

**การแช่แข็งตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ของหนูเมาส์สายพันธุ์ ICR/Mlac-Hydro และ
ICR/Mlac-Free Hydro อย่างยาวนาน ที่ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล
Long-Term Cryopreservation of 2-Cell Stage Embryos in ICR/Mlac-Hydro and
ICR/Mlac-Free Hydro Mice at the National Laboratory Animal Center, Mahidol University**

ธีรพงษ์ บัวบาน^{*}

Theerapong Buaban^{*}

หน่วยธนาคารตัวอ่อน งานผลิตสัตว์ทดลอง ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ประเทศไทย

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

Received : 14 October 2025, Received in revised form : 21 December 2025, Accepted : 9 January 2026

Available online : 21 January 2026

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์และที่มา : ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล เป็นแหล่งเพาะขยายพันธุ์สัตว์ทดลองสำหรับใช้ในงานวิจัยของประเทศไทยและได้ปรับปรุงพันธุ์หนูเมาส์สายพันธุ์ ICR/Mlac-hydro และ ICR/Mlac-free hydro เพื่อใช้เป็นสัตว์ทดลองต้นแบบของภาวะไตบวมในมนุษย์ พร้อมทั้งได้เก็บรักษาสายพันธุ์ไว้ในธนาคารตัวอ่อนตั้งแต่พุทธศักราช 2557 เพื่อป้องกันการสูญเสียสายพันธุ์สัตว์ทดลอง สร้างความมั่นคงทางด้านสายพันธุ์สัตว์ทดลอง เพิ่มความหลากหลายของสายพันธุ์สัตว์ทดลอง สนับสนุนการพัฒนาทางด้านวิทยาศาสตร์สัตว์ทดลอง ลดการนำเข้าสัตว์ทดลองที่มีราคาแพงและลดต้นทุนการเลี้ยงสัตว์ทดลอง เป็นต้น อย่างไรก็ตามหนูเมาส์สายพันธุ์นี้ได้ยุติการเพาะขยายพันธุ์ลง เพื่อให้มั่นใจว่าจะสามารถจัดตั้งโคลนีหนูเมาส์สายพันธุ์นี้ได้อีกครั้ง ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ที่เก็บรักษาไว้ในธนาคารตัวอ่อนเป็นเวลา 11 ปี จะถูกนำออกมาอุ่นละลายเพื่อศึกษาอัตราการรอดชีวิต ตัวอ่อนที่รอดชีวิตจะถูกนำมาย้ายฝากตัวอ่อนเพื่อศึกษาอัตราการรอดของลูกแรกคลอดและลูกหนูเมาส์จะถูกทดสอบความสมบูรณ์พันธุ์ด้วยการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ

วิธีดำเนินการวิจัย : การศึกษานี้ได้รับการอนุมัติการใช้สัตว์ทดลองในงานวิจัยจากคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล (รหัสโครงการ AP2024-02) และดูแลสัตว์ทดลองตามมาตรฐานของ Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) International หนูเมาส์ทั้งหมดอยู่ในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองที่มีสภาพแวดล้อมแบบระบบอนามัยเข้ม ควบคุมอุณหภูมิ 22±3 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 30-70 เปอร์เซ็นต์ ให้แสงสว่าง 14 ชั่วโมง มีด 8 ชั่วโมง เปิดไฟเวลา 6.00 นาฬิกา ปิดไฟเวลา 20.00 นาฬิกา กินน้ำดื่มชนิด reverse osmosis ที่ผสมคลอรีนให้มีความเข้มข้น 5-7 ppm และอาหารสำเร็จรูปให้อาหารและน้ำดื่มวันละครั้ง หนูเมาส์เข้าถึงอาหารและน้ำดื่มได้ตลอดเวลา ใช้วัสดุรองนอนปลอดเชื้อเป็นชั่งข้าวโพด ผักตบชวาอบแห้งแบบท่อนและผักตบชวาอบแห้งแบบเส้น ก่อนการอุ่นละลายจะเตรียมเพลทเลี้ยงตัวอ่อนด้วย M16 medium บนจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 มิลลิเมตร ประกอบด้วย wash drop ปริมาณ 50 ไมโครลิตร 3 drop และ culture drop ปริมาณ 150 ไมโครลิตร

คลุมเพทด้วย mineral oil และบ่มข้ามคืนใน CO₂ incubator เข้าวันต่อมา นำหลอดแช่แข็งออกจากถังไนโตรเจนเหลว ละลายที่อุณหภูมิห้อง 20 วินาที ละลายในน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 20 วินาที ตัดปลายหลอดแช่แข็งทั้ง 2 ข้าง ปลอຍให้ตัวอ่อนที่แขวนลอยอยู่ในน้ำยาแช่แข็งและ 0.3 M Trehalose ไหลลงในจานเลี้ยงเซลล์ อีก 30 วินาที ต่อมา ค้นหาตัวอ่อนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ใช้ mouse pipette ดูดตัวอ่อนไปแช่ใน 0.3 M Trehalose ปริมาณ 50 ไมโครลิตร 3 นาที ย้ายตัวอ่อนไปแช่ใน 0.15 M Trehalose ปริมาณ 50 ไมโครลิตร 3 นาที ย้ายตัวอ่อนไปแช่ใน 0.075 M Trehalose ปริมาณ 50 ไมโครลิตร 3 นาที และแช่ใน Holding medium ปริมาณ 50 ไมโครลิตร 5 นาที ล้างตัวอ่อนใน M2 medium ปริมาณ 50 ไมโครลิตร 3 ครั้ง ล้างตัวอ่อนใน wash drop 3 ครั้ง คัดเลือกตัวอ่อนที่รอดชีวิตไปไว้ใน culture drop และบ่มใน CO₂ incubator จากนั้นย้ายฝากตัวอ่อนที่รอดชีวิตเข้าสู่ท่อฆ่าเชื้อของแม่ตัวรับ ติดตามการคลอดลูกในวันที่ 19-20 หลังย้ายฝากตัวอ่อนและลูกหนูเม้าส์สายพันธุ์ละ 1 คู่ จะถูกจับคู่ผสมพันธุ์ที่อายุ 7 สัปดาห์

ผลการวิจัย : จากการอุ่นละลายตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ของหนูเม้าส์สายพันธุ์ ICR/Mlac-hydro จำนวน 157 ตัวอ่อน สามารถค้นพบตัวอ่อนทั้งหมด 142 ตัวอ่อน มีตัวอ่อนสูญเสีย 15 ตัวอ่อน มีตัวอ่อนตาย 48 ตัวอ่อน เหลือตัวอ่อนรอดชีวิตจำนวน 94 ตัวอ่อน คำนวณร้อยละของการรอดชีวิตได้ 59.9 (94/157) สำหรับหนูเม้าส์สายพันธุ์ ICR/Mlac-free hydro จำนวน 208 ตัวอ่อน สามารถค้นพบตัวอ่อนทั้งหมด 196 ตัวอ่อน มีตัวอ่อนสูญเสีย 12 ตัวอ่อน มีตัวอ่อนตาย 88 ตัวอ่อน เหลือตัวอ่อนรอดชีวิตจำนวน 108 ตัวอ่อน คำนวณร้อยละของการรอดชีวิตได้ 51.9 (108/208) อีกทั้งร้อยละของการรอดชีวิตของตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ของหนูเม้าส์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Fisher's Exact Test, $P>0.05$) หลังการย้ายฝากตัวอ่อนที่รอดชีวิตจำนวน 94 ตัวอ่อนของหนูเม้าส์สายพันธุ์ ICR/Mlac-hydro ให้แม่ตัวรับจำนวน 8 ตัว พบว่าแม่ตัวรับหมายเลข 3, 4, 6 และ 8 คลอดลูกจำนวน 7, 8, 9 และ 8 ตัว ตามลำดับ คำนวณร้อยละของลูกแรกคลอดได้ 30.9 (29/94) แบ่งออกเป็นลูกเพศผู้ 19 ตัว และลูกเพศเมีย 10 ตัว ส่วนการย้ายฝากตัวอ่อนที่รอดชีวิตจำนวน 108 ตัวอ่อนของหนูเม้าส์สายพันธุ์ ICR/Mlac-free hydro ให้แม่ตัวรับจำนวน 7 ตัว พบว่าแม่ตัวรับหมายเลข 10 และ 13 คลอดลูกจำนวน 7 และ 4 ตัว ตามลำดับ คำนวณร้อยละของลูกแรกคลอดได้ 10.2 (11/108) แบ่งออกเป็นลูกเพศผู้ 7 ตัว และลูกเพศเมีย 4 ตัว อย่างไรก็ตาม ร้อยละของลูกแรกคลอดของหนูเม้าส์ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Fisher's Exact Test, $P<0.05$) จากการจับคู่ผสมพันธุ์หนูเม้าส์สายพันธุ์ละ 1 คู่ พบว่าหนูเม้าส์สายพันธุ์ ICR/Mlac-hydro คลอดลูกจำนวน 6 ตัว แบ่งออกเป็นหนูเพศผู้ 3 ตัว และหนูเพศเมีย 3 ตัว สำหรับหนูเม้าส์สายพันธุ์ ICR/Mlac-free hydro คลอดลูกจำนวน 7 ตัว แบ่งออกเป็นหนูเพศผู้ 3 ตัว และหนูเพศเมีย 4 ตัว

สรุปผลการวิจัย : หนูเม้าส์สายพันธุ์ ICR/Mlac-hydro และ ICR/Mlac-free hydro สามารถเก็บรักษาสายพันธุ์ไว้ในธนาคารตัวอ่อนได้ ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ที่ถูกแช่แข็งเก็บไว้เป็นระยะเวลา 11 ปี สามารถรอดชีวิตหลังการอุ่นละลายและคลอดออกมาเป็นลูกหนูเม้าส์ที่มีชีวิตหลังการย้ายฝากตัวอ่อนได้ อีกทั้งลูกหนูเม้าส์สามารถผสมพันธุ์ตามธรรมชาติและมีจำนวนเพียงพอสำหรับจัดตั้งโคไลน์สัตว์ทดลองได้อีกครั้ง

คำสำคัญ : หนูเม้าส์ ; ตัวอ่อน ; การแช่แข็ง ; การย้ายฝากตัวอ่อน ; ธนาคารตัวอ่อน

Abstract

Background and Objectives : The National Laboratory Animal Center, Mahidol University, is a source of laboratory animal production for research in Thailand. ICR/Mlac-hydro and ICR/Mlac-free hydro mice were developed as an animal model for hydronephrosis in humans. Additionally, these mouse strains have been preserved in the embryo bank since 2014. To prevent the loss of mouse strains, ensure the stability of laboratory animals, increase the diversity of mouse strains, develop the science of laboratory animal, reduce the import of expensive laboratory animals, and reduce the costs of laboratory animal breeding. However, the production of these mouse strains has been discontinued as research using these animals has been completed. To ensure that the new colony of ICR/Mlac-hydro and ICR/Mlac-free hydro mice can be established in the future. Therefore, 11-year frozen 2-cell stage embryos of ICR/Mlac-hydro and ICR/Mlac-free hydro mice will be tested by the thawing to determine the percentage of survival 2-cell stage embryos (% survival). The survival 2-cell stage embryos of ICR/Mlac-hydro and ICR/Mlac-free hydro mice were used for embryo transfer in recipients to determine the percentage of newborns (% newborn). After that, a pair of newborns in each mouse strain was tested for fertility with natural mating.

Methodology : This study was approved by the National Laboratory Animal Center-Animal Care and Use Committee (NLAC-ACUC, protocol no. AP2024-02). All animal procedures were conducted at the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) International. All mice were maintained under routine husbandry procedures in the animal room with strict hygienic conventional, controlled temperature at $22\pm 3^{\circ}\text{C}$, 30-70% humidity, 14 hours light conditions (lights on from 6:00 AM to 8:00 PM), 5-7 ppm choline reverse osmosis water, and a standard mouse diet. Mice had access to diet and water at all times (*ad libitum*). Mice are kept in plastic cages and stainless-steel lids. The sterile bedding used consisted of corn cobs and dried water hyacinth. Before thawing, the culture plate was prepared with M16 medium on a 35 mm sterile plastic dish consisting of a 3 drop of wash drop (50 μl), and a culture drop (150 μl) covered with mineral oil in a CO_2 incubator, overnight. The next morning, the 0.25 ml straw tube was removed from the liquid nitrogen tank, warmed at room temperature for 20 seconds, then warmed in a 37°C water bath for 20 seconds. The 0.25 ml straw tube was cut with sterilized scissors, and the 2-cell stage embryos, along with 35EG and 0.3 M Trehalose, were released into a 35 mm sterile plastic dish. 30 seconds later, the embryos were found under a stereomicroscope and thawed using a 50 μl of 37°C 0.3 M Trehalose for 3 minutes, a 50 μl of 37°C 0.15 M Trehalose for 3 minutes, a 50 μl of 37°C 0.075 M Trehalose for 3 minutes, and a 50 μl of 37°C Holding medium for 5 minutes. Embryos were washed in 50 μl of M2 medium 3 times and washed in a wash drop 3 times. The survival 2-cell stage embryos were cultured in a 150 μl culture drop in a CO_2 incubator, waiting for embryo transfer. The survival 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. The newborns were set to mate at 7 weeks of age.

Main Results : The thawing of 157 embryos in ICR/Mlac-hydro mice. The results show that 142 embryos were recovered under a stereomicroscope, and then 48 embryos were found dead. Ninety-four of the 2-cell stage embryos were alive, with the percentage of survival 2-cell stage embryos was 59.9 (94/157). In ICR/Mlac-free hydro mice, 208 embryos were thawed, and 196 embryos were discovered. After that, 88 embryos were determined to be dead. 108 of the 2-cell stage embryos were alive, with the percentage of survival 2-cell stage embryos being 51.9 (108/208). The percentage of survival 2-cell stage embryos did not differ significantly between the two mouse strains (Fisher's Exact Test, $P>0.05$). The embryo transfer of survival 2-cell stage embryos. In ICR/Mlac-hydro mice, the 94 survival embryos were transferred to 8 recipients. 19-20 days later, the number of newborns was 7, 8, 6, and 8 in recipients no. 3, 4, 6, and 8, respectively. The percentage of newborns was 30.9 (29/94), consisting of 19 males and 10 females. For ICR/Mlac-free hydro mice, 108 of the survival 2-cell stage embryos were transferred to 7 recipients. The number of newborns was 7 and 4 in recipients no. 10 and 13, respectively. The percentage of newborns was 10.2 (11/108), including 7 males and 4 females. However, the percentage of newborns differed significantly between the two mouse strains (Fisher's Exact Test, $P<0.05$). After natural mating of each mouse strain, ICR/Mlac-hydro mice gave birth to 6 offspring, including 3 males and 3 females. In ICR/Mlac-free hydro mice, 7 offspring were born, consisting of 3 males and 4 females.

Conclusions : The embryo bank can preserve the strains of ICR/Mlac-hydro and ICR/Mlac-free hydro mice. The 11-year-frozen 2-cell stage embryos survive after thawing and will be born after embryo transfer. Mice can give birth naturally and are sufficient for establishing the new colony.

Keywords : mice ; embryos ; vitrification ; embryo transfer ; embryo bank

*Corresponding author. E-mail : theerapong.bua@mahidol.ac.th

Introduction

ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล เป็นแหล่งเพาะขยายพันธุ์สัตว์ทดลองและให้บริการสัตว์ทดลองสำหรับใช้ในงานวิจัยและงานวิทยาศาสตร์ของประเทศไทย ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติได้พยายามเพิ่มความหลากหลายของสายพันธุ์สัตว์ทดลอง ตลอดจนการสร้างสัตว์ทดลองต้นแบบ (animal model) ที่มีความจำเพาะต่อโรคในมนุษย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งหนูเมาส์ (*Mus musculus*) เป็นสัตว์ทดลองที่มีกายวิภาคและสรีระวิทยาคล้ายคลึงกับมนุษย์จึงนิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง อีกทั้งหนูเมาส์เป็นสัตว์ทดลองที่สามารถเพาะขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว ผสมพันธุ์ง่าย มีระยะเวลาตั้งท้องสั้น สามารถ

เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและใช้อุปกรณ์การเลี้ยงสัตว์ทดลองจำนวนน้อยกว่าสัตว์ทดลองชนิดอื่น ๆ เหมาะสำหรับงานวิจัยที่ต้องใช้สัตว์ทดลองจำนวนมากอย่างต่อเนื่อง ICR/Mlac-hydro คือหนูเมาส์เลือดชิด (inbred strain) เป็นสัตว์ทดลองต้นแบบของภาวะไตบวมน้ำ (hydronephrosis) ในมนุษย์ ถูกปรับปรุงพันธุ์ขึ้นมาด้วยวิธีการผสมพันธุ์แบบเลือดชิด (brother and sister full-sib mating program) (Kengkoom *et al.*, 2012) มีลักษณะทั่วไปเป็นหนูเมาส์ขนาดเล็ก มีขนสีขาว (albino) สามารถตรวจพบภาวะไตบวมน้ำได้ตั้งแต่อายุ 8 สัปดาห์ขึ้นไป เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่หนูเพศผู้มีน้ำหนักตัว 25-40 กรัม และหนูเพศเมียมีน้ำหนักตัว 20-35 กรัม สำหรับหนูเมาส์สายพันธุ์ ICR/Mlac-free hydro เป็นหนูเมาส์เลือดชิดที่เป็น wild type ของหนูเมาส์ ICR/Mlac-hydro ที่ไม่มีภาวะไตบวมน้ำ หนูเมาส์สายพันธุ์นี้เคยถูกนำไปใช้ศึกษาด้านสรีรวิทยา (Suntornsaratoon *et al.*, 2014; Isarangkul *et al.*, 2015) เนื่องจากไม่ได้ใช้ในงานวิจัยอย่างต่อเนื่องและต้องการลดต้นทุนการเลี้ยงสัตว์ทดลองแบบมีชีวิต ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติจึงได้ยุติการเพาะขยายพันธุ์สัตว์ทดลองเหล่านี้ลง พร้อมทั้งได้เก็บรักษาสายพันธุ์หนูเมาส์ ICR/Mlac-hydro และ ICR/Mlac-free hydro ไว้ในธนาคารตัวอ่อนในพุทธศักราช 2557 เพื่อประโยชน์ในด้านการป้องกันการสูญเสียสายพันธุ์สัตว์ทดลอง สร้างความมั่นคงทางด้านสายพันธุ์สัตว์ทดลองของประเทศไทย เพิ่มความหลากหลายของสายพันธุ์สัตว์ทดลอง สนับสนุนการพัฒนางานวิจัยและงานด้านวิทยาศาสตร์สัตว์ทดลอง สนับสนุนการเพิ่มความสามารถในการแข่งขันทางด้านการวิจัยและช่วยลดการนำเข้าสัตว์ทดลองที่มีราคาแพงจากต่างประเทศ

ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ (2-cell stage embryos) ของหนูเมาส์สายพันธุ์ ICR/Mlac-hydro และ ICR/Mlac-free hydro ถูกแช่แข็งด้วยวิธีการแช่แข็งแบบ vitrification ที่เป็นเทคนิคการแช่แข็งตัวอ่อนอย่างรวดเร็ว โดยใช้ไนโตรเจนเหลวแช่แข็งที่มีส่วนผสมของสารป้องกันการแช่แข็ง (cryoprotectants) ที่มีระดับความเข้มข้นสูง ร่วมกับการลดอุณหภูมิของหลอดแช่แข็งตัวอ่อนลงอย่างรวดเร็วด้วยการใช้ไอของไนโตรเจนเหลว สารป้องกันการแช่แข็งที่มีความเข้มข้นสูงจะเข้าไปแทนที่ของเหลวภายในเซลล์ของตัวอ่อนและช่วยป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ของตัวอ่อน การแช่แข็งตัวอ่อนด้วยวิธีนี้ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องแช่แข็งที่มีราคาแพง สามารถปฏิบัติได้ง่าย ลดระยะเวลาในการปฏิบัติงานและเหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการขนาดเล็ก ในระยะเริ่มต้นมีการใช้วิธี vitrification สำหรับการแช่แข็งสเปิร์มเพื่อพัฒนางานทางด้านปศุสัตว์ ต่อมาได้มีการประยุกต์ใช้สำหรับการแช่แข็งตัวอ่อนในสัตว์ทดลองเพื่อประโยชน์ทางด้านการเก็บรักษาสายพันธุ์และได้ประสบความสำเร็จในการแช่แข็งตัวอ่อนหนูเมาส์ตลอดจนการย้ายฝากตัวอ่อน (Whittingham *et al.*, 1972) ทำให้การแช่แข็งเป็นเทคนิคที่ถูกประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางมาเป็นระยะเวลายาวนาน หลังจากนั้นขั้นตอนการจัดตั้งธนาคารตัวอ่อนในสัตว์ทดลองและเทคนิคปฏิบัติการที่เกี่ยวข้องได้ถูกเผยแพร่และแนะนำไว้อย่างมากมาย ได้แก่ การแช่แข็งสเปิร์ม การแช่แข็งโอโอไซด์ การแช่แข็งตัวอ่อน การกระตุ้นเพิ่มจำนวนไข่ตก (Takeo *et al.*, 2020) และการแช่แข็งวิธีนี้ยังถูกใช้สำหรับการเก็บรักษาตัวอ่อนของหนูเมาส์ดัดแปลงพันธุกรรม ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายและสถานที่เลี้ยงดูหนูเมาส์ดัดแปลงพันธุกรรมในขณะนี้ยังไม่มีกรณีการทดลองได้เป็นอย่างดี (Sa-ardrit *et al.*, 2011) อย่างไรก็ตามการแช่แข็งตัวอ่อนหนูเมาส์ในระยะยาวมีจุดมุ่งหมายเพื่อให้ตัวอ่อนสามารถรอดชีวิตหลังการอุ้มดลายและให้กำเนิดหนูเมาส์ที่มีพันธุกรรมและสายพันธุ์คงที่ ความท้าทายสำคัญในกระบวนการนี้ ได้แก่ การป้องกันความเสียหายจากการก่อตัวของผลึกน้ำแข็งทั้งภายในและภายนอกเซลล์ของตัวอ่อน การจัดการความเป็นพิษของสารป้องกันการแช่แข็งที่ระดับความเข้มข้นสูง รวมถึงระยะเวลาสัมผัสและการกำจัดสารป้องกัน

การแช่แข็งที่อาจตกค้างหลังการอุณหภูมิลดลง นอกจากนี้นี้ยังมีปัจจัยที่ส่งผลต่อความสำเร็จ ได้แก่ การดูแลถึงไนโตรเจนเหลวที่ใช้เก็บรักษาตัวอ่อนแช่แข็งอย่างสม่ำเสมอและความแปรปรวนของผลการย้ายฝากตัวอ่อน ซึ่งขึ้นอยู่กับปัจจัยร่วมระหว่างเทคนิคปฏิบัติการ คุณภาพของแม่ตัวรับ ทักษะของผู้ปฏิบัติงานและคุณสมบัติจำเพาะของตัวอ่อน เช่น สายพันธุ์ คุณภาพและระยะของตัวอ่อนที่ทนทานต่อการแช่แข็งได้แตกต่างกัน (Rall *et al.*, 2000)

ดังนั้น ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ของหนูเมาส์สายพันธุ์ ICR/Mlac-hydro และ ICR/Mlac-free hydro ที่ถูกแช่แข็งและเก็บรักษาไว้ในธนาคารตัวอ่อนเป็นเวลา 11 ปี จะถูกนำออกมาอุณหภูมิลดลงเพื่อศึกษาร้อยละของการรอดชีวิตหลังการแช่แข็ง ตัวอ่อนที่รอดชีวิตจะถูกนำมาย้ายฝากตัวอ่อน เพื่อศึกษาร้อยละของลูกแรกคลอดและลูกหนูเมาส์จะถูกทดสอบความสมบูรณ์พันธุ์ด้วยการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติเพื่อให้มั่นใจว่าจะสามารถจัดตั้งโคไลน์หนูเมาส์สายพันธุ์นี้ได้อีกครั้ง

Methodology

1. สัตว์ทดลองและการดูแลสัตว์ทดลอง

การศึกษานี้ใช้หนูเมาส์สายพันธุ์ Jcl:ICR เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ จำนวน 40 ตัว สำหรับเหนี่ยวนำให้เป็นแม่ตัวรับที่มีภาวะท้องเทียมวันที่ 1 (recipients with pseudopragnant day 1) และหนูเพศผู้ อายุ 5 สัปดาห์ จำนวน 20 ตัว สำหรับใช้ในการผ่าตัดทำหมัน (vasectomize male) เพื่อใช้เหนี่ยวนำแม่ตัวรับ เลี้ยงหนูเมาส์ทั้งหมดในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองที่มีสภาพแวดล้อมแบบระบบอนามัยเข้ม (strict hygienic conventional) ควบคุมอุณหภูมิ 22 ± 3 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 30-70 เปอร์เซ็นต์ มีระยะเวลาให้แสงสว่าง 14 ชั่วโมง มีด 8 ชั่วโมง เปิดไฟเวลา 6.00 นาฬิกา ปิดไฟเวลา 20.00 นาฬิกา ควบคุมปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม (total bacterial count) ไม่เกิน 15 cfu/ft^2 หนูเมาส์กินน้ำดื่มชนิด reverse osmosis (RO) ที่ผสมคลอรีนให้มีความเข้มข้น 5-7 ppm และกินอาหารสัตว์ทดลองสำเร็จรูปชนิด 082G แบบเม็ด (Perfect Companion[®]) ให้อาหารสัตว์ทดลองและน้ำดื่มวันละครั้ง หนูเมาส์สามารถเข้าถึงอาหารสัตว์ทดลองและน้ำดื่มได้ตลอดเวลา (*ad libitum*) ใช้วัสดุรองนอนปลอดเชื้อที่ผ่านการอบนิ่งฆ่าเชื้อ ได้แก่ ช้างข้าวโพด ผักตบชวาอบแห้งแบบท่อนและผักตบชวาอบแห้งแบบเส้น ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติดูแลสัตว์ทดลองทั้งหมดตามมาตรฐานของ Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) International และการศึกษานี้ได้รับการอนุมัติการใช้สัตว์ทดลองในงานวิจัยจากคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล (รหัสโครงการ AP2024-02)

2. การเก็บรักษาสายพันธุ์สัตว์ทดลอง

ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติได้เก็บรักษาสายพันธุ์หนูเมาส์ Mlac/ICR-hydro และ Mlac/ICR-free hydro จำนวน 157 และ 208 ตัวอ่อน ตามลำดับ โดยแช่แข็งตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ด้วยวิธีการแช่แข็งแบบ vitrification ใช้ไนยาแช่แข็งชนิด 35EG [35% v/v ethylene glycol (E9129, Sigma-Aldrich), Bovine serum albumin (A9647, Sigma-Aldrich), Polyvinylpyrrolidone (PVP40, Sigma-Aldrich), Trehalose dehydrate (T0167, Sigma-Aldrich), M2 medium (M7167, Sigma-Aldrich)] บรรจุในหลอดแช่แข็งชนิด 0.25 ml straw tube ตั้งแต่ 9-40 ตัวอ่อนต่อหลอด ซึ่งจำนวนตัวอ่อนต่อหลอด

ขึ้นอยู่กับความสำเร็จของการผลิตตัวอ่อนจากแม่พันธุ์แต่ละตัว และเก็บรักษาตัวอ่อนแช่แข็งไว้ในถังไนโตรเจนเหลวภายใต้การดูแลของหน่วยธนาคารตัวอ่อน (embryo bank unit) เป็นระยะเวลา 11 ปี ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ทั้งหมดได้มาจากการผลิตตัวอ่อนด้วยวิธีการผลิตตัวอ่อนแบบในร่างกาย (*in vivo* embryo production) โดยใช้เทคนิคการกระตุ้นเพิ่มจำนวนไข่ตก (superovulation) ในหนูเม้าส์ Mlac/ICR-hydro และ Mlac/ICR-free hydro เพศเมียที่มีอายุ 10-12 สัปดาห์ ด้วยการฉีดฮอร์โมน pregnant mare serum gonadotropin (PMSG, Folligon®, Intervet) ปริมาณ 5 IU/ตัว เข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal, IP) ในเวลา 15.00-16.00 นาฬิกา อีก 48 ชั่วโมง ต่อมา ฉีดตามด้วยฮอร์โมน human chorionic gonadotropin (hCG, Chorulon®, Intervet) ปริมาณ 5 IU/ตัว IP ในเวลา 15.00-16.00 นาฬิกา จากนั้นจับคู่ผสมพันธุ์ด้วยวิธีการผสมพันธุ์แบบเลือดชิดกับหนูเม้าส์เพศผู้สายพันธุ์เดียวกันที่มีอายุ 12 สัปดาห์ ขึ้นไป ข้ามคืน ในสัดส่วนเพศผู้ 1 ตัว ต่อ เพศเมีย 1 ตัว อีก 42-44 ชั่วโมง หลังจากฉีดฮอร์โมน hCG จึงได้ทำการเก็บตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ จากท่อนำไข่ของหนูเพศเมีย

3. การอุ่นละลายตัวอ่อน

เตรียมเพลทเลี้ยงตัวอ่อนด้วยสารละลาย M16 medium (M7292, Sigma-Aldrich) ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 มิลลิเมตร ประกอบด้วย wash drop ปริมาณ 50 ไมโครลิตร จำนวน 3 drop และ culture drop ปริมาณ 150 ไมโครลิตร จำนวน 1 drop คลุมเพลทด้วย mineral oil (M5310, Sigma-Aldrich) และบ่มไว้ข้ามคืนใน CO₂ incubator (อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์และความชื้น 95 เปอร์เซ็นต์) ในเช้าวันต่อมา บ่มน้ำยาอุ่นละลายทุกชนิดใน CO₂ incubator เป็นระยะเวลา 30 นาที จากนั้นนำหลอดแช่แข็งตัวอ่อนออกจากถังไนโตรเจนเหลว ปล่อยให้ละลายในอุณหภูมิห้องนาน 20 วินาที ละลายในน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที เช็ดหลอดแช่แข็งด้วยกระดาษอเนกประสงค์ ใช้กรรไกรปลอดเชื้อตัดปลายหลอดแช่แข็งทั้ง 2 ข้าง ปล่อยให้ของเหลวไหลลงในจานเลี้ยงเซลล์ อีก 30 วินาที ต่อมา ค้นหาตัวอ่อนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ใช้ mouse pipette ดูดตัวอ่อนทั้งหมดไปแช่ใน 0.3 M Trehalose [Trehalose dehydrate; Bovine serum albumin; M2 medium] ปริมาณ 50 ไมโครลิตร บ่มใน CO₂ incubator นาน 3 นาที ย้ายตัวอ่อนไปแช่ใน 0.15 M Trehalose ปริมาณ 50 ไมโครลิตร บ่มใน CO₂ incubator นาน 3 นาที ย้ายตัวอ่อนไปแช่ใน 0.075 M Trehalose ปริมาณ 50 ไมโครลิตร บ่มใน CO₂ incubator นาน 3 นาที และย้ายตัวอ่อนไปแช่ใน Holding medium (Bovine serum albumin; M2 medium) ปริมาณ 50 ไมโครลิตร บ่มใน CO₂ incubator นาน 5 นาที ล้างตัวอ่อนใน M2 medium ปริมาณ 50 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง ล้างตัวอ่อนใน wash drop จำนวน 3 ครั้ง คัดเลือกตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ที่รอดชีวิตไปเลี้ยงไว้ใน culture drop ของ M16 medium และบ่มใน CO₂ incubator เพื่อรอการย้ายฝากตัวอ่อน

4. การทำหมันหนูเพศผู้

ทำหมันหนูเม้าส์สายพันธุ์ Jcl:ICR เพศผู้ที่มีอายุ 5 สัปดาห์ ด้วยการฉีดยาสลบด้วย ketamine HCl 10% (Hamel Pharmaceuticals, Germany) ปริมาณ 50 mg/kg BW และ xylazine HCl 2% (L.B.S. Laboratory CO., LTD, Thailand) ปริมาณ 10 mg/kg BW IP โคนขนบริเวณหน้าท้องส่วนล่าง บำบัดด้วย Terramycin™ จัดวางให้หนูเม้าส์นอนหงาย ใช้นิ้วมือดันอวัยวะให้เข้าไปในช่องท้อง เช็ดหน้าท้องด้วยสำลีชุบแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ใช้กรรไกรปลอดเชื้อตัดผิวหนัง

หน้าท้องส่วนล่างตามแนวขวางลำตัวยาว 1 เซนติเมตร ใช้กรรไกรปลอดเชื้อตัดกล้ามเนื้อหน้าท้องส่วนล่างตามแนวยาวลำตัว ยาว 1 เซนติเมตร ใช้ปากคีบจับไขมันที่ติดกับอวัยวะแล้วดึงออกมาให้พ้นจากช่องท้องจนพบท่อน้ำเชื้อ (vas deferens) ใช้ปากคีบหนีบท่อน้ำเชื้อให้ขาดทั้ง 2 ข้าง แยกปลายท่อน้ำเชื้อที่ขาดออกจากกัน ใส่อวัยวะกลับเข้าไปในช่องท้อง เย็บปิดกล้ามเนื้อหน้าท้องด้วยไหมละลายเบอร์ 3/0 เย็บปิดผิวหนังด้วย AutoClip® ทาแผลที่ผิวหนังด้วยเบตาดีน ให้ความอบอุ่นที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งฟื้น จิตยาแก้ปวดชนิด tramadol™ ปริมาณ 8 mg/kg BW (T.P. Drug Laboratories CO., LTD, Thailand) เข้าทางใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection, SC) ติดตามสุขภาพสัตว์ทดลองหลังผ่าตัดเป็นระยะเวลา 7 วัน และถอด AutoClip® ในวันที่ 10 หลังการผ่าตัด เมื่อหนูเพศผู้ที่ทำหมันแล้วมีอายุ 12 สัปดาห์ จะถูกใช้ผสมพันธุ์เพื่อเหนี่ยวนำแม่ตัวรับ

5. การย้ายฝากตัวอ่อน

จับหนูเม้าส์สายพันธุ์ Jcl:ICR เพศเมียใส่ในกรงหนูเพศผู้ที่ทำหมันแล้วในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ในเวลา 13.00-15.00 นาฬิกา ในเช้าวันต่อมา คัดเลือกหนูเม้าส์เพศเมียที่มี vaginal plug ไว้เป็นแม่ตัวรับ ฉีดยาสลบด้วย ketamine HCl 10% ปริมาณ 50 mg/kg BW และ xylazine HCl 2% ปริมาณ 10 mg/kg BW IP โคนขนบริเวณหลังกลางลำตัว จัดวางให้หนูเม้าส์นอนคว่ำ บำบัดด้วย Terramycin™ เช็ดหลังด้วยสำลีชุบแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ใช้กรรไกรปลอดเชื้อตัดผิวหนังตรงกลางหลังตามแนวกลางลำตัวยาว 1 เซนติเมตร แยกผิวหนังออกจากกล้ามเนื้อหน้าท้องด้วยกรรไกรปลอดเชื้อ ใช้กรรไกรปลอดเชื้อตัดกล้ามเนื้อข้างลำตัว ใช้ปากคีบจับก้อนไขมันที่ติดกับรังไข่แล้วดึงขึ้นจนออกจากช่องท้อง ตรวจหาตำแหน่งของ ampulla ภายใต้กล้องผ่าตัด ใช้เข็มเบอร์ 30G เจาะรูบริเวณใกล้เคียง ampulla ใช้ mouth pipette ดูดตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็ง ใส่เข้าไปใน ampulla ใส่ก้อนไขมันและรังไข่กลับเข้าไปในช่องท้อง เย็บปิดผิวหนังด้วย AutoClip® ทาแผลที่ผิวหนังด้วยเบตาดีน ให้ความอบอุ่นที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งฟื้น จิตยาแก้ปวดชนิด tramadol™ ปริมาณ 8 mg/kg BW เข้าทางใต้ผิวหนัง ติดตามสุขภาพสัตว์ทดลองหลังผ่าตัดเป็นระยะเวลา 7 วัน และติดตามการคลอดลูกในวันที่ 19-20 หลังการผ่าตัด

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษานี้ใช้สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) เพื่ออธิบายข้อมูลที่ได้จากขั้นตอนการอุณหภูมิลดและการย้ายฝากตัวอ่อน โดยนำเสนอในรูปแบบของร้อยละของการรอดชีวิตและร้อยละของลูกแรกคลอด และทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างหนูเม้าส์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ด้วยการทดสอบ Fisher's Exact Test ผ่านโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS Statistics (Version 18.0) โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติไว้ที่ $P < 0.05$

$$\text{ร้อยละของการรอดชีวิต} = \frac{\text{จำนวนตัวอ่อนที่รอดชีวิต} \times 100}{\text{จำนวนตัวอ่อนแช่แข็ง}} \quad (1)$$

$$\text{ร้อยละของลูกแรกคลอด} = \frac{\text{จำนวนลูกแรกคลอด} \times 100}{\text{จำนวนตัวอ่อนที่ย้ายฝาก}} \quad (2)$$

Results

จากการอุณหภูมิลดตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ของหนูเมาส์สายพันธุ์ ICR/Mlac-hydro ที่แช่แข็งเก็บไว้ตั้งแต่พุทธศักราช 2557 เป็นระยะเวลา 11 ปี จำนวน 157 ตัวอ่อน สามารถค้นพบตัวอ่อนทั้งหมดจำนวน 142 ตัวอ่อน มีตัวอ่อนสูญหายไปจำนวน 15 ตัวอ่อน ตัวอ่อนตายในระหว่างการอุณหภูมิลดจำนวน 48 ตัวอ่อน เหลือตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็งจำนวน 94 ตัวอ่อน คำนวณร้อยละของการรอดชีวิตได้เท่ากับ 59.9 (94/157) สำหรับตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ของหนูเมาส์สายพันธุ์ ICR/Mlac-free hydro จำนวน 208 ตัวอ่อน หลังจากการอุณหภูมิลดตัวอ่อน พบว่าสามารถค้นพบตัวอ่อนทั้งหมดจำนวน 196 ตัวอ่อน มีตัวอ่อนสูญหายไปจำนวน 12 ตัวอ่อน ตัวอ่อนตายในระหว่างการอุณหภูมิลดจำนวน 88 ตัวอ่อน เหลือตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็งจำนวน 108 ตัวอ่อน คำนวณร้อยละของการรอดชีวิตได้เท่ากับ 51.9 (108/208) ทั้งนี้ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของร้อยละของการรอดชีวิตในหนูเมาส์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ด้วยการทดสอบ Fisher's Exact Test พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (Table 1)

Table 1 The thawing of 2-cell stage embryos in ICR/Mlac-hydro and ICR/Mlac-free hydro mice

strains	No. of frozen embryos	No. of embryos discovered	No. of dead embryos	No. of survival embryos
ICR/Mlac-hydro	157	142	48	94 ^a
ICR/Mlac-free hydro	208	196	88	108 ^a

^a Fisher's Exact Test was used for the analysis. No significant difference was observed between the two mouse strains ($P=0.138$)

จากการย้ายฝากตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็งของหนูเมาส์สายพันธุ์ ICR/Mlac-hydro จำนวน 94 ตัวอ่อน ให้แม่ตัวรับจำนวน 8 ตัว พบว่าแม่ตัวรับคลอดลูกทั้งหมด 4 แม่ ได้ลูกแรกคลอดทั้งหมด 29 ตัว คำนวณร้อยละของลูกแรกคลอดได้เท่ากับ 30.9 (29/94) แบ่งออกเป็น ลูกเพศผู้จำนวน 19 ตัว และลูกเพศเมียจำนวน 10 ตัว สำหรับการย้ายฝากตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็งของหนูเมาส์สายพันธุ์ ICR/Mlac-free hydro จำนวน 108 ตัวอ่อน ให้แม่ตัวรับจำนวน 7 ตัว พบว่าแม่ตัวรับคลอดลูกทั้งหมด 2 แม่ ได้ลูกแรกคลอดทั้งหมดจำนวน 11 ตัว คำนวณร้อยละของลูกแรกคลอดได้เท่ากับ 10.2 (11/108) แบ่งออกเป็น ลูกเพศผู้จำนวน 7 ตัว และลูกเพศเมียจำนวน 4 ตัว (Table 2, Figure 1) จากการจับคู่ผสมพันธุ์หนูเมาส์สายพันธุ์ละ 1 คู่ พบว่าหนูเมาส์สายพันธุ์ ICR/Mlac-hydro คลอดลูกจำนวน 6 ตัว แบ่งออกเป็นหนูเพศผู้จำนวน 3 ตัว และหนูเพศเมียจำนวน 3 ตัว สำหรับหนูเมาส์สายพันธุ์ ICR/Mlac-free hydro คลอดลูกจำนวน 7 ตัว แบ่งออกเป็นหนูเพศผู้จำนวน 3 ตัว และหนูเพศเมียจำนวน 4 ตัว อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของร้อยละของลูกแรกคลอดในหนูเมาส์ทั้ง 2 สายพันธุ์ ด้วยการทดสอบ Fisher's Exact Test พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

Table 2 The embryo transfer of 2-cell stage embryos in ICR/Mlac-hydro and ICR/Mlac-free hydro mice

strains	recipients No.	No. of embryos transferred	No. of newborns	
			Male	females
ICR/Mlac-hydro	3	13	4	3
ICR/Mlac-hydro	4	16	5	3
ICR/Mlac-hydro	6	15	4	2
ICR/Mlac-hydro	8	15	6	2
ICR/Mlac-free hydro	10	16	3	4
ICR/Mlac-free hydro	13	15	4	-



Figure 1 ICR/Mlac-hydro mice, the survival 2-cell stage embryos (a), the newborns of recipient no. 4 after embryo transfer at 8 days (b), and 14 days of age (c)

Discussion

เทคนิคการแช่แข็งถูกประยุกต์ใช้เพื่อการเก็บรักษาสายพันธุ์สัตว์ทดลองในรูปแบบของธนาคารตัวอ่อน นิยมแช่แข็งหนูเมาส์เลือดชิด หนูเมาส์ตัดแต่งพันธุกรรม หนูเมาส์กลายพันธุ์ที่มักจะเกิดขึ้นจากการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติที่อาจมีประโยชน์ในการศึกษาในอนาคต ตัวอ่อนแช่แข็งเหล่านี้สามารถนำออกมาจัดตั้งโคโลนีใหม่เพื่อใช้ศึกษาในอนาคตได้ สำหรับศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติได้เก็บรักษาสายพันธุ์หนูเมาส์ ICR/Mlac-hydro และ ICR/Mlac-free hydro ได้สำเร็จในพุทธศักราช 2557 หลังจากนั้นได้ยุติการเพาะขยายพันธุ์และการให้บริการหนูเมาส์สายพันธุ์ดังกล่าวลงเนื่องจากไม่มีผู้ให้บริการอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของการเก็บรักษาสายพันธุ์สัตว์ทดลองในธนาคารตัวอ่อนยังจำเป็นต้องประเมินอย่างเป็นระบบเพื่อให้มั่นใจว่าตัวอ่อนที่แช่แข็งเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวจะยังมีชีวิตรอดหลังการอุณหละลายและสามารถใช้สำหรับจัดตั้งโคโลนีของสัตว์ทดลองได้อีกครั้ง โดยทั่วไปแล้วประสิทธิภาพของการเก็บรักษาสายพันธุ์ในธนาคารตัวอ่อนสามารถประเมินได้จากการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดทดลองหลังการอุณหละลายจนถึงระยะบลาสโตซิสต์ (blastocysts) และการย้าย

ฝากตัวอ่อนที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็ง ด้วยหวังว่าจะสามารถฝังตัวและพัฒนาในมดลูกของแม่ตัวรับได้ (Whittingham, 1974) สำหรับการศึกษาครั้งนี้หน่วยธนาคารตัวอ่อนได้นำตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ของหนูเมาส์สายพันธุ์ ICR/Mlac-hydro และ ICR/Mlac-free hydro ที่ได้เก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลวเป็นระยะเวลา 11 ปี ออกมาทำการอุ่นละลายและนำตัวอ่อนที่รอดชีวิตมาทำการย้ายฝากตัวอ่อน

จากการอุ่นละลายตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ของหนูเมาส์สายพันธุ์ ICR/Mlac-hydro มีตัวอ่อนสูญเสียไปร้อยละ 16.0 (15/157) และตัวอ่อนของหนูเมาส์สายพันธุ์ ICR/Mlac-free hydro มีตัวอ่อนสูญเสียไปร้อยละ 11.1 (12/208) ส่งผลให้มีอัตราการ recovery ร้อยละ 90.4 และ 94.2 ตามลำดับ อาจเนื่องมาจากได้ใช้กรรไกรปลอดเชื้อตัดปลายหลอดแช่แข็งชนิด 0.25 ml straw tube ทั้ง 2 ข้าง แล้วปล่อยให้ของเหลวที่บรรจุอยู่ในหลอดแช่แข็งที่ประกอบด้วยตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ที่แขวนลอยอยู่ในน้ำยาแช่แข็งชนิด 35EG และน้ำยาอุ่นละลายชนิด 0.3 M Trehalose ให้ไหลลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบไม่ชะล้างตัวอ่อนออกจากหลอดแช่แข็งเพิ่มเติม เพื่อลดโอกาสติดเชื้อที่อาจเกิดขึ้นได้ในห้องปฏิบัติการแบบ conventional แม้ว่าการชะล้างตัวอ่อนออกจากหลอดแช่แข็งเพิ่มเติมจะเป็นวิธีที่ช่วยให้สามารถค้นพบตัวอ่อนได้เพิ่มมากขึ้นก็ตาม การสูญเสียตัวอ่อนในลักษณะนี้จำเป็นต้องยอมให้เกิดขึ้นอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของอัตราการ recovery ด้วยการทำทดสอบ Fisher's Exact Test พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และควรเก็บข้อมูลการสูญเสียของตัวอ่อนเหล่านี้ไว้สำหรับใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงภายในหน่วยธนาคารตัวอ่อน ถึงแม้ว่าผู้ปฏิบัติงานได้ดำเนินการอุ่นละลายตัวอ่อนตามโปรโตคอลการอุ่นละลายอย่างถูกต้อง พบว่ามีตัวอ่อนตายไปในระดับที่ค่อนข้างสูงถึงร้อยละ 30.6 (48/157) ในหนูเมาส์สายพันธุ์ ICR/Mlac-hydro และร้อยละ 42.3 (88/208) ในหนูเมาส์สายพันธุ์ ICR/Mlac-free hydro ทั้งนี้การปรับวิธีการอุ่นละลายอาจช่วยทำให้ร้อยละของการตายลดลง ได้แก่ การเพิ่มเวลาบ่มน้ำยาอุ่นละลายก่อนเริ่มปฏิบัติงาน การบ่มตัวอ่อนใน CO₂ incubator ตลอดจนการอุ่นละลายและการเพิ่มเวลาบ่มตัวอ่อนในทุกขั้นตอนของการอุ่นละลาย

ประสิทธิภาพของการจัดทำธนาคารตัวอ่อนในสัตว์ทดลองแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของสัตว์ทดลอง คุณภาพของตัวอ่อน การแช่แข็งตัวอ่อน การอุ่นละลายตัวอ่อน การย้ายฝากตัวอ่อน ความพร้อมของแม่ตัวรับและทักษะของผู้ปฏิบัติงาน เป็นต้น ปัจจัยเหล่านี้ส่งผลต่อการวางแผนจัดทำธนาคารตัวอ่อนและความสำเร็จของการย้ายฝากตัวอ่อนเพื่อจัดตั้งโคโลนีสัตว์ทดลองอีกครั้ง (Rall *et al.*, 2000) ในการศึกษาครั้งนี้คุณภาพของตัวอ่อนที่ถูกแช่แข็งเก็บไว้เป็นระยะเวลา 11 ปี ได้ถูกประเมินจากร้อยละของการรอดชีวิต ตัวอ่อนที่มีร้อยละของการรอดชีวิตอยู่ในระดับสูงจะมีโอกาสฝังตัวในปีมดลูกของแม่ตัวรับหลังการย้ายฝากตัวอ่อนและพัฒนาจนคลอดออกมาเป็นลูกสัตว์ทดลองที่มีชีวิตได้เป็นจำนวนมาก ทำให้ทราบว่ามีย่อยละของการรอดชีวิตแรกคลอดเท่ากับ 30.6 ในหนูเมาส์สายพันธุ์ ICR/Mlac-hydro และ 10.2 ในหนูเมาส์สายพันธุ์ ICR/Mlac-free hydro ร้อยละของการรอดชีวิตแรกคลอดที่แตกต่างกันอาจเป็นผลมาจากปัจจัยด้านคุณภาพของตัวอ่อน ความพร้อมของแม่ตัวรับและทักษะของผู้ปฏิบัติงาน คุณภาพของตัวอ่อนเป็นปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลสูงต่อความสำเร็จของการย้ายฝากตัวอ่อน ตัวอ่อนที่เหมาะสมสำหรับการย้ายฝากนั้น นอกเหนือจากการรอดชีวิตหลังการอุ่นละลายแล้ว ยังต้องสามารถพัฒนาเข้าสู่ระยะอื่น ๆ ได้อย่างต่อเนื่อง ทั้งในรูปแบบการพัฒนาในหลอดทดลองและการพัฒนาในตัวสัตว์ จากการศึกษาครั้งนี้แม้ว่าตัวอ่อนทั้ง 2 สายพันธุ์จะมีร้อยละของการรอดชีวิตหลังอุ่นละลายไม่แตกต่างกัน แต่กลับมีย่อยละของการรอดชีวิตแรกคลอดที่แตกต่างกัน ซึ่งการเพาะเลี้ยง

ตัวอ่อนในหลอดทดลองจึงเป็นเทคนิคสำคัญที่ช่วยประเมินคุณภาพของตัวอ่อนในเชิงลึกได้ ทั้งนี้มีความเป็นไปได้ว่าตัวอ่อนอาจมีความเสียหายที่ไม่แสดงออกทันทีหลังการอุณหภูมิลดลง แต่ส่งผลกระทบต่อความสามารถในการพัฒนาจนกระทั่งคลอดออกมาเป็นสัตว์ทดลองที่มีชีวิตได้ ปัจจัยที่อาจเกี่ยวข้อง ได้แก่ ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ ผลกระทบสะสมจากการผสมพันธุ์เลือดชิดอย่างต่อเนื่อง ความเสียหายจากสารป้องกันการแช่แข็ง หรือความไม่เสถียรจากการเก็บรักษาระยะยาว นอกจากนี้ความพร้อมของแม่ตัวรับยังเป็นอีกปัจจัยสำคัญต่อความสำเร็จของการย้ายฝากตัวอ่อน แม้ว่าแม่ตัวรับที่ถูกเหนี่ยวนำภาวะท้องเทียมทุกตัวจะถูกตรวจสอบและพบว่ามี ampulla ซึ่งเป็นลักษณะบ่งชี้ความพร้อมสำหรับการย้ายฝากตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ แต่ความพร้อมทางสรีรวิทยาโดยละเอียดอาจแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของร้อยละการคลอดของแม่ตัวรับด้วยการทดสอบ Fisher's Exact Test พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) งานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่าตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ของหนูเมาส์สายพันธุ์ ICR ที่ถูกแช่แข็งด้วยวิธี vitrification และเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 6 เดือน มีร้อยละของการรอดชีวิตเท่ากับ 93.5 และมีร้อยละของลูกแรกคลอดเท่ากับ 18.0 (Eum *et al.*, 2009) ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ของหนูเมาส์สายพันธุ์ $\beta^{IVS-II-654,c \rightarrow T}$ และ $\beta^{E2/0}$ ที่ถูกแช่แข็งแบบ vitrification ด้วยสารละลาย ethylene glycol มีร้อยละของลูกแรกคลอดเท่ากับ 50.0 และ 57.9 ตามลำดับ (Sa-ardrit *et al.*, 2011) ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ของหนูเมาส์สายพันธุ์ NMRI outbred ที่ถูกแช่แข็งด้วยวิธี vitrification ในน้ำยาแช่แข็งที่ผสมด้วย ethylene glycol และ dimethyl sulfoxide เก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 14 วัน มีร้อยละของการรอดชีวิตเท่ากับ 82.1 (Ghandy & Malekshah, 2017) ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์มีร้อยละของการรอดชีวิตเท่ากับ 48.0 และมีร้อยละของการพัฒนาในหลอดทดลองหลังการแช่แข็งเท่ากับ 84.0 (Taketsuru *et al.*, 2022) ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ของหนูเมาส์ที่ถูกแช่แข็งแบบ slow frozen ด้วย propandiol มีร้อยละของการรอดชีวิตเท่ากับ 80.0 (Nematollahi Mahani *et al.*, 1999)

สำหรับการแช่แข็งตัวอ่อนระยะอื่น ๆ ของหนูเมาส์นั้น มีรายงานว่าไอโอไฮด์ของหนูเมาส์สายพันธุ์ outbred CD1 ที่ถูกแช่แข็งด้วยวิธี vitrification เป็นระยะเวลา 8-10 วัน มีร้อยละของการรอดชีวิตเท่ากับ 97.4 หลังจากนั้นร้อยละของการรอดชีวิตของไอโอไฮด์ลดลงเหลือ 90.4 หลังแช่แข็งเป็นระยะเวลา 6 เดือน (Yan *et al.*, 2011) ตัวอ่อนระยะ 1 เซลล์ของหนูเมาส์สายพันธุ์ B6CBAF1 (C57BLxCBA) ที่ถูกแช่แข็งแบบ vitrification ด้วยน้ำยาแช่แข็งที่ผสมด้วย dimethyl sulfoxide และ ethylene glycol เก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ มีร้อยละของการรอดชีวิตเท่ากับ 97.3 และมีร้อยละของการพัฒนาในหลอดทดลองเท่ากับ 53.4 (Park *et al.*, 2009) ตัวอ่อนระยะ 4 เซลล์ ตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ ตัวอ่อนระยะโมรูล่าและตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสของหนูเมาส์สายพันธุ์ NMRI outbred ที่ถูกแช่แข็งด้วยวิธี vitrification ในน้ำยาแช่แข็งที่ผสมด้วย ethylene glycol และ dimethyl sulfoxide เก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 14 วัน มีร้อยละของการรอดชีวิตเท่ากับ 83.2, 85.8, 77.0 และ 60.5 ตามลำดับ (Ghandy & Malekshah, 2017) ตัวอ่อนระยะ 1 เซลล์ ตัวอ่อนระยะ 4 เซลล์ และ ตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ของหนูเมาส์ที่ถูกแช่แข็งแบบ slow frozen ด้วย propandiol มีร้อยละของการรอดชีวิตเท่ากับ 91.0, 82.0 และ 85.0 ตามลำดับ (Nematollahi Mahani *et al.*, 1999)

หลังจากแม่ตัวรับหมายเลข 4 ได้คลอดลูกและหย่านมลูกหนูเมาส์สายพันธุ์ ICR/Mlac-hydro แล้ว เมื่อลูกหนูเมาส์มีอายุ 8 สัปดาห์ จึงได้จับคู่ผสมพันธุ์เพื่อทดสอบความสมบูรณ์พันธุ์ที่ช่วยให้มั่นใจว่าตัวอ่อนที่แช่แข็งเป็นระยะเวลา 11 ปีนั้น

สามารถผสมพันธุ์ตามธรรมชาติและให้ผลผลิตได้ตามปกติ หลังจากนั้นหนูเม้าส์สายพันธุ์ ICR/Mlac-hydro ได้ตั้งท้องและคลอดลูกจำนวน 6 ตัว แบ่งออกเป็นหนูเพศผู้จำนวน 3 ตัว และหนูเพศเมียจำนวน 3 ตัว มีน้ำหนักตัวที่อายุ 4 สัปดาห์ อยู่ระหว่าง 22-34 กรัม (Figure 2-a) จากนั้นได้ผ่าตรวจภาวะไตบวมในหนูเม้าส์สายพันธุ์ ICR/Mlac-hydro เพศเมียที่อายุ 15 สัปดาห์ (Figure 2-b) พบว่าไตข้างซ้ายมีขนาดใหญ่กว่าข้างขวาอย่างชัดเจน (Figure 2-c) และมีภาวะไตบวมในระดับรุนแรงที่มีของ urine อยู่ภายในโพรงขนาดใหญ่ (Figure 2-d) สำหรับการพัฒนาประสิทธิภาพของหน่วยธนาคารตัวอ่อนของศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติในอนาคตจะได้ทำการทดสอบตัวอ่อนแช่แข็งของทุกสายพันธุ์ที่เก็บรักษามาเป็นระยะเวลานาน พร้อมทั้งจัดโปรแกรมการละลายตัวอ่อนอย่างเป็นระบบซึ่งช่วยให้ทราบว่าร้อยละของการรอดชีวิตลดลงอย่างไร เพื่อที่จะได้วางแผนเก็บตัวอ่อนทดแทนได้อย่างเหมาะสม

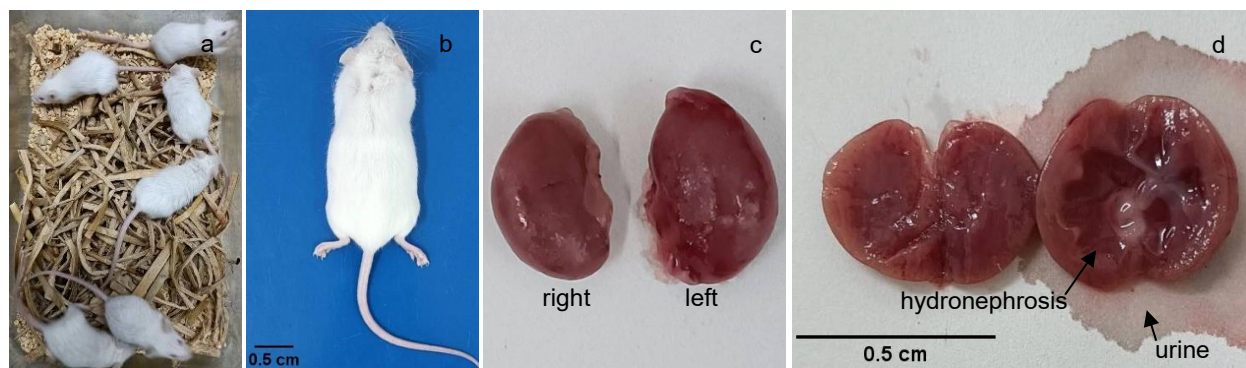


Figure 2 The production of ICR/Mlac-hydro mice (a), ICR/Mlac-hydro female mice at 15 weeks of age (b), kidneys of different sizes (c), hydronephrosis in the left kidney (d)

Conclusions

หนูเม้าส์สายพันธุ์ ICR/Mlac-hydro และ ICR/Mlac-free hydro สามารถเก็บรักษาสายพันธุ์ไว้ในธนาคารตัวอ่อนได้ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ที่ถูกแช่แข็งเก็บไว้เป็นระยะเวลา 11 ปี สามารถรอดชีวิตหลังการอุณหภูมิลดลงและคลอดออกมาเป็นลูกหนูเม้าส์ที่มีชีวิตหลังการย้ายฝากตัวอ่อนได้ อีกทั้งลูกหนูเม้าส์สามารถผสมพันธุ์ตามธรรมชาติและมีจำนวนเพียงพอสำหรับจัดตั้งโคโลนีสัตว์ทดลองได้อีกครั้ง เพื่อต่อยอดงานวิจัยนี้การศึกษาในอนาคตควรมุ่งเน้นไปที่การประเมินความสมบูรณ์พันธุ์ของสัตว์ทดลองที่ได้จากการย้ายฝากตัวอ่อนในระยะยาว การติดตามการเจริญเติบโตและการตรวจประเมินภาวะไตบวม

Acknowledgments

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนและสนับสนุนการตีพิมพ์จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล พร้อมทั้งขอแสดงความขอบคุณแด่ นายสัตวแพทย์สุรชัย จันทร์ทิพย์ และคุณนาถนภิส ประทีป ณ ถลาง ที่ได้ให้คำปรึกษาอย่างต่อเนื่อง

References

- Eum, J. H., Park, J. K., Lee, W. S., Cha, K. R. Yoon, T. K., & Lee, D. R. (2009). Long-term liquid nitrogen vapor storage of mouse embryos cryopreserved using vitrification or slow cooling. *Fertility and Sterility*, 91(5), 1928-1932.
- Ghandy, N., & Karimpur Malekshah, A. A. (2017). Which stage of mouse embryos is more appropriate for vitrification?. *International Journal of Fertility and Sterility*, 10(4), 357-362.
- Isarangkul, D., Wiyakrutta, S., Kengkoom, K., Reamtong, O., & Ampawong, S. (2015). Mitochondrial and cytoskeletal alterations are involved in the pathogenesis of hydronephrosis in ICR/Mlac-hydro mice. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(6), 9192-9204.
- Kengkoom, K., Zaw, K. M., Inpunkaew, R., Angkhasirisap, W., Thongsiri, P., & Ampawong, S. (2012). Development of hydronephrosis inbred strain mouse, ICR/Mlac-Hydro. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11(12), 2054-2058.
- Nematollahi Mahani, S., Rezazadeh, M., & Emami Meibodi, M. (1999). Preimplantation mouse embryo cryopreservation with propandiol and sucrose: The effect of developmental stage. *Cell Journal (Yakhteh)*, 1(2), 15-20.
- Park, M. C., Kim, J. Y., Kim, S. B., Park, Y. S., Park, H. D., Lee, J. H., Oh, D. S., & Kim, J. M. (2009). The effect of cryopreservation on the mouse embryos at various-pronuclear stages. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 22(2), 174-180.
- Rall, W. F., Schmidt, P. M., Lin, X., Brown, S. S., Ward, A. C., & Hansen, C. T. (2000). Factors affecting the efficiency of embryo cryopreservation and rederivation of rat and mouse models. *Institute of Laboratory Animal Resources Journal*, 41(4), 221-227.

- Sa-ardrit, M., Faisaikarm, T., Boonkusol, D., Pratipnatalang, N., Chantip, S., Chariyahpongpan, P., Svasti, S., & Kengkoom, K. (2011). Embryo cryopreservation and transfer of thalassemia transgenic mouse. In *Proceedings of 49th Kasetsart University Annual Conference: Science*. (pp. 258-264). Bangkok: Kasetsart University. (in Thai)
- Suntornsaratoon, P., Wongdee, K., Tiyasatkulkovit, W., Ampawong, S., Krishnamra, N., Kengkoom, K., & Charoenphandhu, N. (2014). Defective bone microstructure in hydronephrotic mice: a histomorphometric study in ICR/Mlac-hydro mice. *the Anatomical Record*, 297, 208-214.
- Taketsuru, H., Tsukada, Y. I., & Kaneko, T. (2022). Survivability and subsequent development of vitrified early-stage mouse embryos after warming at different temperatures. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 591, 50-53.
- Takeo, T., Nakao, S., Nakagawa, Y., Sztein, JM., & Nakagata, N. (2020). Cryopreservation of mouse resources. *Laboratory Animal Research*, 36:33. doi.org/10.1186/s42826-020-00066-w
- Thorat, R., & Ingle, A. (2012). An attempt of cryopreservation of mouse embryos at the ACTREC laboratory animal facility in India. *Experimental Animals*, 61(2), 139-145.
- Whittingham, D. G., Leibo, S. P., & Mazur, P. (1972). Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science (New York, N.Y.)*, 178(4059), 411-414.
- Whittingham, D. G. (1974). Embryo bank in the future of developmental genetics. *Genetics*, 78, 395-402.
- Yan, J., Suzuki, J., Yu, X. M., Qiao, J., Kan, F. W., & Chian, R. C. (2011). Effects of duration of cryo-storage of mouse oocytes on cryo-survival, fertilization and embryonic development following vitrification. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 28(7), 643-649.