บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

แม่แพะมีประสิทธิภาพในการสืบพันธุ์ดีกว่าสัตว์เคี้ยวเอื้องทั่วไป โดยจะมีการตกไข่มากกว่า 1 ฟอง ในแต่ละวงรอบการเป็นสัด ซึ่งมีอัตราการตกไข่เฉลี่ย 1.8 ฟอง (Pendleton *et al.,* 1992) ดังนั้นการตั้งท้องแต่ละครั้งของแม่แพะอาจจะให้ลูกมากกว่า 1 ตัว ตลอดอายุของแม่แพะสามารถให้ลูกได้ประมาณ 10-15 ตัว ซึ่งเป็นจำนวนที่น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับไข่ (oocyte) ที่มีอยู่จำนวนมากในรังไข่ (ovary) นับว่าเป็นเรื่องที่น่าเสียดายยิ่งนัก หากไข่ที่มีอยู่ในรังไข่จำนวนมหาศาลเหล่านั้นต้องสูญเปล่า โดยไม่ได้นำมาใช้ให้เกิดประโยชน์

ปัจจุบันการผลิตสัตว์ได้มีการนำเทคโนโลยีสมัยใหม่มาใช้ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตมากมายหลายวิธี การย้ายฝากเอ็มบริโอ (embryo transfer, ET) เป็นเทคโนโลยีชีวภาพที่นำมาใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของสัตว์เพศเมีย เป็นการเพิ่มจำนวนสัตว์พันธุ์ดีทางฝ่ายแม่ได้รวดเร็วยิ่งขึ้น แต่เทคนิคการทำ ET ประกอบด้วยหลายกระบวนการที่เกี่ยวข้องกัน เช่น การควบคุมการเป็นสัด การชักนำให้เกิดการตกไข่มากกว่าปกติ (superovulation) การเก็บไข่ (collection of ova) การเลี้ยงรักษาไข่ที่เก็บมา (*in vitro* culture) และการย้ายฝากไข่ที่ผสมแล้ว ซึ่งทุกกระบวนการจะมีความสัมพันธ์เกี่ยวเนื่องกันตลอด การชักนำให้เกิดการตกไข่มากกว่าปกติสามารถทำได้โดยการฉีดฮอร์โมนเข้าไปในตัวสัตว์ เพื่อกระตุ้นให้มีการเจริญและพัฒนาของกระเปาะไข่ ฮอร์โมนเหล่านี้ได้แก่ Follicle Stimulating Hormone (FSH) และ Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) ซึ่งสามารถใช้ร่วมกับฮอร์โมนอื่นๆ อีก ในการเหนี่ยวนำให้เป็นสัดพร้อมกัน (synchronization of estrus) เช่น Progesterone และ Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) หรือฮอร์โมนที่ช่วยให้มีการตกไข่ (ovulation) เช่น Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) Luteinizing Hormone (LH) Human Chorionic Gonadotropin (HCG) และ Recombinant Bovine Somatotrophin (rBST) ฮอร์โมนเหล่านี้จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการตกไข่มากกว่าปกติ

ดังนั้นการชักนำให้เกิดการตกไข่มากกว่าปกติในแพะโดยใช้ฮอร์โมน จึงน่าจะมีจำนวนการตกไข่ และเอ็มบริโอมากกว่าวงรอบการเป็นสัดตามธรรมชาติ ซึ่งเอ็มบริโอที่ได้จำเป็นต้องศึกษาอย่างละเอียดถี่ถ้วนพร้อมกับประเมินคุณภาพ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการย้ายฝากเอ็มบริโอแพะและเพื่อการศึกษาค้นคว้าทางเทคโนโลยีชีวภาพเกี่ยวกับการผลิตแพะในอนาคต

ตรวจเอกสาร

1. วงรอบการเป็นสัดและการตกไข่ตามปกติของแพะ

วงรอบการเป็นสัด หมายถึง ช่วงเวลาการเป็นสัดครั้งหนึ่งถึงการเป็นสัดครั้งต่อไป เมื่อสัตว์เพศเมียไม่ได้อยู่ในระหว่างการตั้งท้อง (Campbell and Lasley, 1985) วงรอบการเป็นสัดของแพะโดยทั่วไปจะยาวประมาณ 18-21 วัน โดยที่แพะในเขตร้อนชื้น (tropical climate) จะมีวงรอบการเป็นสัดตลอดทั้งปี ส่วนแพะที่อยู่ในเขตอบอุ่น (temperate climate) มีวงรอบการเป็นสัดเฉพาะช่วงฤดูสืบพันธุ์คือ ช่วงฤดูใบไม้ร่วงและฤดูหนาวเท่านั้น (ศิริชัย, 2531) นอกจากนี้ จรวย (2540) รายงานว่า แพะยังมีการเป็นสัดแบบมีพักยก (split estrus) โดยวงรอบการเป็นสัด (ระยะเป็นสัด + ระยะพักยก) ที่น้อยกว่า 8 วัน จะถือว่าเป็นการเป็นสัดแบบมีการพักยก และจัดแบ่งประเภทของวงรอบการเป็นสัดของแพะเป็น มีวงรอบการเป็นสัดสั้นคือ (8 - 16 วัน) วงรอบปกติ (17-25 วัน) และวงรอบยาว (มากกว่า 25 วัน)

Bearden และ Fuquay (1984) กล่าวว่า วงรอบการเป็นสัดของสัตว์เพศเมียสามารถแบ่งออกเป็น 4 ระยะ คือ

1. proestrus เป็นระยะที่มีการสลายของคอร์ปัส ลูเทียม (corpus luteum, CL) ทำให้ระดับของฮอร์โมน progesterone ลดต่ำลงและมีการเจริญของกระเปาะไข่อย่างรวดเร็ว ช่วงปลายของระยะนี้ฮอร์โมน estrogen จะมีระดับสูงขึ้นส่งผลให้มีการแสดงออกของพฤติกรรมการเป็นสัดอย่างชัดเจน ในแพะมีระยะเวลาในช่วง proestrus นานประมาณ 2-3 วัน

2. estrus เป็นระยะที่สัตว์เพศเมียยอมรับการผสมพันธุ์จากตัวผู้ ยอมยืนนิ่งให้ตัวผู้ปีนทับ สัตว์ต่างชนิดกันอาจมีความยาวของระยะนี้แตกต่างต่างกัน ในแพะมีระยะเวลาในช่วงนี้นานประมาณ 30-40 ชั่วโมง

3. metestrus เป็นระยะคลายจากการเป็นสัด สัตว์เพศเมียไม่ยอมรับการผสมพันธุ์จากเพศผู้อีกต่อไป ในแพะมีการตกไข่เกิดขึ้นในระยะนี้ และระยะนี้มีเวลานานประมาณ 2-3 วัน

4. diestrus เป็นระยะที่มีความยาวกว่าระยะอื่น ๆ โดยในระยะนี้มีการทำงานของ CL อย่างเต็มที่ มีการผลิตฮอร์โมน progesterone ในช่วงปลายของระยะนี้ และประมาณวันที่ 16 ถึง 17 ของวงรอบการเป็นสัดจะมีการสลายของ CL ระยะ diestrus ของแพะมีเวลานานประมาณ 13 ถึง 15 วัน

จรวย (2540) ศึกษาระยะต่างๆ ของวงรอบการเป็นสัดในแพะ (โดยแพะทดลองมีอยู่คละพันธุ์กันทั้งพันธุ์พื้นเมืองของไทย และลูกผสมระหว่างพันธุ์พื้นเมืองไทยกับพันธุ์แองโกลนูเบียนรวมกัน) พบว่า แพะที่มีวงรอบการเป็นสัดแบบวงรอบปกติมีค่าเฉลี่ยของระยะ proestrus, estrus,

metestrus และระยะ diestrus เท่ากับ 14.15±24.26, 23.64±12.86, 19.03±13.45 และ 470.56±51.70 ชั่วโมง ตามลำดับ

อัตราการตกไข่ของแพะขึ้นกับปัจจัยหลายๆ อย่าง เช่น พันธุ์ จำนวนครั้งการให้ลูก สถานะการสืบพันธุ์ อายุ อาหาร สภาพอากาศ ฤดูกาล และด้านการจัดการ ฯลฯ (ศิริชัย และ จรวย, 2541) มีหลายรายงานพบว่าโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วงประมาณ 1.55-1.87 ฟอง ต่อวงรอบการเป็นสัดแต่ละครั้ง (Wani, 1989; Akusa and Egbunike, 1990; Greyling and Van Nickerk, 1990; Pendleton *et al.,* 1992; Chemineau *et al.,* 1992)

2. ฮอร์โมนที่มีบทบาทในการชักนำให้เกิดการตกไข่จำนวนมาก

2.1 **ฟอลลิเคิล สติมูเลทติง ฮอร์โมน (Follicle stimulating hormone , FSH)** มีสูตรโครงสร้างเป็นไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ประกอบด้วย กรดอะมิโนเรียงต่อกันเป็นเปปไทด์ 2 เส้น คือ แอลฟ่าและเบต้า ซึ่งเชื่อมกันโดยไฮโดรเจนบอน (hydrogen bond) และแรงวันเดอวาลล์ (vander waals forces) มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 30,000 – 67,000 สร้างมาจาก basophilic cell ของต่อมใต้สมองส่วนหน้า การหลั่งฮอร์โมน FSH จะอยู่ภายใต้การควบคุมของโกนาโดโทรปินรีลีสซิงฮอร์โมน (GnRH) เอสโตรเจน, โปรเจสเตอโรน และอินฮิบิน (inhibin) FSH อยู่ในกระแสเลือดในรูปอิสระ (free form) และมีครึ่งชีวิต (half life) ประมาณ 3-4 ชั่วโมง FSH ในเพศเมีย ทำหน้าที่กระตุ้นการเจริญของกระเปาะไข่ และเพิ่มขนาดและน้ำหนักของไข่ นอกจากนี้ยังทำหน้าที่ร่วมกับ LH ในการสร้างฮอร์โมนเอสโตรเจนจากกราฟเฟียนฟอลลิเคิล (graafian follicle) และยังมีหน้าที่ควบคุมการตกไข่ (นงลักษณ์, 2526)

2.2 **เพร็กแนน แมร์ ซีรั่ม โกนาโดโทรปิน** Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) หรืออาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า equine Chorionic Gonadotropin (eCG) เป็นฮอร์โมนที่ถูกสร้างโดยเซลล์มดลูกของแม่ม้าที่กำลังตั้งท้องระหว่าง 60-90 วัน มีครึ่งชีวิตนานประมาณ 40-125 ชั่วโมง (Hunter, 1980) เนื่องจากมีคุณสมบัติทางเคมีเป็นไกลโคโปรตีน ซึ่งมีกรดไซอะลิก (sialic acid) เป็นส่วนประกอบอยู่ในปริมาณมาก PMSG ทำหน้าที่คล้ายฮอร์โมน FSH คือ กระตุ้นรังไข่ให้มีการเจริญของกระเปาะไข่ และมีฤทธิ์ของ LH อยู่เล็กน้อย (Hafez, 1980) Armstrong และคณะ (1983b) กล่าวว่า มีการนำ PMSG มาใช้ในการชักนำให้เกิดการตกไข่มากกว่าปกติ ทั้งกับสัตว์ทดลองในห้องปฏิบัติการและปศุสัตว์

3. เทคนิคและวิธีการชักนำให้เกิดการตกไข่จำนวนมาก

การชักนำให้เกิดการตกไข่จำนวนมากเพื่อย้ายฝากเอ็มบริโอมักจะทำควบคู่กับการเหนี่ยวนำให้เป็นสัดพร้อมๆ กัน เพื่อต้องการให้ตัวให้ (donor) และตัวรับ (recipient) มีระยะการเป็นสัดห่างกันไม่เกิน 12 ชั่วโมง เพื่อให้สภาพของมดลูกของตัวให้และตัวรับมีสภาพใกล้เคียงกันมากที่สุด ทำให้เอ็มบริโอที่ย้ายฝากสามารถที่จะฝังตัวและมีการเจริญพัฒนาต่อไปได้

การชักนำให้แพะเป็นสัดพร้อมๆ กัน จะฉีด $PGF_{2\alpha}$ หรือ analogue ของ $PGF_{2\alpha}$ เช่น cloprostenol (CLO) ให้แพะ 2 ครั้ง โดยการฉีดครั้งที่ 2 หลังจากฉีดครั้งแรก 10-14 วัน การฉีดครั้งแรกไม่ทราบว่าแพะอยู่ในวันที่เท่าใดของวงรอบการเป็นสัด แต่หลังจากฉีดครั้งที่ 2 แพะทดลองมีอัตราการเป็นสัดเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการฉีดครั้งแรก (Ott *et al.,* 1980; Greyling and Van Nickerk, 1990; Romano, 1998) แต่ปัจจุบันนิยมใช้ฟองน้ำที่มีฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน สอดเข้าไปในช่องคลอดของแพะเพศเมีย เพื่อปรับระดับปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนให้แพะทุกตัวให้อยู่ในระยะ luteal phase เหมือนๆ กัน และก่อนที่จะดึงเอาฟองน้ำออก 2 วัน จะฉีดฮอร์โมนโกนาโดโทรปินเพื่อชักนำให้เกิดการตกไข่มากกว่าปกติ ฮอร์โมนที่นิยมใช้คือ PMSG และ FSH หลังจากฉีดฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน แล้ว 2 วัน จะฉีด $PGF_{2\alpha}$ เพื่อทำลาย CL และทำให้ progesterone มีระดับต่ำลง เมื่อแพะแสดงอาการเป็นสัด จะผสมโดยใช้พ่อพันธุ์หรือผสมเทียม สามารถผ่าตัดเก็บเอ็มบริโอที่ท่อนำไข่หลังจากแพะแสดงอาการเป็นสัด 60-84 ชั่วโมง (Ishwar and Memon,1996) หรือผ่าตัดเก็บเอ็มบริโอที่ปีกมดลูกของแม่แพะหลังจากผสมพันธุ์แล้ว 5-6 วัน (Valdez *et al.,* 1995; Yeasmin and Haresign, 1998)

3.1 การชักนำให้เกิดการตกไข่มากกว่าปกติในแพะโดยใช้ PMSG

PMSG มีครึ่งชีวิตที่ยาวนาน ซึ่งสามารถใช้ฉีดเพียงครั้งเดียวก็เพียงพอที่จะทำให้เกิดการตกไข่มากกว่าปกติได้ (รังสรรค์, 2530) ปริมาณการใช้ PMSG สรุปจากหลายๆ รายงาน พบว่าการใช้อยู่ในปริมาณ 400-1,000 IU โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อหรือใต้ผิวหนัง (ศิริชัย และ จรวย, 2541; Ritar *et al.,* 1984; Mani and Vadnere, 1989; Sukhato *et al.,* 1991; Pendleton *et al.,* 1992)

การชักนำให้เกิดการตกไข่มากกว่าปกติในแพะ ส่วนใหญ่มักจะฉีด PMSG หรือ FSH ให้แพะในระยะกลาง (วันที่ 10-14) ของวงรอบการเป็นสัด ซึ่งจะให้ผลดีกว่าระยะต้นและระยะปลายของวงรอบการเป็นสัด (Armstrong and Evans, 1983; Ishwar and Memon, 1996; Tiwari *et al.,* 1999) แต่ก็มีบางรายงานที่ผลการทดลองแตกต่างกับรายงานดังกล่าว เช่น Wani และคณะ (1990) รายงานว่า การฉีด PMSG สามารถจะฉีดให้แม่แพะในระยะต้น (วันที่ 3-5) และระยะกลาง (วันที่ 7-15) ของวงรอบการเป็นสัด (ตามด้วย $PGF_{2\alpha}$ และ HCG ทั้งสองระยะ) พบว่าการฉีด

PMSG ในวันที่ 3-5 ของวงรอบการเป็นสัด แพะมีอัตราการตกไข่เฉลี่ย 13.0 ฟอง ซึ่งมากกว่าการฉีด PMSG ในวันที่ 7-15 ของวงรอบการเป็นสัด ซึ่งมีอัตราการตกไข่เฉลี่ย 2.3 ฟองในขณะที่ Sukhato และคณะ (1991) ทดลองฉีด PMSG ให้แก่แพะในวันที่ 15-16 ของวงรอบการเป็นสัดพบว่าแพะมีอัตราการตกไข่เฉลี่ย 11.2 ฟอง

นอกจากนี้การใช้ $PGF_{2\alpha}$, Progesterone และ GnRH ก็มีการนำมาใช้ร่วมกับฮอร์โมน PMSG เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการตกไข่มากกว่าปกติเช่นกัน (Cameron *et al.,* 1988; Ryot and Vadnere, 1991; Sukhato *et al.,* 1991)

ศิริชัย และ จรวย (2541) รายงานว่าการใช้ฮอร์โมน PMSG ร่วมกับ ฮอร์โมน HCG ในการชักนำให้เกิดการตกไข่มากกว่าปกติในแพะพันธุ์พื้นเมืองของไทย และลูกผสม (พื้นเมือง x แองโกลนูเบียน) มีแนวโน้มว่าสามารถเพิ่มจำนวน CL มากกว่ากลุ่มควบคุม และกระเปาะไข่ขนาดใหญ่มีค่าเฉลี่ยน้อยกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่ถึงกับแสดงความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จำนวน CL, กระเปาะไข่ขนาดใหญ่ (เส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 0.5 ซ.ม.) ที่ชักนำให้เกิดการตกไข่มากกว่าปกติโดยใช้ PMSG และ PMSG+HCG

	กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม [1/]	กลุ่มที่ 2 PMSG	กลุ่มที่ 3 PMSG+HCG
จำนวน CL เฉลี่ยต่อตัว (±SD)[NS]			
คำนวณจากจำนวนแพะทั้งหมด	2.38±0.74 (8)	4.37±3.29 (8)	4.38±3.62 (8)
คำนวณจากจำนวนแพะที่มีการตกไข่	2.38±0.74 (8)	5.00±3.00 (7)	5.00±3.42 (7)
คำนวณจากจำนวนแพะที่มีการตกไข่มากกว่าปกติ (CLมากกว่า 3 อัน)	–	5.66±2.66 (6)	6.60±2.51 (5)
จำนวนกระเปาะไข่ขนาดใหญ่(เฉลี่ย/ตัว)[NS]	4.38±2.26 (8)	3.50±3.12 (8)	3.88±1.96 (8)

[NS] ค่าเฉลี่ยในแนวนอนเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

[1/] ไม่ฉีดฮอร์โมน

หมายเหตุ ค่าที่อยู่ในวงเล็บคือ จำนวนสัตว์ทดลองที่นำมาคำนวณ

ที่มา : ดัดแปลงจาก ศิริชัย และ จรวย (2541)

3.2 การชักนำให้เกิดการตกไข่มากกว่าปกติในแพะโดยใช้ FSH

FSH เป็นฮอร์โมนที่มีครึ่งชีวิตสั้น ดังนั้นการใช้ FSH ในการชักนำให้เกิดการตกไข่มากกว่าปกติต้องฉีด FSH ทุกๆ 12 ชั่วโมง เพื่อรักษาระดับ FSH ไม่ให้ลดต่ำลง (รังสี และคณะ, 2541; Adams *et al.,* 1997; Sugano and Shinogi, 1999; Cognie,1999)

การใช้ FSH ละลายด้วย pyrovinylpyrrolidone (PVP) สามารถทำให้ FSH มีครึ่งชีวิตยาวขึ้นโดยใช้ FSH ละลายด้วย PVP 30 เปอร์เซ็นต์ ฉีดเข้ากล้ามเนื้อหรือใต้ผิวหนังเพียงครั้งเดียว สามารถชักนำให้เกิดการตกไข่มากกว่าปกติในโค (Sugano and Shinogi, 1999) มีการศึกษาอัตราส่วนของ FSH กับ LH โดย Baril และคณะ (1989) รายงานว่าอัตราส่วนของ FSH: LH ที่มีค่าเท่ากับ 1: 0.3-0.4 ในระหว่างการฉีด FSH 2 ครั้งสุดท้าย ในการชักนำแม่แพะให้เกิดการตกไข่มากกว่าปกติ สามารถเพิ่มอัตราการตกไข่และคุณภาพของเอ็มบริโอ

ปริมาณการใช้ FSH อยู่ในช่วง 250 – 1000 IU ปริมาณที่ฉีดทั้งหมดอยู่ระหว่าง 18-24 มิลลิกรัม โดยฉีดติดต่อกันประมาณ 3-4 วันๆ ละ 2 ครั้ง (เช้า-เย็น) โดยลดปริมาณลงเรื่อยๆ (D'Alessandro *et al.,* 1996; Adams *et al.,* 1997)

4. ผลการชักนำให้เกิดการตกไข่มากกว่าปกติในแพะ

การชักนำให้เกิดการตกไข่มากกว่าปกติ ด้วยการฉีด PMSG ทำให้แพะมีอัตราการตกไข่เพิ่มขึ้น ซึ่งมีหลายรายงานอยู่ในช่วงประมาณ 3.0-13.0 ฟอง (ศิริชัย และ จรวย, 2541; Cameron *et al.,* 1988; Mani and Vadnere, 1989; Goel and Agrawal, 1990; Wani *et al.,* 1990; Ryot and Vadnere, 1991; Sukhato *et al.,* 1991; Pendleton *et al.,* 1992) ส่วนการฉีด FSH สามารถชักนำให้เกิดการตกไข่และคุณภาพของเอ็มบริโอในแพะที่เก็บได้สูงกว่า PMSG ซึ่งมีหลายรายงานอยู่ประมาณ 6-21 ฟอง (Valdez *et al.,* 1995; D'Alessandro *et al.,* 1996; Adams *et al.,* 1997; Senthilkumar *et al.,* 1998; Graff *et al.,* 1999)

การใช้ PMSG และ FSH ในการชักนำให้เกิดการตกไข่มากกว่าปกติในแพะ มีหลายรายงานกล่าวสอดคล้องกันว่า การใช้ FSH ทำให้อัตราการตกไข่และคุณภาพของเอ็มบริโอสูงกว่า PMSG ทั้งนี้เนื่องจาก PMSG มีครึ่งชีวิตที่ยาว จึงไปมีผลกระตุ้นรบกวนรังไข่ให้มีการเจริญพัฒนาของกระเปาะไข่เป็นเวลานาน แต่ไม่มีการตกไข่ออกจากรังไข่ (Armstrong *et al.,* 1983a; Jabbour and Evans, 1991; Pendleton *et al.,* 1992)

Armstrong และคณะ (1983b) ทดลองชักนำให้เกิดการการตกไข่มากกว่าปกติเพื่อเปรียบเทียบการตอบสนองต่อฮอร์โมน PMSG และ FSH ในแพะพันธุ์ Angora ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 อัตราการตกไข่และจำนวนเอ็มบริโอที่เก็บได้ โดยการชักนำให้เกิดการตกไข่จำนวนมาก โดยใช้ PMSG และ FSH ในแพะพันธุ์ Angora

โกนาโดโทรปิน	จำนวนสัตว์	ค่าเฉลี่ย (±SD)	
		อัตราการตกไข่ (ฟอง)	เอ็มบริโอที่เก็บได้ (ตัว)
PMSG, 750-1000 IU	28	10.8±1.2[ก]	7.9±1.0[ค]
FSH, 18 mg	47	16.1±0.8[ข]	11.9±0.7[ง]

[ก,ข] แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01)

[ค,ง] แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (P<0.01)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Armstrong และคณะ (1983b)

จากตารางที่ 2 จะเห็นว่าการใช้ FSH ชักนำให้เกิดการตกไข่มากกว่าปกติในแพะพันธุ์ Angora ได้อัตราการตกไข่เท่ากับ 16.1±0.8 ฟอง สูงกว่าการใช้ PMSG ซึ่งมีค่าอัตราการตกไข่เท่ากับ 10.8±1.2 ฟอง อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) และเป็นในทำนองเดียวกันที่การใช้ FSH มีอัตราการเก็บเอ็มบริโอได้ 11.9±0.7 ตัว ซึ่งสูงกว่าการใช้ PMSG ที่เก็บเอ็มบริโอได้เพียง 7.9±1.0 ตัว อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01)

5. ปัจจัยที่มีผลต่อการตอบสนองของฮอร์โมนที่ใช้ชักนำให้เกิดการตกไข่มากกว่าปกติ

5.1 ชนิดของฮอร์โมน Senthikumar และคณะ (1998) รายงานว่า การใช้ FSH ชักนำให้เกิดการตกไข่มากกว่าปกติในแพะ ได้อัตราการตกไข่เท่ากับ 21.83±1.99 ฟอง ซึ่งสูงกว่าการใช้ PMSG ที่ได้อัตราการตกไข่เท่ากับ 11.33±2.67 ฟอง อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) และเก็บเอ็มบริโอที่สามารถย้ายฝากได้ในกลุ่มที่ใช้ FSH เท่ากับ 13.16±1.74 ตัว สูงกว่ากลุ่มที่ใช้ PMSG ที่มีจำนวนเอ็มบริโอที่สามารถย้ายฝากได้เท่ากับ 4.16±1.14 ตัว อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Armstrong และคณะ (1983b)

5.2 แหล่งของฮอร์โมน FSH ที่สกัดจากต่อมใต้สมองของสุกร เมื่อนำมาใช้ในการชักนำให้เกิดการตกไข่มากกว่าปกติในแพะ พบว่ามีอัตราการตกไข่เท่ากับ 16.5 ฟอง สูงกว่า FSH ที่ได้จากการสกัดจากต่อมใต้สมองของม้า ที่มีอัตราการตกไข่เท่ากับ 14.1 ฟอง แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) (Graff *et al.,* 1999)

5.3 **พันธุ์** Riha และคณะ (1999) รายงานว่า การใช้ FSH ในการชักนำให้เกิดการตกไข่มากกว่าปกติในแพะพันธุ์ Saanen มีอัตราการตกไข่เท่ากับ 17.7 ฟอง ซึ่งสูงกว่าพันธุ์ Angora ที่มีอัตราการตกไข่เท่ากับ 8.8 ฟอง อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)

5.4 **อายุ** จากผลการทดลองของ Mahmood และคณะ (1991) พบว่า ในแพะพันธุ์ Pashmina อายุประมาณ 4-6 ปี จะมีอัตราการตกไข่ และคุณภาพของเอ็มบริโอสูงกว่าแพะที่มีอายุประมาณ 1.5-3 ปี เมื่อมีการชักนำให้เกิดการตกไข่มากกว่าปกติโดยใช้ PMSG หรือ FSH

5.5 **ฤดูกาลสืบพันธุ์** แพะที่อยู่ในช่วงฤดูกาลสืบพันธุ์มีอัตราการตกไข่สูงกว่าแพะที่อยู่นอกฤดูผสมพันธุ์ เมื่อมีการชักนำให้เกิดการตกไข่มากกว่าปกติ ด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน(Maracek *et al.,* 1989)

5.6 **ปัจจัยเนื่องจากการให้อาหารและลักษณะเฉพาะตัวของแพะ** ก็มีผลต่ออัตราการตกไข่เช่นกัน เมื่อมีการชักนำให้เกิดการตกไข่มากกว่าปกติโดยการใช้ฮอร์โมน PMSG และ FSH (Sukhato *et al.,* 1991; Cognie, 1999)

6. ผลผลิตและคุณภาพของเอ็มบริโอ

6.1 การเก็บเอ็มบริโอ

การเก็บและการย้ายฝากเอ็มบริโอแพะ สามารถทำได้ทั้งวิธีการผ่าตัด และไม่ผ่าตัด ซึ่งการเก็บเอ็มบริโอโดยวิธีไม่ผ่าตัดเป็นการประหยัดค่าใช้จ่าย สัตว์ไม่เจ็บปวดจากบาดแผลที่ผ่า และยังสามารถเก็บเอ็มบริโอจากแม่แพะตัวให้ได้บ่อยครั้งมากกว่าวิธีการผ่าตัด (Amoah and Gelaye, 1991)

Dutta และคณะ (1998) รายงานว่า หลังจากชักนำให้แม่แพะจำนวน 10 ตัว เกิดการตกไข่มากกว่าปกติ โดยใช้ PMSG ขนาด 750 IU แล้วทำการผ่าตัดเก็บเอ็มบริโอในวันที่ 6 หลังจากแพะแสดงอาการเป็นสัด สามารถเก็บเอ็มบริโอที่มีลักษณะปกติได้ 119 ตัว ซึ่งอยู่ในระยะ morula 47 ตัว และในระยะ blastocysts 72 ตัว

สารละลายที่ใช้ในการชะล้างเก็บเอ็มบริโอ นิยมใช้สารละลายบัพเฟอร์ของฟอสเฟต (phosphate buffered saline, PBS) โดยปรับค่า pH เท่ากับ 7.2 และผสมซีรั่มลูกโค (fetal calf serum) 1 เปอร์เซ็นต์ หรือ มีซีรั่มแม่แพะ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หรืออาจจะใช้สารละลายบัพเฟอร์ของไบคาร์บอเนต (bicarbonate buffer solution) ผสมซีรั่มแม่แพะ 10 เปอร์เซ็นต์ และเติมยาปฏิชีวนะลงไปด้วย ในการชะล้างและเก็บเอ็มบริโอจากระบบสืบพันธุ์ของแม่แพะแต่ละครั้งจะใช้ประมาณ 20 – 50 มิลลิลิตร (Armstrong *et al.,* 1983b) โดยมีส่วนประกอบดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้เก็บและเลี้ยงเอ็มบริโอ

สารเคมี	สารละลาย (กรัม/ลิตร)	
	PBS	Bicarbonate
NaCl	8.00	5.85
KCl	0.20	0.36
$CaCl_2$	0.10	0.19
$MgCl_2$	0.10	0.10
KH_2PO_4	0.20	0.16
Na_2HPO_4	1.15	-
NaH_2CO_3	-	2.10
K Penicillin	100 IU/ml	100 IU/ml
Streptomycin sulphate	50 IU/ml	50 IU/ml
Gas phase	Air	5% CO_2 in air

ที่มา : ดัดแปลงจาก Moore (1982)

นอกจากนี้สารละลายชนิดอื่นๆ เช่น Ringer solution, Basal salt solution, Homologous blood serum, Dulbecco phosphate buffer และ Tyrode's solution สามารถใช้ชะล้างเก็บเอ็มบริโอ และใช้เลี้ยงเอ็มบริโอได้เช่นกัน (Agrawal *et al.*, 1983) ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การตั้งท้องของแม่แพะตัวรับ และเอ็มบริโอที่รอดชีวิต หลังเก็บไว้ในน้ำยาเลี้ยงเอ็มบริโอชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 20°C ในช่วงระยะเวลาสั้นๆ ก่อนนำไปย้ายฝาก

	ชนิดของน้ำยาเลี้ยงเอ็มบริโอ				
	Ringer solution	Basal salt solution	Homologous blood serum	Dulbecco phosphate buffer	Tyrode's solution
จำนวนแม่แพะตัวรับ (ตัว)	6	7	5	4	5
จำนวนแม่แพะตัวรับที่ตั้งท้อง (%)	4 (66.7)	4 (57.1)	3 (60.0)	2 (50.0)	2 (40.0)
จำนวนเอ็มบริโอที่ย้ายฝาก (ตัว)	8	9	7	6	7
จำนวนลูกแพะที่เกิด (%)	4 (50.0)	4 (44.4)	3 (42.9)	2 (33.3)	2 (28.6)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Agrawal และคณะ (1983)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บเอ็มบริโอ เช่น หลอดทดลอง บีกเกอร์ เข็มเจาะ ต้องผ่านการฆ่าเชื้อก่อนการใช้ โดยเฉพาะ petri dishes ที่จะรองรับเอ็มบริโอ ก่อนนำไปประเมินคุณภาพ ต้องนำ

ไปอุ่นที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ก่อนนำไปใช้ เอ็มบริโอที่เก็บได้ หากต้องการจะย้ายฝากสด ต้องเก็บไว้ในสารละลาย PBS ที่มีซีรั่มแพะ 10 เปอร์เซ็นต์ หรือซีรั่มลูกโค 1 เปอร์เซ็นต์ และต้องเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส จนกว่าจะได้รับการย้ายฝากให้แม่แพะตัวรับ (Amoah and Gelaye, 1991)

Yadav และคณะ (1998) รายงานว่า การเติมเนื้อเยื่อเซลล์ภายในท่อนำไข่ของกระบือ 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในสารละลายที่เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอแพะในห้องปฏิบัติการ มีผลทำให้เอ็มบริโอในระยะ cleavage มีการเจริญพัฒนาต่อจนเข้าสู่ระยะ morula และ blastocyst ได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่เติมเนื้อเยื่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

เอ็มบริโอที่เก็บจากระบบสืบพันธุ์ของแม่แพะ หากต้องการเก็บรักษาไว้นานๆ จะต้องนำไปผ่านกระบวนการแช่แข็ง (frozen) โดยใช้สารละลายป้องกันเซลล์ (cryoprotectant) ได้แก่ กลีเซอรอล (glycerol) ไดเมธิล ซัลฟอกไซด์ (dimethyl sunfoxide,DMSO) ทั้งนี้เพราะในกระบวนการลดอุณหภูมิจะเกิดเกล็ดน้ำแข็ง ซึ่งจะเป็นอันตรายต่อเอ็มบริโอได้ หลังจากนั้นจะดูดเอ็มบริโอบรรจุในหลอดพลาสติกเล็กๆ (straw) แล้วค่อยๆ ลดอุณหภูมิลงจนถึง -196 องศาเซลเซียส และเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว จะสามารถเก็บรักษาไว้ได้หลายปี ซึ่งจะเป็นแหล่งพันธุกรรมที่ดี เพื่อรอการย้ายให้กับแม่แพะตัวรับ แต่พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตของเอ็มบริโอต่ำกว่าการย้ายฝากเอ็มบริโอสด 15 – 20 เปอร์เซ็นต์ (Trounson and Pugh, 1982)

6.2 การประเมินคุณภาพของเอ็มบริโอ

การประเมินคุณภาพของเอ็มบริโอ จะใช้กล้องสเตอริโอ กำลังขยาย 70 เท่า เพื่อตรวจดูไข่และเอ็มบริโอที่เก็บได้จากระบบสืบพันธุ์ของแม่แพะ โดยแบ่งแยกออกเป็น ไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ เอ็มบริโอที่ไม่พัฒนา หรือเสื่อมสภาพ เอ็มบริโอตามระยะของการเจริญพัฒนา เช่น compacted morula, blastocysts, expanded blastocysts หรือ hatched blastocysts (Baril *et al.,* 1989) Lidner และ Wright (1983) ได้จำแนกคุณภาพของเอ็มบริโอออกเป็น 4 เกรดดังนี้

เกรด 1 คุณภาพดีเยี่ยม (excellent) เอ็มบริโอมีลักษณะเป็นทรงกลม มีความสมมาตร ขนาด สี และโครงสร้างเนื้อเยื่อมีลักษณะเฉพาะของแต่ละเซลล์ แทบไม่มีส่วนที่ผิดปกติของเซลล์

เกรด 2 คุณภาพดี (good) โครงสร้างของเซลล์ไม่ค่อยสม่ำเสมอ มีส่วนของเซลล์และเศษเนื้อเยื่อเซลล์ที่ผิดปกติบ้างเล็กน้อย

เกรด 3 คุณภาพพอใช้ (fair) เอ็มบริโอส่วนใหญ่สามารถมีชีวิตต่อไปได้ แต่มีรูปร่างไม่สม่ำเสมอ มีส่วนของเซลล์ที่ผิดปกติ และเศษเนื้อเยื่อเป็นจำนวนมาก

เกรด 4 เอ็มบริโอที่เสื่อมสภาพ (degenerate) เป็นเอ็มบริโอที่ตายแล้วหรือมีการพัฒนาช้าไม่สัมพันธ์กับอายุ เช่น เอ็มบริโอที่มีอายุ 6 วัน โดยปกติจะพัฒนาถึงระยะ morula หรือ blastocysts แต่กลับพัฒนาได้ 1-2 เซลล์ หรือ 8-16 เซลล์

ลักษณะของ blastomeres ทั้งขนาด และรูปร่าง คุณภาพของเอ็มบริโอและการพัฒนาแต่ละระยะ ต้องสังเกตความสมบูรณ์ของ zona pellucida ลักษณะเซลล์เอ็มบริโอตลอดจนสี และไซโตพลาสซึม นอกจากนี้ยังมีการประเมินคุณภาพของเอ็มบริโอโดยการตรวจระดับกลูโคส และการหลั่งของเอ็นไซม์ ซึ่งถือว่าเป็นการประเมินคุณภาพเอ็มบริโอชั้นสูง แต่มีการศึกษากันน้อยมาก (Kiessling *et al*, 1986)

7. การย้ายฝากเอ็มบริโอ

การย้ายฝากเอ็มบริโอจะทำการย้ายฝากที่ปีกมดลูกหรือท่อนำไข่ ของแม่แพะตัวรับด้วยวิธีการเจาะท้อง(laparoscopy) หลังจากนั้นจะใช้เครื่องมือที่ดัดแปลงให้สามารถฉีดเอ็มบริโอเข้าไปในท่อนำไข่หรือปีกมดลูกได้ หรือใช้วิธีผ่าตัดเปิดช่องท้อง (ventral midline incision) ก่อนผ่าตัดต้องสลบแม่แพะตัวรับ ซึ่งวิธีนี้สามารถตรวจสอบ และนับจำนวน CL ได้ด้วยตาเปล่า การย้ายฝากเอ็มบริโอควรย้ายฝากที่ปีกมดลูก ข้างที่รังไข่มี CL และที่สำคัญแม่แพะตัวให้และตัวรับควรมีระยะการเป็นสัดห่างกันไม่เกิน 12 ชั่วโมง (Moore and Eppleston, 1979)

Stafani และคณะ (1990) รายงานว่า การย้ายฝากเอ็มบริโอแกะ โดยวิธีลาพาโรสโคปิกอัตราการอุ้มท้องจะสูงกว่าวิธีผ่าตัด อีกทั้งเป็นวิธีการที่ประหยัด และเหมาะสมสำหรับการย้ายฝากเอ็มบริโอในสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็ก

8. ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการรอดชีวิตของเอ็มบริโอที่ย้ายฝาก

8.1 ตำแหน่งที่ย้ายฝาก Armstrong และคณะ (1983b) ได้ทดลองเปรียบเทียบ การย้ายฝากเอ็มบริโอแพะที่ท่อนำไข่ และปีกมดลูก พบว่าการรอดชีวิตของเอ็มบริโอไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) แต่แนะนำว่า เอ็มบริโอที่อยู่ในระยะต่ำกว่า 8 เซลล์ ควรจะย้ายฝากที่ท่อนำไข่ ส่วนเอ็มบริโอที่มีการพัฒนามากกว่า 8 เซลล์ ควรจะย้ายฝากที่ปีกมดลูก ทั้งนี้เพราะสภาพแวดล้อมในปีกมดลูก ไม่เหมาะสมต่อการเจริญพัฒนาของเอ็มบริโอในระยะ 8 เซลล์ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 อิทธิพลของระยะการพัฒนา และตำแหน่งที่ย้ายฝากต่ออัตราการมีชีวิตรอดของเอ็มบริโอ

ระยะของเอ็มบริโอ	ตำแหน่งที่ย้ายฝาก	จำนวนเอ็มบริโอที่ย้ายฝาก	จำนวนลูกแพะที่เกิด (ตัว)	อัตราการมีชีวิตรอด (%)
1-4 เซลล์	ท่อนำไข่	44	22	50.0
5-8 เซลล์	ท่อนำไข่	42	29	69.0
8 เซลล์	ท่อนำไข่	34	23	67.6
8 เซลล์	ปีกมดลูก	44	23	52.3

ที่มา : ดัดแปลงจาก Armstrong และคณะ (1983b)

8.2 **จำนวนเอ็มบริโอที่ย้ายฝาก** จำนวนเอ็มบริโอที่ย้ายฝากมีผลต่อการรอดชีวิตของเอ็มบริโอ จากการย้ายฝากเอ็มบริโอให้กับแม่แพะตัวรับ 329 ตัว โดยย้ายฝากให้ตัวรับ ตัวละ 2 เอ็มบริโอ ซึ่งพบว่ามีเอ็มบริโอที่รอดชีวิตเท่ากับ 65.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าการย้ายฝากเอ็มบริโอให้กับแม่แพะตัวรับ 51 ตัว ที่ย้ายฝากให้เพียงตัวละหนึ่งเอ็มบริโอ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเอ็มบริโอเท่ากับ 51.6 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (Armstrong and Evans, 1983)

8.3 **อายุ และระยะการพัฒนาของเอ็มบริโอ** เอ็มบริโอแกะที่มีอายุ 3-4 วัน หรือน้อยกว่า จะย้ายฝากที่ท่อนำไข่ แต่หากมีอายุมากกว่า 4 วัน จะย้ายฝากที่ปีกมดลูก พบว่าเอ็มบริโอที่มีอายุมากกว่า 4 วัน และระยะการพัฒนามากกว่า 8 เซลล์ เมื่อย้ายฝากที่ปีกมดลูกมีแนวโน้มอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้น (Amstrong and Evans, 1983) ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 อิทธิพลของระยะการพัฒนาของเอ็มบริโอแกะต่ออัตราการมีชีวิตรอดหลังจากการย้ายฝาก

ระยะการพัฒนา	ตำแหน่งที่ย้ายฝาก	จำนวนเอ็มบริโอที่ย้ายฝาก (ตัว)	จำนวนลูกแกะที่เกิด (ตัว)	เปอร์เซ็นต์เอ็มบริโอที่มีชีวิตรอด
2-4 เซลล์	ท่อนำไข่	10	0	0.0
5-8 เซลล์	ท่อนำไข่	93	26	28.0
9-16 เซลล์	ปีกมดลูก	98	39	39.8
morula	ปีกมดลูก	49	14	28.6
blastocyst	ปีกมดลูก	14	7	50.0

ที่มา : ดัดแปลงจาก Amstrong และ Evans (1983)

8.4 **จำนวน CL บนรังไข่ของแม่แพะตัวรับ** มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเอ็มบริโอที่ย้ายฝากด้วย พบว่าแม่แพะตัวรับที่มีจำนวนคอร์ปัส ลูเตียม 2-3 อัน มีผลทำให้เอ็มบริโอที่ย้ายฝากมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า แม่แพะตัวรับที่มีคอร์ปัส ลูเตียม เพียงอันเดียว (Warnes *et al.*, 1982)

นอกจากนี้ ความชำนาญในการย้ายฝากก็มีผลต่อความสำเร็จในการย้ายฝากเอ็มบริโอในแพะด้วยเช่นกัน และในปัจจุบันเทคนิคการย้ายฝากเอ็มบริโอมีการพัฒนามากขึ้น ทั้งในด้านวิธีการและเทคนิคใหม่ๆ เพื่อลดขั้นตอนที่ยุ่งยากลง ทำให้การย้ายฝากเอ็มบริโอแพะในปัจจุบัน สามารถทำให้แม่แพะตัวรับมีอัตราการตั้งท้องอยู่ในช่วงระหว่าง 45-80 เปอร์เซ็นต์ (Godke *et al*, 1985)

จากการตรวจเอกสารที่กล่าวมาแล้ว จะเห็นได้ว่าการใช้เทคโนโลยีเกี่ยวกับการย้ายฝากเอ็มบริโอในสัตว์เป็นเรื่องที่ต้องอาศัยความรู้ ความเข้าใจ ในหลายๆ ด้านเกี่ยวกับสรีรวิทยาด้านการสืบพันธุ์ของสัตว์ การจัดการเกี่ยวกับการย้ายฝากเอ็มบริโอในแพะนั้น ความเข้าใจเกี่ยวกับวงรอบการเป็นสัดตามธรรมชาติ การสามารถควบคุมวงรอบการเป็นสัดของแพะได้ และการสามารถกระตุ้นให้เกิดการตกไข่มากกว่าปกติ นับได้ว่าเป็นความรู้ที่ต้องมีเป็นพื้นฐาน ซึ่งเป็นเรื่องที่น่าสนใจให้การศึกษาในครั้งนี้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาระยะเวลาต่างๆ ของวงรอบการเป็นสัดตามธรรมชาติ และวงรอบการเป็นสัดที่ชักนำให้เป็นสัดพร้อมๆ กันด้วย CLO ในแพะก่อนชักนำให้เกิดการตกไข่มากกว่าปกติด้วย FSH

2. เพื่อศึกษาการตกไข่ของวงรอบการเป็นสัดตามธรรมชาติ และการตกไข่ที่เกิดจากการชักนำให้เกิดการตกไข่มากกว่าปกติในแพะด้วย FSH

3.เพื่อศึกษาผลผลิตและคุณภาพของเอ็มบริโอแพะ ที่ได้จากการชักนำให้เกิดการตกไข่มากกว่าปกติโดยใช้ FSH

4.เพื่อทราบข้อมูลที่เกี่ยวข้องทางด้านระบบสรีระการสืบพันธุ์บางประการของแพะเพศเมียและแพะเพศเมียที่ถูกกระตุ้นด้วย FSH