หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง, อุปกรณ์, สารเคมี และวิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง

ใช้หนูแฮมสเตอร์สีทองเพศเมีย (Mesocricetus auratus) ที่มีอายุระหว่าง 2-4 เดือน น้ำหนัก 70-120 กรัม เลี้ยงในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยควบคุมอุณหภูมิห้องประมาณ 24±1 °c แสงสว่างวันละ 14 ชั่วโมง (06.00-20.00 น. และความมืด 10 ชั่วโมง (20.00-06.00 น.) ให้น้ำดื่มและกินอาหารสัตว์ทดลองสำเร็จรูป (C.P. MICE) อย่างไม่จำกัดตลอดเวลา ก่อนนำมาใช้ในการทดลองจะตรวจวงจรการเป็นสัด (Oestrous cycle) ของหนูแฮมสเตอร์ให้อยู่ในเกณฑ์ปกติ (4 วัน) ติดต่อกันอย่างน้อย 2 วงจร

หนูแฮมสเตอร์สีทองเพศผู้ (Mesocricetus auratus) ที่มีอายุระหว่าง 3-6 เดือน น้ำหนัก 80-140 กรัม เลี้ยงในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองดังกล่าว เพื่อนำอสุจิมาใช้ในการทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OVARIAN CYCLE OF HAMSTER

แฮมสเตอร์สีทองเป็นสัตว์ประเภทเดียวกับหนูแรท, หนูเมาซ์ และหนูตะเภา (Polyoestrous species) ซึ่ง ovarian cycle ของสัตว์ประเภทนี้จะไม่เปลี่ยนแปลง นอกจากเกิดการตั้งท้อง (Pregnancy) หรือการตั้งท้องเทียม (Pseudopregnancy) พบว่าแฮมสเตอร์สีทองมี

ovarain cycle ที่สม่ำเสมอ มีการตกไข่ (Ovulation) ทุก ๆ 4 วัน แต่ช่วงเวลาดังกล่าวอาจเปลี่ยนแปลงได้เล็กน้อยขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมภายนอกที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น แสงสว่าง, อุณหภูมิ, อาหาร และความสัมพันธ์ทางสังคมสัตว์ (Social relationships) ส่วนการเจริญเติบโตของ follicles และการตกไข่ถูกควบคุมโดยฮอร์โมน gonadotropins follicle stimulating hormone (FSH) และ luteinizing hormone (LH) จากต่อมใต้สมองส่วนหน้า (Anterior pituitary gland)

วงจรการเป็นสัดของหนูแฮมสเตอร์สีทอง แบ่งออกเป็น 4 ระยะ ดังแสดงในตารางที่ 2.1 ระยะการเกิด heat อยู่ในช่วงระหว่าง 17.00 - 22.00 น. ไข่จะตก 8 ชั่วโมง หลังจากระยะเริ่มการเกิด heat คือช่วงระหว่าง 24.00-01.00 น. ของคืนวันเกิด heat จำนวนไข่ที่ตกจากรังไข่ทั้งสองข้างเฉลี่ยครั้งละประมาณ 10 ใบ (3-17 ใบ) (Austin, 1956) ไข่จะเดินทางเข้าไปอยู่ในส่วนของ ampulla ของท่อนำไข่ภายหลังการตกไข่ประมาณ 3 ชั่วโมง (Strauss, 1956) และมี fertilizable life ประมาณ 6 ชั่วโมง (สูงสุด 13 ชั่วโมง) (Yanagimachi และ Chang, 1961) การตรวจวงอิสตรัสของหนูแฮมสเตอร์ จะตรวจจากลักษณะภายนอกโดยใช้มือกดเบา ๆ บริเวณช่องคลอด (vagina) ของหนูแฮมสเตอร์เพศเมียทุกเช้า ถ้าพบมีก้อนเยื่อมูก (mucous dischange) ที่มีลักษณะเหนียวสีขาวขุ่น และมีกลิ่นออกมาจากช่องคลอดให้นับเป็นวันที่ 1 ของวงจรสัด ซึ่งตรงกับระยะ oestrous

ห้องปฏิบัติการ

ห้องปฏิบัติการ Embryo culture laboratory ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 แสดงระยะเวลาของ Reproductive cycle ของแฮมสเตอร์สีทองเพศเมีย*

Day of cycle	Stage of cycle	Time of day	Condition
1	Oestrus	a.m.	พบเยื่อมูกที่มีลักษณะเหนียว สีขาวขุ่น
	Metaoestrus		ตัวเมียจะยินยอมผสมพันธุ์กับตัวผู้ ถ้าทำ vaginal smear จะพบ oval epithelial cells
	Early dioestrus	p.m.	ยังคงพบเยื่อมูกปากมดลูก แต่ตัวเมียจะไม่ยอมผสมพันธุ์กับตัวผู้ vaginal smear จะพบ leucocytes และ oval epithelial cells
2	Middle dioestrus		ช่วงนี้ถ้าทำ vaginal smear จะพบ leucocytes เป็นส่วนใหญ่ และมี squamous epithelial cells เล็กน้อย
3	Late dioestrus	a.m.	ลักษณะเซลล์ที่พบจะเหมือนวันที่ 2
		p.m.	จำนวนของ leucocytes เริ่มลดลง ตัวเมียจะไม่ยินยอมผสมพันธุ์
4	Late dioestrus	a.m.	มี leucocytes เล็กน้อย
	Proestrus	p.m.	เป็นระยะก่อนเกิด heat ซึ่งเป็นช่วงสั้น ๆ ภายในรังไข่จะมี mature follicles จำนวนมาก
	Oestrus		ตัวเมียจะเกิด heat ในตอนกลางคืน และมักจะมีการตกไข่หลังเที่ยงคืน vaginal smear จะพบ nucleated epithelial cells จำนวนมาก

*ดัดแปลงจาก Kent, 1968

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>อุปกรณ์</u>

1.	Water - jackete incubator	: Model 3030 Gas Guare, Forma Scientific Ohio, U.S.A.
2.	Laminar Flow hood	: Model GLH-48, Gensa Company Limited. Bangkok, Thailand.
3.	Phase Contrást Microscope	: Model IMT-2, Olympus, Tokyo, Thailand.
4.	Dissecting Microscope	: Olympus, Japan.
5.	The Advanced Osmometer	: Model 3 D2, 1000 Highland avenus, Massachusetts.
6.	pH meter	: Cole Parmer, Digi pH ase, Medico, Bangkok, Thailand,
7.	เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียด	: JP-160 Chyo Balance Corporation, Tokyo, Japan.
8.	Embryological watchglass	: 4-cm-square glass block with a 3 mm. diameter cavity Griffin & George Co, HLJ-630-S.
9.	Millipore Filter,	: Filter type HA.Pore

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Plastic swinney adaptor type และ Millipore membrane : size, 0.45 micron. Millipore Corporation. Bedford, Massachusetts, U.S.A.

10. Plastic tissue culture dish # 3001 : Falcon Div.Becton, Dickinson and Co., California, U.S.A.

11. Plastic tissue culture dish : Nunclon, Roskildi, Denmark.

12. Plastic syringe 1 ml : Terumo Corporation. Tokyo, Japan.

13. Hypodermic needles : size G 30x3/4" stainless steel Luer mounts, England.

14. Mouth Pieces

15. Pasteur pipette

16. ตะเกียงแอลกอฮอล์

17. เครื่องมือผ่าตัดสัตว์ทดลอง ประกอบด้วย

กรรไกรปลายตรง	1 อัน
กรรไกรปลายโค้ง	1 อัน
Watch-maker forceps	2 อัน
Non tooth forceps	1 อัน
Needle holder & Curved surgical needle	1 อัน
Surgical silk (size 5-0)	

<u>หมายเหตุ</u> เครื่องมือผ่าตัดและเครื่องแก้วทุกชนิดที่ใช้ในการเตรียมสารเคมีและใช้ในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอ ทำความสะอาดโดยใช้สารละลาย 1-2% 7x ล้างด้วยน้ำสะอาด 3 ครั้ง ก่อนจะล้างด้วยน้ำกลั่น (กลั่น 3 ครั้ง) อีก

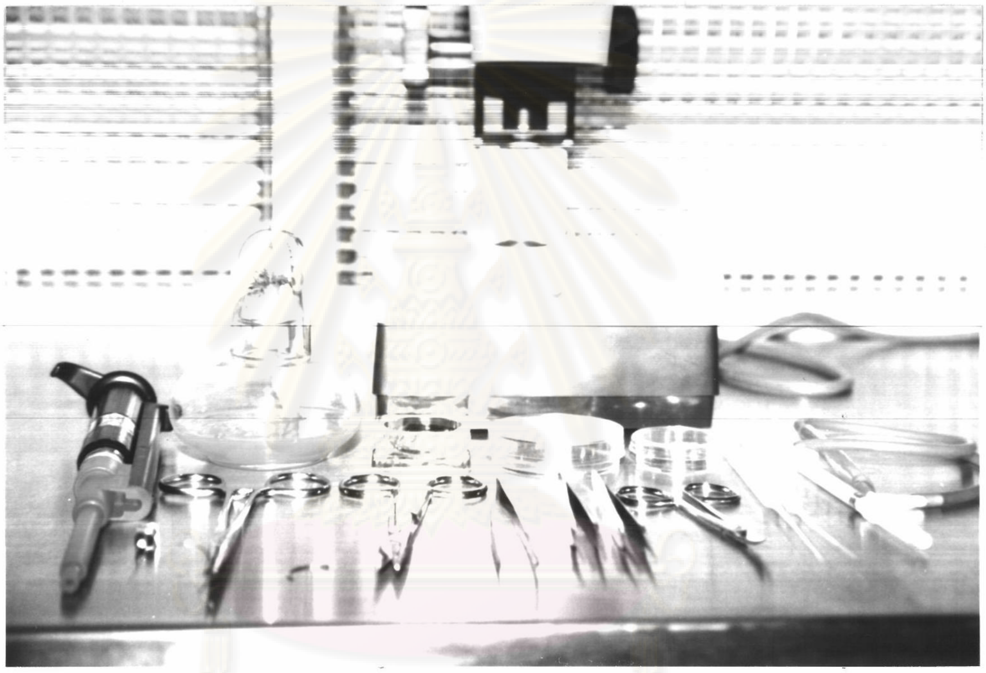
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3 ครั้ง ต่อจากนั้นจะอบแห้งและฆ่าเชื้อด้วยความร้อนสูง 185 °C นาน 2-3 ชั่วโมง รูปที่ 2.1 แสดงอุปกรณ์และเครื่องมือผ่าตัด และรูปที่ 2.2 แสดงวิธีเตรียม capillary pipette

<u>สารเคมี</u>

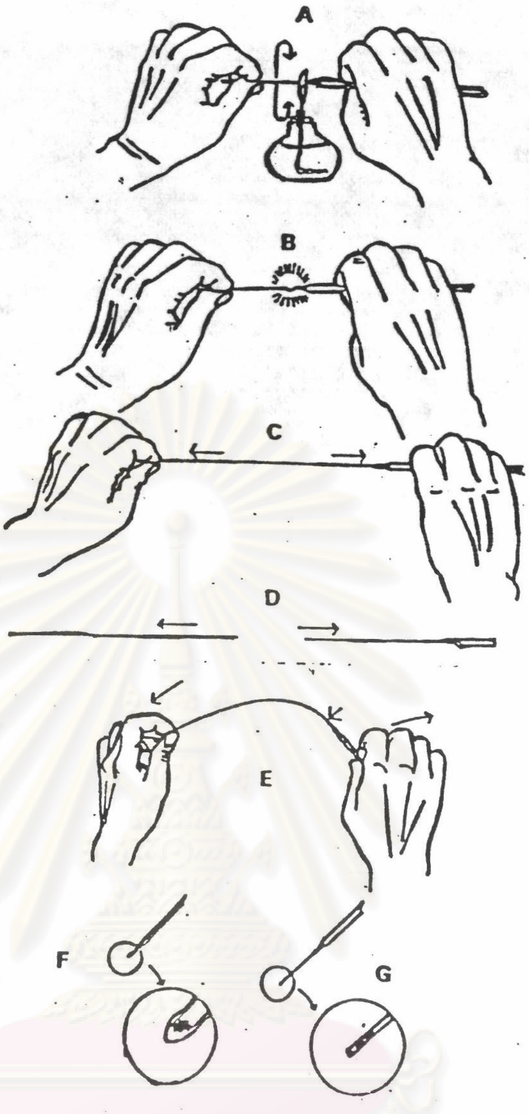
1. สารเคมีที่ใช้เตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยง modified - Tyrode's solution (m-TALP), TL-PVA และ PBT
   - 1.1 Sodium Chloride (NaCl)
   - 1.2 Potassium Chloride (KCl)
   - 1.3 Calcium Chloride 2-hydrat krist ($CaCl_2.2H_2O$)
   - 1.4 Potussium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)
   - 1.5 Sodium dihydrogen phosphate 2-hydrate reint ($NaH_2PO_4.2H_2O$)
   - 1.6 Disodium hydrogen phosphate 7-hydrate keint ($Na_2HPO_4.7H_2O$)
   - 1.7 Magnesium Chloride krist ($MgCl_2.6H_2O$)
   - 1.8 Sodiumbicarbonate ($NaHCO_3$)
   - 1.9 D-Glucose ($C_6H_{12}O_6.H_2O$).
   - 1.10 Sodium pyruvate (Na pyruvate)
   - 1.11 Penicillin G. sodium.
   - 1.12 Sodium Lactate (Na Lactate 60% syrup)
     : NO.L-1375 (DL-Lactic Acid).
     Sigma chemical Company.
     St.Louis. MO. U.S.A.
   - 1.13 Phenol red : Carlo Erba, Italy.
2. Bovine serum albumin : Fraction V. No. A-9647.
3. Hypotaurine : No. H-1384 (2-Aminoethane-

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2.1 แสดงอุปกรณ์และเครื่องมือผ่าตัดที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงและการถ่ายฝากเอมบริโอ



รูปที่ 2.2 แสดงการเตรียม capillary pipette

A. ใช้ pasteur pipette ลนด้วยความร้อน

B. เมื่อ pasteur pipette เริ่มหลอมละลาย

C. ค่อย ๆ ดึง pipette ให้มีขนาดเล็กลงและ

D, E. หักแยกออกจากกันจะได้ capillary pipette ตามต้องการ

F. ลักษณะ capillary pipette ที่ขนาดกว้างเกินไป ไม่เหมาะสมในการนำมาใช้

G. ลักษณะ capillary pipette ที่มีขนาดพอเหมาะในการนำมาใช้

sulfinic acid)

4. Polyvinyl alcohol : No. P-8136

5. L-Epinephrine : Adrenaline injection BP 1980. The Goverment Pharmace Utical Organization, Bangkok, Metropolis, Thailand.

6. ฮอร์โมนที่ใช้ในการกระตุ้นการตกไข่ของสัตว์ทดลอง

6.1 Gonadotropin (Pregnant Mare's Serum, PMSG. No. G-4877)

6.2 Chorionic Gonadotropin (Human Pregnancy Urine, HCG. No. CG-10)

7. ฮอร์โมนที่ใช้ในการย่อยคิวมูลัสเซลล์ (cumulus cell)

7.1 Hyaluronidase (Bovine Tetes)

8. กรดอะมิโนที่ใช้ในการทดลอง

8.1 L-Glutamine (No. G-3126)

8.2 DL-Isoleucine (No. I-2627)

8.3 DL-Methionine (No. M-9500)

8.4 DL-Phenylalanine (No. P-1876)

9. Liquid paraffin colourless : BDH Chemical Ltd., Poole. England.

<u>หมายเหตุ</u> 1.1-1.11 สารเคมีจาก E.Merch.Darmstadt, Germany.

2-8 สารเคมีจาก Sigma Chemical Company. St.Louis, MO. U.S.A.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>น้ำยาเพาะเลี้ยง</u> (Culture medium)

เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบผลของน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เติมกรดอะมิโนที่เหมาะสมต่อการปฏิสนธิ และการเจริญเติบโตของเอมบริโอของแฮมสเตอร์ในหลอดทดลอง จึงเลือกใช้น้ำยาเพาะเลี้ยง 2 ชนิด ซึ่งนักวิจัยหลายท่านได้ใช้ในการศึกษาการปฏิสนธิในหลอดทดลอง(in vitro fertilization) และการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของแฮมสเตอร์ดังนี้

1. The modified TALP-Tyrode's solution with albumin, pyruvate and lactate (The sperm - capacitation medium) (Bavister และ Yanagimachi, 1977, Yanagimachi, 1982) ซึ่งมีส่วนประกอบของสารทางชีวเคมีพวกเกลือแร่และไอออนที่ดัดแปลงมาจาก T6 medium ของ Whittingham (1971) โดยเติมสารสื่อประสาท เช่น epinephrine, taurine หรือ hypotaurine เพื่อช่วยกระตุ้นการเคลื่อนไหว, กระตุ้นให้เกิดกระบวนการคาพาซิเตชั่น และ อะโครโซม รีแอคชั่น และช่วยให้ตัวอสุจิมีชีวิตรอดได้ยาวนานขึ้น (Bavister, 1969; 1973; Bavister และ Yanagimachi, 1977; Gwatkin, 1977; Niwa และคณะ, 1980; Meizel และคณะ, 1980) เรียกสารที่ช่วยกระตุ้นการเคลื่อนไหวของตัวอสุจินี้ว่า sperm motility factor หรือ "SMF" (Bavister, 1975a) ซึ่งเราสามารถพบสาร SMF ได้โดยทั่วไปใน follicular fluid (Yanagimachi, 1969), blood serum (Yanagimachi, 1970; Bavister, 1975b) cauda epididymis (Bavister และ Yanagimachi, 1977) และใน male reproductive tract (Bavister และ Yanagimachi, 1977; Bavister และคณะ, 1978) ซึ่งในปัจจุบันนี้พบว่า adrenal gland หลั่งสาร catecholamine (epinephrine; norepinephrine) (Bavister และคณะ, 1976; Bavister และคณะ, 1979; Cornett และ Meizel, 1978; Cornett และคณะ, 1979) และโปรตีนหลายชนิด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 10302414

โดยเฉพาะ taurine, hypotaurine (Leibfried และ Bavister, 1981; Mrsny และคณะ, 1979) ที่มีคุณสมบัติคล้าย SMF คือมี molecular weight 100 - 200 daltons (gelchromatography) และ heat stable (Jocobsen และ Smith, 1968; Bavister, 1975b; Bavister และ Yanagimachi, 1976) สามารถกระตุ้นการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิให้ดีขึ้นและมีชีวิตรอดจนเข้าไปผสมกับไข่ได้ และพบว่า epinephrine ที่ความเข้มข้น 16 uM, hypotaurine หรือ taurine ที่ความเข้มข้น 0.01-1 uM ในน้ำยาปฏิสนธิสามารถกระตุ้นการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิได้ดีที่สุด (leibfried และ Bavister, 1981) นอกจากนี้น้ำยาปฏิสนธิที่เติม epinephrine และ hypotaurine ยังใช้ในการทำการปฏิสนธิภายนอกร่างกายในวัว (Leibfried และคณะ, 1987), ในหนูเมาซ์พบว่าเฉพาะ taurine เท่านั้นที่ช่วยในการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ (Fraser และ Drury, 1975; Fraser, 1986) ส่วนกลไกการทำงานของสารเหล่านี้ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่นักวิจัยหลายท่านสันนิษฐานว่าสาร SMF น่าจะไปกระตุ้นการทำงานของ adenyl-cyclase ในเซลล์บางชนิด ซึ่งมีผลทำให้เกิดการสร้าง cyclic AMP ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น และ cyclic AMP ที่เพิ่มขึ้นนี้จะไปกระตุ้น เอนไซม์ต่าง ๆ ที่จำเพาะสำหรับการทำงานของเซลล์นั้น ๆ หรือ สาร SMF เมื่อรวมกับตัวรับ (recepter) ที่ผนังเซลล์ทำให้ permeability ของผนังเซลล์เพิ่มขึ้น ซึ่งมีผลทำให้ไอออนต่างๆ โดยเฉพาะ Ca^{2+} จะ influx เข้าเซลล์เพิ่มขึ้น ซึ่งจะมีผลต่อการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ

2. A - modified tyrode's solution (TL-PVA) (Bavister และ Yanagimachi, 1977; Bavister, 1981) มีส่วนประกอบของสารชีวเคมีพวก เกลือแร่และไอออนที่ดัดแปลงมาจากน้ำยาเพาะเลี้ยง T6 โดยเติม Polyvinyl alcohol (PVA) ในความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อซีซี แทน BSA PVA เป็นสารสังเคราะห์ซึ่งมีคุณสมบัติคล้าย BSA คือช่วยการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิให้ดีขึ้นแต่ไม่ช่วยในการเกิดกระบวนการคาพาซิเตชั่น หรือ อะโครโซม รีแอคชั่น แต่ PVA มีคุณสมบัติช่วยรักษา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความตึงผิว (surface tension) ได้ดีกว่า BSA คือช่วยรักษา osmolality ภายนอกเซลล์ไว้ เพื่อป้องกันไม่ให้สารโปรตีนที่สำคัญรั่วไหลออกนอกเซลล์ได้ และ PVA ไม่มีพิษต่อไข่ (Anderson, 1980; Bavister, 1981) เนื่องจาก PVA เป็นสารที่มีคุณสมบัติที่ดีกว่า BSA หลายอย่าง ดังนั้นในปัจจุบันนี้นักวิจัยหลายท่านนิยมใช้ PVA แทน BSA ในการเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอของแฮมสเตอร์ (Bavister และคณะ, 1983a; Kane และคณะ, 1986; Kane และ Bavister, 1989; Seshagiri และ Bavister, 1989) การเพาะเลี้ยงเอมบริโอระยะ 2- เซลล์ ของกระต่าย (Kane และ Foote, 1970a-c) หนูเมาซ์ (Fraser และ Drury, 1975)

การเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยง

น้ำยาปฏิสนธิ m-TALP, น้ำยาเพาะเลี้ยง TL-PVA และน้ำยา PBI นั้นเป็น simple medium ที่เตรียมขึ้นเอง มีส่วนประกอบดังตาราง ที่ 2.2 โดยนำสารเคมีเหล่านี้ยกเว้น epineprine, hypotaurine และ BSA มาละลายในน้ำกรองจากเครื่องกรองน้ำบริสุทธิ์ (conductivity 18 M cm) ปรับความเข้มข้นของสารละลาย (osmolality) ของน้ำยาเพาะเลี้ยงให้อยู่ในระดับ 280-295 mOsmol/kg การปรับความเข้มข้นของสารใช้น้ำกรองบริสุทธิ์ และ NaCl ช่วยในการปรับระดับ ส่วนระดับของ pH จะปรับให้อยู่ในระดับ 7.2 - 7.4 วัดหลังจาก equilibrate ด้วยอากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 การปรับระดับ pH ใช้สารละลาย 1N ของ NaOH หรือ 1N ของ HCl เมื่อสารละลายละลายเข้ากันดีแล้วถึงจะเติม 3 มิลลิกรัมต่อซีซี ของ BSA หรือ 1 มิลลิกรัมต่อซีซี ของ PVA และกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ นำสารละลายที่เตรียมเสร็จแล้วมาทำให้ปลอดเชื้อ ด้วยการกรองผ่านเมมเบรนฟิลเตอร์ (millipore filters) ขนาด 0.45 ไมครอน (เป็นวิธีสเตอไรด์สารละลาย) บรรจุลงในภาชนะสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้ได้นาน 2 อาทิตย์เท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากขณะเก็บน้ำยาเพาะเลี้ยงไว้จะ

ตารางที่ 2.2 แสดงส่วนประกอบของน้ำยาที่ใช้ในการปฏิสนธิและการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูแฮมสเตอร์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)

Component	m-TALP*	TL-PVA**	PBI***
NaCl	5900	6662	8000
KCl	200	235.6	356
$CaCl_2.2H_2O$	265	294	250
$NaH_2PO_4.H_2O$	-	48	-
$NaH_2PO_4.2H_2O$	56	-	-
$Na_2HPO_4.7H_2O$	-	-	1150
$MgCl_2.6H_2O$	100	102	100
KH_2PO_4	-	-	162
$NaHCO_3$	3000	2100	-
Glucose	810	901	1000
Na lactate (60% syrup)	1.5 cc	1.825 cc	-
Na Pyruvate	10	-	27.5
BSA	3000	-	3000
PVA	-	1000	-
Penicillin G.Sodium	60	65	60
L-epinephrine	63	-	-
Hypotaurine	9 cc	-	-
Phenol red	1.0	1.0	1.0
pH	7.3-7.4	7.2-7.4	7.2
Osmolality	285-290	280-290	290

* Yanagimachi, 1982

** Bavister, 1981

*** Whittingham, 1971

เกิด spontaneous decarboxylation ของสารไพรูเวทซึ่งจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของเอมบริโอได้ (Wales และ Whittingham, 1971) เมื่อเราจะใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงแต่ละครั้งจึงจะเติม epinephrine, hypotaurine และจะ equilibrate น้ำยาเพาะเลี้ยงด้วยอากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ก่อน เพื่อให้ pH อยู่ในระดับที่ต้องการ (7.2-7.4) จึงจะทำเป็น microdrop method โดยวิธีของ Brinster (1963) โดยแบ่งน้ำยาเพาะเลี้ยงออกเป็นหยดเล็ก ๆ ประมาณ 50 ไมโครลิตร ใส่ในจานพลาสติก (culture dishs) ขนาด 35x10 มิลลิเมตร และ/หรือ 60x15 มิลลิเมตร แล้วใช้พาราฟิลเหลวราดคลุมน้ำยาเพาะเลี้ยงดังกล่าว เมื่อเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยงได้แล้ว นำจานเพาะเลี้ยงเข้าเก็บในตู้อบ (incubator) ที่อุณหภูมิ 37±0.5 องศาเซลเซียส ความชื้นอยู่ในระดับอิ่มตัว และมีอากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ตลอดเวลาอย่างน้อย 1 - 2 ชั่วโมง ก่อนจะทำการทดลอง

วิธีการทดลอง

การกระตุ้นการตกไข่ (Superovulation)

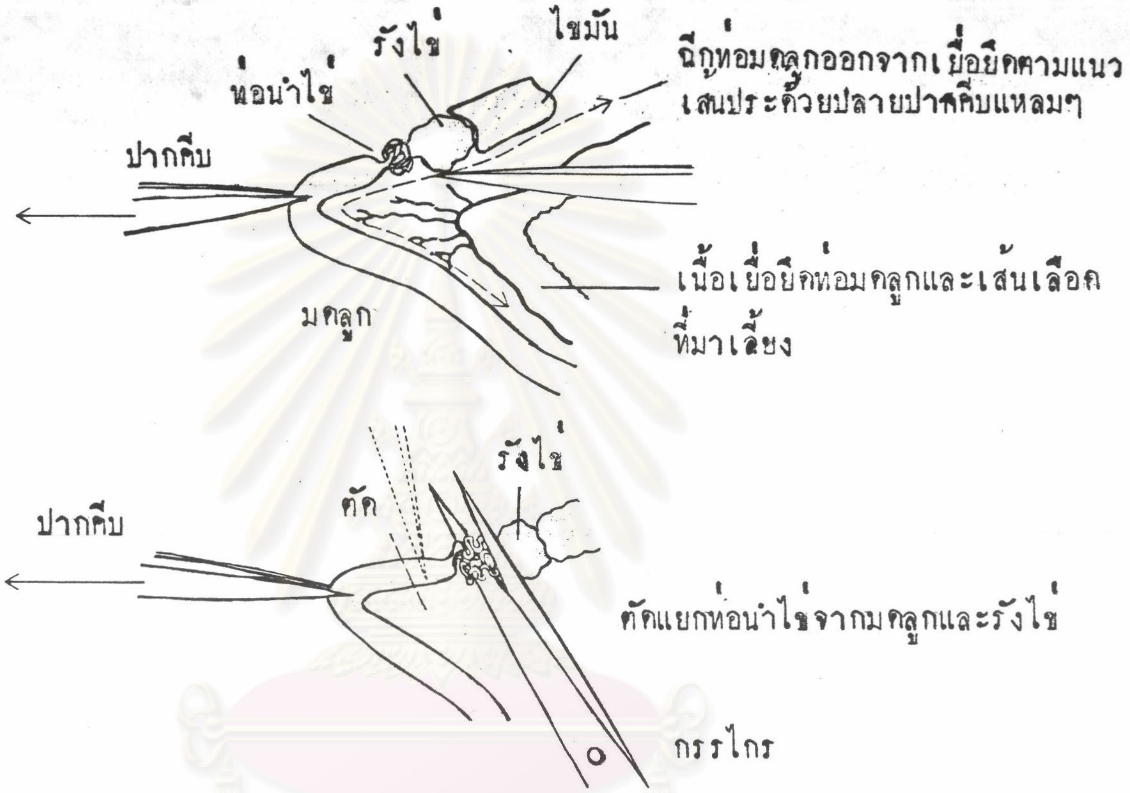
ในหนูแฮมสเตอร์กระตุ้นให้ตกไข่โดยฉีดฮอร์โมน PMSG 25 ยูนิต เข้าช่องท้อง (intraperitoneal injection) ในวันที่พบเยื่อมูก (post oestrous discharge) ที่เวลาประมาณ 8.00 - 10.00 น, หลังจากนั้น 48 - 60 ชั่วโมงต่อมา คือ ในวันที่ 3 ของวงอิสตรัสจะฉีดฮอร์โมน HCG เข้าช่องท้องตัวละ 25 ยูนิต และจะเก็บไข่ 14-15 ชั่วโมงภายหลังฉีดฮอร์โมน HCG (ประมาณ 12 ชั่วโมงหลังฉีด HCG จะมีการตกไข่) (Greenwald, 1962; Yanagimachi, 1969) การชักนำให้ตกไข่เพิ่มขึ้นนี้อาจฉีด PMSG ตอนไหนก็ได้ แต่การฉีด HCG ต้องทิ้งระยะห่างจากการฉีด PMSG ไม่ต่ำกว่า 46 ชั่วโมง จึงจะได้ผลดี (Flemming และ Yanagimachi, 1980)

<u>การเตรียมไข่และตัวอสุจิ</u>

การเตรียมไข่จะเตรียมในช่วงเวลาระหว่าง 2-3 ชั่วโมง ที่อบเลี้ยงอสุจิให้ผ่านกระบวนการ คาพาซิเตชั่น และ อะโครโซม รีแอคชั่น โดยฆ่าแฮมสเตอร์สีทองเพศเมียที่ได้รับการกระตุ้นให้ตกไข่ภายหลังฉีดฮอร์โมน HCG 14-15 ชั่วโมง โดยวิธีดึงคอต่อ (cervical dislocation) ผ่าเปิดหน้าท้องตัดแยกท่อนำไข่ออกจากรังไข่ โดยการตัดเยื่อหุ้มรังไข่ (Ovarian bursa) และตัดที่บริเวณช่วงต่อระหว่างท่อนำไข่กับมดลูก (utero-tubul junction) ดังรูปที่ 2.3 นำท่อนำไข่วางบนกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเพื่อซับเลือดออกจากท่อนำไข่ จากนั้นนำท่อนำไข่ใส่ใน embryo-logical watchglass ที่มีน้ำยา PBI ประมาณ 1.5 - 2.0 มิลลิลิตร นำไปดูด้วยกล้องจุลทัศน์ชนิด dissecting ที่มีกำลังขยาย 10-40 เท่า ใช้ปลายแหลมของ watch-maker forceps กรีดลงบนผนังของท่อนำไข่ส่วนที่บางที่สุด ไข่ที่มีคิวมูลัส (cumulus) ล้อมรอบจะไหลทะลักออกมาในน้ำยา PBI ดูดไข่ที่มีคิวมูลัสล้อมรอบใส่ใน embryological watchglass ที่มี 0.1% Bovine testicular hyaluronidase ปล่อยทิ้งไว้ 10-15 นาที เพื่อย่อยสลายคิวมูลัสเซลล์ออก แล้วใช้ pasteur pipette สเตอร์ไรด์ที่ดึงปลายให้เรียวเล็กดูดไข่ที่มี zona pellucida ล้างใน PBI 3 ครั้ง ก่อนจะนำไข่ไปใช้ในการทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นำแฮมสเตอร์สีทองเพศผู้มาทำให้ตายโดยวิธีดึงคอต่อ ผ่าเปิดหน้าท้องแล้วตัดแยกส่วนของอิพิดิไดมิสส่วนท้าย (cauda epididymis) ใส่ใน embryological watchglass ที่มีน้ำยา PBI 2-3 มิลลิลิตร ใช้ปลายแหลมของ watch-maker forceps เจาะลงบนผนังส่วนที่พองใหญ่ที่สุดของอิพิดิไดมิส เก็บของเหลวขาวข้นที่ไหลออกมาประมาณ 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดแก้ว (test tube) ที่มีน้ำยาปฏิสนธิ m-TALP ประมาณ 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ในตู้อบที่อุณหภูมิ 37.0±0.5 องศาเซลเซียส ภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ตลอดเวลา เพื่อให้อสุจิตัวที่



รูปที่ 2.3 แสดงการตัดแยกท่อนำไข่ออกจากสัตว์ทดลอง โดยตัดที่บริเวณ
ช่วงต่อระหว่างท่อนำไข่กับมดลูกและท่อนำไข่กับรังไข่ ตามลำดับ

แข็งแรงและ active ว่ายขึ้นมาส่วนบน ๆ ของน้ำยาปฏิสนธิก่อนจะนำตัวอสุจิส่วนบนนี้ไปใช้ในการทดลองทำปฏิสนธิ

<u>การปฏิสนธิและการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของแฮมสเตอร์ในจานทดลอง</u>

หลังจากเตรียมอสุจิทิ้งไว้ในตู้อบ 10 นาทีแล้ว ดูดตัวอสุจิด้วย micropipette จากส่วนบน ๆ ของน้ำยาเพาะเลี้ยง (80% ของตัวอสุจิส่วนนี้มีชีวิต และมากกว่า 70% ของตัวอสุจิสามารถว่ายแบบ active movement ใน physiological saline) ประมาณ 50 ไมโครลิตร (2.0 - 3.0 x 10^5 ตัว/มิลลิลิตร) ใส่ใน 100 ไมโครลิตร ของหยดน้ำยาปฏิสนธิ m-TALP(capacitated medium) ที่เตรียมไว้ด้วยวิธีของ Brinster (1963) ทิ้งไว้ในตู้อบ 2-3 ชั่วโมง เพื่อให้อสุจิผ่านกระบวนการ คาพาซิเตชั่นและอะโครโซม รีแอคชั่น โดยตรวจดูความเคลื่อนไหวของตัวอสุจิภายใต้กล้องจุลทัศน์ชนิด phase contrast ถ้าได้ตัวอสุจิที่อยู่รอดและเคลื่อนไหวรุนแรงแบบ whiplash หรือ hyperactivated (Yanagimachi, 1970) เป็นจำนวนมาก แสดงว่าอสุจิพร้อมที่จะเข้าผสมกับไข่ จากนั้นดูดไข่ที่เตรียมไว้ด้วยวิธีดังกล่าวด้วย pipette ใส่ในน้ำยาปฏิสนธิ m-TALP ที่มีอสุจิอยู่ ทิ้งไว้ในตู้อบเพื่อให้เกิดการปฏิสนธิ

ภายหลังอบเลี้ยงอสุจิและไข่ทิ้งไว้ในตู้อบ 3-4 ชั่วโมงต่อมา ดูดไข่ด้วย pipette แล้วล้างด้วยน้ำยา PBI 3 ครั้ง เพื่อแยกอสุจิส่วนเกินออกจากไข่ก่อนจะเพาะเลี้ยงต่อในน้ำยาเพาะเลี้ยง TL-PVA ที่เตรียมไว้ด้วยวิธีของ Brinster (1963) ประมาณ 8-10 ใบต่อ 1 หยด ของน้ำยาเพาะเลี้ยง บันทึกผลของการปฏิสนธิของไข่และตัวอสุจิภายใต้กล้องจุลทัศน์ชนิด phase contrast โดยดูจากเกณฑ์ดังนี้

1. มีการเกิด 2^{nd} polar body
2. เกิด pronuclei ขึ้น (Austin, 1955; Yanagimachi และ Chang, 1979)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภายหลังบันทึกการปฏิสนธิแล้ว นำจานเพาะเลี้ยงเก็บไว้ในตู้อบประมาณ 20 - 28 ชั่วโมงต่อมา บันทึกการแบ่งตัวเป็น 2- เซลล์ ของเอมบริโอ โดยดูจากกล้องจุลทัศน์ชนิด phase contrast

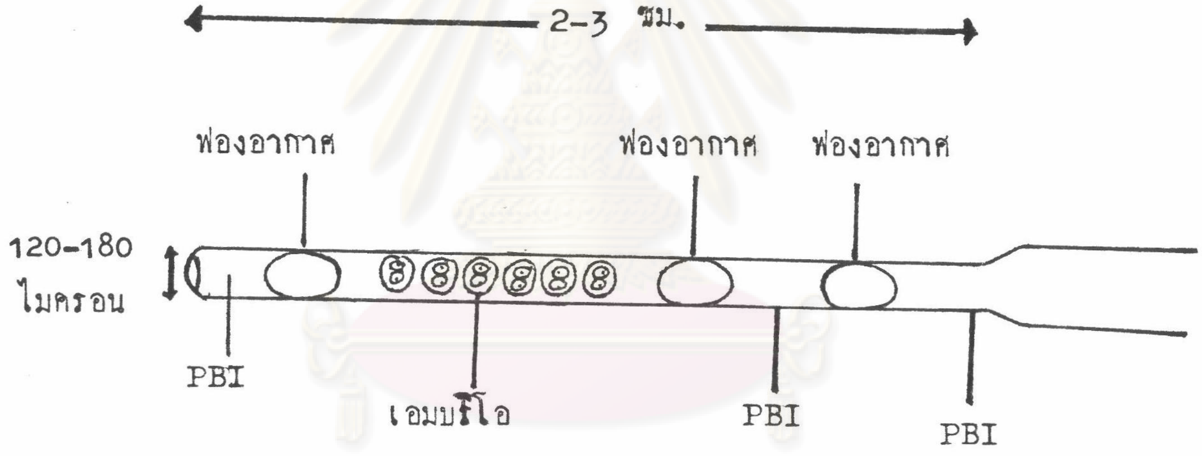
<u>การถ่ายฝากเอมบริโอ</u>

<u>วิธีการเตรียม Pseudopregnant recipients</u>

ใช้หนูแฮมสเตอร์สีทองเพศเมีย อายุ 2-3 เดือน ที่มีวงอิสตรัสปกติ ซึ่งอยู่ในช่วงระยะ heat นำไปผสมกับหนูแฮมสเตอร์สีทองเพศผู้ที่ทำหมันแล้ว (vasectomized male) ในวันที่ 4 เวลา 17.00 - 22.00 น. รุ่งเช้าตรวจดูก้อนเยื่อมูก (plug) โดยใช้มือกดเบาๆ บริเวณช่องคลอด (vagina) ถ้าพบก้อนเยื่อมูกให้นับเป็นวันที่ 1 ของการตั้งท้องเทียม

<u>วิธีการถ่ายฝาก</u>

ดูดเอมบริโอระยะ2-เซลล์ ที่ได้จากการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย ล้างในน้ำยา PBI 3 ครั้ง เพื่อล้างเอาตัวอสุจิที่อยู่รอบ ๆ เอมบริโอออก และเพื่อป้องกันไม่ให้พาราฟิลเหลวติดไปในการถ่ายฝาก ใช้ pasteur pipette ที่ลนไฟและดึงปลายให้เรียวเล็กมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 120-180 ไมครอน ดูดน้ำยา PBI ที่มีเอมบริโอระยะ 2-เซลล์ (รูปที่ 2.4 แสดงวิธีการเก็บเอมบริโอเพื่อนำไปถ่ายฝาก) ไปถ่ายฝากในท่อนำไข่ (oviduct) แต่ละข้างของหนูแฮมสเตอร์ที่ตั้งท้องเทียม โดยวางยาสลบตัวรับที่ตั้งท้องเทียมในวันที่ 2 ด้วยอีเธอร์ (diethylether) ทำความสะอาดด้านข้างลำตัวระดับใต้ชายโครงด้านใดด้านหนึ่งให้ทั่ว ด้วยน้ำยาเดททอล 2% ผ่าเปิดผิวหนังและกล้ามเนื้อด้านข้าง (dorsalateral incission) เป็นช่องขนาดกว้างประมาณ 1-2 เซนติเมตร บริเวณต่ำจากชายโครงเล็กน้อย ใช้ปลายแหลมของ watch-maker forceps ดึงก้อนไขมันที่มีรังไข่, ท่อนำไข่ และส่วน



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2.4 วิธีการเก็บเอมบริโอด้วย capillary pipette เพื่อการถ่ายฝากไปยังท่อนำไข่

ต้นของมดลูกออกมา กรีดผนัง bursa membrane ที่ห่อหุ้มรังไข่ส่วนที่มีเลือดไปเลี้ยงน้อยที่สุดให้ฉีกออกจากกัน ซับน้ำและเลือดออก จะมองเห็นรังไข่และปากท่อนำไข่ (fimbri) ภายใต้กล้องจุลทัศน์ชนิด dissecting ใช้ปลายแหลมของ watch-maker forceps จับท่อนำไข่ และสอดปลาย pipette ที่มีเอมบริโอเข้าไปลึก 0.5-1 เซนติเมตร เป่าดันเอมบริโอเข้าไปในท่อนำไข่ส่วนต้น การประเมินว่าเอมบริโอเข้าสู่ท่อนำไข่ของตัวรับจริงโดยดูจากการเคลื่อนของฟองอากาศที่ใช้เป็นเครื่องหมาย ซึ่งทำไว้ที่ส่วนปลายของ pipette เหนือตำแหน่งที่ดูดเก็บเอมบริโอ ดังรูปที่ 2.4 ทำเช่นนี้ทั้งท่อนำไข่ทั้งข้างซ้ายและข้างขวา โดยแต่ละท่อนำไข่จะถ่ายฝากเอมบริโอจำนวน 6 ตัว เมื่อทำการถ่ายฝากเสร็จซับเลือดให้แห้งและเก็บท่อนำไข่เข้าไปในช่องท้องดังเดิม แล้วจึงเย็บกล้ามเนื้อและผิวหนังด้วยไหมเย็บแผลแยกกันทีละชั้น ทำความสะอาดแผลด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อเดททอล 2% อีกครั้งก่อนขังแยกตัวรับไว้ต่างหากเพื่อดูการตั้งท้องต่อไป

นำเอมบริโอระยะ2- เซลล์ ที่ได้จาก in vivo นำมาถ่ายฝากทันทีที่เก็บมาได้ด้วยวิธีเดียวกันกับข้างต้นดังกล่าวมาแล้ว เพื่อเป็นกลุ่มควบคุม

ภายหลังการถ่ายฝากเอมบริโอ 6 วัน (วันที่ 8 ของการตั้งท้อง) นำหนูแฮมสเตอร์ที่ถูกถ่ายฝากมาวางยาสลบด้วยอีเทอร์ ทำความสะอาดหน้าท้องด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อเดททอล 2% ก่อนผ่าเปิดหน้าท้อง (Mid-ventral incision) ใช้ watch-maker forceps ดึงปีกมดลูกออกมาเพื่อตรวจนับจำนวนและสภาพของฟีตัสในมดลูกแต่ละข้างของตัวรับ จากนั้นเก็บปีกมดลูกเข้าไปในช่องท้อง เย็บปิดหน้าท้อง แล้วทำความสะอาดด้วยน้ำยาเดททอล 2% อีกครั้งก่อนที่จะแยกเลี้ยงเดี่ยวอยู่ในกรงตามลำพัง เพื่อรอให้ครบอายุการตั้งท้องจนกระทั่งคลอด (16 - 17 วัน) แล้วนับจำนวนลูก (young born) ที่คลอดออกมา

<u>การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ</u>

การเปรียบเทียบผลของกรดอะมิโนต่อการปฏิสนธิ และผลของกรดอะมิโนต่อการเจริญและการแบ่งตัวเป็นระยะ 2- เซลล์ ของเอมบริโอของแฮมสเตอร์แต่ละการทดลองนั้น ใช้ one-way analysis of variance (F-test) และ least significant difference (LSD) เป็นค่าสถิติในการทดสอบเปรียบเทียบค่า mean แต่ละ treatment

ส่วนการเปรียบเทียบจำนวนฟีตัสที่ฝังตัว และจำนวนลูกอ่อนที่คลอดภายหลังการถ่ายฝากเอมบริโอระยะ2-เซลล์ ที่ได้จากการทำปฏิสนธิภายนอกร่างกาย (in vitro) กับเอมบริโอระยะ 2- เซลล์ ที่ได้จาก in vivo ของกลุ่มควบคุมไปยังท่อนำไข่ของตัวรับ นั้นใช้ unpaired t-test

กำหนดให้ระดับความเชื่อมั่นมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย