การประเมินคุณภาพของตัวอ่อนจากการปฏิสนธิด้วยวิธีทำการทำเด็กหลอดแก้ว

สุวรรธณา แย้มโตนด

การทำเด็กหลอดแก้วเป็นเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ที่ช่วยให้คู่สมรสที่มีภาวะมีบุตรยากสามารถมีบุตรได้ โดยการนำไข่และอสุจิออกมาปฏิสนธินอกร่างกายภายในห้องปฏิบัติการที่ได้มาตรฐานตามหลักวิทยาศาสตร์ โดยทีมแพทย์ นักวิทยาศาสตร์ พยาบาลและบุคลากรสหสาขาวิชาชีพที่เกี่ยวข้อง จากนั้นจึงนำไข่ที่ได้รับการผสมและเลี้ยงให้เป็นตัวอ่อนแล้วย้ายกลับเข้าไปในโพรงมดลูกของฝ่ายหญิงร่วมกับการให้ฮอร์โมนพยุงเยื่อบุโพรงมดลูกเพื่อให้เกิดการตั้งครรภ์

ในปัจจุบันนี้การทำเด็กหลอดแก้วได้มีเทคโนโลยีใหม่ๆ ที่พัฒนาอยู่อย่างต่อเนื่อง แต่วิธีที่เรานิยมใช้มี 2 วิธีได้แก่ IVF (*In Vitro* Fertilization) และ ICSI (Intracytoplasmic Sperm injection)

ข้อแตกต่างของสองวิธีนี้คือ IVF จะเป็นการนำอสุจิที่เคลื่อนไหวจำนวน 30,000 ตัว/ml ผสมกับไข่แล้วทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง ซึ่งเป็นการปล่อยให้อสุจิผสมกับไข่เองตามธรรมชาติ แล้วจึงนำไข่มาแยกเอา cumulus cells ออกเพื่อตรวจการปฏิสนธิภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ส่วนการทำ ICSI จะคัดเอาเชื้ออสุจิแข็งแรงเพียงตัวเดียว แล้วใช้เข็มแก้วที่มีศูนย์กลางขนาดเล็กดูดอสุจิไว้ แล้วเจาะเปลือกไข่เพื่อฉีดอสุจิเข้าไปในเซลล์ไข่โดยตรงภายใต้กล้องจุลทรรศน์

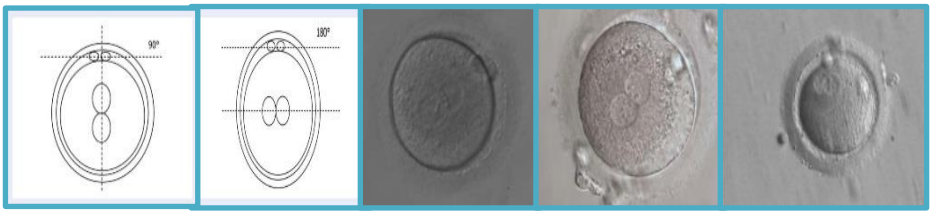
หลังจากที่เกิดการปฏิสนธิระหว่างไข่กับอสุจิเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ทางนักวิทยาศาสตร์เพาะเลี้ยงตัวอ่อนจะตรวจการปฏิสนธิ ไข่ที่มีการปฏิสนธิปกติจะมี 2 pronuclei และ 2 polar bodies Cytoplasm มักมีลักษณะหยาบอาจจะมี clear halo ที่ด้านนอก ในขณะที่ด้านในมี clustering ของ mitochondria เห็นเป็น granularity มากขึ้น ในขณะไข่ใบที่ไม่ถูกปฏิสนธิจะมีลักษณะเรียบเท่าๆกันหมด และประมาณ 5% ของไข่ที่ถูกผสมอาจจะเกิดการปฏิสนธิที่ผิดปกติได้ เช่น 3PN หรือมากกว่า

การประเมินคุณภาพของตัวอ่อนระยะ 2PN (Day1) แบ่งได้เป็น 3 เกรด คือ

เกรด 1 (Symmetrical) Pronuclei ลักษณะสมมาตร โดยเห็น nucleolus precursor bodies (NPBS) จำนวน 2-7 อันเรียงตัวชิดขอบ pronuclei หรือกระจายตัวอยู่ทั้งสอง pronuclei

เกรด 2 (asymmetrical) NPBS ใน pronuclei ทั้งสองจะอยู่ในตำแหน่งไม่สมมาตรกัน เช่น pronucleus อันหนึ่งอยู่ชิดขอบ อีกอันหนึ่งอยู่กระจายตัว

เกรด 3 (abnormal) ได้แก่ Bull's eye คือ pronucleus อันหนึ่งหรือทั้งสองอันมี NPB เพียงอันเดียวเท่านั้น ทั้งสอง PNs ยังอยู่บริเวณขอบของตัวอ่อน แทนที่จะเคลื่อนไปอยู่ในกลางของตัวอ่อน และ Ghost PN จะเห็น 2 pronuclei ที่ภายในว่างเปล่า ไม่มี NPBs



รูปที่ 1 : **Pronuclear morphology**

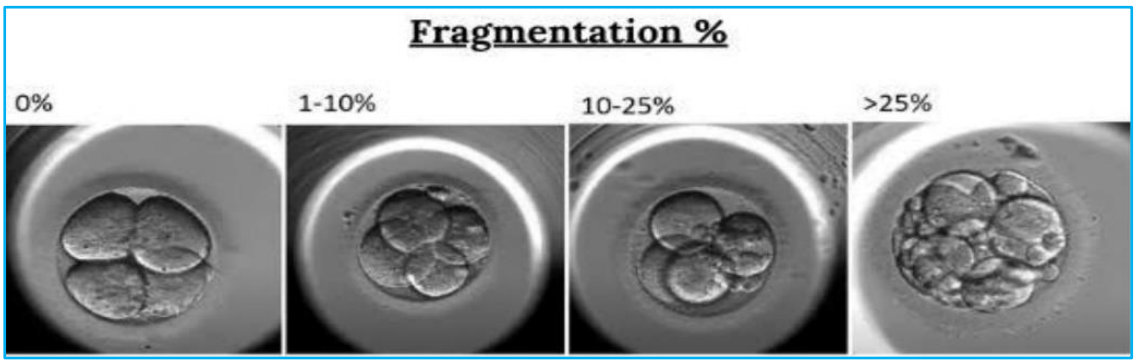
<u>ตัวอ่อนระยะ Cleavage stage (Day2-Day3)</u> ตัวอ่อนที่ดีจะพัฒนาเป็นระยะ 4 เซลล์ในวันที่ 2 และ 8 เซลล์ ในวันที่ 3 หากตัวอ่อนตัวใดที่แบ่งตัวช้ากว่าที่ควร อาจมีศักยภาพในการฝังตัวน้อย ส่วนตัวอ่อนที่แบ่งตัวเร็วกว่าที่ควรอาจจะเป็นตัวอ่อนที่มีโครโมโซมผิดปกติได้เช่นกัน

ตามการแบ่งเกณฑ์ตัวอ่อนระยะ Cleavage stage ของ Istanbul consensus นั้นได้ใช้รูปแบบการรายงานเรียงลำดับคือจำนวนเซลล์และเกรด โดยกำหนดเกรดตาม fragmentation โดย Istanbul แบ่งตัวอ่อนระยะ Cleavage stage เป็น 3 เกรด

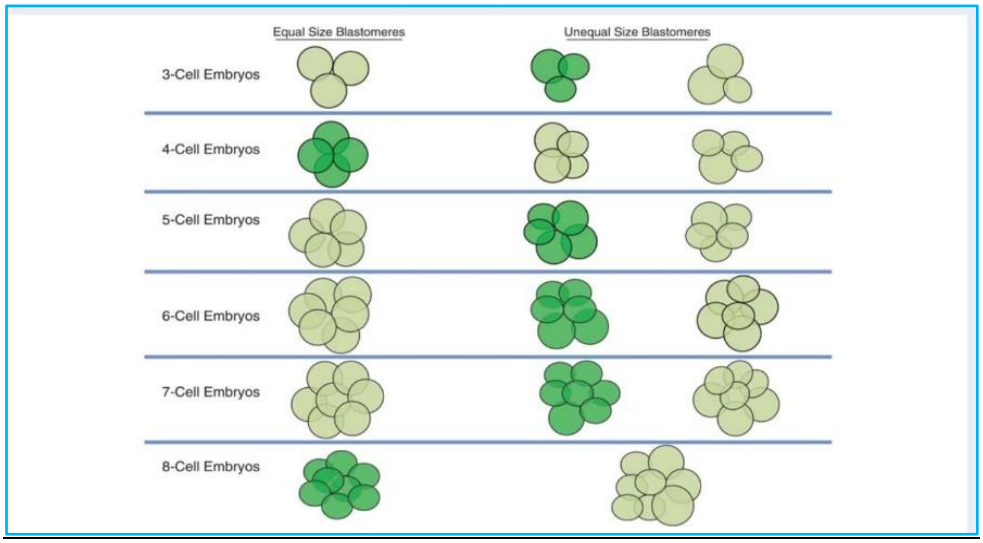
เกรด 1 Good ; ตัวอ่อนมี fragmentation <10 %, ขนาดของ blastomeres เท่ากัน และไม่มี multi-nucleation

เกรด 2 Fair ; ตัวอ่อนมี fragmentation 10-25 %, ขนาดของ blastomeres เท่ากัน และไม่มี multi-nucleation

เกรด 3 Poor ; ตัวอ่อนมี fragmentation >25 %, ขนาดของ blastomeres ไม่เท่ากัน และมี multi-nucleation



รูปที่ 2 : **รูป % Fragment ในตัวอ่อนระยะ Cleavage stage**



รูปที่ 3 : ESHERE atlas. Available at www.eshre.org

ตัวอ่อนระยะ Morula stage (Day4)

ระยะ Morula หรือ Compaction จะเริ่มมีการรวมตัวกันของเซลล์จากประมาณ 8 เซลล์ ในวันที่ 4 หรือประมาณ 92±2 ชั่วโมงหลังจากการปฏิสนธิ เซลล์ควรจะมีการรวมกันให้ครบทุกเซลล์ หากมี blastomeres ที่ไม่รวมกันจำนวนมากอาจจะส่งผลให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซม รวมทั้งอาจมีถึงผลการตั้งครรภ์ที่ต่ำได้อีกด้วย โดยแบ่งออกเป็น 3 เกรด ดังนี้

เกรด 1 Good ; ตัวอ่อนเข้าสู่ 4thCleavage division คือมี ≥16 เซลล์ และมีลักษณะของเซลล์ที่พยายามจะรวมตัวกันที่เรียกว่า compaction เกิดขึ้นตลอดทั้งตัวอ่อน

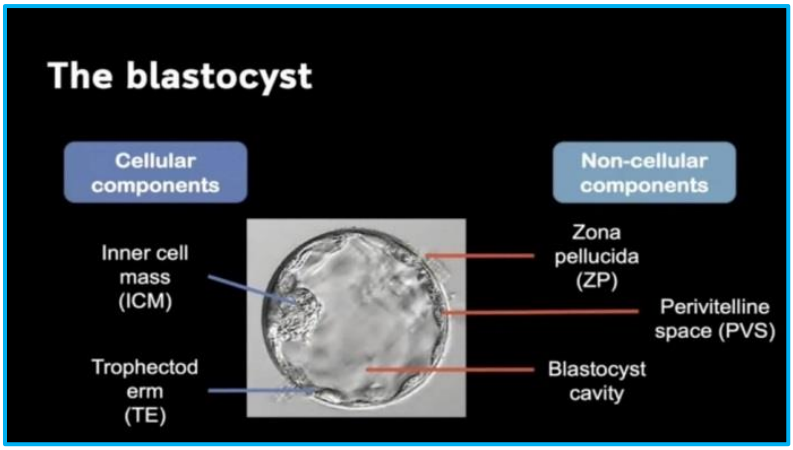
เกรด 2 Fair ; Cell มีการ compaction ≥4 เซลล์ขึ้นไป เกิดขึ้นตลอดทั้งตัวอ่อน แต่มี 1 blastomere ที่ถูกรวมเข้าไป

เกรด 3 Poor ; Cell มีการ compaction คล้ายเกรด Fair แต่มี blastomere ที่ไม่รวมเข้าไป ≥2-3 เซลล์ขึ้นไป compaction ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน

รูปที่ 4 : รูปตัวอ่อน Good –(ซ้าย), fair-(กลาง) และ poor-quality morula (ขวา)

ตัวอ่อนระยะ Blastocyst (Day5)

ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิส (Blastocyst) เป็นตัวอ่อนที่เกิดจากการปฏิสนธิของไข่และอสุจิและเลี้ยงในห้องปฏิบัติการมา 5-6 วัน และมีจำนวนเซลล์ 80-120 เซลล์ขึ้นไป ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสมีวิธีการแบ่งเกรดของตัวอ่อนเป็นตัวเลข 3 ตัวได้แก่ ระยะของตัวอ่อน เกรดของ Inner Cell mass (ICM) และเกรดของ Trophectoderm cell (TE) โดยเกณฑ์การแบ่งที่นิยมกันจะใช้นิยามของ Istanbul consensus, 2011 และ Gardner, 1999 ดังแสดงรายละเอียดตามรูปด้านล่าง



รูปที่ 5 : รูปแสดงตัวอ่อนระยะ Blastocyst

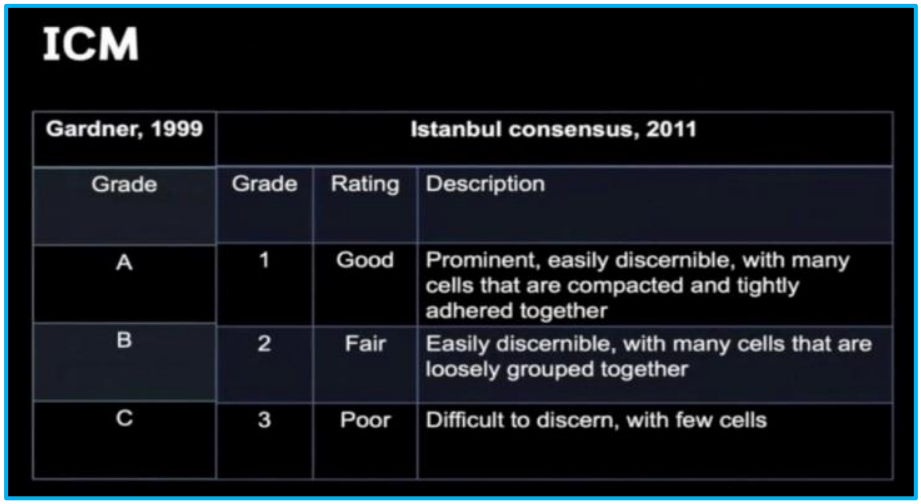
1. เลขตัวที่ 1 แสดงระยะพัฒนาการของตัวอ่อน ตาม Istanbul consensus,2011 แบ่งตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสออกเป็นทั้งหมด 6 ระยะ ส่วน Gardner, 1999 แบ่งออกเป็น 4 ระยะ ตามรูปข้างล่าง

Stage of development

Gardner, 1999		Istanbul consensus,2011	
Grade	Description	Grade	Description
1	Early blastocyst (Blastocoel < 50% of the volume)	1	Early
2	Blastocyst (Blastocoel ≥ 50% of the volume)		
3	Full blastocyst	2	Blastocyst
4	Expanded blastocyst	3	Expanded
5	Hatching blastocyst	4	Hatched/hatching
6	Hatched blastocyst		

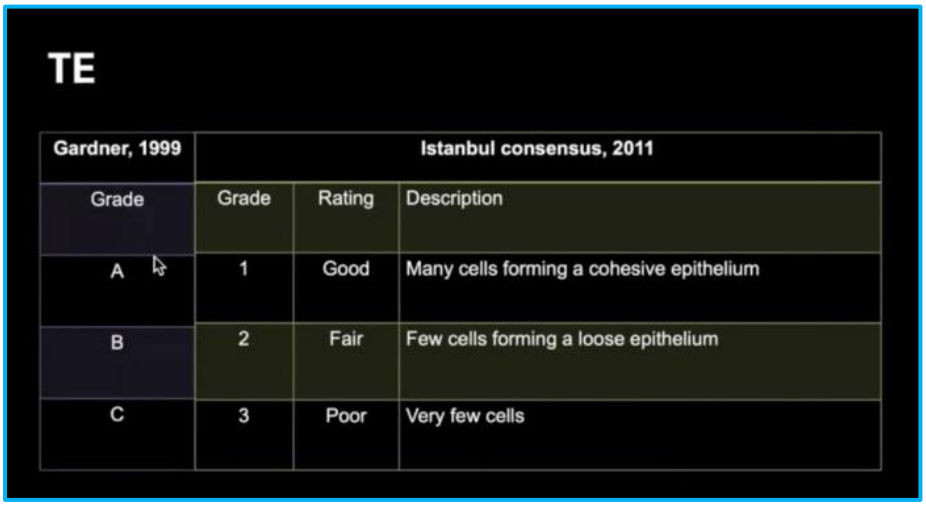
รูปที่ 6 : รูปแสดงระยะพัฒนาการของตัวอ่อนเปรียบเทียบระหว่างทฤษฎีของ Istanbul consensus,2011 และ Gardner, 1999

2. เลขตัวที่ 2 แสดงเกรดของ Inner cell mass (ICM) โดยทั้ง Istanbul consensus,2011 และ Gardner, 1999 แบ่งเหมือนกันคือ Grade A หรือ 1 เซลล์มีจำนวนมาก เห็นได้ชัดเจน มี Compaction ที่ติดแน่นชิด, Grade B หรือ 2 เซลล์มีจำนวนน้อยลงมา แต่ยังมีจำนวนพอสมควร ยึดติดกันอย่างหลวมๆ และ Grade C หรือ 3 จำนวนเซลล์น้อยมาก ดูยากว่า ICM อยู่ตรงไหน



รูปที่ 7 : รูปแสดงเกรดของ Inner cell mass (ICM) เปรียบเทียบระหว่างทฤษฎีของ Istanbul consensus,2011 และ Gardner, 1999

3. เลขตัวที่ 3 เป็นเกรดของ Trophectoderm cells (TE) แบ่งออกเป็น Grade A หรือ 1 เซลล์มีจำนวนเยอะ มีการเกาะกันแน่นเป็นกลุ่ม, Grade B หรือ 2 เซลล์มีจำนวนน้อยลงมา เกาะกันอย่างหลวมๆ และ Grade C หรือ 3 จำนวนเซลล์น้อยมาก



รูปที่ 8 : รูปแสดงเกรดของ Inner cell mass (ICM) เปรียบเทียบระหว่างทฤษฎีของ Istanbul consensus,2011 และ Gardner, 1999