

การศึกษาการย้ายฝากตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ในหนูแรทสายพันธุ์ Mlac:WR

A Study on the Embryo Transfer of 2-Cell Stage Embryos in Mlac:WR

ธีรพงษ์ บัวบาน¹, จุตามาศ วงศ์วิทยาการ¹, สมพงษ์ เชิดอยู่², วลัยภ ธิขิตสุนทรวงศ์³,

นาถนภิส ประทีป ณ ถาลัง⁴ และ สิตติศักดิ์ สะลิวรรณ^{4*}

Theerapong Buaban¹, Jutamas Wongwigkan¹, Sompong Cherdyhu², Wanlop Likitsuntonwong³,

Nathnapith Pratip Na Talang⁴ and Sittisak Saliwan^{4*}

¹หน่วยธนาคารตัวอ่อน งานผลิตสัตว์ทดลอง ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย

²งานผลิตสัตว์ทดลอง ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย

³งานการสัตวแพทย์ ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย

⁴งานบริการวิชาการ ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย

¹Embryo Bank Unit, Laboratory Animal Production Division, National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Thailand

²Laboratory Animal Production Division, National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Thailand

³Veterinary Medical Care Division, National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Thailand

⁴Academic Service Division, National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Thailand

Received : 5 December 2024, Received in revised form : 4 June 2025, Accepted : 5 June 2025

Available online : 18 June 2025

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์และที่มา : ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล มุ่งหวังที่จะเก็บรักษาสายพันธุ์หนูแรท Wistar (Mlac:WR) ไว้ในธนาคารตัวอ่อน เพื่อเป็นแหล่งรวบรวมพันธุ์กรรมของสัตว์ทดลอง ช่วยป้องกันการสูญเสียสายพันธุ์ สัตว์ทดลองจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ความเสื่อมทางระบบสืบพันธุ์ ระบบงานเลี้ยงสัตว์ทดลองล้มเหลว การติดเชื้อ ภายในโคโลนีของสัตว์ทดลอง การเกิดภัยพิบัติทางธรรมชาติ การยุติการเพาะขยายพันธุ์สัตว์ทดลองบางชนิด และการลด ต้นทุนการเลี้ยงสัตว์ทดลอง เป็นต้น นอกจากนั้นการเก็บรักษาสายพันธุ์สัตว์ทดลองไว้ในธนาคารตัวอ่อนยังช่วยป้องกันการ ขาดแคลนสัตว์ทดลองภายในประเทศและลดการนำเข้าสัตว์ทดลองที่มีราคาแพง ดังนั้น การศึกษานี้จึงจัดทำขึ้นเพื่อผลิต ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ จากหนูแรทสายพันธุ์ Mlac:WR ด้วยวิธีการผลิตตัวอ่อนแบบในร่างกาย (*in vivo* embryo production) ร่วมกับเทคนิคกระตุ้นเพิ่มจำนวนไข่ตก (superovulation) เพื่อให้ทราบถึงร้อยละของตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ (% 2-cell stage embryos) ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์จะถูกแช่แข็งด้วยวิธี vitrification จากนั้นอุ่นละลายตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ออกมาศึกษาร้อยละ ของการรอดชีวิต (% survival) ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็งจะถูกนำไปย้ายฝากให้แม่ตัวรับเพื่อให้ทราบถึง ร้อยละของลูกแรกคลอด (% newborn)

วิธีดำเนินการวิจัย : เลี้ยงหนูแรทสายพันธุ์ Mlac:WR ในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองระบบอนามัยเข้ม ควบคุมอุณหภูมิ 22±3 องศา เซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 30-70 เปอร์เซ็นต์ แสงสว่าง 12 ชั่วโมง (เปิดไฟเวลา 6.00-18.00 นาฬิกา) หนูแรทกินน้ำชนิด reverse osmosis ที่ผสมคลอรีนให้มีความเข้มข้น 5-7 ppm และอาหารสำเร็จรูปแบบเม็ด (*ad libitum*) สัตว์ทดลองทั้งหมด ได้รับการดูแลตามมาตรฐานของ Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC)

International และการศึกษาครั้งนี้ได้รับอนุมัติการใช้สัตว์ทดลองในงานวิจัยจากคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่อนำงานทางวิทยาศาสตร์ของศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล (NLAC-ACUC, รหัสโครงการ RA2023-33) โดยหนูแรพเพดเมียอายุ 9 สัปดาห์ จำนวน 8 ตัว จะถูกกระตุ้นเพิ่มจำนวนไข่ตกด้วยการฉีดฮอร์โมน pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) ปริมาณ 175 IU/kg BW เข้าทางช่องท้องในเวลา 9.00-10.00 นาฬิกา อีก 50 ชั่วโมง ต่อมา ฉีดตามด้วยฮอร์โมน human chorionic gonadotropin (hCG) ปริมาณ 300 IU/kg BW ในเวลา 11.00-12.00 นาฬิกา แล้วจับคู่ผสมพันธุ์กับหนูแรพเพดเมียอายุ 12 สัปดาห์ ข้ามคืน หลังจากฉีด hCG ได้ 46-47 ชั่วโมง การลงยมาตหนูแรพเพดเมียด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ฆ่าตัดเก็บท่อนำไข่และชะล้างตัวอ่อนทั้งหมดออกจากท่อนำไข่ด้วย M2 medium ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ตรวจนับและล้างตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ที่มีรูปร่างปกติใน M2 medium 3 ครั้ง พักตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ใน M16 medium ปริมาณ 150 ไมโครลิตร ที่คลุมด้วย mineral oil ที่เตรียมและบ่มไว้ข้ามคืนในตู้ CO₂ incubator (อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์และความชื้น 95 เปอร์เซ็นต์) จากนั้นแช่ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ใน EFS20 (20% v/v ethylene glycol, 15% w/v Ficoll[®] PM 70, 0.25 M sucrose) นาน 2 นาที และแช่แข็งตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ด้วยวิธี vitrification ใช้น้ำยาแช่แข็งชนิด EFS40 (40% v/v ethylene glycol, 30% w/v Ficoll[®] PM 70, 0.5 M sucrose) บรรจุในหลอดแช่แข็งชนิด 0.25 ml straw tube เก็บรักษาหลอดแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลว 7 วัน จากนั้นอุ่นละลายตัวอ่อนแช่แข็งด้วยน้ำยาอุ่นละลายชนิด 0.75 M sucrose และ 0.25 M sucrose ตามลำดับ ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็งจะถูกพักไว้ใน M16 medium เพื่อรอย้ายฝากตัวอ่อน หลังจากนั้นตรวจหาหนูแรพเพดเมียอายุ 8 สัปดาห์ ที่อยู่ในระยะ proestrus ด้วยวิธี vaginal smear นำไปผสมพันธุ์กับหนูแรพเพดเมียที่พ่ายพันธุ์แล้วอายุ 12 สัปดาห์ หนูแรพเพดเมียที่มี vaginal plug หรือพบว่าได้รับการผสมพันธุ์จะถูกใช้เป็นแม่ตัวรับ ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็งจะถูกย้ายฝากเข้าไปในท่อนำไข่ของแม่ตัวรับ ติดตามการคลอดลูกในวันที่ 19-20 หลังการย้ายฝากตัวอ่อน

ผลการวิจัย : จากการผลิตตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ในหนูแรพเพดเมียพันธุ์ Mlac:WR อายุ 9 สัปดาห์ ด้วยวิธีการผลิตตัวอ่อนแบบในร่างกายร่วมกับเทคนิคกระตุ้นเพิ่มจำนวนไข่ตกนั้น พบว่าสามารถเก็บตัวอ่อนได้ทั้งหมดจำนวน 202 ตัวอ่อน แบ่งออกเป็น ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ จำนวน 139 ตัวอ่อน (17.4 ± 6.4) ตัวอ่อนระยะ 4 เซลล์ จำนวน 18 ตัวอ่อน (2.3 ± 0.9) และตัวอ่อนที่ผิดปกติ จำนวน 45 ตัวอ่อน (5.6 ± 3.5) จำนวนร้อยละของตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ได้ 68.8 (139/202) ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ จำนวน 139 ตัวอ่อน ถูกแช่แข็งด้วยวิธี vitrification จำนวน 3 หลอด หลอดละ 47, 47 และ 45 ตัวอ่อน ตามลำดับ หลังจากอุ่นละลายตัวอ่อนแช่แข็งในหลอดที่ 1 (47 ตัวอ่อน) สามารถค้นพบตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์จำนวน 45 ตัวอ่อน มีตัวอ่อนตายระหว่างการอุ่นละลายจำนวน 13 ตัวอ่อน เหลือตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็งจำนวน 32 ตัวอ่อน จำนวนร้อยละของการรอดชีวิตได้ 68.1 (32/47) จากการย้ายฝากตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็งให้แม่ตัวรับจำนวน 2 ตัว ตัวละ 16 ตัวอ่อน พบว่าแม่ตัวรับหมายเลข 1 คลอดลูกจำนวน 1 ตัว และแม่ตัวรับหมายเลข 2 คลอดลูกจำนวน 3 ตัว แบ่งออกเป็นลูกเพศเมียจำนวน 1 ตัว และลูกเพศผู้จำนวน 3 ตัว จำนวนร้อยละของลูกแรกคลอดได้ 12.5 (4/32)

สรุปผลการวิจัย : ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ของหนูแรพเพดเมียพันธุ์ Mlac:WR สามารถใช้สำหรับแช่แข็งตัวอ่อนเพื่อเก็บรักษาสายพันธุ์หนูแรพเพดเมียในธนาคารตัวอ่อนได้ เนื่องจากมีร้อยละของตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ที่ได้จากการผลิตตัวอ่อนแบบในร่างกายและร้อยละของการรอดชีวิตหลังการแช่แข็งอยู่ในระดับค่อนข้างสูง แม้ว่าร้อยละของลูกแรกคลอดจะอยู่ในระดับต่ำ อย่างไรก็ตาม

การศึกษานี้เป็นการย้ายฝากตัวอ่อนหนูแรชสายพันธุ์ Mlac:WR สำเร็จเป็นครั้งแรกของศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ สำหรับความรู้และทักษะที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะถูกใช้พัฒนาเทคนิคการย้ายฝากตัวอ่อนให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น เพื่อให้จัดตั้งธนาคารตัวอ่อนหนูแรชได้สำเร็จและส่งเสริมให้ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล เป็นแหล่งเรียนรู้เทคนิคปฏิบัติการด้านธนาคารตัวอ่อนในสัตว์ทดลองของประเทศไทย

คำสำคัญ : หนูแรช ; ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ; การแช่แข็ง ; การย้ายฝากตัวอ่อน ; ธนาคารตัวอ่อน

Abstract

Background and Objectives : The National Laboratory Animal Center, Mahidol University, aims to preserve the strains of Wistar rats (Mlac:WR) in the embryo bank. The benefits of embryo banking are genetic resources. To prevent the loss of laboratory animal strains due to genetic changes, failure of the reproductive system, failure of the animal husbandry system, infections in the laboratory animal colony, natural disasters, cessation of laboratory animal breeding, and reduction of laboratory animal breeding costs. Additionally, preserving laboratory animal strains in the embryo bank is beneficial in preventing a shortage of laboratory animals in Thailand and reducing the importation of expensive laboratory animals. Therefore, in this study, we attempt to study the superovulation protocol for the *in vivo* embryo production of 2-cell stage embryos in Mlac:WR rats to determine the percentage of 2-cell stage embryos (% 2-cell stage embryos). The 2-cell stage embryos were frozen using the vitrification method. After that, the vitrified 2-cell stage embryos were thawed to determine the percentage of survival rate (% survival), and then the surviving 2-cell stage embryos were used for embryo transfer to determine the percentage of newborns (% newborn).

Methodology : Mlac:WR rats were maintained in the animal room with strict hygienic conventional controlled temperature at $22\pm3^{\circ}\text{C}$, 30-70% humidity, and 12 hours light conditions (lights on from 6:00 AM to 6:00 PM). Rats were supplied with a 5-7 ppm choline reverse osmosis water and standard diet (*ad libitum*). All animal procedures were conducted at the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) International. This study was approved by the National Laboratory Animal Center-Animal Care and Use Committee (NLAC-ACUC, protocol no. RA2023-33). Eight female rats with 9-week-olds were induced to superovulate through an intraperitoneal (IP) injection of 175 IU/kg BW pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) at 9:00-10:00 AM, followed by 300 IU/kg BW IP of human chorionic gonadotropin (hCG) 50 hours later (11:00-12:00 AM). These females were then mated with 12-week-old Mlac:WR male rats overnight. 46-47 hours after the hCG injection, female rats were euthanized by carbon dioxide. The oviducts were collected, and embryos were flushed out from the oviducts with M2 medium under a stereomicroscope. The 2-cell stage embryos with normal morphology were counted and washed in 50 μl of M2 medium 3 times. After that, 2-cell stage embryos were cultured in 150 μl of M16

medium covered with mineral oil in a CO₂ incubator (37°C, 5% CO₂, 95% humidity). For the vitrification, the 2-cell stage embryos were pretreated with EFS20 solution (20% v/v ethylene glycol, 15% w/v Ficoll® PM 70, 0.25 M sucrose) for 2 minutes and then frozen by the vitrification method using an EFS40 solution (40% v/v ethylene glycol, 30% w/v Ficoll® PM 70, 0.5 M sucrose) in a 0.25 ml straw tube. After being stored in a liquid nitrogen tank for 7 days, the vitrified 2-cell stage embryos were thawed using 0.75 M and 0.25 M sucrose (thawing solution), respectively. The surviving 2-cell embryos were counted and cultured in M16 medium, waiting for embryo transfer. The Mlac:WR female rats with 8-week-olds were tested for the proestrus by vaginal smear technique after that set mating overnight with the 12-week-old vasectomized Mlac:WR male rats. Female rats with vaginal plugs or mated with vasectomized males were used as recipients. The surviving 2-cell stage embryos were used for transfer to the oviducts of recipients. The recipients were natural-born on days 19-20 after embryo transfer.

Main Results : The *in vivo* embryo production of 2-cell stage embryos in Mlac:WR female rats at 9-week-old by the superovulation technique. The results show that the total number of embryos harvested from the superovulation was 202 embryos, divided into 139 of 2-cell stage embryos (17.4±6.4), 18 of 4-cell stage embryos (2.3±0.9), and 45 of abnormal embryos (5.6±3.5). The percentage of 2-cell stage embryos was 68.8 (139/202). The 139 of 2-cell stage embryos were divided into 3 groups (47, 47, and 45 embryos) and frozen by vitrification for 3 tubes. After thawing the first tube, 45 of the 2-cell stage embryos were discovered under a stereomicroscope; after that, 13 of the 2-cell stage embryos were dead. The 32 of the 2-cell stage embryos were alive after thawing. The percentage of survival 2-cell stage embryos was 68.1 (32/47). The surviving 2-cell stage embryos were used for embryo transfer to 2 recipients (16 of 2-cell stage embryos per recipient). 19-20 days later, the number of newborns was 1 and 3 in recipients, respectively, with the percentage of newborns being 12.5 (4/32), 1 female, and 3 males.

Conclusions : The 2-cell stage embryos of Mlac:WR rats can be used to establish the embryo bank. Because of that, the percentage of 2-cell stage embryos obtained from *in vivo* embryo production and the percentage of survival 2-cell stage embryos after vitrification are relatively high, although the percentage of newborns after embryo transfer was low. However, this study was the first successful embryo transfer in Mlac:WR rats at the National Laboratory Animal Center. The knowledge and skills gained from this study will be used to improve the embryo transfer protocol. To successfully establish a rat embryo bank and promote the National Laboratory Animal Center as a source of learning on laboratory animal embryo bank techniques in Thailand.

Keywords : rats ; 2-cell stage embryos ; vitrification ; embryo transfer ; embryo bank

*Corresponding author. E-mail : sittisak.sal@mahidol.ac.th

Introduction

ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล มุ่งหวังที่จะเก็บรักษาสายพันธุ์สัตว์ทดลองไว้ในธนาคารตัวอ่อน เพื่อเป็นแหล่งรวบรวมพันธุ์กรรมของสัตว์ทดลองและทำให้สัตว์ทดลองมีสายพันธุ์คงที่ ช่วยป้องกันการสูญเสียสายพันธุ์สัตว์ทดลองจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ความเสื่อมทางระบบสืบพันธุ์ ระบบการเลี้ยงสัตว์ทดลองล้มเหลว การติดเชื้อ การเกิดโรคระบาดภายในโคโลนีของสัตว์ทดลอง การเกิดภัยพิบัติทางธรรมชาติ การยุติการเพาะขยายพันธุ์สัตว์ทดลองบางชนิดและการลดต้นทุนการเลี้ยงสัตว์ทดลอง เป็นต้น นอกจากนั้นการเก็บรักษาสายพันธุ์สัตว์ทดลองไว้ในธนาคารตัวอ่อนยังเป็นการช่วยป้องกันการขาดแคลนสัตว์ทดลองภายในประเทศและการสร้างความมั่นคงทางด้านวิทยาศาสตร์สัตว์ทดลองของประเทศไทย ตลอดจนลดการนำเข้าสัตว์ทดลองที่มีราคาแพงจากต่างประเทศได้อีกด้วย สำหรับหนูแรท (*Rattus norvegicus*) สายพันธุ์ Wistar (Mlac:WR) ของศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มีลักษณะทั่วไปเป็นหนูที่มีขนาดใหญ่ ขนสีขาว ตาสีแดง น้ำหนักตัวเมื่อโตเต็มวัยเท่ากับ 250-300 กรัม ในหนูเพศผู้และ 180-220 กรัม ในหนูเพศเมีย อายุขัยเฉลี่ย 2-3 ปี มีการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์และจัดรูปแบบการผสมพันธุ์ที่ช่วยให้เกิดความคงที่ทางพันธุกรรมและมีความผิดปกติทางพันธุกรรมอยู่ในระดับต่ำ (Chumanee *et al.*, 2022) นิยมใช้ในการศึกษาทางวิทยาศาสตร์และการวิจัยทางด้านโภชนาการ สรีรวิทยา พยาธิวิทยา เกสชวิทยา การทดสอบความเป็นพิษ (Srimangkornkaew *et al.*, 2021) และการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดทดลอง (Buaban *et al.*, 2015; Buaban *et al.*, 2016) เป็นต้น

การกระตุ้นเพิ่มจำนวนไข่ตก (superovulation) ด้วยฮอร์โมน PMSG และ hCG เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการผลิตไข่และตัวอ่อนในสัตว์ทดลองเป็นอย่างมาก สามารถผลิตไข่และตัวอ่อนได้เป็นจำนวนมากและช่วยลดการใช้สัตว์ทดลองได้อีกทางหนึ่ง ปัจจัยที่ส่งผลต่อการกระตุ้นเพิ่มจำนวนไข่ตกในสัตว์ทดลอง ได้แก่ สายพันธุ์ของสัตว์ทดลอง อายุของสัตว์ทดลองและปริมาณฮอร์โมน เป็นต้น Popova *et al.* (2005) รายงานว่าสามารถเก็บไข่ในหนูแรทสายพันธุ์ Sprague-Dawley, Wistar, Lewis และ Wistar Kyoto ได้เท่ากับ 66.3±3.9, 46.3±8.6, 27.0±4.3 และ 22.8±6.1 ใบ ตามลำดับ ในขณะที่ Kito *et al.* (2010) สามารถเก็บไข่ในหนูแรทสายพันธุ์ WMN/Nrs อายุ 4 และ 9 สัปดาห์ได้เท่ากับ 12.3±5.6 และ 43.9±3.0 ใบ ตามลำดับ ส่วน Sotomaru *et al.* (2005) สามารถเก็บไข่ในหนูแรทสายพันธุ์ BrHan:WIST@Jcl อายุ 4 และ 12 สัปดาห์ได้เท่ากับ 38.9±38.2 และ 46.1±22.4 ใบ ตามลำดับ และ Kon *et al.* (2005) เก็บไข่ในหนูแรทสายพันธุ์ Wistar-Imamichi ที่อายุ 12 สัปดาห์ได้เท่ากับ 57.6±13.0 ใบ สำหรับการผลิตตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ในหนูแรทด้วยวิธีการกระตุ้นเพิ่มจำนวนไข่ตกนั้น มักจะเก็บตัวอ่อนได้จำนวนน้อยกว่าการเก็บไข่ Polissen *et al.* (2013) สามารถเก็บตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์จากหนูแรทสายพันธุ์ Wistar ที่มีอายุ 12 สัปดาห์ได้ร้อยละ 80.0 และ Taketsuru *et al.* (2013) สามารถเก็บตัวอ่อนหนูแรทสายพันธุ์ Jcl:Wistar ได้เท่ากับ 15.8±2.7 ตัวอ่อน

vitrification เป็นเทคนิคการแช่แข็งตัวอ่อนอย่างรวดเร็วด้วยน้ำยาแช่แข็งที่มีส่วนผสมของสารป้องกันการแช่แข็ง (cryoprotectants) ที่ระดับความเข้มข้นสูง โดยการลดอุณหภูมิของหลอดแช่แข็งตัวอ่อนลงอย่างรวดเร็วด้วยไอของไนโตรเจนเหลว สารป้องกันการแช่แข็งที่มีความเข้มข้นสูงจะช่วยป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ของตัวอ่อน การแช่แข็งวิธีนี้ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องแช่แข็งที่มีราคาแพง สามารถปฏิบัติได้ง่ายและลดระยะเวลาการปฏิบัติงานได้ ปัจจัยที่มีผลต่อการแช่แข็งตัวอ่อน ได้แก่ สายพันธุ์ของสัตว์ทดลอง ระยะของตัวอ่อน ชนิดและความเข้มข้นของสารป้องกันการแช่แข็ง เป็นต้น

ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ที่ถูกแช่แข็งด้วยวิธี vitrification ด้วยน้ำยาแช่แข็งชนิด EFS40 สามารถพัฒนาเข้าสู่ระยะโมรูล่าได้ร้อยละ 63.0 และมีร้อยละของลูกแรกคลอดหลังการย้ายฝากตัวอ่อนได้เท่ากับ 33.0 (Jiang *et al.*, 1999) ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ของหนูแรทสายพันธุ์ Wistar ที่ถูกแช่แข็งด้วยวิธี vitrification ใช้น้ำยาแช่แข็งชนิด EFS40 มีร้อยละของการรอดชีวิตเท่ากับ 92.0 และมีร้อยละของการพัฒนาเข้าสู่ระยะบลาสโตซิสต์ได้เท่ากับ 34.0 (Han *et al.*, 2003)

ดังนั้นการศึกษานี้จึงจัดทำขึ้นเพื่อให้ทราบถึงแนวทางการจัดทำธนาคารตัวอ่อนหนูแรทของศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ด้วยการผลิตตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ จากหนูแรทสายพันธุ์ Mlac:WR ด้วยวิธีการผลิตตัวอ่อนแบบในร่างกาย (*in vivo* embryo production) ร่วมกับการใช้เทคนิคกระตุ้นเพิ่มจำนวนไข่ตก (superovulation) เพื่อให้ทราบถึงร้อยละของตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์จะถูกนำมาแช่แข็งด้วยวิธี vitrification จากนั้นทำการอุ่นละลายตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ออกมาศึกษาร้อยละของการรอดชีวิตหลังการแช่แข็ง หลังจากนั้นตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็งจะถูกนำไปทำการย้ายฝากให้แม่ตัวรับเพื่อให้ทราบถึงร้อยละของลูกแรกคลอด

Methodology

1. สัตว์ทดลองและการดูแลสัตว์ทดลอง

การศึกษานี้ใช้หนูแรทสายพันธุ์ Mlac:WR ที่เพาะขยายพันธุ์ภายในศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ โดยมุ่งลดจำนวนการใช้สัตว์ทดลองตามหลักของ 3Rs (replacement, reduction and refinement principle) และเพียงพอสำหรับการปฏิบัติการทดลอง สัตว์ทดลองทั้งหมดประกอบด้วย หนูแรทเพศเมียอายุ 9 สัปดาห์ จำนวน 8 ตัว สำหรับใช้ในการผลิตตัวอ่อน หนูแรทเพศผู้อายุ 12 สัปดาห์ จำนวน 8 ตัว สำหรับใช้ผสมพันธุ์ในการผลิตตัวอ่อน หนูแรทเพศผู้ที่ทำหมันแล้วอายุ 12 สัปดาห์ จำนวน 2 ตัว สำหรับใช้ผสมพันธุ์ในการย้ายฝากตัวอ่อน และหนูแรทเพศเมียอายุ 8 สัปดาห์ จำนวน 2 ตัว สำหรับใช้ในการย้ายฝากตัวอ่อน หนูแรททั้งหมดถูกเลี้ยงในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองที่มีสภาพแวดล้อมแบบระบบอนามัยเข้ม (strict hygienic conventional) ควบคุมอุณหภูมิ 22±3 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 30-70 เปอร์เซ็นต์ เวลาให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง มีด 12 ชั่วโมง เปิดไฟเวลา 6.00 นาฬิกา ปิดไฟเวลา 18.00 นาฬิกา ปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม (total bacterial count) ไม่เกิน 15 cfu/ft² หนูแรทกินน้ำ reverse osmosis (RO) ที่ผสมคลอรีนให้มีความเข้มข้น 5-7 ppm และอาหารสำเร็จรูป 082G แบบเม็ด (Perfect Companion[®]) ให้อาหารและน้ำวันละครั้ง หนูแรทสามารถเข้าถึงอาหารและน้ำได้ตลอดเวลา (*ad libitum*) ใช้วัสดุรองนอนเป็นขี้ขาวโพด ผักตบชวาอบแห้งแบบท่อนและผักตบชวาอบแห้งแบบเส้นปลอดเชื้อ หนูแรททั้งหมดได้รับการดูแลตามมาตรฐานของ Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) International และการศึกษานี้ได้รับการอนุมัติการใช้สัตว์ทดลองในงานวิจัยจากคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์ เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล (รหัสโครงการ RA2023-33)

2. การกระตุ้นเพิ่มจำนวนไข่ตก

กระตุ้นเพิ่มจำนวนไข่ตกในหนูแรทเพศเมียที่มีอายุ 9 สัปดาห์ ด้วยการฉีดฮอร์โมน PMSG (Folligon[®], Intervet) ปริมาณ 175 IU/kg BW เข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal, IP) ในเวลา 9.00-10.00 นาฬิกา อีก 50 ชั่วโมง ต่อมา ฉีดตามด้วย

ฮอร์โมน hCG (Chorulon®, Intervet) ปริมาณ 300 IU/kg BW IP ในเวลา 11.00-12.00 นาฬิกา จากนั้นจับคู่ผสมพันธุ์กับหนูแรทเพศผู้อายุ 12 สัปดาห์ ข้ามคืน หนูแรทเพศผู้ 1 ตัว ต่อ หนูแรทเพศเมีย 1 ตัว

3. การเก็บตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์

หลังจากฉีดฮอร์โมน hCG ได้ 46-47 ชั่วโมง ทำการการุณยฆาตหนูแรทเพศเมียด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ฝ่าเปิดกล้ามเนื้อหน้าท้องและตัดท่อนำไข่ออกมาทั้ง 2 ข้าง วางท่อนำไข่ใน M2 medium (M7167, Sigma-Aldrich) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 มิลลิเมตร ชะล้างตัวอ่อนทั้งหมดออกจากท่อนำไข่ด้วย M2 medium ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ใช้ mouth pipette ค้นหาและล้างตัวอ่อนใน M2 medium ปริมาณ 50 ไมโครลิตร 3 ครั้ง คัดเลือกและตรวจนับจำนวนตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ และตัวอ่อนที่ผิดปกติ ล้างตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ใน M16 medium (M7292, Sigma-Aldrich) ปริมาณ 50 ไมโครลิตร 3 ครั้ง และพักตัวอ่อนใน M16 medium ปริมาณ 150 ไมโครลิตร ที่คลุมด้วย mineral oil (M5310, Sigma-Aldrich) ที่เตรียมและบ่มไว้ข้ามคืนในตู้ CO₂ incubator (อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์และความชื้น 95 เปอร์เซ็นต์)

4. การแช่แข็งตัวอ่อน

แช่แข็งตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ด้วยวิธี vitrification ในน้ำยาแช่แข็งชนิด EFS40 [40% v/v ethylene glycol (E9129, Sigma-Aldrich); 30% w/v Ficoll® PM 70 (F2878, Sigma-Aldrich); 0.5 M sucrose (S1888, Sigma-Aldrich)] บรรจุในหลอดแช่แข็งชนิด 0.25 ml straw tube โดยล้างตัวอ่อนใน M2 medium ปริมาณ 50 ไมโครลิตร 3 ครั้ง แช่ตัวอ่อนใน EFS20 (20% v/v ethylene glycol; 15% w/v Ficoll® PM 70; 0.25 M sucrose) 2 นาที นำหลอดแช่แข็งต่อกับกระบอกฉีดขนาด 1 มิลลิเมตร แล้วดูด EFS40 ยาว 1 เซนติเมตร อากาศยาว 1 เซนติเมตร EFS40 ยาว 0.5 เซนติเมตร อากาศยาว 1 เซนติเมตร EFS40 ยาว 1.2 เซนติเมตร ใช้ mouth pipette ดูดตัวอ่อนจำนวน 30-40 ตัวอ่อนใส่ใน EFS40 ยาว 1.2 เซนติเมตร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นดูดอากาศยาว 1 เซนติเมตร ดูดน้ำยาอุ่นละลาย 0.75 M sucrose จนเต็มหลอดแช่แข็ง ปิดปลายหลอดแช่แข็งด้วย sigillum wax (Figure 1) วางหลอดแช่แข็งตัวอ่อนเหนือไนโตรเจนเหลว 1 เซนติเมตร นาน 3 นาที แล้วจุ่มหลอดแช่แข็งตัวอ่อนลงในไนโตรเจนเหลวทันที เก็บรักษาหลอดแช่แข็งตัวอ่อนไว้ในถังไนโตรเจนเหลวเป็นระยะเวลา 7 วัน

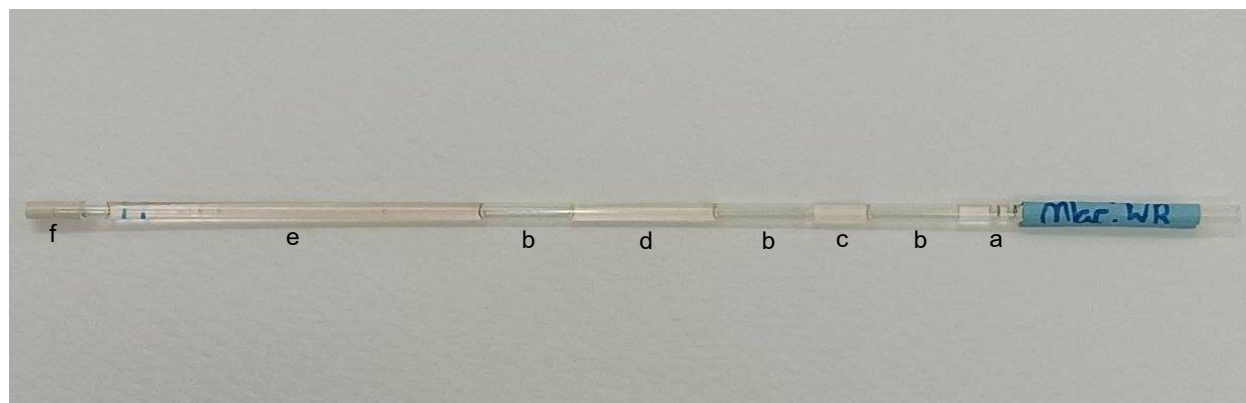


Figure 1 The preparation of a 0.25 ml straw tube, 1 cm of EFS40 (a), 1 cm of air (b), 0.5 ml of EFS40 (c), 1.2 ml of EFS40 with 2-cell stage embryos (d), 0.75 M sucrose (e), and sigillum wax (f)

5. การอุ้มละลายตัวอ่อน

เตรียมเพลทเลี้ยงตัวอ่อนด้วย M16 medium ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 มิลลิเมตร แบ่งออกเป็น wash drop ปริมาณ 50 ไมโครลิตร 3 drop และ culture drop ปริมาณ 150 ไมโครลิตร คลุมเพลทด้วย mineral oil และปั๊มไว้ข้ามคืนในตู้ CO₂ incubator นำหลอดแช่แข็งตัวอ่อนออกจากถังไนโตรเจนเหลว ปล่อยให้ละลายในอุณหภูมิห้องนาน 20 วินาที ละลายในน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที เช็ดหลอดแช่แข็งด้วยกระดาษเช็ดมือแห้ง ใช้กรรไกรตัดปลายหลอดแช่แข็งทั้ง 2 ข้าง ปล่อยให้ของเหลวไหลลงในจานเลี้ยงเซลล์ อีก 30 วินาที ต่อมา คั่นหาตัวอ่อนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แช่ตัวอ่อนใน 0.75 M sucrose นาน 5 นาที 2 ครั้ง แช่ตัวอ่อนใน 0.25 M sucrose นาน 5 นาที 2 ครั้ง ล้างตัวอ่อนใน M2 medium ปริมาณ 50 ไมโครลิตร 3 ครั้ง ล้างตัวอ่อนใน wash drop 3 ครั้ง คัดเลือกตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ที่รอดชีวิตไปพักไว้ใน culture drop ของ M16 medium และปั๊มในตู้ CO₂ incubator เพื่อรอย้ายฝากตัวอ่อน

6. การทำหมันหนูแรพเพศผู้

วางยาสลบหนูแรพเพศผู้ที่มีอายุ 5 สัปดาห์ จำนวน 2 ตัว ด้วย ketamine HCl 10% ปริมาณ 100 mg/kg BW และ xylazine HCl 2% ปริมาณ 4 mg/kg BW IP โคนขนบริเวณหน้าท้องส่วนล่าง ฉีด tramadol ปริมาณ 8 mg/kg BW เข้าทางใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection, SC) ป้ายตาด้วย Terramycin™ จัดวางให้นอนหงาย เช็ดหน้าท้องด้วยเบตาดีน ผ่าเปิดหน้าท้องส่วนล่างจนพบท่อน้ำเชื้อ (vas deferens) ใช้ปากคีบลนไฟหนีบท่อน้ำเชื้อให้ขาดทั้ง 2 ข้าง แยกปลายท่อน้ำเชื้อที่ขาดออกจากกัน เย็บปิดกล้ามเนื้อหน้าท้องด้วยไหมละลายเบอร์ 3/0 เย็บปิดผิวหนังด้วย AutoClip® ทาแผลที่ผิวหนังด้วยเบตาดีน ให้ความอบอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งพื้น ตรวจสุขภาพของหนูแรพเพศผู้เป็นระยะเวลา 7 วัน และถอด AutoClip® ในวันที่ 10 หลังการทำหมัน หนูแรพเพศผู้ที่ทำหมันแล้วอายุ 12 สัปดาห์ จะถูกใช้สำหรับการผสมพันธุ์เพื่อเหนี่ยวนำแม่ตัวรับ

7. การย้ายฝากตัวอ่อน

ตรวจหาหนูแรพสายพันธุ์ Mlac:WR เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ ที่อยู่ในระยะ proestrus ด้วยวิธี vaginal smear จากนั้นนำไปผสมพันธุ์กับหนูแรพเพศผู้ที่ทำหมันแล้วที่มีอายุ 12 สัปดาห์ ในเช้าวันต่อมาคัดเลือกหนูแรพเพศเมียที่มี vaginal plug หรือได้รับการผสมพันธุ์ให้เป็นแม่ตัวรับ หลังจากวางยาสลบ โคนขนบริเวณหลังกลางลำตัว จัดวางให้นอนคว่ำ ป้ายตาด้วย Terramycin™ เช็ดหลังด้วยเบตาดีน ผ่าเปิดเข้าไปในช่องท้องจนพบท่อน้ำไข ใช้ mouth pipette เป่าตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็งจำนวน 15-20 ตัวอ่อน เข้าไปภายในท่อน้ำไขปล่อยตัวอ่อนบริเวณ ampulla (Figure 2) เย็บปิดผิวหนังด้วยไหมเย็บแผลเบอร์ 3/0 ทาแผลที่ผิวหนังด้วยเบตาดีน ให้ความอบอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งพื้น จากนั้นฉีด tramadol ปริมาณ 8 mg/kg BW SC ติดตามสุขภาพของแม่ตัวรับเป็นระยะเวลา 7 วัน ตัดไหมเย็บแผลในวันที่ 10 หลังการย้ายฝากตัวอ่อน ติดตามการคลอดลูกในวันที่ 19-20 หลังการย้ายฝากตัวอ่อน

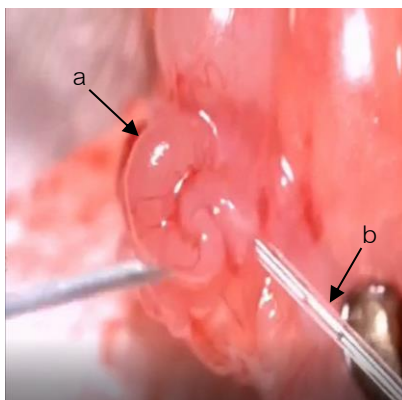


Figure 2 The embryo transfer of 2-cell stage embryos into the oviduct, ampulla (a), and mouth pipette with 2-cell stage embryos (b)

8. การวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษานี้ใช้สถิติพรรณนามาอธิบายข้อมูลที่ได้จากการผลิตตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ การแช่แข็งและอุ่นละลาย และการย้ายฝากตัวอ่อน นำเสนอในรูปแบบของร้อยละของตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ร้อยละของการรอดชีวิตและร้อยละของลูกแรกคลอด ดังนี้

$$\text{ร้อยละของตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์} = \frac{\text{จำนวนตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์} \times 100}{\text{จำนวนตัวอ่อนทั้งหมด}} \quad (1)$$

$$\text{ร้อยละของการรอดชีวิต} = \frac{\text{จำนวนตัวอ่อนที่รอดชีวิต} \times 100}{\text{จำนวนตัวอ่อนแช่แข็ง}} \quad (2)$$

$$\text{ร้อยละของลูกแรกคลอด} = \frac{\text{จำนวนลูกแรกคลอด} \times 100}{\text{จำนวนตัวอ่อนที่ย้ายฝาก}} \quad (3)$$

Results

จากการผลิตตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ในหนูแรทสายพันธุ์ Mlac:WR ที่มีอายุ 9 สัปดาห์ ด้วยวิธีการผลิตตัวอ่อนแบบในร่างกาย มีการใช้เทคนิคกระตุ้นเพิ่มจำนวนไข่ตกและการผสมพันธุ์ตามธรรมชาตินั้น สามารถเก็บตัวอ่อนได้ทั้งหมด จำนวน 202 ตัวอ่อน แบ่งออกเป็น ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ จำนวน 139 ตัวอ่อน (17.4 ± 6.4) ตัวอ่อนระยะ 4 เซลล์ จำนวน 18 ตัวอ่อน (2.3 ± 0.9) และตัวอ่อนที่ผิดปกติ จำนวน 45 ตัวอ่อน (5.6 ± 3.5) คำนวณร้อยละของตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ได้เท่ากับ 68.8 (139/202) ผลของการผลิตตัวอ่อนในหนูแรทสายพันธุ์ Mlac:WR แสดงดัง Table 1 และ Figure 3

Table 1 The *in vivo* embryo production in Mlac:WR

Stage of embryos	No. of embryos (8 female rats)	Mean±standard error (embryos/female rats)	Percentage
2-cell stage embryos	139	17.4±6.4	68.8
4-cell stage embryos	18	2.3±0.9	8.9
abnormal embryos	45	5.6±3.5	22.3

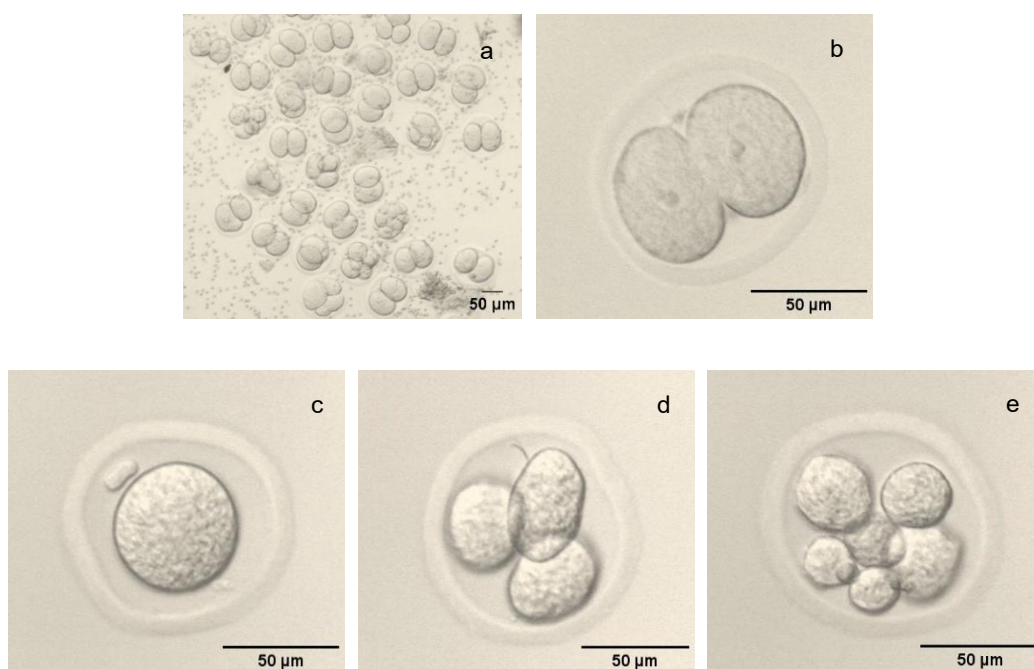


Figure 3 Morphology of Mlac:WR embryos after superovulation, embryos before selection (a), 2-cell stage embryos (b), oocytes (c), 4-cell stage embryos (d), and abnormal embryos (e)

ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ จำนวน 139 ตัวอ่อน ถูกแช่แข็งด้วยวิธี vitrification จำนวน 3 หลอด หลอดละ 47, 47 และ 45 ตัวอ่อน ตามลำดับ หลังจากการอุ่นละลายตัวอ่อนในหลอดที่ 1 จำนวน 47 ตัวอ่อน สามารถค้นพบตัวอ่อนทั้งหมด จำนวน 45 ตัวอ่อน มีตัวอ่อนสูญหายไป จำนวน 2 ตัวอ่อน ตัวอ่อนตายในระหว่างการอุ่นละลาย จำนวน 13 ตัวอ่อน เหลือตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็ง จำนวน 32 ตัวอ่อน คำนวณร้อยละของการรอดชีวิตได้เท่ากับ 68.1 (32/47) ผลของการแช่แข็งและอุ่นละลายตัวอ่อน แสดงดัง Table 2

Table 2 The vitrification and thawing of 2-cell stage embryos in Mlac:WR

0.25 ml straw tube	No. of frozen embryos	No. of embryos discovered	No. of dead embryos	No. of surviving embryos
1	47	45	13	32
2	47	NA	NA	NA
3	45	NA	NA	NA

NA=0.25 ml straw tubes no. 2 and 3 were kept in a liquid nitrogen tank for long-term study

จากการย้ายฝากตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็งให้แม่ตัวรับ จำนวน 2 ตัว ตัวละ 16 ตัวอ่อน พบว่าแม่ตัวรับหมายเลข 1 คลอดลูกจำนวน 1 ตัว และแม่ตัวรับหมายเลข 2 คลอดลูกจำนวน 3 ตัว คำนวณร้อยละของลูกแรกคลอดได้เท่ากับ 12.5 (4/32) แบ่งออกเป็น ลูกเพศผู้ จำนวน 3 ตัว และลูกเพศเมีย จำนวน 1 ตัว ผลของการย้ายฝากตัวอ่อนแสดงดัง Table 3 และ Figure 4

Table 3 The embryo transfer of 2-cell stage embryos in Mlac:WR

No. of recipients	No. of embryos transferred	No. of newborns
1	16	1
2	16	3



Figure 4 The newborns of recipient no. 2 after embryo transfer at 7 days (a), 14 days (b), and 21 days of age (c)

Discussion

การผลิตตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ในหนูแรทสายพันธุ์ Mlac:WR ด้วยวิธีการผลิตตัวอ่อนแบบในร่างกายนั้น ตัวอ่อนทั้งหมดที่ผลิตได้มักจะอยู่ในระยะการแบ่งเซลล์ที่แตกต่างกัน เช่น ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ตัวอ่อนระยะ 4 เซลล์ และตัวอ่อนที่

ผิดปกติ เป็นต้น ทำให้การคัดเลือกตัวอ่อนจำเป็นต้องใช้เวลานานและไม่สะดวกต่อการปฏิบัติงาน อย่างไรก็ตามตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ที่สามารถผลิตได้จากวิธีนี้มีความแข็งแรงและทนทานต่อการแช่แข็งมากที่สุด สำหรับการศึกษาครั้งนี้สามารถเก็บตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ได้ในระดับค่อนข้างสูงที่ร้อยละ 68.8 (17.4 ± 6.4 , 139/202) มีจำนวนตัวอ่อนเพียงพอสำหรับการแช่แข็งและมีจำนวนตัวอ่อนใกล้เคียงกับการผลิตตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ในหนูแรทสายพันธุ์ Jcl:Wistar (15.8 ± 2.7) และ F344/Stm (29.0 ± 5.2) (Taketsuru & Kaneko, 2013) และ Wistar (51.7%) (Polissen *et al.*, 2013) อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของการผลิตตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ สายพันธุ์ของสัตว์ทดลอง อายุของสัตว์ทดลอง โปรแกรมการให้ฮอร์โมน และปริมาณฮอร์โมน เป็นต้น

จากการอุณหลลายตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ของหนูแรทสายพันธุ์ Mlac:WR พบว่ามีร้อยละของการรอดชีวิตอยู่ในระดับค่อนข้างสูงที่ 68.1 (32/47) และมีจำนวนตัวอ่อนเพียงพอสำหรับการย้ายฝากตัวอ่อน ขณะที่ Han *et al.* (2003) รายงานว่าตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ของหนูแรทสายพันธุ์ Wistar ที่ถูกแช่แข็งด้วยน้ำยาแช่แข็งชนิด EFS40 มีร้อยละของการรอดชีวิตอยู่ในระดับสูงที่ 95.0 และมีร้อยละของการพัฒนาในหลอดทดลองเท่ากับ 34.0 อย่างไรก็ตามยังมีน้ำยาแช่แข็งอีกหลายชนิดที่สามารถใช้แช่แข็งตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ในหนูแรทได้ ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ของหนูแรทสายพันธุ์ BrlHan:WIST@Jcl ที่ถูกแช่แข็งด้วยน้ำยาแช่แข็งชนิด PEPeS (10% v/v propylene glycol, 30% v/v ethylene glycol, 20% v/v Percoll, 0.3 M sucrose) มีร้อยละของการรอดชีวิตเท่ากับ 98.3 (Eto *et al.*, 2014) ขณะที่ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ของหนูแรทสายพันธุ์ Jcl:Wistar ที่ถูกแช่แข็งด้วยน้ำยาแช่แข็งชนิด PEPeS มีร้อยละของการรอดชีวิตเท่ากับ 41.0 (Taketsuru & Kaneko, 2018) และตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ของหนูแรทสายพันธุ์ Slc:Wistar ที่ถูกแช่แข็งด้วยน้ำยาแช่แข็งชนิด DAP213 (2 M DMSO, 1 M acetamide, 3 M propylene glycol) มีร้อยละของการรอดชีวิตอยู่ในระดับสูงที่ 96.0 (Hino *et al.*, 2020)

เทคนิคการย้ายฝากตัวอ่อนในแม่ตัวรับที่มีภาวะท้องเทียม 1 วัน ด้วยการผ่าตัดใส่ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็งไว้ภายในท่อนำไข่นั้นเป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมและสามารถปฏิบัติได้ง่าย เมื่อเทียบกับการย้ายฝากตัวอ่อนระยะโมรูล่าเข้าทางปีกมดลูก สำหรับความสำเร็จของการย้ายฝากตัวอ่อนนั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ระยะเวลาของตัวอ่อน คุณภาพของตัวอ่อน ความพร้อมของแม่ตัวรับและทักษะของผู้ปฏิบัติงาน เป็นต้น อย่างไรก็ตามการศึกษานี้มีร้อยละของลูกแรกคลอดอยู่ในระดับต่ำที่ 12.5 (4/32) ขณะที่หนูแรทสายพันธุ์ Wistar (Crj:WI), Long-Evans (Iar:Long-Evans), SD (Crj:CD) และ Lewis (LEW/CRj) มีร้อยละของลูกแรกคลอดหลังการย้ายฝากตัวอ่อนเท่ากับ 54.0, 48.0, 55.0 และ 22.0 ตามลำดับ (Aoto *et al.*, 2011) ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ของหนูแรทสายพันธุ์ Jcl:Wistar และ F344/Stm มีร้อยละของลูกแรกคลอดเท่ากับ 33.0 และ 32.0 ตามลำดับ (Taketsuru & Kaneko, 2013) ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ของหนูแรทสายพันธุ์ BrlHan:WIST@Jcl มีร้อยละของการฝังตัวหลังการย้ายฝากเท่ากับ 65.2 (Eto *et al.*, 2014) และตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ของหนูแรทสายพันธุ์ Jcl:SD, F344/Jcl และ SD-Tg CAG-EGFP มีร้อยละของลูกแรกคลอดหลังการย้ายฝากตัวอ่อนเท่ากับ 21.0, 14.9 และ 23.4 ตามลำดับ (Hino *et al.*, 2020)

จากการพิจารณาแนวทางพัฒนาเพื่อทำให้เทคนิคการย้ายฝากตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ของหนูแรทสายพันธุ์ Mlac:WR มีความสำเร็จเพิ่มมากขึ้นนั้น พบว่าตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ มีความทนทานต่อการแช่แข็งและสามารถรอดชีวิตหลังการแช่แข็ง แต่ในการศึกษานี้ไม่ได้นำตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็งมาทดลองเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองทำให้

ขาดข้อมูลด้านการพัฒนาของตัวอ่อนในหลอดทดลอง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ สามารถรอดชีวิตหลังการแช่แข็งได้ แต่ไม่สามารถพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะต่อไปได้ทั้งในการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองและการย้ายฝากตัวอ่อน อีกทั้งในการศึกษาครั้งนี้จำเป็นต้องใช้ M16 medium ที่เป็นน้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อนของหนูเมาส์ ทดแทนการใช้ modification of rat 1-cell embryo culture medium (mR1ECM) ที่เป็นน้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อนของหนูแรท ซึ่งอาจส่งผลต่อการพัฒนาของตัวอ่อนในระยะก่อนการฝังตัว ขณะที่แม่ตัวรับทั้ง 2 ตัว มีความพร้อมสำหรับการย้ายฝากตัวอ่อนเป็นอย่างมาก เนื่องจากถูกคัดเลือกมาจากหนูแรทเพศเมียที่เริ่มเข้าสู่ระยะเจริญพันธุ์ ทำให้สามารถตรวจระยะเป็นสัดได้ง่ายร่วมกับการตรวจ vaginal smear อีกทั้งขณะผ่าตัดย้ายฝากตัวอ่อนยังสามารถตรวจพบตำแหน่ง ampulla (Figure 2) ที่ใช้สำหรับยืนยันว่าแม่ตัวรับอยู่ในภาวะท้องเทียมวันที่ 1 เหมาะสำหรับการย้ายฝากตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์เป็นอย่างมาก และขณะปฏิบัติการย้ายฝากตัวอ่อนไม่ได้เกิดเหตุการณ์ผิดปกติที่อาจส่งผลต่อความสำเร็จของการย้ายฝากตัวอ่อน อย่างไรก็ตามผู้ปฏิบัติงานจำเป็นต้องฝึกเทคนิคการย้ายฝากตัวอ่อนในหนูแรทอย่างต่อเนื่อง เพื่อช่วยให้การย้ายฝากตัวอ่อนในหนูแรทมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น สำหรับการศึกษาครั้งต่อไปจะนำตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็งมาทดลองเพาะเลี้ยงใน mR1ECM ที่เป็นน้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อนชนิดจำเพาะของหนูแรท ด้วยคาดหวังว่าจะสามารถทำให้ร้อยละของการพัฒนาของตัวอ่อนในหลอดทดลองและร้อยละของลูกแรกคลอดเพิ่มขึ้นได้อย่างสูงสุด

Conclusions

ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ของหนูแรทสายพันธุ์ Mlac:WR สามารถใช้สำหรับแช่แข็งตัวอ่อนเพื่อเก็บรักษาสายพันธุ์สัตว์ทดลองในรูปแบบของธนาคารตัวอ่อนได้ เนื่องจากมีร้อยละของตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ และร้อยละของการรอดชีวิตอยู่ในระดับที่ค่อนข้างสูง แม้ว่าจะมีร้อยละของลูกแรกคลอดอยู่ในระดับต่ำ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้บ่งชี้ว่าเป็นการย้ายฝากตัวอ่อนหนูแรทสำเร็จเป็นครั้งแรกของศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ สำหรับความรู้และทักษะที่ได้รับจากการศึกษาในครั้งนี้จะถูกใช้ในการปรับปรุงและพัฒนาเทคนิคการย้ายฝากตัวอ่อนในหนูแรทให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านการศึกษาการพัฒนาของตัวอ่อนในหลอดทดลองเพื่อให้ทราบถึงรูปแบบของการพัฒนาของตัวอ่อน ด้านการเพิ่มทักษะและความชำนาญในเทคนิคการย้ายฝากตัวอ่อนในหนูแรทอย่างต่อเนื่อง ตลอดจนการทดลองเก็บรักษาสายพันธุ์หนูแรทสายพันธุ์อื่น ๆ ของศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ ด้วยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าจะสามารถจัดตั้งธนาคารตัวอ่อนหนูแรทได้สำเร็จ พร้อมทั้งส่งเสริมให้ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล เป็นแหล่งรวบรวมและเรียนรู้เทคนิคปฏิบัติการทางด้านธนาคารตัวอ่อนในสัตว์ทดลองของประเทศไทย

Acknowledgments

การศึกษานี้ได้รับทุนอุดหนุนและสนับสนุนการตีพิมพ์จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล พร้อมทั้งขอแสดงความขอบคุณแด่ Mr. Khin Maung Zaw และ คุณราตรี เทพเกษตรกุล ผู้ล่วงลับไปแล้ว ที่ให้คำปรึกษาและสนับสนุนหน่วยธนาคารตัวอ่อนมาอย่างต่อเนื่อง

References

- Aoto, T., Takahashi, R. I., & Ueda, M. (2011). A protocol for rat *in vitro* fertilization during conventional laboratory working hours. *Transgenic research*, 20, 1245-1252.
- Buaban, T., Sukglin, T., Zaw, K. M., Chomanee, P., Kengkoom, K., & Pratip-Na-Talang, N. (2015). Efficacy in *in-vitro* culture of rat 1-cell stage embryos by KSOM and mR1ECM medium. In *Proceedings of 53rd Kasetsart University Annual Conference: Plants, Animals, Veterinary Medicine, Fisheries, Agricultural Extension and Home Economics*. (pp. 875-880). Bangkok: Kasetsart University. (in Thai)
- Buaban, T., Chomanee, P., & Pratip-Na-Talang, N. (2016). A comparison of the development of Mlac:WR rat 1-cell stage embryos in M16 and KSOM medium. In *Proceedings of 54th Kasetsart University Annual Conference: Plants, Animals, Veterinary Medicine, Fisheries, Agricultural Extension and Home Economics*. (pp. 483-489). Bangkok: Kasetsart University. (in Thai)
- Chumanee, P., Laosantisuk, A., Thongsiri, P., Likitsuntornwong, W., Butrat, P., & Pinpart, T. (2022). Selecting and establishment of a low-incidence hydronephrosis wistar rat (Mlac:WR) colony at the National Laboratory Animal Center, Mahidol university, Thailand. *Journal of Professional Routine to Research*, 9(1), 39-44.
- Eto, T., Takahashi, R., Kamisako, T., Hioki, L., & Sotomaru, Y. (2014). A study on cryoprotectant solution suitable for vitrification of rat two-cell stage embryos. *Cryobiology*, 68, 147-151.
- Han, M. S., Niwa, K., & Kasai, M. (2003). Vitrification of rat embryos at various developmental stages. *Theriogenology*, 59, 1851-1863.
- Hino, C., Ueda, J., Funakoshi, H., & Matsumoto, S. (2020). Defined oocyte collection time is critical for reproducible *in vitro* fertilization in rats of different strains. *Theriogenology*, 144, 146-151.
- Jiang, J. Y., Umesu, M., & Sato, E. (1999). Vitrification of two-cell rat embryos derived from immature hypothyroid rdw rats by *in vitro* fertilization in ethylene glycol-based solutions. *Cryobiology*, 38, 160-164.
- Kito, S., Yano, H., Ohta, Y., & Tsukamoto, S. (2010). Superovulatory response, oocyte spontaneous activation, and embryo development in WMN/Nrs inbred rats. *Experimental Animals*, 59(1), 35-45.

- Kon, H., Tohei, A., Hokao, R., & Shinoda, M. (2005). Estrous cycle stage-independent treatment of PMSG and hCG can induce superovulation in adult wistar-imamichi rats. *Experimental Animals*, 54(2), 185-187.
- Polisseni, A. F., Andrade, A. T. L., Ribeiro, L. C., Castro, I. Q., Brandão, M., Polisseni, F., & de Oliveira Guerra, M. (2013). Effects of a continuous-combined regimen of low-dose hormone therapy (oestradiol and norethindrone acetate) and tibolone on the quality of life in symptomatic postmenopausal women: a double-blind, randomized study. *Maturitas*, 74(2), 172-178.
- Popova, E., Bader, M., & Krivokharchenko, A. (2005). Strain differences in superovulatory response, embryo development and efficiency of transgenic rat production. *Transgenic Research*, 14, 729-738.
- Srimangkornkaew, P., Suwannasaroj, K., Yottharat, P., & Sirimontaporn, A. (2021). Historical control data from repeated dose 90-days oral toxicity studies of wistar rats (Mlac:WR). *Bulletin of the Department of Medical Sciences*, 63(3), 595-606.
- Sotomaru, Y., Kamisako, T., & Hioki, K. (2005). Estrous stage- and animal age-independent superovulation in the BrlHan:WIST@Jcl(GALAS) rat. *Experimental Animals*, 54(2), 137-141.
- Taketsuru, H., & Kaneko, T. (2013). Efficient collection and cryopreservation of embryos in F344 strain inbred rats. *Cryobiology*, 67(2), 230-234.
- Taketsuru, H., & Kaneko, T. (2018). Tolerance to vitrification of rat embryos at various developmental stages. *Cryobiology*, 84, 1-3.