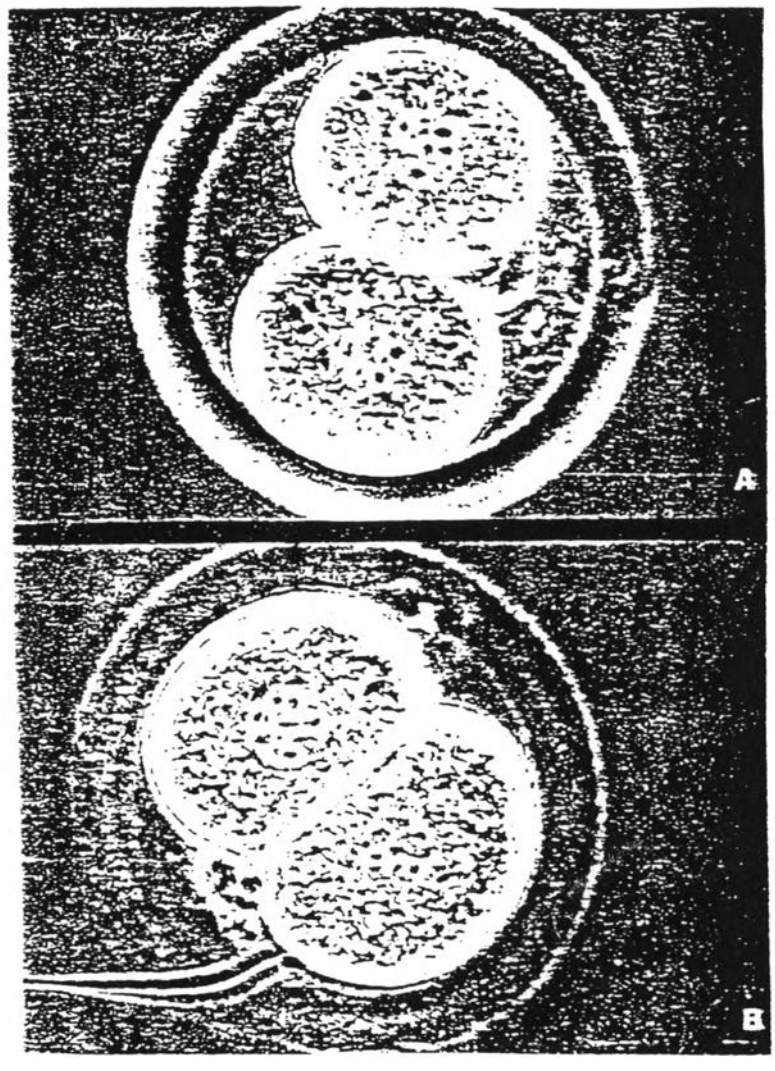
บทที่ 1

บทนำ

การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมระยะก่อนการฝังตัวนอกร่างกาย จากอดีตจนถึงปัจจุบันมีหลักฐานมากมายที่แสดงให้เห็นว่า ได้มีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงให้มีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้นจนปัจจุบันประสบความสำเร็จในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลายชนิด เช่น หนูเมาส์ (Whitten and Bigger, 1968 ; Cross and Brinster, 1973), กระต่าย (Kane and Foote, 1971; Kane and Headen, 1980) แกะ (Tervit et al., 1972), ลิง (Bavister et al., 1983) สุกร (Archibong et al., 1989; Reed et al., 1992) และโค (Pinyopummintr and Bavister, 1991) เป็นต้น ซึ่งจุดประสงค์ในการศึกษาดังกล่าวนี้ นอกจากจะได้เข้าใจถึงขั้นตอนการเจริญของเอ็มบริโอแต่ละระยะก่อนการฝังตัวแล้ว ยังจะได้ทราบว่าในระหว่างการเจริญของเอ็มบริโอต้องการสารอาหารชนิดใดบ้างหรือมีปัจจัยอะไรที่มีผลต่อการเจริญ ความรู้ที่ได้อาจนำไปประยุกต์ใช้ในการแก้ปัญหาการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอในสัตว์ชนิดอื่น ๆ ทั้งที่ยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้และที่เพาะเลี้ยงได้บ้างแล้วแต่ยังต้องปรับปรุงให้ดีขึ้น เพื่อประโยชน์ทางเศรษฐกิจ อย่างไรก็ตามเบื้องหลังความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลายชนิดนั้น เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าได้รับข้อมูลพื้นฐานจากการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของหนูเมาส์และกระต่ายเป็นส่วนใหญ่ เช่น องค์ประกอบของน้ำยาเพาะเลี้ยง ซึ่งอาจจะมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบหรือเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารตัวใดตัวหนึ่งที่มีอยู่แล้วหรือการเพิ่มเติมสารอาหารบางตัวลงไป และการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่าง ๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงให้เหมาะสมกับสัตว์ชนิดที่จะศึกษา แต่สำหรับแฮมสเตอร์ซึ่งเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมชนิดหนึ่งที่นักวิจัยนิยมนำมาใช้ศึกษาด้านชีววิทยาการสืบพันธุ์และการปฏิสนธิภายนอกร่างกายเช่นเดียวกับหนูเมาส์ ในระยะแรกของการศึกษาพบว่าการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอให้เจริญผ่านระยะ 2 -เซลล์ยังไม่ประสบผลสำเร็จ (Yanagimachi and Chang, 1964; Whittingham and Bavister, 1974; Yodyingyuad, 1982; Bavister, 1987) และสามารถสังเกตเห็นลักษณะที่ผิดปกติค่อนข้างจะชัดเจน ดังแสดงในรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 แสดงลักษณะของเอ็มบริโอที่ไม่สามารถเจริญผ่านระยะ 2-เซลล์ (2-cell block) เปรียบเทียบกับเอ็มบริโอระยะ 2-เซลล์ ที่ปกติ

A. แสดงลักษณะเอ็มบริโอระยะ 2-เซลล์ ที่ได้จากการปฏิสนธิภายในร่างกายที่ปกติ จะสังเกตเห็นว่า บลาสโตเมีย (blastomere) จะกลมและมี perivitelline space ค่อนข้างใหญ่

B. แสดงลักษณะเอ็มบริโอระยะ 2-เซลล์ ที่ได้จากการปฏิสนธิภายนอกร่างกายและไม่สามารถเจริญต่อไปได้ พบลักษณะที่ผิดปกติคือบลาสโตเมียจะบวม (swelling) และ perivitelline space เล็ก (Bavister, 1987)

แต่อย่างไรก็ตาม ได้มีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการปรับปรุงและเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของน้ำยาเพาะเลี้ยงและสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมกับการเจริญมากที่สุด ดังเช่นการศึกษาของ Schini และ Bavister ในปี 1988 พบว่าการลดปริมาตรของน้ำยาเพาะเลี้ยงจาก 100 μl. เหลือ 0.6 - 0.8 μl. สามารถส่งเสริมการเจริญของเอ็มบริโอระยะ 2 - เซลล์ไปเป็นระยะ 4 -เซลล์ 14.1 % ในน้ำยาเพาะเลี้ยง Tyrode's solution ที่เติมแลคเตทและไพรูเวท(TLP) และในปีเดียวกันนี้เองยังพบอีกว่าถ้าเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอระยะ 2-เซลล์ในน้ำยา TLP-PVA ที่ไม่เติมกลูโคสและฟอตเฟต จะสามารถสนับสนุนการเจริญไปเป็นเอ็มบริโอระยะ 8 -เซลล์ได้ 29.5% และได้ตั้งชื่อน้ำยาเพาะเลี้ยงใหม่ว่า HECM-1 (Hamster Embryo Culture Medium - 1) ต่อมาในปี 1990 McKiernan และ Bavister ได้รายงานว่าสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีความสำคัญไม่น้อยไปกว่าน้ำยาเพาะเลี้ยง โดยการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอระยะ 2 -เซลล์ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ดัดแปลงมาจาก HECM-1 พบว่าที่อุณหภูมิ 37.5 เซลเซียส, ปริมาณ O_2 10%, osmolarity 250-300 mOsmol, ปริมาณ CO_2 10% และระดับความเป็นกรด - ด่างสามารถส่งเสริมการเจริญเป็นบลาสโตซีสได้ 27.1-32.5 %

ส่วนการเจริญของแฮมสเตอร์เอ็มบริโอระยะ 8-เซลล์นั้น ในระยะแรกของการศึกษากับประสบปัญหาในเพาะเลี้ยงเหมือนกัน แต่ก็ไม่ยุ่งยากและซับซ้อนเท่ากับการเพาะเลี้ยงจากระยะ 2-เซลล์ ทำให้ในปัจจุบันการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอจากระยะ 8-เซลล์ได้ผลดีพอสมควร แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาการเจริญของเอ็มบริโอนอกร่างกายจากระยะ 2-เซลล์และ 8-เซลล์ควบคู่กันไป ยังคงมีความจำเป็นอยู่เพราะจากหลักฐานการศึกษาการเจริญของเอ็มบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมส่วนใหญ่ พบว่าในแต่ละช่วงของการเจริญของเอ็มบริโอนั้น จะมีเมตาบอลิซึมที่ค่อนข้างจะแตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น การศึกษาเอ็มบริโอของหนูเมาส์ พบว่าเอ็มบริโอระยะ 1- หรือ 2-เซลล์ไม่สามารถใช้กลูโคสเป็นแหล่งพลังงานได้ แต่กลับใช้แลคเตท และไพรูเวทแทน (Brinster, 1965) ในขณะที่เอ็มบริโอระยะ 8-เซลล์ สามารถใช้กลูโคสได้ (Hammond, 1949; Whitten, 1956; Brinster,1965 ; Brinster and Thomson, 1966) ตัวอย่างการศึกษาเกี่ยวกับการเจริญของเอ็มบริโอระยะ 8 -เซลล์ เช่นการเติมกรดอะมิโน 4 ชนิด (เฟนิลอลานีน ,ไอโซลิวซีน ,เมทไธโอนีน และกลูตามีนลงในน้ำยาที่ใช้เพาะเลี้ยง สามารถเพิ่มการเจริญเป็นบลาสโตซีสจาก 6% เป็น 42% ส่วนบทบาทเกี่ยวกับกลูโคสและฟอตเฟตต่อการเจริญของเอ็มบริโอระยะ 8 -เซลล์นั้น Seshagiri และ Bavister (1988a, 1988b) รายงาน

ว่าให้ผลการเจริญในลักษณะเดียวกันกับเอ็มบริโอระยะ 2 -เซลล์ กล่าวคือ น้ำยาเพาะเลี้ยง TLP-PVA ที่ไม่เติมกลูโคสและฟอสเฟต สามารถสนับสนุนการเจริญเป็นบลาสโตซีสได้ 88.1%

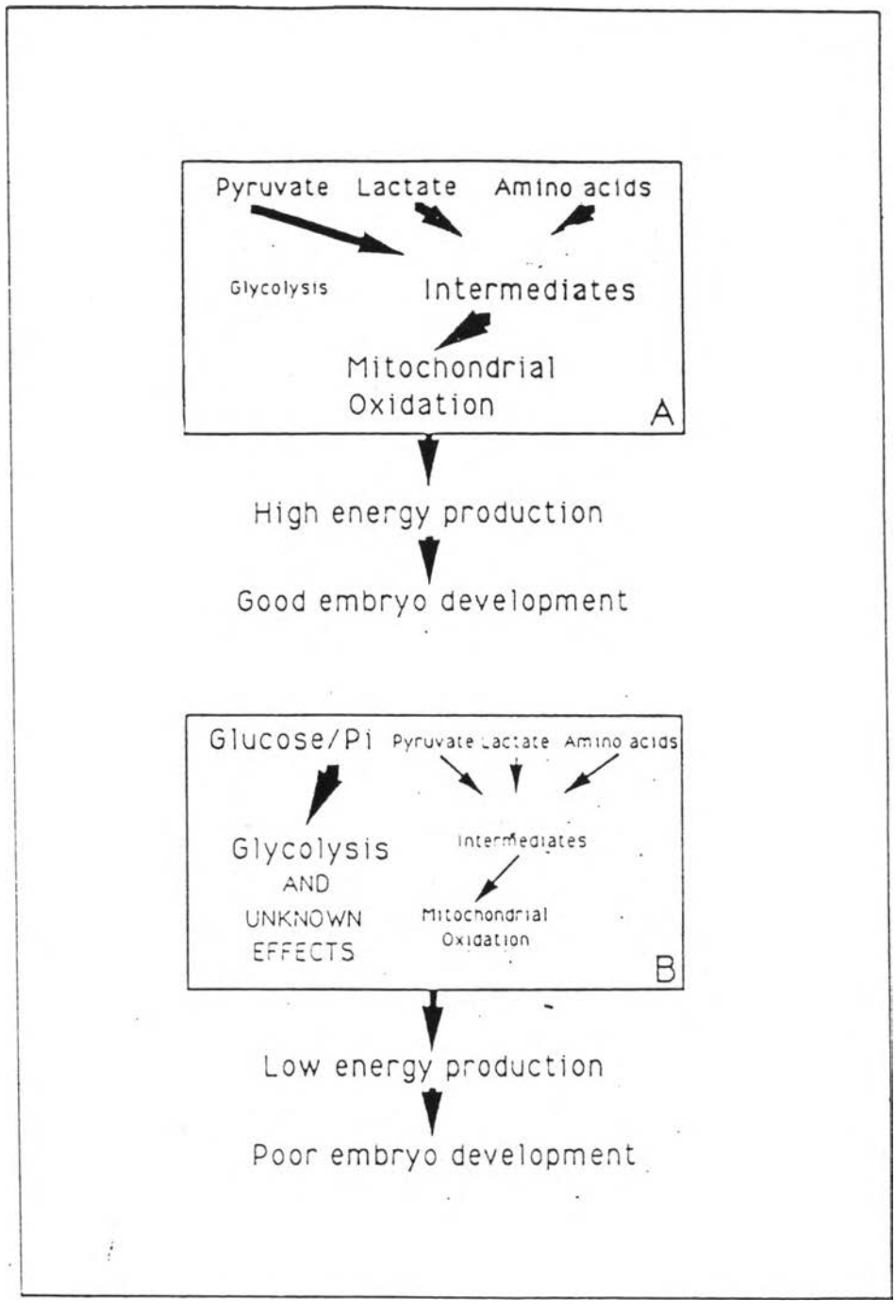
จากรายงานการศึกษาเท่าที่มี จะพบว่าการเพาะเลี้ยงแฮมสเตอร์เอ็มบริโอยังไม่ประสบความสำเร็จอย่างสมบูรณ์ แสดงว่าขั้นตอนการเจริญของเอ็มบริโอ อาจจะต้องการปัจจัยบางอย่างที่จำเพาะเจาะจงจากน้ำยาเพาะเลี้ยงหรือสภาวะภายนอกที่แตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมชนิดอื่นที่เพาะเลี้ยงได้ในขณะนี้ ซึ่งจากความยากลำบากในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอดังกล่าวนี้เอง ที่ทำให้แฮมสเตอร์เป็นสัตว์ทดลองที่นักวิจัยหลายท่านให้ความสนใจมากเป็นพิเศษ และยังได้เสนอแนวคิดไว้ค่อนข้างจะตรงกันว่า ถ้าพวกเขาสามารถที่จะเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของแฮมสเตอร์ให้เจริญภายนอกร่างกายได้อย่างสมบูรณ์แล้ว ความรู้หรือข้อมูลที่ได้อาจนำมาประยุกต์ใช้ในการแก้ปัญหาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมชนิดอื่น ๆ ที่ยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในขณะนี้ เช่น เอ็มบริโอของหนูเมาซ์บางสายพันธุ์ ที่ไม่สามารถเจริญผ่านระยะ 1-เซลล์ หรือ 2- เซลล์ (Bigger, 1971; Cross and Brinster, 1973; Spielmann et al., 1980;Goddard and Pratt, 1983) ในสัตว์เศรษฐกิจหรือสัตว์ที่กำลังจะสูญพันธุ์ไป เช่น ช้าง และ แพนด้า เป็นต้น

<u>ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของแฮมสเตอร์เอ็มบริโอที่เพาะเลี้ยงภายนอกร่างกาย</u>

1. <u>กลูโคส(glucose)และฟอสเฟต(phosphate)</u>

จากหลักฐานเท่าที่มี พบว่าการเจริญของเอ็มบริโอระยะก่อนการฝังตัวของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม จากระยะไซโกตไปเป็นบลาสโตซีส จะสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีโดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงความต้องการของแหล่งที่ให้พลังงาน เช่น เอ็มบริโอของหนูเมาซ์ระยะ 1- หรือ 2-เซลล์ ไม่สามารถใช้กลูโคสเป็นแหล่งพลังงานได้ แต่สามารถใช้ไพรูเวทและแลคเตทเป็นแหล่งพลังงานสำคัญในการเจริญเติบโตและแบ่งตัวของเซลล์ในระยะนี้ (Whitten, 1957; Brinster, 1965) เอ็มบริโอระยะ 8- เซลล์สามารถใช้ได้ทั้งกลูโคส, แลคเตทและไพรูเวท (Hammond, 1949; Whitten, 1956; Brinster, 1965; Brinster and Thomson, 1966) แต่สำหรับแฮมสเตอร์ การเจริญและแบ่งตัวของเอ็มบริโอทุกระยะก่อนการฝังตัวอาศัยไพรูเวท, แลคเตทและกรดอะมิโน เป็นแหล่งพลังงานมากกว่ากลูโคส (Seshagiri and

Bavister, 1988) และยังแสดงให้เห็นว่าในช่วงเวลาก่อนการฝังตัวนั้น Krebs cycle activity เป็นแหล่งสร้างพลังงานใหญ่สำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์มากกว่ากระบวนการ glycolysis ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของแฮมสเตอร์ในระยะ 2- เซลล์และ 8- เซลล์ ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีกลูโคสและฟอตเฟตอยู่ด้วย จึงไม่สามารถส่งเสริมการเจริญได้ (Schini and Bavister, 1988; Seshagiri and Bavister, 1988a, 1988b) นอกจากนั้น ฟอตเฟตที่เติมลงไปจะไปส่งเสริมกระบวนการ glycolysis ให้เพิ่มมากขึ้น ด้วยการกระตุ้น glycolytic enzyme 3 ชนิด คือ hexokinase, phosphofructokinase และ glyceraldehyde- 3 - phosphate dehydrogenase และจากการเพิ่มขึ้นของกระบวนการ glycolysis นี้เอง ส่งผลให้แหล่งใหญ่ที่สร้างพลังงาน (ATP) ถูกยับยั้งโดยผ่านทางไพรูเวท, แลคเตทและกรดอะมิโน ดังนั้นพลังงานที่เอ็มบริโอสร้างได้จึงไม่เพียงพอกับการเจริญเติบโต Seshagiri และ Bavister (1991)ได้ขยายความถึงกลไกการยังยั้งดังกล่าวให้ละเอียดยิ่งขึ้น ว่ากระบวนการ glycolysis ที่เพิ่มขึ้นนี้จะไปแย่งใช้ ADP และ NAD^+ จากขั้นตอนการเปลี่ยน ไพรูเวท, แลคเตทและกรดอะมิโนเป็น intermediate ก่อนเข้า Krebs cycle และเรียก ปรากฏการณ์ดังกล่าวว่า "Craftree effect" แสดงดังรูปที่ 1.2 โดยอาศัยการวัดปริมาณก๊าซ co_2 ที่ให้ออกมา (Brinster,1967a;1967b)และการใช้ออกซิเจน (Mills and Bavister, 1967; Seshagiri and Bavister,1991) เป็นข้อพิสูจน์นี้

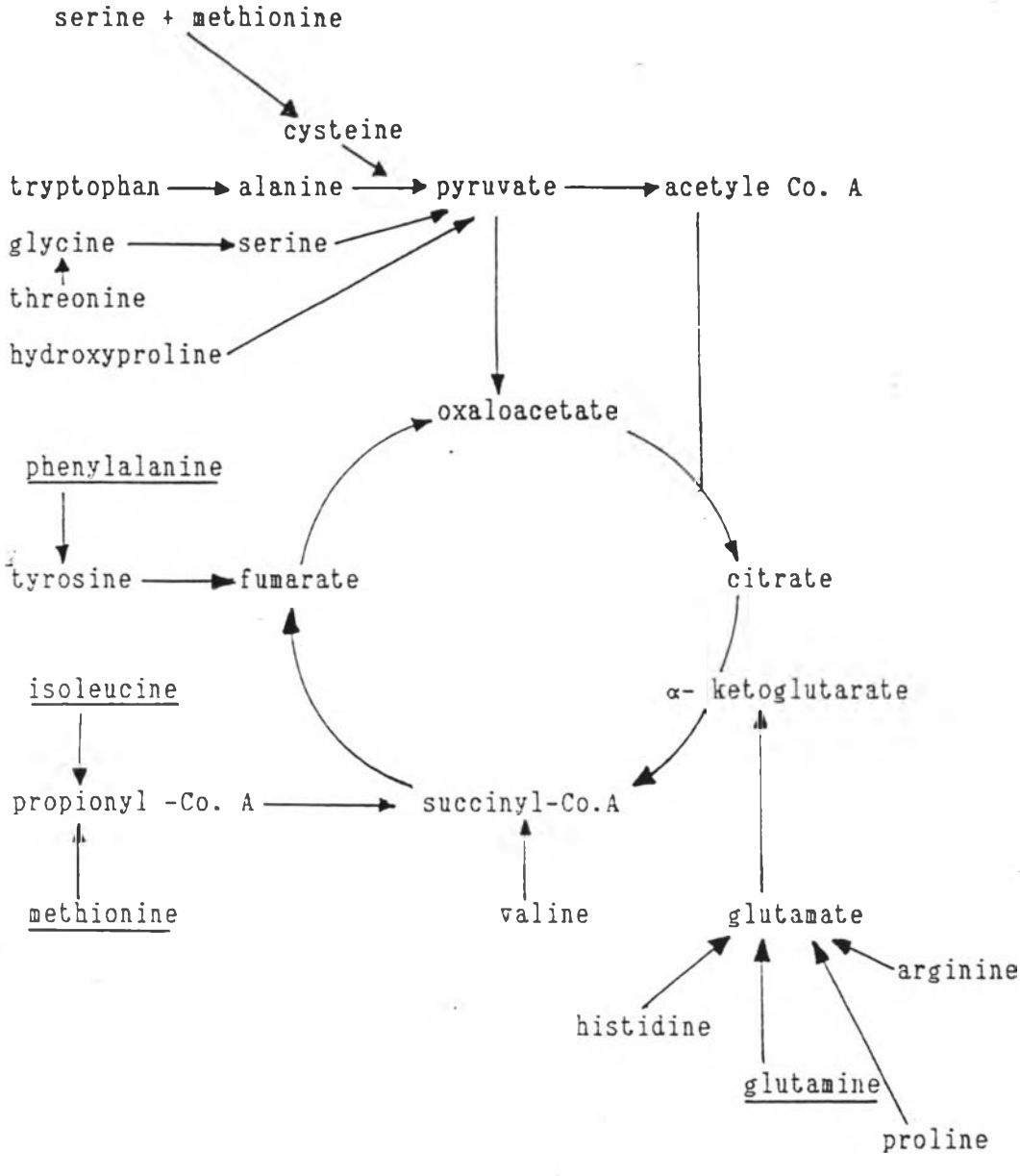


รูปที่ 1.2 แสดงปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นกับเอ็มบริโอที่เจริญในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ไม่เติมกลูโคสและฟอสเฟส (A) และเติมกลูโคสและฟอสเฟส (B) (Seshagiri and Bavister, 1991)

2. กรดอะมิโน (amino acids)

นอกจากไพรูเวทและแลคเตตจะเป็นแหล่งพลังงานแล้ว จากรายงานการศึกษายังพบอีกว่า กรดอะมิโนบางชนิดก็มีผลต่อการเจริญของแฮมสเตอร์เอ็มบริโอและมีแนวโน้มว่าจะเป็นสารสำคัญอีกกลุ่มหนึ่งในการสนับสนุนการเจริญด้วย ดังเช่นรายงานการศึกษาของ Juetten และ Bavister(1983) ที่พบว่า กรดอะมิโน 4 ชนิดได้แก่ กลูตามีน (glutamine), เฟนิลอะลานีน (phenylalanine),เมทไธโอนีน (methionine) และไอโซลิวซีน (isoleucine) สามารถส่งเสริมการเจริญของแฮมสเตอร์เอ็มบริโอจากระยะ 1-เซลล์ ถึงระยะ 2-เซลล์ เพิ่มขึ้นจาก 28% เป็น 52% และมีผลต่อการเจริญและการแบ่งตัวของแฮมสเตอร์เอ็มบริโอจากระยะ 8-เซลล์เจริญถึงระยะบลาสโตซีสเพิ่มจาก 6% เป็น 42% (Carney and Bavister, 1987) และยังพบว่ากลูตามีนและเมทไธโอนีนมีผลต่อการเจริญและการแบ่งตัวมากที่สุด รองลงมาได้แก่ เฟนิลอะลานีนและไอโซลิวซีน ซึ่งแตกต่างจากหนูเมาซ์ คือเอ็มบริโอสามารถเจริญจากระยะ 1-เซลล์ไปจนถึงระยะบลาสโตซีสได้ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ไม่เติมกรดอะมิโน แต่กรดอะมิโนกลับไปมีผลต่อการเจริญเติบโตในระยะหลังบลาสโตซีส โดยพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดอะมิโนในน้ำยาเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของหนูเมาซ์ระยะบลาสโตซีส จะช่วยส่งเสริมการเจริญและการ differentiation ของ inner cell mass ของเอ็มบริโอได้ดีกว่าน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีกรดอะมิโนน้อยกว่าหรือไม่มีเลย (Juurlink and Fedoroff, 1977; Spindle, 1980) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเพิ่มเติมอีกว่า ถ้ามีกรดอะมิโนทั้ง 20 ชนิด จะมีผลต่อการเจริญของเอ็มบริโอของแฮมสเตอร์มากน้อยเพียงใด ด้วยการเติมกรดอะมิโน 20 ชนิดลงไปในน้ำยาเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอระยะ 8-เซลล์ พบว่าผลการเจริญไปเป็นระยะบลาสโตซีสไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมแต่อย่างใด(Carney and Bavister,1987)

จากรายงานการศึกษาที่กล่าวมาแล้วข้างต้น คณะนักวิจัยได้อธิบายไว้ว่า กรดอะมิโน 4 ชนิดดังกล่าวนั้นถูกนำไปใช้ประโยชน์ในขั้นตอนการเจริญของเอ็มบริโอได้มากกว่ากรดอะมิโนชนิดอื่น ๆ โดยกรดอะมิโนเหล่านี้เมื่อซึมผ่านเข้าไปในเซลล์และถูกเปลี่ยนโดยเอ็มไซม์ที่จำเพาะเป็น intermediate ใน Krebs cycle ดังรูปที่ 1.3 และให้พลังงานออกมาส่งเสริมการเจริญของเอ็มบริโอ และยังเสนออีกว่านอกจากกลูตามีนจะเป็นแหล่งพลังงานแล้ว กลูตามีนยังใช้เป็นสับสเตรต (substrate) ในการสังเคราะห์พิวรีนเบส (purine base) และไพริมีดีนเบส (pyrimidine base) ได้อีกด้วย



รูปที่ 1.3 แสดง pathway ของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ก่อนเข้ากระบวนการการ Krebs cycle (จาก Campbell, 1991)

3. ระดับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของน้ำยาเพาะเลี้ยง

การศึกษาถึงระดับความเป็นกรด-ด่างหรือความเข้มข้นของไฮโดรเจนอิออน(H^+) ของน้ำยาเพาะเลี้ยงให้เหมาะสมต่อการเจริญของเอ็มบริโอ ดูเหมือนจะมีความสำคัญไม่น้อยไปกว่าเรื่องอื่น ๆ เลย เพราะถ้าพิจารณาละเอียดโดยอาศัยหลักพื้นฐานทางชีวเคมีจะพบว่าระดับความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อเมตาบอลิซึมของเซลล์ต่าง ๆ ภายในร่างกาย เช่น ผลต่อการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ซึ่งก็รวมถึงเอ็นไซม์ในเอ็มบริโอด้วย ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอ ถ้าระดับความเป็นกรด-ด่างของน้ำยาเพาะเลี้ยงไม่เหมาะสม ก็จะส่งผลต่อการเจริญของเอ็มบริโอด้วย และจากการศึกษาในแฮมสตอร์ระดับความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมของน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ใช้กันอยู่ในช่วง 7.2-7.4(Yodyingyuad, 1982; Bavister et al., 1983; McKiernan and Bavister, 1990)

4. ระดับความเข้มข้น (Osmolarity) ของน้ำยาเพาะเลี้ยง

จากหลักฐานที่มีแสดงให้เห็นว่าระดับความเข้มข้นของน้ำยาเพาะเลี้ยงก็มีความสำคัญต่อการเจริญของเอ็มบริโอ ในแฮมสเตอร์ McKiernan and Bavister (1990) พบว่าระดับความเข้มข้นของน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญของเอ็มบริโออยู่ระหว่าง 250-300 มิลลิออสโมล ซึ่ง Sbarra และคณะ (1963) ได้แสดงให้เห็นถึงผลข้อหนึ่งที่เกิดจากความเข้มข้นของน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ไม่เหมาะสมไว้น่าสนใจว่า การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของหนูเมาซ์ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มข้นมาก จะยับยั้งกระบวนการหายใจ (respiration) ด้วยการส่งเสริมกระบวนการ glycolysis ให้เพิ่มขึ้น

5. โบวายซีรัมอัลบูมิน (BSA)

เป็นที่ทราบกันดีว่า การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมส่วนใหญ่นั้น จำเป็นจะต้องมี macromolecule ซึ่งมักเติมในรูปของโปรตีน และที่นิยมใช้กันมากที่สุดคือ BSA ซึ่งจากรายงานการศึกษาพบว่า BSA มีบทบาทหลายอย่าง เช่น ช่วยทำลายองค์ประกอบที่เป็นพิษในน้ำยาเพาะเลี้ยงซึ่งความเป็นพิษอาจเกิดจากองค์ประกอบธรรมดาในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีในปริมาณที่ไม่เหมาะสมหรือมีอนุมูลของโลหะที่เป็นอันตราย (Cholewa and Whitten, 1970) หรืออาจเกิดจากการปนเปื้อนในน้ำหรือสารอื่น ๆ จากจานเพาะเลี้ยงหรือจาก liquid paraffin ที่ปิดคลุมน้ำยาเพาะเลี้ยงหรือสารโมเลกุลเล็ก ๆ ที่เกาะบน BSA อาจมีผลต่อการเจริญของเอ็ม

บริโอ เพราะเป็นที่ทราบกันดีว่า albumin เป็นที่ยึดเกาะของสารโมเลกุลเล็ก ๆ แต่ในการเพาะเลี้ยงแฮมสเตอร์เอ็มบริโอพบว่า การใช้ macromolecule ที่สังเคราะห์ขึ้นและชื่อว่า polyvinylalcohol (PVA) สามารถส่งเสริมการเจริญได้ดีกว่าBSA (Bavister, 1987) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะใน BSA มีสารอื่น ๆ ปนเปื้อนมา ซึ่งอาจจะมีผลยับยั้งการเจริญของแฮมสเตอร์เอ็มบริโอได้ และนอกจากนี้ PVA ยังมีคุณสมบัติช่วยรักษาความตึงผิว (surface tension) ได้ดีกว่า BSA (Anderson, 1980; Bavister,1981) ดังนั้นในการเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยงแฮมสเตอร์เอ็มบริโอจึงเลือกใช้ PVA(Bavister et al., 1983 ; Kane et al., 1986; Seshagiri and Bavister, 1988)

6. อุณหภูมิ

McKiernan และ Bavister (1990) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของแฮมสเตอร์เอ็มบริโอ โดยเพาะเลี้ยงในน้ำยา HECM-2 ที่อุณหภูมิ 34.5, 36.0, 37.5 และ 39.0°C เปรียบเทียบกันพบว่าที่อุณหภูมิ 37.5°C สามารถส่งเสริมการเจริญของแฮมสเตอร์เอ็มบริโอระยะ 2-เซลล์ไปเป็นบลาสโตซีสได้ดีที่สุด ในขณะที่อุณหภูมิ 34.5°C การเจริญของเอ็มบริโอต่ำมาก แสดงว่าที่อุณหภูมิ 37.5°C เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของปฏิกิริยาต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญ เช่นส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการให้พลังงาน เป็นต้น

7. Oviducal factor

ความต้องการเกี่ยวกับสารอาหารต่าง ๆ รวมถึงสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ส่วนใหญ่ได้ข้อมูลมาจากการศึกษาองค์ประกอบที่เกิดขึ้นในท่อนำไข่และมดลูก แต่ในสัตว์บางชนิด เช่น แฮมสเตอร์ รายละเอียดหรือข้อมูลที่ได้อาจจะยังไม่เพียงพอจะนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงให้เจริญไปอย่างสมบูรณ์ได้ จากปัญหาที่เกิดขึ้นดังกล่าวนี้เอง ทำให้นักวิจัยบางกลุ่มให้แนวคิดการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอในสภาพที่ใกล้เคียงธรรมชาติมากที่สุด ด้วยการเพาะเลี้ยงในท่อนำไข่ที่นำมาเลี้ยงนอกร่างกาย โดยคาดหวังว่าท่อนำไข่อาจจะสร้างสารบางชนิดออกมาและมีความจำเป็นต่อการเจริญของเอ็มบริโอ ดังเช่นการทดลองของ Whittingham(1968) ที่เพาะเลี้ยงเมาซ์เอ็มบริโอระยะ 1-เซลล์ให้เจริญไปเป็นบลาสโตซีสเพิ่มขึ้นได้ในส่วน ampulla ของท่อนำไข่ของหนูเมาซ์ ที่นำออกมาเพาะเลี้ยงนอกร่างกาย

Yodyingyuad (1982) เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของแฮมสเตอร์ในท่อนำไข่ทั้งชิ้นนอกร่างกาย พบว่าสามารถช่วยให้เอ็มบริโอเจริญผ่านระยะ 2-เซลล์ไปเป็นบลาสโตซีสได้

Bavister และ Minami (1988) สามารถเพาะเลี้ยงแฮมสเตอร์เอ็มบริโอให้เจริญผ่านระยะ 2- เซลล์ไปจนถึงระยะ 4-8 เซลล์ ในท่อนำไข่ส่วน ampulla ของหนูเมาซ์ ที่เพาะเลี้ยงนอกร่างกาย

จากรายงานการศึกษาที่กล่าวมา แสดงว่าท่อนำไข่ของหนูเมาซ์บริเวณ ampulla อาจมี activity ในการสร้างและหลั่งสารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของเอ็มบริโอในระยะต้นและไม่จำเพาะต่อเอ็มบริโอของหนูเมาซ์เท่านั้น ส่วนในแฮมสเตอร์ นอกจากบริเวณ ampulla แล้ว บริเวณ isthmus อาจมีส่วนช่วยส่งเสริมการเจริญของเอ็มบริโอด้วย

อย่างไรก็ตาม ถ้าพิจารณาถึงเปอร์เซ็นต์ของการเจริญของแฮมสเตอร์เอ็มบริโอ จะพบว่าเทคนิคดังกล่าวนี้ยังส่งเสริมการเจริญได้ไม่ดีเท่าที่ควร ทำให้วิธีการดังกล่าวไม่ได้รับความนิยมเท่าไรนัก

8. <u>คาร์บอนไดออกไซด์</u> (CO_2)

จากรายงานการศึกษาเท่าที่ผ่านมา พบว่าปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% สามารถส่งเสริมการเจริญของเอ็มบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมส่วนใหญ่ แต่สำหรับในแฮมสเตอร์แล้ว Carney และ Bavister (1987) ; McKiernan และ Bavister (1990) รายงานว่าปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 10% สามารถสนับสนุนการเจริญและการแบ่งตัวของแฮมสเตอร์เอ็มบริโอจากระยะ 2-เซลล์และ 8 -เซลล์ ได้เปอร์เซ็นต์ที่มากกว่าสภาวะที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์เพียง 5% และกล่าวว่าปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์นอกจากจะเป็นแหล่งของคาร์บอนแล้วยังช่วยรักษาระดับความเป็นกรดเป็นด่างภายในเอ็มบริโอให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมการเจริญอีกด้วย

9. <u>ออกซิเจน</u> (O_2)

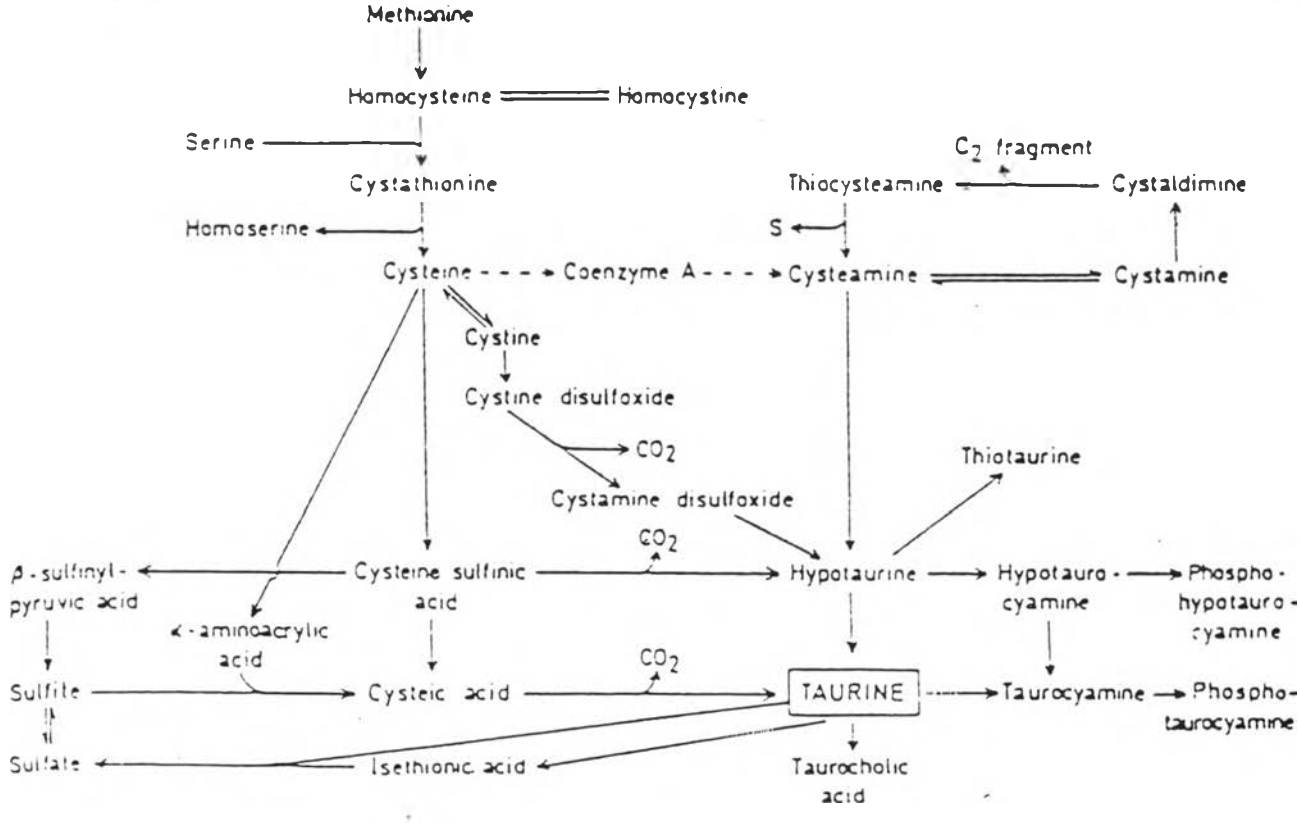
ในเรื่องของการศึกษาเกี่ยวกับปริมาณออกซิเจนต่อการเจริญของเอ็มบริโอ พบว่าเคยมีนักวิจัยหลายท่านได้ให้แนวคิดว่า ในบางสภาวะ ออกซิเจนระดับปกติที่มีอยู่ในอากาศอาจ

เป็นพิษต่อเอ็มบริโอที่เจริญนอกร่างกาย เช่น เอ็มบริโอของหนูเมาซ์บางสายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงจากระยะ 1-เซลล์ ไปถึงระยะบลาสโตซีสต้องการออกซิเจนเพียง 10 % หรือน้อยกว่านั้น (สภาวะปกติโดยทั่วไปใช้ 20%) ซึ่งเหตุผลที่ใช้อธิบายในขณะนั้นยังไม่มีใครทราบ จนกระทั่งในปี 1990 McKiernan และ Bavister ได้พบกรณีดังกล่าวในการเพาะเลี้ยงแฮมสเตอร์เอ็มบริโอเช่นกัน คือ การใช้ปริมาณออกซิเจนเพียง 10% จะให้ผลการเจริญดีกว่า 19% โดยอธิบายว่า การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอในสภาวะที่มีออกซิเจนมาก อาจทำให้เกิดกระบวนการ lipid peroxidation ซึ่งจะส่งผลยับยั้งการเจริญของเอ็มบริโอได้

จากผลการวิจัยดังกล่าวข้างต้น จะเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของแฮมสเตอร์ระยะก่อนการฝังตัวนอกร่างกายนั้น ยังคงมีข้อจำกัดอยู่มาก ทำให้แม้ในปัจจุบันการเพาะเลี้ยงก็ยังไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร เมื่อเปรียบเทียบกับหนูเมาซ์ ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งหาวิธีที่จะพัฒนาการเพาะเลี้ยงให้ดียิ่งขึ้น ด้วยการปรับปรุงองค์ประกอบของน้ำยาที่ใช้เพาะเลี้ยง ซึ่งแนวคิดในการปรับปรุงมีจุดเริ่มต้นมาจากรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการปฏิสนธิในหลอดทดลองของแฮมสเตอร์และกระต่ายว่าการเติมกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์ได้แก่ taurine และ hypotaurine จะช่วยกระตุ้นการเคลื่อนไหวและการช่วยให้สเปิร์มมีชีวิตรอดได้ยาวนานขึ้นจนสามารถเข้าไปผสมกับไข่ได้ และนอกจากนี้ยังพบอีกว่ายังสามารถส่งเสริม capacitation and acrosome reaction อีกด้วย (Mrsny et al., 1979 ; Meizel et al., 1980 ; Liebfried and Bavister, 1981; Alvarez and Storey, 1983) คณะนักวิจัยจึงได้ลงความเห็นร่วมกันว่ากรดอะมิโน taurine และhypotaurine เป็น sperm motility factor (SMF) ส่วนรายงานการศึกษาแหล่งที่มาของ taurine และ hypotaurine ที่นำมาใช้เป็น SMF นั้นในระยะแรกได้มาจากการสกัดต่อมหมวกไตส่วนนอก (adrenal cortex) แต่จากการศึกษาเพิ่มเติมพบว่ายังสามารถพบได้ในระบบสืบพันธุ์เพศผู้ เช่น ใน seminal plasma และ epididymal fluid ของหมูและภายในส่วนที่เป็น acrosome ของสเปิร์มหมู, หนูตะเภา, แฮมสเตอร์และคนเป็นต้น (Meizel et al., 1980) และยังได้กล่าวถึงความน่าจะเป็นไปได้ถึงผลในการเป็น SMF ว่าสาร SMF ทั้ง 2 ชนิดนี้ อาจไปรวมตัวกับ receptor ที่ผนังเซลล์ของสเปิร์ม ทำให้ permeabitity ของผนังเซลล์เพิ่มขึ้น จนทำให้อิออนต่าง ๆ โดยเฉพาะ Ca^{2+} จะเข้าเซลล์เพิ่มขึ้นและมีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและอาจจะเป็นตัวยับยั้งความเป็นพิษอันเนื่องมาจากสารพิษที่เกิดจากกระบวนการ lipid peroxidation แต่ในขณะเดียวกัน Meizel และคณะ(1980)

ก็ได้ข้อมูลที่น่าสนใจเรื่องหนึ่งคือ พบ taurine และ hypotaurine ในของเหลวของระบบสืบพันธุ์เพศเมียได้แก่ ท่อนำไข่บริเวณ ampulla และมดลูกของร่างกาย, ท่อนำไข่ของลิง และแม้กระทั่งของเหลวใน follicle ของวัว ในปริมาณที่ค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนชนิดอื่น ๆ และกล่าวว่า taurine และ hypotaurine อาจมีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มแต่ในเวลาเดียวกันก็น่าจะมีผลต่อการเจริญและการแบ่งตัวของเอ็มบริโอด้วย ซึ่งก็มีรายงานบางฉบับที่สนับสนุนคำพูดดังกล่าวด้วย เป็นรายงานการตรวจพบกรดอะมิโน taurine ในของเหลวในระบบสืบพันธุ์เพศเมียตั้งแต่ระยะที่ตกไข่จนถึงระยะที่เป็นบลาสโตซีสในปริมาณที่ค่อนข้างสูง (Schultz et al., 1981) จนถึงปัจจุบัน ยังไม่มีการศึกษาที่บ่งชี้อย่างแน่ชัดว่า กรดอะมิโน taurine และ hypotaurine ที่ตรวจพบในระบบสืบพันธุ์เพศเมีย มีผลต่อการเจริญและการแบ่งตัวของเอ็มบริโอหรือไม่ จึงน่าสนใจที่จะตรวจสอบและหาข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับกรดอะมิโน 2 ชนิดนี้ เพื่อนำมาทดลองใช้ในการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอของแฮมสเตอร์ ซึ่งกำลังประสบปัญหาในขณะนี้ว่าจะช่วยส่งเสริมการเจริญบ้างหรือไม่ แม้จะยังไม่มีการตรวจวิเคราะห์ว่าพบสารนี้ในของเหลวในระบบสืบพันธุ์ของแฮมสเตอร์เพศเมียก็ตาม

จากการศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับ taurine และ hypotaurine พบว่ากรดอะมิโนทั้ง 2 ชนิดนี้ เป็นสารประกอบที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ มีสมบัติละลายน้ำได้ดี นอกจากนี้ยังพบว่า hypotaurine เป็นสารตั้งต้น (precursor) ของ taurine และกรดอะมิโนทั้ง 2 นี้ยังเกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของเมทไธโอนีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์และจำเป็นต่อร่างกายด้วย ดังแสดงในรูปที่ 1.4



รูปที่ 1.4 แสดง metabolic pathways ที่สัมพันธ์กับ taurine และ hypotaurine

(Jacobsen and Smith , 1968)

จากรายงานการศึกษา พบ taurine ทั้งในพืช สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง สัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่น ปลา สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ สัตว์ปีก สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม เช่น คน กระต่าย หนูเมาซ์ หนูแรท หนูตะเภา สุนัข แมว หมู วัว และแกะ เป็นต้น ส่วน hypotaurine มีรายงานว่าพบแต่ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังเท่านั้น แต่อย่างไรก็ตาม Jacobsen และ Smith(1968) กล่าวว่าทั้ง taurine และ hypotaurine สามารถพบได้ในปริมาณที่แตกต่างกันไปตามชนิดของสัตว์และชนิดของเนื้อเยื่อ

ส่วนบทบาทหรือหน้าที่ของ taurine และ hypotaurine จากหลักฐานเท่าที่มีพบว่าจะแตกต่างกันตามชนิดของสัตว์ ดังเช่นรายงานการศึกษาของ Krogh ในปี 1939 ว่าพบกรดอะมิโน taurine ในปริมาณที่ค่อนข้างสูงในสัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลังใน Phylum Mollusca genus Mytilus, Pecten และ Sepia และเสนอแนะว่า taurine ช่วยควบคุม osmotic pressure นอกจากนี้ยังพบอีกว่า taurine และ hypotaurine เป็นแหล่งพลังงาน (Ennor and Morrison,1958), ยับยั้งการ transmission ของกระแสประสาทส่วนกลาง (Curtis and Watkins, 1960), conjugate กับ bile acid เพื่อทำหน้าที่เกี่ยวกับการดูดซึมไขมันในลำไส้ (Danielsson, 1963) และบทบาทการป้องกันความเสียหายของเมมเบรน (membrane protection) ซึ่งเป็นบทบาทที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการศึกษาในครั้งนี้ด้วย เช่นรายงานการศึกษาของ Hayes และคณะ (1975) ที่แสดงให้เห็นว่า ในแมวที่ขาด taurine จะมีความผิดปกติเกิดขึ้นที่เมมเบรนของ photorecepter cell จนทำให้แมวสูญเสียความสามารถในการมองเห็นไปบางส่วน และถ้ารุนแรงมากอาจทำให้แมวนั้นถึงกับตาบอดได้ ซึ่งคณะนักวิจัยได้อธิบายว่า ในแมว taurine มีความสำคัญมากแต่สำหรับในสัตว์ชนิดอื่น พบว่าการขาด taurine อาจเกิดผลเสียบ้างแต่ก็ไม่รุนแรงเหมือนกับในแมว

Jacobsen และ Smith (1968)ได้อ้างถึงรายงานการศึกษาที่ว่า taurine สามารถป้องกันความเสียหายของเมมเบรนชั้นนอกของ rod cell ที่แยกออกมาจาก retina ของกบที่ถูก lluminant และ oxidants นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นว่า retinol และ retinic acid ที่เติมลงในน้ำยาที่ใช้เพาะเลี้ยง lymphoblastoid cells ของคน จะไปลดความสามารถในการอยู่รอดของเซลล์ และจะมีผลมากน้อยตามปริมาณและเวลาที่เพิ่มขึ้นด้วย แต่ถ้าเติม taurine ลงไป การอยู่รอดสามารถเพิ่มขึ้นได้ และนอกจากนี้ยังพบอีกว่าจากการวิเคราะห์ปริมาณ taurine

ใน lymphoblastoid cells ของคน พบว่ามีถึง 60% ของกรดอะมิโนทั้งหมด ดังนั้นการเพาะเลี้ยง lymphoblastoid cells ในน้ำยาที่ไม่เติม taurine lymphoblastoid cells สามารถเจริญต่อไปได้ แต่ก็เจริญได้เพียงระยะหนึ่งเท่านั้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ taurine ภายในเซลล์อาจไม่เพียงพอกับการเจริญ

Alvarez และ Storey(1983) รายงานว่า taurine ทำหน้าที่เป็น antioxidant ในสเปิร์มของกระต่าย ด้วยการลดปฏิกิริยา lipid peroxidation ที่เกิดขึ้นทั้งที่เซลล์เมมเบรนและไซโตพลาสซึม

Nakashima และคณะ (1983) พบว่า taurine สามารถป้องกันความเสียหายของเมมเบรนของเซลล์ตับ จากความเป็นพิษของคาร์บอนเตตระคลอไรด์(CCl_4)

จากรายงานการศึกษาข้างต้นเกี่ยวกับบทบาทของ taurine ในการเป็น membrane protector คณะนักวิจัยได้เสนอแนะความน่าจะเป็นไปได้ว่า taurine จะช่วย stabilize เมมเบรนที่เสียหายจากการทำลายของสารพิษที่เกิดขึ้นในเซลล์ เช่น lipid peroxide ที่เกิดจากปฏิกิริยา lipid peroxidation

มีรายงานการศึกษาว่า พบ taurine และ hypotaurine ในระบบสืบพันธุ์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมเพศเมียหลายชนิด เช่น ท่อนำไข่บริเวณ ampulla และมดลูกของกระต่าย, ท่อนำไข่ของลิง(Meizel et al.,1980),ของเหลวในระบบสืบพันธุ์เพศเมียของหนูเมาซ์ ตั้งแต่ระยะเป็นไข่จนถึงระยะที่เป็นบลาสโตซีสและสันนิษฐานว่า taurine และ hypotaurine น่าจะมีผลต่อการเจริญของเอ็มบริโอ แต่ในขณะนั้นก็ยังไม่มีหลักฐานหรือรายงานการศึกษาถึงผลในการส่งเสริมการเจริญของเอ็มบริโอในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม จนกระทั่งในปี 1992 Reed และคณะรายงานว่า taurine และ hypotaurine สามารถส่งเสริมการเจริญของเอ็มบริโอของสุกรระยะ 1-2 เซลล์ไปเป็นบลาสโตซีสได้ แต่ยังไม่พบรายงานว่ามีกรดอะมิโนทั้ง 2 ชนิดนี้ ในท่อนำไข่และมดลูก ซึ่งจากผลการทดลองเขาก็ได้เสนอแนวคิดว่าอาจเป็นไปได้ว่ากรดอะมิโน taurine และ hypotaurine อาจไปมีผลต่อขั้นตอนการเจริญของเอ็มบริโอโดยตรงหรืออาจจะมีส่วนช่วยป้องกันเอ็มบริโอจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ป้องกันการเกิด lipid peroxidation

เหมือนกับบทบาทในการส่งเสริมการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เป็นต้น

ส่วนในแฮมเตอร์ก็มีการศึกษาเช่นกัน โดย Schini และ Bavister(1988) ได้ทดลองเติมกรดอะมิโน taurine เข้มข้น 1.0 mM ลงในน้ำยาเพาะเลี้ยงแฮมเตอร์เอ็มบริโอระยะ 2-เซลล์ไปเป็นระยะ 8-เซลล์ แต่จากหลักฐานเท่าที่มีพบว่ายังไม่มีนักวิจัยท่านใดยืนยันว่า taurine จำเป็นต่อการเจริญของแฮมสเตอร์เอ็มบริโอระยะต้นจริง แต่ที่มีการเติมลงไปในน้ำยาเพาะเลี้ยงเป็นเพราะจากรายงานการศึกษาเบื้องต้น พบว่า taurine สามารถเพิ่มการปฏิสนธิของไข่แฮมสเตอร์นอกร่างกาย ทำให้มีการสันนิษฐานว่า taurine อาจจะส่งเสริมการเจริญของเอ็มบริโอด้วย และในปี 1992 Barnette และคณะ พบว่ากรดอะมิโน hypotaurine ความเข้มข้น 1.0 mM ส่งเสริมการเจริญของแฮมสเตอร์เอ็มบริโอที่เกิดจากการปฏิสนธิภายนอกร่างกายให้เจริญไปเป็นมอรูลาและบลาสโตซีสเท่ากับ 14.1% และกล่าวว่าการเจริญของแฮมเตอร์เอ็มบริโอในช่วงต้นของระยะก่อนการฝังตัวคือระยะ 2 - เซลล์จนถึงระยะ 8-เซลล์อาศัย hypotaurine ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงทำการทดลองเพื่อศึกษาผลของ taurine และ hypotaurine ต่อการส่งเสริมการเจริญของแฮมสเตอร์เอ็มบริโอและศึกษาปริมาณที่พอเหมาะ (optimum dose) ของ taurine และ hypotaurine ในน้ำยาเพาะเลี้ยงสำหรับส่งเสริมการเจริญนอกร่างกายของแฮมสเตอร์เอ็มบริโอระยะ 8 -เซลล์ ไปเป็นบลาสโตซีสและผลต่อ เนื่องเมื่อถ่ายฝากบลาสโตซีสที่ได้เข้าสู่มดลูกของตัวรับที่เหมาะสม โดยดูจากของเอ็มบริโอที่เข้าฝังตัวที่ผนังมดลูกและลูกที่เจริญถึงระยะคลอด เปรียบเทียบกับการถ่ายฝากเอ็มบริโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในน้ำยาที่ไม่เติม taurine และ/หรือ hypotaurine

<u>การถ่ายฝากเอ็มบริโอ</u> (Embryo transfer)

เทคนิคการถ่ายฝากเอ็มบริโอระยะก่อนการฝังตัวในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมจากแม่หนึ่งไปยังอีกแม่หนึ่งเป็นวิธีการหนึ่งที่จะใช้ทดสอบว่าเอ็มบริโอที่ได้จากการปฏิสนธิหรือการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอภายนอกร่างกาย สามารถที่จะมีชีวิตรอดอยู่ต่อไปได้มากน้อยเพียงใด เมื่อเข้าสู่ตัวรับที่เหมาะสม การถ่ายฝากเอ็มบริโอสามารถทำได้เป็นผลสำเร็จแล้วในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลายชนิด เช่น กระต่าย (Heape, 1890), หนูเมาส์ (Fekete and Little, 1942), หนูแรท (Nicolas,1933; Noyes and Dickmann, 1960), แพะ (Warwick and Berry, 1949)

แฮมสเตอร์ (Sato and Yanagimachi, 1972 ; Yodyinyuad, 1982) และลิง (Wolf et al., 1989) เป็นต้น ซึ่งกว่าจะประสบความสำเร็จนั้น คณะนักวิจัยดังกล่าวได้ชี้ให้เห็นว่ามีปัจจัยหลายอย่างที่มีความสำคัญต่อการถ่ายฝากให้เป็นผลสำเร็จ ได้แก่

1. ความสอดคล้องระหว่างอายุของเอ็มบริโอกับความพร้อมของตัวรับที่ตั้งท้องเทียมและแตกต่างไปตามสปีชีส์ของสัตว์ด้วย เพราะเอ็มบริโอของสัตว์แต่ละชนิดมีเมตาบอลิซึมที่แตกต่างกัน ดังนั้นช่วงเวลาในการถ่ายฝากจึงไม่เหมือนกัน เช่น ในหนูเมาซ์ พบว่าการถ่ายฝากเอ็มบริโออายุ 3 1/2 วัน ไปยังมดลูกหนูเมาซ์ที่ตั้งท้องเทียมอายุ 2 1/2 วัน จะให้ผลการอยู่รอดดีที่สุด (Mclaren and Michie, 1956) ในหนูแรท Noyes และ Dickmann (1960, 1961) รายงานพบว่าการถ่ายฝากเอ็มบริโอสู่ตัวรับที่ตั้งท้องเทียมอายุน้อยกว่าจะให้ผลดีที่สุด เช่น การถ่ายฝากเอ็มบริโอที่อายุ 5 วัน เข้าสู่มดลูกตัวที่อายุ 4 วัน

สำหรับในแฮมสเตอร์ Chang และ Rickworth (1969) พบว่าการถ่ายฝากเอ็มบริโออายุ 4 วัน เข้าสู่มดลูกตัวรับที่ตั้งท้องเทียมอายุ 4 วัน ได้ผลการอยู่รอดดีกว่าการถ่ายฝากเอ็มบริโอที่อายุ 4 วัน เข้าสู่มดลูกตัวรับที่อายุเพียง 3 วัน และการถ่ายฝากเอ็มบริโอในระยะบลาสโตซีสได้ผลดีกว่าการถ่ายฝากเอ็มบริโอระยะ 1-2 และ 4-8 เซลล์

2. ตำแหน่งของการถ่ายฝากเอ็มบริโอ ก็จัดว่าเป็นองค์ประกอบหนึ่งที่สำคัญต่อการถ่ายฝากให้เป็นผลสำเร็จ ซึ่งถ้าพิจารณาถึงหลักความเป็นจริงแล้วสภาพปกติของการเจริญของเอ็มบริโอภายในร่างกายนั้น เอ็มบริโอในระยะแรก ๆ ของการแบ่งตัวจะอยู่ในท่อนำไข่และระยะท้าย ๆ ดังเช่น มอรูลาและบลาสโตซีส อยู่ในมดลูก ซึ่งในสัตว์ลูกด้วยน้ำนมหลายชนิดการถ่ายฝากเอ็มบริโอก็อาศัยหลักดังกล่าวและได้ผลดี แต่การถ่ายฝากเอ็มบริโอเข้าสู่บริเวณที่ต่างจากแนวคิดดังกล่าวอาจให้ผลสำเร็จได้เช่นกัน เช่น ในหนูเมาซ์สามารถถ่ายฝากเอ็มบริโอทุกระยะก่อนการฝังตัวเข้าสู่ภายในท่อนำไข่ได้ สำหรับในแฮมสเตอร์ การนำเอ็มบริโอระยะ 4 -เซลล์ถึงระยะบลาสโตซีสถ่ายฝากไปยังมดลูกตัวรับจะสามารถตั้งท้องได้สูงถึง 82% และสามารถคลอดลูกได้เป็นปกติ 29.6 % - 57.5% (Sato and Yanagimachi, 1972)

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่คณะผู้วิจัยได้กล่าวถึงและมีความสำคัญไม่น้อยไปกว่าความ

สอดคล้องระหว่างตัวรับและตัวให้เอ็มบริโอและตำแหน่งของการถ่ายฝากนั้น เช่น ระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอภายนอกร่างกายไว้นาน ๆ ก็มีผลต่อการแบ่งตัวและมีชีวิตรอดของเอ็มบริโอหลังการถ่ายฝาก นอกจากนี้เทคนิคบางอย่างในการย้ายฝากคลอดจนความชำนาญและความรวดเร็วในการทำงานของผู้ทำการทดลองก็เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายฝากให้เป็นผลสำเร็จด้วย (Yodyingyuad, 1982)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของการเติม taurine และ hypotaurine ต่อการเจริญของแฮมสเตอร์เอ็มบริโอ

2. เพื่อศึกษาหาปริมาณที่พอเหมาะของ taurine และ hypotaurine และศึกษาผลของการเติมกรดอะมิโนทั้ง 2 ชนิดรวมกัน ในการส่งเสริมการเจริญภายนอกร่างกายของแฮมสเตอร์เอ็มบริโอระยะ 8 -เซลล์ไปเป็นบลาสโตซีส

3. เพื่อศึกษาผลต่อเนื่องเมื่อถ่ายฝากบลาสโตซีส เข้าสู่มดลูกของตัวรับที่เหมาะสม เปรียบเทียบกับการถ่ายฝากเอ็มบริโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในน้ำยาที่ไม่เติม taurine และ/หรือ hypotaurine

ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย

1. ปรับปรุงน้ำยาเพาะเลี้ยงที่สามารถสนับสนุนการเจริญของเอ็มบริโอระยะก่อนการฝังตัวภายนอกร่างกาย

2. ได้เอ็มบริโอระยะก่อนการฝังตัวที่มีคุณภาพ จากการเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยง ซึ่งอาจประยุกต์ใช้กับเอ็มบริโอของสัตว์ชนิดอื่น รวมทั้งคนด้วย