ผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาโอโอไซต์ในน้ำฟอลลิเคิลต่อการพัฒนาของเอ็มบริโอโค

นิติรัฐ ถียัง[1/] อภิรักษ์ อุทธา[2/] สุจิรา ธรรมวัง[1/]

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบผลของระยะเวลาการเก็บรักษาโอโอไซต์นาน 12 18 และ 24 ชั่วโมง ในน้ำฟอลลิเคิลที่ 25 องศาเซลเซียสต่อการพัฒนาของเอ็มบริโอโค รวมถึงติดตามการเจริญของเอ็มบริโอจนถึงระยะที่พัฒนามากกว่าบลาสโตซีสต์ ใช้โอโอไซต์ที่ดูดเก็บจากรังไข่โคจากโรงฆ่าสัตว์ในพื้นที่จังหวัดขอนแก่น คัดเลือกโอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบหลายชั้น แบ่งออกแบบสุ่มเป็น 3 กลุ่ม เก็บในน้ำฟอลลิเคิลที่เตรียมสดและรักษาอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส เมื่อสิ้นสุดเวลาการเก็บในแต่ละกลุ่ม นำมาเข้ากระบวนการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิ ทำการปฏิสนธิ และเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอแบบนอกร่างกาย บันทึกข้อมูลอัตราการพัฒนาของเอ็มบริโอในทุกระยะ ทดลองจำนวน 4 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลด้วย ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติด้วย Duncan multiple rang test พบว่ากลุ่มที่ใช้ระยะเวลาเก็บรักษาโอโอไซต์ 12 ชั่วโมง (82.0±2.6% 78.4±3.4% และ 46.7±7.0%) และ 18 ชั่วโมง (77.4±4.6% 74.0±5.3% และ 38.7±6.8%) มีอัตราการพัฒนาของเอ็มบริโอสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใช้ระยะเวลาเก็บรักษาโอโอไซต์ 24 ชั่วโมง (63.8%, 59.1% และ 17.6%) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) พบว่ากลุ่มที่ใช้ระยะเวลาเก็บรักษาโอโอไซต์ 12 ชั่วโมง และ 18 ชั่วโมง (53.4±4.0% และ 65.9±5.3%) มีอัตราการพัฒนาของเอ็มบริโอในระยะ expanded blastocyst สูงกว่ากลุ่มที่ใช้ระยะเวลาเก็บรักษาโอโอไซต์ 24 ชั่วโมง (29.2±10.5%) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) มีเอ็มบริโอจำนวนหนึ่งในกลุ่ม 12 และ 18 ชั่วโมง สามารถพัฒนาต่อไปได้จนถึงระยะ hatched blastocyst ขณะที่กลุ่ม 24 ชั่วโมงหยุดพัฒนาแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ การศึกษาครั้งสรุปได้ว่าการเก็บรักษาโอโอไซต์โคในน้ำฟอลลิเคิลอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้นานถึง 18 ชั่วโมง ในอนาคตยังมีความจำเป็นในการศึกษาโครงสร้างของเอ็มบริโอและการเสริมสารต่าง ๆ สำหรับปรับปรุงคุณภาพของโอโอไซต์ เพื่อให้สามารถเก็บรักษาได้นานยิ่งขึ้น

คำสำคัญ: โค เอ็มบริโอ โอโอไซต์

เลขทะเบียนวิชาการ: 63(2)-0208-128

[1/]ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพเชียงใหม่ อ. เมือง จ. เชียงใหม่

[2/]ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพขอนแก่น อ. เมือง จ. ขอนแก่น

The effect of oocyte storage time in follicular fluid on bovine embryonic development

Nitirut Theeyoung[1/] Apirak Utta[2/] Sujira Thammawung[1/]

Abstract

The objective of study was to compare the effect of oocyte storage in follicular fluid at 25 degree C for 12, 14 and 18 h on bovine embryonic development in vitro. The development of embryos beyond blastocyst stage was also investigated. Cattle ovaries were collected from a local slaughterhouse in Khon Kaen province. The selected cumulus oocyte complexes (COCs) were randomly divided in to 3 groups, stored in fresh prepared follicular fluid for 12, 18 and 24 h at 25-degree C. At the end of storage period of each group, COCs were matured, fertilized and cultured following the in vitro embryo production (IVP) program. Each experimental group was replicated 4 times. Data were analyzed by ANOVA and statistical differences among means were identified using Duncan's multiple range test (DMRT). No significant differences were found between 12 h (82.0±2.6%, 78.4±3.4%, and 46.7±7.0%) and 18 h (77.4±4.6%, 74.0±5.3% and 38.7±6.8%) storage groups on cleavage, ≥ 4 cells and blastocyst rates, respectively. Storage of bovine oocytes for up to 24 h reduced ($p < 0.05$) the proportion of their developmental competence after processing in vitro fertilization (63.8±4.5%, 59.1±5.4% and 17.6±6.4%) for cleavage, ≥ 4 cells and blastocyst stages, respectively). The rate of development to expanded blastocyst was found significantly ($p < 0.05$) higher in 12 h and 18 h groups (53.4±4.0% and 65.9±5.3%) compared to 24 h group (29.2±10.5%). Some embryos in 12 and 18 h groups were continuously developed to hatched blastocyst stage and none for 24 h group, but not significantly different. This study reveals that bovine oocytes can be stored in follicular fluid for up to 18 h at 25-degree C. Further researches are needed for studying structural of embryos and other supplements for improvement the quality of oocytes to extend the storage period.

Keywords: bovine, embryos, oocytes

Registered No: 63(2)-0208-128

[1/]Chiang Mai Artificial Insemination and Biotechnology Research Center Muang Chiang Mai.

[2/]Khon Kaen Artificial Insemination and Biotechnology Research Center Muang Khon Kaen.

คำนำ

เทคโนโลยีชีวภาพการผลิตเอ็มบริโอโคนอกร่างกายเริ่มเป็นที่รู้จักแพร่หลายมากขึ้นเพราะเป็นวิธีการขยายพันธุ์โคที่เพิ่มจำนวนได้มากกว่าปกติและต่อเนื่อง (เด่นพงษ์ และคณะ, 2555; Ledda et al., 2001; Pilling et al., 2007) ในแม่โคที่มีแนวโน้มปัญหาทางระบบสืบพันธุ์ที่ไม่สามารถทำให้แม่โคอุ้มท้องได้ตามปกติ เช่น ปัญหาถุงน้ำในรังไข่ มดลูกอักเสบเป็นหนอง (Faber et al., 2002) และนับวันเทคโนโลยีนี้ยิ่งเป็นที่ต้องการของเกษตรในการขยายพันธุ์สัตว์ที่เป็นสัตว์พันธุ์ดีหรือสายพันธุ์หายากหรือสายพันธุ์ที่ควรอนุรักษ์ไว้ แต่ปัจจุบันห้องปฏิบัติการด้านการผลิตเอ็มบริโอโคนอกร่างกายมีจำนวนจำกัด การเคลื่อนย้ายโคมีชีวิตหรือซากโคมายังห้องปฏิบัติการที่อยู่ห่างไกลเป็นสิ่งที่ยากลำบากมีความเสี่ยงต่อตัวสัตว์และความเสี่ยงของโรคระบาด เช่น โรคปากและเท้าเปื่อยที่จะมีผลกระทบต่ออุตสาหกรรมปศุสัตว์เป็นอย่างมาก (เทิดศักดิ์ และคณะ, 2556) การเคลื่อนย้ายเฉพาะโอโอไซต์จากแหล่งเก็บไปยังห้องปฏิบัติการจะช่วยทำให้การปฏิบัติงานของเจ้าหน้าที่ในพื้นที่สะดวกขึ้นและลดความเสี่ยงของโรคระบาด ควรมีการศึกษาวิธีการเคลื่อนย้ายโอโอไซต์ที่จะสามารถคงสภาพและรักษาคุณภาพของโอโอไซต์เพื่อการผลิตเอ็มบริโอนอกร่างกายต่อไป

จากการศึกษาน้ำฟอลลิเคิล (follicular fluid) เป็นส่วนที่สังเคราะห์จากพลาสมาในเลือด มีส่วนประกอบเช่น amino acids, meiosis activating sterol, hyaluronan, midkine, carotenoids, antioxidants, urea, hormones และอื่นๆ โดยจะเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นตามวงรอบการเป็นสัดและส่งผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของโอโอไซต์ (El-Nasser Mohammed et al., 2019) เมื่อระยะเวลาที่ใช้เก็บรักษาโอโอไซต์และอุณหภูมิเพิ่มขึ้นค่าความเป็นกรด-ด่างและน้ำตาลกลูโคสจะมีค่าลดลงเพราะเกิดออกซิเดชันของเซลล์คิวมูลัส เกิดการสะสมของกรดแลคติคสร้างความเสียหายแก่โอโอไซต์และการตายของเซลล์สืบพันธุ์ การลดออกซิเดชันโดยการลดอุณหภูมิส่งผลให้อัตราการรอดของโอโอไซต์ลดลง ในการศึกษาการเก็บรักษารังไข่หมูพบว่าที่อุณหภูมิ 25-35°C เวลา 2 ชั่วโมงเป็นช่วงเหมาะสมทำให้การพัฒนาและอัตราการรอดของเอ็มบริโอหลังการเพาะเลี้ยงมีค่าสูงกว่าที่อุณหภูมิและระยะเวลาอื่นๆ (Tellado et al., 2014) การเก็บรักษารังไข่หมูที่อุณหภูมิ 25-35°C ยังสามารถยืดเวลาได้ถึง 6 ชั่วโมง ที่คงคุณภาพโอโอไซต์ได้ (Wongsrikeao et al., 2005) ส่วนการเก็บรักษาโอโอไซต์โคในน้ำฟอลลิเคิลที่อุณหภูมิห้องส่งผลให้อัตราการรอดของเอ็มบริโอสูงกว่าการเก็บในสารละลายอื่นและยังสามารถเก็บได้ถึง 6 ชั่วโมง (Klumpp, 2004; Nakao and Nakatsuji, 1992) จากงานทดลองต่างๆ ที่กล่าวมา จะเห็นว่าการเก็บรักษาโอโอไซต์ที่อุณหภูมิห้องที่ 25°C เป็นอุณหภูมิเหมาะสมที่สามารถช่วยรักษาคุณภาพโอโอไซต์ได้ดีที่สุด จากที่กล่าวมาข้างต้นในปัจจุบันห้องปฏิบัติการสำหรับเพาะเลี้ยงโอโอไซต์และผลิตเอ็มบริโอนอกร่างกายยังมีน้อย อีกทั้งไม่อยู่ในพื้นที่ที่เป็นแหล่งแม่พันธุ์สัตว์ที่จะเก็บโอโอไซต์ นอกจากนี้ต้องใช้ระยะเวลาในการเดินทางอย่างน้อย 12 ชั่วโมงในการเคลื่อนย้ายโอโอไซต์มายังห้องปฏิบัติการโดยการทดลองที่ผ่านมายังไม่พบการทดลองเก็บรักษาโอโอไซต์ในระยะเวลานานมากกว่า 12 ชั่วโมง

ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อเปรียบเทียบช่วงระยะเวลาการเก็บรักษาโอโอไซต์ในน้ำฟอลลิเคิลที่อุณหภูมิ 25°C ในระยะเวลาแตกต่างกันส่งผลต่อการพัฒนาการของเอ็มบริโอและคุณภาพของเอ็มบริโอภายหลังการเพาะเลี้ยง

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

<u>การเจาะเก็บโอโอไซต์และน้ำฟอลลิเคิล</u>

การศึกษาครั้งนี้ใช้โอโอไซต์ที่ได้จากรังไข่โคที่โรงฆ่าสัตว์ในเขตจังหวัดขอนแก่น ทำการเจาะดูดโอโอไซต์พร้อมน้ำฟอลลิเคิลจากฟอลลิเคิลที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-5 มิลลิเมตร โดยใช้เข็มขนาด 18G 1½ นิ้วและไซริงค์ขนาด 5 มิลลิลิตร ที่ได้ลงในหลอดทดลองปลอดเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งที่อุณภูมิที่ 25°C เป็นเวลา 10 นาที ดูดเอาเฉพาะส่วนตะกอนเพื่อการเก็บโอโอไซต์ และดูดเอาส่วนใสเพื่อใช้ในการเตรียมน้ำฟอลลิเคิล

<u>การเตรียมน้ำฟอลลิเคิล</u>

ดูดเอาส่วนใส่ที่ได้จากการเจาะเก็บโอโอไซต์ใส่ในหลอดทดลองปลอดเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความแรง 400xG เป็นเวลา 15 นาที ดูดเก็บเอาเฉพาะส่วนน้ำฟอลลิเคิลเก็บในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตรเพื่อใช้ในการเก็บรักษาโอโอไซต์ เตรียมน้ำฟอลลิเคิลทุกครั้งที่จะใช้ในการทดลอง

<u>การเก็บโอโอไซต์</u>

ดูดเอาเฉพาะส่วนตะกอนที่จากการเจาะเก็บโอโอไซต์ ลงในจานพลาสติกกลมปลอดเชื้อ นำไปส่องหาโอโอไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ กำลังขยาย 20 เท่า คัดเลือกเอาเฉพาะโอโอไซต์ที่มีไซโทพลาสซึมสีสม่ำเสมอ และมีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบอย่างน้อย 3 ชั้น แบ่งโอโอไซต์ออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละเท่าๆ กัน โดยให้ได้โอโอไซต์ทั้งหมดกลุ่มละไม่น้อยกว่า 80 โอโอไซต์ต่อกลุ่ม เก็บรักษาในน้ำฟอลลิเคิล บรรจุในหลอดน้ำเชื้อขนาด 0.25 มิลลิลิตร แช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 25°C เก็บตัวอย่างสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD กำหนดให้กลุ่มทดลองเป็นดังนี้

กลุ่มที่ 1 เก็บโอโอไซต์ในน้ำฟอลลิเคิล เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 2 เก็บโอโอไซต์ในน้ำฟอลลิเคิล เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 3 เก็บโอโอไซต์ในน้ำฟอลลิเคิล เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

<u>การเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธินอกร่างกาย (in vitro maturation; IVM)</u>

เมื่อครบระยะเวลาเก็บรักษา นำโอโอไซต์มาล้างด้วยน้ำยาชนิด TCM-199 และเพาะเลี้ยงในน้ำยาชนิด TCM-199 เสริมด้วย fetal bovine serum 5% (Invitrogen, USA) และฮอร์โม FSH (follicle stimulating hormone) 0.025 IU/มิลลิลิตร (Sigma, USA) นำเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 38.5°C และปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

<u>การปฏิสนธินอกร่างกาย (in vitro fertilization; IVF)</u>

เตรียมน้ำเชื้อโคจากน้ำเชื้อแช่แข็ง นำมาคัดเลือกตัวอสุจิที่แข็งแรงด้วยเทคนิค swim up โดยทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งโดยจุ่มหลอดน้ำเชื้อในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 38°C เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเช็ด

หลอดให้แห้งสะอาด ปล่อยน้ำเชื้อลงในก้นหลอดทดลองปลอดเชื้อขนาด 5 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำยา Tyrode's Albumin-Lactate-Pyruvate (TALP) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำเข้าตู้บ่มที่อุณหภูมิ 38.5°C และปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นระยะเวลา 30 นาที นำเฉพาะของเหลวส่วนบนไปปั่นที่ความแรงขนาด 200×G เป็นระยะเวลา 10 นาที นำส่วนที่ตกตะกอน (pellet) มาประเมินอัตราการเคลื่อนที่ (motility) และความเข้มข้นของตัวอสุจิ จากนั้นผสมน้ำเชื้อกับน้ำยา TALP-IVF ที่เสริมด้วย bovine serum albumin (BSA) 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสาร heparin 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยให้ปรับความเข้มข้นสุดท้ายมีตัวอสุจิในหยดน้ำยา TALP-IVF เท่ากับ 2×10^6 ตัวต่อมิลลิลิตร ปิดทับด้วย mineral oil นำโอโอไซต์ที่ทำการเพาะเลี้ยงจนพร้อมปฏิสนธิมาเลี้ยงในหยดน้ำยา TALP-IVF ที่อุณหภูมิ 38.5°C และปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นาน 21-23 ชั่วโมง

<u>การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอแบบนอกร่างกาย (in vitro culture; IVC)</u>

นำไซโกตที่เพาะเลี้ยง 21-23 ชั่วโมงหลังปฏิสนธินอกร่างกายมาทำการล้างในน้ำยา synthetic oviductal fluid (SOF) จากนั้นย้ายลงเลี้ยงในน้ำยา SOF เสริมด้วย bovine serum albumin (BSA) 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5°C ปริมาณแก๊สออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์อย่างละ 5% เมื่อเพาะเลี้ยงถึง 72 ชั่วโมงหลังปฏิสนธิ ทำการเปลี่ยนน้ำยาเพาะเลี้ยง บันทึกข้อมูลเปอร์เซ็นต์การพัฒนาของเอ็มบริโอในระยะ cleavage และ≥ 4 cells โดยคัดเลือกเอาเฉพาะเอ็มบริโอระยะ ≥ 4 cells เพาะเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 38.5°C ปริมาณแก๊สออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์อย่างละ 5% ในวันที่ 6 หลังการปฏิสนธิ ทำการเปลี่ยนน้ำยาเพาะเลี้ยงเป็นน้ำยาชนิด TCM-199 เสริมด้วย FBS 2% ทำการเพาะเลี้ยงจนกระทั่งวันที่ 8 หลังการปฏิสนธิ นำเอ็มบริโอระยะ blastocyst มาจำแนกระยะการเจริญด้วยการแบ่งออกเป็น 4 ระยะ ดังนี้

1. ระยะ Early blastocyst เมื่อเอ็มบริโอพัฒนามาถึงระยะ compact morula จะเริ่มเข้าสู่ช่วงแรกของระยะ blastocyst ความเปลี่ยนแปลงที่พบคือจะเริ่มมีช่องว่างที่เรียกว่า blastocoel
2. ระยะ Blastocyst เป็นระยะถัดมาของเอ็มบริโอ โดยจะเริ่มเห็น blastocoel มากขึ้น มีการแยกส่วนระหว่าง inner cell mass กับ trophoblast ชัดเจนขึ้น
3. ระยะ Expanded blastocyst เป็นระยะที่แยกส่วนของ inner cell mass และ trophoblast ได้เด่นชัด และผนัง zona pellucida เริ่มบางลง
4. ระยะ Hatching หรือ Hatched blastocyst เป็นระยะสุดท้ายของ blastocyst ซึ่งจะมีส่วนของ inner cell mass ที่แตกออกและเซลล์ของเอ็มบริโอสามารถหลุดออกมา

การวิเคราะห์ข้อมูล

เก็บข้อมูล อัตราการการพัฒนาของเอ็มบริโอระยะ cleavage, ≥4 cells และ blastocyst นำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย ANOVA และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติด้วย Duncan multiple rang test ข้อมูลคุณภาพตัวอ่อนระยะ blastocyst ด้วยการวิเคราะห์ความถี่ (odd ratio)

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาช่วงเวลาในการเก็บโอโอไซต์ในน้ำฟอลลิเคิล มีผลต่ออัตราการพัฒนาของเอ็มบริโอในระยะ cleavage, ≥ 4 cell และ blastocyst พบว่าโอโอไซต์ซึ่งเก็บรักษาที่ 12 และ18 ชั่วโมง มีค่าอัตราการพัฒนาของเอ็มบริโอในระยะ cleavage, ≥4 cell และblastocyst สูงกว่าโอโอไซต์ที่เก็บรักษาในระยะเวลา 24 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังแสดงใน Table 1

Table 1. Effect of oocyte storage duration in follicular fluid on bovine embryonic development

Treatment	No. of oocytes	Cleavage (n)	≥ 4 cells (n)	Blastocyst (n)
12 hr.	84	82.0 ^{a}±2.6 (69)	78.4 ^{a}±3.4 (66)	46.7 ^{a}±7.0 (39)
18 hr.	87	77.4 ^{a}±4.6 (67)	74.0 ^{a}±5.3 (64)	38.7 ^{a}±6.8 (33)
24 hr.	88	63.8 ^{b}±4.5 (56)	59.1 ^{b}±5.4 (52)	17.6 ^{b}±6.4 (15)

$^{a, b}$ Different superscripts within the same column demonstrate significant differences ($p<0.05$).
Data are from 4 replicates and presented as mean (%) ± SE.

การศึกษาครั้งนี้พบว่าระยะเวลาการเก็บรักษาโอโอไซต์ที่นานขึ้น ส่งผลทำให้พัฒนาการของเอ็มบริโอต่ำลง โดยการเก็บรักษาโอโอไซต์ในระยะเวลานานขึ้นมีผลต่อการเกิดออกซิเดชันของเซลล์ มีการใช้กลูโคสมากขึ้นเกิดการสะสมกรดแลคติคทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงสร้างความเสียหายแก่โอโอไซต์และการตายของเซลล์สืบพันธุ์ส่งผลให้อัตราการพัฒนาของโอโอไซต์ลดลงซึ่งเป็นปัจจัยหลัก ยังมีปัจจัยอื่นเช่นการเพิ่มขึ้นของระดับ ROS (reactive oxygen species) ที่ส่งผลให้อัตราการพัฒนาของโอโอไซต์ลดลง (Tellado et al., 2014) การเก็บรักษารังไข่ของโคนานข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง 15°C - 20°C นำไปสู่ gene expression ลดลง (Somfai et al., 2011) มีการรายงานการเก็บรักษารังไข่ของสุกรในระยะเวลา 6 ชั่วโมงถึง 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 15 °C โดยระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นส่งผลต่อการพัฒนาของโอโอไซต์ลดลง (Wongsrikeao et al., 2005)

การเก็บรักษาคุณภาพโอโอไซต์ในการของทดลอง Nakao and Nakatsuji (1992) ได้เก็บรักษารังไข่นาน 1.5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 39°C แล้วแบ่งโอโอไซต์เพื่อเพาะเลี้ยง(ควบคุม) และกลุ่มทดลองโดยชะลอการเสื่อมของโอโอไซต์ด้วยการเก็บรักษาในน้ำยา TCM-199 นาน 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 39°C พบว่าไม่มีผลต่ออัตราการพัฒนาของเอ็มบริโอของทั้งสองกลุ่มโดยที่กลุ่มควบคุมโอโอไซต์สามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริโอระยะ blastocyst ได้ 15% และกลุ่มทดลองโอโอไซต์สามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริโอระยะ blastocyst ได้ 13% ในขณะที่การทดลองของ Klumpp (2004) เก็บรักษารังไข่นาน 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง 22°C แล้วแบ่งโอโอไซต์เพื่อเพาะเลี้ยง(ควบคุม) จากนั้นนำโอโอไซต์เก็บรักษาในน้ำฟอลลิเคิล

น้ำยา lactate ringer solution (LRS) และน้ำฟอลลิเคิลผสมกับ LRS นาน 6 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 22° C พบว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เก็บในน้ำฟอลลิเคิล มีอัตราการพัฒนาเอ็มบริโอสูงกว่ากลุ่มที่เก็บในน้ำฟอลลิเคิลผสมกับ LRS และกลุ่มที่เก็บใน LRS เท่ากับ 26%, 25%, 15% และ5% ตามลำดับ พบว่าน้ำฟอลลิเคิลสามารถชะลอการเสื่อมของโอโอไซต์ใน 6 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 22°C โดยไม่มีผลต่ออัตราการพัฒนาของเอ็มบริโอ

จากการศึกษาดังกล่าวข้างต้น ใช้ระยะเวลาเก็บโอโอไซต์นานที่สุดเพียง 6 ชั่วโมง ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงทดลองศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาคุณภาพโอโอไซต์ที่นานขึ้นกว่าการทดลองของ Nakao and Nakatsuji (1992) และ Klumpp (2004) เพื่อให้สอดคล้องกับการปฏิบัติงานจริงในกรณีที่มีความจำเป็นในการเคลื่อนย้ายโอโอไซต์มายังห้องปฏิบัติการที่อยู่ห่างไกลและเพื่อความสะดวกในการปฏิบัติงานของเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ โดยพบว่าการเก็บรักษาโอโอไซต์ในน้ำฟอลลิเคิลสามารถชะลอการเสื่อมของโอโอไซต์ได้นาน 12-18 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 25°C โดยมีผลต่ออัตราการพัฒนาของเอ็มบริโอสูงกว่าการเก็บรักษาโอโอไซต์นาน 24 ชั่วโมง โดยมีอัตราการพัฒนาในระยะ blastocyst อยู่ที่ 46.7±7.0%, 38.7±6.8% และ17.6±6.4% ตามลำดับ (Table 1) ซึ่งแสดงเห็นว่าการเก็บโอโอไซต์ในน้ำฟอลลิเคิลระหว่าง 12 ถึง 18 ชั่วโมง ยังคงรักษาคุณภาพของโอโอไซต์ไว้ได้ นับว่าเป็นการทดลองเก็บโอโอไซต์ไว้ได้นานที่สุดเท่าที่มีการรายงาน

Table 2. Effect of oocyte storage time in follicular fluid on bovine embryonic development.

Treatment (n)	% Early Blastocyst (n)	% Blastocyst (n)	% Expanded Blastocyst (n)	% Hatched Blastocyst (n)
12 hr. (39)	16.8±4.5 (6)	22.9±3.7 (9)	53.4±4.0[a] (21)	7.0±4.1 (3)
18 hr. (33)	8.1±4.9 (2)	23.7±8.3 (9)	65.9±5.3[a] (21)	2.3±2.3 (1)
24 hr. (15)	16.7±9.6 (4)	54.2±15.8 (6)	29.2±10.5[b] (5)	0.00±0.00 (0)

[a, b] Different superscripts within the same column demonstrate significant differences $p<0.05$).

Data are from 4 replicates and presented as mean (%) ± SE.

จากผลการศึกษาการพัฒนาของเอ็มบริโอต่อจากระยะ blastocyst พบว่าการเก็บรักษาโอโอไซต์ในน้ำฟอลลิเคิลที่ 12 และ 18 ชั่วโมง มีการพัฒนาของเอ็มบริโอโคสูงกว่าการเก็บรักษาโอโอไซต์ในน้ำฟอลลิเคิลที่ 24 ชั่วโมง การพัฒนาเอ็มบริโอในระยะ Expanded blastocyst เท่ากับ 53.4%, 65.9% และ 29.2% ตามลำดับ ยังมีเอ็มบริโอในกลุ่ม 12-18 ชั่วโมง จำนวนหนึ่งสามารถพัฒนาต่อไปได้จนถึงระยะ hatched blastocyst ขณะที่กลุ่ม 24 ชั่วโมงหยุดพัฒนาที่ ระยะ expanded blastocyst แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Table 2) เอ็มบริโอที่พัฒนาจนถึงระยะ hatched blastocyst นับว่าเป็นเอ็มบริโอที่มีคุณภาพ เมื่อนำไปย้ายฝากมีโอกาสตั้งท้องสูงกว่าการย้ายฝากเอ็มบริโอ ระยะ expanded

blastocyst (Natachandra et al., 2013) ซึ่งการเก็บรักษาโอโอไซต์ที่นานขึ้นมีผลต่อการพัฒนาของโอโอไซต์ลดลง (Wongsrikeao et al., 2005) แล้วยังส่งผลต่อการพัฒนาของเอ็มบริโออีกด้วย น้ำฟอลลิเคิลที่เตรียมจากการศึกษาครั้งนี้ องค์ประกอบต่างๆ ได้แก่ amino acids, meiosis activating sterol, hyaluronan, midkine, carotenoids, antioxidants, urea, hormones และอื่นๆ ที่ส่งผลดีต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของโอโอไซต์ (El-Nasser Mohammed et al., 2019) อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้ ใช้น้ำฟอลเคิลที่เตรียมใหม่ในการทดลองทุกครั้ง และไม่ได้ตรวจส่วนประกอบของน้ำฟอลลิเคิลทุกครั้งที่เตรียม จึงขาดข้อมูลส่วนประกอบต่างๆในน้ำฟอลลิเคิลในแต่ละครั้งที่เตรียมซึ่งอาจทำให้ผลการทดลองมีความแปรปรวน ดังนั้นควรมีการเตรียมน้ำฟอลิเคิลใช้ตลอดการทดลองเพื่อลดความแตกต่างในการทดลอง ผลจากการศึกษาครั้งนี้ แสดงว่าเราสามารถเก็บรักษาโอโอไซต์ในน้ำฟอลลิเคิลได้นานถึง 18 ชั่วโมง ภายหลังเจาะเก็บ ก่อนนำมาดำเนินการผลิตตัวอ่อนนอกร่างกายซึ่งจะเป็นการช่วยเพิ่มศักยภาพการผลิตตัวอ่อนจากแม่โคที่มีพันธุกรรมดีแต่อยู่ห่างไกลห้องปฏิบัติการทำให้การขยายสัตว์พันธุ์ดีด้วยเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนที่ผลิตนอกร่างกาย เป็นไปอย่างกว้างขวางและมีตัวอ่อนเพียงพอต่อความต้องการของเกษตร

สรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้สรุปว่าการเก็บรักษาโอโอไซต์โคในน้ำฟอลลิเคิลที่อุณหภูมิ 25°C ที่ระยะเวลา 12 และ 18 ชั่วโมงส่งผลให้อัตราการการพัฒนาเอ็มบริโอระยะ cleavage, ≥4 cells และblastocyst สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลา 24 ชั่วโมง

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปพัฒนาเพื่อศึกษาลักษณะทางโครงสร้างของเอ็มบริโอที่เปลี่ยนแปลงของกลุ่มการทดลองต่างๆ การศึกษาเกี่ยวกับการเสริมสารต่างๆ หรืออาจนำมาปรับใช้กับการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี OPU (ovum pick up) เพื่อช่วยรักษาคุณภาพโอโอไซต์ให้นานขึ้น

เอกสารอ้างอิง

เด่นพงษ์ สาฆ้อง เทวินทร์ วงษ์พระลับ สุภร กตเวทิน และ ศักดิ์ศิริ ศิริเสถียร. 2555. การเจาะเก็บโอโอไซต์ด้วยเครื่องคลื่นความถี่สูงในโคพื้นเมืองไทย (*Bos indicus*) และการพัฒนาของโอโอไซต์ที่ผ่านการแช่แข็งแบบวิทริฟิเคชั่นหลังการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย. The Thai Journal of Veterinary Medicine 42(4): 509-516.

เทิดศักดิ์ ญาโน สุวิชัย โรจนเสถียร ภาณุวัฒน์ แย้มสกุล สมปรียา กองแก้ว ประภาส พัชนี ฉายสุรีย์ ศุภวิไล สมพร พรวิเศษศิริกุล และ ภักดี สุทธิพันธ์กูร. 2556. กรณีศึกษาการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อย ในเขตจังหวัดเชียงใหม่และลำพูน ช่วงปี 2550-2554. เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 11(3): 227-287.

El-Nasser Mohammed, A., S. Al-Suwaiegh and T. Al-Shaheen. 2019. Effects of follicular fluid components on oocyte maturation and embryo development in vivo and in vitro. Advances in Animal and Veterinary Sciences 7(5):346-355.

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

Klumpp, A.M. 2004. The effect of holding bovine oocytes in follicular fluid on subsequent fertilization and embryonic development, M.S. Theses, Louisiana state university.

Ledda, S., G. Leoni, L. Bogliolo and S. Naitana. 2001. Oocyte cryopreservation and ovarian tissue banking. Theriogenology 55(6):1359-1371.

Nakao, H. and N. Nakatsuji. 1992. Effects of storage conditions of bovine ovaries and oocytes on the success rate of in vitro fertilization and culture. Journal of Reproduction and Development 38(1):11-13.

Natachandra, M.C., N.C. Nishad, M.n. Nirmalendu and N.M. Bindu. 2013. Transfer of spontaneously hatching or hatched blastocyst yields better pregnancy rates than expanded blastocyst transfer. Journal of Human Reproductive Sciences. 6(3):183-188.

Pilling, D., R. Cardellino, M. Zjalic, B. Rischkowsky, K.A. Tempelman and I. Hoffmann. 2007. The use of reproductive and molecular biotechnology in animal genetic resources management-a global overview. Animal Genetic Resources Information 40:1-12.

Somfai, T., K. Imai, M. Kaneda, S. Akagi, S. Watanabe, S. Haraguchi, E. Mizutani, T.Q. Dang-Nguyen, Y. Inaba, M. Geshi and T. Nagai. 2011. The effect of ovary storage and in vitro maturation on mRNA Levels in bovine oocytes; A possible impact of maternal ATP1A1 on blastocyst development in slaughterhouse-derived oocytes. Journal of Reproduction and Development 57(6):723-730.

Tellado, M.N., G.M. Alvarez, G.C. Dalvit and P.D. Cetica. 2014. The conditions of ovary storage affect the quality of porcine oocytes. Advances in Reproductive Sciences 2:57-67.

Wongsrikao, P., T. Otoi, N.W.k. Karja, B. Agung, M. Nii and T. Nagai. 2005. Effects of ovary storage time and temperature on DNA fragmentation and development of porcine oocytes. Journal of Reproduction and Development 51(1):87-97.