การพัฒนาการของฟอลลิเคิลและการเพิ่มประสิทธิภาพของการเหนี่ยวนำการตกไข่ในโคนมแรกคลอด

สมจิตร์ กันธาพรม*

บทคัดย่อ

วิทยานิพนธ์นี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา 1) การเปลี่ยนแปลง (การพัฒนาการและการเสื่อมสลาย) ของฟอลลิเคิลบนรังไข่ในโคนมแรกคลอดที่เคยให้ลูกครั้งเดียวกับโคนมที่เคยให้ลูกหลายครั้ง 2) ประสิทธิภาพในการเสริมฮอร์โมน progesterone (P4) การพัฒนาของ corpus luteum (CL) และอัตราการผสมติดในโคนมหลังคลอด และ 3) ประเมินกิจกรรมการแบ่งเซล (mitotic activity) ของฟอลลิเคิลระยะก่อนการตกไข่วันที่ 5 หรือ 6 ของคลื่นฟลอลิเคิลแรกในโค ซึ่งประกอบด้วย 3 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 ทำการศึกษาในโคนมระยะแรกคลอกพันธุ์โฮสไตน์ ฟรีเชี่ยน จำนวน 16 ตัว แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ โคนมที่ให้ลูกครั้งเดียว (primiparous cows) กับโคนมที่ให้ลูกหลายครั้ง (multiparous cows) ทำการศึกษาโดยแยกเลี้ยงคอกละ 1 ตัว โคนมได้รับอาหารหยาบอย่างเต็มที่และอาหารข้นตามความต้องการของร่างกายของโคนมระยะให้นม ทำการติดตามการพัฒนาการของฟอลลิเคิลบนรังไข่แบบวันเว้นวัน ตั้งแต่วันที่ 5 ถึง 90 หลังคลอด ด้วยเครื่องอัลตราซาวนด์ พบว่าทั้งในโคนมที่ให้ลูกครั้งเดียวและให้ลูกหลายครั้ง มีการพัฒนาการของฟอลลิเคิลในลักษณะเป็นคลื่นฟอลลิเคิล (wave-like pattern) โดยตลอดการทดลองโคนมให้ลูกครั้งเดียวมีจำนวนคลื่นฟอลลิเคิลน้อยกว่าโคนมที่ให้ลูกหลายครั้ง (4.3±0.3 และ 5.6±0.3 คลื่น, $P<0.01$) ระยะเวลาที่เกิดคลื่นฟอลลิเคิลในแต่ละคลื่นในโคนมที่ให้ลูกครั้งเดียวมีระยะเวลายาวนานกว่าโคนมที่ให้ลูกหลายครั้ง (17.2±2.3 และ 11.9±0.7 วัน, $P<0.05$) นอกจากนั้นโคนมที่ให้ลูกหลายครั้งมีระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน P4ในวันที่ 42 หลังคลอดสูงกว่าโคนมที่ให้ลูกครั้งเดียว (0.9±0.1 และ 0.6±0.1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร, $P<0.01$) ผลจากการศึกษาในครั้งนี้แสดงถึงความแตกต่างกันบางประการของการเปลี่ยนแปลงฟอลลิเคิลบนรังไข่ในโคนมที่ให้ลูกครั้งเดียวกับโคนมที่ให้ลูกหลายครั้ง

การทดลองที่ 2 ทำการสุ่มโคนมหลังคลอด จำนวน 36 ตัว เข้าสู่แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) โดยแบ่งโคนมออกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 Ovsynch กลุ่มควบคุม โดยในวันที่ -10 โคนมได้รับการฉีดฮอร์โมน GnRH (Receptal®) เข็มแรก ขนาด 100 ไมโครกรัม วันที่ -3 ฉีดฮอร์โมน $PGF_2\alpha$ (Lutalyse®) ขนาด 25 มิลลิกรัม วันที่ -1 ฉีดฮอร์โมน GnRH เข็มที่ 2 ขนาด 50 ไมโครกรัม หลังจากนั้น 16-18 ชั่วโมง ทำการผสมเทียม (วันที่ 0) และวันที่ 5 หลังผสมเทียมโคนมได้รับการฉีดนอร์มัลซาไลน์ (0.9% normal saline) ขนาด 10 มิลลิลิตร กลุ่มที่ 2 (Ovsynch+hCG) โคนมได้รับโปรแกรม Ovsynch เช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม และโคนมได้รับการเสริมฮอร์โมน hCG (Chorulon®) ขนาด 3000 IU ในวันที่ 5 หลังผสมเทียม และกลุ่มที่ 3 (Ovsynch+GnRH) โคนมได้รับโปรแกรม Ovsynch และวันที่ 5 หลังผสมเทียมโคนมได้รับฮอร์โมน hCGขนาด 100 ไมโครกรัม ผลการศึกษาพบว่าโคนมที่ได้รับการเสริมฮอร์โมน hCG และ GnRH มีจำนวน CL มากกว่าโคนมกลุ่มควบคุม (1.8, 1.8 และ 0.8 ใบ ในกลุ่ม Ovsynch+hCG, Ovsynch+GnRH และควบคุมตามลำดับ, $P<0.01$) โคนมกลุ่ม Ovsynch+hCG และ Ovsynch+GnRH มีระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน P4 ในวันที่ 12

---

* วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สัตวศาสตร์) คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 119 หน้า.

หลังผสมเทียมสูงกว่ากลุ่มควบคุม (6.4±0.1, 5.1±0.3 และ 3.8±0.4 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ, P<0.01) อย่างไรก็ตาม อัตราการผสมติดในโคนมทั้ง 3 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

การทดลองที่ 3 ใช้โคเนื้อลูกผสม จำนวน 8 ตัว เป็นสัตว์ทดลอง (อายุเฉลี่ย 60±6.8 เดือน และน้ำหนักร่างกายเฉลี่ย 461±13.8 กิโลกรัม) สัตว์ทดลองทุกตัวได้รับการเหนี่ยวนำให้เป็นสัดด้วยฮอร์โมน $PGF_{2}\propto$ (Estrumate®) จำนวน 2 ครั้ง ห่างกัน 11 วัน โดยวันที่โคแสดงอาการเป็นสัดนับเป็นวันที่ 0 หลังจากนั้นวันที่ 5 หรือ 6 หลังการเป็นสัด ทำการฆ่าและเก็บรังไข่ หลังจากนั้นเก็บเนื้อเยื่อรังไข่ในพาราฟิน (paraffin embed) และทำการแยกความสมบูรณ์ของฟอลลิเคิลตามการจัดเรียงตัวของเซลในชั้นของ granulosaและ theca cell และ pyknotic nuclei ในฟอลลิเคิล โดยแบ่งฟอลลิเคิลออกเป็น 2 ชนิดคือ ฟอลลลิเคิลที่สมบูรณ์ (healthy follicle) และฟอลลิเคิลที่ไม่สมบูรณ์ (unhealthy follicle) ผลการศึกษาพบว่าเปอร์เซ็นต์ของการปรากฏ Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) ของฟอลลิเคิลที่สมบูรณ์สูงกว่าฟอลลิเคิลที่ไม่สมบูรณ์ ทั้งใน granulosa cell (38.1±1.1 และ 16.9±1.4%, P<0.01) และ theca cell (32.3±0.6 และ 13.4±1.3%, P<0.01) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามฟอลลิเคิลที่สมบูรณ์มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่าฟอลลิเคิลที่ไม่สมบูรณ์ (6.9±0.7 และ 9.6±1.5 มิลลิเมตร, P<0.01) นอกจากนี้ยังพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของฟอลลิเคิลและกิจกรรมการแบ่งเซลล์เป็นลักษณะสหสัมพันธ์เชิงลบ ทั้งในชั้น granulosa cell และ theca cell ผลจากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้กิจกรรมในการแบ่งเซล เป็นตัวชี้วัดในกลไกในการคัดเลือก domainant follicle (DF) ระยะก่อนการตกไข่

จาการศึกษาทั้ง 3 การทดลองสรุปได้ว่าโคนมแรกคลอดมีการพัฒนาของฟอลลิเคิลในลักษณะเป็นคลื่นฟอลลิเคิล ซึ่งแสดงให้เห็นว่าบนรังไข่มีการพัฒนาการของฟอลลิเคิลเกิดขึ้น ดังนั้น จึงสามารถใช้โปรแกรมเหนี่ยวนำการตกไข่ (Ovsynch) ร่วมกับการเสริมฮอร์โมน hCG และ GnRHเพิ่มประสิทธิภาพทางการสืบพันธุ์ของโคหลังคลอด นอกจากนั้นยังพบว่ากิจกรรมในการแบ่งเซลสามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดที่บ่งบอกถึงศักยภาพของฟอลลิเคิลที่ถูกคัดเลือกเป็น DF ระยะก่อนการตกไข่ ดังนั้นผลการศึกษาจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีส่วนสำคัญต่อความเข้าใจ เพื่อแก้ปัญหาการผสมไม่ติดในโคนมแรกคลอด โดยใช้องค์ความรู้พื้นฐานในการเพิ่มประสิทธิภาพของโปรแกรมเหนี่ยวนำการตกไข่ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

Follicular Development and Enhancing the Efficiency of Synchronization of Ovulation in Early Postpartum Dairy Cows

SomchitGuntaprom*

Abstract

The aims of the dissertation were to 1) study follicular dynamics of early postpartum dairy cows (primiparous and multiparous cows), 2) determine the effects of hCG and GnRH supplementation in TAI protocol on progesterone concentrations, corpus luteum (CL) development, and conception rate of postpartum dairy cows, and 3) evaluate the mitotic activity of the bovine preovulatory follicles on day 5 or 6 of the first follicular wave. Three experiments were conducted in dairy and beef cattle to meet the objectives of the dissertation as follows.

Experiment 1. Sixteen early postpartum Holstein crossbred dairy cows were divided into two groups (primiparous and multiparous cows) and were individually housed and fed ad libitum of roughage and concentrate to meet requirements for any lactating cows.From day 5 to 90 postpartum, ovarian follicular growth were monitored every other day using transrectal ultrasonography. The follicular wave-like patterns were observed in both primiparous and multiparous cows. The number of follicular wave in primiparous cows were less than those of multiparous cows (4.3±0.3 VS. 5.6±0.3 wave, respectively, $P<0.01$), and the duration of each wave was longer in primiparous cows than in multiparous cows (17.2±2.3 VS.11.9±0.7 days, $P<0.05$). Furthermore, the multiparous cows had greater progesterone concentration on day 42 postpartum than the primiparous cows (0.9±0.1 VS.0.6±0.1 ng/ml, respectively, $P<0.01$). It is obvious that were some difference in follicular development between early postpartum primiparous and multiparous cows.

Experiment 2. Thirty six postpartum Holstein crossbred dairy cows (2.4±0.2 parity) were assigned to each of the three treatment (control=Ovsynch, Ovsynch+hCG, and Ovsynch+GnRH). All cows were subjected to Ovsynch where they were injected with 100 μg of GnRH (Receptal®) on d -10, 25 mg of $PGF_{2\alpha}$(Lutalyse®) on d -3 and 50 μg of GnRH on d -1. Following Ovsynch they were timed artificial inseminated (TAI) 0n day 0. On d 5 after TAI cows were given either 10 ml of normal saline (control, n=12) or 3,000 IU of hCG (Chorulon®) (Treatment 2, n=12) or 100 μg of GnRH (Treatment 3, n=12). Cows treated with hCG or GnRH had a greater number of CL and P4 concentrations on day 12 after TAI than those control cows (CL: 1.8±0.1, and 1.8±0.1, and 0.8±0.1; P4: 6.4±0.1, 5.1±0.3, and 3.8±0.4 ng/ml, respectively, $P<0.01$). However, conception rate were not different (58.3, 58.3 and 41.7% for Ovsynch+hCG, Ovsynch+GnRH, and control, $P>0.05$). From the findings, it can be concluded that hCG and GnRH supplementation affected CL development by increasing number of accessory CL and P4 concentration on day 12 after TAI, but did not improve the conception rate.

---

* Master of Science (Animal Science), Faculty of Agriculture, Khon Kaen University. 119 pages.

Experiment 3. Eight mature crossbred beef cows (60±6.8 mo; 461±13.8 kg BW) received two injections (11 days apart) of a $PGF_{2\alpha}$ analogue (25 mg of Estrumate®) to synchronize estrus. Ovaries were collected from a slaughterhouse on day 5 or 6 the subsequent estrous cycle. Follicles were classified as healthy or unhealthy based on layer of intact granulosa cells (GC), well organized arrangement and pyknotic nuclei. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining was performed using a monoclonal antibody (no.2586, Cell Signaling Technology, CA) to determine the labeling index of the healthy and unhealthy follicles. The granulosa and theca cell (TC) labeling index were determined morphometrically. The rate of cell proliferation in the granulosa and theca layers were greater in the healthy follicles than in the unhealthy follicles (GC: 38.1±1.1 vs. 16.9±1.4; TC: 32.3±0.6 vs. 13.4±1.3%, respectively, $P<0.01$). Follicular diameter in healthy follicles was smaller than that in unhealthy follicles (6.9±0.7 vs. 9.6±1.5 mm, $P<0.01$). This result indicates that a significant decrease in granulosa and theca cell proliferation occur in only the unhealthy follicles after the selection of the preovulatory DF.

In conclusion, results from the dissertation herein described the follicular development in early portpartum daily cows by which follicular wave-like pattern was observed in both primiparous and multiparous cows. Thus, TAI protocol (Ovsynch) with the supplement of hCG or GnRH could be used to precisely synchronize ovulation. Although the conception rate of cows received hCG or GnRH on day 5 were not improved, the CL development and P4 concentrations were greater in the hormone treated cows than in the control ones. The follicular development in cattle was associated with the mitotic activity of preovulatory follicles. Thus the degree of mitotic activity may be a key for follicular growth, development and healthy. The data obtained from dissertation provided some significant approaches for better understanding and maximizing the efficiency of TAI protocols in postpartum dairy cows.