ผลของ cytochalasin B และ demecolcine ต่อคุณภาพของตัวอ่อนหนูเมาส์ที่ผ่านการแช่แข็งแบบ vitrification

Effect of cytochalasin B and demecolcine on the viability of day 3 mouse embryos cryopreserved by vitrification

อนุชัย ภิญโญภูมิมินทร์[1] นาถนภิส ประทีป ณ ถลาง[2] สุรชัย จันทร์ทิพย์[2] ปัญญา ฉริยะพงศ์พันธุ์[2]
วันทนีย์ รัตนศักดิ์[2] และ ปิยวรรณ สุธรรมาภินันท์[1]

Anuchai Pinyopummin[1], Nathnapith Pratip-Na-Talang[2], Surachai Chantip[2], Panya Chaiyahpongpun[2]
Wanthanee Ratanasak[2], and Piyawan Suthanmapinanta[1]

บทคัดย่อ

ทำการแช่แข็งตัวอ่อนหนูเมาส์สายพันธุ์ ICR แบบ vitrification โดยใช้ 40% ethylene glycol, 18% Ficoll 70 และ 0.3 M sucrose (EFS) แบ่งตัวอ่อนออกเป็น 4 กลุ่มดังนี้ (1) EFS, (2) EFS + 0.5 μg/ml cytochalasin B (CB), (3) EFS + 0.1 μg/ml demecolcine (DC) และ (4) EFS + 0.5 μg/ml CB + 0.1 μg/ml DC โดยแช่ตัวอ่อนใน PBS ที่มี CB และ/หรือ DC ตามสารละลาย vitrification ที่ใช้เป็นเวลา 30 นาทีก่อนการแช่แข็ง ผลการศึกษาพบว่าหลังการอุ่นละลายและเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์ตัวอ่อนที่พัฒนาเป็น morula/blastocyst และเปอร์เซ็นต์หนูตัวรับที่ตั้งท้อง ในแต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกันทางสถิติ และไม่ต่างจากกลุ่มควบคุมซึ่งใช้ตัวอ่อนที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง กลุ่ม EFS+DC และ EFS+CB+DC มีแนวโน้มที่จะทำให้เกิดการตั้งท้องสูงกว่า EFS (RR = 2.86 และ 2.50 ตามลำดับ) เปอร์เซ็นต์จำนวนลูกอ่อนในหนูตัวรับที่ตั้งท้องและทำการตรวจสอบในวันที่ 13-15 หลังการย้ายฝาก ในกลุ่ม EFS+CB และ EFS+CB+DC ไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม ซึ่งสูงกว่ากลุ่ม EFS+DC อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และมีแนวโน้มที่จะสูงกว่ากลุ่ม EFS (RR = 3.86 และ 3.89 ตามลำดับ) การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการใช้ microfilament inhibitor ร่วมกับ microtubule inhibitor มีแนวโน้มที่จะช่วยคงคุณภาพตัวอ่อนที่แช่แข็งแบบ vitrification

ABSTRACT

Day 3 ICR mouse embryos were vitrified in (1) 40% ethylene glycol, 18% Ficoll 70 และ 0.3 M sucrose (EFS), (2) EFS + 0.5 μg/ml cytochalasin B (CB), (3) EFS + 0.1 μg/ml demecolcine (DC) and (4) EFS + 0.5 μg/ml CB + 0.1 μg/ml DC. Before vitrification, embryos were incubated in PBS with or

1 ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
Department of Obstetrics Gynaecology and Animal Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Kamphaengsaen, Nakhonpathom
2 สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล
National Laboratory Animal Centre, Mahidol University, Salaya, Nakhonpathom

without CB or DC, according to the vitrification solution used for 30 min. In all groups, percentage of morula/ blastocyst development after thawing and cultured, and percentage of pregnant recipients were not significantly different, which were also not different from fresh control embryos. However, the number of pregnant recipients in EFS+DC and EFS+CB+DC tended to higher than EFS (RR = 2.86 and 2.50, respectively). The number of fetuses in pregnant recipients examined (13 -15 days after transferred) in EFS+CB and EFS+CB+ DC groups were not significantly different from control, but higher than EFS+DC group ($P<0.05$) and tended to be higher than EFS group (RR = 3.86 and 3.89, respectively). This study shows that microfilament inhibitor, together with microtubule inhibitor may increase the viability of day 3 mouse embryos after cryopreserved by vitrification.

คำนำ

การแช่แข็งตัวอ่อนเป็นเทคโนโลยีที่สำคัญในการเก็บรักษาสายพันธุ์สัตว์ โดยเฉพาะในสัตว์ทดลอง เช่น หนูเมาส์ ซึ่งมีการพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม (mutant strains) นับพันสายพันธุ์ (Marschall and de Angelis,1999) โดยการเก็บรักษาสายพันธุ์ในรูปของการแช่แข็งจะเสียค่าใช้จ่ายต่อปีน้อยกว่าการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ (Mobraaten, 1986)

การแช่แข็งแบบ vitrification เป็นการแช่แข็งที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง (cryoprotectant agent) เช่น glycerol, ethylene glycol หรือ propylene glycol ในความเข้มข้นสูงและทำการลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว (ประมาณ 2000 °C/นาที) ทำให้ไม่เกิดผลึกน้ำแข็งซึ่งเป็นอันตรายต่อตัวอ่อน (รายละเอียดใน Palasz et al., 1996) โดยตัวอ่อนหนูเมาส์ (ระยะ morula) ที่ผ่านการแช่แข็งโดยวิธีนี้ 54 - 63% สามารถเจริญไปเป็นลูกหนูได้หลังการย้ายฝากตัวอ่อน (Valdez et al., 1990; Miyake et al., 1993; Rall and Wood, 1994) อย่างไรก็ตาม การใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งในความเข้มข้นสูง พบว่าสารดังกล่าวไปเปลี่ยนแปลงการกระจายหรือการเรียงตัวของ microfilaments และ/หรือ microtubules ซึ่งเป็นโครงสร้างของเซลล์ (cytoskeleton) และอาจส่งผลให้ความสามารถในการเจริญของตัวอ่อนที่ผ่านการแช่แข็งลดลง (Overström et al., 1993; Dobrinsky, 1996; Dobrinsky et al., 2000)

Cytochalasin B (CB) มีคุณสมบัติเป็น microfilament inhibitor และ demecolcine (DC) มีคุณสมบัติเป็น microtubule inhibitor (รายละเอียดใน Dobrinsky, 1996) การใช้ CB หรือ DC จึงเป็นการทำให้โครงสร้างของเซลล์คงสภาพ โดยพบว่าไม่มีผลเสียต่อการเจริญของตัวอ่อนหนูเมาส์ระยะ 8-เซลล์ ที่ผ่านการแช่แข็งเมื่อเพาะเลี้ยง *in vitro* (Prather and First, 1986) นอกจากนั้นการใช้ CB ยังช่วยเพิ่มจำนวนตัวอ่อนสุกรระยะ expanded และ hatched blastocyst ให้สามารถพัฒนา in vitro หลังผ่านการแช่แข็งแบบ vitrification และตัวอ่อนดังกล่าวสามารถเจริญไปเป็นลูกสุกรได้หลังการย้ายฝาก (Dobrinsky et al., 2000)

การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อ ศึกษาผลการใช้ CB และ/หรือ DC ต่อคุณภาพตัวอ่อนหนูเมาส์ที่ผ่านการแช่แข็งแบบ vitrification โดยพิจารณาถึงความสามารถในการเจริญ in vitro และการเจริญเป็นลูกอ่อนหลังการย้ายฝาก

อุปกรณ์และวิธีการ

ฮอร์โมนและสารเคมีที่ใช้เป็นของ Sigma, USA

การเก็บตัวอ่อน

ทำการเหนี่ยวนำหนูเมาส์สายพันธุ์ ICR เพศเมียอายุ 7-8 สัปดาห์ ให้ตกไข่จำนวนมาก โดยใช้ฮอร์โมน pregnant mare serum gonadotropin (PMSG, 5 I.U., I/P) และ 48 ชั่วโมงต่อมาใช้ human chorionic gonadotropin (hCG, 5 I.U., I/P) แล้วใส่รวมกับหนูเพศผู้พันธุ์เดียวกัน เช้าวันต่อมาทำการตรวจและแยกหนูเพศเมียที่มี vaginal plug ไว้ใช้ในการทดลอง

เก็บตัวอ่อนในวันที่ 3 หลังผสมพันธุ์ (66 – 68 ชั่วโมงหลังจากฉีด hCG) โดยทำ cervical dislocation หนูเพศเมียข้างต้น ผ่าเปิดช่องท้องและตัดส่วนท่อนำไข่และปีกมดลูกใส่ในสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) และใช้สารละลาย PBS ชะล้างตัวอ่อนออกจากส่วนดังกล่าว

การแช่แข็งและอุ่นละลายตัวอ่อน

วิธีแช่แข็งและอุ่นละลาย ใช้วิธีการที่กล่าวไว้ใน อนุชัย และคณะ (2544) โดยใช้สารละลาย EFS เป็นสารละลายสำหรับ vitrification ทำการแบ่งตัวอ่อนออกเป็น 4 กลุ่มในการแช่แข็งดังนี้ (1) EFS, (2) EFS + CB 5 μg/ml, (3) EFS + DC 0.1 μg/ml และ (4) EFS + CB 5 μg/ml + DC 0.1 μg/ml โดยก่อนแช่แข็ง ทำการแช่ตัวอ่อนในสารละลาย PBS, สารละลาย PBS ที่มี CB 5 μg/ml, สารละลาย PBS ที่มี DC 0.1 μg/ml, และสารละ ลาย PBS ที่มีทั้ง CB 5 μg/ml และ DC 0.1 μg/ml ตามลำดับ ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 °C, 5% CO_2 เป็นเวลา 30 นาที เก็บรักษาตัวอ่อนแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 2 – 4 สัปดาห์ก่อนทำการอุ่นละลายและเพาะเลี้ยง

การเพาะเลี้ยงและการย้ายฝากตัวอ่อน

เพาะเลี้ยงตัวอ่อนในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 °C, 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการย้ายฝากตัวอ่อนที่พัฒนาถึงระยะ morula และ blastocyst ลงในปีกมดลูกของหนูเพศเมียตัวรับอายุ 8 - 10 สัปดาห์ซึ่งตั้งท้องเทียมมา 3 วัน โดยการตั้งท้องเทียมเกิดจากการผสมพันธุ์กับหนูเพศผู้ที่ถูกตัดท่อ vas deferens จำนวนตัวอ่อนที่ย้ายฝากต่อปีกมดลูกเท่ากับ 7 – 12 ตัวอ่อน หนูตัวรับบางตัวจะได้รับตัวอ่อนปีกมดลูกละกลุ่มที่ต่างกัน บางตัวจะได้รับตัวอ่อนในกลุ่มเดียวกันทั้งสองปีกมดลูก

ใช้ตัวอ่อนที่ไม่ได้ผ่านการแช่แข็ง ซึ่งเก็บในวันที่ 3 หลังผสมพันธุ์ และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเป็นกลุ่มควบคุมในการย้ายฝากตัวอ่อน

การประเมินผล

พิจารณาจากเปอร์เซ็นต์ตัวอ่อนที่พัฒนาถึงระยะ morula และ blastocyst หลังการเพาะเลี้ยง จำนวนหนูตัวรับที่ตั้งท้อง และจำนวนลูกอ่อนในวันที่ 13-15 หลังการย้ายฝาก และหาความสัมพันธ์ของการใช้ CB และ/หรือ DC ต่อเปอร์เซ็นต์ข้างต้น โดยใช้ Chi-square test และ Relative ratio (RR)

ผลการทดลอง

เปอร์เซ็นต์ตัวอ่อนที่พัฒนาถึงระยะ morula และ blastocyst ในทั้ง 4 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และไม่ต่างจากตัวอ่อนที่ไม่ได้ผ่านการแช่แข็ง (กลุ่มควบคุม) เปอร์เซ็นต์หนูตัวรับที่ตั้งท้องในทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ภายในกลุ่มตัวอ่อนที่ผ่านการแช่แข็ง กลุ่ม EFS+DC และ EFS+CB+DC มีแนวโน้มที่จะทำให้เกิดการตั้งท้องสูงกว่า EFS (RR = 2.86 และ 2.50 ตามลำดับ) เปอร์เซ็นต์จำนวนลูกอ่อนในกลุ่ม EFS+CB และ EFS+CB+DC ไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม ซึ่งสูงกว่ากลุ่ม EFS+DC อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และมีแนวโน้มสูงกว่า EFS (RR = 3.86 และ 3.89 ตามลำดับ) (Table 1)

หนูตัวรับที่ตั้งท้อง 1 ตัวในกลุ่ม EFS+CB ที่ปล่อยให้เกิดลูกเองตามธรรมชาติ มีลูกหนูเกิดออกมา 10 ตัว จากตัวอ่อนที่ย้ายฝาก 17 ตัวอ่อน และหนูตัวรับที่ตั้งท้อง 1 ตัวในกลุ่ม EFS+CB+DC ที่ปล่อยให้เกิดลูกเอง มีลูกหนูเกิดออกมา 11 ตัวจากตัวอ่อนที่ย้ายฝาก 16 ตัวอ่อน ซึ่งลูกหนูจากทั้ง 2 กลุ่มมีลักษณะปกติ (Fig 1)

Table 1 Viability of day 3 mouse embryos after vitrification under the influence of cytochalasin B (CB) and demecolcine (DC).

Treatment[a]	No. of embryos developed to morulae/ blastocysts (%)[b]	No. of recipients	No. of recipients establishing pregnancy (%)	No. of embryos transferred into pregnant recipients	No. of normal fetuses (%)[c]
Control	123 (98.4%)	7	3 (42.8%)	68	25 (36.8%)[d]
EFS	60 (89.5%)	5	1 (20.0%)	9	1 (11.1%)[de]
EFS+CB	82 (89.1%)	7	2 (28.6%)	35	15 (42.8%)[d]*
EFS+DC	90 (90.0%)	7	4 (57.1%)	57	9 (15.8%)[e]
EFS+CB+DC	96 (95.0%)	8	4 (50.0%)	74	32 (43.2%)[d]**

[a] control: fresh day 3 mouse embryos which cultured for 24 h; EFS: ethylene glycol 40%, Ficoll 70 18% and sucrose 0.3 M; CB: cytochalasin B 5 μg/ ml; and DC: demecolcine 0.1 μg/ml.

[b] all morulae and blastocysts were transferred.

[c] based on total number of embryos transferred into pregnant recipients, examined on day 13 -15 after transferred.

[de] value with different superscript is significantly different ($P < 0.05$); EFS+CB vs. EFS, RR = 3.86; EFS+CB+DC vs. EFS, RR = 3.89.

*included 10 normal pups from 1 recipient.

**included 11 normal pups from 1 recipient.

วิจารณ์

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า CB และ DC ไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อคุณภาพของตัวอ่อนที่ผ่านการแช่แข็งแบบ vitrification ในการเจริญ *in vitro* และตัวอ่อนกลุ่มที่ได้รับ CB+DC มีแนวโน้มที่จะคงคุณภาพของตัวอ่อนในการเจริญเป็นลูกอ่อนได้ดีกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับ และกลุ่มที่ได้รับแต่เพียง CB หรือ DC

การพัฒนาของตัวอ่อนที่ผ่านการแช่แข็งไปเป็น morula และ blastocyst ในกลุ่มที่ได้รับ CB หรือ DC ได้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Prather and First (1986) คือไม่ต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับ แต่ในกลุ่มที่ได้รับ CB+DC พบว่าต่างจากการศึกษาข้างต้น โดยการศึกษานี้ พบว่าการพัฒนาของตัวอ่อนไม่ต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับ แต่การศึกษาข้างต้นพบว่าการได้รับ CB+DC ทำให้เปอร์เซ็นต์ของตัวอ่อนที่มีการพัฒนาลดลง ทั้งนี้อาจเป็นเนื่องจากการใช้วิธีการแช่แข็งและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งที่ต่างกัน

Fig 1 A recipient (marked) and her pups from EFS+CB+DC group.

เปอร์เซ็นต์หนูตัวรับที่ตั้งท้องในทุกกลุ่มการทดลองรวมทั้งกลุ่มตัวอ่อนที่ไม่ได้ผ่านการแช่แข็ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ทั้งนี้ในกลุ่ม EFS มีหนูตัวรับตั้งท้องเพียง 1 ตัวและมีลูกอ่อนเพียง 1 ตัว ทำให้ไม่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ อย่างไรก็ตามเมื่อเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมา (Miyake et al., 1993) จะมีเปอร์เซ็นต์การตั้งท้องค่อนข้างต่ำ อาจเป็นเนื่องจากการเตรียมหนูตัวรับหรือวิธีการย้ายฝากตัวอ่อนที่ไม่เหมาะสม การใช้ methyl-prednisolone (Velilla et al., 1999) สามารถเพิ่มอัตราการตั้งท้องของหนูตัวรับหลังการย้ายฝากตัวอ่อนสด จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ควรทำการศึกษาในตัวอ่อนที่ผ่านการแช่แข็ง

ตัวอ่อนกลุ่มแช่แข็งที่ได้รับ CB และ CB+DC มีเปอร์เซ็นต์การพัฒนาไปเป็นลูกอ่อน ไม่แตกต่างจากตัวอ่อนที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง และสูงกว่ากลุ่ม DC เมื่อพิจารณาทั้งเปอร์เซ็นต์หนูตัวรับที่ตั้งท้องและเปอร์เซ็นต์ที่มีการพัฒนาไปเป็นลูกอ่อน ตัวอ่อนกลุ่มแช่แข็งที่ได้รับ CB+DC มีแนวโน้มที่จะให้ผลดีที่สุด ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการใช้

microfilament inhibitor ร่วมกับ microfilament inhibitor อาจช่วยในการคงคุณภาพตัวอ่อนที่แช่แข็งแบบ vitrification

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า การที่ตัวอ่อนได้รับ CB+DC เป็นระยะเวลา 30 นาทีก่อนใส่ในสารละลาย vitrification ที่มี CB+DC และแช่แข็ง อาจช่วยคงคุณภาพตัวอ่อนหนูเมาส์อายุ 3 วันในการเจริญไปเป็นลูกอ่อนและลูกหนูปกติหลังการย้ายฝาก

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ อ.สพ.ญ. สุวิชา เกษมสุวรรณ ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนอุดหนุนวิจัยหมายเลข ส-พ 6.40

เอกสารอ้างอิง

อนุชัย ภิญโญภูมิมินทร์ นาถนภิส ประทีป ณ ถลาง สุรชัย จันทร์ทิพย์ ปัญญา ฉริยะพงศ์พันธุ์ วันทนีย์ รัตนศักดิ์ และ ปิยวรรณ สุธรรมาภินันท์ 2544 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารละลาย vitrification 3 แบบในการแช่แข็งตัวอ่อนหนูเมาส์ การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 สาขาสัตวแพทยศาสตร์ หน้า 589-593

Dobrinsky, J.R. 1996. Cellular approach to cryopreservation of embryos. Theriogenology 45: 17-26.

Dobrinsky, J.R., V.G. Pursel, C.R. Long and L.A. Johnson. 2000. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. Biol. Reprod. 62: 564-570.

Marschall, S. and M.H. de Angelis. 1999. Cryopreservation of mouse spermatozoa double your mouse space. Trends Genet. 15: 128-131.

Miyake, T., M. Kasai, S.E. Zhu, T. Sakurai and T. Machida. 1993. Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene glycol-based solution by a simple method. Theriogenology 40: 121-134.

Mobraaten, L.E. 1986. Mouse embryo cryobanking. J. in Vitro Fertil. Emb. Transfer 3: 28-32.

Overström, E.M., R.T. Duby, J.R. Dobrinsky, J.M. Robl, A. Baguisi, P. Lonergan, P. Duffy, J.H. Walsh, J.F. Roche and M.P. Boland. 1993. Cytoskeletal damage in vitrified and frozen embryos. Theriogenology 39: 276.

Palasz, A.T and R.J. Mapletoft. 1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. Biotech. Adv. 14: 127-149.

Prather, R.S. and N.L. First. 1986. Effect of cytochalasin B and demecolcine on freeze-thaw survival of murine embryos in vitro. J. Exp. Zool., 239: 37-40.

Rall, W.F. and M.J. Wood. 1994. High in vitro and in vivo survival of day 3 mouse embryos vitrified or

frozen in a non-toxic solution of glycerol and albumin. J. Reprod. Fertil. 101: 681-688.

Velilla, E., M. Grossmann, J. Egozcue and J. Santalo. 1999. Effect of 6β-methylprednisolone on mouse pregnancy rate. Hum. Reprod.14: 207-210.