จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี ๒๕๔๓

รายงานผลงานวิจัย

เรื่อง

การศึกษาการเก็บโอโอไซต์ซ้ำด้วยเทคนิคใช้เครื่องมือคลื่นความถี่สูงสอดเข้าทางปากช่องคลอดในลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์

(Studies of Repeat Oocyte Recovery by Transvaginal Ultrasound-Guided Follicle Aspiration Technique in Prepubertal Thai Swamp Buffalo Calves)

โดย

มงคล เตชะกำพุ

เอกชาติ พรหมดิเรก

นวเพ็ญ ภูติกนิษฐ์

จินดา สิงห์ลอ

จท
สพ 15
010818

พฤศจิกายน ๒๕๔๔

ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี ๒๕๔๓

รายงานผลงานวิจัย

เรื่อง

การศึกษาการเก็บโอโอไซต์ซ้ำด้วยเทคนิคใช้เครื่องมือคลื่นความถี่สูงสอดเข้าทางปากช่องคลอดในลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์ (Studies of Repeat Oocyte Recovery by Transvaginal Ultrasound-Guided Follicle Aspiration Technique in Prepubertal Thai Swamp Buffalo Calves)

โดย

มงคล เตชะกำพุ

เอกชาติ พรหมดิเรก

นวเพ็ญ ภูติกนิษฐ์

จินดา สิงห์ลอ

พฤศจิกายน ๒๕๔๔

ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

24 พ.ค. 2549

I20141084

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2543 ของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ จังหวัดสุราษฎร์ธานี กองบำรุงพันธุ์ กรมปศุสัตว์ ที่อนุเคราะห์กระบือทดลอง และเจ้าหน้าที่ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยครั้งนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่ จฬ สพ 15
เลขทะเบียน 010818
วัน.เดือน.ปี 7 มค. 45

ชื่อโครงการ: การศึกษาการเก็บโอโอไซต์ซ้ำด้วยเทคนิคใช้เครื่องมือคลื่นความถี่สูงสอดเข้าทางปากช่องคลอดในลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์

ชื่อผู้วิจัย: มงคล เตชะกำพุ เอกชาติ พรหมดิเรก นวเพ็ญ ภูติกนิษฐ์ จินดา สิงห์ลอ

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ: ตุลาคม 2544

บทคัดย่อ

จุดมุ่งหมายของการงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาผลของการเก็บโอโอไซต์ด้วยการใช้เข็มเจาะดูดร่วมกับเครื่อง มือคลื่นเสียงความถี่สูงสอดผ่านทางช่องคลอด (โอพียู) ซ้ำหลายครั้ง ในลูกกระบือปลักจำนวน 9 ตัว ทำการฝังฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ใบหู 7 วัน ก่อนทำการกระตุ้นด้วย ฟอลลิเคิล สติมูเลติงฮอร์โมน (เอฟเอสเอช) ขนาด 180 มิลลิกรัม แบ่งฉีดเช้าและเย็น 3 วันติดต่อกัน (40x40,30x30,20x20) ร่วมกับโกนาโดโทรปิน รีลิสซิง ฮอร์โมน(จีเอ็นอาร์เอช) ตรวจการตอบสนองของรังไข่หลังกระตุ้นและทำการดูดเก็บโอโอไซต์ด้วยแรงดูด 80 –100 mmHg หลังจากฉีดจีเอ็นอาร์เอช 24 ชั่วโมง ห่างกันทุก ๆ 2 สัปดาห์ 5 ครั้ง รวมทั้งหมด 42 ครั้ง ผลการศึกษาพบว่าลูกกระบือมีการตอบสนองต่อการกระตุ้นเท่ากับ 6.6± 3.6 ฟอลลิเคิลต่อตัว (n=256) คิดเป็น 88.1%(37/42) มีขนาดของฟอลลิเคิลที่พบหลังกระตุ้นเฉลี่ยเท่ากับ 5.0 ± 2.0 มิลลิเมตร ผลการเก็บโอโอไซต์ที่ได้ในลูกกระบือเท่ากับ 5.4 ± 3.7 โอโอไซต์ต่อตัว คิดเป็น 82.4%(212/256) การเก็บโอโอไซต์แบบโอพียูหลายครั้งไม่มีผลกระทบต่ออัตราการเก็บ ครั้งที่ 1,2,3,4 และ 5 ให้อัตราการเก็บเท่ากับ 83.2%(43/50), 82.5%(54/66), 81.3%(42/52), 68.8%(27/36), 87.9%(46/52) ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่าการเก็บโอโอไซต์ซ้ำแบบโอพียูไม่มีผลต่ออัตราการเก็บและคุณภาพของโอโอไซต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำสำคัญ: กระบือปลัก โอพียู การเก็บซ้ำ อัตราการเก็บโอโอไซต์ คุณภาพของโอโอไซต์

Project Title: Studies of Repeat Oocyte Recovery by Transvaginal Ultrasound-Guided Follicle Aspiration Technique in Prepubertal Thai Swamp Buffalo Calves

Name of Investigators: Mongkol Techakumphu Akachart Promdireg
Nawapen Phutikanit Jinda Singlor

Year: November 2001

Abstract

The objective of the studies was to investigate the effect of repeated oocyte collection by transvaginal ultrasound – guidance (OPU) in nine prepubertal swamp buffaloes, aged 8 – 10 mo, The animals were stimulated with 180 mg. Follicle Stimulating Hormone(FSH) twice a day for 3 consecutive days at the program of 40x40,30x30,20x20 mg (am/pm), starting from day 7^{th} after an progesterome-ear implant. OPU was applied 24 hr after Gonadotropin releasing hormone (GnRH) injection at the end of treated program with 2 wks interval for 5 repeated collection. The results showed 88.1%(37/42) of animals responded to the treatment with the average of 6.6 $\pm$ 3.6 follicles per animal (n=256). The mean of follicular diameter was 5.0 $\pm$ 2.0 mm. The oocyte recovery rate was 5.4 $\pm$ 3.7 oocytes per animal (212/256) which were 83.2% (43/50), 82.5%(54/66), 81.3%(42/52), 68.8%(27/36) and 87.9%(46/52) in the 1^{st},2^{nd},3^{rd},4^{th} and 5^{th} collection ,respectively (P>0.05). There were no differences in ovarian responses and recovery rates among the collections. From this experiment, it can be concluded that no effect of repeat OPU on recovery rate and oocyte quality were concerned.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

KEY WORDS: Swamp buffalo, OPU, Repeat collection, Oocyte recovery rate, oocyte quality

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	II
บทคัดย่อภาษาไทย	III
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	IV
สารบัญ	V
รายการตารางประกอบ	VI
รายการรูปประกอบ	VII-VIII
รายการสัญลักษณ์และคำย่อ	IX
คำนำ	X
บทนำ	1
อุปกรณ์และวิธีการ	3
ผลการศึกษา	17
วิจารณ์	28
เอกสารอ้างอิง	34

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการประกอบตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	โปรแกรมการฉีดกระตุ้นลูกกระบือด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน	5
ตารางที่ 2	ผลการตรวจสอบรังไข่ก่อนการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอชในลูกกระบือปลัก	17
ตารางที่ 3	ผลการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่หลังกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอช	18
ตารางที่ 4	ขนาดของฟอลลิเคิลที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอช	21
ตารางที่ 5	ผลการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ลูกกระบือปลักที่ได้รับการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลและทำการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีการใช้เข็มเจาะดูดร่วมกับเครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูง	23
ตารางที่ 6	ผลการตรวจสอบลักษณะโครโมโซมของโอโอไซต์ลูกกระบือปลักที่เจาะเก็บด้วยวิธีโอพียูโดยจำแนกตามชนิดของโอโอไซต์	26

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการรูปประกอบ

		หน้า
รูปที่ 1	ลูกกระบือก่อนวัยเจริญพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองเก็บด้วยวิธีโอพียู ที่ศูนย์ฝึกนิสิตสัตวแพทย์ จังหวัดนครปฐม	4
รูปที่ 2	ภาพอัลตราซาวด์แสดงระดับการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ก่อนการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลด้วยฮอร์โมน เอฟเอสเอช ; F (follicle)	6
รูปที่ 3	อุปกรณ์ในการเจาะประกอบด้วยโปรบของอัลตราซาวด์ ชนิดสอดผ่านช่องคลอด ขนาดความถี่ 5 เมกกะเฮิร์ซ (a) แท่งโลหะที่เป็นตัวนำเข็ม (b) ที่ใช้เจาะโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู ภาพประกอบทั้งหมดแสดงในรูปล่าง	8
รูปที่ 4	เครื่องควบคุมระดับแรงดันสูญญากาศ (a) และ test tube heater (b) ที่ใช้ในการทำโอพียู	9
รูปที่ 5 กและข	แสดงการสอด probe ผ่านทางช่องคลอดของกระบือ เพื่อเก็บโอโอไซต์	10
รูปที่ 6	ไดอะแกรมแสดงการเจาะโอโอไซต์จากรังไข่	11
รูปที่ 7	ตำแหน่งรังไข่ขณะทำการเจาะ	11
รูปที่ 8	การตรวจการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอช ก่อนทำการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู อ่านผลจากจอมอนิเตอร์	12
รูปที่ 9	ภาพของรังไข่ขณะเจาะ แนวประแสดงแนวของเข็ม	13
รูปที่ 10	ภาพของรังไข่หลังเจาะแล้ว ไม่เห็นฟอลลิเคิลเหลืออยู่	13
รูปที่ 11	ของเหลวและน้ำยา lactate ringer ที่เก็บได้จากฟอลลิเคิล (follicular fluid) ด้วยวิธีโอพียู	15
รูปที่ 12	ภาพอัลตราซาวด์แสดงผลการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นในลูกกระบือหมายเลข 52-42 (ก) และ 76-42 (ข) แสดงผลการตอบสนองในระดับสูง จุดสีดำแสดงฟอลลิเคิล (F)	19
รูปที่ 13	ภาพอัลตราซาวด์แสดงผลการตอบสนองของลูกกระบือหมายเลข B52/42 ในรังไข่ข้างซ้ายที่ตอบสนองน้อย (ก) และข้างขวาที่ตอบสนองปานกลาง (ข) จุดสีดำแสดงฟอลลิเคิล (F)	20

รูปที่ 14	แสดงอัตราส่วนของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของฟอลลิเคิลในการกระตุ้นครั้งที่ 1 ถึง 5 และค่าเฉลี่ย	22
รูปที่ 15	ภาพของโอโอไซต์ของลูกกระบือปลักเจาะด้วยวิธี โอพียู	25
รูปที่ 16	ภาพระยะต่างๆของการเจริญของโอโอไซต์จากการย้อมสีด้วยวิธี Rapid staining	27

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการสัญลักษณ์และคำย่อ

ภาษาไทย	ภาษาอังกฤษ
กก. กิโลกรัม	µg. Microgram
ชม.ชั่วโมง	FSH. Follicle Stimulating Hormone
มล. มิลลิลิตร	IU. International Unit
มม. มิลลิเมตร	MHz. Megahertz
°ซ. องศาเซลเซียส	CCO. Complex cumulus oocyte
โอพียู. Ovum pick up	S+P. Single or Partial cumulus oocyte
เอฟเอสเอช. ฟอลลิเคิล สติมูเลทติ้ง ฮอร์โมน	D.Denude oocyte
	EXP. Expand cumulus oocyte
	DEG. Degenerate oocyte
	GV. Germinal vesicle
	GVBD. Germinal vesicle breakdown
	I-P. Interphase-Prophase
	MI. Metaphase I
	AI-TI. Anaphase I-Telophase I
	MII. Metaphase II
	U. Unidentified
	D. Degenerate

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำนำ

งานวิจัยเรื่อง "การศึกษาการเก็บโอโอไซต์ซ้ำด้วยเทคนิคใช้เครื่องมือคลื่นความถี่สูงสอดเข้าทางปากช่องคลอดในลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์" เป็นการพัฒนาเทคนิคการเก็บเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย โดยสามารถนำเก็บในสัตว์ซ้ำหลาย ๆ ครั้ง โดยสัตว์ไม่บอบช้ำ สามารถนำไปใช้เป็นแม่พันธุ์หลังเลิกเก็บได้ เทคนิคนี้สามารถร่วมกับเทคนิคขั้นสูง อาทิเช่น การผลิตตัวอ่อนด้วยการปฏิสนธินอกร่างกาย หรือการทำการโคลนนิ่ง โดยใช้เป็นโอโอไซต์ตัวรับ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะได้นำไปพัฒนาในแม่กระบือปลักต่อไป

มงคล เตชะกำพุ

ผู้วิจัยหลัก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

เทคโนโลยีชีวภาพทางวิทยาการสืบพันธุ์เป็นสาขาวิชาหนึ่งที่มีส่วนช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ในกระบือ ซึ่งได้แก่ เทคโนโลยีด้านการผสมเทียม การย้ายฝากตัวอ่อนและการปฏิสนธินอกร่างกาย เป็นต้น อย่างไรก็ตามการศึกษาในหัวข้อดังกล่าวในกระบือโดยเฉพาะในกระบือปลักไทยนับว่ายังน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ทำในโค การเก็บโอโอไซต์ด้วยเทคนิคใช้เครื่องมือคลื่นความถี่สูงสอดเข้าทางปากช่องคลอดเป็นเทคนิคใหม่ที่มีการพัฒนามาไม่เกิน 10 ปี ในวงการสัตวแพทย์และสัตวบาล ได้มีการนำมาใช้ในโคร่วมกับการปฏิสนธินอกร่างกายเพื่อผลิตตัวอ่อน รวมได้มีการศึกษาในลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์เพื่อจุดประสงค์เดียวกัน ในหัวข้อหลังนี้จะมีประโยชน์เห็นได้ชัดในการนำไปย้ายฝากในโคตัวรับและผลิตลูกสัตว์ออกมา เป็นการช่วยลดช่วงห่างระหว่างชีวิต (Interval of Generation) ทำให้การปรับปรุงพันธุ์โคได้รวดเร็วขึ้น การศึกษาในหัวข้อเรื่องการเก็บด้วยเครื่องมือคลื่นความถี่สูงนี้มีเพียง 2-3 รายงานเท่านั้นในแม่กระบือ โดยหนึ่งในสองรายงานทำในแม่กระบือปลัก ส่วนการศึกษาในลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์ยังไม่มีรายงานแต่อย่างใดทั้งในประเทศและต่างประเทศ การพัฒนาเทคนิคนี้ร่วมกับเทคนิคการปฏิสนธินอกร่างกายจึงอาจเป็นหนทางอีกหนทางหนึ่งในการนำไปเพื่อผลิตตัวอ่อนในกระบือปลัก ทดแทนการผลิตตัวอ่อนด้วยการชะล้างจากแม่กระบือที่ได้รับการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ ซึ่งมีจำนวนตัวอ่อนเฉลี่ยไม่ถึงหนึ่งตัวต่อการเก็บจากแม่กระบือหนึ่งตัว (Techakumphu et al., 2001)

การเก็บโอโอไซต์จากตัวสัตว์เพื่อนาไปทำการปฏิสนธินอกร่างกายสามารถทำได้หลายวิธี โดยจากการเจาะเก็บโดยตรงจากฟอลลิเคิลของรังไข่ที่มาจากโรงฆ่าสัตว์ โดยอาจมาจากการแยกฟอลลิเคิลออกเป็นแต่ละอัน (dissection) หรือการดูดเจาะโดยตรง (aspiration) ซึ่งมีข้อดีในแง่ด้านได้โอโอไซต์เป็นจำนวนมาก แต่ข้อเสียคือมักไม่รู้คุณค่าทางพันธุกรรมของสัตว์เพราะไม่รู้แหล่งที่มา และมักเป็นแม่โคที่มีปัญหาด้วยหลายสาเหตุจึงถูกคัดทิ้งจากฝูง หรืออาจเก็บผ่านช่องท้องด้วยกล้องลาปาโรสโคป (laparoscopy) ด้วยการจับรังไข่ด้วยฟอร์เซปอันหนึ่งและเจาะดูดด้วยปลายเข็มผ่านรูอีกหนึ่ง แต่ผลที่ได้ไม่ค่อยแน่นอน (Lambert et al., 1983) หรือเป็นไปได้ว่าการเก็บโอโอไซต์สามารถทำได้จากการผ่าตัดเปิดช่องท้อง (laparotomy) และดูดโอโอไซต์โดยตรง วิธีนี้สามารถทำได้กับสัตว์ขนาดเล็ก ช่น แพะ แกะ สุกร ลูกโค หรือลูกกระบือ แต่มีข้อเสียคือไม่สามารถทำซ้ำได้มากครั้ง มีการติดยึดของอวัยวะสืบพันธุ์กับอวัยวะภายใน ช่น ลำไส้ กระเพาะปัสสาวะ เป็นต้น อัตราความสำเร็จไม่แน่นอน (มงคล และคณะ, 2537; รังสีและคณะ, 2541)

การเก็บด้วยวิธีด้วยเข็มเจาะดูดร่วมกับการใช้เครื่องมือคลื่นความถี่สูง (อัลตราซาวด์ ชนิดเรียลไทม์ บี โมด) เรียกว่า "Transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration" ที่เรียกย่อ ๆ ว่า "Ovum Pick Up (OPU, โอพียู)" หรือ "In vivo oocyte recovery" ได้พัฒนามาจากการเก็บโอโอไซต์ในสตรี เพื่อนำโอโอไซต์ไปทำการปฏิสนธินอกร่างกาย ใช้ในการแก้ปัญหาการมีบุตรยาก วิธีดังกล่าวนี้ได้มีการนำมาใช้เก็บโอโอไซต์ในโคเป็นส่วนใหญ่ โดยสามารถเก็บในโค 4 ประเภท คือ

ก) แม่โคที่มีวงจรการเป็นสัดปกติ ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน โดยเก็บสัปดาห์ละครั้งหรือสองครั้ง โดยอาจเป็นแม่โคที่เคยเป็นแม่โคตัวให้ตัวอ่อน (donor cow) และต่อมาตอบสนองน้อยลงหรือให้ตัวอ่อนที่มีคุณภาพด้อยลงมา รวมทั้งแม่โคที่มีปัญหาการผสมไม่ติดเรียกว่า "Problem cows" (Looney et al., 1994)

ข) แม่โคที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปินเพื่อเพิ่มจานวนและขนาดของฟอลลิเคิล (Bungartz et al., 1995)

ค) แม่โคอุ้มท้องระยะแรก ประมาณ 30-35 วัน (Meintjes et al., 1955)

ง) ลูกโคที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปินเพื่อเพิ่มจานวนและขนาดของฟอลลิเคิล (Brogliattti and Adams, 1996)

การเก็บโอโอไซต์วิธีโอพียู นั้นหากทำร่วมกับเทคนิคการปฏิสนธินอกร่างกาย เป็นวิธีการผลิตตัวอ่อนซึ่งอาจเป็นการทดแทนการผลิตตัวอ่อนจากการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ โดยอาจเก็บจากแม่โคที่ผสมไม่ติดแล้วได้ และสามารถเก็บจากรังไข่ของแม่โคที่รู้ค่าทางพันธุกรรมได้ เมื่อนำมาผลิตตัวอ่อนจะได้ตัวอ่อนที่มีคุณค่าทางพันธุกรรมเอาไว้ย้ายฝากในโคตัวรับได้ (Kruip et al., 1991; 1994) โอกาสที่สามารถทำได้หลาย ๆ ครั้งจากโคตัวเดียวกัน ซึ่งจะแตกต่างกับการเก็บด้วยการเปิดผ่าช่องท้อง โดยมีความถี่สัปดาห์ละครั้งหรือสองครั้ง ติดต่อกัน 5 เดือน โดยไม่มีผลกระทบของการทำงานของรังไข่ ไม่ทำให้เกิดการยึดติดของรังไข่กับอวัยวะภายในเช่นที่พบในการเก็บจากการเปิดช่องท้อง (Kruip et al., 1994) ทำให้สัตว์ไม่บอบช้ำมาก หลังเสร็จสิ้นการเก็บแบบ โอพียู สามารถนำแม่โคไปผสมพันธุ์และตั้งท้องได้ปกติ นอกจากนี้กรณีของการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ของลูกโคและนำเอาโอโอไซต์มาปฏิสนธินอกร่างกายจะเป็นการช่วยลดช่วงห่างระหว่างรุ่นได้ และหลังจากนั้นปล่อยให้ลูกโคเจริญเติบโตกลายเป็นแม่ใช้ในการผสมพันธุ์ผลิตลูกโคได้ต่อไป อย่างไรก็ตามการเก็บด้วยวิธีโอพียู มีข้อเสีย ลงทุนสูงในเรื่องอุปกรณ์ต่าง ๆ รวมทั้งเครื่องมือการเก็บและเครื่องอัลตราซาวด์ ผู้เก็บต้องมีความชำนาญในการปฏิบัติเป็นอย่างดี และที่สำคัญคืออัตราการเก็บโอโอไซต์จะได้ต่ำกว่าที่ได้จากการเก็บจากรังไข่โดยตรง ทั้งนี้ขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ มากมาย (Fry et al., 1997) ตั้งแต่ปัจจัยที่ตัวสัตว์ ขนาดและความคมของเข็มเจาะ ผู้ปฏิบัติ แรงดูดสูญญากาศ การที่โคที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปินก่อนหรือไม่ เป็นต้น โดย

ทั่วไปอัตราการเก็บอยู่ในระดับ 30-40% (Brogliatti and Adams, 1996) ในลูกโค และประมาณ 60-70% ในแม่โค (Looney et al., 1994; Bungartz et al., 1995)

ในกระบือในมีรายงานการทำโอพียูในประเทศอิตาลีโดย Boni (1994) เก็บโอโอไซต์จากรังไข่แม่กระบือที่มีปัญหารังไข่เล็กฟีป จากค่าเฉลี่ยประมาณ 4.2 ฟอลลิเคิลต่อตัว เจาะได้ 1.3 โอโอไซต์ และหากให้ฮอร์โมน เอฟเอสเอช ก่อนจะเพิ่มจำนวนฟอลลิเคิลเป็น 6.8 ฟอลลิเคิลต่อตัว จำนวนโอโอไซต์เพิ่มเป็น 3.0 ใบ อัตราการเก็บอยู่ที่ 44-32% ส่วนในกระบือปลักมีรายงานโดย Kitiyanant และคณะ (1996) ทดลองเก็บในแม่กระบือปลักอายุ 3-5 ปี ทุก 7 วัน ของรอบการเป็นสัด (วันที่ 1-2, 8-9, 15-16) โดยโอโอไซต์ที่ได้นามาทำการปฏิสนธิและได้ตัวอ่อน ส่วนในลูกกระบือทั้งในกระบือปลักและกระบือแม่น้ายังไม่มีรายงานแต่อย่างใด จากรายงานของ มงคลและคณะ (2537) พบว่าสามารถกระตุ้นรังไข่ของลูกกระบือปลักได้ และเก็บโอโอไซต์ด้วยการผ่าตัดเปิดช่องท้อง อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวมีข้อเสียดังกล่าวข้างต้น เพราะไม่สามารถเก็บซ้ำได้หลาย ๆ ครั้ง เกิดการยึดติดของอวัยวะภายใน การทดลองเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี โอพียู ได้ดำเนินการโดยในลูกโคพื้นเมืองโดยได้โอโอไซต์ เฉลี่ย 9.92±5.2 ใบต่อตัว โดยสามารถทำซ้ำในลูกโค 2-5 ครั้งห่างกัน 7 วัน (ชัยณรงค์ และคณะ, 2539)

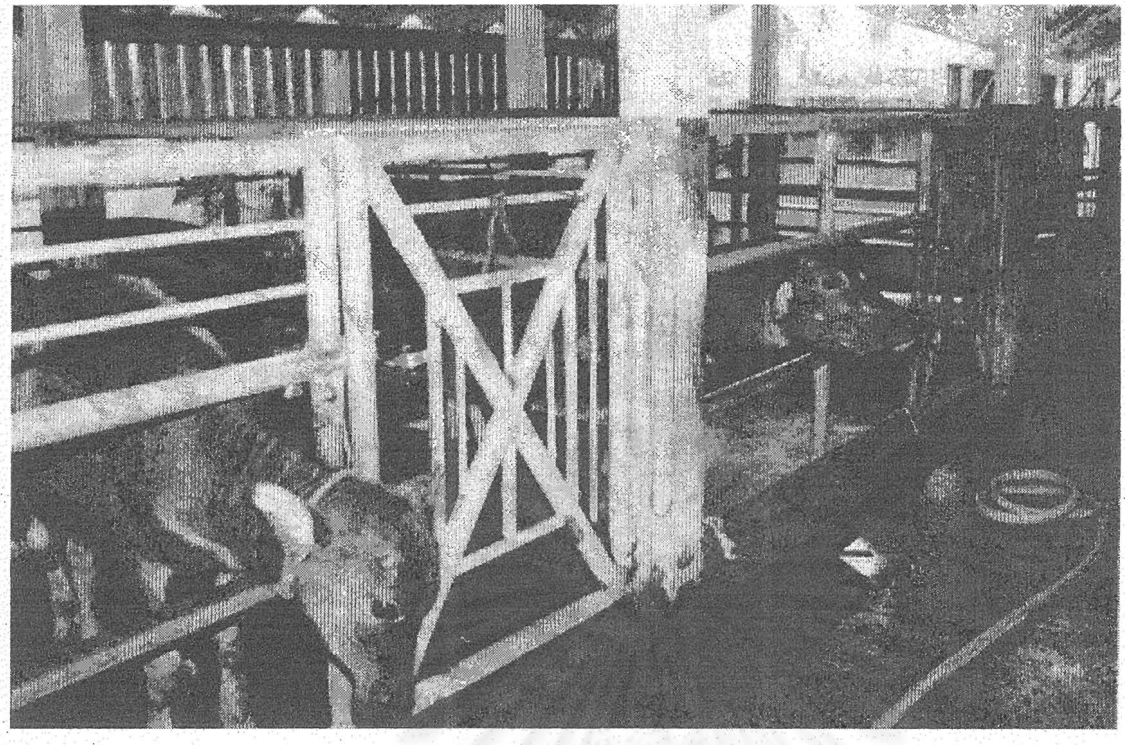
สำหรับวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษา

1. เทคนิคการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีเข็มดูดเจาะต่อกับเครื่องมือคลื่นความถี่สูง
2. ศึกษาผลของการเก็บโอโอไซต์ซ้ำในลูกกระบือด้วยวิธี โอพียู
3. ศึกษาคุณภาพของโอโอไซต์ที่เก็บได้ในลูกกระบือ

อุปกรณ์และวิธีการ

ลูกกระบือทดลอง

เลี้ยงลูกกระบือทดลองเพศเมีย หลังหย่านม อายุประมาณ 8-10 เดือน น้ำหนักประมาณ 150 กิโลกรัม จำนวน 9 ตัว (รูปที่ 1) ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก จากกองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ นำมาเลี้ยงที่ศูนย์ฝึกนิสิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดนครปฐม โดยที่ให้อาหารข้นวันละ 2 กิโลกรัม อาหารหยาบและน้ำเต็มที่



รูปที่ 1 ลูกกระบือก่อนวัยเจริญพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองเก็บด้วยวิธีโอพียู ที่ศูนย์ฝึกนิสิตสัตวแพทย์ จังหวัดนครปฐม

การกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิล

ทำการฝังฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดฝังใบหู (Crester®, Norgestomet&Oestradiol valerate) ประกอบด้วยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนฝังใต้ผิวหนัง (Implant) ที่มี Norgestomet (17α – acetoxy-11β - methyl-19-norpreg-4-en-3,20 dione)ประมาณ 3 มิลลิกรัม ฝังใต้ผิวหนังบริเวณด้านนอกใบหู และฮอร์โมนฉีด 2 มิลลิลิตร ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ที่มี Norgestomet ในรูปสารละลายในน้ำมันปริมาณ 3 มิลลิกรัม และ Oestradiol valerate ปริมาณ 5 มิลลิกรัม 7 วัน ก่อนเริ่มต้นโปรแกรมการกระตุ้นด้วยฟอลลิเคิล สตีมูเลทติ้ง ฮอร์โมน Folltropin-V®, Veterpharm,Ontario,Canada) โดยเปลี่ยนแท่งฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนใหม่ ทุก ๆ 1 เดือน หลังจากนั้น ทำการกระตุ้นรังไข่ โดยใช้ฮอร์โมนเอฟเอสเอช ขนาด 180 มิลลิกรัม ฉีดเข้ากล้าม แบ่งฉีดวันละ 2 ครั้ง (เช้าและเย็น) แบบลดขนาด (40/40, 30/30, 20/20) โดยเริ่มการกระตุ้นหลังฝังฮอร์โมน โปรเจสเตอโรนไปแล้ว 7 วัน ก่อนการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู ฉีดฮอร์โมนจีเอ็นอาร์เอช (Cystorelin®, RHÔNE MERIEUX,France) ขนาด 100 μg/ ตัว เข้ากล้ามเนื้อ หลังฉีดฮอร์โมนเอฟเอสเอช ครั้งสุดท้าย 24 ชั่วโมง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 โปรแกรมการฉีดกระตุ้นลูกกระบือด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (ดัดแปลงจาก มงคล และคณะ (2537)

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

หมายเหตุ : ระยะห่างของการกระตุ้นแต่ละครั้ง 2 สัปดาห์

การตรวจรังไข่ก่อนการกระตุ้น

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

ระดับ 0 คือ รังไข่ที่ไม่พบฟอลลิเคิล

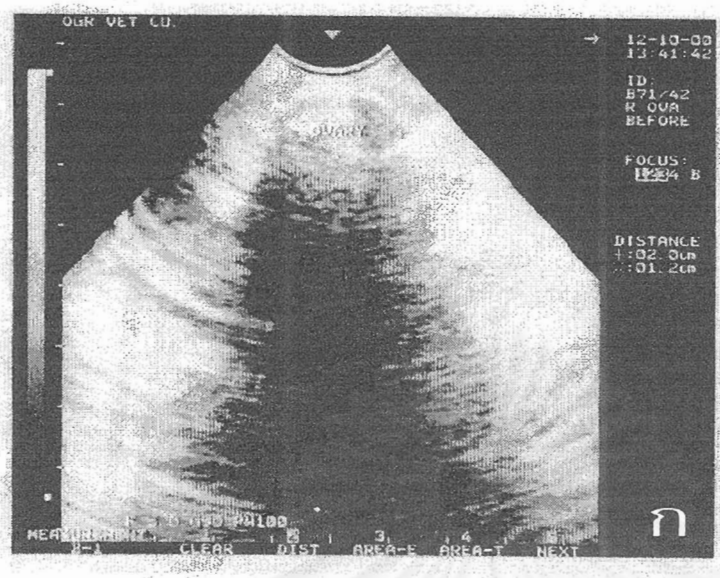
ระดับ +1 คือ รังไข่ที่พบฟอลลิเคิลตั้งแต่ 1-5 ฟอลลิเคิล

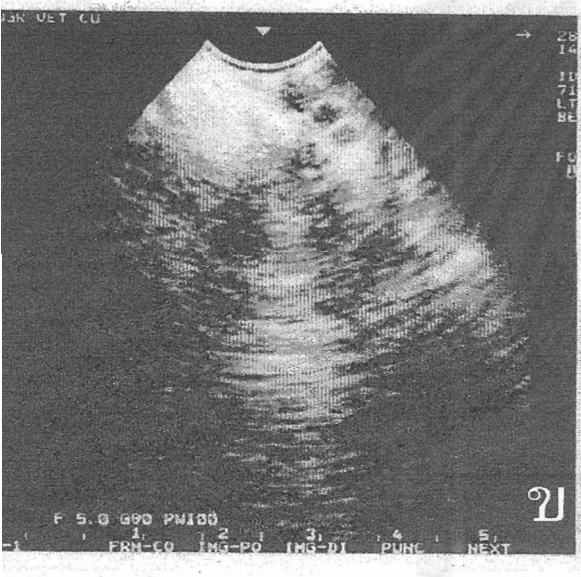
ระดับ +2 คือ รังไข่ที่พบฟอลลิเคิลมากกว่า 5 ฟอลลิเคิล

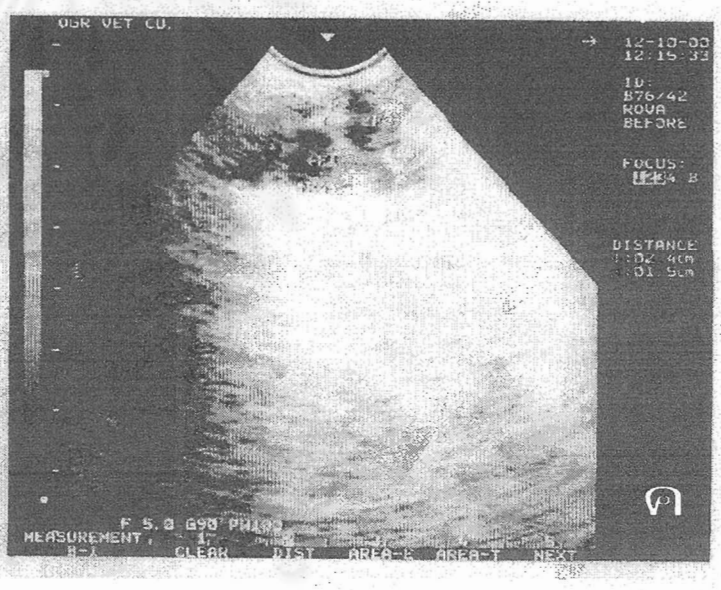
เกณฑ์ในการจัดระดับการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ แสดงไว้ในรูปที่ 2

การตรวจการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้น

หลังจากฉีดฮอร์โมนกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลตามโปรแกรมข้างต้น ตรวจสอบผลการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นโดยทำการตรวจรังไข่หลังจากฉีดฮอร์โมนจีเอ็นอาร์เอช 24 ชั่วโมง ตรวจโดยการใช้อัลตราซาวด์ชนิด เรียลไทม์ บี-โมด และโปรปชนิดสอดผ่านทางช่องคลอด ความถี่ 5 เมกะเฮิร์ท







รูปที่ 2 ภาพอัลตราซาวด์แสดงระดับการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ก่อนการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลด้วยฮอร์โมน เอฟเอสเอช ; F (follicle)

ก. ระดับ 0 เท่ากับรังไข่ที่ตรวจไม่พบฟอลลิเคิล

ข. ระดับ +1 เท่ากับรังไข่ที่ตรวจพบจำนวนของฟอลลิเคิลเคิลตั้งแต่ 1-5 ฟอลลิเคิล

ค. ระดับ +2 เท่ากับรังไข่ที่ตรวจพบจำนวนของฟอลลิมากกว่า 5 ฟอลลิเคิล

การเตรียมตัวสัตว์ก่อนเก็บโอโอไซต์จากรังไข่

ทำการอดน้ำและอาหารลูกกระบือก่อนเก็บโอโอไซต์ประมาณ 24 ชั่วโมง นำลูกกระบือเข้าซองบังคับ ก่อนเริ่มการเก็บควบคุมสัตว์ด้วยการใช้ยากล่อมประสาท เช่น Xylazine HCl (Rompun®, Korea) ขนาด 10 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนัก 100 กิโลกรัม ร่วมกับการให้ 2% Xylocaine HCl จำนวน 1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าไขสันหลัง เพื่อลดการเคลื่อนไหวส่วนบั้นท้าย และความเจ็บปวดจากการเจาะรังไข่ด้วย แล้วทำความสะอาดบริเวณบั้นท้ายและปากช่องคลอดด้วยยาฆ่าเชื้อแล้วเช็ดด้วยแอลกอฮอล์

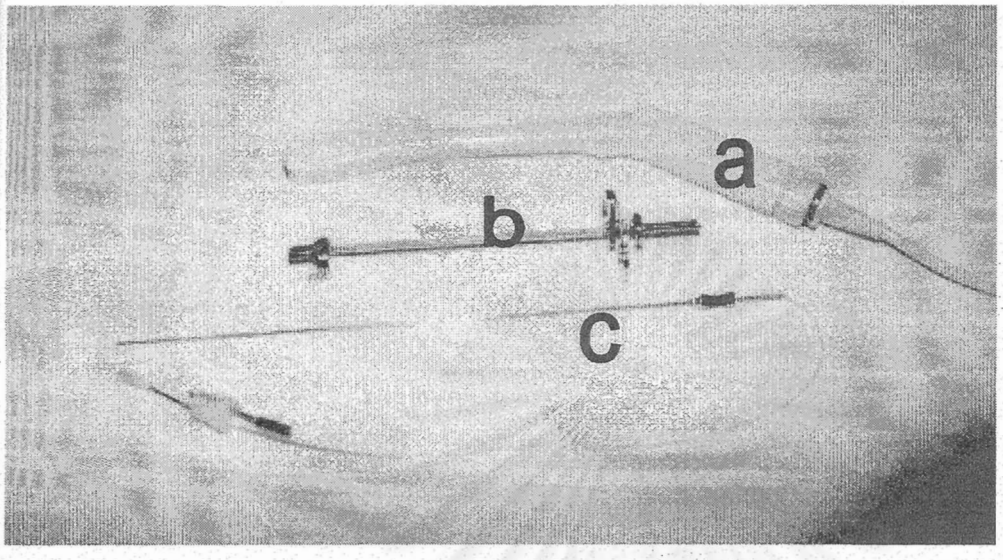
การเจาะเก็บโอโอไซต์จากรังไข่

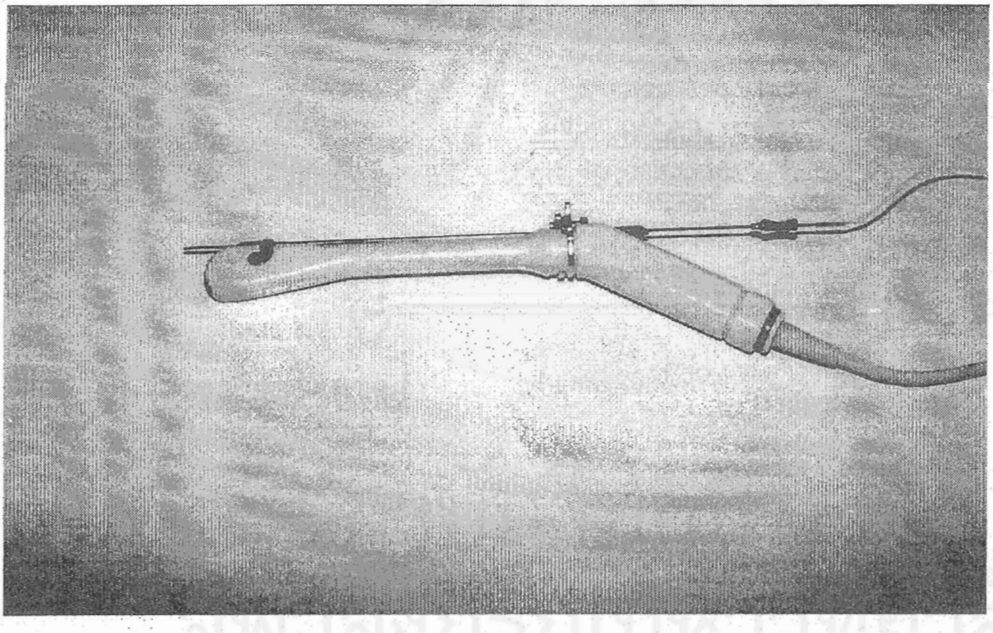
อุปกรณ์ในการเจาะเก็บโอโอไซต์

1. สารเคมีในการควบคุมบังคับสัตว์
   - Xylazine HCL
   - Xylocaine HCL
2. Ovum aspiration set (Cook,Australia) (รูปที่ 3 และ 4) ประกอบด้วย
   - peda vacuum pump
   - test tube heater
   - เข็มเจาะเบอร์ 17 ยาว 34.5 เซนติเมตร
3. เครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูง (อัลตราซาวด์ชนิดเรียล ไทม์ บี-โมด) (Aloka,Japan)
4. Convex array transvaginal probe ขนาดความถี่ 5 MHz.
5. ตัวนำเข็มเจาะ

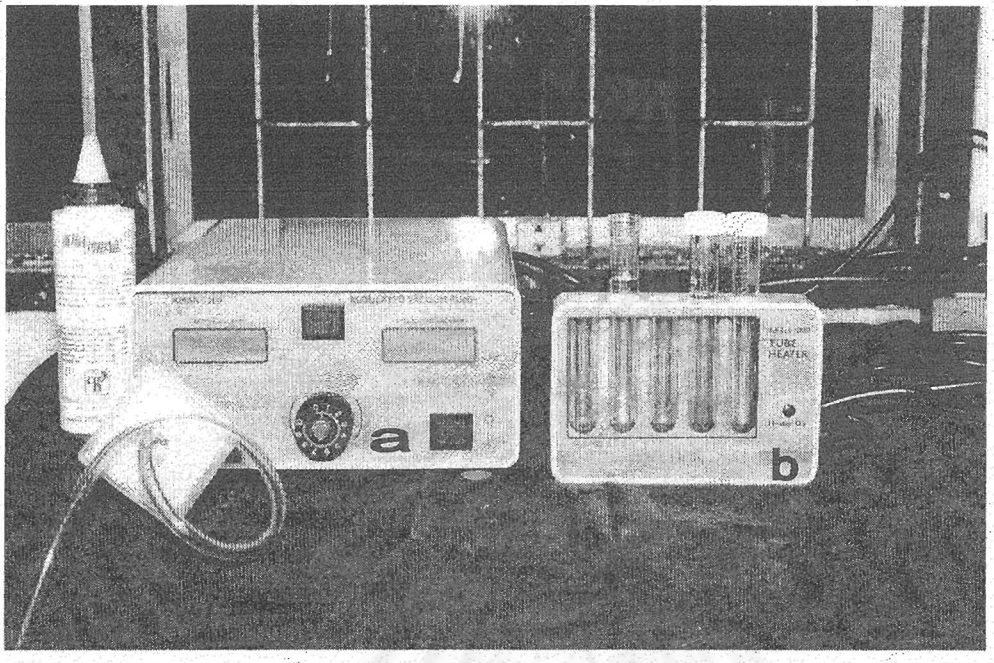
ภาพชุดดูดเจาะที่สามารถควบคุมความดันและการเจาะผ่านทางการเหยียบที่ pedal pump โปรปพร้อมเครื่องอัลตราซาวด์ ร่วมกับเข็มเจาะดูด (รูปที่ 4) ขณะเก็บโอโอไซต์จะควบคุมผ่านทางจอมอนิเตอร์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



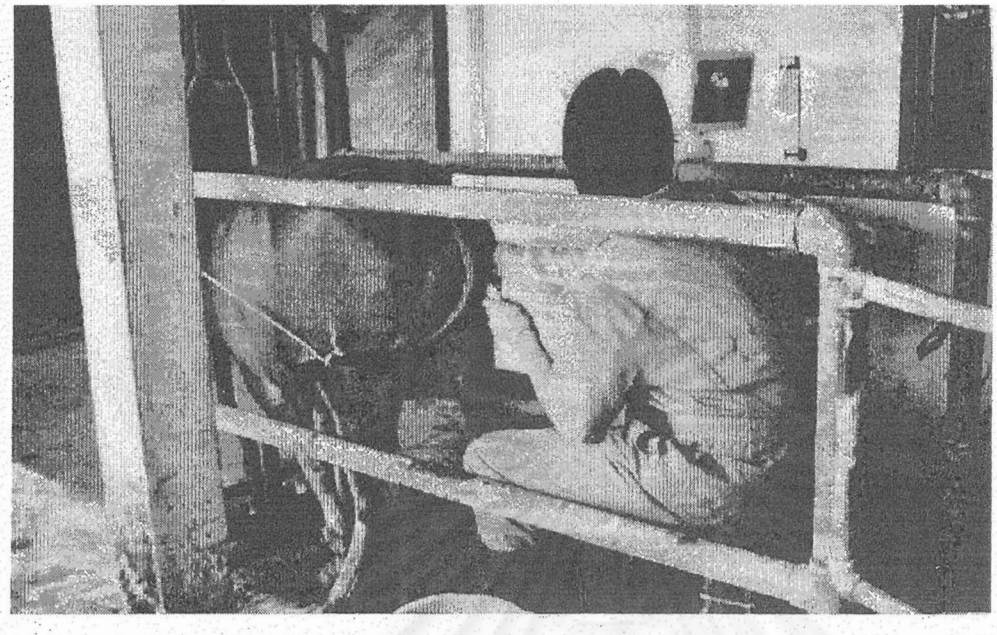


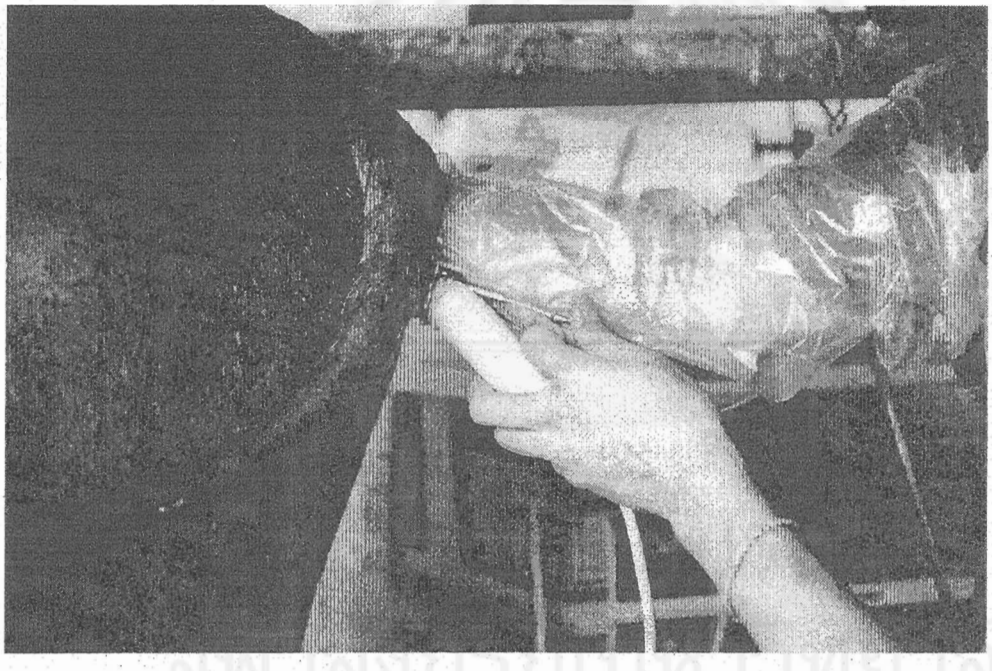
รูปที่ 3 อุปกรณ์ในการเจาะประกอบด้วยโปรบของอัลตราซาวด์ ชนิดสอดผ่านช่องคลอด ขนาดความถี่ 5 เมกกะเฮิต์ซ (a) แท่งโลหะที่เป็นตัวนำเข็ม (b) พร้อมเข็ม (c) ที่ใช้ในการเจาะเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู ภาพประกอบทั้งหมดแสดงในรูปล่าง



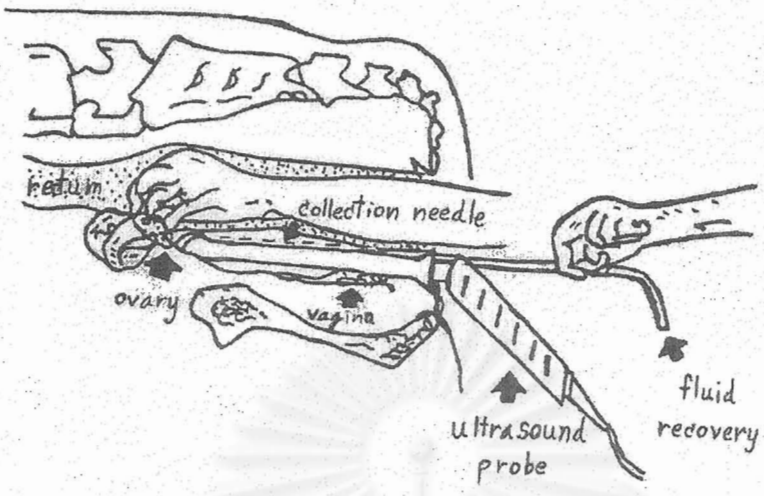
รูปที่ 4 เครื่องควบคุมระดับความดันสูญญากาศ (a) และ test tube heater (b) ที่ใช้ในการทำโอพียู

การเจาะเริ่มจากการสอด transvaginal probe ที่ทาปลายด้วย acoustic gel โดยสวมหุ้มโปรปด้วยถุงยางอนามัย แล้วทำการสอดเข็มเข้าไปในท่อนำโลหะ ดันปลายโปรปเข้าด้านบนช่องคลอด สอดท่อโปรปเข้าช่องคลอดและดันให้ปลายเข้าจนสุดถึงคอมดลูก จากนั้นใช้มืออีกมือหนึ่งล้วงผ่านทางทวารหนัก (รูปที่ 5ก, ข) หารังไข่แล้วดึงมาให้อยู่ในแนวหน้าตัดของโปรป ดังไดอะแกรมแสดงในรูปที่ 6 และ 7 ภาพของรังไข่จะปรากฏบนจอมอนิเตอร์ (รูปที่ 8) โดยปลายของตัวโปรปสามารถเคลื่อนลงในแนวต่าง ๆ ทั้งรอบแกนโปรป แนวตั้ง แนวด้านหน้า ด้านหลัง และแนวนอน

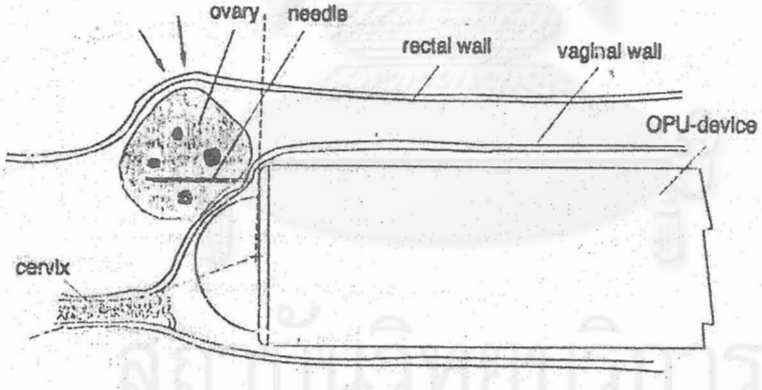




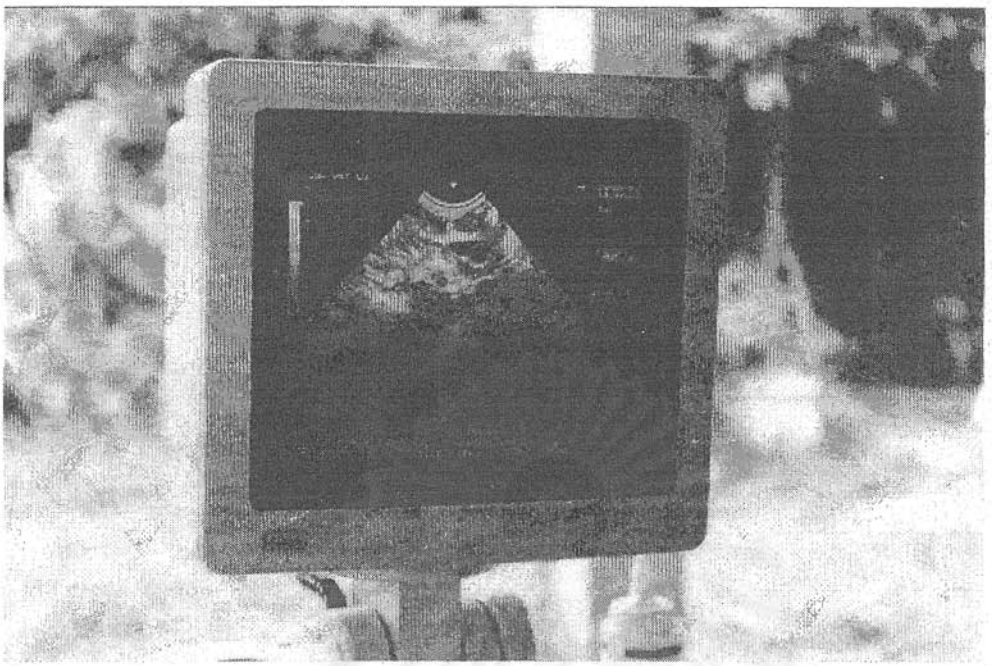
รูปที่ 5 กและ ข แสดงการสอด probe ผ่านทางคลอดของกระบือ เพื่อเก็บโอโอไซต์



รูปที่ 6 ไดอะแกรมแสดงการเจาะโอโอไซต์จากรังไข่ (ดัดแปลงจาก Rath, 1995)

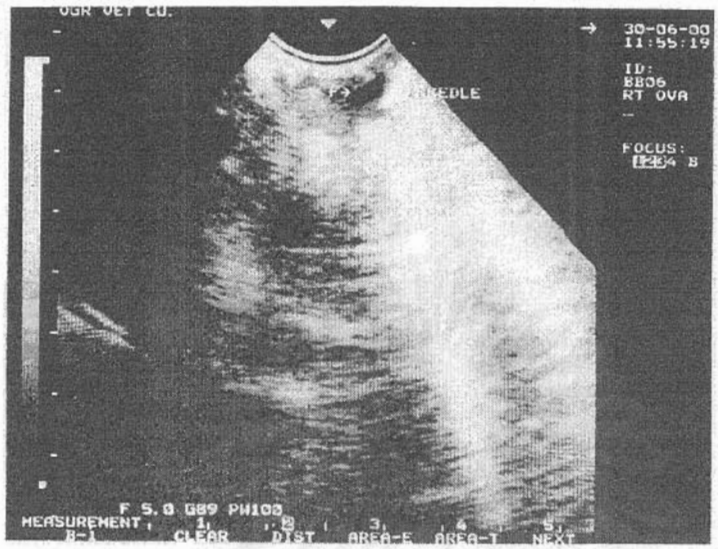


รูปที่ 7 ตำแหน่งรังไข่ขณะทำการเจาะ (Bols et al., 1995)

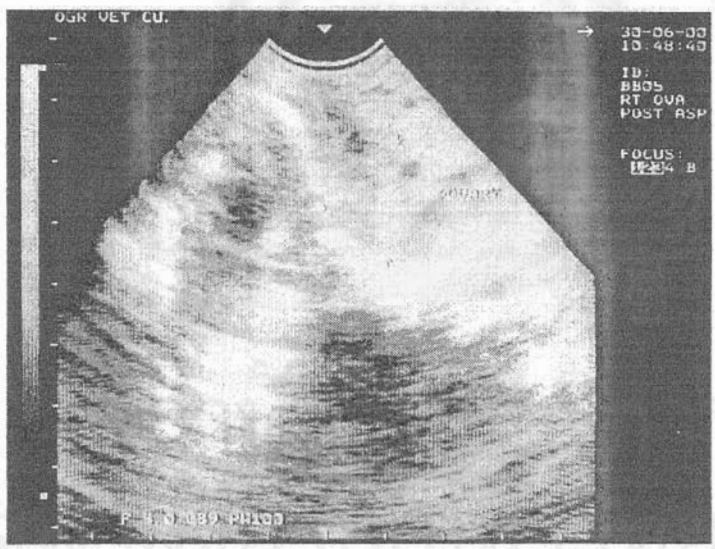


รูปที่ 8 การตรวจการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอชก่อนทำการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู อ่านผลจากหน้าจอมอนิเตอร์

ทำการติดตัวโปรปด้วยเข็มเจาะโอโอไซต์ แทงเข็มทะลุมุมบนของช่องคลอด เมื่อเข็มถูกแทงผ่านผนังช่องคลอดจะเห็นปลายเข็มได้ โดยสามารถดูและควบคุมได้ผ่านจอภาพของเครื่องอัลตราซาวด์ ปลายเข็มจะปรากฏเป็นแนวเส้นประของเข็ม (รูปที่ 9) ดันเข็มทะลุฟอลลิเคิลอย่างช้า ๆ ขณะดูดต้องกดทำ negative pressure อยู่ตลอด ด้วยการควบคุมแรงดูดด้วยการกดที่ปลายเท้า (foot pedal lump) เมื่อปลายเข็มเข้าไปในฟอลลิเคิล ดูดโอโอไซต์พร้อมของเหลวในฟอลลิเคิลด้วยความแรง 80-100 มม.ปรอท (ชัยณรงค์ และคณะ, 2539 ; Fry *et al.*, 1997) กด foot pedal pump เพื่อให้ดูดของเหลวเข้ามาอย่างต่อเนื่อง ผนังฟอลลิเคิลจะแฟบลงทันที ของเหลวที่ถูกดูดไหลเข้าไปในท่อโปลีเอทีลีนที่เคลือบด้วยน้ำยาเฮปารีน ลงในหลอดพลาสติกปลอดเชื้อที่มีน้ำเกลือ 0.9% จำนวน 1 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ ทำการดูดทีละฟอลลิเคิล โดยใช้มือที่ล้วงในทวารหนักจับรังไข่พลิกไปมาให้ฟอลลิเคิลที่จะเจาะอยู่ในแนวปลายเข็ม เจาะฟอลลิเคิลให้ครบทุกฟอลลิเคิลที่สังเกตเห็น (รูปที่ 10) หลังจากทำการเจาะรังไข่ด้านหนึ่งเสร็จให้ทำการเจาะฟอลลิเคิลในรังไข่อีกข้างด้วยวิธีเดียวกัน หลังจากทำการดูดเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ทั้งสองข้างแล้ว ฉีดยาปฏิชีวนะชนิดเพนนิซิลลินและสเรตปโตมัยซิน 100,000 IU เพื่อป้องกันการติดเชื้อ หลังจากนั้นพักลูกกระบือเป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงเริ่มทำการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลและเก็บโอโอไซต์ซ้ำโดยลูกกระบือแต่ละตัวทำการเก็บโอโอไซต์ซ้ำติดต่อกันจำนวน 5 ครั้ง



รูปที่ 9 ภาพของรังไข่ขณะเจาะ แนวประแสดงแนวของเข็ม



รูปที่ 10 ภาพของรังไข่หลังเจาะแล้ว ไม่เห็นฟอลลิเคิลเหลืออยู่

การตรวจหาและจำแนกชนิดของโอโอไซต์

ในการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูนี้ ตามปกติของเหลวที่ดูดออกมาจะมีเลือดปนด้วย (รูปที่ 11) เพราะช่วงที่เจาะผ่านผนังฟอลลิเคิลอาจไปทิ่มแทงในส่วนของเนื้อรังไข่ได้ ดังนั้นจึงต้องนำของเหลวที่เจาะได้เทใสในกรวยกรองตัวอ่อนขนาด 4.5 ไมครอน เม็ดเลือดจะผ่านรูกรองได้ ส่วนโอโอไซต์จะไม่สามารถผ่านได้ ชะล้างด้วยน้ำเกลือ 0.9% เทลงตามเพื่อล้างเลือด โดยให้ของเหลวไหลผ่านช้า ๆ ทำเช่นนี้หลาย ๆ ครั้ง ของเหลวที่เหลือจะใสง่ายต่อการตรวจหา เหลือน้ำยาไว้ประมาณ 50 มิลลิลิตร เทใส่เพลทพลาสติก แล้วตรวจหาภายใต้กล้องสเตอริโอ กำลังขยาย 40 เท่า เก็บโอโอไซต์ไว้ในน้ำยา TCM 199 2.5 mMHepes และจัดชนิดของโอโอไซต์เป็น 6 ลักษณะ คือ

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

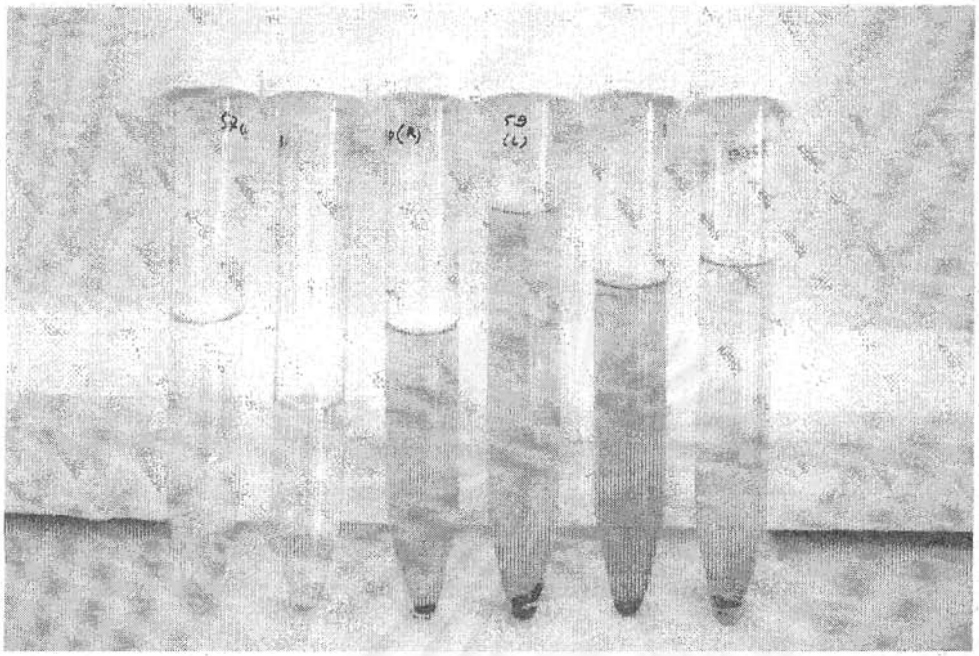
โดยโอโอไซต์ชนิดที่ 1-3 จัดเป็นโอโอไซต์ที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ โอโอไซต์ชนิดที่ 4 เป็นโอโอไซต์ที่พร้อมปฏิสนธิ โอโอไซต์ชนิดที่ 5 เป็นโอโอไซต์ที่มีการเสื่อมสลาย (มงคล และคณะ 2537) ส่วนโอโอไซต์ชนิดที่ 6 เป็น โอโอไซต์ที่พบในการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูในลูกโคพื้นเมืองจากงานวิจัยของ ชัยณรงค์ และคณะ (2539)

การย้อมสีโอโอไซต์ที่เก็บได้ด้วยวิธี Rapid staining

วิธีการตรวจสอบระยะการแบ่งตัวของโอโอไซต์ใช้วิธีตามที่ มาลี และคณะ(2542) ได้เคยรายงานไว้โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. นำโอโอไซต์ที่เก็บรักษาไว้ในน้ำยา TCM199 HEPES ใส่ลงในสารละลาย 1% Sodium citrate ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในจานหลุมแก้ว ทิ้งไว้ 15 นาที

ทำการเตรียมน้ำยา Fixative ประกอบด้วย Glacial acetic acid : Absolute alcohol ในอัตราส่วน 1:3 แบ่งใส่จานเพาะเชื้อชนิด 4 หลุม ปิดฝากันระเหย และเตรียมน้ำยา destaining ประกอบด้วย Gacial acetic acid : น้ำกลั่น : glycerol ในอัตราส่วน 1:3:1 ใส่หลอดพักไว้



รูปที่ 11 ของเหลวและน้ำยา lactate ringer ที่เก็บได้จากฟอลลิเคิล (follicular fluid) ด้วยวิธีโอพียู

2. เมื่อใส่โอโอไซต์ในสารละลาย 1% Sodium citrate ครบ 15 นาที ให้ใช้ปิเปตสำหรับ decoronization ทำการดูดโอโอไซต์เข้าและออกหลายครั้ง เพื่อกำจัดเซลล์คิวมูลัสที่อยู่รอบเปลือกโอโอไซต์ออกให้หมด จากนั้นเคลื่อนย้ายโอโอไซต์ไปใส่ในน้ำยา Fixative นานอย่างน้อย 10 นาที เพื่อให้เม็ดไขมันที่มีอยู่ในไซโทพลาสซึมของโอโอไซต์สลายไป การเก็บโอโอไซต์ในน้ำยา Fixative สามารถเก็บไว้ได้นานประมาณ 1 สัปดาห์ โดยใช้สก็อตเทปปิดรอยต่อระหว่างฝาและตัวจานหลุม เพื่อป้องกันการระเหยของน้ำยาและเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นธรรมดาจนกว่าจะนำมาย้อมสี
3. เตรียมแผ่นสไลด์และ coverslip โดยใช้กระดาษชำระเช็ดให้สะอาด ใช้วาสลีนแต้มเป็นจุดเล็กๆ 4 จุดบนแผ่น สไลด์โดยประมาณให้มีความกว้าง-ยาวพอดีกับขอบของ coverslip
4. ทำการย้ายโอโอไซต์จากน้ำยา Fixative ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ และวางบนสไลด์ให้อยู่กึ่งกลางจุดวาสลีนที่แต้มไว้ พร้อมกับหยดน้ำยา Fixative ลงไปอีก 2-3 หยด ปิด coverslip โดยกดเบา ๆ ให้แผ่นสไลด์แนบกับโอโอไซต์ ใส่สีย้อมผ่านเข้าไประหว่างแผ่นสไลด์กับ coverslip ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที
5. หลังจากนั้นใช้ micropipette ดูดน้ำยา Destaining และหยดไว้ที่ขอบ coverslip และปล่อยให้น้ำยาไหลผ่านเข้าไปชะล้างสีออก โดยใช้กระดาษชำระคอยช่วยซับสีออกที่ขอบ coverslip

I20141087

ด้านตรงข้ามกับด้านที่ปล่อยน้ำยาชะล้างสีเข้าไป ทำจนกว่าจะชะล้างสีจนหมดจะเห็นโอโอไซต์เป็นจุดติดสีชมพู จากนั้นใส่น้ำกลั่นชะล้างไล่น้ำยา destaining และสี ออกอีกครั้ง

6. ใช้น้ำยาทาเล็บทารอบๆ ขอบของ coverslip เพื่อป้องกันการระเหยของของเหลวภายใน ทำให้สามารถเก็บสไลด์ไว้ได้นานขึ้น
7. นำแผ่นสไลด์ไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างเพื่อดูลักษณะของโครโมโซมภายในโอโอไซต์ และจำแนกตามลักษณะโครโมโซมที่พบ

การตรวจสอบผล

วิธีการอ่านผลลักษณะโครโมโซม

การจำแนกลักษณะของโครโมโซมที่พบ ใช้หลักตามการศึกษาของมาลี (2539) คือ

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

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการนับจำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้ นำมาหาค่าเฉลี่ยบวกลบ ค่าเบี่ยงเบน มาตราฐาน ($\bar{X} \pm SD$) และทำการจำแนกออกเป็นชนิดต่าง ๆ ตามการจำแนกข้างต้น แล้วทำการเปรียบเทียบผลของการกระตุ้นแต่ละครั้งต่อคุณภาพของโอโอไซต์แต่ละชนิดโดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) ส่วนในการทดลองที่ 2 เปรียบเทียบผลของแรงดันแต่ละระดับต่อจำนวนและคุณภาพของโอโอไซต์ที่เก็บได้ โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Analysis of Variance(ANOVA) ชนิดทางเดียว

ผลการศึกษา

ผลการศึกษา

ผลการตรวจรังไข่ก่อนการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน

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

ตารางที่ 2 : ผลการตรวจสอบรังไข่ก่อนกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เอฟเอสเอช ในลูกกระบือปลัก

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

ผลการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่

จากผลการทดลองกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ของลูกกระบือปลักจำนวน 9 ตัว ด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอช พบว่าลูกกระบือมีการตอบสนองของรังไข่ในการเจริญของฟอลลิเคิล คิดเป็น 88.1% (37/42) และเมื่อทำการตรวจสอบการตอบสนองของการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ พบว่ามีการตอบสนองของจำนวนฟอลลิเคิลที่ตรวจพบในรังไข่ เท่ากับ

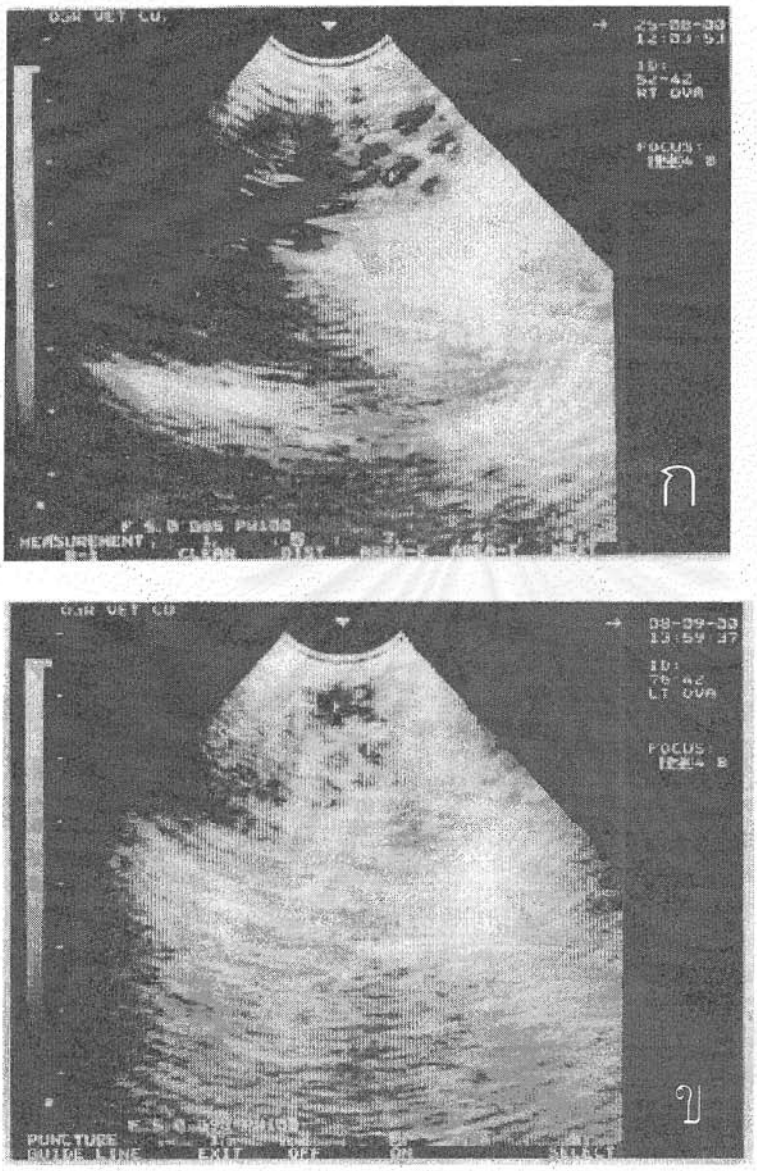
6.6±3.6(n=39) ฟอลลิเคิลต่อตัว ต่อครั้งของการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู และฟอลลิเคิลที่เกิดขึ้นจากการกระตุ้นการทำงานของรังไข่ด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอช จะมีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของฟอลลิเคิล เท่ากับ 0.5±0.2 (n=256) ซม. โดยมีค่าพิสัยของเส้นผ่านศูนย์กลางฟอลลิเคิลตั้งแต่ 0.3-1.0 ซม. ซึ่งสามารถจำแนกฟอลลิเคิลที่พบออกตามขนาดได้ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3 หลังจากนั้นทำการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู พบว่าได้โอโอไซต์เฉลี่ยเท่ากับ 5.4±3.7(n=212) โอโอไซต์ต่อตัว ต่อครั้ง ของการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู โดยค่าพิสัยของจำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้อยู่ในช่วง 0-20 โอโอไซต์ ต่อตัว ต่อครั้ง ของการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู ซึ่งคิดเป็นอัตราการเก็บโอโอไซต์ที่ได้เท่ากับ 82.4%(n=39) ดังแสดงผลไว้ในตารางที่ 3 ภาพอัลตราซาวด์แสดงผลของการกระตุ้นแสดงในรูปที่ 12 และ 13

ตารางที่ 3 : ผลการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่หลังกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอช

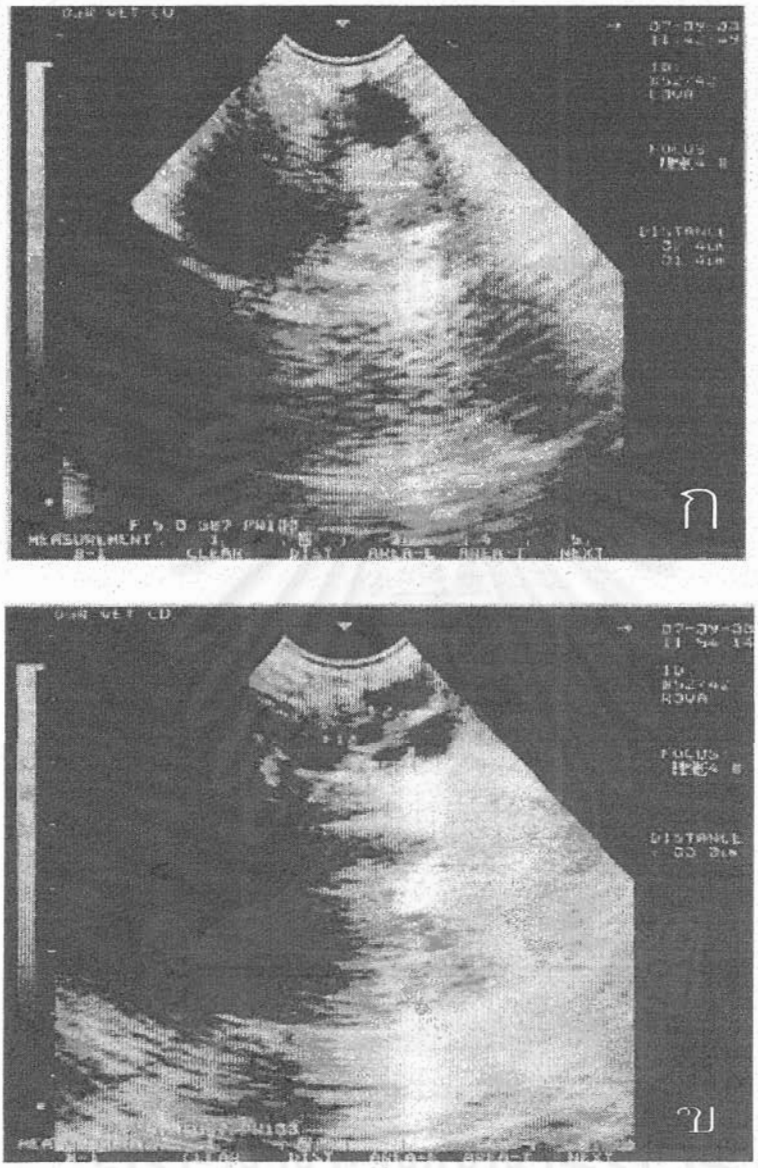
จำนวนลูกกระบือปลักทดลอง(ตัว)	9
จำนวนครั้งของการกระตุ้น(ครั้ง)	42
จำนวนลูกกระบือที่ตอบสนอง (%)	37(88.1)
จำนวนฟอลลิเคิลที่ตรวจพบจากเครื่องอัลตราซาวด์	6.6±3.6
ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของฟอลลิเคิล(มม.)	5.0±2.0(2-10)*
จำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้	5.4±3.7(0-20)*
อัตราการเก็บโอโอไซต์(%)	82.4%(0-100)*

*(*) = พิสัย*

จากผลการทดลองที่แสดงไว้ในตารางที่ 4 พบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของฟอลลิเคิลที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นในการกระตุ้นแต่ละครั้งส่วนมากจะมีขนาดของฟอลลิเคิลประมาณ 4-<6 มม. คิดเป็น 40.6%(104/256) รองลงมาได้แก่ ฟอลลิเคิลที่มีขนาด 6-<8 มม. คิดเป็น 27.0%(69/256) ฟอลลิเคิลขนาด 2-<4 มม. คิดเป็น 21.9%(56/256) ฟอลลิเคิลขนาด 8-<10 มม. คิดเป็น 9.0% (23/256) และฟอลลิเคิลขนาด >10 มม. คิดเป็น 1.5%(4/256) รองลงมาตามลำดับ (รูปที่ 14)



รูปที่ 12 ภาพอัลตราซาวด์แสดงการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นในลูกกระบือเบอร์ 52-42 (ก)และ 76-42 (ข) แสดงผลการตอบสนองในระดับที่สูง จุดสีดำแสดงฟอลลิเคิล (F)



รูปที่ 13 ภาพอัลตราซาวด์แสดงผลการตอบสนองของลูกกระบือหมายเลข B52/42 ในรังไข่ข้างซ้าย ที่ตอบสนองน้อย (ก) และข้างขวาที่ตอบสนองในระดับปานกลาง (ข) จุดสีดำแสดงฟอลลิเคิล (F)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4: ขนาดของฟอลลิเคิลที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอช

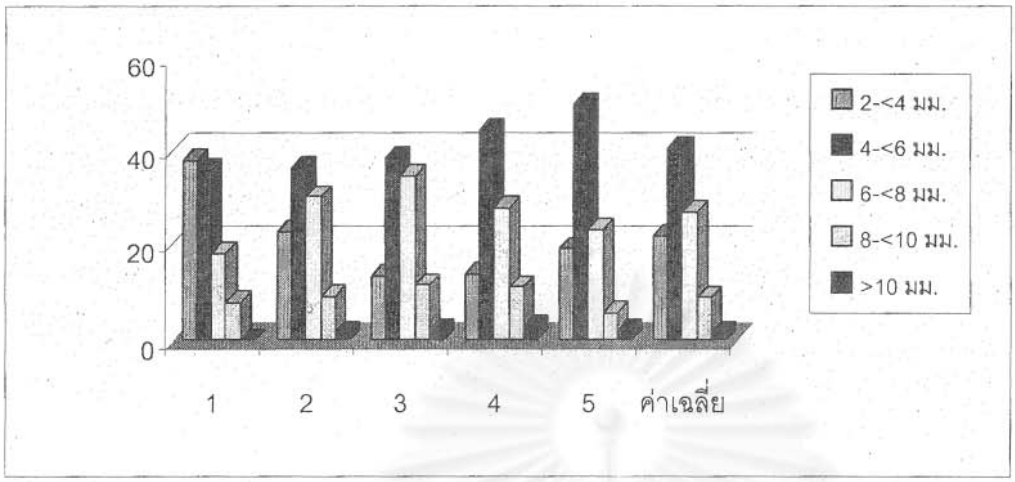
ครั้งของการกระตุ้น	N	เส้นผ่านศูนย์กลางของฟอลลิเคิล (มม.)				
		2 - <4	4 - <6	6 - <8	8 - <10	>10
1	50	19*	18	9	4	0
		(38.0%) **	(36.0%)	(18.0%)	(8.0%)	(0%)
2	66	15	24	20	6	1
		(22.7%)	(36.4%)	(30.3%)	(9.1%)	(1.5%)
3	52	7	20	18	6	1
		(13.5%)	(38.5%)	(34.6%)	(11.5%)	(1.9%)
4	36	5	16	10	4	1
		(13.9%)	(44.4%)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

n จำนวนโอโอไซต์

* *จำนวนฟอลลิเคิลในขนาดต่างๆ*

** *เปอร์เซนต์ฟอลลิเคิลขนาดต่างๆ ของแต่ละครั้งของการกระตุ้น*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 14 แสดงอัตราส่วนของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของฟอลลิเคิลในการกระตุ้นครั้งที่ 1 ถึง 5 และค่าเฉลี่ย

ผลการเก็บโอโอไซต์

จากผลการทดลองเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ลูกกระบือปลักที่ได้รับการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอช หลังจากนั้นทำการเจาะเก็บโอโอไซต์ซ้ำเป็นจำนวน 5 ครั้ง โดยแต่ละครั้งจะทำการเจาะเก็บทุก 2 สัปดาห์ ผลการเจาะเก็บโอโอไซต์พบว่าการเก็บโอโอไซต์ในครั้งที่ 1 ในลูกกระบือปลักจำนวน 8 ตัว โดยตรวจพบการตอบสนองของฟอลลิเคิลจำนวนทั้งหมด 50 ฟอลลิเคิล โดยกระบือแต่ละตัวมีการตอบสนองเฉลี่ย 6.3±6.0 ฟอลลิเคิล และสามารถเก็บโอโอไซต์ได้ทั้งหมด 43 โอโอไซต์ คิดเป็นค่าเฉลี่ย 5.4± 6.0 โอโอไซต์ต่อตัว โดยคิดเป็นอัตราการเก็บเท่ากับ 83.2% ในการเก็บโอโอไซต์ครั้งที่ 2 มีการตอบสนองของฟอลลิเคิลทั้งหมด 66 (8.3±2.8) ฟอลลิเคิล(n=8) โดยเก็บโอโอไซต์ได้ 54(6.8 ± 3.0) โอโอไซต์ คิดเป็นอัตราการเก็บเท่ากับ 82.4% หลังจากนั้นได้ทำการเก็บต่อในครั้งที่ 3 โดยตรวจพบฟอลลิเคิลจำนวน 52 (7.4 ±1.9) ฟอลลิเคิล ได้โอโอไซต์จำนวน 42(6.0± 2.3) โอโอไซต์ จากลูกกระบือ 7 ตัว (n=7) โดยคิดเป็นอัตราการเก็บเท่ากับ 81.3% เมื่อทำการเก็บโอโอไซต์ในครั้งที่ 4 พบการตอบสนองของรังไข่เพียง 36(4.5±1.2) ฟอลลิเคิล(n=8) ซึ่งสามารถเก็บโอโอไซต์ได้ 27(3.4±2.1)โอโอไซต์ มีอัตราการเก็บเท่ากับ 68.8% และในการเก็บครั้งสุดท้ายคือครั้งที่ 5 พบการตอบสนองของรังไข่

52 (6.5±3.5) ฟอลลิเคิล (n=8) และสามารถเก็บโอโอไซต์ได้ทั้งหมด 46(5.8 ± 3.6) โอโอไซต์ คิดเป็นอัตราการเก็บเท่ากับ 87.9% (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 : ผลการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ลูกกระบือปลักที่ได้รับการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิล และทำการเจาะเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีการใช้เข็มเจาะดูดร่วมกับเครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูง

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

** จำนวนฟอลลิเคิลที่ปรากฏบนรังไข่ขนาดตั้งแต่ 2.0 มม.ขึ้นไป*

(%) = อัตราส่วนของชนิดของโอโอไซต์เปรียบเทียบกับโอโอไซต์ทั้งหมดที่เก็บได้

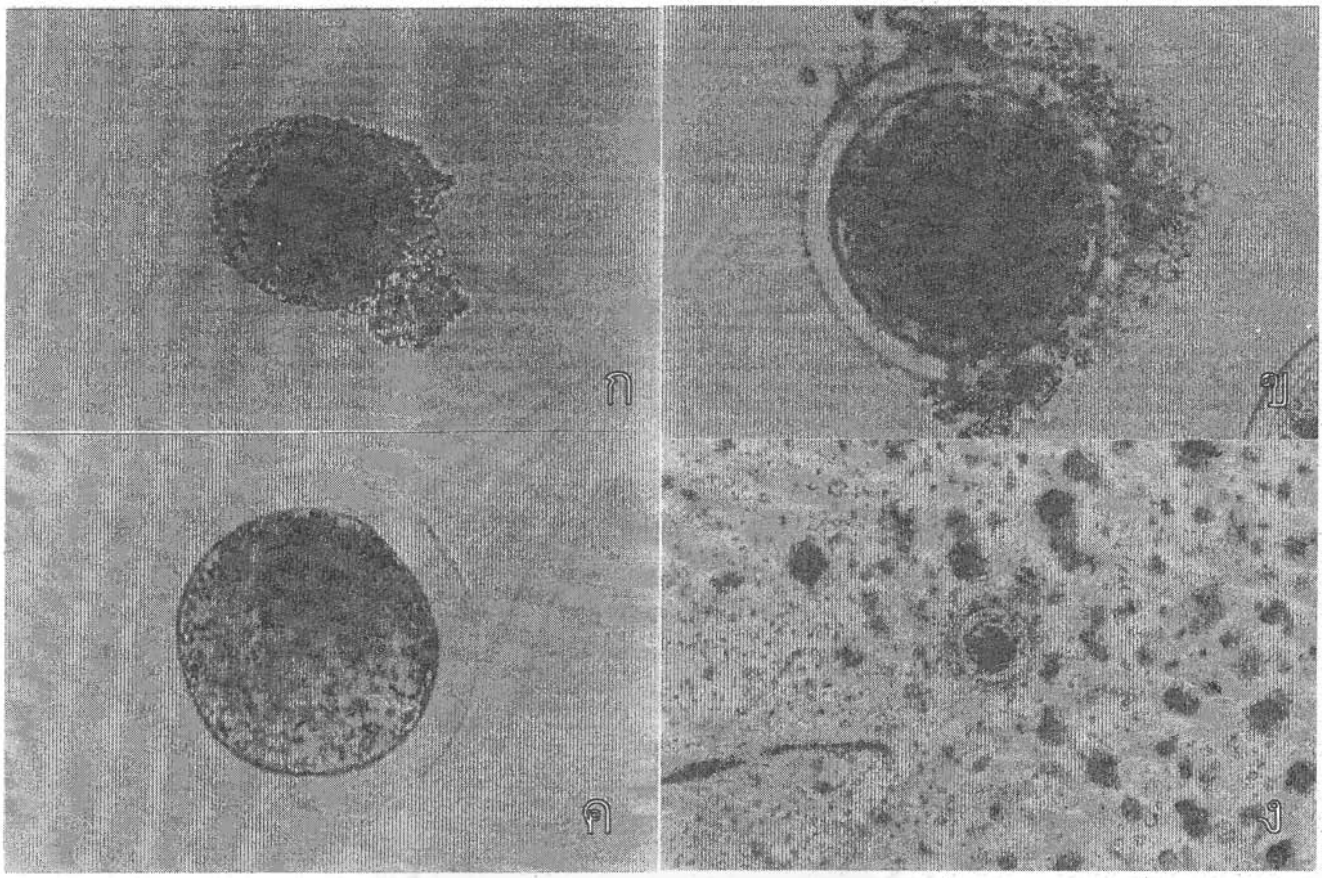
ซึ่งเมื่อนำผลการเก็บโอโอไซต์ทั้ง 5 ซ้ำ มาคำนวนรวมกันพบว่ามีการตอบสนองของการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่เป็นจำนวน 256(6.6±3.6) ฟอลลิเคิล และสามารถเก็บโอโอไซต์ได้ 212 (5.4±3.7) โอโอไซต์ (n=39) คิดเป็นอัตราการเก็บเท่ากับ 82.4%(81.0±25.8)

ในส่วนชนิดของโอโอไซต์พบว่าโอโอไซต์ที่เก็บได้จากการเก็บโอโอไซต์ทั้ง 5 ครั้งส่วนมากเป็นชนิดโอโอไซต์ที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้ม คิดเป็นจำนวนเท่ากับ 76/212(35.9%) โอโอไซต์ หรือเฉลี่ยเท่ากับ 1.95±2.2 โอโอไซต์ต่อตัว ส่วนโอโอไซต์ที่พบมากรองลงมาได้แก่โอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มอย่างน้อย 1-3 ชั้น เท่ากับ 47/ 212 (22.2%) หรือเฉลี่ยเท่ากับ 1.2± 1.7 โอโอไซต์ต่อตัว โอโอไซต์ชนิดที่ไม่มีโอโอพลาสซึม(Ooplasm) เท่ากับ 41/212(19.3%) เฉลี่ย 1.05±1.6 โอโอไซต์ต่อตัว โอโอไซต์ที่มีการเสื่อมสลายเท่ากับ 24/212(11.3%) คิดเป็น 0.6 ± 0.7 โอโอไซต์ต่อตัว ส่วนโอโอไซต์ชนิดที่พบน้อยได้แก่ โอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มมากกว่า 3 ชั้น เท่ากับ 14/212(6.6%) เฉลี่ย 0.35±0.6 โอโอไซต์ต่อตัว และโอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสแผ่ขยาย เท่ากับ 10/212(4.7%) เฉลี่ย 0.3 ±0.5 โอโอไซต์ต่อตัว

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

ภาพของโอโอไซต์ชนิดต่าง ๆ ที่เก็บได้จากลูกกระบือปลักด้วยวิธีโอพียู แสดงในรูปที่ 15

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 15 ภาพของโอโอไซต์ของลูกกระบือปลักเจาะด้วยวิธี โอพียู

ก) โอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มมากชั้น (200X)

ข) โอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มไม่มากชั้น (400X)

ค) โอโอไซต์ชนิดที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้ม (400X)

ง) โอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์แผ่กระจายหุ้มรอบ (100X)

ผลการย้อมสีโอโอไซต์ด้วยวิธี Rapid staining

จากผลการตรวจสอบระยะการเจริญของโอโอไซต์ที่ได้จากการเจาะเก็บโดยวิธีโอพียูในลูกกระบือปลักนั้น พบว่าโอโอไซต์ส่วนใหญ่มีการเจริญในระยะ Interphase-Prophase 26.9% (18/67) รองลงมาได้แก่ระยะ Metaphase I และระยะ GVBD 16.4%(11/67) และ11.9%(8/67) ตามลำดับ ส่วนโอโอไซต์ในระยะ Anaphase I - Telophase I และ Metaphase II พบน้อย คือ 3%(2/67) และ 4.5%(3/67) ตามลำดับ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 6

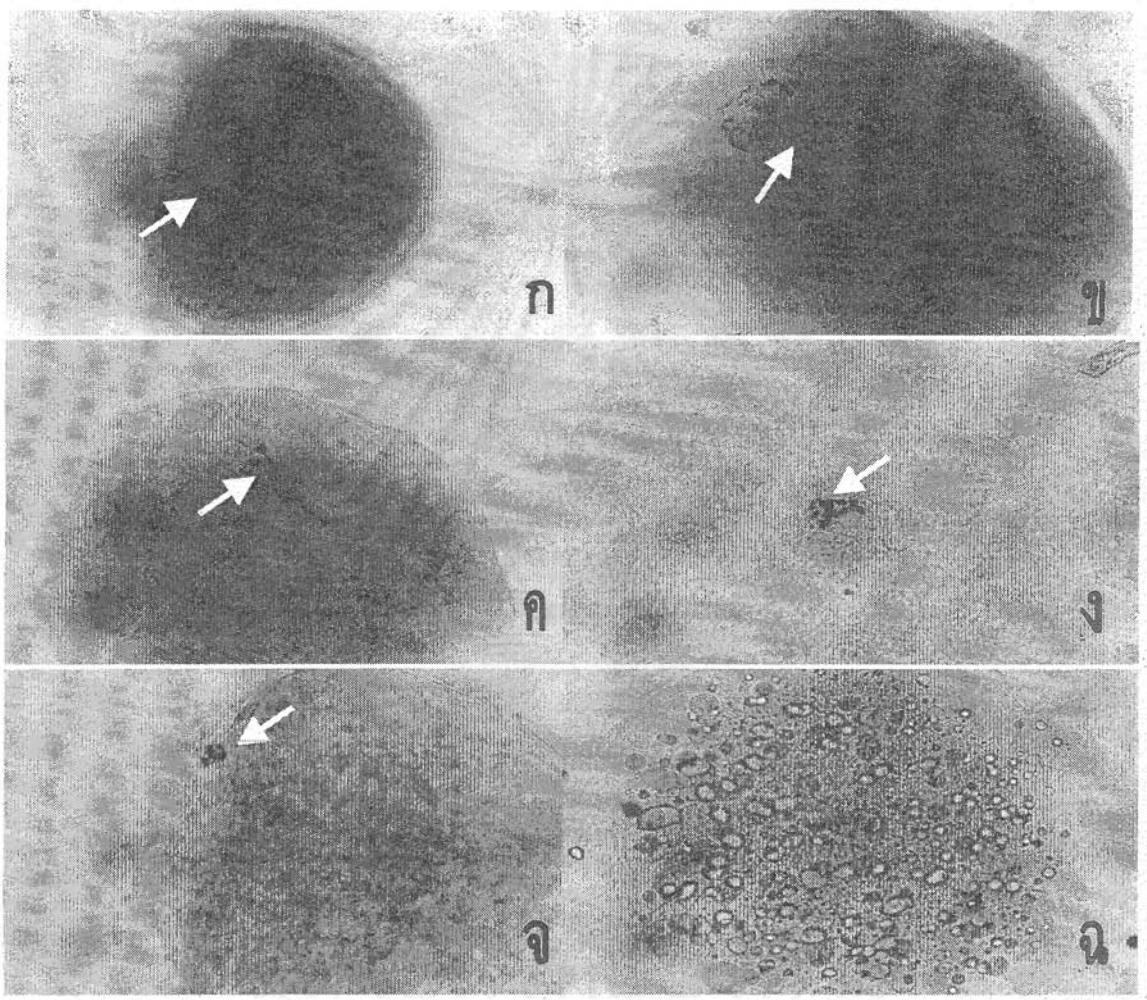
ตารางที่ 6 : ผลการตรวจสอบลักษณะโครโมโซมของโอโอไซต์ลูกกระบือปลักที่เจาะเก็บด้วยวิธีโอพียูโดยจำแนกตามชนิดของโอโอไซต์

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

ในการทดลองนี้พบว่าโอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสแผ่กระจาย (EXP) เมื่อนำมาย้อมสี พบว่าเป็นโอโอไซต์ที่มีการแบ่งตัวอยู่ในระยะ Metaphase II ทั้งหมด (3/3) ซึ่งสามารถนำไปปฏิสนธิได้ทันที ส่วน โอโอไซต์ ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มเพียงชั้นเดียวหรือหุ้มเพียงบางส่วน(S+P) และโอโอไซต์ชนิดที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้ม(D) ส่วนใหญ่จะมีระยะการแบ่งตัวอยู่ในระยะ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Interphase-Prophase คิดเป็น 30.8%(4/13) และ 33.3%(14/42) ตามลำดับ ส่วนโอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มหลายชั้นจะมีระยะการแบ่งตัวอยู่ในระยะ Metaphase I มากถึง 55.6%(5/9) แต่จากผลการย้อมสีโอโอไซต์ก็พบว่ามีโอโอไซต์บางส่วนที่ไม่สามารถจำแนกระยะการแบ่งตัวได้โดยคิดเป็น 23.9%(16/67) สำหรับผลการย้อมสีโอโอไซต์แสดงในรูปที่ 16



รูปที่ 16 ภาพระยะต่าง ๆ ของการเจริญของโอโอไซต์จากการย้อมสีด้วยวิธี Rapid staining

ก. ลักษณะโครโมโซมในระยะ Germinal vesicle

ข. ลักษณะโครโมโซมในระยะ Germinal vesicle breakdown

ค. ลักษณะโครโมโซมในระยะ Interphase-Prophase

ง. ลักษณะโครโมโซมในระยะ Metaphase I

จ. ลักษณะโครโมโซมในระยะ Metaphase II

ฉ. ลักษณะที่ไม่สามารถระบุระยะโครโมโซมได้

วิจารณ์

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ในการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลตลอดจนการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูซ้ำในลูกกระบือปลัก โดยได้ใช้ลูกกระบือปลักอายุตั้งแต่ 8 เดือนขึ้นไปซึ่งเป็นอายุหลังหย่านม ในการทดลองครั้งนี้ทำการเจาะเก็บโอโอไซต์โดยวิธีโอพียู หลังจากการทำการล้วงตรวจทางทวารหนักและใช้อัลตราซาวด์ตรวจการตอบสนองของรังไข่ก่อนการเจาะเก็บซึ่งการล้วงตรวจทางทวารหนักกระทำเช่นเดียวกันกับในแม่กระบือ แต่พบว่าทวารหนักของลูกกระบือก่อนวัยเจริญพันธุ์มีขนาดเล็กทำให้มีพื้นที่ทำงานจำกัดจึงทำให้การจับรังไข่ทำได้ยากและอาจมีเลือดออกได้ และการประมาณการตอบสนองของรังไข่จากการล้วงตรวจได้ผลไม่แม่นยำนัก การใช้เครื่องอัลตราซาวด์เสริมในการตรวจการตอบสนองของรังไข่จะประมาณการตอบสนองของรังไข่ได้แม่นยำกว่าเห็นในรูปภาพชัดเจน (Garcia,1998) ตามปกติแล้วการตรวจด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ต้องทำร่วมกับการล้วงตรวจทางทวารหนักเพื่อช่วยจับรังไข่ แต่ไม่เหมาะสมที่จะทำในลูกกระบือด้วยเหตุผลข้างต้น และพบว่าการสอดเฉพาะโปรบเข้าไปอย่างเดียวก็สามารถตรวจรังไข่ได้ผลที่น่าพอใจ ภาพที่ปรากฏบนจอภาพจะเห็นฟอลิเคิลมีลักษณะเป็นวงกลมสีดำขนาดเล็กกระจายห่างกันอยู่ทั่วรังไข่ แต่ทั้งนี้ต้องขึ้นอยู่กับความชำนาญและประสบการณ์ของผู้ ปฏิบัติ การล้วงตรวจทางทวารหนักและการใช้อัลตราซาวด์ในการตรวจการตอบสนองของรังไข่ ก่อนที่จะทำการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู ทำให้สามารถหลีกเลี่ยงการทำโอพียูของลูกกระบือปลักที่ไม่มีการตอบสนองหรือตอบสนองต่อการกระตุ้นน้อย

การกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ในการทดลองนี้ได้ใช้วิธีการกระตุ้นรังไข่เพื่อให้มีการเพิ่มการเจริญของฟอลลิเคิล พบว่าก่อนการกระตุ้นรังไข่จะมีขนาดเล็ก มีฟอลลิเคิลประมาณ 2 ฟอลลิเคิลต่อตัว หลังกระตุ้นขนาดจะใหญ่ขึ้นพร้อมกับมีฟอลลิเคิลในจำนวนมากขึ้นพบถึง 7 ฟอลลิเคิลต่อตัว การเก็บโอโอไซต์โดยไม่ต้องกระตุ้นด้วยฮอร์โมนจะทำให้ได้โอโอไซต์จำนวนน้อยและทำได้ยากเพราะขนาดรังไข่เล็กมาก ต่างกับในโคพันธุ์ต่างประเทศก่อนวัยเจริญพันธุ์และหลังวัยเจริญพันธุ์ที่มีฟอลลิเคิลอยู่ถึง 3.6-6.8 ฟอลลิเคิลต่อตัว และสามารถเก็บโอโอไซต์โดยไม่ต้องกระตุ้นถึง 1.9 ถึง 3.1 โอโอไซต์ต่อตัว (Majerus *et al.*, 1999) การให้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินจะช่วยให้ฟอลลิเคิลมีการเจริญมากขึ้นและจำนวนของโอโอไซต์ที่ได้จะสูงกว่า ในโค Bungartz และคณะ(1995) พบว่าหากให้ฮอร์โมนเอฟเอสเอช สามารถเพิ่มจำนวนโอโอไซต์ต่อการเก็บโอพียู เป็น 10.6 โอโอไซต์ต่อตัวเปรียบเทียบกับ 5.8 โอโอไซต์ต่อตัว อย่างไรก็ตามผลของการกระตุ้นที่ตรวจต่ำกว่าที่ Techakumphu *et al.*, (2000a) ได้รายงานไว้จากการเจาะรังไข่หลังเปิดผ่าช่องท้อง (laparotomy) โดยใช้โปรแกรมและวิธีการกระตุ้นอย่างเดียวกันทั้งนี้ เพราะการตรวจดูด้วยโปรปขนาดความถี่ 5 MHz ติดกับอัลตราซาวด์จะไม่สามารถเห็นตัวรังไข่ได้ชัดเจนโดยเฉพาะฟอลลิเคิล

ขนาดเล็ก ในขณะที่เปรียบเทียบกับการเปิดผ่าดูรังไข่จะได้จำนวนที่แม่นยำกว่าอย่างแน่นอน Hashimoto และคณะ (1999) เสนอว่าการใช้หัวโปรปขนาด 7.5 MHz ตรวจดูรังไข่ที่ตัดมาจากตัวโค จะทำให้เห็นฟอลลิเคิลขนาดเล็ก 3-5 มิลลิเมตร ได้ชัดเจนดีกว่า (visualization) หัวโปรปขนาด 5.0 MHz โดยพบจำนวน 9.0 ฟอลลิเคิล เปรียบเทียบกับ 3.2 ฟอลลิเคิล ดังนั้นอัตราการเก็บโอโอไซต์จะแตกต่างกันจากหัวโปรปที่แตกต่างกัน

การใช้โกนาโดโทรปินฮอร์โมนเพื่อกระตุ้นให้มีการเจริญฟอลลิเคิลมากขึ้นจะเป็นประโยชน์ในการเจาะ เพราะเมื่อจำนวนฟอลลิเคิลมีมากจะทำให้เจาะโอโอไซต์ได้มาก ในโคการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนแพรกแนนท์ แมร์ซีรั่ม โกนาโดโทรปิน พบว่าจะได้อัตราการเก็บเพิ่มขึ้นประมาณ 22% จาก 18% เป็น 40% (Pieterse *et al.*, 1988) อย่างไรก็ตามการกระตุ้นมากเกินไปจะได้ฟอลลิเคิลที่มีขนาดใหญ่เส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 10 มิลลิเมตร ทำให้แตกขณะล้วงจับรังไข่ก่อนเจาะได้ ในการทดลองนี้ได้ใช้โปรแกรมที่ได้ดำเนินการศึกษามาก่อนโดย Techakumphu และคณะ (2000b) โดยใช้โกนาโดโทรปิน รีลีสซิ่ง ฮอร์โมน (จีเอ็นอาร์เอช) ในการควบคุมการเจริญของฟอลลิเคิลแบบกดฤทธิ์ของฮอร์โมนเอฟเอสเอช (down regulation) ดังนั้นจึงพบว่าฟอลลิเคิลส่วนมากที่พบมากกว่า 90% จะอยู่ในขนาด 2-8 มิลลิเมตร เพราะหากไม่ใช้ฮอร์โมนจีเอ็นอาร์เอช จะทำให้มีฟอลลิเคิลขนาดใหญ่และแตกต่างกันมาก

ผลจากการตอบสนองพบว่าลูกกระบือปลักที่มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นได้ 88.1% เป็นที่น่าสังเกตว่าลูกกระบือบางตัวที่มีการตอบสนองต่อฮอร์โมนน้อยในแต่ละครั้งของการกระตุ้น ซึ่งเป็นลูกกระบือปลักที่มีขนาดเล็กและผอม เนื่องมาจากพันธุกรรมหรือความไม่สมบรูณ์ของลูกกระบือเอง การคัดเลือกกระบือเข้าสู่การทดลองเป็นแนวทางหนึ่งในการปรับปรุงผลการกระตุ้น นอกจากนี้การตอบสนองของรังไข่ของลูกกระบือปลักต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนมีความผันแปรค่อนข้างสูง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ มงคลและคณะ (2537) สำหรับรายงานอื่นๆ ส่วนใหญ่จะเป็นการตรวจการตอบสนองของรังไข่โดยการล้วงตรวจผ่านทางทวารหนัก Chantaraprateep และคณะ (1988) รายงานการตอบสนองของกระบือปลักต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอช ขนาด 32 หรือ 50 มิลลิกรัม เท่ากับ 2-8 ใบต่อตัว ส่วนฮอร์โมน พีเอ็มเอสจี ได้เท่ากับ 3-7 ใบต่อตัว เช่นเดียวกับ Sophon และคณะ (1989) รายงานไว้เท่ากับ 2-7 ใบต่อตัว จากการกระตุ้นกระบือปลักหรือกระบือมูร่าห์หรือกระบือลูกผสม ในขณะที่ Kobayashi และคณะ (1990) ทำการศึกษาในประเทศไทยและรายงานไว้ในกระบือมูร่าห์เท่ากับ 11 ใบ การตอบสนองของรังไข่ของลูกกระบือปลักจากการทดลองในครั้งนี้ต่ำกว่าผลการตอบสนองของลูกโค (Jainudeen *et al.*,1966; Onuma *et al.*,1969; Irvine *et al.*, 1994) และเช่นเดียวกับรายงานการกระตุ้นลูกโคในประเทศไทย (มงคล และคณะ, 2537; รังสี และคณะ, 2541) การตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนของลูกโคหรือลูกกระบือก่อนวัยเจริญพันธุ์จะมีค่าน้อยกว่าการ

ตอบสนองของโคหรือกระบือวัยเจริญพันธุ์ สำหรับการทดลองนี้ใช้ฮอร์โมนเอฟเอสเอช ขนาด 180 (NIH-FSH-P) ซึ่งมีขนาดประมาณครึ่งเดียวเมื่อเปรียบเทียบกับที่ใช้ในแม่กระบือเพื่อกระตุ้นให้มีการตกไข่ครั้งละมากๆ ซึ่งจะใช้ฮอร์โมนเอฟเอสเอช ขนาด 400 มิลลิกรัม (NIH-FSH-P) (Garcia *et al.*,1994) ในการฉีดกระตุ้นแต่ละครั้ง กล้ามเนื้อ 6 เข็ม แบ่งฉีดห่างกันทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน ซึ่งฮอร์โมนเอฟเอสเอช เป็นสารประเภทกลัยโคโปรตีน ที่มีครึ่งชีวิตประมาณ 2 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเหตุผลที่ทำให้ต้องฉีดฮอร์โมนโดยการแบ่งฉีดหลายเข็มและห่างกันทุกๆ 12 ชั่วโมง และเนื่องจากฮอร์โมนตัวนี้มีน้ำหนักของโมเลกุลเล็กประมาณ 32,000-37,000 ทำให้สามารถฉีดกระตุ้นซ้ำได้โดยเกิดปฏิกริยาต่อต้านจากร่างกายน้อย (Carruthers, 1986) จากการศึกษาของ มงคลและคณะ (2537) พบว่าการฉีดกระตุ้นรังไข่ของลูกกระบือพื้นเมืองไทยด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอช ให้ผลการตอบสนองของรังไข่ดีกว่าการใช้ฮอร์โมน พีเอ็มเอสจี จากเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้นในการวิจัยครั้งนี้จึงเลือกใช้ฮอร์โมนเอฟเอสเอช ในการฉีดกระตุ้นรังไข่ลูกกระบือ หลังจากฉีดกระตุ้นรังไข่ด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอช เข็มสุดท้าย จากนั้นประมาณ 24 ชั่วโมง จะฉีดฮอร์โมนจีเอ็นอาร์เอชเพื่อควบคุมขนาดของฟอลลิเคิลให้มีความสม่ำเสมอของการเจริญ โดยลดฟอลลิเคิลที่มีขนาดใหญ่และเพิ่มฟอลลิเคิลขนาดกลางให้มากขึ้น (Bordignon *et al.*, 1997; Fry *et al.*, 1997) จากการกระตุ้นจะพบว่ากระบือจะมีการตอบสนองภายนอกที่สามารถสังเกตได้ คือ แสดงอาการเป็นสัดโดยมีเมือกใสไหลออกมาบริเวณปากช่องคลอดเช่นเดียวกับการเป็นสัดในโคหลังวัยเจริญพันธุ์ (Pieterse *et al.*, 1991) การแสดงการเป็นสัดนี้ได้ผลเช่นเดียวกับการทดลองของ Onuma และคณะ (1969) และ Seidel และคณะ(1971) ชี้ให้เห็นว่าเป็นผลของฮอร์โมนเอสโตรเจนที่หลั่งจากฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ที่เกิดขึ้นเป็นเวลานานกว่า 48 ชั่วโมง ซึ่งเพียงพอสำหรับที่ลูกโคหรือลูกกระบือจะแสดงอาการเป็นสัด

ในส่วนของการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู เป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการเจาะเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ของกระบือ ไม่ต้องฆ่าลูกกระบือเหมือนกับการทดลองในลูกสัตว์ในระยะแรกที่มักส่งโรงฆ่า (Onuma *et al.*,1969 ; Kajihara *et al* .,1991) ซึ่งสามารถกระตุ้นด้วยฮอร์โมนและเจาะเก็บโอโอไซต์ซ้ำได้หลายครั้ง โดยอาจจะทำทุกสัปดาห์ สัปดาห์ละ 2 ครั้ง หรือทุก ๆ 2 สัปดาห์ ไม่ต้องใช้เวลาในการพักฟื้นและกระตุ้นซ้ำได้จำนวนครั้งมากขึ้น การใช้เครื่องอัลตราซาวด์เจาะผ่านเข้าทางช่องคลอดซึ่งได้มีการทดลองในแม่โค (Callesen *et al.*, 1987;Bols *et al* .,1995) โดย (Baltussen และคณะ(1992) ได้ทดลองใช้เข็มชนิดบางเจาะเก็บโอโอไซต์พบว่าให้อัตราการเก็บสูงเท่ากับ 76.4% โดยปราศจากเลือดปนเปื้อนจึงเป็นวิธีที่ดีสำหรับการเจาะเก็บโอโอไซต์ซ้ำ สำหรับในลูกโคมีการศึกษาเบื้องต้น พบว่า น่าจะมีความเป็นไปได้ในการนำวิธีนี้มาใช้ในการเจาะเก็บโอโอไซต์

การผ่าตัดเปิดช่องท้องเพื่อเก็บโอโอไซต์หลังจากมีการกระตุ้นซ้ำในลูกโคพบว่ามีการเชื่อมติดกัน (Adhesion) ของผิวรังไข่กับผนังมดลูกและท่อนำไข่หรือเยื่อหุ้มผิวของรังไข่หนาขึ้น โดยเฉพาะการผ่าตัดครั้งที่ 3 และครั้งที่ 4 ทำให้ไม่สะดวกต่อการดึงมดลูกขึ้นจากช่องท้องเพื่อสะดวกต่อการตอบสนองของรังไข่ และการเจาะโอโอไซต์และอาจทำให้เกิดความผิดพลาดต่อผลการนับจำนวนฟอลลิเคิลและคอร์ปัส ฮีโมราจิกัม ทำให้ผลที่ได้มีค่าน้อยกว่าความเป็นจริง จะมีการเชื่อมติดในกรณีของรังไข่หลังจากที่การกระตุ้นครั้งก่อนมีการตอบสนองให้ฟอลลิเคิลเป็นจำนวนมากและมีเลือดออกมากในขณะเจาะฟอลลิเคิล ซึ่งเป็นสาเหตุให้มีการเชื่อมติดกันเกิดขึ้น (รังสี และคณะ, 2541) จากผลการฉีดกระตุ้นรังไข่แสดงให้เห็นว่าสามารถฉีดกระตุ้นรังไข่ของลูกกระบือและกระบือสาวได้โดยใช้ฮอร์โมนเอฟเอสเอช ให้ผลการตอบสนองของรังไข่เท่ากับ 6.6±3.6 และ 7.4±3.6 ฟอลลิเคิล/ครั้ง/ตัว ตามลำดับ ซึ่งพบว่ามีความแปรปรวนสูงในการตอบสนองของรังไข่ในกระบือแต่ละตัว สอดคล้องกับการศึกษาของ Jainudeen และคณะ(1966) เช่นเดียวกับผลที่ได้ในการกระตุ้นลูกกระบือปลักที่มีการตอบสนองของรังไข่ และมีความผันแปรตั้งแต่ 4-31 ใบ

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

จากผลการกระตุ้นรังไข่และเจาะเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูทั้ง 5 ซ้ำ พบว่าไม่มีความแตกต่างของจำนวนฟอลลิเคิลที่พบและเจาะเก็บได้ ตลอดจนคุณภาพของโอโอไซต์ที่เก็บได้ ทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นของวิธีในการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู พบว่าสามารถที่จะทำซ้ำได้หลายครั้งในสัตว์ที่มีชีวิต รวมทั้งยังเป็นวิธีที่สัตว์ไม่บอบช้ำมากจากการเก็บและไม่ต้องใช้ระยะเวลาในการพักฟื้นนานเหมือนวิธีการเก็บวิธีอื่น ๆ ดังนั้นผลการทดลองที่ได้จึงแสดงให้เห็นว่าการเก็บโอโอไซต์ซ้ำทั้ง 5 ครั้งจึงไม่มีผลกระทบต่อการเจริญของฟอลลิเคิลในครั้งถัดมา ทำให้อัตราการเก็บโอโอไซต์ที่ได้ใกล้เคียงกันสวนการเก็บโอโอไซต์ในครั้งที่ 4 ที่ลดลงนั้นอาจเป็นผลเนื่องมาจากการเจริญของฟอลลิเคิลที่มีขนาดใหญ่ซึ่งไปกดการเจริญของฟอลลิเคิลที่มีขนาดเล็ก และขนาดกลางให้น้อยลง (Ginther *et al.*, 1989 ; Ko *et al.*,1991 ; Kohram *et al.*, 1998 ; Hagemann, 1999) จึงส่งผลให้จำนวนฟอลลิเคิลที่สามารถเจาะเก็บได้ลดลงทำให้อัตราการเก็บที่ได้ลดลง นอกจากนี้ฟอลลิเคิลที่มีขนาดใหญ่เกินไปยังทำให้เกิดความยากลำบากในการเก็บเนื่องจากอาจแตกได้ง่ายในช่วงระหว่างทำการเก็บ

จากผลการย้อมสีโอโอไซต์ด้วยวิธี Rapid staining แสดงว่าการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปินมีผลต่อการเจริญของโอโอไซต์ได้ตามปกติฮอร์โมนเอฟเอสเอชมีผลต่อการสร้างและคัดเลือกฟอลลิเคิล (recruitment & selection) ระดับของฮอร์โมนเอฟเอสเอชจะสูงในช่วงเป็นสัด โดยไปกระตุ้นให้เซลล์กรานูโลซาผลิตฮอร์โมนเอสโตรเจนและสารอินฮีบินที่จำเป็นสำหรับการเจริญพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์ ระยะของการเจริญของโอโอไซต์ที่ได้จากการทดลองนี้แตกต่างจากข้อมูลที่ได้จากรังไข่ของแม่กระบือปลักที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน Kamonpatana และ Chuangsoongneon (1994) ได้รายงานว่าโอโอไซต์ที่เจาะได้จากรังไข่ของแม่กระบือปลักจะอยู่ในระยะ germinal vesicle (GV) ทั้งหมด ซึ่งระยะเวลาในการเลี้ยงในหลอดทดลองต้องใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมงเป็นอย่างน้อย (มาลี, 2539) ดังนั้นเป็นไปได้ว่าหากต้องการเลี้ยงโอโอไซต์ที่เก็บจากลูกกระบือปลักที่ได้รับการกระตุ้นจะต้องใช้เวลาน้อยกว่าโอโอไซต์ที่เก็บจากรังไข่โดยทั่วไป โดยอาจใช้เวลาประมาณ 12 ชั่วโมงเท่านั้นเพราะโอโอไซต์ของกระบือจะเริ่มเข้าสู่ระยะ Metaphase I เมื่อผ่านการเลี้ยงนาน 12 ชั่วโมง (Kamonpatana and Chuangsoongneon, 1994) ขนาดของฟอลลิเคิลที่พบก่อนการเจาะน่าจะเป็นตัวบ่งชี้ของระยะการเจริญของโอโอไซต์ได้ จากผลการตรวจวัดขนาดของฟอลลิเคิลบนรังไข่ก่อนทำการเจาะเก็บ พบว่าเส้นผ่าศูนย์กลางของฟอลลิเคิลที่พบส่วนมากอยู่ระหว่าง 0.5 – 1.0 เซนติเมตร และจากผลการย้อมสีเพื่อดูลักษณะของโครโมโซมของโอโอไซต์ที่เจาะเก็บมาได้ ส่วนมากมีระยะการแบ่งตัวอยู่ที่ระยะ Interphase-Prophase ซึ่งหมายความว่าโอโอไซต์ได้เริ่มมีการเจริญต่อจากระยะหยุดพัก (Meiotic arrest) โดยผ่านขั้นตอนของ GVBD มาแล้ว แต่ยังไม่เจริญจนถึงระยะพร้อมปฏิสนธิได้ จึงมีความจำเป็นต้องทำการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้นอกร่างกายต่อไปอีกระยะหนึ่ง เพื่อให้โอโอไซต์เจริญจนถึงระยะ Metaphase II ซึ่งเป็นระยะพร้อมปฏิสนธิ

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าความสำเร็จในการย้อมสีเพื่อตรวจสอบลักษณะของโครโมโซมของโอโอไซต์ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการด้วยกัน ได้แก่ การเตรียมและเก็บรักษาสีย้อมต้องทำให้เกิดตะกอนน้อยที่สุด เพราะตะกอนสีอาจไปติดอยู่ที่โอโอไซต์ ทำให้ความสับสนในการอ่านผลได้ ระยะเวลาที่ใช้ในการย้อมสี ถ้าใช้ระยะเวลาในการย้อมสีน้อยเกินไป การติดสีของโครโมโซมจะไม่สมบูรณ์ ในทางตรงกันข้ามถ้าใช้เวลานานเกินไปจะทำให้สีของไซโทพลาสซึมของโอโอไซต์เข้มขึ้นและมองเห็นโครโมโซมไม่ชัด ปริมาณของไขมันภายในไซโทพลาสซึมของโอโอไซต์เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการอ่านผล ซึ่งโอโอไซต์กระบือมีเม็ดไขมันอยู่พอสมควร ถ้าทำการตรึงโอโอไซต์ไม่ดีจะมีโอกาสที่เม็ดไขมันจะบังโครโมโซมทำให้มองเห็นโครโมโซมไม่ชัดเจน นอกจากนี้เทคนิคและความชำนาญของผู้ปฏิบัติก็เป็นสิ่งที่มีความสำคัญต่อความสำเร็จในการย้อมสี เช่นในขั้นตอนของการย้ายโอโอไซต์จากน้ำยา Fixative ลงสไลด์เพื่อย้อมสีต้องอาศัยความรวดเร็วเพราะถ้าปล่อยให้น้ำยา Fixative แห้งก่อนทำการย้อมสีจะทำให้โอโอไซต์แห้งติดกับสไลด์และย้อมไม่ติดสีและ

ขั้นตอนการปิด coverslip ให้แนบกับโอโอไซต์ ถ้าทำการกด coverslip แรงเกินไปจะทำให้โอโอไซต์แตก แต่ถ้ากดเบาเกินไปโอโอไซต์จะไหลไปตามการไหลของสีทำให้เกิดการสูญหายได้ ซึ่งถ้าสามารถที่จะควบคุมปัจจัยดังกล่าวข้างต้นได้จะเป็นการเพิ่มโอกาสประสบผลสำเร็จในการย้อมสีเพื่อตรวจสอบลักษณะโครโมโซมของโอโอไซต์ได้อย่างดียิ่งขึ้น

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

จากการวิจัยครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าสามารถที่จะนำการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู มาใช้ในลูกกระบือก่อนวัยเจริญพันธุ์ได้ โดยไม่มีความแตกต่างของอัตรา การเก็บและคุณภาพของโอโอไซต์ที่ได้ในแต่ละครั้งของการเก็บ งานวิจัยเพื่อพัฒนาผลการตอบสนองหรือการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องโดยปัจจุบันหากใช้ผลศึกษาที่ใช้ในโคอาจไม่สามารถนำปรับใช้ได้ทันที ปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูในกระบือนั้นยังมีอีกหลายปัจจัยที่น่าจะทำการศึกษาต่อไป เช่น ผลของสถานภาพทางระบบสืบพันธุ์ในกระบือ ผลของความถี่ในการทำการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู เป็นต้น นอกจากนี้ที่ควรจะมีการศึกษาต่อไป คือ คลื่นการเจริญของฟอลลิเคิล (follicular wave) ในกระบือปลักซึ่งยังไม่มีผู้ศึกษามาก่อน จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาทางวิทยาการสืบพันธุ์ในกระบือต่อไป อีกทั้งยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในการทำการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู โดยสามารถที่จะกำหนดช่วงเวลาที่เหมาะสมในการทำโอพียู สามารถหลีกเลี่ยงผลของฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ (dominant follicle) ที่จะส่งผลกระทบต่อผลการเก็บโอโอไซต์ได้ และที่น่าสนใจอีกประการ คือ การปรับปรุงโปรแกรมที่เหมาะสมในการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในกระบือปลัก เพื่อให้กระบือมีการตอบสนองต่อการกระตุ้นที่ดีขึ้นอันจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูให้มีประสิทธิภาพและให้ผลการเก็บที่ดียิ่งขึ้นต่อไป

เอกสารอ้างอิง

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

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

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

มงคล เตชะกำพุ ชัยณรงค์ โลหชิต วิชัย ทันตศุภารักษ์ วันเพ็ญ ศรีอนันต์ จินดา สิงห์ลอ และจินตนา อินทรมงคล. 2537(1994) การใช้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินเพื่อกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลใน รังไข่ของลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์ รายงานผลการวิจัยทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปี 2537 23 หน้า.

รังสี อดุลยานุภาพ มงคล เตชะกำพุ และชัยณรงค์ โลหชิต การกระตุ้นรัง ไข่ในลูกโคด้วยฮอร์โมนเอฟ เอส เอช ซ้ำหลายครั้ง 2541 เวชชสารสัตวแพทย์ 28(1):60-69.

responses in repeatedly superovulated cows. Theriogenology. 27:201.

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

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

Boni, R. 1994. *In vivo* collection of oocytes and embryos in bovine and buffalo species. Buffalo. J. Supplement. 2:161-171.

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย