จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี ๒๕๔๔

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

ผลของสภาวะการเลี้ยงโอโอไซต์ต่อการปฏิสนธินอกร่างกายของลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์

โดย

มงคล เตชะกำพุ
นวเพ็ญ ภูติกนิษฐ์
วันเพ็ญ อดุลยานุภาพ
จินดา สิงห์ลอ

พส
สพ 15
011630

มีนาคม ๒๕๔๖

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี ๒๕๔๔

รายงานผลการวิจัย
เรื่อง

ผลของสภาวะการเลี้ยงโอโอไซต์ต่อการปฏิสนธินอกร่างกายของลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์

โดย

มงคล เตชะกำพุ

นวเพ็ญ ภูติกนิษฐ์

วันเพ็ญ อดุลยานุภาพ

จินดา สิงห์ลอ

มีนาคม ๒๕๔๖

- 3 พ.ค. 2549

I 20750122

ชื่อโครงการวิจัย ผลของสภาวะการเลี้ยงโอโอไซต์ต่อการปฏิสนธินอกร่างกายของลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์

ชื่อผู้ทำวิจัย มงคล เตชะกำพุ นวเพ็ญ ภูติกนิษฐ์ วันเพ็ญ อดุลยานุภาพ จินดา สิงห์ลอ

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ มีนาคม 2546

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อศึกษาศักยภาพของรังไข่ลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์ด้านการตอบสนองต่อการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลหลายใบด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปินจากภายนอก และศึกษาความเหมาะสมของสภาพการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ของลูกโคภายนอกร่างกาย รวมถึงศึกษาความเหมาะสมของระบบการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกายของโอโอไซต์ของลูกโคจนถึงระยะพร้อมนำไปย้ายฝาก โดยทำการทดลองในลูกโค 3 ชุด คือ ลูกโคนมพันธุ์โฮสไตน์ ฟรีเชี่ยนจำนวน 9 ตัว ลูกโคนมพันธุ์ผสม จำนวน 9 ตัว และลูกโคไทยพื้นเมือง จำนวน 8 ตัว อายุระหว่าง 6-12 เดือน โปรแกรมการกระตุ้นรังไข่มี 2 โปรแกรม โปรแกรมแรกใช้กับลูกโคชุดที่หนึ่งและสอง ทำการฝังฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ใต้ผิวหนังหลังใบหูนาน 7 วันก่อนเริ่มให้ฮอร์โมนชนิด ฟอลลิเคิล สติมูเลติ่ง ฮอร์โมน ขนาด 120 – 180 มิลลิกรัมต่อตัว ร่วมกับโกนาโดโทรปิน รีลิสซิ่ง ฮอร์โมนในขนาด 100 ไมโครกรัมต่อตัว โปรแกรมที่สองใช้กับลูกโคชุดที่สาม ใช้ฮอร์โมนชนิดฟอลลิเคิล สติมูเลทิ่ง ฮอร์โมน ในขนาด 120 มิลลิกรัมต่อตัวเพียงอย่างเดียว เปิดผ่าช่องท้องลูกโคเพื่อดึงรังไข่ขึ้นมานับจำนวนฟอลลิเคิลภายหลังเสร็จสิ้นการให้ฮอร์โมนแล้ว 24 ชั่วโมง พบว่าจำนวนฟอลลิเคิลบนรังไข่มีการแปรปรวนไปในระหว่างลูกโคแต่ละตัว (8-121 ฟอลลิเคิลในลูกโคชุดแรก, 13-99 ฟอลลิเคิลในลูกโคชุดที่สอง และ 23-75 ฟอลลิเคิลในลูกโคชุดที่สาม) เส้นผ่านศูนย์กลางของฟอลลิเคิลที่พบบนรังไข่ลูกโคชุดที่หนึ่ง สอง และสาม เท่ากับ 0.51 ± 0.24, 0.64 ± 0.28 และ 0.54 ± 0.20 เซนติเมตร ตามลำดับ พบว่าฟอลลิเคิลบนรังไข่ของลูกโคชุดที่สองมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยมากกว่าลูกโคชุดแรกและชุดที่สองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

อัตราการเก็บโอโอไซต์ได้จากการเจาะเก็บด้วยวิธีใช้เข็มฉีดยาต่อกับกระบอกฉีดยาเจาะดูดจากฟอลลิเคิลโดยตรงเท่ากับ 24.5% ซึ่งต่ำกว่าการเจาะด้วยการใช้เข็มต่อกับเครื่องดูดสูญญากาศที่แรงดูด 120 มิลลิเมตรปรอทที่เก็บได้ 59.6% และการตัดรังไข่ออกทั้งสองข้างแล้วนำไปเจาะดูดโอโอไซต์ในห้องปฏิบัติการที่เก็บได้ 56.3% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ชนิดของโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้โดยรวม เป็นโอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มหนาแน่น 33.4% มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มเพียงชั้นเดียวหรือบางส่วน 31.8%เซลล์คิวมูลัสแผ่กระจาย 30.5% ไม่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้ม 2.3% และเป็นโอโอไซต์ที่เสื่อมสลาย 2.0% วิธีการเจาะเก็บโอโอไซต์มีผลต่อชนิดของโอโอไซต์ที่ได้ การใช้เข็มฉีดยาเจาะดูดโอโอไซต์จากฟอลลิเคิลโดยตรงจะได้โอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสแผ่กระจายมากที่สุด (41.8%) เช่นเดียวกับการเจาะเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ที่ถูกตัดออกจากตัวสัตว์แล้ว (36.7%) การใช้เครื่องดูดสูญญากาศที่แรงดูด 120 มิลลิเมตรปรอท จะได้โอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มหนาแน่นมากที่สุด (42.5%)

โอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสแผ่กระจาย 29.4% มีโครโมโซมในระยะพร้อมปฏิสนธิทันทีที่เจาะเก็บได้ และมีอัตราการเสื่อมสลายของโครโมโซมเพิ่มขึ้นเมื่อทำการเพาะเลี้ยงนานเกินกว่า 2 ชั่วโมง ส่วนโอโอไซต์ที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิมีอัตราการพัฒนาสู่ระยะพร้อมปฏิสนธิสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 28 ชั่วโมง (24.2%) เมื่อเปรียบเทียบการพัฒนาระหว่างโอโอไซต์จากลูกโคกับโคโตเต็มวัยพบว่า โอโอไซต์จากโคโตเต็มวัยมีการพัฒนาเร็วกว่าโอโอไซต์ที่ได้จากลูกโคในชั่วโมงที่ 8 และ 16 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อนำมาปฏิสนธินอก ร่างกายพบว่าโอโอไซต์สามารถเกิดการปฏิสนธิและแบ่งตัวได้โดยทดลองเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิด TCM 199 ที่เติมซีรั่ม 20% และ น้ำยาเพาะเลี้ยงชนิด B2 ที่เลี้ยงร่วมกับเซลล์ VERO (37.4% กับ 34.6%) แต่ไม่มีตัวอ่อนพัฒนาถึงระยะมอรูล่าหรือบลาสโตซิส จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าสามารถกระตุ้นรังไข่ของลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์ และเลี้ยงให้พร้อมปฏิสนธิได้ แต่อัตราการปฏิสนธิค่อนข้างต่ำและตัวอ่อนไม่สามารถพัฒนาได้ถึงระยะที่เหมาะสมในการย้ายฝากในโคตัวรับ

เลขหมู่ ๙๗ ส๗ 15
เลขทะเบียน 011630
วัน,เดือน,ปี ๘ ก.ย. ๔๘

Project title: Effect of in vitro culture condition of prepubertal calf oocyte on in vitro fertilization
Name of investigators: Mongkol Techakumphu Nawapen Phutikanit
Wanpen Adulyanubap Jinda Singlor
Year: March 2003

Abstract

The objectives of this study were to evaluate the ovarian responses to gonadotropin treatment in prepubertal calves and the suitable condition for in vitro maturation and embryo culture after in vitro fertilization of the calf oocytes.

Two ovarian superstimulation programs were tested. The first program was carried out in crossbred dairy (n=9) and crossbred native calves (n=8). The calves received progesterone ear implant, 7 days before starting gonadotropin treatment. The calves were treated with 120 – 180 mg Follicle Stimulating Hormone (FSH), together with 100 μg Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH). The second program was used in Thai native calves (n=9). The calves received only 120 mg FSH without progesterone and GnRH. All calves underwent surgery 24 hr after the last hormone injection, the ovaries were examined and the follicles were counted and measured after laparotomy. The number of follicles varied greatly among calves (8-121 follicles per animal in crossbred dairy calves, 13-99 follicles per animal in crossbred native calves and 23-75 follicles per animal in Thai native calves). The average diameter of the follicles were 0.51 ± 0.24, 0.64 ± 0.28 and 0.54 ± 0.20 cm in crossbred dairy, crossbred native and Thai native groups respectively.

The oocyte recovery rate was evaluated among three collecting methods; a) manual aspiration from follicles using 19 G needle attached to a syringe, b) aspiration using vacuum pump at 120 mmHg and c) the ovaries were removed and the follicles were aspirated in the laboratory room. Method a) provided the lowest recovery rate (24.5%) compared with method b) (59.6%) and c) (56.3%). The recovered oocytes were classified based on their cumulus appearance. The percentage was 33.4%, 31.8%, 30.5%, 2.3% and 2.0% for the compact layered cumulus, single and partial layered cumulus, expand cumulus, denude and degenerated oocytes respectively. The oocytes collected by method a) were mostly expanded cumulus oocytes (41.8%) as well as of those collected by method c) (36.7%), whereas method b) provided the highest compacted cumulus oocytes (42.5%).

The chromosomal stage of the oocytes was examined after rapid staining. Almost 30% of the expanded cumulus oocytes showed the chromosome of matured stage at the time of collection. The appropriate culture time in vitro for this group should not exceed 2 hours. The immature oocytes cultures for 28 hours showed the highest percentage of maturation (24.2%). The oocytes from adult cows could develop faster than those from calves after being cultured in vitro for 8 and 16 hours.

Two culture systems using for embryo culture after in vitro fertilization were compared. The embryo cultured in TCM199 plus 20%FCS had a slightly higher cleavage rate than those cultured in B2 medium with VERO cell line (37.4% vs 34.6%), but none reached morula or blastocyst stage.

In conclusion, it was possible to stimulate the ovary of prepubertal calf and the oocytes are able to be matured and fertilized in vitro. However, the in vitro embryo culture systems used here did not support the embryo development to transferable stage; morula or blastocyst stage.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2544 ของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ

- สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่สนับสนุนทุนแก่ นางสาว นวเพ็ญ ภูติกนิษฐ์ นักศึกษาทุนปริญญาเอก กาญจนาภิเษก สาขาวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ ในการช่วยทำงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วง
- กองบำรุงพันธุ์ กรมปศุสัตว์ ที่ให้ความร่วมมือในด้านโคทดลอง
- นายสัตวแพทย์ สาโรช งามขำ ผู้อำนวยการศูนย์ผสมเทียมหนองโพ ที่อนุเคราะห์น้ำเชื้อโคในการทำการปฏิสนธินอกร่างกาย
- อาจารย์ ดร. เผด็จ ธรรมรักษ์ ที่ช่วยให้คำแนะนำด้านสถิติ
- บริษัท เวท อะกริเทค จำกัด และบริษัท เวลโนว์น อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด ที่อนุเคราะห์ยาปฏิชีวนะชนิดฉีด
- บริษัท โรห์น เมอเรียล ที่อนุเคราะห์ IVOMECTIN
- บุคลากรของภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	lv
สารบัญ	v
รายการประกอบตาราง	vi
รายการภาพประกอบ	vii
บทนำ	1
วัตถุประสงค์การวิจัย	8
วัสดุและวิธีการ	8
ผลการทดลอง	18
การอภิปรายผลการทดลอง	28
เอกสารอ้างอิง	35

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการประกอบตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ผลการตอบสนองของรังไข่ของลูกโคแต่ละชุดต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เอฟเอสเอช	19
ตารางที่ 2	ผลการตอบสนองของรังไข่ลูกโคชุดแรกภายหลังได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เอฟเอสเอช ครั้งแรกและครั้งที่สอง	18
ตารางที่ 3	อัตราการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีต่าง ๆ	21
ตารางที่ 4	ชนิดของโอโอไซต์จากลูกโคที่ได้จากการเก็บด้วยวิธีต่าง ๆ	21
ตารางที่ 5	จำนวนโอโอไซต์ชนิดพร้อมปฏิสนธิจากรังไข่ลูกโคที่พบโครโมโซมในระยะต่าง ๆ เมื่อผ่านการเพาะเลี้ยงนอกร่างกายในระยะเวลาที่กำหนด	22
ตารางที่ 6	จำนวนโอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิจากรังไข่ลูกโค (C) และรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์ (A) ที่พบโครโมโซมในระยะต่าง ๆ เมื่อผ่านการเพาะเลี้ยงนอกร่างกายในระยะเวลาที่กำหนด	23
ตารางที่ 7	ผลการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกายของโอโอไซต์ที่ได้จากรังไข่ลูกโค	24

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการรูปประกอบ

		หน้า
รูปที่ 1	ลูกโคนมพันธุ์ผสมโฮลสไตน์ ฟรีเซี่ยน	9
รูปที่ 2	ลูกโคพื้นเมือง	9
รูปที่ 3	ขั้นตอนต่าง ๆ ในการผ่าตัดเพื่อเก็บโอโอไซต์ในลูกโค	12
รูปที่ 4	การตัดรังไข่เพื่อเก็บโอโอไซต์กรณีที่รังไข่มีการตอบสนองมาก ดังรูป A	13
รูปที่ 5	ระยะต่าง ๆ ของโครโมโซมของโอโอไซต์ลูกโคหลังเลี้ยงในน้ำยา	25-26
รูปที่ 5	ภาพตัวอ่อนของลูกโคที่เลี้ยงในน้ำยา B2+Vero cell (A x200) และในน้ำยา TCM199 (B x100)	27

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

ในประเทศที่มีการเกษตรกรรมเป็นอาชีพหลักเช่นประเทศไทยย่อมมีความต้องการการพัฒนาเพื่อยกระดับอาชีพให้เทียบเท่าต่างประเทศ ในด้านการปศุสัตว์นั้น การพัฒนาและยกระดับพันธุกรรมของปศุสัตว์ในประเทศถือเป็นเรื่องสำคัญ หนทางหนึ่งในการพัฒนาระดับพันธุกรรมของสัตว์คือ การใช้วิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาเกี่ยวข้อง การร่นช่วงห่างระหว่างรุ่นของสัตว์ (Generation interval) เป็นกลวิธีอย่างหนึ่งในการช่วยเพิ่มอัตราการพัฒนาพันธุกรรม ซึ่งทำได้โดยการใช้ลูกสัตว์ก่อนวัยเจริญพันธุ์เป็นแหล่งผลิตลูกสัตว์อีกต่อหนึ่ง หรือที่เรียกกันว่า Juvenile In Vitro Fertilization and Embryo Transfer (JIVET) (Duby et al., 1996)

จากการศึกษาพบว่าบนรังไข่ของลูกโคตั้งแต่แรกเกิดมีฟอลลิเคิลชนิดไพรมอเดียล (primordial follicle) ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดต้นตอ (stem cells) และมีโอโอไซต์ (oocyte) ซึ่งเป็นเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (germ cells) อยู่เป็นจำนวนมาก และฟอลลิเคิลเหล่านี้มีการพัฒนาสู่ระยะเจริญเติบโต (growing follicle) เพิ่มมากขึ้นเมื่อลูกโคอายุมาก ขึ้นกับการทำงานของต่อมใต้สมองที่ทำหน้าที่ควบคุมการเจริญของฟอลลิเคิล (Erickson, 1966) และเมื่อให้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินแก่ลูกโคพบว่าฟอลลิเหล่านี้ตอบสนองต่อฮอร์โมนดังกล่าว โดยมีการขยายขนาดและเพิ่มจำนวนมากขึ้นเช่นเดียวกับฟอลลิเคิลบนรังไข่ของโคโตเต็มวัย (Jainudeen et al., 1966; Onuma and Foote, 1969; Onuma et al., 1969, Seidel et al., 1971) รวมทั้งโอโอไซต์ที่อยู่ภายในฟอลลิเคิลก็จะมีการเจริญเป็นคู่ขนานกับการเจริญของฟอลลิเคิล จึงทำให้เกิดแนวคิดในการใช้ลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์ในการผลิตตัวอ่อนจากโอโอไซต์แล้วนำมาปฏิสนธินอกร่างกายกลายเป็นตัวอ่อนและเมื่อย้ายฝากตัวอ่อนไปยังแม่โคตัวรับ เกิดการตั้งท้อง แล้วจึงให้ลูกโครุ่นถัดไปได้

ในส่วนของงานวิจัยด้านองค์ประกอบของรังไข่ลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์ จากรายงานของ Erickson (1966) พบว่าลูกโคเพศเมียตั้งแต่แรกเกิดจนอายุ 24 สัปดาห์มีจำนวนเซลล์สืบพันธุ์แตกต่างกันไปในแต่ละตัว ตั้งแต่ไม่มีเซลล์สืบพันธุ์เลย (เป็นหมัน) จนถึง 700,000 เซลล์ จำนวนของฟอลลิเคิลดั้งเดิมบนรังไข่มีจำนวนค่อนข้างคงที่ไปจนโคมีอายุได้ 4 ถึง 6 ปี จึงค่อย ๆ ลดจำนวนลงจนเกือบเป็นศูนย์เมื่ออายุได้ 20 ปี โอโอไซต์ที่อยู่ภายในฟอลลิเคิลดั้งเดิมดังกล่าวมีคุณภาพดีจนโคอายุได้ 180 วัน หลังจากนั้นคุณภาพจะลดลงเรื่อย ๆ จนเข้าสู่ระยะเสื่อมสลายเมื่อโคอายุ 4 ปีขึ้นไป นอกจากนี้พบว่าฟอลลิเคิลที่กำลังเจริญเติบโตมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นเมื่อลูกโคมีอายุ 50 – 80 วันหลังคลอด และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึงช่วงอายุที่ 120 วัน ซึ่งจำนวนฟอลลิเคิลชนิดนี้จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่เห็นได้ชัดไปจนกว่าโคอายุ 4-6 ปี ในขณะเดียวกันฟอลลิเคิลที่มี

ช่องว่างภายใน (Vesicular follicle) มีการเพิ่มจำนวนขึ้นตามจำนวนฟอลลิเคิลที่กำลังเจริญเติบโต ซึ่งอาจพบได้มากถึง 63 ใบ บนรังไข่ลูกโคอายุ 180 วัน แต่จำนวนฟอลลิเคิลชนิดนี้จะลดน้อยลง เมื่อโคเริ่มเข้าสู่ระยะเจริญพันธุ์ (Puberty)

ต่อมามีการนำอุปกรณ์และวิธีการที่ทันสมัยเข้ามาตรวจลักษณะของรังไข่ลูกโค Evans และคณะ (1994) ใช้เครื่องกำเนิดคลื่นเสียงความถี่สูงหรือเครื่องอัลตร้าซาวด์ (ultrasound) ในการตรวจลักษณะของรังไข่ลูกโคอายุ 2 – 36 สัปดาห์ พบว่ารังไข่ของลูกโคอายุ 2 เดือนประกอบด้วยฟอลลิเคิลหลายขนาด ตั้งแต่ขนาดเล็ก (3-5 มิลลิเมตร) ขนาดกลาง (6-8 มิลลิเมตร) และขนาดใหญ่ (9 มิลลิเมตรขึ้นไป) และฟอลลิเคิลเหล่านี้มีการเปลี่ยนแปลงในรูปแบบคล้ายคลื่น (wave-like) เช่นเดียวกับฟอลลิเคิลบนรังไข่ของโคโตเต็มวัย เพียงแต่ไม่มีการตกไข่และไม่มีการสร้างคอร์ปัส ลูเทียม

ในส่วนงานวิจัยด้านการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลบนรังไข่ลูกโคและการผลิตตัวอ่อนทั้งจากภายใน (in vivo) และภายนอก (in vitro) ร่างกาย Jainudeen และคณะ (1966) ทดลองใช้ฮอร์โมนเพรกแนนท์ แมร์ ซีรั่ม หรือ พีเอ็มเอส (Pregnant mare serum; PMS) ลูติไนซิ่งฮอร์โมน (แอลเอช, NIH-LH) และฮอร์โมนฮิวแมน โคริโอนิก โกนาโดโทรปิน หรือ เอชซีจี (Human chorionic gonadotropin; HCG) ในการเหนี่ยวนำการเจริญของฟอลลิเคิลและชักนำให้เกิดการตกไข่ในลูกโคอายุ 4-24 สัปดาห์ พบว่าฮอร์โมน พีเอ็มเอส เหนี่ยวนำการเจริญของฟอลลิเคิลบน รังไข่ลูกโคได้ตั้งแต่ 3 – 53 ใบ และฮอร์โมนแอลเอช ในขนาด 5-10 มิลลิกรัม เหนี่ยวนำให้เกิดการตกไข่ได้ในอัตรา 25 – 84 % ซึ่งให้ผลดีกว่าการใช้ฮอร์โมน เอชซีจี ในขนาด 5,000 ไอยู ต่อมา Onuma และคณะ (1969) รายงานว่าฟอลลิเคิลบนรังไข่ลูกโคอายุ 9-11 สัปดาห์ สามารถตอบสนองต่อฟอลลิเคิล สติมูเลติ้ง ฮอร์โมน หรือ เอฟเอสเอช (Follicle stimulating hormone; FSH) ได้ โดยพบว่าหลังการให้ฮอร์โมนในลูกโคแล้วพบฟอลลิเคิลขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ขึ้นไปบนรังไข่ตั้งแต่ 20-83 ใบ และเมื่อทำการกระตุ้นรังไข่ซ้ำอีกครั้งเมื่อลูกโคอายุ 17-18 สัปดาห์ พบว่าอัตราการตอบสนองของรังไข่ลดลงกว่าการกระตุ้นครั้งแรกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อทำการกระตุ้นรังไข่ซ้ำอีกครั้งเมื่อลูกโคอายุ 53-64 สัปดาห์ ด้วยฮอร์โมน พีเอ็มเอสจี ขนาด 3,000 ไอยู พบว่ามีจำนวนฟอลลิเคิลเฉลี่ย 23.3 ใบ

การศึกษาของ Jainudeen และคณะ (1966) และ Onuma และคณะ(1969) ได้วิจัยถึงขั้นตอนการผลิตตัวอ่อนภายในตัวลูกโค (in vivo) โดยฉีดน้ำเชื้อพ่อโคเข้าไปในมดลูกและทำการเก็บตัวอ่อนที่ได้ออกมาจากมดลูก แต่ผลที่ได้ไม่เป็นที่น่าพอใจ ทั้งในด้านจำนวนและคุณภาพ

ของ ตัวอ่อนที่เก็บได้ ผู้วิจัยให้ข้อสังเกตว่ามีความเป็นไปได้ที่สภาพภายในท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ของลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์ไม่เหมาะสมต่อการพัฒนาของตัวอ่อนระยะแรก และอาจมีผลกระทบจากฮอร์โมนที่ใช้ในการกระตุ้นรังไข่ที่ยังคงเหลือค้างอยู่เข้ามาเกี่ยวข้องด้วย

หลังจากนั้นเมื่อมีรายงานความสำเร็จของการผลิตลูกสัตว์จากการปฏิสนธินอกร่างกาย (in vitro fertilization) ทำให้มีผู้ศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้โอโอไซต์ของลูกโคในเทคนิคดังกล่าว เพื่อหลีกเลี่ยงภาวะไม่เหมาะสมในร่างกายของลูกสัตว์ Armstrong และคณะ (1992) รายงานความสำเร็จในการผลิตลูกโคจำนวน 1 ตัว จากการปฏิสนธินอกร่างกายของโอโอไซต์ที่เก็บได้จากลูกโคอายุ 3-8 สัปดาห์ภายหลังการกระตุ้นรังไข่ด้วยฮอร์โมน เอฟเอสเอช ร่วมกับฮอร์โมน เอชซีจี และทำการเจาะเก็บโอโอไซต์ออกจากรังไข่ด้วยกล้องลาพาโรสโคป (Laparoscope) โอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้มีทั้งชนิดที่มีคุณภาพดี มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มหนาแน่น ซึ่งถือว่าเป็นโอโอไซต์ที่ยังสามารถเกิดการปฏิสนธิได้ แต่ต้องนำไปทำการเพาะเลี้ยงนอกร่างกายในน้ำยาเลี้ยงที่มีการเติมฮอร์โมน เอฟเอสเอช/แอลเอช (FSH/LH) และเอสตราไดออล (Estradiol) และซีรั่ม เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาทำการปฏิสนธินอกร่างกาย นอกจากนี้ยังพบโอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสแผ่กระจาย ซึ่งถือว่าเป็นโอโอไซต์ที่พร้อมเกิดการปฏิสนธิแล้ว สามารถนำไปทำการปฏิสนธินอกร่างกายได้ทันที การปฏิสนธินอกร่างกายทำโดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อโคที่นำมาทำละลายและผ่านกระบวนการคาปาซิเตชั่น (capacitation) หลังจากนั้นทำการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนนอกร่างกายจนถึงระยะบลาสโตซิส ก่อนนำไปย้ายฝากในแม่โคตัวรับจนเกิดการตั้งท้องและคลอดในที่สุด ปัญหาที่ผู้วิจัยพบคือความแปรปรวนของการตอบสนองของรังไข่ต่อฮอร์โมนที่ใช้ เช่นเดียวกับในรังไข่โคโตเต็มวัยที่ถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมนในโปรแกรมที่คล้ายคลึงกัน อาจเป็นไปได้ว่าความแปรปรวนของการตอบสนองของรังไข่ไม่ได้ขึ้นอยู่กับระยะของวงรอบการเป็นสัด แต่อาจเกิดจากความแตกต่างทางพันธุกรรม หรืออิทธิพลจากแม่โคที่กระทำต่อลูกโคในครรภ์ นอกจากนี้การใช้ฮอร์โมน เอชซีจี ในระดับสูงทำให้เซลล์คิวมูลัสแผ่กระจายและมีความเหนียว ซึ่งส่งผลให้อัตราการเก็บโอโอไซต์จากฟอลลิเคิลต่ำลง

ต่อมาในปี ค.ศ. 1994 Armstrong และคณะ ได้ศึกษาการกระตุ้นรังไข่ลูกโคอายุ 3-9 สัปดาห์ โดยใช้โปรแกรมฮอร์โมนหลายโปรแกรม พบว่าการฉีดฮอร์โมน เอฟเอสเอช เพียงครั้งเดียวในขนาด 140 มิลลิกรัม ให้ผลการกระตุ้นรังไข่น้อยกว่าการแบ่งฉีด 6 ครั้ง เมื่อใช้ขนาดฮอร์โมนเท่ากัน แต่เมื่อใช้ฮอร์โมน พีเอ็มเอสจี ร่วมกับการฉีดฮอร์โมน เอฟเอสเอช เพียงครั้งเดียวกลับช่วยเพิ่มอัตราการตอบสนองของรังไข่ให้ดีขึ้นได้ โดยผู้วิจัยกล่าวว่าเป็นเพราะอิทธิพลของฮอร์โมน พีเอ็มเอสจี ที่มีฤทธิ์ยาวนานทำให้กลุ่มของโอโอไซต์ที่ถูกกระตุ้นจากฮอร์โมน เอฟเอสเอช ในช่วง

แรกมีโอกาสเจริญเติบโตมากขึ้น นอกจากนี้เมื่อศึกษาการใช้ฮอร์โมน แอลเอช ร่วมกับโปรแกรมฮอร์โมน เอฟเอสเอช เพื่อช่วยให้โอโอไซต์เกิดภาวะพร้อมปฏิสนธิในร่างกาย พบว่าฮอร์โมน แอลเอช ไม่ได้ช่วยเสริมให้การผลิตตัวอ่อนด้วยโปรแกรมนี้ดีขึ้น แต่การให้ฮอร์โมน แอลเอช ร่วมกับฮอร์โมน เอฟเอสเอช ทำให้ได้โอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสแผ่กระจายและมีความเหนียวจำนวนมากกว่าการใช้ฮอร์โมนแอลเอช เพียงอย่างเดียว ในส่วนปัจจัยด้านอายุของสัตว์ทดลอง ผู้วิจัยพบว่ารังไข่ลูกโคมีการตอบสนองต่อฮอร์โมนเพิ่มขึ้นตามอายุที่มากขึ้น แต่ปัญหาที่ผู้วิจัยยังคงประสบอยู่คือความแปรปรวนของการตอบสนองของรังไข่ต่อฮอร์โมน

Looney และคณะ (1995) ศึกษาการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีเจาะฟอลลิเคิลร่วมกับเครื่องอัลตราซาวด์ (Ultrasound guided aspiration) ในโคอายุ 6-9 เดือนภายหลังการกระตุ้นรังไข่ด้วยโปรแกรมฮอร์โมนแบบต่าง ๆ ได้แก่ (1) การใช้ฮอร์โมน อีซีจี (eCG) ในขนาด 250 ไอยู ฉีดในวันที่ 0 และ 7 หลังการฝังฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ใต้ผิวหนังใบหู และในวันที่ 14 เริ่มให้ฮอร์โมนเอฟเอสเอช ติดต่อกัน 3 วัน และเจาะเก็บโอโอไซต์ในวันที่ 17 หรือ (2) โปรแกรมเดียวกันนี้ แต่เพิ่มฮอร์โมน เอชซีจี ในขนาด 2,000 ไอยูในวันที่ 17 และทำการเก็บโอโอไซต์ในอีก 22 ชั่วโมงต่อมา พบว่าโปรแกรมการกระตุ้นรังไข่ทั้งสองแบบให้จำนวนฟอลลิเคิลที่เจริญบนรังไข่ได้ในระดับที่น่าพอใจ ส่วนวิธีการเก็บแบบนี้ให้อัตราการเก็บโอโอไซต์อยู่ระหว่าง 45 – 58% ในด้านอายุของโคที่ใช้พบว่าส่งผลต่ออัตราการเก็บโอโอไซต์ โดยโคอายุมากขึ้นจะทำให้การเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีนี้ทำได้ง่ายขึ้นและมีอัตราการเก็บโอโอไซต์สูงขึ้นด้วย โอโอไซต์ที่เก็บได้จากโปรแกรมการกระตุ้นรังไข่ทั้งสองแบบสามารถนำไปเพาะเลี้ยงและปฏิสนธินอกร่างกาย ให้อัตราการแบ่งตัวหลังการปฏิสนธิ (Cleavage rate) ในช่วง 41-55% และมีอัตราการพัฒนาสู่ระยะบลาสโตซิส 7-11%

ในปีเดียวกัน Revel และคณะ (1995) ทำการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลบนรังไข่ลูกโคอายุ 3 เดือน เริ่มจากการฝังฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนใต้ผิวหนังนาน 4.5 วันก่อนฉีดฮอร์โมนเอฟเอสเอช ชนิด pFSH รวมทั้งสิ้น 16 มิลลิกรัม โดยแบ่งฉีดเป็น 8 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 12 ชั่วโมง พบว่าสามารถเก็บโอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มหนาแน่นได้เฉลี่ย 39 $\pm$ 22 ใบ ต่อลูกโคแต่ละตัว เมื่อนำโอโอไซต์ดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงและปฏิสนธินอกร่างกายพบว่ามีอัตราการปฏิสนธิ (fertilization rate) และอัตราการแบ่งตัวใกล้เคียงกับโอโอไซต์ที่ได้จากโคโตเต็มวัย (85% ต่อ 87% และ 73% ต่อ 79% ตามลำดับ) แต่เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปจนครบ 7 วัน พบว่าตัวอ่อนที่ได้จากโอโอไซต์ของลูกโคมีการพัฒนาสู่ระยะบลาสโตซิสต่ำกว่าตัวอ่อนที่ได้จากโอโอไซต์ของโคโตเต็มวัยอย่างมีนัยสำคัญ (11% ต่อ 27%) นอกจากนี้ในการทดลองครั้งนี้ ผู้วิจัยรายงานว่าโอโอไซต์ที่ได้จากลูกโคที่ได้รับการกระตุ้นรังไข่ด้วยฮอร์โมนมีอัตราการพัฒนาสู่ระยะบลาสโตซิสภายหลัง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การปฏิสนธินอกร่างกายสูงกว่าตัวอ่อนที่ได้จากโอโอไซต์ลูกโคที่ไม่ได้รับการกระตุ้นรังไข่ด้วยฮอร์โมน และเมื่อนำตัวอ่อนที่ได้ไปย้ายฝากในแม่โคตัวรับ พบว่าตัวอ่อนที่ได้จากลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์มีอัตราการตายสูงกว่าตัวอ่อนที่ได้จากโคโตเต็มวัย และเช่นเดียวกับรายงานอื่นผู้วิจัยพบปัญหาความแปรปรวนของการตอบสนองของรังไข่ลูกโคต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน

Fry และคณะ (1998) กระตุ้นรังไข่ของลูกโคอายุเฉลี่ย 5.3 เดือนจำนวน 19 ตัว ด้วยการฝังฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในวันที่ 1 และในวันที่ 4 ทำการฉีดฮอร์โมน เอฟเอสเอช ในขนาด 140 มิลลิกรัมต่อตัว เข้าใต้ผิวหนัง ร่วมกับฮอร์โมน พีเอ็มเอสจี ในขนาด 200 ไอยู ทำการถอดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ฝังไว้ออกหลังจากการฉีดฮอร์โมนแล้ว 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นสุ่มเลือกลูกโคออกมา 10 ตัว เพื่อฉีดโกนาโดโทรปิน รีลิสซิ่ง ฮอร์โมน หรือฮอร์โมน จีเอ็นอาร์เอช (Gonadotropin realeasing hormone; GnRH) ในขนาด 40 ไอยู หลังการให้ฮอร์โมน เอฟเอสเอช/ พีเอ็มเอสจี แล้ว 72 ชั่วโมง หลังจากการฉีดฮอร์โมน จีเอ็นอาร์เอช แล้ว 88-94 ชั่วโมง ทำการเจาะเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีการเจาะร่วมกับการใช้เครื่องอัลตร้าซาวด์ ผู้วิจัยรายงานว่า 70% ของลูกโคมีการตอบสนองต่อการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลบนรังไข่ ลูกโคกลุ่มที่ได้รับการฉีดฮอร์โมน จีเอ็นอาร์เอช มีฟอลลิเคิลขนาดกลาง (5-9 มิลลิเมตร) มากกว่าลูกโคที่ไม่ได้รับฮอร์โมนดังกล่าว ในขณะที่จำนวนฟอลลิเคิลขนาดเล็ก (2-4 มิลลิเมตร) และขนาดใหญ่ (มากกว่า 9 มิลลิเมตร) ไม่แตกต่างกัน และเมื่อมองภาพรวมทั้งหมดพบว่า ลูกโคที่ได้รับฮอร์โมน จีเอ็นอาร์เอช มีจำนวนฟอลลิเคิลทั้งหมดมากกว่าลูกโคที่ไม่ได้รับฮอร์โมนดังกล่าว และยังมีจำนวนฟอลลิเคิลที่สามารถเจาะได้ (aspirated follcle) มากกว่าด้วย แต่จำนวนโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้ไม่แตกต่างกันเนื่องจากอัตราการเก็บโอโอไซต์ในกลุ่มลูกโคที่ได้รับฮอร์โมน จีเอ็นอาร์เอช มีต่ำกว่าลูกโคที่ไม่ได้รับและมีโอโอไซต์ถึง 40 %ที่มีลักษณะของเซลล์คิวมูลัสที่แผ่กระจาย อย่างไรก็ดี ฮอร์โมน จีเอ็นอาร์เอช ไม่ได้มีอิทธิพลต่อคุณภาพของโอโอไซต์ที่ได้ เนื่องจากอัตราการแบ่งตัวและการพัฒนาสู่ระยะบลาสโตซิสของตัวอ่อนที่มาจากโอโอไซต์ของลูกโคกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับฮอร์โมน นอกจากนี้ฮอร์โมน จีเอ็นอาร์เอช ทำให้โอโอไซต์ที่เกิดขึ้นมีการพัฒนาสู่ระยะพร้อมปฏิสนธิแตกต่างกัน ซึ่งอาจต้องการกระบวนการเพาะเลี้ยงนอกร่างกายที่แตกต่างไปจากโอโอไซต์ที่ได้จากลูกโคที่ไม่ได้รับฮอร์โมนดังกล่าว

Maclellan และคณะ (1998) ศึกษาการกระตุ้นรังไข่ลูกโคเนื้อ (*Bos indicus*) พันธุ์บราห์มัน อายุ 3 เดือน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ (1) ลูกโคไม่ได้รับฮอร์โมนพิเศษในระหว่างวันที่ –8 ถึงวันที่ –1 ในวันที่ 0-2 ได้รับการฉีดฮอร์โมน เอฟเอสเอช (2) ลูกโคได้รับการฝัง จีเอ็นอาร์เอช อะโกนิส (GnRH agonist) ในวันที่ –8 ถึงวันที่ 3 และได้รับฮอร์โมน เอฟเอสเอช ใน

วันที่ 0 ถึงวันที่ 2 และ (3) ลูกโคได้รับการฉีดสาร จีเอ็นอาร์เอช แอนตาโกนิส (GnRH antagonist) วันละ 2 ครั้งตั้งแต่วันที่ –3 ถึงวันที่ 2 โดยได้รับฮอร์โมน เอฟเอสเอช ในวันที่ 0 ถึงวันที่ 2 เช่นกัน เมื่อตรวจสอบการตอบสนองของรังไข่ต่อโปรแกรมการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลทั้ง 3 แบบ พบว่าจำนวนและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของฟอลลิเคิลที่เกิดขึ้นบนผิวรังไข่ภายหลังการกระตุ้นทั้ง 3 แบบไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีจำนวนฟอลลิเคิลทั้งหมดอยู่ระหว่าง 56-77 ใบต่อลูกโคแต่ละตัว และฟอลลิเคิลส่วนใหญ่มีขนาดเล็ก (2-4 มิลลิเมตร) และขนาดกลาง (5-7 มิลลิเมตร) อัตราการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่อยู่ระหว่าง 49-62 % และเมื่อนำโอโอไซต์ดังกล่าวไปผ่านกระบวนการเพาะเลี้ยงและปฏิสนธินอกร่างกาย พบว่ามีอัตราการแบ่งตัวหลังการปฏิสนธิและการพัฒนาสู่ระยะบลาสโตซิสไม่แตกต่างกันในระหว่างกลุ่มทดลอง โดยมีอัตราการพัฒนาถึงระยะบลาสโตซิสอยู่ระหว่าง 21-34 % ผู้วิจัยเสนอว่า รังไข่ของลูกโคเนื้อบราห์มันสามารถผลิตฟอลลิเคิลตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนได้จำนวนมากกว่ารังไข่ของลูกโคนม และไม่พบว่าอายุของลูกโคเนื้อที่เพิ่มขึ้นส่งผลกระทบต่อการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน

Taneja และคณะ (2000) ทำการกระตุ้นรังไข่ของลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์จำนวน 2 ครั้ง ครั้งแรกเมื่อลูกโคอายุ 2 เดือน และครั้งที่สองเมื่อลูกโคอายุ 4 เดือน ก่อนทำการกระตุ้นรังไข่ในลูกโคอายุ 2 เดือน ได้ทำการตรวจนับจำนวนฟอลลิเคิลบนรังไข่ลูกโคด้วยกล้องลาพาโรสโคป ส่วนการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลทำโดยการฝังฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนไว้นาน 6 วัน แล้วทำการฉีดฮอร์โมน เอฟเอสเอช ในขนาด 130 มิลลิกรัม แบ่งฉีด 2 วัน วันละ 2 ครั้ง หลังจากการฉีดฮอร์โมน เอฟเอสเอช เข็มสุดท้าย 12-14 ชั่วโมง ทำการตรวจการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นและทำการเจาะเก็บโอโอไซต์ด้วยกล้องลาพาโรสโคป ผู้วิจัยรายงานว่าพบฟอลลิเคิลเฉลี่ย 23 ใบต่อลูกโคแต่ละตัวก่อนเริ่มโปรแกรมการกระตุ้นรังไข่เมื่อลูกโคอายุ 2 เดือน และเพิ่มเป็น 55 ใบต่อตัวภายหลังการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิล อัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์จากฟอลลิเคิลเป็น 83% เมื่อทำการกระตุ้นรังไข่ลูกโคอีกครั้งเมื่อลูกโคอายุ 4 เดือน พบค่าเฉลี่ยฟอลลิเคิลบนรังไข่เป็น 47 ใบต่อตัว และมีอัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์อยู่ที่ 84% เมื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนฟอลลิเคิลที่ตรวจก่อนได้รับการกระตุ้นรังไข่กับจำนวนฟอลลิเคิลที่เกิดขึ้นหลังการกระตุ้น พบว่าลูกโคที่มีจำนวนฟอลลิเคิลบนรังไข่ก่อนได้รับฮอร์โมนตั้งแต่ 20 ฟอลลิเคิลขึ้นไปมีการตอบสนองต่อการกระตุ้นรังไข่ดีกว่าลูกโคที่มีจำนวนฟอลลิเคิลบนรังไข่น้อยกว่า โอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้เมื่อนำไปผ่านกระบวนการเพาะเลี้ยงและปฏิสนธินอกร่างกายแล้ว พบว่ามีอัตราการแบ่งตัวหลังการปฏิสนธิอยู่ที่ 41% (ลูกโคอายุ 2 เดือน) และ 43% (ลูกโคอายุ 4 เดือน) และอัตราการพัฒนาสู่ระยะมอรูล่าและบลาสโตซิสที่ 11% (ลูกโคอายุ 2 เดือน) และ 10% (ลูกโคอายุ 4 เดือน)

ตามลำดับ ผลการนำตัวอ่อนไปย้ายฝากในแม่โคตัวรับ พบว่าแม่โคตั้งท้อง 11 ตัว และคลอดลูก 9 ตัว เป็นลูกโคมีชีวิต 7 ตัว

สำหรับการศึกษาในประเทศไทย โดย ชัยณรงค์และคณะ (2538) ซึ่งทำการกระตุ้นรังไข่ลูกโคพื้นเมืองอายุ 5-6 เดือน จำนวน 4 ตัว เพื่อทำการศึกษาการเจาะเก็บ โอโอไซต์ด้วยเครื่องอัลตร้าซาวด์ ลูกโคได้รับการฝังฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ใต้ผิวหนังหลังใบหูก่อนได้รับการฉีดฮอร์โมน 7 วัน ฮอร์โมนที่ใช้ในการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลคือ ฮอร์โมน เอฟเอสเอช ในขนาด 120 มิลลิกรัม แบ่งฉีด 3 วัน วันละ 2 ครั้ง ทำการเจาะเก็บโอโอไซต์หลังการฉีดฮอร์โมน เอฟเอสเอช เข็มสุดท้ายประมาณ 12 ชั่วโมง ผู้วิจัยรายงานจำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้เฉลี่ยต่อตัวเท่ากับ 9.92 $\pm$ 5.2 ใบ ส่วนมากเป็นโอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มรอบหนาแน่น (71%) ต่อมา มงคลและคณะ (2539) ที่ทำการกระตุ้นรังไข่ลูกโคซิมเมนทัลและลูกโคพื้นเมืองด้วยฮอร์โมน เอฟเอสเอช ในขนาด 180 มิลลิกรัม พบว่ารังไข่ลูกโคซิมเมนทัลมีฟอลลิเคิลเฉลี่ย 35.8 $\pm$ 24.2 ใบ ส่วนรังไข่ลูกโคพื้นเมืองมีจำนวนฟอลลิเคิลเฉลี่ย 39.0 $\pm$ 27.6 ใบ ทำการเจาะเก็บโอโอไซต์ไปผ่านกระบวนการเพาะเลี้ยงและปฏิสนธินอกร่างกาย หลังจากนั้นทำการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนในท่อนำไข่สัตว์ตัวกลางได้แก่แกะและกระต่าย พบว่าท่อนำไข่ของแกะมีแนวโน้มในการสนับสนุนการพัฒนาของตัวอ่อนได้ดีกว่าท่อนำไข่ของกระต่าย โดยตัวอ่อนที่พัฒนาถึงระยะมอรูล่าและบลาสโตซิสในท่อนำไข่ของแกะมีสูงถึง 58.8 % ผู้วิจัยให้ข้อเสนอแนะว่าควรมีการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนนอกร่างกายสัตว์ เพื่อลดขั้นตอนยุ่งยากในการดูแลสัตว์ตัวกลาง รวมถึงค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงสัตว์ตัวกลางและอุปกรณ์ผ่าตัด ในปี พ.ศ. 2541 รังสี และคณะ ได้ศึกษาการตอบสนองของรังไข่ของลูกโคพื้นเมืองภายหลังการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เอฟเอสเอช ในขนาด 192 มิลลิกรัม โดยทำการกระตุ้นรังไข่ทั้งหมด 4 ครั้ง พบว่าในการกระตุ้นครั้งแรก รังไข่ลูกโคสามารถผลิตฟอลลิเคิลได้เฉลี่ย 44.9 $\pm$ 9.0 ใบ โดยส่วนมากเป็นฟอลลิเคิลขนาด 5-10 มิลลิเมตร (คิดเป็น 60.7% ของฟอลลิเคิลทั้งหมด) การกระตุ้นรังไข่ซ้ำทำห่างกัน 4-6 เดือน พบว่าผลการตอบสนองของรังไข่มีแนวโน้มลดลงกว่าครั้งแรก โดยพบจำนวนฟอลลิเคิลบนรังไข่ภายหลังการกระตุ้นครั้งที่ 2, 3 และ 4 เท่ากับ 28.5 $\pm$ 3.6, 26.3 $\pm$ 3.4 และ 27.7 $\pm$ 5.0 ใบ ตามลำดับ โดยภาพรวมแล้วพบว่า รังไข่ลูกโคพื้นเมืองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้สามารถผลิตฟอลลิเคิลหลังถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเฉลี่ย 31.9 $\pm$ 3.0 ใบ ผู้วิจัยรายงานอัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์อยู่ที่ประมาณ 50% โอโอไซต์ส่วนใหญ่ (60%) เป็นโอโอไซต์ที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ ปัญหาที่พบคือความแปรปรวนของการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นและการยึดติดกันของรังไข่กับอวัยวะภายในช่องท้องภายหลังการเปิดผ่าซึ่งส่งผลต่อการตรวจการตอบสนองของรังไข่และการเจาะเก็บโอโอไซต์

ดังนั้นงานวิจัยในประเทศไทยที่ทำสำเร็จไปแล้ว คือการกระตุ้นรังไข่ของลูกโคพื้นเมืองและลูกโคลูกผสมสายพันธุ์ต่างประเทศ การเก็บโอโอไซต์ด้วยการผ่าตัดช่องท้อง และการใช้เครื่องอัลตราซาวด์ต่อกับโปรปสอดเข้าช่องท้อง รวมทั้งมีการนำมาเลี้ยงในหลอดทดลองแล้วนำไปปฏิสนธินอกร่างกาย

วัตถุประสงค์การวิจัย

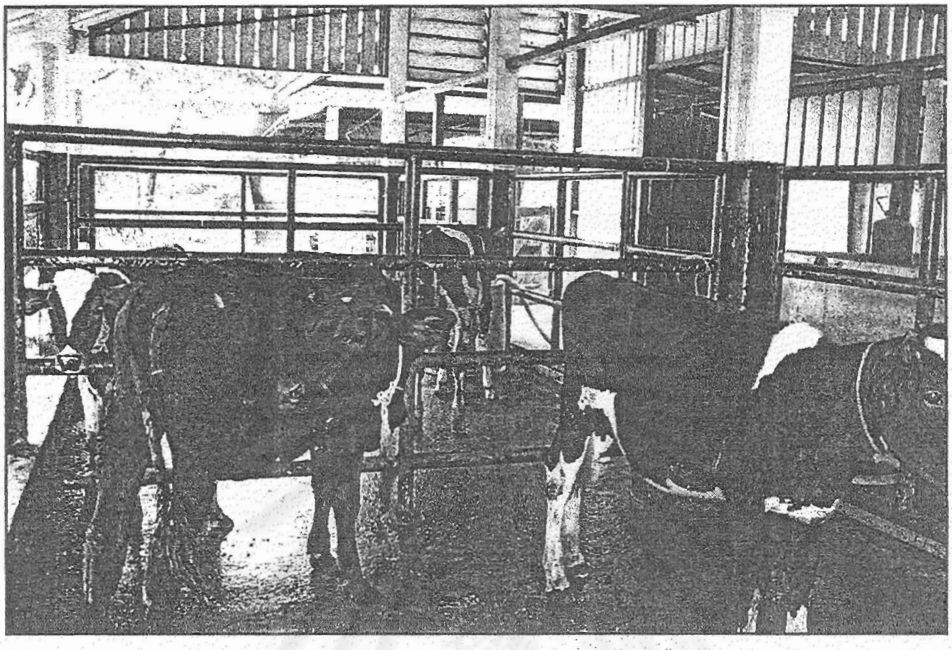
1. เพื่อศึกษาการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลบนรังไข่ลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์ด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน เพื่อทำการเจาะเก็บโอโอไซต์มาใช้ในการผลิตตัวอ่อนนอกร่างกาย
2. เพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ที่ได้จากลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์ให้เกิดภาวะพร้อมปฏิสนธิ
3. เพื่อศึกษาความเหมาะสมของระบบการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนภายหลังการปฏิสนธินอกร่างกายของโอโอไซต์จากลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์จนถึงระยะที่สามารถนำไปย้ายฝากได้
4. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการพัฒนานอกร่างกายระหว่างโอโอไซต์ที่ได้จากลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์กับโอโอไซต์ที่ได้จากโคโตเต็มวัย

วัสดุและวิธีการ

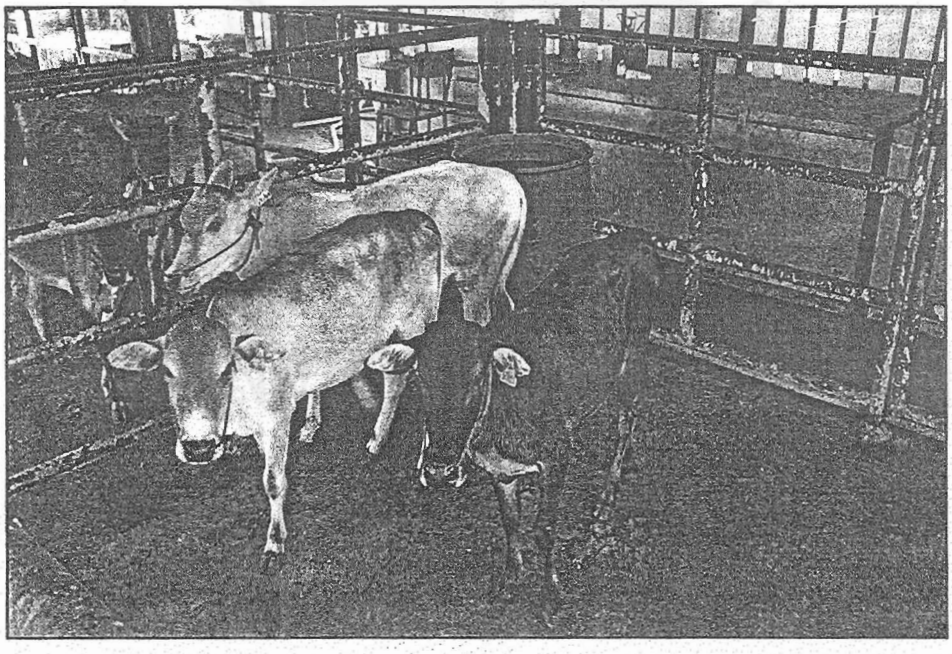
1. สัตว์ทดลอง

ใช้ลูกโคจำนวน 3 ชุด ชุดแรกเป็นลูกโคนมพันธุ์ผสมโฮลสไตน์ ฟรีเซี่ยน จำนวน 9 ตัว ชุดที่สองเป็นลูกโคนมผสมโคเนื้อพันธุ์พื้นเมือง จำนวน 8 ตัว และชุดที่สามเป็นลูกโคเนื้อพันธุ์พื้นเมือง จำนวน 9 ตัว ลูกโคทั้งหมดอายุอยู่ในช่วง 6-12 เดือน น้ำหนัก 90 – 200 กิโลกรัม ลูกโคชุดแรกและชุดที่สองถูกเลี้ยงด้วยต้นข้าวโพดสดสับเป็นท่อนสั้น ๆ เสริมด้วยอาหารข้น โปรตีนไม่ต่ำกว่า 16 %วันละ 1 กิโลกรัมต่อตัว ลูกโคชุดที่สามเลี้ยงด้วยฟางแห้งอัดก้อน เสริมด้วยอาหารข้นเช่นเดียวกัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 ลูกโคนมพันธุ์ผสมโฮลสไตน์ ฟรีเซี่ยน



รูปที่ 2 ลูกโคพื้นเมือง

2. โปรแกรมการเหนี่ยวนำให้เกิดการเจริญของฟอลลิเคิลหลายใบ

โปรแกรมการเหนี่ยวนำการเจริญของฟอลลิเคิลหลายใบในลูกโคที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มี 2 โปรแกรม ดังนี้

โปรแกรมที่ 1

โปรแกรมนี้ใช้กับลูกโคชุดที่หนึ่งและชุดที่สอง โดยทำการฝังฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่บริเวณใต้ผิวหนังบริเวณใบหู ร่วมด้วยการฉีดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนร่วมกับฮอร์โมนเอสตร้าไดออลเข้ากล้ามเนื้อ (Crestar®, Intervet International, The Netherlands) อีก 7 วันต่อมาทำการฉีดฮอร์โมนชนิด ฟอลลิเคิล สติมูเลทิ่ง ฮอร์โมน หรือฮอร์โมน เอฟเอสเอช (Follicle stimulating hormone, FSH, Folltropin®-V, Vetrepharm, Australia) ในขนาด 120 – 180 มิลลิกรัมต่อตัว ฉีดเข้ากล้ามเนื้อวันละ 2 ครั้ง (07.00 น. และ 19.00 น.) ติดต่อกันนาน 3 วัน โดยแบ่งฉีดแบบลดขนาดของฮอร์โมน (120 มิลลิกรัม แบ่งเป็น 30/30, 20/20 และ 10/10 มิลลิกรัม 180 มิลลิกรัม แบ่งเป็น 40/40, 30/30 และ 20/20 มิลลิกรัม) หลังจากฉีดฮอร์โมน เอฟเอสเอช เข็มสุดท้ายแล้ว 12 ชั่วโมง ทำการฉีดฮอร์โมน จีเอ็นอาร์เอช (Cystorelin®, Sanofi, France) ในขนาด 100 ไมโครกรัมต่อตัว เข้ากล้ามเนื้อ ทำการเก็บโอโอไซต์ภายหลังการฉีดฮอร์โมนโกนาโดโทรปินแล้วอย่างน้อย 24 ชั่วโมง

โปรแกรมที่ 2

ใช้กับลูกโคชุดที่สาม ลูกโคได้รับการฉีดฮอร์โมน เอฟเอสเอช ในขนาด 120 มิลลิกรัมต่อตัว เข้ากล้ามเนื้อวันละ 2 ครั้ง (08.00 น. และ 16.00 น.) ติดต่อกันนาน 2 วัน โดยแบ่งฉีดแบบลดขนาดของฮอร์โมน (แบ่งเป็น 40/40 และ 20/20 มิลลิกรัม) ทำการเก็บโอโอไซต์หลังการฉีดฮอร์โมนเอฟเอสเอช เข็มสุดท้ายภายใน 18-24 ชั่วโมง

3. การเก็บโอโอไซต์จากลูกโค

อดอาหารและน้ำลูกโคที่จะเข้ารับการผ่าตัดเก็บโอโอไซต์อย่างน้อย 24 ชั่วโมงก่อนการผ่าตัด วิธีการผ่าตัดเปิดช่องท้องเพื่อเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ใช้วิธีที่รายงานโดย Techakumphu และคณะ (1994) โดยชักนำการสลบในลูกโดด้วยการฉีด Xylazine Hydrochloride ในขนาด 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เข้ากล้ามเนื้อ เมื่อลูกโคแสดงอาการซึม ทำการฉีดยาสลบชนิด Thiopental Sodium ในขนาด 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เข้าหลอดเลือดดำใหญ่ ต่อสายน้ำเกลือเข้าหลอดเลือดบริเวณใบหูและให้น้ำเกลือชนิด 0.9% Sodium Chloride ตลอดระยะการผ่าตัด สามารถเติมยาสลบในขนาด 100-150 มิลลิกรัมต่อครั้งเมื่อลูกโครู้สึกตัว

เมื่อลูกโคสลบแล้ว ทำการเตรียมบริเวณผ่าตัด คือ ช่องท้องส่วนล่างจนถึงระหว่างเต้านมคู่แรก ด้วยวิธีปลอดเชื้อ ทำการเปิดผ่าเข้าสู่ช่องท้อง ดึงมดลูกและรังไข่ขึ้นมาบริเวณปากแผล

ทำการวัดขนาดของรังไข่ นับจำนวนและวัดขนาดของฟอลลิเคิล และนับจำนวนคอร์ปัส ยีโมราจิคัม ที่ปรากฏอยู่บนรังไข่ทั้งสองข้าง จากนั้นทำการเก็บโอโอไซต์จากฟอลลิเคิล วิธีการเก็บโอโอไซต์แบ่งเป็น 3 วิธี ดังนี้

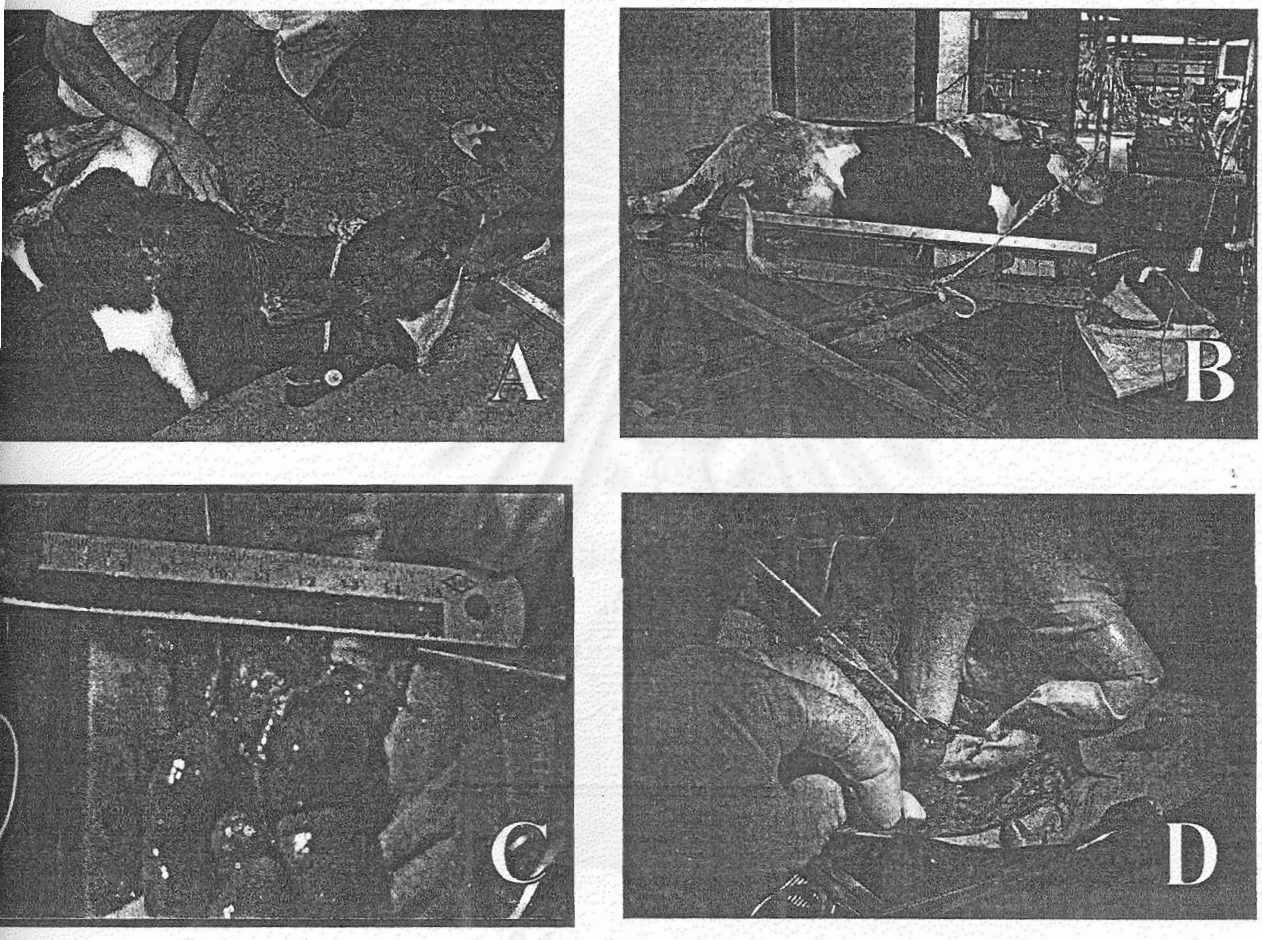
(1) ใช้เข็มฉีดยาพลาสติกเบอร์ 19 ต่อกับกระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร เจาะดูดของเหลวออกจากฟอลลิเคิลแต่ละใบจนหมด เทของเหลวที่เจาะเก็บได้ลงในหลอดพลาสติกปลอดเชื้อที่บรรจุน้ำยาซนิด TCM199 (Gibco BRL®, Live Technologies) ที่มีส่วนประกอบของ HEPES (Sigma Chemical, USA) และเฮปารินในขนาด 25 ไอยู ต่อมิลลิลิตร นำส่งห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจหาโอโอไซต์ต่อไป

(2) ใช้เครื่องกำเนิดแรงดูดสูญญากาศ ต่อกับเข็มเจาะโอโอไซต์เบอร์ 18 ที่ใช้ในการเจาะเก็บโอโอไซต์ในมนุษย์ ตั้งระดับแรงดูดอยู่ที่ 100-120 มิลลิเมตรปรอท แทงเข็มเจาะเข้าไปในฟอลลิเคิลและใช้แรงดูดดูดของเหลวออกจากฟอลลิเคิล ของเหลวที่ดูดเก็บได้ถูกเก็บไว้ในหลอดพลาสติกปลอดเชื้อที่บรรจุน้ำยาซนิดเดียวกับที่กล่าวไว้ในข้อหนึ่ง

(3) ทำการตัดรังไข่ออกทั้งสองข้าง แช่รังไข่ทั้งใบลงในน้ำเกลือ (0.9% Sodium Chloride) อุ่นที่ 35-37 องศาเซลเซียส นำส่งห้องปฏิบัติการภายใน 30 นาทีหลังการตัดเก็บจากตัวลูกโค ทำการเจาะดูดของเหลวจากฟอลลิเคิลบนรังไข่ด้วยเข็มฉีดยาพลาสติกเบอร์ 19-21 ต่อกับกระบอกฉีดยาพลาสติก เทของเหลวที่เจาะดูดได้ลงในน้ำยา TCM199 HEPES และนำไปตรวจหาโอโอไซต์ต่อไป

ขั้นตอนของการผ่าตัดเพื่อเก็บโอโอไซต์ในลูกโคแสดงในรูปที่ 3 และ 4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



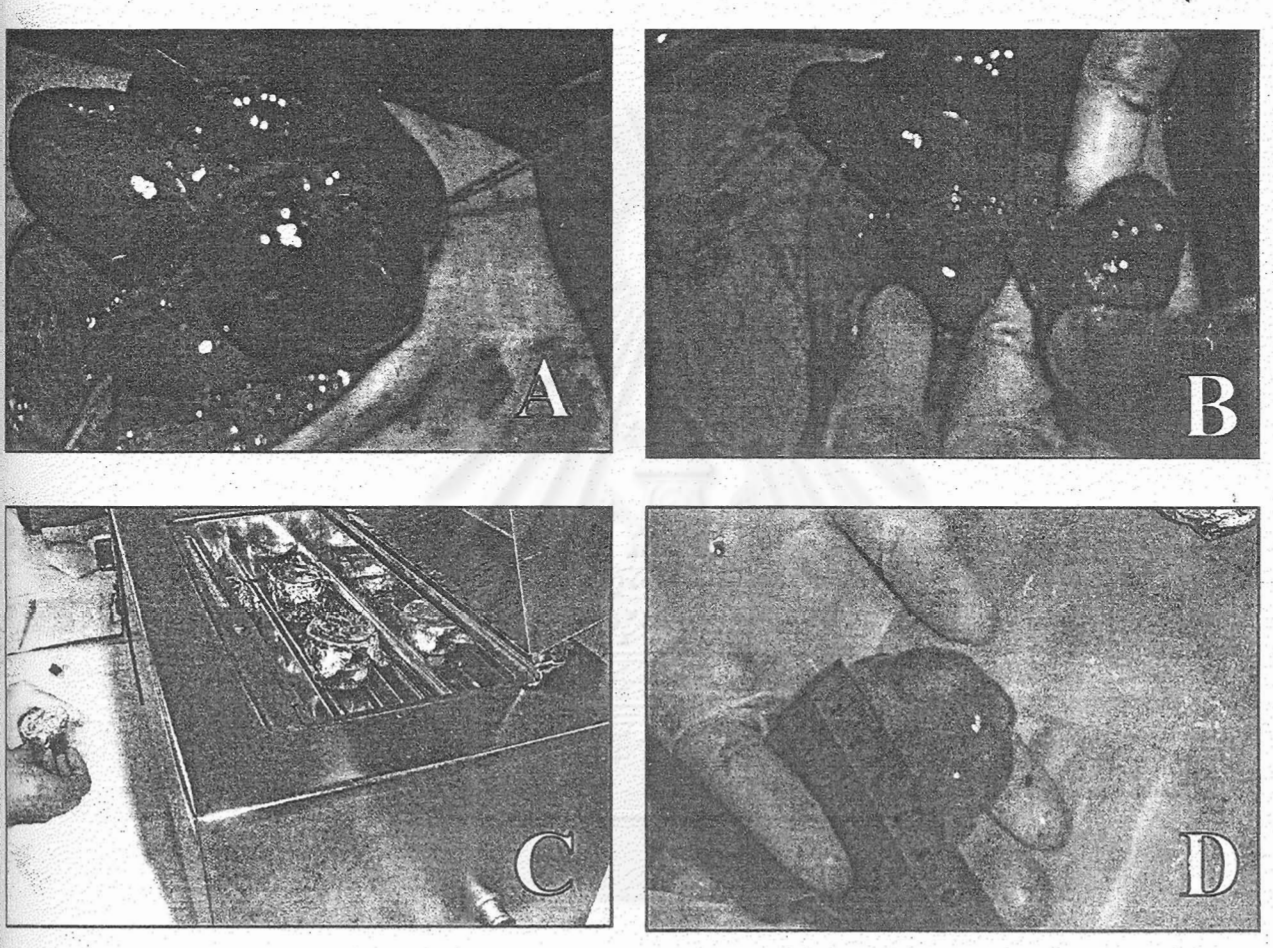
รูปที่ 3 ขั้นตอนต่าง ๆ ในการผ่าตัดเพื่อเก็บโอโอไซต์ในลูกโค

A การวางยาสลบเข้าหลอดเลือดดำ jugular vein

B การควบคุมลูกโคให้อยู่ในท่า ventral recumbancy

C รังไข่ทั้งสองข้างที่มีการตอบสนอง เห็นฟอลลิเคิลเป็นเม็ดใส

D การเจาะรังไข่ด้วยเข็มต่อกับไซริงค์



รูปที่ 4 การตัดรังไข่เพื่อเก็บโอโอไซต์กรณีที่รังไข่มีการตอบสนองมากดังรูป A

A รังไข่ที่ถูกกระตุ้นมีการตอบสนองมาก

B ทำการผูก mesovarium และหลอดเลือดที่เลี้ยงรังไข่

C เก็บรังไข่ไว้ในบีกเกอร์ที่ 37°C ก่อนการเก็บโอโอไซต์

D ทำการวัดขนาดรังไข่ ฟอลลิเคิลและจำนวนฟอลลิเคิลบนรังไข่ก่อนทำการเจาะ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การเก็บรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์

เก็บรังไข่โคนมที่ถูกส่งเข้าโรงฆ่าสัตว์ท้องถิ่น แช่รังไข่ทั้งใบลงในน้ำเกลือ (0.9% Sodium Chloride) อุ่นที่ 30-32 องศาเซลเซียส นำส่งห้องปฏิบัติการภายใน 3 ชั่วโมง หลังการตัดเก็บจากโค ทำการเจาะดูดของเหลวในฟอลลิเคิลขนาด 0.3 – 1 เซนติเมตร ด้วยเข็มพลาสติกเบอร์ 19-21 ต่อกับกระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 10 มิลลิลิตร เทของเหลวที่เจาะดูดได้ลงในน้ำยาชนิด TCM199 HEPES และนำไปตรวจหาโอโอไซต์ต่อไป

5. การตรวจหาโอโอไซต์และการแยกชนิด

เทของเหลวที่เจาะเก็บได้จากโอโอไซต์ลงในจานเพาะเชื้อพลาสติก (Nunc®, Denmark) ตรวจหาโอโอไซต์ภายใต้กล้องจุลทัศน์สเตอริโอ ย้ายโอโอไซต์ที่พบลงในน้ำยา TCM199 HEPES และทำการแยกชนิดโอโอไซต์เป็น 2 ประเภท ได้แก่

(1) โอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิ (Immature oocyte) คือโอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มรอบหนาแน่นหลายชั้น (compact cumulus oocytes, COCs) หรือโอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มเพียงชั้นเดียวหรือบางส่วน (single-layer and Partial cumulus oocytes, S&P) หรือโอโอไซต์ที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มเลย (denuded oocytes, D)

(2) โอโอไซต์ชนิดพร้อมปฏิสนธิ (mature oocyte) คือโอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสแผ่กระจาย (expanded cumulus oocytes, EXP) และมีความเหนียว (mucification)

ทำการตรวจลักษณะของโครโมโซมก่อนทำการเพาะเลี้ยงนอกร่างกายโดยใช้โอโอไซต์จากลูกโคทดลองกลุ่มที่หนึ่งและสอง และโอโอไซต์ที่ได้จากรังไข่โคจากโรงฆ่าสัตว์ โดยทำการสุ่มเลือกโอโอไซต์ทั้งที่อยู่ในภาวะพร้อมและไม่พร้อมปฏิสนธิ นำมาตรวจสอบลักษณะโครโมโซม

6. การเพาะเลี้ยงโอโอไซต์นอกร่างกาย

น้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์นอกร่างกายที่ใช้ ประกอบด้วย TCM199 + $NaHCO_3$ ที่เติมฮอร์โมน FSH/LH (Folltropin®-V, Vetrepharm, Australia) ในขนาด 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ฮอร์โมน Estradiol (Sigma Chemical, USA) ในขนาด 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 10% Fetal calf serum (Gibco, USA) และเติมยาปฏิชีวนะชนิด Penicillin-Streptomycin กรองด้วยหัวกรองขนาด 0.2 ไมครอน ใส่ในจานเพาะเลี้ยงชนิด 4 หลุม (4-well Multidish, Nunc®, Denmark) อบในตู้อบ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % ความชื้นเต็มที่ ก่อนใช้งานจริงไม่น้อยกว่า 30 นาที

โอโอไซต์ที่นำมาใช้ในการศึกษาการเพาะเลี้ยงนอกร่างกาย มาจากลูกโคชุดที่หนึ่งและชุดที่สอง และโอโอไซต์ที่ได้จากรังไข่โคจากโรงฆ่าสัตว์ เมื่อทำการแยกชนิดของโอโอไซต์ที่ได้

ล้างโอโอไซต์ด้วยน้ำยา TCM199 $NaHCO_3$ ก่อนนำลงในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เตรียมไว้ เก็บในตู้อบภายใต้สภาวะดังกล่าวข้างต้น ทำการเลี้ยงโอโอไซต์ตามระยะเวลาที่กำหนดดังนี้

(1) โอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิ ทำการเพาะเลี้ยงนาน 8, 16, 24, 28, 32, 36 และ 40 ชั่วโมง

(2) โอโอไซต์ชนิดพร้อมปฏิสนธิ ทำการเพาะเลี้ยงนาน 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง

เมื่อเพาะเลี้ยงถึงระยะที่กำหนด ทำการเก็บตัวอย่างโอโอไซต์มาตรวจลักษณะของโครโมโซมตามวิธีการที่กล่าวถึงต่อไป

7. การตรวจระยะโครโมโซมของโอโอไซต์หลังการเพาะเลี้ยงนอกร่างกาย

ทำการตรึงสภาพของโอโอไซต์ด้วยน้ำยาที่มีส่วนประกอบของกรดอะซีติกเข้มข้น และเอทานอล ในอัตราส่วน 1:3 แช่โอโอไซต์ ในน้ำยาดังกล่าวนานอย่างน้อย 24 ชั่วโมง จากนั้นนำโอโอไซต์มาย้อมสีด้วยวิธี Rapid staining ตามวิธีของ มาลีและคณะ (2542) โดยวางโอโอไซต์ลงบนสไลด์กระจก แต้มวาสลินหยดเล็ก ๆ ที่ขอบของกระจกปิดสไลด์และวางครอบลงเหนือโอโอไซต์ ปล่อยสีผ่านโอโอไซต์และล้างด้วยน้ำยาล้างสีและน้ำกลั่น ใช้น้ำยาทาเล็บทารอบขอบของกระจกปิดสไลด์เพื่อกันน้ำกลั่นระเหย นำไปส่องตรวจลักษณะของโครโมโซมที่จะติดสีม่วงน้ำเงินภายใต้กล้องจุลทัศน์แสงสว่าง กำลังขยาย 400 – 1000 เท่า

ทำการแบ่งลักษณะของโครโมโซมที่พบออกเป็น 7 ลักษณะ ได้แก่

(1) โครโมโซมระยะ Germinal Vesicle (GV) พบเยื่อหุ้มนิวเคลียสและนิวคลีโอลัสชัดเจน

(2) โครโมโซมระยะ Germinal Vesicle breakdown (GVBD) เยื่อหุ้มนิวเคลียสและนิวคลีโอลัสสลายไป เส้นใยโครมาตินเริ่มหดตัวแต่ยังเห็นไม่ชัดเจน

(3) โครโมโซมระยะ Prophase I (PI) เส้นใยโครมาตินมีการหดตัวแน่นขึ้นจนเห็นเป็นสายยาว ๆ อยู่ในโอโอพลาส แต่ยังไม่แน่นจนเกิดรูปร่างของแท่งโครโมโซม

(4) โครโมโซมระยะ Metaphase I (MI) เห็นเส้นใยโครมาตินหดตัวหนาแน่นเป็นโครโมโซมเพียงชุดเดียว

(5) โครโมโซมระยะ Anaphase I – Telophase I (AI – TI) โครโมโซมแยกตัวออกจากกันโดยเห็นเส้นใยสปินเดิลโยงระหว่างแท่งโครโมโซมทั้งสองด้าน

(6) โครโมโซมระยะ Metaphse II (MII) พบลักษณะของโครโมโซมในส่วนของโอโอพลาสและส่วนของเส้นใยโครมาตินที่ใกล้เสื่อมสลายในส่วนของโพล่าร์ บอดี้ที่หนึ่ง

(7) โครโมโซมที่เสื่อมสลาย (Degenerate chromosome, DEG) พบลักษณะของเส้นโครมาติน หรือโครโมโซมที่ผิดปกติ มีการแตกกระจายในโอโอพลาส และไม่สามารถระบุระยะของโครโมโซมได้

(8) ไม่พบโครโมโซมในโอโอพลาส (Unidentified oocytes, UID) ไม่พบเส้นใยโครมาติน หรือโครโมโซมที่ติดสีอยู่ในโอโอพลาส

8. การปฏิสนธินอกร่างกาย

โอโอไซต์ที่นำมาใช้ในการศึกษาการปฏิสนธินอกร่างกายเป็นโอโอไซต์ที่เก็บได้จากลูกโคทดลองกลุ่มที่สามเท่านั้น นำโอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มรอบหนาแน่นมาทำการเพาะเลี้ยงนอกร่างกายด้วยน้ำยาเช่นเดียวกับในข้อ 6 แต่เลี้ยงในอุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % ความชื้นเต็มที่ นาน 24 ชั่วโมงก่อนนำมาใช้ปฏิสนธิ

ขั้นตอนการปฏิสนธินอกร่างกาย ประกอบด้วย

8.1) <u>การเตรียมน้ำเชื้อ</u>

ใช้น้ำเชื้อพ่อโคบรามันห์แช่แข็งชนิดหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร จำนวน 2-6 หลอดต่อครั้ง นำมาทำละลายในน้ำอุ่น อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 วินาที หยดตัวอย่างน้ำเชื้อหลังทำละลายลงบนสไลด์แก้วอุ่นเพื่อนำไปตรวจดูการเคลื่อนไหว จากนั้นนำน้ำเชื้อที่เหลือผ่านกระบวนการ Capacitation ในน้ำยาชนิด TALP ที่เติม Bovine serum albumin faction V (Sigma Chemical, USA) ปริมาณ 0.009 กรัม ใส่ในหลอดพลาสติกปลอดเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการปล่อยน้ำเชื้อลงที่ก้นหลอดและปล่อยให้ตัวอสุจิที่แข็งแรงว่ายขึ้นสู่ผิวน้ำยาเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในตู้อบอุณหภูมิ 38.5 °C จากนั้นดูดน้ำยาส่วนบนโดยไม่ให้มีตะกอนน้ำเชื้อด้านล่างปนเปื้อนขึ้นมาใส่ในหลอดพลาสติกปลอดเชื้อ นำไปปั่นด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อวินาที นาน 5 นาที เพื่อให้ตัวอสุจิตกตะกอน ดูดน้ำยาส่วนใสด้านบนทิ้งโดยเหลือไว้เล็กน้อย ใช้ปิเปตดูดน้ำยาที่เหลือขึ้นและลงหลายครั้งเพื่อละลายตะกอนตัวอสุจิ หยดสารละลายตัวอสุจิจำนวนเล็กน้อยลงบนสไลด์อุ่นเพื่อนำไปตรวจการเคลื่อนไหวแบบ hyperactive movement และคำนวณหาความเข้มข้นของตัวอสุจิที่ได้ปรับปริมาตรให้ได้ความเข้มข้นของตัวอสุจิที่ 1 x 106 ตัวต่อมิลลิลิตรเพื่อใช้ในการผสม

8.2) <u>การเตรียมโอโอไซต์และการผสมตัวอสุจิ</u>

นำโอโอไซต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงนอกร่างกายตามที่ระบุไว้ด้านบนมาล้างในน้ำยาชนิด TALP จากนั้นย้ายลงในน้ำยาชนิด TALP ที่มีส่วนผสมของ Penicillamine, Hypotaurine และ Epinephrine และเติม Heparin ในขนาด 10 ไมโครลิตร ที่บรรจุอยู่ในจานเพาะเชื้อพลาสติกชนิด 4 หลุม ปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยใส่โอโอไซต์จำนวน 5-10 ใบต่อหลุม ผสมตัวอสุจิที่ผ่าน

กระบวนการ capacitation แล้วลงไปเลี้ยงรวมกับโอโอไซต์ในตู้อบ อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % ความชื้นเต็มที่ เป็นเวลานาน 18 ชั่วโมง

9. **การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนระยะแรกนอกร่างกาย**

ภายหลังการปฏิสนธินอกร่างกาย ทำการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนระยะแรกในน้ำยาเพาะเลี้ยง 2 ชนิด ได้แก่

(1) น้ำยา TCM199 $NaHCO_3$ ที่เติม Fetal calf serum 20 % ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในจานเพาะเลี้ยงชนิด 4 หลุม โดยใส่โอโอไซต์ที่ผ่านการปฏิสนธินอกร่างกายแล้ว 5-10 ใบต่อหลุม

(2) น้ำยา Upgraded B2 (Menezo, France) ที่เติม Fetal calf serum 2.5% ร่วมกับเซลล์เวโร (Vero cell) ในปริมาณ 50,000 เซลล์ต่อน้ำยา 50 ไมโครลิตร ทำเป็นหยดเล็ก ๆ (microdrop) ปิดทับด้วยน้ำมันพาราฟิน ใส่โอโอไซต์ที่ผ่านการปฏิสนธินอกร่างกายแล้ว 5-10 ใบต่อหนึ่งหยด

ทำการตรวจการพัฒนาของตัวอ่อนที่ชั่วโมงที่ 48 เพื่อดูการแบ่งตัว (cleavage rate) ในชั่วโมงที่ 144 เพื่อดูอัตราการเกิดมอรูล่า และในชั่วโมงที่ 168 เพื่อดูอัตราการเกิดบลาสโตซีส

9. **การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ**

ขนาดของฟอลลิเคิลบนรังไข่ของลูกโคแต่ละตัวแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean$\pm$SD) ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของฟอลลิเคิลระหว่างลูกโคแต่ละชุดด้วย T-test ด้วยโปรแกรม SAS

เปรียบเทียบความแตกต่างของอัตราการเก็บโอโอไซต์และชนิดโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้ระหว่างวิธีต่าง ๆ ด้วย Chi-square test

เปรียบเทียบความแตกต่างของระยะการพัฒนาของโอโอไซต์ในระหว่างการเพาะเลี้ยงนอกร่างกายระหว่างโอโอไซต์ที่ได้จากลูกโคกับโคโตเต็มวัยด้วย Chi-square test

ผลการทดลอง

1. ผลของการเหนี่ยวนำการเจริญของฟอลลิเคิลหลายในบนรังไข่ของลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์

ลูกโคทดลองทั้งสามกลุ่มมีการตอบสนองต่อการกระตุ้นรังไข่ด้วยฮอร์โมน เอฟเอสเอช โดยผลการตอบสนองมีความแปรปรวนแตกต่างกันไป ดังแสดงในตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยของขนาดฟอลลิเคิลบนรังไข่ของลูกโคแต่ละชุด พบว่าเท่ากับ 0.51±0.24 ในชุดที่หนึ่ง 0.64±0.28 ในชุดที่สอง และ 0.54±0.20 ในชุดที่สาม ตามลำดับ ขนาดของฟอลลิเคิลในชุดที่สอง ใหญ่กว่าชุดที่ หนึ่งและสามอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ลูกโคชุดแรกบางตัวได้รับการกระตุ้นรังไข่ซ้ำเป็นครั้งที่สอง ผลการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นทั้งสองครั้งแสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลการตอบสนองของรังไข่ลูกโคชุดแรก ภายหลังได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เอฟเอสเอช ครั้งแรกและครั้งที่สอง

หมายเลขโค	รังไข่ข้างซ้าย				รังไข่ข้างขวา			
	กระตุ้นครั้งแรก		กระตุ้นครั้งที่สอง		กระตุ้นครั้งแรก		กระตุ้นครั้งที่สอง	
	จำนวนฟอลลิเคิล	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.)*	จำนวนฟอลลิเคิล	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.)*	จำนวนฟอลลิเคิล	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.)*	จำนวนฟอลลิเคิล	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.)*
C01	26	0.51±0.19	13	0.55±0.14	25	0.58±0.26	38	0.58±0.19
C03	22	0.40±0.15	18	0.55±0.24	20	0.41±0.12	19	0.47±0.12
C04	5	0.68±0.47	3	0.67±0.11	3	0.73±0.12	0	-
C05	3	0.60±0.36	3	0.87±0.11	6	0.87±0.45	6	0.85±0.31
C06	16	0.74±0.30	15	0.70±0.26	14	0.57±0.35	35	0.62±0.32
C07	65	0.35±0.16	30	0.53±0.23	56	0.46±0.15	10	0.53±0.34
C08	10	0.68±0.20	6	0.62±0.42	9	0.76±0.27	10	0.81±0.37
C09	10	0.60±0.12	-	-	11	0.53±0.23	-	-
C10	26	0.49±0.19	-	-	23	0.60±0.24	-	-

* ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD)

ตารางที่ 1 ผลการตอบสนองของรังไข่ของลูกโคแต่ละชุดต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เอฟเอสเอช

ลูกโคชุดที่ 1					ลูกโคชุดที่ 2					ลูกโคชุดที่ 3				
หมายเลขโค	รังไข่ซ้าย		รังไข่ขวา		หมายเลขโค	รังไข่ซ้าย		รังไข่ขวา		หมายเลขโค	รังไข่ซ้าย		รังไข่ขวา	
	จำนวนฟอลลิเคิล	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.)*	จำนวนฟอลลิเคิล	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.)*		จำนวนฟอลลิเคิล	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.)*	จำนวนฟอลลิเคิล	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.)*		จำนวนฟอลลิเคิล	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.)*	จำนวนฟอลลิเคิล	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.)*
C01	26	0.51±0.19	25	0.58±0.26	17/44	28	0.54±0.19	36	0.44±0.17	37/44	15	0.64±0.23	10	0.64±0.13
C03	22	0.40±0.15	20	0.41±0.12	26/44	19	0.57±0.24	18	0.63±0.25	38/44	12	0.78±0.22	11	0.60±0.23
C04	5	0.68±0.47	3	0.73±0.12	40/44	26	0.48±0.11	28	0.48±0.20	45/44	14	0.53±0.14	20	0.45±0.20
C05	3	0.60±0.36	6	0.87±0.45	57/44	8	0.65±0.14	5	1.14±0.22	40/44	25	0.38±0.18	16	0.56±0.20
C06	16	0.74±0.30	14	0.57±0.35	50/44	23	0.80±0.24	25	0.81±0.22	41/44	15	0.47±0.20	12	0.59±0.17
C07	65	0.35±0.16	56	0.46±0.15	47/44	40	0.56±0.28	38	0.54±0.26	44/44	14	0.61±0.22	11	0.62±0.20
C08	10	0.68±0.20	9	0.76±0.27	51/44	39	0.69±0.33	47	0.65±0.26	46/44	38	0.48±0.15	28	0.48±0.19
C09	10	0.60±0.12	11	0.53±0.23	52/44	64	0.77±0.29	35	0.83±0.25	53/44	42	052±0.20	33	0.54±0.16
C10	26	0.49±0.19	23	0.60±0.24						39/44	12	0.58±0.16	16	0.68±0.17

* ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ผลการเก็บโอโอไซต์จากฟอลลิเคิลบนรังไข่ลูกโค

อัตราการเก็บโอโอไซต์จากวิธีการเก็บแบบต่าง ๆ แสดงไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 อัตราการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีต่าง ๆ

วิธีการเก็บ*	จำนวนลูกโค	จำนวน ฟอลลิเคิล	จำนวนครั้ง ของการเจาะ	จำนวน โอโอไซต์ที่ได้	อัตราการเก็บ โอโอไซต์
วิธีที่ 1	8	283	273	67	24.5[a]
วิธีที่ 2	12	441	414	247	59.6[b]
วิธีที่ 3	7	506	497	280	56.3[b]
รวม	27	1,230	1,184	594	50.2

* วิธีที่ 1 คือการใช้เข็มพลาสติกต่อกับกระบอกฉีดยาพลาสติกเจาะดูดของเหลวจากฟอลลิเคิล

วิธีที่ 2 คือการใช้แรงดูดสูญญากาศ

วิธีที่ 3 คือการตัดรังไข่ออกทั้งสองข้างและนำมาเจาะดูดในห้องปฏิบัติการ

a, b ตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ชนิดของโอโอไซต์ที่ได้จากการเก็บด้วยวิธีต่าง ๆ รายงานไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ชนิดของโอโอไซต์จากลูกโคที่ได้จากการเก็บด้วยวิธีต่าง ๆ

วิธีการเก็บ	จำนวน โอโอไซต์	EXP (%)	COCs (%)	S&P (%)	D (%)	DEG (%)
วิธีที่ 1	67	28 (41.8)[a]	24 (35.8)[c]	10 (14.9)[e]	5 (7.5)	0 (0)
วิธีที่ 2	247	53 (21.4)[b]	105 (42.5)[c]	89 (36.0)[f]	0 (0)	0 (0)
วิธีที่ 3	240	88 (36.7)[a]	56 (23.3)[d]	77 (32.1)	8 (3.3)[g]	11 (4.6)
รวม	554	169 (30.5)	185 (33.4)	176 (31.8)	13 (2.3)	11 (2.0)

* ตัวเลขในวงเล็บ ( ) แสดงค่า%ของโอโอไซต์แต่ละชนิดเทียบกับจำนวนโอโอไซต์ทั้งหมด

a, b; c,d; e, f มีความแตกต่างกันในคอลัมภ์เดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

3. ผลการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์นอกร่างกาย

ระยะของโครโมโซมที่พบเมื่อนำโอโอไซต์ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงถึงระยะเวลาต่าง ๆ แสดงไว้ในตารางที่ 5 และ 6 โดยตารางที่ 5 เป็นผลของการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ชนิดพร้อมปฏิสนธิ ซึ่งมาจากรังไข่ลูกโคเท่านั้น เนื่องจากโอโอไซต์ชนิดนี้ที่ได้จากรังไข่ของโคโตเต็มวัยจากโรงฆ่าสัตว์ส่วนมากจะเป็นโอโอไซต์ที่เสื่อมสลายไปแล้ว และมีจำนวนตัวอย่างน้อยมาก ส่วนในตารางที่ 6 เป็นผลการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิทั้งที่ได้จากรังไข่ลูกโคและรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์

ตารางที่ 5 จำนวนโอโอไซต์ชนิดพร้อมปฏิสนธิจากรังไข่ลูกโคที่พบโครโมโซมในระยะต่าง ๆ เมื่อผ่านการเพาะเลี้ยงนอกร่างกายในระยะเวลาที่กำหนด

ระยะเวลาเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	จำนวนโอโอไซต์	จำนวนโอโอไซต์ที่พบโครโมโซมในระยะ (%)						
		GV	GVBD	PI	MI	AI - TI	MII	DEG &UID
0	17	0	0	10 (58.8)	0	1 (5.9)	5 (29.4)	1 (5.9)
2	20	0	0	7 (35)	3 (15)	0	2 (10)	8 (40)
4	18	0	0	3 (16.7)	1 (5.5)	0	3 (16.7)	11 (61.1)
6	35	0	0	17 (48.6)	5 (14.3)	1 (2.8)	2 (5.7)	10 (28.6)
8	16	1 (6.25)	0	2 (12.5)	1 (6.25)	1 (6.25)	1 (6.25)	10 (62.5)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 จำนวนโอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิจากรังไข่ลูกโค (C) และรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์ (A) ที่พบโครโมโซมในระยะต่าง ๆ เมื่อผ่านการเพาะเลี้ยงนอกร่างกายในระยะเวลาที่กำหนด

ระยะเวลาเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	แหล่งโอโอไซต์	จำนวนโอโอไซต์	จำนวนโอโอไซต์ที่พบโครโมโซมในระยะ (%)						
			GV	GVBD	PI	MI	AI - TI	MII	DEG &UID
0	C	30	0	7 (23.3)	21 (70)	1 (3.3)	0	0	1 (3.3)
0	A	87	4 (4.6)	1 (1.1)	51 (58.6)	1 (1.1)	0	0	30 (34.5)
8	C	43	2 (4.6)	7 (16.3)	13 (30.2)	8[a*] (18.6)	0	0	13 (30.2)
8	A	115	1 (0.9)	2 (1.7)	15 (13.0)	65[b*] (56.5)	0	0	32 (27.8)
16	C	43	0	0	2 (4.6)	30[a*] (69.8)	1[b*] (2.3)	0	10 (23.2)
16	A	112	0	0	1 (0.9)	39[b*] (34.8)	39[a*] (34.8)	1 (0.9)	32 (28.6)
24	C	57	0	1 (1.7)	1 (1.7)	22 (38.6)	15 (26.3)	12 (21.0)	6 (10.5)
24	A	34	1 (2.9)	0	1 (2.9)	9 (26.5)	4 (11.8)	13 (38.2)	6 (17.6)
28	C	91	1 (1.1)	1 (1.1)	2 (2.2)	34 (37.4)	12 (13.2)	22 (24.2)	19 (20.9)
28	A	74	0	0	2 (2.7)	23 (31.1)	8 (10.8)	12 (16.2)	29 (39.2)
32	C	69	1 (1.4)	0	0	27 (39.1)	14 (20.3)	9 (13.0)	18 (26.1)
32	A	74	1 (1.3)	0	0	20 (27.0)	6 (8.1)	19 (25.7)	28 (37.8)
36	C	54	0	1 (1.8)	0	25 (46.3)	3 (5.5)	7 (13.0)	18 (33.3)
36	A	73	0	0	1 (1.4)	16 (21.9)	8 (10.9)	19 (26.0)	29 (39.7)
40	C	58	0	0	0	22 (37.9)	4 (6.9)	14 (24.1)	18 (31.0)
40	A	63	0	1 (1.6)	0	11 (17.5)	2 (3.2)	15 (23.8)	34 (54.0)

* ในชั่วโมงเดียวกัน ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

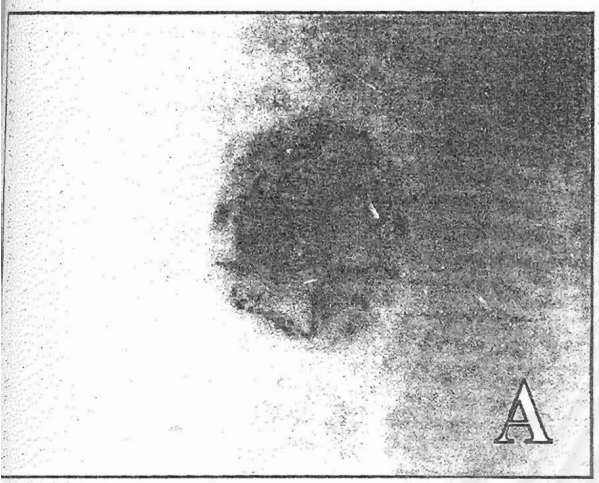
จากตารางที่ 6 แสดงให้เห็นว่าโอโอไซต์ที่ได้จากรังไข่ของโคโตเต็มวัยจากโรงฆ่าสัตว์มีการพัฒนาเร็วกว่าโอโอไซต์ที่มาจากลูกโค เห็นได้ชัดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 จนถึงชั่วโมงที่ 16 โดยโอโอไซต์จากรังไข่ของโคโตเต็มวัยมีการพัฒนาสูระยะ Metaphase I ณ ชั่วโมงที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงมากกว่าโอโอไซต์จากลูกโค และในชั่วโมงที่ 16 พบว่าโอโอไซต์จากรังไข่โคโตเต็มวัยมีการพัฒนาสูระยะ Anaphase I – Telophase I มากกว่าโอโอไซต์จากลูกโคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อคำนวณหา%ของโอโอไซต์ที่มีการพัฒนาถึงระยะพร้อมปฏิสนธิ (ระยะตั้งแต่ AI – TI และ MII) พบว่า โอโอไซต์ที่ได้จากลูกโคมีการพัฒนาถึงระยะดังกล่าวสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 24 คิดเป็น 47.4% (27/57) ส่วนโอโอไซต์จากรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์มีการพัฒนาถึงระยะพร้อมปฏิสนธิสูงที่สุดที่ชั่วโมงที่ 24 เช่นเดียวกัน คิดเป็น 50 % (17/34) ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

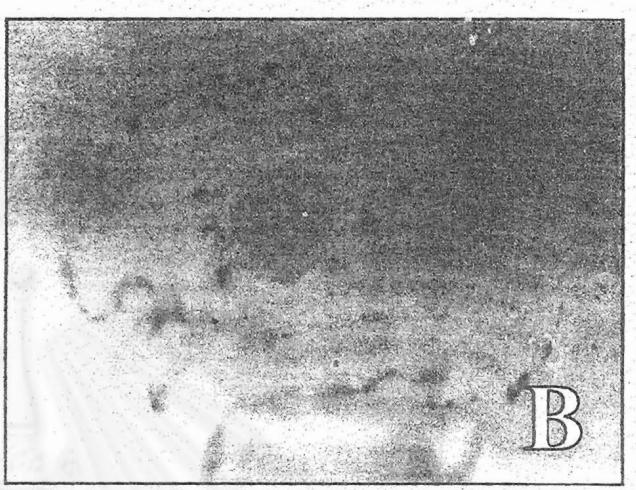
4. ผลการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนหลังการปฏิสนธินอกร่างกาย

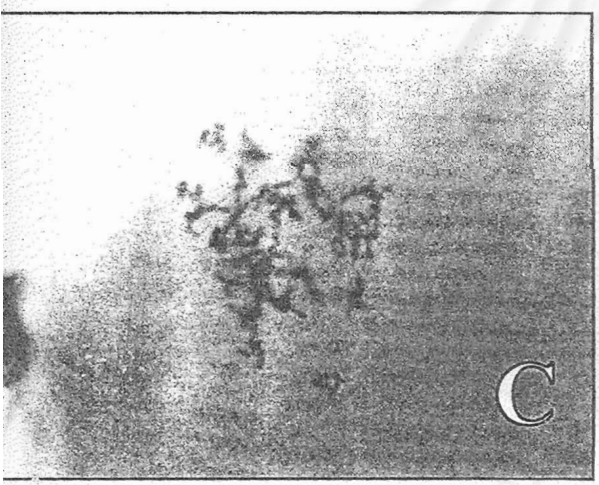
ผลของการแบ่งตัวและการพัฒนาของตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกายของโอโอไซต์ที่ได้จากรังไข่ลูกโค แสดงไว้ในตารางที่ 7 ตัวอ่อนที่แบ่งตัวเมื่อเพาะเลี้ยงไปได้ 48 ชั่วโมงจะเสื่อมสลายลงในช่วง 4-6 เซลล์ทั้งหมด

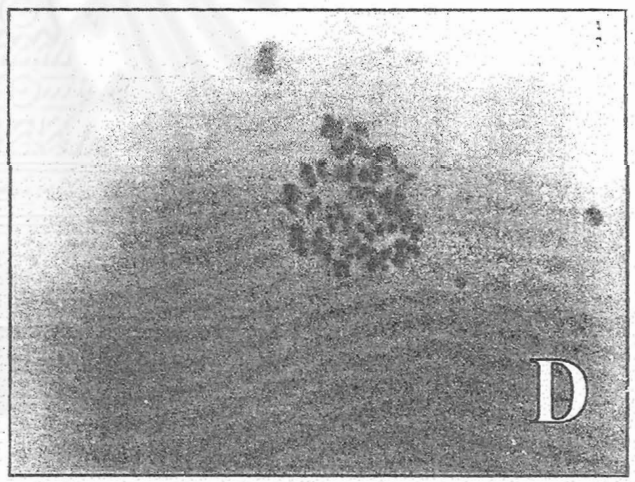
ตารางที่ 7 ผลการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกายของโอโอไซต์ที่ได้จากรังไข่ลูกโค

ระบบการเพาะเลี้ยง	จำนวนซ้ำ	จำนวนตัวอ่อนทั้งหมด	จำนวนตัวอ่อนที่แบ่งตัว (Cleave) (%)	จำนวนมอรูล่า (%)	จำนวนบลาสโตซิส (&)
TCM199 + 20% FCS	5	53	20/53 (37.4)	0/53 (0)	0/53 (0)
B2 + VERO CELL	4	52	18/52 (34.6)	0/52 (0)	0/52 (0)



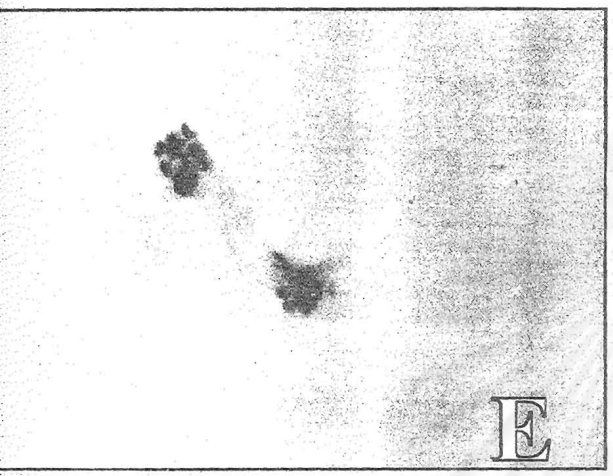


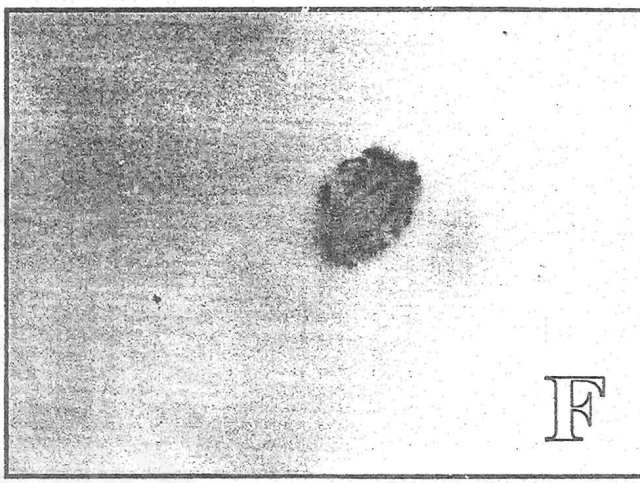


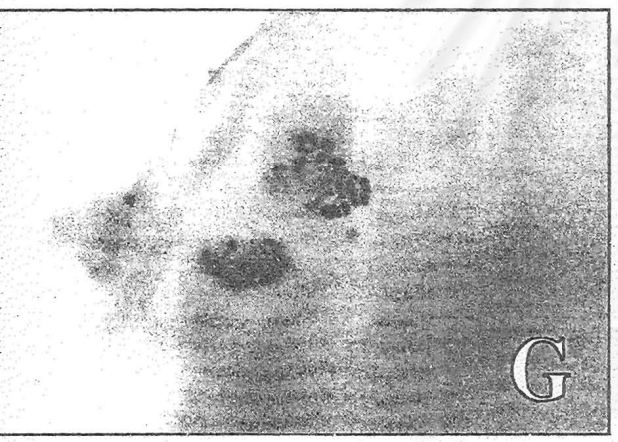


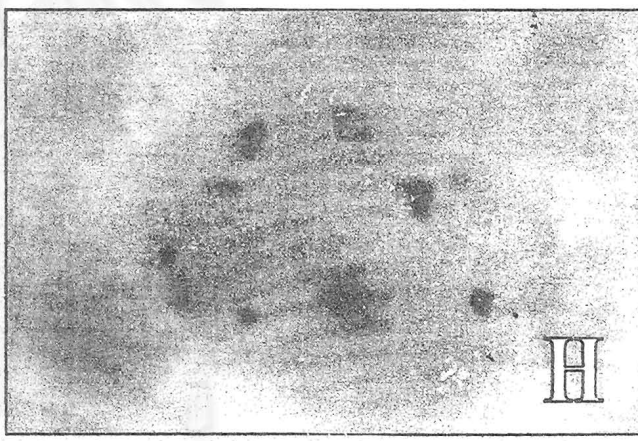
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I20750193.









รูปที่ 5 ระยะต่าง ๆ ของโครโมโซมของโอโอไซต์ลูกโคหลังเลี้ยงในน้ำยา

A) Germinal Vesicle (GV)

B) Germinal Vesical Breakdown (GVBD)

C) Prophase I

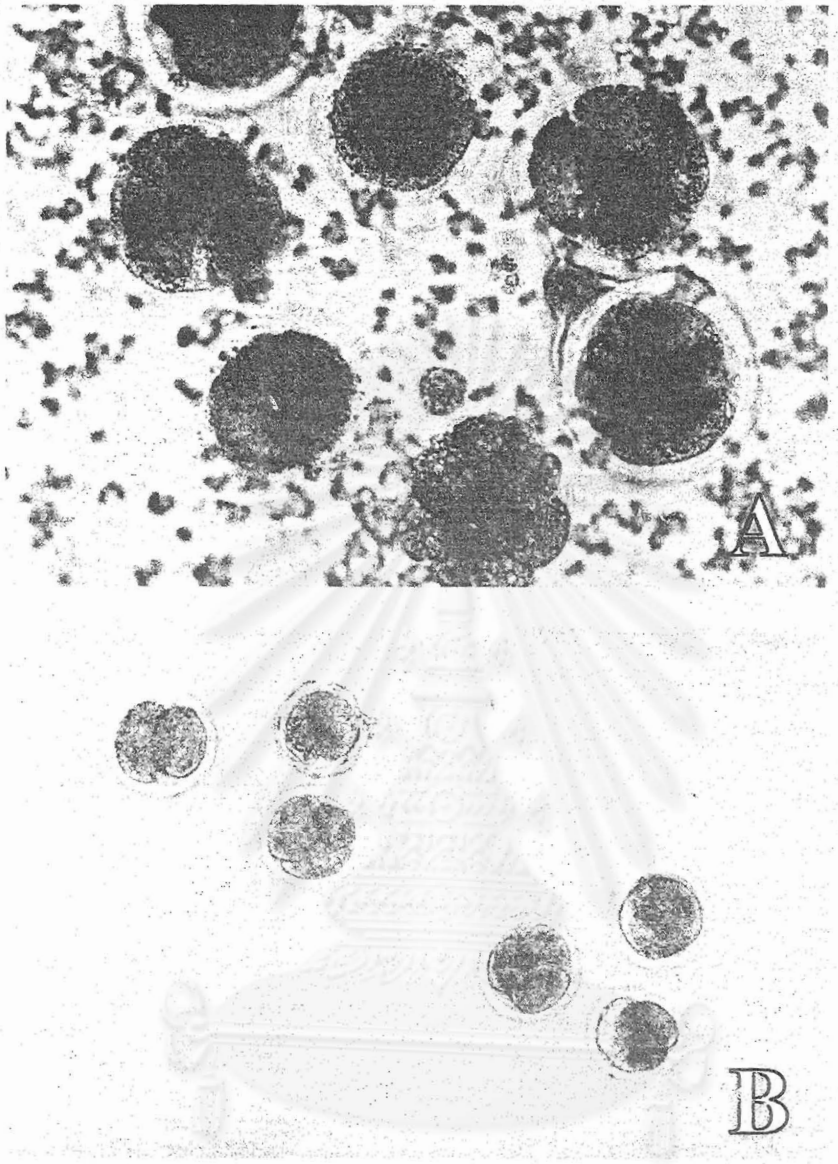
D) Metaphase I

E) Anaphase I

F) Telephase I

G) Metaphase II

H) Degenerated



รูปที่ 6 ภาพตัวอ่อนของลูกโคที่เลี้ยงในน้ำยา B2+Vero cell (A x200) และในน้ำยา TCM199 (B x100)

การอภิปรายผลการทดลอง

จากผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าลูกโคนมพันธุ์ผสมและลูกโคเนื้อพันธุ์พื้นเมืองของไทยในช่วงอายุก่อนวัยเจริญพันธุ์สามารถตอบสนองต่อการให้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินจากภายนอก ทำให้รังไข่มีการพัฒนาฟอลลิเคิลจำนวนมากกว่าปกติ และสามารถเก็บโอโอไซต์จากฟอลลิเคิลเหล่านั้นมาทำการเพาะเลี้ยงและปฏิสนธินอกร่างกายได้ เช่นเดียวกับรายงานของ ชัยณรงค์และคณะ (2538), มงคลและคณะ (2539) และรังสีและคณะ (2541) ที่ทำการศึกษาทั้งในลูกโคพันธุ์พื้นเมืองและโคเนื้อในประเทศไทย จากผลการทดลองที่รายงานไว้ในตารางที่ 1 เห็นได้ว่าลูกโคทดลองทั้งสามชุดให้ผลการตอบสนองต่อฮอร์โมน เอฟเอสเอช แตกต่างกันค่อนข้างมาก โดยมีการผลิตฟอลลิเคิลตั้งแต่ 8 ถึง 99 สอดคล้องกับรายงานหลายฉบับที่กล่าวถึงความแปรปรวนของการตอบสนองของรังไข่ลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์ต่อฮอร์โมนโกนาโดโทรปินที่ให้จากภายนอก เช่น รายงานของ Revel และคณะ (1994) พบว่าสามารถเก็บโอโอไซต์จากลูกโคที่ได้รับการกระตุ้นรังไข่เป็นจำนวนตั้งแต่ 10 ถึง 78 โอโอไซต์ มงคล และคณะ (2538) รายงานจำนวนฟอลลิเคิลบนรังไข่ลูกโคเนื้อภายหลังได้รับการกระตุ้นว่ามีตั้งแต่ 4 ถึง 71 ใบ ในขณะที่ รังสี และคณะ (2541) รายงานจำนวนฟอลลิเคิลอยู่ระหว่าง 6 ถึง 119 ใบ ซึ่งปัจจัยแท้จริงที่ก่อให้เกิดความแปรปรวนของผลการตอบสนองของรังไข่ลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์ต่อฮอร์โมนโกนาโดโทรปินนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด แต่มีผลการศึกษาวิจัยบางประการที่อาจนำมาอธิบายปรากฏการณ์นี้ได้ เช่น Maclellan และคณะ (1998) พบว่า ลูกโคสายพันธุ์ *Bos indicus* ให้ผลการตอบสนองต่อฮอร์โมนโกนาโดโทรปินดีกว่าลูกโคสายพันธุ์ *Bos taurus* ซึ่งสอดคล้องกันผลการศึกษาในครั้งนี้ จากตารางที่ 1 เห็นได้ว่าลูกโคพันธุ์ผสมที่มีสายเลือดโคเนื้อสูง (ลูกโคชุดที่สอง) และลูกโคเนื้อพันธุ์พื้นเมือง (ลูกโคชุดที่สาม) มีแนวโน้มที่รังไข่มีการตอบสนองต่อฮอร์โมน เอฟเอสเอช ดีกว่า โดยให้จำนวนฟอลลิเคิลมากกว่าและมีความแปรปรวนของจำนวนฟอลลิเคิลน้อยกว่าลูกโคนมพันธุ์ผสมโฮลสไตน์ ฟรีเซียน (ลูกโคชุดที่หนึ่ง)

นอกจากนี้ Armstrong และคณะ (1992) กล่าวว่ามีความเป็นไปได้ที่ความแตกต่างของระดับพันธุกรรมและอิทธิพลของแม่ที่มีต่อลูกโคเพศเมียตั้งแต่อยู่ในครรภ์มีผลต่อการตอบสนองของรังไข่ต่อฮอร์โมนโกนาโดโทรปินของลูกโค ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยไม่สามารถสืบค้นแหล่งข้อมูลด้านพันธุกรรมของลูกโคทดลองได้ จึงไม่สามารถระบุได้ว่าพันธุกรรมมีผลหรือไม่ มีรายงานการศึกษาหลายรายงานที่กล่าวว่า อายุของลูกโคที่ใช้ในการทดลองมีส่วนเกี่ยวข้องอย่างมากกับผลการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนจากภายนอก Armstrong และคณะ (1992, 1994) พบว่ารังไข่ของลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์มีการตอบสนองต่อฮอร์โมนเพิ่มขึ้นเมื่อลูกโคอายุมาก

ขึ้นจาก 3 ถึง 9 สัปดาห์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Erickson (1966 อ้างโดย Armstrong (2001) ที่พบว่าบนรังไข่ลูกโคมีจำนวนฟอลลิเคิลชนิด แอนทรัล ฟอลลิเคิล (antral follicle) เพิ่มมากขึ้นตามอายุ และมีจำนวนสูงสุดเมื่อลูกโคอายุ 9 ถึง 12 สัปดาห์ หลังจากนั้นจำนวนฟอลลิเคิลชนิดดังกล่าวจะลดลง จากการรวบรวมผลการศึกษาในลูกโคโดย Armstrong (2001) แสดงให้เห็นว่าเมื่ออายุลูกโคเพิ่มขึ้น จำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้จากลูกโคก็ลดลง ในขณะที่รายงานของ รังสี และคณะ (2541) แสดงให้เห็นว่าลูกโคมีการตอบสนองต่อฮอร์โมนโกนาโดโทรปินลดลงเมื่อทำการให้ฮอร์โมนครั้งที่ 2, 3 และ 4 ซึ่งสาเหตุหนึ่งอาจมาจากลูกโคที่ใช้มีอายุมากขึ้นและเกิดการยึดติดของรังไข่กับปากแตร หรือกับลำไส้ ทำให้เกิดความผิดพลาดในการนับจำนวนฟอลลิเคิล ส่วนในการศึกษาครั้งนี้ลูกโคชุดแรกได้รับการให้ฮอร์โมนซ้ำเป็นครั้งที่สอง โดยห่างจากครั้งแรกประมาณ 6 ถึง 8 สัปดาห์ แต่ไม่พบว่าจำนวนฟอลลิเคิลลดลงกว่าครั้งแรกมากนัก (ตารางที่ 2) ในการลูกโคชุดที่ 2 หรือ 3 จะพิจารณาใช้การตัดรังไข่ออกจากตัว (ovariectomy) ในกรณีที่มีการตอบสนองมาก แต่อย่างไรก็ตามการเจาะดูดโอโอไซต์แม้จากรังไข่ที่ตัดออกมานั้น เก็บได้เพียงประมาณ 50% จากจำนวนฟอลลิเคิลทั้งหมด

ปัจจัยอีกประการที่ส่งผลต่อการตอบสนองของรังไข่ต่อการให้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินที่มีรายงานคือ จำนวนฟอลลิเคิลบนรังไข่ของลูกโคก่อนได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับจำนวนฟอลลิเคิลที่เพิ่มขึ้นหลังการกระตุ้น (Taneja et al, 2000) แต่เป็นที่น่าเสียดายที่ในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้มีการตรวจนับจำนวนฟอลลิเคิลบนรังไข่ลูกโคทดลองก่อนเริ่มโปรแกรมการกระตุ้นรังไข่ ทำให้ไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่าลูกโคแต่ละชุดมีจำนวนของฟอลลิเคิลบนรังไข่ก่อนได้รับการกระตุ้นแตกต่างกันหรือไม่ และจำนวนฟอลลิเคิลนั้นมีความสัมพันธ์กับจำนวนฟอลลิเคิลที่เกิดภายหลังการกระตุ้นรังไข่ด้วยฮอร์โมนหรือไม่ จากผลการทดลองที่รายงานไว้ในตารางที่ 1 และ 2 แสดงให้เห็นว่า โปรแกรมการกระตุ้นรังไข่ด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปินที่ทางผู้วิจัยเลือกใช้ในครั้งนี้ ให้ผลค่อนข้างน่าพอใจ เนื่องจากฟอลลิเคิลที่ได้ส่วนใหญ่มีขนาดปานกลาง (3 ถึง 8 มิลลิเมตร) ซึ่งสะดวกต่อการเจาะเก็บโอโอไซต์ไม่ว่าจะใช้วิธีการใดก็ตาม ในส่วนโปรแกรมที่ใช้กับลูกโคชุดที่สามที่ไม่ทำการฝังฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและลดจำนวนวันของการฉีดฮอร์โมน เอฟเอสเอช ไม่มีผลต่อขนาดของฟอลลิเคิลที่ได้ แต่โปรแกรมดังกล่าวไม่สามารถยับยั้งการหลั่งฮอร์โมนชนิด ลูทีไนซิ่งฮอร์โมน หรือ ฮอร์โมน เอลเอช จากร่างกายลูกโคได้ ทำให้พบการตกไข่ขึ้นได้ ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าวถือว่าไม่เป็นผลดี เนื่องจากการมีระดับฮอร์โมน แอลเอช ในกระแสเลือดสูงถึงระดับที่ทำให้เกิดการตกไข่ได้อาจจะมีผลต่อโอโอไซต์ใบอื่น ๆ ที่ยังคงอยู่ในฟอลลิเคิล เนื่องจากฮอร์โมนแอลเอช จะกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาของโอโอไซต์ต่อจากระยะพัก (first meiotic arrest) ซึ่งทำให้โอโอไซต์ในฟอลลิเคิลแต่ละใบมีระยะการพัฒนาที่แตกต่างกันไป และมีผลต่อ

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงนอกร่างกายและไม่สามารถกำหนดเวลาการปฏิสนธินอกร่างกายที่เหมาะสมได้ (Armstrong, 2001) ซึ่งอาจนำมาอธิบายถึงความล้มเหลวของการพัฒนาของตัวอ่อนระยะแรกที่ได้จากการปฏิสนธิของโอโอไซต์ที่ได้จากลูกโคที่ได้รับการกระตุ้นตามโปรแกรมนี้ (ตารางที่ 7) นอกจากนี้ ฮอร์โมน แอลเอช ยังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์แกรนูโลซ่า โดยจะทำให้เกิดลักษณะการแผ่กระจายและมีความเหนียวซึ่งอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้อัตราการเก็บโอโอไซต์ต่ำลง (Armstrong *et al.*, 1992) เป็นไปได้ว่าเมื่อมีการตอบสนองมากของเหลวในฟอลลิเคิลจะเกิดความเหนียว เป็นเมือก (mucification) ทำให้ดูดออกมาได้ไม่หมด ถึงแม้จะทำการตัดย่อยรังไข่ก็จะเกิดปัญหาของเมือก ยึดติดกับจานทดลอง รวมทั้งตัวโอโอไซต์ด้วย ดังนั้นการพิจารณาโปรแกรมที่เหมาะสมในการกระตุ้นรังไข่ลูกโคน่าจะเป็นแนวทางหนึ่งในการศึกษาในครั้งต่อไป รวมทั้งการปรับปรุงวิธีในการเก็บโอโอไซต์ให้มีประสิทธิภาพมากที่สุดอย่างไรก็ดี เมื่อดูอัตราการเก็บโอโอไซต์ของลูกโคที่ใช้โปรแกรมที่มีการฝังฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนก็ยังต่ำกว่ารายงานอื่นแม้ว่าจะไม่พบการตกไข่ และวิธีการเก็บโอโอไซต์ส่งผลโดยตรงต่อจำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้ จากตารางที่ 3 พบว่าการใช้เข็มพลาสติกต่อกับกระบอกฉีดยาเจาะดูดของเหลวออกจากฟอลลิเคิลโดยตรงให้อัตราการเก็บโอโอไซต์ต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับการใช้เครื่องดูดสูญญากาศที่สามารถกำหนดระดับแรงดูดให้คงที่อยู่ตลอดเวลาได้ และการตัดรังไข่ออกและนำไปเจาะเก็บโอโอไซต์ในห้องปฏิบัติการ และเมื่อเปรียบเทียบชนิดของโอโอไซต์ที่เก็บได้พบว่า มีปริมาณโอโอไซต์ที่มีคุณภาพดีในการจะนำไปทำการปฏิสนธินอกร่างกายค่อนข้างน้อย โดยประมาณหนึ่งในสามของจำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้เป็นโอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสแผ่กระจาย ซึ่งแสดงว่าโอโอไซต์เหล่านี้ได้รับอิทธิพลจากฮอร์โมน แอลเอช แล้ว และเมื่อดูผลการตรวจสอบระยะโครโมโซมของโอโอไซต์ที่ยังไม่ผ่านการเพาะเลี้ยงนอกร่างกายในตารางที่ 6 (ชั่วโมงที่ศูนย์) พบว่าโอโอไซต์ทุกตัวอย่างที่นำมาตรวจมีการพัฒนาพ้นระยะพัก (First meiotic arrest) หรือระยะ Germinal vesicle ไปแล้ว แสดงให้เห็นว่ามีฮอร์โมน แอลเอช ในกระแสเลือดในระดับหนึ่งที่กระตุ้นให้โอโอไซต์เกิดการพัฒนาได้ แต่ยังไม่สูงพอให้เกิดการตกไข่

คุณภาพของโอโอไซต์มีความสัมพันธ์ต่อความสำเร็จในการนำไปปฏิสนธินอกร่างกายในการทำการปฏิสนธินอกร่างกายนั้นมีความต้องการโอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มรอบจำนวนมาก (compac cumulus oocyte) ในการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ลูกโคนี้พบว่ามีโอโอไซต์หลายลักษณะ พบว่าจำนวนโอโอไซต์ที่มีลักษณะเซลล์คิวมูลัสห่อหุ้มหนาแน่นที่เก็บคิดเป็นประมาณหนึ่งในสามของจำนวนโอโอไซต์ทั้งหมด โดยวิธีการใช้เข็มเจาะดูดจากฟอลลิเคิลบนรังไข่ในตัวลูกโคและการใช้เครื่องดูดสูญญากาศสามารถเก็บโอโอไซต์ชนิดนี้ได้มากกว่าการเจาะจากรังไข่ที่ถูกตัดออกไปจากตัวลูกสัตว์แล้ว เป็นไปได้ว่าการที่รังไข่ขาดเลือดหล่อเลี้ยง ทำให้เกิดการตายของเซลล์คิวมูลัส

บางส่วน ทำให้เซลล์ลอกหลุดจากเปลือกโซนาเวลาถูกแรงดูดออกไป ดังนั้นโอโอไซต์ที่ที่ได้จากการเจาะเก็บจากรังไข่ที่ถูกตัดออกจากร่างกายสัตว์แล้วส่วนหนึ่ง (ประมาณ 35 %) มีลักษณะของเซลล์คิวมูลัสเพียงชั้นเดียวหรือบางส่วน หรือไม่มีเลย ในขณะที่การใช้เครื่องดูดสูญญากาศทำให้ได้โอโอไซต์ชนิดดังกล่าวสูงถึง 36 %เช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบกับชนิดของโอโอไซต์ที่เก็บด้วยวิธีเดียวกันในรายงานของ ชัยณรงค์และคณะ (2538) พบว่าเป็นโอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มหนาแน่นสูงถึง 71 % โดยใช้แรงดูดสูญญากาศอยู่ที่ 80-100 มิลลิเมตรปรอท จึงเป็นไปได้ว่าแรงดูดที่ใช้ (100-120 มิลลิเมตรปรอท) นั้นมีความแรงมากเกินไป ทำให้เซลล์คิวมูลัสลอกหลุดระหว่างการเจาะเก็บ ส่วนเมื่อใช้การเจาะดูดโอโอไซต์จากรังไข่ที่ติดอยู่กับตัวลูกโค จะได้โอโอไซต์ชนิดดังกล่าวเพียง 22 % ซึ่งลักษณะของเซลล์คิวมูลัสที่ห่อหุ้มโอโอไซต์ไว้มีผลต่อการปฏิสนธิและการพัฒนาของตัวอ่อน ดังรายงานของ Yang และ Lu (1990) ที่พบว่าโอโอไซต์ของโคที่มีเซลล์คิวมูลัสห่อหุ้มตั้งแต่ 4-5 ชั้นขึ้นไป ให้ผลการแบ่งตัวและการเกิดบลาสโตซิสภายหลังการปฏิสนธินอกร่างกายสูงกว่าโอโอไซต์ที่มีชั้นของเซลล์คิวมูลัสน้อยกว่าหรือไม่มีเลย

จากผลการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์นอกร่างกายที่รายงานไว้ในตารางที่ 5 และ 6 แสดงให้เห็นว่า ถ้าเก็บโอโอไซต์ได้เป็นชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสแผ่กระจายและมีความเหนียว ซึ่งถือว่าเป็นโอโอไซต์ที่อยู่ในภาวะพร้อมปฏิสนธิแล้ว ไม่ควรนำมาเพาะเลี้ยงนอกร่างกายนานเกิน 2 ชั่วโมง เนื่องจากอัตราของโอโอไซต์ในระยะ Metaphase II จะค่อย ๆ ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป ในขณะที่มีโอโอไซต์ที่ไม่พบโครโมโซมในโอโอพลาสมากขึ้น ดังนั้นจึงควรทำการปฏิสนธินอกร่างกายภายใน 2 ชั่วโมงหลังการเก็บโอโอไซต์ชนิดนี้ได้จากลูกโค ส่วนผลการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิในครั้งนี้ พบว่ามีอัตราการพัฒนาสู่ภาวะพร้อมปฏิสนธิต่ำมากเมื่อเทียบกับรายงานอื่น Armstrong และคณะ (1992) รายงานอัตราการพัฒนาสู่ระยะพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์จากลูกโคอายุ 10 สัปดาห์ว่าสูงถึง 86% ในขณะที่ Damiani และคณะ (1996) รายงานอัตราการพัฒนาสู่ระยะพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์จากลูกโคอายุ 4 เดือน อยู่ที่ 76% แต่จากผลการศึกษาในครั้งนี้ อัตราการพัฒนาสู่ระยะพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์จากลูกโคอยู่ที่ 47.4% ใกล้เคียงกับรายงานของ Palma และคณะ (1993) ที่ได้ 37% แต่การศึกษาดังกล่าวกระทำในลูกโคที่ไม่ได้รับการกระตุ้นรังไข่ด้วยฮอร์โมน ในขณะเดียวกัน เมื่อสังเกตอัตราการพัฒนาสู่ระยะพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์ที่ได้จากรังไข่โคโตเต็มวัย ก็พบว่ามีอัตราต่ำมากเช่นกัน (50%) ดังนั้น ปัจจัยสำคัญที่ลดอัตราการพัฒนาสู่ระยะพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์ทั้งสองชนิดน่าจะเนื่องมาจากระบบการเพาะเลี้ยงนอกร่างกายที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ไม่เหมาะสม โดยเฉพาะระดับอุณหภูมิที่ใช้ (37°C) ต่ำกว่าการทดลองอื่น ๆ อย่างไรก็ดีพบว่าโอโอไซต์ที่เก็บได้จากรังไข่ลูกโคมีความสามารถในการพัฒนาถึงระยะพร้อมปฏิสนธิจากการเพาะเลี้ยงนอกร่างกายได้ใกล้เคียงกับโอโอไซต์ที่เก็บได้จากรังไข่โค

โตเต็มวัยที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ (47.4% ในลูกโค กับ 50% ในโคโตเต็มวัย เมื่อเพาะเลี้ยงไป 24 ชั่วโมง) ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Khatir และคณะ (1998) ที่รายงานว่าโอโอไซต์จากลูกโคมีการพัฒนาสู่ระยะ Metaphase II ต่ำกว่าโอโอไซต์จากโคโตเต็มวัย อย่างไรก็ดีอัตราการพัฒนาสู่ระยะพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์ทั้งสองกลุ่มที่ใกล้เคียงกันในการศึกษาครั้งนี้อาจเนื่องมาจากสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการศึกษามากกว่าขึ้นกับความสามารถในการพัฒนาของโอโอไซต์ ส่วนผลของการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์นอกร่างกายยาวนานกว่า 24 ชั่วโมงสอดคล้องกับรายงานของ Xu และคณะ (1986) ที่พบว่ามีโอโอไซต์ที่อยู่ในระยะ Metaphase I เพิ่มมากขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงนานเกิน 24 ชั่วโมง โดยสาเหตุอาจมาจากการเสื่อมสลายของโพล่าร์ บอดี้ ทำให้เห็นโครโมโซมเพียงชุดเดียว

ผลการปฏิสนธินอกร่างกายและการพัฒนาของตัวอ่อนระยะแรกของโอโอไซต์ที่ได้จากลูกโคในการศึกษาครั้งนี้มีค่าค่อนข้างต่ำ อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนในการศึกษานี้มีค่าใกล้เคียงกับรายงานของ Armstrong และคณะ (1992) ที่พบอัตราการแบ่งตัวอยู่ที่ 36 % และรายงานของ Looney และคณะ (1995) ที่พบอัตราการแบ่งตัวที่ 40% ในขณะที่ Armstrong และคณะ (1994) มีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงจนได้อัตราการแบ่งตัวอยู่ที่ 80% Revel และคณะ (1995) รายงานอัตราการแบ่งตัวอยู่ระหว่าง 60-80 % จากการศึกษาครั้งนี้ ใช้ระบบการเพาะเลี้ยงตัวอ่อน 2 ระบบเปรียบเทียบกัน พบว่า การใช้น้ำยาชนิด TCM 199 ที่เติม Fetal calf serum 20 % มีแนวโน้มสนับสนุนการแบ่งตัวของตัวอ่อนดีกว่าน้ำยาชนิด Upgraded B2 (37.7% เทียบกับ 34.6%) แต่ไม่มีการเพาะเลี้ยงระบบใดที่สนับสนุนการแบ่งตัวของตัวอ่อนจนถึงระยะบลาสโตซิส ซึ่งผลการเพาะเลี้ยงในน้ำยาชนิด B2ขัดแย้งกับรายงานของ Farin และคณะ (1995) ที่พบว่าระบบการเพาะเลี้ยงด้วยน้ำยาชนิด B2 ร่วมกับเซลล์ชนิด Buffalo rat liver (BRL) ให้ผลการแบ่งตัวของตัวอ่อนโคหลังการปฏิสนธิดีกว่าการเลี้ยงในน้ำยา TCM199 ที่เติม 1%BSA แต่ทั้งนี้แหล่งที่มาของโอโอไซต์ไม่เหมือนกัน โดยรายงานของ Farin นั้นใช้โอโอไซต์จากรังไข่โคโตเต็มวัยจากโรงฆ่าสัตว์ แต่การทดลองครั้งนี้ใช้โอโอไซต์จากลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์ ซึ่งมีรายงานมากมายกล่าวว่าโอโอไซต์จากลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์มีความสามารถในการพัฒนาเป็นตัวอ่อนที่สมบูรณ์ต่ำกว่าโอโอไซต์ที่ได้จากโคโตเต็มวัย เนื่องจากคุณสมบัติของโอโอไซต์จากลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์ที่แตกต่างจากโคโตเต็มวัย ทั้งในด้านขนาดของโอโอไซต์ ระบบเมตาโบลิซึมและการผลิตโปรตีน (Gandolfi et al., 1998) โครงสร้างภายในของไซโตพลาสซึม เช่น เม็ดไขมันและปริมาณไมโตคอนเดรีย (dePaz et al., 2001) รวมถึงความสามารถในการพัฒนาสู่ระยะพร้อมปฏิสนธิทั้งในส่วนของนิวเคลียส (Khatir et al., 1998) และไซโตพลาสซึม (Mermillod et al., 1998; Salamone et al., 2001)

ซึ่งคาดว่ามีบทบาทสำคัญที่ทำให้การผลิตลูกโคจากโอโอไซต์ลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์ไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร

ระบบการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกายโดยใช้โอโอไซต์จากลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์ที่มีรายงานว่าสามารถสนับสนุนการแบ่งตัวของตัวอ่อนได้จากถึงระยะบลาสโตซิสมีหลายระบบ ทั้งการเพาะเลี้ยงภายในร่างกายสัตว์ทดลองต่างชนิด เช่น ในท่อนำไข่ของแกะและกระต่าย (Techakumphu et al., 1996) ซึ่งพบว่าตัวอ่อนที่เพาะเลี้ยงในท่อนำไข่ของแกะมีอัตราการแบ่งตัวดีกว่าในท่อนำไข่ของกระต่าย อย่างไรก็ดีผู้วิจัยได้ให้ข้อเสนอแนะว่า การเพาะเลี้ยงในร่างกายสัตว์ทดลองนั้นมีความยุ่งยากและเสียค่าใช้จ่ายมาก ถ้าสามารถพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงแบบนอกร่างกายสัตว์ได้จะมีประโยชน์มากยิ่งขึ้น ระบบการเพาะเลี้ยงนอกร่างกายที่รายงานโดย Armstrong และคณะ (1992) สามารถสนับสนุนการพัฒนาของตัวอ่อนจนถึงระยะบลาสโตซิสได้คือ การเพาะเลี้ยงในน้ำยาชนิด Synthetic oviduct fluid medium (SOFM) ที่เติมซีรั่มของมนุษย์ในปริมาณ 20 % ต่อมาได้มีการทดลองเพิ่มเซลล์ท่อนำไข่เพื่อให้เป็นเซลล์พี่เลี้ยงลงในน้ำยาชนิดเดียวกัน พบว่าอัตราการเกิดบลาสโตซิสเพิ่มมากขึ้นอีก 5 % (Armstrong et al., 1994) ในขณะที่ Taneja และคณะ (2000) ใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อนชนิด Modified synthetic oviduct fluid (mSOF) ที่เติม BSA ชนิดไม่มีกรดไขมัน พบว่าตัวอ่อนสามารถพัฒนาสู่ระยะบลาสโตซิสได้ 10-11 % ซึ่งต่ำกว่าตัวอ่อนที่ได้จากโอโอไซต์โคโตเต็มวัย

สำหรับการศึกษาในครั้งนี้เนื่องจากผู้วิจัยไม่ได้ทำการศึกษาโดยใช้ตัวอ่อนที่ได้จากโอโอไซต์โคโตเต็มวัยคู่ขนานกันไป ทำให้ไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นปัจจัยด้านแหล่งที่มาของโอโอไซต์หรือระบบการเพาะเลี้ยงที่ทำให้ตัวอ่อนหยุดการแบ่งตัวที่ระยะ 4-8 เซลล์ อีกทั้งจำนวนตัวอ่อนที่นำมาศึกษามีปริมาณน้อย (50 ตัวอ่อน ต่อ ระบบการเพาะเลี้ยง) ทำให้การสรุปผลทำได้ไม่ชัดเจน แต่จากการสังเกตของผู้วิจัยพบว่า ตัวอ่อนระยะหนึ่งเซลล์ที่ได้หลังการปฏิสนธิส่วนมากมีคุณภาพค่อนข้างต่ำ ไซโตพลาสซึมไม่เนียนเสมอกัน แต่เนื่องจากจำนวนตัวอย่างมีน้อยจึงต้องทำการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนทั้งหมดที่ได้ ดังนั้นถึงแม้ตัวอ่อนที่ได้บางตัวสามารถแบ่งตัวได้ แต่ไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้จนถึงระยะบลาสโตซิส นอกจากนี้ ตามรายงานของ Zeron และคณะ (2001) พบว่า ตัวอ่อนโคที่เกิดจากการปฏิสนธินอกร่างกายด้วยโอโอไซต์จากรังไข่โคในช่วงฤดูร้อน มีอัตราการแบ่งตัวและพัฒนาสูบลาสโตซิสต่ำกว่าในฤดูหนาว จึงอาจเป็นไปได้ว่า สภาพอากาศร้อนในประเทศไทยส่งผลกระทบต่อโอโอไซต์ภายในรังไข่ของลูกโค ทำให้มีคุณภาพและความสามารถในการพัฒนาต่ำลง

โดยสรุป จากศึกษาครั้งนี้พบว่า

1.) สามารถทำการเหนี่ยวนำการเจริญของฟอลลิเคิลหลายใบบนรังไข่ลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์ด้วยฮอร์โมน เอฟเอสเอช ได้ ไม่ว่าจะใช้ร่วมกับฮอร์โมนจีเอ็นอาร์เอช หรือโปรเจสเตอโรนหรือไม่ก็ตาม

2.) การตอบสนองของรังไข่ในลูกโคมีความแปรปรวนสูงและลูกโคเนื้อหรือพันธุ์ผสมที่มีสายเลือดโคเนื้อสูงให้จำนวนฟอลลิเคิลบนรังไข่หลังการกระตุ้นมากกว่าลูกโคนมพันธุ์ผสม

3.) การเจาะเก็บโอโอไซต์จากฟอลลิเคิลดังกล่าวทำได้ทั้งการใช้กระบอกฉีดยาต่อกับเข็มฉีดยาเจาะดูดจากฟอลลิเคิลโดยตรง หรือการใช้เครื่องดูดสูญญากาศเลียนแบบการทำ OPU หรือการตัดรังไข่แล้วนำมาเจาะเก็บโอโอไซต์ในห้องปฏิบัติการ แต่มีอัตราการเก็บโอโอไซต์อยู่ในระดับต่ำ

4.) โอโอไซต์ที่เก็บได้สองในสามส่วนเป็นโอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิ และหนึ่งในสามเป็นโอโอไซต์ชนิดพร้อมปฏิสนธิ

5.) เมื่อนำโอโอไซต์ทั้งสองชนิดดังกล่าวไปทำการเพาะเลี้ยงนอกร่างกายเพื่อหาเวลาเหมาะสมในการทำการปฏิสนธิ พบว่า สามารถทำการปฏิสนธิโอโอไซต์ชนิดพร้อมปฏิสนธิได้เมื่อทำการเพาะเลี้ยงนอกร่างกายไปแล้วไม่เกิน 2 ชั่วโมง ส่วนโอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธินั้นมีอัตราที่สามารถพัฒนาถึงระยะพร้อมปฏิสนธิได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงนอกร่างกายแล้ว 24 ชั่วโมง

6.) โอโอไซต์จากลูกโคสามารถนำไปทำการปฏิสนธินอกร่างกายด้วยน้ำเชื้อพ่อโคแช่แข็งได้ แต่มีอัตราการแบ่งตัวต่ำและไม่สามารถพัฒนาเกินกว่าระยะ 4-8 เซลล์ได้ ภายใต้การเพาะเลี้ยงด้วยน้ำยาชนิด TCM199 ที่เติม 20% FCS หรือในน้ำยาชนิด B2 โดยใช้ VERO cell เป็นเซลล์พี่เลี้ยง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

ชัยณรงค์ โลหชิต มงคล เตชะกำพุ วิชัย ทันตศุภารักษ์ เกวลี ฉัตรดรงค์ และศิริวัฒน์ ทรวดทรง 2538 (1995) Ovum Pick Up ในลูกโคพื้นเมืองไทย เวชชสารสัตวแพทย์ 25(4):303 – 313

มาลี อภิเมธีธำรง นุชรินทร์ ศงสะเสน วิบูลย์ เยี่ยงวิศวกูร และ จุรีย์รัตน์ สำเร็จประสงค์ 2542 การย้อมสีนิวเคลียสของโอโอไซต์กระบือปลักและโคด้วยวิธี Rapid Staining Method การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพมหานคร ครั้งที่ 37 หน้า 329-335

มงคล เตชะกำพุ ศิริวัฒน์ ทรวดทรง และจินดา สิงห์ลอ 2539 (1996) การกระตุ้นรังไข่และการเก็บโอโอไซต์ในลูกโคชิมเมนทัลและลูกโคพื้นเมืองด้วยฟอลลิคูล่าร์ สติมูเรตติ้ง ฮอร์โมน ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 23 วันที่ 27 – 29 พฤศจิกายน 2539 หน้า 32 – 41

รังสี อดุลยานุภาพ มงคล เตชะกำพุ และชัยณรงค์ โลหชิต 2541 (1998) การกระตุ้นรังไข่ลูกโคด้วยฮอร์โมน เอฟเอสเอช ซ้ำหลายครั้ง เวชชสารสัตวแพทย์ 28(1):59 – 69

Armstrong D.T. 2001. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. Theriogenology 55:1303 – 1322.

Armstrong D.T., Holm P., Irvine B., Petersen B.A., Stubbings R.B., McLean D., Stevens G. and Seamark R.F. 1992. Pregnancies and live birth from in vitro fertilization of calf oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. Theriogenology 38:667 – 678.

Armstrong D.T., Irvine B.J., Earl C.R., McLean D. and Seamark R.F. 1994. Gonadotropin stimulation regimens for follicular aspiration and in vitro embryo production from calf oocytes. Theriogenology 42:1227 – 1236.

Damiani P., Fissore R.A., Cibelli J.B., Long C.R., Balise J.J., Robl J.M. and Duby R.T. 1996. Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. Mol Reprod Dev 45:521 – 534.

De Paz P., Sanchez A.J., De la Fuente J., Chamorro C.A., Alvarez M., Anel E. and Anel L. 2001. Ultrastructal and cytochemical comparison between calf and cow oocytes. Theriogenology 55:1107 – 1116.

Duby R.T., Damiani P., Looney C.R., Fissore R.A. and Robl J.M. 1996. Prepubertal calves as oocyte donors: Promises and problems. Theriogenology 45:121-130.

Erickson B.H. 1966. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. J Anim Sci 24:800-805.

Evans A.C.O., Adams G.P. and Rawlings N.C. 1994. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. J. Reprod. Fert. 102:463-470.

Farin C.E., Hasler J.F. and Martus N.S. 1995. Comparison of MENEZO B2 and TCM-199 media for in vitro production of bovine blastocysts. Theriogenology 43: 210. (abstract)

Fry R.C., Simpson T.L. and Squires T.J. 1998. Ultrasonically guided transvaginal oocyte recovery from calves treated with or without GnRH. Theriogenology 49:1077-1082.

Gandolfi F., Milanesi E., Pocar P., Luciano A.M., Brevini T.A.L., Acocella F., Lauria A. and Armstrong D.T. 1998. Comparative analysis of calf and cow oocytes during in vitro maturation. Mol Reprod Dev 49:168 – 175.

Jainudeen M.R., Hafez E.S.E. and Lineweaver J.A. 1966. Superovulation in the calf. J. Reprod. Fert. 12:149-153.

Khatir H., Lonergan P. and Mermillod P. 1998. Kinetics of nuclear maturation and protein profiles of oocytes from prepubertal and adult cattle during in vitro maturation. Theriogenology 50:917 – 929.

Looney C.R., Damiani P., Lindsey B.R., Long C.R., Gonseth C.L., Johnson D.L. and Duby R.T. 1995. Use of prepubertal heifers as oocyte donors from IVF: Effect of age and gonadotrophin treatment. Theriogenology 43:269. (Abstract)

Maclellan L.J., Whyte T.R., Murray A., Fitzpatrick L.A., Earl C.R., Aspden W.J., Kinder J.E., Grotjan H.E., Walsh T.E., Trigg T.E. and D'Occhio M.J. 1998. Superstimulation of ovarian follicular growth with FSH, oocyte recovery, and embryo production from Zebu (Bos indicus) calves: Effects of treatment with a GnRH agonist or antagonist. Theriogenology 49:1317 – 1329.

Mermillod P., Le Bourhis D., Lonergan P., Khatir H. and Heyman Y. 1998. Assessment of cytoplasmic competence of prepubertal calf oocytes by use of nuclear transfer. Theriogenology 49:187. (Abstract)

Onuma H. and Foote R.H. 1969. In vitro development of ova from prepuberal cattle. J. Dairy Sci. 52:1085-1087.

Onuma H., Hahn J., Maurer R.R. and Foote R.H. 1969. Repeated superovulation in calves. J Anim. Sci. 28:634-637.

Palma G.A., Clement-Sengewald A. and Krefft H. 1993. In vitro production of embryos from calf oocytes. Theriogenology 39:278. (Abstract)

Revel F., Mermillod P., Peynot N., Renard J.P. and Heyman Y. 1995. Low developmental capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. J. Reprod. Fert. 103:115 – 120.

Salamone D.F., Damiani P., Fissore R.A., Robl J.M. and duby R.T. 2001. Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised. Biol. Reprod. 64:1761 – 1768.

Seidel G.E., Larson L.L. and Foote R.H. 1971. Effects of age and gonadotropin treatment on superovulation in the calf. J. Anim. Sci. 33:617-622.

Taneja M., Bols P.E.J., Van de Velde A., Ju J.C., Schreiber D., Tripp M.W., Levine H., Echelard Y., Riesen J. and Yang X. 2000. Developmental competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: Influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. Biol. Reprod. 62:206 – 213.

Techakumphu M., Tantasuparak W. and Singlor J. 1996. Successful blastocyst production from native Thai calf oocytes after in vitro fertilization. Thai J. Vet. Med 26:169 – 176.

Xu K.P., Greve T., Smith S. and Hyttel P. 1986. Chronological changes of bovine follicular oocyte maturation in vitro. Acta Vet. Scand. 27:505 – 519.

Yang Y.B. and Lu K.H. 1990. The influence of bovine oocyte type on in vitro fertilization and subsequent development in vitro. Theriogenology 33:355. (Abstract)

Zeron Y., Ocheretny A., Kedar O., Borochov A., Sklan D. and Arav A. 2001. Seasonal changes in bovine fertility: Relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. Reproduction 121: 447 – 454.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย