บทที่1

บทนำ

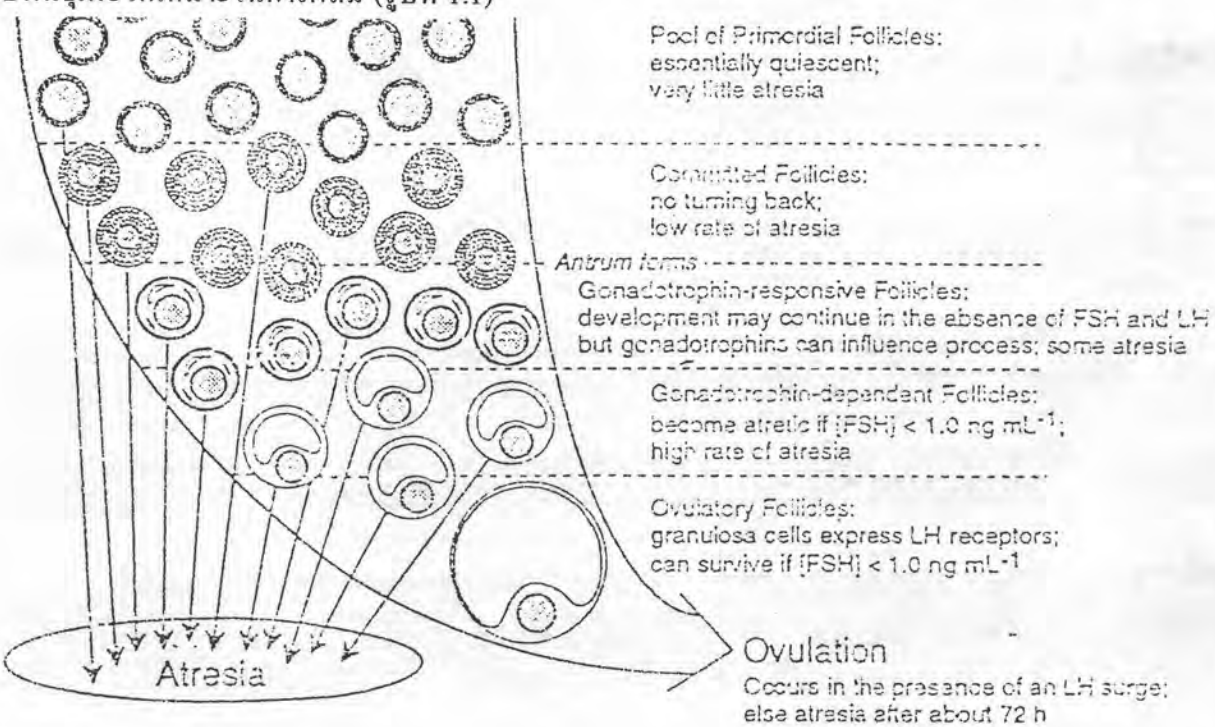
ในปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีชีวภาพ มาใช้ในการพัฒนาวิทยาการด้านการสืบพันธุ์ เพื่อวัตถุประสงค์ในการเพิ่มผลผลิต ในการผลิตสัตว์ให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น โดยเริ่มตั้งแต่การผสมเทียม(Artificial Insemination) ซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลายในสัตว์เศรษฐกิจหลายชนิด ต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิคการย้ายฝากตัวอ่อน (Embryo transfer) โดยการนำตัวอ่อนของสัตว์ตัวให้ (Donor) ที่กระตุ้นให้มีการตกไข่จำนวนมาก (Superovulation) ไปฝากให้ยังสัตว์ตัวรับ ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณสัตว์ที่มีพันธุกรรมสูงได้รวดเร็วยิ่งขึ้น จากนั้นมีการศึกษา วิธีการปฏิสนธินอกร่างกาย (In vitro fertilization) ตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกายจะเพาะเลี้ยงไว้จนกระทั่งตัวอ่อนเจริญถึงระยะที่เหมาะสมก่อนนำไปฝากยังสัตว์ตัวรับ (Recipient)

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมได้มีการศึกษาการปฏิสนธินอกร่างกายมานานกว่า 30 ปี และประสบความสำเร็จในการผลิตตัวอ่อนได้ครั้งแรกในกระต่าย (Cheng, 1959) วิธีการนี้สามารถผลิตตัวอ่อนได้ในสัตว์เศรษฐกิจหลายชนิด เช่น แกะ (Moor and Trounson, 1977), สุกร (Mattioli et al., 1989) และโค (Brackett et al., 1982) นอกจากนี้มีการศึกษาการปฏิสนธินอกร่างกายในแมว (Johnston et al., 1989) เพื่อเป็นแบบจำลองในของการปฏิสนธินอกร่างกายในสัตว์ป่า โดยเฉพาะสัตว์ป่าที่อยู่ในตระกูลแมว เช่น เสือ (tiger),และเสือดาว (Leopard) เป็นต้น(Johnston et al., 1991) สำหรับในทางปศุสัตว์การศึกษาเกี่ยวกับการปฏิสนธินอกร่างกาย มีการศึกษากันมากในโค โดยการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่แม่โคที่ได้จากโรงฆ่า (Crister et al., 1986; Mermillod et al., 1992; Miller et al., 1994) ใช้ในการผลิตตัวอ่อนจำนวนมากเพื่อใช้ใน การวิจัยและเพื่อประโยชน์ในทางการค้า อย่างไรก็ตามมีวิธีการเก็บโอโอไซต์จากสัตว์ที่ยังคงมีชีวิต เช่น การผ่าตัดเก็บโอโอไซต์จากโคหรือลูกโคที่ฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (Gonadotropin) และสามารถทำการเก็บโอโอไซต์ซ้ำได้อีกหลายครั้ง วิธีนี้สามารถใช้เป็นโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ โดยมีการทดลองฉีดกระตุ้น รังไข่แม่โคด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน และทำการเจาะเก็บโอโอไซต์โดยวิธีการผ่าตัดเปิดช่องท้อง (Caudal midline laparotomy) ในลูกโค (Kajihara et al., 1991) และลูกกระบือ (มงคล และคณะ, 1993) ซึ่งใช้เวลาในการผ่าตัดนานและลูกสัตว์ใช้เวลาในการพักฟื้นนาน ต่อมามีวิธีการเจาะเก็บโอโอไซต์โดยใช้ลาพาโลสโคป (Laparoscope)ในลูกโค (Armstrong et al., 1991; Irvine et al., 1993) และในลูกแกะ จากการเจาะเก็บในลูกแกะนำโอโอไซต์ที่เก็บได้โดยการใช้ลาพาโลสโคปไปทำการปฏิสนธินอกร่างกาย และนำตัวอ่อนที่ได้ไปฝากยังตัวรับ พบว่าได้ลูกแกะจากการทำการปฏิสนธินอกร่างกาย จำนวน 25 ตัว จากการเจาะเก็บโอโอไซต์เพียง

ครั้งเดียว(Earl et al., 1995) และสำหรับการเก็บโอโอไซต์ในลูกโคโดยใช้ลาพาโลสโคป สามารถผลิตตัวอ่อนระยะมอรูลาและบลาสโตซิสและนำไปฝากยังโคตัวรับ จนกระทั่งได้ลูกออกมาเช่นเดียวกัน (Armstrong et al., 1992; Kajihara et al., 1991) ต่อมา ได้มีการพัฒนาการเจาะเก็บโอโอไซต์ผ่านทางช่องคลอด โดยใช้เครื่องอัลตราซาวด์ (Ultrasound) ในแม่โค (Callesen et al., 1987; Bols et al., 1995) ทำให้โคได้รับความบอบช้ำน้อยกว่าการใช้วิธีเปิดผ่าช่องท้องและสามารถเจาะเก็บโอโอไซต์ซ้ำได้ดีขึ้น (Pieterse et al., 1991) ดังนั้นจึงสามารถนำประโยชน์ของการปฏิสนธินอกร่างกายไปใช้ในการผลิตตัวอ่อน เพื่อใช้ในการวิจัยทางด้านวิทยาการสืบพันธุ์และเมื่อใช้ร่วมกับเทคนิคการย้ายฝากตัวอ่อน (Embryo transfer) ไปยังสัตว์ตัวรับจะเป็นการลดช่วงห่างของช่วงอายุ(Generation interval) เพื่อปรับปรุงพันธุ์ให้เร็วยิ่งขึ้นและอาจนำไปประยุกต์ใช้กับสัตว์ที่มีคุณค่าสูงหรือสัตว์ป่าหายาก เพื่อป้องกันการสูญพันธุ์ได้

<u>กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์</u>

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของสัตว์ชั้นสูงทุกชนิด ต้องมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ทั้งสองชนิดคือ ตัวอสุจิและโอโอไซต์ ในการเตรียมการเพื่อเกิดขบวนการปฏิสนธินั้น เซลล์สืบพันธุ์ทั้งสองเพศจะต้องมีการลดจำนวนโครโมโซม (chromosome) รวมทั้งลักษณะภายในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) การลดจำนวนโครโมโซมมีความจำเป็นเพราะ เมื่อมีการปฏิสนธิตัวอ่อนที่ได้จะมีจำนวนโครโมโซมเป็นดิพลอยด์ (2n) นอกจากนี้ยังมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์สืบพันธุ์เพื่อให้เหมาะในการผสม (รูปที่ 1.1)

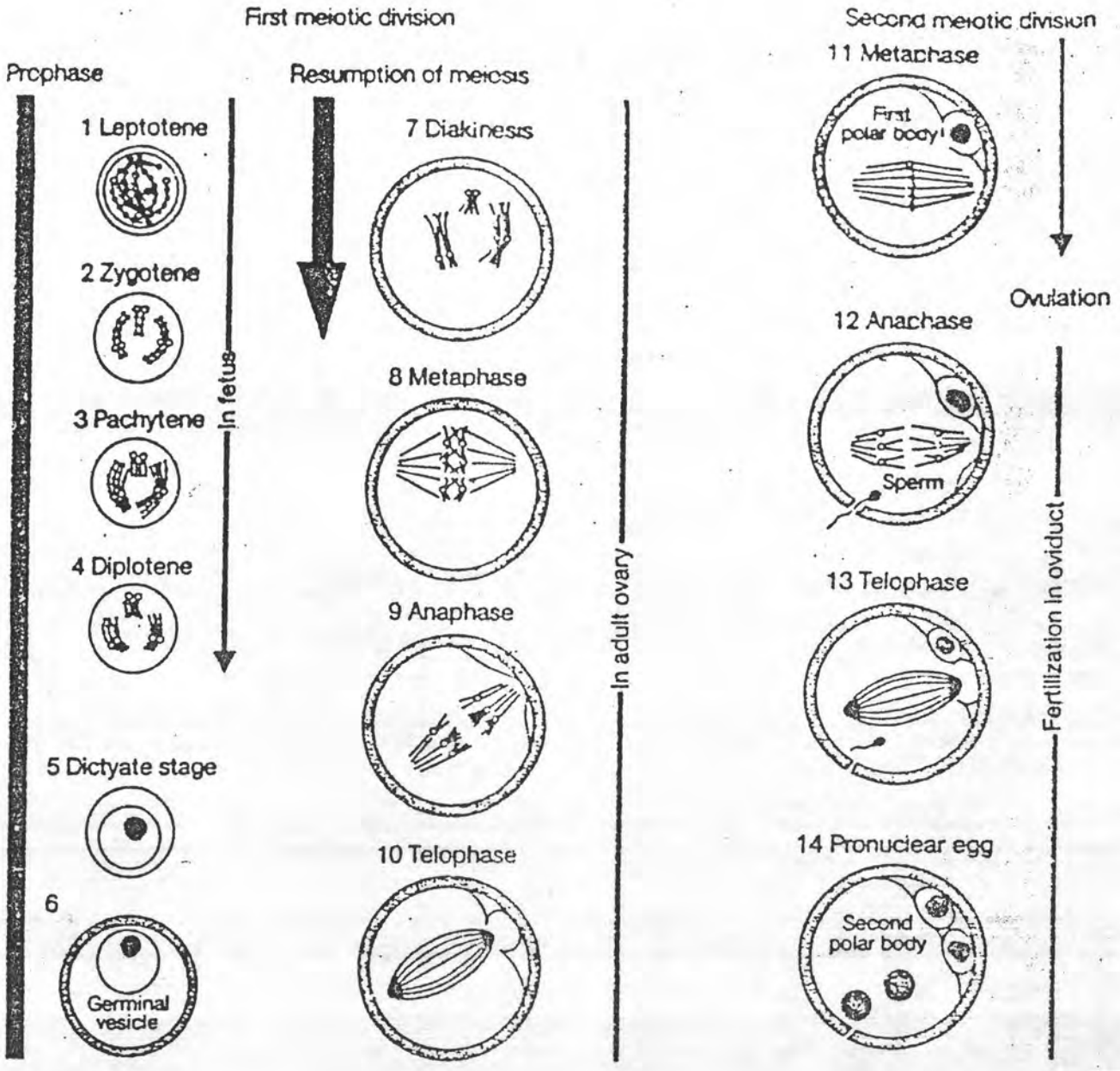


รูปที่ 1.1 แสดงแบบจำลองการเจริญของฟอลลิเคิลในแกะ(จาก Scarmuzzi, 1993)

โอโอไซต์จะสร้างภายในรังไข่จากกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า โอโอโกเนียม (oogonium) ซึ่งเป็นเซลล์ดิพลอยด์ ที่เจริญเปลี่ยนแปลงมาจากไพรมอร์เดียลเจิร์มเซลล์ (Primordial germ cell) เซลล์เหล่านี้มีการแบ่งแบบไมโตซิสตลอดเวลาทำให้ได้เซลล์ใหม่เป็นจำนวนมาก และบางเซลล์จะเจริญเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ เรียกว่า โอโอไซต์ระยะแรก (Primary oocyte) ซึ่งจะมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสระยะที่ 1 (Meiosis I) แต่เนื่องจากมีการแบ่งไซโตพลาสซึมเกิดขึ้นไม่เท่ากันทำให้ได้เซลล์โอโอไซต์ระยะที่สอง(Secondary oocyte) 1 เซลล์ที่มีขนาดใหญ่กับโพลาร์บอดี (polar body) จำนวน 1 เซลล์ที่มีขนาดเล็ก ซึ่งต่างก็เป็นเซลล์แฮพลอยด์ (n) จากนั้นโอโอไซต์ระยะที่ 2 และโพลาร์บอดีจะเข้าสู่การแบ่งแบบไมโอซิสระยะที่ 2 (Meiosis II) ซึ่งมีการแบ่งไซโตพลาสซึมไม่เท่ากันอีกทำให้ได้เซลล์ขนาดใหญ่คือ โอโอติด (Ootid) ซึ่งจะเจริญไปเป็นเซลล์ไข่ (Ovum) และโพลาร์บอดีจะสลายไป รังไข่ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมเมื่อแรกเกิดจะมีโอโอไซต์ระยะแรก และจะไม่มีจำนวนเพิ่มขึ้นอีกจนกระทั่งย่างเข้าสู่วัยที่สืบพันธุ์ได้ โอโอไซต์ระยะแรกจึงจะเริ่มมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส สำหรับโอโอไซต์ที่หลุดออกมาจากรังไข่ (Ovulation) จะเป็นโอโอไซต์ระยะที่สองโดยหยุดการแบ่งตัวที่ระยะเมตาเฟส 2 ของการแบ่งตัวแบบไมโอซิส (รูปที่1.2) และโอโอไซต์จะแบ่งตัวจนเสร็จสมบูรณ์เมื่อเกิดการปฏิสนธิขึ้น ในธรรมชาติลูกโคแรกเกิดจะมีไพรมอร์เดียลเจิร์มเซลล์ซึ่งอยู่ใน ไพรมอร์เดียล ฟอลลิเคิล (Primordial follicle) มากถึง 700,000 เซลล์และเมื่อลูกโคมีอายุ 6 เดือน จะยังมีจำนวนเท่ากับ 206,000± 52,000 เซลล์ และหลังจากนั้นปริมาณจะลดลงอย่างรวดเร็ว (71-100%) จนกระทั่งอายุ 4 ปีขึ้นไปจะเสื่อมสภาพเกือบทั้งหมด ซึ่งจำนวน Growing follicle (จะมี follicle cell 2-3 ชั้น) เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วระหว่างอายุ 50-80 วันหลังคลอด เท่ากับ 93± 18ใบ ถึง 204± 41ใบ และค่อยๆเพิ่มขึ้นจนถึงอายุ 120 วันหลังจากนั้นปริมาณจะค่อนข้างคงที่จนถึงช่วงอายุ 3 ปี ในส่วนของ Vesicular follicle (Follicle with a fully formed vesicle) จะมีจำนวน 63 ใบ (35± 6 ใบ) ที่อายุ 6 เดือน และเมื่ออายุ 8 เดือนจะลดลง เล็กน้อยเท่ากับ 22 ± 5 ใบ หรือเมื่อเข้าใกล้วัยเจริญพันธุ์ (Puberty) หลังจากนั้นจะคงที่จนกระทั่งอายุ 10-14ปี (Erickson, 1966) (รูปที่ 1.3)

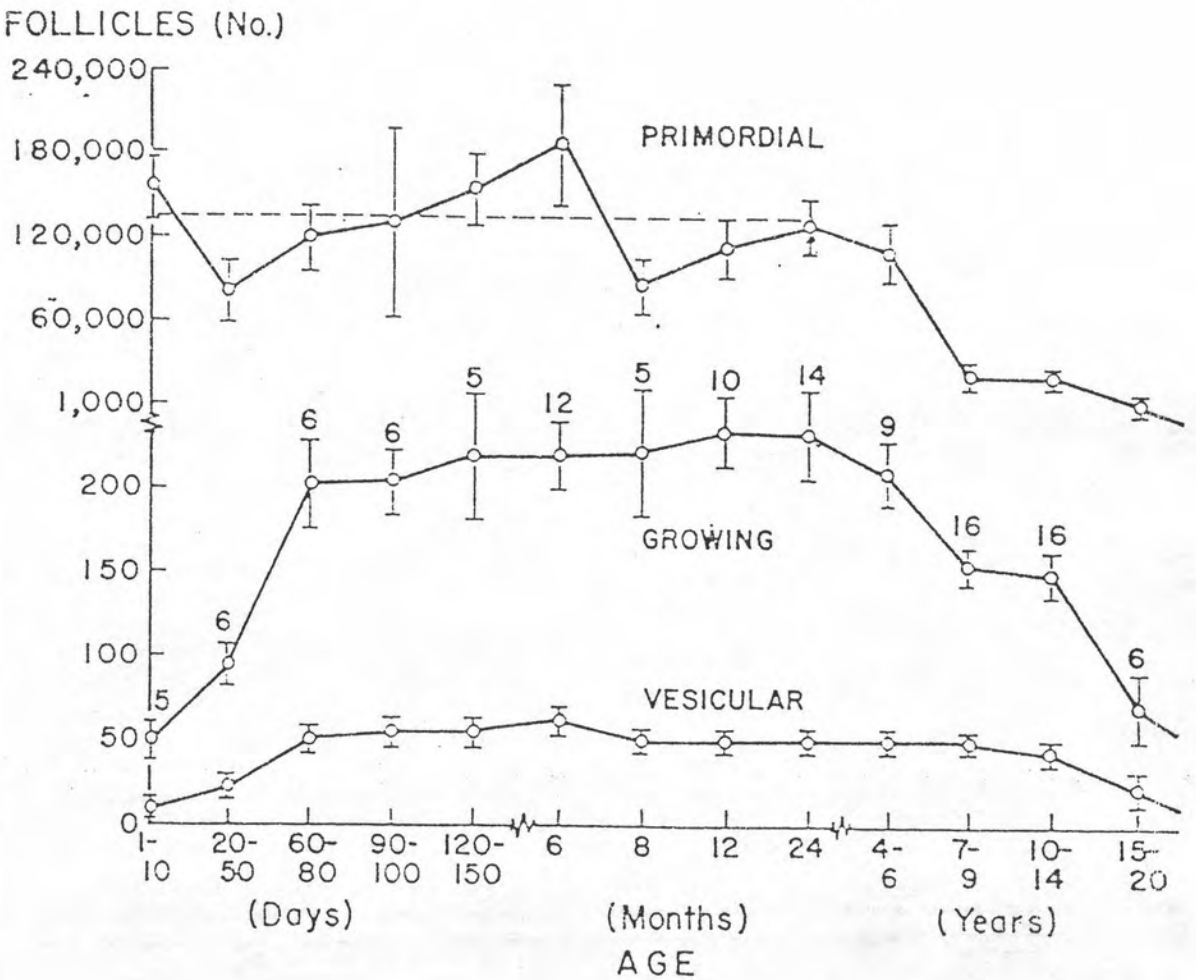
ต่อมา Evan และคณะ(1994) ได้ศึกษาถึงการเจริญของฟอลลิเคิลในลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์ระหว่างอายุ 2-36 สัปดาห์ โดยใช้เครื่องอัลตราซาวด์ตรวจผ่านทางทวารหนัก (Transrectal ultrasonography) พบว่า ลูกโคอายุตั้งแต่ 2 เดือน จะมีการเจริญของฟอลลิเคิลที่มีลักษณะเป็นคลื่นเช่นเดียวกันกับลักษณะการเจริญของฟอลลิเคิลในโคใหญ่ โดยฟอลลิเคิลชนิด Dominant ซึ่งมีขนาดใหญ่ที่สุดจะยับยั้งการเจริญของฟอลลิเคิลอื่นที่มีขนาดเล็กกว่า (Subdominant follicle) (รูปที่1.4 ก,ข) และมีระดับฮอร์โมน เอฟ เอส เอช และฮอร์โมน แอล เอช สูงขึ้นก่อนที่จะเริ่มมีการเจริญของฟอลลลิเคิลชนิด Dominant (รูป 1.4 ก) ฟอลลิเคิลขนาดเล็ก (เส้นผ่าศูนย์กลาง 3-5 มม.) และขนาดกลาง (เส้นผ่าศูนย์กลาง 6-8 มม.) จะมีจำนวนเพิ่มขึ้นเมื่อลูกโคมีอายุประมาณ

2-14 สัปดาห์ หลังจากนั้นจะมีจำนวนคงที่ (รูปที่ 1.5 ก) สำหรับฟอลลิเคิลชนิด Dominant จะมีเพิ่มขึ้นเมื่อลูกโคมีอายุประมาณ 2-34 สัปดาห์ (รูปที่ 1.5 ก,ข)



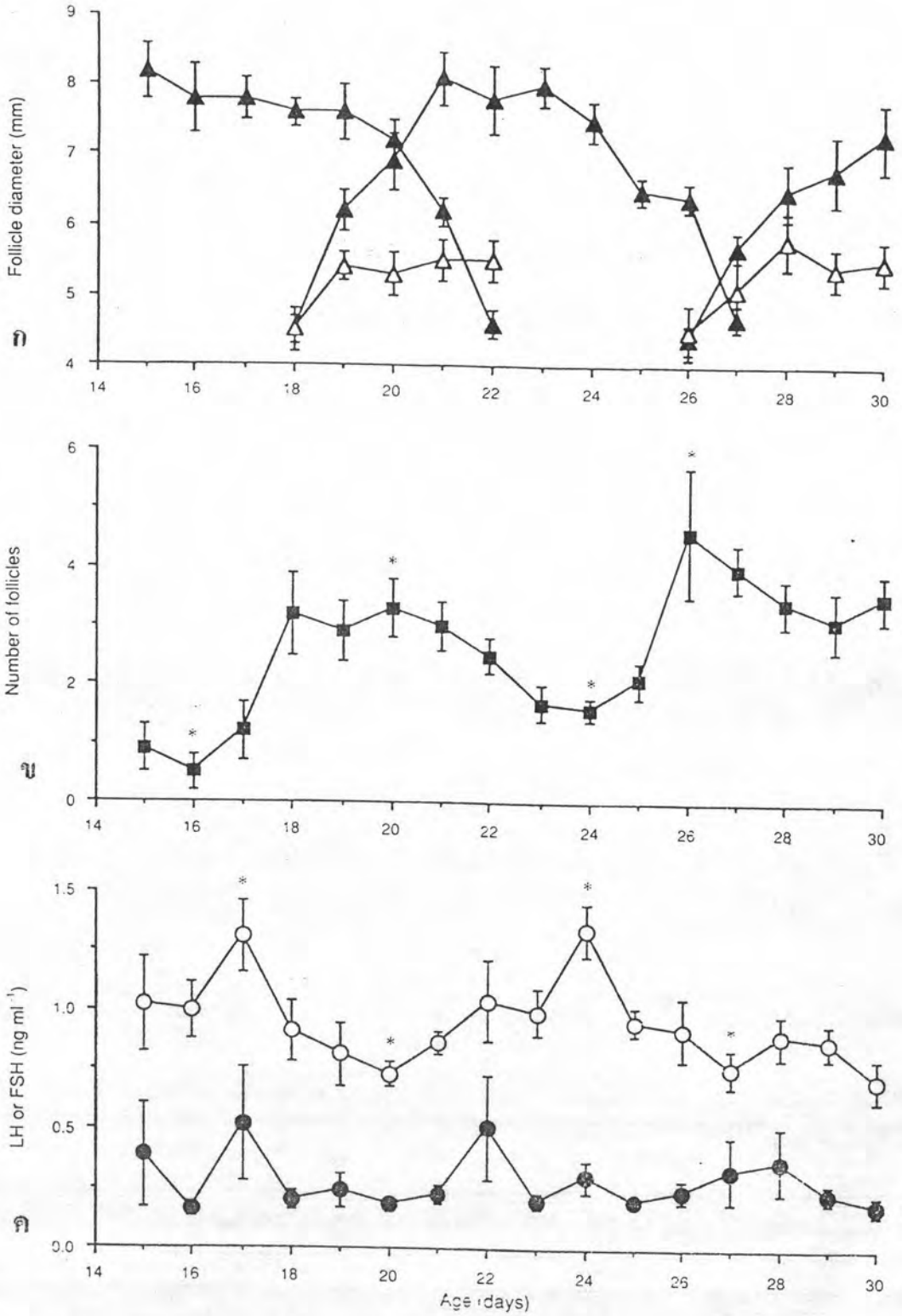
รูปที่ 1.2 แบบจำลองแสดงการแบ่งตัวแบบไมโอซิสของโอโอไซต์

(จาก Tsafriri and Pomerantz, 1986)



รูปที่ 1.3 กราฟแสดงจำนวนฟอลลิเคิลชนิดต่างๆของรังไข่โคแรกเกิด(จาก Erickson, 1966)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



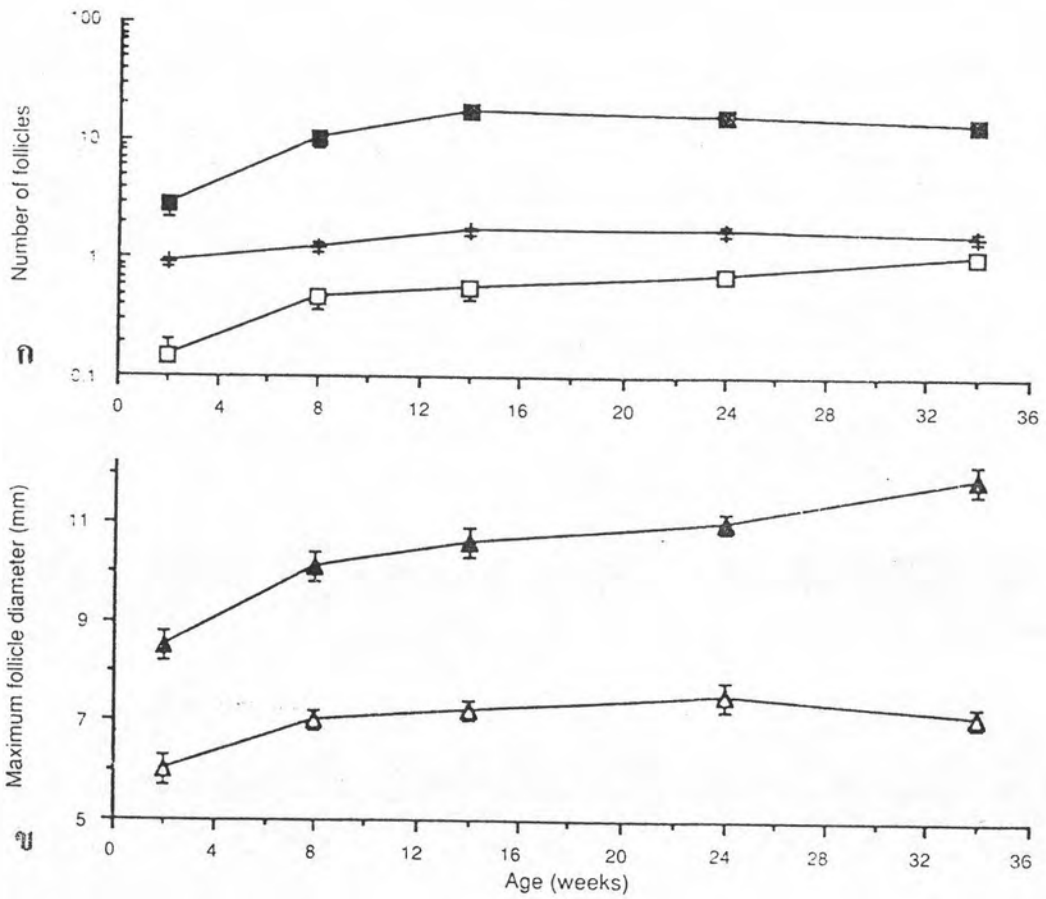
รูปที่ 1.4 แสดงการเจริญของฟอลลิเคิลที่มีลักษณะเป็นคลื่น (wave) ในลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์ อายุ 14 - 30 วัน โดยการตรวจด้วยเครื่องอัลตราซาวด์

ก. ฟอลลิเคิลชนิดDominant (▲) และชนิดSubdominant (Δ)ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด

ข. จำนวนฟอลลิเคิลขนาดมากกว่า 4 มิลลิเมตร

ค. ระดับของฮอร์โมนโกนาโดโทรปินในเลือด :FSH (O),LH (●)

(จาก Evan,et al., 1994)



รูปที่ 1.5 แสดงจำนวนของฟอลลิเคิลขนาดต่างๆ ในลูกโคอายุ 2,8,14,24 และ 34 สัปดาห์ โดยการใช้เครื่องอัตราซาวด์

ก. จำนวนของฟอลลิเคิล

1.ฟอลลิเคิลขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลาง 3-5 มิลลิเมตร (■)

2.ฟอลลิเคิลขนาดกลาง เส้นผ่าศูนย์กลาง 6-8 มิลลิเมตร (†)

3.ฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง ≥9 มิลลิเมตร (□)

ข. ขนาดของฟอลลิเคิล

1.ขนาดของฟอลลิเคิล Dominant (▲)

2.ขนาดของฟอลลิเคิลSubdominant ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด(Δ)

(จาก Evan,et al., 1994)

ลูกโคจะเข้าสู่ระยะวัยเจริญพันธุ์และมีการตกไข่ครั้งแรกเมื่ออายุประมาณ 1 ปี (52.8±1.6 สัปดาห์)(Evan et al., 1994) มีความแปรปรวนของการเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ตั้งแต่อายุ 4 เดือนถึง 2 ปี ขึ้นอยู่กับพันธุกรรมและสภาพแวดล้อม (Carruthers, 1986) โดยในแต่ละรอบของวงจรการเป็นสัด (Estrous cycle) ฟอลลิเคิลจำนวนหนึ่งจะถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน ทำให้มีการเจริญของฟอลลิเคิลระยะแรกเป็น Growing follicle จนกระทั่งเป็นฟอลลิเคิลที่มีขนาดใหญ่ (Graaffian follicle) และพร้อมจะมีการตกไข่เกิดขึ้น การเจริญของฟอลลิเคิลจะมีลักษณะเป็นคลื่น (wave) ตลอดวงจรการเป็นสัด โดยระดับของฮอร์โมน เอฟ เอส เอช จะสูงขึ้นก่อนการเกิดคลื่นครั้งต่อไปประมาณ 2 วัน (Adams et al., 1992a.,b.,c.) ซึ่งในแต่ละรอบจะมีฟอลลิเคิลจำนวนมากเจริญขึ้นแต่จะมีเพียงใบเดียวเท่านั้นที่เจริญเร็วกว่าและยับยั้งการเจริญของฟอลลิเคิลอื่น (Dominant follicle) เมื่อมีคอร์ปัส ลูเทียม บนรังไข่หลังจากมีการตกไข่ ฟอลลิเคิลใบอื่นจะฝ่อตัวสลายไปและเริ่มมีวงจรการเป็นสัดใหม่ จากที่กล่าวมาแล้วแสดงว่า มีฟอลลิเคิลจำนวนมากที่ฝ่อไปในแต่ละรอบวงจรการเป็นสัด จึงมีแนวคิดในการใช้ลูกโคเป็นแหล่งผลิตโอโอไซต์โดยใช้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินฉีดกระตุ้นให้มีฟอลลิเคิลเจริญมากขึ้นเพื่อให้มีจำนวนการตกไข่มากขึ้น

<u>ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการสร้างฟอลลิเคิลของรังไข่</u>

ฮอร์โมน (Hormone) เป็นสารเคมีที่สร้างจากต่อม แล้วไปออกฤทธิ์ต่ออวัยวะหรือเนื้อเยื่อที่เป็นเป้าหมาย (Target organ) โดยทางกระแสเลือด ฮอร์โมนที่ใช้ในการกระตุ้นการสร้างฟอลลิเคิลของรังไข่และการกระตุ้นการตกไข่เพิ่มที่ใช้ คือ ฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน ประกอบด้วย ฮอร์โมน เอฟ เอส เอช (Follicle Stimulating Hormone:FSH) หรือ ฮอร์โมน แอล เอช (Lutenizing hormone : LH) หรือฮอร์โมน พี เอม เอส จี (Pregnant Mare Serum : PMSG) การฉีดฮอร์โมนโกนาโดโทรปินจะลดการฝ่อ (atresia) ของฟอลลิเคิลขนาดเล็กและเพิ่มอัตราการเจริญและการคัดเลือกฟอลลิเคิล (Driancourt, 1991) และช่วยให้เกิดการตกไข่ได้จากโอโอไซต์ที่ยังเจริญไม่เต็มที่ (Premature ovulation) โดยกระตุ้น ให้มีการเจริญของฟอลลิเคิลและโอโอไซต์ (Callesen et al., 1986)

1. ฮอร์โมน เอฟ เอส เอช (FSH) เป็นฮอร์โมนที่หลั่งจากต่อมใต้สมองส่วนหน้า (Anterior Pituitary Gland) ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของต่อมฮัยโปธารามัส (Hypothalamus) มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 32,000-37,000 ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต เท่ากับ 24% และกรดซิเอริค (sialic acid) เท่ากับ 5% และมีค่าครึ่งชีวิต (Half-life) 2 ชั่วโมง การที่มีค่าครึ่งชีวิตสั้นทำให้การใช้ฮอร์โมน เอฟ เอส เอช จะต้องทำการแบ่งฉีดหลายเข็มและห่างกันทุกๆ 12 ชั่วโมงเพื่อให้มีปริมาณฮอร์โมนสม่ำเสมอเพียงพอที่จะไปกระตุ้นการสร้างฟอลลิเคิลและมีการตกไข่เพิ่ม ฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ที่ใช้ในปัจจุบันฤทธิของ ฮอร์โมน เอฟ เอส เอช และฮอร์โมน แอล เอช จะมีความแปรผันมากในแต่ละชุดของการผลิต (Chupin et al., 1984) โดยพบว่าผลิตภัณฑ์ที่มีสัดส่วนของฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ต่อฮอร์โมน แอล เอช ต่ำ จะให้ผลการตกไข่ต่ำ เนื่องจากฮอร์โมน

แอล เอช จำนวนมากจะมีอิทธิพลไปยับยั้งการตกไข่ แต่กลไกที่เกิดขึ้นไม่ทราบแน่ชัด Donalson และ Ward (1985) ได้ทดลองใช้ผลิตภัณฑ์ ที่มีปริมาณของ ฮอร์โมน แอล เอช ต่ำ ได้แก่ Folltropin ® และ Superov® โดยใช้ฮอร์โมนที่ผลิตชุดเดียวกันในการฉีดกระตุ้น ซึ่งให้ผลการตอบสนองของรังไข่ดี.

2. ฮอร์โมน พี เอม เอส จี (PMSG) เป็นฮอร์โมนชนิดไกลโคโปรตีนและออกฤทธิ์เช่นเดียวกับฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ฮอร์โมน พี เอม เอส จี เป็นฮอร์โมนที่หลั่งมาจากเซลล์โทรโฟบลาสติก (Trophoblastic) ของลูกม้าในช่วงวันที่ 40-150 วันของการตั้งท้อง แต่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดใหญ่ เท่ากับ 68,000 ซึ่งมีผลทำให้เกิดปฏิกริยาต่อต้านของร่างกายต่อฮอร์โมน พี เอม เอส จี เมื่อฉีดกระตุ้นซ้ำ และมีปริมาณของกรดซิเอริคสูงถึง 10.4% ทำให้ฮอร์โมน พี เอม เอส จี มีค่าครึ่งชีวิต (Half-life) นานกว่าฮอร์โมน เอฟ เอส เอช คือประมาณ 26 ชั่วโมง (Moor et al., 1984) การใช้ฮอร์โมน พี เอม เอส จี จะให้ผลการตอบสนองของรังไข่ที่มีความแปรปรวนสูง เนื่องจากปริมาณฮอร์โมนที่ได้จากแม่ม้าแต่ละตัวจะแตกต่างกัน (Gonzalez-mencio et al., 1978) นอกจากนี้ Humphrey และคณะ(1979) ศึกษาพบว่า ฮอร์โมน พี เอม เอส จี ที่มีส่วนประกอบของฮอร์โมน เอฟ เอส เอช สูงกว่า ฮอร์โมน แอล เอช จะให้ผลการตอบสนองต่อการตกไข่สูงกว่าผลิตภัณฑ์ที่มีสัดส่วนของฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ต่ำกว่า ฮอร์โมน แอล เอช

3. ฮอร์โมน เอช ซี จี (Human chorionic gonadotropin: hCG) เป็นฮอร์โมนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 38,000 และมีค่าครึ่งชีวิต (Half-life) เท่ากับ 11 ชั่วโมง ผลิตโดยเซลล์โทรโฟบลาสติกในช่วงระหว่างการฝังตัวจนกระทั่งใกล้คลอด ในสัตว์หลายชนิดฮอร์โมน เอช ซี จี มีฤทธิ์เหมือนฮอร์โมน แอล เอช ซึ่งกระตุ้นให้โอโอไซต์เจริญพร้อมปฏิสนธิและและทำให้เกิดการตกไข่

<u>การกระตุ้นการสร้างฟอลลิเคิลและการกระตุ้นให้มีการตกไข่เพิ่ม</u>

ในแม่โคการกระตุ้นให้มีการตกไข่เพิ่ม อาจทำให้เกิดการตั้งท้องแฝดได้(Bellows and Short, 1972) เป็นปัจจัยสำคัญในการทำการย้ายฝากตัวอ่อน ในทางปศุสัตว์โดยเฉพาะในโค (Elsden et al., 1978) ซึ่งสามารถทำให้แม่โคมีลูกได้มากกว่า 1 ตัว ต่อปี โดยการฉีดกระตุ้นรังไข่ด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน ได้แก่ ฮอร์โมน เอฟ เอส เอชและฮอร์โมน พี เอม เอส จี ทำให้มีการตกไข่มากกว่า 1 ใบ และได้ตัวอ่อนเป็นจำนวนมากหลังการผสม แต่ปัญหาสำคัญของการกระตุ้นการตกไข่เพิ่ม คือมีความแปรปรวนมากในการตอบสนองของรังไข่ ที่มีต่อฮอร์โมนที่ฉีดกระตุ้น ซึ่งมีความสำคัญทำให้เกิดความล้มเหลวในการได้ตัวอ่อนหลังการผสม เมื่อเปรียบเทียบผลการใช้ฮอร์โมนทั้ง 2 ชนิด พบว่า ฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ให้การตอบสนอง การตกไข่ของรังไข่สูงกว่าฮอร์โมน พี เอม เอส จี และตัวอ่อนที่ได้มีคุณภาพและเมื่อนำไปฝากยังตัวรับจะให้อัตราการตั้งท้องสูง (Elsden et al. 1978) สำหรับการกระตุ้นการสร้างฟอลลิเคิลในแม่โคมีการศึกษาไม่มากนัก มีวัตถุประสงค์เพื่อเก็บ โอโอไซต์มาทำการปฏิสนธินอกร่างกาย

โดย Lu และคณะ (1991) ได้ทดลองฉีดกระตุ้นรังไข่แม่โคเนื้อด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช แล้วเก็บโอโอไซต์มาทำการปฏิสนธินอกร่างกาย พบว่า ได้อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อน (Cleavage rate) และมีอัตราการเจริญเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส (Blastocyst rate) สูงกว่าแม่โคกลุ่มที่ไม่ได้ฉีดกระตุ้นรังไข่

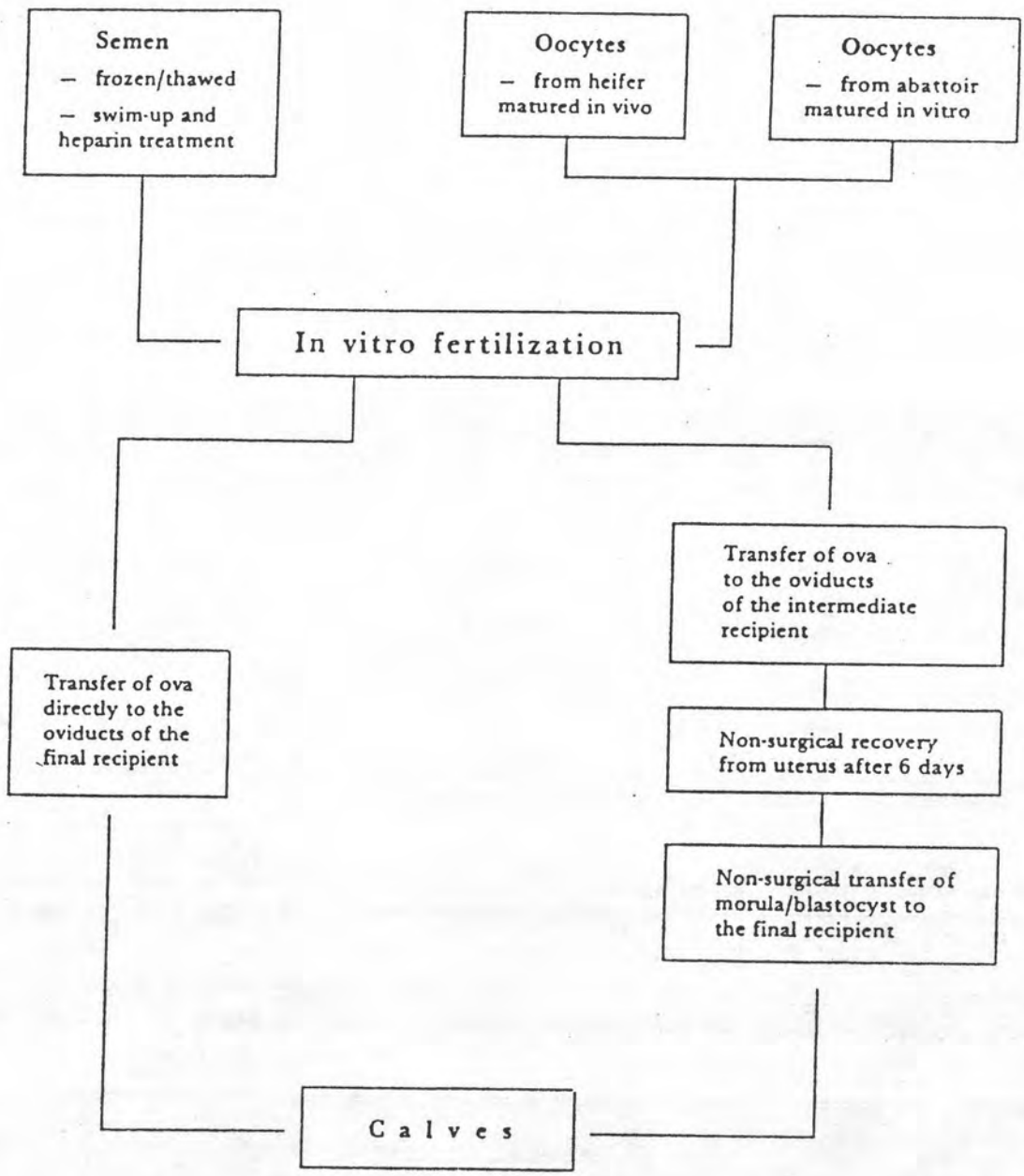
ส่วนในลูกโคนั้นเนื่องจากเป็นระยะที่มี ไพรมอเดียล เจิร์มเซลล์ เป็นจำนวนมาก (Erickson , 1966) ซึ่งเป็นแหล่งของโอโอไซต์ที่มากและเหมาะต่อการนำมาทำการปฏิสนธินอกร่างกาย และเพื่อลดการสูญเสียโอโอไซต์โดยเปล่าประโยชน์เนื่องจากโอโอไซต์ในลูกโคจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อมีอายุเพิ่มขึ้นและจะเสื่อมสภาพหมดเมื่อลูกโคมีอายุประมาณ 4 ปี จึงมีการศึกษาเพื่อกระตุ้นรังไข่ลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์ให้มีการตกไข่ โดยใช้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน เช่น ใช้ฮอร์โมน พี เอม เอส จี ขนาด 1,500-2,000 ไอยู กระตุ้นรังไข่ลูกโคที่มีช่วงอายุ 1-6 เดือน (Jainudeen et al., 1966) ลูกโคอายุ 2 เดือน (Onuma et al., 1969; Seidal et al., 1971) และลูกโคอายุ 4 เดือน (Onuma and Foote, 1969) และตรวจการตอบสนองของรังไข่โดยการเปิดผ่าช่องท้องหรือส่งเข้าโรงฆ่าประมาณวันที่ 3 หลังจากฉีดฮอร์โมน แอล เอช ซึ่งพบว่า รังไข่ลูกโคสามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน พี เอม เอส จี แต่มีอัตราการเก็บโอโอไซต์และ อัตราการปฏิสนธิต่ำ (Jainudeen et al., 1966) และสามารถกระตุ้นซ้ำให้มีการตกไข่ได้อีก โดย Onuma และคณะ(1969) ได้ทดลองฉีดฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ขนาด 50 มก. วันละ10 มก. เป็นเวลา 5 วัน ที่อายุ 2-3 เดือนและกระตุ้นซ้ำ 2 ครั้งห่างกันครั้งละ 2 เดือน พบว่ารังไข่สามารถตอบสนองการกระตุ้นซ้ำได้ โดยมีฟอลลิเคิล ขนาด > 10 มม. น้อยลง เท่ากับ 47.3 ใบ/ ตัว 21.1 ใบ/ ตัว และ 18.8 ใบ/ตัว ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องจากมีการเกิด Refractoriness ต่อฮอร์โมน และการเชื่อมติดของรังไข่กับอวัยวะภายในช่องท้อง แต่มีอัตราตกไข่ไม่แตกต่างกัน เนื่องจากในปัจจุบันสามารถทำการปฏิสนธินอกร่างกายจากโอโอไซต์ของแม่โคได้ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาเพื่อหาแหล่งของโอโอไซต์ โดยพบว่าสามารถใช้ลูกโคเป็นแหล่งโอโอไซต์สำหรับการผลิตตัวอ่อนจากการปฏิสนธินอกร่างกาย (Armstrong et al., 1991) โดยใช้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินชนิด เอฟ เอส เอช (Stubbing et al., 1993) และมีการฉีดร่วมกับฮอร์โมนพี เอ็ม เอส จี ขนาด 200-400 ไอยู (Irvine et al., 1993, 1994) ซึ่งให้การตอบสนองของรังไข่ในลูกโค ไม่แตกต่างจากการใช้ฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ขนาด 140-190 มก (NIH- FSH-P1) ตรวจการตอบสนองและเจาะฟอลลิเคิลเพื่อเก็บโอโอไซต์โดยการเปิดผ่าช่องท้อง (Armstrong et al., 1991; Techakumphu et al., 1993) หรือการใช้ลาพาโลสโคป (Irvine et al., 1993, 1994; Stubbing et al., 1993) สำหรับในประเทศไทย มีการทดลองกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในลูกกระบือก่อนวัยเจริญพันธุ์อายุ 8-15 เดือน โดยใช้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (Techakumphu et al., 1993) จากการศึกษาทั้งหมดที่กล่าวมาแล้ว สรุปได้ว่าสามารถกระตุ้นการสร้างฟอลลิเคิล เพื่อเจาะเก็บโอโอไซต์ในลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์ได้ และสามารถนำโอโอไซต์ที่ได้ไปทำการปฏิสนธินอกร่างกาย (Armstrong et al., 1992) และมีอัตรา

การเจริญของตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสไม่แตกต่างจากโอโอไซต์จากแม่โคที่ได้จากโรงฆ่า (Irvine et al., 1993) และสามารถนำไปฝากยังโคตัวรับจนกระทั่งคลอดออกมาได้ (Kajihara et al., 1991; Armstrong et al., 1992) ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งในการใช้ลูกสัตว์ก่อนวัยเจริญพันธุ์ เป็นแหล่งของ โอโอไซต์ในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ โดยจะช่วยลดช่วงห่างระหว่างรุ่น (General interval) และเพิ่มอัตราการเพิ่มพันธุ์กรรม (Genetic rate of gain) (Duby et al., 1996) ซึ่งจะเพิ่มขึ้นประมาณ 22% เมื่อสามารถผลิตตัวอ่อนได้จากลูกโคที่มีอายุ 1-5 เดือน (Lohuis, 1995)

<u>ขบวนการปฏิสนธิ (Fertilization)</u>

การปฏิสนธิคือ การรวมกันระหว่าง male pronucleus ของตัวอสุจิ(sperm) และ female pronucleus ของไข่ ซึ่งในธรรมชาติจะเกิดขึ้นภายในท่อนำไข่ (oviduct) ส่วน ampulla ประมาณ 1-2 ชั่วโมงหลังเกิดการตกไข่ โดยปกติตัวอสุจิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมไม่สามารถเข้าผสมกับไข่ได้ทันที โดยตัวอสุจิจะต้องผ่านขบวนการที่เรียกว่า capacitation ก่อนเพื่อให้เกิดความสามารถของตัวอสุจิที่จะเข้าปฏิสนธิได้ ซึ่งขบวนการนี้จะเกิดในท่อทางเดินสืบพันธุ์ของเพศเมียทั้งในมดลูกและท่อนำไข่ สำหรับเวลาในการเกิดจะแตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิดการเกิด capacitation เป็นการเกิดปฏิกริยาทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของ ผิวด้านหน้าของตัวอสุจิ การเปลี่ยนแปลงระดับของคลอเรสเตอรอล (chloresterol) และฟอสโฟไลปิด (phospholipid) ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ผลดังกล่าวจะไปเพิ่มปริมาณแคลเซียม ให้เข้าไปในตัวอสุจิ ซึ่งจะชักนำให้เกิด acrosome reaction ต่อไป การเกิด acrosome reaction เป็นขบวนการที่เกี่ยวข้องกับ การขาดเป็นท่อนๆของผนังเซลล์และการรวมกันของ plasma membrane กับ outer acrosome membrane ของตัวอสุจิ ทำให้มีการปล่อยเอ็นไซม์ออกมา เช่น hyaluronidase หรือ tripsin-ike enzyme เป็นต้น ร่วมทั้งมีการสลายตัวของ plasma membrane อีนไซม์ที่ถูกปล่อยออกมาในขณะเกิด acrosome reaction จะช่วยในการเจาะผ่านชั้น cumulus oophorus และ corona radiata ของโอโอไซต์ จากนั้นตัวอสุจิจะผ่านเข้าไป จนถึงชั้นโซนา เพลลูซิดา (zona pellucida) ซึ่งจะมีคุณสมบัติที่เป็น species specific reception ต่อสัตว์ชนิดเดียวกันเท่านั้น และจะมีตัวอสุจิเพียงตัวเดียวเท่านั้นที่สามารถเจาะเข้าไปในโอโอไซต์ได้ เนื่องจากหลังจากที่มีตัวอสุจิตัวแรกเข้าไป จะเกิดขบวนการป้องกันตัวอสุจิตัวอื่นที่จะเข้าผสม คือ การเกิด zona reaction และ vittelline block ต่อมาจะเกิดการรวมกันของ male และ female pronucleus หลังจากนั้นตัวอ่อนที่ได้จะมีการแบ่งตัวในท่อนำไข่ จนถึงระยะเข้าไปฝังในมดลูกต่อไป (Andrews et al., 1992) สำหรับการปฏิสนธินอกร่างกายหรือที่เรียกว่า ไอ วี เอฟ (<u>In vitro</u> fertilization) จะเป็นการรวมกันระหว่าง male promucleus ของตัวอสุจิกับ female pronucleus ของโอโอไซต์ภายนอกร่างกาย โดยมีการจัดสภาวะแวดล้อมในการปฏิสนธิให้ใกล้เคียงกับธรรมชาติมากที่สุด ซึ่งขั้นตอนของการทำการปฏิสนธินอกร่างกายในสัตว์แต่ละชนิดจะมีขั้นตอนการทำที่เหมือนกันคือ ประกอบด้วย การเก็บโอโอไซต์ (Oocyte collection) การทำให้โอโอไซต์เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ (Maturation)

(Sperm preperation) และการปฏิสนธิ(รูปที่ 1.6) โดยในสัตว์แต่ละชนิดจะมีปัจจัยที่มีผลต่อการปฏิสนธินอกร่างกายแตกต่างกัน สำหรับในโคมีผู้ศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการปฏิสนธินอกร่างกายดังต่อไปนี้คือ



รูปที่ 1.6 แผนภาพแสดงขบวนการปฏิสนธินอกร่างกาย(In vitro Fertilization)

ปัจจัยที่มีผลต่อการปฏิสนธินอกร่างกายในโค

ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ เช่น เวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง (Prokof et al., 1992; Sekine et al., 1992) หรือองค์ประกอบของน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ใช้ (Parrish, et al., 1985; Liebfried-Rutledge et al., 1986; Coskun et al., 1991; Shamsuddin et al., 1993; Yang, et al., 1993.) เป็นต้น ที่มีผลต่อขบวนการปฏิสนธินอกร่างกายของโอโอไซต์ที่เก็บจากโรงฆ่าก็ตาม อัตราการพัฒนาของตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์จนถึงระยะบลาสโตซีสมีอัตราประมาณ 2 ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ (Vajta et al., 1992; Mermillod et al., 1992)และอัตราการถ่ายฝากตัวอ่อนไปยังโคตัวรับจนกระทั่งคลอดได้ลูกโคยังคงมีอัตราประมาณ 10 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ (Xu et al., 1992.) ปัจจัยที่มีผลต่อการปฏิสนธินอกร่างกายในโค ประกอบด้วย

1.การเก็บโอโอไซต์ (Oocyte collection)

สำหรับวิธีการเก็บโอโอไซต์จากฟอลลิเคิลที่กำลังเจริญ ที่อยู่บนผิวของรังไข่ที่เก็บจากโรงฆ่า จากการศึกษาพบว่า อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเก็บรังไข่จนกระทั่งนำโอโอไซต์ที่ได้มาทำการเพาะเลี้ยง มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ โดยอุณหภูมิเหมาะสมต่อการเก็บรังไข่ ประมาณ 31-33 องศาเซลเซียส (Sekine et al., 1992) และระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บไม่ควรเกิน 8-11 ชั่วโมง (Yang et al., 1990) นอกจากนี้ยังพบว่าการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีการกรีดลงบนผิวของรังไข่ (cutting method) จะได้จำนวนโอโอไซต์มากกว่าการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีการเจาะฟอลลิเคิล โอโอไซต์ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ที่เก็บได้ด้วยวิธีการเจาะจากฟอลลิเคิล จะเป็นชนิดที่มีเซลล์คูมูลัสหนาแน่น (Compact cumulus oocyte) (Hamano and Kuwayama, 1993) และ โอโอไซต์ที่เจาะจากฟอลลิเคิลขนาด 3-8 มิลลิเมตร จะให้อัตราการปฏิสนธิสูงกว่าโอโอไซต์ที่เก็บได้จากการกรีดลงบนผิวของรังไข่ สำหรับในลูกสัตว์สามารถที่จะเจาะเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ที่ได้จากโรงฆ่า เช่น ในแพะ (Martino, 1994) และ ในโค (Palma et al., 1993, 1994) สำหรับในลูกโคนั้นการผ่าตัดเปิดช่องท้อง เป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการเจาะเก็บโอโอไซต์ จากรังไข่ของลูกโค (Kajihara et al., 1991) ที่ฉีดกระตุ้นให้มีการเจริญของฟอลลิเคิลด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน

2.ชนิดและคุณภาพของโอโอไซต์(Type and Quality of oocyte)

โอโอไซต์ที่เก็บได้จากรังไข่แบ่งชนิดของโอโอไซต์โดยดูจากปริมาณเซลล์คูมูลัสที่ล้อมรอบสามารถแบ่งออกได้เป็น4 ชนิด ดังนี้คือ

ก. โอโอไซต์ที่มีเซลล์คูมูลัสหุ้มหลายชั้น (Compacted cumulus oocyte)

ข. โอโอไซต์ที่มีเซลล์คูมูลัสหุ้มบางส่วน (Partial cumulus oocyte)

ค.โอโอไซต์ที่ไม่มีเซลล์คูมูลัสหุ้มเลย (Denuded oocyte)

ง. โอโอไซต์ที่มีเซลล์คูมูลัสแผ่ขยายออก(Expanded cumulus oocyte)

เมื่อนำโอโอไซต์ทั้ง 4 ชนิดไปทำการเพาะเลี้ยงจนเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ พบว่าหลังจากนำไปทำการปฏิสนธินอกร่างกาย โอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คูมูลัสหุ้มหลายชั้น จะมีอัตราการปฏิสนธิสูง

กว่าโอโอไซต์ชนิดอื่น (Pavasuthipiasit et al., 1992) และถ้าทดลองทำการลอกเอาเซลล์คูมูลัสออกจากนั้นนำไปปฏิสนธิ พบว่ามีผลทำให้อัตราการปฏิสนธิลดลง (Hawk et al., 1992)ทั้งนี้เพราะเซลล์คูมูลัสที่หุ้มรอบโอโอไซต์ จะช่วยป้องกันการแข็งตัว (Hardening) ของโซนาเพลลูซิดา และช่วยให้สเปิร์มสามารถเจาะโอโอไซต์ได้ดีขึ้น คุณภาพของโอโอไซต์มีผลต่อความสามารถในการเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ โดย Hazeleger และ Stubbing (1992) ได้จัดแบ่งคุณภาพของโอโอไซต์ โดยดูจากลักษณะทางกายภาพดังนี้คือ

1.ดูความหนาและความหนาแน่นของเซลล์คูมูลัส (Thickness and compactness)

2.ดูจากความกลมกลืนเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogenous) ของไซโตพลาสซึม ของโอโอไซต์จากกลมกลืนเป็นเนื้อเดียวกัน (fine) จนกระทั่งลักษณะหยาบหยาบ (coarse)

3.ดูจากสีของโอโอไซต์จากสีซีดจนถึงสีน้ำตาลเข้ม

4.ดูจากขนาดของโอโอไซต์

จากการศึกษาพบว่ารูปร่างและลักษณะของโอโอไซต์มีผลโดยตรงต่อความสามารถในการเกิดไมโอซิส ได้เป็นระยะเมตาเฟส 2 โดยโอโอไซต์ที่มีคุณภาพจะมีอัตราการเกิด เมตาเฟส 2 เท่ากับ 100% และมีอัตราการแบ่งตัวเท่ากับ 48-50% สำหรับโอโอไซต์ที่ได้จากการฉีดกระตุ้นลูกโคด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน จะได้โอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คูมูลัสแผ่ขยายเป็นจำนวนมาก (73%) ซึ่งเป็นโอโอไซต์ที่เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิค่อนข้างสมบูรณ์ (Armstrong et al., 1994)

3.สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง(Maturation condition)

โอโอไซต์ที่เก็บได้จากรังไข่ทั้งจากการกรีดลงบนผิวรังไข่ หรือจากการเจาะฟอลลิเคิล จะได้โอโอไซต์ที่มีหลายระยะของการเจริญเติบโต ทั้งนี้เพราะโอโอไซต์แต่ละใบจะมีการเจริญอยู่ที่ระยะต่างๆไม่เท่ากัน ดังนั้นในกระบวนการทำการปฏิสนธินอกร่างกาย จึงจำเป็นที่จะต้องนำโอโอไซต์ที่เก็บได้ไปเพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงก่อนเพื่อให้ โอโอไซต์มีสภาพที่พร้อมจะปฏิสนธิ ซึ่งจะเห็นได้จากหลังการเพาะเลี้ยง จะมีการแผ่ขยายของเซลล์คูมูลัสที่ล้อมรอบโอโอไซต์ (Cumulus Expansion) และเมื่อนำโอโอไซต์ ไปย้อมสีจะเห็นโครโมโซมมีการแบ่งตัวอยู่ในระยะเมตาเฟส 2 ของการแบ่งตัวแบบไมโอซิส กระบวนการเพาะเลี้ยง โอโอไซต์เพื่อให้เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธินอกร่างกาย เรียกว่า ไอ วี เอ็ม (In vitro maturation) ซึ่งจากการศึกษาของ Prokof และคณะ(1992) พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์นาน 18 ชั่วโมงและ24 ชั่วโมง จะได้อัตราการเจริญของตัวอ่อนสูงถึง 77.0% และ 75.9%และมีอัตราการแบ่งตัวจนถึงระยะบลาสโตซีสเป็น 25.6% และ 24.2%ตามลำดับ นอกจากนี้สามารถแบ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์ได้ดังนี้

3.1 ฮอร์โมนที่เติมในน้ำยาเพาะเลี้ยง (Hormone supplement)

ในธรรมชาติการเจริญของโอโอไซต์ที่อยู่ภายในฟอลลิเคิล จนกระทั่งเกิดกระบวนการตกไข่ กลไกของการเกิดจะถูกควบคุมด้วยฮอร์โมนโกรนาโดโทรปินโดยเฉพาะฮอร์โมน เอฟ เอส เอช (FSH) ฮอร์โมน แอล เอช (LH) และฮอร์โมน เอสตร้าไดออล (Estradiol-17β) จะมีผลมากต่อการเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์และกระบวนการตกไข่ สำหรับโอโอไซต์ของโค การเติมฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ฮอร์โมน แอล เอช และฮอร์โมน เอสตร้าไดออล ในน้ำยาเพาะเลี้ยงเพื่อให้เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ มีผลช่วยให้อัตราการพัฒนาของตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกาย สามารถเจริญจนถึงระยะมอรูลาและบลาสโตซีสถึง 38% (Crister et al., 1986) และจากการศึกษาของSchellander และคณะ(1990) พบว่า โอโอไซต์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำยา TCM-199 ที่เติม 10% fetal calf serum (FCS) อย่างเดียวจะมีอัตราการเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ 39% แต่เมื่อเติมฮอร์โมน แอล เอช จำนวน 10 μg/ml และฮอร์โมน เอสตร้าไดออล จำนวน 1 μg/ml ในน้ำยาเพาะเลี้ยงมีผลทำให้อัตราการเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์เพิ่มขึ้นเป็น 70% แสดงให้เห็นว่าฮอร์โมนโกนาโดโทรปินมีผลต่อการเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิภายนอกร่างกายของโอโอไซต์ สำหรับในลูกโคฮอร์โมนที่ใช้เติมในน้ำยาเพาะเลี้ยงเพื่อให้เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ จะเหมือนกับในโคใหญ่ เช่น จากการศึกษาของ Palma ในปี 1994 พบว่าการเติมฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ขนาด 20 μg/ml ในน้ำยาเพาะเลี้ยงจะช่วยให้ อัตราการเกิดระยะบลาสโตซีสของโอโอไซต์จากลูกโคเพิ่มขึ้นเป็น 19.5% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เติมฮอร์โมน เอฟ เอส เอช 10 μg/ml ซึ่งเท่ากับ 13.4%

3.2 ซีรั่มที่เติมในน้ำยาเพาะเลี้ยง(Serum supplement)

การเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ของโคในน้ำยาเพาะเลี้ยง เพื่อให้เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิมีองค์ประกอบที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งที่ใช้เติมในน้ำยาเพาะเลี้ยงคือ ซีรั่ม เช่น Fetal calf serum (FCS), Bovine serum albumin (BSA) และ Maternal serum เป็นต้น (Sanbuissho and Therelfall., 1990)ทั้งนี้เนื่องจากในซีรั่มมีสารเร่งการเจริญ (growth factor)ที่มีความจำเป็นต่อการเจริญของโอโอไซต์ และในระหว่างชนิดของโปรตีนที่เติมลงไป มีการศึกษาพบว่า การเติมFCS จะให้อัตราการเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์ดีกว่าการเติมBSA ลงในน้ำยาเพาะเลี้ยงเนื่องจาก FCS มีส่วนช่วยให้ฮอร์โมน เอฟ เอส เอช เหนี่ยวนำให้เกิดการแผ่ขยายของเซลล์คูมูลัสเพิ่มขึ้น มีผลทำให้อัตราการปฏิสนธิเพิ่มขึ้น (Leibfried-Rutledge et al., 1986) นอกจากนี้ Saeki และคณะ (1991) พบว่า FCS ที่เติมในน้ำยาเพาะเลี้ยงควรมีปริมาณ 10-20 เปอร์เซ็นต์ สำหรับในลูกโคปริมาณ FCSที่เติมในน้ำยาเพาะเลี้ยงจะอยู่ในช่วง 10-20% (Kajihara et al., 1991; Armstrong et al., 1994) และปริมาณซีรั่มที่เติมลงในน้ำยาเพาะเลี้ยงควรใช้ maternal serum ควรมีปริมาณ 20% จะทำให้โอโอไซต์เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิได้ดี (Palma et al., 1993)

4. สภาวะที่ใช้ในการปฏิสนธิ (Fertilization condition)

หลังจากโอโอไซต์เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิแล้ว จะถูกนำมาเพาะเลี้ยงร่วมกับตัวอสุจิที่เตรียมไว้เพื่อให้เกิดการปฏิสนธิ ซึ่งระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสำหรับในโคประมาณ 18-20 ชั่วโมง (Myers et al., 1992) หลังจากนั้นจะนำตัวอ่อนที่ได้ไปทำการเพาะเลี้ยงต่อไป เราสามารถประเมินอัตราการปฏิสนธิโดยดูจากการที่มีตัวอสุจิเกาะรอบ ๆโซนาเพลลูซิดา และการพบตัวอสุจิใน Perivitelline space หรือดูจาก pronuclei และ secondary polar body ที่เกิดขึ้น และเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมงจะมีการแบ่งตัวเกิดขึ้น (Cleavage) (Fukushima and Fukui, 1985) จากการศึกษาพบว่า การเตรียมตัวอสุจิเพื่อให้มีความพร้อมที่จะปฏิสนธิได้นั้นเป็นขั้นตอนที่สำคัญขั้นตอนหนึ่งในการปฏิสนธินอกร่างกาย โดยปกติแล้วตัวอสุจิที่เก็บได้จากการหลั่ง (ejaculated spermatozoa) หรือจากต่อมอีพิดิไดมิส (epididymis spermatozoa) ไม่สามารถนำมาปฏิสนธิกับโอโอไซต์นอกร่างกายได้ทันที เนื่องจากตัวอสุจิจะต้องผ่านกระบวนการที่เรียกว่า capacitation และ acrosome reaction ก่อน เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน คลอเลสเตอรอลและประจุไฟฟ้าบนผนังของตัวอสุจิ ในธรรมชาติการเกิด capacitation จะเกิดขึ้นเมื่ออสุจิเคลื่อนผ่านเขาไปใน ทางเดินระบบสืบพันธุ์เพศเมีย (female genital tract) สำหรับภายนอกร่างกายทำได้โดยการนำตัวอสุจิไปเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง จากการศึกษาพบว่าการเติม สารเฮปาริน (heparin) ลงในน้ำยาเพาะเลี้ยงจะช่วยให้อสุจิเกิด capacition และ acrosome reaction ได้ดีขึ้นมีผลทำให้อัตราการเกิด pronuclei เพิ่มมากขึ้น (Parrish et al., 1985) เนื่องจาก เฮปาริน เป็นสาร glycosaminoglycans ที่พบมากในทางเดินระบบสืบพันธุ์เพศเมีย ซึ่งช่วยในการเกิด capacitation ของตัวอสุจิ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของ เฮปาริน และระยะเวลาที่ใช้ในการเกิด capacitation ภายนอกร่างกายของอสุจิโคมีความสำคัญต่อความสามารถในการเจาะโอโอไซต์ของตัวอสุจิ อัตราการปฏิสนธิและอัตราการเจริญของตัวอ่อน โดยปริมาณของเฮปารินที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 25-100 μg/ml และระยะเวลา ที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 5-60 นาที (Fukui et al., 1990) นอกจากสาร เฮปาริน แล้วยังมีปัจจัยอื่น ที่มีผลต่อการเกิด capacitation และอัตราการปฏิสนธิ พบว่าการเติมสาร PHE (Penicillamine,Hypotaurine Epinephrine) จะช่วยเพิ่มความสามารถของอสุจิ เนื่องจาก hypotaurine ช่วยให้ตัวอสุจิเคลื่อนที่ได้ดีขึ้น สำหรับ penicillamine และ epinephrine จะช่วยสนับสนุนการเกิด capacitation และ acrosome reaction โดยทำงานร่วมกับ hypotaurine (Miller et al., 1994)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาการตอบสนองของรังไข่ลูกโคพื้นเมืองไทยก่อนวัยเจริญพันธุ์ ต่อการกระตุ้นการสร้างฟอลลิเคิลด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช และผลของการกระตุ้นซ้ำ

2. ศึกษาผลของฮอร์โมน เอช ซี จี ต่ออัตราการเก็บและชนิดของโอโอไซต์

3. ศึกษาโอโอไซต์ที่ได้จากรังไข่ลูกโคไทยพื้นเมืองก่อนวัยเจริญพันธุ์ ภายหลังการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ด้านต่างๆ ดังนี้

   3.1 ชนิดและคุณภาพของโอโอไซต์ที่เก็บได้

   3.2 ความสามารถในการเจริญพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์นอกร่างกาย

   3.3 ความสามารถในการปฏิสนธินอกร่างกาย

   3.4 ความสามารถในการเจริญของตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกายหลังผสม 48 ชั่วโมง

ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย

1. เป็นการผลิตตัวอ่อนจากการปฏิสนธินอกร่างกายจากโอโอไซต์ของลูกโคพื้นเมืองไทยก่อนวัยเจริญพันธุ์ เพื่อใช้ในการวิจัยทางวิทยาการสืบพันธุ์สัตว์

2. เมื่อใช้เทคนิคนี้ร่วมกับการย้ายฝากตัวอ่อนไปยังโคตัวรับ จะเป็นการลดช่วงห่างของช่วงอายุ (Generation interval) ทำให้การปรับปรุงพันธุ์กรรมให้เร็วขึ้น

3. นำไปประยุกต์ใช้กับสัตว์ที่มีคุณค่าสูง หรือสัตว์ป่าหายากเพื่อป้องกันการสูญพันธุ์