จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนงบประมาณแผ่นดินประจำปี ๒๕๔๕

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การเก็บโอโอไซต์ด้วยการเจาะผ่านช่องคลอด โอพียู ในแม่กระบือปลักที่มีวงจรการเป็นสัดปกติและในแม่กระบือเลี้ยงลูก

โดย

มงคล เตชะกำพุ
เอกซาติ พรหมดิเรก
วันเพ็ญ ศรีอนันต์
จินดา สิงห์ลอ

จฬ
สพ 15
011706

มกราคม ๒๕๔๗

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2545 ของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ

- สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่สนับสนุนทุนแก่ นายเอกชาติ พรหมดิเรก นักศึกษาทุนปริญญาเอก กาญจนาภิเษก สาขาวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ ในการช่วยทำงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วง
- กองบำรุงพันธุ์ กรมปศุสัตว์ ที่ให้ความร่วมมือในด้านกระบือทดลอง
- บุคลากรของภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่ (ศ) สพ 15
เลขทะเบียน 011706
วัน,เดือน,ปี 2 พ.ย. 47

19 มี.ค. 2548

I21484089

ชื่อโครงการวิจัย การเก็บโอโอไซต์ด้วยการเจาะผ่านช่องคลอด โอพียู ในแม่กระบือปลักที่มีวงจรการเป็นสัดปกติและในแม่กระบือเลี้ยงลูก

ชื่อผู้ทำวิจัย มงคล เตชะกำพุ เอกชาติ พรหมดิเรก วันเพ็ญ ศรีอนันต์ จินดา สิงห์ลอ

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ มกราคม 2547

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อศึกษาการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีเข็มดูดเจาะต่อกับเครื่องมือคลื่นความถี่สูงในกระบือปลักไทยในกระบือที่ไม่ตั้งท้องและกระบือหลังคลอด โดยศึกษาจำนวนโอโอไซต์และชนิดของโอโอไซต์ที่เก็บได้ และผลกระทบของการเจาะรังไข่ด้วยวิธี OPU ต่อการทำงานของระบบสืบพันธุ์ ทำการศึกษาในกระบือไม่ตั้งท้อง จำนวน 5 ตัว และกระบือหลังคลอดประมาณ 3 เดือนจำนวน 6 ตัว แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่กระตุ้นด้วยฟอลลิเคิล สติมูเลติงฮอร์โมน ขนาด 400 มก. และกลุ่มที่ไม่ได้กระตุ้น ผลการศึกษาพบว่าการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนทำให้ได้จำนวนโอโอไซต์ที่มากกว่าในกระบือทั้งสองชนิดเมื่อเปรียบเทียบกับกระบือที่ไม่ได้ทำการกระตุ้น โดยได้ค่าเท่ากับ 3.7 $\pm$ 2.7 (n=112) เทียบกับ 1.4$\pm$1.3 (n=35) โอโอไซต์ต่อตัว ($P<0.05$) ในกลุ่มกระบือที่ไม่อุ้มท้อง และเท่ากับ 5.9$\pm$3.5 (n=196) เทียบกับ 0.7$\pm$0.8 (n=24) โอโอไซต์ต่อตัว ($P<0.05$) ในกลุ่มกระบือหลังคลอด โดยอัตราการเก็บโอโอไซต์ในกระบือทั้งสองกลุ่มเท่ากับ 50-60% โอโอไซต์ที่ได้มีลักษณะที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มรอบประมาณ 60-70% และจากการศึกษาผลกระทบหลังเจาะโดยติดตามการเจริญของฟอลลิเคิลทุกสัปดาห์ในกระบือ 4 ตัว พบว่าทุกสัปดาห์จะมีฟอลลิเคิลจำนวนหนึ่งที่เจริญขึ้นมาเท่ากับ 2.4$\pm$1.3 (n=75) ฟอลลิเคิลต่อตัว และสามารถเจาะเอาโอโอไซต์ได้ทุกสัปดาห์ เท่ากับ 1.2$\pm$1.3 (n=37) โอโอไซต์ต่อตัว และจากการติดตามการทำงานของรังไข่โดยตรวจจากการเจริญของฟอลลิเคิลด้วยเครื่องอัลตราซาวน์หลังสิ้นสุดการเจาะโอโอไซต์พบว่ากระบือ 3 ใน 4 ตัว มีการแสดงการพัฒนาเป็นคลื่น มีการเกิดฟอลลิเคิลชนิดโดมิแนนท์ประมาณ 15-16 วัน แสดงให้เห็นว่ารังไข่ยังคงมีการทำงานได้ตามปกติ จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสามารถเจาะเก็บโอโอไซต์จากรังไข่ของแม่กระบือที่ไม่อุ้มท้องและหลังคลอด ทั้งกระตุ้นและไม่กระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน รวมทั้งรังไข่มีฟอลลิเคิลที่เจริญปกติหลังเลิกเจาะ

คำสำคัญ: แม่กระบือปลักไม่อุ้มท้อง แม่กระบือปลักหลังคลอด โอพียู โอโอไซต์

Project title: Oocyte Recovery by Transvaginal Ultrasound-Guided Follicle Aspiration Technique in Cyclic and Lactating Swamp Buffalo Cows (*Bubalus bubalis*)

Name of investigators: Mongkol Techakumphu Akachart Promdireg Jinda Singlor

Year: January 2004

Abstract

The objective of the study was to compare oocyte quality and recovery rate from non pregnant and postpartum, swamp buffalo cows, after gonadotropin stimulation and non stimulation. The long term effect of post OPU on ovarian function, was investigated by daily ultrasonography. Ultrasound-guided, follicular aspirations (OPU) were performed on 5 non-pregnant and 6 early postpartum buffalo cows, every two weeks. For visualization of the ovaries and guidance of the aspiration needle, a 5.0 MHz transvaginal probe attached to a probe carrier, was inserted into the vagina. After penetration of the vaginal wall, the needle was inserted into the follicles. The follicular fluid, with oocytes were aspirated at a pressure of 80-100 mmHg. The buffaloes with two different reproductive statuses were given a total dose of with 400 mg Follicle Stimulating Hormone (FSH) over three days, in decreasing doses and 100 μg Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) intramuscularly, 24 h after the last FSH. Oocyte collections were made for 6 sessions in the FSH-treated animals in both of the non pregnant and postpartum cows. After a 2 week resting period, OPU was restarted for another 6 sessions in non stimulated animals. In the non pregnant group, the recovered oocytes numbered 3.7 ± 2.7(n=112), higher than in nontreated animals, 1.4 ± 1.3(n=35) ($P<0.05$), while in postpartum group, they were 9.0 ± 3.2(n=196), higher than in the non stimulated group, 0.7 ± 0.8 (n=24) ($P<0.05$). The oocyte recovery rates in both buffalo groups was around 50-60%. Sixty to seventy percent of recovered oocytes were classified as complex cumulus oocytes and single cumulus oocytes. After finishing OPU, it was found that follicle development occurred normally in all observed animals, with the appearance of a dominant follicle between15-16 days. In this study, it could be concluded that oocyte retreival by OPU can be performed in non-pregnant and early postpartum buffalo cows and the supplementation of FSH can increase the number of aspirated oocytes. No significant effect on ovarian function after long term OPU was seen in these buffaloes.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Key words: Non-pregnant, early postpartum, OPU, buffalo cows,

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	v
รายการประกอบตาราง	vi
รายการภาพประกอบ	vii
บทนำ	1
วัสดุและวิธีการวิจัย	8
ผลการทดลอง	13
การอภิปรายผลการทดลอง	34
เอกสารอ้างอิง	40

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการประกอบตาราง

ตารางที่ 1	1 จำนวนกระบือในประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ 2537-2543 (FAO, 1996)	1
ตารางที่ 2	การเก็บโอโอไซต์แบบ OPU ในโคและอัตราความสำเร็จ	5
ตารางที่ 3	ผลการศึกษา OPU-IVF จากแม่โคที่มีปัญหา (Problems cows)	7
ตารางที่ 4	โปรแกรมการกระตุ้นรังไข่ของกระบือทดลองกลุ่มที่ 1 และ 2	9
ตารางที่ 5	ผลเปรียบเทียบคุณภาพของโอโอไซต์ระหว่าง 280 มก. 2 วัน (2d) และ 3 วัน (3d) และ 400 มก. 3 วัน (3d)	14
ตารางที่ 6	ผลการตอบสนองของรังไข่แม่กระบือที่ไม่ตั้งท้อง ทั้งที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH และไม่ได้รับการกระตุ้น โดยจำแนกเป็นรายตัว	14
ตารางที่ 7	ผลการตอบสนองของรังไข่แม่กระบือหลังคลอดระยะแรก ทั้งที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH และไม่ได้รับการกระตุ้น โดยจำแนกเป็นรายตัว	15
ตารางที่ 8	ผลการตอบสนองของรังไข่แม่กระบือที่ไม่ตั้งท้อง ทั้งที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH และไม่ได้รับการกระตุ้น โดยจำแนกตามครั้งของการกระตุ้น	15
ตารางที่ 9	ผลการตอบสนองของรังไข่แม่กระบือหลังคลอดระยะแรก ทั้งที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH และไม่ได้รับการกระตุ้น โดยจำแนกตามครั้งของการกระตุ้น	16
ตารางที่ 10	ขนาดและจำนวนของฟอลลิเคิลของแม่กระบือจำแนกกลุ่มตามขนาดของฟอลลิเคิลออกเป็น ขนาดเล็ก(3-5 มม.) ขนาดกลาง(6-9 มม.) ขนาดใหญ่(>9 มม.)	17
ตารางที่ 11	อัตราการเก็บโอโอไซต์ในแม่กระบือที่ไม่ได้ตั้งท้องที่กระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH ด้วยวิธีOPU จำแนกตามแม่กระบือแต่ละตัว	18
ตารางที่ 12	อัตราการเก็บโอโอไซต์ในแม่กระบือที่ไม่ได้ตั้งท้องที่ไม่ได้กระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH ด้วยวิธี OPU จำแนกตามแม่กระบือแต่ละตัว	19
ตารางที่ 13	อัตราการเก็บโอโอไซต์ในแม่กระบือหลังคลอดระยะแรกที่กระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH ด้วยวิธี OPU จำแนกตามแม่กระบือแต่ละตัว	20

ตารางที่ 14	อัตราการเก็บโอโอไซต์ในแม่กระบือหลังคลอดระยะแรกที่ไม่ได้กระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH ด้วยวิธี OPU จำแนกตามแม่กระบือแต่ละตัว	21
ตารางที่ 15	สรุปผลการเก็บโอโอไซต์ในแม่กระบือด้วยวิธี OPU	22
ตารางที่ 16	ผลของการเก็บโอโอไซต์ในแม่กระบือหลังคลอดที่ไม่ได้กระตุ้นฮอร์โมนจำแนกตามครั้งที่ของการเก็บ	23
ตารางที่ 17	ผลของการเก็บโอโอไซต์ในแม่กระบือที่ไม่ตั้งท้องที่ไม่ได้กระตุ้นฮอร์โมนจำแนกตามครั้งที่ของการเก็บ	24
ตารางที่ 18	ผลของการเก็บโอโอไซต์ในแม่กระบือหลังคลอดที่กระตุ้นฮอร์โมนจำแนกตามครั้งที่ของการเก็บ	25
ตารางที่ 19	ผลของการเก็บโอโอไซต์ในแม่กระบือที่ไม่ได้ตั้งท้องที่กระตุ้นฮอร์โมนจำแนกตามครั้งที่ของการเก็บ	26
ตารางที่ 20	สรุปผลของการเก็บโอโอไซต์ในแม่กระบือจำแนกตามครั้งที่ของการเก็บ	27
ตารางที่ 21	ชนิดของโอโอไซต์ที่เก็บด้วยวิธี OPU ในแม่กระบือ	28
ตารางที่ 22	ผลการเก็บโอโอไซต์ในแม่กระบือหลังคลอดจำแนกตามจำนวนเดือนหลังคลอด	29
ตารางที่ 23	ตารางที่ 23 ผลการเจาะโอโอไซต์ทุกสัปดาห์จากฟอลลิเคิลที่มีการเกิดขึ้นมาใหม่ในกระบือทดลองที่ไม่ตั้งท้องและหลังคลอดรวมกัน	30
ตารางที่ 24	ผลการเจาะโอโอไซต์ในแต่ละสัปดาห์ในกระบือทดลองที่ไม่ตั้งท้องและหลังคลอด	31
ตารางที่ 25	ผลเปรียบเทียบของการเจาะโอโอไซต์ทุก 2 สัปดาห์และทุกสัปดาห์	32
ตารางที่ 26	ระยะห่างของคลื่นฟอลลิเคิลและอัตราการเจริญของฟอลลิเคิลชนิดโดมีแนนท์ในกระบือหลังเลิกเจาะรังไข่เพื่อเก็บโอโอไซต์	32

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

		หน้า
รูปที่ 1	จำนวนกระบือในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ 2537 ถึง 2543	2
รูปที่ 2	ฝูงกระบือทดลองที่ศูนย์ฝึกนิสิตคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นครปฐม	10
รูปที่ 3	แม่กระบือหลังคลอดประมาณ 3 เดือน ที่ใช้ในการเจาะรังไข่เพื่อเก็บโอโอไซต์	11

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการสัญลักษณ์

COC = Cumulus oocyte complexes

S = Single layers cumulus oocyte

P = Partial layers cumulus oocyte

EXP = Expanded cumulus oocyte

D = Denude oocyte

Deg = Degenerated

FZ = free zona

OPU = Ovum Pick Up

FSH = Follicle Stimulating Hormone

GnRH = Gonadotropin Releasing Hormone

PMSG = Pregnant Mare Serum Gonadotropin

HCl = Hydrochrolide

d = day

h = hour

กก. = กิโลกรัม

มก. มิลลิกรัม

มม. = มิลลิเมตร

มล. = มิลลิลิตร

ซม. = ชั่วโมง

ซม. เซนติเมตร

g = gauge

ไอยู = International Unit

ml = milliter

µl = ไมโครลิตร

µg = ไมโครกรัม

MHz = megahertz

mmHg = มิลลิเมตรปรอท

$P<0.05$ = significant

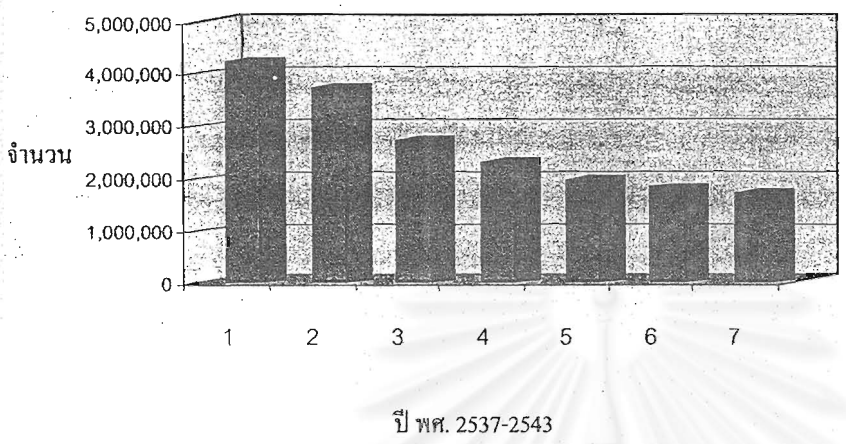
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

กระบือเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย และเป็นชนิด swamp buffalo เพื่อใช้ทำนา เป็นเสมือนเงินออมและนำไปขายเป็นเนื้อ โดยมีการเลี้ยงในชนบทของประเทศโดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (อีสาน) ถึง 83% ของประชากรกระบือทั้งหมด ประมาณกันว่ามีครอบครัวที่เลี้ยงกระบือทั่วประเทศประมาณ 518,000 ครอบครัว (Na-Chiengmai, 2002) เป็นการเลี้ยงขนาดเล็ก (small holders) เฉลี่ยครอบครัวละ 3.25 ตัว จากข้อมูลขององค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) เมื่อ 10 ปีที่แล้ว (พ.ศ 2539) ประเทศไทยมีจำนวนกระบือมากเป็นอันดับ 4 ของโลก รองมาจากประเทศอินเดีย จีนและปากีสถาน แต่มีแนวโน้มของการลดจำนวนอย่างมากจนน่าเป็นห่วงว่ากระบือไทยจะมีจำนวนน้อย ประเทศไทยเคยมีกระบือมากที่สุดถึง 6 ล้านตัวในปี พ.ศ. 2521 จากนั้นค่อย ๆ ลดลงอย่างรวดเร็ว เหลือ 4.2 ล้านตัวในปี พ.ศ. 2537 เป็น 1.7 ล้านตัว ในปี พ.ศ. 2543 คิดเป็นอัตราลดลงเท่ากับ –13.8% ต่อปี (FAO, 1996; กรมปศุสัตว์, 2543) ในขณะที่ทั่วโลกมีอัตราการเพิ่มของกระบือประมาณ 1.3% ต่อปี (ตารางที่ 1) เนื่องจากมีการฆ่าทำลายเพื่อนำมาบริโภค จนถึงจุดที่น่าเป็นห่วงถึงการสูญเสียพันธุกรรมของกระบือที่ดีที่สุดในทวีปเอเชียอาคเนย์ไปในอนาคตอันใกล้นี้

ตารางที่ 1 จำนวนกระบือในประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ 2537-2543 (FAO, 1996)

ปี พ.ศ.	จำนวน	อัตราการเปลี่ยนแปลงต่อปี	
		±ตัว	%
2537	4,224,791	-579,355	-12.1
2538	3,710,061	-514,730	-12.2
2539	2,719,674	-990,387	-26.7
2540	2,293,938	-425,736	-15.7
2541	1,951,068	-342,870	-14.9
2542	1,799,606	-151,462	-7.8
2543	1,702,223	-97,383	-5.4
		การเปลี่ยนแปลงทั้งหมด	-13.8



รูปที่ 1 จำนวนกระบือในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ 2537 ถึง 2543 (Indramongala, 2001)

สาเหตุที่สำคัญที่ทำให้จำนวนกระบือในประเทศไทยลดลงมาจากการเปลี่ยนแปลงสภาพทางเศรษฐกิจและสังคม โดยเฉพาะก่อนเกิดวิกฤตการณ์ทางเศรษฐกิจในปี พ.ศ 2541 มีการขยายตัวในอุตสาหกรรมในเมืองใหญ่ โดยเฉพาะกรุงเทพมหานคร ทำให้คนชนบทโดยเฉพาะหนุ่มสาวมาหางานทำในชนบท เหลือแต่คนเฒ่าคนแก่ เด็ก หรือผู้หญิง ที่เลี้ยงกระบือ ซึ่งบางบ้านไม่ไหวก็ขายกระบือไป ทำให้ขาดแรงงานในการเลี้ยงกระบือ กระบือมีการถูกนำไปฆ่าเพื่อบริโภคมากกว่าการผลิต จากจำนวนประชากรที่มีมากกว่า 60 ล้านคนในปัจจุบัน มีการฆ่ากระบืออย่างผิดกฎหมาย นำกระบือเพศเมียท้องว่าง บางครั้งยังมีลูกดูดนมอยู่และกระบือท้องส่งโรงฆ่าชำแหละชากทั้งในต่างจังหวัดและหัวเมืองกรุงเทพมหานคร เกษตรกรรายย่อยเลิกเลี้ยงกระบือเพื่อใช้แรงงานโดยนำเอารถไถแทรกเตอร์ขนาดเล็กมาทดแทน จึงมีการขายยกฝูง (Chantalakhana, 2001) จากข้อมูลเป็นสภาวะที่ทำให้เกิดการลดทั้งจำนวนและพันธุกรรมกระบือไทยที่เคยได้ชื่อว่าเป็นพันธุ์กระบือปลักที่ดีที่สุดในทวีปเอเชีย

ข้อมูลทางระบบสืบพันธุ์ พบว่าปัญหาที่สำคัญ ๆ ในกระบือเพศผู้คือ อายุถึงวัยเจริญพันธุ์ (puberty) ช้า โดยกระบือจะใช้งานในการผสมพันธุ์อย่างต่ำต้องมีอายุประมาณ 2-3 ปี ขึ้นไป ความกำหนัดต่ำ เนื่องจากมีขนาดของลูกอัณฑะที่เล็กกว่าโคเพศผู้ที่มีอายุเท่าเทียมกัน ส่วนในกระบือเพศเมียพบว่าปัญหาสำคัญมีอย่างน้อยด้วยกัน 3-4 ปัญหา คือ อายุถึงวัยเจริญพันธุ์ค่อนข้างช้า (late maturity) โดยพบว่ากระบือปลักไทยจะถึงวัยเจริญพันธุ์ประมาณ 3-4 ปี (Fischer and Bhodipaksha, 1992) การเป็นสัดไม่เด่นชัดหรือเป็นสัดเงียบ ไม่เหมือนในโค

เพศเมีย ยากแก่การผสมเทียม และมีปัญหาไม่เป็นสัดหลังคลอดยาวนาน (prolonged postpartum anestrus) ทำให้ระยะห่างของการตกลูก (calving interval) ค่อนข้างยาวนาน มีรายงานว่าประมาณ 500-600 วัน (Chantarakhana et al., 1981) ปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้ทำให้ประสิทธิภาพทางการสืบพันธุ์ (reproductive efficiency) ค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับในโค

เป็นที่ยอมรับว่าเทคโนโลยีชีวภาพทางการสืบพันธุ์ (Reproductive technology) มีส่วนช่วยในการปรับปรุงพันธุกรรมและรักษาพันธุกรรม และอาจนำมาใช้เพื่อการใช้ประโยชน์ทางระบบสืบพันธุ์ในกระบือได้สูงสุด เทคนิคนี้ประกอบด้วยเทคนิคสำคัญ ๆ มากมาย ตั้งแต่การผสมเทียม การย้ายฝากตัวอ่อน การทำโคลนนิ่ง การตัดต่อยีนส์เพื่อทำสัตว์ข้ามพันธุ์ (transgenic animal) เป็นต้น ในประเทศไทยได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีนี้มาเป็นลำดับ สำหรับการผสมเทียมได้มีการพัฒนามามากกว่า 40 ปี โดยเทคนิคในการปฏิบัติเช่นเดียวกับในโค แต่ในกระบือพบว่ามีจำนวนการผสมเทียมน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับในโค เนื่องจากเกษตรกรไม่สามารถจับการเป็นสัดได้แม่นยำและระยะทางระหว่างสถานีผสมเทียมกับหมู่บ้านบางแห่งไม่เอื้อต่อการผสมเทียมกระบือ (Na-Chiengmai, 2002) งานวิจัยทางเทคโนโลยีทางระบบสืบพันธุ์ขั้นสูงโดยเฉพาะเทคโนโลยีเกี่ยวกับการย้ายฝากตัวอ่อน (Embryo Technology) ได้มีการพัฒนามานานมากกว่า 20 ปี นั้นพบว่าในปัจจุบันนั้นสามารถกระตุ้นรังไข่ เก็บตัวอ่อน นำไปแช่แข็งหรือไปย้ายฝากและได้ลูกกระบือปลัก (Chanteraprateep et al., 1988; 1989a, b; Techakumphu et al., 1989; 1990; มงคลและคณะ, 2541ก; 2541ข) โดยคณะผู้วิจัยมีประสบการณ์ในโครงการผลิตตัวอ่อนจากฝูงกระบือพันธุ์ดี ซึ่งเป็นโครงการความร่วมมือระหว่างกรมปศุสัตว์และคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยระหว่างปี พ.ศ. 2539-2542 ซึ่งจากงานวิจัยนี้พบว่าการผลิตตัวอ่อนด้วยวิธีการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่และผสมในกระบือปลักมีจำนวนตัวอ่อนที่ได้ต่ำมาก 1-2 ใบต่อตัวเท่านั้น (มงคล และคณะ 2541ก)

งานวิจัยด้านการเก็บตัวอ่อนในรูปแช่แข็งซึ่งเป็นวิธีการในการเก็บรักษาพันธุกรรม ซึ่งสามารถอยู่ได้นานและได้มีการศึกษาถึงความเป็นไปได้แล้วในประเทศ (Techakumphu et al., 1989; มาลีและคณะ, 2541) ตัวอ่อนของกระบือสามารถผลิตได้จากการปฏิสนธิภายในร่างกาย (มงคล และคณะ, 2539ก) และภายนอกร่างกายด้วยวิธีนำเอาโอโอไซต์จากรังไข่มาปฏิสนธิในหลอดทดลอง (Changsooneon and Kamonpatana., 1991) ในการทำการปฏิสนธินอกร่างกายนั้นต้องมีแหล่งโอโอไซต์ที่ดูดจากรังไข่ โดยสามารถเก็บได้หลายวิธีทั้งจากเก็บจากสัตว์ที่ตาย หรือจากการเปิดผ่าช่องท้อง หรือการเจาะผ่านกล้องลาปาโรสโคปและในปัจจุบันพบว่าเทคนิคการเก็บโอโอไซต์จากรังไข่วิธีด้วยเข็มเจาะดูดร่วมกับการใช้เครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูง (อัลตราซาวน์ชนิด เรียลไทม์ บี โมด) เรียกว่า "transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration" ที่เรียก

ย่อ ๆ ว่า "Ovum Pick Up (OPU)" เป็นการเก็บจากสัตว์ขณะมีชีวิตอยู่ เป็นที่นิยมและได้นำไปใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงโคเป็นส่วนใหญ่ วิธีนี้มีข้อดีคือสามารถเก็บจากตัวสัตว์ที่ยังมีชีวิตและรู้ พันธุกรรมที่แน่นอน อาทิเช่น หากต้องการเก็บโอโอไซต์จากแม่กระบือปลักที่มีผ่านการทดสอบสมรรถภาพ (performance test) และผ่านการทดสอบลูกหลาน (progeny test) ก็สามารถเก็บได้ซ้ำ ๆ ทุกสัปดาห์เป็นระยะเวลานานจากสัตว์ตัวเดียวกัน มีรายงานวิจัยในโคว่าสามารถทำติดต่อทุกสัปดาห์กันนาน 5 เดือน โดยไม่มีผลกระทบของการทำงานของรังไข่ ไม่ทำให้เกิดการยึดติดของรังไข่กับอวัยวะภายในเช่นที่พบในการเก็บจากการเปิดช่องท้อง ทำให้สัตว์ไม่บอบช้ำมาก หลังเสร็จสิ้นการเก็บแบบ OPU สามารถนำแม่โคไปผสมพันธุ์ และตั้งท้อง (Kruip et al., 1994)

งานวิจัยด้านการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี OPU มีรายงานในสัตว์กีบหลายชนิด เช่นในแแม่โคและแม่ม้าที่มีวงจรการเป็นสัดปกติ ในโคสาวก่อนวัยเจริญพันธุ์ ในแม่ม้าหรือแม่โคตั้งท้องระยะแรก ในม้าลายและในแพะ (Graff et al., 1999) วิธีการนี้ร่วมกับการปฏิสนธินอกร่างกายนั้นเป็นที่ยอมรับว่าสามารถใช้ทดแทนการผลิตตัวอ่อนจากการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ (superovulation) ได้ งานวิจัยในการทำ OPU มีรายงานส่วนใหญ่ในโคตั้งแต่ปี ค.ศ. 1988 โดย Pieterse ซึ่งรวมรวมโดย Hashimoto (1999) (ตารางที่ 2)

การเก็บโอโอไซต์ในโคด้วยวิธี OPU นี้ สามารถทำได้ในโคอย่างน้อย 4 ประเภท คือ แม่โคที่มีวงจรการเป็นสัดปกติ (Looney et al., 1994) แม่โคที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเฮสตร์โมนโกนาโดโทรปินเพื่อเพิ่มจำนวนและขนาดของฟอลลิเคิล (Bungartz et al., 1995) แม่โคอุ้มท้องระยะแรกประมาณ 30-35 วัน (Meintjes et al., 1955) และในลูกโคที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปินเพื่อเพิ่มจำนวนและขนาดของฟอลลิเคิล (Brogliattti and Adams, 1996) ซึ่งในแม่โคนั้นยังพบว่าอาจทำในกรณีที่เป็นแม่โคที่มีปัญหาทางระบบสืบพันธุ์หรือมีปัญหาอื่น ๆ ที่ไม่สามารถนำมาเป็นแม่โคให้ตั้งท้องปกติ อาทิเช่น แม่โคที่ผสมไม่ติดที่ไม่ได้มาจากรังไข่แฟบลีบ (hypotrophy) ปัญหารังไข่เป็นถุงน้ำ (cystic ovary) หรือมดลูกอักเสบเป็นหนอง (metritis) รวมทั้งแม่โคตัวให้ตัวอ่อน (embryo donor) ที่ผ่านการกระตุ้นและเก็บตัวอ่อนมาพอสมควร เมื่อไม่สามารถให้จำนวนตัวอ่อนที่เหมาะสมก็อาจถูกนำมาเป็นแม่โคสำหรับเจาะเอาโอโอไซต์ด้วยวิธี OPU แม่โคเหล่านี้เรียกว่า "*Problems cows*" โดยได้มีการรวบรวมข้อมูลโดย Faber และคณะ (2003) ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1992 จนถึง 2002 ข้อมูลเปรียบเทียบระหว่างแม่โคที่มีการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH และไม่ได้กระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH รวมจำนวนการเก็บแบบ OPU ทั้งหมด 6,606 ครั้ง ได้โอโอไซต์ทั้งหมด 50,429 โดยมีโอโอไซต์ต่อการเก็บแต่ละครั้งเท่ากับ 7.63 และหลังทำ IVF ได้ตัวอ่อนเท่ากับ 1.16 คิดเป็นอัตราเท่ากับ 15.2% และเมื่อนำไปย้ายฝากได้อัตราการตั้งท้องประมาณ 48.1% นอกจากนี้ยังสามารถเจาะจากแม่โคในช่วง 1, 2 และ 3 เดือนหลังคลอด (postpartum period)

ห้องสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในแม่โคสามารถทำการเก็บสัปดาห์ละครั้งหรือสองครั้งต่อสัปดาห์ เนื่องจากการเจริญของฟอลลิเคิลจะเป็นกระบวนการต่อเนื่องตลอดเวลาในรังไข่ เมื่อเจาะเอาฟอลลิเคิลจำนวนหนึ่งออกไปก็จะมีการเจริญทดแทนเข้ามา โดยทั่วไปอัตราความสำเร็จในการเก็บได้จะแตกต่างกันไปตามงานวิจัยเนื่องจากมีความแตกต่างของวิธีการตั้งแต่ชนิดของ transvaginal probe การกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปินโดยเฉพาะฮอร์โมน PMSG หรือ FSH รวมทั้งความถี่ของการเก็บเป็นสัปดาห์ละครั้งหรือสองครั้ง ดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3

ตารางที่ 2 การเก็บโอโอไซต์แบบ OPU ในโคและอัตราความสำเร็จ

ผู้วิจัย	ชนิดของ transvaginal probe	ฮอร์โมนที่ใช้	ความถี่ของการเก็บ	อัตราความสำเร็จ (โอโอไซต์/ฟอลลิเคิล)
Peterse, 1988	5.0 MHz	PMSG	ไม่แน่นอน	1.5
Van der Schans, 1991	7.5 MHz	PMSG	สัปดาห์ละครั้ง	10.8
			สัปดาห์สองครั้ง	
Kruip, 1991	7.5 MHz	No hormone	ไม่ได้กล่าวถึง	9.4
Meinjtes, 1993	ไม่ได้กล่าวถึง	FSH	สัปดาห์ละครั้ง	0.3-13
Simon, 1993	6.5 MHz	No hormone	ห่างกัน 48 ชม.	11.9
			ห่างกัน 96 ชม.	8.7
Fry, 1994	6.5 MHz	PMSG or inhibin vaccine	สัปดาห์ละสองครั้ง	2.6
Gibbons, 1994	5.0 MHz	No hormone	สัปดาห์ละครั้ง	6.8
			สัปดาห์ละสองครั้ง	6.3
Kruip, 1994	6.5 MHz	No hormone	สัปดาห์ละสองครั้ง	8.0-12.9
Looney, 1994	5.0 MHz	FSH	สัปดาห์ละครั้ง	8.6
		No hormone		6.2
Bols, 1995	7.5 MHz	FSH and LH	สัปดาห์ละสองครั้ง	1.8
Bungartz, 1995	6.5 MHz	FSH	สัปดาห์ละสองครั้ง	7.0
		No hormone		5.8
Hasler, 1995	5.0 MHz	No hormone	สัปดาห์ละครั้ง	4.9
Broadbent, 1997	5.0 MHz	No hormone	สัปดาห์ละครั้ง	1.7
			สัปดาห์ละสองครั้ง	1.8

(ที่มา Hashimoto et al., 1999)

การทำ OPU ในกระบือนั้นมีรายงานการเก็บโอโอไซต์ในกระบือแม่น้ำเมดิเตอร์เรเนียนในประเทศอิตาลี (Boni, 1994; Boni et al., 1996) ส่วนในประเทศไทยได้มีการทดลองเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี OPU คณะผู้วิจัยได้เริ่มดำเนินการในลูกโคพื้นเมืองโดยได้โอโอไซต์ เฉลี่ย 9.92±5.2 ใบต่อตัว (ชัยณรงค์ โลหชิต, 2539) โดยสามารถทำซ้ำในลูกโค 2-5 ครั้งห่างกัน 7 วัน รายงานในกระบือปลักมีรายงานโดย Kitiyanant และคณะ (1996) ทดลองเก็บในแม่กระบือปลักอายุ 3-5 ปี ทุก 7 วัน ของรอบการเป็นสัด (วันที่ 1-2, 8-9, 15-16) โดยโอโอไซต์ที่ได้นำมาทำการปฏิสนธิและได้ตัวอ่อน นอกจากนี้จากงานวิจัยในโครงการ "การศึกษาการเก็บโอโอไซต์ซ้ำด้วยเทคนิคใช้เครื่องมือคลื่นความถี่สูงสอดเข้าทางปากช่องคลอดในลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์และแม่กระบือปลัก" พบว่ามีความเป็นไปได้ในการใช้วิธีนี้สำหรับลูกกระบือ โดยอัตราการเก็บโอโอไซต์อยู่ในระดับ 63% ได้โอโอไซต์ต่อตัวเท่ากับ 4.1±2.0 โอโอไซต์ (เอกชาติ และคณะ, 2543) ซึ่งใกล้เคียงกับที่ได้ในโค (Looney et al., 1994; Bungart et al., 1995)

งานวิจัยเกี่ยวกับสถานภาพต่าง ๆ ของระบบสืบพันธุ์ของโคต่อการเก็บโอโอไซต์แบบ OPU นั้น Bungart และคณะ (1995) ได้ทดลองเก็บโอโอไซต์จากแม่โคให้นม (lactating cow) แม่โคที่หยุดให้นม (dry cow) แม่โคอุ้มท้อง (pregnant cow) และโคสาว (heifer) พบว่าแม่โคให้นมและหยุดให้นมมีจำนวนฟอลลิเคิลให้เจาะมากกว่าในแม่โคอุ้มท้องและโคสาว แต่จำนวนโอโอไซต์ที่เจาะได้ไม่ต่างกัน คือ 7.3±0.5, 6.9±0.7, 5.0±0.4 และ 5.7+0.5 โอโอไซต์ต่อตัว ตามลำดับ คุณภาพของโอโอไซต์ดีที่สุดพบในแม่โคให้นม ส่วนโคอีกสามชนิดไม่แตกต่างกัน ส่วนในกระบือมีงานวิจัยเกี่ยวข้องกับการเก็บโอโอไซต์จากแม่พันธุ์ที่มีความผิดปกติของรังไข่และแม่พันธุ์ที่มีระยะของ days open แตกต่างกันเท่านั้น (Boni, 1994; Boni et al., 1996) ส่วนในกระบือปลักยังไม่มีรายงานการศึกษาเปรียบเทียบสถานภาพของระบบสืบพันธุ์ต่อผลการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี OPU แต่อย่างใด

วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อ

1. ศึกษาการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีเข็มดูดเจาะต่อกับเครื่องมือคลื่นความถี่สูงในกระบือปลักไทยในสถานภาพแตกต่างกันทางระบบสืบพันธุ์
2. ศึกษาชนิดของโอโอไซต์ที่เก็บได้ทางกายภาพ
3. ศึกษาผลกระทบของการเจาะรังไข่ด้วยวิธี OPU ต่อการทำงานของระบบสืบพันธุ์

ตารางที่ 3 ผลการศึกษา OPU-IVF จากแม่โคที่มีปัญหา (Problems cows)

ปี ค.ศ	จำนวนแม่โค	การให้ FSH	จำนวน OPU (ครั้ง)	โอโอไซต์	โอโอไซต์ /OPU	ตัวอ่อน /OPU	ตัวอ่อน	อัตราการตั้งท้อง (%)
1992	47	-	331	1769	5.34	0.98	323(18.3)	117(36.2)
	4	+	4	22	5.50	1.75	7(31.8)	3(42.9)
1993	152	-	795	5775	7.26	1.20	952(16.5)	414(43.5)
	48	+	75	738	9.84	1.53	115(15.8)	56(48.7)
1994	153	-	846	7238	8.56	1.37	1162(16.0)	591(50.9)
	89	+	155	2185	14.10	2.01	312(14.3)	182(58.3)
1995	160	-	853	5769	6.76	0.70	595(10.3)	326(54.8)
	173	+	569	7544	13.26	1.27	721(9.6)	390(54.1)
1996	107	-	375	4010	6.0	1.01	603(15.0)	294(48.8)
	111	+	80	3599	9.66	1.45	457(12.7)	249(54.5)
1997	72	-	375	2189	5.84	1.15	430(19.6)	175(40.7)
	48	+	80	773	9.66	2.83	226(29.2)	105(46.5)
1998	52	-	344	1869	5.43	0.98	338(18.1)	139(41.1)
	40	+	65	678	10.43	2.46	160(23.6)	80(50.0)
1999	62	-	376	1704	4.53	0.86	322(18.9)	157(48.8)
	43	+	68	615	9.04	2.12	144(23.4)	77(53.5)
2000	45	-	222	881	3.97	0.65	144(16.3)	65((45.1)
	51	+	103	878	8.52	2.11	217(24.7)	111(51.1)
2001	37	-	187	829	4.43	0.65	121(14.6)	49(40.5)
	37	+	69	509	7.38	1.55	107(21.0)	40(37.4)
2002	36	-	151	699	4.63	0.99	150(21.5)	44(29.3)
	17	+	28	156	5.57	1.50	42(27.0)	16(38.1)
รวม	**1584**		**6,606**	**50,429**	**7.63**	**1.16**	**7,648 (15.2)**	**3,680(48.1)**

(ที่มา Faber et al., 2002)

วัสดุและวิธีการวิจัย

<u>กระบือทดลอง</u>

คัดเลือกกระบือทดลองเพศเมียที่มีลักษณะร่างกายสมบูรณ์และไม่มีปัญหาทางระบบสืบพันธุ์โดยอยู่ในสถานภาพการสืบพันธุ์ต่าง ๆ คือ กระบือไม่อุ้มท้องที่มีวงจรการเป็นสัดปกติและกระบือหลังคลอด 3 เดือน จากสถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ จังหวัดบุรีรัมย์ กรมปศุสัตว์ และกระบือสาวของภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาฯ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทำการทดลองในศูนย์ฝึกนิสิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ จังหวัดนครปฐม โดยกระบือได้รับหญ้าสด หญ้าหมัก แร่ธาตุและน้ำเต็มที่ (รูปที่ 1)

แบ่งกลุ่มก.ารทดลองตามชนิดกระบือเป็น 3 กลุ่ม คือ

<u>กลุ่มที่ 1</u> กระบือสาว จำนวน 4 ตัว เพื่อทดลองโปรแกรมที่เหมาะสมในการกระตุ้นด้วยขนาดของฮอร์โมน FSH ต่างกันระหว่าง 280 มก. แบ่งฉีดนาน เช้า/เย็น 2 วัน (80x80, 60x60) และแบ่งฉีด เช้า/เย็น นาน 3 วัน (60x60, 50x50, 30x30) และ 400 มก. วัน แบ่งฉีดนาน 3 วัน (80x80, x70x70, 50x50)

<u>กลุ่มที่ 2</u> แม่กระบือไม่อุ้มท้อง จำนวน 5 ตัว โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นและไม่ได้รับการกระตุ้นรังไข่ด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน ชนิดฟอลลิเคิล สติมูเลติง (FSH)เพื่อเพิ่มก.ารเจริญฟอลลิเคิล ทำการปรับขนานการเป็นสัดในกระบือด้วยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดฝังหู (3 mg Norgestromet, Intervet, The Netherlands) และฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล วาลีเรท (5 mg Estradiol valerate) ในวันที่ฝังหู โดยฝังนาน 12 วันแล้วดึงออก วันที่ดึงออกฉีดสารพรอสตาแกลนดิน (Lutalyse®, Upjohn, USA)

<u>กลุ่มที่ 2.1</u> กระตุ้นด้วยฟอลลิเคิล สติมูเลติงฮอร์โมน ใช้ฮอร์โมน FSH ขนาด 400 มก. (มงคล และคณะ, 2541ก) กระตุ้นรังไข่หลังเป็นสัดแล้ว 4 วัน โดยแบ่งฉีดวันละ 2 ครั้ง (เช้า/เย็น) ขนาด 80x80, 70x70, 60x60 มก. ติดต่อกัน (Day+4, +5, +6) และ 24 ชั่วโมง (Day +7) ต่อมาฉีดฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน (100 μg GnRH, Cystolerin®, Sanofi, France) เข้ากล้าม (Day +8) (ตารางที่ 4) โปรแกรมดังกล่าวดัดแปลงมาจาก Techakumphu et al., (2000) ทำการเก็บโอโอไซต์หลังฉีด GnRH 24 ชั่วโมงต่อมา ทำการกระตุ้นซ้ำหลังจากนั้น 7 วัน และเก็บทุก ๆ 2 สัปดาห์ติดต่อกันนาน 3 เดือน รวมทั้งหมด 6 ครั้ง และทำการเก็บโอโอไซต์ในกลุ่มที่ 2.1 ทุก 7 วัน

<u>กลุ่มที่ 2.2</u> ไม่ได้รับการกระตุ้น ทำการเก็บสัปดาห์ละครั้งเริ่มที่ 7 วันหลังแสดงการเป็นสัดโดยเจาะในคลื่นฟอลลิเคิลแรก (Taneja et al., 1996) และเก็บซ้ำและเก็บทุก ๆ 2 สัปดาห์ติดต่อกันนาน 3 เดือน รวมทั้งหมด 6 ครั้ง

แม่กระบือทั้งสองกลุ่มเป็นชุดเดียวกัน โดยทำการทดลองในกลุ่มกระตุ้นก่อน และหลังจากนั้นจึงทำการเก็บแบบไม่กระตุ้น โดยทั้งสองกลุ่มใหญ่ ห่างกัน 1 เดือน ดังนั้นแต่ละตัวทำการเก็บทั้งหมด 12 ครั้ง แต่ละกลุ่มเท่ากับ 30 ครั้ง (OPU session) รวมทั้งหมด 60 ครั้ง

กลุ่มที่ 3 แม่กระบือหลังคลอดมาแล้ว 3 เดือน กำลังเลี้ยงลูก จำนวน 6 ตัว โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 3.1 กระตุ้นด้วยฟอลลิเคิล สติมูเลติง ฮอร์โมน (FSH stimulation) ใช้ฮอร์โมน FSH ขนาด 400 มก. โปรแกรมเดียวกับกลุ่ม 1.1 ทำการกระตุ้นซ้ำหลังจากนั้น 7 วัน และและเก็บทุก ๆ 2 สัปดาห์ติดต่อกันนาน 3 เดือน รวมทั้งหมด 6 ครั้ง

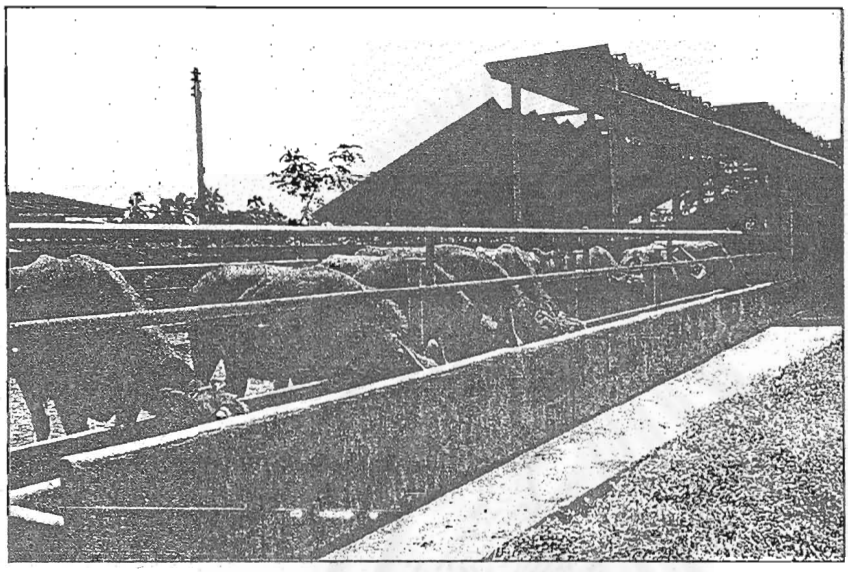
กลุ่มที่ 3.2 ไม่ได้รับการกระตุ้น (non FSH stimulation) ทำการเก็บสัปดาห์ละครั้ง และเก็บซ้ำและเก็บทุก ๆ 2 สัปดาห์ติดต่อกันนาน 3 เดือน รวมทั้งหมด 6 ครั้ง

ตารางที่ 4 โปรแกรมการกระตุ้นรังไข่ของกระบือทดลองกลุ่มที่ 2 และ 3

วันของการทดลอง	กลุ่มที่ไม่ได้กระตุ้น	กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้น FSH 400 มก.
Day –14	Crestar® implant (12 days)	Crestar® implant (12 days)
Day -2	Remove implant and PGF 2 alpha	Remove implant and PGF 2 alpha
Day 0	Expected heat	Expected heat
Day +4	-	FSH (am/pm) 80x80 mg
Day +5	-	FSH (am/pm) 70x70 mg
Day +6		FSH (am/pm) 50x50 mg
Day +7	-	GnRH 100 μg
Day +8	Ovum Pick Up (1)	Ovum Pick Up (1)
Day +14	Ovum Pick Up (2)	Rest for 7 days
Day +15		↑
Day +16		Repeat program (day +4 to +7)
Day +17		↓
Day +18		Ovum Pick Up (2)

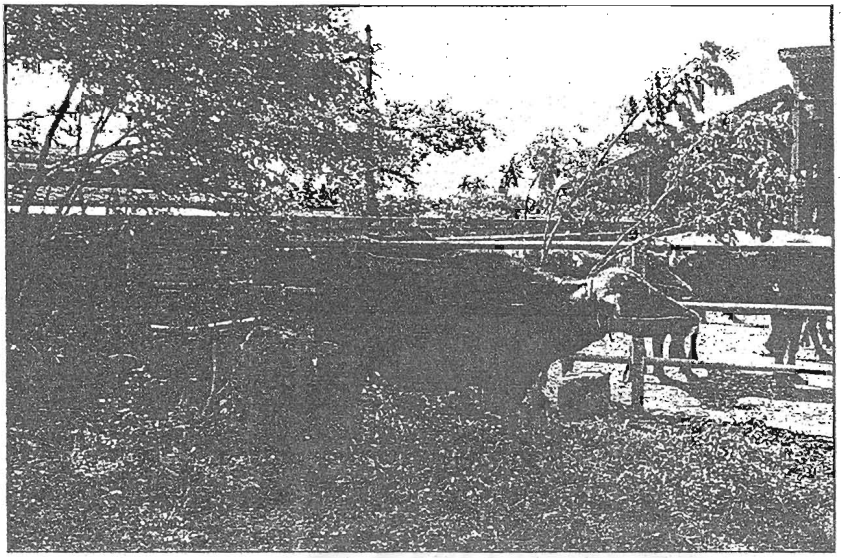
หมายเหตุ ทำการปรับการเป็นสัดของกระบือทั้งสองกลุ่มในตอนเริ่มโปรแกรม

เช่นเดียวกับกลุ่มทดลองที่ 2 แม่กระบือทั้งสองกลุ่มเป็นชุดเดียวกัน โดยทำการทดลองในกลุ่มกระตุ้นก่อน และหลังจากนั้นจึงทำการเก็บแบบไม่กระตุ้น โดยทั้งสองกลุ่มใหญ่ ห่างกัน 1 เดือน ดังนั้นแต่ละตัวจะทำการเก็บทั้งหมด 12 ครั้ง รวมกลุ่มละ 36 ครั้ง (OPU session) เท่ากับทั้งหมด 72 ครั้ง



รูปที่ 2 ฝูงกระบือทดลองที่ศูนย์ฝึกนิสิตคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นครปฐม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 แม่กระบือหลังคลอดประมาณ 3 เดือน ที่ใช้ในการเจาะรังไข่เพื่อเก็บโอโอไซต์

การเก็บโอโอไซต์แบบ OPU

ทำการเก็บโอโอไซต์โดยรายละเอียดมีดังนี้ อดอาหารและน้ำกระบือประมาณ 24 ชม. หลังจากนั้นควบคุมก.ระบือในซองให้อยู่ในท่ายืน โดยให้ Xylacine HCl 20 มิลลิกรัม เข้ากล้าม ต่อมาอีก 10 นาที ฉีดยาชาชนิด Xylocaine Hcl 2% จำนวน 1 มล. เข้าไขสันหลัง ทำความสะอาดบริเวณปากช่องคลอดด้วยย่าฆ่าเชื้อ และเช็ดแอลกอฮอลล์ ล้างช่องคลอดให้สะอาดด้วยน้ำเกลือ 0.9% จำนวน 100 มล. ทำการสอด convex array transvaginal probe ขนาดความถี่ 5 MHz (Aloka, SSD-210 Tokyo, Japan) เข้าทางช่องคลอด ดันจนสุด ใช้มืออีกข้างหนึ่งสอดเข้าทางทวารหนัก จับรังไข่ไว้ในแนวการกระจายของรังสีจากปลาย probe ตรวจนับการตอบสนองของรังไข่จากฟอลลิเคิลที่เห็นจากจอมอนิเตอร์ (รูปที่ 3) รวมทั้งวัดขนาดของฟอลลิเคิล สอดเข็มเจาะเบอร์ 18 ยาว 54 ซม. เข้าทางเครื่องมือที่ต่อกับ probe ทำการเจาะฟอลลิเคิล ขนาดตั้งแต่ 3 มม. ขึ้นไป ทีละฟอลลิเคิล จนหมด โดยใช้ vacumm pump (KMAR-5000, Cook, Australia) ดูดเข้าไปในหลอดพลาสติกปลอดเชื้อ ด้วยแรงดูด 80-100 mmHg ทำการเจาะฟอลลิเคิลจากรังไข่ทั้งสองข้างจนหมด ทำการฉีดยาปฏิชีวนะชนิดเพนนิซิลลิน-สเตรปโตมัยซิน ขนาด 1,000,000 ไอยู เข้ากล้าม 1 ครั้งเพื่อป้องกันการติดเชื้อจากการเจาะ การเก็บโอโอไซต์ทุกครั้งทำโดยบุคคลคนเดียวตลอดการทดลอง เทคนิคดังกล่าวได้เคยรายงานในการศึกษาที่ผ่านมา (มงคล และคณะ, 2544)

การตรวจหาโอโอไซต์

นำเอาของเหลวเทในกรวยกรองโอโอไซต์ (Emcon, Sweden) ขนาด 0.45 ไมครอน เพื่อกรองเอาเฉพาะโอโอไซต์ ส่วนเลือดจะถูกกรองออกไป ใช้น้ำเกลือผสมยาปฏิชีวนะล้าง จนของเหลวที่เก็บมาใส่ ตรวจหาโอโอไซต์และแยกออกเป็นชนิดต่าง ๆ 5 ชนิด คือ ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มมากชั้น (COC) ชนิดที่มีเซลล์คัวมูลัสหุ้มสองถึงสามชั้น (S) ชนิดที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัส (D) ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มแบบกระจายตัว (EXP) และชนิดเสื่อมสลาย (Deg) การตรวจกระทำทันทีภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยเทเอาของเหลวที่อยู่ในกรวยเก็บโอโอไซต์ในจานทดลอง โอโอไซต์ที่แยกได้นำแยกเป็นชนิดต่าง ๆ

การศึกษาผลกระทบของการเจาะรังไข่ด้วยวิธี OPU ต่อการทำงานของระบบสืบพันธุ์

ดำเนินการศึกษาผลกระทบของการเจาะด้วยวิธี OPU ต่อการทำงานของรังในกระบือที่ไม่ตั้งท้องและหลังคลอดจำนวนรวมกัน 4 ตัว โดยติดตามการเจริญของฟอลลิเคิลทุก 7 วัน แล้วทำการเจาะรังไข่ซ้ำสัปดาห์ละครั้งติดต่อกันประมาณ 5-9 ครั้ง รวมทั้งติดตามการทำงานของรังไข่จากการเจริญของฟอลลิเคิลหลังเลิกเจาะนาน 4 สัปดาห์ วันละครั้ง โดยทำการสอด convex array transvaginal probe ขนาดความถี่ 5 MHz สังเกตการพัฒนาของฟอลลิเคิลบนรังไข่ และจดบันทึกข้อมูลทั้งหมด

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลทั้งขนาดของฟอลลเคิล เป็นมิลลิเมตร (มม.) จำนวนฟอลลิเคิลที่ตอบสนองต่อตัว จำนวนฟอลลิเคิลที่เก็บต่อตัว และจำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้ต่อตัวมาค่าเฉลี่ย (mean±SD) และนำมาเปรียบเทียบโดย Analysis of Variance ส่วนจำนวนชนิดของโอโอไซต์แต่ละชนิดทดสอบความแตกต่างโดย Chi Square Analysis ในแต่ละกลุ่มการทดลอง

การคำนวณช่วงห่างของคลื่นฟอลลิเคิล (follicular wave) พิจารณาจากระยะห่างของการเกิดฟอลลิเคิลชนิดโดมิแนนท์ (dominant follicle) และอัตราการเจริญของฟอลลิเคิลชนิดโดมิแนนท์ คำนวณจากขนาดของฟอลลิเคิลระยะเริ่มต้นลบจากขนาดของฟอลลิเคิลชนิดโดมิแนนท์ และหารด้วยจำนวนวันที่เกิด

ผลการทดลอง

ผลเปรียบเทียบโปรแกรมการกระตุ้นรังไข่ในกระบือสาว

จากตารางที่ 5 และ 6 แสดงให้เห็นว่าการใช้โปรแกรมกระตุ้นแบบ 2 และ 3 วัน โดยใช้ขนาด 280 มก. ไม่แตกต่างกันในแง่ของจำนวนฟอลลิเคิลที่ตอบสนอง (8.8 vs 10.3) และจำนวนโอโอไซต์ที่เจาะ (8.8 vs 8.3) ได้แต่ละกลุ่ม ส่วนในโปรแกรม 400 มก. พบว่ามีการตอบสนอง (12.8) และจำนวนโอโอไซต์ (11.0) ที่เก็บได้มีมากกว่ากลุ่ม 280 มก. ทั้งแบบ 2 และ 3 วัน รวมทั้งคุณภาพของโอโอไซต์ชนิด COC+S มากกว่ากลุ่ม 280 มก. ทั้งสองกลุ่ม 86.4% เทียบกับ 41.2% และ 30.3% ตามลำดับ

ตารางที่ 5 ผลเปรียบเทียบโปรแกรมการกระตุ้นรังไข่และผลของการเก็บโอโอไซต์ระหว่าง 280 มก. 2 วัน (2d) และ 3 วัน (3d) และ 400 มก. 3 วัน (3d)

กระบือ	จำนวนฟอลลิเคิล/ตัว			จำนวนโอโอไซต์/ตัว			อัตราการเก็บ (%)		
หมายเลข	280 มก. (2d)	280 มก. (3d)	400 มก. (3d)	280 มก. (2d)	280 มก. (3d)	400 มก. (3d)	280 มก. (2d)	280 มก. (3d)	400 มก. (3d)
02	11	14	18	10	12	16	90.9	85.7	88.9
19	4	4	13	4	0	11	100	0	84.6
09	18	15	11	18	14	9	100	93.3	81.8
03	2	8	9	2	7	8	100	100	88.9
Total	35	41	51	34	33	44	34/35	33/41	44/51
Mean	8.8	10.3	12.8	8.8	8.3	11.0	97.1	80.5	86.3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ผลเปรียบเทียบคุณภาพของโอโอไซต์ระหว่าง 280 มก. 2 วัน (2d) และ 3 วัน (3d) และ 400 มก. 3 วัน (3d)

กลุ่มทดลอง	COC+S	D+EXP+Deg
280 มก. (2d)	14/34(41.2%)	20/34(58.8%)
280 มก. (3d)	10/33(30.3%)	23/33(69.7%)
400 มก. (3d)	38/44(86.4%)	6/44(13.6%)

ผลของการเหนี่ยวนำการเจริญของฟอลลิเคิลหลายใบบนรังไข่ของแม่กระบือ

ผลการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH ในแม่กระบือที่ไม่ได้ตั้งท้องแต่ละตัว มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของฟอลลิเคิล ประมาณ 4.5 - 5.1 มม. ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าฟอลลิเคิลที่พบบนรังไข่แม่กระบือที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH ที่มีขนาดประมาณ 4.8 – 5.5 มม. ดังแสดงในตารางที่ 6 ส่วนขนาดของฟอลลิเคิลในแม่กระบือหลังคลอดระยะแรกที่กระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH ก็มีการเจริญของขนาดของฟอลลิเคิลเล็กกว่าในแม่กระบือที่ไม่ได้กระตุ้นด้วยฮอร์โมน (5.0 – 5.5 มม. 5.2 - 6.0 มม. ตามลำดับ) เช่นเดียวกับที่แสดงไว้ในตารางที่ 7

ตารางที่ 6 ผลการตอบสนองของรังไข่แม่กระบือที่ไม่ตั้งท้อง ทั้งที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH และไม่ได้รับการกระตุ้น โดยจำแนกเป็นรายตัว

กระบือ	กระตุ้นด้วย FSH		ไม่ได้กระตุ้นด้วย FSH	
หมายเลข	จำนวนฟอลลิเคิล	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.)*	จำนวนฟอลลิเคิล	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.)*
007	76	4.6 ± 1.4	19	4.9 ± 1.3
35	45	4.8 ± 1.5	9	5.5 ± 1.7
58	31	5.1 ± 2.0	14	5.3 ± 1.2
64	35	4.9 ± 1.8	14	5.1 ± 1.2
82	30	4.5 ± 1.6	8	4.8 ± 1.9

*ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD)

ตารางที่ 7 ผลการตอบสนองของรังไข่แม่กระบือหลังคลอดระยะแรก ทั้งที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH และไม่ได้รับการกระตุ้น โดยจำแนกเป็นรายตัว

กระบือ	กระตุ้นด้วย FSH		ไม่ได้กระตุ้นด้วย FSH	
หมายเลข	จำนวนฟอลลิเคิล	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.)*	จำนวนฟอลลิเคิล	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.)*
21	25	5.4 ± 1.1	9	5.2 ± 1.7
204	62	5.0 ± 0.9	8	6.0 ± 2.0
7	54	5.1± 1.5	6	5.8 ± 1.7
26	51	5.0 ± 1.5	10	5.8± 1.7
19	70	5.4 ± 1.5	6	5.8 ± 1.2
02	61	5.5 ± 2.3	10	5.7± 1.5

*ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD)

ผลของการตอบสนองต่อการกระตุ้นทั้งในแม่กระบือไม่ได้ตั้งท้อง และแม่กระบือหลังคลอดระยะแรกตามครั้งของการกระตุ้น และผลเปรียบเทียบกับแม่กระบือที่ไม่ได้รับการกระตุ้น พบว่าขนาดของฟอลลิเคิลในแม่กระบือทั้งสองกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นมีแนวโน้มของขนาดของฟอลลิเคิลที่ใหญ่ดังตารางที่ 8 และ 9

ตารางที่ 8 ผลการตอบสนองของรังไข่แม่กระบือที่ไม่ตั้งท้อง ทั้งที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH และไม่ได้รับการกระตุ้น โดยจำแนกตามครั้งของการกระตุ้น

ครั้งที่ของ	กระตุ้นด้วย FSH		ไม่ได้กระตุ้นด้วย FSH	
การเก็บ	จำนวนฟอลลิเคิล	เส้นผ่านศูนย์กลาง	จำนวนฟอลลิเคิล	เส้นผ่านศูนย์กลาง
โอโอไซต์		(มม.)*		(มม.)*
1	35	5.1 ± 1.4	13	5.4 ± 1.0
2	33	5.2 ± 1.2	12	5.1 ± 1.3
3	39	4.9 ± 1.5	10	5.3 ± 1.2
4	41	4.7 ± 1.6	9	5.8 ± 1.4
5	42	4.6 ± 1.3	11	5.0 ± 1.1
6	27	5.3 ± 1.2	9	5.5 ± 1.6

*ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD)

ตารางที่ 9 ผลการตอบสนองของรังไข่แม่กระบือหลังคลอดระยะแรก ทั้งที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH และไม่ได้รับการกระตุ้น โดยจำแนกตามครั้งของการกระตุ้น

ครั้งที่ของการเก็บโอโอไซต์	กระตุ้นด้วย FSH		ไม่ได้กระตุ้นด้วย FSH	
	จำนวนฟอลลิเคิล	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.)*	จำนวนฟอลลิเคิล	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.)*
1	62	4.9 ± 1.2	8	5.9 ± 2.0
2	59	4.8 ± 1.4	10	5.3 ± 1.5
3	50	5.1 ± 1.6	8	5.3 ± 1.2
4	50	4.9 ± 1.3	9	5.5 ± 1.4
5	49	5.3 ± 1.5	8	5.1 ± 1.7
6	53	5.3 ± 1.4	6	6.0 ± 1.4

*ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD)

จำนวนของฟอลลิเคิลที่ได้จากการกระตุ้นที่พบในแม่กระบือไม่ได้ตั้งท้อง (7.2 ฟอลลิเคิล/ตัว) มีแนวโน้มน้อยกว่าแต่ไม่แตกต่างกันในแม่กระบือหลังคลอดระยะแรก (9.0 ฟอลลิเคิล/ตัว) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่จำนวนฟอลลิเคิลต่อตัวที่พบบนรังไข่ในแม่กระบือทั้งที่ไม่ได้ตั้งท้อง และหลังคลอดระยะแรกที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนนั้น มีจำนวนมากกว่าฟอลลิเคิลที่พบในแม่กระบือไม่ได้ตั้งท้องและหลังคลอดระยะแรกที่ไม่ได้ระบการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH (7.2 vs 2.1 และ 9.0 vs1.4 ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เมื่อนำฟอลลิเคิลที่พบมาแยกกลุ่มตามขนาดฟอลลิเคิล พบว่าฟอลลิเคิลที่พบบนรังไข่ของแม่กระบือที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนทั้งในแม่กระบือที่ไม่ได้ตั้งท้อง และแม่กระบือหลังคลอดระยะแรกมีขนาดของฟอลลิเคิลส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มฟอลลิเคิลขนาดเล็ก (3-5 มม.) ส่วนแม่กระบือที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน ฟอลลิเคิลที่พบส่วนมากจะอยู่ในกลุ่มฟอลลิเคิลที่มีขนาดกลาง (6-9 มม.) ขนาดใหญ่ (>9 มม.) และขนาดเล็ก รองลงมาตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ขนาดและจำนวนของฟอลลิเคิลของแม่กระบือจำแนกกลุ่มตามขนาดของฟอลลิเคิลออกเป็น ขนาดเล็ก(3-5 มม.) ขนาดกลาง(6-9 มม.) ขนาดใหญ่ (>9 มม.)

กลุ่มของกระบือ	การกระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH	จำนวนฟอลลิเคิลที่เจาะเก็บ (ฟอลลิเคิล/ตัว)	ขนาดของฟอลลิเคิล ขนาดเล็ก (3-5 มม.)*	ขนาดกลาง (6-9 มม.)*	ขนาดใหญ่ (>9 มม.)*
ไม่ได้ตั้งท้อง (N=5)	กระตุ้น (n=30)	217(7.2±3.7)	5.6 ± 3.0 (77.8%)[a]	1.5 ± 1.5 (20.8%)[c]	0.1 ± 0.3 (1.4%)[e]
	ไม่ได้กระตุ้น (n=30)	64(2.1±1.4)	0.6 ± 1.5 (28.6%)[b]	1.2 ± 1.3 (57.1%)[d]	0.2 ± 0.4 (14.3%)[f]
หลังคลอดระยะแรก (N=5)	กระตุ้น (n=36)	323(9.0±3.2)	5.9 ± 1.9 (65.6%)[a]	3.0 ± 2.6 (33.3%)[c]	0.1 ± 0.3 (1.1%)[e]
	ไม่ได้กระตุ้น (n=36)	49(1.4±0.7)	0.2 ± 0.9 (14.3%)[b]	0.6 ± 0.9 (42.9%)[c]	0.6 ± 0.5 (42.8%)[f]

*ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD), n= จำนวนครั้งของ OPU

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

ผลการเก็บโอโอไซต์จากฟอลลิเคิลบนรังไข่แม่กระบือที่เก็บด้วยวิธี OPU

อัตราการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี OPU ในแม่กระบือที่ไม่ได้ตั้งท้องที่กระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) แต่พบว่ามีความแปรปรวนในแม่กระบือแต่ละตัว โดยมีอัตราการเก็บอยู่ในช่วง 40 –70 % ดังตารางที่ 12 ซึ่งใกล้เคียงกับในแม่กระบือที่ไม่ได้ตั้งท้องและไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน ที่มีอัตราการเก็บ 35 – 63% ตารางที่ 12 ส่วนในแม่กระบือหลังคลอดที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนมีความแปรปรวนในอัตราการเก็บน้อยกว่าในแม่กระบือหลังคลอดที่ไม่ได้กระตุ้นด้วยฮอร์โมน (50-70% และ 20-80% ตามลำดับ) ดังแสดงในตารางที่ 11 และ 12

ตารางที่ 11 อัตราการเก็บโอโอไซต์ในแม่กระบือที่ไม่ได้ตั้งท้องที่กระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH ด้วยวิธี OPU จำแนกตามแม่กระบือแต่ละตัว

กระบือ หมายเลข	จำนวนครั้งของ การเก็บ	จำนวน ฟอลลิเคิล	จำนวนครั้ง ของการเจาะ	จำนวน โอโอไซต์ที่ได้	อัตราการเก็บ โอโอไซต์(%)
007	6	76 (12.7±1.2)	76	33 (5.5±3.0)	43.4
35	6	45 (7.5±3.1)	45	32 (5.3±3.4)	71.1
58	6	31 (5.2±1.7)	31	16 (2.7±2.1)	51.6
64	6	35 (5.8±3.3)	35	14 (2.3±2.1)	40.0
82	6	30 (5.0±2.8)	30	17 (2.8±2.2)	56.7
รวม	30	217 (7.3±3.7)	217	112 (3.7±2.7)	51.6

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 อัตราการเก็บโอโอไซต์ในแม่กระบือที่ไม่ได้ตั้งท้องที่ไม่ได้กระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH ด้วยวิธี OPU จำแนกตามแม่กระบือแต่ละตัว

กระบือ หมายเลข	จำนวนครั้งของ การเก็บ	จำนวน ฟอลลิเคิล	จำนวนครั้ง ของการเจาะ	จำนวน โอโอไซต์ที่ได้	อัตราการเก็บ โอโอไซต์(%)
007	6	19	19	12	63.2
		(4.2±1.8)		(5.5±3.0)	
35	6	9	9	5	55.6
		(10.3±2.3)		(5.3±3.4)	
58	6	14	14	5	35.7
		(9.0±1.7)		(2.7±1.8)	
64	6	14	14	8	57.1
		(8.5±0.8)		(2.3±2.1)	
82	6	8	8	5	56.7
		(11.7±1.6)		(2.8±2.2)	
รวม	30	64	64	35	54.7
		(7.2±3.7)		(3.7±2.7)	

เมื่อนำอัตราการเก็บโอโอไซต์ที่ได้จากแม่กระบือที่ไม่ได้ตั้งท้องที่กระตุ้น (51.6%, 112/217) และไม่กระตุ้น (60.7%, 196/323) และแม่กระบือหลังคลอดที่กระตุ้นด้วยฮอร์โมน 54.70%(35/64) และแม่กระบือทั้งสองระยะที่ไม่ได้กระตุ้นด้วยฮอร์โมน 49.0%(24/49) พบว่ามีอัตราการเก็บที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ตารางที่ 13-15

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 อัตราการเก็บโอโอไซต์ในแม่กระบือหลังคลอดระยะแรกที่กระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH ด้วยวิธี OPU จำแนกตามแม่กระบือแต่ละตัว

กระบือหมายเลข	จำนวนครั้งของการเก็บ	จำนวนฟอลลิเคิล	จำนวนครั้งของการเจาะ	จำนวนโอโอไซต์ที่ได้	อัตราการเก็บโอโอไซต์(%)
21	6	25	25	13	52.0
		(4.2±1.8)		(2.2±1.7)	
204	6	62	62	43	69.4
		(10.3±2.3)		(7.2±3.9)	
7	6	54	54	32	59.3
		(9.0±1.7)		(5.3±2.0)	
26	6	51	51	33	64.7
		(8.5±0.8)		(5.5±2.5)	
19	6	70	70	33	47.1
		(11.7±1.6)		(5.5±2.5)	
02	6	61	61	42	68.9
		(10.2±4.4)		(7.0±4.9)	
รวม	36	323	323	196	60.7
		9.0±3.2		(5.9±3.5)	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 อัตราการเก็บโอโอไซต์ในแม่กระบือหลังคลอดระยะแรกที่ไม่ได้กระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH ด้วยวิธี OPU จำแนกตามแม่กระบือแต่ละตัว

กระบือ หมายเลข	จำนวนครั้งของ การเก็บ	จำนวน ฟอลลิเคิล	จำนวนครั้ง ของการเจาะ	จำนวน โอโอไซต์ที่ได้	อัตราการเก็บ โอโอไซต์(%)
21	6	9	9	2	22.2
		1.5±0.5		0.3±0.5	
204	6	8	8	2	25.0
		1.3±0.5		0.3±0.5	
7	6	6	6	4	66.7
		1.0±0.9		0.7±0.8	
26	6	10	10	5	50.0
		1.7±0.8		0.8±0.7	
19	6	6	6	3	50.0
		1.0±0		0.5±0.5	
02	6	10	10	8	80.0
		1.7±1.0		1.3±1.0	
รวม	36	49	49	24	49.0
		1.4±0.7		0.7±0.8	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 สรุปผลการเก็บโอโอไซต์ในแม่กระบือด้วยวิธี OPU

แม่กระบือทดลอง	การกระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH	จำนวนฟอลลิเคิลที่เจาะต่อตัว	จำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้ต่อตัว	อัตราการเก็บโอโอไซต์ (%)
ไม่ได้ตั้งท้อง (N=5)	กระตุ้น (n=30)	7.2±3.7[a]	3.7 ± 2.7[a]	112/217(51.6)
	ไม่ได้กระตุ้น (n=30)	2.1±1.4[B]	1.4 ± 1.3[b]	35/64 (55.0)
หลังคลอดระยะแรก (N=5)	กระตุ้น (n=36)	9.0±3.2[a]	5.9 ± 3.5[a]	196/323(60.7)
	ไม่ได้กระตุ้น (n=36)	1.4±0.7[B]	0.7 ± 0.8[b]	24/49 (49.0)

a, b $P<0.05$

N= จำนวนกระบือทดลอง, n= จำนวนครั้งของการกระตุ้น

ตารางที่ 16-20 แสดงผลของการเก็บแต่ละครั้งต่อจำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้และอัตราการเก็บ พบว่าครั้งของการเก็บไม่ให้ผลที่แตกต่างกัน แต่พบว่าอัตราความสำเร็จในการเก็บมีความผันแปรในกลุ่มแม่กระบือทดลองหลังคลอดที่ไม่ได้รับการกระตุ้นและกระตุ้น และแม่กระบือไม่ได้ตั้งท้องที่ไม่ได้รับการกระตุ้นและกระตุ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 ผลของการเก็บโอโอไซต์ในแม่กระบือหลังคลอดที่ไม่ได้กระตุ้นฮอร์โมนจำแนกตามครั้งที่ของการเก็บ

ครั้งที่ของการเก็บ	จำนวนฟอลลิเคิลที่เจาะ	จำนวนโอโอไซต์ที่ได้ต่อครั้งการเก็บ	อัตราการเก็บ (%)
1	8 1.3±0.8	1 0.2±0.4	1/8(12.5)
2	10 1.7±0.5	5 0.8±0.8	5/10(50.0)
3	8 1.3±1.0	4 0.7±0.8	4/8(50.0)
4	9 1.5±0.8	5 0.8±1.2	5/9(55.6)
5	8 1.3±0.8	4 0.7±0.8	4/8(50.0)
6	6 1.0±0	5 0.8±0.4	5/6(83.3)
รวม	49 1.4±0.7	24 0.7±0.8	24/49(49.0)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 ผลของการเก็บโอโอไซต์ในแม่กระบือที่ไม่ตั้งท้องที่ไม่ได้กระตุ้นฮอร์โมนจำแนกตามครั้งที่ของการเก็บ

ครั้งที่ของการเก็บ	จำนวนฟอลลิเคิลที่เจาะ	จำนวนโอโอไซต์ที่ได้ต่อครั้งการเก็บ	อัตราการเก็บ (%)
1	13	9	9/13(69.2)
	2.6±1.5	1.8±1.3	
2	12	6	6/12(50.0)
	2.4±0.9	1.2±1.1	
3	10	7	7/10(70.0)
	2.0±1.4	1.4±1.1	
4	9	4	4/9(44.4)
	1.8±1.1	0.8±0.8	
5	11	6	6/11(54.5)
	2.2±0.8	1.2±1.1	
6	9	3	3/9(33.3)
	1.8±1.9	0.6±0.3	
รวม	64	35	35/64(54.7)
	2.1±1.4	1.4±1.3	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 18 ผลของการเก็บโอโอไซต์ในแม่กระบือหลังคลอดที่กระตุ้นฮอร์โมนจำแนกตามครั้งที่ของการเก็บ

ครั้งที่ของการเก็บ	จำนวนฟอลลิเคิลที่เจาะ	จำนวนโอโอไซต์ที่ได้ต่อครั้งการเก็บ	อัตราการเก็บ (%)
1	62	48	48/62(77.4)
	10.3±4.5	8.0±4.2	
2	59	37	37/59(62.7)
	9.8±5.0	6.2±4.5	
3	50	30	30/50(60.0)
	8.3±2.3	5.0±1.3	
4	50	26	26/50(52.0)
	8.3±.3.0	4.3±3.1	
5	49	23	23/49(46.9)
	8.2±2.1	3.8±2.3	
6	53	32	32/53(60.4)
	8.8±2.3	5.3±2.6	
รวม	323	196	196/323(60.7)
	9.0±3.2	5.9±3.5	

I21484089

ตารางที่ 19 ผลของการเก็บโอโอไซต์ในแม่กระบือที่ไม่ได้ตั้งท้องที่กระตุ้นฮอร์โมนจำแนกตามครั้งที่ของการเก็บ

ครั้งที่ของการเก็บ	จำนวนฟอลลิเคิลที่เจาะ	จำนวนโอโอไซต์ที่ได้ต่อครั้งการเก็บ	อัตราการเก็บ (%)
1	35	22	22/35(62.9)
	7.0±3.5	4.4±1.5	
2	33	16	16/33(48.5)
	6.6±3.4	3.2±1.5	
3	39	16	16/39(41.0)
	7.8±4.0	3.2±3.0	
4	41	26	26/41(63.4)
	8.2±3.1	5.2±4.0	
5	42	19	19/42(45.2)
	8.4±4.3	3.8±3.3	
6	27	13	13/27(48.1)
	5.4±5.0	2.6±3.0	
รวม	217	112	112/217(51.6)
	7.2±3.7	3.7±2.7	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 20 สรุปผลของการเก็บโอโอไซต์ในแม่กระบือจำแนกตามครั้งที่ของการเก็บ

ครั้งที่ของการเก็บโอโอไซต์	กลุ่มแม่กระบือทดลอง	จำนวนฟอลลิเคิลที่เจาะ	จำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้	อัตราการเก็บ (%)
1	ไม่ท้อง-กระตุ้น	7.0±3.5(35)	4.4±1.5(22)	22/35(62.9)
	หลังคลอด-กระตุ้น	10.3±4.5(62)	8.0±4.2(48)	48/62(77.4)
	ไม่ท้อง-ไม่กระตุ้น	2.6±1.5(13)	1.8±1.3(9)	9/13(69.2)
	หลังคลอด-ไม่กระตุ้น	1.3±0.8(8)	0.2±0.4(1)	1/8(12.5)
2	ไม่ท้อง-กระตุ้น	6.6±3.4(33)	3.2±1.5(16)	16/33(48.5)
	หลังคลอด-กระตุ้น	9.8±5.0(59)	6.2±4.5(37)	37/59(62.7)
	ไม่ท้อง-ไม่กระตุ้น	2.4±0.9(12)	1.2±1.1(6)	6/12(50.0)
	หลังคลอด-ไม่กระตุ้น	1.7±0.5(10)	0.8±0.8(5)	5/10(50.0)
3	ไม่ท้อง-กระตุ้น	7.8±4.0(39)	3.2±3.0(16)	16/39(41.0)
	หลังคลอด-กระตุ้น	8.3±2.3(50)	5.0±1.3(30)	30/50(60.0)
	ไม่ท้อง-ไม่กระตุ้น	2.0±1.4(10)	1.4±1.1(7)	7/10(70.0)
	หลังคลอด-ไม่กระตุ้น	1.3±0.8(8)	0.7±0.8(4)	4/8(50.0)
4	ไม่ท้อง-กระตุ้น	8.2±3.1(41)	5.2±4.0(26)	26/41(63.4)
	หลังคลอด-กระตุ้น	8.3±.3.0(50)	4.3±3.1(26)	26/50(52.0)
	ไม่ท้อง-ไม่กระตุ้น	1.8±1.1(9)	0.8±0.8(4)	4/9(44.4)
	หลังคลอด-ไม่กระตุ้น	1.5±0.8(9)	0.8±1.2(5)	5/9(55.6)
5	ไม่ท้อง-กระตุ้น	8.4±4.3(42)	3.8±3.3(19)	19/42(45.2)
	หลังคลอด-กระตุ้น	8.2±2.1(49)	3.8±2.3(23)	23/49(46.9)
	ไม่ท้อง-ไม่กระตุ้น	2.2±0.8(11)	1.2±1.1(6)	6/11(54.5)
	หลังคลอด-ไม่กระตุ้น	1.3±1.0(8)	0.7±0.8(4)	4/8(50.0)
6	ไม่ท้อง-กระตุ้น	5.4±5.0(27)	2.6±3.0(13)	13/27(48.1)
	หลังคลอด-กระตุ้น	8.8±2.3(53)	5.3±2.6(32)	32/53(60.4)
	ไม่ท้อง-ไม่กระตุ้น	1.8±1.9(9)	0.6±0.3(3)	3/9(33.3)
	หลังคลอด-ไม่กระตุ้น	1.0±0(6)	0.8±0.8(5)	5/6(83.3)
รวม		653	367	367/653(56.2)

คุณภาพของโอโอไซต์ของแม่กระบือที่เก็บด้วยวิธี OPU

คุณภาพของโอโอไซต์ที่เก็บได้จากการเก็บด้วยวิธี OPU ในแม่กระบือที่ไม่ได้ตั้งท้อง และแม่กระบือหลังคลอด ทั้งที่กระตุ้นด้วยฮอร์โมน และไม่ได้กระตุ้นด้วยฮอร์โมน ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) โดย โอโอไซต์ส่วนใหญ่เป็นชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสตั้งแต่ 2-4 ชั้น (S) ประมาณ 70% รองลงมาได้แก่ โอโอไซต์ที่มีคิวมูลัสหุ้มหลายชั้น(COC) ประมาณ 10-20% โดยทั้ง 2 กลุ่มเป็นโอโอไซต์ที่เหมาะสมในการนำไปปฏิสนธินอกร่างกายเพื่อผลิตตัวอ่อนต่อไป (ตารางที่ 21 และ 22)

ตารางที่ 21 ชนิดของโอโอไซต์ที่เก็บด้วยวิธี OPU ในแม่กระบือไม่ได้ตั้งท้องและหลังคลอด

กลุ่มกระบือทดลอง	การกระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH	จำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้	ชนิดของโอโอไซต์			
			COC (%)	S(%)	EXP+D(%)	Deg+FZ*(%)
ไม่ได้ตั้งท้อง (N=5)	กระตุ้น (n=30)	112	22(19.6)	75(67.0)	13(11.6)	2(1.8)+55*
	ไม่ได้กระตุ้น (n=30)	35	5(14.3)	24(68.6)	2(5.7)	4(11.4)
หลังคลอด (N=6)	กระตุ้น (n=36)	196	19(9.7)	141(71.9)	36(19.4)	0+20*
	ไม่ได้กระตุ้น (n=36)	24	-	17(70.8)	7(29.2)	-

*จำนวน free zona (FZ) ไม่ได้นำมาคำนวณ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 22 ผลการเก็บโอโอไซต์ในแม่กระบือหลังคลอดจำแนกตามจำนวนเดือนหลังคลอด

เดือนที่หลังคลอด	การกระตุ้นด้วยฮอร์โมน	จำนวนฟอลลิเคิลที่สามารถเจาะได้	จำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้	อัตราการเก็บ(%)	COC (%)	S (%)	EXP+D (%)	DEG (%)
3	กระตุ้น	121	85	70.3	18 (21.2)	52 (61.2)	15 (17.6)	-
4	กระตุ้น	100	56	56.0	-	42 (75.0)	14 (25.0)	-
5	กระตุ้น	102	55	53.9	1 (1.8)	47 (85.5)	7 (12.7)	-
6	พัก							
7	ไม่กระตุ้น	18	6	33.3	-	3 (50.0)	3 (50.0)	-
8	ไม่กระตุ้น	17	9	52.9	-	6 (66.7)	3 (33.3)	
9	ไม่กระตุ้น	14	9	64.3	-	8 (88.9)	1 (11.1)	-

การศึกษาผลกระทบของการเจาะรังไข่ด้วยวิธี OPU ต่อการทำงานของระบบสืบพันธุ์

ก) ผลของการตรวจการเจริญของฟอลลิเคิลและการเจาะเก็บโอโอไซต์ซ้ำ

จากการศึกษาติดตามการทำงานของรังไข่พบว่ากระบือที่ศึกษาทั้งหมด 4 ตัว พบว่ามีการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ขึ้นเท่ากับ 2.4±1.3 และสามารถนำมาใช้ในการเจาะซ้ำอีก ได้จำนวนโอโอไซต์เฉลี่ยต่อตัวเท่ากับ โดยคุณภาพของโอโอไซต์ชนิด COC+S พบเท่ากับ 62.2% (ตารางที่ 23) โดยแต่ละสัปดาห์จะมีฟอลลิเคิลที่เจริญใกล้เคียงกันและสามารถเจาะโอโอไซต์ได้ในจำนวนที่ใกล้เคียงกันดังแสดงในตารางที่ 24 ผลดังกล่าวทั้งจำนวนฟอลลิเคิลที่เจริญขึ้นมาและจำนวนโอโอไซต์เฉลี่ยต่อตัวที่ได้ไม่ได้แตกต่างในแม่กระบือไม่ได้ตั้งท้องและหลังคลอดที่เจาะโอโอไซต์ทุก 2 สัปดาห์ (ตารางที่ 25)

ตารางที่ 23 ผลการเจาะโอโอไซต์ทุกสัปดาห์จากฟอลลิเคิลที่มีการเกิดขึ้นมาใหม่ในกระบือทดลองที่ไม่ตั้งท้องและหลังคลอดรวมกัน

กระบือหมายเลข	จำนวนครั้งของการกระตุ้น	จำนวนฟอล-ลิเคิล	จำนวนโอโอไซต์	อัตราการเก็บ (%)	ชนิดของโอโอไซต์		
					COC+S (%)	EXP (%)	D+Deg (%)
007	9	31	18	18/31	11	3	4
		3.4±1.6	2.0±1.7	(58.1)	(61.1)	(16.7)	(22.2)
21	9	19	7	7/19	6	0	1
		2.1±1.0	0.8±1.0	(36.8)	(85.7)	0	(14.3)
26	5	10	7	7/10	2	2	3
		2.0±1.2	1.4±1.1	(70.0)	(28.6)	(28.6)	(42.8)
82	8	15	5	5/15	4	0	1
		1.9±0.6	0.6±0.7	(33.3)	(80.0)	0	(20.0)
รวมทั้งหมด	31	75	37	37/75	23	5	9
		2.4±1.3	1.2±1.3	(49.3)	(62.2)	(13.5)	(24.3)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 24 ผลการเจาะโอโอไซต์ในแต่ละสัปดาห์ในกระบือทดลองที่ไม่ตั้งท้องและหลังคลอด

สัปดาห์ของการเจาะ	จำนวนครั้งของการกระตุ้น	จำนวนฟอลลิเคิล	จำนวนโอโอไซต์	อัตราการเก็บโอโอไซต์ (%)	ชนิดของโอโอไซต์		
					COC+S (%)	EXP (%)	D+Deg (%)
1	4	13	6	6/13	5	0	1
		3.3±1.0	1.5±1.3	(46.2)	83.3	0	16.7
2	4	10	7	7/10	4	2	1
		2.5±0.6	1.8±1.0	(70.0)	57.1	28.6	14.3
3	4	13	6	6/13	3	1	2
		3.3±2.5	1.5±3.0	(46.2)	50.0	16.6	33.4
4	4	7	3	3/7	2	0	1
		1.8±1.0	0.8±0.5	(42.9)	66.7	0	33.3
5	3	8	2	2/8	2	0	0
		2.7±0.6	0.7±0.6	(25.0)	100.0	0	0
6	3	6	4	4/6	2	0	2
		2.0±1.0	1.3±1.2	(66.7)	50.0	0	50.0
7	4	9	4	4/9	1	2	1
		2.3±1.9	1.0±1.4	44.4	25.0	50.0	25.0
8	2	4	2	2/4	2	0	0
		2.0±0.0	1.0±0.0	50.0	100.0	0	0
9	3	5	3	3/5	2	0	1
		1.7±1.2	1.0±0.0	60.0	66.7	0	33.3
รวมทั้งหมด	31	75	37	37/75	25	5	7
		2.4±1.2	1.3±1.2	49.6±17.0	62.2	13.5	24.3

ตารางที่ 25 ผลเปรียบเทียบของการเจาะโอโอไซต์ทุก 2 สัปดาห์และทุกสัปดาห์

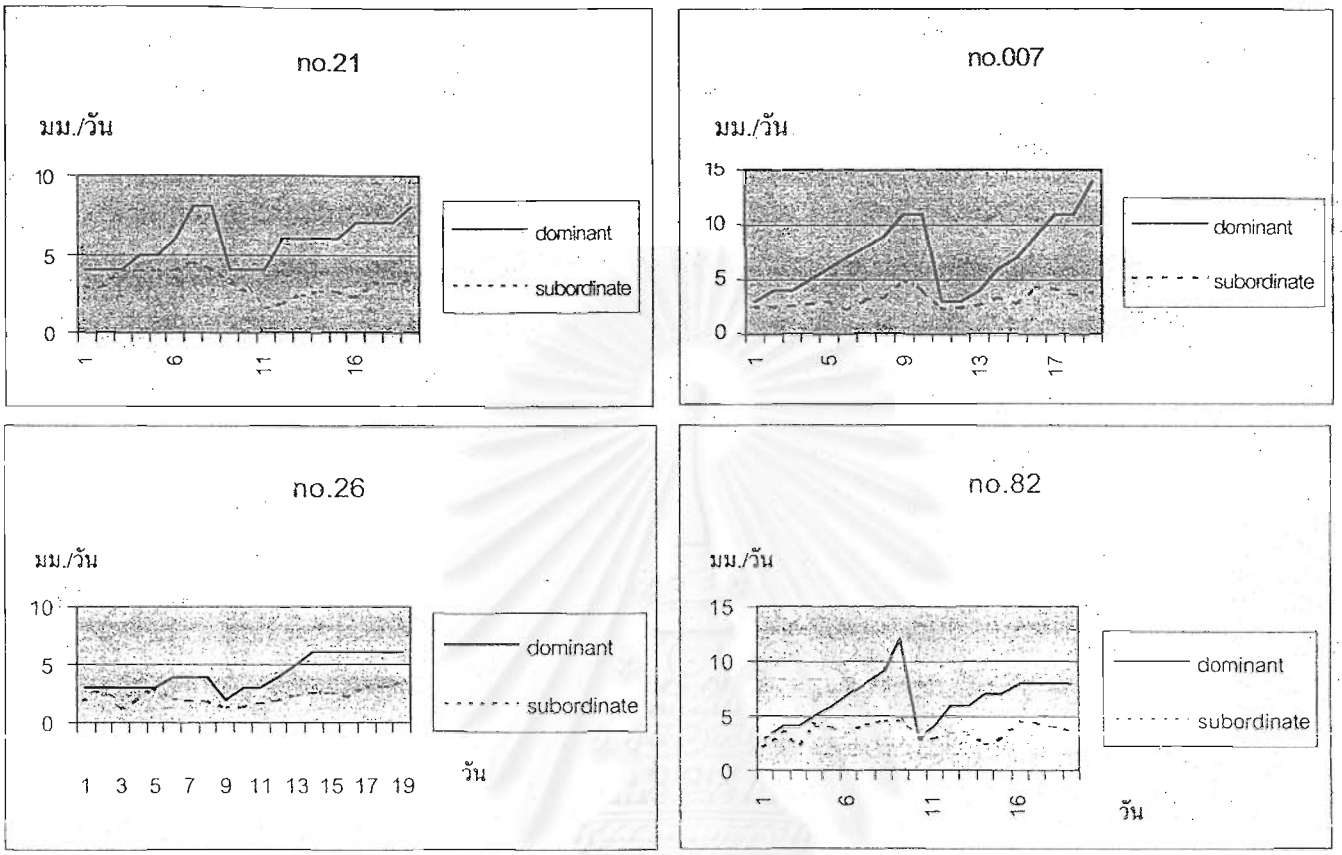
กลุ่มทดลอง	จำนวนครั้งของการกระตุ้น	จำนวนฟอล-ลิเคิล	จำนวนโอโอไซต์	อัตราการเก็บโอโอไซต์	ชนิดของโอโอไซต์		
					COC+S %	EXP %	D+Deg %
กระบือไม่อุ้มท้อง (ทุก 2 สัปดาห์)	30	64 2.1±1.4	35 1.4±1.3	35/64 (55.0)	29 82.9	2 5.7	4 11.4
กระบือหลังคลอด (ทุก 2 สัปดาห์)	36	49 1.4±0.7	24 0.7±0.8	24/49 (49.0)	17 70.8	7 29.2	0 0
กระบือไม่อุ้มท้อง (ทุกสัปดาห์)	31	75 2.4±1.3	37 1.2±1.3	37/75 (49.6)	23 62.2	5 13.5	9 24.3

ข) ผลของการตรวจการเจริญของฟอลลิเคิลหลังสิ้นสุดการเจาะ

จากการตรวจการเจริญของฟอลลิเคิลชนิดโดมิแนนท์ โดยใช้เครื่องอัลตราซาวด์ชนิดสอดเข้าช่องคลอดดูการเจริญของฟอลลิเคิล พบว่าหลังสิ้นสุดการเจาะรังไข่แล้ว ฟอลลิเคิลมีการเจริญขึ้นและมีระยะห่างของคลื่นในกระบือศึกษาจำนวน 3 ใน 4 ตัว คือหมายเลข 007 82 และ 21 ตามลำดับ โดยมีอัตราการเจริญเป็น มม./วัน เท่ากับ 0.7 ในกระบือหมายเลข 007 0.8 มม./วัน ในกระบือหมายเลข 82 และ 0.5 มม./วัน ในกระบือหมายเลข 21 ส่วนกระบือหมายเลข 26 มีการเจริญของฟอลลิเคิลชนิดซับออดิเนท (subordinate follicle) แต่ไม่พบว่ามีการเจริญถึงฟอลลิเคิลชนิดโดมิแนนท์ (ตารางที่ 26 และรูปที่ 4)

ตารางที่ 26 ระยะห่างของคลื่นฟอลลิเคิลและอัตราการเจริญของฟอลลิเคิลชนิดโดมีแนนท์ในกระบือหลังเลิกเจาะรังไข่เพื่อเก็บโอโอไซต์

กระบือหมายเลข	ระยะห่างของคลื่นฟอลลิเคิล (วัน)	อัตราการเจริญของฟอลลิเคิล (มม./วัน)
007	16	11/16(0.7)
82	15	12/15(0.8)
21	15	8/15(0.5)
26	-	-



รูปที่ 4 การพัฒนาของฟอลลิเคิลในลักษณะเป็นคลื่นในแม่กระบือจำนวน 4 ตัวหลังเลิกเก็บโอโอไซต์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การอภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสามารถเก็บโอโอไซต์จากกระบือที่มีสถานภาพทางการสืบพันธุ์แตกต่างกัน โดยทำการเก็บจากรังไข่ของกระบือที่มีวงจรการเป็นสัดปกติ ไม่มีการตั้งท้อง และจากแม่กระบือที่คลอดลูกมาแล้ว 3 เดือน โดยมีลูกดูดนมอยู่ด้วย การกระตุ้นรังไข่ด้วยฮอร์โมน FSH ทำให้สามารถเพิ่มจำนวนฟอลลิเคิลต่อตัวทั้งสองกลุ่ม ทำให้ได้จำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้มากกว่าการไม่กระตุ้นด้วยฮอร์โมน

จุดเด่นของงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถเก็บโอโอไซต์เพื่อนำไปใช้ในการวิจัยหรือผลิตตัวอ่อนในช่วงไม่ให้ผลผลิตหรือ days open ในกระบือหลังคลอด ซึ่งให้ผลที่ไม่แตกต่างกับที่ได้กับกระบือที่ไม่ท้องและวงจรการเป็นสัดปกติ และยังเป็นงานวิจัยที่ยังไม่มีผู้วิจัยเคยศึกษามาก่อนในกระบือปลัก โดยคณะผู้วิจัยจึงมีความประสงค์ที่จะนำเอาเทคนิคการเก็บโอโอไซต์ดังกล่าวที่ได้พัฒนาขึ้นในลูกกระบือก่อนวัยเจริญพันธุ์ (Techakumphu et al., 2003) นำมาดัดแปลงใช้กับในกระบือปลักหลังวัยเจริญพันธุ์ เนื่องจากกระบือปลักมีประสิทธิภาพทางการสืบพันธุ์ต่ำกว่าในโคมาก เนื่องจากระยะตั้งท้องที่นานกว่าประมาณ 1 เดือน อายุของการถึงวัยเจริญพันธุ์ช้ากว่าในโคประมาณ 1 ปี การผลิตลูกกระบือ 2 ตัวต้องใช้เวลานานถึง 3-4 ปี ในขณะที่โคนั้นจะตั้งท้องและคลอดลูกประมาณปีละ 1 ตัว ในการเลี้ยงตามธรรมชาติจะพบว่าระยะดูดนมในแม่กระบือจะค่อนข้างยาว แม้ลูกกระบือจะมีอายุ 1 ปี หรือมากกว่า ก็ยังคงพบเห็นว่ายังดูดนมแม่กระบือ แม้แม่ตัวนั้นจะตั้งท้องครั้งใหม่แล้วก็ตาม แต่ในสถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ โดยเฉพาะข้อมูลจากสถานีบำรุงพันธุ์กระบือแห่งชาติ จังหวัดสุรินทร์นั้น จะทำการหย่านมเมื่อลูกกระบืออายุ 8 เดือน โดยพบว่าแม่กระบือบางตัวเริ่มตั้งท้อง เหตุผลเนื่องจากหากหย่านมก่อนอายุดังกล่าวมักพบปัญหาอัตราการตายหลังหย่านมค่อนข้างสูง การที่ calving interval ของกระบือปลักค่อนข้างยาว ประมาณ 500 วัน น่าจะมาจากระยะเวลาหลังคลอด (postpartum period) จนถึงเป็นสัดและผสมติดในกระบือปลักค่อนข้างยาว หากหักลบกับจำนวนวันของการตั้งท้องที่ตกประมาณ 330 วัน ระยะเวลาดังกล่าวจะประมาณ 170 วัน หรือประมาณ 5.6 เดือนทีเดียว ดังนั้นหากสามารถเก็บโอโอไซต์จากแม่พันธุ์ในช่วงเลี้ยงลูก (lactating period) ที่ใช้เวลานาน แล้วนำมาปฏิสนธินอกร่างกายน่าจะเป็นวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกระบือได้และยังเป็นแนวทางวิจัยที่สำคัญของการพัฒนาการเก็บรักษาพันธุกรรมของสัตว์พื้นเมืองไทยอีกด้วย การเจาะเอาโอโอไซต์ในช่วงที่หลังคลอดจะมีประโยชน์ในการใช้ประโยชน์จากแม่กระบือสูงสุด

ในวงจรการเป็นสัดปกติของกระบือ จะพบว่ามีการเจริญของฟอลลิเคิลขนาดเล็ก (recruitment) ตามด้วยการคัดเลือกเอาเฉพาะฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ (dominant follicle) และการสลายตัวของฟอลลิเคิลขนาดอื่น ๆ (regression) Baruselli และคณะ(1997) พบว่าในกระบือ Murrah นั้นพบว่ามีการเจริญของฟอลลิเคิลเป็นคลื่น ทุก ๆ 9-10 วัน โดยมีฟอลลิเคิลเจริญขึ้นประมาณ 5-7 ฟอลลิเคิลต่อคลื่น เช่นเดียวกันกับหลังคลอด ในโคนั้นพบว่าหลังคลอดเพียงประมาณ 10.2±0.5 วัน จะสามารถตรวจพบว่ามีฟอลลิเคิลชนิดโดมิแนนท์ และระยะเวลาตั้งแต่คลอดจนถึงการตกไข่ครั้งแรกจะใช้เวลาประมาณ 35 วัน (Murphy et al., 1990; Henao et al., 2000) ซึ่งรายงานนี้ยังไม่พบในกระบือปลัก แต่คาดว่าหลังคลอดที่เป็นระยะพักก่อนจะผสมติดครั้งต่อไป น่าจะมีการทำงานของรังไข่เป็นลักษณะการพัฒนาของฟอลลิเคิลเป็นคลื่นเช่นเดียวกัน ดังนั้นหากทำการกระตุ้นให้ฟอลลิเคิลเหล่านี้เจริญขึ้นมาในช่วงที่กระบือไม่ตั้งท้องและในช่วงหลังคลอดจะสามารถทำการเจาะรังไข่และได้โอโอไซต์ได้ จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าหากกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปินชนิด FSH จะได้จำนวนฟอลลิเคิลและจำนวนโอโอไซต์ต่อครั้ง ซึ่งจำนวนโอโอไซต์ที่ได้นั้นมากกว่าในแม่กระบือที่ไม่ได้รับการกระตุ้นในทั้งแม่กระบือที่ไม่อุ้มท้องและหลังคลอด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในกลุ่มแม่โคที่มีสถานภาพทางระบบสืบพันธุ์แตกต่างกัน คือ แม่โคที่กำลังให้นม แม่โคที่แห้งนม แม่โคตั้งท้องอุ้มท้องระยะแรก (1-3 เดือน) และโคสาว โดยพบว่าในกลุ่มที่กระตุ้นด้วย FSH จะมีจำนวนฟอลลิเคิลที่เจาะได้มากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้กระตุ้น (10.6±0.7 vs 8.9±0.5) รวมทั้งในแม่โคที่มีปัญหา พบว่าการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH จากแม่โค 923 ตัว เก็บ OPU ทั้งหมด 5,075 ครั้ง จะให้โอโอไซต์ เท่ากับ 11.6 เทียบกับในแม่โค 661 ตัว จากการเก็บ OPU 1,531 ครั้ง เท่ากับ 6.4 (no-FSH) (Faber et al., 2003) ในกระบือนั้น Boni (1994) ได้ทดลองเก็บโอโอไซต์จากรังไข่แม่กระบือที่มีปัญหารังไข่เล็กไม่ทำงานและไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน จากค่าเฉลี่ยประมาณ 4.2 ฟอลลิเคิลต่อตัว เจาะได้ 1.3 โอโอไซต์ และหากให้ฮอร์โมน FSH ก่อนจะเพิ่มจำนวนฟอลลิเคิลเป็น 6.8 ฟอลลิเคิลต่อตัว จำนวนโอโอไซต์เพิ่มเป็น 3.0 ใบ อัตราการเก็บอยู่ที่ 40% ในปี ค.ศ 1996 Boni และคณะ ได้ทดลองเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี OPU ในแม่กระบือเมดิเตอร์เรเนียน 6 ตัว ทุกสัปดาห์ สัปดาห์ละ 2 ครั้ง ได้โอโอไซต์เฉลี่ยประมาณ 2.71 โอโอไซต์ต่อตัว คิดเป็นอัตราการเก็บประมาณ 53.5% โดยการเก็บติดต่อกันนาน 2 เดือน ไม่มีผลกระทบต่อการทำงานของระบบสืบพันธุ์โดยกระบือสามารถผสมติดประมาณ 47.5±27.5 วัน หลังเลิกเก็บ ในการศึกษานี้ได้ใช้กระบือกลุ่มเดียวกันทั้งกระตุ้นและไม่กระตุ้น โดยมีช่วงพักห่างกันประมาณ 1 เดือน พบว่าการเก็บซ้ำ ๆ ไม่มีผลกับจำนวนการตอบสนองและโอโอไซต์ที่เก็บ ซึ่งเป็นข้อมูลที่ยืนยันการศึกษาที่ผ่านมา (มงคล เตชะกำพุ และคณะ, 2544; Techakumphu et al., 2003)

ในส่วนของคุณภาพของโอโอไซต์จากการศึกษาพบว่าคุณภาพของโอโอไซต์ชนิด COC และ S ที่ได้ไม่แตกต่างกันระหว่างกระตุ้นและไม่กระตุ้น ในทั้งสองสถานภาพของระบบสืบพันธุ์ แต่มีแนวโน้มว่าในกลุ่มกระตุ้นได้โอโอไซต์ที่มีคุณภาพที่ดีกว่า แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เหตุผลน่าจะมาจากการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH และ GnRH ช่วยให้เกิดความสมบูรณ์ของการเจริญของฟอลลิเคิลขนาดเล็กที่สะสมอยู่ในรังไข่ (reserved follicles) ในขณะที่ในกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นนั้นอาจเป็นไปได้ว่าอาจไปเจาะจากเป็นฟอลลิเคิลที่กำลังเกิดการเสื่อมสลายและไม่เสื่อมสลาย เนื่องจากว่าในการเจาะนั้นกระทำทุก 14 วัน จากงานวิจัยของ Taneja et al. (1996) ในกระบือมูร่าห์ พบว่าการเกิดการพัฒนาของฟอลลิเคิล (follicular wave) ในกระบือที่มี 2 wave จะเกิดทุก ๆ 7 วัน เริ่มต้นที่วันที่ 1.8±0.6 และ 7.8±2.0 วันของรอบการเป็นสัด ในขณะที่งานวิจัยของ Manik และคณะ (2002) พบว่าระยะระหว่าง wave ประมาณ 9 วัน ในกรณีที่มี 2 wave และห่างกัน 8 วัน หากมี 3 wave ดังนั้นเป็นไปได้ว่าโอโอไซต์ที่คุณภาพไม่ดีที่เก็บได้จากแม่กระบือที่ไม่กระตุ้นอาจมาจากฟอลลิเคิลที่กำลังเสื่อมสลาย (atresia follicles) ก็ได้ การปรับช่วงห่างของการเจาะในกรณีที่ไม่กระตุ้นเป็นสัปดาห์ละครั้ง อาจเป็นแนวทางที่จะได้โอโอไซต์ที่มีคุณภาพดีขึ้น ในโค พบว่าการเก็บในช่วงสัปดาห์ละ 1 ,ครั้งหรือสัปดาห์ละ 2 ครั้งนั้น โอโอไซต์ที่ได้จะมีคุณภาพไม่แตกต่างกัน ส่วนในกระบือ Boni และคณะ (1996) ได้ศึกษาระยะเวลานานในการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี OPU พบว่าสามารถเก็บได้เป็นเวลาอย่างน้อย 4 เดือน โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนฟอลลิเคิลต่อครั้งการเก็บ แต่พบว่าหากระยะห่างของการเก็บมากขึ้นคุณภาพโอโอไซต์ลดลง โดยระยะห่างที่เหมาะสมในการเก็บคือประมาณทุก 4 วัน ทำให้ได้เปอร์เซนต์ของโอโอไซต์ชนิด COC สูงสุด (30.2%) เมื่อเปรียบเทียบกับทุก 3 หรือ 5 วัน ที่ได้เท่ากับ 17.6 และ 12.5% ตามลำดับ จากข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่าระยะห่างของการเจาะ OPU มีผลต่อคุณภาพของโอโอไซต์ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าหากต้องการเพิ่มอัตราของโอโอไซต์ที่มีคุณภาพนั้นจะทำได้ด้วยการลดระยะห่างของการเก็บจากทุก ๆ 2 สัปดาห์เป็น ทุก ๆ สัปดาห์ หรือศึกษาระยะห่างของการเก็บเป็นจำนวนวันดังที่มีรายงานไว้

นอกจากนี้ขนาดของฮอร์โมนน่าจะเกี่ยวข้องกับคุณภาพของโอโอไซต์ที่ได้ จากการทดลองเบื้องต้นระหว่างขนาด 280 มก. กับ 400 มก. พบว่ามีจำนวนของฟอลลิเคิลที่สามารถเจาะได้มากเมื่อใช้ขนาดสูง และโอโอไซต์ได้มากกว่าและมีคุณภาพดีกว่าเกือบเท่าตัว ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ใช้ฮอร์โมนขนาด 400 มก. ต่อตัว ซึ่งขนาดดังกล่าวเป็นขนาดที่ใช้ในโค (Stubbing and Walton, 1995) เป็นที่น่าสังเกตว่าจำนวนการฉีดระหว่าง 2 และ 3 วัน ในขนาด 280 มก. ไม่ให้ผลที่ต่างกันทั้งในการตอบสนองของรังไข่ จำนวนโอโอไซต์และคุณภาพโอโอไซต์

ขนาดของฟอลลิเคิลในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วย FSH กับไม่กระตุ้นแตกต่างกัน โดยในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นจะมีประชากรของฟอลลิเคิลที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 3-5 มม. มากกว่าในกลุ่มที่ไม่ได้กระตุ้น ประชากรของฟอลลิเคิลในกลุ่มที่ไม่ได้กระตุ้นจะอยู่ระหว่าง 6->9 มม. ทั้งนี้น่าจะเป็นผลของการใช้ฮอร์โมน FSH ในการกระตุ้นรังไข่ทำให้ฟอลลิเคิลมีการเจริญ และมี GnRH ที่เสริมเข้าไปในโปรแกรมการกระตุ้น ทำหน้าที่ควบคุมก.ารเจริญของฟอลลิเคิลไม่ให้เจริญเป็นฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษามาก่อนหน้านี้แล้ว (Techakumphu et al., 2000) ส่วนในกลุ่มที่ไม่กระตุ้นนั้นเป็นไปได้ว่าช่วงห่างของการเก็บที่ทำทุก 2 สัปดาห์ นั้นน่าจะห่างเกินไป ช่วงห่างดังกล่าวทำให้ฟอลลิเคิลมีการเจริญเป็นฟอลลิเคิลชนิดโดมิแนนท์

การทดลองนี้ไม่พบว่ามีความแตกต่างกันระหว่างแม่กระบือที่ไม่อุ้มท้องและแม่กระบือเลี้ยงลูกหลังคลอดทั้งในกลุ่มกระตุ้นและไม่กระตุ้น โดยจำนวนการตอบสนอง จำนวนโอโอไซต์รวมทั้งชนิดของโอโอไซต์ไม่แตกต่างกัน แสดงว่าสถานภาพของระบบสืบพันธุ์ไม่มีผลต่อการเก็บโอโอไซต์ด้วย โดยดังที่กล่าวไปข้างต้นว่าในช่วงวงจรการเป็นสัดและหลังคลอดจะมีการทำงานของรังไข่ในลักษะของการเจริญของฟอลลิเคิลเป็นคลื่น (follicular wave) ทั้งช่วง recruitment, selection และ dominance วิธี OPU ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bungart และคณะ (1995) ที่พบว่าไม่มีความแตกต่างของจำนวนฟอลลิเคิลของการตอบสนองในแม่โคให้นมและแม่โคแห้งนมเท่ากับ 10.6 vs 9.3 และจำนวนโอโอไซต์เท่ากับ 7.2 vs 6.9 ดังนั้นการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแม่กระบือที่กำลังเลี้ยงลูกสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งผลิตโอโอไซต์ได้ขณะท้องว่าง เป็นการใช้ประโยชน์จากแม่พันธุ์สูงสุดได้ แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าการเจาะ OPU ในกระบือที่มีระยะพักหลังคลอดนานกว่า 500 วัน จะมีจำนวนการตอบสนองของรังไข่ต่ำและโอโอไซต์ต่ำ (Boni et al., 1996) และหากระยะเวลานานขึ้นจะมีผลต่อคุณภาพของโอโอไซต์ที่ได้ โดยคุณภาพจะลดลงหากระยะเวลาหลังคลอดนานขึ้น (Gasparrini, 2002) อย่างไรก็ตามได้มีงานวิจัยที่เสนอให้มีการเจาะในแม่โคท้อง 3 เดือนแรก ที่ได้โอโอไซต์ประมาณ 5.0 โอโอไซต์ต่อตัว งานวิจัยเบื้องต้นในแม่กระบืออุ้มท้อง 1 เดือน พบว่ามีความเป็นไปได้ในการเก็บโอโอไซต์ประมาณครั้งละ 1-2 โอโอไซต์ จากที่ไม่ได้กระตุ้น ดังนั้นแนวทางการวิจัยเพื่อใช้ประโยชน์สูงสุดอาจทำในกระบืออุ้มท้องและให้ฮอร์โมน FSH ในระดับต่ำเพื่อให้มีการเพิ่มจำนวนของฟอลลิเคิลสำหรับเจาะ

อัตราการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี OPU นั้น อัตราประมาณ 50% ต่ำกว่าที่ เอกชาติ และคณะ (2543); มงคล และคณะ (2544) รายงานไว้ เนื่องจากในการทดลองนี้ได้คำนวณโดยตัดโอโอไซต์ชนิดที่มีเฉพาะเปลือก (free zona) ออกไป ซึ่งหากคิดรวมแล้วอัตราน่าจะใกล้เคียงกับที่เคยรายงานไว้ สำหรับโอโอไซต์ชนิด free zona ที่ได้นั้น อาจมาจากฟอลลิเคิลขนาดเล็กที่ยังไม่

ได้พัฒนาซึ่งเป็นช่วงที่เข็มเจาะผ่าน รายงานวิจัยโดยทั่วไปไม่มีระบุไว้ แต่จากการทดลองที่ผ่านมาพบว่าโอโอไซต์ชนิดนี้อาจพบได้จากการเก็บจากฟอลลิเคิลขนาดต่าง ๆ เช่นในกระบือหมายเลข 007 พบ free zona ทุกครั้งของการเจาะ มีจำนวนมากบ้างหรือน้อยบ้าง ทำให้อัตราการเก็บเหลือแค่ 43.4% เท่านั้น อัตรานี้ใกล้เคียงกับที่รายงานในกระบือเมอดิเตอร์เรเนียน โดย Boni และคณะ (1996) รายงานไว้ 49.4% และต่ำกว่าในโคที่รายงานโดยทั่วไปที่อยู่ในช่วงระหว่าง 60-80% ทั้งนี้อาจเนื่องจากประชากรของฟอลลิเคิลและการสร้างฟอลลิเคิล (recruitment) ในกระบือจะต่ำกว่าในโคทั้งจำนวนและคุณภาพ (review โดย Manik et al., 2002) ในกระบือจะมี primordial follicle ประมาณ 12,000-19,000 ฟอลลิเคิลสำหรับกระบือสาว และ 10,000-20,000 ฟอลลิเคิลในแม่กระบือ ส่วนในโคมีประมาณ 150,000 ฟอลลิเคิลมากกว่าเกือบ 10 เท่า นอกจากนี้รังไข่ของกระบือยังมีขนาดเล็ก การ fix รังไข่เพื่อเก็บด้วยวิธี OPU นั้นมีความลำบากมากกว่ารังไข่ของโค จึงเป็นสาเหตุของความแตกต่างของอัตราการเก็บระหว่างกระบือและโค

การติดตามผลกระทบหลังจากการเก็บด้วยวิธี OPU กับการทำงานของระบบสืบพันธุ์ ได้เลือกวิธีการตรวจสอบการทำงานของรังไข่ใน 2 รูปแบบ คือ วิธีที่ 1 ทำการติดตามการเจริญของฟอลลิเคิลสัปดาห์ละครั้ง และทำการเจาะซ้ำด้วยวิธี OPU และวิธีที่ 2 โดยการติดตามการเจริญของฟอลลิเคิลทุกวัน วันละครั้งเพื่อตรวจสอบจากการทำงานของรังไข่จะการสร้างฟอลลิเคิลขึ้นมาใหม่ (recruitment) หลังโปรแกรมการเจาะสิ้นสุดลงทั้งกลุ่มกระบือที่ไม่อุ้มท้องและกระบือหลังคลอด โดยพบว่าหลังจากทำการเลิกเจาะโอโอไซต์แล้ว ฟอลลิเคิลมีการเกิดขึ้นมาใหม่ทุกสัปดาห์ โดยทดลองเจาะโอโอไซต์พบว่าจำนวนที่ได้ไม่แตกต่างกับที่ทำการเจาะแบบทุกสองสัปดาห์ทั้งในแง่ปริมาณและคุณภาพ สามารถนำมาทำการเจาะซ้ำอีกอย่างน้อยตัวละ 5-9 ครั้ง โดยได้จำนวน โอโอไซต์ที่ใกล้เคียงกับที่เจาะเดิมแบบไม่กระตุ้น และคุณภาพของโอโอไซต์ในกลุ่ม COC+S ประมาณ 64% แสดงรังไข่มีการทำงานที่ปกติ ดังแสดงในตารางที่ 23 นอกจากนี้จากการติดตามการเจริญของฟอลลิเคิลของแม่กระบือหลังสิ้นสุดการเจาะ พบว่ามีการพัฒนาเป็นคลื่นฟอลลิเคิลหลังเลิกเจาะนาน 15-16 วัน โดยเฉลี่ย ในกระบือ 3 ใน 4 ตัว แสดงให้เห็นว่ารังไข่ของกระบือที่ถูกเจาะเป็นระยะเวลานานแม้จะทำการเจาะมาแล้วอย่างน้อย 6 เดือนติดต่อกัน อย่างไรก็ตามพบว่ามีกระบือ 1 ใน 4 ตัว ไม่มีแนวโน้มของการพัฒนาเป็นคลื่นของฟอลลิเคิล ซึ่งเป็นไปได้ว่าอาจเกิดจากสภาพความสมบูรณ์ของกระบือ (body condition) โดยกระบือดังกล่าวมี body condition ประมาณ 2.5 เท่านั้น Henao et al. (2000) เสนอแนะว่าความสมบูรณ์ของร่างกายโคจะมีส่วนเกี่ยวข้องการเกิด (emergence) ของการเจริญของฟอลลิเคิล จากงานวิจัยในโคพบว่าหลังการเจาะแล้ว รังไข่จะมี fibrous tissue หุ้มรอบรังไข่ รังไข่มีการหนาตัวขึ้นเล็กน้อย และมีก้อนเลือดในฟอลลิเคิล Petyim et al. (2001) หลังจากเจาะรังไข่ในโคนาน 4-5 สัปดาห์ พบว่า

ลักษณะทางพยาธิวิทยาจากการสังเกตด้วยตาเปล่าและจากภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของรังไข่มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย โดยมี connective tissue ใน ovarian tunica albuginea หนากว่าโคที่ไม่ได้เจาะ รวมทั้งมีการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมน FSH, LH, Progesterone และ PGF2 alpha metabolite ส่วน Kriup et al. (1994) พบว่าสามารถนำแม่โคไปใช้ผสมพันธุ์ได้หลังเลิกเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี OPU ซึ่งจะสอดคล้องกับข้อมูลของการติดตามผลกระทบของการเจาะในกระบือของการทดลองนี้

สำหรับประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัยครั้งนี้ คือ

1. สามารถใช้แม่กระบือเป็นแหล่งเก็บโอโอไซต์เพื่องานวิจัยขั้นสูง และใช้ประโยชน์สูงสุดโดยเก็บโอโอไซต์จากแม่พันธุ์ในช่วงเลี้ยงลูกหลังคลอด
2. เมื่อใช้เทคนิคนี้ร่วมกับการปฏิสนธินอกร่างกายและการย้ายฝากตัวอ่อนจะเป็นวิธีการผลิตตัวอ่อนและลูกกระบือที่มีคุณภาพ
3. ปรับใช้กับกระบือพันธุ์ดีที่เลี้ยงในศูนย์กระบือแห่งชาติ จังหวัดสุรินทร์ จะเป็นการพัฒนาด้านปรับปรุงพันธุกรรมในอนาคต
4. เป็นองค์ความรู้ใหม่ด้านวิทยาการสืบพันธุ์โดยเฉพาะในกระบือปลักซึ่งยังไม่มีข้อมูล
5. สามารถรู้ถึงผลกระทบของการเจาะรังไข่ด้วยวิธี OPU ต่อการทำงานต่อเนื่องของระบบสืบพันธุ์หลังเลิกเจาะ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

- กรมปศุสัตว์. 2543. ประมวลสถิติประจำปี 2543. ฝ่ายประมวลผลและสถิติ กองแผนงาน กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
- ชัยณรงค์ โลหชิต มงคล เตชะกำพุ วิชัย ทันตศุภาลักษณ์ เกวลี ฉัตรดรงค์ ศิริวัฒน์ ทรวดทรง จินดา สิงห์ลอ 2539. การเก็บโอโอไซต์ในลูกโคพื้นเมืองด้วยวิธี Ovum Pick Up. เวชชสารสัตวแพทย์ 25(4):303-313.
- มาลี อภิเมธีธำรง นุชรินทร์ ศงสะเสน วิบูลย์ เยี่ยงวิศวกูร ยันต์ สุขวงศ์ และมงคล เตชะกำพุ 2541. การแช่แข็งตัวอ่อนที่เก็บจากฝูงแม่กระบือปลัก (*Bubalus bubalis*) พันธุ์ดี เวชชสารสัตวแพทย์ 28(4):39-48
- มงคล เตชะกำพุ ชัยณรงค์ โลหชิต วิชัย ทันตศุภารักษ์ วันเพ็ญ ศรีอนันต์ จินดา สิงห์ลอ และจินตนา อินทรมงคล 2537. การใช้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินเพื่อกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ของลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์ รายงานผลการวิจัยทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปี 2537 23 หน้า
- มงคล เตชะกำพุ ยันต์ สุขวงศ์ มาลี อภิเมธีธำรง ศิริวัฒน์ อินทรมงคล จินตนา อินทรมงคล สุพรชัย ฟ้ารี ชัยณรงค์ โลหชิต และพีระศักดิ์ จันทร์ประทีป 2541ก. การใช้ฮอร์โมนแพรกแนนท์ แมร์ ซีรั่มโกนาโดโทรปินและฟอลลิเคิล สติมูเลติ้ง ฮอร์โมน ในการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ในกระบือปลักไทย (*Bubalus bubalis*). รายงานการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 24 ประจำปี 2541 5-7 สิงหาคม 2541 หน้า 88-96
- มงคล เตชะกำพุ ยันต์ สุขวงศ์ จินตนา อินทรมงคล มาลี อภิเมธีธำรง วิบูลย์ เยี่ยงวิศวกูร บงกาล บุญตาราษฎร์ สุพรชัย ฟ้ารี และศิริวัฒน์ อินทรมงคล 2541ข. การตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็งที่ได้จากฝูงแม่กระบือปลักพันธุ์ดี รายงานการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 24 ประจำปี 2541 5-7 สิงหาคม 2541 หน้า 97-106
- มงคล เตชะกำพุ เอกชาติ พรหมดิเรก นวเพ็ญ ภูติกนิษฐ์ จินดา สิงห์ลอ 2544. ผลของขนาดของแรงดูดสูญญากาศต่อการเก็บโอโอไซต์ด้วยเครื่องมือคลื่นเสียงความถี่สูงสอดผ่านทางช่องคลอดจากกระบือปลักไทย รายงานฉบับสมบูรณ์ กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 35 หน้า
- เอกชาติ พรหมดิเรก มงคล เตชะกำพุ นวเพ็ญ ภูติกนิษฐ์ และอัญชลี ณ เชียงใหม่ 2543. การศึกษาเบื้องต้นของการเก็บโอโอไซต์โดยวิธี OPU ในกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์ รายงานการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์ ครั้งที่ 26 ประจำปี 2543 15-17 พฤศจิกายน 2543 หน้า 97-106

Boni, R. 1994. *In vivo* collection of oocytes and embryos in bovine and buffalo species. Buffalo J. Supplement 2:161-171.

Boni, R., Roviello, S. and Zicarelli, L. 1996. Repeated ovum pick-up in Italian mediterrnean buffalo Cows. Theriogenology. 46:899-909.

Boni, R., Roelofsen, MWM., Pieterse, MC., Kogut, J. and Kruip, ThAM. 1997. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. Theriogenology. 48:277-289.

Broadbent, P.J., Dolman, D.F., Watt, R.G., Smith, A.K. and Franklin, M.F. 1997. Effect of frequency of follicle aspiration on oocyte yield and subsequent superovulatory response in cattle. Theriogenology. 47:1027-1040.

Brogliattti, G.M. and Adams, G.P. 1996. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. Theriogenology. 4: 1163-1176.

Bungartz, L., Lucas-Hahn, A., Rath, D. and Niemann, H. 1995. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. Theriogenology. 43:667-675.

Baruselli,P.S. ,Mucciolo, R.G.., Visintin, J.A., Viana, W.G., ARRUDA, R.P., Madureira, E.H., Oliveira, C.A. and Molero-Fiho, J.R. 1997. Ovarian follicular dynamics during the estous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). Theriogenology. 47:1531-1547.

Chantarakhana, C., Usanakornkul, S., Kamnerdpecth, V., Na Phuket, S.R., Veerasit, P. and Pookesorn, W. 1981. Age of first calving and calving interval of Thai swamp buffaloes. Ann. Rep. 1981. The Nat. Buffalo Res. And Development Proj., Bangkok, Thailand, pp. 50-55.

Chantalakhana, C. 2001. Contribution of water buffaloes in rural development. In: Water Buffaloesfro Food Security and Sustainable Rural Development. Proc. Regional Workshop on Buffalo Development. Surin, Thailand. 8-10 Feb, 2001, p1-10.

Chantaraprateep, P., Lohachit, C., Kobayshi, 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.

Chantaraprateep, P., Lohachit, C., Techakumphu, M. Kobayshi, G., Virakul, P., Kunavongkrit, A. Prateep, P. and Limskul, A. 1989a. Early embryonic development in Thai swamp buffalo.(*Bubalus bubalis*). Theriogenology. 31(6): 1131-1139.

Chantaraprateep, P., Kobayashi, G., Lohachit, C., Virakul P., Kunavongkrit, A. Techakumphu, M., Prateep, P. and Dusitsin, N. 1989b. Success in embryo transfer in Thai swamp buffalo. Buffalo Bullentin. 8(1):4-5.

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.

Faber, D.C., Molina, J.A., Ohlrichs, C.L., Vander Zwaag, D.F. and Ferre, L.B. 2002. Commercialization of animal biotechnology. Theriogenology 59:125-138.

FAO, 1996. FAO Yearbook Production, Vol. 50. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Fisher, H. and Bodhipaksha, P. 1992. Reproduction in swamp buffalo. In: Buffalo Production. Chapter 7., Edited by N.M. Tulloh and J.H.G. Holmes. Elsevier, New York, p153-181.

Fry, P.J., Niall, E.M., Simpson, T.L., Squires, T.J. and Reynolds, J. 1997. The collection of oocytes from bovine ovaries. Theriogenolgy. 47:977-987.

Galli, C., Duchi, R., Crotti, G. and Lazzani, G. 1998. Embryo production by ovum pick up in water buffalo. Theriogenology. 49: 400 (Abstr.)

Gasparrini, B. 2002. In vitro embryo production in buffalo species: State of the art. Theriogenology. 57: 237-256.

Graff, K,J., Meintjes, M., Dyer, V.W., Paul, J.B. Denniston, R.S., Ziomek, C., and Godke, R.A. 1999. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval following FSH stimulation of domestic goats. Theriogenology. 51:1099-1199.

Hashimoto, S., Tkakura, R., Minami, N and Yamada, M. 1999. Ultrasound-guided follicle aspiration: Effect of the frequency of a linear transvanal probe on the collection of bovine oocytes. Theriogenology. 52:131-138.

Henao. G., Oliver-Angel, M. and Maldonado-Estrada, J.G. 2000. Follicular dynamics during postpartum anestrus and the first estrous cycle in suckled or non-suckled Brahman (*Bos indicus*) cows. Anim. Reprod. Sci. 63:127-136.

- Kitiyanant, Y., Tocharus, C., Areekijseree, M. and Pavasuthipaisit, K. 1995. Swamp buffalo oocytes from transvaginal ultrasound-guided aspiration fertilized and co-cultured *in vitro* with bovine oviductal epithelial cells. Theriogenology. 43(1):250. (Abstr.)
- Kruip, Th.A.M., Pieterse, M.C., van Beneden, Th.H., Vos, P.L.A.M, Wurth, Y.A. and Taverne, M.A.M. 1991. A new method for bovine embryo production: a potential alternative to superovulation. Vet. Rec. 208-210.
- Kruip, Th.A.M., Boni, R., Wurth, Y.A., Roelofsen, M.W.M. and Pieterse, M.C. 1994. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. Theriogenology. 42:675-684.
- 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. 41:67-72.
- Manik, R.S., Palta, R., Singla, S.K. and Sharma, V. 2002. Folliculogenesis in buffalo (Bubalus bubalis): a review. Reprod. Fertil. Dev. 14:315-325.
- Meintjes, M., Bellow, M.S., Broussard, J.R., Paul, J.B. and Godke, R.A. 1995. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef cattle for *in vitro* fertilization. J. Anim. Sci. 73:967-974.
- Murphy, M.G., Boland, M.P. and Roche, J.F. 1990. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post-partum beef suckler cows. J. Reprod. Fert. 90:523-533.
- Na-Chiengmai, A. 2002. Development of swamp buffalo breeding improvement for sustainable use in Thailand. Workshop on EC-China water buffalo development project. 5-8 April, 2002, Kunming, PRC, 7p.
- Petyim, S., Bage, R., Forsberg, M., Rodriguez-Martinez, H. and Larrson, B. 2001. Effects of repeated follicular punctures on ovarian morphology and endocrine parameters in dairy heifers. J. Vet. Med. A. 48: 449-463.
- Stubbing, R.B. and Walton, J.S. 1995. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows. Theriogenology. 43: 705-712.

- Techakumphu, M., Lohachit, C., Chantaraprateep, Prateep, P. and Lobayshi, G. 1989. Preliminary report on cryoperservation of Thai swamp buffalo embryo:manual and automatic methods. Buffalo Bullentin, 8(2):29-36.
- Techakumphu, M. 1990. Study on embryonic development and embryo freezing of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) in Thailand. Thai J. Hlth. Resch. 4(1):65- 71.
- Techakumphu, M., Phutikanit, N., Suadsong, S., Bhumibhanom, T., Pita, A. and Coygasem, G.2000. The effect of GnRH supplement of FSH and PMSG treatments for prepubertal swamp buffalo calves (*Bubalus bubalis*). J. Vet. Med. Sci. 62(3):269-272.
- Techakumphu, M., Promdireg, A., Na-Chiengmai A. and Phutikanit, N. 2003. Repeated Ovum Pick Up in Prepubertal Swamp Buffalo (Bubalus bubalis) Calves after FSH Superstimulation. Theriogenology (in press)
- Taneja, M., Ali, A. and Singh, G. 1996. Ovarian follicular dynamics in water buffalo. Theriogenology. 46:121-130.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย