บทที่ 4

สรุปการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษา แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ ในการแบ่งเอมบริโอสุกรในระยะมอรูล่าและระยะบลาสโตซิส โดยใช้ใบมีดและเข็มแก้วแบ่งเอมบริโอ 1 เอมบริโอออกเป็น 2 ส่วนแล้วนำแต่ละส่วนมาเลี้ยงต่อ พบว่าครึ่งเอมบริโอแต่ละส่วนนั้นสามารถเจริญเป็นเอมบริโอระยะบลาสโตซิสเล็ก ๆ ได้ ซึ่งเป็นรายงานในสุกรเป็นครั้งแรกในประเทศไทย การทดลองนี้ใช้สุกรเพื่อเป็นรูปแบบของการแบ่งเอมบริโอในสัตว์เศรษฐกิจ เนื่องจากมีข้อดีคือสามารถผลิตเอมบริโอได้มากในแต่ละครั้ง โดยเฉพาะเมื่อกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (gonadotrophin hormone) ได้จำนวนเอมบริโอเฉลี่ยในสุกรสาวเท่ากับ 16 ใบ (Techakumphu et al., 1994) และเอมบริโอสุกรยังมีขนาดใกล้เคียงกับเอมบริโอของ โค กระบือ แพะและแกะด้วยคือประมาณ 120 ไมครอน ในการทดลองได้เลือกศึกษาเอมบริโอระยะมอรูล่าและระยะบลาสโตซิส ซึ่งเป็นเอมบริโอระยะก่อนการฝังตัวที่มีผู้ศึกษากันมากในต่างประเทศเนื่องจากง่ายต่อการเก็บและย้ายฝากเพราะไม่ต้องทำการผ่าตัดสัตว์ นอกจากนี้หลังการแบ่งครึ่งเอมบริโอแล้ว ครึ่งเอมบริโอ ระยะนี้ไม่จำเป็นต้องนำใส่คืนโซนา เพลลูซิดา ก่อนการย้ายฝากให้สัตว์ตัวรับ เพราะโซนาเพลลูซิดา ไม่มีความจำเป็นต่อการป้องกันอันตรายหรือการเจริญ อีกต่อไป (Polge,1985) ได้มีผู้ศึกษาการย้ายฝากครึ่งเอมบริโอที่มีหรือไม่มี โซนาเพลลูซิดาเปรียบเทียบกัน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญต่อการมีชีวิตรอดของครึ่งเอมบริโอหลังการย้ายฝาก (Warfield et al.,1987; Kippax et al; Szell and Hudson,1991) นอกจากนี้ได้มีผู้ศึกษาหลายคนแสดงให้เห็นว่า ครึ่งเอมบริโอที่ได้จากเอมบริโอระยะมอรูล่าและบลาสโตซิส สามารถเจริญไปเป็นตัวอ่อนปกติได้ดีกว่าเอมบริโอระยะต้น เช่น ในหนูถีบจักร (Tsunoda and McLaren,1983; Nagashima et al., 1984), แกะ (Willadsen,1979,1981; Gatica et al., 1984; Willadsen and Godke,1984) ,

โค (Willadsen and Polge,1981; Williams et al., 1982; Ozil et al.,1982), แพะ (Tsunoda et al., 1985) และในสุกร (Saito et al.,1991)

การตัดแบ่งเอมบริโอออกเป็นสองส่วนเท่าๆกันในระยะมอรูล่าจะตัดแบ่งในระนาบใดๆก็ได้ แต่การแบ่งเอมบริโอในระยะบลาสโตซิสต้องคำนึงถึง symmetry โดยแต่ละครึ่งต้องประกอบไปด้วย inner cell massและ trophoblast cell โดยที่ inner cell mass มีความจำเป็นต่อการพัฒนาของเอมบริโอเป็นชั้น ectoderm mesoderm และ endoderm หากแบ่งไม่ดี inner cell mass ไม่เจริญจะพบเพียง เซล trophoblast แบ่งตัวเท่านั้นที่เรียกว่า trophoblastic vesicle Taoและคณะ(1995) พบว่าครึ่งเอมบริโอจากระยะมอรูล่า ที่เขาจัดไว้ในกลุ่มเจริญดีและปานกลาง หลังการเลี้ยงจะมีจำนวนของ inner cell mass nuclei ประมาณ 1-4 nuclei ในขณะที่ครึ่งเอมบริโอจากระยะบลาสโตซิสจะพบ inner cell mass nuclei ประมาณ 5-8 nuclei แต่อย่างไรก็ตามเขาพบว่า สัดส่วนของจำนวนเซลทั้งหมดต่อ inner cell mass ทั้งของครึ่งเอมบริโอที่รอดชีวิตหลังการเลี้ยงใน 24 ชม.และในเอมบริโอที่ไม่ได้แบ่ง (intact embryos) จะมีความคล้ายคลึงกัน

วิธีการแบ่งเอมบริโอด้วยใบมีด ในการทดลองนี้ได้ดัดแปลงโดยพยายามใช้เครื่องมือชิ้นเดียวติดกับ micromanipulator ยึดเอมบริโอในร่องที่ขูดบนพื้นของ petri dish ขนาด 35 มม. ซึ่งคล้ายกับวิธีการที่รายงานโดย Chesne และคณะ (1987) ในแกะ Williamsและ Moore (1988) ในโค และ Reichelt และ Niemann (1994) ในสุกร วิธีนี้ง่ายต่อการตัดแบ่งเอมบริโอ เพราะทำได้รวดเร็วและอาศัยเครื่องมือจำนวนน้อย แต่อย่างไรก็ตาม มีข้อเสียมากกว่าวิธีการแบ่งที่รายงานโดย Ozil และคณะ (1982) ที่ตัดแบ่งเอมบริโอด้วยเข็มแก้วสองอัน หลังไล่เอมบริโอออกจาก โซนา เพลลูซิดา เพราะโซนา เพลลูซิดา มีความเหนียวและยืดหยุ่น ดังนั้นการตัดจึงต้องมีการเอาใจใส่มากเป็นพิเศษโดยเฉพาะความคมของใบมีด รวมทั้งส่วนของใบมีดที่จะใช้ตัดเอมบริโอต้องอยู่ในแนวตั้งฉากกับเอมบริโอ จากการใช้วิธีการตัดแบ่งด้วยใบมีดในการทดลองนี้ พบว่ามีครึ่งเอมบริโอที่ถูกกระทบ (ไม่เจริญและรอดชีวิต) จากการแบ่งด้วยใบมีดถึง 37% ในระยะมอรูล่าและ 41% ในระยะบลาสโตซิส โดยน่าจะเกิดจากมีการสูญเสียเซลหรือเซลถูกทำลายขณะตัดแบ่ง เซลของเอมบริโอจะต้องมีการสูญเสียไปหรือไม่ก็ถูกกระทบ

กระเทือนจากการแบ่ง การดูดจับ (holding) ซึ่งทำให้จำนวนเซลเหลือที่จะก่อตัวเป็นบลาสโตซิสลดน้อยลงไป Tao และคณะยังรายงานว่า เปอร์เซ็นต์การสูญเสียเซล จากการแบ่งเพิ่มขึ้น จะทำให้คุณภาพของครึ่งเอมบริโอลดต่ำลง แต่อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้เราได้ครึ่งเอมบริโอที่เจริญเป็น บลาสโตซิสหลังการแบ่งครึ่งเอมบริโอระยะมอรูล่าและบลาสโตซิสเป็น 63%และ 59% ซึ่งเมื่อเทียบกับการศึกษาอื่น ๆ ที่ได้รายงานไว้ในสุกร (Saito et al.,1991; Reichelt and Niemann,1994) พบว่าได้เปอร์เซ็นต์น้อยกว่า ซึ่งอาจจะเป็นผลเนื่องมาจาก เทคนิคและใบมีดที่แตกต่างกัน

ส่วนวิธีการแบ่งเอมบริโอด้วยเข็มแก้วในการทดลองนี้ได้ ทำการแบ่งตามวิธีการของ Nagashima และคณะ (1988) ในสุกร และ Bredbacka และคณะ (1992) ในโค โดยแบ่งโดยใช้เข็มแก้วสองอันแยกแต่ละครึ่งของเอมบริโอ ออกจากกัน หลังจากที่มีการเตรียมเอมบริโอ ก่อนการแบ่งโดยการใช้ pronase ทำการย่อย โซนา เพลลูซิดา ในช่วงเวลาสั้นๆเพื่อให้โซนาเพลลูซิดา นิ่ม จากนั้นก็ตามด้วยการ incubation ใน Hanks' banlance salt solution (HBSS) ซึ่งเป็นสารละลายที่ไม่มี Mg^{2+}และ Ca^{2+} แยกเซลของเอมบริโอก่อน ซึ่งจะทำให้การแบ่งทำได้ง่ายขึ้น Ponzilius และคณะ (1987) เคยศึกษาความสามารถในการเจริญของครึ่งเอมบริโอของหนูถีบจักร หลังจากที่มีการเตรียมเอมบริโอก่อนการแบ่งด้วยการ incubate เอมบริโอใน 0.5% pronase และตามด้วยการ incubate ใน HBSS พบว่าการเตรียมเอมบริโอก่อนการแบ่ง ด้วยการทำการย่อย โซนาเพลลูซิดา หลังจากนั้นก็ทำให้เซลเอมบริโอ แยกจากกันโดยใช้สารละลายที่ไม่มี Ca^{2+}และ Mg^{2+} นอกจากจะทำให้การแยกเซลง่ายและสะดวกต่อการผลิตฝาแฝดมากกว่าการไม่ได้เตรียมด้วยวิธีดังกล่าวแล้ว ยังพบว่าเอมบริโอที่ผ่านการเตรียมและไม่ผ่านการเตรียมด้วยวิธีการดังกล่าว หลังการแบ่งครึ่งเอมบริโอแล้วทำการย้ายฝากให้สัตว์ตัวรับ ได้ผลผลิตออกมาเป็นลูก ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ การทดลองนี้ได้ครึ่งเอมบริโอที่เจริญเป็น บลาสโตซิสหลังการแบ่ง ในระยะมอรูล่าและบลาสโตซิสเป็น 61.4% และ 38% ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเทียบกับการศึกษาของ Nagashima และคณะ (1989) แล้วพบว่าการทดลองนี้ได้เปอร์เซ็นต์น้อยกว่าในทั้งสองระยะ ซึ่งอาจจะเป็นผลเนื่องมาจาก เทคนิคและเข็มแก้วที่แตกต่างกันนั่นเอง โดยที่

หลังการแบ่งครึ่งเอมบริโอ Nagashima และคณะ นำครึ่งเอมบริโอระยะมอรูล่าใส่คืนโซนาเพลลูซิดา ส่วนระยะบลาสโตซิส แบ่งโดยไม่แยกแต่ละครึ่งออกจากกันอย่างสมบูรณ์แต่ละครึ่งยังติดกัน (cell bridge) ซึ่งผู้ทดลองคิดว่า ด้วยวิธีการดังกล่าวทำให้มีโอกาสสูญเสียเซลน้อยกว่าการทดลองนี้ซึ่งพยายามที่จะแยกแต่ละครึ่งออกจากกันทำให้เซลถูกทำลายและมีการสูญเสียเซลมากขึ้น

การแบ่งครึ่งเอมบริโอระยะมอรูล่าด้วยใบมีดและเข็มแก้ว พบว่าครึ่งเอมบริโอ ที่ได้จากการแบ่งในทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกัน (63% และ 61.4%) ส่วนเอมบริโอระยะบลาสโตซิสหลังการแบ่งด้วยใบมีดและเข็มแก้ว ครึ่งเอมบริโอมีการเจริญและรอดชีวิตแตกต่างกัน (59.2% และ 38%)

Kippax และคณะ (1991) ศึกษาในโค พบว่าวิธีการแบ่งเอมบริโอโดยใบมีดและเข็มแก้ว ไม่มีผลต่อการเจริญและมีชีวิตรอดของครึ่งเอมบริโอ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่ Kippax และคณะ ไม่ได้แยกว่าเป็นแบ่งเอมบริโอระยะมอรูล่าหรือบลาสโตซิส นอกจากนี้เขายังพบว่าการแบ่งครึ่งเอมบริโอระยะมอรูล่าและบลาสโตซิสด้วยใบมีด ไม่มีผลต่อการเจริญและมีชีวิตรอดของ ครึ่งเอมบริโอในทั้งสองระยะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีผลใกล้เคียงกับการทดลองนี้แม้ว่าจะเป็นสัตว์ต่างชนิดกัน

จากการทดลอง สรุปว่าเอมบริโอระยะมอรูล่า น่าจะเป็นระยะที่ดีกว่าระยะบลาสโตซิสที่จะนำมาแบ่งครึ่ง โดยจะใช้ใบมีดหรือเข็มแก้วก็ได้เพราะไม่มีความแตกต่างกัน ส่วนการแบ่งครึ่งเอมบริโอระยะบลาสโตซิส ควรเลือกใช้ใบมีด ทั้งนี้เพราะนอกจากจะมีความสะดวก รวดเร็ว ทำได้ง่ายและใช้เวลาน้อยในการตัดแบ่งแต่ละใบแล้ว ยังใช้เครื่องมือจำนวนน้อยชิ้นกว่าเข็มแก้ว เปอร์เซ็นต์การเจริญและรอดชีวิตแตกต่างจากการใช้เข็มแก้ว ในการตัดแบ่งแต่ละครั้งใบมีดต้องคม และต้องทำการปรับใบมีดให้อยู่ในระดับเหมาะสมก่อน ซึ่งจะเสียเวลาเล็กน้อยแต่ถ้าทำการปรับใบมีดได้แล้วการตัดจะดำเนินไปอย่างรวดเร็ว ซึ่งในการทดลองนี้จะปรับใบมีดโดยใช้ไข่ที่ไม่ปฏิสนธิหรือใช้เอมบริโอที่มีคุณภาพไม่ดีที่จะคัดทิ้งในการเก็บแต่ละครั้งทำการทดลองตัดก่อน ซึ่งวิธีการแบ่งด้วยใบมีดนี้ หลังการแบ่งและเลี้ยงไว้พบว่ามีการสูญเสียเซลประมาณ 25-30% ในครึ่งเอมบริโอที่เจริญและรอดชีวิต เป็น เกรด เอ บี ในขณะที่ พบ

ว่ามีการสูญเสียเซลสูงถึง 65%ในครึ่งเอมบริโอที่เสื่อมสลาย (เกรด ซี) (Tao et al.,1995) ซึ่งการสูญเสียเซลพบว่ามีความสัมพันธ์กับคุณภาพของครึ่งเอมบริโอ

ส่วนการแบ่งเอมบริโอโดยใช้เข็มแก้วนั้น เอมบริโอระยะมอรูล่าน่าจะใช้ได้ผลดีกว่าระยะบลาสโตซิส เนื่องจาก จากการสังเกตการแบ่งมอรูล่าด้วยเข็มแก้วมีการสูญเสียเซลน้อยมาก หรือบางเอมบริโอไม่มีการสูญเสียเลย ในขณะที่บลาสโตซิสนั้นทำได้ยากหรือบางเอมบริโอแยกอย่างสมบูรณ์ไม่ได้เลยเพราะ junction ของแต่ละเซลเกาะติดกันเหนียวมาก ทำให้โอกาสที่เซลจะถูกทำลายจากการแบ่งเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจากการทดลองได้เปอร์เซ็นต์ การเจริญและรอดชีวิตในระยะบลาสโตซิสน้อยมาก (38%) นอกจากนี้การแบ่งครึ่งเอมบริโอโดยใช้เข็มแก้วยังสามารถผลิต ครึ่งเอมบริโอแฝดได้ 31.3%ในระยะมอรูล่าและ 10% ในระยะบลาสโตซิส ในขณะที่การแบ่งด้วยใบมีดได้ 4% และ 15% ตามลำดับ Lewis(1994) พบว่าช่วงเวลาระหว่างการเก็บเอมบริโอจนกระทั่งถึงการตัดแบ่งเอมบริโอเสร็จสมบูรณ์ภายในเวลาประมาณ 10 ชม. ไม่มีผลต่อการเจริญของครึ่งเอมบริโอที่ได้จากการแบ่งที่เวลาแตกต่างกัน

จากการทดลองนี้ แสดงถึงความเป็นไปได้ในการแบ่งครึ่งเอมบริโอของสุกร เพื่อเพิ่มจำนวนเอมบริโอและผลิตเอมบริโอ ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกัน ซึ่งสามารถนำไปปรับใช้ในสัตว์เศรษฐกิจชนิดอื่นๆ เช่น โค กระบือ แพะ แกะ เป็นต้น ส่วนจะเลือกใช้เอมบริโอระยะมอรูล่าหรือบลาสโตซิส ใช้ใบมีดหรือเข็มแก้วแบ่งนั้นขึ้นอยู่กับความสะดวกและความเหมาะสมของแต่ละห้องทดลอง และผู้ศึกษาขอเสนอแนะว่าเอมบริโอระยะมอรูล่าน่าจะเป็ นระยะที่เหมาะสมกว่าระยะบลาสโตซิสที่จะนำมาแบ่งครึ่งเพื่อเพิ่มผลผลิตเอมบริโอ ส่วนการใช้ใบมีดหรือเข็มแก้ว แบ่งครึ่งเอมบริโอระยะมอรูล่านั้นประสิทธิภาพไม่มีความแตกต่างกัน แต่สำหรับเอมบริโอระยะบลาสโตซิสใบมีดจะมีประสิทธิภาพดีกว่า ส่วนการแบ่งครึ่งเอมบริโอเพื่อผลิตเอมบริโอแฝด การแบ่งครึ่งเอมบริโอระยะมอรูล่าด้วยเข็มแก้วจะผลิตเอมบริโอแฝดได้ดี ผู้ศึกษาหวังว่าเอมบริโอ ของสุกรน่าจะเป็นตัวแทนที่ดีให้แก่การทดลองในสัตว์เศรษฐกิจชนิดอื่น ๆ ในอนาคต เพราะในเมืองไทยการศึกษาการแบ่งครึ่งเอมบริโอยังมีน้อยมาก เมื่อเทียบกับในต่างประเทศ และเพื่อดูผลสำเร็จของครึ่งเอมบริโอที่ได้จากการ

แบ่งว่าสามารถเจริญเป็นตัวอ่อนปกติได้ดีหรือไม่ น่าจะมีการย้ายฝากครึ่งเอมบริโอที่ได้จากการแบ่งในโอกาสต่อไป