เทคโนโลยีการผลิตตัวอ่อนนอกร่างกาย (in vitro embryo production) ในแมวบ้าน ถือเป็นต้นแบบที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อการอนุรักษ์ในสัตว์ป่าตระกูลแมว ซึ่งการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลการใช้ไบรลิแอนท์ คริซิล บลู (brilliant cresyl blue; BCB) ในการคัดเลือกโอโอไซต์ ควบคู่กับการเสริมอิพิเดอร์มอล โกรทแฟคเตอร์ (epidermal growth factor; EGF) ในน้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ เพื่อเพิ่มความสามารถในการพัฒนาของโอโอไซต์ให้สมบูรณ์เต็มที่ อันจะส่งผลดีต่อการปฏิสนธินอกร่างกาย (in vitro fertilization; IVF) และการเพาะเลี้ยงตัวอ่อน (in vitro culture; IVC) ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น โดยใช้โอโอไซต์ทั้งหมดจำนวน 417 ใบ และแบ่งออกเป็น 2 การทดลอง เพื่อใช้ในการศึกษา ดังต่อไปนี้

การทดลองที่ 1 ผลของการเสริม EGF ต่อความสมบูรณ์พร้อมปฏิสนธินอกร่างกายของโอโอไซต์แมวบ้าน โดยใช้โอโอไซต์จำนวนทั้งหมด 156 ใบ แบ่งเป็น 3 กลุ่มการทดลองๆ ละ 52 ใบ ตามความแตกต่างของ EGF ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ไม่เสริม EGF, กลุ่มที่ 2 เสริม EGF ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และกลุ่มที่ 3 เสริม EGF ความเข้มข้น 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการศึกษาพบว่าสัดส่วนของโอโอไซต์ที่เกิดโพลาร์บอดี้ที่ 1 (first polar body) ในกลุ่มที่ไม่เสริม EGF น้อยกว่า กลุ่มที่เสริม EGF ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และกลุ่มที่เสริม EGF ความเข้มข้น 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) คือ 3.8, 17.3 และ 19.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) ระหว่างกลุ่มที่เสริม EGF ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และกลุ่มที่เสริม EGF ความเข้มข้น 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร การประเมินด้าน meiotic status พบว่าสัดส่วนของโอโอไซต์ระยะเทโลเฟสที่ 1 หรือเมทาเฟสที่ 2 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) ระหว่างกลุ่มการทดลอง อย่างไรก็ตามสัดส่วนของโอโอไซต์ในระยะเจมินอลเวสซิเคิลของกลุ่มที่ไม่เสริม EGF สูงกว่ากลุ่มที่เสริม EGF ความเข้มข้น 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) คือ 13.5 และ 0.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การทดลองที่ 2 ผลของการคัดเลือกโอโอไซต์แมวบ้านด้วย BCB และการเสริม EGF ต่อความสามารถในการพัฒนาความสมบูรณ์พร้อมปฏิสนธินอกร่างกาย โดยใช้โอโอไซต์จำนวนทั้งหมด 261 ใบ แบ่งเป็น 4 กลุ่มการทดลอง ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ติดสี BCB และเสริม EGF ความเข้มข้น 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร, กลุ่มที่ 2 ติดสี BCB และไม่เสริม EGF, กลุ่มที่ 3 ไม่ติดสี BCB และเสริม EGF ความเข้มข้น 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และกลุ่มที่ 4 ไม่ติดสี BCB และไม่เสริม EGF ผลการศึกษาจำนวนและสัดส่วนโอโอไซต์ที่มีการแบ่งตัวและสามารถพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะต่างๆ หลังการปฏิสนธิ พบว่าสัดส่วนของตัวอ่อนที่มีการแบ่งตัวทั้งหมดในกลุ่มติดสี BCB และเสริม EGF สูงกว่ากลุ่มไม่ติดสี BCB และเสริม EGF และกลุ่มไม่ติดสี BCB และไม่เสริม EGF อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) คือ 40.2, 22.0 และ 14.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มติดสี BCB และไม่เสริม EGF สูงกว่ากลุ่มไม่ติดสี BCB และไม่เสริม EGF อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) คือ 37.1 และ 14.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สัดส่วนของตัวอ่อนที่แบ่งตัวถึงระยะมอรูล่าในกลุ่มที่ติดสี BCB และเสริม EGF สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ติดสี BCB และไม่เสริม EGF อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) คือ 12.2 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่สัดส่วนของตัวอ่อนที่แบ่งตัวถึงระยะบลาสโตซิส และสัดส่วนของตัวอ่อนระยะบลาสโตซิส ต่อจำนวนของตัวอ่อนที่มีการแบ่งตัวทั้งหมดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ระหว่างกลุ่มการทดลอง

จากการศึกษาสรุปได้ว่าการคัดเลือกโอโอไซต์ด้วยสี BCB ร่วมกับการเสริม EGF ที่ระดับความเข้มข้น 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลดีต่อการพัฒนาความสมบูรณ์พร้อมปฏิสนธิ (in vitro maturation; IVM) และต่อความสามารถในการพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนของโอโอไซต์แมวบ้าน

In vitro embryo production (IVP) in domestic cats is a model that can be applied to the wild felid conservation. The aim of this study was to determine the effects of oocyte selection with brilliant cresyl blue (BCB) and supplementation of oocyte maturation medium (OMM) with epidermal growth factor (EGF), on developmental competence of oocytes after in vitro fertilization (IVF) and in vitro culture (IVC). The total of 417 oocytes recovered by ovarian slicing were carried out under 2 experiments.

Experiment 1 was to study the effects of EGF supplementation on in vitro maturation of domestic cat oocytes. The total of 156 oocytes were randomly divided into three groups with different EGF concentrations; group 1 without EGF (control), group 2 with 10 ng/mL EGF, and group 3 with 25 ng/mL EGF. The results showed that the percentage of oocytes with the 1$^{st}$ polar body (PB) of control group was significantly ($p<0.05$) lower than that of 10 ng/mL and 25 ng/mL group (3.8, 17.3, and 19.2%, respectively) but no difference between 10 ng/mL and 25 ng/mL group ($p>0.05$). The percentage of oocytes in telophase I (TI) or metaphase II (MII) stage were not difference among groups ($p>0.05$). However, the percentage of oocytes in germinal vesicle (GV) stage of control group was significantly ($p<0.05$) higher than that of 25 ng/mL group (13.5 and 0.0% respectively).

Experiment 2 was to study the effects of EGF supplementation on developmental competence of domestic cat oocytes after selection with BCB. The total of 261 oocytes were randomly divided into four groups with ooplasm coloration of BCB and different EGF concentrations; group 1 blue ooplasm (BCB+)/with EGF (25 ng/mL), group 2 BCB+/without EGF (0 ng/mL), group 3 colorless ooplasm (BCB-)/with EGF, and group 4 BCB-/without EGF. The results showed that the percentage of cleavage was significantly ($p<0.05$) higher in BCB+/with EGF group than that of BCB-/with EGF and BCB-/without EGF group (40.2, 22.0, and 14.0% respectively). The percentage of cleavage in BCB+/without EGF group was significantly ($p<0.05$) higher than that of BCB-/without EGF group (37.1 and 14.0 %). The percentage of morula in BCB+/with EGF was significantly ($p<0.05$) higher than that of BCB-/without EGF group (12.2 and 2.0% respectively). No difference in percentage of blastocyst and blastocyst per clevage among groups.

In conclusion, our results indicated that the combination of oocyte selection with BCB (BCB+ group) and supplementation of OOM with 25 ng/mL EGF has improved the in vitro maturation and developmental competence of domestic cat oocytes.