รายงานผลการวิจัย

ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินปี พ.ศ. 2534

เรื่อง

การศึกษาการเจริญเติบโตของตัวอ่อนสุกร หลังเพาะเลี้ยงและย้ายฝากในสุกรตัวรับ

โดย

มงคล เตชะกำพุ

วิชัย ทันดศุภารักษ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พฤศจิกายน 2534

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

b 1282/1299

รายงานผลการวิจัย

ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินปี พ.ศ. 2534

เรื่อง

การศึกษาการเจริญเติบโตของตัวอ่อนสุกร หลังเพาะเลี้ยงและย้ายฝากในสุกรตัวรับ

โดย

มงคล เตชะกำพุ

วิชัย ทันดศุภารักษ์

SF81
.ม122
สพ.ดร.
1991

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พฤศจิกายน 2534

หองสมุด
คณะสัตวแพทยศาสตร์
ได้รับความอนุเคราะห์จาก
ผศ.น.สพ.ดร.มงคล เตชะก
ลงทะเบียนที่รับ 118
วันที่ 6 ตุลาคม 2536

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ได้ให้ทุนในการศึกษาครั้งนี้ และรองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง สุวรรณี นิธิอุทัย รองคณบดีฝ่ายวิจัย ผู้สนับสนุนงานวิจัย ตลอดจนอาจารย์และเจ้าหน้าที่ของภาควิชาสัตวบาลและภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ช่วยเหลือในงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาการเจริญเติบโตของตัวอ่อนสุกรหลังเพาะเลี้ยงและย้ายฝากในสุกรตัวรับ

ชื่อผู้วิจัย มงคล เตชะกำพุ
วิชัย ทันตศุภารักษ์

เดือนและปีที่ทำวิจัยสำเร็จ ตุลาคม 2534

บทคัดย่อ

นำตัวอ่อนระยะ 1-2 เซลล์ จำนวน 122 ตัวอ่อน มาเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิด Modified Kreb's Ringer เป็นเวลา 24 ชม. พบว่ามีอัตราการเจริญเป็นตัวอ่อนระยะ 4 เซลล์ จำนวน 96 ตัวอ่อน คิดเป็น 78.7% (96/122) หลังจากนั้นนำตัวอ่อนที่เพาะเลี้ยงจำนวน 40 ตัวอ่อน ไปฝากในสุกรตัวรับ จำนวน 3 ตัว ที่มีวงจรการเป็นสัดใกล้เคียงกันอายุตัวอ่อน ผลได้อัตราการตั้งท้อง 100%(3/3), อัตราการเจริญเป็นตัวฟิตัสเท่ากับ 42.5% (17/40) และอัตราการเจริญเป็นลูกสุกรปกติเท่ากับ 40% (16/40) ซึ่งพบว่าไม่ต่างกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับตัวอ่อนที่ไม่ได้เพาะเลี้ยง โดยมีอัตราต่าง ๆ เท่ากับ 75% (3/4), 46% (29/62) และ 35.5% (22/62) ตามลำดับ ลูกสุกรที่เกิดมาจากตัวอ่อนที่ผ่านการเพาะเลี้ยงมีน้ำหนักแรกคลอด และการเจริญเติบโตตั้งแต่ 1 ถึง 8 สัปดาห์ ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม การศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าตัวอ่อนสุกรสามารถพัฒนาตัวเองได้ หลังนำมาเลี้ยงนอกร่างกายนาน 24 ชม.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Project Title : In vivo development of pig embryo after culture

Name of Investigators : Mongkol Techakumphu
Wichai Tantasuparuk

Year October 1990.

Abstract

A total of 122 pig embryos at one to two-cell-stage was cultivated in Modified Kreb's Ringer solution for 24 hrs. Seventy eight point seven percent (96/122) were developed to four cell stage. Forty four cell-stage embryos after culture were transferred to suitable recipients. The results of pregnancy rate, fetal development rate and normal piglet born rate were 100% (3/3), 42.5% (17/40) and 40% (16/40) compared to 75% (3/4), 46% (29/62) and 35.5% (22/62) in the control group respectively. The birth weight and their development during one to eight weeks were comparable to the control. This experiment showed that the pig embryos can survive until term after spending 24 hrs. in culture medium.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	II
บทคัดย่อ	III
Abstract	IV
สารบัญ	V
รายการตารางประกอบ	VI
รายการรูปประกอบ	VII
รายการสัญลักษณ์และคำย่อ	VIII
บทนำ	1
อุปกรณ์และวิธีการ	2
ผลการทดลอง	7
วิจารณ์	17
บทสรุป	19
แนวทางการศึกษาในอนาคต	20
เอกสารอ้างอิง	21

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

ตารางที่ 1 จำนวนการตกไข่ จำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้ จำนวนตัวอ่อนปกติและผิดปกติในการเก็บตัวอ่อน

ตารางที่ 2 ผลการเลี้ยงตัวอ่อนระยะ 1-2 เซลล์ ในน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิด m-Kreb's Ringer + 20% FBS เป็นระยะเวลา 24 ชม.

ตารางที่ 3 ผลการย้ายฝากตัวอ่อนในสุกรตัวรับหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชม. เทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 4 อัตรารอดและการเจริญของลูกสุกรที่เกิดจากการย้ายฝากตัวอ่อน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการรูปประกอบ

รูปที่ 1 การชะล้างตัวอ่อนจากท่อนำไข่ในห้องปฏิบัติการ
รูปที่ 2 ตัวอ่อนสุกรระยะ 1 เซลล์ เก็บจากท่อนำไข่หลังผสม 2.0 วัน (x 200)
รูปที่ 3 ตัวอ่อนสุกรระยะ 2 เซลล์ เก็บจากท่อนำไข่หลังผสม 2.5 วัน (x 200)
รูปที่ 4 ตัวอ่อนระยะ 4 เซลล์ ที่เจริญจากตัวอ่อนระยะ 1-2 เซลล์ หลังเพาะเลี้ยงนาน 24 ชม. (x 200)
รูปที่ 5 ลูกสุกรแท้งที่อายุ 45 วัน จากแม่สุกรกลุ่มควบคุม
รูปที่ 6 อัตราการเจริญเติบโตของลูกสุกรในกลุ่มทรีตเมนต์ (T1,T2,T3) และกลุ่มควบคุม (T4)
รูปที่ 7 ลูกสุกรที่เกิดจากการย้ายฝากตัวอ่อนที่เลี้ยงไว้นอกร่างกายนาน 24 ชม.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการสัญลักษณ์และคำย่อ

กก.	=	กิโลกรัม
ชม.	=	ชั่วโมง
°ซ	=	อุณหภูมิเป็นองศาเซลเซียส
ซม.	=	เซนติเมตร
พี.เอ็ม.เอส.จี.	=	แพรกแนน แมร์ ซีรั่ม โกนาโดโทรปิน
มก.	=	มิลลิกรัม
x10	=	กำลังขยาย 10 เท่า
มล.	=	มิลลิลิตร
ไอยู	=	อินเตอร์เนชั่นแนล ยูนิต
เอส.ซี.จี.	=	ฮิวแมนคลอริโอมิค โกนาโดโทรปิน
FBS	=	ฟิตัส โบวาย ซีรั่ม
T	=	Treatment = กลุ่มสุกรที่ได้รับการฝากตัวอ่อนที่ไม่ได้นำมาเลี้ยงนอกร่างกาย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

การพัฒนางานวิจัยด้านเทคโนโลยีชีวภาพในส่วนที่เกี่ยวกับการย้ายฝากตัวอ่อนได้มีการศึกษากันทั่วโลก ในส่วนของประเทศไทยนั้นได้เริ่มอย่างจริงจังในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา ผลสำเร็จของการนำตัวอ่อนตัวหนึ่งไปฝากในครรภ์ของสัตว์อีกตัวหนึ่งที่ไม่ได้รับการผสมจนเกิดการตั้งท้องและคลอด ได้มีรายงานในสัตว์ทดลองและในปศุสัตว์หลายชนิด อาทิเช่น โค กระบือ แพะ สุกร (สัมพันธ์และคณะ 2530, Chantaraprateep et al., 1988, มงคลและสุพจน์ 2531, พีระศักดิ์และคณะ 2530, มงคลและคณะ 2530) เป็นต้น ในสุกรนั้นพีระศักดิ์และคณะ (2530) ได้ประสบความสำเร็จเป็นครั้งแรกในประเทศไทย ในการนำตัวอ่อนสุกรไปฝากในสุกรตัวรับ และต่อมาในปีเดียวกัน มงคลและคณะ (2530) ได้พบว่าเทคนิคการย้ายฝากตัวอ่อน สามารถนำไปใช้ปฏิบัติในฟาร์มเลี้ยงสุกรพันธุ์แท้แห่งหนึ่งในจังหวัดชลบุรี โดยได้อัตราการตั้งท้องเท่ากับ 57% และอัตราการเจริญเป็นลูกสุกรเท่ากับ 40% ในปี 2531 มงคลและคณะ ได้ทดลองขนย้ายตัวอ่อนข้ามฟาร์มที่มีระยะทางห่างกันประมาณ 70 กม.โดยตัวอ่อนอยู่ภายนอกร่างกายที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 4-6 ชม. พบว่าตัวอ่อนสามารถพัฒนาเป็นลูกสุกรหลังนำฝากได้ แต่อยู่ในเกณฑ์ต่ำประมาณ 10% ซึ่งสาเหตุส่วนหนึ่งมาจากสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการเก็บรักษาตัวอ่อนขณะอยู่นอกร่างกายการเก็บตัวอ่อนในน้ำยาเพาะเลี้ยงหรือการเลี้ยงตัวอ่อน เป็นวิธีการเดียวที่ใช้ปฏิบัติเพื่อขนย้ายตัวอ่อนจากที่หนึ่งไปอีกที่หนึ่งหรือรอเวลาที่เหมาะสมเพื่อฝากในสุกรตัวรับ เนื่องจากตัวอ่อนของสุกรไม่สามารถทนต่ออุณหภูมิต่ำกว่า -15°ซ. ดังนั้นจึงไม่สามารถนำไปแช่แข็งเช่นเดียวกับตัวอ่อนของสัตว์ชนิดอื่น ๆ (Polge, 1977) การเลี้ยงตัวอ่อนสุกรนอกร่างกายได้มีผู้รายงานความสำเร็จตั้งแต่ปี ค.ศ.1968 โดย Polge & Frederick ซึ่งสามารถเลี้ยงตัวอ่อนจากระยะ 1 เซลล์ จนถึงระยะ 4 เซลล์ และจากรายงานของ Lindner & Wright (1978) และ Niemann et al. (1983) พบว่าตัวอ่อนของสุกรสามารถเจริญจากระยะไซโกตจนถึงระยะบลาสโตซีสในน้ำยาเพาะเลี้ยงได้ การนำตัวอ่อนที่เลี้ยงไว้ไปฝากในสุกรตัวรับ ได้มีรายงานความสำเร็จรวบรวมโดย Gourlaouen (1982) โดยมีอัตรารอดระหว่าง 0-60% ทั้งนี้ขึ้นกับระยะของตัวอ่อนที่นำฝาก เวลาในการเลี้ยงนอกร่างกาย สภาวะการเลี้ยงตัวอ่อน และสภาพของมดลูกของสุกรตัวรับขณะย้ายฝาก การศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อหาอัตราการรอดที่เหมาะสมของตัวอ่อนสุกรระยะ 1-2 เซลล์ที่นำมาเลี้ยงนอกร่างกายเป็นระยะเวลา 24 ชม. โดยอาศัยข้อมูลพื้นฐานที่ได้ศึกษาในประเทศมาก่อนหน้านี้ และเพื่อเป็นแนวทางปรับใช้เทคนิคนี้ร่วมกับเทคนิคชีวภาพอื่น ๆ

อุปกรณ์และวิธีการ

สุกร : ใช้สุกรสาวสามสายพันธุ์ (แลนด์เรช x ลาร์จไวท์ x ดูร็อค เจอซี) น้ำหนักระหว่าง 90-100 กก. จำนวนทั้งสิ้น 15 ตัว แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุม โดยใช้สุกรในกลุ่มแรก 7 ตัว เป็นสุกรตัวให้ตัวอ่อน 4 ตัว และสุกรตัวรับตัวอ่อน 3 ตัว กลุ่มที่ 2 ใช้สุกรตัวให้ และสุกรตัวรับอย่างละ 4 ตัว รวม 8 ตัว

สุกรทั้งตัวให้ และสุกรตัวรับคัดจากสุกรสาวโตเต็มวัยจากโรงเรือนสุกรชุนที่ทำการเลี้ยงรวมกัน โดยให้อาหารผงเฉลี่ยวันละ 2 กิโลกรัม ในระดับโปรตีน 15% สุกรที่คัดไว้ดูจากที่มีลักษณะรูปร่างและขนาดของอวัยวะเพศภายนอกที่สมบูรณ์ และแสดงอาการเป็นสัดหลังฉีดสารประกอบของฮอร์โมนแพรกแนนแมร์ชีรั่ม โกนาโดโทรปิน และฮิวแมนโครีออนิค โกนาโดโทรปิน ขนาดอัตราส่วน 400:200 (พี.จี.600, Intervet, Holland) การฉีดสารประกอบฮอร์โมนดังกล่าวทำโดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังในช่วงเย็น (17.00 น.) หลังจากนั้นสังเกตอาการของการเป็นสัดทุกวัน ๆ ละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น โดยดูจากการบวมแดงของอวัยวะเพศ และการขึ้นขี่สุกรตัวอื่นในคอกหรือจากการเบื่ออาหาร รวมทั้งการกดหลังจากผู้เลี้ยง (Standing reflex) หลังจากนั้นทำการจับคู่สุกรที่มีการเป็นสัดในวันเดียวกันหรือใกล้เคียงกันโดยไม่เกิน 12 ชม. ในการทดลองแต่ละครั้งจะทำการกระตุ้นการเป็นสัดในสุกรด้วยสารประกอบฮอร์โมนประมาณ 5-7 ตัว รวมสุกรที่ทำการกระตุ้นทั้งหมด 31 ตัว คู่ของสุกรที่แสดงอาการเป็นสัดจะถูกนำจากคอกสุกรขุนเข้ามายืนชอง ทำการตรวจการเป็นสัดโดยการกดหลัง และดูความชุ่มของเยื่อเมือกอีกครั้งหนึ่ง หลังจากนั้นทำการผสมสุกรตัวใดตัวหนึ่งในคู่ของมันที่มีอาการเป็นสัดเต็มที่ โดยพ่อพันธุ์ที่ตรวจสอบความสมบูรณ์พันธุ์มาแล้ว ทำการผสมอย่างน้อย 2 ครั้ง ห่างกัน 8-12 ชม. ส่วนสุกรอีกตัวหนึ่งที่เป็นคู่ที่ใช้เป็นตัวรับไม่ทำการผสม

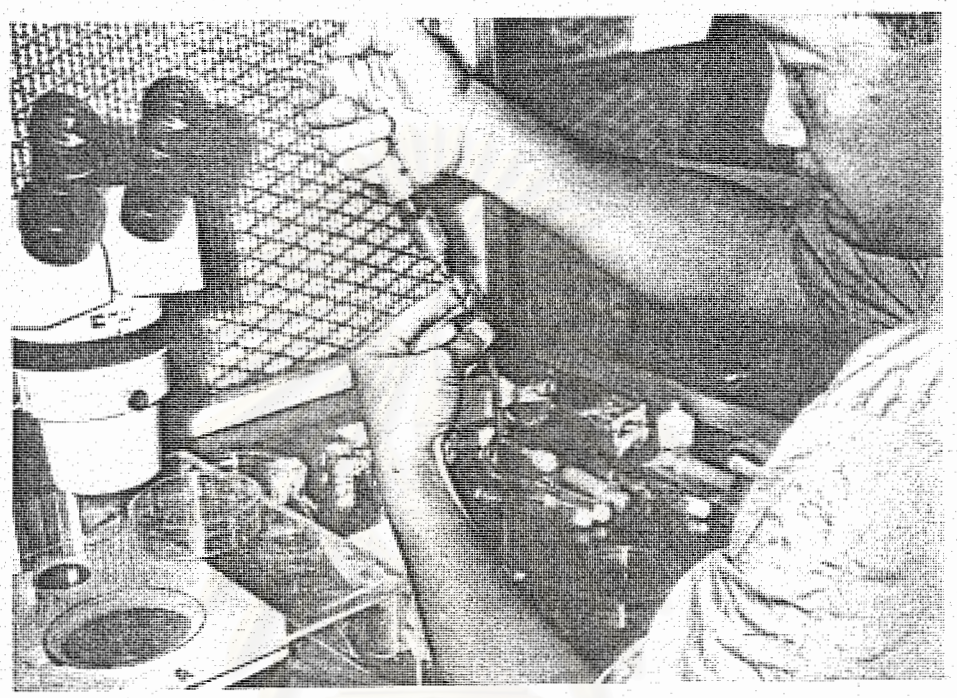
การเก็บตัวอ่อน : ตัวอ่อนที่ทำการเก็บเป็นระยะ 1-2 เซลล์ หรือประมาณประมาณ 48-60 ชม. หลังผสมครั้งแรก ระยะของตัวอ่อนเทียบกับเวลาที่เก็บได้อาศัยจากเอกสารอ้างอิงโดย Oxenreider และ Day (1965)

การเก็บตัวอ่อนทำโดยการผ่าตัดเปิดช่องท้อง (Midline incision) ตามเทคนิคที่เสนอโดยพีระศักดิ์และคณะ (2530) และ มงคลและคณะ (2530) ขั้นตอนของการเก็บตัวอ่อนในสุกรมีดังนี้

- อดอาหารและน้ำแก่สุกรเป็นเวลา 24 ชม. ก่อนทำการผ่าตัด
- ฉีดยากล่อมประสาทด้วยสาร Azaperone (Stresnil®, Janssen, Belgium) เข้ากล้ามเนื้อหลังใบหูในขนาด 200 มก. หลังจากนั้นประมาณ 10 นาที ทำการฉีดยา 2% Xylocaine HCl จำนวน 6 ซีซี. เข้าไขสันหลังเพื่อให้เกิดการชาบริเวณปั้นท้ายและให้ยาสลบ Methomedate (Hypnodil®, Janssen, Belgium) ขนาด 2 กรัม โดยให้ผ่านทางหลอดเลือดดำบริเวณใบหู ให้น้ำเกลือชนิด Lactate Ringer ปล่อยให้หยดอย่างช้า ๆ ขณะทำการผ่าตัด

- นำสุกรขึ้นเตียงผ่าตัดชนิด แฮนโนเวอร์ และผูกมัดสุกรเพื่อกันการดิ้นรน
- โกนขนและทำความสะอาดบริเวณหน้าท้องด้วยทิงเจอร์ไอโอดีน และแอลกอฮอล
- ทำการเปิดช่องท้องในแนวกลางลำตัวจากสะดือลงมาประมาณ 2.5 ซม. และกรีดแผลยาวลงมาจนถึงระหว่างเต้านมคู่สุดท้าย เปิดชั้นผิวหนัง เยื่อหุ้มไขมัน กล้ามเนื้อ และชั้นเยื่อบุช่องท้อง
- ล้วงหามดลูกและรังไข่ ตรวจสอบการตกไข่และนับจำนวน คอร์พัส ลูเทียม ซึ่งเป็นจุดแสดงการตกไข่ คอร์พัส ลูเทียมในระยะนี้จะมีสีแดงชมพู และง่ายต่อการกระทบกระแทกเป็นผลที่ให้เลือดออกได้ บันทึกจำนวนคอร์พัส ลูเทียม เพื่อนำมาหาเป็นอัตราการเก็บตัวอ่อนเพื่อเทียบจากจำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้

