การตอบสนองต่อการกระตุ้นเพื่อเพิ่มจำนวนไข่ตกด้วยการฉีดฮอร์โมนเอชเอ็มจีร่วมกับช่วงเวลาที่เหมาะสมของฮอร์โมนเอชซีจีในกระต่าย

อนุชา สธนวงศ์[1] สุวิชัย โรจนเสถียร[2] และอภิชาติ โอพารรัตนชัย[3*]

[1] นักศึกษาปริญญาเอก สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[2] สาขาวิชาคลินิกสัตว์เคี้ยวเอื้อง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[3] ภาควิชาสูติศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[*] ผู้เขียนรับผิดชอบบทความ โทรสาร 0-5389-2904, E-mail: aoranrat@loxinfo.co.th

บทคัดย่อ

จุดประสงค์งานวิจัยเพื่อศึกษาขนาดของฮอร์โมนเอชเอ็มจี พร้อมทั้งระยะเวลาที่เหมาะสมก่อนและหลังการฉีดร่วมกับฮอร์โมนเอชซีจีจนถึงการผ่าตัดเก็บรังไข่และท่อนำไข่ เพื่อเพิ่มจำนวนไข่ตกในท่อนำไข่ของกระต่าย การทดลองใช้กระต่ายพันธุ์ผสมวัยเจริญพันธุ์ ทั้งหมด 13 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง เพื่อศึกษา (1) ขนาดฮอร์โมนเอชเอ็มจี (2) ระยะเวลาระหว่างการฉีดฮอร์โมนเอชเอ็มจีและฮอร์โมนเอชซีจี และ (3) ระยะเวลาภายหลังจากการฉีดฮอร์โมนเอชซีจีจนถึงการผ่าตัด ผลการทดลองพบว่า การฉีดฮอร์โมนเอชเอ็มจีขนาด 150 ไอยู เพียงครั้งเดียว ทำให้ไข่ที่ตกในท่อนำไข่จำนวน 28.6±10.0 ฟอง สูงกว่าการฉีดเอชเอ็มจีขนาด 75 ไอยูครั้งเดียว หรือฉีดติดต่อกัน 2 ครั้ง จำนวน 9.4±6.8 และ 12.4±8.0 ฟอง ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) การเว้นช่วงระยะเวลาตั้งแต่ฉีดฮอร์โมนเอชเอ็มจีจนถึงฉีดฮอร์โมนเอชซีจีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่าง 84, 96 และ 108 ชั่วโมง จากจำนวน 19.8±7.9, 38.8±31.3 และ 28.7±25.8 ฟอง ตามลำดับ แต่มีแนวโน้มว่าที่ 96 ชั่วโมง ทำให้ไข่ตกในท่อนำไข่มากที่สุด คือ 38.8±31.3 ฟอง ระยะเวลาภายหลังจากการฉีดฮอร์โมนเอชซีจีในช่วงเวลา 14 ถึง 15.5 ชั่วโมง ได้จำนวนไข่ตก 22.8±15.5, 43.7±28.5, 36.9±30.1 และ 34.1±18.3 ฟอง ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่มีแนวโน้มว่าเว้นระยะเวลา 14.5 ชั่วโมง ทำให้จำนวนไข่ตกในท่อนำไข่มากที่สุดคือ 43.7±28.5 ฟอง สรุปการกระตุ้นเพื่อเพิ่มจำนวนไข่ตกและไข่ที่เจริญทั้งหมดในกระต่าย คือ กระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอชเอ็มจีขนาด 150 ไอยูครั้งเดียว เว้นช่วงระยะเวลาตั้งแต่ฉีดฮอร์โมนเอชเอ็มจีจนถึงฉีดฮอร์โมนเอชซีจี 96 ชั่วโมง และภายหลังจากการฉีดฮอร์โมนเอชซีจี 14.5 ชั่วโมง จึงทำการเก็บรังไข่และท่อนำไข่สำหรับใช้ในงานวิจัยต่อไป

คำสำคัญ: การตอบสนอง การกระตุ้นเพิ่มจำนวนไข่ตก ฮอร์โมนเอชเอ็มจี ฮอร์โมนเอชซีจี กระต่าย

บทนำ

ไข่ (Oocytes) ของกระต่ายเป็นเซลล์มีคุณค่า สำหรับงานวิจัยทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพระบบสืบพันธุ์ (Assisted reproductive technology) ทั้งในมนุษย์และสัตว์ เนื่องมาจากไซโตพลาสซึมของไข่กระต่าย สามารถรองรับการย้ายฝากนิวเคลียสจากสัตว์ได้หลายชนิด (Universal oocytes) เช่น หมีแพนด้า (Chen *et al*., 2002; Li *et al*., 2002; Jiang *et al*., 2004; Wen *et al*., 2003) ไก่ (Lui *et al*., 2004) หนูเมาท์ (Li *et al*., 2002) ลิง (Yang *et al*., 2004; Hosoi *et al*., 2005) หมู (Chen *et al*., 2005) แพะป่า (Jiang *et al*., 2005) โค (Zhang *et al*., 2004; Jiang *et al*., 2006) อูฐ (Chen *et al*., 2005) ช้าง (Numchaisrika *et al*., 2005) และมนุษย์ (Chen *et al*., 2003) ช่วยให้เซลล์จากสัตว์ชนิดต่างๆ และมนุษย์สามารถเปลี่ยนแปลงเจริญ (Reprogramming) จนเป็นตัวอ่อนได้ เรียกวิธีการนี้ว่า การย้ายฝากนิวเคลียสหรือการโคลนนิ่งระหว่างสปีชีส์ (Interspecies nuclear transfer or interspecies cloning) นอกจากนี้ตัวอ่อนที่ได้ยังมีประโยชน์ในการนำไปผลิตเซลล์ต้นกำเนิด (Embryonic stem cells) ต่อไปได้

สำหรับงานวิจัยตามที่มีรายงานมาแล้วข้างต้น จำเป็นต้องใช้ไข่ของกระต่ายจำนวนมาก การใช้ฮอร์โมนเพื่อเพิ่มจำนวนไข่ หรือการกระตุ้นเพื่อเพิ่มจำนวนไข่ตกในท่อนำไข่ (Superovulation) ช่วยเพิ่มจำนวนไข่ต่อตัวกระต่าย และเพิ่มจำนวนไข่ในแต่ละครั้งการทดลองอีกด้วย นอกจากนี้ยังลดจำนวนกระต่ายที่ต้องเสียชีวิต และลดค่าใช้จ่ายของสัตว์ทดลองลงได้

การศึกษาเกี่ยวกับการใช้ฮอร์โมนเพื่อเพิ่มจำนวนไข่ตกในท่อนำไข่กระต่ายนั้น มีรายงานการใช้ฮอร์โมนเพื่อเพิ่มจำนวนฟอลลิเคิล ด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอช (Follicle stimulating hormone, FSH) (Hashimoto *et al*., 2007) ฮอร์โมนพีเอ็มเอชจี (Pregnancy mare serum gonodotrophin, PMSG) (Asakawa *et al*., 1988; Liu *et al*., 2005) ฮอร์โมนอีซีจี (Equine chorionic gonadotrophin, eCG) (Piotrowska *et al*., 2000; Li *et al*., 2006) และ ฮอร์โมนเอชเอ็มจี (Human menopausal gonadotrophin, hMG) (Kanayama *et al*., 1992; Edirisinghe *et al*., 1986; Kanayama *et al*., 1995) ร่วมกับการใช้ฮอร์โมนเพื่อทำให้ไข่ตกด้วยฮอร์โมนจีเอ็นอาร์เอช (Gonadotrophin releasing hormone, GnRH) (Mehaisen *et al*., 2005) ฮอร์โมนแอลเอช (Lutenizing hormone, LH) (Salvetti *et al*., 2007) หรือฮอร์โมนเอชซีจี (Human chorionic gonadotrophin, hCG) (Asakawa *et al*.,1988; Piotrowska *et al*., 2000; Mehaisen *et al*., 2005; Liu *et al*., 2005; Li *et al*., 2006) วิธีการฉีดฮอร์โมนโดยทั่วไปฉีดติดต่อกันประมาณ 3 ถึง 4 วัน และใช้ขนาดของฮอร์โมนก็แตกต่างกันไป รวมถึงระยะเวลาระหว่างการให้ฮอร์โมน และภายหลังจากการฉีดฮอร์โมนจนถึงระยะการตกไข่

การศึกษาของ Kanayama และคณะ (1995) ซึ่งเหนี่ยวนำเพิ่มจำนวนไข่ตกโดยใช้ฮอร์โมนเอชเอ็มจีขนาด 30 ไอยู (International units, IU) ห่างกันทุก 24 ชั่วโมงฉีดติดต่อกัน 3 ครั้ง พบว่าให้ผลดีกว่าการฉีดด้วยฮอร์โมนเอฟเอชเอสที่ฉีดติดต่อกัน 6 ครั้ง ซึ่งเป็นที่นิยมใช้กันโดยทั่วไปและยังพบว่า การกระตุ้นการตกไข่ด้วยฮอร์โมนเอชเอ็มจีฉีดเพียงครั้งเดียว ร่วมกับฮอร์โมนเอชซีจีสามารถทำให้เกิดการตกไข่ในท่อนำไข่ได้ในขนาดฮอร์โมน 60 ไอยู (Kanayama *et al*., 1992) จากการศึกษาของ Edirisinghe และคณะ (1986) กระตุ้นการตกไข่ในหนูเมาท์ด้วยฮอร์โมนเอชเอ็มจี

เปรียบทียบกับฮอร์โมนเอฟเอสเอช ร่วมกับฮอร์โมนเอชซีจี พบว่า ฮอร์โมนเอชเอ็มจีทำให้ไข่ตกเฉลี่ย 14.19 ฟองต่อตัว (454/32) สูงกว่าฮอร์โมนเอฟเอสเอชซึ่งทำให้ไข่ตกเฉลี่ย 5.13 ฟองต่อตัว (77/15) นอกจากนี้ยังพบว่า การฉีดฮอร์โมนเอฟเอสเอชครั้งเดียวก็สามารถกระตุ้นให้เกิดการตกไข่ในกระต่ายได้จำนวนมากเช่นกัน (Hashimoto *et al*., 2007)

ดังนั้นการทดลองนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาขนาดที่เหมาะสมของการใช้ฮอร์โมนเอชเอ็มจี ระยะเวลาระหว่างการฉีดฮอร์โมนเอชเอ็มจีกับฮอร์โมนเอชซีจี รวมถึงระยะเวลาที่เหมาะสมภายหลังจากการฉีดฮอร์โมนเอชซีจีเพื่อที่จะทำให้ได้ไข่ที่เจริญพร้อมปฏิสนธิมากที่สุด

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ออกแบบการทดลอง

1.1 เปรียบเทียบขนาดของฮอร์โมนเอชเอ็มจี โดยแบ่งออกเป็น 3 ขนาด คือ (1) ขนาด 75 ไอยูครั้งเดียว (2) ขนาด 75 ไอยูฉีด 2 ครั้งห่างกัน 24 ชั่วโมงติดต่อกันใน 2 วันแรก และ (3) ขนาด 150 ไอยูครั้งเดียว เว้นระยะเวลา 96 ชั่วโมง นับจากฉีดฮอร์โมนเอชเอ็มจีเข็มแรกจนถึงฉีดฮอร์โมนเอชซีจี และเว้นระยะเวลา 14 ชั่วโมง จึงทำการผ่าตัดเก็บรังไข่และท่อนำไข่

