บทที่ 1

บทนำ

ความต้องการเอ็มบริโอโคเจริญในระยะแรกมีจำนวนมาก ทั้งในงานวิจัยและทางการค้า ได้มีการนำเทคนิคการเร่งการตกไข่จากแม่โคด้วยฮอร์โมน แต่โคเพศเมียมีขีดจำกัดในการผลิตจำนวนไข่หรือเอ็มบริโอ ดังนั้นนักวิจัยจึงพยายามศึกษาและได้ค้นพบเทคนิคการเพาะเลี้ยงไข่โค การปฏิสนธิ และการเจริญของเอ็มบริโอ ก่อนระยะการฝังตัว ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมนอกร่างกายภายใต้ 5% CO_2 ในอากาศ ในปี ค.ศ. 1976 Wright และคณะได้ประสบความสำเร็จในการปฏิสนธิไข่โคในจานทดลองเป็นครั้งแรก ซึ่งเป็นเทคโนโลยีการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกายและเป็นการขยายพันธุ์สัตว์จากเซลล์ไข่ที่ได้จากการดูดไข่จากฟอลิเคิลในรังไข่ของโคที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ หรือจากฟอลลิเคิลที่โตขึ้นระหว่างวงรอบการเป็นสัดของโค นำมาเลี้ยงให้เจริญในจานทดลองจนถึงระยะที่ปฏิสนธิได้ แต่มีรายงานวิจัยซึ่งอธิบายถึงความล้มเหลวของการเจริญของเอ็มบริโอโคนอกร่างกาย ว่าอาจเป็นผลมาจากปัจจัยต่าง ๆ ที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ แม้ว่ามีอัตราการปฏิสนธินอกร่างกายสูงถึง 90 เปอร์เซนต์ พบว่ามีเพียง 10 เปอร์เซนต์ของไข่ที่ปฏิสนธิเจริญเป็นตัวอ่อนที่สมบูรณ์ และถ่ายฝากฝังตัวที่มดลูกได้เป็นผลสำเร็จ เมื่อเปรียบเทียบความสำเร็จนี้ให้ผลต่ำกว่าการเจริญของไข่โคภายในร่างกาย (Eppig และ Schraeder, 1986)

ในการเพาะเลี้ยงไข่ให้เจริญภายนอกร่างกายสัตว์มีความละเอียดอ่อนและซับซ้อนในเชิงความชำนาญพิเศษและกลไกควบคุมเรื่องปฏิกิริยาชีวภาพในระดับโมเลกุลอย่างมาก ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงในลักษณะทางสรีรวิทยา ทางกายภาพ และทางชีวเคมี ด้วยความพยายามที่จะทราบถึงรายละเอียดต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงไข่โคในจานทดลอง พบว่ามีปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญ ได้แก่ขนาดของ follicle ไข่ที่คัดเลือก (Fukui และ Sakuma, 1980; Iritani, 1988) ความสำคัญของคิวมูลัสเซลล์ที่ล้อมรอบเซลล์ไข่ (Crister และคณะ, 1986) อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยง (Lenz และคณะ, 1983) ชนิดของน้ำยาเพาะเลี้ยง (Fukui และคณะ, 1982; Wright และ Bondioli, 1981) ฮอร์โมนต่าง ๆ ในระยะการเจริญของไข่ (Fukui และคณะ, 1982; Herisleigh และ Hunter, 1985) ซีรัมและโปรตีนต่อการเจริญของไข่ (Wright และ Bondioli, 1981) เป็นต้น ปัจจัยดังกล่าวมีผลต่อไข่โคเจริญจนถึงระยะที่เรียกว่า maturation จัดเป็นการเจริญของไข่ที่มีความสำเร็จในการแบ่งเซลล์แบบไมโอติกที่มีการแบ่งเซลล์สองระยะ ได้แก่ ไมโอซีส I และ ไมโอซีส II ได้โพลาบอดีอันที่หนึ่ง ระยะนี้เซลล์ไข่มีการเปลี่ยนแปลงใน

นิวเคลียส และอยู่ในระยะการแบ่งเซลล์ที่เรียกว่า เมตาเฟส II พร้อมทั้งมีการเปลี่ยนแปลงในไซโตพลาสซึมด้วย และมีการสังเคราะห์ของโปรตีนชนิดต่าง ๆ ในไซโตพลาสซึม (Wilson, 1975)

การเลือกน้ำยาเพาะเลี้ยงให้เหมาะสมเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการเพาะเลี้ยงไข่หรือเอ็มบริโอที่ต้องมีความจำเพาะในสูตรน้ำยาให้เหมาะสมกับสัตว์แต่ละชนิด น้ำยาเพาะเลี้ยงเริ่มแรก หรือน้ำยาประเภทที่ 1 ที่ใช้ คือ น้ำยาเพาะเลี้ยงที่เรียกว่า "chemical defined medium" ซึ่งเป็นสูตรน้ำยาที่ใช้เพาะเลี้ยงในเอ็มบริโอหนู สามารถเจริญจากระยะ 8-เซลล์จนถึงระยะบลาสโตซีส เป็นน้ำยาพื้นฐานตามเครบริงเกอร์ไบคาร์บอเนต (krebs ringer bicarbonate) มีกลูโคส BSA (Bovine Serum Albumin) และแอนติไบโอติก (Whitten, 1956) เป็นองค์ประกอบ ต่อมามีน้ำยา Tyrode's medium พัฒนามาและได้มีการพัฒนาในสูตรน้ำยาให้เหมาะต่อกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวเคมี และมีสารพลังงานต่อการเจริญในสัตว์แต่ละชนิด น้ำยาเพาะเลี้ยง HECM (Hamster Embryo Chemical Medium) พัฒนามาจากน้ำยา Tyrode's medium ให้เหมาะสำหรับเพาะเลี้ยงหนูแฮมสเตอร์ (Schini และ Bavister, 1988a; Seshagin และ Bavister, 1989; McKiernan และคณะ, 1991) น้ำยา CZB และ SOM ใช้สำหรับในเอ็มบริโอหนูพันธุ์ผสม โดย Ziomek's และ Biggers' Laboratories (Chatot และคณะ, 1989; Lawitts และ Biggers, 1992; Erbach และคณะ, 1992) และมีสูตรน้ำยา NCSU พัฒนาโดย Petters' Laboratories ใช้กับเอ็มบริโอหมู (Petters, 1992)

น้ำยาประเภทที่ 2 จัดเป็นน้ำยาที่มีส่วนประกอบของของเหลวในท่อนำไข่ มี "SOF" และ "HIF" จากของเหลวในท่อนำไข่โคและคน ตามลำดับ (Tervit และคณะ, 1972; Quinn และคณะ, 1985) น้ำยาเหล่านี้มีความแตกต่างในความเข้มข้น และอัตราส่วนของอนุมูลลบ (เช่น HCO_3^-, Cl^-, $H_2PO_4^-$ เป็นต้น) แต่ผลต่อการเจริญของไข่และเอ็มบริโอไม่ต่างจาก Chemical defined medium

น้ำยาประเภทที่ 3 เป็นน้ำยาที่นิยมใช้มาก เรียกว่า "Complex" media ออกแบบสำหรับ somatic cells เช่น Ham's F10 และ Tissue culture medium-199 (TCM-199) ใช้ในคนและสัตว์เคี้ยวเอื้อง ตามลำดับ

นอกจากจะเลือกน้ำยาเพาะเลี้ยงให้เหมาะสมแล้วยังต้องคำนึงถึงส่วนประกอบเสริมที่ต้องเติมเพิ่มเข้าไปในน้ำยา เช่นโปรตีน มีซีรัมหรือ BSA ซึ่งพบว่าเป็นแหล่งของสารให้พลังงานที่ประกอบด้วย กรดอะมิโน วิตามิน ฮอร์โมน Growth factors (EGF) และ trace elements

เป็นต้น แต่ซีรัมให้ผลเสียหายต่อน้ำยาเพาะเลี้ยงในกรณีที่มีการจับกันโดยการแข็งตัวของเลือดซึ่งเป็นกระบวนการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในซีรัม (Maurer, 1992) มีรายงานพบว่าในน้ำยาเพาะเลี้ยงซึ่งมีซีรัม ที่มีผลให้ไข่และเอ็มบริโอเจริญและแบ่งเซลล์ในระยะต่าง ๆ เนื่องจากในซีรัมมีสารประกอบที่เรียกว่า Growth factors เช่น EGF (Epidermal Growth Factor) และฮอร์โมนต่าง ๆ (Eppig และคณะ, 1992) ต่อมามีรายงานของ Pinyopumintr และ Bavister (1991) เสนอว่า ซีรัมจะให้ผลสองทางต่อการเจริญของเอ็มบริโอ โดยมีผลยับยั้งการแบ่งเซลล์ในระยะแรกและกระตุ้นการแบ่งเซลล์ในระยะการเจริญของมอรูลาจนถึงระยะบลาสโตซีส แต่ยังไม่ทราบกลไกการกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของซีรัมอย่างแน่ชัด

ฮอร์โมนจัดเป็นองค์ประกอบสำคัญที่สุดต่อการเจริญอย่างสมบูรณ์ของไข่ ซึ่งจะส่งผลในความสำเร็จของการปฏิสนธิ ได้แก่ ฮอร์โมนโกนาโดโทปิน (follicle-stimulating hormone, FSH; Luteinizing hormone, แอลเอช และสเตรอยด์ฮอร์โมน; 17β-estradiol, ε_2) มีรายงานว่าฮอร์โมนแอลเอช มีผลต่อการเพิ่มอัตราการเจริญในเซลล์ไข่ การปฏิสนธิ และการเจริญของเอ็มบริโออย่างมาก ในสิ่งมีชีวิตต่อไปนี้คือ หนู (rat) (Shalgi และคณะ, 1979) คน (Soupart, 1974) กระต่าย (Thibault และคณะ, 1975) และแกะ (Moor และคณะ, 1980; Moor, 1989) ฮอร์โมนเอฟ เอส เอช มีผลต่อการขยายขนาดของคิวมูลัสเซลล์ ทำให้อสุจิสามารถผ่านทะลุเข้าสู่เซลล์ไข่ได้ดีกว่าในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ไม่มีฮอร์โมนนี้ (Moor และ Warnes, 1978; Tsafriri, 1982; Ball และคณะ, 1983) ส่วนฮอร์โมนโกนาโดโทรปินทำงานร่วมกับเอสตร้าไดออลมีผลต่อนิวเคลียสไข่ในระยะเมตาเฟส I ให้ดำเนินต่อไปจนถึงระยะเมตาเฟส II และมีผลส่งเสริมการสังเคราะห์กรดอะมิโนและโปรตีนในไซโตพลาสซึมในจานทดลอง และส่งเสริมอัตราการเจริญของไข่และจำนวนเอ็มบริโอในระยะบลาสโตซีส (Benjamin และคณะ,1982)

ต่อมานักวิจัยค้นพบการติดต่อระหว่างคิวมูลัสเซลล์และเซลล์ไข่ซึ่งอยู่ในลักษณะ cumulus-oocyte complexes (COCs) เซลล์ไข่ถูกล้อมรอบด้วยแกรนนูโลซาเซลล์หลาย ๆ ชั้น เรียกว่า cumulus oophorus และมี corona radiata ซึ่งเป็นเซลล์ชั้นในสุดของ cumulus oophorus ที่บริเวณขอบ ๆ เซลล์ corona radiata ไซโตพลาสซึมจะเปลี่ยนแปลง โดยยื่นส่วนทะลุผ่านเข้าสู่ Zona pellucida ที่ติดกับ oolemma ของไข่ เรียกว่า Cytoplasmic process (Bjorkman, 1962; Odor, 1960; Sotelo และ Porter, 1959; Zamboni, 1974) ซึ่งเป็นส่วนที่ยืนยันว่ามีการติดต่อกับเซลล์ไข่ผ่านทาง gap junction (Anderson, 1976; Hytel, 1987 และ Loos de และคณะ, 1991 เพื่อใช้ขนส่งสารเมตาบอไลท์และไอออนต่าง ๆ เข้าสู่เซลล์ไข่ และของเสียออกจากเซลล์ การขนส่งสารเหล่านี้เป็นผลจากการกระตุ้นโดยฮอร์โมนโกนาโดโทปิน (Giluia และคณะ, 1978) ต่อมา

Moor และคณะ (1981) พบว่าฮอร์โมนแอลเอช และเอฟ เอส เอช ในปริมาณที่ต่ำมีผลให้หยุดการติดต่อระหว่างคิวมูลัสเซลล์และเซลล์ไข่ แต่ระยะไมโอซีสของเซลล์ไข่ยังคงดำเนินต่อไป ฮอร์โมน เอฟ เอส เอช จะไปหยุดการทำงานบริเวณ gap junction แต่ไม่มีผลต่อการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีส แต่ฮอร์โมนแอลเอช มีผลกระตุ้น meiotic maturation และไม่พบผลกระทบในการติดต่อระหว่างคิวมูลัสเซลล์และเซลล์ไข่

สมมุติฐานของกลไกควบคุมการเจริญของไข่ผ่านทางคิวมูลัสเซลล์มี

<u>สมมุติฐานที่ 1</u> คาดว่าการสิ้นสุดหรือการลดลงในการติดต่อระหว่างคิวมูลัสเซลล์และเซลล์ไข่ โดยส่วนของ cytoplasmic process ที่ติดต่อกับเซลล์ไข่แตกออก จึงเป็นการขัดขวางการไหลของสาร meiosis inhibitor factor เข้าสู่เซลล์ไข่ (Dekel และ Beers, 1978; 1980)

<u>สมมุติฐานที่ 2</u> สารต่าง ๆ มีการเปลี่ยนแปลงในปริมาณหรือคุณภาพของฮอร์โมนโกนาโดโทรปินส่งผลให้สัญญาณเปลี่ยนแปลงไปในการติดต่อจากคิวมูลัสเซลล์เข้าสู่เซลล์ไข่ แต่ไม่ใช่การสิ้นสุดของการติดต่อระหว่างเซลล์ทั้งสอง (Moor และคณะ, 1981)

สมมุติฐานทั้งสองอาจเป็นจริงเมื่อพิจารณาการขนส่งสารยับยั้งการเจริญของไข่ในระยะไมโอซีสที่อาจส่งผลต่อฮอร์โมนแอลเอช ที่มีผลการทำงานต่อฟอลลิเคิลหรือเกี่ยวข้องกับการขนส่งสารควบคุมระยะไมโอซีสผ่านทาง cytoplasmic process ที่ติดต่อระหว่างคิวมูลัสเซลล์และเซลล์ไข่ ซึ่งอาจจะควบคุมปริมาณและคุณภาพของฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน นอกจากนี้การติดต่อกันระหว่างเซลล์ไข่และคิวมูลัสเซลล์ ยังมีความสำคัญใช้เป็นส่วนที่แสดงการเจริญของไข่ในระหว่างเข้าสู่ระยะเจริญอย่างสมบูรณ์ คิวมูลัสเซลล์มีขนาดขยายใหญ่และแผ่ออก (Buccione และคณะ, 1990)

การแตกออกของไข่ตรงบริเวณ gap junction มีความสัมพันธ์ต่อการดำเนินการแบ่งตัวของไข่แบบไมโอติก (Larsen และคณะ, 1986) Cumulus oocyte complexs (COCs) ที่ดูดออกจาก antral follicle นำไปเพาะเลี้ยงในน้ำยาสำหรับการเจริญ พบว่าเซลล์ไข่มีการเจริญของนิวเคลียสแบบ spontaneous (Pincus และ Enzmann, 1935; Edwards, 1965) ต่อมาในปี ค.ศ. 1995 Zhang และคณะ รายงานผลว่าเมื่อนำเซลล์ไข่ที่ไม่มีคิวมูลัสเซลล์ล้อมรอบเพาะเลี้ยงในน้ำยานาน 22 ชั่วโมงในจานทดลอง มีเพียง 4% ของเซลล์ไข่ที่เจริญจนถึงระยะเมตาเฟส II เซลล์ไข่ส่วนใหญ่จะสลายตัวเอง แต่เมื่อนำเซลล์ไข่ที่มี COCs เลี้ยงในจานทดลอง พบว่าการเจริญอย่างสมบูรณ์ถึงระยะเมตาเฟส II เป็นจำนวน 93% แสดงว่าคิวมูลัสเซลล์มีประโยชน์โดยเป็นทางเชื่อม

ติดต่อกับเซลล์ไข่ ส่งเสริมให้ไข่เจริญอย่างสมบูรณ์พร้อมที่จะได้รับการปฏิสนธิและเจริญจนถึงระยะบลาสโตซีส (Hawk และคณะ, 1992) การเจริญของไข่โคในร่างกาย พบภาวะการหยุดชะงักในระยะไมโอซีส เป็นผลจากการทำงานของ cyclic adreno. monophosphate (cAMP) ซึ่งได้จากแกรนนูโลซาเซลล์ โดยผ่านเข้าสู่เซลล์ไข่ (Dekel และ Beers, 1980; Tasfriri และคณะ, 1982) ต่อมาพบว่า forskolin มีผลต่อการหยุดชะงักในระยะไมโอซีส โดยกระตุ้นให้ระดับ cAMP ในคิวมูลัสเซลล์สูงขึ้น พบในแฮมสเตอร์และในโค (Racowsky, 1985) ระดับ cAMP ที่สูงขึ้นจะไปยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนแอลเอชในเซลล์ไข่ มีผลต่อเซลล์ไข่หยุดการเจริญในระยะไมโอซีส (Tsafriri และคณะ, 1982; Sanbuissho, 1992)

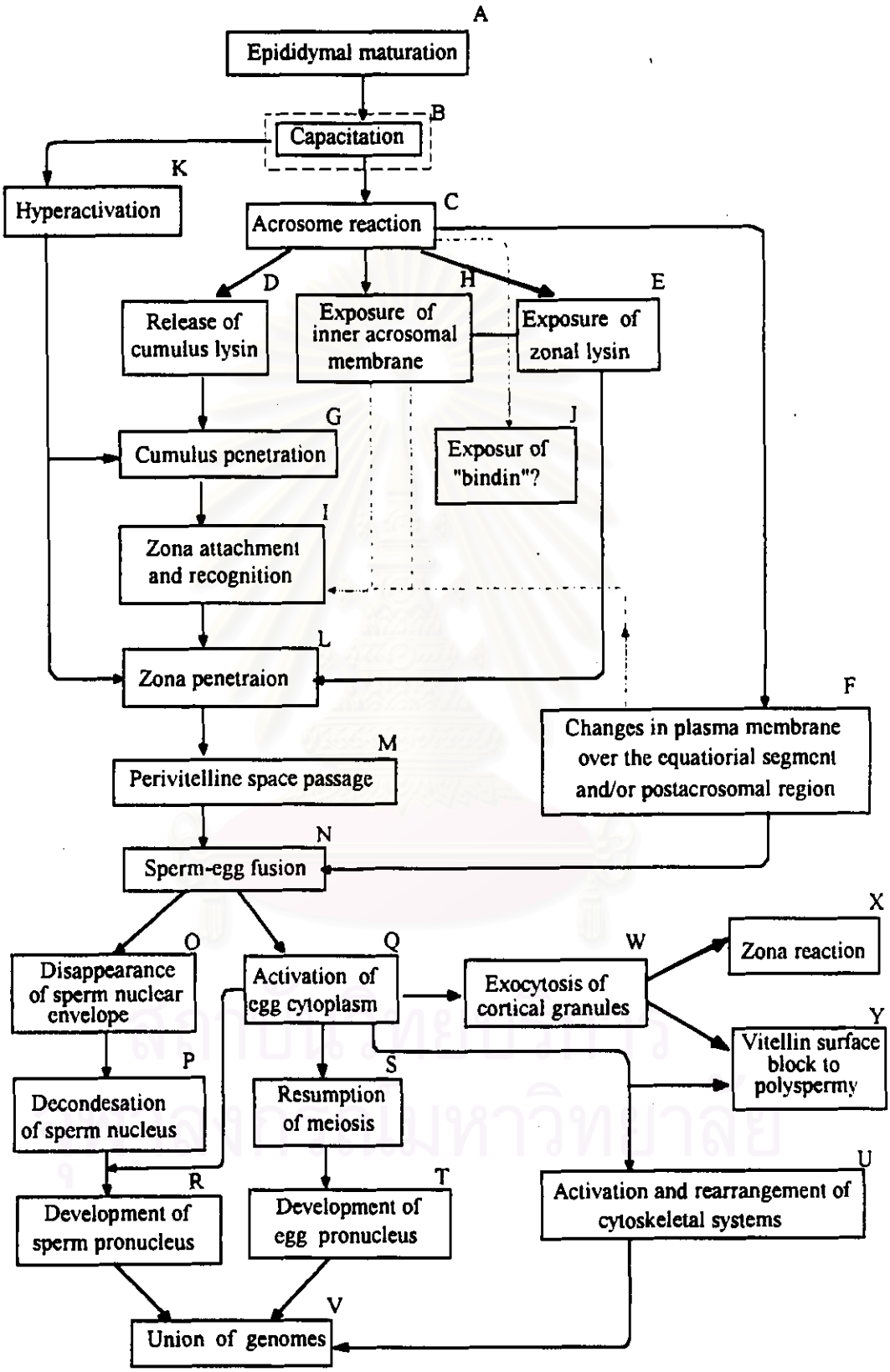
การเจริญของไข่โคในจานทดลองขึ้นกับอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง เมื่ออุณหภูมิของร่างกายโคมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 38 - 39 องศาเซลเซียส (Anderson, 1970) ต่อมาพบโปรตีนที่สำคัญต่อการปฏิสนธิ เรียกว่า ไกลโคอะมิโนไกลแคน (glycoaminoglycans; GAGs) มีคุณสมบัติสามารถเปลี่ยน proacrosin ไปเป็น acrosin ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดปฏิกิริยาอะโครโซม (acrosome reaction) ในโค (Wincek และคณะ, 1979; Lenz และคณะ, 1982; Handrow และคณะ, 1982) ฮอร์โมนเอฟเอสเอชมีผลกระตุ้นให้คิวมูลัสเซลล์สร้าง GAGs (Ball และคณะ, 1980) ซึ่งมีแขนงข้างหนึ่งเป็นโปรตีนที่เรียกว่า โปรทีโอไกลแคน (Proteoglycan) พบภายในฟอลลิเคิลโคที่สามารถชักนำให้เกิดปฏิกิริยาอะโครโซม เช่นกัน Lenz และคณะ (1983) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของไข่โคในจานทดลองอยู่ที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมินี้มีไข่โคเจริญถึง 53% และมีการสังเคราะห์ GAGs ได้สูงสุด ทำให้เกิดอัตราการปฏิสนธิได้สูง

การศึกษาการเจริญของนิวเคลียสภายในเซลล์ไข่ พบว่าขึ้นกับขนาดของฟอลลิเคิลไข่ที่ได้จาก antral follicle เมื่อเลือกฟอลลิเคิลที่มีขนาดใหญ่กว่า 1.8 มิลลิเมตร ไข่ที่ได้มีความสมบูรณ์ในลักษณะที่เรียกว่า cumulus - oocyte complex (ดังรูปที่ 3.1) สามารถมีการเจริญแบบ spontaneous nuclear maturation ในจานทดลอง (Edward, 1965; Motlik และ Fulka, 1986) ซึ่งใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง ก็จะเจริญได้อย่างสมบูรณ์ในระยะ 1st ไมโอติก (Edward, 1965; Leibfried และ First, 1979) ส่วนไข่โคจากฟอลลิเคิลที่เล็กกว่า 1.6 มม. เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในจานทดลอง พบว่าไข่โคไม่สามารถเจริญอย่างสมบูรณ์ในระยะ 1st ไมโอติก (Motlik และ Fulka, 1986) เมื่อนำเอาของเหลวออกจากฟอลลิเคิลและแกรนนูโลซาเซลล์ พบว่าไม่มีผลต่อการเจริญของนิวเคลียส (Leibfried และ First, 1980; Critser และคณะ, 1986)

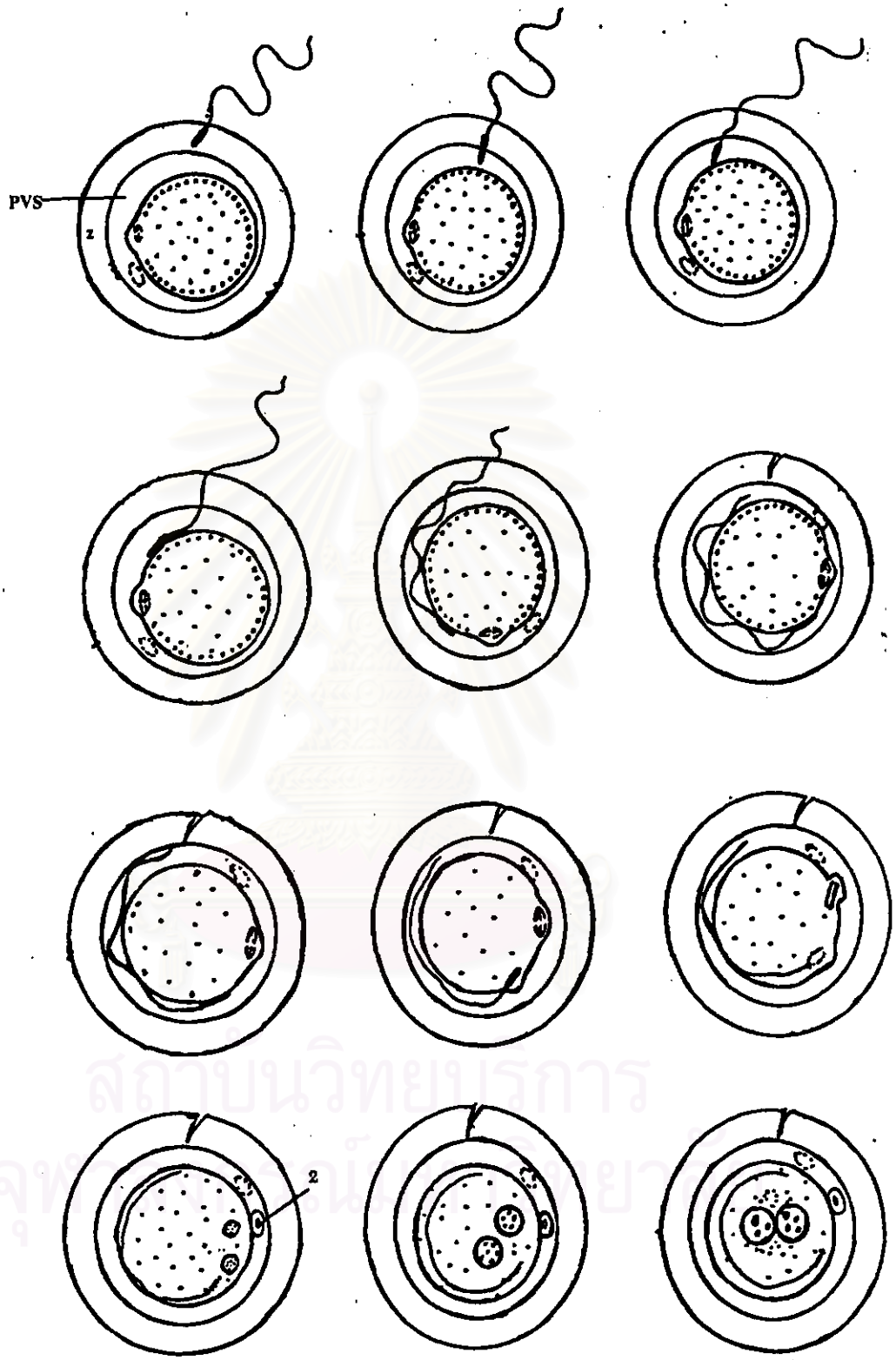
หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การปฏิสนธิภายนอกร่างกาย

การปฏิสนธิภายนอกร่างกายของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ต้องใช้ไข่ที่เพาะเลี้ยงในจานทดลองที่เจริญอยู่ในระยะเมตาเฟส II ของการแบ่งตัวแบบไมโอซีส (Yanagimachi, 1981) มีโพลาบอดีอันที่หนึ่งและกลุ่มเซลล์คิวมูลัสที่ล้อมรอบไข่เจริญขยายใหญ่ ส่วนอสุจิจะผ่านขั้นตอนการเตรียมให้เหมาะสมที่จะปฏิสนธิกับไข่ ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงภายในตัวอสุจิเกิดขึ้น โดยผ่านกระบวนการคาพาซิเตชัน (capacitation) (Austin, 1951; 1952) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเอาโปรตีนที่ปกคลุมผิวนอกของตัวอสุจิออก (Johnson และ Hunter, 1972; Oliplant และ Brackett, 1973; Schill และคณะ, 1975) และการเปลี่ยนแปลงของ glycoprotein ใน plasma membrane ของตัวอสุจิ (Gordon และคณะ, 1975) อสุจิที่ผ่านกระบวนการคาพาซิเตชันแล้วจะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของอะโครโซม (acrocsome) ซึ่งเป็น membrane - bound ที่ปกคลุมด้านหน้าของนิวเคลียสของเซลล์อสุจิ เรียกการเปลี่ยนแปลงนี้ว่า ปฏิกิริยาอะโครโซม (Austin และ Bishop, 1958) การเกิดกระบวนการนี้มีการหลั่งอะโครโซมอลเอนไซม์ (Acrosomal enzyme) ที่อยู่ในอะโครโซม เช่น อะโครซิน (acrosin) ซึ่งเป็น Trypsin - like enzyme ออกมาย่อยสลายชั้น Zona pellucida ของไข่เพื่อให้อสุจิผ่านเข้าไปปฏิสนธิกับไข่ได้ (Meizel และ Lui, 1976; Meizel, 1978) ทันทีที่อสุจิเจาะทะลุ Zona pellucida เข้าไปอยู่ใน perivitelline space ส่วนหัวของอสุจิซึ่งเป็นส่วนของนิวเคลียสจะเชื่อมติดกับ vitelline membrane ซึ่งเป็นการเริ่มต้นของการปฏิสนธิ (fertilization) เมื่อหัวของอสุจิเข้าไปอยู่ใน ooplasm แล้วจะเกิด decondenzation ส่วนไข่จะเริ่มมีการแบ่งตัวแบบไมโอซีสต่อไปจนสมบูรณ์โดยจะขับ second polar body ออกจากไข่ เกิด female และ male pronuclei (Yanagimachi, 1981) ต่อมา nuclear membrane จะสลายไป โครโมโซมของแต่ละ pronucleus จะจับคู่กัน กระบวนการปฏิสนธินี้จะเสร็จสมบูรณ์เมื่อมีการสร้าง diploid complement ซึ่งเป็นลักษณะโครโมโซมในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ไข่ที่ถูกผสมจะเปลี่ยนเป็นไซโกต (zygote) หรือเอ็มบริโอระยะ 1- เซลล์ และจะเริ่มมีการแบ่งตัวแบบไมโตซีสเจริญขึ้นเป็นชีวิตใหม่ต่อไป ในระยะแรกเอ็มบริโอแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ไปเรื่อย ๆ เรียกช่วงนี้ว่า คลีเวจ (cleavage) เจริญแบ่งตัวต่อได้ระยะมอรูลา และบลาสโตซีส ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมชนิดต่าง ๆ เอ็มบริโอในระยะต่าง ๆ ของการแบ่งตัวระหว่าง 4- เซลล์ถึงบลาสโตซีสระยะต้นสามารถนำไปถ่ายฝากให้ตัวรับ (Blandau และคณะ, 1961) (รูปที่ 1.1 และ 1.2 แสดงกระบวนการปฏิสนธิของเอ็มบริโอ)



รูปที่ 1.1 แสดงกระบวนการต่าง ๆ ที่สำคัญที่เกิดขึ้นก่อนและระหว่างการปฏิสนธิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (จาก Yanagimachi, 1981)



รูปที่ 1.2 แสดงกระบวนการปฏิสนธิระหว่างตัวอสุจิกับไข่ (จาก Yanagimachi, 1981)

แม้ว่าในระยะแรกของการศึกษาการปฏิสนธิโดยการนำอสุจิผสมกับไข่ภายนอกร่างกายสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (Schenk, 1878) จะประสบความล้มเหลวก็ตาม นักวิทยาศาสตร์ก็ไม่ละความพยายามยังคงศึกษาค้นคว้ากันต่อ ๆ มา และบรรลุผลสำเร็จจนสามารถทำการปฏิสนธิภายนอกร่างกายของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้เป็นครั้งแรก ในปี ค.ศ. 1954 โดย Thibault และคณะศึกษาในกระต่าย ต่อมามีผู้ให้ความสนใจศึกษาและค้นคว้าเทคนิคใหม่ ๆ ใน 5 ปีต่อมา ผลงานของ Chang ได้รับความสนใจอย่างมาก โดยศึกษาในกระต่ายสามารถทำการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย เอ็มบริโอที่ได้เจริญถึงระยะ 4-เซลล์ นำเอ็มบริโอไปถ่ายฝากให้ตัวรับเป็นผลสำเร็จ ได้มีนักวิจัยศึกษาพัฒนาวิธีการปฏิสนธิภายนอกร่างกายของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น ๆ ได้เป็นผลสำเร็จ

สำหรับในโค การทำการปฏิสนธิภายนอกร่างกายทำเป็นผลสำเร็จเมื่อปี ค.ศ. 1976 โดย Wright และคณะ แต่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของโคให้เจริญผ่านระยะ 8- 16- เซลล์ ถึง ระยะบลาสโตซีส (blastocyst) ได้ ด้วยในสภาวะการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอภายนอกร่างกายที่กำหนดขึ้นมีผลต่อเอ็มบริโอในการแสดงออกของ embryonic genome โดยพบว่าในระยะนี้เอ็มบริโอโคมีการลอกแบบ (replication) ของสายพันธุกรรม (Barnes และ Eyeston, 1990) และมีการเปลี่ยนแปลงของการจัดรูปแบบของโปรตีน (Frei และคณะ, 1989) สอดคล้องกับในหนูแฮมสเตอร์ ไม่สามารถเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอให้ผ่านระยะ 2- เซลล์ ถึงบลาสโตซีสได้ (Whittingham และ Bavister, 1974; Yodyingyuad, 1982) โดยเปรียบเทียบในหนูเมาซ์ พบว่าสามารถเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอจากระยะไซโกตในน้ำยาเพาะเลี้ยงเครบ-ริงเกอร์ไบคาร์บอเนต ให้เจริญถึงระยะบลาสโตซีสได้ถึง 60 - 100% ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่กำหนดขึ้นนอกร่างกาย (Brinster, 1963; Gwatkin, 1963) และเมื่อถ่ายฝากไปยังตัวรับ (recipient) ที่ตั้งท้องเทียมพบว่าสามารถเจริญต่อไปจนครบกำหนดคลอดเป็นลูกปกติได้ (Bigger, 1979; Brinster และ Troike, 1979; Brackett, 1981) แสดงให้เห็นว่าเอ็มบริโอของแฮมสเตอร์และเอ็มบริโอโคต้องการปัจจัยบางอย่างที่จำเพาะเจาะจงจากน้ำยาเพาะเลี้ยงในการเจริญและการแบ่งตัวให้ผ่านระยะ 2- เซลล์และ 8- 16- เซลล์ตามลำดับ มากกว่าในเอ็มบริโอของหนูเมาซ์ ซึ่งการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นผลของกรดอะมิโนต่อการเจริญของเอ็มบริโอในจานทดลอง (Gwatkin และ Haidri, 1973) หรือศึกษาปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการเจริญจากระยะ 4- หรือ 8-เซลล์เป็นระยะบลาสโตซีส (Bavister และคณะ, 1983; Monis และ Bavister, 1990) และโดยนำกลุ่มฟอสเฟตและกลูโคสเติมในน้ำยาเพาะเลี้ยง (Schini และ Bavister, 1988b; Seshagiri และ Bavister, 1989a) ได้มีการศึกษาเพื่อหาปัจจัยที่มีผลต่อเอ็มบริโอโคในระยะ 1-เซลล์ หรือ 8-เซลล์ก็ตาม ส่งผลให้ทราบถึงความต้องการของ

เอ็มบริโอโคในระยะ 8- 16- เซลล์ เช่นกัน เพื่อให้เอ็มบริโอโคเจริญต่อถึงระยะบลาสโตซีสได้ในเปอร์เซนต์ที่สูง

ปัจจุบันนี้แม้ว่ามีการศึกษาและดัดแปลงสภาวะแวดล้อมภายนอกร่างกายให้คล้ายกับสภาพแวดล้อมภายในร่างกาย ดังเช่น มีการดัดแปลงน้ำยาเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอขึ้นมากมายหลายชนิด ทั้งน้ำยาที่มีองค์ประกอบเกลือแร่และไอออนธรรมดาหรือน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีองค์ประกอบสลับซับซ้อนก็ตาม หรือมีการเพาะเลี้ยงร่วมกับเนื้อเยื่อชนิดอื่น ๆ เพื่อให้สามารถเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของสัตว์แต่ละชนิดให้เจริญได้ถึงระยะบลาสโตซีสนอกร่างกาย เป็นผลสำเร็จ (Schini และ Bavister, 1988a; Seshagiri และ Bavister, 1989a; McKiernan และคณะ, 1991; Petters, 1992; Tervit และคณะ, 1972; Quinn และคณะ, 1985) แต่ก็ยังไม่เป็นที่พอใจ ด้วยเหตุผลดังกล่าวนี้จึงทำให้มีนักวิจัยรุ่นหลังพยายามคิดค้นหาปัจจัยต่าง ๆ ที่จะช่วยส่งเสริมการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอในจานทดลอง ให้ได้ผลดียิ่งขึ้น ให้ได้จำนวนเอ็มบริโอเพิ่มมากขึ้น และเอ็มบริโอสามารถจะเจริญมีชีวิตรอดจนครบกำหนดคลอดเป็นลูกปกติได้

ปัจจัยที่มีผลต่อการปฏิสนธิและการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอโคภายนอกร่างกาย

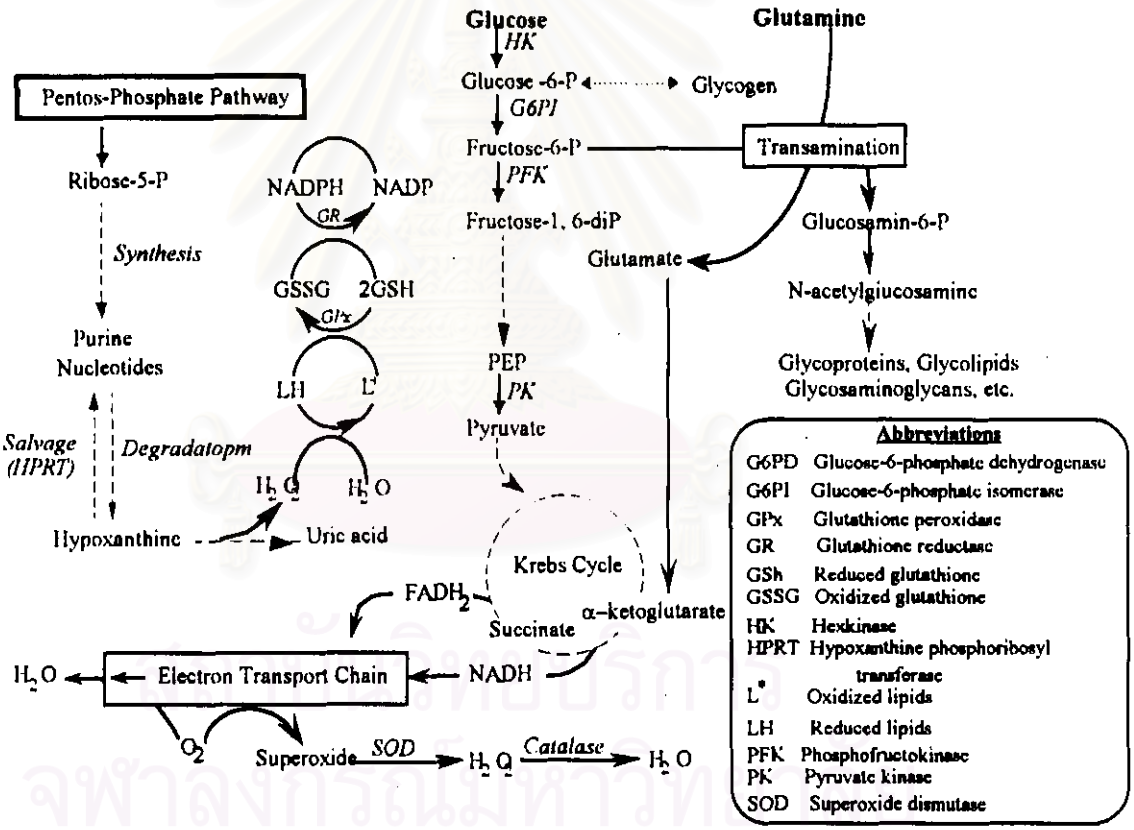
1. ส่วนประกอบของน้ำยาเพาะเลี้ยงและสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงเซลล์

1.1 สารที่ให้พลังงาน พบว่าน้ำยาเพาะเลี้ยงไม่ว่าจะเป็นน้ำยาเพาะเลี้ยง modified Tyrode's solution (m-TALP) ที่ใช้ในการปฏิสนธิหรือในการล้างไข่ m-TALP-Hepes (TL-Hepes) และน้ำยาล้างอสุจิ m-TALP-Sperm (TL-Sperm) และน้ำยา HECM-3 ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของโคซึ่งนำมาจากน้ำยาเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของแฮมสเตอร์ที่เรียกว่า 'hamster embryo culture medium' ซึ่งก็คือน้ำยาที่ดัดแปลงมาจากน้ำยา Tyrode's medium ที่ไม่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบอยู่ (McKiernan และ Bavister, 1990; McKiernan และคณะ, 1991; Seshagiri และ Bavister, 1989a) รวมทั้งน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีองค์ประกอบสลับซับซ้อนที่เรียกว่า Tissue culture medium-199 (TCM-199) นั้นมีองค์ประกอบของเกลือแร่ และไอออนที่มีลักษณะคล้ายกับส่วนประกอบของน้ำยาเพาะเลี้ยงเครบริงเกอร์ ไบคาร์บอเนต (Biggers และคณะ, 1965; 1967, Whitten และ Biggers, 1968; Biggers, 1987) คือมีส่วนประกอบของสารที่ให้พลังงาน ได้แก่ กลูโคส แลคเตท และไพรูเวท จากการทดลองพบว่าการใช้สารที่ให้พลังงานเหล่านี้เปลี่ยนเป็นพลังงานของเอ็มบริโอในระยะก่อนการฝังตัวของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมมีลักษณะคล้ายกับในหนูเมาซ์

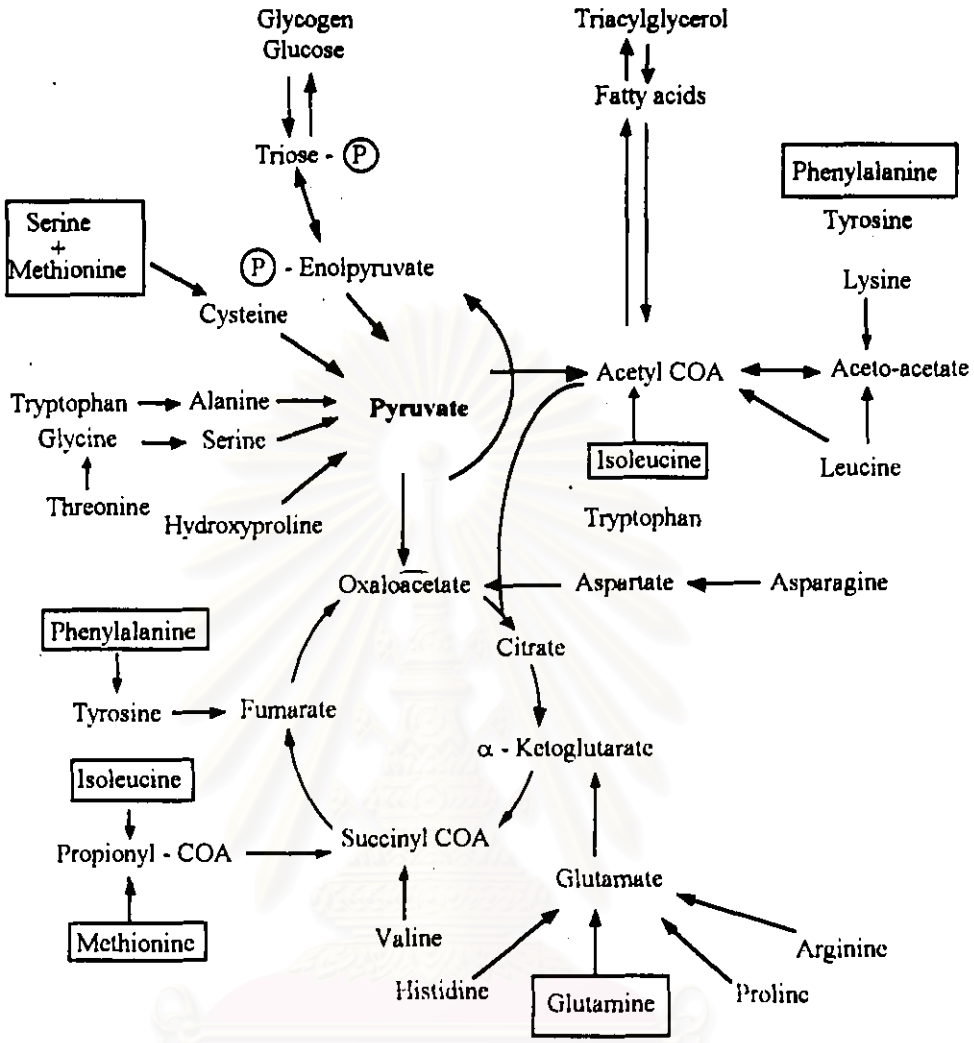
นั่นคือเอ็มบริโอระยะ 1- หรือ 2-เซลล์ไม่สามารถออกซิไดซ์ (Oxidized) กลูโคสให้ผ่านกระบวนการไกลโคไลซีส (glycolysis) แล้วให้พลังงานออกมาได้ ดังนั้นไพรูเวทและแลคเตทจึงเป็นแหล่งพลังงานสำคัญในการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ในระยะนี้ ส่วนกลูโคสจะเป็นแหล่งพลังงานส่งเสริมในระยะหลัง 8-เซลล์ ได้ดีเท่ากับไพรูเวทและแลคเตท (Whitten, 1957; Brinter, 1963; 1965 a, 1965b; Whitten และ Biggers, 1968; Biggers และคณะ, 1967; Whittingham, 1969; Bigger และ Stern, 1973; Biggers, 1987; Leese, 1991) ส่วนในแฮมสเตอร์ แลคเตท ไพรูเวท และกรดอะมิโน เป็นแหล่งพลังงานมากกว่ากลูโคส (Seshagiri และ Bavister, 1989a) และเอ็มบริโอในระยะ 1-เซลล์ ของการเจริญเติบโตในจานทดลองอาศัยแลคเตทเป็นพลังงานมากกว่า ส่วนไพรูเวทพบว่าไม่มีส่วนสนับสนุนหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอ (McKiernan และคณะ, 1991) ส่วนกลูโคสจะยับยั้งการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอในทุกระยะหรือมีผลให้การเจริญเติบโตของเอ็มบริโอช้ากว่าปกติจนถึงระยะ 8-เซลล์ (Seshagiri และ Bavister, 1989b)

สำหรับการเจริญและการแบ่งตัวของเอ็มบริโอโค ทุกระยะก่อนการฝังตัวต้องการพลังงานโดยอาศัยไพรูเวท แลคเตทและกรดอะมิโน เป็นแหล่งให้พลังงานมากกว่ากลูโคส (Robl และคณะ, 1991; Rosenkrans และคณะ, 1990; Rosenkrans และคณะ, 1993; Takahashi และ First, 1992) ส่วนกลูโคสมีผลต่อการเจริญและแบ่งตัวของเอ็มบริโอโคโดยเป็นแหล่งให้พลังงานตั้งแต่ระยะ 8 - เซลล์ โดยมีผู้ทดลองให้กลูโคสผ่านกระบวนการ Embden Meyerhof และวัดปริมาณของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ที่ได้ พบว่ามีปริมาณ CO_2 52.3% ที่ระยะ 6-เซลล์ และ 93.3% ที่ระยะบลาสโตซีส (Javed และ Wright, 1991; Robl และคณะ, 1991) เอ็มบริโอเกือบทุกระยะของการเจริญเติบโตอาศัยแลคเตทและไพรูเวทเป็นแหล่งพลังงานมากกว่ากลูโคสและพลังงานที่ได้ในระยะก่อนการฝังตัวนั้นจะเข้าสู่เครบไซเคิล ซึ่งจัดเป็นแหล่งพลังงานใหญ่สำหรับใช้ในการเจริญและการแบ่งตัวของเซลล์ในระยะเอ็มบริโอ (ดังรูปที่ 1.3 และ 1.4 ซึ่งแสดงวิถี (pathway) ของกระบวนการไกลโคไลซีสและกระบวนการเพนโตส-ฟอสเฟต และกระบวนการเครบไซเคิล)

สำหรับความต้องการพลังงานของตัวอสุจิ พบว่า ตัวอสุจิสามารถเคลื่อนไหวได้เองในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีองค์ประกอบของเกลือแร่และไอออนธรรมดา (simple culture medium) โดยใช้พลังงานที่สะสมภายในตัว ส่วนการเติมแลคเตท ไพรูเวทและกลูโคสในน้ำยาเพาะเลี้ยงจะช่วยส่งเสริมให้อสุจิเกิดกระบวนการคาพาซิเตชันและอะโครโซมรีแอ็กชัน ได้เร็วขึ้น (Miyamoto และ Chang, 1973; Bavister และ Yangimachi, 1977; Parrish และคณะ, 1988) แต่ถ้าเติมกลูโคสเพียงอย่างเดียวไม่สามารถส่งเสริมการปฏิสนธิได้ (Rogers และ yanagimachi, 1975; Roger และคณะ, 1979)



รูปที่ 1.3 แผนภาพแสดงกระบวนการไกลโคไลซีส กระบวนการเพนโตสฟอสเฟต และกระบวนความสัมพันธ์ของเครบไซเคิล (Rieger, 1992)



รูปที่ 1.4 แสดงวิถีของกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ก่อนเข้ากระบวนการเครบไซเคิล

(Rieger, 1992)

นอกจากกลูโคส แลคเตท และไพรูเวทจะเป็นสารที่ให้พลังงานต่ออสุจิและไข่ในระยะก่อนการฝังตัวแล้ว ยังพบว่ากรดอะมิโนหลายชนิดและโปรตีนมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญของไข่ตั้งแต่อยู่ในรังไข่ Hafez และ Blandau (1969) พบโปรตีนและกรดอะมิโนในของเหลวภายในท่อนำไข่โค ซึ่งมีกรดอะมิโนทั้งหมด 20 ชนิด โดยจะพบธีโอนีน (threonine) เอสปาราจีน (asparagine) และกลูตามีน (glutamine) ในบางระยะของรอบวงจรสัด แต่กรดอะมิโนอีก 17 ชนิดพบในทุกระยะของวงรอบการเป็นสัด กรดอะมิโนที่พบในปริมาณมากมีไกลซีน (glycine) กรดกลูตามิก (glutamic acid) อะลานีน (alanine) ไลซีน (Lysine) (Iritani และคณะ, 1971) ส่วนธีโอนีนพบมากในของเหลวในมดลูก (Loe และคณะ, 1970) ปริมาณความเข้มข้นของกรดอะมิโนไกลซีน กรดกลูตามิก อาจีนีน และไลซีน มีภาวะการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน

ในรอบวงจรสัด เมื่อเทียบกับกรดอะมิโนตัวอื่น ๆ (Stanke และคณะ, 1974) ยังพบว่ากรดอะมิโนชนิดจำเป็น (essential amino acids) ในน้ำยาเพาะเลี้ยง Ham's F-10 มีความจำเป็นต่อการเจริญของไข่ไค (Wright และคณะ, 1976) กระต่าย (Kane และ Foote, 1970b; Kane, 1989) สุกร (Shea และคณะ, 1976) แกะ (Shea และคณะ 1976; Newcomb และคณะ, 1978) และไข่ของคน (Seitz และคณะ, 1971; Lopata และคณะ, 1980; Leung และคณะ, 1984)

จากการศึกษาพบว่ากรดอะมิโนที่มีความเข้มข้น 0.05 หรือ 0.5 mM สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญและการแบ่งตัวของเอ็มบริโอจากระยะ 1-เซลล์ จนถึงระยะบลาสโตซีสของกระต่าย (Kane และ Foote, 1970c), แฮมสเตอร์ (Bavister และคณะ, 1983), หนู (rat) (Zhang และ Armstrong, 1990) และหมู (Rosenkrans และคณะ, 1989) กรดอะมิโนเหล่านี้จะไปมีผลต่อการเจริญในระยะบลาสโตซีส โดยพบว่าเมื่อเติมกรดอะมิโนในน้ำยาเพาะเลี้ยงในระยะบลาสโตซีสจะช่วยส่งเสริมการเจริญและ differentiation ของเซลล์ inner cell mass และเซลล์ trophoblast ในเอ็มบริโอได้ดีกว่าเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาที่มีกรดอะมิโนในจำนวนที่น้อยกว่าหรือไม่มีเลย (Spindle, 1980) ส่วนในโคยังไม่มีรายงานเปรียบเทียบผลของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ต่อการเจริญและแบ่งตัวของเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในจานทดลอง พบแต่จำนวนของกรดอะมิโนภายในท่อนำไข่และในมดลูกมีจำนวน 20 ชนิด (Stanke และคณะ, 1974; Fahning และคณะ, 1967) ต่อมาในปี ค.ศ. 1989 Frie และคณะ พบอัตราการสังเคราะห์ RNA และโปรตีนสูงในระยะ 16-เซลล์และระยะบลาสโตซีสของเอ็มบริโอโค โดยเฉพาะในระยะ 16-เซลล์ มีกรดอะมิโน เมทไทโอนีนสูง การศึกษาต่อมาพบว่าน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีกรดอะมิโน 20 ชนิดมีผลต่อการแบ่งตัวและจำนวนเซลล์ของเอ็มบริโอโคในระยะบลาสโตซีส โดยเพิ่มจำนวนขึ้นจาก 71.5 เซลล์เป็น 111.5 เซลล์ นอกจากนี้ยังกระตุ้นการเจริญของเอ็มบริโอโคจากระยะ 1-เซลล์ให้เจริญถึงระยะมอรูลาและบลาสโตซีส (Takahashi และ First, 1992; Kim และคณะ, 1993) Moore และ Boridioli (1993) พบว่ากรดอะมิโนไกลซีนและอะลานีนมีผลส่งเสริมการเจริญและการแบ่งตัวของเอ็มบริโอโคจากระยะ 1-เซลล์เจริญจึงระยะมอรูลาและบลาสโตซีส ซึ่งกรดอะมิโนทั้งสองสามารถตรวจพบได้ภายในท่อนำไข่

สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดอื่นในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม พบว่าต้องการกลูตามีนในการสร้างพลังงานเพื่อการเจริญและการแบ่งตัวมากกว่ากลูโคส (Ehrensvard และคณะ, 1949) และต้องการกลูตามีนมากกว่ากรดอะมิโนชนิดอื่น 5 - 20 เท่า (Eagle, 1955) ได้ทำการศึกษาจากการวัด oxidation rate ของกลูโคสและกลูตามีนในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลายชนิดพบว่า oxidation rate ของการออกซิไดซ์กลูตามีนมากกว่ากลูโคส (Sumbilla และคณะ, 1981)

ในการออกซิไดซ์กลูตามีนจะให้กลูตาเมท คาร์บอนไดออกไซด์เป็นส่วนใหญ่ และแลคเตทเป็นส่วนน้อย (Stoner และ Merchant, 1972; Zielke และคณะ, 1980) แต่การออกซิไดซ์กลูโคสจะให้แลคเตทเป็นส่วนใหญ่ คาร์บอนไดออกไซด์เป็นส่วนน้อย (Morell และ Froesch, 1973) จากการที่ออกซิไดซ์กลูตามีนได้คาร์บอนไดออกไซด์มากกว่าการออกซิไดซ์กลูโคสอาจบ่งชี้ว่ากลูตามีนน่าจะเป็นแหล่งให้พลังงานส่วนใหญ่ในการเจริญและการแบ่งเซลล์มากกว่ากลูโคสและกรดอะมิโนชนิดอื่น ๆ ในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (Stoner และ Merchant, 1972) นอกจากนี้กลูตามีนยังช่วยควบคุมความดันออสโมติกและหรือความสมดุลย์ของไอออนภายในเอ็มบริโอโดยป้องกัน osmotic shock (Winkle และคณะ, 1990; Lawitts และ Biggers, 1992; Biggers และคณะ, 1993) โดยกรดอะมิโนทุกชนิดเมื่อซึมผ่านเข้าไปภายในเซลล์ เซลล์จะต้องเปลี่ยนกรดอะมิโนเหล่านี้เป็นสาร Amphibolic intermediates โดยอาศัยเอนไซม์ที่เฉพาะเจาะจงในการสลายกรดอะมิโนแต่ละชนิดก่อนเข้าเครบไซเคิล ดังแสดงในรูปที่ 1.1 สำหรับการสลายกลูตาเมทไปเป็น α-ketoglutarate นอกจากอาศัยเอนไซม์ L-glutamate dehydrogenase ที่เฉพาะเจาะจงแล้วยังอาศัย NAD^+ (Nicotinamide adenine dinucleotide) เป็น coenzyme ในการรับไฮโดรเจนอะตอมเพื่อเปลี่ยนกลูตาเมทเป็น α-ketoglutarate ก่อนเข้าเครบไซเคิล แล้วให้พลังงานออกมา (รูปที่ 1.1) กลูตามีนมีความสำคัญต่อการเจริญของเอ็มบริโอโดยจะเป็นสารเมทตาบอไลท์ในระยะ 2- และ 4-เซลล์ (Rieger, 1992; Rieger และคณะ,1990a, b)

สำหรับความสำคัญของกรดอะมิโนและโปรตีนจำพวก bovine serum albumin (BSA) ซึ่งจัดเป็นสารโมเลกุลใหญ่ นอกจากจะเป็นแหล่งที่ให้ไนโตรเจนยังพบกรดไขมัน (fatty acid) รวมอยู่ประมาณ 0.06 - 2.5 โมลกรดไขมัน/โมลอัลบูมิน (mol fatty/mol albumin) (Chen, 1966; Thomson, 1966) กรดไขมันนี้จัดเป็นแหล่งให้พลังงานต่อเซลล์อสุจิ ไข่ และเอ็มบริโอ จากการศึกษา BSA พบว่ามีผลต่อเอ็มบริโอหนูเมาซ์ โดยจะหยุดยั้งการเจริญและการแบ่งตัวในระยะ 1-เซลล์ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มี BSA อยู่ระหว่าง 1 - 4 mg/ml (Whittengham, 1969) ในกระต่ายพบว่า น้ำยาเพาะเลี้ยงที่มี BSA ระหว่าง 1.5 - 15 mg/ml มีผลช่วยส่งเสริมการเจริญของเอ็มบริโอระยะ 1-เซลล์ให้เจริญถึงระยะบลาสโตซีส (Kane และ Foote, 1971; Kane, 1987) นักวิจัยได้ศึกษาและค้นคว้า เสนอแนะว่า BSA จะมีผลช่วยส่งเสริมการเจริญจนถึงระยะบลาสโตซีสหรือ Hatching blastocyst ได้มากหรือน้อยขึ้นกับการเลือกชนิดของ BSA ที่ไม่มีกรดไขมันมาใช้ (McKiernan และ Bavister, 1992) BSA ยังมีบทบาทในการ stabilize membrane โดยลดการรั่วไหลของกรดอะมิโนภายในเซลล์ (Edogenous amino acids) ออกสู่น้ำยาเพาะเลี้ยง (Brinster, 1965) และมีส่วนช่วยทำลายอนุมูลโลหะ ซึ่งเป็นอันตรายต่อเอ็มบริโอในน้ำยาเพาะเลี้ยง (Cholewa และ Whitten, 1970) แล้วยังพบว่า BSA ช่วยส่งเสริมการเกิดกระบวนการคาพาซิเตชัน

และอะโครโซมรีแอ็กชันของเซลล์อสุจิให้เร็วขึ้น (Lui และ Meizel, 1977; Meizel, 1978; Menger และ Black, 1979; Hall, 1981; Karp และคณะ, 1981; Zausner-Guelman และคณะ, 1981; Cohen และคณะ, 1982) ยังพบว่า BSA มีสารประกอบบางอย่างที่สามารถทำปฏิกิริยากับสารที่เป็นส่วนประกอบใน seminal plasma อาจเป็น spermin หรือ polyamine อื่นได้ เกิดเป็นสารประกอบที่มีพิษต่อเซลล์อสุจิและไข่ได้ (Quinn และ Stanger, 1980) จึงได้มีการนำสารสังเคราะห์จำพวก polyvinyl alcohol (PVA) มาช่วยกระตุ้นการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ แต่สารนี้ไม่ได้ช่วยส่งเสริมการเกิดคาพาซิเตชันหรือปฏิกิริยาอะโครโซม (Bavister, 1981) พบเพียงว่า PVA มีสมบัติช่วยรักษาความตึงผิว (surface tension) ของน้ำยาเพาะเลี้ยงให้มีสภาพคงที่ และช่วยลดการรั่วไหลของกรดอะมิโนภายในเซลล์ออกสู่น้ำยาเพาะเลี้ยงได้ดีกว่า BSA (Bavister, 1981; Anderson, 1980) ซึ่งในปัจจุบันนี้นักวิจัย นิยมใช้ PVA เติมในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลายชนิด (Gwatkin และ Haidri, 1978; Bavister และคณะ, 1983; Kane และคณะ, 1986; Boatman, 1987; Kane และ Bavister, 1989; Seshagiri และ Bavister, 1989; Zhang และ Armstrong, 1990) ซีรัมจัดเป็นองค์ประกอบที่ให้ประโยชน์ในน้ำยาเพาะเลี้ยงซึ่งประกอบไปด้วยสารที่ให้พลังงาน เช่น กรดอะมิโน ,วิตามิน และปัจจัยการเจริญ (growth factor), ฮอร์โมน, cell attachment, serum protein, คาร์โบไฮเดรต, trace elements ฯลฯ จึงเป็นองค์ประกอบที่นิยมใช้ในน้ำยาเพาะเลี้ยงสำหรับเซลล์ไข่และเอ็มบริโอ และจะเป็นพิษต่อเซลล์ไข่หรือเอ็มบริโอได้ในกรณีที่มีเลือดผสมอยู่ (Maurer, 1992) สารประกอบต่าง ๆ ในซีรัมมีผลต่อการเจริญของนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมภายในเซลล์ไข่ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (Moor และ Trounson, 1977; Moore และคณะ, 1980; Fukui และคณะ, 1982; Takage และคณะ, 1991) และมีผลส่งเสริมการปฏิสนธิของไข่โค (Fukushima และ Fukui, 1985) ยังพบว่าซีรัมมีผลยับยั้งการเจริญของเอ็มบริโอโครระยะ 2-เซลล์ แต่เมื่อเติมซีรัมในน้ำยาเพาะเลี้ยงของเอ็มบริโอโครระยะมอรูลา พบว่าช่วยส่งเสริมการเจริญในระยะมอรูลาให้เจริญถึงระยะบลาสโตซีส (Pinyopummitr และ Bavister, 1991) ซีรัมยังมีผลกระตุ้นการแบ่งจำนวนเซลล์ในระยะบลาสโตซีสและระยะ hatching blastocyst ซึ่งพบในเอ็มบริโอแกะ (Thompson และคณะ, 1992)

1.2 <u>ระดับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของน้ำยาเพาะเลี้ยง</u> พบว่ามีส่วนสำคัญในการช่วยส่งเสริมการเจริญของไข่ การปฏิสนธิ และการเจริญเติบโตของเอ็มบริโอในโค ระดับ pH ที่เหมาะสมของน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ใช้กันอยู่ 7.3 - 7.4 (Hensleigh และ Hunter, 1985) และพบว่าในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีการเปลี่ยนแปลงของ pH อยู่ระหว่าง 6.5 และ 7.4 ซึ่งมีโซเดียมไบคาร์บอเนตอยู่ประมาณ 6 - 50 mM ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ พบว่าไม่มีผลกระทบต่อการเจริญของเอ็มบริโอในจานทดลอง (Carney และ Bavister, 1987) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Yanaginachi

(1984) ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนตและคาร์บอนไดออกไซด์ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ จะมีระดับความเป็นกรด-ด่างคงที่ อยู่ในตู้เพาะเลี้ยงที่มีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์คงที่

1.3 <u>ระดับความเข้มข้นของสารละลาย (osmolality)</u> ระดับความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมของน้ำยาเพาะเลี้ยงส่วนมากมักมีค่าโดยประมาณเท่ากับค่าของของเหลวภายในร่างกาย คือ ประมาณ 250 - 300 mOsmols (Brinster, 1965a) หรือ 250 - 280 mOsmols (Whitten, 1971) ซึ่งสอดคล้องกับ McKiernan และ Bavister (1990) พบว่าความดันออสโมติกที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างความเข้มข้นที่ 250 - 300 mOsmols ไม่มีผลต่อเอ็มบริโอ เนื่องจากเอ็มบริโอมีความสามารถปรับสภาพตามความดันออสโมติกที่เปลี่ยนไปและการเจริญของเอ็มบริโอจะขึ้นกับองค์ประกอบของน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ใช้ มีรายงานความแตกต่างของระดับความเข้มข้นของน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ เช่น น้ำยาเพาะเลี้ยงของหนูเมาซ์และหนูแฮมสเตอร์อยู่ในช่วงระหว่าง 177 - 396 mOsmols และ 250 - 388 mOsmols ตามลำดับ (Miyamoto และ Chang, 1973) ในไข่โคอยู่ในช่วงระหว่าง 290 - 300 mOsmols (Bavister และคณะ, 1983) เอ็มบริโอโครยะ 1-เซลล์ อยู่ในช่วงระหว่าง 275 - 300 mOsmols (McKiernan และ Bavister, 1991; Pinyopummitr และ Bavister, 1991) ไข่หมูมีระดับ 285 mOsmols (McGaughey, 1977) ไข่กระต่ายมีระดับ 308 mOsmols (Bae และ Foote, 1975) ดังนั้นการเลือกน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีระดับความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมกับสัตว์แต่ละชนิดจะช่วยส่งเสริมการปฏิสนธิและการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอให้เจริญได้ผลดี

2. <u>อายุของไข่และช่วงเวลาที่เพาะเลี้ยงไข่กับอสุจิ</u>

2.1 <u>อายุของไข่</u> มีผลต่อการปฏิสนธิและการแบ่งตัวของเอ็มบริโอมาก การศึกษาโดย Hyttel และคณะ (1986) และ Prokofiev และคณะ (1992) พบว่าถ้าใช้ไข่ที่มีคุณภาพดี ที่เรียกว่า cumulus - oocyte complex ที่เจาะจากฟอลลิเคิลที่มีขนาด 2 - 5 มิลลิเมตร จากรังไข่โคที่เพิ่งถูกฆ่าไม่เกิน 30 นาที และใช้เวลาในการเลือกเก็บไข่ cumulus - oocyte complex ไม่นานเกิน 1.6 - 3 ชั่วโมง เมื่อนำ COCs นี้มาเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 20 - 24 ชั่วโมง จะได้ไข่ที่เจริญเต็มที่อยู่ในระยะเมตาเฟส II ของการแบ่งแบบไมโอซีสมีโพลาบอดีอันที่ 1 ถึง 80%

2.2 <u>ช่วงเวลาและอุณหภูมิของการเพาะเลี้ยงไข่และอสุจิไว้ด้วยกัน</u> ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงไข่และอสุจิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมไว้ด้วยกันนั้น มีแตกต่างกัน เช่น ในโคช่วงเวลาที่เหมาะสมของการเพาะเลี้ยงอยู่ในระยะ 18 ชั่วโมง (Pinyopummintr และ Bavister, 1991) จากการทดลองพบว่า ช่วงเวลาในการเพาะเลี้ยงอสุจิและไข่เป็นเวลานาน 20 และ 24 ชั่วโมง มีผลต่อไข่ทำให้เกิด polyspermy 3.7% และ 4.8% ตามลำดับ และไข่มีอันตรายจากสารที่หลั่งออกมาจากตัวอสุจิที่ตายแล้ว (Xu และ Greve, 1988) ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมของการปฏิสนธิไข่และอสุจิอยู่ที่ 39 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมินี้เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดคาพาซิเตชันของอสุจิ อสุจิสามารถผ่านทะลุผนังของ Zona pellucida ของไข่โคให้อัตราการปฏิสนธิสูง นอกจากนั้นยังพบว่าปริมาณโปรตีนที่เรียกว่า Proteoglycan มีปริมาณสูงในของเหลวภายในฟอลลิเคิลโค สามารถชักนำให้เกิดปฏิกิริยาอะโครโซม (Lambert, 1981; Lenz และคณะ, 1982; Lenz และคณะ, 1983; Mahi และ Yanagimachi, 1978)

<u>การตรวจหาเพศเอ็มบริโอของโคที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกายด้วยพอลิเมอเรสเชนรีแอ็กชัน</u>

การเลี้ยงสัตว์ในทางการเกษตรกรรม ได้แก่ โค กระบือ ม้า หมู เป็นต้น พบว่าผลผลิตของสัตว์เหล่านี้ในแถบเอเชียต่ำกว่าการผลิตในแถบยุโรป (Mason และ Bavanendran, 1982) โคจัดเป็นหนึ่งในสามของแหล่งผลิตโปรตีนที่สำคัญทางอาหารของประชากรโลก (Payne, 1970) มีการนำพันธุ์โคจากยุโรปมาปรับปรุงพันธุ์ และขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิตโคให้สูง โคที่ได้มีความสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมและภาวะอากาศในเขตร้อน ได้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงไข่การปฏิสนธิ และเอ็มบริโอเจริญจนถึงระยะบลาสโตซีสในจานทดลอง จึงนำไปถ่ายฝากให้ตัวรับที่เหมาะสมต่อไป

ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา นักวิจัยมากมายพยายามค้นคว้าหาเทคนิคเพื่อใช้ในการตรวจแยกเพศ Hare และ Betteridge (1978) เสนอรายงานการตรวจเพศก่อนกำเนิดได้ในโค กระบือ ม้า และหมู เป็นต้น ระยะเริ่มแรกของการกำหนดเพศในสัตว์เพศเมียจะมีโครโมโซมเพศเป็น X-bearing haploid ovum ส่วนในเพศผู้อสุจิมีโครโมโซมเพศเป็น Y- หรือ Y-bearing spermatozoa เมื่อไข่ในเพศเมียเข้าร่วมกับอสุจิในเพศผู้ สภาวะนี้เรียกว่า เกิดการปฏิสนธิ ได้ไซโกต (zygote) ถ้าโครโมโซมของไซโกตเป็น XX ได้ลูกเพศเมีย แต่ถ้าโครโมโซมไซโกตเป็น XY จะได้เพศผู้ เทคนิคที่พัฒนาใช้สำหรับการตรวจเพศในทางปฏิบัติ ได้แก่

1. <u>การตรวจเพศโดยใช้อสุจิ</u> อสุจิจะมีความสำคัญเป็นตัวกำหนดเพศด้วย มีอสุจิสองประเภท คือ อสุจิที่มีโครโมโซมเพศเป็น X Beatty (1974) สามารถแยกอสุจิชนิด X-โครโมโซม และ Y-โครโมโซม ออกจากกันเป็นผลสำเร็จได้ในแพะก่อนนำไปผสมเทียม ต่อมามีวิธีแยกอสุจิโดยอาศัยลักษณะที่แตกต่างทางกายภาพ ดังนี้

a. centrifugation ปั่นแยกน้ำหนักอสุจิ ทั้งนี้เพราะอสุจิที่มี X- โครโมโซมจะมีขนาดและความหนาแน่นสูงกว่าอสุจิที่มี Y-โครโมโซม

b. sedimentation (Ericsson และคณะ, 1973; Ericsson, 1977; Glass และ Ericsson, 1978; Goodeaux และ Kreider, 1978; Dmowski และคณะ, 1979; Dixon และคณะ, 1980; Beal และคณะ, 1984; Maxwell และคณะ, 1984; White และคณะ, 1984; Estienne และคณะ, 1988)

c. ใช้หลักการของ filtration แยกขนาดอสุจิที่ต่างออกจากกัน (Steenan และคณะ, 1975; Quinlivan และคณะ, 1982)

d. เนื่องจากโปรตีนที่เมมเบรนของอสุจิตัวผู้และตัวเมียต่างกัน ดังนั้นจึงสามารถแยกอสุจิ 2 ชนิดออกจากกันโดยอาศัยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อชนิดของอสุจิโดยวิธี immunoselection (Bennett และ Boyse, 1973) และ immunosedimentation (McCormick และคณะ, 1983)

e. การวิเคราะห์ขนาดของอสุจ โดยใช้ flow cytometric (Otto และคณะ, 1979; Garner และคณะ, 1983; Pinkel และคณะ, 1985)

f. โดยใช้ฮอร์โมน สารเคมี และแอนติบอดี ต่อ Y-bearing spermatozoa หรือ H-Y แอนติเจน (Bennett และ Boyse, 1973)

2. <u>การตรวจหาเพศในระยะเอ็มบริโอ</u> (Sexing Embryos) การตรวจเพศในสัตว์สามารถทำได้ โดยการ transplantation diploid nuclei ระยะบลาสโตซีส เข้าสู่เซลล์ไข่ที่ไม่มี nucleus ซึ่งสามารถทำได้สำเร็จใน หนู โค และแกะ (King, 1966; Gurdon, 1977; Willadsen, 1986; Barnes และคณะ, 1987; Smith และ Willmut, 1988) หรือกระตุ้นไข่ให้เกิด Parthenogenesis หรือ นำ pronuclues ออก 1 อันในไข่ที่ปฏิสนธิแล้ว

ต่อมามีการพัฒนาเทคนิคเพื่อใช้ตรวจเพศในเอ็มบริโอ หรือ fetus จากโครโมโซมเพศ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมเพศเมีย มีโครโมโซมเพศเป็น XX ส่วนในเพศผู้มี

โครโมโซมเป็น XY หรือตรวจหาสารแอนติเจนที่พบเฉพาะว่ามีใน Y- โครโมโซมของเพศผู้ เทคนิคที่นิยมใช้ตรวจเพศในระยะเอ็มบริโอ (Seidel และ Seidel, 1991) ได้แก่

2.1 **Karyotyping** ตรวจเพศโดยใช้สาร colchicine หยุดการแบ่งเซลล์โดยโครโมโซม หยุดอยู่ในระยะเมทาเฟส แล้วย้อมสีโครโมโซม นำมาตรวจรูปร่างของโครโมโซมโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ เทคนิคนี้ต้องอาศัยความชำนาญและใช้ระยะเวลามาก และเซลล์เอ็มบริโอจะถูกทำลาย

2.2 **Antibody to male-specific antigen** ทำโดยใช้แอนติบอดีซึ่งเป็นโมเลกุลของสารที่มีความจำเพาะต่อผิวเซลล์ของเพศผู้ โดยนำเอ็มบริโอมาเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีแอนติบอดีติดสลากสารฟลูออเรสเซนซ์นาน 30 - 60 นาที นำเอ็มบริโอไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ ถ้าเป็นเอ็มบริโอเพศผู้จะปรากฏสีของฟลูออเรสเซนซ์ แต่เทคนิคที่ได้ยังไม่เป็นที่พอใจ เนื่องจากเทคนิคการติดสลากด้วยสารฟลูออเรสเซนซ์ที่ใช้ยังไม่ดีพอ จึงทำให้ specific activity ของ antibody ติดกับสารฟลูออเรสเซนซ์ต่ำ เป็นผลให้เทคนิคนี้มีความไวต่ำไปด้วย

2.3 **Y - chromosome - specific DNA probe** อาศัยหลักการของชีวโมเลกุล โดยใช้ชิ้นส่วนของ DNA ที่พบเฉพาะใน Y- โครโมโซม (Y-chromosome-specific DNA) เท่านั้นเป็นตัวติดตามว่า เซลล์ในเอ็มบริโอมี Y-โครโมโซม หรือไม่ โดยทำ DNA hybridization ระหว่าง DNA ที่สกัดจากเซลล์เอ็มบริโอ และ Y-chromosome specific DNA probe ที่ติดสารกัมมัตภาพรังสี (radioistope) หรือไบโอติน (non-radioisotopr) Leonard และคณะ (1987) ได้ตรวจเพศโดยหลักการนี้และใช้ probe ที่ติดฉลากด้วยไบโอติน ผลปรากฏว่า จากเอ็มบริโอที่ตรวจทั้งหมดเป็นเพศผู้ 57% ต่อมา Nibert (1991) ได้ทดลองเช่นเดียวกัน และพบว่า การตรวจเพศเอ็มบริโอโดยวิธีนี้ถูกต้องถึง 98% จึงจัดเป็นเทคนิคให้ผลการตรวจค่อนข้างแน่นอน

2.4 **Polymerase chain reaction technique or *In vitro* enzymatic gene amplication (PCR)** PCR เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพและศักยภาพสูงเทคนิคหนึ่ง ใน Molecular biology มีผู้ใช้ในงานด้านต่าง ๆ เป็นจำนวนมาก ในปัจจุบันเทคนิคด้าน Molecular Biology เจริญแพร่หลายและได้รับการพัฒนามาอย่างดี นับตั้งแต่ปี ค.ศ. 1869 ซึ่งถือเป็นจุดเริ่มต้นของความรู้ Molecular Biology เป็นต้นมา ได้มีการค้นพบความรู้ใหม่ ๆ เพิ่มขึ้นดังมีผลงานที่สำคัญของบุคคลหรือคณะผู้วิจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องดังนี้

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปี ค.ศ. 1869 พระชาวออสเตรีย ชื่อ Gregor Medel ศึกษาการผสมพันธุ์ต้นถั่ว ทำให้สามารถอธิบายกลไกทางพันธุกรรม (mechanism of heredity) นับได้ว่าเป็นบิดาแห่งพันธุศาสตร์

ปี ค.ศ. 1944 D.T. Avery และคณะ แห่งมหาวิทยาลัย Rockefeller ศึกษาแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคปอดบวม (pneumonia) ทำให้ค้นพบว่ายีน (gene) ประกอบด้วย DNA

ปี ค.ศ. 1953 Francis H.C. Crick และ James D. Watson ค้นพบโครงสร้างของ DNA เป็น double helix ที่ประกอบด้วย deoxyribose, phosphate และ base 4 ชนิด ได้แก่ A(adenine), T(thymine), C(cytosine) และ G(guanine)

ปี ค.ศ. 1965 การสังเคราะห์โปรตีนทำได้ในหลอดทดลอง (*in vitro* translation) โดยนักวิทยาศาสตร์หลายกลุ่ม สามารถแสดงให้เห็นว่าลำดับของ 3 นิวคลิโอไทด์กำหนดชนิดของกรดอะมิโนที่มาเชื่อมต่อกันเป็นโปรตีนโดย ribosome และมีความรู้เรื่องรหัสพันธุกรรม (genetic codes)

ปี ค.ศ. 1970 Hamilton Smith และ Daniel Nathans แห่งมหาวิทยาลัย John Hopkins ค้นพบและสามารถใช้เอนไซม์ตัดเฉพาะ (restriction endonucleases) ที่เปรียบเสมือนเป็นกรรไกร (chemical scissors) ที่ตัดและแยกโมเลกุล DNA ได้

ปี ค.ศ. 1972 Paul Berg และคณะ มหาวิทยาลัย Stanford สามารถเชื่อม DNA ของไวรัส 2 ชนิด ทำให้ได้ DNA ลูกผสม (recombinant DNA)

ปี ค.ศ. 1973 Stanley Cohen มหาวิทยาลัย Stanford และ Herbert Boyer มหาวิยาลัย California at San Francisco สามารถสอดใส่ DNA ลูกผสมเข้าไปในแบคทีเรียทำให้ได้ clone ที่มี DNA จากสิ่งมีชีวิตอื่นปนอยู่ นับว่าเป็นการเริ่มต้นของพันธุวิศวกรรม (Genetic Engineering)

ปี ค.ศ. 1977 Walter Gilbert มหาวิทยาลัย Harvard และ Frederick Sanger จาก British Medical Research Council ต่างค้นพบเทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุล DNA (DNA sequencing technique)

ปี ค.ศ. 1977 Genetech เป็นบริษัทแรกทางพันธุวิศวกรรมสังเคราะห์ยาโดยเทคนิค DNA ลูกผสม (Recombinant DNA technology)

ปี ค.ศ. 1978 สามารถตรวจวินิจฉัยโรค Sickel cell anemia ของทารกในครรภ์ก่อนคลอดได้ โดยการตรวจวิเคราะห์ DNA

ปี ค.ศ. 1982 ใช้เทคนิค DNA ลูกผสมสังเคราะห์สาร Human insulin

อณูชีววิทยาในยุคที่ 2 (Second generation of Molecular Biology) เริ่มต้นในปี ค.ศ. 1985 โดย Saiki และคณะบริษัท Cetus Corporation เสนอผลงานการค้นพบ Polymerase Chain Reaction (PCR) ในกระชุม American Society of Human Genetics Conference ในชื่อเรื่อง Novel method for the prenatal diagnosis of sickle cell anemia การค้นพบ PCR มาจากพื้นฐานความรู้เกี่ยวกับ DNA replication ซึ่งใช้เอนไซม์ DNA polymerase และ RNA primers Saiki และคณะ ได้เพิ่มจำนวน DNA ในหลอดทดลองโดยใช้ PCR ซึ่งประกอบด้วยกระบวนการ 3 ขั้นตอน คือ DNA template denaturation, primer annealing และ primer extension โดยใช้ DNA polymerase สำหรับประวัติความเป็นมาของการค้นพบ DNA polymerase มีดังต่อไปนี้ ในปี ค.ศ. 1970 Klenow และ Henningsen ค้นพบ Large fragment ของ E. coli DNA polymerase I (Klenow fragment) ซึ่งมีคุณสมบัติ 5′→ 3′ DNA polymerase และ 3′–->5′ exonuclease ต่อมาในปี ค.ศ. 1977 Sanger นำ Klenow fragment ที่มีคุณสมบัติ 5′–->3′ DNA polymerase activity ใช้ในเทคนิค DNA sequencing ที่เป็นการเริ่มต้นของ DNA replication ในหลอดทดลอง (*In vitro* DNA replication) แต่มีเพียงรอบเดียว (one-cycle replication) ต่อมา Feinberg และ Vogelstein (1983) นำ Klenow fragment ที่มีคุณสมบัติ 5′–->3′ DNA polymerase activity ใช้ในเทคนิค Random primed DNA labelling เพื่อการสังเคราะห์ complementary DNA strand โดยการต่อลำดับนิคลีโอไทด์ที่ปลาย 3′-OH ของ radom hexanucleotide primer โดยอาศัยเอนไซม์ Klenow fragment ด้วย 5′–->3′ DNA polymerase activity แต่กระบวนการนี้เกิดการสังเคราะห์ DNA เพียงรอบเดียว

ต่อมามีการค้นพบเอนไซม์ Taq DNA polymerase ที่ใช้สำหรับเทคนิค PCR ชนิดที่ทนความร้อนสูงได้ (thermostabel DNA polymerase) สกัดได้จาก Thermophilic bacteria Thermus aquaticus (Taq) Brock และ Freeze แยกได้จากบ่อน้ำพุร้อนใน Yellowstone National Park ดังนั้น Saiki และคณะ (1988) นำเอนไซม์ Taq DNA polymerase มาใช้ในงาน PCR ที่มีแอคติวิตี้สูงถึง 200,000 unit/ mg Protein นอกจากนี้มีการค้นพบเอนไซม์ DNA polymerase ชนิดที่ทนความร้อนสูงมากถึง 104 องศาเซลเซียส สกัดแยกได้จากแบคทีเรีย *Pyrococcus species* Taq DNA polymerase ชนิดนี้มักนำมาใช้ในปฏิกิริยา PCR สำหรับ DNA ต้นแบบที่มี secondary structure เป็น stable hair-pin loop (New England Biolabs Catalog, 1992: 61) โดยทั่วไป Taq DNA polymerase สามารถแสดงแอคติวิตี้ดีในช่วงกว้างของความเข้มข้น Mg^{+2} (Perkin Elmer Cetus. Applification. 1991: 14) เอนไซม์ Taq DNA polymerase นั้นเพิ่มความสะดวกในการทำงาน

หลักการทำงานของพอลิเมอเรสเชนรีแอ็กชัน

การเพิ่มขยายจำนวน DNA (DNA replication) โดยทำให้เกิดในหลอดทดลอง (*in vitro*) แบบซ้ำ ๆ กันหลายรอบ (repeated cycles) ใช้ Taq DNA polymerase นั้น ทำให้สามารถเพิ่มขยายจำนวน DNA จากเดิมได้อย่าง exponential โดยมีจำนวนผลิตภัณฑ์ (PCR product) คำนวนได้เท่ากับ 2^n (n = จำนวนรอบ) เมื่อ PCR มีประสิทธิภาพ 100% ปริมาณ DNA ที่เพิ่มขึ้นตั้งต้นจาก DNA ที่ใช้เป็นต้นแบบ (DNA template) ซึ่งเป็น DNA สายคู่ (double stranded DNA) การสังเคราะห์ DNA สายใหม่ เกิดขึ้นโดยขั้นแรกจะทำให้เกิดการแยกสายของ DNA ต้นแบบทั้งสองเส้น ออกจากกันเป็น DNA สายเดี่ยว (single stranded DNA) ขั้นตอนนี้เกิดขึ้นได้โดยอาศัยความร้อน สาย DNA ที่ถูกแยกออกจากกันทั้งสองสายจะเป็นต้นแบบในการวิเคราะห์ DNA สายใหม่ที่เป็นคู่ (complementary strands) และมีลำดับของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ตรงกันกับที่สามารถจับเข้าคู่ (pairing) กับสายเดิมได้ การสังเคราะห์ DNA สายใหม่จำเป็นต้องอาศัยส่วนประกอบที่สำคัญ 3 อย่างคือ (1) oligonucleotide primers สองสายซึ่งใช้สำหรับตั้งต้นสังเคราะห์ DNA สายใหม่ primer จะจับ (anneal) ได้อย่างจำเพาะกับ DNA ต้นแบบที่เป็นคู่ของมัน และเริ่มสร้างสายใหม่จากปลาย 3′ OH ของ primer (2) Taq DNA polymerase และ (3) นิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด คือ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ใช้สร้าง DNA สายใหม่ นอกจากนี้ยังมีส่วนประกอบที่จำเป็นอื่น ๆ เช่น เกลือ $MgCl_2$, KCl และบัฟเฟอร์

เมื่อมีองค์ประกอบครบทั้งหมด ปฏิกิริยาสังเคราะห์ DNA จะเกิดขึ้น เมื่อทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิหมุนเวียนอยู่ ณ อุณหภูมิ 3 ระดับ คือ

1. ทำให้เกิดการแยกสายของ DNA ต้นแบบ เป็น DNA สายเดี่ยวที่อุณหภูมิสูงถึง 90 - 95 องศาเซลเซียส เรียกว่า Denaturation

2. การจับกันระหว่างสาย primers กับ DNA ต้นแบบ ที่เป็นสายเดี่ยวที่อุณหภูมิต่ำระหว่าง 40 - 60 องศาเซลเซียส เรียกว่า Primer annealing

3. การสังเคราะห์ DNA สายใหม่ โดยการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3′-OH ของ primer ที่อุณหภูมิปานกลาง 72 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ Taq DNA polymerase

ขั้นตอนทั้งสามจะใช้เวลาสั้น ๆ เป็นนาทีหรือส่วนของนาที และทำหมุนเวียนเป็นวงจร (cycles) ซ้ำ 30 - 40 รอบ (Innis และคณะ, 1990)

องค์ประกอบสำคัญต่อเทคนิคใน PCR

1. Taq DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่ทนความร้อนสูง เมื่อใช้ในการวิเคราะห์ PCR สะดวกในการใช้งานเพราะเติมเพียงครั้งเดียวสามารถทำงานต่อสาย DNA เส้นใหม่ได้ตลอดรอบการทำงาน

2. เครื่องอัตโนมัติควบคุมปฏิกิริยา PCR (PCR Automotion) ในระยะแรกของเทคนิค PCR ใช้เครื่องอัตโนมัติที่เรียกว่า Mr. Cycle โดยบริษัท Perkin Elmer Cetus ที่พัฒนามาจากเครื่อง Pro/ Pette liquid handler ที่ประกอบด้วย 2 block คือ front block เชื่อมต่อกับอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) 2 อ่างที่อุณหภูมิ 94 และ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ มี switch valve คอยเปลี่ยนอุณหภูมิโดยอัตโนมัติ และ back block เชื่อมต่อกับอ่างควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เครื่องมีความยุ่งยากซับซ้อนมาก ต่อมาค้นพบเอนไซม์ Taq DNA polymerase ที่สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ จึงง่ายในการพัฒนาเครื่องอัตโนมัติสำหรับควบคุมปฏิกิริยา PCR

เครื่องอัตโนมัติของ PCR จะต้องมีคุณสมบัติที่สำคัญ ดังต่อไปนี้

1. สามารถเปลี่ยนอุณหภูมิไปตามจุดที่กำหนดได้อย่างรวดเร็วโดยใช้เวลาเป็นวินาที
2. สามารถรักษาอุณหภูมิให้คงที่ ณ จุดที่ต้องการซึ่งมีอุณหภูมิที่แตกต่างกัน 3 - 4 จุด ได้ตามระยะเวลาที่กำหนด
3. สามารถเปลี่ยนอุณหภูมิหมุนเวียนเป็นวงจรตามที่กำหนดได้

ส่วนประกอบที่สำคัญของเครื่องโดยทั่วไป มี 4 ส่วนคือ

1. block ควบคุมอุณหภูมิ หรือ rack วางหลอดปฏิกิริยาหรือช่องว่างในตัวเครื่องสำหรับวางหลอดหรือถาดหลุมสำหรับทำปฏิกิริยา
2. ส่วนให้กำเนิดความร้อน (heating system)
3. ส่วนที่ทำให้เย็นหรือทำให้อุณหภูมิลดลง (cooling system)
4. ส่วนควบคุมอุณหภูมิ และเวลา (temperature/ timer control)

<u>ตัวอย่างเครื่องซึ่งใช้ระบบแตกต่างกัน</u> ได้แก่

1. เครื่องอัตโนมัติที่ใช้ heater ทำความร้อนและใช้ระบบ air-compressor ให้ความเย็น ได้แก่ - DNA Thermal Cycler
2. เครื่องอัตโนมัติที่ใช้ heater ทำความร้อนและระบายความร้อนด้วยน้ำประปา (tap water) หรือระบบทำความเย็น (water cooling unit) มาต่อเพิ่มต่างหาก ได้แก่ - Microcycler (Eppendorf)
   - Bioexcellence DNA inhibitors I + II (Bioexcellence)
3. เครื่องอัตโนมัติที่ใช้ระบบ Peltier (Thermoelectric heat pump หรือ solid state heating and cooling) ในการควบคุมอุณหภูมิ ได้แก่
   - Temp Cycler I + II (Coy)
   - Temperature Cycle (Savat)
   - PREM (LEP Scientific)
4. เครื่องอัตโนมัติที่มีโครงสร้างการทำงานแบบตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (oven) ได้แก่ - ISS Pro - Oven II
   - BioTherm BioOven II
5. เครื่องอัตโนมัติที่ใช้หลอดไฟทำความร้อนและระบายความร้อนด้วยพัดลม ได้แก่ - Thermal Reactor
   - Omni Gene
6. เครื่องอัตโนมัติที่ใช้อากาศเป็นตัวส่งผ่านความร้อนและความเย็น ได้แก่
   - 1605 Air Thermo-Cycler

8. <u>การออกแบบไพรเมอร์</u> ใช้คอมพิวเตอร์ช่วยออกแบบไพรเมอร์ โดยช่วยวิเคราะห์ข้อมูลที่มีประโยชน์ต่าง ๆ เช่น Tm (melting temperature) โอกาสที่จะเกิด hair-pin หรือ dimer โอกาสที่จะเกิด anneal กับส่วนอื่น ๆ ของ target sequence และโอกาสที่จะจับกับ sequence อื่น ๆ โดยอาศัยข้อมูลจาก Nucleaotide Database เช่น GenBank ประโยชน์ที่ได้จากการใช้คอมพิวเตอร์ช่วยในด้านอำนวยความสะดวกและลดเวลาในการออกแบบและการเลือกความเข้มข้นของ Primer อยู่ระหว่าง 0.1 และ 0.5 μM ในกรณีที่มี primer สูงกว่านี้มีผลต่อการเกิด primer dimer ได้ การ annealing ของ primer และ DNA ต้นแบบขึ้นกับอุณหภูมิและระยะเวลา อุณหภูมิที่มักจะใช้ในขั้นตอน extension การสร้าง DNA สายใหม่มีค่าอยู่ระหว่าง 55 - 72 องศา

เซลเซียส ถ้าอุณหภูมิในการต่อสาย DNA สูงขึ้น มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของ primer ที่ไม่ใช่ annealed primers รวมทั้งลดการต่อของ nucleotide ที่ไม่ถูกต้อง ตรงตำแหน่ง 3′ end ของ primer ระยะเวลาในการทำงานของ extension primer ขึ้นกับความยาวและความเข้มข้นของสายลำดับ DNA ที่ต้องการ ส่วนอุณหภูมิที่ใช้ในการแยกสาย DNA ออกจากกันอยู่ระหว่าง 94 - 97 องศาเซลเซียส (Kim และ Smithies, 1988)

4. <u>ความเข้มข้นของเอนไซม์</u> ความเข้มข้นของ Taq DNA polymerase (จาก Perkin-Elmer Cetus) อยู่ระหว่าง 1 และ 2.5 units (Lawyer และคณะ, 1989) ต่อ 100 µl ในปฏิกิริยาเอนไซม์นี้จะมีความจำเพาะต่อเป้าหมายหรือ primers จากการทดสอบความเข้มข้นของเอนไซม์ระหว่าง 0.5 - 5 units/100 µl แล้ววิเคราะห์ PCR product ด้วย gel electrophoresis โดยพบว่าถ้าใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์สูงเกินไปจะไม่มีผลจำเพาะและมีการสะสมมากเกินพอ และในกรณีที่ใช้ความเข้มข้นต่ำกว่าที่ต้องการก็จะไม่พอเพียงในการสังเคราะห์สาย DNA ทำให้ได้ PCR product ต่ำเกินไป

5. <u>ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ ไตรฟอสเฟต</u> (deoxynucleotide triphosphate, dNTP) ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR (dATP, dGTP, dCTP และ dTTP) โดยทั่วไปจะมีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 50 - 200 µM โดยต้องปรับให้เป็นกลาง (neutralized) ที่ pH 7.0 การเตรียม dNTPs เป็น primery stock solution มีความเข้มข้น 10 mM แล้วจึงเจือจางให้มีความเข้มข้น 1 mM แบ่งเก็บไว้ที่ - 20 องศาเซลเซียส (dNTPs สามารถจับกับ Mg^{+2} ปริมาณ dNTPs ในปฏิกิริยาจะเป็นตัวกำหนดปริมาณ free Mg^{+2}) dNTPs ทั้ง 4 ชนิดที่มีอยู่ในปฏิกิริยาควรจะมีความเข้มข้นของแต่ละชนิดสมดุลกันอย่างพอเหมาะ (optimal balance) เพื่อให้ปฏิกิริยา PCR เกิดขึ้นอย่างจำเพาะถูกต้อง ได้ปริมาณผลิตภัณฑ์สูง ถ้ามีความเข้มข้นของ dNTPs สูงเกินไปอาจเร่งให้เกิดการต่อลำดับเบสคู่กันผิดพลาด

เทคนิค PCR นี้จัดเป็นเทคนิคที่ให้ผลการวิเคราะห์ได้รวดเร็วและแม่นยำ ช่วยลดความยุ่งยาก เวลา และค่าใช้จ่ายที่เคยเป็นปัญหาในงานวิจัยทั้งหลาย นอกจากนี้เทคนิค PCR ยังนำไปศึกษาวิจัยทาง Molecular biology ประโยชน์ทางการแพทย์และนิติเวชวิทยาในการชันสูตรโรคและพิสูจน์หลักฐานในการดำเนินคดี เช่น โรคผิดปกติทางพันธุกรรม โรคติดเชื้อ โรคมะเร็ง เป็นต้น

ในปี ค.ศ. 1990 เทคนิค PCR ได้ถูกนำมาใช้วิเคราะห์เพศจากเซลล์บลาสโตเมียร์ของโค (ระยะ 6- 7-วันหลังผสม) โดยดูดเซลล์จำนวน 1- 2-เซลล์มาตรวจวิเคราะห์ โดยใช้ไพรเมอร์ของ Y-chromosome-specific sequence 1 คู่ จากผลการวิเคราะห์โดย PCR นี้ทำให้ทราบผลได้อย่างรวดเร็ว และผลที่แน่นอน (Schroder และคณะ) และให้ผลสอดคล้องกับการทดสอบโดยวิธีอื่น จากรายงานของ Paura และคณะ (1991) ที่ได้ทำการวิเคราะห์หาเพศโดยแบ่งครึ่งของโคจำนวน 24 ตัว โดย PCR และใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ ผลการตรวจสอบพบว่ามีค่าความถูกต้องถึง 90% ในปีต่อมา Postiglioni และคณะ ทำการวิจัยโดยใช้เซลล์บลาสโตเมียร์จำนวน 8 - 30 เซลล์ (ระยะ compact morula) ของโคจำนวน 6 ตัว มาวิเคราะห์หาเพศ จากผลการทดลองพบว่า มีเอ็มบริโอจำนวน 2 เอ็มบริโอเป็นเพศผู้ ส่วนที่เหลืออีก 4 เอ็มบริโอเป็นเพศเมีย ต่อมาได้ศึกษาค้นคว้าหาไพรเมอร์ที่มีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์เพศมากขึ้น โดยใช้ Y-chromosome specific primers ที่เรียกว่า 97 M primer ไพรเมอร์นี้จะมีการจับจำเพาะต่อ DNA ต้นแบบเพื่อจำลอง DNA เส้นใหม่ใน PCR นำไพรเมอร์นี้มาใช้ตรวจวิเคราะห์เพศของเอ็มบริโอจำนวน 92 ตัว (ในระยะ 6- 7-วันหลังผสม) จากผลการ วิเคราะห์พบว่า มีเอ็มบริโอจำนวน 40 เอ็มบริโอเป็นเพศผู้ และจำนวน 50 เอ็มบริโอเป็นเพศเมีย ส่วนอีก 2 เอ็มบริโอ เซลล์สูญเสียไปในระหว่างการวิเคราะห์ (Agrawala และคณะ, 1992)

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ทั้งเพศผู้และเพศเมียมีโครโมโซมเพศต่างกัน โดยในเพศผู้จะเป็น XY และเพศเมียจะเป็น XX บริเวณที่มีความคล้ายคลึงกัน (Homologous) ของโครโมโซมเพศทั้งสองได้แก่ ในส่วนของ short arm บริเวณดังกล่าวของเพศผู้ เรียกว่า zfy ส่วนในเพศเมีย เรียกว่า zfx และในโครโมโซมทั้งสองจะมีโปรตีนที่เรียกว่า zinc finger protein เป็นองค์ประกอบเฉพาะที่พบใน X และ Y โครโมโซมเท่านั้น จากลักษณะเฉพาะของโปรตีนและโครโมโซมเพศ จึงได้นำมาใช้ในการแยกเพศ โดยมีการสร้างไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน zfx และ zfy ยีนบริเวณนี้มี base pairs ขนาด 447 หรือ 445 bp (base pairs) (Aasen และ Medrano, 1990) ความจริงดังกล่าวได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจเพศเอ็มบริโอด้วยวิธีพอลิเมอเรสเชนรีแอ็กชัน

เนื่องจากบลาสโตเมียร์ที่ได้จากเอ็มบริโอที่ทำ biopsies จะมีจำนวน DNA อยู่น้อย คือประมาณ 4 - 20 pg ต่อเอ็มบริโอ จึงได้มีการแก้ปัญหาโดยใช้ลำดับเบสของบริเวณ zfx และ zfy ในโค มาออกแบบชนิดของไพรเมอร์เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ทาง PCR เรียกว่า nested primers ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนที่แยกจากกันด้วยชนิดของไพรเมอร์สองชนิด คือ bracket primers และ nested primers (รูป 2.4) ในปฏิกิริยาโปรแกรมแรกของ PCR ใช้ bracket primers ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่อยู่รอบนอก DNA ต้นแบบชุดแรกที่ได้จากปฏิกิริยา PCR จำนวน 30 รอบทำ

ให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA ต้นแบบอยู่ภายใน แต่มีขนาดยาวกว่า ซึ่งสัมพันธ์กับตำแหน่งของ bracket primers ที่ออกแบบไว้ จำนวนผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา PCR ช่วงแรกนี้จะเทียบเท่ากับจำนวนผลิตผลที่เพิ่มขยายได้จากเทคนิค PCR พื้นฐานด้วยไพรเมอร์คู่เดียว ปฏิกิริยา PCR โปรแกรมที่สอง ทำโดยใช้ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยารอบแรกเป็นต้นแบบ และใช้ nested primers ซึ่งออกแบบให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับเพิ่มผลิตภัณฑ์ของ DNA ต้นแบบอยู่ถัดเข้ามาด้านในจาก bracket primers ให้เกิดปฏิกิริยาจำนวน 30 รอบ จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ DNA ต้นแบบ มีความบริสุทธิ์สูงและได้จำนวนขยายเพิ่มขึ้นมาก เทคนิค PCR นี้นำมาใช้ในการตรวจเพศในโค และคาดว่าจะมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจและมีประสิทธิภาพการปรับปรุงพันธุ์ นอกจากนี้ยังสามารถนำไปตรวจสอบความผิดปกติทางพันธุกรรมได้ เช่น ทาง sex-linked allele (Pellevick และคณะ, 1992)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาถึงความสำคัญของกรดอะมิโนว่ามีส่วนช่วยส่งเสริมการเจริญและการแบ่งตัวของเอ็มบริโอโคที่ได้จากการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย จาก 72 ชั่วโมงถึง 192 ชั่วโมงหลังผสมหรือไม่ และถ้ามี กรดอะมิโนจำพวกใดมีผลมากน้อยอย่างไร

2. เพื่อศึกษาถึงความสำคัญของกลูโคสและฟอสเฟตช่วยส่งเสริมการเจริญและการแบ่งตัวของเอ็มบริโอโคที่ได้จากการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย จาก 72 ชั่วโมงถึง 192 ชั่วโมงหลังผสมหรือไม่ และถ้ามี กลูโคสและฟอสเฟตชนิดใดมีผลมากน้อยอย่างไร

3. เพื่อศึกษาการตรวจเพศเอ็มบริโอของโคที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกายด้วย PCR

ความสำคัญและประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบถึงความสำคัญของกรดอะมิโนที่มีผลต่อการเจริญจนกระทั่งถึงระยะบลาสโตซีสของเอ็มบริโอโค

2. ช่วยให้ได้เอ็มบริโอระยะก่อนการฝังตัวที่มีคุณภาพจากการเพาะเลี้ยงในจานทดลองและได้จำนวนเอ็มบริโอมากขึ้นในระยะก่อนการฝังตัว

3. นำไปสู่การเรียนรู้เกี่ยวกับ eight - sixteen - cell block ในโค รวมทั้งในสัตว์ชนิดอื่นที่พบในลักษณะเดียวกัน

4. ทำให้ทราบถึงเพศของเอ็มบริโอโครยะก่อนการฝังตัวจากการเพาะเลี้ยงในจานทดลองซึ่งอาจประยุกต์ใช้ถึงการเลือกเพศเอ็มบริโอของโคที่ทราบเพศแน่นอนก่อนระยะการฝังตัวนำไปถ่ายฝากให้แม่โคตัวรับ

5. นำไปสู่การนำความรู้ไปปรับปรุงพันธุ์สัตว์และขยายพันธุ์สัตว์

6. นำความรู้ทางผลการวิเคราะห์ด้วย PCR ไปป้องกันผลของความบกพร่องทางพันธุกรรมจาก sex - linked allele ในเอ็มบริโอโค

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย