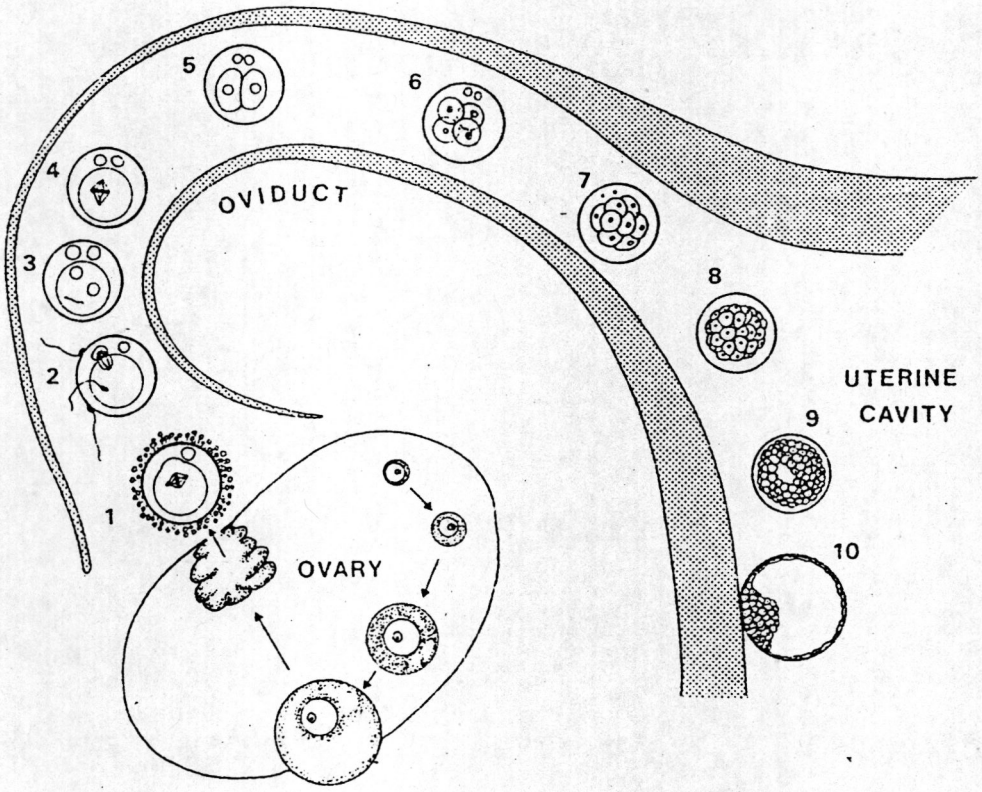
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ไข่ที่หลุดจากรังไข่จะอยู่ในระยะ second metaphase ของการแบ่งตัวแบบไมโอซีส ต่อจากนั้นไข่ซึ่งล้อมรอบด้วยกลุ่มเซลล์ cumulus oophorus จะผ่านเข้าสู่ท่อนำไข่ (oviduct หรือ Fallopian tube) ขบวนการปฏิสนธิ (fertilization) จะเกิดที่ส่วน ampulla ของท่อนำไข่ (รูปที่ 1.1) ในขณะที่สเปิร์มเดินทางมาสู่บริเวณนี้มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นกับตัวสเปิร์ม 2 ขั้นตอน คือ capacitation และ acrosome reaction ซึ่งทำให้สเปิร์มสามารถผ่าน follicular cells และ zona pellucida ได้ และเจาะเข้าไปในไข่ได้สำเร็จ ไข่ที่ได้รับการผสมแล้วจะมีการแบ่งตัวแบบ meiosis ต่อไปจนสมบูรณ์ มีการขับ second polar body ออกจากไข่ เกิด female และ male pronuclei ซึ่งมีโครโมโซมจากแม่และพ่อขึ้น ต่อมา nuclear membrane จะสลายไป โครโมโซมจากแต่ละ pronucleus จะจับคู่กัน ขบวนการปฏิสนธิจะเสร็จสมบูรณ์เมื่อมีการสร้าง diploid complement (รูปที่ 1.2) ซึ่งเป็นลักษณะของโครโมโซมในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ไข่ที่ผสมแล้ว ซึ่งก็คือเอมบริโอนั้นจะแบ่งตัวต่อไปตลอดระยะเวลาที่เคลื่อนผ่านท่อนำไข่และลงสู่มดลูก (รูปที่ 1.1) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมชนิดต่าง ๆ เอมบริโอใช้ระยะเวลาเคลื่อนผ่านท่อนำไข่ประมาณ 3-8 วัน ภายหลังการเกิดปฏิสนธิ เอมบริโอที่เคลื่อนลงสู่มดลูกอยู่ในระยะต่าง ๆ ของการแบ่งตัวระหว่าง 4-เซลล์ ถึงบลาสโตซิสระยะต้น (Blandau, 1961) ส่วนการฝังตัว (implantation) ของเอมบริโออาจใช้เวลา 1 วัน หรือหลายสัปดาห์ต่อมา ขึ้นกับชนิดของสัตว์ (Whittingham, 1979)

เมื่อทราบถึงรายละเอียดเกี่ยวกับขบวนการปฏิสนธิและการเจริญของเอมบริโอในระยะแรกก่อนที่จะมีการฝังตัวดีแล้ว จะเห็นได้ว่าเมื่อต้องการศึกษาทดลอง และเพาะเลี้ยง (culture) เอมบริโอนอกท่อสืบพันธุ์ (reproductive tract) ของเพศเมียแล้ว จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษาและคิดค้นเทคนิค ตลอดจนวิธีการที่ทันสมัยและเหมาะสมต่อการนี้ แม้ว่าจะมีนักวิจัยก่อนหน้านี้หลายท่านพยายามที่จะทำการเพาะเลี้ยงเอมบริโอ in vitro มาก่อนก็ตาม (ดูงานรวบรวมของ Whittingham, 1975; Gwatkin, 1977) แต่ความเจริญ



KEY:

1: egg released from ovary with first polar body and second metaphase spindle

2: sperm entry into egg, second polar body forming

3: male and female pronucleus formation. Sperm tail in egg cytoplasm

4: first cleavage metaphase spindle

5: 2-cell stage

6: 4-cell stage

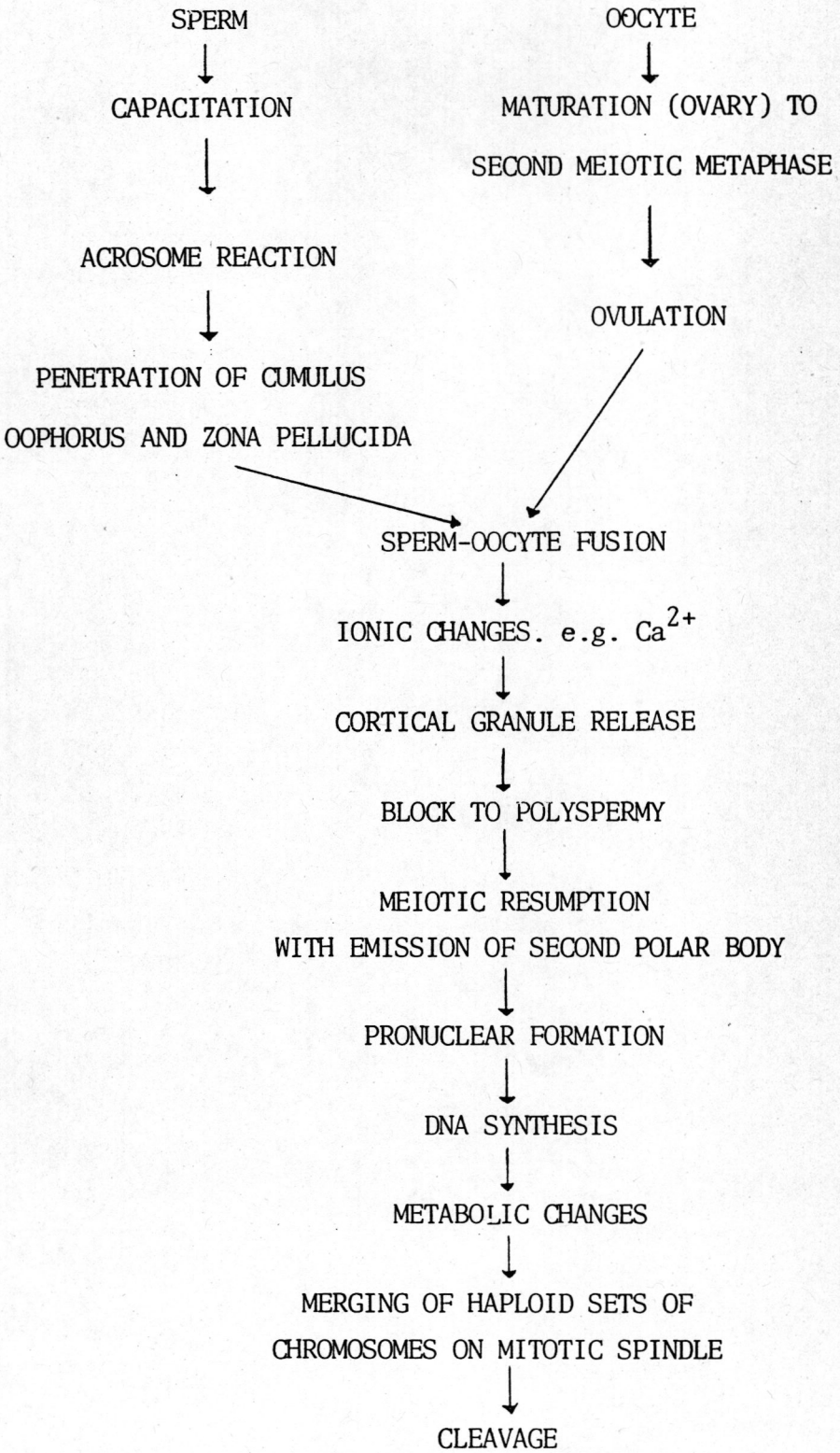
7: 8-cell stage

8: morula

9: early blastocyst, blastocoele cavity forming

10: blastocyst starting to implant

รูปที่ 1.1 แสดงแผนภาพที่ใช้แทนลักษณะการเกิดการเจริญของไข่, การตกไข่, ขบวนการผสมพันธุ์ และเอมบริโอระยะก่อนฝังตัว (จาก Whittingham, 1979)



รูปที่ 1.2 สรุปเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นในระบบท่อสืบพันธุ์ของเพศเมียที่นำไปสู่การปฏิสนธิ

ก้าวหน้าทางด้านนี้เป็นไปอย่างเชื่องช้าทั้ง ๆ ที่มีรายงานมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1880 ว่า Schenk เป็นคนแรกที่พยายามทำการเพาะเลี้ยงเอมบริโอ in vitro และต่อมาปี ค.ศ. 1890 Heape เป็นคนแรกที่สามารถเพาะเลี้ยงและถ่ายฝาก (transfer) เอมบริโอของกระต่าย อย่างไรก็ตาม ปรากฏว่าเทคนิคต่าง ๆ ที่เป็นที่ยอมรับและสามารถนำมาใช้เพาะเลี้ยงเอมบริโอ in vitro ได้นั้นเพิ่งเกิดขึ้นเมื่อ 20-25 ปีที่ผ่านมา สาเหตุเนื่องมาจาก

1. ขนาดไข่ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมนั้นเล็กมาก (เมื่อปราศจาก zona pellucida ขนาดกว้าง 60-180 μm) และจำนวนไข่ที่เกิดจากการตกไข่แต่ละครั้งมีจำกัด แม้ในสัตว์ที่มีการตกไข่ทีละมาก ๆ (polyovular species) เช่น สุกร หนูเมาซ์ และกระต่าย ก็ตาม

2. สภาวะแวดล้อมภายนอก in vitro ที่เตรียมไว้เพื่อการเพาะเลี้ยงไม่เหมาะสม นอกจากนี้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมแต่ละชนิดยังอาจมีความต้องการสภาวะแวดล้อมสำหรับการเจริญของเอมบริโอในระยะแรกที่แตกต่างกัน ดังนั้นการเปลี่ยนสภาวะแวดล้อมภายนอกให้เหมือนภายใน (in vivo) จึงยากลำบากยิ่งขึ้น

แม้ว่าในปัจจุบันไข่และเอมบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลายชนิด เช่น หนูเมาซ์ กระต่าย วัว แกะ และคน สามารถทำการผสมและเพาะเลี้ยงนอกร่างกายได้ และสามารถเจริญเติบโตต่อไปจนคลอดเป็นปกติภายหลังการถ่ายฝากไปยัง foster mother ก็ตาม แต่สัตว์ทดลองอีกหลายชนิด เช่น หนูขาว แฮมส์เตอร์ ก็ยังไม่สามารถทำได้ในระดับเดียวกัน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาวิจัยเพื่อให้ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมสำหรับสัตว์เหล่านี้ เพื่อให้สามารถเพาะเลี้ยงนอกร่างกายได้เช่นเดียวกับสัตว์อื่น ๆ

<u>การเพาะเลี้ยงเอมบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม</u>

การเพาะเลี้ยงเอมบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมนั้นปรากฏครั้งแรกเมื่อประมาณ 100 ปีที่ผ่านมา โดย Schenk (1880) เป็นคนแรกที่พบว่ามีการแบ่งตัวในเอมบริโอของกระต่ายและหนูตะเภาที่เพาะเลี้ยง in vitro และนับตั้งแต่นั้นมามีนักวิชาการอีกหลาย ๆ ท่านให้ความสนใจต่อการเพาะเลี้ยงเอมบริโอ in vitro มากยิ่งขึ้น มีการปรับปรุงเทคนิคต่าง ๆ เพื่อนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยง ศึกษาถึงสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญของเอมบริโอ ตลอดจนสิ่งที่จำเป็นต่อการเจริญของเอมบริโอ เพื่อประโยชน์ในการศึกษาและทำความเข้าใจในการเจริญเติบโต

ของเอมบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมรวมทั้งคนได้ดียิ่งขึ้น ตลอดจนนำมาปรับปรุงและประยุกต์ใช้ในด้านการสืบพันธุ์ต่อไป

การเจริญเติบโตนอกร่างกายของเอมบริโอในระยะก่อนฝังตัว (preimplantation embryo) จากไข่ที่ได้รับการผสมถึงระยะบลาสโตซิสของสัตว์ที่ใช้ในการทดลองนั้น มีหลายชนิดที่ประสบผลสำเร็จในการทดลอง ส่วนในบางชนิดพบว่าอัตราการเจริญนอกร่างกายค่อนข้างต่ำ อาจเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมและความต้องการทางเมตาบอลิคเพื่อการเจริญเติบโต in vitro นั้นยังไม่เหมาะสมก็เป็นได้ แต่ในสัตว์บางชนิดมีการศึกษากันแล้วอย่างกว้างขวาง และทราบถึงสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอจากระยะไซโกท (zygote) ถึงระยะบลาสโตซิส เช่น ในหนูเมาซ์ (Biggers, 1979; Brinster & Troike, 1979; Brackett, 1981) พบว่าเอมบริโอในระยะก่อนฝังตัวเจริญจนถึงระยะบลาสโตซิสได้ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่กำหนดขึ้น in vitro ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากในสัตว์ชนิดนี้เป็นที่ทราบกันดีพอสมควรถึงความต้องการทางสภาวะแวดล้อมและเมตาบอลิคสำหรับการเจริญเติบโตระยะนี้ และเมื่อทำการถ่ายฝากไปยัง recipient พบว่าสามารถเจริญต่อไปจนครบกำหนดคลอดออกมาเป็นลูกปกติได้เช่นกัน นอกจากในหนูเมาซ์ การเพาะเลี้ยง in vitro ในกระต่ายก็ทำได้เช่นกัน (Seidel et al, 1976; Binkerd & Anderson, 1979; Kane & Headon, 1980) ส่วนการศึกษาเช่นเดียวกันนี้ในหนูขาวและแฮมส์เตอร์ยังไม่ประสบผลสำเร็จมากนัก (Folstad et al, 1969; Yamamura & Markert, 1981; Whittingham & Bavister, 1974; Liebfried et al, 1982; Yodyingyuad, 1982; Bavister et al, 1983) การเพาะเลี้ยงเอมบริโอของสัตว์เลี้ยงประเภทวัวและแกะ มีผู้ศึกษากันมากเนื่องจากเป็นสัตว์เศรษฐกิจเท่าที่ประสบผลสำเร็จนั้นมักเป็นการเพาะเลี้ยงใน undefined media ที่เติมส่วนผสมของซีรั่มลงไปด้วย (Tervit & Row, 1974; Wright et al, 1976 a,b,c; Wright, 1977; Peters et al, 1977; Davis & Day, 1978; Linder & Wright, 1978; Boone et al, 1978; Brackett et al, 1980) ตารางที่ 1.1 แสดงเอมบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลาย ๆ ชนิดที่สามารถเพาะเลี้ยงจากระยะ 1-เซลล์ ถึง บลาสโตซิสได้สำเร็จ ส่วนตารางที่ 1.2 เป็นน้ำยาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

ตารางที่ 1.1 แสดงเอมบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลาย ๆ ชนิด ที่สามารถเพาะเลี้ยง in vitro จากระยะ 1- เซลล์ ถึงบลาสโตซิสได้สำเร็จ

Date	Species	References
1967	Mouse	Whittingham & Biggers
1968	Mouse	Whitten & Biggers
1969	Rabbit	Maurer, Whitener & Foote
1971	Man	Steptoe, Edwards & Purdy
1972	Sheep	Tervit, Whittingham & Rowson
1976	Cow	Wright, Anderson, Cupps & Drost

(จาก Yodyingyuad, 1982)

ตารางที่ 1.2 แสดงส่วนประกอบของน้ำยาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอจากระยะ 1- เซลล์ ถึงบลาสโตซิส in vitro

A. กระต่าย, B. หนูเมาซ์, C. แกะและวัว

Component	Concentration		
	A. Kane & Foote* (1970) g/litre	B. Whitten & Biggers (1968) g/litre	C. Tervit, Whittingham & Rowsow (1972) mM
NaCl	6.683	4.000	107.70
KCl	0.356	0.356	7.16
$CaCl_2$	-	-	1.71
$CaCl_2.2H_2O$	0.251	-	-
KH_2PO_4	0.162	0.162	1.19
$MgSO_4.7H_2O$	0.294	0.294	-
$NaHCO_3$	2.106	2.106	25.07
Na lactate	-	2.416	3.30
L(+)Ca lactate.$4H_2O$	-	0.496	-
Na pyruvate	-	0.036	0.33
Glucose	1.801	1.000	1.50
BSA	15.000	4.000	32 mg/ml
Penicillin, K salt	100 i.u./ml	75 µg/ml	100 i.u./ml
Streptomycin sulphate	50 µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml

* น้ำยาเพาะเลี้ยงนี้ยังประกอบด้วยสารอาหารประเภท กรดอะมิโน วิตามิน สารให้กรดนิวคลีอิค และ trace element

ความต้องการสารให้พลังงานของเอมบริโอในระยะก่อนฝังตัว

จากการศึกษาและทดลองพบว่า การเจริญเติบโตของเอมบริโอในระยะแรก ๆ ในหนูเมาซ์นั้น สารประกอบที่เป็นแหล่งพลังงานในการเปลี่ยนแปลงเมตาโบลิสมซึ่งมีความสำคัญอย่างมากต่อการเจริญของเอมบริโอจากระยะ 1-เซลล์ จนถึงบลาสโตซิส ได้แก่ ไพรูเวทและแลคเทต ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่คล้ายกับ Krebs-Ringer bicarbonate salt solution (Biggers et al, 1965; 1967; Whitten & Biggers, 1968) ส่วนกลูโคสซึ่งปกติแล้วจัดเป็นแหล่งพลังงานสำคัญสำหรับเซลล์ของสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมกลับไม่สามารถส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอระยะ 1- หรือ 2- เซลล์ได้ พบว่าการเจริญของเอมบริโอหนูเมาซ์ในระยะแรก ๆ เอมบริโอจะ oxidize ไพรูเวทมากกว่ากลูโคส (Brinster, 1967 a.,b.) แต่พอถึงระยะบลาสโตซิสเอมบริโอสามารถ oxidize กลูโคสได้ดีเท่า ๆ กับไพรูเวท จึงจัดไพรูเวทเป็นแหล่งพลังงานใหญ่สำหรับ oocyte ไซโกท และเอมบริโอระยะ 2- เซลล์ (Brinster, 1965c; 1967 a.,b., Biggers et al, 1967) ส่วนกลูโคสจะเป็นแหล่งพลังงานที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอหนูเมาซ์ให้เจริญได้ดีภายหลังระยะ 8- เซลล์ ความต้องการสารจำพวกกรดอะมิโน (essential amino acid) นั้นไม่จำเพาะเจาะจงในเอมบริโอของหนูเมาซ์ระยะก่อนบลาสโตซิส เอมบริโอสามารถเจริญได้ถึงระยะบลาสโตซิสในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มี crystallized bovine serum albumin (BSA) หรือ polyvinyl-pyrrolidone เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงลำพังโดยปราศจากกรดอะมิโนอิสระตัวอื่น ๆ ก็เพียงพอต่อการเจริญเป็นปกติได้ (Brinster, 1965 c; 1968 c; Cholewa & Whitten, 1970) แต่กรดอะมิโนกลับจำเป็นอย่างมากต่อการเจริญของเอมบริโอของกระต่าย in vitro (Kane & Foote, 1970) นอกจากนี้เอมบริโอในระยะก่อนฝังตัวยังไม่ต้องการ nucleic acid precursors แต่อย่างใด เนื่องจากเอมบริโอสามารถสังเคราะห์กรดนิวคลีอิคที่ต้องการขึ้นจาก simple exogenous carbon ในขณะที่มีชีวิตอยู่ในน้ำยาเพาะเลี้ยงอีกด้วย (Sanyal & Meyer, 1970)

การศึกษาเกี่ยวกับการเจริญของเอมบริโอของหนูขาวในระยะก่อนฝังตัวพบมีรายงานไว้น้อยมาก ส่วนมากมักเป็นการศึกษาในระยะหลังการฝังตัวแล้ว (postimplantation) หรือระยะที่ก่อกำเนิดอวัยวะ (organogenesis) มากกว่า Suzuki & Iizuka (1968) เป็นพวกแรกที่พยายามเพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูขาวในระยะ 1-, 2- และ 4- เซลล์ in vitro โดยใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงหลายชนิดได้แก่ Waymouths' MB 752/1, Earle Balanced

Salt; TC-199 และ Fischer's และทดลองเปรียบเทียบการใช้ BSA กับ 10% rat serum เมื่อเติมลงในน้ำยาเพาะเลี้ยงแต่ละชนิดด้วย แต่การทดลองประสบความล้มเหลว เนื่องจากภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เอมบริโอไม่มีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นและเสื่อมสลายในที่สุด ในปี ค.ศ. 1969 Folstad และคณะ ได้พยายามที่จะเพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูขาว in vitro อีกโดยใช้เอมบริโอระยะ 2-, 4- และ 8- เซลล์ เพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีสารให้พลังงานและไนโตรเจน ความสำเร็จในการเพียรพยายามครั้งนี้สามารถเพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูขาวระยะ 8- เซลล์ ที่นำออกมาจากมดลูกของหนูที่ตั้งท้องเป็นวันที่ 4 (วันที่ 1 คือวันที่พบสเปิร์มในช่องคลอด) แล้วนำมาเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงพบว่ามีการเจริญจนถึงระยะบลาสโตซิสได้ โดยอาศัยวิธีของ Brinster (1963) ซึ่งมีโซเดียมไพรูเวทและแลคเทตเป็นสารให้พลังงานกับ bovine serum albumin เป็นสารให้ไนโตรเจน (Thomson, 1966) ต่อจากนั้นมาไม่มีรายงานการศึกษารายละเอียดอย่างจริงจังเกี่ยวกับภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูขาวในระยะก่อนฝังตัว in vitro อีก ว่าควรใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงชนิดใด ระดับ pH และ osmolality เท่าไร จึงจะให้ผลดีในการเพาะเลี้ยงซึ่งแตกต่างกันกับสัตว์อื่น ๆ หลายชนิดที่มีการศึกษากันมาก และทราบชนิดของน้ำยาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง เช่น น้ำยาเพาะเลี้ยง Medium 16 ใช้เพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูเมาซ์ (Whittingham, 1971; Roblero et al, 1981) สุกร (Robl & Davis, 1981) ใช้ในขบวนการทำปฏิสนธิไข่ของแฮมส์เตอร์และหนูเมาซ์ (Niwa et al, 1980) modified Tyrode's medium (T6) เหมาะต่อการเพาะเลี้ยงเอมบริโอระยะ 8- เซลล์ของแฮมสเตอร์ (Whittingham & Bavister, 1974; Bavister, 1981; Yodyingyuad, 1982; Bavister et al, 1983) และเอมบริโอของหนูเมาซ์ระยะ 2- เซลล์ ถึงบลาสโตซิส (Gianaroli et al, 1985; Seracchioli et al, 1985) Ham's F-10 เหมาะต่อการเลี้ยงเอมบริโอของสัตว์หลายชนิดคือ หนูเมาซ์ (Saito et al, 1984; Shirley et al, 1985) กระต่าย (Kane, 1985) วัว (Wright et al, 1976 a) สุกร (Shea et al, 1976) แกะ (Shea et al, 1976; Newcomb et al, 1978) คน (Lopata et al, 1980; Leung et al, 1984) Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ใช้ในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูเมาซ์ (Spindle, 1980; Winkle & Campione, 1984) แกะ (Moore & Spry, 1972)

ระดับ osmolalily ที่เหมาะสมของน้ำยาเพาะเลี้ยงส่วนมากมักมีค่าโดยประมาณเท่ากับค่าของของเหลวภายในร่างกายคือประมาณ 308 mosmol (Brinster, 1965 a) แต่ก็มีรายงานถึงความแตกต่างของระดับ osmolality ของน้ำยาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง เช่น น้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูเมาซ์มีระดับ 200-354 mosmol (Brinster, 1965 a,b) mouse oocyte ระดับ 250-260 mosmol (Cross & Brinster, 1970) ซึ่งค่า osmolality นี้ค่อนข้างต่ำกว่าระดับปกติ hamster oocytes 285-295 mosmol (Gwatkin & Haidri, 1963) แฮมส์เตอร์เอมบริโอระยะ 8- เซลล์ ระดับ 275-300 mosmol (Yodyingyuad, 1982; Bavister et al, 1983) pig oocytes ระดับ 285 mosmol (McGaughey, 1977) rabbit oocytes ระดับ 308 mosmol (Bae & Foote, 1975) เอมบริโอของกระต่ายระยะ 2-, 4- เซลล์ ระดับ 270 mosmol (Naglee et al. 1969; Bae & Foote, 1980)

ระดับ pH ของน้ำยาเพาะเลี้ยง in vitro ที่ศึกษาในหนูเมาซ์ (Brinster, 1965 a) และกระต่าย (Kane, 1974) พบว่าการเจริญเกิดขึ้นในระดับ pH ที่มีช่วงกว้างมากคือระดับ 6.0-7.8 ในแฮมสเตอร์ระดับ pH ของน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ใช้กันอยู่ในระดับ 6.8-7.4 (Yodying-yuad, 1982; Bavister et al, 1983)

ส่วนการศึกษาถึงผลของสารต่าง ๆ ที่มีต่อการเจริญของเอมบริโอของหนูขาว in vitro นั้น พบว่าวิตามินอีและ synthetic antioxidants พวก N, N'-diphenyl-p-phenylene-diamine มีผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของเอมบริโอระยะหลังฝังตัว (อายุการตั้งท้อง 8 วัน) ส่วนพวก ethoxyquin ไม่มีผล (Steele et al, 1974) กลูโคสและวิตามินบางตัว เช่น pantothenic acid, riboflavin, i-inosital และ folic acid นั้นเป็นสารอาหารที่จำเป็นและให้พลังงานต่อเอมบริโอของหนูขาวในระยะที่ก่อเกิดอวัยวะต่าง ๆ (organogenesis) ethanol alcohol ก็มีผลต่อการเจริญของเอมบริโอหนูขาวทั้งระยะก่อนและระยะหลังฝังตัว โดยพบว่าถ้าในกรณี acute ethanol intoxication จะพบลักษณะการเจริญเติบโตของเอมบริโอเกิดขึ้นอย่างล่าช้าในลูกบางตัว แต่ถ้าเป็น chronic ethanol intoxication เอมบริโอของหนูขาวในระยะก่อนฝังตัวจะเกิดการเจริญล่าช้าอย่างชัดเจน ส่วนในระยะฝังตัวแล้วขนาดของลูกมีค่าเฉลี่ยลดลงกว่าปกติ ถ้าเป็นในหนูเมาซ์จะเพิ่ม pathological forms ในระยะก่อนฝังตัวในหนูขาวก็เช่นกัน (Sandor et al, 1980) สำหรับผลของ actinomycin D หรือ cychlophosphamide ซึ่งเป็น antimetabolite และเป็น blocker ของการสังเคราะห์

m-RNA polymerase ที่มีต่อการเจริญในระยะแรกของเอมบริโอหนูขาวระยะ 2-, 4- และ 8- เซลล์ นั้น จะมีผลต่อเอมบริโอระยะ 8- เซลล์ มากที่สุด โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงใน nucleolus มากที่สุด โดยพบว่า chromatin เกิดการรวมตัวแน่นเป็น karyosome (Longo, 1978; Horky, 1982) และพบว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณ (dose-related) ที่ให้ 24 ชั่วโมง ก่อนมีการฝังตัวด้วย คือเพิ่ม resorption, การเจริญเติบโตล่าช้า (retardation) และลดจำนวน blastomere ของเอมบริโอหนูขาว แต่เมื่อ fetus คลอดออกมากลับไม่พบลักษณะผิดปกติแต่อย่างใด ส่วนสารเคมีชนิดอื่นที่มีพิษต่อการเจริญเติบโตของเอมบริโอสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมนั้นมีการทดลองใช้ Chlorambucil กับเอมบริโอของหนูขาวพบว่ามีผลมากกับเอมบริโอระยะบลาสโตซิส โดยเพิ่ม mitotic index สูงกว่าปกติ การเพิ่ม "micronucleus-like-bodies" สัมพันธ์กับปริมาณของสารที่ใช้ แต่พอครบกำหนดคลอดออกมาจะไม่พบลักษณะผิดปกติของลูกที่คลอด แต่น้ำหนักน้อยกว่าปกติ นอกจากนี้ยังพบ post implantation loss สูงอีกด้วย (Giavini et al, 1984) ส่วนเอมบริโอหนูขาวระยะที่ก่อกำเนิดอวัยวะ (organogenesis) (อายุการตั้งท้อง 9.5 วัน) เมื่อเติม phenylalanine ลงในน้ำยาเพาะเลี้ยงปริมาณ 6.0 มิลลิโมล เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบมีการลด embryonic protein content และ somite number (Walsh & Christian, 1984) สำหรับกลูโคสในปริมาณสูง ๆ เช่น 12-15 mg/ml จะทำให้เอมบริโอในระยะที่ก่อกำเนิดอวัยวะลดอัตราในการเจริญเติบโต, protein content, crown-rump length และ somite number (Cockroft, 1984) สารพวก proteinase inhibitor ก็พบว่ามีผลต่อเอมบริโอหนูขาวระยะก่อนฝังตัวเช่นกัน เช่น chymostatin และ α-MAPI ซึ่งเป็น inhibitor ของ chymotrypsin-like serine proteinase และ thiolstatin ซึ่งเป็น inhibitor ของ thiol proteinase เช่นกัน inhibitors ทั้ง 2 ชนิดนี้จะยับยั้งการเจริญเติบโตของเอมบริโอระยะโมรูลาและบลาสโตซิสอย่างรุนแรง ส่วน antipain และ leupeptin ที่เป็น inhibitor ของ trypsin-like proteinase และ thiol proteinase.ตลอดจน talopeptin ที่เป็น inhibitor ของ metal proteinase นั้นจะไปรบกวนการกำจัด zona pellucida ในการขยายตัวของบลาสโตซิส (Ichikawa et al, 1985)

สำหรับผลของฮอร์โมนที่มีต่อเอมบริโอนั้น Sengupta et al (1977) เป็นคณะแรกที่รายงานว่า oestrogen จำเป็นต่อการ differentiate ของเอมบริโอหนูเมาซ์ in vitro Dickmann & Dey (1974) เคยรายงานว่าเมื่อเกิด steroidogenic enzymes 2 ชนิด

คือ Δ^5-3β-hydroxysteroid dehydrogenase (3β-HSD) และ 17β-hydroxysteroid dehydrogenase (17β-HSD) ในเอมบริโอของหนูขาวและหนูเมาซ์ในระยะก่อนฝังตัว จะช่วยให้เอมบริโอสังเคราะห์ oestradiol ได้ดีขึ้น และการเจริญของเอมบริโอระยะ 8- เซลล์เป็นบลาสโตซิสจะถูกยับยั้งเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำยาที่มีสาร antioestrogen (nafoxidine 3 μg/ml) อยู่ด้วย ถ้าเลี้ยงไว้นาน 37 ชั่วโมง เอมบริโอทั้งหมดจะเสื่อมสลาย (degenerate) พบเป็น cellular debris และภายในเกิด perivitelline spaces ขนาดใหญ่ และเมื่อใส่ oestradiol 17-β ลงไปในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มี antioestrogen อยู่นั้น ก็ไม่สามารถแก้ปฏิกิริยายับยั้งของสารที่มีต่อการเจริญเติบโตของเอมบริโอได้ (Roy et al, 1981) ในปีต่อมามีผู้อ้างว่าเมื่อเติม prolactin ความเข้มข้นสูง ๆ คือ 0.1-1 μg/ml จะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเอมบริโอ แต่ prolactin ขนาด 0.01 μg/ml และ 17β-oestradiol ที่ความเข้มข้น 10^{-6} M-10^{-8} M จะไม่มีผลทำลายการเจริญเติบโตของเอมบริโอ in vitro แต่อย่างใด (Ivanenko et al, 1984)

ส่วนใหญ่ของการศึกษาการเจริญของเอมบริโอหนูขาวมักเป็นการศึกษาผลของวิตามินบางชนิด กลูโคส สารเคมี ตลอดจนฮอร์โมนที่มีพิษหรือเป็นอันตรายต่อการเจริญของเอมบริโอในระยะโมรูลา บลาสโตซิส หรือระยะหลังการฝังตัวแล้วมากกว่า ส่วนการศึกษาการเจริญของเอมบริโอหนูขาวตั้งแต่ระยะ 1-เซลล์ ถึงบลาสโตซิส ตลอดจนสภาพสิ่งแวดล้อมภายนอกที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง เช่น ชนิดของน้ำยาเพาะเลี้ยงยังมีน้อย ระดับ pH และ osmolality ที่เหมาะสมก็ยังไม่มีผู้ใดศึกษามาก่อน นับเป็นเรื่องที่น่าสนใจและศึกษาค้นคว้าอย่างยิ่ง

<u>การถ่ายฝากเอมบริโอ</u>

การถ่ายฝากเอมบริโอของสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมจากแม่พันธุ์หนึ่งไปอีกแม่พันธุ์หนึ่งนั้นเริ่มเป็นครั้งแรกเมื่อเกือบ 100 ปีที่ผ่านมา โดย Heape (1890) สามารถถ่ายฝากเอมบริโอจาก Angora rabbit ไปยัง Belgian hare rabbit และมีชีวิตอยู่รอดได้ในมดลูดของ foster mother ต่อจากนั้นมาจึงนิยมนำเอาเทคนิคในการถ่ายฝากเอมบริโอใช้ในสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมอีกหลายชนิด ตารางที่ 1.3 แสดงความสำเร็จเป็นครั้งแรกในการถ่ายฝากเอมบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมชนิดต่าง ๆ

ตารางที่ 1.3 แสดงความสำเร็จครั้งแรกในการถ่ายฝากเอมบริโอของสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม

Date	Species	Reference
1891	Rabbit	Heape
1933	Rat	Nicholas
1934	Sheep	Warwick et al.
1934	Goat	Warwick et al.
1942	Mouse	Fekete & Little
1949	Cow	Umbaugh
1949	Goat	Warwick & Berry
1951	Cow	Willett et al.
1951	Pig	Kvasnickii
1964	Cow (cervical)	Mutter et al.
1968	Ferret	Chang
1974	Horse	Oguri & Tsutsumi
1976	Baboon	Kraemer et al.
1978	Man	Steptoe & Edwards
1978	Cat	Schriver & Kraemer
1979	Dog	Kinney et al.

(จาก Betteridge, 1981)

การถ่ายฝากเอมบริโอมีประโยชน์หลายอย่าง เช่น

1. เพื่อศึกษาความอยู่รอดของเอมบริโอภายหลังที่ได้ทำการทดลอง in vitro เช่น ภายหลังการทำปฏิสนธิ การเพาะเลี้ยง และการเก็บแช่แข็งไว้เป็นเวลานาน

2. เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างแม่และเอมบริโอในระยะต่าง ๆ เช่น ในเรื่องการฝังตัว (implantation) การตั้งท้อง อายุในการถ่ายฝากเอมบริโอ และการควบคุมทางพันธุกรรม (genetic control)

3. เพิ่มคุณภาพของสัตว์เลี้ยง

4. ควบคุมโรคที่อาจติดต่อถึงกันได้ เช่น โรคทางพันธุกรรม (genetic disease) (Marcus, 1979)

5. ใช้เป็นวิธีการรักษาหญิงที่มีบุตรยาก (infertility) เช่น มีการอุดตันของท่อนำไข่ (Fallopian tube block)

ในหนูขาวมีการถ่ายฝากเอมบริโอเป็นครั้งแรกที่ Yale เพื่อทดสอบสภาพการมีชีวิตและได้ชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของความสอดคล้อง (synchrony) ระหว่าง donor และ recipient (Nicholas, 1933) ในหนูเมาซ์การถ่ายฝากเอมบริโอครั้งแรกใช้ในการวิจัยเรื่องของมะเร็ง (Fekete & Little, 1942; Beatty, 1951) ในแกะและแพะ Warwick, Berry & Horlacher (1934) ใช้การถ่ายฝากเอมบริโอเป็นครั้งแรกเพื่อชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของสภาวะแวดล้อมในมดลูก (uterine environment) ต่อมา Noyes (1952) ทำการถ่ายฝากไข่ที่ได้จากรังไข่ของหนูขาวเพศเมียตัวหนึ่งไปยัง ovrian bursa ของหนูเพศเมียอีกตัวหนึ่ง ซึ่งเมื่อหนูเพศเมียตัวนี้มีการผสมพันธุ์พบว่าไข่ที่ฝากไปไว้นั้นได้รับการผสมและเจริญจนครบอายุคลอดได้ แต่จะพบลักษณะเช่นนี้ได้ไข่ต้องมีการเจริญถึงระยะ second meiotic division ในรังไข่เสียก่อน Chang (1955) ถ่ายฝากไข่ของกระต่าย ที่ได้จากรังไข่ไปยังท่อนำไข่ของเพศเมียอีกตัวหนึ่ง พบว่าไข่เจริญได้อย่างสมบูรณ์ (mature) ภายหลังการถ่ายฝากและมีไข่ถึง 19-35% ได้รับการผสมเมื่อนำกระต่ายเพศเมียตัวนี้ไปผสมพันธุ์ แต่ได้เอมบริโอเพียง 1/39 เท่านั้น ที่สามารถเจริญจนครบอายุการคลอดได้

องค์ประกอบหนึ่งของความสำเร็จในการถ่ายฝากเอมบริโอโดยที่เอมบริโอเจริญเติบโตได้ดีภายหลังการถ่ายฝากนั้นขึ้นกับระดับของความสอดคล้อง (degree of synchronization) ระหว่าง donor กับ recipient อายุการตั้งท้องหรือการตั้งท้องเทียม

(ในกรณีที่มีการกระตุ้นให้เกิดการตั้งท้องเทียมเพื่อเตรียมรับการถ่ายฝาก) ของ recipient ควรเท่าหรือใกล้เคียงกับอายุของเอมบริโอจาก donor ตำแหน่งของการถ่ายฝากก็เป็นอีกองค์ประกอบที่สำคัญอีกอันหนึ่ง เอมบริโอที่อยู่ในระยะแรก ๆ ของการแบ่งตัว (1- ถึง 8- เซลล์) มักพบในท่อนำไข่ซึ่งเมื่อมีการถ่ายฝากไปยัง recipient ก็ควรถ่ายฝากไปที่ท่อนำไข่เช่นกัน แต่ในหนูเมาซ์พบว่าเอมบริโอในระยะก่อนฝังตัวทุกระยะจะมีชีวิตอยู่รอดได้ถึงแม้จะถ่ายฝากเอมบริโอไปยังท่อนำไข่ของ recipient ที่มีอายุการตั้งท้องเทียมเพียง 1 วัน (Tarkowski, 1959) ในสัตว์แต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันในเรื่องของความอยู่รอดของเอมบริโอในระยะแบ่งตัวตอนต้นจนถึงระยะ 8- เซลล์ เมื่อมีการถ่ายฝากไปยังมดลูกของ recipient ความเหมาะสมของภาวะแวดล้อมภายในมดลูกที่จะช่วยส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอระยะต้นในสัตว์แต่ละชนิดแตกต่างกัน เช่น ในหนูขาวและหนูเมาซ์เอมบริโอระยะ 1- ถึง 2- เซลล์ จะเสื่อมสลายใน 24 ชั่วโมง หลังถ่ายฝากไปยังมดลูกที่ถึงแม้จะมีอายุการตั้งท้องที่สอดคล้องระหว่าง donor กับ recipient ก็ตาม (Noyes et al, 1963) ส่วนเอมบริโอของสุกรระยะ 2- เซลล์ (Betteridge, 1977) และเอมบริโอของแกะระยะ 2- ถึง 8- เซลล์ (Moore & Shelton, 1964) จะมีชีวิตอยู่รอดได้จนอายุครบคลอดเมื่อถ่ายฝากไว้ที่มดลูกของ recipient แต่พบว่าโอกาสรอดของเอมบริโอจะมีมากกว่าถ้าทำการถ่ายฝากเอมบริโอไว้ที่ท่อนำไข่ Marston และคณะ (1977) พบว่าเอมบริโอของลิงวอกระยะ 1- ถึง 8- เซลล์ เจริญจนครบอายุคลอดได้เมื่อมีการถ่ายฝากไปยังท่อนำไข่ด้านตรงข้ามหรือมดลูกของลิงตัวเดียวกัน ส่วนเอมบริโอของคนระยะ 8- เซลล์ เจริญจนครบอายุคลอดภายหลังการทำปฏิสนธินอกร่างกาย แล้วทำการถ่ายฝากไปไว้ในมดลูก (Steptoe & Edwards, 1978)

การที่จะกำหนดให้แน่นอนว่าสภาพเหลื่อมล้ำของเวลา (asynchrony) จะแตกต่างกันมากขนาดไหน ที่มดลูกยังพอยอมรับการถ่ายฝากได้นั้นต้องพิจารณาในสัตว์แต่ละชนิดเนื่องจากสัตว์แต่ละชนิดการฝังตัวของเอมบริโอจะเกิดขึ้นในช่วงเวลาที่ไม่เหมือนกันเมื่อผ่านลงสู่มดลูกแล้ว เช่น ในวัวและแกะระยะของ recipient สามารถเหลื่อมล้ำกับ donor ได้มากที่สุด $\pm$ 2 วัน (Betteridge, 1977) ในแพะวงอีสตรัสของ recipient ควรสอดคล้องกับวงอีสตรัสของ donor หรือแตกต่างกันไม่เกิน $\pm$ 1 วัน เปอร์เซนต์เอมบริโอที่อยู่รอดจึงจะสูง (Armstrong et al, 1983) ส่วนในหนูขาวกับหนูเมาซ์นั้นก็เช่นเดียวกันให้สอดคล้องหรือเหลื่อมล้ำได้เพียง 1 วัน (Whittingham, 1979) Snow (1975) และ Harlow & Quinn (1979) รายงานว่าเมื่อปรับปรุงสภาพการเพาะเลี้ยง in vitro ให้มีคุณภาพดีพบว่าบลาสโตซิสที่ได้จากการ

012503

เพาะเลี้ยงให้จำนวนฟีตัสใกล้เคียงกับบลาสโตซิสที่ได้จาก in vivo จำนวนฟีตัสที่ได้หลังการถ่ายฝากนอกจากขึ้นกับระดับของความสอดคล้องระหว่าง donor กับ recipient แล้ว พบว่าวิธีการทำตลอดจนความชำนาญอาจทำให้มีการสูญเสียเอมบริโอระหว่างที่ทำได้ ในหนู-เมาซ์ความตึงเครียด (strain) จากการเพาะเลี้ยง in vitro ตลอดจนการแช่แข็ง (freezing) ซึ่งเป็นวิธีการเก็บไข่, สเปิร์ม, เอมบริโอ ไว้นาน ๆ โดยการใช้ความเย็น และการละลาย (thawing) เมื่อต้องการนำกลับมาใช้ทำให้เอมบริโอลดอัตราการฝังตัวลงได้เช่นกัน (Whittingham, 1974; Nakagata & Toyoda, 1980; Hahn & Schneider, 1982; Shelton & Craft, 1982) ในกระต่ายก็พบเช่นกัน (Schneider, Hahn & Sulzer, 1974) แต่ Tsunoda, Soma & Sugie (1982) พบว่าโมรูลาของกระต่ายที่แช่แข็งแล้วนำมาละลายเมื่อถ่ายฝากไปที่ท่อนำไข่ของ recipient ที่มีการตกไข่หลัง donor 18 ชั่วโมง ฟีตัสที่ได้จะมากกว่าในกรณีที่ recipient มีการตกไข่พร้อมกันหรือเร็วกว่าถึง 23 % คาดว่าคงเนื่องจากไข่ที่ถูกผสมและแช่แข็งแล้วนำมาละลายจะเกิดความล่าช้าในการกลับคืนสู่ระดับเมตาบอลิสม และการสังเคราะห์ (synthetic activity) ปกติเหมือนอย่างที่รายงานในหนูเมาซ์ (Whittingham, 1975; Whittingham & Anderson, 1976) และถ้านำโมรูลาของกระต่ายที่แช่แข็งมาละลายแล้วถ่ายฝากเข้าสู่ท่อนำไข่ทั้ง 2 ข้างของ recipient โอกาสที่จะได้ donor จะเพิ่มถึง 48 %. ในเอมบริโอของคนที่มีการทดลองถ่ายฝากนั้น Biggers (1981) ทำการคำนวณทางสถิติพบว่าเมื่อมีการถ่ายฝากเอมบริโอเพียง 1 ตัว ไปยัง recipient โอกาสที่จะได้ fetus ออกมา = 0.11 % แต่ถ้าเป็นการถ่ายฝากเอมบริโอ 2 ตัว จะเพิ่มอัตราการตั้งท้อง = 0.21 % โอกาสเกิด twin 1 % และยิ่งเพิ่มจำนวนการถ่ายฝากเป็น 3 ตัว อัตราการตั้งท้องจะยิ่งเพิ่มขึ้น = 0.29 % โอกาสเกิด twin 3 % triple 3 % (Crosignani, 1983; Spiers et al; 1984 Wood et al, 1985)

<u>วัตถุประสงค์ในการวิจัย</u>

1. เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเอมบริโอของหนูขาวพันธุ์วิสตาร์ในน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิดต่าง ๆ ในหลอดทดลอง

2. เพื่อศึกษาผลของ pH และ osmolality ของน้ำยาเพาะเลี้ยงต่อการเจริญของเอมบริโอของหนูขาว

3. เพื่อศึกษาความอยู่รอดของบลาสโตซิสของหนูขาวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเมื่อนำไปถ่ายฝากในหนูที่ท้องเทียม

<u>ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ</u>

1. ทราบขั้นตอนการเจริญเติบโตของเอมบริโอของหนูขาวพันธุ์วิสตาร์ในหลอดทดลอง ซึ่งเป็นความรู้พื้นฐานที่ยังไม่มีผู้ใดรายงานไว้

2. ทราบความสำคัญของ pH และ osmolality ของน้ำยาเพาะเลี้ยงต่อการเจริญของหนูพันธุ์นี้

3. ทราบถึงผลกระทบของการเพาะเลี้ยงเอมบริโอในหลอดทดลองต่อลูกอ่อนที่ออกมา

ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ในการเสริมสร้างความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับการเจริญของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม รวมทั้งคนในระยะก่อนฝังตัว ผลขององค์ประกอบแวดล้อมต่าง ๆ เป็นต้นว่า pH, osmolality, สารอาหารในน้ำยาเพาะเลี้ยง ฯลฯ ที่มีต่อการเจริญของเอมบริโอในช่วงที่ทำการเพาะเลี้ยง in vitro ซึ่งยังต้องมีการศึกษาให้ละเอียดอีกมาก