หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผล

ผลการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเอมบริโอหนูเมาซ์ ระยะ 2-เซลล์ เป็นบลาสโตซีสในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ไม่ผสมซีรั่ม 3 ชนิด คือ Ham's F-10, HTF และ T6 (ตารางที่ 3.1, 3.2 และรูปที่ 3.1) พบว่าน้ำยาเพาะเลี้ยง Ham's F-10 ให้ผลส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอหนูเมาซ์ได้ต่ำกว่าเอมบริโอที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง HTF และ T6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนน้ำยาเพาะเลี้ยง HTF และ T6 ให้ผลส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอได้ไม่แตกต่างกัน

จากการศึกษาเพื่อหาสารอาหารและสารประกอบต่าง ๆ ที่อาจมีผลช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเอมบริโอในระยะบลาสโตซีส เช่น กรดอะมิโนที่จำเป็น (essential amino acid) (Gwatkin, 1966; Spindle และ Pederson, 1973; Juurlink และ Fedoroff, 1977), กรดอะมิโนที่ไม่จำเป็นต่อร่างกาย (non-essential amino acid) (Spindle และ Pederson, 1973), วิตามิน (Juurlink และ Fedoroff, 1977; Bavister et al, 1983) และกรดไขมัน (fatty acid), อินสุลิน (insulin), โซมาโตมิดิน (Somatomidin), ทรานสเฟอริน (transferrin), พบว่ามีเพียงกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย ได้แก่ ฮิสติดีน (histidine), เมธไทโอนีน (methionine), ธริโอนีน (theonine) ทริปโตเฟน (tryptophan), ไธโรซีน (tyrosine) และ วาลีน (valine) ที่มีผลช่วยส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอในระยะบลาสโตซีส เมื่อมีการเติมลงในน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูเมาซ์ การทดลองในเอมบริโอของหนูแฮมสเตอร์ระยะ 8-เซลล์ (Bavister et al, 1983) ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน โดยพบว่าในน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูแฮมสเตอร์ที่เติมกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย 4 ชนิด ลงไปด้วยคือ กลูตามีน (glutamine) พินิวลาลานีน (phenylalanine), เมธไทโอนีน และไอโซลิวซีน (isoleucine) จะทำให้อัตราการเจริญของเอมบริโอหนูแฮมสเตอร์เข้าสู่ระยะบลาสโตซีสมากกว่าเอมบริโอหนูแฮมส์เตอร์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ไม่ได้เติมกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายทั้ง 4 ชนิดนี้ ถึง 18: 1 เท่า

อย่างไรก็ตาม เมื่อศึกษาถึงองค์ประกอบของน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ Ham's F-10, HTF และ T6 พบว่าน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิด Ham's

F-10 เท่านั้น ที่มีการเติมกรดอะมิโนลงในน้ำยาเพาะเลี้ยง (ดูตาราง ที่ 2.2 ประกอบ) HTF และ T6 ไม่มีการเติมกรดอะมิโนชนิดใด ๆลงในน้ำยาเพาะเลี้ยงเลย แต่ก็สามารถนำไปใช้เพาะเลี้ยงเอมบริโอหนูเมาซ์ในการศึกษาครั้งนี้ และได้ผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเอมบริโอหนูเมาซ์เข้าสู่ระยะบลาสโตซีส ได้ดีกว่าน้ำยาเพาะเลี้ยง เอมบริโอชนิด Ham's F-10 อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) อีกด้วย จาก ผลการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนอาจมีผลช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเอมบริโอ แต่ไม่ใช่ปัจจัยสำคัญ เพราะในน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอหนูเมาซ์ที่ไม่มีกรดอะมิโนเป็นส่วนประกอบ เอมบริโอก็สามารถเจริญจากระยะ 2-เซลล์ ถึงระยะบลาสโตซีสได้ดี สอดคล้องกับรายงานผลการทดลองของ Brinster (1965 C), Cholewa และ Whitten (1970) ซึ่งพบว่าการเจริญของเอมบริโอหนูเมาซ์เข้าสู่ระยะบลาสโตซีสนั้น เกิดขึ้นได้ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มี BSA หรือ polyvinylpyrrolidone (PVP) เท่านั้น โดยปราศจากกรดอะมิโนตัวอื่น ๆ นอกจากนี้ Brinster (1971) พบว่าการเจริญเติบโตของเอมบริโอหนูเมาซ์ในระหว่าง 3 วันแรกนั้น ปริมาณโปรตีนของเอมบริโอ ลดลงประมาณ 26% endogenous taurine และ glycine pools ลดลงประมาณร้อยละ 50 และร้อยละ 10 ตามลำดับ ระหว่างการเจริญถึงระยะบลาสโตซีส และ free amino acid ในเอมบริโอที่ลดลงภายหลังการปฏิสนธิแล้ว จะค่อย ๆเพิ่มขึ้นจนถึงระยะ late blastocyst แสดงว่า เอมบริโอใช้ endogenous amino acid ระหว่างการแบ่งตัวระยะแรกๆ ของการเจริญเติบโต สำหรับ exogenous amino acid อาจไม่จำเป็นสำหรับการสังเคราะห์โปรตีนหรือสำหรับ embryo viability ก่อนถึงระยะ hatching blastocyst แต่เอมบริโออาจนำ exogenous amino acid ไปใช้ก็ได้ ในบลาสโตซีสที่พบว่า amino acid pool size เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ oocyte อาจจะเนื่องจาก metabolism ของ endogenous protein เริ่มแรกหรือเนื่องจาก conversion ของ exogenous lactate และ pyruvate ไปเป็น glutamine, aspartate และ alanine ซึ่งแหล่งพลังงานทั้ง 2 ตัวนี้ (lactate และ pyruvate) มีอยู่ในน้ำยาเพาะเลี้ยงอยู่แล้ว (Caro และ Trounson, 1984)

การศึกษาผลของวิตามินต่อการเจริญเติบโตของเอมบริโอในน้ำยาเพาะเลี้ยง พบว่าวิตามินไม่มีผลเพิ่มการเจริญเติบโตของเอมบริโอเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสในหนูเมาซ์ (Kane, 1978) แกะ (Tervit et al, 1972; Trounson และ Moore, 1974)

วัว (Tervit et al, 1972) สุกร Davis และ Day, 1978; Lindner และ Wright, 1978) และแฮมสเตอร์ (Bavister et al, 1983)

เมื่อศึกษาส่วนประกอบในน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอหนูเมาซ์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ทั้ง 3 ชนิด คือ Ham's F-10, HTF และ T6 พบว่าประกอบด้วยส่วนประกอบสำคัญ 6 ประเภท คือ เกลืออนินทรีย์ (inorganic salt) บัฟเฟอร์ (buffer) แหล่งพลังงาน (energy source) กรดอะมิโน (amino acid) ยาต้านจุลชีพ (antimicrobial) และวิตามิน (vitamin) ส่วนประกอบทั้ง 6 ประเภทนี้ จะพบได้ในน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอหนูเมาซ์ทั้ง 3 ชนิด แต่ในอัตราส่วนที่ต่างกัน ยกเว้นในน้ำยาเพาะเลี้ยง HTF และ T6 จะไม่พบกรดอะมิโน และวิตามิน ซึ่งส่วนประกอบทั้ง 2 ประเภทนี้ พบในน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิด Ham's F-10 เท่านั้น จากผลการวิจัยครั้งนี้พบว่า น้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอ Ham's F-10 ให้ผลเพิ่มอัตราการเจริญของเอมบริโอหนูเมาซ์เข้าสู่ระยะบลาสโตซีส น้อยกว่าน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอ HTF และ T6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แสดงให้เห็นว่า กรดอะมิโน และวิตามิน ไม่มีบทบาทเพิ่มการเจริญของเอมบริโอหนูเมาซ์เข้าสู่ระยะบลาสโตซีส ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ปัจจัยสำคัญที่ทำให้น้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอ Ham's F-10 ให้ผลเพิ่มอัตราการเจริญของเอมบริโอหนูเมาซ์ เข้าสู่ระยะบลาสโตซีส ต่ำกว่าน้ำยาเพาะเลี้ยง HTF และ T6 น่าจะอยู่ที่แหล่งพลังงานในน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอ จากการศึกษาและทดลองพบว่า การเจริญเติบโตในระยะแรก ๆ ของเอมบริโอหนูเมาซ์จนเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสนั้นจำเป็นต้องอาศัยแหล่งพลังงานในน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอ ซึ่งมีอยู่ 3 ชนิด คือ กลูโคส, ไพรูเวท และแลคเตท ซึ่งทั้งไพรูเวทและแลคเตทมีบทบาทช่วยส่งเสริมขบวนการ maturation ของ oocyte และส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอหนูเมาซ์ระยะ 1 เซลล์ เข้าสู่ระยะ 2-เซลล์ (Bigger et al, 1967) และจากระยะ 2-เซลล์ เข้าสู่ระยะบลาสโตซีส (Brinster, 1965b; Wales และ Whittingham, 1970) บทบาทของแลคเตทนั้น Bishop (1957) รายงานว่าของเหลวในท่อนำไข่ของกระต่ายมีความเข้มข้นของแลคเตทสูง โดยเฉพาะระหว่าง 3 วันแรกหลังการตกไข่เชื่อว่าความเข้มข้นของแลคเตทที่สูงขึ้นนี้เกิดขึ้นจากเนื้อเยื่อ (tissue) ที่ล้อมรอบท่อนำไข่ และในท่อนำไข่ของคน ก็พบลักษณะเช่นนี้เหมือนกัน Mastroianni, Winternitz และ Lowi (1958) พบว่า mucosa ของท่อนำไข่คนสามารถเปลี่ยน 60% ของกลูโคสในน้ำยาเพาะเลี้ยงไปเป็นกรดแลคติคได้ นอกจากนี้ Brinster (1965 b) ได้เสนอแนะว่าการใช้แลกเตทร่วมกับไพรูเวท ในน้ำยาเพาะเลี้ยงจะให้

ผลส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอมากกว่าการใช้เพียงตัวใดตัวหนึ่งตามลำพัง โดยการเจริญของเอมบริโอจากระยะ 2-เซลล์เป็นบลาสโตซีส จะเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ความเข้มข้นที่มากที่สุดของไพรูเวทร่วมกับแลกเตท (2.5-5.0 x 10^{-4} M-pyruvate + 2.5-5.0 x 10^{-2} M-lactate) ผลนี้เพื่อ maintenance (โดยผ่าน lactate dehydrogenase reaction) NAD^+ : NADH + H^+ ratio ให้อยู่ใน physiological range ทำให้ความเครียดของเอมบริโอที่มีต่อ oxidation-reduction potential เกิดขึ้นน้อยที่สุด ด้วยเหตุนี้จึงส่งเสริมความสามารถที่จะเจริญถึงระยะบลาสโตซีสได้ดี (Brinster, 1965d)

เมื่อพิจารณาปริมาณของแลคเตท และไพรูเวทใน น้ำยาเพาะเลี้ยง Ham's F-10, HTF และ T6 พบว่าใน HTF และ T6 มีความเข้มข้นของแลคเตท มากกว่าใน Ham's F-10, HTF และ T6 อาจเป็นไปได้ว่าความเข้มข้นที่มากกว่านี้มีผลให้ น้ำยาเพาะเลี้ยง HTF และ T6 ส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอหนูเมาซ์ได้ดีกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเอมบริโอใน น้ำยาเพาะเลี้ยง Ham's F-10

ผลของเกลืออนินทรีย์ต่าง ๆ ในน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอที่มีต่อการเจริญของเอมบริโอพบว่า เกลืออนินทรีย์ที่มีความจำเป็นสำหรับการเจริญของเอมบริโอประกอบด้วย Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Cl^-, Po^{3-} และ HCO_3 ซึ่งระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม (Optimum Levels) ของ K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+} และ Po_4^{-3} คล้ายคลึงกับค่าที่พบในซีรั่ม (Wales, 1970) Ca^{2+} จำเป็นสำหรับความคงทนของเยื่อหุ้มเซลล์ (stability) การซึมผ่าน (permeability) และปฏิกริยาต่อกันระหว่างเซลล์ (cell-cell interaction) โดยเฉพาะช่วงเวลาที่เซลล์เกิดการรวมตัวกัน (compaction) เป็นมอลูล่า ระดับความเข้มข้นของ Ca^{2+} ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเอมบริโออยู่ในช่วงประมาณ 0.4-10 mM (Whitten, 1971; Ducibella และ Anderson, 1975) ถ้าขาด Ca^{2+} อัตราการแบ่งตัวจะลดลง, พบบลาสโตเมียมีลักษณะกลม (spherical) มี intercellular contact น้อย (Wales, 1970; Whitten, 1971) การเจริญเติบโตและการ Compact ของเอมบริโอหยุดชะงัก จากรายงานผลการทดลองของ Wales (1970) พบว่าการเจริญของเอมบริโอหนูเมาซ์ระยะก่อนฝังตัว จะเกิดขึ้นในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มข้นของ K^+ สูงเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Restall และ Wales ในปี 1966 ที่พบว่าความเข้มข้นของ K^+ ในท่อสืบพันธุ์ของแกะตัวเมียสูงกว่าระดับความเข้มข้นของ K^+ ใน

พลาสม่า ดังนั้น การเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอจึงมักเตรียมให้มีความเข้มข้นของ K^+ สูง เพื่อให้ใกล้เคียงกับระดับความเข้มข้นของ K^+ ในของเหลวที่มดลูกและท่อนำไข่

เมื่อพิจารณาระดับความเข้มข้นของ K^+ ใน น้ำยาเพาะเลี้ยง Ham's F-10, HTF และ T6 แล้วพบว่าน้ำยาเพาะเลี้ยง T6 ซึ่งมีผลส่งเสริมการเจริญเติบโตของเอมบริโอได้ดี กลับมีความเข้มข้นของ K^+ อยู่ในระดับต่ำกว่า น้ำยาเพาะเลี้ยง Ham's F-10 และ HTF แสดงว่า ความเข้มข้นของ K^+ น่าจะเป็นเพียงปัจจัยหนึ่งที่ส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอหนูเมาส์เท่านั้น ถ้าในน้ำยาเพาะเลี้ยงนั้นมีปริมาณของแหล่งให้พลังงานเพียงพอ

ส่วนไบคาร์บอเนตไอออน (HCO_3^-) ในน้ำยาเพาะเลี้ยง ไม่ได้มีบทบาทควบคุมความเป็นกรด-ด่างของน้ำยาเพาะเลี้ยงเพียงอย่างเดียว แต่จะช่วยส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอด้วย โดยเฉพาะช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นบลาสโตซีส (blastocyst formation) และการขยายตัว (expansion) ของบลาสโตซีส การเจริญเติบโตของเอมบริโอหนูเมาส์จะต้องมีไบคาร์บอเนตไอออน สำหรับการสังเคราะห์ไพริมิดีน (pyrimidine biosynthesis) ความต้องการนี้เด่นชัดมากที่สุด ขณะที่มีการเปลี่ยนแปลงจากระยะ มอลูร่าเป็นบลาสโตซีส ซึ่งเป็นระยะเวลาที่มีการสังเคราะห์ RNA เพิ่มขึ้น ดังที่มีผู้ศึกษาพบว่าของเหลวในท่อนำไข่และโพรงมดลูกของกระต่ายมีความเข้มข้นของ HCO_3^- เพิ่มขึ้นในระยะแรกของการตั้งท้อง (Vishwakarma, 1962) ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ไม่มี HCO_3^- และ CO_2 จะทำให้การเจริญเติบโตของเอมบริโอลดลง (Brinster, 1972) ส่วน PO_4^{3-}, Mg^{2+} และ SO_4^{2-} มีผลต่อการเจริญของเอมบริโอหนูเมาส์เข้าสู่ระยะบลาสโตซีสน้อยมาก (Wales, 1970) ในการศึกษาครั้งนี้ปริมาณของ HCO_3^- ที่เติมลงในน้ำยาเพาะเลี้ยงทั้ง 3 ชนิดมีปริมาณเท่ากัน จึงไม่น่าเป็นไปได้ว่าผลที่แตกต่างกันของน้ำยาเพาะเลี้ยงทั้ง 3 ชนิด จะเกิดจาก HCO_3^-

จากการศึกษาผลของซีรั่มต่อการส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอหนูเมาส์เข้าสู่ระยะบลาสโตซีส ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ได้มีการเติมซีรั่มลงในน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอ 3 ชนิด คือ FCoS, FBS และ BSA (น้ำยาเพาะเลี้ยงที่ใช้มี 3 ชนิดเช่นกันคือ Ham's F-10, HTF และ T6) จากตารางผลการทดลองที่ 3.4 ถึง 3.9 แสดงให้เห็นว่า ซีรั่มที่เติมลงในน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอชนิด FCoS และ FBS จะช่วยส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอหนูเมาส์เข้าสู่ระยะบลาสโตซีส ได้ดีกว่าซีรั่มชนิด BSA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในขณะที่

ซีรั่ม FCoS ที่เติมลงในน้ำยาเพาะเลี้ยงทั้ง 3 ชนิด จะให้ผลส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอ-หนูเมาซ์เข้าสู่ระยะบลาสโตซีสไม่แตกต่างกับผลของซีรั่ม FBS อย่างมีนัยสำคัญ

โดยปกติในน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม มักมีการเติมซีรั่มหรือแหล่งให้โปรตีนชนิดอื่น ๆ ลงไปด้วย เช่น FCoS, BSA และ FCS (Austin, 1961; Brinster, 1963; Kane และ Foote, 1970, Steptoe et al; 1971; Brinster, 1972; Tervit et al, 1972; Wright et al, 1976 ; Juurlink และ Fedoroff, 1977; Spindle, 1980) ในระยะหลังมีการใช้ FBS ด้วย เนื่องจากมีรายงานว่า FCS ที่เติมในน้ำยาเพาะเลี้ยงมี bacterial toxin และ strong immuno-stimulatory effect ต่อเซลล์ของม้ามของหนูเมาซ์ที่เพาะเลี้ยง โดยทั่วไปเชื่อว่า ผลในการส่งเสริมการเจริญของซีรั่ม เนื่องจากผลของ cyclic adenosine monophosphate, catecholamines, วิตามิน, putative growth factor, ไขมัน และ อัลบูมิน อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าซีรั่มที่เติมในน้ำยาเพาะเลี้ยงให้ผลยับยั้งการเจริญของเอมบริโอเช่นกัน จากรายงานผลการทดลองพบว่าโปรตีนในซีรั่ม (อัลบูมิน) ค่อนข้างจะให้ผลทาง physical มากกว่าบทบาทที่จะเป็นอาหารของเซลล์ เช่นทำหน้าที่ในการ stabilize membrane และลดการรั่วไหลของกรดอะมิโนภายในเซลล์เอมบริโอออกสู่น้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอ (Brinster, 1971) ผลนี้เนื่องจาก เมื่อใช้สารสังเคราะห์ polyvinulpurrolidone (PVP) (a synthetic macromolecule) ก็ยังทำให้เอมบริโอหนูเมาซ์เจริญจากระยะ 2-เซลล์ ถึงระยะบลาสโตซีสได้ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ไม่มี external source of nitrogen นอกจากนี้อัลบูมินในซีรั่มยังสามารถจับโมเลกุลเล็ก ๆ ของไขมัน และทำหน้าที่นำพา (carrier) โมเลกุลของไขมันไปใช้เป็นแหล่งพลังงานเพื่อการเจริญแบ่งเซลล์ของเอมบริโอด้วย (Ham's 1963 a, b; Iscove และ Melchers, 1978) อัลบูมินยังทำหน้าที่เป็นตัวกำจัดหรือยับยั้งการออกฤทธิ์ของสารพิษต่าง ๆ ในน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอ เช่น อนุมูลโลหะ(Cholewa และ Whitten, 1970; Tervit et al, 1972; Guibert และ Iscove,1976; Holland และ Pike, 1978; Van Winkle และ Campione, 1982) บทบาทที่แท้จริงของซีรั่มในการส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอยังไม่แน่ชัด แต่เชื่อกันว่า ซีรั่มมีโปรตีนและ growth factors ซึ่งไปช่วยส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอ

ในซีรั่มชนิด FBS มีรายงานว่ามีองค์ประกอบบางอย่างซึ่งยังไม่ทราบแน่ชัดแต่เชื่อ

ว่าส่งเสริมการเกาะรวมตัว, การเจริญและการอยู่รอดของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงได้ (Rizzo et al, 1984) นอกจากนี้ยังพบว่ามี antiproteolytic liter (APT) ในซีรั่ม FBS ด้วย ซึ่ง APT นี้สามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของ proteolytic enzymes ที่เกิดจากการสังเคราะห์ของเซลล์ จึงเป็นผลให้ซีรั่ม FBS ที่เติมลงในน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอ ช่วยส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอหนูเมาซ์เข้าสู่ระยะบลาสโตซีสในทำนองเดียวกัน จากผลการวิจัยในครั้งนี้ อาจกล่าวได้ว่าซีรั่ม FBS และ FCoS ที่เติมลงในน้ำยาเพาะเลี้ยงน่าจะมี APT เป็นส่วนประกอบมากกว่า ซีรั่ม BSA แต่อย่างไรก็ตาม APT ก็เป็นเพียงปัจจัยหนึ่งเท่านั้นที่นำมาอธิบายถึงเหตุผลที่ซีรั่ม BSA ช่วยส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอหนูเมาซ์น้อยกว่าซีรั่ม FBS และ FCoS ผลของ APT นี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Wallis et al (1969) ซึ่งรายงานไว้ว่าในการเพาะเลี้ยงเซลล์ไตของลิงซีรั่มที่เติมลงไปในน้ำยาเพาะเลี้ยงต้องมี APT ในปริมาณสูง จึงจะทำให้ผลการเพาะเลี้ยงที่ดี เพราะ APT สามารถไปยับยั้ง proteolytic enzymes และยังพบว่า ซีรั่มที่มีผลเป็นพิษต่อเซลล์ที่เพาะเลี้ยงส่วนใหญ่เนื่องจากขาด antiprotease factor นั่นเอง

ในส่วนประกอบของซีรั่ม FBS เชื่อกันว่ามีสารจำพวกสเตอรอยด์จากพลาสม่าที่มาจากแม่ (maternal plasma) ได้แก่ โปรเจสเตอโรน (progesterone) และอีสตราไดออล-17บีต้า (oestradiol-17B) ซึ่งสารสเตอรอยด์เหล่านี้ มีรายงานไว้มากมายว่า มีผลช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและการ differentiate ของเอมบริโอหนูเมาซ์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอ (Dickman และ Day, 1974; Sengupta et al, 1977; Roy et al, 1981) นอกจากนี้ยังประกอบด้วยกรดอะมิโนถึง 16 ชนิด ซึ่งกรดอะมิโนมีผลต่อการเจริญเติบโตของเอมบริโอ เมื่อเติมลงในน้ำยาเพาะเลี้ยง จากการศึกษาของ Juurlink และ Fedoroff (1977) กับ Spindle (1980) พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดอะมิโนในน้ำยาที่ใช้เพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูเมาซ์ระยะบลาสโตซีสจะส่งเสริมการเจริญ และ differentiation ของ inner cell mass ของเอมบริโอได้ดีกว่าน้ำยาเพาะเลี้ยงอื่น ๆ ที่มีกรดอะมิโนน้อยกว่าหรือไม่มีเลย FBS ที่ผสมลงในน้ำยาเพาะเลี้ยง ส่วนประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ซึ่งมีอยู่จำนวนเล็กน้อยใน FBS จะมีบทบาทเหมือนเป็นแหล่งให้อาหารส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาก มีบทบาทเกี่ยวกับ cell attachment, mitogenic activity ซึ่งจะ pro-

mote optimal growth และช่วงอายุของเซลล์ในการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ FBS ยังมี unidentified factor ที่ช่วยส่งเสริม optimal attachment, growth และ survival ของเซลล์ในน้ำยาเพาะเลี้ยงอีกด้วย

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น อาจสรุปได้ว่า FBS เป็นซีรั่มที่เหมาะสมในการเติมลงในน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอ เพื่อช่วยส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอหนูเมาซ์เข้าสู่ระยะบลาสโตซีส ซึ่งผลการศึกษาวิจัยครั้งนี้ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน และยังพบอีกว่า FCoS จัดเป็นซีรั่มที่เหมาะสมเช่นกัน เนื่องจากช่วยส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอหนูเมาซ์ในน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอได้ดีเทียบเท่ากับ FBS

FCoS เป็นซีรั่มที่นิยมใช้ผสมในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ใช้สำหรับการปฏิสนธิ และเลี้ยงเอมบริโอของคน (Leung et al, 1984; Saito et al, 1984) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะซีรั่ม FCoS ช่วยส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอในน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอได้ดีกว่าพวก maternal plasma, maternal serum และ fetal cord plasma ในปริมาณเท่ากัน (Shirley et al, 1985) เชื่อว่าใน FCoS ประกอบด้วย embryo growth factor ซึ่งความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอหนูเมาซ์ มีความแตกต่างกันตามน้ำหนักโมเลกุลของสารที่เป็นองค์ประกอบ คือ สารประกอบในซีรั่ม FCoS ที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 30,000 และต่ำกว่า 1,000 จะมีผลยับยั้งการเจริญของเอมบริโอ แต่ส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 1,000 และต่ำกว่า 5,000 จะมีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโต โดยสามารถส่งเสริมเอมบริโอของหนูเมาซ์ให้เกิด hatching ได้ก่อนการฝังตัว (Ogawa et al, 1984) ความเข้มข้นของ FCoS ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ ร้อยละ 10 ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเอมบริโอ ดังที่ Saito และคณะในปี 1984 ได้รายงานไว้ว่าความเข้มข้นของ FCoS ที่เติมลงในน้ำยาเพาะเลี้ยง Ham's F-10 ในร้อยละ 10 จะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเอมบริโอได้ดี และพบว่าให้อัตราของ sister chromatid exchange ต่ำสุดด้วย

ผลของ FCoS ที่ส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอหนูเมาซ์จากระยะ 2-เซลล์ ถึงระยะบลาสโตซีส ได้แตกต่างจาก FBS นั้นอาจเป็นเพราะความแตกต่างของ growth factor, steroid และ unknown protein ระหว่างซีรั่มทั้ง 2 ชนิดนี้ ทำให้มีความสามารถส่งเสริมการเจริญได้แตกต่างกัน

BSA ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็น impured protein ที่ประกอบด้วย กรดไขมัน, สเตอรอยด์ และสารโปรตีนบางชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Kane, 1978) เชื่อว่าสารเหล่านี้ มีบทบาทต่อการเจริญของเอมบริโอ และเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ BSA ในทางการค้านั้นให้ผลต่อการเจริญของบลาสโตซีส กระต่ายคือ เป็นแหล่งพลังงานโดยผ่านทางอัลบูมินที่จับกับกรดไขมัน และส่งเสริมการ hatching ของบลาสโตซีส (Kane, 1978) จึงนิยมใช้เติมลงในน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลายชนิด (Brinster, 1963; Rizzino และ Sherman, 1979; Kane และ Headon, 1980; Yodyingyuad, 1982) Kane (1983) ได้ทดลองเลี้ยงเอมบริโอของกระต่ายระยะมอลูร่าในน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอและมีการเติมซีรั่ม BSA ที่มีเครื่องหมายทางการค้าต่างกัน 2 ชนิด คือ BSA no. 41F-9300 และ BSA no. 119C-9325 เพื่อศึกษาการเจริญของเอมบริโอเข้าสู่ระยะบลาสโตซีส พบว่า BSA 2 ชนิดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีผลต่อการแบ่งตัวของเซลล์ และการ hatch ของบลาสโตซีส แตกต่างกันกล่าวคือ BSA no.41F-9300 จะส่งเสริมการเจริญและการ hatch ของบลาสโตซีสมากกว่า BSA no.119C-9325 2 เท่า ผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า BSA แต่ละตัวสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอได้มากน้อยแตกต่างกัน และ BSA บางชนิดอาจไม่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของสัตว์บางชนิดด้วย ผลการทดลองครั้งนี้สามารถนำไปอธิบายผลการทดลองของ Tervit et al (1972) ซึ่งพบว่าเมื่อทำการเลี้ยงเอมบริโอของวัวใน simple medium ที่ประกอบด้วย BSA แต่ก็ไม่พบการเจริญของเอมบริโอวัวเกิดขึ้น และการทดลองของ Wright et al (1976) พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของวัวระยะก่อนมอลูร่า เอมบริโอเจริญเข้าสู่ระยะบลาสโตซีส และ hatch ได้ดีกว่าในน้ำยาเพาะเลี้ยง Ham's F-10 แต่จะไม่พบการ hatch ในน้ำยาเพาะเลี้ยง Ham's F-10 ที่เติม BSA ลงไปด้วย นอกจากนี้การเพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูขาวระยะ 8-เซลล์ในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM ซึ่งมี 3 mg/ml/BSA ก็ไม่พบการเจริญของเอมบริโอหนูขาวเช่นกัน (เกศรินทร์ แสงจันทร์, 2530) จากรายงานผลการทดลองดังกล่าวมาแล้วข้างต้น จะเห็นได้ว่าสอดคล้องกับผลการวิจัยครั้งนี้ ดังนั้นอาจสรุปได้ว่า BSA ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้อาจไม่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเอมบริโอหนูเมาซ์ในน้ำยาเพาะเลี้ยงก็ได้เนื่องจาก BSA ที่ใช้นี้เป็น impure BSA ซึ่ง Kane และ Headon, 1980 รายงานไว้ว่า normal commercial BSA มีปัจจัยที่จะส่งเสริมการเจริญสู่ hatching ของบลาสโตซีส แล้วยังมีปัจจัยที่มี toxic ต่อ

เอมบริโออยู่ด้วย ปัจจัยที่ส่งเสริม complete hatching ในเอมบริโอกระต่ายอาจอยู่ที่ high molecular weight protein จากการศึกษาทาง electrophoresis บ่งชี้ว่า commercial BSA มีการปนเปื้อนด้วยโปรตีนชนิดอื่น อาจเป็นส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่ไปจับกับอัลบูมิน ทำให้คุณสมบัติของ commercial BSA มีความแตกต่างกัน และให้ผลส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอได้ต่ำในบาง lots ส่วน purification ของ BSA มีผลลดการเจริญของเอมบริโอหนูเมาซ์ด้วย (Caro และ Trounson, 1984)

เมื่อศึกษาการเจริญของเอมบริโอที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ไม่มีซีรั่ม กับเอมบริโอที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีซีรั่ม พบว่าในน้ำยาเพาะเลี้ยงทั้ง 3 ชนิด ที่มีซีรั่มให้ผลการเจริญของเอมบริโอมากกว่า ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ไม่มีซีรั่ม ส่วนเอมบริโอที่เลี้ยงใน T6 มีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากเอมบริโอที่เลี้ยงใน T6+BSA ทั้งนี้อาจเป็นเพราะโดยส่วนประกอบของน้ำยาเพาะเลี้ยง T6 เพียงลำพังก็มีแหล่งให้พลังงานและส่วนประกอบที่เหมาะสมเพียงพอที่จะส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอได้ดีอยู่แล้ว เมื่อผสม BSA ซึ่งอาจเป็น lot ที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญได้ต่ำ จึงทำให้ผลที่ได้ไม่แตกต่างกัน

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Saito และคณะ (1984) ว่าการผสมซีรั่มในน้ำยาเพาะเลี้ยงจะช่วยส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอหนูเมาซ์ได้ดีขึ้น และเขายังพบว่าเอมบริโอที่เลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีซีรั่มจะมีจำนวนเซลล์มากกว่าด้วยซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการเจริญที่มากกว่าได้ เอมบริโอมีความต้องการไม่เพียงแต่อัลบูมิน แต่ยังมีส่วนประกอบที่เป็นโปรตีนชนิดอื่น ซึ่งมีอยู่ในส่วนของซีรั่มที่จะช่วยส่งเสริม hatching และ attachment ของเอมบริโอมากกว่า อัลบูมินอย่างเดียว ความสำคัญของโปรตีนที่แท้จริงยังไม่ทราบแน่นอน แต่จากที่มีผู้ทำการศึกษาพบว่าปริมาณโปรตีนในมดลูกของหนูเมาซ์เพิ่มขึ้นในระยะตั้งท้อง 2-4 วัน และจากการศึกษาทาง histological พบว่าเอมบริโอของหนูเมาซ์สามารถ take up exogenousprotein ได้ และเอมบริโอระยะบลาสโตซีสสามารถ take up โปรตีนได้มากกว่าเอมบริโอระยะมอรูล่า และระยะ 2-เซลล์ ถึง 7 เท่า (Pemble และ Kane, 1976)

จากการศึกษาถึงความอยู่รอดของเอมบริโอภายหลังที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง โดยทำการถ่ายฝากเอมบริโอไปยัง recipient ที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดท้องเทียมในระยะเวลาที่สอดคล้องกับ donor แล้วเปรียบเทียบจำนวนฟีตัสที่ฝังตัวในมดลูกของ

recipient และจำนวนลูกหนูที่ครบกำหนดคลอดของกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ปรากฏว่าไม่พบความแตกต่างทั้งจำนวนพีตัสที่ฝังตัว และจำนวนลูกอ่อน แสดงว่าสภาวะแวดล้อมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไม่มีผลต่อระบบการเจริญเติบโตของเอมบริโอ

การเจริญของเอมบริโอหนูเมาซ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงนั้น ความสำเร็จของการถ่ายฝากจะสัมพันธ์กับระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง (Hahn และ Schneider, 1982) อัตราการแบ่งตัวในระยะเริ่มแรกของเอมบริโอในการเพาะเลี้ยงกับการเจริญใน reproductive tract จะไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อถึงระยะบลาสโตซีสการเจริญของเอมบริโอในน้ำยาเพาะเลี้ยงจะช้ากว่าเอมบริโอในร่างกาย (Bowman and MeLaren, 1970;Harlow และ Quinn, 1979) เมื่อมีการศึกษาเปรียบเทียบ ultrastructure ของ late blastocyst ที่เจริญ in vivo และ in vitro โดย Mc Reynolds และ Hadex (1972) พบความแตกต่างในโครงสร้างของนิวเคลียสและไซโตพลาสมของเอมบริโอ in vitro เจริญไปได้ช้ากว่า in vivo และ heterochromatin ลดลงแสดงว่ามีการแสดงออกของยีนส์ต่ำกว่าปกติจำนวนไมโตคอนเดรียลดลง แต่ละอันมีจำนวน cristae เพียง 2-3 อัน ความแตกต่างดังกล่าวแสดงว่ามีการสูญเสียทาง metabolic ability เป็นเหตุให้จำนวนพีตัสที่ได้ภายหลังการถ่ายฝากต่ำ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าบลาสโตซีสที่ได้จากการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน (superovulation) จะมีผิวเซลล์ยื่นออกไป และมี smooth area มากกว่า บลาสโตซีสที่ได้จากการตกไข่ตามธรรมชาติ ซึ่งมี microvilli ที่ผิวเซลล์มากกว่า แสดงถึงมีอัตราการแบ่งตัวได้มากกว่าตามปกติเซลล์ของบลาสโตซีสจะมี microvilli ปานกลาง ซึ่ง microvilli บน trophoblast cells ของเอมบริโอสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลายชนิด จะไป interdigitate กับ microvilli ของ epithelial cells ของมดลูกระหว่างเริ่มมีการฝังตัว ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าบลาสโตซีสที่มี microvilli มีโอกาสฝังตัวได้ต่ำ ถ้าจำนวนของ microvilli สัมพันธ์กับความสำเร็จในการฝังตัวได้จริง ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้ จำนวนพีตัสที่ได้น้อยอาจเป็นเพราะเอมบริโอระยะบลาสโตซีสได้จากการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน และผ่านการเพาะเลี้ยง ทำให้มีจำนวน microvilli น้อย และ metabolic activity ลดลง นอกจากนี้การดมยาสลบ (ether) เทคนิคในการถ่ายฝากที่ยังมีความชำนาญน้อย อาจเป็นปัจจัยร่วมด้วยก็ได้

ในการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า สามารถเพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูเมาซ์พันธุ์ผสม (BALB/C x CD-1) จากระยะ 2-เซลล์ ถึงระยะบลาสโตซีสเป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง ในจานทดลอง น้ำยาเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุดคือ T6 และซีรั่มที่มีความเหมาะสมที่สุดสำหรับผสมในน้ำยาเพาะเลี้ยงคือ 10% FCoS แม้ว่าซีรั่มมีบทบาทช่วยส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอได้ดีขึ้น แต่เอมบริโอก็สามารถเจริญได้ในน้ำยาเพาะเลี้ยง Ham's F-10, HTF และ T6 ที่ไม่มีการเติมซีรั่มลงไป บลาสโตซีสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงครั้งนี้มีระดับความอยู่รอดเท่า ๆ กับบลาสโตซีสปกติ เพราะเมื่อทำการถ่ายฝากไปยังมดลูกของหนูที่ตั้งท้องเทียม เอมบริโอสามารถเข้าฝังตัวเจริญเป็นฟีตัส และมีชีวิตอยู่รอดจนครบกำหนดคลอด เช่น เดียวกับการถ่ายฝากเอมบริโอที่เจริญ in vivo ในการศึกษาครั้งนี้ขั้นตอนการถ่ายฝาก นอกจากสภาพของเอมบริโอต้องมีความสมบูรณ์อย่างแท้จริงแล้ว ยังมีปัจจัยอื่นเข้ามามีผลกับการฝังตัวด้วย ซึ่งน่าจะได้มีการศึกษาถึงผลของสิ่งเหล่านี้ในหนูสายพันธุ์นี้ต่อไป และถ้าเป็นไปได้ควรมีการศึกษาฟีตัสที่ได้จากการถ่ายฝากไปจนถึงเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ได้ ซึ่งจะเป็นสิ่งบ่งชี้ที่แน่ชัดว่า ผลการเพาะเลี้ยงด้วยน้ำยาและซีรั่มดังกล่าวมีความเหมาะสมจริงหรือไม่