

4. การทดลองที่ 1

การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการใช้ฮอร์โมนกระตุ้นการตกไข่ในกระต่าย

4.1 การตรวจเอกสาร

การกระตุ้นเพื่อเพิ่มอัตราการตกไข่โดยใช้ฮอร์โมนในสัตว์เลี้ยงที่ให้ออกเป็นครอก มีการศึกษากันมานานาน (Polidoro and Black, 1970; Phillippo, 1968) ฮอร์โมนที่นิยมใช้กันมากคือ FSH หรือ PMSG ซึ่งทำให้ follicle มีการพัฒนามากกว่าปกติ และฮอร์โมน LH หรือ HCG เพื่อกระตุ้นการตกไข่ สำหรับสัตว์ที่มีการตกไข่เอง (Spontaneous ovulator) เมื่อใช้แก่การใช้ฮอร์โมน PMSG เพียงอย่างเดียว (Gates, 1971) หรือใช้ร่วมกับฮอร์โมน LH หรือ HCG สามารถทำให้เพิ่มการตกไข่ได้ (Onuma and Foote, 1970) แต่ในสัตว์ที่มีการตกไข่เมื่อได้รับการเหนี่ยวนำ (Induced ovulator) จะใช้ฮอร์โมนทั้งสองชนิดควบคู่กัน เช่น FSH กับ LH, PMSG กับ HCG (Gates, 1971) หรือ PMSG กับ LH (Dziuk and Gehlbach, 1966)

ในกระต่ายที่มีน้ำหนักระหว่าง 2-3 กิโลกรัมการใช้ฮอร์โมน PMSG 50-100 I.U. และ HCG 50 I.U. (Soliman, Labib and El-Azab, 1979) ส่วนการฉีดฮอร์โมน FSH ควรใช้ 0.5 มิลลิกรัม และ HCG 50 I.U. ฮอร์โมนที่ใช้กระตุ้นการเจริญเติบโตของ follicle เช่น PMSG สามารถฉีดเข้าใต้ผิวหนังหรือฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (Kennelly and Foote, 1965) หรือฉีดเข้าช่องท้อง ไม่มีผลแตกต่างกัน ส่วนฮอร์โมนที่ใช้กระตุ้นการตกไข่อาจฉีดเข้าช่องท้องหรือฉีดเข้าทางเส้นเลือดดำก็ได้ (Gates, 1970)

เนื่องจากกระต่ายมีหลาย follicle เจริญเติบโตในแต่ละครั้ง การฉีดฮอร์โมน FSH หรือ PMSG ทำให้ follicle พัฒนาเพิ่มจำนวนมากขึ้น follicle ที่แก่จะตกไข่เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยการฉีดฮอร์โมน HCG หรือ LH หรือการได้รับการผสมพันธุ์จากตัวผู้ จำนวน

ครั้งของการฉีดฮอร์โมน PMSG มีตั้งแต่ 1-2 ครั้ง (Soliman, Labib and El-Azab, 1979) หรือฉีดติดต่อกัน 6 ครั้งในระยะ 3 วัน (Polidoro and Black, 1970) หลังจากนั้น 40-44 ชั่วโมงจึงทำการฉีดฮอร์โมน HCG หรือ LH แล้วจึงนำไปผสมกับตัวผู้ (Gates, 1971)

หลังจากการผสม 10 ชั่วโมงกระต่ายจะเริ่มมีการตกไข่ (Nalbandov, 1968) ระยะเวลาการตกไข่จะเสร็จสมบูรณ์ประมาณ 14 ชั่วโมง (Gates, 1971) และผ่าซากในวันถัดไป หลังจากผสม การตรวจหาไข่ตกตามวิธีการของ Gates (1971) โดยตัดเอาท่อนำไข่และมดลูกมาแช่ลงในถ้วยน้ำเกลือที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.9 ใส่ในถ้วยแก้วแล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องขยาย ขนาดของไข่มีขนาดเล็กกว่า 0.3 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นการตรวจโดยการนับจำนวนไข่โดยตรง ส่วนการตรวจการตกไข่โดยการนับจุดเลือดออกบนรังไข่ (haemorrhagic follicle) เป็นวิธีการตรวจโดยทางอ้อมวิธีหนึ่งซึ่งอธิบายไว้โดย Robert (1971)

4.2 วัตถุประสงค์ของการทดลอง

1. เพื่อศึกษาผลของการฉีดฮอร์โมนเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของ follicle
2. เพื่อศึกษาผลของการฉีดฮอร์โมนเพื่อกระตุ้นการตกไข่
3. เพื่อหาแนวทางการศึกษาขั้นต่อไป

4.3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. เครื่องมือผ่าตัด
2. น้ำเกลือ (normal saline) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.9
3. ถ้วยแก้ว (petridish)
4. กระจกนาฬิกา (watch glass)
5. กล้องขยาย compound microscope
6. กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตรพร้อมเข็ม
7. สำลี, กระดาษซับ

8. ซอร์โมน PMSG (Prolan A, Bayer) และ HCG (Physex Leo)

4.3.1 สัตว์ทดลอง

กระต่ายสาวที่นำมาทดลองมีอายุอยู่ระหว่าง $4-4\frac{1}{2}$ เดือน มีน้ำหนักประมาณ 2-3 กิโลกรัม ซึ่งเป็นน้ำหนักที่ได้มาตรฐานของกระต่ายพันธุ์เมือง กระต่ายมีการเจริญเติบโตเต็มที่พร้อมที่จะผสมพันธุ์ได้จำนวน 12 ตัว เป็นกระต่ายสีขาวตาแดง 6 ตัว สีคละ 6 ตัว แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มฉีดซอร์โมน 6 ตัว เป็นกระต่ายสีขาวตาแดง 3 ตัว สีคละ 3 ตัว และกลุ่มไม่ฉีดซอร์โมน (ฉีดน้ำเกลือแทน) 6 ตัว เป็นกระต่ายสีขาวตาแดง 3 ตัว สีคละ 3 ตัว กระต่ายทั้งหมดได้รับน้ำ อาหาร และหญ้าสดเต็มที่ โดยให้สูตรอาหารแม่พันธุ์ซึ่งมีโปรตีนร้อยละ 17 (NRC, 1977) ดังแสดงไว้ในตารางภาคผนวกที่ ๑

4.3.2 วิธีการทดลอง

ในกลุ่มแรกฉีดซอร์โมน PMSG 100 I.U. (0.5 มิลลิลิตร) ในวันที่ 1 เวลา 10.00 น. ในวันที่ 3 เวลา 6.00 น. ฉีดซอร์โมน HCG 50 I.U. (0.25 มิลลิลิตร) เข้าที่กล้ามเนื้อโคนขาซ้ายใน

ในกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มเปรียบเทียบ ฉีดน้ำเกลือ 0.5 มิลลิลิตร ในวันที่ 1 เวลา 10.00 น. ในวันที่ 3 เวลา 6.00 น. ฉีดน้ำเกลือ 0.25 มิลลิลิตร เข้าที่กล้ามเนื้อโคนขาซ้ายในเช่นกัน ต่อมา 3 ชั่วโมงจึงทำการผสมพันธุ์กระต่ายทั้งสองกลุ่ม ดังแสดงในรูปที่ 1

ในวันที่ 1 เวลา 8.00 น. ทำการผ่าซากกระต่ายทั้งหมดโดยวิธีการฉีดยาอากาศเข้าเส้นเลือดดำที่ใบหู หักไว้ 2-3 นาทีจนกระต่ายตาย

การตรวจการตกไข่ทำได้โดยการนับจำนวน haemorrhagic follicle เพราะไม่สามารถตรวจหาไข่ที่ตกได้โดยตรงเนื่องจากไข่มีขนาดเล็กมาก นอกจากนี้ยังบันทึกลักษณะต่างๆ คือ จำนวน follicle ที่มีขนาดใหญ่และมีลักษณะใสบนโคนทั้งหมด จำนวน corpus luteum ชี้น้ำหนักรังไข่ วัถความยาวรังไข่ และสังเกตสีของรังไข่

เวลา	10.00 น.		06.00 น. 9.00 น.		8.00 น.
วันที่	1	2	3		4
กลุ่มที่ 1	PMSG		HCG ผสม		ผ่าซาก
กลุ่มที่ 2	น้ำเกลือ		น้ำเกลือ ผสม		ผ่าซาก

รูปที่ 1. แสดงแผนผังระยะเวลาการฉีดฮอร์โมน

4.4 ผลการทดลอง

ผลของการฉีดฮอร์โมน PMSG และ HCG เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ฉีดฮอร์โมน สรุปไว้ในตารางที่ 1 ขนาดของรังไข่และระบบอวัยวะสืบพันธุ์อื่น ๆ เช่น มดลูก ปีกมดลูก ของกระต่ายในกลุ่มที่ฉีดฮอร์โมนขยายใหญ่กว่าในกลุ่มที่ไม่ฉีดฮอร์โมน จากการวัดขนาดรังไข่ของกระต่ายในกลุ่มที่ฉีดฮอร์โมนและกลุ่มที่ไม่ฉีดฮอร์โมนมีความยาวเฉลี่ย 1.64 ± 0.04 และ 1.55 ± 0.08 เซนติเมตรตามลำดับ น้ำหนักเฉลี่ยของรังไข่ทั้งสองเท่ากับ 0.88 ± 0.04 และ 0.79 ± 0.12 กรัมตามลำดับ พบว่าลักษณะโดยทั่วไปของระบบสืบพันธุ์ในกลุ่มที่ฉีดฮอร์โมน PMSG และ HCG จะขยายใหญ่กว่าในกลุ่มที่ไม่ฉีดฮอร์โมน

จำนวนไข่ที่ตกจรังตรวจโดยการนับจุดเลือดออก (haemorrhagic follicle) ที่พบบนรังไข่ทั้งสองข้าง ซึ่งเป็นรอยฉีกขาดของ stigma พบว่าการฉีดฮอร์โมน PMSG กับ HCG ทำให้บนรังไข่มีรอยจุดเลือดออกมากกว่าในกลุ่มที่ไม่ฉีดฮอร์โมนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) คือ โดยเฉลี่ย 7.3 ± 3.98 และ 1.7 ± 2.66 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวน follicle ที่นับได้ทั้งหมดบนรังไข่โดยการนับจำนวน follicle ที่มีขนาดใหญ่ นูนเด่น มีลักษณะใส ในกลุ่มที่ฉีดฮอร์โมนมีจำนวนมากกว่าในกลุ่มที่ไม่ฉีดฮอร์โมน คือ 14.7 ± 5.35 และ 6.7 ± 1.37 follicle ตามลำดับ

ผลการตรวจสอบลักษณะอื่น ๆ เช่น สีของระบบสืบพันธุ์ รังไข่ มดลูก พบว่าในกลุ่มที่ฉีดฮอร์โมนจะมีสีแดงเข้ม ส่วนในกลุ่มที่ไม่ฉีดฮอร์โมนจะมีสีชมพูอ่อน เมื่อนำกระต่ายสาวที่ฉีด

ซอร์โมนและไมดักซอร์โมนผสมกับตัวผู้ พบว่ากระต่ายสาวที่ไม่ดักซอร์โมนมีแนวโน้มไม่ยอมรับการผสมพันธุ์มากกว่าในกลุ่มที่ดักซอร์โมน คือ ในกลุ่มที่ดักซอร์โมนมีกระต่ายไม่ยอมรับการผสม 2 ตัว และในกลุ่มที่ไม่ดักซอร์โมนมีกระต่ายที่ไม่ยอมรับการผสม 3 ตัว ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

4.5 วิจารณ์ผลการทดลอง

ในการศึกษาเบื้องต้นซึ่งเป็นการทดลองผลของการดักซอร์โมน PMSG และ HCG เพื่อกระตุ้นให้มีการเจริญเติบโตของ follicle และมีการตกไข่มากกว่าปกตินั้น แสดงให้เห็นว่าผลของการดักซอร์โมน PMSG และ HCG ในระดับ 100 I.U. และ 50 I.U. ตามลำดับ ทำให้มีการตกไข่มากกว่าในกลุ่มเปรียบเทียบ ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับที่รายงานโดย Polidoro และ Black (1970); Chang, Hanada และ Hunt (1971) และ Blandua (1971) ที่ได้ทำการทดลองกระตุ้นให้มีการตกไข่มากกว่าปกติโดยใช้ซอร์โมน gonadotrophins ในการตรวจหาไข่ตกจริง ๆ นั้นเป็นการยากที่จะตรวจพบ และนับจำนวนโคโกสก็เกี่ยวกับการตกไข่จริงได้ เพราะไข่นั้นมีขนาดเล็กกว่า 0.3 มิลลิเมตร และในระหว่างการชะล้างท่อไข่อาจจะทำให้ไข่แตกเนื่องจากเยื่อหุ้มไข่บางมาก (Gates, 1971) ดังนั้นจึงถือว่าจุดเลือดออก (haemorrhagic follicle) ซึ่งเป็น follicle ที่แตกแล้วแทนจำนวนไข่ตก นอกจากจุดเลือดออกแล้วลักษณะที่อาจบ่งชี้ให้เห็นว่าผลของการดักซอร์โมน PMSG และ HCG ทำให้มีการตกไข่มากขึ้นก็คือ จำนวน follicle ที่มีขนาดใหญ่และมีของเหลวใสอยู่ภายใน กระต่ายที่ดักซอร์โมนจะมีอวัยวะทางเดินสืบพันธุ์ภายใน เช่น มดลูก ขนาดรังไข่ใหญ่กว่า สีส้มคล้ำกว่า ซึ่งเป็นผลมาจากการดักซอร์โมนทำให้มีเลือดมาเลี้ยงอวัยวะส่วนนี้มากขึ้น ส่วนในกลุ่มที่ไม่ดักซอร์โมนมีรังไข่ สีมดลูก เป็นสีชมพู และจากการวัดขนาดความยาว ชั่งน้ำหนักของรังไข่ พบว่ามีความยาวและน้ำหนักต่ำกว่าในกลุ่มดักซอร์โมน

กระต่ายที่ใช้ทำการทดลองเป็นพันธุ์พื้นเมือง มีน้ำหนัก อายุ ใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงไม่ เป็นปัญหาที่จะทำให้เกิดความแตกต่างกันของจำนวนไข่ตก เพราะตามรายงานของ Lang และ Lamond (1966) กล่าวว่า สัตว์ทดลองที่มีน้ำหนักแตกต่างกัน พวกที่มีน้ำหนักมากตกไข่

ตารางที่ 1. แสดงผลการศึกษาเบื้องต้นของการใช้ฮอร์โมนกระตุ้นการตกไข่

รายการ	กลุ่มที่ฉีดฮอร์โมน						ค่าเฉลี่ย±S.D.	C.V. %	กลุ่มที่ฉีดคน้ำเกลือ						ค่าเฉลี่ย±S.D.	C.V. %
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6			วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6		
น้ำหนักกระต่าย (กรัม)*	2670	2790	2630	2730	2595	2605	2670±76.75	2.87	2560	2600	2805	2580	2645	2635	2638±88.13	3.34
ความยาวรังไข่ (ซม.)	1.725	1.625	1.62	1.64	1.6	1.62	1.64±0.04	2.44	1.45	1.525	1.7	1.53	1.55	1.55	1.55±0.08	5.16
น้ำหนักรังไข่ (กรัม)	0.94	0.89	0.88	0.92	0.83	0.84	0.88±0.04	4.55	0.68	0.71	1.0	0.73	0.81	0.79	0.79±0.12	15.19
จำนวน corpus luteum	2	6	0	3	0	4	2.5 ±2.35	94	5	0	6	4	3	4	3.7 ±2.07	55.95
จำนวน follicle																
ขนาดใหญ่**	9	10	24	16	15	14	14.7±5.35	36.39	5	5	8	7	7	8	6.7 ±1.37	20.45
จำนวนไข่ที่ตกจริง***	8	2	12	10	3	9	7.3 ±3.98	54.52	0	0	0	0	4	6	1.7 ±2.66	156.37
สีของรังไข่	แดงช้ำ	แดงช้ำ	แดงช้ำ	แดงช้ำ	แดงช้ำ	แดงช้ำ	-	-	ชมพู	ชมพู	ชมพู	ชมพู	ชมพู	ชมพู	-	-
การยอมรับตัว	ยอมรับ	ไม่ยอม	ยอมรับ	ยอมรับ	ไม่ยอม	ยอมรับ	-	-	ไม่ยอม	ไม่ยอม	ยอมรับ	ไม่ยอม	ยอมรับ	ยอมรับ	-	-

หมายเหตุ * น้ำหนักกระต่ายซึ่งเมื่อเริ่มทำการทดลอง

** หมายถึง นับจาก follicle ที่นับเด่นจากรังไข่ของเหลวใสอยู่ภายใน

*** หมายถึง จุดเลือดออกบนรังไข่ (haemorrhagic follicle)

มากกว่า แม้ว่าได้รับฮอร์โมนในปริมาณที่เท่ากันก็ตาม

การฉีดฮอร์โมน PMSG และ HCG เพื่อกระตุ้นให้มีการเจริญเติบโตของ follicle และพร้อมที่จะมีการตกไข่จำนวนมากนั้น ไม่ทำให้พฤติกรรมของกระต่ายบางตัวยอมรับการผสมจากตัวผู้ ดังเห็นได้จากตารางที่ 1 เมื่อทำการผ่าซากและตรวจการตกไข่พบว่า กระต่ายตัวที่ไม่ยอมรับการผสมมีการตกไข่น้อยกว่าปกติทั้งในกลุ่มที่ฉีดฮอร์โมนและกลุ่มที่ไม่ฉีดฮอร์โมน ทั้งนี้ อาจมีสาเหตุจากกระต่ายในกลุ่มที่ฉีดฮอร์โมนตรงกับช่วงที่ไข่กำลังจะสลายตัว และมี follicle ใหม่กำลังเจริญขึ้นมาแทนที่ เมื่อสัตว์ได้รับฮอร์โมนเข้าไปแทนที่จะไปกระตุ้นให้ follicle เจริญ กลับมีผลในทางลบในลักษณะเดียวกับที่พบว่า การให้ฮอร์โมน PMSG ในระดับสูงเกินไป จะทำให้เกิดผลในทางลบได้ (มณีวรรณ, 2524) เช่น การทดลองของ Land (1970) พบว่า การฉีด PMSG 100 I.U. วันละ 2 ครั้ง ทำให้การตกไข่ลดลงมาก จึงมีการสันนิษฐานว่าเกิดจากผลของ PMSG ไปกระตุ้นการหลั่ง FSH ทำให้การพัฒนาของ follicle มีจำนวนน้อย จึงทำให้มีการตกไข่น้อยกว่าปกติ ในทำนองเดียวกัน Kenelly และ Foote (1965) กล่าวว่า การฉีด FSH ในระดับสูงให้กระต่ายอายุน้อย คือ 0.31 มิลลิกรัม เมื่ออายุ 12 สัปดาห์ ไม่ทำให้มีการตกไข่ เพราะเกิดการกระตุ้นมากเกินไป ส่วนในกลุ่มเปรียบเทียบที่ไม่ยอมรับการผสมนั้น อาจจะเป็นเพราะว่าอยู่ในช่วง 4 วันที่กระต่ายไม่ยอมรับการผสม ในระยะนี้ฮอร์โมน FSH และ LH ในเลือดต่ำตามที่ Nalbandov (1964) พบว่า ระดับฮอร์โมน LH สูงมากในขณะที่กระต่ายยอมรับการผสมพันธุ์ แม้ว่าในกลุ่มที่ฉีดฮอร์โมนมีกระต่ายบางตัวไม่ยอมรับการผสม แต่มีการตกไข่ ทั้งนี้เป็นเพราะว่าการฉีดฮอร์โมน LH อย่างเดียวสามารถเหนี่ยวนำให้มีการตกไข่ได้ (Nalbandov, 1964) แต่จำนวนไข่ที่ตกจะต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับพวกที่ยอมรับการผสม