เพื่อเป็นการเพิ่มจำนวนการตกไข่ สุกรตัวให้จำนวน 3 ใน 11 ตัว ได้รับการฉีดฮอร์โมน พี.เอ็ม.เอส.จี. ขนาด 1500 ไอยู. ในวันที่ 15 ของวงจรการเป็นสัด และฮอร์โมน เอส.ซี.จี. ขนาด 2000 ไอยู. ประมาณ 72 ชม.หลังฉีด พี.เอ็ม.เอช.จี (สุทินและคณะ 2533) ทำการเก็บตัวอ่อนในสุกรตัวให้ทั้ง 2 กลุ่ม จำนวนทั้งหมด 11 ตัว โดยใช้วิธีตัดท่อนำไข่ตั้งแต่ปากแตรจนถึงเหนือบริเวณส่วนต่อของท่อนำไข่และมดลูก (Utero-tubal junction) โดยทำการผูกเส้นเลือดด้วยไหมละลายเบอร์ 2/0 ตั้งแต่ปลายปากแตรลงมาจนถึงส่วนต่อของท่อนำไข่และมดลูก แล้วทำการตัดเหนือบริเวณที่ผูกไว้จนหมด นำท่อนำไข่ใส่ในจานทดลองแก้ว แล้วใส่ในกระติกที่สะอาด นำท่อนำไข่ทั้ง 2 ข้าง ที่ถูกตัดออกมาตัดแต่งให้เป็นเส้นตรงจากปากแตรถึงส่วนต่อของท่อนำไข่และมดลูก ซับเอาเลือดที่ติดออกแล้วทำการตัดปลายที่ผูกไว้ทางด้าน Utero-tubal junction เหนือขึ้นมาเล็กน้อย ทำการชะล้างท่อนำไข่ด้วยน้ำยาฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ซาไลน์ ที่มีส่วนผสมของฟิตัสโบวาย ซีรั่ม (Fetal Bovine Serum, Flow Biolaboratory, N.S.W.) อยู่ 20% จำนวนข้างละ 20 มล. โดยสอดเข็มตัดปลายที่ฆ่าเชื้อผ่านทางปากแตร และให้น้ำยาชะล้างไหลออกทางอีกปลายหนึ่ง โดยทำการไล่น้ำยาชะล้างตัวอ่อนอย่างช้า ๆ ใช้จานทดลองพลาสติกขนาด 100 มล. รองรับน้ำยาชะล้าง (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 การชะล้างตัวอ่อนจากท่อนำไข่สุกร

กรณีที่ไม่พบตัวอ่อนจากการชะล้างท่อนำไข่ในห้องปฏิบัติการ จะกลับมาล้างท่อมดลูกโดยใช้วิธีที่ได้รายงานโดย มงคล และคณะ (2530) โดยใช้น้ำยาฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ซาไลน์ ล้างท่อนำไข่และมดลูกข้างละ 50 มล. รองรับน้ำยาชะล้างด้วยขวดแก้ว แล้วนำมาตรวจหาตัวอ่อนในห้องปฏิบัติการ

- ส่องตรวจหาตัวอ่อนภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ ด้วยกำลังขยาย 10, 20 และ 40 เท่า นำตัวอ่อนหรือไข่ที่ตรวจพบใส่ในจานทดลองขนาดเล็กที่มีน้ำยาฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ที่มีฟิตัล โบวาย ซีรั่ม ผสมอยู่ 20% จำนวน 1 มล. น้ำยาดังกล่าวจะผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน ทำการล้างตัวอ่อน 4 ครั้ง โดยผ่านไปในน้ำยาดังกล่าวที่สะอาด ฆ่าเชื้อและรอการประเมินคุณภาพตัวอ่อน

- ประเมินคุณภาพของตัวอ่อน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับด้วยกำลังขยาย 100 เท่า แยกชนิดของตัวอ่อนและประเมินคุณภาพตามวิธีที่เสนอโดย มงคล และคณะ (2532) ทำการบันทึกภาพ

การเลี้ยงตัวอ่อน

นำตัวอ่อนที่คัดเลือกแล้วไว้ในน้ำยา Modified Kreb's-Ringer ที่มีฟิตัล โบวาย ซีรั่ม ผสมอยู่ 20% น้ำยาดังกล่าวมี Phenol red เป็นตัวบ่งชี้การเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่าง ดังนั้นก่อนนำตัวอ่อนไว้ในน้ำยาเพาะเลี้ยงต้องนำเข้าปรับความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิ โดยนำจานเลี้ยงตัวอ่อนชนิด 4 หลุม ที่มีน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนอยู่ไปใส่ในตู้อบอัตโนมัติที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 37°ซ. และมีส่วนผสมของอากาศที่ 5% CO_2 ความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 90% ทำการล้างตัวอ่อนอีก 2 ครั้ง ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนก่อนนำตัวอ่อนใส่ในจานเลี้ยงตัวอ่อน ใส่ตัวอ่อนจำนวน 4-5 ตัวอ่อนในแต่ละหลุมของจานเลี้ยงตัวอ่อนในการทดลองนี้ได้เลี้ยงตัวอ่อนจำนวน 122 ตัวอ่อน โดยแยกเป็นตัวอ่อนระยะ 1 เซลล์ จำนวน 92 ตัวอ่อน ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ จำนวน 30 ตัวอ่อน

ทุกขั้นตอนของการปฏิบัติทำภายในตู้ Lamina flow ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแสดงอุลตร้า ไวโอเลต ข้ามคืน

การประเมินผลตัวอ่อนหลังการเลี้ยง

ดูการพัฒนาของตัวอ่อนภายหลังที่เลี้ยงในน้ำยา 24 ชม. โดยดูจากการแบ่งเซลล์ เกณฑ์การประเมินผลคือ ตัวอ่อนที่เลี้ยงไว้ต้องมีการแบ่งตัวอย่างน้อย 1 รอบ อาทิ เช่น ตัวอ่อนระยะ 1 เซลล์ จะต้องพัฒนาเป็น 2 เซลล์ และตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ต้องพัฒนาอย่างน้อยเป็น 4-8 เซลล์ เป็นต้น

คัดเลือกเฉพาะตัวอ่อนที่มีการพัฒนาด้วยหลักเกณฑ์ดังกล่าว มาแยกไว้ในน้ำยา Modified Kreb's Ringer + 20% ของฟิตัส โบวาย ซีรั่ม เพื่อรอการย้ายฝากในสุกรตัวรับ คิดอัตราการพัฒนาตัวอ่อนโดยดูอัตราส่วน = $\frac{\text{จำนวนตัวอ่อนที่พัฒนา}}{\text{จำนวนตัวอ่อนที่เลี้ยงไว้}} \times 100\%$

อัตราของการพัฒนาของตัวอ่อนระยะ 1 เซลล์ และ 2 เซลล์ คิดแยกจากกันเพื่อดูผลของระยะของตัวอ่อนต่อการเลี้ยงต่อการเจริญภายนอกร่างกาย

การนำฝากในสุกรตัวรับ

ทำการฝากตัวอ่อนผ่านทางท่อนำไข่ในสุกรตัวรับ ที่มีวงจรการเป็นสัดใกล้เคียงกับสุกรตัวให้หรือหลังจากสุกรตัวให้ประมาณ 12-24 ชม. การฝากตัวอ่อนทำโดยการผ่าตัดเปิดช่องท้อง (Midline laparotomy incision) โดยวางยาสลบทั้งตัวร่วมกับการฉีดยาชาเข้าไขสันหลังด้วยวิธีเช่นเดียวกับสุกรตัวให้ เฉพาะสุกรตัวรับที่มีการตกไข่เท่านั้นจึงทำการย้ายฝากตัวอ่อน

ดูดตัวอ่อนที่คัดเลือกไว้ในท่อโปลีเอทิรีนที่ต่อด้วยกระบอกฉีดยาขนาด 1 มล. น้ำยาพร้อมตัวอ่อนไม่เกิน 30 ไมโครลิตร สอดท่อผ่านปากแตรเข้าไปประมาณ 5 ซม. หนีบท่อโปลีเอทิลีนผ่านท่อนำไข่ด้วยที่หนีบเส้นเลือด 2 เปราะ ไล่ตัวอ่อนออกจากท่อโปลีเอทิลีนอย่างช้า ๆ หลังจากนั้นดึงเอาท่อโปลีเอทิลีนออกอย่างช้า ๆ และจับบริเวณที่หนีบ

ท่อนำไข่ดันกลับเข้าช่องท้องทันที ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที แล้วจึงดึงเอาที่หนีบท่อนำไข่ออกทั้ง 2 อัน โรยยาปฏิชีวนะชนิดเพนนิซิลลิน สเตร์ปโตมัยซินผง เพื่อป้องกันการติดเชื้อ ทำการฝากตัวอ่อนในท่อนำไข่เพียงข้างเดียว เทคนิคการฝากตัวอ่อนดัดแปลงจากการถ่ายฝากตัวอ่อนในกระต่ายซึ่งรายงานโดย Techakumphu et al. (1987a)

หลังการย้ายฝากตัวอ่อน ทำการเย็บปิดช่องท้องด้วยไหมละลายเบอร์ 2/0 ในชั้นเยื่อบุช่องท้องด้วย Simple continuous suture pattern และชั้นเยื่อยึดกล้ามเนื้อหน้าท้อง (Rectus abdominis) ด้วย Simple interrupted suture pattern เย็บปิดชั้นผิวหนังโดยใช้ไหมเบอร์ 0 แบบ Simple interrupted suture pattern ทาบริเวณแผลด้วยทิงเจอร์ไอโอดีนและยากันแมลงวัน (Negasunt, Bayer, Germany) และฉีดยาปฏิชีวนะชนิดเพนนิซิลลิน และสเตรปโตมัยซิน เข้ากล้ามหลังใบหูขนาด 200,000 ไอยู. แล้วนำสุกรตัวรับกลับเข้าช่องยืน ดูแลแผลผ่าตัดทุกวันนาน 4 วัน และตัดไหมออกหลังผ่าตัด 10 วัน

<u>การตรวจการตั้งท้อง</u>

หลังจากย้ายฝากแล้วทำการดูแลสุกรตัวรับ โดยทั้งน้ำและอาหารเม็ดในระดับโปรตีน 14% วันละ 2 กก. แบ่งให้เช้า-เย็น ทำการสังเกตการกลับเป็นสัดในวันที่ 21 ของรอบหรือประมาณ 19 วัน หลังทำการย้ายฝาก หากสุกรไม่แสดงอาการเป็นสัดทำการตรวจการตั้งท้องที่ 35-42 วัน โดยใช้เครื่องตรวจท้องชนิดคลื่นความถี่สูง (Ultrasonic test) ปล่อยสุกรตัวรับที่ตั้งท้องให้คลอดตามปกติ

<u>การประเมินผลความสำเร็จ</u>

ความสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองประเมินจาก

ก. อัตราการตั้งท้อง

ข. อัตราการรอดของตัวอ่อนปกติเป็นตัวฟิตัส

ค. อัตราการเกิดของลูกสุกรมีชีวิตต่อจำนวนตัวอ่อนที่ย้ายฝาก

ง. น้ำหนักแรกคลอดและน้ำหนักลูกสุกรที่ 1-8 สัปดาห์

ทำการวัดอัตราการเจริญเติบโตของลูกสุกรที่เกิดขึ้นจากการย้ายฝากในทั้งสองกลุ่ม ในวันแรกคลอดและทุก ๆ สัปดาห์จนถึงอายุ 8 สัปดาห์ ลูกสุกรที่เกิดจะได้รับการทำวัคซีนป้องกันโรคอหิวาต์ที่อายุ 0, 3 และ 7 สัปดาห์ และวัคซีนป้องกันโรคปากและเท้าเปื่อยชนิด O/A ที่ 4 และ 8 สัปดาห์

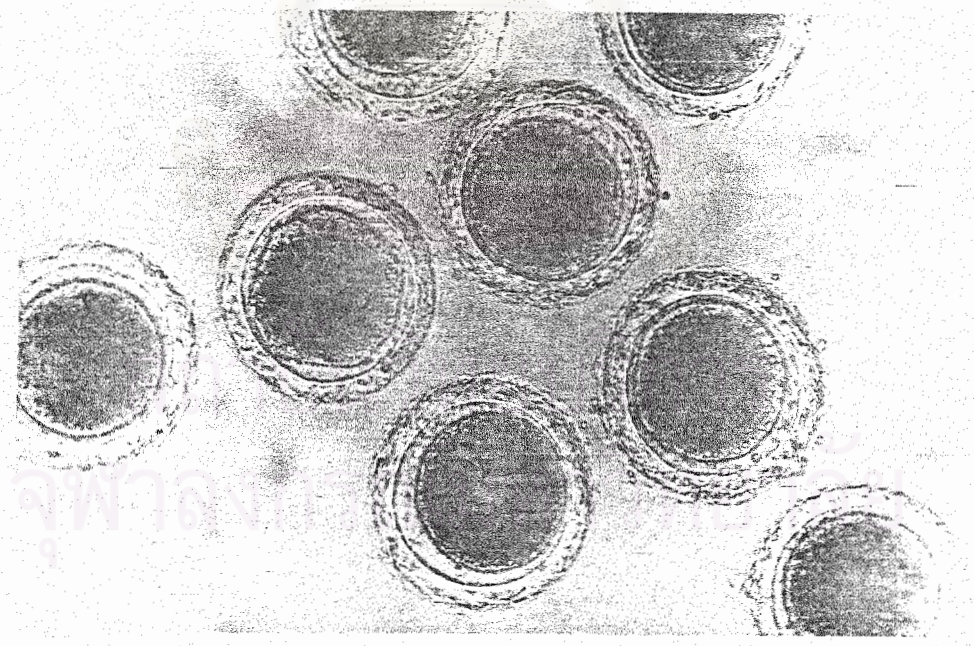
<u>การวิเคราะห์ทางสถิติ</u>

เปรียบเทียบอัตราการเจริญของตัวอ่อนในน้ำยาเพาะเลี้ยง ระหว่างระยะ 1 เซลล์ และ 2 เซลล์ อัตราการตั้งท้อง อัตรารอดของตัวอ่อนปกติ และอัตราการเกิดของลูกสุกร ระหว่างกลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุม โดยใช้ Proportion t test

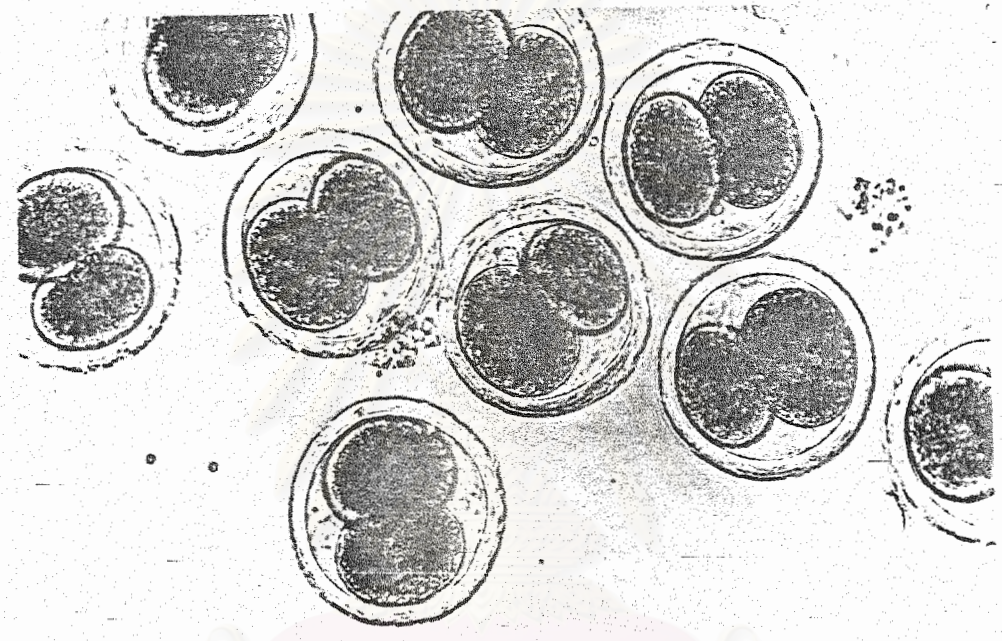
ผลการทดลอง

จากการเก็บตัวอ่อนโดยการชะล้างท่อนำไข่และมดลูก ได้ตัวอ่อนเฉลี่ยในกลุ่มที่ทำการกระตุ้นการเพิ่มการตกไข่ด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (n=3) เท่ากับ 24.7 ± 9.9 ตัวอ่อน คิดเป็น 71.1% ส่วนในกลุ่มปกติ (n=8) ได้ตัวอ่อนเฉลี่ย 16.5 ± 9.2 ตัวอ่อน คิดเป็น 86.3% (ตารางที่ 1) โดยสุกรอย่างละ 1 ตัว ในทั้ง 2 กลุ่ม (เบอร์ 1 และ 10) ต้องทำการชะล้างซ้ำจากมดลูก เนื่องจากไม่ได้ตัวอ่อนหรือได้น้อยกว่าจำนวนคอร์พัส ลูเตียมมาก

ตัวอ่อนทั้งหมด 100% ในกลุ่มแรก และ 90% ในกลุ่มที่สอง มีลักษณะปกติ ตัวอ่อนที่เก็บประมาณ 2.0 วัน หลังผสม ส่วนใหญ่จะอยู่ในระยะ 1 เซลล์ (รูปที่ 2) ตัวอ่อนที่เก็บที่ประมาณ 2.5 วัน อยู่ในระยะ 2-4 เซลล์ (รูปที่ 3) และตัวอ่อนที่เก็บประมาณ 3.0 วัน จะพบในระยะ 4 เซลล์ จากการศึกษาครั้งนี้ได้ตัวอ่อนระยะ 1 เซลล์ จำนวน 89 ตัวอ่อน ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ จำนวน 49 ตัวอ่อน และตัวอ่อนระยะ 4 เซลล์ จำนวน 55 ตัวอ่อน รวมทั้งสิ้น 193 ตัว โดยเฉลี่ยได้ตัวอ่อนเท่ากับ 14.9 ± 10 ตัวอ่อนต่อสุกร 1 ตัว



รูปที่ 2 ภาพของตัวอ่อนสุกรระยะ 1 เซลล์ เก็บจากท่อนำไข่หลังผสม 2.0 วัน (x 200)



รูปที่ 3 ภาพของตัวอ่อนสุกระยะ 2 เซลล์ เก็บจากท่อนำไข่หลังผสม 2.5 วัน (x 200)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 จำนวนการตกไข่ จำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้ จำนวนตัวอ่อนปกติและผิดปกติในการเก็บตัวอ่อน

สุกรตัวให้ เบอร์	วันที่เก็บตัวอ่อน	วิธีการเก็บ	จำนวนการตกไข่ ขวา	ซ้าย	รวม	จำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้ (%) ขวา	ซ้าย	รวม	จำนวนตัวอ่อนปกติ(%) 1 เซลล์	2 เซลล์	4 เซลล์	รวม	จำนวนตัวอ่อนผิดปกติ
1	2.0	in vitro	24	-	-	-	-	-					
					44								
		in situ		20	-	-	20	20	20	-	-	20	
2	2.0	in vitro	9	9	18	9	9	18	18	-	-	18	
3	2.5	in vitro	19	23	42	15	21	36	-	34	-	36	
			17.3 ± 7.6	17.3 ± 7.4	34.7 ± 14.5	8 ± 7.5	16.7 ± 6.6	24.7 ± 9.9				24.7 ± 9.9	
								(71.1)				(100)	
4	2.0	in vitro	12	24	36	12	24	36	35	-	-	35	1 UNF
5	2.0	in vitro	2	7	9	1	7	8	-	8	-	8	
6	2.0	in vitro	8	13	21	7	6	13	5	-	-	5	8 UNF
7	2.0	in vitro	3	7	10	3	7	10	10	-	-	10	
8	2.5	in vitro	15	16	31	14	17	21	-	-	21	21	
9	2.5	in vitro	9	1	10	9	1	10	-	7	-	7	3 DEG
10	2.5	in vitro	12	10	22	2	2	4					
									20		20	20	
		in situ				8	8	16					
11	3.0	in vitro	8	6	14	8	6	14	1	-	12	13	1 UNF
			8.6 ± 4.5	10.5 ± 7.1	19.1 ± 10.2	8 ± 4.3	9.8 ± 7.3	16.5 ± 9.2				14.9 ± 10.2	
								(86.3)				(90.2)	
	รวม								89	49	55		

หมายเหตุ - UNF = ไข่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ, DEG = ตัวอ่อนเสื่อมสลายสุกรตัวให้เบอร์ 1, 2 และ 3 ทำการกระตุ้นการตกไข่เพิ่มด้วย PMSG 1500 ไอยู และ HCG 2000 ไอยู
In vitro : การเก็บตัวอ่อนโดยชะล้างท่อนำไข่ในห้องปฏิบัติการ
In situ : การเก็บตัวอ่อนโดยชะล้างมดลูกจากตัวสุกร

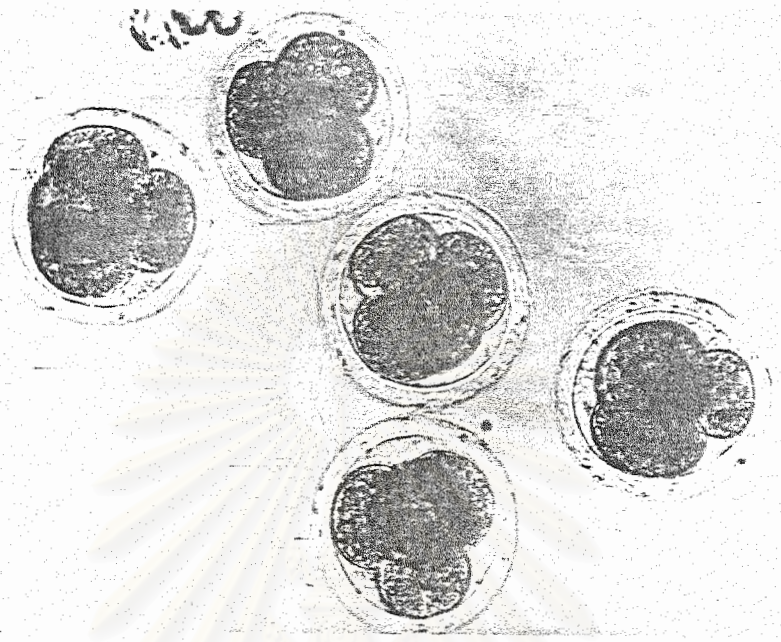
ผลการเลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยา m - Kreb's Ringer + 20% FBS นาน 24 ชม. พบว่าตัวอ่อนระยะ 1 เซลล์ มีการแบ่งตัวเป็นตัวอ่อนระยะ 2-4 เซลล์ จำนวน 66 ตัวอ่อน เท่ากับ 77.1% ในขณะที่ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ มีการเจริญเป็นตัวอ่อนระยะ 4 เซลล์ ทั้งหมด 30 ตัวอ่อน เท่ากับ 100% ($P<0.01$) รวมคิดเป็นอัตราการเจริญในน้ำยาเท่ากับ 78.7% (96/122, ตารางที่ 2, รูปที่ 4)

ตารางที่ 2 ผลการเลี้ยงตัวอ่อนระยะ 1-2 เซลล์ ในน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิด m-Kreb's Ringer + 20% FBS เป็นระยะเวลา 24 ชม.

ตัวอ่อนระยะ	จำนวน	จำนวนที่พัฒนาใน 24 ชม.	อัตราการพัฒนา (%)
1 เซลล์	92(5)[ก]	66	77.1[ข]
2 เซลล์	30(2)[ก]	30	100
รวม	122	96	78.7

( )[ก] = จำนวนครั้งในการเลี้ยงตัวอ่อน
( )[ข] = $P<0.01$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

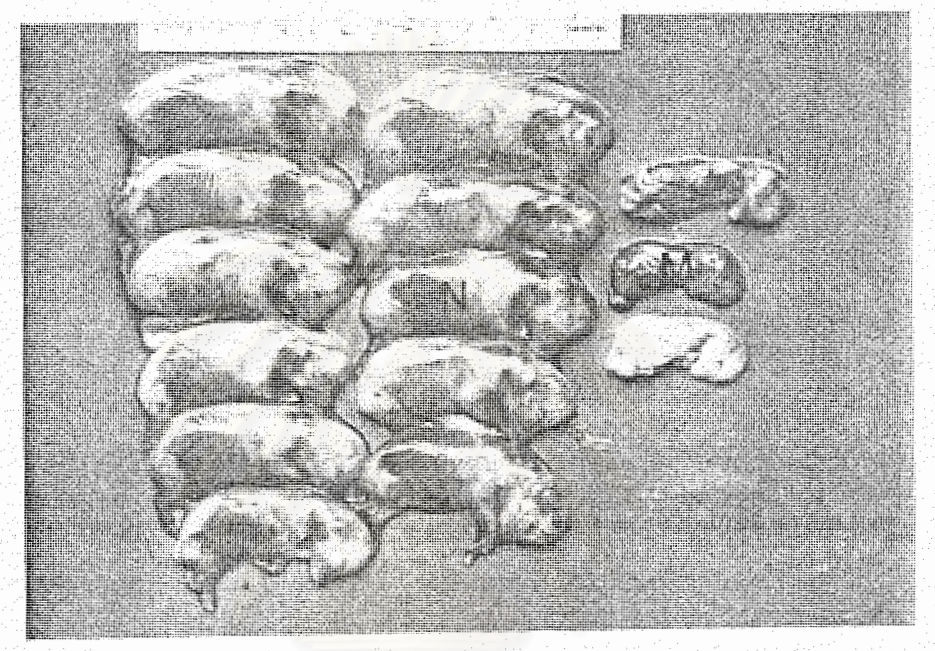
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 ตัวอ่อนระยะ 4 เซลล์ ที่เจริญจากตัวอ่อนระยะ 1-2 เซลล์ หลังเพาะเลี้ยงนาน 24 ชม. (x 200)

จากการนำตัวอ่อนที่ผ่านการเพาะเลี้ยงนาน 24 ชม. จำนวน 40 ตัวอ่อน ฝากในสุกรตัวรับจำนวน 3 ตัว โดยทำการฝากตัวละ 9, 15, 16 ตัวอ่อน ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ผลการตรวจท้องพบสุกรตั้งท้องทั้งหมดคิดเป็น 100% โดยสุกรทั้งหมดคลอดให้ลูกสุกรทั้งหมด 17 ตัว คิดเป็น 42.5% ลูกสุกรที่มีลักษณะปกติจำนวน 16 ตัว คิดเป็น 40% โดยอัตราการเจริญของตัวอ่อนเป็นฟีตัส และอัตราการเจริญเป็นลูกสุกรปกติอยู่ในอัตราระหว่าง 26.7-77.8% และ 20.0-77.8% ตามลำดับ

ในส่วนของสุกรในกลุ่มควบคุมที่ได้รับตัวอ่อนที่เก็บและนำฝากทันที พบมีการตั้งท้อง 3/4 ตัว เท่ากับ 75% (ตารางที่ 3) โดยได้ตัวอ่อนที่เจริญเป็นฟีตัสทั้งหมด 32 ตัว คิดเป็น 46.8% โดยอยู่ในพิสัยระหว่าง 42.9-70.0% และพบว่าอัตราการเจริญเป็นลูกสุกรปกติเท่ากับ 40.3% (พิสัย 28.7-55.0%) สุกร 1 ใน 3 ตัว ที่ตั้งท้องได้แท้งลูกจำนวน 14 ตัว จากที่ถ่ายฝากไป 20 ตัวอ่อน (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 ลูกสุกรแท้งที่อายุ 45 วัน จากแม่สุกรกลุ่มควบคุม
N = ลูกสุกรปกติ M = ลูกสุกรเป็นมัมมี่

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 ผลการย้ายฝากตัวอ่อนในสุกรตัวรับหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชม. เทียบกับกลุ่มควบคุม

สุกรตัวรับเบอร์	จำนวนตัวอ่อนย้ายฝาก	ผลการตรวจท้องที่ 21,42 63 วัน (%)	จำนวนตัวอ่อนเจริญเป็นฟิตัส (%)	อัตราการเจริญเป็นฟิตัส (%)	จำนวนลูกสุกรปกติ	อัตราการเจริญเป็นลูกสุกรมีชีวิต(%)	หมายเหตุ
ก) กลุ่มทดลอง							
1	9	+	7	77.8	7	77.8	
2	15	+	4(1M)	26.7	3	20.0	
3	16	+	6(25B)	37.5	6	37.5	
	40	3/3(100)	17	42.5	16	40.0	
ข) กลุ่มควบคุม							
4	14	+	9(2M+1SB)	64.3	7	50.0	
5	14	+	6(2M)	42.9	4	28.7	
6	20	+	14(3M)	70.0	11	55.0	แท้งที่ 45 วัน
7	14	-	-	-	-	-	
	62	3/4(75)	29	46.0	22	35.5	

หมายเหตุ M = ลูกสุกรเป็นมัมมี่
SB = ลูกสุกรตายแรกคลอด

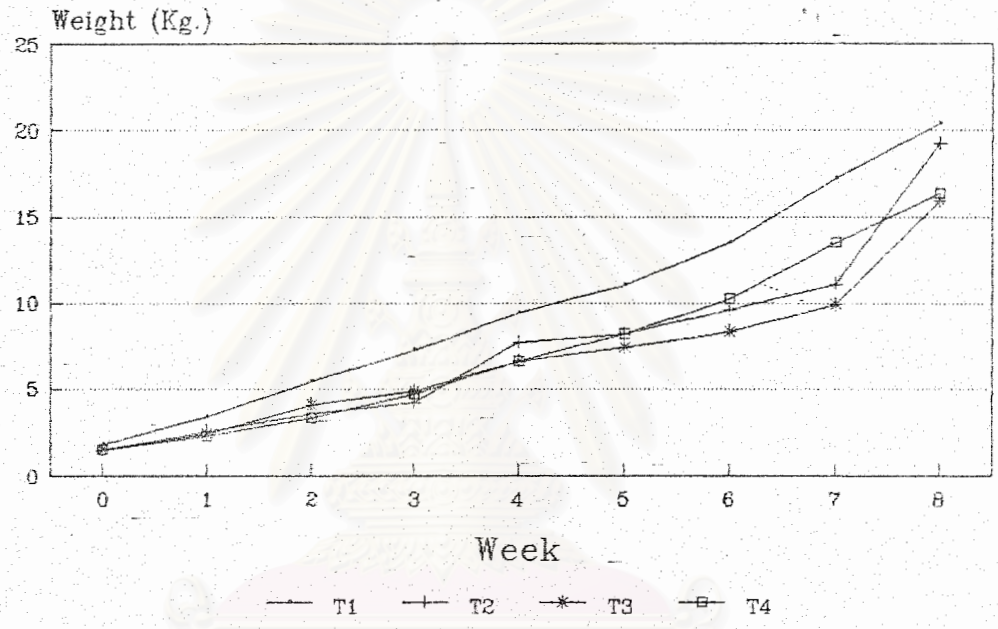
ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของลูกสุกรเปรียบเทียบในกลุ่มทรีตเมนต์และกลุ่มควบคุมพบว่าน้ำหนักแรกคลอดในทั้ง 2 กลุ่ม ไม่แตกต่างกันมากนักคือ 1.8 ± 0.1, 1.5 ± 0.1 และ 1.5 ± 0.2 กก. ในกลุ่มทรีตเมนต์เทียบกับ 1.5 ± 0.2 และ 1.6 ± 0.1 ในกลุ่มควบคุมตามลำดับ (ตารางที่ 4) ส่วนอัตราการเจริญเติบโตของลูกสุกรทั้ง 2 กลุ่ม วัดทุก ๆ 1 สัปดาห์ จนถึง 8 สัปดาห์ พบว่าการเจริญของลูกสุกรในกลุ่มทรีตเมนต์มีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 4 รูปที่ 6

ตารางที่ 4 อัตรารอดและการเจริญของลูกสุกรที่เกิดจากการย้ายฝากตัวอ่อน

สุกรตัวรับ เบอร์	จำนวนลูกสุกรแรกเกิดมีชีวิต	จำนวนลูกสุกรมีชีวิตที่ 8 สัปดาห์ (%)	การเจริญเติบโตในช่วงอายุ (สัปดาห์) เป็น กก. 0	1	2	3	4	5	6	7	8
1	7	7 (100%)	1.8 ± 0.1	3.4 ± 0.3	5.4 ± 0.4	7.2 ± 0.7	9.4 ± 0.9	11.0 ± 1.0	13.5 ± 1.3	17.2 ± 2.1	20.4 ± 3.0
2	3	2* (66.7%)	1.5 ± 0.2	2.5 ± 0.5	3.6 ± 1.4	4.2 ± 2.1	7.7 ± 0.1	8.2 n=2	9.6 ± 0.6 n=2	11.1 ± 0.8 n=2	19.2 ± 1.2 n=2
3	6	5 (83.3%)	1.5 ± 0.2	2.4 ± 0.4	4.1 ± 0.5	4.9 ± 1.1	6.6 ± 0.8	7.4 ± 0.9	8.3 ± 1.8	9.9 ± 1.8	15.9 ± 3.9
4	7	5 (71.4%)	1.5 ± 0.2	2.3 ± 0.6	3.3 ± 0.3	4.7 ± 0.4	6.6 ± 0.7	8.2 ± 0.4	10.2 ± 0.8	13.5 ± 1.6	16.3 ± 0.9
5	4	0	1.6 ± 0.1								

หมายเหตุ * ลูกสุกรในกลุ่มเหลือ 2 ตัว ที่ 5 สัปดาห์
สุกร 1, 2 และ 3 เป็นสุกรในกลุ่มทดลอง
สุกร 4, 5 เป็นสุกรในกลุ่มควบคุม

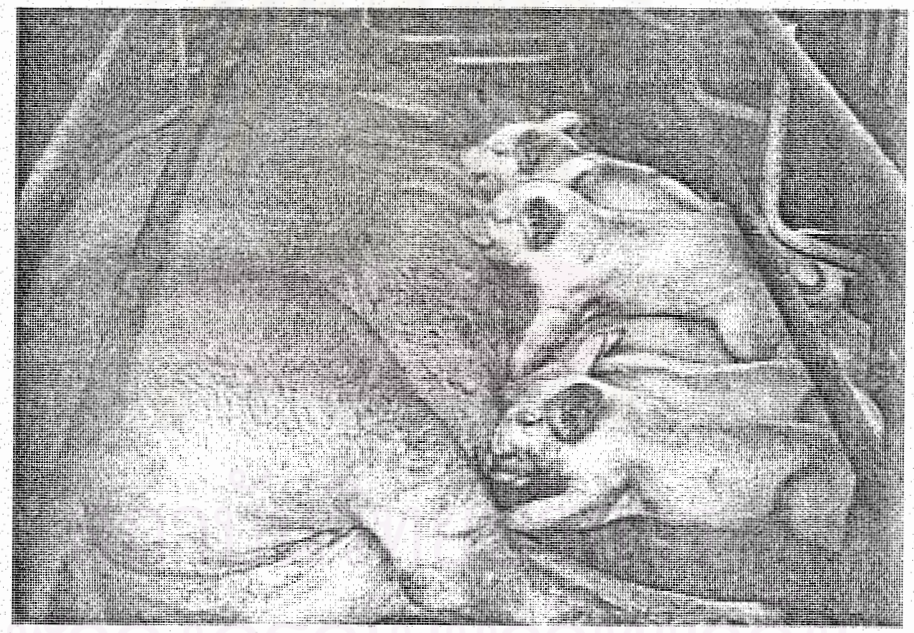
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 6 อัตราการเจริญเติบโตของลูกสุกรในกลุ่มทรีตเมนต์ (T1, T2, T3) และกลุ่มควบคุม (T4)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพของลูกสุกรที่เกิดจากการย้ายฝากตัวอ่อนที่เลี้ยงไว้นอกร่างกายนาน 24 ชม. แสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7 ลูกสุกรที่เกิดจากการย้ายฝากตัวอ่อนที่เลี้ยงไว้นอกร่างกาย นาน 24 ชม.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทวิจารณ์

การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าตัวอ่อนสุกระยะ 1-2 เซลล์ สามารถพัฒนาตัวเองจนถึงระยะ 4 เซลล์ ในน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิด Modified Kreb's Ringer และเมื่อนำตัวอ่อนหลังเพาะเลี้ยงไว้ 24 ชม. นี้กลับไปฝากในสุกรตัวรับที่มีวงจรการเป็นสัดใกล้เคียงกับอายุตัวอ่อน ตัวอ่อนดังกล่าวสามารถพัฒนาต่อเนื่องได้จนเจริญเป็นตัวเต็มวัยและคลอดเป็นลูกสุกรปกติ และมีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมที่เกิดจากตัวอ่อนที่ไม่ได้เพาะเลี้ยง

เป็นที่น่าสังเกตว่าอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนระยะ 1 เซลล์ ในน้ำยาเพาะเลี้ยงจะมากกว่าของระยะ 2 เซลล์ ประมาณ 20% ทั้งนี้เนื่องจากการประเมินคุณภาพของตัวอ่อนระยะ 1 เซลล์ โดยเฉพาะของสุกรมีความยากมากกว่าการประเมินคุณภาพตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ โดยในสุกรตัวอ่อนระยะ 1 เซลล์ และไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ (Unfertilized eggs) แยกกันได้ค่อนข้างลำบากเนื่องจากตัวอ่อนสุกรมีลักษณะพิเศษที่มีเซลล์ไขมันในไซโตพลาสซึมสูง ทำให้สีของตัวอ่อนคล้ำดำผิดกับตัวอ่อนของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น ๆ ที่มีสีน้ำตาลอ่อน (มงคล, 2534) ผลทำให้มองเห็นโปรนิวคลีไอทั้งเพศผู้และเพศเมีย ซึ่งเป็นสัญลักษณ์ของการปฏิสนธิไม่ได้เลย อีกทั้งตัวโปลาบอดีก็มองได้ไม่ชัดเจน ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่ไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิถูกนำไปเพาะเลี้ยงรวมกับตัวอ่อนระยะ 1 เซลล์ ซึ่งทำให้ไม่มีการพัฒนาเกิดขึ้นถ้าอย่างไรก็ตามโดยเฉลี่ยแล้วอัตราการเจริญของตัวอ่อนสุกรระยะ 1-2 เซลล์ ในการทดลองที่ได้เกือบ 80% เทียบเท่ากับที่รายงานโดย Davis และ Day(1978) ที่ใช้น้ำยาในการเพาะเลี้ยงชนิดเดียวกัน

ในการศึกษาครั้งนี้ทำการเลี้ยงตัวอ่อนสุกรเพียง 24 ชม. ซึ่งเป็นเวลาที่เหมาะสมในการเคลื่อนย้ายตัวอ่อนจากจังหวัดหนึ่งไปอีกจังหวัดหนึ่งในประเทศ (มงคลและคณะ 2531) หรือแม้แต่นำตัวอ่อนข้ามจากทวีปหนึ่งไปอีกทวีปหนึ่ง (James et al., 1980) และด้วยเหตุผลของปัญหาในการเลี้ยงตัวอ่อนสุกรซึ่งมีปัญหาหยุดตัวเอง (Blocking stage) (Polge และ Frederick, 1968) โดยเมื่อนำตัวอ่อนระยะต้น ๆ มาเลี้ยงไว้นอกร่างกาย ตัวอ่อนดังกล่าวจะพัฒนาได้เพียงถึงระยะ 4 เซลล์ และแม้ทิ้งไว้นานขึ้นก็ไม่พัฒนาเป็นระยะอื่น (Rundell และ Vincent, 1969) (มงคลและคณะ 2532) การพัฒนาของตัวอ่อนให้ผ่าน blocking stage สามารถทำได้โดยการนำฝากในท่อนำไข่ของสัตว์ตัวกลางอาทิเช่น กระต่ายหรือแกะ (Boland 1984, Prather et al., 1991) ซึ่งจะทำให้สามารถเก็บตัวอ่อนไว้นอกร่างกายสุกรได้นานขึ้นด้วย หรืออาจเลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยาที่ไม่มีส่วนประกอบของเกลือไพรูเวตและเกลือแลคเตท (Davis และ Day, 1978) และจากการทดลองล่าสุดโดย Beckman และคณะ (1990) พบว่าหากใช้อุณหภูมิการเลี้ยงที่ 39°ซ. ในน้ำยา Whitten สามารถเลี้ยงตัวอ่อนจากระยะ

1-2 เซลล์ จนถึงมอรูล่าและบลาสโตซีสได้ ซึ่งการศึกษานี้สอดคล้องกับการทำการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกรซึ่งทำให้อัตราความสำเร็จสูงเมื่อทำการที่ 39 °ซ. แทนที่จะเป็น 37 °ซ. (Eng et al., 1986)

เหตุผลอีกประการหนึ่งของการเลี้ยงตัวอ่อนไว้เพียง 24 ชม. นั้นก็คือ อัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อนจะขึ้นกับระยะเวลาการเลี้ยงนอกร่างกายโดยตรง การศึกษาในสัตว์หลายชนิดอาทิเช่น ในกระต่าย Adams (1970) พบว่าอัตราการเจริญเป็นฟิตัสจะลดลงอย่างรวดเร็วอย่างน้อย 30% เมื่อเวลาการเลี้ยงเพิ่มจาก 24 เป็น 48 ชม. เช่นเดียวกับในโค (Renard, 1983) สังเกตพบว่าตัวอ่อนโคระยะมอรูล่าจะพัฒนาตัวเองได้น้อยมากไม่เกิน 10% เมื่อเลี้ยงไว้นาน 48 ชม. และนำกลับไปฝากในตัวรับ ในสุกร จากการศึกษาของ Davis และ Day ในปี 1978 ได้ย้ายฝากตัวอ่อนสุกรที่เลี้ยงไว้นอกร่างกายนาน 24, 48 และ 72 ชม. ไปยังครรภ์ของสุกรตัวรับ จากการตรวจสอบที่ 21 และ 30 วัน ของการตั้งท้อง พบว่าอัตราฝังตัวและอัตราการเจริญเป็นฟิตัสลดลงจาก 60% เป็น 0% และ 19% ตามลำดับ เช่นเดียวกับ Renard (1983) พบว่าอัตรารอดลดลงจาก 26% เป็น 16% เท่านั้น เมื่อเลี้ยงตัวอ่อนเพิ่มจาก 24 ชม. เป็น 48 ชม. การที่อัตราการรอดชีวิตลดลงเมื่อเวลาการเลี้ยงเพิ่มขึ้นนี้ มิได้ขึ้นกับชนิดของน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนหรือสภาวะแวดล้อมของการเลี้ยง เพราะแม้จะพัฒนาน้ำยาที่มีสารประกอบใกล้เคียงกับสารคัดหลั่งในท่อนำไข่และมดลูก อาทิเช่น น้ำยา Synthetic oviduct fluid (Tervi et al., 1972) หรือน้ำยา B2 (Menezo, 1976) อัตราการรอดของตัวอ่อนก็มิได้เพิ่มขึ้น การศึกษาของ Hahn (1982) พบว่าการเลี้ยงตัวอ่อนนอกร่างกายนานขึ้นทำให้เกิดความผิดปกติในระดับส่วนประกอบของเซลล์ และอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ช้าลง ผลทำให้ตัวอ่อนเจริญได้ลดลงเมื่อนำกลับไปฝากในครรภ์ของตัวรับ ดังนั้นเพื่อให้อัตราการรอดสูงสุดและเหมาะสมกับเวลาในการขนย้ายตัวอ่อนสุกรจึงไม่ควรเลี้ยงตัวอ่อนไว้นอกร่างกายไว้นานเกินกว่า 24 ชม.

ในส่วนของอัตราความสำเร็จในการย้ายฝากนั้น จากการศึกษาครั้งนี้ได้ค่อนข้างสูงเป็นที่น่าพอใจ โดยได้อัตราการตั้งท้อง 100% ในกลุ่มทดลองและ 75% ในกลุ่มควบคุม อัตราการรอดเป็นฟิตัส และอัตราการเจริญเป็นลูกสุกรปกติอยู่ในระดับ 40% ซึ่งไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม และเมื่อเทียบกับเอกสารอ้างอิงการทดลองนี้ได้อัตราสูงกว่าในรายงานของ Polge และ Frederick (1968); Rundell และ Vincent (1969); Polge และ Rowson (1975); Lee et al. (1989) แต่ต่ำกว่าในรายงานของ Pope และ Day (1977); Davis และ Day (1978) ในการย้ายฝากตัวอ่อนที่เลี้ยงไว้จากระยะ 1-2 เซลล์ นาน 24 ชม. ปัจจัยอันหนึ่งที่สำคัญที่คาดว่ามีผลต่ออัตราการรอดสูงคือ การนำตัวอ่อนที่เลี้ยงไว้ฝากกลับในท่อนำไข่ ทั้งนี้จากข้อสมมติฐานว่า

การพัฒนาของตัวอ่อนนอกร่างกายจะช้าลงเมื่อเทียบกับในร่างกาย การนำกลับในท่อนำไข่จะช่วยชลอการเดินทางเข้าสู่มดลูกของตัวอ่อน ซึ่งทำให้ตัวอ่อนได้ปรับตัวในระยะหนึ่งและในขณะเดียวกัน พบว่าในท่อนำไข่จะประกอบด้วยสารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญของตัวอ่อนครบถ้วน ทั้งสารไพรูเวต สารแลคเตท น้ำตาลกลูโคส ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานของการแบ่งตัวระยะแรกของตัวอ่อน (Biggers et al., 1967) ทั้งในร่างกาย (In vivo) และนอกร่างกาย (In vitro) (Gardner และ Leese, 1986) ตามปกติตัวอ่อนสุกรระยะ 4 เซลล์ ซึ่งเป็นระยะที่ย้ายฝากในการทดลองสามารถพบได้ทั้งในท่อนำไข่และมดลูก (Oxenreider และ Day, 1965) ดังนั้นจึงสามารถย้ายฝากทั้งในมดลูกและให้ลูกสุกรปกติได้ (พีระศักดิ์และคณะ 2530) หรือฝากในท่อนำไข่เช่นการทดลองครั้งนี้ ซึ่งน่าจะมีข้อดีดังกล่าวข้างต้น จากการศึกษาในกระต่ายของ Techakumphu et al. (1987a,b), Techakumphu และ Heyman, 1987 พบว่าหากนำตัวอ่อนปกติ ตัวอ่อนที่ผ่านการเลี้ยงนอกร่างกายนาน 48 ชม. หรือตัวอ่อนหลังผ่านการแช่แข็งฝากกลับในท่อนำไข่ จะทำให้ได้อัตราการรอดสูงกว่าที่รายงานในเอกสารอ้างอิงใด ๆ จากเทคนิคของการฝากตัวอ่อนในท่อนำไข่ในกระต่ายได้นำมาปรับใช้ในการฝากตัวอ่อนสุกรในการทดลองนี้ โดยต้องอาศัยความละเอียดอ่อนและนุ่มนวลในการจับต้องปากแตรและตัวท่อนำไข่ รวมทั้งปริมาตรของน้ำยาที่ตัวอ่อนแขวนลอยอยู่ต้องน้อยมากเพื่อกันการไหลกลับ หลังการย้ายฝากแล้วรีบนำท่อนำไข่และมดลูกกลับเข้าช่องท้องเพื่อให้ท่อนำไข่และมดลูกกลับสู่สภาวะเดิม ดังนั้นผลสำเร็จในอัตราสูงของการศึกษานี้ คาดว่าวิธีการย้ายฝากตัวอ่อนและสภาพแวดล้อมในท่อนำไข่เป็นปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่ง แต่ถึงอย่างไรก็ตามพบว่าการฝากในท่อนำไข่มีข้อจำกัด เพราะหากนำตัวอ่อนระยะเกินกว่าระยะมอรูล่าคือระยะบลาสโตซีส เป็นระยะที่เข้าสู่มดลูกแล้วจะให้อัตรารอดที่ต่ำ (Broerman et al., 1990)

บทสรุป

การศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าเราสามารถเพิ่มอัตราการรอดของตัวอ่อนระหว่างนำตัวอ่อนมาเก็บไว้นอกร่างกายภายในระยะเวลาและในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ซึ่งจะแตกต่างจากผลศึกษาของมงคลและคณะ (2531) ที่ได้อัตรารอดของตัวอ่อนที่ย้ายข้ามจังหวัดเพียง 10% เนื่องจากสภาวะที่ตัวอ่อนอยู่นอกร่างกายไม่เหมาะสม พื้นฐานของการศึกษาของการย้ายฝากตัวอ่อนในสุกรจากงานของคณะผู้วิจัยในภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ตั้งแต่ปี 2523 พบว่าการศึกษานี้เป็นก้าวต่อจากการศึกษาก่อนหน้านี้ในการย้ายฝากทางตรง หรือการศึกษาการเลี้ยงตัวอ่อนนอกร่างกายและจนมาถึงการตัวอ่อนสุกรที่เลี้ยงไว้นาน 24 ชม. และนำฝากจนได้ลูกสุกรปกติ ซึ่งพื้นฐานต่าง ๆ เหล่านี้จะเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยทางวิทยาการสืบพันธุ์ด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งปัจจุบันทั่วโลก

หรือในประเทศเอเชีย เช่น เกาหลี ญี่ปุ่น ไต้หวัน กำลังมุ่งศึกษาไปว่าจะเป็นการแช่แข็งตัวอ่อนสุกร การปฏิสนธินอกร่างกาย การผลิตสัตว์เหมือน (Cloning) การถ่ายฝากยีนส์ การพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทันสมัยในหัวข้อต่าง ๆ ซึ่งต้องอาศัยพื้นฐานของการเลี้ยงตัวอ่อนและการย้ายฝาก เพื่อใช้เป็นข้อประเมินผลสำเร็จของเทคนิคนั้น ๆ และจากวิธีการนี้ใช้ในการทดลองครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในสัตว์เศรษฐกิจชนิดอื่น ๆ ด้วย

<u>แนวทางการศึกษาในอนาคต</u>

การวิจัยในการย้ายฝากตัวอ่อนในสุกร เป็นงานวิจัยของภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทย์ จุฬาฯ ตั้งแต่ปี 2523 โดยทิวากรและคณะ จนถึงปัจจุบันข้อมูลจากการศึกษาชี้ว่า

1) การเก็บตัวอ่อนสามารถทำได้ในอัตราสูง 85-100% (มงคลและคณะ 1986)

2) การย้ายฝากตัวอ่อนสามารถทำได้ผลสำเร็จทั้งในศูนย์วิจัย (พีระศักดิ์และคณะ 2530) และในฟาร์มเลี้ยงสุกร (มงคลและคณะ 2530)

3) การนำตัวอ่อนจากสุกรตัวให้ของฟาร์มสุกรแห่งหนึ่งไปฝากย้ายในสุกรตัวรับของอีกฟาร์มหนึ่งมีความเป็นไปได้ แต่อยู่ในอัตราความสำเร็จต่ำประมาณ 10% (มงคลและคณะ 2531)

4) การศึกษาระยะตัวอ่อนและสภาวะในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในน้ำยาเพาะเลี้ยง (มงคลและคณะ 2532) เป็นแนวทางแก้ปัญหาในข้อที่ 3

5) และจากการศึกษาครั้งนี้ที่แสดงในรายงานนั้น แสดงให้เห็นว่าเราสามารถนำตัวอ่อนมาเลี้ยงไว้นานถึง 24 ชม. โดยไม่ทำให้อัตรารอดสูญเสียมากนัก

การพัฒนาเทคนิคการย้ายฝากตัวอ่อนในสุกรเท่าที่ผ่านมา จึงเป็นการพัฒนาทำให้สามารถนำไปรองรับเทคโนโลยีต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นการตัดแบ่งตัวอ่อน การผลิตสุกรโดยการปฏิสนธินอกร่างกาย หรือการถ่ายฝากยีนส์หรือนิวเคลียส (Cheng et. al., 1990) ซึ่งจำต้องอาศัยเทคนิคพื้นฐานจากการศึกษาข้อ 1 ถึง 5 ทั้งสิ้น อนึ่งแม้เทคนิคการย้ายฝากตัวอ่อนในสุกรจะไม่สามารถนำมาปฏิบัติในภาคอุตสาหกรรมการเกษตรได้โดยตรงในช่วงนี้ แต่หากพิจารณาความเป็นไปได้และการศึกษาวิจัยในที่ต่าง ๆ ทั่วโลกแล้วเห็นว่าในอนาคตประเทศไทย น่าจะมีการนำเทคโนโลยีนี้มาใช้อย่างแน่นอน

ในส่วนของการศึกษาต่อเนื่องในงานวิจัยด้านนี้คณะผู้วิจัยได้วางแนวทาง 2 แนวคือ

1) การเลี้ยงตัวอ่อนไว้นอกร่างกายเป็นเวลานานนั้น โดยใช้ท่อนำไข่กระต่ายเป็น in vivo incubator ซึ่งจะช่วยเพิ่มระยะเวลาการเลี้ยงตัวอ่อนและสามารถทำให้ตัวอ่อนกระต่ายผ่านระยะ Blocking ที่ 4 เซลล์ได้

2) การปฏิสนธินอกร่างกายหรือตัวอ่อนจากการทำ ไอ.วี.เอฟ อาศัยเทคนิคในการเลี้ยงตัวอ่อนสุกรระยะสั้นและฝากถ่ายในท่อนำไข่

คณะผู้วิจัยคาดว่าหัวข้อที่จะศึกษาต่อไปจะเป็นก้าวอีกก้าวหนึ่งของการพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพเกี่ยวกับการย้ายฝากตัวอ่อน ซึ่งจะยังประโยชน์ต่องานวิจัยในประเทศและอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ของประเทศต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ทิวากร กิจรุ่งโรจน์เจริญ ชวลิต หว่อง ประสิทธิ์ โพธิปักษ์ พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป ชัยณรงค์ โลหชิต และปราจีน วีรกุล 2523. การถ่ายฝากคัพภะในสุกร เสนอต่อที่ประชุมวิชาการสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 13 หน้า

พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป ชัยณรงค์ โลหชิต อรรณพ คุณาวงษ์กฤต ปราจีน วีรกุล ประสิทธิ์ โพธิปักษ์ นันทวิกา โพธิปักษ์ และสมชัย มีนมณี 2530. การถ่ายฝากตัวอ่อนในครรภ์สุกร เวชชสารสัตวแพทย์ 17(2) : 116-127.

มงคล เตชะกำพุ อังสนา ฮ้อเจริญ บุญญิตา รุจิทิฆัมพร นิภาภรณ์ รักษ์อาริยะธรรม ศิริพงษ์ จิงธนาเจริญเลิศ และวิเชียร พวงศิลป์ 2530. การศึกษาเบื้องต้นของการย้ายฝากตัวอ่อนสุกรในฟาร์ม เวชชสารสัตวแพทย์ 17(3) : 227-242

มงคล เตชะกำพุ บุญญิตา รุจิทิฆัมพร นิภาภรณ์ รักอาริยะธรรม เจนวิชญ์ หมายเจริญ อังสนา ฮ้อเจริญ เกรียงมาศ พันธุ์ชัย และปราณี อินทรอุทก 2531. การย้ายฝากตัวอ่อนระหว่างฟาร์ม เวชชสารสัตวแพทย์ 18(2) : 173-178

มงคล โปร่งเจริญ และสุพจน์ ชีวะถาวร 2531. การย้ายฝากตัวอ่อนในแพะ โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ 2531. 29 หน้า

มงคล เตชะกำพุ สุพจน์ อานันทนะสุวงศ์ สุพจน์ เลื่องยศลือชากุล วัชรี ตันติวัฒนเสถียร และชัยณรงค์ โลหชิต 2532. การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนสุกร : ผลของระยะการเจริญเติบโตของตัวอ่อนและชนิดของน้ำยาเพาะเลี้ยง เวชชสารสัตวแพทย์ 19(3) : 157-169

มงคล เตชะกำพุ 2534. การประเมินคุณภาพของตัวอ่อนในเทคโนโลยีชีวภาพทางวิทยาการสืบพันธุ์สัตว์ : มงคล เตชะกำพุ บรรณาธิการ ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทย์ จุฬาฯ หน้า 47-57.

สุทิน พันธดงอดิศักดิ์ วรพันธ์ พันธ์พิมพ์วรกุล อนุพงศ์ สันตะวานนท์ 2530. การกระตุ้นการตกไข่เพิ่มในสุกรสาว. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 16 หน้า

สัมพันธ์ สิงหจันทร์ วรรณดา สุจริต สมุทร สิริเวชพันธุ์ จำเนียร สัตยาพันธุ์ อุดม วังตาล วิสุทธิ์ สุขภัทราภิรมย์ 2530. ความก้าวหน้าของการย้ายตัวอ่อนในโคนมและข้อสังเกต การประชุมทางวิชาการสัตวแพทย์ ครั้งที่ 14 สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทย โรงแรมเอเชีย พญาไท กรุงเทพฯ หน้า 73

Adams, C.E. 1970. The development of rabbit eggs after culture in vitro 1-4 days. J. Embryo. Exp. Morphol., 22 : 21-34.

Beckman, L.S., Cantley, T.C., Rieke, A.R. and Day, B.N. 1990. Development and viability of one and two-cell the four-cell block. Theriogenology, 33(1) : 193 (Abstr).

Biggers, J. D., Whittingham, D.G. and Donahue, R.P. 1967). The pattrn of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 58 : 560-567.

Boland, M.P. 1984. Use of the rabbit oviduct as a screening tool for the viability of mammalian eggs. Theriogenology, 21(1) : 126-127.

Broermann, D.M., Nephew, K.P. and Pope, W.F. 1990. Limitations of oviductal transfers in swine. Theriogenology, 33(3) : 709-721.

Chantaraprateep, P., Kobayashi, G., Lohachit, C., Virakul, P., Kunavongkrit, A., Techakumphu, M., Prateep, P. and Dusitsin, N. 1988. Success in embryo transfer in Thai swamp buffalo (Bubalus bubalis). Buffalo bullentin, 8(1) : 4-5.

Cheng, W.T.K., Hsu, T.T., Huang, J.C., Lin, A.C. and Wu, H.K. 1990. In vitro fertilization and embryo manipulation in farm animals. Proceeding of the 5th AAAP Animal Science Congress, Taipei, Taiwan, May 27-June 1, 1990. p. 268-281.

Eng, L.A., Kornegay, E.T., Huntington, J. and Wellman, T. 1986. Effects of incubation temperature and bicarbonate on maturation of pig oocytes in vitro J. Reprod. Fert., 76, 657-662.

Davis, D.L. and Day, B.N. 1978. Cleavage and blastocyst formation by pig eggs in vitro. J. Anim. Sci., 46(4) : 1043-1053.

Gardner, D.K. and Leese, H.J. 1986. Non-invasive measurement of nutrient uptake by single cultured pre-implantation mouse embryos. Hum. Reprod. 1, 25-27.

Gourlaouen, S. 1982. Transplantation d'embryons chez la truie, Memoire, INRA. France. 44p.

Hahn, J. 1982. Technical aspects and perspectives of embryo transfer in laboratory animals. 2nd Congr. Int. Transfert Embryons chez les mammiferes, 20-22 Sept, Annecy, France, pp. 215-222.

James, J.E., Reeser, P.D., Davis, D.L., Straition, E.C., Talbot, A.C. and Polge, C. 1980. Culture and Long-distance shipment of swine embryo. Theriogenology, 14(6) : 463-469.

Lee, K.W., Son, D.S., Park, C.S. and Chee, S.H. 1989. Embryo transfer in multiparous sows in Korea. Theriogenology, 31(1) : 216. (Abstr).

Lindner, G.M. and Wright, Jr. R.W. 1978. Morphological and quantitative aspects of the development of swine embryos in vitro. J. Anim. Sci, 46 : 711-718.

Menezo, Y. 1976. Milieu synthetique pour la survie et la maturation des gametes et pour la culture de l'oeuf feconde. C.R. Acad. Sci. Paris, Ser. D., 282 : 1967-1970.

Niemann, H., Illera, M.J. and Dzuik, P.J. 1983. Developmental capacity size and number of nuclei in pig embryos culturred in vitro. Anim. Reprod. Sci. 5 : 3111-321

Oxenreider, S.L. and Day, B.N. 1965. Transport and cleavage of ova in swine J. Anim. Sci., 24 : 413-417.

Polge, C. and Frederick, C.L. 1968. Culture and storage of fertilized pig eggs. Proc. 6th Int. Congr. Anim. Reprod. & AI., Paris 1, 211. (Abstr).

Polge, C. and Rowson. L.E.A. 1975. Egg transplantation in farm animals. Symposium on egg transplantation. Setp. 24-25, 1974, Meddelander No.75, October, 1975.

Polge, C. 1977. Short-term maintenance and culture of embryos. In "Embryo Transfer in farm animal" Ed. K.J. Betteridge, Canada, Dept. Agric. Monograph., 16 : 44.

Pope, C.E. and Day, B.N. 1977. Transfer of preimplantation pig embryos following in vitro culture for 24 or 48 hours. J. Anim. Sci., 44(2) : 1036-1040.

Prather, R.S., Sims, M.M. and First, N.L. 1991. Culture of porcine embryos from the one-and two-cell stage to the blastocyst stage in sheep oviducts. Theriogenology, 35 (6); 1147-1151.

Renard, J.P. 1983. La conservation de l'embryon de Mammifere : Etude aux stades preimplantatoires chez plusieurs especes domestiques. These Docteur es Sciences Universite Pierre et Marie Curie Paris VI. 118 p.

Rundell, J.W. and Vincent, C.K., 1969. Growth of tubal swine ova in vivo and in vitro. J. Anim. Sci. 28 : 145-146 (Abstr).

Techakumphu, M. and Heyman, Y. 1987. Survival of frozen-thawed rabbit morulae after synchronous and asynchronous transfer. Anim. Reprod. Sci., 12 : 308-312.

Techakumphu, M., Wintenberger-Torres, S. and Sevellec, C. 1987a. Survival of rabbit embryos after synchronous and asynchronous transfer. Anim. Reprod. Sci., 12 : 297-304.

Techakumphu, M., Wintenberger-Torres, C., Sevellec, C. and Menezo, Y. 1987b. Survival of rabbit embryos after culture or culture/freezing. Anim. Reprod. Sci., 13, 221-228.

Tervit, H.R., Whittingham, D.C. and Rowson, L.E.A. 1972. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. J. Reprod. Fertil. 30 : 493.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย