หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม การปฏิสนธิของไข่และการเจริญเติบโตของเอมบริโอ (embryo) เกิดขึ้นภายในท่อนำไข่ (oviduct) ส่วน ampulla โดยเริ่มต้นจากเมื่อไข่หลุดจาก Antral follicle บนรังไข่ (ซึ่งอยู่ในระยะ second metaphase ของการแบ่งตัวแบบไมโอซิส) แล้วได้รับการผสมกับตัวอสุจิที่ผ่านกระบวนการ capacitation และ acrosome reaction จะเกิด resumption ของการแบ่งตัวแบบไมโอซิสได้ second polar body เกิด female และ male pronuclei ซึ่งมีโครโมโซมจากพ่อและแม่ขึ้น ต่อมาเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear membrane) จะสลายไป โครโมโซมจากแต่ละ pronucleus จะจับคู่กันและกระบวนการปฏิสนธิเสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์เมื่อมีการสร้าง diploid complement ซึ่งเป็นลักษณะของโครโมโซมในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ไข่ที่ผสมแล้วหนือเอมบริโอจะแบ่งตัว (cleavage) ต่อไป ตลอดระยะเวลาที่เคลื่อนผ่านท่อนำไข่และลงสู่มดลูก ขณะที่เอมบริโอแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์นั้น ขนาดของเอมบริโอเท่าเดิม ดังนั้น แต่ละครั้งของการแบ่งตัวขนาดของบลาสโตเมีย (blastomere) จึงเล็กลง ในไซโตพลาสซึมของไข่ จะมีส่วนประกอบสำคัญที่จำเป็นสำหรับกระบวนการแบ่งตัวไปจนถึงระยะ 8 - เซลล์ ในระยะ 2 - เซลล์ ยีนส์ (gene) เริ่มเข้ามามีบทบาทส่งเสริมการทำงาน (activity) และการเจริญเติบโตของเอมบริโอ เมื่อผ่านพ้นระยะ 4-8 เซลล์ เอมบริโอจะมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น 2 อย่างคือ

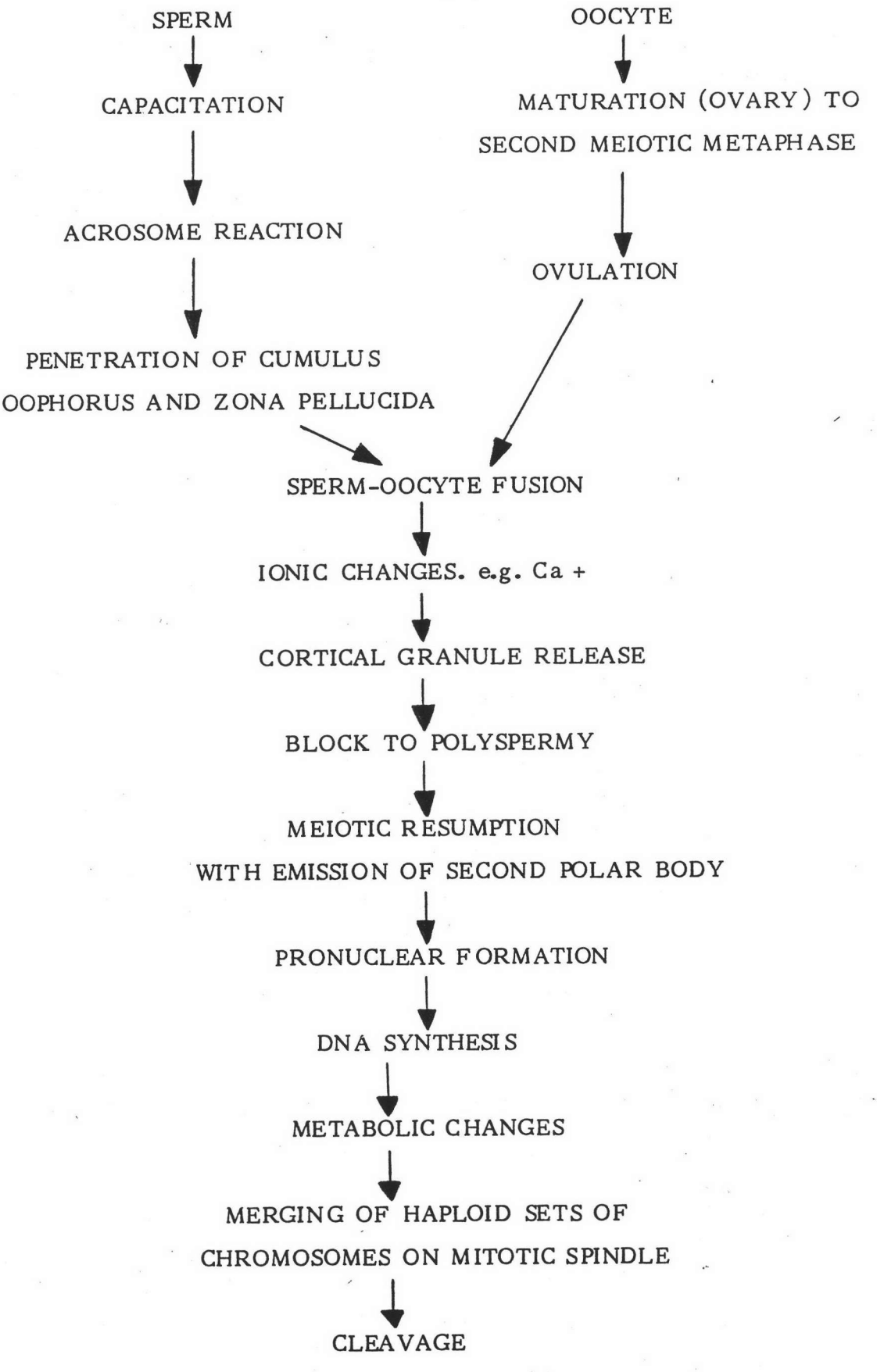
1. เปลี่ยนแปลงรูปร่าง โดยเกิดกระบวนการ "compaction" เป็นมอรูล่า (morula)

2. เพิ่มความสามารถการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุล (biosynthetic capacity) มีการสังเคราะห์ RNA และโปรตีนเพิ่มขึ้น, การส่งผ่านกรดอะมิโน (amino acid) และนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) เข้าสู่เซลล์เพิ่มขึ้น และมีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการสังเคราะห์ ฟอสโฟไลบิด (phospholipid) และ โฆเลสเตอรอล (clolesterol)

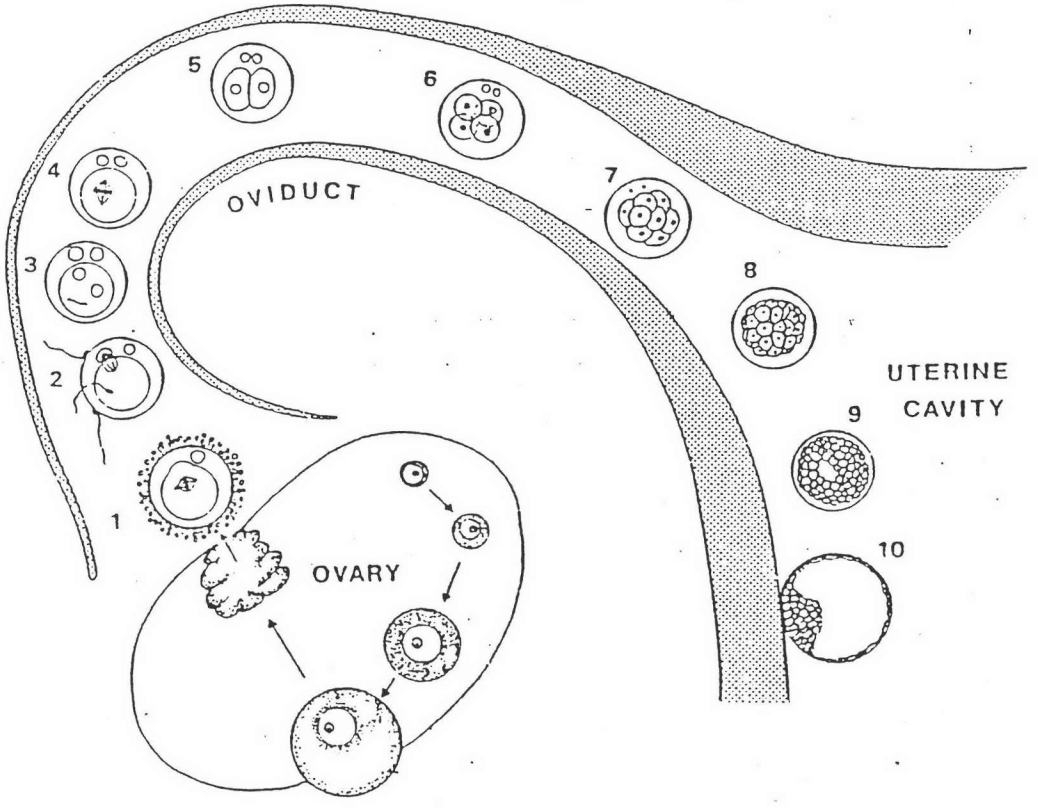
ระหว่างเกิดกระบวนการ compaction นี้ เอมบริโอยังคงมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้น ต่อมา จึงมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างอีกครั้งหนึ่งจากระยะมอรูล่า เป็นระยะบลาสโตซิส (blastocyst) บลาสโตซิสจะมีเซลล์ 2 ชนิด ที่แตกต่างกันคือ ส่วนรอบนอกเรียกว่า trophectoderm cells ซึ่งล้อมรอบ blastocoelic cavity ที่มี blastocoelic fluid อยู่ภายในอีกส่วนหนึ่งคือ inner cell mass ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมชนิดต่าง ๆ เอมบริโอ ใช้เวลาเคลื่อนผ่านท่อนำไข่โดยเฉลี่ยประมาณ 3-4 วัน ภายหลังการเกิดปฏิสนธิ เอมบริโอที่เคลื่อนลงสู่มดลูกโดยส่วนใหญ่จะอยู่ในระยะบลาสโตซิส (Blandau, 1961) ส่วนการฝังตัว (implantation) ของเอมบริโอ อาจใช้เวลา 1 วัน หรือหลายสัปดาห์ต่อมา ซึ่งขึ้นกับชนิดของสัตว์ (Whittingham, 1979) การเจริญเติบโตของเอมบริโอในสัตว์แต่ละชนิดขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของสารคัดหลั่ง (secretion) ของท่อนำไข่ และมดลูกที่ประกอบด้วยสารชีวเคมี, เกลือแร่ธาตุ และไอออน (Restall and Wales, 1966; Wales, 1973) สภาพแวดล้อมดังกล่าวสามารถสร้างให้เกิดขึ้นภายนอกร่างกายได้ดังที่มีผู้ทำการศึกษาและได้รับความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอระยะก่อนฝังตัวในหลอดทดลอง (in vitro) จากไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิแล้ว ถึงระยะบลาสโตซีส เช่น การศึกษาในวัว (Wright et al, 1976) เฟเร็ท (ferret) (Whittingham, 1975) แกะ (Tervit et al, 1972) หนูเมาซ์ (Whitten and Biggers, 1968; Mukherjee and Cohen, 1970) และกระต่าย (Maurer et al, 1969; Kane and Foote, 1971; Ogawa et al, 1971; Kane, 1972) ที่ได้รับผลสำเร็จมากที่สุดคือ การเพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูเมาซ์ เนื่องมาจากความเข้าใจ ถึงความต้องการสำหรับการเจริญเติบโตและกระบวนการเปลี่ยนแปลง (differentiation) การเจริญเติบโตดังกล่าวถือว่าเหมือนกับการเจริญในโพรงมดลูก ทั้งนี้เพราะเมื่อนำเอมบริโอที่เพาะเลี้ยงภายนอกร่างกายใส่กลับสู่โพรงมดลูกของเพศเมียที่ตั้งท้องเทียม (pseudopregnancy) แล้วสามารถฝังตัวและเจริญเติบโตได้ตามปกติ

<u>ข้อบ่งชี้สำหรับใช้ประเมินผลการเจริญเติบโตของเอมบริโอในการเพาะเลี้ยง</u>

1. สามารถเจริญเติบโตถึงระยะมอลูร่าหรือบลาสโตซีสได้
2. มีระยะเวลาของการแบ่งตัวและรูปร่างของเซลล์ที่ได้เหมือนกับเอมบริโออายุเดียวกันจากท่อนำไข่



รูปที่ 1.1 สรุปขั้นตอนที่เกิดขึ้นในระบบท่อสืบพันธุ์ของเพศเมียที่นำไปสู่การปฏิสนธิ
(จาก Whittingham, 1979)



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 1.2 แสดงแผนภาพที่ใช้แทนลักษณะการเกิดการเจริญของไข่, การตกไข่, กระบวนการผสมพันธุ์ และเอมบริโอระยะก่อนฝังตัว (จาก Whittingham, 1979)

3. สามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติเมื่อถ่ายฝากเอมบริโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงสู่มดลูกของ ตัวรับถ่ายฝากเอมบริโอ (recipient)

รายงานผลการวิจัยเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเอมบริโอระยะก่อนฝังตัวของหนูเมาซ์เริ่มต้นในปี ค.ศ. 1949 โดย Hammond สามารถเพาะเลี้ยงเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ ให้เจริญเติบโต จนถึงระยะบลาสโตซีส ใน balanced salt solution รวมกับกลูโคสและไข่ขาว ต่อมา Whitten (1956) ใช้ crystallized bovine serum albumin (BSA) แทนไข่ขาว ในน้ำยาเพาะเลี้ยง Krebs-Ringer bicarbonate solution กับกลูโคส สามารถเลี้ยงเอมบริโอได้เช่นเดียวกัน เมื่อถ่ายฝากเข้าสู่มดลูกของ recipient ก็เจริญเติบโตได้ตามปกติต่อมา Whitten ยังสามารถเพาะเลี้ยงเอมบริโอตั้งแต่ระยะ 2-เซลล์ ให้เจริญถึงระยะบลาสโตซีสได้และมีการเติม กรดแลคติค 1 มก./มล. ลงในน้ำยาเพาะเลี้ยงด้วย วิธีการดังกล่าวได้นำมาเป็นแนวทางศึกษาและพัฒนาโดยนักวิทยาศาสตร์อีกหลายท่าน จากการที่มีผู้ทำการศึกษาเพาะเลี้ยงเอมบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลายชนิด พบว่าการเลี้ยงเอมบริโอของหนูเมาซ์ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ เพื่อศึกษาและวิจัยหาปัจจัยสำคัญ สำหรับการเจริญเติบโตในระยะก่อนฝังตัวและผลกระทบของสภาวะแวดล้อมต่อเอมบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมได้หลายชนิด ดังนั้น จึงมีการใช้เอมบริโอของหนูเมาซ์ เป็นรูปแบบสำหรับศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญของเอมบริโอระยะก่อนฝังตัวต่อไป เช่น

1. ใช้ศึกษา metabolic activity ของเอมบริโอ
2. ใช้ศึกษาการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่องจนถึงระยะบลาสโตซีสของเอมบริโอ
3. ใช้ศึกษาเทคนิคต่าง ๆ เช่น microsurgerys และ direct manipulation of the embryo cell fusion สำหรับการประยุกต์ใช้ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง และสัตว์มีกระดูกสันหลังที่ไม่ได้เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม
4. ใช้ศึกษาผลของยาโดยตรงต่อเอมบริโอ
5. ใช้ศึกษาสารอาหารที่จำเป็นสำหรับเอมบริโอ : (จาก Whittingham, 1971)

การศึกษาเพาะเลี้ยงเอมบริโอหนูเมาซ์ระยะหลังมีบทบาทมากขึ้น โดยเฉพาะในห้องปฏิบัติการที่ใช้ศึกษาการเลี้ยงเอมบริโอของคนคือนำมาประยุกต์ใช้เพื่อเป็นดัชนีชี้บ่งทางด้าน

ควบคุมคุณภาพในการเตรียมอุปกรณ์เครื่องใช้ การเตรียมน้ำยา, ส่วนประกอบของโปรตีน และความเป็นกรด-ด่างของน้ำยาที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการผสมของไข่กับตัวอสุจิ ตลอดจนการเลี้ยงเอม-บริโอในคน (Edward, 1981 ; Leung et al, 1984) ในสถาบันที่สามารถผสมไข่กับตัวอสุจิของคนและเลี้ยงเอมบริโอในหลอดทดลองไปได้ถึง 4-เซลล์หรือมากกว่า ก่อนที่จะนำเอมบริโอใส่กลับเข้าสู่โพรงมดลูกนั้นจะต้องสามารถเลี้ยงเอมบริโอของหนู ตั้งแต่ระยะ 1-ถึง 2-เซลล์ ไปถึงระยะบลาสโตซีสให้ได้อย่างน้อย ร้อยละ 70 จึงจะนับได้ว่า อุปกรณ์เครื่องใช้, การเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยงตลอดจนสภาพแวดล้อมอื่น ๆ มีความเหมาะสมพอที่จะนำไปประยุกต์ใช้ต่อในการเลี้ยงเอม-บริโอของคน (Marrs et al, 1983; Quinn et al, 1984 ; Ackerman et al, 1984)

การเก็บเอมบริโอของหนูเมาซ์มาศึกษานั้น นอกจากสภาวะแวดล้อมของการเพาะเลี้ยงจะมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตแล้ว ยังต้องคำนึงถึงพันธุ์ของหนูเมาซ์ที่จะนำมาใช้สำหรับเก็บเอมบริโอด้วยในระยะแรกใช้เอมบริโอที่ได้จากหนูเมาซ์ทั่วไป (Random-bred albino mice) เนื่องจากหาได้ง่าย จนกระทั่ง Whitten และ Biggers (1968) พบว่า ไซโกตระยะ 1-เซลล์ ที่ได้จากหนูเมาซ์พันธุ์ผสม (F_1 hybrid) ระหว่าง C57/BL 10J x SJL/J, SJL/J x C57BL/10J สามารถเจริญเติบโตถึงระยะบลาสโตซีสได้ในขณะที่เอมบริโอหนูเมาซ์ที่ไม่ใช่พันธุ์ผสม ไม่สามารถเจริญได้ การศึกษาเพาะเลี้ยงเอมบริโอช่วงหลัง จึงมีผู้เลือกใช้เอมบริโอจากหนูเมาซ์พันธุ์ผสมชนิดต่าง ๆ เช่น C57B/6 x CBA (Quinn et al, 1984) BALB c/6 x C3H (Quinn and Whittingham, 1982) และ SJL x C57BL/10Dg (Edirisinghe et al, 1986) เนื่องจากสามารถเพาะเลี้ยงให้เจริญเติบโตถึงระยะบลาสโตซีสได้ในอัตราที่สูง แต่ยังไม่มีผู้ใช้พันธุ์ที่ได้จาก BALB/c x CD-1 ดังนั้น การศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงได้นำหนูเมาซ์พันธุ์ผสมดังกล่าวมาเป็นตัวอย่างในการศึกษา

<u>สารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของเอมบริโอในการเพาะเลี้ยง</u>

การเจริญเติบโตของเอมบริโอหนูเมาซ์ในระยะแรก จะมีการเปลี่ยนแปลงความต้องการสารให้พลังงาน คือ ก่อนระยะ 8-เซลล์ แหล่งให้พลังงานที่สำคัญคือ ออกซาโลอะซีเตท (oxaloacetate) หรือไพรูเวท (pyruvate) (Biggers, Whittingham and Donahue, 1967) โดยเริ่มแรกโอโอไซท์ต้องได้รับ ไพรูเวท หรือออกซาโลอะซีเตทในน้ำยาเพาะเลี้ยง เมื่อเข้าสู่ระยะ 2-เซลล์ แหล่งให้พลังงานอาจเป็น แลคเตท (lactate), ออกซาโลอะซีเตท, ไพรูเวท หรือ ฟอสโฟอีนอล ไพรูเวท (phosphoenol pyruvate) (Brinster, 1965b) เชื่อว่าการใช้แลคเตท

และไพรูเวท ซึ่งเป็นแหล่งให้พลังงานร่วมกันในน้ำยาเพาะเลี้ยง จะเป็นการป้องกัน leaching ทำให้ความเครียด (stress) ของเอมบริโอต่อ redox potential เกิดขึ้นน้อยที่สุด จึงเหมือนกับช่วยให้เอมบริโอสามารถปรับตัวอยู่ในสภาวะแวดล้อมของน้ำยาเพาะเลี้ยงได้ดีขึ้น ส่วนกลูโคสไม่ส่งเสริมการเจริญเติบโตระยะ 1 – หรือ 2 – เซลล์ แต่จะเป็นแหล่งพลังงานที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตจะมีการ oxidize ไพรูเวทมากกว่ากลูโคส แต่เมื่อถึงระยะบลาสโตซีสจะ oxidize กลูโคสได้ดีเท่า ๆ กับไพรูเวท จึงจัดไพรูเวทเป็นแหล่งพลังงานสำคัญ สำหรับโอโอไซท์, ไซโกต และเอมบริโอ ระยะ 2–6 เซลล์ เมื่อเอมบริโอเจริญถึงระยะบลาสโตซีสหรือช่วงที่กำลังฝังตัวความต้องการแหล่งที่จะให้พลังงาน และ energy metabolism คล้ายคลึงกับ adult cells มากที่สุด

นอกจากหนูเมาซ์และกระต่ายซึ่งพบว่ากลูโคสจะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเอมบริโอภายหลัง 8–เซลล์ พบว่ากลูโคสไม่มีส่วนช่วยในการเจริญเติบโตของเอมบริโอของแกะระยะ 8–เซลล์ หรืออวัยวะระยะ 16–เซลล์เลย ส่วนไพรูเวทมีรายงานว่า ยับยั้งการเจริญของเอมบริโอหมูระยะ 4 เซลล์ (David and Day, 1978)

ความต้องการสารจำพวกกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย (essential amino acid) ไม่จำเพาะเจาะจงในเอมบริโอของหนูเมาซ์ระยะก่อนบลาสโตซีส เอมบริโอสามารถเจริญได้ถึงระยะบลาสโตซีสในน้ำเพาะเลี้ยงที่มี BSA หรือ polyvinylpyrrolidone (PVP) เป็นแหล่งไนโตรเจนตามลำพัง โดยปราศจากกรดอะมิโนอิสระตัวอื่น (Brinster and Thomson, 1966) นอกจากนี้เอมบริโอสามารถสังเคราะห์กรดนิวคลีอิค (nucleic acid) ที่ต้องการขึ้นจาก simple exogenonus carbon ในขณะที่มีชีวิตอยู่อีกด้วยก่อนระยะ 8–เซลล์ metabolic pathway สำหรับการใช้ fixed nitrogen ไม่แตกต่างกัน ซึ่งระยะก่อน 8–เซลล์นี้จำนวนการสังเคราะห์โปรตีนยังต่ำ แต่หลังจากระยะนี้แล้วจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วมี incor – poration ของคาร์บอนจากคาร์บอนไดออกไซด์ และไพรูเวทเข้าสู่โปรตีนของเอมบริโอ แสดงให้เห็นว่าสารนี้เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนในการเจริญเติบโตระยะแรก

ระดับ osmolarity ที่เหมาะสมของน้ำยาเพาะเลี้ยงส่วนมาก มักมีค่าโดยประมาณเท่ากับค่าของของเหลวภายในร่างกาย คือ ประมาณ 308 มิลลิออสโมล/กิโลกรัม (Brinster, 1965) แต่ยังมีความแตกต่างของระดับ osmolarity ของน้ำยาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง เช่น

น้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูเมาซ์มีระดับ 200-354 มิลลิออสโมล/กิโลกรัม (Brinster, 1965a) น้ำยาเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ของหนูเมาซ์ (mouse oocyte) มีระดับ 250 - 260 มิลลิออสโมล (Cross and Brinster, 1970) เป็นต้น

ระดับความเป็นกรด - ด่าง (pH) ของน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูเมาซ์เจริญเติบโตได้ดีในระยะ 8-เซลล์ ที่ระดับความเป็นกรด - ด่าง ของน้ำยาเพาะเลี้ยง 6.9 และ 7.7 (Whitten, 1956) และระยะ 2-เซลล์ ที่ pH ระหว่าง 5.87 และ 7.78 โดยทั่ว ๆ ไป ในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูเมาซ์ จะใช้ระดับ pH ที่ 7.2 ถึง 7.4 (Brinster, 1965a)

ผลของฮอร์โมนที่มีต่อเอมบริโอ มีรายงานว่า เอสโตรเจน (oestrogen) จำเป็นต่อการเปลี่ยนแปลงของเอมบริโอหนูเมาซ์ในการเพาะเลี้ยง (Sengupta et al, 1977) และเมื่อเกิด steroidogenic enzymes 2 ชนิด คือ 4S - 3B - hydroxysteroid dehydrogenase (3B - HSD) ในเอมบริโอของหนูเมาซ์ในระยะก่อนฝังตัวจะช่วยให้เอมบริโอสังเคราะห์เอสตราดิออล (oestradiol) ได้ดีขึ้น (Dickmann and Dey, 1974) ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีสาร antioestrogen (nafoxidine, 3 ug/ml) อยู่ด้วย จะทำให้การเจริญของเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ เป็นบลาสโตซีสถูกยับยั้ง และถ้าเลี้ยงไว้นาน 37 ชั่วโมง เอมบริโอทั้งหมดจะเสื่อมสลาย (degenerate) พบเป็น cellular debris ภายในเกิด perivitelline spaces ขนาดใหญ่ และเมื่อใส่ oestradiol 17-B ลงไปในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มี antioestrogen อยู่ก็ไม่สามารถแก้ไขปฏิกริยายับยั้งของสารที่มีต่อการเจริญเติบโตของเอมบริโอได้ (Roy et al, 1981) นอกจากนี้โปรแลคติน (prolactin) ยังมีผลต่อการเจริญเติบโตของเอมบริโอได้คือ ถ้าขนาดความเข้มข้นสูง (0.1 - 1 ug/ml) จะยับยั้งการเจริญของเอมบริโอหนูแรท แต่โปรแลคตินขนาดความเข้มข้น 0.01 ug/ml จะไม่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเอมบริโอในการเพาะเลี้ยงแต่อย่างใด (Ivanenko et al, 1985)

น้ำยาเพาะเลี้ยงสำหรับเพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูเมาซ์

จากการศึกษาชนิดของน้ำยาที่ ใช้เพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูเมาซ์ พบว่ามี 2 ประเภทคือ

-Biological media

Hammond (1949) ได้นำ biological media มาใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเอมบริโอหนูเมาซ์ โดยมีส่วนผสมระหว่าง ไข่ขาว ไข่แดง และเกลืออนินทรีย์ (inorganic salts) ซึ่ง media ชนิดนี้ สามารถเลี้ยงเอมบริโอจากระยะ 8 เซลล์ ให้เจริญเติบโตถึงระยะบลาสโตซีสได้ ต่อมา Mintz (1964) ทำการศึกษาโดยเพาะเลี้ยงเอมบริโอจากระยะ 2-เซลล์ ถึงบลาสโตซีส

ตารางที่ 1.1 แสดงส่วนประกอบของน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเอมบริโอ จากระยะ 2- เซลล์ ถึงระยะบลาสโตซีส (Standard Egg Culture Medium)

Components	Mol. Wt.	gm/1	mM
NaC1	58.4	5.540	94.59
KC1	74.6	0.356	4.78
Ca lactate $5H_2O$	308.3	0.527	1.71
$KH_2\ PO_4$	136.1	0.162	1.19
$MgSO_4\ .7H_2O$	246.5	0.294	1.19
$NaHCO_3$	84.0	2.106	25.07
Na-pyruvate	110.0	0.028	0.25
Na-lactate	112.1	2.416	21.58
Glucose	180.2	1.0	5.56
BSA		1	
Antibiotic stock solution[1]		1.0 ml	
Distilled water		1,000 ml	
Osmolality		308	

[1] penicillin 100,000 I.U./ml ผสม streptomycin 50 mg/ml

โดยใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงที่ประกอบด้วย fetal calf serum 50% ผสมกับ Earle's balanced salt solution แต่ระยะหลังมีผู้นำน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิดนี้มาใช้เพาะเลี้ยงเอมบริโอกันน้อย ที่นำมาศึกษาอีกคือ Gianaroli และคณะ (1986) ได้ใช้ ammiotic fluid ของคนในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูเมาซ์ ซึ่งสามารถเพาะเลี้ยงให้เจริญจากระยะ 2-เซลล์ ถึงบลาสโตซีสได้เช่นเดียวกัน

-Chemically defined media

น้ำยาเพาะเลี้ยงชนิดนี้มีส่วนประกอบของสารเคมีหลายชนิด สำหรับเพาะเลี้ยงเอมบริโอให้เจริญเติบโต ซึ่งมีการนำมาใช้ครั้งแรก โดย Whitten (1956) ส่วนประกอบของน้ำยาเพาะเลี้ยงดังกล่าวเป็นส่วนประกอบพื้นฐานของ Krebs-Ringer bicarbonate solution ผสมกับกลูโคส, bovine plasma albumin และยาปฏิชีวนะ ต่อมา McLarenและ Biggers (1958) ได้ใช้ส่วนประกอบของน้ำยาเพาะเลี้ยงดังกล่าวในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูเมาซ์ พบว่าได้รับผลสำเร็จเช่นเดียวกัน เมื่อถ่ายฝากสู่มดลูกของ foster mother สามารถเจริญเติบโตจนคลอดได้ปกติ

ส่วนประกอบของน้ำยาเพาะเลี้ยง ต่อมาถูกดัดแปลงความเข้มข้นของสารเคมีชนิดต่าง ๆ เพื่อให้เหมาะสมกับการเจริญของเอมบริโอยิ่งขึ้น ช่วงหลังต่อมาจึงมีการเติมวิตามิน, เกลือแร่ และกรดอะมิโน ที่คิดว่าจำเป็นสำหรับการเจริญของเซลล์ เช่น Ham's F-10 (Ham, 1963b) และทำให้ส่วนประกอบของน้ำยาเพาะเลี้ยงมีความสมบูรณ์มากขึ้น นอกจากนี้ในน้ำยาเพาะเลี้ยง จะมีแหล่งให้ไนโตรเจน โดยปกติจะอยู่ในรูปของซีรั่มหรือซีรั่มอัลบูมิน (serum albumin) แต่การเติมซีรั่มนั้นยังไม่แน่ชัดว่ามีความจำเป็นหรือก่อให้เกิดสภาวะแวดล้อมที่ดีที่สุดสำหรับการเพาะเลี้ยงเอมบริโอหรือไม่ (Ogawa and Marrs, 1987)

การถ่ายฝากเอมบริโอ (Embryo transfer)

การถ่ายฝากเอมบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมจากแม่พันธุ์หนึ่งไปยังแม่พันธุ์หนึ่งนั้นเริ่มครั้งแรกเมื่อเกือบ 100 ปี ที่ผ่านมา โดย Heape (1890) สามารถถ่ายฝากเอมบริโอจาก Angora rabbit ไปยัง Belgian hare rabbit และมีชีวิตอยู่รอดได้ในมดลูกของ foster mother ต่อจากนั้นจึงมีผู้นำเทคนิคในการถ่ายฝากเอมบริโอมาใช้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมอีกหลายชนิด ดังตารางที่ 1.2 แสดงความสำเร็จเป็นครั้งแรกในการถ่ายฝากเอมบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมชนิดต่าง ๆ

ประโยชน์ของการถ่ายฝากเอมบริโอ

1. เพื่อศึกษาความอยู่รอดของเอมบริโอ ภายหลังที่ได้ทำการทดลองภายนอกร่างกาย (in vitro) เช่น ภายหลังการเกิดปฏิสนธิในหลอดทดลอง (in vitro fertilization) การเพาะเลี้ยงการเก็บแช่แข็งไว้เป็นเวลานานที่อุณหภูมิต่าง ๆ

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

3. เพื่อปรับปรุงพันธุ์สัตว์เลี้ยง

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

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

ในหนูเมาซ์การถ่ายฝากเอมบริโอครั้งแรก ใช้ในการวิจัยเรื่องของมะเร็ง (Fekete และ Little, 1942; Beatty, 1951) ต่อมาจึงมีผู้นำเอาวิธีการถ่ายฝากเอมบริโอในหนูเมาซ์มาใช้กันเพิ่มขึ้น และได้รับผลสำเร็จ เช่น การถ่ายฝากบลาสโตซีสที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดทดลอง (Hoppe และ Pitts, 1973; Kasai, Sugimoto และ Toyoda, 1979), จากการเพาะเลี้ยงเอมบริโอระยะ 1-เซลล์ (Whitten และ Biggers, 1968) และระยะ 2-เซลล์ (Biggers, Moore และ Whittingham, 1965 ตลอดจนการถ่ายฝากเอมบริโอภายหลังการแช่แข็งอุณหภูมิ -196 °c (Nakagata และ Toyoda, 1980 เป็นต้น

องค์ประกอบ ของความสำเร็จขึ้นกับระดับความสอดคล้อง (degree of synchronization) ระหว่างอายุของเอมบริโอจาก donor กับอายุการตั้งท้องหรือการตั้งท้องเทียมของ recipient (ในกรณีที่มีการกระตุ้นให้เกิดการตั้งท้องเทียม) และตำแหน่งของการถ่ายฝาก คือ เอมบริโอที่อยู่ในระยะแรก ๆ ของการแบ่งตัว (1-ถึง 8-เซลล์) ควรนำฝากที่ท่อนำไข่และระยะท้าย ๆ ควรนำไปฝากในมดลูก แต่ในหนูเมาซ์มีรายงานว่าเอมบริโอในระยะก่อนฝังตัวทุกระยะจะมีชีวิตอยู่รอดได้ แม้จะถ่ายฝากเอมบริโอไปยังท่อนำไข่ของ recipient ที่มีอายุการตั้งท้องเทียมเพียง 1 วัน (Tarkowski, 1959) แต่ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการถ่ายฝากในหนูเมาซ์ คือ เอมบริโอระยะ 1-หรือ 2-เซลล์ ควรถ่ายฝากใน ovarianbursa ของ recipient ที่ตั้งท้องเทียมได้ 12 ชั่วโมง และ

บลาสโตซีส อายุ 3 วันครึ่ง ถ่ายฝากในมดลูก ของ recipient ที่ตั้งท้องเทียมได้ 2 วันครึ่ง ถึง 3 วันครึ่ง ส่วนเอมบริโอระยะต้น ๆ ไม่ควรถ่ายฝากในมดลูกเพราะสภาวะแวดล้อมภายในมดลูกยังไม่เหมาะสมที่จะช่วยส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอ ในสัตว์แต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันในเรื่องของความอยู่รอดของเอมบริโอในระยะแบ่งตัวตอนต้น จนถึงระยะ 8-เซลล์ เมื่อมีการถ่ายฝากไปยังมดลูกของ recipient ความเหมาะสมของสภาวะแวดล้อมภายในมดลูกที่จะช่วยส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอระยะต้น เช่น ในหนูขาว และหนูเมาซ์ เอมบริโอ ระยะ 1- ถึง 2-เซลล์ จะเสื่อมสลายใน 24 ชั่วโมง หลังถ่ายฝากไปยังมดลูกซึ่งถึงแม้จะมีอายุการตั้งท้องที่สอดคล้องระหว่าง donor กับ recipient ก็ตาม (Noyes et al, 1963)

การจะกำหนดให้แน่นอนว่าสภาพเลื่อมล้ำของเวลา (asynchrony) จะแตกต่างกันมากแค่ไหน ที่มดลูกยังพอยอมรับการถ่ายฝากได้นั้น ต้องพิจารณาในสัตว์แต่ละชนิด เนื่องจากสัตว์แต่ละชนิด การฝังตัวของเอมบริโอจะเกิดขึ้นในช่วงเวลาที่ไม่เหมือนกัน เมื่อผ่านลงสู่มดลูกแล้ว เช่น ในวัว และแกะ ระยะของ recipient สามารถเหลื่อมล้ำกับ donor ได้มากที่สุด $\pm$ 2 วัน (Betteridge, 1977) ส่วนในหนูขาวกับหนูเมาซ์ให้สอดคล้องหรือเหลื่อมล้ำได้เพียง 1 วัน (Whittingham, 1979); Snow (1975), และ Harlow and Quinn (1979) รายงานว่าเมื่อปรับปรุงสภาพการเพาะเลี้ยงภายนอกร่างกายให้มีคุณภาพดีแล้วพบว่าบลาสโตซีสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงให้จำนวนฟีตัส (fetus) ใกล้เคียงกับบลาสโตซีสที่ได้จากภายในร่างกายภายหลังการถ่ายฝากในตัวรับปัจจัยที่ทำให้อัตราการฝังตัวของเอมบริโอลดลงขึ้นกับระดับความสอดคล้องระหว่าง donor กับ recipient, ตำแหน่งที่ถ่ายฝาก, ภาวะ stress จากการเพาะเลี้ยงและการแช่แข็งซึ่งเป็นวิธีการเก็บไข่, สเปร์มและเอมบริโอไว้นาน, โดยใช้ความเย็นและการละลาย เมื่อต้องการนำกลับมาใช้จะทำให้เอมบริโอลดอัตราการฝังตัวลงได้เช่นกัน (Whittingham, 1974; Nakagata และ Toyada, 1980; Hahn และ Schneider, 1982; Shelton และ Carft, 1982)

<u>วัตถุประสงค์ในการวิจัย</u>

1. เพื่อศึกษาหาน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม ต่อการเจริญเติบโตของเอมบริโอหนูเมาซ์พันธุ์ผสมที่ได้จากการผสมระหว่างหนูเพศเมียพันธุ์แท้ BALB/c กับเพศผู้พันธุ์แท้ CD-1 ตั้งแต่ระยะ 2- เซลล์ จนถึงระยะบลาสโตซีสในหลอดทดลอง

2. เพื่อศึกษาความเหมาะสมชนิดของซีรั่มต่อการเจริญเติบโตของเอมบริโอในระยะต่าง ๆ

3. เพื่อศึกษาการอยู่รอดของเอมบริโอ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในจานทดลอง เมื่อนำไปถ่ายฝากในแม่หนูที่ตั้งท้องเทียม (pseudopregnancy)

ความสำคัญหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้

1. ได้หนูสายพันธุ์ผสม (จากสายพันธุ์แท้ที่หาได้ง่ายในประเทศไทย) ที่เหมาะสมสำหรับนำมาศึกษาการเลี้ยงเอมบริโอในหลอดทดลอง

2. ทราบขั้นตอนการเจริญเติบโตของเอมบริโอจากหนูสายพันธุ์ผสม (BALB/c x CD-1) ซึ่งเป็นความรู้พื้นฐานที่ยังไม่มีผู้ใดรายงานไว้

3. ทราบชนิดของน้ำยาเพาะเลี้ยง และซีรั่มที่ผสม ที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูสายพันธุ์ผสมนี้ในจานทดลอง

4. ทราบผลกระทบของการเพาะเลี้ยงเอมบริโอในจานทดลอง ต่อการฝังตัวที่ผนังมดลูก

5. นำมาประยุกต์ใช้เป็น Quality control ในห้องปฏิบัติการเพื่อการศึกษาเลี้ยงเอมบริโอของคนในหลอดทดลองต่อไป

ข้อมูลจากการวิจัยนี้ จะเป็นประโยชน์ในการเสริมสร้างความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับการเจริญเติบโตของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมรวมทั้งคนในระยะก่อนฝังตัว ความสำคัญของสารอาหารในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีต่อการเจริญของเอมบริโอในช่วงที่ทำการเพาะเลี้ยงภายนอกร่างกาย ซึ่งยังต้องมีการศึกษากันต่อไป.

ตารางที่ 1.2 แสดงความสำเร็จครั้งแรกในการถ่ายฝากเอมบริโอของสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม

Date	Species	Reference
1890	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)