บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แมวบ้านและสัตว์ป่าตระกูลแมวมีวงรอบการเป็นสัดซึ่งมีลักษณะเฉพาะ 2 ประการคือ วงรอบการเป็นสัดแบบหลายวงรอบตามฤดูกาล (seasonal polyoestrus) และการตกไข่จะเกิดขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นจากภายนอกส่งผลให้ต่อมพิทูอิทารี่หลั่งฮอร์โมนแอลเอชเท่านั้น (induced ovulator) โดยระยะเวลาของแสงที่ได้รับมีผลต่อการทำงานของรังไข่ ในฤดูกาลที่มีเวลากลางวันยาวจะกระตุ้นให้รังไข่ของแมวทำงาน แต่หากเป็นฤดูกาลที่เวลากลางวันสั้นจะส่งผลให้รังไข่ของแมวเข้าสู่ระยะเงียบที่เรียกว่า ระยะ anoestrus (Kutzler, 2007) พันธุ์ของแมวมีผลต่อการเป็นสัด แมวพันธุ์ขนยาวมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของแสงที่ลดลงมากกว่าแมวพันธุ์ขนสั้นจึงไม่มีการผสมพันธุ์ในช่วงฤดูหนาว (Johnston, 2001)

การเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแมวบ้านและสัตว์ป่าตระกูลแมว จะทำเมื่อไม่มีโอกาสในการผสมพันธุ์ ตามธรรมชาติ หรือมีการผสมพันธุ์กันแต่ไม่เกิดการตั้งท้อง การเข้าสู่ระยะเงียบของวงรอบการเป็นสัด รวมถึงการเหนี่ยวนำให้เกิดการตกไข่เพื่อทำการย้ายฝากตัวอ่อน ซึ่งในสัตว์ตระกูลแมวนี้จะใช้ exogenous gonadotropins (LH, FSH, hCG, eCG, hMG) อาจใช้ฮอร์โมนเหล่านี้เพียงตัวเดียว หรือใช้ร่วมกันก็ได้ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัด ซึ่งฮอร์โมนเหล่านี้จะกระตุ้นให้เกิดการเจริญของฟอลลิเคิล เป็นผลให้ระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดสูงขึ้นและทำให้สัตว์แสดงอาการเป็นสัด (Kutzler, 2007)

การเจริญของฟอลลิเคิลในช่วงที่ไม่ใช่ฤดูผสมพันธุ์จากการใช้ฮอร์โมน partially purified porcine follicle stimulating hormone (FSH-P) เหนี่ยวนำการเป็นสัด พบว่าสามารถทำให้แมวร้อยละ 89 เป็นสัดได้ แมวจะเริ่มแสดงอาการเป็นสัดภายหลังจากฉีดฮอร์โมน 3-8 วัน และระยะเวลาในการเป็นสัดอยู่ในช่วง 2-7 วัน ซึ่งปริมาณฮอร์โมนที่ใช้ทั้งสิ้นคือ 5-9 มิลลิกรัม ต่อแมวหนึ่งตัว อีกทั้งยังพบว่า การใช้ฮอร์โมน FSH มีผลดีกว่าการใช้ equine chorionic gonadotropin (eCG) เนื่องจากฮอร์โมน FSH มีครึ่งชีวิตที่สั้นกว่าฮอร์โมน eCG ทำให้ช่วงเวลาในการจัดการบริหารยามีความแม่นยำมากขึ้น จำนวนของโอโอไซต์ที่เกิดการตกไข่ไม่มีความแตกต่างกัน และแมวตอบสนองต่อการได้รับฮอร์โมนซ้ำในครั้งที่สองเป็นอย่างดี (Tsutsui et al., 1989)

การเพิ่มขึ้นของระดับ FSH จะเหนี่ยวนำให้เกิด folliculogenesis โดยมีรายงานความสำเร็จของการใช้ eCG และ FSH-P ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแมวบ้าน จากการศึกษา

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

พบว่าการใช้ฮอร์โมน FSH-P นั้นการตอบสนองของรังไข่และอัตราการตกไข่นั้นขึ้นอยู่กับขนาดปริมาณของฮอร์โมนที่ใช้ และข้อเสียของฮอร์โมนนี้คือต้องฉีดวันละหนึ่งถึงสองครั้งติดต่อกันเป็นเวลา 2-6 วัน ต้องมีการจับบังคับสัตว์ทำให้เกิดความเครียด ส่วนการใช้ eCG จะเกิดถุงน้ำที่รังไข่ เกิดการสลายของฟอลลิเคิลก่อนที่จะมีการผสมพันธุ์ และเกิดแอนติบอดี้ต่อฮอร์โมน eCG และเมื่อมีการใช้ฮอร์โมน eCG เป็นครั้งที่สองในระยะเวลาที่ใกล้เคียงกัน แมวจะมีการตอบสนองต่อฮอร์โมนลดลง ดังนั้นหากมีการใช้ฮอร์โมนนี้ซ้ำควรเว้นระยะเวลาในการใช้ให้ห่างกันอย่างน้อยเป็นเวลา 6 เดือน (Wildt et al., 1978) ซึ่ง Wildt และคณะ (1978) ได้สรุปไว้ว่าการใช้ฮอร์โมนเหนี่ยวนำให้มีการเจริญของฟอลลิเคิลในแมวบ้านที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือ การฉีด FSH 2 มิลลิกรัม เข้ากล้ามเนื้อ ทุกวัน (แต่ไม่ควรเกิน 5 วัน) จนกระทั่งแมวแสดงอาการเป็นสัด อีกทั้งจำนวนตัวอ่อนที่ได้จากการเหนี่ยวนำให้มีการเจริญของฟอลลิเคิลดังกล่าวยังมีจำนวนมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับแมวที่มีวงรอบปกติตามธรรมชาติ (Goodrowe et al., 1986) Orosz และคณะ (1992) รายงานการใช้ human urinary follicle stimulating hormone (huFSH) และ human menopausal gonadotropin(hMG) เพื่อกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ folliculogenesis ในแมวบ้าน พบว่าจำนวนและขนาดของฟอลลิเคิลเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับก่อนได้รับฮอร์โมน ซึ่งเป็นการตอบสมมติฐานที่แสดงให้เห็นถึงความสำเร็จในการนำฮอร์โมนของมนุษย์มาใช้ในแมวบ้าน

ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาวิธีการต่างๆในการช่วยเรื่องระบบสืบพันธุ์ในมนุษย์มีการพัฒนาไปอย่างมาก มีการใช้การปฏิสนธิภายนอกร่างกาย รวมถึงการใช้ฮอร์โมนต่างๆเช่น FSH และ hMG ซึ่งการใช้ฮอร์โมนเหล่านี้จะมีผลกระตุ้นให้รังไข่ทำงาน และฮอร์โมนที่ใช้กันมากที่สุดคือ ฟอลลิเคิล สติมูเลติง ฮอร์โมน (FSH) ทำให้มีการคิดค้นฟอลลิเคิล สติมูเลติง ฮอร์โมน ชนิดรีคอมบิแนนต์ (rhFSH) ขึ้นมาจาก Chinese hamster ovarian cell ทำให้ได้ฮอร์โมน FSH ที่เหมือนกับ FSH ที่ผลิตได้ในร่างกาย ปราศจากอิทธิพลของฮอร์โมน LH ต่างจากการใช้ฮอร์โมน FSH ที่สกัดได้จากปัสสาวะหรือต่อมพิทูอิทารี่ ที่มีส่วนประกอบของฮอร์โมน LH อยู่ด้วย ซึ่งมีข้อดีคือมีความบริสุทธิ์มาก ลดความแปรปรวนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิต รวมถึงลดความเสี่ยงในการติดเชื้อ และได้มีการศึกษาในมนุษย์เพื่อเปรียบเทียบการใช้ rhFSH กับการใช้ฟอลลิเคิล สติมูเลติง ฮอร์โมน ชนิดที่สกัดได้จากปัสสาวะ พบว่า การใช้ rhFSH ดีกว่าการใช้ฟอลลิเคิล สติมูเลติง ฮอร์โมน ชนิดที่สกัดได้จากปัสสาวะ คือ เพิ่มจำนวนฟอลลิเคิลบนรังไข่ ได้โอโอไซต์เพิ่มมากขึ้น รวมทั้งคุณภาพตัวอ่อนและอัตราการตั้งครรภ์ที่ดีขึ้น (Palagiano et al., 2004) ขนาดของฮอร์โมนรวมถึงระยะเวลาที่ใช้ในการกระตุ้นแต่ละครั้งลดลง (Coelingh Bennink et al., 1998)

มีการศึกษาในผู้หญิงที่มีการกดการทำงานของต่อมพิทูอิทารีจากการกินยาคุมกำเนิด พบว่าการฉีด rhFSH 150 ไอยู ทุกวัน เป็นเวลา 1 สัปดาห์ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดฟอลลิเคิลจำนวนมากและมีขนาดใหญ่ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ฟอลลิเคิล สติมูเลติง ฮอร์โมน ชนิดที่สกัดได้จากปัสสาวะ (Mannaerts et al.,1996)

สำหรับในสัตว์ ได้มีการศึกษาถึงการใช้ rhFSH ในสัตว์หลายชนิด ซึ่งมีรายงานความสำเร็จต่างๆกันไป ในหนู (mice) มีการศึกษาโดยฉีด rhFSH 2 ครั้งเข้าทางใต้ผิวหนังในช่วงเวลาห่างกัน 24 ชั่วโมง ในขนาด 2.5, 5, 10, 20 ไอยู ซึ่งพบว่าจำนวนตัวอ่อนที่ได้จากหนูที่ได้รับฮอร์โมนขนาด 2.5 และ 5 ไอยู มีจำนวนน้อยกว่า หนูที่ได้รับฮอร์โมนขนาด 10 และ 25 ไอยู อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยในจำนวนตัวอ่อนที่ได้มาทั้งหมดนั้นมีสัดส่วนของตัวอ่อนที่มีความผิดปกติมากขึ้นเช่นกัน (Edwards et al., 2005)

ในกระต่าย มีการศึกษาถึงการใช้ rhFSH ร่วมกับ ลูทีไนท์ซิ่งฮอร์โมนชนิดรีคอมบิแนนต์ (rhLH) ที่มีผลต่อคุณภาพของตัวอ่อนในการทำการกระตุ้นให้เกิดการตกไข่หลายใบ (superovulation) และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนภายหลังจากการได้รับฮอร์โมนซ้ำ พบว่าจำนวนตัวอ่อนทั้งหมด และจำนวนตัวอ่อนที่ปกติ ที่ได้รับจากกลุ่มที่ฉีดฮอร์โมนนั้นมีมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมในการพัฒนาของตัวอ่อนไปจนถึงระยะบลาสโตซิส การฉีดฮอร์โมนซ้ำเป็นครั้งที่สองการตอบสนองของรังไข่จะลดลง แต่ยังคงกระตุ้นให้เกิดการตกไข่หลายใบได้มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันนั้นจะสามารถตรวจพบได้ชัดเจนเมื่อฉีดฮอร์โมนซ้ำเป็นครั้งที่สาม (Viudes De Castro et al., 2009)

ได้มีการศึกษาถึงขนาดการใช้ rhFSH ในลิง(rhesus monkeys) โดยแบ่งเป็น 3 การทดลองคือ การทดลองที่ 1 ฉีด rhFSH 37.5 ไอยู วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 8 วัน การทดลองที่ 2 ฉีด rhFSH 18 ไอยู วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 8 วัน และการทดลองที่ 3 ฉีด rhFSH 9 ไอยู วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 8 วัน พบว่าในการทดลองที่ 1 และ 2 ฟอลลิเคิลมีการตอบสนองที่ดีต่อฮอร์โมน แต่ในการทดลองที่ 3 นั้นฟอลลิเคิลตอบสนองต่อฮอร์โมนน้อยกว่าการทดลองที่ 1 และ 2 อย่างมีนัยสำคัญ (Yang et al., 2007)

การทดลองฉีด rhFSH ในม้า ขนาด 450และ 900 ไอยู วันละสองครั้ง เข้ากล้ามเนื้อ แล้วใช้การอัลตราซาวน์ติดตามผลของการเจริญของฟอลลิเคิล วัดขนาดของฟอลลิเคิลในวันที่ตกไข่ พบว่า rhFSH ไม่ได้ช่วยเพิ่มจำนวนของฟอลลิเคิลขนาดกลาง (25-35 มิลลิเมตร) และฟอลลิเคิล

ขนาดใหญ่ (>35 มิลลิเมตร) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม รวมถึงไม่มีผลต่ออัตราการตกไข่ จำนวนตัวอ่อนและคุณภาพของตัวอ่อนที่ได้ด้วย (Tharasanit et al., 2006)

อย่างไรก็ตามในปัจจุบันยังไม่พบว่ามีการศึกษาถึงขนาดการใช้ rhFSH ในแมวบ้านหรือสัตว์ป่าตระกูลแมวที่จะทำให้เกิดผลต่อการเปลี่ยนแปลงของฟอลลิเคิลและการเหนี่ยวนำการเป็นสัด ดังนั้นการใช้ฮอร์โมนดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในแมวบ้านจึงเป็นเรื่องที่ควรทำการศึกษาเพื่อทำให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการจัดการทางระบบสืบพันธุ์ การศึกษานี้จึงมุ่งหวังจะศึกษาถึงประสิทธิภาพของการใช้ rhFSH ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแมวบ้าน

การจัดการกับปัญหาความไม่สมบูรณ์พันธุ์หรือปัญหาการผสมพันธุ์ให้ครบวงจรนั้นคือการทำให้เกิดลูก ดังนั้นการผสมจริงหรือผสมเทียมภายหลังจากการเหนี่ยวนำให้เป็นสัดจึงเป็นขั้นตอนสำคัญอีกขั้นหนึ่ง หากแต่การผสมจริงไม่สามารถทำได้ในทุกกรณี ในบางครั้งสัตว์เพศผู้และสัตว์เพศเมียอาศัยอยู่คนละที่ การผสมเทียมจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการจัดการกับปัญหาที่เกิดขึ้น การผสมเทียมในแมวเป็นเทคนิคที่มีความสำคัญในการกระจายพันธุกรรมที่มีค่าสามารถทำได้ทั้งในแมวบ้านและแมวป่า โดยเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถใช้ได้เมื่อการผสมจริงตามธรรมชาติไม่สามารถเกิดขึ้นได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแมวป่า การผสมเทียมได้เข้ามามีบทบาทในการอนุรักษ์เป็นอย่างมาก ซึ่งจะต้องทำการเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ไว้ก่อนโดยการรีดเก็บน้ำเชื้อโดยใช้ช่องคลอดเทียมหรือใช้เครื่องกระตุ้นไฟฟ้า รวมถึงการเก็บน้ำเชื้อจากอิพิดิไดมิสส่วนท้าย ทั้งนี้สามารถใช้ทำการผสมเทียมได้ทันทีที่ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อมาหรือทำการผสมเทียมภายหลังการเก็บรักษาโดยการแช่เย็นหรือแช่แข็ง ซึ่งการผสมเทียมนี้สามารถปล่อยน้ำเชื้อได้ในหลายตำแหน่ง คือ ในช่องคลอด ในมดลูก และในท่อนำไข่ วิธีการต่างๆเหล่านี้ล้วนมีรายงานความสำเร็จในการผสมติดแล้วทั้งสิ้น (Tsutsui et al., 2006)

การผสมเทียมในช่องคลอดและในมดลูกจำเป็นจะต้องใช้ตัวอสุจิจำนวน 80×10^6 และ 8×10^6 ตัว เพื่อทำให้เกิดการผสมติด แต่ในกรณีที่มีตัวอสุจิจำนวนน้อยสามารถใช้การผสมเทียมบริเวณท่อนำไข่มาประยุกต์ใช้ในทางคลินิคได้ เนื่องจากตำแหน่งที่ทำการปล่อยน้ำเชื้อมีความสัมพันธ์กับจำนวนอสุจิที่ทำการผสม หากมีตัวอสุจิอยู่น้อยการผสมเทียมในตำแหน่งที่ใกล้เคียงกับบริเวณที่เกิดการปฏิสนธิตามธรรมชาติจะทำให้โอกาสในการผสมติดมากขึ้น (Tsutsui et al., 2000) โดยในแมวบ้านได้มีผู้เคยทำการทดลองโดยใช้น้ำเชื้อสดมีตัวอสุจิ 5×10^3 ตัว 5×10^5 ตัว 2×10^6 ตัว และ 4×10^6 ตัว พบว่า กลุ่มที่ใช้น้ำเชื้อสดที่มีตัวอสุจิ 5×10^3 ตัว และ 5×10^5 นั้นผสมไม่ติด แต่กลุ่มที่ใช้น้ำเชื้อสดที่มีตัวอสุจิ 2×10^6 ตัว มีอัตราการผสมติดร้อยละ 25 และกลุ่มที่ใช้น้ำเชื้อสดที่มีตัวอสุจิ 4×10^6 ตัว มีอัตราการผสมติดร้อยละ 43 (Tsutsui et al., 2001) แต่หากใช้

อสุจิจากอิพิดิไดมิส10×10^6 ตัว ที่ผ่านการแช่เย็นภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนจะนำไปผ่านกระบวนการแช่แข็ง พบว่าถ้าทำการผสมภายหลังเหนี่ยวนำการตกไข่ด้วย hCG เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 30 ชั่วโมง จะมีอัตราการผสมติดเป็นร้อยละ 80และ 20 ตามลำดับ (Toyonaga et al., 2011) จากการศึกษาเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าการผสมเทียมผ่านทางท่อนำไข่นั้นใช้จำนวนตัวอสุจิน้อยกว่าการผสมเทียมที่มีการปล่อยน้ำเชื้อในช่องคลอดหรือในมดลูก

ช่วงเวลาที่ตกไข่ในแมวเพศเมียเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสัมพันธ์ต่ออัตราการผสมติด การผสมที่เกิดขึ้นในช่วงก่อนการตกไข่มีอัตราการผสมติดที่ดีกว่าการผสมที่เกิดขึ้นภายหลังการตกไข่ (Tsutsui et al., 2000; Toyonaga et al., 2011) ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้ทดลองการจัดการระบบสืบพันธุ์ทั้งในแมวเพศเมียและแมวเพศผู้ เมื่อมีความพร้อมในการผสมพันธุ์ไม่ตรงกัน เพื่อศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการผสมติดภายหลังจากการเหนี่ยวนำการเป็นสัดแมวเพศเมียด้วย rhFSH และทำการผสมเทียมผ่านทางท่อนำไข่ด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะช่วยจัดการปัญหาในแมวที่มีภาวะการเป็นสัดเงียบหรือไม่มีอาการเป็นสัด ซึ่งพบได้บ่อยในแมวพันธุ์ขนยาว เช่น แมวเปอร์เซีย หรือช่วยในเรื่องการเก็บรักษาพันธุกรรมที่ดีของแมวพันธุ์แท้ไว้ อีกทั้งแมวบ้านยังสามารถใช้เป็นต้นแบบในทางระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ป่าตระกูลแมว ซึ่งสามารถก่อให้เกิดประโยชน์ยิ่งขึ้นในกรณีของสัตว์ป่าตระกูลแมวในธรรมชาติที่ใกล้จะสูญพันธุ์จากการถูกล่า การถูกเปลี่ยนแปลงสภาพที่อยู่อาศัยหรือการเกิดตายเฉียบพลัน

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1.เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของ rhFSH ที่มีต่อการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแมวบ้าน

2.เพื่อศึกษาการใช้ rhFSH ในขนาดต่างๆ ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของฟอลลิเคิล

3.เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของ rhFSH ที่มีต่อการเจริญถึงระยะพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์

4.เพื่อศึกษาถึงความเป็นไปได้ในผสมติดภายหลังจากการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่ในแมว rhFSH และ hCG แล้วทำการผสมเทียมผ่านทางท่อนำไข่ด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.การจัดการกับระบบสืบพันธุ์ในแมวเพศเมียที่มีระยะเป็นสัดเงียบหรือไม่เป็นสัด ด้วยการใช้ rhFSH เพื่อเหนี่ยวนำการเป็นสัด หรืออาจนำไปประยุกต์ใช้ในการเหนี่ยวนำแม่ตัวรับในการย้ายฝากตัวอ่อน

2.สามารถใช้การเหนี่ยวนำการเป็นสัด และการผสมเทียมผ่านทางท่อนำไข่ด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง เป็นทางเลือกหนึ่งในการจัดการผสมพันธุ์ในแมว สามารถผสมติด ทำให้เกิดลูกได้และลูกที่เกิดมาไม่มีความผิดปกติ

3.นำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในสัตว์ป่าตระกูลแมวขนาดเล็ก

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การเหนี่ยวนำการเป็นสัดวในสัตว์ตระกูลแมว

การเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแมวบ้านและสัตว์ป่าตระกูลแมวจะมีบทบาทเมื่อสัตว์ไม่มีโอกาสในการผสมพันธุ์กันสัตว์เพศผู้และเพศเมียอาศัยอยู่กันคนละถิ่นที่อยู่ มีปัญหาด้านการผสมติด การรักษาสภาวะการไม่เป็นสัด สัตว์ไม่อยู่ในฤดูผสมพันธุ์ และ การเหนี่ยวนำการเป็นสัดในโปรแกรมการย้ายฝากตัวอ่อน (Kutzler ,2007) ซึ่งในแมวมีรายงานวิธีการเหนี่ยวนำการเป็นสัดไว้หลายวิธีการเช่น การควบคุมระยะเวลาที่แมวได้รับแสง การใช้การกระตุ้นทางสังคม (Michel, 1993) และการใช้ฮอร์โมนกลุ่มgonadotropins (LH, FSH, hCG, eCG, hMG)

การควบคุมระยะเวลาที่แมวได้รับแสง และการใช้การกระตุ้นทางสังคม

มีการศึกษาถึงการควบคุมระยะเวลาที่แมวได้รับแสง 12 ชั่วโมงต่อวันเป็นเวลา 1 เดือน ตามด้วยแสง 14 ชั่วโมงต่อวัน จนกระทั่งแมวแสดงอาการเป็นสัด จะสามารถทำให้แมวแสดงอาการเป็นสัดได้ใน 44.6 ± 0.5 วัน ภายหลังจากที่ปรับระยะเวลาการให้แสง และหากปรับการให้แสงให้มีช่วงเวลาที่แสงจ้าเป็นเวลา 1 ชั่วโมงในช่วงเวลากลางคืน แมวจะแสดงอาการเป็นสัดในเวลา 15.6 ± 0.5 วัน ช่วยลดระยะเวลาที่ใช้ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดได้จากการที่แมวมีระยะที่ไวรับต่อการเปลี่ยนแปลงของช่วงแสง และเมื่อแมวได้รับแสง 12 ชั่วโมงต่อวันเป็นเวลา 3 สัปดาห์ จากนั้นนำแมวเพศผู้ หรือแมวเพศเมียที่เป็นสัด มาอาศัยอยู่ในที่เดียวกัน พบว่า แมวจะแสดงอาการเป็นสัดในเวลา 22.3 ± 0.7 วัน ดังนั้นวิธีการที่ง่ายและรวดเร็วที่สุดในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแมวคือการปรับการให้แสงให้มีช่วงเวลาที่แสงจ้าในตอนกลางคืน (Michel, 1993)

การใช้ฮอร์โมนกลุ่ม Gonadotropins

การเจริญของฟอลลิเคิลบนรังไข่แมวและสัตว์ป่าตระกูลแมว สามารถทำได้ในช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์ โดยการฉีดฮอร์โมน eCG หรือ FSH

การใช้ฮอร์โมน Equine chorionic gonadotropin (eCG)

eCG เป็นฮอร์โมนที่มีฤทธิ์ของทั้ง FSH และ LH มีค่าครึ่งชีวิตยาว ซึ่งเหมาะกับการใช้ในสัตว์ป่าตระกูลแมว มากกว่าการใช้ FSH ที่ออกฤทธิ์ระยะสั้นและต้องฉีดวันละครั้งหรือหลายครั้ง เพราะ eCG มีฤทธิ์อยู่ในกระแสเลือดได้นาน 120 ชั่วโมง (Swanson et al., 1997) การฉีด eCG เพียงครั้งเดียวสามารถเพิ่มระดับ gonadotropin ในร่างกายที่จะไปกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิล และเกิดการตกไข่ได้ รังไข่ของแมวบ้านมีความไวต่อฮอร์โมน eCG มาก เมื่อฉีดเข้าไปแล้วจะไป

เพิ่ม LH receptors บนรังไข่ (La Polt et al., 1990) อย่างไรก็ตามถ้าฉีด eCG ในขนาดน้อยกว่า 100 ไอยู จะไม่สามารถเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแมวบ้านได้ (Colby, 1970) แต่พบว่าสามารถใช้ eCG ขนาด 200 ไอยู ในการเหนี่ยวนำให้ตกไข่พร้อมกันหลายๆใบได้และค่าเฉลี่ยของการตกไข่ คือ 39.1 โอโอไซต์ต่อแมวหนึ่งตัว (Kanda et al., 1995) มีรายงานว่าการฉีด eCG 300-500 ไอยู ในการเหนี่ยวนำให้ตกไข่พร้อมกันหลายๆใบ จะเป็นผลในการลดอัตราการตั้งท้องลง (Cline et al., 1980) ซึ่งอัตราการตั้งท้องที่ลดลงนี้ อาจเนื่องมาจากการขนส่งบริเวณท่อนำไข่มีความผิดปกติ จากการมีฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดมากจากการมีจำนวนฟอลลิเคิลที่มากเกินไป

eCG ที่ใช้ในแมวบ้านอาจเป็นสาเหตุของการเกิด ถุงน้ำที่รังไข่ (follicular cyst) มีจำนวนฟอลลิเคิลที่ไม่เกิดการตกไข่จำนวนมาก (Wildt et al., 1978) หรืออาจจะเกิดการตกไข่ก่อนเวลาผสมพันธุ์ได้ (Swanson et al., 1995) เมื่อฉีด eCG ไปจะเกิดแอนติบอดี้ขึ้น ส่งผลต่อการกระตุ้นการทำงานของรังไข่ได้หากทำการกระตุ้นติดต่อกันเร็วเกินไป

การใช้ฮอร์โมน Follicle stimulating hormone

FSH มีค่าครึ่งชีวิต 149 นาที เมื่อ FSH หลั่งออกมาจะไปจับกับตัวรับบน granulosa cell ซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญที่จะทำให้เกิดการพัฒนาของแอนทรัลฟอลลิเคิล (antral follicles) และฟอลลิเคิลในระยะก่อนการตกไข่ (Palagiano et al., 2004) การใช้ฮอร์โมน FSH นี้สามารถกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลบนรังไข่ได้จำนวนมาก ซึ่งการตอบสนองของรังไข่ ต่อฮอร์โมนนี้รวมถึงอัตราการตกไข่จะขึ้นอยู่กับขนาดที่ใช้ในการบริหารยา ข้อเสียของการใช้ FSH คือต้องฉีดฮอร์โมนวันละหนึ่งถึงสองครั้ง ติดต่อกันเป็นเวลา 2-6 วัน (Pelican et al., 2006) จากการศึกษาถึงจำนวนและคุณภาพตัวอ่อนที่ได้ภายหลังจากการเป็นสัดตามธรรมชาติเปรียบเทียบกับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย FSH-P 2 มิลลิกรัม/วัน เป็นเวลา 5 วัน พบว่าการเหนี่ยวนำการเป็นสัดเกิดการตอบสนองของรังไข่ และจำนวนตัวอ่อน มากกว่าการเป็นสัดตามธรรมชาติ แต่คุณภาพของตัวอ่อนที่ได้จากการเป็นสัดตามธรรมชาตินั้นดีกว่า มีความสามารถเจริญไปถึงระยะมอรูล่าและบลาสโตซิสต์ได้มากกว่าการเหนี่ยวนำการเป็นสัด อย่างไรก็ตามการย้ายฝากตัวอ่อนภายหลังจากการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย FSH-P สามารถทำให้เกิดลูกได้ (Goodrowe et al., 1986)

การใช้ FSH-P ในขนาดต่างกันมีผลต่อการเหนี่ยวนำการเป็นสัด การเจริญของฟอลลิเคิลบนรังไข่ และการเหนี่ยวนำให้เกิดการตกไข่พร้อมกันหลายๆใบในแมวบ้าน ขนาดการใช้ FSH-P ที่สามารถกระตุ้นการทำงานของรังไข่และเก็บตัวอ่อนได้คือ การฉีด FSH-Pเข้าใต้ผิวหนัง 0.75 มิลลิกรัม/วัน เป็นเวลา 5 วัน ในวันที่ 6 ฉีด FSH-P 0.25 มิลลิกรัม เข้าใต้ผิวหนัง และ hCG 375 ไอยู เข้ากล้ามเนื้อ และในวันที่ 7 ฉีด hCG 375 ไอยู เข้ากล้ามเนื้อ (Dresser et al., 1987) มีความพยายามในการเหนี่ยวนำให้แมวตกไข่นอกฤดูผสมพันธุ์โดยการฉีด FSH-P 2 มิลลิกรัม/วัน ในวัน

แรก หลังจากนั้นฉีด FSH-P 1 มิลลิกรัม/วัน ทุกวันจนแมวแสดงอาการเป็นสัด พบว่าแมวร้อยละ 89.5 แสดงอาการเป็นสัดภายใน 3-8 วันหลังจากฉีดฮอร์โมนเข็มแรก (Tsutsui et al., 1989)

กระบวนการฟอลิคูโลจีนีสิส (Folliculogenesis) ถูกกระตุ้นโดยการเพิ่มขึ้นของระดับฮอร์โมน FSH จึงมีการทดลองใช้ FSH ที่สกัดได้จากปัสสาวะ (huFSH และ hMG) ในการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการฟอลิคูโลจีนีสิสในแมวบ้าน พบว่า huFSH และ hMG สามารถเพิ่มจำนวนฟอลลิเคิลได้เล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการเป็นสัดตามธรรมชาติ ซึ่งสามารถทำให้เก็บโอโอไซต์จากการเจาะดูดที่รังไข่ได้ 13.8 โอโอไซต์ แล้วนำไปปฏิสนธิภายนอกร่างกาย ซึ่งอัตราการผสมติดของกลุ่มที่รับ huFSH และ hMG คือ ประมาณร้อยละ 26.3 ± 6.6 และร้อยละ 19.1 ± 8.9 ตามลำดับ จากนั้นทำการย้ายฝากตัวอ่อนประสบผลสำเร็จมีการตั้งท้องเกิดขึ้น แต่ลูกที่เกิดขึ้นจากกลุ่มที่ฉีด huFSH ตายในขณะคลอด ส่วนลูกที่เกิดขึ้นจากกลุ่มที่ฉีด hMG เกิดมาปกติ 2 ตัว (Orosz et al., 1992)

FSH ที่ได้จากรีคอมบิแนนต์ ดีเอ็นเอ เทคโลโนยี

30 ปีที่ผ่านมา FSH ที่มีจำหน่ายทั่วไป เป็นสารที่สกัดแยกได้จากปัสสาวะของผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน จะมีทั้ง FSH และ LH เป็นส่วนประกอบ ซึ่งข้อเสียคือ ความไม่บริสุทธิ์ของ FSH จึงมีการนำดีเอ็นเอ เทคโนโลยีมาใช้ในการผลิต rhFSH ผลิตโดยการนำพลาสมิดที่มียีน FSH 2 ซับยูนิต เลี้ยงบน Chinese hamster ovary (CHO) cell ผลิตภัณฑ์ที่ได้มานี้มีความบริสุทธิ์มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 99 เมื่อเปรียบเทียบในระดับโปรตีน ส่วนประกอบของกรดอะมิโน ลำดับกรดอะมิโน มีความเหมือนกับ FSH ตามธรรมชาติที่ได้จากคน แต่จะมีความต่างในสายคาร์โบไฮเดรตที่ FSH ในธรรมชาติเป็น α 2-6 ต่อกับกรดเซียลิค ในขณะที่ rhFSH จะเป็น α 2-3 ต่อกับกรดเซียลิค (Leeuw et al., 1996) ในปี 1991 มีการนำฮอร์โมนชนิดนี้มาใช้ในคนเป็นครั้งแรก และในปี 1992 ทารกแฝด 2 คนได้กำเนิดขึ้นมา (Palagiano et al., 2004)

rhFSH ที่มีจำหน่ายมี 2 ชนิด คือ follitropin alpha (Gonal-F®, Serono, Switzerland) และ follitropin beta (Puregon®, Organon, The Netherlands) ผลิตภัณฑ์ทั้งสองมีความเหมือนกันมาก เนื่องจากผลิตจากกระบวนการรีคอมบิแนนต์เทคโนโลยีแบบเดียวกัน แตกต่างกันเพียงกระบวนการ glycosylation และ purification เท่านั้น (Palagiano et al., 2004)

การออกฤทธิ์ของ rhFSH ที่ใช้ในคน

ในคนมีการศึกษาการใช้ rhFSH เปรียบเทียบกับ huFSH ในผู้หญิง 1,556 ราย และ 1,319 ราย ที่เข้ารับการรักษาการมีบุตรยาก ด้วยวิธีการ IVF และ ICSI พบว่าการใช้ rhFSH จะมีอัตราการตั้งครรภ์ที่ดีกว่าการใช้ huFSH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Daya and Gunby, 1999) ในผู้หญิงสาวที่ไม่มีการตอบสนองต่อการใช้ฮอร์โมน huFSH เมื่อให้ rhFSH ทำให้ระดับฮอร์โมน FSH และ estradiol อยู่ในระดับปกติได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า rhFSH มีประสิทธิภาพมากกว่า huFSH (Raga et al., 1999) ในผู้หญิงที่เป็น endometriosis เมื่อใช้ฮอร์โมน rhFSH เปรียบเทียบกับ huFSH พบว่ามีการตกไข่ ร้อยละ 85.7 และ 80.9 ตามลำดับ และมีอัตราการตั้งท้องเป็นร้อยละ 36.4 และ 31.2 ตามลำดับ

ข้อเสียของรีคอมบิแนนต์ฮอร์โมน คือ มีราคาสูง แต่เมื่อศึกษาถึงราคาเปรียบเทียบกับความสำเร็จในการรักษา พบว่าเมื่อเปรียบเทียบการใช้ฮอร์โมนกับจำนวนวงรอบที่ทำให้เกิดความสำเร็จในการตั้งครรภ์ rhFSH จะให้ผลสำเร็จที่มากกว่า huFSH ดังนั้นราคาของการรักษาด้วย rhFSH จึงต่ำกว่าการรักษาด้วย huFSH (Daya, 2002)

การใช้ rhFSH ในสัตว์

สำหรับในสัตว์ ได้มีการศึกษาถึงการใช้ rhFSH ในสัตว์หลายชนิด ซึ่งมีรายงานความสำเร็จต่างๆกันไป ในหนู (mice) มีการศึกษาโดยฉีด rhFSH 2 ครั้งเข้าทางใต้ผิวหนังในช่วงเวลาห่างกัน 24 ชั่วโมง ในขนาด 2.5 ,5 , 10 และ 20 ไอยู ซึ่งพบว่าจำนวนตัวอ่อนที่ได้จากหนูที่ได้รับฮอร์โมนขนาด 2.5 และ 5 ไอยู มีจำนวนน้อยกว่า หนูที่ได้รับฮอร์โมนขนาด 10 และ 25 ไอยู อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยในจำนวนตัวอ่อนที่ได้มาทั้งหมดนั้นก็มีสัดส่วนของตัวอ่อนที่มีความผิดปกติมากขึ้นด้วยเช่นกัน (Edwards et al., 2005)

ในกระต่าย มีการศึกษาถึงการใช้ rhFSH ร่วมกับ ลูทีไนท์ซิ่งฮอร์โมน ชนิดรีคอมบิแนนต์ (rhLH)ที่มีผลต่อคุณภาพของตัวอ่อนในการทำการกระตุ้นให้เกิดการตกไข่หลายใบ (superovulation) และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อฮอร์โมนภายหลังจากการได้รับฮอร์โมนซ้ำ พบว่าจำนวนตัวอ่อนทั้งหมด และจำนวนตัวอ่อนที่ปกติ ที่ได้รับจากกลุ่มที่ฉีดฮอร์โมนนั้นมีมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมในการพัฒนาของตัวอ่อนไปจนถึงระยะบลาสโตซิส การฉีดฮอร์โมนซ้ำเป็นครั้งที่สองการตอบสนองของรังไข่จะลดลง แต่ยังคงกระตุ้นให้เกิดการตกไข่หลายใบได้มากกว่า

กลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันนั้นจะสามารถตรวจพบได้ชัดเจนเมื่อฉีดฮอร์โมนซ้ำเป็นครั้งที่สาม (Viudes De Castro et al., 2009)

ได้มีการศึกษาถึงขนาดการใช้ rhFSH ในลิง(rhesus monkeys) โดยแบ่งเป็น 3 การทดลองคือ การทดลองที่ 1 ฉีด rhFSH 37.5 ไอยู วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 8 วัน การทดลองที่ 2 ฉีด rhFSH18 ไอยู วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 8 วัน และการทดลองที่ 3 ฉีด rhFSH 9 ไอยู วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 8 วัน พบว่าในการทดลองที่ 1 และ 2 ฟอลลิเคิลมีการตอบสนองที่ดีต่อฮอร์โมน แต่ในการทดลองที่ 3 นั้นฟอลลิเคิลตอบสนองต่อฮอร์โมนน้อยกว่าการทดลองที่ 1 และ 2 อย่างมีนัยสำคัญ (Yang et al., 2007)

ในม้ามีการทดลองฉีด rhFSH ขนาด 450 และ 900 ไอยู วันละสองครั้ง เข้ากล้ามเนื้อ แล้วใช้การอัลตราซาวน์ติดตามผลของการเจริญของฟอลลิเคิล วัดขนาดของฟอลลิเคิลในวันที่ตกไข่ พบว่าrhFSHไม่ได้ช่วยเพิ่มจำนวนของฟอลลิเคิลขนาดกลาง (25-35mm) และฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ (>35mm) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม รวมถึงไม่มีผลต่ออัตราการตกไข่ จำนวนตัวอ่อนและคุณภาพของตัวอ่อนที่ได้ด้วย (Tharasanit et al., 2006)

การเจริญถึงระยะพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์

โอโอไซต์ที่ได้จากการกรีดหั่นรังไข่ของแมวจะถูกคัดแยกเป็น 4 เกรด ตามคุณภาพ (Wood and Wildt, 1997) คือ

เกรด I คุณภาพดีมาก ไซโทพลาสซึมสีเข้มเป็นเนื้อเดียวกัน มี cumulus cell ล้อมรอบมากกว่า 5 ชั้น

เกรด II คุณภาพดี ไซโทพลาสซึมสีเข้มเป็นเนื้อเดียวกัน มี cumulus cell ล้อมรอบน้อยกว่า 5 ชั้น

เกรด III คุณภาพพอใช้ ไซโทพลาสซึมสีจาง ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน cumulus cell ที่ล้อมรอบลอกหลุดออกไปบางส่วน

เกรด IV คุณภาพไม่ดี ไซโทพลาสซึมสีจาง ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน cumulus cell ที่ล้อมรอบลอกหลุดออกไปทั้งหมด

โอโอไซต์เกรด I จะมีโอกาสเจริญไปถึงระยะพร้อมปฏิสนธิและสามารถปฏิสนธิภายนอกร่างกายด้วยวิธี IVF ร้อยละ 60 และ 30 ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าโอโอไซต์เกรดอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าโอโอไซต์เกรด III และ IV จะไม่สามารถแบ่งตัวหรือ

เจริญเติบโตในการเลี้ยงในตู้ทดลองได้ ดังนั้นควรจะทำการคัดแยกโอโอไซต์ก่อนที่จะทำการเลี้ยงในตู้ทดลอง เนื่องจากโอโอไซต์ที่มีคุณภาพต่างกันจะส่งผลต่อความสามารถของโอโอไซต์ในการเจริญถึงระยะพร้อมปฏิสนธิ การปฏิสนธิ หรือการพัฒนาของตัวอ่อน (Wood and Wildt, 1997)

การผสมเทียมในแมว

การผสมเทียมในแมวมีบทบาทสำคัญเมื่อการผสมตามธรรมชาติไม่ประสบความสำเร็จ แมวเพศผู้กับแมวเพศเมียอาศัยอยู่กันคนละที่ ส่วนใหญ่จะทำในแมวพันธุ์แท้ที่มีคุณค่ามาก หรือสัตว์ป่าตระกูลแมวที่ใกล้สูญพันธุ์ การผสมเทียมมี 3 วิธี โดยเรียกชื่อตามตำแหน่งที่ปล่อยตัวอสุจิ คือ การผสมเทียมบริเวณช่องคลอด (intravaginal artificial insemination; IVAI) การผสมเทียมบริเวณมดลูก(intrauterine artificial insemination; IUAI) และการผสมเทียมบริเวณท่อนำไข่ (intratubal artificial insemination; ITAI) จำนวนตัวอสุจิมีความสำคัญต่อการผสมติดมากซึ่งจำนวนตัวอสุจิจะมีปริมาณต่างๆกันไปตามวิธีที่ใช้ในการผสมเทียม ทั้งนี้สามารถใช้ตัวอสุจิที่เป็นน้ำเชื้อสด ตัวอสุจิที่ผ่านกระบวนการแช่เย็น หรือตัวอสุจิที่ผ่านกระบวนการแช่แข็ง ในการผสมเทียม ซึ่งผลสำเร็จของการผสมติดจะขึ้นอยู่กับวงรอบการเป็นสัดของแมวเพศเมีย และเวลาที่ทำการผสมเทียมด้วย (Tsutsui, 2006)

การผสมเทียมในแมวประสบความสำเร็จครั้งแรกในแมวที่เป็นสัดตามธรรมชาติด้วยวิธีการผสมเทียมบริเวณช่องคลอด โดยใช้น้ำเชื้อสดที่มีตัวอสุจิ 5-50×10^6 ตัว โดยมีอัตราการผสมติดร้อยละ 54 และลูกที่เกิดมาเฉลี่ยครอกละ 2-4 ตัว (Sojka et al., 1970) หลังจากการศึกษาครั้งแรก 30 ปี มีการศึกษาเรื่องการผสมเทียมด้วยวิธีการผสมเทียมบริเวณช่องคลอดถึงจำนวนตัวอสุจิที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดการผสมติด ทำการผสมเทียมในแมวที่เป็นสัดตามธรรมชาติ ทำการผสมในชั่วโมงที่ 15 ชั่วโมงที่20 และ ชั่วโมงที่ 30 โดยใช้น้ำเชื้อสดที่มีตัวอสุจิ 20 ×10^6 ตัว 40 ×10^6 ตัว และ 80 ×10^6 ตัว ภายหลังจากเหนี่ยวนำการตกไข่ อัตราการผสมติดคือ ร้อยละ 6 ร้อยละ34 และร้อยละ 78 ตามลำดับ (Tanaka et al., 2000)

ความสำเร็จครั้งแรกของการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง ด้วยวิธีการผสมเทียมบริเวณช่องคลอด ทำทั้งในแมวที่เป็นสัดตามธรรมชาติและแมวที่เหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย FSH 2 มิลลิกรัม/วัน จนกระทั่งแมวแสดงอาการเป็นสัด โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งที่มีตัวอสุจิเคลื่อนที่ได้ 50-100×10^6 ตัว โดยมีอัตราการตั้งท้องร้อยละ 10.6 และลูกที่เกิดมาครอกละ 1-4 ตัว (Platz et al., 1978)

การผสมเทียมบริเวณปีกมดลูกทั้งสองข้าง ภายหลังการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย eCG 100 ไอยู เหนี่ยวนำการตกไข่ด้วย hCG ใน 80 ชั่วโมงถัดมา โดยใช้น้ำเชื้อสดที่มีตัวอสุจิ 2.4-19.2×10^6 ตัว (เฉลี่ย 6.2 ± 0.9×10^6 ตัว) โดยมีอัตราการผสมติดร้อยละ 14 เมื่อทำการผสมเทียม

ก่อนที่จะเกิดการตกไข่ (25-33 ชั่วโมงภายหลังการฉีด hCG) และอัตราการผสมติดร้อยละ 50 เมื่อทำการผสมเทียมหลังจากที่มีการตกไข่ (31-41 ชั่วโมงภายหลังการฉีด hCG) (Howard et al., 1992)

มีรายงานการทำการผสมเทียมในปีกมดลูกข้างเดียวโดยใช้น้ำเชื้อสดที่มีตัวอสุจิ 2 $\times 10^6$ ตัว 4×10^6 ตัว และ 8 $\times 10^6$ ตัว พบว่าอัตราการผสมติดเป็นร้อยละ 13 ร้อยละ31 และร้อยละ 80 ตามลำดับ โดยการผสมก่อนที่จะมีการตกไข่ให้อัตราการผสมติดที่สูงกว่าการผสมหลังจากที่มีการตกไข่ (ร้อยละ 56 และ 21 ตามลำดับ) (Tsutsui et al., 2000)

การผสมเทียมในปีกมดลูกข้างเดียวโดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง 50×10^6 ตัว มีอัตราการผสมติดร้อยละ 57 แต่หากใช้อสุจิจากอิพิดิไดมิสที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งมาทำการผสมด้วยวิธีเดียวกันนี้จะได้อัตราการผสมติดร้อยละ 27 (Tsutsui et al, 2000; Tsutsui et al., 2003)

การผสมเทียมบริเวณท่อนำไข่ โดยใช้น้ำเชื้อสดมีตัวอสุจิ 5 $\times 10^3$ ตัว 5×10^5 ตัว 2×10^6 ตัว และ 4 $\times 10^6$ ตัว พบว่า กลุ่มที่ใช้น้ำเชื้อสดที่มีตัวอสุจิ 5 $\times 10^3$ ตัว และ 5×10^5 นั้นผสมไม่ติด แต่กลุ่มที่ใช้น้ำเชื้อสดที่มีตัวอสุจิ 2×10^6 ตัว มีอัตราการผสมติดร้อยละ 25 และกลุ่มที่ใช้น้ำเชื้อสดที่มีตัวอสุจิ 4×10^6 ตัว มีอัตราการผสมติดร้อยละ 43 (Tsutsui et al., 2001) แต่หากใช้อสุจิจากอิพิดิไดมิสที่ผ่านการแช่เย็นภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนจะนำไปผ่านกระบวนการแช่แข็ง พบว่าถ้าทำการผสมภายหลังเหนี่ยวนำการตกไข่ด้วย hCG เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 30 ชั่วโมง จะมีอัตราการผสมติดเป็นร้อยละ 80และ 20 ตามลำดับ (Toyonaga et al., 2011)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

<u>การทดลองที่1</u> การศึกษาผลของขนาดการใช้ฟอลลิเคิล สติมูเลติง ฮอร์โมน ชนิดรีคอมบิแนนต์ที่มีผลต่อการเหนี่ยวนำการเป็นสัด ฟอลลิเคิลบนรังไข่ และคุณภาพของโอโอไซต์ในแมวบ้าน

ประชากร

แมวเลี้ยงเพศเมีย อายุ 1-3 ปี น้ำหนัก 1.5-3 กิโลกรัม ยังไม่ทำหมัน ไม่ตั้งท้อง ไม่เคยมีประวัติการป่วยด้วยโรคทางระบบสืบพันธุ์หรือความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์จากการตรวจร่างกายเบื้องต้น ไม่เคยผ่านการใช้ฮอร์โมนมาก่อน ผ่านการตรวจสุขภาพแล้วว่ามีสุขภาพแข็งแรงและได้รับความยินยอมจากเจ้าของสัตว์ให้นำมาทำการศึกษาวิจัย

การแบ่งกลุ่มทดลอง

แมวสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงที่ผ่านการคัดเลือกจำนวน 24 ตัว จะถูกแบ่งกลุ่มด้วยวิธีการสุ่มเลือกตัวอย่าง (Randomization) ออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม เป็นแมวสุขภาพสมบูรณ์ แข็งแรง ที่เข้ารับการผ่าตัดทำหมันและไม่เคยมีประวัติได้รับฮอร์โมนสังเคราะห์มาก่อน รังไข่ภายหลังการทำหมันอยู่ในระยะพัก จำนวน 7 ตัว

กลุ่มที่ 2 กลุ่มทดลอง แมวจะได้รับการฉีดrhFSH ขนาด 5 ไอยู จำนวน 5 ตัว

กลุ่มที่ 3 กลุ่มทดลอง แมวจะได้รับการฉีดrhFSH ขนาด 10 ไอยู จำนวน 6 ตัว

กลุ่มที่ 4 กลุ่มทดลอง แมวจะได้รับการฉีดrhFSH ขนาด 25 ไอยู จำนวน 6 ตัว

โดยแมวทุกตัวในกลุ่มทดลอง (กลุ่ม 2-4) จะได้รับการควบคุมการให้แสงวันละ 12 ชั่วโมง และอยู่ในระยะ interoestrus ก่อนได้รับการฉีดฮอร์โมนโดยยืนยันได้จากการเฝ้าสังเกตวงรอบการเป็นสัดอย่างน้อย 2 วงรอบจากพฤติกรรมและการตรวจเซลล์เยื่อบุช่องคลอด

<u>การทดลองที่2</u> การใช้ฟอลลิเคิลสติมูเลติงฮอร์โมน ชนิดรีคอมบิแนนต์ ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและทำการผสมเทียมผ่านทางท่อนำไข่ด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง

ประชากร

1. แมวเลี้ยงเพศเมีย มีเจ้าของ อายุ 1-3 ปี น้ำหนัก 1.5-3 กิโลกรัม ยังไม่ทำหมัน ไม่ตั้งท้อง ไม่เคยมีประวัติการป่วยด้วยโรคทางระบบสืบพันธุ์หรือความผิดปกติของระบบ

สืบพันธุ์จากการตรวจร่างกายเบื้องต้น ไม่เคยผ่านการใช้ฮอร์โมนมาก่อน และอยู่ในระยะ interoestrus

2. แมวเพศผู้ อายุ 1-3 ปี น้ำหนัก 2-3.5 กิโลกรัม ที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ แมวทุกตัวผ่านการตรวจสุขภาพแล้วว่ามีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงและได้รับความยินยอมจากเจ้าของสัตว์ให้นำมาทำการศึกษาวิจัย

กลุ่มทดลอง

แมวเลี้ยงเพศผู้จำนวน 3 ตัว ที่จะถูกนำมารีดน้ำเชื้อด้วยวิธีกระตุ้นด้วยไฟฟ้าและทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส

แมวเพศเมียจำนวน 9 ตัว ที่ผ่านการคัดเลือกจากประชากรจะถูกนำมาศึกษา

วิธีดำเนินงานวิจัย

1. **ขั้นเตรียมดำเนินงานวิจัย**

1.1 การตรวจสอบประวัติ

ทำการซักประวัติ อายุ การเลี้ยงดู พฤติกรรม และประวัติการเจ็บป่วยหรือโรคทางระบบสืบพันธุ์ และพฤติกรรมการเป็นสัด

1.2 การตรวจร่างกาย

ทำการตรวจร่างกายทั่วไป (Physical examination) ทั้งแมวเพศผู้และเพศเมีย ซึ่งได้แก่ การตรวจสภาพความแห้งน้ำ ตรวจวัดค่า capillary refill time (CRT) ตรวจรอยโรคในช่องปาก ตรวจฟังเสียงปอดและจังหวะการเต้นของหัวใจ สำรวจความผิดปกติของอวัยวะเพศภายนอก ในแมวเพศเมียจะทำการคลำตรวจท้อง ส่วนในสัตว์ที่ไม่ทราบการผสมพันธุ์หรือการเป็นสัดอย่างแน่ชัด การใช้วิธีอัลตร้าซาวน์อย่างน้อย 2 ครั้ง โดยเว้นระยะห่าง 1-2 สัปดาห์ เพื่อเป็นการตรวจยืนยันการตั้งท้อง หากสัตว์ไม่ตั้งท้องจึงจะคัดเลือกมาอยู่ในกลุ่มทดลอง แมวที่ผ่านเกณฑ์การตรวจสอบประวัติ และการตรวจร่างกายแล้ว ได้รับการเลี้ยงดูแบบแยกเลี้ยงเดี่ยวในกรงขนาด 60×80×60 ซม. โดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป และจัดให้มีน้ำสะอาดสำหรับดื่มตลอดเวลา ซึ่งในการดำเนินการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (เลขที่ 1031024)

1.3 การตรวจวงรอบการเป็นสัด

ในการทดลองที่1 แมวที่ผ่านการตรวจร่างกายแล้วจะถูกคัดเลือกให้เข้ามาอยู่ในกลุ่มทดลองและทำการสังเกตและประเมินวงรอบการเป็นสัดปกติ 2 วงรอบการเป็นสัด ก่อนทำการ

ทดลองฉีดฮอร์โมน ซึ่งการตรวจระยะของวงรอบการเป็นสัดโดยดูจากพฤติกรรมและเซลล์เยื่อบุช่องคลอด แต่ในการทดลองที่ 2 จะไม่ได้ทำการสังเกตและประเมินวงรอบการเป็นสัด

1.3.1 การสังเกตพฤติกรรม แมวที่มีอาการเป็นสัดจะแสดงพฤติกรรมคือ จะมีการส่งเสียงร้อง ถูและกลิ้งตัวไปมา ถ้าใช้มือจับหนังคอแล้วทำการกระตุ้นบริเวณหลังส่วนท้ายลำตัว แมวจะแอ่นหลัง มีการเบี่ยงหาง และย่ำเท้าหลังอยู่กับที่

1.3.2 การตรวจเซลล์เยื่อบุช่องคลอด ทำการจับบังคับแมวให้อยู่ในท่า sternal recumbency แล้วใช้ cotton swab ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร ที่ชุ่มด้วยสารละลาย 0.9% normal saline (NSS) สอดเข้าไปเก็บเซลล์เยื่อบุช่องคลอด ทำการป้าย cotton swab ลงบนสไลด์แก้ว ผึ่งให้แห้ง แล้วจึงทำการย้อมด้วยสี modified Wright's Giemsa (Dip Quick, S.E. Supply Co.,Ltd., Bangkok, Thailand) ในการประเมินว่าแมวอยู่ในระยะใดของวงรอบการเป็นสัด จะประเมินจากลักษณะเซลล์เยื่อบุช่องคลอด หากพบว่ามี superficial cell มากกว่าร้อยละ 80 ร่วมกับการมีพื้นหลังสไลด์ใส แสดงว่าแมวอยู่ในระยะ oestrus ส่วนแมวที่อยู่ในระยะ interoestrus และระยะอื่นๆ จะพบว่ามีเซลล์เยื่อบุหลายชนิด มีเศษเซลล์จำนวนมาก (Mills et al., 1979)

1.3.3 การตรวจวัดระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือด ในการทดลองที่ 1 จะทำการเจาะเก็บเลือดจากหลอดเลือด femoral vein หลังจากที่แมวผ่านวงรอบการเป็นสัดไปแล้ว และอยู่ในระยะ interoestrus ซึ่งถ้าตรวจระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือด หากค่าต่ำกว่า 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร จึงเริ่มทำการทดลองโดยฉีด rhFSH ให้กับแมวในกลุ่มทดลอง ส่วนในการทดลองที่ 2 จะเริ่มการทดลองเมื่อทำการเจาะเลือดตรวจระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือด มีค่าต่ำกว่า 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร แมวไม่แสดงพฤติกรรมการเป็นสัดและเซลล์เยื่อบุช่องคลอดไม่ได้อยู่ในระยะoestrus ภายหลังจากที่นำแมวเข้ามาในการทดลองอย่างน้อย 7 วัน

2. ขั้นดำเนินงานวิจัย

การทดลองที่ 1

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (แมวสุขภาพแข็งแรง อยู่ในระยะ interoestrus ภายหลังการทำหมัน รังไข่จะถูกนำไปศึกษาเช่นเดียวกับรังไข่ที่เก็บจากแมวที่ได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย rhFSH ในกลุ่มที่ 2-4)

กลุ่มที่ 2 ฉีด rhFSH ขนาด 5 ไอยู เข้ากล้ามเนื้อ วันละ 2 ครั้ง ห่างกัน 12 ชั่วโมง ติดต่อกันเป็นเวลา 3 วัน

กลุ่มที่ 3 ฉีด rhFSH ขนาด 10 ไอยู เข้า กล้ามเนื้อ วันละ 2 ครั้ง ห่างกัน 12 ชั่วโมง ติดต่อกันเป็นเวลา 3 วัน

กลุ่มที่ 4 ฉีด rhFSH ขนาด 25 ไอยู เข้า กล้ามเนื้อ วันละ 2 ครั้ง ห่างกัน 12 ชั่วโมง ติดต่อกันเป็นเวลา 3 วัน

ในวันที่ 4 หลังจากแมวได้รับการฉีด rhFSH ทำการเก็บตัวอย่างรังไข่ ณ ห้องผ่าตัด หน่วยสูติกรรม โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเริ่มจากวางยาสลบทั้งตัว โดยใช้ ketamine hydrochloride (Gedeon richter LTD., Budapest, Hungary) ขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับ xylazine hydrochloride (Laboratorios calier, S.A., Barcelona, Spain) ขนาด 3 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และ atropine sulfate (A.N.B. laboratories Co.,LTD. Bangkok, Thailand) ขนาด 0.04 มิลลิกรัม/กิโลกรัม จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างรังไข่ตามขั้นตอนปฏิบัติในการผ่าตัดทำหมันแมวเพศเมียโดยตัดมดลูกและรังไข่ออก (ovariohysterectomy) ทำแผลและฉีดยาปฏิชีวนะ penicillin-streptomycin (ShotapenLA®, VIRBAC (Thailand) Co., Ltd., Bangkok, Thailand) ขนาด 20,000 ไอยู/กิโลกรัม ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 4 วันร่วมกับการให้ยาแก้ปวด tramadol hydrochloride (Harson Laboratories, Baroda, India) 3 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เป็นเวลา 2 วัน หลังการผ่าตัดจะทำการตัดไหมในวันที่ 7 หลังการผ่าตัด

ตัวอย่างรังไข่ที่ได้จะถูกเก็บไว้ normal saline ผสมยาปฏิชีวนะ penicillin-streptomycin ความเข้มข้นร้อยละ 1 และนำไปห้องปฏิบัติการภายในเวลา 30 นาที ทำการล้างรังไข่ด้วย normal saline ผสมยาปฏิชีวนะ penicillin-streptomycin 3 ครั้ง เพื่อขจัดคราบเลือดจากการผ่าตัด นำรังไข่ของแมวที่ได้มานับจำนวนฟอลลิเคิล แล้วทำการกรีดหั่นรังไข่อย่างละเอียด ใน oocyte collection medium (M199 Hepes 25 มิลลิโมล่าร์ glutamine 0.292 กรัม/มิลลิลิตร pyruvate 0.026 กรัม/มิลลิลิตร BSAร้อยละ 0.4 (น้ำหนัก/ปริมาตร), Penicillin-streptomycin ร้อยละ 1) (Wood and Wildt, 1997) จากนั้นทำการหาโอโอไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ คัดแยกคุณภาพโอโอไซต์ โดยแบ่งเป็น 4 ประเภท ตามหลักเกณฑ์การจำแนกของ Wood and Wildt (1997)

- เกรด I คุณภาพดีมาก ไซโทพลาสซึมสีเข้มเป็นเนื้อเดียวกัน มี cumulus cell ล้อมรอบมากกว่า 5 ชั้น

- เกรด II คุณภาพดี ไซโทพลาสซึมสีเข้มเป็นเนื้อเดียวกัน มี cumulus cell ล้อมรอบ น้อยกว่า 5 ชั้น
- เกรด III คุณภาพพอใช้ ไซโทพลาสซึมสีจาง ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน cumulus cell ที่ล้อมรอบลอกหลุดออกไปบางส่วน
- เกรด IV คุณภาพไม่ดี ไซโทพลาสซึมสีจาง ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน cumulus cell ที่ล้อมรอบลอกหลุดออกไปทั้งหมด

โดยในการทดลองนี้จะคัดเลือกคุณภาพเกรด I และ II มาเลี้ยงรวมกัน และคัดเลือกเกรด III และ IV มาเลี้ยงรวมกันในน้ำยา oocyte maturation medium (M199, glutamine 0.292 กรัม/มิลลิลิตร pyruvate 0.026 กรัม/มิลลิลิตร BSAร้อยละ 0.4 (น้ำหนัก/ปริมาตร) FSHร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร) EGF 25 นาโนกรัม/มิลลิลิตร estradiolร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร) penicillin-streptomycinร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร)) ภายใต้บรรยากาศ CO_2 ร้อยละ5 38.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้โอโอไซต์เจริญถึงระยะพร้อมปฏิสนธิ (Wood and Wildt, 1997) กำจัด cumulus cell รอบ ๆ โอโอไซต์ออกโดยใช้ปิเปตแก้ว แล้วเก็บโอโอไซต์ใน paraformaldehyde ร้อยละ 4 รอการย้อมสีเพื่อดูระยะของโอโอไซต์ โดยใช้สี Hoechst 33342 และทำการประเมินระยะของโอโอไซต์ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์ (Graham et al., 2000)

การทดลองที่ 2

แมวเพศผู้

การรีดเก็บน้ำเชื้อ

รีดน้ำเชื้อแมวเพศผู้ โดยวิธีกระตุ้นด้วยไฟฟ้า ภายใต้วางยาสลบทั้งตัวด้วย ketamine hydrochloride (Gedeon richter LTD., Budapest, Hungary) ขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับ xylazine hydrochloride (Laboratorios calier, S.A., Barcelona, Spain) ขนาด 3 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และ atropine sulfate (A.N.B. laboratories Co.,LTD. Bangkok, Thailand) ขนาด 0.04 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทำความสะอาดปลายของอวัยวะเพศด้วยสำลีชุบน้ำเกลือ สอดหัว probe ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.3 เซนติเมตร ยาว 12 เซนติเมตร มีแท่งนำไฟฟ้าทองแดงเรียงตัวตามยาว 3 แถวที่หล่อลื่นด้วยเควายเจล ผ่านทางทวารหนัก ประมาณระยะให้ปลาย probe อยู่บนตำแหน่งของต่อมลูกหมากหรือคอกระเพาะปัสสาวะ ใช้ eppendorf ที่อุ่นให้ได้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นภาชนะรองรับน้ำเชื้อ ให้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ต่าง ๆ กันเป็นชุด จำนวน 3 ชุด โดยเริ่มจาก ชุดที่หนึ่งคือ 2, 3 และ 4 โวลต์ ขนาดละ 10 ครั้ง ชุดที่สองคือ 3, 4 และ 5 โวลต์ ขนาดละ 10 ครั้ง ชุดที่สามคือ 4 และ 5 โวลต์ ขนาดละ 10 ครั้ง เมื่อได้รับกระแสไฟฟ้า แมวจะตอบสนอง

โดยการยืดขาหลังทั้งสองข้างเหยียดตรงไปในทิศทางเดียวกันและหลั่งน้ำเชื้อ (Chatdarong et al., 2007)

การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ

ทำการตรวจคุณภาพของน้ำเชื้อภายหลังจากการรีดเก็บน้ำเชื้อ (Axnér et al., 2004; Chatdarong et al., 2009) ได้แก่

อัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสงที่กำลังขยาย 400 เท่า

อัตราการมีชีวิตของอสุจิ ตรวจโดยย้อมสี Aniline blue นับอสุจิจำนวน 200 ตัวด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

จำนวนตัวอสุจิทั้งหมด นับตัวอสุจิที่ดองไว้ใน Formol-saline โดยใช้ hemocytometer

ความผิดปกติของส่วนหัว ตรวจโดยย้อมสี Carbol-fuchsine นับอสุจิจำนวน 500 ตัวด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

ความผิดปกติของหาง นับตัวอสุจิจำนวน 200 ตัว ที่ดองไว้ใน Formol-saline โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสงที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

และความสมบูรณ์ของอะโครโซม ตรวจโดยย้อมสี Fluorescein isothiocyanate conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA)และสี Propidium iodide ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม และ 18ไมโครโมล่าร์ ตามลำดับ แล้วตรวจภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนต์

น้ำเชื้อที่จะทำการแช่เข็งนั้นจะต้องมีอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิร้อยละ 70 ขึ้นไป ร้อยละของตัวอสุจิมีชีวิต ร้อยละ70 ขึ้นไป และความผิดปกติของหางไม่เกินร้อยละ 30

การแช่แข็งน้ำเชื้อ

เก็บน้ำเชื้อในหลอดเก็บน้ำเชื้อหลอดละ 5×10^6 ตัว โดยจะทำการปั่นเหวี่ยงที่ 300 g นาน 6 นาที จากนั้นเอาส่วนใสด้านบนออก เติมสารละลายน้ำเชื้อชนิดที่ 1 (ประกอบด้วย Tris ร้อยละ 2.4 (น้ำหนัก/ปริมาตร), citric acid monohydrate ร้อยละ 1.4 (น้ำหนัก/ปริมาตร), glucose ร้อยละ 0.8 (น้ำหนัก/ปริมาตร), glycerol ร้อยละ 3 (ปริมาตร/ปริมาตร), egg yolk ร้อยละ 20 (ปริมาตร/ปริมาตร), Na-benzylpenicillin ร้อยละ 0.06 (ปริมาตร/ปริมาตร), streptomycin sulfate ร้อยละ 0.1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในน้ำกลั่น โดยวัดค่าความเป็นกรดด่างได้ 6.5 และมี osmolarity 800 มิลลิออสโมล) วางหลอดน้ำเชื้อที่เติมสารละลายน้ำเชื้อลงในตู้ลดอุณหภูมิ จากอุณหภูมิห้องไปจนถึงอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งใช้เวลาประมาณ 45 นาที จากนั้นเติมสารละลายน้ำเชื้อชนิดที่ 2 (ประกอบด้วย Tris ร้อยละ 2.4 (น้ำหนัก/ปริมาตร), citric acid monohydrate ร้อยละ 1.4 (น้ำหนัก/ปริมาตร), glucose ร้อยละ 0.8 (น้ำหนัก/ปริมาตร), glycerol ร้อยละ 7 (ปริมาตร/

ปริมาตร), egg yolk ร้อยละ 20 (ปริมาตร/ปริมาตร), Na-benzylpenicillin ร้อยละ 0.06 (ปริมาตร/ปริมาตร), streptomycin sulfate ร้อยละ 0.1 (น้ำหนัก/ปริมาตร), Equex STM paste ร้อยละ 1 (ปริมาตร/ปริมาตร)ใน น้ำกลั่น) ลงไปในอัตราส่วน 1:1 ก่อนที่จะดูดน้ำเชื้อเก็บในหลอดเก็บน้ำเชื้อ ทำการดูดสารผสมระหว่างสารละลายน้ำเชื้อ1และ 2 ในอัตรา 1:1 ขึ้นมาก่อนเพื่อให้ซึมเข้าไปใน cotton plug ด้านบนของหลอดเก็บน้ำเชื้อ แล้วจึงทำการดูดน้ำเชื้อเข้าไปภายในหลอดเก็บน้ำเชื้อ ทำการลดระดับลงที่ความลึกจากปากถังไนโตรเจนเหลวที่ 7, 13 และ 20 เซนติเมตร ด้วยระยะเวลา 2, 2 และ 1 นาที ตามลำดับ ภายในถังบรรจุไนโตรเจนเหลวอยู่ที่ระดับสูงประมาณ 16-18 เซนติเมตรจากก้นถัง (Chatdarong et al., 2007)

การละลายน้ำเชื้อเพื่อนำมาใช้ในการผสมเทียม

ทำการละลายน้ำเชื้อในน้ำที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 30 วินาที แล้วจึงทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ ภายหลังจากการอุ่นประมาณ 10 นาที โดยจะตรวจอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ อัตราการมีชีวิตของอสุจิ ความผิดปกติของส่วนหัว และความสมบูรณ์ของอะโครโซม (Axnér et al., 2004; Chatdarong et al., 2007) ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 300 g นาน 6 นาที จากนั้นดูดสารละลายด้านบนออก เติมสารละลาย Tris buffer เพื่อปรับปริมาตรให้ได้ตัวอสุจิ 5×10^6 ตัว/30 ไมโครลิตร

แมวเพศเมีย

การเหนี่ยวนำการเป็นสัด

เมื่อแมวได้รับการตรวจยืนยันว่าอยู่ในระยะ interoestrus โดยการตรวจดูพฤติกรรมการเป็นสัด การเปลี่ยนแปลงเซลล์เยื่อบุช่องคลอด และระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือด แมวจะได้รับการฉีด rhFSH เพื่อเหนี่ยวนำการเป็นสัด โดยปริมาณการฉีดจะประเมินและเลือกจากขนาดที่ให้ผลดีในการศึกษาที่ 1 ทำการฉีดต่อเนื่องทุกวัน ห่างกัน 12 ชั่วโมง เช่นเดียวกับการศึกษาที่ 1 จนแมวแสดงอาการเป็นสัดจึงหยุดทำการฉีดฮอร์โมน แต่ไม่เกิน 5 วัน ทำการตรวจอาการเป็นสัดและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุช่องคลอดทุกวัน หลังจากแมวแสดงอาการเป็นสัด 72 ชั่วโมง จะทำการฉีด human chorionic gonadotropin (hCG) ขนาด 150 ไอยู ต่อตัว เข้ากล้ามเนื้อ เพื่อเหนี่ยวนำการตกไข่

การผสมเทียมผ่านทางท่อนำไข่ด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง

หลังจากแมวเพศเมียที่ได้รับการฉีด human chorionic gonadotropin (hCG) ไปแล้ว 24 ชั่วโมง จะทำการผ่าตัดผสมเทียมผ่านทางท่อนำไข่โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง (Tsutsui et al., 2001) ณ

ห้องผ่าตัด หน่วยสูติกรรม โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ขั้นตอนเริ่มจากวางยาสลบทั้งตัว โดยใช้ ใช้ ketamine hydrochloride (Gedeon richter LTD., Budapest, Hungary) ขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับ xylazine hydrochloride (Laboratorios calier, S.A., Barcelona, Spain) ขนาด 3 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และ atropine sulfate (A.N.B. laboratories Co.,LTD. Bangkok, Thailand) ขนาด 0.04 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เปิดผ่า ช่องท้องบริเวณ ventral midline เพื่อตรวจดูลักษณะทางมหกายวิภาคของรังไข่ นับจำนวนฟอลลิเคิลบนรังไข่ทั้งสองข้างและจดบันทึก ทำการสอดท่อผสมเทียม (Atom Indwelling Feeding Tube for infant 3Fr, Japan) ผ่านทาง fimbria ลึกประมาณ 2 เซนติเมตร ปลายท่ออยู่ในบริเวณ ampulla ของท่อนำไข่ นำน้ำเชื้อแช่แข็งที่ละลายเตรียมไว้แล้วมาฉีดผ่านท่อ จากนั้นยกท่อนำไข่ในแนวดิ่งเป็นเวลานานประมาณ 3-5 นาที เพื่อลดจำนวนน้ำเชื้อที่อาจไหลย้อนกลับออกมาทาง fimbria ทำเช่นเดียวกันกับท่อนำไข่อีกข้าง การดูแลหลังการผ่าตัดประกอบด้วยการทำแผลและฉีดยาปฏิชีวนะชนิด penicillin-streptomycin (Shotapen LA®, VIRBAC (Thailand) Co., Ltd., Bangkok, Thailand) ขนาด 20,000 ไอยู/กิโลกรัม ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 4 วัน ร่วมกับการให้ยาแก้ปวด tramadol hydrochloride (Harson Laboratories, Baroda, India) 3 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เป็นเวลา 2 วันและจะทำการตัดไหมในวันที่ 7 หลังการผ่าตัด

การตรวจระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือด

เจาะเลือดตรวจฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือดในชั่วโมงที่ 28, 48, 72, 96, 120 หลังจากฉีด hCG หยุดทำการเจาะเลือดเมื่อระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือดมากกว่า 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร

การตรวจการตั้งท้อง

ภายหลังจากการผสมเทียม 20 วัน ทำการอัลตราซาวน์เพื่อวินิจฉัยการตั้งท้อง

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การทดลองที่ 1

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุช่องคลอดโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา ทำการวิเคราะห์ข้อมูล จำนวนของฟอลลิเคิลทั้งหมด จำนวนของฟอลลิเคิลที่เจริญสมบูรณ์ จำนวนของฟอลลิเคิลที่ยังไม่เจริญ โดยใช้วิธี General linear model (GLM) และทำการวิเคราะห์จำนวนรวมของโอโอไซต์ เกรด I และII จำนวนรวมของโอโอไซต์ เกรด III และ IV จำนวนโอโอไซต์ที่เจริญถึงระยะพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์เกรด I และII รวมถึงจำนวน

โอโอไซต์ที่เจริญถึงระยะพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์เกรด III และ IV โดยใช้วิธี chi-square ด้วยโปรแกรม SAS (version 9) ข้อมูลที่ผ่านการวิเคราะห์แสดงในรูปแบบร้อยละและค่าเฉลี่ย ± SEM ที่ระดับนัยสำคัญ (p<0.05)

การทดลองที่ 2

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา

บทที่ 4
ผลการศึกษา

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของขนาดการใช้ฟอลลิเคิล สติมูเลติง ฮอร์โมน ชนิดรีคอมบิแนนต์ที่มีผลต่อการเหนี่ยวนำการเป็นสัด ฟอลลิเคิลบนรังไข่ และคุณภาพของโอโอไซต์ในแมวบ้าน

1.<u>การเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมการเป็นสัดและเซลล์เยื่อบุช่องคลอด</u>

1.1 การเปลี่ยนแปลงของพฤติกรรมการเป็นสัดในแมวกลุ่มทดลอง

การสังเกตการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมโดยการใช้มือจับหนังคอร่วมกับทำการกระตุ้นบริเวณ หลังส่วนท้ายลำตัว ในแมวกลุ่มทดลอง พบว่า แมวในกลุ่มที่ 2 (ขนาด 5 ไอยู) แมวไม่มีการแสดงออกของพฤติกรรมการเป็นสัดเลย (0/5 ตัว) ซึ่งต่างจากแมวในกลุ่มที่ 3 (ขนาด 10 ไอยู) และกลุ่มที่ 4 (ขนาด 25 ไอยู) ที่มีการแสดงออกของพฤติกรรมการเป็นสัดจำนวนร้อยละ 66.7 (4/6 ตัว) เช่นเดียวกันทั้งสองกลุ่ม

1.2 การเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุช่องคลอดของแมวในกลุ่มทดลอง

แมวกลุ่มที่ 2 (ขนาด 5 ไอยู) ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุช่องคลอดเลย แต่แมวกลุ่มที่ 3 (ขนาด 10 ไอยู) และกลุ่มที่ 4 (ขนาด 25 ไอยู) ทุกตัวเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุช่องคลอดภายหลังจากการฉีดฮอร์โมน โดยกลุ่มที่ 3 (ขนาด 10 ไอยู) มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุช่องคลอดจำนวนร้อยละ 50.0 (3/6 ตัว) ซึ่งแมวทั้งสามตัวนี้พบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุช่องคลอดในวันที่ 3 ของการฉีดฮอร์โมน แมวกลุ่มที่ 4 (ขนาด 25 ไอยู) มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุช่องคลอดจำนวนร้อยละ 66.7 (4/6 ตัว) ซึ่งแมวหนึ่งตัวในกลุ่มนี้พบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุช่องคลอดในวันที่ 3 ของการฉีดฮอร์โมน ส่วนอีกสามตัวพบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุช่องคลอดในวันที่ 2 ของการฉีดฮอร์โมน

ทั้งนี้แมวกลุ่มควบคุมจะไม่ได้ทำการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของพฤติกรรมการเป็นสัดและเซลล์เยื่อบุช่องคลอด

2. <u>ลักษณะของรังไข่ทางมหกายวิภาค</u>

ฟอลลิเคิลที่มีขนาด $\geq$ 2 มิลลิเมตร ของแมวกลุ่มที่ 3 (ขนาด 10 ไอยู) และกลุ่มที่ 4 (ขนาด 25 ไอยู) มีจำนวนมากกว่าแมวกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ 2 (ขนาด 5 ไอยู) ($p < 0.05$) (ตารางที่ 2) โดยฟอลลิเคิลที่มีขนาด $\geq$ 2 มิลลิเมตรของแมวกลุ่มควบคุม ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ 2

(ขนาด 5 ไอยู) ($p > 0.05$) และฟอลลิเคิลที่มีขนาด ≥ 2 มิลลิเมตร ของแมวกลุ่มที่ 3 (ขนาด 10 ไอยู) และ 4 (ขนาด 25 ไอยู) ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$)
ในขณะที่จำนวนของฟอลลิเคิลทั้งหมดและฟอลลิเคิลที่มีขนาด < 2 มิลลิเมตร ไม่มีความแตกต่าง ($p > 0.05$) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1จำนวนและขนาดของฟอลลิเคิลที่เก็บได้จากแมวกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นการเป็นสัดโดยใช้ rhFSH ขนาด 5, 10 และ 25 ไอยู (ค่าเฉลี่ย ± SEM)

ขนาด rhFSH (ไอยู)	จำนวนแมว	จำนวนฟอลลิเคิลทั้งหมด	ขนาดฟอลลิเคิล ≥ 2 มม.	ขนาดฟอลลิเคิล < 2 มม.
กลุ่มควบคุม	7	13.7 ± 1.6	0.7 ± 0.7[a]	13.0 ± 1.6
5	5	12.0 ± 2.4	2.2 ± 0.7[a]	9.8 ± 2.7
10	6	19.2 ± 3.6	8.8 ± 2.1[b]	10.3 ± 3.9
25	6	17.0 ± 3.1	10.2 ± 2.3[b]	6.8 ± 1.8

ตัวอักษร a b c และ d ที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสดมภ์เดียวกัน

3. จำนวนโอโอไซต์ในรังไข่

จำนวนโอโอไซต์ทั้งหมดที่เก็บได้ของแมวทุกกลุ่มไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) รังไข่ของแมวกลุ่มที่ 3 (ขนาด 10 ไอยู) และกลุ่มที่ 4 (ขนาด 25 ไอยู) มีจำนวนโอโอไซต์เกรด I และ II มากกว่าแมวกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ 2 (ขนาด 5 ไอยู) ($p < 0.05$) (ตารางที่ 2) โดยจำนวนโอโอไซต์เกรด I และ II ของแมวกลุ่มควบคุม ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ 2 (ขนาด 5 ไอยู) ($p > 0.05$)และจำนวนโอโอไซต์เกรด I และ II ของแมวกลุ่มที่ 3 (ขนาด 10 ไอยู) และ 4 (ขนาด 25 ไอยู) ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$)

ตารางที่ 2 จำนวนโอโอไซต์แยกตามคุณภาพ (ค่าเฉลี่ย ± SEM) (ร้อยละ) ที่เก็บได้จากรังไข่แมวกลุ่มควบคุมและแมวที่ได้รับการกระตุ้นการเป็นสัดโดยใช้ rhFSH ขนาดต่าง ๆ

ขนาด rhFSH (ไอยู)	จำนวนทั้งหมด	เกรด I และ II	เกรด III และ IV
กลุ่มควบคุม	30.6 ± 4.2	9.6 ± 0.9[a](31.3)	21.0 ± 3.5[a](68.7)
5	20.0 ± 3.0	8.0 ± 3.2[a](40.0)	12.0 ± 1.6[a](60.0)
10	33.0 ± 7.0	17.8 ± 4.7[b](54.0)	15.2 ± 5.3[b](46.0)
25	26.5 ± 5.0	16.3 ± 3.2[b](61.6)	10.2 ± 2.4[b](38.4)

ตัวอักษร a และ b ที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสดมภ์เดียวกัน

4. การเจริญของโอโอไซต์ถึงระยะพร้อมปฏิสนธิ

จำนวนโอโอไซต์เกรด I และ II ที่เจริญถึงระยะพร้อมปฏิสนธิของแมวกลุ่มทดลองทั้งสามกลุ่มไม่ต่างกัน ($p > 0.05$) (ตารางที่ 3) แต่มากกว่ากลุ่มควบคุม โดยพบว่าจำนวนโอโอไซต์เกรด I และ II ที่เจริญถึงระยะพร้อมปฏิสนธิของแมวกลุ่มที่ 3 (ขนาด 10 ไอยู) และ 4 (ขนาด 25 ไอยู) มากกว่ากลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)

ตารางที่ 3 จำนวนโอโอไซต์ที่เจริญถึงระยะพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์ (ค่าเฉลี่ย ± SEM) (ร้อยละ) ของแมวกลุ่มควบคุม และแมวกลุ่มทดลอง ที่ได้รับการกระตุ้นการเป็นสัดโดยใช้ rhFSH ขนาดต่าง ๆ กัน แยกตามคุณภาพโอโอไซต์ (เกรด I และ II และเกรด III และ IV)

ขนาด rhFSH (ไอยู)	เกรด I และ II	เกรด III และ IV
กลุ่มควบคุม	2.4 ± 0.8[a] (25.4)	1.4 ± 0.4(6.8)
5	3.4 ± 1.2[a,b] (42.5)	1.4 ± 0.9(11.7)
10	7.7 ± 0.9[b](43.0)	2.5 ± 1.0(16.5)
25	8.8 ± 2.4[b](54.0)	1.8 ± 0.5(18.0)

[a,b]คือ ค่าของระดับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสดมภ์เดียวกัน ($p < 0.05$)

การทดลองที่2 การใช้ฟอลลิเคิลสติมูเลติงฮอร์โมน ชนิดรีคอมบิแนนต์ ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและทำการผสมเทียมผ่านทางท่อนำไข่ด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง

การเหนี่ยวนำการเป็นสัด

เหนี่ยวนำการเป็นสัดในแมวเพศเมียจำนวน 9 ตัว ด้วย rhFSH ขนาด 10 ไอยู วันละ 2 ครั้ง พบว่าแมวจำนวนร้อยละ 55.6 (5/9 ตัว) แสดงอาการเป็นสัดและมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุช่องคลอด ส่วนแมวอีก 4 ตัว ไม่พบการเปลี่ยนแปลงใด ๆ ทั้งทางพฤติกรรมและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุช่องคลอด โดยแมว 3 (แมวตัวที่ 1 2 และ 5) ใน 5 ตัว (ร้อยละ 60) ที่เหนี่ยวนำการเป็นสัดได้สำเร็จนั้นแสดงอาการเป็นสัดและมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุช่องคลอดในวันที่ 5 ของการได้รับฮอร์โมน ส่วนอีก 2 ตัว (แมวตัวที่ 3 และ 4) แสดงอาการเป็นสัดและมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุช่องคลอดในวันที่ 4 และ 3 ของการได้รับฮอร์โมนตามลำดับ

คุณภาพน้ำเชื้อ

คุณภาพน้ำเชื้อจากแมวเพศผู้ 3 ตัว ภายหลังการรีดเก็บน้ำเชื้อด้วยวิธีกระตุ้นด้วยไฟฟ้าและหลังการแช่แข็งและละลาย มีอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ จำนวนอสุจิมีชีวิต จำนวนอสุจิรูปร่างผิดปกติ และจำนวนอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์แสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 คุณภาพของตัวอสุจิก่อนและหลังการแช่แข็ง (ร้อยละ)

แมว	คุณภาพของตัวอสุจิ							
	อัตราการเคลื่อนที่		อสุจิมีชีวิต		อสุจิรูปร่างผิดปกติ		อสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์	
	ก่อนแช่แข็ง	หลังแช่แข็ง	ก่อนแช่แข็ง	หลังแช่แข็ง	ก่อนแช่แข็ง	หลังแช่แข็ง	ก่อนแช่แข็ง	หลังแช่แข็ง
1	80	60	93	52	6	7	67	40
2	70	60	90	54	4	4	68	58
3	70	50	75	50	2	10	62	50

การผสมเทียมผ่านทางท่อนำไข่ด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง

ในชั่วโมงที่ 24 หลังจากฉีด hCG ตรวจลักษณะทางมหกายวิภาคของรังไข่ พบฟอลลิเคิลบนรังไข่ข้างขวาเฉลี่ย 6.8 ± 1.0 ฟอลลิเคิล ฟอลลิเคิลบนรังไข่ข้างซ้ายเฉลี่ย 5.4 ± 0.5 ฟอลลิเคิล โดยแมวทุกตัวมีลักษณะของท่อนำไข่ขยายใหญ่สามารถสอดท่อผสมเทียมเข้าไปได้ง่าย ยกเว้นแมวตัวที่ 2 ที่ท่อนำไข่มีลักษณะตีบแคบ แมวตัวที่ 5 มีปลายท่อนำไข่ บริเวณ fimbria มีลักษณะ

บานออกและท่อนำไข่สั้น และแมว 2 ตัว (ตัวที่ 4 และ 5) จาก 5 ตัว (ร้อยละ 40) พบว่ามีการตกไข่เกิดขึ้นโดยพบคอร์ปัส ฮีโมราจิคัมบนรังไข่ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 จำนวนฟอลลิเคิลบนรังไข่ และจำนวนฟอลลิเคิลที่เกิดการตกไข่ขณะทำการผสมเทียม

แมว	จำนวนฟอลลิเคิลบนรังไข่		จำนวนฟอลลิเคิลที่เกิดการตกไข่	
	ขวา	ซ้าย	ขวา	ซ้าย
1	8	5	0	0
2	10	5	0	0
3	4	4	0	0
4	6	7	2	2
5	6	6	2	2

การตรวจระดับโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือด

แมวแต่ละตัวมีการเพิ่มขึ้นของระดับโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือดแตกต่างกัน โดยโปรเจสเตอโรนเพิ่มขึ้นมากกว่า 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ภายหลังการฉีด hCG ในชั่วโมงที่ 48, 96, 120, 28 และ 72 ของแมวตัวที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ (เฉลี่ย 72.8 ± 16.4) (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ระดับโปรเจสเตอโรนภายหลังฉีดฮอร์โมน hCG ในช่วงเวลาต่างๆ

แมว	ระดับโปรเจสเตอโรน (นาโนกรัม/มิลลิลิตร)				
	28 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	96 ชั่วโมง	120 ชั่วโมง
1	0.3	2.0	-	-	-
2	0.6	0.4	0.6	2.4	-
3	0.6	0.4	0.5	0.8	1.2
4	8.9	-	-	-	-
5	0.1	0.7	2.0	-	-

การตรวจการตั้งท้อง

ตรวจการตั้งท้องด้วยอัลตราซาวน์ในวันที่ 20 หลังจากการผสมเทียม พบแมวจำนวน 1 ตัว (แมวตัวที่ 1) (1/5) ผสมติด คิดเป็นร้อยละ 20 คลอดลูกจำนวน 2 ตัว

บทที่ 5
สรุปผลงานวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

การทดลองที่ 1

ผลการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของพฤติกรรมโดยการใช้มือจับหนังคอร่วมกับทำการกระตุ้นบริเวณหลังส่วนท้ายลำตัว ในแมวกลุ่มทดลอง พบว่า แมวในกลุ่มที่ 2 (ขนาด 5 ไอยู) แมวไม่มีการแสดงออกของพฤติกรรมการเป็นสัดเลย ซึ่งต่างจากแมวในกลุ่มที่ 3 (ขนาด 10 ไอยู) และกลุ่มที่ 4 (ขนาด 25 ไอยู) ที่มีการแสดงออกของพฤติกรรมการเป็นสัดร้อยละ 66.7 และในส่วนของการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุช่องคลอดนั้นแมวในกลุ่มที่ 2 (ขนาด 5 ไอยู) ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุช่องคลอดเลย แต่แมวในกลุ่มที่ 3 (ขนาด 10 ไอยู) ทุกตัวเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุช่องคลอดในวันที่ 3 ภายหลังจากการฉีด rhFSH และกลุ่มที่ 4 (ขนาด 25 ไอยู) ร้อยละ 25 พบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุช่องคลอดในวันที่ 3 ของการฉีดฮอร์โมน และร้อยละ 75 พบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุช่องคลอดในวันที่ 2 ของการฉีดฮอร์โมน แสดงให้เห็นว่า rhFSH สามารถเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแมวบ้านได้ ผลของการใช้ฮอร์โมนนี้ในขนาดการใช้ที่มากขึ้น จะทำให้มีแอนทรัลฟอลลิเคิลจำนวนมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่ใช้ ultra-pure preparation ของ porcine follicle-stimulating hormone (FSH) ที่กล่าวว่าการเพิ่มขนาดการใช้ฮอร์โมนจะทำให้ได้ฟอลลิเคิลจำนวนมากขึ้น (Verstegen et al., 1993) FSH จะมีผลกระตุ้นให้เกิดการเจริญของฟอลลิเคิล (Bristol-Gould and Woodruff, 2006) ซึ่งแอนทรัลฟอลลิเคิลที่มากขึ้นจะส่งผลให้ระดับฮอร์โมน estradiol ที่หลั่งออกมาจาก granulosa cell ภายในผนังฟอลลิเคิลเพิ่มสูงขึ้น (Palagiano, 2004) แสดงให้เห็นว่าแมวอยู่ในระยะที่มีการเจริญของฟอลลิเคิล เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุช่องคลอดและแสดงอาการเป็นสัดเพิ่มขึ้นตามจำนวนวันที่เข้าสู่ระยะฟอลลิคูล่านี้ จากการศึกษาของ Shille และคณะ (1979) พบว่าแมวจำนวนร้อยละ 8, 36, 52, 80, 85 และ 100 เริ่มแสดงอาการเป็นสัด ในวันที่ 1 ถึงวันที่ 6 ของระยะฟอลลิคูล่าตามลำดับ

แม้ว่าจำนวนโอโอไซต์ที่ได้ทั้งหมดจากรังไข่ของแมวในทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่การที่ฟอลลิเคิลขนาดมากกว่าหรือเท่ากับ 2 มิลลิเมตร จากรังไข่ของแมวในกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนในขนาดสูงมีจำนวนมากกว่าแมวที่ได้รับฮอร์โมนในขนาดต่ำ อีกทั้งรังไข่ของแมวในกลุ่มที่ 3 (ขนาด 10 ไอยู) และกลุ่มที่ 4 (ขนาด 25 ไอยู) มีจำนวนโอโอไซต์คุณภาพดี (เกรด I และ II) มากกว่า รวมทั้งการพัฒนาเจริญไปถึงระยะพร้อมปฏิสนธิมากกว่าแมวกลุ่มควบคุมและแมวในกลุ่มที่ 2 (ขนาด 5 ไอยู) แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของ rhFSH ในการเพิ่ม

จำนวนโอโอไซต์คุณภาพดีซึ่งสามารถเจริญไปสู่ระยะพร้อมปฏิสนธิ ซึ่งสามารถอธิบายได้จากการศึกษาเรื่องผลของคุณภาพโอโอไซต์ที่มีต่อการเจริญของโอโอไซต์ โดยระหว่างที่โอโอไซต์เจริญอยู่ในฟอลลิเคิลจะเกิดการแสดงออกของยีนต่างๆ เช่น maturation promoting factor ที่จะมีส่วนสำคัญในการเกิดกระบวนการ meiosis ดังนั้นขนาดของฟอลลิเคิลจึงมีผลต่อความสามารถในการพัฒนาของโอโอไซต์ เนื่องจากในช่วงระยะเวลาที่โอโอไซต์เกิดการเจริญ โอโอไซต์ที่อยู่ในระยะพักจะเก็บสะสม messenger RNA (mRNA) และโปรตีนไว้เพื่อใช้ภายหลังการปฏิสนธิและช่วยควบคุมการพัฒนาของตัวอ่อนในระยะก่อนการฝังตัว ซึ่งโอโอไซต์ที่ได้จากฟอลลิเคิลที่มีขนาดเล็กนั้น cytoplasmic maturation จะยังไม่สมบูรณ์ โอโอไซต์ยังสะสม mRNA และโปรตีนไม่เพียงพอต่อการเจริญไปสู่ระยะ meiosis (Krisher, 2004) อย่างไรก็ตามโอโอไซต์ที่ได้จากฟอลลิเคิลขนาดน้อยกว่า 1 ไมโครเมตรของแมวที่ไม่ได้อยู่ในฤดูผสมพันธุ์ ประมาณร้อยละ 70-80 จะสามารถกลับเข้าสู่กระบวนการ meiosis ได้และสามารถเจริญถึงระยะพร้อมปฏิสนธิได้ (Comizzoli et al., 2003)

จากการผลการทดลองที่ 1 สามารถสรุปได้ว่า rhFSH ขนาด 10 ไอยู เป็นขนาดการใช้ที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำการเป็นสัด เนื่องจากมีฟอลลิเคิลขนาดมากกว่าหรือเท่ากับ 2 มิลลิเมตรจำนวนมากกว่าแมวที่ได้รับฮอร์โมนในขนาดต่ำ มีจำนวนโอโอไซต์คุณภาพดี (เกรด I และ II) รวมทั้งการพัฒนาเจริญไปถึงระยะพร้อมปฏิสนธิมากกว่าแมวกลุ่มควบคุมและแมวในกลุ่มที่ 2 (ขนาด 5 ไอยู) อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่แตกต่างจากแมวในกลุ่มที่ 4 (ขนาด 25 ไอยู) แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของ rhFSH ในการเพิ่มจำนวนโอโอไซต์คุณภาพดีซึ่งสามารถเจริญไปสู่ระยะพร้อมปฏิสนธิ

การทดลองที่2

การฉีด rhFSH ขนาด 10 ไอยู เข้ากล้ามเนื้อ วันละ 2 ครั้ง เพื่อเหนี่ยวนำการเป็นสัด พบว่าแมวร้อยละ 55.6 แสดงอาการเป็นสัดและมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุช่องคลอด ซึ่งเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จของการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในการทดลองที่ 2 มีความใกล้เคียงกับการทดลองที่ 1 ซึ่งแมวที่ได้รับ การฉีด rhFSH ขนาด 10 ไอยู แสดงอาการเป็นสัดร้อยละ 66.7 และจำนวนแมวที่มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุช่องคลอดเท่ากับร้อยละ 50 แต่วันที่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของพฤติกรรมการเป็นสัดและเซลล์เยื่อบุช่องคลอดของการทดลองที่ 1 คือวันที่ 3 หลังจากได้รับฮอร์โมน แต่ในการทดลองที่ 2 นี้มีการเปลี่ยนแปลงตั้งแต่วันที่ 3 วันที่ 4 และวันที่ 5 ซึ่งความผันแปรด้านจำนวนวันที่ใช้ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดนี้อาจเกี่ยวข้องกับความแตกต่างกันระหว่างตัวสัตว์เอง (Shille et al., 1979) ไม่น่าจะเกี่ยวข้องกับความแปรปรวนที่เกิดจากการผลิต

ฮอร์โมนในแต่ละครั้งเนื่องจาก rhFSH จะไม่มีความแปรปรวนในการผลิตในแต่ละครั้งที่ผลิต (Palagiano et al., 2004)

จากการทดลองพบว่าแมวตัวที่เป็นสัดเร็วที่สุดจะเป็นสัดในวันที่ 3 ที่ทำการฉีดฮอร์โมน ส่วนตัวที่เป็นสัดช้าที่สุดจะเป็นสัดในวันที่ 5 ของการฉีดฮอร์โมน ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าการใช้ฮอร์โมน partially purified porcine follicle stimulating hormone (FSH-P) ขนาด 2 มิลลิกรัม/วัน ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ติดต่อกันเป็นเวลา 5 วัน จะสามารถทำให้แมวแสดงอาการเป็นสัดได้ภายใน 5 วัน (Wildt and Seager,1978) การใช้ rhFSH ในขนาด 10 ไอยู น่าจะมีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำให้เกิดการเป็นสัด ได้เร็วกว่าฮอร์โมน FSH-P แต่อย่างไรก็ตามยังคงมีความผันแปรในด้านจำนวนวันที่ใช้ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดอยู่บ้าง การศึกษาทดลองเพิ่มเติมในกลุ่มประชากรแมวจำนวนมากขึ้น น่าจะเป็นประโยชน์ในการพิจารณาถึงความเหมาะสมของจำนวนวันที่ฉีดฮอร์โมน เพื่อประโยชน์ในการนำ rhFSH ไปใช้ในอนาคต

แมวบ้านจะตกไข่ภายในชั่วโมงที่ 25 ถึง 27 ภายหลังการฉีด hCG (Sojka et al., 1970; Howard et al., 1992) การศึกษานี้จึงได้กำหนดเวลาที่จะทำการผสมเทียมในช่วงเวลาก่อนการตกไข่ คือ 24 ชั่วโมงภายหลังจากการฉีดฮอร์โมน hCG แต่ในการศึกษาที่ 2 พบว่า แมวจำนวน 2 ใน 5 ตัวเกิดการตกไข่ไปก่อนที่จะถึงเวลา 24 ชั่วโมง การตกไข่ก่อน 24 ชั่วโมงอาจเกิดจาก spontaneous ovulation ดังเช่นการศึกษาก่อนหน้าที่พบว่าแม้แมวเพศเมียไม่ได้เห็นหรือได้กลิ่นของแมวตัวผู้เลยในขณะที่ทำการศึกษาแต่พบว่าแมวร้อยละ 67 ตกไข่ได้เอง และมีจำนวนตั้งแต่ 1 ถึง 5 ฟอลลิเคิล (Graham et al., 2000) มีการการพบ คอร์ปัสฮีโมราจิคัม ในขณะที่เปิดช่องท้องเพื่อทำการผสมเทียมผ่านทางท่อนำไข่ในแมวจำนวน 2 ตัว ซึ่งแมวทั้ง 2 ตัวนี้ผสมไม่ติด ส่วนแมวที่เหลืออีก 3 ตัว ขณะที่เปิดช่องท้องเพื่อทำการผสมเทียม ยังไม่มีการตกไข่เกิดขึ้น และแมว 1 ใน 3 ตัวนี้ผสมติด สอดคล้องกับรายงานที่ว่าการผสมเทียมก่อนการตกไข่ทำให้ได้อัตราการผสมติดที่ดีกว่าการผสมเทียมหลังการตกไข่ (Tsutsui et al., 2000)

การวางยาสลบด้วย atropine sulfate ร่วมกับ xylazine hydrochloride และ ketamine hydrochloride ที่ใช้ในการศึกษานี้ไม่พบว่ามีผลต่อการตกไข่เนื่องจากแมว 3 ใน 5 ตัวที่ยังไม่เกิดการตกไข่ในขณะที่ทำการผสมนั้น เมื่อเจาะตรวจฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนภายหลังจากที่ผสม พบว่าระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมีค่ามากกว่า 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 48 ชั่วโมงที่ 96 และชั่วโมงที่ 120 ตามลำดับ แสดงว่าแมวทุกตัวสามารถเกิดการตกไข่ได้ อย่างไรก็ตามการใช้ ketamine hydrochloride ร่วมกับ acepromazine และ halothane เพื่อเหนี่ยวนำการสลบในแมว พบว่ามีผลยับยั้งการตกไข่ (Howard et al., 1992) แต่ผลที่ได้นี้กลับสอดคล้องกับที่ 90% ของแมว

ที่วางยาสลบด้วย atropine sulfate ร่วมกับ acepromazine maleate ketamine hydrochloride และ halothane ที่มีการตกไข่เกิดขึ้นตามปกติ (Tsutsui et al., 2000)

น้ำเชื้อที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นน้ำเชื้อแช่แข็ง ซึ่งในกระบวนการแช่แข็งนี้จะทำให้เกิด capacitation/acrosome reaction-like modification ทำให้ตัวอสุจิถูกลดความสามารถในการปฏิสนธิลง (Luvoni, 2006) อย่างไรก็ตามการใช้ Equex STM paste เป็นส่วนประกอบในสารละลายน้ำเชื้อมีผลดีต่ออสุจิที่ได้จากการรีดน้ำเชื้อด้วยการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า คือ เมื่อทำการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อทันทีหลังจากการละลายน้ำเชื้อพบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิและความคงทนของผนังเซลล์ของตัวอสุจิ จะมีอัตราสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ใช้ Equex STM paste เป็นส่วนประกอบในสารละลายน้ำเชื้อ (Zambelli et al., 2010) ซึ่งผลที่ได้ต่างจากการแช่แข็งอสุจิที่ได้จากอิพิดิไดมิส โดยมี Equex STM paste เป็นส่วนประกอบในสารละลายน้ำเชื้อ โดยพบว่าแม้การเติม Equex STM paste ในสารละลายน้ำเชื้อจะลดความเสียหายต่อ อะโครโซม ระหว่างการละลายน้ำเชื้อลงได้ แต่ ผนังเซลล์ของอสุจิเกิดเสียหายมากขึ้น และมีอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิลดลง หากไม่ปั่นแยกสารละลาย Equex STM paste ออกหลังการละลายน้ำเชื้อแล้ว เป็นไปได้ว่าสารออกฤทธิ์ของ Equex STM paste ซึ่งคือ sodium dodecyl sulphate (SDS) เป็นสารที่เป็นพิษต่อตัวอสุจิที่เก็บจาดอิพิดิไดมิสภายหลังจากการละลายน้ำเชื้อ (Axnér et al., 2004) ดังนั้นการเลือกใช้น้ำเชื้อแช่แข็งจากอสุจิที่เก็บได้จากวิธีกระตุ้นด้วยไฟฟ้าจึงเป็นทางเลือกที่น่าจะดีกว่าการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งจากอสุจิที่เก็บได้จากส่วนอิพิดิไดมิส แต่ควรคำนึงถึงจำนวนอสุจิมีชีวิตภายหลังการละลายน้ำเชื้อด้วยว่ามีจำนวนเพียงพอที่จะทำการผสมเทียมหรือไม่ เพราะจากการศึกษานี้ใช้ 5×10^6 ตัว (โดยอสุจิภายหลังจากการละลายมีอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิมากกว่า 50% และตัวอสุจิมีชีวิตมากกว่า 50%) สรุปได้ว่าอสุจิมีชีวิตภายหลังการละลายน้ำเชื้อจำนวนประมาณ 2.5×10^6 ตัว สามารถทำให้เกิดการตั้งท้องในแมวได้ (1/5) แต่เป็นอัตราการตั้งท้องที่ค่อนข้างต่ำ การศึกษาเพิ่มเติมต่อไปถึงจำนวนอสุจิที่เหมาะสมในการผสมเทียมผ่านทางท่อนำไข่โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้จากการรีดเก็บน้ำเชื้อด้วยการกระตุ้นไฟฟ้าจึงเป็นอีกหนึ่งแนวทางการศึกษาที่น่าสนใจ เนื่องจากในปัจจุบันมีรายงานการผสมเทียมผ่านท่อนำไข่ในแมวเพียง 2 รายงาน รายงานฉบับแรกเป็นการใช้น้ำเชื้อสดและอีกรายงานเป็นการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บได้จากอิพิดิไดมิส การใช้น้ำเชื้อสดในการผสมเทียมผ่านทางท่อนำไข่นั้น หากใช้จำนวน 2×10^6 ตัว และ 4×10^6 ตัว (อัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิมากกว่าร้อยละ 85 และตัวอสุจิมีชีวิตมากกว่าร้อยละ 85) จะมีอัตราการผสมติดคือร้อยละ 25และ 43 ตามลำดับ (Tsutsui et al., 2001) และการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งจากอสุจิที่เก็บได้จากส่วนอิพิดิไดมิสผสมเทียมผ่านทางท่อนำไข่ จำนวน 10×10^6 ตัว โดยอสุจิภายหลังจากการ

ละลายมีอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิเฉลี่ยร้อยละ 38 และตัวอสุจิมีชีวิตเฉลี่ยร้อยละ 59 จะมีอัตราการผสมติดคือร้อยละ 80 และร้อยละ 20 เมื่อทำการผสมเทียมผ่านทางท่อนำไข่ในเวลา 24 ชั่วโมง และ30 ชั่วโมง ภายหลังการฉีด hCG ตามลำดับ (Toyonaga et al., 2011)

ในส่วนของการผสมเทียม ปัญหาที่เกิดขึ้นในการผสมเทียมผ่านทางท่อนำไข่คือ ลักษณะทางมหกายวิภาคที่แตกต่างกันของแมวแต่ละตัว ลักษณะของรูเปิดของท่อนำไข่ซึ่งมีลักษณะที่แผ่ออก มีความผิดปกติทางกายวิภาคทำให้ยากต่อการสอดท่อผสมเทียมเข้าไป และเป็นอุปสรรคในการจับยึดเพื่อยกท่อนำไข่ให้อยู่ในแนวตั้งภายหลังจากปล่อยน้ำเชื้อเข้าสู่ท่อนำไข่แล้ว ซึ่งทำให้เกิดการไหลย้อนกลับของน้ำเชื้อออกมาได้ ทั้งนี้การสัมผัสกับบริเวณท่อนำไข่มากเกินไปเป็นสิ่งที่ควรระวังขณะผสมเทียมโดยวิธีนี้ เพราะอาจส่งผลทำให้ท่อนำไข่เกิดการบวมน้ำ ซึ่งความผิดปกติของท่อนำไข่นี้ อาจส่งผลต่อการพัดโบกเอาโอโอไซต์ที่เกิดการตกไข่ในภายหลังการผสมเทียมเข้าไปสู่ท่อนำไข่ ส่งผลให้เกิดการผสมไม่ติดได้เช่นกัน (Swanson et al., 1994)

แมวแต่ละตัวมีการเพิ่มขึ้นของระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือดต่างกันไป โดยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจะเพิ่มขึ้นภายหลังจากฉีด hCG ไปเป็นเวลา 48, 96, 120, 28 และ 72 ชั่วโมงในแมวตัวที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ (เฉลี่ย 72.8±16.4) อาจเนื่องมาจากระดับฮอร์โมน LH surge ในระยะเวลาที่ต่างกัน ซึ่งแมวมีรูปแบบการเพิ่มของ LH อยู่ 2 ประเภท คือ LH surge ช่วงสั้นๆ (4 ชั่วโมง) และ LH surge เป็นเวลานาน (16 ชั่วโมง) ซึ่งจะมีผลต่อการตกไข่ เพราะโดยปกติแมวจะตกไข่โดยสมบูรณ์ภายใน 48-52 ชั่วโมงหลังจาก LH surge และระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจะเพิ่มขึ้นครั้งแรกหลังจากฮอร์โมน LH surge ประมาณ 64-68 ชั่วโมง (wildt et al., 1981) หรือ 48-72 ชั่วโมงภายหลังจากการกระตุ้นให้เกิดการตกไข่สำเร็จ (Shille et al., 1983) แสดงว่าในการศึกษานี้การกระตุ้นให้เกิดการตกไข่สำเร็จในชั่วโมงที่ 0, 48, 72,-20 และ 24 เมื่อเทียบกับเวลาในการผสมเทียม ซึ่งจะเห็นได้ว่าแมวตัวที่ผสมติดและเกิดการตั้งท้องนั้น เวลาในการผสมเทียมและการตกไข่นั้นเหมาะสมกันพอดี แต่การตกไข่ในแมวตัวอื่นอาจจะช้าหรือเร็วเกินไป ทำให้เวลาที่โอโอไซต์ตกออกมากับเวลาที่ใส่ตัวอสุจิเข้าไปไม่พอดีกัน ในกรณีที่โอโอไซต์ตกมาก่อนโอโอไซต์จะสามารถมีชีวิตรอตัวอสุจิได้อย่างน้อย 14 ชั่วโมง (Howard et al., 1992) และตัวอสุจิจากการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งเข้าไปก่อนจะสามารถรอโอโอไซต์ได้อย่างน้อย 6 ชั่วโมง

การใช้ hCG ขนาด 150 ไอยู ในแมวที่ทำการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและกระตุ้นให้เกิดการเจริญของฟอลลิเคิลด้วย rhFSH พบว่าสามารถทำให้เกิดการตกไข่ได้แต่ผลยังไม่เป็นที่น่าพอใจ เนื่องจากมีความผันแปรจากปัจจัยจากตัวสัตว์เอง แมวบางตัวเกิดการตกไข่ได้เองก่อนจะครบระยะเวลาที่สมควรจะเกิดการตกไข่หลังการฉีดกระตุ้นด้วย hCG ดังนั้นหากจะพิสูจน์ประสิทธิภาพ

ของ hCG ที่ใช้เหนี่ยวนำการตกไข่ในแมวที่เหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยฮอร์โมน rhFSH การเพิ่มจำนวนประชากรที่ใช้ในการทดลองเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญ การเหนี่ยวนำการตกไข่โดยการใช้ hCG ในการศึกษาที่ผ่านมาเป็นการเหนี่ยวนำการตกไข่ในแมวที่เป็นสัดเองตามธรรมชาติ และการเหนี่ยวนำการตกไข่ในแมวที่เหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยฮอร์โมน eCG ด้วยขนาดการใช้ฮอร์โมน hCG ที่แตกต่างกันไป และมีอัตราความสำเร็จในการตกไข่ต่างกันไป (Kutzler, 2007) ดังนั้นขนาดการใช้ hCG ที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำการตกไข่ในแมวที่ถูกเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยฮอร์โมน rhFSH จึงเป็นหัวข้อที่ควรจะมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

การศึกษาถึงผลของการใช้ rhFSH ต่อกระบวนการขนส่งโอโอไซต์หรือตัวอสุจิภายในบริเวณท่อนำไข่เป็นเรื่องที่ควรมีการศึกษาต่อไป เนื่องจากแมวที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน eCG และ hCG มีการเพิ่มขึ้นของระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนถึงจุดสูงสุดช้า และเมื่อฮอร์โมนเอสโตรเจนเพิ่มขึ้นแล้วจะคงอยู่เป็นระยะเวลานาน ซึ่งฮอร์โมนเอสโตรเจนเป็นฮอร์โมนสำคัญที่ส่งผลต่อการขนส่งเซลล์สืบพันธุ์ภายในท่อนำไข่ ในการศึกษาครั้งนั้นมีโอโอไซต์และตัวอ่อนเพียง 55% ที่สามารถพบในมดลูก หลังจากที่ฉีด hCG ไป 160 ชั่วโมง (Graham et al., 2000) ต่างจากแมวกลุ่มที่เป็นสัดและผสมตามธรรมชาติจำนวนมากกว่า 90% ที่จะพบตัวอ่อนในมดลูกหลังจากทำการผสมเป็นเวลาเพียง 148 ชั่วโมงหลังจากโดนผสมครั้งแรก (Swanson et al., 1994) กลไกของฮอร์โมนเอสโตรเจนต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติของการขนส่งโอโอไซต์มีการศึกษาอย่างกว้างขวางในกระต่ายซึ่งเป็นสัตว์ ที่ต้องเหนี่ยวนำการตกไข่เช่นเดียวกันกับแมว เรียกว่า tubal locking ซึ่งการขนส่งโอโอไซต์ผ่านจากท่อนำไข่ไปสู่มดลูกนั้นต้องการเวลาที่เหมาะสมทั้งการพัฒนาของโอโอไซต์และความพร้อมของมดลูก หากเกิดความผิดปกติขึ้นในขั้นตอนการขนส่งสภาพความไม่พร้อมของมดลูกอาจทำให้เกิดปัญหาการผสมไม่ติดได้ (Graham et al., 2000)

ในการศึกษานี้ลูกแมวคลอดสมบูรณ์ 2 ตัว แต่ตายหลังจากคลอด 1 ตัวเนื่องจากแม่แมวไม่กัดถุงหุ้มตัวอ่อน ทำให้ลูกแมวขาดอากาศหายใจ ดังนั้นการดูแลในระหว่างคลอดจะช่วยลดการสูญเสียนี้ได้

สรุปผลการทดลอง

การใช้ฮอร์โมน rhFSH ในขนาด 10 ไอยู สามารถเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแมวบ้าน ทำให้มีฟอลลิเคิลเจริญสมบูรณ์จำนวนมาก และส่งผลให้โอโอไซต์สามารถเจริญถึงระยะพร้อมปฏิสนธิได้ อีกทั้งยังสามารถทำการผสมเทียมแมวที่ถูกเหนี่ยวนำการเป็นสัดนั้นด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งโดยผ่านทางท่อนำไข่ และทำให้เกิดลูกแมวได้

รายการอ้างอิง

Axnér, E., Hermansson, U. and Linde-Forsberg, C. 2004. The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. 84(1-2): 179-191.

Bristol, S.K. and Woodruff, T.K. 2006. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). Theriogenology. 66(1): 5-13.

Cline, E.M., Jenning, L.L. and Sojka, N.J. 1980. Breeding laboratory cats during artificially induced estrus. Lab. Anim. Sci. 30(6): 1003–1005.

Chatdarong, K., Axnér, E., Manee-In, S., Thuwanut, P. and Linde-Forsberg, C. 2007. Pregnancy in the domestic cat after vaginal or transcervical insemination with fresh and frozen semen. Theriogenology. 68(9): 1326-1333.

Chatdarong, K., Thuwanut, P., Suksamai, P., Patanatiradaj, S. and Sangwornrachasup, A. 2009. Survival of frozen-thawed cat spermatozoa pre-cooled in the epididymides. Reprod. Domest.Anim. 44 (2): 377-380.

Coelingh Bennink, H.J., Fauser, B.C. and Out, H.J. 1998. Recombinant follicle-stimulating hormone (FSH; Puregon) is more efficient than urinary FSH (Metrodin) in women with clomiphene citrate-resistant, normogonadotropic, chronic anovulation: a prospective, multicenter, assessor-blind, randomized, clinical trial. European Puregon Collaborative Anovulation Study Group. Fertil. Steril. 69(1): 19-25.

Colby, E.D. 1970. Induced estrus and timed pregancies in cats. Lab. Anim. Care. 20(6): 1075-1080.

Comizzoli, P., Wildt, D. E. and Pukazhenthi, B. S. 2003. Overcoming poor in vitro nuclear maturation and developmental competence of domestic cat oocytes during the non-breeding season. Reproduction. 126: 809-816.

Daya, S. 2002. Updated meta-analysis of recombinant follicle-stimulating hormone (FSH) versus urinary FSH for ovarian stimulation in assisted reproduction. Fertil Steril. 77(4): 711-714.

Daya, S.and Gunby, J. 1999. Recombinant versus urinary follicle stimulating hormone for ovarian stimulation in assisted reproduction. Hum Reprod. 14(9): 2207-2215.

Dresser, B.L., Sehlhorst, C.S., Wachs, K.B., Keller, G.L. Gelwicksl, E.J. and Turne, J.L. 1987. Hormonal stimulation and embryo collection in the domestic cat (*Felis catus*) Theriogenology. 28(6): 915-927.

Edwards, L.J., Kind, K.L., Armstrong, D.T. and Thompson, J.G. 2005. Effects of recombinant human follicle-stimulating hormone on embryo development in mice. Am. J. Physiol Endocrinol Metab. 288: E845-E851.

Goodrowe, K.L., Howard, J.G. and Wildt, D.E. 1986. Embryo recovery and quality in the domestic cat: natural versus induced estrus. Theriogenology. 25(1): 156.

Graham, L.H., Swanson, W.F. and Brown, J.L. 2000. Chorionic gonadotropin administration in domestic cats causes an abnormal endocrine environment that disrupts oviductal embryo transport. Theriogenology. 54(7): 1117-1131.

Howard, J.G., Barone, M.A., Donoghue, A.M. and Wildt, D.E. 1992. The effect of pre-ovulatory anaesthesia on ovulation in laparoscopically inseminated domestic cats. J. Reprod. Fertil. 96(1): 175-186.

Johnston, S.D., Root Kustritz, M.V. and Olson, P.N.S. 2001.The Feline Estrus Cycle In: Canine and Feline Theriogenology. Philadelphia, PA: WB Saunders Co. 396–403.

Kanda, M., Oikawa, H., Nakao, H. and Tsutsui, T. 1995. Early embryonic development in vitro and embryo transfer in the cat. J. Vet. Med. Sci. 57(4): 641–646.

Krisher, R.L. 2004. The effect of oocyte quality on development. J. Anim. Sci. 82: E14-E23.

Kutzler, M.A. 2007. Estrus induction and synchronization in canids and felids. Theriogenology. 68(3): 354-374.

La Polt, P.S., Oikawa, M., Jia, X.C., Dargan, C. and Hsueh, A.J. 1990. Gonadotropin-induced up- and down-regulation of rat ovarian LH receptor message levels during follicular growth, ovulation, and luteinization. Endocrinology. 126: 3277–3279.

Leeuw, R. D., Mulders, J., Voortman, G., Rombout, F., Damm, J. and Kloosterboer, L. 1996. Structure-function relationship of recombinant follicle stimulating hormone (Puregon®). Mol. Hum. Repro. 2: 361-369.

Luvoni, G. C. 2006. Gamete cryopreservation in the domestic cat. 2006. Theriogenology. 66: 101-111.

Mannaerts, B.M.J.L., Rombout, F., Out, H.J., Bennink, H.C., 1996. Clinical profiling of recombinant follicle stimulating hormone (rFSH;Puregon): relationship between serum FSH and efficacy. Human reproductive update. Vol 2. no. 2

Michel, C. 1993. Introduction of oestrus in cat by photoperiodic manipulations and social stimuli. Lab. Anim. 27: 278–280.

Mills, J. N., Valli, V. E.and Lumsden, J. H. 1979. Cyclical changes of vaginal cytology in the cat. Can. Vet. J. 20(4): 95-101.

Orosz, S.E., Morris, P.J., Doody, M.C., Niemeyer, G.P., Cortelyou Lee, J., Eaton, N.L. and Lothrop, C.D. Jr. 1992. Stimulation of folliculogenesis in domestic cats with human FSH and LH. Theriogenology. 37(5): 993-1004.

Palagiano, A., Nesti, E. and Pace, L. FSH: urinary and recombinant. 2004. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 115S : S30-S33.

Pelican, K.M., Wildt, D.E., Pukazhenthi, B. and Howard, J. 2006. Ovarian control for assisted reproduction in the domestic cat and wild felids. Theriogenology. 66(1): 37–48.

Platz, C.C., Wildt, D.E. and Seager, S.W. 1978. Pregnancy in the domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 52(2): 279-282.

Raga, F., Bonilla-Musoles, F., Casañ, E.M.and Bonilla, F. 1999. Recombinant follicle stimulating hormone stimulation in poor responders with normal basal concentrations of follicle stimulating hormone and oestradiol: improved reproductive outcome. Hum. Reprod. 14(6): 1431-1434.

Shille,V.M., Lundstrom, K.E. and Stabenfeldt, G.H. 1979. Follicular function in the domestic cat as determined by estradiol-17 beta concentrations in plasma: relation to estrous behavior and cornification of exfoliated vaginal epithelium. Biol. Reprod. 21: 953–963.

Shille, V. M., Munro, C., Farmer, S. W., Papkoff, H. and Stabenfelt, G.H. 1983. Ovarian and endocrine responses in the cat after coitus. J. Reprod. Fert. 68: 29-39.

Sojka, N.J., Jennings, L.L. and Hamner, C.E. 1970. Artificial insemination in the cat (Felis catus). Lab. Anim. Care. 20(2): 198-204.

Swanson, W. F., Roth, T. L. and Wildt, D. E. 1994. In vivo embryogenesis, embryo migration, and embryonic mortality in the domestic cat. Biol. Reprod. 51: 452-464.

Swanson, W.F., Horohov, D.W. and Godke, R.A. 1995. Production of exogenous gonadotrophin-neutralizing immunoglobulins in cats after repeated eCG-hCG treatment and relevance for assisted reproduction in felids. J. Reprod. Fertil. 105: 35–41.

Swanson, W.F.,Wolfe, B.A., Brown, J.L., Martin-Jimenez, T., Riviere, J.E. and Roth, T.L. 1997. Pharmacokinetics and ovarian-stimulatory effects of equine and human chorionic gonadotropins administrated singly and in combination in the domestic cat. Biol. Reprod. 57: 295–302.

Tanaka, A., Takagi, Y., Nakagawa, K., Fujimoto, Y., Hori, T. and Tsutsui, T. 2000. Artificial intravaginal insemination using fresh semen in cats. J. Vet. Med. Sci. 62(11): 1163-1167.

Tharasanit, T., Colenbrander, B., Bevers, M.M. and Stout, T.A.E. 2006. Effect of recombinant human follicle stimulating hormone on follicle development and ovulation in the mare. Theriogenology. 65: 1071-1081.

Toyonaga, M., Sato, Y., Sasaki, A., Kaihara, A.and Tsutsui, T. 2011. Artificial insemination with cryopreserved sperm from feline epididymides stored at 4 °C. Theriogenology. 76(3): 532-537.

Tsutsui, T., Sakai, Y., Matsui, Y., Sato, M., Yamane, I., Murao, I.and Stabenfeldt, G. H. 1989. Induced ovulation in cats using porcine pituitary gland preparation during the non-breeding season. J. Vet. Sci. 51(4): 677-683.

Tsutsui, T., Tanaka, A., Takagi, Y., Nakagawa, K., Fujimoto, Y., Murai, M., Anzai, M. and Hori, T. 2000. Unilateral intrauterine horn insemination of fresh semen in cats. J. Vet. Med. Sci. 62(12): 1241-1245.

Tsutsui, T., Tanaka, A., Takagi, Y., Nakagawa, K., Fujimoto, Y., Murai, M., Anzai, M.and Hori, T. 2000. Unilateral intrauterine horn insemination of frozen semen in cats. J. Vet. Med. Sci. 62(12): 1247-1251.

Tsutsui, T., Tanaka, A. and Hori, T. 2001. Intratubal insemination with fresh semen in cats. J. Reprod. Fertil. Suppl. 57: 347-351.

Tsutsui, T., Wada, M., Anzai, M. and Hori, T. 2003. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. J. Vet. Med. Sci. 65(3): 397-399.

Tsutsui, T. 2006. Artificial insemination in domestic cats (Felis catus). Theriogenology. 66(1): 122-125

Viudes De Castro, M.P., Cortell, C., Moc'e, E., Marco-Jiménez, F., Joly, T. and Vicente, J.S. 2009. Effect of recombinant gonadotropins on embryo quality in superovulated rabbit does and immune response after repeated treatments. Theriogenology. 72: 655-662

Verstegen, J.P., Onclin, K., Silva, L.D.M., Donnay, I., Mettens, P. and Ectors, F. 1993. Superovulation and embryo culture in vitro following treatment with ultra-pure follicle stimulating hormone in cats. J. Reprod. Fertil. Suppl. 47: 209–218.

Wildt, D.E. and Seager, S.W. 1978. Ovarian response in the estrual cat receiving varying dosages of HCG. Horm. Res. 9(3): 144-150.

Wildt, D.E., Guthrie, S.C. and Seager, S.W.J. 1978. Ovarian and behavioral cyclicity of the laboratory maintained cat. Horm. Behav. 10: 251–257.

Wildt, D. E., Chan, S. Y. W., Seager, S.W.J. and Chakraborty, P. K. 1981. Ovarian activity, circulating hormone, and sexual behavior in the cat. I. Relationships during the coitus-induced luteal phase and the estrus period without mating. Biol. Reprod. 25: 15-28.

Wood, T.C. and Wildt, D.E. 1997. Effect of the quality of the cumulus-oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocysts in vitro. J. Reprod. Fertil. 110(2): 355-360.

Yang, S., He, X., Hildebrandt, T.B., Jewgenow, K., Goeritz, F., Tang, X., Zhou, Q. and Ji, W. 2007. Effects of rhFSH dose on ovarian follicular response, oocyte recovery and embryo development in rhesus monkeys. Theriogenology. 67(6): 1194-1201.

Zambelli, D., Iacono, E., Raccagni, R. and Merlo, B. 2010. Quality and fertilizing ability of electroejaculated cat spermatozoa frozen with or without Equex STM Paste. Theriogenology. 73: 886-892.

ผลิตภัณฑ์ สารเคมี และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

rhFSH	Puregon®, Organon, The Netherlands
hCG	Chorulon®, Intervet, The Netherlands
ketamine hydrochloride	Gedeon richter LTD., Budapest, Hungary
xylazine hydrochloride	Laboratorios calier, S.A., Barcelona, Spain
atropine sulfate	A.N.B. laboratories Co.,LTD. Bangkok, Thailand
penicillin-streptomycin	ShotapenLA®, VIRBAC (Thailand) Co., Ltd., Bangkok, Thailand
tramadol hydrochloride	Harson Laboratories, Baroda, India
medium 199	Sigma, USA.
hepes	Sigma, USA.
glutamine	Sigma, USA.
pyruvate	Sigma, USA.
BSA	Sigma, USA.
Penicillin-streptomycin	Sigma, USA.
กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง	Nikon ECLIPSE E200, Japan
กล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสง	Olympus CX41RF, Japan
กล้องจุลทรรศน์ 3 มิติ	Nikon SMZ645, Japan
กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์	Olympus BX51TRF, Japan

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว อัจจิมา จันท์แสนโรจน์ เกิดวันที่ 16 พฤษภาคม พ.ศ. 2528 ที่เขตป้อมปราบศัตรูพ่าย จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551 และเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโทในหลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาการสืบพันธุ์สัตว์ ที่ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2552 โดยได้รับทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเพื่อเฉลิมฉลองในวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา และได้รับ ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช