เทคนิคการเจาะเก็บโอโอไซต์แพะด้วยวิธี Laparoscopic Ovum Pick-Up (LOPU) และการผลิตตัวอ่อนแพะด้วยวิธีปฏิสนธินอกร่างกาย

พิงค์ลานนา กุญชร[1/] อรรถพล พรประไพ[2/]

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคการเจาะเก็บโอโอไซต์แพะด้วยวิธี Laparoscopic Ovum Pick-Up (LOPU) และผลิตตัวอ่อนแพะจากโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้ด้วยวิธีปฏิสนธินอกร่างกาย (*In Vitro* Embryo Production, IVP) โดยใช้แพะเพศเมียพันธุ์แองโกลนูเบียน จำนวน 10 ตัว ทำการกระตุ้นรังไข่แพะด้วยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและฟอลลิเคิลสติมูเลติง แล้วนำมาเจาะเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี LOPU โดยประยุกต์ใช้ Robertson's pipette เชื่อมต่อ OPU needle ซึ่งเป็นเข็มเบอร์ 18G ยาว 3 นิ้ว แบบความลาดเอียงของเข็มน้อย (short bevel) เข้ากับชุดอุปกรณ์การเจาะเก็บโอโอไซต์และเครื่องปั๊มสุญญากาศ โดยใช้แรงดูดสุญญากาศในการเจาะเก็บโอโอไซต์ 40 -50 มิลลิเมตรปรอท ร่วมกับการใช้กล้องลาพาโรสโคป พบว่าแพะมีการตอบสนองโดยการสร้างฟอลลิเคิลของรังไข่เฉลี่ย 17.8±6.23 ฟอลลิเคิลต่อตัว ในจำนวนนี้มีโอโอไซต์ที่สามารถเจาะเก็บได้เฉลี่ย 13.5±5.44 โอโอไซต์ต่อตัว โดยมีอัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์ (recovery rate) ร้อยละ 75.84 (135/178) นำโอโอไซต์ที่เก็บได้ทั้งหมดเข้าสู่กระบวนการผลิตตัวอ่อนด้วยวิธีปฏิสนธิภายนอกร่างกาย โดยใช้น้ำเชื้อสดผสมกับโอโอไซต์ที่เจริญพร้อมปฏิสนธิด้วยการใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงสำเร็จรูป (IVF bioscience, UK) เพาะเลี้ยงโอโอไซต์และตัวอ่อนตลอดกระบวนการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย พบว่ามีอัตราการปฏิสนธิ ร้อยละ 91.38 (106/116) มีตัวอ่อนเจริญจนถึงระยะคลีเวจและบลาสโตซิสต์ ร้อยละ 55.17 (64/116) และ 36.21 (42/116) ของจำนวนโอโอไซต์ที่เจริญพร้อมปฏิสนธิตามลำดับ จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิคการเจาะเก็บโอโอไซต์แพะด้วยวิธี LOPU โดยใช้ OPU needle ที่แรงดูดสุญญากาศ 40 -50 มิลลิเมตรปรอท ร่วมกับการใช้กล้องลาพาโรสโคป สามารถเก็บโอโอไซต์จากแพะมีชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถนำโอโอไซต์นั้นมาผลิตเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ด้วยกระบวนการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย

คำสำคัญ : กระบวนการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย การเก็บโอโอไซต์ด้วยการส่องกล้องลาพาโรสโคป แพะ

เลขทะเบียนวิชาการ : 64(2)-0208-119

[1/]สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ อ.เมือง จ.ปทุมธานี

[2/]ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

Laparoscopic Ovum Pick-Up (LOPU) and *In Vitro* Embryo Production (IVP) in goats.

Pinglanna Kunshorn[1/] Attapol Pornprapai[2/]

Abstract

The objectives of this study were to develop techniques for collecting caprine oocytes using the laparoscopic ovum pick-up (LOPU) technique, and to produce embryos *in vitro*. Ten donors Anglo-Nubian female goats were superovulated using progesterone and follicle stimulating hormone. Then, oocytes were collected by LOPU with short bevel OPU needle size 18G, 3 inch length, which connected to an air suction pump machine by Robertson's pipette to aspirate the follicle from the ovary of doe at 40-50 mmHg and laparoscopy. The results showed that after the hormonal treatment, donors produced 17.8±6.23 follicles/doe and average oocytes of 13.5±5.44 oocytes/doe, which the recovery rate was 75.84% (135/178). All oocytes were processed through *in vitro* embryo production (IVP) program, using commercial media (IVF bioscience, UK) at all steps of production. Matured oocytes from each doe were fertilized with fresh semen. The fertility rate was 91.38 (106/116), the cleavage rate and the blastocyst rate of all mature oocyte that entering IVF were 55.17 (64/116) and 36.21 (42/116), respectively. The results of this study showed that caprine oocytes could be effectively collected using LOPU method with OPU needle with air suction pump at 40-50 mmHg and laparoscopy. Furthermore, these oocytes could be fertilized by IVP and succeed to develop to blastocyst stage.

keywords : *In Vitro* Embryo Production, laparoscopic ovum pick-up, goat

Registered No.: 64(2)-0208-119

[1/]Bureau of Biotechnology in Livestock Production, Muang, Pathumthani.

[2/]Embryo Transfer Technology and Animal Germplasm Research Center, Pakchong, Nakornrachasima.

คำนำ

แพะเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย จากข้อมูลปี พ.ศ. 2564 พบว่าประชากรแพะในประเทศไทย มีจำนวนทั้งสิ้น 1,308,000 ตัว มีเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะ จำนวน 86,000 ราย (ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมปศุสัตว์, 2564) ด้วยคุณลักษณะของแพะที่มีการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว สามารถผสมพันธุ์ได้ตลอดทั้งปี เลี้ยงง่าย ใช้พื้นที่ในการเลี้ยงน้อย ทนทานและสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมในเขตร้อนได้เป็นอย่างดี อีกทั้งมีช่องทางในการจำหน่ายหลากหลายและยังสามารถส่งออกแพะบางส่วนไปยังประเทศที่มีความต้องการบริโภคได้ราคาสูง ทำให้แพะเป็นสัตว์ที่ได้รับความนิยมในการเลี้ยง สามารถเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงได้เป็นอย่างดี โดยสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ เป็นหน่วยงานที่ได้รับมอบหมายภารกิจสำคัญที่จะนำเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ เพื่อการเพิ่มจำนวน พัฒนาปรับปรุงและสร้างพันธุ์แพะที่มีคุณลักษณะพันธุกรรมที่ดีตอบสนองความต้องการของตลาด ซึ่งการย้ายฝากตัวอ่อนเป็นเทคโนโลยีหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการลดระยะเวลาในการพิสูจน์พ่อพันธุ์และเพิ่มความแม่นยำในการทดสอบพันธุ์ในการสร้างสัตว์พันธุ์ดีโดยการดึงเอาลักษณะพันธุกรรมดีจากสายของพ่อและแม่มารวมเสริมจุดเด่นของตัวอ่อนนั้น ๆ ทำให้สามารถกระจายพันธุกรรมที่ดีทั้งทางสายพ่อและแม่พันธุ์ได้พร้อม ๆ กัน ส่งผลให้เพิ่มความเข้มข้นในการคัดเลือก (selection intensity) และร่นระยะเวลาช่วงชั่วรุ่น (generation interval) (Paramio, 2010) โดยเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนจะมีประสิทธิภาพดีหรือไม่นั้น ส่วนหนึ่งขึ้นกับคุณภาพตัวอ่อนที่ผลิตได้ ซึ่งอาจได้จากวิธีการผลิตตัวอ่อนภายในร่างกาย (*In vivo* production) หรือ การผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย (*In vitro* production, IVP)

การผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย เป็นเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพระบบสืบพันธุ์ ที่นำเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (โอโอไซด์) และเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (อสุจิ) มาผสมกันในหลอดทดลองภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ทำให้เกิดกระบวนการปฏิสนธิภายนอกร่างกายในห้องปฏิบัติการจนเกิดเป็นตัวอ่อน และสามารถนำตัวอ่อนที่ได้นั้นไปฝากในมดลูกของเพศเมียเพื่อให้ตั้งท้องต่อไป ซึ่งกระบวนการปฏิสนธินอกร่างกายประกอบกระบวนการเก็บโอโอไซต์ (Oocyte Recovery) การเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิ (*In Vitro* Maturation, IVM) การเตรียมน้ำเชื้อ (Sperm Preparation) การปฏิสนธิระหว่างน้ำเชื้อกับโอโอไซต์ในจานทดลอง *(In Vitro* Fertilization, IVF) และการเพาะเลี้ยงไซโกต (*In Vitro* Culture, IVC) (Mondal et al., 2008) โดยการเก็บโอโอไซต์ (Oocyte Recovery) จากตัวสัตว์มีชีวิตนั้น ทำได้หลายวิธี เช่น วิธีผ่าตัดแบบเปิดหน้าท้อง (Laparotomy) แล้วเจาะดูดโอโอไซต์โดยตรง วิธีเจาะดูดโอโอไซต์ผ่านทางผนังช่องคลอดร่วมกับการใช้เครื่องตรวจอวัยวะภายในด้วยคลื่นความถี่สูง (Transvaginal Ultrasound) และวิธีผ่าตัดด้วยการส่องกล้องลาพาโรสโคปและเจาะดูดโอโอไซต์ (Laparoscopic Ovum Pick Up, LOPU) (เอกชาติ และคณะ, 2543; อรรถพล และคณะ, 2564) โดยวิธี LOPU เป็นเทคโนโลยีการเก็บโอโอไซต์จากฟอลลิเคิลที่รังไข่โดยวิธีการผ่าตัดด้วยการส่องกล้องลาพาโรสโคป (Laparoscopy) ทำได้โดยเจาะรูเล็กๆที่ผิวหนังหน้าท้องแล้วผ่านกล้องขนาดเล็กเข้าไปทำให้เห็นอวัยวะภายในช่องท้องได้ชัดเจน ทำให้การผ่าตัดมีความปลอดภัยสูง สามารถใส่เครื่องมือการแพทย์ผ่านทางรูที่เจาะไว้เพื่อทำหัตถการภายในช่องท้องได้อย่างง่ายดาย การผ่าตัดวิธี Laparoscopy ไม่จำเป็นต้องมีการดึงหรือขยายแผลให้กว้างออกเหมือนการผ่าตัดวิธี Laparotomy ทำให้มีการกระทบกระเทือนต่ออวัยวะอื่นในท้องลดลง และการฟื้นตัวหลังผ่าตัดเร็วขึ้นมาก

ในปัจจุบัน ประเทศไทยโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ได้มีการศึกษาการนำเทคโนโลยี Laparoscopy มาใช้ในกระบวนการเก็บโอโอไซต์แพะ พบว่ามีความเป็นไปได้ในการเจาะเก็บ

โอโอไซต์โดยการใช้อุปกรณ์ผสมเทียมร่วมกับการผ่าตัดด้วยการส่องกล้องลาพาโรสโคป (LOPU) (อรรถพล และคณะ, 2564) และคาดว่าหากสามารถพัฒนาเทคนิคและอุปกรณ์ในการเก็บโอโอไซต์ให้เหมาะสมยิ่งขึ้น จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของ LOPU ทำให้ได้โอโอไซต์คุณภาพดี และสามารถนำโอโอไซต์ดังกล่าวไปเข้ากระบวนการ IVP จนพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์จำนวนมากในคราวเดียว สามารถนำไปฝากให้แม่ตัวรับได้ครั้งละมาก ๆ ทำให้ราคาต้นทุนในการผลิตต่อตัวอ่อนลดลง และสามารถนำเทคโนโลยีนี้ไปใช้แก้ไขปัญหาการปฏิสนธิในแม่แพะที่มีพันธุกรรมดี รังไข่และฟอลลิเคิลสมบูรณ์แต่อาจมีปัญหาที่ท่อนำไข่ ปีกมดลูกหรือมดลูกผิดปกติ นอกจากนั้นยังสามารถใช้ในกรณีที่ต้องการขยายพันธุ์จากน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ที่มีลักษณะดีเยี่ยมแต่ปริมาณจำกัด เช่น น้ำเชื้อพ่อพันธุ์ดีที่อายุมาก น้ำเชื้อพ่อพันธุ์จากต่างประเทศ หรือน้ำเชื้อแยกเพศ เป็นต้น เนื่องจากจะช่วยลดปริมาณอสุจิที่จะทำปฏิสนธิได้ เป็นการเก็บพันธุกรรมจากแม่พันธุ์และพ่อพันธุ์ที่ดีให้เกิดประโยชน์สูงสุด ทั้งยังสามารถประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคโนโลยีชีวภาพอื่น ๆ เช่น การย้ายฝากสารพันธุกรรม (Gene transfer) การย้ายฝากนิวเคลียส (nuclear Transfer) หรือ cloning เพื่อพัฒนางานด้านเทคโนโลยีชีวภาพในวงการปศุสัตว์ต่อไป

ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคการเจาะเก็บโอโอไซต์แพะด้วยวิธี Laparoscopic Ovum Pick-UP และผลิตตัวอ่อนแพะจากโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้ด้วยวิธีปฏิสนธินอกร่างกาย

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

<u>สัตว์ทดลอง</u>

คัดเลือกแพะเพศเมีย พันธุ์แองโกลนูเบียน ในศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา ที่มีสุขภาพแข็งแรงสมบูรณ์ ไม่มีปัญหาระบบสืบพันธุ์ จำนวน 10 ตัว อายุ 2-4 ปี

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. การเก็บโอโอไซต์ (Oocyte recovery) จากแพะมีชีวิตด้วยวิธี LOPU

1.1 เหนี่ยวนำการเป็นสัดและกระตุ้นการตกไข่หลายใบด้วยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอดและฟอลลิเคิลสติมูเลติง (FSH) ตามโปรแกรมของอรรถพล และคณะ (2564) (Figure 1.) ดังนี้

วันที่ 0 สอดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด (CIDR®-G, 0.3 g progesterone, Eazi Breed, InterAg, New Zealand) เวลา 06.00 น. (AM)

วันที่ 9 ฉีดฮอร์โมน FSH (Folltropin-V®, Ontario, Canada) ปริมาณ 30 mg. เข้ากล้ามเนื้อ เวลา 18.00 น. (PM)

วันที่ 10 ฉีดฮอร์โมน FSH ปริมาณ 30 mg. เข้ากล้ามเนื้อเวลา 06.00 น. (AM) และปริมาณ 20 mg. เข้ากล้ามเนื้อ เวลา 18.00 น. (PM)

วันที่ 11 ฉีดฮอร์โมน FSH ปริมาณ 20 mg. เข้ากล้ามเนื้อเวลา 06.00 น. (AM) และถอด CIDR -G® เวลา 18.00 น. (PM) (12 ชั่วโมงหลังจากฉีดฮอร์โมน FSH เข็มสุดท้าย)

วันที่ 12 เก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี LOPU เวลา 06.00 น. (AM) (หลังจากถอด CIDR®-G 12 ชั่วโมง)

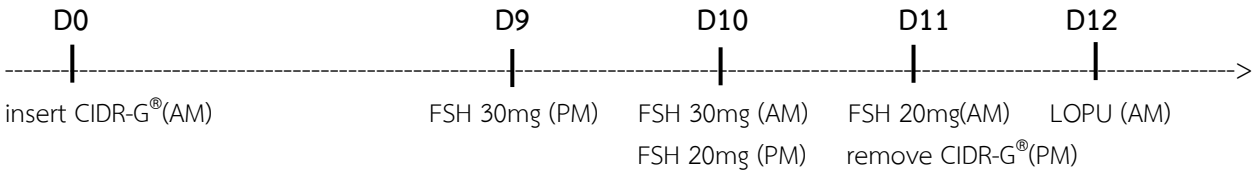

Figure 1. Estrus synchronization and superovulation program for LOPU. AM = 06.00, PM = 18.00

1.2 เตรียมตัวแพะก่อนเจาะเก็บโอโอไซต์ โดยงดน้ำและอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อลดความเสี่ยงที่ปลายเข็มจะไปทิ่มแทงอวัยวะภายในขณะทำ LOPU (Souza-Fabjan et al., 2014; Antonio, 2018) หลังจากนั้นทำการระงับความรู้สึกแพะแบบทั่วร่างกายโดยการฉีดยาระงับประสาท (tranquilizer drug) กลุ่ม alpha-2 agonist ด้วย xylazine HCL 0.2 mg/kg ร่วมกับ atropine 0.04 mg/kg เข้ากล้ามเนื้อ และ ยาระงับปวด (analgesic drug) ด้วย phenylbutazone 4 mg/kg เข้ากล้ามเนื้อ และยาปฏิชีวนะก่อนเริ่มทำผ่าตัด (prophylaxis antibiotic drug) ด้วย penicillin-streptomycin 20,000 IU/kg เข้ากล้ามเนื้อ (อรรถพล และคณะ, 2564) เมื่อแพะมีอาการซึม นำแพะขึ้นบนเตียงผ่าตัด จัดท่าแพะให้อยู่ในท่านอนหงาย (dorsal recumbency) โดยให้ส่วนหัวของแพะอยู่ต่ำกว่าส่วนท้ายลำตัว ทำมุมเอียงประมาณ 30 - 45 องศา เพื่อให้อวัยวะภายในช่องท้องเคลื่อนไปทางด้านหน้า และสามารถมองเห็นระบบสืบพันธุ์แพะเพศเมียจากกล้องลาพาโรสโคปได้สะดวกยิ่งขึ้น (Antonio, 2018) หลังจากนั้นทำการโกนขนและเตรียมบริเวณผ่าตัดด้วยเทคนิคการปลอดเชื้อ (aseptic technique) (Figure 2.)

1.3 เก็บโอโอไซต์แพะทดลอง ด้วยวิธี LOPU ดังนี้

กำหนดตำแหน่งที่จะทำการเจาะช่องท้องเพื่อสอดอุปกรณ์ 3 ตำแหน่ง โดยตำแหน่งที่ 1 อยู่บริเวณด้านหน้าของเต้านมซ้าย ประมาณ 2-3 เซนติเมตร (ตำแหน่งที่สอดกล้องลาพาโรสโคป) ตำแหน่งที่ 2 ด้านหน้าของเต้านมขวา (ตำแหน่งที่สอด OPU needle) ตำแหน่งที่ 3 ตำแหน่งกึ่งกลางลำตัวค่อนมาทางด้านหน้า (สอด grasping forceps)

ดำเนินการระงับความรู้สึกเฉพาะที่ โดยการฉีดยา lidocaine HCl ณ ตำแหน่งที่มีการกรีดผิวหนังจุดละ 2 ml ทั้ง 3 ตำแหน่ง เจาะผนังช่องท้องตำแหน่งที่ 1 ด้วย trocar (1) นำกล้องลาพาโรสโคป สอดเข้าช่องท้องทางช่องของ trocar ซึ่ง trocar นี้มีที่เชื่อมต่อกับสายแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้นเติมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เข้าช่องท้องเพื่อเพิ่มช่องว่างในช่องท้องและเพิ่มมุมมองการมองเห็นจากกล้องลาพาโรสโคป ทำการเจาะผนังช่องท้องตำแหน่งที่ 2 ด้วย trocar (2) เพื่อสอด OPU needle จากนั้นใช้ trocar (3) เจาะที่ตำแหน่งกึ่งกลางลำตัวค่อนมาทางด้านหน้า เพื่อสอด grasping forceps ซึ่งใช้ในการจับเยื่อแขวนรังไข่ (mesovarium) และใช้ควบคุมบังคับตำแหน่งรังไข่ให้สะดวกในการเจาะเก็บโอโอไซต์ (Antonio, 2018) (Figure 2.)

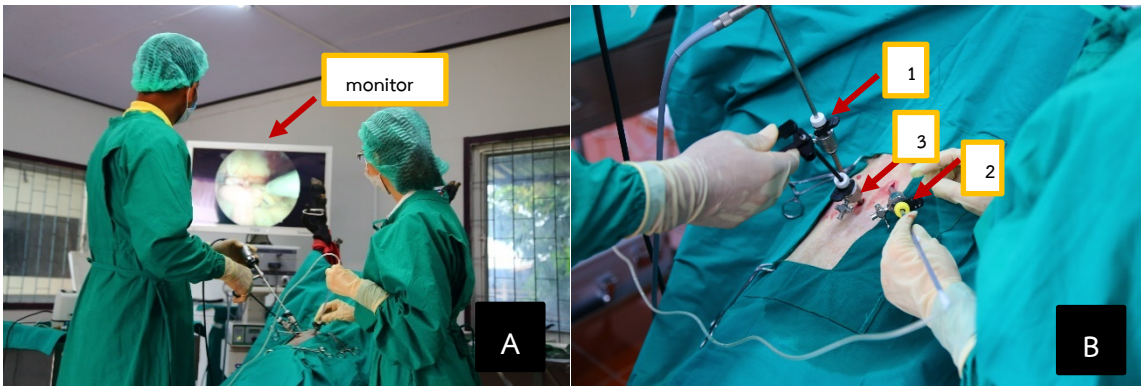

Figure 2. (A) LOPU view from monitor. (B) Positions of three trocars, 1 = laparoscope, 2 = OPU needle and 3 = grasping forceps.

ทำการเจาะฟอลลิเคิลที่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 3 มิลลิเมตร ซึ่งสามารถมองเห็นได้จากบนผิวของรังไข่ (Figure 3.) โดยประยุกต์ใช้ Robertson's pipette เชื่อมต่อกับ OPU needle ซึ่งเป็นเข็มเบอร์ 18G ยาว 3 นิ้ว แบบความลาดเอียงของเข็มน้อย (short bevel) (Watanabe Applied Technology : WTA, Brazil) เข้ากับชุดอุปกรณ์การเจาะเก็บโอโอไซต์และเครื่องปั๊มสุญญากาศ (NF100KT.18 RC (LIQUIDPORT 100), KNF, Switzerland) และ heating block (N-FTH-2012, COOK, Australia) ด้วยสายซิลิโคน โดยใช้แรงดูดสุญญากาศระหว่าง 40-50 มิลลิเมตรปรอท (Antonio, H.M. et al., 2018) ใช้สารละลาย phosphate buffered saline (PBS) (Gibco, BRL, USA) เสริมด้วย 1% bovine serum (Gibco, New Zealand) เป็นน้ำยาเก็บโอโอไซต์ ซึ่งควบคุมอุณหภูมิสารละลายนี้ไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ใน heating block (figure 4)

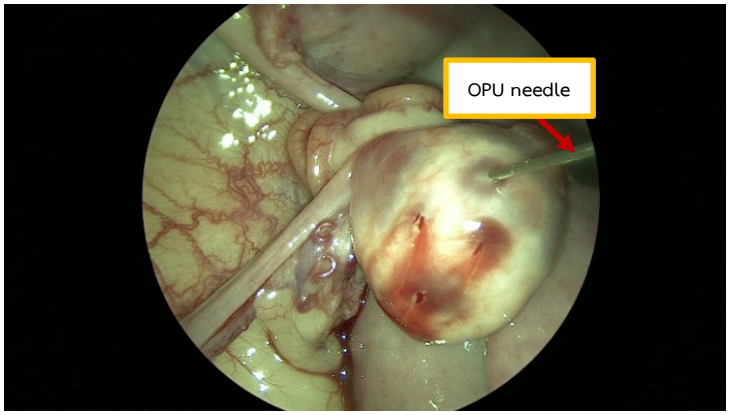

Figure 3. Endoscopic view of using OPU needle.

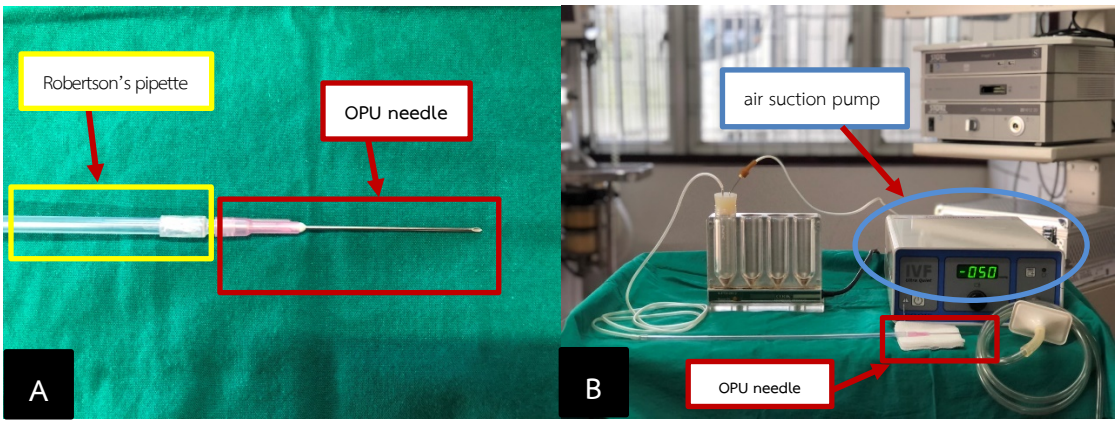

Figure 4. (A) Robertson's pipette and short bevel OPU needle size 18G, 3 inch length. (B) Robertson's pipette and OPU needle which connected to air suction pump machine.

หลังจากนั้นเติมสารละลาย normal saline 1,000 มิลลิลิตร ผสมกับ heparin 10,000 IU/ml (Gland Pharm Limited, India) 2 มิลลิลิตร ที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ลงในช่องท้องปริมาณ 200 - 250 มิลลิลิตร เพื่อชำระล้างรังไข่ และป้องกันการเกิดแผลยึดติด (adhesion) ของอวัยวะระบบสืบพันธุ์และอวัยวะอื่นๆภายในช่องท้อง (Antonio, 2018) เย็บปิดบาดแผล และดูแลบาดแผลหลังการผ่าตัด

1.4 นำของเหลวจากฟอลลิเคิล ไปตรวจหาโอโอไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ บันทึกจำนวนและคุณภาพของโอโอไซต์ โดยจำแนกคุณภาพโอโอไซต์เป็น 4 เกรด ตามวิธีของศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ ดังนี้

เกรด A : เป็นโอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบไม่น้อยกว่า 2 ชั้น (Cumulus-Oocyte Complexes, COCs)

เกรด B : เป็นโอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสบางส่วน (Partial Cumulus Cells, Partial CCs)

เกรด C : เป็นโอโอไซต์ที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัส (denuded oocytes, Dos)

เกรด D : เป็นโอโอไซต์ที่เสื่อมสภาพ (Degenerated oocytes, Deg)

2. นำโอโอไซต์ที่ได้ทั้งหมด มาเข้ากระบวนการผลิตตัวอ่อนนอกร่างกาย (IVP) ที่ดัดแปลงมาจากวิธีของอรรถพลและคณะ (2564) ดังนี้

2.1 การเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิ (*In vitro* maturation, IVM)

เป็นกระบวนการที่เพาะเลี้ยงโอโอไซต์ที่ยังเจริญเติบโตไม่เต็มที่ (Immature Oocyte) ให้มีการเจริญถึงระยะพร้อมปฏิสนธิ (Mature Oocyte) คือ มีสภาพ Nuclear and cytoplasmic Maturation (วิบูลย์ และคณะ, 2540) โดยทำการตรวจหาโอโอไซต์จากของเหลวในฟอลลิเคิล แล้วทำการคัดเลือกโอโอไซต์ที่เสื่อมสภาพ (degenerated oocytes) ออก จากนั้นนำโอโอไซต์มาล้างในน้ำยา TCM-199 Hepes (Gibco, USA) เสริมด้วย 5% FBS และ penicillin-streptomycin 10,000 IU/ml (Gibco, USA) ปริมาตร 2-3 มิลลิลิตร ในจานปลอดเชื้อพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร จำนวน 3 ครั้ง โดยใช้ปิเปตต์ดูดโอโอไซต์ใส่จานปลอดเชื้อที่ 1 แล้วย้ายไปจานปลอดเชื้อที่ 2 และ 3 ตามลำดับ จากนั้นนำโอโอไซต์มาล้างอีก 3 ครั้ง ในน้ำยา BO-IVM Oocyte maturation medium (IVF Bioscience, UK) สำหรับเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิด้วยวิธีการเช่นเดิม แล้วจึงนำโอโอไซต์ใส่ในน้ำยา BO-IVM Oocyte maturation medium (IVF Bioscience, UK)

ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ในจานเพาะเลี้ยงแบบ 4 หลุม (4-well petri dishes, Nunc, Roskilde, Denmark) และเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงที่ควบคุมสภาวะ (คาร์บอนไดออกไซต์ 5% อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 95%) นาน 23-25 ชั่วโมง

2.2 การเตรียมน้ำเชื้อแพะ (semen preparation)

ทำการปรับสมดุลน้ำยาสำหรับปฏิสนธิระหว่างโอโอไซต์กับตัวอสุจิ โดยใส่น้ำยา BO-IVF fertilization medium (IVF Bioscience, UK) ในจานเพาะเลี้ยงชนิด 4 หลุมๆ ละ 400 ไมโครลิตร นำเข้าในตู้เพาะเลี้ยงที่ควบคุมสภาวะ (แก๊สคาร์บอนไดออกไซต์ 5% อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนใช้งาน

จากนั้นทำการเตรียมน้ำเชื้อ โดยนำน้ำเชื้อสดจากแพะพ่อพันธุ์แองโกนูเบียน จำนวน 6 ตัว มาตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อสดด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์คุณภาพอสุจิ (computer assisted semen analysis, CASA) รุ่น Hamiton Thorne CEROS II (Hamilton Thorne, USA) และตรวจวัดความเข้มข้นน้ำเชื้อด้วยเครื่อง photometer (Minitube, Germany) ทำการปั่นล้างน้ำเชื้อ 2 ครั้ง ที่ความเร็ว 300 x g นาน 5 นาทีในน้ำยา BO-SemenPrep medium (IVF Bioscience, UK) โดยใช้น้ำยาปั่นครั้งละ 2 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง ในการปั่นครั้งที่ 2 ให้เหลือน้ำยาที่มีตะกอนน้ำเชื้อประมาณ 200 ไมโครลิตร นำมาตรวจประเมิน motility ตรวจนับอสุจิด้วย hematocytometer จากนั้นคำนวณความเข้มข้นของน้ำเชื้อและปริมาณน้ำเชื้อที่จะเติมในจานเพาะเลี้ยงชนิด 4 หลุม โดยแต่ละหลุมจะใช้น้ำเชื้อ 1 ล้านตัว ต่อน้ำยา BO-IVF fertilization medium (IVF Bioscience, UK) 500 ไมโครลิตร ต่อโอโอไซต์ไม่เกิน 50 โอโอไซต์

2.3 การปฏิสนธิกับโอโอไซต์ในจานทดลอง (*In vitro* fertilization, IVF)

นำโอโอไซต์ที่เพาะเลี้ยงจนครบเวลาการเจริญพร้อมปฏิสนธิแล้ว มาล้างด้วยน้ำยา BO-IVF fertilization medium ปริมาตร 2-3 มิลลิลิตร ในจานปลอดเชื้อพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร จำนวน 3 ครั้ง โดยใช้ปิเปตต์ดูดโอโอไซต์ใส่จานปลอดเชื้อที่ 1 แล้วย้ายไปจานปลอดเชื้อที่ 2 และ 3 ตามลำดับ หลังจากนั้นย้ายโอโอไซต์ลงในจานเพาะเลี้ยงชนิด 4 หลุม(4-well petri dishes, Nunc, Roskilde, Denmark) ที่มีน้ำยา BO-IVF fertilization medium 500 ไมโครลิตรที่เตรียมไว้ก่อนหน้า ทำการหยอดน้ำเชื้อลงในหลุมที่มีโอโอไซต์ เพาะเลี้ยงต่อในตู้เพาะเลี้ยงที่ควบคุมสภาวะ (คาร์บอนไดออกไซต์ 5% อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส) เป็นเวลานาน 18-19 ชั่วโมง

2.4 การเพาะเลี้ยงตัวอ่อน (*In vitro* embryo culture, IVC)

เมื่อสิ้นสุดเวลาการปฏิสนธิ ล้างตัวอ่อนในน้ำยา TCM-199 เสริมด้วย 5% FBS และ penicillin-streptomycin 10,000 IU/ml ปริมาตร 2-3 มิลลิลิตร ในจานปลอดเชื้อพลาสติกขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร จำนวน 3 ครั้ง โดยใช้ปิเปตต์ดูดตัวอ่อนดูดตัวอ่อนเข้าออกหลายๆครั้ง ใส่จานปลอดเชื้อที่ 1 แล้วย้ายไปจานปลอดเชื้อที่ 2 และ 3 ตามลำดับ เพื่อกำจัดเซลล์คิวมูลัสออก จากนั้นนำตัวอ่อนมาล้างอีก 3 ครั้ง ในน้ำยา BO-IVC 1 step culture medium (IVF Bioscience, UK) ด้วยวิธีการเช่นเดิม แล้วจึงนำตัวอ่อนใส่ในน้ำยา BO-IVC 1 step culture medium (IVF Bioscience, UK)ในจานเพาะเลี้ยงแบบ 4 หลุม (4-well petri dishes, Nunc, Roskilde, Denmark) ปริมาณ 500 ไมโครลิตร และเททับด้วย BO-OIL liquid paraffin (IVF Bioscience, UK) ปริมาณ 350 ไมโครลิตร เลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงที่ควบคุมสภาวะ (คาร์บอนไดออกไซต์ 5% อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ มากกว่า 95%) เพาะเลี้ยงจนถึงวันที่ 7 (วันที่ 1 คือวันที่เริ่มเพาะเลี้ยง) ทำการตรวจดูพัฒนาการของตัวอ่อน และบันทึกข้อมูล

ผลการทดลองและวิจารณ์

หลังการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและกระตุ้นการตกไข่หลายใบด้วยฮอร์โมน พบว่าแพะทดลองมีอัตราการตอบสนองของรังไข่เฉลี่ย 17.8±6.23 ฟอลลิเคิลต่อตัว จากการเจาะฟอลลิเคิลทั้งหมด 178 ฟอลลิเคิลเพื่อเก็บโอโอไซต์ ได้โอโอไซต์ทั้งหมดจำนวน 135 โอโอไซต์ เฉลี่ย 13.5±5.44 โอโอไซต์ต่อตัว โดยคิดเป็นอัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์ (recovery rate) คือ ร้อยละ 75.84 (135/178) โดยพบโอโอไซต์เกรด A (COCs) มากที่สุด ร้อยละ 33.33 (45/135) ดังแสดงใน Table 1

Table 1. No. of aspirated follicles and No. of derived oocytes from LOPU in 10 donors.

Table 1. No. of aspirated follicles and No. of derived oocytes from LOPU in 10 donors.

Parameters	Total Amount	Mean ± S.D.	Min-Max
No. of aspirated follicles	178	17.8±6.23	9-31
No. of derived oocytes (recovery rate)	135 (75.84)	13.5±5.44	6-21
- No. of oocytes grade A (%)	45 (33.33)	4.5 ±4.43	0-12
- No. of oocytes grade B (%)	39 (28.89)	3.9±4.18	0-15
- No. of oocytes grade C (%)	39 (28.89)	3.9±2.33	1-7
- No. of oocytes grade D (%)	12 (8.89)	1.2±1.62	0-5

เมื่อนำโอโอไซต์ที่เก็บด้วยวิธี LOPU มาเข้ากระบวนการ IVP และคัดเลือกโอโอไซต์ที่เสื่อมสภาพออก หลังจากนั้นนำโอโอไซต์เข้าสู่กระบวนการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิ (IVM) จนครบเวลา 23-25 ชั่วโมง พบว่ามีโอโอไซต์ที่เจริญพร้อมเข้าสู่กระบวนการปฏิสนธิ (IVF) จำนวน 116 โอโอไซต์ หลังจากกระบวนการปฏิสนธินาน 18-19 ชั่วโมง มีตัวอ่อนที่เข้าสู่กระบวนการการเพาะเลี้ยงตัวอ่อน (IVC) จำนวน 106 ตัวอ่อน และพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะคลีเวจและบลาสโตซิสต์ จำนวน 64 และ 42 ตัวอ่อนตามลำดับ คิดเป็นอัตราการปฏิสนธิ (Fertilization rate) คือ ร้อยละ (91.38 (106/116) อัตราการเกิดตัวอ่อนระยะคลีเวจ (cleavage rate) ร้อยละ 55.17 และตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ (blastocyst rate) ร้อยละ 36.21 (42/116) ของจำนวนโอโอไซต์ที่เจริญพร้อมเข้าสู่กระบวนการปฏิสนธิตามลำดับ ดังแสดงใน Table 2

Table 2. *In vitro* production of caprine oocytes derived from LOPU.

Parameters	number	Percent
mature oocytes entering IVF	116	
embryos entering IVC	106	
embryos developed to cleavage stage	64	
embryos developed to blastocyst stage	42	
Fertilization rate of all matured oocytes entering IVF		91.38 (106/116)
Cleavage rate of all matured oocytes entering IVF		55.17 (64/116)
Blastocyst rate of all matured oocytes entering IVF		36.21 (42/116)

In vitro fertilization(IVF), *In vitro* embryo culture (IVC).

จุดประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อพัฒนาเทคนิคการเก็บโอโอไซต์แพะมีชีวิตด้วยวิธี LOPU ให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยพิจารณาจากจำนวนและคุณภาพโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้ และสามารถนำโอโอไซต์นั้นไปเข้ากระบวนการปฏิสนธินอกร่างกาย เพื่อให้ได้ตัวอ่อนที่สามารถพัฒนาจนถึงระยะบลาสโตซิสต์ ซึ่งเป็นระยะที่เหมาะสมสำหรับนำไปย้ายฝากให้แก่แม่ตัวรับ

ในการทดลองครั้งนี้ได้นำเอาเทคนิค LOPU ที่ใช้ Robertson's pipette เชื่อมต่อกับ OPU needle ซึ่งเป็นเข็มเบอร์ 18G ยาว 3 นิ้ว แบบความลาดเอียงของเข็มน้อย (short bevel) เข้ากับชุดอุปกรณ์เจาะเก็บโอโอไซต์และเครื่องปั๊มสุญญากาศ ร่วมกับการผ่าตัดแบบใช้กล้องลาพาโรสโคป จาก Table 1 พบว่าได้ผลอัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์ (recovery rate) สูงถึงร้อยละ 75.84 และมีสัดส่วนของโอโอไซต์เกรด A มากถึงร้อยละ 33.33 ของโอโอไซต์ที่เก็บได้ทั้งหมด เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับเทคนิค LOPU ของอรรถพล และคณะ (2564) ที่ทำการศึกษาความเป็นไปได้ของการเจาะเก็บโอโอไซต์แพะด้วย LOPU และใช้โปรแกรมเดียวกันในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและกระตุ้นการตกไข่หลายใบ แต่แตกต่างกันที่เทคนิคและอุปกรณ์ในการเจาะเก็บโอโอไซต์ ที่ใช้เข็ม injection set ซึ่งเป็นอุปกรณ์สำหรับผสมเทียมแพะแบบลาพาโรสโคปิค และแรงดูดสุญญากาศ ในระดับที่ต่ำกว่า คือ 30-40 มิลลิเมตรปรอท ได้ผลอัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์ร้อยละ 73.17 และมีสัดส่วนของของโอโอไซต์เกรด A เพียงร้อยละ 16.7 ของโอโอไซต์ที่เก็บได้ทั้งหมด นอกจากนั้นเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับเทคนิค LOPU ของ Wieczorek et al. (2020) ที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการเจาะเก็บโอโอไซต์แพะด้วยวิธี LOPU โดยมีการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและกระตุ้นการตกไข่ด้วยโปรแกรมฮอร์โมนแล้วทำการเจาะเก็บโอโอไซต์โดยใช้อุปกรณ์เข็มเบอร์ 20-22G ร่วมกับเทคนิคการใช้ grasping forceps และใช้ไซริงค์ในการดูดซึ่งเป็นแรงดูดสุญญากาศระดับต่ำและไม่สามารถเฝ้าระวังระดับของแรงดูดสุญญากาศดังกล่าวได้ พบว่ามีอัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์ได้ร้อยละ 72 เห็นได้ว่าประสิทธิภาพ LOPU จากการทดลองในครั้งนี้ดีกว่าจากทั้งสองรายงานที่กล่าวถึง และจากข้อสังเกตอาจเป็นไปได้ว่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและความลาดเอียงของเข็มที่เป็นอุปกรณ์ในการเจาะ รวมถึงระดับของแรงดูดสุญญากาศ มีผลต่ออัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์ สอดคล้องกับรายงานของ Souza-Fabjan et al. (2014) ที่สนับสนุนว่าในการทำ LOPU แพะ ขนาดของเข็มมีผลทำให้ได้อัตรา

การเจาะเก็บโอโอไซต์ที่สูงกว่าแต่ไม่มีผลต่อคุณภาพโอโอไซต์ เมื่อพิจารณาแรงดูดสุญญากาศที่ใช้ ก็พบว่ามีผลต่ออัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์และสัดส่วนโอโอไซต์คุณภาพดีด้วยเช่นกัน การศึกษาครั้งนี้ใช้แรงดูดสุญญากาศที่ 40-50 มิลลิเมตรปรอท สอดคล้องกับ Souza-Fabjan et al. (2014) ที่รายงานว่าแรงดูดสุญญากาศที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 25-70 มิลลิเมตรปรอท หากแรงดูดสุญญากาศน้อยกว่า 25 มิลลิเมตรปรอท จะทำให้อัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์ได้ต่ำ และหากใช้แรงดูดสุญญากาศมากกว่า 100 มิลลิเมตรปรอท จะทำให้สัดส่วนของโอโอไซต์เกรด A ต่อโอโอไซต์ที่เก็บได้ทั้งหมดลดลง สอดคล้องกับรายงานของเอกชาติ และคณะ (2543) ที่สนับสนุนว่าเมื่อใช้แรงดูดสุญญากาศมากเกิน จะทำให้ได้โอโอไซต์ที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มและยังไม่เจริญเต็มที่ (immature oocyte) เป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นโอโอไซต์ที่มีคุณภาพไม่เหมาะสมสำหรับนำมาเข้ากระบวนการ IVP นอกจากนั้น Souza Fabjan et al. (2014) ยังได้รายงานว่า อัตราการไหลของของเหลวในการเก็บโอโอไซต์ก็มีผลต่อการเก็บโอโอไซต์คุณภาพดีในแพะด้วยเช่นกัน พบว่าอัตราการไหลของของเหลวที่สม่ำเสมอ 7-7.5 มิลลิลิตร/นาที จะทำให้ได้โอโอไซต์คุณภาพดีมากถึงร้อยละ 70 เมื่อพิจารณาขนาดของเข็มเจาะ แม้ว่าการเจาะดูดโอโอไซต์ด้วยปลายเข็มที่ขนาดใหญ่กว่า อาจทำให้สามารถเก็บโอโอไซต์ได้ปริมาณมากขึ้นแต่ขนาดของปลายเข็มที่ใหญ่เกินนั้นก็มีข้อด้อย คือ อาจทำให้รังไข่บอบช้ำได้ อย่างไรก็ตามการบาดเจ็บที่เกิดขึ้นอาจขึ้นอยู่กับทักษะความชำนาญของผู้ปฏิบัติงานด้วย มีรายงานของ Anna et al. (2003) ระบุว่าหากมีการบาดเจ็บของรังไข่เนื่องจาก LOPU จำนวนโอโอไซต์ที่เก็บได้ในแต่ละครั้งจะลดลงสวนทางกับจำนวนครั้งที่เจาะเก็บโอโอไซต์และภายหลังการเก็บโอโอไซต์อาจมีโอกาสเกิดแผลยึดติดเล็กน้อยได้ประมาณร้อยละ 30 จากการทำ LOPU ซ้ำ ในช่วงเวลา 10 สัปดาห์ (Mencheca et al., 2016)

สิ่งที่จะทำให้ IVP ประสบความสำเร็จ มี 2 ปัจจัยหลัก คือ คุณภาพโอโอไซต์ที่เหมาะสมสำหรับ IVP และระยะเวลาระหว่างนำโอโอไซต์ออกจากฟอลลิเคิลไปถึงขั้นตอนการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิ (IVM) (Jie et al., 2018) จากการพัฒนาเทคนิค LOPU ครั้งนี้ สามารถเจาะเก็บโอโอไซต์ที่มีคุณภาพเกรด A และเกรด B ได้เป็นจำนวนมากถึงร้อยละ 33.33 และ 28.89 ตามลำดับ ซึ่งโอโอไซต์เกรด A สามารถพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะคอมแพคมอรูล่า และระยะบลาสโตซิสต์ดีกว่าโอโอไซต์เกรด B (Mondal et al., 2008) แต่ในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้คัดเลือกเฉพาะโอโอไซต์เกรด A และ B เท่านั้น ที่มาเข้ากระบวนการ IVP แต่ได้มีการนำเอาโอโอไซต์เกรด C มาเพาะเลี้ยงรวมด้วย เนื่องจากมีรายงานของ Choi et al. (2013) สนับสนุนว่าการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์เกรด A ร่วมกับ เกรด C จะทำให้พัฒนาการและคุณภาพของตัวอ่อนจากการทำ IVF ดีขึ้น

นอกจากนั้น ระยะเวลาระหว่างนำโอโอไซต์ออกจากฟอลลิเคิลไปถึงขั้นตอนการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิ (IVM) ก็มีผลต่อความสำเร็จของกระบวนการ IVP เช่นกัน โดยรายงานของ Jie et al. (2018) สนับสนุนว่า ขั้นตอนนี้ควรใช้เวลาน้อยที่สุด เนื่องจากในขณะที่โอโอไซต์หลุดออกจากฟอลลิเคิลบนรังไข่แล้ว โอโอไซต์จะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ meiosis ตามธรรมชาติ ส่งผลให้ไซโตพลาสซึมกับนิวเคลียสของโอโอไซต์ไม่สัมพันธ์กัน หากใช้เวลาระหว่างนำโอโอไซต์ออกจากฟอลลิเคิลไปถึงขั้นตอน IVM นาน จะทำให้โอโอไซต์นั้นมีโอกาสเสื่อมสภาพมากยิ่งขึ้น เป็นการลดความสามารถในการพัฒนาของโอโอไซต์ ดังนั้น ทักษะการปฏิบัติงานเป็นทีมภาคสนามเพื่อนำโอโอไซต์ออกจากตัวแพะก่อนส่งต่อไปยังห้องปฏิบัติการควรต้องทำงานประสานสอดคล้องกันอย่างดี ให้เกิดความรวดเร็วและเป็นการป้องกันความเสียหาย

ที่อาจเกิดขึ้นได้ ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ ใช้ระยะเวลาในการเก็บโอโอไซต์แพะตั้งแต่ขึ้นเตียงผ่าตัดจนถึงนำของเหลวจากฟอลลิเคิลส่งห้องปฏิบัติการ ประมาณ 20 นาทีต่อตัว

ช่วงเวลาที่โอโอไซต์และอสุจิพร้อมที่จะผสมกันมากที่สุด (fertile span) นั้น เป็นช่วงเวลาที่จำกัดและแตกต่างออกไปตามคุณภาพของโอโอไซต์และอสุจิ หากคุณภาพไม่ดีมาก ระยะเวลาที่เหมาะสมอาจสั้น โอกาสในการปฏิสนธิได้ก็จะต่ำลง ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้พร้อมปฏิสนธิ (IVM) และตรวจคุณภาพอสุจิก่อนใช้งาน นอกจากนั้นในหว่างกระบวนการ IVF จำเป็นต้องอาศัยระยะเวลาที่เพียงพอสำหรับการทำปฏิสนธิ ซึ่งห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งมีการใช้ระยะเวลาในการทำ IVF ที่แตกต่างกันออกไป ระหว่าง 6-24 ชั่วโมง ตามโปรแกรมของแต่ละห้องปฏิบัติการ (Jie et al., 2018) ในการศึกษาครั้งนี้ เลือกใช้เวลาในขั้นตอน IVF 18-19 ชั่วโมง ซึ่งเพียงพอที่จะให้เกิดการปฏิสนธิ และได้อัตราการปฏิสนธิ ร้อยละ 91.38 (106/116) ของโอโอไซต์ที่เจริญพร้อมเข้าสู่กระบวนการปฏิสนธิ อย่างไรก็ตามการเพิ่มเวลาในกระบวนการ IVF เพื่อเพิ่มอัตราการปฏิสนธิควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

จากผลการทดลองพัฒนาเทคนิคการเจาะเก็บโอโอไซต์แพะด้วยวิธี LOPU และผลิตตัวอ่อนแพะจากโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้ด้วยวิธีปฏิสนธินอกร่างกายครั้งนี้ ทำให้มั่นใจได้ว่า LOPU เป็นเทคนิคที่เหมาะสมในการเก็บโอโอไซต์จากแพะมีชีวิต เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถเก็บโอโอไซต์ได้จริง มีความปลอดภัยสูง รวดเร็ว แพะมีความบอบช้ำจากการผ่าตัดน้อย บาดแผลมีขนาดเล็ก แผลหายเร็ว และหลังการเก็บโอโอไซต์แล้วแพะยังมีสวัสดิภาพที่ดี ความสำเร็จของเทคนิค LOPU ภายใต้การเหนี่ยวนำการเป็นสัดและกระตุ้นการตกไข่หลายใบด้วยโปรแกรมฮอร์โมนที่มีประสิทธิภาพ ต้องอาศัยเข็มเจาะฟอลลิเคิลที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางเหมาะสมกับขนาดของฟอลลิเคิล ความลาดเอียงของเข็มน้อย แรงดูดสุญญากาศและอัตราการไหลของของเหลวในการเก็บโอโอไซต์ที่เหมาะสม ร่วมกับการยึดตรึงรังไข่เพื่อให้เกิดความแม่นยำ จะทำให้ได้อัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์ที่สูงและโอโอไซต์คุณภาพดี เหมาะสำหรับนำไปเข้ากระบวนการ IVP จนเพาะเลี้ยงได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ ซึ่งเป็นระยะที่เหมาะสมที่จะนำไปย้ายฝากให้แก่แม่ตัวรับต่อไป

สรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษาเทคนิคการเจาะเก็บโอโอไซต์แพะที่ถูกเหนี่ยวนำการเป็นสัดและกระตุ้นการตกไข่หลายใบ ด้วยวิธี LOPU โดยการใช้ OPU needle ขนาด 18G ยาว 3 นิ้ว แบบความลาดเอียงของเข็มน้อย (short bevel) ร่วมกับการใช้กล้องลาพาโรสโคป ที่แรงดูดสุญญากาศ 40-50 มิลลิเมตรปรอท พบว่าแพะมีการตอบสนองโดยการสร้างฟอลลิเคิลของรังไข่เฉลี่ย 17.8$\pm$6.23 ฟอลลิเคิลต่อตัว ในจำนวนนี้มีโอโอไซต์ที่สามารถเจาะเก็บได้เฉลี่ย 13.5$\pm$5.44 โอโอไซต์ต่อตัว โดยมีอัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์ (recovery rate) ร้อยละ 75.84 (135/178) เมื่อนำโอโอไซต์นั้นเข้ากระบวนการผลิตตัวอ่อนด้วยวิธีปฏิสนธิภายนอกร่างกาย พบว่ามีอัตราการปฏิสนธิ ร้อยละ 91.38 (106/116) มีตัวอ่อนเจริญจนถึงระยะคลีเวจและบลาสโตซิสต์ ร้อยละ 55.17 (64/116) และ 36.21 (42/116) ของจำนวนโอโอไซต์ที่เจริญพร้อมปฏิสนธิ

ข้อเสนอแนะ

ในปัจจุบันการพัฒนาเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับการปฏิสนธินอกร่างกายแพะของประเทศไทยยังเป็นเพียงจุดเริ่มต้นและอยู่ระหว่างการพัฒนา ทางผู้เขียนมีความคิดเห็นว่าควรศึกษาในประเด็นอื่นที่เกี่ยวข้องเพิ่มเติมนอกเหนือไปจากเทคนิคการเก็บโอโอไซต์เพื่อนำไปผลิตตัวอ่อนนอกร่างกาย เป็นการเพิ่มขีดความสามารถของการขยายพันธุ์สัตว์พันธุ์ดีสู่เกษตรกร เช่น การพัฒนาโปรแกรมเหนี่ยวนำการเป็นสัดและกระตุ้นการตกไข่หลายใบที่เหมาะสมต่อการเกิดฟอลิเคิลขนาดใหญ่ที่อาจทำให้ได้โอโอไซต์คุณภาพดีและเหมาะสมต่อการนำมาทำ IVP หรือการลดปริมาณตัวอสุจิที่จะทำปฏิสนธิในกระบวนการ IVF เพื่อให้สามารถใช้ประโยชน์จากน้ำเชื้อที่พันธุกรรมดีแต่มีจำนวนจำกัดได้อย่างคุ้มค่า รวมทั้งการพัฒนาโปรแกรมการแช่แข็งตัวอ่อน IVP เพื่อนำไปย้ายฝากแก่แม่ตัวรับให้เป็นลูกเกิดจากการปฏิสนธินอกร่างกายต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสัตวแพทย์หญิง ดร.สายใจ ชื่นสุข นายสัตวแพทย์ณัฐนันท์ ศิริรัตนธัญญะกุล และคณะกรรมการวิจัยสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ทุกท่านที่ให้ความรู้และคำแนะนำด้านรูปแบบการเขียนงานวิจัย นายสัตวแพทย์อนนท์ เทืองสันเที๊ยะ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ ที่ให้ความรู้เกี่ยวกับสัตว์ทดลองและปฏิบัติงานด้านผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย ดร.สุจิรา ธรรมวัง ที่ให้คำแนะนำด้านการอ่านผลทางห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงานห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ คุณนิตยา วาปีกา นักวิทยาศาสตร์ที่ให้ความรู้และตรวจหาโอโอไซต์รวมถึงปฏิบัติงานผลิตตัวอ่อนจากการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย คุณจีราภา ขาวสุข นักวิทยาศาสตร์ที่ให้ความรู้และตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อแพะ ขอบคุณเจ้าหน้าที่ทีมดูแลสุขภาพและการจัดการแพะพ่อแม่พันธุ์ที่ช่วยควบคุมดูแลแพะและรีดเก็บน้ำเชื้อแพะ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ช่วยเหลือ จนงานวิจัยครั้งนี้ประสบความสำเร็จเป็นประโยชน์ในการพัฒนางานด้านเทคโนโลยีชีวภาพในวงการปศุสัตว์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

วิบูลย์ เยี่ยงวิศวกูรมาลี อภิเมธีธำรง ยันต์ สุขวงศ์. 2540. การศึกษาเบื้องต้น: การผลิตตัวอ่อนโครระยะบลาสโตซีสต์โดยการปฏิสนธินอกร่างกาย. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35 : สาขาสัตวแพทยศาสตร์ 3-5 กุมภาพันธ์ 2540. กรุงเทพมหานคร : 475-479

ศูนย์สารสนเทศและการสื่อสาร กรมปศุสัตว์, 2564. แหล่งที่มา : https://ict.dld.go.th/webnew/index.php/th/service-ict/report/365-statsummary-typeanimal/statsummary-goat, 20 สิงหาคม 2564.

อรรถพล พรประไพ อนนท์ เทืองสันเทียะ พิงค์ลานนา กุญชร และมาลี อภิเมธีธำรง. 2564. การศึกษาความเป็นไปได้ในการเจาะเก็บโอโอไซต์แพะด้วยวิธี laparoscopic ovum pick-up (LOPU) และการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกายในประเทศไทย. วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. 12(1) : 136-160.

เอกชาติ พรหมดิเรก มงคลเตชะกำพุ นวเพ็ญ ภูติกนิษฐ์ อัญชลี ณ เชียงใหม่. 2543. การศึกษาเบื้องต้นของการเก็บโอโอไซต์. เวชชสารสัตวแพทย์. ปีที่ 30 ฉบับที่ 1 : 43-50.

Anna, A.A., M.N. Hisham, W.E. Wan Khadijah and R.B. Abdullah. 2013. Comparative Study on Goat Oocyte Recovery Methods and Factors Affecting the Quantity of Oocytes. Asian J. Anima. Vet.Adv. Vol8 (3) : 437-448.

Antonio, H.M.,2018. Aspiration of oocytes by laparoscopy for embryo transfer in goat : a review. ABANICO VETERINARIO. Vol8(2) : 14-23.

Choi, B.H., B. Jae-Il, J. Jong-In, K. Seong-Su, J. Hyun-Tae, D. Gautam Kumar, D. Nasser, C. Kyu-Woan and K. Il-Keun. 2013. Coculturing cumulus oocyte complexes with denuded oocytes alters zona pellucida ultrastructure in *In vitro* matured bovine oocytes. Theriogenology. 80: 1117–1123.

Jie, Z., A.R. Moawadb, C. Wanga, H. Lia, J. Rena and Y. Daia. 2018. Review Article Advances in *In vitro* production of sheep embryos. Int. J. Vet. Sci. Med. Vol6 : 15-26.

Mencheca, A., N. Barrera, P.C.D. Santos Neto, F. Cuadro and M. Crispo. 2016. Advances and limitations of in vitro embryo production in sheep and goat. Anim. Reprod. Vol13 (3) : 273-278.

Mondal A., A.M.Y. Khandoker, M.A. Mondal, A.H.M.S. Rahman, A.S. Apu and S. Pervage. 2008 *In Vitro* Production of Goat Embryos In Bangladesh. Bang. J. Anim. Sci. 37(1) : 1-9.

Paramio MT. 2010. *In vivo* and *In vitro* embryo production in goats. Reprod Domest Anim. 49 (4) : 37-48

Souza-Fabjan, J.M.G., L. Yann, D. Nicolas, C. Emilie, T. Jean-Luc, P. Christine, B. Jean Francois, F.F. Vicente Jose and M. Pascal. 2014. *In vitro* embryo production in goats: Slaughterhouse and laparoscopic ovum pick up- derived oocytes have different kinetics and requirements regarding maturation media. Theriogenology. 81 : 1021-1031.

Souza-Fabjan, J. M. G. , P.Barbara, D.Nicolas, L.Yann, F..Jose Ricado, F. F. Vicente Jose and P. Mermillod. 2014. *In vitro* production of small ruminant embryos : Late improvements and future research. Theriogenology. 81 : 1149-1162.

Wieczorek, J., K. Jurij, S. Maria and C. Miroslaw. 2020. L-OPU in goat and sheep–different variant of the oocyte recovery method. Animal. (10) : 658-672.