บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

การเลี้ยงแฮมสเตอร์ (Mesocricetus auratus)

นำแฮมสเตอร์มาเลี้ยงในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ควบคุมอุณหภูมิห้องประมาณ 24 ± 1°C ควบคุมแสงให้แต่ละวันสว่าง 14 ช.ม.(06.00 - 20.00 น.) และมืด 10 ช.ม. (20.00 - 06.00 น.) มีอาหารสัตว์สำเร็จรูป และน้ำดื่มอย่างเพียงพอตลอดเวลา แฮมสเตอร์มีระยะการตั้งท้องนานประมาณ 16 วัน และจะให้ลูกคลอกละประมาณ 8-10 ตัว

แฮมสเตอร์เพศเมียที่ใช้ในการทดลองนี้มีอายุระหว่าง 2-4 เดือน น้ำหนัก 70-120 กรัม ส่วนแฮมสเตอร์เพศผู้อายุระหว่าง 3-6 เดือน น้ำหนัก 80-140 กรัม ก่อนนำมาใช้ทดลองได้ตรวจแล้วว่ามีการเจริญพันธุ์ปกติ โดยมีวงจรการเป็นสัด (ตารางที่ 2.1) อยู่ในเกณฑ์ปกติ 4 วัน ติดต่อกันอย่างน้อย 2 วงจรและแฮมสเตอร์เพศผู้ที่เคยผสมให้ลูกมาแล้ว

ตารางที่ 2.1 แสดงระยะต่าง ๆ ของวงจรการเป็นสัดของแฮมสเตอร์ *

Day of cycle	State of cycle	Time of day	conditions
1	Late diestrus	A.M.	vaginal smear พบ leucocyte เล็กน้อย
	Proestrus	P.M.	vaginal smear พบ squamous cells
			รังไข่มี mature follicle จำนวนมากและ
			จะตกไข่หลังเที่ยงคืน
	Estrus		ตัวเมียจะมี heat ในตอนกลางคืน
			vaginal smear พบ nucleate epithelial
			cells และ squamous cells
			@ Day 1 จะสิ้นสุดเมื่อมีการตกไข่
2	Estrus	A.M.	ตรวจพบ postovulatory discharge
	Metestrus		vaginal smear พบ oval epithelial cells
			ตัวเมียอินยอมผสมพันธุ์กับตัวผู้
	Early diestrus	P.M.	vaginal smear พบ leucocyte และ oval
			epithelial cells
			อังคงพบ postovulatory discharge
			ตัวเมียไม่อินยอมผสมพันธุ์กับตัวผู้
3	Middle diestrus		vaginal smear พบ leucocyte และ
			oval epithelial cells
4		A.M.	ลักษณะ cells ที่พบจะเหมือนวันที่ 2(P.M.)
	Late diestrus	P.M.	vaginal smear พบ leucocyte

* Hoffman และคณะ, 1968

ทำการผสมเอ็มสเตอร์โดยตังตัวผู้และตัวเมียก่อนตรวจพบ postovulatory discharge 1 วัน(day 1 ของวงจรการเป็นสัด)

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการ Embryo culture laboratory ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์

1. Water-Jackete incubator : Model 3030 Gas Guare, Forma Scientific Ohio, U.S.A.

2. Laminar Flow hood : Model GLH-48, Gensa Company Limited Bangkok, Thailand.

3. Phase Contrast Microscope : Model IMT-2, Olympus, Tokyo, Thailand.

4. Dissecting Microscope : Olympus , Japan

5. The Advanced Osmometer : Model 3D2 1000 Highland avenue, Massachusetts.

6. pH meter : Cole Parner Digi pH ase, Medico, Bangkok, Thailand.

7. เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียด : JP-160 Chyo Balance Corporation, Tokyo, Japan.

8. Embryological watchglass : 4-cm-square glass block with a 3 mm. diameter cavity Griffin & George Co, HLJ-630-S

9. Millipore filter, plastic swinney adaptor type and Millipore membrane : Filter type HA. Pore size 0.22 micron Millipore Corporation. Bedford Massachusetts, U.S.A.

10. Plastic tissue culture dish: Nunclon, Roskildi, Denmark.

11. Plastic syringe 1, 10 ml : Terumo Corporation Tokyo, Japan.

12. Hypodermic needles : size G 30 X 3/4" Stainless steel Luer mounts England

13. Mouth pieces

14. Pasteur pipette

15. ตะเกียงแอลกอฮอล์

16. เครื่องมือผ่าตัด ประกอบด้วย

กรรไกรปลายตรง	1 อัน
กรรไกรปลายโค้ง	1 อัน
Watch-maker forceps	2 อัน
Tooth forceps	1 อัน
Artery forceps	1 อัน
Curved surgical needle	
Surgical silk (size 5-0)	

หมายเหตุ เครื่องมือผ่าตัดและเครื่องแก้วทุกชนิดที่ใช้ในการเตรียมสารเคมีและใช้ในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอทำความสะอาดโดยใช้สารละลาย 7x 2% ล้างด้วยน้ำสะอาด 2 ครั้ง ก่อนจะล้างด้วยน้ำกลั่น (น้ำกลั่น 3 ครั้ง) อบแห้งด้วยความร้อนสูง 70 - 80°C นาน 3-4 ชั่วโมง และฆ่าเชื้อด้วยความร้อนสูง 150°C นาน 2 ชั่วโมง

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้เตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยง Hamster Embryo Culture medium (HECM-2)

1. Sodium Chloride (NaCl)
2. Potassium Chloride (KCl)
3. Calcium Chloride Dihydrate ($CaCl_2.2H_2O$)
4. Magnesium Chloride hexahydrate ($MgCl_2.6H_2O$)
5. Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)
6. Sodium Pyruvate (Na-Pyruvate)
7. Penicillin - G - Sodium
8. Phenol red : Carlo Erba, Italy
9. Sodium Lactate (Na-Lactate 60% Syrup)
10. Polyvinyl Alcohol (NO. P-8136)

11. L-Glutamine (NO. G-3126)

12. DL-Isoleucine (NO.I-2627)

13. DL-Methionine (NO.M-9500)

14. DL-Phenylalanine (NO.P-1876)

15. Hypotaurine (2- Aminoethanesulfinic acid)
    : NO.H-1384

16. Taurine (2-Aminoethanesulfonic acid) :NO.T -7146

17. ฮอร์โมนที่ใช้ในการกระตุ้นการตกไข่ของแฮมสเตอร์
    17.1 Pregnant Mare's Serum Gonadotropin, PMSG
    17.2 Human Chorionic Gonadotropin,HCG

18. Liquid Paraffin Colorless : BDH Chemieal Ltd,
    Poole England.

หมายเหตุ 1-8 สารเคมีจาก E.Merck-Darmstadt.Germany
9-17 สารเคมีจาก Sigma Chemical Company
St. Louis, MO. U.S.A.

การเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยง

น้ำยาเพาะเลี้ยง HECM-2 (Hamster Embryo Culture Medium-2) มีส่วนประกอบ ดังตารางที่ 2.2 นำสารเคมีเหล่านั้นมาละลายในน้ำบริสุทธิ์จากเครื่องกรองน้ำบริสุทธิ์ UHQ ปรับ pH ให้อยู่ในระดับ 7.2-7.4 ด้วย 0.1 N NaOH หรือ 0.1 N HCl โดยวัดหลังจากที่ equilibrate ด้วยอากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % นำสารละลายที่เตรียมได้ มาทำให้ปลอดเชื้อด้วยการกรองผ่านเมมเบรนฟิลเตอร์ (millipore filter) ขนาดรู 0.22 m บรรจุลงในภาชนะที่สะอาดผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C ความเข้มข้นของสารละลาย (Osmolarity) ของน้ำยาเพาะเลี้ยงอยู่ในระดับ 300 $\pm$ 10 mOsmol

ก่อนจะใช้น้ำยาทุกครั้ง equilibrate ด้วยอากาศที่มี CO_2 5% ก่อนเพื่อให้ pH อยู่

ในระดับ 7.2-7.4 จึงนำมาทำเป็นหยดเล็ก ๆ ประมาณ 50 l ในจานเพาะเลี้ยงพลาสติก (plastic culture dish) ขนาด 35x10 mm แล้วใช้พาราฟินเหลว (liquid paraffin) เทคลุมน้ำยาเพาะเลี้ยงดังกล่าวนำจานเพาะเลี้ยงเก็บในตู้อบ (incubator) ที่อุณหภูมิ 37.5°c มีไอน้ำอิ่มตัวและอากาศที่มี CO_2 5% ตลอดเวลาอย่างน้อย 1-2 ชั่วโมง ก่อนจะทำการทดลอง

ตารางที่ 2.2 แสดงองค์ประกอบของน้ำยาเพาะเลี้ยง HECM-2 (Hamster Embryo Culture Medium-2) ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแฮมสเตอร์เอ็มบริโอ *

Component	M.W.	mM	mg/100 ml
NaCl	58.44	11.65	680.8
KCl	74.56	3.1	23.4
$CaCl_2.2H_2O$	147.02	2.0	29.4
$MgCl_2.6H_2O$	203.31	0.5	10.2
$NaHCO_3$	84.01	25.0	210.0
Na-lactate	112.10	10.0	0.14 ml.
Na-pyruvate	110.05	0.5	5.4
glutamine	146.10	1.0	14.6
isoleucine	131.20	0.2	2.6
phenylalanine	165.20	0.1	1.8
methionine	149.20	0.05	0.6
PVA	-	-	10.0
penicillin-G	-	-	6.4
phenol red	-	-	0.5

pH = 7.2-7.4

osmolarity 300$\pm$ 10 mOsmol

* McKiernan และ Bavister (1990)

วิธีการทดลอง

1. การกระตุ้นให้ตกไข่เพิ่มมากกว่าปกติ (Superovulation)

นำแฮมสเตอร์สีทองเพศเมียที่มี Oestrus cycle เป็นปกติ มากระตุ้นให้ตกไข่เพิ่มมากกว่าปกติ โดยการฉีดฮอร์โมน pregrant mare's serum gonadotropin (PMSG) เข้าช่องท้องตัวละ 12.5 i.u. ในวันที่พบ post-ovulatory discharge เวลา 16.00-17.00 น. 66 ช.ม.ต่อมาฉีด human chorionic gonadotropin (hCG) เข้าช่องท้องปริมาณเท่ากับ PMSG หลังจากนั้นนำไปจับรวมกับแฮมสเตอร์เพศผู้ในอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย 1 ต่อ 1 เช้าวันรุ่งขึ้น ถ้าทำ vaginal smear พบ sperm ในช่องคลอด ให้ถือเป็นวันแรกของการตั้งท้อง (P_1) เลี้ยงต่อไปจนถึงวันที่ 3 ของการตั้งท้อง (P_3) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การเก็บเอ็มบริโอ (Embryo Collection)

นำแฮมสเตอร์ที่ตั้งท้องได้ 3 วัน (P_3) มาดึงแยกคอต่อ (cervical dislocation) ในตอนเย็นเวลา 16.00-17.00 น. เปิดหน้าท้องแล้วผ่าแยกท่อนำไข่และมดลูก นำมาซับเลือดบนกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปใส่ในบล็อกแก้ว (embryological watchglass) ที่มีน้ำยา HECM-2 ที่ equilibrate ด้วยอากาศที่มี CO_2 5% 1.2-1.5 ml นำท่อนำไข่และมดลูกดังกล่าวไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 10-40 เท่า ใช้ plastic syringe ขนาด 1 ml ที่มีน้ำยา HECM-2 ที่ equilibrate ด้วยอากาศที่มี CO_2 5% และมีเข็มฉีดยาเบอร์ 30 กรณีใช้กับท่อนำไข่หรือเข็มฉีดยาเบอร์ 26 (กรณีใช้กับมดลูก) สวมอยู่ ฉีดไล่เอ็มบริโอภายในท่อนำไข่และมดลูกดังกล่าวลงในบล็อกแก้ว เก็บเอ็มบริโอระยะ 8- เซลล์ด้วย capillary pipette ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 120-180 μm. ล้างเอ็มบริโอในน้ำยาเพาะเลี้ยง HECM-2 2 ครั้ง นำเอ็มบริโอที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในน้ำยาที่เตรียมไว้ทดสอบ

3. ศึกษาผลของ taurine และ hypotaurine ต่อการเจริญของแฮมสเตอร์เอ็มบริโอ

3.1 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ taurine และ hypotaurine ต่อการเจริญของเอ็มบริโอ

แบ่งเอ็มบริโอระยะ 8-เซลล์ เป็น 7 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 เลี้ยงในน้ำยา HECM-2 (กลุ่มควบคุม)

กลุ่มที่ 2 เลี้ยงในน้ำยา HECM-2 + 0.1 mM taurine

กลุ่มที่ 3 เลี้ยงในน้ำยา HECM-2 + 1.0 mM taurine

กลุ่มที่ 4 เลี้ยงในน้ำยา HECM-2 +10.0 mM taurine

กลุ่มที่ 5 เลี้ยงในน้ำยา HECM-2 + 0.1 mM hypotaurine

กลุ่มที่ 6 เลี้ยงในน้ำยา HECM-2 + 1.0 mM hypotaurine

กลุ่มที่ 7 เลี้ยงในน้ำยา HECM-2 + 10.0 mM hypotaurine

3.2 ศึกษาการเจริญของเอ็มบริโอ ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มี taurine + hypotaurine

แบ่งเอ็มบริโอระยะ 8-เซลล์ เป็น 4 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 เลี้ยงในน้ำยา HECM-2 (กลุ่มควบคุม)

กลุ่มที่ 2 เลี้ยงในน้ำยา HECM-2 + taurine

กลุ่มที่ 3 เลี้ยงในน้ำยา HECM-2 + hypotaurine

กลุ่มที่ 4 เลี้ยงในน้ำยา HECM-2 + taurine + hypotaurine

เลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงที่มีไอน้ำอิ่มตัว อุณหภูมิ 37.5 °C และคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ในอากาศตรวจนับจำนวนเอ็มบริโอที่เจริญจากระยะ 8-เซลล์ สู่ระยะต่าง ๆ หลังจากการเพาะเลี้ยงปั่นเวลา 24 ช.ม.และ 48 ช.ม. ตามลำดับ บันทึกผล

3.3 ศึกษาความอยู่รอดหลังการถ่ายฝาก เพื่อศึกษาว่าเอ็มบริโอที่ได้จากการเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มี taurine หรือ hypotaurine ชนิดใดชนิดหนึ่งและมีกรดอะมิโนทั้ง 2 ชนิดอยู่รวมกันนั้น สามารถมีชีวิตรอดได้เพียงใด เมื่อถ่ายฝากบลาสโตซีสที่ได้เข้าสู่มดลูกของตัวรับที่เหมาะสม เปรียบเทียบกับการถ่ายฝากเอ็มบริโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในน้ำยาที่

ไม่เติม taurine และ/หรือ hypotaurine จึงทำการทดลองดังต่อไปนี้

3.3.1 วิธีการเตรียม Pseudopregnant recipient นำหนูแฮมสเตอร์เพศเมียอายุ 2-4 เดือน ที่มี Oestrus cycle ปกติ ผสมกับหนูแฮมสเตอร์เพศผู้ที่ทำหมันแล้ว (vasectomized male) ในวันที่พบ postovulatory discharge เวลา 17.00-20.00 น. รุ่งเช้าตรวจดูก้อนเยื่อมูก (plug) โดยใช้มือกดเบา ๆ บริเวณช่องคลอด (vagina) ถ้าพบก้อนเยื่อมูกให้นับเป็นวันที่ 1 ของการตั้งท้องเทียม

3.3.2 การถ่ายฝาก นำเอ็มบริโอระยะบลาสโตซีสที่ได้จากการเจริญในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ใช้ทดสอบแต่ละชนิด มาทำการถ่ายฝากเข้าในมดลูกทั้ง 2 ข้างของแฮมสเตอร์เพศเมียที่ตั้งท้องเทียมข้างละ 4-6 ตัว กลุ่มละ 10 ตัว ติดตามดูการฝังตัวของเอ็มบริโอหลังการถ่ายฝาก และติดตามลูกที่คลอด(รูปที่ 2.1)

วิธีการถ่ายฝาก

ใช้ pasteur pipette ที่ลนไฟและดึงปลายให้เรียวเล็กมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 120-180 μm ดูดเอ็มบริโอระยะบลาสโตซีสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในน้ำยาที่ใช้ทดสอบแต่ละชนิดไปถ่ายฝากในมดลูกแต่ละข้างของแฮมสเตอร์ที่สลบด้วยอีเธอร์ ทำความสะอาดด้านข้างลำตัวให้ทั่วด้วยน้ำยาเดทตอล 2% ผ่าเปิดผิวหนังและกล้ามเนื้อบริเวณด้านข้างลำตัวบริเวณต่ำกว่าซี่โครงซี่สุดท้าย เป็นช่องกว้างประมาณ 1-2 cm ใช้ปลายแหลมของปากคีบดึงก้อนไขมันที่มีรังไข่, ท่อนำไข่และส่วนต้นของมดลูกออกมา เจาะผนังมดลูกด้วยเข็มหมุดและสอดปลาย pipette ที่มีเอ็มบริโอระยะบลาสโตซีสเข้าไปในโพรงมดลูก 0.5-1.0 cm เป่าตัวเอ็มบริโอเข้าสู่โพรงมดลูก ทำเช่นนี้กับมดลูกข้างซ้ายและขวาและถ่ายฝากเอ็มบริโอข้างละ 4-6 ตัว หลังทำการถ่ายฝากเสร็จซับเลือดให้แห้งและเก็บมดลูกเข้าในช่องท้องเหมือนเดิม เย็บกล้ามเนื้อและผิวหนังทำความสะอาดแผลด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อเดทตอล 2% อีกครั้งก่อนจะแยกตัวรับไว้ต่างหากเพื่อดูการตั้งท้องต่อไป

ภายหลังการถ่ายฝากเอ็มบริโอได้ 4 วัน(ตรงกับวันที่ 8 ของการตั้งท้อง) นำแฮมสเตอร์ตัวรับ วางยาสลบด้วยอีเธอร์ ผ่าเปิดช่องท้อง แล้วตรวจนับจำนวนเอ็มบริโอทั้งที่มีชีวิต (live fetus) และที่ตาย (resorbed fetus) บันทึกผล จากนั้นเก็บมดลูกเข้าที่เดิมแล้วเย็บปิดช่องท้อง เลี้ยงต่อไปจนครบกำหนดคลอด ตรวจนับจำนวนลูกที่คลอดอีกครั้งหนึ่ง

A.

B.

รูปที่ 2.1 เทคนิคการถ่ายฝากเอ็มบริโอระยะบลาสโตซีสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงนอกร่างกายเข้าสู่มดลูกตัวรับ

A. การใช้เข็มหมุดเจาะผนังมดลูก

B. การสอดปลาย pipette ที่มีเอ็มบริโอระยะบลาสโตซีสที่เข้าไปภายในโพรงมดลูกตามช่องที่เข็มหมุดเจาะและเป่าดันเอ็มบริโอเข้าไป

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การเปรียบเทียบผลของ taurine และ hypotaurine เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดและการเปรียบเทียบผลของ taurine และ hypotaurine ที่ความเข้มข้นดีที่สุดกับผลของ taurine และ hypotaurine รวมกัน ต่อการเจริญเป็นระยะบลาสโตซีส,บลาสโตซีสที่หลุดจากโซนาเพลูซิดาและดีเจนเนอเรทของแฮมสเตอร์เอ็มบริโอระยะ 8-เซลล์ รวมถึงการเปรียบเทียบจำนวนนิวคลีสที่ฝังตัวแล้วยังมีชีวิตอยู่และที่ตายและจำนวนถุกอ่อนที่คลอดภายหลังการถ่ายฝากเอ็มบริโอระยะบลาสโตซีส ด้วยการใช้ one - way analysis of variance (F-test) เป็นค่าสถิติในการทดสอบเปรียบเทียบค่า mean ของ percent แต่ละ treatment กำหนดให้