1.2 เปรียบเทียบระยะเวลาระหว่างการฉีดฮอร์โมนเอชเอ็มจีและฮอร์โมนเอชซีจี โดยแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ 72, 84, 96 และ 108 ชั่วโมง ใช้ฮอร์โมนเอชเอ็มจีขนาด 150 ไอยู และเว้นระยะเวลา 14 ชั่วโมงภายหลังจากการฉีดฮอร์โมนเอชซีจี จึงทำการผ่าตัดเก็บรังไข่และท่อนำไข่

1.3 เปรียบเทียบระยะเวลาภายหลังจากการฉีดฮอร์โมนเอชซีจีจนถึงผ่าตัด โดยแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม คือ 13, 13.5, 14, 14.5, 15 และ 15.5 ชั่วโมง ใช้ฮอร์โมนเอชซีจี 150 ไอยูฉีดครั้งเดียว และเว้นระยะเวลาระหว่างฮอร์โมนเอชเอ็มจีและฮอร์โมนเอชซีจี 96 ชั่วโมง

2. สัตว์ทดลอง

ใช้กระต่ายพันธุ์ผสม เพศเมีย วัยเจริญพันธุ์ อายุ 5 เดือน ถึง 2 ปี จำนวนทั้งหมด 130 ตัว แบ่งออกเป็นกลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว

3. ฮอร์โมน

3.1 ฮอร์โมนเอชเอ็มจี ขนาด 75 ไอยู และ 150 ไอยู (IVF-M®, Korea) ซึ่งมีส่วนประกอบของ ฮอร์โมนเอฟเอชเอส และฮอร์โมนแอลเอชในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ฉีดเข้ากล้ามเนื้อบริเวณหลัง (Lumbar muscle) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร

3.2 ฮอร์โมนเอชซีจี ขนาด 1,000 ไอยู (IVF-C®, Korea) ฉีดเข้าหลอดเลือดดำที่บริเวณใบหูขนาด 100 ไอยู ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร

4. การวางยาสลบ

การวางยาสลบเพื่อผ่าตัดเก็บรังไข่และท่อนำไข่ โดยใช้ยานำสลบคือ โพรโปฟอล (1% Fresofol®, Austria) ขนาด 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และยาสลบคือ Zolazepam-Tiletidine (Zoletil®, France) ขนาด 15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ฉีดเข้าหลอดเลือดดำอย่างช้าๆ

5. การผ่าตัด

ผ่าตัดบริเวณหน้าท้องด้านท้าย (Caudal midline incision) ภายหลังจากการนำรังไข่และท่อนำไข่ออก ทำการมัดเส้นเลือด และปีกมดลูก จากนั้นเย็บปิดชั้นกล้ามเนื้อ และชั้นผิวหนัง ปล่อยให้กระต่ายฟื้น ซึ่งใช้ระยะเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

6. การเก็บไข่กระต่าย

เก็บไข่จากท่อนำไข่โดยการชะล้าง (Flush) ด้วยน้ำยา TCM-199 Hepes และเก็บไข่จากฟอลลิเคิลด้วยการกรีดโดยใช้เข็มฉีดยาติดกับกระบอกฉีดยา แล้วทำการย่อยเอาเซลล์พี่เลี้ยงออกด้วยเอนไซม์ไฮยารูโลนิเดสขนาด 100 ไอยูต่อมิลลิลิตร จากนั้นประเมินไข่ที่เจริญพร้อมปฏิสนธิ พิจารณาจากการพบโพลาร์บอดี้ที่ 1 (First polar body)

7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างของจำนวนไข่ที่เก็บได้เป็นค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ด้วยสถิติ Student' T test โปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 11 ใช้ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ($P<0.05$)

ผลการศึกษา

การเปรียบเทียบขนาดของฮอร์โมนเอชเอ็มจี 75 ไอยูครั้งเดียว 75 ไอยูสองครั้ง และ 150 ไอยูครั้งเดียว พบว่า การฉีดฮอร์โมนเอชเอ็มจีครั้งเดียวขนาด 150 ไอยู ทำให้ได้ค่าเฉลี่ยของจำนวนไข่เจริญในท่อนำไข่ จำนวนไข่เจริญทั้งหมด และจำนวนไข่ทั้งหมด คือ 28.6±10.0 ฟอง 62.0±40.6 ฟอง และ 72.2±44.6 ฟอง ตามลำดับ สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับอีกสองกลุ่มการทดลอง ที่ฉีดฮอร์โมนเอชเอ็มจี 75 ไอยูครั้งเดียว ให้จำนวนไข่ 9.4± 6.82 ฟอง 26.6±12.0 ฟอง และ 38.8±14.8 ฟอง ตามลำดับ หรือ ฉีด 75 ไอยูติดต่อกัน 2 ครั้ง ห่างกัน 24 ชั่วโมงใน 2 วันแรก โดยมีค่าเฉลี่ยของจำนวนไข่เจริญในท่อนำไข่ จำนวนไข่เจริญทั้งหมด และจำนวนไข่ทั้งหมด เท่ากับ 12.4±8.0 ฟอง 30.0±7.7 ฟอง และ 37.8±13.5 ฟอง ตามลำดับ ในส่วนของจำนวนไข่ที่คงเหลือในฟอลลิเคิลของทั้ง 3 กลุ่มการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบขนาดของฮอร์โมนเอชเอ็มจีที่ใช้ฉีดกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิล เว้นระยะ เวลา 96 ชั่วโมงจึงทำการฉีดฮอร์โมนเอชซีจีขนาด 100 ไอยู ทำการผ่าตัดเก็บรังไข่และท่อนำไข่ภายหลังจากการฉีดฮอร์โมนเอชซีจี 14 ชั่วโมง

ขนาด HMG (ไอยู)	จำนวนไข่เจริญในท่อนำไข่ (ค่าเฉลี่ยต่อตัว)	จำนวนไข่ในฟอลลิเคิล		จำนวนไข่เจริญทั้งหมด (ค่าเฉลี่ยต่อตัว)	จำนวนไข่ทั้งหมด (ค่าเฉลี่ยต่อตัว)
		ไข่เจริญ (ค่าเฉลี่ยต่อตัว)	ไข่ไม่เจริญ (ค่าเฉลี่ยต่อตัว)		
75	94 (9.4± 6.8)[a]	172 (17.2±12.4)[a]	122 (12.2±5.4)[a]	266 (26.6±12.0)[a]	388 (38.8±14.8)[a]
75+75	124 (12.4±8.0)[a]	176 (17.6±5.9)[a]	78 (7.8±4.1)[a]	300 (30.0±7.7)[a]	378 (37.8±13.5)[a]
150	286 (28.6±10.0)[b]	334 (33.4±34.5)[a]	102 (10.2±6.4)[a]	620 (62.0±40.6)[b]	722 (72.2±44.6)[b]

a และ b แสดงความแตกต่างทางสถิติระหว่างแถวในคอลัมน์เดียวกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P<0.05$)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบระยะเวลาระหว่างการฉีดฮอร์โมนเอชเอ็มจีขนาด 150 ไอยูครั้งเดียวกับการฉีดฮอร์โมนเอชซีจีขนาด 100 ไอยู และทำการผ่าตัด 14 ชั่วโมงหลังฉีดฮอร์โมนเอชซีจี

เวลาระหว่าง HMG และ hCG (ชั่วโมง)	จำนวนไข่เจริญในท่อนำไข่ (ค่าเฉลี่ยต่อตัว)	จำนวนไข่ในฟอลลิเคิล		จำนวนไข่เจริญทั้งหมด (ค่าเฉลี่ยต่อตัว)	จำนวนไข่ทั้งหมด (ค่าเฉลี่ยต่อตัว)
		ไข่เจริญ (ค่าเฉลี่ยต่อตัว)	ไข่ไม่เจริญ (ค่าเฉลี่ยต่อตัว)		
72	89 (8.9±11.2)[a]	329 (32.9±23.6)[a]	95 (9.5±4.9)[a]	418 (41.8±23.1)[a]	513 (51.3±25.8)[a]
84	198 (19.8±7.9)[b]	268 (26.8±20.6)[a]	104 (10.4±5.6)[a]	466 (46.6±23.7)[a]	570 (57.0±24.7)[a]
96	388 (38.8±31.3)[b]	223 (22.3±21.3)[a]	94 (9.4±1.6)[b]	611 (61.1±32.8)[a]	705 (70.5±36.1)[a]
108	287 (28.7±25.8)[b]	330 (33.0±22.2)[a]	72 (7.2±4.0)[b]	617 (61.7±25.0)[a]	689 (68.9±25.1)[a]

a และ b แสดงความแตกต่างทางสถิติระหว่างแถวในคอลัมน์เดียวกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P<0.05$)

จากตารางที่ 2 ทำการเปรียบเทียบระยะเวลาระหว่างการฉีดฮอร์โมนเอชเอ็มจี และฮอร์โมนเอชซีจี พบว่า กลุ่มที่เว้นระยะเวลา 96 ชั่วโมง ให้จำนวนไข่เจริญเฉลี่ยที่ตกในท่อนำไข่สูงที่สุด 38.8±31.3 ฟอง แตกต่างกับกลุ่มที่เว้นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ที่ให้ไข่จำนวน 8.9±11.2 ฟอง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่เว้นระยะเวลา 84 หรือ 108 ชั่วโมง ที่มีจำนวนไข่ 19.8±7.9 ฟอง และ 28.7±25.8

ฟอง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนไข่เจริญในฟอลลิเคิล จำนวนไข่เจริญทั้งหมด และจำนวนไข่ทั้งหมด พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติของทั้ง 4 กลุ่มการทดลอง แต่พบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนไข่ที่ไม่เจริญภายในฟอลลิเคิลของกลุ่มที่เว้นระยะเวลา 96 และ 108 ชั่วโมง คือ 9.4±1.6 ฟอง และ 7.2±4.0 ฟอง ตามลำดับ ต่ำกว่ากลุ่มที่เว้นระยะเวลา 72 และ 84 ชั่วโมง ที่ให้จำนวนไข่ 9.5±4.9 ฟอง และ10.4±5.6 ฟอง ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบระยะเวลาภายหลังจากการฉีดฮอร์โมนเอชซีจีขนาด 100 ไอยูจนถึงการผ่าตัดเก็บรังไข่และท่อนำไข่

ระยะเวลาหลังการฉีด hCG (ชั่วโมง)	จำนวนไข่เจริญในท่อนำไข่ (ค่าเฉลี่ยต่อตัว)	จำนวนไข่ในฟอลลิเคิล		จำนวนไข่เจริญทั้งหมด (ค่าเฉลี่ยต่อตัว)	จำนวนไข่ทั้งหมด (ค่าเฉลี่ยต่อตัว)
		ไข่เจริญ (ค่าเฉลี่ยต่อตัว)	ไข่ไม่เจริญ (ค่าเฉลี่ยต่อตัว)		
13	66	199	106	265	371
	(6.6±8.4)^{a}	(19.9±9.7)^{a}	(10.6±5.7)^{a}	(26.5±11.7)^{a}	(37.1±16.0)^{a}
13.5	124	305	83	429	512
	(12.4±9.7)^{a}	(30.5±21.1)^{a}	(8.3±5.0)^{a}	(42.9±27.0)^{ab}	(51.2±23.5)^{ab}
14	228	215	127	443	570
	(22.8±15.5)^{b}	(21.5±9.3)^{a}	(12.7±4.6)^{a}	(44.3±15.1)^{b}	(57.0±15.9)^{c}
14.5	437	363	70	800	870
	(43.7±28.5)^{b}	(36.3±20.6)^{a}	(7.0±2.5)^{a}	(80.0±29.3)^{c}	(87.0±25.2)^{d}
15	369	230	68	599	667
	(36.9±30.1)^{b}	(23.0±22.9)^{a}	(6.8±2.0)^{a}	(59.9±31.7)^{bc}	(66.7±33.6)^{bcd}
15.5	341	290	100	631	731
	(34.1±18.3)^{b}	(29.0±20.9)^{a}	(10.0±5.2)^{a}	(63.1±20.2)^{bc}	(73.1±21.2)^{cd}

a, b, c และ d แสดงความแตกต่างทางสถิติระหว่างแถวในคอลัมน์เดียวกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P<0.05$)

ผลของระยะเวลาภายหลังจากการฉีดฮอร์โมนเอชซีจีจนถึงการผ่าตัดต่อจำนวนไข่ พบว่ากลุ่มที่เว้นระยะเวลา 14.5 ชั่วโมงให้ผลสูงที่สุดทั้งค่าเฉลี่ยของจำนวนไข่เจริญในท่อนำไข่ จำนวนไข่เจริญทั้งหมด และจำนวนไข่ทั้งหมด คือ 43.7±28.5 ฟอง 80.0±29.3 ฟอง และ 87.0±25.2 ฟอง ตามลำดับ สูงกว่ากลุ่มที่เว้นระยะเวลา 13 และ 13.5 ชั่วโมง ที่ให้ไข่จำนวน 6.6±8.4 ฟอง 26.5±11.7 ฟอง 37.1±16.0 และ12.4±9.7 ฟอง 42.9±27.0 ฟอง 51.2±23.5 ฟอง ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ค่าเฉลี่ยของจำนวนไข่เจริญในท่อนำไข่ของกลุ่มที่เว้นระยะเวลา 14, 14.5, 15 และ 15.5 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 22.8±15.5 ฟอง 43.7±28.5 ฟอง 36.9±30.1 ฟอง และ 34.1±18.3 ฟอง ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยของจำนวนไข่เจริญของกลุ่มที่เว้นระยะเวลา 14.5 ชั่วโมง คือ 80.0±29.3 ฟอง สูงกว่า 14 ชั่วโมง ที่ให้ไข่ 44.3±15.1 ฟองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่

ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่เว้นระยะเวลา 15 และ 15.5 ชั่วโมง ที่ให้ไข่ 59.9±31.7 ฟอง และ 63.1±20.2 ฟอง ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยจำนวนไข่ทั้งหมดของกลุ่มที่เว้นระยะเวลา 14.5 ชั่วโมง (87.0±25.2 ฟอง) สูงกว่า 14 ชั่วโมง (57.0±15.9 ฟอง) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่เว้นระยะเวลา 15 และ 15.5 ชั่วโมง ที่มีจำนวนไข่ 66.7±33.6 ฟอง และ 73.1±21.2 ฟอง ตามลำดับ ส่วนค่าเฉลี่ยของจำนวนไข่ในฟอลลิเคิลของทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ดังตารางที่ 3

วิจารณ์และสรุป

การกระตุ้นเพื่อเพิ่มจำนวนไข่ตกในท่อนำไข่สำหรับกระต่าย โดยทั่วไปใช้การกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอชฉีดติดต่อกัน 3 ถึง 4 วัน ร่วมกับฮอร์โมนเอชซีจี หรือฮอร์โมนแอลเอช เพื่อทำให้ไข่ตกในท่อนำไข่ (Maurer *et al.*, 1968; Mehaisen *et al.*, 2006; Savetti *et al.*, 2007) บางการศึกษา (Kauffman *et al.*, 1998) พบว่า การใช้ฮอร์โมนอีซีจีมีผลในการกระตุ้นการตกไข่ได้ดีกว่า เนื่องจากมีระดับของฮอร์โมนในกระแสเลือด (Half life) ได้นานกว่าฮอร์โมนเอฟเอสเอชหลายวัน (Moor *et al.*, 1984) แต่ Fujimoto และคณะ (1974) พบว่า ฮอร์โมนอีซีจีมีผลต่อความผิดปกติของโครโมโซมของตัวอ่อนระยะบลาสโตซิส ดังนั้นจึงนิยมใช้ฮอร์โมนเอฟเอสเอชสำหรับกระตุ้นการตกไข่ในกระต่าย มีการศึกษาของ Hashimoto และคณะ (2007) ได้ทำการกระตุ้นการตกไข่ด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอชโดยฉีดเพียงครั้งเดียว และใช้สารอะลูมิเนียมเป็นสารละลาย ทำให้ไข่ตกเฉลี่ย 40.5 ฟองต่อตัว ซึ่งไม่ต่างจากการฉีดหลายครั้งได้ไข่เฉลี่ย 47.4 ฟองต่อตัว นอกจากนี้มีการใช้ฮอร์โมนเอชเอ็มจีเพื่อกระตุ้นการตกไข่ โดยฉีดใต้ผิวหนังเพียงครั้งเดียว ขนาดของฮอร์โมน 15 ถึง 90 ไอยูมีผลต่อการปฏิสนธิ และขนาด 60 ไอยูให้ผลดีที่สุดในการปฏิสนธิและการพัฒนาของตัวอ่อนกระต่าย

จากการศึกษานี้ใช้ฮอร์โมนเอชเอ็มจีขนาด 75 ไอยู ฉีดครั้งเดียว หรือ 2 ครั้ง เปรียบเทียบกับขนาด 150 ไอยู ฉีดเพียงครั้งเดียวพบว่า ขนาด 150 ไอยูให้ผลต่อการกระตุ้นการตกไข่ในกระต่ายดีกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ทำให้ไข่ตกในท่อนำไข่เฉลี่ย 28.6 ฟองต่อตัว และมีค่าสูงกว่าการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนอีซีจีซึ่งทำให้ไข่ตก 19.2 ฟองต่อตัว (Mehaisen *et al.*, 2005) การใช้ฮอร์โมนพีเอ็มเอชจีซึ่งทำให้ไข่ตก 17.6 ฟองต่อตัว (Gravance, 1994) และใกล้เคียงกับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอฟเอสเอช (27.1 ฟองต่อตัว; Salvetti *et al.*, 2007) ซึ่งเกี่ยวข้องกับขนาดฮอร์โมนในครั้งแรกที่ฉีดมีผลต่อระดับฮอร์โมนในร่างกาย เพื่อการกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาของฟอลลิเคิล นอกจากนี้การฉีดด้วยฮอร์โมนเพื่อกระตุ้นการตกไข่ด้วยฮอร์โมนเอชเอ็มจีครั้งเดียว ช่วยให้ทำได้ง่าย สะดวก และลดความเครียดจากการจับบังคับกระต่ายหลายครั้งด้วย

การเว้นระยะเวลาระหว่างการฉีดฮอร์โมนเพื่อกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิล จนถึงการใช้ฮอร์โมนเพื่อให้ไข่ตกนั้น โดยทั่วไปเว้นระยะเวลา 72 ถึง 96 ชั่วโมง (Piotrowska *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2006) โดยพบว่า เว้นระยะที่ 96 ชั่วโมงให้ผลของการตกไข่ดีกว่า และจากการทดลองนี้หากเว้นระยะระหว่างฮอร์โมนเอชเอ็มจีและเอชซีจี 96 ชั่วโมงทำให้ไข่กระต่ายตกในท่อนำไข่ถึง 38.8 ฟองต่อตัว และทำให้จำนวนไข่ที่ยังไม่เจริญพร้อมปฏิสนธิที่คงเหลือในฟอลลิเคิลน้อยอีกด้วย

ระยะเวลาภายหลังจากการฉีดฮอร์โมนเอชซีจีจนถึงเก็บรังไข่และท่อนำไข่นั้น โดยทั่วไปอยู่ที่ 14 ถึง 15 ชั่วโมง (Piotrowska *et al*., 2000; Li *et al*., 2005; Li *et al*., 2006) จากการทดลองนี้ พบว่าที่ 14 ถึง 15.5 ชั่วโมง สามารถเก็บไข่ที่ตกอยู่ในท่อนำไข่ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อพิจารณาถึงจำนวนไข่ที่สามารถนำไปใช้งานได้นั้นที่ระยะเวลา 14.5 ชั่วโมงมีค่าสูงที่สุด แม้จะไม่แตกต่างจาก 15 และ 15.5 ชั่วโมงก็ตาม แต่หากต้องการไข่ที่เจริญพร้อมปฏิสนธิ อยู่ในระยะเมทาเฟสที่สอง และไม่เป็นไข่แก่ (Aging oocytes) ควรใช้ระยะเวลาภายหลังจากการฉีดเอชซีจีที่ 14.5 ชั่วโมงดีที่สุด สอดคล้องกับรายงานของ Chen และคณะ (2003) ที่พบว่าเว้นระยะเวลา 14.5 ชั่วโมง ภายหลังจากการฉีดฮอร์โมนเอชซีจีให้ผลดีที่สุดทั้งจำนวนและคุณภาพของไข่ และจากรายงานของ Asakawa และคณะ (1988) ทำการกระตุ้นกระต่ายด้วยฮอร์โมนพีเอ็มเอชจีขนาด 100 ไอยู เว้นระยะเวลา 72 ชั่วโมง จึงทำการฉีดฮอร์โมนเอชซีจีขนาด 100 ไอยู จากนั้น 9-10 ชั่วโมงทำการเก็บรังไข่และเก็บไข่จากฟอลลิเคิล ซึ่งสามารถเก็บไข่ได้เฉลี่ย 20 ฟองต่อตัว แม้จะได้ไข่จำนวนไม่มาก แต่เป็นไข่ที่คุณภาพดี และเป็นไข่ไม่แก่ เนื่องจากไข่ที่แก่จะทำให้ไม่สามารถควบคุมการเจริญพร้อมปฏิสนธิ การปฏิสนธิ และยังพบความผิดปกติของโครโมโซมมากอีกด้วย

สรุป การใช้ฮอร์โมนเอชเอ็มจีขนาด 150 ไอยูฉีดครั้งเดียว เว้นระยะเวลา 96 ชั่วโมง จึงทำการฉีดฮอร์โมนเอชซีจีขนาด 100 ไอยูเข้าหลอดเลือดดำ จากนั้นเว้นระยะเวลา 14.5 ชั่วโมง จึงทำการผ่าตัดเก็บรังไข่และท่อนำไข่ของกระต่าย เป็นวิธีการที่ดีที่ทำการกระตุ้นการตกไข่ในกระต่าย เพื่อให้ได้ไข่ที่เจริญพร้อมปฏิสนธิจำนวนมากและมีคุณภาพดี

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการศึกษา และทุนวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ นางสาวอมร สันธิ นางสาวญาดา จารุจินดาและนางสาวแจ่มจิต ด้วงปันตา ที่ช่วยเหลือเกี่ยวกับการเลี้ยงกระต่ายและเทคนิคทางห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

Asakawa, T., Ishikawa, M., Shimizu, T. and Dukelow, W.R. 1988. The chromosomal normality of in vitro-fertilizated rabbit oocytes. Biol. Reprod. 38: 292-295.

Chen, D.Y., Wen, D.C., Zhang, Y.P., Sun, Q.Y., Han, Z.M., Liu, Z.H., Shi, P., Li, J.S., Xiangyu, J.G., Lian, L., Kou, Z.H., Wu, Y.Q., Chen, Y.C., Wang, P.Y. and Zhang, H.M. 2002. Interspecies implantation and mitochondria fate of panda-rabbit cloned embryos. Biol. Reprod. 67: 637-642.

Chen, Y., He, Z.X., Liu, A., Wang, K., Mao, W.W., Chu, J.X., Lu, Y., Fang, Z.F., Shi, Y.T., Yang, Q.Z., Chen, D.Y., Wang, M.K., Li, J.S., Huang, S.L., Kong, X.Y., Shi, Y.Z., Wang, Z.Q., Xia, J.H., Long, Z.G., Xue, Z.G., Ding, W.X. and Sheng, H.Z. 2003. Embryonic stem cells generated by

nuclear transfer of human somatic nuclei into rabbit oocytes. Cell. Res. 13: 251-264.

Chen, T., Zhang, Y.L., Liu, J.H., Schatten, H., Chen, D.Y. and Sun, Q.Y. 2005. Interspecies nuclear transfer reveals that demethylation of specific repetitive sequences is determined by recipient ooplasm but not by donor intrinsic property in cloned embryos. Mol. Reprod. Dev. 73: 313-317.

Edirislinghe, W.R., Law, H.Y., NG, S.C., Chia, C.M. and Ratnam, S.S. 1986. Superovulation of mice with human menopausal gonadotrophin or pure follicle-stimulating hormone in combination with human chorionic gonadotrophin and the effects of oocyte aging on in vitro fertilization. *J. In Vitro Fert. Embryo Transf.* 3: 314-318.

Fujimoto, S., Pahlavan, N. and Dukelow, W.R. 1974. Chromosome abnormalities in rabbit preimplantation blastocysts induced by superovulation. J Reprod Fertil. 40: 177-181.

Gravance, C.G. 1994. Effects of a single combined dose of pregnant mares serum gonadotrophin and human chorionic gonadotrophin on ovulation rate in young rabbits. Anim. Reprod. Science. 34: 299-305.

Hashimoto, S., Kimura, K., Kuramochi, T., Aoyagi, K., Hirako, M., Kawaguchi, M., Iwata, H., Hirao, M., Kitada, K., Hirasawa, K. and Ueda, M. 2007. Responsiveness of rabbits to superovulation treatment by a single injection of follicle-stimulating hormone with aluminum hydroxide gel. Mol. Reprod. Dev. 74: 1208-1212.

Hosoi, Y., Yamochi, T., Kawata, N., Takenoshita, M., Ohta, S., Matsumoto, K., Saeki, K. and Iritani, A. 2005. Developmental competence of reconstructed embryos produced by nuclear transfer between cynomolgus monkey fibroblast cells and rabbit oocytes. Reprod. Fert. Dev. 18: 128.

Jiang, M.X., Yang, C.X., Zhang, L.S., Zheng, Y.L., Liu, S.Z., Sun, Q.Y. and Chen, D.Y. 2004. The effects of chemical enucleation combined with whole cell intracytoplasmic injection on panda-rabbit interspecies nuclear transfer. Zygote. 12: 315.

Jiang, Y., Chen, T., Nan, C.L., Ouyang, Y.C., Sun, Q.Y. and Chen, D.Y. 2005. In vitro culture and mtDNA fate of ibex-rabbit nuclear transfer embryos. Zygote. 13: 233.

Jiang, Y., Chen, T., Wang, K., Jiang, M.X., Liu, S.Z., Ouyang, Y.L., Sun, Q.Y. and Chen, D.Y. 2006. Different fates of donors mitochondrial DNA in bovine-rabbit and cloned bovine-rabbit reconstructed embryos during preimplantation development. Front. .Biol.11: 1425.

Kanayama, K., Endo, T. and Sakuma, Y. 1992. Simplification of superovulation induction in rabbits by means of human menopausal gonadotrophin dissolved in polyvinylpyrrolidone. Zentralbl. Veterinarmed. A. 39: 798-800.

Kanayama, K., Nariai, K., Sankai, T. and Endo, T. 1995. Superovulation induction by human menopausal gonadotrophin in rabbits. *J. Vet. Med. Sci.* 57: 543-544.

Kauffman, R.D., Schmidt, P.M., Rall, W.F. and Hoeg, J.M. 1998. Superovulation of rabbits with FSH alters in vivo development of vitrified morulae. Theriogenology. 50: 1081-1092.

Li, J.S., Han, Z.M., Zhu, Z.Y., Wen, D.C., Liu, Z.H., Wang, M.K., Lian, L., Du, J., Wang, P.Y., Zhang, H.M. and Chen, Y. 2002. Interspecies nuclear transfer using nonquiescent somatic cell. Shi. Yan. Sheng. Wu. Xue. Bao. 35: 62.

Li, S., Chen, X., Fang, Z., Shi, J. and Sheng, H.Z. 2006. Rabbits generated from fibroblasts through nuclear transfer. Reproduction. 131: 1085-1090.

Liu, S.Z., Yao, L.J., Jiang, M.X., Lei, Z.L., Zhang, L.S., Zhang, Y.L., Sun, Q.Y., Zheng, Y.L., Song, X.F. and Chen, D.Y. 2005. Apoptosis in rabbit embryos produced by fertilization or nuclear transfer with fibroblasts and cumulus cells. Reproduction. 130: 359-366.

Lui, S.Z., Zhou, Z.M., Chen, T., Zhang, Y.L., Wen, D.C., Kou, Z.H., Li, Z.D., Sun, Q.Y. and Chen, D.Y. 2004. Blastocysts produced by nuclear transfer between chicken blastodermal cells and rabbit oocytes. Mol. Reprod. Dev. 69: 296.

Maurer, R.R., Hunt, W.L. and Foote, R.H. 1968. Repeated superovulation following administration of exogenous gonadotrophins in dutch-belted rabbits. *J. Reprod. Fertil.* 15: 93-102.

Mehaisen, G.M.K., Vicente, J.S., Lavara, R. and Viudes-de-Castro, M.P. 2005. Effect of eCG dose and ovulation induction treatments on embryo recovery and in vitro development post-vitrification in two selected lines of rabbit does. Anim Reprod Science. 90: 175-184.

Mehaisen, G.M.K, Viudes-de-Castro, M.P., Vicente, J.S. and Lavara, R. 2006. In vitro and in vivo viability of vitrified and non-vitrified embryo derived from eCG and FSH treatment in rabbit does. Theriogenology. 65: 1279-1291.

Moor, R.M., Kruip, Th.A.M. and Green, D. 1984. Intraovarian control of folliculogenesis limits to superovulation? Theriogenology. 21: 103-116.

Numchaisrika, P., Rungsriwiwat, R., Thongpakdee, A. and Techakumphu M. 2005. A preliminary study of the in vitro developmental of asian elephant, cloned embryos, reconstructed using a rabbit recipient oocyte. Reprod. Fertil. Dev. 17: 179-180.

Piotrowska, K., Modlinski, J.A., Korwin-Kossakowski, M. and Karasiewicz, J. 2000. Effects of preactivation of ooplasts or synchronization of blastomere nuclei in G1 on preimplantation development of rabbit serial nuclear transfer embryos. Biol Reprod. 63: 677-682.

Salvetti, P., Clement, M.T., Beckers, J.F., Hurtaud, J., Guerin, P., Neto, V., Falieres, J. and Joly, T. 2007. Effect of the luteinizing hormone on embryo production in superovulated rabbit does. Theriogenology. 67: 1185-1193.

Wen, D.C., Yang, C.X., Cheng, Y., Li, J.S., Liu, Z.H., Sun, Q.Y., Zhang, J.X., Lei, L., Wu, Y.Q., Kou, Z.H. and Chen, D.Y. 2003. Comparison of developmental capacity for intra- and interspecies cloned cat (felis catus) embryos. Mol Reprod Dev. 66: 38.

Yang, L.X., Kou, Z.H., Wang, K., Jiang, Y., Mao, W.W., Sun, Q.Y., Sheng, H.Z. and Chen, D.Y. 2004. Quantitative analysis of mitochondrial DNAs in macaque embryos reprogrammed by rabbit oocytes. Reproduction. 127: 201-205.

Zhang, X.R., Liu, Y., Zhang, Y.H., Chen, D.Y., Lian, L., Li, J.S., Jin, R.T., Zhang, Z.G., Zhang, M.L., Wang, C.L. 2004. Effect of some factors on the fusion rate of bovine-rabbit interspecies reconstructed eggs. *China J Agri Biotech*. 1: 135-138.

Responsiveness of rabbits to superovulation treatment by injection of hMG and appropriate timing of hCG injection

Anucha Sathanawongs[1] Suvichai Rojanasthien[2] and Apichart Oranratnachai[3*]

[1] PhD Student of Biotechnology, Faculty of Graduate School, Chiang Mai University

[2] Department of Ruminant Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University

[3] Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University

* Corresponding Author : Fax. 0-5389-2904 E-mail : aorantrat@loxinfo.co.th

Abstract

The objectives of this study were to evaluate the effects of hMG dosage; the appropriate time before and after hCG injections to oocyte collection from ovaries and oviducts to increase the number of ovulated oocytes in rabbits. Matured rabbits were allocated into 13 groups' with 10 rabbits per group. There were 3 experiments; (1) hMG dosage (2) time intervals between hMG and hCG injections (3) time after hCG injections until oocyte collection. It was found that single injection of hMG 150 IU led to ovulation of 28.6±10.0 oocytes which were significantly more than those of single and double injections of hMG 75 IU leading to ovulation of 9.4± 6.8 and 12.4±8.0 oocytes, respectively ($P<0.05$). The intervals between hMG and hCG injections of 84, 96 and 108 hours: 19.8±7.9, 38.8±31.3 and 28.7±25.8 obtaining oocytes, respectively were not significantly different, the interval time of 96 hours tended to give highest number of ovulation of 38.8±31.3 oocytes. The intervals after hCG injections were not significantly different from 14 to 15.5 hours: 43.7±28.5, 36.9±30.1 and 34.1±18.3 obtaining oocytes, respectively, the interval of 14.5 hours until operation tended to give the highest ovulation of 43.7±28.5 oocytes. In conclusion, the best protocol in this study of rabbit superovulation is single injection of hMG 150 IU and followed by 96 hours injection with hCG with the interval of 14.5 hours until oocyte collection.

Keywords: responsiveness, superovulation, hMG, hCG, rabbits