้า ๆ ทำเช่นนี้หลาย ๆ ครั้ง ของเหลวที่เหลือจะใสง่ายต่อการตรวจหา เหลือน้ำยาไว้ประมาณ 50 มิลลิลิตร เทใส่เพลทพลาสติก แล้วตรวจหาภายใต้กล้องสเตอริโอ กำลังขยาย 40 เท่า เก็บโอโอไซต์ไว้ในน้ำยา TCM 199 2.5 mMHepes และจัดชนิดของโอโอไซต์เป็น 6 ลักษณะ(รูปที่ 13-17) คือ

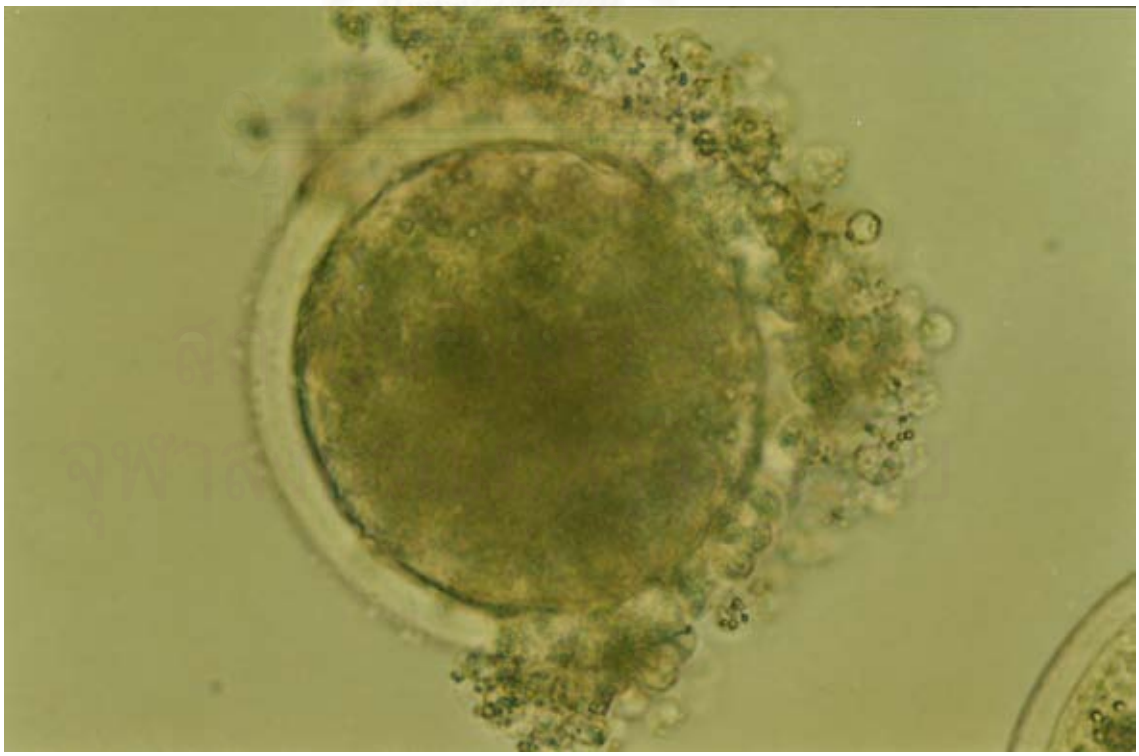
1. โอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสหลายชั้น (Complex cumulus oocyte ,CCO)
2. โอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัส1-3 ชั้น (Single or Partial cumulus oocyte ,S+P)
3. โอโอไซต์ที่ไม่มีมีเซลล์คิวมูลัสหุ้ม (Denude oocyte,D)
4. โอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสกระจาย (Expand cumulus oocyte,EXP)
5. โอโอไซต์ที่ไซโตพลาสซึมเสื่อมสลาย (Degenerate oocyte,DEG)
6. โอโอไซต์ที่มีไม่ไซโตพลาสซึม (Free-zona oocyte,FZ)

โดยโอโอไซต์ชนิดที่ 1-3 จัดเป็นโอโอไซต์ที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ โอโอไซต์ชนิดที่ 4 เป็นโอโอไซต์ที่พร้อมปฏิสนธิ โอโอไซต์ชนิดที่ 5 เป็นโอโอไซต์ที่มีการเสื่อมสลาย (มงคล และคณะ 2537) ส่วนโอโอไซต์ชนิดที่ 6 เป็น โอโอไซต์ที่พบในการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูในลูกโคพื้นเมืองจากงานวิจัยของ ชัยณรงค์ และคณะ (2539)

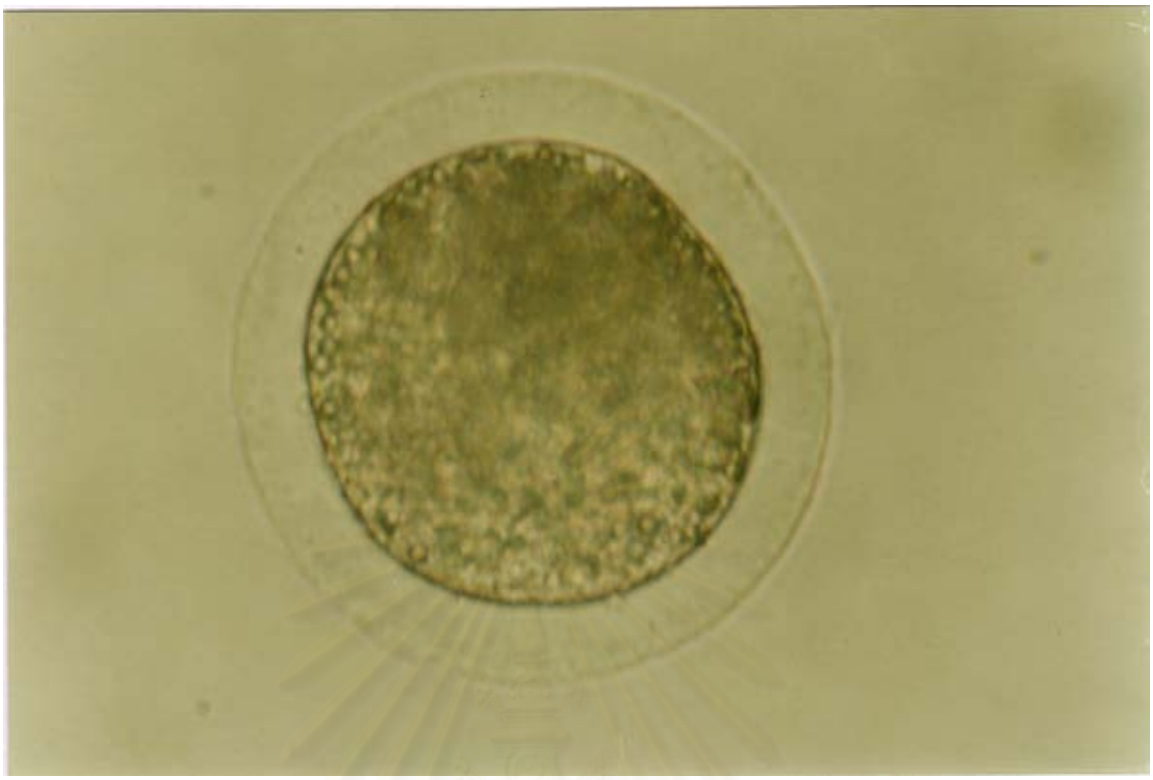
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



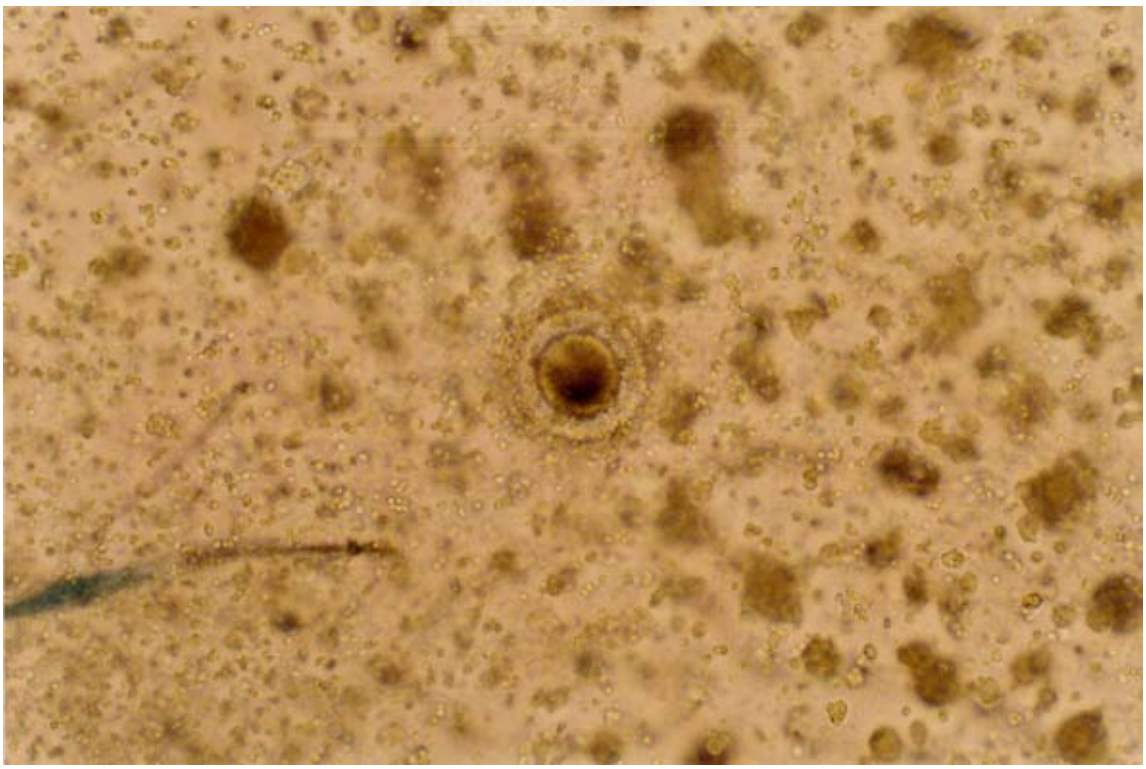
รูปที่ 13 โอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มหลายชั้น (Complex cumulus oocyte, CCO) (กำลังขยาย 200x)



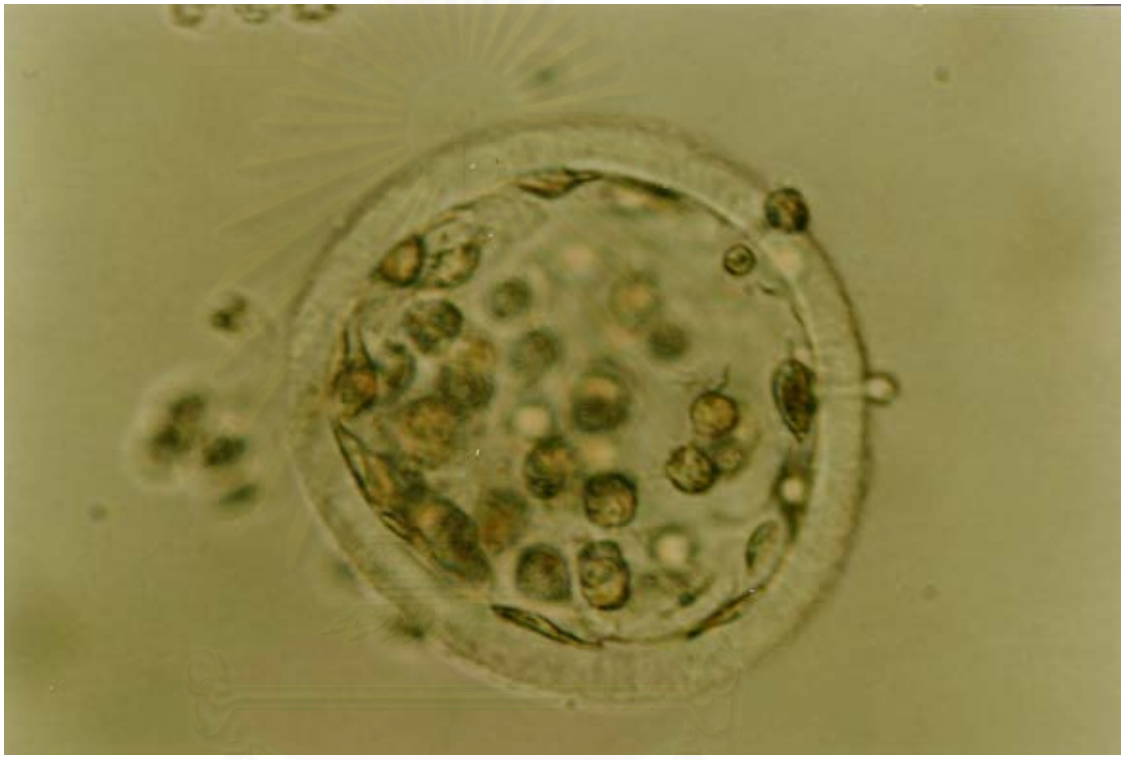
รูปที่ 14 โอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มเพียงบางส่วน (Partial cumulus oocyte, P) (กำลังขยาย 400x)



รูปที่ 15 โอโอไซต์ชนิดที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้ม (Denude oocyte,D) (กำลังขยาย 400x)



รูปที่ 16 โอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสแผ่กระจาย (Expand cumulus oocyte,EXP) (กำลังขยาย 200x)



รูปที่ 17 โอโอไซต์ชนิดที่มีการเสื่อมสลาย (Degenerate oocyte,DEG) (กำลังขยาย 400x)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.8 การย้อมสีโอโอไซต์ที่เก็บได้ด้วยวิธี Rapid staining

วิธีการย้อมสี

วิธีการตรวจสอบระยะการแบ่งตัวของโอโอไซต์ใช้วิธีตามที่ มาลี และคณะ(2542) ได้เคยรายงานไว้โดยมีรายละเอียดคร่าว ๆ ดังนี้

1. นำโอโอไซต์ที่เก็บรักษาไว้ในน้ำยา TCM199 HEPES ใส่ลงในสารละลาย 1% Sodium citrate ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในจานหลุมแก้ว ทิ้งไว้ 15 นาที
2. ทำการเตรียมน้ำยา Fixative ประกอบด้วย Glacial acetic acid : Absolute alcohol ในอัตราส่วน 1:3 แบ่งใส่จานเพาะเชื้อชนิด 4 หลุม ปิดฝากันระเหย และเตรียมน้ำยา destaining ประกอบด้วย Gacial acetic acid : น้ำกลั่น : glycerol ในอัตราส่วน 1 : 3 :1 ใส่หลอดพักไว้
3. เมื่อใส่โอโอไซต์ในสารละลาย 1% Sodium citrate ครบ 15 นาที ให้ใช้ปิเปตสำหรับ decoronization ทำการดูดโอโอไซต์เข้าและออกหลายครั้ง เพื่อกำจัดเซลล์คิวมูลัสที่อยู่รอบเปลือกโอโอไซต์ออกให้หมด จากนั้นเคลื่อนย้ายโอโอไซต์ไปใส่ในน้ำยา Fixative นานอย่างน้อย 10 นาที เพื่อให้เม็ดไขมันที่มีอยู่ในไซโทพลาสซึมของโอโอไซต์สลายไป การเก็บโอโอไซต์ในน้ำยา Fixative สามารถเก็บไว้ได้นานประมาณ 1 สัปดาห์ โดยใช้สก็อตเทปปิดรอยต่อระหว่างฝาและตัวจานหลุม เพื่อป้องกันการระเหยของน้ำยาและเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นธรรมดาจนกว่าจะนำมาย้อมสี
4. เตรียมแผ่นสไลด์และ coverslip โดยใช้กระดาษชำระเช็ดให้สะอาด ใช้วาสลีนแต้มเป็นจุดเล็กๆ 4 จุด บนแผ่น สไลด์โดยประมาณให้มีความกว้าง-ยาวพอดีกับขอบของ coverslip
5. ทำการย้ายโอโอไซต์จากน้ำยา Fixative ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ และวางบนสไลด์ให้อยู่กึ่งกลางจุดวาสลีนที่แต้มไว้ พร้อมกับหยดน้ำยา Fixative ลงไปอีก 2-3 หยด ปิด coverslip โดยกดเบา ๆ ให้แผ่นสไลด์แนบกับโอโอไซต์ ใส่สีย้อมผ่านเข้าไประหว่างแผ่นสไลด์กับ coverslip ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที
6. หลังจากนั้นใช้ micropipette ดูดน้ำยา Destaining และหยดไว้ที่ขอบ coverslip และปล่อยให้น้ำยาไหลผ่านเข้าไปชะล้างสีออก โดยใช้กระดาษชำระคอยช่วยซับสีออกที่ขอบ coverslip ด้านตรงข้ามกับด้านที่ปล่อยน้ำยาชะล้างสีเข้าไป ทำจนกว่าจะชะล้างสีจนหมด จะเห็นโอโอไซต์เป็นจุดติดสีชมพู จากนั้นใส่น้ำกลั่นชะล้างไล่น้ำยา Destaining และสี ออกอีกครั้ง
7. ใช้น้ำยาทาเล็บทารอบๆ ขอบของ coverslip เพื่อป้องกันการระเหยของของเหลวภายใน ทำให้สามารถเก็บสไลด์ไว้ได้นานขึ้น
8. นำแผ่นสไลด์ไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างเพื่อดูลักษณะของโครโมโซมภายในโอโอไซต์และจำแนกตามลักษณะโครโมโซมที่พบ

1.9 การตรวจสอบผล

วิธีการอ่านผลลักษณะโครโมโซม

การจำแนกลักษณะของโครโมโซมที่พบ ใช้หลักตามการศึกษาของมาลี (2539) คือ

1. ระยะ Germinal vesicle (GV) โดยพบชั้นเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear membrane) และนิวคลีโอลัส (nucleolus) ชัดเจน สายโครมาตินยังไม่เกิดการรวมตัว (condensation) ชัดเจน
2. ระยะ Germinal vesicle breakdown (GVBD) โดยชั้นเยื่อหุ้มนิวเคลียสสลายไป สายโครมาตินกระจายออก อาจยังพบนิวคลีโอลัสเหลืออยู่ในช่วงต้นๆ แต่ในช่วงท้ายจะสลายไปเช่นกัน
3. ระยะ Interphase-Prophase (I-P) สายโครมาตินเริ่มรวมตัวกันเห็นชัดเจน แต่ยังไม่รวมกันเป็นกลุ่ม
4. ระยะ Metaphase I (MI) สายโครมาตินรวมตัวกันแน่นเห็นชัดเจนเป็นแท่งโครโมโซมรวมกลุ่มกันเพียงกลุ่มเดียว
5. ระยะ Anaphase I - Telophase I (AI-TI) โครโมโซมเริ่มแยกตัวออกจากกันแต่ยังไม่ชัดเจน
6. ระยะ Metaphase II (MII) โครโมโซมรวมตัวกันเป็นสองกลุ่ม แยกกันอย่างชัดเจน
7. Unidentified (U) ไม่สามารถระบุลักษณะของโครโมโซมได้ชัดเจน
8. Degenerate (D) มีการเสื่อมสลายของโครโมโซมภายในไซโทพลาสซึม

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของแรงดูดสูญญากาศต่ออัตราการเก็บโอโอไซต์และคุณภาพของ โอโอไซต์ในกระบือปลักสาวที่เก็บด้วยวิธีโอพียู

2.1 กระบือสาวทดลอง

เลี้ยงกระบือสาวทดลองเพศเมียอายุประมาณ 3 ปี น้ำหนักประมาณ 250 กิโลกรัม จำนวน 6 ตัว ที่เลี้ยงไว้ที่ศูนย์ฝึกนิสิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดนครปฐม โดยที่ให้อาหารข้น อาหารหยาบและน้ำเต็มที่

2.2 การกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิล

ทำการฝังฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดฝังใบหู 7 วัน ก่อนเริ่มต้นโปรแกรมการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนฟอลลิเคิล สตีมูเลทติ้ง ฮอร์โมน (Follicle Stimulating Hormone, FSH) โดยเปลี่ยนฮอร์โมนอันใหม่ทุก ๆ 1 เดือน หลังจากนั้น ทำการกระตุ้นรังไข่ โดยใช้ฮอร์โมน เอฟเอสเอช ขนาด 280 มิลลิกรัม ฉีดเข้ากล้าม แบ่งฉีดวันละ 2 ครั้ง (เช้าและเย็น) แบบลดขนาด (60/60, 50/50, 30/30) โดยเริ่มการกระตุ้นหลังฝังฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนไปแล้ว 7 วัน ก่อนการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูฉีดฮอร์โมน จีเอ็นอาร์เอช ขนาด 100 μg/ ตัว เข้ากล้ามเนื้อ หลังฉีดฮอร์โมน เอฟเอสเอช ครั้งสุดท้าย 24 ชั่วโมง

2.3 การตรวจการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้น

ตรวจสอบผลการกระตุ้นต่อการตอบสนองของรังไข่โดยทำการตรวจรังไข่ก่อนฉีดฮอร์โมนเอฟเอสเอช 24 ชั่วโมง และหลังจากฉีดฮอร์โมน จีเอ็นอาร์เอช 24 ชั่วโมง ตรวจโดยการใช้อัลตราซาวด์ชนิด เรียลไทม์ บี-โมด และโปรปชนิดสอดผ่านทางช่องคลอดความถี่ 5 เมกะเฮิร์ท

2.4 การเตรียมตัวสัตว์ก่อนเก็บโอโอไซต์จากรังไข่

เหมือนการเตรียมตัวสัตว์ในการทดลองที่ 1

2.5 การเจาะเก็บโอโอไซต์จากรังไข่

มีเทคนิคและวิธีการเหมือนในการทดลองที่ 1 แต่ทำการเก็บโอโอไซต์โดยใช้แรงดูดในระดับที่ต่างกัน คือ 100, 80 และ 60 mmHg โดยการสุ่มเป็นจำนวน 2 รอบ รวมการเก็บทั้งสิ้น 6 ครั้ง โดยการเก็บแต่ละครั้ง ห่างกัน 2 สัปดาห์

2.6 การตรวจหาและจำแนกชนิดของโอโอไซต์

มีเทคนิคและวิธีการเหมือนในการทดลองที่ 1 แต่ใช้สารละลาย Lactate ringer ‘ s ในการชะล้าง

2.7 การย้อมสีโอโอไซต์ที่เก็บได้ด้วยวิธี Rapid staining

เหมือนการทดลองที่ 1.7

2.8 การอ่านผลการย้อมสี

เหมือนการทดลองที่ 2.8

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ในการทดลองที่ 1 ทำการนับจำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้ นำมาหาค่าเฉลี่ยบวกลบ ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน ($X \pm SD$) และทำการจำแนกออกเป็นชนิดต่าง ๆ ตามการจำแนกข้างต้น แล้วทำการเปรียบเทียบผลของการกระตุ้นแต่ละครั้งต่อคุณภาพของโอโอไซต์แต่ละชนิดโดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) ส่วนในการทดลองที่ 2 เปรียบเทียบผลของแรงดันแต่ละระดับต่อจำนวนและคุณภาพของโอโอไซต์ที่เก็บได้ โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Analysis of Variance(ANOVA) ชนิดทางเดียว

ระยะเวลาในการศึกษา

ระหว่างเดือน เมษายน 2543 – เมษายน 2544

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การทดลองที่ 1 การศึกษาการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูในลูกกระบือปลัก

ผลการทดลองและการเปรียบเทียบข้อมูล

ผลการตรวจรังไข่ก่อนการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน

ผลการตรวจรังไข่ก่อนการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เอฟเอสเอช พบว่า ก่อนการกระตุ้นการทำงานของรังไข่แต่ละครั้ง ในรังไข่จะมีระดับของการเจริญของฟอลลิเคิลโดยเฉลี่ย 1.3 ± 0.7 ใบ โดยจะมีการเจริญของฟอลลิเคิลในระดับ +1 เป็นจำนวนมากที่สุด 37 รังไข่ คิดเป็น 44.0% รองลงมา ได้แก่ระดับ +2 และ 0 เป็นจำนวน 34(40.5%) และ13(15.5%) ตามลำดับ ซึ่งการเก็บในครั้งที่ 4 จะมีความแตกต่างจากครั้งอื่นตรงที่ระดับการเจริญของฟอลลิเคิลที่ระดับ +1 จะมีจำนวนมากกว่าระดับ +2 ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 : **ผลการตรวจสอบรังไข่ก่อนกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เอฟเอสเอช ในลูกกระบือปลัก**

ครั้งของ	จำนวนรังไข่	ระดับของการเจริญของฟอลลิเคิลก่อนกระตุ้น		
การกระตุ้น	(ข้าง)	0	+ 1	+ 2
1	18	5	7	6
		(27.8%)	(38.9%)	(33.3%)
2	18	2	6	10
		(11.1%)	(32.3%)	(56.6%)
3	16	2	7	7
		(12.4%)	(43.8%)	(43.8%)
4	16	2	11	3
		(12.4%)	(68.8%)	(18.8%)
5	16	2	6	8
		(12.4%)	(37.5%)	(50.1%)
รวม	84	13	37	34
		(15.5%)	(44.0%)	(40.5%)
$\overline{X}$ ± S.D.			1.3 ± 0.7	

ผลการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่

จากผลการทดลองกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ของลูกกระบือปลักจำนวน 9 ตัว ด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอช พบว่าลูกกระบือมีการตอบสนองของรังไข่ในการเจริญของฟอลลิเคิล คิดเป็น 88.1% (37/42) และเมื่อทำการตรวจสอบการตอบสนองของการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ พบว่ามีการตอบสนองของจำนวนฟอลลิเคิลที่ตรวจพบในรังไข่ เท่ากับ 6.6±3.6(n=39) ฟอลลิเคิล ต่อตัว ต่อครั้งของการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี โอพียู และฟอลลิเคิลที่เกิดขึ้นจากการกระตุ้นการทำงานของรังไข่ด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอช จะมีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของฟอลลิเคิล เท่ากับ 0.5±0.2 (n=256)เซนติเมตร โดยมีค่าพิสัยของเส้นผ่านศูนย์กลางฟอลลิเคิลตั้งแต่ 0.3-1.0 เซนติเมตร ซึ่งสามารถจำแนกฟอลลิเคิลที่พบออกตามขนาดได้ดังแสดงไว้ในตารางที่ 6 หลังจากนั้นทำการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู พบว่า ได้โอโอไซต์เฉลี่ยเท่ากับ 5.4±3.7(n=212) โอโอไซต์ ต่อตัว ต่อครั้ง ของการเก็บ โอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู โดยค่าพิสัยของจำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้อยู่ในช่วง 0-20 โอโอไซต์ ต่อตัว ต่อครั้ง ของการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู ซึ่งคิดเป็นอัตราการเก็บโอโอไซต์ที่ได้เท่ากับ 82.4%(n=39) ดังแสดงผลไว้ในตารางที่ 6

จากผลการทดลองที่แสดงไว้ในตารางที่ 7 พบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของฟอลลิเคิลที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นในการกระตุ้นแต่ละครั้งส่วนมากจะมีขนาดของฟอลลิเคิลประมาณ 4-<6 มิลลิเมตร คิดเป็น 40.6%(104/256) รองลงมาได้แก่ ฟอลลิเคิลที่มีขนาด 6-<8 มิลลิเมตร คิดเป็น 27.0%(69/256) ฟอลลิเคิลขนาด 2-<4 มิลลิเมตร คิดเป็น 21.9%(56/256) ฟอลลิเคิลขนาด 8-<10 มิลลิเมตร คิดเป็น 9.0%(23/256) และฟอลลิเคิลขนาด >10 มิลลิเมตร คิดเป็น 1.5%(4/256) รองลงมาตามลำดับ

ตารางที่ 6 : ผลการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่หลังกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอช

จำนวนลูกกระบือปลักทดลอง(ตัว)	9
จำนวนครั้งของการกระตุ้น(ครั้ง)	42
จำนวนลูกกระบือที่ตอบสนอง (%)	37(88.1)
จำนวนฟอลลิเคิลที่ตรวจพบจากเครื่องอัลตราซาวด์	6.6±3.6
ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของฟอลลิเคิล(มิลลิเมตร)	5.0±2.0(2-10)*
จำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้	5.4±3.7(0-20)*
อัตราการเก็บโอโอไซต์(%)	82.4%(0-100)*

(*) = พิสัย

ตารางที่ 7 : แสดงขนาดของฟอลลิเคิลที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอชในลูกกระบือปลัก

ครั้งของ		เส้นผ่านศูนย์กลางของฟอลลิเคิล (มิลลิเมตร)				
การกระตุ้น	n	2 - <4	4 - <6	6 - <8	8 - <10	>10
1	50	19*	18	9	4	0
		(38.0%) **	(36.0%)	(18.0%)	(8.0%)	(0%)
2	66	15	24	20	6	1
		(22.7%)	(36.4%)	(30.3%)	(9.1%)	(1.5%)
3	52	7	20	18	6	1
		(13.5%)	(38.5%)	(34.6%)	(11.5%)	(1.9%)
4	36	5	16	10	4	1
		(13.9%)	(44.4%)	(27.8%)	(11.1%)	(2.8%)
5	52	10	26	12	3	1
		(19.2%)	(50.0%)	(23.1%)	(5.8%)	(1.9%)
รวม	256	56	104	69	23	4
(100%)		(21.9%)	(40.6%)	(27.0%)	(9.0%)	(1.5%)
$\overline{X}$ ± S.D. (พิสัย)		5.0±2.0 (2 – 10)				

n จำนวนโอโอไซต์

* จำนวนฟอลลิเคิลในขนาดต่างๆ

** เปอร์เซนต์ฟอลลิเคิลขนาดต่างๆ ของแต่ละครั้งของการกระตุ้น

ผลการเก็บโอโอไซต์

จากผลการทดลองเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ลูกกระบือปลัก ที่ได้รับการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอช หลังจากนั้นทำการเจาะเก็บโอโอไซต์ซ้ำเป็นจำนวน 5 ครั้ง โดยแต่ละครั้งจะทำการเจาะเก็บทุก 2 สัปดาห์ ซึ่งจากผลการเจาะเก็บโอโอไซต์พบว่าการเก็บโอโอไซต์ในครั้งที่ 1 ในลูกกระบือปลักจำนวน 8 ตัว โดยตรวจพบการตอบสนองของฟอลลิเคิลจำนวนทั้งหมด 50 ฟอลลิเคิล โดยกระบือแต่ละตัวมีการตอบสนองเฉลี่ย 6.3 ± 6.0 ฟอลลิเคิล และสามารถเก็บโอโอไซต์ได้ทั้งหมด 43 โอโอไซต์ คิดเป็นค่าเฉลี่ย 5.4 ± 6.0 โอโอไซต์ต่อตัว โดยคิดเป็นอัตราการเก็บเท่ากับ 83.2% ในการเก็บโอโอไซต์ครั้งที่ 2 มีการตอบสนองของฟอลลิเคิลทั้งหมด 66(8.3±2.8) ฟอลลิเคิล(n=8) โดยเก็บโอโอไซต์ได้ 54(6.8 ± 3.0) โอโอไซต์ คิดเป็นอัตราการเก็บเท่ากับ 82.4% หลังจากนั้นได้ทำการเก็บต่อในครั้งที่ 3 โดยตรวจพบ

ฟอลลิเคิลจำนวน 52(7.4 ± 1.9) ฟอลลิเคิลในการเก็บครั้งนี้ได้โอโอไซต์จำนวน 42(6.0 ± 2.3) โอโอไซต์(n=7) โดยคิดเป็นอัตราการเก็บเท่ากับ 81.3% เมื่อทำการเก็บโอโอไซต์ในครั้งที่ 4 พบการตอบสนองของรังไข่เพียง 36(4.5± 1.2) ฟอลลิเคิล(n=8) ซึ่งสามารถเก็บโอโอไซต์ได้ 27(3.4 ± 2.1)โอโอไซต์ มีอัตราการเก็บเท่ากับ 68.8% และในการเก็บครั้งสุดท้ายคือครั้งที่ 5 พบการตอบสนองของรังไข่ 52 (6.5 ± 3.5) ฟอลลิเคิล (n=8) และในครั้งนี้สามารถเก็บโอโอไซต์ได้ทั้งหมด 46(5.8 ± 3.6) โอโอไซต์ คิดเป็นอัตราการเก็บ เท่ากับ 87.9% ซึ่งเมื่อนำผลการเก็บโอโอไซต์ทั้ง 5 ซ้ำ มาคำนวนรวมกันพบว่ามีการตอบสนองของการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่เป็นจำนวน 256(6.6±3.6) ฟอลลิเคิล และสามารถเก็บโอโอไซต์ได้ 212(5.4 ± 3.7) โอโอไซต์(n=39) คิดเป็นอัตราการเก็บเท่ากับ 82.4%(81.0±25.8) ซึ่งเมื่อนำโอโอไซต์ที่เก็บได้ทั้งหมดมาจำแนกชนิดของโอโอไซต์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอพบว่า ชนิดของโอโอไซต์ที่เก็บได้จากการเก็บโอโอไซต์ทั้ง 5 ครั้งส่วนมากเป็นชนิดโอโอไซต์ที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้ม คิดเป็นจำนวนเท่ากับ 76/212(35.9%) โอโอไซต์ หรือเฉลี่ยเท่ากับ 1.95 ± 2.2 โอโอไซต์ต่อตัว ส่วนโอโอไซต์ที่พบมากรองลงมาได้แก่ โอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มอย่างน้อย 1-3 ชั้น เท่ากับ 47 / 212 (22.2%) หรือเฉลี่ยเท่ากับ 1.2 ± 1.7 โอโอไซต์ต่อตัว โอโอไซต์ชนิดที่ไม่มีโอโอพลาสซึม(Ooplasm) เท่ากับ 41/212(19.3%) เฉลี่ย 1.05 ± 1.6 โอโอไซต์ต่อตัว โอโอไซต์ที่มีการเสื่อมสลายเท่ากับ 24/212(11.3%) คิดเป็น 0.6 ± 0.7 โอโอไซต์ต่อตัว ส่วนโอโอไซต์ชนิดที่พบน้อยได้แก่ โอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มมากกว่า 3 ชั้น เท่ากับ 14/212(6.6%) เฉลี่ย 0.35 ± 0.6 โอโอไซต์ต่อตัว และโอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสแผ่ขยาย เท่ากับ 10/212(4.7%) เฉลี่ย 0.3 ± 0.5 โอโอไซต์ต่อตัว รองลงมาตามลำดับ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2

นอกจากนี้จากการศึกษา ผลของจำนวนครั้งของการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอช และครั้งของการเก็บโอโอไซต์ซ้ำ พบว่าไม่มีความแตกต่างของจำนวนฟอลลิเคิลที่เกิดขึ้นจากการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนดังกล่าว และจำนวนของโอโอไซต์ที่เก็บได้จากการทำโอพียูซ้ำ(P>0.05) หรือ กล่าวอีกนัยหนึ่ง คือ การกระตุ้นการทำงานของรังไข่ด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอชซ้ำ และการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูซ้ำในลูกกระบือปลัก จำนวน 5 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 2 สัปดาห์ ไม่มีผลกระทบต่อการเจริญของฟอลลิเคิลในการกระตุ้นครั้งต่อไป และไม่มีผลกระทบต่ออัตราการเก็บโอโอไซต์ในแต่ละครั้งของการเก็บโอโอไซต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 : ผลการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ลูกกระบือปลักที่ได้รับการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิล และทำการเจาะเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีการใช้เข็มเจาะดูดร่วมกับเครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูง

ครั้งของการเก็บโอโอไซต์	จำนวนลูกกระบือปลัก	จำนวนฟอลลิเคิล*	ชนิดของโอโอไซต์						อัตราการเก็บโอโอไซต์
			จำนวนรวม	COC	P+S	D	EXP	Deg	FZ	(%)
ครั้งที่ 1	8	50	43	3	11	17	1	5	6	83.2
		6.3±6.0	5.4±6.0							83.2±21.8
ครั้งที่ 2	8	66	54	1	14	15	3	6	15	82.5
		8.3±2.8	6.8±3.0							82.5±20.5
ครั้งที่ 3	7	52	42	3	9	13	2	4	11	81.3
		7.4±1.9	6.0±2.3							81.3±25.0
ครั้งที่ 4	8	36	27	5	4	7	2	4	5	68.8
		4.5±1.2	3.4±2.1							68.8±35.8
ครั้งที่ 5	8	52	46	2	9	24	2	5	4	87.9
		6.5±3.5	5.8±3.6							87.9±17.5
รวม	39	256	212	14	47	76	10	24	41	212/256
		6.6±3.6	5.4±3.7	0.35±0.6 (6.6%)	1.2±1.7 (22.2%)	1.95±2.2 (35.9%)	0.3±0.5 (4.7%)	0.6±0.7 (11.3%)	1.05±1.6 (19.3%)	81.0±25.8 (82.4%)

* จำนวนฟอลลิเคิลที่ปรากฏบนรังไข่ขนาดตั้งแต่ 2.0 มิลลิเมตรขึ้นไป

(%) = อัตราส่วนของชนิดของโอโอไซต์เปรียบเทียบกับโอโอไซต์ทั้งหมดที่เก็บได้

ผลการย้อมสีโอโอไซต์ด้วยวิธี Rapid staining

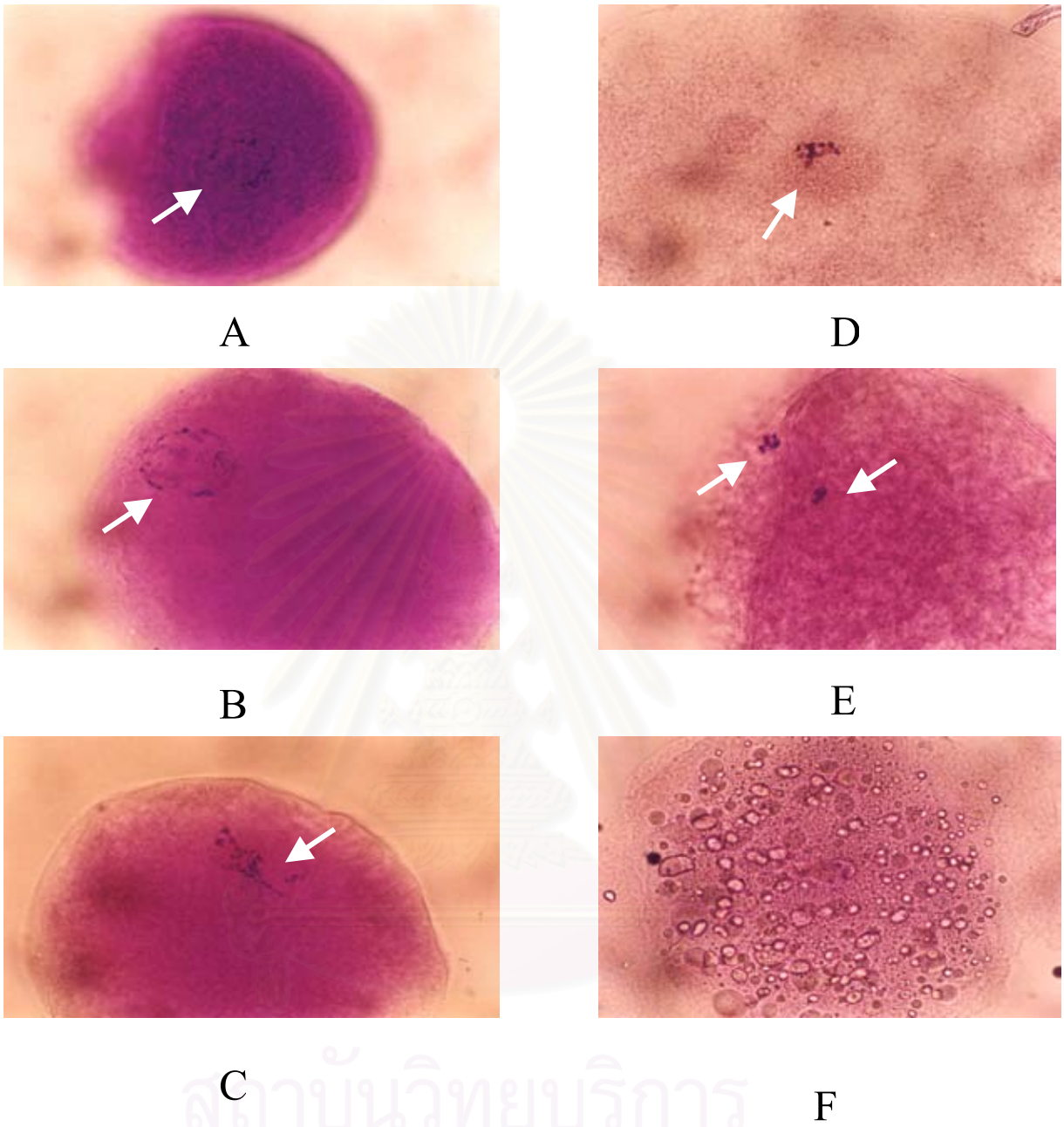
จากผลการตรวจสอบระยะการเจริญของโอโอไซต์ที่ได้จากการเจาะเก็บโดยวิธีโอพียูในลูกกระบือปลักนั้น พบว่าโอโอไซต์ส่วนใหญ่มีการเจริญในระยะ Interphase-Prophase 26.9%(18/67) รองลงมาได้แก่ระยะ Metaphase I และระยะ GVBD 16.4%(11/67) และ11.9%(8/67) ตามลำดับ ส่วนโอโอไซต์ในระยะ Anaphase I - Telophase I และ Metaphase II พบน้อย คือ 3%(2/67) และ 4.5%(3/67) ตามลำดับ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 : ผลการตรวจสอบลักษณะโครโมโซมของโอโอไซต์ลูกกระบือปลักที่เจาะเก็บด้วยวิธีโอพียูโดยจำแนกตามชนิดของโอโอไซต์

ระยะการเจริญ	COC (%)	S+P (%)	D (%)	EXP (%)	รวม(%)
GV	-	3/13(23.0)	2/42(4.8)	-	5/67(7.4)
GVBD	1/9(11.1)	-	7/42(16.7)	-	8/67(11.9)
I - P	-	4/13(30.8)	14/42(33.3)	-	18/67(26.9)
MI	5/9(55.6)	1/13(7.7)	5/42(11.9)	-	11/67(16.4)
AI-TI	-	1/13(7.7)	1/42(2.4)	-	2/67(3.0)
MII	-	-	-	3/3(100%)	3/67(4.5)
U	2/9(22.2)	4/13(30.8)	10/42(23.8)	-	16/67(23.9)
D	1/9(11.1)	-	3/42(7.1)	-	4/67(6.0)
รวม(%)	9	13	42	3	67/67(100.0)

ในการทดลองนี้พบว่าโอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสแผ่กระจาย (EXP) เมื่อนำมาย้อมสีพบว่าเป็นโอโอไซต์ที่มีการแบ่งตัวอยู่ในระยะ Metaphase II ทั้งหมด (3/3) ซึ่งสามารถนำไปปฏิสนธิได้ทันที ส่วนโอโอไซต์ ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มเพียงชั้นเดียวหรือหุ้มเพียงบางส่วน(S+P) และโอโอไซต์ชนิดที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้ม(D) ส่วนใหญ่จะมีระยะการแบ่งตัวอยู่ในระยะ Interphase-Prophase คิดเป็น 30.8%(4/13) และ 33.3%(14/42) ตามลำดับ ส่วนโอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มหลายชั้นจะมีระยะการแบ่งตัวอยู่ในระยะ Metaphase I มากถึง 55.6%(5/9) แต่จากผลการย้อมสีโอโอไซต์ก็พบว่ามีโอโอไซต์บางส่วนที่ไม่สามารถจำแนกระยะการแบ่งตัวได้โดยคิดเป็น 23.9%(16/67) สำหรับผลการย้อมสีโอโอไซต์แสดงในรูปที่ 18

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 18 ภาพระยะต่าง ๆ ของการเจริญของโอโอไซต์จากการย้อมสีด้วยวิธี Rapid staining

A คือ ลักษณะโครโมโซมในระยะ Germinal vesicle

B คือ ลักษณะโครโมโซมในระยะ Germinal vesicle breakdown

C คือ ลักษณะโครโมโซมในระยะ Interphase-Prophase

D คือ ลักษณะโครโมโซมในระยะ Metaphase I

E คือ ลักษณะโครโมโซมในระยะ Metaphase II

F คือ ลักษณะที่ไม่สามารถระบุระยะโครโมโซมได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของแรงดูดสูญญากาศต่ออัตราการเก็บโอโอไซต์และคุณภาของโอโอไซต์ในกระบือปลักสาวที่เก็บด้วยวิธีโอพียู

ผลการตรวจรังไข่ก่อนการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน

ผลการตรวจรังไข่ก่อนการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เอฟเอสเอช ในกระบือสาวพบว่าก่อนการกระตุ้นการทำงานของรังไข่แต่ละครั้ง ในรังไข่จะมีระดับของการเจริญของฟอลลิเคิลโดยเฉลี่ย 1.9 ± 0.8 ใบ โดยจะมีการเจริญของฟอลลิเคิลในระดับ +1 เป็นจำนวนมากที่สุด 31 รังไข่ คิดเป็น 43.1% รองลงมา ได้แก่ระดับ 0 และ +2 เป็นจำนวน 24(33.3%) และ17(23.6%) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ผลการตรวจสอบรังไข่ก่อนกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอชในกระบือสาว

ระดับของ	จำนวนรังไข่	ระดับของการเจริญของฟอลลิเคิล		
แรงดัน(mmHg)	(ข้าง)	0	+1	+2
60	24	5	12	7
		(20.8%)	(50.0%)	(29.2%)
80	24	11	10	3
		(45.8%)	(41.7%)	(12.5%)
100	24	8	9	7
		(33.3%)	(37.5%)	(29.2%)
รวม	72	24	31	17
		(33.3%)	(43.1%)	(23.6%)
$\bar{X}$ ± S.D.		1.9 ± 0.8 ใบ		

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่

จากผลการทดลองกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่กระบือสาว จำนวน 6 ตัว ด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอช พบว่ากระบือสาวมีการตอบสนองของรังไข่ในการเจริญของฟอลลิเคิล คิดเป็น 100.0% (36/36) และเมื่อทำการตรวจสอบการตอบสนองของการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ พบว่ามีการตอบสนองของจำนวนฟอลลิเคิลที่ตรวจพบในรังไข่ เท่ากับ 7.4±3.6(n=36) ฟอลลิเคิล ต่อตัว ต่อครั้งของการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูและฟอลลิเคิลที่เกิดขึ้นจากการกระตุ้นการทำงานของรังไข่ด้วยฮอร์โมน

เอฟเอสเอช จะมีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของฟอลลิเคิล เท่ากับ 0.4±0.1 (n=267)เซนติเมตร โดยมีค่าพิสัยของเส้นผ่านศูนย์กลางฟอลลิเคิลตั้งแต่ 0.2-1.2 เซนติเมตร โดยพบว่าการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ในการเก็บที่ใช้ระดับแรงดัน 60 ,80 และ 100 รังไข่จะมีการตอบสนองต่อการกระตุ้นโดยมีของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของฟอลลิเคิลส่วนมาก อยู่ในช่วง 0.4-0.5 เซนติเมตร คิดเป็น 63.0% ,52.9% และ 46.1% ตามลำดับ ซึ่งสามารถจำแนกฟอลลิเคิลที่พบออกตามขนาดได้ดังแสดงไว้ในตารางที่ 12 หลังจากนั้นทำการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูพบว่าได้โอโอไซต์เฉลี่ยเท่ากับ 6.0±3.9(n=215) โอโอไซต์ต่อตัวต่อครั้ง ของการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู โดยค่าพิสัยของจำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้อยู่ในช่วง 1 - 16 โอโอไซต์ ต่อตัวต่อครั้งของการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู ซึ่งคิดเป็นอัตราการเก็บโอโอไซต์ที่ได้เท่ากับ 76.5%(n=36) ดังแสดงผลไว้ในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ผลการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่หลังกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอช

จำนวนกระบือสาวทดลอง (ตัว)	6
จำนวนครั้งของการกระตุ้น(ครั้ง)	36
จำนวนกระบือสาวที่ตอบสนอง (%)	36(100)
จำนวนฟอลลิเคิลที่ตรวจพบจากเครื่องอัลตราซาวด์	7.4±3.6
ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของฟอลลิเคิล(มิลลิเมตร)	0.4±0.1(0.2-1.2)*
จำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้	6.0±3.9(1-16)*
อัตราการเก็บโอโอไซต์(%)	76.5±523.4(20-100)*

(*) = พิสัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 แสดงขนาดของฟอลลิเคิลที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เอฟเอสเอชในกระบือสาว

ระดับ		เส้นผ่านศูนย์กลางของฟอลลิเคิล (มิลลิเมตร)				
ของแรงดัน	n	2 - <4	4 - <6	6 - <8	8 - <10	>10
60	180	16*	68	21	2	1
		(14.8%) **	(63.0%)	(19.4%)	(1.9%)	(0.9%)
80	70	16	37	14	3	0
		(22.9%)	(52.9%)	(20.0%)	(4.2%)	(0%)
100	89	40	41	8	0	0
		(44.9%)	(46.1%)	(9.0%)	(0%)	(0%)
รวม	267	72	146	143	5	1
(100%)		(27.0%)	(54.7%)	(16.1%)	(1.9%)	(0.3%)
$\bar{X}$ ± S.D. (พิสัย)		4.0±1.0 (2 – 12)				

n จำนวนโอโอไซต์

* จำนวนฟอลลิเคิลในขนาดต่างๆ

** เปอร์เซนต์ฟอลลิเคิลขนาดต่างๆ ของแต่ละครั้งของการกระตุ้น

ผลการเก็บโอโอไซต์

จากผลการทดลอง เก็บโอโอไซต์จากรังไข่กระบือสาว ที่ได้รับการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอช หลังจากนั้นทำการเจาะเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู โดยใช้แรงดันในการเก็บในระดับที่ต่างกัน คือ 60 ,80 และ100 มิลลิเมตรปรอท แต่ละครั้งจะทำการเจาะเก็บทุก 2 สัปดาห์ ทำการเก็บเป็นจำนวน 2 รอบ ซึ่งจากผลการเจาะเก็บโอโอไซต์พบว่าการเก็บโอโอไซต์ด้วยแรงดัน 100 มิลลิเมตรปรอท ในกระบือสาวจำนวน 12 ตัว โดยตรวจพบการตอบสนองของฟอลลิเคิลจำนวนทั้งหมด 89 ฟอลลิเคิล โดยกระบือแต่ละตัวมีการตอบสนองเฉลี่ย 7.4 ± 4.2 ฟอลลิเคิล และสามารถเก็บโอโอไซต์ได้ทั้งหมด 69 โอโอไซต์ คิดเป็นค่าเฉลี่ย 5.8 ± 4.0 โอโอไซต์ต่อตัว โดยคิดเป็นอัตราการเก็บเท่ากับ 72.6% ส่วนในการเก็บโอโอไซต์ด้วยแรงดัน 80 มิลลิเมตรปรอท มีการตอบสนองของฟอลลิเคิลทั้งหมด 70(5.8±2.1) ฟอลลิเคิล(n=12) โดยเก็บโอโอไซต์ได้ 53(4.4 ± 2.6) โอโอไซต์ คิดเป็นอัตราการเก็บเท่ากับ 72.8% และในการเก็บที่ระดับแรงดัน 60 มิลลิเมตรปรอท โดยตรวจพบฟอลลิเคิลจำนวน 108(9.0 ± 3.7) ฟอลลิเคิลในการเก็บครั้งนี้ได้ โอโอไซต์จำนวน 93(7.8 ± 4.1) โอโอไซต์(n=12) โดยคิดเป็นอัตราการเก็บเท่ากับ 84.1% ซึ่งเมื่อ

นำผลการเก็บโอโอไซต์ของแรงดันทั้ง 3 ระดับ มาคำนวนรวมกันพบว่ามีการตอบสนองของการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่เป็นจำนวน 267(7.4±3.6) ฟอลลิเคิล และสามารถเก็บโอโอไซต์ได้ 215(6.0 ± 3.9) โอโอไซต์(n=36) คิดเป็นอัตราการเก็บ เท่ากับ 80.5%(76.5±23.4) ซึ่งเมื่อนำโอโอไซต์ที่เก็บได้ทั้งหมดมาจำแนกชนิดของโอโอไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอพบว่า ชนิดของโอโอไซต์ที่เก็บได้จากการเก็บโอโอไซต์ด้วยแรงดันทั้ง 3 ระดับทั้งส่วนมากเป็นชนิดโอโอไซต์ที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้ม คิดเป็นจำนวนเท่ากับ 77/215(35.8%) โอโอไซต์ หรือเฉลี่ยเท่ากับ 2.1 ± 2.3 โอโอไซต์ต่อตัว ส่วนโอโอไซต์ที่พบมากรองลงมาได้แก่ โอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มอย่างน้อย 1-3 ชั้นเท่ากับ 51/215(23.7%) หรือเฉลี่ยเท่ากับ 1.4 ± 1.5 โอโอไซต์ต่อตัว โอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มมากกว่า 3 ชั้น เท่ากับ 29/215 (13.5%) เฉลี่ย 0.8 ± 1.1 โอโอไซต์ต่อตัว โอโอไซต์ที่มีการเสื่อมสลายเท่ากับ 23/215(10.7%) คิดเป็น 0.6 ± 0.7 โอโอไซต์ต่อตัว และโอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสแผ่ขยายเท่ากับ 21/215(9.8%) เฉลี่ย 0.6 ± 1.2 โอโอไซต์ต่อตัว รองลงมาตามลำดับ ส่วนโอโอไซต์ชนิดที่พบน้อยได้แก่ โอโอไซต์ชนิดที่ไม่มีโอโอพลาสซึม(Ooplasm) เท่ากับ 14/215(6.5%) เฉลี่ย 0.4 ± 0.8 โอโอไซต์ต่อตัว ซึ่งเมื่อทำการจำแนกตามชนิดของ โอโอไซต์พบว่า ที่ระดับแรงดันในการดูดเก็บ60, 80, 100 มิลลิเมตรปรอท จะพบโอโอไซต์ชนิดที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มมากที่สุด คือ 35/93(37.6%), 15/53(28.3%), 27/69(39.1%) ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์จะพบว่าที่ระดับแรงดัน 100 มิลลิเมตรปรอท จะเก็บได้โอโอไซต์ชนิดที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มได้มากที่สุด รองลงมาได้แก่แรงดันที่ 60 และ 80 มิลลิเมตรปรอท รองลงมาตามลำดับ โอโอไซต์ชนิดที่พบรองลงมาได้แก่ โอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มอย่างน้อย 1-3 ชั้น เท่ากับ 21/93(22.6%), 15/53(28.3%), 15/69(21.7%) โอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มมากกว่า 3 ชั้นจะพบได้จากการเก็บที่ระดับแรงดัน 60 และ100 มิลลิเมตรปรอท ใกล้เคียงกัน คือ 13/93(14.0%) และ 11/69(15.9%) ตามลำดับ ส่วนที่ระดับแรงดัน 80 มิลลิเมตรปรอท จะพบน้อยกว่าเพียง 5/53(9.4%) โอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสแผ่ขยายจะพบมากที่สุดจากการเก็บด้วยแรงดัน 60 มิลลิเมตรปรอทเท่ากับ 13/93(14.0%) ส่วนที่แรงดัน 80 และ100 มิลลิเมตรปรอท จะพบน้อยกว่าเพียง 3/53(5.7%) และ 5/69(7.3%) ที่แรงดัน 80 และ100 มิลลิเมตรปรอท ตามลำดับ ส่วนโอโอไซต์ที่มีการเสื่อมสลายจะพบในการเก็บโอโอไซต์ที่ระดับแรงดัน 80 มิลลิเมตรปรอท มากที่สุดเท่ากับ 10/53(18.9%) ที่ระดับแรงดัน 60 และ100 มิลลิเมตรปรอท จะพบน้อยเพียง 6/93(6.5%) และ 7/69(10.2%)ตามลำดับ โดยจะเหมือนกับโอโอไซต์ที่ไม่มีโอโอพลาสซึม ที่จะพบมากที่ระดับแรงดัน 80 มิลลิเมตรปรอท เท่ากับ 15/53(9.4%)ส่วนที่แรงดัน 60และ100 มิลลิเมตรปรอท จะพบน้อยเท่ากับ 5/93(5.3%) และ 4/69(6.8%)ตามลำดับ โอโอไซต์ที่มีคุณภาพดีที่สามารถใช้นำมาเลี้ยงและปฏิสนธิในหลอดทดลอง คือโอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มมากกว่าสามชั้น โอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้ม 1-3 ชั้นและโอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสแผ่ขยาย เมื่อเปรียบเทียบผลการเก็บโอโอไซต์ชนิดดังกล่าว โดยใช้ความดันในการเก็บทั้งสามระดับพบว่าที่ระดับแรงดัน 60 มิลลิเมตรปรอท จะให้ผลการเก็บที่ดีกว่าแรงดัน 80และ100 มิลลิเมตรปรอท โดยให้ผลการเก็บเท่ากับ 47/93(50.5%) ส่วนที่ระดับแรงดัน 80และ100 มิลลิเมตรปรอท จะให้ผลการเก็บโอโอไซต์ชนิดดังกล่าวน้อยกว่าเพียง 23/53(43.4%)และ31/69(45.0%) ตามลำดับ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 13

จากผลการทดลองดังกล่าวจะพบว่าที่ระดับแรงดัน 80 และ100 มิลลิเมตรปรอท จะให้อัตราการเก็บโอโอไซต์ที่ไม่แตกต่างกัน ส่วนที่ระดับแรงดันในการเก็บที่ 60 มิลลิเมตรปรอท จะให้อัตราการเก็บที่สูงกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) และเมื่อเปรียบเทียบคุณภาพของโอโอไซต์ที่เก็บได้พบว่าโอโอไซต์ที่มีคุณภาพดีที่สามารถนำไปเลี้ยงและปฏิสนธิในหลอดทดลองได้จะเก็บได้มากในการเก็บที่ใช้แรงดัน 60 มิลลิเมตรปรอท ส่วนแรงดัน 80 และ100 มิลลิเมตรปรอท จะให้ผลการเก็บที่ใกล้เคียงกัน แต่อย่างไรก็ตามการเก็บทั้งสามระดับแรงดันพบว่าคุณภาพของโอโอไซต์ที่สามารถนำไปเลี้ยงและปฏิสนธิในหลอดทดลองได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 13 ผลการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่กระบือสาวที่ได้รับการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลและทำการเจาะเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีการใช้เข็มเจาะดูดร่วมกับเครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูง

ครั้งของแรงดูด (mmHg)	จำนวนครั้งของการเก็บ	จำนวนฟอลลิเคิล* รวม	ชนิดของโอโอไซต์ จำนวน	COC	S+P	D	EXP	Deg	FZ	อัตราการเก็บ(%)
60	12	108	93	13	21	35	13	6	5	84.1[a]
		9.0±3.7	7.8±4.1							84.1±20.8
80	12	70	53	5	15	15	3	10	5	72.8[b]
		5.8±2.1	4.4±2.6							72.8±28.3
100	12	89	69	11	15	27	5	7	4	72.6[b]
		7.4±4.2	5.8±4.0							72.6±17.9
รวม	36	267	215	29	51	77	21	23	14	215/267
		7.4±3.6	6.0±3.9	0.8±1.1	1.4±1.5	2.1±2.3	0.6±1.2	0.6±0.7	0.4±0.8	76.5±23.4
				(13.5%)	(23.7%)	(35.8%)	(9.8%)	(10.7%)	(6.5%)	(80.5%)

* จำนวนฟอลลิเคิลที่ปรากฏบนรังไข่ขนาดตั้งแต่ 2.0 มิลลิเมตรขึ้นไป

(%) = อัตราส่วนของชนิดของโอโอไซต์เปรียบเทียบกับโอโอไซต์ทั้งหมดที่เก็บได้

a,b ; P<0.05

ผลการย้อมสีโอโอไซต์ด้วยวิธี Rapid staining

จากผลการตรวจสอบระยะการเจริญของโอโอไซต์ที่ได้จากการเจาะเก็บโดยวิธีโอพียูในกระบือสาวนั้น พบว่าโอโอไซต์ส่วนใหญ่มีการเจริญในระยะ Interphase-Prophase 47%(70/149) รองลงมาได้แก่ระยะ Metaphase I ระยะGV ระยะ GVBDและ Metaphase II 22.1%(33/149) ,6.0%(9/149) 5.4%(8/149) และ5.4%(8/149)ตามลำดับ ส่วนโอโอไซต์ในระยะAnaphase I - Telophase I นั้นไม่พบ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ผลการตรวจสอบลักษณะโครโมโซมของโอโอไซต์กระบือสาวที่เจาะเก็บด้วยวิธีโอพียูโดยจำแนกตามชนิดของโอโอไซต์

ระยะการเจริญ	COC (%)	S+P (%)	D (%)	EXP (%)	รวม(%)
GV	-	4/42(9.5)	5/70(7.2)	-	9/140(6.0)
GVBD	-	4/42(9.5)	4/70(5.7)	-	8/149(5.4)
I - P	11/22(50.0)	23/42(54.8)	35/70(50.0)	1/15(6.7)	70/149(47.0)
MI	7/22(31.8)	8/42(19.0)	17/70(24.2)	1/15(6.7)	33/149(22.1)
AI-TI	-	-	-	-	0/149(0)
MII	-	-	-	8/15(53.3)	8/149(5.4)
U	4/22(18.2)	3/42(7.2)	4/70(5.7)	3/15(20.0)	14/149(9.4)
D	-	-	5/70(7.2)	2/15(13.3)	7/149(4.7)
รวม(%)	22	42	70	15	149/149(100.0)

ในการทดลองนี้พบว่าโอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสแผ่กระจาย (EXP) เมื่อนำมาย้อมสีพบว่าเป็นโอโอไซต์ที่มีการแบ่งตัวอยู่ในระยะ Metaphase II 53.3%(8/15) ซึ่งสามารถนำไปปฏิสนธิได้ทันที ส่วนโอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มหลายชั้น โอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มเพียงชั้นเดียวหรือหุ้มเพียงบางส่วน (S+P) และโอโอไซต์ชนิดที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้ม (D) ส่วนใหญ่จะมีระยะการแบ่งตัวอยู่ในระยะ Interphase - Prophase คิดเป็น 50.0%(11/22),54.8%(23/42) และ 50.0%(35/70) ตามลำดับ แต่จากผลการย้อมสีโอโอไซต์ ก็พบว่ามีโอโอไซต์บางส่วนที่ไม่สามารถจำแนกระยะการแบ่งตัวได้โดยคิดเป็น 9.4%(14/149) และมี โอโอไซต์ที่เสื่อมสลาย4.7%(7/149)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การอภิปรายผลการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ในการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิล ตลอดจนการเก็บ โอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูซ้ำในลูกกระบือปลัก และกระบือสาว นอกจากนี้ยังเป็นการศึกษาเบื้องต้นถึงระดับแรงดันที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการเจาะดูดเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ลูกกระบือปลักอายุตั้งแต่ 8 เดือนขึ้นไป ซึ่งเป็นอายุที่ทำการหย่านม สำหรับลูกกระบือปลักจะเป็นช่วงก่อนวัยเจริญพันธุ์ และกระบือสาวอายุประมาณ 2.5 ปี ตามปกติอายุที่ถึงวัยเจริญพันธุ์ในกระบือใช้เวลานานกว่าในโค โดยปกติมีผู้รายงานตั้งแต่อายุอย่างน้อย 1.5 ถึง 2 ปี ขึ้นไป กระบือมูร่าห์ (Murrah type) จะมีวัยเจริญพันธุ์เร็วกว่ากระบือปลัก(Swamp type) Salama และคณะ(1994) รายงานอายุของวัยเจริญพันธุ์ของกระบือนมในประเทศอียิปต์ เท่ากับ 15.4 ± 0.8 เดือน และมีน้ำหนักประมาณ 270 กิโลกรัม ส่วน Chaudhary และ Saga (1990) รายงานไว้ประมาณ 2 ปี ในกระบือปลักมีผู้รายงานไว้ว่าอายุของการเจริญพันธุ์เท่ากับ 2.5 ปี น้ำหนักประมาณ 300 กิโลกรัม (McCool and Entwistle,1989) ในประเทศไทย Bodhippaksha และคณะ (1978) รายงานอายุเฉลี่ยของลูกกระบือเพศเมียที่ถึงวัยเจริญพันธุ์ประมาณ 3-4 ปี ทั้งนี้ขึ้นกับอาหาร อากาศและการเลี้ยงดู ดังนั้นหากต้องการให้ลูกกระบือเพศเมียตัวหนึ่งเจริญจนถึงวัยเจริญพันธุ์และผลิตลูกออกมาจะต้องใช้เวลาประมาณ 4-5 ปี (Intaramongkol and Intaramongkol,1992) การศึกษานี้ได้แสดงถึงความเป็นไปได้ในการผลิตโอโอไซต์จากลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์ และกระบือสาวโดยวิธีการใช้เข็มเจาะดูดเก็บโอโอไซต์ร่วมกับเครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูงสอดผ่านทางช่องคลอด และเมื่อนำไปผลิตตัวอ่อนและย้ายฝากในกระบือ ในอนาคตจึงอาจเป็นแนวทางในการลดช่วงห่างระหว่างรุ่น (Interval of generation)

การตรวจรังไข่ก่อนการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน

จากการตรวจรังไข่ก่อนการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอชพบว่า ระดับการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ของลูกกระบือปลักและกระบือสาวมีระดับใกล้เคียงกัน แต่การเจริญของฟอลลิเคิลในกระบือสาวก่อนการกระตุ้นจะมากกว่าในลูกกระบือปลัก (Hashimoto *et al.,*1999a) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอายุ สถานภาพทางระบบสืบพันธุ์ที่มีการพัฒนามามากกว่าในลูกกระบือ ตลอดจนความพ้อมของร่างกายทั้งทางกายวิภาคและสรีรวิทยา

ในการทดลองครั้งนี้ทำการเจาะเก็บโอโอไซต์โดยวิธีโอพียู หลังจากการทำการล้วงตรวจทางทวารหนักและใช้อัลตราซาวด์ตรวจการตอบสนองของรังไข่ก่อนการเจาะเก็บซึ่งการล้วงตรวจทางทวารหนัก

กระทำเช่นเดียวกันกับในแม่กระบือ แต่พบว่าทวารหนักของลูกกระบือก่อนวัยเจริญพันธุ์มีขนาดเล็กทำให้มีพื้นที่ทำงานจำกัดจึงทำให้การจับ รังไข่ทำได้ยากและอาจมีเลือดออกได้ และยังพบว่าการประมาณการตอบสนองของรังไข่ได้ผลไม่แม่นยำนัก การใช้เครื่องอัลตราซาวด์เสริมในการตรวจการตอบสนองของรังไข่จะสามารถประมาณการตอบสนองของรังไข่ได้แม่นยำกว่าเห็นในรูปภาพชัดเจน (Garcia,1998)ตามปกติแล้วการตรวจด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ต้องทำร่วมกับการล้วงตรวจทางทวารหนักเพื่อช่วยจับรังไข่ แต่ไม่เหมาะที่จะทำในลูกกระบือด้วยเหตุผลข้างต้น และพบว่าการสอดเฉพาะ probe เข้าไปอย่างเดียว ก็สามารถตรวจรังไข่ได้ผลที่น่าพอใจ ภาพที่ปรากฏบนจอภาพ จะเห็นฟอลลิเคิลมีลักษณะเป็นวงกลมสีดำกระจายอยู่ทั่วรังไข่ แต่ทั้งนี้ต้องขึ้นอยู่กับความชำนาญและประสบการณ์ของผู้ปฏิบัติ การล้วงตรวจทางทวารหนักและการใช้อัลตราซาวด์ในการตรวจการตอบสนองของรังไข่ ก่อนที่จะทำการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู ทำให้สามารถหลีกเลี่ยงการทำโอพียูของลูกกระบือปลักที่ไม่มีการตอบสนองหรือตอบสนองต่อการกระตุ้นน้อย เนื่องจากการเจาะเก็บโอโอไซต์โดยที่มีการตอบสนองไม่ดีแล้วฝืนทำการเจาะไปจะเป็นการทำให้สัตว์บอบช้ำ และอาจทำให้รังไข่เสียหาย ซึ่งอาจส่งผลต่อการเก็บในครั้งต่อไปโดยใช่เหตุ ดังนั้นจึงไม่มีความจำเป็นในการทำโอพียูกระบือที่ไม่มีการตอบสนองหรือตอบสนองต่อการกระตุ้นน้อย การที่ใช้อัลตราซาวด์เพื่อตรวจสอบการตอบสนองของ รังไข่ จะให้ผลดีกว่าการใช้การล้วงตรวจเพียงอย่างเดียว แต่อย่างไรก็ตามต้องระวังการจับต้องหรือการสัมผัสกับรังไข่ที่รุนแรงเกินไป ซึ่งอาจทำให้มีการแตกของฟอลลิเคิลได้

การกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่

ในการทดลองนี้ได้ใช้วิธีการกระตุ้นรังไข่เพื่อให้มีการเพิ่มการเจริญของฟอลลิเคิล พบว่าก่อนการกระตุ้นรังไข่จะมีขนาดเล็ก พบฟอลลิเคิลประมาณ 2 ฟอลลิเคิลต่อตัว หลังกระตุ้นขนาดจะใหญ่ขึ้นพร้อมกับมีฟอลลิเคิลในจำนวนมากข้นพบถึง 7 ฟอลลิเคิลต่อตัว ดังนั้นการเก็บโอโอไซต์โดยไม่ต้องกระตุ้นเป็นไปได้ยากเพราะขนาดรังไข่เล็กมากและมีฟอลลิเคิลน้อย ต่างกับในโคพันธุ์ต่างประเทศก่อนวัยเจริญพันธุ์และหลังวัยเจริญพันธุ์ที่มีฟอลลิเคิลอยู่ถึง 3.6-6.8 ฟอลลิเคิลต่อตัว และสามารถเก็บโอโอไซต์โดยไม่ต้องกระตุ้นถึง 1.9-3.1 โอโอไซต์ต่อตัว (Majerus *et al.,* 1999) การให้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินจะช่วยให้ฟอลลิเคิลมีการเจริญมากขึ้น และจำนวนของโอโอไซต์ที่ได้จะสูงกว่าที่ไม่ได้ให้ ในโค Bungartz และคณะ(1995) พบว่าหากให้ฮอร์โมน เอฟเอสเอช จะเพิ่มโอโอไซต์ต่อการเก็บโอพียูได้ 10.6 โอโอไซต์เปรียบเทียบกับ 5.8 โอโอไซต์ อย่างไรก็ตามผลของการกระตุ้นที่ตรวจต่ำกว่าที่ Techakumphu *et al*., (2000a) ได้รายงานไว้จากการเจาะรังไข่หลังเปิดผ่าช่องท้อง (laparotomy) โดยใช้โปรแกรมและวิธีการกระตุ้นอย่างเดียวกันทั้งนี้ เพราะการตรวจดูด้วยโปรปขนาดความถี่ 5 MHz ติดกับอัลตราซาวด์จะไม่สามารถเห็นตัวรังไข่ได้ชัดเจนโดยเฉพาะฟอลลิเคิลขนาดเล็ก ในขณะที่เปรียบเทียบกับการเปิดผ่าดูรังไข่จะได้จำนวนที่แม่นยำกว่าอย่างแน่นอน Hashimoto และคณะ (1999b) เสนอว่าการใช้หัวโปรปขนาด 7.5 MHz ตรวจดูรังไข่ที่ตัดมาจากตัวโค จะทำให้เห็นฟอลลิเคิลขนาดเล็ก 3-5 มิลลิเมตร ได้ชัดเจนดีกว่า (visualization) หัวโปรปขนาด

5.0 MHz โดยพบจำนวน 9.0 ฟอลลิเคิล เปรียบเทียบกับ 3.2 ฟอลลิเคิล ดังนั้นอัตราการเก็บโอโอไซต์จะแตกต่างกันจากหัวโปรปที่แตกต่างกัน

การใช้โกนาโดโทรปินฮอร์โมนเพื่อกระตุ้นให้มีการเจริญฟอลลิเคิลมากขึ้นจะเป็นประโยชน์ในการเจาะเพราะเมื่อฟอลลิเคิลมีมากจะทำให้เจาะโอโอไซต์ได้มาก ในโคการใช้ฮอร์โมนแพรกแนนท์ แมร์ซีรั่ม โกนาโดโทรปิน กระตุ้น พบว่าจะได้อัตราการเก็บเพิ่มขึ้นประมาณ 22% จาก 18% เป็น 40% (Pieterse *et al*., 1988) อย่างไรก็ตามการกระตุ้นมากเกินไปจะได้ฟอลลิเคิลที่มีขนาดใหญ่ เส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 10 มิลลิเมตร ซึ่งอาจจะเกิดการแตกขณะจับรังไข่และก่อนเจาะได้ ในการทดลองนี้ได้ใช้โปรแกรมที่ได้ดำเนินการศึกษามาก่อนโดย Tecchakumphu และคณะ (2000b) โดยใช้โกนาโดโทรปิน รีลีสซิ่งฮอร์โมน (จีเอ็นอาร์เอช) ในการควบคุมการเจริญแบบ down regulation ต่อฤทธิ์ของฮอร์โมนเอฟเอสเอช ดังนั้นจึงพบว่าฟอลลิเคิลส่วนมากที่พบมากกว่า 90% จะอยู่ในขนาด 2-8 มิลลิเมตร

ผลจากการตอบสนองพบว่าลูกกระบือปลักที่มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นได้ 88.1% ส่วนในกระบือสาวมีการตอบสนองต่อการกระตุ้นที่มากกว่าเท่ากับ 100% ซึ่งจะมีการตอบสนองมากกว่าในลูกกระบือและเป็นที่น่าสังเกตว่ากระบือบางตัวที่มีการตอบสนองต่อฮอร์โมนน้อยในแต่ละครั้งของการกระตุ้นเป็นตัวเดียวกัน ซึ่งเป็นลูกกระบือปลักที่มีขนาดเล็กและผอม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพันธุกรรม หรือความไม่สมบรูณ์ของลูกกระบือเอง การตอบสนองของรังไข่ของลูกกระบือปลักต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนมีความผันแปรค่อนข้างสูง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ มงคลและคณะ (2537) สำหรับรายงานอื่นๆ ส่วนใหญ่จะเป็นการตรวจการตอบสนองของรังไข่โดยการล้วงตรวจผ่านทางทวารหนัก Chantaraprateep และคณะ (1988) รายงานการตอบสนองของกระบือปลักต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอช ขนาด 32 หรือ 50 มิลลิกรัม เท่ากับ 2-8 ใบต่อตัว ส่วนฮอร์โมน พีเอ็มเอสจี ได้เท่ากับ 3-7 ใบต่อตัว เช่นเดียวกับ Sophon และคณะ (1989) รายงานไว้เท่ากับ 2-7 ใบต่อตัว จากการกระตุ้นลูกกระบือปลักหรือกระบือมูร่าห์หรือกระบือลูกผสม ในขณะที่ Kobayashi และคณะ (1990) ทำการศึกษาในประเทศไทยและรายงานไว้ในกระบือมูร่าห์เท่ากับ 11 ใบ การตอบสนองของรังไข่ของลูกกระบือปลักจากการทดลองในครั้งนี้ต่ำกว่าผลการตอบสนองของลูกโค (รังสี และคณะ, 2541 ;Jainudeen *et al*.,1966; Onuma *et al*.,1969 ; Irvine *et al*., 1994) และเช่นเดียวกับรายงานการกระตุ้นลูกโคในประเทศไทย โดยมงคล และคณะ(2537) การตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนของลูกโคหรือลูกกระบือก่อนวัยเจริญพันธุ์จะมีค่าน้อยกว่าการตอบสนองของโคหรือกระบือวัยเจริญพันธุ์ ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินที่ใช้กระตุ้นการสร้างฟอลลิเคิล (Folliculogenesis) ในลูกกระบือปลักและกระบือสาว สำหรับการทดลองนี้ใช้ฮอร์โมนเอฟเอสเอช ขนาด 180 และ 280 มิลลิกรัม (NIH-FSH-P) ตามลำดับ ซึ่งมีขนาดเพียงครึ่งเดียวเมื่อเปรียบเทียบกับที่ใช้ในแม่กระบือเพื่อกระตุ้นให้มีการตกไข่ครั้งละมากๆ ซึ่งจะใช้ ฮอร์โมนเอฟเอสเอช ขนาด 400 มิลลิกรัม (NIH-FSH-P) (Garcia *et al*.,1994) ในการฉีดกระตุ้นแต่ละครั้ง กล้ามเนื้อ 6 เข็ม แบ่งฉีดห่างกันทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน ซึ่งฮอร์โมน เอฟเอสเอช เป็นสารประเภทกลัยโคโปรตีน ที่มี Half-life ประมาณ 2 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเหตุผลที่ทำให้ต้องฉีดฮอร์โมนโดยการแบ่งฉีดหลายเข็มและห่างกันทุกๆ 12 ชั่วโมง และเนื่องจากฮอร์โมนตัวนี้มีน้ำหนักของโมเลกุลเล็กประมาณ 32,000-37,000 ทำให้สามารถฉีดกระตุ้นซ้ำได้

โดยเกิดปฏิกริยาต่อต้านจากร่างกายน้อย (Carruthers.,1986) จากการศึกษาของ มงคลและคณะ(2537) พบว่าการฉีดกระตุ้นรังไข่ของลูกกระบือ พื้นเมืองไทยด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอช ให้ผลการตอบสนองของรังไข่ดีกว่าการใช้ ฮอร์โมน พีเอ็มเอสจี จากเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้นในการวิจัยครั้งนี้จึงเลือกใช้ฮอร์โมนเอฟเอสเอชในการฉีดกระตุ้นรังไข่ลูกกระบือปลักและกระบือสาว ถึงแม้ว่าฮอร์โมนเอฟเอสเอชจะมีราคาแพง (1,800บาท/ครั้ง/ตัว) หลังจากฉีดกระตุ้น รังไข่ด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอช เข็มสุดท้าย จากนั้นประมาณ 24 ชั่วโมง จะฉีดฮอร์โมนจีเอ็นอาร์เอชเพื่อ ควบคุมขนาดของฟอลลิเคิลให้มีความสม่ำเสมอของการเจริญโดยลดฟอลลิเคิลที่มีขนาดใหญ่และเพิ่ม ฟอลลิเคิลขนาดกลางให้มากขึ้น(Bordignon *et al.,* 1997 ; Fry *et al.,* 1997) กระบือจะมีการตอบสนองภายนอกที่สามารถสังเกตได้ คือ แสดงอาการเป็นสัดโดยมีเมือกใสไหลออกมาบริเวณปากช่องคลอดเช่นเดียวกับการเป็นสัดในโคหลังวัยเจริญพันธุ์ (Pieterse *et al*., 1991) การแสดงการเป็นสัดนี้ได้ผลเช่นเดียวกับการทดลองของ Onuma(1969) และSeidel และคณะ(1971) แสดงว่าเป็นผลของฮอร์โมนเอสโตรเจน ที่หลั่งจากฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ที่เกิดขึ้น เป็นเวลานานกว่า 48 ชั่วโมง ซึ่งเพียงพอสำหรับที่ลูกโคจะแสดงอาการเป็นสัด

การเก็บโอโอไซต์

การเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู เป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการเจาะเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ของกระบือ ไม่ต้องฆ่าลูกกระบือเหมือนกับการทดลองในลูกสัตว์ในระยะแรกที่มักส่งโรงฆ่า (Onuma *et al*.,1969 ; Kajihara *et al* .,1991) ซึ่งสามารถกระตุ้นด้วยฮอร์โมนและเจาะเก็บโอโอไซต์ซ้ำได้หลายครั้ง โดยอาจจะทำทุกสัปดาห์ สัปดาห์ละ 2 ครั้ง หรือทุก ๆ 2 สัปดาห์ ไม่ต้องใช้เวลาในการพักฟื้นและกระตุ้นซ้ำได้จำนวนครั้งมากขึ้น การใช้เครื่อง อัลตราซาวด์เจาะผ่านเข้าทางช่องคลอด (transvaginal ultrasound guided follicular aspiration) ซึ่งได้มีการทดลองในแม่โค (Callesen *et al*., 1987;Bols *et al* .,1995) โดย (Baltussen และคณะ(1992) ได้ทดลองใช้เข็มชนิดบางเจาะเก็บโอโอไซต์พบว่าให้อัตราการเก็บสูงเท่ากับ 76.4% โดยปราศจากเลือดปนเปื้อนจึงเป็นวิธีที่ดีสำหรับการเจาะเก็บโอโอไซต์ซ้ำ สำหรับในลูกโคมีการศึกษาเบื้องต้นพบว่า น่าจะมีความเป็นไปได้ในการนำวิธีนี้มาใช้ในการเจาะเก็บโอโอไซต์

การผ่าตัดเปิดช่องท้องเพื่อเก็บโอโอไซต์หลังจากมีการกระตุ้นซ้ำในลูกโคพบว่ามีการเชื่อมติดกัน (Adhetion) ของผิวรังไข่กับผนังมดลูกและท่อนำไข่หรือเยื่อหุ้มผิวของรังไข่หนาขึ้น โดยเฉพาะการผ่าตัดครั้งที่ 3 และครั้งที่ 4 ทำให้ไม่สะดวกต่อการดึงมดลูกขึ้นจากช่องท้องเพื่อสะดวกต่อการตอบสนองของรังไข่ และการเจาะโอโอไซต์และอาจทำให้เกิดความผิดพลาดต่อผลการนับจำนวนฟอลลิเคิลและ คอร์ปัส ฮีโมราจิกัม ทำให้ผลที่ได้มีค่าน้อยกว่าความเป็นจริง จะมีการเชื่อมติดในกรณีของรังไข่หลังจากที่การกระตุ้นครั้งก่อนมีการตอบสนองให้ฟอลลิเคิลเป็นจำนวนมากและมีเลือดออกมากในขณะเจาะฟอลลิเคิล ซึ่งเป็นสาเหตุให้มีการเชื่อมติดกันเกิดขึ้น (รังสี, 2541) จากผลการฉีดกระตุ้นรังไข่แสดงให้เห็นว่าสามารถฉีดกระตุ้นรังไข่ของลูกกระบือและกระบือสาวได้โดยใช้ฮอร์โมนเอฟเอสเอช ให้ผลการตอบสนองของรังไข่เท่ากับ 6.6± 3.6 และ 7.4 ± 3.6 ฟอลลิเคิล/ครั้ง/ตัว ตามลำดับ ซึ่งพบว่ามีความแปรปรวนสูงในการตอบสนองของรังไข่ในกระบือ

แต่ละตัว ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Jainudeen และคณะ(1966) เช่นเดียวกับผลที่ได้ในการกระตุ้นลูกกระบือปลักที่มีการตอบสนองของรังไข่ และมีความผันแปรตั้งแต่ 4-31 ใบ

ในการทดลองนี้จะทำการเก็บโอโอไซต์จากฟอลลิเคิลตั้งแต่ 3 มิลลิเมตร ถึง >10 มิลลิเมตร จากการกระตุ้นรังไข่ของกระบือปลักนี้ พบว่าประชากรของฟอลลิเคิลที่ตรวจพบส่วนมาก อยู่ในระยะกำลังเจริญ (growing follicle) การทดลองของ Pieterse และ Kappen และคณะ (1988) ชี้ให้เห็นว่าขนาดของฟอลลิเคิลมีส่วนเกี่ยวข้องกับความสำเร็จในการเก็บโอโอไซต์แบบโอพียู โดยหากเจาะจากฟอลลิเคิลขนาด 3-5 มิลลิเมตร จะได้อัตราเท่ากับ 13% และเพิ่มเป็น 35, 31 และ 66% เมื่อเจาะจากฟอลลิเคิลขนาด 5 - 10, 10 -15 และ 15 มิลลิเมตร

จากผลการกระตุ้นรังไข่และเจาะเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูทั้ง 5 ซ้ำพบว่าไม่มีความแตกต่างของจำนวน ฟอลลิเคิลที่พบและเจาะเก็บได้ตลอดจนคุณภาพของโอโอไซต์ที่เก็บได้ก็ไม่มีความแตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นของวิธีในการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู ว่าสามารถที่จะทำซ้ำได้หลายครั้งในสัตว์ที่มีชีวิต รวมทั้งยังเป็นวิธีที่สัตว์ไม่บอบช้ำมากจากการเก็บ และไม่ต้องใช้ระยะเวลาในการพักฟื้นนานเหมือนวิธีการเก็บวิธีอื่น ดังนั้นผลการทดลองที่ได้จึงแสดงให้เห็นว่าการเก็บโอโอไซต์ซ้ำทั้ง 5 ครั้งจึงไม่มีผลกระทบต่อการเจริญของฟอลลิเคิลในครั้งถัดมา ทำให้อัตราการเก็บโอโอไซต์ที่ได้ใกล้เคียงกันส่วนการเก็บโอโอไซต์ในครั้งที่ 4 ที่ลดลงนั้นอาจเป็นผลเนื่องมาจากการเจริญของฟอลลิเคิลที่มีขนาดใหญ่ซึ่งไปกดการเจริญของฟอลลิเคิลที่มีขนาดเล็ก และขนาดกลางให้น้อยลง(Ginther *et al.,* 1989 ; Ko *et al.,*1991 ; Kohram *et al.,* 1998 ; Hagemann, 1999)จึงส่งผลให้จำนวน ฟอลลิเคิลที่สามารถเจาะเก็บได้ลดลงทำให้อัตราการเก็บที่ได้ลดลง นอกจากนี้ฟอลลิเคิลที่มีขนาดใหญ่เกินไปยังทำให้เกิดความยากลำบากในการเก็บเนื่องจากอาจแตกได้ง่ายในช่วงระหว่างทำการเก็บ

จากการทดลองที่ 2 พบว่าในสภาวะที่สัตว์นิ่งไม่ดิ้นร้น ระดับความดันที่ให้ผลในการเก็บโอโอไซต์ดีที่สุดคือ 60 มิลลิเมตรปรอท เป็นอัตราการเก็บที่สูงอยู่ในเกณฑ์ที่น่าพอใจคือประมาณ 80% ซึ่งจะให้อัตราการเก็บที่ดีกว่าแรงดันในระดับ 80 และ100 มิลลิเมตรปรอทและโอโอไซต์ที่เสียหายทั้งเสื่อมสลาย (degenerated oocytes) และเปลือกเปล่า ๆ ของ zona pellucida (free ZP) อยู่ในเกณฑ์ต่ำ นอกจากนั้นคุณภาพของโอโอไซต์ที่ดีที่สามารถนำไปเลี้ยงและปฏิสนธิในหลอดทดลองได้มากกว่าความดันในระดับ 80 และ100 มิลลิเมตรปรอท ทั้งนี้อาจเนื่องจากความดันทั้งสองระดับดังกล่าวอาจจะแรงไปในการนำมาใช้ในการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูในกระบือปลัก สาเหตุหนึ่งที่อาจเป็นได้คือ ในฟอลลิเคิลที่มีขนาดเล็ก หากใช้ความดันที่แรงเกินเมื่อทำการดูดเก็บโอโอไซต์อาจทำให้ผนังของ ฟอลลิเคิลยุบลงเร็วไปอุดปลายเข็มได้ทำให้เก็บโอโอไซต์ได้ลดลง ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Fry และคณะในปี(1997)ที่ได้รายงานว่าความดันที่เหมาะสมในการเก็บโอโอไซต์ในโคอยู่ที่ระดับ 80-100 มิลลิเมตรปรอท สอดคล้องกับรายงานของ Looney และคณะ(1994) ทั้งนี้อาจเนื่องจากขนาดของรังไข่และฟอลลิเคิลในโคมีขนาดใหญ่กว่าในกระบือจึงต้องใช้ความดันในการดูดที่สูงกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการเก็บโอโอไซต์จะเพิ่มขึ้น เมื่อความดันในการดูดเพิ่มขึ้น แต่ในทางตรงกันข้ามหากเพิ่มความดันขึ้นจะมีผลต่อคุณภาพของโอโอไซต์คุณภาพดีให้ลดลง ทำให้อัตราการปฏิสนธิต่ำลง และยังส่งผลให้ได้ตัวอ่อนจำนวนน้อยจากการปฏิสนธิ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ

Lenz และคณะ(1987) อ้างถึงโดย Bols และคณะ(1996) ที่รายงานว่า การเพิ่มแรงดูดที่มากเกินไปจะเป็นสาเหตุในการก่อให้เกิดความผิดปกติของรูปร่างลักษณะของโอโอไซต์ได้ จากรายงานข้างต้นจะเห็นได้ว่าระดับของความดันที่เหมาะสมในการดูดเก็บ โอโอไซต์จากรังไข่โคอยู่ในช่วง 75-100 มิลลิเมตรปรอท ซึ่งแตกต่างกับผลที่ได้จากการทดลองนี้ ทั้งนี้เนื่องจากการทดลองของ Fry และคณะ(1997) และ Bols และคณะ(1996) เป็นการทดลองที่ทำการเก็บ โอโอไซต์นอกร่างกายสัตว์จากรังไข่ที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ที่ไม่ได้เก็บด้วยวิธีโอพียูเหมือนในการทดลองนี้ ทำให้อัตราการเก็บที่ได้สูงกว่า ทั้งนี้เนื่องจากไม่ได้รับผลกระทบจากปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่ออัตราการเก็บโอโอไซต์ในสัตว์ที่มีชีวิตเหมือนการเก็บด้วยวิธีโอพียู เช่น การควบคุมบังคับสัตว์ ฮอร์โมนที่ใช้ในโปรแกรมการกระตุ้น เป็นต้น

อย่างไรก็ตามการใช้ความดันในการดูดต่ำจำเป็นต้องอาศัยการควบคุมบังคับกระบือให้ดี เนื่องจากความเร็วในการดูดต่ำจะช้ากว่าการใช้แรงดันที่สูงหากสัตว์ขยับตัวหรือดิ้นรนจะทำให้เข็มหลุดจากฟอลลิเคลได้ แสดงให้เห็นว่าการบังคับสัตว์ที่ดีจะมีผลอย่างมากต่อการเก็บ การควบคุมกระบือด้วย Xylacine HCl มีความสำคัญมาก เพราะกระบือบางตัวจะมีการตอบสนองมากเกินไป แม้จะให้ในขนาดที่น้อยหรือขนาดตามน้ำหนักตัวก็ตามจะล้มตัวลงและไม่สามารถเจาะได้ เพราะการเจาะในสัตว์ (โคและกระบือ) จะทำในท่ายืนเท่านั้น รวมทั้งการใช้ Xylocaine HCl เป็นยาชาเข้าไขสันหลังก็ต้องควรที่จะคำนึง เพราะหากให้มากเกินไปจะเกิดโพรงอากาศในทวารหนัก ทำให้ไม่สามารถจับรังไข่ได้เพราะผนังลำไส้ใหญ่จะตึงมาก นอกจากการควบคุมพฤติกรรมของกระบือภายนอกด้วยยาทั้งสองชนิดแล้ว ยาทั้งสองชนิดยังช่วยให้เกิดการหย่อนตัวของอวัยวะภายในทั้งมดลูกและลำไส้ ทำให้การทำงานทำได้ค่อนข้างสะดวกในช่วงเวลาประมาณ 30-45 นาทีของการทำงาน แรงดันสูญญากาศที่ใช้ในการดูดเก็บโอโอไซต์จากฟอลลิเคลที่ใช้ในการทดลองนี้อาจต่ำกว่าที่ใช้ในคน ซึ่งอาจใช้สูงถึง 180 มิลลิเมตรปรอท (Van Beek อ้างถึงโดย Pieterse *et al*., 1988) ทั้งนี้เพราะในสตรีที่มีบุตรยากนั้น จะทำการเก็บโอโอไซต์จากฟอลลิเคลขนาดใหญ่ที่ใกล้ mature ขนาดตั้งแต่ 10 มิลลิเมตร และโอโอไซต์จะเป็นชนิด mature มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มกระจายตัวเป็นเมือกล้อมรอบ จะทำให้ดูดเก็บได้ยากหากใช้แรงดันในการดูดต่ำ แต่ในโคและกระบือที่ทดลองจะเจาะเก็บในฟอลลิเคลที่กำลังเจริญ (growing follicles) ซึ่งมีขนาด 2-8 มิลลิเมตร และโอโอไซต์ที่ได้ส่วนมากจะเป็นชนิด immature ที่ต้องทำการเลี้ยงให้พร้อม ปฏิสนธิในหลอดทดลองก่อน (*in vitro* maturation)

การย้อมสีโอโอไซต์ด้วยวิธี Rapid staining

จากผลการย้อมสีโอโอไซต์ด้วยวิธี Rapid staining แสดงว่าการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปินมีผลต่อการเจริญของโอโอไซต์ได้ตามปกติฮอร์โมนเอฟเอสเอชมีผลต่อการสร้างและคัดเลือกฟอลลิเคล (recruitment & selection) ระดับของฮอร์โมนเอฟเอสเอชจะสูงในช่วงเป็นสัด โดยไปกระตุ้นให้เซลล์กรานูโลซาผลิตฮอร์โมน เอสโตรเจนและสารอินฮีบินที่จำเป็นสำหรับการเจริญพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์ ระยะของการเจริญของโอโอไซต์ที่ได้จากการทดลองนี้แตกต่างจากข้อมูลที่ได้จากรังไข่ของแม่กระบือปลักที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน Kamonpatana และ Chuangsoongneon (1994) ได้รายงานว่าโอโอไซต์ที่

เจาะได้จากรังไข่ของแม่กระบือปลักจะอยู่ในระยะ germinal vesicle (GV) ทั้งหมด ซึ่งระยะเวลาในการเลี้ยงในหลอดทดลองต้องใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมงเป็นอย่างน้อย (มาลี, 2539) ดังนั้นเป็นไปได้ว่าหากต้องการเลี้ยงโอโอไซต์ที่เก็บจากลูกกระบือปลักที่ได้รับการกระตุ้นจะต้องใช้เวลาน้อยกว่าโอโอไซต์ที่เก็บจากรังไข่โดยทั่วไปโดยอาจใช้เวลาประมาณ 12 ชั่วโมงเท่านั้นเพราะโอโอไซต์ของกระบือจะเริ่มเข้าสู่ระยะ Metaphase I เมื่อผ่านการเลี้ยงนาน 12 ชั่วโมง (Kamonpatana and Chuangsoongneon, 1994) ขนาดของฟอลลิเคิลที่พบก่อนการเจาะน่าจะเป็นตัวบ่งชี้ของระยะการเจริญของโอโอไซต์ได้ จากผลการตรวจวัดขนาดของฟอลลิเคิลบนรังไข่ก่อนทำการเจาะเก็บ พบว่าเส้นผ่าศูนย์กลางของฟอลลิเคิลที่พบส่วนมากอยู่ระหว่าง 0.5 – 1.0 เซนติเมตร และจากผลการย้อมสีเพื่อดูลักษณะของโครโมโซมของโอโอไซต์ที่เจาะเก็บมาได้ ส่วนมากมีระยะการแบ่งตัวอยู่ที่ระยะ Interphase-Prophase ซึ่งหมายความว่าโอโอไซต์ได้เริ่มมีการเจริญต่อจากระยะหยุดพัก (Meiotic arrest) โดยผ่านขั้นตอนของ GVBD มาแล้ว แต่ยังไม่เจริญจนถึงระยะพร้อมปฏิสนธิได้ จึงมีความจำเป็นต้องทำการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้นอกร่างกายต่อไปอีกระยะหนึ่ง เพื่อให้โอโอไซต์เจริญจนถึงระยะ Metaphase II ซึ่งเป็นระยะพร้อมปฏิสนธิ

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าความสำเร็จในการย้อมสีเพื่อตรวจสอบลักษณะของโครโมโซมของโอโอไซต์ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการด้วยกัน ได้แก่ การเตรียมและเก็บรักษาสีย้อมต้องทำให้เกิดตะกอนน้อยที่สุด เพราะตะกอนสีอาจไปติดอยู่ที่โอโอไซต์ ทำให้ความสับสนในการอ่านผลได้ ระยะเวลาที่ใช้ในการย้อมสี ถ้าใช้ระยะเวลาในการย้อมสีน้อยเกินไป การติดสีของโครโมโซมจะไม่สมบูรณ์ ในทางตรงกันข้ามถ้าใช้เวลานานเกินไปจะทำให้สีของ ไซโทพลาสซึมของโอโอไซต์เข้มขึ้นและมองเห็นโครโมโซมไม่ชัด ปริมาณของไขมันภายในไซโทพลาสซึมของโอโอไซต์เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการอ่านผล ซึ่งโอโอไซต์กระบือมีเม็ดไขมันอยู่พอสมควร ถ้าทำการ fix โอโอไซต์ไม่ดีจะมีโอกาสที่เม็ดไขมันจะบังโครโมโซมทำให้มองเห็นโครโมโซมไม่ชัดเจน นอกจากนี้เทคนิคและความชำนาญของผู้ปฏิบัติก็เป็นสิ่งที่มีความสำคัญต่อความสำเร็จในการย้อมสี เช่นในขั้นตอนของการย้ายโอโอไซต์จากน้ำยา Fixative ลงสไลด์เพื่อย้อมสีต้องอาศัยความรวดเร็วเพราะถ้าปล่อยให้น้ำยา Fixative แห้งก่อนทำการย้อมสีจะทำให้โอโอไซต์แห้งติดกับสไลด์และย้อมไม่ติดสีและขั้นตอนการปิด coverslip ให้แนบกับโอโอไซต์ ถ้าทำการกด coverslip แรงเกินไปจะทำให้โอโอไซต์แตก แต่ถ้ากดเบาเกินไปโอโอไซต์จะไหลไปตามการไหลของสีทำให้เกิดการสูญหายได้ ซึ่งถ้าสามารถที่จะควบคุมปัจจัยดังกล่าวข้างต้นได้จะเป็นการเพิ่มโอกาสประสบผลสำเร็จในการย้อมสีเพื่อตรวจสอบลักษณะโครโมโซมของโอโอไซต์ได้อย่างดียิ่งขึ้น

จากผลการย้อมสีโอโอไซต์ที่ได้จากการเจาะเก็บโดยวิธีโอพียูในลูกกระบือปลักด้วยวิธี Rapid staining พบว่าโอโอไซต์ส่วนใหญ่มีการแบ่งตัวอยู่ในระยะ Interphase-Prophase รองลงมาได้แก่ระยะ Metaphase I และระยะ GVBD ตามลำดับ ซึ่งโอโอไซต์ในระยะดังกล่าวเป็นโอโอไซต์ที่ยังไม่เจริญพร้อมที่จะปฏิสนธิ จึงมีความจำเป็นต้องทำการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้นอกร่างกายต่อไปอีกระยะหนึ่ง เพื่อให้โอโอไซต์เจริญจนถึงระยะ Metaphase II ซึ่งเป็นระยะพร้อมปฏิสนธิ

จากการวิจัยครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า

1. สามารถที่จะนำการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูมาใช้ในลูกกระบือและกระบือสาวได้
2. สามารถที่จะเก็บโอโอไซต์ซ้ำด้วยวิธีโอพียูในลูกระบือและกระบือสาวได้ โดยไม่มีความแตกต่างของอัตราการเก็บและคุณภาพของโอโอไซต์ที่ได้ในแต่ละครั้งของการเก็บ
3. ระดับของแรงดันสูญญากาศในการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูที่เหมาะสมในกระบือสาว คือ 60 มิลลิเมตรปรอท ซึ่งให้อัตราการเก็บและคุณภาพของโอโอไซต์ที่ดีที่สุด เมื่อเทียบกับที่ระดับแรงดัน 80 และ 100 มิลลิเมตรปรอท

ข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัยดังกล่าวข้างต้นในส่วนของปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูในกระบือนั้น ยังมีอีกหลายปัจจัยที่น่าจะทำการศึกษาต่อไป เช่น ผลของสถานภาพทางระบบสืบพันธุ์ในกระบือ ผลของความถี่ในการทำการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู เป็นต้น นอกจากนี้ที่น่าจะมีการศึกษาต่อไป คือ คลื่นการเจริญของฟอลลิเคิล (follicular wave) ในกระบือซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาทางวิทยาการสืบพันธุ์ในกระบือต่อไป อีกทั้งยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในการทำการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูโดยสามารถที่จะกำหนดช่วงเวลาที่เหมาะสมในการทำโอพียู ซึ่งจะสามารถหลีกเลี่ยงผลของ dominant ที่จะส่งผลกระทบต่อผลการเก็บโอโอไซต์ได้ และที่น่าสนใจอีกประการ คือ การปรับปรุง โปรแกรมที่เหมาะสมในการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในกระบือปลัก เพื่อให้กระบือมีการตอบสนองต่อการกระตุ้นที่ดีขึ้นอันจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูให้มีประสิทธิภาพและให้ผลการเก็บที่ดียิ่งขึ้นต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ชัยณรงค์ โลหชิต มงคล เตชะกำพุ วิชัย ทันตศุภารักษ์ เกวลี ฉัตรดรงค์ ศิริวัฒน์ ทรวดทรง และจินดา สิงห์ลอ. 2539. Ovum pick up ในลูกโคพื้นเมืองไทย.เวชชสารสัตวแพทย์ 25(4):303-313.

มาลี อภิเมธีธำรง 2539 ผลของอุณหภูมิ ซีรั่มลูกอ่อนโค และคาร์บอนไดออกไซด์ ต่อการเจริญพร้อมปฏิสนธิของไข่อ่อนกระบือปลัก วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สายวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า ปีการศึกษา 2539 91 หน้า.

มาลี อภิเมธีธำรง นุชรินทร์ ศงสะเสน วิบูลย์ เยี่ยงวิศวกูร และจุรีย์รัตน์ สำเร็จประสงค์ 2542 การย้อมสีนิวเคลียสของโอโอไซต์กระบือปลักและโคด้วยวิธี Rapid Staining Method การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37 หน้า 329-335

มงคล เตชะกำพุ ชัยณรงค์ โลหชิต วิชัย ทันตศุภารักษ์ วันเพ็ญ ศรีอนันต์ จินดา สิงห์ลอ และจินตนา อินทรมงคล. 2537(1994) การใช้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินเพื่อกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ของลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์ รายงานผลการวิจัยทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภชประจำปี 2537 23 หน้า.

รังสี อดุลยานุภาพ มงคล เตชะกำพุ และวันเพ็ญ อดุลยานุภาพ 2541 การปฏิสนธินอกร่างกายของโอโอไซต์เก็บจาก ลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์ เวชชสารสัตวแพทย์ 28(2) หน้า 39-46

เอกชาติ พรหมดิเรก มงคล เตชะกำพุ นวเพ็ญ ภูติกนิษฐ์ และอัญชลี ณ เชียงใหม่ 2543 การศึกษาเบื้องต้นของการเก็บโอโอไซต์โดยวิธีโอพียูในกระบือปลักสาวก่อนวัยเจริญพันธุ์ ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 26 หน้า 24-32

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Ali dinar, M., Diskin, M.G., McDonagh, T. and Sreenan, J.M. 1987 . Oestrous and ovarian responses in repeatedly superovulated cows. Theriogenology. 27:201.

Baltussen, R.M.W.A., Vos, P.L.A.M., Pieterse,M.C.,de Loos, F.A.M., Bevers, M.M. and Dieleman, S.J. 1992. Transvaginal ultrasound-guided follicle puncture in PMSG/PG treated cows: A comparison between three puncture needles. The 12th International Congress on Animal Reproduction the Hague, The Netherlands. August 23rd – August 2th congression Proceeding. 1:129-131.

Bodhipaksha,P., Kamonpatana, M., Chantaraprateep, P ., Kunavongkrit, A. and Luvira, Y.1978. The study for improvement of reproduction of the Thai buffalo. Res. Proj .supported by Rajadapiseksompot Research Fund, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 107 pages. (in thai)

Bols, P.E.J., Vanderheede, J.M.M., Van Soom, A. and Kruif, A. de. 1995. Transvaginal ovum pick-up OPU in the cow : A new disposable needle guidance system. Theriogenology. 43:677-687.

Bols, P.E.J., Van Soom, A., Ysebaert, M.T., Vandenheede, J.M.M. and de Kruif, A. 1996. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. Theriogenology. 45:1001-1014.

Bols, P.E.J., Ysebaert, M.T., Van Soom, A. and de Kruif, A. 1997. Effect of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. Theriogenology. 47:1221-1236.

Boni, R., Roviello, S and Zicarelli, L. 1996. Repeated ovum pick-up in Itallian Mediterranean buffalo cows. Theriogenology. 46:899-909.

Bordignon, V., Morin, N., Durocher, J., Bousquet, D. and Smith, L.C. 1997. GnRH improves the recovery rate and the *in vitro* developmental competence of oocytes obtained by transvaginal follicular aspiration from superstimulated heifers. Theriogenology. 48:291-298.

Bousquet, D., Twagiramungu, H. Durocher, J. Barnes, F.L.and Sirard, M.A. 2000. Effect of LH injection before ovum pick-up on *in vitro* embryo production with oocyte collected at different intervals aafter the last FSH injection. Theriogenology. 53(1):347(Abstr.)

Broadbent, P.J., Dolman, D.F., Watt, R.G., Smith, A.K. and Franklin, M.F. 1997. Effect of frequency of follicle aspiration on oocyte yield and subsequent superovulatory response in cattle. Theriogenology. 47:1027-1040.

Brogliatti, G.M. and Adams, G.P. 1996. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. Theriogenology. 45:1163-1176.

Brogliatti, G.M., Salamone, D.F. and Adams, G.P. 1997. Ovarian follicular wave synchronization and superstimulation in prepubertal calves. Theriogenology. 47:1253-1264.

Brogliatti, G.M.,Swan, C.D. and Adam, G.P. 1995. Transvaginal ultrasound – guided oocyte collection in 10 to 16 weeks of age calves. Theriogenology.46:1163-1176.

Bungartz, L., Lucas-Hahn, A., Rath, D. and Niemann, H. 1995. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. Theriogenology. 43:667-675.

Callesen, H., Greve, T. and Christensen, F. 1987. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocyte. Theriogenology. 27:217 (Abstr.)

Carruthers, T.D. 1986. Principle of hormone therapy in Theriogenology. In: Current therapy in Theriogenology edited by D.Morrow,Saunders Co. U.S.A.:3-12.

Chantaraprateep, P ., Lohachit, C., Kobayashi, G., Techakumphu, M., Virakul, P.,Kunavongkrit, A. and Prateep, P.1988. Ovarian responses to gonadotropin stimulation in swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). Buffalo Bullentin. 7(4) :82-86.

Chaudhary,Z,I. and Saga,F.H. 1990 .Growth of limb bonse in Ravi-Nili buffalo calves. Pakistan J. Zool.22 (3):245-248.

Eikelmann,E., Frank, K.u., Schinder, L. and Niemann, H. 2000. Repeated ultrasound-guided follicular aspiratioon in pregnant heifer and cows. Theriogenology.53(1):351. (Abstr.)

Fricke, P.M., Kirsch, J.D., Reynolds, L.P. and Redmer, D.A. 1994. Studies of FSH-P induced follicular growth in cows. Theriogenology. 43(1):43-53.

Fry, R.C., Niall, E.M., Simpson, T.L., Squires, T.J. and Reynolds. 1997. The collection of oocytes from bovine ovaries. Theriogenology. 47:977-987.

Fry, R.C., Simpson, T.J., Parr, R.A. and Demanik,R.M. 1994. Factors affecting transvaginal oocyte pick up in heifers. Theriogenology. 41:197. (Abstr.)

Garcia, A., Ma Pletoft, R.J. and Kennedy, R. 1994. Effect of serum dose on fertilization and embryo quality in superovulated cows. Theriogenology. 41:202 (Abstr.).

Garcia, A. 1998. Real-time ultrasonography for the study of reproductive events in the cow. Harry Otter // Addix, Wijk bij Duurstede, The Netherlands. p.83-98.

Gerber, D., Arlotto, T. and Cooper, D. 2000. A new disposable needle guide system for transvaginal oocyte recovery in domestic cows and african buffalo. Theriogenology. 51(1):333 (Abstr.)

Ginther, O.J., Kastelic, J.P. and Knopf, L. 1989. Intraovarian relationship among dominant and subordinate follicles and the corpus luteum in heifers. Theriogenology. 32(5):787-795.

Gonen, Y., Blanker, J. and Casper, R.F. 1990. Transvaginal ultrasonically guided follicular aspiration: a comparative study with laparoscopically guided follicular aspiration.J. Clin. Ultrasound 18(1):257-261 (Abstr.)

Hanenberg, E.H.A.T., Van Wagtendonk-de leeuw, A.M. 1997. Comparison of 3, 4 or 7 day interval between oocyte collections for *in vitro* embryo production results. Theriogenology. 47(1):158.

Hashimoto, S., Takakura, R., Kishi, M., Sudo, T., Minami, N. and Yamada, M. 1999a. Ultrasound-guided follicle aspiration : The collection of bovine cumulus-oocyte complexes from ovaries of slaughtered or live cows. Theriogenology. 51:757-765.

Hashimoto, S., Takakura, R., Minami, N., and Yamada, M. 1999b. Ultrasound-guided follicle aspiration : effect of the frequency of a linear transvaginal probe on the collection of bovine oocytes. Theriogenology. 52:131-138.

Intaramongkol, J. and Intaramongkol, S. 1992. Genetic improvement of Thai swamp buffalo. Report of Surin Livestock Breeding and Research Center. Thailand. 16 p.

Irvine,B.J., Earl, C.R ., Armstong, D.T. and Seamark, R.F. 1994. Effects of hormonal treatment and interval between treatment on folliccle development in calves. Theriogenology.41 (1) :221. (Abstr.)

Jainudeen, M.R., Hafez, E.S.E. and Lineweaver, J.A. 1966. Superovulation in the calf. J. Reprod. Fertil. 12:149-153.

Kajihara, Y., Blakewood, E.G., Myers, M.W., Kometani, N., Goto, K. and Godke, R.A.1991. *In vitro* maturation of follicular oocytes obtained from calves. Theriogenology. 35 (1):220. (Abstr.)

Kamonpatana, M. and Chuangsoongneon, U. 1994. Time related to *in vitro* maturation of immature oocytes in swamp buffaloes. Buffalo J. (Suppl). 2:135-146.

Kobayashi, G', Techakumphu, M. and Eiamvitayakorn, J. 1990. Ovarian response to pregnant mare gonadotrophin in murrah buffalo. Proceeding of the 7th Congress of FAVA, Pattaya, Thailand 4-7 Nov 1990. p 694-700.

Kohram, H., Bousquet, D., Durocher, J. and Guilbault, A. 1998. Alteration of follicular dynamics and superovulatory responses by gonadotropin releasing hormone and follicular puncture in cattle : a field trial. Theriogenology. 49:1165-1174.

Kruip, Th.A.M., Boni< R., Wurth, Y.A., Roelofsen, M.W.M. and Pieterse, M.C. 1994. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in the cattle.Theriogenology.42:675-684.

Ko, J.C.H., Kastelic, J.P., Del Campo, M.R. and Ginther, O.J. 1991. Effect of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers. J. Reprod. Fert. 91: 511-519.

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 (1) :67-72.

Majerus, V., De Roover, R., Etienne, D., Kaidi, S., Massip, A., Dessy, F. and Donnay, I. 1999. Embryo production by ovum pick up in unstimulated calves before and after puberty. Theriogenology. 52:1169-1179.

McCool, C.J. and Entwistle, K.W. 1989. The development of puberty and sexual maturity in the Australian swamp buffalo bull. Theriogenology. 32 (2):171-184.

Meintjes, M., Bellow, M.S., Broussard, J.R., Paul, J.B. and Godke, R.A. 1995. Transvaginal aspiration of oocyte from hormone-treated pregnant beef cattle for *in vitro* fertilization. J. Anim. Sci. 73:967-974.

Nibart, M. and Marquant-Le Guienne,B. 1995. Production d, embryons et de veauz par OPU-FIV chez les bovins. Elevage et Insemination. 266:1-23.

Onuma, H., Halm, J., Maurer, R.R. and Foote, R.H. 1969. Repeated superovulation in calves. J. Anim. Sci. 28:634-637.

Pavasuthipaisit K ., Holyoak R.G., Tocharus C. and Kittiyanant Y.1995. Repeated transvaginal follicular aspiration in swamp buffalo. Theriogenology . 43(1):295.(Abstr.)

Perez,O., Richhhard lll, R., Green, H.L., Youngs, C.R. and Godke, R.A. 2000. Ultrasound-guided tranvaginal oocyte recovery from FSH – treated post-partum beef cows. Theriogenology . 53(1):364.(Abstr.)

Pieterse, M.C., Kappen, K.A., Kruip, Th.A.M. and Taverne, M.A.M. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. Theriogenology.30: 751-762.

Pieterse, M.C., Taverne, M.A.M., Kruip, Th.A.M. and Willemse, A.H. 1990. Detection of corpora lutea and follicles in cows : a comparison of transvaginal ultrasonography and rectal palpation. Vet. Rec. 126:552-554.

Pieterse, M.C., Vos, P.L.A.M., Kruip, Th.A.M., Willemse, A.H. and Taverne, M.A.M. 1991.Characteristics of bovine oestrus cycles during repeated ultrasound-guided punctured of follicles for ovum pick-up. Theriogenology. 35:401-413.

Rath, D. 1993. Current status of ultrasound-guided retrieval of bovine oocytes. Embryo Transfer Newletter. 11(2):10-15.

Roelofsen-Vendrig, M.W., Boni, R., Wurth, Y.A. and Pieterse, M.C., Kruip, T.A. 1994. Possibilities of ovum pick up in cattle. Tijdschr Diergeneeskd. 119(3):61-63. (Abstr.)

Ruigh, l., Mullaart, E. and Wagtendonk-de leeuw, A.M.2000. The effect of FSH stimulation prior to ovum pick-up on oocyte and embryo yield. Theriogenology. 53(1):349. (Abstr.)

Salama, M.A.M., Mokhless, E.M. and Barkawi, A.H. 1994. Pubertal performance of Egyptian buffalo heifers. Buffalo J. 10 (1):61-66.

Santl, B., Wenigerkind, H., Schernthaner, W., Modl, J., Stojkovic, M., Prelle, K. Holtz, W., Brem, G. and Wolf, E. 1998. Comparison of ultrasound-guided vs laparoscopic transvaginal ovum pick-up (opu) in Simmental heifers. Theriogenology. 50:89-100.

Seidel, G.E., Larson, C.H., Hahn, J. and Foote, R.H. 1971. Culture and transfer of calf ova. J.Dairy.Sci. 54:923-926.

Simon, C., Bungartz, L., Rath, D. and Niemann. H. 1993. Repeated bovine oocyte collection by means of a permanentsly rinsed ultrasound - guided aspiration unit Theriogenology. 39:312 (Abstr.)

Sophon, S., Parnpai, R. and Kamonpatana, M.1989. Multiovulation leading to embryo transfer in buffaloes; Using PMSG and FSH under oestrous regulation by Norgestomet. Buffalo J. 5 (1):85-98.

Stubbing, R.B. and Walton, J.S. 1995. Effect of ultrasonically - guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows. Theriogenology. 43:705-712.

Techakumphu, M., Lohachit, C., Tantasuparuk, W., Intaramongkol, C. and Intaramongkol, S. 2000a. Ovarian responses and oocyte recovery in prepubertal swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) calves after FSH or PMSG treatment. Theriogenology. 54:305-312.

Techakumphu, M.,Phutikanit, N., S.Suadsong, S, T. Bhumibhamon, Pita, A. and Coygasem, G. 2000b.Effect of GnRH supplement in FSH or PMSG treatments for prepubertal swamp buffalo calves (*Bubalus bubalis*). J. Vet. Med. Sci. 62(3):269-272.

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

วัสดุและเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

1.อุปกรณ์กระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิล

1.1 ฮอร์โมนที่ใช้สำหรับกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิล

1.1.2 ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดฝังใบหู (Crestar ®)

1.1.3 ฮอร์โมนฟอลลิเคิลสติมูเลติง หรือ เอฟเอสเอช (Folltropin-V ®)

1.1.4 ฮอร์โมน จีเอ็นอาร์เอช (Cystorelin ®)

1.2 อุปกรณ์ในการฝังฮอร์โมนที่ใบหู

1.3 ไซริงค์ ขนาด 5 มิลลิลิตร

1.4 แอลกอฮอล์

1.5 สำลี

1.6 ใบมีดผ่าตัด

1.7 ทิงเจอร์ไอโอดีน

2.อุปกรณ์ในการตรวจสอบการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่

2.1 เครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูง (อัลตราซาวด์ชนิดเรียล ไทม์ บี-โมด) (Aloka,SSD-620,Japan)

2.2 Convex array transvaginal probe ขนาดความถี่ 5 MHz.

2.3 ถุงยางอนามัย

2.4 หนังยาง

2.5 เจลสำหรับเป็นตัวนำคลื่นเสียงของเครื่องอัลตราซาวด์

2.6 ถุงมือล้วงตรวจชนิดยาว

2.7 ถังน้ำ

2.8 ขันน้ำ

2.9 กระดาษชำระ

3. อุปกรณ์ในการเจาะเก็บโอโอไซต์

3.1 สารเคมีในการควบคุมบังคับสัตว์

3.1.1 Xylazine HCL (Rompun®)

3.1.2 Xylocaine HCL

3.2 Ovum aspiration set (Cook,Australia) ประกอบด้วย

3.2.1 เข็มเจาะเบอร์ 17 ยาว 34.5 มิลลิเมตร

3.2.2 Vacuum pump

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.3 Test tube heater

3.3 เครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูง (อัลตราซาวด์ชนิดเรียล ไทม์ บี-โมด)(Aloka,Japan)

3.4 Convex array transvaginal probe ขนาดความถี่ 5 MHz.

3.5 ตัวนำเข็มเจาะ

3.6 ถุงยางอนามัย

3.7 ถุงมือล้วงตรวจชนิดยาว

3.8 Heparin (Sigma,USA)

3.9 Lactat Ringer's solution

3.10 หลอดสำหรับเก็บของเหลวที่เจาะได้จากฟอลลิเคิล

3.11 ไซริงค์ ขนาด 5 และ10 มิลลิลิตร

3.12 เข็ม เบอร์ 18 ความยาว 1 นิ้ว

3.13 ยาปฏิชีวนะ Penicillin - Streptomycin(Aescostrep forte® ,Farvet Laboratories B.V.,Bladel, Netherland)

4.อุปกรณ์ในการกรอง จำแนกชนิดและย้อมสีโอโอไซต์

4.1 กรวยกรองตัวอ่อน (EM Con Filter,KRUUSE,Sweden.)

4.2 ไซริงค์ ขนาด 10 มิลลิลิตร

4.3 Lactate Ringer's solution

4.4 petridish ขนาด 100x20 มิลลิเมตร และขนาด 10x35 มิลลิเมตร

4.5 ปากกาเขียนแผ่นใส

4.6 สีย้อม Rapid stain

4.7 Acetic acid

4.8 Ethyl alcohol

4.9 Glycol

4.10 น้ำกลั่น

4.11 กระดาษทิชชู

4.12 แผ่นสไลด์แก้ว

4.13 Cover slip

4.14 Micropipett ขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร (Gilson,USA)

4.15 Micropipett tip ขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร

4.16 Holding pipett

4.17 Deconinzing pipett

4.18 4-well multidish

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.19 เข็มเบอร์ 18 ความยาว 1 นิ้ว

4.20 กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ

4.21 ฟิล์มถ่ายภาพ

4.22 กระดาษกาว

4.23 ตู้เย็น

4.24 กล้องจุลทรรศน์ชนิด Light microscope

4.25 TCM-199 Hepes

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

ฮอร์โมนที่ใช้ในโปรแกรมการกระตุ้นสร้างฟอลลิเคิล

1.Crester® (Norgestomet and Oestradiol valerate)

ประกอบด้วย

ยาฝังใต้ผิวหนัง (Implant) ที่มี Norgestomet (17α –acetoxy-11β - methyl-19-norpreg-4-en-3,20 dione)ประมาณ 3 มิลลิกรัม ฝังใต้ผิวหนังบริเวณด้านนอกใบหู

ยาฉีด 2 มิลลิลิตร ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ที่มี Norgestomet ในรูปสารละลายในน้ำมันปริมาณ 3 มิลลิกรัม และ Oestradiol valerate ปริมาณ 5 มิลลิกรัม

บริษัทที่ผลิต : Intervet ,Netherlands

2.Folltropin-V®

ประกอบด้วย ฮอร์โมนเอฟเอสเอช (Follicle stimulating hormone) ปริมาณ 400 มิลลิกรัม NIH*-FSH-P1 ทำละลายด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม /มิลลิลิตร โทรปิน เป็นฮอร์โมนเอฟเอสเอชที่มีความบริสุทธิ์สูงซึ่งสกัดจากต่อมใต้สมองของสุกรมีอัตราส่วนฮอร์โมนเอฟเอสเอช ต่อฮอร์โมนแอลเอช (FSH / LH)สูงทำให้มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการตอบสนองของรังไข่

บริษัทที่ผลิต : Veterpharm ,Ontario,Canada

3.Cystorelin®

ประกอบด้วยฮอร์โมนจีเอ็นอาร์เอช (Gonadorelin diacetate tetrahydrate) 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ฮอร์โมน Gonadorelin ถูกหลั่งมาจากไฮโปธารามัสเพื่อกระตุ้นให้มีการหลั่งของโกนาโดโทรปินจากต่อมใต้สมองส่วนหน้า

บริษัทที่ผลิต : RHÔNE MERIEUX,France

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

การเตรียมน้ำยาเพื่อใช้ในการทดลอง

TCM 199 HEPES(Maintenance media)

องค์ประกอบ

1. TCM-199(powder,Gibco BRL 071-01100A)	9.5	กรัม
2. Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$)	0.35	กรัม/ลิตร
3. Penicillin-G	0.06	กรัม/ลิตร
4. Streptomycin	0.05	กรัม/ลิตร
5. HEPES	4.766	กรัม/ลิตร

วิธีเตรียม

สารละลายที่ 1 : ละลาย TCM-199 9.5 กรัม พร้อมกับ Sodium hydrogen carbonate และ Penicillin –Streptomycin ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร

สารละลายที่ 2 : ละลาย Hepes จำนวน 4.677 กรัม/ลิตร ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นค่อยๆ รินสารละลายที่ 2 ลงในสารละลายที่ 1 อย่างช้าๆ แล้วผสมสารละลายทั้ง 2 ให้เข้ากัน ปรับความเป็นกรด-ด่างpH เป็น 7.35 กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส นำมาอุ่นที่ 39 องศาเซลเซียสก่อนใช้

การเตรียมสีย้อม Rapid stain

สารเคมี

1. สารละลาย 1% Sodium citrate

   เตรียมโดยชั่งสาร 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

2. Fixative solution

   ประกอบด้วยอัตราส่วน acetic acid : ethanol เท่ากับ 1:3 โดยปริมาตร

3. Destaining solution

   ประกอบด้วยอัตราส่วน acetic acid : น้ำกลั่น : glycerol เท่ากับ 1:3:1 โดยปริมาตร

4. สีย้อม ประกอบด้วย

สารละลาย	ส่วนประกอบ	จำนวน
ก	Basic fuchsin	3 กรัม
	70% ethanol	100 มิลลิลิตร
ข	สารละลาย ก	10 มิลลิลิตร
	5% phenol	90 มิลลิลิตร
สีย้อม	สารละลาย ข	45 มิลลิลิตร
	Glacial acetic acid	6 มิลลิลิตร
	37% formaldehyde	6 มิลลิลิตร

กรองสีย้อมที่เตรียมแล้ว จากนั้นปิดฝาให้แน่น เก็บไว้ในตู้เย็น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

ผลงานตีพิมพ์จากหัวข้อวิทยานิพนธ์

	เรื่อง	พ.ศ.
1.	การศึกษาเบื้องต้นของการเก็บโอโอไซต์โดยวิธีโอพียูในกระบือปลักสาวก่อนวัยเจริญพันธุ์ ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 26 โรงแรม มิราเคิล แกรนด์ คอนเวนชั่น หลักสี่ ดอนเมือง กรุงเทพฯ 15-17 พฤศจิกายน 2543 หน้า 24-32	2543
2.	การตรวจสอบระยะการเจริญของโอโอไซต์ที่เก็บจากรังไข่ของลูกกระบือปลัก การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 39 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์(กำลังรอตีพิมพ์)	2543
3.	การศึกษาเบื้องต้นของการเก็บโอโอไซต์โดยใช้เครื่องตรวจอวัยวะภายในด้วย คลื่นเสียงความถี่สูงในกระบือปลักสาว เวชชสารสัตวแพทย์ ปีที่ 30 ฉบับที่ 1 หน้า 43-50	2544

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นาย เอกชาติ พรหมดิเรก เกิดเมื่อวันที่ 23 พฤษภาคม พ.ศ. 2518 ที่เขตบางกอกน้อย กรุงเทพมหานคร จบการศึกษาชั้นประถมศึกษาจากโรงเรียนมหาไถ่ศึกษา จังหวัดขอนแก่น เมื่อปี พ.ศ. 2529 จบการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาจากโรงเรียนสาธิตมอดินแดง มหาวิทยาลัยขอนแก่น และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปีการศึกษา 2541 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2542

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย