

การเก็บตัวอ่อนและโอโอไซต์จากแม่กระบือปลักไทย ภายหลังการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่

มงคล เตชะกำพูน* ยันต์ สุขวงศ์** มาลี อภิเมธีธารง**
ศิริวัฒน์ อินทรมงคล*** และจินตนา อินทรมงคล***

Abstract

Mongkol Techakumphu* Yant Sukwong** Malee Apimeteetumrong** Siriwat Intaramongkol***
Jintana Intaramongkol***

EMBRYO AND OOCYTE COLLECTION IN THAI SWAMP BUFFALO (*Bubalus bubalis*) AFTER SUPEROVULATION

Six-day embryos were recovered from 25 swamp buffalo cows treated with pregnant mare serum gonadotropin (2,500 iu PMSG, n=9) and follicle stimulating hormone (280 mg, n=12 and 400 mg FSH, n=4). Two techniques, non surgical collection from live animals and direct flushing after slaughter were compared. The oocytes were collected from ovaries immediately after slaughter by aspiration with or without ovarian chopping. The studies showed that 0.44 ± 0.59 embryos were collected from PMSG group, while 1.38 ± 1.31 embryos were collected in FSH group. Fifty percent to 60% of recovered embryos were transferable. The non surgical technique gave a low recovery rate (14.40%) and a low number of recovered embryos (0.38 ± 0.56) and of transferable embryos (0.13 ± 0.22) per donor. The average number of oocytes collected were 14.78 ± 13.7 per ovary after aspiration and 34.33 ± 13.7 per ovary after aspiration and chopping which presented the average of 18.23 ± 15.45 per ovary. About 48% of recovered oocytes were surrounded by cumulus mass with one or more layers and they can be matured *in vitro* after 12 hr of preservation and transportation at room temperature (25°C) at the rate of 5.8%. From this experiment, we showed that the embryos can be recovered from superstimulated buffalo cows treated with PMSG or FSH and the oocytes can be collected, preserved and matured *in vitro*.

Key words : embryo, oocyte, superovulation, swamp buffalo

* Department of Obstetrics Gynaecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Science,
Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

** Animal Husbandry Division

*** AI Division, Department of Livestock Development, Ministry of Agriculture and Cooperatives

* ภาควิชาสูติศาสตร์ เภสัชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

** กองผสมเทียม กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

*** กองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

บทคัดย่อ

มงคล เตชะกำพุ* ยนต์ สุขวงศ์** มาลี อภิเมธีธำรง** ศิริวัฒน์ อินทรมงคล*** และจินตนา อินทรมงคล***

การเก็บตัวอ่อนและโอโอไซต์จากแม่กระบือปลักไทยภายหลังการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่

ทำการเก็บตัวอ่อนอายุ 6 วัน จากแม่กระบือปลักจำนวน 25 ตัว หลังกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ด้วยฮอร์โมน แพรกแนน แมร์ ซีรัม โกลนาโดโทรปิน (พีเอ็มเอสจี) ขนาด 2500 ไอยู (n=9) และฟอลลิเคิล สติมูเลตติง ฮอร์โมน (เอฟเอสเอช) 2 ขนาด คือ 280 มิลลิกรัม (n= 12) และ 400 มิลลิกรัม (n=4) โดยใช้เทคนิคการชะล้างมดลูกแบบไม่ผ่าตัดและชะล้างท่อนำไข่และมดลูกโดยตรง หลังกระบือถูกฆ่า (17 ตัว) และทำการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ด้วยวิธีการเจาะดูด หรือ/และวิธีการตัดย่อยรังไข่ จากการศึกษาพบว่าเก็บตัวอ่อนได้เท่ากับ 0.44 ± 0.59 ใบในกลุ่มพีเอ็มเอสจี และ 1.38 ± 1.31 ใบในกลุ่มเอฟเอสเอช โดยประมาณ 50-60% เป็นตัวอ่อนที่คุณภาพดีและนำไปย้ายฝากได้ การเก็บแบบไม่ผ่าตัดได้จำนวนตัวอ่อนน้อยกว่า คือได้เพียง 0.38 ± 0.56 ใบต่อตัว และตัวอ่อนดีเท่ากับ 0.13 ± 0.22 ใบต่อตัวเท่านั้น การเก็บโอโอไซต์ด้วยการเจาะดูดได้เท่ากับ 14.78 ± 13.7 ใบต่อรังไข่ ส่วนการเจาะดูดรวมกับการตัดย่อยรังไข่ได้เท่ากับ 34.33 ± 13.7 ใบต่อตัว เฉลี่ยเท่ากับ 18.23 ± 15.45 ใบต่อตัว โดยประมาณ 48% เป็นโอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์นิวคลีโอลัสล้อมรอบหนึ่งหรือหลายชั้น และเมื่อนำไปเลี้ยงให้เจริญพร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลองหลังขนส่งและเก็บไว้นานที่อุณหภูมิห้องประมาณ 12 ชั่วโมง พบว่าอัตราการเจริญดังกล่าวเท่ากับ 5.8% จากการทดลองนี้พบว่าสามารถเก็บตัวอ่อนและโอโอไซต์ จากแม่กระบือหลังกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ได้ และโอโอไซต์ที่เจาะได้จากรังไข่สามารถเจริญพร้อมปฏิสนธิได้

คำสำคัญ : ตัวอ่อน โอโอไซต์ การกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ กระบือปลัก

บทนำ

การผลิตตัวอ่อนจากกระบือหลังการกระตุ้นรังไข่ด้วยฮอร์โมนโกลนาโดโทรปินเป็นวิธีที่ใช้เพื่อเพิ่มจำนวนสัตว์พันธุ์ดีได้มีการใช้ฮอร์โมนโกลนาโดโทรปินชนิดแพรกแนน แมร์ ซีรัม โกลนาโดโทรปิน (พีเอ็มเอสจี) และชนิดฟอลลิเคิล สติมูเลตติงฮอร์โมน (เอฟเอสเอช) โดยทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันในด้านเภสัชจลนศาสตร์และวิธีใช้ ทำให้ผลการตอบสนองที่ได้แตกต่างกัน ในประเทศไทยได้มีรายงานหลายฉบับเกี่ยวกับการเก็บตัวอ่อนในแม่กระบือหลังกระตุ้นรังไข่เพื่อเพิ่มการตกไข่โดยใช้ฮอร์โมน

อย่างใดอย่างหนึ่งแต่ส่วนมากมักสรุปในแนวเดียวกันคือจำนวนตัวอ่อนต่อตัวเก็บได้น้อย (Chantaraprateep et al., 1989, Tanomthong, 1992, 1994; Kobayashi et al., 1993, Bunjonrat et al., 1995,) งานวิจัยข้างต้นใช้วิธีการเก็บตัวอ่อนด้วยการชะล้างมดลูกแบบไม่ผ่าตัดซึ่งรายงานความสำเร็จในการเก็บเพียง 50% หรือน้อยกว่าจนถึงเก็บไม่ได้เลย แม้ว่าจะตรวจพบว่ามี การตกไข่ การดูดเก็บโอโอไซต์จากรังไข่หลังกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ ยังไม่มีรายงานแต่อย่างใดจะมีเพียงการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ของกระบือจากโรงฆ่าสัตว์เท่านั้น (Apimeteetumrong et al.,

1996) ซึ่งการเก็บโอโอไซต์เป็นวิธีที่มีประโยชน์ต่อการปฏิสนธิในหลอดทดลองเพื่อผลิตตัวอ่อนที่ได้มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในโค งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ที่จะเก็บตัวอ่อนให้มากที่สุดจากฝูงแม่กระบือพันธุ์ก่อนถูกคัดทิ้งจากฝูง ภายหลังจากการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ด้วยฮอร์โมนฟีเอ็มเอสจีและเอฟเอสเอช และศึกษาถึงจำนวนของโอโอไซต์ที่ได้จากรังไข่ที่ได้รับการกระตุ้นแล้วนำมาเลี้ยงให้พร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลองเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปปฏิสนธิในหลอดทดลองต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

แม่กระบือ

คัดเลือกแม่กระบือปลักที่ถูกคัดออกจากฝูงทั้งหมด 25 ตัว จากสถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ จังหวัดสุรินทร์ เป็นกระบือที่มีสภาพร่างกายสมบูรณ์และเคยให้ลูกมาแล้วเฉลี่ย 5.5 ตัว (2-11 ตัว) โดยมีอายุเฉลี่ยประมาณ 10.3 ปี (5-15 ปี) ล้างตรวจสอบรังไข่และมดลูกผ่านทางทวารหนัก เฉพาะแม่กระบือที่มีรังไข่และมดลูกปกติเท่านั้นที่ใช้ในการทดลอง กระบือดังกล่าวเลี้ยงแบบปล่อยทุ่งในเวลากลางวัน (8.00-18.00 น.) และนำกลับเข้าคอก ในเวลากลางคืนหลัง 18.00 น. โดยให้หญ้าสด อาหารข้น และ น้ำดื่มที่

โปรแกรมการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ด้วยฮอร์โมน

กระตุ้นเพิ่มการตกไข่เพื่อผลิตตัวอ่อนจำนวนหลายใบด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปินชนิดแพรกแนน เมร์ ซีรัม โกนาโดโทรปิน (ฟีเอ็มเอสจี, Folligon® , Intervet, Holland) ขนาด 2,500 ไอู หรือฟอลลิเคิล สติมูเลตติง ฮอร์โมน (เอฟเอสเอช, Follotropin® , Vetrapharm, Canada) ขนาด 280 มิลลิกรัม และ 400 มก.

ดังแสดงในตารางที่ 1 สำหรับฮอร์โมนฟีเอ็มเอสจีนั้นทำการฉีดเข้ากล้ามเนื้อครั้งเดียวในวันที่ 12 ของโปรแกรมการกระตุ้น หลังให้สารพรอสตาแกลนดิน เอฟ ทู อัลฟา (PGF2 α , Prostavet®, Virbac, France) จำนวน 15 มิลลิกรัม เข็มแรก (วันที่ 1 ของโปรแกรม) ในแม่กระบือที่ตรวจพบคอร์ปัส ลูเทียม (corpus luteum) บนรังไข่ ส่วนฮอร์โมนเอฟเอสเอช ทำการฉีดวันละ 2 ครั้ง (เช้า 8.00 น./เย็น 18.00 น.) ห่างกัน 10 ชั่วโมง ในระหว่างวันที่ 10-13 ของโปรแกรม รวมทั้งหมด 4 วัน ใช้ฮอร์โมนเอฟเอสเอช 2 ขนาด คือ 280 มิลลิกรัม (50/50, 40/40, 30/30, 20/20) จำนวน 12 ตัว และ 400 มิลลิกรัม (80/80, 60/60, 40/40, 20/20) จำนวน 4 ตัว ในแม่กระบือที่ควบคุมวงจรการเป็นสัดด้วยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดเข้าช่องคลอด (CIDR-B®, RAB, Australia) ในการศึกษาแบ่งแม่กระบือออกตามโปรแกรมของการกระตุ้นการเพิ่มการตกไข่เป็น 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 แม่กระบือจำนวน 9 ตัวกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน ชนิดแพรกแนน เมร์ ซีรัม โกนาโดโทรปิน (ฟีเอ็มเอสจี) ขนาด 2500 ไอู

กลุ่มที่ 2 แม่กระบือจำนวน 8 ตัวกระตุ้น ด้วยฟอลลิเคิล สติมูเลตติง ฮอร์โมน (เอฟเอสเอช) 2 ขนาด คือ 280 มิลลิกรัม และ 400 มิลลิกรัม จำนวนอย่างละ 4 ตัว

แม่กระบือในกลุ่มที่ 1 และ 2 ตรวจนับจำนวนคอร์ปอรา ลูเทีย และฟอลลิเคิลที่ไม่ตก (unovulated follicles) ขนาดตั้งแต่ 10 มิลลิเมตรขึ้นไป บนผิวของรังไข่โดยตรงหลังแม่กระบือและทำการเก็บตัวอ่อนจากการชะล้างท่อไข่และมดลูกโดยตรง (Direct flushing collection, DF)

กลุ่มที่ 3 แม่กระบือจำนวน 8 ตัวกระตุ้น ด้วยฟอลลิเคิล สติมูเลตติง ฮอร์โมน (เอฟเอสเอช) ขนาด 280 มิลลิกรัม ตรวจสอบการตอบสนองของรังไข่ด้วยวิธีการ

ตารางที่ 1 โปรแกรมการกระตุ้นการเพิ่มการตกไข่ในกระบือปลักด้วยฮอร์โมน PMSG หรือ FSH

วันของโปรแกรม	PMSG (n= 9)	FSH (n= 16)
1	ล้วงตรวจรังไข่ PGF ₂ α (เช้า)	ล้วงตรวจรังไข่ สอด CIDR-B (เช้า)
2-8	-	-
10	-	FSH (เช้า/เย็น)
11	-	FSH (เช้า/เย็น)
12	PMSG 2,500 ไอยู (เช้า) PGF ₂ α (เช้า)	FSH (เช้า/เย็น) ดิง CIDR-B ออก (เช้า) PGF ₂ a (เช้า/เย็น)
13	สังเกตการเป็นสัด (เช้า/เย็น)	FSH (เช้า/เย็น) สังเกตการเป็นสัด (เช้า/เย็น)
14-15	ผสมเมื่อเป็นสัด	ผสมเมื่อเป็นสัด
20-21	เก็บตัวอ่อนหลังผสม 6 วัน	เก็บตัวอ่อนหลังผสม 6 วัน

ล้วงผ่านทางทวารหนักและเก็บตัวอ่อนแบบไม่ผ่าตัด (Non surgical collection, NS) ดังวิธีที่รายงานโดย Lohachit และคณะ (1987)

รายละเอียดในการเก็บตัวอ่อน เริ่มจากตรวจการเป็นสัดในแม่กระบือด้วยการนำกระบือเข้าไปในฝูงหลังฉีด PGF₂ α หรือหลังถอด CIDR-B ออก ในวันที่ 13 ของโปรแกรม และทำการผสมแม่กระบือที่เป็นสัดสองครั้ง ครั้งแรกผสมธรรมชาติด้วยพ่อพันธุ์ และครั้งสองด้วยการผสมเทียมน้ำเชื้อแช่แข็ง กระบือปลักประมาณ วันที่ 14-15 ของโปรแกรม หลังจากนั้นทำการเก็บตัวอ่อนในวันที่ 6 หลังผสมครั้งแรก (วันที่ 20-21 ของโปรแกรม) ด้วยวิธี NS ในกลุ่ม 3 และเก็บตัวอ่อนแบบ DF ในกลุ่มที่ 1 และ

2 รวมทั้งตรวจนับจำนวนการตกไข่ (คอร์ปอร์ลูเทียม) และฟอลลิเคิลขนาดใหญ่กว่า 10 มิลลิเมตรบนรังไข่ในแต่ละข้าง

วิธีการเก็บตัวอ่อนด้วยวิธี DF นั้น โดยทำการตัดอวัยวะสืบพันธุ์ทั้งหมดจากตัวแม่กระบือทันทีหลังกระบือถูกฆ่าใช้กรรไกรตัดแยกเอาท่อนำไข่และมดลูกออกจากพังผืดใกล้เคียงแยกรังไข่ออกมาแล้ว ตัดปีกมดลูก (uterine horn) เหนือตัวมดลูก (body) ประมาณ 1 เซนติเมตร ทำทั้งปีกมดลูกด้านซ้ายและด้านขวาเช่นเดียวกัน หลังจากนั้นใช้น้ำยาล้างตัวอ่อน (Vigro media[®], RAB, Australia) คูณใส่ไשרริงค์ 10 มิลลิตร ต่อกับเข็มเบอร์ 18 ที่ตัดปลาย สอดปลายเข็มเข้าไปในปากแตรของท่อนำไข่ จับยึดปลายท่อกับเข็มแล้วทำ

การไล่น้ำยาจากปลายท่อเข้าไปยังปลายมดลูกที่ตัดออกอย่างช้าๆ รองรับน้ำยาที่ชะล้างออกลงในจานทดลองขนาด 100x20 มิลลิเมตร ที่ปลอดเชื้อชะล้างซ้ำอย่างน้อย 4 ครั้ง แต่ละครั้ง ใช้น้ำยาประมาณ 10 มิลลิลิตร นำน้ำยาชะล้างมา ตรวจหาตัวอ่อนภายใต้กล้องสเตอริโอ กำลังขยาย 10 - 20 เท่า บันทึกจำนวนระยะและคุณภาพตัวอ่อนที่เก็บได้

การเก็บโอโอไซต์จากรังไข่

ทำการเก็บโอโอไซต์ในแม่กระบือกลุ่มที่ 1 และ 2 จำนวน 17 ตัว โดยนำรังไข่ใส่ในกระติกควบคุมอุณหภูมิเก็บไว้ในตู้เย็น (25°C) ขนส่งจากสถานีบำรุงพันธุ์จังหวัดสุรินทร์ มาที่ห้องปฏิบัติการย้ายฝากตัวอ่อนของกองผสมเทียม จังหวัดปทุมธานีใช้เวลาประมาณ 12 ชั่วโมงตั้งแต่กระบือถูกฆ่าถึงการเก็บโอโอไซต์ ทำการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ 28 อัน ด้วยวิธีการเจาะคู่ออกมาโดยตรงจากแม่กระบือ จำนวน 14 ตัว และด้วยวิธีเจาะคู่ออกมาโดยการตัดข้อยังรังไข่เป็นชิ้นเล็ก ๆ จำนวนรังไข่ 6 อัน จากแม่กระบือจำนวน 3 ตัว การเก็บโอโอไซต์ที่อยู่ในฟอลลิเคิลทำโดยใช้วิธีการเจาะคู่ออกมาของเหลวจากฟอลลิเคิลขนาดตั้งแต่ 2 มิลลิเมตรขึ้นไป ด้วยการใช้นเข็มฉีดยาเบอร์ 18 ต่อกับไซริงค์ขนาด 5 มิลลิเมตร ที่มีน้ำยาสำหรับเก็บปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร เจาะบริเวณใกล้ๆ ฟอลลิเคิลที่มองเห็นได้ที่ผิวของรังไข่และเจาะผ่านเข้าไปในฟอลลิเคิลแล้วดูดเอาของเหลวออกมา ส่วนการตัดข้อยังรังไข่เป็นชิ้นเล็ก ๆ นั้นทำโดยยึดรังไข่ด้วยปากคีบในจานทดลองขนาด 100 x 20 มิลลิเมตร ที่มีน้ำยาชะล้างตัวอ่อนอยู่ประมาณ 5 มิลลิลิตร ใช้นิ้วชี้กดตัดปลอดเชื้อ กรีดบนผิวของรังไข่เป็นรอยถี่ ๆ ตามขวางและตามยาวจนทั่วรังไข่แล้วแกว่งรังไข่ไปมาหลาย ๆ ครั้งในจานทดลองแล้วตรวจหาและเก็บโอโอไซต์ใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอกำลังขยาย 10 เท่า จึงนำโอโอไซต์ไปใส่ในจานทดลองขนาด 10x35 มิลลิเมตร ที่มีน้ำยา TCM 199

Hepes จำนวน 1 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ นำโอโอไซต์มาประเมินคุณภาพโดยแบ่งเป็น 5 ชนิด ตามที่ Apimeteetumrong (1996) และ Techakumphu และคณะ (2000) ได้รายงานไว้คือ

1. โอโอไซต์ชนิด CCO (Complex cumulus oocyte) เป็นชนิดที่มีเซลล์คลุมตัวจำนวนหลายชั้นหุ้มล้อมรอบเปลือกโซนาเพลลูซิดา
 2. โอโอไซต์ชนิด P (Partial cumulus oocyte) เป็นชนิดที่มีเซลล์คลุมตัวชั้นหนึ่งถึงสองชั้นรอบเปลือกโซนาเพลลูซิดา
 3. โอโอไซต์ชนิด D (Denude oocyte) เป็นชนิดที่ไม่มีเซลล์คลุมตัวหุ้มล้อมรอบเปลือกโซนาเพลลูซิดา
 4. โอโอไซต์ชนิด EXP (Expanded cumulus oocyte) เป็นชนิดที่มีเซลล์คลุมตัวหุ้มกระจายรอบเปลือกโซนาเพลลูซิดา
 5. โอโอไซต์ชนิด Deg (Degenerated oocyte) เป็นโอโอไซต์ที่มีไซโตพลาซึมภายในเสื่อมสลาย
- นำโอโอไซต์มาเลี้ยงในน้ำยา TCM199+10% fetal calf serum ในตู้อบ 5%CO₂ ที่มีความชื้นสัมพัทธ์เต็มที่หลังเลี้ยง 24 ชั่วโมง นำโอโอไซต์ย้อมสีด้วยวิธี Rapid staining method (Apimeteetumrong, 1996) ตรวจการเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิโดยดูจากการปรากฏตัวของโครโมโซมระยะเมทาเฟส ทุ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 200-1000 เท่า

ผลการศึกษา

ผลการเก็บตัวอ่อนและการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่

พบว่า การฉีดฮอร์โมนพีเอ็มเอสจี ได้จำนวนตัวอ่อนเท่ากับ 0.44±0.59 (0-1) ไขต่อตัวจากจำนวนของการตกไข่เท่ากับ 1.44±0.81(0-4) ไขต่อตัว คิดเป็น 30.6% และมีฟอลลิเคิลบนรังไข่ที่เหลืออยู่เท่ากับ 15.57±6.49(4-34) ไขต่อตัว ได้จำนวนตัวอ่อนคุณภาพดีเท่ากับ 0.22±0.35(0-1) ไขต่อตัว คิดเป็น 50% (ตารางที่ 2) และในส่วนของ

ฮอร์โมนเอสโตรเจนที่สังเคราะห์ได้จำนวนตัวอ่อนเท่ากับ $1.38+1.31$ (0-3) ใบต่อตัว จากจำนวนของการตกไข่เฉลี่ยเท่ากับ $3.75+2.69$ (1-11) ใบต่อตัว คิดเป็น 36.8% และพบฟอลลิเคิลบนรังไข่เท่ากับ $9.63+2.72$ (2-14) ใบต่อตัว และไม่พบความแตกต่างของขนาดของฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ระหว่าง 280 และ 400 มิลลิกรัม โดยเก็บตัวอ่อนได้ $1.25+1.39$ (0-4) ใบต่อตัว (33.3%) และ $2.00+1.33$ (0-4) ใบต่อตัว (53.3%) ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ผลการกระตุ้นรังไข่และการเก็บตัวอ่อนหลังกระตุ้นด้วยฮอร์โมน PMSG และ FSH

ส่วนการเก็บตัวอ่อนแบบไม่ผ่าตัดได้จำนวนตัวอ่อนเท่ากับ $0.38+0.56$ (0-2) ใบต่อตัว จากจำนวนการตกไข่เท่ากับ $2.63+1.28$ (1-5) ใบต่อตัว คิดเป็น 14.4% โดยมีฟอลลิเคิลบนรังไข่เท่ากับ $2.63+2.63$ (0-8) ใบต่อตัว จำนวนตัวอ่อนปกติในแต่ละกลุ่มเท่ากับ $1.25+1.38$ (0-4), $0.5+0.75$ (0-2) และ $0.13+0.22$ (0-1) ใบต่อตัว คิดเป็นอัตราของตัวอ่อนปกติเท่ากับ 100, 25 และ 34.2% ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

วิธีการเก็บตัวอ่อน	Direct Flushing after Slaughter				Non surgical
ขนาดของฮอร์โมนที่ใช้	PMSG	FSH(280)	FSH(400)	Total	FSH(280)
จำนวนแม่กระป๋องทดลอง	9	4	4	8	8
จำนวนแม่กระป๋องที่ตอบสนอง (%)	3(33.30)	2(50)	3(75)	5(62.50)	6(75)
จำนวนการตกไข่	$1.44+0.81$ [0-4]	$3.75+3.62$ [1-11]	$3.75+1.75$ [1-6]	$3.75+2.69$ [1-11]	$2.63+1.28$ [1-5]
จำนวนฟอลลิเคิลที่ไม่ตกไข่	$15.57+6.49$ [4-34]	$8.25+3.75$ [2-12]	$11.00+1.5$ [9-14]	$9.63+2.72$ [2-14]	$2.63+2.63$ [0-8]
จำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้ (%)	$0.44+0.59$ (33.60) [0-1]	$1.25+1.39$ (33.30) [0-4]	$2.00+1.33$ (53.30) [0-4]	$1.38+1.31$ (36.80) [0-3]	$0.38+0.56$ (14.40) [0-2]
จำนวนตัวอ่อนที่ย้ายฝากได้ (%)	$0.22+0.35$ (50) [0-1]	$1.25+1.38$ (100) [0-4]	$0.5+0.75$ (25) [0-2]	$0.88+1.0$ (63.8) [0-4]	$0.13+0.22$ (34.2) [0-1]

FSH(280) = FSH 280 mg, FSH(400) = FSH 400 mg

[] ค่าพิสัย

ผลการเก็บโอโอไซต์

พบว่าจำนวนโอโอไซต์ที่ใช้วิธีเจาะดูดจากรังไข่ที่ถูกกระตุ้นจากแม่กระป๋อง 17 ตัวเท่ากับ $14.78+13.7$ (6-52) ใบต่อตัว จากรังไข่ 28 อัน และหากใช้วิธีการดูดเก็บรวมกับการสับย่อยรังไข่ จะได้โอโอไซต์ที่เพิ่ม

ขึ้นเป็น $34.33+17.56$ (2-51) ใบต่อตัว จากรังไข่ 6 อัน เฉลี่ยเท่ากับ $18.23+15.45$ ใบต่อตัว โดยแยกเป็นโอโอไซต์ชนิด CCO+P เท่ากับ $8.82+10.55$ (48.38%) ชนิด denude เท่ากับ $3.70+5.16$ (20.29%) ชนิด EXP เท่ากับ $2.29+0.9$ (12.56%) และชนิด Deg เท่ากับ $3.29+6.23$ (18.04%) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ที่ได้รับการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ในกระบือ 17 ตัว ที่ส่งโรงฆ่าสัตว์

วิธีการเก็บ โอโอไซต์	จำนวน รังไข่	จำนวน ฟอลลิเคิล*	ชนิดของโอโอไซต์				
			จำนวนรวม	CCO+	D	EXP	Deg
การเจาะดูด	28	15.21	14.78	8.64	2.57	2.43	0.86
		+11.39	+13.7	+11.37	+4.54	+4.31	+1.99
การเจาะดูด และการตัด ย่อยรังไข่	6	7.00	34.33	9.00	9.00	1.67	14.67
		+5.00	+17.56	+7.06	+5.29	+0.58	+7.02
รวม	34	13.76	18.23	8.82	3.70	2.29	3.29
		+10.91	+15.45	+10.55 (48.38%)	+5.16 (20.29%)	+9.0 (12.56%)	+6.23 (18.04%)

* จำนวนฟอลลิเคิลที่ปรากฏบนรังไข่ขนาดตั้งแต่ 10 มิลลิเมตรขึ้นไป

(%) = อัตราส่วนของชนิดของโอโอไซต์เปรียบเทียบกับโอโอไซต์ทั้งหมดที่เก็บได้

ผลการเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ

ผลการเลี้ยงโอโอไซต์เพื่อให้เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ (*in vitro* maturation) พบว่าได้อัตราความสำเร็จเท่ากับ 5.8% จากโอโอไซต์ทั้งหมด 51 ใบ โอโอไซต์ชนิด CCO เป็นชนิดที่ให้อัตราความสำเร็จมากที่สุดเท่ากับ 14.3% รองลงมาคือชนิด P เท่ากับ 5% และน้อยที่สุดคือ denude เท่ากับ 4.2% (ตารางที่ 4)

วิจารณ์

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถเก็บตัวอ่อนจากแม่กระบือปลักหลังกระตุ้นเพิ่มการตกไข่โดยใช้โปรแกรมที่ใช้ฮอร์โมนฟีเอ็มเอสจีหรือเอฟเอสเอสได้ รวมทั้งเก็บโอโอไซต์จากรังไข่และนำมาเลี้ยงให้เกิดความพร้อมปฏิสนธิได้ โดยประสิทธิภาพของการเก็บตัวอ่อนจะเกี่ยวข้องกับโปรแกรมการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ ขนาดของฮอร์โมนและวิธีการเก็บตัวอ่อน การกระตุ้น

เพิ่มการตกไข่พบว่ามีความผันแปรของการตอบสนองค่อนข้างสูงและมีจำนวนฟอลลิเคิลที่ไม่เกิดการตกไข่เป็นจำนวนมากด้วย ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการได้จำนวนตัวอ่อนต่ำในการทดลองนี้

จากการใช้โปรแกรมแรกด้วยฮอร์โมนฟีเอ็มเอสจีได้จำนวนตัวอ่อนเพียง 0.44 ใบต่อตัว และตัวอ่อนที่มีคุณภาพดีที่อาจนำไปย้ายฝากได้เท่ากับ 0.22 ใบต่อตัวเท่านั้น ซึ่งต่ำกว่าโปรแกรมที่สองที่ใช้ฮอร์โมนเอฟเอสเอสที่ได้ประมาณหนึ่งถึงสองตัวอ่อนต่อตัวโดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในขนาดของฮอร์โมนระหว่าง 280 มิลลิกรัม และ 400 มิลลิกรัม ที่ใช้ฉีดกระตุ้นฮอร์โมนฟีเอ็มเอสจีมักเป็นฮอร์โมนที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในอดีตเพื่อกระตุ้นเพิ่มการตกไข่แต่จากงานวิจัยส่วนมากพบว่าฮอร์โมนฟีเอ็มเอสจีไม่เหมาะสมในการกระตุ้นการเพิ่มการตกไข่ในกระบือปลักนัก Tanomtong (1992) ทดลองใช้ฮอร์โมนฟีเอ็มเอสจีอย่างเดียวหรือร่วมกับอิวเมน

ตารางที่ 4 ผลการเลี้ยงโอโอไซต์เพื่อให้พร้อมปฏิสนธิในกระป๋อง 17 ตัวที่ส่งโรงพยาบาลสัตว์

ชนิดของโอโอไซต์	จำนวนโอโอไซต์	โครโมโซม
		ระยะเมทาเฟส ทุ(%)
CCO+P	27	2(7.40)
- CCO	7	1(14.30)
- P	20	1(5)
Denude	24	1(4.20)
รวม	51	3(5.80)

โคริโอนิก โกนาโดโทรปิน (HCG) หรือร่วมกับแอนติพีเอ็มเอสจี (anti-PMSG) พบจำนวนการตกไข่เท่ากับ 4, 2.6 และ 1.12 ใบต่อตัวตามลำดับ และเก็บตัวอ่อนได้เพียง 5 ใบจากแม่กระป๋อง 24 ตัว เช่นเดียวกับ Bunjongrat และคณะ (1995) ได้จำนวนการตกไข่ประมาณ 3 ใบต่อตัว เมื่อนัดฮอร์โมนพีเอ็มเอสจีขนาด 2,000 และ 2,500 ไอยู และได้จำนวนตัวอ่อนเพียง 4 ใบจากแม่กระป๋อง 18 ตัว Techakumpfu และคณะ (2000) ได้พบว่าฤทธิ์ของฮอร์โมนเอฟเอสเอชดีกว่าพีเอ็มเอสจีในการกระตุ้นการสร้างฟอลลิเคิลในลูกกระป๋องปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์ สอร์โมนเอฟเอสเอชให้ผลในการกระตุ้นฟอลลิเคิลมากกว่าสอร์โมนพีเอ็มเอสจีถึงเท่าตัว

วิธีการเก็บตัวอ่อนมีผลอย่างมากโดยการเก็บแบบไม่ผ่าตัดซึ่งเป็นวิธีที่นิยม ได้จำนวนตัวอ่อนเพียง 14% เท่านั้น ซึ่งต่ำกว่าการชะล้างท่อนำไข่และมดลูกโดยตรงหลังฆ่ากระป๋อง แต่อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าแม้การเก็บตัวอ่อนด้วยวิธีหลังนี้ก็ไม่ได้จำเป็นต้องได้ตัวอ่อนเสมอไปเพราะมีถึง 70% ที่หายไป เหตุผลของปัญหานี้เป็นเรื่องที่อธิบายได้ยาก โดยอาจเกี่ยวเนื่องจากปัญหาสภาวะแวดล้อมของมดลูกหลังถูกกระตุ้นด้วยสอร์โมนหรือการเกิดการเสื่อมสลาย ทั้งนี้เพราะในแม่กระป๋องบางตัว

พบเพียงเปลือกตัวอ่อนโดยไม่มีไซโตพลาสซึมภายในหรือถูกกระบวนการทำลายของเม็ดเลือดขาวภายในมดลูก (phagocytosis) ซึ่งเป็นกระบวนการปกติที่มีในมดลูกและท่อนำไข่ นอกจากนี้พบว่าการตรวจสอบการตกไข่ด้วยวิธีการสังเกตทางทวารหนักให้ผลที่ไม่แม่นยำและต่ำกว่าที่เป็นจริงในกลุ่มที่ฉีดด้วยสอร์โมนเอฟเอสเอช 280 มิลลิกรัม จำนวนของคอร์ปัส ลูเทียมต่างกันประมาณ 1 ใบ และที่แตกต่างกันมากคือจำนวนฟอลลิเคิลที่ไม่ตกไข่ ที่แตกต่างกันถึง 6 ใบต่อตัว เป็นไปได้ว่าการสังเกตไม่สามารถตรวจพบฟอลลิเคิลขนาดต่าง ๆ เกิดขึ้นมากมายหากแต่การสัมผัสด้วยมือ การใช้วิธีการตรวจอย่างอื่น ๆ อาทิเช่น ใช้เครื่องมืออัลตราซาวด์ก็อาจช่วยให้เกิดความแม่นยำของการตอบสนองมากขึ้น

ในส่วนของคุณภาพของตัวอ่อนจะพิจารณาจากลักษณะและระยะของตัวอ่อนที่เก็บได้ โดยตัวอ่อนควรอยู่ในระยะมอรูล่าหรือระยะบลาสโตซิสแรก (morula or early blastocyst) ตามผลงานวิจัยโดย Chantaraprateep และคณะ (1988) ทั้งนี้พบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับชนิดของสอร์โมนที่ใช้ เพราะหากเป็นสอร์โมนพีเอ็มเอสจี จะได้จำนวนตัวอ่อนปกติอยู่เพียง 50% ในขณะที่สอร์โมนเอฟเอสเอช พบได้ถึง 100% ในกลุ่มที่ฉีดด้วยขนาด 280 มิลลิกรัม

แต่ก็พบว่าขนาดของสอร์โมนที่เป็นชนิดเดียวกันก็มีผลเช่นกัน โดยสอร์โมนเอฟเอสเอส ขนาด 280 มิลลิกรัม ให้จำนวนการตกไข่ไม่ต่างกับขนาด 400 มิลลิกรัม แต่ให้จำนวนตัวอ่อนที่ปกติได้มากกว่า ดังนั้นในการทดลองนี้โปรแกรมการฉีดสอร์โมนเอฟเอสเอส ขนาด 280 มิลลิกรัม น่าจะเหมาะสมที่สุดในการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ในกระป๋องปลัก

ในส่วนของไอโอไซด์ที่เก็บได้จากรังไข่หลังกระตุ้นด้วยสอร์โมนในกระป๋องปลักพบว่าการใช้วิธีการเจาะดูดจากฟอลลิเคิลได้ไอโอไซด์จำนวนประมาณ 15 ใบต่อรังไข่ แต่หากใช้วิธีการเก็บแบบคู่รวมกับการตัดย่อยรังไข่จะได้ไอโอไซด์มากกว่าถึงเท่าตัว ตัวเลขดังกล่าวสูงกว่าจำนวนไอโอไซด์ที่เก็บได้จากรังไข่ปกติที่มีรายงานไว้ Apimeteetumrong (1996) รายงานการเก็บไอโอไซด์จากรังไข่กระป๋องปลักได้เท่ากับ 3.6 ใบต่อรังไข่ โดยหากเป็นรังไข่ที่ตรวจพบคอร์ปัส ลูเทียมจะได้จำนวน ไอโอไซด์สูงกว่าประมาณ 1 ใบ ในงานวิจัยนี้ได้ไอโอไซด์ประมาณ 50% อยู่ในระยะที่เหมาะสมในการทำการปฏิสนธินอกร่างกาย เพราะมีเซลล์นิวคลีอัสหุ้มรอบทั้งหมดหรือบางส่วนซึ่งหากนำไปปฏิสนธิจะได้อัตราสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ไม่ได้แยกตัวเลขระหว่างไอโอไซด์ชนิด CCO และ P ซึ่งรวมกันได้ประมาณ 8 ไอโอไซด์ต่อรังไข่ รองลงมาคือชนิด denude และชนิด expand และมีประมาณ 18% ที่เสื่อมสลาย ไอโอไซด์ทั้งสามชนิดหลังไม่เหมาะสำหรับการนำไปปฏิสนธินอกร่างกายแต่อย่างใด งานวิจัยในกระป๋องปลักชี้ให้เห็นว่าไอโอไซด์ชนิดดี (CCO) ที่ดูดเก็บจากรังไข่มีจำนวนน้อยมาก Apimeteetumrong (1996) รายงานไว้ 0.60 ใบต่อรังไข่ เช่นเดียวกับในกระป๋องแม่น้ Das และคณะ (1996) รายงานไว้ 0.20 ใบต่อรังไข่ และ Madan และคณะ (1994)

ได้ 0.42 ใบต่อตัว ซึ่งเป็นปัญหาเนื่องจากประชากรของฟอลลิเคิลในรังไข่มีปริมาณต่ำ (Ty *et al.*, 1989) ดังนั้นการใช้วิธีการเจาะดูดและตัดย่อยรังไข่ภายหลังการกระตุ้นรังไข่ภายหลังการกระตุ้นรังไข่จะสามารถเพิ่มจำนวนไอโอไซด์ต่อรังไข่ได้

ในการวิจัยนี้พบว่ามีความเป็นไปได้ในการขนส่งรังไข่จากสถานที่เก็บจังหวัดหนึ่งมายังห้องปฏิบัติการอีกจังหวัดหนึ่งแล้วทำการดูดเอาไอโอไซด์มาเลี้ยงในหลอดทดลองให้อยู่ในสภาวะพร้อมปฏิสนธินอกร่างกาย ซึ่งจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า ได้อัตราความสำเร็จค่อนข้างต่ำโดยเป็นไปได้อาจคุณภาพของไอโอไซด์อาจต่ำลงเนื่องจากระยะเวลาตั้งแต่เก็บรังไข่จากกระป๋องจนถึงนำเข้าห้องปฏิบัติการใช้เวลานาน ปัญหาดังกล่าวพบเช่นเดียวกับการเลี้ยงไอโอไซด์ชนิดอื่น ๆ ที่ผ่านการเก็บนอกร่างกายเป็นระยะเวลานาน ซึ่งต่างกับที่เลี้ยงโดยตรงหลังเก็บทันทีโดยอัตราอยู่ในระดับสูงถึง 70-80% Yang และคณะ (1990) ได้แนะนำว่าในโคนนั้นอุณหภูมิที่เลือกเก็บรังไข่ก่อนการนำไปเลี้ยงให้พร้อมปฏิสนธิควรอยู่ที่อุณหภูมิ 25°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ดีกว่า 37°C และ 4°C เนื่องจากไอโอไซด์ไปปฏิสนธิในหลอดทดลองแล้วจะได้อัตราการแบ่งตัวและอัตราการเจริญเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์สูงสุด ทั้งนี้ไม่ว่าจะเก็บไว้ที่อุณหภูมิใดอุณหภูมิหนึ่งจะขึ้นกับระยะเวลาในการเก็บรักษารังไข่ไว้ โดยหากเก็บนานเกินกว่า 16 ชั่วโมง จะมีผลต่อการปฏิสนธิของไอโอไซด์ ดังนั้นการพัฒนากระบวนการขนส่งรังไข่จึงเป็นสิ่งที่ควรศึกษาต่อไปเพื่อให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของไอโอไซด์ของกระป๋องรวมทั้งการเก็บไอโอไซด์ซ้ำๆ ในสัตว์ที่มีชีวิตอยู่ด้วยการใช้หลอดมือกลั่นเสียงความถี่สูงสอดผ่านช่องคลอด (Ovum Pick Up) ซึ่งคณะผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้นแล้วในลูกโคและลูกกระป๋องปลัก (Lohachit *et al.*, 1996; Promdiret *et al.*, 2000)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกรมปศุสัตว์ โดยเป็นความร่วมมือระหว่างกองบำรุงพันธุ์ กองผสมเทียม กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และภาควิชาสัตวศาสตร์ เชนเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของสถานีบำรุงพันธุ์ จังหวัดสุรินทร์ ที่ช่วยเหลือในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Apimeteetumrong, M. 1996. Effects of culture temperature, fetal calf serum, and CO₂ concentration on *in vitro* maturation in swamp buffalo oocytes. Master Degree Thesis, Graduate School of King Mongkut Univ. (Thonburi), Bangkok, 91p.
- Bunjongrat, R., Intaramongkol, J., Techakumphu, M. and Chantaraprateep, P. 1995. Superovulation in Thai swamp buffalo after natural or induced estrus with PMSG or FSH. Proc. 22nd TVMA, 20-22, Nov. p174-179.
- Chantaraprateep, P., Lohachit, C., Techakumphu, M., Kobayashi, G., Virakul, P., Kunavongkrit A., Prateep, P. and Limskul, A. 1988. Early embryonic development in Thai swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). Theriogenology. 31(6):1131-1139.
- Chantaraprateep, P., Kobayashi, G., Lohachit, C., Virakul, P., Kunavongkrit, A. Techakumphu, M., Prateep, P. and Dusitsin, N. 1989. Success in embryo transfer in Thai swamp buffalo. Buffalo Bulletin. 8(1):4-5.
- Chantaraprateep, P., Lohachit, C., Onwan, N., Techakumphu, M., Virakul, P. and Intaramongkol, C. 1994. Low rate of embryo recovery in swamp buffalo. Proc. 1st ABAC. Jan. 17-21, Khon Kaen, Thailand, p421-426.
- Das, G.K., Jain, G.C., Solanki, V.S. and Tripathi, V.N. 1996. Efficacy of various collection methods for oocyte retrieval in buffalo. Theriogenology. 46(8):1403-1411.
- Kobayashi, G., Techakumphu, M., Chantaraprateep, P. and Lohachit, C. 1993. Embryo transfer between Murrah buffalo and Thai swamp buffalo. Thai J. Vet. Med. 23(4):275-296.
- Lohachit, C., Chantaraprateep, P., Virakul, P., Krnavongkrit, A. and Bodhipaksha, P. 1987. Techniques of embryo transfer in Swamp buffalo. In : Kamonpatana, M. 9th ed. *In vitro* fertilization and embryo transfer. Chulalongkorn University Press. Bangkok. Thailand, p 185-200.
- Lohachit, C., Techakumphu, M., Tantasuparak, W., Chatdarong, K., Suadsong, S. and Singlor, J. 1996. Ovum pick up in Thai native calf. Thai J. Vet. Med. 25(4):303-313.
- Madan, M.L., Singla, S.K., Chauhan, M.B. and Manik, R.S., 1994. *In vitro* production and transfer of embryos in buffalo. Theriogenology. 41:139-143.
- Promdireg, A., Techakumphu, M., Phutikanit, N. and Na-Chiangmai, A. 2000. Preliminary studies on oocyte collection by ovum pick up in pre-pubertal swamp buffalo heifers (*Bubalus bubalis*). Proc. 26th TVMA, 15-17 November. p24-31.
- Tanomtong, A. 1992. Non-surgical embryo recovery in swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). Master Degree Thesis, Graduate School, Chulalongkorn Univ. Bangkok, 60p.
- Techakumphu, M., Lohachit, C., Tantasuparak, V., Intaramongkol, C. and Intaramongkol, S. 2000. Ovarian responses and oocyte recovery in prepubertal swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) calves after FSH or PMSG treatment. Theriogenology. 54:305-312.
- Ty, L.V., Nguyen, B.X., Chupin, D. and Driancourt, M.A. 1989. Histological study of follicular population in swamp buffalo. Proc. II World Buffalo Congress, New Delhi, India, Dec. p122 (Abstr.)
- Yang, M.S., Lu, K.H. and Gordon, I. 1990. *In vitro* fertilization (IVF) and culture (IVC) of bovine oocytes from stored ovaries. Theriogenology. 33:352. (Abstr.)