การทดลองที่ 4 อัตราการมีชีวิตรอดของไข่สุกกระบือปลักหลังจากแช่แข็งโดยวิธี Microdrop และ Cryotop vitrification และการเจริญของตัวอ่อนหลังจากทำ intracytoplasmic sperm injection

Survival rates of matured buffalo oocytes after vitrification by Microdrop and Cryotop and subsequent embryos development after intracytoplasmic sperm injection

บทนำ

การแช่แข็งไข่โดยวิธี vitrification ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าได้ผลดีในการเก็บรักษาตัวอ่อนและไข่ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งมีอยู่ด้วยกันหลายแบบ ได้แก่ Cryotop, Cryoloop, Open pulled straw, Glass micropipette, Microdrop, Electron microscope grid และ Solid surface vitrification ซึ่งในจำนวนนี้วิธี Microdrop เป็นวิธีที่มีผู้สนใจใช้กันมาก เนื่องจากไม่ต้องการอุปกรณ์พิเศษราคาแพง เป็นวิธีที่ทำง่ายและสะดวก โดยการหยดไข่ที่อยู่ในน้ำยาลงในไนโตรเจนเหลว ผู้วิจัยได้รายงานการทดลองแช่แข็งไข่สุกกระบือปลักโดยวิธี Microdrop vitrification โดยใช้น้ำยา vitrification ที่มีสาร croprotectant (CPA) สองชนิดคือ 20% dimethylsulfoxide (DMSO) และ 20% ethylene glycol (EG) รวมแล้วมีสาร CPA อยู่ 40% และใช้ 0.5 M sucrose เป็นสารช่วยทำให้เกิด membrane stabilizer เพื่อลดการเกิด osmotic shock ซึ่งได้ไข่มีชีวิตรอดสูงไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม และได้ ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสหลังจากทำ intracytoplasmic sperm injection (ICSI) นอกจากนี้มีรายงานการแช่แข็งไข่โดยใช้น้ำยา vitrification ที่มีสาร CPA เพียงชนิดเดียวคือ 35% EG โดยมีการเติม 5% polyvinylpyrrolidone (PVP) และ 0.4 M trehalose เพื่อช่วยให้การทำ vitrification ดีขึ้น วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อเปรียบเทียบผลของการทำ vitrification สองวิธีคือ Microdrop และ Cryotop และน้ำยา vitrification สองชนิด ต่ออัตราความมีชีวิตรอดของไข่สุกกระบือปลัก และการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซีสหลังจากทำ ICSI

วิธีการทดลอง

การเตรียมไข่

เก็บรังไข่กระบือจากโรงฆ่าสัตว์ไว้ในน้ำเกลือ ขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ แล้วใช้เข็มเบอร์ 21G ต่อกับกระบอกฉีดยาขนาด 10 ซีซี ดูดไข่จากฟอลลิเคิลที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-8 มม. ทำการคัดเลือกไข่ที่มีชั้นเซลล์คิวมูลัสหุ้มอย่างน้อย 3 ชั้นไปเลี้ยงในน้ำยาในจานเลี้ยงเซลล์ซึ่งปิดคลุมน้ำยาด้วย mineral oil เลี้ยงในสัดส่วน 10 ใบ/50 μL น้ำยาเลี้ยงไข่ประกอบด้วย TCM199 ที่เติมด้วย 10% FCS, 50 IU/mL HCG, 0.02 AU/mL FSH และ 1 μg/mL E_2 นำไปเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 21 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไข่กระบือที่ผ่านการเลี้ยงในหลอดแก้วมาแล้วมาย่อยเซลล์คิวมูลัสออก แล้วคัดเลือกเฉพาะใบที่สุกแล้ว (มี 1st PB) เก็บไว้ในน้ำยา Emcare holding เพื่อเตรียมไว้ทำการทดลอง

การแช่แข็งไข่

จะทำการแช่แข็งสองชนิดคือ Microdrop และ Cryotop vitrification ด้วยน้ำยาแช่แข็งสองชนิดคือ **VA** (10% EG + 10% DMSO นาน 1 นาที ตามด้วย 20% EG + 20% DMSO + 0.5M sucrose นาน 30 วินาที) และ **VB** (4% EG นาน 12-15 นาที ตามด้วย 35% EG + 5% PVP + 0.4M trehalose นาน 30 วินาที) และใช้ไข่สดเป็นกลุ่มควบคุม ซึ่งทำดังนี้

การแช่แข็งด้วยน้ำยา VA: นำไข่สุกกระบือปลักมาไว้ในน้ำยา equilibration solution (TCM199-Hepes + 20% FCS + 10% DMSO + 10% EG) นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิ 23-24 °C แล้วนำไปไว้ในน้ำยา vitrification solution (TCM199-Hepes + 20% FCS + 20% DMSO + 20% EG + 0.5 M Sucrose) ที่อุณหภูมิ 23-24 °C นาน 30 วินาที แล้วทำการแช่แข็ง 2 วิธีคือ **วิธี Microdrop** โดยใช้ปิเปตแก้วปลายเล็กดูดน้ำยา 2-3 µL พร้อมไข่ 5 ใบ ไปหยดลงในไนโตรเจนเหลวซึ่งอยู่ในกระทง aluminum foid ที่ลอยอยู่ในไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม จากนั้นนำ Microdrop ของน้ำยาที่แข็งแล้วไปไว้ใน cryotube แล้วนำไปเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว หรือ **วิธี Cryotop** โดยใช้ปิเปตแก้วปลายเล็กดูดน้ำยา 2-3 µL พร้อมไข่ 5 ใบ ไปวางไว้ที่ปลายของ Cryotop (Kitazato Supply Co. Tokyo, Japan) แล้วดูดน้ำยาที่อยู่รอบๆไข่ออกให้มากที่สุดเท่าที่จะมากได้ จากนั้นนำ Cryotop ไปจุ่มในไนโตรเจนเหลว แล้วนำไปเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว การทำละลายไข่ทำโดยใช้ปากคีบคีบ Mirodrop จากไนโตรเจนเหลว หรือนำ Cryotop จากไนโตรเจนเหลว แล้วนำไปไว้ในน้ำยา TCM199-Hepes + 20% FCS + 0.5 M Sucrose ที่อุณหภูมิ 38 °C นาน 5 นาที แล้วนำไปไว้ในน้ำยา TCM199-Hepes + 20% FCS ที่อุณหภูมิ 38 °C นาน 5 นาที แล้วนำไปไว้ในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปตรวจสอบความอยู่รอดด้วยการนำไปไว้ใน 2.5 µg/mL FDA ซึ่งละลายใน PBS+5 mg/mL BSA ที่ 38.5 °C นาน 2 นาทีในที่มืด แล้วนำไปล้าง 3 ครั้งด้วย PBS+5 mg/mL BSA แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ fluorescence ภายใต้แสง UV ไข่ที่เรืองแสงสีเขียวแสดงว่ามีชีวิตรอด

การแช่แข็งด้วยน้ำยา VB: นำไข่สุกกระบือปลักมาไว้ในน้ำยา equilibration solution (TCM199-Hepes + 20% FCS + 4%EG) นาน 11-15 นาที ที่อุณหภูมิ 23-24 °C แล้วนำไปไว้ในน้ำยา vitrification solution (TCM199-Hepes + 20% FCS + 35% EG + 5% PVP + 0.4M trehalose) ที่อุณหภูมิ 23-24 °C นาน 30 วินาที แล้วทำการแช่แข็ง 2 วิธีคือ **Microdrop และ Cryotop** ดังที่กล่าวมาแล้วในการทดลองแช่แข็งด้วยน้ำยา VA

การเตรียมตัวอสุจิ

นำน้ำเชื้อกระบือแช่แข็งครั้งละ 1 หลอดมาละลายใน 7 mL น้ำยา BO ที่เติมด้วย10 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 จากนั้นใช้ปิเปตดูดน้ำยาส่วนบน 1 mL ไปผสมกับน้ำยา BO 7 mL และปั่นที่ 500x g นาน 5 นาที นำ sperm pellet มาเติมด้วยน้ำยา BO เพื่อปรับให้มีความเข้มข้นตัวอสุจิ 8 x 10^6/mL

การทำ ICSI

นำไข่ที่มีชีวิตรอดหลังการทำ vitrification และไข่สดในกลุ่มควบคุมครั้งละ 10 ใบไว้ในน้ำยา Emcare holding ที่ทำหยดไว้ 50 μL ที่ปิดคลุมด้วย mineral oil เพื่อใช้สำหรับฉีดอสุจิ โดยทำ ICSI ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับกำลังขยาย 200 เท่า นำตัวอสุจิที่เตรียมไว้แล้วผสมในสัดส่วน 1:1 ด้วย 12% PVP ที่ละลายในน้ำยา Emcare holding โดยจะเตรียมหยดน้ำยาสำหรับฉีดอสุจิ 1 หยด และน้ำยาที่มี PVP ที่มีอสุจิอยู่ 2 หยดๆละ 10 μL บนฝาจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 60 มม. ใช้ปิเปตฉีดอสุจิที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 8-10 ไมครอน ทำ immobilize อสุจิแต่ละตัว ด้วยการกดลงตรงกลางหาง แล้วดูดอสุจิให้เข้าไปในปิเปตโดยให้ส่วนหางเข้าก่อน ใช้ holding pipette ดูดไข่ให้ตำแหน่ง 1st PB อยู่ที่ 6 หรือ 12 นาฬิกา และปรับให้ปิเปตฉีดอสุจิอยู่ที่ตำแหน่ง 3 นาฬิกา ระหว่างที่ใช้ปิเปตแทงเข้าในไซโตพลาสซึม จะดูดไซโตพลาสซึมเล็กน้อยเพื่อยืนยันว่าแทงผ่านเยื่อหุ้มไข่แล้ว ทำการฉีดตัวอสุจิเข้าไปในไซโตพลาสซึมของไข่โดยมีน้ำยาเข้าไปให้น้อยที่สุด (<5 μL) นำไข่ที่ทำ ICSI แล้วเก็บไว้ในน้ำยา Emcare holding แล้วนำไปกระตุ้นโดยการนำไปไว้ในน้ำยา Emcare holding มี 7% EtOH นาน 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa + 10 μg/mL cycloheximide + 1.25 μg/mL cytochalacin D ในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air นาน 5 ชั่วโมง แล้วนำไปเลี้ยงต่อด้วยน้ำยา mSOFaa+0.3% BSA ในสัดส่วน 10-20 ใบ/100 μL ที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้ บรรยากาศที่มี 5% O_2, 5% CO_2 และ 90% N_2 นาน 2 วัน แล้วคัดเลือกตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ ไปเลี้ยงแบบ co-culture กับเซลล์บุท่อนำไข่โคในน้ำยา mSOFaa+0.3% BSA ในสัดส่วน 10ใบ/100 μL แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 5 วัน เปลี่ยนน้ำยาทุกๆวัน พร้อมทั้งบันทึกการเจริญเติบโตของตัวอ่อน

การวางแผนการทดลอง

การทดลองนี้แบ่งออกเป็น 6 กลุ่มคือ

1. ไข่สุกแช่แข็งด้วยวิธี Microdrop ในน้ำยา VA (Microdrop +VA)
2. ไข่สุกแช่แข็งด้วยวิธี Microdrop ในน้ำยา VB (Microdrop +VB)
3. ไข่สุกแช่แข็งด้วยวิธี Cryotop ในน้ำยา VA (Cryotop +VA)
4. ไข่สุกแช่แข็งด้วยวิธี Cryotop ในน้ำยา VB (Cryotop +VB)
5. ไข่สุกที่ผ่านการย้อมด้วย FDA และไม่ผ่านการแช่แข็ง (Control)
6. ไข่สุกที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง (Fresh control)

ผลการทดลอง

ผลการทดลองนี้ได้เขียน manuscript เพื่อเตรียมส่งไปตีพิมพ์ในวารสาร Animal Reproduction Science (Liang, Y., Phermthai, T., Nagai, T., Somfai, T. and Parnpai, R. 2011. Survival rates of matured buffalo oocytes after vitrification by Microdrop and Cryotop and subsequent embryos development after intracytoplasmic sperm injection) **ดังรายละเอียดในเอกสารแนบหมายเลข 4**