1. บทนำ

การเลี้ยงโคเนื้อนับเป็นอาชีพพื้นฐานสำคัญของประเทศ ณ วันที่ 1 มกราคม 2552 มีจำนวนโคเนื้อรวมกันทั้งสิ้นประมาณ 8,595,428 ตัว ซึ่งในจำนวนนี้เป็นโคพันธุ์ และโคลูกผสมจำนวน 3,153,013 ตัว (ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์ม, 2552) วิถีการผลิตโคเนื้อส่วนใหญ่ยังเป็นระบบดั้งเดิม มีวัตถุประสงค์เพื่อการ บริโภคของตลาดท้องถิ่น โดยโคในระบบนี้เป็นโคพื้นเมืองและลูกผสมพื้นเมือง อย่างไรก็ตามนอกเหนือจากตลาดล่างดังกล่าวแล้ว ยังมีตลาดเนื้อโคขุน และตลาดเนื้อชั้นสูง ซึ่งต้องการเนื้อโคที่มีคุณภาพตามทัศนะสังคมเมือง และสังคมตะวันตก ซึ่งนับวันเติบโตและขยายตัว ในการผลิตโคดังกล่าวมักใช้โคลูกผสมที่มีสายเลือดบราห์มันระดับสูง และโคสายเลือดยุโรป หรือใช้โคสายพันธุ์ลูกผสมต่างๆ ที่เริ่มมีการปรับปรุงพันธุ์ในประเทศโคพันธ์บราห์มันเป็นโคเนื้อพันธุ์แท้ ที่ปรับปรุงพันธ์มายาวนาน เป็นที่ยอมรับในต่างประเทศทั่วไป ประกอบกับบรรพบุรุษมีถิ่นกำเนินในแถบอินเดียจึงมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมในประเทศไทยสูงกว่าโคยุโรปพันธุ์แท้ ดังนั้นโคบราห์มันจึงได้รับความนิยมในหมู่เกษตรกรที่เลี้ยงโคเนื้อเป็นอย่างดี และพบว่ามีเอกสารการจองสั่งซื้อโคพันธุ์บราห์มันที่ทำไว้กับกรมปศุสัตว์เป็นจำนวนมาก ในขณะที่หน่วยงานภายในกรมปศุสัตว์สามารถผลิตโคบราห์มันในปี 2550 ได้เพียง 1,700 ตัว เท่านั้น ทั้งนี้ไม่รวมฟาร์มเอกชน ซึ่งคาดว่าผลิตได้ไม่มากนักการผลิตลูกโคตามวิถีธรรมชาติที่เป็นอยู่จึงไม่พอเพียงกับความต้องการของเกษตรกรจึงทำให้มีการนำเข้าโคพันธุ์แท้จากต่างประเทศมาโดยตลอดซึ่งมีราคาสูง ดังนั้นเทคโนโลยีทางการสืบพันธุ์โดยเฉพาะเทคโนโลยีตัวอ่อนน่าจะมีบทบาทสำคัญในการช่วยแก้ปัญหาดังกล่าวได้ การศึกษาวิจัยเพื่อผลิตตัวอ่อนโคบราห์มันที่มีประสิทธิภาพ และประสิทธิผล เมื่อนำไปย้ายฝากเพิ่มประชากร โคพันธุ์ดังกล่าวจึงนับว่าเป็นแนวทางที่น่าจะมีประโยชน์ยิ่งแก่การปรับโครงสร้างการผลิตโคเนื้อของประเทศสู่การลดการนำเข้าตลอดจนการนำประเทศก้าวสู่การเป็นครัวของโลกได้

2. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การเก็บไข่อ่อนจากรังไข่โดยเทคนิค ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration for ovum pick – up (OPU) เริ่มต้นใช้ในมนุษย์โดยมีรายงานในปี 1984 และต่อมาได้มีการในโค ในประเทศเดนมาร์คในปี 1987 (Pieterse et al., 1988; Van Wagtendank Leeuw. 2006) เทคนิคนี้มีความยืดหยุ่นและไม่เพียงแต่สามารถใช้ได้ในโคที่มีสภาวะทางสรีระวิทยาที่แตกต่างกัน เช่นโคตั้งท้อง โคที่ไม่อยู่ในวงรอบ และไม่ได้กระตุ้นด้วยฮอร์โมน แต่ยังสามารถใช้ในโคอายุมากที่มีปัญหาระบบสืบพันธุ์ (Bols et al., 1996; Galli et al., 2001) ตลอดจนลูกโคและโคก่อนวัยสาว (Taneja et al., 2000) เทคนิคนี้ไม่มีผลเสียหายต่อรังไข่โคแม้ว่าจะทำการเจาะดูดสัปดาห์ละ 2 ครั้งต่อเนื่องเป็นปีก็ตาม (Galli et al., 2001)

<u>ประเภทของตัวให้ (donors)</u>

ไข่ที่เก็บจากลูกโคอายุ 2 เดือน สามารถปฏิสนธิและพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสได้ซึ่ง Galli et al. (2001) รายงานว่าคุณภาพที่ได้ต่ำกว่าแม่โคและโครุ่น Amstrong et al. (1992) และ Lazzori et al. (1998) รายงานว่าอัตราอดภายหลังย้ายฝากต่ำกว่าแม่โคแต่ Revel et al. (1995) รายงานว่าอัตราการพัฒนาและปฏิสนธิของไข่จากลูกโคไม่แตกต่างจากโคที่โตแล้ว

การใช้ฮอร์โมนกระตุ้นแม่โคเพื่อให้ได้รับจำนวนไข่และตัวอ่อนจากระบบการเจาะเก็บไข่และผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย (OPU-IVP system)

การนำเทคนิคการเก็บไข่จากแม่โคมีชีวิตโดยวิธีการเจาะดูดไข่ภายใต้อัลตราซาวด์ (OPU) แล้วนำไข่ที่ได้มาเลี้ยงให้พร้อมปฏิสนธิ ดำเนินการปฏิสนธิและเลี้ยงตัวอ่อนภายใต้ห้องปฏิบัติการ ได้กลายเป็นแนวทางเลือกที่มีความเป็นไปได้ที่จะทดแทนในการผลิตตัวอ่อนแบบเดิม ซึ่งทำการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ในแม่โค ชะล้างตัวอ่อนและเก็บมาทำการย้ายฝาก (MOET) (Bousguet et al., 1999; Kriq et al., 1991) และในปัจจุบันวิธีการใหม่นี้ได้ถูกนำมาใช้กว้างขวางมากขึ้นในการผลิตตัวอ่อนโคเพื่อการค้า (Feber et el., 2003; Merton et al., 2003)

ในระหว่างคลื่อนการพัฒนาของฤงไข่ในวงรอบการเป็นสัด ช่วงการเจริญของฤงไข่และมีฤงไข่ที่เจริญมากกว่าใบอื่น (dominant follicle) มีผลวิกฤตต่อประสิทธิภาพการพัมนาของฤงไข่ใบอื่น (Hyttel et al., 1997) การพัฒนาจนสมบูรณ์พร้อมผสมของ oocyte ในฤงที่พร้อมจะตกไข่ขึ้นกับการเพิ่มสูงขึ้นของ LH ในกระแสเลือด ซึ่งจะทำให้เกิด secondary oocyte ที่เป็น haploid ซึ่งสามารถที่จะปฏิสนธิและพัฒนาเป็นตัวอ่อนต่อไป (Hyttle et al., 1997) อย่างไรก็ตามในระบบ OPU-IVP ซึ่งการเจาะดูดไข่ขนาด 3-8 มิลลิลิตรซึ่งไม่ได้รับสถาวะการเพิ่มสูงขึ้นของ LH และสภาพแวดล้อมก่อนการตกไข่ในฤงไข่ (Dieleman et al., 2002) แนวทางที่เป็นไปได้ในการเพิ่มศักยภาพในการพัฒนาพร้อมของไข่คือการดำเนินการดัดแปลงให้การกระตุ้นเพิ่มการตกไข่มีผลให้ไข่เจริญจนสมบูรณ์พร้อมผสมภายหลังการเติบโตอย่างรวดเร็วของฤงไข่ (Blondin et al., 1997)

ในการฉีด FSH ให้กับแม่โคก่อให้เกิดในความเครียดในระดับหนึ่งจึงมีความพยายามที่จะลดจำนวนครั้งของการฉีดลง Chaubal et al (2009) ได้ศึกษาผลของการฉีด FSH หลายครั้งกับครั้งเดียว และให้ LH ก่อน OPU 6 ชั่วโมง กับไม่ให้ LH ทั้งหมดใช้ CIDR ควบคุมและรายงานว่าการฉีด FSH 3 ครั้งห่างกัน 24 ชั่วโมง ให้ผลดีกว่าการฉีด 1 ครั้งและได้ศึกษาถึงผลของการมีและไม่มี CIDR ขณะกระตุ้นด้วย FSH และฉีดและไม่ฉีด LH ต่อการตอบสนองของฤงไข่ จำนวนไข่ที่ดีและตัวอ่อนภายหลังการเลี้ยง และรายงานว่าการมี CIDR ไม่มีผลต่อการตอบสนองของฤงไข่ การฉีด FSH ก่อน OPU ทำให้ได้รังไข่ที่มีคุณภาพดีขึ้น และในกลุ่มที่ไม่ไดสออด CIDR จะพบว่าคุณภาพตัวอ่อนระยะ blastocyst มีจำนวนที่สูงขึ้นจากการศึกษานี้สรุปว่าการฉีด FSH หลายครั้ง และการฉีด FSH หลายครั้ง และการฉีด LH 6 ชั่วโมง ก่อนเจาะดูดไข่ มีผลดีต่อการผลิตตัวอ่อนในการทำ OPU-IVP

การกระตุ้นรังไข่โดยฮอร์โมน gonadotrophin ส่งผลต่อการลดลงของ LH เนื่องจากการเพิ่มสูงขึ้นของ estradiol ทั้งนี้เนื่องจาก FSH ไปกระตุ้นให้มีการเจริญเติบโตของฤงไข่ ซึ่งฤงไข่ดังกล่าวจะผลิต estrogen ที่สูงขึ้น และ estrogen มีผลไปกด LH และนอกจากนี้ที่ปะปนกับ FSH มีผลให้เกิด Luleotropic effect ทำให้ progesterone เพิ่ม ซึ่ง progesterone มีผลต่อการกด LH pulse frequency ในโคและแกะ (Schallen berger et al., 1984; Goodman et al., 1980)

การควบคุมคลื่นพัฒนาของฤงไข่เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตอบสนองต่อการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่

วิธีการดั้งเดิมในการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ในโค คือการฉีดฮอร์โมนแก่แม่โคในช่วงกลางของวงรอบการเป็นสัด (8-12 วันภายหลังเป็นสัด) (Bo et al., 1995) ซึ่งการตอบสนองจะมีสูงหากให้ฮอร์โมน gonadotropin สอดคล้องกับการเริ่มการพัฒนาของคลื่น ดังนั้นหากสามารถควบคุมการเกิดขึ้นของคลื่นการพัฒนาของฟอลลิเคิลได้ไม่ว่าจะเป็นช่วงใดจะเป็นประโยชน์ต่อการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ วิธีการควบคุมคลื่นการพัฒนาของฤงไข่มีการดำเนินการหลายวิธีดังนี้

1. การกำจัดถุงไข่เดิมโดยวิธีกล (abation)

มีการเจาะดูดถุงไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง > 5 มิลลิเมตร หรือถุงไข่ขนาดใหญ่ออกไป (Baracaldo et al., 2006) และทำการให้ฮอร์โมนเพื่อการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ในอีก 1 – 2 วันต่อมาซึ่งเป็นช่วงแรกที่เริ่มเกิดคลื่นพัฒนาของถุงไข่คลื่นใหม่ วิธีการนี้ได้ผลดีมากแต่มีปัญหาในทางปฏิบัติในฟาร์ม (Bo et al., 2006)

2.การควบคุมโดยใช้ estradiol ควบคู่กับ progesterone

มีการฉีด estradiol - 17β (E-17β) หรือ estradiol benzoate (EB) ให้กับแม่โคเมื่อสอด CIRD แล้ว FSH ธรรมชาติในกระแสเลือดเพิ่มขึ้นและเกิดคลื่นพัฒนาของถุงไข่คลื่นใหม่ และเมื่อให้ FSH ในเวลาดังกล่าวนี้ก็จะเกิดการพัฒนาของถุงไข่จำนวนมาก

3.การควบคุมโดยฮอร์โมนทางเลือกอื่น

3.1 GnRH หรือ pLH พบว่ามีผลทำให้ตกไข่และเกิดคลื่นพัฒนาของถุงไข่ตามมาประมาณ 2 วันแต่ต่อมาอัตราตกไข่ภายหลังการสุ่มให้ฮอร์โมนมีประมาณ 60% จึงเป็นปัญหาต่อการทำการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ที่ต้องการ (Bo et al,. 2008)

3.2 การเพิ่มการตกไข่โดยไม่ต้องทำลาย dominant follicle การตอบสนองต่อการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ส่วนใหญ่แล้วขึ้นอยู่กับจำนวนถุงไข่เมื่อเริ่มต้นของคลื่นการพัฒนา หากมีจำนวนถุงไข่ใบเล็กมากก็จะตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนสูงกว่าการมีไข่จำนวนน้อย เมื่อเร็วๆ นี้มีหลักฐานว่าถุงไข่เส้นผ่านศูนย์กลางเล็กเพียง 1 มิลลิเมตร สามารถกระตุ้นให้เติบโตด้วย FSH Jaiwal et al. (2004) การให้ PMSG 500 IU 2 วัน ก่อนที่จะเริ่มโปรแกรมการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ด้วย FSH มีผลเพิ่มจำนวนถุงไข่ที่ตอบสนองต่อ FSH (Bo et al,. 2008)

<u>ประสิทธิภาพในการผลิตตัวอ่อนจาก OPU-IVP system</u>

ในการเจาะดูดไข่ (OPU) แม่โคภายใต้ระบบการไม่ใช้ฮอร์โมนกระตุ้น พบว่าการเจาะดูด 2 ครั้ง/สัปดาห์ ได้ไข่ในช่วง 0-26 ใบ/ครั้ง และ 20% ของไข่ที่ได้พวก denude หรือ degenerate หากมีการทำ OPU 2,3 วัน/ครั้ง จะทำให้ไม่มีปัญหาในเรื่อง dominant follicle (Van Wagtendonk – de Lwwuw, 2006) Vinn et al. (2010) ได้ศึกษาผลของการเจาะดูดซ้ำในโค Gyr. (Bos indicus) พบว่าการเจาะดูดไข่ซ้ำในระบบการเจาะดูดไข่ซ้ำในระบบเจาะดูดทุก 96ชั่วโมง พบว่ามี dominant follicle หรือ / codominant (> 9 มิลลิเมตร) 63% ซึ่งพบว่าการปรากฏของ codominant follicle มีผลเสียต่อการพัฒนาของตัวอ่อนนั้ผลิตจากไข่ที่เก็บดูด

Van Wagtendonk – de Leeuw (2006) รายงานว่าในปี 2005 สามารถผลิตลูกโค/แม่จากระบบ MOET ประมาณ 20-25 ตัว/ปี แต่หากผลิตจากระบบ OPU/IVP จะสามารถผลิตได้ถึง 80-100 ตัว/ปี ในโคพันธุ์ Nelore Pontes et al. (2009) ได้ศึกาเปรียบเทียบผลผลิตตัวอ่อนโคที่ผลิตจากระบบการผลิตโดยกระตุ้นการตกไข่ (In Vivo) กับระบบการผลิตภายนอกร่างกายแบบ OPU /IVM โดยในการผลิตในระบบ OPU/IVP จะทำ 15 วัน/ครั้ง จะสามารถผลิตตัวอ่อนได้สูงกว่า MOET ในการศึกษานี้ผลผลิตตัวอ่อนจาก OPU/IVPจะสามารถผลิตตัวอ่อนได้ 9.4 $\pm$ 5.3 ตัว/แม่/ครั้ง ในขณะที่ MOET ผลิตตัวอ่อนได้ 6.7 $\pm$ 3.7 ตัว/แม่ 3.2 $\pm$ 1.2 ครั้ง/ปี

การกระตุ้นด้วยฮอร์โมน

ในการเก็บเกี่ยวไข่มีรายการใช้ฮอร์โมนกระตุ้นการพัฒนาของถุงไข่ก่อนเก็บไข่ และเก็บไข่ตามปกติโดยไม่ใช้ฮอร์โมนโดย Paul et al. (1995) รายงานว่าการใช้ฮอร์โมน gonadotropin ทำให้ได้ไข่จำนวนมากขึ้น Fry et al.(1998) รายงานว่าการใช้ฮอร์โมนหรือไม่ให้ไม่มีผลต่อจำนวนไข่ที่เก็บได้ Galli et al. (2001) รายงานว่าการกระตุ้นฮอร์โมนในลูกโคและโคสาว ทำให้ได้รับตัวอ่อนที่สามารถไปย้ายฝากได้สูงกว่ากลุ่มควบคุม Sumretprasong et al;. (2005) ได้ศึกษาในประเทศไทย โดยเปรียบเทียบผลของการให้ฮอร์โมน FSH / ระดับ คือ 100 และ 200 mg แก่โคนมก่อนการเก็บไข่ 48 ชม. พบว่าให้ผลไม่แตกต่างกัน

การเลี้ยงไข่ให้พัฒนาจนพร้อมปฏิสนธิ

ไข่ที่ได้ส่วนใหญ่จะนำมาเลี้ยงในน้ำยา TSM-199 ที่เสริม FCS, ฮอร์โมน FSH, LH, Etradial และ EGF (Mermillod et al. 1993; Majerus et al., 1999) การเลี้ยงร่วมกับ granulose cell ตลอดจนการเสริมด้วย growth factor หรือ heparin มีผลดีต่อการพัฒนาของไข่ (Galliet al. 2001)

การปฏิสนธิ

ส่วนใหญ่มักทำการปฏิสนธิใน Tyrode's medium (De Roover et al., 2001, Machado et al. 2006) ในตู้บ่มอุณหภูมิ 38.5 °ซ CO_2 5% ในอากาศ Galli et al. (2001) รายงานว่า การลดระดับ o_2 ลง และการเสริม amino acid ในน้ำยา SOF มีผลดีต่ออัตราการปฏิสนธิ

การเลี้ยงตัวอ่อน

การเลี้ยงตัวอ่อนมักเลี้ยงในน้ำยา SOF เสริม FCS ระดับ 5-10 % เลี้ยงร่วมกับเซลล์พื้นที่ผิวท่อนำไข่ของโค ในตู้บ่มอุณหภูมิ 38.5 °ซ co_2 5% ในอากาศ (Manik et al. 2003, De Roover et al. 2005) หรือ SOF เสริมด้วย amino acid และเลี้ยงในตู้ที่มี CO_2 ระดับ 5% และ O_2 ระดับ 5% (Galli et al., 2001; Machado et al. 2006)

3. วัตถุประสงค์ของโครงการ (ตามที่เสนอของบประมาณสนับสนุนการวิจัย)

เพื่อพัฒนาเทคนิคในการเก็บไข่จากแม่โคบราห์มันโดยวิธีการเจาะดูดจากรังไข่อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนภายนอกร่างกาย

4. วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

วิธีการเจาะเก็บโอโอไซต์ด้วยเครื่องอัลตราซาวน์ (Transvaginal ovum pick - up)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สัตว์ทดลอง

แม่โคพันธุ์บราห์มันจำนวนค้าที่มี 4 ตัว ถูกปรับสภาพของร่างกายให้สมบูรณ์ ก่อนเริ่มทำการทดลอง โดยได้รับอาหารหยาบให้กินเต็มที่ และอาหารข้นทางการเปอร์เซ็นต์ 16 % ให้เสริมให้กินวันละ 2 กก./ตัว/วัน ควบคุมค่าคะแนนความสมบูรณ์ของร่างกาย ไม่ให้ต่ำกว่า 3.5

2. โปรแกรมการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่

การเจาะเก็บไข่โดยไม่กระตุ้นด้วยฮอร์โมนหรือการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนทั้ง 2 แบบจำนวน 8 ครั้ง/แม่จะทำการสุ่มเจาะดูดไข่โดยเทคนิค OPU 1 สัปดาห์/ครั้ง โดยก่อนเจาะดูดในครั้งที่ 1 ทำการฉีด PGF2α (estrumate, Schering-Plough Animal Health, Germany) เข้ากล้ามเนื้อในขนาด 25 มก./ตัว เจาะถุงไข่ทุกสัปดาห์ ดังนั้นจะไม่พบ CL ในรังไข่แม่โค ในครั้งที่สุ่มฉีดฮอร์โมน FSH ทางการค้าชื่อ Folltropin-V (Bioniche Animal Health (A/Asia) Pty. Ltd.) 400 มิลลิกรัม/ขวด ซึ่งละลายใน polyvinylpyrrolidome (P2307, Sigma) molwt 10,000 ในน้ำเกลือ 20 มิลลิลิตร ฉีดให้กับแม่โคเช้ากล้ามวันละ 1 ครั้ง 2 วัน รวมฮอร์โมน 100 มิลลิกรัม/แม่ ทำการเจาะดูดไข่ในวันที่ 3 ภายหลังการให้ฮอร์โมนครั้งสุดท้าย

3. เครื่องอัลตร้าซาวน์และเครื่องเจาะดูด

เครื่องอัลตร้าซาวน์ real – time B – mode (Honda, HS – 2000, japan) พร้อมหัวตรวจชนิดสอดผ่านทางช่องคลอด (Tranvaginal probe linear transducer) ความถี่ 7.5 MHz พร้อมเข็มเจาะขนาด 17 – gauge ต่อเข้ากับหลอด 15 มล. และเครื่องปั๊ม (MiniTab N 86 KN. 18, Germany) แรงดูดขนาด -400 mBar เจาะเก็บโอโอไซต์ DPBS เสริมด้วย Bovine Serum (BS) 2% (V/V) ยาปฏิชีวนะ (penicillin – streptomycin) และ heparin 50 หน่วย/มล.

4. การเจาะเก็บโอโอไซต์

นำโคเข้าซองบังคับสัตว์ทำการล้วงอุจจาระออก และล้างทำความสะอาดบริเวณทวารหนักและปากช่องคลอด ฉีดยาชาที่โคนหาง (ลิโดเคน 2 %) ในอัตราส่วน 1 มล. ต่อน้ำหนักโค 100 กก. ทำการเจาะเก็บโอโอไซต์โดยมีน้ำยา DPBS เติมด้วย Bovine Serum (BS) 2% (V/V) ยาปฏิชีวนะ (penicillin – streptomycin) และ heparin 50 หน่วย/มล. ตรวจนับจำนวนฟอลลิเคิลบนรังไข่ด้วย Vaginal Probe linear transducer (7.5 MHz) จากนั้นดำเนินการเจาะเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ ด้วยเข็มเจาะที่เคลือบด้วยน้ำยาเจาะดูด

5. การเพาะเลี้ยงตัวอ่อน

<u>การตรวจหาไข่</u>

ภายหลังการเจาะดูดไข่ด้านเทคนิค OPU ลงในหลอดขนาด 15 มล. ทิ้งหลอดบรรจุไว้อย่างน้อย 15 นาที เพื่อให้ไข่นอนตัวลงสู่ก้นหลอดดูดของเหลว (ซึ่งมักมีเลือดปน) ส่วนบนออกจนเหลือปริมาตรของเหลวในหลอดประมาณ 3 มล. เทน้ำยาที่มีไข่ดังกล่าวลงในจานพลาสติกที่ถูกขีดตารางแล้ว หากหากมีเลือดปนมากทำการเจือจางด้วย DPBS จนจางพอที่จะมองเห็นได้ดี ดำเนินการตรวจหาไข่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ ดูดเก็บรวบรวมไข่ลงในจานพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 35 มม. ที่มีน้ำยา DPBS อย่างน้อย 2 มล.

<u>การเลี้ยงไข่</u>

เตรียมหยดน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน โดยการหยดน้ำยา IVM (TCM-199 ที่มี FCS 10% และเสริมด้วย FSH 1 μg/ml, LH 10 μg/ml และ estradial 1 μg/ml) ปริมาณ 100 μg/หยด องค์ประกอบที่กล่าวข้างต้นลงในจานเลี้ยงตัวอ่อน เลือกเจาะเฉพาะไข่ที่มีเซลล์คูมูลัสห้อมล้อม (cumulus oocyte complexes) ล้างไข่ดังกล่าวในหยดน้ำยา DPBS อย่างน้อย 3 หยดหยดละ 1 มล. และนำมาล้างน้ำยาเพาะเลี้ยงไข่ ที่ผ่านการบ่มในตู้ที่มี CO_2 5% มาแล้วอย่าง

น้อย 6 ชม. ที่มีปริมาตรหยดละ 100 ไมโครลิตร จำนวน 3 หยด แล้วดูดไข่ไปเลี้ยงในหยดน้ำเลี้ยงภายใต้ mineral oil ในจาน 3 หยด 35 มม. ที่เตรียมไว้แล้วในตู้บ่มภายใต้สถานที่มี CO_2 5%.ในบรรยากาศ ความชื้นสัมพัทธ์ 99 % อุณหภูมิ 38.5 °ซ เป็นเวลา 22-24 ชม.

การปฏิสนธิ

การเตรียม capacitation อสุจิ สำหรับการปฏิสนธิภายนอกร่างกายทำโดยนำน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของโคบราห์มันจำนวน 2 หลอดๆ ละ 0.25 มิลลิลิตร มาละลาย และเจือจางด้วยน้ำยา TALP ในหลอดขนาด 15 มล. ปริมาตรรวม 8 มล. ปั่นล้างแยกอสุจิ 2 ครั้ง ด้วยเครื่อง centrifuge ที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็ว 1,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 8 นาที ทำการปั่นล้าง 2 ครั้งเจือจางอสุจิที่ตกตะกอนด้วยน้ำยา TALP ที่มี heparin 25 IU/มล. ให้อสุจิมีความเข้มข้น 2 ล้านเซลล์/มล. นำหลอดน้ำเชื้อไว้ในตู้บ่ม 30 นาที จากนั้นดูดน้ำเชื้อส่วนบนหลอดปริมาตร 20-30 µl ลงในหยดน้ำยาปฏิสนธิในจานปฏิสนธิซึ่งมีขนาดหยดละประมาณ 100 µl 4 หยดซึ่งเทลาดทับด้วย mineral oil เพื่อเตรียมไว้ปฏิสนธิ ล้างไข่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงให้สมบูรณ์ (IVM) ภายหลังเลี้ยงครบเวลา 22 – 24 ชม.ด้วยน้ำยา TALP จากนั้นย้ายไข่ดังกล่าวลงในหยดน้ำยาอสุจิที่เตรียมไว้แล้ว หลอดละประมาณ 5-10 ใบ

การเลี้ยงตัวอ่อน

ภายหลังทำการปฏิสนธิ 10 -18 ชม.ดูดไข่ที่คาดว่าผ่านการปฏิสนธิ (zygote) มากำจัดเซลล์อสุจิ และเซลล์คูมูลัส บางส่วนโดยการเขย่าด้วย Vertex จากนั้นล้างด้วยน้ำยา KSOM 3 ครั้ง แล้วนำ zygote ไปเลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ที่เลี้ยงด้วยน้ำยา KSOM (Mucci et al, 2006) ในตู้บ่มเก็บข้อมูลการพัมนาหาตัวอ่อนเปลี่ยนน้ำยาในหยดน้ำยาที่เลี้ยงตัวอ่อน 50 % ทุก 3 วัน

<u>การทดลองที่ 1</u> การศึกษาผลของการให้ฮอร์โมน FSH ต่อจำนวนฝูงไข่ จำนวนไข่อ่อนและตัวอ่อนที่ผลิตนอกร่างกายจากแม่โคที่เจาะเก็บไข่โดยเทคนิค OPU

การวางแผนการทดลอง

ศึกษาเปรียบเทียบโดยใช้แม่โคกลุ่มละ 4 ตัว เจาะเก็บไข่ 8 ครั้ง/ตัว รวม 32 sessions โดยภายในตัวเดียวกัน แบ่งเป็นการเจาะเก็บไข่ภายใต้สภาวะไม่กระตุ้นฮอร์โมน 4 ครั้ง และภายใต้สภาวะกระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH 100 มิลลิกรัม จำนวน 4 ครั้ง ภายใต้การทดลองแบบ Latin square

ดำเนินการเก็บไข่โดยเทคนิค OPU โดยสุม โดยดำเนินการทุก 7 วันดำเนินการเลี้ยงไข่ (oocyte) ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิ การปฏิสนธิและการเลี้ยงตัวอ่อนดำเนินตามวิธีที่อ้างโดย Machado et al. (2006)

การเก็บข้อมูล

เก็บข้อมูลจำนวน follicle ทั้งหมด follicle ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-5, 6 – 10 และ >10 มม. อัตราการปฏิสนธิ และอัตราการพัฒนาถึงระยะ blastocyst การจำแนกคุณภาพไข่อ่อนดำเนินการตามวิธีการที่อ้างโดย De loos et al. (1989) โดยแบ่งไข่เป็น 4 กลุ่ม คือ เกรด 1 compact cocs มี cumulus อย่างน้อย 1 ชั้น และไข่อ่อนที่มี cytoplasm ที่เสมอหรือเป็นจุดเล็กน้อย เกรด 3 เป็นพวกที่ไม่มี cumulus ที่ผิดปกติต่าง เกรด 4 เป็นพวกที่มี

cumulus expansion เลี้ยงไข่และทำการปฏิสนธิ และเลี้ยงตัวอ่อน เก็บข้อมูลอัตราการปฏิสนธิและการพัฒนาถึงระยะ blastocyst

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลจำนวน follicle ระยะต่างๆมาวิเคราะห์ความแปรปรวนเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยใช้วิธี Duncan's multiple rang test วิเคราะห์ข้อมูลความแตกต่างระหว่าง treatment ของอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการพัมนาสู่ระยะ blastocyst โดย Chi-square test

5. ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

ผลสำเร็จในการเจาะดูดไข่ในโคบราห์มัน

ในการเจาะดูดไข่โค พบว่าในบางครั้งไม่สามารถดำเนินการเจาะดูดอย่างมีประสิทธิภาพแม้จะทำการวางยาชาแก่สัตว์แล้วก็ตาม ในจำนวนครั้งที่เจาะดูดได้ยังพบว่า ไม่พบไข่ (oocyte) ที่ทำการเจาะดูดจาก follicle เลย จำนวน 10 ครั้งซึ่งจำนวนครั้งที่ล้มเหลวดังกล่าวไม่ได้นำข้อมูลมารวมในตารางรายงานผล และดำเนินการทดลองใหม่

ในการศึกษาครั้งนี้ทำการเจาะเก็บไข่สัปดาห์และ 1 ครั้ง ซึ่งพบว่าขนาด follicle ของทั้ง 2 กลุ่มทดลองส่วนใหญ่ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง > 5 มม. แสดงให้เห็นว่า ควรเจาะเก็บไข่เร็วขึ้นโดยเฉพาะในกลุ่มที่กระตุ้นด้วยฮอร์โมน ควรจะเก็บไข่เร็ว (ก่อนวันที่ 3 ภายหลังให้ฮอร์โมน FSH) ซึ่งน่าจะได้จำนวน follicle ที่มีขนาดเหมาะสม (3-8 มม) มากขึ้น De Roover et al. (2005) รายงานดำเนินการเจาะเก็บไข่ภายหลังฉีดฮอร์โมนเข็มสุดท้าย 48 ชม Chanbal et al. (2007) รายงานว่าดำเนินการเจาะเก็บไข่ภายหลังการฉีดฮอร์โมน FSH เข็มสุดท้าย 52 ชม.

ความล้มเหลวในการเจาะดูดโดยไม่สามารถดำเนินการเจาะได้ อาจเกิดจากลักษณะเฉพาะของโคบราห์มันซึ่งรูปร่างใหญ่ จับบังคับลำบาก มีความตื่นตะหนกง่าย และร่างกายแข็งแรง ควรปรับการฉีด FSH มาเหลือ 1 ครั้งโดยใช้ FSH ผสม PVP เพื่อลดความยุ่งยาก และความเครียดของสัตว์ ส่วนความล้มเหลวในการเก็บไข่ (oocyte) จากของเหลวตัวอย่างที่ดูดจากถุงไข่ อาจเกิดจากการมีลิ่มเลือด และการจับตัวของของเหลว (clotted) โดยเฉพาะในกลุ่มที่ให้ฮอร์โมน FSH ซึ่งเป็นอุปสรรคในการสังเกตไข่ นอกจากนี้ยังพบอุปสรรค์จากการใช้เข็มเจาะดูดที่ใช้แล้ว ซึ่งการใช้งานบ่อยครั้งมีผลทำให้ปลายเข็มไม่คม ทำให้มีการสูญเสียในระหว่างการดูด De Roover et al.(2005) รายงานว่าความแปรปรวนของผลการเจาะไข่เกิดจากทั้งปัจจัยทางเทคนิคและตัวสัตว์เอง

FSH ต่อจำนวนถุงไข่ (follicle) ที่พบบนรังไข่

จากการศึกษาพบจำนวนถุงไข่ในแม่โคที่ได้รับ FSH สูงกว่าถุงไข่ในแม่โคที่ไม่ได้รับ FSH (ตารางที่ 1) พบว่าจำนวนถุงไข่มีความแตกต่างกันในแต่ละครั้งที่ทำการศึกษา สอดคล้องกับรายงานของ Maplettoft et al. (2002) และ Singh et al. (2004) ซึ่งรายงานว่าแม้จะกระตุ้นการพัฒนาของ follicle ด้วยฮอร์โมนแต่ก็ไม่มีความแน่นอนในเรื่องจำนวนของถุงไข่ที่พัฒนา

ผลสำเร็จในการเก็บไข่จากถุงไข่ของแม่โคที่ไม่ได้รับและได้รับ FSH

จากการศึกษาพบว่าไข่ (oocyte) ที่สามารถเก็บได้จากของเหลวที่ดูดออกมาจากถุงไข่ในแม่โคมีค่าเท่ากับ 6.70 และ9.10 ใบ เป็นไข่ที่เป็นเกรด 1 และ 2 (5.57 และ 8.00 ใบ) ในแม่โคกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ FSH

ตามลำดับ โดยสามารถเจาะเก็บไข่ในกลุ่ม FSH ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามประสิทธิผลในการเจาะเก็บยังอยู่ในระดับที่ต่ำ (45.0 และ 39.0 % ตามลำดับ) De Roover et al. (2003) ซึ่งอัตรา recovery rate ระหว่าง 68.2 – 73.5 ใกล้เคียงกับรายงานของ Faler et al. (2003) ได้รายงานว่าการเจาะเก็บไข่เฉลี่ยในโคที่ไม่กระตุ้น และกระตุ้นด้วย FSH (200 มก.) มีค่าประมาณ 6.4 และ 11.6 ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ Lopez et al. (2006) รายงานว่าในการทดลองการเจาะดูดไข่ด้วย OPU ในโคตระกูลยุโรป รวม 3 กลุ่ม พบว่าให้จำนวนไข่ที่ได้ซึ่งมีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม โดยมีค่าเท่ากับ 6.0, 2.8 และ 4.3 ใบสำหรับการศึกษาในไทย Sumretprasong et al.(2005) รายงานว่าการใช้ FSH กระตุ้นแม่โคนมให้ไข่ 4.17 ใบ ส่วนสุจิรา และคณะ (2547) ได้รายงานว่าในการเก็บไข่โคพื้นเมืองในภาคใต้ 2 สัปดาห์/ครั้ง ในแม่โค 4 ตัว จำนวน 4 ครั้ง พบว่าให้ไข่เฉลี่ย 4.00 – 5.25 ใบ อย่างไรก็ตาม Pontes et al. (2011) ทำการเจาะเก็บไข่ในโค Nelore (Bos indicus) ในการผลิตเพื่อการค้า ซึ่งไม่ได้ทำการกระตุ้นแม่โคด้วยฮอร์โมน เก็บไข่แม่โค 317 ตัวได้จำนวนไข่เฉลี่ย 30.84 ใบ โดยมีความแปรปรวนระหว่างแม่โค ส่วน Viana et al. (2010) ทำการเก็บไข่ในโคพันธุ์ Gyr (Bos indicus) โดยดำเนินการใช้เทคนิค OPU ทุก 3 วันจำนวนถุงไข่ที่เจาะประมาณ 8.5-10.1 ใบ และก็เจาะได้ 4.4 – 7.0 ใบ ดังนั้นพบว่าเมื่อมีความแตกต่างกันมากในแต่ละงานทดลอง

ตารางที่ 1 ผลของ FSH ต่อจำนวนเฉลี่ยของถุงไข่ในแม่โคบราห์มันต่อการเจาะดูด 1 ครั้ง

ปัจจัย	ขนาดถุงไข่ (เส้นผ่าศูนย์กลาง)					จำนวนไข่	
	>10 มม.	≤10 มม.	6-10 มม.	2-5 มม.	จำนวนรวม	ไข่คุณภาพดี	ไข่รวม
ไม่ให้ FSH	4.19[ข]	11.38[ข]	9.89	1.63[ข]	14.63[ก]	5.57	6.70
ให้ FSH	7.69[ก]	16.56[ก]	11.63	4.38[ก]	23.19[ข]	8.0	9.10

[ก,ข] อักษรที่แตกต่างกันในแถวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันในทางสถิติ ($P < 0.05$)

การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนจากไข่ที่ได้จากการเจาะดูดโดย OPU

มีการนำไข่ที่ได้มาเพาะเลี้ยงตามปกติโดยที่ยังไม่เข้างานทดลองเพื่อศึกษา โดยคาดว่าเมื่อทำการกระตุ้นเพิ่มการพัฒนาของถุงไข่ จึงจะทำการเจาะดูดไข่มาศึกษาตามทรีทเมนต์ต่างๆ ที่วางไว้ การกระตุ้นเพิ่มด้วย FSH มีที่สังเกตว่าในการเลี้ยงไข่เพื่อให้พัฒนาจนสมบูรณ์ กลุ่มไข่ที่แม่โคได้รับ FSH มีการกระจายตัวของ cumulus สูงกว่ากลุ่มไข่ที่แม่โคไม่ได้รับ FSH จากการนำไข่ที่ได้มาเพาะเลี้ยงในงานนั้น จำนวนไข่ที่เลี้ยงทั้งหมด 128 ใบ ปฏิสนธิได้ 2 เซลล์ ขึ้นไปใน 48 ชม. ภายหลังการปฏิสนธิ 90 ใบ (70.30%) และพัฒนาถึงระยะ blastocyst ที่ 9 วันหลังปฏิสนธิจำนวน 12 ใบ จากไข่ระยะ 2 เซลล์ ที่นำมาเลี้ยงซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่เป็นไข่จากแม่โคที่ไม่ได้รับ FSH แต่ในการศึกษานี้อัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2) แต่การพัฒนาของตัวอ่อนจากไข่ของแม่โคที่ได้รับ FSH ถึงระยะ blastocyst สูงกว่ากลุ่มควบคุมแสดงให้เห็นถึงคุณประโยชน์ของการให้ gonadotropin (FSH) ต่อการผลิตตัวอ่อนที่ได้

ตารางที่ 2 อัตราการปฏิสนธิของไข่ที่ได้รับจากกลุ่มควบคุม และแม่โคที่ได้รับ FSH กระตุ้น

	กลุ่มควบคุม	กลุ่มที่ได้รับ FSH กระตุ้น
จำนวนไข่	89	128
อัตราการปฏิสนธิ	67.9	70.3
จำนวนตัวอ่อน 2 เซลล์ที่นำไปเลี้ยง	32	33
อัตราการพัฒนาระยะ blastocyst	12.5[ข]	36.4[ก]

[ก,ข] แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$)

6. ปัญหาและอุปสรรคในงานทดลอง

เพื่อให้นักวิจัยที่สนใจดำเนินงานวิจัยในลักษณะเดียวกันนี้ประสบปัญหาน้อยลง คณะผู้วิจัยใคร่ขอสะท้อนถ่ายทอดปัญหาและอุปสรรคในงานทดลองให้ได้รับทราบดังนี้

1. ปัญหาสัตว์ทดลอง โคที่มีลักษณะดีหาได้ลำบากมากมีบ้างตามหน่วยราชการ ในช่วงดังกล่าวแม่โคที่หาได้นี้เป็นโคที่ได้มาจึงตั้งท้องทั้งหมดทำให้ต้องรอเวลาจนหลังคลอดจึงสามารถเข้างานทดลองได้ ค่าใช้จ่ายจึงสูงเกินงบประมาณที่คาดไว้
2. ปัญหาพฤติกรรมสัตว์ โคมีความเปรียว คุ้นเคยเฉพาะเมื่อให้อาหาร แต่เมื่อเข้างานทดลองจะจดจำและขัดขืนจึงมีความลำบากในการควบคุม
3. ปัญหาฮอร์โมนไม่มีจำหน่าย ในการศึกษานี้ประสงค์จะใช้ FSH ในการกระตุ้นเพิ่มการพัฒนาถุงไข่ในแม่โค แต่ฮอร์โมนดังกล่าวในช่วงปี พ.ศ. 2551 ขาดตลาดไม่มีการนำเข้าประเทศ คณะผู้วิจัยรอระยะเวลานาน ส่งผลให้งานทดลองต้องมีค่าใช้จ่ายมาก
4. ปัญหาอุปกรณ์ราคาแพงในงานวิจัยครั้งนี้มีความจำเป็นต้องใช้เข็มเจาะดูดชนิดยาวในการเจาะดูดไข่จากรังไข่ เข็มดังกล่าวมีราคาประมาณอันละหนึ่งพันบาทเศษและได้เพียง 1 ครั้ง จากนั้นปลายเข็มจะทู่ประสิทธิภาพการเจาะดูดลดลง ซึ่งการลับปลายเข็มปัจจุบันไม่มีบริการ การใช้เข้มสั้นที่มีลักษณะปลายเข้มเดียวกันต้องดัดแปลงอุปกรณ์งาน และเทคนิคซับซ้อน แต่เข็มดังกล่าวก็ไม่มีผู้นำเข้า ซึ่งการทำวิจัยลักษณะนี้หากหวังผลควรมีการสนับสนุนงบประมาณมากกว่า 500,000 บาท อีกทั้งต้องฝึกทีมงานเป็นระยะเวลานาน

7. สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

<u>สรุปผลการวิจัย</u>

การวิจัยครั้งนี้สรุปผลได้ดังนี้

1. การกระตุ้นการพัฒนาของถุงไข่ด้วย FSH ระดับ 100 มิลลิลิตร ในแม่โคบราห์มันทำให้มีจำนวนถุงไข่ขนาด > 2 มม. มากกว่าการไม่ให้ FSH
2. การกระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH ทำให้พบถุงไข่ขนาดใหญ่, กลาง และเล็ก บนรังไข่มากกว่าการไม่ให้ฮอร์โมน FSH
3. การกระตุ้นด้วย FSH มีผลดีต่อเนื่องถึงการพัฒนาของตัวอ่อนจากไข่ของแม่โคที่ได้รับฮอร์โมน FSH เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับฮอร์โมน

ข้อเสนอแนะ

1. การทำการศึกษาเพิ่มเติมถึง ระดับฮอร์โมน FSH และระยะเวลาที่ดำเนินการเจาะไข่ภายหลังจากการให้ FSH ครั้งสุดท้าย โดยเจาะลดระยะเวลาระหว่างการฉีดฮอร์โมนครั้งสุดท้าย และการเจาะเก็บไข่
2. ควรทำการศึกษาถึงวิธีการฉีดฮอร์โมนครั้งเดียว ซึ่งจะลดความยุ่งยากและลดความเครียดแก่สัตว์