บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง

ลูกโคพื้นเมืองเพศเมียก่อนวัยเจริญพันธุ์ อายุ 4-6 เดือนน้ำหนักประมาณ 50-70 กก จำนวน 10 ตัว โดยนำมาเลี้ยงไว้ที่ศูนย์ฝึกนิสิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดนครปฐมและทำการตรวจสุขภาพพร้อมทั้งถ่ายพยาธิให้เรียบร้อยก่อนทำการทดลอง ประมาณ 1 เดือน (รูปที่ 2.1 และ 2.2) หลังจากนั้นทำการสุ่มแบ่งลูกโคออกเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่ม A และ กลุ่ม B โดยแบ่งกลุ่มละ 5 ตัว

ฮอร์โมนที่ใช้ในการทดลองและโปรแกรมการกระตุ้น (รูปที่ 2.3)

1. ฮอร์โมน เอฟ เอส เอช (FSH*, Follicle Stimulating Hormones) ขนาด 192 มก แบ่งฉีดเข้ากล้ามเนื้อวันละ 2 ครั้ง เช้าเวลา 7.00 น. และเย็นเวลา 19.00 น. ห่างกัน 12 ชม ติดต่อกันเป็นเวลา 4 วัน (32/32,24/24,24/24และ 16/16 มก. ตามลำดับ)

2. ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน(Progesterone**) ฝังที่ใบหูลูกโคตั้งแต่วันแรกที่เริ่มโปรแกรม และถอนออกในวันที่ 4 หลังจากการฝัง

3. ฮอร์โมน เอช ซี จี (Human Chorionic Gonadotropin***) ขนาด 500 ไอยู ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ 24 ชม. ก่อนการผ่าตัดเก็บโอโอไซต์เฉพาะในลูกโคกลุ่ม A แต่ไม่ได้ฉีดใน ลูกโคกลุ่ม B และเมื่อเริ่มโปรแกรมการกระตุ้นฮอร์โมนครั้งที่ 2,3 และ 4 มีการสลับกลุ่มการฉีดฮอร์โมน

4. โปรแกรมการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นการสร้างฟอลลิเคิล ด้วยฮอร์โมน เอฟ เอส เอช (ตารางที่ 2.1 และรูปที่ 2.4)

---

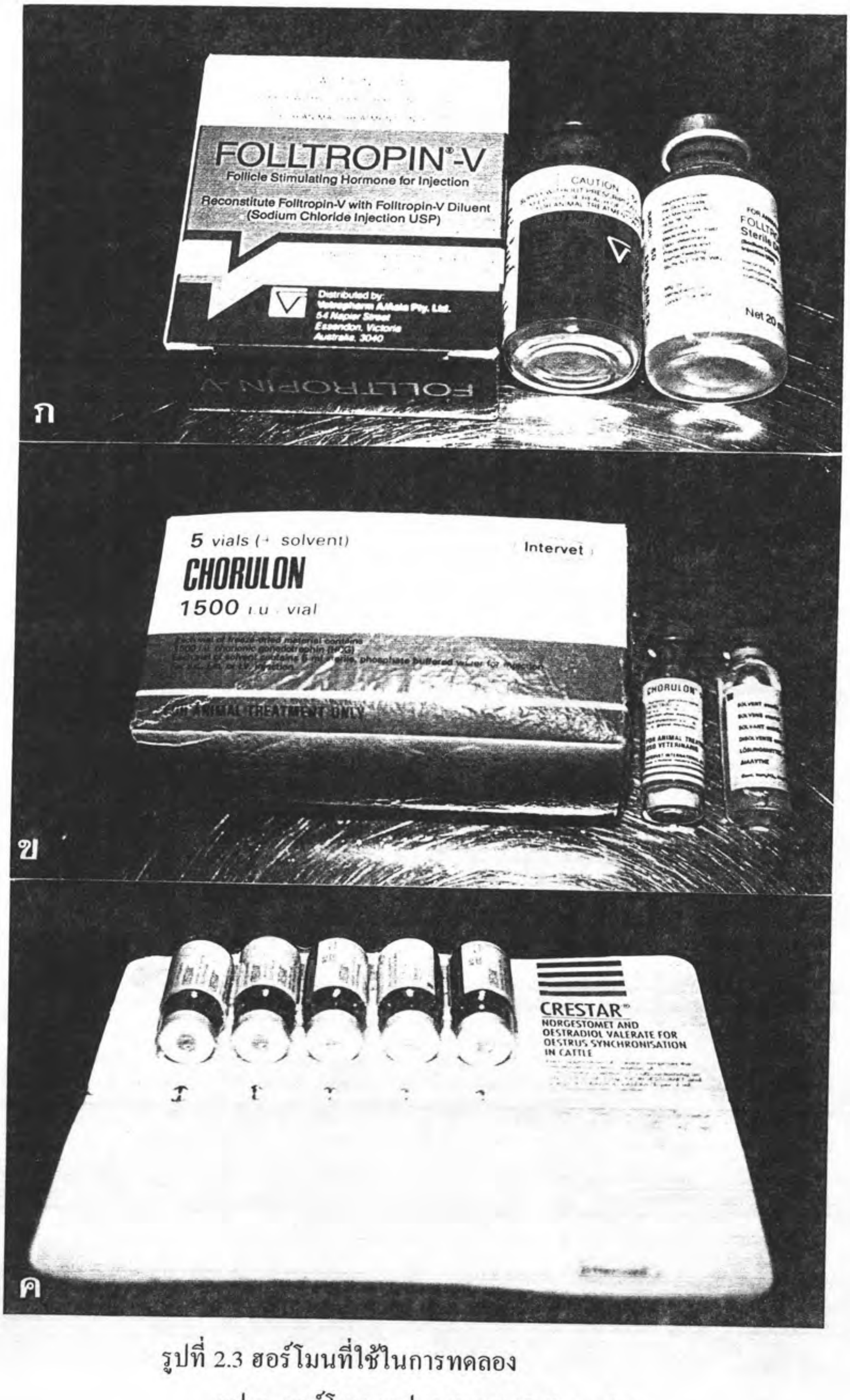
*Folltropin® -V : Vetepharm,Canada

**Crestar® : Intervet, Holland

***Chorulon® : Intervet, Holland

รูปที่ 2.1 ลูกโคพื้นเมืองไทยก่อนวัยเจริญพันธุ์ที่เลี้ยงไว้ใช้ในการทดลอง

รูปที่ 2.2 การตรวจสุขภาพและชั่งน้ำหนักลูกโคก่อนเริ่มการทดลอง



รูปที่ 2.3 ฮอร์โมนที่ใช้ในการทดลอง

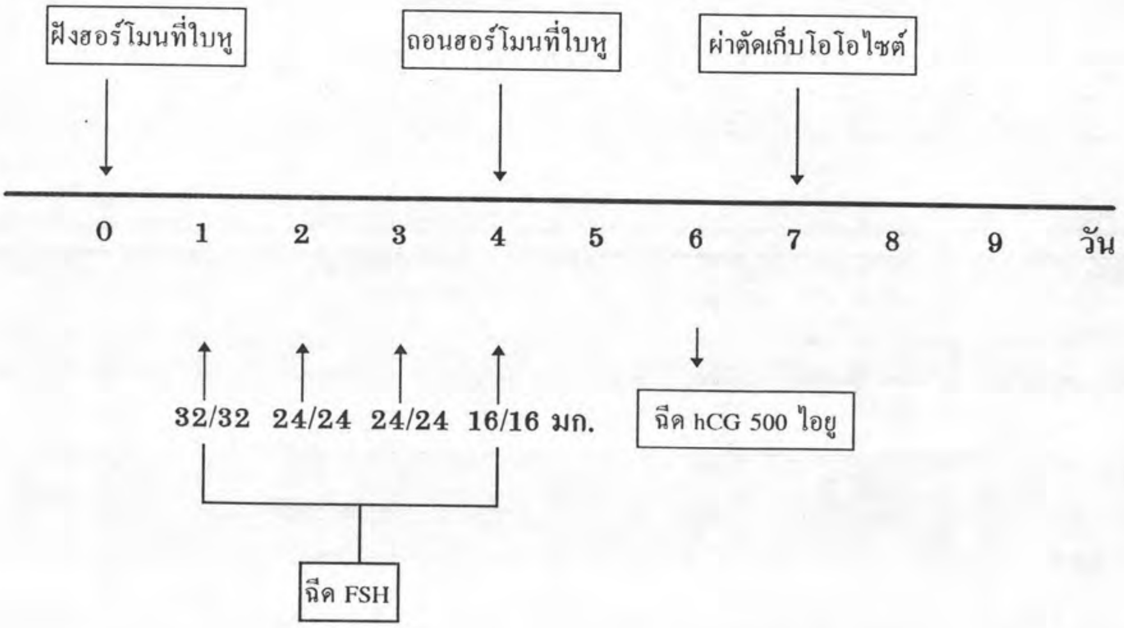
รูป ก. ฮอร์โมน เอฟ เอส เอช (Follotropin)

รูป ข. ฮอร์โมน เอช ซี จี (Chorulon)

รูป ค. ฮอร์โมน โปรเจสเตอร์โรนสำหรับฝังหู

ตารางที่ 2.1 : แสดงโปรแกรมการฉีดกระตุ้นลูกโคด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน

วันที่	โปรแกรมฮอร์โมน
0	ฝังฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรน(Progesterone) ใต้ผิวหนังด้านหลังของใบหูส่วนนอก
1	ฉีด FSH 32/32 มก. เช้า/เย็น
2	ฉีด FSH 24/24 มก. เช้า/เย็น
3	ฉีด FSH 24/24 มก. เช้า/เย็น
4	ฉีด FSH 16/16 มก. เช้า/เย็น และถอนฮอร์โมนฝังใบหูออกเวลา 12.00 น.
6	ฉีดฮอร์โมน เอช ซี จี 500 ไอยู เวลา 10.00น. เฉพาะลูกโคที่อยู่ในกลุ่มทดลอง A
7	ผ่าตัดเก็บโอโอไซต์ เวลา 10.00 น.(60 ชั่วโมงหลังฉีดฮอร์โมนเอฟ เอส เอช เข็มสุดท้าย)



รูปที่ 2.4 แผนภาพแสดงโปรแกรมการฉีดฮอร์โมนเพื่อกระตุ้นการสร้างฟอลลิเคิล

5. การฉีดฮอร์โมนกระตุ้นซ้ำ

ทำการฉีดกระตุ้นฮอร์โมนเพื่อผ่าตัดเก็บโอโอไซต์ซ้ำเป็นครั้งที่ 2 , 3 และ 4 โดยมีระยะเวลากระตุ้นห่างกันครั้งละประมาณ 6-8 สัปดาห์ โดยลูกโค 1 ตัวจะได้รับการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นและผ่าตัดจำนวนทั้งหมด 4 ครั้ง โดยสลับกลุ่มทดลองชนิดแผนการทดลองแบบสลับเมื่อมี 2 กลุ่มทดลอง(Change over design) รายละเอียดแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 : แสดงการเปลี่ยนกลุ่มทดลองในการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นซ้ำ

	กลุ่มทดลอง A (FSH+hCG)	**กลุ่มทดลอง B** (FSH)
	ลูกโคกลุ่มที่	
กระตุ้นฮอร์โมนครั้งที่ 1	1	2
กระตุ้นฮอร์โมนครั้งที่ 2	2	1
กระตุ้นฮอร์โมนครั้งที่ 3	1	2
กระตุ้นฮอร์โมนครั้งที่ 4	2	1

หมายเหตุ : ระยะห่างของการกระตุ้นแต่ละครั้ง ประมาณ 6-8 สัปดาห์

<u>การเก็บโอโอไซต์</u>

เก็บโอโอไซต์โดยการผ่าตัดเก็บเปิดช่องท้อง(Caudal midline laparoscope) มีวิธีการดังนี้

1 .อดอาหารและน้ำลูกโคก่อนที่จะทำการผ่าตัด 24 ชั่วโมง

2. ฉีดยานำสลบด้วย Xylazine hydrochloride* ขนาด 0.2 มก/กก เข้ากล้ามเนื้อและอีก15 นาทีต่อมาฉีดยาสลบ Thiopental sodium** ขนาด 5 มก/กก เข้าเส้นเลือดดำใหญ่ที่คอ (Jugular vein) เมื่อเริ่มสลบแล้วสอดท่อ Endotracheal และต่อสายน้ำเกลือความเข้มข้น 0.9% เข้าเส้นเลือดดำที่ใบหู (Ear vein) ด้วย IV-catheter ***ขนาดเบอร์ 21 เพื่อใช้เติมยาสลบ Thiopental Sodium ความเข้มข้น 0.1% ปริมาณครั้งละเล็กน้อย เมื่อสัตว์เริ่มรู้สึกตัวในขณะทำการผ่าตัด จากนั้นนำลูกโคขึ้นโต๊ะผ่าตัดชนิดแฮนโนเวอร์ จัดท่าให้นอนหงายโดยให้ส่วนหัวลูกโคต่ำกว่าส่วนท้ายเล็กน้อย โกนขนเพื่อทำความสะอาดและฆ่าเชื้อบริเวณผนังท้องที่จะกรีดผ่า(รูปที่ 2.5และ2.6)

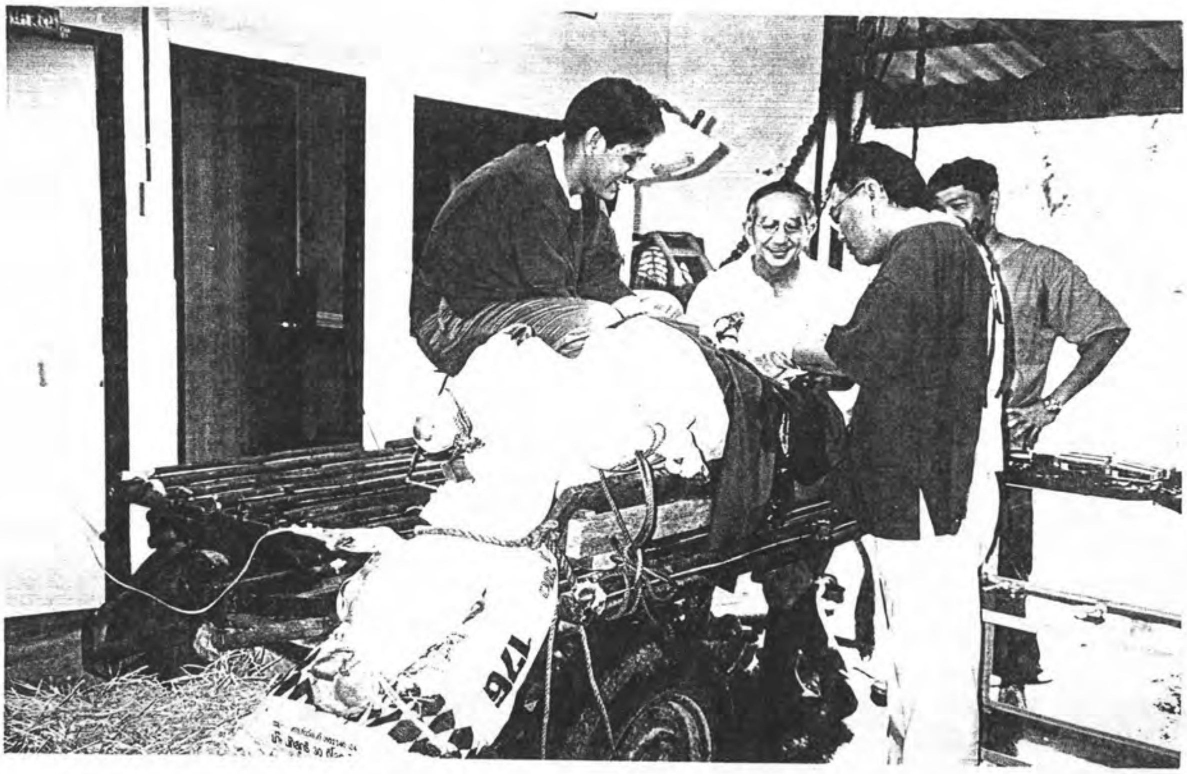
---

* Rompun® : Bayer, Vetchem, Korea

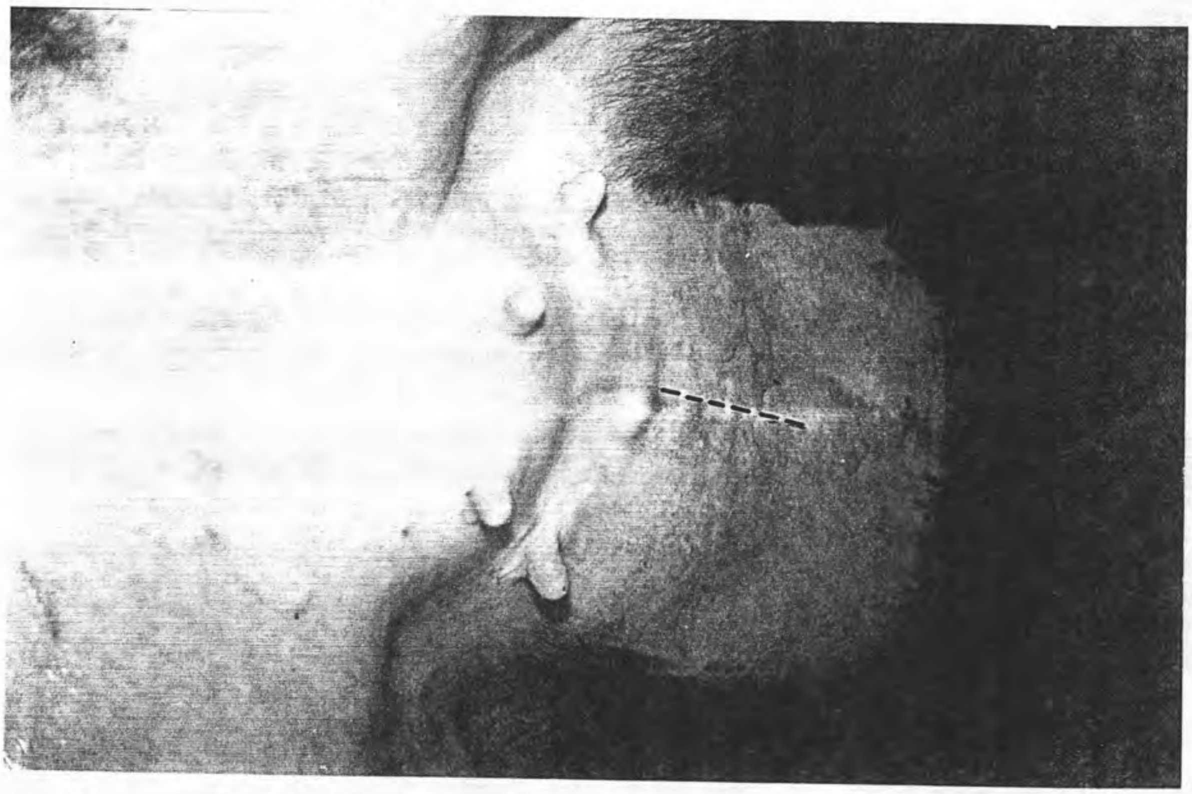
** Thiopental sodium® :Research of antibiotics and biotransformation ,Czech Replubic

***Insyte® : Deseret Medical , Utah , U.S.A.

ศูนย์หนังสือ สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.5 การเตรียมลูกโคนอนหงายท้องบนโต๊ะผ่าตัดชนิดแฮนโนเวอร์



รูปที่ 2.6 แสดงตำแหน่งเปิดผ่าช่องท้องบริเวณกลางลำตัวระหว่างเต้านมคู่หน้าและคู่หลัง

3. เปิดผ่าช่องท้องด้วยวิธี Caudal midline laparotomy ระหว่างเต้านมคู่หน้าและคู่หลัง ยาวประมาณ 15 ซม แล้วดึงจับคอมดลูกมาบริเวณปากแผลด้วยความระมัดระวัง ตรวจการตอบสนองของรังไข่ โดยการนับจำนวนฟอลลิเคิล และคอร์ปัส ฮีโมเรจีกัม รวมทั้งวัดขนาดของรังไข่และฟอลลิเคิลขนาดต่างๆทั้ง 2 ข้าง(รูปที่ 2.7) จากนั้นเจาะฟอลลิเคิลด้วยเข็มเบอร์ 19 ที่ต่อกับไซตริงขนาด 10 มล. (รูปที่ 2.8) ใส่ของเหลวที่ดูดได้ในหลอดทดลองที่บรรจุด้วย 1 มล. ของน้ำยา TCM 199* 2.5 mM hepes** แล้วเย็บปิดช่องท้องฉีดยาปฏิชีวนะต่อเนื่องอีก 3 วัน และเมื่อครบ 7 วันหลังผ่าตัดทำการตัดไหม นำของเหลวที่ได้จากการเจาะฟอลลิเคิลไปตรวจหาโอโอไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศ์ชนิดสเตอริโอ (Stereomicroscope) ที่กำลังขยาย 10X และคัดแบ่งโอโอไซต์ที่ได้ออกเป็น 2 ชนิดโดยดูจากจำนวนชั้นของเซลล์คูมูลัสที่ล้อมรอบดังนี้ (รูปที่ 2.9)

1.โอโอไซต์ที่เจริญไม่พร้อมปฏิสนธิ(Immature oocyte) เป็นโอโอไซต์ที่ไม่สามารถนำไปปฏิสนธิได้ทันที ซึ่งประกอบด้วย

1.1 โอโอไซต์ที่ไม่มีเซลล์คูมูลัสล้อมรอบ(Denude oocyte)

1.2 โอโอไซต์ที่ล้อมรอบด้วยเซลล์คูมูลัสเพียงบางส่วน (Partial cumulus oocyte)

1.3 โอโอไซต์ที่ล้อมรอบด้วยเซลล์คูมูลัสหลายชั้น (Compact cumulus oocyte)

2.โอโอไซต์ที่เจริญพร้อมปฏิสนธิ(matured oocytes) จะล้อมรอบด้วยเซลล์คูมูลัสที่แผ่ขยาย (Expanded cumulus oocyte)

3.โอโอไซต์ที่เสื่อมสภาพ(Degenerate oocyte)

<u>การเลี้ยงโอโอไซต์เพื่อให้พร้อมปฏิสนธิ</u> (<u>In vitro</u> maturation)

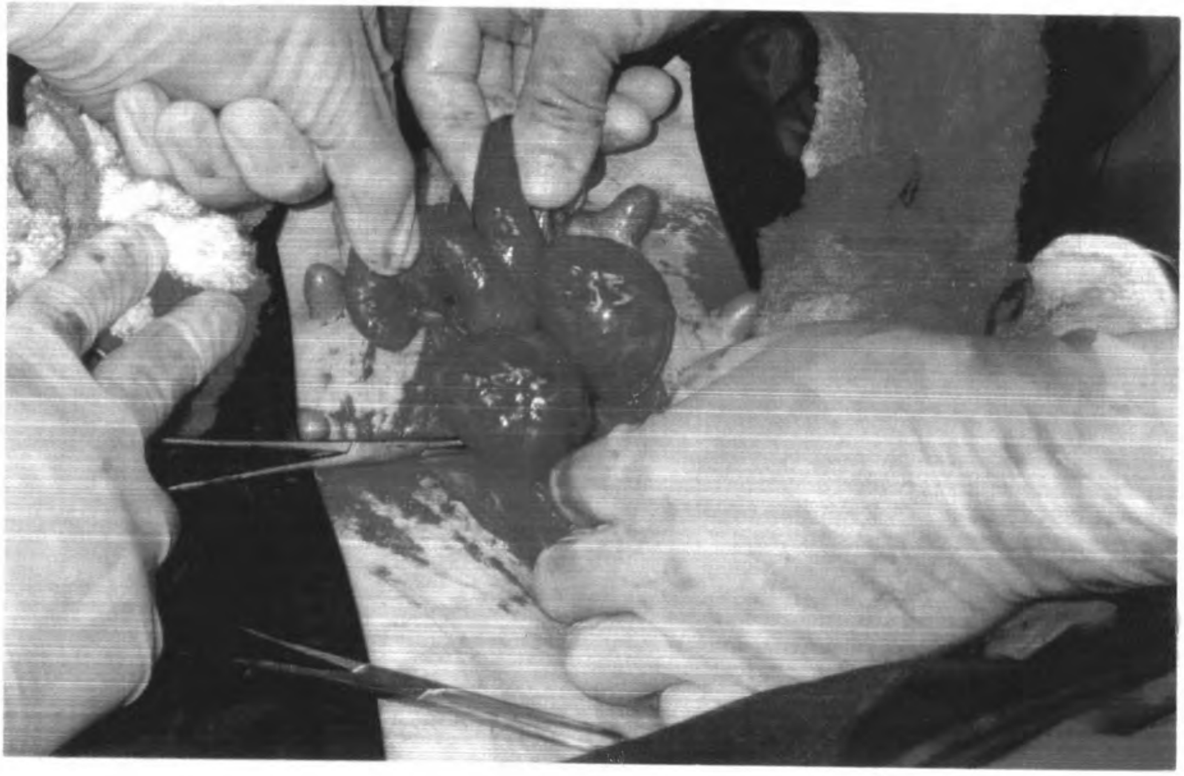
ทำการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ในรูปของการเลี้ยงร่วมกับเซลล์แกรนูโลซา (Co-culture)

1. การเตรียมเซลล์ กรานูโลซา(Granulosa cell) โดยนำน้ำยาที่เหลือจากการตรวจหาโอโอไซต์แล้ว มาปั่นแยกเอาเซลล์กรานูโลซาออก ด้วยความเร็ว 1500 รอบ นาน 10 นาที จากนั้นปั่นล้างเซลล์กรานูโลซาที่ได้อีก 2 ครั้งด้วยความเร็ว 1500 รอบ นาน 10 นาที ด้วยน้ำยาที่ใช้เพาะเลี้ยงโอโอไซต์ ดูดเซลล์กรานูโลซาที่ได้จำนวน 100 µl.ใส่ในน้ำยาเพาะเลี้ยงร่วมกับโอโอไซต์

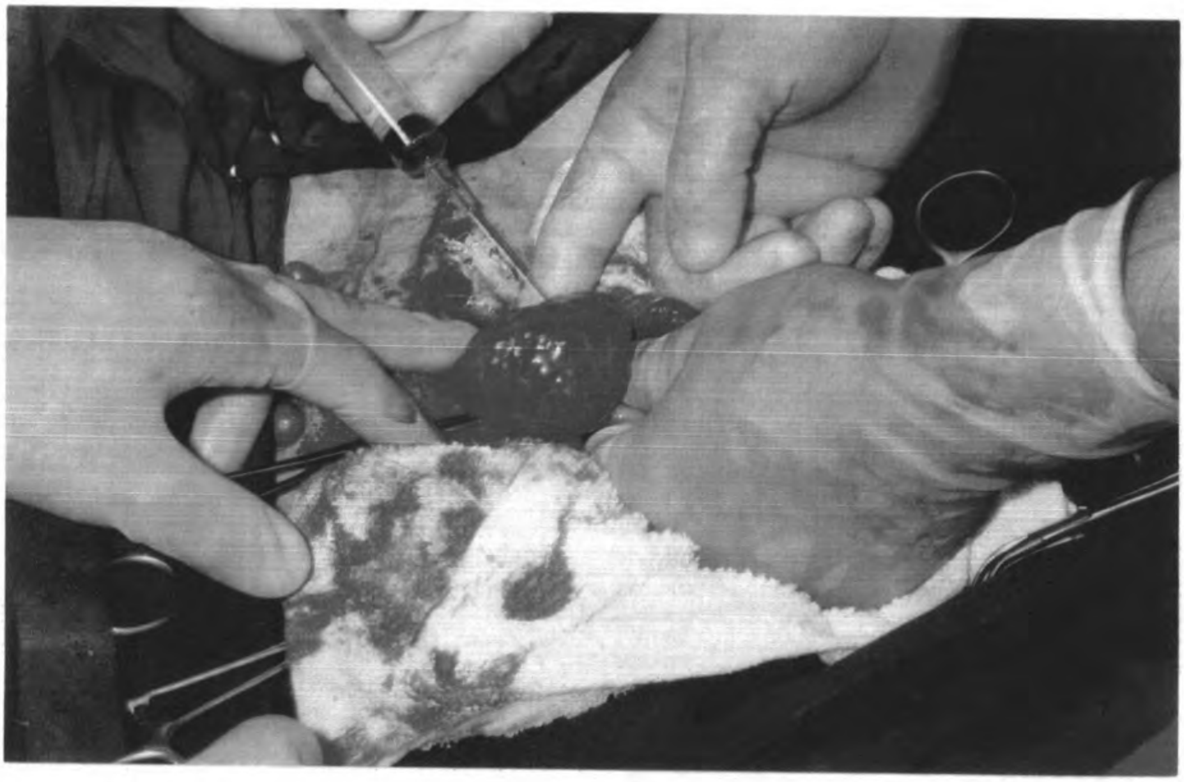
---

*TCM-199 : Tissu culture medium 199 : Gibgo RBL., U.S.A.

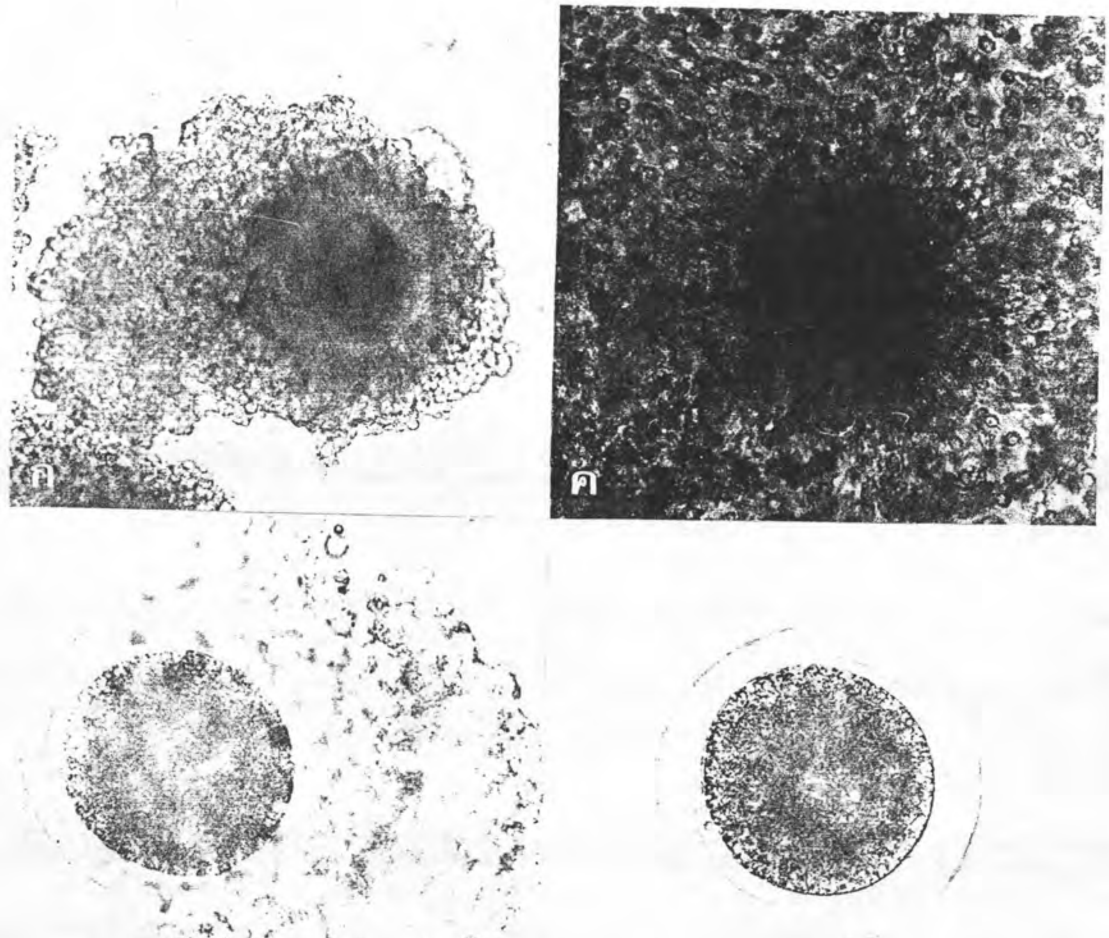
**Hepes : Sigma chemical co.,U.S.A.



รูปที่ 2.7 การเปิดผ่าช่องท้อง(Laparotomy)เพื่อตรวจการตอบสนองของรังไข่ต่อการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน (ศรชี้)



รูปที่ 2.8 การเจาะฟอลลิเคิลโดยใช้ไซริ้งค์ต่อกับเข็มเบอร์ 19



รูปที่ 2.9 แสดงชนิดของโอโอไซต์ที่เจาะได้จากลูกโค

ก. โอโอไซต์ที่มีเซลล์คูมูลัสหุ้มหนาแน่น(Compacted cumulus oocyte)

ข. โอโอไซต์ที่มีเซลล์คูมูลัสหุ้มบางส่วน(Partial cumulus oocyte)

ค. โอโอไซต์ที่มีเซลล์คูมูลัสแผ่ขยาย(Expanded cumulus oocyte)

ง. โอโอไซต์ที่ไม่มีเซลล์คูมูลัสหุ้ม(Denuded cumulus oocyte)

2 การเตรียมโอโอไซต์ในน้ำยาเพาะเลี้ยงเพื่อให้เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิ

ล้างโอโอไซต์ที่เจาะได้จากรังไข่ลูกโคจำนวน 3 ครั้งโดยล้างผ่านในน้ำยาครั้งละ 2 มล. ด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ชนิด TCM-199 +$NaHCO_3$ ที่เติม FSH/LH* (10 μg/ml) และ Estradiol-17β** (1 μg/ml) พร้อมด้วย 10% Fetal Calf Serum(FCS)*** จากนั้นเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ที่ยังไม่เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิในน้ำยาดังกล่าวร่วมกับเซลล์กรานูโลซาที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลานาน 24 ชม. และโอโอไซต์ที่เจริญพร้อมปฏิสนธิ เพื่อให้โอโอไซต์เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธินาน 4 ชม.

3 การตรวจสภาวะพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์

ตรวจดูสภาวะพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์หลังเพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงโดยดูจาก

3.1 มีการแผ่ขยายตัวของเซลล์คูมูลัส(cumulus expansion) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอกำลังขยาย 10X(รูปที่ 2.10)

3.2 ตรวจดูระยะของโครโมโซม(Chromosome) โดยทำการสุ่มตัวอย่างโอโอไซต์ประมาณ 10% ของจำนวนโอโอไซต์ที่เพาะเลี้ยง จากโอโอไซต์ทั้ง 2 กลุ่ม นำมาผ่านการ Fixation ด้วยน้ำยา acetic acid : absoluted alcohol (1:3) นาน 24 ชม.จากนั้นย้อมด้วยสี 1%aceto-orcein (รูปที่ 2.11) แล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศ์ชนิด phase contrast microscope โอโอไซต์ที่เจริญพร้อมปฏิสนธิ จะเห็นโครโมโซม อยู่ในระยะเมตาเฟส II (metaphase II) ของการแบ่งตัวแบบ ไมโอซิส(รูปที่ 2.12 และ 2.13)

<u>การปฏิสนธินอกร่างกาย</u>(**<u>In vitro</u> fertilization)**

1. การเตรียมตัวอสุจิ (รูปที่ 2.13)

ใช้น้ำเชื้อแช่แข็งจากโคพ่อพันธุ์**** ตัวเดียว และจากการผลิตครั้งเดียวกันตลอดการศึกษา โดยมีวิธีการเตรียมตัวอสุจิดังนี้

1.1. นำน้ำเชื้อแช่แข็งที่บรรจุในหลอดฟางขนาด 0.25 มล. ละลายในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เช็ดหลอดฟางและกรรไกรที่ใช้ตัดด้วย 70% แอลกอฮอลล์ จากนั้นตัดปลายหลอดฟางแล้วหยดน้ำเชื้อจำนวนเล็กน้อยเพื่อไปตรวจดูการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิหลังการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

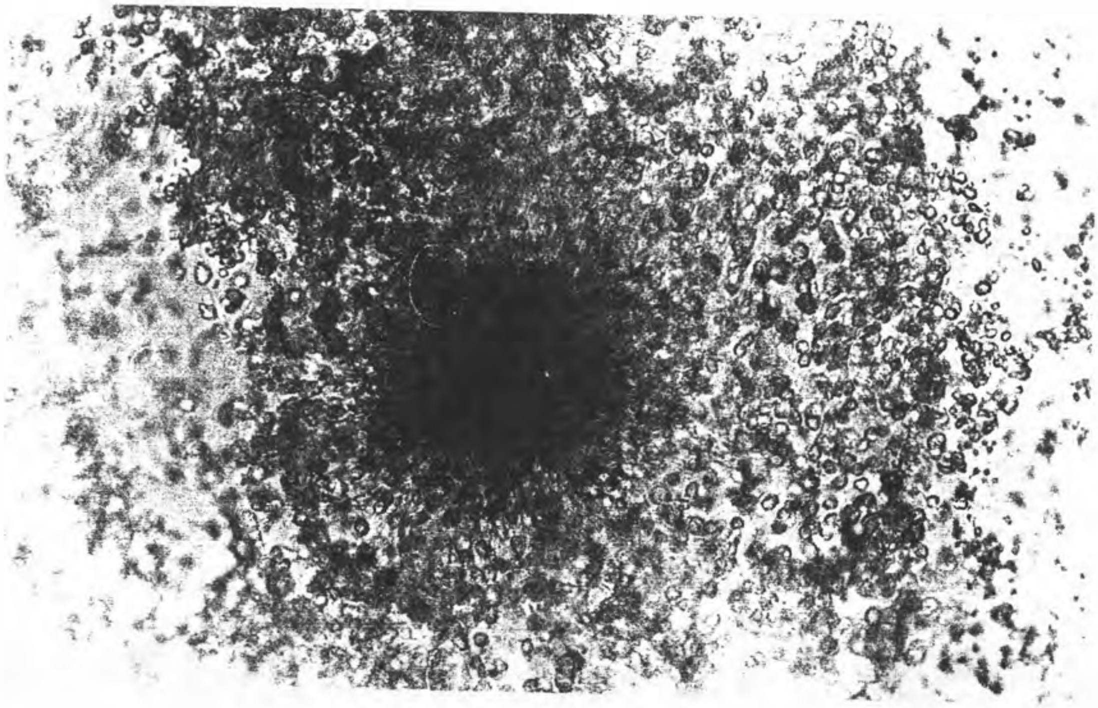
---

* Stimufol® : RHONE MERIEUX, France

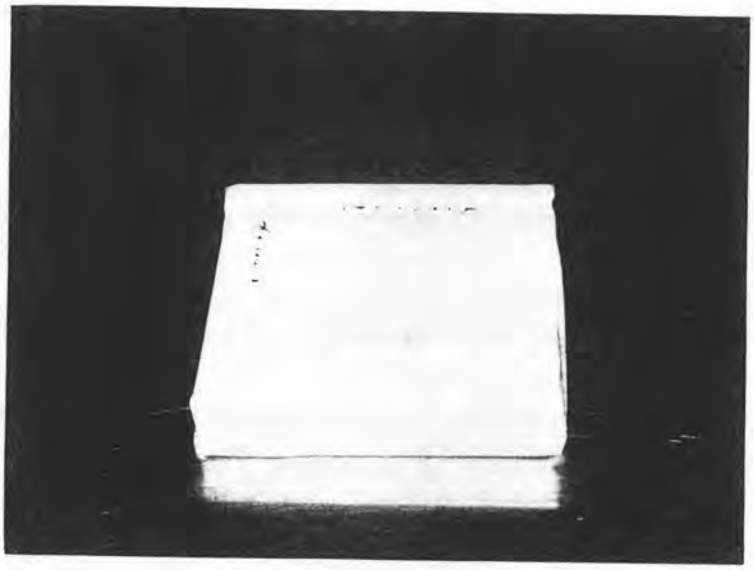
** Estradiol-17β : Sigma Chemical co. U.S.A.

*** Fetal Calf Serum : Gibco BRL. U.S.A.

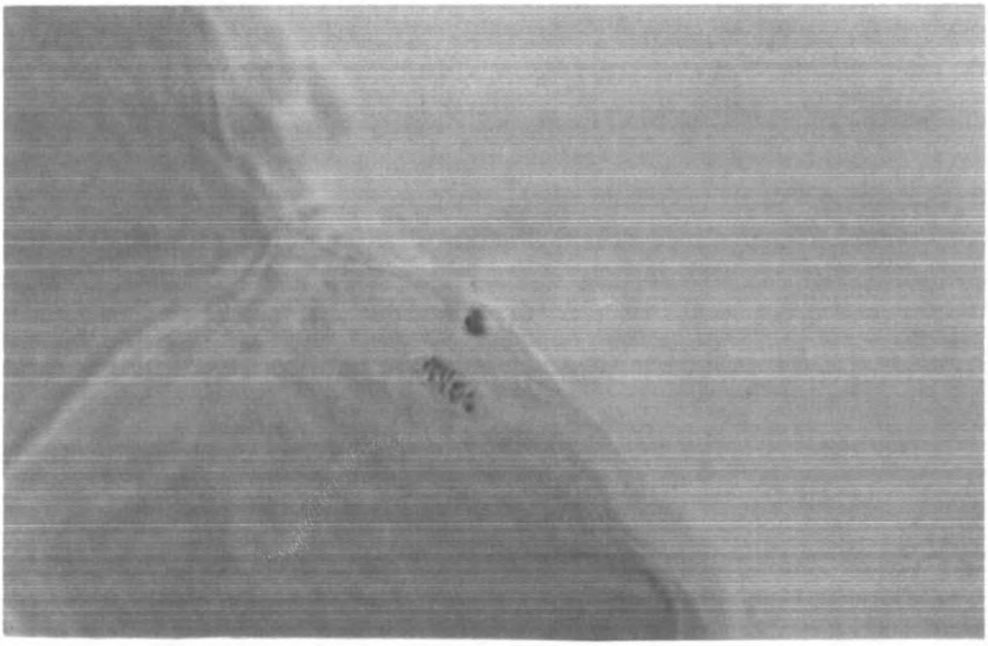
****1H583J 100% Holstien fresian, Japan : กรมปศุสัตว์



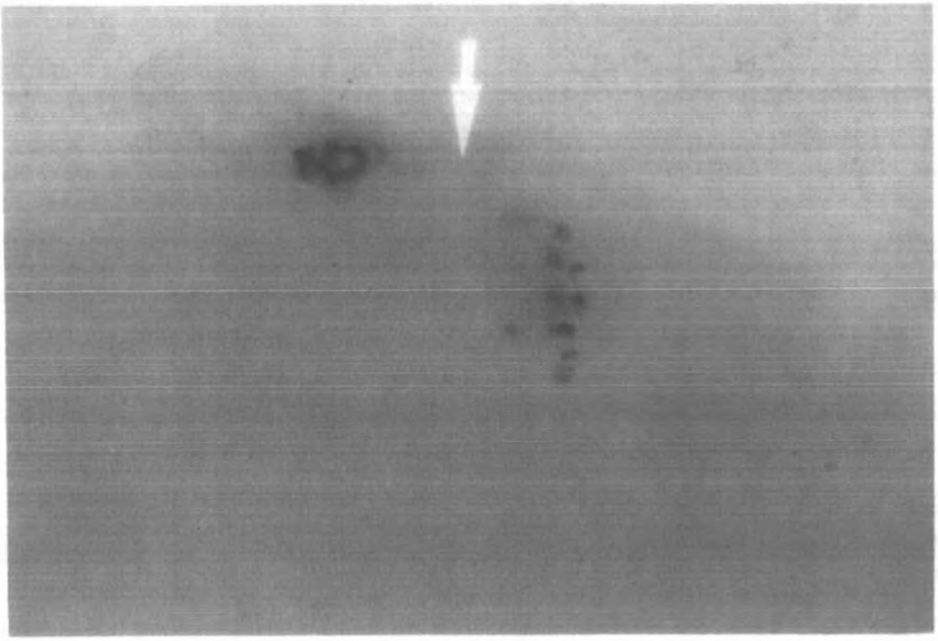
รูปที่ 2.10 โอโอไซต์ที่มีการแผ่ขยายตัวของเซลล์คูลัสหลังเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง



รูปที่ 2.11 การทำ Fixation ในสารละลายของ absoluted methanol ต่อ acetic acid อัตราส่วน 3:1



รูปที่ 2.12 โอโอไซต์ที่ผ่านการย้อมด้วยสี 1% Aceto-orcein



รูปที่ 2.13 ภาพขยายแสดงโอโอไซต์ที่มีโครโมโซมอยู่ในระยะเมตาเฟส 2
และมีโพลาร์บอดีที่ 1 (ศรชี้)

1.2 นำน้ำเชื้อส่วนที่เหลืออยู่ในหลอดหยดลงบริเวณก้นหลอดทดลองที่มีน้ำยา capacitation ชนิด TALP ปริมาตร 1 มล ที่เติม BSA fraction V 0.09 กรัม (ดูภาคผนวก) ที่มีความเป็นกรด-ด่าง7.2 ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างโดยใช้สารละลาย10% HCl และ 10% NaOH

1.3 ให้ตัวอสุจิที่แข็งแรงว่ายขึ้นสู่ผิวน้ำยา(Swimup) นาน 1 ชั่วโมง ในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ และความชื้นเต็มที่

1.4 แยกตัวอสุจิที่อยู่บริเวณส่วนบนของน้ำยาโดยใช้ micropipette ขนาด 1000 μl. ดูดน้ำยาส่วนบนออกโดยดูดอย่างเบาๆและระมัดระวังเพื่อไม่ให้ตะกอนของตัวอสุจิที่ตกตะกอนอยู่ฟุ้งกระจายขึ้นมาปนกับตัวอสุจิที่ต้องการ จากนั้นนำน้ำยาส่วนใสที่ได้ไปปั่นด้วยความเร็ว 1000 รอบ นาน 5 นาที เพื่อแยกตัวอสุจิแล้วดูดน้ำยาส่วนบนทิ้ง(supernatant) แยกเอาเฉพาะส่วนที่ เป็นตะกอน ไปตรวจดูการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิอีกครั้ง และคำนวณปริมาตรให้ได้ความเข้มข้นของตัวอสุจิเป็น 1 ล้านตัวต่อมิลลิลิตรเพื่อใช้ในการผสม

2. การปฏิสนธินอกร่างกาย

นำโอโอไซต์ที่เพาะเลี้ยงจนเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิแล้วมาล้างในน้ำยาที่ใช้สำหรับการปฏิสนธิชนิดTALPที่ประกอบด้วยสาร PHE (Penicillamine,Hypotaurine,Epinephrine) และเฮปาริน(Heparin) 10 μg/ml (วิธีเตรียมดูที่ภาคผนวก) ที่มีความเป็นกรด-ด่าง 7.6 ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างโดยใช้สารละลาย 10% HCl และ 10% NaOH จากนั้นผสมอสุจิที่ผ่านขบวนการเปลี่ยนแปลงส่วนหัวแล้ว ลงในโอโอไซต์ที่อยู่ในจานพลาสติกชนิด 4 หลุม (Nunc, Denmark) ที่มีโอโอไซต์อยู่ 15-20 ใบต่อหลุม ที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ และความชื้นเต็มที่ เป็นเวลานาน 18 ชั่วโมง

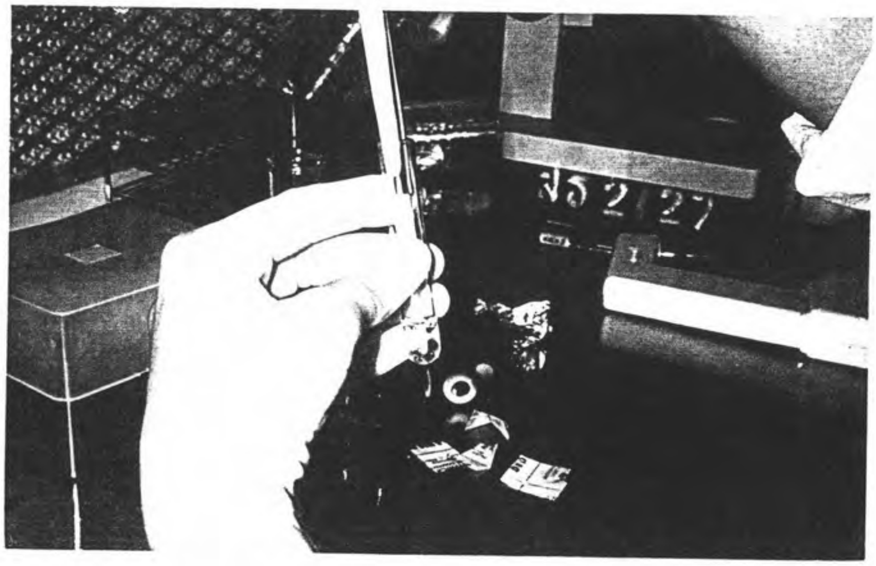
<u>การเลี้ยงตัวอ่อนหลังปฏิสนธินอกร่างกาย</u> **(<u>In vitro</u> culture)**

1. การเตรียมเซลล์ท่อนำไข่โค (Bovine Oviductal Epitherial Cell : BOEC)

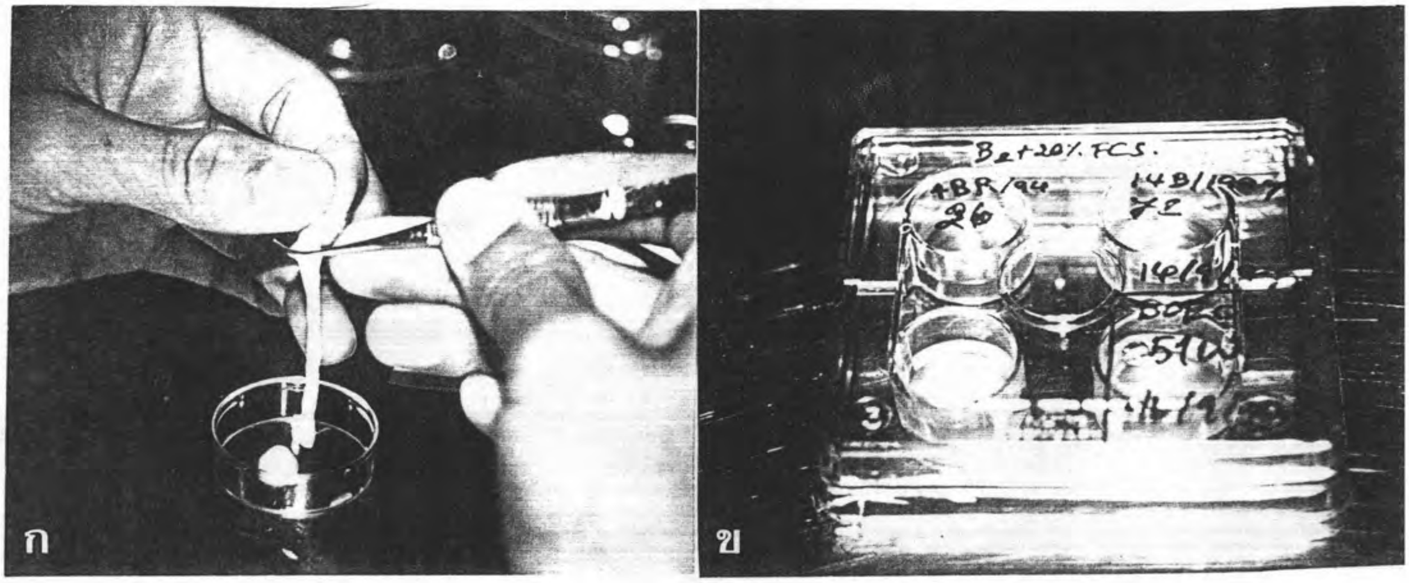
โดยนำท่อนำไข่ที่เลาะเอาเนื้อเยื่ออื่นออกแล้วมาล้างแอลกอฮอล์ 70% และตามด้วยน้ำเกลือเข้มข้น 0.9% จากนั้นบรรจุน้ำยา Hank' s solution ในท่อนำไข่ให้เต็มแล้วใช้ forceps หนีบทั้งส่วนหัวและท้ายของท่อนำไข่ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศ ที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ นาน 30 นาที จากนั้นรีดเยื่อบุผิวในท่อนำไข่ออกมาแล้ว ปั่นล้างเซลล์ท่อนำไข่ที่ได้ด้วย Hank's solution 2 ครั้งที่ความเร็ว 2000 รอบ นาน 10 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง แล้วปั่นล้างซ้ำด้วยน้ำยาที่จะใช้เพาะเลี้ยงตัวอ่อน 2 ครั้ง (รูปที่ 2.14 และ 2.15)

2. เพาะเลี้ยงตัวอ่อนที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกาย

โดยเลี้ยงตัวอ่อนร่วมกับเซลล์จากท่อนำไข่โคในน้ำยาเพาะเลี้ยง B_2 ที่เติม 10% FCS (Fetal Calf Serum) ที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ในบรรยากาศที่มี 5% คาร์บอนไดออกไซด์ ความชื้นเต็มที่ ตรวจดูการแบ่งตัวของตัวอ่อนระยะ 2-4 เซลล์หลังจากผสมน้ำเชื้อแล้ว 48 ชั่วโมง



รูปที่ 2.14 วิธีการ SWIMUP ในน้ำยา Capacitation ของตัวอสุจิ



รูปที่ 2.15 การเตรียมเยื่อบุผิวท่อนำไข่ (Bovine Oviductal Epithelial Cell)

ก. วิธีการรีดเซลล์เยื่อบุผิวจากท่อนำไข่เพื่อนำไปเพาะเลี้ยง

ข. เพาะเลี้ยงเซลล์ท่อนำไข่ก่อนนำไปใช้เลี้ยงร่วมกับตัวอ่อน

<u>การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ</u>

แสดงผลการตอบสนองของรังไข่,จำนวนฟอลลิเคิลขนาดต่างๆ,จำนวนคอร์ปัส ฮีโมเรจิกัม และชนิดของโอโอไซต์ ด้วยค่าเฉลี่ย ± S.E.M. (Standard error of means) และอัตราส่วนเมื่อเทียบกับการตอบสนองทั้งหมด

เมื่อเปรียบเทียบผลดังกล่าวระหว่างกลุ่มทดลองที่ทำการฉีดฮอร์โมนทั้งสองกลุ่ม และผลการกระตุ้นซ้ำโดยการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เอส เอ เอส (SAS: Statistical analysis system) ชนิด Analysis of variance

แสดงผลการเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์และการแบ่งตัวของตัวอ่อนด้วยอัตราส่วนและเปรียบเทียบผลระหว่างชนิดของโอโอไซต์ด้วยการทดสอบเกี่ยวกับสัดส่วนของประชากร 2 ชุด (Two population proportions) โดยใช้สถิติชนิด T-test