เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2549;4(1):51-56.

นิพนธ์ต้นฉบับ

ผลของฮอร์โมนเอชซีจีต่อจำนวนและการพัฒนาของเซลล์ไข่โค โดยวิธีการฉีดเพื่อกระตุ้นการเจริญของถุงไข่

อนุชา สธนวงศ์,[1] สุวิชัย โรจนเสถียร,[1] อภิชาติ โอฬารรัตนชัย,[2] ศร ธีปฏิมากรณ์,[3] กีรติ ธิแจ้,[3] จุรีย์รัตน์ สำเร็จประสงค์[1]

[1]คณะสัตวแพทยศาสตร์, [2]คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่,
[3]ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพเชียงใหม่ ต. สุเทพ อ.เมือง จ. เชียงใหม่

บทคัดย่อ แม่โคพันธุ์โฮล์สไตน์ ฟรีเซี่ยน จำนวน 4 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว โดยกลุ่มที่ 1 ให้ฮอร์โมนเอฟเอสเอช (Folltropin-V 200 มิลลิกรัม) เป็นเวลา 3 วันโดยให้เช้าและเย็น และทิ้งระยะเวลาห่างจากเข็มสุดท้าย 48 ชั่วโมง จึงเก็บเซลล์ไข่ กลุ่มที่ 2 ทำการฉีดฮอร์โมนเอฟเอสเอชร่วมกับฮอร์โมนเอชซีจีปริมาณ 2,000 ไอ.ยู. ต่อตัว เว้นระยะเวลา 18 ชั่วโมงหลังจากให้ฮอร์โมนเอชซีจีจึงเก็บเซลล์ไข่ ในกลุ่มที่ 3 และ 4 เวนระยะเวลา 24 และ 32 ชั่วโมง ตามลำดับ โคทั้ง 4 กลุ่มได้ทำการเก็บเซลล์ไข่ด้วยวิธีการเจาะดูดผ่านผนังช่องคลอดโดยไม่พึ่งเครื่องอัลตราซาวด์และเลี้ยงตัวอ่อนจากการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย ผลการทดลองพบว่า ในกลุ่มที่ 4 ซึ่งเว้นระยะ 32 ชั่วโมง ภายหลังจากการฉีดฮอร์โมนเอชซีจีเข็มสุดท้ายแล้วจึงทำการเก็บเซลล์ไข่ให้จำนวนเซลล์ไข่ที่เก็บคืนและอัตราการเจริญพร้อมปฏิสนธิ สูงกว่าอีก 3 กลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) คือ 6.8±1.1 ฟองต่อตัวต่อครั้ง และร้อยละ 89.0 ตามลำดับ ส่วนผลการแบ่งตัวของตัวอ่อนภายหลังจากการเลี้ยงไว้ 72 ชั่วโมงพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติของทั้ง 4 กลุ่ม แต่มีแนวโน้มสูงขึ้นในกลุ่มที่ 4 (ร้อยละ 53.2) จึงสรุปได้ว่า การให้ฮอร์โมนเอฟเอสเอชร่วมกับฮอร์โมนเอชซีจี และเว้นระยะ เวลา 32 ชั่วโมง มีส่วนช่วยเพิ่มทั้งจำนวนและการพัฒนาของเซลล์ไข่โคสำหรับการเลี้ยงตัวอ่อนจากการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย **เชียงใหม่สัตวแพทยสาร** 2549;4(1):51-56.

คำสำคัญ: ฮอร์โมนเอชซีจี เซลล์ไข่โค การกระตุ้นถุงไข่ การพัฒนาของตัวอ่อน

บทนำ

การเก็บเซลล์ไข่จากโคที่ยังมีชีวิตอยู่นั้นโดยทั่วไปจะใช้วิธีการเจาะดูดผ่านผนังช่องคลอด (transvaginal ovum pick-up, OPU) โคที่นำมาทำการทดลองนั้นเป็นโคแห้งนมที่มีปัญหาในฟาร์มโคนมรายย่อยแต่ยังมีระบบสืบพันธุ์

ติดต่อขอสำเนาบทความได้ที่: อนุชา สธนวงศ์, คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ต.แม่เหียะ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50100; E-mail:anutee2005@yahoo.com

ได้รับบทความวันที่ 15 กรกฎาคม 2548

ปกติดีอยู่ ทำให้อาจพบปัญหาของปริมาณและคุณภาพของเซลล์ไข่ที่จะเก็บจากโคดังกล่าวค่อนข้างต่ำ จึงมีการศึกษาเพื่อเพิ่มของขนาดและจำนวนของถุงไข่ (follicle) รวมถึงปริมาณของเซลล์ไข่โดยใช้ฮอร์โมนเอฟเอสเอช (FSH) ซึ่งให้ผลค่อนข้างดี[1] แต่การใช้ฮอร์โมนเอฟเอสเอชไม่ได้เพิ่มคุณภาพของเซลล์ไข่ภายในร่างกาย (*in vivo* maturation) ซึ่งพบว่า หากใช้เซลล์ไข่ที่เจริญพร้อมปฏิสนธิภายในร่างกายจะให้ผลการเจริญของตัวอ่อนหลังการปฏิสนธิภายนอกร่างกายดีกว่าการใช้เซลล์ไข่ที่เจริญพร้อมปฏิสนธิภายนอกร่างกาย (*in vitro* maturation)[2] การใช้ฮอร์โมนเอชซีจี (hCG) ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับฮอร์โมนแอลเอช (LH) จะสามารถช่วยทำให้เซลล์ไข่เจริญพร้อมปฏิสนธิ และทำให้เกิดการตกไข่ได้[3] นอกจากนี้การใช้ฮอร์โมนเอชซีจีร่วมกับการผสมเทียมยังส่งผลให้อัตราการตั้งท้องเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากมีคอร์ปัสลูเตียมเพิ่มขึ้น (accessory corpus luteum) จึงทำให้สามารถรักษาระดับฮอร์โมนในการตั้งท้องได้ดีขึ้น[4]แต่สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับช่วงเวลาที่เหมาะสมของการใช้ฮอร์โมนเอชซีจีต่อการเจริญของถุงไข่ (super-stimulation) ในโคยังไม่มีการทดลอง ดังนั้นในการทดลองนี้จึงต้องการศึกษาถึงช่วงเวลาที่เหมาะสม ภายหลังจากการฉีดฮอร์โมนเอชซีจีต่อจำนวนและคุณภาพของเซลล์ไข่โค

วิธีการศึกษา

แม่โคพันธุ์โฮลสไตน์ ฟรีเซี่ยน ในระยะแห้งนม จำนวน 12 ตัว แบ่งเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมโดยได้รับฮอร์โมน FSH (Folltropin-V®, Canada Inc., Canada) ขนาด 200 มก. แบ่งให้เช้าเย็นติดต่อกัน 3 วัน เว้นระยะ 48 ชั่วโมง แล้วทำการเก็บเซลล์ไข่

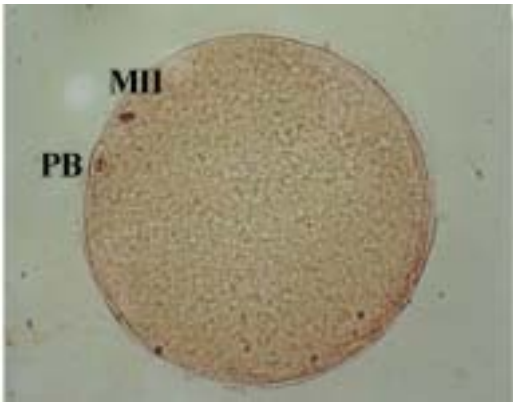
กลุ่มที่ 2 ฉีดฮอร์โมน FSH ร่วมกับฮอร์โมน hCG (Profasi®, Serono, Mexico) ขนาด 2000 ไอยู (IU) เว้นระยะ 18 ชั่วโมงก่อนการเก็บเซลล์ไข่

กลุ่มที่ 3 ฉีดฮอร์โมน FSH ร่วมกับฮอร์โมน hCG เว้นระยะ 24 ชั่วโมงก่อนเก็บเซลล์ไข่

กลุ่มที่ 4 ฉีดฮอร์โมน FSH ร่วมกับฮอร์โมน hCG เว้นระยะ 32 ชั่วโมง ก่อนเก็บเซลล์ไข่

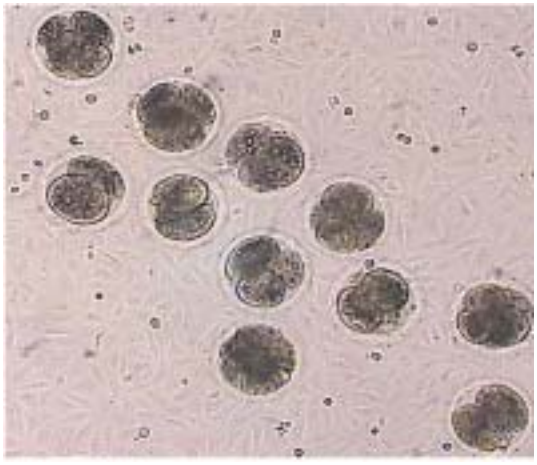
ทั้ง 4 กลุ่มทำการเก็บเซลล์ไข่ผ่านผนังช่องคลอดโดยไม่พึ่งอัลตราซาวด์ โดยใช้อุปกรณ์ของฮิลล์ (Hill Aspirator) (รูปที่ 1) เลี้ยงเซลล์ไข่ทั้งหมดให้เกิดสภาพพร้อมปฏิสนธิในน้ำยา TCM-199 ในตู้คาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 22 ชั่วโมง จากนั้นสุ่มประมาณร้อยละ 10 เพื่อตรวจสอบอัตราการเจริญพร้อมปฏิสนธิด้วยการย้อมสี 1% aceto-orcein (รูปที่ 2) เซลล์ไข่ที่เหลือทำการปฏิสนธิกับน้ำเชื้อโคแช่แข็งด้วย

รูปที่ 1. การเจาะเก็บเซลล์ไข่ผ่านผนังช่องคลอดโคโดย ไม่พึ่งเครื่องอัลตราซาวด์



รูปที่ 2. เซลล์ไข่ในระยะ metaphase II ที่ผ่านการย้อมด้วยสี 1% aceto-orcein MII คือ โครโมโซมในระยะ metaphase II และ PB คือ โพลาร์ บอดี้ที่ 1 (First polar body) (กำลังขยาย 400 เท่า)

ความเข้มข้น 1 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นเลี้ยงตัวอ่อนที่ผ่านการปฏิสนธิแล้วด้วยน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน (synthetic oviductal fluid; SOF) กับเซลล์พี่เลี้ยง (Vero cells) ตรวจสอบอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนที่ 72 ชั่วโมง (รูปที่ 3) แล้วทำการจดบันทึก



รูปที่ 3. ตัวอ่อนที่แบ่งตัวระยะ 2-4 เซลล์ในน้ำยา synthetic oviduetal fluid ร่วมกับ vero cells (กำลังขยาย 200 เท่า)

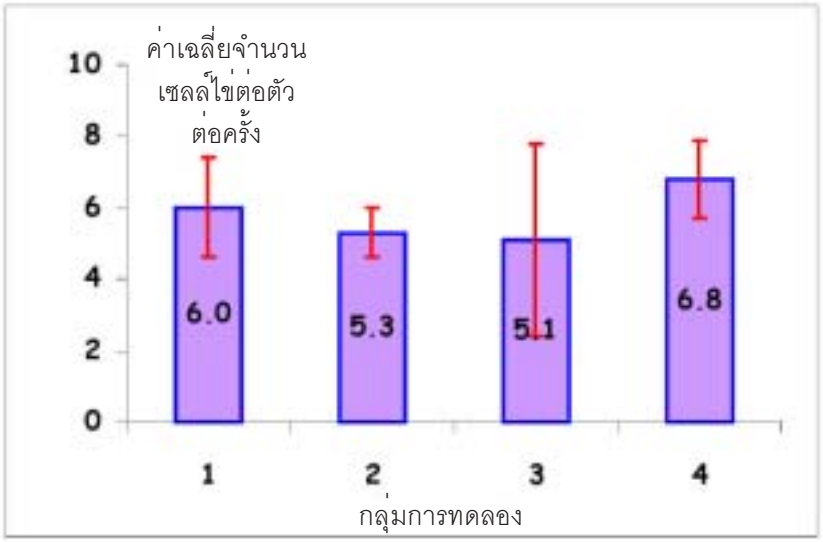
ผลการศึกษา

ผลของฮอร์โมนเอชซีจีต่อจำนวนของเซลล์ไข่ภายหลังจากการเจาะเก็บเซลล์ไข่ผ่านผนังช่องคลอดโค (รูปที่ 4) พบว่า จำนวนเซลล์ไข่ที่เก็บจากโคต่อตัวต่อครั้ง (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ในกลุ่มที่ 1-4 เท่ากับ 6.0±1.4, 5.3±0.7, 5.1±2.7 และ 6.8±1.1 ตามลำดับ ซึ่งจำนวนเซลล์ไข่ทั้ง 4 กลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

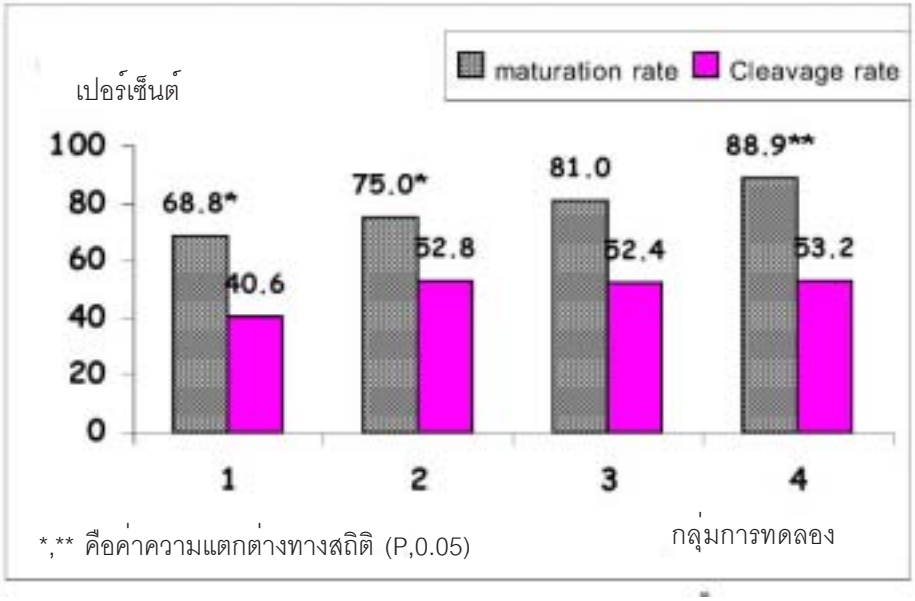
ผลของฮอร์โมนเอชซีจีต่อคุณภาพและการพัฒนาของเซลล์ไข่โค (รูปที่ 5) พบว่าอัตราการเจริญพร้อมปฏิสนธิ (maturation rate) ของเซลล์ไข่โคในกลุ่มที่ 4 (ร้อยละ 88.9) มีค่าสูงกว่าในกลุ่มที่ 1 และ 2 (ร้อยละ 68.8 และ 75.0 ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากกลุ่มที่ 3 (ร้อยละ 81.0) ส่วนการแบ่งตัวของตัวอ่อนายหลังจากการเลี้ยงตัวอ่อนภายนอกร่างกาย 72 ชั่วโมงของโคทั้ง 4 กลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p> 0.05$) โดยมีอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อน (cleavage rate) เท่ากับร้อยละ 40.6, 52.8, 52.4, และร้อยละ 53.2 ตามลำดับ

บทวิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษาถึงผลของฮอร์โมนเอชซีจีร่วมกับการฉีดด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอชเพื่อเพิ่มการเจริญของถุงไข่ และจำนวนของเซลล์ไข่ในโค พบว่าการให้ฮอร์โมนเอฟเอสเอชเพียงอย่างเดียวหรือการให้ร่วมกับฮอร์โมนเอชซีจีสามารถเพิ่มปริมาณของถุงไข่และเซลล์ไข่ได้ไม่แตกต่างกัน แต่ภายหลังจากการเลี้ยงเซลล์ไข่เพื่อให้เกิดสภาพ



รูปที่ 4. ผลของฮอร์โมนเอชซีจีต่อจำนวนเซลล์ไข่โคต่อตัวต่อครั้ง



รูปที่ 5. ผลของฮอร์โมนเอชซีจีต่ออัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนภายหลังจากเลี้ยงไว้ 72 ชั่วโมง

พร้อมปฏิสนธิภายนอกร่างกายนั้น พบว่าการให้ฮอร์โมนเอฟเอสเอชร่วมกับฮอร์โมนเอชซีจี โดยทิ้งช่วงระยะเวลาก่อนการเก็บเซลล์ไข่ 32 ชั่วโมงให้ผลที่สูงกว่าอีก 3 กลุ่ม แม้ว่าอัตราการแบ่งตัวของ

ตัวอ่อนภาพหลังจากการเลี้ยงไว้ภายนอกร่างกายของโคทั้ง 4 กลุ่มจะไม่แตกต่างกัน แต่ก็มีแนวโน้มว่าโคที่ให้ฮอร์โมนเอชซีจีจะให้ผลของพัฒนาของตัวอ่อนดีกว่าการให้ฮอร์โมนเอฟเอชเอสเพียงอย่างเดียว ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเจริญของเซลล์ไข่ภายในถุงไข่ให้ผลดีกว่าภายนอกร่างกาย เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงระดับอณูเมโลกุล ซึ่งมีความสำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพในการพัฒนาของเซลล์ไข่ไปเป็นตัวอ่อนนั้นจะเกิดพร้อมๆ กับการพัฒนาของถุงไข่ โดยอาศัยอิทธิพลของฮอร์โมนทั้งเอฟเอสเอช และแอลเอชช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการพัฒนาเซลล์ไข่มากขึ้น[4-6] และยังมีส่วนช่วยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการเลี้ยงเซลล์ไข่ภายนอกร่างกาย โดยให้มีการเจริญของเซลล์ไข่เกิดขึ้นภายในถุงไข่บางส่วนก่อน[7] นอกจากนี้ยังพบว่าการให้ฮอร์โมนเอชซีจี ซึ่งมีส่วนช่วยในการเพิ่มคุณภาพของเซลล์แกรนูโลซา (granulose cells) และช่วยเพิ่มคุณภาพของเซลล์ไข่ในช่วงของการขยายใหญ่ของถุงไข่ โดยในช่วงนี้จะมีการเพิ่มปริมาณของฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) และปริมาณของเซลล์แกรนูโลซา[8] นอกจากนี้ยังพบว่าฮอร์โมนเอชซีจีมีส่วนช่วยลดอุบัติการณ์การตาย (apoptosis) ของเซลล์แกรนูโลซาด้วย[9] ดังนั้นการให้ฮอร์โมนเอชซีจี ร่วมกับฮอร์โมนเอฟเอสเอช และการเว้นระยะเวลาหลังจากการฉีดที่เหมาะสมและอยู่ในช่วงที่ยังไม่เกิดการตกไข่ขึ้นร่วมกับการเก็บเซลล์ไข่ผ่านผนังช่องคลอดนั้น จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีส่วนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเลี้ยงตัวอ่อนจากการปฏิสนธิภายนอกร่างกายสำหรับแม่โคทดลองที่ให้ผลของจำนวนและคุณภาพของเซลล์ไข่ไม่ดีนัก

จากการทดลองสรุปได้ว่า การให้ฮอร์โมนเอชซีจีร่วมกับฮอร์โมนเอฟเอสเอชเพื่อกระตุ้นการเจริญของถุงไข่ และเว้นช่วงระยะเวลา 32 ชั่วโมง มีส่วนช่วยเพิ่มทั้งจำนวน และการพัฒนาของเซลล์ไข่โคสำหรับการเลี้ยงตัวอ่อนจากการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย

กิตติกรรมประกาศ

แหล่งเงินทุนจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTECH) ประจำปี 2544-2547

คุณมาลี อภิเมธีธำรง สำหรับความเอื้อเฟื้อ vero cells และเทคนิคทางห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

1. Goodhand KL, Staines ME, Hutchinson JS, Broadbent PJ. *In vivo* oocyte recovery and *in vitro* embryo production in cattle pre-treated with FSH, progestogen and estradiol. Anim Reprod Sci 2000;63(3-4):145-58.
2. van de Leemput EE, Vos PL, Zeinstra EC, Bevers MM, van der Weijden GC, Dieleman SJ. Improved *in vitro* embryo development using *in vivo* matured oocytes from heifers superovulated with controlled preovulatory LH surge. Theriogenology 1999;52(2):335-49.
3. Morphy BD, Martinuk SD. Equine chorionic gonadotropin. Endocr Rev 1991;12:27-44.
4. Santos JE, Thatcher WW, Pool L, Overton MW. Effect of human chorionic gonadotropin on luteal function and reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows. J Anim Sci 2001;7(11):2881-94.
5. Hendriksen PJ, Vos PL, Steenweg WN, Bevers MM, Dieleman SJ. Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* compe-