นิพนธ์ต้นฉบับ

การเลี้ยงตัวอ่อนของหนูในจานทดลอง

ประมวล วีรุตมเสน* เย็นจิต จันทร์ประสิทธิ์*
วิสุทธ์ บุญเกษมสันติ* วิทยา ยศยิ่งยวด**

Virutamasen P. Boonkasemsanti W, Chandraprasit Y, Yosyingyuad V. Cultivation of fertilized mouse ova in vitro. Chula Med J 1986 Sep; 30(9) : 875-882

The 2-cell or 4-cell zygotes of eighty nine female mice were identified under dissecting microscope. Fertilized mouse ova at 2-cell stage were immediately collected and placed in Ham's F-10 culture media which contained either 15% bovine serum albumin or fetal cord serum. The culture media were gassed for a minimum of 5 minutes with humidified 5% O_2 : 5% CO_2 : 90% N_2. The whole process was performed under a sterilized laminar flow hood. The Falcon petri-dishes containing fertillized ova, were then further incubated at 37° celcius in a constant stream of humidified 5% O_2 : 5% CO_2 : 90% N_2. The development of the oocytes were periodically observed over 3-4 days. It was found that at 24 hours after incubation, 83% of oocytes developed to the 4 to 8-cell stage. Morula and blastocysts first appeared at 42 hours of culture. About 38% of the 2-cell stage of fertilized ova developed to blastocysts after 72 hours of incubation.

*ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
**คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเลี้ยงตัวอ่อนที่ระยะ 2-เซลล์ในหลอดทดลองที่ได้จากการผสมในหลอดมดลูกของหนู mice ได้มีการศึกษาและวิจัยกันอย่างกว้างขวาง มีการพัฒนาทางด้านน้ำเลี้ยงตัวอ่อน (Culture medium) การเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่าง (pH) สัดส่วนของโปรตีนที่ใช้ผสม ซึ่งโปรตีนดังกล่าวอาจจะใช้ Bovine serum albumin (BSA), fetal cord serum (FCoS)[1,2,3] ความสำเร็จดังกล่าวได้นำมาประยุกต์ใช้เพื่อเป็นดัชนีชี้บ่งทางด้านควบคุมคุณภาพในการเตรียมอุปกรณ์เครื่องใช้ การเตรียมน้ำยาส่วนประกอบของโปรตีน ตลอดจนความเป็นกรด-ด่างของน้ำยาที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการผสมของไข่กับตัวอสุจิ ตลอดจนการเลี้ยงตัวอ่อนในคน[4,5] ในสถาบันที่สามารถผสมไข่และตัวอสุจิของคนและเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดทดลองไปได้ถึง 4 เซลล์ หรือมากกว่าก่อนที่จะนำใส่กลับเข้าสู่โพรงมดลูกนั้น จะต้องสามารถเลี้ยงตัวอ่อนในหนูจาก 2 เซลล์ไปถึง blastocyst ให้ได้อย่างน้อยร้อยละ 70 จึงจะนับได้ว่า อุปกรณ์เครื่องใช้ เตรียมน้ำเชื้อ ตลอดจนสภาพแวดล้อมอื่น ๆ มีความเหมาะสมพอที่จะนำไปประยุกต์ใช้ต่อในการเลี้ยงตัวอ่อนของคน[6,7] วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อหาข้อมูลพื้นฐานการเตรียมน้ำเลี้ยงตัวอ่อน การเลือกใช้โปรตีน การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่างของน้ำยาที่เตรียม ตลอดจนสภาพแวดล้อมของการดำเนินการทดลอง ซึ่งเพิ่งเริ่มกระทำเป็นครั้งแรก

สัตว์ทดลองและวิธีการ

ใช้หนู mice เพศเมียสีขาวเป็นพันธุ์ผสมชนิด Swiss Albino ที่มีอยู่ในศูนย์เลี้ยงสัตว์ทดลองของคณะแพทยศาสตร์ อายุระหว่าง 8-16 สัปดาห์ น้ำหนักตัวระหว่าง 20-25 กรัม เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูป (เอ็ฟอีซีลิก) และน้ำตลอดเวลา ในอุณหภูมิห้องตามฤดูกาล โดยใช้แสงสว่างตามธรรมชาติซึ่งอยู่ในกรงรวม 6-10 ตัว ก่อนจะทำการทดลองชักนำให้หนูเพศเมียดังกล่าวตกไข่โดยฉีด Pregnant Mare Serum Gonadotropins (PMSG, Sigma Chemical Comp. U.S.A.) ซึ่งละลายในน้ำเกลือ 0.1-0.2 มล. เข้าช่องท้องตัวละ 10 ยูนิต ในระหว่างเวลา 16.00-17.00 น. 48 ชั่วโมงต่อมาฉีด Human Chorionic Gonadotropins (hCG) (Ayerst, Laboratory N.Y.) เข้าช่องท้องตัวละ 5-10 ยูนิต (0.1-0.2 มล.) ในช่วงเวลา 16.00-17.00 น. แล้วแยกกรงผสมกับหนูเพศผู้พันธุ์ Swiss albino (เป็นพันธุ์ผสม) ทันที 24 ชั่วโมงหลังผสมดู "Vaginal plug" ถ้าพบแสดงว่ามีการผสม 42-46 ชั่วโมงหลังผสมจะทำให้หนูตายโดยวิธี "cervical dislocation" ทำความสะอาดหน้าท้องหนูด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 70 ผ่าท้องหนูด้วยกรรไกและอุปกรณ์ผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ แล้วตัดแยกหลอดมดลูกทั้ง 2 ข้าง นำใส่จานพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Nunclon, Nunc Intermed, Denmark) ซึ่งมีน้ำยา Ham's F-10 ที่ผสมแล้ว 1 มล. นำหลอดมดลูกที่อยู่ในน้ำยาดูด้วยกล้องขยายชนิด dissecting (Olympus, Tokyo) โดยใช้กำลังขยาย 15-20 เท่า ไล่ไข่ออกจากหลอดมดลูกโดยฉีดน้ำยา Ham's F-10 ผ่านทาง fimbria โดยใช้หัวเข็มขนาด 30 เมื่อได้ไข่ที่อยู่ในระยะ 2 เซลล์หรือ 4 เซลล์แล้วแยกไข่โดยใช้หลอดแก้วที่ลนไฟให้เรียวเล็ก แล้วดูดแยกไข่เพื่อไปใส่จานพลาสติกที่สะอาด และปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ (Falcon 3037) ที่มีน้ำยา Ham's F-10 รวมกับ BSA (BSA : Reagent Batch 8310, WHO BIA Reagent program) หรือ FCoS ในความเข้มข้นร้อยละ 15 นำ oocytes ที่ได้ซึ่งอาจจะอยู่ในระยะ 2 เซลล์ หรือ 4 เซลล์ ไปเลี้ยงในตู้อบที่มีความชื้นอากาศร้อยละ 100 ปรับอุณหภูมิระหว่าง 37 $\pm$ 0.2 องศาเซลเซียสมีแกส CO_2 และ N_2 ไหลผ่านและปรับให้แกสในตู้อบมีส่วนประกอบดังนี้ N_2

90% CO_2 5% และ O_2 5% จากนั้นจะดูการเจริญเติบโตของไข่ที่ผสมแล้วด้วย "Inverted microscope" (Olympus Tokyo) มีกำลังขยาย 200 เท่า ทุก 12-24 ชั่วโมง บันทึกจำนวนการเปลี่ยนแปลงของไข่จนถึงระยะ blastocyst และ "Hatching blastocyst" ซึ่งจะใช้เวลา 3-4 วัน หลังเริ่มเลี้ยง

การเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อ Ham's F-10 นำ Ham's F-10 (Gibco, Grand Island N.Y.) ซึ่งเป็นผงสำเร็จรูปและมี Glutamine ปนอยู่แล้ว หนัก 9.81 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน (ion) (deionized water) 100 มล. รวมกับเพนนิซิลลิน 75 มก. และสเตร็ปโตมัยซิน 75 มก. เขย่าให้เข้ากันดีแล้วเติม Ca-Lactate 1.5 H_2O 245.2 มก.แล้ว แล้วเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้ได้ 800 มล. ละลาย $NaHCO_3$ 2.106 กรัมลงในน้ำกลั่น 100 มล. นำสารละลายนี้รวมกับสารละลายที่เตรียมไว้เติมคนให้เข้ากันดีแล้วเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้ได้ 1000 มล. ตลอดเวลาการเตรียมต้องทำใน Laminar flow hood นำสารละลายที่ได้ไปวัด osmolarity และปรับให้ได้ 385 ± 5 มิลลิออสโมล นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ผ่านแกสผสม N_2 90% CO_2 5% และ O_2 5% ประมาณ 10 นาที จากนั้นนำมาปรับความเป็นกรด-ด่างด้วย IN. NaOH หรือ IN. HCI เพื่อให้ได้ความเป็นกรดด่าง ประมาณ 7.3-7.6 แล้วนำไปกรองที่มีแผ่นกรองเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.22 ไมครอน (Millipore filter, Millex-GV, Millipore, (UK), Limited) นำเข้าเลี้ยงใส่ใน tissue culture flask (Falcon, Becton-Dickinson U.S.A.) เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 4 สัปดาห์ เมื่อจะใช้น้ำเลี้ยงเชื้อมาผสมกับ BSA หรือ FCoS ถ้าเตรียมน้ำเลี้ยงเชื้อสำหรับไล่ไข่จากหลอดมดลูกจะใช้ BSA หรือ FCoS ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 7.5 แต่น้ำเลี้ยงเชื้อที่ใช้เลี้ยงตัวอ่อนใช้ความเข้มข้นร้อยละ 15 ทั้ง BSA และ FCoS จะต้องผ่านการกรองด้วย millipore filter แล้ว

น้ำกลั่นที่ปราศจากไอออนเตรียมได้โดยกลั่นน้ำ 1 ครั้ง แล้วผ่านเครื่องกรอง milli-Q Reagent Grade Water System (Millipors Continental Water System U.S.A.) จะได้น้ำมีความบริสุทธิ์ปราศจากไอออน (deionized water) ซึ่งน้ำบริสุทธิ์นี้ได้จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

FCoS ได้จากเลือดที่สายสะดือของเด็กแรกคลอดที่มาคลอดปกติ ไม่ติดเชื้อ ไม่มีโรคเลือด หรือโรคทางกรรมพันธุ์ นำเลือดที่ได้ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3-5 ชั่วโมง แล้วปั่นแยกเอาเซรั่มออก นำไปใส่ตู้อบที่ 56 องศาเซลเซียส แล้วกรองผ่าน Millipore filter ขนาด 0.4 และ 0.22 ไมครอน ตามลำดับ นำเซรั่มที่ได้นี้เก็บไว้ที่ ลบ 10-20 องศาเซลเซียส

อุปกรณ์เครื่องแก้ว และเครื่องมือผ่าตัดหนู ทำความสะอาดโดย แช่ใน 3% 7x 24 ชั่วโมง แล้วนำมาล้างด้วยน้ำประปา จากนั้นนำไปแช่ในน้ำยา 7x 2% 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปต้มแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจาก ion แล้วแช่ไว้ 24 ชั่วโมง แล้วนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออนอีก 2-3 ครั้ง ทำให้แห้งทันที จากนั้นจึงนำไปฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

ในช่วง 6 เดือนแรกของการทดลองได้ใช้หนู mice จากศูนย์สัตว์ทดลองของคณะแพทย์ จากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และจากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล หนู mice ทั้งหมดเป็น Swiss albino พันธุ์ผสม พบว่า ประสบความล้มเหลวเป็นส่วนมาก กล่าวคือ หนูไม่ตอบสนองต่อการชักนำให้ตกไข่ หนูไม่ผสมพันธุ์กัน oocyte ที่ได้ไม่สมบูรณ์ หรือนำมาเลี้ยงแล้ว การเจริญเติบโตถึง 4 เซลล์ หรือ ระยะ 8 เซลล์ เท่านั้น จึงได้ทดลองใช้หนู mice จากกองวิทยาศาสตร์ สภากาชาดไทย ซึ่งเป็นพันธุ์ Swiss albino มีลักษณะ

สมบูรณ์, พันธุ์ผสม (ไม่ใช่ Hybrid) พบว่า ได้ผลดีกว่าและสะดวกจึงได้เลือกมาทำการศึกษา

ผลการศึกษา

ในช่วงแรกของการศึกษาได้ทำการเปรียบเทียบน้ำเลี้ยงของ Ham's F-10 กับน้ำเลี้ยงของ Whitten's ที่ดัดแปลงจากน้ำยาของ Hoppe และ Pitt[6] โดยใส่ BSA ให้มีความเข้มข้นร้อยละ 15 พบว่าตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ (N = 56) ในน้ำเลี้ยง Ham's F-10 เจริญไปเป็นระยะ 8 เซลล์ (21/56) ได้ร้อยละ 39 ในช่วง 24 ชั่วโมง แต่ในน้ำเลี้ยง Whitten เจริญไปได้เพียงร้อยละ 25 (15 ใน 60) ต่อมาได้เปรียบเทียบระหว่าง BSA กับ FCoS ในน้ำเลี้ยง Ham's F-10 ในความเข้มข้นร้อยละ 15 ร้อยละ 60 ของตัวอ่อนจาก 2 เซลล์ (n = 75) เจริญเติบโตไปเป็น 8 เซลล์ ในน้ำเลี้ยงที่มี FCoS ส่วนที่ตัวอ่อนด้วย BSA (n = 72) มีร้อยละ 35 ที่เจริญเติบโตไปเป็น 8 เซลล์ ในช่วงเวลาเดียวกัน จึงได้เลือกใช้ Ham's F-10 เป็นน้ำเลี้ยง

หนูเพศเมียที่นำมาทดลอง 163 ตัว ได้ไข่ที่อยู่ในระยะ 2 เซลล์ 89 ตัว รวมได้ไข่ที่มาทำการศึกษา 791 ใบ อยู่ในระยะ 4 เซลล์ 57 ใบ และใน 8 เซลล์ 45 ใบ (ตารางที่ 1) การเลี้ยงตัวอ่อนจาก 2 เซลล์ด้วยน้ำเลี้ยง Ham's F-10 พบว่า 24 ชั่วโมงหลังเลี้ยงในตู้อบ ร้อยละ 83 เจริญเติบโตไปเป็นระยะ 3-4 เซลล์ จะพบตัวอ่อนที่มีลักษณะเป็น morula ในช่วงเวลา 42-48 ชั่วโมงหลังเริ่มเลี้ยง อีกประมาณ 12 ชั่วโมงต่อมาจะเริ่มพบ blastocyst ซึ่งกลุ่มเซลล์มีลักษระบวมน้ำ มีเซลล์ล้อมรอบจะเห็น inner cell mass ได้ชัดเจน ตามรูป (A,B, C,D) ประมาณ 12-24 ชั่วโมง blastocyst จะแตกออกเป็นระยะที่เรียกว่า "Hatching stage" ซึ่งเชื่อว่าเป็นระยะเริ่มแรกที่ตัวอ่อนจะฝังตัวเข้ากับผนังมดลูก จากการเลี้ยงตัวอ่อนทั้งระยะ 2 เซลล์ 4 เซลล์ และ 8 เซลล์ รวม 791 ใบ เจริญเติบโตถึงระยะ blastocyst และ Hatching stage 299 ใบ คิดเป็นร้อยละ 37.8 เมื่อติดตามดูครบ 72 ชั่วโมง

Table 1 Number of fertilized and non-fertilized mice for cultivating oocytes in vitro (N = 163) after inducing vulation with PMSG and hCG

	number of mice	result (%)
No response to induction	41	25.15
No fertilization	33	20.3
Fertilized mice	89	54.55
2-cell stage	79	-
4-cell stage	6	-
8-cell stage	4	-

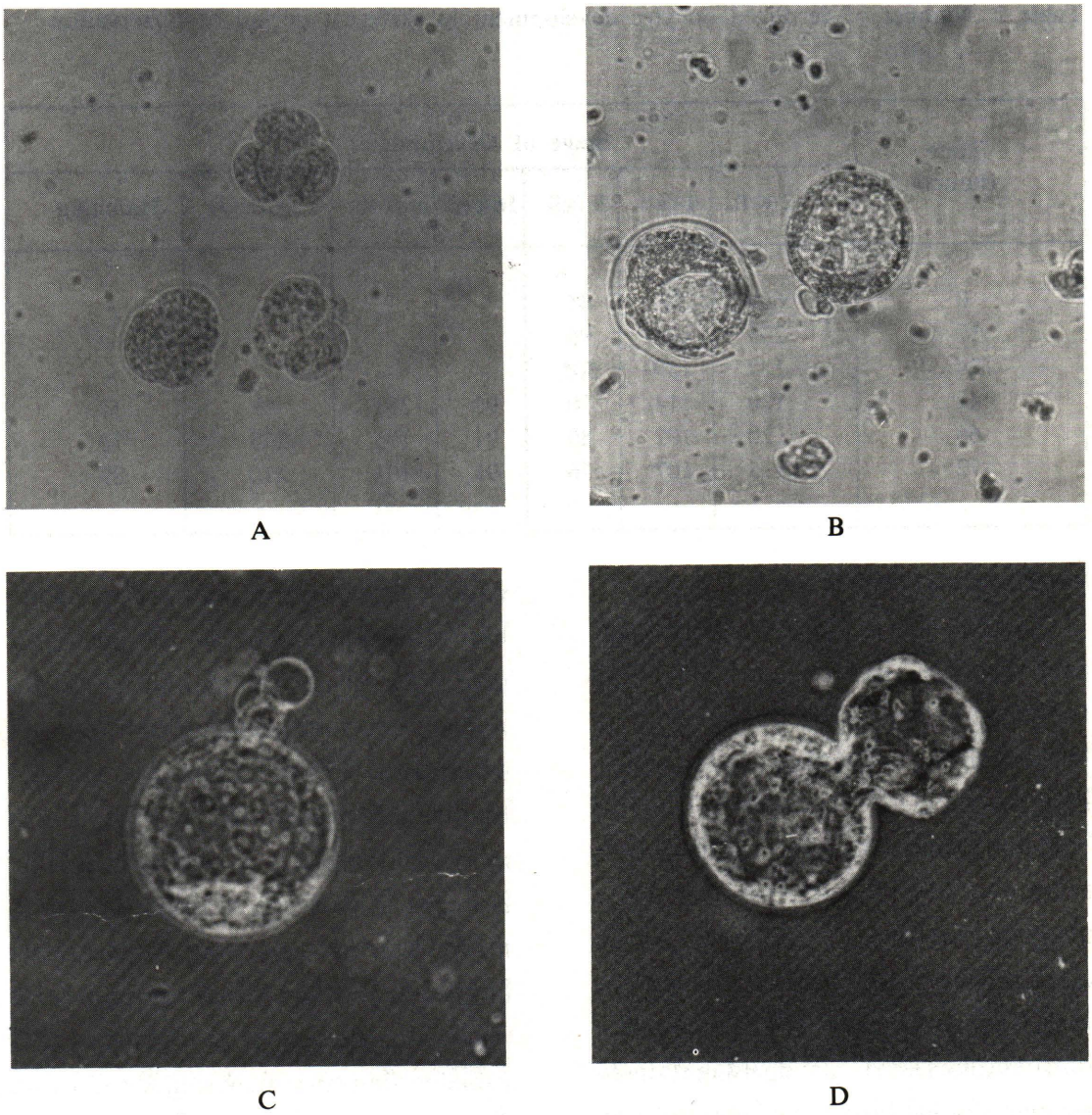

Figure Photographs of fresh mouse embryos
A. Two-cell and three-cell embryo
B. Blastocyst
C. Hatching blastocyst (early)
D. Hatching blastocyst

Table 2 Number of fertilized oocytes development in different period of observation in vitro.

Time (hours)	Stage of Development						
	2-cell	4-cell	8-cell	16-cell	morula	blastocyst	Hatching
0	689	57	45	-	-	-	-
17	205	491	95	-	-	-	-
24	127	159	505	-	-	-	-
42	120	114	70	90	331	38	12
66	120	102	80	91	105	223	70
72	115	107	76	93	101	210	89

วิจารณ์และสรุปผล

การศึกษาถึงสภาพที่เหมาะสมในการเลี้ยงตัวอ่อนจากไข่ที่ผสมแล้วของหนูจากระยะ 2 เซลล์ มีความสำคัญและจำเป็นเพื่อหาข้อมูลและอุปสรรคในการเตรียมหรือเลือกใช้น้ำเลี้ยง ตลอดจนการเลือกใช้อุปกรณ์ที่เหมาะสม[9] ทั้งนี้เทคนิคต่าง ๆ ดังกล่าวได้มีผู้นำมาใช้เป็นแนวทางที่จะทำการศึกษาและวิจัยการผสมตัวอสุจิและไข่ในคน[4,7] ความสำเร็จในการเลี้ยงตัวอ่อนจะได้ผลสำเร็จมากน้อยเพียงใดยังขึ้นอยู่กับการเตรียมห้องปฏิบัติการ กล่าวคือภายในห้องจะต้องได้รับการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ โดยการอบด้วยฟอร์มาลีนเป็นครั้งคราว และต้องให้แสงไวโอเล็ตตลอดเวลาเมื่อเลิกใช้ห้อง ยิ่งกว่านั้นภายในห้องจะต้องมีความสะอาดไม่มีฝุ่นละออง สารเคมีเจือปน[10] เพราะฝุ่นละอองเคมีอาจจะมีพิษต่อตัวอ่อน

การเลือกใช้พันธุ์หนู mice มีความสำคัญ เพราะตัวอ่อนที่ได้และนำมาเลี้ยงจะเป็นสิ่งชี้บ่งถึงการเตรียมน้ำเลี้ยงและความสะอาด ตลอดความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลี้ยงที่เตรียมหนู mice ที่ได้ศึกษาในช่วงแรกเป็นพันธุ์ Swiss albino ที่เป็นพันธุ์ผสมหลายช่วง หนูไม่อยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ การเลี้ยงทั้งแสงสว่างและอุณหภูมิเป็นไปตามธรรมชาติ ทำให้อัตราการผสมและการตอบสนองต่อการชักนำให้ตกไข่ได้ผลน้อย (ร้อยละ 54) เมื่อเปลี่ยนใช้หนู mice Swiss albino ที่ได้จากสถานเสาวภาซึ่งเป็นพันธุ์ผสม แต่การเพาะและเลี้ยงอยู่ในสภาพสมบูรณ์อายุระหว่าง 8-16 สัปดาห์ ตอบสนองต่อการชักนำให้ตกไข่และมีอัตราการผสมได้ดีกว่า อย่างไรก็ตามผลการเลี้ยงจากระยะ 2 เซลล์เจริญเติบโตไปถึง blastocyst ได้เพียงร้อยละ 38 เท่านั้น ซึ่งมาตรฐานการเลี้ยงที่ยอมรับว่า การเตรียมน้ำเลี้ยงและอุปกรณ์อื่นที่ดีฉันจะต้องสามารถเลี้ยงตัวอ่อนจากระยะ 2 เซลล์ไม่ถึง blastocyst ได้อย่างน้อยร้อยละ 70[8] ทั้งนี้ได้มีการศึกษาพบว่า หากห้องปฏิบัติการที่สามารถเลี้ยงตัวอ่อนหนู mice ให้เจริญเติบโตได้อัตราดังกล่าวแล้วโอกาสที่จะใช้วิธีการต่าง ๆ ที่ใช้เลี้ยงตัวอ่อนในหนู mice มาทำการศึกษาในการผสมตัวอสุจิกับไข่ของคนและการเลี้ยงตัวอ่อนจะประสบความสำเร็จสูง[5] หนู mice ที่ใช้เตรียมตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ที่นับว่าเป็นเกณฑ์มาตรฐานนั้น จะใช้เพศเมียพันธุ์ C57 BL/6J ผสมกับหนูเพศผู้พันธุ์ CBA/J (Jackson Laboratory, Bar Harbor ME) เมื่อผสมได้ลูกหนูเพศเมีย (hybrid) อายุ 7 สัปดาห์ จึงนำมาให้ตกไข่และมาผสมกับหนูเพศ

ผู้พันธุ์ CD-1 (Charles River Bleeding Laboratories Washington MA) แล้วจึงนำไข่ที่ผสมระยะ 2 เซลล์มาเลี้ยงจนถึง blastocyst ซึ่งในห้องปฏิบัติการที่ดีจะได้อัตราการเจริญเติบโตมากกว่าร้อยละ 70 ในขณะนี้ได้เริ่มทดลองเลี้ยงระยะ 2 เซลล์จากหนู mice hybrid ที่ได้จากการผสมพันธุ์แท้ Balb c (เพศเมีย) กับ CD 1 (เพศผู้) ซึ่งได้จากศูนย์สัตว์ทดลอง SEATO พบว่าสามารถเลี้ยงตัวอ่อนจากระยะ 2 เซลล์ถึง blastocyst มากกว่าร้อยละ 80 ทำให้เชื่อว่าการเตรียมน้ำเลี้ยงและความพร้อมของห้องปฏิบัติการได้มาตรฐาน ผลที่จะเริ่มทำการศึกษาการผสมไข่และตัวอสุจิ และการเลี้ยงตัวอ่อนในคน โอกาสจะประสบความสำเร็จสูง

น้ำกลั่นบริสุทธิ์ที่นำมาใช้เตรียมน้ำเลี้ยงตัวอ่อนและล้างอุปกรณ์ภาชนะเพื่อการทดลองจะต้องเป็นน้ำปราศจากไอออน ในมาตรฐานที่ยอมรับจะต้องเป็นน้ำกลั่น 5 ครั้ง หรือมีความบริสุทธิ์ถึง 18 เมกกะโอห์ม ในช่วงแรกการศึกษาใช้น้ำกลั่น 2-3 ครั้ง (จากองค์การเภสัช) พบว่า อัตราการเจริญเติบโตจากระยะ 2 เซลล์เป็นไปโดยช้าและน้อยกว่ามาตรฐาน[2,8]

ความเป็นกรด-ด่างของน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโต ความเป็นกรด-ด่างของน้ำยาที่พอดีคือ 7.3-7.6[11] น้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนจะเปลี่ยนความเป็นกรดด่างเมื่ออยู่ใน Laminar flow hood นานเกินกว่า 5 นาที โดยจะเปลี่ยนเป็นด่างมากขึ้น ในการศึกษานี้ได้แก่ไขโดยให้ แกสผสมที่มี CO_2 5%, O_2 5% และ NO_2 90% ไหลผ่าน microfilter ผ่านน้ำยาอยู่ตลอดเวลา ทำให้น้ำยาเปลี่ยนเป็นด่างช้าลง

การเลือกใช้โปรตีนในน้ำเลี้ยงตัวอ่อนยังมีความเห็นแตกต่างกัน บางท่านพบว่าการใช้พลาสม่าของคนในความเข้มข้นของน้ำเลี้ยงจะยับยั้งการเจริญเติบโตของตัวอ่อนในหนู mice แต่ถ้าใช้พลาสม่าจากสายสะดือเด็กแรกเกิดในความเข้มข้นเดียวกันไม่ยับยั้งการเจริญเติบโตของตัวอ่อนของหนู[2] นอกจากนี้ได้มีผู้แสดงให้เห็นว่าการใช้ BSA เติมในน้ำเลี้ยงจะสามารถทำให้ตัวอ่อนเจริญเติบโตได้ถึง blastocyst[12] และความเข้มข้นของโปรตีนที่เติมลงในน้ำเลี้ยงตัวอ่อนอย่างน้อยต้องมีความเข้มข้นร้อยละ 10[3] แต่บางท่านใช้ซีรั่มของคนแทนโดยให้น้ำเลี้ยงตัวอ่อนมีซีรั่มในความเข้มข้นร้อยละ 15[13] อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้เลือกใช้ FCoS เนื่องด้วยหาและเตรียมได้ง่าย ไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายและเป็นที่ยอมรับในการใช้ FCoS ผสมในน้ำเลี้ยงตัวอ่อน Ham's F-10 เพื่อการผสมและเลี้ยงตัวอ่อนในหนู mice และของคน[4,5]

จากการศึกษานี้อาจจะสรุปได้ว่า การเลี้ยงตัวอ่อนในสภาวะนี้โดยใช้น้ำเลี้ยงตัวอ่อน Ham's F-10 ที่มีความเป็นกรด-ด่าง 7.4-7.6 และมี FCoS ในความเข้มข้นร้อยละ 15 สามารถเลี้ยงตัวอ่อนจากการทดลองของหนู mice พันธุ์ Swiss albino ที่เป็นพันธุ์ไม่แท้ได้เจริญเติบโตจากระยะ 2 เซลล์ไปเป็น blastocyst ได้ร้อยละ 38

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ทำการศึกษาขอขอบคุณคณะกรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ ที่จัดสรรเงินทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช-ไชน่าเมดิคัลบอร์ด และขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์คุภวัฒน์ ชุติวงศ์ หัวหน้าภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา ที่ให้การสนับสนุนทรัพยากรทุกอย่างเพื่อให้เป็นจุดเริ่มต้นของการวิจัยทางด้านนี้ต่อไป

อ้างอิง

1. Ham RG. An improved nutrient solution for diploid Chinese hamster and human cell lines. Exp Cell Res 1963 Feb; 29: 515-526
2. Shirley B, Edward Wortham JW Jr, Witmyer J, Condon-Mahony M. Effects of human serum and plasma on development of mouse embryos in culture media. Fertil Steril 1985 Jan; 43 (1) : 129-134
3. Saito H, Berger T, Mishell Jr. Marrs RP. Effect of variable concentration of serum on mouse embryo development. Fertil Steril 1984 Mar; 41 (3) : 460-464
4. Edward RG. Test-tube babies, Nature 1981 Sep 24; 293 (5830) : 253-256
5. Leung PCS, Gronon MJ, Kellow GN, Lopata A, Speirs AL, McBain JC. Serum supplement in human in vitro fertilization and embryo development. Fertil Steril 1984 Jan; 41(1) : 36-39
6. Quinn P, Wanes G, Kerin J, Kirley C. Culture factors in relation to success of human in vitro fertilization and embryo transfer. Fertil Steril 1984 Feb; 41 (2) : 202-210
7. Marrs RP, Vargyas JM, Saito H, Gibbons WE, Berger T, Mishell DR. Clinical applications of techniques used in human in vitro fertilization research. Am J Obstet Gynecol 1983 Jul 1; 146 (5) : 477-481
8. Hoppe PC, Pitts S. Fertilization in vitro and development of mouse ova. Biol Reprod 1973 May; 8 : 420-426
9. Lopata A. Concepts in human in vitro fertilization and embryo transfer. Fertil Steril 1983 Sep; 40 (3) : 289-301
10. Paul J. Cell and Tissue Culture. 2 ed. London : Livingstone, 1970.
11. Miyamoto H, Toyoda Y, Chang MC. Effect of hydrogen-ion concentration on in vitro fertilization of mouse, golden hamster and rat eggs. Biol Reprod 1974 May; 10 (4) : 487-493
12. Massip A, Van Der Zwalmen P, Puissant F, Camus M, Leory F. Effect of in-vitro fertilization, culture, freezing and transfer on the ability of mouse embryos to implant and survive. J Reprod Fertil 1984 May; 71 (1) : 194-204
13. Schmidt GE, Sites Cindy, Mansour R. Embryo toxicity of clomiphene citrate on mouse embryos fertilized in vitro and in vivo. Am J Obstet Gynecol 1985 Nov 15; 153 (6) : 679

จุฬาลงกรณ์เวชสารได้รับต้นฉบับเมื่อวันที่ 18 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2529