

การทดลองที่ 5 ผลของการแช่แข็งโดยวิธี SSV และ Cryotop vitrification ต่ออัตราการเจริญของไข่สุก กระป๋องปลักหลังจากทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว

Effect of SSV and Cryotop vitrification on subsequent development of in vitro matured
swamp buffalo oocytes following *in vitro* fertilization

บทนำ

การแช่แข็งไข่โดยวิธี vitrification ได้รับการพิสูจน์แล้วว่าได้ผลดีในการเก็บรักษาตัวอ่อนและไข่ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งมีอยู่ด้วยกันหลายแบบ ได้แก่ Cryotop, Cryoloop, Open pulled straw, Glass micropipette, Microdrop, Electron microscope grid และ Solid surface vitrification ผู้วิจัยได้รายงานการทดลองแช่แข็งไข่สุกกระป๋องปลักโดยวิธี Microdrop vitrification โดยใช้น้ำยา vitrification ที่มีสาร cryoprotectant (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 ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์หลังจากทำ intracytoplasmic sperm injection (ICSI) นอกจากนี้มีรายงานการแช่แข็งไข่โดยใช้น้ำยา vitrification ที่มีสาร CPA เพียงชนิดเดียวคือ 35% EG โดยมีการเติม 5% polyvinylpyrrolidone (PVP) และ 0.4 M trehalose เพื่อช่วยให้การทำ vitrification ดีขึ้น นอกจากนี้แล้วยังมีรายงานการแช่แข็งไข่ด้วยวิธี solid surface vitrification (SSV) ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ต้องการอุปกรณ์พิเศษราคาแพง เป็นวิธีที่ทำงานสะดวกโดยการหยดไข่ที่อยู่ ลงบนพื้นผิวโลหะที่แช่อยู่ในไนโตรเจนเหลว ซึ่งแตกต่างจากวิธี Microdrop ที่หยดไข่และน้ำยาลงไปในไนโตรเจนเหลวโดยตรง วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อเปรียบเทียบผลของการทำ vitrification สองวิธีคือ SSV และ Cryotop และน้ำยา vitrification สองชนิด ต่ออัตราความมีชีวิตรอดของไข่สุกกระป๋องปลัก และการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซิสต์หลังจากทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว

วิธีการทดลอง

การเตรียมไข่

เก็บรังไข่กระป๋องจากโรงฆ่าสัตว์ไว้ในน้ำเกลือ ขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ แล้วใช้เข็มเบอร์ 21G ต่อกับกระบอกฉีดยาขนาด 10 ซีซี ดูดไข่จากฟอลลิเคิลที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-8 มม. ทำการคัดเลือกไข่ที่มีชั้นเซลล์ทิวมูลล์หุ้มอย่างน้อย 3 ชั้น ไปเลี้ยงในน้ำยาในงานเลี้ยงเซลล์ซึ่งปิดคลุมน้ำยาด้วย 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 E_2 นำไปเลี้ยงในตู้บที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 21 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไข่กระป๋องที่ผ่านการเลี้ยงในหลอดแก้วมาแล้วมาย่อยเซลล์ทิวมูลล์สออก แล้วคัดเลือกเฉพาะใบที่สุกแล้ว (มี 1st PB) เก็บไว้ในน้ำยา Emcare holding เพื่อเตรียมไว้ทำการทดลอง

การแช่แข็งไข่

จะทำการแช่แข็งสองวิธีคือ SSV 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: นำไข่สุกกระป๋องปลักมาไว้ในน้ำยา 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 SSV โดยใช้ปิเปตแก้วปลายเล็กดูดน้ำยา 2-3 μ L พร้อมไข่ 5 ใบ ไปหยดลงพื้นผิวของ aluminum foil ที่ลอยอยู่ในไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม จากนั้นนำหยดน้ำยาที่แข็งแล้วไปไว้ใน cryotube แล้วนำไปเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว หรือ วิธี Cryotop โดยใช้ปิเปตแก้วปลายเล็กดูดน้ำยา 2-3 μ L พร้อมไข่ 5 ใบ ไปวางไว้ที่ปลายของ Cryotop แล้วดูดน้ำยาที่อยู่รอบๆ ไข่ออกให้มากที่สุดเท่าที่จะทำได้ จากนั้นนำ Cryotop ไปจุ่มในไนโตรเจนเหลว แล้วนำไปเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว การทำละลายไข่ทำโดยใช้ปากคีบ คีบหยดน้ำยาที่แข็งแล้วจากไนโตรเจนเหลว 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 แล้วนำไปไว้ในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂ in air นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปตรวจสอบความอยู่รอดด้วยการนำไปไว้ใน 2.5 μ g/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: นำไข่สุกกระป๋องปลักมาไว้ในน้ำยา equilibration solution (TCM199-Hepes + 20% FCS + 4%) 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 SSV และ Cryotop ดังที่กล่าวมาแล้วในการทดลองแช่แข็งด้วยน้ำยา VA

การเตรียมตัวอสุจิ

นำน้ำเชื้อกระป๋องแช่แข็งครั้งละ 1 หลอดมาละลายในน้ำอุ่น 37 °C แล้วดูดน้ำเชื้อไปไว้ที่ก้นหลอด conical tube ที่มี 2 mL น้ำยา TALP (ที่เติมด้วย 1 mM caffeine) นำหลอดน้ำยาไปตั้งเอียง 45 องศาที่อุณหภูมิ 38.5 °C นาน 30 นาที เพื่อทำ swim up จากนั้นใช้ปิเปตดูดน้ำยาส่วนบน 1 mL ออกมาผสมกับน้ำยา TALP (ที่เติมด้วย 1 mM caffeine) 5 mL และปั่นที่ 500x g นาน 5 นาที แล้วทำซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำ sperm pellet มาเติมด้วยน้ำยา TALP (ที่เติมด้วย 100 μ g/mL heparin, 20 mM penicillamine, 10 mM hypotaurine และ 20 mM epinephrine) เพื่อปรับให้มีความเข้มข้นตัวอสุจิ $1-2 \times 10^6$ /mL แล้วนำไปหยดลงในจานเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 60 มม (50 μ L/หยด) แล้วปิดคลุมด้วย Mineral oil จากนั้นนำไปเก็บไว้ในตู้บ่ม

การปฏิสนธิในหลอดแก้ว

นำไข่ที่ผ่านการแช่แข็งและมีชีวิตรอด มาล้างในน้ำยา TALP (ที่เติมด้วย 100 µg/mL heparin, 20 mM penicillamine, 10 mM hypotaurine และ 20 mM epinephrine) 3 ครั้ง แล้วนำไข่ 10 ใบ ไปใส่ในหยดน้ำยาที่มีตัวอสุจิที่เตรียมไว้แล้ว จากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้อบภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂ ที่อุณหภูมิ 38.5 °C นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไข่มาล้างตัวอสุจิและเซลล์กิวมูล์สออกด้วยน้ำยา mSOFaa 3 ครั้ง แล้วนำมาเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa+0.3% BSA ในสัดส่วน 10-20 ใบ/100 µL ที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้ บรรยากาศที่มี 5% O₂, 5% CO₂ และ 90% N₂ นาน 2 วัน แล้วคัดเลือกตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ ไปเลี้ยงแบบ co-culture กับเซลล์บุท่อนำไข่โคในน้ำยา mSOFaa+0.3% BSA ในสัดส่วน 10ใบ/100 µL แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5 °C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO₂ นาน 5 วัน เปลี่ยนน้ำยาทุกๆวัน พร้อมทั้งบันทึกการเจริญเติบโตของตัวอ่อน

การวางแผนการทดลอง

การทดลองนี้แบ่งออกเป็น 5 กลุ่มคือ

1. ไข่สุกแช่แข็งด้วยวิธี Cryotop ในน้ำยา VA (Cryotop+VA)
2. ไข่สุกแช่แข็งด้วยวิธี Cryotop ในน้ำยา VB (Cryotop+VB)
3. ไข่สุกแช่แข็งด้วยวิธี SSV ในน้ำยา VA (SSV+VA)
4. ไข่สุกแช่แข็งด้วยวิธี SSV ในน้ำยา VB (SSV+VB)
5. ไข่สุกสดที่ไม่ผ่านการแช่แข็งเป็นกลุ่มควบคุม (Fresh control)

ผลการทดลอง

จาก Table 1 พบว่าอัตราการมีชีวิตรอดหลังการย้ายด้วย FDA ของไข่ที่แช่แข็งในกลุ่ม Cryotop+VA (92%) สูงกว่ากลุ่ม Cryotop+VB (76%), SSV+VA (86%) และ SSV+VB (71%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ น้ำยา VA ให้อัตราการมีชีวิตรอดหลังแช่แข็งสูงกว่าน้ำยา VB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งการแช่แข็งโดยวิธี Cryotop และการแช่แข็งด้วยวิธี SSV ให้อัตราการมีชีวิตรอดของไข่สูงกว่าการแช่แข็งโดยวิธี SSV อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อัตราตัวอ่อนเจริญถึงระยะบลาสโตซิสต์หลังทำปฏิสนธิในหลอดแก้วของไข่ที่แช่แข็งในกลุ่ม Cryotop+VA (9%) สูงกว่ากลุ่ม Cryotop+VB (3%), SSV+VA (5%) และ SSV+VB (1%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ น้ำยา VA ให้ตัวอ่อนเจริญถึงระยะบลาสโตซิสต์สูงกว่าน้ำยา VB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การแช่แข็งด้วยวิธี Cryotop ให้ตัวอ่อนเจริญถึงระยะบลาสโตซิสต์สูงกว่าการแช่แข็งโดยวิธี SSV อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จะเขียน manuscript การทดลองนี้เพื่อส่งไปตีพิมพ์ยังวารสาร Theriogenology (Liang, Y., Phermthai, T., Nagai, T., Somfai, T. and Parnpai, R. 2011. Effect of SSV and Cryotop vitrification on subsequent development of *in vitro* matured swamp buffalo oocytes following *in vitro* fertilization.)

Table 1. *In vitro* development of *in vitro* matured (MII) vitrified buffalo oocytes after *in vitro* fertilization

Treatments	No. vitrified COCs	No. recovered (%)	FDA viability (%)	No. IVF	No. cleaved (%)	No. (%) of oocytes developed to			
						8-C	16-C	Mor	BL
Cryotop+VA	146	146(100)	134(92) ^b	134	87(65) ^b	48(36) ^b	29(22) ^b	18(13) ^b	12(9) ^b
Cryotop+VB	147	147(100)	111(76) ^d	111	62(56) ^{cd}	27(24) ^c	13(12) ^c	7(6) ^{cd}	3(3) ^{cd}
SSV+VA	145	145(100)	125(86) ^c	125	75(60) ^{bc}	34(27) ^c	19(15) ^{bc}	11(9) ^{bc}	6(5) ^c
SSV+VB	147	147(100)	105(71) ^e	105	55(52) ^d	24(23) ^c	10(10) ^c	3(3) ^d	1(1) ^d
Fresh control	153	153(100)	153(100) ^a	153	109(71) ^a	66(43) ^a	48(31) ^a	37(24) ^a	29(19) ^a

^{a,b,c,d} Means within columns with different superscripts differ ($P < 0.01$ ANOVA)

Abbreviations: 8-C = 8 cell stage; 16-C = 16 cell stage; Mor = morula stage; BL = blastocyst stage