หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

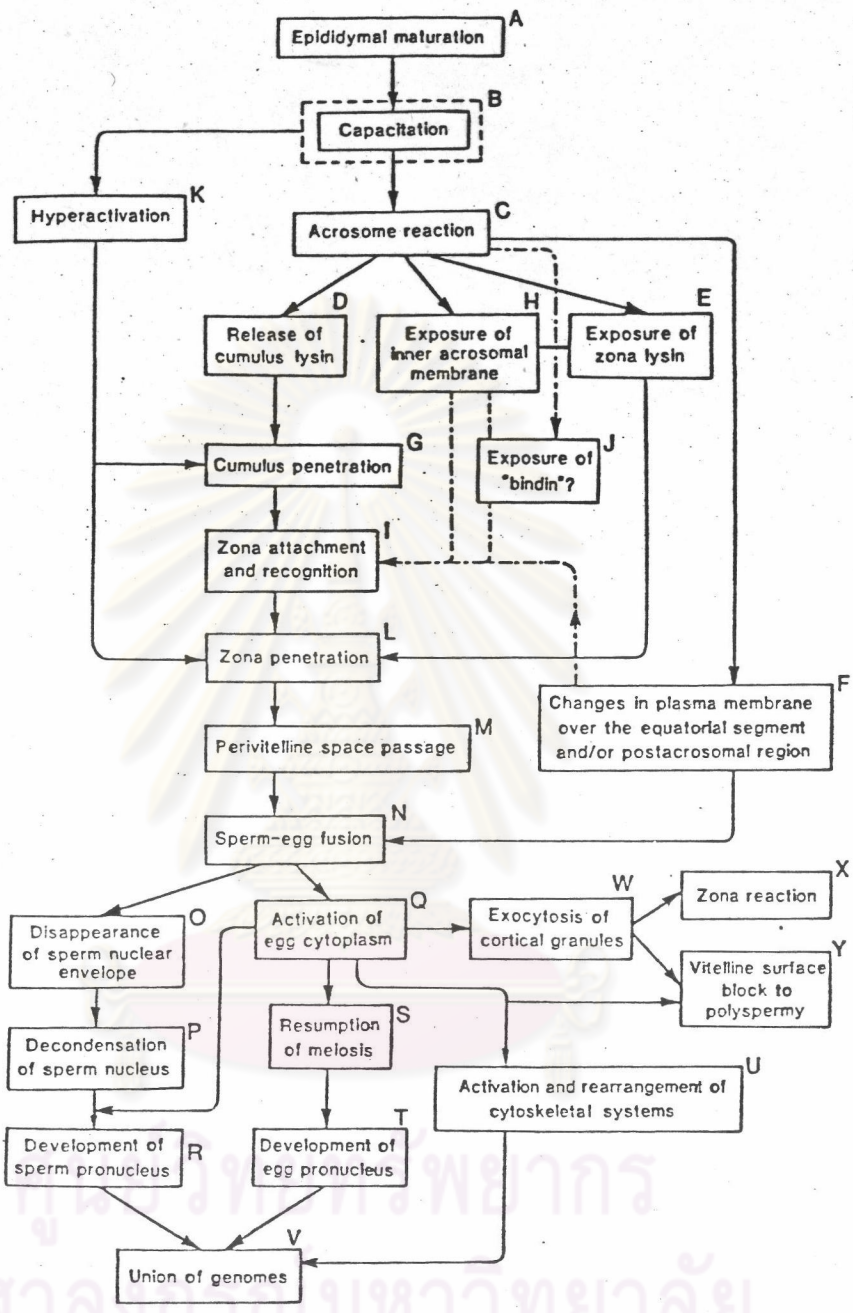
บทที่ 1

บทนำ

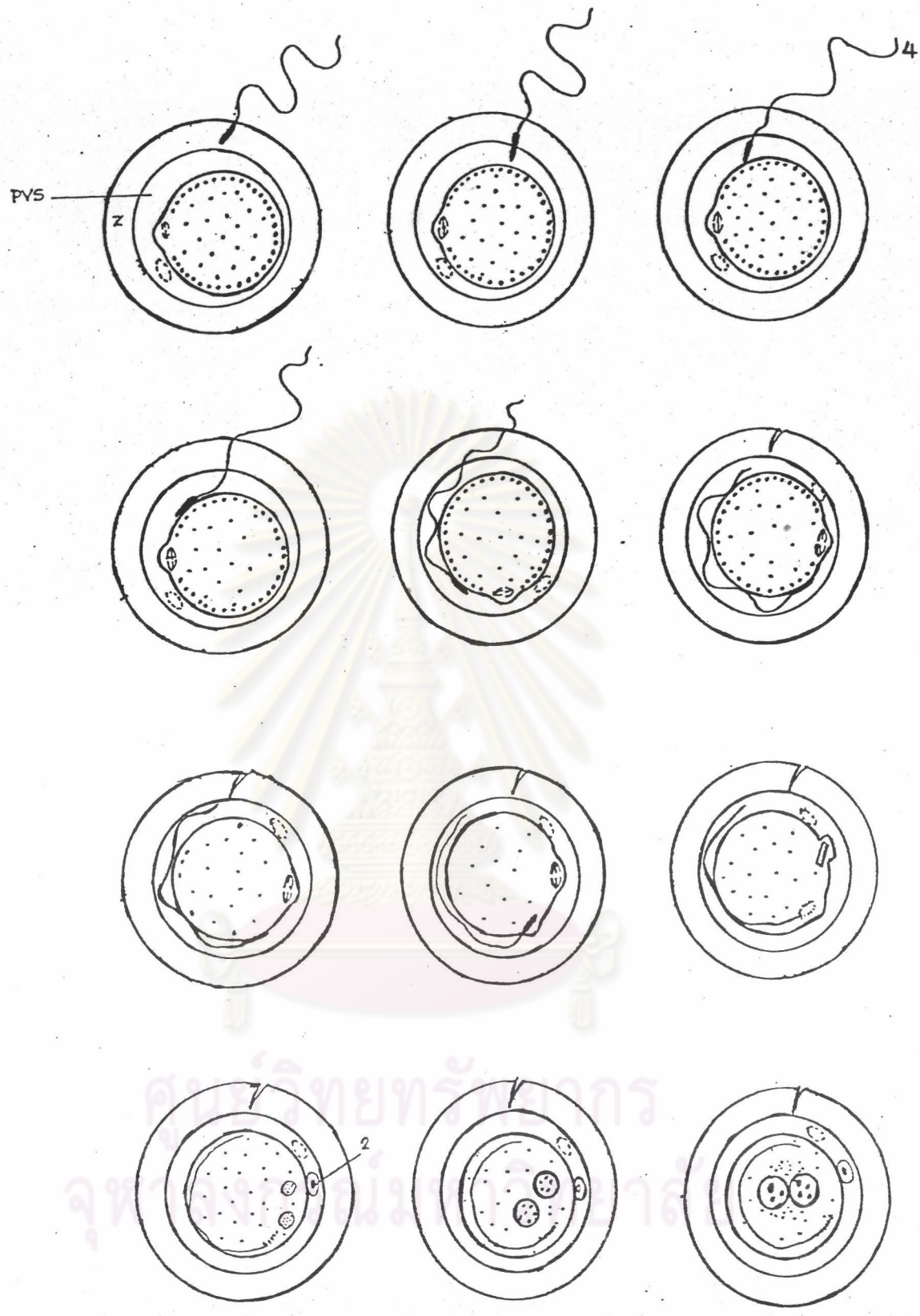
กระบวนการปฏิสนธิ (FERTILIZATION) ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมเกิดขึ้นบริเวณท่อนำไข่ (oviduct หรือ follopian tube) โดยไข่ที่หลุดจากรังไข่ของสัตว์ส่วนใหญ่จะอยู่ในระยะ mataphase II ของการแบ่งตัวแบบไมโอซีส (Yanagimachi และ Chang, 1961) ต่อจากนั้นไข่ที่ล้อมรอบด้วยกลุ่มเซลล์คิวมูลัส (cumulus masses) จะเคลื่อนเข้าสู่ท่อนำไข่บริเวณแอมพูลลา (ampulla) โดยอาศัยการพัดโบกของซีเลีย (cilia) บริเวณปากแตรของท่อนำไข่ (fimbria) และแรงการบีบตัวภายในท่อนำไข่ ซึ่งการปฏิสนธิจะเกิดขึ้นที่บริเวณแอมพูลลาของท่อนำไข่ อสุจิที่เดินทางผ่านท่อสืบพันธุ์ของเพศเมีย (female reproductive tract) เข้ามาสู่ส่วนของแอมพูลลาของท่อนำไข่จะมีการเปลี่ยนแปลงภายในตัวอสุจิเกิดขึ้น เพื่อเตรียมตัวให้เหมาะสมที่จะปฏิสนธิกับไข่ โดยผ่านกระบวนการคาพาซิเตชั่น (capacitation) (Austin, 1951; 1952; Chang, 1951) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเอาโปรตีนที่ปกคลุมผิวนอกของตัวอสุจิออก (Johnson และ Hunter, 1972; Oliplant และ Brackett, 1973; Schill และคณะ, 1975) และการเปลี่ยนแปลงของ glycoprotein ใน plasma membrane ของตัวอสุจิ (Gordon และคณะ, 1975) อสุจิที่ผ่านกระบวนการคาพาซิเตชั่นแล้วจะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของอะโครโซม(acrosome) ซึ่งเป็น membrane-bound ที่ปิดคลุมด้านหน้าของนิวเคลียส (nucleus) ของเซลล์อสุจิ เรียกการเปลี่ยนแปลงนี้ว่า อะโครโซม รีแอคชั่น (Acrosome Reaction) (Austin และ Bishop, 1958) การเกิดกระบวนการนี้มีการหลั่งอะโครโซมอลเอนไซม์ (Acrosomal enzyme) ที่อยู่ในอะโครโซม เช่น อะโครซิน (acrosin) ซึ่งเป็น Trypsin-like enzyme ออกมาย่อยสลายชั้น zona pellucida ของไข่ เพื่อให้อสุจิผ่านเข้าไปปฏิสนธิกับ

ไข่ได้ (Meizel และ Lui,1976) ทันทีที่อสุจิเจาะทะลุ zona pellucida เข้าไปอยู่ใน perivitteline space ส่วนหัวของอสุจิซึ่งเป็นส่วนของนิวเคลียสจะเชื่อมติดกับ vitteline membrane ซึ่งเป็นการเริ่มต้นของการปฏิสนธิ (fertilization) เมื่อหัวของอสุจิเข้าไปอยู่ใน ooplasm แล้วจะเกิด decondenzation ส่วนไข่จะเริ่มมีการแบ่งตัวแบบไมโอซีสต่อไปจนสมบูรณ์ โดยจะขับ second polar body ออกจากไข่เกิด female และ male pronuclei (Yanagimachi, 1981) ต่อมา nuclear membrane จะสลายไป โครโมโซมของแต่ละ pronucleus จะจับคู่กัน กระบวนการปฏิสนธินี้จะเสร็จสมบูรณ์เมื่อมีการสร้าง diploid complement ซึ่งเป็นลักษณะโครโมโซมในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ไข่ที่ถูกผสมจะเปลี่ยนเป็นไซโกต (Zygote) หรือ เอมบริโอระยะ 1- เซลล์ และจะเริ่มมีการแบ่งตัวแบบไมโตซีสเจริญขึ้นเป็นชีวิตใหม่ต่อไป ตลอดระยะเวลาที่เคลื่อนที่ผ่านท่อนำไข่และลงสู่มดลูก เอมบริโอแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ไปเรื่อย ๆ เรียกช่วงนี้ว่า คลีเวจ (cleavage) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมชนิดต่าง ๆ เอมบริโอใช้ระยะเวลาเคลื่อนที่ผ่านท่อนำไข่ประมาณ 3 - 8 วัน ภายหลังการปฏิสนธิ เอมบริโอที่เคลื่อนที่ลงสู่มดลูกอยู่ในระยะต่าง ๆ ของการแบ่งตัวระหว่าง 4- เซลล์ ถึงบลาสโตซิสระยะต้น (Blandau และคณะ, 1961) ส่วนการฝังตัว (Implantation) ของเอมบริโออาจใช้เวลา 1 วัน หรือหลายสัปดาห์ต่อมาขึ้นกับชนิดของสัตว์ (Whittingham, 1979) (รูปที่ 1.1 - 1.3 แสดงกระบวนการปฏิสนธิและการเจริญเติบโตของเอมบริโอ)

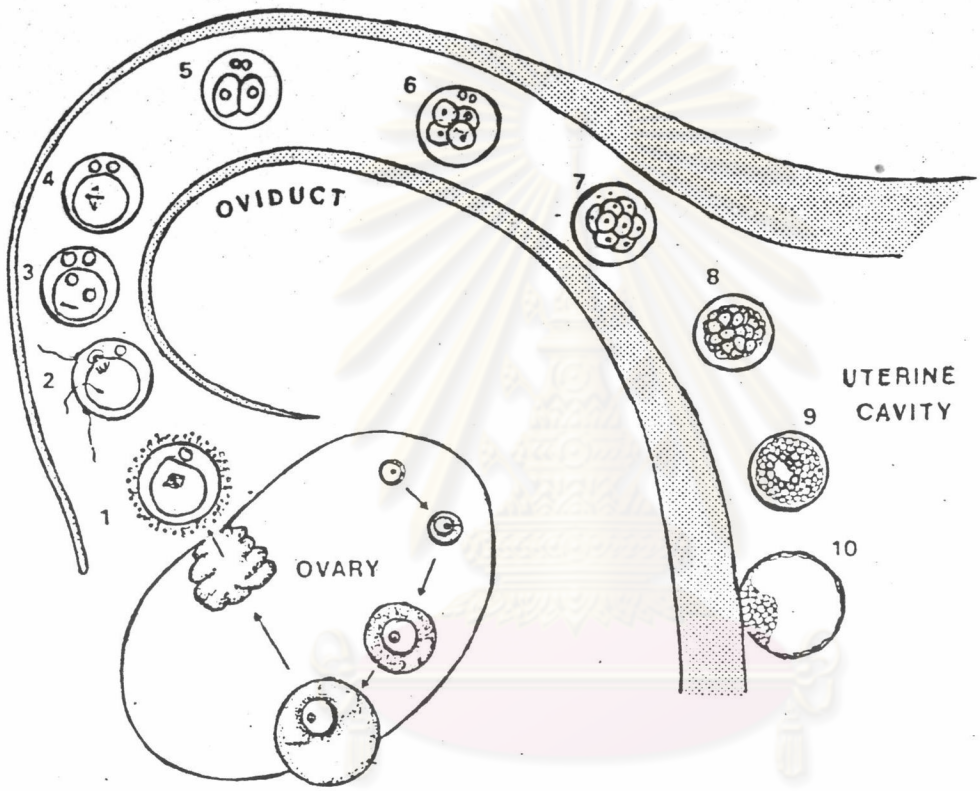
ถึงแม้ว่าในระยะแรกของการศึกษาการปฏิสนธิโดยการนำอสุจิผสมกับไข่ภายนอกร่างกายของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (Schenk, 1878) จะประสบความล้มเหลวก็ตาม นักวิทยาศาสตร์ก็ไม่ละความพยายาม ยังคงศึกษาค้นคว้ากันต่อ ๆ มา และบรรลุผลสำเร็จจนสามารถทำการปฏิสนธิภายนอกร่างกายของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมได้เป็นครั้งแรก โดย Thibault และคณะ ในปี 1954 โดยศึกษาในกระต่าย ซึ่งต่อมามีผู้ให้ความสนใจศึกษาและคิดค้นเทคนิคใหม่ ๆ ตลอดจนวิธีการที่จะพัฒนาการปฏิสนธิภายนอก



รูปที่ 1.1 แสดงถึงกระบวนการต่าง ๆ ที่สำคัญที่เกิดขึ้นก่อน และระหว่างการปฏิสนธิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (จาก Yanagimachi, 1981)



รูปที่ 1.2 แสดงกระบวนการปฏิสนธิระหว่างตัวอสุจิกับไข่ (จาก Yanagimachi, 1981)



KEY:

1: egg released from ovar with first polar body an second metaphase spindl

2: sperm entry into eg second polar body formir

3: male and female pronuclei formation. Sperm tail i egg cytoplasm

4: first cleavage metapha spindle

5: 2-cell stage

6: 4-cell stage

7: 8-cell stage

8: morula

9: early blastocyst, blastocoe cavity forming

10: blastocyst starting t implant

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1.3 แสดงแผนภาพของการเจริญของไข่, การตกไข่ กระบวนการปฏิสนธิ และการแบ่งตัวของเอมบริโอระยะต่าง ๆ ก่อนการฝังตัว (จาก Whittingham, 1979)

ร่างกายของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมชนิดอื่น ๆ เพิ่มมากขึ้นจนประสบความสำเร็จดังแสดงในตารางที่ 1.1

สำหรับในหนูแฮมสเตอร์การทำการปฏิสนธิภายนอกร่างกายเป็นผลสำเร็จเมื่อปี ค.ศ. 1963 โดย Yanagimachi และ Chang แต่พบว่าไม่สามารถเพาะเลี้ยงเอมบริโอของแฮมสเตอร์ให้เจริญผ่านระยะ 2- เซลล์ถึงระยะบลาสโตซิส (blastocyst) ได้ (Whittingham และ Bavister, 1974; Yodyingyuad, 1982) ถึงแม้ว่าจะนำเอมบริโอระยะ 2- เซลล์ ที่ได้จากการผสมภายในร่างกายมาเพาะเลี้ยงภายนอกร่างกายก็ไม่สามารถเจริญผ่านระยะ 2- เซลล์ได้ (Whittingham และ Bavister, 1974) ในขณะที่สัตว์ชนิดอื่น เช่นในหนูเมาซ์ พบว่าสามารถเพาะเลี้ยงเอมบริโอจากระยะไซโกตในน้ำยาเพาะเลี้ยง เครบ-ริงเกอร์ไบคาบอเนต (Krebs-Ringer's bicarbonate) ให้เจริญถึงระยะบลาสโตซิลได้ถึง 60-100% ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่กำหนดขึ้นภายนอกร่างกาย (Brinster, 1963; Gwatkin, 1963) และเมื่อทำการถ่ายฝากไปยังตัวรับ (recipient) ที่ตั้งท้องเทียมพบว่าสามารถเจริญต่อไปจนครบกำหนดคลอดเป็นลูกปกติได้ (Biggers, 1979; Brinster และ Troike, 1979; Brackett, 1981) แสดงให้เห็นว่าเอมบริโอของแฮมสเตอร์ต้องการปัจจัยบางอย่างที่เฉพาะเจาะจงจากน้ำยาเพาะเลี้ยงในการเจริญและการแบ่งตัวให้ผ่านระยะ 2- เซลล์ มากกว่าเอมบริโอของหนูเมาซ์ ซึ่งการศึกษาหาปัจจัยต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นผลของกรดอะมิโนต่อการเจริญเติบโต (Gwatkin และ Haidri, 1973) หรือการศึกษาปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการเจริญจากระยะ 8- เซลล์ เป็นระยะบลาสโตซิส (Bavister และคณะ, 1983a) ถึงแม้ว่าการศึกษาต่างๆ จะเป็นการศึกษาหาปัจจัยที่มีผลต่อเอมบริโอของแฮมสเตอร์ในระยะ 1- เซลล์ หรือ 8- เซลล์ ก็ตาม แต่สามารถที่จะนำไปศึกษาย้อนหลังถึงความต้องการของเอมบริโอในระยะ 2- เซลล์ต่อไปได้ นอกจากในหนูเมาซ์การเพาะเลี้ยงเอมบริโอภายนอกร่างกายจากระยะ 1- เซลล์ ให้เจริญผ่านถึงระยะบลาสโตซิสยังพบในกระต่าย (Seidel และคณะ,

ตารางที่ 1.1 แสดงการทำปฏิสนธิในหลอดแก้วสำเร็จเป็นครั้งแรกของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมชนิดต่าง ๆ

ชนิดของสัตว์	ผู้วิจัย	ค.ศ.
กระต่าย	Chang	1959
แฮมสเตอร์	Yanagimachi และ Chang	1963
หนูถีบจักร	Iwamatsu และ Chang	1969
ไซนิสแฮมสเตอร์	Pickworth และ Chang	1969
มนุษย์	Edwards, Bavister และ Steptoe	1969
หนูตะเภา	Yanagimachi	1972b
มองโกเลียนเจอบิล	Noske	1972
ลิงคลคริรอล	Gould, Cline และ Williams	1973
หนูขาว	Miyamoto และ Chang	1973c
โค	Wright, Anderson, Cupps และ Drost	1976a
ลิงบาบูน	Gould	1977
ลิงหางยาว	Kreitmann, Lynch, Nixon และ Hodgen	1982
ลิงวอก	Bavister, Boatman, Leibfried, Loose และ Vernon	1983b
ลิงชิมแพนซี	Gould	1983

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1976; Binkerd และ Anderson, 1979; Kane และ Headon, 1980) และในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมซึ่งมีเพียงไม่กี่ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1.2

ปัจจุบันนี้แม้ว่ามีการศึกษาและดัดแปลงสภาพแวดล้อมภายนอกร่างกายให้คล้ายกับสภาพแวดล้อมภายในร่างกายดังเช่น มีการดัดแปลงน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอขึ้นมากมายหลายชนิด ทั้งน้ำยาที่มีองค์ประกอบเกลือแร่และไอออนธรรมดา หรือน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีองค์ประกอบสลับซับซ้อนแล้วก็ตาม แต่การเพาะเลี้ยงเอมบริโอของแฮมสเตอร์ให้เจริญผ่านระยะ 2-เซลล์ ยังไม่ประสบผลสำเร็จมากนัก (Yodyingyuad, 1982; Schini และ Bavister, 1988) ซึ่งด้วยเหตุผลดังกล่าวนี้จึงทำให้นักวิจัยรุ่นหลังพยายามคิดค้นหาปัจจัยต่าง ๆ ที่จะไปมีผลช่วยส่งเสริมการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของแฮมสเตอร์ให้เจริญผ่านระยะไซโกตถึงระยะบลาสโตซิส หรือเมื่อทำการถ่ายฝากไปยังตัวรับแล้ว เอมบริโอสามารถจะเจริญและมีชีวิตรอดจนครบกำหนดคลอดเป็นลูกปกติได้ นอกจากเป็นเรื่องที่น่าสนใจศึกษาแล้ว ความรู้ที่ได้ยังอาจนำมาประยุกต์ใช้กับการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของสัตว์อื่นที่ยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในจานทดลองอีกด้วย

<u>ปัจจัยที่มีผลต่อการปฏิสนธิและการเจริญเติบโตของเอมบริโอของแฮมสเตอร์ภายนอกร่างกาย</u>

1. <u>ส่วนประกอบของน้ำยาเพาะเลี้ยงและสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงเซลล์</u>

1.1 <u>สารที่ให้พลังงาน</u> พบว่าน้ำยาเพาะเลี้ยงไม่ว่าจะเป็นน้ำยาเพาะเลี้ยง Tyrode's solution (m-TALP) ที่ใช้ในการปฏิสนธิ หรือน้ำยา TL-PVA ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของแฮมสเตอร์ (Bavister และ Yanagimachi, 1977; Bavister, 1981) นั้นมี

ตารางที่ 1.2 ความสำเร็จครั้งแรกของการเพาะเลี้ยงตัวอ่อน ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมในหลอดแก้ว จากระยะไซโกตไปเป็นบลาสโตซิส

ชนิดของสัตว์	ผู้วิจัย	ค.ศ.
หนูถีบจักร*	Whittingham และ Biggers	1967
หนูถีบจักร	Whitten และ Biggers	1968
กระต่าย	Maurer, Whitener และ Foote	1969
มนุษย์**	Steptoe, Edwards และ Purdy	1971
แกะ	Tervit, Whittingham และ Rowson	1972
โค	Wright, Anderson, Cupps และ Drost	1976b

* ไซโกตเจริญเป็น 2 เซลล์ ก่อนย้ายเข้าเลี้ยงในท่อนำไข่ในหลอดแก้ว

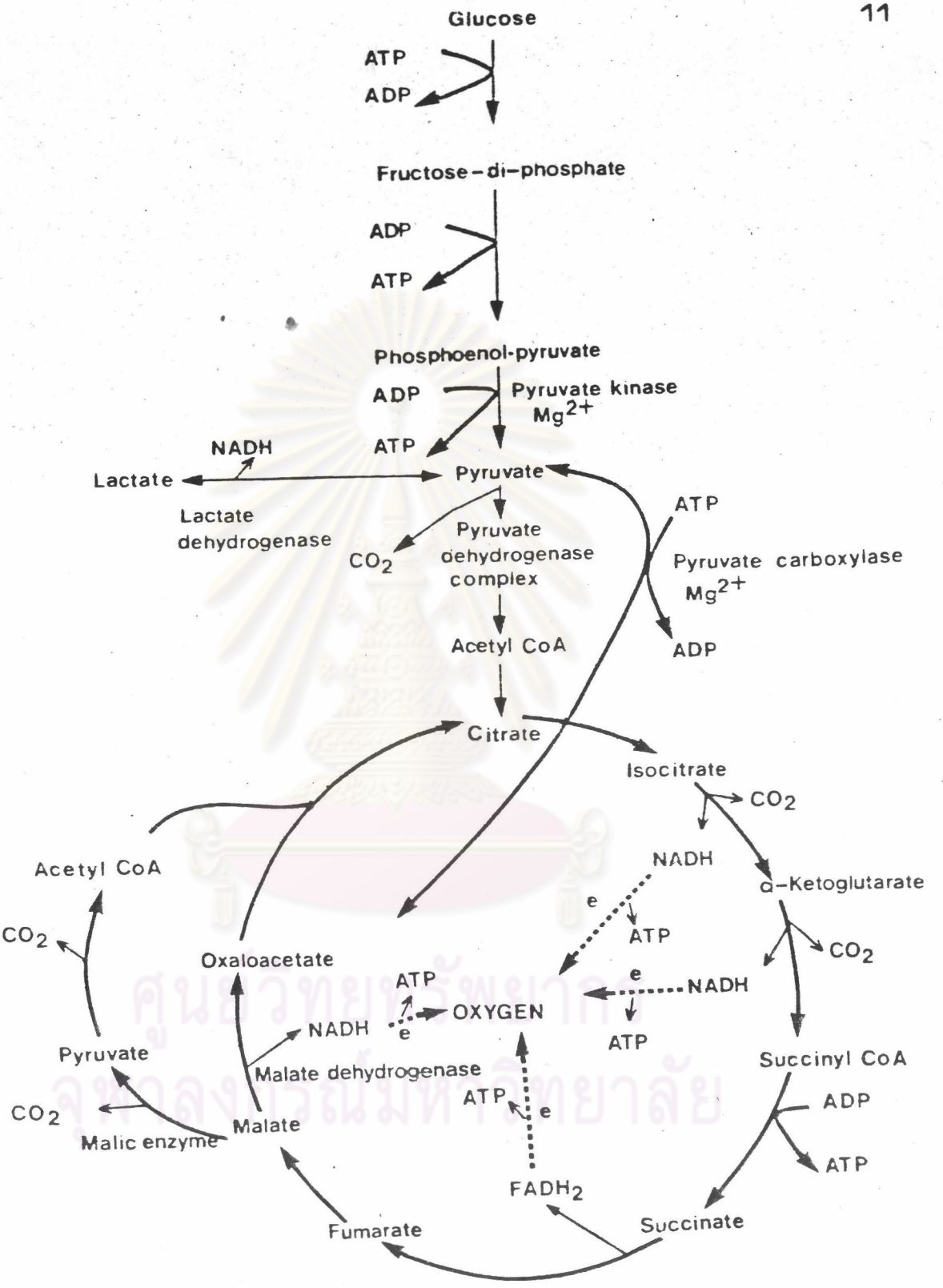
** ไซโกตเกิดจากการปฏิสนธิในหลอดแก้ว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

องค์ประกอบของสารเคมีเกลือแร่และไอออนที่มีลักษณะคล้ายกับส่วนประกอบของน้ำยาเพาะเลี้ยง เครบ-ริงเกอร์ไบคาร์บอเนต (Biggers และคณะ, 1965; 1967; Whitten และ Biggers, 1968) คือมีส่วนประกอบของสารที่ให้พลังงานได้แก่ กลูโคส, แลคเตท และไพรูเวท จากการทดลองพบว่าการใช้สารที่ให้พลังงานเหล่านี้เปลี่ยนเป็นพลังงานของเอมบริโอในระยะก่อนการฝังตัวของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมมีลักษณะคล้ายกับในหนูเมาซ์ นั่นคือเอมบริโอระยะ 1- หรือ 2-เซลล์ ไม่สามารถออกซิไดซ์ (oxidize) กลูโคสให้ผ่านกระบวนการไกลโคไลซีส (glycolysis) แล้วให้พลังงานออกมาได้ ดังนั้นไพรูเวทและแลคเตทจึงเป็นแหล่งพลังงานสำคัญในการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของเซลล์ในระยะนี้ ส่วนกลูโคสจะเป็นแหล่งพลังงานส่งเสริมในระยะหลัง 8- เซลล์ ได้ดีเท่า ไพรูเวทและแลคเตท (Brinster, 1965c; Brinster และ Thomson, 1966; Cross และ Brinster, 1973)

สำหรับการเจริญและการแบ่งตัวของเอมบริโอของแฮมสเตอร์ ทุกระยะก่อนการฝังตัวอาศัยไพรูเวท, แลคเตท และกรดอะมิโน เป็นแหล่งให้พลังงานมากกว่ากลูโคส (Seshagiri และ Bavister, 1989) จากการที่เอมบริโอเกือบทุกระยะของการเจริญเติบโตอาศัยไพรูเวทเป็นพลังงานมากกว่ากลูโคส แสดงให้เห็นว่าในช่วงเวลาก่อนการฝังตัวนั้น krebs cycle activity เป็นแหล่งพลังงานใหญ่สำหรับใช้ในการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของเซลล์ โดยเอนไซม์ไพรูเวทดีไฮโดรจีเนส (pyruvate dehydrogenate) มากกว่ากระบวนการไกลโคไลซีส (Fridhandler, 1959; 1961; Brinster; 1967a; 1968) โดยวัดปริมาณของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ที่ให้ออกมา (Brinster, 1967a; 1967b) และการใช้ออกซิเจน (Mills และ Brinster, 1967) ดังรูปที่ 1.4 แสดง pathway ของกระบวนการไกลโคไลซีสและกระบวนการเครบไซเคิล

สำหรับความต้องการพลังงานของตัวอสุจิพบว่า อสุจิสามารถ



รูปที่ 1.4 แสดง pathway ของกระบวนการไกลโคไลซีสและกระบวนการเครบไซเคิล

เคลื่อนไหวได้เองในน้ำยาเพาะเลี้ยง ที่มีองค์ประกอบของเกลือแร่และไอออน ธรรมดา (simple culture medium) โดยใช้พลังงานที่สะสมภายในตัวได้ (Hoshi และคณะ, 1982a-c) และการเติมแลคเตท,ไพรูเวทและกลูโคส ในน้ำยาเพาะเลี้ยงจะช่วยส่งเสริมให้อสุจิเกิดกระบวนการคาพาซิเตชั่น และ อะโครโซม รีแอคชั่น ได้เร็วขึ้น (Miyamoto และ Chang, 1973a; Bavister และ Yangimachi, 1977) แต่ถ้าเติมกลูโคสเพียงอย่างเดียว ไม่สามารถส่งเสริมการปฏิสนธิได้ (Rogers และ Yanagimachi, 1975; Rogers และคณะ, 1979)

นอกจากกลูโคส, แลคเตท และไพรูเวท จะเป็นสารที่ให้พลังงาน ต่ออสุจิและไข่ในระยะก่อนการฝังตัวแล้วพบว่า กรดอะมิโนหลายชนิดและโปรตีน ก็มีความจำเป็นต่อการเจริญของไข่ตั้งแต่อยู่ในรังไข่ จากการทดลองนำไข่ ของแฮมสเตอร์ที่เจริญไม่ถึงระยะที่มี 1st polar body เลี้ยงในจานทดลอง ในน้ำยาเพาะเลี้ยง Eagle's ที่เติมกรมอะมิโน 13 ชนิด พบว่าไข่ของ แฮมสเตอร์สามารถเจริญต่อจนถึงระยะที่มี 1st polar body ได้ แต่ไม่ สามารถเจริญต่อในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ไม่เติมกรดอะมิโน และยังพบว่ากรด อะมิโน 4 ชนิด (กลูตามีน (Gln, 1.0 mM), เฟนนิลอาลานีน (Phe, 0.1 mM), ไอโซลูซีน (Ile, 0.0 mM) และ เมทไธโอนีน (Met, 0.05 mM)) มีผลต่อการเจริญเติบโตมากที่สุด (Gwatkin และ Haidri, 1973) นอกจากนี้กรดอะมิโนที่จำเป็น (essential amino acids) ที่ผสมในน้ำยา เพาะเลี้ยง HAM's F-10 ก็มีความจำเป็นต่อการเจริญของไข่ของกระต่าย (Kane และ Foote, 1970a-c; Kane, 1987), วัว (Wright และคณะ, 1976a), สุกร (Shea และคณะ, 1976), แกะ (Shea และคณะ, 1976; Newcomb และคณะ, 1978) และไข่ของคน (Seitz และคณะ, 1971; Edwards และ Steptoe, 1975; Lopata และคณะ, 1980; Leung และคณะ, 1984)

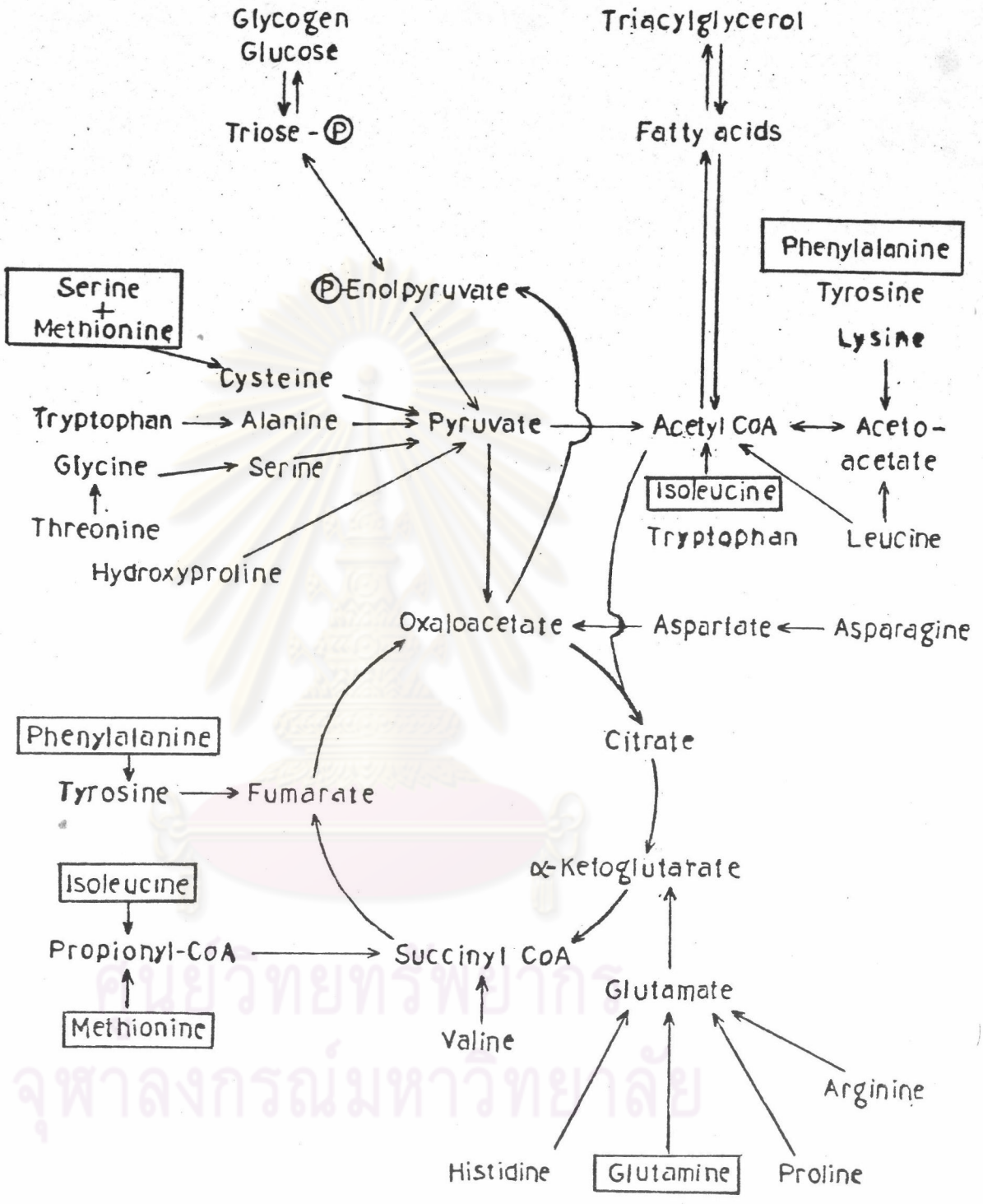
นอกจากนี้กรดอะมิโนยังช่วยส่งเสริมการเจริญและการแบ่งตัวของเอมบริโอของแฮมสเตอร์จากระยะ 1- เซลล์ เจริญถึงระยะ 2- เซลล์ เพิ่มมากขึ้นจากร้อยละ 28 เป็นร้อยละ 52 (Juetten และ Bavister, 1983), มีผลต่อการเจริญและการแบ่งตัวของเอมบริโอของแฮมสเตอร์จากระยะ 8- เซลล์ เจริญถึงระยะบลาสโตซิสเพิ่มจาก 36% เป็น 60% และยังพบว่ากลูตามีนและเมทไธโอนีนมีผลต่อการเจริญและการแบ่งตัวมากที่สุด รองลงมาได้แก่เฟนนิลอาลานีนและไอโซลูซีน (Bavister และคณะ, 1983a) แต่ก็พบว่าในหนูเมาซ์สามารถเจริญและแบ่งตัวจากระยะ1- เซลล์ จนถึงระยะบลาสโตซิลได้ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ไม่เติมกรดอะมิโน (Cholewa และ Wnitten, 1970) แต่กรดอะมิโนจะไปมีผลต่อการเจริญเติบโตในระยะหลังบลาสโตซีส โดยพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดอะมิโนในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ใช้เลี้ยงเอมบริโอของหนูเมาซ์ระยะบลาสโตซีส จะช่วยส่งเสริมการเจริญและการ differentiation ของ inner cell mass ของเอมบริโอดีกว่าน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิดอื่นที่มีกรดอะมิโนน้อยกว่าหรือไม่มีเลย (Juurlink และ Fedoroff, 1977; Spindle, 1980)

สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดอื่นในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมพบว่าเซลล์ต้องการกลูตามีนมากกว่ากรดอะมิโนชนิดอื่น 5-20 เท่า (Eagle, 1955) และต้องการกลูตามีนในการสร้างพลังงานเพื่อการเจริญและการแบ่งตัวมากกว่ากลูโคส (Ehrensvard และคณะ, 1949) และจากการศึกษาการวัด oxidation rate ของกลูโคสและกลูตามีนในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลายชนิด พบว่า oxidation rate ของการออกซิไดซ์กลูตามีนมากกว่ากลูโคส (Sumbilla และคณะ, 1981) และการออกซิไดซ์กลูตามีนจะให้กลูตาเมท, คาร์บอนไดออกไซด์เป็นส่วนใหญ่ และแลคเตทเป็นส่วนน้อย (Stoner และ Merchant, 1972; Zielke และคณะ, 1980) แต่การออกซิไดซ์กลูโคสจะให้แลคเตทเป็นส่วนใหญ่ และคาร์บอนไดออกไซด์เป็นส่วนน้อย (Eagle และคณะ, 1958; Morell และ Froesch, 1973) จากการที่การออกซิไดซ์กลูตามีนแล้วให้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นส่วนใหญ่ และ

การออกซิไดซ์กลูโคสให้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นส่วนน้อย Stoner และ Merchant (1972) ให้ข้อเสนอแนะว่า กลูตามีนน่าจะเป็นแหล่งให้พลังงานส่วนใหญ่ในการเจริญและการแบ่งตัวของเซลล์มากกว่ากลูโคสและกรดอะมิโนชนิดอื่น ๆ ในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม

กรดอะมิโนทุกชนิดเมื่อซึมผ่านเข้าไปภายในเซลล์ เซลล์จะต้องเปลี่ยนกรดอะมิโนเหล่านี้เป็นสาร Amphibolic intermediates โดยอาศัยเอนไซม์ที่เฉพาะเจาะจงในการสลายกรดอะมิโนแต่ละชนิดดังแสดงในรูปที่ 1.5 (แสดง path way ของกรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิด ก่อนจะเข้าเครบไซเคิล) สำหรับการสลายกลูตาเมทไปเป็น α- ketoglutarate นอกจากอาศัยเอนไซม์ L-glutamate dehydrogenate ที่เฉพาะเจาะจงแล้ว ยังอาศัย NAD^+ (nicotinamide adenine dinucleotide) เป็น co-factor ในการรับไฮโดรเจนอะตอมเพื่อเปลี่ยนกลูตาเมทเป็น α- ketoglutarate ก่อนเข้าเครบไซเคิลแล้วให้พลังงานออกมา (รูปที่ 1.6)

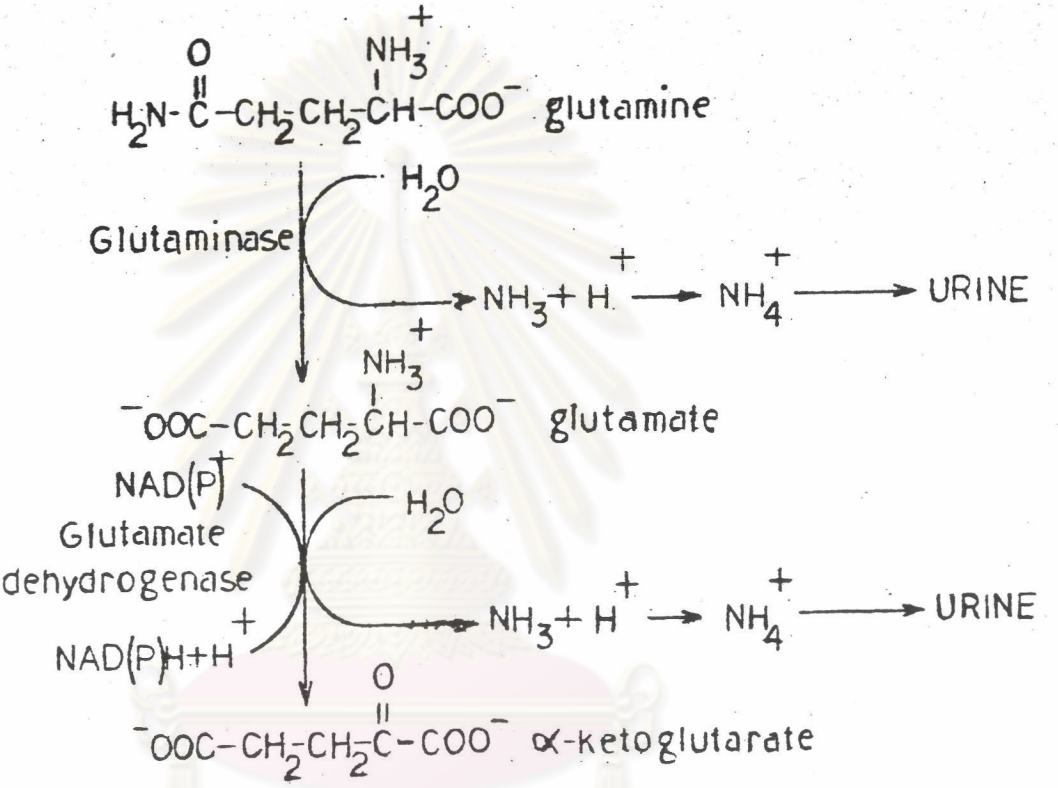
สำหรับความสำคัญของกรดอะมิโน, โปรตีนจำพวก crystallized bovine serum albumin (BSA) และสารสังเคราะห์จำพวก polyvinyl alcohol (PVA) นอกจากจะเป็นแหล่งที่ให้ไนโตรเจน (Thomson, 1966) มีบทบาทในการ stabilize membrane คือลดการรั่วไหลของกรดอะมิโนภายในเซลล์ (Endogeneous amino acids) ออกสู่น้ำยาเพาะเลี้ยง (Brinster, 1965c; 1970) มีส่วนช่วยทำลายอนุมูลโลหะที่เป็นอันตรายในน้ำยาเพาะเลี้ยง (Cholewa และ Whitten, 1970) แล้วพบว่า BSA ยังช่วยส่งเสริมการเกิดกระบวนการ คาพาซิเตชั่นและอะโครโซม รีแอคชั่นของเซลล์อสุจิให้เร็วขึ้น (Lui และ Meizel, 1977; Meizel, 1978; Menge และ Black, 1979; Hall, 1981; Karp และคณะ, 1981; Zausner-Guelman และคณะ, 1981; Cohen และคณะ, 1982) แต่พบว่า BSA มีสารประกอบบางอย่างที่สามารถทำ



รูปที่ 1.5 แสดง pathway ของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ก่อนเข้ากระบวนการเครบไซเคิล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

015727



รูปที่ 1.6 แสดงการสลายของ Glutamine แล้วจะได้ ∝-ketoglutarate ก่อนจะเข้าเครบไซเคิล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปฏิกิริยากับส่วนประกอบใน seminal plasma ซึ่งอาจเป็น spermine หรือ polyamine อื่นได้เกิดเป็นสารประกอบที่มีพิษต่อเซลล์อสุจิและไข่ได้ (Quinn และ Stanger, 1980) ส่วน PVA นั้นช่วยกระตุ้นการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ แต่ไม่ได้ช่วยส่งเสริมการเกิดคาพาซิเตชั่นหรืออะโครโซมรีแอคชั่น (Bavister, 1981) แต่พบว่า PVA มีคุณสมบัติช่วยรักษาความตึงผิว (surface tension) ของน้ำยาเพาะเลี้ยงให้มีสภาพคงที่ และช่วยลดการรั่วไหลของกรดอะมิโนภายในเซลล์ออกสู่น้ำยาเพาะเลี้ยงได้ดีกว่า BSA (Bavister, 1981; Anderson, 1980) ซึ่งในปัจจุบันนี้นักวิจัยนิยมใช้ PVA เติมในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลายชนิด (Gwatkin และ Haidri, 1973; Bavister และคณะ, 1983a; Kane และคณะ, 1986; Boatman, 1987; Kane และ Bavister, 1989; Seshagiri และ Bavister, 1989)

1.2 <u>ระดับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของน้ำยาเพาะเลี้ยง</u> ก็มีส่วนสำคัญในการช่วยส่งเสริมการปฏิสนธิและการเจริญเติบโตของเอมบริโอในแอมลเตอร์ระดับ pH ที่เหมาะสมของน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ใช้กันอยู่ในช่วงระหว่าง 6.8-7.4 (Yodyingyuad, 1982; Bavister และคณะ, 1983a) และระดับ pH ที่เหมาะสมในการเกิดการปฏิสนธิได้สูงสุดอยู่ในช่วงระหว่าง 7.4-7.6 (Tyler และคณะ, 1981) จากการทดลองพบว่าถ้าระดับ pH สูงกว่านี้จะทำให้เกิด polyspermic fertilization ได้ (Bavister, 1969) และพบว่าน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีโซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) และคาร์บอนไดออกไซด์เป็น buffer นี้จะมีระดับความเป็นกรด-ด่าง คงที่อยู่ในตู้อบที่มีความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์คงที่ด้วย (Yanagimachi, 1984)

1.3 <u>ระดับความเข้มข้นของสารละลาย (Osmolality)</u> ที่เหมาะสมของน้ำยาเพาะเลี้ยงส่วนมากมักมีค่าโดยประมาณเท่ากับค่าของ

ของเหลวภายในร่างกาย คือประมาณ 308 mOsmol (Brinster, 1965a) แต่ก็มีรายงานถึงความแตกต่างของระดับความเข้มข้นของน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เช่น น้ำยาเพาะเลี้ยงของหนูเมาซ์และหนูแฮมสเตอร์อยู่ในช่วงระหว่าง 177-396 และ 250-388 mOsmol ตามลำดับ (Miyamoto และ Chang, 1973b) ใน hamster oocytes 285-295 mOsmol (Gwatkin และ Haidri, 1973) แฮมสเตอร์เอมบริโอระยะ 8- เซลล์ 275-300 mOsmol (Yodyingyuad, 1982; Bavister และคณะ, 1983a), pig oocytes ระดับ 285 mOsmol (Mcgaughey, 1977), rabbit oocytes ระดับ 308 mOsmol (Bae และ Foote, 1975) ดังนั้นการเลือกน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีระดับความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมกับสัตว์แต่ละชนิดจะช่วยส่งเสริมให้การปฏิสนธิ และการเพาะเลี้ยงเอมบริโอเจริญได้ดี

2. <u>อายุของไข่และช่วงเวลาที่อบเลี้ยงไข่กับอสุจิ</u>

2.1 <u>อายุของไข่</u> มีผลต่อการปฏิสนธิและการแบ่งตัวของเอมบริโอมาก ไข่แฮมสเตอร์ที่เจริญเต็มที่และหลุดจากรังไข่จะต้องอยู่ในระยะ Metaphase II ของการแบ่งตัวแบบไมโอซีส(Yanagimachi และ Chang, 1961) โดยพบว่าหลังจากที่กระตุ้นหนูแฮมสเตอร์ที่โตเต็มที่ให้ตกไข่หลายใบ (superovulation) ด้วยการฉีดฮอร์โมน pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) และ human chorionic gonadotropin (HCG) แล้วประมาณ 12-13 ชั่วโมง หลังฉีด HCG จะเกิดการตกไข่ (Yanagimachi, 1969) จากการทดลองพบว่าถ้าเก็บไข่ 2-9 ชั่วโมง หลังตกไข่มาผสมกับอสุจิภายนอกร่างกายจะเกิดการปฏิสนธิสูงถึง 94-90% แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเอมบริโอต่อไปพบว่า กลุ่มที่ผสม 2 ชั่วโมง หลังตกไข่สามารถเจริญและแบ่งตัวต่อไปได้ (68%) มากกว่ากลุ่มที่ผสม 9 ชั่วโมง หลังตกไข่ (21%) ถึง 3 เท่า (Juetten และ Bavister, 1983)

การเก็บไข่ 0 - 2 ชั่วโมงหลังตกไข่จะเป็นช่วงที่เหมาะสมที่สุดในการปฏิสนธิและการเจริญของเอมบริโอ เนื่องจากในช่วง 6-12 ชั่วโมงหลังตกไข่ follicular cells และ zona pellucida จะมีการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีรวิทยา ซึ่งมีผลทำให้ไข่อยู่ในสภาพที่ไม่เหมาะที่จะให้อสุจิเข้าผสมได้ (Chang และ Fernandez-cano, 1958; Yanagimachi และ Chang, 1961; Juetten และ Bavister, 1983) และไข่ที่มีอายุมากกว่า 12 ชั่วโมง หลังตกไข่อาจเกิด spongtaneous activation ได้ (Yanagimachi และ Chang, 1961; Juetten และ Bavister, 1983)

2.2 ช่วงเวลาของการอบเลี้ยงไข่และอสุจิไว้ด้วยกัน (co-incubation period) ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการอบเลี้ยงไข่และอสุจิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมไว้ด้วยกันนั้นแตกต่างกัน ในแฮมสเตอร์ช่วงเวลาที่เหมาะสมของการอบเลี้ยงอยู่ในช่วง 3-4 ชั่วโมง (Yanagimachi และ Chang, 1979) ในกระต่าย, หนูเมาซ์ ควรจะล้างอสุจิออกจากไข่ก่อน 8 ชั่วโมง ภายหลังที่อบเลี้ยงไว้ด้วย (Hoppe และ Pitts, 1973) เนื่องจากพบว่า ถ้าช่วงเวลาของการอบเลี้ยงอสุจิและไข่ไว้ด้วยกันเป็นเวลานาน จะมีผลทำให้ไข่มีอันตรายจากสารที่หลั่งออกมาจากตัวอสุจิที่ตายแล้ว ผลจากความเป็นกรดด่างของน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ลดลงจาก 7.6 เป็น 7.2-7.4 และจากระดับความเข้มข้นของสารละลายที่เพิ่มขึ้นจาก 280-285 mOsmol เป็น 332 mOsmol (Bavister, 1977)

3. วิธีการเตรียมอสุจิและจำนวนของอสุจิต่อไข่

3.1 วิธีการเตรียมอสุจิ อสุจิที่นำมาใช้ในการปฏิสนธิของหนูแฮมสเตอร์, หนูเมาซ์ และหนูแรท นิยมเก็บจาก cauda epididymis (Yanagimachi และ Chang, 1963; 1964) เนื่องจากอสุจิที่ผ่านเข้ามาอยู่ในบริเวณนี้มีการเจริญและเปลี่ยนแปลงทั้งทางด้านสรีรวิทยา

(Physiology), ด้านรูปร่าง (Morphology) และมีการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี (Biochemistry) มาระดับหนึ่งแล้ว (Orgebin-Crist, 1969; Bedford, 1975; 1979; Hamilton, 1977) เซลล์อสุจิได้รับสารอาหารบางอย่างจากสภาพแวดล้อมภายนอก เช่น จาก cauda epididymis และ seminiferous tubules เข้าไปเก็บสะสมเป็นพลังงานในการเคลื่อนไหวได้ (Mohri และ Yanagimachi, 1980) แต่ก็พบว่าของเหลวจากท่อสืบพันธุ์เพศผู้ปริมาณมาก ๆ ที่ติดมากับอสุจิจะมีผลยับยั้งการเกิด อะโครโซม รีแอคชั่นได้ (Bavister, 1973; Bavister และคณะ, 1978) ทำให้อสุจิไม่สามารถเจาะเข้าไปผสมกับไข่ได้ (Morton และ Chang, 1973; Oliphant และ Brackett, 1973) ดังนั้นจึงมีขั้นตอนในการเตรียมอสุจิเพื่อแยกสารจากท่อสืบพันธุ์เพศผู้ออกจากตัวอสุจิก่อนจะนำเข้าไปผสมกับไข่ สำหรับในหนูแฮมสเตอร์เมื่อเตรียมตัวอสุจิได้แล้ว นิยมเติมสาร catecholamine เช่น epinephrine, taurine หรือ hypotaurine ลงในน้ำยาปฏิสนธิ สารเหล่านี้เรียกว่า sperm motility factors (SMF) จะช่วยกระตุ้นการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิและช่วยส่งเสริมให้เกิดกระบวนการ คาพาซิเตชั่น และ อะโครโซม รีแอคชั่น ให้เร็วขึ้น และยังช่วยให้อสุจิมีชีวิตรอดได้ยาวนานจนกระทั่งสามารถเจาะทะลุเข้าไปผสมกับไข่ได้ (Bavister, 1973; Gwatkin, 1977; Niwa และคณะ, 1980; Meizel และคณะ, 1980)

3.2 <u>จำนวนอสุจิ : ไข่</u> เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการปฏิสนธิและการแบ่งตัวของไข่ จากการทดลองพบว่าอัตราส่วนของอสุจิที่เหมาะสมในการปฏิสนธิภายนอกร่างกายนั้น จะใช้อสุจิ 10^3 - 10^5 ตัวต่อซีซีต่อไข่ 1 ใบ (Talbot และคณะ, 1974; Niwa และ Chang, 1974; Fraser และ Drury, 1975, Rogers, 1978) เนื่องจากถ้าใช้อสุจิมากกว่า $19\text{-}30\times10^5$ ตัวต่อซีซีต่อไข่ 1 ใบ จะมีผลทำให้เกิด triploidy ได้มาก (Fraser และ Drury, 1975)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การถ่ายฝากเอมบริโอ

การถ่ายฝากเอมบริโอในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมจากแม่หนึ่งไปยังอีกแม่หนึ่งเป็นผลสำเร็จครั้งแรก โดย Heape (1890) สามารถถ่ายฝากเอมบริโอระยะ 4- เซลล์ ของกระต่ายไปยังแม่กระต่ายที่ตั้งท้องเทียม และสามารถเจริญมีชีวิตรอดในมดลูกของ foster mother ได้ สำหรับในแฮมสเตอร์นั้น การถ่ายฝากเอมบริโอครั้งแรกเพื่อทดสอบสภาพการมีชีวิตและอายุระหว่างตัวฝาก (donor) และตัวรับ (recipient) (Blaha, 1964) ต่อมามีการถ่ายฝากเพื่อดูบทบาทของฮอร์โมนต่อการฝังตัว (implantation) (Orsini และ Psychoyos, 1965), ดูผลความสอดคล้อง (synchrony) ระหว่างตัวฝากและตัวรับ ในการถ่ายฝากเอมบริโอ (Sato และ Yanagimachi, 1972) และทดสอบสภาพการมีชีวิตรอดของเอมบริโอที่ได้จากการปฏิสนธิ in vitro และ in vivo (Whittingham และ Bavister, 1974) หลังจากนั้นได้มีการถ่ายฝากเอมบริโอระยะก่อนการฝังตัวในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมได้อีกหลายชนิด ดังตารางที่ 1.3 ซึ่งแสดงความสำเร็จเป็นครั้งแรกในการถ่ายฝากเอมบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมชนิดต่าง ๆ

จากการศึกษาพบว่าปัจจัยที่ช่วยส่งเสริมการถ่ายฝากให้เป็นผลสำเร็จนั่นคือ ความสอดคล้อง (degree of synchronization) ระหว่างอายุของเอมบริโอกับอายุและความพร้อมของการที่ตั้งท้องเทียม การที่จะกำหนดให้แน่นอนว่าสภาพเหลื่อมล้ำของเวลา (asynchrony) จะแตกต่างกันมากน้อยแค่ไหนที่ท่อนำไข่หรือมดลูกพร้อมที่จะยอมรับการถ่ายฝากนั้นขึ้นอยู่กับสัตว์แต่ละชนิดซึ่งไม่เหมือนกัน เนื่องจากเอมบริโอของสัตว์แต่ละชนิดจะตอบสนองต่อสารคัดหลั่งที่หลั่งจากท่อนำไข่หรือมดลูกต่างกัน และการถ่ายฝากเอมบริโอของสัตว์แต่ละชนิดจะกระทำในช่วงเวลาที่ไม่เหมือนกัน โดยทั่ว ๆ ไปการถ่ายฝากเอมบริโอเข้าไปในมดลูกของสัตว์ที่มีอายุการตั้งท้องเทียมสอดคล้องกับอายุของเอมบริโอจะประสบผลสำเร็จมากที่สุด (Chang, 1950;

ตารางที่ 1.3 แสดงความสำเร็จครั้งแรกในการถ่ายฝากเอมบริโอในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม

ชนิดของสัตว์	ผู้วิจัย	ค.ศ.
กระต่าย	Heape	1890
หนูขาว	Nicholas	1933
แกะ	Warwick, Berry และ Horlacher	1934
หนูถีบจักร	Fekete และ Little	1942
แพะ	Warwick และ Berry	1949
โค	Willett, Black, Casida, Stone และ Buckner	1951
สุกร	Kvasnickii	1951
เฟอเรท	Chang	1968
แฮมสเตอร์	Sato และ Yanagimachi	1972
ม้า	Oguri และ Tsutsumi	1974
ลิงบาบูน	Kraemer, Moore และ Kramen	1976
มนุษย์	Steptoe และ Edwards	1978
แมว	Schriver และ Kraemer	1978
สุนัข	Kinney, Pennycook, Schriver, Templeton และ Kraemer	1979

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Noyes และ Dickmann, 1960; 1961; Sato และ Yanagimachi, 1972) เช่น ในหนูแฮมสเตอร์ ถ้านำเอมบริโอที่มีอายุ 3-4 วัน ไปถ่ายฝากให้ตัวรับที่ตั้งท้องเทียม 3-4 วัน จะมีการฝังตัว 49 - 54% (Orsiniและ Psychoyos, 1965) แต่ในสัตว์บางชนิดการถ่ายฝากเอมบริโอที่มีอายุมากกว่าการตั้งท้องเทียม 1 วัน การฝังตัวของเอมบริโอจะดีกว่าเช่น การถ่ายฝากเอมบริโอของหนูเมาซ์ อายุ 3 1/2 วัน ไปยังมดลูกของตัวรับที่ตั้งท้องเทียม 2 1/2วัน จะให้ผลในการฝังตัวของเอมบริโอได้ดีกว่า การนำเอมบริโอที่มีอายุ 2 1/2 วัน ถ่ายฝากไปยังมดลูกที่มีอายุของการตั้งท้องเทียม 3 1/2 วัน (Mclaren และ Michie, 1956), ในกระต่ายถ้าเอมบริโอมีอายุมากกว่าตัวรับที่ตั้งท้องเทียม 1-2 วัน จะให้ผลในการฝังตัวได้ดีกว่า (Chang, 1950)

ตำแหน่งของการถ่ายฝากและอายุของเอมบริโอก็เป็นองค์ประกอบหนึ่งที่สำคัญมากต่อการอยู่รอดของเอมบริโอ เอมบริโอที่อยู่ในระยะแรก ๆ ของการแบ่งตัว (1-8 เซลล์) มักพบในท่อนำไข่ ซึ่งเมื่อมีการถ่ายฝากไปยังตัวรับก็ควรจะถ่ายฝากไปที่ท่อนำไข่เช่นเดียวกัน แต่ก็พบว่าเอมบริโอของหนูเมาซ์ในระยะก่อนการฝังตัวทุกระยะสามารถมีชีวิตรอดได้ ถึงแม้จะทำการถ่ายฝากเอมบริโอไปยังท่อนำไข่ของตัวรับที่มีอายุการตั้งท้องเทียมเพียง 1 วันก็ตาม (Tarkowski, 1959) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเอมบริโอที่มีอายุ 3 วัน ซึ่งอยู่ในระยะ 4 - 8 เซลล์ โอกาสจะมีชีวิตรอดเมื่อทำการถ่ายฝากไปยังตัวรับที่ตั้งท้องเทียมได้มากกว่าเอมบริโอที่มีอายุ 1-2 วัน ซึ่งอยู่ในระยะ 1-2 เซลล์ (Pickworth และ Chang, 1969) เช่น ในหนูแฮมสเตอร์ ถ้านำเอมบริโอที่มีอายุ 3-4 วัน (ระยะ 4 เซลล์ ถึงบลาสโตซิส) ถ่ายฝากไปยังมดลูกของตัวรับโอกาสการตั้งท้องสูงถึง 82% และสามารถคลอดลูกได้เป็นปกติ 29.6% - 57.5% (Sato และ Yanagimachi, 1972; Whittingham และ Bavister, 1974) แต่ถ้านำเอมบริโอที่มีอายุ 1-2 วัน ถ่ายฝากไปยังท่อนำไข่ของตัวรับที่ตั้งท้องเทียมพบว่า โอกาสที่เอมบริโอจะแบ่งตัวจนถึงระยะบลาสโตซีสและฝังตัวน้อยมาก (Whittingham และ Bavister, 1974)

นอกจากนี้พบว่าปัจจัยอื่น ๆ เช่น สภาพคงที่ของความเป็นกรด-ด่างของน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการถ่ายฝากก็มีผลต่อการแบ่งตัวและการอยู่รอดของเอมบริโอภายหลังทำการถ่ายฝาก (Whittingham และ Bavister, 1974) โดยพบว่าถ้าใช้น้ำยาเพาะเลี้ยง Tyrode's solution (Tyrode-B_2) ในการถ่ายฝากเอมบริโอระยะ 1-2 เซลล์ ที่ได้จากการปฏิสนธิภายนอกร่างกายไปยังท่อนำไข่ของแอมสเตอร์ที่ตั้งท้องเทียม เอมบริโอไม่สามารถจะเจริญและแบ่งตัวต่อไปได้ภายหลังการถ่ายฝาก 48 ชั่วโมง แต่ถ้าใช้น้ำยา PBI ถ่ายฝากเอมบริโอ พบว่าเอมบริโอสามารถจะแบ่งตัวได้ต่อจนถึงระยะบลาสโตซีสถึง 35.4% ภายหลังการถ่ายฝาก 48 ชั่วโมง ระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยงเอมบริโอภายนอกร่างกายไว้นาน ๆ ก็มีผลต่อการแบ่งตัวและมีชีวิตรอดของเอมบริโอภายหลังการถ่ายฝาก (Yodyingyuad, 1982) นอกจากนี้วิธีทำการทดลองตลอดจนความชำนาญของผู้ทำการทดลองก็เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อความอยู่รอดของเอมบริโอภายหลังทำการถ่ายฝาก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้</u>

1. เพื่อศึกษาว่ากรดอะมิโนจะมีส่วนช่วยส่งเสริมการปฏิสนธิในหลอดทดลองจริงหรือไม่ ถ้ามี กรดอะมิโนชนิดใดมีผลมากน้อยเท่าไร

2. เพื่อศึกษาถึงความสำคัญของกรดอะมิโนว่ามีส่วนช่วยส่งเสริมต่อการเจริญและการแบ่งตัวของเอมบริโอของแอมสเตอร์ที่ได้จากการปฏิสนธิภายนอกร่างกายหรือไม่ ถ้ามีกรดอะมิโนชนิดใดมีผลมากน้อยเท่าไร

3. เพื่อศึกษาว่ากรดอะมิโนช่วยเพิ่มความอยู่รอดของเอมบริโอภายหลังการถ่ายฝากหรือไม่

<u>ความสำคัญและประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ</u>

1. ทำให้ทราบถึงความสำคัญของกรดอะมิโนที่มีผลต่อการปฏิสนธิและการเจริญจนกระทั่งถึงระยะแบ่งตัวของเอมบริโอของแอมสเตอร์

2. ช่วยให้ได้เอมบริโอระยะก่อนการฝังตัวที่มีคุณภาพจากการเพาะเลี้ยงในจานทดลอง ซึ่งอาจประยุกต์ใช้ถึงการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของคนได้

3. นำไปสู่การเรียนรู้เกี่ยวกับ two-cell block ในหนูแอมสเตอร์ รวมทั้งในสัตว์ชนิดอื่นที่พบในลักษณะเดียวกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย