

**การทดลองที่ 1 ผลของสารเคมีที่ใช้กระตุ้นไข่กระบือปลักภายหลังการฉีดตัวอสุจิเข้าในไซโตพลาสซึมต่ออัตรา
การเจริญเติบโตของตัวอ่อน
(Effect of chemical activation treatment on the development of swamp buffalo (*Bubalus
bubalis*) follicular oocytes following intracytoplasmic sperm injection)**

บทนำ

กระบือปลักเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่มีความสำคัญทั้งการให้เนื้อ หนัง และแรงงานทางการเกษตร โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ กระบือปลักเป็นสัตว์ที่ทนความร้อนและความแห้งแล้งได้ดี แต่ประสิทธิภาพของระบบสืบพันธุ์ต่ำกว่าโค เนื่องจากมีการเป็นสัดเฉียบ ระยะห่างการตกูกมาก อายุถึงวัยเจริญพันธุ์มาก และมีจำนวนฟอลลิเคิลในรังไข่น้อย ทำให้อัตราการเกิดลูกต่ำ แม้ว่าจะมีการนำเทคโนโลยีชีวภาพมาช่วยเพิ่มจำนวนกระบือปลักให้มีจำนวนมากขึ้น เช่นการเหนี่ยวนำการตกไข่และผสมเทียม การย้ายฝากตัวอ่อน การเก็บไข่จากกระบือมีชีวิตด้วยอัลตราซาวด์ร่วมกับการผลิตตัวอ่อนในหลอดแก้ว แต่ยังไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้รวดเร็วกว่าเดิม การใช้น้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อผสมเทียมและทำปฏิสนธิในหลอดแก้วในกระบือปลักยังประสบปัญหาอัตราการปฏิสนธิต่ำเนื่องจากตัวอสุจิหลังทำลายมีอัตราความอยู่รอดต่ำ เพื่อลดปัญหาดังกล่าวจึงมีการทำการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไข่ (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) ซึ่งมีการทำอย่างได้ผลดีมาแล้วในหนูแฮมสเตอร์ หนูถีบจักร และมนุษย์ โดยหลังจากทำ ICSI ไข่จะมีการแบ่งตัวโดยไม่จำเป็นต้องกระตุ้นอีก แต่ในโคและสุกรจำเป็นต้องทำการกระตุ้นไข่หลังจากทำ ICSI แล้ว สำหรับในกระบือปลักมีรายงานการทำ ICSI น้อยมาก และยังไม่มีการศึกษาถึงการกระตุ้นที่เหมาะสมต่ออัตราการแบ่งตัวของไข่ และการเจริญของตัวอ่อน การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาสารเคมีที่เหมาะสมในการกระตุ้นไข่กระบือปลักหลังจากทำ ICSI โดยทำการเปรียบเทียบสารเคมี 4 ตัวร่วมกันในการกระตุ้นไข่เพื่อศึกษาอัตราการเกิด 2nd PB การเกิด pronucleus การแบ่งตัว และการเจริญเติบโตของตัวอ่อนหลังจากเลี้ยงในหลอดแก้ว

วิธีการทดลอง

การเตรียมไข่

เก็บรังไข่กระบือจากโรงฆ่าสัตว์ไว้ในน้ำเกลือขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ แล้วใช้เข็มเบอร์ 21G ต่อกับกระบอกฉีดขนาด 10 ซีซี ดูดไข่จากฟอลลิเคิลที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-8 มม. ทำการคัดเลือกไข่ที่มีชั้นเซลล์คิวมูลัสหุ้มอย่างน้อย 3 ชั้นไปเลี้ยงในน้ำยาในงานเลี้ยงเซลล์ซึ่งปิดคลุมน้ำยาด้วย mineral oil เลี้ยงในสัดส่วน 10 ใบ/50 μ L น้ำยาเลี้ยงไข่ประกอบด้วย TCM199 ที่เติมด้วย 10% FCS, 50 IU/mL HCG, 0.02 AU/mL FSH และ 1 μ g/mL E₂ นำไปเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂ นาน 22 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไข่กระบือที่ผ่านการเลี้ยงในหลอดแก้วมาแล้วมาย่อยเซลล์คิวมูลัสออก แล้วคัดเลือกเฉพาะใบที่สุกแล้ว (มี first polar body, 1st PB) เก็บไว้ในน้ำยา Emcare holding เพื่อเตรียมไว้ทำ ICSI

การเตรียมตัวอสุจิ

นำน้ำเชื้อกระป๋องแช่แข็งครั้งละ 1 หลอดมาละลายใน 7 mL น้ำยา BO (Bracket และ Oliphant, 1975) ที่เติมด้วย 10 mM Caffeine และปั่นที่ 500x g นาน 5 นาที แล้วนำ sperm pellet มาไว้ก้นหลอด conical tube ที่มีน้ำยา BO อยู่ 1.5 mL นำหลอดน้ำยาไปตั้งเอียง 45 องศาที่อุณหภูมิ 38.5 °C นาน 30 นาที เพื่อทำ swim up จากนั้นใช้ปิเปตคูดน้ำยาส่วนบน 1 mL ไปผสมกับน้ำยา BO 7 mL และปั่นที่ 500x g นาน 5 นาที นำ sperm pellet มาเติมด้วยน้ำยา BO เพื่อปรับให้มีความเข้มข้นตัวอสุจิ 8×10^6 /mL

การทำ ICSI

นำไข่ที่สุกแล้วครั้งละ 10 ใบไว้ในน้ำยา Emcare holding ที่ทำหยอดไว้ 50 μ L ที่ปิดคลุมด้วย mineral oil เพื่อใช้สำหรับฉีดอสุจิ โดยทำ ICSI ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับกำลังขยาย 200 เท่า นำตัวอสุจิที่เตรียมไว้แล้วผสมในสัดส่วน 1:1 ด้วย 12% PVP ที่ละลายในน้ำยา Emcare holding โดยจะเตรียมหยอดน้ำยาสำหรับฉีดอสุจิ 1 หยด และน้ำยาที่มี PVP ที่มีอสุจิอยู่ 2 หยดๆละ 10 μ L บนฝาจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มม. ใช้ปิเปตฉีดอสุจิที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 8-10 ไมครอน ทำ immobilize อสุจิแต่ละตัว ด้วยการกดลงตรงกลางทาง แล้วคูดอสุจิให้เข้าไปในปิเปตโดยให้ส่วนหางเข้าก่อน ใช้ holding pipette คูดไข่ให้ตำแหน่ง 1" PB อยู่ที่ 6 หรือ 12 นาฬิกา และปรับให้ปิเปตฉีดอสุจิอยู่ที่ตำแหน่ง 3 นาฬิกา ระหว่างที่ใช้ปิเปตแทงเข้าไปในไซโตพลาสซึม จะคูดไซโตพลาสซึมเล็กน้อยเพื่อยืนยันว่าแทงผ่านเยื่อหุ้มไข่แล้ว ทำการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไซโตพลาสซึมของไข่โดยมีน้ำยาเข้าไปให้น้อยที่สุด (<5 μ L) ในกลุ่มควบคุม (sham injection) จะทำการฉีดน้ำยาเข้าไปในไข่อย่างเดียว นำไข่ที่ทำ ICSI แล้วเก็บไว้ในน้ำยา Emcare holding เพื่อรอทำการกระตุ้นต่อไป

การกระตุ้นไข่หลังฉีดตัวอสุจิ

การกระตุ้นจะทำภายใน 1 ชั่วโมงหลังจาก ICSI โดยในเบื้องต้นจะทดสอบการเกิด 2nd PB ภายหลังการกระตุ้นด้วยสารเคมี 2 ชนิดคือ 5 μ M Ionomycin (Io) นาน 5 นาที และ 7% ethanol (EtOH) นาน 5 นาที ที่ 3, 6 และ 9 ชั่วโมง

โดยแบ่งการกระตุ้นออกเป็น 4 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 1: นำไข่ไว้ใน 5 μ M Io ที่ละลายในน้ำยา Emcare holding นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และล้างในน้ำยา Emcare holding 3 ครั้ง แล้วนำไปไว้ในน้ำยา TCM199+10% FCS ที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂ นาน 3 ชั่วโมง แล้วนำไปตรวจสอบการเกิด 2nd PB คัดเฉพาะไข่ที่มี 2nd PB ไปเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa+0.3% BSA ที่มี 2.0 mM 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) ที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂ นาน 3 ชั่วโมง การกระตุ้นชนิดนี้ใช้ชื่อว่า Io+6-DMAP

กลุ่มที่ 2: นำไข่ไว้ใน 5 μ M Io ที่ละลายในน้ำยา Emcare holding นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และล้างในน้ำยา Emcare holding 3 ครั้ง แล้วนำไปไว้ในน้ำยา TCM199+10% FCS ที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂ นาน 3 ชั่วโมง แล้วนำไปตรวจสอบการเกิด 2nd PB คัดเฉพาะไข่ที่มี 2nd PB ไปเลี้ยงในน้ำยา

mSOFaa+0.3% BSA ที่มี 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cycloheximide (CHX) ที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 5 ชั่วโมง การกระตุ้นชนิดนี้ใช้ชื่อว่า Io+CHX

กลุ่มที่ 3: นำไข่ไว้ใน 7% EtOH ที่ละลายในน้ำยา Emcare holding นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และล้างในน้ำยา Emcare holding 3 ครั้ง แล้วนำไปไว้ในน้ำยา TCM199+10% FCS ที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 3 ชั่วโมง แล้วนำไปตรวจสอบการเกิด 2nd PB คัดเฉพาะไข่ที่มี 2nd PB ไปเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa+0.3% BSA ที่มี 2.0 mM 6-DMAP ที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 3 ชั่วโมง การกระตุ้นชนิดนี้ใช้ชื่อว่า EtOH+6-DMAP

กลุ่มที่ 4: นำไข่ไว้ใน 7% EtOH ที่ละลายในน้ำยา Emcare holding นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และล้างในน้ำยา Emcare holding 3 ครั้ง แล้วนำไปไว้ในน้ำยา TCM199+10% FCS ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 3 ชั่วโมง แล้วนำไปตรวจสอบการเกิด 2nd PB คัดเฉพาะไข่ที่มี 2nd PB ไปเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa+0.3% BSA ที่มี 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CHX ที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 5 ชั่วโมง การกระตุ้นชนิดนี้ใช้ชื่อว่า EtOH+CHX

การเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว

นำไข่ที่ผ่านการกระตุ้นแล้วมาเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa+0.3% BSA ในสัดส่วน 10-20 ใบ/100 μL ที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% O_2 , 5% CO_2 และ 90% N_2 นาน 2 วัน แล้วคัดเลือกตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ ไปเลี้ยงแบบ co-culture กับเซลล์บุท่อผนังไข่โค ในน้ำยา mSOFaa+0.3% BSA ในสัดส่วน 10 ใบ/100 μL แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 5 วัน เปลี่ยนน้ำยาทุกๆวัน พร้อมทั้งบันทึกการเจริญเติบโตของตัวอ่อน

การตรวจสอบการเกิดโปรนิวเคลียส

นำไข่ที่ผ่านการทำ ICSI มาแล้ว 18 ชั่วโมงมาไว้บนสไลด์แก้วแล้วปิดด้วย cover slip แล้วนำไปไว้ใน ethanol:acetic acid (3:1, v:v) นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำไปย้อมด้วย 1% (w/v) aceto-orcein แล้วตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า เพื่อตรวจสอบ male และ female pronuclei

การนับจำนวนเซลล์ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์

นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์อายุ 7 วัน มาไว้ในน้ำยา 4% paraformaldehyde นาน 15 นาที แล้วนำไปล้าง 3 ครั้ง ในน้ำยา mDPBS+0.1% PVP แล้วนำไปไว้ในน้ำยา mDPBS+5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33258 นาน 5 นาที แล้วล้าง 3 ครั้งในน้ำยา mDPBS+0.1% PVP แล้วนำไปไว้บนสไลด์แก้ว ปิดด้วย glycerol แล้วปิดด้วย cover slide จากนั้นนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ fluorescence (IX71, Olympus, Japan) กำลังขยาย 400 เท่า เพื่อ นับจำนวนเซลล์ทั้งหมด

ผลการทดลอง

ผลการทดลองนี้ได้ตีพิมพ์ในวารสาร *Reproduction in Domestic Animal* (Liang Y.Y., Ye, D.N., Laowtammathron, C., Phermthai, T., Nagai, T., and Parnpai, R. 2010. Effects of chemical activation treatment on development of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes matured in vitro and fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Reprod. Domestic Anim.* doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01636.x) **ตั้ง**
รายละเอียดในเอกสารแนบหมายเลข 1