



ผลของการเสริม linoleic acid albumin และ conjugated linoleic acid ในน้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อนต่อการพัฒนาสู่ระยะ blastocyst

พิรวิทย์ เชื้อวงษ์บุญ^{1*} ดำรงรักษ์ รักวงศ์ฤทธิ์² สุจิตรา ธรรมวัง³ และ เทวินทร์ วงษ์พระลับ²

¹คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี ประเทศไทย 76120

²สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น ประเทศไทย 40002

³ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี อำเภอแก่งคอย จังหวัดสระบุรี ประเทศไทย 18620

ข้อมูลบทความ

Article history

รับ: 29 เมษายน 2567

แก้ไข: 3 มิถุนายน 2567

ตอบรับการตีพิมพ์: 3 กันยายน 2567

ตีพิมพ์ออนไลน์: 18 กันยายน 2567

คำสำคัญ

กรดไขมันไม่อิ่มตัว

ตัวอ่อน

โคพื้นเมือง

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงน้ำยาในการเลี้ยงตัวอ่อนเพื่อเพิ่มอัตราการพัฒนาของตัวอ่อน ภายหลังการเลี้ยงตัวอ่อนระยะ 2-4 เซลล์ ให้พัฒนาสู่ระยะ blastocyst ของตัวอ่อนโคพื้นเมือง โดยผลการเสริม linoleic acid albumin (LAA) ระดับ 0 1 2 และ 3 mg/ml และ conjugated linoleic acid (CLA) ที่ระดับ 0 0.1 0.2 และ 0.3 mg/ml ในน้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อนจากระยะ 2-4 เซลล์ สู่อัตราการพัฒนาของตัวอ่อนระยะ blastocyst ที่ 8 วัน พบว่า LAA ระดับ 0 และ 1 mg/ml ให้อัตราการพัฒนาของตัวอ่อนระยะ blastocyst ที่ 8 วัน สูงกว่า LAA ระดับ 2 และ 3 mg/ml ($P < 0.05$) และพบว่า CLA ระดับ 0 และ 0.1 mg/ml ให้อัตราการพัฒนาของตัวอ่อนถึงระยะ blastocyst สูงกว่าระดับ 0.2 และ 0.3 mg/ml ($P < 0.05$) สรุปได้ว่า ในโคพื้นเมืองการเสริม LAA และ CLA ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนระยะ 2-8 วัน ภายหลังการปฏิสนธิ ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนระยะ blastocyst ได้

บทนำ

ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงโค ได้มีการนำเทคโนโลยีทางการสืบพันธุ์มาใช้ได้แก่ การผสมเทียม การกระตุ้นการเพิ่มการตกไข่ การเจาะเก็บไข่ (Ovum pickup, OPU) การผลิตตัวอ่อนในห้องปฏิบัติการ การแช่แข็งตัวอ่อน และการย้ายฝากตัวอ่อน เป็นต้น มีการพัฒนาเทคนิคด้านการย้ายฝากตัวอ่อน มาเป็นลำดับ และในปี 2013 ทั้งโลกมีการย้ายตัวอ่อนทั้งสิ้น 986,983 ตัวอ่อน ประกอบด้วยตัวอ่อนที่ชะล้างจากมดลูกแม่โค 575,783 ตัวอ่อน ที่เหลือเป็นตัวอ่อนที่ผลิตในห้องปฏิบัติการทั้งไข่จากเทคนิค OPU และจากการเจาะเก็บจากรังไข่ของโคที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ (Perry, 2013) ในปี 2018 ทั่วโลกมีการย้ายฝากตัวอ่อนทั้งสิ้น 1,129,041 ตัวอ่อน โดยเป็นตัวอ่อนจากแม่โคที่ทำ superovulation จำนวน 386,133 ตัวอ่อน และผลิตในห้องปฏิบัติการเป็นจำนวนถึง 742,908 ตัวอ่อน (Viana, 2019) การคัดเลือกพันธุ์ในโคพิจารณาจากยีนส์ ที่มีความจำเพาะตามที่ต้องการมีความสำคัญมากขึ้น ตอบสนองต่อการผลิตแม่โคชั้นยอด

ทำให้สามารถเพิ่มสัตว์ที่มีพันธุกรรมดีเด่นมากขึ้นเป็นลำดับ การผลิตตัวอ่อนจากห้องปฏิบัติการสามารถช่วยการปรับปรุงพันธุ์ได้รวดเร็วขึ้น โดยสามารถผลิตตัวอ่อนพันธุ์ดีได้ในปริมาณมาก อย่างไรก็ตามพบว่าตัวอ่อนที่ผลิตจากห้องปฏิบัติการมีอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากต่ำกว่าตัวอ่อนที่ชะล้างจากแม่โค พบว่าการย้ายฝากตัวอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการมีเพียง 9 % ของตัวอ่อนที่ผลิตได้จากห้องปฏิบัติการเท่านั้นต่างจากตัวอ่อนที่ผลิตจากแม่โคมีการย้ายฝากถึง 60 % ของตัวอ่อน (Perry, 2013)

ได้มีการศึกษาถึงการปรับปรุงคุณภาพตัวอ่อนจากการผลิตในห้องปฏิบัติการโดยการควบคุมการสะสมไขมันของเซลล์ตัวอ่อน ได้แก่ การเสริม linoleic acid albumin (LAA) ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน ให้ตัวอ่อนสามารถพัฒนาถึงระยะ morula ถึง blastocyst (Hochi et al., 1999) การเสริม Conjugated linoleic acid (CLA) พบว่า มีผลดีต่อการรอดชีวิตของตัวอ่อน (Pereira et al., 2007) และ Pereira et al. (2008) ยังได้รายงานไว้ว่า CLA ดังกล่าวมีผลดีต่อ re-expansion

*Corresponding author

E-mail address: chuawongboon_p@su.ac.th (P. Chuawongboon)

Online print: 18 September 2024 Copyright © 2024. This is an open access article, production, and hosting by Faculty of Agricultural Technology, Rajabhat Maha Sarakham University. <https://doi.org/10.14456/paj.2024.38>

ของตัวอ่อนทั้งที่ผ่าแบ่งภายหลังการเลี้ยงและพวกที่ไม่ผ่าแบ่ง (Chasombat et al., 2015) ได้รายงานถึงผลดีของ LAA ระดับ 1 และ 2 % และ CLC 2 mg/ml ในน้ำยาบ่มไข่โค ต่ออัตราการรอดชีวิตของไข่ และอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนถึงระยะ blastocyst จากไข่ที่ผ่านการแช่แข็ง จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาเพื่อแสวงหาเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการเลี้ยงตัวอ่อนและเก็บรักษาตัวอ่อนโคพื้นเมือง อันจะเป็นประโยชน์ต่อการอนุรักษ์ และใช้ประโยชน์ทางพันธุกรรมของโคพื้นเมืองต่อไป ตลอดจนเป็นองค์ความรู้เพื่อนำไปต่อยอดใช้ในการเลี้ยงตัวอ่อนโคสายพันธุ์อื่น ซึ่งการเสริมสาร LAA และ CLA ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน เพื่อให้ตัวอ่อนระยะ 2-4 เซลล์ได้พัฒนา ถึงระยะ blastocyst ในอัตราที่สูงได้

จากการค้นคว้ายังไม่พบการศึกษาการเสริมสาร LAA และ CLA ในช่วงการเลี้ยงตัวอ่อนหลังการปฏิสนธิหรือ ระยะ 2-4 เซลล์ต่ออัตราการพัฒนาสู่ระยะ blastocyst ในวันที่ 8 ของตัวอ่อนโคพื้นเมือง และลูกผสมพื้นเมือง ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้วัตถุประสงค์หลักเพื่อปรับปรุงสูตรน้ำยาเพื่อให้ตัวอ่อนโคพื้นเมืองและลูกผสมพื้นเมืองที่ผลิตในห้องปฏิบัติการ (*In Vitro* Embryo Production, IVP) โดยเปรียบเทียบระดับที่เหมาะสมของ LAA และ CLA ในน้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อน ต่ออัตราการพัฒนาจนถึงระยะ blastocyst ของตัวอ่อนโคพื้นเมืองและลูกผสมพื้นเมือง

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

น้ำเชื้อโค

ใช้น้ำเชื้อแบบแช่แข็งของโคพื้นเมืองไทย โดยนำน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Tris egg yolk ของพ่อพันธุ์ที่มีผลการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อด้านการเคลื่อนที่เฉลี่ยแล้วไม่น้อยกว่า 40 % มาใช้ในการทดสอบความสามารถในการปฏิสนธิและการพัฒนาของเอ็มบริโอในนอกร่างกาย

การประเมินความสามารถในการปฏิสนธิและการพัฒนาของตัวอ่อนนอกร่างกาย

1) การเพาะเลี้ยง oocyte จนสมบูรณ์พร้อมปฏิสนธิในนอกร่างกาย

Oocyte จากรังไข่โคที่ได้มาจากโรงฆ่าสัตว์ท้องถิ่นที่ทำการคัดเลือกด้วยวิธีการเจาะดูดจากฟอลลิเคิลเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-6 ml และทำการประเมินคุณภาพของ oocyte ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ โดยจัดแบ่งเกรดตามจำนวนชั้นของคิวมูลัสเซลล์ (cumulus cell: CCs) oocyte เกรด A มี CCs มากกว่า 4 ชั้น เกรด B มี CCs 3-4 ชั้น เกรด C มี CCs 1-2 ชั้น เกรด D ไม่มี CCs และเกรด E มี CCs กระจัดตัวแล้วรอบล้อม oocyte (Merton et al., 2003)

ในการทดลองนี้เลือกใช้ oocyte ที่มีเกรด A และ B โดยนำ oocyte มาล้างด้วยน้ำยา TCM-199 จำนวน 4 ครั้ง นอกจากนั้นนำ oocyte จำนวน 20-25 ใบ มาเพาะเลี้ยงใน drop ของน้ำยา TCM-

199 ที่เสริม FSC 10 %, penicillin-streptomycin 1 % (v/v), LH 10 µg/mL, FSH 1 µg/ml และ estradiol 1 µg/mL โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม หลังจากนั้นปิดทับด้วย mineral oil (sigma, M-8410) บ่มเป็นเวลา 22-24 ชั่วโมง ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 38.5 °C คาร์บอนไดออกไซด์ที่ระดับ 5 % ความชื้นที่ระดับ 95 % (Shamsuddin & Rodriguez-Martinez, 1994)

2) การปฏิสนธิในนอกร่างกาย

นำหลอดน้ำเชื้อแช่แข็ง (frozen semen) มาทำละลายในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 วินาที ตัดหลอดแล้วนำไปทำการคัดเลือกอสุจิที่แข็งแรงด้วยเทคนิค ว่ายขึ้นด้านบน (swim up) เพื่อคัดเลือกอสุจิที่พร้อมปฏิสนธิ โดยปลดปล่อยน้ำเชื้อบริเวณก่อนหลอดพลาสติกปลอดเชื้อขนาด 5 mL หลอดละ 150 µL ที่มีสารละลาย Tyrode's albumin lactate pyruvate (TALP) อยู่ปริมาตร 2 mL จำนวน 3 หลอดต่อกลุ่มทดลอง นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 38.5 °C คาร์บอนไดออกไซด์ที่ระดับ 5 % ความชื้นที่ระดับ 95 % นาน 45 นาที ดูส่วนปริมาตร 1.5 mL ของแต่ละหลอดใส่ในพลาสติกขนาด 15 mL ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (รุ่น LMC 3000, Biosan, Latvia) ที่ 1700 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 5 นาที จากนั้นดูส่วนบนที่มีลักษณะใสออก และ นำส่วนของตะกอนอสุจิ ปริมาตร 1000 µL มาเจือจางในน้ำยา TALP ปริมาตร 2 mL หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 1700 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที แล้วดูส่วนบนทิ้ง และนับความเข้มข้นอสุจิเพื่อปรับความเข้มข้นของอสุจิสุดท้ายคือ 1×10^6 ตัว/mL ในหยด µL น้ำยา TALP-IVF โดยเสริม EFAF-BSA 5 mg/ml (Sigma, A6003) และเฮปารินความเข้มข้น 10 µL/mL (Leo, Denmark) หลังจากนั้นนำ oocyte จำนวน 20-25 ใบมาบ่มร่วมกับอสุจิในน้ำยา TALP-IVF ปริมาตร 100 µL ปิดทับด้วย mineral oil แล้วบ่มในตู้ที่อุณหภูมิ 38.5 °C ที่ระดับความชื้น 95 % และคาร์บอนไดออกไซด์ที่ระดับ 5 % เป็นเวลานาน 18 ชั่วโมง (Shamsuddin & Rodriguez-Martinez, 1994)

3) การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนนอกร่างกาย

นำตัวอ่อนที่ผ่านการปฏิสนธิใหม่ (presumptive zygote) ทำการแยกคิวมูลัสเซลล์ที่ล้อมรอบออกโดยใช้ปิเปตแก้ว และล้างในน้ำยา CR 1aa (Rosenkrans et al., 1993) จำนวน 4 ครั้ง จากนั้นย้าย oocyte ขณะที่คล้ายไซโกต (presumptive Zygote) จำนวน 20-25 ใบ ลงในน้ำยา CR 1 aa ปริมาตร 50 µL ซึ่งเสริม BSA 3 mg/ml ปิดทับ mineral oil บ่มเลี้ยงในตู้บ่ม tri gas CO₂ (Model, 3131 Thermo scientific, USA) ที่อุณหภูมิ 38.5 °C ที่ระดับความชื้น 95 % คาร์บอนไดออกไซด์ 5 %, ไนโตรเจน 90 % และออกซิเจน 5 % หลังจากปฏิสนธิ 72 ชั่วโมง ทำการประเมินการปฏิสนธิจากการแบ่งตัวของตัวอ่อน (cleavage rate) หลังจากนั้นนำเอ็มบริโอที่แบ่งเซลล์อย่างน้อย 4 เซลล์ ย้ายลงในน้ำยา CR 1 aa ปริมาตร 50 µL ที่เสริม BSA 3 mg/ml ปิดทับ mineral oil เลี้ยงในตู้บ่ม

tri gas CO₂ ที่อุณหภูมิ 38.5 °ซ คาร์บอนไดออกไซด์ 5 % ไนโตรเจน 90 % และออกซิเจน 5 % จนถึงวันที่ 8 บันทึกผลเอ็มบริโอระยะ Blastocysts (Shamsuddin & Rodriguez-Marting, 1994)

สถานที่ทดลอง

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และคณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร

การเก็บข้อมูล

การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนโคในอกร่างกายโดยบันทึกอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนในระยะ Zygotes และตัวอ่อนระยะ blastocyst ในวันที่ 8 อัตราการกลับมาพัฒนาภายหลังการแช่แข็งและทำละลาย และนำกลับมาเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน

แผนการดำเนินการทดลอง

การวิจัยประกอบไปด้วย การเสริม linoleic acid albumin (LAA) และ conjugated linoleic acid (CLA) ในน้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อนโคอายุตั้งแต่ 2-4 เซลล์ ต่ออัตราการพัฒนาสู่ระยะ blastocyst

