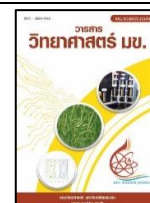




KKU SCIENCE JOURNAL

Journal Home Page : <https://ph01.tci-thaijo.org/index.php/KKUSciJ>

Published by the Faculty of Science, Khon Kaen University, Thailand



ประสิทธิภาพการกระตุ้นการตกไข่และการพัฒนาของตัวอ่อนนอกร่างกาย ในหนูไมซ์สายพันธุ์ ICR และ BALB/c Rag2.Jak3 Double Knockout Efficiency of Superovulation and *In Vitro* Embryonic Development in ICR and BALB/c Rag2.Jak3 Double Knockout Mice

บุศรา แก้วสมุทร^{1*}Butsara Kaewsamut^{1*}¹ศูนย์สัตว์ทดลองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002¹Northeast Laboratory Animal Center, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

บทคัดย่อ

การแช่แข็งตัวอ่อนเป็นวิธีสำคัญในการเก็บรักษาสายพันธุ์หนูไมซ์ เพื่อบริหารจัดการต้นทุนและคงความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพของการกระตุ้นให้เกิดการตกไข่ (superovulation) และการปฏิสนธินอกร่างกาย (*in vitro* fertilization, IVF) อาจแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งข้อมูลเปรียบเทียบที่จำเพาะเจาะจงสำหรับสายพันธุ์สำคัญ เช่น หนูไมซ์ภูมิคุ้มกันบกพร่อง BALB/c Rag2.Jak3 double knockout (BRJ) และสายพันธุ์ ICR ยังมีจำกัด งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ไข่ที่ได้ อัตราการปฏิสนธิ และการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะ 2 เซลล์ ระหว่างหนูไมซ์สายพันธุ์ ICR และ BRJ โดยทำการกระตุ้นหนูไมซ์เพศเมียอายุ 12 สัปดาห์ ($n = 5$ ตัว/สายพันธุ์) ด้วยฮอร์โมน Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG) และ human Chorionic Gonadotropin (hCG) ตามลำดับ จากนั้นเก็บเซลล์ไข่ ดำเนินการปฏิสนธินอกตัวสัตว์ โดยเก็บตัวอสุจิหนูไมซ์เพศผู้อายุ 12 สัปดาห์ ($n = 5$ ตัว/สายพันธุ์) และเพาะเลี้ยงตัวอ่อนในสภาวะควบคุม 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂ จนถึงตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ผลการศึกษาพบว่า หนูสายพันธุ์ ICR ให้จำนวนเซลล์ไข่เฉลี่ยที่เก็บได้ 52.4 ± 29.69 เซลล์/ตัว สูงกว่าสายพันธุ์ BRJ (34.4 ± 25.18 เซลล์/ตัว) ส่วนอัตราการปฏิสนธิและการเจริญถึงระยะ 2 เซลล์ของ ICR เท่ากับ 78.24% (205/262) ในขณะที่ BRJ เท่ากับ 75.00% (129/172) อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์ทางสถิติไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของจำนวนเซลล์ไข่ที่ได้และอัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะ 2 เซลล์ระหว่างสองสายพันธุ์ ($p > 0.05$) แต่หนูไมซ์สายพันธุ์ ICR มีแนวโน้มให้ผลผลิตเซลล์ไข่และอัตราการเจริญของตัวอ่อนที่ดีกว่า ผลการศึกษานี้ชี้ว่าแม้วิธีการที่นำมาใช้จะสามารถนำไปใช้กับหนูไมซ์ทั้งสองสายพันธุ์ได้ แต่มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นฮอร์โมนที่แปรปรวนในแต่ละสายพันธุ์ ข้อมูลนี้จึงมีความสำคัญเพื่อเป็นแนวทางปรับปรุงวิธีการแช่แข็งตัวอ่อน ตลอดจนเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการจัดตั้งธนาคารตัวอ่อน

*Corresponding Author, E-mail: butska@kku.ac.th

Received date: 9 January 2025 | Revised date: 3 July 2025 | Accepted date: 14 July 2025

doi: 10.14456/kkuscij.2025.23

ABSTRACT

Embryo cryopreservation is a crucial method for preserving mouse strains, aiding in cost management and maintaining genetic purity. However, the efficiency of superovulation and *in vitro* fertilization (IVF) can vary significantly among different strains. Specific comparative data for important strains, such as the immunodeficient BALB/c Rag-2.Jak3 double knockout (BRJ) mouse strain and the control ICR strain, remain limited. Therefore, this study aimed to compare the number of retrieved oocytes, fertilization rates, and 2-cell embryo development between ICR and BRJ mouse strains. Twelve-week-old female mice (n=5/strain) were superovulated with Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG) and human Chorionic Gonadotropin (hCG), respectively. Retrieved oocytes were then subjected to *in vitro* fertilization (IVF) using sperm collected from 12-week-old male mice (n=5/strain). Embryos were subsequently cultured under controlled conditions (37°C, 5% CO₂) until the 2-cell stage. Results indicated that ICR mice yielded a higher average number of retrieved oocytes (52.4 ± 29.69 oocytes/mouse) compared to BRJ mice (34.4 ± 25.18 oocytes/mouse). The fertilization and 2-cell development rates were 78.24% (205/262) for ICR and 75.00% (129/172) for BRJ. However, statistical analysis revealed no significant differences in the number of retrieved oocytes and 2-cell embryo development rates between the two strains ($p > 0.05$). Nevertheless, the ICR strain consistently showed a tendency towards superior oocyte yield and embryo development rates. This study indicates that the response to superovulation and embryo development in mice is strain-specific, potentially influenced by underlying physiological and genetic factors. This study reveals a variable response to hormonal stimulation between mouse strains, despite the applicability of the same protocol to both. These findings are crucial for optimizing embryo cryopreservation and provide fundamental data for establishing an embryo bank.

คำสำคัญ: การปฏิสนธินอกตัวสัตว์ในหนูไมซ์ การเจริญของตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ การกระตุ้นการตกไข่ การแช่แข็งตัวอ่อน หนูไมซ์สายพันธุ์ ICR และ BRJ

Keywords: *In Vitro* Fertilization in Mice, 2-cells Embryonic, Ovarian Stimulation, Cryopreservation, ICR and BRJ Mice

บทนำ

ศูนย์สัตว์ทดลองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (NELAC) มหาวิทยาลัยขอนแก่น มีบทบาทสำคัญในการผลิตและให้บริการสัตว์ทดลองขนาดเล็ก เพื่อสนับสนุนงานวิจัย การเรียนการสอน และงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี โดยมีการเพาะขยายพันธุ์หนูไมซ์สายพันธุ์ที่จำเป็น ได้แก่ หนูไมซ์ Institute of Cancer Research (ICR) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่นิยมใช้ในงานวิจัยหลากหลายประเภท เช่น การทดสอบความเป็นพิษและเภสัชวิทยา เนื่องจากมีความหลากหลายทางพันธุกรรมและอัตราการสืบพันธุ์ที่ดี (Kim *et al.*, 2017) นอกจากนี้ ยังมีการเพาะขยายพันธุ์หนูไมซ์ภูมิคุ้มกันบกพร่อง BALB/c Rag-2.Jak3 double knockout (BRJ) ซึ่งเป็นโมเดลสำคัญสำหรับงานวิจัยการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง เนื่องจากมีความสามารถในการกดภูมิคุ้มกันที่ช่วยให้เนื้องอกจากมนุษย์สามารถฝังตัวและเจริญเติบโตได้ดี เหมาะสำหรับการศึกษากายการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อเนื้องอก และการทดสอบยาหรือวิธีการรักษาที่เน้นภูมิคุ้มกัน เช่น การพัฒนาโมเดลผู้ปลูกถ่ายเนื้องอกจากผู้ป่วย (Patient-Derived Xenograft, PDX) สำหรับการทดสอบยารักษาในขนาดต (Vaeteewoottacharn *et al.*, 2019) อย่างไรก็ตาม การบริหารจัดการและเพาะขยายพันธุ์สัตว์ทดลองเหล่านี้อย่างต่อเนื่อง เพื่อรักษาสายพันธุ์ให้คงที่และ

พร้อมใช้งานนั้นมีข้อจำกัดด้านต้นทุนค่าใช้จ่ายที่สูงมาก ทั้งจากการนำเข้าพ่อแม่พันธุ์ โดยเฉพาะสายพันธุ์เฉพาะทางที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ และค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงดูบำรุงรักษา ซึ่งรวมถึงการใช้พื้นที่และทรัพยากรจำนวนมาก (Brown and Moore, 2012) ซึ่งปัญหาเหล่านี้ส่งผลกระทบโดยตรงต่องานวิจัยที่จำเป็นต้องใช้สัตว์ทดลอง เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวและสนับสนุนการดำเนินงานวิจัยให้ต่อเนื่องและมีประสิทธิภาพ การนำเอาเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ (Assisted Reproductive Technology, ART) โดยเฉพาะการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย (*in vitro* fertilization, IVF) จึงเป็นแนวทางที่ได้รับการยอมรับและนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย IVF เป็นกระบวนการที่นำเซลล์ไข่ที่เจริญเต็มที่จากเพศเมียมาปฏิสนธิกับอสุจิของเพศผู้ในสภาพแวดล้อมที่ควบคุมในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) เพื่อให้เกิดตัวอ่อน ซึ่งกระบวนการ IVF มีข้อได้เปรียบที่สำคัญเหนือการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ คือสามารถผลิตตัวอ่อนได้ในปริมาณที่มากกว่ามาก เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลล์ไข่สำหรับการทำ IVF จะมีการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะตกไข่เกิน (superovulation) โดยใช้ฮอร์โมน equine chorionic gonadotropin (eCG หรือ PMSG) เพื่อกระตุ้นการเจริญของถุงไข่ และตามด้วย human chorionic gonadotropin (hCG) เพื่อเหนี่ยวนำการตกไข่พร้อมกัน (Gates, 1956; Luo *et al.*, 2011) การกระตุ้นด้วยวิธีนี้สามารถทำให้ได้เซลล์ไข่โดยเฉลี่ยประมาณ 25 ใบต่อหนูหนึ่งตัว (Byers *et al.*, 2006) ตัวอ่อนที่ได้จากกระบวนการ IVF สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย เช่น การขยายพันธุ์อย่างรวดเร็ว การสร้างกลุ่มหนูทดลองที่มีอายุเท่ากัน และที่สำคัญคือสามารถแช่แข็งตัวอ่อนได้ตั้งแต่วัย 2 เซลล์เป็นต้นไป ซึ่งเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาสายพันธุ์หนูไมซ์ทางพันธุกรรม รวมถึงการช่วยสืบทอดสายพันธุ์ในกรณีที่หนูไม่สามารถผสมพันธุ์ได้ตามธรรมชาติ หรือเมื่อต้องการใช้ไข่หรืออสุจิที่ถูกแช่แข็งไว้ (Takeo and Nakagata, 2018)

ดังนั้น การแช่แข็งตัวอ่อนสัตว์ทดลองจึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการรักษาสายพันธุ์ให้คงที่ทางพันธุกรรม สามารถป้องกันการสูญเสียสายพันธุ์จากอุบัติเหตุและรักษาอายุไม่ให้เปลี่ยนแปลงหรือสูญหายไป นอกจากนี้ยังช่วยประหยัดเวลา ค่าใช้จ่าย และพื้นที่ในการเลี้ยงดูสัตว์เมื่อยังไม่มีความต้องการใช้งาน โดยทั่วโลกมีการเก็บรักษาสายพันธุ์หนูที่ถูกปรับแต่งพันธุกรรมไว้แล้วกว่า 60,000 สายพันธุ์ (Takeo *et al.*, 2020) และสามารถนำตัวอ่อนที่แช่แข็งไว้กลับมาเพาะขยายพันธุ์ใหม่ได้เมื่อต้องการใช้ประโยชน์ ในระดับนานาชาติ เช่น ญี่ปุ่นมีธนาคารสายพันธุ์หนูที่มหาวิทยาลัยคามาโมโตะ ซึ่งจัดเก็บรักษาสายพันธุ์หนูที่ถูกปรับแต่งพันธุกรรมในรูปแบบธนาคารสายพันธุ์ เพื่อให้นักวิจัยสามารถขอใช้ได้ (Nakagata and Takeo, 2019) สำหรับประเทศไทย ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติก็มีการจัดทำธนาคารตัวอ่อนหนูไมซ์ด้วยวิธีแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (vitrification) โดยการเก็บตัวอ่อนจากการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติที่ได้รับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน มีการศึกษาที่ยืนยันว่าตัวอ่อนหนูแรทสามารถพัฒนาเป็นระยะที่เหมาะสมสำหรับการแช่แข็งได้ดีในสารละลายต่างชนิดกัน (ธีรพงษ์และคณะ, 2559) ด้วยเหตุนี้ เพื่อสนับสนุนการผลิตและเพาะขยายพันธุ์สัตว์ทดลองของ NELAC และลดปัญหาดังกล่าวข้างต้น ทางศูนย์ฯ จึงริเริ่มพัฒนาและส่งเสริมความรู้ด้านเทคนิควิศวกรรมการสืบพันธุ์สัตว์ทดลอง โดยการเก็บรักษาสายพันธุ์สัตว์ทดลองที่เพาะขยายพันธุ์ขึ้นภายในศูนย์ฯ

ในงานวิจัยครั้งนี้จึงสนใจที่จะศึกษา (1) เพื่อเปรียบเทียบการตอบสนองต่อการกระตุ้นการตกไข่โดยวัดจากจำนวนเซลล์ไข่ที่เก็บได้ และ (2) เพื่อเปรียบเทียบอัตราการปฏิสนธิและการพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ระหว่างหนูไมซ์ทั้งสองสายพันธุ์ ในการเก็บรักษาสายพันธุ์สัตว์ทดลองที่เพาะเลี้ยงภายในศูนย์สัตว์ทดลองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ถึงแม้จะมีการใช้หนูทั้งสองสายพันธุ์อย่างแพร่หลาย แต่ยังคงขาดข้อมูลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตตัวอ่อนด้วยวิธี IVF ซึ่งเป็นข้อมูลจำเป็นอย่างต่อการวางแผนการเก็บรักษาสายพันธุ์อย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อนำมาเพาะขยายพันธุ์และบริการหนูไมซ์ตรงตามความต้องการของนักวิจัยและผู้ใช้บริการศูนย์สัตว์ทดลองฯ ทั้งภายในและนอกมหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งสามารถลดการนำเข้าสายพันธุ์หนูจากต่างประเทศ ลดต้นทุนในการเพาะเลี้ยงหนูเพื่อนักวิจัย ทำให้สามารถสร้างผลงานวิจัยและนวัตกรรมที่มีคุณภาพและได้รับการยอมรับ ทั้งในระดับชาติและระดับนานาชาติ

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลองที่ใช้ในการเก็บเซลล์ไข่และตัวอสุจิ

การศึกษานี้ใช้หนูไมซ์ (*Mus musculus* Linnaeus, 1758) 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ ICR ใช้วิธีการผสมข้ามสายพันธุ์ (Outbreeding) จำนวน 5 คู่ผสม ($n = 10$) อายุสัตว์ทดลอง 12 สัปดาห์ ± 3 วัน น้ำหนัก เพศผู้ 30 - 35 กรัม เพศเมีย 25 - 30 กรัม เพศผู้ 5 ตัว สำหรับการเก็บตัวอสุจิ (sperm collection) เพศเมีย 5 ตัว สำหรับการเก็บเซลล์ไข่ (oocyte collection) และสายพันธุ์ BRJ ใช้วิธีการผสมพันธุ์แบบเลือดชิด (Inbreeding) จำนวน 5 คู่ผสม ($n = 10$) อายุสัตว์ทดลอง 12 สัปดาห์ ± 3 วัน น้ำหนัก เพศผู้ 25 - 30 กรัม เพศเมีย 20 - 25 กรัม เพศผู้ 5 ตัว สำหรับการเก็บตัวอสุจิ เพศเมีย 5 ตัว สำหรับการเก็บเซลล์ไข่ การทดลองนี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น รหัสโครงการเลขที่ จส.มข. 17/66

2. การเลี้ยงดูสัตว์ทดลอง

เลี้ยงภายใต้สภาวะแวดล้อม : อุณหภูมิ 22 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ $55 \pm 10\%$ รอบแสง 12 ชั่วโมงสว่าง/12 ชั่วโมงมืด การระบายอากาศ : 10 - 15 รอบต่อชั่วโมง ชั่วโมงให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับหนูทดลอง (Perfect Companion Group Co., Ltd., กรุงเทพฯ, ประเทศไทย) สูตรสำหรับเลี้ยงและขยายพันธุ์ (Breeding Diet, Cat. No. 082) มีโปรตีน 24% และให้น้ำ RO ที่ผสมคลอรีนความเข้มข้น 3 - 4 ppm เพื่อให้ปราศจากเชื้อ บรรจุใส่ขวดพร้อมจุลหอดปิดนำไปเลี้ยงสัตว์ทดลอง โดยให้กินอาหารและน้ำอย่างเพียงพอต่อความต้องการของสัตว์ในแต่ละวัน นำมาเลี้ยงแยกเพศในกรงพลาสติกโพลีคาร์บอเนต ขนาด $26.6 \times 42.5 \times 18.5$ เซนติเมตร จำนวน 5 ตัวต่อกรง และดำเนินการตามแนวทางการเลี้ยงและดูแลสัตว์ทดลองของศูนย์สัตว์ทดลองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

3. การกระตุ้นการตกไข่

ทำการเหนี่ยวนำให้หนูเพศเมียเกิดการตกไข่จำนวนมาก โดยฉีด PMSG (Prospec-Tany TechnoGene Ltd., Ness-Ziona, Israel) 10 IU เข้าช่องท้อง (intraperitoneal; IP) ในช่วงเวลา 16:00 น. หลังจากนั้น 48 ชั่วโมง ฉีด hCG (Prospec-Tany TechnoGene Ltd., Ness-Ziona, Israel) 10 IU IP

4. การเก็บไข่

ทำการเก็บเซลล์ไข่ ณ เวลา 17 ชั่วโมงหลังการฉีดฮอร์โมน hCG โดยวางยาสลบหนูทดลองด้วยก๊าซไอโซฟลูเรน (isoflurane) โดยนำหนูไปวางในภาชนะปิดสนิท (sealed chamber) ที่มีสารพิษ isoflurane (Piramal Critical Care, Bethlehem, PA, USA) วางอยู่ใน รอกจนกระทั่งสัตว์หมดสติโดยสังเกตจากอัตราการหายใจที่ช้าลงและไม่ตอบสนองต่อการสัมผัส ก่อนนำไปทำการฉีดยาด้วยวิธีเคลื่อนข้อต่อบริเวณคอ (cervical dislocation) จากนั้น ทำการผ่าตัดเปิดช่องท้องเพื่อเก็บท่อนำไข่ (oviducts) นำไปวางไว้ใน mineral oil (MilliporeSigma, Burlington, MA, USA) ด้านข้างครอบของอาหารเลี้ยงตัวอ่อน mHTF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) จากนั้นนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (Olympus, SZX16, Japan) แล้วใช้เข็มกรีดเปิดบริเวณแอมพูลลา (ampulla) ของท่อนำรังไข่ เพื่อให้กลุ่มเซลล์ไข่ (cumulus-oocyte complexes) หลุดออกมา แล้วทำการย้ายกลุ่มเซลล์ไข่ไปยังครอบของอาหารเลี้ยงตัวอ่อน mHTF นำไปบ่มในตู้บ่มเซลล์ที่สภาวะ 37 องศาเซลเซียส 5% CO_2 เป็นระยะเวลา 30 - 60 นาที

5. การเก็บตัวอสุจิ

ทำการเก็บตัวอสุจิ โดยวางยาสลบหนูทดลองด้วยก๊าซ isoflurane และทำการรุมขนาดด้วยวิธี cervical dislocation จากนั้นทำการผ่าตัดเปิดช่องท้องเพื่อเก็บส่วนของท่อนำอสุจิ (caudal epididymis) ทั้งสองข้างมาวางบนกระดาษซับของเหลว ตัดส่วนไขมันออกและซับเลือดออก นำไปวางไว้ที่ mineral oil ด้านข้างตลับของอาหารเลี้ยงตัวอ่อน mHTF จากนั้นนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ แล้วใช้เข็มกรีดเปิดเพื่อให้ตัวอสุจิไหลออกมาแล้วทำการย้ายตัวอสุจิไปยังตลับของอาหารเลี้ยงตัวอ่อน mHTF นำไปบ่มในตู้บ่มเซลล์ที่สภาวะ 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂ เป็นระยะเวลา 60 นาที

6. การผสมตัวอ่อน

ทำการปฏิสนธิในกรงกาย โดยใช้ปิเปตดูดสารละลายตัวอสุจิ (sperm suspension) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เติมนลงในตลับของอาหารเลี้ยงตัวอ่อน mHTF ที่มีกลุ่มของเซลล์ไข่อยู่ นำไปบ่มในตู้บ่มเซลล์ที่สภาวะ 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂ เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง แล้วทำการล้างเซลล์ไข่จำนวน 3 ครั้ง ด้วยอาหารเลี้ยงตัวอ่อน mHTF ปริมาตรตลับละ 80 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดตัวอสุจิส่วนเกินและเซลล์ที่เลี้ยง (cumulus cells) ที่เกาะอยู่รอบเซลล์ไข่ออกไป ณ เวลา 6 ชั่วโมง หลังการปฏิสนธิ ทำการประเมินผลการปฏิสนธิภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และคัดแยกไซโกต (zygotes) ซึ่งเป็นเซลล์ไข่ที่ปฏิสนธิสมบูรณ์ ออกจากเซลล์ไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ (unfertilized oocytes) ย้ายไซโกตที่ไม่ได้รับการผสมออก ให้เหลือแต่ไซโกตที่ได้รับการผสม โดยไซโกตที่ได้รับการปฏิสนธิสมบูรณ์ (zygote) จะต้องแสดงลักษณะการมีโปรนิวเคลียส 2 อัน (two pronuclei, 2PN) ที่ชัดเจนอยู่ภายในไซโทพลาซึม ดังแสดงในรูปที่ 3(C) ส่วนไซโกตที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิจะไม่มีลักษณะดังกล่าว หรือมีลักษณะเสื่อมสภาพ (degenerate) และแตกหัก (fragmented) ซึ่งจะถูกคัดออก จากนั้น นำไซโกตไปเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการแบ่งเซลล์และเจริญไปเป็นตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ (2-cell stage embryo) ทำการนับและคัดเลือกตัวอ่อน โดยตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ที่มีคุณภาพดีและถูกคัดเลือกเพื่อการแช่แข็ง จะต้องประกอบด้วยบลาสโตเมียร์ (blastomere) 2 เซลล์ที่มีขนาดเท่ากันและสมมาตร โดยมีอัตราการแตกหักของไซโทพลาซึม (cytoplasmic fragmentation) น้อยกว่า 10% ก่อนนำไปผ่านกระบวนการแช่แข็ง (cryopreservation) เพื่อเก็บรักษาสำหรับการย้ายฝากในแม่ตัวรับ (recipient female) ในลำดับถัดไป

7. การตรวจนับจำนวนของตัวอ่อน

ตรวจนับจำนวนไซโกตที่เก็บได้ และจำนวนตัวอ่อนที่ปฏิสนธิเจริญเป็นระยะ 2 เซลล์ของหนูไม่ซายพันธุ์ ICR และ BRJ เพื่อคำนวณร้อยละการพัฒนามเป็นตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์

8. สถิติที่ใช้ในการออกแบบการวิจัย/การคำนวณขนาดตัวอย่าง/การวิเคราะห์ผล

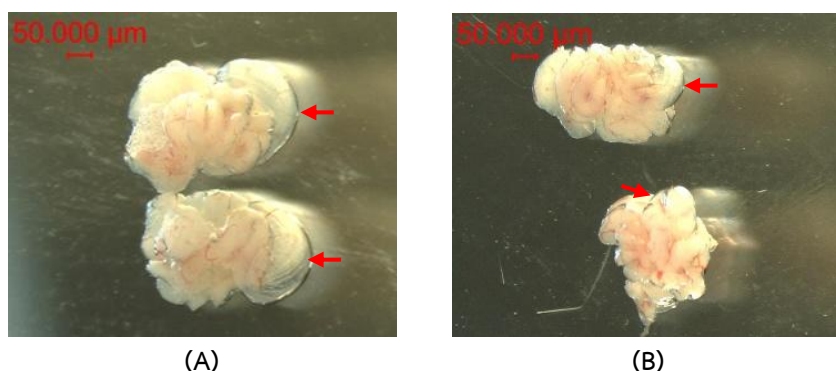
ในการทดลองนี้จะเก็บจำนวน 5 คู่ต่อสายพันธุ์ โดยใช้หนูทดลองจำนวน 5 ตัวต่อกลุ่มทางด้านสถิติ ซึ่งเป็นการคำนวณขนาดกลุ่มตัวอย่างในงานวิจัยสัตว์ทดลอง สำหรับการศึกษาเปรียบเทียบการตอบสนองต่อการกระตุ้นการตกไข่ระหว่างสายพันธุ์ ซึ่งเพียงพอต่อการสังเกตความแตกต่างได้ (Arifin and Zahiruddin, 2017) โดยสัตว์ทดลองได้มาจากการจับคู่ผสมพันธุ์ของพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ได้ลูกออกมาแล้วคัดแยกสัตว์ที่คัดเลือกไว้เป็นพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ออกเป็นแต่ละกลุ่มเพื่อนำมาเก็บเซลล์ไข่และตัวอสุจิ ตรวจนับจำนวนเซลล์ไข่ที่เก็บได้ของแต่ละสายพันธุ์ และจำนวนตัวอ่อนที่ปฏิสนธิเจริญเป็นระยะ 2 เซลล์ โดยเปรียบเทียบอัตราการปฏิสนธิการเจริญของตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ แบบ Non-parametric test ด้วยวิธี Mann-Whitney U test โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics 28.0 เพื่อบ่งชี้ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$

$$\text{Calculate Fertilization rate} = \frac{\text{No. of 2-cell embryos} \times 100}{\text{No. of 2-cell embryos} + \text{No. of unfertilized oocytes}}$$

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

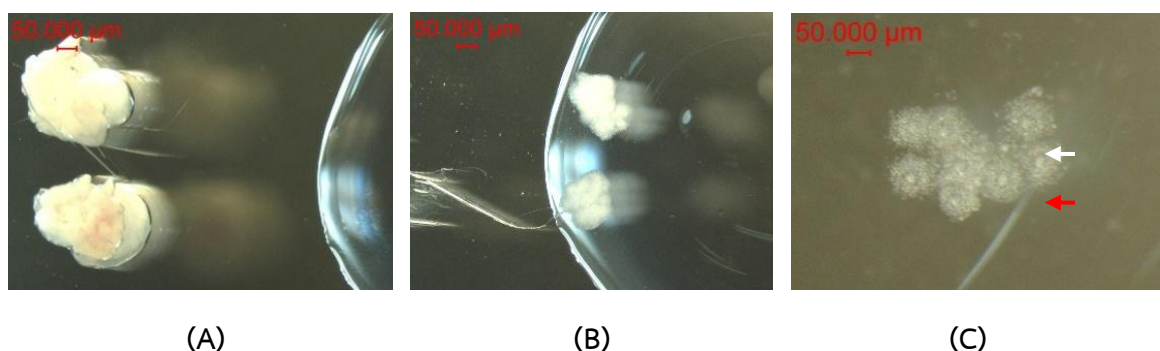
1. ผลการเปรียบเทียบการตอบสนองต่อการกระตุ้นการตกไข่โดยวัดจากจำนวนเซลล์ไข่ที่เก็บได้

จากรูปที่ 1 ผลของการฉีดกระตุ้นไข่ด้วยฮอร์โมน PMSG และ hCG เพื่อตรวจสอบความสามารถในการกระตุ้นการเจริญของไข่และเกิดการไข่ตก เมื่อทำการกระตุ้นไข่โดยการฉีดฮอร์โมน PMSG ขนาด 10 IU หลังจากนั้น 48 ชั่วโมง ทำการฉีดฮอร์โมน hCG 10 IU เพื่อให้ไข่ตก ภายหลังจากการฉีดผ่านไป 17 ชั่วโมง ทำการเก็บท่อนำไข่อย่างรวดเร็ว นำไปไว้ในจานอาหารที่มี mineral oil ดูภายใต้กล้องสเตอริโอ โดยสังเกตลักษณะทางกายภาพภายนอกของท่อนำรังไข่ ตรงตำแหน่งของ ampulla พบว่า ผลของการฉีดกระตุ้นไข่ด้วยฮอร์โมน ฮอร์โมน PMSG และ hCG ขนาด 10 IU มีประสิทธิภาพในการเพิ่มจำนวนไข่ที่เกิดขึ้นในถุงไข่ของหนูไมซ์ สายพันธุ์ ICR และ BRJ ทั้งคู่ โดยขนาดของถุงไข่ของหนูไมซ์ สายพันธุ์ ICR มีขนาดใหญ่กว่าหนูไมซ์ สายพันธุ์ BRJ



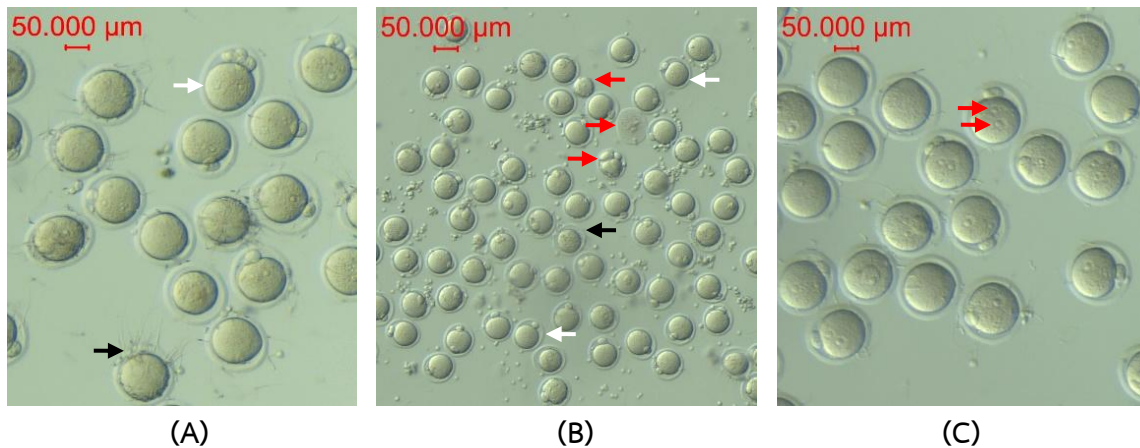
รูปที่ 1 ลักษณะทางกายภาพภายนอกของรังไข่ที่เกิดการบวมของถุงรังไข่หลังฉีดฮอร์โมน hCG 10 IU ของหนูไมซ์ สายพันธุ์ ICR (A) และ BRJ (B) โดยลูกศรสีแดงชี้ไปยังตำแหน่งของ ampulla ที่กำลังขยาย 12.5 เท่า

จากรูปที่ 2 ภายใน ampulla (A) จะพบกลุ่มของ COCs อยู่ภายในท่อนำไข่ ทำการเก็บ COCs ไปยังจานอาหาร (B) และนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂ เวลา 30 - 60 นาที จะพบไข่ที่ล้อมรอบด้วยคิวมูลัส (C) ซึ่งเป็นเซลล์ที่เลี้ยงที่ช่วยในกระบวนการเจริญเติบโตของไข่และช่วยในการปฏิสนธิ โดยเทคนิคที่ใช้ในการเก็บรวบรวมไข่เป็นกระบวนการที่สำคัญมากที่เกี่ยวข้องกับการเจริญไข่และการประเมินคุณภาพของไข่ก่อนการผสมของไข่ในห้องปฏิบัติการ



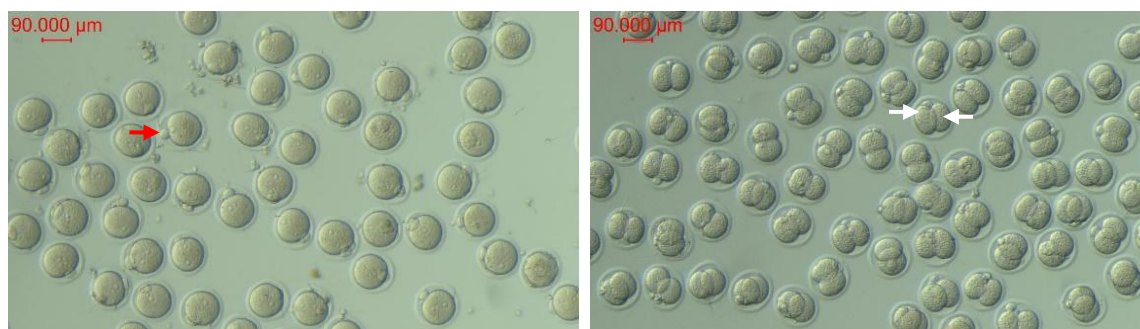
รูปที่ 2 ลักษณะ ampulla ที่ลอยอยู่ใน mineral oil ในจานอาหาร ที่กำลังขยาย 12.5 เท่า (A) การเก็บ COCs ไปยังจานอาหาร ที่กำลังขยาย 12.5 เท่า (B) กลุ่ม COCs ที่มีเซลล์ไข่ (ลูกศรสีแดง) ล้อมรอบเซลล์คิวมูลัส (ลูกศรสีขาว) ที่กำลังขยาย 40 เท่า (C)

จากรูปที่ 3 เมื่อนำเซลล์ไข่มาผสมกับตัวอสุจิ โดยทำปเปตสารละลายตัวอสุจิปริมาณ 5 ไมโครลิตร หยดลงบนดรอปปอาหารที่มีเซลล์ไข่ (A) หลังการผสม 3 ชั่วโมง จะนำไข่ที่ไม่สมบูรณ์ มีการย่อยสลายแตกหักของเซลล์ภายในออกจากดรอปป (B) และหลังการผสม 6 ชั่วโมง จะประเมินไข่ที่เกิดการปฏิสนธิที่สมบูรณ์จากการมี 2 pronuclei ซึ่งจะเห็นวงกลมสองวงมาจากพ่อและแม่อย่างละ 1 เซลล์ ซึ่งเรียกว่าระยะนี้ว่า 2PN ซึ่งโปรนิวเคลียสทั้งสองก็คือโครโมโซมของไข่และเชื้ออสุจิ (C)



รูปที่ 3 การผสมระหว่างเซลล์ไข่ (ลูกศรสีขาว) และตัวอสุจิ (ลูกศรสีดำ) ในดรอปปอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่กำลังขยาย 63 เท่า (A) หลังการผสม 3 ชั่วโมง จะพบไข่ที่ผสม (ลูกศรสีขาว) และไม่ผสม (ลูกศรสีดำ) ไข่ที่ไม่สมบูรณ์ซึ่งมีลักษณะเสื่อมสภาพและแตกหักจะถูกคัดออก (ลูกศรสีแดง) ที่กำลังขยาย 40 เท่า (B) หลังการผสม 6 ชั่วโมง ไข่ที่ปฏิสนธิสมบูรณ์จะแสดงลักษณะ โปรนิวเคลียส 2 อัน (2 pronuclei; 2PN) (ลูกศรสีแดง) ซึ่งเป็นนิวเคลียสที่มาจากพ่อและแม่อย่างละหนึ่งอัน ก่อนที่จะรวมตัวกันเป็นนิวเคลียสของไซโกต ที่กำลังขยาย 63 เท่า (C)

จากรูปที่ 4 การคัดเลือกเซลล์ไข่ (oocytes) ที่มีคุณภาพดีเป็นขั้นตอนสำคัญอย่างยิ่งต่อความสำเร็จของการปฏิสนธิในหลอดทดลอง และการพัฒนาของตัวอ่อนในระยะถัดไป เกณฑ์การคัดเลือกหลักจะพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ภายใตกล้องจุลทรรศน์ โดยเซลล์ไข่ที่สมบูรณ์ควรมีลักษณะ กลม (spherical shape) และมีเยื่อหุ้มเซลล์ (zona pellucida) ที่เรียบเนียน ไม่บวมสลายหรือผิดปกติ มีการปรากฏของ โพลาร์บอดีแรก (first polar body) ที่มีขนาดปกติ กลม และไม่แตกตัว (intact and non-fragmented) เป็นตัวบ่งชี้สำคัญของเซลล์ไข่ที่อยู่ในระยะเมตาเฟส II (Metaphase II, MII) ซึ่งเป็นระยะที่พร้อมสำหรับการปฏิสนธิ (A) ส่วนตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ (2-cell embryo) ที่มีคุณภาพดีและถูกคัดเลือกเพื่อการแช่แข็ง จะต้องประกอบด้วยบลาสโตเมียร์ (blastomere) 2 เซลล์ที่มีขนาดเท่ากันและสมมาตร โดยมีอัตราการแตกหักของไซโทพลาซึม (cytoplasmic fragmentation) น้อยกว่า 10% (B)



(A)

(B)

รูปที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เป็นตัวแทนของเกณฑ์การคัดเลือกเซลล์ไข่คุณภาพดี จะพบ first polar body (ลูกศรสีแดง) ที่กำลังขยาย 50 เท่า (A) และตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์คุณภาพดีมีบลาสโตเมียร์ (blastomere) 2 เซลล์ (ลูกศรสีขาว) ที่มีขนาดเท่ากันซึ่งจะถูกคัดเลือกเพื่อแช่แข็ง ที่กำลังขยาย 50 เท่า (B)

จากผลการศึกษาการเปรียบเทียบจำนวนไข่ที่เก็บได้ของหนูไมซ์ สายพันธุ์ ICR และ BRJ พบว่า สามารถเก็บไข่ จาก หนูไมซ์ สายพันธุ์ ICR ได้จำนวน 19 37 53 54 99 ใบ (ตารางที่ 1) ซึ่งสามารถเก็บไข่หนูไมซ์สายพันธุ์ ICR ได้ทั้งสิ้น 262 ใบ และ BRJ ได้ 15 18 23 40 76 ใบ (ตารางที่ 2) ซึ่งสามารถเก็บไข่หนูไมซ์สายพันธุ์ BRJ ได้ทั้งสิ้น 172 ใบ และ สามารถปฏิสนธิเจริญเป็นตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ได้ทั้งสองสายพันธุ์

2. ผลการเปรียบเทียบอัตราการปฏิสนธิและการพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ระหว่างหนูไมซ์ทั้งสองสายพันธุ์

จากผลการศึกษาการเปรียบเทียบอัตราการปฏิสนธิการเจริญของตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ของหนูไมซ์ สายพันธุ์ ICR และ BRJ ภายหลังการผสม 24 ชั่วโมง พบว่า ผลการทดลองในตารางที่ 1 หนูไมซ์ สายพันธุ์ ICR สามารถปฏิสนธิเจริญเป็น ระยะ 2 เซลล์ ได้ 14 30 48 30 83 ใบโดยคิดเป็น 73.68%(14/19) 81.08%(30/37) 90.57%(48/53) 55.56%(30/54) 83.84%(83/99) ตามลำดับ โดยสามารถเก็บรักษาสายพันธุ์หนูไมซ์ สายพันธุ์ ICR จากการเก็บตัวอ่อนระยะ 2 cell ได้ทั้งสิ้น 205 ตัวอ่อน ซึ่งมีอัตราการปฏิสนธิเจริญเป็นตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ของหนูไมซ์ของสายพันธุ์ ICR ได้ 78.24%(205/262)

ตารางที่ 1 การคำนวณอัตราการปฏิสนธิของของหนูไมซ์ สายพันธุ์ ICR

Calculate Fertilization rate				
stain	Total No. of oocyte	No. of unfertilized oocyte	No. of 2-cell embryos	Fertilization rate (%)
ICR-1	19	5	14	73.68
ICR-2	37	7	30	81.08
ICR-3	53	5	48	90.57
ICR-4	54	24	30	55.56
ICR-5	99	16	83	83.84
Total	262	57	205	78.24

จากตารางที่ 2 หนู BRJ สามารถปฏิสนธิเจริญเป็นระยะ 2 เซลล์ได้ 10 16 15 36 52 ใบ โดยคิดเป็น 66.67% (10/15) 88.89%(16/18) 65.22%(15/23) 90.00%(36/40) 68.42%(52/76) ตามลำดับ โดยสามารถเก็บรักษาสายพันธุ์ หนูไมซ์ สายพันธุ์ BRJ จากการเก็บตัวอ่อนระยะ 2 cell ได้ทั้งสิ้น 129 ตัวอ่อน ซึ่งมีอัตราการปฏิสนธิการเจริญของตัวอ่อน ระยะ 2 เซลล์ ของหนูไมซ์ของสายพันธุ์ BRJ ได้ 75.00%(129/172)

ตารางที่ 2 การคำนวณอัตราการปฏิสนธิของของหนูไม่ซ้ สายพันธุ์ BRJ

Calculate Fertilization rate				
Stain	Total No. of oocyte	No. of unfertilized oocyte	No. of 2-cell embryos	Fertilization rate (%)
BRJ-1	15	5	10	66.67
BRJ-2	18	2	16	88.89
BRJ-3	23	8	15	65.22
BRJ-4	40	4	36	90.00
BRJ-5	76	24	52	68.42
Total	172	43	129	75.00

จากตารางที่ 3 การวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Non-parametric test ด้วยวิธี Mann-Whitney U test พบว่า ค่าเฉลี่ยของอัตราการเก็บไข่ของหนูไม่ซ้ สายพันธุ์ ICR 52.4 ± 29.69 BRJ 34.4 ± 25.18 จำนวนตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ของหนูไม่ซ้ สายพันธุ์ ICR 41.00 ± 26.38 BRJ 25.8 ± 17.69 แม้ว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนไข่ที่เก็บได้และจำนวนตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ในกลุ่มหนู ICR จะมีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่ม BRJ แต่เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแล้ว ค่าเฉลี่ยของอัตราการปฏิสนธิการเจริญของตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ของหนูไม่ซ้ สายพันธุ์ ICR 76.94 ± 13.40 BRJ 75.84 ± 12.47 ในแต่ละกลุ่มไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่ม ($p > 0.05$) อย่างไรก็ตามหนูไม่ซ้ สายพันธุ์ ICR มีแนวโน้มการเก็บไข่และการเจริญตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์มีจำนวนมากกว่าหนูไม่ซ้ สายพันธุ์ BRJ

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD) ของจำนวนไข่, ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ และอัตราการปฏิสนธิของหนูไม่ซ้สายพันธุ์ ICR และ BRJ (n=5 ต่อกลุ่ม) วิเคราะห์โดยใช้สถิติ Mann-Whitney U test

variables	ICR	BRJ	p - value
Total oocyte (No.)	52.4 ± 29.69	34.4 ± 25.18	0.251
2 cell embryo (No.)	41.00 ± 26.38	25.8 ± 17.69	0.463
% fertility	76.94 ± 13.40	75.84 ± 12.47	0.754

ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้ฮอร์โมน PMSG และ hCG ขนาด 10 IU สามารถกระตุ้นการตกไข่ในหนูไม่ซ้ทั้งสองสายพันธุ์ได้ จากการสังเกตลักษณะทางกายภาพ พบว่าบริเวณถุงไข่ (ampulla) ของหนูไม่ซ้สายพันธุ์ ICR มีลักษณะบวมโตกว่าของสายพันธุ์ BRJ (รูปที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับแนวโน้มของจำนวนเซลล์ไข่ที่เก็บได้โดยเฉลี่ยซึ่งสูงกว่าในหนู ICR (52.4 ± 29.69 ใบ) เมื่อเทียบกับหนู BRJ (34.4 ± 25.18 ใบ) แม้ว่าความแตกต่างนี้จะยังไม่มีความสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) อย่างไรก็ตาม การตีความว่าขนาดของถุงไข่ที่ใหญ่กว่าเป็นผลมาจากการตอบสนองต่อฮอร์โมนที่ดีกว่าเพียงอย่างเดียวนั้นจำเป็นต้องพิจารณาปัจจัยอื่นที่อาจส่งผลกระทบได้เช่นกัน ประการแรกคือ ความแตกต่างพื้นฐานทางสรีรวิทยาและพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าการตอบสนองต่อการกระตุ้นการตกไข่ให้ได้ไข่จำนวนมากนั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสัตว์ทดลองเป็นอย่างยิ่ง (Takeo and Nakagata, 2016) โดยหนู ICR เป็นสายพันธุ์ Outbred ที่มีขนาดตัวใหญ่และน้ำหนักมากกว่าหนู BRJ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ Inbred ขนาดของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ที่ใหญ่กว่าจึงอาจเป็นลักษณะประจำสายพันธุ์อยู่แล้ว ปัจจัยนี้อาจเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อจำนวนไข่ที่เก็บได้ นอกจากนี้ โครงสร้างและขนาดของ ampulla ยังมีความสำคัญต่อกระบวนการเก็บไข่ การปฏิสนธิ และการเจริญของตัวอ่อนในระยะแรกเริ่มอีกด้วย (Li Shuai and Winuthayanon, 2017) ประการที่สอง ซึ่งถือเป็นข้อจำกัดของการศึกษานี้ คือการประเมินขนาดถุงไข่เป็นการประเมินเชิงคุณภาพจากการสังเกตด้วยสายตาเท่านั้น โดยไม่ได้มีการวัดขนาดเชิงปริมาณและนำมาวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อยืนยันความแตกต่างอย่างชัดเจน ดังนั้นจึงไม่สามารถสรุปได้อย่างแน่ชัดว่าขนาดที่แตกต่างกันนั้นเป็นผลโดยตรงจากการกระตุ้นด้วย

ฮอร์โมนหรือเป็นลักษณะทางกายภาพปกติของสายพันธุ์ ดังนั้น แม้ว่าผลการทดลองจะชี้ให้เห็นถึงแนวโน้มที่หนู ICR ให้จำนวนไข่มากกว่า แต่การจะสรุปถึงประสิทธิภาพการตอบสนองต่อฮอร์โมนจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยควบคุมตัวแปร ด้าน น้ำหนักตัว หรือมีการวัดขนาดของถุงไข่อย่างเป็นมาตรฐาน เพื่อแยกแยะผลกระทบจากฮอร์โมนออกจากปัจจัยพื้นฐานทางสายพันธุ์ให้ชัดเจนยิ่งขึ้นนอกจากนี้ การศึกษายังพบความแปรปรวนในการตอบสนองของหนูแต่ละตัว ถึงแม้จะมีอายุเท่ากันหรือมาจากครอกเดียวกัน ซึ่งชี้ให้เห็นถึงความแตกต่างในระดับปัจเจกบุคคล ขนาดของฮอร์โมนที่ใช้กระตุ้น ผลการศึกษานี้ซึ่งใช้ฮอร์โมนขนาด 10 IU มีความแตกต่างจากการศึกษาที่ผ่านมาซึ่งพบว่าขนาดของยาที่ต่ำกว่า (5 IU) ก็สามารถกระตุ้นการตกไข่ได้ดีในหนูบางสายพันธุ์ (Byers *et al.*, 2012) ผลลัพธ์ที่แตกต่างนี้ชี้ให้เห็นว่าขนาดฮอร์โมนที่เหมาะสมที่สุดอาจมีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ การใช้ฮอร์โมนขนาด 10 IU สามารถกระตุ้นให้เกิดการตกไข่ในปริมาณที่เพียงพอต่อการนำไปศึกษาต่อได้ในหนูทั้งสองสายพันธุ์ ซึ่งเป็นขนาดมาตรฐานที่ใช้กันทั่วไปในการทำ IVF ในหนูไม่ช (Takeo and Nakagata, 2015) ทั้งนี้ การศึกษานี้ไม่ได้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของฮอร์โมนที่ขนาดความเข้มข้นต่างๆ อย่างไรก็ตามในขั้นตอนของกระบวนการเก็บไข่ ซึ่งต้องมีความชำนาญและเทคนิคที่ใช้ในการเก็บรวบรวมไข่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อทั้งปริมาณและคุณภาพของเซลล์ไข่ที่ได้ ซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่ออัตราการปฏิสนธิและการพัฒนาของตัวอ่อนในระยะต่อไป (Whittingham and Wood, 1983) ถึงแม้จะมีปัจจัยที่ซับซ้อนเหล่านี้ แต่วิธีการที่ใช้ในการศึกษานี้ก็ประสบความสำเร็จในการเก็บเซลล์สืบพันธุ์เพื่อนำมาปฏิสนธิภายนอกและสามารถพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ได้ ซึ่งเป็นการยืนยันศักยภาพของการศึกษานี้สำหรับงานวิจัยด้านเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ต่อไป

จากการเปรียบเทียบอัตราการปฏิสนธิของการพัฒนาเป็นตัวอ่อนในระยะ 2 เซลล์ของหนูไม่ชสายพันธุ์ ICR และ BRJ นั้น หนูสายพันธุ์ ICR มีอัตราการปฏิสนธิและพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์สูงกว่าเล็กน้อยเมื่อเทียบกับหนูสายพันธุ์ BRJ แต่ผลการวิเคราะห์ทางสถิติไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสามารถเก็บรักษาตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ของหนูไม่ช สายพันธุ์ ICR ในการผสมแบบข้ามจากการเก็บตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ได้ทั้งสิ้น 208 ตัวอ่อน และหนูไม่ช สายพันธุ์ BRJ จากการผสมพันธุ์แบบเลือดชิดได้ทั้งสิ้น 129 ตัวอ่อน โดยมีอัตราการปฏิสนธิเจริญเป็นตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ของหนูไม่ชของสายพันธุ์ ICR 79.39%(208/262) และหนูไม่ชของสายพันธุ์ BRJ 75.00%(129/172) ซึ่งจากการจับคู่ผสมภายนอกร่างกายสัตว์ มีความสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่าอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ในกลุ่มหนูไม่ชที่ใช้ไข่และตัวสุจิจากสายพันธุ์ต่าง ๆ มีอัตราการพัฒนาอยู่ในช่วง 22 - 45% (Nakagata, 1993) ซึ่งต่ำกว่าผลการทดลองในหนูไม่ชสายพันธุ์ ICR และ BRJ ที่มีอัตราการพัฒนาอยู่ระหว่าง 55 - 90% ในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งอาจสะท้อนให้เห็นว่าหนูสายพันธุ์ ICR และ BRJ มีศักยภาพในการตอบสนองต่อการปฏิสนธิและพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ที่ดีกว่า ซึ่งความแตกต่างในอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนระหว่างงานวิจัยนี้และงานวิจัยก่อนหน้านี้อาจเนื่องมาจากปัจจัยหลายประการ เช่น วิธีการเก็บไข่ เทคนิคการปฏิสนธิ และสภาพแวดล้อมการเลี้ยงตัวอ่อนในห้องปฏิบัติการที่แตกต่างกัน โดยงานวิจัยนี้ใช้ฮอร์โมน PMSG และ hCG ขนาด 10 IU ซึ่งอาจมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพการตกไข่และการพัฒนาของตัวอ่อนสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา (Takeo and Nakagata, 2015) ที่แสดงให้เห็นว่าการใช้ฮอร์โมนขนาดเหมาะสมช่วยเพิ่มอัตราการพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ การผสมพันธุ์แบบข้ามในสายพันธุ์ ICR และการผสมพันธุ์แบบเลือดชิดในสายพันธุ์ BRJ อาจมีผลต่อการพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ซึ่งเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สามารถส่งผลต่อความแตกต่างในอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนระหว่างสายพันธุ์ อีกทั้งการศึกษานี้มีข้อจำกัดด้านจำนวนหนูทดลอง เนื่องจากมีจำนวนคู่ผสมพันธุ์น้อยเกินไป ทำให้ได้ลูกหนูสำหรับทดลองไม่มากพอที่จะสรุปผลในภาพรวมของแต่ละสายพันธุ์ได้ ความแปรปรวนในการตอบสนองต่อฮอร์โมนที่สูงในหนู ICR ซึ่งเป็นสายพันธุ์ outbred (SD = 29.69) และ BRJ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ inbred (SD = 25.18) โดยขนาดตัวอย่างที่ค่อนข้างเล็ก (n = 5 ต่อกลุ่ม) อาจมีกำลังทางสถิติไม่เพียงพอที่จะตรวจจับความแตกต่างเล็กน้อยได้ ชี้ให้เห็นว่าการวางแผนการทดลองอาจต้องใช้จำนวนสัตว์ทดลองมากขึ้นเพื่อชดเชยความหลากหลายทางพันธุกรรมนี้ จึงควรเพิ่มจำนวนหนูพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ในแต่ละรุ่นการผสมพันธุ์ เพื่อให้ได้ขนาดตัวอย่างที่มากพอสำหรับการวิเคราะห์ผลที่จะทำให้ผลการวิจัยน่าเชื่อถือยิ่งขึ้นเกี่ยวกับความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ ICR และ BRJ อีกทั้งข้อจำกัดในการทดลองนี้ยังไม่ได้มีการเก็บข้อมูลเชิงปริมาณเพื่อวัดขนาด

ampulla เทียบกับน้ำหนักตัว จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการวัดขนาด ampulla และนำมาปรับมาตรฐาน (standardize) กับน้ำหนักตัว เพื่อแยกแยะผลกระทบระหว่างปัจจัยทางสรีรวิทยาของสายพันธุ์และการตอบสนองต่อฮอร์โมนให้ชัดเจนยิ่งขึ้น รวมถึงการประเมินผลในครั้งนี้สิ้นสุดที่ระยะ 2 เซลล์ ซึ่งยังไม่สามารถรับประกันศักยภาพการพัฒนาไปจนถึงระยะที่สามารถฝังตัวได้ และการใช้ฮอร์โมนเพียงขนาดความเข้มข้นเดียว ทำให้ไม่สามารถสรุปได้ว่าเป็นขนาดที่เหมาะสมที่สุดสำหรับแต่ละสายพันธุ์

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตตัวอ่อนระหว่างหนูไมซ์สายพันธุ์ ICR และ BRJ สรุปได้ว่าวิธีการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน PMSG และ hCG ขนาด 10 IU สามารถใช้ในการผลิตตัวอ่อนนอกร่างกายของทั้งสองสายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในอัตราการเจริญเป็นตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในประเด็นต่อไปนี้ (1) เพิ่มจำนวนสัตว์ทดลองเพื่อเพิ่มความน่าเชื่อถือทางสถิติ (2) การเก็บข้อมูลเชิงปริมาณเพื่อวัดขนาด ampulla เทียบกับน้ำหนักตัว (3) ติดตามการพัฒนาของตัวอ่อนไปจนถึงระยะบลาสโตซิสต์ (blastocyst) และทดลองย้ายฝากตัวอ่อนเพื่อประเมินศักยภาพการให้กำเนิดลูก และ (4) ศึกษาเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่ต่างกัน เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมที่สุด (optimization) สำหรับแต่ละสายพันธุ์โดยเฉพาะ

เอกสารอ้างอิง

- ธีรพงษ์ บัวบาน, พรธิดา ช่อมณี และนาถนภิส ประทีป ณ ถลาง (2559). การเปรียบเทียบการเจริญของตัวอ่อนระยะ 1 เซลล์ของหนูแรท สายพันธุ์ Mlac: WR ในสารละลาย M16 และ KSOM. ใน: การประชุมทาง วิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 54, กรุงเทพฯ. 483 - 489
- Arifin, W. N. and Zahiruddin, W. M. (2017). Sample size calculation in animal studies using resource equation approach. *The Malaysian journal of medical sciences: MJMS* 24(5): 101.
- Brown, S.D. and Moore, M.W. (2012). The International Mouse Phenotyping Consortium: past and future perspectives on mouse phenotyping. *Mammalian Genome* 23: 632 - 640.
- Byers, S.L., Payson, S.J. and Taft, R.A. (2006). Performance of ten inbred mouse strains following assisted reproductive technologies (ARTs). *Theriogenology* 65(9): 1716 - 1726.
- Byers, S.L., Wiles, M.V., Dunn, S.L. and Taft, R.A. (2012). Mouse estrous cycle identification tool and images. *PloS one* 7(4): e35538.
- Gates, A.H. (1956). Viability and developmental capacity of eggs from immature mice treated with gonadotrophins. *Nature* 177: 754 - 755.
- Kim, J.E., Nam, J.H., Cho, J.Y., Kim, K.S. and Hwang, D.Y. (2017). Annual tendency of research papers used ICR mice as experimental animals in biomedical research fields. *Laboratory Animal Research* 33: 171 - 174.
- Li Shuai, L.S. and Winuthayanon, W. (2017). Oviduct: roles in fertilization and early embryo development. *Journal of Endocrinology* 232(1): 1 - 26.
- Luo, C., Zuñiga, J., Edison, E., Palla, S., Dong, W. and Parker-Thornburg, J. (2011). Superovulation strategies for 6 commonly used mouse strains. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 50(4): 471 - 478.

- Nakagata, N. (1993). Production of normal young following transfer of mouse embryos obtained by in vitro fertilization between cryopreserved gametes. *Reproduction* 99(1): 77 - 80.
- Nakagata, N. (2016). *Reproductive engineering techniques in mice* (3rd ed.). Cosmo Bio Co., Ltd.
- Nakagata, N. and Takeo, T. (2019). Basic mouse reproductive techniques developed and modified at the Center for Animal Resources and Development (CARD), Kumamoto University. *Experimental Animals* 68(4): 391 - 395.
- Takeo, T. and Nakagata, N. (2015). Superovulation using the combined administration of inhibin antiserum and equine chorionic gonadotropin increases the number of ovulated oocytes in C57BL/6 female mice. *PloS one* 10(5): e0128330.
- Takeo, T. and Nakagata, N. (2016). Immunotherapy using inhibin antiserum enhanced the efficacy of equine chorionic gonadotropin on superovulation in major inbred and outbred mice strains. *Theriogenology* 86(5): 1341 - 1346.
- Takeo, T. and Nakagata, N. (2018). *In Vitro Fertilization in Mice*. Cold Spring Harbor Protocols 2018(6).
- Takeo, T., Nakao, S., Nakagawa, Y., Sztejn, J.M. and Nakagata, N. (2020). Cryopreservation of mouse resources. *Laboratory Animal Research* 36(1): 1 - 6.
- Vaeteewoottacharn, K., Pairojkul, C., Kariya, R., Muisuk, K., Imtawil, K., Chamgramol, Y., Bhudhisawasdi, V., Khuntikeo, N., Pugkhem, A., and Saeseow, O.T. (2019). Establishment of highly transplantable cholangiocarcinoma cell lines from a patient-derived xenograft mouse model. *Cells* 8 (5): 496.
- Whittingham, D.G. and Wood, M.J. (1983). Reproductive physiology. In *The mouse in biomedical research* San Diego: Academic Press. 137 - 164

