รายงานผลการวิจัย
ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

เรื่อง

การผลิตตัวอ่อนจากการปฏิสนธินอกร่างกาย ของโอโอไซต์ที่เก็บจากรังไข่ลูกโค

โดย

มงคล เตชะกำพุ
ชัยณรงค์ โลหชิต
วิชัย ทันตศุภารักษ์
ศิริวัฒน์ ทรวดทรง
จินดา สิงห์ลอ

636.089
8178
กพ491

ตุลาคม 2539

TM
๙๘-๐๑-๒๙

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การผลิตตัวอ่อนจากการปฏิสนธินอกร่างกายของโอโอไซต์ที่เก็บจากรังไข่ลูกโค

(Embryo Production by *In Vitro* Fertilization of Calf Oocyte)

โดย

มงคล เตชะกำพุ
ชัยณรงค์ โลหชิต
วิชัย ทันตศุภารักษ์
ศิริวัฒน์ ทรวดทรง
จินดา สิงห์ลอ

ธันวาคม 2539

I ๑๙๙๐๔๙๙๖

ฝ่ายวิชัย คุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
30 / ม.ค. / 41

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ผลงานวิจัยเรื่องนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ

- อ. นพ. วิสุทธิ์ บุญเกษมสันติ และเจ้าหน้าที่ของห้องปฏิบัติการ ไอ วี เอฟ ภาควิชาสูติศาสตร์ นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- บริษัท แอ๊ดว๊านซ์ฟาร์ม่า จำกัด ที่สนับสนุนฮอร์โมน
- คุณอดุลย์ วังตาล ที่ให้ยืมลูกโคพันธุ์ซิมเมนทัลในการทดลอง
- คณาจารย์และเจ้าหน้าที่ของภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ การผลิตตัวอ่อนจากการปฏิสนธินอกร่างกายของโอโอไซต์ที่เก็บจากรังไข่ลูกโค
ชื่อผู้วิจัย มงคล เดชะกำพุ
ชัยณรงค์ โลหชิต
วิชัย ทันดศุภารักษ์
ศิริวัฒน์ ทรวดทรง
จินดา สิงห์ลอ

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ ธันวาคม 2539

บทคัดย่อ

ศึกษาการผลิตตัวอ่อนด้วยการปฏิสนธินอกร่างกายจากโอโอไซต์ของลูกโคพื้นเมืองก่อนวัยเจริญพันธุ์อายุ 4-6 เดือน หลังการกระตุ้นครั้งแรกและกระตุ้นซ้ำอีก 3 ครั้ง ด้วยฟอลลิคูล่าร์ สติมูเรตดิ้ง ฮอร์โมน ขนาด 192 มก. ฉีดเข้ากล้ามวันละ 2 ครั้ง (เช้า/เย็น) ติดต่อกัน 4 วัน โดยขนาดลดโด๊ส (32/32,24/24,24/24,16/16) ตรวจการตอบสนองของรังไข่และการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีการผ่าตัดเปิดช่องท้องหลังกระตุ้นเข็มสุดท้าย 60 ชม. นำโอโอไซต์ที่ได้มาเลี้ยงให้เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธินอกร่างกาย และปฏิสนธิกับตัวอสุจิ แล้วนำตัวอ่อนที่ได้เลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนหรือฝากในท่อนำไข่ของแกะหรือกระต่ายนาน 6 วัน ผลการศึกษาพบว่าการตอบสนองของรังไข่ของลูกโคต่อการฉีดกระตุ้นฮอร์โมนมีความผันแปรค่อนข้างสูงในลูกโคแต่ละตัว โดยมีค่าเฉลี่ยของการตอบสนองของรังไข่ (ฟอลลิเคิล+คอร์ปัส ฮีโมราจีกัม) จากการกระตุ้น 4 ครั้ง เท่ากับ 31.9±3.0 ใบ/ครั้ง/ตัว ได้โอโอไซต์เฉลี่ยเท่ากับ 17.6±1.8 ใบ/ครั้ง/ตัว คิดเป็นอัตราการเก็บโอโอไซต์เท่ากับ 55.2% การกระตุ้นซ้ำทำให้ผลของการตอบสนองของรังไข่และจำนวนโอโอไซต์เฉลี่ยต่อตัวลดลงจากการกระตุ้นครั้งแรก ($P<0.05$) โอโอไซต์สามารถเจริญพร้อมปฏิสนธิในอัตราเฉลี่ย 73.6% และอัตราการแบ่งตัวหลังเลี้ยงในหลอดทดลองเท่ากับ 31.6% ตัวอ่อนที่เลี้ยงไว้ในท่อนำไข่ของแกะหรือกระต่ายสามารถแบ่งตัว และพัฒนาจนถึงระยะมอรูล่าและระยะบลาสโตซีสได้แต่ท่อนำไข่ของแกะดูจะเหมาะสมมากกว่า สามารถนำตัวอ่อนไปแช่แข็งและบางส่วน (20%) พัฒนาได้หลังแช่แข็งในหลอดทดลอง นอกจากนี้ทางคณะผู้วิจัยได้พัฒนาการเก็บโอโอไซต์ในลูกโคด้วยวิธีการเจาะผ่านช่องคลอดด้วยเครื่องมือคลื่นความถี่สูง รวมทั้งได้ปรับเทคนิคนี้ไปใช้ในการกระตุ้นและเก็บโอโอไซต์ในลูกโคที่มีพันธุกรรมดี

การศึกษานี้จะเป็นแนวทางใหม่ในการนำเอาเทคนิคการผลิตตัวอ่อนจากลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์ไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ได้รวดเร็วขึ้นด้วยการไปลดช่วงห่างระหว่างชีวิตได้

Project title : Embryo Production by *in vitro* Fertilization of Calf Oocyte

Name of Investigators : Mongkol Techakumphu
Chainarong Lohachit
Wichai Tantasuparak
Siriwat Suadsong
Jinda Singlor

Year : December 1996

Abstract

The embryo production by *in vitro* fertilization of prepubertal calf oocytes were studied. The calves aged 4-6 months were superstimulated by 192 mg follicle stimulating hormone (FSH) for 4 consecutive days (am/pm) in the reducing manner; 32/32,24/24,24/24,16/16. The calves were repeated stimulated for 4 times. Sixty hours after the last FSH injection, the ovarian responses were examined and the oocytes were directly aspirated from growing follicles after caudal midline laparotomy. The oocytes were later matured and fertilized *in vitro* (IVF). After IVF, the embryos were either cultivated *in vitro* or transferred in ligated oviducts of sheep or rabbit doe for 6 days. Results showed that a high variation of responses among calves existed with the average of 31.9±3.0 follicles per calf and the average oocytes per calf was 17.6±1.8 which presented the recovery rate of 55.2%. A repeat stimulation tended to reduce the responses and the average number of recovered oocytes per donor significantly ($P<0.05$). The *in vitro* maturation rate was 73.6% and the cleavage rate was 31.6%. The embryos can cleave in sheep or rabbit oviduct and developed to morula or blastocyst stage, however, it seemed that sheep oviduct was more appropriate to culture calf oocytes than rabbit oviduct. Subsequently, some of these embryos (20%) were able to develop *in vitro* after frozen-thawed. In addition, the oocyte collection by intravaginal ultrasound-guided aspiration (Ovum Pick Up) was developed and the technique applied for oocyte collection technique in a high genetic value calf.

This study suggests a new track for cattle breeding improvement in the future by a reduction of generation interval, using prepubertal calf and *in vitro* fertilization and embryo transfer techniques.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	II
บทคัดย่อ	III
Abstract	IV
สารบัญ	V
รายการตารางประกอบ	VI
รายการภาพประกอบ	VIII
รายการสัญญลักษณ์และคำย่อ	X
บทที่ 1	
- บทนำ	1-9
บทที่ 2	
- การกระตุ้นรังไข่และการกระตุ้นซ้ำในลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์	10-29
บทที่ 3	
- การเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิและการเจริญหลังการปฏิสนธินอกร่างกายของโอโอไซต์จากลูกโค	30-50
บทที่ 4	
- การพัฒนาการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี OVUM PICK UP	51-60
บทที่ 5	
- การกระตุ้นรังไข่และการเก็บโอโอไซต์ในลูกโคที่มีพันธุกรรมดี	61-66
บทที่ 6	
- บทสรุปและข้อเสนอแนะ	67-68

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

		หน้า
ตารางที่ 1.1	อัตราการเปลี่ยนแปลงต่อปีในทางทฤษฎีของปริมาณน้ำนมที่จะได้รับจากการใช้ระบบการผสมพันธุ์ในรูปแบบต่าง ๆ	3
ตารางที่ 2.1	โปรแกรมการฉีดกระตุ้นลูกโคด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน	12
ตารางที่ 2.2	การเปลี่ยนกลุ่มการทดลองในการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นซ้ำ	12
ตารางที่ 2.3	การตอบสนองของรังไข่ของลูกโคพื้นเมืองไทยก่อนวัยเจริญพันธุ์เมื่อกระตุ้นซ้ำด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช	16
ตารางที่ 2.4	เปรียบเทียบผลการตอบสนองของรังไข่ในลูกโคพื้นเมืองไทยก่อนวัยเจริญพันธุ์ต่อการกระตุ้นซ้ำด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ร่วมกับฮอร์โมน เอส ซี จี หรือฮอร์โมน เอฟ เอส เอช อย่างเดียว	19
ตารางที่ 2.5	ผลการกระตุ้นซ้ำของลูกโคพื้นเมืองไทยก่อนวัยเจริญพันธุ์ด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปินต่อชนิดของโอโอไซต์และอัตราการเก็บโอโอไซต์	20
ตารางที่ 2.6	ผลการกระตุ้นลูกโคพื้นเมืองไทยก่อนวัยเจริญพันธุ์ด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ร่วมกับฮอร์โมน เอส ซี จี หรือด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช อย่างเดียวต่อชนิดของโอโอไซต์และอัตราการเก็บโอโอไซต์	21
ตารางที่ 3.1	ผลการเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์จากลูกโคพื้นเมืองก่อนวัยเจริญพันธุ์หลังจากผ่าน IVM	38
ตารางที่ 3.2	อัตราการแบ่งตัวหลังการปฏิสนธินอกร่างกายเปรียบเทียบระหว่างโอโอไซต์ชนิด immature และ matured	39
ตารางที่ 3.3	จำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้และจำนวนตัวอ่อนที่แบ่งตัวหลังฝากในท่อนำไข่ของแกะ	39
ตารางที่ 3.4	จำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้และจำนวนตัวอ่อนที่แบ่งตัวหลังฝากในท่อนำไข่ของกระต่าย	40
ตารางที่ 3.5	ระยะต่าง ๆ ของตัวอ่อนปกติหลังฝากในท่อนำไข่ของแกะ	40

ตารางที่ 4.1	ผลการเก็บโอโอไซต์และชนิดของโอโอไซต์ที่เก็บโดย OPU ในลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์	56
ตารางที่ 5.1	ผลของการตอบสนองและการเก็บโอโอไซต์ของลูกโคพันธุ์ซิมเมนทัลและพันธุ์ซิมเมนทัล-บราห์มัน	64
ตารางที่ 5.2	ผลการตอบสนองและการเก็บโอโอไซต์จากลูกโคพันธุ์พื้นเมือง	64

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

		หน้า
รูปที่ 1.1	ขั้นตอนของการผลิตลูกโคด้วยวิธี JIVET	3
รูปที่ 1.2	ภาพจำลองแสดงการเจริญของฟอลลิเคิลในแกะ	6
รูปที่ 2.1	ลูกโคพันธุ์พื้นเมืองไทยเพศเมียที่ใช้ในการทดลอง	13
รูปที่ 2.2	ชนิดของโอโอไซต์ที่เก็บได้จากลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์	17
รูปที่ 2.3	ภาพของการตอบสนองของรังไข่หลังกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช	18
รูปที่ 3.1	ไดอะแกรมแสดงขั้นตอนของการปฏิสนธินอกร่างกายในลูกโค	35
รูปที่ 3.2	ไดอะแกรมแสดงการฝากตัวอ่อนของลูกโคในท่อนำไข่แกะหรือกระต่าย	36
รูปที่ 3.3	ตัวอ่อนระยะต่าง ๆ ที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกายของโอโอไซต์ของลูกโค	41
รูปที่ 3.4	ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสระยะแรก (EB) และระยะบลาสโตซีส (B) หลังเลี้ยงในท่อนำไข่ของแกะนาน 6 วัน	42
รูปที่ 3.5	ภาพของตัวอ่อนที่แบ่งตัวและตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้จากการเลี้ยงตัวอ่อนจากการปฏิสนธินอกร่างกายของโอโอไซต์แม่โคในท่อนำไข่กระต่าย สังเกตได้ว่ารอบ ๆ มีชั้นใส ๆ ของ mucin coat อยู่ล้อมรอบชั้นเปลือกโซน่า	42
รูปที่ 3.6	ตัวอ่อนระยะ 2-8 เซลล์ที่เสื่อมสลายที่เลี้ยงไว้ในท่อนำไข่ของกระต่าย	43
รูปที่ 3.7	ตัวอ่อนระยะมอรูล่าของลูกโค (cM) และของแม่โค (CM) หลังแช่แข็งนาน 6 เดือนและทำละลาย	43
รูปที่ 3.8	ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่เจริญขึ้นในหลอดทดลอง จากตัวอ่อนระยะมอรูล่าที่ได้จากการเลี้ยงในท่อนำไข่ และผ่านการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว	44
รูปที่ 3.9	ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่กำลังจะหลุดจากเปลือกจากตัวอ่อนในรูปที่ 3.8 เลี้ยงต่ออีก 48 ชม.	44
รูปที่ 4.1	ภาพแสดงการดูดเก็บโอโอไซต์ในลูกโค โดยสอด transvaginal probe สอดเข้าทาง vagina และควบคุมขณะทำการเจาะด้วยจอภาพ (monitor) และชุด vacuum pump	52

รูปที่ 4.2	ภาพรังไข่ของลูกโคที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช (F= Follicle) จากหน้าจอเครื่องอัลตราซาวน์	54
รูปที่ 4.3	ไดอะแกรมแสดงการเจาะโอโอไซต์จากรังไข่ด้วยวิธี OPU	54
รูปที่ 4.4	โอโอไซต์ชนิด compact cumulus oocyte ที่ดูดได้จากรังไข่ของลูกโคหลังกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช	55
รูปที่ 5.1	ลูกโคพันธุ์ซิมเมนทัลเพศเมียที่ใช้ในการทดลองกระตุ้นรังไข่	62
รูปที่ 5.2	ภาพของรังไข่ลูกโคพันธุ์ซิมเมนทัลที่มีการตอบสนองมากทั้งข้างซ้ายและข้างขวา	65

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการสัญญลักษณ์และคำย่อ

เอฟ เอส เอช	Follicle Stimulating Hormone, FSH
พี เอ็ม เอส จี	Pregnant Mare Serum Gonadotropin, PMSG
เอส ซี จี	Human Chorionic Gonadotropin, hCG
ไอ ยู	International unit
กก.	กิโลกรัม
ชม.	ชั่วโมง
มก.	มิลลิกรัม
มม.	มิลลิเมตร
มล.	มิลลิลิตร
B	Blastocyst
CH	Corpus Hemorrhagicum
ET	Embryo Transfer
EB	Early Blastocyst
F	Follicle
FCS	Fetal Calf Serum
FIVET	Fetal In Vitro Fertilization and Embryo Transfer
JIVET	Juvenile In Vitro Fertilization and Embryo Transfer
IVM	*in vitro* maturation
IVF	*in vitro* fertilization
IVC	*in vitro* culture
M	Morula, cM= calf morula, CM= cow morula
mM	milliMolar
MOET	Multiple Ovulation and Embryo Transfer

บทที่ 1

บทนำ

การปฏิสนธินอกร่างกาย (*in vitro* fertilization) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้มีการศึกษามากว่า 30 ปี โดยประสบความสำเร็จครั้งแรกในกระต่าย (Chang, 1959) และต่อมาในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น ๆ อาทิเช่น ในแกะ (Moor and Trounson, 1977) ในสุกร (Mattioli *et al.*, 1989) และในโค (Brackett *et al.*, 1982) เป็นต้น ในโคนั้นวิธีดังกล่าวมีประโยชน์อย่างมากเพื่อผลิตตัวอ่อนเพื่อใช้ในงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์และในอุตสาหกรรมการผลิตโค วิธีดังกล่าวมักกระทำโดยการเก็บเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (โอโอไซต์) จากรังไข่ของแม่โคจากโรงฆ่าสัตว์ (Mermillod *et al.*, 1992) และมาผ่านกระบวนการทางห้องปฏิบัติการเพื่อให้ได้ตัวอ่อนขึ้นมา การเก็บรังไข่จากแม่โคจากโรงฆ่าสัตว์นี้มักมีข้อโต้แย้งในด้านที่มาของพันธุกรรมที่ไม่รู้แน่ชัดและความสมบูรณ์ของแม่พันธุ์ ซึ่งส่วนมากเป็นแม่พันธุ์ที่ถูกคัดออกจากฝูงด้วยสาเหตุต่าง ๆ เช่น ผสมไม่ติด มีการติดเชื้อในท่อสืบพันธุ์ อายุมาก เป็นต้น ดังนั้นจึงได้มีผู้ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตตัวอ่อนจากลูกสัตว์ก่อนวัยเจริญพันธุ์ (prepubertal หรือ juvenile period, Armstrong *et al.*, 1991; Irvine *et al.*, 1993) โดยทำการกระตุ้นรังไข่ของลูกโคด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน ซึ่งมีฤทธิ์ในการเพิ่มการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ (folliculogenesis) หลังจากนั้นก็ทำการเก็บโอโอไซต์ แล้วนำโอโอไซต์ที่ได้ซึ่งอยู่ในระยะที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ (immature stage) เลี้ยงให้เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธินอกร่างกายในหลอดทดลอง (*in vitro* maturation) และนำมาปฏิสนธิกับตัวอสุจิในหลอดทดลอง (*in vitro* fertilization) หลังจากนั้นนำตัวอ่อนมาเลี้ยงในหลอดทดลอง (*in vitro* culture) จนถึงระยะที่พร้อมจะนำไปย้ายฝากในแม่โคตัวรับด้วยวิธีการย้ายฝาก (embryo transfer) และเกิดลูกโคขึ้นมา วิธีดังกล่าวเรียกรวม ๆ กันว่า "JIVET" ซึ่งมาจากคำว่า "**J**uvenile **I**n **V**itro **F**ertilization and **E**mbryo **T**ransfer" ขั้นตอนของการผลิตลูกโคด้วยวิธี JIVET แสดงในรูปที่ 1.1

วิธี JIVET นี้เป็นประโยชน์อย่างมากในด้านเศรษฐกิจและด้านงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ คือการไปช่วยในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ให้เร็วและมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยเฉพาะไปลดช่วงห่างของชีวิต (generation Interval) โดยผลิตลูกโคจากเซลล์สืบพันธุ์ของลูกโคได้โดยไม่ต้องรอให้ลูกโคตัวนั้น ๆ โตขึ้นเป็นโคสาวแล้วจึงผสม อุ้มท้องและเกิดลูกขึ้น ดังจะเห็นได้จากสมการที่แสดงนี้

$$\text{อัตราการเพิ่มพันธุกรรมต่อปี} = \frac{\text{ความเข้มของการคัดเลือก} \times \text{ความแม่นยำของการคัดเลือก} \times \text{ความผันแปรของพันธุกรรม}}{\text{ช่วงห่างของชีวิต}}$$

จะเห็นได้ว่าอัตราของการเพิ่มทางพันธุกรรมต่อปี (Annual Genetic Gain) นั้น จะถูกกำหนดด้วยปัจจัยสี่ปัจจัย คือ

ก) ความเข้มของการคัดเลือก (Intensity of Selection)

ข) ความแม่นยำของการคัดเลือก (Accuracy of Selection)

ค) ความผันแปรของพันธุกรรม (Genetic Variance)

ง) ช่วงห่างระหว่างรุ่น (Generation Interval)

ปัจจัยสามปัจจัยแรกจะเกี่ยวข้องกับการคัดเลือกพันธุ์ การควบคุมของยีนส์ในตัวสัตว์นั้น ๆ และอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม ซึ่งต้องใช้วิธีการปรับปรุงพันธุกรรมในเชิงปริมาณ (quantitative genetic improvement) เข้ามาจัดการ อย่างไรก็ตามการปรับปรุงพันธุ์โคเนื้อและโคนมนั้นก็มีอุปสรรคอยู่ไม่น้อย เนื่องจากประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ต่ำ (low reproductive effeciency) ให้ลูกต่อตัวเพียงตัวเดียว และยังมีระยะการให้ลูกแต่ละครั้งยาว (large generation interval) หนทางหนึ่งในการเร่งการปรับปรุงพันธุ์สามารถทำได้โดยการลดช่วงห่างระหว่างรุ่น โดยทั่วไปอยู่ประมาณ 5 ปี ตามธรรมชาติค่านี้จะเปลี่ยนแปลงได้น้อยมากเนื่องจากถูกกำหนดด้วยตัวแปรทางสรีรวิทยา อาทิเช่น อายุของวัยเจริญพันธุ์ (ประมาณ 1.0-1.5 ปี) ระยะเวลาในการอุ้มท้อง (280 วัน โดยเฉลี่ย) อัตราของการผสมติด ฯลฯ การนำเอาเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อน (embryo transfer) หรือเทคโนโลยีสมัยใหม่อื่น ๆ เช่น การผลิตลูกแฝดหลายตัว (cloning) การผลิตสัตว์ข้ามสายพันธุ์ (transgenesis) เป็นต้น เข้ามาเท่านั้นที่จะลดช่วงห่างของชีวิต ได้มีการคาดคะเนว่าหากใช้วิธีการ MOET (Multiple Ovulation and Embryo Transfer) จะช่วยในการปรับปรุงพันธุ์โคเนื้อได้เร็วขึ้นปีละประมาณ 1.4-2.6% ต่อปี (Randel and Robertson, 1950; Smith, 1988) แต่อัตราการปรับปรุงทางพันธุกรรมนี้จะเพิ่มขึ้นเป็น 12% หากทดแทนด้วยการใช้ JIVET และยิ่งกว่านั้นหากใช้ลูกโคอายุ เพียง 1-5 เดือนเพื่อใช้ในการผลิตตัวอ่อนอัตราจะเพิ่มเป็น 22% เมื่อเปรียบเทียบกับการปรับปรุงตามแบบดั้งเดิม (conventional progeny testing programs) (Duby *et al.*, 1996) จากตารางที่ 1.1 แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าหากใช้เทคโนโลยี JIVET จะช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ได้อย่างเด่นชัดขึ้น จนถึงปัจจุบันได้มีการศึกษาการนำเอาโอโอไซต์จากตัวฟีตัสขณะอยู่ในครรภ์มาเพื่อทำกระบวนการดังแสดงในรูปที่ 1.1 เรียกว่า "FIVET, Fetal In Vitro Fertilization and Embryo Transfer" ซึ่งยังไม่ประสบความสำเร็จ (Betteridge *et al.*, 1989) วิธีนี้จะช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ได้ รวดเร็วยิ่งขึ้นกว่าการปรับปรุงพันธุ์ตามปกติ

ตารางที่ 1.1 อัตราการเปลี่ยนแปลงต่อปีในทางทฤษฎีของปริมาณน้ำนมที่จะได้รับจากการใช้ระบบการผสมพันธุ์ในรูปต่าง ๆ (Betteridge *et al*, 1989)

ระบบการผสมพันธุ์ (Breeding system)	อัตราการตอบสนองต่อปี (Annual response*)
การทดสอบลูกหลาน (Conventional progeny test)	0.081
การทดสอบลูกหลานอย่างมีประสิทธิภาพ (Efficient progeny test)	0.117
การกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ในแม่โคและการย้ายฝากตัวอ่อน Multiple ovulation of adults and embryo transfer (MOET)	0.117
การกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ในลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์และการย้ายฝากตัวอ่อน (Multiple ovulation of juveniles and embryo transfer (JIVET)	0.174
การปฏิสนธินอกร่างกายจากฟิตัสอายุ 90 วันโดยการใช้น้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ที่ผ่านการทดสอบลูกหลานแล้ว (*In vitro* fertilization of Day-90 fetal oocytes by selected progeny tested sires)	0.127

*Annual response = $\frac{\sum irh}{\sum L}$ และค่า heritability (h^2) = 0.25

รูปที่ 1.1 ขั้นตอนของการผลิตลูกโคด้วยวิธี JIVET

ในการศึกษา JIVET นั้น ต้องอาศัยความรู้พื้นฐานด้านสรีรวิทยาของรังไข่ของลูกโค ก่อนวัยเจริญพันธุ์ ในรังไข่ของฟีตัสของลูกโคขณะอยู่ในครรภ์ประมาณ 220-240 วัน ก็สามารถตรวจพบฟอลลิเคิลที่มีของเหลวอยู่ภายใน (vesicular follicles) แล้ว และหลังคลอดจะพบเซลล์สืบพันธุ์ชนิด ไพรมอเดียล เจอร์มเซลล์ (primordial germ cells) ซึ่งอยู่ในไพรมอเดียลฟอลลิเคิล (primordial follicles) โดยพบประมาณ 75,000-300,000 ฟอลลิเคิล (Erickson, 1966) เซลล์ดังกล่าวเป็นเซลล์ตั้งต้น (stem cells) ของเซลล์ไข่ (oocyte) ต่อมาเมื่อลูกโคอายุได้ 5 วัน สามารถพบฟอลลิเคิลที่มีขนาด 5 มม. น้ำหนักของรังไข่เพิ่มขึ้นจาก 0.5 กรัม ที่อายุ 2 สัปดาห์ และเพิ่มเป็น 4 กรัม ที่อายุ 4 เดือน และ 10 กรัมเมื่ออายุ 12 เดือน เมื่อลูกโคมีอายุ 6 เดือน จำนวนเซลล์จะยังมีจำนวนเท่ากับ 206,000±52,000 เซลล์ และหลังจากนั้นปริมาณจะลดลงอย่างรวดเร็ว (71-100%) จนกระทั่งอายุ 4 ปีขึ้นไปจะเสื่อม (atresia) เป็นส่วนใหญ่ ในส่วนของฟอลลิเคิลชนิดที่กำลังเจริญ (growing follicles) จะมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ระหว่างอายุ 50-80 วันหลังคลอด เท่ากับ 93±18 ฟอลลิเคิล ถึง 204±41 ฟอลลิเคิล และค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนถึงอายุ 120 วัน หลังจากนั้นปริมาณจะค่อนข้างคงที่จนถึงช่วงอายุ 3 ปี ในส่วนของ antral follicles นั้นพบตั้งแต่ช่วงแรกเกิด และเมื่ออายุประมาณ 6 เดือนมี 63 ใบ และเมื่ออายุ 8 เดือน จะลดลงเล็กน้อยเท่ากับ 22 ± 5 ใบ หรือเมื่อเข้าใกล้วัยเจริญพันธุ์ (puberty) หลังจากนั้นจะคงที่จนกระทั่งอายุ 10-14 ปี (Erickson, 1966)

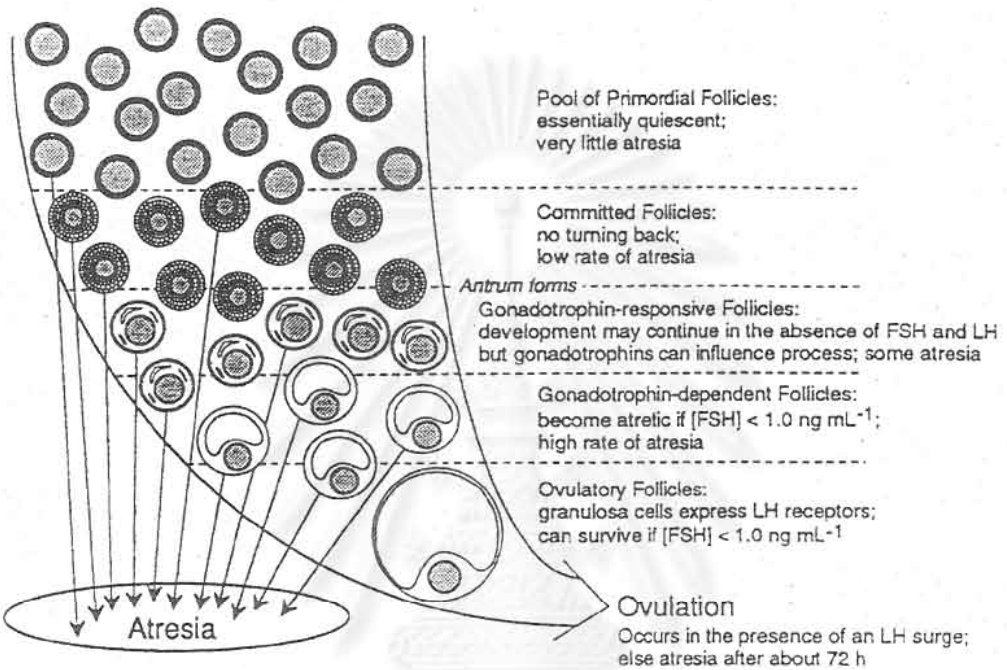
ได้มีการศึกษาถึงการเจริญของฟอลลิเคิลในลูกโค ก่อนวัยเจริญพันธุ์ระหว่างอายุ 2-36 สัปดาห์ (Evans *et al.*,1994) โดยใช้เครื่องอัลตราซาวด์ตรวจผ่านทางทวารหนัก (Transrectal ultrasonography) พบว่าลูกโคอายุตั้งแต่ 2 เดือน จะมีการเจริญของฟอลลิเคิลที่มีลักษณะเป็นคลื่น (wave-like manner) เช่นเดียวกันกับลักษณะการเจริญของฟอลลิเคิลในโคสาวหรือแม่โค โดยมีการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มประชากรของฟอลลิเคิลขนาดต่าง ๆ ทั้งขนาดเล็ก (3-5 มม.) ขนาดกลาง (6-8 มม.) และขนาดใหญ่ (≥9 มม. ขึ้นไป) การกำหนดช่วงห่างของคลื่น (interwave interval) จะดูจากการปรากฏตัวของฟอลลิเคิลขนาดใหญ่กว่าฟอลลิเคิลอื่น ๆ ที่เรียกว่า "dominant follicle" ซึ่งมีเพียงฟอลลิเคิลเดียวในช่วงนั้น พบว่าบทบาทของฟอลลิเคิลชนิด dominant จะยับยั้งการเจริญของฟอลลิเคิลอื่นที่มีขนาดเล็กกว่า (subordinate follicles) การเปลี่ยนแปลงของประชากรของฟอลลิเคิลขนาดต่าง ๆ นั้น ขึ้นกับระดับของฮอร์โมน โกนาโดโทรปินทั้งฮอร์โมน เอฟ เอส เอช และฮอร์โมน แอล เอช ซึ่งพบว่าสูงขึ้นก่อนเริ่มมี การเจริญของฟอลลิเคิลชนิด dominant ฟอลลิเคิลขนาดเล็กและขนาดกลางจะมีจำนวนเพิ่มขึ้นเมื่อลูกโคมีอายุประมาณ 2-14 สัปดาห์ หลังจากนั้นมีจำนวนคงที่ สำหรับฟอลลิเคิลชนิด dominant มีเพิ่มขึ้นเมื่อลูกโคมีอายุประมาณ 2-34 สัปดาห์ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวสอดคล้องกับระดับของฮอร์โมน estradiol 17-β ซึ่งผันแปรและเกี่ยวพันกับปริมาณของฟอลลิเคิลในลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์ (Testart *et al.*, 1977) ดังนั้นการควบคุมการสร้างหรือการเปลี่ยนแปลงของฟอลลิเคิล (folliculogenesis) จึงขึ้นกับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โกนาโดโทรปินและขึ้นกับขนาดของฟอลลิเคิล ภาพของการควบคุมดังกล่าวแสดงในรูปที่ 1.2 โดย Professor Jock Findley (1994) อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงของฟอลลิเคิลในลูกโค แตกต่างกับในแม่โคหรือโคสาวโดยจะมีช่วงระหว่างคลื่นสั้นกว่า และฟอลลิเคิลมีขนาดเล็กกว่า รวมทั้งพบว่าในแต่ละช่วงคลื่นไม่มีการตกไข่หรือการสร้างคอร์ปัส ลูเทียมเกิดขึ้นในรังไข่ของลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์ (Anderson *et al.*, 1986)ลูกโคจะเข้าสู่ระยะวัยเจริญพันธุ์และมีการตกไข่ครั้งแรกเมื่ออายุประมาณ 1 ปี (52.8±1.6 สัปดาห์) (Evans *et al.*, 1994) มีความแปรปรวนของการเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ขึ้นอยู่กับพันธุกรรมและสภาพแวดล้อม โดยในแต่ละรอบของวงจรการเป็นสัด (estrous cycle) ฟอลลิเคิลจำนวนหนึ่งจะถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน ทำให้มีการเจริญของฟอลลิเคิลระยะแรกเป็น growing follicle จนกระทั่งเป็นฟอลลิเคิลที่มีขนาดใหญ่ (graaffian follicle) และพร้อมจะมีการตกไข่เกิดขึ้น การเจริญของฟอลลิเคิลจะมีลักษณะเป็นคลื่นตลอดวงจรการเป็นสัด อาจพบมี 2, 3 หรือ 4 คลื่นแล้วแต่โคแต่ละตัว โดยระดับของฮอร์โมน เอฟ เอส เอช จะสูงขึ้นก่อนการเกิดคลื่นครั้งต่อไปประมาณ 2 วัน (Adams *et al.*, 1992)

จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าในรังไข่ของลูกสัตว์ก่อนวัยเจริญพันธุ์จะประกอบด้วยฟอลลิเคิลชนิดต่าง ๆ เป็นจำนวนมาก และจำนวนในแต่ละชนิดมีแนวโน้มลดลงเมื่อใกล้อายุที่จะถึงวัยเจริญพันธุ์ ทั้งนี้เนื่องมาจากส่วนหนึ่งเกิดสภาพการเสื่อมที่เกี่ยวข้องกับระดับฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน ซึ่งยังมีไม่เพียงพอในช่วงก่อนวัยเจริญพันธุ์ จึงมีแนวคิดในการใช้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินฉีดกระตุ้นเสริมเข้าไปเพื่อให้ฟอลลิเคิลขนาดเล็กเจริญมากขึ้น และเพื่อป้องกันการฝ่อของฟอลลิเคิล ฟอลลิเคิลดังกล่าวก็จะเป็นแหล่งผลิตโอโอไซต์ด้วย แล้วนำโอโอไซต์เหล่านี้จะผ่าน IVM-IVF-IVC ดังได้กล่าวในข้างต้น

จากการศึกษาของที่ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้ทำการศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการกระตุ้นรังไข่ของลูกกระบือก่อนวัยเจริญพันธุ์ ตั้งแต่ปี พศ. 2536 (มงคล และคณะ, 2537) ด้วยการสนับสนุนของทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พบว่ามีความเป็นไปได้ในการกระตุ้นรังไข่ และได้มีการพัฒนาวิธีการเก็บโอโอไซต์และนำมาเลี้ยงจนพร้อมปฏิสนธิในตู้อบ งานวิจัยดังกล่าวได้เสนอในการประชุมวิชาการประจำปีของสมาคม International Embryo Transfer Society 1996 (IETS) ณ ประเทศสหรัฐอเมริกา (Techakumphu *et al.*, 1996) และเวชสารสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Techakumphu *et al.*, 1995) งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาต่อเนื่องจากงานวิจัยข้างต้นโดยวัตถุประสงค์อยู่สองประการ คือ ประการแรกเพื่อเป็นการเปรียบเทียบข้อมูลที่ศึกษาในลูกโคกับข้อมูลในลูกกระบือปลักที่มีอยู่แล้ว ประการที่สองเพื่อเป็นพื้นฐานการศึกษาการปฏิสนธินอกร่างกายในขั้นต่อไปในการปรับใช้ในลูกกระบือปลักซึ่งยังไม่มีการศึกษาจนถึงปัจจุบัน



รูปที่ 1.2 ภาพจำลองแสดงการเจริญของฟอลลิเคิลในแกะ (Findley, 1994)

(เริ่มต้นจาก ไพรเมอเดียล เจอร์มเซลล์, ต้นตอเซลล์ที่มีเซลล์กรานูโรซ่าเพียงชั้นเดียว, จำนวนหนึ่ง ฟอลลิเคิลเหล่านี้จะเจริญขึ้นเป็นฟอลลิเคิลที่มีเซลล์กรานูโลซ่าเพิ่มชั้นขึ้น ขณะเดียวกันโอโอไซต์ที่อยู่ภายในก็เจริญขึ้นด้วย (committed follicles) หลังจากนั้นจะมีการสร้างช่องว่าง (antrum) ขึ้น จะเริ่มตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (gonadotrophin-responsive follicles) จะมีฟอลลิเคิลบางส่วนที่เกิดการเสื่อมสลาย (atresia) การเจริญของฟอลลิเคิลดังกล่าวขึ้นระดับของฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ซึ่งต้องมากกว่า 1.0 ng/ml ดังนั้นหากเพิ่มระดับฮอร์โมน เอฟ เอส เอช เข้าไปเช่นในการทดลองในลูกโคนี้หรือในการเพิ่มการตกไข่ (superovulation) จะกระตุ้นฟอลลิเคิลได้ และป้องกันการเกิดการเสื่อมสลายของฟอลลิเคิลบางส่วนได้ ในวงจรการเป็นสัดปกติจะมีเพียงหนึ่งฟอลลิเคิลที่เจริญเต็มที่จนกลายเป็น ovulatory follicle ซึ่งจะตกไข่ขึ้นมากภายใต้การกระตุ้นของฮอร์โมน แอล เอช)

การศึกษาได้แบ่งหัวข้อในการศึกษาเป็น 5 หัวข้อ ดังนี้

1. ศึกษาการกระตุ้นรังไข่และการกระตุ้นซ้ำในลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์ (บทที่ 2)
2. ศึกษาการเจริญพร้อมปฏิสนธิและการเจริญของตัวอ่อนหลังปฏิสนธินอกร่างกาย (บทที่ 3)
   2.1) การเจริญพร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลอง
   2.2) การเจริญของตัวอ่อนหลังเลี้ยงในหลอดทดลอง
   2.3) การเจริญของตัวอ่อนหลังเลี้ยงชั่วคราวในท่อนำไข่แกะและกระต่าย
   2.4) ศึกษาการแช่แข็งตัวอ่อนจากการปฏิสนธิของโอโอไซต์ลูกโค
3. ศึกษาการพัฒนาการเก็บตัวอ่อนด้วยวิธี OVUM PICK UP (บทที่ 4)
4. ศึกษาการกระตุ้นรังไข่ด้วยฟอลลิคูล่าร์ สติมูเรตติ้ง ฮอร์โมน และการเก็บโอโอไซต์ในลูกโคที่มีพันธุกรรมดี (บทที่ 5)
5. บทสรุปและข้อเสนอแนะ (บทที่ 6)

เอกสารอ้างอิง

มงคล เตชะกำพุ ชัยณรงค์ โลหชิต วิชัย ทันตศุภารักษ์ วันเพ็ญ ศรีอนันต์ จินดา สิงห์ลอ และ จินตนา อินทรมงคล 2536 การใช้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินเพื่อกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ของลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์ รายงานทุนวิจัยรัชดาภิเษก-สมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 23 หน้า

Adams, G.P., Matteri, R.L., Kastelic, J.P., Ko, J.C.H. and Ginther, O.J. 1992. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. J. Reprod. Fert. 94:177-188.

Anderson, W.J., Forrest, D.W., Goff, B.A., Shaikh, A.A. and Harms, P.G. 1986. Ontogeny of ovarian inhibition of pulsatile hormone secretion in postnatal Holstein heifers. Dom. Anim. Endo. 3:107-116.

Armstrong, D.T., Holm, P., Irvine, B., Peterson, B.A., Stubbing, R.b., Mclean, D., Stevens, G. and Seamark, R.F. 1991. Laparoscopic aspiration and *in vitro* maturation of oocytes from calves. Theriogenology. 35: 182.(Abstr)

Betteridge, K.J. Smith, C., Stubbing, R.B., Xu, K.P. and King, W.A. 1989. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes *in vitro*. J. Reprod. Fert. Suppl. 38:87-98.

Brackett, B.G., Bousquet, D., Boice, M.L., Donawick, W.J., Evans, J.F. and Dressel, M.A. 1982. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. J. Biol. Reprod. 27:147-158.

Chang, M.C. 1959. Fertilization of rabbit ova *in vitro*. Nature. 184. 466-467.

Duby, R.T., Damiani, P., Looney, C.R., Fissore, R.A. and Robl, J. M. 1996. Prepuberal calves as oocyte donors: Promises and Problems. Theriogenology. 45(1):121-130.

Evans, A.C.O., Adams, G.P. and Rawling, N.C 1994. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2-36 weeks of age. J. Reprod. Fert. 102:463-470.

Erickson, B.H. 1966. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. J. Anim.Sci. 24(3): 800.

Findley, J.K. 1994. Peripheral and local regulators of folliculogenesis. Reprod. Fert. Dev. 6:127-139.

Irvine ,B., Armstrong ,D.T., Earl, C.R., McLean ,D.and Seamark ,R.F. 1993. Follicle development and oocyte recovery from calves with repeated gonadotropin stimulation and follicular aspiration. Theriogenology. 39: 237. (Abstr)

Mattioli, M., Bacci, M.L., Galeati, G. and Seren, E. 1989. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized *in vitro* . Theriogenology. 31:1201-1207.

Mermillod, P., Wils, C., Massip, A. and Dessy, F. 1992. Collection of oocytes and production of blastocysts *in vitro* from individual, slaughtered cows. J. Reprod. Fert. 96(2):717-723.

Moor, R.M. and Trounson, A.O. 1977. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *in vitro* and their subsequent developmental capacity. J. Reprod. Fert. 49:101-109.

Randel, J.M. and Robertson, A. 1950. Estimation of genetics gain in milk yield by selection in a closed herd of dairy cattle. Genetics 50:1-9.

Smith, C. 1988. Application of embryo transfer in animal breeding. Theriogenology. 29:203-212.

Techakumphu, M., Lohachit, C., Tantasuparuk, W., Srianan, W., Singlor, J. and Intaramongkol, J. 1995. The stimulation of follicular growth with exogenous gonadotrophin in pre-pubertal swamp buffalo calves. Thai J. Vet. Med. 25(1) : 49-62.

Techakumphu, M. Lohachit, C., Tantasuparak, W., Srianan, W., Intaramongkol, C., Intaramongkol, S. and Chantaraprateep, P. 1996. Ovarian response and oocyte recovery in prepubertal swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) calves after FSH or PMSG treatment. Theriogenology. 45(1):244. (Abstr.)

Testart, J., Kann, G., Saumande, J. and Thibier, M. 1977. Oestradiol -17β, progesterone, FSH and LH in prepubertal calves induced to superovulate. J. Reprod. Fert. 51:329-336.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

การกระตุ้นรังไข่และการกระตุ้นซ้ำในลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์

บทนำ

การศึกษาการกระตุ้นรังไข่ในลูกโคก่อนถึงวัยเจริญพันธุ์ (อายุน้อยกว่า 1 ปี) ได้มีรายงานในปี คศ. 1953 โดย Marden ได้พบว่าลูกโคเพียงอายุ 1 สัปดาห์ ก็สามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน ต่อมา Jainudeen และคณะ (1966) ได้ทดลองฉีดฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน พี เอ็ม เอส จี (Pregnant Mare Serum Gonodotropin, PMSG) ขนาด 2,000 ไอยู ในลูกโคอายุ 4-24 สัปดาห์ และตามด้วยฮอร์โมน เอส ซี จี พบว่ามากกว่า 80 เปอร์เซนต์ของลูกโคทดลองตอบสนองต่อการกระตุ้นและมีการตกไข่ตั้งแต่ 1-50 ใบ Onuma และคณะ (1969) ได้ใช้ลูกโคอายุ 55-64 สัปดาห์ โดยใช้ฮอร์โมน เอฟ เอส เอช (Follicle Stimulating Hormone, FSH) หรือ พี เอ็ม เอส จี พบว่าสามารถกระตุ้นรังไข่ได้เช่นกัน ฮอร์โมนที่ใช้ในการกระตุ้นการสร้างฟอลลิเคิลของรังไข่ (folliculogenesis) คือ ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินชนิด เอฟ เอส เอช หรือ พี เอ็ม เอส จี การฉีดฮอร์โมนโกนาโดโทรปินนี้จะลดหรือป้องกันการฝ่อ (atresia) ของฟอลลิเคิลขนาดเล็ก และเพิ่มอัตราการเจริญฟอลลิเคิลชนิด primordial และ growing (Driancourt, 1991) และในขณะเดียวกันจะช่วยให้โอโอไซต์เจริญขึ้นและเกิดการเจริญพร้อมปฏิสนธิ (maturation) ได้

การกระตุ้นรังไข่ซ้ำด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปินเพื่อเก็บตัวอ่อนและนำไปย้ายฝากมักใช้ในแม่โคที่อยู่ในโปรแกรมการย้ายฝากตัวอ่อน ซึ่งจะช่วยในการกระจายพันธุ์จากแม่โคตัวนั้นได้เป็นอย่างดี ส่วนการกระตุ้นรังไข่ซ้ำในลูกโคก็เช่นเดียวกันจะเป็นประโยชน์ต่อการผลิตโอโอไซต์เพื่อใช้ในการปฏิสนธินอกร่างกาย ในการศึกษาเกี่ยวกับการกระตุ้นรังไข่ในลูกโคโดยทั่วไปมักใช้เพียงครั้งเดียวโดยเก็บจากรังไข่หลังส่งลูกโคเข้าฆ่าซึ่งจะเป็นการใช้เพียงครั้งเดียวและมักใช้เพียงงานวิจัยเท่านั้น ดังนั้นความพยายามในการกระตุ้นซ้ำและเก็บโอโอไซต์จึงเป็นวิธีที่จะสามารถใช้ลูกโคอย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะหากเป็นลูกโคที่มีพันธุกรรมสูงจะช่วยให้มีความเป็นไปได้ในการผลิตลูกโคจากวิธีการดังกล่าว Onuma และคณะ (1969) ได้ศึกษาในลูกโคอายุ 2-3 เดือน ด้วยการฉีดฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ขนาด 50 มก. วันละ 10 มก. เป็นเวลา 5 วัน และกระตุ้นซ้ำ 2 ครั้งห่างกันครั้งละ 2 เดือน พบว่ารังไข่สามารถตอบสนองการกระตุ้นซ้ำได้ แต่อย่างไรก็ตามจำนวนของการตอบสนองลดลงหลังกระตุ้นซ้ำ (Armstrong *et al.*, 1992)

จุดประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการกระตุ้นรังไข่ และเก็บโอโอไซต์และการกระตุ้นซ้ำในลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

ลูกโคพันธุ์พื้นเมืองเพศเมีย อายุ 4-6 เดือนน้ำหนักประมาณ 50-70 กก. จำนวนทั้งหมด 10 ตัว (หมายเลข B1 ถึง B10) (รูปที่ 2.1) โดยนำมาเลี้ยงไว้ที่ศูนย์ฝึกนิสิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดนครปฐม และทำการตรวจสุขภาพพร้อมทั้งถ่ายพยาธิก่อนทำการทดลองประมาณ 1 เดือน ลูกโคได้รับอาหารข้นวันละ 2.0 กก. หญ้าสด และน้ำอย่างเต็มที่ หลังจากนั้นทำการสุ่มแบ่งลูกโคออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่ม A และกลุ่ม B โดยแบ่งกลุ่มละ 5 ตัว กลุ่ม A เป็นลูกโคที่ได้รับการฉีดฮอร์โมน FSH+hCG กลุ่ม B เป็นลูกโคที่ได้รับการฉีดฮอร์โมน FSH เพียงอย่างเดียว

ฮอร์โมนที่ใช้ในการทดลองและโปรแกรมการกระตุ้น

1. ฮอร์โมน เอฟ เอส เอช (FSH*, Follicle Stimulating Hormones) ขนาด 192 มก. แบ่งฉีดเข้ากล้ามเนื้อวันละ 2 ครั้ง (เช้าและเย็น) เช้าเวลา 7.00 น. และเย็นเวลา 19.00 น. ห่างกัน 12 ชม. ติดต่อกันเป็นเวลา 4 วัน โดยฉีดแบบลดปริมาณ โดยมีรายละเอียด คือ 32/32,24/24,24/24 และ 16/16 มก. ตามลำดับ สำหรับวันที่ 1, 2, 3 และ 4 (ตารางที่ 2.1) เริ่มฉีดเข็มแรกหลังฝังฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 7 วัน

2. ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Progesterone**) ฝังใต้หนังที่ใบหูด้านนอกของลูกโคก่อนเริ่มกระตุ้นนาน 7 วัน และดึงออกหลังจากฉีดฮอร์โมน เอฟ เอส เอช เข็มที่ 7 ประมาณ 5 ชม.

3. ฮอร์โมน เอช ซี จี (Human Chorionic Gonadotropin***) ขนาด 500 ไอยู ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ 24 ชม. ก่อนการผ่าตัดเก็บโอโอไซต์เฉพาะในลูกโคกลุ่ม A แต่ไม่ได้ฉีดในลูกโคกลุ่ม B และเมื่อเริ่มโปรแกรมการกระตุ้นฮอร์โมนครั้งที่ 2, 3 และ 4 มีการสลับกลุ่มการฉีดฮอร์โมน ดังตารางที่ 2.2

4. การกระตุ้นซ้ำ ทำการฉีดกระตุ้นฮอร์โมนเพื่อผ่าตัดเก็บโอโอไซต์ 4 ครั้งต่อลูกโคหนึ่งตัว โดยมีระยะห่างครั้งละ 6-8 สัปดาห์ โดยทำการสลับกลุ่มทดลองชนิดแผนการทดลองแบบสลับเมื่อมีสองกลุ่มทดลอง (Change over design) ดังรายละเอียดในตารางที่ 2.2

---

*Follotropin® -V, Vetepharm, Australia

**Crestar®, Intervet, Holland

***Chorulon®, Intervet, Holland

ตารางที่ 2.1 โปรแกรมการฉีดกระตุ้นลูกโคด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน
(ดัดแปลงจากมงคล และคณะ, 2537)

วันที่	โปรแกรมฮอร์โมน
0	ฝังฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรนใต้ผิวหนัง
7	ฉีด FSH 32/32 มก. เช้า/เย็น
8	ฉีด FSH 24/24 มก. เช้า/เย็น
9	ฉีด FSH 24/24 มก. เช้า/เย็น
10	ฉีด FSH 16/16 มก. เช้า/เย็น และถอนฮอร์โมนฝังใบหูออกเวลา 12.00 น.
12	ฉีดฮอร์โมน เอช ซี จี 500 ไอยู เวลา 10.00 น. เฉพาะลูกโคที่อยู่ในกลุ่มทดลอง A
13	ผ่าตัดเก็บโอโอไซต์ เวลา 10.00 น. (ประมาณ 60 ชม.หลังฉีดฮอร์โมน เอฟ เอส เอช เข็มสุดท้าย)

ตารางที่ 2.2 การเปลี่ยนกลุ่มการทดลองในการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นซ้ำ

	กลุ่มทดลอง A (FSH+hCG)	กลุ่มทดลอง B (FSH)
	หมายเลขของลูกโค	
การกระตุ้นฮอร์โมนครั้งที่ 1	B1, B2, B3, B4, B5	B6, B7, B8, B9, B10
การกระตุ้นฮอร์โมนครั้งที่ 2	B6, B7, B8, B9, B10	B1, B2, B3, B4, B5
การกระตุ้นฮอร์โมนครั้งที่ 3	B1, B2, B3, B4, B5	B6, B7, B8, B9, B10
การกระตุ้นฮอร์โมนครั้งที่ 4	B6, B7, B8, B9, B10	B1, B2, B3, B4, B5

หมายเหตุ: ระยะห่างของการกระตุ้นแต่ละครั้งประมาณ 6-8 สัปดาห์

การเก็บโอโอไซต์

เก็บโอโอไซต์โดยการผ่าตัดเปิดช่องท้อง (Caudal midline laparotomy) ดังรายงานของมงคล และคณะ (2537) มีรายละเอียดของวิธีการดังนี้

1. อดอาหารและน้ำลูกโคก่อนที่จะทำการผ่าตัด 24 ชม.
2. ฉีดยานำสลบด้วย Xylazine hydrochloride* ขนาด 0.2 มก./กก เข้ากล้ามเนื้อและ

* Rompun® : Bayer, Vetchem, Korea

อีก 15 นาทีต่อมาฉีดยาสลบ Thiopental sodium* ขนาด 5 มก./กก. เข้าเส้นเลือดดำใหญ่ที่คอ (jugular vein) เมื่อเริ่มสลบแล้วสอดท่อ Endotracheal และต่อสายน้ำเกลือความเข้มข้น 0.9% เข้าเส้นเลือดดำที่ด้านนอกของใบหู (ear vein) ด้วย IV-catheter** เบอร์ 21 เพื่อสะดวกในการเติมยาสลบ Thiopental Sodium ความเข้มข้น 0.1% ปริมาณครั้งละเล็กน้อย เมื่อสัตว์เริ่มรู้สึกตัวในขณะทำการผ่าตัด จากนั้นนำลูกโคขึ้นโต๊ะผ่าตัดชนิดแฮนโนเวอร์ จัดท่าให้นอนหงายโดยให้ส่วนหัวลูกโคต่ำกว่าส่วนท้ายเล็กน้อย ทำการโกนขนเพื่อทำความสะอาดและฆ่าเชื้อบริเวณผนังท้องที่จะผ่าตัด

รูปที่ 2.1 ลูกโคพันธุ์พื้นเมืองไทยเพศเมียที่ใช้ในการทดลอง

---

* Thiopental sodium®:Research of antibiotics and biotransformation ,Czech Republic

**Insyte®: Deseret Medical , Utah , U.S.A.

3. เปิดผ่าช่องท้องด้วยวิธี caudal midline laparotomy ระหว่างเต้านมคู่หน้าและคู่หลัง ยาวประมาณ 15 ซม. แล้วดึงจับคอมดลูกมาบริเวณปากแผลด้วยความระมัดระวัง ตรวจการตอบสนองของรังไข่ โดยการนับจำนวนฟอลลิเคิล และคอร์ปัส ฮีโมเรจีกัม รวมทั้งวัดขนาดของรังไข่และฟอลลิเคิลขนาดต่างๆทั้ง 2 ข้าง จากนั้นเจาะฟอลลิเคิลด้วยเข็มเบอร์ 19 ที่ต่อกับไซริงค์ขนาด 10 มล. ใส่ของเหลวที่ดูดได้ในหลอดทดลองที่บรรจุด้วย 1 มล. ของน้ำยา TCM 199* 2.5M Hepes** ขณะผ่าตัดป้องกันไม่ให้มดลูก ท่อนำไข่และรังไข่แห้งด้วยการราดสารละลายเฮปาริน*** อุ่นที่ 37°ซ ในขนาดความเข้มข้น 10 ไอยู/มล. ตลอดเวลา นอกจากนี้ยังเพื่อป้องกันการยึดติดของอวัยวะสืบพันธุ์กับผนังช่องท้องด้วย

4. เย็บปิดช่องท้อง ฉีดยาปฏิชีวนะต่อเนื่องอีก 3 วัน และทำการตัดไหมเมื่อครบ 7 วันหลังผ่าตัด

5. นำของเหลวที่ได้จากการเจาะฟอลลิเคิลไปตรวจหาโอโอไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอที่กำลังขยาย 10X และคัดแบ่งโอโอไซต์ที่ได้ออกเป็น 2 ชนิดโดยดูจากจำนวนชั้นของเซลล์คิวมูลัสที่ล้อมรอบดังนี้

1. โอโอไซต์ที่เจริญไม่พร้อมปฏิสนธิ (immature oocyte) เป็นโอโอไซต์ที่ไม่สามารถนำไปปฏิสนธิได้ทันที ซึ่งแบ่งออกเป็น

1.1 โอโอไซต์ที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบ (denude oocyte)

1.2 โอโอไซต์ที่ล้อมรอบด้วยเซลล์คิวมูลัสเพียงบางส่วน (partial cumulus oocyte)

1.3 โอโอไซต์ที่ล้อมรอบด้วยเซลล์คิวมูลัสหลายชั้น (compact cumulus oocyte)

2. โอโอไซต์ที่เจริญพร้อมปฏิสนธิ (matured oocytes) จะล้อมรอบด้วยเซลล์คิวมูลัสที่แผ่ขยาย (expanded cumulus oocyte)

เก็บโอโอไซต์ในน้ำยา TCM199 2.5M Hepes เพื่อรอการตรวจและนำไปเลี้ยงต่อไป ภาพของโอโอไซต์ชนิดต่าง ๆ แสดงในรูปที่ 2.2

การกระตุ้นรังไข่ซ้ำ

ทำการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นเพื่อผ่าตัดเก็บโอโอไซต์ซ้ำเป็นครั้งที่ 2, 3 และ 4 โดยมีระยะเวลากระตุ้นห่างกันครั้งละประมาณ 6-8 สัปดาห์ โดยลูกโคแต่ตัวจะได้รับการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นและผ่าตัดจำนวนทั้งหมด 4 ครั้ง

---

*TCM-199 : Tissue culture medium 199 : Gibco RBL.,U.S.A.

**Hepes : Sigma chemical co., U.S.A

*** Leo, USA

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

แสดงผลการตอบสนองของรังไข่ จำนวนฟอลลิเคิลขนาดต่าง ๆ จำนวนคอร์ปัส ฮีโมเรจิกัมและชนิดของโอโอไซต์ ด้วยค่าเฉลี่ย ± S.E.M. (Standard error of means) และอัตราส่วน เมื่อเทียบกับการตอบสนองทั้งหมด

เมื่อเปรียบเทียบผลดังกล่าวระหว่างกลุ่มทดลองที่ทำการฉีดฮอร์โมนทั้งสองกลุ่ม และผลการกระตุ้นซ้ำโดยการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เอส เอ เอส (SAS: Statistical analysis system) ชนิด Analysis of variance

แสดงผลการเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์และการแบ่งตัวของตัวอ่อนด้วยอัตราส่วนและเปรียบเทียบผลระหว่างชนิดของโอโอไซต์ด้วยการทดสอบเกี่ยวกับสัดส่วนของประชากร 2 ชุด (Two population proportions) โดยใช้สถิติชนิด T-test

ผล

จากตารางที่ 2.3 แสดงผลการกระตุ้นรังไข่ลูกโคพันธุ์พื้นเมืองไทย ด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน จำนวน 10 ตัว แต่ละตัวกระตุ้นซ้ำ 4 ครั้งได้ค่าเฉลี่ย ± S.E.M. ของการตอบสนองของรังไข่ (F+CH) เท่ากับ 32.2±3.0 ใบ/ครั้ง/ตัว โดยมีจำนวนฟอลลิเคิล (F)ที่เจริญในขนาดต่าง ๆ ทั้งหมดเท่ากับ 31.9±3.0 ใบ/ครั้ง/ตัว และจำนวนฟอลลิเคิลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง < 5 มม., 5-10 มม. และ > 10 มม. และจำนวน คอร์ปัส ฮีโมเรจิกัม (CH) เป็น 4.1±1.1, 19.6±1.8, 8.2±1.2 และ 0.4±0.2 ใบ/ครั้ง/ตัว ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบเป็นอัตราส่วนแล้วจะพบว่าจำนวนฟอลลิเคิลที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง ขนาด 5-10 มม.มีมากที่สุด คือ 60.7% เมื่อเทียบกับฟอลลิเคิลขนาด < 5 มม , >10 มม.และคอร์ปัส ฮีโมเรจิกัมเท่ากับ 12.8%, 25.4% และ1.1% ตามลำดับ

การตอบสนองของรังไข่ของลูกโคต่อการฉีดกระตุ้นฮอร์โมนมีความผันแปรค่อนข้างสูงในลูกโคแต่ละตัว และมีแนวโน้มลดลงจากครั้งแรกเมื่อพิจารณาจากจำนวนฟอลลิเคิลและคอร์ปัส ฮีโมราจีกัม (F+CH) (P>0.05) เท่ากับ 46.1±8.8, 28.6±3.6, 26.4±3.5 และ 27.7±5.1 ใบ/ครั้ง/ตัว เป็นจำนวน 4 ครั้งตามลำดับ รวมทั้งได้ผลรวมของฟอลลิเคิลขนาดต่าง ๆ ในแต่ละครั้งของการฉีดกระตุ้นเป็น 44.9±9.0, 28.5±3.6 , 26.3±3.4 และ 27.7± 5.0 ใบ/ครั้ง/ตัว ตามลำดับ ซึ่งมีแนวโน้มลดลงจากการกระตุ้นครั้งแรก พบว่าจำนวนฟอลลิเคิล ขนาด >10 มม. ที่ได้จากการกระตุ้นครั้งแรกมีจำนวนลดลงในครั้งต่อ ๆ ไปอย่างมี นัยสำคัญ (P<0.05) เท่ากับ 15.9± 2.6 ,8.0±1.7, 4.7±1.4 และ 4.1±1.7 ใบ/ครั้ง/ตัว ตามลำดับ เช่นเดียวกับฟอลลิเคิลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง <5 มม. ที่มีแนวโน้มลดลงจากกระตุ้นครั้งที่ 1 เมื่อเปรียบเทียบกับครั้งที่ 2 และ 3 (P<0.05), 7.2±3.3 เทียบกับ 2.4 ± 1.7 และ 1.5 ± 0.6 ใบ/ครั้ง/ตัว ส่วนฟอลลิเคิลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5-10 มม. ไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละครั้งของการกระตุ้นเท่ากับ

21.8 ± 4.7, และ 18.1± 3.2, 20.1± 2.9 และ 18.2±4.2 ใบ/ตัว/ครั้ง ส่วนจำนวนคอร์ปัส ฮีโมเรจิกัม เป็น 1.2±0.6, 0.1±0.1 และ 0.1±0.1 ใบ/ครั้ง/ตัว สำหรับการกระตุ้นครั้งที่ 4 ไม่พบคอร์ปัส ฮีโมเรจิกัม

ภาพของการตอบสนองของรังไข่ลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์แสดงในรูปที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 การตอบสนองของรังไข่ในลูกโคพื้นเมืองไทยก่อนวัยเจริญพันธุ์เมื่อกระตุ้นซ้ำด้วย ฮอร์โมน เอฟ เอส เอช

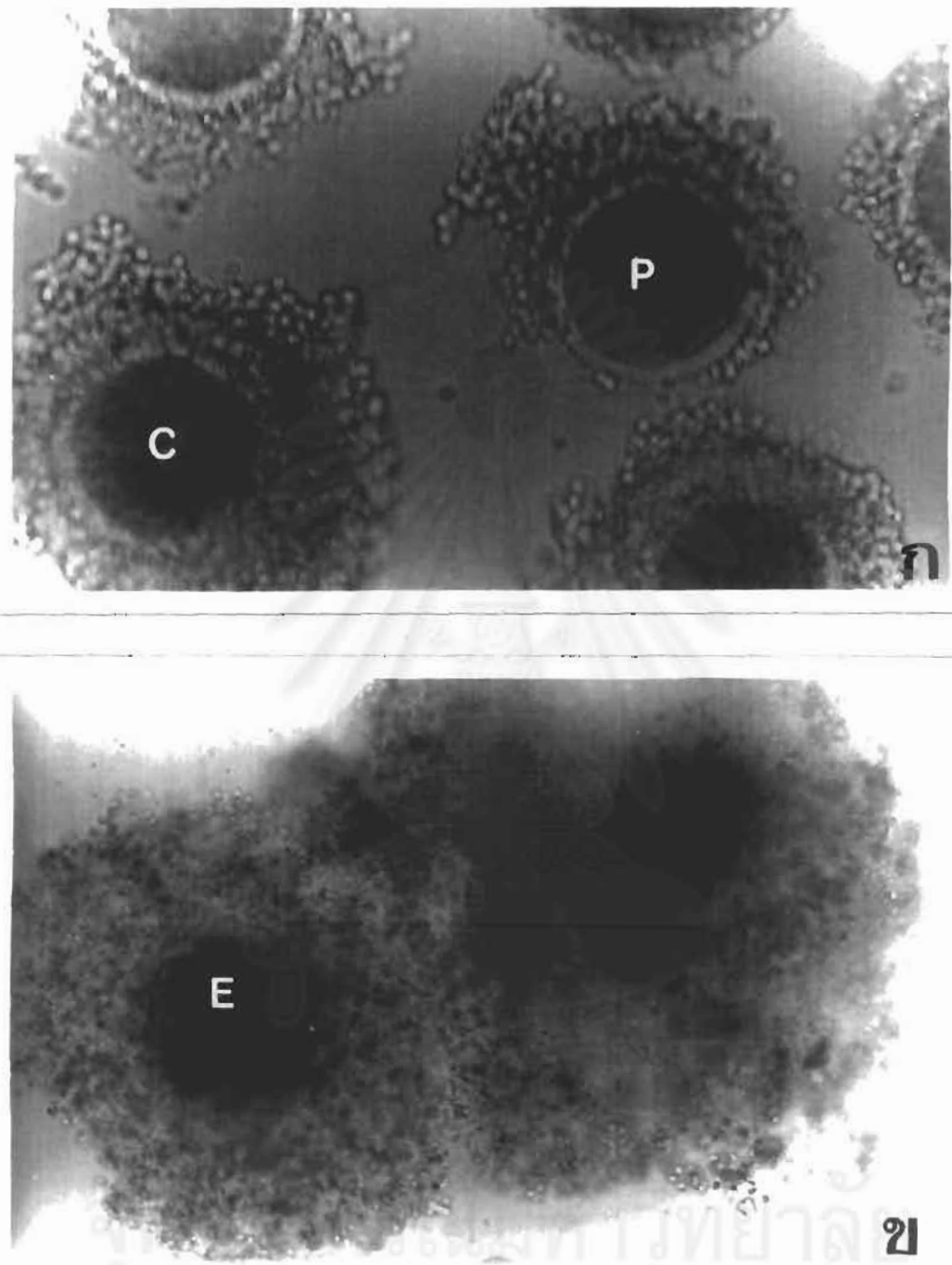
กระตุ้นครั้งที่	จำนวนลูกโค	ผลการตอบสนองของรังไข่					ค่าเฉลี่ย (F+CH)
		∅ ฟอลลิเคิล				CH	
		<5 มม.	5-10 มม.	>10 มม.	ผลรวม		
1	10	72(15.6%)* 7.2±3.3[a]** (0-32)***	218(47.3%) 21.8±4.7 (8-56)	159(34.5%) 15.9±2.6[a] (5-29)	449(97.4%) 44.9±9.0 (22-119)	12(2.6%) 1.2±0.6 (0-5)	461 46.1±8.8[a] (22-119)
2	10	24(8.4%) 2.4±1.7[b] (0-27)	181(63.3%) 18.1±3.2 (10-41)	80(28.0%) 8.0±1.7[b] (4-18)	285(99.7%) 28.5±3.6 (16-50)	1(0.4%) 0.1±0.1 (0-1)	286 28.6±3.6[b] (16-50)
3	10	15(5.7%) 1.5±0.6[b] (0-6)	201(76.1%) 20.1±2.9 (7-35)	47(17.8%) 4.7±1.4[b] (1-15)	263(99.6%) 26.3±3.4 (9-43)	1(0.4%) 0.1±0.1 (0-1)	264 26.4±3.5[b] (9-43)
4	10	54(19.5%) 5.4±1.7[a] (0-15)	182(65.7%) 18.2±4.2 (6-44)	41(14.8%) 4.1±1.7[b] (0-15)	277(100%) 27.7±5.0 (6-62)	0 0 0	277 27.7±5.1[b] (6-62)
ค่าเฉลี่ย		165(12.8%) 4.1±1.1 (0-32)	782(60.7%) 19.6±1.8 (6-58)	327(25.4%) 8.2±1.2 (0-29)	1274(98.9%) 31.9±3.0 (6-119)	14(1.1%) 0.4±0.2 (0-5)	1288 32.2±3.0 (6-119)

* จำนวน(%) , ** $\overline{X}$ ± S.E.M.: ค่าเฉลี่ย ± Standard error of means

*** พิสัย

F : Follicle , C.H. : Corpus haemorhagicum

a, b แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

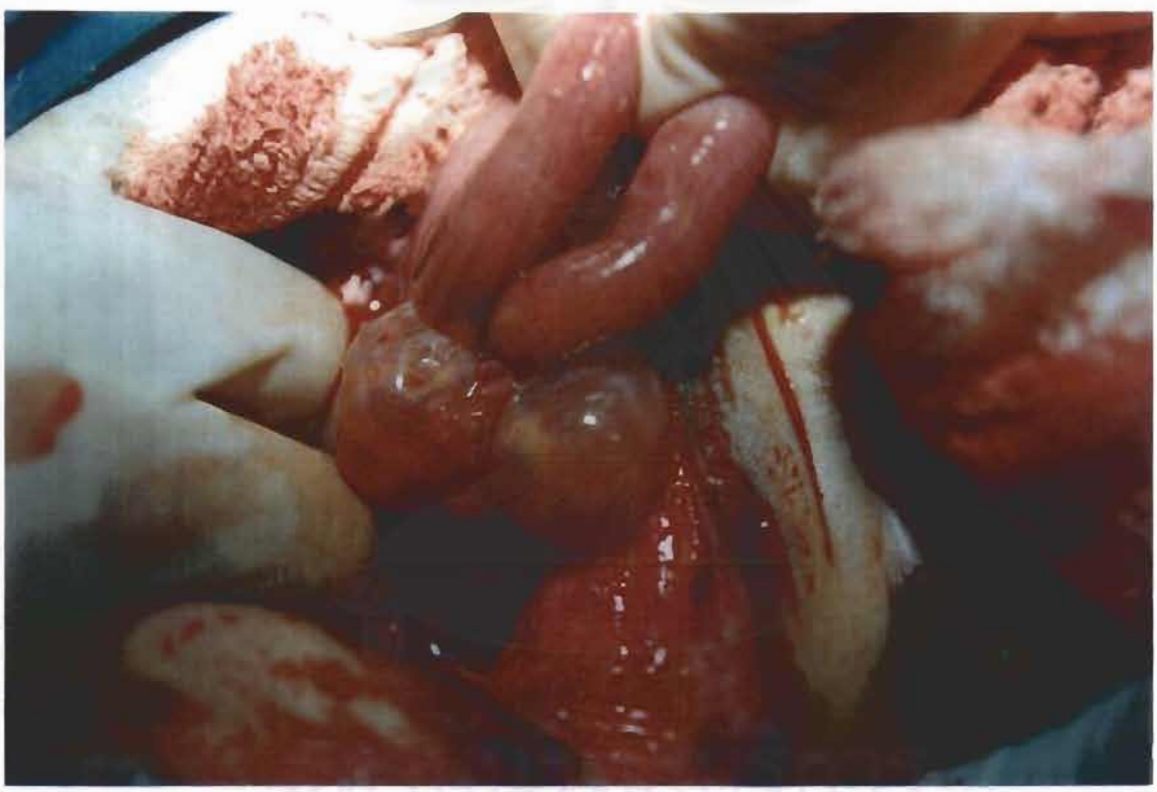


รูปที่ 2.2 ชนิดของโอโอไซต์ที่เก็บได้จากลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์

ก) โอโอไซต์ชนิด immature ที่มีเซลล์คูมูลัสหุ้มรอบหนาแน่น (C) และ โอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มบางส่วน (P)

ข) โอโอไซต์ชนิด mature ที่มีเซลล์คิวมูลัสแผ่กระจายรอบ ๆ (E)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ร่วมกับ ฮอร์โมน เอช ซี จี (กลุ่ม A) และกลุ่มที่ฉีดฮอร์โมน เอฟ เอส เอช อย่างเดียว (กลุ่ม B) เป็น 35.2± 5.4 และ 29.2±2.7 ใบ/ครั้ง/ตัว ตามลำดับ (ตารางที่ 2.4) ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างเป็นนัยสำคัญ ($P>0.05$) ต่อการตอบสนองของรังไข่ทั้งสองกลุ่ม แสดงให้เห็นว่าสามารถกระตุ้นรังไข่ของลูกโคพื้นเมืองไทยก่อนวัยเจริญพันธุ์ โดยการฉีดฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ร่วมกับฮอร์โมน เอช ซี จี ไม่มีผลต่อการตอบสนองของรังไข่ทั้งจำนวนและขนาดของฟอลลิเคิลที่ได้ และไม่มีผลต่อการตกไข่ซึ่งดูได้จากการเกิดคอร์ปัส ฮีโมเรจิกัมที่เกิดขึ้น



รูปที่ 2.3 ภาพของการตอบสนองของรังไข่หลังกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช

ตารางที่ 2.4 : เปรียบเทียบผลการตอบสนองของรังไข่ในลูกโคพันธุ์พื้นเมืองไทยก่อนวัยเจริญพันธุ์ต่อการกระตุ้นซ้ำด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ร่วมกับฮอร์โมน เอส ซี จี หรือฮอร์โมน เอฟ เอส เอช อย่างเดียว

กลุ่มทดลอง	จำนวนลูกโค	ผลการตอบสนองของรังไข่					ค่าเฉลี่ย (F+CH)
		Ø ฟอลลิเคิล				CH	
		< 5 มม.	5-10 มม.	> 10 มม.	ผลรวม		
กลุ่ม A (FSH+hCG)	20	10 (15.3%)* 5.4±1.9** (0-32)***	414 (58.8%) 20.7±3.0 (7-58)	173 (24.6%) 8.7±1.6 (0-29)	695 (98.7%) 34.8±5.4 (7-119)	9 (1.3%) 0.5±0.3 (0-5)	704 35.2±5.4 (7-119)
กลุ่ม B (FSH)	20	57 (9.8%) 2.9±0.9 (0-15)	368 (63.0%) 18.4±2.2 (6-41)	154 (26.4%) 7.7±1.7 (0-25)	579 (99.1%) 29.0±2.7 (6-51)	5 (0.9%) 0.3±0.2 (0-3)	584 29.2±2.7 (6-51)
ผลรวม	40	165 (12.8%) 4.1±1.1 (0-32)	782 (60.1%) 19.6±1.8 (6-58)	327 (25.4%) 8.2±1.2 (0-29)	127 (98.9%) 31.9±3.0 (6-119)	14 (1.1%) 0.4±0.2 (0-5)	1288 32.2±3.0 (6-119)

หมายเหตุ * จำนวน(%)

** $\bar{X} \pm$ S.E.M. : ค่าเฉลี่ย±Standard error of means

*** พิสัย

ผลการเก็บโอโอไซต์

ผลจากการเจาะเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ลูกโคที่ฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ทั้งหมด 40 ครั้ง โดยวิธีการผ่าตัดเปิดช่องท้อง พบว่าเก็บโอโอไซต์ได้จำนวนทั้งหมดเท่ากับ 704 ใบ จาก 1,274 ฟอลลิเคิล(55.2%) ได้ค่าเฉลี่ยเป็น 17.6 ± 1.8 ใบ/ครั้ง/ตัว และการกระตุ้นซ้ำด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปินได้จำนวนโอโอไซต์ที่ต่ำกว่าครั้งแรกอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) คือ 23.0± 5.0, 16.8 ± 3.0, 15.2 ± 1.5 และ 15.4 ± 3.6 ใบ/ตัว ตามลำดับ และมีอัตราการเก็บโอโอไซต์ในแต่ละครั้งของการกระตุ้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) เป็น 51.2, 59.0, 57.8 และ 55.4% ตามลำดับ เฉลี่ย 55.2% (ตารางที่ 2.5)

กลุ่มที่ฉีดฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ร่วมกับฮอร์โมน เอช ซี จี (กลุ่ม A) มีจำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้ 20.6±3.0 ใบ/ตัว และกลุ่มที่ฉีดฮอร์โมนเอฟ เอส เอช อย่างเดียว (กลุ่ม B) มีจำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้ 14.7±1.7 ใบ/ตัว ผลของจำนวนโอโอไซต์ที่ได้จากทั้ง 2 กลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) แต่มีอัตราการเก็บสูงกว่าอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P=0.08$) เท่ากับ 59.1%และ 50.5% ตามลำดับ ดังในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.5 ผลการกระตุ้นซ้ำของลูกโคพันธุ์พื้นเมืองไทยก่อนวันเจริญพันธุ์ ด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปินต่อชนิดของโอโอไซต์และอัตราการเก็บโอโอไซต์

กระตุ้นครั้งที่	จำนวนลูกโค	ฟอลลิเคิล	ชนิดของโอโอไซต์				อัตราการเก็บโอโอไซต์
			IMMATURE	MATURED	DEGENERATE	จำนวนทั้งหมด	
1	10	449* 44.9±9.0** (22-119)***	89 (38.7%)[a] 8.9±3.1 (0-31)	135 (58.7%)[a] 13.5±5.7 (0-60)	6 (2.6%) 0.6±0.3 (0-3)	230 23.0±5.0[a] (5-63)	51.2%
2	10	285 28.5±3.6 (16-50)	111 (66.0%)[b] 11.1±2.3 (0-23)	57 (34%)[b] 5.7±2.0 (0-20)	0 0 0	168 16.8±3.0[b] (6-30)	59.0%
3	10	263 26.3±3.4 (9-43)	110 (72.4%)[b] 11.0±1.8 (1-18)	12 (7.9%)[b] 1.2±0.8 (0-7)	30 (19.7%) 3.0±1.0 (0-7)	152 15.2±1.5[b] (8-22)	57.8%
4	10	277 27.7±5.0 (6-62)	113 (73.4%)[b] 11.3±3.5 (2-38)	36 (23.4%)[b] 3.6±2.3 (0-21)	5 (3.2%) 0.5±0.5 (0-5)	154 15.4±3.6[b] (2-43)	55.4%
ค่าเฉลี่ย	40	1274 31.9±3.0 (6-119)	423 (60%) 10.6±1.3 (0-38)	240 (34.2%) 6.0±1.7 (0-60)	41 (5.8%) 1.0±0.3 (0-7)	704 17.6 ±1.8 (2-63)	55.2%

* จำนวน

** $\bar{X} \pm$ S.E.M. = ค่าเฉลี่ย ± Standard error of means

*** พิสัย

a,b แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

หมายเหตุ % ของโอโอไซต์ชนิดต่าง ๆ เป็นสัดส่วนที่คิดจากโอโอไซต์ที่เก็บได้ทั้งหมด

ชนิดของโอโอไซต์

จากการดูดโอโอไซต์จากรังไข่ลูกโคพันธุ์พื้นเมืองหลังกระตุ้นด้วยฮอร์โมน ได้โอโอไซต์เฉลี่ยเท่ากับ 17.6 ±1.8 ใบ/ตัว (ตารางที่ 2.5) โดยได้โอโอไซต์ที่ยังไม่เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ (immature oocyte) ซึ่งรวมเอาโอโอไซต์ที่มีคิวมูลัสเซลล์หุ้มหลายชั้น และชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มบางส่วน เท่ากับ 423 ใบ (60.0%) เฉลี่ยเท่ากับ 10.6±1.3 ใบ/ตัว และ โอโอไซต์ที่มีคิวมูลัสแผ่ขยาย (matured oocyte) เท่ากับ 240 ใบ (34.2%) เฉลี่ยเท่ากับ 6.0 ±1.7 ใบ/ตัว และโอโอไซต์ที่เสื่อมสภาพ เท่ากับ 41 ใบ (5.8%) เฉลี่ยเท่ากับ 1.0± 0.3 ใบ/ตัว นอกจากนี้พบว่าการกระตุ้นซ้ำ 4 ครั้ง ด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปินมีผลต่อจำนวนโอโอไซต์แต่ละชนิดที่ได้ในแต่ละครั้งของการกระตุ้นดังนี้ คือ immature oocyte ที่ได้สัดส่วนเพิ่มขึ้น (P<0.05) จาก

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

38.7% เฉลี่ยเท่ากับ 8.9±3.1 ใบ/ตัว, เป็น 66% เฉลี่ยเท่ากับ 11.1± 2.3 ใบ/ตัว, 72.4% เฉลี่ยเท่ากับ 11.0±1.8 ใบ/ตัว และ 73.4% เฉลี่ยเท่ากับ 11.3±3.5 ใบ/ตัว ตามลำดับ จากการกระตุ้นครั้งที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ ในขณะเดียวกันก็ได้ สัดส่วนของ matured oocyte ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) จาก 58.7% เฉลี่ยเท่ากับ 13.5±5.7 ใบ/ตัว เป็น 34% เฉลี่ยเท่ากับ 5.7± 2.0 ใบ/ตัว, 7.9% เฉลี่ยเท่ากับ 1.2±0.8 ใบ/ตัว และ 23.4% เฉลี่ยเท่ากับ 3.6±2.3 ใบ/ตัว ตามลำดับ (ตารางที่ 2.5)

เมื่อเปรียบเทียบจำนวนโอโอไซต์ที่ได้ระหว่างกลุ่ม A และกลุ่ม B ดังผลในตารางที่ 2.6 พบว่ากลุ่มที่ฉีดฮอร์โมนเอฟ เอส เอช ร่วมกับฮอร์โมน เอส ซี จี มีจำนวน immature oocyte น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ฉีดเฉพาะฮอร์โมน เอฟ เอส เอช คือ 195 ใบ เฉลี่ยเท่ากับ 9.9±2.1 ใบ/ตัว และ 228 ใบ (77.8%) เฉลี่ยเท่ากับ 11.4±1.7 ใบ/ตัว ตามลำดับ และในทางกลับกันได้จำนวน matured oocyte มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) คือ 195 ใบ (47.4%) เฉลี่ย 9.9±3.2 ใบ/ตัว และ 45 ใบ (15.4%) เฉลี่ยเท่ากับ 2.3±0.7 ใบ/ตัว ตามลำดับ แต่ได้จำนวนโอโอไซต์ที่เสื่อมสภาพไม่แตกต่างกัน (P>0.05) เป็น 21 ใบ (5.2%) เฉลี่ยเท่ากับ 1.1±0.5 ใบ/ตัว และ 20 ใบ (6.8%) เฉลี่ย เท่ากับ 1.0 ± 0.5 ใบ/ตัว ตามลำดับ (ตารางที่ 2.6)

ตารางที่ 2.6 : ผลการกระตุ้นลูกโคพันธุ์พื้นเมืองไทยก่อนวันเจริญพันธุ์ ด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ร่วมกับฮอร์โมน เอส ซี จี หรือด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช อย่างเดียวต่อชนิดของโอโอไซต์

กลุ่มทดลอง	จำนวนลูกโค	ฟอลลิเคิล	ชนิดของโอโอไซต์			
			IMMATURE	MATURED	DEGENERATE	ทั้งหมด
กลุ่ม A FSH+hCG	20	34.8±5.4* (9-119)**	9.9±2.1[a] (0-18) (47.4%)***	9.9±3.2[a] (0-60) (47.4%)	1.1±0.5 (0-6) (5.2%)	20.6±3.0 (3-63)
กลุ่ม B FSH	20	29.0±2.7 (15-49)	11.4±1.7[b] (1-31) (77.8%)	2.3±0.7[b] (0-11) (15.4%)	1.0±0.5 (0-7) (6.8%)	14.7±1.7 (5-31)
ผลรวม	40	**31.9±3.0** (6-119)	**10.6±1.3** (0-31) (60.0%)	**6.0±1.7** (0-60) (34.0%)	**1.0±0.3** (0-7) (5.9%)	**17.6±1.8** (3-63)

* $\bar{X}$ ± S.E.M. : ค่าเฉลี่ย ± Standard error of means

** พิสัย

***เปอร์เซนต์

a,b แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)

วิจารณ์

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินชนิด เอฟ เอส เอช กระตุ้นการสร้างฟอลลิเคิลในลูกโคได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา (Marden,1953; Jainudeen *et al.*, 1966; Onuma *et al.*, 1969) สำหรับการทดลองนี้ได้ใช้ฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ซึ่งการศึกษาในโคโดยทั่วไปพบว่าฮอร์โมน เอฟ เอส เอช จะให้ผลของการตอบสนองของรังไข่และคุณภาพของตัวอ่อนได้ดีกว่าฮอร์โมนโกนาโดโทรปินชนิด พี เอ็ม เอส จี รวมทั้งการศึกษาในลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์ก็ได้ผลเช่นเดียวกัน (มงคลและคณะ, 2537) โดยขนาดของฮอร์โมน (NIH-FSH-P) ที่ใช้เท่ากับ 192 มก. เท่ากับที่ใช้ทดลองในลูกกระบือปลัก และใกล้เคียงกับที่ใช้ในการทดลองกระตุ้นลูกโคพันธุ์ยุโรป (Adams *et al.*, 1994) ขนาด ดังกล่าวนี้จะเป็นปริมาณเพียงครึ่งเดียวเมื่อเปรียบเทียบกับที่ใช้ในแม่โคและโคสาวเพื่อกระตุ้นให้มีการตกไข่เพิ่ม (superovulation) ซึ่งจะใช้ฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ขนาด 400 มก. (NIH-FSH-P) ต่อการกระตุ้นหนึ่งครั้ง เนื่องจากฮอร์โมน เอฟ เอส เอช เป็นสารประเภทกลัยโคโปรตีน (glycoprotein) ที่มีครึ่งชีวิต (Half-life) ประมาณ 2 ชม. จึงต้องแบ่งฉีดหลายครั้งและห่างกันทุก ๆ 12 ชม. เพื่อให้คงในกระแสเลือดและมีผลต่อการออกฤทธิ์อย่างต่อเนื่อง ในการทดลองในลูกโคครั้งนี้ก็ได้ทำการแบ่งฉีด 8 ครั้ง (เช้าและเย็น) ติดต่อกัน 4 วัน ข้อดีของฮอร์โมน เอฟ เอส เอช เมื่อเปรียบเทียบกับฮอร์โมน พี เอ็ม เอส จี ซึ่งเป็นฮอร์โมนโกนาโดโทรปินที่ออกฤทธิ์ในการกระตุ้นการสร้างฟอลลิเคิลเหมือนกัน คือฮอร์โมน เอฟ เอส เอช มีน้ำหนักของโมเลกุลเล็กประมาณ 32,000-37,000 ทำให้สามารถฉีดกระตุ้นซ้ำได้โดยเกิดปฏิกริยาต่อต้านจากร่างกายน้อย (Carruthers, 1986) ในขณะที่ฮอร์โมน พี เอ็ม เอส จี ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่หลั่งออกมาจาก trophoblastic cell จากรกของลูกม้าในช่วงการตั้งท้องวันที่ 40-150 วัน มีน้ำหนักโมเลกุลใหญ่ประมาณ 68,000 และมีกรด Sialic สูงประมาณ 10.4 เปอร์เซนต์ มี Half-life สูง คือ 11 ชม. (Carruthers, 1986) จึงฉีดเพียงเข็มเดียวแต่มักพบปฏิกิริยาการต่อต้านของร่างกายต่อฮอร์โมนทำให้ผลการตอบสนองลดลงเมื่อให้ในครั้งต่อไป จากเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้นในการวิจัยครั้งนี้จึงเลือกใช้ฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ในการฉีดกระตุ้นรังไข่ลูกโคพันธุ์พื้นเมืองไทย ถึงแม้ว่าฮอร์โมน เอฟ เอส เอช จะมีราคาแพง (1,500 บาท/ครั้ง/ตัว) พบว่าหลังจากฉีดกระตุ้นรังไข่ด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช เข็มสุดท้าย ประมาณ 24 ชม. ลูกโคบางตัวจะมีการตอบสนองภายนอกที่สามารถสังเกตได้ คือ แสดงอาการเป็นสัด โดยจะขึ้นปีนลูกโคตัวอื่นในคอก (mounting behavior) และมักมีน้ำเมือกใสไหลออกจากปากช่องคลอดเช่นเดียวกับอาการเป็นสัดในแม่โค การแสดงการเป็นสัดนี้ได้มีรายงานเช่นเดียวกับการทดลองของ Onuma และ Foote (1969) และ Seidel และคณะ (1971) ซึ่งน่าจะเป็นอิทธิพลของฮอร์โมนเอสโตเจนที่หลั่งจากฟอลลิเคิลที่ถูกกระตุ้น อย่างไรก็ตามอาการเป็นสัดและการมีเมือกไหลออกมา จากการศึกษาครั้งนี้ไม่มีความสัมพันธ์ต่อผลของการตอบสนองในแง่จำนวนของฟอลลิเคิล ทั้งนี้ใช่ว่าลูกโคบางตัวที่มีอาการ

ดังกล่าวก็พบว่ามีจำนวนการตอบสนองของรังไข่สูงหรือลูกโคที่ไม่มีอาการดังกล่าวจะมีการตอบสนองของรังไข่ที่ต่ำ

วิธีการผ่าตัดเปิดช่องท้อง (caudal midline laparotomy) เป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการเจาะเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ของลูกโค (Kajihara *et al.*, 1991) ซึ่งสามารถตรวจการตอบสนองของรังไข่ได้ชัดเจนแม่นยำกว่าการตรวจโดยวิธีการล้วงคลำผ่านทวารหนัก (rectal palpation) หรือการตรวจด้วยเครื่องมือคลื่นความถี่สูง (อัลตราซาวด์) วิธีการดังกล่าวนี้ทางคณะผู้วิจัยได้เริ่มพัฒนาในลูกกระบือปลักตามรายงานของ มงคลและคณะ (2537) เป็นที่น่าสังเกตว่าการผ่าตัดในลูกโคเพื่อเก็บโอโอไซต์มีความง่ายในแง่การควบคุมสัตว์ ตอบสนองต่อการวางยาสลบได้ดีโดยไม่ต้องเติมยาสลบบ่อยครั้ง และการนำเอารังไข่มาที่ปากแผลทั้งนี้อาจเนื่องจากผนังเยื่อยึดของมดลูกและรังไข่มีความยืดหยุ่นกว่าในลูกกระบือ ในการผ่าตัดเก็บโอโอไซต์นี้ Onuma และ Foote (1969) และ Kajihara และคณะ (1991) พบว่าสามารถกระตุ้นฮอร์โมนและผ่าตัดซ้ำในลูกโคได้หลังจากพักฟื้นหลังผ่าตัดประมาณ 6-8 สัปดาห์ ซึ่งต้องใช้เวลาพักฟื้นนานกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้วิธีการเจาะโอโอไซต์ผ่านกล้องลาพาโลสโคป (laparoscope) และยังกระตุ้นซ้ำได้จำนวนครั้งมากกว่าด้วย (Armstrong *et al.*, 1991) หรืออาจใช้วิธีการใช้เครื่องอัลตราซาวด์เจาะผ่านเข้าทางช่องคลอด (Intravaginal ultrasound guided follicular aspiration) ซึ่งได้มีการทดลองในแม่โค (Callesen *et al.*, 1987; Bols *et al.*, 1995) สำหรับในลูกโคมีการศึกษาเบื้องต้นพบว่า น่าจะมีความเป็นไปได้ในการนำวิธีนี้มาใช้ในการเจาะเก็บโอโอไซต์ดังแสดงในรายงานบทที่ 4

