จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย
เรื่อง

ผลของขนาดของแรงดูดสูญญากาศต่อการเก็บโอโอไซต์ด้วยเครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูงสอดผ่านทางช่องคลอดจากกระบือปลักไทย

โดย

มงคล เตชะกำพุ
เอกชาติ พรหมดิเรก
นวเพ็ญ ภูติกนิษฐ์
จินดา สิงห์ลอ

จฬ
ธห 15
011344

มกราคม ๒๕๔๕

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

ผลของขนาดของแรงดูดสูญญากาศต่อการเก็บโอโอไซต์ด้วยเครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูงสอดผ่านทางช่องคลอดจากกระบือปลักไทย

โดย

มงคล เตชะกำพุ
เอกชาติ พรหมดิเรก
นวเพ็ญ ภูติกนิษฐ์
จินดา สิงห์ลอ

มกราคม 2545

I20251981 19 พ.ย. 2546

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ

- สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ จังหวัดสุราษฎร์ธานี ที่อนุเคราะห์กระบือปลักสาวทดลอง
- คุณนิทัศน์ อ่อนหวาน คุณศักดิ์ ทองจันทร์ เจ้าหน้าที่สถานีบำรุงพันธุ์ ลำพญากลาง จังหวัดนครราชสีมา ที่อนุเคราะห์สถานที่และลูกกระบือปลักทดลอง
- คุณอัญชลี ณ เชียงใหม่ ที่ช่วยในการประสานงานวิจัยการทดลอง
- อาจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. เผด็จ ธรรมรักษ์ ที่กรุณาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ
- Dr. Terry Heard กรุณาช่วยตรวจแก้บทคัดย่อภาษาอังกฤษ
- เจ้าหน้าที่ของภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ ที่จังหวัดนครปฐม ในการร่วมงานวิจัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่ ๙๕๔ ส๗๕ 15
เลขทะเบียน 011344
วัน,เดือน,ปี 29 ต.ค. 45

ชื่อโครงการวิจัย	ผลของขนาดของแรงดูดสูญญากาศต่อการเก็บโอโอไซต์ด้วยเครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูงสอดผ่านทางช่องคลอดจากกระบือปลักไทย
ชื่อผู้วิจัย	มงคล เตชะกำพุ เอกชาติ พรหมดิเรก นวเพ็ญ ภูติกนิษฐ์ จินดา สิงห์ลอ
เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ	มกราคม 2545

บทคัดย่อ

จุดประสงค์ของงานวิจัยเพื่อหาระดับแรงดูดสูญญากาศที่เหมาะสมในการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีการใช้เครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูงสอดผ่านทางช่องคลอดในกระบือปลักไทย โดยทำศึกษาในกระบือปลักสาวหลังวัยเจริญพันธุ์ (การทดลองที่ 1) และลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์ (การทดลองที่ 2) ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฟอลลิเคิล สติมูเลติง ฮอร์โมน (FSH) ก่อนทำการเก็บโอโอไซต์ วัดความสำเร็จจากอัตราการเก็บโอโอไซต์และคุณภาพของโอโอไซต์ที่เก็บได้ และประเมินสภาวะพร้อมปฏิสนธิด้วยการย้อมสีโอโอไซต์

การทดลองที่ 1 ทดลองในกระบือปลักสาว อายุ 3 ปี จำนวน 6 ตัว ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH ขนาด 280 มก. โดยแบ่งฉีด 3 วัน ติดต่อกัน (เช้า/เย็น, 60/60, 50/50, 30/30 มก.) แบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ใช้แรงดูดในระดับ 100 mmHg กลุ่มที่ 2 ใช้แรงดูดในระดับ 80 mmHg และกลุ่มที่ 3 ใช้แรงดูดในระดับ 60 mmHg แต่ละกลุ่มทำการเก็บ 2 รอบ ห่างกันรอบละ 2 เดือน ครั้งละ 6 ตัว โดยหมุนเวียนกันจัดกลุ่มระดับแรงดูดด้วยการสุ่ม รวมการเก็บทั้งหมด 36 ครั้ง ผลการศึกษาพบว่าที่ระดับแรงดูดที่ 100 และ 80 mmHg ให้อัตราการเก็บโอโอไซต์ไม่แตกต่างกันเท่ากับ 81.2%(69/85) และ 79.1%(53/67) ส่วนที่ระดับแรงดูดที่ 60 mmHg ให้อัตราการเก็บโอโอไซต์เท่ากับ 90.1%(93/103) สูงกว่ากลุ่มแรงดูดอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ได้จำนวนโอโอไซต์ในแต่ละกลุ่ม เท่ากับ 5.33±3.27, 4.42±2.71 และ 7.75±4.31 โอโอไซต์ต่อตัว ตามลำดับ เปอร์เซนต์โอโอไซต์ที่มีคุณภาพดี (COC, S+P, EXP) ไม่แตกต่างกันในทั้ง 3 ระดับ เท่ากับ 44.8, 43.4 และ 49.4% ตามลำดับ

การทดลองที่ 2 ทดลองในลูกกระบือปลัก อายุ 1.5 ปี จำนวน 12 ตัว ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH ขนาด 180 มก. โดยแบ่งฉีด 3 วัน ติดต่อกัน (เช้า/เย็น, 40/40, 30/30, 20/20) โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่มระดับแรงดูด คือ 100, 80 และ 60 mmHg โดยมีกระบือกลุ่มละ 4 ตัว ทำการทดลอง 2 รอบ ห่างกัน 2 เดือน จากการศึกษาพบว่าที่ระดับแรงดูดที่ 100 และ 80 mmHg ให้อัตราการเก็บโอโอไซต์ไม่แตกต่างกัน เท่ากับ 78.4%(29/37) และ 83.6%(61/73) ส่วนที่ระดับแรงดูดที่ 60 mmHg ให้อัตราการเก็บโอโอไซต์เท่ากับ 65.7%(23/35) ต่ำกว่ากลุ่ม 80 mmHg อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ได้จำนวนโอโอไซต์ในแต่ละกลุ่มเท่ากับ 5.8±4.87, 7.6±8.6 และ 3.29±2.06 โอโอไซต์ต่อตัว ตามลำดับ เปอร์เซนต์โอโอไซต์ที่มีคุณภาพดี (COC, S+P, EXP) ไม่แตกต่างกันใน ทั้ง 3 ระดับ เท่ากับ 82.0, 65.5 และ 79.3% ตามลำดับ

ในการกระตุ้นรังไข่ทั้งสองการทดลองพบว่า ประมาณ 80% ของฟอลลิเคิลที่ตอบสนองอยู่ในขนาด 2-6 มม. และโอโอไซต์ที่เก็บจากกระบือปลักก่อนและหลังวัยเจริญพันธุ์มีการเจริญเป็นระยะ prophase I และ metaphase I จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าระดับแรงดูดสูญญากาศในการเก็บโอโอไซต์ด้วยเครื่องมือคลื่นเสียงความ ถี่สูงสอดผ่านทางช่องคลอดมีผลต่ออัตราการเก็บโอโอไซต์ในกระบือปลักไทย แต่ไม่มีผลต่อคุณภาพของโอโอไซต์ที่เก็บได้

Project title: The effect of aspiration vacuum after transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval from Thai swamp buffalo (*Bubalus bubalis*)

Name of the Investigators: Mongkol Techakumphu Ekachart Promdireg Nawapen Phutikanit Jinda Singlor

Year: January 2002

Abstract

The objective of the study was to investigate the effect of the aspiration vacuum after transvaginal, ultrasound-guided, oocyte retrieval from Thai swamp buffalo. Two experiments were conducted in buffalo heifers (Exp. 1) and in prepubertal buffalo calves (Exp. 2), after Follicle Stimulating Hormone (FSH) treatment. The oocyte recovery, oocyte quality and maturation stages were compared for the different groups of aspiration vacuum pressure, that were used.

Experiment 1: Six buffalo heifers, aged 3 yrs were treated with 280 mg FSH, twice a day, in a divided dose for 3 d (60/60, 50/50, 30/30). Three vacuum pressures were used; 100(n=12), 80(n=12) and 60 mmHg(n=12). The animals were treated repeatedly and collected with 2 sets of each pressure every 2 months giving a total of 36 collections. The results showed that there was no difference in the oocyte recovery rate between the 100 and 80 mmHg giving 81.2%(69/85) and 79.1%(53/67), while the 60 mmHg provided a better rate, 90.1%(93/103) ($P<0.05$) than the other two pressures. The oocytes collected per donor were 5.33 ± 3.27, 4.42 ± 2.71 and 7.75 ± 4.31 respectively. The COC, S+P and EXP oocytes showed no differences between the different pressures being 44.8, 43.4 and 49.4%.

Experiment 2: Twelve prepubertal calves, aged 1.5 yrs were treated with 180 mg FSH twice a day, in a divided dose for 3 d (40/40, 30/30, 20/20). The animals were randomized into 3 groups, according to the different vacumm pressures, 100(n=8), 80 (n=8) and 60 mmHg(n=8). Two sets of treatments, were performed with 2 months interval between them. The results were similar to Exp. 1 with oocyte recovery rates using 100 and 80 mmHg, no different at 78.4%(29/37) and 83.6%(61/73). The 60 mmHg gave a lower rate, 65.7%(23/35) compared to 80 mmHg group ($P<0.05$). The oocytes recovered per donor were 5.8 ± 4.87, 7.6 ± 8.6 and 3.29 ± 2.06 respectively. The percentage of COC, S+P, EXP oocytes showed no differences between the pressures, being 82.0, 65.5 and 79.3%.

The two experiments showed that the follicles with a size of 2-6 mm were dominant after FSH treatment, being around 80% of the total number. Furthermore, the maturation stage of these oocytes proceeded to be prophase I and metaphase I. In conclusion, the vacuum pressure used for the transvaginal, ultrasound-guided, oocyte retrieval technique, influenced the recovery rate but not the oocyte quality.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	v
รายการตารางประกอบ	vi
รายการภาพประกอบ	vii
รายการสัญลักษณ์	ix
บทนำ	1
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
วิธีการวิจัย	9
ผลการวิจัย	20
การอภิปรายผล	42
เอกสารอ้างอิง	51
ภาคผนวก	56

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

		หน้า
ตารางที่ 1	ผลของการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี OPU ด้วยหัวโปรปขนาดแตกต่างกัน	5
ตารางที่ 2	ระดับของแรงดูดสูญญากาศและขนาดของเข็มที่ใช้ในการเจาะฟอลลิเคิลแบบ OPU	7
ตารางที่ 3	ความสัมพันธ์ระหว่างแรงดูดสูญญากาศ (mmHg) กับการไหลของของเหลว (ml H_2O/mm) เปรียบเทียบระหว่างเข็มขนาดต่าง ๆ	8
ตารางที่ 4	ผลการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นและผลการเก็บโอโอไซต์ด้วยระดับแรงดูดสูญญากาศ 100, 80 และ 60 mmHg ในกระบือปลักสาว	20
ตารางที่ 5	ผลเปรียบเทียบการตอบสนองและการเก็บโอโอไซต์จากการกระตุ้นครั้งที่ 1 และ 2 ด้วยระดับแรงดูดสูญญากาศขนาด 100, 80 และ 60 mmHg ในกระบือปลักสาว	22
ตารางที่ 6	ผลการตรวจสอบลักษณะของโอโอไซต์กระบือปลักสาวที่เจาะเก็บด้วยวิธี OPU โดยจำแนกตามลักษณะโอโอไซต์	29
ตารางที่ 7	ผลการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นและผลการเก็บโอโอไซต์ด้วยระดับแรงดูดสูญญากาศ 100, 80 และ 60 mmHg ในลูกกระบือปลัก	30
ตารางที่ 8	ผลเปรียบเทียบการตอบสนองและการเก็บโอโอไซต์จากการกระตุ้นครั้งที่ 1 และ 2 ด้วยระดับแรงดูดสูญญากาศขนาด 100, 80 และ 60 mmHg ในลูกกระบือปลัก	32
ตารางที่ 9	ผลการตรวจสอบลักษณะของโอโอไซต์ลูกกระบือปลักที่เจาะเก็บด้วยวิธี OPU โดยจำแนกตามลักษณะโอโอไซต์	35

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

		หน้า
รูปที่ 1	ภาพแสดงการผลิตตัวอ่อนด้วยการเก็บโอโอไซต์จากสัตว์ตัวรับด้วยวิธี OPU-IVF-ET	3
รูปที่ 2	ลูกกระบือก่อนวัยเจริญพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองเก็บด้วยวิธี OPU ที่สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ อำเภอลำพญากลาง จังหวัดนครราชสีมา	10
รูปที่ 3	โปรแกรมการกระตุ้นรังไข่ในกระบือปลักสาวเพื่อเก็บโอโอไซต์	11
รูปที่ 4	ภาพรังไข่ข้างซ้าย (a) และข้างขวา (b) ก่อนการกระตุ้นตรวจด้วยเครื่องอัลตราซาวน์ (x- - - -x) แสดงขอบเขตของรังไข่	12
รูปที่ 5	ภาพการบังคับสัตว์ในซองควบคุม ในขณะทำการเจาะแบบ OPU ที่ศูนย์ ฝึกนิสิตสัตวแพทย์ จังหวัดนครปฐม	13
รูปที่ 6	ภาพการบังคับสัตว์ในซองควบคุม ลูกกระบือจะถูกหนีบที่คอ และมีเชือกคล้องบริเวณเอวเพื่อกันการนั่งลงในขณะทำการเจาะแบบ OPU ที่สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ ลำพญากลาง จังหวัดนครราชสีมา a) การให้ยา Xylacine HCl เข้ากล้ามเนื้อสะโพก b) การทำงานขณะเจาะโดยผู้ปฏิบัติต้องอยู่ในท่ายืน	13
รูปที่ 7	Transvaginal probe ความถี่ 5.0 MHz พร้อมเข็มเจาะโอโอไซต์	14
รูปที่ 8	ภาพของการเจาะฟอลลิเคิลด้วยวิธี OPU โดยสอด transvaginal probe เข้าทางช่องคลอด	15
รูปที่ 9	ภาพจากหน้าจอมอนิเตอร์แสดงตำแหน่งของเข็ม (needle) เข้าไปในฟอลลิเคิล	16
รูปที่ 10	ระบบการเก็บโอโอไซต์แบบ Ovum Pick Up	18
รูปที่ 11	ขนาดของฟอลลิเคิลในกลุ่มต่าง ๆ ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH ในกระบือปลักสาว	23
รูปที่ 12	ภาพการตอบสนองของกระบือหมายเลข 36/43 มีการตอบสนองน้อย จำนวน 5 ฟอลลิเคิล	24
รูปที่ 13	ภาพการตอบสนองของกระบือหมายเลข 105/42 มีการตอบสนองปานกลาง จำนวน 7 ฟอลลิเคิล	25
รูปที่ 14	ภาพการตอบสนองของลูกกระบือหมายเลข 32 ที่มีการตอบสนองมาก จำนวน 15 ฟอลลิเคิล	26

รูปที่ 15	ชนิดของโอโอไซต์ที่เก็บได้จากการเก็บแบบ OPU จากกระบือปลักสาวด้วยแรงดูดระดับ 100, 80 และ 60 mmHg	28
รูปที่ 16	ขนาดของฟอลลิเคิลในกลุ่มต่าง ๆ ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH ในลูกกระบือปลัก	33
รูปที่ 17	ชนิดของโอโอไซต์ที่เก็บได้จากการเก็บแบบ OPU จากลูกกระบือปลักด้วยแรงดูดระดับ 100, 80 และ 60 mmHg	34
รูปที่ 18	ผลเปรียบเทียบอัตราการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี OPU จากกระบือปลักสาวและลูกกระบือปลัก	36
รูปที่ 19	ผลเปรียบเทียบขนาดของโอโอไซต์จากกระบือปลักสาวและลูกกระบือปลัก	37
รูปที่ 20	ผลเปรียบเทียบชนิดของโอโอไซต์เก็บด้วยแรงดูด 100 mmHg ในกระบือปลักสาวและลูกกระบือปลัก	38
รูปที่ 21	ผลเปรียบเทียบชนิดของโอโอไซต์เก็บด้วยแรงดูด 80 mmHg ในกระบือปลักสาวและลูกกระบือปลัก	39
รูปที่ 22	ผลเปรียบเทียบชนิดของโอโอไซต์เก็บด้วยแรงดูด 60 mmHg ในกระบือปลักสาวและลูกกระบือปลัก	40
รูปที่ 23	ผลเปรียบเทียบสภาวะการเจริญพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์กระบือปลักสาวและลูกกระบือปลักที่เจาะเก็บด้วยวิธี OPU โดยจำแนกตามชนิดของโอโอไซต์	41

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการสัญลักษณ์

COC = Cumulus oocyte complexes

S = Single layers cumulus oocyte

P = Partial layers cumulus oocyte

EXP = Expanded cumulus oocyte

D = Denude oocyte

Deg = Degenerated

FZ = free zona

GV = Germinal Vesicle

GVBD = Germinal Vesicle BreakDown

P I = Prophase I

M I = Metaphase I

A I = Anaphase I

T I = Telophase I

M II = Metaphase II

U = Unidentified

HCl = Hydrochloride

OPU = Ovum Pick Up

ET = Embryo Transfer

IVF = *In vitro* Fertilization

IVP embryo = *In vitro* produced embryo

F = Folllicle

FSH = Follicle Stimulating Hormone

GnRH = Gonadotropin Releasing Hormone

PMSG = Pregnant Mare Serum Gonadotropin

กก. = กิโลกรัม

มก. มิลลิกรัม

มม. = มิลลิเมตร

มล. = มิลลิลิตร

ชม. = ชั่วโมง

ซม. เซนติเมตร

°ซ = องศาเซลเซียส

ไอยู = International Unit

d = day

g = gauge

h = hour

n = number

X= ค่าเฉลี่ย

SD = ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ID = Internal Diameter

ml = milliter

µl = ไมโครลิตร

µg = ไมโครกรัม

MM = millimole

MHz = megahertz

mmHg = มิลลิเมตรปรอท

min = minute

TCM = tissue culture medium

P<0.05 = significant

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

เป็นที่ทราบกันดีว่าในช่วงระยะเวลา 10 กว่าปีที่ผ่านมา จำนวนกระบือปลักในประเทศไทยลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากมีการฆ่ากระบือเพื่อการบริโภคที่มากกว่าที่ผลิตได้ การฆ่ากระบือเพศเมียและกระบืออุ้มท้อง การเลี้ยงกระบือลดลง การตอนกระบือเพศผู้ทำให้กระบือเพศเมียไม่ได้รับการผสมพันธุ์ อุ้มท้องคลอดลูกได้ ปัจจุบันปัญหาดังกล่าวยังไม่ได้รับการแก้ไขอย่างจริงจังและต่อเนื่อง ซึ่งสิ่งนี้จะเป็นการทำลายแหล่งพันธุกรรมของกระบือปลักได้ ภาครัฐบาลโดยเฉพาะหน่วยงานที่เกี่ยวข้องด้านปศุสัตว์ได้มีความกระตือรือร้นในการนำเอาเทคโนโลยีชีวภาพทางวิทยาการสืบพันธุ์ในกระบือปลักต่าง ๆ อาทิเช่น เทคโนโลยีการผสมเทียม การย้ายฝากตัวอ่อน และเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องอื่น ๆ เกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์ มาเพื่อช่วยในการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์กระบือปลักไทย การร่วมกันระหว่างหน่วยงานของรัฐและมหาวิทยาลัยจะเป็นการพัฒนาเทคโนโลยีได้เร็วและยั่งยืนขึ้น ซึ่งทางคณะผู้วิจัยได้ดำเนินการตามวิถีทางนี้โดยตลอด โดยทำการพัฒนาบุคลากร พัฒนาเทคนิคและทำการถ่ายทอดไปยังหน่วยงานปศุสัตว์ที่เกี่ยวข้อง รวมทั้งการวิจัย ร่วมกัน อาทิเช่น การศึกษาในงานวิจัยนี้

การใช้เครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูงสอดเข้าทางปากช่องคลอด (Ovum Pick Up, OPU) เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมกันมากขึ้นในโลกเพื่อใช้เก็บโอโอไซต์จากโค สามารถทำกับสัตว์ที่มีชีวิตหลาย ๆ ครั้ง โดยไม่มีผลกระทบต่อการทำงานของการสืบพันธุ์และการเจริญของตัวสัตว์หลังการเจาะโอโอไซต์นี้โดยเจาะโอโอไซต์มาผลิตตัวอ่อนด้วยการปฏิสนธินอกร่างกาย (*in vitro* fertilization) หรือการใช้เพื่อเป็นเซลล์ไข่ตัวรับ (oocyte recipient) ในการโคลนนิ่งด้วยการย้ายฝากนิวเคลียส (nuclear transfer) หรือการศึกษาของเทคโนโลยีชีวภาพอื่น ๆ ส่วนการศึกษาในเรื่อง OPU ในประเทศไทยนั้นยังมีไม่มากโดยเฉพาะในกระบือปลัก หากสามารถพัฒนาได้จะเป็นวิธีการเก็บโอโอไซต์แล้วนำมาปฏิสนธินอกร่างกาย ได้ตัวอ่อนแล้วจึงไปย้ายฝาก ซึ่งน่าจะเป็นวิธีผลิตตัวอ่อนที่ได้จำนวนมากกว่าการเก็บหลังการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ (superovulation) ซึ่งจำนวนตัวอ่อนที่ได้มีประมาณ 1-2 ตัวอ่อนเท่านั้น (Techakumphu *et al.*, 2001) การศึกษาของคณะผู้วิจัยในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการเก็บโอโอไซต์ได้ดำเนินการมาโดยใช้วิธีการเปิดผ่าช่องท้องและดูดโอโอไซต์โดยตรงจากฟอลลิเคิลในลูกกระบือและลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์ (มงคล เตชะกำพุและคณะ, 2537; 2539) พบว่าสามารถกระตุ้นรังไข่ เก็บโอโอไซต์จากสัตว์ตัวเดียวกันได้หลายครั้ง โดยจำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้ไม่ลดลง โอโอไซต์ที่ได้ยังสามารถนำมาปฏิสนธิและพัฒนาเป็นตัวอ่อนได้ แต่มีปัญหาด้านการยึดติดของอวัยวะภายในกับรังไข่ ทำให้เป็นข้อจำกัดของการเก็บโอโอไซต์ซ้ำ (มงคล เตชะกำพุและคณะ, 2539) ส่วนการพัฒนาการเก็บโอโอไซต์แบบ OPU ได้มีการศึกษา

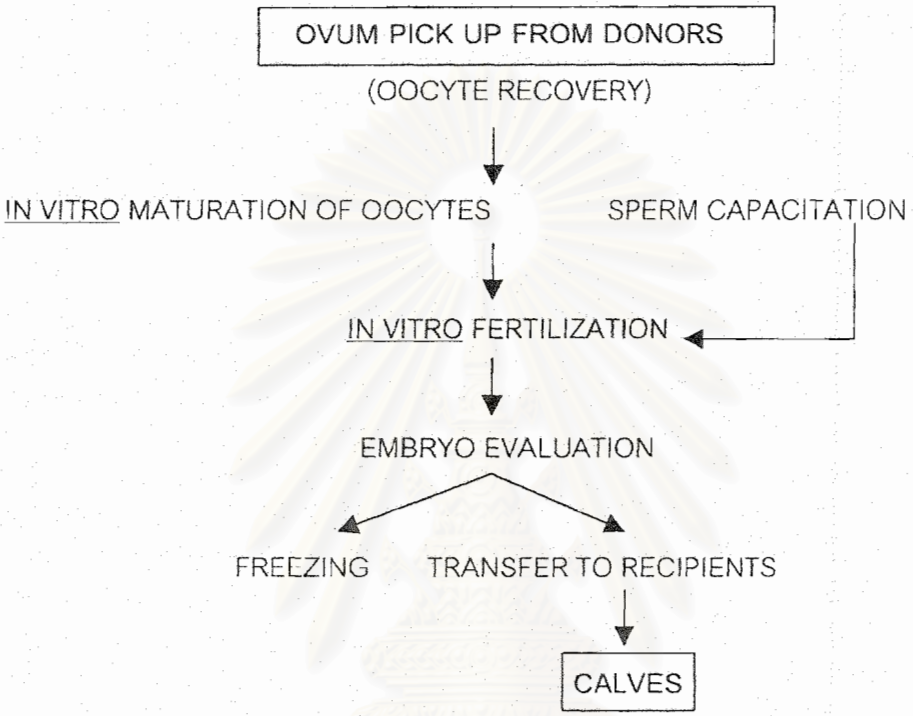
ในลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์ (มงคล เตชะกำพุและคณะ, 2539) และเริ่มพัฒนาในกระบือปลัก (เอกชาติ พรหมดิเรกและคณะ, 2543; มงคล เตชะกำพุและคณะ, 2544) แต่ยังมีข้อจำกัดในเรื่องของ คุณภาพของโอโอไซต์ที่ได้ยังไม่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ปฏิสนธินอกร่างกายต่อไป โดยข้อสันนิษฐานว่าน่าจะมาจากปัจจัยของอายุของสัตว์และแรงดูดสูญญากาศขณะทำการเก็บโอโอไซต์

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีการใช้เข็มดูดเจาะร่วมกับการใช้เครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูง (อัลตราซาวน์ ซนิดเรียล ไทม์ บี-โมด) เรียกสั้น ๆ ว่า "ovum pick up, OPU" นี้เป็นวิธีที่มีการใช้เป็นประจำในสตรีที่มีปัญหามีบุตรยาก ต่อมาได้มีการนำวิธีดังกล่าวมาพัฒนาใช้ในสัตว์หลายชนิดเมื่อประมาณ 10 กว่าปีที่ผ่านมา เช่น ม้า (Ginther and Pierson, 1984; Hinrichs and Kenney,1987; Palmer *et al.*,1987; Gastal *et al.*,1995; Brück *et al.*,1997) แพะ (Graff *et al.*,1999) แกะ (Kühholzer *et al.*, 1997 ;Stangl *et al.*, 1999) และโค (Pieterse *et al.*,1988) จากนั้นเป็นต้นมาจึงมีการนำอัลตราซาวน์เข้ามาช่วยในการเก็บโอโอไซต์และมีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย ทั้งนี้เพราะสามารถที่จะนำมาประยุกต์ใช้เพื่อเป็นผลประโยชน์ในเชิงธุรกิจในอุตสาหกรรมเลี้ยงโค โดยเก็บโอโอไซต์แล้วนำมาผ่านกระบวนการปฏิสนธินอกร่างกาย และนำไปย้ายฝากในสัตว์ตัวรับให้เกิดการตั้งท้อง (embryo transfer) เรียกโดยสรุปว่าวิธี OPU-IVF-ET ดังรูปที่ 1

การเก็บโอโอไซต์แบบ OPU นี้เป็นวิธีทดแทนการเก็บโอโอไซต์จากโรงฆ่าสัตว์ซึ่งโอโอไซต์ที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์นั้นมักมาจากสัตว์ไม่รู้คุณค่าทางพันธุกรรม (Kruip *et al.*,1994; Pieterse *et al.*,1991) ถึงแม้เมื่อนำโอโอไซต์ที่ได้ไปผลิตตัวอ่อน และนำตัวอ่อนไปย้ายฝาก ก็จะได้ลูกสัตว์ที่ไม่มีคุณค่าทางพันธุกรรม ซึ่งต่างจากการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี OPU ที่สามารถเก็บโอโอไซต์จากแม่โคที่รู้คุณค่าทางพันธุกรรม เมื่อนำมาผลิตตัวอ่อนจะได้ตัวอ่อนที่มีคุณค่าทางพันธุกรรมเอาไว้ย้ายฝากในโคตัวรับได้ ดังนั้นการใช้เทคนิคการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี OPU ร่วมกับการผลิตตัวอ่อนในหลอดทดลอง (*In vitro* embryo Production, IVP) เป็นแนวทางที่จะประสบผลสำเร็จในการผลิตตัวอ่อนในระยะก่อนการฝังตัว (preimplantation stage) (Looney *et al.*, 1994) การเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี OPU จึงได้กลายมาเป็นเทคนิคที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับการเก็บโอโอไซต์ที่อยู่ในระยะที่ยังไม่เจริญเต็มที่ (immature oocyte) เนื่องจากมีข้อได้เปรียบกว่าการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีอื่น ๆ ตรงที่ไม่ต้องทำการผ่าตัด สัตว์จึงไม่บอบช้ำมาก มีความ

ปลอดภัยสูง สัตว์ฟื้นตัวได้เร็ว ใช้เวลาในการปฏิบัติน้อย การเป็นอันตรายต่อตัวสัตว์น้อย สามารถทำซ้ำได้หลายครั้ง หลังเจาะเก็บหลาย ๆ ครั้งแล้วก็ไม่มีผลกระทบต่อเนื่องการทำงานของระบบสืบพันธุ์ ซึ่งหมายความว่าสัตว์สามารถเจริญวัยได้ปกติและนำไปเป็นแม่พันธุ์ต่อไปได้ (Majerus *et al.*, 1999)



รูปที่ 1 ภาพแสดงการผลิตตัวอ่อนด้วยการเก็บโอโอไซต์จากสัตว์ตัวรับด้วยวิธี OPU-IVF-ET โดยเก็บโอโอไซต์จากแม่พันธุ์ที่มีพันธุกรรมดีแล้วนำมาเลี้ยงให้พร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลอง นำมาปฏิสนธิกับตัวอสุจิในหลอดทดลอง เมื่อได้ตัวอ่อนแล้วนำแช่แข็งหรือทำการย้ายฝากในโคตัวรับเพื่อผลิตลูก

ในปัจจุบันได้มีผู้เสนอให้ใช้เทคนิค OPU-IVF เพื่อทดแทนการผลิตตัวอ่อนจากการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ในเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนแบบดั้งเดิม (Kruip *et al.*,1991) ได้มีการใช้ตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกายด้วยโอโอไซต์จากการเก็บ OPU มากขึ้น โดยเฉพาะในช่วง 2-3 ปีที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาการผลิตตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกายจากโอโอไซต์ที่เก็บจากวิธี OPU อย่างมากในทวีปยุโรป สถิติที่รวบรวมจากประเทศฝรั่งเศส ไอร์แลนด์ อิตาลี เนเธอร์แลนด์ และสหราชอาณาจักร พบว่ามีจำนวนตัวอ่อนที่ผลิตด้วยวิธีนี้ที่ทำการย้ายฝากถึงปีละ 11,012

ตัวอ่อน ในปี ค.ศ.1998 และเพิ่มขึ้นเป็น 12,566 ตัวอ่อน ในปี ค.ศ. 1999 และแสดงให้เห็นว่าเทคนิคนี้มีการใช้ในอุตสาหกรรมการย้ายฝากตัวอ่อนโค และในอนาคตจะทดแทนการผลิตตัวอ่อนจากการกระตุ้นการเพิ่มการตกไข่ (Pansart, 2000)

การเก็บด้วยวิธี OPU ในแม่โคสามารถที่จะทำได้ในทุกระยะของวงจรการเป็นสัด (van der Schans *et al.*,1991) และยังได้มีการนำมาใช้ในแม่โคที่มีปัญหาการผสมไม่ติดหรือผสมติดยาก (Looney *et al.*,1994) แม่โคที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปินเพื่อเพิ่มจำนวนและขนาดของฟอลลิเคิล (Bungartz *et al.*,1995) แม่โคอุ้มท้องระยะแรกประมาณ 30-35 วัน (Meintjes *et al.*,1995) หรือในช่วง 3 เดือนแรกของการอุ้มท้อง (Bungartz *et al.*,1995) และในลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์ที่ไม่ได้กระตุ้นหรือที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปินเพื่อเพิ่มจำนวนและขนาดของฟอลลิเคิล (Armstrong *et al.*,1992; Brogliatti and Adams, 1996) วิธีหลังนี้จะเป็นการช่วยเร่งการพัฒนาทางพันธุกรรมโดยลด generation interval โดยใช้ลูกสัตว์ก่อนวัยเจริญพันธุ์เป็นแหล่งผลิตตัวอ่อนได้ อัตราความสำเร็จในการเก็บด้วยวิธี OPU คำนวณจากจำนวนของโอโอไซต์ที่ยังไม่เจริญเต็มที่และเจริญเต็มที่ที่เก็บได้ในแต่ละครั้ง (recovered oocyte per session) เปรียบเทียบกับจำนวนฟอลลิเคิลที่พบเมื่อเวลาที่ทำการเจาะเก็บ (punctured follicles) จำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้นั้นจะผันแปรในสัตว์แต่ละตัวและในแต่ละครั้งของการเก็บจากสัตว์ตัวเดียวกัน โดยได้เท่ากับ 2-3 โอโอไซต์ต่อตัวต่อครั้ง (Pieterse *et al.*,1988) จนถึง 11 โอโอไซต์ต่อครั้ง (van der Schans *et al.*, 1991)

ในการเก็บโอโอไซต์ในโคที่มีวงจรการเป็นสัดปกติจะคำนึงถึงการพัฒนาของฟอลลิเคิลตลอดวงจร โดยเป็นที่ทราบกันว่าในแต่ละรอบของวงจรการเป็นสัดจะมีประชากรฟอลลิเคิลเจริญขึ้นมาเป็นลักษณะคลื่น (follicular wave) คลื่นแต่ละรอบอาจมี 2 ถึง 4 คลื่น ขึ้นโคแต่ละตัว แต่มากกว่า 80% ของโค มีจำนวนคลื่นอยู่สองคลื่นในแต่ละรอบของวงจรการเป็นสัด โดยสามารถพบคลื่นของฟอลลิเคิลที่เกิดขึ้นเองประมาณทุกๆ 10 วัน (Ginther *et al.*,1989) จึงเป็นข้อมูลเบื้องต้นนี้มาใช้ในการกำหนดความถี่ของการเจาะโอโอไซต์ในแต่ละรอบวงจรการเป็นสัด โดยหากกำหนดความถี่ที่เหมาะสมจะทำให้ได้โอโอไซต์จำนวนมาก โปรแกรมของความถี่ที่ใช้ในการเก็บจะมีทั้งการเก็บสัปดาห์ละครั้งหรือสองครั้งต่อสัปดาห์ โดยมีทั้งการใช้ฮอร์โมนกระตุ้นก่อนการเก็บโอโอไซต์หรือไม่ต้องใช้ฮอร์โมนกระตุ้น (Pieterse *et al.*,1991; Looney *et al.*,1994; Bungartz *et al.*, 1995) ความสำเร็จในการเจาะแบบ OPU ได้มีการรวบรวมในรายงานของ Hashimoto และคณะ (1999) (ตารางที่ 1)

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 ผลของการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี OPU ด้วยหัวโปรปขนาดแตกต่างกัน (Hashimoto *et al.*,1999)

Author	Frequency of the probe	Hormone treatment*	Frequency of aspiration	Oocyte recovery/follicle
Pieterse, 1988	5.0 MHz	PMSG	Irregularly	1.5
Van der Schans, 1991	7.5 MHz	PMSG	Once Twice	10.8 9.4
Kruip, 1991	7.5 MHz	No hormone	Not mentioned	
Meinjtes, 1993	Not mentioned	FSH	Once	0.3-13
Simon, 1993	6.5 MHz	No hormone	48 h 96 h	11.9 8.7
Fry, 1994	6.5 MHz	PMSG or inhibin vaccine	Twice	2.6
Gibbons, 1994	5.0 MHz	No hormone	Once Twice	6.8 6.3
Kruip, 1994	6.5 MHz	No hormone	Twice	8.0-12.9
Looney, 1994	5.0 MHz	FSH No hormone	Once	8.6 6.2
Bols, 1995	7.5 MHz	FSH and LH	Twice	1.8
Bungartz, 1995	6.5 MHz	FSH No hormone	Twice Twice	7.0 5.8
Hasler, 1995	5.0 MHz	No hormone	Once	4.9
Broadbent, 1997	5.0 MHz	No hormone	Once Twice	1.7 1.8

* ฉีดฮอร์โมนก่อนการเก็บ

ในกระบือมีรายงานการทำ OPU ในประเทศอิตาลีโดย Boni (1994) เก็บโอโอไซต์จากรังไข่แม่กระบือที่มีปัญหารังไข่เล็กฝ่อลีบ จากค่าเฉลี่ยประมาณ 4.2 ฟอลลิเคิลต่อตัว เจาะได้ 1.3 โอโอไซต์ และหากให้ฟอลลิเคิล สติมูเลติง ฮอร์โมน (FSH) ก่อนการเจาะ จะเพิ่มจำนวนฟอลลิเคิลเป็น 6.8 ฟอลลิเคิลต่อตัว และได้จำนวนโอโอไซต์เพิ่มเป็น 3.0 โอโอไซต์ต่อตัว อัตราการเก็บอยู่ที่ 32-44% ส่วนในกระบือปลักมีรายงานโดย Kitiyanant และคณะ (1996) ทดลองเก็บในแม่กระบือปลักอายุ 3-5 ปี ทุก 7 วัน ของรอบการเป็นสัด (วันที่ 1-2, 8-9, 15-16) โดยโอโอไซต์ที่ได้นามาทำการปฏิสนธิและได้ตัวอ่อน เอกชาติ พรหมดิเรกและคณะ (2543) ได้รายงานการเก็บในกระบือปลักสาวที่ได้รับการกระตุ้นด้วยแพรกแนนท์ แมร์ ซีรัม โกนาโดโทรปิน (PMSG) ขนาด 3,000 ไอยู พบว่าได้อัตราการเก็บโอโอไซต์ที่ 63% เฉลี่ยต่อตัวเท่ากับ 4.1±2.0 โอโอไซต์ต่อตัว ส่วนในลูกกระบือก่อนวัยเจริญพันธุ์ จากรายงานของ มงคล เตชะกำพุและคณะ (2537) พบว่าการให้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินสามารถกระตุ้นรังไข่ของลูกกระบือปลักได้ และเก็บโอโอไซต์ด้วยการผ่าตัดเปิดช่องท้อง อย่างไรก็ตามวิธีดังกล่าวมีข้อเสียดังกล่าวข้างต้น เพราะไม่สามารถเก็บซ้ำได้หลาย ๆ ครั้ง เกิดการยึดติดของอวัยวะภายใน การทดลองเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี OPU ได้ดำเนินการโดยในลูกโคพื้นเมืองโดยได้โอโอไซต์ เฉลี่ย 9.92±5.2 ใบต่อตัว โดยสามารถทำซ้ำในลูกโค 2-5 ครั้งห่างกัน 7 วัน (ชัยณรงค์ โลหชิตและคณะ, 2539) ล่าสุด มงคล เตชะกำพุและคณะ (2544) ได้รายงานการเก็บโอโอไซต์ซ้ำในลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์ โดยจำนวนการตอบสนองและจำนวนโอโอไซต์ไม่แตกต่างกันในการเก็บทั้งหมด 5 ซ้ำ ห่างกันทุก ๆ 2 สัปดาห์

การเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี OPU ที่จะให้ประสบผลสำเร็จได้นั้นต้องอาศัยปัจจัยอยู่หลายประการที่มีผลต่อการเก็บโอโอไซต์ ทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพของโอโอไซต์ที่ได้ เช่น แรงดูดสูญญากาศ (Looney *et al.*,1994; Bols *et al.*,1996; Fry *et al.*, 1997) การกระตุ้นรังไข่ด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (Bungartz, *et al.*, 1995) สถานภาพทางระบบสืบพันธุ์ (Bungartz *et al.*, 1995) ระยะเวลานานของการเก็บและความถี่ในการเก็บ (Boni, *et al.* 1996 ; Broadbent, *et al.*, 1997) ขนาดและความยาวของเข็มเจาะ (Bols *et al.*, 1996 ; Fry *et al.*, 1997) ความคมของเข็ม ประสบการณ์ของผู้ปฏิบัติ (Brogliatti *et al.*, 1995 ; Meintjes *et al.*, 1995) หรือ/และการบังคับสัตว์ (ชัยณรงค์ โลหชิตและคณะ, 2539) เป็นต้น งานวิจัยถึงปัจจัยต่าง ๆ ดังกล่าวเป็นงานวิจัยในโคทั้งสิ้น ความแรงของการดูดแบบสูญญากาศเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสัมพันธ์กับความสำเร็จและคุณภาพของโอโอไซต์ที่เก็บ งานวิจัยส่วนมากจะศึกษาจากรังไข่ที่ตัดออกมาจากตัวสัตว์และผันแปรความแรงในการเจาะดูดโอโอไซต์ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ระดับของแรงดูดสูญญากาศและขนาดของเข็มที่ใช้ในการเจาะฟอลลิเคิลแบบ OPU (Bols *et al.*, 1996)

Authors	Aspiration vacuum	Needle ϕ
Pieterse (1988)	30-40 ml H_2O/min	0.8-1.0 mm ID
Van der Schans (1991)	40 mmHg	18g
Kanitz (1993)	100-400 mmHg	not mentioned
Moreno (1993)	120 mmHg	18g
Rath (1993)	20-60 mmHg	18-20g
Fry (1994)	50 mmHg	17g
Gibbons (1994)	75 mmHg	17g
Kruip (1994)	40-50 mmHg	0.9 mmID
Looney (1994)	22 ml H_2O/min	17g
Scott (1994)	26 ml H_2O/min	17-18g
Vos (1994)	4.4 ml H_2O/min	0.6 mmID
Bols (1995)	36 ml H_2O/min	19g
Bungartz (1995)	10 ml H_2O/min	18g
Stubbing (1995)	not mentioned	18g

ID, internal diameter in millimiters

จากข้อมูลในตารางที่ 2 พบว่าความแรงของการดูดเจาะฟอลลิเคิลคิดเป็น มิลลิเมตรปรอท (mmHg) ผันแปรในแต่ละงานวิจัย ตั้งแต่ขนาดต่ำ 20-40 mmHg จนถึงขนาดสูง 100-400 mmHg และแตกต่างกันระหว่างขนาดเข็มที่ใช้ (g) หรือความเร็วของการไหลของน้ำเป็น มิลลิลิตรของน้ำต่อนาที (flow rate, ml H_20/min) จาก 10 ml H_20/min ถึง 40 ml H_20/min และทั้งนี้ยังขึ้นกับขนาดของเข็ม (g) ที่ใช้อีกด้วย ความแรงของการดูดนี้จะมีความสัมพันธ์กับอัตราการไหลของของเหลวในท่อ (มิลลิลิตร/นาที) และขนาดของเข็ม โดยแรงดูดสูงจะทำให้อัตราการไหลของของเหลวในท่อสูงกว่าที่ใช้แรงดูดต่ำ และหากเข็มที่มีขนาดใหญ่จะมีอัตราการไหลสูงกว่าเข็มขนาดเล็ก (ตารางที่ 3) (Bols *et al.*, 1996)

ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างแรงดูดสูญญากาศ (mmHg) กับการไหลของของเหลว (ml H_2O/mm) เปรียบเทียบระหว่างเข็มขนาดต่าง ๆ (Bols *et al.*, 1996)

Aspiration pressure (mmHg)	Needle size (g) vs Flow rate (ml H_2O/min)		
	18g	19g	21g
50	21.8	15.4	8.0
70	31.6	21.4	11.0
90	38.8	26.8	13.8
110	46.2	32.0	16.4
130	50.0	37.4	18.8

Looney และคณะ (1994) รายงานว่าความแรงของการดูดควรอยู่ในระดับที่เหมาะสม ประมาณ 75-100 mmHg โดยมีอัตราการไหลของน้ำยาที่เก็บได้ประมาณ 22 มล./นาที ซึ่งใกล้เคียงกับระดับของแรงดูดที่ Gerber และคณะ (2000) ใช้ โดยให้อัตราการเก็บ 51% ในโค และ 45.3% ในกระบือแอฟริกัน Bols และคณะ(1996) ได้ทดลองใช้ความแรงของการดูดที่แตกต่างกัน จาก 50, >70, 90, 110 และ 130 mmHg ในการทดลองเจาะฟอลลิเคิลจากรังไข่ของโคจากโรงฆ่าสัตว์โดยใช้เข็มเจาะขนาด 18g, 19g และ 21g พบว่าเมื่อความแรงของแรงดูดสูงขึ้นจะได้จำนวนของโอโอไซต์เพิ่มขึ้นไม่ว่าจะใช้เข็มขนาดใด แต่เมื่อเพิ่มแรงดูดขึ้นจะทำให้สัดส่วนของโอโอไซต์คุณภาพดีที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มหลายชั้น (cumulus oocyte complexes) ลดลง นอกจากนั้นความสามารถของโอโอไซต์ในการพัฒนาถึงระยะบลาสโตซีสยังลดลง เมื่อเพิ่มแรงดูดโดยเฉพาะแรงดูดในช่วง 70-130 mmHg ซึ่งขัดแย้งกับการทดลองของ Looney และคณะ(1994) รายงานว่าเมื่อเพิ่มแรงดูดมากเกินไปจะเป็นสาเหตุเกิดความผิดปกติของรูปร่างลักษณะของโอโอไซต์ได้ ในปี 1997 Fry และคณะ ได้ทำการศึกษาผลของระดับแรงดูดที่ต่างกัน ตั้งแต่ 25, 50, 75 และ 100 mmHg ในการทดลองเจาะฟอลลิเคิลจากรังไข่ของโคจากโรงฆ่าสัตว์ พบว่าอัตราการเก็บโอโอไซต์จะเพิ่มขึ้นจาก 46% เป็น 51, 53 และ 59% เมื่อความแรงในการดูดเพิ่มขึ้น แต่ในทางตรงกันข้ามหากเพิ่มความแรงจาก 50 mmHg เป็น 100 mmHg จะมีผลต่อคุณภาพของโอโอไซต์เกรด เอ (มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มหลายชั้น) และโอโอไซต์ปกติที่เหมาะจะนำไปทำการปฏิสนธินอกร่างกาย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bols และคณะ(1996) โดยโอโอไซต์เกรดที่ดีจะลดลงจาก 18% เป็น 11, 6 และ 5% เท่านั้น เมื่อเพิ่มความแรงจาก 25 mmHg เป็น 50, 75 และ 100 mmHg ตามลำดับ เปอร์เซนต์ของโอโอไซต์ปกติในแต่ละกลุ่มมีค่าใกล้เคียงกันระหว่างความแรง 25, 50 และ 75 mmHg คือ 39, 45 และ 39% แต่จะลดเหลือเพียง 31% ในความแรง 100 mmHg ดังนั้นจากการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นพบว่าหากความแรงในการดูดหรืออัตราไหล

เร็วเกินไปจะมีผลต่อคุณภาพของโอโอไซต์ โดยจะพบโอโอไซต์ที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้ม (denude oocyte) เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากแรงดูดที่มากเกินไปจะทำให้เซลล์คิวมูลัสหลุดออก ซึ่งโอโอไซต์ชนิดนี้เป็นโอโอไซต์ที่ให้อัตราการปฏิสนธิต่ำและยังส่งผลให้ได้ตัวอ่อนจำนวนน้อยจากการปฏิสนธิ

จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้ต้องการหาแรงดูดสูญญากาศที่เหมาะสมที่จะใช้ในกระบือด้วยวิธีเข็มดูดเจาะต่อกับเครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูงที่ให้อัตราการเก็บและคุณภาพของโอโอไซต์สูงสุด และเพื่อศึกษาชนิดของโอโอไซต์ที่เก็บได้ในกระบือปลัก รวมทั้งเพื่อศึกษาระยะความพร้อมในการปฏิสนธิของโอโอไซต์ที่เก็บได้ เหมาะที่จะนำไปปฏิสนธินอกร่างกายต่อไป โดยทำการศึกษาในกระบือปลักเพศเมียหลังวัยเจริญพันธุ์และลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์

วิธีการวิจัย

กระบือทดลอง

แบ่งงานวิจัยเป็น 2 การทดลอง

<u>การทดลองที่ 1</u> ทดลองในกระบือปลักสาวที่โตเต็มที่หลังวัยเจริญพันธุ์ที่ไม่เคยได้รับการผสมพันธุ์มาก่อน อายุประมาณ 3 ปี น้ำหนักประมาณ 250 กิโลกรัม จำนวน 6 ตัว ที่เลี้ยงไว้ที่ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาฯ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดนครปฐม กระบือดังกล่าวได้นำเข้ามาที่ภาคนานกว่า 1 ปี เลี้ยงในคอก ๆ ละ 2 ตัว ให้น้ำหญ้าสดและอาหารหยาบอย่างเต็มที่

การแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

กลุ่มที่ 1 ใช้แรงดูดสูญญากาศในการดูดขนาด 100 mmHg (n =12)

กลุ่มที่ 2 ใช้แรงดูดสูญญากาศในการดูดขนาด 80 mmHg (n =12)

กลุ่มที่ 3 ใช้แรงดูดสูญญากาศในการดูดขนาด 60 mmHg (n =12)

(n = จำนวนครั้งของการเก็บ, OPU session)

แต่ละกลุ่มการทดลองจะเป็นกระบือชุดเดียวกันที่มีจำนวนสัตว์ทดลองกลุ่มละ 6 ตัว โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 รอบ รอบที่หนึ่งเริ่มการทดลองจากกลุ่มที่ 1 ไปกลุ่มที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ห่างกัน 1 สัปดาห์ แต่ละรอบใช้แรงดูดทั้ง 3 ระดับ โดยการจับสลากแบ่งกลุ่ม หลังจากนั้นทำซ้ำอีกหนึ่งรอบ โดยพักกระบือประมาณ 2.0 เดือน รอบที่สองจะเริ่มเช่นเดียวกับรอบแรกโดยเริ่มจากกลุ่มที่ 1 ไปกลุ่มที่ 2 และ 3 ตามลำดับ รวมแต่ละกลุ่มจะมีจำนวนการเก็บ 12 ครั้ง (6 ตัวx2 ครั้ง) การออกแบบการทดลองนี้อาศัยงานวิจัยในลูกกระบือปลักที่พบว่าการกระตุ้นและการเก็บซ้ำจะไม่มีผลเปลี่ยนแปลงต่อการตอบสนองของรังไข่และชนิดของโอโอไซต์ที่ได้ (มงคล เตชะกำพุ และคณะ, 2544)

<u>การทดลองที่ 2</u> ทดลองในลูกกระบือปลักเพศเมียก่อนวัยเจริญพันธุ์ อายุประมาณ 1.5 ปี ที่ทำการคัดเลือกด้วยการล้วงตรวจความปกติของอวัยวะสืบพันธุ์ น้ำหนักสัมพันธ์กับอายุ และสุขภาพ จากสถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ อำเภอลำพญากลาง จังหวัดนครราชสีมา ก่อนเริ่มการทดลองประมาณ 1 เดือน จำนวน 12 ตัว โดยเลี้ยงปล่อยในคอกรวมกัน โดยที่ให้อาหารข้น อาหารหยาบ และน้ำเต็มที่ และปล่อยทุ่งหญ้าระหว่าง 9.00-15.00 น. (รูปที่ 2)

แบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 3 กลุ่ม

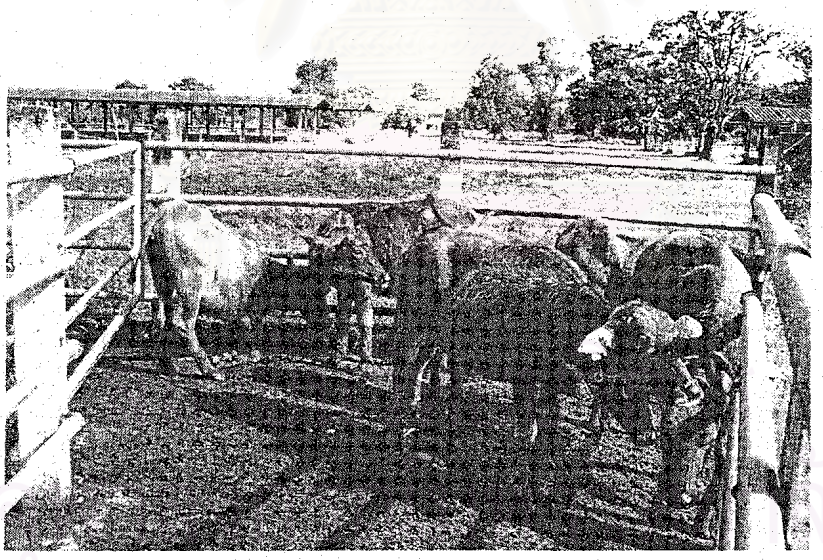
กลุ่มที่ 1 ใช้แรงดูดสูญญากาศในการดูดขนาด 100 mmHg (n =8)

กลุ่มที่ 2 ใช้แรงดูดสูญญากาศในการดูดขนาด 80 mmHg (n =8)

กลุ่มที่ 3 ใช้แรงดูดสูญญากาศในการดูดขนาด 60 mmHg (n =8)

(n = จำนวนครั้งของการเก็บ, OPU session)

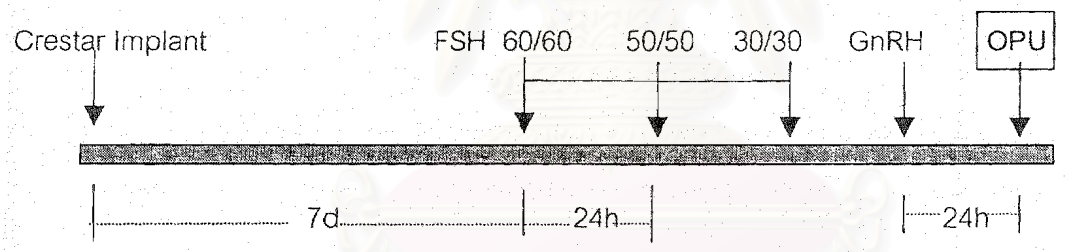
ทำการจับสลากแบ่งกลุ่มลูกกระบือเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 4 ตัว โดยแต่ละตัวจะได้รับการกำหนดความแรงในการดูดก่อนทำการเจาะ ลูกกระบือแต่ละตัวจะได้รับการเจาะทั้งหมด 2 ครั้ง ห่างกัน 60 วัน งานวิจัยในส่วนนี้ได้ทำที่สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ ลำพญากลาง



รูปที่ 2 ลูกกระบือก่อนวัยเจริญพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองเก็บด้วยวิธี OPU ที่สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ อำเภอลำพญากลาง จังหวัดนครราชสีมา

การกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิล

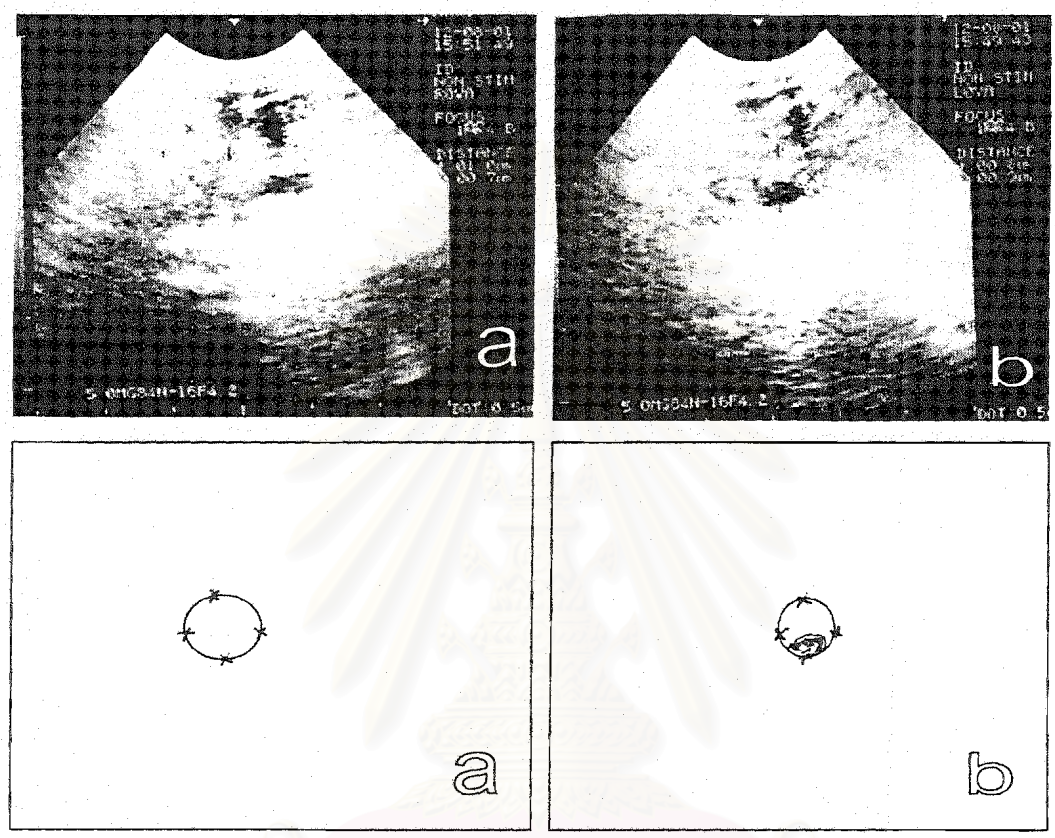
ทำการฝังฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ชนิดฝังใบหู (Crestar® Ear Implant, Intervet, Netherlands) นาน 7 วัน ก่อนเริ่มต้นโปรแกรมการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนฟอลลิเคิล สติมูเลติง ฮอร์โมน (FSH, Follicle Stimulating Hormone, Folltropin®, Vetaphaarm, Australia) ทำการเปลี่ยนฮอร์โมนฝังหูใหม่ทุกเดือน สำหรับกระบือปลักสาวในการทดลองที่ 1 ทำการกระตุ้นรังไข่ด้วยฮอร์โมน FSH ขนาด 280 มก. แบบลดขนาด (60/60, 50/50, 30/30) ฉีดเข้ากล้าม แบ่งฉีดวันละ 2 ครั้ง (เช้าและเย็น) และสำหรับลูกกระบือในการทดลองที่ 2 ให้ฮอร์โมนขนาด 180 มก. (40/40, 30/30, 20/20) โดยเริ่มหลังฝังฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนไปแล้ว 7 วัน หลังจากการฉีดฮอร์โมน FSH ครั้งสุดท้ายไปแล้ว 24 ชั่วโมง ทำการฉีดโกนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน (GnRH, Cystolerin®, Sanofi, France) ขนาด 100 μg/ ตัว เข้ากล้ามเนื้อ ก่อนการเก็บโอโอไซต์ โปรแกรมการกระตุ้นแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 โปรแกรมการกระตุ้นรังไข่ในกระบือปลักสาวเพื่อเก็บโอโอไซต์ (ดัดแปลงจาก Techakumphu *et al.*, 2000a,b)

การตรวจการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้น

ตรวจสอบรังไข่ก่อนการกระตุ้น (รูปที่ 4) และผลการตอบสนองของรังไข่ในวันที่ทำการเก็บโอโอไซต์ โดยการใช้อัลตราซาวน์ชนิดเรียลไทม์ บี-โมด และโปรปชนิดสอดผ่านทางช่องคลอด ความถี่ 5 MHz บันทึกจำนวนฟอลลิเคิลขนาดต่าง ๆ คือ 2-<4, 4-<6, 6-<8, 8-<10 และ >10 มม. ของรังไข่ซ้ายและรังไข่ขวา



รูปที่ 4 ภาพของรังไข่ข้างซ้าย (a) และข้างขวา (b) ก่อนการกระตุ้นตรวจด้วยเครื่องอัลตราซาวน์ (X- - - - X) แสดงขอบเขตของรังไข่

การเตรียมตัวสัตว์ก่อนเก็บโอโอไซต์จากรังไข่

อดน้ำและอาหารกระบือ ก่อนทำการเก็บโอโอไซต์ประมาณ 24 ชม. นำกระบือเข้าซองบังคับ ก่อนเริ่มการเก็บควบคุมสัตว์ด้วยการใช้ยากล่อมประสาท เช่น Xylazine HCl (Rompun®, Korea) 5 มก. ต่อน้ำหนัก 100 กก. เข้ากล้ามเนื้อ ร่วมกับการให้ยาชาเข้าไขสันหลัง โดยฉีดยาชา 2% Xylocaine HCl จำนวน 1 มล. เพื่อลดการเคลื่อนไหวส่วนปั้นท้าย และความเจ็บปวดจากการเจาะรังไข่ ทำความสะอาดบริเวณปั้นท้ายและปากช่องคลอดด้วยยาฆ่าเชื้อแล้วเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ ใช้มือหนึ่งสอดเข้าทางทวารหนัก ทำการล้วงเอาอุจจาระออกจากทวารก่อนการเจาะ ภาพของการควบคุมและการเจาะฟอลลิเคิลแสดงในรูปที่ 5 และ 6

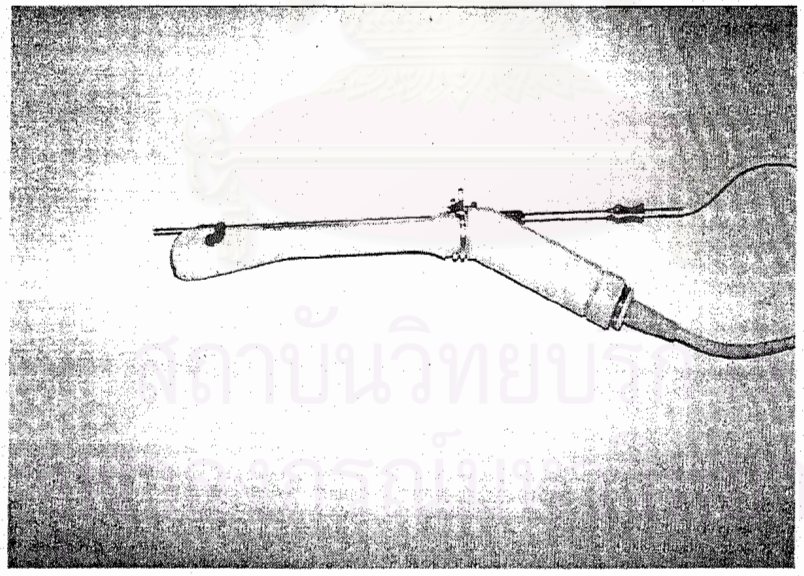
รูปที่ 5 ภาพการบังคับสัตว์ในซองควบคุม ในขณะทำการเจาะแบบ OPU ในท่ายืน ที่ศูนย์ฝึกนิสิตสัตวแพทย์ จังหวัดนครปฐม

รูปที่ 6 ภาพการบังคับสัตว์ในซองควบคุม ลูกกระบือจะถูกหนีบที่คอ และมีเชือกคล้องบริเวณเอว เพื่อกันการนั่งลงในขณะทำการเจาะแบบ OPU ที่สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ ลำพญากลาง จังหวัดนครราชสีมา a) การให้ยา Xylacine HCl เข้ากล้ามเนื้อสะโพก b) การทำงานขณะเจาะโดยผู้ปฏิบัติต้องอยู่ในท่ายืน

การเจาะเก็บโอโอไซต์จากรังไข่

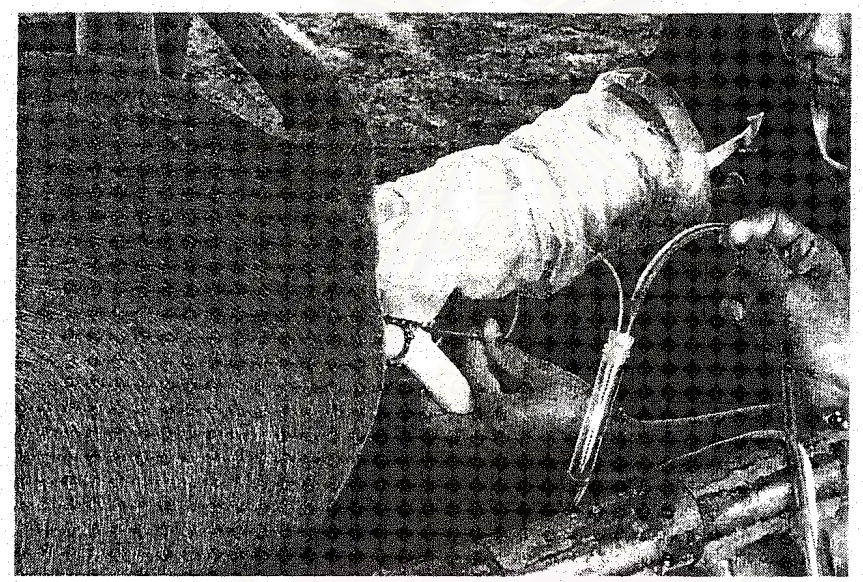
ขั้นตอนของการเจาะดำเนินตามที่ มงคล เตชะกำพุและคณะ (2544) ได้เคยรายงานไว้ มีขั้นตอนโดยย่อ ๆ ดังนี้

1. ทำการเจาะโอโอไซต์ในท่ายืน (standing position) โดยสอด transvaginal probe ความถี่ 5.0 MHz (รูปที่ 7) ที่ทาปลายด้วย acoustic gel ที่สวมหุ้มโปรปด้วยถุงยางปลอดเชื้อ ดันปลายโปรปที่มีท่อโลหะนำเข็มเข้าด้านหน้าและด้านบนของช่องคลอด และดันปลายโปรปให้สุดจนถึงคอมดลูก จากนั้นใช้มืออีกมือหนึ่งล้วงผ่านทางทวารหนัก
2. หารังไข่แล้วดึงมาให้อยู่ในแนวหน้าตัดของโปรป ตรวจรังไข่บนจอรับภาพโดยใช้ปลายของตัวโปรปเคลื่อนลงในแนวต่าง ๆ ทั้งรอบแกนในแนวตั้ง แนวด้านหน้า แนวด้านหลังและแนวนอน
3. ติดตัวโปรปด้วยเข็มเจาะโอโอไซต์ 17 ยาว 34.5 ซม. แทงเข็มทะลุมุมบนของช่องคลอด ควบคุมการเจาะผ่านจอภาพของเครื่องอัลตราซาวน์ (รูปที่ 7)
4. ดันเข็มทะลุฟอลลิเคิลอย่างช้า ๆ ขณะดูดต้องกดทำ negative pressure อยู่ตลอดเวลา ด้วยการควบคุมแรงดูดด้วยการกดที่ปลายเท้า (foot pedal pump)



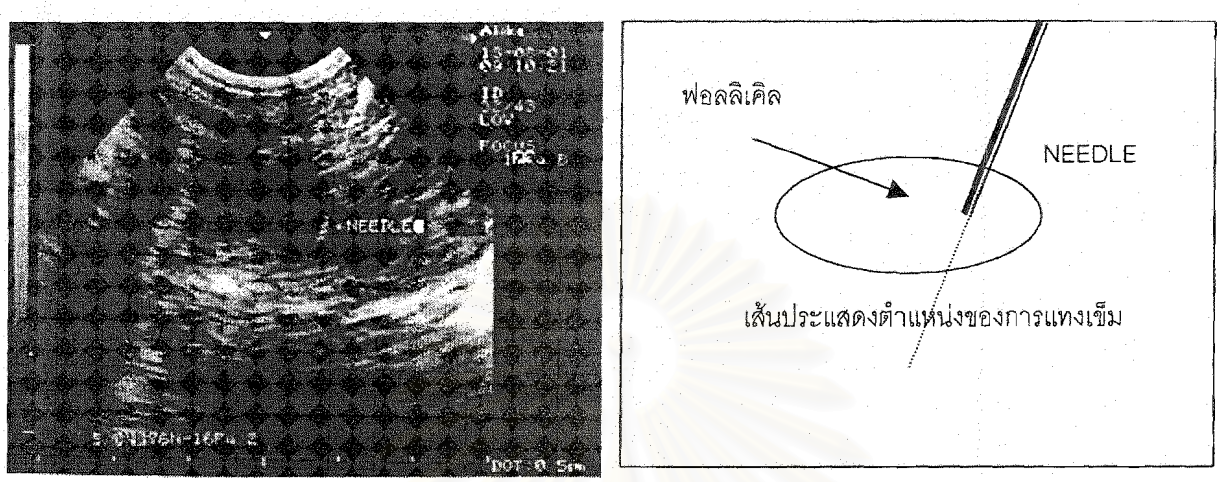
รูปที่ 7 transvaginal probe ความถี่ 5.0 MHz พร้อมเข็มเจาะโอโอไซต์

5. ดูดโอโอไซต์พร้อมของเหลวในฟอลลิเคิลด้วยความแรง 60 หรือ 80 หรือ 100 mmHg แล้วแต่กลุ่มการทดลอง กด foot pedal pump เพื่อให้ดูดของเหลวเข้ามาอย่างต่อเนื่องลงในหลอดพลาสติกปลอดเชื้อที่มีน้ำยาพีบีเอส จำนวน 1 มล. บรรจุอยู่ ทำการดูดทีละฟอลลิเคิล โดยใช้มือที่ล้วงในทวารหนัก จับรังไข่พลิกไปมาให้ฟอลลิเคิลที่จะเจาะอยู่ในแนวปลายเข็ม (รูปที่ 8) เจาะฟอลลิเคิลขนาด 2 มม. ขึ้นไปให้ครบทุกฟอลลิเคิลที่สังเกตเห็น โดยควบคุมผ่านหน้าจอมอนิเตอร์ (รูปที่ 9) ทำการเจาะฟอลลิเคิลในรังไข่อีกข้างด้วยวิธีเดียว



รูปที่ 8 ภาพของการเจาะฟอลลิเคิลด้วยวิธี OPU โดยสอด transvaginal probe เข้าทางช่องคลอด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 9 ภาพจากหน้าจอมอนิเตอร์แสดงตำแหน่งของเข็ม (needle) เข้าไปในฟอลลิเคิล

หลังจากทำการดูดเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ทั้งสองข้างแล้ว ฉีดยาปฏิชีวนะชนิดเพนนิซิลลินและสเตรปโตมัยซิน 100,000 ไอยู เข้ากล้ามเนื้อ เพื่อป้องกันการติดเชื้อ หลังจากนั้นพักกระบือเป็นเวลา 7 วันสำหรับการทดลองที่หนึ่งและประมาณ 60 วันสำหรับการทดลองที่สอง แล้วจึงเริ่มทำการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลและเก็บโอโอไซต์ซ้ำ สำหรับการทดลองที่หนึ่งกระบือแต่ละตัวทำการเก็บโอโอไซต์ซ้ำจำนวน 6 ครั้ง (สองรอบของการทดลอง) แต่ละครั้งใช้แรงดูดต่างกัน เมื่อครบแรงดูดทั้งสามกลุ่ม จึงทำซ้ำอีกรอบหนึ่งห่างกัน 60 วัน ส่วนการทดลองที่สอง ลูกกระบือแต่ละตัวจะได้รับการเจาะ 2 ครั้ง แต่ละครั้งทำการจับสลากในระดับความแรงของการดูดต่างกันในทั้งสามระดับ ไดอะแกรมของระบบการเจาะด้วยวิธี OPU แสดงในรูปที่ 10

การตรวจหาและจำแนกชนิดของโอโอไซต์

นำของเหลวที่เจาะได้เทใส่ในกรวยกรองโอโอไซต์ขนาด 45 ไมครอน (Em Con, Immuno Systems, Inc, Spring Valley, WI, USA) ชะล้างด้วยน้ำเกลือ 0.9% เทลงตามเพื่อล้างเม็ดเลือดที่ติดมา โดยให้ของเหลวไหลผ่านช้า ๆ ทำเช่นนี้หลาย ๆ ครั้ง เหลือน้ำยาไว้ประมาณ 50 มล. เทใส่เพลทพลาสติกขนาด 100x20 มม. แล้วตรวจหาภายใต้กล้องสเตอริโอ กำลังขยาย 40 เท่า เก็บโอโอไซต์ไว้ในน้ำยา TCM 199 2.5 mMHepes ในหลอดพลาสติกขนาด 10x35 มม. และจัดชนิดของโอโอไซต์เป็น 5 ลักษณะ คือ

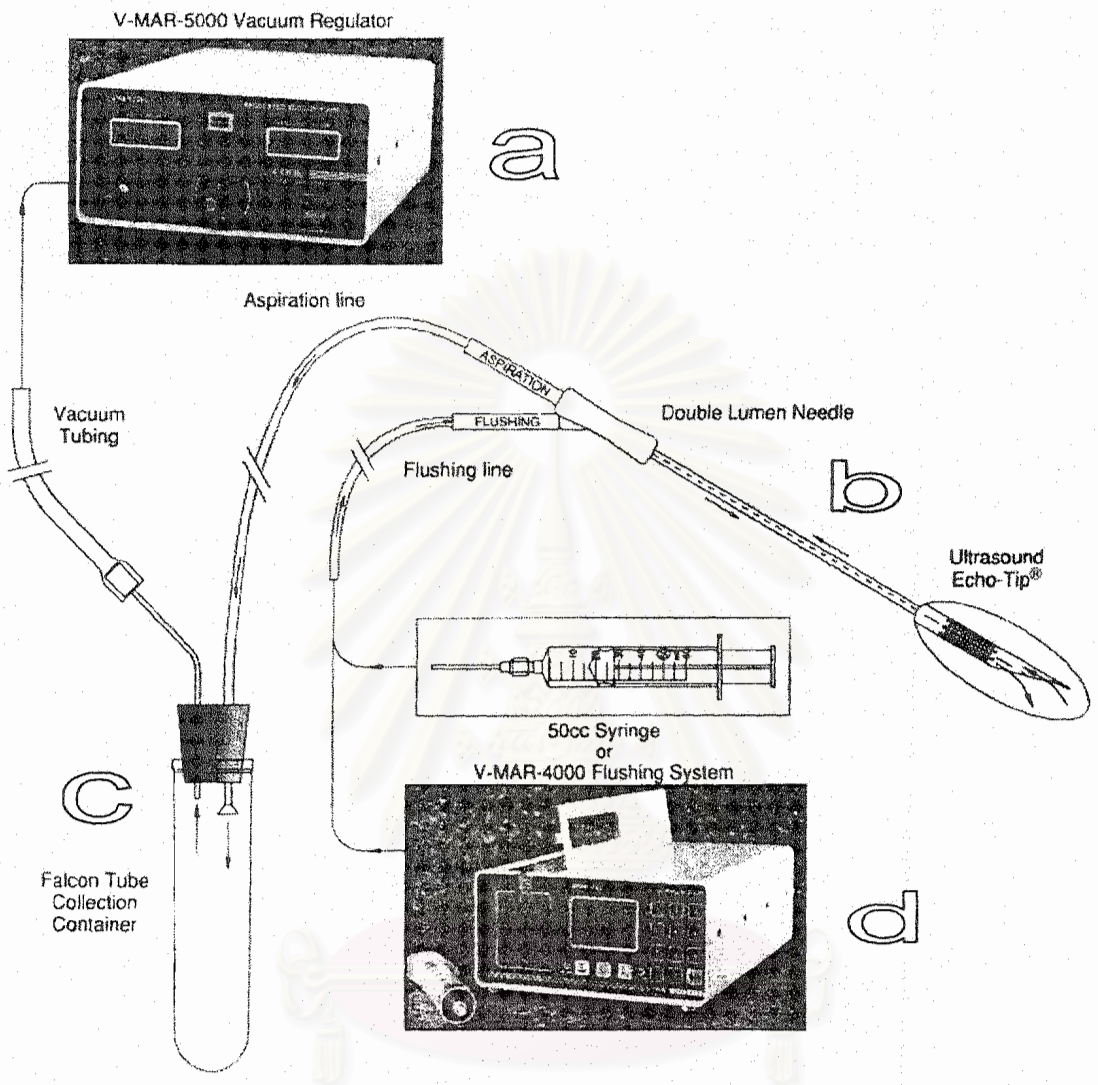
1. โอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสหลายชั้น (Cumulus oocyte complexes, COC)
2. โอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัส 1-3 ชั้น (Single or Partial oocyte cumulus, S+P)
3. โอโอไซต์ที่ไม่มีมีเซลล์คิวมูลัสหุ้ม (Denude oocyte, D)
4. โอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสแผ่ (Expanded cumulus oocyte, EXP)
5. โอโอไซต์ที่ไซโทพลาสซึมเสื่อมสลาย (Degenerate oocyte, DEG) และโอโอไซต์ที่ไม่มีไซโทพลาสซึม (Free-zona oocyte, FZ)

เฉพาะโอโอไซต์ชนิดที่ 1, 2 และ 4 จัดเป็นโอโอไซต์ที่ดี เหมาะนำไปปฏิสนธินอกร่างกาย โอโอไซต์ชนิดที่เหลือจัดเป็นชนิดที่ไม่เหมาะสำหรับการนำไปปฏิสนธินอกร่างกาย (มงคล เตชะกำพุ และคณะ, 2539)

การตรวจสอบลักษณะโครโมโซมของโอโอไซต์

นำโอโอไซต์มาล้างในน้ำยา phosphate buffer saline +10% fetal calf serum 2 ครั้ง แล้วนำไปย้อมสีดูลักษณะและระยะของโครโมโซมด้วยวิธี rapid staining จากนั้นนำไปส่องเพื่อตรวจระยะการเจริญของโอโอไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง ทำการถ่ายภาพเก็บบันทึกไว้ วิธีการตรวจสอบระยะการแบ่งตัวของโอโอไซต์ใช้วิธีตามที่ มาลี อภิเมธีธำรงและคณะ (2542) ได้เคยรายงานไว้ โดยมีรายละเอียดดังนี้

1. นำโอโอไซต์ที่เก็บรักษาไว้ในน้ำยา TCM199 HEPES ใส่ลงในสารละลาย 1% sodium citrate ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในจานหลุมแก้วทิ้งไว้ 15 นาที
2. ทำการเตรียมน้ำยา fixative ประกอบด้วย glacial acetic acid: absolute alcohol ในอัตราส่วน 1:3 แบ่งใส่จานเพาะเชื้อชนิด 4 หลุม ปิดฝากันระเหยและเตรียมน้ำยา destaining ประกอบด้วย glacial acetic acid:น้ำกลั่น:glycerol ในอัตราส่วน 1:3:1 ใส่หลอดพักไว้
3. เมื่อใส่โอโอไซต์ในสารละลาย 1% sodium citrate ครบ 15 นาที ใช้ปิเปตสำหรับดูดโอโอไซต์เข้าและออกหลายครั้ง เพื่อกำจัดเซลล์คิวมูลัสที่อยู่รอบเปลือกโอโอไซต์ออกให้หมด จากนั้นเคลื่อนย้ายโอโอไซต์ไปใส่ในน้ำยา Fixative นานอย่างน้อย 10 นาที เพื่อให้เม็ดไขมันที่มีอยู่ในไซโทพลาซึมของโอโอไซต์สลายไป การเก็บโอโอไซต์ในน้ำยา Fixative เก็บไว้นานประมาณ 1 สัปดาห์ โดยใช้เทปปิดรอยต่อระหว่างฝาและตัวจานหลุม เพื่อป้องกันการระเหยของน้ำยา และเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่ 4°ซ จนกว่าจะนำมาย้อมสี



รูปที่ 10 ระบบการเก็บโอโอไซต์แบบ Ovum Pick Up (COOK, Australia)

a) ระบบการควบคุมระดับแรงดูดสูญญากาศ (mmHg)

b) เข็มดูดเจาะ ในการทดลองใช้แบบ single lumen

c) หลอดเก็บของเหลวที่ดูดเจาะต่อกับระบบ a และเข็ม b

d) ระบบล้างฟอลลิเคิล กรณีใช้ double lumen

4. เตรียมแผ่นสไลด์ และ coverslip โดยใช้กระดาษชำระเช็ดให้สะอาด ใช้วาสลินแต้มเป็นจุดเล็ก ๆ 4 จุดบนแผ่นสไลด์โดยประมาณให้มีความกว้างและความยาวพอดีกับขอบของ coverslip
5. ทำการย้ายโอโอไซต์จากน้ำยา Fixative ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ และวางบนสไลด์พร้อมกับหยดน้ำยา fixative 2-3 หยด ปิด coverslip โดยกดเบา ๆ ให้แผ่นสไลด์แนบกับโอโอไซต์ ไล่สีย้อมผ่านเข้าไประหว่างแผ่นสไลด์กับ coverslip ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที
6. ใช้ micropipette ดูดน้ำยา Destaining และหยดไว้ที่ขอบ coverslip ใช้น้ำยาทาเล็บทารอบ ๆ ขอบของ coverslip เพื่อป้องกันการระเหยของของเหลวภายใน
7. นำแผ่นสไลด์ไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างเพื่อดูลักษณะของโครโมโซมของโอโอไซต์ และจำแนกตามลักษณะโครโมโซมที่พบ โดยแบ่งเป็นระยะ GV, GVBD, Prophase (P I) , Metaphase I (M I) , Anaphase I (A I) and Metaphase II (M II) (นวเพ็ญ ภูติกนิษฐ์ และคณะ, 2544)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ประเมินการตอบสนองของกระบือจากการตรวจรังไข่ที่มีฟอลลิเคิลมากกว่า 2 ฟอลลิเคิล นับจำนวนฟอลลิเคิลที่ปรากฏอยู่บนจอมอนิเตอร์ และจำนวนฟอลลิเคิลที่ทำการเจาะ จำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้ในแต่ละตัว นำมาหาค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($\bar{X}\pm SD$) และทำการจำแนกออกเป็นชนิดต่าง ๆ ตามการจำแนกข้างต้น คิดอัตราการเจาะฟอลลิเคิลเป็นเปอร์เซนต์จากฐานของจำนวนฟอลลิเคิลทั้งหมดที่สังเกตเห็น และอัตราการเก็บโอโอไซต์เป็นเปอร์เซนต์จากฐานของจำนวนฟอลลิเคิลที่ทำการเจาะทั้งหมดในแต่ละกลุ่มทดลอง เปรียบเทียบผลในแต่ละกลุ่มจำนวนและคุณภาพของโอโอไซต์ที่เก็บได้ โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี chi square analysis และคำนวณเปอร์เซนต์จากระยะของโครโมโซมในโอโอไซต์จากจำนวนทั้งหมด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการวิจัย

การทดลองที่ 1

จากการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลด้วยฮอร์โมน FSH ในรังไข่กระบือปลักสาว จำนวน 6 ตัว โดยกระตุ้นทั้งหมด 36 ครั้ง พบว่ากระบือปลักสาวมีการตอบสนองของรังไข่ทุกครั้ง จึงทำการเก็บโอโอไซต์ทุกครั้ง จำนวนฟอลลิเคิลที่เจริญขึ้นที่ตรวจพบในรังไข่เฉลี่ยทั้งสามกลุ่มเท่ากับ 7.42±3.65 (n=264) ฟอลลิเคิลต่อตัว โดยในกลุ่ม 100 mmHg มีจำนวนฟอลลิเคิลเฉลี่ยเท่ากับ 7.42±4.21 (n=89) ฟอลลิเคิลต่อตัว กลุ่ม 80 mmHg มีค่าเท่ากับ 5.83±2.08 (n=70) ฟอลลิเคิลต่อตัว และกลุ่ม 60 mmHg มีค่าเท่ากับ 9.0±3.86 (n=108) ฟอลลิเคิลต่อตัว ทำการเจาะฟอลลิเคิลเฉลี่ยเท่ากับ 7.08±2.81 (n=255) ฟอลลิเคิลต่อตัว คิดเป็น 96.6% (255/264) โดยแต่ละกลุ่มเท่ากับ 7.08±4.18 (n=85), 5.58±2.19 (n=67) และ 8.58±4.33 (n=103) ฟอลลิเคิลต่อตัว ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ผลการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นและผลการเก็บโอโอไซต์ด้วยระดับแรงดูดสูญญากาศ 100, 80 และ 60 mmHg ในกระบือปลักสาว

ระดับแรงดูดสูญญากาศ (mmHg)	จำนวนกระบือ	จำนวนครั้งของการเจาะ	จำนวนฟอลลิเคิลเฉลี่ยต่อตัว	จำนวนฟอลลิเคิลที่เจาะต่อตัว	จำนวนโอโอไซต์ที่เจาะได้ต่อตัว	อัตราการเก็บโอโอไซต์ (%)
100 mmHg	6	12	7.42±4.21 (n=89)	7.08±4.18 (n=85)	5.33±3.27 (n=69)	81.2[a] (69/85)
80 mmHg	6	12	5.83±2.08 (n=70)	5.58±2.19 (n=67)	4.42±2.71 (n=53)	79.10[a] (53/67)
60 mmHg	6	12	9.0±3.86 (n=108)	8.58±4.33 (n=103)	7.75±4.31 (n=93)	90.1[b] (93/103)
X±SD รวม		36	7.42±3.65 (264)	7.08±2.81 (255) [96.6%]	5.97±3.95 (215)	84.3 (215/255)

แสดงค่าเป็น $\bar{X}$+SD, n= จำนวน a, b ; $P<0.05$

[ ] อัตราการเจาะ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากตารางที่ 5 เป็นข้อมูลการกระตุ้นในครั้งที่ 1 และ 2 ในแต่ละกลุ่มแรงดูดการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นในแต่ละกลุ่ม โดยในกลุ่ม 100 mmHg ครั้งที่ 1 เท่ากับ 9.5±4.68 (n=57) และครั้งที่ 2 เท่ากับ 5.33±2.58 (n=32) ในกลุ่ม 80 mmHg ครั้งที่ 1 เท่ากับ 6.67±1.87 (n=40) และครั้งที่ 2 เท่ากับ 5.0±2.09 (n=30) ในกลุ่ม 60 mmHg ครั้งที่ 1 เท่ากับ 7.33±3.14 (n=44) และครั้งที่ 2 เท่ากับ 10.7±4.03 (n=64)

จำนวนฟอลลิเคิลที่ถูกเจาะในแต่ละกลุ่ม กลุ่ม 100 mmHg ครั้งที่ 1 เท่ากับ 9.33±4.72 (n=56) และครั้งที่ 2 เท่ากับ 4.83±2.04 (n=29) กลุ่ม 80 mmHg ครั้งที่ 1 เท่ากับ 6.50±2.07 (n=39) และครั้งที่ 2 เท่ากับ 4.67±2.07 (n=28) และกลุ่ม 60 mmHg ครั้งที่ 1 เท่ากับ 6.50±3.83 (n=39) และครั้งที่ 2 เท่ากับ 10.7±4.03 (n=64) ตามลำดับ ทั้งการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นและจำนวนฟอลลิเคิลที่เจาะของรังไข่ด้านซ้ายและด้านขวาไม่แตกต่างกัน

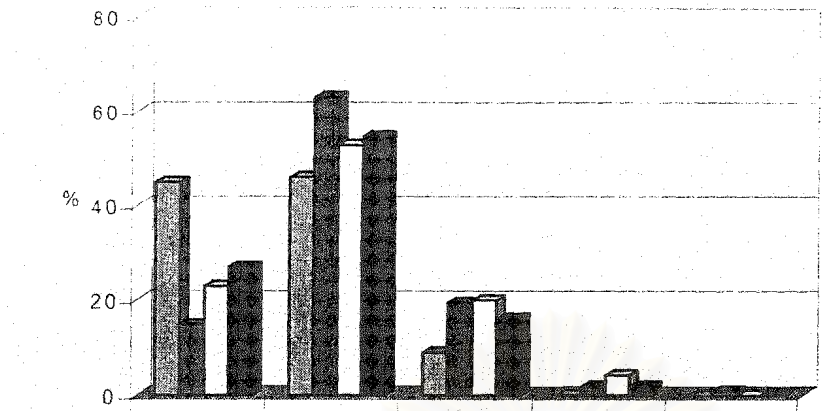
เมื่อตรวจดูฟอลลิเคิลที่ตอบสนองพบว่าส่วนมากจะอยู่ในขนาด 2 ถึง <4 มม. และ 4 ถึง <6 มม. เท่ากับ 27 และ 54.7% ฟอลลิเคิลขนาด 6 ถึง <8 มม. เท่ากับ 16.1% ส่วนฟอลลิเคิลขนาด 8 ถึง 10 มม. หรือ >10 มม. มีจำนวนน้อยมาก 1.9 และ 0.3% ตามลำดับ (รูปที่ 11) ภาพของฟอลลิเคิลที่ตอบสนองจะเห็นกระจายทั่วรังไข่สะท้อนภาพเป็นสีดำ (anechoic) ของของเหลวภายในฟอลลิเคิล (follicular fluid) แต่ไม่เห็นภาพของโอโอไซต์ การตอบสนองจะมีจำนวนแต่ละตัวและแต่ละครั้งที่แตกต่างกันออกไป ดังแสดงในรูปที่ 12, 13 และ 14

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ผลเปรียบเทียบการตอบสนองและการเก็บโอโอไซต์จากการกระตุ้นครั้งที่ 1 และ 2 ด้วยระดับแรงดูดสูญญากาศขนาด 100, 80 และ 60 mmHg ในกระบือปลักสาว

ระดับแรงดูดสูญญากาศ	ครั้งของการกระตุ้น	จำนวนกระบือ	จำนวนฟอลลิเคิล			จำนวนฟอลลิเคิลที่เจาะ			จำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้			อัตราการเก็บโอโอไซต์(%)*		
			ซ้าย	ขวา	ทั้งหมด	ซ้าย	ขวา	ทั้งหมด	ซ้าย	ขวา	ทั้งหมด	ซ้าย	ขวา	ทั้งหมด
100mmHg	1st	6	5.0±3.63 (30)	4.50±1.76 (27)	9.5±4.68 (57)	4.83±3.76 (29)	4.5±1.76 (27)	9.33±4.72 (56)	4.33±3.83 (26)	3.83±3.82 (23)	8.17±4.62 (49)	89.7	85.2	87.5
	2nd	6	2.67±1.63 (16)	2.67±1.37 (16)	5.33±2.58 (32)	2.5±1.52 (15)	2.33±1.03 (14)	4.83±2.04 (29)	1.5±1.38 (9)	1.83±1.47 (11)	3.33±1.86 (20)	60	78.6	69
	$\bar{X}$±SD รวม	12	3.83±2.95 (46)	3.58±1.78 (43)	7.42±4.21 (89)	3.67±2.99 (44)	3.42±1.78 (41)	7.08±4.18 (85)	2.92±3.11 (35)	2.83±1.94 (34)	5.33±3.27 (69)	79.5	82.9	81.2
80mmHg	1st	6	3.67±1.86 (22)	3.0±1.79 (18)	6.67±1.87 (40)	3.67±1.87 (22)	2.83±1.83 (17)	6.50±2.07 (39)	3.33±2.07 (20)	2.0±2.52 (12)	5.33±3.27 (32)	90.9	70.6	82.1
	2nd	6	2.17±1.17 (13)	2.83±1.33 (17)	5.0+2.09 (30)	2.0±0.89 (12)	2.67±1.37 (16)	4.67±2.07 (28)	1.33±1.21 (8)	2.17±0.98 (13)	3.50±1.87 (21)	66.7	81.3	75
	$\bar{X}$+SD รวม	12	2.92+1.67 (35)	2.92+1.51 (35)	5.83+2.08 (70)	2.83+1.64 (34)	2.75+1.54 (33)	5.58±2.19 (67)	2.33±1.92 (28)	2.08±1.83 (25)	4.42±2.71 (53)	82.3	75.8	79.1
60mmHg	1st	6	4.33+1.37 (26)	3.0±2.0 (18)	7.33+3.14 (44)	3.50+2.17 (21)	3.0±2.0 (18)	6.5±3.83 (39)	3.33±2.16 (20)	2.83±2.04 (17)	6.62±3.89 (37)	95.2	94.4	94.9
	2nd	6	6.17±2.56 (37)	4.50±2.51 (27)	10.7±4.03 (64)	6.17±2.56 (37)	4.50±2.51 (27)	10.70±4.03 (64)	5.0±2.97 (30)	4.33±2.34 (26)	9.33±4.47 (56)	81.1	96.3	87.5
	$\bar{X}$±SD รวม	12	5.25±2.18 (63)	3.75±2.3 (45)	9.0±3.86 (108)	4.83±2.65 (58)	3.75±2.3 (45)	8.58±4.33 (103)	4.17±2.62 (50)	3.58±2.23 (43)	7.75±4.31 (93)	86.2	95.6	90.3
	เฉลี่ย รวม	36	4.0±2.46 (144)	3.42±1.87 (123)	7.42±3.65 (264)	3.78±2.57 (136)	3.31±1.90 (119)	7.08±3.81 (255)	3.14±2.64 (113)	2.83±2.05 (102)	5.97±3.95 (215)	83.1	85.7	84.3

* อัตราการเก็บโอโอไซต์ = จำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้/จำนวนฟอลลิเคิลที่เจาะ

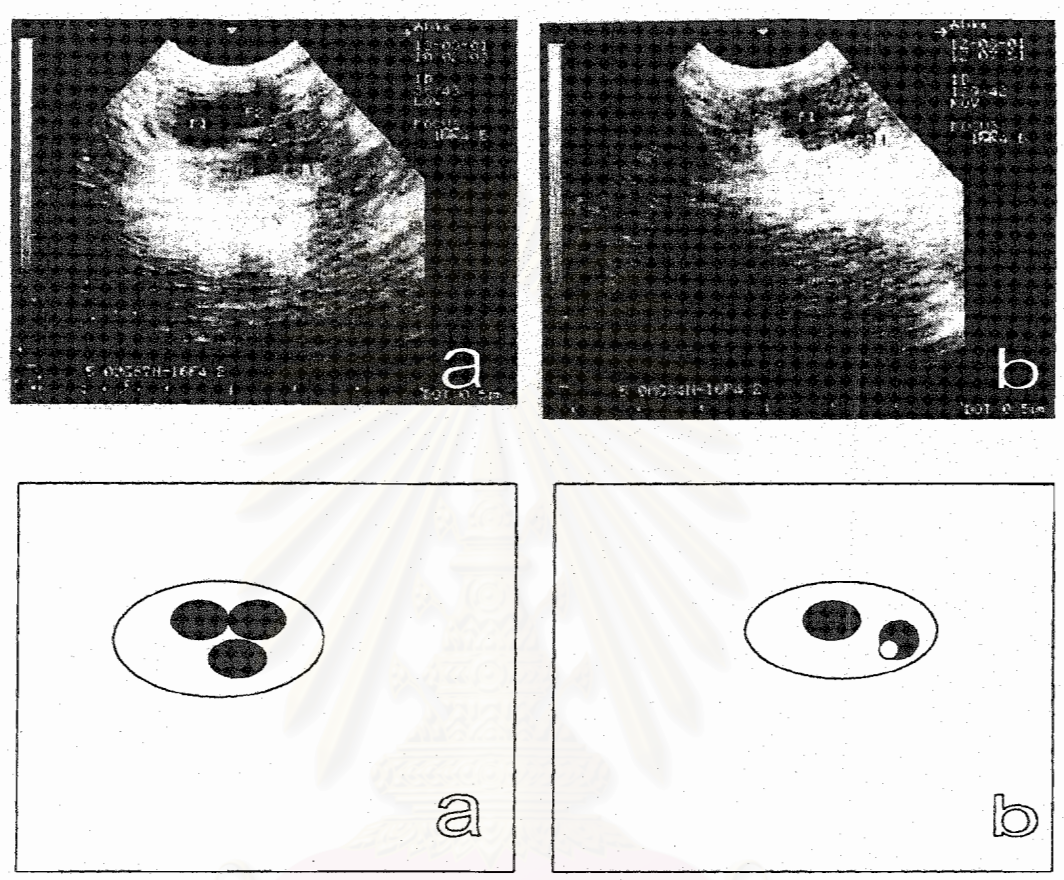


	2-<4 mm	4-<6 mm	6-<8 mm	8-<10 mm	>10 mm
100 mmHg	44.9	46.1	9	0	0
80 mmHg	14.8	63	19.4	1.9	0.9
60 mmHg	22.9	52.9	20	4.2	0
total	27	54.7	16.1	1.9	0.3

รูปที่ 11 ขนาดของฟอลลิเคิลในกลุ่มต่าง ๆ ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH ในกระบือปลักสาว

หลังจากนั้นทำการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี OPU ได้โอโอไซต์เฉลี่ยเท่ากับ 5.97±3.95 (n=215) โอโอไซต์ต่อตัว ซึ่งคิดเป็นอัตราการเก็บโอโอไซต์เฉลี่ยทั้งสามกลุ่มที่ได้เท่ากับ 84.3% (215/255) โดยผันแปรตั้งแต่ 0-100% (ตารางที่ 4)

ผลการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่กระบือปลักสาว โดยใช้แรงดูดในการเก็บในระดับที่ต่างกัน คือ 100, 80 และ 60 mmHg พบว่าการเก็บโอโอไซต์ด้วยแรงดูด 100 mmHg สามารถเก็บได้เฉลี่ย 5.33±3.27 (n=69) โอโอไซต์ต่อตัว (ครั้งที่ 1 เท่ากับ 8.17±4.62, n=49 และครั้งที่ 2 เท่ากับ 3.33±1.86, n=20) คิดเป็นอัตราการเก็บเท่ากับ 81.2% ส่วนในการเก็บโอโอไซต์ด้วยแรงดูด 80 mmHg เก็บโอโอไซต์ได้เฉลี่ย 4.42±2.71 (n=53) โอโอไซต์ต่อตัว (ครั้งที่ 1 เท่ากับ 5.33±3.27, n=32 และครั้งที่ 2 เท่ากับ 3.5±1.87, n=21) คิดเป็นอัตราการเก็บเท่ากับ 79.1% ซึ่งไม่แตกต่างกับกลุ่ม 100 mmHg (P>0.05) และในการเก็บที่ระดับแรงดูด 60 mmHg เก็บโอโอไซต์ได้เฉลี่ย 7.75±4.31(n=93) โอโอไซต์ต่อตัว (ครั้งที่ 1 เท่ากับ 6.62±3.89, n=37 และครั้งที่ 2 เท่ากับ 9.33±4.47, n=56) โดยคิดเป็นอัตราการเก็บเท่ากับ 90.1% ซึ่งสูงกว่าทั้งสองกลุ่มแรกอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) โดยทั้งสามกลุ่มมีอัตราผันแปรตั้งแต่ 0-100% (ตารางที่ 4 และ 5)



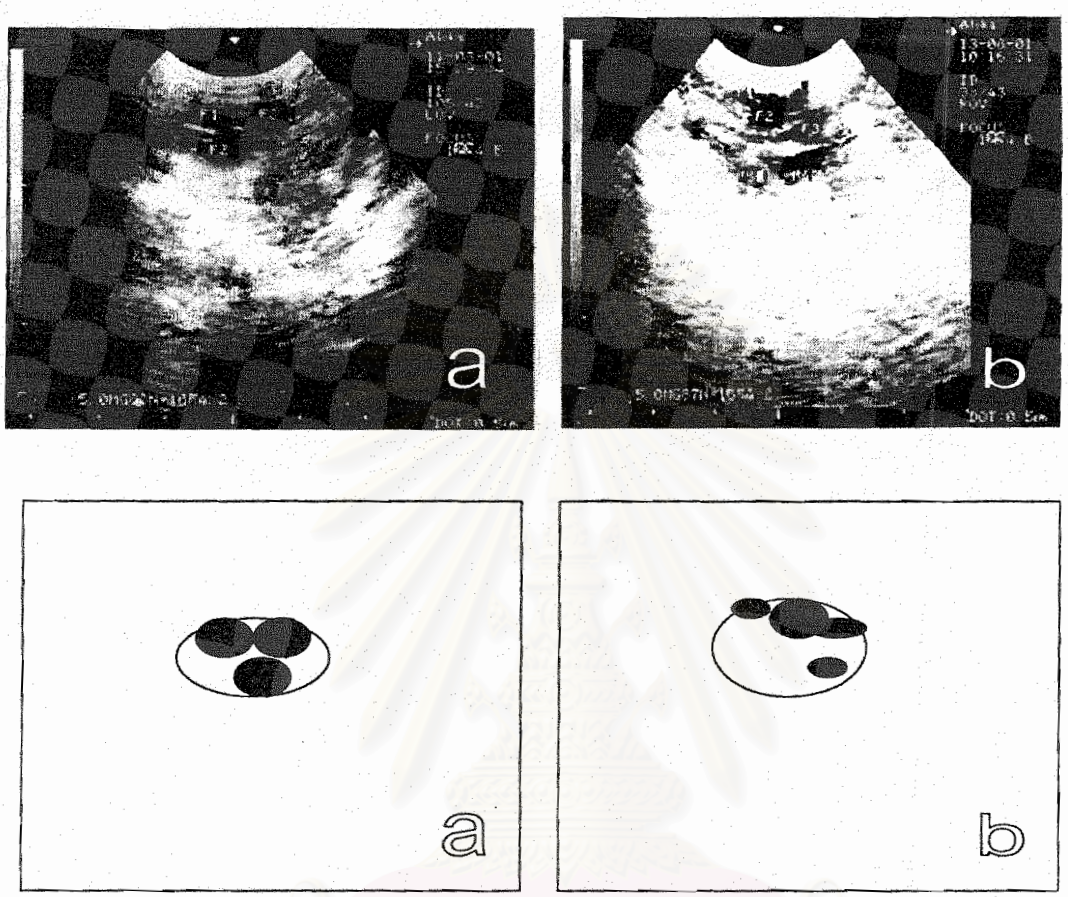
รูปที่ 12 ภาพการตอบสนองของกระบือหมายเลข 36/43 มีการตอบสนองน้อย จำนวน 5 ฟอลลิเคิล

(a) ข้างซ้าย จำนวน 3 ฟอลลิเคิล

(b) ข้างขวา จำนวน 2 ฟอลลิเคิล)

(F= Follicles)

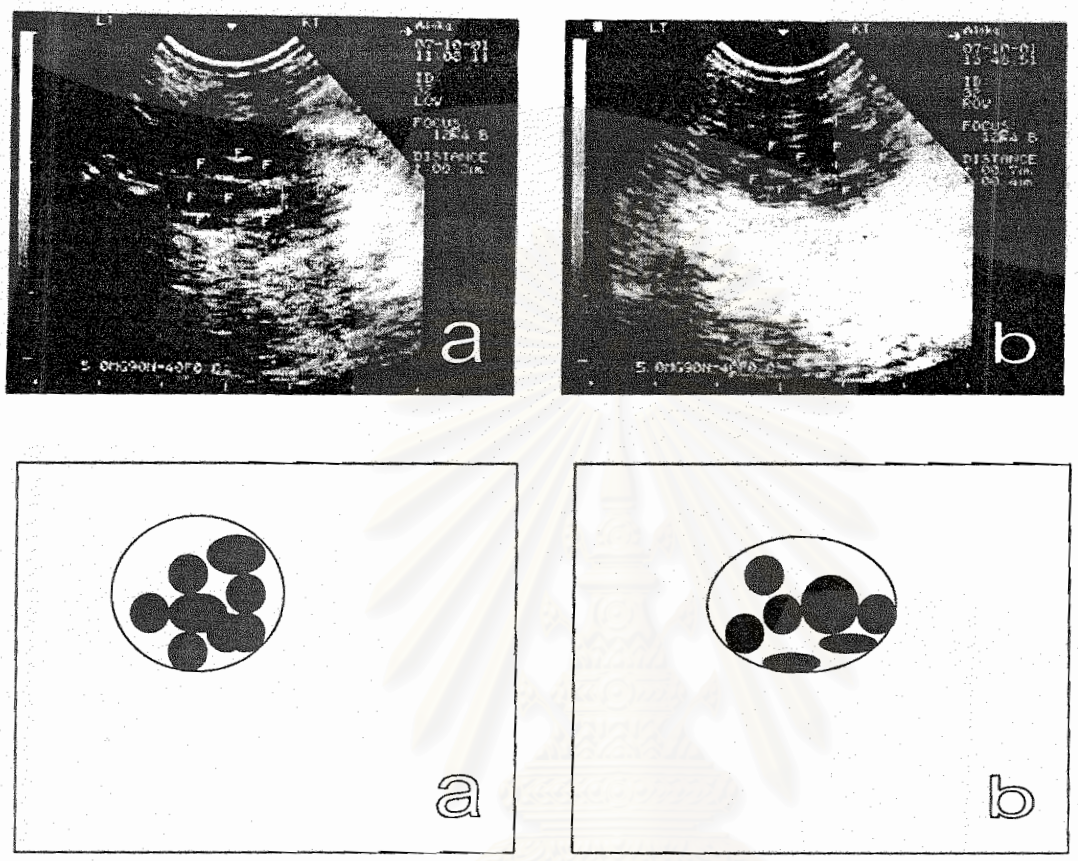
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 13 ภาพการตอบสนองของกระบือหมายเลข 105/42 ที่มีการตอบสนองระดับปานกลาง จำนวน 7 ฟอลลิเคิล (a) ข้างซ้าย จำนวน 3 ฟอลลิเคิล (b) ข้างขวา จำนวน 4 ฟอลลิเคิล

(F= Follicles)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



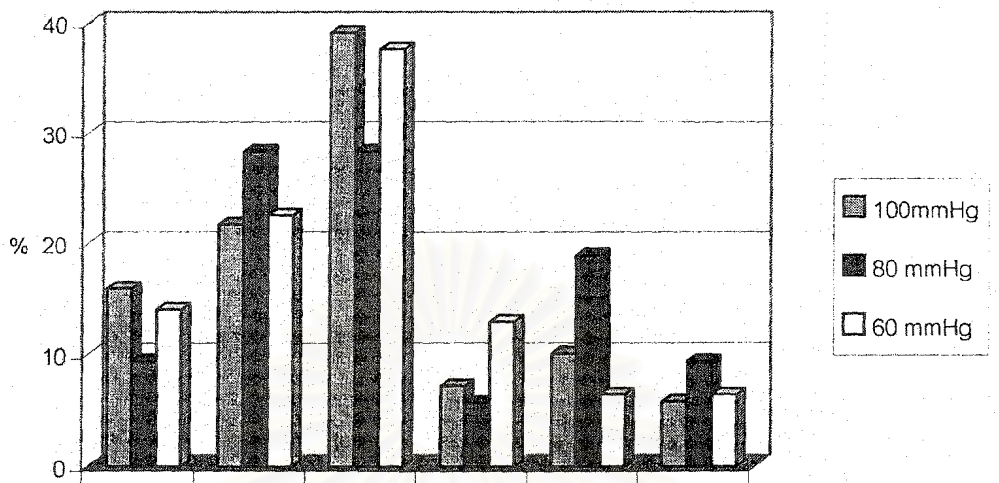
รูปที่ 14 ภาพการตอบสนองของลูกกระบือหมายเลข 32 ที่มีการตอบสนองมาก
จำนวน 15 ฟอลลิเคิล (a) ข้างซ้าย จำนวน 8 ฟอลลิเคิล
(b) ข้างขวา จำนวน 7 ฟอลลิเคิล
(F= Follicles)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในส่วนของชนิดของโอโอไซต์ที่เก็บได้ พบว่าโอโอไซต์ชนิดที่ดีคือ COC อยู่ในอัตรา 15.9, 9.4 และ 14% ในกลุ่ม 100, 80 และ 60 mmHg ตามลำดับ ในขณะที่โอโอไซต์ที่มีคุณภาพรองลงมา คือ S+P มีอัตราเท่ากับ 21.7, 28.3 และ 22.5% ส่วนโอโอไซต์ชนิดที่พร้อมปฏิสนธิมีเซลล์คิวมูลัสแผ่กระจาย (EXP) พบในอัตรา 7.2, 5.7 และ 12.9% ในแต่ละกลุ่ม โอโอไซต์ทั้งสามชนิดเหมาะสำหรับการนำไปปฏิสนธินอกร่างกาย ซึ่งรวมกันมีค่าเท่ากับ 44.8, 43.4 และ 49.4% ซึ่งไม่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่ม โอโอไซต์ชนิด D เป็นโอโอไซต์ที่พบมากที่สุดในการเก็บโดยเท่ากับ 39.1, 28.3 และ 37.6% ตามลำดับ ในขณะที่โอโอไซต์ที่มีไซโทพลาสซึมที่เสื่อมสลาย (DEG) อยู่ในอัตรา 10.1, 18.9 และ 6.45% ส่วนโอโอไซต์ที่เป็นเปลือกหุ้มเปล่าพบเท่ากับ 5.8, 9.4 และ 6.5% คิดเป็นโอโอไซต์ที่ไม่มีคุณภาพรวมกับเท่ากับ 55, 56.6 และ 50.6% (รูปที่ 15)

จากผลการทดลองดังกล่าวจะพบว่าที่ระดับแรงดูด 80 และ100 mmHg จะให้อัตราการเก็บโอโอไซต์ที่ไม่แตกต่างกัน ส่วนที่ระดับแรงดูดในการเก็บที่ 60 mmHg จะให้อัตราการเก็บที่สูงกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แต่อย่างไรก็ตามการเก็บทั้งสามระดับแรงดูดพบว่าคุณภาพของโอโอไซต์ที่สามารถนำไปเลี้ยงและปฏิสนธิในหลอดทดลองได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



	COC	S+P	D	EXP	DEG	FZ
100mmHg	15.9	21.7	39.1	7.2	10.1	5.8
80 mmHg	9.4	28.3	28.3	5.7	18.9	9.4
60 mmHg	14	22.5	37.6	12.9	6.45	6.45

รูปที่ 15 ชนิดของโอโอไซต์ที่เก็บได้จากการเก็บแบบ OPU จากกระบือปลักสาวด้วยแรงดูดระดับ 100, 80 และ 60 mmHg

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากผลการตรวจสอบระยะการเจริญของโอโอไซต์จำนวน 149 โอโอไซต์ ที่ได้จากการเจาะเก็บโดยวิธี OPU ในกระบือปลักสาวนั้น พบว่าโอโอไซต์ส่วนใหญ่มีการเจริญในระยะ Prophase I เท่ากับ 47%(70/149) รองลงมาได้แก่ระยะ Metaphase I , GV , GVBD และ Metaphase II เท่ากับ 22.1%(33/149), 6.0%(9/149), 5.4%(8/149) และ 5.4%(8/149) ตามลำดับ ส่วนโอโอไซต์ในระยะ Anaphase I- Telophase I นั้นไม่พบ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการตรวจสอบลักษณะโครโมโซมของโอโอไซต์กระบือปลักสาวที่เจาะเก็บด้วยวิธี OPU โดยจำแนกตามชนิดของโอโอไซต์

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

( )=%

ในการทดลองนี้พบว่าโอโอไซต์ชนิด EXP เมื่อนำมาย้อมสีพบว่าเป็นโอโอไซต์ที่มีการแบ่งตัวอยู่ในระยะ Metaphase II 53.3% (8/15) ซึ่งสามารถนำไปปฏิสนธิได้ทันที ส่วนโอโอไซต์ชนิด COC และ S+P และโอโอไซต์ชนิด D ส่วนใหญ่มีระยะการแบ่งตัวอยู่ในระยะ Prophase คิดเป็น 50.0% (11/22), 54.8% (23/42) และ 50.0% (35/70) ตามลำดับ จากผลการย้อมสีโอโอไซต์พบว่ามีโอโอไซต์บางส่วนที่ไม่สามารถจำแนกระยะการแบ่งตัวได้โดยคิดเป็น 9.4% (14/149) และมีโอโอไซต์ที่เสื่อมสลาย เท่ากับ 4.7%(7/149)

การทดลองที่ 2

จากผลการทดลองกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์ จำนวน 12 ตัว โดยแต่ละกลุ่มแบ่งเป็น 4 ตัว ทำการทดลองทั้งหมด 2 ซ้ำ จากการกระตุ้นทั้งหมด รวม 24 ครั้ง ลูกกระบือมีการตอบสนอง 23 ครั้ง คิดเป็น 95.8% ซึ่งทำการเจาะเก็บจากลูกกระบือทั้งหมด 20 ครั้ง คิดเป็น 83.3% คือในกลุ่ม 100 mmHg จำนวน 5 ครั้ง กลุ่ม 80 mmHg จำนวน 8 ครั้ง และกลุ่ม 60 mmHg จำนวน 7 ครั้ง จำนวนฟอลลิเคิลที่ตอบสนอง เท่ากับ 8.14±4.10 (n=168) ฟอลลิเคิลต่อตัว แยกเป็นกลุ่ม 100 mmHg เท่ากับ 9.0±4.47(n=45) ฟอลลิเคิลต่อตัว กลุ่ม 80 mmHg เท่ากับ 9.75±3.96 (n=78) ฟอลลิเคิลต่อตัว และกลุ่ม 60 mmHg เท่ากับ 6.43±3.78 (n= 45) ฟอลลิเคิลต่อตัว ได้ทำการเจาะฟอลลิเคิลเฉลี่ยเท่ากับ 6.91±4.27 (n=145) ฟอลลิเคิลต่ตัว คิดเป็น 84.8% (145/168) โดยแต่ละกลุ่มเท่ากับ 7.4±3.65 (n=37), 9.1±5.0 (n=73) และ 5.0±1.83 (n=23) ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ผลการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นและผลการเก็บโอโอไซต์ด้วยระดับแรงดูดสูญญากาศ 100, 80 และ 60 mmHg ในลูกกระบือปลัก

ระดับแรงดูดสูญญากาศ (mmHg)	จำนวนลูกกระบือ	จำนวนลูกกระบือที่เจาะ	จำนวนฟอลลิเคิลเฉลี่ยต่อตัว	จำนวนฟอลลิเคิลที่เจาะต่อตัว	จำนวนโอโอไซต์ที่เจาะได้ต่อตัว	อัตราการเก็บโอโอไซต์ (%)
100 mmHg	8	5	9.0±4.47 (n=45)	7.4±3.65 (n=37)	5.8±4.87 (n=29)	78.4[a] (29/37)
80 mmHg	8	8	9.75±3.96 (n=78)	9.1±5.0 (n=73)	7.6±8.6 (n=61)	83.6[b] (61/73)
60 mmHg	8	7	6.43±3.78 (n=45)	5.0±1.83 (n=35)	3.29±2.06 (n=23)	65.7[c] (23/35)
$\bar{X}$±SD รวม	24	20	8.14±4.16 (168)	6.91±4.27 (145) [84.8%]	5.38±4.47 (113)	77.9 (113/145)

แสดงค่าเป็น $\bar{X}$+SD, n= จำนวน a, b ; P>0.05; b, c: P<0.05

[ ] อัตราการเจาะ

จากตารางที่ 8 แสดงผลของการตอบสนองของรังไข่ในการกระตุ้นครั้งที่ 1 และ 2 ของกลุ่มต่าง ๆ ในกลุ่ม 100 mmHg จากการกระตุ้น 8 ตัว ทำการเจาะ 5 ตัว (62.5%) ครั้งที่ 1 จำนวน 3 ตัว เท่ากับ 8.67±3.01 (n=26) และครั้งที่สอง จำนวน 2 ตัว เท่ากับ 7.33±6.66 (n= 19) กลุ่ม 80 mmHg ทำการเจาะในกระบือ 8 ตัว จากกระตุ้นทั้งหมด 8 ตัว (100%) ครั้งที่ 1 เท่ากับ 9.25±3.20 (n=37) และครั้งที่ 2 เท่ากับ 10.0±6.22 (n=41) ฟอลลิเคิลต่อตัว กลุ่ม 60 mmHg ในการกระตุ้น 8 ตัว สามารถเจาะเก็บ 7 ตัว (87.5%) ครั้งที่ 1 เท่ากับ 7.33±5.86 (n=22) และครั้งที่ 2 เท่ากับ 5.75±2.06 (n=23)

จำนวนฟอลลิเคิลที่ทำการเจาะในกลุ่ม 100 mmHg ครั้งที่ 1 เท่ากับ 6.67±2.08 (n=20) และครั้งที่ 2 เท่ากับ 8.5±6.36 (n=17) กลุ่ม 80 mmHg ครั้งที่ 1 เท่ากับ 8.5±5.62 (n=34) และครั้งที่ 2 เท่ากับ 10.0±6.22 (n=39) กลุ่ม 60 mmHg ครั้งที่ 1 เท่ากับ 4.67±2.52 (n=14) และครั้งที่ 2 เท่ากับ 5.25±1.50 (n=21)

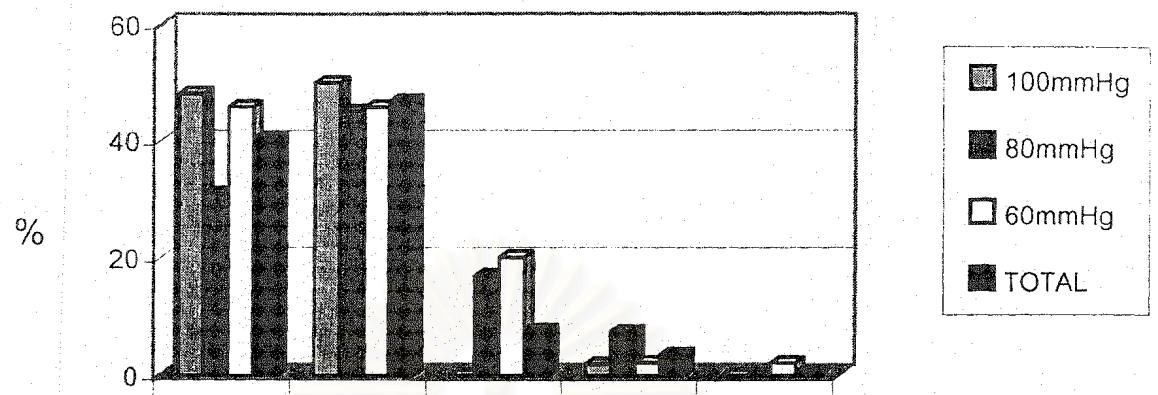
เมื่อตรวจดูฟอลลิเคิลที่ตอบสนองพบว่าฟอลลิเคิลส่วนมากจะอยู่ในขนาด 2 ถึง <4 มม. และ 4 ถึง <6 มม. 40.4% และ 46.8% ตามลำดับ ฟอลลิเคิลขนาด 6 ถึง <8 มม. เท่ากับ 7.6% ส่วนฟอลลิเคิลขนาด 8 ถึง 10 มม. หรือ >10 มม. มีจำนวนน้อยมาก 3.5 และ 0.5% ตามลำดับ (รูปที่ 16)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 ผลเปรียบเทียบการตอบสนองและการเก็บโอโอไซต์จากการกระตุ้นครั้งที่ 1 และ 2 ด้วยระดับแรงดูดสูญญากาศขนาด 100, 80 และ 60 mmHg ในลูกกระบือปลัก

ระดับแรงดูดสูญญากาศ	ครั้งของการกระตุ้น	จำนวนกระบือกระตุ้น	จำนวนกระบือที่เจาะ	จำนวนฟอลลิเคิล			จำนวนฟอลลิเคิลที่เจาะ			จำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้			อัตราการเก็บโอโอไซต์(%)*		
				ซ้าย	ขวา	ทั้งหมด	ซ้าย	ขวา	ทั้งหมด	ซ้าย	ขวา	ทั้งหมด	ซ้าย	ขวา	ทั้งหมด
100mmHg	1st	4	3	5.67±0.58 (17)	3.0±2.64 (9)	8.67±3.01 (26)	4.33±1.16 (13)	2.33±2.08 (7)	6.67±2.08 (20)	3.0 (9)	2.33±2.08 (7)	5.33±2.08 (16)	69.2	100	80
	2nd	4	2	4.33±3.22 (10)	3.0±3.61 (9)	7.33±6.66 (19)	5.0±4.24 (10)	3.50±2.12 (7)	8.50±6.36 (17)	4.0±5.66 (8)	2.50±3.54 (5)	6.5±9.19 (13)	80	71.4	76.4
	$\bar{X}$±SD รวม	8	5	5.40±2.19 (27)	3.60±2.70 (18)	9.0±4.47 (45)	4.60±2.30 (23)	2.80±1.92 (14)	7.40±3.65 (37)	3.40±2.88 (17)	2.40±2.30 (12)	5.8±4.86 (29)	73.9	85.7	78.4
80mmHg	1st	4	4	4.0±0.82 (16)	5.25±2.76 (22)	9.25±3.2 (37)	3.75±1.26 (15)	4.75±3.59 (19)	8.50±5.62 (34)	3.25±2.36 (13)	4.25±3.1 (17)	7.5±4.88 (30)	86.7	89.5	88.2
	2nd	4	4	3.75±0.96 (15)	6.25±5.56 (25)	10.0±6.22 (41)	3.75±0.96 (15)	6.25±5.56 (24)	10.0±6.22 (39)	2.25±2.83 (10)	5.50±5.8 (21)	7.75±6.13 (31)	60	88	77.5
	$\bar{X}$±SD รวม	8	8	3.88±0.83 (31)	5.88±3.44 (47)	9.75±3.96 (78)	3.75±1.04 (30)	5.38±4.17 (43)	9.30±5.05 (73)	2.88±2.10 (23)	4.75±4.10 (38)	7.63±5.04 (61)	76.7	88.4	83.6
60mmHg	1st	4	3	3.33±3.22 (10)	4.0±2.65 (12)	7.33±5.86 (22)	1.33±1.53 (4)	3.33±3.22 (10)	4.67±2.52 (14)	1.0 (2)	1.33±1.53 (4)	2.0±1.0 (6)	50	40	42.8
	2nd	4	4	3.07±0.96 (12)	3.0±1.83 (11)	5.75±2.06 (23)	2.75±0.96 (11)	2.50±1.73 (10)	5.25±1.5 (21)	2.50±1.0 (10)	1.75±2.22 (7)	4.25±2.17 (17)	90.9	70	80.9
	$\bar{X}$±SD รวม	8	7	3.95±1.79 (22)	4.19±3.04 (23)	6.43±3.78 (45)	2.50±1.05 (15)	3.67±3.26 (20)	6.09±4.27 (35)	2.0±1.01 (12)	2.91±3.32 (11)	3.29±2.06 (23)	80	55	65.7
	เฉลี่ย รวม	24	20	4.05±1.73 (87)	4.35±3.03 (81)	8.14±4.10 (168)	3.58±1.61 (68)	3.85±3.23 (77)	7.25±4.06 (145)	2.74±2.05 (52)	3.05±3.24 (61)	5.65±4.40 (113)	76.5	79.2	77.9

* อัตราการเก็บโอโอไซต์ = จำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้/จำนวนฟอลลิเคิลที่เจาะ

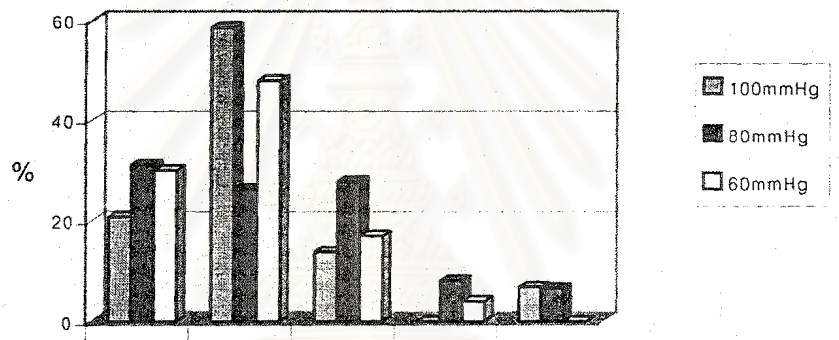


	2-<4 mm	4-<6 mm	6-<8 mm	8-<10 mm	>10 mm
100mmHg	48.1	50	0	1.9	0
80mmHg	31	45.1	16.9	7.4	0
60mmHg	45.8	45.8	20.1	2.1	2.1
TOTAL	40.4	46.8	7.6	3.5	0.5

รูปที่ 16 ขนาดของฟอลลิเคิลในกลุ่มต่าง ๆ ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH ในลูกกระบือปลัก

ผลการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ลูกกระบือปลัก พบว่าการเก็บโอโอไซต์ด้วยแรงดูด 100 mmHg สามารถเก็บได้เฉลี่ย 5.8±4.86 (n=29) โอโอไซต์ต่อตัว (ครั้งที่ 1 เท่ากับ 5.33±2.08, n=16 และครั้งที่ 2 เท่ากับ 6.5±9.19, n=13) คิดเป็นอัตราการเก็บเท่ากับ 78.4% ส่วนในการเก็บโอโอไซต์ด้วย แรงดูด 80 mmHg เก็บโอโอไซต์ได้เฉลี่ย 7.63±5.04 (n=61) โอโอไซต์ต่อตัว (ครั้งที่ 1 เท่ากับ 7.5±4.88, n=30 และครั้งที่ 2 เท่ากับ 7.75±6.13, n=31) คิดเป็นอัตราการเก็บเท่ากับ 83.6% ซึ่งไม่แตกต่างกับกลุ่ม 100 mmHg (P>0.05) และในการเก็บที่ระดับแรงดูด 60 mmHg เก็บโอโอไซต์ได้เฉลี่ย 3.29±2.06 (n=23) โอโอไซต์ต่อตัว (ครั้งที่ 1 เท่ากับ 2.0±1.0, n=6 และครั้งที่ 2 เท่ากับ 4.25±2.17,n=17) (n=93) คิดเป็นอัตราการเก็บเท่ากับ 65.7% น้อยกว่ากลุ่ม 80 mmHg อย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่ม 100 mmHg (ตารางที่ 7 และ 8)

ในส่วนของชนิดของโอโอไซต์ที่เก็บได้จากลูกกระบือปลัก จากข้อมูลในรูปที่ 17 พบว่า โอโอไซต์ชนิด COC ในแต่ละกลุ่ม (100, 80 และ 60 mmHg) มีค่าเท่ากับ 20.7, 31.1 และ 30% ตามลำดับ ในขณะที่โอโอไซต์ชนิด S+P มีอัตราเท่ากับ 58.6, 26.2 และ 48% โดยในกลุ่ม 100 mmHg ต่างกับ 80 mmHg อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.01$) โอโอไซต์ชนิด EXP เท่ากับ 0, 8.2 และ 4% รวมทั้งสามชนิดมีอัตราเท่ากับ 79.3, 65.5 และ 82% สำหรับโอโอไซต์ชนิด D พบเท่ากับ 13.8, 27.8 และ 17% และ และ FZ พบเท่ากับ 6.9, 6.6, 0% ตามลำดับ



	COC	S+P	D	EXP	FZ
100mmHg	20.7	58.6	13.8	0	6.9
80mmHg	31.1	26.2	27.8	8.2	6.6
60mmHg	30	48	17	4	0

รูปที่ 17 ชนิดของโอโอไซต์ที่เก็บได้จากการเก็บแบบ OPU จากลูกกระบือปลักด้วยแรงดูดระดับ 100, 80 และ 60 mmHg

จากตารางที่ 9 แสดงผลของการย้อมดูระยะของการเจริญพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์ชนิดต่าง ๆ ที่เจาะมาจากลูกกระบือปลัก พบว่าโอโอไซต์ชนิด EXP เมื่อนำมาย้อมสีพบว่าเป็นโอโอไซต์ที่มีการแบ่งตัวอยู่ในระยะ Metaphase II 42.9% (3/7) ส่วนโอโอไซต์ชนิด COC, S+P และชนิด D ไม่มีระยะ Metaphase II ส่วนใหญ่มีระยะการแบ่งตัวอยู่ในระยะ GVBD คิดเป็น 52.1%(12/23), 61.9% (13/21) และ 20%(2/10) ตามลำดับ คิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 44.4% (27/61) โอโอไซต์บางส่วนพัฒนาเป็นระยะ Prophase I และ Metaphase I โดยคิดเป็นค่าเฉลี่ยของโอโอไซต์ทุกชนิดเท่ากับ 16.3%(10/61) และ 9.8%(6/61) จากผลการย้อมสีโอโอไซต์พบว่ามีโอโอไซต์ บางส่วนที่ไม่สามารถจำแนกระยะการแบ่งตัวได้โดยคิดเป็น 23%(14/61)

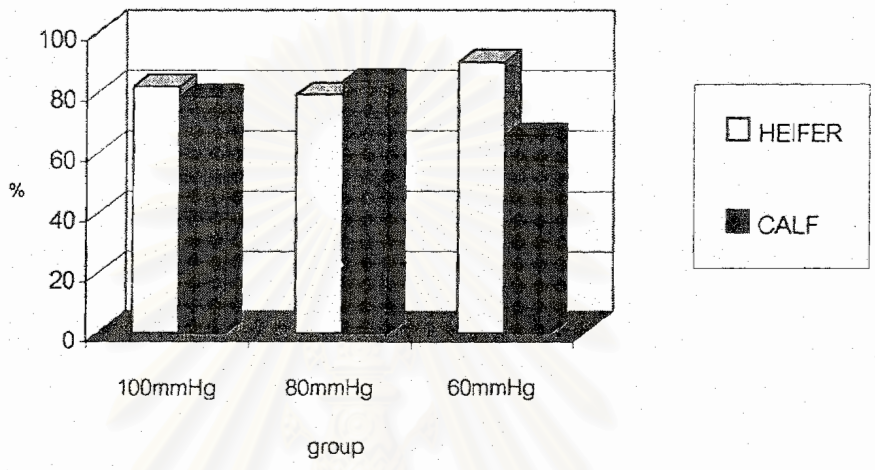
ตารางที่ 9 ผลการตรวจสอบลักษณะโครโมโซมของโอโอไซต์ลูกกระบือปลักที่เจาะเก็บด้วยวิธี OPU โดยจำแนกตามชนิดของโอโอไซต์

ระยะการเจริญ	ชนิดของโอโอไซต์ (%)				รวม (%)
	COC	S+P	D	EXP	
GV	0		1(10)	-	1(1.6)
GVBD	12(52.1)	13(61.9)	2(20)	-	27(44.4)
PI	2(8.7)	3(14.3)	5(50)	-	10(16.3)
MI	4(17.4)	-	1(1)	1(14.3)	6(9.8)
AI-PI	-	-	-	-	-
MII	-	-	-	3(42.9)	3(4.9)
U	5(21.7)	5(23.8)	1(1)	3(42.9)	14(23)
รวม(%)	23	21	10	7	61

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลเปรียบเทียบระหว่างกระบือปลักสาวและลูกกระบือปลัก

ก) อัตราในการเก็บโอโอไซต์

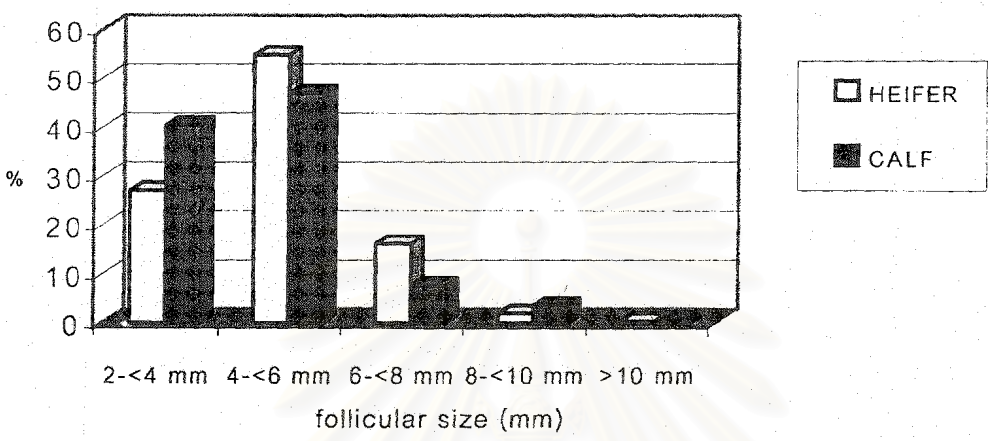


รูปที่ 18 ผลเปรียบเทียบอัตราการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี OPU จากกระบือปลักสาว และลูกกระบือปลัก

จากรูปที่ 18 พบว่าอัตราการเก็บโอโอไซต์ในกระบือปลักสาวและลูกกระบือปลักโดยใช้แรงดูด 100 mmHg (81.2% vs 78.4%) และ 80 mmHg (79.1% vs 83.6%) ไม่แตกต่างกัน ในขณะที่อัตราการเก็บโอโอไซต์ในกระบือปลักสาวด้วยแรงดูด 60 mmHg มีอัตราสูงกว่าในลูกกระบือ (90.1% vs 65.7%)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

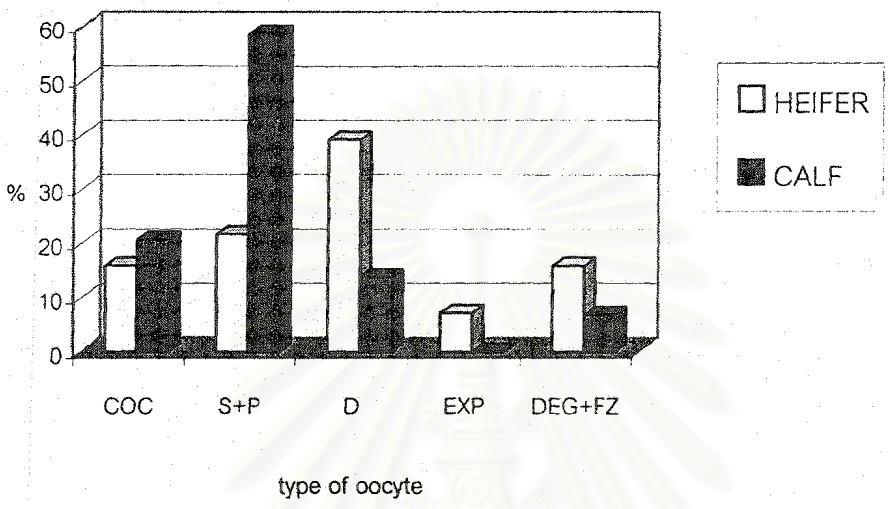
ข) ขนาดของฟอลลิเคิลจากการกระตุ้น



รูปที่ 19 ผลเปรียบเทียบขนาดของโอโอไซต์จากกระบือปลักสาวและลูกกระบือปลัก

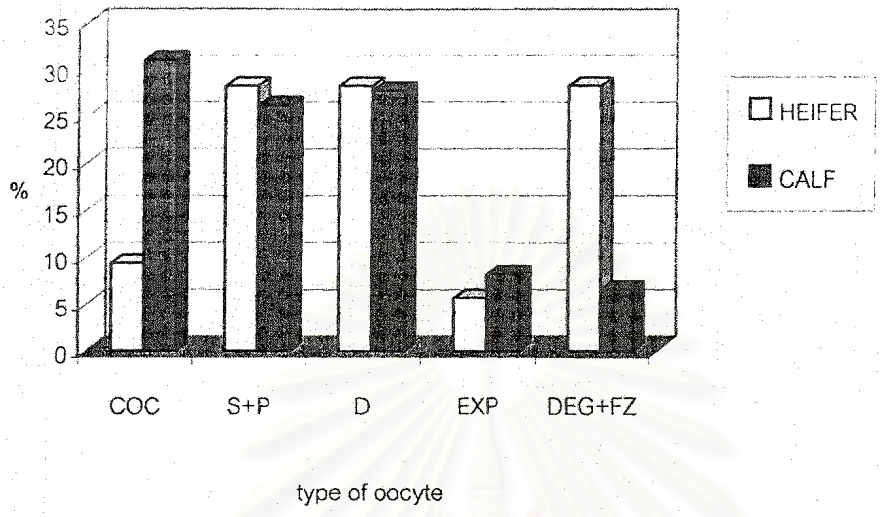
อัตราส่วนของฟอลลิเคิลชนิดต่าง ๆ ในกระบือปลักสาวและลูกกระบือปลักนั้น พบว่าส่วนมากจะเป็นฟอลลิเคิลขนาด 2-6 มม. โดยเท่ากับในกระบือปลักเท่ากับ 81.7% (2-<4 มม. =27%, 4-<6 มม.=54.7%) ส่วนในลูกกระบือเท่ากับ 87.13% (2-<4 มม.=40.4%, 4-<6 มม.=46.78%) โดยในลูกกระบือปลักจะมีฟอลลิเคิลขนาด 2-<4 มม. มากกว่าในกระบือปลักสาว (40.4% เทียบกับ 27%) ฟอลลิเคิลขนาดใหญ่มากกว่า 8 มม. มีน้อยมากประมาณ 2-4% ในทั้งกระบือปลักสาวและลูกกระบือปลัก (รูปที่ 19)

ค) ชนิดของโอโอไซต์ที่เก็บได้



รูปที่ 20 ผลเปรียบเทียบชนิดของโอโอไซต์เก็บด้วยแรงดูด 100 mmHg ในกระบือปลักสาวและลูกกระบือปลัก

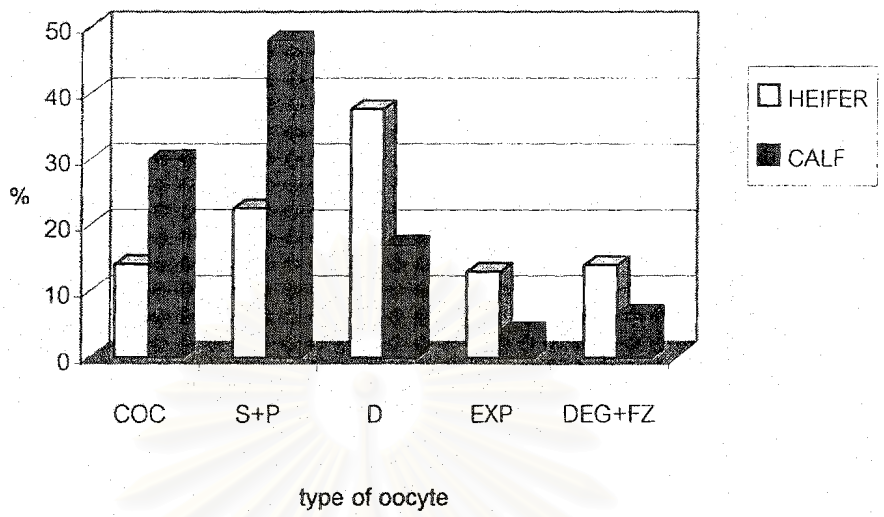
ผลเปรียบเทียบชนิดของโอโอไซต์ที่เก็บได้ในกระบือปลักสาวและลูกกระบือปลักในกลุ่ม 100 mmHg พบว่าในส่วนของสัดส่วนของ COC ใกล้เคียงกัน (15.9% vs 20.7%) แต่ลูกกระบือปลักจะพบชนิดของ S+P มากกว่า (58.6% vs 21.7%) โอโอไซต์ชนิด D ในกลุ่มกระบือปลักสาวสูงกว่าในลูกกระบือปลัก (39.1% vs 27.8%) เช่นเดียวกับในกลุ่ม EXP (10.1% vs 0%) โอโอไซต์ในกลุ่ม DEG +FZ เท่ากับ 15.9% vs 6.9% (รูปที่ 20)



รูปที่ 21 ผลเปรียบเทียบชนิดของโอโอไซต์เก็บด้วยแรงดูด 80 mmHg ในกระบือปลักสาวและลูกกระบือปลัก

ในกลุ่ม 80 mmHg พบว่าโอโอไซต์ในกลุ่ม S+P, D และ EXP มีสัดส่วนใกล้เคียงกัน ส่วนโอโอไซต์ในกลุ่ม COC ของกระบือปลักสาวจะมีอัตราที่น้อยกว่าในลูกกระบือปลัก (9.4% vs 31.1%) รวมทั้งโอโอไซต์ชนิด DEG+FZ มีสูงในกลุ่มกระบือปลักสาว (28.3% vs 6.6%) (รูปที่ 21)

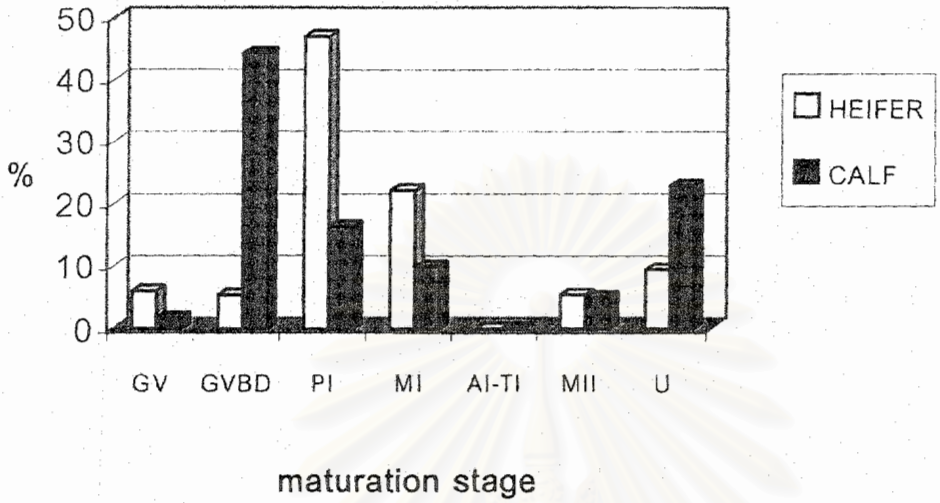
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 22 ผลเปรียบเทียบชนิดของโอโอไซต์เก็บด้วยแรงดูด 60 mmHg ในกระบือปลักและลูกกระบือปลัก

ในกลุ่ม 60 mmHg พบว่า โอโอไซต์ในกลุ่ม COC และ S+P ของกระบือปลักมีเปอร์เซนต์ต่ำกว่าของลูกกระบือปลัก (30% vs 14%, 48% vs 37.6%) ตามลำดับ ส่วนโอโอไซต์ในกลุ่ม D, EXP และ DEG+FZ ในกระบือปลักสาวสูงกว่าในลูกกระบือปลัก (37.6% vs 17%, 12.9% vs 4% และ 13.9% vs 0%) ตามลำดับ (รูปที่ 22)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 23 ผลเปรียบเทียบสภาวะการเจริญพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์กระบือปลักสาวและลูกกระบือปลักที่เจาะเก็บด้วยวิธี OPU โดยจำแนกตามชนิดของโอโอไซต์

จากรูปที่ 23 หากนำเอาสภาพการเจริญพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์ของกระบือปลักสาวและลูกกระบือปลักมาเปรียบเทียบกันพบว่าโอโอไซต์ของกระบือปลักสาวจะอยู่ในระดับ Prophase I (47%) รองลงมาคือระยะ Metaphase I (22.1%) ในขณะที่ลูกกระบืออยู่ในระยะ GVBD (44.4%) โอโอไซต์ของกระบือปลักสาวมีโอโอไซต์ที่เมื่อย้อมสีแล้วไม่สามารถระบุระยะที่ชัดเจนได้ (unidentified) 9.4% ในขณะที่ของลูกกระบือปลักมีถึง 23% โอโอไซต์ระยะ EXP ส่วนมากจะเกิดการพร้อมปฏิสนธิแล้ว (Metaphase II) ทั้งสองกลุ่ม

การอภิปรายผล

องค์ประกอบของการเก็บ OPU นั้นประกอบด้วย 3 อย่าง คือ ระบบการควบคุมจากจอภาพด้วยอัลตราซาวน์ ระบบการเจาะดูดด้วยเข็ม และระบบการดูดด้วยสูญญากาศ จากงานวิจัยนี้ได้ทดลองระบบการดูดด้วยสูญญากาศ โดยผันแปรระดับของแรงดูดสูญญากาศจาก 100, 80 และ 60 mmHg ทั้งนี้อ้างอิงจากงานวิจัยในโคที่ใช้ระดับแรงดูดค่อนข้างผันแปรดังข้อมูลในตารางที่ 2 แต่โดยทั่วไปมักแนะนำที่ระดับประมาณ 80-100 mmHg ส่วนงานวิจัยในกระบือนั้นพบว่ามีตั้งแต่ 40 mmHg (Boni *et al.*, 1996) หรือใช้เช่นเดียวกับในโค (เอกชาติ พรหมดิเรกและคณะ, 2543, มงคล เตชะกำพุและคณะ, 2544, Kittiyanant *et al.*,1995, Pavasuthipaisit *et al.*, 1995) งานวิจัยนี้ได้ทำการทดลองเก็บโอโอไซต์จากกระบือสาวและลูกกระบือปลัก เพื่อดูผลของระดับแรงดูดสูญญากาศที่ต่างกัน โดยประเมินจากดัชนีตัวชี้วัด 3 ตัว คือ อัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์ (recovery rate) ที่เป็นสัดส่วนจากจำนวนโอโอไซต์ที่เจาะได้ (recovered oocyte) เปรียบเทียบกับจำนวนฟอลลิเคิลที่ทำการเจาะเก็บ (aspirated follicles) จำนวนของโอโอไซต์ที่เจาะได้ต่อตัว (oocyte per session or per animal) และชนิดของโอโอไซต์ต่าง ๆ โดยเฉพาะโอโอไซต์ที่มีคุณภาพดี คือโอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มรอบหลายชั้น (cumulus oocyte complexes) และชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้ม 2-5 ชั้น หรือบางส่วน (single layers or partial cumulus oocyte) รวมทั้งศึกษาถึงวัยเจริญพันธุ์ของกระบือต่ออัตราความสำเร็จดังกล่าว นอกจากนี้การประเมินระยะพร้อมปฏิสนธิจากโอโอไซต์ที่ได้โดยดูจากลักษณะของโครโมโซมหลังย้อมสีมาใช้เพื่อนำเอาโอโอไซต์ไปปฏิสนธินอกร่างกายต่อไปในอนาคต

การตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปินชนิด FSH ของกระบือปลักสาวในการทดลองที่ 1 นั้น ทำการกระตุ้นซ้ำทั้งหมด 36 ครั้งห่างกัน 2 สัปดาห์ ในกระบือ 6 ตัว พบว่ากระบือทั้งหมด 100% มีการตอบสนองโดยมีจำนวนฟอลลิเคิลมากกว่า 2 ฟอลลิเคิล ส่วนการทดลองที่ 2 นั้น พบว่ามีการตอบสนอง 22 ตัวจาก 24 ตัว คิดเป็น 92% แสดงว่าฮอร์โมน FSH เป็นฮอร์โมนโกนาโดโทรปินที่ให้ผลดีต่อการกระตุ้นรังไข่ ทั้งในกระบือก่อนวัยเจริญพันธุ์และหลังวัยเจริญพันธุ์ การกระตุ้นซ้ำในสัตว์ตัวเดียวกันพบว่าไม่มีผลแตกต่างต่อจำนวน การตอบสนองในแต่ละครั้ง โดยให้ผลที่ใกล้เคียงกัน สอดคล้องกับงานวิจัยในการกระตุ้นซ้ำในลูกกระบือปลักโดยมงคล เตชะกำพุและคณะ (2544) แสดงให้เห็นการกระตุ้นรังไข่และเจาะเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี OPU จำนวน 5 ครั้งติดต่อกันห่างกันครั้งละ 2 สัปดาห์ ไม่มีความแตกต่างของจำนวนฟอลลิเคิลที่พบและเจาะเก็บได้ ตลอดจนคุณภาพของโอโอไซต์ที่เก็บได้ ทั้งนี้เนื่องจากการเก็บโอโอไซต์ด้วย

วิธี OPU สามารถที่จะทำซ้ำได้หลายครั้งในสัตว์ที่มีชีวิต รวมทั้งยังเป็นวิธีที่สัตว์ไม่บอบช้ำมากจากการเก็บและไม่ต้องใช้ระยะเวลาในการพักฟื้นนานเหมือนวิธีการเก็บวิธีอื่น ๆ อย่างไรก็ตาม มงคล เตชะกำพุและคณะ (2539) ให้ข้อสังเกตว่าสัตว์มักจะตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH ในครั้งแรกได้ดีกว่าในครั้งต่อ ๆ มา โดยพบว่าในลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์จะตอบสนองในครั้งแรกประมาณ 40 ฟอลลิเคิลต่อตัว และต่อมาจะลดลงประมาณ 20% เหลือประมาณ 30 ฟอลลิเคิลต่อตัว งานวิจัยส่วนมากในเอกสารอ้างอิงการเก็บแบบ OPU นั้นในโคหรือม้า นิยมใช้การเก็บโอโอไซต์ในสัตว์ซ้ำ ๆ จากจำนวนสัตว์ไม่มากนัก โดยนับจำนวนครั้งของการเก็บ (no. of session) ในสัตว์ตัวเดียวกัน มากกว่าใช้จำนวนตัวสัตว์ในการทดลองจำนวนมาก ๆ เพื่อลดความแปรปรวนของการตอบสนองและการเก็บโอโอไซต์ของตัวสัตว์ โดยงานวิจัยพบว่าจำนวนครั้งของการกระตุ้นไม่มีผลต่อการตอบสนอง แต่ผลจะแตกต่างกันมากในสัตว์แต่ละตัวและแต่ละครั้งของการกระตุ้น โดยสัตว์ตัวเดียวกันอาจให้ผลตอบสนองที่ดีและไม่ดีได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ออกแบบโดยการใช้สัตว์จำนวนไม่มาก

ในการทดลองนี้ได้ใช้วิธีการกระตุ้นรังไข่เพื่อให้มีการเพิ่มการเจริญของฟอลลิเคิล พบว่าก่อนการกระตุ้นรังไข่จะมีขนาดเล็กมาก ประมาณ 0.5X1.0 ซม^2 จำนวนของฟอลลิเคิลปรากฏบนรังไข่มีน้อยมากประมาณ 1-2 ฟอลลิเคิลต่อตัวเท่านั้น หลังกระตุ้นขนาดของรังไข่จะใหญ่ขึ้นพร้อมกับมีฟอลลิเคิลที่เจริญในจำนวนมากขึ้นพบถึง 7-8 ฟอลลิเคิลต่อตัว ทั้งในกระบือปลักสาวและลูกกระบือปลัก และเป็นเช่นเดียวกับที่สังเกตในลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์ (มงคล เตชะกำพุและคณะ, 2539) ที่รังไข่มีขนาดเล็กมากและไม่พบฟอลลิเคิลขนาดที่กำลังเจริญ (growing follicles) ทั้งนี้เนื่องจากระบบ การทำงานของฮอร์โมนโกนาโดโทรปินยังไม่ทำงานเต็มที่จนกว่าถึงวัยเจริญพันธุ์ แต่รังไข่ยังมีไพรมอเดียล ฟอลลิเคิล (primordial follicles) สะสมเป็นจำนวนมหาศาล ผลการตรวจรังไข่ก่อนการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH โดย มงคล เตชะกำพุและคณะ (2544) พบว่าก่อนการกระตุ้นรังไข่แต่ละครั้ง ในรังไข่จะมีระดับของการเจริญของฟอลลิเคิลโดยเฉลี่ย 1.3$\pm$0.7 ฟอลลิเคิล เท่านั้น ซึ่งยืนยันได้จากข้อมูลในรูปที่ 4 แสดงจำนวนของฟอลลิเคิลที่สังเกตเห็นจากจอมอนิเตอร์ที่พบน้อยมาก แตกต่างกับในโคพันธุ์ต่างประเทศก่อนวัยเจริญพันธุ์และหลังวัยเจริญพันธุ์ที่มีฟอลลิเคิลอยู่ถึง 3.8-6.8 ฟอลลิเคิลต่อตัว และสามารถเก็บโอโอไซต์โดยไม่ต้องกระตุ้นถึง 1.9-3.1 โอโอไซต์ต่อตัว (Majerus *et al*., 1999) ส่วนในโคหลังวัยเจริญพันธุ์พบว่าการเก็บ OPU จากรังไข่ของแม่โคที่มีวงจรการเป็นสัดปกติไม่ได้รับการกระตุ้นสามารถทำได้ ทั้งนี้เนื่องจากประชากรของฟอลลิเคิลในโคจะมีมากกว่าในกระบือหลายเท่า ในโครายงานโดย Erickson (1966) พบว่า

จำนวน primordial follicles สะสมในรังไข่มีมากถึง 75,000-300,000 ฟอลลิเคิลต่อตัว ส่วนในกระบือปลักจาก การศึกษาพบว่ามีประชากรฟอลลิเคิลมีประมาณ 6,000 ฟอลลิเคิล (Danell, 1987) และ 19,000 ฟอลลิเคิล (Samad and Nasseri, 1979) เท่านั้น นับว่าน้อยกว่าในโคเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ยังในกระบือพบว่าอัตราการเจริญของฟอลลิเคิลขนาด 2-8 มม. (growing follicles) ซึ่งเป็นขนาดเล็กเป็นฟอลลิเคิลขนาดกลาง (secondary follicles) เป็นไปในอัตราที่ช้ามาก ในกระบือหลัง วัยเจริญพันธุ์พบว่ามี secondary follicles เพียง 7.56% ของ growing follicles เท่านั้น ส่วนกระบือเพศเมียที่โตเต็มที่มีจำนวน secondary follicles เพียง 14% ในขณะที่มีจำนวน growing follicles ถึง 77.7% เช่นเดียวกับกระบืออายุมากมี secondary follicles เพียง 8% ในขณะที่มี growing follicles ถึง 47% และสิ่งที่พบว่ามีความแตกต่างกับโคที่เห็นชัดคือจำนวน atretic follicles มีสูงกว่า จากข้อมูลนี้ชี้ให้เห็นว่าในกระบืออัตราการเจริญของฟอลลิเคิลเป็นไปได้อย่างช้าและยังมีอัตราการเสื่อมสลายของฟอลลิเคิลที่สูง จึงเป็นที่มาของความแตกต่างของจำนวนการตอบสนองของฮอร์โมนโกนาโดโทรปินต่อการกระตุ้นรังไข่ระหว่างโคและกระบือ นอกจากนี้อัตราการเจริญของฟอลลิเคิลดังกล่าวยังเกี่ยวข้องกับอายุของกระบือ Smith (1990) ได้ศึกษาพบว่ากระบืออายุ 2-3 ปี มีการเจริญของฟอลลิเคิลจาก primordial follicles เป็น growing follicles และ tertiary follicle สูงกว่ากระบืออายุ 7-8 ปี ซึ่งอาจอธิบายความแตกต่างของ การตอบสนองของฟอลลิเคิลต่อการกระตุ้นด้วย FSH ที่มีลูกกระบือมีการตอบสนองสูงกว่ากระบือปลักสาวประมาณ 1 ฟอลลิเคิล (7.4 เทียบ 8.4 ฟอลลิเคิลต่อตัว) ดังนั้นการเก็บโอโอไซต์ในกระบือปลักโดยไม่ต้องกระตุ้นจึงเป็นสิ่งที่ทำได้ยาก เพราะขนาดรังไข่เล็กมากและจำนวนฟอลลิเคิลบนรังไข่น้อย การให้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินจึงช่วยให้ฟอลลิเคิลขนาดเล็กเจริญเป็นขนาดกลางมากขึ้นและจำนวนของโอโอไซต์ที่ได้จะสูงกว่าที่ไม่ได้ให้ฮอร์โมนกระตุ้นรังไข่ Bungartz และคณะ (1995) ได้ศึกษาในโคพบว่าหากให้ฮอร์โมน FSH จะเพิ่มโอโอไซต์ต่อการเก็บ OPU ได้ 10.6 โอโอไซต์ เปรียบเทียบกับ 5.8 โอโอไซต์ ในการทดลองนี้ได้ผลของการตอบสนองในกระบือปลักที่ 7.42±3.65 ฟอลลิเคิลต่อตัวและในลูกกระบือได้เท่ากับ 8.14±4.16 ฟอลลิเคิลต่อตัวในลูกกระบือ

จำนวนของฟอลลิเคิลที่ตรวจหลังกระตุ้นนี้มีจำนวนต่ำกว่าที่ Techakumphu และคณะ (2000a, b) ได้รายงานไว้จากการตรวจรังไข่จากเปิดผ่าช่องท้อง โดยใช้โปรแกรมและวิธีการกระตุ้นอย่างเดียวกัน โดยหากใช้ FSH+GnRH ได้ผลตอบสนอง 17.6±12.1 ฟอลลิเคิลต่อตัว แต่หากใช้ FSH อย่างเดียว ได้ผลตอบสนองเป็น 13.9±8.6 ฟอลลิเคิลต่อตัว รวมทั้งได้ต่ำกว่าที่รายงานในกระบือปลักเพศเมียที่ได้รับการกระตุ้นด้วย FSH ขนาด 280 มก. ร่วมกับ GnRH 100 µg

(Techakumphu *et al.*, 2001) ในการกระตุ้นนี้จำนวนการตอบสนองนี้สูงกว่าที่ เอกชาติ พรหมดิเรกและคณะ (2543) ในกระบือปลักสาว 7 ตัว ที่ฉีดด้วยแพรกแนนท์ แมร์ ซีรั่ม โกนาโดโทรปิน (PMSG) โดยได้เท่ากับ 6.6±1.1 ฟอลลิเคิล โดยน่าจะมาจากการที่ฮอร์โมน FSH ให้ผลที่ดีกว่า PMSG (Techakumphu *et al.*, 2000a) ความแตกต่างนี้อธิบายได้จากวิธีการตรวจรังไข่ที่แตกต่างกัน โดยการตรวจดูด้วยโปรปขนาดความถี่ 5 MHz ติดกับอัลตราซาวน์จะไม่สามารถเห็นตัวรังไข่ได้ ชัดเจนโดยเฉพาะฟอลลิเคิลขนาดเล็กประมาณ 2-3 มม. เพราะอาจเกิดความผิดพลาดจากการนับซ้ำหรือไม่ได้นับ ในขณะที่เปรียบเทียบกับการเปิดผ่าดูรังไข่จะได้จำนวนที่แม่นยำกว่าอย่างแน่นอน ในการทดลองนี้ได้ตรวจรังไข่ในหลายระนาบและบันทึกจำนวนฟอลลิเคิลโดยให้เป็นหมายเลข (รูปที่ 12 และ 13) อาทิเช่น F1, F2, F3 ฯลฯ หรือในกรณีที่ไม่แตกต่างกันในแต่ละระนาบจะให้เป็นอักษร F แทนฟอลลิเคิล ดังแสดงในรูปที่ 14 Hashimoto และคณะ (1999) เสนอว่าการใช้หัวโปรปขนาด 7.5 MHz ตรวจดูรังไข่ที่ตัดมาจากตัวโค จะทำให้เห็นฟอลลิเคิลขนาดเล็ก 3-5 มม. ได้ชัดเจน (visualization) ดีกว่าหัวโปรปขนาด 5.0 MHz โดยพบจำนวน 9.0 ฟอลลิเคิล เปรียบเทียบกับ 3.2 ฟอลลิเคิล รวมทั้งเมื่อนำไปเก็บโอโอไซต์จากโคที่มีชีวิตการใช้โปรปขนาด 7.5 MHz จะเห็นภาพของฟอลลิเคิลที่จะเจาะ (aspirated follicles) ได้ดีกว่าขนาด 5.0 MHz และเมื่อเจาะแล้วยังพบว่าได้อัตราความสำเร็จในการเก็บสูงกว่าและมีจำนวนของโอโอไซต์ที่เหมาะสำหรับการนำไปปฏิสนธิได้ดีกว่า

อัตราการเก็บโอโอไซต์ในการทดลองนี้เฉลี่ยอยู่ที่ 84% ในกระบือสาว และ 78% ในลูกกระบือ โดยใช้ผู้ปฏิบัติเพียงคนเดียวในทั้งสองการทดลอง จึงไม่มีความแปรผันของผู้ปฏิบัติการ ตลอดจนประสบการณ์ เพราะเป็นผู้ที่มีประสบการณ์ในการเจาะมามากว่า 1 ปี ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่น่าพอใจได้จำนวนโอโอไซต์ประมาณ 7-8 โอโอไซต์ต่อตัว โดยทำการเก็บโอโอไซต์จากฟอลลิเคิลขนาดตั้งแต่ 3 มม. ถึง >10 มม. สูงกว่ารายงานในกระบือนมที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนก่อนการเจาะเก็บ OPU ได้ 2.78±1.75 โอโอไซต์ต่อตัว จากอัตราการเก็บ 50% (Boni *et al.*, 1996) และ 4.1 โอโอไซต์ต่อตัว (Galli *et al.*,1998) อัตราความสำเร็จในการเจาะโอโอไซต์ด้วยวิธี OPU นี้สูงกว่าที่เจาะโดยตรงจากการเปิดผ่าช่องท้องด้วยวิธีดูดด้วยไซริงค์ต่อกับเข็ม (laparotomy) ที่ Techakumphu และคณะ (2000a) ได้รายงานไว้ประมาณ 30% ส่วนรายงานในโคโดยทั่วไปอัตราการเจาะโอโอไซต์ผันแปรตั้งแต่ 18-66% ได้โอโอไซต์ตั้งแต่ 0.3-13 โอโอไซต์ โดยขึ้นกับหลายปัจจัย อาทิเช่น ความถี่ในการเจาะต่อสัปดาห์ การกระตุ้นด้วยฮอร์โมนหรือไม่ได้กระตุ้น การใช้หัวโปรปที่มีความถี่ต่างกัน (ตารางที่ 1) โดยน่าจะมาจากขนาดของฟอลลิเคิลและจำนวน

ของฟอลลิเคิล โดยในส่วนของขนาดพบว่า 80-90% ของฟอลิเคิลมีขนาด 2-6 มม. ในขณะที่ในลูกโคที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH ขนาดเดียวกัน มีประชากรของฟอลลิเคิลขนาดดังกล่าวน้อยกว่า โดยฟอลลิเคิลจะมีขนาด <5 มม. ประมาณ 15% เท่านั้น ส่วนใหญ่จะเป็นฟอลลิเคิลขนาด 5 มม. ถึงมากกว่า 10 มม. ถึง 85% ส่วนจำนวนของฟอลลิเคิลพบว่าการตอบสนองของโคต่อการฉีดฮอร์โมน FSH มีมากกว่า ประมาณ 30-40 ฟอลลิเคิลต่อตัว (มงคล เตชะกำพุและคณะ, 2539) การทดลองของ Pieterse และคณะ (1988) ชี้ให้เห็นว่าขนาดของฟอลลิเคิลมีส่วนเกี่ยวข้องกับความสำเร็จในการเก็บโอโอไซต์แบบ OPU โดยหากเจาะจากฟอลลิเคิลขนาด 3-5 มม. จะได้อัตราเท่ากับ 13% และเพิ่มเป็น 35, 31 และ 66% เมื่อเจาะจากฟอลลิเคิลขนาด 5-10, 10-15 และ 15 มม. อย่างไรงานวิจัยในลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์พบว่าการเจาะฟอลลิเคิลที่มีขนาดใหญ่มากกว่า 15 มม. มักประสบปัญหาในการเก็บโดย follicular fluid จะมีลักษณะเป็นเยลและแข็งตัวไม่สามารถแตกเอาโอโอไซต์ออกมาได้ (มงคล เตชะกำพุและคณะ, 2539)

ระดับของแรงดูดสูญญากาศมีผลต่ออัตราการเก็บและคุณภาพของโอโอไซต์ที่ได้ Looney และคณะ (1994) รายงานว่าความแรงของการดูดควรอยู่ในระดับที่เหมาะสมประมาณ 75-100 mmHg โดยมีอัตราการไหลของน้ำยาที่เก็บได้ประมาณ 22 มิลลิลิตร/นาที ซึ่งใกล้เคียงกับระดับของแรงดูดที่ Gerber และคณะ (2000) ใช้ โดยให้อัตราการเก็บ 51% ในโค และ 45.3% ในกระบือแอฟริกัน งานวิจัยนี้ได้ผลที่แตกต่างกับที่ศึกษาในโคที่ว่าอัตราการเก็บโอโอไซต์จะลดลงเมื่อระดับความแรงเพิ่มขึ้น ทั้งนี้มีเหตุผลที่อธิบายได้คือ

<u>หนึ่ง</u> การศึกษาผลของการใช้ระดับแรงดูดสูญญากาศต่าง ๆ ต่อความสำเร็จในการเจาะเก็บโอโอไซต์มักทำกับรังไข่ที่ตัดมาจากสัตว์ที่ตาย แล้วปรับระดับแรงดูดต่าง ๆ ในการเจาะฟอลลิเคิล ในขณะการศึกษานี้ทำการศึกษาในครั้งนี้ทำในสัตว์ที่มีชีวิตซึ่งจำเป็นต้องอาศัยการควบคุมเป็นอย่างดี

<u>สอง</u> ขนาดและจำนวนของฟอลลิเคิลของกระบือปลัก มีฟอลลิเคิลขนาดเล็กกว่าโดย 80-90% อยู่ในขนาด 2-8 มม. และจำนวนแตกต่างกันประมาณ 3-4 เท่า ทั้งที่ใช้โปรแกรมในการกระตุ้นเดียวกัน (มงคล เตชะกำพุและคณะ, 2539)

ระดับความแรงของการดูดที่เหมาะสมในกระบือปลักสาวที่ควบคุมและไม่ดิ้นรนขณะทำการเจาะ คือ 60 mmHg ปลัก ได้อัตราการเก็บสูงอยู่ในเกณฑ์ที่น่าพอใจถึง 90% และได้ชนิดของโอโอไซต์ที่ดี (COC+SP) ใกล้เคียงกับที่พบในกลุ่มแรงดูดอื่น ๆ อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าการใช้แรงดูดต่ำจำเป็นต้องอาศัยการควบคุมบังคับกระบือให้ดี เนื่องจากความเร็วของการไหลของ

follicular fluid ในการดูดด้วยแรงดูดต่ำจะช้ากว่าหากใช้แรงดูดที่สูง ไม่ว่าเข็มจะมีขนาดใดก็ตาม (ตารางที่ 2) หากสัตว์ขยับตัวหรือดิ้นรนจะทำให้เข็มหลุดจากฟอลลิเคิลได้ จากการทดลองในลูกกระบือปลักเพศเมียจำนวน 12 ตัว ที่สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ลำพญากลาง พบว่าการใช้แรงดูดขนาดต่ำ (60 mmHg) กับลูกกระบือซึ่งไม่เคยผ่านการล้วงตรวจ หรือการควบคุมเช่นเดียวกับที่ทำในกระบือปลักสาวที่ศูนย์ฝึกนิสิตสัตวแพทย์ จุฬาฯ ไม่เหมาะสมในการเจาะเก็บโอโอไซต์ โดยในกระบือปลักสามารถนำเข้าซองควบคุมได้อย่างง่าย และไม่ต้องมีการควบคุมเป็นพิเศษ (รูปที่ 5) ส่วนในลูกกระบือปลักที่สถานีต้องใช้การควบคุมพิเศษ (รูปที่ 6a) และสัตว์มักดิ้นรนมาก ขณะถูกควบคุมและทำการเจาะ OPU จึงได้อัตราการเก็บโอโอไซต์ทั้ง 2 ครั้งเหลือเพียง 66% เท่านั้น โดยเฉพาะในครั้งแรกที่อัตราการเก็บเพียง 43% เท่านั้น ลูกกระบือ 1 ใน 4 ตัว ไม่สามารถควบคุมการเจาะได้ เพราะเมื่อเริ่มเจาะดูดแล้วปรากฏว่าลูกกระบือจะพยายามดิ้นรน ทำให้ปลายเข็มหลุดจากฟอลลิเคิลได้ในขณะที่แรงดูดขนาด 100 และ 80 mmHg ที่มีความเร็วของการดูดเร็วกว่าได้อัตราที่สูงกว่า ซึ่งจะตรงกันข้ามกับที่ทำการทดลองในกระบือปลัก แสดงให้เห็นว่าการบังคับสัตว์ให้ดีจะมีผลอย่างมากต่อการเก็บ อย่างไรก็ตามหากมีการควบคุมลูกกระบือและกระบือมีความคุ้นเคยกับการควบคุมและการเจาะ น่าจะสามารถเพิ่มอัตราความสำเร็จในการเจาะได้ ดังเช่นการทดลองในรอบที่ 2 ของการทดลองครั้งที่ 2 ในกลุ่ม 60 mmHg นั้น สามารถเพิ่มอัตราการเก็บจาก 40% เป็น 80% ใกล้เคียงกับกลุ่ม 100 และ 80 mmHg เป็นที่น่าสังเกตว่าการควบคุมกระบือด้วย Xylacine HCl มีความสำคัญมาก เพราะลูกกระบือบางตัวจะมีการตอบสนองมาก เกินไปแม้จะให้ขนาดที่น้อยหรือขนาดตามน้ำหนักตัวก็ตาม จะล้มตัวลงและไม่สามารถเจาะได้ เพราะการเจาะในโคและกระบือ โดยทั่วไปจะทำในท่ายืนเท่านั้น รวมทั้งการใช้ Xylocaine HCl เป็นยาชาเข้าไขสันหลังเป็นสิ่งที่ควรคำนึง เพราะหากให้มากเกินไปจะเกิดโพรงอากาศในทวารหนัก ทำให้ไม่สามารถจับรังไข่ได้เพราะผนังลำไส้ใหญ่จะตึงมาก นอกจากการควบคุมพฤติกรรมของกระบือภายนอกด้วยยาทั้งสองชนิดแล้ว ยาทั้งสองชนิดยังช่วยเกิดการหย่อนตัวของอวัยวะภายในทั้งมดลูกและลำไส้ทำให้การทำงานได้ค่อนข้างสะดวกในช่วงเวลาประมาณ 30-45 นาทีของการทำงาน แรงดูดสูญญากาศที่ใช้ในฟอลลิเคิลที่ใช้ในการทดลองนี้อาจต่ำกว่าที่ใช้ในคนซึ่งอาจใช้สูงถึง 180 mmHg (van Beek อ้างโดย Pieterse and Kappen, 1988) ทั้งนี้เพราะในสตรีที่มีบุตรยากนั้นจะทำการเก็บโอโอไซต์จากฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ที่ใกล้ mature ขนาดตั้งแต่ 10 มม. และโอโอไซต์จะเป็นชนิด mature มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มกระจายตัวเป็นเมือกล้อมรอบ ดูดได้ยากหากใช้แรงดูดต่ำ แต่ในโคและกระบือที่ทดลองจะเจาะในฟอลลิเคิลที่กำลังเจริญ (growing follicles)

ซึ่งมีขนาด 2-8 มม. และโอโอไซต์ที่ได้ส่วนมากจะเป็นชนิด immature ที่ต้องทำการเลี้ยงให้พร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลองก่อน (*in vitro* maturation)

ในส่วนของคุณภาพของโอโอไซต์นั้น จากการทดลองนี้พบว่าไม่แตกต่างกันมากนักในชนิดของโอโอไซต์ที่ได้ ทั้งกลุ่มที่ดี (COC, S+P) และกลุ่มที่ไม่ดี (D, DEG, FZ) Bols และคณะ(1996) ได้ทดลองใช้ความแรงของการดูดที่แตกต่างกัน จาก 50, >70, 90, 110 และ 130 mmHg ในการทดลองเจาะฟอลลิเคิลจากรังไข่ของโคจากโรงฆ่าสัตว์โดยใช้เข็มเจาะขนาด 18g, 19g และ 21g พบว่าเมื่อแรงดูดสูงขึ้นจะได้จำนวนของโอโอไซต์เพิ่มขึ้น ไม่ว่าจะใช้เข็มขนาดใด แต่เมื่อเพิ่มแรงดูดขึ้นจะทำให้สัดส่วนของโอโอไซต์คุณภาพดีที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มหลายชั้นลดลง และความสามารถของโอโอไซต์ในการพัฒนาถึงระยะบลาสโตซีสยังลดลง เมื่อเพิ่มแรงดูดโดยเฉพาะแรงดูดในช่วงจาก 70 mmHg เป็น 130 mmHg ทั้งนี้เพราะการเพิ่มระดับแรงดูดมากเกินไปจะเป็นสาเหตุเกิดความผิดปกติของรูปร่างลักษณะของโอโอไซต์รวมทั้งไซโทพลาซึมได้ ในปี 1997 Fry และคณะได้ทำการศึกษาผลของระดับแรงดูดที่ต่างกัน ตั้งแต่ 25, 50, 75 และ 100 mmHg ในการทดลองเจาะฟอลลิเคิลจากรังไข่ของโคจากโรงฆ่าสัตว์ พบว่าอัตราการเก็บโอโอไซต์จะเพิ่มขึ้นจาก 46% เป็น 51, 53 และ 59% เมื่อความแรงในการดูดเพิ่มขึ้น แต่ในทางตรงกันข้ามหากเพิ่มความแรงจาก 50 mmHg เป็น 100 mmHg จะมีผลต่อคุณภาพของโอโอไซต์เกรด เอ (มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มหลายชั้น) และโอโอไซต์ปกติที่เหมาะจะนำไปทำการปฏิสนธินอกร่างกาย ดังนั้นจากการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นพบว่าหากความแรงในการดูดหรืออัตราไหลเร็วเกินไปจะมีผลต่อคุณภาพของโอโอไซต์ โดยจะพบโอโอไซต์ที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้ม (denude oocyte) เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากแรงดูดที่มากเกินไปจะทำให้เซลล์คิวมูลัสหลุดออก ซึ่งโอโอไซต์ชนิดนี้เป็นโอโอไซต์ที่ให้อัตราการปฏิสนธิต่ำและยังส่งผลให้ได้ตัวอ่อนจำนวนน้อยจากการปฏิสนธิ ระดับแรงดูดที่สูงจะทำให้น้ำไหลได้เร็วกว่าระดับแรงดูดต่ำหรืออีกนัยหนึ่งคือเจาะของเหลวในฟอลลิเคิลได้รวดเร็วกว่า จากการวัดอัตราการไหลของน้ำของการทดลองนี้พบว่าที่แรงดูด 60 mmHg จะมีน้ำไหลเท่ากับ 11.2 มล./ ต่อนาที ในขณะที่ 80 mmHg มีอัตราเท่ากับ 15 มล./นาที และที่ 100 mmHg มีอัตราไหลเท่ากับ 19 มล./นาที ซึ่งจะต่ำกว่าที่รายงานในตารางที่ 3 ทั้งนี้เนื่องมาจากเข็มที่ใช้มีความยาวกว่าโดยเป็นเข็มขนาดยาวถึง 34.5 ซม. งานวิจัยใน การทดลองที่ 1 ในกระบือปลักพบว่าอัตราของโอโอไซต์ชนิดที่ degenerate และ free zona มีประมาณ 13% เมื่อใช้ระดับ 60 mmHg ส่วนในกลุ่ม 80 และ 100 mmHg พบประมาณ 16-20% สอดคล้องกับการทดลองของ เอกชาติ พรหมดิเรกและคณะ (2543) ในกระบือสาวที่ใช้แรงดูดประมาณ 80-100 mmHg ที่พบประมาณ

21% ส่วนในลูกกระบือปลักในการทดลองที่ 2 ในกลุ่มแรงดูดระดับ 60 mmHg ไม่พบโอโอไซต์ที่ผิดปกติเหล่านี้ ในขณะที่ในระดับ 80-100 mmHg พบประมาณ 7% การลดโอโอไซต์ชนิด D และ FZ ดังกล่าวในกระบือาจทำได้ด้วยการใช้แรงดูดในระดับต่ำ อย่างไรก็ตามปัจจัยที่สำคัญต่อการเจาะโอโอไซต์ในกระบือปลักนอกเหนือระดับของแรงดูดแล้ว คือ การควบคุมสัตว์ยังมีผลโดยตรงต่ออัตราการเจาะเก็บอย่างมาก ทั้งนี้พบว่าผลการทดลองในลูกกระบือปลักจะกลับกับที่พบในกระบือปลักสาว โดยกลุ่ม 60 mmHg มีแนวโน้มที่ให้อัตราการเก็บโอโอไซต์ที่ต่ำสุด ในขณะที่ในกระบือปลักสาวอัตราการเก็บได้สูงมากถึง 90% สูงกว่าอีก 2 กลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ Bols และคณะ (1996) แสดงให้เห็นว่าความยาวของเข็มและขนาดของเข็มเป็นปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่โคที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ กรณีใช้เข็มขนาดใหญ่ (18g) จะให้อัตราของการเก็บสูงกว่าการใช้เข็มขนาดเล็ก (21g) แต่โอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัส (COC) จะสูงในกรณีหลังมากกว่า แต่พบว่าเข็มไม่ว่าขนาดใด (18, 19, 20, 21g) ก็ตามหากใช้ แรงดูดในการดูดมากคุณภาพของโอโอไซต์ลดลง จำนวนโอโอไซต์ชนิด COC ลดลง การใช้แรงดูดต่ำจะได้โอโอไซต์ที่ไม่เสียหายมาก โดยเปรียบเทียบแรงดูด 5 ขนาด คือ 50, 70, 90, 110 และ 130 mmHg หากใช้แรงดูดต่ำจะได้โอโอไซต์ชนิด COC สูง 60-70% ในขณะที่แรงดูดสูงจะให้เพียง 35-40% เท่านั้น อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ใช้การเจาะดูดจากรังไข่มิใช่เจาะจากสัตว์ที่มีชีวิตซึ่งจะมีความแตกต่างในเรื่องการควบคุมสัตว์ดังได้กล่าวในข้างต้น แต่ไม่พบว่ามีความแตกต่างของคุณภาพของโอโอไซต์ชนิด COC และ S+P ซึ่งเป็นโอโอไซต์ที่เหมาะสำหรับการนำไปเลี้ยงแล้วปฏิสนธิให้ผลของตัวอ่อนสูงอยู่ในระดับประมาณ 30% ในการทดลองนี้ใช้เข็มขนาด 17g ซึ่งอัตราการเก็บก็ใกล้เคียงกับที่รายงานในโค ในกระบือสาวพบว่าชนิดของโอโอไซต์ประมาณ 40% พบเป็นชนิดที่เหมาะสำหรับไปเลี้ยงต่อเพื่อนำไปปฏิสนธินอกร่างกาย ซึ่งต่ำกว่าในลูกกระบือที่พบโอโอไซต์เหล่านี้ถึงถึงเกือบเท่าตัวคือประมาณ 80% ซึ่งแสดงว่าโอโอไซต์ที่เจาะในลูกกระบือจะมีคุณภาพที่ดีกว่าในกระบือหลังวัยเจริญพันธุ์ ส่วนในการเจาะครั้งนี้พบว่ามีโอโอไซต์ชนิด EXP น้อย โดยโอโอไซต์ชนิดนี้เป็นชนิดที่เกิดการ maturation ในฟอลลิเคิลที่มีขนาดใหญ่ซึ่งมาจาก การฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH พบในเปอร์เซนต์ที่น้อยมากซึ่งสอดคล้องกับขนาดของฟอลลิเคิล ที่มีขนาด 10 มม. ขึ้นไป มีจำนวนน้อยด้วย และเมื่อย้อมดูลักษณะโครโมโซมพบว่าเป็นระยะ metaphase II อย่างไรก็ตามตามปกติในสัตว์มักไม่นิยมนำเอาโอโอไซต์ชนิดนี้ไปปฏิสนธิเพราะ มีจำนวนน้อยและมี maturation stage ที่แตกต่างกันในแต่ละใบ

การศึกษาสภาวะพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์เป็นแนวทางหนึ่งของการนำข้อมูลไปใช้ในการปฏิสนธินอกร่างกายต่อไป โดยเกี่ยวข้องกับระยะเวลาในการเลี้ยงโอโอไซต์ในหลอดทดลอง พบว่าโอโอไซต์ทั้งในกระบือสาวและลูกกระบือปลักผ่านระยะ GV (germinal vesicle) ซึ่งเป็นระยะของโอโอไซต์ชนิด immature ที่เจาะจาก growing follicles ของรังไข่ที่จากโรงฆ่าสัตว์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้น โดยโอโอไซต์ส่วนมากจะอยู่ก่อน metaphase I มีเพียงส่วนน้อยที่เป็นระยะ metaphase II ซึ่งเป็นโอโอไซต์ชนิด EXP ทั้งสิ้น แสดงให้เห็นว่าฮอร์โมน FSH เกี่ยวข้องกับการเกิดการเจริญพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์ การศึกษานี้สอดคล้องกับ นวเพ็ญ ภูติกนิษฐ์และคณะ (2544) ซึ่งแสดงว่าชั่วโมงของการเลี้ยงโอโอไซต์ชนิด COC และ S+P ในหลอดทดลองควรจะใช้เวลาที่น้อยกว่าที่รายงานโดยทั่วไปในกระบือ (มาลี อภิเมธีธำรง, 2539)

ข้อสรุปจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าแรงดูดสูญญากาศที่เหมาะสมนั้นอยู่ในระดับ 60-100 mmHg ทั้งนี้ขึ้นกับการควบคุมกระบือเป็นสำคัญ โดยหากเป็นกระบือที่ควบคุมได้เป็นอย่างดี ระดับแรงดูดที่ต่ำสามารถให้ผลการเก็บและคุณภาพโอโอไซต์ที่ดี ในขณะที่หากเป็นกระบือที่ไม่สามารถควบคุมได้อย่างดีจำต้องอาศัยการเจาะเก็บด้วยแรงดูดที่รวดเร็ว การศึกษาต่อไปในประเด็นของการนำโอโอไซต์ไปเลี้ยงในหลอดทดลองเพื่อศึกษาอัตราการเกิดสภาพพร้อมปฏิสนธินอกร่างกาย (*in vitro* maturation rate) และการศึกษาการปฏิสนธินอกร่างกายจากโอโอไซต์ (*in vitro* fertilization) ดังกล่าวจะเป็นวิธีการผลิตตัวอ่อนกระบือปลักได้ โดยทำการเก็บโอโอไซต์ซ้ำจากกระบือขณะมีชีวิตอยู่ด้วยวิธี OPU ซึ่งจะเป็นวิธีการทดแทนการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์ นอกจากนี้การเจาะเก็บโอโอไซต์เพื่อนำโอโอไซต์ไปผ่านกระบวนการวิจัยขั้นสูงทางเทคโนโลยีชีวภาพทางวิทยาการสืบพันธุ์ อาทิเช่น การย้ายฝากนิวเคลียส เป็นแนวทางหนึ่งเช่นกันที่ควรได้ทำการศึกษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

ชัยณรงค์ โลหชิต มงคล เตชะกำพุ วิชัย ทันตศุภารักษ์ เกวลี ฉัตรดรงค์ ศิริวัฒน์ ทรวดทรง และจินดา สิงห์ลอ. 2539 (1996). Ovum pick up ในลูกโคพื้นเมืองไทย. เวชชสาร-สัตวแพทย์. 25(4):303-313.

นวเพ็ญ ภูติกนิษฐ์ เอกชาติ พรหมดิเรก และมงคล เตชะกำพุ. 2544 (2001). การตรวจสอบระยะการเจริญของโอโอไซต์ที่เก็บจากรังไข่ของลูกกระบือปลักหลังกระตุ้นด้วยฟอลลิเคิลสติมูเลติง ฮอร์โมน. การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 สาขาสัตวแพทยศาสตร์ 5-7 กุมภาพันธ์ 2544 10 หน้า.

มาลี อภิเมธีธำรง 2539 (1996). ผลของอุณหภูมิ ซีรั่มลูกอ่อนโค และคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญพร้อมปฏิสนธิของไข่อ่อนกระบือปลัก. วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สายวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า ปีการศึกษา 2539 91 หน้า.

มาลี อภิเมธีธำรง นุชรินทร์ ศงสะเสน วิบูลย์ เยี่ยงวิศวกูร และจุรีย์รัตน์ สำเร็จประสงค์ 2542 (1999) การย้อมสีนิวเคลียสของโอโอไซต์กระบือปลักและโคด้วยวิธี Rapid Staining Method การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37 หน้า 329-335.

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

มงคล เตชะกำพุ เอกชาติ พรหมดิเรก นวเพ็ญ ภูติกนิษฐ์ และจินดา สิงห์ลอ. 2544 (2001). การศึกษาการเก็บโอโอไซต์ซ้ำด้วยเทคนิคใช้เครื่องมือคลื่นความถี่สูงสอดเข้าทางปากช่องคลอดในลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์ รายงานผลการวิจัยทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ปี 2543 42 หน้า

เอกชาติ พรหมดิเรก มงคล เตชะกำพุ นวเพ็ญ ภูติกนิษฐ์ และอัญชลี ณ เชียงใหม่. 2543 (2000). การศึกษาเบื้องต้นของการเก็บโอโอไซต์โดยใช้เครื่องตรวจอวัยวะภายในด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงในกระบือปลักสาว. เวชชสารสัตวแพทย์. 30(1):43-50.

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

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

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.

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

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

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

Brück, I., Synnestvedt, B. and Greve, T. 1997. Repeated transvaginal oocyte aspiration in unstimulated and FSH-treated mares. Theriogenology. 47:1157-1167.

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

Danell, B. 1987. Oestrous behavior, ovarian morphology and cyclical variation in follicular system and endocrine pattern in water buffalo heifers. PhD. Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden. 124p.

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

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

Galli, G., Duchi, R., Crotti, G. and Lazzari, G. 1998. Embryo production by ovum pick up in water buffalo. Theriogenology. 49:400. (Abstr.)

Gastal, E.L., Kot, K. and Ginther, O.J. 1995. Ultrasound-guided intrafoliicular treatment in mares. Theriogenology. 44:1027-1037.

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

Ginther, O.J. and Pierson, R.A. 1984. Ultrasonic anatomy of equine ovaries. Theriogenology. 21(3):471-484.

Graff, K.J., Meintjes, M., Dyer, V.W., Paul, J.B., Denniston, Ziomek, C. and Godke, R.A. 1999. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval following FSH stimulation of domestic goats. Theriogenology. 51:1099-1119.

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

Hinrichs, K. and Kenney, R.M. 1987. A colpotomy procedure to increase oocyte recovery rates on aspiration of equine preovulatory follicles. Theriogenology. 27:237. (Abstr.)

Kitiyanant, Y., Tocharus, C., Areekijseree, M. and Pavasuthipaisit, K. 1995. Swamp buffalo oocytes from transvaginal ultrasound-guided aspiration fertilized and co-cultured *in vitro* with bovine oviductal epithelial cells. Theriogenology. 43(1):250. (Abstr.)

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

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

Kühholzer, B., Miiller, S., Treuer, A., Seregi, J., Besenfelder, U. and Brem, G. 1997. Repeated endoscopic ovum pick-up in hormonally untreated ewes: a new technique. Theriogenology. 48:545-550.

Looney, C.R., Lindsey, B.R., Gonseth, C.L. and Johnson, D.L. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. Theriogenology. 41 (1) :67-72.

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

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

Palmer, E., Duchamp, G., Bezard, J., Magistrini, M., King, W.A., Bousquet, D. and Betteridge, K.J. 1987. Non-surgical recovery of follicular fluid and oocytes of mares. J. Reprod. Fert., Suppl. 35:689-690.

Pansart, C. 2000. Evolution de l'activite de transfert embryonnaire et d'ovum pick up en France et en Europe depuis 1995. Elevage et Insemination. UNCEIA, No. 298:18-24.

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

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

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

Samad, H.A. and Nasseri, A.A. 1979. Quantitaive study of primordial follicles in buffalo heifer ovaries. Compendium 13th FAO/SIDA International Course on Animal Reproduction, Uppsala, Sweden.

Smith, O.F. 1990. Follicular dynamics in Phillippine water buffalo (Bubalus bubalis). Ph.D Thesis., Central Luzon State University, Nueva Ecija, Phillippines. 227p.

Stangl, M., Kühholzer, B., Besenfelder, U. and Brem, G. 1999. Repeated endoscopic ovum pick-up in sheep. Theriogenology. 52:709-716.

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

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

Techakumphu M., Sukavong Y., Yienvisavakul V., Buntaracha B., Pharee S., Intaramongkol S., Apimeteetumrong M. and Intaramongkol J. 2001. The transfer of fresh and frozen embryos in an elite swamp buffalo herd. J. Vet. Med. Sci. 63 (8):849-852.

van der Schans, A, van de Westerlaken, L.A.J., De WIT, A.A.C., Eyestone, W.H. and de Boer, H.A.1991.Ultrasound – guided transvaginal collection of oocytes in the cow.Theriogenology. 35:288.(Abstr.)

ภาคผนวก

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์และกำลังเตรียมการตีพิมพ์

1. มงคล เตชะกำพุ เอกชาติ พรหมดิเรก นวเพ็ญ ภูติกนิษฐ์ 2545.(2002). ผลของระดับแรงดันสูญญากาศต่อการเก็บโอโอไซต์ด้วยเครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูงสอดผ่านทางช่องคลอดจากกระบือปลักสาว. การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 40 สาขาสัตวแพทยศาสตร์ 4-7 กุมภาพันธ์ 2544, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน หน้า 360-368
2. Techakumphu, M., Promdireg, A. 2002. The Effect of Aspiration Vacuum on Oocyte Recovery After Transvaginal Ultrasound – Guided Oocyte Retrieval from Swamp Buffalo Heifers (*Bubalus bubalis*). (in preparation)
3. Techakumphu, M., Promdireg and Phutikanit, N. 2002. Ovum pick up in prepubertal calves by different aspiration vacuum pressures. (in preparation)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลของระดับแรงดันสูญญากาศต่อการเก็บโอโอไซต์ด้วยเครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูง สอดผ่านทางช่องคลอดจากกระบือปลักสาว

The Effect of Aspiration Vacuum on Oocyte Recovery After Transvaginal Ultrasound – Guided Oocyte Retrieval from Swamp Buffalo Heifers (*Bubalus bubalis*)

มงคล เตชะกำพุ เอกชาติ พรหมดิเรก นาเพ็ญ ภูติกนิษฐ์

คำนำ

การเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีการดูดเจาะโดยอาศัยเครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูงพร้อมกับโปรบติดเข็มเจาะรังไข่ผ่านทางช่องคลอด หรือที่เรียกว่า "Transvaginal ultrasound guided oocyte retrival, Ovum Pick Up, OPU) เป็นวิธีที่นิยมเพื่อเก็บโอโอไซต์จากสัตว์ที่มีชีวิต แล้วนำโอโอไซต์มาปฏิสนธินอกร่างกาย (*in vitro* fertilization) ในการผลิตตัวอ่อนหรือนำมาเป็นโอโอไซต์ตัวรับเพื่อใช้ในการย้ายฝากนิวเคลียส (nuclear transfer, โคลนนิ่ง) ซึ่งกำลังเป็นที่สนใจในวงการวิทยาศาสตร์อย่างมาก เพราะมีประโยชน์ในวงการปศุสัตว์และวงการแพทย์อย่างมหาศาล พบว่างานวิจัยส่วนมากในปศุสัตว์จะดำเนินการในโคส่วนในกระบืองานวิจัยดังกล่าวมีไม่มากนัก เนื่องจากไม่ใช่เป็นสัตว์เศรษฐกิจในประเทศที่พัฒนาแล้ว ส่วนในประเทศไทยนั้นเป็นที่ทราบกันดีว่าปริมาณกระบือลดลงเหลือไม่ถึงล้านตัว และพันธุกรรมชั้นเลิศได้ถูกทำลายจากผู้คนในประเทศที่ไม่เห็นความสำคัญ การใช้เทคโนโลยีชีวภาพด้านการสืบพันธุ์นับเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถนำมารักษาพันธุกรรมได้ไม่ว่าจะเป็นด้านการผสมเทียม การย้ายฝากตัวอ่อน และการผลิตตัวอ่อนเพื่อการนำไปย้ายฝาก การที่จะได้ตัวอ่อนที่รู้พันธุกรรมต้องได้โอโอไซต์จากสัตว์ที่รู้พันธุกรรมนำมาปฏิสนธิกับพ่อกระบือชั้นเลิศและผลิตตัวอ่อน ดังนั้นการเก็บแบบโอพียูจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้เจาะรังไข่จากแม่กระบือที่รู้พันธุกรรม แล้วนำเอาโอโอไซต์ไปผลิตตัวอ่อนต่อไป จุดประสงค์ของงานวิจัยนี้ต้องการหาระดับแรงดันสูญญากาศที่เหมาะสมที่จะใช้ในกระบือเพื่อสามารถเก็บโอโอไซต์ได้มากและมีคุณภาพเหมาะที่จะนำไปปฏิสนธินอกร่างกายต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

กระบือสาวทดลอง

เลี้ยงกระบือปลักสาวทดลองเพศเมีย อายุประมาณ 2.5-3.0 ปี น้ำหนักประมาณ 250-300 กิโลกรัม จำนวน 6 ตัว ไว้ที่ศูนย์ฝึกนิสิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดนครปฐม โดยที่ให้อาหารข้น อาหารหยาบ และน้ำเต็มที่

ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department of Obstetrics Gynaecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

การแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

กลุ่มที่ 1 ใช้แรงดันสูญญากาศในการดูดขนาด 100 mmHg. (n =12)

กลุ่มที่ 2 ใช้แรงดันสูญญากาศในการดูดขนาด 80 mmHg. (n =12)

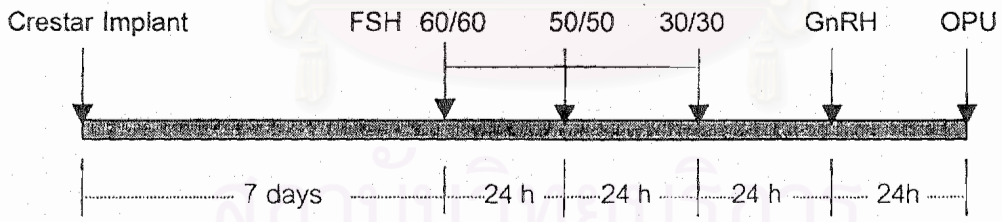
กลุ่มที่ 3 ใช้แรงดันสูญญากาศในการดูดขนาด 60 mmHg. (n =12)

(n = จำนวนครั้งของการเก็บ, OPU session)

โดยในแต่ละกลุ่มการทดลองจะเป็นกระบือชุดเดียวกันที่มีจำนวนสัตว์ทดลองกลุ่มละ 6 ตัว โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 รอบ รอบที่หนึ่งเริ่มการทดลองจากกลุ่มที่ 1 ไปกลุ่มที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ห่างกัน 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นทำซ้ำอีกหนึ่งรอบ โดยพักกระบือประมาณ 2.0 เดือน รอบที่สองจะเริ่มเช่นเดียวกับรอบแรกโดยเริ่มจากกลุ่มที่ 1 ไปกลุ่มที่ 2 และ 3 ตามลำดับ รวมแต่ละกลุ่มจะมีจำนวนการเก็บ 12 ครั้ง (6 ตัวx2 ครั้ง) การทดลองได้เริ่มดำเนินการในช่วงเดือนพฤษภาคม 2544 ถึงเดือนสิงหาคม 2544

การกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิล

ทำการฝังฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ชนิดฝังใบหู (Crestar®, Intervet, Netherlands) นาน 7 วัน ก่อนเริ่มต้นโปรแกรมการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนฟอลลิเคิล สตีมูเลทติง ฮอร์โมน (เอฟเอสเอช, Follicle Stimulating Hormone, FSH1, Folltropin®, Vetaphaarm, Australia) โดยเปลี่ยนฮอร์โมนฝังหูใหม่ทุกเดือน หลังจากนั้นทำการกระตุ้นรังไข่ โดยใช้ฮอร์โมน เอฟเอสเอช ขนาด 280 มก. ฉีดเข้ากล้าม แบ่งฉีดวันละ 2 ครั้ง (เช้าและเย็น) แบบลดขนาด (60/60, 50/50, 30/30) โดยเริ่มการกระตุ้นหลังฝังฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนไปแล้ว 7 วัน ก่อนการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู ฉีดฮอร์โมนจีเอ็นอาร์เอช (Cystolerin®, Sanofi, France) ขนาด 100 µg/ ตัว เข้ากล้ามเนื้อ หลังฉีดฮอร์โมน เอฟเอสเอช ครั้งสุดท้าย 24 ชั่วโมง (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 โปรแกรมการกระตุ้นรังไข่ในกระบือเพื่อเก็บโอโอไซต์ (Techakumphu et al., 2000)

การเตรียมตัวสัตว์ก่อนเก็บโอโอไซต์จากรังไข่

อดน้ำและอาหารกระบือ ก่อนทำการเก็บโอโอไซต์ประมาณ 24 ชั่วโมง นำลูกกระบือเข้าซองบังคับ ก่อนเริ่มการเก็บควบคุมสัตว์ด้วยการใช้ยากล่อมประสาท เช่น Xylazine HCl (Rompun®, Korea) 5 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนัก 100 กิโลกรัม เข้ากล้ามเนื้อ ร่วมกับการให้ยาชาเข้าไขสันหลังด้วย โดยฉีดยาชา 2% Xylocaine HCl จำนวน 1 มิลลิลิตร เพื่อลดการเคลื่อนไหวส่วนบั้นท้าย และความเจ็บปวดจากการเจาะรังไข่ ทำความสะอาดบริเวณบั้นท้ายและปากช่องคลอดด้วยยาฆ่าเชื้อแล้วเช็ดด้วยแอลกอฮอล์

การเจาะเก็บโอโอไซต์จากรังไข่

ทำการเจาะโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู ดังรายละเอียดที่เคยรายงานโดย ชัยณรงค์ โลหชิตและคณะ (2539) และ เอกชาติ พรหมดิเรกและคณะ (2544)

การตรวจหาและจำแนกชนิดของโอโอไซต์

นำของเหลวที่เจาะได้เทใส่ในกรวยกรองโอโอไซต์ขนาด 0.45 ไมครอน ชะล้างด้วยน้ำเกลือ 0.9%เทลงตามเพื่อล้างเม็ดเลือดที่ติดมา โดยให้ของเหลวไหลผ่านช้า ๆ ทำเช่นนี้หลาย ๆ ครั้ง เหลือน้ำยาไว้ประมาณ 50 มิลลิลิตร เทใส่เพลทพลาสติกขนาด 100x20 มม. แล้วตรวจหาภายใต้กล้องสเตอริโอ กำลังขยาย 40 เท่า เก็บโอโอไซต์ไว้ในน้ำยา TCM 199 2.5 mMHepes ในหลอดพลาสติกขนาด 10x35 มม. และจัดชนิดของโอโอไซต์เป็น 6 ลักษณะ คือ

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

โดยโอโอไซต์ชนิดที่ 1-3 จัดเป็นโอโอไซต์ที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ โอโอไซต์ชนิดที่ 4 เป็นโอโอไซต์ที่พร้อมปฏิสนธิ โอโอไซต์ชนิดที่ 5 เป็นโอโอไซต์ที่มีการเสื่อมสลาย (มงคล เตชะกำพุและคณะ, 2538) ส่วนโอโอไซต์ชนิดที่ 6 เป็นโอโอไซต์ที่พบในการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียูในลูกโคพื้นเมืองจากงานวิจัยของ ชัยณรงค์ โลหชิตและคณะ (2539)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการนับจำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้ในแต่ละตัว นำมาหาค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และทำการจำแนกออกเป็นชนิดต่าง ๆ ตามการจำแนกข้างต้น คิดอัตราการเก็บโอโอไซต์ในแต่ละครั้งของการเก็บจากจำนวนฟอลลิเคิลในแต่ละตัว แล้วนำมาคำนวณค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean±SD) ในแต่ละกลุ่มทดลอง เปรียบเทียบผลในแต่ละกลุ่มจำนวนและคุณภาพของโอโอไซต์ที่เก็บได้ โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Analysis of Variance(ANOVA) ชนิดทางเดียว

ผลการศึกษา

จากการเก็บโอโอไซตในกระบือปลักสาวทั้งสามกลุ่มการทดลองในแต่ละระดับแรงดัน คือ 60, 80 และ 100 mmHg โดยเป็นกระบือชุดเดียวกันจำนวนกลุ่มละ 6 ตัว พบว่าในแต่ละกลุ่มทดลองนั้นฟอลลิเคิลที่ถูกเจาะเปรียบเทียบกับฟอลลิเคิลที่ตรวจพบ (รูปที่ 2) คิดเป็นอัตราประมาณ 90-100% เฉลี่ย 95.6% (255/267) จากตารางที่ 1 เปรียบเทียบอัตราการเก็บโอโอไซต์ได้จากแรงดันขนาดต่าง ๆ พบว่าการเก็บด้วยแรงดัน 60 mmHg ได้อัตราที่สูงสุดคือ 84.10±21.68% ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับแรงดันขนาด 80 และ 100 mmHg ซึ่งทั้งสอง

แรงดันจะไม่แตกต่างกัน เท่ากับ 73.05±26.12% และ 74.6±17.82% ตามลำดับ เฉลี่ยทั้งสามกลุ่มจะมีอัตราการเก็บโอโอไซต์ได้เท่ากับ 77.25±22.06%

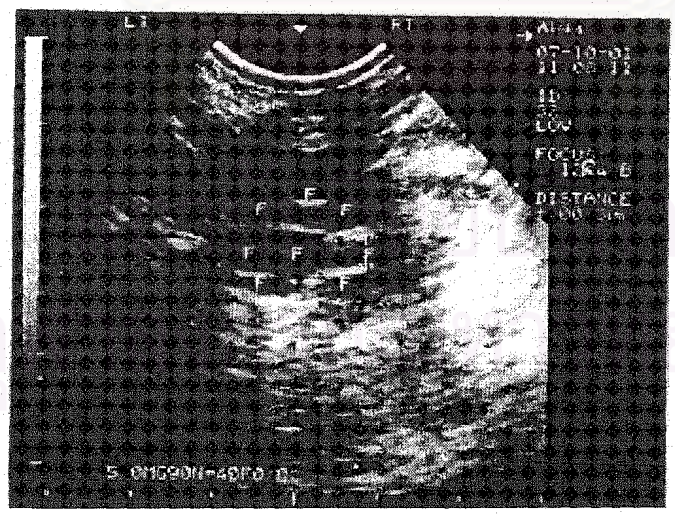
ตารางที่ 1 ผลเปรียบเทียบอัตราการเก็บโอโอไซต์ด้วยแรงดันสูญญากาศในระดับ 60, 80 และ 100 mmHg ในกระบือปลักสาว

Vacuum pressure (mmHg)	No. of Aspiration	Average no. of follicles per buffalo	Average no. of aspirated follicles per buffalo	Average no. of oocytes per session	Recovery rate (%)
60 mmHg	12	9.0±3.88 (n=108)	8.58±4.33 (n=103)	7.75±4.31 (n=93)	84.10±21.68[a]
80 mmHg	12	5.83±2.08 (n=70)	5.58±2.19 (n=67)	4.42±2.71 (n=53)	73.05±26.12[b]
100 mmHg	12	7.41±4.21 (n=89)	7.08±4.18 (n=85)	5.33±3.27 (n=69)	74.6±17.82[b]
Mean±SD	36	7.4±3.6 (n=267)	7.08±3.81 (n=255) [95.6%]	6.0±3.9 (n=215) (76.9%]	77.25±22.06

Value presented in mean±SD, n= number

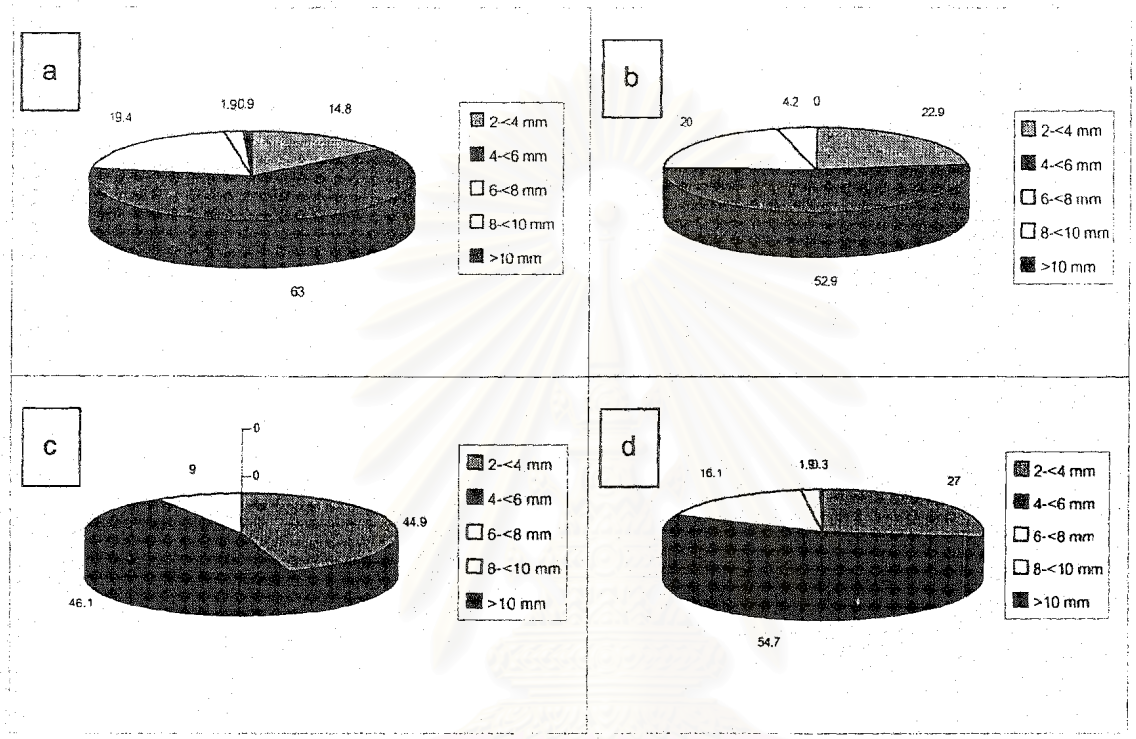
a, b ; P<0.05

[ ] = percentage



รูปที่ 2 ภาพอัลตราซาวด์แสดงผลการตอบสนองรังไข่ต่อการกระตุ้นก่อนการเก็บโอพียู (F=follicle)

รูปที่ 3 แสดงฟอลิเคิลขนาดต่าง ๆ ที่พบหลังกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เอฟเอสเอช พบว่าประชากรส่วนใหญ่จะเป็นฟอลลิเคิลที่มีขนาด 2-8 มม. มีสัดส่วนประมาณ 90% ส่วนที่เหลือจะเป็นขนาดใหญ่ที่มีฟอลลิเคิลตั้งแต่ 8 มม. จนถึงมากกว่า 10 มม.



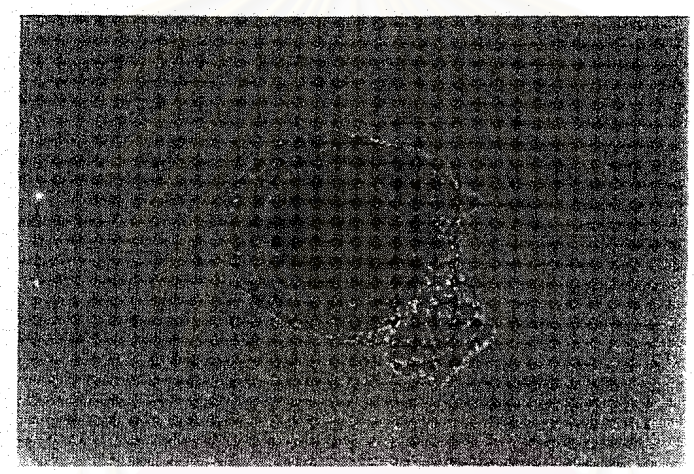
รูปที่ 3 กราฟแสดงสัดส่วนของฟอลลิเคิลขนาดต่าง ๆ ในกลุ่มทดลอง
A) 60 mmHg,B) 80 mmHg, C) 100 mmHg D) รวมทั้ง 3 กลุ่ม

จากตารางที่ 3 และรูปที่ 4 แสดงให้เห็นว่าชนิดของโอโอไซต์ในการเก็บพบว่าโอโอไซต์ชนิด Denude จะพบสูงสุดคือประมาณ 30-40% โดยแรงดันขนาด 80 mmHg จะพบน้อยที่สุด คือ 28.3% รองลงมาคือชนิด SP จะพบประมาณ 20-28% โอโอไซต์ชนิด COC และ EXP จะมีอัตราพอๆ กัน คือประมาณ 10-15% อัตราของโอโอไซต์ชนิดที่เสื่อมสลาย (DEG) สูงสุดในกลุ่ม 80 mmHg ในขณะที่โอโอไซต์ที่มีแต่เปลือก (FZ) พบประมาณ 5-10%

ตารางที่ 3 ชนิดของโอโอไซต์ในแต่ละระดับแรงดัน (mmHg) ที่ใช้เก็บแบบโอพียู

Vacuum pressure (mmHg)	No of oocytes	COC	SP	D	EXP	DEG	FZ
60 mmHg	69	11	15	16	5	7	4
		(14)	22.5	(37.6)	(12.9)	(6.45)	(6.45)
80 mmHg	53	5	15	15	3	10	5
		(9.4)	(28.3)	(28.3)	(5.7)	(18.9)	(9.4)
100 mmHg	130	13	21	35	12	9	8
		15.9	(21.7	(39.1)	(7.2)	(10.1)	(5.8)

Value in percent (%)



รูปที่ 4 ชนิดของโอโอไซต์ที่เก็บได้ด้วยวิธี โอพียู

วิจารณ์

ในการทดลองนี้ได้ทำการเก็บโอโอไซต์จากกระบือสาวทดลองจำนวน 6 ตัว จากการกระตุ้นทั้งหมด 36 ครั้ง โดยกระบือแต่ละตัวจะถูกกระตุ้นด้วยฟอลลิเคิล สติมูเลทติง ฮอร์โมน จำนวน 6 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 2 สัปดาห์ อัตราการเก็บโอโอไซต์ในการทดลองนี้เฉลี่ยอยู่ที่ 77% ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่น่าพอใจ โดยทำการเก็บโอโอไซต์จากฟอลลิเคิล ขนาดตั้งแต่ 3 มม. ถึง >10 มม. จากการกระตุ้นรังไข่ของกระบือปลักนี้พบว่ามีประมาณ 97% ของประชากรฟอลลิเคิลที่ตรวจพบอยู่ในระยะที่กำลังเจริญ (growing follicles) ในการทดลองนี้จะทำ การเก็บฟอลลิเคิลตั้งแต่ 3 มม.ขึ้นไป การทดลองของ Pieterse และ Kappen (1988) ชี้ให้เห็นว่าขนาดของฟอลลิเคิลมีส่วนเกี่ยวข้องกับความสำเร็จในการเก็บโอโอไซต์แบบโอพียู โดยหากเจาะจากฟอลลิเคิลขนาด 3-5

มม. จะได้อัตราเท่ากับ 13% และเพิ่มเป็น 35, 31 และ 66% เมื่อเจาะจากฟอลลิเคิลขนาด 5-10, 10-15 และ 15 มม.

ระดับของแรงดันจะมีผลต่อการเก็บโอโอไซต์ โดยพบว่าระดับแรงดันที่เหมาะสมคือ 60 mmHg ได้อัตราการเก็บสูงอยู่ในเกณฑ์ที่น่าพอใจคือประมาณ 80% และโอโอไซต์ที่เสียหายทั้งเสื่อมสลาย (degenerated oocytes) และเปลือกเปล่า ๆ ของ zona pellucida (free ZP) อยู่ในเกณฑ์ต่ำ อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าการใช้แรงดันต่ำจำเป็นต้องอาศัยการควบคุมบังคับกระบือให้ดี เนื่องจากความเร็วในการดูดด้วยแรงดันต่ำจะช้ากว่าหากใช้แรงดันที่สูง หากสัตว์ขยับตัวหรือดิ้นรนจะทำให้เข็มหลุดจากฟอลลิเคิลได้ งานทดลองโดยคณะผู้วิจัย (ข้อมูลที่ไม่นำเสนอ) จากการทดลองนี้ในลูกกระบือปลักเพศเมียจำนวน 3 ตัว ที่สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ลำพญากลาง พบว่าการใช้แรงดันระดับต่ำ (60 mmHg) กับลูกกระบือซึ่งไม่เคยผ่านการล้วงตรวจหรือการควบคุมเช่นเดียวกับที่ทำในกระบือปลักสาวที่ศูนย์ฝึกนิสิตสัตวแพทย์ จุฬาฯ พบว่าอัตราการเก็บได้เพียง 20% เท่านั้น เพราะเมื่อเริ่มเจาะดูดแล้วปรากฏว่าลูกกระบือจะพยายามดิ้นรน ทำให้ปลายเข็มหลุดจากฟอลลิเคิลได้ในขณะที่แรงดันระดับ 100 และ 80 mmHg ที่มีความเร็วของการดูดเร็วกว่าได้อัตราที่สูงกว่า ซึ่งจะตรงกันข้ามกับที่ทำการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่าการบังคับสัตว์ให้ดีจะมีผลอย่างมากต่อการเก็บ การควบคุมกระบือด้วย Xylacine HCl มีความสำคัญมาก เพราะกระบือบางตัวจะมีการตอบสนองมากเกินไปแม้จะให้ขนาดที่น้อยหรือขนาดตามน้ำหนักตัวก็ตาม จะล้มตัวลงและไม่สามารถเจาะได้ เพราะการเจาะในสัตว์ (โคและกระบือ) จะทำในท่ายืนเท่านั้น รวมทั้งการใช้ Xylocaine HCl เป็นยาชาเข้าไขสันหลังก็ต้องควรคำนึง เพราะหากให้มากเกินไปจะเกิดโพรงอากาศในทวารหนัก ทำให้ไม่สามารถจับรังไข่ได้เพราะผนังลำไส้ใหญ่จะตึงมาก นอกจากการควบคุมพฤติกรรมของกระบือภายนอกด้วยยาทั้งสองชนิดแล้ว ยาทั้งสองชนิดยังช่วยเกิดการหย่อนตัวของอวัยวะภายในทั้งมดลูกและลำไส้ทำให้การทำงานได้ค่อนข้างสะดวกในช่วงเวลาประมาณ 30-45 นาทีของการทำงาน แรงดันสูญญากาศที่ใช้ในฟอลลิเคิลที่ใช้ในการทดลองนี้อาจต่ำกว่าที่ใช้ในคนซึ่งอาจใช้สูงถึง 180 mmHg (van Beek อ้างโดย Pieterse and Kappen, 1988) ทั้งนี้เพราะในสตรีที่มีบุตรยากนั้นจะทำการเก็บโอโอไซต์จากฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ที่ใกล้ mature ขนาดตั้งแต่ 10 มม. และโอโอไซต์จะเป็นชนิด mature มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มกระจายตัวเป็นเมือกล้อมรอบ ดูดได้ยากหากใช้แรงดันต่ำ แต่ในโคและกระบือที่ทดลองจะเจาะในฟอลลิเคิลที่กำลังเจริญ (growing follicles) ซึ่งมีขนาด 2-8 มม. และโอโอไซต์ที่ได้ส่วนมากจะเป็นชนิด immature ที่ต้องทำการเลี้ยงให้พร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลองก่อน (*in vitro* maturation)

ในการทดลองนี้ได้ใช้วิธีการกระตุ้นรังไข่เพื่อให้มีการเพิ่มการเจริญของฟอลลิเคิล พบว่าก่อนการกระตุ้นรังไข่จะมีขนาดเล็ก พบฟอลลิเคิลประมาณ 2 ฟอลลิเคิลต่อตัว หลังกระตุ้นขนาดจะใหญ่ขึ้นพร้อมกับมีฟอลลิเคิลในจำนวนมากขึ้นพบถึง 7 ฟอลลิเคิลต่อตัว ฟอลลิเคิลที่มีขนาดมากกว่า 2 มิลลิเมตร มีประมาณ 95% ดังนั้นการเก็บโอโอไซต์โดยไม่ต้องกระตุ้นเป็นไปได้ยากเพราะขนาดรังไข่เล็กมากและมีฟอลลิเคิลน้อย แตกต่างกับในโคพันธุ์ต่างประเทศก่อนวัยเจริญพันธุ์และหลังวัยเจริญพันธุ์ที่มีฟอลลิเคิลอยู่ถึง 3.8-6.8 ฟอลลิเคิลต่อตัว และสามารถเก็บโอโอไซต์โดยไม่ต้องกระตุ้นถึง 1.9-3.1 โอโอไซต์ต่อตัว (Majerus et al., 1999) การให้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินจะช่วยให้ฟอลลิเคิลมีการเจริญมากขึ้นและจำนวนของโอโอไซต์ที่ได้จะสูงกว่าที่ไม่ได้ให้ การศึกษาในโคโดย Bungartz และคณะ (1995) พบว่าหากให้ฮอร์โมนเอฟเอสเอช จะเพิ่มโอโอไซต์ต่อการเก็บ

โอพียู ได้ 10.6 โอโอไซต์เปรียบเทียบกับ 5.8 โอโอไซต์ อย่างไรก็ตามผลของการกระตุ้นที่ตรวจต่ำกว่าที่ Techakumphu et al. (2000) ได้รายงานไว้จากการเจาะรังไข่หลังเปิดผ่าช่องท้อง (laparotomy) โดยใช้โปรแกรมและวิธีการกระตุ้นอย่างเดียวกัน ทั้งนี้เพราะการตรวจดูด้วยโปรปขนาดความถี่ 5 MHz ติดกับอัลตราซาวน์จะไม่สามารถเห็นตัวรังไข่ได้ชัดเจนโดยเฉพาะฟอลลิเคิลขนาดเล็ก ในขณะที่เปรียบเทียบกับการเปิดผ่าดูรังไข่จะได้จำนวนที่แม่นยำกว่าอย่างแน่นอน Hashimoto และคณะ (1999) เสนอว่าการใช้หัวโปรปขนาด 7.5 MHz ตรวจดูรังไข่ที่ตัดมาจากตัวโคจะทำให้เห็นฟอลลิเคิลขนาดเล็ก 3-5 มม. ได้ชัดเจน ดีกว่า (visualization) หัวโปรปขนาด 5.0 MHz โดยพบจำนวน 9.0 ฟอลลิเคิล เปรียบเทียบกับ 3.2 ฟอลลิเคิล ดังนั้นอัตราการเก็บโอโอไซต์จะแตกต่างกันจากหัวโปรปที่แตกต่างกัน

การใช้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินเพื่อกระตุ้นให้มีการเจริญฟอลลิเคิลมากขึ้นจะเป็นประโยชน์ในการเจาะ เพราะเมื่อฟอลลิเคิลมีมากจะทำให้เจาะโอโอไซต์ได้มาก ในโคการใช้ฮอร์โมนแพรกแนนท์ แมร์ซีรั่ม โกนาโดโทรปินกระตุ้นพบว่าจะได้อัตราการเก็บเพิ่มขึ้นประมาณ 12% จาก 18% เป็น 40% (Pieterse and Kappen, 1988) อย่างไรก็ตามการกระตุ้นมากเกินไปจะได้ฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 10 มม. ซึ่งอาจจะเกิดการแตกขณะจับรังไข่และก่อนเจาะได้ในการทดลองนี้ได้ใช้โปรแกรมที่ทางคณะผู้วิจัยได้ดำเนินการศึกษามาก่อน (Techakumphu et al., 2000) โดยใช้โกนาโดโทรปิน รีลีสซิ่งฮอร์โมน (จีเอ็นอาร์เอช) ในการควบคุมการเจริญแบบ down regulation ต่อฤทธิ์ของฮอร์โมนเอฟเอสเอช ดังนั้นจึงพบว่าฟอลลิเคิลส่วนมากที่พบมากกว่า 90% จะอยู่ในขนาด 2-8 มม. Bols และคณะ (1977) แสดงให้เห็นว่าความยาวของเข็มและขนาดของเข็มเป็นปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่โคที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ กรณีใช้เข็มขนาดใหญ่ (18g) จะให้อัตราของการเก็บสูงกว่าการใช้เข็มขนาดเล็ก (21g) แต่โอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัส (COC) จะสูงในกรณีหลังมากกว่า แต่พบว่าเข็มไม่ว่าขนาดใด (18, 19, 20, 21) ก็ตามหากใช้แรงดันในการดูดมากคุณภาพของโอโอไซต์ลดลง จำนวนโอโอไซต์ชนิด COC ลดลง การใช้แรงดันต่ำจะได้โอโอไซต์ที่ไม่เสียหายมาก โดยเปรียบเทียบแรงดัน 5 ขนาด คือ 50, 70, 90, 110 และ 130 mmHg หากใช้แรงดันต่ำจะได้โอโอไซต์ชนิด COC สูง 60-70% ในขณะที่แรงดันสูงจะให้เพียง 35-40% เท่านั้น อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ใช้การเจาะดูดจากรังไข่มิใช่เจาะจากสัตว์ที่มีชีวิตซึ่งจะมีความแตกต่างในเรื่องการควบคุมสัตว์ดังได้กล่าวในข้างต้น สำหรับในการทดลองนี้ไม่พบว่ามีความแตกต่างของคุณภาพของโอโอไซต์ชนิด COC และ SP ซึ่งเป็นโอโอไซต์ที่เหมาะสำหรับการนำไปเลี้ยงแล้วปฏิสนธิให้ผลของตัวอ่อนสูง อยู่ในระดับประมาณ 30% ในการทดลองนี้ใช้เข็มขนาด 17g ซึ่งอัตราการเก็บก็ใกล้เคียงกับที่รายงานในโค

สรุป

งานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าความสำเร็จในการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีโอพียู นั้นจะมีปัจจัยของแรงดันสูญญากาศเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย โดยทั้งนี้พบว่าหากมีการควบคุมสัตว์ได้เป็นอย่างดี การใช้แรงดันในระดับ 60 mmHg นั้นจะให้ผลที่สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับแรงดันที่ 80 และ 100 mmHg

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการเงิน 2543 (ครั้งที่ 4) ส่วนสัตว์ทดลองได้รับความอนุเคราะห์จากกองบำรุงพันธุ์ กรมปศุสัตว์

เอกสารอ้างอิง

ชัยณรงค์ โลหชิต มงคล เตชะกำพุ วิชัย ทันตศุภารักษ์ เกวลี ฉัตรดรงค์ ศิริวัฒน์ ทรวดทรง และจินดา สิงห์ลอ. 2538. Ovum pick up ในลูกโคพื้นเมืองไทย. เวชชสารสัตวแพทย์ 25(4):303-313.

มงคล เตชะกำพุ ชัยณรงค์ โลหชิต วิชัย ทันตศุภารักษ์ วันเพ็ญ ศรีอนันต์ จินดา สิงห์ลอ และ จินตนา อินทรมงคล. 2538. การกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ของลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์โดยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน. เวชชสารสัตวแพทย์. 25(1):49-62

เอกชาติ พรหมดิเรก มงคล เตชะกำพุ และนวเพ็ญ ภูติกนิษฐ์ 2545. การศึกษาเบื้องต้นของการเก็บโอโอไซต์โดยใช้เครื่องมือตรวจอวัยวะภายในด้วยคลื่นเสียงความถี่สูงในกระบือปลักสาว. เวชชสารสัตวแพทย์ 30(1):43-50.

Bols, P.E.J., Ysebaert, M.T., Van Soom, A. and de Kruif, A. 1997. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. Theriogenology. 47:1221-1226.

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

Hashimoto, S., Takakura, R., Minami, N. and Yamada, M. 1999. Ultrasound-guidedfollicle aspiration: Effect of the frequency of a linear transvaginal probe on the collection of bovine oocytes. Theriogenology. 52(3):131-138.

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

Pieterse, M.C. and Kappen, K.A. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. Theriogenology. 30(4): 751-762.

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