

การเจริญของเอ็มบริโอหนูธาลัสซีเมียระยะ 8-16 เซลล์
ที่ผ่านการแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเคชัน



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ตุลาคม 2554

การเจริญของเอ็มบริโอหนูธาลัสซีเมียระยะ 8-16 เซลล์
ที่ผ่านการแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเคชั่น



ปฏิญานิพนธ์
ของ
ทัศนีย์ ฝ้ายซ้ายคราม

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ตุลาคม 2554
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การเจริญของเอ็มบริโอหนูธาลัสซีเมียระยะ 8-16 เซลล์
ที่ผ่านการแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเคชัน



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ตุลาคม 2554

ทัศนีย์ ฝ่ายซ้ายคราม. (2554). การเจริญของเอ็มบริโอหนูธาลัสซีเมีย ระยะ 8-16 เซลล์ที่ผ่านการ
แช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเคชัน. ปรินต์งานพิมพ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ:
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม:
อาจารย์ ดร. ดวงใจ บุญกุล, ศาสตราจารย์ สพ.ญ. ยินดี กิตยพันธ์.

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของการแช่แข็ง และความสามารถใน
การเจริญไปเป็นบลาสโตซิสของเอ็มบริโอหนูธาลัสซีเมีย 4 สายพันธุ์ เพื่อนำไปใช้เก็บรักษาหนูสายพันธุ์
ที่มีคุณค่านี้ เอ็มบริโอหนูธาลัสซีเมีย ระยะ 8-16 เซลล์ เกิดจากการนำหนูเมาส์ธาลัสซีเมียเพศผู้แต่ละ
สายพันธุ์ผสมกับหนูเมาส์เพศเมียปกติ (C57BL/6J) แล้วนำมาแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเคชัน (vitrification)
ในสารละลายเอทิลีน ไกลคอล (ethylene glycol) 35% พบว่าอัตราการเจริญไปเป็นบลาสโตซิสของ
เอ็มบริโอแช่แข็งเปรียบเทียบกับเอ็มบริโอสดในหนูสายพันธุ์ 654, BKO, E2 และ E4 เท่ากับ 62 V.S. 93,
63 V.S. 94, 48 V.S. 81 และ 54 V.S. 87% ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเจริญไปเป็น
บลาสโตซิสของเอ็มบริโอแช่แข็งต่ำกว่าเอ็มบริโอสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตรวจสอบคุณภาพของ
บลาสโตซิส จากการนับจำนวนเซลล์ของบลาสโตซิส พบว่าจำนวนเซลล์ในบลาสโตซิสที่เจริญ มาจาก
เอ็มบริโอสดและเอ็มบริโอแช่แข็งไม่มีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติในหนูทั้ง 4 สายพันธุ์
โดยค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ (mean±SD) ในบลาสโตซิสที่เจริญมาจากเอ็มบริโอสดในหนูสายพันธุ์ 654,
BKO, E2 และ E4 มีค่าเท่ากับ 60±10, 57±14, 67±12 และ 66±12 เซลล์/บลาสโตซิส ตามลำดับ และ
จำนวนเซลล์ในบลาสโตซิสที่เจริญมาจากเอ็มบริโอแช่แข็งในหนูสายพันธุ์ 654, BKO, E2 และ E4 มีค่า
เท่ากับ 59±11, 60±13, 57±15 และ 62±9 เซลล์/บลาสโตซิส ตามลำดับ สำหรับการตรวจสอบการเจริญ
ของเอ็มบริโอในตัวสัตว์หลังการย้ายฝาก โดยตรวจสอบการฝังตัว จุดเลือดฝังตัว และการเจริญเป็นฟีตัส
ของเอ็มบริโอสดและเอ็มบริโอแช่แข็ง หลังการย้ายฝาก พบว่าอัตราการฝังตัวของเอ็มบริโอสดมีค่าอยู่
ระหว่าง 26.2 ถึง 48.3% สายพันธุ์ที่มีอัตราการฝังตัวของเอ็มบริโอสูงสุด คือ BKO (48.3%) รองลงมาคือ
654 (39.1%), E2 (33.3%) และ E4 (27.4%) อัตราการฝังตัวของเอ็มบริโอที่ผ่านการแช่แข็งมีค่าอยู่
ระหว่าง 13.1 ถึง 41.9 % สายพันธุ์ที่มีอัตราการฝังตัวของเอ็มบริโอสูงสุด คือ BKO (41.9%) รองลงมาคือ
654 (33.9%), E2 (32.3%), และ E4 (13.1%) การตรวจสอบจีโนไทป์ของเอ็มบริโอที่มีการฝังตัว พบว่ามี
เอ็มบริโอที่เป็นหนูธาลัสซีเมียในหนูสายพันธุ์ 654, BKO, E2 และ E4 มีค่าระหว่าง 10.0 ถึง 38.5% จาก
ผลการทดลองการเจริญของเอ็มบริโอในตัวสัตว์หลัง การแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเคชัน ที่ใช้ในการทดลองใน
ครั้งนี้ไม่มีผลต่ออัตราการฝังตัวของเอ็มบริโอหนูสายพันธุ์ 654, BKO, E2 ยกเว้นสายพันธุ์ E4 ซึ่งมีอัตรา
การฝังตัวต่ำกว่าเอ็มบริโอสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อัตราการเกิดจุดเลือด และการเจริญเป็นฟีตัสของ
เอ็มบริโอหนูทั้ง 4 สายพันธุ์ไม่แตกต่างจากเอ็มบริโอสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

DEVELOPMENT OF VITRIFIED 8-16-CELL
THALASSAEMIC MOUSE EMBRYO



Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Science Degree in Biotechnology
at Srinakharinwirot University

October 2011

Tassanee Faisaikarm. (2011). *Development of vitrified 8-16-cell thalassaemic mouse embryo*. Master thesis, M.S. (Biotechnology). Bangkok: Graduate school, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Dr. Duangjai Boonkusol, Prof. Yindee Kitiyanant .

The purpose of this study was to investigate the efficiency of embryo cryopreservation for four transgenic (TG) thalassaemic mouse strains, key elements of the ongoing gene banking efforts for these high-valued animals. Heterozygous transgenic embryos were produced by breeding four lines of transgenic males to wild type (WT) female (C57BL/6J). Intact 8-16-cell embryos were cryopreserved by vitrification in straw using 35% ethylene glycol. Percentage of blastocyst developed from cryopreserved and fresh embryos in 654, BKO, E2, and E4 strains were 62 V.S. 93, 63 V.S. 94, 48 V.S. 81, and 54 V.S. 87%, respectively. Blastocyst quality was evaluated from counting of blastocyst cell number. Mean \pm SD of cell number in blastocyst developed from fresh embryo in 654, BKO, E2, and E4 strains were 60 \pm 10, 57 \pm 14, 67 \pm 12 and 66 \pm 12 cells/blastocyst, respectively. Mean \pm SD of cell number in blastocyst developed from vitrified embryo were 59 \pm 11, 60 \pm 13, 57 \pm 15 and 62 \pm 9 cells/blastocyst, respectively. The results showed that there was no significantly different in blastocyst cell number among groups. *In vivo* development of fresh and vitrified embryos after embryo transfer was determined from implantation and fetus rate. The implantation and fetus percentages of fresh embryo of four strains were between 26.2 to 48.3%. The best implantation was BKO (48.3%), 654 (39.2%), E2 (33.3), and E4 (27.4%). The implantation percentages of vitrified embryos of four strains were between 13.1 to 41.9%. The best implantation was BKO (41.9%), 654 (33.9%), E2 (32.3%), and E4 (13.1%). After genotyping of implantation embryo, percentages of thalassaemic mouse embryo were between 10.0 to 38.5%. The present study showed that vitrification was not influent to the implantation rates of 654, BKO and E2, while E4 had a significant reduction in implantation rate. Mole and fetus rates were not significantly different among four strains.

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการทำปริญญาโท
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ



ปริญญานิพนธ์
เรื่อง
การเจริญของเอ็มบริโอหนูธาลัสซีเมียระยะ 8-16 เซลล์
ที่ผ่านการแช่แข็งด้วยวิธีวิทรีฟิเคชัน
ของ
ทัศนีย์ ฝ้ายชัยคราม

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สมชาย สันติวัฒนกุล)
วันที่ เดือน พ.ศ. 2554

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

..... ประธาน
(อาจารย์ ดร. ดวงใจ บุญกุล)

..... ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กุลณสรร์ สายขุน)

..... กรรมการ
(ศาสตราจารย์ สพ.ญ. ยินดี กิตยานันท์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ภัทริน ศรีตุลยกุลย์)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ดวงใจ บุญกุล)

..... กรรมการ
(ศาสตราจารย์ สพ.ญ. ยินดี กิตยานันท์)

ประกาศคุณูปการ

การศึกษาค้นคว้าฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความกรุณาอย่างยิ่งจาก อาจารย์ ดร. ดวงใจ บุญกุล ประธานกรรมการควบคุมปริญญาโท และศาสตราจารย์ สพ.ญ. ยินดี กิตยานันท์ กรรมการควบคุมปริญญาโท ทำ นทั้งสองได้เสียสละเวลาอันมี ค่าให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือแนะนำ ข้อบกพร่องมาตั้งแต่ต้นจนสำเร็จได้เป็นอย่างดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ นอกจ ากนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กุลณสรณ์ สายขุน ประธานกรรมการสอบปริญญาโท และ รองศาสตราจารย์ ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธิทางกูร ประธาน กรรมการ บริหาร หลักสูตร วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) อาจารย์ ดร. ภาทริน ศรีดุลยกุลย์ กรรมการสอบปริญญา โท นตลอดจน อาจารย์ ท่านที่ให้ความรู้และคำแนะนำแก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาที่ศึกษาและทำงานวิจัย และขอขอบคุณ คุณมยุรฉัตร สอาดฤทธิ์ คุณนาถนภิส ประทีป ณ ถลาง ผู้อำนวยการและเจ้าหน้าที่สำนักสัตว์ทดลอง ทุกท่านที่อำนวยการความสะดวกให้งานวิจัยประสบความสำเร็จ ไปด้วยดี รวมถึงคุณอาทิ ตยา อินทะนะ คุณธัญย์ทิวา จันท์ภคพัฒน์ หัวหน้าศูนย์วิจัยธาลัสซีเมียและเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่มีส่วนช่วย เป็นฝ่าย สนับสนุนงานวิจัยจนสำเร็จไปได้ด้วยดี

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากการศึกษาค้นคว้าในครั้งนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นเครื่องบูชา พระคุณบิดา มารดา ตลอดจนบูรพาจารย์ ที่ให้ความรู้และอบรมสั่งสอนให้การศึกษา ให้สติปัญญาและ คุณธรรมอันเป็นตั้งเครื่องชี้นำความสำเร็จในชีวิต

ทัศนีย์ ฝ่ายซ้ายคราม

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ	1
ภูมิหลัง.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
สมมุติฐานในการวิจัย.....	3
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
โรคธาลัสซีเมีย.....	5
สาเหตุของโรคธาลัสซีเมีย.....	5
ชนิดของธาลัสซีเมีย.....	6
การแข่งเอ็มบริโอ.....	9
หลักการและวิธีการแข่ง.....	9
การแข่งแบบวิทรีฟิเคชั่น.....	11
ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการแข่ง.....	12
3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	15
สารเคมีและสารละลาย.....	15
สัตว์ทดลอง.....	16
การบริหารจัดการเลี้ยงสัตว์ทดลอง.....	16
การผสมพันธุ์หนูธาลัสซีเมีย.....	16
การตรวจจีโนไทป์ของหนู.....	17
การสกัด DNA จากหางหนูและจุดเลือดของเอ็มบริโอ.....	17
ขั้นตอนต่าง ๆ ของ PCR	18
การตั้งโปรแกรมปฏิกิริยา PCR	19
การศึกษาการแข่งเอ็มบริโอหนูธาลัสซีเมีย.....	20
การนับจำนวนเซลล์ของเอ็มบริโอระยะบลาสโตซิส.....	23
การย้ายฝากเอ็มบริโอ.....	24

สารบัญ(ต่อ)

บทที่	หน้า
3 (ต่อ)	
ขั้นตอนการกระตุ้นการตกไข่จำนวนมาก.....	24
ขั้นตอนการผ่าตัดอวัยวะสืบพันธุ์หนูเพศเมีย.....	25
ขั้นตอนการเก็บเอ็มบริโอระยะ 1 เซลล์ (zygotes)	26
การทำหมันหนูเพศผู้ด้วยวิธีการตัดท่อนำน้ำเชื้อ(vasectomy).....	29
การย้ายฝากเอ็มบริโอ (embryo transfer) เข้าแม่ตัวรับเพื่อตรวจสอบ	
การเจริญภายในตัวหนูแม่ (in vivo development).....	31
การการวิเคราะห์ผล.....	33
4 ผลการทดลอง	34
การศึกษาผลของการเจริญของเอ็มบริโอในหลอดทดลอง	
(in vitro development) หลังการแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเคชัน.....	34
การศึกษาผลของการเจริญของเอ็มบริโอในตัวสัตว์ (in vivo development)	
หลังการแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเคชัน.....	37
5 สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	42
การศึกษาผลของการเจริญของเอ็มบริโอในหลอดทดลอง(in vitro development)	
หลังการแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเคชัน.....	42
การศึกษาผลของการเจริญของเอ็มบริโอในตัวสัตว์ (in vivo development)	
หลังการแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเคชัน.....	43
บรรณานุกรม.....	46
ภาคผนวก.....	51
ประวัติย่อผู้วิจัย	64

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 ผลสำเร็จของการแช่แข็งเอ็มบริโอด้วยวิธีวิทรีฟิเคชัน.....	12
2 ผลของคุณภาพของเอ็มบริโอโคแช่แข็งหลังการย้ายฝาก.....	14
3 อัตราการเจริญในหลอดทดลองของเอ็มบริโอระยะ 8-16 เซลล์ หลังการแช่แข็งด้วยวิธีวิทรีฟิเคชัน.....	35
4 จำนวนเซลล์ในบลาสโตซิสต์ที่เจริญมาจากเอ็มบริโอสดและเอ็มบริโอแช่แข็ง.....	35
5 การฝังตัวและเจริญไปเป็นฟัตส์หลังการย้ายฝากเอ็มบริโอสดและเอ็มบริโอ แช่แข็งของแม่ตัวรับทั้ง 4 สายพันธุ์.....	39
6 การฝังตัวและการเจริญไปเป็นฟัตส์หลังการย้ายฝากเอ็มบริโอสดและ เอ็มบริโอแช่แข็ง.....	40



บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 ตัวอย่างตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาโกลบินที่พบในประเทศไทย ซึ่งมีทั้งชนิด α^{SEA} ซึ่งมีการขาดหาย (deletion) ของยีนแอลฟาโกลบิน ประมาณ 17.5 Kb ชนิด $\alpha^{3.7}$ ซึ่งมีการขาดหายของยีนแอลฟาโกลบิน ประมาณ 3.7 Kb และชนิด $\alpha^{4.2}$ ซึ่งมีการขาดหายของยีนแอลฟาโกลบิน ประมาณ 4.2 K.....	7
2 ตัวอย่างตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีนเบต้าโกลบินที่พบในประเทศไทย....	9
3 หลอดพลาสติก (straw) ขนาด 0.25 ml ที่มีสารละลายป้องกันการแช่แข็ง และเอ็มบริโอบรรจุอยู่ในหลอด.....	21
4 แสดงวิธีการชะล้างเอ็มบริโอจากท่อหน้าไข่ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ.....	22
5 แสดงจำนวนเซลล์ของเอ็มบริโอระยะ 8-16 เซลล์.....	22
6 เอ็มบริโอระยะบลาสโตซิสต์.....	23
7 แสดงจำนวนเซลล์ของเอ็มบริโอระยะบลาสโตซิสต์.....	23
8 วิธีการควบคุมหนูเม้าส์และการฉีดยาเข้าทางช่องท้อง	24
9 การเปิดชั้นหนังที่ปกคลุมด้านหลัง.....	25
10 การตัดส่วนที่เป็นท่อหน้าไข่ (oviduct) และรังไข่ (ovary).....	25
11 ตำแหน่งของปีกมดลูก (uterus) ท่อหน้าไข่ (oviducts) และรังไข่ (ovaries).....	26
12 แนวการตัดเลาะส่วน mesometrium หรือ membrane ตามลูกศร.....	26
13 บริเวณของ ampulla ที่บวมขยายใหญ่ (x400).....	27
14 การใช้เข็มปลายแหลมฉีกส่วน ampulla ที่บวมขยายใหญ่ (x200).....	27
15 เอ็มบริโอระยะ 1 เซลล์ (zygotes) ไหลออกมาจาก ampulla (x400).....	28
16 เอ็มบริโอระยะ 1 เซลล์ (zygotes) ที่มี cumulus cell (x400).....	28
17 สารละลาย M16 ขนาด 60 μ l ในจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มี mineral oil.....	29
18 ตำแหน่งปกติของอวัยวะหนู (ซ้าย) อวัยวะถูกดันขึ้นไปอยู่ในช่องท้อง (ขวา).....	30
19 ท่อน้ำเชื้อในลักษณะท่อเป็นสายคู่รูปตัว U คว่ำ (ซ้าย) ลักษณะการหนีบส่วนของท่อน้ำเชื้อ (ขวา).....	30
20 การตัดชั้นผิวหนังตามแนวยาว (ซ้าย) การใช้ serafine clip หนีบส่วนก้อนไขมัน(ขวา).....	30

บัญชีภาพประกอบ(ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
21 การเย็บปิดแผลด้วย autoclip.....	32
22 หนูตั้งท้องหลังจากการย้ายฝากประมาณ 5 วัน (ซ้าย) และการเปิดหน้าท้องเพื่อตรวจการฝังตัวและนับจำนวนฟัตหลังจากย้ายฝากเอ็มบริโอเข้าแม่ตัวรับ.....	33
23 จำนวนเซลล์ในบลาสโตซิสที่เจริญมาจากเอ็มบริโอสดและเอ็มบริโอแช่แข็งในหนูสายพันธุ์ 654, BKO, E2 และ E4 หลังจากข้อมด้วย Hoechst 33342 (x1000).....	36
24 แม่ตัวรับตั้งท้องหลังการย้ายฝากเอ็มบริโอเป็นเวลา 15 วัน	38
25 แสดงจำนวนเอ็มบริโอที่มีการฝังตัวในแม่ตัวรับในกลุ่มเอ็มบริโอสดและเอ็มบริโอแช่แข็ง.....	38
26 ผลการตรวจสอบจีโนไทป์ของหนูด้วยเทคนิค multiplex PCR.....	41

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

การเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลองที่ได้รับการดัดแปร ลงพันธุกรรมให้เป็นต้นแบบ (model) การศึกษาโรค มนุษย์ เพื่องานวิจัย งานทดสอบ และงานสอนเป็นสิ่งที่ จำเป็น เพื่อสร้างความรู้และทักษะของบุคลากร และพัฒนาคุณภาพชีวิตของมนุษย์

ธาลัสซีเมียเป็นโรคถ่ายทอดทางพันธุกรรมที่พบบ่อยที่สุดในคนไทย โดยประมาณจากอุบัติการณ์ของผู้ที่เป็นพาหะซึ่งมีประมาณ ร้อยละ 30-40 ของประชากร (Fucharoen. 1987)¹ โรคเบต้า-ธาลัสซีเมีย เกิดจากความผิดปกติของยีนที่ทำให้มีการสังเคราะห์เบต้าโกลบินลดลงหรือสังเคราะห์ไม่ได้ ในขณะที่การสังเคราะห์อัลฟาโกลบินยังเกิดขึ้นได้ตามปกติ ทำให้เกิดความไม่สมดุล (imbalance) ของโปรตีนอัลฟาและเบต้าโกลบินในเม็ดเลือดแดง เพราะ อัลฟาโกลบินไม่มีคู่จับอัลฟาโกลบินที่เหลือไม่สามารถรวมตัวเป็นฮีโมโกลบินที่เสถียร จึง ตกตะกอนและสลายไปในเม็ดเลือดแดงฮีเม (Heme) หรือเหล็กที่เกิดจากการสลายของ อัลฟาโกลบินจะจับกับผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง ก่อให้เกิดพยาธิสภาพที่ผนังเม็ดเลือดแดงโดยกระบวนการออกซิเดชัน ส่งผลให้เม็ดเลือดแดงธาลัสซีเมียมีรูปร่างผิดปกติ ขาดความยืดหยุ่น เซลล์เม็ดเลือดแดงที่อยู่ในไขกระดูกของผู้ป่วยจึงมีอายุสั้นและถูกทำลายไปตั้งแต่ระยะที่ยังเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดง ตัวอ่อน (ineffective erythropoiesis) ผู้ป่วยเบต้าธาลัสซีเมียที่มีอาการรุนแรงจะมีอาการซีดมาก จึงต้องได้รับเลือดหรือรับการรักษาอาการต่าง ๆ เป็นประจำตั้งแต่เด็ก การรับเลือดบ่อย ๆ จะทำให้เกิดภาวะเหล็กเกินและสะสมตามอวัยวะในร่างกาย (Weatherall. 2001)²

สภาวะเหล็กเกินในโรคเบต้าธาลัสซีเมีย ซึ่งมีผลมาจากการได้รับเลือดเป็นประจำและมีการดูดซึมธาตุเหล็กเพิ่มมากขึ้นในลำไส้ (Fiorelli. 1990)³ ทำให้มีการสะสมของธาตุเหล็กตามอวัยวะต่าง ๆ เช่น ตับ หัวใจ ม้ามและต่อมไร้ท่อต่าง ๆ ภาวะเหล็กเกินนี้ทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนหลายอย่าง เช่น การเพิ่มขึ้นของสารอนุมูลอิสระ (free radicals) ภาวะหัวใจล้มเหลว ความผิดปกติของต่อมไร้ท่อ นอกจากนี้ ภาวะซีดเรื้อรังทำให้กลไกการต่อสู้เชื้อโรคลดลงทำให้ง่ายต่อการติดเชื้อ เกิดภาวะความดันโลหิตสูง จะเห็นได้ว่า ภาวะซีดเรื้อรังและภาวะเหล็กเกินเป็นปัจจัยสำคัญของการเกิดพยาธิสภาพในโรคธาลัสซีเมีย (Fucharoen. 2000)⁴

โครงการวิจัยธาลัสซีเมีย สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล ได้ร่วมมือกับ Dr. Panos Ioanou และ Prof. Robert Williamson จาก Murdoch Institute University of Melbourne ประเทศออสเตรเลีย ทำการสร้างหนูธาลัสซีเมียที่มีการสอดแทรก ยีนทั้งกลุ่มของ β -globin gene cluster ของคนเข้าไป โดยยีน β -globin จะเป็นยีน β -thalassaemia ที่มีการผ่าเหล่าชนิดที่พบบ่อยในคนไทย เช่น β^E และ $\beta^{4bp\ deletion}$ (Jamsai et al. 2005 ; Jamsai et al. 2006)⁵⁻⁶

นอกจากนี้โครงการวิจัยธาลัสซีเมียยังได้รับ transgenic mice ซึ่งยีน β -globin ของหนูข้างหนึ่งถูกแทนที่ (knockin) ด้วยยีนธาลัสซีเมีย $\beta^{IVSII-654, C \rightarrow T}$ และ ($\beta^{m+/IVSII-654}$) ของมนุษย์ (Lewis et al. 1998)⁷ และหนูธาลัสซีเมียซึ่งมียีน β -globin ของหนูข้างหนึ่งถูกตัดทิ้งไป (knockout) จาก Professor Ryszard Kole ที่ Lineberger Comprehensive Cancer Center and Department of Pharmacology, University of North Carolina, Chapel Hill ประเทศสหรัฐอเมริกา

ขั้นตอนการผลิตหนูตัดแปลงพันธุกรรม (transgenic mice) นั้นถือได้ว่าเป็นขั้นตอนที่มีความซับซ้อนสูง มีค่าใช้จ่ายมากและใช้เวลานาน ที่สำคัญคือภายหลังการสร้าง transgenic mice จำเป็นที่จะต้องมีการเลี้ยงดูอย่างต่อเนื่องแบบรุ่นต่อรุ่น (live stocks) เพื่อเก็บไว้ใช้ในการทดลองตามต้องการซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูง สิ้นเปลืองเวลาและทรัพยากรอื่น ๆ อีกเป็นจำนวนมาก

การเก็บรักษาสายพันธุ์หนูด้วยวิธีการแช่แข็งเอ็มบริโอ (embryo cryopreservation) เป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยประหยัดเวลา ค่าใช้จ่าย และสถานที่เลี้ยงหนู ในขณะที่ยังไม่มีการดำเนินการทดลองได้เป็นอย่างดี ยิ่งไปกว่านั้นจะสามารถป้องกันยีนที่ถ่ายทอดไว้ไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหรือสูญหาย และสามารถป้องกันความล้มเหลวในการผสมพันธุ์ของหนูที่มีสายเลือดใกล้เคียง (inbred) และประหยัดค่าใช้จ่ายในกรณีที่มีการขนส่งไปยังที่ต่าง ๆ

ความสำเร็จในการแช่แข็งเอ็มบริโอหนูเกิดขึ้นครั้งแรกในปี 1972 โดย Whittingham และคนอื่น ๆ ในปี 1972⁸ ได้แช่แข็งเอ็มบริโอหนูด้วยวิธี freezing และเก็บรักษาเอ็มบริโอที่อุณหภูมิ -196°C ต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งเอ็มบริโอหนูอย่างต่อเนื่อง เริ่มจาก Liebo และคนอื่น ๆ ในปี 1974⁹ กับ Rall ในปี 1987¹⁰ ได้ใช้วิธีการแช่แข็งที่เรียกว่า slow freezing แต่วิธีนี้พบว่ามีผลกระทบต่อการเจริญของเอ็มบริโอหนู ภายหลังการแช่แข็ง จึงมีการพัฒนาวิธีการที่เรียกว่า วิทริฟิเคชัน (vitrification) ขึ้น

วิธีแช่แข็งแบบวิทริฟิเคชัน ได้เริ่มนำมาใช้แช่แข็งเพื่อเก็บรักษาเนื้อเยื่อตั้งแต่ปี 1937 (Luyet. 1937)¹¹ และถูกนำมาปรับใช้กับเอ็มบริโอหนูโดย Rall และ Fahy ในปี 1985¹² การแช่แข็งด้วยวิธี วิทริฟิเคชัน จะใช้สารละลายแช่แข็งที่ผสมสารป้องกันการแช่แข็ง (cryoprotectant) ที่มีความเข้มข้นสูง และมีการลดอุณหภูมิของสารป้องกันการแช่แข็งลงอย่างรวดเร็วเพื่อป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดความเสียหาย ต่อเซลล์ และทำลายเซลล์ แต่อย่างไรก็ตามความเข้มข้นที่สูงของ สารป้องกันการแช่แข็ง นั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับเซลล์ไข่และเอ็มบริโอในระยะ pronuclear (Mukaida et al. 1998)¹³ ซึ่งสามารถลดความเป็นพิษลงได้ด้วยการใช้เอทิลีนไกลคอล (ethylene glycol) เนื่องจากมีรายงานว่าเป็นสารป้องกันการแช่แข็ง ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์น้อยที่สุด (Kasai et al. 1990¹⁴; Miyamoto. 1986¹⁵) และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการแช่แข็งแบบ freezing พบว่าราคาอุปกรณ์สูงกว่า ขั้นตอนในการทำง่ายกว่าและใช้เวลาเพียงเล็กน้อย (Palasz & Mapletoff. 1996)¹⁶

งานวิจัยครั้งนี้ จึงเลือกใช้ ใช้การแช่แข็งแบบวิทริฟิเคชันโดยใช้หลอดพลาสติก (straw) ขนาด 0.25 ml เป็นวิธีที่ทำให้เอ็มบริโอแขวนลอยในสารละลายที่มีสารป้องกันการแช่แข็งน้อยที่สุด

เท่าที่จะทำได้ การแช่แข็งแบบวิทริฟิเคชันเป็นเทคนิคในการเก็บรักษาเอ็มบริโอของสัตว์ที่ประสบความสำเร็จอย่างสูงสุด เป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็วได้ผลกว่าวิธีอื่น

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาเปรียบเทียบ ผลของ การแช่แข็งแบบวิทริฟิเคชัน ต่ออัตราการเจริญของเอ็มบริโอหนูธาลัสซีเมีย 4 สายพันธุ์ในหลอดทดลอง (*in vitro*) และ ในตัวสัตว์ (*in vivo*) หลังการย้ายฝาก

ขอบเขตของการวิจัย

1. กระตุ้นการตกไข่ (superovulation) หนูเพศเมีย ปกติ (wild type) จับคู่ผสมกับหนูธาลัสซีเมียเพศผู้
2. ตรวจสอบการผสมโดยดูจาก vaginal plug หลังจากผสมพันธุ์กับหนูเพศผู้ ชะล้างเอ็มบริโอระยะไซโกต
3. แช่แข็งเอ็มบริโอระยะ 8-16 เซลล์ ด้วยวิธีวิทริฟิเคชันแบบ in-straw เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว
4. อนุเคราะห์เอ็มบริโอและเลี้ยงต่อจนเจริญเข้าสู่ระยะบลาสโตซิสต์
5. ติดตามอัตราการเจริญไปเป็นบลาสโตซิสต์ และย้อมด้วยสี Hoechst 33342 เพื่อนับจำนวนเซลล์ในบลาสโตซิสต์
6. ติดตามอัตราการเจริญของเอ็มบริโอหลังการย้ายฝากเข้าแม่ตัวรับโดยตรวจสอบการตั้งท้องหลังการย้ายฝาก โดยหลังการย้ายฝาก 15 วัน นำมาผ่าตัดเพื่อตรวจสอบการฝังตัวและจำนวนเอ็มบริโอของหนูธาลัสซีเมียที่เจริญเป็นฟetus

สมมุติฐานในการวิจัย

การแช่แข็ง ด้วยวิธีวิทริฟิเคชัน ไม่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตและการ เจริญของ เอ็มบริโอหนูธาลัสซีเมียระยะ 8-16 เซลล์

นิยามศัพท์เฉพาะ

Vitrification คือ วิธีการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิเร็วมาก โดยใช้สารป้องกันการแช่แข็งชนิดเดียวหรือสองชนิดหรือมากกว่าที่มีความเข้มข้นสูง

Embryo transfer คือ การย้ายฝาก เอ็มบริโอ เข้าสู่แม่ตัวรับที่ทำการเหนี่ยวนำพร้อมเป็นแม่อุ้มท้องแทน จนครบกำหนดคลอดลูก

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. โรคธาลัสซีเมีย (thalassaemia)

โรคธาลัสซีเมีย เป็นโรคโลหิตจางที่มีสาเหตุมาจากความผิดปกติทาง พันธุกรรม ที่มีการสร้างโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของเม็ดเลือดแดงผิดปกติ จึงทำให้เม็ดเลือดแดงมีอายุสั้นกว่าปกติ แดงง่าย ถูกทำลายง่าย ผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้อาจมีโลหิตจาง (anemia) โรคนี้อาจพบได้ทั้งหญิงและชาย ในอัตราส่วนเท่ากัน ถ่ายทอดมาจากพ่อและแม่ทางพันธุกรรม พบได้ทั่วโลกและรวมถึงประเทศไทย ด้วยเช่นกัน ในประเทศไทยพบผู้ป่วยโรคนี้อยู่ละ 1 และพบผู้ที่เป็นพาหะนำโรคถึงร้อยละ 30-40 หรือประมาณ 20-25 ล้านคน เมื่อผู้ที่เป็นพาหะแต่งงานกันและพบยีนผิดปกติร่วมกัน ก็อาจมีลูกที่เกิดโรคนี้อได้ ซึ่งประมาณการณ่ว่าจะมีคนไทยเป็น โรคธาลัสซีเมีย มากถึง 500,000 คน (ธนศักดิ์ ตาตุ. 2550)¹⁷

1.1 สาเหตุของโรคธาลัสซีเมีย

ฮีโมโกลบิน (hemoglobin) เป็นโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในเม็ดเลือดแดงของคนและสัตว์ชั้นสูง การสังเคราะห์ฮีโมโกลบินเริ่ม เกิดตั้งแต่ระยะ pronormoblast และอาศัยกระบวนการเช่นเดียวกันกับการสังเคราะห์โปรตีนทั่ว ๆ ไปยีนที่รับผิดชอบต่อการสร้างสายโกลบิน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของฮีโมโกลบินคือ ยีนโกลบิน (globin genes) ซึ่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 11 และ 16 อย่างไรก็ตามเราสามารถตรวจพบฮีโมโกลบินได้เมื่อเม็ดเลือดแดงเจริญเข้าสู่ ระยะ polychromatophilic normoblast และตามปกติอัตราการสังเคราะห์ globin chain จาก α -globin gene cluster และ β -globin gene cluster จะเท่ากัน โดยฮีโมโกลบินเกิดจากการรวมตัวกันของ heme กับ globin การสร้าง heme เกิดภายใน mitochondria ส่วน globin สร้างใน cytoplasm โดย heme และ globin จะรวมตัวกันเป็น hemoglobin ภายใน cytoplasm Heme synthesis เริ่มจากภายใน mitochondria โดย glycine และ succinyl coenzyme A ซึ่งได้จาก Krebs cycle ร่วมกับ vitamin B6 ทำปฏิกิริยากันเกิดเป็น γ -aminolevulinic acid (γ -ALA) จากนั้น γ -ALA จะออกจาก mitochondria สู่ cytoplasm แล้วถูก enzyme เปลี่ยนเป็น prophobilinogen (PBG), uroporphobilinogen (UPG) และ coproporphyrinogen (CPG) ตามลำดับ ต่อจากนั้น CPG จะกลับเข้าสู่ mitochondria และถูกเปลี่ยนเป็น protoporphyrinogen (PPG) และ protoporphyrin (PP) ตามลำดับ จากนั้นเหล็ก (Fe) ซึ่งได้จาก ferritin ภายในเซลล์ จะสอดเข้าไปในวงแหวน PP เกิดเป็น heme แล้ว heme จะออกจาก mitochondria ไปจับกับ globin ภายใน cytoplasm (ธนศักดิ์ ตาตุ. 2250)¹⁷

การสังเคราะห์สายโกลบิน (globin chain synthesis) มาจากการแสดงออกของ globin gene ลักษณะทั่ว ๆ ไปของ globin gene ทุกชนิดจะเหมือนกัน ประกอบด้วย coding sequence หรือ exon 3 แห่ง และส่วน non-coding sequence หรือ intron หรือ intervening sequence (IVS) 2 แห่ง

Globin chain synthesis ประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

1. Transcription เป็นการสังเคราะห์ messenger RNA (mRNA) โดยใช้ DNA (globin gene) เป็นแม่แบบ (template) และใช้ RNA polymerase enzyme สังเคราะห์ mRNA ที่ได้เรียกว่า mRNA precursor ซึ่งประกอบด้วย sequence ที่จำลองมาจาก globin gene คือมีทั้ง intron และ exon

2. RNA processing เป็นกระบวนการตัดแต่ง mRNA precursor เพื่อให้พร้อมที่จะปลดปล่อยออกสู่ cytoplasm เพื่อการแปลรหัส กระบวนการนี้ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ

a) RNA splicing เป็นการตัดเอาส่วน intron ออกไป โดยตัดตรงบริเวณ intron-exon junction หรือ splice junction

b) Cap structure adding เป็นการเติม guanosine triphosphate เข้าทางด้าน 5' – end ตรงจุดที่มีการเริ่ม transcription Cap structure ช่วยป้องกัน mRNA มิให้ถูกทำลายด้วย phosphatase enzyme

c) Poly A adding เป็นการเติม adenosine หลาย ๆ ตัวเข้าทางด้าน 3' – end หลังบริเวณ AATAAA, Poly A tail ทำให้ mRNA มีความเสถียร Translation เป็นการแปลรหัสจาก mature mRNA ผลิตผลของการแปลรหัสคือ polypeptide chain หรือ globin chain ความผิดปกติในขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งของการสังเคราะห์ globin chain

โดยเฉพาะอย่างยิ่งความผิดปกติที่โครงสร้างของยีน และบริเวณใกล้เคียง จะส่งผลให้กระบวนการสังเคราะห์ globin chain ผิดปกติไป และเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิด อาการ ของโรคธาลัสซีเมีย และ ผู้ป่วยทางโลหิตวิทยา (ธนูศักดิ์ ตาตุ. 2550)¹⁷

1.2 ชนิดของธาลัสซีเมีย

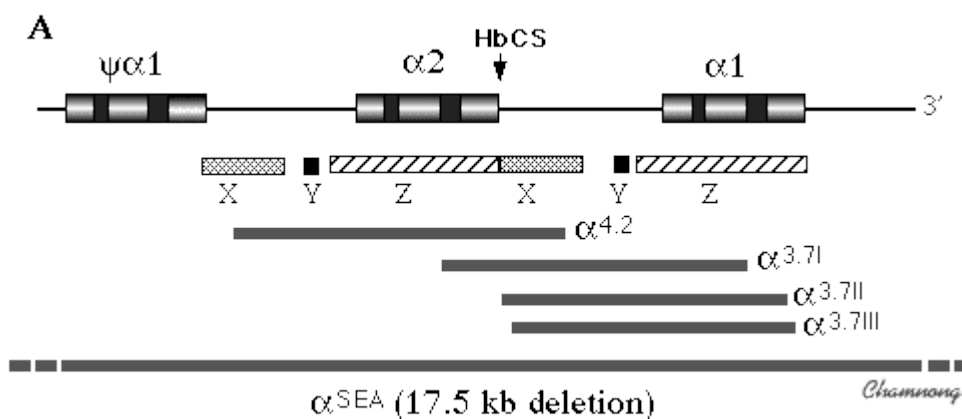
ธาลัสซีเมีย แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ แอลฟาธาลัส ซีเมียซึ่งมีความผิดปกติของสายแอลฟา และเบต้าธาลัสซีเมียมีความผิดปกติของสายเบต้า

1. แอลฟาธาลัสซีเมีย มักเกิดจากยีนแอลฟาโกลบินขาดหายไป เป็นท่อนยาวหลาย Kb (large deletion) ทำให้การสร้างสายโปรตีนแอลฟาโกลบินลดลงหรือสร้างไม่ได้เลย ความรุนแรงที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับจำนวนยีนแอลฟาโกลบินที่ขาดหายไป แอลฟาธาลัสซีเมียแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดคือ

1.1) แอลฟาธาลัสซีเมีย 1 (α -thalassaemia 1) หรือแอลฟาศูนย์ธาลัสซีเมีย (α^0 -thalassaemia) แอลฟาธาลัสซีเมียชนิดนี้จะไม่สร้างสายแอลฟาโกลบินเลย ส่วนใหญ่เกิดจากยีน

แอลฟาทั้ง 2 โลไซ (loci) ขาดหายไป แอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ที่พบบ่อยในเอเชียอาคเนย์ รวมทั้งในประเทศไทยคือชนิด SEA (Southeast Asia type) เกิดจากยีนขาดหายไปประมาณ 17.5 Kb (แสดงในภาพที่ 1) และชนิดที่พบบ่อยแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียนคือ ชนิด Med (Mediterranean type) มียีนขาดหายไปประมาณ 18 Kb และมีชนิดอื่น ๆ ที่พบไม่บ่อยอีกประมาณ 10 ชนิด เช่น ชนิด Thai มีรายงานว่าพบในคนไทย หลายครอบครัว เกิดจากยีนขาดหายไปยาวประมาณ 34 Kb โฮโมไซโกต (homozygote) ของยีนแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 (--/--) จะไม่สามารถสร้างสายโปรตีนแอลฟาโกลบินได้เลย ทำให้เกิดโรคทารกบวมน้ำชนิดมีฮีโมโกลบินบาร์ท (Hb Bart's hydrops fetalis) ซึ่งเป็นโรคธาลัสซีเมียที่มีอาการรุนแรงที่สุด ทารกที่เป็นธาลัสซีเมียชนิดนี้จะเสียชีวิตทั้งหมด อาจเสียชีวิตก่อนหรือหลังคลอดภายใน 24 ชั่วโมง

1.2) แอลฟาธาลัสซีเมีย 2 (α -thalassaemia 2) หรือ แอลฟาเบกธาลัสซีเมีย (α^+ -thalassaemia) แอลฟาธาลัสซีเมียชนิดนี้สามารถสร้างสายโปรตีนแอลฟาโกลบินได้ แต่ในปริมาณที่น้อยกว่าปกติ มีอาการรุนแรงน้อยกว่าแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 ความผิดปกติส่วนใหญ่เกิดจากบางส่วนของยีนขาดหายไป เหลือยีนแอลฟาโกลบินเพียงยีนเดียวที่ทำหน้าที่ ชนิดที่พบบ่อยคือ ชนิดยีนขาดหายไป 3.7 Kb ($\alpha^{3.7}$) และ 4.2 Kb ($\alpha^{4.2}$) ดังแสดงภาพที่ 1 แอลฟาธาลัสซีเมีย 2 พบ บ่อยกว่าแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 และแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 ยังมีอีกหลายชนิดที่เกิดจากการกลายพันธุ์ เฉพาะจุด (point mutation) ชนิดที่พบบ่อยคือฮีโมโกลบินคอนสแตนท์สปริง (Hb Constant-Spring, Hb CS) ซึ่งเป็นฮีโมโกลบินผิดปกติที่เกิดจากการแทนที่เบส (base substitution) 1 ตัว ที่โคดอนหยุด (stop codon) คือเบส U เปลี่ยนเป็น C ทำให้โคดอนหยุดเลื่อนถัดไปอีก 31 โคดอน สายโปรตีนแอลฟาโกลบิน ที่สร้างได้จึงยาวกว่าปกติและไม่เสถียร ส่วนเฮเทอโรไซโกตเชิงซ้อน (compound heterozygote) ของแอลฟาธาลัสซีเมีย 1 และแอลฟาธาลัสซีเมีย 2 (--/ α) ทำให้เกิดโรคฮีโมโกลบินเอช (Hb H diseases) ซึ่งเป็นโรคธาลัสซีเมียที่มีอาการรุนแรงปานกลาง (thalassaemia-intermediate)



ภาพประกอบ 1 ตัวอย่างตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีนแอลฟาโกลบินที่พบในประเทศไทยซึ่งมีทั้งชนิด α^{SEA} ซึ่งมีการขาดหาย (deletion) ของยีนแอลฟาโกลบินประมาณ 17.5 Kb, $\alpha^{3.7}$ ซึ่งมีการขาดหายของยีนแอลฟาโกลบินประมาณ 3.7 Kb และ $\alpha^{4.2}$ ซึ่งมีการขาดหายของยีนแอลฟาโกลบินประมาณ 4.2 Kb (มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 2553)¹⁸

2. เบต้าธาลัสซีเมีย เกิดจากความผิดปกติของยีนเบต้าโกลบิน ที่ทำให้การสร้างสายโปรตีนเบต้าโกลบินลดลงหรือไม่สร้างเลย ความผิดปกติส่วนใหญ่เกิดจากมีเบสเปลี่ยนแปลงไปเฉพาะจุด หรือเบสไม่ก็ตัวขาดหายไป (small deletion) หรือเกินมา (small insertion) ความรุนแรงของเบต้าธาลัสซีเมียขึ้นอยู่กับชนิดของการกลายพันธุ์ว่าจะยังคงสร้างสายโปรตีนเบต้าโกลบินได้หรือไม่ ถ้าไม่สามารถสร้างได้เลยจะมีอาการรุนแรงมากกว่า เรียกว่าเบต้าศูนย์ธาลัสซีเมีย (β^0 -thalassaemia) และถ้าสามารถสร้างได้บ้างจะรุนแรงน้อยกว่า เรียกว่าเบต้าบวกธาลัสซีเมีย (β^+ -thalassaemia) ปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนเบต้าศูนย์กับเบต้าศูนย์ (β^0/β^0) เบต้าศูนย์กับเบต้าบวก (β^0/β^+) หรือเบต้าบวกกับเบต้าบวก (β^+/β^+) ทำให้เกิดโรคเบต้าธาลัสซีเมียได้หลายชนิด และมีอาการรุนแรงได้มากน้อยแตกต่างกัน ชนิดของการกลายพันธุ์ในเบต้าธาลัสซีเมียมีความหลากหลายมากจนถึงปัจจุบัน มีรายงานแล้วทั่วโลกเกือบ 200 ชนิด ในประเทศไทยมีรายงานแล้วอย่างน้อยประมาณ 24 ชนิด (ธนศักดิ์ ตาตุ. 2550)¹⁷

เบต้าธาลัสซีเมียเกิดจากสาเหตุหลายประการและสามารถจัดแบ่งเป็นกลุ่มได้ดังนี้ (ธนศักดิ์ ตาตุ. 2550)¹⁷

1. การกลายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการถอดรหัส ผิดปกติ (transcription mutation) เกิดจากการแทนที่เบสตัวใดตัวหนึ่ง ที่บริเวณโปรโมเตอร์ (promoter) ชนิดที่พบบ่อยมี 2 ชนิด คือชนิดเบส C เปลี่ยนเป็น G ที่ตำแหน่ง -86 (-86, C-G) และชนิดเบส A เปลี่ยนเป็น G ที่ตำแหน่ง -28 (-28, A-G) การกลายพันธุ์กลุ่มนี้ทั้งหมดเป็นเบต้าบวกธาลัสซีเมีย การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง -101 (C-T) ทำให้เกิดเบต้าธาลัสซีเมียแบบแฝงเงียบ (silent b-thalassaemia) เม็ดเลือดแดงของผู้ที่เป็น

พาหะของการกลายพันธุ์ชนิดนี้จะมีขนาดและรูปร่าง ปกติ และปริมาณฮีโมโกลบินเอ 2 ปกติ แต่มีอัตราการสร้างสายโกลบินลดลง ไฮโมไซโกตจะมีอาการรุนแรงปานกลาง

2. การกลายพันธุ์ที่ทำให้ mRNA ทำหน้าที่ไม่ได้ (nonfunctional mRNA) เบต้าทาลัสซีเมียชนิดนี้ เกิดจากการแทนที่เบสเพียงตำแหน่งเดียวที่ทำให้เกิดโคดอนหยุดขึ้นก่อนกำหนด และมีผลให้ mRNA ถอดรหัสต่อไม่ได้ (nonsense) ทำให้เกิดเบต้าศูนย์ทาลัสซีเมีย มีรายงานในประเทศไทย 3 ชนิดคือ การกลายพันธุ์ที่โคดอน 17 (A-T) โคดอน 35 (C-A) และโคดอน 26 (G-T)

3. การกลายพันธุ์แบบเฟรมชิฟท์ (frameshift mutation) เกิดจากการขาดหายหรือแทรกของเบสประมาณ 1-4 เบส มีผลให้ mRNA ทำหน้าที่ไม่ได้ หรือ mRNA ไม่เสถียร มีรายงานในประเทศไทย 3 ชนิด คือ ชนิดการกลายพันธุ์ที่เกิดจากเบสหายไป 4 เบส ที่โคดอน 41-42 (-CTTT) เป็นชนิดที่พบบ่อยที่สุดในประเทศไทย ชนิดที่มีเบส A 1 ตัวแทรกที่โคดอน 71-72 (+A) และชนิดเบส G 1 ตัวแทรกที่โคดอน 14-15 (+G)

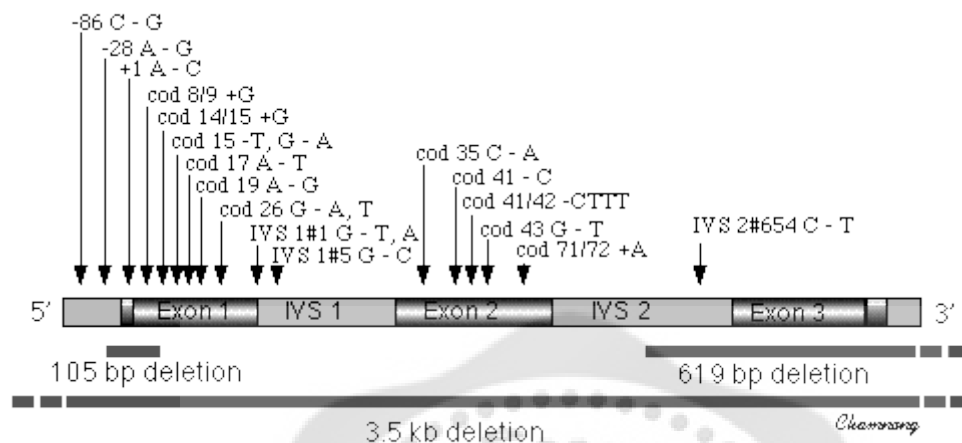
4. การกลายพันธุ์ที่ทำให้การตัดต่อ mRNA ผิดปกติ (mRNA processing mutation) มีรายงานแล้วกว่า 30 ชนิด การกลายพันธุ์ในกลุ่มนี้เกิดจากการตัดอินทรอน (intron) และบริเวณที่ไม่แปลรหัส (untranslated sequence) ในกระบวนการทรานสคริปชันผิดพลาด เกิดจากการแทนที่เบสตรงจุดตัด (splice junction change) ทางด้าน 5' หรือ 3' ของอินทรอน ทำให้ไม่สามารถตัดอินทรอนออกไปได้ ส่วนใหญ่เป็นเบต้าศูนย์ทาลัสซีเมีย เช่น การกลายพันธุ์ที่นิวคลีโอไทด์ 1 ของอินทรอน 1 (IVS-1 nt 1, G-T) หรือเกิดการแทนที่เบสตรงบริเวณใกล้จุดตัด (consensus change) มีผลให้การสังเคราะห์สายเบต้าโกลบินต่ำลง เป็นเบต้าบวกรหัสซีเมีย ชนิดที่พบในประเทศไทย คือ IVS-1 nt 5 (G-C) หรือเกิดจากการแทนที่เบสตำแหน่งอื่น ๆ ของอินทรอน (internal IVS change) ที่ทำให้เกิดจุดตัดขึ้นใหม่ภายในอินทรอน เช่น IVS-2 nt 654 (C-T) เกิดจุดตัดขึ้นใหม่ทางด้าน 5' ทำให้เกิดเบต้าบวกรหัสซีเมีย หรือเกิดการแทนที่เบสในเอ็กซอน (mutation in exon) ที่ทำให้เกิดจุดตัดขึ้นใหม่ภายในเอ็กซอน ส่วนใหญ่เป็นเบต้าบวกรหัสซีเมียเช่นกัน เช่น ฮีโมโกลบินอี (โคดอน 26, G-A) การกลายพันธุ์ที่โคดอน 24 (T-A) และฮีโมโกลบินมาเลย์ (โคดอน 19, A-G) เป็นต้น

5. การกลายพันธุ์ที่เกิดการแทนที่เบสที่ตำแหน่ง AATAAA (polyadenylation mutation) การแทนที่เบสตัวใดตัวหนึ่งหรือขาดหายไป 6 ตัวของรหัสนี้ จะทำให้เกิดเบต้าบวกรหัสซีเมีย

6. การกลายพันธุ์ที่เกิดการแทนที่เบสที่ตำแหน่งแคป (cap site mutation) พบชนิดเดียวในคนอินเดียและคนไทยที่อยู่ในภาคใต้ คือการแทนที่เบส A ด้วย C เป็นชนิดเบต้าบวกรหัสซีเมีย

7. การกลายพันธุ์ที่เกิดจากยีนขนาดใหญ่ขาดหายไปทำให้เกิดเบต้าศูนย์ทาลัสซีเมีย เช่น ชนิดยีนขาดหายไป 619 เบส ทางด้าน 3' ของยีนเบต้าโกลบิน พบร้อยละ 30 ของยีนเบต้าทาลัสซีเมียในคนเผ่าชิน ที่อาศัยในประเทศอินเดียและปากีสถาน และมีรายงานในประเทศไทย

ด้วย ชนิด ยีนขาดหายไป 3485 เบส เป็นชนิดที่ยีนเบต้าโกลบินทั้งหมดขาดหายไป พบในภาคใต้ได้ บ่อยกว่าภาคอื่น ๆ และชนิดยีนขาดหายไป 105 เบสทางด้าน 5' ชนิดนี้มีรายงานครั้งแรกที่ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ เป็นผู้ป่วยจากจังหวัดนครศรีธรรมราช



ภาพประกอบ 2 ตัวอย่างตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีนเบต้าโกลบินที่พบในประเทศไทย (มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2553)¹⁹

อาการของโรคธาลัสซีเมียที่พบโดยทั่วไป จะมี อาการซีด ตาขาวสีเหลือง ตัวเหลือง ตับโต ม้ามโต ผิวหนังดำคล้ำ กระดูกใบหน้าจะเปลี่ยนรูป มีจมูกแบน กะโหลกศีรษะหนา โหนกแก้มสูง คางและ ขากรรไกรกว้างใหญ่ ฟันบนยื่น กระดูกบาง เปราะ หักง่าย ร่างกายเจริญเติบโตช้ากว่าคนปกติ แคระแกร็น ท้องป่อง ในประเทศไทยมีผู้เป็นโรคประมาณร้อยละ 1 ของประชากรหรือประมาณ 5 แสนคน โรคเลือดจางธาลัสซีเมียมีอาการตั้งแต่ไม่มี อาการใด จนถึงมีอาการรุนแรงมากที่ทำให้ เสียชีวิตตั้งแต่อยู่ในครรภ์หรือหลังคลอดไม่เกิน 1 วัน ผู้ที่มีอาการจะซีดมากหรือมีเลือดจางมาก ต้อง ให้เลือดเป็นไป ประจำ หรือมีภาวะติดเชื้อม่อย ๆ หรือมีไข้เป็นหวัดบ่อย ๆ ได้ มากน้อยแล้วแต่ชนิด ของธาลัสซีเมีย ผู้ที่มีโอกาสเป็นพาหะ ได้แก่ ผู้ที่มีญาติพี่น้องเป็นโรคนี้อาจมีโอกาสที่จะเป็นพาหะหรือ มียีนแฝงสูง ผู้ที่มีลูกเป็นโรคนี้อาจแสดงว่าทั้งคู่สามีภรรยาเป็นพาหะหรือมียีนแฝง และลูกทุกคนที่เกิด จากผู้ป่วยที่เป็นโรคธาลัสซีเมียและแต่งงานกับคนปกติที่ไม่มียีน จะเป็นพาหะ การรักษาทำได้โดย การให้รับประทานวิตามินโฟลิควันละเม็ด ให้เลือดเมื่อผู้ป่วยซีดมากและมีอาการของการขาดเลือด และเมื่อต้องรับเลือดบ่อย ๆ ทำให้มีภาวะเหล็กเกิน อาจต้องฉีดยาขับ (ธนุศักดิ์ ตาตุ, 2550)¹⁷

2. การแช่แข็งเอ็มบริโอ (Embryo cryopreservation)

2.1 หลักการและวิธีการแช่แข็ง

การแช่แข็งเป็นการดึงเอาน้ำออกจาก กเซลล์โดยใช้หลักการของกระบวนการออสโมซิส (osmosis) คือ เมื่ออุณหภูมิลดลงน้ำภายนอกเซลล์ (extracellular medium) จะกลายเป็นน้ำแข็ง (freezing point) ซึ่งเกิดขึ้นที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส ($^{\circ}\text{C}$) คือประมาณ -5°C ถึง -10°C

เซลล์หรือตัวอ่อนจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ระหว่างการแช่แข็งมีการปรับสภาพแวดล้อมภายในโดยการขับน้ำ (dehydration) ออกจากเซลล์ เซลล์ของตัวอ่อนจะตอบสนองด้วยการหดตัว เนื่องจากอยู่ในสารละลายที่มีสารป้องกันการแช่แข็งที่มีความเข้มข้นสูงกว่าภายในเซลล์ น้ำภายในเซลล์จะไหลออกขณะที่อุณหภูมิลดลง ทั้งนี้ เพื่อความสมดุล (equilibration) ของตัวเซลล์กับสภาพภายนอกเซลล์ที่กลายเป็นน้ำแข็ง (crystallization) กรณีเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสจะสังเกตเห็นพบช่องว่างภายในเลย แต่เหตุการณ์นี้จะกลับเหมือนเดิมเมื่อนำตัวอ่อนกลับเข้าอุณหภูมิเดิมที่เริ่มต้น และในสารละลายที่มีความเข้มข้นเท่ากับสภาพภายในเซลล์ของตัวอ่อน (ดวงใจ บุญกุลศล. 2008)²⁰

การศึกษาผลของการแช่แข็งของเอ็มบริโอในปี 1972 โดย Whittingham และคนอื่น ๆ⁸ ประสบความสำเร็จในการแช่แข็งเอ็มบริโอของหนูเม้าส์ ได้มีการศึกษาค้นคว้าและวิจัยทางด้านการแช่แข็ง เพื่อพัฒนางานด้านการแช่แข็งเอ็มบริโอตลอดมา ในปี 1973 Wilmut และ Rowson²¹ ได้รายงานความสำเร็จในการย้ายฝากเอ็มบริโอโคแช่แข็งด้วยการลดอุณหภูมิอย่างช้า ๆ (slow freezing) และการทำละลายโดยการเพิ่มอุณหภูมิอย่างช้า ๆ จึงเรียกว่า การแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิอย่างช้า ๆ (conventional slow freezing)

การแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิจำ ๆ เป็นวิธีที่ต้องมีการควบคุมอัตราเร็วในการแช่แข็ง (cooling or freezing rate) และอัตราเร็วในการทำละลายหลังการแช่แข็ง (thawing rate) ส่วนมากตัวอ่อนจะถูกแช่แข็งด้วย วิธีนี้ และ เฉพาะอย่างยิ่งตัวอ่อนของโคที่มีการค้าขายทั่วยุโรป การแช่แข็งแบบนี้ต้องใช้เครื่องมือแช่แข็งที่สามารถควบคุมอัตราเร็วของการแช่แข็งอย่างช้า ๆ เป็น^oC ต่อนาที จึงมีค่าใช้จ่ายสูง ขั้นตอนของการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิจำ ๆ วิธีนี้ประกอบด้วย 7 ขั้นตอน คือ (ดวงใจ บุญกุลศล. 2008)²⁰

1. การนำสารป้องกันการแช่แข็งเข้าไปในเซลล์
1. การบรรจุตัวอ่อนในหลอดหรือภาชนะสำหรับแช่แข็ง
2. การนำตัวอ่อนไปแช่แข็ง
3. การชักนำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็ง
4. การแช่แข็งตัวอ่อนด้วยอัตราความเร็วช้า ๆ
5. การเก็บตัวอ่อนในไนโตรเจนเหลว
6. การทำละลายตัวอ่อน
7. การเจือจางเอาสารป้องกันการแช่แข็งออกจากเซลล์

ถึงแม้วิธีนี้จะประสบความสำเร็จมาก และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังการแช่แข็งจะค่อนข้างสูง แต่ก็ยังมีข้อจำกัดตรงที่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง และมีความเสียหายของเซลล์ที่เกิดจากเกล็ดน้ำแข็ง ดังนั้นจึงมีการศึกษาวิธีการแช่แข็งแบบลดขั้นตอนและเวลา ในการแช่แข็ง เป็นการเพิ่มความเร็วในการแช่แข็ง (rapid freezing) และความเร็วในการละลายสูง (rapid thawing) เรียกว่า การแช่แข็งแบบวิธีพิเกชั่น การแช่แข็งเซลล์โดยวิธีพิเกชั่น เป็นอีกทางเลือกที่นำมาใช้ในการแช่แข็งเอ็มบริโอที่มีการเจริญระยะต้น ๆ

2.2 การแช่แข็งแบบวิทริฟิเคชัน

วิธีวิทริฟิเคชัน ได้เริ่มนำมาใช้แช่แข็งเพื่อเก็บรักษาเนื้อเยื่อได้ตั้งแตปี 1937 (Luyet. 1937)¹¹ และถูกนำมาปรับใช้กับเอ็มบริโอหนูโดย Rall และ Fahy ในปี 1985¹² การแช่แข็งด้วยวิธี vitrification จะใช้สารละลายแช่แข็งที่ผสมสารป้องกันการแช่แข็ง (cryoprotectant) ที่เข้มข้นสูงและมีการลดอุณหภูมิของสารละลายแช่แข็งลงอย่างรวดเร็วเพื่อป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดความเสียหาย และการถูกทำลายของเซลล์ แต่อย่างไรก็ตามความเข้มข้นที่สูงของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งนั้นก็เป็นที่พิชต่อเซลล์โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับเซลล์ไข่ และเอ็มบริโอในระยะ pronuclear (Mukaida et al. 1998)¹³ สารป้องกันการแช่แข็งมีความเหมาะสมในการแช่แข็งเอ็มบริโอของสัตว์แต่ละชนิดแตกต่างกัน ethylene glycol จัดเป็นสารป้องกันการแช่แข็งที่เหมาะสมในการแช่แข็งเอ็มบริโอหนูเมาส์มากที่สุด (Kasai et al. 1981; Miyamoto. 1986)^{22,15} ซึ่ง Kasai และคนอื่น ๆ ได้รายงานการวิจัยในปี 1990¹⁴ โดยความเข้มข้นของ ethylene glycol ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 30% ถึง 40% อัตราการเจริญหลังการแช่แข็งของเอ็มบริโอหนูเมาส์ในระยะมอรูลา เท่ากับ 98% และ 84% ตามลำดับ ในขณะที่สารพรอพานไดออล (propanediol) ใช้ได้ทั้งในเอ็มบริโอระยะต้นและระยะท้ายของทั้งกระต่ายและโค ข้อดีของ propanediol คือซึมเข้าสู่เซลล์ได้มากกว่า และก่อให้เกิดน้ำแข็งในเซลล์น้อยกว่ากลีเซอรอล (glycerol) และ ไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide) Voelkel และ Hu ในปี ค.ศ. 1992²³ ได้มีการศึกษาเปรียบเทียบสารป้องกันการแช่แข็งชนิดต่าง ๆ 4 ชนิด ที่ใช้ในการแช่แข็งเอ็มบริโอโคระยะบลาสโตซิส พบว่าอัตราการเจริญของเอ็มบริโอหลังการทำละลายใน ethylene glycol (70%) ดีกว่า propylene glycol (11%) dimethyl sulfoxide (25%) และ glycerol (30%) ถึงแม้ว่าวิธีวิทริฟิเคชัน จะยังพบปัญหาอยู่แต่เมื่อเปรียบเทียบประโยชน์กับวิธีการแช่แข็งแบบ freezing พบว่าอุปกรณ์ที่ใช้ราคาถูกกว่า ขั้นตอนในการทำงานง่ายกว่า และใช้เวลาเพียงเล็กน้อย (Palasz และ Mapletoft. 1996)¹⁶ การตั้งท้องหรือการเกิดลูกหลังการย้ายฝากเอ็มบริโอที่ผ่านการแช่แข็งนั้น เป็นตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพของการแช่แข็งเอ็มบริโอที่พัฒนาสูงสุดและสามารถนำไปใช้ได้ดี ดังแสดงในตาราง 1 ซึ่งแสดงผลสำเร็จของการเกิดลูกจากเอ็มบริโอที่ผ่านการแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเคชัน ในสัตว์แต่ละชนิด

ตาราง 1 ผลสำเร็จของการแช่แข็งเอ็มบริโอด้วยวิธีวิทรีฟิเคชัน (ที่มา: Kasai et al. 2002)²⁴

ชนิดสิ่งมีชีวิต	ระยะเอ็มบริโอ	ผู้ศึกษา
Hamster	1-2-cell embryo	Lane และคน อื่น ๆ (1999a) ²⁵
Mouse	Blastocyst	Lane และคน อื่น ๆ (1999b) ²⁶
Pig	Unhatched blastocyst	Berthelot และคน อื่น ๆ (2000) ²⁷
Pig	early blastocyst	Cameron และคน อื่น ๆ (2000) ²⁸
Cow	Morula/ Blastocyst	Lazar และคน อื่น ๆ (2000) ²⁹
Human	Blastocyst	Mukaida และคน อื่น ๆ (2001) ³⁰
Human	Blastocyst	Cho และคน อื่น ๆ (2002) ³¹
Mouse	1-cell embryo	Bagis และคน อื่น ๆ (2002) ³²

2.3 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการแช่แข็ง

การแช่แข็งจะประสบความสำเร็จนั้นขึ้นกับหลายปัจจัยได้แก่ (ดวงใจ บุญกุล. 2008)²⁰

1. อัตราการลดอุณหภูมิระหว่างการแช่แข็งเอ็มบริโอมีส่วนสำคัญต่ออัตราการรอดมาก หากใช้ความเร็วเกินไป มีผลทำให้น้ำในเซลล์มีเวลาออกจากเซลล์ได้น้อยและเหลืออยู่ในเซลล์กลายเป็นเกล็ดน้ำแข็งที่อยู่ภายในเซลล์มาก หรือตรงกันข้ามหากใช้ความเร็วช้าเกินไปจะมีผลทำให้น้ำในเซลล์มีโอกาสออกจากเซลล์ได้มาก เกิดความเสียหายจากความเข้มข้นของอิเล็คโตรไลต์ภายในเซลล์มีความเข้มข้นสูงเกินไป

2. อัตราการเพิ่มอุณหภูมิระหว่างการทำละลาย ความเร็วของการทำละลายขึ้นกับความเร็วของการแช่แข็งและอุณหภูมิสุดท้ายก่อนจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว ซึ่งทั้งสองกรณีเกี่ยวข้องกับปริมาณน้ำที่เหลืออยู่ในเซลล์ โดยหากมีน้ำเหลืออยู่ในเซลล์มาก การใช้ความเร็วในการทำละลายช้าจะมีผลทำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งขึ้นในเซลล์ แต่หากมีน้ำเหลืออยู่ในเซลล์น้อยต้องใช้ความเร็วในการทำละลายช้าเพื่อปรับสภาพสมดุลของตัวทำละลาย

3. ชนิดและความเข้มข้นของสารป้องกันการแช่แข็ง สารป้องกันการแช่แข็งมีหน้าที่สำคัญในการป้องกันการทำละลายของเซลล์ในระหว่างการแช่แข็งและการทำละลายชนิดของสารป้องกันการแช่แข็งมี 3 กลุ่ม คือ

3.1 สารที่สามารถซึมผ่านเข้าเซลล์ได้ (permeating cryoprotectant) สามารถเข้าไปแทนที่น้ำในเซลล์ เพื่อช่วยลดการเปลี่ยนแปลงปริมาตรของเซลล์อย่างกะทันหันและช่วยป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง ตัวอย่างเช่น methanol (MW 32.04) ethylene glycol (MW 62.07) propandiol (MW 76.1) dimethyl sulfoxide (MW 78.13) Butanediol (MW 90.12) และ glycerol (MW 92.1)

3.2 สารที่ไม่สามารถซึมผ่านเข้าเซลล์ได้ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low molecular weight- nonpermeating cryoprotectant) ทำหน้าที่ร่วมกับสารที่ซึมผ่านเข้าเซลล์ได้ช่วยดึงน้ำออกจากเซลล์ให้เร็วขึ้น ตัวอย่างเช่น galactose (MW 180.2) glucose (MW 181.1) sucrose (MW 342.3) และ trehalose (MW 378.3)

3.3 สารที่ไม่สามารถซึมผ่านเข้าเซลล์ได้ที่มีน้ำหนัก โมเลกุลสูง (high molecular weight- nonpermeating cryoprotectant) (MW > 50,000 D) ทำหน้าที่ช่วยป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งรอบนอกของเซลล์ ตัวอย่างเช่น polyvinyl pyrrolidone, polyvinyl alcohol และ sodium hyaluronate

4. อุณหภูมิของการชักนำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็ง จากการศึกษาของ Whittingham ในปี ค.ศ. 1972 ในหนูเม้าส์พบว่าอุณหภูมิที่ชักนำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งมีผลต่ออัตราการรอดของเอ็มบริโอโดยหากต่ำกว่า -6°C /นาที จะมีอัตราการรอดชีวิตลดลงอย่างมาก และชักนำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็ง ควรให้เอ็มบริโอปรับตัวประมาณ 5 ถึง 10 นาที เรียกว่า “เวลาสมดุล (equilibration time)”

5. ระยะของเอ็มบริโอ ความทนทานต่อการแช่แข็งจะเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาของเอ็มบริโอที่พัฒนาขึ้น เอ็มบริโอระยะต้น ๆ หลังการปฏิสนธิจะไวต่อการแช่แข็ง และมักไม่ประสบความสำเร็จในการแช่แข็งเท่าที่ควร เอ็มบริโอระยะมอรูล่า หรือระยะบลาสโตซิสต์ จะมีความทนต่อการแช่แข็งมากกว่าเอ็มบริโอระยะ 2, 4, 8 และ 16 เซลล์ ตามลำดับ

6. ระยะเวลาจากการเก็บเอ็มบริโอจนถึงการแช่แข็ง เป็นที่ทราบกันดีว่าเอ็มบริโอที่เก็บได้หากต้องการแช่แข็งควรทำทันที มิฉะนั้นเอ็มบริโอจะมีคุณภาพลดลงเมื่อเวลาที่อยู่นอกร่างกาย นานขึ้น ระยะเวลาที่เหมาะสมไม่ควรเกิน 3 ชั่วโมง หากเกินอัตราการเจริญของเอ็มบริโอจะลดลงโดยต้องระวังเรื่องของสภาพอากาศร้อนเป็นพิเศษ เพราะจะทำให้เกิดความเสียหายต่อเอ็มบริโอเร็วขึ้น หากไม่ทำการแช่แข็งทันทีต้องเก็บเอ็มบริโอในตู้ควบคุมอุณหภูมิ $37-38^{\circ}\text{C}$

7. คุณภาพของเอ็มบริโอ คุณภาพของ เอ็มบริโอของสัตว์ มีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดชีวิตหลังการแช่แข็ง ตัวอย่างเช่นการศึกษาในโคพบว่าเอ็มบริโอ สัตว์ที่ไม่ได้แช่แข็งมีความสัมพันธ์ กับอัตราการตั้งท้องของแม่โคตัวรับ เช่นเดียวกับคุณภาพของ เอ็มบริโอ หลังการแช่แข็งและทำละลายที่มีผลต่อการพัฒนาในหลอดทดลองและหลังย้ายฝากในโคตัวรับ ตัวอ่อนที่ปกติในเกรด 1 (ดีมาก) หลังแช่แข็งจะให้อัตราการตั้งท้องสูงกว่า เอ็มบริโอที่อยู่ในเกรด 2 (ดี) ประมาณ 10-20% การทดลองของ Wright (1985)³³ แสดงให้เห็นว่าเอ็มบริโอโคระยะมอรูล่า บลาสโตซิสต์ระยะแรก และบลาสโตซิสต์ที่มีคุณภาพเกรด 1 ที่มีลักษณะดีหลังทำละลายให้อัตราการตั้งท้องดีกว่าเอ็มบริโอที่มีคุณภาพเกรด 2 และ 3 ดังข้อมูลในตาราง 2

ตาราง 2 ผลของคุณภาพของเอ็มบริโอโคแซ่แข็งหลังการย้ายฝาก (ที่มา: Wright. 1985)³³

คุณภาพ (เกรด)	จำนวนเอ็มบริโอ		อัตราการตั้งท้อง(%)	
	หลังทำละลาย	ปกติที่ย้ายฝากได้	หลังทำละลาย	ปกติที่ย้ายฝากได้
1	470	440(93.6%)	40.5%	43.2%
2	315	247(87.0%)	22.3%	25.6%
3	47	30(63.8%)	14.9%	23.4%



บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. สารเคมีและสารละลาย

M2 medium	SIGMA®	M7167
M16 medium	SIGMA®	M7296
BSA (Ablumin bovine serum)	SIGMA®	A9647
D-(+)-Trehalose Dihydrate, ≥ 99%	SIGMA®	T0167
Polyvinylpyrrolidone	SIGMA®	PVP40
Ethylene Glycol	SIGMA®	E9129
Mineral oil	SIGMA®	M8410
pentobarbital	Nembutal®	
Normal saline		

M2 Medium สารละลายนี้นำมาใช้เป็นตัวทำละลายสารป้องกันการแช่แข็งที่นำมาใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ เพื่อใช้เป็นสารละลายสำหรับการแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเคชัน

M16 Medium เป็นสารละลายที่ใช้เลี้ยงเอ็มบริโอในตู้ปลอดเชื้อ เพื่อดูการเจริญภายในหลอดทดลองของเอ็มบริโอหนูแรดส์ซีเมียและเป็นสารละลายที่ย้ายฝากพร้อมกับเอ็มบริโอหนูฉีดเข้าไปยังแม่ตัวรับเพื่อดูการเจริญภายในตัวสัตว์

Mineral oil นำมาคลุมสารละลาย M16 Medium ในจานเลี้ยงเซลล์เพื่อป้องกันการรวมกันของดรอปสารละลายเพื่อควบคุมพื้นที่ของสารละลาย M16 ไม่ให้ไหลรวมกัน และป้องกันการระเหยของสารละลายเมื่อนำไปเลี้ยงเอ็มบริโอภายในตู้ปลอดเชื้อ

Normal saline นำเกลือนำมาเป็นตัวเจือจางสาร pentobarbital เพื่อให้ได้ 10% Nembutal® ฉีดหนูเพื่อทำให้หนูสลบโดยเข้าทางช่องท้อง (Intraperitoneal) ในปริมาณ 0.1 µl ต่อน้ำหนักตัว 10 กรัม

2. สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองหนูธาลัสซีเมียมีทั้งหมด 4 สายพันธุ์คือ

1. หนู IVSII-654 (654) เป็น transgenic mice ซึ่งยีน β^{major} และ β^{minor} -globin บนโครโมโซม 7 ของหนูถูกแทนที่ (knock-in) ด้วยยีนธาลัสซีเมีย (IVSII-654,C->T ของมนุษย์ หนู heterozygote IVSII-654 จะมีอาการของโรค thalassaemia ส่วนหนู homozygote IVS II-654/ IVS II-654 จะตายตั้งแต่อยู่ในครรภ์ (Lewis et al.1998)⁷

2. หนู β^{th3} (BKO) เป็น transgenic mice ซึ่งยีน β^{major} และ β^{minor} -globin บนโครโมโซม 7 ของหนูถูกตัดทิ้งไป (knock-out) หนู heterozygote β^{th3} จะมีอาการของโรค thalassaemia ส่วนหนู homozygote $\beta^{\text{th3/th3}}$ จะตายตั้งแต่อยู่ในครรภ์ (Yang et al.1995)³⁴

3. หนู β^{E} เป็น transgenic mice ที่มีการสอดแทรกยีนทั้งกลุ่มบน β -globin gene cluster ของคนเข้าไปบนโครโมโซมหนู โดยยีน β -globin จะเป็นยีน β^{E} -globin หนู β^{E} มี 2 ชนิดคือ

3.1 หนู β^{E2} (E2) เป็น transgenic mice ที่มีการสอดแทรกยีน β^{E} -globin ของคนเข้าไป 2 ชุดบนโครโมโซม 6 (Jamsai et al.2006)⁶

3.2 หนู β^{E4} (E4) เป็น transgenic mice ที่มีการสอดแทรกยีน β^{E} -globin ของคนเข้าไป 4 ชุดบนโครโมโซม 2 (Jamsai et al.2006)⁶

3. การบริหารจัดการเลี้ยงสัตว์ทดลอง

ได้ทำการเลี้ยงหนูธาลัสซีเมียที่ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองของศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ ที่มีการควบคุมสภาพแวดล้อมในห้องเลี้ยงในระบบ Low Barrier/Non-HVAC ซึ่งควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 2 °C และความชื้นสัมพัทธ์ระหว่าง 50-90 % ความเข้มของแสง 130-325 Lux โดยมีอัตราส่วนของแสงสว่าง/ความมืด 12:12 ชม. ได้รับอาหารและน้ำดื่มตลอดเวลา (ad libitum) มีการป้องกันการติดเชื้อในน้ำดื่ม โดยการให้น้ำกรอง Ro ที่มีความเข้มของคลอรีน 10-12 ppm. อาหารเม็ด No.082 ผลิตโดยโรงงานผลิตอาหารสัตว์ที่เชื่อถือได้ในประเทศไทย สัตว์ทดลองถูกเลี้ยงในกรงสแตนเลสที่มีขนาด 6x10.5x5 นิ้ว (กว้างxยาวxสูง) จำนวนสัตว์ทดลอง 5 ตัวต่อกรง และมีการปฏิบัติดูแลเป็นไปตามมาตรฐานของ Guide for the Care and Use of Laboratory Animal (มยรฉัตร สะอาดฤทธิ์. 2553)³⁵

4. การผสมพันธุ์หนูธาลัสซีเมีย

ผสมพันธุ์หนูธาลัสซีเมียด้วยวิธี Congenic mating คือการผสมพันธุ์เพื่อรักษาสายพันธุ์ของหนูที่มียีนที่เรา ต้องการในหนูที่เป็นโมเดลของโรค โดยหนูธาลัสซีเมียที่ตรวจพบ ซึ่งมียีนที่ต้องการจะนำมาผสมกับหนู wild type (C57BL/6) ถ้าหนูธาลัสซีเมียเป็นเพศผู้ จะนำหนูเพศเมียปกติมาผสม และถ้าหนูธาลัสซีเมียเป็นเพศเมียก็จะนำหนู wild type เพศผู้มาผสมและนำรุ่นลูกที่เกิด

มาตรวจสอบหาหนูที่เป็นหนูที่มียีนธาลัสซีเมีย เพื่อจะนำมาทำการผสมพันธุ์ดังได้กล่าวมาแล้วต่อไป เมื่อลูกเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์

5. การตรวจจีโนไทป์ของหนู

การตรวจสอบจีโนไทป์ ของหนูจากเนื้อเยื่อ ปลายหางหนู ทำได้โดยการตัดหางหนูที่มี อายุ 15 วันหลังการย้ายฝาก ยาวประมาณ 0.3-0.5 ซม. และจากจุดเลือดที่แสดงการฝังตัวแต่ไม่เจริญเป็น เอ็มบริโอ นำไปสกัด DNA ด้วย phenol/chloroform แล้วนำ DNA ที่ได้มาตรวจสอบหา ยีนธาลัสซีเมียด้วยเทคนิค multiplex PCR (Vadolas et al. 2005) โดยใช้ primer 3 คู่ คู่แรกจำเพาะต่อยีน β -globin ของหนูให้ PCR product ขนาด 260 bp คู่ที่สองจำเพาะต่อยีน β^E -globin ของมนุษย์ให้ PCR product ขนาด 447 bp และ primer คู่สุดท้ายจำเพาะกับโครโมโซมหนูที่ถูกแทนที่ด้วยยีน HPRT (hypoxanthine phosphoribosyl transferase) ซึ่งจะให้ PCR product ขนาด 315 bp ผลของ PCR fragment จะบ่งบอกถึงจีโนไทป์ของหนู

โดยใช้ primer 3 คู่ ได้แก่

1. mouse-hFw, mouse-hRev: mouse β -actin gene

Mouse-h Fw, 5'-TGAGAAGGCTGCTGTCTCTTG-3'

Mouse-h Rev, 5'-AGAGGATAGGTCTCCAAAGCTA-3'

2. LUG1A, LUG2A : human β -globin gene

LUG1A, 5'-ACAAGACAGGTTTAAGGAGACCA-3'

LUG2A, 5'-GTCTGTTTCCCATTCTAAACTGTA-3'

3. HPRT-Fw, HPRT-Rev : HPRT gene

HPRT-Fw , 5'-GATGGGAGGCCATCACATTGTAG-3'

HPRT-Rev, 5'-GCGACCTTGACCTCTTTGGATTA-3'

การสกัด DNA จากหางหนูและจุดเลือดของเอ็มบริโอที่ฝังตัวแต่ไม่เจริญต่อไปเป็นฟีตัส

1. นำตัวอย่างมาบดให้ละเอียดแล้วเติมน้ำยา lysis buffer ปริมาณ 500 μ l และเติมสาร proteinase K 10 μ l ที่มีความเข้มข้น 10 mg ใน 1 ml เพื่อทำการย่อยหางหนูและจุดเลือดของแต่ เอ็มบริโอ ในหลอดขนาด 1.5 ml

2. ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ประมาณ 3-5 ชั่วโมงในน้ำยา regular gentle mixing เพื่อให้ย่อยอย่างสมบูรณ์

3. เติมสาร silicones , chloroform ปริมาณ 250 μ l และ phenol ปริมาณ 250 μ l และ ขย่ำส่วนผสมในหลอดให้ผสมกัน

4. แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องที่ 12,000 rpm นาน 5 นาที

5. เอาส่วนบนของหลอดทดลองออกไปเติมด้วย absolute-ethanol 700 μ l ซึ่งแช่เย็นที่

อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และเติม NaCl 4 μ l ที่มีความเข้มข้น 4 M ผสมให้เข้ากัน

6. นำไปปั่นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

7. นำมาปั่นด้วยเครื่อง ที่ 12,000 rpm นาน 5 นาที

8. จะได้ DNA ที่ยังไม่บริสุทธิ์ นำมาล้างด้วย 70% ethanol 1 มิลลิลิตร แล้วปล่อยให้แห้ง

ให้แห้ง

9. แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่อง 12,000 rpm นาน 5 นาที

10. ได้ตะกอน DNA ที่บริสุทธิ์ เติมน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร และละลายที่อุณหภูมิห้อง และใช้ 1 ไมโครลิตร ใน 25 ไมโครลิตรของ PCR reaction

11. เมื่อได้ PCR product นำมา 25 ไมโครลิตรและใส่ loading dye 1.5 ไมโครลิตรทำปฏิกิริยาใน 2% Agarose gel ใช้ไฟ 100 โวลต์ นาน 35 นาที จำนวน 30 รอบ

12. แล้วนำมาย้อมด้วย ethidium bromide นาน 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 5 นาที

13. นำ gel ที่ได้มาตรวจดูผลภายใต้แหล่งกำเนิดแสง UV

14. ทำการบันทึกภาพเป็นหลักฐานและทำการจดบันทึกผล

ขั้นตอนต่าง ๆ ของ PCR

1. ทำการแยกสายดีเอ็นเอเส้นคู่ออกจากกันโดยใช้ความร้อน ส่วนใหญ่จะใช้อุณหภูมิประมาณ 94°C ซึ่งจะทำลายพันธะไฮโดรเจนที่ยึดติดดีเอ็นเอเส้นคู่ทำให้ดีเอ็นเอแยกออกจากกัน (denature)

2. ลดอุณหภูมิลงมาที่ประมาณ 50-60°C ซึ่งจะทำให้ไพรเมอร์มาจับดีเอ็นเอ (anneal) ตรงบริเวณที่จำเพาะ

3. เพิ่มอุณหภูมิขึ้นจนถึง 72-74°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ Taq DNA polymerase (เอนไซม์ที่แยกได้จากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* ที่อาศัยอยู่บริเวณน้ำพุร้อน) เอนไซม์นี้สังเคราะห์ดีเอ็นเอเส้นใหม่ โดยอาศัย dNTPs เป็นสารตั้งต้น จะเห็นว่าเมื่อทำ PCR 1 รอบ ถ้าเริ่มจากดีเอ็นเอเส้นคู่ 1 โมเลกุลจะทำให้ได้ดีเอ็นเอเส้นคู่ 2 โมเลกุล

4. จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 94°C อีกครั้งเพื่อเริ่มการทำ PCR รอบใหม่จนกระทั่งครบ 30 รอบจะทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอในขนาดที่ต้องการเพิ่มขึ้นมากกว่า 250 ล้านโมเลกุลผลผลิตของ PCR ที่เกิดขึ้นสามารถนำไปวิเคราะห์ต่อโดยการนำไปแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าเพื่อดูขนาดของแถบดีเอ็นเอว่าตรงตามที่ต้องการหรือไม่ (ผศ.ดร. ปรีนทร์ ชัยวิสุทธางกูร. 2550)³⁶

การตั้งโปรแกรมปฏิกิริยา PCR

PCR เป็นกระบวนการที่ทำซ้ำกันหลายรอบ ประกอบด้วยการแยกดีเอ็นเอต้นแบบด้วยความร้อน (denaturation) การจับกันระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเส้นเดี่ยว (annealing) และการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเส้นใหม่โดยเอนไซม์ DNA polymerase (extension)

1. การแยกดีเอ็นเอด้วยความร้อน การแยกดีเอ็นเอเส้นคู่ออกจากกันนั้นส่วนหนึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณ GC ของดีเอ็นเอ ถ้ามีปริมาณ GC สูงก็ต้องใช้อุณหภูมิสูง และถ้าดีเอ็นเอมีขนาดยาวก็ต้องใช้เวลานานขึ้นในการแยกสายดีเอ็นเอออกจากกันอย่างสมบูรณ์ อุณหภูมิที่ใช้คือ 94-95 °c ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เอนไซม์สามารถทนได้ในการทำ PCR ประมาณ 30 รอบ หรือมากกว่า ในช่วงแรกๆ ของการทำ PCR มักใช้เวลาในการแยกดีเอ็นเอประมาณ 5 นาที (initial denaturation) เพื่อให้ดีเอ็นเอต้นแบบที่มีขนาดยาวแยกจากกันอย่างสมบูรณ์ ต่อมาในการทำ PCR แต่ละรอบ อาจใช้เวลาประมาณ 45 วินาที ที่อุณหภูมิ 94-95 °c ในการทำให้ดีเอ็นเอเส้นตรงที่มีปริมาณ GC ร้อยละ 55 หรือน้อยกว่าแยกออกจากกัน

2. การจับกันของไพรเมอร์และดีเอ็นเอต้นแบบ อุณหภูมิที่เหมาะสมมักมีค่าต่ำกว่าค่า T_m ของไพรเมอร์ประมาณ 3-5 °c อย่างไรก็ตามเครื่อง thermal cycle สามารถตั้งโปรแกรมให้มี annealing temperature ที่ลดลงต่อเนื่องในแต่ละรอบของการทำ PCR ทำให้สามารถหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำ PCR เพียงครั้งเดียว วิธีนี้เรียกว่า touchdown PCR

3. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิ 72-78 °c สำหรับอัตราการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของ *Taq polymerase* คือประมาณ 2,000 นิวคลีโอไทด์ต่อนาที แต่อย่างไรก็ตามมักจะใช้กฎว่า การสังเคราะห์ดีเอ็นเอในการทำ PCR มักใช้เวลา 1 นาที ต่อทุกๆ 1,000 คู่เบส และในรอบสุดท้ายของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (final extension) มักมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ใช้เวลานานกว่ารอบก่อนๆ ประมาณ 3 เท่า เพื่อให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอทั้งหมดให้มีความยาวตามที่ต้องการ (ผศ.ดร. ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร. 2550)³⁶

การทดลองในครั้งนีตั้งโปรแกรมปฏิกิริยา PCR ดังนี้

PCR set up

- BMN	6	ไมโครลิตร
- Primer Mix	2.5	ไมโครลิตร
- Taq	0.1	ไมโครลิตร
- D.W.	15.4	ไมโครลิตร
- DNA	1	ไมโครลิตร
ทั้งหมด	25	ไมโครลิตร

PCR Condition

94 °C	5	นาที	} 30 รอบ
94 °C	30	วินาที	
55 °C	30	วินาที	
72 °C	30	วินาที	
72 °C	10	นาที	
4 °C	α		

Working primer (stock 2 μM)

Mouse β primer

Fw	5	ไมโครลิตร
Rev	5	ไมโครลิตร
D.W.	120	ไมโครลิตร

HPRT primer

Fw	5	ไมโครลิตร
Rev	5	ไมโครลิตร
D.W.	120	ไมโครลิตร

Human β primer

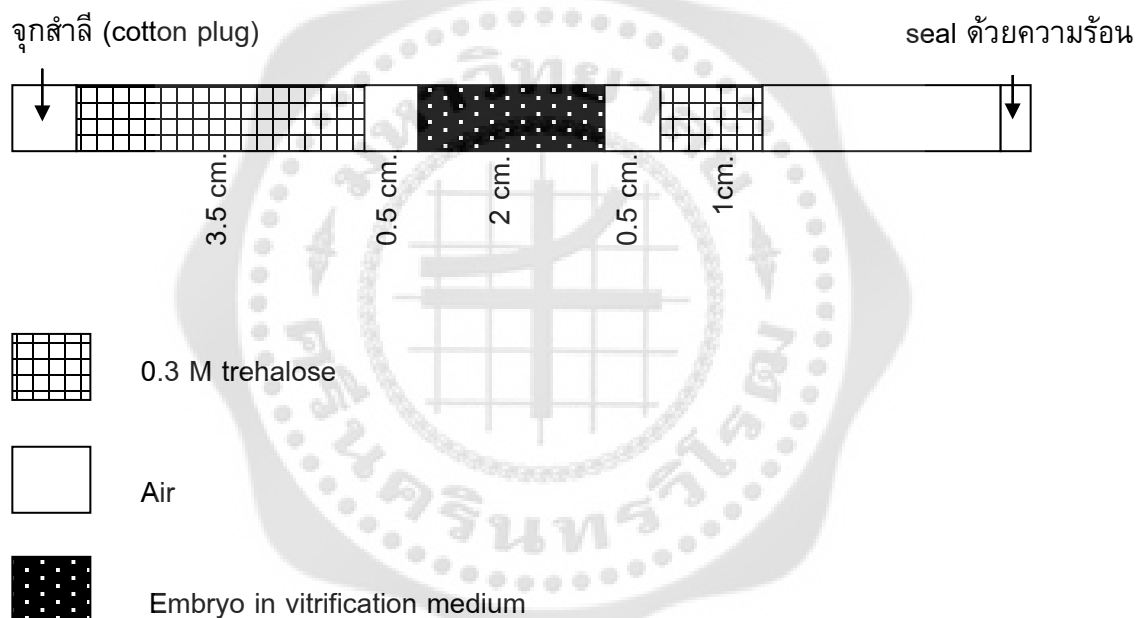
LUG1A	5	ไมโครลิตร
LUG2A	5	ไมโครลิตร
D.W.	120	ไมโครลิตร

6. การศึกษาการแข่งแ่งเอ็มบริโอหนูธาลัสซีเมีย

เอ็มบริโอหนูธาลัสซีเมียที่ใช้ในการทดลองนี้ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างหนูเพศเมีย wild type (C57BL/6) กับหนูธาลัสซีเมียเพศผู้ โดยทำ superovulation หนูเพศเมีย wild type ด้วยการฉีดฮอร์โมน Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) 5 IU และหลังจากนั้น 48 ชั่วโมง ฉีดฮอร์โมน human Chorionic Gonadotrophin (hCG) 5 IU จากนั้นจับคู่กับหนูธาลัสซีเมียเพศผู้ ตรวจสอบการผสมโดยดูจาก vaginal plug หลังจากผสมพันธุ์กับหนูเพศผู้ ประมาณ 20 ชั่วโมง ผ่าตัดนำท่อหน้าไข่ออกมาเพื่อชะล้างเอ็มบริโอระยะไซโกต (ภาพประกอบ 4) โดยใช้สารละลาย M2 และเลี้ยงต่อในสารละลายสำหรับเลี้ยงเอ็มบริโอ M16 ในตู้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO₂ จนได้เอ็มบริโอระยะ 8-16 เซลล์ จากนั้นเลือกเฉพาะเอ็มบริโอที่มีคุณภาพดี มาแข่ง โดยวิธี วิทริฟิเคชัน

ขั้นตอนการแช่แข็งด้วยวิธี in-straw vitrification และการอุ่นคืนสภาพ (thawing)

1. นำเอ็มบริโอระยะบลาสโตซิสต์ลงแช่ในละลาย holding medium ที่มี bovine serum albumin (BSA) 0.4 mg/ml นาน 5-10 นาที
2. หลังจากนั้นนำมาแช่ในสารละลาย equilibration medium ที่มีการเติม 4% ของ ethylene glycol (EG) ในสารละลาย holding medium นาน 3-5 นาที
3. แล้วนำแช่ในสารละลาย vitrification solution ที่มีการเติม 35% EG, 5% PVP, 0.3 M Trehalose ในสารละลาย holding medium นาน 20 วินาที แล้วรีบทำการดูดน้ำยาเข้าหลอดพลาสติกขนาด 0.25 ml เพื่อบรรจุเอ็มบริโอ ดังภาพประกอบ 3



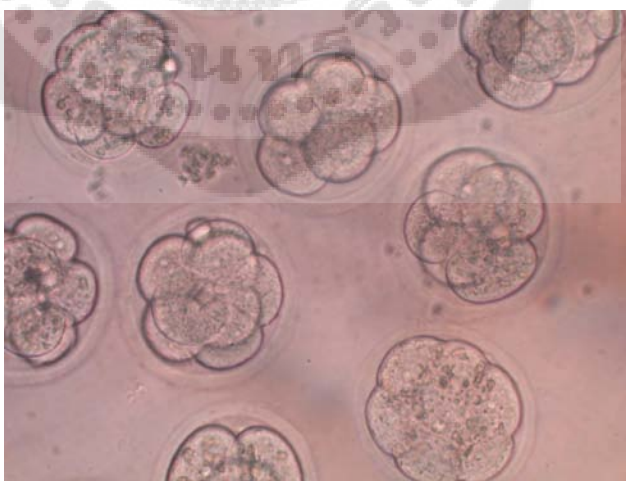
ภาพประกอบ 3 หลอดพลาสติก (straw) ขนาด 0.25 ml ที่มีสารละลายป้องกันการแช่แข็งและเอ็มบริโอบรรจุอยู่ในหลอด

การอุ่นคืนสภาพเริ่มจากการนำ หลอดเก็บเอ็มบริโอ ออกมาจากถังไนโตรเจนเหลวและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 20 วินาที จากนั้นใส่ในอ่างน้ำอุ่น 35 °C 10 วินาที ตัดปลายทั้งสองด้านของ straw เพื่อนำเอ็มบริโอออกมา แล้วใส่ในสารละลาย 0.3 M, 0.15 M และ 0.075 M trehalose ขั้นตอนละ 3 นาที ตามลำดับ แล้วนำมาแช่ในน้ำยา holding medium 5-10 นาที ล้างเอ็มบริโอในสารละลาย M16 และเลี้ยงเอ็มบริโอต่อใน M16 ในตู้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ จนได้เอ็มบริโอระยะบลาสโตซิสต์ เพื่อติดตามอัตราการเจริญเติบโตในหลอดทดลอง (*in vitro* development) เมื่อได้เอ็มบริโอระยะบลาสโตซิสต์ให้นำมาย้อมสี Hoechst 33342 ที่มีความเข้มข้น 10 µg/ml เป็นเวลา 10

นาที่ในที่มีด ที่อุณหภูมิห้องหลังจากนั้นนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ฟลูออเรสเซนซ์เพื่อ นับจำนวนเซลล์ในบลาสโตซิส เอ็มบริโอบางส่วนนำไปย้ายฝาก (embryo transfer) เข้าแม่ตัวรับเพื่อ ตรวจสอบอัตราการเจริญภายในตัวสัตว์ (*in vivo* development) และเกิดเป็นลูกหนู จากนั้นนำ ลูกหนูไปศึกษาต่อไป



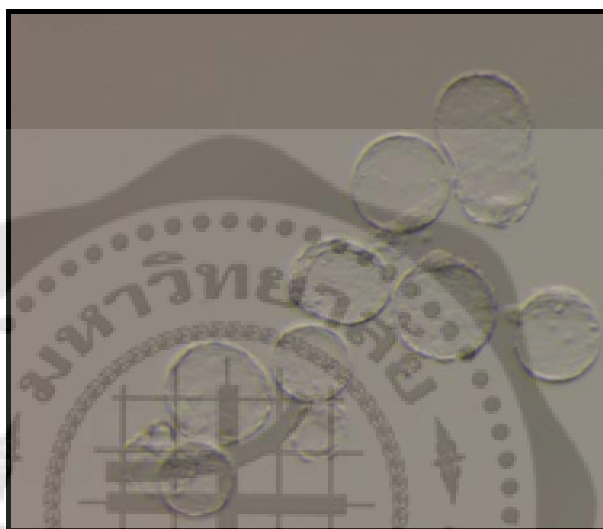
ภาพประกอบ 4 แสดงวิธีการชะล้างเอ็มบริโอจากท่อหน้าไข่ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ



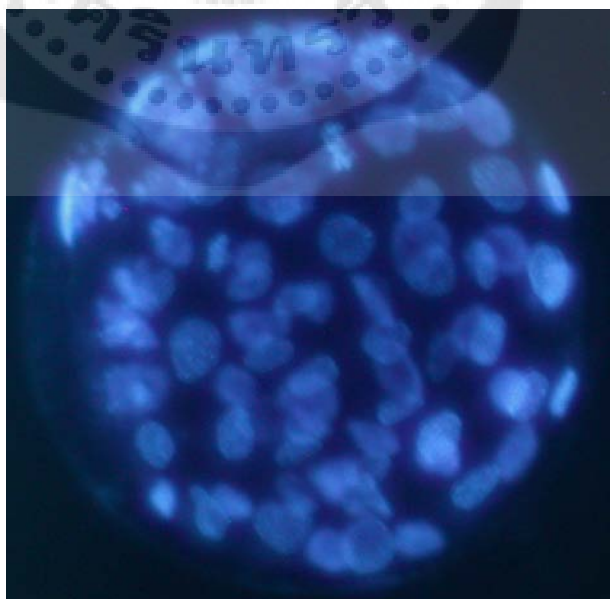
ภาพประกอบ 5 แสดงจำนวนเซลล์ของเอ็มบริโอระยะ 8-16 เซลล์ (x400)

7. การนับจำนวนเซลล์ของเอ็มบริโอระยะบลาสโตซิส

นำเอ็มบริโอที่ผ่านการแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเคชัน มาทำการอุ่นคืนสภาพ ทั้ง 4 สายพันธุ์ และนำไปเลี้ยงต่อในตู้ปลอดเชื้อควบคุมอุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ ประมาณ 34 ชั่วโมง เอ็มบริโอเจริญจนถึงระยะบลาสโตซิส แล้วนำบลาสโตซิสที่ได้นำมาใส่ในหยดสารละลายสี Hoechst 33342 ที่มีความเข้มข้น 10 ug/ml แช่ทิ้งไว้นาน 10 นาที ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ เพื่อนับจำนวนเซลล์ในแต่ละเอ็มบริโอในระยะบลาสโตซิส



ภาพประกอบ 6 เอ็มบริโอระยะบลาสโตซิส (x200)



ภาพประกอบ 7 สีฟ้าแสดงจำนวนเซลล์ของเอ็มบริโอระยะบลาสโตซิส (x1000)

8. การย้ายฝากเอ็มบริโอ

ตรวจสอบจำนวนเอ็มบริโอที่ผ่าน การแช่แข็งแล้วมีชีวิตรอดหลังจากการอุ่นคืนสภาพ โดยแยกนำไปเลี้ยงในตู้ปลอดเชื้อที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C, 5% CO₂ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปย้ายฝากให้แม่ตัวรับหนูเมาส์เพศเมีย ICR ที่เป็นสัตว์พร้อมรับการผสม เพื่อให้พร้อมสำหรับการตั้งท้อง โดยผสมกับหนูเมาส์ ICR เพศผู้ ที่มีอายุ 8 สัปดาห์ ซึ่งได้ผ่าตัดเอาท่อนำสุจิออกไป เพื่อเป็นการทำหมันแต่ยังมีความสามารถในการผสม หลังจากนั้นนำหนูตัวเมียที่ผสมแล้วมาตรวจดู vaginal plug ตัวที่มี plug นำมาย้ายฝากที่ปีกมดลูกทั้งสองข้าง

8.1 ขั้นตอนการกระตุ้นการตกไข่จำนวนมาก (superovulation)

ฉีดฮอร์โมน PMSG ที่มีความเข้มข้น 5 IU ต่อตัวให้หนูเมาส์เพศเมีย หลังจากนั้น 46-48 ชั่วโมง ฉีดฮอร์โมน hCG ที่มีความเข้มข้น 5 IU ต่อตัวให้กับหนูเมาส์ เพศเมียเข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal) (ภาพประกอบ 8)



ภาพประกอบ 8 วิธีการควบคุมหนูเมาส์และการฉีดยาเข้าทางช่องท้อง

หลังจากนั้นนำหนูเมาส์ เพศเมียที่ได้รับการฉีดฮอร์โมนลงไปในกรงหนูเมาส์เพศผู้ในอัตราส่วนผสมพันธุ์ต่อกรง หนูเพศผู้ 1 ตัว ต่อหนูเพศเมีย 1 ตัว หลังจากฉีดฮอร์โมน hCG กรณีที่ต้องการเก็บเซลล์ไข่ (oocyte) จากท่อนำไข่ (oviduct) ต้องเก็บเซลล์ไข่ หลังจากฉีดฮอร์โมน hCG ที่ช่วงเวลาประมาณ 20-22 ชั่วโมง

8.2 ขั้นตอนการผ่าตัดอวัยวะสืบพันธุ์หนูเพศเมีย

8.2.1 นำหนูเมาส์ เพศเมียที่ได้รับการฉีดฮอร์โมน PMSG และ hCG ตามความเข้มข้นของสาร และตามเวลาที่กำหนดมาทำให้ตายอย่างสงบด้วยวิธีการดึง กระดูกต้นคอ (cervical dislocation) นำหนูเมาส์ เพศเมียที่ตายสนิท มาวางบนกระดาษทึบที่สะอาดโดยให้ คอว่าหน้าติดกับกระดาษทึบ ใช้สำลิจับด้วยแอลกอฮอล์ 70% ทำความสะอาดบริเวณด้านหลัง

8.2.2 ใช้กรรไกรตัดหนังบริเวณ ด้านหลัง ตามขวางประมาณ 1-2 เซนติเมตร (ภาพประกอบ 9) จับชั้นหนังที่ปกคลุมด้านหลังอย่างมั่นคงทั้งด้านบน และด้านล่างของรอยแผลดึงหนังขึ้นไปทางหัวและหางจนสุด สามารถมองเห็นส่วนของกล้ามเนื้อบริเวณ ด้านหลังนำปากคีบ (forceps) จับชั้นผิวหนังด้านหลัง และใช้กรรไกรตัด กล้ามเนื้อบริเวณโคนขา ทั้งสองด้านและดึงส่วนของไขมันที่ติดกับรังไข่ขึ้นมา



ภาพประกอบ 9 การเปิดชั้นหนังที่ปกคลุมด้านหลัง

8.2.3 นำปากคีบจับส่วนที่เป็นมดลูกไว้ด้านข้างลำตัวเพื่อให้มองเห็น ใช้กรรไกรตัด ส่วนที่เป็นท่อนำไข่ (oviduct) และรังไข่ (ovary) (ภาพประกอบ 10)

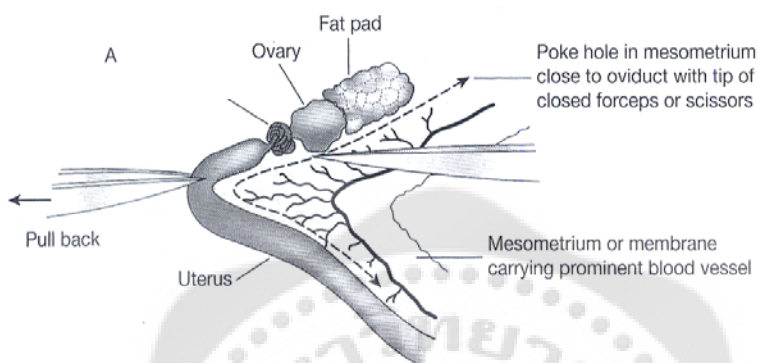


ภาพประกอบ 10 การตัดส่วนที่เป็นท่อนำไข่ (oviduct) และรังไข่ (ovary)

8.3 ขั้นตอนการเก็บเอ็มบริโอระยะ 1 เซลล์ (zygotes)

8.3.1 การเก็บเอ็มบริโอระยะ 1 เซลล์ (zygotes)

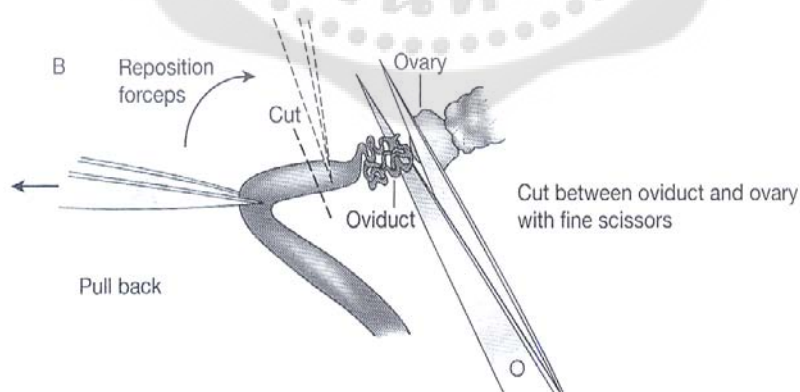
8.2.1.1 ใช้ปากคีบเนื้อเยื่อจับบริเวณด้านบนเกือบสุดของปลายปีกมดลูกและดึงมดลูก(uterus) ท่อนำไข่ (oviduct) และรังไข่ (ovary) อย่างนุ่มนวล ให้สามารถมองเห็นส่วนของ mesometrium หรือ membrane ใช้กรรไกรตัดเลาะบริเวณ mesometrium หรือ membrane ตามแนวลูกศร (ภาพประกอบ 11)



ภาพประกอบ 11 แนวการตัดเลาะส่วน mesometrium หรือ membrane ตามลูกศร

ที่มา: *Manipulating the mouse embryo* (2003)³⁷

8.3.1.1 ใช้ปากคีบเนื้อเยื่อดึงส่วนของ ท่อนำไข่ รังไข่ และ ก้อนไขมัน (fat pad) จากนั้นใช้ กรรไกรตัดบริเวณ รอยต่อระหว่างท่อนำไข่ และรังไข่ และเปลี่ยนแนวการจับของปากคีบ ขยับ เข้าใกล้ ท่อนำไข่ (ภาพประกอบ 11) และตัดที่ส่วนปลายของมดลูกใกล้กับท่อนำไข่ (ภาพประกอบ 12)



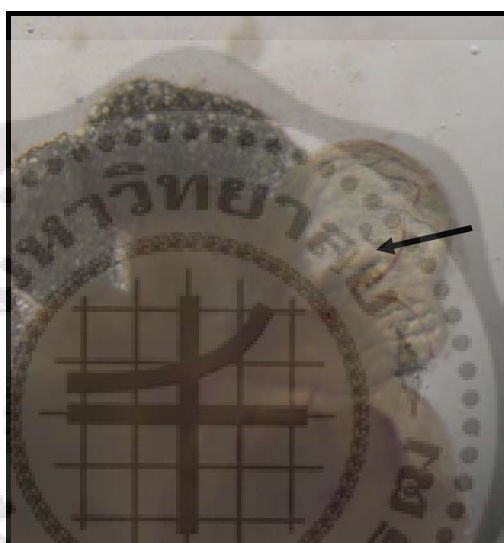
ภาพประกอบ 12 การใช้กรรไกรตัดบริเวณรอยต่อระหว่างท่อนำไข่ และรังไข่แนวการตัดเลาะส่วน mesometrium หรือ membrane ตามลูกศร

ที่มา: *Manipulating the mouse embryo* (2003)³⁷

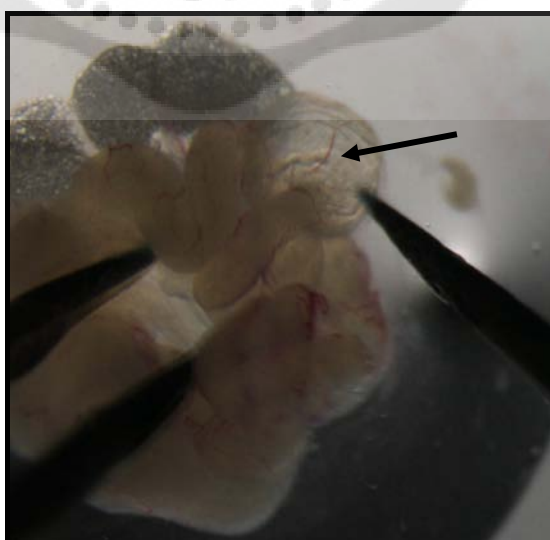
8.3.1.2 นำชิ้นส่วนของ ท่อนำไข่และมดลูกวางบนกระดาษกรอง จากนั้นใช้ปากคีบเนื้อเยื่อจับ ชิ้นส่วนของ ท่อนำไข่และมดลูกวางในจาน เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขนาด 35 มิลลิเมตร ที่มี M2 medium

8.3.1.3 นำไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ ที่กำลังขยาย 400X จะเห็นส่วนของ ampulla ที่บวมขยายใหญ่ (ภาพประกอบ 13)

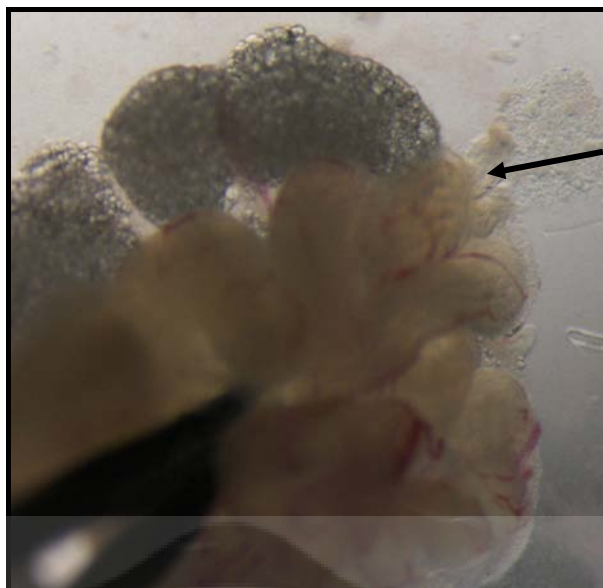
8.3.1.4 ใช้ปากคีบเนื้อเยื่อ ดึงส่วนของท่อนำไข่ และใช้เข็มปลายแหลม (collect needle) ฉีกส่วนของ ampulla ที่บวมขยายใหญ่ (ภาพประกอบ 14) ทำให้กลุ่มของเอ็มบริโอระยะ 1 เซลล์ (zygotes) ที่มี cumulus cells ล้อมรอบไหลออกมา (ภาพประกอบ 15)



ภาพประกอบ 13 บริเวณของ ampulla ที่บวมขยายใหญ่ (x400)

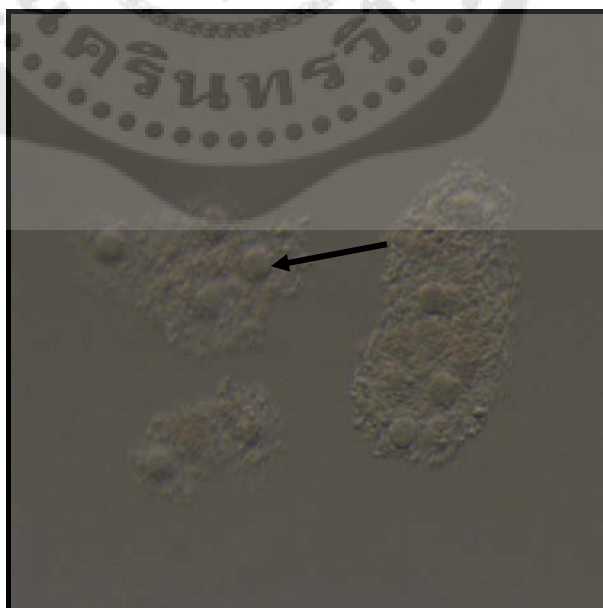


ภาพประกอบ 14 การใช้เข็มปลายแหลมฉีกส่วน ampulla ที่บวมขยายใหญ่ (x200)



ภาพประกอบ 15 เอ็มบริโอระยะ 1 เซลล์ (zygotes) ไหลออกมาจาก ampulla (x400)

8.3.1.5 ใช้ pipette แก้วดูดเอ็มบริโอระยะ 1 เซลล์ ที่มี cumulus cell ล้อมรอบ (ภาพประกอบ 16) มาล้างด้วยสารละลาย M16 2-3 ครั้ง นำใส่ลงใน droplets ของสารละลาย M16 ขนาด 60 μ l ในจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มี mineral oil (ภาพประกอบ 17) ปกคลุมจากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในตู้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C ในบรรยากาศ $5\% \text{CO}_2$ เป็นเวลานาน 48 – 50 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ เอ็มบริโอระยะ 8-16 เซลล์



ภาพประกอบ 16 เอ็มบริโอระยะ 1 เซลล์ (zygotes) ที่มี cumulus cell (x400)



ภาพประกอบ 17 สารละลาย M16 ขนาด 60 μ l ในจานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มี mineral oil

จากนั้นนำไปเก็บไว้ในตู้ปลอดเชื้อซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C ในบรรยากาศของ 5% CO₂ และมีความชื้นสูงมากกว่า 90% เพื่อนำไปแช่แข็งหรือเพาะเลี้ยง ต่อไปเป็นเวลานาน 72-84 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เอ็มบริโอระยะบลาสโตซิสต์

ขั้นตอนการเตรียมแม่ตัวรับจะต้องใช้หนูเม้าส์เพศเมียสายพันธุ์ ICR ที่มีอายุ 8 สัปดาห์ นำมาผสมกับหนูเพศผู้ที่ทำการผ่าตัดทำหมันแล้ว เพื่อปรับสภาพให้พร้อมเป็นแม่ตัวรับการย้ายฝาก เอ็มบริโอระยะ 8-16 เซลล์

9. การทำหมันหนูเพศผู้ด้วยวิธีการตัดท่อน้ำเชื้อ (vasectomy)

9.1 ให้ยาสลบสัตว์ทดลอง โดยนำหนูเม้าส์เพศผู้ อายุ 4 หรือ 5 สัปดาห์ มาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งดิจิทัล จากนั้นฉีด 10% Nembutal[®] (เจือจางใน normal saline) เข้าทางช่องท้อง (IP; Intraperitoneal) ในปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัว 10 กรัม

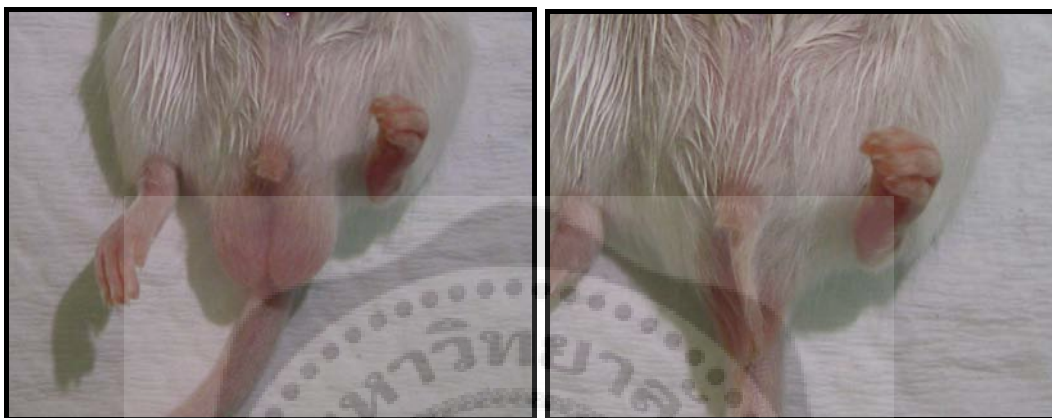
9.2 ปฏิบัติตามขั้นตอนการตรวจติดตาม เฝ้ารอ และประเมินสุขภาพหนู ทั้งก่อนผ่าตัด ระหว่างผ่าตัด และหลังผ่าตัดและคอยเฝ้ารอสังเกตสภาพหนู พร้อมทั้งบันทึกชื่อยาที่ใช้ ขนาดยาที่ใช้วิธีการให้ เวลาที่ให้ และการตรวจประเมินอัตราการเต้นของหัวใจ (HR/Pulse), อัตราการหายใจ (RR) และสภาพ mucous membrane color ในเชิงคุณภาพ ลงในฟอร์ม surgical and anesthetic record for survival surgery

9.3 หลังจากที่หนูสลบแล้วจัดวางให้อยู่บนกระดาษทิชชูปลอดเชื้อ ทำความสะอาดบริเวณหน้าท้องสัตว์ทดลองด้วยสำลีชุบด้วยแอลกอฮอล์ 70 % ใช้วิธี aseptic technique

9.4 ใช้ปากคีบหนีบจับชั้นผิวหนังตรงหน้าท้อง ใช้กรรไกรตัดเฉาะชั้นผิวหนังตามแนวยาวของ แฉกกลางลำตัว ยาวประมาณ 0.5-1.0 เซนติเมตร แยกชั้นผิวหนังและชั้นกล้ามเนื้อออก

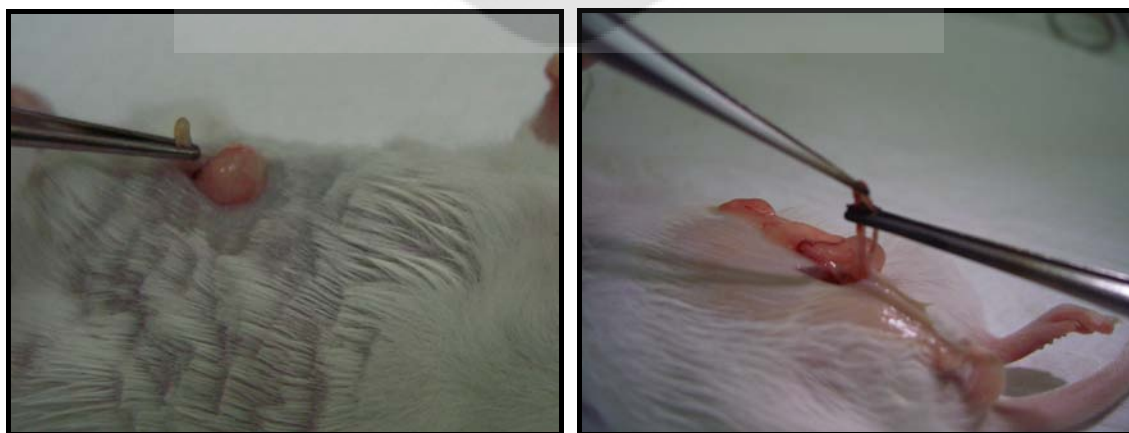
จากกันด้วยปากคืบเนื้อเยื่อและกรรไกร จากนั้นตัดชั้นกล้ามเนื้อด้วยกรรไกรตามแนวขวางของลำตัว ยาวประมาณ 0.5-1.0 เซนติเมตร)

9.5 ใช้มือดันอัณฑะ (testis) ขึ้นไปในช่องท้องอย่างนุ่มนวล (ภาพประกอบ 18) ใช้ปากคืบเนื้อเยื่อจับก้อนไขมัน (fat pad) ในช่องท้องที่ติดอยู่กับอัณฑะ (testis) ท่อนำน้ำเชื้อ (vas deferens) ท่อพักอสุจิ (epididymis) ขึ้นมาอย่างระมัดระวังและวางบนหน้าท้องสัตว์ทดลอง



ภาพประกอบ 18 ตำแหน่งปกติของอัณฑะหนู (ซ้าย) อัณฑะถูกดันขึ้นไปอยู่ในช่องท้อง (ขวา)

9.6 ใช้ปากคืบเนื้อเยื่อหนีบจับส่วนท่อนำน้ำเชื้อ (vas deferens) ในลักษณะท่อเป็นสายคู่รูปตัว U คว่า ทั้งสองข้างของท่อนำน้ำเชื้อ นำปากคืบอีกอันลงไฟให้ส่วนปลายร้อนด้วยตะเกียงแอลกอฮอล์ และนำมาหนีบส่วนของท่อนำน้ำเชื้อต้องหนีบเหนือปากคืบเนื้อเยื่ออันแรก (ภาพประกอบ 19) แล้วใช้ปากคืบที่ไม่ร้อนแยกปลายที่ขาด ออกจากกันจากนั้นนำก้อนไขมัน อัณฑะและส่วนอื่นๆ กลับเข้าช่องท้อง



ภาพประกอบ 19 ท่อนำน้ำเชื้อในลักษณะท่อเป็นสายคู่รูปตัว U คว่า (ซ้าย) ลักษณะการหนีบส่วนของท่อนำน้ำเชื้อ (ขวา)

9.7 แยกเย็บชั้นกล้ามเนื้อและชั้นผิวหนัง โดยวิธี simple interrupted suture โดยใช้เข็มเย็บและไหมชนิดละลาย เบอร์ 3/0 ทาแผลที่ผิวหนังด้วยน้ำยาเบตาดีน แล้วจับตัวสัตว์ทดลองเขย่าเบาๆ เพื่อให้อัมตะ กลับเคลื่อนไหวลงสู่จุดอัมตะดั้งเดิม

9.8 นำหนูเมาส์ไปให้ความอบอุ่นบนแท่นให้ความร้อน (hot plate) ที่อุณหภูมิ 37°C คอยเฝ้าระวังสังเกตสภาพสัตว์ทดลองจนกระทั่งสัตว์ทดลองฟื้น นำหนูเมาส์ไปใส่ในกรงสะอาดพร้อมวัสดุรองนอนปลอดเชื้อ และจึงนำกลับเข้าห้องเลี้ยงสัตว์

9.9 ตรวจสอบสุขภาพหนูเมาส์อย่างต่อเนื่องอีก 7 วัน หลังจากผ่าตัด โดยสังเกตพฤติกรรม และตรวจดูแผลผ่าตัดพร้อมบันทึกข้อมูลลงในฟอร์ม monitoring sheet for animal after surgery

9.10 ตรวจสอบประสิทธิ ภาพของการทำหมัน หนูเมาส์เพศผู้ภายหลังจากการผ่าตัด 3 สัปดาห์ โดยนำหนูเพศเมียอายุ 8-10 สัปดาห์ มาผสมพันธุ์ และตรวจการตั้งท้องของหนูเพศเมีย หลังจากที่อยู่กรงเดียวกันนานเกิน 3 สัปดาห์

9.11 หนูเมาส์เพศผู้ที่ผ่านการทำหมันอย่างสมบูรณ์แล้ว สามารถใช้ผสมพันธุ์กับเพศเมียเพื่อเป็นตัวรับการย้ายฝาก

10. การย้ายฝากเอ็มบริโอ (embryo transfer) เข้าแม่ตัวรับเพื่อตรวจสอบอัตราการเจริญภายในตัวหนูเมาส์ (*in vivo development*)

10.1 นำหนูเมาส์สายพันธุ์ ICR เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ ผสมกับหนูเมาส์สายพันธุ์ ICR เพศผู้ที่ได้ผ่านการนำน้ำเชื้อ ออกไปหรือทำหมัน (vasectomize) เรียบร้อยแล้ว

10.2 หลังจากนั้นตรวจดูเพศเมียที่ได้รับการผสมเพื่อเช็ค vaginal plug ในเช้าวันรุ่งขึ้น ตัวเมียที่พบ plug จะถูกนำมาเป็นแม่ตัวรับ นำแม่ตัวรับที่ได้มาซึ่งนำหนักด้วยเครื่องชั่งดิจิตอลจากนั้นฉีด 10% Nembutal[®] (เจือจางใน Normal saline) เข้าทางช่องท้อง (IP; Intraperitoneal) ในปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ต่อน้ำหนักตัว 10 กรัม

10.3 ปฏิบัติตามขั้นตอนการตรวจติดตาม เฝ้าระวัง และประเมินสุขภาพหนูเมาส์ ทั้งก่อนผ่าตัดระหว่าง ผ่าตัด และหลังผ่าตัดและคอยเฝ้าระวังสังเกตสภาพสัตว์ทดลอง พร้อมทั้งบันทึกชื่อยา ขนาดยาที่ใช้วิธีการ เวลาที่ให้ และตรวจประเมินอัตราการเต้นของหัวใจ (HR/Pulse), อัตราการหายใจ(RR) และสภาพ mucous membrane color ในเชิงคุณภาพ ลงในฟอร์ม Surgical and anesthetic record for survival surgery

10.4 หลังจากหนูเมาส์สลบ จึงโกนขนบริเวณด้านหลังครึ่งล่างก่อนทำการผ่าตัด แล้วจัดวางให้นอนคว่ำบนกระดาษทึบปลอดเชื้อ ทำความสะอาด บริเวณด้านหลังสัตว์ทดลองด้วยสำลีชุบด้วยแอลกอฮอล์ 70 % ใช้วิธี aseptic technique (ภาพประกอบ 29)

10.5 ใช้ปากคีบหนีบจับชั้นผิวหนังตรงด้านหลัง ใช้กรรไกรตัดเฉพาะชั้นผิวหนังตามแนวยาวของแนวกลางลำตัว ยาวประมาณ 0.5-1.0 เซนติเมตร ใช้ปากคีบเนื้อเยื่อและกรรไกรแยกชั้นผิวหนังและชั้นกล้ามเนื้อออกจากกัน (ภาพประกอบ 20)

10.6 ใช้ปากคีบเนื้อเยื่อจับกล้ามเนื้อด้านข้างลำตัวบริเวณที่ติดกับรังไข่(ovary) ใช้กรรไกรตัดชั้น กล้ามเนื้อยาวประมาณ 0.5 – 0.7 เซนติเมตร



ภาพประกอบ 20 การตัดชั้นผิวหนังตามแนวยาว (ซ้าย) การใช้ serafine clip หนีบส่วนก้อนไขมัน(ขวา)

10.7 ใช้ปากคีบเนื้อเยื่อจับก้อนไขมัน (fat pad) ในช่องท้องที่ติดอยู่กับ ซูดรังไข่ ที่มี ปีกมดลูก และท่อหน้าไข่ออกมาวางไว้ด้านบนลำตัวและใช้ serafine clip หนีบส่วนก้อนไขมันไว้ (ภาพประกอบ 20)

10.8 ตรวจสอบท่อหน้าไข่ออกมาเพื่อดูตำแหน่งของ fundibulum ภายใต้อุ้งมือจูลทรศน์สเตอร์ไอ และใช้กรรไกรเล็กตัดเนื้อเยื่อส่วนบริเวณ fundibulum

10.8 ใช้ transfer pipette ดูดเอ็มบริโอระยะ 8-16 เซลล์ที่เตรียมไว้ ประมาณ 8-10 เอ็มบริโอ และนำไปย้ายฝากเข้าทางส่วนของ infundibulum อย่างนุ่มนวล

10.10 ทำการย้ายฝากเอ็มบริโออีกข้างดังขั้นตอนข้อที่ 10.6-10.9 แล้วเย็บปิดแผลด้วย autoclip (ภาพประกอบ 21)



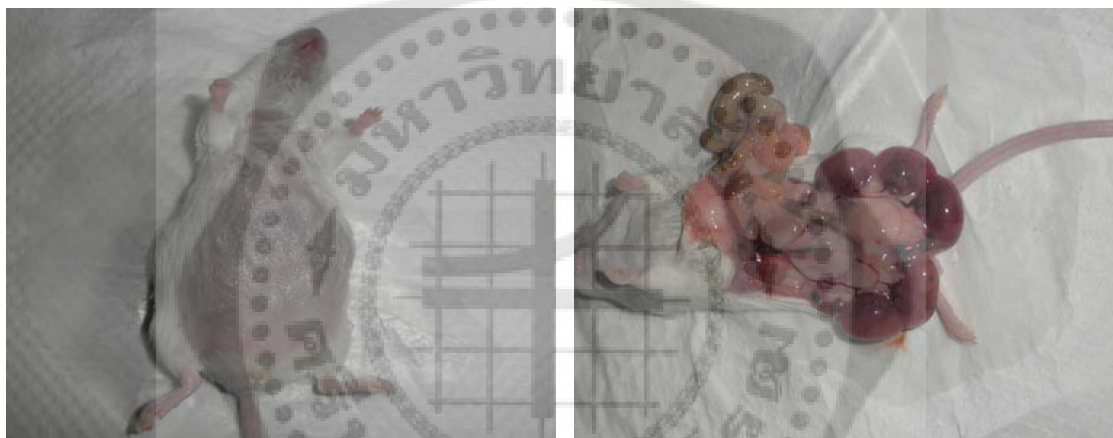
ภาพประกอบ 21 การเย็บปิดแผลด้วย autoclip

10.11 นำหนูเมาส์ไปให้ความอบอุ่นบนแท่นให้ความร้อน (hot plate) ที่อุณหภูมิ 37°C คอยเฝ้าระวังสังเกตสภาพสัตว์ทดลองจนกระทั่งสัตว์ทดลองฟื้น

10.12 นำหนูเมาส์ใส่ในกรงสะอาดที่มีวัสดุรองนอนปลอดเชื้อ พร้อมเขียนป้ายหน้ากรง เพื่อบอกวันที่และสายพันธุ์ที่ย้ายฝาก และจึงนำกลับเข้าห้องเลี้ยงสัตว์

10.13 ตรวจสอบสุขภาพหนูเมาส์ต่อเนื่องอีก 7 วัน หลังจากผ่าตัด โดยสังเกตพฤติกรรมและ ตรวจดูแผลผ่าตัดพร้อมบันทึกข้อมูลลงในฟอร์ม monitoring sheet for animal after surgery

10.14 ตรวจสอบการตั้งท้องหลังจากการย้ายฝากประมาณ 5 วัน ทำการเปิดหน้าท้องเพื่อ ตรวจสอบการฝังตัวของเอ็มบริโอและจำนวนที่เจริญไปเป็น เอ็มบริโอ โดยตัดหางลูกหนูและ นับจุด เลือดที่แสดงการฝังตัวนำมาสกัด DNA เพื่อตรวจสอบสายพันธุ์หนูที่เกิดว่าเป็นหนูธาลัสซีเมียชนิดใด ด้วยวิธี PCR (ภาพประกอบ 22)



ภาพประกอบ 22 หนูตั้งท้องหลังจากการย้ายฝากประมาณ 5 วัน (ซ้าย) และการเปิดหน้าท้องเพื่อ ตรวจสอบการฝังตัวและนับจำนวนฟัตัสหลังจากย้ายฝากเอ็มบริโอเข้าแม่ตัวรับ

11. การวิเคราะห์ผล

การวิเคราะห์ผลทำได้โดยการเปรียบเทียบอัตราการเจริญของเอ็มบริโอไปจนถึงระยะ บลาสโตซิสต์และอัตราการเกิดลูกหลังการย้ายฝากของกลุ่ม แม่แข็งแรงและกลุ่มควบคุม ด้วยวิธี Chi-square test (χ^2 test)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การศึกษาผลการเจริญของเอ็มบริโอในหลอดทดลอง(*in vitro* development)

หลังการแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเคชัน

เอ็มบริโอหนูธาลัสซีเมียที่ใช้ในการทดลองนี้ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างหนูเพศเมีย wild type (C57BL/6 Mlac) กับหนูธาลัสซีเมียเพศผู้ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ 654, BKO, E2 หรือ E4 หลังจากผสมพันธุ์กับหนูเพศผู้ ชะล้างนำเอ็มบริโอระยะไซโกต (ภาพประกอบ 16) โดยใช้สารละลาย M2 และเลี้ยงต่อในสารละลาย M16 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกเฉพาะเอ็มบริโอระยะ 8-16 เซลล์ (ภาพประกอบ 5) ที่มีคุณภาพดีมาแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเคชันและอุ่นคืนสภาพ หลังการทำอุ่นคืนสภาพนำเอ็มบริโอกลับไปเลี้ยงต่อในสารละลาย M16 ในตู้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ จนได้เอ็มบริโอระยะ บลาสโตซิสต์เพื่อติดตามอัตราการเจริญในหลอดทดลอง (*in vitro* development) (ตาราง 3)

จากผลการทดลองในตาราง 3 พบว่าอัตราการเจริญไปเป็นบลาสโตซิสต์ของเอ็มบริโอสดในหนูสายพันธุ์ 654, BKO, E2 และ E4 เท่ากับ 93, 94, 81 และ 87% ตามลำดับ %การเจริญไปเป็นบลาสโตซิสต์ของเอ็มบริโอแช่แข็งในหนูสายพันธุ์ 654, BKO, E2 และ E4 เท่ากับ 62, 63, 48 และ 54 % ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการเจริญไปเป็น บลาสโตซิสต์ของเอ็มบริโอสดและเอ็มบริโอแช่แข็งในหนูทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่าอัตราการเจริญไปเป็นบลาสโตซิสต์ ของเอ็มบริโอแช่แข็ง มีค่าต่ำกว่าอัตราการเจริญไปเป็นบลาสโตซิสต์ของเอ็มบริโอสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

หลังจากการตรวจสอบจำนวนเซลล์ใน ระยะบลาสโตซิสต์ (ภาพประกอบ 23) พบว่าจำนวนเซลล์ใน บลาสโตซิสต์ที่เจริญมาจากเอ็มบริโอสดและเอ็มบริโอแช่แข็งไม่มีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในหนูทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยจำนวนเซลล์ (mean±SD) ในบลาสโตซิสต์ที่เจริญมาจากเอ็มบริโอสดในหนูสายพันธุ์ 654, BKO, E2 และ E4 มีค่าเท่ากับ 60±10, 57±14, 67±12 และ 66±12 เซลล์/บลาสโตซิสต์ ตามลำดับ จำนวนเซลล์ในบลาสโตซิสต์ที่เจริญมาจากเอ็มบริโอแช่แข็งในหนูสายพันธุ์ 654, BKO, E2 และ E4 มีค่าเท่ากับ 59±11, 60±13, 57±15 และ 62±9 เซลล์/บลาสโตซิสต์ ตามลำดับ(ตาราง 4)

ตาราง 3 อัตราการเจริญในหลอดทดลองของเอ็มบริโอระยะ 8-16 เซลล์ หลังการแช่แข็งด้วยวิธี
วิธีพีเกิน

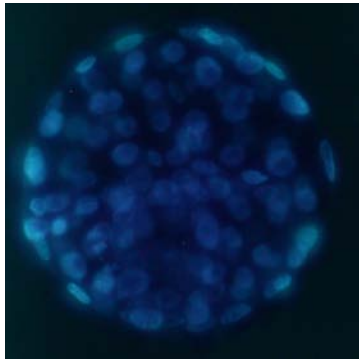
สายพันธุ์	กลุ่มทดลอง	อัตราการเจริญของเอ็มบริโอไป เป็นบลาสโตซิส (%)
WT ♀ X 654 ♂	เอ็มบริโอสด	27/30(93) ^a
	เอ็มบริโอแช่แข็ง	18/29(62) ^b
WT ♀ X BKO ♂	เอ็มบริโอสด	27/31(94) ^a
	เอ็มบริโอแช่แข็ง	19/30(63) ^b
WT ♀ X E2 ♂	เอ็มบริโอสด	26/32(81) ^a
	เอ็มบริโอแช่แข็ง	14/29(48) ^b
WT ♀ X E4 ♂	เอ็มบริโอสด	26/30(87) ^a
	เอ็มบริโอแช่แข็ง	17/31(54) ^b

^{a, b} ตัวอักษรต่างกันในแต่ละสายพันธุ์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่
(χ^2 test, $p < 0.05$)

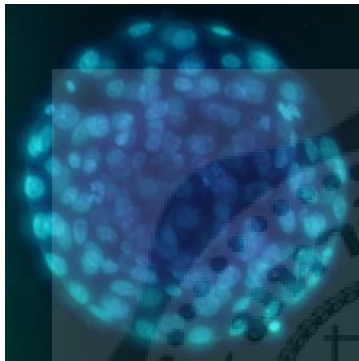
ตาราง 4 แสดงจำนวนเซลล์ในบลาสโตซิสที่เจริญมาจากเอ็มบริโอสดและเอ็มบริโอแช่แข็ง

สายพันธุ์	กลุ่มทดลอง	จำนวน เอ็มบริโอ	เซลล์/บลาสโตซิส (MEAN \pm SD)
WT ♀ X 654 ♂	เอ็มบริโอสด	27	60 \pm 10
	เอ็มบริโอแช่แข็ง	18	59 \pm 11
WT ♀ X BKO ♂	เอ็มบริโอสด	27	57 \pm 14
	เอ็มบริโอแช่แข็ง	19	60 \pm 13
WT ♀ X E2 ♂	เอ็มบริโอสด	26	67 \pm 12
	เอ็มบริโอแช่แข็ง	14	57 \pm 15
WT ♀ X E4 ♂	เอ็มบริโอสด	26	66 \pm 12
	เอ็มบริโอแช่แข็ง	17	62 \pm 9

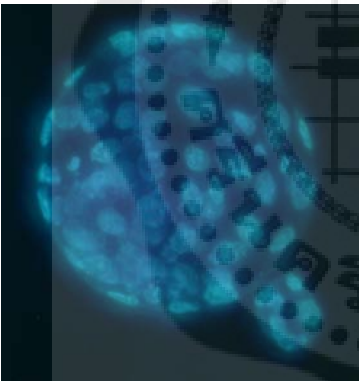
บลาสโตซิสจากเอ็มบริโอสด



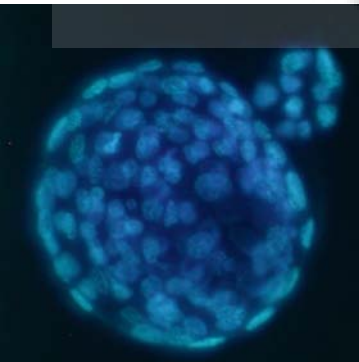
654



BKO

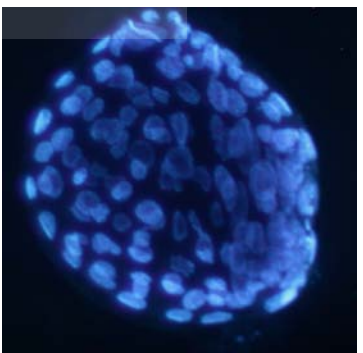
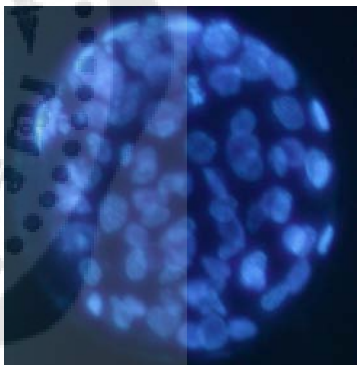
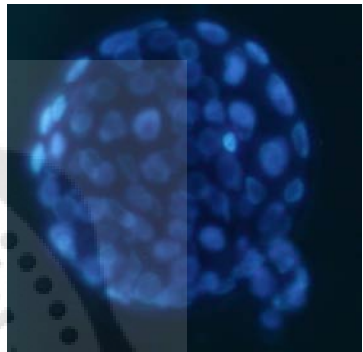
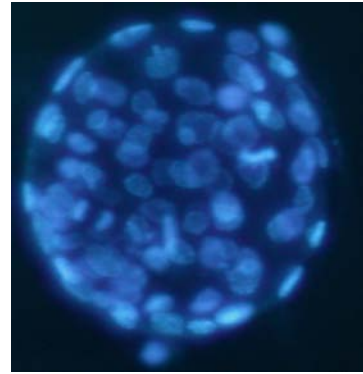


E2



E4

บลาสโตซิสจากเอ็มบริโอแช่แข็ง



ภาพประกอบ 23 จำนวนเซลล์ในบลาสโตซิสที่เจริญมาจากเอ็มบริโอสดและเอ็มบริโอแช่แข็งในหนู
สายพันธุ์ 654, BKO, E2 และ E4 หลังจากย้อมด้วย Hoechst 33342 (x1000)

2. การศึกษาผลการเจริญของเอ็มบริโอในตัวสัตว์ (*in vivo development*)

หลังการแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเคชัน

จากการย้ายฝากเอ็มบริโอสดและเอ็มบริโอแช่แข็งให้แม่ตัวรับที่ได้ผสมกับหนูเมาส์ สายพันธุ์ ICR เพศผู้ที่ได้ผ่านการนำท่อน้ำเชื้อออกไปหรือทำหมัน (vasectomize) เรียบร้อยแล้ว ติดตามการตั้งท้องของแม่ตัวรับ (ภาพประกอบ 24) เป็นเวลา 15 วัน ผ่าตัดเปิดหน้าท้องเพื่อนับจำนวนการฝังตัวของเอ็มบริโอ (embryo implantation) และจำนวนเอ็มบริโอที่เจริญเข้าสู่ระยะฟีตัส (fetus) (ภาพประกอบ 25)

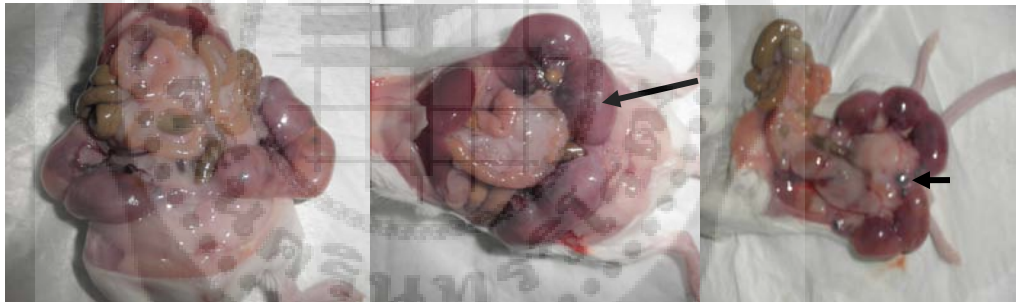
จากผลการทดลองใน ตาราง 5 และ 6 พบว่าอัตราการฝังตัวของเอ็มบริโอสดมีค่าอยู่ระหว่าง 26.2 ถึง 48.3% สายพันธุ์ที่มีอัตราการฝังตัวของเอ็มบริโอสูงสุด คือ BKO (48.3%) รองลงมาคือ 654 (39.1%), E2 (33.3%) และ E4 (26.2%) ตามลำดับ อัตราการฝังตัวของเอ็มบริโอที่ผ่านการแช่แข็งมีค่าอยู่ระหว่าง 13.1 ถึง 41.9 % สายพันธุ์ที่มีอัตราการฝังตัวของเอ็มบริโอสูงสุด คือ BKO (41.9%) รองลงมาคือ E2 (32.3%), 654 (33.9%) และ E4 (13.1%) ตามลำดับ

หลังการตรวจสอบจีโนไทป์ของหน่วยเทคนิค multiplex PCR (ภาพประกอบ 26) พบว่าฟีตัสที่เป็นหนูธาลัสซีเมียของเอ็มบริโอสดในหนูสายพันธุ์ 654, BKO, E2 และ E4 มีค่าระหว่าง 10.0 ถึง 29.4% (ตาราง 6) ซึ่งจำนวนฟีตัสที่มีธาลัสซีเมียสายพันธุ์ 654 เท่ากับ 7 ใน 25 ตัว สายพันธุ์ BKO เท่ากับ 8 ใน 29 ตัว สายพันธุ์ E2 เท่ากับ 2 ใน 20 ตัว และสายพันธุ์ E4 เท่ากับ 5 ใน 17 ตัว ซึ่งคิดเป็น 28.0% 27.6% 10.0% และ 29.4% ตามลำดับ จำนวนฟีตัสที่เป็นหนูธาลัสซีเมียของเอ็มบริโอสดในหนูสายพันธุ์ 654, BKO, E2 และ E4 พบว่าลูกหนูที่เป็นธาลัสซีเมียมีต่ำกว่าอัตราการเกิดลูกหนูธาลัสซีเมียที่ได้จากการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติเมื่อนำผลการทดลองครั้งนี้เปรียบเทียบกับอัตราการเกิดลูกหนูธาลัสซีเมียที่ได้จากการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติของหนูสายพันธุ์ 654, BKO, E2 และ E4 เท่ากับ 34.3, 35, 40.6 และ 44.6% ตามลำดับ ทั้งนี้ค่าเหล่านี้ไม่ได้นับรวมลูกที่ตายจากการแท้งหรือการกินลูก

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการฝังตัวและจำนวนฟีตัสระหว่างเอ็มบริโอสดและเอ็มบริโอแช่แข็งของหนูสายพันธุ์ BKO และ E2 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนหนูสายพันธุ์ 654 และ E4 ที่มีอัตราการฝังตัวระหว่างเอ็มบริโอสดและเอ็มบริโอแช่แข็งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนจำนวนฟีตัสไม่แตกต่างจากกลุ่มเอ็มบริโอสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพประกอบ 24 แม่ตัวรับตั้งท้องหลังการย้ายฝากเอ็มบริโอเป็นเวลา 15 วัน



แม่ตัวรับกลุ่มเอ็มบริโอสด



แม่ตัวรับกลุ่มเอ็มบริโอแช่แข็ง

ภาพประกอบ 25 แสดงจำนวนเอ็มบริโอที่มีการฝังตัวในแม่ตัวรับในกลุ่มเอ็มบริโอสดและเอ็มบริโอแช่แข็งตำแหน่งการฝังตัวฟิตัส (←) และจุดเลือดฝังตัว (↔)

ตาราง 5 การฝังตัวและเจริญไปเป็นฟีตัสหลังการย้ายฝากเอ็มบริโอสดและเอ็มบริโอแช่แข็งของแม่
ตัวรับทั้ง 4 สายพันธุ์

กลุ่มทดลอง	จำนวนการฝังตัวและเจริญไปเป็นตัวอ่อนหลังการย้ายฝากแต่ละสายพันธุ์			
	WT x 654 No(F/I): (T)	WT x BKO No(F/I): (T)	WT x E2 No(F/I): (T)	WT x E4 No(F/I): (T)
เอ็มบริโอสด				
แม่ตัวรับ 1	22(5/5): (2)	22(5/4): (5)	20(1/2): (0)	22(3/4): (2)
แม่ตัวรับ 2	22(5/7): (4)	18(4/8): (2)	20(4/5): (1)	20(4/3): (2)
แม่ตัวรับ 3	20(2/1): (1)	20(2/6): (1)	20(3/5): (1)	20(2/1): (1)
รวม	64 (12/13): (7)	60 (11/18): (8)	60(8/12): (2)	62 (9/8): (5)
เอ็มบริโอแช่แข็ง				
แม่ตัวรับ 1	20(3/5): (3)	22(5/1): (5)	22(5/4): (1)	20(3/2): (1)
แม่ตัวรับ 2	20(3/2): (2)	20(5/2): (2)	20(1/4): (1)	22(2/0): (1)
แม่ตัวรับ 3	19(2/0): (0)	20(5/8): (3)	20(2/4): (1)	19(1/0): (0)
รวม	59 (8/12): (5)	62 (15/11): (10)	62 (8/12): (3)	61 (6/2): (2)

F คือ จำนวนฟีตัส

I คือ จำนวนจุดเลือดฝังตัว

T คือ จำนวนเอ็มบริโอที่เป็นธาตัสซีเมีย

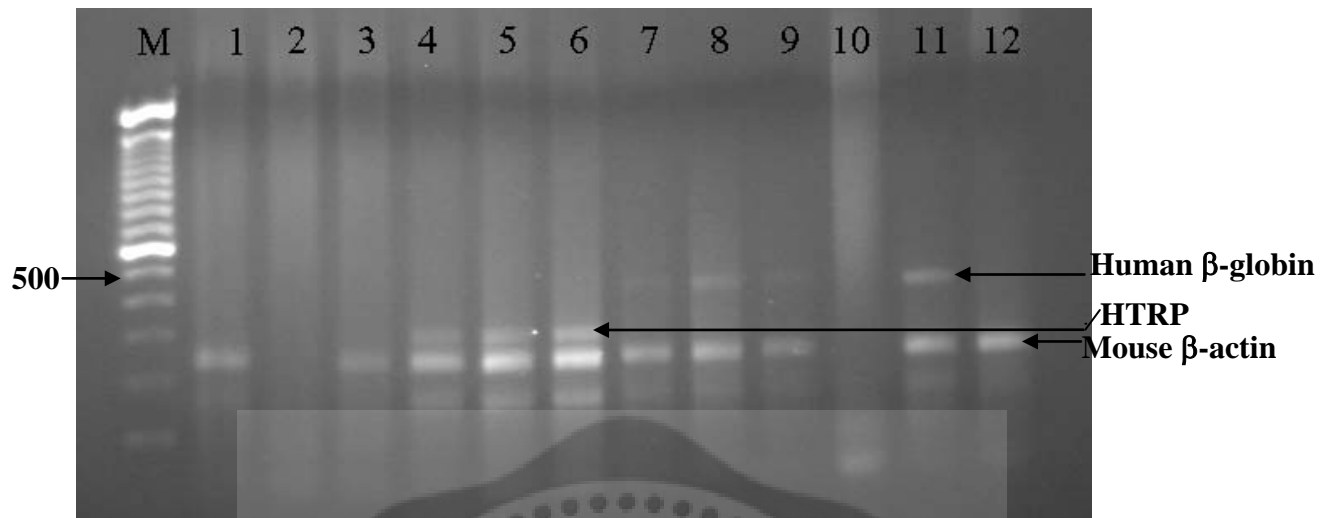
ตาราง 6 การฝังตัวและการเจริญไปเป็นฟีตส์หลังการย้ายฝากเอ็มบริโอสดและเอ็มบริโอแช่แข็ง

สายพันธุ์	กลุ่มทดลอง	จำนวน เอ็มบริโอ ย้ายฝาก	จำนวนการฝัง ตัว* (%)	จำนวนจุดเลือด ฝังตัว* (MOLES) (%)	จำนวนฟีตส์* (%)	จำนวนเอ็มบริโอ ที่เป็นหนุณธาลัสซี เมีย** (%)
WT ♀ X 654 ♂	เอ็มบริโอสด	64	25 (39.1) ^a	13 (20.3) ^a	12 (18.8) ^a	7(28.0)
	เอ็มบริโอแช่แข็ง	59	20 (33.9) ^a	12 (20.3) ^a	8 (13.6) ^a	5(25.0)
WT ♀ X BKO ♂	เอ็มบริโอสด	60	29 (48.3) ^a	18 (30.0) ^a	11 (18.3) ^a	8(27.6)
	เอ็มบริโอแช่แข็ง	62	26 (41.9) ^a	11 (17.7) ^a	15 (24.2) ^a	10(38.5)
WT ♀ X E2 ♂	เอ็มบริโอสด	60	20 (33.3) ^b	12 (20.0) ^a	8 (13.3) ^b	2(10.0)
	เอ็มบริโอแช่แข็ง	62	20 (32.3) ^b	12 (19.4) ^a	8 (12.9) ^b	3(15.0)
WT ♀ X E4 ♂	เอ็มบริโอสด	62	17 (27.4) ^b	8 (12.3) ^b	9 (13.8) ^b	5(29.4)
	เอ็มบริโอแช่แข็ง	61	8 (13.1) ^c	2 (3.3) ^b	6 (9.8) ^b	2(25.0)

a, b, c, ตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ (χ^2 test, $p < 0.05$)

* ค่า % ได้จากจำนวนการฝังตัว จำนวนจุดเลือดฝังตัว และจำนวนฟีตส์ต่อจำนวนเอ็มบริโอที่ย้ายฝากทั้งหมด

** ค่า % ได้จากจำนวนเอ็มบริโอที่เป็นหนุณธาลัสซีเมียต่อจำนวนการฝังตัว



ภาพประกอบ 26 ผลการตรวจสอบจีโนไทป์ของหน่วยเทคนิค multiplex PCR: แถวที่ 1, 3, 12 = wild type; แถวที่ 4 = 654 แถวที่ 5, 6 = BKO แถวที่ 7, 8 = E2 แถวที่ 9, 11 = และ E4 (M = 100 bp DNA ladder 0.5 μ g/lane; Invitrogen[®]) (ขนาดของ mouse β -globin, HPRT และ human β -globin = 260, 315 และ 447 bp ตามลำดับ)

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. การศึกษาผลการเจริญของเอ็มบริโอในหลอดทดลอง (*in vitro* development) หลังการแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเคชัน

จากผลการศึกษาผลของการเจริญของเอ็มบริโอ ระยะ 8-16 เซลล์ ในหลอดทดลอง (*in vitro*) หลังการแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเคชัน พบว่าความสามารถในการเจริญของเอ็มบริโอธาลัสซีเมียไปเป็นบลาสโตซิสต์ในหลอดทดลองลดลงหลังการแช่แข็งด้วยวิธี in-straw vitrification ในการศึกษาครั้งนี้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเอ็มบริโอสด ซึ่งผลการศึกษานี้ไม่สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Boonkusol และคนอื่น ๆ. (2010)³⁸ ที่แช่แข็งเอ็มบริโอระยะ 2-4 เซลล์ ในหนูธาลัสซีเมีย 654, BKO, E2 และ E4 ด้วยวิธีเดียวกัน คือ in-straw vitrification และใช้สารละลาย ethylene glycol 35% ซึ่งพบว่าการแช่แข็ง ไม่มีผลกระทบต่อการเจริญไปเป็นบลาสโตซิสต์ในหลอดทดลองของเอ็มบริโอหนูธาลัสซีเมีย ทั้ง 4 สายพันธุ์ ผลกระทบของการแช่แข็งต่อการเจริญไปเป็นบลาสโตซิสต์ในการศึกษาครั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของระยะการเจริญของเอ็มบริโอที่นำมาแช่แข็ง โดยเอ็มบริโอระยะ 8-16 เซลล์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้จากการเลี้ยงเอ็มบริโอในหลอดทดลองจากระยะ ไซโกตจนถึง 8-16 เซลล์ ซึ่งอาจทำให้เอ็มบริโอมีคุณภาพลดลงและมีความไวต่อการแช่แข็งมากขึ้น Wright. (1985)³³ รายงานว่าคุณภาพของเอ็มบริโอมีความสัมพันธ์กับการเจริญในหลอดทดลองของเอ็มบริโอหลังการแช่แข็ง รวมทั้งรายงานเกี่ยวกับผลกระทบของสภาวะแวดล้อมในหลอดทดลองต่อการเจริญของเอ็มบริโอ ethylene glycol นั้นจัดได้ว่าเป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่เหมาะสมสำหรับการแช่แข็งเอ็มบริโอหนู เมาส์มากที่สุด Kasai และคนอื่น ๆ (1990)¹⁴ รายงานความเข้มข้นของ ethylene glycol ที่เหมาะสมในการแช่แข็งอยู่ระหว่าง 30% ถึง 40%

จากการตรวจสอบนับจำนวนเซลล์ของเอ็มบริโอระยะบลาสโตซิสต์เพื่อ ดูคุณภาพของเอ็มบริโอที่เจริญเป็นบลาสโตซิสต์ หลังการแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเคชัน ไม่มีผล ผลของการทดลองพบว่าการแช่แข็งแบบ in-straw vitrification ต่อจำนวนเซลล์ของเอ็มบริโอสดและเอ็มบริโอแช่แข็งในหนูธาลัสซีเมียทั้ง 4 สายพันธุ์ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Boonkusol และคนอื่น ๆ (2010)³⁸

2. การศึกษาผลของการเจริญของเอ็มบริโอในตัวสัตว์ (*in vivo* development) หลังการแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเคชัน

การศึกษาผลของการเจริญของเอ็มบริโอในตัวสัตว์ (*in vivo*) หลังการแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเคชันในครั้งนี้ เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับประยุกต์ใช้ในการเก็บรักษาสายพันธุ์ของหนูธาลัสซีเมียซึ่งเป็นหนูตัดแปลงพันธุกรรม (transgenic mice) ที่มีความสำคัญต่องานวิจัยเกี่ยวกับโรคธาลัสซีเมีย

จากผลการทดลองการเจริญของเอ็มบริโอในตัวสัตว์หลังการแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเคชัน พบว่าวิธีการแช่แข็งที่ใช้ในการทดลองในครั้งนี้ไม่มีผลต่อ อัตราการฝังตัวและจำนวนฟัตสของเอ็มบริโอหนูธาลัสซีเมียสายพันธุ์ 654, BKO และ E2 ส่วนในหนูสายพันธุ์ E4 ที่มีอัตราการฝังตัวของเอ็มบริโอแช่แข็งต่ำกว่าเอ็มบริโอสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงว่าการแช่แข็งมีผลทำให้การฝังตัวหลังการย้ายฝากเอ็มบริโอหนูธาลัสซีเมียสายพันธุ์ E4 ลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องจากชนิดของสายพันธุ์หนูธาลัสซีเมีย E4 ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Boonkusol และคนอื่น ๆ (2010)³⁸ ซึ่งรายงานอัตราการฝังตัวของเอ็มบริโอระยะ 2-4 เซลล์ ในหนูธาลัสซีเมียสายพันธุ์ E4 มีค่า ต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับหนูธาลัสซีเมียสายพันธุ์ 654, BKO และ E2 นอกจากนี้ มีรายงานเกี่ยวกับผลของการแช่แข็งด้วยวิธีการลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆ (conventional slow freezing) ต่อการเจริญของเอ็มบริโอหนูตัดแปลงพันธุกรรมระยะ 2 เซลล์ พบว่าอัตราการรอดหลังการแช่แข็งอยู่ในช่วง 11.1 ถึง 77.1% (Ibanez et al. 1997)³⁹ หนูธาลัสซีเมียสายพันธุ์ E4 เป็นหนูตัดแปลงพันธุกรรมที่มีการสอดแทรกยีน β^E -globin ของคนเข้าไป 4 ชุดบนโครโมโซม 2 (Jamsai et al. 2006) และสายพันธุ์ 654 เป็นหนูตัดแปลงพันธุกรรม ซึ่งยีน β^{major} และ β^{minor} -globin บนโครโมโซม 7 ของหนูถูกแทนที่ (knock-in) ด้วยยีนธาลัสซีเมีย (IVSII-654,C->T) ของมนุษย์ สำหรับ หนู heterozygote IVSII-654 จะมีอาการของโรค thalassaemia ส่วนหนู homozygote IVS II-654/ IVS II-654 จะตายตั้งแต่อยู่ในครรภ์ จึงยังไม่เป็นที่ทราบแน่นอนว่าการสอดใส่ยีนเข้าไปบนโครโมโซมนี้ เป็นการรบกวนการทำงานของยีนอื่น ๆ หรือไม่ ซึ่ง อาจทำให้เอ็มบริโอของหนูธาลัสซีเมียของหนูสายพันธุ์ E4 มีความไวต่อการแช่แข็งมากกว่าหนูธาลัสซีเมียอีก 3 สายพันธุ์ รวมทั้งมีรายงานว่าสายพันธุ์ของหนูตัดแปลงพันธุกรรมที่แตกต่างกันมีผลต่ออัตราการรอดหลังการแช่แข็ง (Schmidt et al. 1985;1987)⁴⁰⁻⁴¹ ผลการศึกษานี้คล้ายคลึงกับรายงานผลการแช่แข็งต่ออัตราการรอดของหนูตัดแปลงพันธุกรรม โดย Radice และคนอื่น ๆ. (1991)⁴² พบว่าการสอดใส่ยีน β -globin (HB58) มีผลให้เอ็มบริโอหนูตัดแปลง พันธุกรรมสายพันธุ์นี้ มีการ เจริญ ในตัวสัตว์ (*in vivo* development) ลดลงการแช่แข็งแบบ in-staw vitrification ด้วยสารละลาย ethylene glycol 35% เป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยส่งเสริมงานวิจัยทางด้านชีววิทยา โดยสิ่งที่จะต้องคำนึงถึงเมื่อใช้วิธีวิทริฟิเคชันคือคุณภาพของเอ็มบริโอที่นำมาแช่ แข็ง ระยะเวลาการ เลี้ยงเอ็มบริโอก่อนถึงการแช่แข็ง ซึ่งเอ็มบริโอจะมี

คุณภาพลดลงเมื่ออยู่นอกร่างกายนานขึ้น โดยเฉพาะเอ็มบริโอที่ถูกตัดแปลงพันธุกรรม นอกจากนี้ควรคำนึงถึงความเสียหายอื่น ๆ ที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้สารป้องกันการแช่แข็งที่มีความเข้มข้นสูง ด้วยวิธีนี้ อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพและผลข้างเคียงระยะยาวของการแช่แข็งต่อเอ็มบริโอมีความจำเป็นต่อการศึกษาด้านการเจริญทั้งภายนอกและภายในร่างกายสัตว์ โดยการเก็บรักษาเอ็มบริโอของหนูธาลัสซีเมียโดยการแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเคชันยังคงเป็นทางเลือกที่ดีที่สุดสำหรับการเก็บรักษาเอ็มบริโอที่มีการเจริญอยู่ในระยะต้นๆ (Van der Auwera et al. 1990; Shaw et al. 1991; Bernart et al. 1994; Nowshari et al. 1995; Van der Elst et al. 1995)⁴³⁻⁴⁷ นอกจากนี้วิธีนี้เป็นวิธีที่ไม่ต้องมีอุปกรณ์ราคาแพงและสามารถลดขั้นตอนและเวลาที่ใช้ในการแช่แข็ง (Palasz & Mapletoft. 1996)¹⁶

ในการแช่แข็งเอ็มบริโอต้องยอมรับสิ่งหนึ่งก็คือ อัตราการรอดหลังการแช่แข็งหรือหลังการย้ายฝากจะต่ำกว่าเอ็มบริโอที่ไม่ได้แช่แข็ง ทั้งนี้เนื่องจาก เกิดความเสียหายของเอ็มบริโอในระหว่างการแช่แข็ง เช่นการนำเอ็มบริโอใส่ในสารป้องกันการแช่แข็งที่มีความเข้มข้นมากกว่าหรือการเจือจางสารป้องกันการแช่แข็งออกจากเซลล์ และรวมทั้งจากการแช่แข็งเอง เมื่อเอ็มบริโอเผชิญกับอุณหภูมิต่ำ มักสังเกตความผิดปกติที่เกิดขึ้น ในระดับเปลือกโซนา เพลลูซิตา ที่แตกออกจากการแช่แข็งและความผิดปกติของเซลล์ ซึ่งหากมีไม่มากเอ็มบริโอสามารถพัฒนาต่อได้จากเซลล์ที่ไม่เสียที่เหลือนอยู่ เอ็มบริโอที่มีจำนวนเซลล์เพียงครึ่งเดียวก็สามารถพัฒนาได้ ความเสียหายอาจเกิดขึ้นจากสาเหตุต่าง ๆ ตั้งแต่เกล็ดน้ำแข็งในเซลล์ การเปลี่ยนแปลงความดันออสโมซิส ความเป็นพิษของสารป้องกันการแช่แข็ง การบวมและการหดตัวของเซลล์จากแรงดันออสโมซิส (ดวงใจ บุญกุล. 2008)²⁰

Vajta และคนอื่น ๆ ในปี 1997⁴⁸ พบว่ากรณีของการแช่แข็งวิทริฟิเคชันนั้นซึ่งเป็นวิธีแช่แข็งที่กำจัดน้ำแข็งไม่ให้เกิดขึ้นในเซลล์ แต่ความเสียหายจะเกิดจากความดันออสโมซิส และความเป็นพิษจากสารป้องกันการแช่แข็งที่ใช้ในความเข้มข้นสูงมาก แต่ควรใช้ความเร็วในการแช่แข็งและการทำละลายโดยผ่านจุดวิกฤตประมาณ 0°C จะช่วยลดความเสียหายจากการเย็นจัด โดยเฉพาะในส่วนของไขมันที่ประกอบในเซลล์ของเอ็มบริโอ มีรายงานการศึกษาจำนวนมากเกี่ยวกับ แนวทางที่จะช่วยเพิ่มอัตราการรอดของเอ็มบริโอหลังการแช่แข็ง

Leibo และคนอื่น ๆ. (1974)⁹ ได้ชี้ให้เห็นว่าไขมันในเอ็มบริโอ (intracellular lipid) มีอิทธิพลที่ทำให้เอ็มบริโอไวต่อการแช่แข็ง โดยพบว่าเอ็มบริโอระยะ 8 เซลล์ ซึ่งเจริญมาจากเซลล์ที่ปั่นเอาไขมันออกสามารถทนต่อการแช่เย็นที่ 0°C และต่อการแช่แข็งได้ เช่นเดียวกับรายงานวิจัยของ Diez และคนอื่น ๆ. 1996⁴⁹ พบว่าเอ็มบริโอโคระยะไซโกตจากการปฏิสนธินอกร่างกายที่ผ่านการดูดไขมันออกจะมีอัตราการแบ่งตัวและอัตราการเจริญเป็นเอ็มบริโอระยะ บลาสโตซิสไม่แตกต่างกับเอ็มบริโอที่ไม่ได้ดูดไขมันออก 96.6% เปรียบเทียบกับ 91.5% และอัตราการแบ่งตัว 45.7% เปรียบเทียบกับ 46.2% และเมื่อนำเอาเอ็มบริโอที่ปราศจากไขมัน (lipid free) ไปแช่แข็ง เอ็มบริโอหลังแช่แข็งดังกล่าวจะมีอัตราการเจริญดีกว่าเอ็มบริโอที่ไม่ได้ดูดไขมันออกไป ดังนั้นแนวทางการลดหรือดูดไขมันออกจากไซโทพลาซึม

ของเอ็มบริโอจึงเป็นวิธีการที่จะช่วยเพิ่มอัตราการรอดของเอ็มบริโอโคที่ได้จากการปฏิสนธิในนอกร่างกายได้ สำหรับเอ็มบริโอสุกร ซึ่งเป็นเอ็มบริโอที่มีปริมาณไขมันในเซลล์สูง จึงมีความไวต่อการแช่แข็งสูง ทำให้ผลสำเร็จในการแช่แข็งเอ็มบริโอสุกรต่ำ รายงานของ Nagashima และคนอื่น ๆ ในปี 1994⁵⁰ พบว่า เอ็มบริโอที่ได้ดูดไขมันออกไป สามารถทนต่อความเย็นที่ 4°C ได้มากขึ้น โดยพบว่ามีอัตราการเจริญจนถึงระยะบลาสโตซิสติกว่า เอ็มบริโอที่ไม่ได้ดูดไขมันออกไป และเอ็มบริโอที่ดูดไขมัน ออกไปบางส่วน (27% เทียบกับ 0% และ 8%) ล่าสุดในปี 2007 Du และคนอื่น ๆ⁵¹ รายงานอัตราการรอดหลังการแช่แข็งของเอ็มบริโอระยะบลาสโตซิสติกที่ผลิตจากการทำโคลนนิ่งไข่ที่ ดูดไขมันออกไป พบว่าอัตราการรอดหลังการแช่แข็งเอ็มบริโอกลุ่มที่ ดูดไขมันออกไป สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ ดูดไขมัน (79% และ 32% ตามลำดับ)

ในการแช่แข็งไม่ว่าจะเป็นวิธีการใดก็ตามจะเกิดความเสียหายเกิดขึ้นในโครงร่างของเซลล์ในขั้นตอนต่าง ๆ นับตั้งแต่การสัมผัสกับสารป้องกันการแช่แข็งระหว่างการแช่แข็งและ /หรือระหว่างการทำลาย ความเสียหายดังกล่าวอาจกลับคืน เป็นปกติได้เหมือนเดิม หรือหากความเสียหายดังกล่าวไม่มากนักหรือกระทบเซลล์ของ เอ็มบริโอเพียงบางส่วนก็ทำให้เซลล์ของ เอ็มบริโอที่เหลืออยู่เกิดการเจริญต่อไปได้เช่นเดียวกับกรณีของครึ่ง เอ็มบริโอที่สามารถเจริญได้หลังถูกตัดแบ่งแล้ว ได้มีผู้ทดลองนำเอาสารรักษาโครงร่างเซลล์มาเสริม โดยให้ เอ็มบริโอก่อนการแช่แข็งสัมผัสกับสารดังกล่าวเพื่อเพิ่มความทนทานของโครงร่างเซลล์ เรียกสารนี้ว่า “cytoskeleton stabilizers” เช่น ไซโตคาลาซิน-บี โคลชิซิน เป็นต้น ไซโตคาลาซิน- บีทำหน้าที่ป้องกันการแตกของสายโพลีเมอร์ของโปรตีนแอกติน (actin) ที่เป็นส่วนประกอบของไมโครฟิลาเมนต์ เรียกสั้น ๆ ว่า “microfilament inhibitor” ส่วนสารโคลชิซินเป็น microtubule inhibitor ของโปรตีนทิวบูลิน (tubulin) Dobrinsky และคนอื่น ๆ. (2000)⁵² พบว่า ไซโตคาลาซิน- บี สามารถรักษาโครงสร้างไมโครฟิลาเมนต์ของเอ็มบริโอสุกรระหว่างการแช่แข็ง และช่วยเพิ่มอัตราการเจริญของเอ็มบริโอหลังการแช่แข็ง เนื่องจากเอ็มบริโอมีโครงของเซลล์เช่นเดียวกับเซลล์ชนิดอื่น ๆ โดยเป็นเส้นใยโปรตีน 3 ชนิด คือ ไมโครฟิลาเมนต์ ไมโครทิวบูล และอินเตอร์มีเดียท ฟิลาเมนต์ ส่วนประกอบดังกล่าวทำหน้าที่รักษาโครงสร้างของเซลล์ให้คงรูป และให้มีการแบ่งตัวของเซลล์เอ็มบริโอได้ปกติ

นอกจากนี้ การให้เอ็มบริโอสัมผัสโปรตีนป้องกันความเย็น (antifreeze proteins, AFP) ที่สกัดได้จากแมลง พืชบางชนิด แบคทีเรีย เห็ดบางชนิดและปลาในทวีปแอนตาร์กติกก่อนการแช่แข็ง ทำให้อัตราการรอดของเอ็มบริโอเพิ่มสูงขึ้น (Palasz & Mapletoft. 1996)¹⁶ โดยเชื่อว่าโปรตีนนี้จะช่วยควบคุมการเกิดเกล็ดน้ำแข็งในเซลล์

บรรณานุกรม



บรรณานุกรม

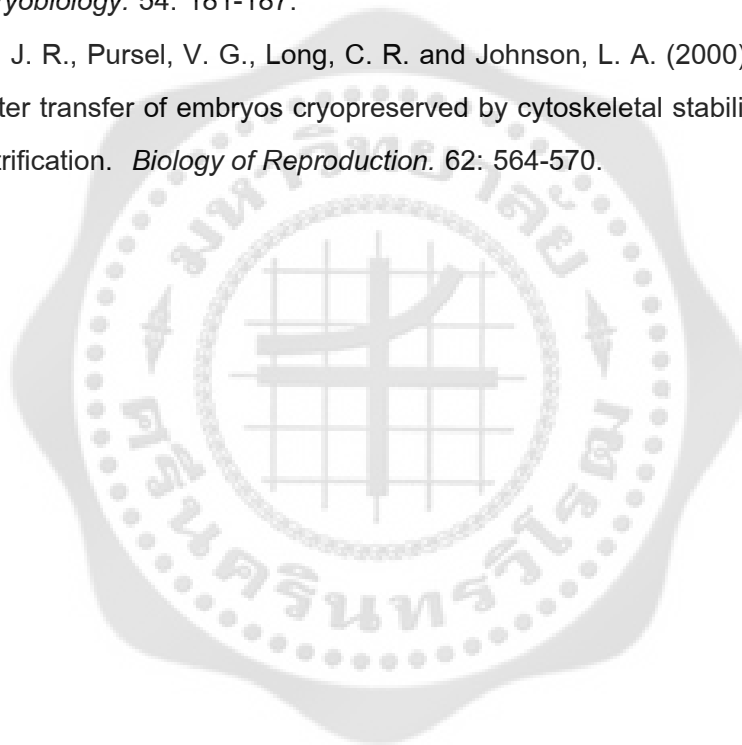
1. Fucharoen, S., and Winichagoon, P. (1987). Hemoglobinopathies in Southeast Asia. *Hemoglobin*. 11: 65-88.
2. Weatherall, DJ., and Clegg, JB. (2001). *The thalassemia syndromes*. 4th ed. Malden, Massachusetts: Blackwell Science.
3. Fiorelli, G., Fargion, S., Piperno, A., Battafarano, N., and Cappellini, MD. (1990). Iron metabolism In thalassemia intermedia. *Haematologica*. 75:89–95.
4. Fucharoen, S., and Winichagoon, P. (2000). Clinical and hematologic aspects of hemoglobin E β -thalassemia. *Current Opinion Hematology*. 7: 106-112.
5. Jamsai, D., Zaibak, F., Khongnium, W., Vadolas, J., Voullaire, L., Fowler KJ., Gazeas, S., Fucharoen, S., Williamson, R., and Ioannou, P. (2005). A humanized mouse model for a common β^0 -thalassemia mutation. *Genomics*. 85:353-361.
6. Jamsai, D., Zaibak, F., Vadolas, J., Voullaire, L., Fowler, KJ., Gazeas, S., Peters, H., Fucharoen, S., Williamson, R., and Ioannou, PA. (2006). A humanized BAC transgenic/knockout mouse model for HbE/ β -thalassemia. *Genomics*. 88:309-315.
7. Lewis, J., Yang, B., Kim, R., Sierakowska, H., Kole ,R., Smithies, O., and Maeda, N. (1998). A common human β -globin splicing mutation modeled in mice. *Blood*. 91:2152-2156.
8. Whittingham, D. G., Leibo, S. P., and Mazur, P. (1972). Survival of mouse embryos. Frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science*. 178: 411-414.
9. Leibo, S. P., Mazur, P., and Jackowski, S. J. (1974). Factors affecting survival of mouse embryos during freezing and Thawing. *Experimental Cell Research*. 89: 79-88.
10. Rall, WF. (1987). Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*. 24: 387-402.
11. Luyet, BJ. (1937). The vitrification of organic colloids and protoplasm. *Biodynamica*. 1: 1-14.
12. Rall, WF., and Fahy , GM. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*. 313: 573-575.
13. Mukaida, T., Wada, S., Takahashi, K., Pedro, PB., An, TZ., and Kasai ,M. (1998). Vitrification of human embryos bases on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. *Hum. Reprod*. 13: 2874-2879.

14. Kasai, M., Komi, JH., Takakamo, A., Tsudera, H., Sakurai, T., and Machida T. (1990). A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J. Reprod. Fertil.* 89: 91-97.
15. Miyamoto, H. (1986). Factors affecting the survival of mouse embryos during freezing and thawing. *J. In Vitro Fert. Embryo Transf.* 3: 15-19.
16. Palasz, A.T., and Mapletoft, R. J. (1996). Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnology Advances.* 14: 127-149.
17. ชนุศักดิ์ ดาดู. (2550). เทคนิคและการแปลผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการโรคซัลส์ซีเมียและฮีโมโกลบินผิดปกติที่พบบ่อยในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. โครงการตำรา คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. ธนบรรณการพิมพ์.
18. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. (2553). แอลฟาซัลส์ซีเมีย. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก <http://medinfo.2.psu.ac.th/pathology/education/thai/alpha.html> (วันที่สืบค้นข้อมูล 28 มกราคม 2553)
19. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. (2553). เบต้าซัลส์ซีเมีย. [ออนไลน์] เข้าถึงได้จาก <http://medinfo.2.psu.ac.th/pathology/education/thai/beta.html> (วันที่สืบค้นข้อมูล 28 มกราคม 2553)
20. ดวงใจ บุญกุล. (2008). Biotechnology of embryo vitrification. *SWU Science.* 24 (2) : 38-154.
21. Wilmut, I., and Rowson, L. E. (1973). Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Veterinary Record.* 92: 686-690.
22. Kasai, M., Niwa, K., and Iritani, A. (1981). Effects of Various Cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. *Reproduction and Fertility.* 63: 175-180.
23. Voelkel, S. A. and Hu, Y. X. (1992). Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. *Theriogenology.* 37: 687-697.
24. Kasai, M., Ito, K., and Edashige, K. (2002). Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury. *Human Reproduction.* 17: 1863-1874.
25. Lane, M., Schoolcraft, W. B., and Gardner, D. K. (1999a). Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertility and Sterility.* 72:1073-1078.

26. Lane, M., Bavister, B. D., Lyons, E. A., and Forest, K. T. (1999b). Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nature Biotechnology*. 17: 1234-1236.
27. Berthelot, F., Martinat-Botté, F., Locatelli, A., Perreau, C., and Terqui, M. (2000). Piglets born after vitrification of embryos using the open pulled straw method. *Cryobiology*. 41: 116-124.
28. Cameron, R. D. A., Beebe, L. F. S., Blackshaw, A. W., Higgins, A., and Nottle, M. B. (2000). Piglets born from vitrified early blastocysts using a simple technique. *Australian Veterinary Journal*. 78: 195-196.
29. Lazar, L., Spak, J., and David, V. (2000). The vitrification of in vitro fertilized cow blastocysts by the open pulled straw method. *Theriogenology*. 54(4): 571-578.
30. Mukaida, T., Nakamura, S., Tomiyama, T., Wada, S., Kasai, M., and Takahashi, K. (2001). Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of a cryoloop containerless technique. *Fertility and Sterility*. 76: 618- 620.
31. Cho, H. J., Son, W. Y., Yoon, S. H., Lee, S. W., and Lim, J. H. (2002). An improved protocol for dilution of cryoprotectants from vitrified human blastocysts. *Human reproduction*. 17: 2419-2422.
32. Bagis, H., Odaman, H., Sagirkaya, H., and Dinnyes, A. (2002). Production of transgenic mice from vitrified pronuclear-stage embryos. *Molecular Reproduction and Development*. 61: 173-179.
33. Wright, J. M. (1985). Commercial Freezing of Bovine Embryos in Straws. *Theriogenology*. 23: 17-29.
34. Yang, B., Kirby, S., Lewis, J., Detloff, P. J., Maeda, N., and Smithies, O. (1995). A mouse model for β^0 -thalassaemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 11 608–11 612. doi:10.1073/PNAS.92.25.11608.
35. มยุรฉัตร สะอาดฤทธิ์. (2553). *คู่มือการผลิตและแช่แข็งเอ็มบริโอหนูเม้าส์ด้วยวิธี vitrification*. สำนักงานบริการวิชาการ ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล.
36. ปรีนทร์ ชัยวิสุทธางกูร. (2550). *พันธุวิศวกรรมและชีวสารสนเทศศาสตร์เบื้องต้น*. กรุงเทพฯ. โอ.เอส.พรีนติ้ง เฮ้าส์.
37. Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K., and Behringer, R. (2003). *Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual 3rd edition*. New York.
38. Boonkusol, D., Dinnyes, A., Faisaikarm, T., Sangsuwan, P., Pratipnatalang, N., Sa-ardrit, M., Saikhun, K., Saovaros, S., Vadolas, J., Winichagoon, P., Fucharoen, S., and Kitiyanant, Y. (2010). Effects of human β -globin bacterial

- artificial chromosome transgenesis on embryo cryopreservation in mouse model. *Reprod. Fertil. Dev.* 22:788-795.
39. Ibañez, E., Grossmann, M., Vidal, F., Egozcue, J., and Santalo, J. (1997). Cryopreservation of caprine beta-lactoglobulin transgenic mouse embryos. *Cryobiology*. 35: 290–298. doi:10.1006/CRYO.1997.2051
 40. Schmidt, P. M., Hansen, C. T., and Wildt, D. E. (1985). Viability of frozen–thawed mouse embryos is affected by genotype. *Biol. Reprod.* 32: 507–514. doi:10.1095/BIOLREPROD32.3.507
 41. Schmidt, P. M., Schiewe, M. C., and Wildt, D. E. (1987). The genotypic response of Mouse embryos to multiple freezing variables. *Biol. Reprod.* 37:1121–1128. doi:10.1095/BIOLREPROD37.5.1121
 42. Radice, G., Lee, J. L., and Costantini, F. (1991). H β 58, an insertional mutation affecting early postimplantation development of the mouse embryo. *Development*. 111: 801–811.
 43. Van der Auwera, I., Cornillevi, F., Ongkowidjojo, R., Pijnenborg, R., and Koninckx, P.R. (1990). Cryopreservation of pronuclear mouse ova: slow versus ultrarapid freezing. *Human Reproduction*. 4: 619-621.
 44. Shaw, J. M., Diotallevi, L., and Trounson, A. O. (1991). A simple rapid 4.5 M Dimethylsulfoxide freezing technique for the cryopreservation of 1-cell to blastocyst stage preimplantation mouse embryos. *Reproductive fertility and development*. 3: 621-626.
 45. Bernart, W., Kamel, M., Neulen, J., and Breckwoldt, M. (1994). Influence of the developmental stage and the Equilibration time on the outcome of ultrarapid cryopreservation of mouse embryos. *Human Reproduction*. 9: 100-102
 46. Nowshari, M. A., Nayadu, P. L., and Hodges, J. K. (1995). Effect of cryoprotectants and their concentration on post-thaw survival and development of rapid frozen-thawed pronuclear stage mouse embryos. *Human Reproduction*. 10: 3237-3242.
 47. Van der Elst, J., Van den Abbeel, E., and Van Steirteghem, A. C. (1995). The effect of equilibration temperature and time on the outcome of ultrarapid freezing of 1-cell mouse embryos. *Human Reproduction*. 10: 379-383.
 48. Vajta, G., Booth, P. J., Holm, P., Greve, T. and Callesen, H. (1997). Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the Open Pulled Straw (OPS) method. *Cryobiology Letters*. 18: 191-195.

49. Diez, C., Le Bourhis, D., Heyman, Y., Renard, J. P. (1996). Effect of partial lipid removal from in vitro produced bovine zygotes on further development *in vitro* and on the freezing tolerance of blastocysts. *Theriogenology*. 45: 166 (abstract).
50. Nagashima, H., Kashiwazaki, N., Ashman, R., Grupen, C. G., Seamark, R. F. and Nottle, M. B. (1994). Removal of cytoplasmic lipid enhances the tolerance of porcine embryos to chilling. *Biology of Reproduction*. 51: 618-622.
51. Du, Y., Zhang, Y., Li, J., Kragh, P. M., Kuwayama, M., Leda, S., Zhang, X., Schmidt, M., Boghg, I. B., Purup, S., Pedersen, A. M., Villemoes, K., Yang, H., Bolund, L. and Vajta, G. (2007). Simplified cryopreservation of porcine cloned blastocysts. *Cryobiology*. 54: 181-187.
52. Dobrinsky, J. R., Pursel, V. G., Long, C. R. and Johnson, L. A. (2000). Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biology of Reproduction*. 62: 564-570.



ภาคผนวก



ภาคผนวก

การเตรียมสารละลายแช่แข็งและอุณหภูมิต่ำ

1. สารละลาย holding medium (base medium)

M2 medium	100	มิลลิลิตร
BSA	4.0	กรัม

2. สารละลาย 4 % EG ในสารละลาย holding medium

holding medium	9.6	มิลลิลิตร
EG	0.4	มิลลิลิตร

3. สารละลาย 35 % EG

M2 medium	3.0	มิลลิลิตร
EG	3.5	มิลลิลิตร
Trehalose	1.5132	กรัม
PVP	0.5	กรัม
BSA	4.0	กรัม

ปรับให้ได้ ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ด้วยสารละลาย M2 medium

4. สารละลาย 0.3 M Trehalose ในสารละลาย holding medium

holding medium	27.0	มิลลิลิตร
Trehalose	3.4047	กรัม

5. สารละลาย 0.15 M Trehalose ในสารละลาย holding medium

0.3 M Trehalose	10.0	มิลลิลิตร
holding medium	10.0	มิลลิลิตร

6. สารละลาย 0.075 M Trehalose ในสารละลาย holding medium

0.15 M Trehalose	10.0	มิลลิลิตร
holding medium	10.0	มิลลิลิตร

นำสารละลายวัดค่า osmolarity ให้อยู่ระหว่าง (270-290 mOSM) ค่า pH ให้อยู่ระหว่าง (7.2-7.4) และกรองผ่านด้วยตัวกรอง ขนาด 0.22 ไมครอน เก็บที่อุณหภูมิ 2-4°C ได้นาน 2 สัปดาห์

การเตรียมเพื่อทำปฏิกิริยา PCR

BMN (Buffer Magnesium Nucleotide)

10X PCR buffer	500	ไมโครลิตร
50 mM MgCl ₂	250	ไมโครลิตร
dNTPs(100 mM each)	40	ไมโครลิตร
D.W.	410	ไมโครลิตร
ทั้งหมด	1,200	ไมโครลิตร

dNTP mix

dTTP(100 mM)	10	ไมโครลิตร
dATP(100mM)	10	ไมโครลิตร
dCTP(100mM)	10	ไมโครลิตร
dGTP(100mM)	10	ไมโครลิตร
รวม	40	ไมโครลิตร

DH-screening primer mix

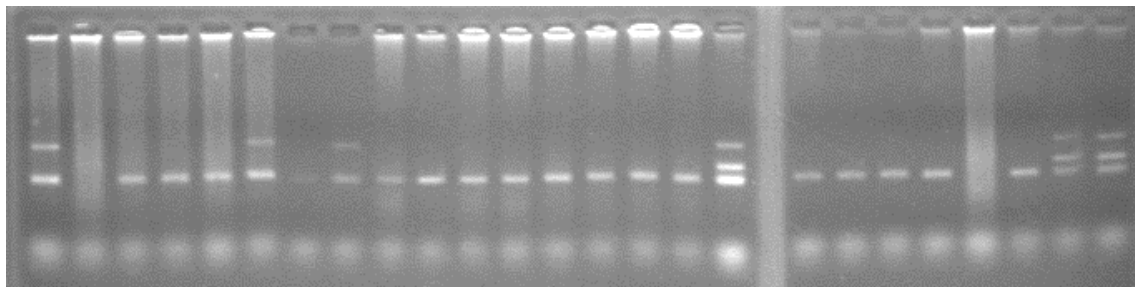
Working mouse β primer(Fw+Rev) PCR product 260 bp	20 ไมโครลิตร
Working HPRT primer(Fw+Rev) PCR product 315 bp	40 ไมโครลิตร
Working human β primer(LUG) PCR product 417 bp (LUG1A+LUG2A)	80 ไมโครลิตร
รวม	140 ไมโครลิตร

Tail lysis Buffer

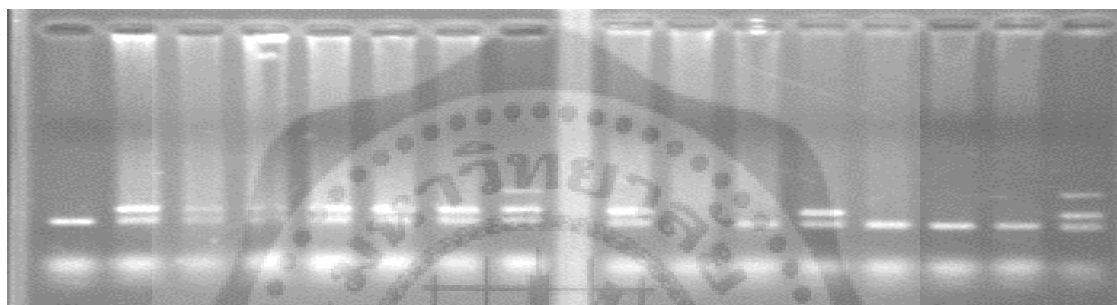
1M Tris pH 8.0 (autoclave)	2.5	มิลลิลิตร
0.5M EDTA (autoclave)	10	มิลลิลิตร
เติม dH ₂ O เพื่อปรับให้ได้ปริมาตร	47.5	มิลลิลิตร
10% SDS (filter sterilized)	2.5	มิลลิลิตร
รวม	50	มิลลิลิตร



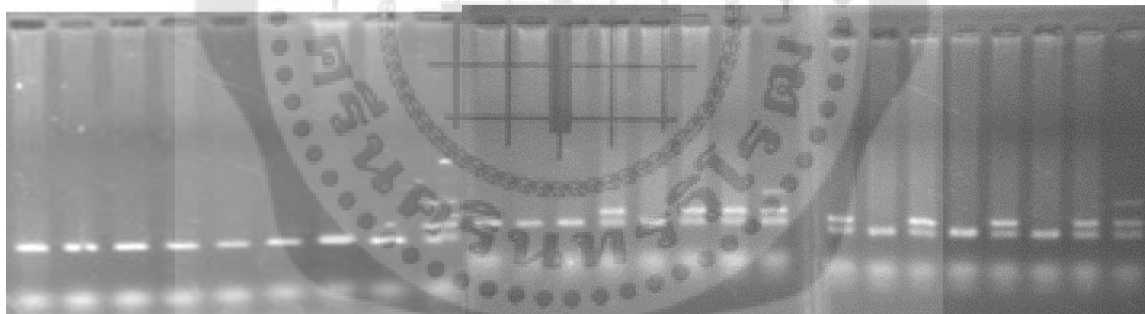
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 + 17 18 19 20 21 22 + +



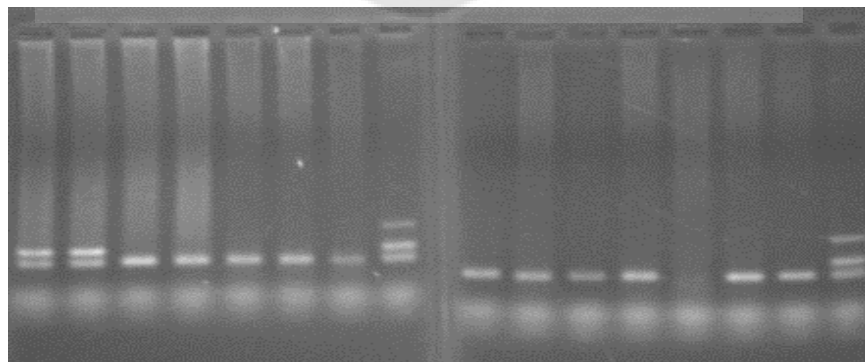
23 24 25 26 27 28 29 + 30 31 32 33 34 35 36 +



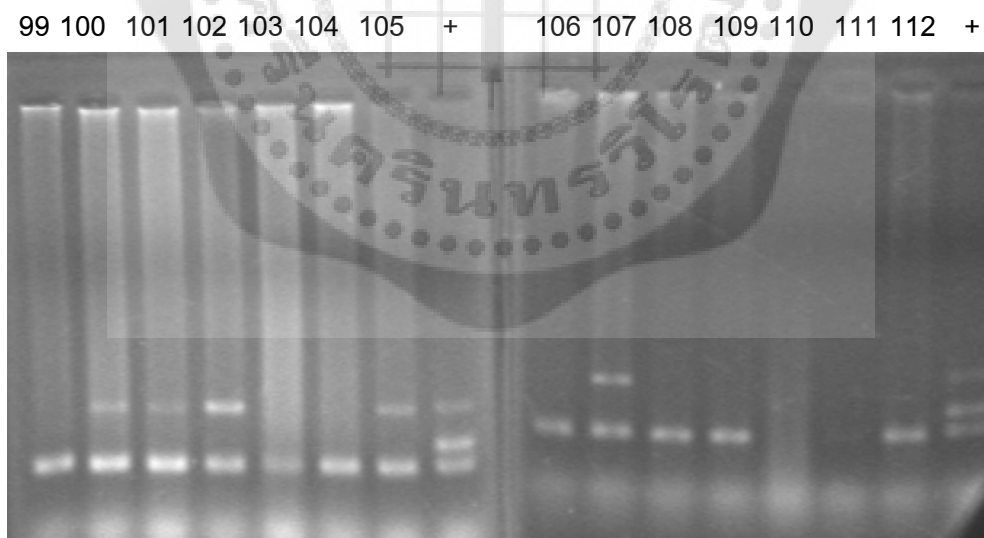
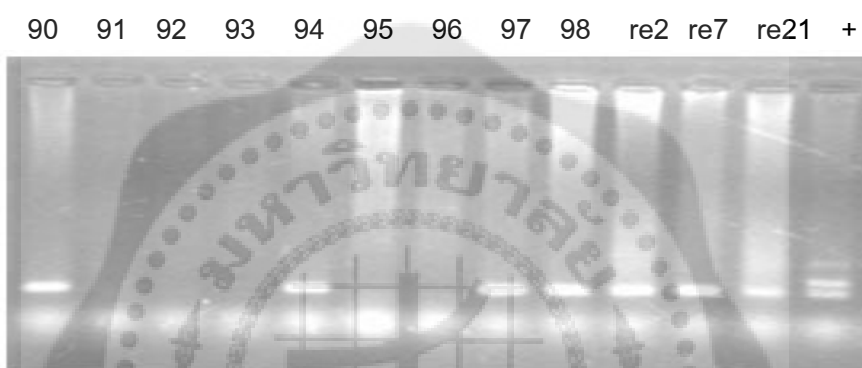
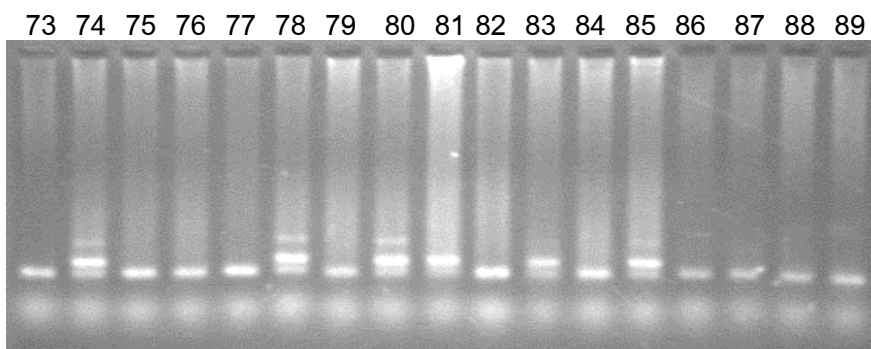
37 38 39 40 41 42 43 44 + 45 46 47 48 49 50 51 + 52 53 54 55 56 57 58 +



59 60 61 62 63 64 65 + 66 67 68 69 70 71 72 +

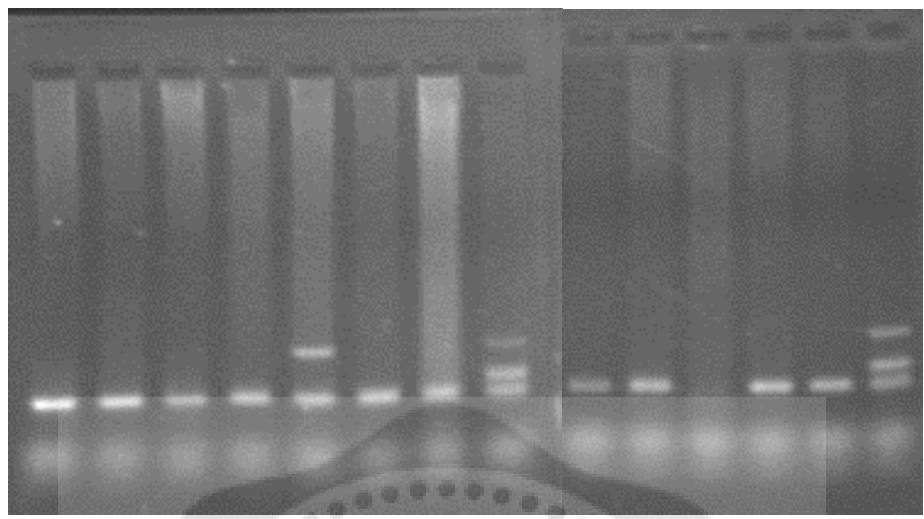


ภาพประกอบ แสดงจีโนมของหนูธาลัสซีเมียที่ทำการตรวจสอบ

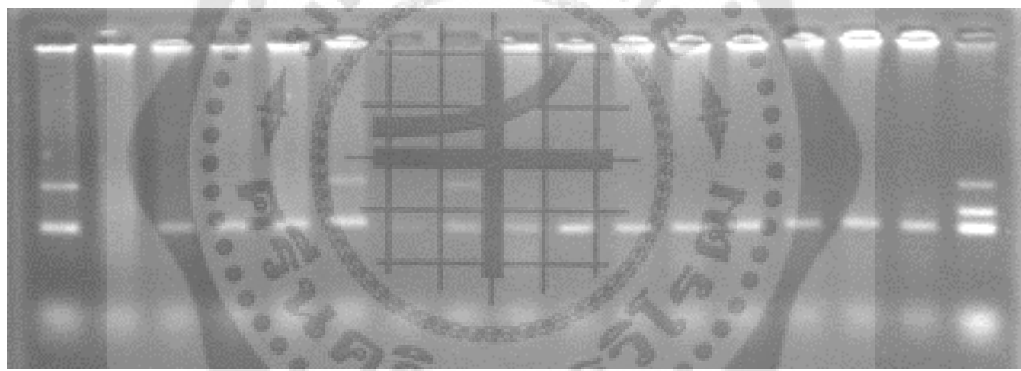


ภาพประกอบ แสดงจีโนมไทป์ของหนูธาลัสซีเมียที่ทำการตรวจสอบ(ต่อ)

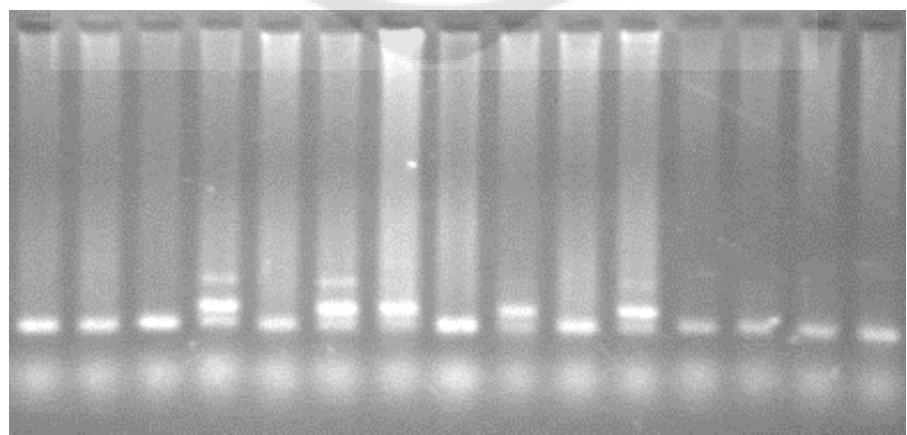
113 114 115 116 117 118 119 + 120 121 122 123 124 +



125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 +



141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155



ภาพประกอบ แสดงจีโนไทป์ของหนูธาลัสซีเมียที่ทำการตรวจสอบ(ต่อ)

No.			code	เอ็มบริโอตัวที่	genotype
1	Vitrification	E2	พีตัส	1	E2
2	Vitrification	E2	พีตัส	2	WT
3	Vitrification	E2	พีตัส	3	WT
4	Vitrification	E2	พีตัส	4	WT
5	Vitrification	E2	พีตัส	5	WT
6	Vitrification	E2	พีตัส	6	E2
7	Vitrification	E2	พีตัส	7	WT
8	Vitrification	E2	พีตัส	8	E2
9	Vitrification	E2	จุดเลือดฝังตัว	1	WT
10	Vitrification	E2	จุดเลือดฝังตัว	2	WT
11	Vitrification	E2	จุดเลือดฝังตัว	3	WT
12	Vitrification	E2	จุดเลือดฝังตัว	4	WT
13	Vitrification	E2	จุดเลือดฝังตัว	5	WT
14	Vitrification	E2	จุดเลือดฝังตัว	6	WT
15	Vitrification	E2	จุดเลือดฝังตัว	7	WT
16	Vitrification	E2	จุดเลือดฝังตัว	8	WT
17	Vitrification	E2	จุดเลือดฝังตัว	9	WT
18	Vitrification	E2	จุดเลือดฝังตัว	10	WT
19	Vitrification	E2	จุดเลือดฝังตัว	11	WT
20	Vitrification	E2	จุดเลือดฝังตัว	12	WT
21	control	E2	พีตัส	1	WT
22	control	E2	จุดเลือดฝังตัว	1	WT
23	control	E2	จุดเลือดฝังตัว	2	WT
24	control	BKO	พีตัส	1	BKO
25	control	BKO	พีตัส	2	BKO
26	control	BKO	พีตัส	3	BKO
27	control	BKO	พีตัส	4	BKO
28	control	BKO	พีตัส	5	BKO
29	control	BKO	พีตัส	6	BKO
30	control	BKO	พีตัส	7	BKO

No.		code	เอ็มบริโอตัวที่	genotype
31	control BKO	พีตัส	8	WT
32	control BKO	พีตัส	9	WT
33	control BKO	พีตัส	10	BKO
34	control BKO	พีตัส	11	BKO
35	control BKO	จุดเลือดฝิ่งตัว	1	WT
36	control BKO	จุดเลือดฝิ่งตัว	2	WT
37	control BKO	จุดเลือดฝิ่งตัว	3	WT
38	control BKO	จุดเลือดฝิ่งตัว	4	WT
39	control BKO	จุดเลือดฝิ่งตัว	5	WT
40	control BKO	จุดเลือดฝิ่งตัว	6	WT
41	control BKO	จุดเลือดฝิ่งตัว	7	WT
42	control BKO	จุดเลือดฝิ่งตัว	8	WT
43	control BKO	จุดเลือดฝิ่งตัว	9	WT
44	control BKO	จุดเลือดฝิ่งตัว	10	WT
45	control BKO	จุดเลือดฝิ่งตัว	11	WT
46	control BKO	จุดเลือดฝิ่งตัว	12	WT
47	control BKO	จุดเลือดฝิ่งตัว	13	WT
48	Vitrification BKO	พีตัส	1	BKO
49	Vitrification BKO	พีตัส	2	WT
50	Vitrification BKO	พีตัส	3	BKO
51	Vitrification BKO	พีตัส	4	BKO
52	Vitrification BKO	พีตัส	5	BKO
53	Vitrification BKO	พีตัส	6	WT
54	Vitrification BKO	พีตัส	7	BKO
55	Vitrification BKO	พีตัส	8	WT
56	Vitrification BKO	พีตัส	9	BKO
57	Vitrification BKO	พีตัส	10	WT
58	Vitrification BKO	พีตัส	11	BKO
59	Vitrification BKO	พีตัส	12	BKO
60	Vitrification BKO	พีตัส	13	BKO

No.		code	เอ็มบริโอตัวที่	genotype
61	Vitrification BKO	พีตัส	14	WT
62	Vitrification BKO	พีตัส	15	WT
63	Vitrification BKO	จุดเลือดฝิ่งตัว	1	WT
64	Vitrification BKO	จุดเลือดฝิ่งตัว	2	WT
65	Vitrification BKO	จุดเลือดฝิ่งตัว	3	WT
66	Vitrification BKO	จุดเลือดฝิ่งตัว	4	WT
67	Vitrification BKO	จุดเลือดฝิ่งตัว	5	WT
68	Vitrification BKO	จุดเลือดฝิ่งตัว	6	WT
69	Vitrification BKO	จุดเลือดฝิ่งตัว	7	WT
70	Vitrification BKO	จุดเลือดฝิ่งตัว	8	BKO
71	Vitrification BKO	จุดเลือดฝิ่งตัว	9	WT
72	Vitrification BKO	จุดเลือดฝิ่งตัว	10	WT
73	Vitrification BKO	จุดเลือดฝิ่งตัว	11	WT
74	control 654	พีตัส	1	654
75	control 654	พีตัส	2	WT
76	control 654	พีตัส	3	WT
77	control 654	พีตัส	4	WT
78	control 654	พีตัส	5	654
79	control 654	พีตัส	6	WT
80	control 654	พีตัส	7	654
81	control 654	พีตัส	8	654
82	control 654	พีตัส	9	WT
83	control 654	พีตัส	10	654
84	control 654	พีตัส	11	WT
85	control 654	พีตัส	12	654
86	control 654	จุดเลือดฝิ่งตัว	1	WT
87	control 654	จุดเลือดฝิ่งตัว	2	WT
88	control 654	จุดเลือดฝิ่งตัว	3	WT
89	control 654	จุดเลือดฝิ่งตัว	4	WT
90	control 654	จุดเลือดฝิ่งตัว	5	WT

No.		code	เอ็มบริโอตัวที่	genotype
91	control 654	จุดเลือดฝิ่งตัว	6	654
92	control 654	จุดเลือดฝิ่งตัว	7	WT
93	control 654	จุดเลือดฝิ่งตัว	8	WT
94	control 654	จุดเลือดฝิ่งตัว	9	WT
95	control 654	จุดเลือดฝิ่งตัว	10	WT
96	control 654	จุดเลือดฝิ่งตัว	11	WT
97	control 654	จุดเลือดฝิ่งตัว	12	WT
98	control 654	จุดเลือดฝิ่งตัว	13	WT
99	control E4	พีตัส	1	WT
100	control E4	พีตัส	2	E4
101	control E4	พีตัส	3	E4
102	control E4	พีตัส	4	E4
103	control E4	พีตัส	5	WT
104	control E4	พีตัส	6	WT
105	control E4	พีตัส	7	E4
106	control E4	พีตัส	8	WT
107	control E4	พีตัส	9	E4
108	control E4	จุดเลือดฝิ่งตัว	1	WT
109	control E4	จุดเลือดฝิ่งตัว	2	WT
110	control E4	จุดเลือดฝิ่งตัว	3	WT
111	control E4	จุดเลือดฝิ่งตัว	4	WT
112	control E4	จุดเลือดฝิ่งตัว	5	WT
113	control E4	จุดเลือดฝิ่งตัว	6	WT
114	control E4	จุดเลือดฝิ่งตัว	7	WT
115	control E4	จุดเลือดฝิ่งตัว	8	WT
116	vitrification E4	พีตัส	1	WT
117	vitrification E4	พีตัส	2	E4
118	vitrification E4	พีตัส	3	WT
119	vitrification E4	พีตัส	4	WT
120	control E2	พีตัส	2	WT

No.		code	เอ็มบริโอตัวที่	genotype
121	control E2	พีตัส	3	WT
122	control E2	จุดเลือดฝิ่งตัว	3	WT
123	control E2	จุดเลือดฝิ่งตัว	4	WT
124	control E2	จุดเลือดฝิ่งตัว	5	WT
125	vitrification E4	พีตัส	5	E4
126	vitrification E4	พีตัส	6	WT
127	vitrification E4	จุดเลือดฝิ่งตัว	5	WT
128	vitrification E4	จุดเลือดฝิ่งตัว	6	WT
129	control E2	พีตัส	4	WT
130	control E2	พีตัส	5	E2
131	control E2	พีตัส	6	WT
132	control E2	พีตัส	7	E2
133	control E2	พีตัส	8	WT
134	control E2	จุดเลือดฝิ่งตัว	6	WT
135	control E2	จุดเลือดฝิ่งตัว	7	WT
136	control E2	จุดเลือดฝิ่งตัว	8	WT
137	control E2	จุดเลือดฝิ่งตัว	9	WT
138	control E2	จุดเลือดฝิ่งตัว	10	WT
139	control E2	จุดเลือดฝิ่งตัว	11	WT
140	control E2	จุดเลือดฝิ่งตัว	12	WT
141	vitrification 654	พีตัส	1	WT
142	vitrification 654	จุดเลือดฝิ่งตัว	1	WT
143	vitrification 654	จุดเลือดฝิ่งตัว	2	WT
144	vitrification 654	พีตัส	2	654
145	vitrification 654	พีตัส	3	WT
146	vitrification 654	พีตัส	4	654
147	vitrification 654	พีตัส	5	654
148	vitrification 654	จุดเลือดฝิ่งตัว	3	WT
149	vitrification 654	พีตัส	6	654
150	vitrification 654	พีตัส	7	WT

No.		code	เอ็มบริโอตัวที่	genotype
151	vittrification 654	ฟิตัส	8	654
152	vittrification 654	จุดเลือดฝิ่งตัว	4	WT
153	vittrification 654	จุดเลือดฝิ่งตัว	5	WT
154	vittrification 654	จุดเลือดฝิ่งตัว	6	WT
155	vittrification 654	จุดเลือดฝิ่งตัว	7	WT





ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวทัศนีย์ ฝ่ายซ้ายคราม
วันเดือนปีเกิด	28 กรกฎาคม 2518
สถานที่เกิด	61 หมู่ 10 ตำบลเตือศรีคันไชย อำเภอวานรนิวาส จังหวัดสกลนคร
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	คอนโดมมหาวิทยาลัยมหิดล เลขที่ 99/99 หมู่ 5 ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม E-mail : sttfs@mahidol.ac.th
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2536	มัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนพังโคนวิทยาคม จังหวัดสกลนคร
พ.ศ. 2538	ประกาศนียบัตรวิชาชีพชั้นสูง สาขาสัตวรักษ์ จากสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล จังหวัดกาฬสินธุ์
พ.ศ. 2541	ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการเพาะขยายพันธุ์สัตว์ จากมหาวิทยาลัยมหิดล
พ.ศ. 2554	ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