การผ่าตัดเปิดช่องท้องเพื่อเก็บโอโอไซต์หลังจากมีการกระตุ้นซ้ำในลูกโคพบว่ามีการยึดติดกัน (adhesion) ของผิวรังไข่กับผนังมดลูกและท่อนำไข่หรือเยื่อหุ้มผิวของรังไข่หนาตัวขึ้น โดยเฉพาะการผ่าตัดครั้งที่ 3 และครั้งที่ 4 ทำให้การดึงมดลูกขึ้นจากช่องท้องเพื่อตรวจการตอบสนองของรังไข่และการเจาะโอโอไซต์ทำได้ยาก และอาจทำให้เกิดความผิดพลาดต่อผลการนับจำนวนฟอลลิเคิลและคอร์ปัส ฮีโมราจิกัม พบว่ามีการยึดติดจะเกิดขึ้นค่อนข้างชัดเจนในกรณีที่รังไข่หลังจากที่การกระตุ้นครั้งก่อนมีการตอบสนองให้ฟอลลิเคิลเป็นจำนวนมากเพราะจับต้องรังไข่มากและใช้เวลานานที่รังไข่สัมผัสกับอากาศ รวมทั้งมีเลือดออกมากในขณะเจาะฟอลลิเคิล ซึ่งเป็นสาเหตุให้มีการยึดติดกันเกิดขึ้น ในการทดลองนี้ได้พยายามทำให้อวัยวะสืบพันธุ์ชุ่มอยู่ตลอดเวลาด้วยการราดด้วยสารเฮปาริน ผสมน้ำเกลือ 0.9% ในขนาดความเข้มข้นสูง และราดเข้าช่องท้องก่อนปิดปากแผล อย่างไรก็ตามมีข้อเสนอแนะว่าในการจับมดลูกเพื่อดูการตอบสนองของรังไข่นั้น ควรทำอย่างระมัดระวังและปลอดเชื้อที่สุด และต้องฉีดยาปฏิชีวนะหลังการผ่าตัดเพื่อหลีกเลี่ยงการติดเชื้อ

ผลของการฉีดกระตุ้นรังไข่ของลูกโคพันธุ์พื้นเมืองไทยก่อนวัยเจริญพันธุ์ มีความผันแปรสูงมากในลูกโคแต่ละตัว โดยผันแปรตั้งแต่ 6-119 ใบ ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Jainudeen และคณะ (1966) และเป็นเช่นเดียวกับผลที่ได้ในการกระตุ้นลูกกระบือปลักที่มีความผันแปรของการตอบสนองของรังไข่ตั้งแต่ 4-31 ใบ ความผันแปรดังกล่าวไม่น่าเกี่ยวข้องกับชนิดของฮอร์โมนโกนาโดโทรปินเพราะไม่ว่าจะเป็นชนิด เอฟ เอส เอช หรือ พี เอ็ม เอส จี ก็พบ

ความผันแปรดังกล่าว (มงคล และคณะ, 2537) มีข้อสันนิษฐานหลายข้อถึงความผันแปรของการตอบสนองเมื่อมีการให้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินเข้าไปในร่างกายของตัวสัตว์ Chupin และคณะ (1976) เสนอแนะว่าความแตกต่างน่ามาจากต้นตอของพันธุกรรมของสัตว์นั้นเอง โดยเฉพาะหากใช้ฮอร์โมน พี เอ็ม เอส จี จะเห็นได้ค่อนข้างชัดเจน หรือเป็นไปได้ว่าอาจเกิดความไม่สมดุลย์ของฮอร์โมนหลังฉีดกระตุ้นหรืออาจเกิดจากฮอร์โมนโกนาโดโทรปินเอง Evans และ Rawling (1995) ได้ทดลองฉีดฮอร์โมน แอล เอช และ เอฟ เอส เอช ในลูกโคอายุ 8-12 สัปดาห์ พบว่าการให้ฮอร์โมนดังกล่าวในลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์นี้จะไปลดจำนวน antral follicles และลดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของฟอลลิเคิลเหล่านี้ รวมทั้งยังพบฟอลลิเคิลที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาดใหญ่และขนาดกลางลดลงด้วยเมื่อเปรียบเทียบกับลูกโคที่ไม่ได้ฉีดฮอร์โมนเลย ดังนั้นการให้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินเข้าไปอาจไปเปลี่ยนแปลงกระบวนการสร้างฟอลลิเคิล (folliculogenesis)

ข้อสันนิษฐานอีกข้อหนึ่งคือ ความผันแปรของการตอบสนองที่พบจากการทดลองนี้อาจเป็นเรื่องของลูกโคแต่ละตัวที่มีการตอบสนองที่แตกต่างกัน โดยมีผู้เสนอแนะว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับสถานภาพของรังไข่ของสัตว์ขณะได้รับฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (exogenous gonadotropin) โดยเฉพาะหากฉีดในขณะที่รังไข่มีฟอลลิเคิลที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาดใหญ่ (dominant follicle, $\geq$10 มม.) อยู่ จะให้ผลของการตอบสนองต่ำ เพราะ dominant follicle ควบคุมการเจริญของฟอลลิเคิลชนิดอื่น ๆ ในแง่ของการกด (inhibitory effect) การทดลองในลูกโคโดย D'Occhio และคณะ (1995) พบว่าในรังไข่ของลูกโคกลุ่มที่มีฟอลลิเคิลขนาดมากกว่าหรือเท่ากับ 10 มม. จะมีจำนวนฟอลลิเคิลรวมในขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-4, 5-7 และ 8-9 มม. น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับลูกโคกลุ่มที่ไม่มีฟอลลิเคิลขนาดดังกล่าวอยู่ เช่นเดียวกับ Grasso และคณะ (1989) พบว่าในการกระตุ้นการตกไข่เพิ่มในแม่โค ฟอลลิเคิลที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 7 มม. จะเกิดขึ้นช้าและมีจำนวนลดลงหากรังไข่มี dominant follicle อยู่บนรังไข่ นอกจากนี้ยังมีการทดลองที่เกี่ยวข้องกับสถานภาพของรังไข่ขณะที่ให้ฮอร์โมน โดยการทดลองของ Nasser และคณะ (1993) พบว่าหากให้ฮอร์โมน เอฟ เอส เอช (exogenous FSH) ในช่วงต้น wave (before wave emergence) จะสามารถสร้าง (recruit) ฟอลลิเคิลให้มีการเจริญขึ้นได้ช่วยเสริมฤทธิ์ของฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ภายในด้วย (endogenous FSH) และยังป้องกันการฝ่อตัวของ subordinate follicles อีกด้วย (Moor *et al*., 1994) ผลดังกล่าวจะเด่นชัดและให้ผลตอบสนองดีกว่าเมื่อให้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินในช่วงหลัง wave (after wave emergence) หรือขณะกำลังเกิด wave (onset wave emergence) ที่มี dominant follicle ปรากฏอยู่บนรังไข่ อย่างไรก็ตามการให้ฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ใน wave ที่หนึ่งหรือที่สองของวงจรการเป็นสัดไม่ได้ให้ผลที่แตกต่างกันในแง่จำนวนการตอบสนองและจำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้ในแม่โค (Adams *et al*, 1994) จากข้อสังเกตประการหลังถึงสถานภาพของรังไข่ ณ เวลาที่ให้ฮอร์โมน จึงน่าจะอธิบายความแปรปรวนของการตอบสนองของรังไข่ของลูกโคในการทดลองนี้ เนื่องจากการเจริญของฟอลลิเคิลของลูกโคมีลักษณะเป็น wave เช่นเดียวกันดังข้อมูลที่แสดงในบทที่ 1 การศึกษาถึงสาเหตุและการลดความแปรปรวนของการตอบสนอง

จึงเป็นจุดหนึ่งที่ความมีการศึกษาต่อไป เพื่อสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตโอโอไซต์ในลูกโค โดยหากสามารถตรวจรังไข่ของลูกโคก่อนการเริ่มต้นการกระตุ้นอาจช่วยเพิ่มการเจริญของฟอลลิเคิลและลดความแปรปรวนของการตอบสนอง ดังที่พบในแม่โคว่าหากเลือกช่วงของการฉีดกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ในช่วงที่ไม่มี dominant follicle อยู่บนรังไข่จะสามารถเพิ่มการตอบสนองได้ (Guilbault *et al.*, 1991) รวมทั้งการลดการกระตุ้นที่อาจมากเกินไปด้วยการลดปริมาณของฮอร์โมนลง เพื่อไม่ให้ไปรบกวนระบบการทำงานของฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน

จากผลการศึกษานี้พบว่ามีฟอลลิเคิลที่เจริญเป็นฟอลลิเคิลที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาดกลาง (5-10 มม.) มีปริมาณสูงสุดถึง 60.7% และฟอลลิเคิลที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาดใหญ่เท่ากับ 25.4% แสดงให้เห็นผลการกระตุ้นการสร้างฟอลลิเคิลจากฤทธิ์ของฮอร์โมนเอฟ เอส เอช เพราะตามปกติในลูกโคแรกเกิดจะไม่พบฟอลลิเคิลขนาดกลางและขนาดใหญ่หรือพบเป็นจำนวนน้อย เนื่องจากระบบของฮอร์โมนโกนาโดโทรปินยังไม่พร้อมหรือทำงานอย่างเต็มที่ (on function) จนกว่าจะถึงวัยเจริญพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวนของการตกไข่จากจำนวนคอร์ปัส ฮีโมราจีกัมมีเพียง 1.1% แสดงว่าวันที่ทำการผ่าตัดเพื่อเก็บโอโอไซต์ควรผ่าตัดหลังจากฉีดฮอร์โมน เอฟ เอส เอช เข็มสุดท้ายนาน 60 ชม. เหมาะสม เนื่องจากยังไม่มีการตกไข่เกิดขึ้น หรืออาจเนื่องจากระดับของฮอร์โมนเอสโตรเจนที่หลั่งจากฟอลลิเคิลไม่สูงพอที่จะกระตุ้นการหลั่งของฮอร์โมน แอล เอช (LH surge) ที่จะทำให้เกิดการตกไข่ได้ อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าแม้ในกลุ่มของลูกโคที่ให้ฮอร์โมน เอส ซี จี ซึ่งมีฤทธิ์เช่นเดียวกับฮอร์โมน แอล เอช ก็ไม่พบว่าจะให้จำนวนของคอร์ปัส ฮีโมราจิกัม เพิ่มขึ้นแต่อย่างไร การเสริมฮอร์โมน เอส ซี จี ให้ผลบวกในแง่ของอัตราการเก็บโอโอไซต์เท่านั้น

การกระตุ้นซ้ำในลูกโคนี้มีผลต่อการลดจำนวนการตอบสนองของรังไข่ ซึ่งต่างกับการศึกษาการกระตุ้นการตกไข่เพิ่ม (superovulation) ในแม่โค Lamberson และ Lambeth (1986) ไม่พบว่าจำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้และจำนวนตัวอ่อนทั้งหมดไม่ลดลงในแม่โคพันธุ์แบรงกัสหลังกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ซ้ำหลาย ๆ ครั้ง เช่นเดียวกับการทดลองของ Saumande และ Chupin (1977) อย่างไรก็ตาม Saumande และคณะ (1978) ได้พบว่ามีการลดลงของการตอบสนองจากการฉีดเพิ่มการตกไข่ในแม่โคสาวประมาณ 64% และแม่โคที่เหลือจะมีความสามารถที่จะตอบสนองและให้จำนวนตัวอ่อนที่คงที่

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า อัตราการเก็บโอโอไซต์ (Oocyte recovery rate) ที่ได้เท่ากับ 55.2% ซึ่งเป็นอัตราการเก็บที่ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการเก็บโอโอไซต์จากการใช้การเก็บผ่านกล้องลาพาโลสโคป ซึ่งได้อัตราการเก็บโอโอไซต์เท่ากับ 68% (Armstrong *et al.*, 1992) โดยปกติการเก็บโอโอไซต์โดยการเปิดผ่าช่องท้อง มีความสะดวกในการควบคุมการเจาะโอโอไซต์ได้ดีกว่าการเก็บโดยวิธีใช้กล้องลาพาโลสโคป สำหรับผลการเจาะเก็บจากการเปิดช่องท้องได้น้อย อาจเนื่องจากมีเกิดการยึดติดกันหลังจากมีการผ่าตัดหลายครั้ง หรือในกรณีที่โอโอไซต์มีเซลล์คิวมูลัสที่แผ่ขยายมากทำให้เจาะได้ลำบาก อาจสูญหายในขณะเจาะเก็บโดยเฉพาะในกรณีที่เป็นฟอลลิเคิลขนาดเล็ก ที่ขนาดเข็มอาจใหญ่เกินไป หรือแหลมเป็นปากฉลามเกินไป ทำให้ไม่เข้าไปในฟอลลิเคิลได้ทั้งปลายเข็ม เกิดเป็นช่องว่างของอากาศ ดังนั้น

การเลือกขนาดของเข็มจึงเป็นเรื่องหนึ่งที่อาจเพิ่มอัตราการเก็บโอโอไซต์ได้ ส่วนในลูกโคบางตัวพบว่ามีความข้นของของเหลว (follicular fluid) มากจนเป็นวุ้น มีเลือดปนเปื้อนมาก ดังนั้นมักพบว่าโอโอไซต์อาจติดกับวุ้นหรือก้อนเลือดที่แข็งตัวและยากแก่การตรวจพบ สำหรับผลของโอโอไซต์ที่ได้จากกลุ่มทดลองที่ฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ร่วมกับฮอร์โมน เอช ซี จี (กลุ่ม A) นั้น ได้อัตราการเก็บโอโอไซต์ที่สูงกว่ากลุ่มทดลองที่ฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ชนิดเดียว (กลุ่ม B) ประมาณ 10% แสดงให้เห็นว่าฮอร์โมน เอช ซี จี ช่วยทำให้โอโอไซต์หลุดออกจากฟอลลิเคิลง่ายขึ้นในขณะที่ทำการเจาะ (มงคลและคณะ, 2537; Armstrong *et al.*, 1992) แต่การกระตุ้นซ้ำไม่มีผลต่ออัตราการเก็บโอโอไซต์แต่อย่างไร

จากการแบ่งโอโอไซต์ที่เก็บได้ออกเป็นชนิดต่าง ๆ พบว่าจำนวนโอโอไซต์ชนิด immature สูงกว่าโอโอไซต์ชนิด matured ประมาณ 1 เท่า (60% เทียบกับ 34.2%) ซึ่งโอโอไซต์ที่เก็บได้ทั้งสองชนิดจะต้องนำไปเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงก่อนที่จะนำไปทำการปฏิสนธิต่อไปโดยโอโอไซต์ชนิด matured จะนำไปเพาะเลี้ยงนาน 4 ชม. และโอโอไซต์ชนิด immature จะนำไปเลี้ยงนาน 24 ชม. สำหรับโอโอไซต์ที่เสื่อมสภาพจะไม่นำไปเพาะเลี้ยงเนื่องจากให้อัตราการเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ (metaphase II) ต่ำมาก และมีอัตราการแบ่งตัวต่ำเมื่อนำไปปฏิสนธินอกร่างกาย (Duby *et al.*, 1996) การฉีดกระตุ้นซ้ำด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปินมีผลต่อชนิดของโอโอไซต์ที่เก็บได้โดยมีจำนวนโอโอไซต์ชนิด matured ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อมีการกระตุ้นแต่ไม่มีผลต่อจำนวนโอโอไซต์ทั้งหมด และลูกโคกลุ่มที่ฉีดฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ร่วมกับฮอร์โมน เอส ซี จี จะได้จำนวนโอโอไซต์ที่เจริญไม่พร้อมปฏิสนธิน้อยกว่าโอโอไซต์ที่ได้จากกลุ่มที่ฉีดฮอร์โมน เอฟ เอส เอช อย่างเดียว แต่มีโอโอไซต์ชนิดที่เจริญพร้อมปฏิสนธิมากกว่าอย่างเป็นนัยสำคัญ เนื่องจากฮอร์โมน เอช ซี จี มีการออกฤทธิ์คล้ายกับฮอร์โมน แอล เอช ทำให้ได้โอโอไซต์ที่เจริญพร้อมปฏิสนธิมาก (Carruthers, 1986)

จากการศึกษานี้จึงสรุปได้ว่ารังไข่ของลูกโคสามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปินได้และสามารถเก็บโอโอไซต์ รวมทั้งสามารถทำการกระตุ้นซ้ำเพื่อผลิตโอโอไซต์ในลูกโคตัวเดียวกันนั้นได้ โอโอไซต์ที่เก็บได้นำไปเพื่อศึกษาในเรื่องการปฏิสนธิในหลอดทดลองดังแสดงในบทที่ 3 ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

มงคล เตชะกำพุ ชัยณรงค์ โลหชิต วิชัย ทันตศุภารักษ์ วันเพ็ญ ศรีอนันต์ จินดา สิงห์ลอ และ จินตนา อินทรมงคล 2537 (1994) การใช้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินเพื่อกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ของลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์ รายงานทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 23 หน้า

Adams, G.P., Nasser, L.F., Bo, G.A., Garcia, A., Del Campo, M.R. and Mapletoft, R.J. 1994. Superovulatory response of ovarian follicles of wave 1 versus wave 2 in 1995. heifers. Theriogenology. 42:1103-1113.

Armstrong, D.T., Holm, P., Irvine, B., Peterson, B.A., Stubbing, R.b., Mclean, D., Stevens, G. and Seamark, R.F. 1991. Laparoscopic aspiration and *in vitro* maturation of oocytes from calves. Theriogenology. 35: 182.(Abstr.)

Armstrong, D.T.,Holm, P., Irvine, B., Peterson, B.A., Stubbing, R.b., Mclean, D., Stevens, G. and Seamark,R.F. 1992. Pregnancies and live birth from *in vitro* fertilization of calf oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. Theriogenology. 38 (4):667 -678.

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

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

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

Chupin, D., Nguyen Huy, N., Mauleon, P. and Ortavant, R. 1976. Induction hormonale de naissnaces gemellaires: principales consequences sur les performances zootechniques. Ann. Zootech., 25(1):79-94.

D'Occhio, M.J., Earl, C.R., Niasari-Naslaji, A. and Armstrong, D.T. 1995. Relationship of large ovarian follicles to the response to superovulation with FSH and PMSG in heifer calves. Australian Society of Reproductive Biology (ASRB) September 1995, Melbourne, Australia.

Driancourt. M.A. 1991. Follicular dynamics in sheep and cattle. Theriogenology. 35:55-79.

Duby, R.T., Damiani, P., Looney, C.R., Fissore, R.A. and Robl, J. M. 1996. Prepuberal calves as oocyte donors: Promises and Problems. Theriogenology. 45 (1) : 121-130.

Evans A.C.O. and Rawling, N.C. 1995. Effects of treatment with LH and FSH between 8 and 12 weeks of age on ovarian follicular development and puberty in heifers. Theriogenology. 44:725-740.

Grasso, F., Guilbault, L.A., Roy, G.L., Matton, P. and Lussier, J.G. 1989. The influence of the presence of a dominant follicle at the time of initiation of a superovulatory treatment on superovulatory responses in cattle. Theriogenology. 31:199. (Abstr.)

Guilbault, L.A., Grasso, F., Lusssier, J.G., Rouiller, P. and Matton, P. 1991. Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominat follicle. J. Reprod. Fert. 91:81-89.

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

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

Lamberson, W.R. and Lambeth, V.A. 1986. Repeatability of response to superovulation in Brangus cow. Theriogenology. 26(5):643-648.

Moor, R.M., Kruip, T.A.M. and Green, D. 1994. Intraovarian control of folliculogenesis: Limits to superovulation. Theriogenology. 21:103-115.

Marden, W.G.R. 1953. The hormone control of ovulation in the calf. J. Agri. Sci. 43:381-412.

Nasser, L.F., Adams, G.P., Bo, G.A. and Mapletoft, R.J. 1993. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. Theriogenology. 40:713-724.

Onuma, H. and Foote ,R.H. 1969. *In vitro* development of ova from prepuberal cattle. J. Dairy Sci. 52(7):1085 -1087.

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

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.

Saumande, J. and Chupin, D. 1977. Superovulation: A limit to egg transfer in cattle. Theriogenology. 7:141-149.

Saumande, J., Chupin, D., Mariana, J.C., Ortavant, R. and Mauleon, P. 1978. Factors affecting the variability of ovulation rates after PMSG stimulation. In "Control of reproduction in the cow", E.E.C. Conference, Galway, 1977 J.R. Sreenan Ed., Martinus Nijhoff Publ., London p.195-224.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

การเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ และการเจริญหลังการปฏิสนธินอกร่างกายของโอโอไซต์ลูกโค

บทนำ

การเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ (maturation) มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการปฏิสนธิของโอโอไซต์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จากการศึกษาในอดีตพบว่าแม้ว่าจะสามารถทำให้เกิดการเพิ่มการตกไข่ในลูกโค แต่พบว่าโอโอไซต์ไม่สามารถเกิดการปฏิสนธิภายในท่อนำไข่ของลูกโคได้หลังทำการฉีดน้ำเชื้อเข้าไป หรือหากเกิดการปฏิสนธิได้ก็ไม่สามารถแบ่งตัวเจริญได้เป็นปกติ(Jainudeen *et al.*, 1966; Seidel *et al.*, 1971) ทั้งนี้เพราะสภาพแวดล้อมภายในท่อนำไข่ของลูกโคและมดลูกไม่เหมาะสมสำหรับการปฏิสนธิและการเจริญของตัวอ่อน อย่างไรก็ตามปัญหาดังกล่าวสามารถแก้ไขได้เมื่อได้มีการพัฒนาระบบการปฏิสนธินอกร่างกายอย่างครบวงจร (IVM-IVF-IVC-ET) คือ นำโอโอไซต์ที่เก็บได้มาเลี้ยงให้เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลอง (ไอวีเอ็ม, IVM) แล้วนำมาปฏิสนธิกับตัวอสุจิในหลอดทดลอง (ไอวีเอฟ, IVF) หลังจากนั้นมาเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดทดลอง (ไอวีซี, IVC) จนถึงตัวอ่อนที่พร้อมจะนำไปย้ายฝากในแม่โคตัวรับได้ (อีที, ET) อย่างไรก็ตามในช่วงแรกนั้นความพยายามที่จะนำเอาโอโอไซต์ของลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์มาปฏิสนธิกับตัวอสุจิยังไม่ประสบความสำเร็จ จนในปี คศ. 1987 Duby และ Robl ได้รายงานว่าโอโอไซต์จากรังไข่ของลูกโคสามารถนำมาปฏิสนธิได้ ในประเทศญี่ปุ่น Kajihara และคณะ (1991) ได้เก็บโอโอไซต์จากลูกโคอายุประมาณ 4 เดือนหลังฆ่ามาผ่านการทำ IVM-IVF-IVC และสามารถผลิตลูกโคจากวิธีการนี้หลังย้ายฝากในแม่โคตัวรับ เช่นเดียวกับในประเทศแคนาดา Armstrong และคณะ (1991,1992) ได้ใช้ลูกโคเป็นแหล่งผลิตโอโอไซต์เช่นกัน

ในส่วนของการทดสอบการเจริญของตัวอ่อนของลูกโคที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกายทำได้อย่างน้อย 2 วิธี คือ การนำมาเลี้ยงในหลอดทดลอง (*in vitro*) หรือนำไปย้ายฝากในแม่โคตัวรับ (*in vivo*) มีรายงานว่าอัตราความสำเร็จในการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดทดลอง (Duby *et al.*, 1996; Revel *et al.*, 1995) และผลการย้ายฝาก (Armstrong *et al.*, 1992; Revel *et al.*, 1995) อยู่ในอัตราค่อนข้างต่ำ โดยอาจเกี่ยวสภาพแวดล้อมของการเลี้ยงตัวอ่อนโดยเฉพาะในหลอดทดลองอาจไม่เหมาะสม การนำตัวอ่อนไปฝากเลี้ยงชั่วคราวในท่อนำไข่ของกระต่ายหรือท่อนำไข่ของแกะก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยในการตรวจสอบความสำเร็จในการปฏิสนธินอกร่างกายได้ ซึ่งการใช้ท่อนำไข่ของสัตว์ชนิดหนึ่งสำหรับฝากเลี้ยงตัวอ่อนชั่วคราวของสัตว์อีกชนิดหนึ่งได้มีการศึกษามานานแล้ว เช่น ท่อนำไข่ของหนูเม้าส์ใช้เลี้ยงตัวอ่อนของหนูแฮมสเตอร์ได้

(Bavister and Minami, 1986) หรือใช้ท่อนำไข่ของกระต่ายสำหรับเลี้ยงตัวอ่อนของสุกร (Hermann and Holtz, 1985; มงคลและคณะ, 2536) การนำเอาไข่หลังปฏิสนธินอกร่างกายโดยเฉพาะไข่ที่เก็บจากลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์ฝากในท่อนำไข่ของสัตว์ตัวกลางยังไม่มีข้อมูลแต่อย่างไร นอกจากนี้เมื่อสามารถผลิตตัวอ่อนได้แล้วคณะผู้วิจัยมีจุดประสงค์ที่จะศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเอาตัวอ่อนไปเก็บแช่แข็งไว้ในไนโตรเจนเหลวเพื่อเป็นหนทางในการเก็บรักษาพันธุกรรม ความมุ่งหมายของงานวิจัยนี้จึงประกอบด้วย 4 หัวข้อ คือ

1) ศึกษาอัตราการเจริญพร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลองของโอโอไซต์ที่เก็บจากลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์ (*in vitro* maturation)

2) ศึกษาความสำเร็จในการปฏิสนธินอกร่างกายโดยตรวจดูการเจริญของตัวอ่อนหลังเลี้ยงในหลอดทดลอง (*in vitro* fertilization and *in vitro* culture)

3) ศึกษาการเจริญของตัวอ่อนหลังเลี้ยงชั่วคราวในท่อนำไข่แกะและกระต่าย (temporary culture of calf oocyte in sheep and rabbit oviduct)

4) ศึกษาความเป็นไปได้ในการแช่แข็งตัวอ่อนของลูกโคที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกาย (freezability of calf embryo)

อุปกรณ์และวิธีการ

แหล่งโอโอไซต์

ได้จากการเก็บโดยตรงจากรังไข่ของลูกโคพื้นเมืองจำนวน 20 ตัว (B1-B20) ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน ดังได้กล่าวไปในบทที่ 2 ในการทดลองเรื่องการย้ายฝากตัวอ่อนชั่วคราวและการแช่แข็งตัวอ่อนได้ใช้โอโอไซต์ที่เก็บจากแม่โค โดยนำมาจากโรงฆ่าสัตว์ท้องถิ่น จ. นครปฐม และดูดออกมาด้วยวิธีเช่นเดียวกับที่ทำในรังไข่ของลูกโค

นำโอโอไซต์ที่เก็บได้มาคัดเลือกเอาเฉพาะโอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มทั้งแบบอัดแน่น (compact cumulus oocyte = immature oocyte) และที่แผ่ขยายรอบเปลือกโซน่า (expanded cumulus oocyte= matured oocyte) มาใช้ในการทดลอง

การเลี้ยงโอโอไซต์เพื่อให้พร้อมปฏิสนธิ (*In vitro* maturation)

ทำการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ในรูปของการเลี้ยงร่วมกับเซลล์แกรนูโลซา (Co-culture)

1. การเตรียมเซลล์กรานูโลซา (Granulosa cells) โดยนำน้ำยาที่เหลือจากการตรวจหาโอโอไซต์แล้ว มาปั่นแยกเอาเซลล์กรานูโลซาออก ด้วยความเร็ว 1,500 รอบ นาน 10 นาที จากนั้นปั่นล้างเซลล์กรานูโลซาที่ได้อีก 2 ครั้งด้วยความเร็ว 1,500 รอบ นาน 10 นาที ด้วยน้ำยาที่ใช้เพาะเลี้ยงโอโอไซต์ ดูดเซลล์กรานูโลซาที่ได้จำนวน 100 ไมโครลิตร ใส่ในน้ำยาเพาะเลี้ยงร่วมกับโอโอไซต์

2. การเตรียมโอโอไซต์ในน้ำยาเพาะเลี้ยงเพื่อให้เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ

ล้างโอโอไซต์ที่เจาะได้จากรังไข่ลูกโคจำนวน 3 ครั้งโดยล้างผ่านในน้ำยาครั้งละ 2 มล. ด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ชนิด TCM-199*+ $NaHCO_3$ ที่เติม FSH/LH** (10 μg/ml) และ Estradiol-17β*** (1 μg/ml) พร้อมด้วย 10% Fetal Calf Serum (FCS)**** ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ขึ้นกับชนิดของโอโอไซต์ที่เก็บได้ว่าเป็นชนิด immature หรือ matured โดยเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ที่ยังไม่เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ (immature oocyte) ในน้ำยาดังกล่าวร่วมกับเซลล์กรานูโลซ่าที่อุณหภูมิ 39°ซ ในบรรยากาศที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลานาน 24 ชม. และโอโอไซต์ที่เจริญพร้อมปฏิสนธิ (mature oocyte) เพื่อให้โอโอไซต์เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธินาน 4 ชม.

3 การตรวจสภาวะพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์

ตรวจดูสภาวะพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์หลังเพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงโดยดูจาก

3.1 มีการแผ่ขยายตัวของเซลล์คิวมูลัส (cumulus expansion) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอกำลังขยาย 10X

3.2 ตรวจดูระยะของโครโมโซม (chromosome) โดยทำการสุ่มตัวอย่างโอโอไซต์ประมาณ 30-50 ใบจากโอโอไซต์ทั้ง 2 ชนิด นำมาผ่านการตรึง (fixation) บนแผ่นสไลด์ด้วยน้ำยา acetic acid:absoluted alcohol (1:3) นาน 24 ชม. จากนั้นย้อมด้วยสี 1% aceto-orcein แล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศ์ชนิด phase contrast microscope โอโอไซต์ที่เจริญพร้อมปฏิสนธิจะตรวจเห็นโครโมโซม อยู่ในระยะเมตาเฟส ทู (metaphase II) ของการแบ่งตัวแบบไมโอซิส

การปฏิสนธินอกร่างกาย(*In vitro* fertilization)

1. การเตรียมตัวอสุจิ

ใช้น้ำเชื้อแช่แข็งจากโคพ่อพันธุ์โคนม ที่ได้ความอนุเคราะห์ศูนย์วิจัยและการผสมเทียมจังหวัดราชบุรี กองผสมเทียม กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

1.1 นำน้ำเชื้อแช่แข็งที่บรรจุในหลอดฟางขนาด 0.25 มล. ละลายในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 30 วินาที เช็ดหลอดฟางและกรรไกรที่ใช้ตัดด้วย 70% แอลกอฮอลล์ จากนั้นตัดปลายหลอดฟาง แล้วหยดน้ำเชื้อจำนวนเล็กน้อยเพื่อไปตรวจดูการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิหลังการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

---

*TCM-199 : Tissue culture medium 199 : Gibco RBL., U.S.A

** Stimufol® : RHONE MERIEUX, France

***Estradiol-17β : Sigma Chemical co. U.S.A

**** Fetal Calf Serum : Gibco BRL. U.S.A

1.2 นำน้ำเชื้อส่วนที่เหลืออยู่ในหลอดหยดลงบริเวณก้นหลอดทดลองที่มีน้ำยา capacitation ชนิด TALP ปริมาตร 1 มล. ที่เติม BSA fraction V* 0.09 กรัม ที่มีความเป็นกรด-ด่าง 7.2 ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างโดยใช้สารละลาย 10% HCl และ 10%NaOH

1.3 ปล่อยให้ตัวอสุจิที่แข็งแรงว่ายขึ้นสู่ผิวน้ำยา (swim up) นาน 1 ชม. ในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 39 °ซ ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ และความชื้นเต็มที่

1.4 แยกตัวอสุจิที่อยู่บริเวณส่วนบนของน้ำยาโดยใช้ micropipette ขนาด 1000 µl ดูดน้ำยาส่วนบนออกโดยดูดอย่างเบาๆ และระมัดระวังเพื่อไม่ให้ตะกอนของตัวอสุจิที่ตกตะกอนอยู่ฟุ้งกระจายขึ้นมาปนกับตัวอสุจิที่ต้องการ จากนั้นนำน้ำยาส่วนใสที่ได้ไปปั่นด้วยความเร็ว 1,000 รอบ นาน 5 นาที เพื่อแยกตัวอสุจิแล้วดูดน้ำยาส่วนบนทิ้ง (supernatant) แยกเอาเฉพาะส่วนที่เป็นตะกอน ไปตรวจดูการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิอีกครั้ง และคำนวณปริมาตรให้ได้ความเข้มข้นของตัวอสุจิเป็น 1 ล้านตัว/มล. เพื่อใช้ในการปฏิสนธิ

เทคนิคในการเตรียมตัวอสุจิได้เคยรายงานโดย Techakumphu และคณะ (1993)

2. การปฏิสนธินอกร่างกาย

นำโอโอไซต์ที่เพาะเลี้ยงจนเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ แล้วมาล้างในน้ำยาที่ใช้สำหรับการปฏิสนธิชนิด TALP ที่ประกอบด้วยสาร PHE* (Penicillamine, Hypotaurine, Epinephrine) ซึ่งเป็นสารเร่งการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ (sperm stimulating factor) และเฮปาริน (Heparin)* 10 µg/ml ที่มีความเป็นกรด-ด่าง 7.6 ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างโดยใช้สารละลาย 10%HCl และ 10%NaOH จากนั้นผสมอสุจิที่ผ่านขบวนการเปลี่ยนแปลงส่วนหัว (capacitation) แล้วลงในจานพลาสติกชนิด 4 หลุม** ที่มีโอโอไซต์อยู่ 15-20 ใบต่อหลุม ที่อุณหภูมิ 35°ซ ในบรรยากาศที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ และความชื้นเต็มที่ เป็นเวลานาน 18 ชม. (Techakumphu *et al.*, 1993)

การเลี้ยงตัวอ่อนหลังปฏิสนธินอกร่างกาย (*In vitro* culture)

1. การเตรียมเซลล์ท่อนำไข่โค (Bovine Oviductal Epithelial Cell, BOEC)

โดยนำท่อนำไข่ที่เลาะเอาเนื้อเยื่ออื่น ๆ ออกแล้วมาล้างแอลกอฮอล์ 70% และตามด้วยน้ำเกลือเข้มข้น 0.9% จากนั้นบรรจุน้ำยา Hank's solution*** ในท่อนำไข่ให้เต็มแล้วใช้ปากคีบหนีบทั้งส่วนหัวและท้ายของท่อนำไข่ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 39°ซ ในบรรยากาศที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ นาน 30 นาที จากนั้นรีดเยื่อบุผิวในท่อนำไข่ออกมา แล้วใช้ไซริงค์ขนาด 1 มล. ต่อกับเข็มเบอร์ 24 ดูดเอาเซลล์และน้ำยาขึ้นมา ดูดขึ้นลงหลาย ๆ ครั้งเพื่อให้

---

*Sigma Chemical co, U.S.A

**Nunc, Denmark

***Gibco GBL, U.S.A

เซลล์แยกเป็นเซลล์เดี่ยว ปั่นล้างเซลล์ท่อนำไข่ที่ได้ด้วย Hank's solution 2 ครั้งที่ความเร็ว 2,000 รอบ นาน 10 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง ปั่นล้างซ้ำด้วยน้ำยาที่จะใช้เพาะเลี้ยงตัวอ่อนอีก 2 ครั้ง เทคนิคนี้ดัดแปลงมาจาก Gondolfi และคณะ (1987)

2. เพาะเลี้ยงตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกาย

เลี้ยงตัวอ่อนร่วมกับเซลล์จากท่อนำไข่โคในน้ำยาเพาะเลี้ยง B_2* ที่เติม 10% FCS (Fetal Calf Serum) ในสภาวะเช่นเดียวกับการเลี้ยงโอโอไซต์ให้พร้อมปฏิสนธิ ตรวจดูการแบ่งตัวของตัวอ่อนหลังจากผสมน้ำเชื้อแล้วทุก ๆ 24 ชม. เป็นเวลานาน 6 วัน

รายละเอียดของวิธีการปฏิสนธินอกร่างกายในลูกโคแสดงในไดอะแกรมของรูปที่ 3.1 (Techakumphu et al., 1993)

การย้ายฝากตัวอ่อนชั่วคราวในท่อนำไข่ของแกะและกระต่าย

การเตรียมแกะและกระต่ายทดลอง

ใช้แกะลูกผสมพันธุ์เมอริโนและกระต่ายพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์เพศเมียที่โตเต็มที่ อย่างละ 3 ตัว นำมาเลี้ยงไว้ที่ ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดนครปฐม ประมาณ 2 เดือน ก่อนการทดลอง โดยให้อาหารข้น หญ้าสด และน้ำสะอาดอย่างเต็มที่

ทำการสอดโปรเจสเตอโรน** ประมาณ 1 สัปดาห์ในแกะทดลอง ส่วนในกระต่ายนั้นทำการฉีดฮอร์โมน เอส ซี จี*** (Human Chorionic Gonadotropin) จำนวน 150 ไอยู เข้ากล้ามก่อนทดลอง 3 วัน ทั้งสองกรณีเพื่อให้สัตว์อยู่ในระยะลูเตียลในขณะที่ทำการฝากตัวอ่อนเพื่อให้ท่อนำไข่และมดลูกไม่หดตัวมากเกินไป

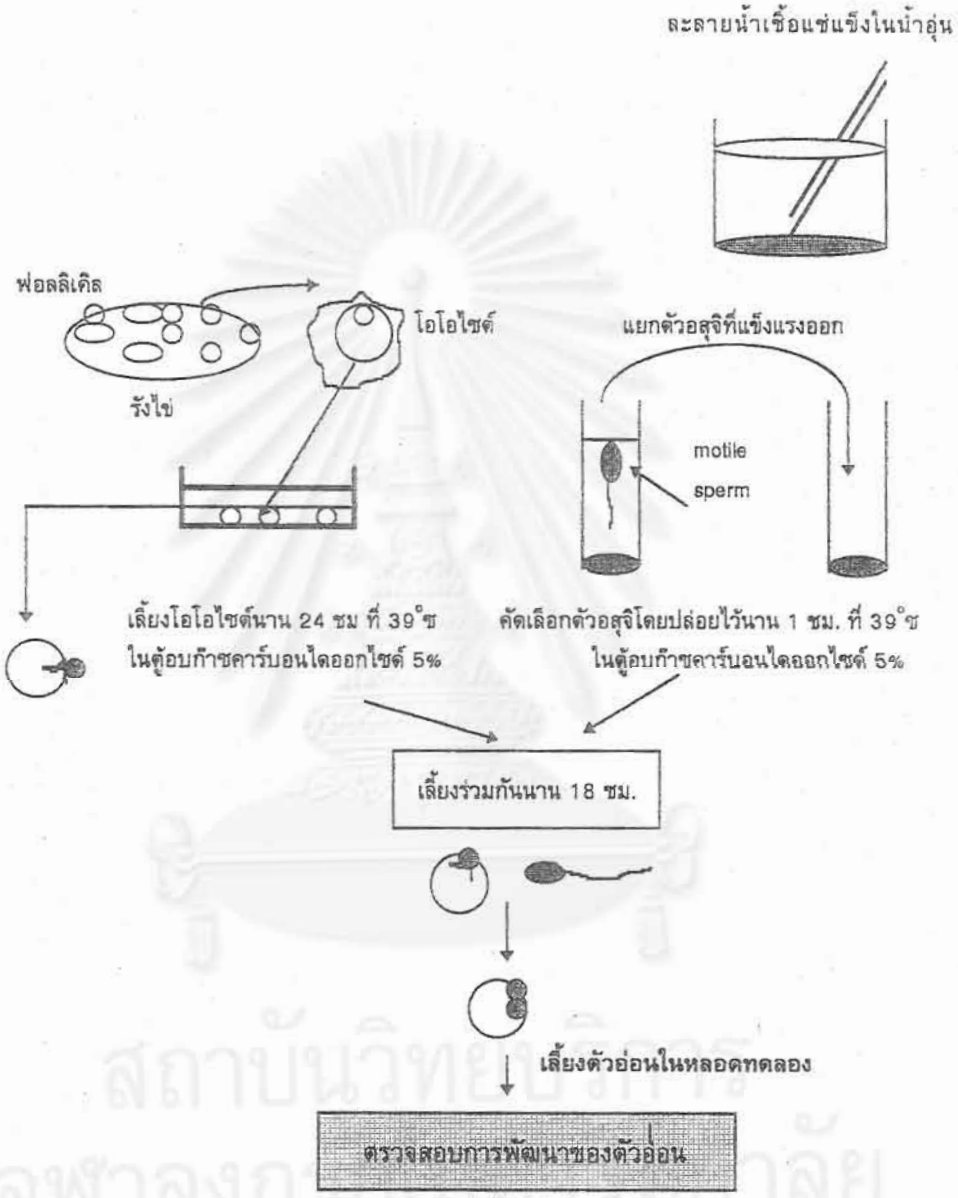
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

---

* Menezo, Rhone Merieux, France

**Chronogest®, Intervet, Holland

***Chorulon®, Intervet, Holland



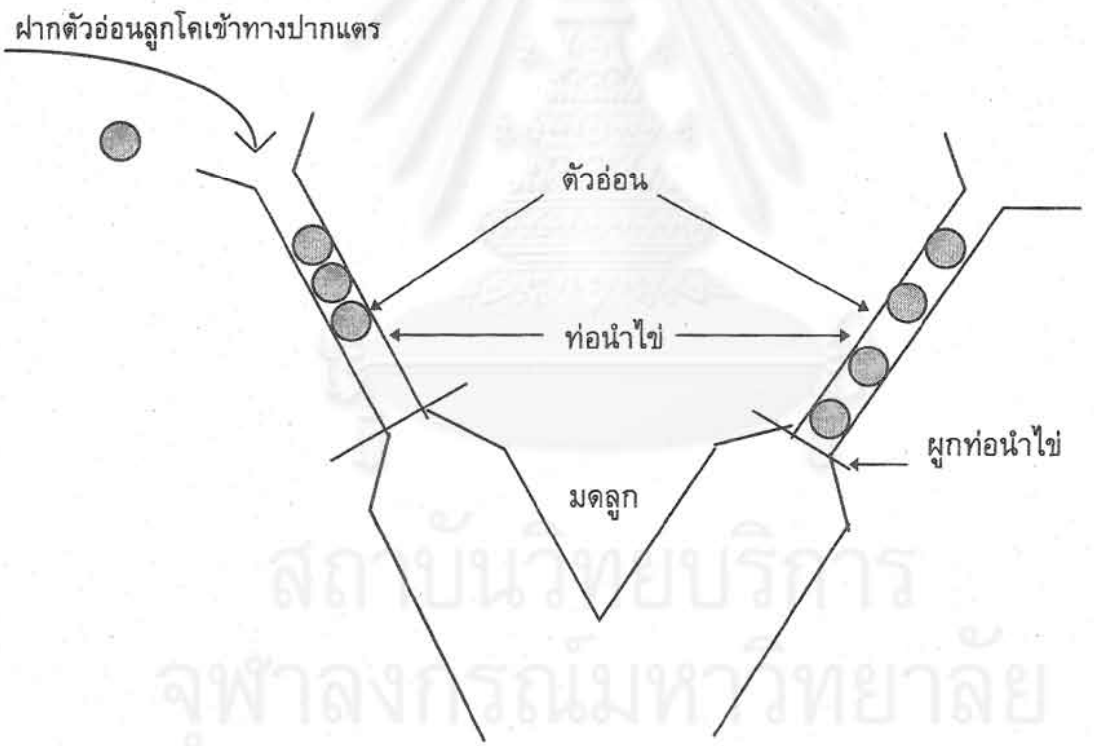
รูปที่ 3.1 ไดอะแกรมแสดงขั้นตอนการปฏิสนธินอกร่างกายในลูกโค

T137904996

การฝากตัวอ่อนในท่อนำไข่ของแกะและกระต่าย

ใช้วิธีการฝากตัวอ่อนดังรายงานของ Techakumphu และคณะ (1987) ในแกะทำการผ่าตัดหลังจากวางยากล่อมประสาท 20 มก. Xylazine HCl* เข้ากล้าม ส่วนในกระต่ายใช้การวางยาสลบทั่วตัวด้วย 20 มก. Ketamine HCl** ผสมกับ 8 มก. Xylazine HCl ฉีดเข้ากล้าม หลังจากนั้น 15 นาที วางยาสลบด้วย 20% Thiopentone Sodium จำนวน 20 มก. เข้าเส้นเลือด

ทำการผ่าตัดโดยเปิดช่องท้อง (midline laparotomy) แล้วผูกท่อนำไข่ไว้ที่ส่วนต่อระหว่างท่อนำไข่และมดลูก (uterotubal junction) ดูดตัวอ่อนเข้าไปในท่อโปลีเอทีลีนแล้วสอดผ่านทางปากแตรเข้าประมาณ 2-2.5 ซม. (รูปที่ 3.2) โดยทำการฝากทั้งข้างซ้ายและข้างขวา ในกระต่ายแต่ละตัวนั้นทำการฝากตัวอ่อนที่ได้จากโอโอไซต์ของลูกโคและแม่โคคนละข้าง เลี้ยงตัวอ่อนไว้นาน 6-7 วัน แล้วทำการเก็บตัวอ่อนจากการชะล้างท่อนำไข่ที่ตัดออกมา ตรวจหาและประเมินคุณภาพของตัวอ่อนภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ



รูปที่ 3.2 ไดอะแกรมแสดงฝากตัวอ่อนของลูกโคในท่อนำไข่แกะหรือกระต่าย

**Rompun®, Korea,

**Ketalar®,Park-Davis, U.S.A.

การแช่แข็งตัวอ่อนที่เก็บได้หลังเก็บจากท่อนำไข่

ทำการแช่แข็งตัวอ่อนลูกโคที่ได้จากการเก็บจากท่อนำไข่ของแกะหรือกระต่าย ด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ (Planer, UK) โดยมีขั้นตอนคือ

1) ใส่ตัวอ่อนโดยตรงใน 1.5M glycerol ที่อุณหภูมิห้อง โดยแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน 0.5M, 1.0M และ 1.5M แต่ละขั้นตอนนาน 10 นาที

2) บรรจุตัวอ่อนในหลอด straw 0.25 มล. รวมทั้ง freezing medium แยกจากกันเป็น 3 ส่วน ด้วยฟองอากาศ

3) ใส่ตัวอ่อนในตู้แช่แข็ง (freezing chamber) ที่อุณหภูมิห้อง

4) ลดอุณหภูมิลงอย่างช้า ๆ ด้วยความเร็ว -1°ซ/นาที จนถึงอุณหภูมิ -7°ซ

5) ที่อุณหภูมิ -7°ซ ชักนำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งโดยใช้ฟอร์เซฟที่แช่ในไนโตรเจนเหลว มาแตะข้างหลอดที่มีตัวอ่อนอยู่ หลังทิ้งไว้ให้อยู่ในสภาวะสมดุลย์นาน 10 นาที หลังชักนำแล้วปล่อยไว้อีก 5 นาที

6) แช่แข็งอย่างช้า ๆ จาก -7°ซ ไปยัง -30°ซ ด้วยความเร็ว 0.3°ซ/นาที ทิ้งตัวอ่อนไว้ที่อุณหภูมินี้ประมาณ 15 นาที

7) จุ่มหลอดบรรจุตัวอ่อนลงในไนโตรเจนเหลวที่ -196°ซ เก็บไว้นาน 3-6 เดือน

8) ตรวจดูสภาพของตัวอ่อนหลังแช่แข็งโดยนำมาละลาย (thawing) ด้วยการแช่น้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 37°ซ

9) เจือจางเอาสารป้องกันการแช่แข็งออกด้วยสารละลาย 1.5M กลีเซอรอล แบบ 3 ขั้นตอน คือ จาก 1.5M, 1.0M และ 0.5M นานขั้นตอนละ 10 นาที นำตัวอ่อนมาใส่ในน้ำยา TCM199 2.5M Hepes บันทึกภาพ และนำตัวอ่อนไปเลี้ยงอีก 48 ชม. ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนชนิด B2 +20% fetal calf serum

10) ตรวจการเจริญของตัวอ่อนและบันทึกภาพ

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

คำนวณค่าต่าง ๆ ที่วัดเป็นเปอร์เซนต์โดยเทียบกับจำนวนโอโอไซต์ที่เริ่มต้นและเปรียบเทียบความแตกต่างด้วยการทดสอบแบบ student T test

ผล

1) ศึกษาอัตราการพร้อมปฏิสนธินอกร่างกายของโอโอไซต์จากลูกโคพันธุ์พื้นเมือง

ผลการเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์จากรังไข่ของลูกโคที่ผ่านการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน พบว่ามีอัตราการเกิดเมตาเฟส ทู เท่ากับ 73.6 % (67/91 ใบ) แอนาเฟส 1 เท่ากับ 3.3 % (3/91 ใบ) เทโลเฟส 1 เท่ากับ 1.1 % (1/91 ใบ) และชนิดไม่สามารถบอกระยะได้ชัดเจน เท่ากับ 22.0 % (20/91 ใบ) และเมื่อแบ่งตามชนิดของโอโอไซต์

พบว่าโอโอไซต์ชนิด immature ที่เลี้ยงในน้ำยานาน 24 ชม. มีอัตราการเกิดเมตาเฟส ทู ซึ่งไม่แตกต่างกับโอโอไซต์ชนิด matured ที่เลี้ยงในน้ำยา 4 ชม. เท่ากับ 73.6 % และ 73.5 % ตามลำดับ (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 ผลการเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์จากลูกโคพันธุ์พื้นเมืองก่อนวัยเจริญพันธุ์หลังจากผ่านการ IVM

ชนิดของโอโอไซต์	จำนวนโอโอไซต์	ระยะของการแบ่งตัวแบบไมโอซิส			U+A
		เมตาเฟส 2	แอนาเฟส 1	เทโลเฟส 1	
IMMATURE (IVM 24 ชม.)	57	42 (73.6%)	3 (5.3%)	1 (1.8%)	11 (19.3%)
MATURED (IVM 4 ชม.)	34	25 (73.5%)	0	0	9 (26.5%)
ผลรวม	91	67 (73.6%)	3 (3.3%)	1 (1.1%)	20 (22.0%)

U+A= Unidentified (ไม่สามารถระบุได้)+Abnormal oocytes

2) ศึกษาความสำเร็จในการปฏิสนธินอกร่างกายดูจากอัตราการเจริญเติบโตในหลอดทดลอง

อัตราการแบ่งตัวเป็นตัวอ่อนระยะต่าง ๆ หลังการปฏิสนธิ (cleavage rate) ของโอโอไซต์ที่ได้จากรังไข่ลูกโคที่กระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน สามารถปฏิสนธินอกร่างกายและมีอัตราการแบ่งตัวเท่ากับ 31.6%(159/503) โดยซึ่งมีอัตราการแบ่งตัวไม่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบระหว่างโอโอไซต์ชนิด immature, 31.5%(123/371) กับโอโอไซต์ชนิด matured, 27.3%(36/132) (ตารางที่ 3.2) ตัวอ่อนส่วนใหญ่ประมาณ 80% (n=402) หยุดการเจริญที่ 2-4 เซลล์ จะมีเพียง 10% (n=51) เป็นตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์และที่เหลืออีก 10% (n=50) เป็นตัวอ่อนระยะ 16 เซลล์หรือมากกว่า รูปของตัวอ่อนระยะต่าง ๆ แสดงในรูปที่ 3.3

ตารางที่ 3.2 อัตราการแบ่งตัวหลังการปฏิสนธินอกร่างกายเปรียบเทียบระหว่างโอโอไซต์ชนิด immature และ matured

ชนิดของโอโอไซต์	จำนวนโอโอไซต์ที่เพาะเลี้ยง	อัตราการแบ่งตัว
IMMATURE (IVM 24 ชม.)	371	123(31.5%)
MATURED (IVM 4 ชม.)	132	36 (27.3%)
ผลรวม	503	159 (31.6%)

3) ศึกษาการเจริญของตัวอ่อนของลูกโคที่ได้หลังจากการปฏิสนธินอกร่างกายหลังฝากในท่อนำไข่ของแกะและกระต่าย

ตารางที่ 3.3 และ 3.4 แสดงจำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้จากการชะล้างท่อนำไข่ของแกะและกระต่ายหลังฝากเลี้ยงไว้นาน 6-7 วัน โดยได้อัตราการเก็บในแกะเท่ากับ 54.7%(47/86) และในกระต่ายเท่ากับ 57.0%(65/114) แยกแหล่งโอโอไซต์โดยเท่ากับ 45.5% (20/44) สำหรับโอโอไซต์ของลูกโค และเท่ากับ 64.3%(45/70) สำหรับโอโอไซต์ของแม่โค ดังนั้นไม่ว่าจะเป็นท่อนำไข่ของแกะหรือกระต่ายจะให้อัตราการเก็บตัวอ่อนได้ใกล้เคียงกัน

ในส่วนของการแบ่งตัวนั้นที่พบในแกะเท่ากับ 36.2%(17/47) โดยมีตัวอ่อนเจริญถึงระยะมอรูล่าและระยะบลาสโตซีสในอัตรา 58.8%(10/17) (รูปที่ 3.4) ในขณะที่ในท่อนำไข่กระต่ายนั้นจะไม่เอื้อต่อการเจริญของตัวอ่อนเท่าไรนัก โดยพบตัวอ่อนระยะมอรูล่าและระยะบลาสโตซีสจากตัวอ่อนของแม่โคในกระต่ายตัวที่ 2 เพียงอย่างละ 1 ใบ เท่านั้น คิดเป็น 3.07%(2/65) (รูปที่ 3.5) ตัวอ่อนส่วนใหญ่ของลูกโคมีการแบ่งตัวได้เป็น 2, 4, 6 และ 8 เซลล์ และมีการเสื่อมสลายดังแสดงในรูปที่ 3.6 และตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.3 จำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้และจำนวนตัวอ่อนที่แบ่งตัวหลังฝากในท่อนำไข่ของแกะ

แกะ	จำนวนตัวอ่อนที่ย้ายฝาก (%)	จำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้ (%)	จำนวนตัวอ่อนที่แบ่งตัว (%)*
ตัวที่ 1	17	14 (83.2%)	8 (57.1%)
ตัวที่ 2	39	13 (33.3%)	5 (38.5%)
ตัวที่ 3	30	20 (66.7%)	4 (20%)
รวม	86	47(54.7%)	17 (36.2%)

* คิดจากจำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้

ตารางที่ 3.4 จำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้และจำนวนตัวอ่อนที่แบ่งตัวหลังฝากในท่อนำไข่ของกระต่าย

กระต่าย	จำนวนตัวอ่อนที่ย้ายฝาก (%)		จำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้ (%)		จำนวนตัวอ่อนที่แบ่งตัว (%)*	
	ลูกโค	แม่โค	ลูกโค	แม่โค	ลูกโค	แม่โค
ตัวที่ 1	10	36	8(80%)	33(91.7%)	0	0
ตัวที่ 2	19	20	10(52.6%)	6(30.0%)	0	2
ตัวที่ 3	15	14	2(13.3%)	6(42.9%)	0	0
รวม	44	70	20(45.5%)	45(64.3%)	0	2
รวมทั้งหมด	114		65(57.0%)		2(3.07%)	

* คิดจากจำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้

ตารางที่ 3.5 ระยะต่าง ๆ ของตัวอ่อนปกติหลังฝากในท่อนำไข่ของแกะ

แกะ	จำนวนตัวอ่อนที่แบ่งตัว	จำนวนตัวอ่อนปกติ	M	B	HB
ตัวที่ 1	8	8	1	4	3
ตัวที่ 2	5	2	1	-	1
ตัวที่ 3	4	0	-	-	-
รวม	17	10(58.8%)	2(20%)	4(40%)	4(40%)

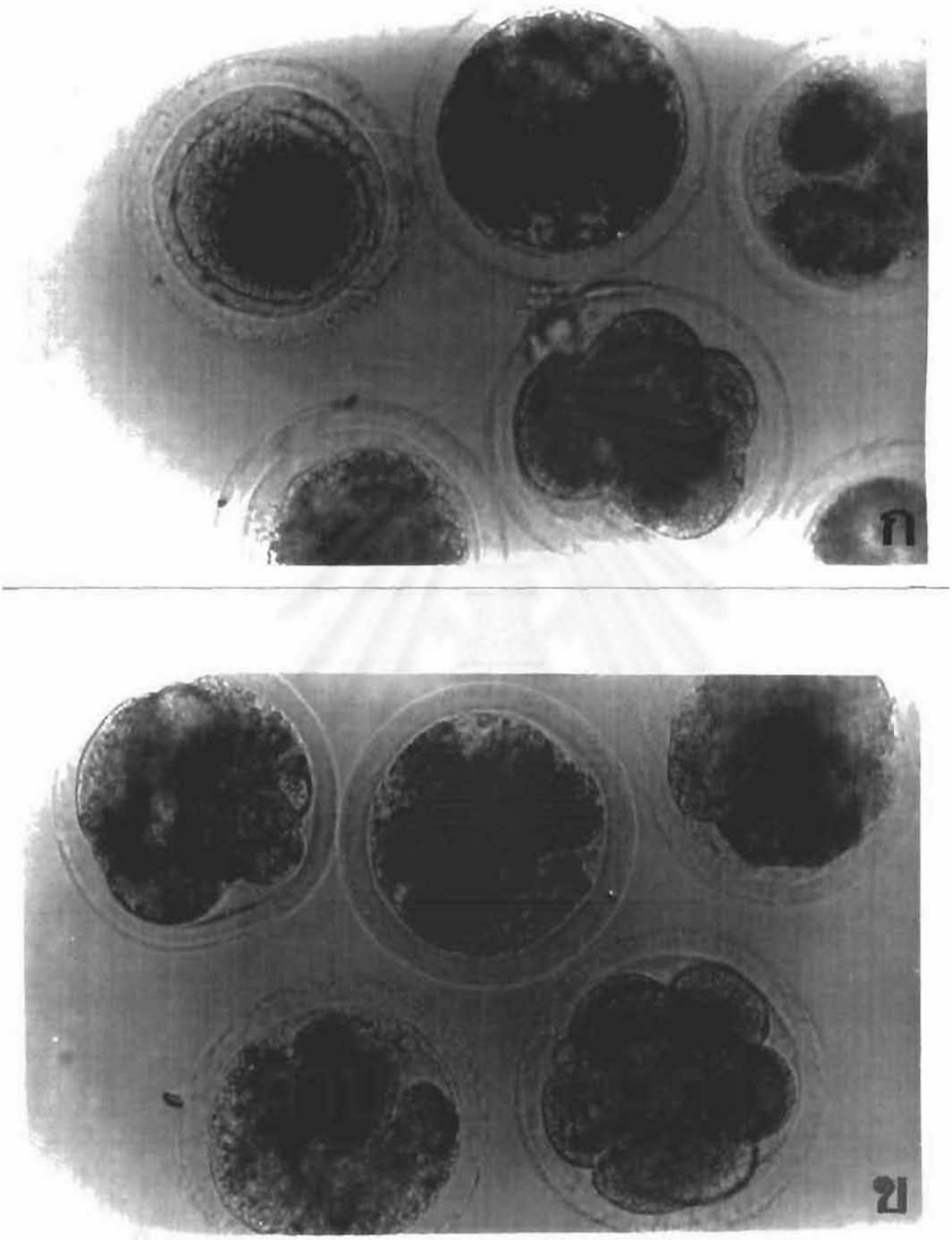
*ตัวอ่อนปกติ คิดเฉพาะตัวอ่อนที่เจริญเป็นระยะมอรูล่าและระยะบลาสโตซีส

M = Morula, B = Blastocyst, HB = Hatched Blastocyst

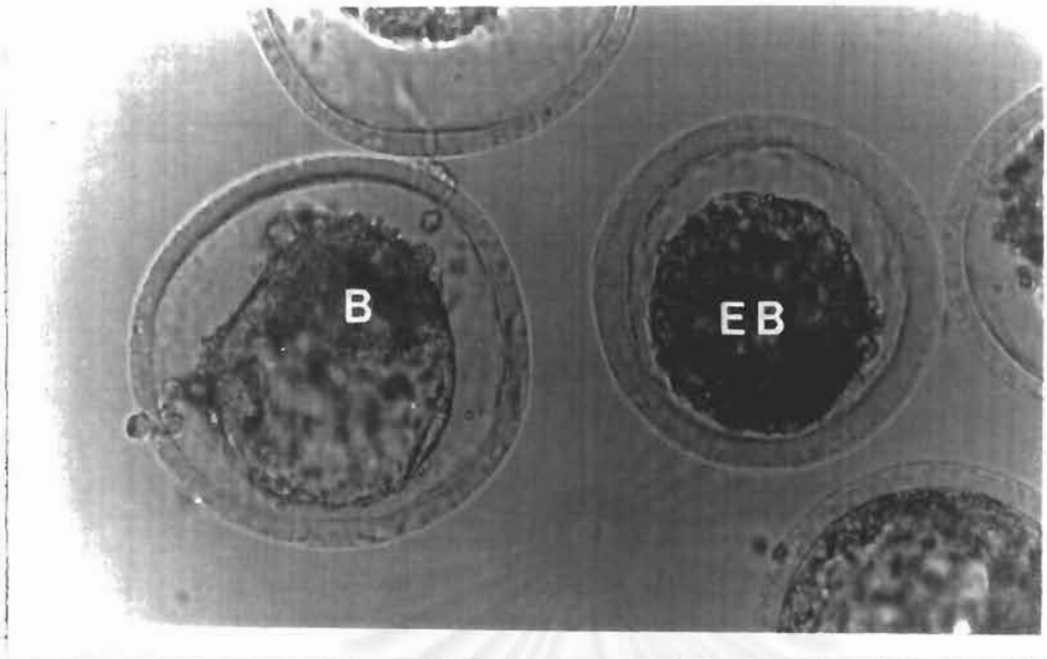
4) ศึกษาความเป็นไปได้ในการแช่แข็งตัวอ่อนลูกโคที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกาย

ผลการแช่แข็งตัวอ่อนได้ทำการแช่แข็งตัวอ่อนจากโอโอไซต์ของลูกโคที่เก็บได้จากการเลี้ยงในท่อนำไข่ของแกะ (n=15) ตัวอ่อนจากโอโอไซต์ของแม่โคที่ได้จากการเลี้ยงในท่อนำไข่กระต่าย (n=2) ได้จำนวนตัวอ่อนหลังทำละลายเท่ากับ 58.8%(10/17) (รูปที่ 3.7) โดยมีจำนวนตัวอ่อนปกติหลังทำละลายเท่ากับ 20%(2/10)

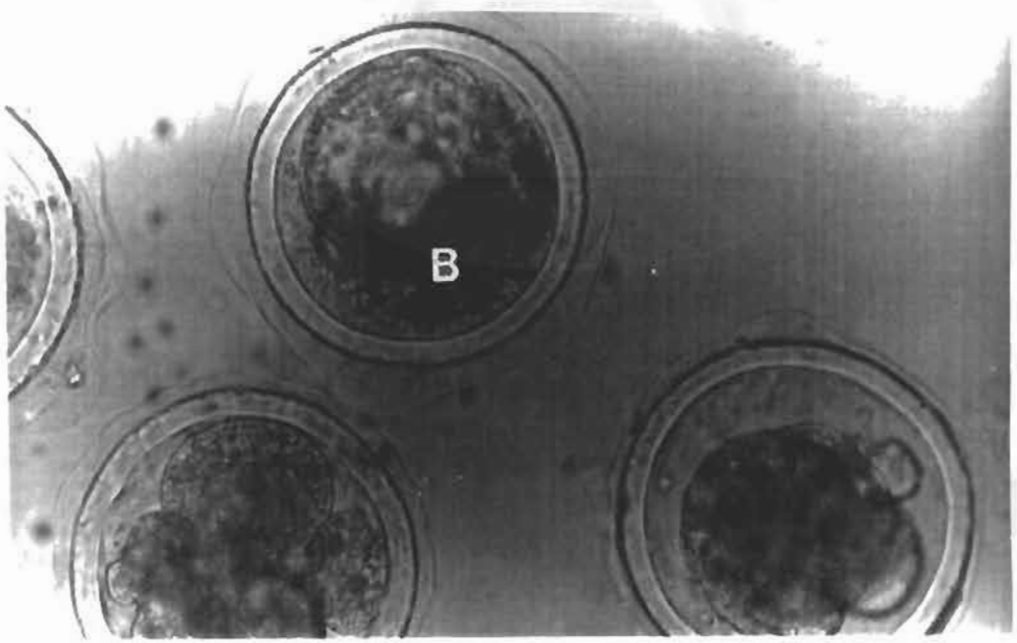
ทดลองนำตัวอ่อนระยะมอรูล่าจำนวน 2 ตัวอ่อน จากรูปที่ 3.7 ไปเลี้ยงในน้ำยา B2 นาน 48 ชม. พบว่าหนึ่งในสองตัวอ่อนมอรูล่าเจริญเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส และเจริญเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่กำลังหลุดจากเปลือก (Hatching blastocyst) หลังเลี้ยงต่ออีก 48 ชม. (รูปที่ 3.8, 3.9)



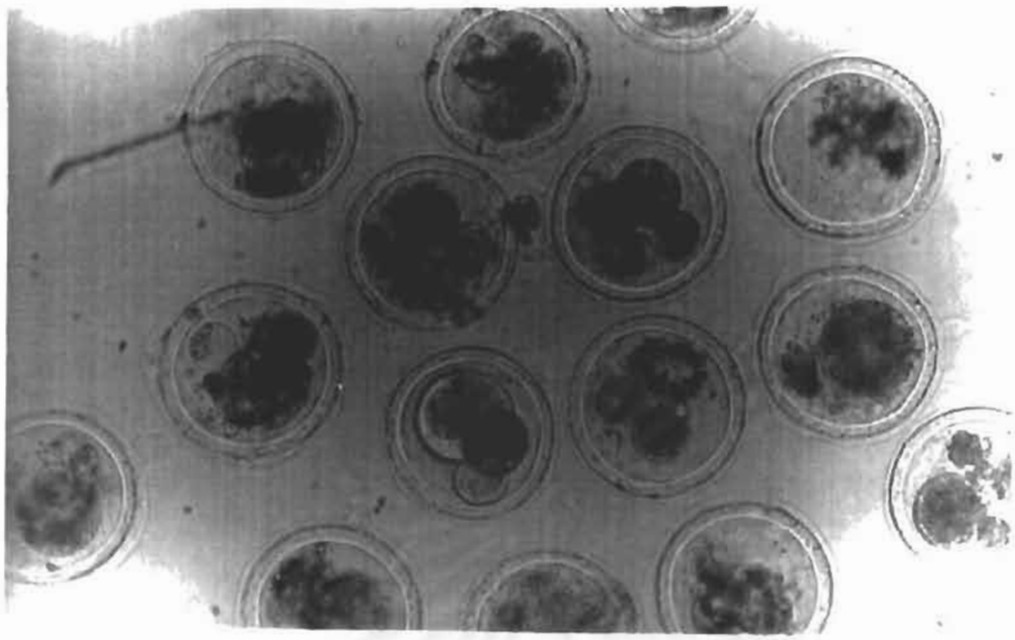
รูปที่ 3.3 ตัวอ่อนระยะต่าง ๆ ที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกายจากโอโอไซต์ของลูกโค
ก) ตัวอ่อนระยะ 1 เซลล์ พบตัวอสุจิเกาะรอบชั้นเปลือกหุ้ม
และตัวอ่อนระยะ 4 เซลล์
ข) ตัวอ่อนระยะ 8-16 เซลล์



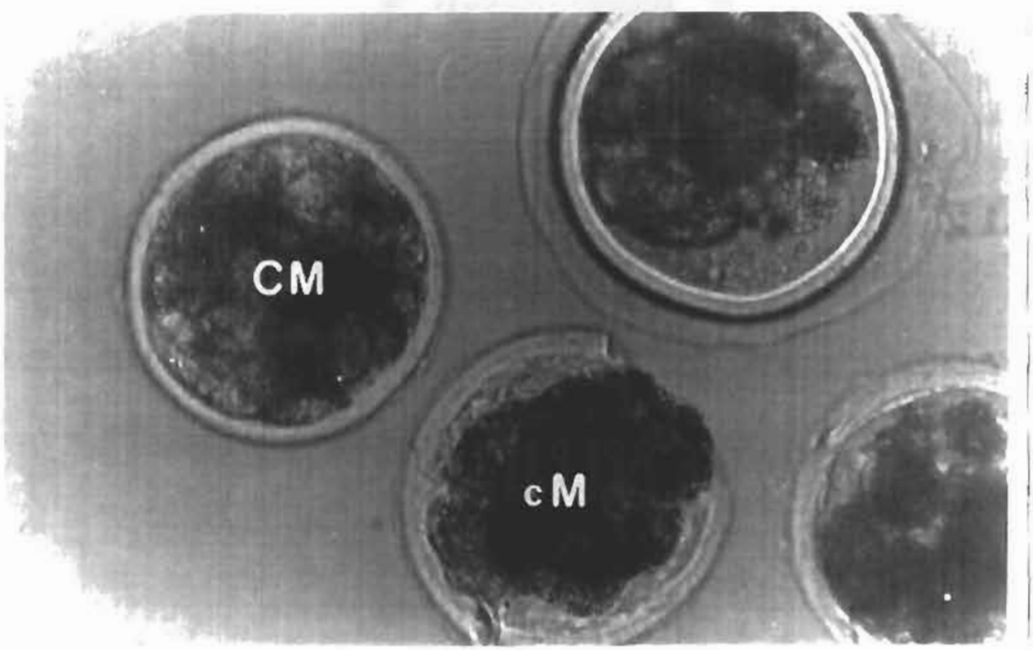
รูปที่ 3.4 ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสระยะแรก (EM) และระยะบลาสโตซีส (B) หลังเลี้ยงในท่อนำไข่ของแกะนาน 6 วัน



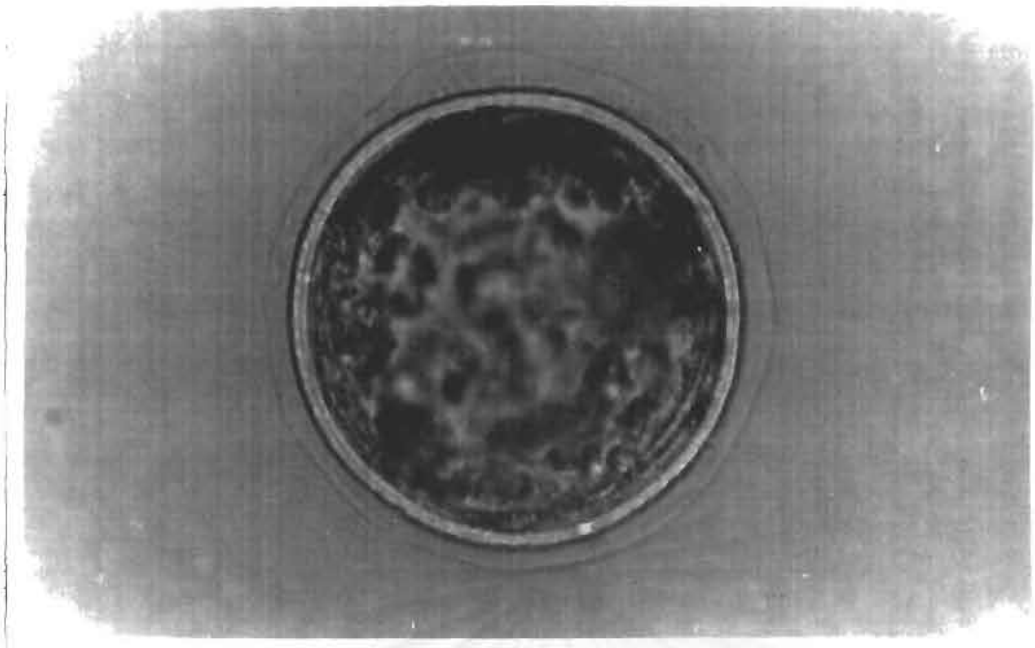
รูปที่ 3.5 ภาพของตัวอ่อนที่แบ่งตัวและตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้จากการเลี้ยงตัวอ่อนจากการปฏิสนธินอกร่างกายของโอโอไซต์แม่โคในท่อนำไข่กระต่าย สังเกตได้ว่ารอบ ๆ มีชั้นใส ๆ ของ mucin coat อยู่ล้อมรอบชั้นเปลือกโซน่า



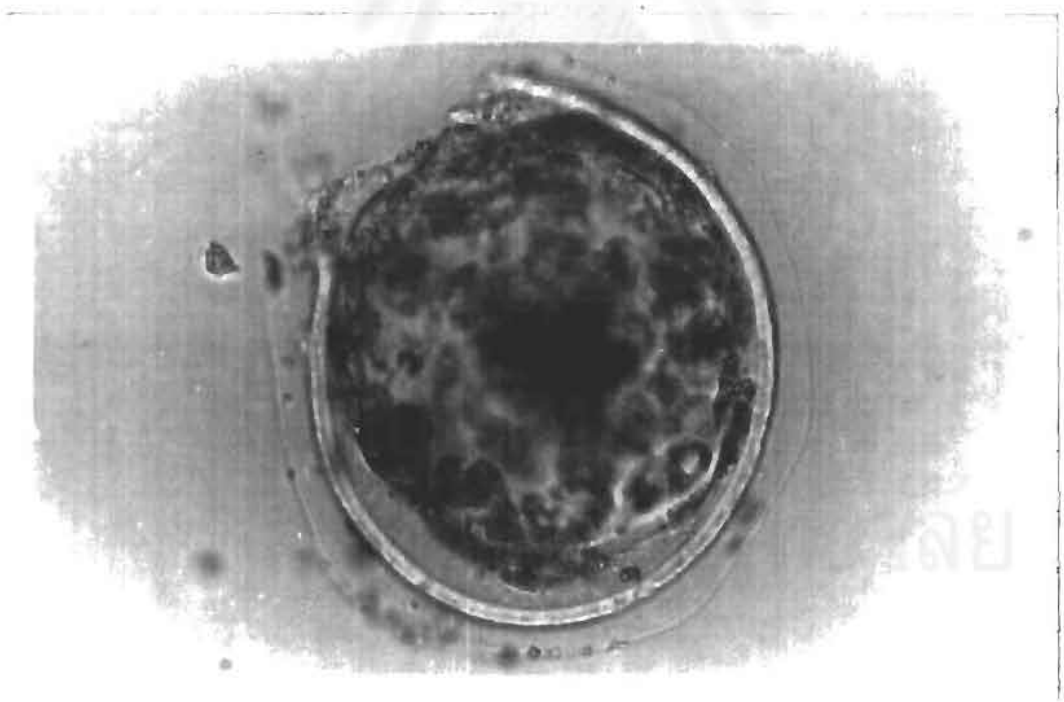
รูปที่ 3.6 ตัวอ่อนระยะ 2-8 เซลล์ที่เสื่อมสลายที่เลี้ยงไว้ในท่อนำไข่ของกระต่าย



รูปที่ 3.7 ตัวอ่อนระยะมอรูล่าของลูกโค (cM) และของแม่โค (CM) หลังหลังแช่แข็งนาน 6 เดือน และทำละลาย



รูปที่ 3.8 ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่เจริญขึ้นในหลอดทดลอง จากตัวอ่อนระยะมอรูล่าที่ได้จากการเลี้ยงในท่อนำไข่ และผ่านการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว



รูปที่ 3.9 ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสจากโอโอไซต์ของแม่โคที่กำลังจะหลุดจากเปลือกจากตัวอ่อนในรูปที่ 3.8 เลี้ยงต่ออีก 48 ชม.

วิจารณ์

ในการศึกษานี้ไม่พบความแตกต่างของอัตราการเจริญพร้อมปฏิสนธิ (maturation) ระหว่างโอโอไซต์ชนิด matured และระยะ immature โดยปกติการเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิสามารถตรวจได้คร่าว ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยไม่ต้องย้อมสีโดยดูจากการแผ่ขยายตัวของเซลล์คิวมูลัสรอบ ๆ เปลือกหุ้มตัวอ่อนและการปรากฏตัวของโพลาร์ บอดีที่ 1 (first polar body) บริเวณขอบของโอโอไซต์ ในการทดลองนี้ไม่ได้ทำการตรวจดูโอโอไซต์ชนิด matured ด้วยวิธีนี้ แต่ได้สุ่มเอาตัวอย่างมาจำนวนหนึ่งเพื่อย้อมสีดูการปรากฏตัวของโครโมโซมระยะเมตาเฟส (metaphase plate) ซึ่งเป็นระยะเมตาเฟส ทู ของการแบ่งตัวแบบไมโอซิส โครโมโซมมีการจัดเรียงตัวของโครโมโซมบริเวณขอบเซลล์ ในการทดลองนี้ได้ใช้เวลาของการเลี้ยงโอโอไซต์ที่แตกต่างกัน โดยใช้เวลา 4 ชม.สำหรับโอโอไซต์ชนิด matured และ 24 ชม. สำหรับโอโอไซต์ immature ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ใช้เหมือนกับในแม่โค Armstrong และคณะ (1994) เสนอแนะว่าโอโอไซต์ชนิด matured สามารถนำมาปฏิสนธินอกร่างกายได้เลยโดยไม่ต้องนำไปเพาะเลี้ยงก่อนก็ได้ อัตราการเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธินี้ต่ำกว่าที่รายงานโดย Bedirian และ Baker (1975) เท่ากับ 81% แต่ใกล้เคียงกับ Armstrong และคณะ (1991) เท่ากับ 73% และสูงกว่าของ Duby และคณะ (1996) ผันแปรระหว่าง 14-53% โดยขึ้นกับช่วงระยะเวลาที่เก็บโอโอไซต์กับเวลาที่ให้ฮอร์โมน เอส ซี จี อัตราที่ได้นี้สูงกว่าที่ได้ในลูกกระบือปลัก (มงคล และคณะ, 2537) ซึ่งน่าจะเป็นผลของการเติมเอาเซลล์กรานูโรซ่าในน้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์ด้วย (วันเพ็ญและมงคล, 2537) อย่างไรก็ตามอัตราความสำเร็จในการเลี้ยงโอโอไซต์นี้ยังต่ำกว่าที่มีรายงานในโอโอไซต์ที่ได้จากแม่โคซึ่งจะสูงประมาณ 80-90% (Asrmstrong *et al.*, 1991) Duby และคณะ (1996) ได้เสนอแนะว่าอัตราความสำเร็จของการปฏิสนธิและการเจริญของโอโอไซต์ของลูกโคหลังปฏิสนธินอกร่างกาย เกิดจากปัญหาที่โอโอไซต์ของลูกโคมีอัตราความพร้อมที่จะปฏิสนธิในหลอดทดลองต่ำ (*in vitro* maturation)

จากการทดลองนี้พบว่าโอโอไซต์ที่เจาะได้จากรังไข่ของลูกโคที่ฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปินสามารถนำมาปฏิสนธินอกร่างกายได้ แต่อัตราการแบ่งตัวนี้ยังต่ำกว่าผลการทดลองของ Kajihara และคณะ(1991) โดยศึกษาในลูกโคอายุ 5 เดือน โอโอไซต์ที่ได้หลังจากนำไปทำการปฏิสนธิ มีอัตราการแบ่งตัวเท่ากับ 48.3% จากเอกสารอ้างอิงหลาย ๆ ฉบับ พบว่าโอโอไซต์ของลูกโคจะมีประสิทธิภาพของการปฏิสนธินอกร่างกายต่ำกว่าโอโอไซต์ของแม่โค Palma และคณะ (1993) ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของโอโอไซต์ทั้งสองชนิด พบว่าจำนวนตัวอ่อนที่ได้ต่อสัตว์หนึ่งตัวเท่ากับ 1.8 ตัวอ่อนในลูกโคเปรียบเทียบกับ 3.4 ตัวอ่อนในแม่โค และจำนวนตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเท่ากับ 1.3 ตัวอ่อนในลูกโคและ 2.2 ตัวอ่อนในแม่โค ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่รวมรวมโดย Duby และคณะ (1996) ในการประชุมของสมาคมการย้ายฝากตัวอ่อนนานาชาติ ในปี คศ. 1996 ซึ่งได้ข้อสรุปว่าอัตราการปฏิสนธินอกร่างกาย

มักปกติ แต่อัตราการแบ่งตัวและการเจริญต่อเนื่องเป็นตัวอ่อนระยะมอรูล่าและระยะบลาสโตซีสนั้นจะต่ำกว่าที่สังเกตพบเมื่อเปรียบเทียบกับในการปฏิสนธิของโอโอไซต์ของแม่โค ข้อมูลนี้ยืนยันจากการทดลองของ Revel และคณะ (1995) ประสิทธิภาพของโอโอไซต์ของลูกโคอายุ 3 เดือนต่ำกว่าแม่โค โดยเฉพาะอัตราของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส ซึ่งต่ำกว่าประมาณ 10% และเมื่อนำเอาตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสไปย้ายฝากในแม่โคตัวรับพบว่าอัตราการตายของตัวอ่อนค่อนข้างสูง แม่โคตั้งท้องเพียงตัวเดียวจาก 23 ตัว คิดเป็น 4% ต่ำกว่าตัวอ่อนจากแม่โคที่ได้อัตราตั้งท้อง 38% (10/26) ข้อมูลดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองของ Levesque และ Sirard (1994) เมื่อใช้โอโอไซต์จากลูกโคอายุ 40 วัน ข้อมูลที่พบนี้ไม่เฉพาะในโคเท่านั้น จากการสังเกตในสุกร Pinkert และคณะ (1989) พบว่าอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนที่เก็บมาจากสุกรสาวในหลอดทดลองมักมีอัตราที่ไม่สูงเท่ากับที่ได้จากแม่สุกร อย่างไรก็ตามข้อมูลดังกล่าวจะแตกต่างกับผลของนักวิจัยชาวออสเตรเลียที่ไม่พบความแตกต่างของความสามารถของตัวอ่อนจากโอโอไซต์ลูกโคเมื่อเปรียบเทียบกับของแม่โค (Armstrong *et al.*, 1992; Irvine *et al.*, 1993) ซึ่งมีผู้แย้งว่าใช้จำนวนโอโอไซต์น้อยเกินไป เหตุผลที่อธิบายความแตกต่างของความสามารถของโอโอไซต์ทั้งสองที่สำคัญคือ

ประการที่หนึ่ง เริ่มจากอัตราความสามารถในการเลี้ยงให้พร้อมปฏิสนธิจะต่ำกว่า Palma และคณะ (1993) อัตราการเจริญพร้อมปฏิสนธิในระดับนิวเคลียสในหลอดทดลอง (nuclear maturation rate) ต่างกันประมาณ 30% (37% ในลูกโคและ 65% ในแม่โค) ประการที่สอง การเจริญพร้อมปฏิสนธิในระดับไซโตพลาสซึม (cytoplasmic maturation) อาจเกิดไม่สมบูรณ์ การวัดความสามารถในระดับไซโตพลาสซึมต้องใช้วิธีการทางชีวเคมีในการวัดการสังเคราะห์ RNA หรือดูจากอัตราการเจริญเป็นตัวอ่อนระยะท้าย เช่นระยะมอรูล่าหรือระยะบลาสโตซีส อัตราการเจริญในระดับไซโตพลาสซึมดังกล่าวขึ้นกับขนาดของโอโอไซต์ หากเป็นโอโอไซต์จากฟอลลิเคิลที่โตเต็มที่ (graffian follicle) จะเกิดได้อย่างสมบูรณ์ จากรายงานพบว่าโอโอไซต์ที่ได้จากลูกโคมักมีขนาดเล็กกว่าของแม่โค และมีความผันแปรค่อนข้างสูงในขนาดของฟอลลิเคิลดังแสดงให้เห็นในบทที่ 2

ประการที่สาม พบว่าการกระจายตัวของ cortical granules จะเกิดขึ้นน้อยในกรณีของการปฏิสนธิของโอโอไซต์จากลูกโค และการหลั่งของแคลเซี่ยมไอออน (Ca++) จากการกระตุ้นของสาร inositol 1,4,5 triphosphate (InsP3) จะต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับโอโอไซต์ของแม่โค (Duby et al., 1996) ในการทดลองนี้พบว่าแม้ตัวอ่อนจะเกิดการปฏิสนธิได้แต่ปัญหาที่สำคัญคือการพัฒนาต่อเนื่องในหลอดทดลองอยู่ในเกณฑ์ที่ยังไม่น่าพอใจ การทดลองเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดทดลองนี้ได้ทำซ้ำกว่า 15 ครั้ง แต่ละครั้งจะพบว่าอัตราการแบ่งตัวจะไม่เกิน 50% และบางครั้งไม่มีการแบ่งตัวเลยทั้งที่ใช้วิธีการเดียวกันโดยตลอด รวมทั้งการแบ่งตัวของตัวอ่อนเพียงหนึ่งถึงสองรอบ (cycle) ก็หยุด จึงพบตัวอ่อนระย 2-4 เซลล์เป็นจำนวนมาก ส่วนตัวอ่อนระยะที่ต้องการคือระยะมอรูล่าและระยะบลาสโตซีส มีจำนวนน้อยมาก คณะผู้วิจัยได้ให้ข้อสันนิษฐานนอกเหนือจากเหตุผลของความสามารถของการพัฒนาของโอโอไซต์ที่ต่ำจากตัวโอโอไซต์เองแล้ว ยังอาจขึ้นกับสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมซึ่งอาจหมายถึงความต้องการของ

สารอาหารบางอย่างหรือปัจจัยบางปัจจัยที่สนับสนุนการเจริญอย่างต่อเนื่อง จึงได้นำเอาตัวอ่อนหลังปฏิสนธิไปเลี้ยงฝากชั่วคราวในท่อนำไข่แกะหรือกระต่าย ท่อนำไข่ของสัตว์ตัวกลางมีข้อได้เปรียบกว่าการเลี้ยงในหลอดทดลอง (*in vitro*) เนื่องจากในท่อนำไข่จะมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา (dynamic) ในแง่ของสารคัดหลั่ง อาทิเช่น โปรตีน ปัจจัยของการเจริญ (growth factors) ฯลฯ ในขณะที่หากเลี้ยงในหลอดทดลองจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวหรือไม่สามารถสังเคราะห์ได้ นอกจากนี้สิ่งสำคัญอีกสิ่งหนึ่งคือ ท่อนำไข่ของสัตว์ตัวกลางจะช่วยให้ตัวอ่อนมีการพัฒนาผ่านระยะหยุดตัว (blocking stage) ซึ่งในโคจะพบที่ระยะ 8 เซลล์ไปยัง 16 เซลล์ หรือการแบ่งตัวที่ 4 (4th cell cycle) อีกด้วย ระยะหยุดตัวดังกล่าวจะพบในการเลี้ยงตัวอ่อนโคในน้ำยาเพาะเลี้ยงอย่างเดียว ผลการทดลองพบว่าตัวอ่อนของลูกโคหลังปฏิสนธินอกร่างกายแบ่งตัวได้อย่างปกติเฉพาะในท่อนำไข่ของแกะเท่านั้นจนถึงระยะมอรูล่าและระยะบลาสโตซีส แต่อย่างไรก็ตามตัวอ่อนส่วนใหญ่ที่ฝากในท่อนำไข่ของแกะหรือกระต่าย หยุดการเจริญหลังแบ่งตัวได้เพียงสองถึงสามครั้งเท่านั้น ซึ่งเป็นข้อมูลที่ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป ข้อมูลนี้แตกต่างกับที่ได้ในการฝากตัวอ่อนของสุกรที่คณะผู้วิจัยได้เคยทดลอง (มงคลและคณะ, 2536) โดยอัตราการพัฒนาเป็นตัวอ่อนปกติจากตัวอ่อนระยะ 1-2 เซลล์ที่เก็บหลังการผสมธรรมชาติ (*in vivo*) ได้ถึง 90, 79% และ 68% เมื่อระยะเวลาที่ใช้จาก 48 เป็น 72 และ 96 ชม. ตามลำดับ อย่างไรก็ตามตัวอ่อนสุกรใช้เวลาเพียง 4-5 วัน ที่จะพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะมอรูล่าและระยะบลาสโตซีส ในขณะที่ตัวอ่อนของโคต้องใช้เวลาถึง 6-7 วัน เนื่องจากระยะเวลาในการแบ่งเซลล์ต่างกันตามชนิดของสัตว์

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาการเลี้ยงตัวอ่อนด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิดปราศจากเซลล์ (cell free culture) และเลี้ยงตัวอ่อนร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง (co-culture) ซึ่งการเลี้ยงแบบหลังจะให้อัตราการพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะมอรูล่าและระยะบลาสโตซีสสูงกว่าการเลี้ยงแบบแรกประมาณ 10% รวมทั้งคุณภาพของตัวอ่อนจะดีกว่าด้วย (Goto *et al.*, 1994) โดยเซลล์ส่วนใหญ่ที่ใช้มักเป็นเซลล์บุท่อนำไข่ (Bovine Oviductal Epithelial Cell, BOEC) เซลล์กรานูโรซา (Granulosa cell monolayers) หรือในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเซลล์ monolayers ชนิด Buffalo rat liver cells (Rehman *et al.*, 1994) ซึ่งไม่ยุ่งยากในการเตรียมเหมือนกับเซลล์ BOEC วิธีการดังกล่าวนี้สามารถทดแทนการย้ายฝากในท่อนำไข่ของแกะหรือกระต่ายชั่วคราวได้ แต่อย่างไรก็ตามทางคณะผู้วิจัยมีความคิดเห็นว่าคุณภาพของตัวอ่อนจากการเลี้ยงในหลอดทดลองโดยตลอดน่าจะต่ำกว่าที่ได้จากการเลี้ยงในท่อนำไข่ของแกะ

จากผลของการแช่แข็งตัวอ่อน แม้ว่าจำนวนตัวอ่อนที่ได้น้อย เนื่องจากมีความสูญเสียในสองจุด คือ จุดที่หนึ่งตัวอ่อนจาการปฏิสนธินอกร่างกายค่อนข้างเปราะบาง ในส่วนของเปลือกโซน่าและเซลล์ของตัวอ่อน Le Guienne และคณะ (1988) ได้เสนอแนะว่าตัวอ่อนโคที่เกิดจากการปฏิสนธินอกร่างกายจะมีคุณภาพด้อยกว่าตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธิตามธรรมชาติ จุดที่สองมีจำนวนตัวอ่อนบางส่วนโดยเฉพาะจากลูกโคที่สูญหายขณะทำละลายเนื่องจากมีการหลุดของปลายสำลีที่อยู่ตอนปลายเนื่องจากมีแรงดันจากด้านในหลอด ทำให้ไม่สามารถประเมินความสำเร็จในส่วนนี้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งเทคนิคนี้จำเป็นต้องมีการปรับปรุงแก้ไขต่อไป

อย่างไรก็ตามแม้จำนวนตัวอ่อนที่ประเมินมีน้อยแต่จากการศึกษาครั้งนี้ จากรูปที่ 3.7, 3.8 และ 3.9 แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่ตัวอ่อนจากการปฏิสนธินอกร่างกายที่สามารถทนต่อการแช่แข็งและการทำละลายได้

สรุปจากงานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ในการเลี้ยงโอโอไซต์ของลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์ให้พร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลองได้ และโอโอไซต์ที่เลี้ยงไว้สามารถเกิดการปฏิสนธิกับตัวอสุจิในหลอดทดลอง และตัวอ่อนสามารถเจริญในท่อนำไข่ของแกะซึ่งมีความเหมาะสมในการเลี้ยงตัวอ่อนจากลูกโคและแม่โคหลังการปฏิสนธินอกร่างกายมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับท่อนำไข่ของกระต่าย วิธีการย้ายฝากชั่วคราวในท่อนำไข่ของแกะก็จะเป็นวิธีหนึ่งในการผลิตตัวอ่อนที่มีคุณภาพจากกระบวนการดังกล่าวถึงระยะที่พร้อมนำไปย้ายฝากในแม่โคตัวรับต่อไป ตัวอ่อนดังกล่าวยังสามารถนำไปแช่แข็งและเจริญต่อเนื่องต่อไปได้ การศึกษาด้านการเพิ่มประสิทธิภาพในการแช่แข็งตัวอ่อนที่เกิดจากการปฏิสนธินอกร่างกายเป็นสิ่งที่ต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

มงคล เตชะกำพุ วิชัย ทันตศุภารักษ์ วันเพ็ญ ศรีอนันต์ และจินดา สิงห์ลอ 2536 การศึกษาการเจริญของตัวอ่อนสุกรภายหลังฝากชั่วคราวในท่อนำไข่ของกระต่ายและนำฝากในสุกรตัวรับ รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2536 สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ 32 หน้า

มงคล เตชะกำพุ ชัยณรงค์ โลหชิต วิชัย ทันตสุภารักษ์ วันเพ็ญ ศรีอนันต์ จินดา สิงห์ลอ และจินตนา อินทรมงคล 2537 การใช้ฮอร์โมนโกนาโดโทปินเพื่อกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ของลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์ รายงานผลการวิจัยทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 23 หน้า

วันเพ็ญ ศรีอนันต์ และมงคล เตชะกำพุ 2537 ผลการเติมเซลล์กรานูโลซ่าและซีรั่มต่ออัตราการเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์สุกร ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการสัตวแพทยสมาคม ครั้งที่ 21 สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ โรงแรมดิเอมเมอรัลด์ กรุงเทพฯ 28-30 พฤศจิกายน 2537 หน้า 195-201

Armstrong, D.T., Holm, P., Irvine, B., Peterson, B.A., Stubbing, R.b., Mclean, D., Stevens, G. and Seamark, R.F. 1991. Laparoscopic aspiration and *in vitro* maturation of oocytes from calves. Theriogenology. 35: 182.(Abstr.)

Armstrong, D.T.,Holm, P., Irvine, B., Peterson, B.A., Stubbing, R.b., Mclean, D., Stevens, G. and Seamark,R.F. 1992. Pregnancies and live birth from *in vitro* fertilization of calf oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. Theriogenology. 38(4):667 -678.

Armstrong, D.T., Irvine, B., Earl ,C.R., Mclean ,D. and Seamark, R.F. 1994. Gonadotropin stimulation regimens for follicular aspiration and *in vitro* embryo production from calf oocytes. Theriogenology. 42:1127-1236.

Bavister, B.D. and Minami, N. 1986. Use of cultured mouse oviducts to by-pass *in vitro* development block in cleavage stage hamster embryos. Biol. Reprod. 34, Suppl. I 191: 284. (Abstr.)

Bedirian, K.N. and Baker, R.D. 1975. Follicular development, oocyte maturation and ovulation gonadotrophin-treated prepuberal calves. J.Anim.Sci. 55: 193-199.

Crister, E.S., Leibfried-Rutledge, M.L., Eyestone, W.H., Northey, D.L. and First, N.L. 1986. Acquistion of developmental competence during maturation *in vitro*. Theriogenology. 25: 150.(Abstr.)

Duby, R.T. and Robl, J.M. 1987, Oocyte collection from gonadotropin-stimulated calves and their subsequent fertilization *in vitro*. J.Anim.Sci. 65 (Suppl.1) :387. (Abstr.)

Duby, R.T., Damiani, P., Looney, C.R., Fissore, R.A. and Robl, J. M. 1996. Prepuberal calves as oocyte donors: Promises and Problems. Theriogenology. 45(1):121-130.

Gondolfi, F. And Moor, R.M. 1987. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. J. Reprod. Fert. 81:23-28.

Goto, K., Iwai, N., Ide, K., Takuma, Y. and Nakanishi, Y. 1994. Viability of one-cell bovine embryos cultured *in vitro*: comparison of cell-free culture with co-culture. J. Reprod. Fert. 100:239-243.

Hermann, H.H. and Holtz, W. 1985. Storage of pig embryos in the ligated rabbit oviduct and its effect on the viability after re-transfer to synchronized gilts. Anim. Reprod. Sci., 28:313-315.

Irvine, B., Armstong, D.T., Earl, C.R., McLean, D. And Seamark, R.F. 1993. Follicle development and oocyte recovery from calves with repeated gonadortrpin stimulation and follicular aspiration. Theriogenlogy. 39:237. (Abstr.)

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

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

Le Guienne, B., Gerard, M., Chupin, D. And Thibault, C. 1988. Developpement *in vitro* de l'oeuf bovin apres fecondation *in vitro*. Proceeding of the Fourth Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association (Lyon), p33.

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

Palma, G.A., Clement-Sengewald, A. and Krefft, H. 1993. *In vitro* production of cattle embryos from calf oocytes. Theriogenology. 39:278. (Abstr.)

Pinkert, C.A., Kooyman, D.L., Baumgartner, A. and Keisler, D.H. 1989. *In vitro* development of zygotes from superovulated prepubertal and mature gilts. J. Reprod. Fert. 87:63-66.

Revel, F., Mermillod, P., Peynot, N., Renard, JP. and Heyman, Y. 1995. Low developmental capacity of *in vitro* matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. J. Reprod. Fert. 103:115-120.

Rehman, N., Collins, A.R., Suh, T.K., and Wright, R.W. Jr. 1994. Development of *in vitro* maturated and fertilized bovine oocytes co-cultured with buffalo rat liver cells. Theriogenology. 41:1453-1462.

Seidel, G.E., Jr., Larson, L.L., Spilman, C.H., Hanh, J. and Foote, R.H. 1971. Culture and transfer of calf ova. J. Anim. Scie. 54(6):923-925.

Techakumphu, M., Wintengerger-Torres, S. and Sevellec, C. 1987. Survival of rabbit embryos after synchronous and asynchronous transfer. Anim. Reprod. Sci.12:297-304.

Techakumphu, M., Srianan, W., Singlor J. and Tantasuparak, W. 1993. Embryo production in pigs by *in vitro* fertilization. Thai J. Vet. Med. 23(3):189-199.

บทที่ 4

การพัฒนาการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี OVUM PICK UP

บทนำ

การเก็บโอโอไซต์ในลูกโคสามารถทำได้หลายวิธี เริ่มจากการเก็บหลังฆ่า โดยเฉพาะเพื่องานวิจัย แต่หากใช้เพื่อนำไปใช้ในวงการเลี้ยงโค อาจใช้วิธีอื่น ๆ เช่น ด้วยการเปิดผ่าช่องท้อง ซึ่งต้องอาศัยการวางยาสลบทั่วตัว หรือการเก็บจากการส่องด้วยกล้องลาปาโรสโคป ในประเทศไทยการเก็บโอโอไซต์จากลูกสัตว์ได้มีรายงานโดย มงคล และคณะ (2537) โดยเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ของลูกกระบือปลักอายุประมาณ 6-10 เดือน หลังกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน ซึ่งได้อัตราการเก็บโอโอไซต์ประมาณ 60-80% ขึ้นกับชนิดของฮอร์โมนที่ใช้ ในการทดลองในบทที่ 2 ในเรื่องการกระตุ้นรังไข่ลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์และการกระตุ้นซ้ำ พบว่ามีข้อจำกัดเนื่องจากไม่สามารถทำซ้ำได้มากครั้งและยังก่อให้เกิดการยึดติดของรังไข่ ท่อนำไข่และมดลูกกับอวัยวะภายในหรือกับผนังช่องท้อง ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีเจาะผ่านเครื่องมือคลื่นความถี่สูง (Ultrasonography) ซึ่งไม่จำเป็นต้องวางยา เรียกย่อ ๆ "OPU (Ovum Pick Up)" วิธีนี้ได้มีการดัดแปลงมาจากการเก็บโอโอไซต์ในสตรีและในแม่โค จุดประสงค์ของงานทดลองนี้เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี OPU ในลูกโคพันธุ์พื้นเมืองไทยที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนซ้ำหลาย ๆ ครั้ง

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

เป็นลูกโคพันธุ์พื้นเมืองไทย เพศเมีย อายุ 5-6 เดือน น้ำหนักประมาณ 100 กก จำนวน 4 ตัว (หมายเลข B21, B22, B23, B24) การเตรียมลูกโคทดลองทำเช่นเดียวกับการทดลองในบทที่ 2 โดยลูกโคได้รับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดฝังหู* ประมาณ 1 สัปดาห์ก่อนเริ่มการกระตุ้นรังไข่

การกระตุ้นรังไข่

ฉีดฟอลลิคูล่าร์ สติมูเรทติ้ง ฮอร์โมน (เอฟ เอส เอช; FSH)** จำนวน 120 มก. (เข้ากล้าม โดยแบ่งฉีด 3 วัน ๆ ละ 2 ครั้ง (เช้า เย็น, 30/30,20/20,10/10 มก.) โปรแกรมดังกล่าวดัดแปลงมาจากการทดลองในบทที่ 2 โดยลดปริมาณฮอร์โมนและไม่ต้องถอดฮอร์โมนโปรเจสเตอรโรนออกขณะกระตุ้นจนถึงวันเจาะเนื่องจากเป็นการทดลองต่อเนื่องทุก 2 สัปดาห์ ทำการดูดเก็บโอโอไซต์หลังกระตุ้น เอฟ เอส เอช เข็มสุดท้าย ประมาณ 24 ชม.

การเก็บโอโอไซต์

อดอาหารและน้ำลูกโคประมาณ 24 ชม. ควบคุมลูกโคด้วยการผูกติดให้ยืนกับเตียงแฮนโนเวอร์ในลักษณะตั้งตรง ดังรูปที่ 4.1

รูปที่ 4.1 ภาพแสดงการดูดเก็บโอโอไซต์ในลูกโค โดยสอด transvaginal probe สอดเข้าทาง vagina และควบคุมขณะทำการเจาะด้วยจอภาพ (monitor) และชุด vacuum pump

---

*Crestar® : Intervet, Holland

**Folltropin® -V : Vetepharm, Canada

ก) เครื่องตรวจอวัยวะภายในด้วยคลื่นความถี่สูง*(อัลตราซาวน์) โดยมีจอรับภาพให้เห็นภาพของรังไข่ขณะเจาะ และแนวของเข็มที่เจาะ

ข) convex array transvaginal probe* ขนาดความถี่ 5 MHz

ค) เข็มเจาะเบอร์ 17 ยาว 34.5 ซม**

ง) Vacuum pump**

จ) Test tube heater**

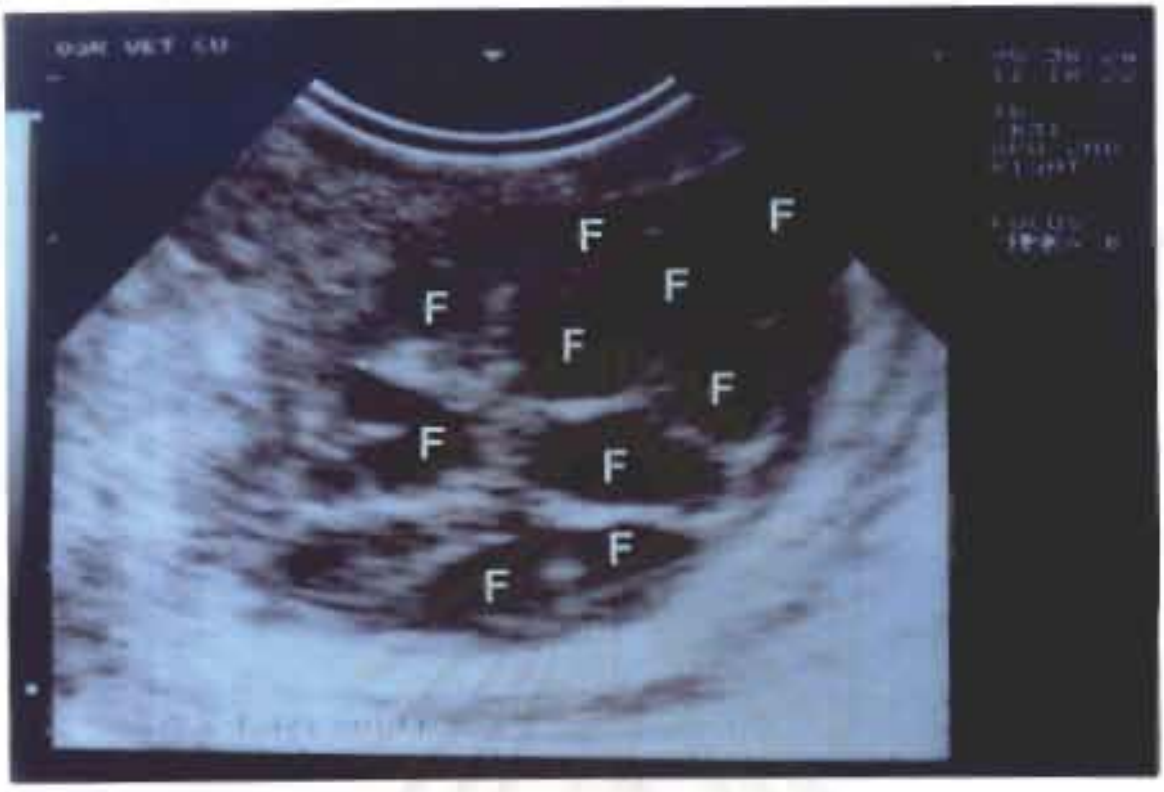
ก่อนการเก็บโอโอไซต์ ฉีดยาชา 2%Xylocaine HCl จำนวน 1 มล. เข้าไขสันหลังในช่องว่างระหว่างกระดูกเชิงกรานและกระดูกหางข้อที่ 1 ทำความสะอาดบริเวณปากช่องคลอดด้วยยาฆ่าเชื้อ และเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ สอด transvaginal probe ที่หล่อลื่นปลายด้วย acoustic gel และสวมหุ้ม probe ด้วยถุงยางชนิดยาว ดันปลาย probe เข้าทางด้านบนช่องคลอดและให้ลึกสุดจนถึงบริเวณหน้าคอมดลูก ใช้มืออีกมือหนึ่งล้วงทางทวารหนักคลำหารังไข่และดึงมาให้อยู่ในแนวหน้าตัดของ probe ภาพของรังไข่จะปรากฏอยู่บนจอรับภาพ (รูปที่ 4.2) ติดตัว probe ด้วยเข็มเจาะโอโอไซต์ แทงเข็มทะลุมุมบนของผนังช่องคลอด ปลายเข็มจะปรากฏบนแนวเส้นประของเข็ม ดันเข็มทะลุฟอลลิเคิลอย่างช้า ๆ เมื่อปลายเข็มเข้าไปในฟอลลิเคิล ดูดโอโอไซต์พร้อมของเหลวในฟอลลิเคิลด้วยความแรง 80-100 mmHg ควบคุมด้วย foot pedal pump ฟอลลิเคิลจะแฟบลงทันที ของเหลวที่ถูกดูดไหลเข้าไปตามท่อโปลีเอทีลีนที่เคลือบด้วยสารเฮปารีน ลงในหลอดพลาสติกปลอดเชื้อขนาด 15 มล. ที่มีน้ำยา TCM199 2.5 mMHepes จำนวน 1 มล. บรรจุอยู่ ทำการดูดทีละฟอลลิเคิล โดยใช้มือที่ล้วงในทวารหนักจับรังไข่พลิกไปมาให้ฟอลลิเคิลที่จะเจาะอยู่ในแนวปลายเข็ม เจาะฟอลลิเคิลจนครบทุกฟอลลิเคิลที่สังเกตเห็น หลังเสร็จรังไข่ด้านหนึ่ง ทำการเจาะฟอลลิเคิลในรังไข่อีกข้างหนึ่งด้วยวิธีการเดียวกัน หลังดูดเก็บแล้วฉีดยาปฏิชีวนะชนิดเพนนิซิลลินและสเตรปโตมัยซิน 1,00,000 ไอยู*** เข้ากล้ามเนื้อ ทำการเก็บซ้ำลูกโคทุก ๆ 2 สัปดาห์ ติดต่อกันในลูกโคหมายเลข B21 และ B22 จำนวน 5 ครั้ง หมายเลข B23 จำนวน 2 ครั้ง และหมายเลข B24 จำนวน 1 ครั้ง โดยมีโปรแกรมการกระตุ้นเช่นเดียวกันทุกครั้ง ภาพของการเจาะรังไข่แสดงในไดอะแกรมในรูปที่ 4.3

---

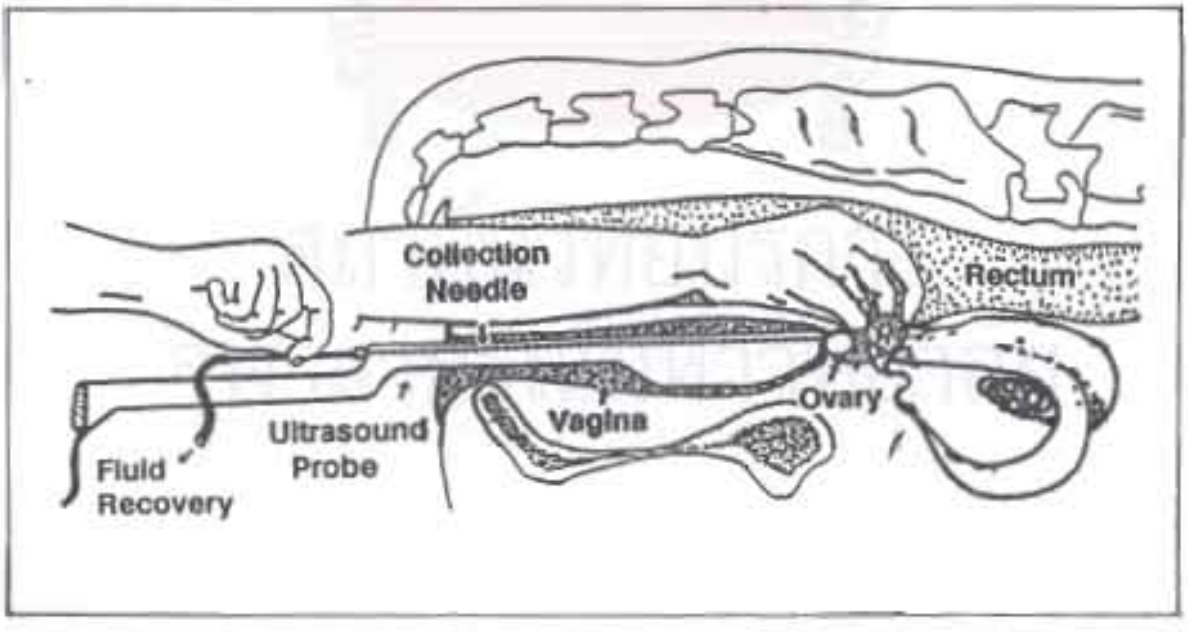
*Aloka, SSD-620, Japan

**Looney Bovine Ovum Aspiration Set, V-BOAS-17r35-S-VIAS,Cook, Veterinary Products, Australia

***Duphapen Strep® (1cc = Procain Penicillin G 200,000 iu, Dihydrostreptomycin sulphate 250mg) Solvay Animal Health, Thailand



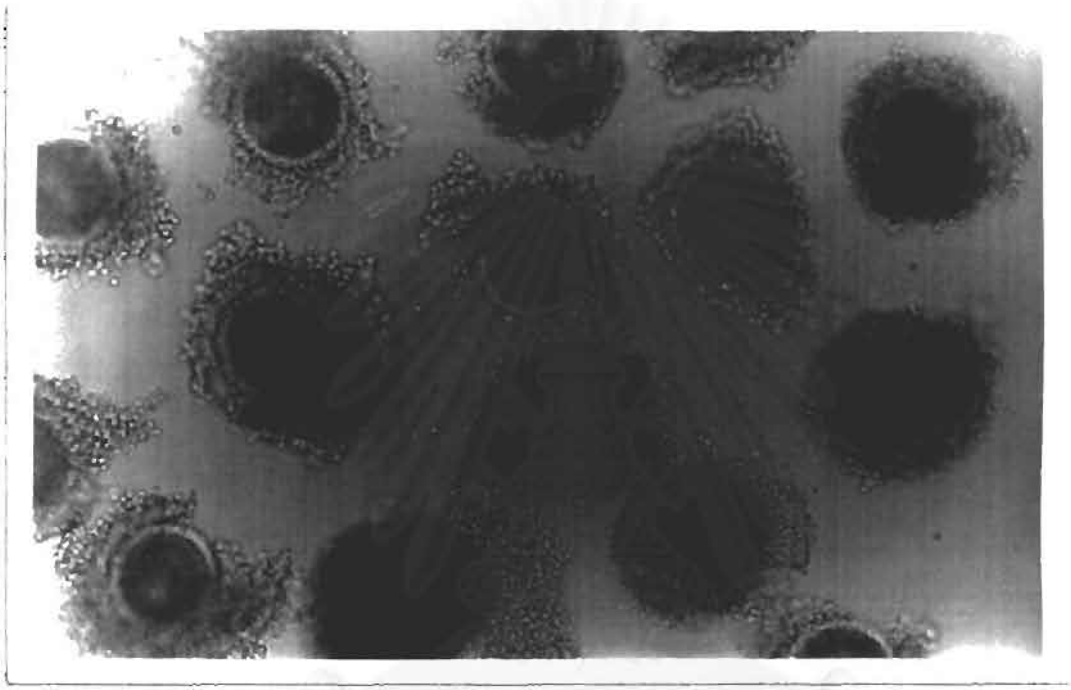
รูปที่ 4.2 ภาพรังไข่ของลูกโคที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช (F = Follicle) จากหน้าจอเครื่องอัลตราซาวน์



รูปที่ 4.3 ไดอะแกรมแสดงการเจาะโอโอไซต์จากรังไข่ด้วยวิธี OPU

การตรวจหาโอโอไซต์

นำของเหลวที่เจาะได้เทใส่ในกรวยกรองตัวอ่อนขนาด 0.45 ไมครอน* ใช้น้ำเกลือ 0.9% เทลงตามเพื่อล้างเลือด และทำให้ของเหลวใสง่ายต่อการตรวจหา เหลือน้ำยาไว้ประมาณ50 มล. เทใส่เพลทพลาสติก แล้วตรวจหาภายใต้กล้องสเตอริโอ กำลังขยาย 40 เท่า เก็บโอโอไซต์ในน้ำยา TCM 199 2.5 mMHepes และจัดชนิดของโอโอไซต์เป็น 4 ลักษณะ คือ COC (Complex oocyte cumulus), S+P (Single or Partial oocyte cumulus), D (Denude oocyte) และ EXP (Expand cumulus oocyte)



รูปที่ 4.4 โอโอไซต์ชนิด compact cumulus oocyte ที่ดูดจากรังไข่ของลูกโคหลังกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

*Bovine embryo cup"CMPTL", Millipore, 125/B OX, Brazil

ผล

จากการเก็บโอโอไซต์พบว่าจำนวนโอโอไซต์เฉลี่ยในแต่ละตัวเท่ากับ 9.92 ± 5.2 โอโอไซต์ โดยหากทำการกระตุ้นซ้ำจะได้โอโอไซต์เฉลี่ยเท่ากับ 10.2±7.2 ในลูกโคหมายเลข B21 และ 9.8±4.5 สำหรับลูกโคหมายเลข B22 ส่วนใหญ่โอโอไซต์ชนิด COC เท่ากับ 71.3% (รูปที่ 4.4) นอกจากนั้นเป็นชนิด S+P เท่ากับ 16.3% ชนิด D เท่ากับ 3.1% และ ชนิด EXP เท่ากับ 9.3% ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ผลการเก็บโอโอไซต์และชนิดของโอโอไซต์ที่เก็บโดย OPU ในลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์

ลูกโค	ครั้งของการกระตุ้น	จำนวนโอโอไซต์	ชนิดโอโอไซต์			
			COC	S+P	D	EXP
B21	1	4	4	-	-	-
	2	5	5	-	-	-
	3	17	15	2	-	-
	4	19	13	6	-	-
	5	6	3	-	3	-
	ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบน	10.2±7.2				
B22	1	9	8	-	-	1
	2	5	4	1	-	-
	3	15	4	3	-	8
	4	14	14	-	-	-
	5	6	5	-	-	1
	ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบน	9.8±4.5				
B23	1	5	3	1	1	-
B24	1	12	10	2	-	-
	2	12	4	6	-	2
	รวม	129	92 (71.3%)	21 (16.3%)	4 (3.1%)	12 (9.3%)
	ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนรวมทุกตัว	**9.92±5.2**				

วิจารณ์

ผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่ามีความเป็นไปได้ในการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีการเจาะผ่านผนังช่องคลอดและดูดเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี OPU ในลูกโคที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปินชนิด เอฟ เอส เอช วิธีนี้มีข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับการเปิดผ่าช่องท้อง (Laparotomy) เนื่องจากสามารถเจาะได้ซ้ำหลายครั้ง จากสัตว์ตัวเดียวกันโดยไม่มีผลต่อการกระตุ้นครั้งต่อไปและไม่ลดความสมบูรณ์พันธุ์ แม่โคสามารถมีวงจรการเป็นสัดปกติ ตกไข่ได้ และสามารถอุ้มท้องและคลอดลูกได้ (Bungartz *et al.*, 1995; Kruip *et al.*, 1994) ในการทดลองนี้สามารถเจาะได้ติดต่อกันทุก 2 สัปดาห์ โดยไม่ต้องมีการพักลูกโคนานเมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บโอโอไซต์ด้วยการผ่าตัดเช่นเดียวกับการทดลองในบทที่ 2 วิธีนี้จะช่วยประหยัดเวลาในการกระตุ้นและการเลี้ยงดูสัตว์ทดลองได้มากรวมทั้งไม่มีการยึดติดของอวัยวะสืบพันธุ์ เช่น มดลูก รังไข่ กับอวัยวะภายใน เป็นต้น มีการศึกษาในแม่โคพบว่าสามารถทำการเก็บได้ทุกสัปดาห์ในวงรอบการเป็นสัดปกติโดยไม่ต้องทำการกระตุ้นเลย (Kruip *et al.*, 1994)

ข้อได้เปรียบของการเจาะด้วย OPU เมื่อเทียบกับการผ่าเก็บ คือไม่ต้องยุ่งยากในการดูแลหลังการเจาะเหมือนการผ่าตัด สัตว์สามารถฟื้นตัวได้หลังการเก็บโอโอไซต์ทันที และใช้เวลาในการปฏิบัติน้อยกว่ามาก โดยทั่วไปการเจาะด้วย OPU ในรังไข่ซ้ายและขวาในการทดลองนี้ใช้เวลาประมาณ 30 นาทีต่อตัว อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อที่น่าสังเกตหลายประการ

ประการแรกประสบการณ์ของผู้ปฏิบัติเป็นสำคัญ โดยเฉพาะเทคนิคในการจับรังไข่เป็นสิ่งสำคัญมากที่ต้องจับรังไข่ไม่ให้มีการเคลื่อนไหว เพราะเป็นการยากที่จะจับรังไข่ให้อยู่กับที่ขณะแทงเข็ม เพราะเมื่อแทงเข็มเข้าไปรังไข่มักเลื่อนหลุด Brogliatti และคณะ (1995) ได้ทดลองใช้อุปกรณ์ควบคุมสอดผ่านทางทวารหนักป้องกันไม่ให้รังไข่เคลื่อนไหวขณะเจาะ หรือใช้ laparoscopy forceps สอดเข้าทาง vaginal fornix ไปจับขั้วรังไข่ ก็ไม่ได้ผลดีและมักมีผลต่อการเห็นรังไข่จากจอภาพ นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการเก็บโอโอไซต์ยังขึ้นกับผู้ปฏิบัติ Meintjes และคณะ (1995) เสนอว่าอัตราการเก็บโอโอไซต์ในแม่โคมีความแตกต่างระหว่างผู้เก็บประมาณ 10-15%

ในการเจาะโอโอไซต์ด้วย OPU นี้ ได้ใช้ผู้ปฏิบัติการสองคน โดยมีผู้ล้วงช่วยจับตรึงรังไข่หนึ่งคนในขณะที่อีกคนหนึ่งทำหน้าที่เจาะ การพัฒนาด้ามจับ probe ให้ยาวขึ้นอาจช่วยให้เจาะโอโอไซต์ได้ง่ายขึ้นและสามารถปฏิบัติการเก็บด้วยตนเองได้ โดยใช้ส่วนท้องของผู้ปฏิบัติดันปลาย probe ด้านนอกให้แนวไปยังรังไข่ มืออีกสองข้างก็ปฏิบัติเช่นเดียวกับการเจาะในข้างต้น

ข้อสังเกตประการที่สอง คือการบังคับสัตว์ การทดลองนี้ได้ดัดแปลงเอาเตียงผ่าตัดแบบแฮนโนเวอร์มาใช้ในลักษณะตั้งตรงและใช้สายรัดแนบกับเตียง ทำให้การทำงานสะดวก ลูกโคไม่ดิ้น และเคลื่อนไหวบ่อย เมื่อเทียบกับการนำเข้ายืนในซองบังคับสัตว์ หากซองที่ใช้บังคับไม่พอเหมาะหรือใหญ่เกินไป เนื่องจากมักใช้กับสัตว์ใหญ่ จะทำให้ลูกโคเคลื่อนไหวไม่สะดวกต่อ

การเก็บโอโอไซต์ และพบว่าลูกโคพันธุ์พื้นเมืองมักมีการนั่งลงเสมอเมื่อถูกควบคุมเข้าไปในซองบังคับสัตว์ การให้ยาซึมแก่ลูกโคไม่มีความจำเป็นเพราะจะทำให้ลูกโคนอนลงและไม่สามารถปฏิบัติงานได้ ควรให้แต่ยาชาเข้าไขสันหลังเท่านั้นก็เป็นการเพียงพอที่จะปฏิบัติงานได้ การเก็บเจาะด้วยวิธี OPU นี้อาจทำในสัตว์ขณะทำการสลบและเก็บในท่านอนซึ่งอาจง่ายต่อการเก็บเพราะสัตว์ไม่ดิ้นรน แต่หากนำไปปรับใช้ในทางปฏิบัติในฟาร์มอาจไม่เหมาะสม

ความคมของเข็มเป็นอีกสิ่งหนึ่งที่ควรคำนึง พบว่าหากเป็นเข็มที่เจาะครั้งแรกมักจะให้ผลที่ดี หากใช้ครั้งที่ 2 หรือครั้งที่ 3 ความคมจะลดลงและมีปัญหาต่อการเจาะ ในทางปฏิบัติการใช้เข็มซ้ำและทำการลับเข็มให้คมไว้และนำมาใช้ใหม่จะเป็นการประหยัดกว่า เพราะเข็มใหม่แต่ละด้ามราคาค่อนข้างแพง นอกจากนี้พบว่าเมื่อทำการเจาะมากครั้งในลูกโคหมายเลข B01 และ B02 การเก็บจะลำบากมากขึ้น โดยเฉพาะเมื่อเจาะผ่านผนังช่องคลอดด้านบนและเมื่อจะเจาะเข้าไปในฟอลลิเคิล ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ fibrosis ของผนังเนื้อเยื่อบริเวณดังกล่าว

วิธีการแทงทะลุผ่านมุมบนของผนังช่องคลอดด้านบนก็มีข้อควรระวังเพราะอาจแทงทะลุเข้าไปในทวารหนักและทำให้เกิดการอักเสบของช่องท้องจากมูลที่ติดปลายเข็มได้ นอกจากนี้เข็มที่ใช้เจาะและท่อโปลีเอ่ทีลีนที่ต่ออยู่ควรเคลือบด้วยน้ำยาละลายด้วยสารละลายเฮปปารินก่อนทุกครั้ง เพื่อป้องการการอุดตันของเลือดที่ดูดเข้ามาจากรังไข่ ในส่วนความแรงของการดูดควรให้อยู่เกณฑ์พอดีประมาณ 75-100 mmHg โดยมีอัตราการไหลของน้ำยาที่เก็บได้ประมาณ 22 มล/นาที (Looney *et al.*, 1994) เพราะหากแรงดูดมากเกินไปหรือน้อยเกินไปอาจมีผลเสียต่อโอโอไซต์และอัตราการเก็บได้

จากการศึกษาเบื้องต้นนี้พบว่าลูกโคทุกตัว มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอฟ เอส เอช ยกเว้นลูกโคหมายเลข B23 ที่จำนวนการตอบสนองของรังไข่มีแต่ไม่มากนักจึงไม่ได้ทำการเก็บในครั้งแรก ซึ่งความแปรผันระหว่างลูกโคแต่ละตัวนั้นเป็นสิ่งที่พบเช่นกันในการทดลองในบทที่ 2 ด้วยวิธีการเก็บแบบ OPU นี้ ได้จำนวนโอโอไซต์เฉลี่ยประมาณ 10 โอโอไซต์ต่อตัว ซึ่งต่ำกว่าจำนวนโอโอไซต์ที่สังเกตเห็นบนจอภาพ และต่ำกว่าจำนวนที่เจาะด้วยการดูดโดยตรงจากรังไข่หลังเปิดช่องท้อง เป็นการยากที่จะนับจำนวนฟอลลิเคิลอย่างแม่นยำเพราะเป็นการมองเห็นในด้านเดียวหรือหากพลิกรังไข่ไปมาก็นับจำนวนฟอลลิเคิลซ้ำได้ หากนำเอาค่าเฉลี่ย (32.2 ± 3.0) ที่ได้จากข้อมูลในบทที่ 2 อัตราการเก็บโอโอไซต์จะได้ 30%(10/32) โดยประมาณ ซึ่งใกล้เคียงกับ Brogliatti และ Adams (1996) ซึ่งได้อัตราการเก็บโอโอไซต์เท่ากับ 25% ในลูกโคที่ไม่ได้รับการกระตุ้น และ 37% ในลูกโคที่ได้รับการกระตุ้นด้วย Follotropin 200 มก.

การเก็บด้วย OPU จะมีข้อดีคือสามารถทำได้หลายครั้งโดยไม่มีผลกระทบของการทำงานของรังไข่ สามารถปล่อยให้ลูกโคโตเป็นแม่พันธุ์ได้ แต่ข้อเสียที่เห็นได้อย่างน้อยสองประการ คือ ต้องลงทุนสูงในเครื่องมือการเก็บและเครื่องอัลตราซาวน์ ตลอดจนอัตราการเก็บโอโอไซต์จะได้ต่ำกว่าที่ได้จากการเก็บจากการผ่าตัดเปิดช่องท้องโดยตรง

ในส่วนของชนิดของโอโอไซต์พบว่าเป็นโอโอไซต์ชนิดที่ยังไม่เจริญ (immature) โดยเป็นชนิดที่เซลล์คิวมูลัสหุ้มรอบหลาย ๆ ชั้นและไม่มากชั้น อย่างไรก็ตามพบว่าในการเจาะบางครั้งจะพบเปลือกของโอโอไซต์เปล่า ๆ จำนวนมากพอควร คาดว่ามาจากโอโอไซต์ที่สลายหลุดออกมา

สรุปจากการทดลองนี้เป็นการพัฒนาการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีการเจาะดูดผ่านอัลตราซาวน์ แม้ว่าอัตราการเก็บโอโอไซต์ยังอยู่ในระดับต่ำอยู่ก็ตาม ซึ่งยังต้องมีการปรับปรุงในเรื่องการเจาะเก็บ อย่างไรก็ตามวิธีนี้หากนำไปร่วมกับการปฏิสนธินอกร่างกายจะเป็นประโยชน์ต่อการผลิตตัวอ่อน (Kruip *et al.*, 1991) และหากนำไปปรับใช้กับแม่โคก็จะเป็นประโยชน์ในแง่ของการผลิตตัวอ่อนจากโอโอไซต์ที่เก็บได้จากแม่พันธุ์ที่มีคุณค่าทางพันธุกรรมสูง ซึ่งจะเป็นหนทางเลือกอีกวิธีหนึ่งที่อาจทดแทนการเก็บตัวอ่อนหลังการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทร-ปิน (MOET=Multiple Ovulation and Embryo Transfer) ได้ (Kruip *et al.*, 1994)

เอกสารอ้างอิง

มงคล เตชะกำพุ ชัยณรงค์ โลหชิต วิชัย ทันตศุภารักษ์ วันเพ็ญ ศรีอนันต์ จินดา สิงห์ลอ และจินตนา อินทรมงคล 2537 การใช้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินเพื่อกระตุ้น การเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ของลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์ รายงานผลการวิจัยทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปี 2537 23 หน้า

Brogliattti, G.M., Swan, C.D. and Adams, G.P. 1995. Transvaginal ultrasound-guided oocyte collection in 10 to 16 weeks of age calves. Theriogenology. 43(1): 177. (Abstr)

Brogliattti, G.M. and Adams, G.P. 1996. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. Theriogenology. 4: 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.

Kruip, Th.A.M., Pieterse, M.C., van Beneden, Th.H., Vos, P.L.A.M, Wurth, Y.A. and Taverne, M.A.M. 1991. A new method for bovine embryo production: a potential alternative to superovulation. Vet. Rec. 208-210.

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 cattle. Theriogenology. 42:675-684.

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

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

การกระตุ้นรังไข่และการเก็บโอโอไซต์ในลูกโคที่มีพันธุกรรมดี

บทนำ

จากข้อมูลเบื้องต้นในบทที่ 2 พบว่ามีความเป็นไปได้ในการกระตุ้นลูกโคพันธุ์พื้นเมืองด้วยฟอลลิคูล่าร์ สติมูเรตติ้ง ฮอร์โมน (เอฟ เอส เอช) รวมทั้งสามารถทำการกระตุ้นซ้ำเพื่อเก็บโอโอไซต์ไว้ในการทำปฏิสนธินอกร่างกายด้วย โอโอไซต์ดังกล่าวนำมาเลี้ยง ปฏิสนธิและเจริญได้ในหลอดทดลอง อย่างไรก็ตามการนำวิธีการดังกล่าวมาใช้นี้ควรปรับใช้กับลูกโคที่มีคุณค่าทางพันธุกรรม (high genetic value) อาทิเช่น เป็นลูกโคพันธุ์เนื้อที่สามารถเพิ่มปริมาณเนื้อหรือเจริญเติบโตเร็ว หรือเป็นลูกโคนมที่ให้นมปริมาณมาก ซึ่งหากประสบผลสำเร็จสามารถนำไปปรับในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งจะเป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยลดช่วงห่างของชีวิต (generation interval) ดังรายละเอียดในบทที่ 1 ทำให้มีปรับปรุงพันธุ์ได้รวดเร็วขึ้น

จุดประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อศึกษาผลการตอบสนองพื้นฐานและจำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้เปรียบเทียบกับผลในลูกโคพันธุ์พื้นเมือง

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

ก) ลูกโคพันธุ์ซิมเมนทัลแท้ (S1-S3) เพศเมีย จำนวน 3 ตัว และลูกโคพันธุ์ซิมเมนทัลบราห์มัน (SB) เพศเมีย จำนวน 1 ตัว อายุ 5-7 เดือน น้ำหนักประมาณ 150-200 กก. (รูปที่ 5.1)

ข) ลูกโคพันธุ์พื้นเมืองเพศเมีย จำนวน 7 ตัว (หมายเลข BB01-BB07) อายุ 5-7 เดือน น้ำหนักประมาณ 80-100 กก.

นำมาเลี้ยงที่ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาฯ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตำบลบ่อพลับ จังหวัดนครปฐม ทำการตรวจสุขภาพ ถ่ายพยาธิก่อนเริ่มการทดลอง 1 เดือน ลูกโคดังกล่าวเลี้ยงด้วยอาหารข้นวันละ 2 กก./ตัว/วัน และให้หญ้าสด น้ำเต็มที่

การกระตุ้นรังไข่

ทำการฝังฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดฝังหู* (Progesterone Implant) 7 วันก่อนกระตุ้นรังไข่ ทำการกระตุ้นรังไข่ด้วย พี-ฟอลลิคูล่าร์ สติมูเลตติ้ง ฮอร์โมน, เอฟ เอส เอช** ขนาด 180 มก. (NIH unit) โดยแบ่งฉีด 3 วัน ด้วยโปรแกรม 40/40, 30/30, 20/20 มก. เช้าและเย็น ทำการกระตุ้นทั้งหมด 5 ครั้งในลูกโคพันธุ์ซิมเมนทัล และ 9 ครั้งในลูกโคพันธุ์พื้นเมือง โดยลูกโคบางตัวได้รับการกระตุ้นซ้ำจำนวน 1-2 ครั้ง โดยมีระยะห่างระหว่างการกระตุ้นประมาณ 1 เดือน ขนาดของฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ได้ปรับให้มีความเหมาะสมสำหรับการกระตุ้นทั้งลูกโคพันธุ์ซิมเมนทัลและลูกโคพันธุ์พื้นเมือง ตามการศึกษาเบื้องต้นในบทที่ 2

รูปที่ 5.1 ลูกโคพันธุ์ซิมเมนทัล เพศเมียที่ใช้ในการทดลองกระตุ้นรังไข่

---

*Crestar®, Intervet, Holland

**Follotropin®, Vetepharm, Ontario, Canada

การตรวจการตอบสนองของรังไข่และการเก็บโอโอไซต์

ทำการผ่าเปิดช่องท้อง (caudal midline laparotomy) หลังฉีดฮอร์โมน เอฟ เอส เอช 48 ชม. เพื่อเก็บโอโอไซต์ ดังวิธีการที่รายงานในบทที่ 2 ตรวจการตอบสนองของรังไข่โดยนับจากฟอลลิเคิลมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 5 มม. ขึ้นไป

ในกรณีที่มีการกระตุ้นซ้ำจะเริ่มประมาณ 1 เดือนหลังการกระตุ้นครั้งแรก ในลูกโคบางตัวจะทำการตรวจรังไข่ด้วยเครื่องมือคลื่นความถี่สูง (อัลตราซาวน์) ชนิดเรียลไทม์ บี-โมด (Aloka, SSD-620, Japan) โดยสอด Convex array transvaginal probe เข้าทางปากช่องคลอด เพื่อตรวจสอบการตอบสนองของรังไข่ก่อนทำการเจาะ (ดังวิธีการที่ใช้ในบทที่ 4)

การตรวจหาโอโอไซต์

ตรวจหาภายใต้กล้องสเตริโอ กำลังขยาย 10-40 เท่า โอโอไซต์ที่ได้เก็บไว้ในน้ำยา TCM 199 2.5 mM Hepes เพื่อทำการศึกษาในเรื่องการปฏิสนธิภายนอกร่างกายต่อไปตามขั้นตอนที่ได้กล่าวไปในบทที่ 3

ผล

ผลของการตอบสนองและการเก็บโอโอไซต์จากลูกโคพันธุ์ซิมเมนทัล พันธุ์ซิมเมนทัล-บราห์มัน และลูกโคพันธุ์พื้นเมือง แสดงในตารางที่ 5.1 และ 5.2 การตอบสนองของรังไข่ของลูกโคสายเลือดซิมเมนทัล จากการกระตุ้นทั้งหมด 5 ครั้ง ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 35.8±24.2 ฟอลลิเคิลต่อตัว ผันแปรระหว่าง 4-71ฟอลลิเคิลต่อตัว จำนวนโอโอไซต์เฉลี่ยที่ได้เท่ากับ 12.6±8.9 โอโอไซต์ต่อตัว ผันแปรระหว่าง 1-25 โอโอไซต์ต่อตัว คิดเป็นอัตราการเก็บโอโอไซต์เท่ากับ 35.20%

ในส่วนของผลการตอบสนอง และการเก็บโอโอไซต์จากลูกโคพันธุ์พื้นเมือง 7 ตัว จากการกระตุ้น ทั้งหมด 9 ครั้งได้เท่ากับ 39.0±27.6 ฟอลลิเคิลต่อตัว ผันแปรระหว่าง 7-61 ฟอลลิเคิลต่อตัว และ 22.0±15.6 โอโอไซต์ต่อตัว ผันแปรระหว่าง 4-34 โอโอไซต์ต่อตัว คิดเป็นอัตราการเก็บโอโอไซต์เฉลี่ยเท่ากับ 58.88%

ภาพของการตอบสนองของลูกโคพันธุ์ซิมเมนทัลแสดงในรูปที่ 5.2

ตารางที่ 5.1 ผลการตอบสนองและการเก็บโอโอไซต์จากลูกโคพันธุ์ซิมเมนทัลและพันธุ์ซิมเมนทัล-บราห์มัน

ลูกโคหมายเลข	การตอบสนองของรังไข่	จำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้	อัตราการเก็บโอโอไซต์ (%)
S1(1)	7	2	28.9%
S2(1)	45	18	31.0%
S3(1)	4	1	25.0%
S1(2)	71	17	23.9%
SB(1)	52	25	48.1%
Mean±SD (range)	35.8±24.2 (4-71)	12.6±8.9 (1-25)	35.20%

S= SIMMENTAL , SB=SIMMENTAL BRAHMAN ( )* ครั้งของการกระตุ้น

ตารางที่ 5.2 ผลการตอบสนองและการเก็บโอโอไซต์จากลูกโคพันธุ์พื้นเมือง

ลูกโคหมายเลข	การตอบสนองของรังไข่	จำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้	อัตราการเก็บโอโอไซต์(%)
BB01(1)*	61	32	52.5%
BB01(2)	28	16	57.1%
BB02(1)	9	5	55.6%
BB02(2)	7	4	57.1%
BB03(1)	12	8	66.7%
BB04(1)	9	5	55.6%
BB05(1)	44	34	77.2%
BB06(1)	22	12	54.5%
BB07(1)	22	10	45.5%
Mean±SD (range)	39.0±27.6 (7-61)	22.0±15.6 (4-34)	58.88%

BB= ลูกโคพื้นเมือง, ( )* = ครั้งของการกระตุ้น

รูปที่ 5.2 ภาพของรังไข่ลูกโคพันธุ์ซิมเมนทัลที่มีการตอบสนองมากทั้งข้างซ้ายและข้างขวา

วิจารณ์

ผลการตอบสนองของลูกโคพันธุ์พื้นเมืองในการทดลองนี้ต่ำกว่าที่รายงานในบทที่ 2 ที่ได้เคยรายงานไว้ อาจเนื่องมาจากขนาดของฮอร์โมนที่ใช้ต่ำกว่า (จาก 192 มก. มาเป็น 180 มก.) อัตราการเก็บโอโอไซต์ที่ได้ไม่แตกต่างกับที่เคยรายงานไว้ในบทที่ 2 ซึ่งอยู่ในระดับประมาณ 50-60% อย่างไรก็ตาม มงคลและคณะ (2537) ให้ข้อสังเกตว่าในลูกกระบือปลักอัตราการเก็บโอโอไซต์ในกรณีที่มีการตอบสนองของรังไข่สูงมักมีค่าต่ำกว่าอัตราการเก็บโอโอไซต์ในกรณีที่รังไข่มีการตอบสนองต่ำ จากการสังเกตครั้งนี้พบว่าอุปสรรคอย่างหนึ่งของการเก็บโอโอไซต์ที่ไม่สามารถเก็บได้ เกิดจากการเจาะฟอลลิเคิลที่มีขนาดใหญ่เส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 10 มม. ขึ้นไป ซึ่งมักจะได้โอโอไซต์ชนิดที่เจริญเต็มที่ ที่มีเซลล์คิวมูลัสแผ่ขยายเต็มที่รอบ ๆ ชั้นเปลือกโซน่า ทำให้ยากแก่การดูดออก นอกจากนี้ยังพบปัญหาการเป็นวุ้น (jelly-like) หลังดูดเก็บ follicular fluid ใส่ในหลอดทดลอง ซึ่งมีผลทำให้โอโอไซต์ที่เก็บได้ติดกับวุ้นดังกล่าว ยากแก่การตรวจพบ โดยเฉพาะลูกโคที่มีการตอบสนองต่อการฉีดฮอร์โมนสูง ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นอิทธิพลของฮอร์โมนเอสโตรเจน ซึ่งจะมีค่าความเข้มข้นสูงโดยเฉพาะฟอลลิเคิลที่มีขนาดใหญ่ (Smith *et al.*, 1996) เหตุผลดังกล่าวจึงเป็นสาเหตุหนึ่งของอัตราการเก็บโอโอไซต์ที่ลดลงในกรณีของลูกโคสายพันธุ์ซิมเมนทัล การปรับปรุงค่าเฉลี่ยของการตอบสนองและอัตราการเก็บโอโอไซต์สามารถทำได้จากการปรับช่วงห่างของการกระตุ้นหรือ

การปรับโปรแกรมการกระตุ้นด้วยการนำเอาฮอร์โมน โกนาโดโทรปิน รีลีซซิ่ง ฮอร์โมน (gonadotropin releasing hormone, GnRH) เข้าไปในการกระตุ้นด้วย Irvine และคณะ (1994) แสดงให้เห็นว่าหากช่วงห่างของการกระตุ้นเพียง 3 สัปดาห์จะให้ผลการตอบสนองดีกว่า 5 สัปดาห์ รวมทั้งหากเสริม GnRH เข้าไปจะช่วยเพิ่มจำนวนการตอบสนองในกลุ่ม 3 สัปดาห์ จาก 25.3±34.9 เป็น 51.5±22.1 ฟอลลิเคิลต่อตัวทีเดียว หรืออาจทำการตรวจสอบว่า ณ เวลาที่เริ่มฉีดมีการคงอยู่หรือ dominant follicle ซึ่งมีผลต่อการตอบสนองในการฉีดฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ได้ (Grasso *et al.*, 1989)

การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างลูกโคสายพันธุ์ยุโรปหรือลูกโคพันธุ์พื้นเมืองในแง่ของการตอบสนองของรังไข่ แต่อัตราการเก็บโอโอไซต์ในลูกโคพันธุ์ซิมเมนทัลมีค่าที่ต่ำกว่าในลูกโคพื้นเมือง ซึ่งยังต้องมีการปรับปรุงโปรแกรมการกระตุ้นและเทคนิคการเก็บโอโอไซต์ต่อไป ผลการศึกษานี้เป็นแนวทางการนำเอาเทคนิคการผลิตตัวอ่อนจากลูกโค ซึ่งทางคณะผู้วิจัยสามารถผลิตตัวอ่อนในระยะมอรูล่าและระยะบลาสโตซีสดังรายงานในบทที่ 3 เพื่อไปเสริมในการปรับปรุงพันธุ์ได้เร็วขึ้น

เอกสารอ้างอิง

มงคล เดชะกำพุ ชัยณรงค์ โลหชิต วิชัย ทันตศุภารักษ์ วันเพ็ญ ศรีอนันต์ จินดา สิงห์ลอ และจินตนา อินทรมงคล 2537 การใช้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินเพื่อกระตุ้น การเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ของลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์ รายงานผลการวิจัยทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปี 2537 23 หน้า

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

Grasso, F., Guilbault, L.A., Roy, G.L., Matton, P. and Lussier, J.G. 1989. The influence of the presence of a dominant follicle at the time of initiation of a superovulatory treatment on superovulatory responses in cattle. Theriogenology. 31:199. (Abstr.)

Smith, L.C. Olivera-Angel, M., Groome, N.P., Bhatia, B. and Price, C.A. 1996. Oocyte quality in small antral follicles in the presence or absence of a large dominant follicle in cattle. J. Reprod. Fert. 106:193-199.

บทที่ 6

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยเรื่อง "การผลิตตัวอ่อนจากการปฏิสนธินอกร่างกายของโอโอไซต์ที่เก็บจากรังไข่ของลูกโค" โดยเป็นงานต่อเนื่องที่ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปี 2536 ในหัวข้อ "การใช้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินเพื่อกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ของลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์" จากงานวิจัยนี้พบว่า

1) มีความแตกต่างกับงานวิจัยในลูกกระบือในด้านจำนวนการตอบสนองของรังไข่ระหว่างลูกกระบือปลัก (*Bubalus bubalis*) และลูกโคพื้นเมืองไทย (*Bos indicus*) โดยในลูกโคให้ผลการตอบสนองเฉลี่ยมากกว่า ข้อมูลนี้ยังไม่มีรายงานแต่อย่างไรในต่างประเทศ จึงถือเป็นข้อมูลใหม่และเป็นข้อมูลพื้นฐานด้านสรีรวิทยาของระบบสืบพันธุ์สัตว์

2) ความแปรปรวนของการตอบสนองเป็นสิ่งที่ทางคณะผู้วิจัยประสบทั้งในสัตว์สองชนิด ซึ่งได้มีรายงานโดยทั่วไปเมื่อมีการกระตุ้นรังไข่ด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน การศึกษาเพิ่มเติมเพื่อลดความแปรปรวนและเพิ่มจำนวนการตอบสนองโดยใช้โปรแกรมอื่น ๆ ไม่ว่าจะร่วมด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน รีลีสซิ่งฮอร์โมน (จี เอ็น อาร์ เอช, Gonadotropin Releasing Hormone, GnRH) หรือการเปรียบเทียบโด้สของฮอร์โมน เอฟ เอส เอช เป็นสิ่งที่อาจต้องศึกษาเพิ่มเติม

3) รังไข่ของลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์เป็นแหล่งโอโอไซต์ที่สำคัญ โดยโอโอไซต์ที่ผลิตได้มีทั้งที่อยู่ในระยะเจริญพร้อมปฏิสนธิ (matured oocytes) และชนิดที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิต้องนำมาเลี้ยงในหลอดทดลอง (immature oocytes) โอโอไซต์ทั้งสองสามารถมาเลี้ยงให้เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลองได้ในอัตราประมาณ 70%

4) โอโอไซต์สามารถเกิดการปฏิสนธิในหลอดทดลองได้ แต่ยังอยู่ในอัตราที่ไม่สูงเป็นที่น่าพอใจ โดยอยู่ในระดับ 30% ซึ่งยังต่ำกว่าเอกสารอ้างอิงบางรายงาน ตัวอ่อนส่วนใหญ่จะหยุดตัวหลังแบ่งตัวเพียงหนึ่งถึงสองครั้งเท่านั้น จะมีเพียงส่วนน้อยที่พัฒนาได้จนถึงระยะที่เหมาะสมในการย้ายฝากและการแช่แข็งตัวอ่อน การศึกษาเพิ่มเติมเพื่อปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมเป็นสิ่งที่ต้องวิจัยเพิ่มเติม

5) แม้ว่าในหลอดทดลองจะประสบปัญหาการหยุดตัวของตัวอ่อนที่เกิดจากการปฏิสนธินอกร่างกายในลูกโค แต่ทางคณะผู้วิจัยได้แก้ไขโดยการนำเอาตัวอ่อนของลูกโคไปฝากชั่วคราวในท่อนำไข่ของแกะและกระต่าย ซึ่งพบว่ามีตัวอ่อนบางส่วนจากลูกโคสามารถเจริญเป็นตัวอ่อนระยะมอรูล่าและระยะบลาสโตซีสที่พร้อมที่จะนำไปย้ายฝากให้เกิดลูกโคได้

6) มีความเป็นไปได้ในการนำตัวอ่อนของลูกโคที่เกิดจากการปฏิสนธินอกร่างกาย และฝากชั่วคราวในท่อนำไข่ของแกะหรือกระต่าย ไปแช่แข็งและตัวอ่อนที่ได้มีบางส่วนปกติหลังการแช่แข็งและทำละลาย รวมทั้งตัวอ่อนนี้สามารถเจริญต่อเนื่องต่อไปได้ในหลอดทดลอง

จากข้อมูลในข้อ 1-6 แสดงให้เห็นว่าสามารถกระตุ้นรังไข่ของลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์เก็บโอโอไซต์ นำมาเลี้ยงให้เกิดสภาวะที่พร้อมปฏิสนธินอกร่างกาย หลังจากนั้นนำมาเลี้ยงไว้ในหลอดทดลอง หรือเลี้ยงในท่อนำไข่ของสัตว์ตัวกลาง จนได้ตัวอ่อนที่พร้อมนำไปย้ายฝาก ตัวอ่อนที่ได้ยังสามารถนำไปแช่แข็งได้ ซึ่งจะเป็นความหวังใหม่ในการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์โคด้วยเทคนิค JIVET อันจะลดช่วงห่างระหว่างชีวิตได้ อย่างไรก็ตามทางคณะผู้วิจัยยังได้ศึกษาเพิ่มเติมในการพัฒนาเทคนิคในการเก็บไข่ด้วยเครื่องมืออัลตราซาวด์ ตลอดจนความพยายามในการนำเทคนิคนี้ไปใช้ในกับลูกโคที่มีคุณค่าทางพันธุกรรมอีกด้วย ความสำเร็จนี้ทางคณะผู้วิจัยได้มีโครงการต่อเนื่องในสองแนวทาง คือ

1) พัฒนาการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดทดลองให้ถึงระยะที่พร้อมย้ายฝากแบบไม่ผ่าตัด คือระยะมอรูล่าและระยะบลาสโตซีสเพื่อเป็นการลดขั้นตอนและความยุ่งยากในการย้ายฝากตัวอ่อนชั่วคราวในสัตว์ตัวกลาง

2) พัฒนาการปฏิสนธินอกร่างกายในลูกกระบือปลักดังจุดประสงค์ที่วางไว้ในขั้นต้น

3)มีการพัฒนาร่วมกับหน่วยงานของภาครัฐที่ทำหน้าที่ส่งเสริมปศุสัตว์ที่จะศึกษาในลูกโคที่มีพันธุกรรมดี ไม่ว่าจะเป็นโคนมหรือโคเนื้อต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย