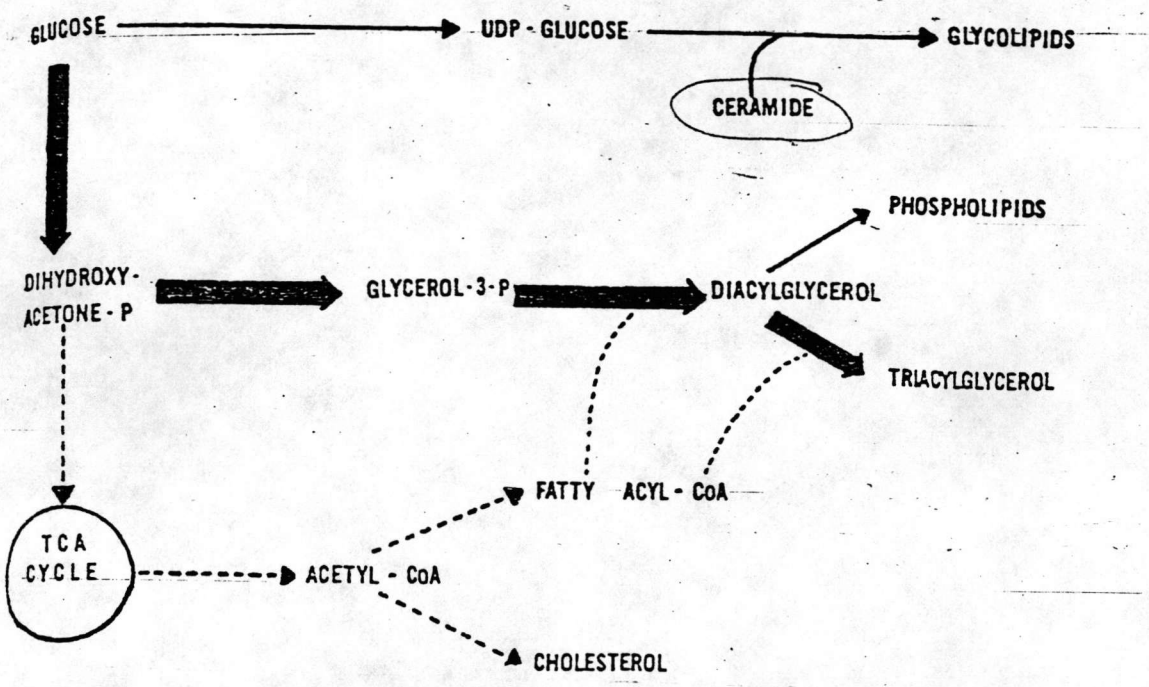
บทที่ 4

วิจารณ์ และสรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองเปรียบเทียบผลของซีรัมอัลบูมินชนิดธรรมดาที่มักมีกรดไขมันปนเปื้อนกับซีรัมอัลบูมินชนิดที่สกัดเอากรดไขมันออก พบว่ามีความแตกต่างในการส่งเสริมการเจริญของเอ็มบริโอหนูเมาซ์ ที่ระยะบลาสโตซิสและระยะที่บลาสโตซีสหลุดออกจากโซนาเพลลูซิดา จากการศึกษาของ Chen (1966) พบว่ามีกรดไขมันยึดเกาะกับซีรัมอัลบูมินประมาณ 0.06-2.5 โมเลกุล ของกรดไขมัน/โมเลกุล อัลบูมิน ดังนั้นถ้าหากว่ากรดไขมันที่เกาะกับอัลบูมินมีความสำคัญต่อการเจริญของเอ็มบริโอหนูเมาซ์ ก็อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เอ็มบริโอในกลุ่มที่ใช้อัลบูมินชนิดที่สกัดเอากรดไขมันออกมีการเจริญลดต่ำลง จากการทดลองของ Cholewa และ Whitten (1970) พบว่า เอ็มบริโอของหนูเมาซ์ สามารถเจริญในหลอดทดลองจากระยะ 2 เซลล์ถึงระยะบลาสโตซีส โดยไม่ได้เติมอัลบูมินในน้ำยาเพาะเลี้ยง แต่เขาก็พบว่า บลาสโตซีสจำนวนมากไม่สามารถ ออกจากโซนาเพลลูซิดา (hatch) ซึ่งแตกต่างกับบลาสโตซีสที่มาจากเอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีอัลบูมิน ในการศึกษาหน้าที่ของกรดไขมันในการสนับสนุนการเจริญของเซลล์ของแฮมสเตอร์ในหลอดทดลอง Nilausen (1976) ได้แยกเอากรดไขมันที่เกาะกับอัลบูมินออกมาโดยวิธี thin-layer chromatography พบกรดไขมันหลายชนิดในจำนวนนี้ oleic มีปริมาณสูงสุดถึง 30.6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

สำหรับผลของกรดไขมันต่อการจริญของเอ็มบริโอหนูเมาซ์นั้น ผลการทดลองครั้งนี้ สอดคล้องกับผลที่ได้ จากการศึกษาของ Wales และ Whittingham (1974) ซึ่งพบว่าการใช้อัลบูมินชนิดที่ปราศจากกรดไขมันในน้ำยาเพาะเลี้ยงจะลดการเจริญที่ระยะ 8 เซลล์ไปถึงบลาสโตซีส และสอดคล้องกับการทดลองของ Kane (1979) ในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของกระต่าย ที่ระยะ 1-เซลล์ในน้ำ

ยาเพาะเลี้ยงที่ใช้อัลบูมินชนิดที่สกัดเอากรดไขมันออกพบว่า เอ็มบริโอของกระต่ายที่ระยะมอรูลา มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของเซลล์ (Morphological) และมีเพียง 1.5% เท่านั้นที่สามารถเจริญถึงระยะบลาสโตซีส เขาให้เหตุผลว่าเป็นไปได้ที่กรดไขมันอาจทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานสำหรับเอ็มบริโอ Quinn และ Whittingham (1982) ก็พบว่าเอ็มบริโอของหนูเมาซ์ที่ระยะ 1-2เซลล์จะเจริญไปถึงระยะบลาสโตซีสได้น้อย เมื่อใช้อัลบูมินชนิดที่สกัดเอากรดไขมันออก นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาของ Brinster และคณะ (1983) ที่พบว่าเอ็มบริโอของแฮมสเตอร์ที่ระยะต่าง ๆ ของการเจริญ มีความจำเพาะต่อกรดไขมันภายนอกเซลล์ เขาพบว่าถ้าใช้อัลบูมินธรรมดาในการปฏิสนธิในหลอดทดลองและในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอที่ระยะ 2-8 เซลล์ จะทำให้เอ็มบริโอไม่เจริญ แต่ที่ระยะ 8-เซลล์เป็นต้นไปจะเจริญได้ดีอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ใช้อัลบูมินชนิดที่สกัดเอากรดไขมันออก จากที่กล่าวมาทั้งหมดน่าจะเป็นข้อบ่งชี้ให้เห็นว่ากรดไขมันภายนอก จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ มีการทดลองของ Flynn และ Hillman (1978, 1980) ได้วิจัยพบว่าเอ็มบริโอของหนูเมาซ์สามารถสังเคราะห์ไขมันได้จากกลูโคส โดยได้ติดฉลากกลูโคส ด้วยสารกัมมันตภาพรังสี [$U^{14}C$glucose] พบว่าเอ็มบริโอของหนูเมาซ์ที่ระยะ 8-เซลล์สามารถสังเคราะห์ไขมันได้โดยใช้แหล่งคาร์บอนจากกลูโคสได้ดังนี้



จากรูปที่ 4.1 แสดงความเป็นไปได้ของการเปลี่ยนแปลงคาร์บอนอะตอม จาก [U^{14}C]glucose ไปเป็นไขมันโดยเฉพาะไตรเอซิลกลีเซอรอล (Flynn และ Hillman 1978)

พบว่ามีมากถึง 78.90% ของกลูโคสที่ติดฉลาก เป็นไปได้ว่าไตรเอซิล-กลีเซอรอลถูกสังเคราะห์และเก็บสะสมโดยเอ็มบริโอในระยะ 8-เซลล์ แต่จะถูกใช้หมดในระหว่างตอนปลายของระยะบลาสโตซีส และช่วงที่เอ็มบริโอหลุดออกจากโซนาเพลลูซิดา ต่อมาในปี 1980 ได้ศึกษาการนำกรดไขมันจากภายนอกเข้าไปใช้ประโยชน์ในเอ็มบริโอหนูเมาซ์ โดยวิธีติดฉลากสารกัมมันตภาพรังสีกรดปาล-มิติก (palmitic) พบว่าสารกัมมันตภาพรังสี มากกว่า 93% อยู่ที่ไตรเอซิล กลีเซอรอล เป็นที่ทราบกันดีทางชีววิทยาว่าไตรเอซิลกลีเซอรอลเป็นรูปแบบของแหล่งพลังงานสะสมของไขมันสำหรับใช้ในขบวนการเมแทบอลิซึม และได้อ้างว่าเอ็มบริโอของหนูเมาซ์ระยะก่อนการฝังตัวจะมีการสังเคราะห์และสะสมไตรเอซิล-

กลีเซอรอลเพื่อเตรียมไว้สำหรับการเจริญช่วงสำคัญ เช่น ที่ระยะบลาสโตซีสและระยะบลาสโตซีสหลุดออกจากโซนาเพลลูซิดา จากการทดลองพบว่าระหว่างกลูโคสและ กรดปาลมิติกที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสีได้พบความแตกต่างที่น่าสนใจ เริ่มตรวจพบสารกัมมันตภาพรังสีจากกลูโคสที่ระยะมอรูลาขณะที่สารกัมมันตภาพรังสีจากกรดปาลมิติกเริ่มเห็นผลที่ระยะ 8 เซลล์แสดงว่าระยะต่าง ๆ ของการเจริญเอ็มบริโอของหนูเมาซ์ จะมีความจำเพาะในการสังเคราะห์ไตเอซิลกลีเซอรอล และยังตรวจพบการเพิ่มขึ้นของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ระยะ 8-เซลล์ และมอรูลา ซึ่งคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นมาจากกระบวนการเบต้าออกซิเดชัน (-oxidation) ของกรดปาลมิติก แสดงให้เห็นว่า เอ็มบริโอของหนูเมาซ์ระยะก่อนการฝังตัวที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองสามารถใช้ประโยชน์จากกรดไขมันที่มีอยู่ในน้ำยาเพาะเลี้ยง ทั้งที่นำเข้าไปเป็นองค์ประกอบของไขมันในตัวเอ็มบริโอ เช่น ไตรเอซิลกลีเซอรอลและฟอสโฟลิพิด แล้วยังสามารถนำกรดไขมันมาใช้เป็นแหล่งพลังงานโดยตรงผ่านกระบวนการออกซิเดชัน

จากที่กล่าวมาทั้งหมด แสดงว่ากรดไขมันที่บนเปื้อนมากับอัลบูมินน่าจะมีผลต่อการเจริญของเอ็มบริโอในหลอดทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองนี้ดังได้แสดงเป็นเบอร์เซนต์ และรูปที่ 3.1 แต่มีสิ่งที่เกิดขึ้นในการทดลองผลของเอธานอลที่ใช้เป็นตัวทำลายกรดไขมัน พบว่ากลุ่มที่ใช้อัลบูมินชนิดธรรมดาและเติมเอธานอลไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมขณะที่กลุ่มที่ใช้อัลบูมินชนิดที่สกัดเอากรดไขมันออกและเติมเอธานอลให้ผลในการเจริญต่ำอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 3.2)

จากจุดนี้มีความเป็นไปได้ว่า อัลบูมินชนิดธรรมดาอาจจะมีสารบางชนิดที่สามารถต้านหรือยับยั้งพิษของเอธานอลได้ ซึ่งสารนี้อาจถูกสกัดออกไปพร้อมกับกรดไขมันในกระบวนการเตรียม ซีรัมอัลบูมินชนิดที่ปราศจากกรดไขมัน ในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมในหลอดทดลอง ส่วนใหญ่แล้วมีการเติม BSA ชนิดธรรมดา (Fraction V) ซึ่งพบว่ามี อัลบูมินบริสุทธิ์ 90-99% แต่ผลึก BSA ก็มีสารอื่น ๆ บนเปื้อนอยู่ เนื่องจากอัลบูมินโดยธรรมชาติจะมีตำแหน่งที่มีความจำเพาะในการจับกับกรดไขมันสูง แต่ยังมีตำแหน่งที่ไม่มีจำเพาะอีกหลายตำแหน่ง จึงทำให้สารอื่น ๆ ยึดเกาะได้มาก ๆ ดังนั้นการเตรียมให้อัลบูมินมีความบริสุทธิ์จึงเป็นการยาก ในร่างกายอัลบูมินเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการขนส่ง

สาร (transport protein) สิ่งนี้อาจจะบ่งบอกให้รู้ว่ามีสารต่าง ๆ เกาะกับอัลบูมิน เช่น กรดไขมัน, bilirubin bile acids, hormone ฯลฯ (Spector 1975) ทำให้การใช้ BSA ในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอในสัตว์หลาย ๆ ชนิด มักพบปัญหาและยังพบว่าห้องปฏิบัติการที่ใช้ BSA ชนิดเดียวกัน แต่เตรียมคนละครั้ง (lot ต่างกัน) ให้ผลในการส่งเสริมการเจริญต่างกัน เป็นไปได้ว่ามีสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low-molecular weight) ปนเปื้อนต่างกัน สิ่งนี้อาจเป็นปัจจัยที่สนับสนุนการเจริญ ทำให้เกิดความแตกต่างในการตอบสนองในเรื่องของการเจริญ (Kane, 1983) รายละเอียดเกี่ยวกับการศึกษาการปนเปื้อนของสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำใน BSA มีรายงานหลายชิ้นได้อ้างว่า BSA ที่เติมในปริมาณสูง จะกระตุ้นการเจริญของเอ็มบริโอที่ระยะบลาสโตซีส ในหนู (Wales และ Whittingham (1974)),

ต่อมา Kane (1985) ได้พบว่ามีปัจจัยใน BSA สามารถกระตุ้นการเจริญของเอ็มบริโอกระต่าย ซึ่งพบว่าเป็นสารโมเลกุลเล็กที่สกัดออกมาได้ด้วยกรดฟอร์มิค โดยนำ BSA มาละลายในกรดฟอร์มิก แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง (Membrane filter) พบว่าสารนี้มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 1,000 และมีประสิทธิภาพน้อยกว่า 10 mg/g BSA การเติมสารที่สกัดได้ ในความเข้มข้น 0.2 mg/ml ในน้ำยาเพาะเลี้ยง Complex semi - defined Medium ที่มี charcoal-treated BSA เป็นผลให้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ถึง 8 เท่า และเส้นผ่าศูนย์กลางของบลาสโตซีสที่เพาะเลี้ยงจากมอรูลาเพิ่มขึ้น 2 เท่า แต่ก็ยังไม่สามารถระบุชนิดของสารตัวนี้ได้อย่างเด่นชัด

สำหรับกรดไขมันลิโนเลอิก และอะราคิโดนิก ในการทดลองครั้งนี้ให้ผลต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ยกเว้นกรดโอเลอิกให้ผลต่อการเจริญได้ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมมาก ส่วนกรดอะราคิโดนิกให้ผลดีกว่าลิโนเลอิก ในการทดลองครั้งนี้พบว่ากรดไขมันทุกกลุ่มที่มีค่าความเข้มข้น 0.045 mM ให้ผลต่อการเจริญดีที่สุด ในการทดลองครั้งนี้ได้พยายามใช้ความเข้มข้นต่ำกว่า 0.045 mM คือที่ 0.022 และ 0.011 แล้วไม่ปรากฏว่าการเจริญของเอ็มบริโอจะดีกว่ากลุ่มควบคุมจึงไม่ได้แสดงผลการทดลองให้เห็น

ในการศึกษาผลของกรดไขมันหลาย ๆ ชนิดทั้งกรดไขมันชนิดที่อิ่มตัวและไม่อิ่มตัวต่อการเจริญของเอ็มบริโอของกระต่าย พบว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีจำนวนพันธะคู่หลายตำแหน่งจะเข้าไปในเอ็มบริโอของกระต่ายได้น้อยกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ต่ำ เช่น โอเลอิก (18:1)>ลินโนเลอิก (18:2)> อะราคิโดนิก (20:4) (Kane, 1979) สอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ human skin fibroblasts พบว่ามีการนำกรดโอเลอิกเข้าไปในเซลล์มากกว่าลินโนเลอิก และยังพบว่าลินโนเลอิกจะเข้าไปอยู่ในส่วนไตรเอซิลกลีเซอรอล ขณะที่กรดโอเลอิกจะเข้าไปอยู่เป็นองค์ประกอบของฟอสโฟลิพิด (Rosenthal, 1979) และจากการศึกษาของ Flynn และ Hillman (1978,1980) ที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น จะพบว่าโดยปกติเอ็มบริโอของหนูเมาซ์จะสามารถสังเคราะห์ไขมันได้จากกลูโคสที่มีอยู่ในน้ำยาเพาะเลี้ยง โดยเก็บสะสมในรูปไตรเอซิลกลีเซอรอล สอดคล้องกับการทดลองของ Tsai และ Geyer (1978) ซึ่งพบว่าเมื่อเติมกรดไขมันปริมาณสูงลงไปในน้ำยาเพาะเลี้ยง LM เซลล์ของหนูเมาซ์ พบว่าภายในเซลล์จะเต็มไปด้วย ไตรเอซิลกลีเซอรอลในรูป Lipid droplets ทำให้เซลล์ผิดปกติและการแบ่งเซลล์ลดลง

จากการทดลองครั้งนี้พบว่ากรดลินโนเลอิกให้ผลในการเจริญต่อเอ็มบริโอหนูเมาซ์ต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับกรดไขมันอีก 2 ชนิด ซึ่งอาจจะอธิบายได้ว่าลินโนเลอิกจะเข้าไปสะสมในตัวเอ็มบริโอในรูปไตรเอซิลกลีเซอรอล เมื่อเติมกรดลินโนเลอิกที่ความเข้มข้นสูง 0.18 mM ทำให้เอ็มบริโอมีการสะสมไตรเอซิลกลีเซอรอล ในรูป Lipid droplet มากขึ้นซึ่งในที่สุดก็ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเอ็มบริโอได้ แม้ว่าจะใช้ความเข้มข้น 0.045 mM ซึ่งต่ำกว่าก็ยังพบการเจริญต่ำกว่ากรดไขมันตัวอื่น ๆ ที่ระยะบลาสโตซีสและบลาสโตซีสหลุดออกจากโซนาเพลลูซิดา จากที่ทราบมาว่าอัลบูมินจะมีตำแหน่งที่มีความจำเพาะในการจับกับกรดไขมันสายยาว 6 ตำแหน่ง

ดังนั้นในการเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยง การเติมกรดลินโนเลอิกลงไปผสมกับอัลบูมินชนิดที่บริสุทธิ์จากกรดไขมัน อาจทำให้เกิดกรดลินโนเลอิกอิสระจำนวนมากในน้ำยาเพาะเลี้ยง เนื่องจากตำแหน่งที่จำเพาะต่อกรดลินโนเลอิกในอัลบูมินมีจำนวนจำกัด Spector (1975) ได้กล่าวไว้ว่ากรดไขมันแต่ละชนิดจะเข้าเกาะที่

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตำแหน่งจำเพาะบนอัลบูมินเท่านั้น ดังนั้น กรดไขมันอิสระในน้ำยาเพาะเลี้ยงอาจส่งผลต่อการเจริญของเอ็มบริโอได้ โดยเกิด lipid peroxidation ซึ่งส่วนใหญ่เกิดกับกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว ปกติแล้วเซลล์ที่เจริญอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มี O_2 (aerobic environment) จะเกิด autooxidation ของกรดไขมันได้ ซึ่งจะส่งผลให้เกิด free radical ตามมา เป็นที่ทราบกันดีว่า โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์จะประกอบด้วย lipid-protein complex คอยควบคุมการเข้าออกของสารต่าง ๆ ให้เป็นไปอย่างปกติ เมื่อเกิด free radical จะทำให้เกิดการทำลายต่อโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น ทำให้โครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยน, เอนไซม์เปลี่ยนผลที่ตามมาคือ ความสามารถในการคัดเลือกสารของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนไป ทำให้การเจริญของเอ็มบริโอลดลงได้ จากที่กล่าวมาข้างต้น ทั้ง Lipid droplet และ lipid peroxidation น่าจะเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้กรดลิโนเลอิกไม่สนับสนุนการเจริญเอ็มบริโอของหนูเมาซ์

สำหรับกรดอะราคิโดนิก (20:4) เป็นกรดไขมันที่มีคาร์บอน 20 ตัว และยังมีพันธะคู่ 4 ตำแหน่งทำให้อะราคิโดนิกเข้าไปในเซลล์ได้น้อยที่สุด (Kane, 1979) ดังนั้นจึงมีอยู่ภายนอกเซลล์เป็นจำนวนมากทำให้เกิด lipid peroxidation ในการเพาะเลี้ยง เอ็มบริโอกระต่ายที่ระยะ 1 เซลล์พบว่า กรดอะราคิโดนิกล้มเหลวในการสนับสนุนการเจริญ ทำให้เอ็มบริโอหยุดการเจริญ ในการทดลองครั้งนี้ lipid peroxidation อาจเป็นตัวทำให้เกิด Cytotoxic พร้อมกับที่เอ็มบริโอไม่สามารถที่จะ Metabolize กรดอะราคิโดนิก เนื่องจากโครงสร้างของพันธะคู่ 4 ตำแหน่ง Kane (1979) ต่อมา Gavino และคณะ (1981) ได้ทดสอบผลของกรดไขมัน หลายชนิดต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อเรียบและ fibroblasts ได้กล่าวว่ากรดอะราคิโดนิกจะลดการเจริญของเซลล์ และการแบ่งเซลล์ ขณะเดียวกันเป็นที่ทราบกันว่า กรดอะราคิโดนิกเป็นสารตั้งต้นของพรอสตาแกลนดิน (prostaglandin) ในการศึกษาผลของกรดไขมันต่อการเจริญของเม็ดเลือดขาวในหลอดทดลองได้อ้างว่ากรดอะราคิโดนิกที่เป็นสารตั้งต้นของพรอสตาแกลนดิน ไม่สนับสนุนการเจริญ ขณะที่กรดไขมันชนิดอื่น ๆ จะกระตุ้นการเจริญของเซลล์อย่างเห็นได้ชัดเช่น โอเลอิกและปาล์มติกซึ่งทั้ง 2 ตัวไม่ได้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ พาพรอสตาแกลนดินเลย แต่สนับสนุนการเจริญ

ของเซลล์ดังนั้นจึงสรุปว่าพรอสตาแกลนดินไม่สนับสนุนการเจริญของเซลล์

สำหรับในการทดลอง ผลของกรดอะราคิโดนิกต่อการเจริญของเอ็มบริโอหนูเมาซ์พบว่าไม่ส่งเสริมการเจริญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมแต่ให้ผลในการสนับสนุนเอ็มบริโอมากกว่าลิโนเลอิกเป็นไปได้ว่าการเกิด lipid droplet ในเซลล์จะให้ผลในการเป็นพิษมากกว่าการเกิด Lipid peroxidation ของกรดอะราคิโดนิก

ในกรดไขมันทั้ง 3 ชนิด ที่นำมาทดสอบกรดโอเลอิกจะให้ผลในการส่งเสริมการเจริญใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมจากการทดลองของ Rosenthal (1979) ในการเพาะเลี้ยง normal human skin fibrolast พบว่าโอเลอิกจะเข้าไปอยู่ในองค์ประกอบของฟอสโฟลิพิด ซึ่งฟอสโฟลิพิดเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์และเป็นสิ่งสำคัญในการรักษาความมั่นคงของเยื่อหุ้มเซลล์ และการตอบสนองต่อการทำหน้าที่ต่าง ๆ ของเยื่อหุ้มเซลล์ให้เป็นไปตามปกติ ต่อมา Polet (1981) ได้ศึกษากรดไขมันต่อการเจริญของเซลล์เม็ดเลือดขาวในหลอดทดลอง เขาได้สรุปว่า ผลของกรดไขมันต่อการเจริญของเซลล์น่าจะเกิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ โดยทำให้โครงสร้างไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนไปมากว่านำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานหรือใช้สังเคราะห์สารอื่น ๆ เช่นพรอสตาแกลนดิน

จากผลการทดลองกรดโอเลอิกที่ทุก ๆ ความเข้มข้นไม่มีผลในการสนับสนุนการเจริญ ของเอ็มบริโอของหนูเมาซ์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่มีกรดไขมันชนิดใดเลย จากที่กล่าวมาข้างต้นกรดโอเลอิกจะเข้าไปในเซลล์ได้มากกว่ากรดลิโนเลอิกและอะราคิโดนิกแต่โอเลอิกจะเข้าไปอยู่ในส่วนฟอสโฟลิพิดมากกว่าไตรเอซิลกลีเซอไรด์ ทำให้การเกิด lipid droplet ในเซลล์เอ็มบริโอน้อยกว่าลิโนเลอิกทำให้ความเป็นพิษต่อเอ็มบริโอลดลง จากที่ทราบมาแล้วว่า พันธะคู่ของกรดโอเลอิกมีเพียงตำแหน่งเดียว การเข้าไปในเซลล์จึงมีมากกว่ากรดอะราคิโดนิกที่มีพันธะคู่ 4 ตำแหน่ง (20:4) ทำให้จำนวนกรดไขมันที่อยู่ภายนอกเซลล์จึงมีน้อยโอกาสถูกออกซิเจนทำให้เกิด lipid peroxidation น้อย จึงแสดงความเป็นพิษต่อเอ็มบริโอน้อยยังมีการทดลองของ Doi และคณะ (1978) ได้ศึกษากรดไขมันที่มีอยู่ในน้ำยาเพาะเลี้ยงต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของฟอสฟอลิพิดของเยื่อหุ้มเซลล์ LM เซลล์ของหนูเมาซ์ พบว่า ฟอสฟอลิปิดจะมี

เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวประมาณ 63% และกรดไขมันอิ่มตัวอีก 37% จากการทดสอบพบว่า ถ้ามีกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวในน้ำยาเพาะเลี้ยงสูง จนทำให้มีการเพิ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวในฟอสฟอลิพิดของเยื่อหุ้มเซลล์จาก 65% เป็น 80% จะไม่มีผลต่ออัตราการเจริญของเซลล์ แต่ถ้าลดกรดไขมันไม่อิ่มตัวลงในช่วง 48-55% โดยเติมกรดไขมันอิ่มตัวในน้ำยาเพาะเลี้ยงอัตราการเจริญจะลดลง

สำหรับในกรณีที่ทำการย้ายฝากเอ็มบริโอของหนูเมาซ์ที่ระยะ 8-เซลล์นั้น เปรียบเทียบระหว่างน้ำยาเพาะเลี้ยง M-16 ที่ใช้ BSA ต่างกัน 2 ชนิดที่มีอัลบูมินชนิดปกติ และชนิดที่สกัดเอากรดไขมันออกไปพบว่าอัตราการฝังตัวที่มดลูกและจำนวนลูกที่คลอดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และพิจารณาการย้ายฝากเอ็มบริโอที่ระยะ 8-เซลล์ ในกรณีที่เติมกรดโอเลอิก 0.045 mM เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีกรดไขมัน ปรากฏว่าทั้ง 2 กลุ่มก็ให้ผลในการฝังตัวที่มดลูกและจำนวนลูกที่คลอดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน มีสิ่งที่น่าสนใจคือ เมื่อมีการย้ายฝากเอ็มบริโอที่ระยะ 8-เซลล์เข้าไปยังตัวรับ เป็นไปได้ที่เอ็มบริโอได้รับสารอาหารหรือองค์ประกอบที่จำเป็นต่อการเจริญกลับคืนมา ทำให้การฝังตัวและจำนวนลูกที่คลอดไม่แตกต่างกันทั้ง 2 กลุ่มซึ่งสอดคล้องกับการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอตั้งแต่ระยะ 2-เซลล์ จนถึงระยะบลาสโตซีสหลุดออกมาจากโซนาเพลลูซิดาในหลอดทดลอง พบว่าที่ระยะ 4-เซลล์ถึงมอรูลา การเจริญของหนูเมาซ์ทุก ๆ กลุ่มไม่แตกต่างกัน แต่จะเริ่มเห็นผลที่ระยะบลาสโตซีสและบลาสโตซีสหลุดออกจากโซนา-เพลลูซิดา ในการทดลองนี้พบว่าอัตราการฝังตัวและการคลอดนั้นไม่สูงเท่าที่ควร น่าจะเป็นผลจากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอนอกร่างกาย สภาวะของการเพาะเลี้ยงไม่ดีเหมือนอยู่ในร่างกาย ทำให้เอ็มบริโอที่ได้อ่อนแอกว่าปกติ ในการทดลองครั้งนี้ได้ย้ายฝากเอ็มบริโอที่ระยะ 8-เซลล์ ที่ชะล้างจากมดลูก หนูเพศเมียที่ท้องเป็นวันที่ 3 เพื่อตรวจสอบว่าอัตราการฝังตัวและการคลอดที่ต่ำนั้นเป็นผลจากการเพาะเลี้ยงนอกร่างกาย ซึ่งอาจไม่เหมาะสมหรือเป็นผลจากเทคนิคในการย้ายฝากในการทดลองครั้งนี้ ตรวจพบจำนวนพีตัสถึง 62.50% ซึ่งจัดอยู่ในระดับใช้ได้ จึงน่าเชื่อว่าอัตราการฝังตัวและการคลอดที่ต่ำ เป็นผลจากการเพาะเลี้ยง ส่วนเปอร์เซ็นต์การคลอดที่ต่ำ (15.83%) อาจเป็นผลจากการทำ laparotomy เพื่อตรวจนับจำนวนปีตัส ในวันที่ 8 ของการตั้งครรภ์ ส่งผลให้สูญเสียเอ็มบริโอที่

ฝังตัวแล้วบางส่วน ทำให้จำนวนลูกที่คลอดลดต่ำลงอย่างไรก็ตามเทคนิคและความชำนาญในการย้ายฝากก็อาจเป็นสาเหตุร่วมที่ทำให้ได้ผลต่ำด้วย

การศึกษาครั้งนี้ อาจสรุปได้ว่าการที่เอ็มบริโอหนูเมาซ์ เจริญในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เติมซีรัมอัลบูมินปกติได้ดีกว่าซีรัมอัลบูมินที่สกัดเอากรดไขมันออก อาจเนื่องจาก

1. กรดไขมัน น่าจะมีผลต่อการเจริญของเอ็มบริโอ

2. ในกระบวนการเตรียมอัลบูมินชนิดที่ปราศจากไขมัน อาจจะมีการสกัดสารที่มีความจำเป็นต่อเอ็มบริโอออกไปด้วย

สำหรับการศึกษากรดไขมันทั้ง 3 ชนิด กรดโอเลอิก, อะราคิโดนิก และลิโนเลอิก พบว่ามีผลต่อการเจริญของเอ็มบริโอหนูเมาซ์จากมากไปหาน้อยได้ดังนี้ กรดโอเลอิก, กรดอะราคิโดนิก และลิโนเลอิก ตามลำดับแต่กรดทั้งสามชนิดไม่ได้ให้ผลดีกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งไม่มีกรดไขมันอยู่เลย