บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1. การทดลองที่ 1

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอิทธิพลของ LAA ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน, Ficoll ในน้ำยาแช่แข็งและ hatching stage ต่ออัตรารอดของตัวอ่อนโคโคลนนิ่งเพศเมียหลังจากแช่แข็งโดยวิธี vitrification โดยใช้ Cryotop

3.1.1. วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

3.1.1.1. การเตรียมเซลล์ต้นแบบ

เก็บตัวอย่างใบหูโคนมพันธุ์ดีที่ให้น้ำนมไม่ต่ำกว่า 7,000 กิโลกรัม/ระยะเวลาให้นม ไว้ในน้ำเกลือขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ ทำความสะอาดผิวหนังด้านนอกด้วยสบู่ฆ่าเชื้อ แล้วฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% โดยทำในตู้ปลอดเชื้อ ลอกผิวหนังด้านนอกและด้านในออกจากส่วนกระดูกอ่อน แล้วตัดให้มีขนาดประมาณ 1x1 mm แล้วนำไปวางไว้บนจานเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 60 mm แล้วปิดทับด้วยกระจกสไลด์ จากนั้นเติมน้ำยา α MEM +10% FCS ลงไป 5 ml แล้วนำไปเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้ 5% CO_2 in air เป็นเวลา 10 วัน ทำการเปลี่ยนน้ำยาทุกๆ 3 วัน เมื่อพบเซลล์ไฟโบรบลาสเจริญออกมาจากชิ้นหนังหูมากพอสมควรแล้วจึงแยกเซลล์ไฟโบรบลาสออกด้วยการเติมสารละลาย Trypsin/EDTA (0.25% Trypsin/0.04% EDTA ใน PBS ที่ไม่มี Ca^{++} และ Mg^{++}) ลงไปในจานเลี้ยงเซลล์แล้วนำชิ้นหนังหูและกระจกสไลด์ออก จากนั้นนำสารละลายในจานเลี้ยงเซลล์ไปปั่นแยกที่ 500x g นาน 10 นาที แล้วละลายเซลล์ที่ปั่นแยกได้ด้วยน้ำยา α MEM +10% FCS แล้วนำไปเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ (culture flask) ขนาด 25 cm^2 ที่อุณหภูมิ 37°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เมื่อเซลล์แบ่งตัวเต็มขวดเลี้ยงเซลล์แล้วเก็บเกี่ยวเซลล์ด้วยสารละลาย Trypsin/EDTA จากนั้นนำเซลล์ไปเพาะเลี้ยงต่ออีกในขวดเลี้ยงเซลล์ เพื่อให้มีปริมาณมากๆจนถึง passage ที่ 4 แล้วแช่แข็งเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวไว้ใช้งานต่อไป

นำเซลล์ที่แช่แข็งไว้มาเลี้ยงใหม่ในน้ำยา α MEM+10% FCS ในขวดเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37° C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air แล้ว passage ทุกๆ 3-4 วัน จะใช้เซลล์จนถึง passage ที่ 8

3.1.1.2. การเตรียมไซโตพลาสซึมผู้รับ

เก็บรังไข่โคจากโรงฆ่าสัตว์ไว้ในน้ำเกลือที่อุณหภูมิห้อง ขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ เจาะดูดโอโอไซท์จากฟอลลิเคิล (∅ 3-6 mm) ด้วยกระบอกฉีดยา 10 ml ที่ต่อกับเข็ม 21G เก็บส่วนที่ดูดได้ไว้ในหลอด 15 ml ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วดูดส่วนก้นหลอดไว้ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 90x15 ml นำไป

ส่องตรวจหาโอโอไซท์ด้วยกล้อง stereo microscope แล้วนำเอาโอโอไซท์ที่เจาะดูดได้ไปเลี้ยงในหลอดแก้ว โดยใช้วิธีการเดียวกับที่รายงานไว้แล้ว (รังสรรค์และคณะ 2543a; Parnpai et al. 2000) โดยคัดเลือกโอโอไซท์คุณภาพดีไปเลี้ยงในน้ำยาในจานเลี้ยงเซลล์ซึ่งปิดคลุมน้ำยาด้วย mineral oil เลี้ยงในสัดส่วน 10 ใบ/50 µl น้ำยาเลี้ยงโอโอไซท์ประกอบด้วย TCM199 ที่เติมด้วย 10% FCS, 50 IU/ml HCG (Chorulon®, Intervet, Netherlands), 0.02 AU/ml FSH (Antrin®, Denka Pharmaceutical, Japan) และ 1 µg/ml E_2 นำไปเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 20 ชม. แล้วนำมาย่อยเซลล์คิวมูลัสออกด้วย 0.1% hyaluronidase แล้วคัดเลือกโอโอไซท์ที่สุกแล้ว(มี first polar body) ไปดูดเอานิวเคลียสออกด้วย micromanipulator ภายใต้กล้อง inverted microscope ในน้ำยาที่มี 5 µg/ml cytochalasin B ตรวจสอบผลสำเร็จการดูดนิวเคลียสด้วยการนำส่วนที่ดูดได้ไปย้อมด้วย 5 µg/ml Hoecht 33342

3.1.1.3. การฉีดเซลล์ต้นแบบและเชื่อมเซลล์

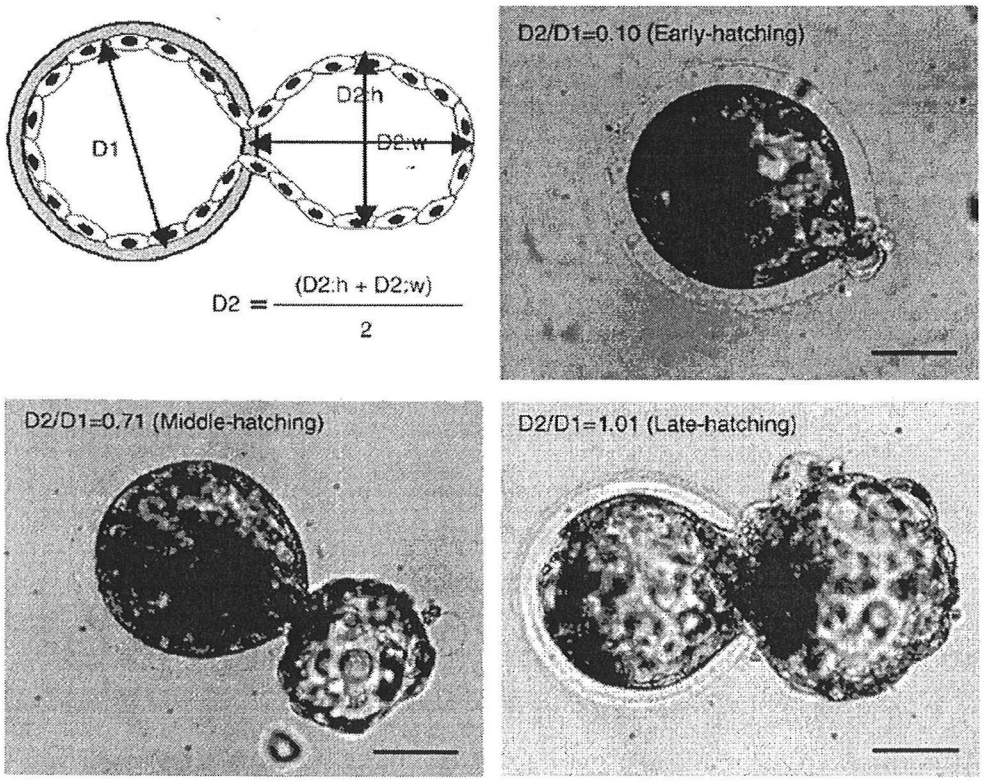
ใช้วิธีการเดียวกับที่รายงานไว้แล้ว (รังสรรค์และคณะ 2543a; Parnpai et al. 2000) โดยใช้ micromanipulator ภายใต้กล้อง inverted microscope ฉีดเซลล์ต้นแบบ 1 เซลล์ เข้าไปในบริเวณ perivitteline space ของไข่ที่ดูดนิวเคลียสออกแล้ว จากนั้นนำไข่ครั้งละใบไปไว้ระหว่างปลายสองข้างของ fusion electrode เพื่อเชื่อมเซลล์เข้าด้วยกันด้วยกระแสไฟฟ้า โดยใช้เครื่อง Electro Cell Fusion จ่ายกระแสไฟ 30V/ใบ ระยะเวลานาน 30 µsec 2 ครั้งต่อเนื่องกัน แล้วนำไปไว้ในน้ำยา TCM199+20% FCS นาน 1 ชั่วโมง จึงทำการตรวจสอบการเชื่อมกันภายใต้กล้อง inverted microscope คัดเฉพาะเซลล์ที่เชื่อมกันแล้วไปกระตุ้นด้วย 7% ethanol นาน 5 นาที แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยา SOFaa (Gardner et al., 1994) +10% FCS ที่มี 10 µg/ml cycloheximide(CH) และ 1.25 µg/ml cytochalasin D (CD) ในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้ บรรยากาศที่มี 5% CO_2 นาน 5 ชั่วโมง

3.1.1.4. การเลี้ยงตัวอ่อนโคลนนิ่งในหลอดแก้ว

ใช้วิธีการเดียวกับที่รายงานไว้แล้ว (รังสรรค์และคณะ 2543a; Parnpai et al. 2000) นำไข่ที่ผ่านการกระตุ้นแล้วมาเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa ที่มี 0.3% BSA หรือ 0.1% LAA + 0.2% BSA โดยเลี้ยงที่ 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 อุณหภูมิ 38.5°C นาน 2 วัน (20 ตัวอ่อน/100 µl) จากนั้นคัดเลือกตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ไปเลี้ยงร่วมกับเซลล์บุท่อนำไข่โคที่ 5% CO_2 in air อุณหภูมิ 38.5°C นาน 5 วัน (10 ตัวอ่อน/100 µl) ทำการเปลี่ยนน้ำยาเก่าออก 50 µl และเติมน้ำยาใหม่ในปริมาณเท่ากันทุกวัน

3.1.1.5. การคัดเลือกตัวอ่อนระยะ hatching blastocyst เพื่อแช่แข็งโดยวิธี vitrification

ตัวอ่อนโคอายุ 7 วัน เกรด 1 และเกรด 2 ที่พัฒนาเข้าสู่ระยะ hatching blastocyst ถูกนำมาถ่ายภาพ (ภาพที่ 1) และแบ่งตัวอ่อนออกเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งแบ่งตามขนาดของการเจริญเติบโตของตัวอ่อนซึ่งเคลื่อนออกจาก zona pellucida โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางตัวอ่อนที่เคลื่อนออกมาจาก zona pellucida (D2) ต่อเส้นผ่าศูนย์กลางของตัวอ่อนภายใน zona pellucida (D1) โดยหากผลของ D2/D1 = 0.01-0.70 จัดให้อยู่ในกลุ่ม early-hatching stage; หากผลของ D2/D1 = 0.71–1.00 จัดให้อยู่ในกลุ่ม middle-hatching stage และ หากผลของ D2/D1 = 1.01–1.70 จัดให้อยู่ในกลุ่ม late-hatching stage แต่หากผลของ D2/D1 มากกว่า 1.71 หรือมีคุณภาพต่ำไม่นำมาใช้ในการทดลอง



ภาพที่ 1 Hatching stage ของตัวอ่อนโคลนนิ่ง A) ตัวอ่อนระยะ early-hatching stage: D2/D1 = 0.01–0.70; B) ตัวอ่อนระยะ middle-hatching stage: D2/D1 = 0.71–1.00; C) ตัวอ่อนระยะ late-hatching stage: D2/D1 = 1.01–1.70; Scale bar = 50 μm.

3.1.1.6. การแช่แข็งโดยวิธี vitrification โดยใช้วิธี Cryotop

ตัวอ่อนถูกนำไปไว้ในน้ำยา equilibration ซึ่งประกอบด้วย TCM199HEPES + 20% FBS (M199/FBS) ที่มี 10% (v/v) ethylene glycol (EG) + 10% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO) นาน 2 นาที ที่อุณหภูมิ 22°C จากนั้นย้ายตัวอ่อนไปไว้ในน้ำยา vitrification ซึ่งประกอบด้วย M199/FBS ที่มี

20% (v/v) EG + 20% (v/v) DMSO + 0.5 M sucrose มีและไม่มี 10% (w/v) Ficoll จากนั้นนำตัวอ่อน 1-3 ใบไปวางบนปลายของ Cryotop (Kitazato Supply Co., Tokyo, Japan) โดยให้มีน้ำยา vitrification เหลืออยู่บน Cryotop ให้น้อยที่สุด (<1 µl) หลังจากตัวอ่อนอยู่ในน้ำยา vitrification ครบ 30 วินาทีให้นำ Cryotop แช่ในไนโตรเจนเหลวทันที

3.1.1.7. การละลายตัวอ่อนและการเลี้ยงตัวอ่อนหลังจากละลาย

ตัวอ่อนที่แช่แข็งแล้วถูกละลายโดยนำปลาย Cryotop มาแช่ในน้ำยา 0.5 M sucrose ที่ละลายใน M199/FBS ตัวอ่อนอยู่ในน้ำยานี้นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นย้ายไปไว้ในน้ำยา 0.4, 0.3, 0.2 และ 0.1 M sucrose ตามลำดับ น้ำยาละ 5 นาที จากนั้นนำตัวอ่อนไปล้างในน้ำยา mSOFaa ที่มี BSA หรือ LAA + BSA (เป็นน้ำยาชนิดเดียวกันที่เลี้ยงตัวอ่อน) และนำไปเลี้ยงร่วมกับเซลล์บุท่อนำไข่โคที่ 5% CO_2 in air อุณหภูมิ 38.5°C นาน 24 ชั่วโมง (1-5 ตัวอ่อนต่อ 100 µl) หลังจากละลายตัวอ่อนแล้วดูทันทีว่ามีลักษณะที่ปกติหรือไม่ และหลังจากเลี้ยงต่ออีก 24 ชั่วโมงต่อมา หากตัวอ่อนสามารถเจริญเติบโตต่อได้แสดงว่าตัวอ่อนรอดจากการแช่แข็ง

3.1.1.8. การย้ายฝากตัวอ่อน

ตัวอ่อนโคโคลนนิ่งที่ถูกนำไปแช่แข็งและละลายแล้ว 24 ชั่วโมง บางส่วนถูกย้ายฝากสู่แม่ตัวรับที่เป็นสัดมาแล้ว 7-8 วันโดยวิธีไม่ผ่าตัด โดยย้ายฝาก 1-2 ตัวอ่อน/ตัวรับ โดยนำตัวอ่อนไปปล่อยไว้ที่ปลายปีกมดลูกข้างที่มีการตกไข่ของโคสาวหรือแม่โค ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นสัดและที่เป็นสัดตามธรรมชาติ การเหนี่ยวนำให้โคเป็นสัดทำได้โดยการฉีด 500 µg ของ $PGF_{2\alpha}$ analogue (Estrumate; Sherling-Plough, New South Wales, Australia) ตัวอ่อนโคลนนิ่งระยะ hatching blastocyst อายุ 7 วันที่ไม่ได้แช่แข็งถูกย้ายฝากสู่แม่ตัวรับเช่นเดียวกัน (กลุ่มควบคุม) และตรวจการตั้งท้องโดยใช้เครื่องอุลตราซาวด์ในวันที่ 40 ของการตั้งท้องและล้วงตรวจการตั้งท้องในวันที่ 60 และ 120 ของการตั้งท้องเพื่อยืนยันผลอีกครั้งหนึ่ง

3.1.2. การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองถูกทำซ้ำอย่างน้อยกลุ่มละ 3 ซ้ำ อัตรารอดของตัวอ่อนแช่แข็งโคลนนิ่งวิเคราะห์โดยใช้ Chi-square test ส่วนอัตราการตั้งท้องของแม่ตัวรับใช้ Fisher's exact probability test ซึ่งเป็นการคำนวณโดยใช้โปรแกรม StatView program (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA) ค่าความแตกต่างทางสถิติคิดที่ค่า $P < 0.05$

3.2. การทดลองที่ 2 การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแช่แข็งและย้ายฝากตัวอ่อนตัวอ่อนโคโคลนนิ่งโดยวิธี vitrification แบบ micro-drop

3.2.1. สารเคมี วิธีการโคลนนิ่ง การเลี้ยงตัวอ่อน เหมือนในการทดลองที่ 1

3.2.1.1. การแช่แข็งตัวอ่อน

ตัวอ่อนอายุ 7 และ 8 วัน ที่ระยะ hatching blastocyst เกรด 1 และ 2 จำนวน 1-5 ตัวอ่อน ถูกนำมาใส่ในน้ำยา equilibration solution (7.5% EG + 7.5% DMSO in TCM199 + 20% FBS) นาน 3 นาที และย้ายไปไว้ในน้ำยา VS33 (16.5% EG + 16.5% DMSO + 0.5M sucrose in TCM199 + 20%FBS) หรือ VS35 (17.5% EG + 17.5% DMSO + 0.5M sucrose in TCM199 + 20% FBS) นาน 30 วินาทีที่อุณหภูมิ 22°C จากนั้นใช้ปิเปตแก้วดูดน้ำยาและตัวอ่อนมาและปล่อยน้ำยา 1-2 µl ที่มีตัวอ่อนลงในไนโตรเจนเหลวโดยตรง จากนั้นนำไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลวต่อไป

3.2.1.2. การละลายตัวอ่อน

micro-drop ถูกละลายโดยนำออกมาใส่ในน้ำยา 0.6M sucrose ที่อุณหภูมิ 38°C นาน 5 นาที จากนั้นย้ายไปไว้ในน้ำยา 0.4M sucrose, 0.2M sucrose และ 0M sucrose ใน TCM199 + 20% FBS นานความเข้มข้นละ 5 นาที ที่อุณหภูมิ 38°C หลังจากละลายแล้วจะสังเกตลักษณะภายนอกของตัวอ่อนว่าปกติหรือไม่ จากนั้นนำตัวอ่อนไปเลี้ยงร่วมกับเซลล์บุท่อนำไข่โคในน้ำยา mSOFaa นาน 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาบันทึกผลการทดลองว่ามีตัวอ่อนใบใดบ้างที่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้

3.2.1.3. การย้อมสีตัวอ่อน

หลังจากละลายตัวอ่อนแล้ว 24 ชั่วโมงนำตัวอ่อนที่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้มาย่อย zona pellucida ออกโดยแช่ตัวอ่อนใน 0.5% protease และล้างตัวอ่อนที่ย่อย zona pellucida ออกแล้วในน้ำยา mSOFaa จากนั้นนำตัวอ่อนไปไว้ในน้ำยาที่มี 10% rabbit anti bovine spleenocytes นาน 45 นาที จากนั้นย้ายไปไว้ในน้ำยาที่มี 10% guinea pig complement + 75 µg/ml propidium iodide + 100 µg/ml hoechst 33258 นาน 45 นาที แล้วนำตัวอ่อนมาวางบนกระจกสไลด์และปิดทับด้วย glycerol และกระจกปิดสไลด์ จากนั้นนับจำนวนเซลล์ trophectoderm (TE) และ inner cell mass (ICM) ภายใต้ fluorescence microscope

3.2.1.4. การย้ายฝากตัวอ่อน

เหมือนในการทดลองที่ 1 โดยตัวอ่อนโคโคลนนิ่งที่ถูกนำไปแช่แข็งในน้ำยา VS33 และละลายแล้ว 24 ชั่วโมง บางส่วนถูกย้ายฝากสู่ตัวรับแบบไม่ผ่าตัด

3.2.2. การวิเคราะห์ทางสถิติ

อัตรารอดของตัวอ่อนแช่แข็งโคลนนิ่ง วิเคราะห์โดยการหาค่าความแตกต่างทางสถิติ โดยใช้วิธี ANOVA โดยใช้โปรแกรม SAS โดยคิดค่าความแตกต่างทางสถิติที่ $P < 0.05$