บทที่ 4

วิจารณ์ และสรุปผล

ผลจากการทดลองเพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูขาวในน้ำยาเพาะเลี้ยง 4 ชนิด คือ Ham's F-10, M16, T6 และ DMEM โดยเติม 10% FBS ในน้ำยาแต่ละชนิดพบว่า เอมบริโอระยะ 8- เซลล์เจริญเป็นบลาสโตซิสในน้ำยา DMEM ได้ดีกว่าในน้ำยาอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) นอกจากนั้นการเสื่อมสลายของเอมบริโอในน้ำยา DMEM ยังเกิดน้อยกว่าในน้ำยาอื่น ๆ อีกด้วย ส่วนน้ำยาเพาะเลี้ยง Ham's F-10, M16 และ T6 ให้ผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเอมบริโอไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$)

จากการทดสอบเพื่อหาสารอาหารและสารประกอบที่อาจมีผลช่วยส่งเสริมการเจริญของบลาสโตซิส เช่น essential amino acid (Gwatkin, 1966; Spindle & Pederson, 1973; Juurlink & Fedoroff, 1977) non essential amino acid (Spindle & Pederson, 1973) vitamin (Juurlink & Fedoroff, 1977; Bavister et al, 1983) epidermal growth factor, estradiol, fatty acids, insulin, somatomedin และ transferrin (อ้างโดย Spindle, 1980) พบว่ามีเพียง essential amino acid เท่านั้นที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเอมบริโอเมื่อเติมลงในน้ำยาเพาะเลี้ยงหรือเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้น จากการศึกษาของ Juurlink & Fedoroff (1977) กับ Spindle (1980) พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดอะมิโนในน้ำยาที่ใช้เพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูเมาซ์ระยะบลาสโตซิสจะส่งเสริมการเจริญ และ differentiation ของ inner cell mass ของเอมบริโอได้ดีกว่าน้ำยาเพาะเลี้ยงอื่น ๆ ที่มีกรดอะมิโนน้อยกว่าหรือไม่มีเลย Bavister et al (1983) ก็พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของแฮมสเตอร์ระยะ 8- เซลล์ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง TALP ที่เติมกรดอะมิโน 4 ชนิด คือ glutamine, phenylalanine, methionine และ isoleucine เอมบริโอเจริญเข้าสู่ระยะบลาสโตซิสจำนวนมากกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเอมบริโอในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ปราศจากกรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิดนี้ เป็นอัตราถึง 18 : 1 เท่า ในกรณีของน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM ซึ่งสนับสนุนการเจริญของเอมบริโอหนูขาวระยะ 8- เซลล์ เป็นบลาสโตซิสมากกว่าน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

DMEMก็มีปริมาณความเข้มข้นของกรดอะมิโน เช่น cystine, glutamine, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, serine, threonine, tryptophane, tyrosine, valine สูงกว่าในน้ำยาเพาะเลี้ยง Ham's F-10, M16 และ T6 หลายเท่า จึงอาจเป็นไปได้ว่ากรดอะมิโนเหล่านี้เป็นองค์ประกอบสำคัญที่มีส่วนช่วยส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอดังกล่าว เหตุผลนี้อาจแตกต่างกับรายงานของ Brinster (1965 c) กับ Cholewa & Whitten (1970) ที่พบว่าการเจริญของเอมบริโอหนูเมาซ์เข้าสู่ระยะบลาสโตซิสนั้นเกิดขึ้นได้ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีเพียง BSA หรือ polyviny-pyrrolidone (PVP) โดยปราศจากกรดอะมิโนอิสระตัวอื่น ๆ แต่อย่างไรก็ตามกรดอะมิโนนั้นเป็นสารอาหารที่จำเป็นอย่างยิ่งต่อการเจริญเติบโตของเอมบริโอกระต่าย in vitro (Kane & Foote, 1970)

น้ำยาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม in vitro นั้น ส่วนมากมักประกอบด้วยซีรั่ม หรือ unidentified protein sources ชนิดอื่น ๆ (Austin, 1961; Brinster, 1972) ที่พบว่านำมาใช้บ่อย ๆ คือ BSA และ fetal calf serum (FCS) (Whitten, 1956; Brinster, 1963; Kane & Foote, 1970; Steptoe et al, 1971; Tervit et al, 9172; Wright et al, 1976 a; Bondioli & Wright, 1981) ในระยะหลัง ๆ มีการใช้ FBS ด้วย (Juurlink & Fedoroff, 1977; Spindle, 1980; Barr et al, 1984) เนื่องจากมีรายงานว่า FCS ที่เติมในน้ำยาเพาะเลี้ยงมี bacterial toxin (Whitaker & Smith, 1977) ตลอดจน strong immuno-stimulatory effect ต่อเซลล์ของม้ามของหนูเมาซ์ที่เพาะเลี้ยง (Mishell et al, 1977) ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงใช้ FBS เป็นซีรั่มในการทดสอบการเจริญของเอมบริโอเหมือนอย่างที่ Spindle (1980) กับ Winkle et al (1984) ใช้เติมในน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูเมาซ์ระยะบลาสโตซิส โดยเชื่อว่าโปรตีนอาจไปมีบทบาทในการ stablilize membrane และลดการรั่วไหลของ endogenous amino acid ออกสู่น้ำยาที่ใช้เพาะเลี้ยง (Brinster, 1965 c; 1971) นอกจากนี้ยังคาดว่า albumin มีส่วนช่วยทำลายอนุมูลโลหะที่เป็นอันตรายในน้ำยาเพาะเลี้ยงอีกด้วย (Cholewa & Whitten, 1970) ส่วนบทบาทของซีรั่มที่มีผลต่อการแบ่งตัวของเอมบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมนั้นยังไม่ทราบแน่นอน จากการศึกษาที่ผ่านมาของ Spindle และ Pederson (1973) พบว่าปริมาณความเข้มข้นของซีรั่มที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนู-เมาซ์นั้นมีผลต่อการเจริญเติบโตของเอมบริโอ โดยจากการทดสอบน้ำยาเพาะเลี้ยง Eagle's

basal medium (BME) ที่ประกอบด้วยปริมาณของซีรั่มขนาดต่าง ๆ กันคือ 0%, 1% และ 10% พบว่าทั้ง trophoblast และ inner cell masses จะมีการเจริญได้ดีที่สุดในน้ำยาเพาะเลี้ยง BME + 10% serum ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทดสอบการเจริญของเอมบริโอหนูขาวระยะ 8-เซลล์ เป็นบลาสโตซิสในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM ที่ประกอบด้วย ชนิด และปริมาณของซีรั่มที่แตกต่างกัน และพบว่าการเจริญของเอมบริโอในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM + 10% FBS มีมากกว่าใน DMEM + 2.5% FBS อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.005$) ส่วนใน DMEM + 3 mg/ml BSA นั้นไม่พบการแบ่งตัวของเอมบริโอ อาจเนื่องจาก FBS นั้นมีสารซึ่งกระตุ้นการแบ่งตัวของเอมบริโอก็ได้ Rizzo et al (1984) รายงานว่ามีองค์ประกอบที่ยังไม่ทราบว่าเป็นอะไรอยู่ใน FBS ซึ่งช่วยส่งเสริมการเกาะรวมตัว การเจริญและการอยู่รอดของเซลล์ที่เพาะเลี้ยง นอกจากนี้ยังพบว่าใน FBS มี antiproteolytic titer (APT) ในปริมาณที่สูงกว่า FCS หลายเท่า ซึ่ง Wallis et al (1969) รายงานว่าในการเพาะเลี้ยงเซลล์ของไตจากลิงนั้นซีรั่มที่ดีต้องมี APT ในปริมาณที่สูงจึงจะสามารถยับยั้ง proteolytic enzymes ที่เกิดจากการสังเคราะห์จากเซลล์ได้ และซีรั่มที่มีผลเป็นพิษต่อเซลล์นั้นก็พบบ่อยว่าเนื่องจากขาด antiprotease factor

ใน FCS นั้นประกอบด้วยสารประกอบต่าง ๆ หลายชนิด รวมทั้งสเตอรอยด์จากพลาสมาที่มาจากแม่ (maternal plasma) ได้แก่ progesterone และ oestradiol -17β (Solomon & Sherman, 1975) สเตอรอยด์เหล่านี้มีรายงานว่ามีผลต่อการเจริญของเอมบริโอ โดย Dickman & Day (1974) พบว่าเมื่อเกิด steroidogenic enzymes 2 ชนิด คือ Δ^5-3β- hydroxysteroid dehydrogenase (3β-HSD) กับ 17β- hydroxysteroid dehydrogenase (17β-HSD) ขึ้นในเอมบริโอของหนูขาวระยะก่อนฝังตัวเมื่อใดเอมบริโอจะเพิ่มความสามารถในการสังเคราะห์ oestradiol มากยิ่งขึ้น ต่อมา Sengupta et al (1977) ได้รายงานเป็นครั้งแรกว่า oestrogen นั้นจำเป็นต่อการ differentiate ของหนู-เมาซ์ in vitro และ Roy et al (1981) ก็รายงานว่า endogenous oestrogen มีบทบาทต่อการเจริญเติบโต และ differentiation ของเอมบริโอ ใน FBS ก็น่าจะมีสเตอรอยด์เหล่านี้จากพลาสมาที่มาจากแม่ และมีบทบาทช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต และ differentiation ของเอมบริโอได้เช่นกัน สำหรับความเข้มข้นของซีรั่มที่ใช้ในการทดลองนั้นมักใช้ความเข้มข้น 10% และพบว่าแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของซีรั่มเป็น 20% ก็ไม่กระตุ้นการเจริญของเอมบริโอให้เพิ่มขึ้นแต่อย่างใด (Spindle & Pederson, 1973; New et al, 1976) และการศึกษาครั้งนี้ก็สนับสนุนการค้นคว้าของ New et al (1976) ด้วย แต่ตรงกัน-

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ข้ามกับ McLaren & Hensleigh (1975) ที่พบการเจริญของเอมบริโอสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมสูง เมื่อใช้ซีรั่มที่ความเข้มข้น 20% เติมในน้ำยาเพาะเลี้ยง Medium 199 ความแตกต่างของผลที่ได้นี้อาจขึ้นกับชนิดของน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ใช้ และคุณสมบัติหรือชนิดของซีรั่มที่เติมก็ได้ เช่น fetal cord serum (FCoS) ก็เป็นซีรั่มอีกชนิดหนึ่งที่มีผลช่วยส่งเสริมความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอ in vitro ได้ดีกว่าพวก maternal serum, maternal plasma และ fetal cord plasma ที่ปริมาณเท่า ๆ กัน (Shirley et al, 1985)

BSA ที่เตรียมขึ้นทางการค้านั้นเป็น impured protein ที่ประกอบด้วย unknown low molecular weight protein, กรดไขมันและสเตอรอยด์ (Kane, 1978) เชื่อว่าสารเหล่านี้ไปมีบทบาทต่อการเจริญของเอมบริโอ นิยมใช้เติมในน้ำยาเพาะเลี้ยงเพื่อเป็นแหล่งโปรตีนหรือใช้แทนซีรั่มในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอระยะก่อนฝังตัวของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (Brinster, 1963; Ham, 1963b; Moore et al, 1963; Yamane et al. 1975; Guilbert & Iscove, 1976; Rizzino & Sherman, 1979; Kane & Headon, 1980; Roy et al, 1981; Yodyingyuad, 1982; Bavister et al, 1983; Kane, 1983; Caro & Trounson, 1984; Meneses & Pederson, 1984; Massip et al, 1984) albumin สามารถจับโมเลกุลเล็ก ๆ ของไขมัน (Ham, 1963 a, b) และทำหน้าที่คล้ายเป็น carrier ของไขมันกับโมเลกุลชนิดอื่น ๆ ที่จำเป็นต่อการให้พลังงานและการเจริญของเซลล์ที่กำลังมีการแบ่งตัว (Iscove & Melchers, 1978) นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็นตัวกำจัดหรือยับยั้งการออกฤทธิ์ของสารพิษในน้ำยาเพาะเลี้ยง (Moskowitz et al, 1963; Temin et al. 1972; Guilbert & Isove, 1976) เช่น อนุมูลโลหะ (Holland & Pike. 1978; Van Winkle & Campione, 1981) และมีความสำคัญต่อการ hatch จาก zona pellucida ของบลาสโตซิสของหนูเมาซ์และกระต่าย (Wright et al, 1978; Kane & Headon, 1980)

การเพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูขาวระยะ 8- เซลล์ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM ซึ่งมี 3 mg/ml BSA ในการศึกษานี้ไม่พบการเจริญของเอมบริโอเหมือนในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM ที่เติม FBS ผลการศึกษานี้คล้ายกับที่นักวิชาการหลายท่านพบปัญหาในการใช้ BSA เมื่อเติมในน้ำยาที่ใช้เพาะเลี้ยงเอมบริโอ เช่น Tervit et al (1972) ทำการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของวัวใน simple medium ที่ประกอบด้วย BSA ก็แทบจะไม่พบการเจริญของเอมบริโอ แม้จะพยายามทำซ้ำ ๆ หลายครั้งก็ตาม Wright et al (1976a) พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของ วัวระยะก่อนโมรูลาเอมบริโอเจริญเข้าสู่ระยะบลาสโตซิสและ hatch ได้ดีกว่าในน้ำยาเพาะ-

เลี้ยง Ham's F-10 ที่ประกอบด้วยซีรั่ม แต่จะไม่พบลักษณะการ hatch ในน้ำยาเพาะเลี้ยง Ham's F-10 ที่เติม BSA Kane (1983) ก็ได้ทดลองเลี้ยงเอมบริโอของกระต่ายระยะโมรูลา in vitro เป็นเวลา 4 วัน โดยใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงที่ประกอบด้วย BSA ที่มีหมายเลขของการค้าต่างกัน 2 ชนิด แล้วศึกษาการเจริญของเอมบริโอเป็นบลาสโตซิส ซึ่งพบว่า BSA 2 ชนิดที่ใช้นั้นมีผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์ และการ hatch ของบลาสโตซิสแตกต่างกันโดย BSA no. 41F-9300 จะส่งเสริมการฟอร์มและการ hatch ของบลาสโตซิสมากกว่า BSA no. 119C-9325 ถึง 2 เท่า ผลการทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า BSA แต่ละตัวสามารถสนับสนุนการเจริญของเอมบริโอได้มากน้อยแตกต่างกัน BSA บางตัวอาจไม่เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของสัตว์บางชนิด ดังที่ Tervit et al (1972) และ Wright et al (1976a) ได้ประสบมาแล้ว BSA ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้อาจไม่เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงเอมบริโอหนูขาวก็ได้

เกลืออนินทรีย์ต่าง ๆ (inorganic salts) ในน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอก็มีความสำคัญต่อการเจริญของเอมบริโอ มีรายงานว่าถ้าปราศจาก Ca^{2+} ในน้ำยาเพาะเลี้ยงจะยับยั้งการแบ่งตัวและการเกิด compaction ของเอมบริโอหนูเมาซ์ระยะโมลูลา สำหรับระดับความเข้มข้นของ Ca^{2+} ที่เหมาะต่อการเจริญของเอมบริโอนั้นอยู่ในช่วงที่กว้างมาก (.4-10 mM) (Whitten, 1971; Ducibella & Anderson, 1975) PO_4^{3-}, Mg^{2+} และ SO_4^{2+} มีผลกระทบต่อการแบ่งตัวของเอมบริโอหนูเมาซ์เข้าสู่ระยะบลาสโตซิสเพียงเล็กน้อย (Wales, 1970) สำหรับ HCO_3^- นั้นมีบทบาทสำคัญในน้ำยาเพาะเลี้ยงมาก คือมีหน้าที่ในการปรับระดับ pH จากการศึกษาของ Brinster (1972) พบว่าถ้าไม่เติม HCO_3^- และ CO_2 ลงในน้ำยาเพาะเลี้ยงจะมีผลลดการเจริญของเอมบริโอ นอกจากนี้ยังพบว่าในเอมบริโอหนูเมาซ์ระยะ 8- เซลล์ ถ้ามีการปรับให้ปริมาณของ CO_2 คงที่ตลอดเวลาที่ระยะนี้เอมบริโอจะเจริญได้ถึงระยะบลาสโตซิสและเอมบริโอทั้งหมดมีเมตาโบลิสมอยู่ในระดับสูงที่สุด (Wales et al, 1969; Graves & Biggers, 1970; Quinn & Wales, 1971) K^+ เป็นอนินทรีย์สารอีกชนิดหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อการเจริญของเอมบริโอ Wales (1970) พบว่าการเจริญของเอมบริโอหนูเมาซ์ระยะก่อนฝังตัวจะเกิดขึ้นในน้ำยาที่มีช่วงความเข้มข้นของ K^+ สูง และถ้าปราศจาก K^+ การเจริญของเอมบริโอจะถูกยับยั้งอย่างสิ้นเชิง Restall & Wales (1966) พบด้วยว่าความเข้มข้นของ K^+ ในท่อสืบพันธุ์ของแกะตัวเมียนั้นสูงกว่าระดับ K^+ ในพลาสมา ดังนั้นน้ำยาเพาะเลี้ยงที่สังเคราะห์ขึ้นจึงมีระดับ K^+ ที่ค่อนข้างสูงเพื่อเลียนแบบระดับ K^+ ในของเหลวที่ท่อนำไข่ และมดลูก และจากการศึกษาครั้งนี้น้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM ก็มีระดับ K^+ ที่สูงกว่าน้ำยาเพาะเลี้ยง

Ham's F-10, M16 และ T6 ซึ่งก็อาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่พบการเจริญของเอมบริโอหนูขาวระยะ 8- เซลล์ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM มากกว่าในน้ำยาเพาะเลี้ยงอีก 3 ชนิด

ส่วนผลของวิตามินที่มีต่อการเจริญของเอมบริโอนั้น Kane and Foote (1970) พบว่าถ้าในน้ำยาเพาะเลี้ยงไม่มีวิตามินที่ละลายได้ในน้ำ 11 ชนิด ได้แก่ biotin, calcium pantothenate, choline chloride, myo-inositol, niacinamide, lipoic acid, pyridoxine HCl, riboflavin, thiamine HCl, folic acid, vitamin B12 จะลดอัตราส่วนของการฟอร์มบลาสโตซิสในเอมบริโอของกระต่าย แต่อย่างไรก็ดีวิตามินดูเหมือนว่าจะไม่มีบทบาทที่จำเป็นอย่างใดต่อการฟอร์มบลาสโตซิสในหนูเมาซ์ (Kane, 1978) วัว (Tervit et al, 1972; Bowen et al, 1975; Kamagawa et al, 1975) แกะ (Tervit et al, 1972; Trounson & Moore, 1974; Wright et al, 1976b) และสุกร (Wright, 1977; Davis & Day, 1978; Lindner & Wright, 1978) ตลอดจนแฮมส์เตอร์ (Bavister et al, 1983)

จากการศึกษาครั้งนี้เอมบริโอหนูขาวระยะ 8- เซลล์ เจริญเป็นบลาสโตซิสได้ในน้ำยาเพาะเลี้ยงทั้ง 4 ชนิด ผลอันนี้น่าจะเนื่องมาจากน้ำยาเพาะเลี้ยงทั้ง 4 ชนิดนั้นมี FBS เป็นสารประกอบที่อาจมีส่วนช่วยส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอดังได้กล่าวมาแล้ว นอกจากนี้ยังมีไพรูเวทเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญอีกด้วย บทบาทของไพรูเวทนั้นพบว่าในหนูเมาซ์จะส่งเสริมขบวนการ maturation ของ oocyte และส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอระยะ 1- เซลล์ เข้าสู่ระยะ 2-เซลล์ (Biggers et al, 1967) และยังส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอระยะ 2-เซลล์ เข้าสู่ระยะบลาสโตซิส (Brinster, 1965b; Wales & Whittingham, 1970) เอมบริโอของกระต่ายในระยะ 2-3 วันแรกของการเจริญก็ได้ไพรูเวทช่วยส่งเสริมการเจริญเช่นกัน (Brinster, 1970; Kane, 1979) จึงเห็นได้ว่าทั้งเอมบริโอของหนูเมาซ์และกระต่ายในระยะก่อนฝังตัวนั้น ไพรูเวทเข้าไปมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญอย่างมากโดยทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานที่ใช้ได้มากกว่ากลูโคสตลอดระยะก่อนฝังตัวของเอมบริโอ (Brinster, 1967 a, b; 1968 b) ซึ่งก็มีรายงานว่าเอมบริโอในระยะก่อนฝังตัวนั้นมี glycolytic activity ค่อนข้างต่ำจนกว่าจะเข้าสู่ระยะบลาสโตซิส (Fridhandler, 1959; 1961; Brinster, 1967 a., 1968 a.) แสดงว่าในช่วงระยะเวลาก่อนฝังตัวนั้น Krebs cycle activity เป็นแหล่งพลังงานใหญ่สำหรับใช้ในการเจริญของเอมบริโอ โดย pyruvate dehydrogenase system มีบทบาทในการสนับสนุนการเจริญของเอมบริโอมากกว่า glycolysis system

ตลอดระยะก่อนฝังตัวของเอมบริโอ

ถึงแม้น้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM จะมีองค์ประกอบที่จำเป็นต่อการเจริญของเอมบริโอมากมายหลายชนิด เป็นต้นว่า มีสารไพรูเวท แลคเตท กลูโคส ซึ่งเป็นแหล่งให้พลังงาน มีอนุมูลเกลือแร่หลายชนิดและวิตามินที่คาดว่าเป็นองค์ประกอบที่จำเป็น มีกรดอะมิโน และ FBS ที่เติมลงในน้ำยาเพาะเลี้ยงเป็นแหล่งไนโตรเจน นอกจากนี้น้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM + 10% FBS ก็ยังสนับสนุนการเจริญของเอมบริโอหนูขาวระยะ 8-เซลล์ เป็นบลาสโตซิสได้ดี แต่น้ำยานี้ไม่สามารถใช้เพาะเลี้ยงเอมบริโอหนูขาวระยะ 1-, 2- และ 4- เซลล์ได้เลย อาจเป็นได้ว่าการที่เอมบริโอหนูขาวในระยะต้น ๆ ไม่สามารถเจริญในน้ำยาเพาะเลี้ยงดังกล่าวได้เป็นเพราะยังขาดองค์ประกอบที่จำเป็นชนิดอื่น ๆ นอกเหนือจากที่กล่าวมาแล้ว หรือขาดเอนไซม์ หรือสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมเช่นเดียวกับที่พบในท่อนำไข่

จากการศึกษาอิทธิพลของ pH ของน้ำยาเพาะเลี้ยงต่อการเจริญของเอมบริโอหนูขาว พบว่าเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ เจริญในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ระดับ pH สูง (7.5-7.9) ได้ดีกว่าที่ระดับ pH ต่ำ (6.9-7.3) ($p < 0.05$) แตกต่างจากที่พบในหนูเมาซ์ที่เอมบริโอเจริญในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ระดับ pH ต่ำ (6.4-7.2) ได้ดีกว่าที่ระดับ pH สูงกว่า 7.2 (Brinster, 1965 a.) และในแฮมส์เตอร์ก็พบว่าเอมบริโอเจริญในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีระดับ pH 6.8-7.2 ได้ดีกว่าที่ระดับ pH 7.4-7.8 (Yodyingyuad, 1982) ในกระต่ายพบการเจริญของเอมบริโอเกิดขึ้นในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีระดับ pH กว้างมากคือ 6.0-7.8 (Kane, 1974) ข้อนี้อาจสะท้อนถึงความแตกต่างของระดับ pH ภายในมดลูกในระยะก่อนที่เอมบริโอจะเข้าฝังตัวในสัตว์ชนิดต่าง ๆ ว่าระดับ pH ที่เหมาะต่อการเจริญของเอมบริโอระยะก่อนฝังตัวของสัตว์แต่ละชนิดไม่เหมือนกัน เหมือนอย่างที่ Hall (1936) ทดลองวัดระดับ pH ในมดลูกของหนูขาวและหนูเมาซ์ in vivo พบว่าในหนูขาวนั้นมีระดับ pH โดยเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 7.21-7.67 ส่วนหนูเมาซ์ค่าเฉลี่ยของระดับ pH อยู่ระหว่าง 7.11-7.46 นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงระดับ pH ของของเหลวในท่อสืบพันธุ์ของหนูขาวโดย Balandau et al (1958) และพบว่าของเหลวจาก ligated uterus มีระดับ pH 7.74; ของเหลวจาก dilated ampulla มีระดับ pH 8.04; ของเหลวจาก peri-ovarian sac มีระดับ pH 8.05 และของเหลวจาก peritoneal cavity มีระดับ pH 7.47 ส่วนการศึกษาถึงระดับ pH ของของเหลวในท่อสืบพันธุ์ของกระต่าย Vishwakarma (1962) รายงานถึงค่าเฉลี่ยของระดับ pH ของของเหลว

จาก ligated uterus มีระดับ pH 7.857 และของเหลวจาก ligated fallopian tube มีระดับ pH 7.913 ในขณะที่ whole blood มีระดับ pH 7.522 ในการศึกษาครั้งนี้เอมบริโอของหนูขาวระยะ 8-เซลล์ ซึ่งได้มาจากมดลูกเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM + 10% FBS พบการเจริญเป็นบลาสโตซิสดีที่สุดที่ระดับ pH 7.5-7.9 ซึ่งใกล้เคียงกับค่าระดับ pH ของของเหลวจาก ligated uterus ที่ Balandau et al (1958) รายงานไว้ ผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าเอมบริโอจะเจริญได้ดีที่สุดเมื่อสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง in vitro ใกล้เคียงกับสภาพตามธรรมชาติ in vivo

ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่า osmolality ของน้ำยาเพาะเลี้ยงก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญของเอมบริโอหนูขาว โดยเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ เจริญเป็นบลาสโตซิสได้ดีในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีระดับ osmolality 320-350 mosmol/kg เปอร์เซนต์ของเอมบริโอที่เจริญที่ระดับ 350 mosmol/kg แตกต่างจากที่ระดับ 290 หรือ 380 mosmol/kg อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในสัตว์ชนิดอื่นเท่าที่พบมีรายงาน เช่น ในหนูเมาซ์และกระต่าย ก็พบว่าระดับ osmolality นั้นมีผลต่อการเจริญของเอมบริโอระยะ 2-เซลล์ เป็นบลาสโตซิสเช่นกัน (Brinster, 1965 a; Whitten, 1971; Naglee et al. 1969) ในหนูเมาซ์น้ำยาเพาะเลี้ยงที่ใช้เพาะเลี้ยงเอมบริโอระยะ 2-เซลล์ เป็นบลาสโตซิสได้ดีนั้นมีระดับ osmolality 200-354 mosmol/kg. (Brinster, 1965 a.) โดยช่วงที่เจริญได้ดีที่สุดมีระดับ 250-285 mosmol/kg (Whitten, 1971) เอมบริโอของกระต่ายระยะ 2-เซลล์ มีการเจริญเป็นบลาสโตซิสในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีระดับ osmolality 230-339 mosmol/kg (Naglee et al, 1969) ส่วนช่วงที่เจริญดีที่สุดมีระดับ 270 mosmol/kg ซึ่งเท่ากับระดับ osmolality ของน้ำยาที่ใช้เพาะเลี้ยง oocyte ของกระต่าย และพบการแบ่งตัวคือระยะ meiosis II มากที่สุด (Bae & Foote, 1980) ส่วน osmolality ของน้ำยาเพาะเลี้ยง oocyte ของสัตว์ชนิดอื่น เช่น pig oocytes มีระดับ 285 mosmol/kg (McGaughey, 1977) และ hamster oocytes มีระดับ 285-295 mosmol/kg (Gwatkin & Haidri, 1973) ส่วนเอมบริโอของแฮมส์เตอร์ระยะ 2-เซลล์ ที่มีการแบ่งตัวเป็น 3-, 4- เซลล์ พบในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีระดับ osmolality 250-300 mosmol/kg (Yodyingyuad, 1982) จะเห็นได้ว่าในสัตว์แต่ละชนิด ตลอดจนในแต่ระยะของการเจริญของเอมบริโอมีการเจริญในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีระดับ osmolality ที่แตกต่างกัน ที่อาจจะคล้ายกันสิ่งหนึ่งก็คือ oocyte และเอมบริโอของสัตว์ต่าง ๆ ที่กล่าวมานี้มีการเจริญดีในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีระดับ osmolality ต่ำ (250-295

mosmol/kg) แต่เอมบริโอหนูขาวระยะ 8-เซลล์กลับมีการเจริญดีในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีระดับ osmolality สูง (320-350 mosmol/kg) และการเสื่อมสลายก็น้อยกว่าพวกที่เลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มี osmolality สูงหรือต่ำกว่านี้ อาจเป็นไปได้ว่าระดับ osmolality นี้มีค่าใกล้เคียงกับระดับ osmolality ของของเหลวในมดลูกในช่วงที่เอมบริโอหนูขาวเจริญถึงระยะ 8-เซลล์ - บลาสโตซิส ข้อนี้จำเป็นต้องมีการศึกษากันอย่างละเอียดต่อไปเพราะยังไม่เคยพบมีผู้ใดรายงานไว้เลย

จากการศึกษาถึงความอยู่รอดของเอมบริโอภายหลังที่ได้ทำการเพาะเลี้ยง in vitro เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง โดยทำการถ่ายฝากเอมบริโอไปยัง recipient ที่ได้รับการกระตุ้นให้มีการตั้งท้องเทียมในระยะเวลาที่สอดคล้องกันกับ donor แล้วเปรียบเทียบจำนวน fetus ที่ฝังตัวในมดลูกของ recipient และจำนวนลูกอ่อนที่ครบกำหนดคลอดของทั้งกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ปรากฏว่าไม่พบความแตกต่างทั้งจำนวนฟีตัสที่ฝังตัวที่มดลูก และจำนวนลูกอ่อนที่คลอด แสดงว่าสภาพแวดล้อมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไม่มีผลในการยับยั้งหรือทำลายระบบการเจริญเติบโตของเอมบริโอแต่อย่างใด

Bowman & McLaren (1970 a) กับ Quinn & Wales (1973) รายงานว่าเอมบริโอหนูเมาซ์ random bred ที่เพาะเลี้ยง in vitro มีอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ และ metabolic activity ต่ำกว่าเอมบริโอที่เจริญ in vivo และมีชีวิตรอดน้อยกว่าอีกด้วยเมื่อทำการถ่ายฝากไปยัง recipient ที่ตั้งท้องเทียม (Bowman & McLaren, 1970 b) นอกจากนี้ยังพบมี differentiation น้อยกว่าอีกด้วย (McReynolds & Hadek, 1972) ผลจากการศึกษาเปรียบเทียบทาง ultrastructure ของบลาสโตซิสหนูเมาซ์ที่มีการเจริญ in vivo และ in vitro โดย McReynolds & Hadek (1972) ปรากฏว่า differentiation ของ nuclear และ cytoplasmic structure ต่ำในเอมบริโอหนูเมาซ์ที่เพาะเลี้ยง in vitro heterochromatin ลดลง สะท้อนให้เห็นว่ามีการแสดงออกของ gene ต่ำกว่าปกติ และ nucleoli ก็ลดการเจริญด้วยไรโบโซมในไซโตพลาสซึมลดจำนวน mitochondria แต่ละอันแสดงจำนวน cristae เพียง 2-3 อัน ความแตกต่างดังกล่าวแสดงว่าเกิดการสูญเสียทาง metabolic ability เป็นเหตุให้จำนวนฟีตัสที่ได้ภายหลังการถ่ายฝากต่ำ ลักษณะเช่นนี้แสดงว่าสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง in vitro ยังเป็น suboptimal ต่อมา Snow (1975) และ Harlow & Quinn (1979) กล่าวว่าสภาวะแวดล้อม in vitro นั้นได้รับการปรับปรุงขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพ ปัจจุบันการถ่ายฝากเอมบริโอ

ที่ทำการเพาะเลี้ยง in vitro จนเข้าสู่ระยะบลาสโตซิสไปยัง recipient นั้น ให้จำนวนลูกได้พอ ๆ กับบลาสโตซิสจากมดลูก in vivo คือเอมบริโอมีชีวิตอยู่รอดเพิ่มมากขึ้น Harlow & Quinn (1982) ยังพบอีกว่าเอมบริโอของหนูเมาซ์ที่ทำการเพาะเลี้ยงจนเข้าสู่ระยะบลาสโตซิส in vitro จะประกอบด้วยจำนวนเซลล์ในระดับเดียวกับเซลล์ของบลาสโตซิสที่เจริญ in vivo เพียงแต่อัตราการแบ่งตัวของเซลล์ใน inner cell masses ของเอมบริโอที่ทำการเพาะเลี้ยง in vitro จะค่อนข้างช้ากว่าพวกที่เจริญ in vivo เท่านั้น

จากการศึกษาครั้งนี้ผลการทดลองที่ได้นั้นมีลักษณะคล้ายคลึงกับที่ Folstad et al (1969) ศึกษาผ่านมาคือสามารถเพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูขาวระยะ 8-เซลล์ เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง จนแบ่งตัวเข้าสู่ระยะบลาสโตซิส in vitro ได้สำเร็จ โดยพบว่าน้ำยาที่เหมาะสมในการใช้เพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูขาวระยะ 8-เซลล์ คือน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM + 10% FBS แต่น้ำยาชนิดนี้ไม่สามารถส่งเสริมการแบ่งตัวของเอมบริโอหนูขาวระยะ 1-, 2- และ 4-เซลล์ ได้สำหรับระดับ pH และระดับ osmolality ของน้ำยาเพาะเลี้ยงพบว่ามีผลต่อการเจริญของเอมบริโอหนูขาวระยะ 8-เซลล์ ระดับ pH 7.5 และระดับ osmolality 350±5 mosmol/kg พบการเจริญเติบโตของเอมบริโอมากที่สุด และสภาพที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูขาวครั้งนี้ไม่มีผลกระทบต่อการเจริญและความอยู่รอดของเอมบริโอแต่อย่างใด เนื่องจากเมื่อทำการถ่ายฝากเอมบริโอที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ไปยัง pseudopregnant recipients เอมบริโอสามารถเข้าฝังตัวเจริญเป็นฟีตัสและมีชีวิตอยู่จนครบกำหนดคลอดเช่นเดียวกับการถ่ายฝากเอมบริโอที่เจริญ in vivo