1) การเสริม LAA ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนต่อการพัฒนาสู่ระยะ Blastocyst ใช้แผนการทดลองแบบ CRD นำรังไข่โคพื้นเมืองมาเจาะเก็บ oocyte ที่มีคุณภาพระดับ 1 และ 2 นำมาเลี้ยงในน้ำยา IVM ทำการปฏิสนธิกับอสุจิโคพื้นเมือง ตามวิธีการที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ภายหลังการปฏิสนธิ นำ Zygote มาเลี้ยงในน้ำยา IVC เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ขึ้นไปมาเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน *In vitro* culture (IVC) ที่มีส่วนผสมของ LAA (Sigma, L 9530) 0, 1, 2 และ 3 mg/ml เลี้ยงในตู้เลี้ยงตัวอ่อนแบบ Tri-gas เปลี่ยนน้ำยา IVC 50 % ทุก 2 วัน เก็บข้อมูลการพัฒจนถึงระยะ blastocyst ภายหลังการปฏิสนธิใน 8 วัน

2) การเสริม CLA ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนต่อการพัฒนาสู่ระยะ Blastocyst ใช้แผนการทดลองแบบ CRD นำรังไข่โคพื้นเมืองมาเจาะเก็บ oocyte ที่มีคุณภาพระดับ 1 และ 2 นำมาเลี้ยงในน้ำยา IVM ทำการปฏิสนธิกับอสุจิโคพื้นเมือง ตามวิธีการที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

ภายหลังการปฏิสนธิ นำ Zygote มาเลี้ยงในน้ำยา IVC เป็นเวลา 48 ชม. จากนั้นนำตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ขึ้นไปมาเลี้ยงในน้ำยาที่มีส่วนผสมของ CLA (Sigma, L05507) ระดับ 0, 0.1, 0.2 และ 0.3 มก/มล. วิธีการละลาย และเจือจางดำเนินการตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตเลี้ยงตู้ เลี้ยงตัวอ่อนแบบ tri-gas; 90 % N₂, 5 % O₂ และ 5 % CO₂ อุณหภูมิ 38.5 °ซ ความชื้น 99 % เปลี่ยนน้ำยา 50 % ทุก 2 วัน เก็บข้อมูลจำนวนตัวอ่อนที่พัฒนาถึงระยะ blastocyst เมื่ออายุ 8 วัน นับจากวันที่ทำการปฏิสนธิ

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองและข้อมูลทั้งหมดจะถูกนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance: Anova) ภายใต้การทดลองแบบ Randomize completed block design (RCBD) ระดับความเชื่อมั่น 95 % และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้วิธี Duncan's new multiple rang test (DMRT) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (1998)

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

ผลของการเสริม linoleic acid albumin (LAA) และ conjugated linoleic acid (CLA) ในน้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อนโคอายุตั้งแต่ 2-4 เซลล์ ต่ออัตราการพัฒนาสู่ระยะ blastocyst ของตัวอ่อนโคพื้นเมือง

1) ผลของการเสริม linoleic acid albumin ในน้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อนโคต่ออัตราการพัฒนาสู่ระยะ blastocyst ของตัวอ่อนโคพื้นเมือง พบว่าการเสริม linoleic acid albumin (LAA) ที่ระดับ 0 1 2 และ 3 มก/มล. ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนโคพื้นเมือง และลูกผสมพื้นเมืองบราห์มันตั้งแต่ระยะ 2 ถึง 4 เซลล์ขึ้นไปจนถึงระยะ blastocyst นั้น การเสริมในระดับ 2 และ 3 mg/ml ให้ผลต่ำกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เสริม 1 mg/ml ดังแสดงใน Table 1

Table 1 Effect of supplementation in embryos culture medium with linoleic acid albumin (LAA) on blastocyst embryo production rates (15 replications)

Treatment	No. of 2-4 cells embryos	% of oocytes developed to 8 days blastocyst ($\bar{x} \pm SD$)
Control (0 mg/ml)	215	31.1 $\pm$ 1.6 ^a
LAA (1 mg/ml)	220	31.3 $\pm$ 4.1 ^a
LAA (2 mg/ml)	225	26.4 $\pm$ 3.5 ^b
LAA (3 mg/ml)	209	25.6 $\pm$ 3.4 ^b
P-value		0.0081

^{a,b} Means within a column with different superscripts are statistically different (P<0.05).

1 mg LAA /ml was about 940 μ M.

2) ผลของการเสริม conjugated linoleic acid ในน้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อนโคระยะตั้งแต่ 2-4 เซลล์ ต่ออัตราการพัฒนาสู่ระยะ blastocyst ของตัวอ่อนโคพื้นเมือง พบว่าการเสริม conjugated linoleic acids (CLA) ที่ระดับ 0.1, 0.2 และ 0.3 mg/ml ในน้ำยา

เลี้ยงตัวอ่อนโคพื้นเมือง และลูกผสมพื้นเมืองบราห์มัน การเสริม CLA ในระดับ 0.2 และ 0.3 mg/ml ให้อัตราการพัฒนาของตัวอ่อนจนถึงระยะ blastocyst ที่ 8 วันภายหลังการปฏิสนธิ ต่ำกว่าการเสริมที่ระดับ 0.1 mg/ml และกลุ่มควบคุม ดังแสดงใน Table 2

Table 2 Effect of supplementation in embryos culture medium with conjugated linoleic acid (CLA) on blastocyst embryo production rates (15 replications)

Group	No. of ≥ 2 cells embryos	blastocyst Embryo (%)
Control		
0 mg CLA /ml	221	32.1 $\pm$ 4.8 ^a
0.1 mg CLA/ml	227	33.0 $\pm$ 3.3 ^a
0.2 mg CLA/ml	229	28.1 $\pm$ 3.9 ^b
0.3 mg CLA/ml	228	24.1 $\pm$ 3.8 ^c
P-value		0.007

^{a, b, c} Mean in the same column with different superscripts are statistically different (P< 0.05).

0.1 mg CLA/ml was about 357 μ M.

การผลิตตัวอ่อนโคภายใต้ห้องปฏิบัติการมีบทบาทมากขึ้นในการเป็นแหล่งตัวอ่อนที่จะนำไปเพิ่มประชากรโคพันธุ์ดีต่อไป โดยส่วนใหญ่ นำไปย้ายฝากยังแม่ตัวรับในรูปแบบตัวอ่อนสด ทั้งนี้เนื่องจากตัวอ่อนที่ผลิตภายใต้ห้องปฏิบัติการมีความไวต่อความเสียหายจากการแช่แข็ง เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อนที่มาจากแม่โคโดยตรง ซึ่งผ่านกระบวนการขยายพันธุ์โดยเทคโนโลยี superovulation ทั้งนี้เนื่องจากตัวอ่อนที่ผ่านการผลิตภายใต้ห้องปฏิบัติการมีปริมาณ lipid ภายในเซลล์สูง เมื่อทำการแช่แข็งและทำละลายตัวอ่อนจึงมีความเสียหายมากกว่าตัวอ่อนจากแม่โค จึงได้มีการศึกษาถึงการลด lipid droplet ในไข่ (oocyte) และตัวอ่อนโดยกรรมวิธีต่าง ๆ รวมถึงการเสริมสารในน้ำยาเลี้ยงซึ่งส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในโคตระกูลยุโรป ในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้ดำเนินการศึกษาโดยใช้ไข่จากโคพื้นเมืองและลูกผสมบราห์มันพื้นเมืองโดยทำการปฏิสนธิในห้องปฏิบัติการด้วยน้ำเชื้อโคพื้นเมือง

ผลของการเสริม LAA ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนตั้งแต่ 48 ชั่วโมง ภายหลังการปฏิสนธิ (ระยะประมาณ 2-4 เซลล์) ในระดับ 0, 1, 2, และ 3 mg/ml (1mg. ประมาณ 940 μ M LAA) จนถึงวันที่ 8 ภายหลังการปฏิสนธิ (ระยะ blastocyst) ซึ่งพบว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มที่เสริม LAA มีอัตราการพัฒนาสู่ระยะ blastocyst สูงกว่ากลุ่มที่เสริมในระดับ 2 และ 3 mg/ml แสดงให้เห็นว่าการเสริม LAA ในระดับที่สูงเกินไปไม่เป็นผลดีต่อการพัฒนาตัวอ่อน สอดคล้องกับรายงานของ Hochi et al. (1999) ซึ่งพบว่า LAA ที่ระดับสูงมีผลเสียต่อการพัฒนาของ blastocyst คาดว่าผลดังกล่าวน่าจะมีสาเหตุจาก lipid peroxide ซึ่งมาจาก linoleic acid มีผลกระทบต่อการแบ่งเซลล์ โดยมีรายงานว่า polyunsaturated fatty acid (รวมถึง LAA) ชัดขวางการแบ่งเซลล์ระยะ 1 ถึงระยะ 2 เซลล์ของตัวอ่อนหนูซึ่งเมื่อมีการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนพบว่าสามารถลดปัญหานี้ได้ (Nonogaki et al. 1994) สอดคล้องกับ Hendrikx (2016) ซึ่งรายงานว่าน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนที่มี linoleic acid ทำให้การพัฒนาของตัวอ่อนไปยังระยะ blastocyst ลดลง

จากการเสริม CLA ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนช่วงระยะ 2-4 เซลล์ (หลังการปฏิสนธิ 48 ชม.) ต่อการพัฒนาจนถึงระยะ blastocyst โดยทำการเสริมที่ระดับ 0, 0.1, 0.2 และ 0.3 mg/ml (0.1 mg/ml ประมาณ 357 μ M) พบว่าการเสริม CLA ระดับ 0 และ 0.1 mg/ml ให้อัตราของการพัฒนาสู่ระยะ blastocyst ที่ 8 วัน ภายหลังการปฏิสนธิ สูงกว่า ระดับ 0.2 และ 0.3 mg/ml นอกจากนี้ Absolon-Medina et al. (2014) รายงานว่าการเสริม CLA ชนิดเดียวกันนี้ที่ระดับ 100 μ M ไม่มีผลต่ออัตราการพัฒนาของตัวอ่อนจนถึงระยะ blastocyst และยังได้รายงานว่าการเสริม CLA ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนระดับ 20-200 μ M เป็นระยะเวลายาวนานมีผลเสียต่อคุณภาพตัวอ่อน ในการศึกษาทำการเสริม CLA ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนระหว่างอายุ 2-8 วันซึ่งค่อนข้างยาวนานจึงอาจส่งผลเสียต่อการพัฒนาตัวอ่อนได้ ผลการเสริม LAA และ CLA ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนตามระดับความเข้มข้นระดับที่ทำการศึกษานี้ จึงไม่ได้ให้ผลผลิต blastocyst แตกต่างจากกลุ่มควบคุมและมีผลเสียเมื่อใช้ความเข้มข้นที่สูง แต่หากเสริม LAA สูงถึง 0.3 % ก็มีผลต่อ lipid bilayer โดยทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความยืดหยุ่นสูงขึ้น เป็นการปรับปรุงองค์ประกอบของเนื้อเยื่อหุ้มเซลล์ได้ (Hochi et al., 1999) นอกจากนี้ Leao et al. (2015) ได้รายงานว่าการเสริม CLA ซึ่งมีส่วนผสมระหว่าง trans-9, 11 และ 10, 12-CLA isomer ทั้งในระยะ IVM ซึ่งเป็นช่วงการพัฒนาจนสมบูรณ์ของไข่ ก่อนที่จะนำไปปฏิสนธิ และระยะ IVM + IVC (ระยะเป็นไข่-หลังปฏิสนธิ-เป็นตัวอ่อน จนถึง blastocyst) นอกจากนี้ แสดงให้เห็นว่าการเสริม CLA ไปมีผลลดปริมาณ lipid ใน เซลล์ไข่และตัวอ่อน (Pereira et al., 2007) อีกทั้งไปเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ (Leao et al., 2015) และอีกประการหนึ่ง มีรายงานว่าไข่ของโคตระกูลอินเดียนมีปริมาณ lipid droplet สูงกว่าโคตระกูลยุโรป (Ballard et al., 2006 ; Pereira et al., 2016; Lopez-Damian et al., 2018) ตลอดจนโคพื้นเมืองและลูกผสมบราห์มันพื้นเมือง ซึ่งเป็นแหล่งของไข่ที่ทำการศึกษานี้จัดเป็นกลุ่มที่มีไขมันในไข่ (oocyte) สูง

ผลการศึกษาพบว่าอัตราการรอดของตัวอ่อนไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ ซึ่งการศึกษาของนักวิจัยท่านอื่นนั้น Hochi et al. (1999) ได้รายงานว่าการเสริม sericin ตั้งแต่ระยะ zygote มีผลต่อตัวอ่อนระยะ Morula

จากรายงานการศึกษาแสดงให้เห็นถึงผลของการเสริม tran -10, cis-12 CLA ในน้ำยา IVM ส่งผลดีต่อคุณภาพไข่ภายหลังการปฏิสนธิ (Matos et al., 2015; Collade et al., 2015) รวมถึงผลดีของการเสริมในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนตั้งแต่ระยะ zygote (Perera et al., 2007) แต่การศึกษาของ Absolon-Medina et al., (2014) ซึ่งศึกษาผลของการเสริม CLA ชนิด cis-9, tran -11 และ tran -10, cis-12 ทั้งระดับและช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ของการพัฒนาตั้งแต่ระยะ oocyte จนถึงระยะ blastocyst ต่อคุณภาพตัวอ่อนโดยระบุว่า cis-9, tran-11 เท่านั้น และรายงานนี้ชี้ให้เห็นว่า การเสริม cis-9, tran-11 ในระยะเวลานานไม่ควรใช้ความเข้มข้นสูงแต่หากเสริมในระยะ 36 ชั่วโมงสุดท้ายควรเสริมในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น ผลการศึกษารังนี้ซึ่งแตกต่างจากรายงานอื่นอาจเนื่องมาจากระดับการเสริมสารที่ต่างกันและเหตุผลแวดล้อมอื่น ๆ ต่างกัน ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น

นอกจากนี้ จากการศึกษา fatty acid เช่น oleic acid (Adema et al., 2011; Karasahin, 2019) รายงานว่ามีผลดีต่อตัวอ่อนมากกว่า linoleic acid และมีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับ cryotolerance (Absalon – Medina et al., 2014) และในน้ำยา IVM ควรเสริม FBS ระดับประมาณ 5 % เนื่องจาก ซีรัม มีผลต่อการสะสมปริมาณ lipid ในตัวอ่อน

สรุปผลการวิจัย

การศึกษถึงการปรับปรุงการพัฒนาของตัวอ่อนโคพื้นเมืองและบราห์มันลูกผสมพื้นเมืองพบว่า ผลของการเสริม Linoleic acid albumin (LAA) ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนตั้งแต่ 48 ชั่วโมง ภายหลังการปฏิสนธิ (ระยะประมาณ 2-4 เซลล์) ในระดับ 0 1 2 และ 3 mg/ml (1 มก. ประมาณ 940 µM LAA) จนถึงวันที่ 8 ภายหลังการปฏิสนธิ (ระยะ blastocyst) ซึ่งพบว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มที่เสริม LAA มีอัตราการพัฒนาสู่ระยะ blastocyst สูงกว่ากลุ่มที่เสริมในระดับ 2 และ 3 mg/ml แต่อัตราการรอดของตัวอ่อนไม่แตกต่างกันระหว่างปัจจัย ส่วนการเสริม CLA ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน ระยะ 2-8 วัน ภายหลังการปฏิสนธิ ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนระยะ blastocyst

นอกจากนี้จากการศึกษารังนี้เป็นการศึกษาถึงการปรับปรุงการพัฒนาของตัวอ่อนโคพื้นเมืองและบราห์มันลูกผสมพื้นเมือง โดยรังไข่ที่นำมาศึกษาได้จากโรงฆ่าสัตว์ท้องถิ่น ซึ่งแม่โคที่ถูกนำมาเข้าสู่โรงฆ่าสัตว์นั้น ส่วนใหญ่เป็นพวกที่มีอายุมากและเป็นแม่โคที่ถูกคัดทิ้งจากปัญหาทางการสืบพันธุ์ จึงอาจเป็นสาเหตุพื้นฐานที่ทำให้ไขมีคุณภาพ

แปรปรวน แม้ว่าจะมีการคัดเลือกก่อนนำมาใช้ในขั้นตอน IVM แล้วก็ตาม ในการศึกษาได้ใช้ระดับ LAA และ CLA ที่ใกล้เคียงกับการศึกษาแต่สูงกว่าบางรายงานของนักวิจัยอื่น แต่แหล่งที่มาของ oocyte มีความแตกต่างกันโดยรายงานเกือบทั้งหมดเป็นการศึกษาในท้องถิ่นที่มีการเลี้ยงโค *Bos taurus* ซึ่งไขของโคกลุ่มดังกล่าวมีไขมันต่ำกว่า ไขของกลุ่ม *Bos indicus* ซึ่งโคพื้นเมืองไทยเป็นสายพันธุ์ย่อยในกลุ่ม *Bos indicus* จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผลที่ได้ในการศึกษานี้มีผลแตกต่างกับการศึกษาอื่น จากสายพันธุ์สัตว์ที่มีความแตกต่างกันกับการศึกษาอื่น ดังนั้นหากมีผู้สนใจที่มีความประสงค์จะทำการศึกษาเมื่อปรับปรุงคุณภาพตัวอ่อนของโคกลุ่มโคพื้นเมืองไทยหรือลูกผสมพื้นเมืองไทย

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนโครงการวิจัยทุนทั่วไปมหาวิทยาลัยขอนแก่น และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยศิลปากรที่ช่วยสนับสนุนการวิจัยให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

References

- Absalon-Medina, V. A., Bedford-Guaus, S. J., Gilbert, R. O., Siqueira, L. C., Esposito, G., Schneider, A., Cheong, S. H., & Butler, W. R. (2014). The effects of conjugated linoleic acid isomers cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 on *in vitro* bovine embryo production and cryopreservation. *Journal of Dairy Science*, 97(10), 6164-6176. doi: 10.3168/jds.2013-7719
- Aderma, H., Vos, P. L. A. M., Lolicato, F., Roelen, B. A. J., Knijn, H. M., Vaandrager, A. B., Helms, J. B., & Gadella, B. M. (2011). Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. *Biology Reproduction*, 85(1), 62-69. doi: 10.1095/biolreprod.110.088815
- Ballard, C. B., Looney, C. R., Linsey, B. R., Pryor, J. H., Lynn, J. W., Bondioli K. R., & Godke, R. A. (2006). Using a buoyant density gradient and Nile red staining to evaluate the lipid content of *Bos taurus* and *Bos indicus* oocytes. *Reproduction Fertility and Development*, 19(1), 170-171. doi:10.1071/RDv19n1Ab106
- Chasombat, J., Vongpralub, T., Sirisathien, S., Phasuk, Y., & Sonseeda, P. (2015). Vitrification of Thai native cattle oocytes: effect of ethylene glycol concentrations and exposure time, linoleic acid albumin and cholesterol- loaded methyl- β -cyclodextrin. *Cryoletters*, 36(3), 165-173.

- Collado, M. D., Saraiva, N. Z., Lopes, F. L., Gaspar, R. C., Padilha, L. C., Costa, R. R., Rossi, G. F., Vantini, R., & Garcia, J. M. (2015). Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during in vitro maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(11) , 1721- 1732. doi. : 10.1071/RD15067
- Hendrikx, A. L. (2016) . *Lipid modifications to improve cryopreservation of bovine in vitro produced oocytes and embryos*. (Doctoral dissertation). Utrecht, the Netherlands: Honors Programme Veterinary Medicine, Utrecht University.
- Hochi, S., Kimura, K., & Hanada, A. (1999). Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of *in vitro*- produced bovine morulae. *Theriogenology*, 52(3), 497-504. doi:10.1016/S0093-691X(99)00146-6
- Karasahin, T. (2019). The effect of oleic and linoleic acid addition to the culture media on bovine embryonic development following vitrification. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 22(4), 661-666. doi: 10.24425/pjvs.2019.129978
- Leão, B. C. S., Rocha- Frigoni, N. A. S, Cabral, E. C., Coelho, M. B., Ferreira, C. R., Eberlin, M. N., Accorsi, M. F., Nogueiro, É., & Mingoti, G. Z. (2015). Improved embryonic cryosurvival observed after *in vitro* supplementation with conjugated linoleic acid is related to changes in the membrane lipid profile. *Theriogenology*, 84(1), 127- 136. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.02.023
- López-Damián, E. P., Jiménez-Medina, J. A., Lammoglia, M. A., Pimentel, J. A., Agredano-Moreno, L. T., Wood, C., Galina, C. S., & Fiordelisio, T. (2018). Lipid droplets in clusters negatively affect *Bos indicus* embryos during cryopreservation. *Anatomia Histologia Embryologia*. 47(5), 435-443. doi: 10.1111/ahc.12382
- Matos, J. E., Marques, C. C., Moura, T. F., Baptista, M. C., Horta, A. E. M., Soveral, G., & Pereira, R. M. L. N. (2015). Conjugated linoleic acid improves oocyte cryosurvival through modulation of the cryoprotectants influx rate. *Reproduction Biology and Endocrinology*, 13,(1), 1-8. doi: 10.1186/s12958-015-0059-3
- Merton, J. S., de Roos, A. P. W., Mulaart, E., de Ruigh, L., Kaal, L., Vos, P. L. A. M., & Dieleman S. J. (2003). Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, 59(2) , 651- 674. doi: 10.1016/S0093-691X(02)01246-3
- Nonogaki, T., Noda, Y., Goto, Y., kishi, J., & Mori, T. (1994). Developmental blockage of mouse embryos caused by fatty acids. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 11(9), 482-488. doi: 10.1007/BF02215713
- Pereira, L. C., Ferreira-Silva, J. C., Cantanhede, L. F., Neto H. F. V., Andrade J. C., Souza, B. P. de A., Moura, M. T., & Oliveira, M. A. L. (2016). Viability of *in vitro* produced embryos of gyr cattle (*Bos indicus*) after cryopreservation by vitrification under field conditions. *Boletim de Indústria Animal*, 73(2),159-164. doi: 0.17523/bia.v73n2p159
- Pereira, R. M., Baptista, M. C., Vasques, M. I., Horta, A. E. M., Portugal, P. V., Bessa, R. J. B., Silva, C. E., Pereira, M. S., & Marques, C. C. (2007). Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid. *Animal Reproduction Science*, 98(3-4), 293- 301. doi: 10.1016/j.anireprosci.2006.03.015
- Pereira, R. M., Carvalhais, I., Pimenta, J., Baptista, M. C., Vasques, M. I., Horta, A. E. M., Santos, I. C., Marques, M. R., Reis, A., Silva Pereira, M., & Marques, C. C. (2008). Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by trans10, and cis12 conjugated linoleic acid supplementation during in vitro embryos culture. *Animal Reproduction Science*, 106(3-4), 322-332. doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.05.008
- Perry, G. (2013). Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. Accessed July 2, 2024. Retrieved from <https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/December2014.pdf>
- Rosenkrans, C. F. J., Zeng, G. Q., McNamara, G. T., Schoff, P. K., & First, N. L. (1993). Development of bovine embryo *in vitro* as affected by energy substrates. *Biology of Reproduction*, 49(3), 459-462. doi: 10.1095/biolreprod49.3.459
- Statistical Analysis System (SAS). (1998). *SAS/STAT user' guide*. North Carolina, United States: SAS Institute Inc.
- Shamsuddin, M., & Rodriguez – Martinez, H. (1994). A simple, non-traumatic swim-up method for the selection of spermatozoa for *in vitro* fertilization in the bovine. *Animal Reproduction Science*, 36(1-2), 61-75. doi: 10.1016/0378-4320(94)90054-X

- Viana, J. (2019). *The international embryo transfer society data retrieval committee 2018, statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animal*. Accessed July 2, 2024. Retrieved from <https://www.iets.org/>

Research article

Effect of supplementing culture medium with linoleic acid albumin and conjugated linoleic on blastocyst embryo production rates

Phirawit Chuawongboon^{1*} Dumrongruk Rakwongrit² Sujira Thummawung³ and Thevin Vongpralub²

¹Faculty of Animals Sciences and Agricultural Technology, Slipakorn University, Phetchaburi IT Campus District, Cha-am District, Phetchaburi Province, Thailand 76120

²Department of Animal Science, Faculty of Agricultural, Khon Kaen University, Khon Kaen Province, Thailand 40002

³Saraburi Artificial Insemination and Biotechnology Research Center, Kaeng Khoi District, Saraburi Province, Thailand 18620

ARTICLE INFO**Article history**

Received: 29 April 2024

Revised: 3 June 2024

Accepted: 3 September 2024

Online published: 18 September 2024

Keyword

Unsaturated fatty acid

Embryo

Native cattle

ABSTRACT

The objective of the present study was to improve the culture medium and the survival rates of in vitro-produced blastocyst embryos from native cattle. The effects of supplementing the culture medium with linoleic acid albumin (LAA) (0, 1, 2, and 3 mg/ml) and conjugated linoleic acid (CLA) (0, 0.1, 0.2, and 0.3 mg/ml) on the production rates of 2- to 4-cell embryos to D8 blastocyst embryos and on the survival rates of vitrified blastocyst embryos were evaluated. The results showed that the blastocyst rates in the LAA 0 mg and 1 mg groups were higher than in the 2 mg and 3 mg groups ($P<0.05$), and the CLA 0 mg and 0.1 mg groups were higher than the 0.2 mg and 0.3 mg groups ($P<0.05$). In conclusion, this study demonstrated that supplementation with LAA and CLA in the embryo medium from day 2 to day 8 had no beneficial effect on blastocyst embryo production in native cattle.

*Corresponding author

E-mail address: chuawongboon_p@su.ac.th (P. Chuawongboon)

Online print: 18 September 2024 Copyright © 2024. This is an open access article, production, and hosting by Faculty of Agricultural Technology, Rajabhat Maha Sarakham University. <https://doi.org/10.14456/paj.2024.38>