รายงานผลการวิจัย

ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

เรื่อง

การใช้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินเพื่อกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิล ในรังไข่ของลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์

(Follicular growth stimulation by exogenous gonadotropin in pre-pubertal swamp buffalo calf)

โดย

มงคล เตชะกำพุ

ชัยฉรงค์ โลหเชิต

วิชัย ทันตสุภารักษ์

วันเพ็ญ ศรีอนันต์

จินดา สิงห์ลอ

จินตนา อินทรมงคล

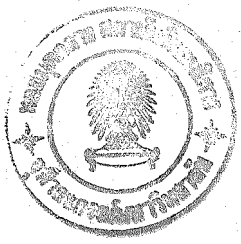
วส
ธส 15
008091

2537

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย



การใช้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินเพื่อกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ของลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์

(Follicular growth stimulation by exogenous gonadotropin in pre-pubertal swamp buffalo calf)

โดย

มงคล เตชะกำพุ[1]
ชัยณรงค์ โลหชิต[1]
วิชัย ทันตศุภารักษ์[1]
วันเพ็ญ ศรีอนันต์[1]
จินดา สิงห์ลอ[1]
จินตนา อินทรมงคล[2]

ธันวาคม 2537

[1]ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
[2]ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ จังหวัดสุรินทร์

I17964246 13 มิ.ย. 2542

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก เงินทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้วิจัยขอขอบคุณ
- ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ จังหวัดสุรินทร์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
- นายสัตวแพทย์ ยันต์ สุขวงศ์ และ สัตวแพทย์หญิง จุรีรัตน์ เอี่ยมวิทยากร
  กองผสมเทียม กรมปศุสัตว์
- ศ. นพ. ประมวล วีรุตนเสนและ อ. นพ. วิสุทธิ์ บุญเกษมสันติ
  ภาควิชาสูติศาสตร์ นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- บริษัท แอ๊ดว้านซ์ฟาร์ม่า จำกัด ที่สนับสนุนฮอร์โมน
- บริษัท โซลเวย์ (ประเทศไทย) จำกัด ที่สนับสนุนยาปฏิชีวนะในการทดลอง
- คณาจารย์และเจ้าหน้าที่ของภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยา
  และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ การใช้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินเพื่อกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิล
ในรังไข่ของลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์

ชื่อผู้วิจัย มงคล เตชะกำพุ
ชัยณรงค์ โลหชิต
วิชัย ทันตศุภารักษ์
วันเพ็ญ ศรีอนันต์
จินดา สิงห์ลอ
จินตนา อินทรมงคล

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ ธันวาคม 2537

บทคัดย่อ

จากการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์อายุ 8-12 เดือน จำนวนทั้งหมด 10 ตัว แบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรก ใช้ลูกกระบือ 5 ตัวในการฉีดฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน ชนิด เอฟ เอส เอช (FSH) ขนาด 24 มก ครั้งแรก และหลังจากนั้น 2 เดือน ฉีดฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน ชนิด พี เอ็ม เอส จี (PMSG) ขนาด 3000 ไอยู และกลุ่มที่ 2 ใช้ลูกกระบือ 5 ตัว ฉีดฮอร์โมน พี เอ็ม เอส จี ครั้งแรก และหลังจากนั้น 2 เดือน ฉีดฮอร์โมนเอฟ เอส เอช ตรวจสอบการตอบสนองและเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีการผ่าตัดเปิดช่องท้อง นับจำนวนฟอลลิเคิล ($\phi \geq 0.8$ ซม) ผลการศึกษาพบว่า รังไข่มีการตอบสนองต่อฮอร์โมน เอฟ เอส เอช มากกว่าฮอร์โมน พี เอ็ม เอส จี (13.9$\pm$8.6 ใบ เทียบกับ 5.9$\pm$3.3 ใบ, $p<0.01$) ได้จำนวนโอโอไซต์เฉลี่ยจากฮอร์โมนเอฟ เอส เอช เท่ากับ 8.3$\pm$5.0 ใบต่อตัว คิดเป็นอัตราการเก็บโอโอไซต์เท่ากับ 63.8% และจากฮอร์โมน พี เอ็ม เอส จี เท่ากับ 4.6$\pm$3.2 ใบต่อตัว คิดเป็นอัตราการเก็บโอโอไซต์เท่ากับ 82% นำโอโอไซต์ที่เจริญไม่เต็มที่จำนวน 38 ใบ มาเลี้ยงต่อในหลอดทดลองนาน 24-25 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ พบว่า 52.6%(20/38) อยู่ในระยะเมตาเฟส ทู การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้รังไข่ลูกกระบือปลักหลังกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปินเป็นแหล่งโอโอไซต์และโอโอไซต์นี้สามารถเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลอง

Project title : Follicular growth stimulation by exogenous gonadotropin in pre-pubertal swamp buffalo calf

Name of Investigators : Mongkol Techakumphu
Chainarong Lohachit
Wichai Tantasuparak
Wanpen Srianan
Jinda Singlor
Chintana Intaramongkol

Year : December 1994

Abstract

Stimulation of follicular growth was experimented in ten pre-pubertal swamp buffaloes (8-12 months old). They were divided into two groups according to the gonadotropin treatments.

Five calves were injected intramuscularly with a 24 mg of follicular stimulating hormone (FSH) and 2 months later with a 3000 IU of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG), while the other 5 calves were first treated with PMSG and followed by FSH. The ovarian responses were examined by laparotomy and indicated by a number of follicles ($\phi \geq 0.8$ cm) and corpus hemorrhagicum. Ovaries had more significant response to FSH than PMSG treatment (13.9 $\pm$ 8.6 V.S. 5.9 $\pm$ 3.3 follicles, $p < 0.01$). Sixty three point eight percent of oocytes were recovered from FSH treated animals (8.3 oocytes per animal) while eighty two percent from PMSG (4.6 oocytes per animal). The immature oocytes (n = 38) were cultivated 24-25 hour for maturation, and *in vitro* maturation rate was 52.6% (20/38). This study shows the possibility of oocyte production from the pre-pubertal swamp buffaloe calves by gonadotropin treaments and the harvested oocytes can be matured by *in vitro* cultivation.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	II
บทคัดย่อ	III
Abstract	IV
สารบัญ	V
รายการตารางประกอบ	VI
รายการภาพประกอบ	VII
รายการสัญญลักษณ์และคำย่อ	VIII
บทนำ	1
อุปกรณ์และวิธีการ	2
ผล	7
วิจารณ์	16
เอกสารอ้างอิง	21

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่ คพ
สพ 15
เลขทะเบียน 008091
วัน,เดือน,ปี 29 ส.ค. 38

รายการตารางประกอบ

		หน้า
ตารางที่ 1	ผลการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช	8
ตารางที่ 2	ผลการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน พี เอ็ม เอส จี	9
ตารางที่ 3	การเปรียบเทียบผลการตอบสนองระหว่างการฉีดฮอร์โมน เอฟ เอส เอช และฮอร์โมน พี เอ็ม เอส จี	9
ตารางที่ 4	อัตราการเก็บโอโอไซต์หลังกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช	10
ตารางที่ 5	อัตราการเก็บโอโอไซต์หลังกระตุ้นด้วยฮอร์โมน พี เอ็ม เอส จี	11
ตารางที่ 6	ชนิดของโอโอไซต์จากการเก็บจากรังไข่ลูกกระบือ	12
ตารางที่ 7	การเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์	13

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

		หน้า
รูปที่ 1	แผนการกระตุ้นการเพิ่มการเจริญของฟอลลิเคิล	4
รูปที่ 2	แผนการทดลอง	4
รูปที่ 3	ภาพของรังไข่ที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน	10
รูปที่ 4	โอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบจำนวนมาก (Compact cumulus oocytes)	12
รูปที่ 5	โอโอไซต์ชนิดที่เซลล์คิวมูลัสหุ้มไม่มากชั้น (Partial or Single layers cumulus oocyte)	13
รูปที่ 6	โอโอไซต์ชนิด immature ที่เลี้ยงไว้จนถึงระยะ mature มีเซลล์คิวมูลัสแผ่กระจายรอบ ๆ ชั้น zona pellucida	14
รูปที่ 7	โอโอไซต์ immature ที่เลี้ยงไว้จนถึงระยะ mature บริเวณผิวของโอโอไซต์พบ 1st polar body (ลูกศร)	14
รูปที่ 8	ภาพ ก แสดงโอโอไซต์ในระยะ Metaphase II (ลูกศร) ภาพ ข ภาพขยายของโครโมโซมระยะ Metaphase II	15
รูปที่ 9	ภาพของโอโอไซต์ในระยะ Telophase I	15
รูปที่ 10	โอโอไซต์หลังทำการปฏิสนธินอกร่างกาย มีตัวอสุจิเกาะรอบ (ศรชี้)	20
รูปที่ 11	ตัวอ่อนระยะประมาณ 8 เซลล์ (ข้างซ้าย) ที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกาย	20

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการสัญญลักษณ์และคำย่อ

เอฟ เอส เอช	Follicular Stimulating Hormone, FSH
พี เอ็ม เอส จี	Pregnant Mare Serum Gonadotropin, PMSG
ไอ ยู	International unit
กก	กิโลกรัม
ชม	ชั่วโมง
ซม	เซนติเมตร
มก	มิลลิกรัม
มม	มิลลิเมตร
มล	มิลลิลิตร
CH	corpus hemorrhagicum
F	follicle
FCS	Fetal Calf Serum
IVF	*in vitro* fertilization
mM	milliMolar

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

การผลิตตัวอ่อนด้วยการใช้เทคนิคของการปฏิสนธินอกร่างกาย (ไอ วี เอฟ) เป็นจุดที่มีผู้สนใจและมีการศึกษาอย่างแพร่หลายในโค สุกร ซึ่งเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญ แหล่งของโอโอไซต์ซึ่งใช้ในการทำ ไอ วี เอฟ ตามปกติได้มาจากการเจาะรังไข่ที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ ซึ่งมีข้อเสียคือเราไม่สามารถรู้พันธุกรรมได้ หรือหากรู้ก็มักเป็นสัตว์ที่มีปัญหาทางระบบสืบพันธุ์ หรือโรค หรืออายุมาก ดังนั้นจึงมีผู้เสนอให้เจาะเอาโอโอไซต์จากรังไข่ของลูกสัตว์ โดยทำหลังการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน ชนิดฟอลลคูล่าร์ สตีมูเลตติ้ง ฮอร์โมน ที่มีผลต่อการสร้างฟอลลิเคิลและการเจริญของโอโอไซต์

กล่าวได้ว่ารังไข่ของลูกสัตว์แรกเกิดเป็นแหล่งสะสมที่สำคัญของฟอลลิเคิลชนิด primordial รวมทั้งโอโอไซต์ที่อยู่ภายในฟอลลิเคิล ในลูกโคแรกเกิดอาจพบเป็นจำนวนสูงถึง 700,000 ใบ (Erickson, 1966) จำนวนของฟอลลิเคิลเหล่านี้จะลดลงเมื่อลูกสัตว์อายุมากขึ้นจนถึงวัยเจริญพันธุ์ และจนไม่พบเลยเมื่อสัตว์หมดช่วงอายุทางการสืบพันธุ์ พบว่าในช่วงวัยเจริญพันธุ์ของสัตว์เพศเมีย ในแต่ละรอบของวงจรการเป็นสัด ฟอลลิเคิลจำนวนหนึ่งจะถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน ทำให้เจริญจากชนิด primordial ไปเป็นฟอลลิเคิลชนิด primary แล้วเป็นฟอลลิเคิลชนิด secondary จนถึงฟอลลิเคิลชนิด mature โดยในสัตว์ที่ออกลูกเพียงตัวเดียวจะมีเพียงฟอลลิเคิลชนิด mature ใบเดียวที่เกิดการตกไข่ ส่วนที่เหลือเกิดการเสื่อมสลายเนื่องจากระดับของฮอร์โมนโกนาโดโทรปินไม่พอเพียง ดังนั้นจึงมีผู้นำเอาฮอร์โมนโกนาโดโทรปินฉีดเพิ่มในระหว่างรอบการเป็นสัดเพื่อหวังให้ฟอลลิเคิลเกิดการเจริญมาก ๆ จนถึงเกิดการตกไข่ได้มากกว่า 1 ใบ เรียกวิธีนี้ว่า "การกระตุ้นเพิ่มการตกไข่" (superovulation) ผลทำให้ได้ตัวอ่อนเป็นจำนวนมากขึ้นต่อการตกไข่แต่ละครั้งภายหลังการผสมพันธุ์

การทดลองการเพิ่มการตกไข่มีมากในสัตว์หลังวัยเจริญพันธุ์ โดยเฉพาะในโคและในกระบือเพื่อใช้ในการทำการย้ายฝากตัวอ่อน (Embryo Transfer) ส่วนในวัยก่อนการเจริญพันธุ์งานทดลองส่วนมากเป็นการทดลองในลูกโค โดยพบว่าลูกโคอายุเพียง 1 สัปดาห์ สามารถตอบสนองต่อการฉีดฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (Marden, 1953) ต่อมา Jainudeen และคณะ (1966) ได้ทดลองใช้ฮอร์โมนชนิด พี เอ็ม เอส จี ขนาด 2000 ไอยู ฉีดในลูกโคอายุ 4-24 สัปดาห์ และตามด้วยการฉีดฮอร์โมน เอส ซี จี หลังฉีด พี เอ็ม เอส จี ประมาณ 5 วัน สามารถกระตุ้นลูกโคได้ถึง 11 ใน 13 ตัว และมีการตกไข่ตั้งแต่ 1 ถึง 50 ใบ นอกจากนี้ Onuma และคณะ (1969) ได้ทดลองใช้ฮอร์โมนชนิด เอฟ เอส เอช หรือ พี เอ็ม เอส จี ในลูกโคอายุ 55-64 สัปดาห์ พบว่าสามารถกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลได้เป็นจำนวนมาก

การนำโอโอไซต์จากฟอลลิเคิลดังกล่าวมาใช้ พบว่าการศึกษาระยะแรกต้องประสบกับความล้มเหลว โดยโอโอไซต์ไม่เกิดการปฏิสนธิกับตัวอสุจิที่ผสมแบบธรรมชาติในลูกโคที่ทดลอง หรือหากเกิดการปฏิสนธิก็เป็นจำนวนไม่มากนัก (Jainudeen *et al.*, 1966) หรือเมื่อเอาตัวอ่อนจากการปฏิสนธิในร่างกายมาเลี้ยงไว้ในหลอดทดลองก็เกิดการหยุดตัวที่ 16 เซลล์ (Onuma *et al.*, 1969)

แต่ในปัจจุบันพบว่าปัญหาดังกล่าวไม่เกิดขึ้นเนื่องจากมีการศึกษาโดยเอาโอโอไซต์มาทำการปฏิสนธินอกร่างกายและเลี้ยงด้วยวิธี co-culture ร่วมกับเซลล์พี่เลี้ยง พบว่าได้ตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซีส (Kajihara *et al.*, 1991; Torner *et al.*, 1992) และตัวอ่อนดังกล่าวยังเกิดเป็นลูกโคได้อีกเมื่อนำไปฝากในครรภ์ของแม่โคตัวรับ (Armstrong *et al.*, 1992)

การทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า มีความเป็นไปได้ในการทำการปฏิสนธินอกร่างกายกับโอโอไซต์ที่ได้จากลูกสัตว์และสามารถผลิตลูกสัตว์จากลูกสัตว์ได้ จึงเป็นแนวคิดที่นำมาปรับใช้และทดลองในกระบือปลัก โดยการศึกษาในลูกกระบือที่ยังไม่มีผู้ศึกษามาก่อน รายงานส่วนใหญ่เป็นข้อมูลจากกระบือปลักหลังวัยเจริญพันธุ์ทั้งสิ้น ดังนั้นเพื่อเป็นแนวทางนำเทคโนโลยีทางการปฏิสนธินอกร่างกายมาใช้ในกระบือปลัก จึงได้วางวัตถุประสงค์ของงานวิจัยเป็น 4 ข้อ คือ

1) ศึกษาการกระตุ้นการเพิ่มการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์ โดยเปรียบเทียบระหว่างฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน ชนิด เอฟ เอส เอช และ ชนิด พี เอ็ม เอส จี
2) ศึกษาวิธีการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ดังกล่าว
3) ศึกษาลักษณะและชนิดของโอโอไซต์ที่เก็บได้
4) ศึกษาความสามารถในการเจริญจนพร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลอง (*in vitro* oocyte maturation)

รูปแบบงานวิจัย เป็นแบบ cross over design

อุปกรณ์และวิธีการ

ลูกกระบือปลัก

คัดลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์หลังหย่านมอายุประมาณ 8-12 เดือน น้ำหนักประมาณ 150 กก จากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ จังหวัดสุรินทร์ จำนวนทั้งสิ้น 10 ตัว นำมาเลี้ยงไว้ที่ศูนย์ฝึกนิสิตคณะสัตวแพทยศาสตร์ ตำบลบ่อพลับ อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม ก่อนเริ่มการทดลองประมาณ 1 เดือน โดยให้น้ำ หญ้าสด หญ้าแห้ง ฟางแห้ง อย่างเต็มที่ และอาหารข้นวันละ 2.0 กก/ตัว/วัน

การกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิล

เปรียบเทียบผลของฮอร์โมน 2 ชนิด คือ ฟอลลิคูล่าร์ สตีมูเลตติ้งฮอร์โมน* (เอฟ เอส เอช) และ แพรกแนน แมร์ชีรั่ม โกนาโดโทรปิน** (พี เอ็ม เอส จี) โดยแบ่งการศึกษาเป็น 2 ชุด คือ

---

* FSH-p, Schering, Canada

** Folligon^{R}, Intervet, Holland

ชุดที่ 1: ศึกษาเปรียบเทียบการกระตุ้นครั้งแรกระหว่าง ฮอร์โมน เอฟ เอส เอช และ พี เอ็ม เอส จี โดยใช้ลูกกระบือจำนวนกลุ่มละ 5 ตัว

กลุ่มที่ 1 : ฉีดฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน เอฟ เอส เอช จำนวน 24 มก/ตัว เป็นเวลา 5 วัน

กลุ่มที่ 2 : ฉีดฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน พี เอ็ม เอส จี จำนวน 3,000 ไอยู/ตัว ในวันที่ 3 หลังฝังฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน*

หมายเหตุ การฉีดฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ทำโดยแบ่งฉีด 5 วัน วันละ 2 ครั้ง ในลักษณะลดจำนวน คือ 4x4, 3x3, 2x2, 2x2, 1x1 มก หลังทำการฝังฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรนใต้ผิวหนังที่ใบหูประมาณ 1 วัน

รายละเอียดของแผนการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนฟอลลิเคิลแสดงในรูปที่ 1

ชุดที่ 2: ศึกษาเปรียบเทียบการกระตุ้นซ้ำด้วยฮอร์โมนต่างชนิดจากการกระตุ้นครั้งแรก โดยแบ่งลูกกระบือเป็น 2 กลุ่ม ๆ ละ 5 ตัว

กลุ่มที่ 3: ฉีดฮอร์โมน เอฟ เอส เอช จำนวน 24 มก หลังฉีดกระตุ้นครั้งแรกด้วยฮอร์โมน พี เอ็ม เอส จี ประมาณ 2 เดือน

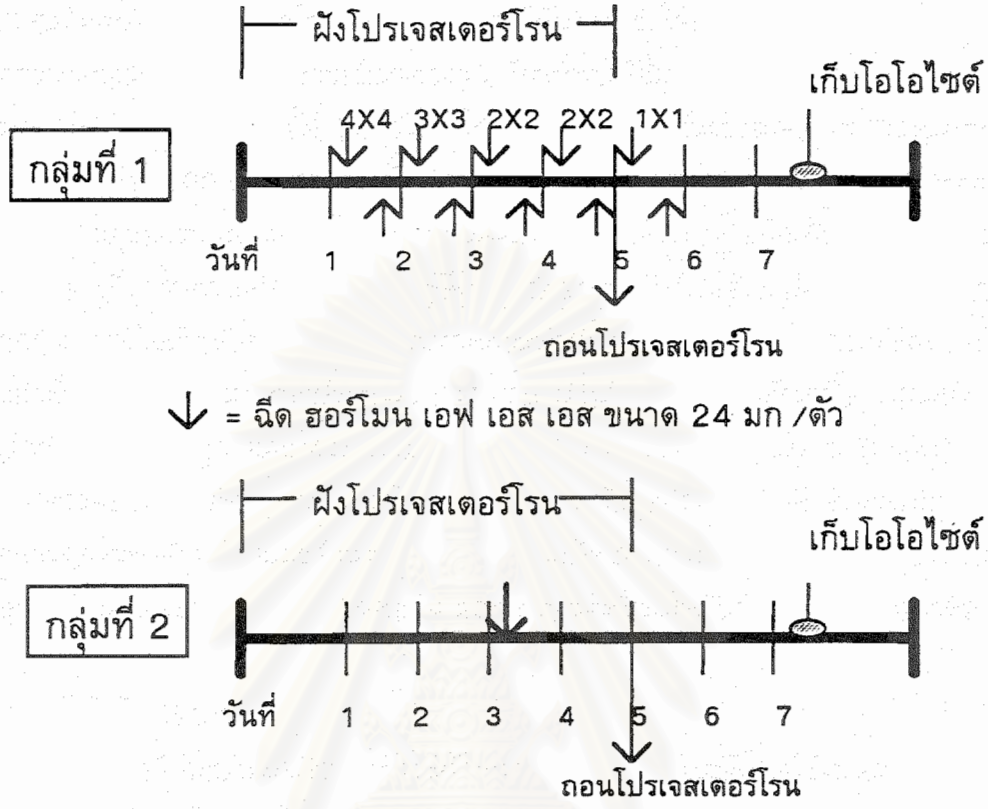
กลุ่มที่ 4: ฉีดฮอร์โมน พี เอ็ม เอส จี จำนวน 3,000 ไอยูหลังฉีดกระตุ้นครั้งแรกด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ประมาณ 2 เดือน

แผนการศึกษาแสดงในรูปที่ 2

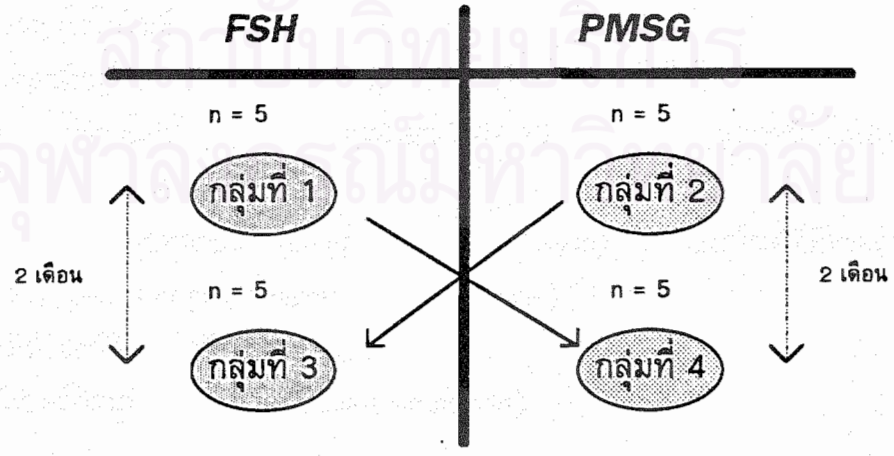
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

---

* Norgestomet, Crestar^{R}, Intervet, Holland



รูปที่ 1 แผนการกระตุ้นการเพิ่มการเจริญของฟอลลิเคิล



รูปที่ 2 แผนการทดลอง

การตรวจการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้น

ตรวจสอบผลของการกระตุ้นต่อการตอบสนองของรังไข่หลังถอนเอาโปรเจสเตอร์โรนออก ประมาณ 72 ชม โดยทำการผ่าตัดเปิดช่องท้องตรวจดูจำนวนฟอลลิเคิลที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 0.8 ชม และจำนวนการตกไข่ (คอร์ปัส ฮีโมราจีกัม) บนรังไข่แต่ละข้าง

ทำการวางยาสลบทั่วตัวในลูกกระบือหลังจากให้ยาที่ทำให้ซึมชนิด Xylacine Hydrochloride* ขนาด 10 มก/100 กก เข้ากล้ามเนื้อ 15 นาที โดยให้ยาสลบเข้าเส้นเลือดดอดด้วย Thiopentone sodium ขนาด 1 กรัม/100 กก แบบให้ครั้งเดียว (knock down dose) สอดท่อ endotracheal ทันทีที่สัตว์สลบ และต่อสายน้ำเกลือ 0.9% เข้าเส้นเลือดดำบริเวณใบหู เพื่อเติมยาสลบในขนาดความเข้มข้น 1% เพิ่มเติมกรณีสัตว์เริ่มมีความรู้สึก นำลูกกระบือขึ้นโต๊ะผ่าตัดชนิดแฮนโนเวอร์ โดยให้หัวต่ำกว่าส่วนท้ายเล็กน้อย ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อบริเวณผ่าตัด กรีดเปิดช่องท้องบริเวณกลางลำตัวระหว่างเต้านม ยาวประมาณ 12 ชม ผ่านผิวหนัง ชั้นกล้ามเนื้อ และผนังช่องท้อง ล้วงเอาคอมดลูก มดลูก และรังไข่ มาบริเวณปากแผล แยกผนังหุ้มรังไข่ (bursa) ออก การกระทำดังกล่าวต้องทำด้วยความระมัดระวังเพื่อป้องกันฟอลลิเคิลแตก นับจำนวนฟอลลิเคิลและจุดที่เกิดการตกไข่ทั้งด้านซ้ายและด้านขวา ทำการเย็บปิดช่องท้อง และฉีดยาปฏิชีวนะและทำความสะอาดบาดแผล เป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน และทำการตัดไหมในวันที่ 10 หลังจากผ่าตัด

การเจาะโอโอไซต์จากรังไข่

ทำการเจาะฟอลลิเคิลบริเวณผิวของรังไข่ด้วยการเจาะแบบอัตโนมัติโดยใช้เข็มยาวประมาณ 30 ชม เบอร์ 18 ต่อกับเครื่องดูดอัตโนมัติชนิดดัดแปลง โดยอีกด้านหนึ่งของปลายเข็มต่อเข้ากับหลอดพลาสติกสำหรับเก็บโอโอไซต์ หรือเจาะด้วยมือ โดยใช้เข็มเบอร์ 19 ยาว 1.5 นิ้ว ต่อกับไซริงค์พลาสติกขนาด 10 มล

ดูดโอโอไซต์จากฟอลลิเคิลแต่ละใบใส่ในหลอดพลาสติกที่มีน้ำยา TCM 199 2.5 mM HEPES จำนวน 1 มล แล้วนำมาตรวจหาโอโอไซต์ในห้องปฏิบัติการ

การตรวจหาโอโอไซต์

เทของเหลวที่อยู่ในหลอดพลาสติกลงในจานพลาสติก ส่องหาโอโอไซต์ภายใต้กล้องสเตริโอกำลังขยาย 10-40 เท่า แยกโอโอไซต์ที่พบในน้ำยา TCM 199+10%FCS แยกชนิดโอโอไซต์โดยดูจากลักษณะเป็น 3 ชนิด คือ

ก) โอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสหลายชั้น (compact cumulus oocyte) หรือ โอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสเพียง 2-3 ชั้น (partial or single layers cumulus oocyte)

ข) โอโอไซต์ที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้ม (denude oocyte)

ค) โอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสแผ่ (expand cumulus oocyte)

---

* Rompun^{R}, Bayer, Germany

การเลี้ยงให้เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ (*in vitro* maturation)

นำโอโอไซต์ข้อ ก และ ข มาเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์ชนิด TCM 199 $NaHCO_3$ + 10% FCS ที่มี 10 ไมโครกรัม/มล ของ FSH/LH และ 1 ไมโครกรัม/มล ของ Estradiol-17B เป็นส่วนประกอบ นาน 24-25 ชม

การตรวจการเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ

นำเอาโอโอไซต์หลังเลี้ยง มา fix ในน้ำยาเคมี ชนิด glacial acetic acid : methanol (1:3) นานอย่างน้อย 48 ชม ดูดเอาโอโอไซต์ จำนวน 2-3 ใบมาหยดบนสไลด์ โดยให้มีน้ำยาดังกล่าวน้อยที่สุด วางโอโอไซต์ตรงกลางสไลด์ระหว่างเส้นพาราฟินผสมวาสซาลีน แล้ววางแผ่น cover glass ระหว่างเส้นดังกล่าว กดลงจนโอโอไซต์ไม่เคลื่อนไหว หยดสีย้อม aceto-orcein ลงบนช่องว่างจากปลายข้างหนึ่งจนถึงปลายอีกข้างหนึ่ง วิธีการดังกล่าวทำได้กล้องสเตอริโอเพื่อป้องกันการแตกของโอโอไซต์ และการไหลของโอโอไซต์หายไป

ตรวจสภาวะพร้อมปฏิสนธิโดยดูจากการปรากฏของโครโมโซมในไซโตพลาสซึม ในระยะเมตาเฟส ทู (metaphase II)

การปฏิสนธินอกร่างกาย

ทดสอบความสามารถในการปฏิสนธิของโอโอไซต์จำนวนหนึ่ง โดยนำมาปฏิสนธินอกร่างกาย กับน้ำเชื้อกระบือปลักชนิดแช่แข็ง (frozen semen) ที่เตรียมด้วยวิธีการ swim up นาน 1 ชม ในน้ำยาเลี้ยงตัวอสุจิ (capacitation medium) เป็นชนิด TALP ที่มี bovine serum albumin 0.006 กรัม/มล เป็นส่วนประกอบอยู่ และปรับความเป็นกรด-ด่างที่ 7.2 ในตู้อบที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ และความชื้นสัมพัทธ์เต็มที่ ดูดแยกตัวอสุจิเหนือตะกอนประมาณ 800-900 ไมโครลิตร และนำมาปั่นอีกครั้งหนึ่งด้วยความเร็ว 1000 g นาน 5 นาที แยกเอาเฉพาะตะกอนตัวอสุจิที่นอนก้น ตรวจการเคลื่อนไหวและนับจำนวนตัวอสุจิต่อมิลลิลิตร

นำตัวอสุจิในระดับความเข้มข้น $1x10^6$ ตัว/มล ใส่ในหลุมของจานพลาสติกชนิด 4 หลุม* ที่มีโอโอไซต์อยู่ เลี้ยงตัวอสุจิร่วมกับโอโอไซต์นาน 18 ชม นำโอโอไซต์ที่เตรียมไว้หลังเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิมาล้าง 2 ครั้ง ก่อนทำการปฏิสนธิ ครั้งแรกด้วยน้ำยา TCM 199 2.5 mM HEPES และครั้งที่ 2 ในน้ำยา IVF ที่มี bovine serum albumin 0.006 กรัม/มล และมีสาร PHE** และ 10 มก/มล Heparin ที่มีความเป็นกรด-ด่าง ที่ 7.6 หลังปฏิสนธิแล้วทำการเลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยา B2***+20%FCS

---

* Nunc, USA

** Penicillamine, Hypotaurine, Epinephrine

** Menezo, France

ขั้นตอนต่าง ๆ ของการเลี้ยงโอโอไซต์ การเตรียมตัวอสุจิ การปฏิสนธินอกร่างกาย การเลี้ยงตัวอ่อน ทำที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ ภายใต้ความชื้นสัมพัทธ์เต็มที่

การวิเคราะห์ทางสถิติ

หาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของผลการตอบสนองต่อการฉีดกระตุ้น เปรียบเทียบโดยใช้การทดสอบด้วย F-test โดยวิธี completely randomized experiment และคิดอัตราการเก็บโอโอไซต์ได้จากการคำนวณเป็นเปอร์เซนต์ของจำนวนของโอโอไซต์ที่เก็บได้หารด้วยจำนวนฟอลลิเคิลที่ดูดเก็บ

ผล

1) <u>ผลของการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน</u>

ผลเฉลี่ยการตอบสนองต่อการฉีดฮอร์โมนโกนาโดโทรปินชนิด เอฟ เอส เอช ของลูกกระบือจำนวน 10 ตัว เท่ากับ 13.9±8.6 ใบต่อรังไข่ (ผันแปรตั้งแต่ 4-31 ใบ) โดยรังไข่ด้านซ้ายได้เท่ากับ 6.5±4.3 ใบ (ผันแปรตั้งแต่ 2-14 ใบ) และรังไข่ด้านขวาเท่ากับ 7.4±4.6 ใบ (ผันแปรตั้งแต่ 2-17 ใบ) โดยมีเฉพาะฟอลลิเคิลที่เหลือให้ดูดเอาโอโอไซต์เท่ากับ 13.0 ใบ เป็นด้านซ้ายเท่ากับ 5.7 ใบ และด้านขวาเท่ากับ 7.3 ใบ (ตารางที่ 1) ในการศึกษานี้ไม่พบความแตกต่างของการตอบสนองระหว่างกลุ่มทดลองที่ 1 ซึ่งเป็นการกระตุ้นครั้งแรกและกลุ่มทดลองที่ 3 ซึ่งเป็นลูกกระบือที่เคยได้รับการฉีดด้วยฮอร์โมน พี เอ็ม เอส จี มาก่อน โดยจำนวนการตอบสนองในกลุ่มทดลองที่ 1 เท่ากับ 13.8±11.1 ใบ (รังไข่ซ้าย = 6.2±5.2 ใบ, รังไข่ขวา = 7.6±6.2 ใบ) เทียบกับในกลุ่มที่ 3 เท่ากับ 14.0±6.4 ใบ (รังไข่ซ้าย = 6.8±3.9 ใบ, รังไข่ขวา = 7.2±3.2 ใบ) ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 ผลการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช

กลุ่มทดลอง	ลูกกระบือ	หมายเลข	รังไข่ซ้าย		รังไข่ขวา		การตอบสนองทั้งหมด (F+CH)
			F/CH	Loss	F/CH	Loss	
1	1	180672	2F+1CH	-	7F+1CH	-	9F+2CH
	2	180680	1CH	1F	2F	-	3F+1CH
	3	180673	6F	3F	9F	-	18F
	4	180618	3F	-	2F	-	5F
	5	180678	14F	-	17F	-	31F
พิสัย ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบน (ใบ)			1-14 6.2±5.2		2-17 7.6±6.2		5-31 13.8±11.1
3	6	310012	3F	2F	7F	-	12F
	7	310014	11F	-	7F	-	18F
	8	310015	3F	-	7F	-	10F
	9	310013	4F	-	3F	-	7F
	10	310016	11F	-	12F	-	23F
พิสัย ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบน (ใบ)			3-11 6.8±3.9		3-12 7.2±4.2		7-23 14.0±6.4
รวมทั้งหมด			57F+2CH	6F	73F+1CH	-	136F+3CH
ค่าเฉลี่ย[ก] (ใบ)			5.7F		7.3F		13.0F
ค่าเฉลี่ย[ข] (ใบ)			6.5±4.3		7.4±4.6		13.9±8.6

ก) จำนวนฟอลลิเคิลเฉลี่ยเฉพาะที่เหลือสำหรับดูดเก็บโอโอไซต์

ข) จำนวนการตอบสนองเฉลี่ยทั้งหมด (จำนวนฟอลลิเคิล + คอร์ปัส ฮีโมราจิกัม)

F = ฟอลลิเคิลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ≥ 0.8 มม CH = คอร์ปัส ฮีโมราจิกัม)

Loss = ฟอลลิเคิลที่สูญเสียขณะทำการเก็บโอโอไซต์

ในส่วนของการตอบสนองของรังไข่ต่อการฉีดฮอร์โมน พี เอ็ม เอส จี พบว่าได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.9±3.3 ใบ (ผันแปรตั้งแต่ 0-9 ใบ) โดยได้ด้านซ้ายเท่ากับ 3.7±2.4 ใบ (ผันแปรตั้งแต่ 0-9 ใบ) และด้านขวาเท่ากับ 2.2±1.3 ใบ (ผันแปรตั้งแต่ 0-4 ใบ) จำนวนฟอลลิเคิลที่เหลือไว้เก็บโอโอไซต์เท่ากับ 5.6 ใบ (ด้านซ้ายเท่ากับ 3.5 และด้านขวาเท่ากับ 2.1) (ตารางที่ 2) และเช่นเดียวกับผลของการตอบสนอง ด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ไม่พบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของการตอบสนองระหว่างกลุ่มทดลองที่ 2 และกลุ่มทดลองที่ 4 โดยเท่ากับ 6.2±1.9 ใบ (รังไข่ซ้าย = 4.2±0.8 ใบ และรังไข่ขวา = 2.0±1.6 ใบ) เทียบกับ 5.6±4.5 ใบ (รังไข่ซ้าย = 3.2±1.5 ใบ และรังไข่ขวา = 2.4±1.1 ใบ)

ตารางที่ 2 ผลการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน พี เอ็ม เอส จี

กลุ่มทดลอง	ลูกกระบือ	หมายเลข	รังไข่ซ้าย		รังไข่ขวา		การตอบสนองทั้งหมด (F+CH)
			F/CH	Loss	F/CH	Loss	
2	6	310012	3F	-	1F	-	4F
	7	310014	4F	-	3F	-	7F
	8	310015	3F+1CH	-	1F+1CH	-	4F+2CH
	9	310013	5F	-	0F	-	5F
	10	310016	5F	-	4F	-	9F
พิสัย ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบน (ใบ)			3-5 4.2±0.8		0-4 2.0±1.6		4-9 6.2±1.9
4	1	180672	2F	-	2F	-	4F
	2	180680	3F	-	3F	-	6F
	3	180673	0F	-	1F	-	1F
	4	180618	1F+1CH	-	2F	-	3F+1CH
	5	180678	9F	-	4F	-	13F
พิสัย ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบน (ใบ)			0-9 3.2±1.5		1-4 2.4±1.1		1-13 5.6±4.5
รวมทั้งหมด			35F+2CH		21+1CH		56F+3CH
ค่าเฉลี่ย[ก] (ใบ)			3.5		2.1		5.6
ค่าเฉลี่ย[ข] (ใบ)			3.7±2.4		2.2±1.3		5.9±3.3

[ก] จำนวนฟอลลิเคิลเฉลี่ยเฉพาะที่เหลือสำหรับดูดแก็บโยโยไซต์

[ข] จำนวนการตอบสนองเฉลี่ยทั้งหมด (จำนวนฟอลลิเคิล + คอร์ปัส ฮีโมราจีกัม)

F = ฟอลลิเคิลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ≥ 0.8 มม CH = คอร์ปัส ฮีโมราจีกัม)

Loss = ฟอลลิเคิลที่สูญเสียขณะทำการเก็บโยโยไซต์

ผลของการตอบสนองของรังไข่ระหว่างฮอร์โมน 2 ชนิด คือฮอร์โมน เอฟ เอส เอช และ พี เอ็ม เอส จี แสดงในตารางที่ 3 โดยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ให้ค่าตอบสนองที่มากกว่าเมื่อเทียบกับฮอร์โมน พี เอ็ม เอส จี เท่ากับ 13.9 ใบ เทียบกับ 5.9 ใบ ($p<0.01$) โดยวิธี F-Test ภาพของรังไข่ที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน แสดงในรูปที่ 3

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบผลการตอบสนองของรังไข่ระหว่างการฉีดฮอร์โมน เอฟ เอส เอช และฮอร์โมน พี เอ็ม เอส จี

ชนิดของฮอร์โมน	จำนวนลูกกระบือ	การตอบสนอง (F+CH) (ใบ)		
		รังไข่ข้างซ้าย	รังไข่ข้างขวา	ทั้งหมด
เอฟ เอส เอช	10	6.5±4.3	7.4±4.6[ก]	13.9±8.6[ก]
พี เอ็ม เอส จี	10	3.7±2.4	2.2±1.3[ข]	5.9±3.3[ข]

ก และ ข แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.01$)

รูปที่ 3 ภาพของรังไข่ที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโคนาโดโทรปิน

2) อัตราการเก็บโอโอไซต์

อัตราการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ได้เท่ากับ 63.8% (83/130) โดยให้อัตราผันแปรระหว่าง 50-100% (ตารางที่ 4) ส่วนอัตราการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ที่กระตุ้นด้วยฮอร์โมน พี เอ็ม เอส จี ได้เท่ากับ 82% (46/56) และมีอัตราผันแปรเท่ากับ 50-100% (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 อัตราการเก็บโอโอไซต์หลังกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช

ลูกกระบือ	หมายเลข	จำนวนฟอลลิเคิล	จำนวนโอโอไซต์	อัตราการเก็บโอโอไซต์
1	180672	9	8	89%
2	180680	2	2	100%
3	180673	15	6	40%
4	180618	5	3	60%
5	180678	31	19	61%
6	310012	10	5	50%
7	310014	18	12	67%
8	310015	10	9	90%
9	310013	7	7	100%
10	310015	23	12	52%
รวม		130	83	
ค่าพิสัย + ส่วนเบี่ยงเบน		2-23 13.0+8.9	2-19 8.3+5.0	50-100% 63.8+22.0

ตารางที่ 5 อัตราการเก็บโอโอไซต์หลังกระตุ้นด้วยฮอร์โมน พี เอ็ม เอส จี

ลูกกระบือ	หมายเลข	จำนวนฟอลลิเคิล	จำนวนโอโอไซต์	อัตราการเก็บโอโอไซต์
1	180672	4	2	50%
2	180680	6	4	67%
3	180673	1	1	100%
4	180618	3	3	100%
5	180678	13	12	92%
6	310012	4	4	100%
7	310014	7	7	100%
8	310015	4	2	50%
9	310013	5	5	100%
10	310015	9	6	67%
ทั้งหมด		56	46	
พิสัย		1-13	1-12	50-100%
ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบน		5.6±3.4	4.6±3.2	82±21.6

3) ชนิดของโอโอไซต์

จากโอโอไซต์จำนวน 107 ใบ พบว่าเป็นโอโอไซต์ชนิด compact cumulus oocyte (รูปที่ 4) และชนิด single layers oocyte (รูปที่ 5) รวมกันเท่ากับ 61% (65/107) ส่วนชนิด denude oocyte เท่ากับ 10% (11/107) ซึ่งโอโอไซต์ทั้ง 3 ชนิดจัดเป็นโอโอไซต์ชนิดที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ (immature oocyte) คิดเป็น 71% (76/107) โดยไม่พบความแตกต่างของ immature oocyte ระหว่างการฉีดฮอร์โมนชนิด เอฟ เอส เอช และ พี เอ็ม เอส จี (72%, 44/61 เทียบกับ 70%, 32/46) (ตารางที่ 6) ในส่วนของ โอโอไซต์ที่อยู่ในลักษณะพร้อมปฏิสนธิ (mature oocyte) ชนิด expand cumulus oocyte เท่ากับ 25% (27/107) และเป็นโอโอไซต์ที่เสื่อมสลายเท่ากับ 4% (4/107) อัตราส่วนทั้งสองดังกล่าวไม่แตกต่างกัน ระหว่างโอโอไซต์ที่ได้จากการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช และฮอร์โมน พี เอ็ม เอส จี

ตารางที่ 6 ชนิดของโอโอไซต์จากการเก็บจากรังไข่ลูกกระบือ

ฮอร์โมน	จำนวนโอโอไซต์	ชนิดของโอโอไซต์				
		immature			mature	
		C+P	denude	รวม	expand	Deg
เอฟ เอส เอช	61	36 (59%)	8 (13%)	44 (72%)[ก]	15 (25%)[ก]	2 (3%)[ก]
พี เอ็ม เอส จี	46	29 (63%)	3 (7%)	32 (70%)[ข]	12 (26%)[ข]	2 (4%)[ข]
รวม	107	65(61%)	11(10%)	76(71%)	27(25%)	4(4%)

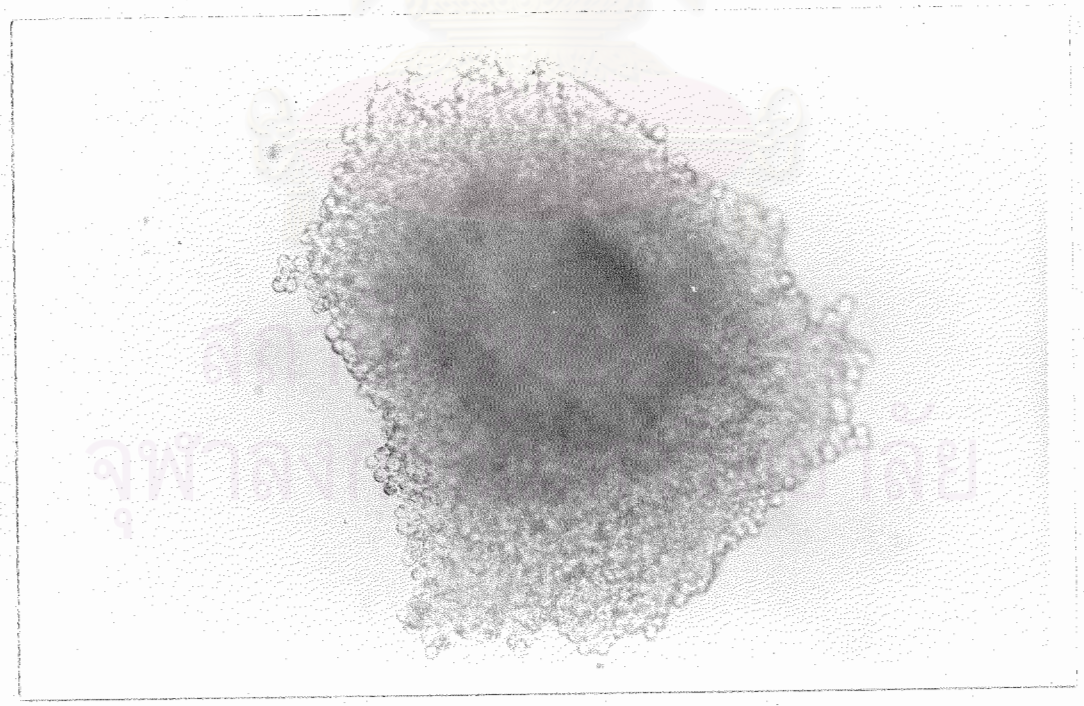
หมายเหตุ ก ข ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

C+P = compact and single layers cumulus oocyte

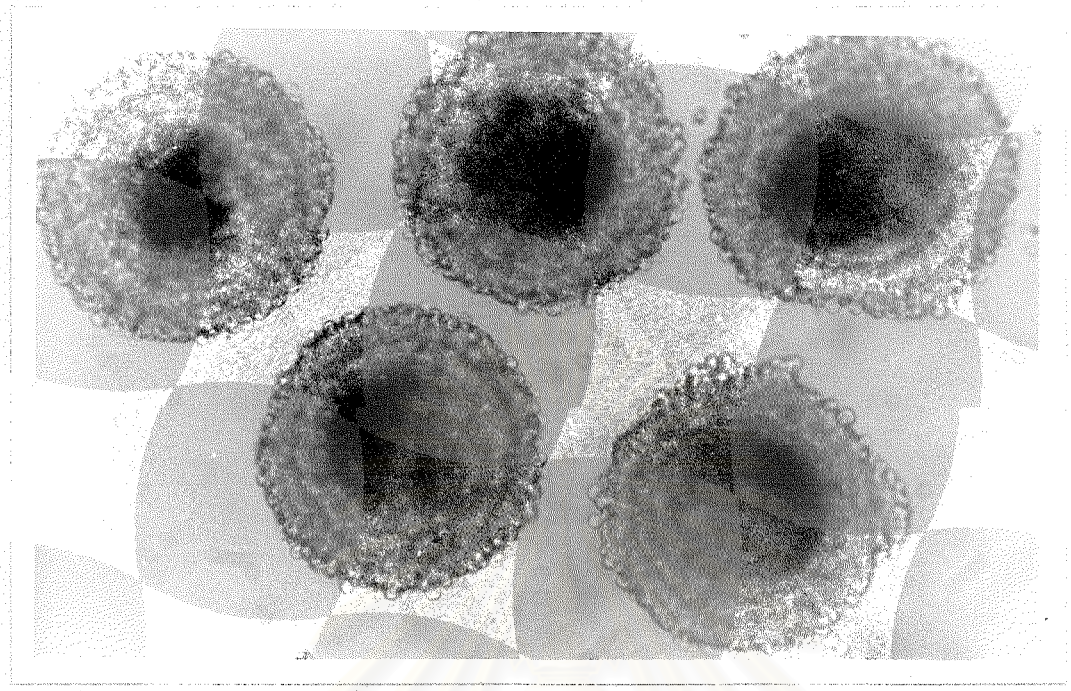
denude = denude oocyte

expand = expand cumulus oocyte

Deg = degenerated oocyte



รูปที่ 4 โอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบจำนวนมาก (Compact cumulus oocyte)



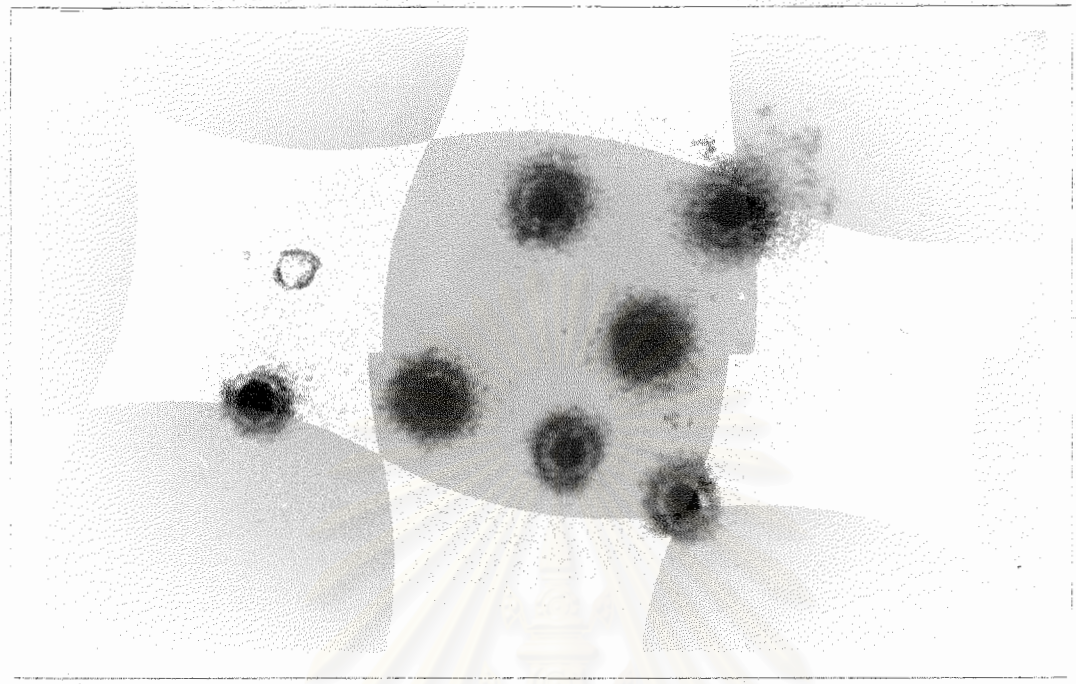
รูปที่ 5 โอโอไซต์ชนิดที่เซลล์คิวมูลัสหุ้มไม่มากชั้น (Partial or Single layers cumulus oocyte)

4) <u>การเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ</u>

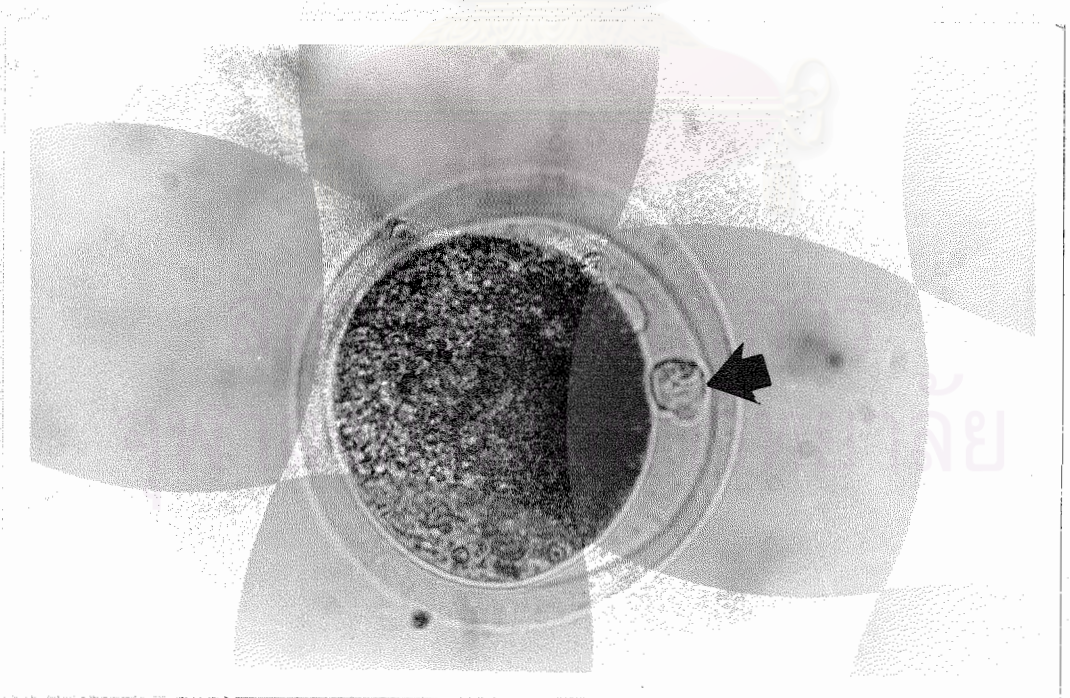
การเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลอง (*in vitro* maturation) ตรวจสอบจากการแผ่กระจายของเซลล์คิวมูลัส (รูปที่ 6) การเกิดของ 1st polar body จากการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิสของโอโอไซต์ (รูปที่ 7) และจากการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมเป็นระยะ metaphase II ซึ่งได้เท่ากับ 52.6%(20/38) (รูปที่ 8) และเป็นระยะ Anaphase I เท่ากับ 2.7%(1/38) และ Telophase I 18.4%(7/38) (รูปที่ 9) ส่วนโอโอไซต์ที่ไม่สามารถบอกได้แน่ชัดถึงระยะและมีความผิดปกติ พบเท่ากับ 21.0%(8/38) รวมทั้งโอโอไซต์ที่เกิดการเสื่อมขณะทำการตรวจสอบอีก 5.3%(2/38) (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 การเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์

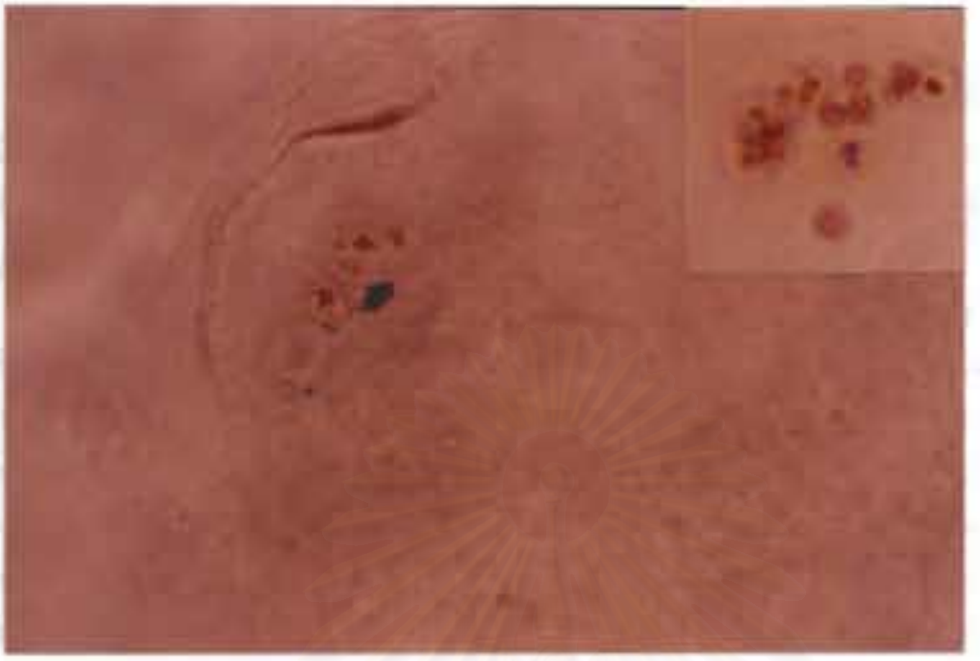
ระยะของการเกิด maturation	จำนวนโอโอไซต์	เปอร์เซนต์
Anaphase I	1	2.7%
Telophase I	7	18.4%
Metaphase I	20	52.6%
Unidentify	8	21.0%
Degenerate	2	5.3%
รวม	38	100%



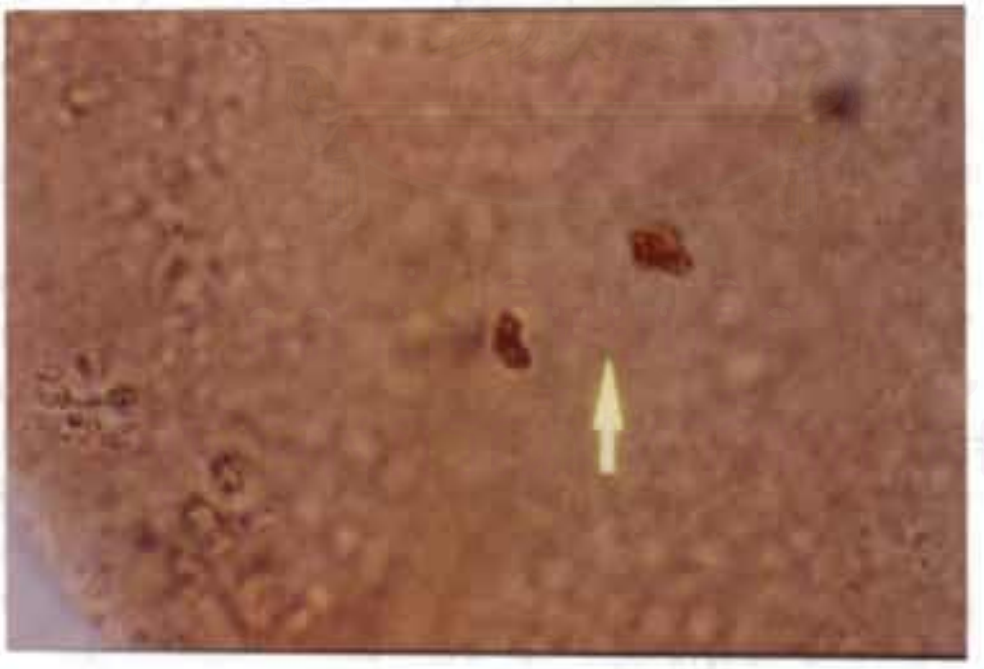
รูปที่ 6 โอโอไซต์ชนิด immature ที่เลี้ยงไว้จนถึงระยะ mature มีเซลล์คิวมูลัสแผ่กระจายรอบ ๆ ชั้น zona pellucida



รูปที่ 7 โอโอไซต์ชนิด immature ที่เลี้ยงไว้จนถึงระยะ mature โดย 1st polar body (ลูกศร)



รูปที่ 8 ภาพ ก แสดงโอโอไซต์ที่การแบ่งโครโมโซมอยู่ในระยะ metaphase II (ลูกศร)
ภาพ ข ภาพขยายของโครโมโซมระยะ metaphase II



รูปที่ 9 ภาพของโอโอไซต์ในระยะ Telophase I

วิจารณ์

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ในการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์โดยรังไข่ลูกกระบือปลักสามารถตอบสนองต่อฮอร์โมนโกนาโดโทรปินทั้งชนิด เอฟ เอส เอช และ พี เอ็ม เอส จี และโอโอไซต์ที่เก็บจากรังไข่ของลูกกระบือปลักสามารถเจริญพร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลองได้

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ลูกกระบือปลักอายุตั้งแต่ 8 เดือนขึ้นไป ซึ่งเป็นอายุที่ทำการหย่านมสำหรับลูกกระบือปลักและเป็นช่วงก่อนวัยเจริญพันธุ์ ตามปกติอายุที่ถึงวัยเจริญพันธุ์ในกระบือใช้เวลานานกว่าในโค โดยปกติมีผู้รายงานตั้งแต่อายุอย่างน้อย 1.5 ถึง 2 ปี ขึ้นไป กระบือมูร่าห์ (Murrah type) จะมีวัยเจริญพันธุ์เร็วกว่ากระบือปลัก (Swamp type) Salama และ คณะ(1994) รายงานอายุของวัยเจริญพันธุ์ของกระบือนมในประเทศอียิปต์ เท่ากับ 15.4±0.8 เดือน และมีน้ำหนักประมาณ 270 กิโลกรัม ส่วน Chaudhary และ Saga (1990) รายงานไว้ประมาณ 2 ปี ในกระบือปลักมีผู้รายงานไว้ว่าอายุของการเจริญพันธุ์เท่ากับ 2.5 ปี น้ำหนักประมาณ 300 กิโลกรัม (McCool and Entwistle, 1989) ในประเทศไทย Bodhipaksha และคณะ (1978) รายงานอายุเฉลี่ยของลูกกระบือเพศเมียที่จะถึงวัยเจริญพันธุ์ประมาณ 3-4 ปี ทั้งนี้ขึ้นกับอาหาร อากาศและการเลี้ยงดู ดังนั้นหากต้องการให้ลูกกระบือเพศเมียตัวหนึ่งเจริญจนถึงวัยเจริญพันธุ์และผลิตลูกออกมาจะต้องใช้เวลาประมาณ 4-5 ปี (Intaramongkol and Intaramongkol, 1992) การศึกษานี้ได้แสดงถึงความเป็นไปได้ในการผลิตโอโอไซต์จากลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์และเมื่อนำไปผลิตตัวอ่อนและย้ายฝากในกระบือ ในอนาคตจึงอาจเป็นแนวทางในการลดช่วงห่างระหว่างรุ่น (interval of generation) ได้

ในการทดลองนี้ได้พัฒนาการเก็บโอโอไซต์ด้วยการทำการเปิดผ่าช่องท้อง (laparotomy) และการเจาะโอโอไซต์จากรังไข่โดยตรง (direct oocyte aspiration) การเก็บโอโอไซต์วิธีนี้มีข้อดี คือ ไม่ต้องฆ่าลูกสัตว์หลังทำการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเหมือนรายงานการทดลองโดยทั่วไป นอกจากนี้ยังสามารถดูดโอโอไซต์จากรังไข่ได้โดยตรงและนำลูกสัตว์ตัวนั้น ๆ มาใช้อีกได้ ผลการเก็บด้วยวิธีในการทดลองนี้ได้อัตราการเก็บโอโอไซต์อยู่ในเกณฑ์สูง โดยเฉพาะในกรณีที่รังไข่มีการตอบสนองไม่มากนัก เช่นในกรณีของการกระตุ้นด้วย พี เอ็ม เอส จี อย่างไรก็ตามวิธีการเก็บแบบนี้มีข้อเสียคือ ไม่สามารถเปิดผ่าเก็บได้มากครั้ง เนื่องจากปัญหาการยึดติด (adhesion) ของรังไข่กับถุงหุ้มไข่ หรือกับตัวมดลูก หรือระหว่างอวัยวะสืบพันธุ์กับผนังช่องท้อง ซึ่งเป็นข้อจำกัดของการเปิดผ่าช่องท้องในการผ่าตัดทั่วไป การผ่าตัดสามารถทำได้อย่างน้อย 2-3 ครั้งขึ้นกับหลายกรณี โดยเฉพาะการจับต้อง (manipulate) บริเวณรังไข่หรือมดลูก การป้องกันการ bleeding การทำให้เนื้อเยื่อชุ่มอยู่เสมอขณะทำการผ่าตัด เป็นต้น ในการเก็บโอโอไซต์ในการศึกษาครั้งนี้มีความจำเป็นต้องจับต้องตัวมดลูกมาก เนื่องจากมดลูกของลูกกระบือปลักอายุประมาณ 8-12 เดือนมีขนาดเล็กและอยู่ในช่องเชิงกราน ผนังที่ยึดมดลูกและรังไข่กับช่องท้อง (broad ligament) ค่อนข้างหนาและตึงเมื่อเทียบกับในลูกโค (สังเกตส่วนตัว) ดังนั้นจึงค่อนข้างลำบากในการดึงเอามดลูกและรังไข่

มาบริเวณปากแผลเพื่อดูดเอาโอโอไซต์ ดังนั้นวิธีการที่ใช้เก็บโอโอไซต์ในการศึกษานี้จึงไม่เหมาะในกรณีที่ต้องการเก็บลูกสัตว์ตัวนั้น ๆ ให้เป็นแม่พันธุ์ในอนาคต การสงวนลูกสัตว์ไว้เป็นแม่พันธุ์หรือเพื่อไว้เก็บโอโอไซต์หลายครั้ง อาจใช้วิธีการส่องกล้องแล้วเจาะผ่านช่องท้อง (laparoscopy) (Sirard and Lambert, 1985; Fayer-Hosken and Caulde, 1991) หรือดูดเก็บด้วยเครื่องคลื่นความถี่สูง (Intravaginal ultrasound-guided follicular aspiration) ซึ่งมีผู้นิยมใช้ในการเก็บจากแม่โค (Looney *et al.*, 1994) วิธีการทั้งสองหากนำมาใช้จะช่วยให้เก็บโอโอไซต์จากตัวสัตว์ได้มากครั้งขึ้น

ในแง่ของการใช้ฮอร์โมน ขนาดของฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ที่ใช้นั้น ประมาณ 2 ใน 3 ของที่ใช้ในโคนมในประเทศไทย (จุรีรัตน์ และคณะ 2537) หรือกระบือหลังวัยเจริญพันธุ์ (Chantaraprateep *et al.*, 1988) หรือเป็นขนาดที่ใช้ในการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ลูกโคพันธุ์ยุโรป (Armstrong *et al.*, 1992) ส่วนขนาดของฮอร์โมน พี เอ็ม เอส จี นั้นใช้ในระดับที่ใช้ในการฉีดแม่กระบือหลังวัยเจริญพันธุ์ (Chantaraprateep *et al.*, 1988; Kobayashi *et al.*, 1990) จากการกระตุ้นดังกล่าว พบว่าจำนวนของลูกกระบือปลักที่มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นโดยคิดจากจำนวนฟอลลิเคิลที่ตอบสนองมากกว่า 2 ใบ พบว่าลูกกระบือทุกตัวที่ถูกฉีดด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช มีการตอบสนองทั้งหมด ในขณะที่ฮอร์โมน พี เอ็ม เอส จี มีการตอบสนอง 9 ใน 10 ตัว ซึ่งคิดเป็นอัตราลูกกระบือที่มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นรวมถึง 95% อัตรานี้สูงกว่าที่รายงานในการใช้ฮอร์โมนประเภทเดียวกับทั้งสองชนิดต่อการกระตุ้นกระบือปลักหรือกระบือมูร่าห์ Sopon และคณะ (1989) ไม่พบความแตกต่างของการตอบสนองเท่ากับ 67% ในการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช หรือ พี เอ็ม เอส จี ในขณะที่ Singh และ คณะ (1988) และ Alexiev และคณะ (1988) พบความแตกต่างประมาณ 15-20% โดยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช จะให้ผลการตอบสนองได้ดีกว่า

ผลการตอบสนองนของรังไข่ต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ในการทดลองนี้ให้ผลดีกว่าฮอร์โมน พี เอ็ม เอส จี เป็นที่ทราบกันดีว่า ฮอร์โมน เอฟ เอส เอช มีข้อดี คือมี short biological half life และไม่สร้างแอนติ้บอดีต่อการกระตุ้นครั้งต่อไป แต่มีข้อเสียคือต้องฉีดหลายครั้ง และมีราคาแพงเมื่อเทียบกับฮอร์โมน พี เอ็ม เอส จี ผลตอบสนองในแง่ของจำนวนของฟอลลิเคิลในลูกกระบือที่ฉีดด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช สามารถให้การตอบสนองถึง 13 ใบ ต่อตัว โดยสามารถให้สูงสุดถึง 31 ฟอลลิเคิล ส่วนในลูกกระบือที่ฉีดฮอร์โมน พี เอ็ม เอส จี ได้เพียง 6 ใบ โดยให้จำนวนสูงสุดเท่ากับ 13 ฟอลลิเคิล เช่นเดียวกับจำนวนโอโอไซต์ในกรณีของฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ได้มากกว่าฮอร์โมน พี เอ็ม เอส จี เกือบเท่าตัว (8.3 เทียบกับ 4.6) เป็นที่น่าสังเกตว่าอัตราการตอบสนองต่อการฉีดฮอร์โมนโกนาโดโทรปินทั้งชนิด เอฟ เอส เอช และพี เอ็ม เอส จี จะผันแปรขึ้นกับตัวสัตว์ ซึ่งความผันแปรดังกล่าวพบได้เช่นเดียวกับในกระบือหลังวัยเจริญพันธุ์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน เป็นที่น่าสังเกตว่าลูกกระบือตัวใดที่ให้ผลตอบสนองที่ดีต่อฮอร์โมน เอฟ เอส เอช มักจะให้ผลดีเช่นเดียวกันต่อฮอร์โมน พี เอ็ม เอส จี ดังจะเห็นจากลูกกระบือหมายเลข 180678 ที่ตอบสนองสูงสุดสำหรับฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ให้ผลตอบสนองต่อ

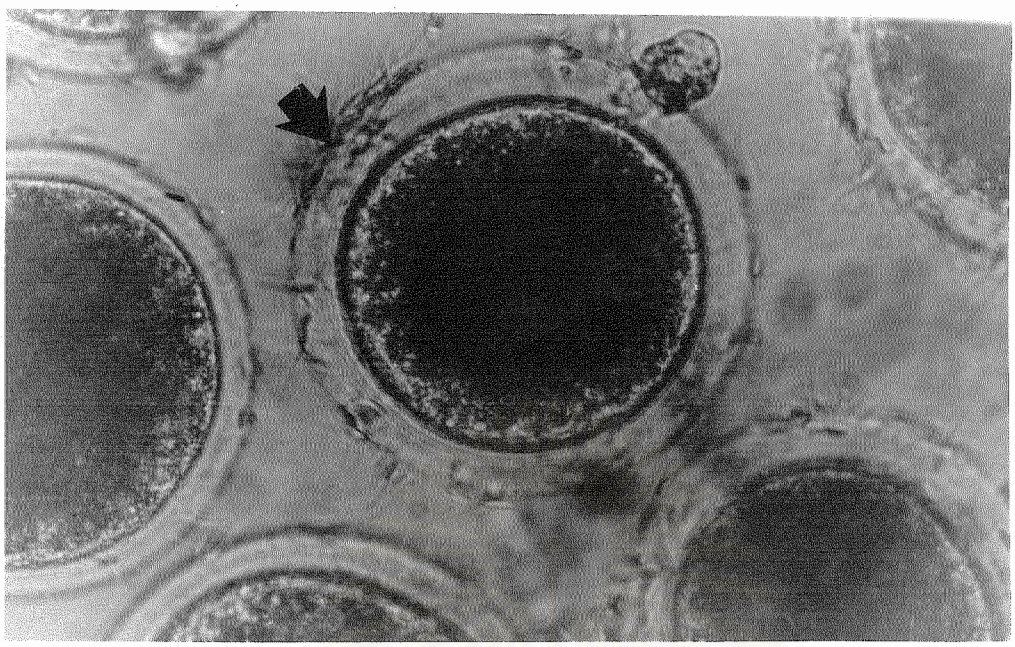
ฮอร์โมน พี เอ็ม เอส จี สูงสุดเช่นกัน หรือลูกกระบือที่ตอบสนองต่ำมีแนวโน้มที่จะพบทั้งการใช้ฮอร์โมน เอฟ เอส เอช หรือ พี เอ็ม เอส จี จำนวนการตอบสนองดังกล่าวนี้หากเปรียบเทียบกับกระบือหลังวัยเจริญพันธุ์จะสูงกว่า Manik และคณะ (1994) ได้ตรวจสอบผลของการตอบสนองต่อการฉีดฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ในกระบือมูร่าห์จำนวน 8 ตัว โดยตรวจสอบด้วยวิธีใช้เครื่องอุตราซาวด์ดูการพัฒนาของฟอลลิเคิลก่อนการกระตุ้นและหลังการกระตุ้นพบว่าจำนวนฟอลลิเคิลจะเพิ่มขึ้นหลังกระตุ้นจาก 1.25 ฟอลลิเคิลต่อตัวเป็น 4.25 ฟอลลิเคิลหลังฉีดฮอร์โมน เอฟ เอส เอช เข็มแรกประมาณ 52 ชม และ สูงสุดถึง 9.13 ฟอลลิเคิลต่อตัวขณะที่กระบือแสดงการเป็นสัด อย่างไรก็ตามจากจำนวนฟอลลิเคิลสูงสุดดังกล่าวมีเพียง 4.74 ฟอลลิเคิลเท่านั้นที่เกิดการตกไข่เกิดขึ้น และจากกระบือที่ศึกษาได้จำนวนการตกไข่ทั้งหมด 16 ใบ คิดเป็นเพียง 2 ใบต่อตัวเท่านั้น Chantaraprateep และคณะ (1988) รายงานการตอบสนองของกระบือปลักต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ขนาด 32 หรือ 50 มก เท่ากับ 2-8 ใบ ส่วนฮอร์โมน พี เอ็ม เอส จี ได้เท่ากับ 3-7 ใบ เช่นเดียวกับ Sophon และคณะ (1989) รายงานไว้เท่ากับ 2-7 ใบ จากการกระตุ้นกระบือปลัก หรือกระบือมูร่าห์ หรือกระบือลูกผสม ในขณะที่ Kobayashi *et al.* (1990) ได้ทำการศึกษาในประเทศไทยและรายงานไว้ในกระบือมูร่าห์เท่ากับ 11 ใบ (4-15 ใบ) อย่างไรก็ตามผลการตอบสนองในกระบือหลังวัยเจริญพันธุ์ส่วนใหญ่มาจากการคาดคะเนโดยการล้วงตรวจคลำผ่านทางทวารหนัก การตรวจสอบในการศึกษาครั้งนี้ให้ความแม่นยำมากกว่าเนื่องจากทำการผ่าตัดเปิดช่องท้องดูโดยตรง ดังนั้นจากการศึกษานี้จึงชี้ให้เห็นชัดว่าการใช้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินฉีดในลูกกระบือปลักน่าจะให้จำนวนฟอลลิเคิลมากกว่าหรือเท่ากับที่กระตุ้นได้จากแม่กระบือ นอกจากนี้เป็นที่น่าสังเกตว่า อัตราการตอบสนองดังกล่าวไม่ว่าจะใช้การกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช หรือ พี เอ็ม เอส จี ก่อน ไม่มีผลต่อการกระตุ้นครั้งที่ 2

การตอบสนองของรังไข่ต่อการฉีดฮอร์โมนทั้ง เอฟ เอส เอช หรือ พี เอ็ม เอส จี ในลูกกระบือปลักต่ำกว่าผลการตอบสนองที่ได้จากเอกสารอ้างอิงในลูกโค (Jainudeen *et al.*, 1966; Onuma *et al.*, 1969; Irvine *et al.*, 1994) การศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Le-Van และคณะ (1993) พบว่าการตอบสนองของการฉีดฮอร์โมนเพื่อเพิ่มการตกไข่ในลูกกระบืออายุ 4-9 เดือนจะต่ำกว่าเมื่อเทียบกับลูกโคอายุใกล้เคียงกัน จำนวนของฟอลลิเคิลชนิด antral ในลูกกระบือน้อยกว่าถึง 3 เท่า (43 ในลูกกระบือเทียบกับ 117 ฟอลลิเคิลในลูกโค) รวมทั้งฟอลลิเคิลชนิดantral ขนาดใหญ่ก็แตกต่างกัน (28 ฟอลลิเคิลในกระบือเทียบกับ 99 ฟอลลิเคิลในลูกโค) จากประชากรของฟอลลิเคิลดังกล่าวจึงเป็นความเป็นจริงของการตอบสนองที่ต่ำต่อการฉีดฮอร์โมนโกนาโดโทรปินที่มีรายงานทั่วไปในกระบือทั้งกระบือปลักและกระบือมูร่าห์

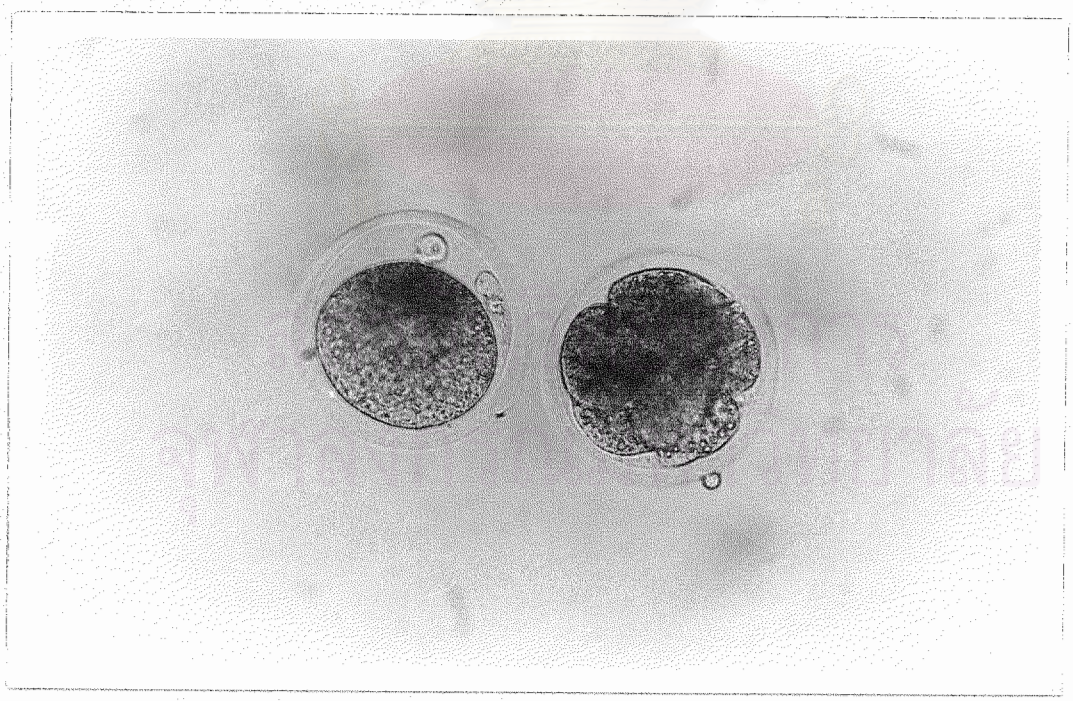
ในส่วนชนิดของโอโอไซต์ที่ได้ พบว่าโอโอไซต์ชนิด immature และโอโอไซต์ชนิด mature ไม่แตกต่างกันระหว่างการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนทั้งสองชนิด Armstrong และคณะ (1992) ได้รายงานเปอร์เซนต์ของโอโอไซต์ชนิด mature จากการฉีดฮอร์โมนชนิด เอฟ เอส เอช ขนาด 16 มก หรือ 24 มก ในลูกโคอายุ 5-6 สัปดาห์ เท่ากับ 43% ในการกระตุ้นครั้งแรกและ 70% ในการกระตุ้นครั้งที่สอง ซึ่งแตกต่างกับที่ได้ในลูกกระบือปลักในการทดลองครั้งนี้ ชนิดของโอโอไซต์

ที่ได้จะมีส่วนสำคัญหากนำไปทำการปฏิสนธินอกร่างกาย (ไอ วี เอฟ) โดยหากเป็นโอโอไซต์ชนิด immature ต้องใช้เวลาในการเลี้ยงประมาณ 24 ชม ในขณะที่หากเป็นชนิด mature จะใช้เวลาเพียง 4-6 ชม ในการเลี้ยงเท่านั้น จากการเลี้ยงโอโอไซต์ชนิด immature เป็นเวลา 24-25 ชม ได้อัตราของการเกิด maturation เท่ากับ 52% ที่โครโมโซมเจริญถึงขั้น metaphase II อัตราการเกิด maturation นี้ต่ำกว่าที่รายงานโดย Chuangsoongneon และ Kamonpatana (1991) ที่รายงานไว้ 82% ของโอโอไซต์ที่เจาะจากรังไข่ของแม่กระบือปลักจากโรงฆ่าสัตว์ หรือ 65-80% ในแม่กระบือมูร่าห์ (Madan *et al.*, 1994) การเลี้ยงโอโอไซต์ในการศึกษานี้พบว่า 23% อยู่ในระยะที่เกือบถึงระยะ metaphase II ดังนั้นหากปรับปรุงสภาวะการเกิด maturation ให้เหมาะสมมากขึ้น อาทิเช่น การเติมเซลล์กรานูโลซ่า หรือเซลล์คิวมูลัสในน้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์ จะช่วยเพิ่มอัตราการเกิด maturation อย่างน้อยเพิ่มขึ้น 10% (วันเพ็ญและมงคล, 2537) หรือการปรับเวลาในการเลี้ยงโอโอไซต์ขณะอยู่นอกร่างกายให้เหมาะสมมากขึ้น (Chuangsoongneon and Kamonpatana, 1991) หรือการปรับความเข้มข้นของแหล่งโปรตีน ชนิด bovine serum albumin หรือ ซีรั่ม (Madan *et al.*, 1994) เป็นต้น อย่างไรก็ตามจุดสำคัญอีกจุดหนึ่งของการตรวจสอบความสมบูรณ์ของการเกิด maturation ขณะอยู่นอกร่างกาย คือการนำเอาโอโอไซต์ไปทำการปฏิสนธินอกร่างกาย แล้วตรวจการเกิดการปฏิสนธิและการพัฒนาของตัวอ่อน ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ดำเนินการศึกษาเบื้องต้นโดยนำโอโอไซต์ชนิด immature มาเลี้ยงนาน 24 ชม แล้วนำไปปฏิสนธิกับตัวอสุจิจากพ่อกระบือ จากการทดลองนำร่องจำนวน 4-5 ครั้ง พบว่าตัวอสุจิสามารถเกาะติดกับผนังโอโอไซต์และมีโอโอไซต์จำนวนหนึ่งที่เกิดการปฏิสนธิ ดังแสดงในรูปที่ 10 และ 11

จากงานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยได้เสนอแนวทางของการใช้โอโอไซต์จากการกระตุ้นรังไข่ลูกกระบือปลักหลังหย่านมด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน แล้วดูดเก็บโอโอไซต์มาทำการเลี้ยงให้เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ หลังจากนั้นมาปฏิสนธินอกร่างกายจนถึงระยะของตัวอ่อนที่เหมาะแก่การย้ายฝากได้ จึงนำไปฝากในกระบือแม่พันธุ์ตัวรับให้เกิดการตั้งท้องและคลอดลูกได้ แนวทางดังกล่าวอาจเป็นหนทางของการแก้ปัญหาของการผลิตตัวอ่อนในกระบือ ที่มีผู้รายงานถึงผลผลิตของจำนวนตัวอ่อนที่ได้จากการกระตุ้นการเพิ่มการตกไข่อยู่ในเกณฑ์ต่ำมาก (Prakash et al. 1992; Chantaraprateep et al. 1988)



รูปที่ 10 โอโอไซต์หลังทำการปฏิสนธินอกร่างกาย มีตัวอสุจิเกาะรอบ (ศรชี้)



รูปที่ 11 ตัวอ่อนระยะประมาณ 8 เซลล์ (ข้างซ้าย) ที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกาย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

- จุรีรัตน์ เอี่ยมวิทยากร วิบูลย์ เยี่ยงวิศวกูร มาลี อภิเมธีธำรง ยันต์ สุขวงศ์ และ ซาโตชิ ซาอิโต 2537 ประสิทธิภาพของยาและวิธีการให้ยาเร่งการตกไข่ต่อการผลิตตัวอ่อนในโค นม. ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการสัตวแพทยสมาคม ครั้งที่ 21 สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ โรงแรมดิเอมเอมรัลด์ กรุงเทพฯ 28-30 พฤศจิกายน 2537. หน้า 62-69.
- วันเพ็ญ ศรีอนันต์ และ มงคล เตชะกำพุ. 2537. ผลของการเติมเซลล์กรานูโลซ่าและซีรั่มต่ออัตราการเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์สุกร. ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการสัตวแพทยสมาคม ครั้งที่ 21 สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ โรงแรมดิเอมเมอรัลด์ กรุงเทพฯ, 28-30 พฤจิกายน 2537 หน้า 195-201.
- Alexiev, A., Vlahov, K., Karaivanov, C.H., Kacheva, D., Polykhronov, O., Petrov, M., Nikolov, N., Drogoev., A. and Radev, P. 1988. Embryo transfer in buffaloes in Bulgaria. Proceeding of the 2nd World Buffalo Congress. Vol II Part. II: 591-595.
- 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(4):667-678.
- Bodhipaksha, P., Kamonpatana, M., Chantaraprateep, P., Kunavongkrit, A. and Luvira, Y. 1978. The study for improvement of reproduction of the Thai buffalo. Res. Proj. supported by Rajadapiseksompot Research Fund, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, 107 pages. (in Thai)
- Chantaraprateep, P., Lohachit, C., Kobayashi, G., Techakumphu, M., Virakul, P., Kunavongkrit, A. and Prateep, P. 1988. Ovarian responses to gonadotropin stimulation in swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). Buffalo Bullentin. 7(4):82-86.
- Chaudhary, Z, I. and Saga, F.H. 1990. Growth of limb bones in Ravi-Nili buffalo calves. Pakistan J. Zool. 22(3):245-248.
- Chuangsoongneon, U. and Kamonpatana, M. 1991. Oocyte maturation, *in vitro* fertilization and culture system for developing preimplantation swamp buffalo embryos using frozen thawed semen. Buffalo J. 7(2):189-198.
- Erickson, B.H. 1966. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. J. Anim. Sci. 24(3): 800.

- Fayer-Hosken, R.A. and Caulde, A.B. 1991. The laparoscope in follicular oocyte collection and gamate intrafallopian transfer and fertilization (GIFT). Theriogenology. 36(5):709-725.
- Intaramongkol, J. and Intaramongkol, S. 1992. Genetic improvement of Thai swamp buffalo. Report of Surin Livestock Breeding and Research Center.16 p.
- Irvine, B.J., Earl, C. R., Armstrong, D.T. and Seamark, R.F. 1994. Effects of hormonal treatment and interval between treatment on follicle development in calves. Theriogenology. 41(1):221. (Abstr.)
- Jainudeen, M.R., Hafez, E.S.E. and Lineweaver, J.A. 1966. Superovulation in the calf. J. Reprod. Fertil. 12:149-153.
- Kajihara, Y., Blakewood, E.G., Myers, M.W., Kometani, N., Goto, K. and Godke, R.A. 1991. *In vitro* maturation of follicular oocytes obtained from calves. Theriogenology. 35(1):220. (Abstr.)
- Kobayashi, G., Techakumphu, M. and Eiamvitayakorn, J. 1990. Ovarian response to pregnant mare gonadotrophin in murrah buffalo. Proceeding of the 7th Congress of FAVA, Pattaya, Thailand 4-7 November 1990. p 694-700.
- Le-Van, T., Nguyen, B.X., Son, H.N. and Driancourt, M.A. 1993. Superovulation and ovarian follicular population of juvenile buffaloes and calves. Anim. Reprod. Sci. 35(3-4): 191-199.
- Looney, C.R., Lindsey, B.R., Gonseth, C.L. and Johnson, D.L. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. Theriogenology. 41(1):67-72.
- McCool, C.J. and Entwistle, K.W. 1989. The development of puberty and sexual maturity in the Australian swamp buffalo bull. Theriogenology. 32(2):171-184.
- Madan, M.L., Chauhan, M.S., Singla, S.K. and Manik, R.S. 1994. Pregnancies established from water buffalo (*Bubalus bubalis*) blastocysts derived from *in vitro* matured, in *vitro* fertilized oocytes and co-cultured with cumulus and oviductal cells. Theriogenology. 42(4):591-600.
- Manik, R.S., Ambrose, J.D., Singla, S.K., Chauhan, M.S. and Madan, M.L. 1994. Real time ultrasound evaluation of follicular changes in superovulated murrah buffaloes. Buffalo J. 10(2):139-146.
- Marden, W.G.R. 1953. The hormone control of ovulation in the calf. J. Agri. Sci. 43:381-412.

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

- Prakash, B.S., Singla, S.K. Ambrose, J.D. Jailkhani, S. and Madan, M.L. 1992. Assessment of superovulatory response in terms of palpable corpora lutea and embryo recovery using milk progesterone. Theriogenology. 37(4):897-905.

- Salama, M.A.M., Mokhless, E.M. and Barkawi, A.H. 1994. Pubertal performance of Egyptian buffalo heifers. Buffalo J. 10(1):61-66.

- Sophon, S., Parnpai, R. and Kamonpatana, M. 1989. Multiovulation leading to embryo transfer in buffaloes; Using PMSG and FSH under oestrous regulation by Norgestomet. Buffalo J. 5(1):85-98.

-Sirard, M.A. and Lambert, R.D. 1985. *In vitro* fertilization of bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy. Biol. Reprod. 33:487-494.

- Singh, M., Sodhi, H.S., Matharoo, J.S., Shama, R.D., Takkar, O.P., Karainov, K.C. and Alexiev, A. 1988. Embryo transfer in buffalo: I. Response of various hormone regimens on superovulation. Proceeding of the 2nd World Buffalo Congress. Vol. I:106.

- Torner, H., Hannelore, A. and Goristanov, I. 1992. IVM/IVF of calf oocytes. 12th Int. Congress on Animal Reproduction. August 23-27, 1992, Hague, Netherlands, p. 656-658.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Chulalinet
3 0021 00216993 6

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย