หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสัตว์ทดลอง

หนูเมาซ์เพศเมียและเพศผู้พันธุ์ ICR (outbred) ได้จากศูนย์เลี้ยงสัตว์ทดลอง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ สาธารณสุขแห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ นำมาเลี้ยงในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ก่อนผสมพันธุ์ ภายในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง มีการควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ระหว่าง 24 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส มีแสงสว่าง 14 ชั่วโมง (06.00 น. ถึง 20.00 น.) มืด 10 ชั่วโมง ให้อาหารสำเร็จรูปและน้ำโดยไม่จำกัดจำนวนตลอดเวลา

ธรรมชาติการเจริญพันธุ์ของหนูเมาซ์

หนูเมาซ์เป็นสัตว์ประเภท Polyestrous เช่นเดียวกับ แฮมสเตอร์สีทอง หนูแรท มีการตกไข่ (ovulation) ทุก ๆ 4 วัน ซึ่ง ovarian cycle ของสัตว์พวกนี้จะไม่เปลี่ยนแปลง นอกจากเกิดการตั้งท้อง (pregnancy) หรือการตั้งท้องเทียม (pseudopregnancy) ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อ ovarian cycle ได้แก่ แสงสว่าง อุณหภูมิ อาหาร และ ความสัมพันธ์ทางสังคมของสัตว์

ธรรมชาติการผสมพันธุ์ของหนูเมาซ์มีดังนี้ คือ หนูเมาซ์เพศเมียจะผสมพันธุ์กับเพศผู้ (mating) เวลาประมาณ 22.00-24.00 น. ของวันเกิด estrous หลังจากนั้น ไข่จะตกระหว่าง 22.00-02.00 น. การปฏิสนธิมักเกิดช่วงกึ่งกลางของ dark period ประมาณ 01.00 น. ระยะเวลาการตั้งท้อง ประมาณ 21 วัน คลอดเวลาประมาณ 24.00 - 04.00 น.

การตกไข่และผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ จะได้ไข่ประมาณ 10 ฟองต่อตัว ถ้ากระตุ้นการตกไข่ด้วยฮอร์โมน จะได้ไข่ โดยเฉลี่ยประมาณ 20-30 ฟองต่อตัว ซึ่งการเจริญของ follicle และการตกไข่ถูกควบคุมโดย Gonadotropins (FSH และ LH) จากต่อมใต้สมองส่วนหน้าสำหรับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน ใช้เวลาการฉีด hCG เป็นจุดเริ่มต้น (Zero reference time) ในการคาดคะเนระยะเวลาที่ไข่ตก (Edwards และ Gates,1959) คือไข่จะตกภายหลังการฉีด hCG 12 $\pm$ 3 ชั่วโมง ดังนั้น ในหนูเมาซ์ ที่กระตุ้นการตกไข่ด้วยฮอร์โมนเพื่อเก็บเอมบริโอในระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆ จึงคาดคะเนเวลา ที่จะพบเอมบริโอได้ดังตารางที่ 2.1

015982

ตารางที่ 2.1 แสดงตำแหน่งที่พบเอมบริโอและระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆ ภายหลังจากฉีด hCG (จาก Whittingham , 1971b)

ระยะการเจริญเติบโตของเอมบริโอ	เวลาหลังจากฉีด hCG (ชั่วโมง)	ตำแหน่งที่พบเอมบริโอ
1- เซลล์	0-24	ท่อนำไข่ (Ampulla)
2- เซลล์	24-38	ท่อนำไข่ (Ampulla และ Isthmus)
3-4- เซลล์	38-50	ท่อนำไข่ (Isthmus)
8- เซลล์	50-64	ท่อนำไข่และมดลูก (Isthmus และ Uterus)
มอรูล่าและบลาสโตซิสระยะแรก	> 60	มดลูก (Uterus)
บลาสโตซิสระยะสุดท้าย	116-120	มดลูก (Uterus)

<u>เครื่องมือและอุปกรณ์</u>

1. Programmable biological freezer : Planer Biomed ,Kryo 10 Series , England .

2. Plastic straw ขนาด 0.25 มล. และ Pluging rod : ZA 479 , ZA 144 , IMV , France.

3. ตู้อบ (Water-jacketed incubator) : Model 3192 ,Forma scientific , U.S.A.

4. Microscope

- Dissecting microscope : Olympus , Japan.
  กำลังขยาย 80 เท่า
- Inverted microscope : Diaphot - TMD , Nikon ; Tokyo , Japan .
  กำลังขยาย 400 เท่า

5. Laminar flow hood : Pravit Engineering , LTD.Part , Bangkok , Thailand .

6. เครื่องมือตรวจสอบระดับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในตู้อบ (Fyrite detector) : Bacharach Co. Pittstburgh , PA., U.S.A.

7. pH meter : Model SA 520 ,Orion Research Incorporation Laboratory products , Boston , U.S.A.

8. Osmometer : Advanced Wide-Range , 3WZ , U.S.A.

9. เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียด : Satorius , 2004 MP.

10. เครื่อง Centrifuge : Model EBA 3S , Hettich - Zentrifugen Tuttlingen , Germany .

11. เครื่องกรองน้ำ Milli - RO4 และ Mill. Q : Millipore corporation , Blackford , Massashusetts , U.S.A.

12. Sterile plastic filter : Sterive G.S. , Millipore Corp. Blackford ,Massasshusetts , U.S.A

13. เครื่องแก้วสำหรับเตรียมน้ำยา : Pyrex , U.S.A.

14. Embryological watchglass : 4 cm - square glass block with 3 mm diameter cavity , Griffin & George Co, HJL.630-S

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

16. Plastic syringe (disposable)

- 1 มล. : Nipro Medical Instrument ; Tokyo,Japan.
- 5 และ 20 มล. : Ersta , Denmark.

17. Plastic tissue culture tube : 2063 , Falcon Div. Becton, Dickinson and Co.,California , U.S.A.

18. Plastic 4 - well multidish : Nunclon,Roskilde,Denmark.

19. หัวเข็มปลายตัด เบอร์ 30

20. Mouth pieces

21. Pasteur pipette

22. ตะเกียงแอลกอฮอล์

23. เครื่องมือผ่าตัดสัตว์ทดลอง ประกอบด้วย

- กรรไกรปลายมน
- กรรไกรปลายโค้ง
- กรรไกรปลายตรง
- ปากคีบ (forceps)
- เข็มเย็บแผลและด้าย

สารเคมี

1. สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง (Cryoprotectants)
   - 1-2, Propanediol (Propylene glycol)
   - DMSO (Dimethyl sulfoxide)
   - Glycerol
   - สารละลาย Sucrose
2. สารเคมีที่ใช้เตรียม Human Tubal Fluid (HTF) คือ
   - Sodium chloride (NaCl)
   - Potassium chloride (KCl)
   - Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)
   - Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)
   - Magnesium sulfate 7- hydrate ($MgSO_4$ 7 H_2O)
   - Calcium chloride 2- hydrate ($CaCl_2$ 2 H_2O)
   - Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)
   - Sodium pyruvate (Na pyruvate)
   - Sodium lactate (Na lactate)
   - Glucose
   - Penicillin
   - Streptomycin sulfate
   - Phenol red
3. ฮอร์โมนสำหรับใช้กระตุ้นการตกไข่ของหนูเมาซ์
   - Pregnant Mares Serum Gonadotropin (PMSG)
   - Human chorionic gonadotropin (hCG) : Ayerst Laboratory, N.Y.; U.S.A.
4. Phosphate Buffered Saline (PBS) : Seromed, Germany
5. แอลกอฮอล์ 70 %
6. น้ำยาสำหรับล้างเครื่องแก้ว ใช้น้ำยา 7X (non-toxic neutral tissue culture detergents)

หมายเหตุ 1-3 เป็นสารเคมีจาก Sigma Chemical Company , St.Louis, Mo. U.S.A.

น้ำยาที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเอมบริโอ

น้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีส่วนประกอบคล้ายของเหลวในท่อนำไข่ของคน (The medium base on the composition of human tubal fluid,HTF medium; Quinn และคณะ, 1985) เป็นน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ดัดแปลงมาจากส่วนประกอบของของเหลวในท่อนำไข่ของคน นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอหนูเมาซ์และสำหรับขบวนการปฏิสนธิของคนนอกร่างกาย

การเตรียมน้ำยา Phosphate Buffered Saline (PBS)

ชั่งสารตามน้ำหนักที่ต้องการ ดังตารางที่ 2.2

ละลายสารดังกล่าวในน้ำกลั่น คนให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มล. นำไปวัดค่า osmolality ปรับค่าให้ได้ 280 $\pm$ 5 มิลลิออสโมลต่อกิโลกรัมน้ำ จึงกรองด้วยแผ่นกรองที่มีรูกรองขนาด 0.22 ไมครอน น้ำยาที่เตรียมได้นี้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้เติม Fetal cord serum 10 %

สำหรับน้ำกลั่นที่ใช้เตรียมสารละลายต่าง ๆ เป็นน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออนมีความบริสุทธิ์ 18 เมกะโอห์ม ซึ่งในห้องปฏิบัติการเตรียม โดยใช้เครื่องกรอง Milli-RO 4 water purification system และ Mill-Q reagent grade water system

การเตรียม Fetal cord serum (FCoS)

เก็บเลือดโดยเจาะจากสายสะดือ (umbilical vein) ของทารกที่คลอดปกติ มารดาไม่มีประวัติเป็นโรคเลือดหรือโรคกรรมพันธุ์ เลือดที่เจาะได้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 3,000 rpm นาน 10 นาที ซีรั่มที่ได้นำไป inactivated ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จึงกรองด้วยแผ่นกรองที่มีรูกรองขนาด 0.22 ไมครอนแล้วแยกเก็บในหลอดพลาสติก Falcon ขนาด 5 มล. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเตรียมสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง

การเตรียม 1,2 -Propanediol,DMSO หรือ Glycerol 1.5 โมลา จำนวน 4 มล. : โดยการใช้ pipette ดูด 1,2-Propanediol,DMSO หรือ Glycerol 0.44 มล. ผสมใน PBS ที่มี FCoS 10 % จำนวน 3.56 มล.

ตารางที่ 2.2 แสดงส่วนประกอบของน้ำยา Phosphate Buffered Saline

	กรัมต่อ100 มล.
NaCl	0.8000
KCl	0.0356
KH_2PO_4	0.0162
$MgCl_2 6H_2O$	0.0100
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.0250
$NaHPO_4 \cdot 7H_2O$	0.0609
Na pyruvate	0.0028
Glucose	0.1000
Penicillin	0.0060
Phenol red	0.0001
pH	7.2 $\pm$ 0.1
Osmolality	280 $\pm$ 5 mOsm

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมน้ำตาลซูโครส 1.0 โมลา จำนวน 10 มล. : โดยชั่งน้ำตาลซูโครส 3.423 กรัม นำมาละลายใน PBS ที่มี FCoS 10 % คนให้น้ำตาลซูโครส ละลายเติม PBS จนให้ได้สารละลายซูโครสครบจำนวน 10 มล.

ก่อนนำไปใช้กรองด้วยแผ่นกรองที่มีรูกรองขนาด 0.22 ไมครอน

การเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยง Human Tubal Fluid

โดยชั่งสารตามน้ำหนักที่ต้องการ ตามตารางที่ 2.3 แยกโซเดียมไบคาร์บอเนต แมกนีเซียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์ละลายในน้ำกลั่นอย่างละ 10 มล. ส่วนสารอื่น ๆ ละลายในน้ำกลั่น 60 มล. คนให้เข้ากันจึงเติมสารละลาย 3 ชนิด ที่แยกละลายไว้ก่อน แล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มล. นำไปวัดค่า osmolality ปรับค่าให้ได้ 280 $\pm$ 5 มิลลิออสโมลต่อกิโลกรัมน้ำ ด้วยน้ำกลั่น จึงกรองด้วยแผ่นกรองที่มีรูกรองขนาด 0.22 ไมครอนจะได้ stock solution เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงเอมบริโอ ทำให้ละลายแล้วเติม FCoS 20 % ปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 7.2 - 7.4 นำไปใส่ในตู้อบภายใต้บรรยากาศของอากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ทิ้งไว้ 1 คืน

น้ำยาเพาะเลี้ยงที่เตรียม เก็บไว้ใช้ภายใน 10 วัน เนื่องจากน้ำยาเพาะเลี้ยงขณะที่เก็บไว้ จะเกิด spontaneous decarboxylation ของสารไพรูเวท ทำให้น้ำยาที่เก็บไว้นาน ๆ ไม่เหมาะแก่การเพาะเลี้ยงเอมบริโอ (Wales และ Whittingham, 1970)

การทำความสะอาดเครื่องแก้ว

1. แช่ในน้ำยา 7X 2% เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง
2. นำมาต้มด้วยน้ำยา 7X 2% เป็นเวลานาน 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน 3 ครั้ง แล้วแช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง
3. ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ตามด้วย Nanopure water (deionized water) 3 ครั้ง
4. นำเข้าตู้อบแห้ง แล้วจึงนำไปอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.3 แสดงส่วนประกอบน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอ Human Tubal Fluid (HTF)

	มิลลิกรัมต่อลิตร	
NaCl	5,937	
KCl	349	
$CaCl_2$ $2H_2O$	299	
KH_2PO_4	50	
$MgSO_4$ $7H_2O$	24	
Glucose	500	
Na pyruvate	300	ul
Na lactate	3.12	ml
Penicillin	100	iu/ml
Streptomycin sulfate	50	ug/ml
$NaHCO_3$	2,100	
Phenol red	1	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเก็บเอมบริโอ

1. เอมบริโอระยะ 2-,4- และ 8-เซลล์ สำหรับการเก็บรักษาโดยการแช่แข็ง

นำหนูเมาซ์เพศเมียพันธุ์ ICR (outbred) อายุประมาณ 6-8 สัปดาห์น้ำหนักประมาณ 30-50 กรัม มากระตุ้นให้ตกไข่จำนวนมาก โดยฉีด Pregnant Mares Serum Gonadotropin (PMSG) เข้าช่องท้องตัวละ 10 i.u. ในน้ำกลั่น 0.10 มล. 48 ชั่วโมงต่อมาฉีด Human Chorionic Gonadotropin (hCG) เข้าช่องท้อง ตัวละ 10 i.u.ในน้ำกลั่น 0.10 มล. เช่นเดียวกัน แล้วแยกกรงผสมพันธุ์กับหนูเพศผู้พันธุ์ ICR ทันที (1:1) เช้าวันรุ่งขึ้นตรวจดู vaginal plug ถ้าพบแสดงว่า ได้รับการผสม

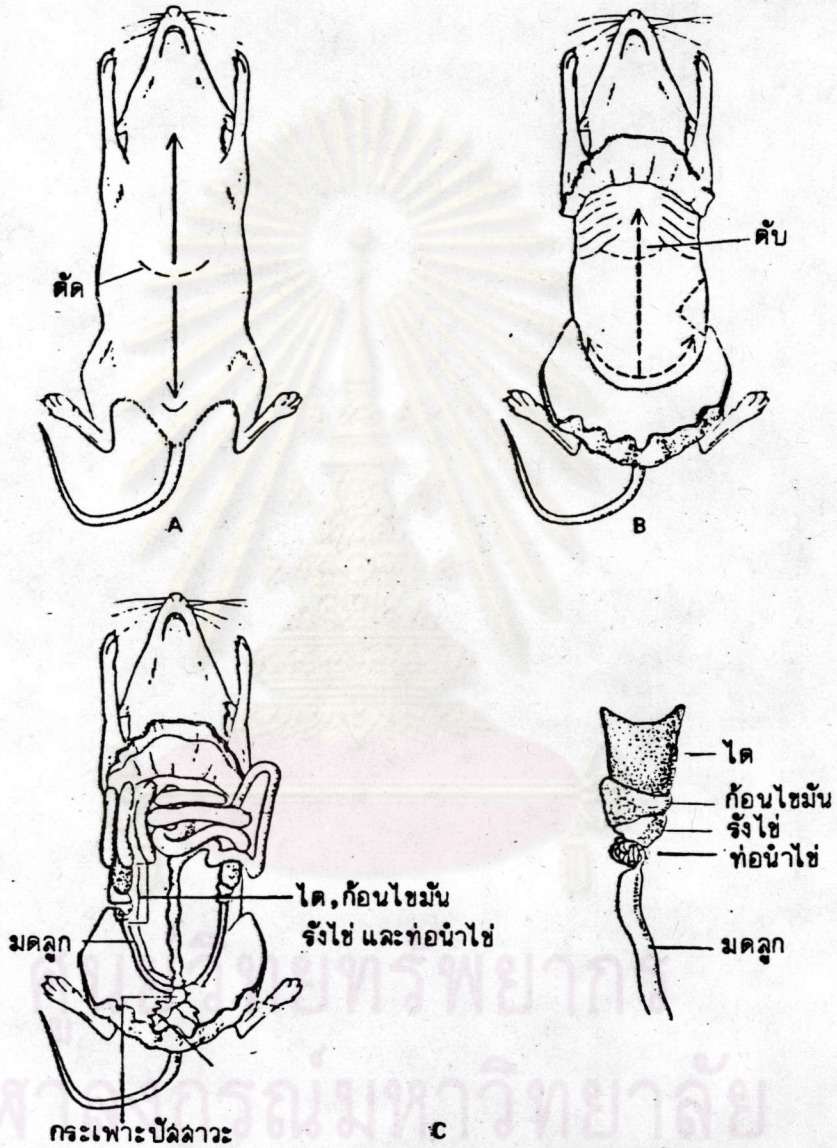
ทำให้หนูตายโดยวิธีการดึงคอต่อ (cervical dislocation) หลังจากฉีด hCG 36-40 ชั่วโมง สำหรับเอมบริโอระยะ 2-เซลล์ 44-48 ชั่วโมง สำหรับเอมบริโอระยะ 4-เซลล์ และ 66-70 ชั่วโมง สำหรับเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ทำความสะอาดหน้าท้องหนูเมาซ์ด้วยแอลกอฮอล์ 70% ผ่าตัดเปิดหน้าท้องด้วยเครื่องมือที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ตัดท่อนำไข่ทั้งสองข้างดังรูปที่ 2.1 และ 2.2 ใส่ใน embryological watch glass ซึ่งมีน้ำยา PBS ที่ผสม FCoS 10 % อยู่ประมาณ 1.5 มล. เพื่อล้างเลือดและไขมันออกนำท่อนำไข่ใส่ใน embryological watch glass ที่มีน้ำยา PBS 1 หยด (ประมาณ 20 ไมโครลิตร) นำมาดูด้วยกล้องขยายชนิด dissecting โดยใช้กำลังขยาย 30-40 เท่า ฉีดชับเอมบริโอจากท่อนำไข่ โดยใช้ปลายเข็มเบอร์ 30 ที่สวมติดกับ syringe 1 มล. สอดเข้าทาง fimbria ดังรูปที่ 2.3 แล้วฉีดน้ำยา PBS ผ่านทาง fimbria หลังจากนั้นดูดเก็บเอมบริโอระยะ 2- ,4- และ 8- เซลล์ที่ได้โดยใช้ pasteur pipette ที่ลนไฟแล้วดึงปลายให้เรียวเล็ก ดังรูปที่ 2.4

2. เอมบริโอระยะบลาสซิส สำหรับการถ่ายฝาก

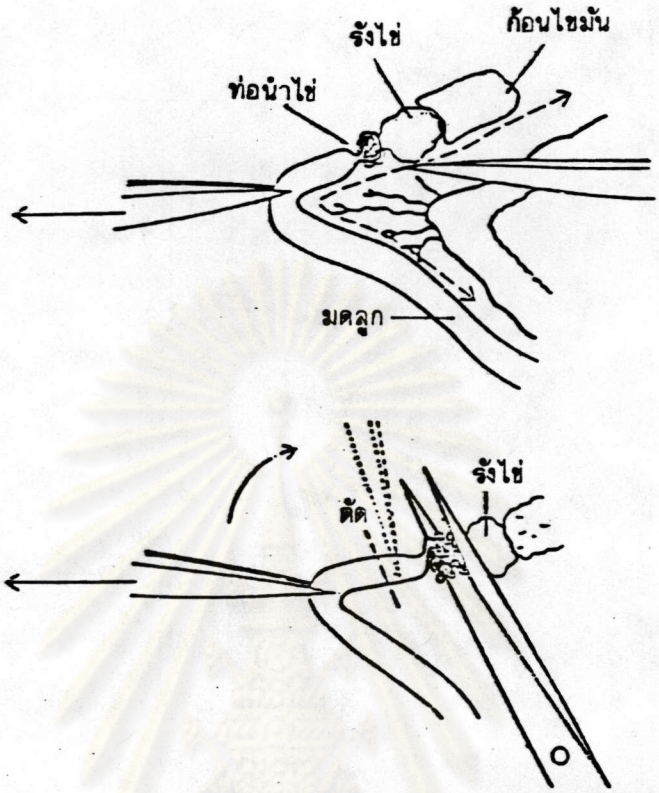
เก็บเอมบริโอจากมดลูกของหนูเมาซ์ หลังจากฉีด hCG แล้วผสมพันธุ์กับหนูเพศผู้เป็นเวลา 92-96 ชั่วโมง ก่อนนำไปถ่ายฝากล้างด้วยน้ำยา PBS 2 ครั้ง

การแช่แข็ง (Freezing)

ล้างเอมบริโอระยะ 2- ,4- และ 8- เซลล์ ด้วยน้ำยา PBS แล้วจึงย้ายเอมบริโอใส่ใน petri dish ที่มี 1,2- Propanediol ความเข้มข้น 1.5 โมลาใน PBS 100 ไมโครลิตร เป็นเวลานาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 23 องศาเซลเซียส) จากนั้นนำเอมบริโอบรรจุใส่ใน plastic straw ขนาด 0.25 มล. ดังรูปที่ 2.5

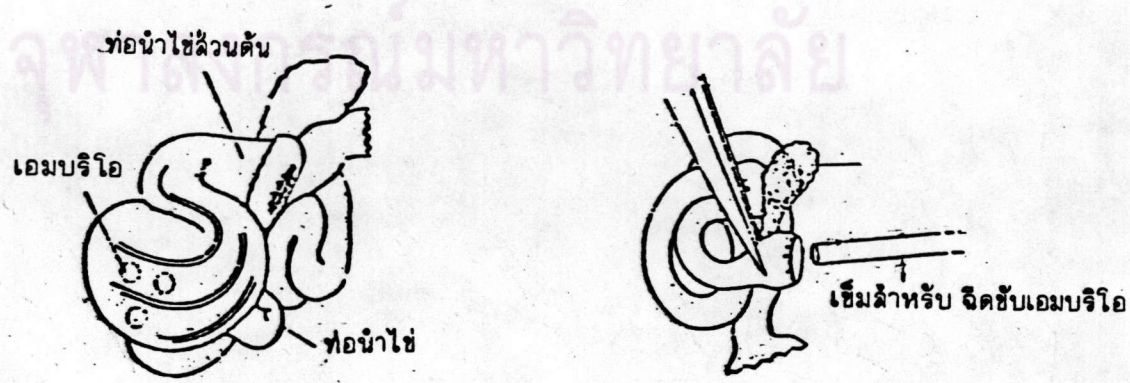


รูปที่ 2.1 แสดงการผ่าตัดหน้าท้อง เพื่อตัดท่อนำไข่ออกจากมดลูก

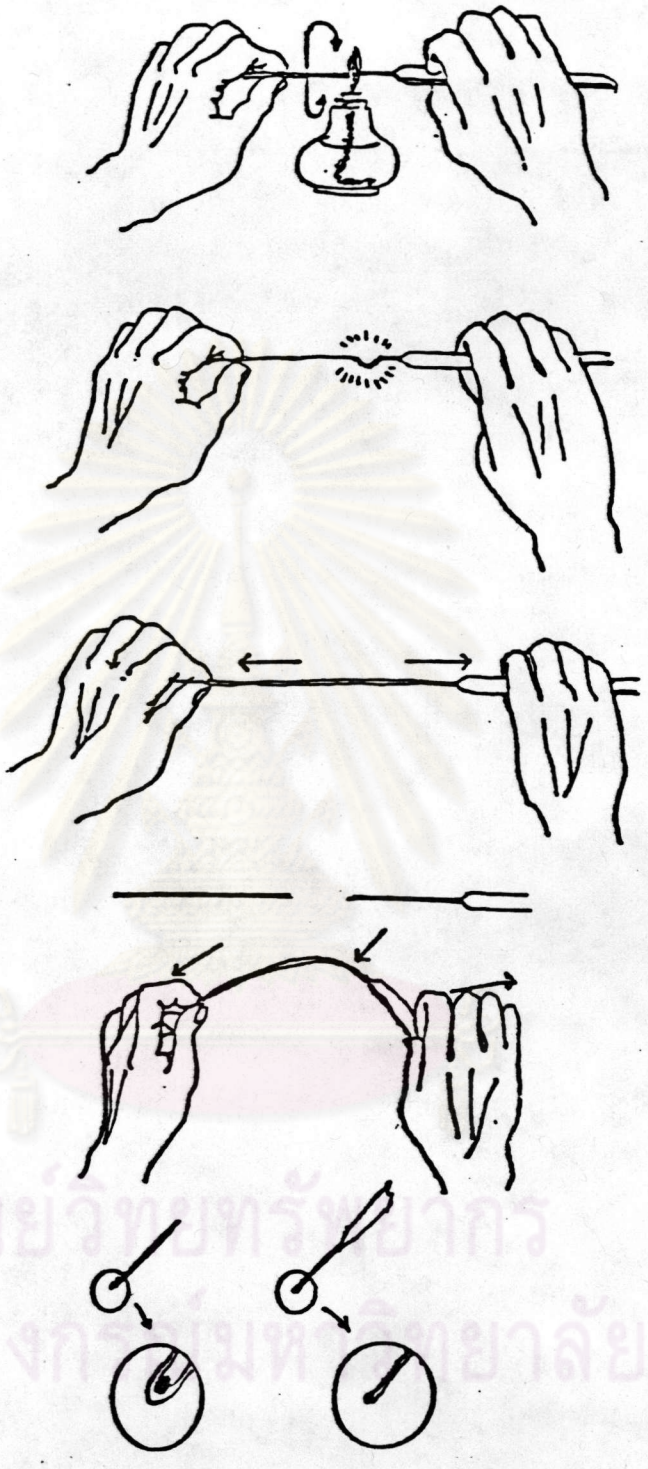


รูปที่ 2.2 แสดงการตัดท่อนำไข่ออกจากมดลูก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

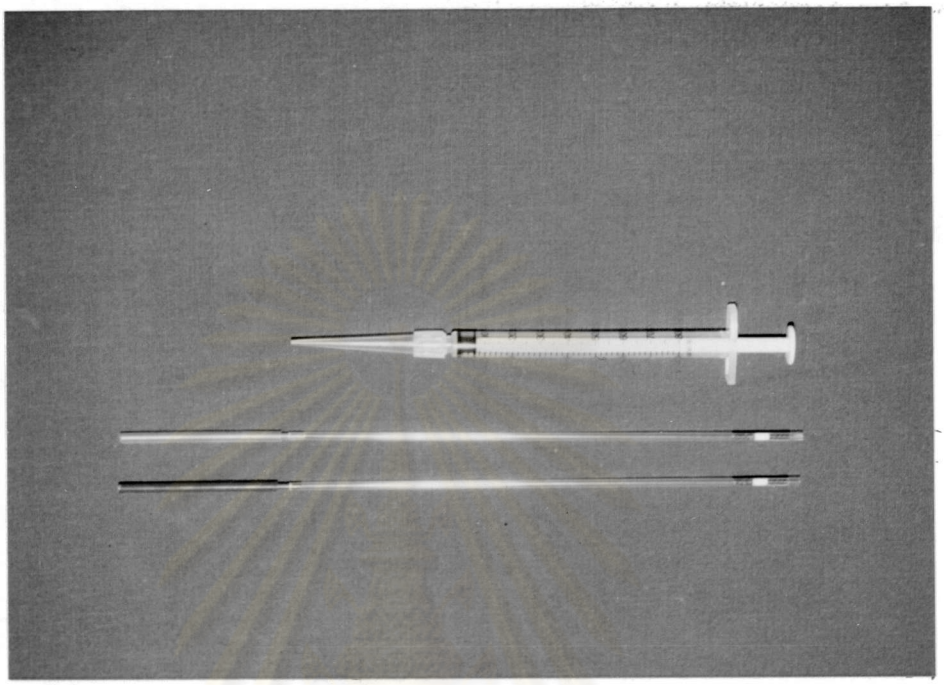


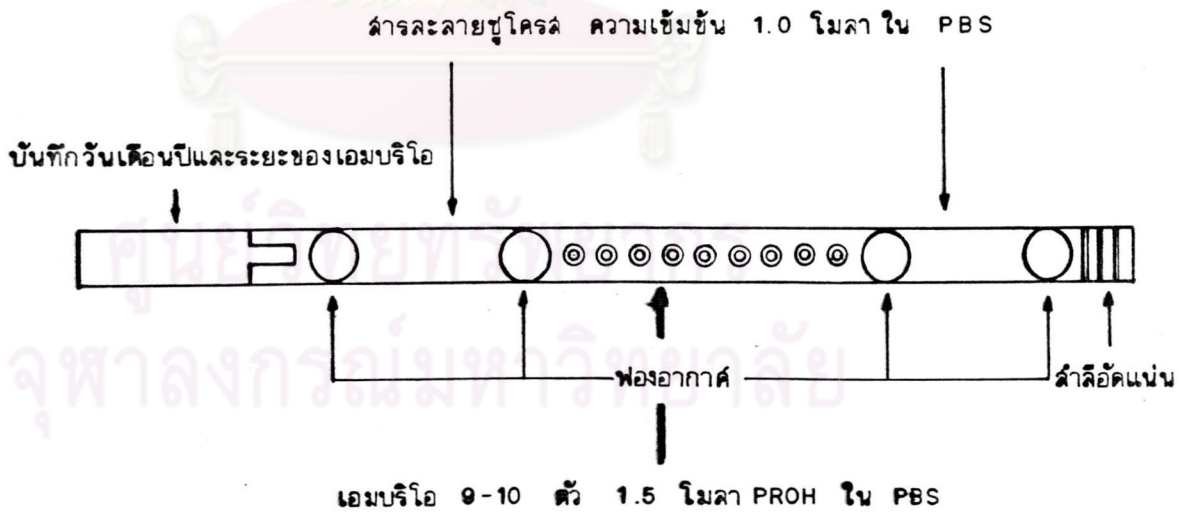
รูปที่ 2.3 แสดงการฉีดชับเอมบริโอออกจากท่อนำไข่



รูปที่ 2.4 แสดงวิธีการดึง Pasteur pipette

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 2.5 แสดงการบรรจุเอมบริโอใน plastic straw

นำ plastic straw ใส่ในเครื่อง Programmable biological freezer (Planer Biomed,Kryo 10 series,England) ดังรูปที่ 2.6 โดยใช้โปรแกรมดังนี้ คือ จากอุณหภูมิห้องประมาณ 23 องศาเซลเซียส ลดอุณหภูมิด้วยอัตราเร็ว 2 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ -7 องศาเซลเซียส ทำ seeding โดยใช้ forceps จุ่มในไนโตรเจนเหลวให้เย็นจัด แล้วนำมาแตะที่ plastic straw เหนือบริเวณที่มีเอมบริโออยู่ ดังรูปที่ 2.7 ให้อุณหภูมิคงที่ -7 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิ ด้วยอัตราเร็ว 0.3 องศาเซลเซียสต่อนาที จนกระทั่งอุณหภูมิถึง -30 องศาเซลเซียส รักษาอุณหภูมิให้คงที่ไว้เป็นเวลานาน 20 นาที จึงนำ plastic straw จุ่มลงในไนโตรเจนเหลว ดังรูปที่ 2.8

การเก็บเอมบริโอไว้ในไนโตรเจนเหลว

เก็บเอมบริโอในไนโตรเจนเหลว เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับการศึกษาระยะของเอมบริโอที่เหมาะสมในการเก็บรักษาโดยการแช่แข็ง และเก็บไว้เป็นเวลานาน 1,28 และ 56 วัน เพื่อให้สอดคล้องกับระยะรอบระดูของคน สำหรับการศึกษา ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเอมบริโอโดยการแช่แข็ง โดยทำการบันทึกระยะของเอมบริโอ วันเดือนปี และเวลาในการทดลอง บนแผนผังของถังไนโตรเจนเหลวเพื่อสะดวก ในการนำเอมบริโอมาทำการละลายต่อไป และตรวจวัดไนโตรเจนเหลวในถังให้มีระดับคงที่สม่ำเสมอ

การละลายและการเจือจางสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง

เมื่อเก็บเอมบริโอไว้จนครบระยะเวลาที่กำหนดแล้ว นำ plastic straw ที่มีเอมบริโอแต่ละระยะ ตั้งแต่ 2-,4- และ 8-เซลล์ ออกจากไนโตรเจนเหลวมาทำการละลายด้วยการจุ่มลงใน waterbath ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำแข็งใน plastic straw ละลายจนหมดประมาณ 1 นาทีหลังจากนั้นทำการเจือจางสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง โดยใช้ syringe 1 มล. ดันสารละลายทั้งหมดใน plastic straw ใส่ใน petri dish ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 10 นาที (ประมาณ 23 องศาเซลเซียส) เพื่อให้สารละลายซูโครส ความเข้มข้น 1.0 โมลา ดึงสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 1, 2-Propanediol ออกจากเอมบริโอ ล้างเอมบริโอด้วยน้ำยา PBS 2 ครั้ง

การประเมินผลภายหลังการแช่แข็ง

หลังจากล้างเอมบริโอด้วยน้ำยา PBS แล้ว นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทัศน์ชยายชนิด dissecting ด้วยกำลังขยาย 400 เท่า เพื่อดูลักษณะรูปร่างที่ปกติและผิดปกติ โดยเปรียบเทียบ

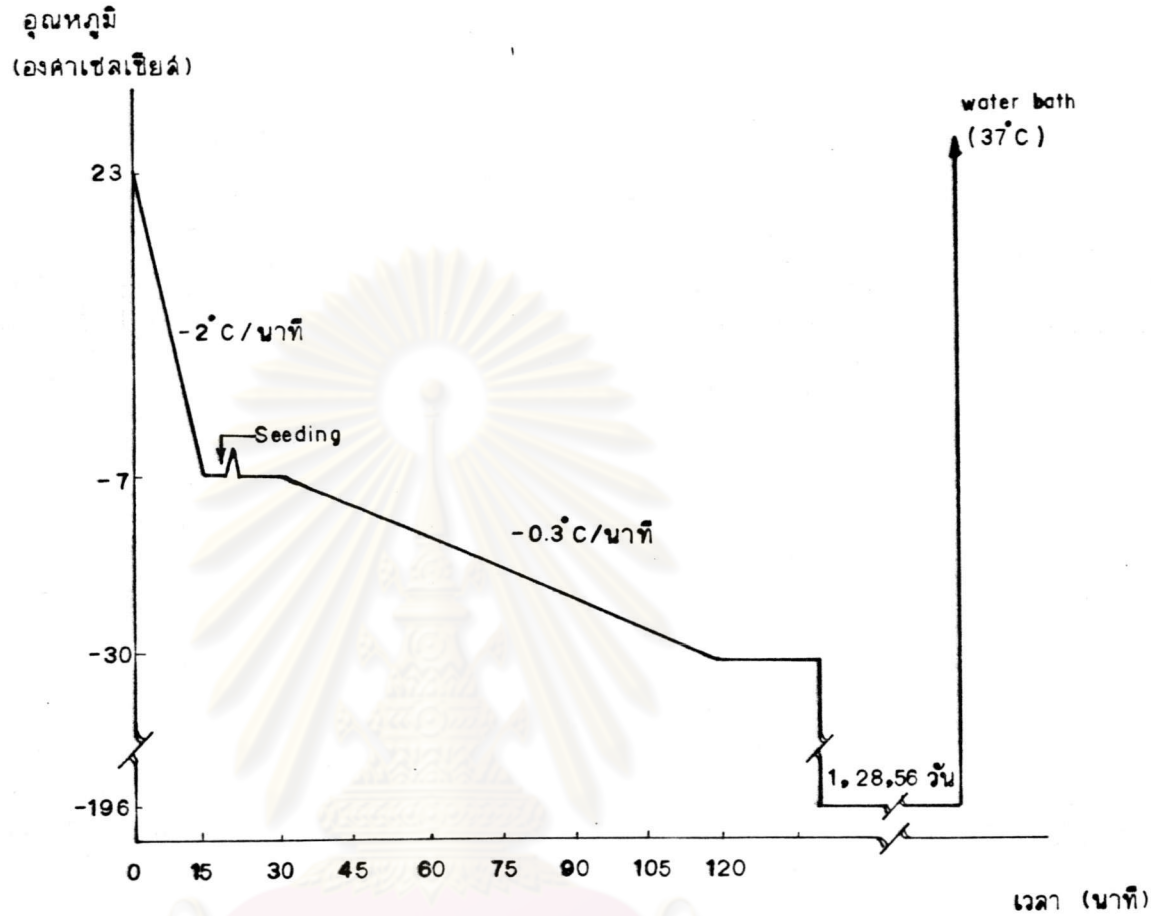
รูปที่ 2.6 แสดงเครื่อง Programmable biological freezer

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. Forceps
2. Plastic straw

รูปที่ 2.7 แสดงการทำ seeding โดยใช้ forceps จุ่มในไนโตรเจนเหลว ให้เย็นจัด แล้วนำมาแตะที่ plastic straw เหนือบริเวณที่มีเอมบริโออยู่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.8 แสดงลำดับขั้นตอนการแช่แข็งและการละลาย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กับเอมบริโอกลุ่มควบคุม (ไม่ผ่านการแช่แข็ง)

สำหรับการประเมินผลเอมบริโอที่มีลักษณะรูปร่างปกติและผิดปกติ ดังรูปที่ 2.9 โดยดูจากเซลล์ blastomere ของเอมบริโอและชั้น zona pellucida ที่ล้อมรอบเอมบริโอ

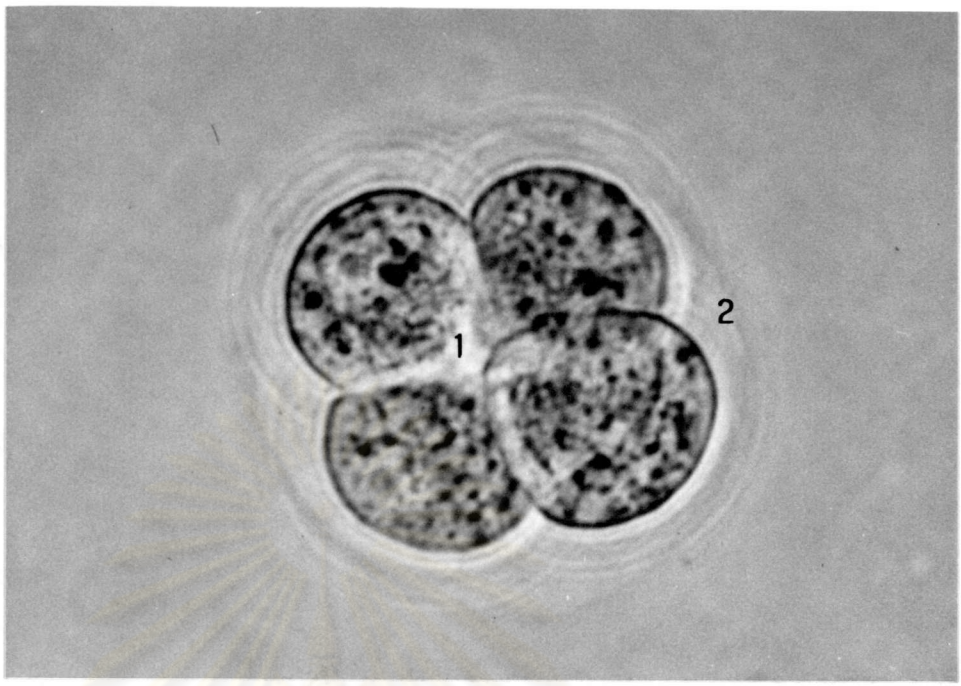
การเพาะเลี้ยงเอมบริโอภายหลังการแช่แข็ง

นำเอมบริโอเฉพาะที่มีลักษณะรูปร่างที่ปกติ ล้างด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยง HTF 2 ครั้ง จึงนำไปใส่ใน 4-well multidish ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยแต่ละหลุมมีน้ำยาเพาะเลี้ยง 1 ซีซี จะใส่เอมบริโอไว้ ไม่เกิน 20 ตัว นำไปเลี้ยงในตู้อบที่มีไอน้ำอิ่มตัว ปรับอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 37 $\pm$ 0.5 องศาเซลเซียสและภายใต้บรรยากาศของอากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 โดยตรวจระดับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในตู้อบด้วย Bacharach Fyrite สังเกตการเจริญเติบโตของเอมบริโอจนถึงระยะบลาสโตซิสเป็นระยะทุก 24 ชั่วโมง ด้วย Inverted microscope ซึ่งมีกำลังขยาย 400 เท่า บันทึกจำนวนเอมบริโอที่เจริญเติบโตถึงระยะบลาสโตซิส ดังรูปที่ 2.10 ซึ่งใช้เวลาประมาณ 72-76 และ 48-52 ชั่วโมง หลังจากเริ่มต้นเพาะเลี้ยงจากระยะ 2- และ 4-,8- เซลล์ ตามลำดับ

การถ่ายฝากเอมบริโอ (Embryo Transfer)

1. การทำหมันหนูเมาซ์เพศผู้ (vasectomized mouse) สำหรับใช้ผสมพันธุ์ให้เกิดการตั้งท้องเทียมในหนูเมาซ์เพศเมีย

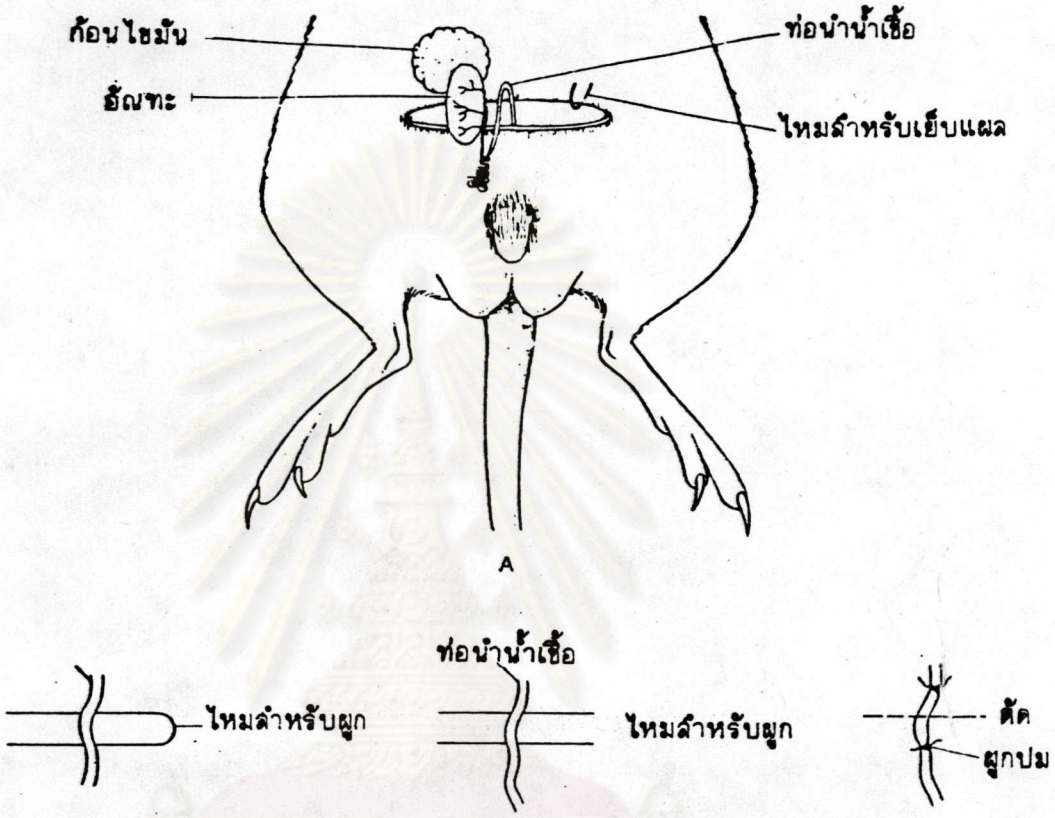
ใช้หนูเมาซ์เพศผู้ พันธุ์ ICR อายุ 6-12 เดือน ทำให้สลบด้วยอีเธอร์(ether) ทำความสะอาดบริเวณถุงอัณฑะ (scrotum) ด้วยแอลกอฮอล์ 70 % เปิดผิวหนัง บริเวณถุงอัณฑะ (midline incision) ด้วยกรรไกรและ forceps ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วผูก vas deferens ซึ่งเป็นส่วนที่ต่อจาก epididymis ดังรูปที่ 2.11 แล้ว จึงตัดออกประมาณ 0.5 ซม.และเย็บปิดผิวหนังบริเวณนั้น สำหรับ vas deferens อีกข้างหนึ่ง ทำเช่นเดียวกัน หนูเมาซ์ที่ทำ vasectomy แล้ว แยกขังเดี่ยวไว้ ประมาณ 10 วัน เพื่อให้ sperm หมด ก่อนนำไปผสมกับหนูเมาซ์เพศเมีย ซึ่งการตัด vas deferens ออก จะไม่มีผลต่อการผสมพันธุ์ในหนูเพศผู้ ทั้งนี้เพราะอัณฑะยังคงมีอยู่และทำหน้าที่ได้ตามปกติ sperm ที่สร้างขึ้นจะสลายตัวไปใน epididymis ส่วน seminal vesicles และ secretory gland อื่น ๆ ยังคงมีอยู่ ดังนั้นเมื่อหนูเพศเมียมาผสมจะพบ plug ได้ตามปกติ



รูปที่ 2.9 แสดงเอมบริโอระยะ 4-เซลล์ ที่มีลักษณะรูปร่างปกติภายหลังการแช่แข็ง โดยที่ blastomere และ zona pellucida ไม่ถูกทำลาย (กำลังขยาย 400 เท่า)

1. Blastomere
2. Zona pellucida

รูปที่ 2.10 แสดงเอมบริโอระยะ early hatching blastocyst ซึ่งเจริญเติบโตจากเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ ภายหลังการแช่แข็ง และเพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง HTF (กำลังขยาย 400 เท่า)



รูปที่ 2.11 แสดงการทำ Male vasectomy

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การเตรียมหนูเมาซ์เพศเมียให้เกิดการตั้งท้องเทียม (pseudopregnancy) สำหรับเป็นหนูตัวรับ (recipient)

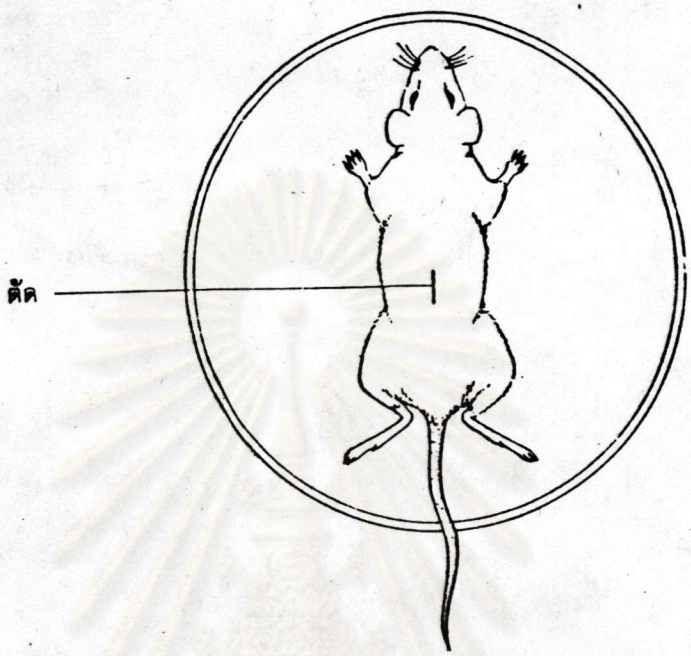
ใช้หนูเมาซ์เพศเมีย พันธุ์ ICR อายุ ประมาณ 6-8 สัปดาห์ กระตุ้นให้เกิดการเป็นสัดพร้อมกัน โดยฉีด PMSG เข้าช่องท้อง ตัวละ 10 i.u. ในน้ำกลั่น 0.10 มล. 48 ชั่วโมงต่อมาฉีด hCG เข้าช่องท้อง ตัวละ 10 i.u. ในน้ำกลั่น 0.10 มล. เช่นเดียวกันกับหนูตัวให้ (donor) แล้วนำไปผสมพันธุ์กับหนูเมาซ์เพศผู้ที่เป็นหมัน (vasectomized mouse) ทันที เช้าวันรุ่งขึ้น ตรวจดู vaginal plug ถ้าพบแสดงว่าได้รับการผสมพันธุ์ และถือเป็นวันที่ 1 ของการตั้งท้องเทียมบางครั้งหนูที่ไม่พบ vaginal plug ก็เกิดการตั้งท้องเทียมและใช้เป็นหนูตัวรับได้เหมือนกัน การถ่ายฝากจะทำในหนูตัวรับที่ตั้งท้องเทียมเป็นวันที่ 3

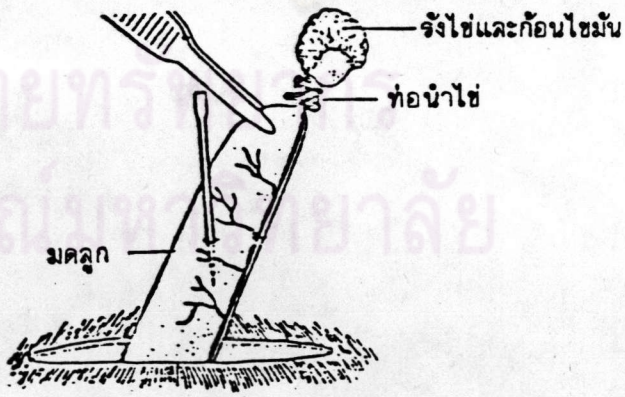
3. วิธีการถ่ายฝากเอมบริโอ ดังรูปที่ 2.12

นำเอมบริโอระยะบลาสโตซิส ล้างด้วยน้ำยา PBS 2 ครั้ง เพื่อเอาน้ำยาเพาะเลี้ยง HTF ออก นำเอมบริโอไปใส่ในมดลูกของหนูตัวรับที่ตั้งท้องเทียมเป็นวันที่ 3 โดยที่ระยะเวลาการตั้งท้องเทียมเหลื่อมล้ำกับอายุของเอมบริโอที่นำมาถ่ายฝาก 1 วัน วางยาสลบหนูตัวรับด้วยอีเธอร์ ทำความสะอาดบริเวณผิวหนังด้วยแอลกอฮอล์ 70 % ผ่าตัดเปิดด้านหลัง (dorsal mid-line incision) ในแนวระดับชิ้นโครงชิ้นสุดท้าย ใช้ forceps ดึงก้อนไขมันที่มีรังไข่ ท่อนำไข่และส่วนต้นของมดลูกออกมา ใช้เข็มเบอร์ 26 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เจาะที่บริเวณต่ำจาก utero-tubal junction เล็กน้อยจิงสอด capillary pipette ที่มีเอมบริโอระยะบลาสโตซิสดังรูปที่ 2.13 แล้วค่อย ๆ เป่าดันเอมบริโอออกจาก capillary pipette เข้าสู่มดลูก โดยสังเกตจากการเคลื่อนที่ของฟองอากาศ ซึ่งทำเครื่องหมายไว้บริเวณส่วนปลายของ capillary pipette เหนือตำแหน่งที่มีเอมบริโออยู่ทำเช่นนี้ทั้งมดลูกซ้ายและขวา โดยทำการถ่ายฝากเอมบริโอที่ผ่านการแช่แข็งไปยังมดลูกข้างใดข้างหนึ่งจำนวน 6 ตัว ส่วนมดลูกด้านตรงกันข้ามทำการถ่ายฝากเอมบริโอระยะเดียวกันจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการแช่แข็งและการเพาะเลี้ยง (ได้จากการเจริญในร่างกาย 92-96 ชั่วโมง หลังจากฉีด hCG) หลังจากนั้น จิงเก็บมดลูกเข้าสู่ที่เดิม แล้วเย็บปิดแผลและเลี้ยงแยกกรงไว้ต่างหาก เพื่อดูการฝังตัวของเอมบริโอต่อไป

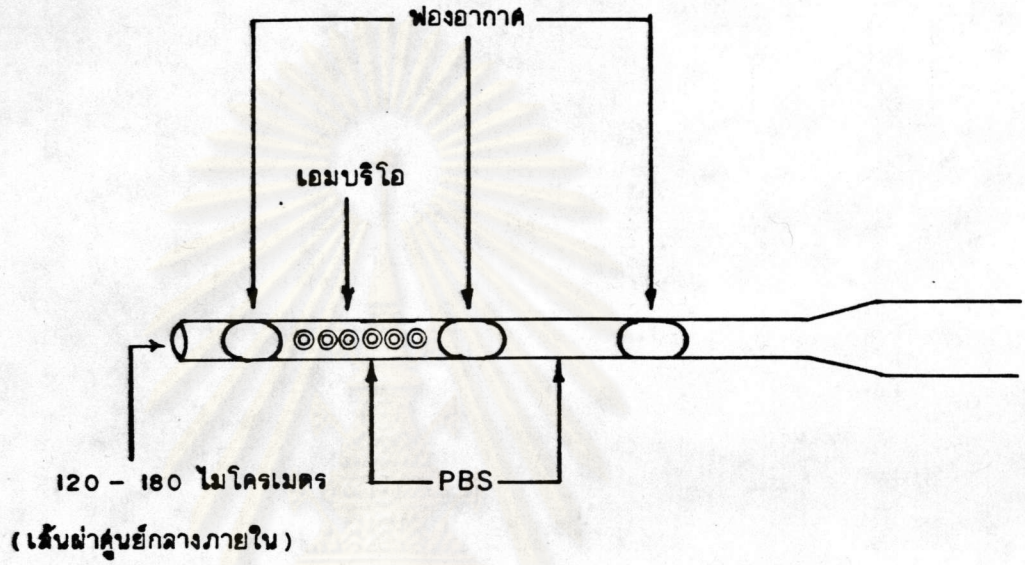
ภายหลังการถ่ายฝากเอมบริโอ 7 วัน นำหนูเมาซ์ตัวรับดังกล่าว มาฆ่าโดยการดึงคอต่อผ่าตัดเปิดหน้าท้อง นับจำนวนฟีตัสในมดลูกแต่ละข้าง ดังรูปที่ 2.14 ซึ่งเป็นจำนวนเอมบริโอที่ฝังตัว จดบันทึกไว้นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบทางสถิติ

I17514903





รูปที่ 2.12 แสดงการถ่ายฝากเอมบริโอที่มดลูกระยะบลาสโตซิล ไปยังบริเวณมดลูกของหนูตัวรับที่ตั้งท้องเทียม



รูปที่ 2.13 แสดงการบรรจุเอมบริโอใน capillary pipette เพื่อนำไปถ่ายฝากยังหนูตัวรับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2.14 แสดงลักษณะมดลูกของหนูตัวรับที่ตั้งท้อง 10 วัน แต่ละปุ่ม คือ บริเวณที่มีการฝังตัวของเอมบริโอ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถิติวิเคราะห์

การเปรียบเทียบผลการเจริญเติบโตถึงระยะบลาสโตซิสของเอมบริโอที่แช่แข็งในระยะ 2-, 4- และ 8- เซลล์ ที่แช่แข็งด้วย Cryoprotctants ชนิดต่าง ๆ (PROH, DMSO และ Glycerol) และที่เก็บในไนโตรเจนเหลวในช่วงเวลาต่าง ๆ (1,28 และ 56 วัน) ภายหลังการแช่แข็งในแต่ละการทดลอง รวมทั้งการเปรียบเทียบผลการฝังตัวของบลาสโตซิส

โดยใช้ Z - Test เป็นค่าสถิติในการทดสอบเปรียบเทียบ

การเปรียบเทียบผลของระยะการเจริญถึงระยะบลาสโตซิส ภายหลังการแช่แข็ง ใช้ Chi-Square test เป็นค่าสถิติในการทดสอบเปรียบเทียบ

กำหนดให้ระดับความเชื่อมั่นมีนัยสำคัญ ที่ $p < 0.05$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย