

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ในบทการตรวจเอกสารได้แบ่งเนื้อหาเป็นหัวข้อหลักดังนี้คือ การพัฒนาของตัวอ่อนระยะก่อนฝังตัว การตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อน ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเลี้ยงตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง และการเลี้ยงตัวอ่อนหลังจากตัดแบ่งครึ่ง

1. การพัฒนาของตัวอ่อนระยะก่อนฝังตัว

หลังจากที่ไข่ (oocyte) ได้รับการปฏิสนธิ ตัวอ่อนจะเริ่มมีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) แต่ในการแบ่งเซลล์ของตัวอ่อนเรียกว่า cleavage ในระยะนี้มีการเพิ่มเฉพาะจำนวนเซลล์ แต่ไม่มีการเพิ่มมวลของเซลล์ (cell mass) เป็นการเจริญเติบโตในเชิงลบ (negative) ไม่เป็นการพัฒนาที่แท้จริง (true development) มวลของเซลล์ตัวอ่อนในโคลดลงประมาณ 20 เพอร์เซ็นต์ ในแกะลดลงประมาณ 40 เพอร์เซ็นต์ หลังจากปฏิสนธิ 3 วัน ปริมาณโปรตีนในตัวอ่อนหนูลดลงประมาณ 25 เพอร์เซ็นต์ (McLaren, 1990) เมื่อตัวอ่อนแบ่งเซลล์จากเซลล์เดียวเป็น 2 เซลล์ เซลล์ของตัวอ่อนในระยะนี้เรียกว่า blastomere (Metzler, 1977)

เมื่อตัวอ่อนแบ่งตัวถึงระยะ 4 เซลล์ blastomere เริ่มมีการสัมผัสกัน เมื่อถึงระยะ 8 เซลล์ blastomere มีการจับกันแบบหลวมๆ มีการเปลี่ยนแปลงระบบขนส่งของเซลล์ทำให้มีช่องเหลวเข้าไปอยู่ระหว่าง blastomere ขณะที่มีการสะสมของเหลวและการสื่อสารภายในเซลล์ทำให้ blastomere มีการเชื่อมติดกัน ในช่วงนี้ตัวอ่อนมีลักษณะเป็นลูกบอลกลมคล้ายผลหม่อน (mulberry) เรียกว่าระยะ morula ซึ่งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั่วไปมีจำนวนเซลล์ประมาณ 16 ถึง 64 เซลล์ (วรรณดา สุจริต, 2535) plasma membrane ของ blastomere ในระยะนี้เริ่มมีการทำงานมากขึ้น และมีพื้นที่ที่ติดกันเพิ่มมากขึ้น เซลล์เปลี่ยนจากรูปร่างกลมเป็นรูปกลมและแบนเพื่อให้เกิดการสัมผัสกันระหว่างเซลล์มากที่สุด มีการพัฒนาการเชื่อมกันที่จำเพาะ (junctional complex) หรือเรียกว่า tight junctions ซึ่งพบในตัวอ่อนระยะ 8 ถึง 16 เซลล์ (McLaren, 1990) plasma membrane ของ blastomere ชิดเกาะกันแน่นและมีการรวมกลุ่มของเซลล์ตัวอ่อน (compaction) เป็นตัวอ่อนระยะ compacted morula เซลล์ตัวอ่อนจึงสามารถสื่อสารกันได้ดีและการรวมกลุ่มของเซลล์ตัวอ่อนเป็นลักษณะที่แสดงให้เห็นว่าตัวอ่อนมีการพัฒนาปกติ (Seidel และ Seidel, 1991)

ตัวอ่อนระยะ compacted morula มีช่องว่างเกิดขึ้นระหว่าง membrane บริเวณที่ไม่มีการยึดเกาะกัน ของเหลวจากภายในมดลูกเข้าไปสะสมอยู่ในช่องว่างนี้ (Pansky, 1982) โดยการทำงานของ Na^+/K^+ ATPase และการสร้าง tight junctional complex ระหว่างเซลล์ด้านนอก (Bazer และคณะ, 1993) ทำให้ตัวอ่อนเข้าสู่ระยะ early blastocyst ต่อมาช่องว่างขยายใหญ่อย่างรวดเร็วเป็น blastocyst cavity หรือ blastocoele เรียกกระบวนการนี้ว่า cavitation (Shostak, 1991) ตัวอ่อนระยะนี้เรียกว่าระยะ blastocyst มีรูปร่างกลมและเซลล์แยกออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งเป็นชั้นผิวนอก (peripheral) เรียกว่า trophoctoderm หรือ trophoblast ที่จะพัฒนาไปเป็นรก มี microvilli ปกคลุมอยู่รอบๆ เซลล์ trophoblast มีสัดส่วน 2 ใน 3 ของเซลล์ blastocyst ทั้งหมด อีกส่วนหนึ่งเป็นชั้นที่อยู่ภายใน (interior) เป็นกลุ่มของเซลล์ขนาดเล็กเรียกว่า inner cell mass หรือ embryoblast ซึ่งพัฒนาเป็นตัวอ่อนต่อไป การแบ่งออกเป็นส่วน trophoblast และ inner cell mass เป็นการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและหน้าที่ของเซลล์ (differentiate) ครั้งแรกของตัวอ่อน

ตัวอ่อนระยะ blastocyst มีการสะสมของเหลวมากขึ้นและมีการเพิ่มจำนวนเซลล์ทำให้ตัวอ่อนมีขนาดขยายใหญ่ ชั้นของ zona pellucida บางลง เรียกตัวอ่อนระยะนี้ว่า ระยะ expanded blastocyst เมื่อตัวอ่อนขยายขนาดใหญ่มากขึ้น zona pellucida จะแตกออกเรียกว่าการ hatching (เป็นการฟีกตัวของตัวอ่อนออกจาก zona pellucida) เรียกตัวอ่อนระยะนี้ว่าระยะ hatched blastocyst การแตกของ zona pellucida ในกรณีที่ไม่ได้อยู่ในมดลูกของสัตว์อาจเกิดจากเอนไซม์ protease ที่ผลิตจากเซลล์ trophoblast หรือเกิดจากการขยายขนาดของตัวอ่อน (McLaren, 1990) หรือเกิดจากเอนไซม์ blastolemmase ที่หลั่งจากเซลล์ที่อยู่ใต้ trophoblast หรือเกิดจากการสะสมของเหลวใน blastocoele (Bazer และคณะ, 1993) แต่สภาพที่อยู่ในมดลูกของสัตว์ การสลายของ zona pellucida อาจเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ protease ที่หลั่งจากเซลล์เยื่อ (epithelium) ของมดลูกซึ่งไวต่อฮอร์โมนเอสโตรเจน หรือจากการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง (pH)

การเปลี่ยนแปลงรูปร่างและหน้าที่ของเซลล์ครั้งแรกของตัวอ่อนมีการสร้าง gap junction เชื่อมระหว่าง blastomere ทั้งที่อยู่ชั้นผิวนอกกับ blastomere ที่อยู่ชั้นภายใน แต่ tight junction พบเฉพาะการเชื่อมระหว่าง blastomere ที่อยู่ชั้นผิวนอกเท่านั้น

การสื่อสารระหว่างเซลล์บริเวณ junctions อาจเกิดขึ้นโดย metabolites, second messengers เช่น cyclic AMP (cAMP) หรือประจุไฟฟ้า (electrical charge) เซลล์ที่ไม่มีการยึดติดกัน การแลกเปลี่ยนข่าวสารอาจเกิดขึ้นที่บริเวณชั้นผิวนอกในรูปของปฏิกิริยาสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างตัวกระตุ้น (effector) และตัวรับ (receptor) (Freshney, 1987) การขนถ่าย metabolites ระหว่างเซลล์อาจมีบทบาทสำคัญในขบวนการเมตาบอลิซึม metabolites ที่สร้างโดยเซลล์หนึ่งอาจ

ถูกเซลล์อื่นนำไปใช้ (Tedeschi, 1993) เซลล์ของตัวอ่อนมีการเปลี่ยนแปลงอยู่เสมอ มีความสามารถที่จะรับและตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นหลายชนิด (Gilbert, 1986)

2. การตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อน

การตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนเพื่อผลิตฝาแฝดเหมือน โดยการแยก blastomere ช่วงระยะต้นๆ ของการพัฒนาของตัวอ่อน (earlier stage) เริ่มมีการศึกษาในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด เช่น หนู (Tarkowski, 1959) กระต่าย (Moore และคณะ, 1968) สุนัข (Moore และคณะ, 1969) แกะ (Moor และ Cragle, 1971) ต่อมาได้มีการทำให้เกิดฝาแฝดเหมือนจากการตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนเป็นรายแรก โดย Trounson และ Moore (1974a) ได้ตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนแกะระยะ 2 ถึง 8 เซลล์ ต่อมา Willadsen และ Polge (1981) ได้ทำให้เกิดฝาแฝดเหมือนโดยการตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนโค หลังจากนั้นจึงมีการนำเทคนิคตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนมาใช้กันอย่างแพร่หลายมากขึ้นในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด นอกจากนี้ยังมีการนำเทคนิคการตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนไปใช้ร่วมกับการย้ายฝากตัวอ่อนในโคเป็นการค้า (Baker และ Shea, 1985; Takeda และคณะ, 1986; Arave และคณะ, 1987; Leibo และ Rall, 1987; Gray และคณะ, 1991; Kippax และคณะ, 1991; Lewis, 1994) และ (Udy, 1987)

2.1 ประโยชน์จากการตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อน

การตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนสามารถนำมาใช้เพิ่มประสิทธิภาพของเทคโนโลยีย้ายฝากตัวอ่อน โดยก่อให้เกิดประโยชน์หลายประการ (Nicholas และ Smith, 1983; Leibo และ Rall, 1987; Lucas-Hahn และ Niemann, 1991; Bredbecka และคณะ, 1992; 1994; Nowshari และ Holtz, 1993) ดังนี้

1. เพิ่มการผลิตสัตว์พันธุ์ดี โดยเพิ่มประชากรสัตว์และเพิ่มการแพร่พันธุ์อย่างรวดเร็ว
2. ผลิตฝาแฝดเหมือน เพื่อใช้ในงานวิจัยด้านโภชนาศาสตร์ พันธุศาสตร์ การปรับปรุงพันธุ์ สรีรวิทยา คัพภะวิทยา สภาพแวดล้อม
3. เพิ่มจำนวนสัตว์ตั้งท้องต่อสัตว์ตัวผู้ โดยเพิ่มจำนวนตัวอ่อนที่นำไปใช้ต่อการเก็บตัวอ่อนแต่ละครั้ง เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการใช้ตัวผู้ ตัวรับ และตัวอ่อน
4. ใช้ในการคัดแยกเพศ หรือตรวจสอบความผิดปกติทางพันธุกรรม ความเหมือนทางพันธุกรรม
5. ใช้ในการทดสอบวิธีการแช่แข็งตัวอ่อน
6. ศึกษาการพัฒนาของตัวอ่อน และความสามารถในการมีชีวิตรอดของเซลล์ตัวอ่อน
7. เพิ่มความเหมือนกันในฝูงสัตว์ (uniformity)

2.2 ข้อจำกัดของการตัดแบ่งครั้งตัวอ่อน

ข้อจำกัดของการนำเทคนิคตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนไปใช้ในการผลิตปศุสัตว์ คือ

1. ถ้าตัดแบ่งครั้งมากกว่า 4 ส่วน ตัวอ่อนจะไม่สามารถพัฒนาอย่างปกติได้

เนื่องจากมีจำนวนเซลล์น้อยเกินไป (Wooliams และ Wilmut, 1989)

2. การตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนไม่สามารถนำมาใช้ร่วมกับการแช่แข็ง และการละลายหลังแช่แข็งได้ เนื่องจากมีอัตราการมีชีวิตรอดต่ำ ตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่ได้จึงต้องย้ายฝากสู่ตัวรับทันที (Gray และคณะ, 1991)

3. การตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนไม่ได้เปลี่ยนแปลงการพัฒนาของตัวอ่อน ตัวอ่อนตัดแบ่งครั้ง หรือ blastomere ที่แยกมาจากตัวอ่อนระยะการเจริญอื่นๆ สามารถพัฒนาถึงระยะ blastocyst หรือเป็น blastocyst vesicle ที่ไม่มี inner cell mass โดยใช้เวลาเท่ากับตัวอ่อนปกติ แต่มีจำนวนเซลล์น้อยกว่ามาก ทำให้ความสามารถในการพัฒนาเป็นลูกสัตว์ลดลง และ blastocyst vesicle ไม่สามารถพัฒนาเป็นลูกสัตว์ได้ (Yang และ Anderson, 1992)

2.3 วิธีการตัดแบ่งครั้งตัวอ่อน

วิธีการในการตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนเพื่อผลิตฝาแฝดเหมือน มีด้วยกันหลายวิธีคือ การแยก blastomere การตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนโดยใช้ปิเปตยึดตัวอ่อน (holding pipette) การตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนโดยไม่ใช้ปิเปตยึดตัวอ่อน การตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนโดยใช้น้ำยาตัดแบ่งตัวอ่อน (splitting medium) การตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนในน้ำยาตัดแบ่งที่ใส่น้ำตาลซูโครส การตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนโดยทำรอยบากที่งานตัดแบ่งตัวอ่อน และการตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนโดยใช้มือควมคุมใบมีดโดยตรง ดังรายละเอียดต่อไปนี้

2.3.1 การแยก blastomere

การแยก blastomere คือ การนำตัวอ่อนระยะระยะต่างๆ ของการพัฒนา (2 ถึง 8 เซลล์) มาแยก blastomere โดย Tarkowski (1959) ทำการศึกษาในหนู ใช้ปิเปตยึดตัวอ่อนและผ่าเปิด zona pellucida ด้วยใบมีดขนาดเล็ก จากนั้นแยก blastomere ออกจากกลุ่มของเซลล์ตัวอ่อน โดยอาจแยก 1 blastomere จากตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ ($1/2$) แยก 2 blastomere จากตัวอ่อนระยะ 4 เซลล์ ($2/4$) แยก 1 blastomere จากตัวอ่อนระยะ 4 เซลล์ ($1/4$) หรือ แยก 4 blastomere จากตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ ($4/8$) โดยใช้ปิเปตที่มีขนาดใหญ่กว่า blastomere ที่ต้องการแยกเพียงเล็กน้อย จากนั้นนำ blastomere ที่แยกออกมาได้ไปใส่ใน zona pellucida ที่ได้จากตัวอ่อนที่ไม่มีการปฏิสนธิหรือจากไข่อ่อน แล้วจึงนำไปเลี้ยงหรือย้ายฝากสู่ตัวรับเพื่อดูความสามารถในการมีชีวิตรอด การแยกเซลล์ตัวอ่อนส่วนใหญ่ใช้ในการศึกษาความสามารถ (totipotency) ในการแบ่งเซลล์

หรือพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะต่อไป หรือพัฒนาเป็นลูกสัตว์ของตัวอ่อนที่ถูกแยก blastomere หรือ blastomere ที่แยกออกมาจากตัวอ่อนระยะต่างๆ

2.3.2 การตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนโดยใช้ปิเปตยึดตัวอ่อน

การตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนครั้งแรกมีรายงานโดย Trounson และ Moore (1974a) โดยนำตัวอ่อนเกาะไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนที่มีเอนไซม์ pronase ซึ่งเป็นเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน (proteolytic enzyme) เพื่อย่อยชั้นที่เป็นเยื่อเมือก (mucin) ทำให้ zona pellucida บางลง และมีลักษณะนุ่มทำให้ตัดได้ง่าย เทคนิคในการตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนนี้จำเป็นต้องใช้ปิเปตยึดตัวอ่อนไว้ด้วยแรงดึงดูด (negative pressure) จากนั้นจึงใช้อุปกรณ์ที่มีความแหลมคมเปิดผ่าส่วน zona pellucida และใช้ใบมีดขนาดเล็กตัดส่วนของเซลล์ตัวอ่อน โดยตัวอ่อนระยะ morula ต้องตัดให้ทั้ง 2 ส่วนมีขนาดเท่ากัน ตัวอ่อนระยะ blastocyst ต้องตัดส่วนของ inner cell mass และ trophoblast มีขนาดและสัดส่วนเท่ากัน (symmetrical) จากนั้นจึงนำตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งไปใส่ใน zona pellucida โดยอาจใส่ใน zona pellucida เดียวกัน หรือแยกใส่ใน zona pellucida ต่างกันก่อนนำไปทำการย้ายฝากหรือเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนเพื่อดูความสามารถในการพัฒนาของตัวอ่อน

2.3.3 การตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนโดยไม่ต้องใช้ปิเปตยึดตัวอ่อน

การตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนโดยใช้ปิเปตยึดตัวอ่อนเป็นวิธีที่ยุ่งยาก ต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญในการใช้เครื่องมือ และสิ้นเปลืองเวลาในการปฏิบัติ จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคในการตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนให้สะดวกขึ้น โดย Nagashima และคณะ (1984) ใช้พื้นของจานเลี้ยงตัวอ่อนเป็นพื้นผิวในการตัด (cutting surface) โดยไม่ต้องเปิดผ่า zona pellucida ก่อน สารละลายที่ใช้ตัดตัวอ่อนก็เป็นเพียงน้ำยาเก็บรักษาตัวอ่อน (holding medium) ต่อมาจึงได้มีผู้นำเทคนิคนี้มาใช้ตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนมากขึ้น (Mertes และ Bondioli, 1985; Kato และคณะ, 1987; Goto และคณะ, 1989; Kobayashi และคณะ, 1990; Nowshari และ Holtz, 1993)

2.3.4 การตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนโดยใช้น้ำยาดัดแบ่งตัวอ่อน

Herr และคณะ (1990b) ได้พัฒนาเทคนิคการตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนแบบไม่ต้องใช้ปิเปตยึดตัวอ่อน โดยคิดค้นน้ำยาดัดแบ่งตัวอ่อน คือ Dulbecco's modified phosphate buffer saline (DPBS) ที่ไม่มีโปรตีนเป็นส่วนประกอบ และมีน้ำตาลซูโครส 0.2 M ดังสูตรของน้ำยาดัดแบ่งตัวอ่อนในตารางที่ 1 ภาคผนวก การที่น้ำยาดัดแบ่งตัวอ่อนไม่มีโปรตีนเป็นส่วนประกอบต่างกับน้ำยาเก็บรักษาตัวอ่อนที่มีโปรตีน เมื่อใส่ตัวอ่อนลงไปในหยดขนาดเล็ก (microdrop) ของน้ำยาดัดแบ่งตัวอ่อน ทำให้ตัวอ่อนมีประจุไฟฟ้าเป็นลบ (net negative charge) ตัวอ่อนจะลงไปติดแน่นอยู่ที่พื้นของจานดัดแบ่งตัวอ่อน (splitting dish) ซึ่งมีประจุไฟฟ้าเป็นบวก (net positive charge) เป็นการใชความแตกต่างของประจุไฟฟ้า (electrostatic charge) ระหว่าง zona pellucida

และจานตัดแบ่งตัวอ่อน จากนั้นจึงตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนด้วยใบมีดสำหรับตัดตัวอ่อน (splitting blade) ที่มีความคมมาก จึงไม่ต้องตัดหรือกำจัด zona pellucida ก่อน การตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนจึงสามารถทำได้โดยง่าย เมื่อตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนเรียบร้อยแล้ว เก็บตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งขึ้นมาจากน้ำยาตัดแบ่งตัวอ่อนโดยใส่สารละลายโปรตีนเข้มข้น เช่น BSA 1.2 เปอร์เซ็นต์ หรือ ovine serum albumin 3 เปอร์เซ็นต์ ลงในหยดน้ำยาคัดแบ่งตัวอ่อนประมาณ 10 ไมโครลิตร เพื่อทำลายความแตกต่างระหว่างประจุ (neutralize electrostatic) ของตัวอ่อนและจานตัดแบ่งตัวอ่อน ทำให้สามารถเก็บตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งขึ้นมาจากน้ำยาคัดแบ่งตัวอ่อนได้ง่าย (Herr และ Reed, 1991)

การตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนโดยใช้น้ำยาคัดแบ่งตัวอ่อนทำให้ตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนได้อย่างรวดเร็ว ใช้ระยะเวลาน้อย ทำให้มีผลต่อการมีชีวิตรอดของตัวอ่อนน้อยมาก ได้มีการพัฒนาระบบตัดตัวอ่อนให้สามารถมองเห็นตัวอ่อนที่จะตัดแบ่งและใบมีดตัดแบ่งพร้อมกันขณะตัดแบ่ง ทำให้สามารถนำไปใช้งานในสภาพห้องที่ได้ จากการนำไปใช้ในการปฏิบัติงาน พบว่ามีอัตราการตั้งท้องต่ำกว่าตัวอ่อนปกติประมาณ 5-10 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น (Herr และคณะ, 1990a) รายงานการศึกษาการตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนโดยใช้น้ำยาคัดแบ่งตัวอ่อนนี้ แสดงดังตารางที่ 1 ตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งที่ตัดแบ่งโดยใช้น้ำยาคัดแบ่งตัวอ่อน มีความสามารถมีชีวิตรอด 52.5 ถึง 86 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 1 การใช้น้ำยาคัดแบ่งตัวอ่อนในการตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อน

ชนิดสัตว์	การจัดการ	ความสามารถมีชีวิตรอด	เอกสารอ้างอิง
แกะ	ตัดในซูโครส 0.375 M -ย้ายฝาก	66 %	Herr และคณะ (1990b)
	ตัดในซูโครส 0.1875 M -ย้ายฝาก	86 %	
โค	ใช้ตัดตัวอ่อนในการคัดแยกเพศ	-	Herr และคณะ (1990a)
โค	ใช้ตัดตัวอ่อนในการคัดแยกเพศ	-	Herr และ Reed (1991)
โค	ย้ายฝาก	52.5 %	Lewis (1994)
แพะ	ย้ายฝากหลังตัดแบ่ง หรือหลังเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อน 3 ชั่วโมง	66.7 %	Sumretprasong และคณะ (1995)

2.3.5 การตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนในน้ำยาตัดแบ่งตัวอ่อนที่ใส่น้ำตาลซูโครส

การใส่น้ำตาลซูโครสลงในน้ำยาที่ใช้ตัดแบ่งตัวอ่อน เมื่อนำตัวอ่อนใส่ลงไปในน้ำยาตัดแบ่งตัวอ่อน ทำให้เกิดการดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydration) ปริมาณน้ำภายในเซลล์และของเหลวที่อยู่ในช่องว่าง blastocoele ลดลง ทำให้ช่องว่าง perivitelline มีขนาดเพิ่มขึ้น การหดตัวของเซลล์ตัวอ่อนทำให้ตัวอ่อนทนทานต่อแรงคัดแบ่งที่เกิดจากใบมีด ลดการแตกของเซลล์ตัวอ่อนจึงตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนได้ง่าย ช่วยเพิ่มการมีชีวิตรอดของตัวอ่อนโคตัดแบ่งครั้งหลังจากเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อน (Suzuki และ Shimohira, 1986) แต่มีรายงานว่าน้ำตาลซูโครสไม่ได้เพิ่มอัตราการตั้งท้องของตัวอ่อนคัดแบ่งครั้งเมื่อนำไปย้ายฝากในโค (Lewis, 1994) และ (Shelton, 1992; Szell และคณะ, 1994) ขณะที่ Szell และ Hudson (1991) รายงานว่าการใส่น้ำตาลซูโครสลดการมีชีวิตรอดของตัวอ่อนแคะคัดแบ่งครั้ง การลดความสามารถในการมีชีวิตรอดของตัวอ่อนคัดแบ่งครั้งเกิดจากการหดตัว (shrinkage) ของเซลล์ถึงระดับวิกฤติ หรือคัดแบ่งครั้งตัวอ่อนที่กำลังขยายของก่อดังจุลทรรศน์คำ Szell และคณะ (1989) พบว่าการใส่น้ำตาลซูโครส 0.125 M หรือ 0.25 M ทำให้ตัวอ่อนแคะระยะ morula หดตัว 72 หรือ 57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ Szell และคณะ (1994) รายงานการคัดแบ่งครั้งตัวอ่อนแคะที่กำลังขยายคำของก่อดังจุลทรรศน์ (50 เท่า) ทำให้อัตราการมีชีวิตรอดของตัวอ่อนคัดแบ่งครั้งต่ำกว่าที่กำลังขยายสูง เนื่องจากการหดตัวของตัวอ่อนโดยเฉพาะระยะ blastocyst ทำให้ส่วนที่เป็นเซลล์ของตัวอ่อนมีขนาดเล็กลง ช่องว่าง blastocoele มีขนาดเล็กลง แยกแยะส่วนของ inner cell mass ได้ยาก เมื่อทำการคัดแบ่งครั้งที่กำลังขยายต่ำจึงทำให้คัดแบ่งครั้งส่วน inner cell mass ให้เท่ากันได้ยาก การที่ inner cell mass มีขนาดไม่เท่ากันส่งผลกระทบต่อความสามารถในการพัฒนาของตัวอ่อนคัดแบ่งครั้ง

การใส่น้ำตาลซูโครสปริมาณสูงทำให้น้ำยาตัดแบ่งตัวอ่อนมีความหนาแน่นมาก ตัวอ่อนจึงใช้เวลานานในการตกลงสู่พื้นจานตัดตัวอ่อน และตัวอ่อนมีการหดตัวมาก ทำให้การคัด inner cell mass ให้มีขนาดเท่ากันทำได้ยาก และเมื่อนำตัวอ่อนแคะคัดแบ่งครั้งไปย้ายฝากทำให้อัตราการตั้งท้องต่ำกว่าการใส่น้ำตาลซูโครสในปริมาณต่ำ (Herr และคณะ, 1990b) การใส่น้ำตาลซูโครสในน้ำยาตัดแบ่งทำให้น้ำยาตัดแบ่งมีความหนาแน่นมากกว่าน้ำยาเก็บรักษาตัวอ่อน การนำตัวอ่อนที่อยู่ในน้ำยาเก็บรักษาตัวอ่อนใส่ในน้ำยาตัดแบ่งจึงไม่ต้องล้างตัวอ่อนก่อน เพราะน้ำยาเก็บรักษาตัวอ่อนจะลอยติดอยู่ที่ด้านบนของน้ำยาตัดแบ่งตัวอ่อน ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ใส่ลงในน้ำยาที่ใช้สำหรับคัดแบ่งตัวอ่อนประมาณ 0.100-0.375 M ดังแสดงในตารางที่ 2 ส่วนใหญ่นิยมใส่น้ำตาลซูโครสปริมาณ 0.2 M (Herr และคณะ, 1990a; 1990b; Bredbecka และคณะ, 1994; Herr และ Reed, 1994; Lewis, 1994)

ตารางที่ 2 การตัดแบ่งตัวอ่อนโดยใช้น้ำตาลซูโครสลงในน้ำยาที่ใช้ตัดแบ่งตัวอ่อน

ชนิดสัตว์	น้ำยาคัดแบ่ง	ปริมาณซูโครส (M)	เอกสารอ้างอิง
โค	น้ำกลั่นที่กลั่น 3 ครั้ง	0.125	Suzuki และ Shimohira (1986)
โค, แกะ	DPBS	0.125 และ 0.25	Szell และคณะ (1989)
โค	DPBS	0.2	Herr และคณะ (1990a)
แกะ	DPBS	0.187 และ 0.375	Herr และคณะ (1990b)
โค	DPBS	0.2	Herr และ Reed (1991)
สุกร	PBS + 1% ซีรัมลูกโค	0.3	Saito และคณะ (1991)
แกะ	DPBS	0.25	Szell และ Hudson (1991)
แกะ	TCM199+20mM Hepes	0.1	Shelton (1992)
โค	PBS+4 mg/ml PVP	0.2	Bredbecka และคณะ (1994)
โค	PBS	0.2	Lewis (1994)
แกะ	ไม่ได้ระบุ	0.125	Szell และคณะ (1994)

PVP = polyvinylpyrrolidone

2.3.6 การตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนโดยทำรอยบาก

Bredbecka (1991) ได้ใช้ใบมีดสำหรับตัดตัวอ่อนทำรอยบาก (scratched) ที่พื้นของจานตัดแบ่งตัวอ่อน เพื่อไม่ให้ตัวอ่อนกลิ้งหรือเลื่อนไปมาขณะตัดแบ่งครึ่ง เมื่อวางตัวอ่อนบนรอยบาก 2 รอย ทำให้สามารถตัดหรือตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนได้สะดวกขึ้น และสามารถตัดแบ่งครึ่งได้สมมาตรกัน การตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนด้วยวิธีนี้ไม่จำเป็นต้องใช้ปิเปตยึดตัวอ่อน และไม่ต้องใช้น้ำยาคัดแบ่งตัวอ่อนที่จำเพาะ มีการนำวิธีนี้ไปใช้ในการตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนโค (Bredbecka และคณะ, 1994) แกะ (Shelton, 1992) และสุกร (Reichelt และ Niemann, 1994; Tao และคณะ, 1995) ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การตัดแบ่งตัวอ่อนโดยทำรอยบากที่พื้นจานตัดแบ่งตัวอ่อน

ชนิดสัตว์	น้ำยาตัดแบ่งที่ใช้	เอกสารอ้างอิง
แกะ	TCM199 + Hepes 20 mM + ซูโครส 0.1 M ทำ รอยบากเมื่อตัวอ่อนกลิ้งไปมาขณะตัดแบ่ง	Shelton (1992)
โค	PBS + polyvinylpyrrolidone 4 mg/ml + ซูโครส 0.2 M	Bredbecka และคณะ (1994)
สุกร	PBS + ซีรัมลูกโค 10 %	Reichelt และ Niemann (1994)
สุกร	PBS + ซีรัมลูกโค 10 %	Tao และคณะ (1995)

2.3.7 การตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนโดยใช้มือควบคุมใบมีดโดยตรง

การตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนโดยใช้มือควบคุมใบมีดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สเตอริโอสามารถตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนได้โดยง่าย ทำให้ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ยุ่งยาก มีผู้รายงานการนำวิธีนี้มาใช้ตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนโค (Zhu และคณะ, 1990; Tao และคณะ, 1991; Wu และคณะ, 1995) ซึ่ง Zhu และคณะ (1990) สามารถใช้มือควบคุมใบมีดตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนได้ถึง 4 ส่วน (quater-embryo)

2.4 การตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนในแพะ

การตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนในแพะมีรายงานไม่มากนัก (Tsunoda และคณะ, 1985; 1987; Udy, 1987; Yong และ Jianchen, 1990; Yong และคณะ, 1990; Nowshari และ Holtz, 1993) ทั้งๆ ที่มีการใช้แพะเป็นตัวแทนของโคในการทดลองต่างๆ สาเหตุที่การตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนในแพะไม่เป็นที่นิยมอาจเนื่องจากตัวอ่อนของแพะแตกต่างจากตัวอ่อนของโคและแกะ Udy (1987) ได้อธิบายถึงความแตกต่างนี้ไว้ 3 ประการ คือ

1. การยึดติดกันระหว่างเซลล์ของตัวอ่อนแพะระยะ morula และ compacted morula น้อยกว่าของตัวอ่อนโคและแกะ เมื่อนำตัวอ่อนไปตัดแบ่งครึ่งจึงมีแนวโน้มที่เซลล์จะแยกออกจากกันได้ง่าย
2. ตัวอ่อนแพะมี zona pellucida ที่ยืดหยุ่นมากกว่าตัวอ่อนโคและแกะ ทำให้ตัดด้วยมีดได้ยาก และเกิดความเสียหายได้มาก สามารถแก้ปัญหานี้ได้โดยการใช้ระบบตัดแบ่งครึ่งแบบขั้นตอนเดียว (single needle splitting system)
3. เมื่อตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนแพะ เซลล์บริเวณที่ถูกตัดจะติดกับสิ่งต่างๆ ได้ง่าย และทำให้ตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งติดกับเครื่องมือตัดแบ่ง ขณะที่ในโคและแกะจะพบปัญหานี้้น้อย

นอกจากนี้ Tsunoda และคณะ (1985) รายงานว่าตัวอ่อนแพะระยะ blastocyst มักจะมีช่องว่างขนาดใหญ่ ทำให้มีเซลล์เสียหายเมื่อตัดแบ่งครั้งตัวอ่อน ขณะที่ตัวอ่อนระยะ hatched blastocyst มีเซลล์จำนวนมากและเซลล์มีขนาดเล็ก จึงตัดแบ่งครั้งได้มีความเสียหายของเซลล์น้อย

จากปัญหาเหล่านี้ทำให้ระบบตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนที่ใช้ในปัจจุบัน ไม่สามารถนำมาใช้ตัดแบ่งตัวอ่อนแพะให้ประสบความสำเร็จดังเช่นตัวอ่อนของสัตว์ชนิดอื่น เนื่องจากการทำลายเซลล์ตัวอ่อน หรือเป็นอันตรายต่อตัวอ่อนที่ตัดแบ่ง Nowshari และ Holtz (1993) ได้ใช้เทคนิคตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนแพะที่ง่ายและรวดเร็ว โดยไม่ต้องใช้ปิเปตดูดตัวอ่อนและเปิดฝา zona pellucida ก่อน โดยตัดแบ่งใน DPBS ที่เสริมด้วยซีรัมของแพะ 20 เปอร์เซ็นต์ ตัวอ่อนระยะ blastocyst ตัดแบ่งครั้งขั้นตอนเดียว ส่วนตัวอ่อนระยะ morula ตัดแบ่งครั้ง 2 ขั้นตอน ในขั้นตอนที่ 1 ตัดส่วน zona pellucida ครึ่งหนึ่ง และเซลล์ตัวอ่อนถูกตัดบางส่วน จากนั้นปรับตั้งไบมิดใหม่แล้วจึงตัดเซลล์ตัวอ่อนส่วนที่เหลือ เพื่อหลีกเลี่ยงการหลุดของ blastomere การศึกษาการตัดแบ่งตัวอ่อนในแพะสรุปดังตารางที่ 4

3. ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความสำเร็จของการตัดแบ่งครั้งตัวอ่อน

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความสำเร็จของการตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนประกอบด้วย ระยะการเจริญของตัวอ่อนที่ตัดแบ่งครั้ง ความจำเป็นของการมี zona pellucida จำนวนเซลล์ของตัวอ่อนหลังจากตัดแบ่งครั้ง คุณภาพของตัวอ่อนที่ตัดแบ่งครั้ง เครื่องมือที่ใช้ตัดแบ่งครั้งตัวอ่อน ความเร็วในการตัดแบ่งครั้งตัวอ่อน การเลี้ยงตัวอ่อนตัดแบ่งครั้ง และการย้ายฝากตัวอ่อนตัดแบ่งครั้ง

3.1 ระยะการเจริญของตัวอ่อนที่นำมาตัดแบ่งครั้ง

ระยะการเจริญของตัวอ่อนที่เหมาะสมในการนำมาตัดแบ่งครั้ง ก่อนข้างแตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด ขึ้นอยู่กับวิธีการตัดแบ่งครั้งและการจัดการกับตัวอ่อนตัดแบ่งครั้ง ในช่วงต้นๆ ของการศึกษากการผลิตฝาแฝดเหมือน นิยมนำตัวอ่อนระยะต้นๆ ของการพัฒนามาทำการตัดแบ่งครั้ง เนื่องจากจำนวนเซลล์ที่เหลือเพียงครึ่งเดียว หรือเพียงเศษหนึ่งส่วนสี่ ยังมีศักยภาพในการพัฒนาต่อไป Skrzyszowska และ Smorag (1989) ได้รายงานว่าการแยก blastomere ประสบความสำเร็จมากกว่าการตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนระยะ morula เนื่องจากตัวอ่อนระยะ morula มีการสูญเสียเซลล์ขณะตัดแบ่งครั้ง Wilton และ Trounson (1989) และ Losskutoff และคณะ (1992) รายงานว่า blastomere จากตัวอ่อนหนูและโคระยะก่อนการเกาะกลุ่มของเซลล์ (pre-compact) มีขนาดใหญ่และง่ายในการจัดการมากกว่าตัวอ่อนระยะหลังการเกาะกลุ่มของเซลล์ (post-compact) และเมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนจะได้จำนวนเซลล์ของตัวอ่อนสูงกว่า นอกจากนี้ Losskutoff และคณะ (1993) ยังพบว่าตัวอ่อนโคระยะ 2-16 เซลล์ เมื่อแยก blastomere ออกไปครึ่งหนึ่ง ตัวอ่อนที่

ตารางที่ 4 การศึกษาการตัดแบ่งตัวอ่อนในแพะ

ระยะการเจริญ	การจัดการหลังตัดแบ่งและการตรวจสอบการมีชีวิตรอด	ผลจากการตรวจสอบการมีชีวิตรอด	เอกสารอ้างอิง
M	ใส่ ZP เสียใน M16+20% ซึ่งรับแพะ นาน 16-20 ชั่วโมง และย้ายฝาก	มีการพัฒนา 38 % แต่ไม่มีชีวิตรอด	Tsunoda และคณะ (1985)
B	ใส่ ZP และย้ายฝาก	มีชีวิตรอด 33 %	
HB	ใส่ ZP และย้ายฝาก	มีชีวิตรอด 55 % เกิดฝาแฝด 36.4 %	
B ถึง HB	ใส่ ZP -ใส่ในกระบอกที่มีวัน-แซ่แข็ง-เสียใน M16 + 20% ซึ่งรับลูกโค 1-2 ชั่วโมง-ย้ายฝาก	ตั้งท้อง 47 % มีชีวิตรอด 27 %	Tsunoda และคณะ (1987)
B ถึง HB	ใส่ ZP-แซ่แข็ง-เสียใน M16+20% ซึ่งรับลูกโค 1-2 ชั่วโมง-ย้ายฝาก	ไม่มีตั้งท้อง และไม่มีชีวิตรอด	
M ถึง HB	ใส่ ZP -ใส่ในกระบอกที่มีวัน-แซ่แข็ง-เสียใน M16 +20% ซึ่งรับลูกโค 1-2 ชั่วโมง-ย้ายฝาก	ตั้งท้อง 80 % มีชีวิตรอด 53 %	
M ถึง HB	ใส่ ZP-แซ่แข็ง-เสียใน M16+20% ซึ่งรับลูกโค 1-2 ชั่วโมง-ย้ายฝาก	ตั้งท้อง 67 % มีชีวิตรอด 45 %	
B ถึง HB	ใส่ตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งใน ZP เดียวกัน -ย้ายฝาก	มีชีวิตรอด 39 %	Udy, (1987)
B ถึง HB	ใส่ตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งใน ZP ต่างกัน -ย้ายฝาก	มีชีวิตรอด 27 %	

ตารางที่ 4 การศึกษาการตัดแบ่งตัวอ่อนในแพะ (ต่อ)

ระยะ การเจริญ	การจัดการหลังตัดแบ่งและการตรวจสอบการมีชีวิตรอด	ผลจากการตรวจสอบการมีชีวิตรอด	เอกสารอ้างอิง
HB	ดัดในรุ่น 1 % -แช่แข็ง-ย้ายฝาก	มีชีวิตรอด 18.8 % เกิดฝาแฝด 12.5 %	Yong และ Jianchen (1990)
HB	เลี้ยงใน PBS+10% ซีรัมลูกโค นาน 2 ชั่วโมง-ดัดในรุ่น 1 % -แช่แข็ง-ย้ายฝาก	มีชีวิตรอด 41.7 % เกิดฝาแฝด 33.3 %	
B	แช่แข็ง-ตัดแบ่งในน้ำกลั่นที่กลั่น 3 ครั้ง มีซูโครส 0.12 M -	มีการพัฒนา 43.8 %	Yong และคณะ (1990)
ExB	เลี้ยงใน PBS+15% ซีรัมลูกโค 6-12 ชั่วโมง	มีการพัฒนา 50 %	
HB		มีการพัฒนา 25.6 %	
HB	ดัดในรุ่น 1 % แช่แข็ง-ตัดแบ่ง-เลี้ยงใน PBS+15% ซีรัม ลูกโค 6-12 ชั่วโมง	มีการพัฒนา 68.8 %	
M	ตัดแบ่งใน PBS+20% ซีรัมแพะ เลี้ยงใน PBS+20% นาน 2 ชั่วโมง	มีการพัฒนามีถึงคุณภาพดี 45 %	Nowshari และ Holtz (1993)
B	ตัดแบ่งใน PBS+20% ซีรัมแพะ เลี้ยงใน PBS+20% นาน 24 ชั่วโมง	มีการพัฒนามีถึงคุณภาพดี 75 %	
M	ตัดแบ่งใน PBS+20% ซีรัมแพะ เลี้ยงใน PBS+20% นาน 2 ชั่วโมง นำไปแช่แข็ง-ตรวจสอบคุณภาพ	คุณภาพดี 52 % คุณภาพพอใช้ 26 %	
B	ตัดแบ่งใน PBS+20% ซีรัมแพะ เลี้ยงใน PBS+20% นาน 2	คุณภาพดี 83 % คุณภาพพอใช้ไม่มี	

ตารางที่ 4 การศึกษาการดัดแปลงตัวอ่อนในแพะ (ต่อ)

ระยะ	การจัดการหลังตัดแบ่งและการตรวจสอบการมีชีวิตรอด	ผลจากการตรวจสอบการมีชีวิตรอด	เอกสารอ้างอิง
การเจริญ			
M และ B	ตัวโมง นำไปแช่แข็ง-ตรวจสอบคุณภาพ		
	ตัดแบ่งใน PBS+20% ซีรัมแพะ เลี้ยงใน PBS+20% นำไปแช่แข็ง-ย้ายฝาก	อัตราการตั้งท้อง 55 %	
M และ B	ตัดแบ่งใน PBS+20% ซีรัมแพะ เลี้ยงใน PBS+20% นำไปย้ายฝาก	อัตราการตั้งท้อง 82 %	
B	ตัดแบ่งในน้ำยาตัดแบ่งตัวอ่อน-ย้ายฝากสด หรือย้ายฝากหลังเลี้ยงใน Hec-2 นาน 3 ชั่วโมง ก่อนย้ายฝาก	อัตราการตั้งท้อง 66.7 % เกิดฝาแฝด 75 % ได้ลูกแพะเกิดต่อตัวอ่อนปกติ 116.7 %	Sumretprasong และคณะ (1995)

M = ตัวอ่อนระยะ morula; B= ตัวอ่อนระยะ blastocyst; ExB = ตัวอ่อนระยะ expanded blastocyst

HB = ตัวอ่อนระยะ hatched blastocyst; ZP = zona pellucida

เหลือยังคงมีความสามารถในการพัฒนาถึงระยะ hatched blastocyst ตามปกติ Smith และคณะ (1992) พบว่าตัวอ่อนสุกระยะ 8 เซลล์ มีศักยภาพในการพัฒนาถึง blastocyst อาจเกิดจากความสามารถในการพัฒนาจากภายใน blastomere เนื่องจากอัตราการสังเคราะห์โปรตีนสูง และมีความสามารถในการแบ่งเซลล์สูงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อนระยะอื่นๆ ของการพัฒนา (Tomanek และคณะ, 1989 อ้างโดย Smith และคณะ, 1992) การแบ่งตัวของ blastomere มีอิทธิพลจากการสัมผัสกันระหว่างเซลล์ทำให้ใช้เวลาในการสร้าง blastocoele ใกล้เคียงกับตัวอ่อนปกติและตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง จากการนับจำนวนเซลล์พบว่า ความสามารถในการพัฒนาไม่ถูกควบคุมโดยจำนวนเซลล์ เช่นเดียวกับที่ Saito และคณะ (1991) และ Saito และ Niemann (1991) พบว่าการเลี้ยง blastomere จากตัวอ่อนสุกระยะอื่นๆ ของการพัฒนา มีการพัฒนาถึงระยะ blastocyst ถึง 42-57 เปอร์เซ็นต์ Stein-Stefani และ Holtz (1994) รายงานว่าตัวอ่อนสุกระยะ 4 เซลล์ เหมาะสำหรับนำมาตัดแบ่งครึ่งมากกว่าตัวอ่อนระยะ morula เพราะแยก blastomere ได้ง่าย เนื่องจากไม่มี tight junction และ Robl และ First (1985) รายงานว่าตัวอ่อนสุกระยะ 4 ถึง 16 เซลล์ เหมาะสมในการนำมาตัดแบ่งครึ่งเพราะยังไม่มีการพัฒนาการเชื่อมต่อระหว่างเซลล์ แต่การนำตัวอ่อนระยะนี้มาทำการตัดแบ่งครึ่งมีความยุ่งยาก เกิดจากสาเหตุหลัก 2 ประการคือ (Brem, 1989)

1. ต้องเก็บตัวอ่อนจากท่อไข่ จึงจำเป็นต้องใช้วิธีสตัลยกรรมในการเก็บตัวอ่อน
2. ตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งที่ได้จากตัวอ่อนระยะนี้ ต้องได้รับการปกป้องจากการสัมผัส

กับสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น การนำไปติดในวุ้นและนำไปเลี้ยงในท่อระบบสืบพันธุ์ของสัตว์

ตัวกลาง (intermediate host) เป็นระยะเวลาหลายวัน เพื่อให้พัฒนาถึงระยะ morula หรือ blastocyst จึงนำออกมาย้ายฝากสู่ตัวรับ

Rieger และคณะ (1992) พบว่าตัวอ่อนโคระยะ 2-4 เซลล์ มีความอ่อนไหวต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมมากกว่าตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ถึง expanded blastocyst ในการนำมาตัดแบ่งครึ่ง เช่นเดียวกับรายงานของ Moore และคณะ (1969) ที่พบว่าการย้ายฝาก 1 blastomere ที่แยกออกมาจากตัวอ่อนสุกระยะอื่นๆ ของการพัฒนา ใส่ใน zona pellucida ไม่มีชีวิตรอด และการแยก blastomere ออกไปเพียง 1 blastomere ทำให้การมีชีวิตรอดลดลง อาจเนื่องจากการทำลาย blastomere หรือ blastomere ของตัวอ่อนมีศักยภาพในการพัฒนาต่อไปไม่เท่ากัน

ตัวอ่อนที่นิยมนำมาตัดแบ่งครึ่งคือ ตัวอ่อนระยะ morula และ blastocyst เนื่องจากตัวอ่อนระยะนี้สามารถเก็บจากสัตว์ตัวให้โดยไม่ต้องใช้วิธีสตัลยกรรม และหลังจากตัดแบ่งครึ่งแล้วสามารถนำไปย้ายฝากสู่ตัวรับได้โดยตรงโดยไม่ต้องใช้วิธีสตัลยกรรมเช่นกัน ตัวอ่อนระยะ morula สามารถตัดแบ่งครึ่งเป็น 2 ส่วนที่เท่ากันได้ง่าย ไม่เสียเวลามาก ส่วนตัวอ่อนระยะ blastocyst ต้องตัดแบ่งครึ่งให้ส่วนของเซลล์ inner cell mass และเซลล์ trophoblast มีสัดส่วนเท่ากัน จึงทำให้ตัวอ่อน

ตัดแบ่งครั้งมีความสามารถในการมีชีวิตรอดหรือพัฒนาเป็นลูกสัตว์สูง ในการย้ายฝากตัวอ่อนเป็นการค้าในอุตสาหกรรมจะใช้ตัวอ่อนระยะหลังจากมีการรวมกลุ่มของเซลล์ โดยเฉพาะในโค (Williams และคณะ, 1982; 1983; Ozil, 1983) เพราะตัวอ่อนระยะหลังจากมีการรวมกลุ่มของเซลล์ มีจำนวนเซลล์ของ inner cell mass มากกว่าตัวอ่อนระยะก่อนมีการรวมกลุ่มของเซลล์ จึงมีความสามารถที่จะพัฒนาเป็น blastocyst ได้ดีกว่า (Bredbecka และคณะ, 1991) เช่นเดียวกับรายงานที่ว่าการนำตัวอ่อนที่อยู่ในระยะท้ายๆ ของการพัฒนาก่อนมีการฝังตัวมาตัดแบ่งครั้ง ทำให้การตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนประสบความสำเร็จ (Ozil และคณะ, 1982; Willadsen และ Godke, 1984; Williams และคณะ, 1984a; 1984b; Rorie และคณะ, 1985; Tsunoda และคณะ, 1985; Chesne และคณะ, 1987a; Udy, 1987; Maurer และ Hruska, 1988; Ash และคณะ, 1989; McEvoy และ Sreenan, 1990; Saito และคณะ, 1991; De Armas, 1992; Shelton, 1992; Losskutoff และคณะ, 1993; Nowshari และ Holtz, 1993)

การที่ตัวอ่อนระยะ morula มีความสามารถในการมีชีวิตรอดต่ำกว่าตัวอ่อนระยะ blastocyst อาจเนื่องจากการแตกของ zona pellucida มีผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ตัวอ่อน และตัวอ่อนระยะ blastocyst สามารถมองเห็น inner cell mass ได้ชัดเจนจึงตัดแบ่งครั้งได้เท่ากับตัวอ่อนระยะ blastocyst อาจทนทานต่อการตัดแบ่งครั้งได้มากกว่าตัวอ่อนระยะ morula และมีผลกระทบจากการเปิดผ่า zona pellucida น้อย Skrzyszowska และ Smorag (1989) รายงานว่าการตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนระยะอื่นๆ ของการพัฒนามีเซลล์เสียหายมากกว่าการตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนระยะท้ายๆของการพัฒนา เนื่องจากตัวอ่อนที่มีอายุน้อยมีความทนทานต่อการนำไปจัดการ (manipulate) สูง

การสูญเสียเซลล์ของตัวอ่อนขึ้นอยู่กับระยะการเจริญของตัวอ่อนที่นำมาตัดแบ่งครั้ง ความทนทานต่อการจัดการของตัวอ่อนมีบทบาทสำคัญมาก Udy (1987) รายงานว่าตัวอ่อนแพะระยะ blastocyst ถึง hatched blastocyst เหมาะสำหรับการตัดแบ่งครั้ง เพราะมีการหลุดของเซลล์น้อยกว่าตัวอ่อนระยะอื่นๆ ของการพัฒนา เช่นเดียวกับ Tsunoda และคณะ (1985) ที่พบว่าตัวอ่อนแพะระยะ hatched blastocyst เหมาะสำหรับการนำมาตัดแบ่งครั้งมากกว่าตัวอ่อนระยะ morula และ blastocyst เนื่องจากตัวอ่อนแพะระยะ blastocyst มีช่องว่างขนาดใหญ่ และการตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนระยะ morula ทำให้เกิดความเสียหาย ขณะที่ตัวอ่อนระยะ hatched blastocyst มีจำนวนเซลล์มาก และมีขนาดเล็กกว่า จึงทนทานต่อการตัดแบ่งครั้งได้ดี Nowshari และ Holtz (1993) กล่าวว่าตัวอ่อนแพะระยะ morula มีการยึดเกาะกันระหว่าง blastomere น้อย เมื่อตัดแบ่งครั้งจึงอาจเกิดการหลุดของเซลล์จากตัวอ่อนแพะตัดแบ่งครั้ง และตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่ได้จากตัวอ่อนระยะ morula ยังขาดความสามารถในการพัฒนาต่อไป ตัวอ่อนแพะระยะ blastocyst จึงเหมาะสำหรับนำมา

ตัดแบ่งครั้งมากกว่าตัวอ่อนระยะ morula มีรายงานว่าตัวอ่อนโคระยะก่อนมีการรวมกลุ่มของเซลล์ ต้องมี zona pellucida เมื่อนำไปย้ายฝากสู่ตัวรับ เพื่อเพิ่มความสามารถในการมีชีวิตรอด (Massey และคณะ, 1982; Williams และคณะ, 1982)

อย่างไรก็ตามมีรายงานการตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนระยะ morula, blastocyst และ expanded blastocyst เมื่อนำไปเลี้ยงหรือย้ายฝาก ให้อัตราการมีชีวิตรอดหรืออัตราการตั้งท้องไม่แตกต่างกัน (Takeda และคณะ, 1986; Seike และคณะ, 1989; McEvoy และ Sreenan, 1990; Zhu และคณะ, 1990; Kippax และคณะ, 1991; Szell และ Hudson, 1991; Tao และคณะ, 1991; Lewis, 1994) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ตัวอ่อนโคระยะ early blastocyst เหมาะสมในการนำมาตัดแบ่งครั้ง (Williams และคณะ, 1984a; Wu และคณะ, 1995) ตัวอ่อนโคระยะ compacted morula เมื่อนำมาตัดแบ่งครั้งและย้ายฝากให้อัตราลูกเกิดสูงกว่าตัวอ่อนระยะหลังจากมีการรวมกลุ่มของเซลล์ (Arave และคณะ, 1987; Bredbeck และคณะ, 1994) Nagashima และคณะ (1984) ตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนหนุระยะ morula โดยไม่มีการทำลาย blastomere และ blastomere ของตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่เหลือต้องไม่ผิดปกติหรือหลุดออกจากกันขณะเลี้ยงก่อนนำไปย้ายฝาก ซึ่ง blastomere ที่เหลืออยู่จะพัฒนาเป็น inner cell mass และ trophoctoderm ทำให้ตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งมีชีวิตรอด

3.2 ความจำเป็นของการมี zona pellucida

Zona pellucida เป็น extracellular matrix ที่ล้อมรอบ oocyte หรือตัวอ่อน ประกอบด้วย glycoprotein โดยมีโปรตีนประมาณ 71 เปอร์เซ็นต์ มีคาร์โบไฮเดรตประมาณ 19 เปอร์เซ็นต์ (Austin, 1990)

หน้าที่ของ zona pellucida มีหลายประการด้วยกัน (McLaren, 1990; Reichelt และ Niemann, 1994; Suzuki และคณะ, 1995) คือ

- มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแบ่งเซลล์ของตัวอ่อนก่อนจะมีการฝังตัว
- ป้องกันไม่ให้ตัวอ่อนติดกับผนังของท่อ นำไข่ขณะที่ผ่านเข้าไปในท่อ นำไข่หรือกับเซลล์อื่นๆ เนื่องจากภายในตัวอ่อนในแง่ของ electrostatic ถือว่าไม่มีประจุ แต่เมื่อตัวอ่อนพักตัวออกจาก zona pellucida ทำให้ตัวอ่อนมีประจุเป็นลบและติดกับสิ่งต่างๆ ได้ง่ายมาก
- ป้องกันตัวอ่อนจากการทำลายของเม็ดเลือดขาว การติดเชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อรา โดยมี mucopolysaccharide เคลือบอยู่
- เป็นตำแหน่งที่ยึดเกาะของเซเปิร์มและชักนำให้เกิด acrosome reaction หลังจากเซเปิร์ม จับกับ zona pellucida
- ป้องกันการเกิด polyspermic fertilization
- ป้องกันตัวอ่อนจากการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง

- ป้องกันการแยกของ blastomere ในตัวอ่อนระยะต้นๆ ของการพัฒนา

การศึกษาการตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนในสัตว์ชนิดต่างๆ ที่ผ่านมา ต้องใส่ตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งกลับเข้าไปใน zona pellucida ก่อนที่จะนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อน หรือย้ายฝาก (Willadsen และ Polge, 1981; Williams และคณะ, 1983; Warfield และคณะ, 1986; Udy, 1987; Shelton และ Szell, 1988) การใส่ตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งกลับเข้าไปใน zona pellucida มีความยุ่งยาก และเสียเวลา ต่อมาพบว่าการใส่หรือไม่ใส่ตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งกลับเข้าไปใน zona pellucida ไม่มีผลต่อการมีชีวิตรอดของตัวอ่อนตัดแบ่งครั้ง (Menino และ Wright, 1983; Voelkel และคณะ, 1984a; 1984b; Willadsen และ Godke, 1984; McFarland และคณะ, 1985; Takeda และคณะ, 1986; 1987; Warfield และคณะ, 1986; 1987; Leibo และ Rall, 1987; Nagashima และคณะ, 1988; Shelton และ Szell, 1988; Seike และคณะ, 1989; Zhu และคณะ, 1990; Kippax และคณะ, 1991; Szell และ Hudson, 1991; Tao และคณะ, 1991; De Armas, 1992; Nowshari และ Holtz, 1993) Tao และคณะ (1995) รายงานว่า ตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่ไม่มี zona pellucida สามารถพัฒนาได้เร็วกว่าตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่ไม่มี zona pellucida จึงไม่จำเป็นต้องใส่ตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งกลับเข้าไปใน zona pellucida หลังจากตัดแบ่งครั้ง แต่มีรายงานว่า การใส่ตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งกลับเข้าไปใน zona pellucida เมื่อนำไปเลี้ยงหรือย้ายฝากทำให้มีอัตราการมีชีวิตรอดดีขึ้น (Baker และ Shea, 1985) ตัวอ่อนหรือตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่ไม่มี zona pellucida ทำให้มองเห็นด้วยกล้องจุลทรรศน์ได้ง่าย มีการติดกับหลอดพลาสติก (straw) หรือปิเปตน้อย และอาจเกิดความเสียหายน้อยจากการจัดการและการย้ายฝาก (Williams และคณะ, 1984b) zona pellucida อาจมีบทบาทในการช่วยป้องกันความเสียหายของ blastomere ขณะตัดแบ่งครั้ง

ตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่ได้จากตัวอ่อนระยะต้นๆ ของการพัฒนา จำเป็นต้องมี zona pellucida เพื่อให้มีความสามารถในการพัฒนาต่อไปหลังจากย้ายฝาก (Moor และ Cragle, 1971; Trounson และ Moore, 1974b; Massey และคณะ, 1982) นอกจากนี้การนำตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งไปใส่ไว้ใน zona pellucida ที่ไม่ใช่ zona pellucida เดิม ทำให้อัตราการตั้งท้องลดลง (Baker และ Shea, 1985) แต่ Williams และคณะ (1984b) รายงานว่าการใส่ตัวอ่อนโคตัดแบ่งครั้งใน zona pellucida เดิม หรือ zona pellucida ใหม่ ให้ผลไม่แตกต่างกัน McEvoy และ Sreenan (1990) เสนอแนะว่าการไม่มี zona pellucida ทำให้ความสามารถในการมีชีวิตรอดของตัวอ่อนโคตัดแบ่งครั้งต่ำเมื่อนำไปย้ายฝาก โดยตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่ได้จากตัวอ่อนระยะ morula ต้องการ zona pellucida เมื่ออยู่ในมดลูกของตัวรับ อาจเกี่ยวข้องกับการสร้าง blastocoele ซึ่ง blastocoele มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับความสามารถในการมีชีวิตรอดของการย้ายฝากตัวอ่อนที่ไม่มี zona pellucida มีรายงานว่าตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งจากตัวอ่อนระยะ morula ต้องการ zona pellucida

(Hoppe และ Bavister, 1983; Shelton และ Szell, 1988) ขณะที่ตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งจากตัวอ่อนระยะ early blastocyst และ blastocyst ไม่จำเป็นต้องมี zona pellucida อาจเป็นเพราะตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งที่ได้จากตัวอ่อนระยะ morula ไม่เหมือนกับตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งที่ได้จากตัวอ่อน blastocyst ทำให้ส่งผลถึงการพัฒนาของตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง หรืออาจเป็นเพราะการเปิด zona pellucida และตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนไปลดการมีชีวิตรอดของตัวอ่อน (Massey และคณะ, 1982; Willadsen and Godke, 1984; Williams และคณะ, 1984b) Nagashima และคณะ (1988) ได้อธิบายว่า ตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งต้องการ zona pellucida ใน 2 กรณี คือ 1. เป็นตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งที่ได้จากการตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนระยะ morula หรือระยะต้นๆ ของการพัฒนา 2. การย้ายฝากตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งเข้าสู่ตัวรับก่อนที่จะมีการพัฒนาดัง blastocyst อีกครั้ง

3.3 จำนวนเซลล์ของตัวอ่อนหลังตัดแบ่งครึ่ง

Heyman (1985) รายงานว่าจำนวนเซลล์ของตัวอ่อนโคมีผลต่ออัตราการตั้งท้องเมื่อย้ายฝาก เมื่อจำนวนของตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งที่ย้ายฝากเพิ่มมากขึ้น อัตราการตั้งท้องก็เพิ่มขึ้น Reichelt และ Niemann (1994) ใช้จำนวนเซลล์ของตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งหลังจากเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อน เป็นสิ่งบ่งชี้ถึงศักยภาพในการพัฒนาของตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง และพบว่าจำนวนเซลล์ของตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อนปกติขณะที่มีการสร้างช่องว่าง blastocoele หรือพัฒนาเป็นระยะ blastocyst Allen และ Pashen (1984) พบว่าจำนวนเซลล์มีผลต่อการพัฒนาของเซลล์ตัวอ่อนม้าที่เปลี่ยนเป็นส่วนที่เป็นตัวสัตว์และเนื้อเยื่อของรก การมีชีวิตรอดของตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งขึ้นอยู่กับจำนวนเซลล์ที่เหลือที่จะพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะ blastocyst อีกครั้ง (Hasler และคณะ, 1987) Heyman (1985) พบว่าเมื่อตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนโค จำนวนเซลล์ของตัวอ่อนลดลงอย่างน้อย 50 เปอร์เซ็นต์ และยังมีส่วนหลุดออกไปอีกด้วย Skrzyszowska และ Smorag (1989) รายงานว่าตัวอ่อนโคระยะ blastocyst มีการสูญเสียทั้งส่วนของ inner cell mass และ trophoblast ตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งอาจมีจำนวนเซลล์น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ตัวอ่อนปกติ จึงควรตัดแบ่งครึ่งให้ตัวอ่อนมีจำนวนเซลล์มากพอที่จะทำให้เกิดสัญญาณ (signal) ต่อมดลูกของตัวรับเพื่อให้มีการตั้งท้อง ตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งที่มีจำนวนเซลล์มากอาจมีความสามารถในการพัฒนามากกว่าตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งที่มีเซลล์น้อย Nowshari และ Holtz (1993) อธิบายว่าการลดจำนวนเซลล์ของตัวอ่อนแพะมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์จากการตัดแบ่งครึ่ง หรือการแช่แข็งอาจทำให้เซลล์ตัวอ่อนไม่สามารถมีชีวิตรอด

จำนวนเซลล์ที่สูญเสียหรือเสียหายขณะตัดแบ่งครึ่งประมาณ 9 ถึง 18 เปอร์เซ็นต์ (Chesne และคณะ, 1987b; Nibart และคณะ, 1988; Skrzyszowska และ Smorag, 1989; McEvoy และ Sreenan, 1990; Reichelt และ Niemann, 1994) McEvoy และ Sreenan (1990) และ

Niemann และคณะ (1986) พบว่าการลดจำนวนเซลล์ การเสียหายของเซลล์และการหลุดของ blastomere ขณะตัดแบ่งครั้ง ทำให้ตัวอ่อนโคตัดแบ่งครั้งมีความสามารถในการมีชีวิตรอด หรือ อัตราการตั้งท้องต่ำ เช่นเดียวกับ Losskutoff และคณะ (1992) พบว่า blastomere ที่แยกจากตัวอ่อน ระยะ 4-8 เซลล์ มีอัตราการตั้งท้องเมื่อย้ายฝากต่ำกว่าตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่ได้จากตัวอ่อนระยะก่อน ที่จะพัฒนาถึงระยะ blastocyst อาจเนื่องจากมีจำนวนเซลล์น้อยกว่า Skrzyszowska และ Smorag, (1989) พบว่าส่วนของ inner cell mass มีเซลล์สูญเสียมากกว่าส่วน trophoblast เนื่องจากการบีด เกาะของเซลล์ inner cell mass ไม่แข็งแรงเท่ากับเซลล์ของ trophoblast เช่นเดียวกับ Nibart และ คณะ (1988) รายงานว่าเซลล์ inner cell mass ของตัวอ่อนโคอาจอ่อนไหวมากกว่าเซลล์ trophoblast เมื่อนำมาตัดแบ่งครั้ง การสูญเสียของเซลล์อาจเกิดจากเทคนิคที่ใช้ในการตัดแบ่งครั้ง ตัวอ่อน (Mertes และ Bondioli, 1985) การสูญเสียจำนวนเซลล์มากทำให้อัตราการมีชีวิตรอดลดลง เนื่องจากจำนวนเซลล์ที่จะพัฒนาไปเป็น inner cell mass และ trophoblast ขณะพัฒนาเข้าสู่ระยะ blastocyst ไม่เพียงพอ การสร้างส่วนของ inner cell mass ต้องการเซลล์อย่างน้อย 8 ถึง 16 เซลล์ ถ้าจำนวนเซลล์น้อยกว่านี้จะเกิดเป็น trophoblast เพียงอย่างเดียว โดยไม่มี inner cell mass (Robl และ First, 1985) เช่นเดียวกับ Saito และ Niemann (1991) อธิบายว่าการตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนสุกร ทำให้ลดจำนวนเซลล์ที่จะไปสร้าง inner cell mass และมีจำนวนเซลล์ที่จะทำหน้าที่ของ inner cell mass ไม่เพียงพอ Willadsen และ Polge (1981) พบว่าการลดสัดส่วน inner cell mass ของ ตัวอ่อนโคทำให้ลดความสามารถในการมีชีวิตรอด

Menino และ Wright (1983) พบว่า blastocyst ที่พัฒนาจาก blastomere ที่แยกออกมาจากตัวอ่อนสุกรมีจำนวนเซลล์น้อยและขนาดของเซลล์เล็กกว่า blastocyst ที่ได้จากตัวอ่อนปกติ เช่นเดียวกับ Losskutoff และคณะ (1991) พบว่าจำนวนเซลล์ของตัวอ่อนโคระยะ blastocyst ซึ่ง พัฒนามาจาก blastomere ที่แยกออกมา น้อยกว่าจำนวนเซลล์ของตัวอ่อนระยะ blastocyst ปกติ เช่นกัน แต่ความสามารถในการพัฒนาถึงระยะ compacted morula และ blastocyst ไม่แตกต่างกัน เช่นเดียวกับ Nibart และคณะ (1988) พบว่าจำนวนเซลล์ของตัวอ่อนโคตัดแบ่งครั้งที่น้อยกว่า ตัวอ่อนปกติไม่มีผลต่อการพัฒนาของตัวอ่อน เช่นเดียวกับ Voelkel และคณะ (1985) ที่พบว่า ตัวอ่อนโคระยะ morula ที่ตัดแบ่งครั้ง 4 ส่วน (quater-embryo) มีความสามารถในการคงหน้าที่ ของคอร์ปัสลูเทียม (corpus luteum) และมีความสามารถพัฒนาถึงระยะ blastocyst แสดงถึงความสามารถพัฒนาของเซลล์ตัวอ่อน เช่นเดียวกับ Takeda และคณะ (1986) ที่รายงานว่าตัวอ่อนโค ตัดแบ่งครั้งที่ตัดแบ่งครั้งได้ขนาดใหญ่ เมื่อนำไปย้ายฝากมีอัตราการตั้งท้องไม่แตกต่างจากขนาด เล็ก จึงเป็นไปได้ที่การพัฒนาของตัวอ่อนไม่ขึ้นอยู่กับจำนวนเซลล์ แต่ขึ้นอยู่กับการควบคุมจาก

ภายใน Ozil และคณะ (1982) รายงานว่าการตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนโคไม่ได้ไปจำกัดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและหน้าที่ครั้งแรกของเซลล์ตัวอ่อนขณะที่พัฒนาเป็นระยะ blastocyst

ความสำเร็จของการตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนไม่เพียงแต่ตัดแบ่งครั้งให้ได้ตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่มีขนาดเท่ากันเท่านั้น แต่ต้องให้สัดส่วนของ trophoblast และ inner cell mass เท่ากันด้วย ซึ่งอาจมีผลต่อการพัฒนาของตัวอ่อนตัดแบ่งครั้ง (Willadsen และ Godke, 1984; Skrzyszowska และ Smorag, 1989; Tao และคณะ, 1995) การลดสัดส่วนของ inner cell mass ทำให้ลดความสามารถในการมีชีวิตรอดของตัวอ่อนโคตัดแบ่งครั้ง (Willadsen และ Polge, 1981) ตัวอ่อนสุกรตัดแบ่งครั้งที่มีจำนวนเซลล์น้อย ไม่สามารถจะพัฒนาเป็นลูกสัตว์ได้ (Reichelt และ Niemann, 1994) การเพิ่มจำนวนเซลล์ของตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งก่อนทำการย้ายฝากจึงเป็นสิ่งสำคัญ (Tsunoda และ McLaren, 1983) Warfield และคณะ (1987) กล่าวว่าตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมของมดลูกตัวรับอาจมีอันตรายมาก เพราะมีจำนวนเซลล์น้อย และสภาพแวดล้อมอาจไม่เหมาะสม

3.4 คุณภาพของตัวอ่อนที่นำมาตัดแบ่งครั้ง

คุณภาพของตัวอ่อนที่นำมาตัดแบ่งครั้งมีผลต่อความสำเร็จของการตัดแบ่งครั้งตัวอ่อน โดยมีผลต่ออัตราการตั้งท้อง (Brem และคณะ, 1984; Takeda และคณะ, 1986; Arave และคณะ, 1987; De Armas และคณะ, 1992; Nowshari และ Holtz, 1993) ตัวอ่อนที่เหมาะสมในการนำมาตัดแบ่งครั้ง คือตัวอ่อนที่มีคุณภาพระดับดี ถึงดีเยี่ยม (Baker และคณะ, 1984; Picard และคณะ, 1984; Williams และคณะ, 1984a; Niemann และคณะ, 1986; Takeda และคณะ, 1986; 1987; Arave และคณะ, 1987; Warfield และคณะ, 1987; Brem, 1989; Seike และคณะ, 1989; Tao และคณะ, 1991; Bredbecka และคณะ, 1994) ตัวอ่อนคุณภาพระดับดี ถึงดีเยี่ยมเมื่อนำมาตัดแบ่งครั้งแล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนหรือย้ายฝาก มีความสามารถในการมีชีวิตรอดหรืออัตราการตั้งท้องสูงกว่าคุณภาพระดับพอใช้ หรือระดับเลว (Williams และคณะ, 1984a; Takeda และคณะ, 1987; Arave และคณะ, 1987; McEvoy และ Sreenan, 1990; Szell และคณะ, 1994) ตัวอ่อนที่มีคุณภาพดีเยี่ยมเมื่อนำมาตัดแบ่งครั้งประสบความสำเร็จสูงกว่าตัวอ่อนที่มีคุณภาพดี ตัวอ่อนที่มีคุณภาพไม่ดี เมื่อนำมาตัดแบ่งครั้งจะมีความอ่อนแอหลังจากตัดแบ่งครั้ง ทำให้ความสามารถในการแบ่งเซลล์ต่ำ มีจำนวนเซลล์น้อยกว่าตัวอ่อนที่มีคุณภาพดีและดีเยี่ยม ตัวอ่อนที่มีคุณภาพไม่ดีจึงควรย้ายฝากในรูปของตัวอ่อนปกติ (De Armas และคณะ, 1992; Bredbecka และคณะ, 1994)

3.5 เครื่องมือที่ใช้ในการตัดแบ่งครั้งตัวอ่อน

มีรายงานว่าความสำเร็จของการตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนขึ้นอยู่กับชนิดของเครื่องมือตัดแบ่งที่แตกต่างกัน (Ozil และคณะ, 1982; Williams และคณะ, 1984b) เครื่องมือตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนที่ต่างกันอาจทำให้คุณภาพของตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่เหมาะสมในการนำไปย้ายฝากแตกต่างกัน (Reichelt และ Niemann, 1994) ขณะที่ Kippax และคณะ (1991) รายงานการใช้เข็มขนาดเล็ก (microneedle) หรือใบมีดขนาดเล็ก (microblade) ตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนโคให้ผลไม่แตกต่างกัน เช่นเดียวกับ Mertes และ Bondioli (1985) รายงานการใช้ใบมีดที่ทำจากแก้ว (glass knife) และใบมีดที่ทำจากโลหะ (metal microblade) ตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนโคให้อัตราการเกิดลูกแฝดไม่ต่างกัน

3.6 ความเร็วในการตัดแบ่งครั้งตัวอ่อน

การตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนในทางการค้าต้องตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนอย่างรวดเร็วเพื่อที่จะทำอันตรายต่อตัวอ่อนน้อยที่สุด หากใช้เวลาในการตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนนานเกินไปอาจมีผลต่อการพัฒนาของตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งหลังเลี้ยงหรือย้ายฝาก ระยะเวลาที่ใช้ตัดแบ่งตัวอ่อนอยู่ระหว่าง 90 วินาที ถึง 20 นาทีต่อตัวอ่อน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับเทคนิควิธีการที่ใช้ตัดแบ่งตัวอ่อน ดังในตารางที่ 5 การตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนที่นำตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งใส่กลับเข้าไปใน zona pellucida ใช้เวลาในการตัดแบ่งมาก ขณะที่การตัดแบ่งครั้งโดยใช้น้ำยาตัดแบ่งตัวอ่อนใช้เวลาเพียง 90 วินาทีต่อตัวอ่อน อย่างไรก็ตาม Lewis (1994) รายงานว่าระยะเวลาที่ใช้ตัดแบ่งตัวอ่อนไม่มีผลต่อการตั้งท้องเมื่อนำไปย้ายฝาก

3.7 การเลี้ยงตัวอ่อนตัดแบ่งครั้ง

การเลี้ยงตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งก่อนนำไปทำการย้ายฝากพบว่าทำให้ตัวอ่อนมีอัตราการมีชีวิตรอดหรืออัตราการตั้งท้องดีขึ้น (Massey และคณะ, 1982; Hoppe และ Bavister, 1983; McEvoy และ Sreenan, 1990; King และคณะ, 1992) Baker และคณะ (1984) รายงานว่าตัวอ่อนโคตัดแบ่งครั้งเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อน มีขนาดใหญ่ขึ้นและเกิดช่องว่าง blastocoele เมื่อนำไปย้ายฝากสามารถตั้งท้องได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ แต่มีรายงานว่า การเลี้ยงตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งก่อนนำไปย้ายฝากไม่ได้ช่วยให้อัตราการมีชีวิตรอดดีขึ้นในโค (Baker และ Shea, 1985; De Armas และคณะ, 1992) และ (Tounson และ Moore, 1974a) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การเลี้ยงตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งระยะเวลานาน ทำให้การพัฒนาของตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งเป็น blastocyst หรืออัตราการตั้งท้องลดลง (Picard และคณะ, 1984; Baker และ Shea, 1985; Chesne และคณะ, 1987b; Seike และคณะ, 1989; Lucas-Hahn และ Niemann, 1991; De Armas, 1992; Nowshari และ Holtz, 1993; Stein-Stefani และ Holtz, 1994) เช่นเดียวกับ Losskutoff และคณะ (1993) ที่พบว่าช่วงเวลาในการเลี้ยงตัวอ่อนโคตัดแบ่งครั้งมีผลต่ออัตราการมีชีวิตรอดหลังจากย้ายฝาก แต่ Spark และคณะ



ตารางที่ 5 ระยะเวลาที่ใช้ตัดแบ่งครั้งตัวอ่อน

ชนิดสัตว์	เทคนิคที่ใช้ในการตัดแบ่งตัวอ่อน	เวลาตัดแบ่งต่อตัวอ่อน	เอกสารอ้างอิง
โค	ใช้ปิเปตบีดตัวอ่อนและใส่ตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งกลับเข้าไปใน zona pellucida	10 นาที	Ozil และคณะ (1982)
แกะ	ใช้ปิเปตบีดตัวอ่อนและใส่ตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งกลับเข้าไปใน zona pellucida	20 นาที	Gatica และคณะ (1984)
โค	ใช้ปิเปตบีดตัวอ่อนและใส่ตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งกลับเข้าไปใน zona pellucida	10 นาที	Williams และคณะ (1984b)
แพะ	ใช้ปิเปตบีดตัวอ่อนและใส่ตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งเข้าไปใน zona pellucida	12 นาที	Udy (1987)
	ใช้ปิเปตบีดตัวอ่อน และให้ตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งทั้ง 2 ส่วนอยู่ใน zona pellucida เดิม	8 นาที	
	ใช้ปิเปตบีดตัวอ่อน ตัดแบ่งครั้งเฉพาะส่วน inner cell mass และให้อยู่ใน zona pellucida เดิม	5 นาที	
โค	ใช้ปิเปตบีดตัวอ่อน และให้ตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งทั้ง 2 ส่วนอยู่ใน zona pellucida เดิม	5 นาที	Suzuki และ Shimohira (1986)
โค	ใช้น้ำยาดัดแบ่งตัวอ่อน	90 วินาที	Lewis (1994)
สุกร	ทำรอยบากที่พื้นจานตัดแบ่งตัวอ่อน	10 นาที/ 3 ตัวอ่อน	Reichelt และ Niemann (1994)

(1994) พบว่าระยะเวลาในการเลี้ยงตัวอ่อนโคตดแบ่งครึ่ง ไม่มีผลต่อการพัฒนาของตัวอ่อนคัตแบ่งครึ่ง อาจเป็นเพราะใช้ตัวอ่อนระยะ morula ขณะที่นักวิจัยส่วนใหญ่ใช้ตัวอ่อนระยะ blastocyst

3.8 การย้ายฝากตัวอ่อนคัตแบ่งครึ่ง

การนำตัวอ่อนคัตแบ่งครึ่งไปย้ายฝากสู่ตัวรับ เป็นการตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดของตัวอ่อนคัตแบ่งครึ่งวิธีหนึ่ง ทำให้ตัวรับตั้งท้องและคลอดเป็นลูกสัตว์ต่อไป วิธีการย้ายฝากตัวอ่อนคัตแบ่งครึ่งสู่ตัวรับมีหลายวิธีแตกต่างกัน เช่น ย้ายฝาก 1 ตัวอ่อนคัตแบ่งครึ่งต่อ 1 ตัวรับ ย้ายฝาก 2 ตัวอ่อนคัตแบ่งครึ่งต่อ 1 ตัวรับ ในปีกมดลูกข้างเดียวกัน ย้ายฝาก 2 ตัวอ่อนคัตแบ่งครึ่งต่อ 1 ตัวรับ ในปีกมดลูกคนละข้าง นอกจากนี้ยังแบ่งได้เป็นการย้ายฝากโดยวิธีศัลยกรรม และไม่ใช้วิธีศัลยกรรม

การย้ายฝาก 1 ตัวอ่อนคัตแบ่งครึ่งแก่ตัวรับทำให้อัตราการมีชีวิตรอดหรืออัตราการตั้งท้องต่ำกว่าการย้ายฝาก 2 ตัวอ่อนคัตแบ่งครึ่งในตัวรับตัวเดียวกัน (Lambeth และคณะ, 1983; Ozil, 1983; Picard และคณะ, 1984; Heyman, 1985) แต่มีรายงานว่า การย้ายฝาก 1 หรือ 2 ตัวอ่อนคัตแบ่งครึ่ง มีอัตราการตั้งท้องไม่แตกต่างกัน (Brem และคณะ, 1984; Warfield และคณะ, 1986; 1987; Seike และคณะ, 1989; Kippax และคณะ, 1991; Szell และ Hudson, 1991; Bredbecka และคณะ, 1994) Maurer และ Hruska (1988) รายงานการย้ายฝาก 2 ตัวอ่อนคัตแบ่งครึ่งในปีกมดลูกข้างเดียวกันให้ผลตั้งท้องสูงกว่าการย้ายฝากในปีกมดลูกคนละข้าง

การย้ายฝากตัวอ่อนคัตแบ่งครึ่งโดยวิธีศัลยกรรมให้อัตราการตั้งท้องสูงกว่าไม่ใช้วิธีศัลยกรรม และให้อัตราการเกิดลูกแฝด (twinning rate) สูงกว่า (Takeda และคณะ, 1986) แต่ Williams และคณะ (1984b) และ Kippax และคณะ (1991) พบว่ามีอัตราการตั้งท้องไม่แตกต่างกัน และ Willadsen และ Godke (1984) รายงานว่าการใช้สัตว์ตัวให้และตัวรับตัวเดียวกัน (auto transfer) เป็นแนวทางในการผลิตฝาแฝดเหมือนได้ดีและยังเป็นการลดต้นทุนได้อีกด้วย จากการเปรียบเทียบการย้ายฝากตัวอ่อนปกติและตัวอ่อนคัตแบ่งครึ่งพบว่ามีอัตราการตั้งท้องไม่แตกต่างกัน (Baker และคณะ, 1984; Voelkel และคณะ, 1984a; Takeda และคณะ, 1986; Leibo และ Rall, 1987; Brem, 1989; Seike และคณะ, 1989; McEvoy และ Sreenan, 1990) Gray และคณะ (1991) รายงานว่าการย้ายฝากตัวอ่อนโคตดแบ่งครึ่งในทางการค้า มีอัตราการตั้งท้องประมาณ 45-50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถูกค้าสามารถยอมรับได้ และเป็นการเพิ่มการตั้งท้องจากตัวอ่อนที่เก็บมาได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การย้ายฝากตัวอ่อนโคตดแบ่งครึ่ง ให้อัตราการตั้งท้องสูงกว่าการย้ายฝากตัวอ่อนปกติ (Baker และ Shea, 1985) แต่มีรายงานว่า การเลี้ยงตัวอ่อนคัตแบ่งครึ่งและย้ายฝากให้อัตราการมีชีวิตรอดต่ำกว่าตัวอ่อนปกติ (Yang และ Foote, 1987; Maurer และ Hruska, 1988;

Shelton และ Szell, 1988; Ash และคณะ, 1989; McEvoy และ Sreenan, 1990; Stein-Stafani และ Holtz, 1994)

4. การเลี้ยงตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง

4.1 ระบบการเลี้ยงตัวอ่อน

การเลี้ยงตัวอ่อนเพื่อให้ตัวอ่อนของสัตว์เลี้ยงมีการพัฒนาต่อไป มี 2 ระบบ ซึ่งมีจุดมุ่งหมายในการเลี้ยงแตกต่างกัน ระบบแรกเป็นการเลี้ยงตัวอ่อนระยะยาว (หลายวัน) เป็นวิธีที่ใช้อาหารเลี้ยงตัวอ่อนชนิดที่มีสารอาหารสมบูรณ์ (complete media) มีการควบคุมสภาวะอากาศ และเทคนิคการจัดการตัวอ่อน ใช้ในการศึกษาระบบเลี้ยงตัวอ่อนและความสามารถในการพัฒนาของตัวอ่อน ระบบที่สองเป็นการเลี้ยงตัวอ่อนระยะสั้น (หลายชั่วโมง) เพื่อเพิ่มการพัฒนาของตัวอ่อนก่อนที่จะย้ายฝากสู่ตัวรับ หรือแช่แข็ง เป็นวิธีที่ใช้อาหารเลี้ยงตัวอ่อนชนิดง่ายที่มีสารอาหารไม่ซับซ้อนมาก (Wright และ Bondioli, 1981) ระบบเลี้ยงตัวอ่อนที่ดีต้องมีประสิทธิภาพ และมีการพัฒนาให้เหมาะสม เพื่อใช้ในกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพสำหรับสัตว์เลี้ยง เช่น การปฏิสนธินอกร่างกาย (*In Vitro* fertilization ; IVF) การย้ายฝากตัวอ่อน (embryo transfer ; ET) การตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อน การโคลนตัวอ่อน (embryo cloning) และการผลิตสัตว์ที่ได้รับการถ่ายฝากยีน (transgenic animals)

ความจำเป็นในการเลี้ยงตัวอ่อนสามารถแบ่งได้เป็น 2 ระยะคือ (Wright และ Bondioli, 1981)

1. การเลี้ยงตัวอ่อนระยะ morula ถึงระยะ blastocyst เพื่อตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดหลังจากแช่แข็งหรือตัดแบ่งครึ่ง ตัวอ่อนโคสามารถเลี้ยงจากระยะหลังจาก 8 เซลล์ หรือ ระยะ morula ถึงระยะ blastocyst ในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนที่มีสารอาหารไม่ซับซ้อนมาก เช่น phosphate buffered saline (PBS) ที่เสริมด้วยซีรัมจากลูกโค (fetal calf serum หรือ FCS) หรือ ซีรัมของแกะ

2. การเลี้ยงตัวอ่อนระยะ 1 เซลล์ที่ได้รับการถ่ายฝากยีน ให้พัฒนาดังระยะ morula หรือระยะ blastocyst เพื่อตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตรอด และย้ายฝากสู่ตัวรับได้โดยไม่ต้องใช้วิธีสตัลकरण

การเลี้ยงตัวอ่อนส่วนใหญ่ใช้ระบบของ Brinster (Brinster, 1963 อ้างโดย Kane, 1987) ซึ่งเลี้ยงตัวอ่อนในหยดของอาหารเลี้ยงตัวอ่อน (droplets) ภายใต้น้ำมันพาราฟิน (paraffin oil) ในจานพลาสติกเลี้ยงตัวอ่อน น้ำมันพาราฟินทำหน้าที่ป้องกันการระเหยของอาหารเลี้ยงตัวอ่อน และการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์

4.2 การใช้สาร solcoseryl® ในการเลี้ยงตัวอ่อน

Solcoseryl® เป็นสารที่ได้จาก haemodialysate ของเลือดลูกโคที่กำจัด fibrin ออก และแยกส่วนต่างๆ ด้วย membrane สาร solcoseryl® ไม่มีโปรตีน ไม่มีแอนติเจน และไม่มี pyrogen มีอนุพันธ์ของสารน้ำหนักโมเลกุลต่ำจากเซลล์เม็ดเลือดแดง และพลาสมา (plasma) เช่น ไกลโคไลปิด (glycolipids), นิวคลีโอไซด์ (nucleosides) และ นิวคลีโอไทด์ (nucleotides), กรดอะมิโน, เปปไทด์สายสั้นๆ (oligopeptides), แร่ธาตุที่จำเป็น, อิเล็กโทรไลต์ (electrolytes), สารตัวกลางที่ได้จากขบวนการเมตาบอลิซึมของแป้ง และไขมัน

กลไกการทำงานหรือออกฤทธิ์

กลไกการออกฤทธิ์ของสาร solcoseryl® สืบเนื่องจากการศึกษาทางคลินิก สัตว์ทดลอง และจากการเลี้ยงเซลล์ กลไกการออกฤทธิ์ไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นกลไกเดียว เนื่องจากมีกลไกออกฤทธิ์หลายประการ ซึ่งช่วยเพิ่มกระบวนการเมตาบอลิซึมและทำให้เนื้อเยื่อที่ถูกทำลายกลับคืนสู่สภาพปกติ โดย (Solcoseryl, nd)

- เพิ่มการนำออกซิเจนเข้าเซลล์ โดยเฉพาะสภาพที่มีออกซิเจนต่ำ (hypoxia) เพิ่มการนำสารอาหารเข้าในเซลล์ ทำให้เร่งการซ่อมแซมซึ่งต้องการพลังงานสูง

- กระตุ้นการสร้างพลังงาน (ATP) ภายในเซลล์
- เพิ่มการขนย้ายน้ำตาลกลูโคสมีการทำงานที่คล้ายกับอินซูลิน
- กระตุ้นการสร้าง collagen และสร้างเส้นโลหิต (angiogenesis)
- เพิ่มอัตราการสร้างเซลล์บริเวณที่ถูกทำลาย
- มีกลไกการทำงานเหมือนสารเร่งการเจริญเติบโต
- ช่วยป้องกันเซลล์ (cytoprotective)

จากกลไกเหล่านี้ทำให้เร่งการหายของแผล เช่น แผลหลุม แผลหลุมในกระเพาะ แผลที่ผิวหนัง เพิ่มการสร้างเม็ดเล็กๆ ที่เกิดบริเวณแผลขณะใกล้จะหาย (granulation) ช่วยเพิ่ม oxidative metabolism และเพิ่มการซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ผิดปกติ

ความเป็นพิษ ไม่เป็นพิษต่อตัวอ่อน ไม่มีคุณสมบัติเป็นสารที่ก่อให้เกิดการผ่าเหล่า (mutagenic)

การใช้เลี้ยงตัวอ่อน

จากกลไกการออกฤทธิ์ของสาร solcoseryl® คาดว่าน่าจะช่วยเพิ่มการพัฒนาของตัวอ่อน จึงมีการนำสาร solcoseryl® มาใช้ในการเลี้ยงตัวอ่อน (Hahn, 1984; Maurer และ Hruska, 1984; Viker และคณะ, 1984; Reed และคณะ, 1987; Russler-Long และคณะ, 1991) ซึ่ง Hahn (1984) ใช้สาร solcoseryl® เสริมใน Whitten's medium ที่มีซีรัมลูกโค 20 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงตัวอ่อน

และตัวอ่อนหนู mouse ตัดแบ่งครั้งที่ไม่มี zona pellucida พบว่าช่วยเพิ่มให้การพัฒนาคืบหน้าขึ้น เพิ่มการฝังตัวของตัวอ่อน และลดการดูดซึมกลับตัวอ่อนของตัวแม่ Reed และคณะ (1987) เสริมสาร solcoseryl[®] ใน Whitten's medium ที่มี EDTA 0.1 mM ในการเลี้ยงตัวอ่อนหนู mouse และตัวอ่อนหนู mouse ที่ได้รับการฉีดขึ้น พบว่าสาร solcoseryl[®] อาจช่วยเพิ่มการพัฒนาของตัวอ่อน และตัวอ่อนที่ได้รับการฉีดขึ้น Viker และคณะ (1984) ได้ศึกษาในระดับที่เหมาะสมของสาร solcoseryl[®] ที่ใช้เสริมใน Ham's F10 ที่มีซีรัมลูกโค 10 เปอร์เซ็นต์ในการเลี้ยงตัวอ่อนโค พบว่าระดับสาร solcoseryl[®] ที่เสริม 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีแนวโน้มเพิ่มความสามารถในการมีชีวิตรอดมากกว่าการเสริมที่ระดับ 0.01 เปอร์เซ็นต์ หรือไม่เสริม ซึ่งระดับของสาร solcoseryl[®] ที่ใช้เสริมในการเลี้ยงตัวอ่อนกันมากคือ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (Hahn, 1984; Maurer และ Hruska, 1984; Viker และคณะ, 1984; Reed และคณะ, 1987)

แต่ Russler-Long และคณะ (1991) รายงานการเสริมสาร solcoseryl[®] ระดับ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ใน Brinster's medium เปรียบเทียบกับการเสริมด้วย BSA 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในการเลี้ยงตัวอ่อนแกะ พบว่าการเสริมด้วย BSA เพิ่มการพัฒนาของตัวอ่อนถึงระยะ blastocyst และเพิ่มการฟักตัวของตัวอ่อนได้ดีกว่าการเสริมด้วยสาร solcoseryl[®] เช่นเดียวกับ Thuemmel และคณะ (1989) ใช้สาร CLB1107 ซึ่งเป็นสารประเภทเดียวกับสาร solcoseryl[®] เสริมใน Ham's F10 เปรียบเทียบกับการเสริมด้วยซีรัมจากโคเพศผู้ที่ตอนแล้ว (steer serum) พบว่าการเสริมด้วยซีรัมจากโคเพศผู้ที่ตอนแล้วช่วยเพิ่มการพัฒนาของตัวอ่อนโคมากกว่าการเสริมด้วยสาร CLB1107

4.3 การตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดของตัวอ่อน

การตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตรอด (viability) ของตัวอ่อนนิยมใช้การตรวจสอบจากลักษณะรูปร่างของตัวอ่อน และการดูจากความสามารถในการพัฒนาของตัวอ่อนจากการเลี้ยงตัวอ่อน (Gardner และ Leese, 1993)

การตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดของตัวอ่อนจากการตรวจสอบลักษณะรูปร่างเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยใช้การให้คะแนนลักษณะรูปร่างที่ปรากฏ แต่ในทางปฏิบัติการให้คะแนนของตัวอ่อนโดยเฉพาะระยะหลังจากการรวมกลุ่มของเซลล์ทำได้ยาก ขึ้นอยู่กับความชำนาญนักกลัพพะวิทยา (embryologist) ซึ่งตัวอ่อนที่เห็นว่ามีรูปร่างปกติภายใต้กล้องจุลทรรศน์อาจมีความผิดปกติอยู่ภายในเซลล์ การใช้วิธีตรวจสอบลักษณะรูปร่างร่วมกับการดูความสามารถในการพัฒนาของตัวอ่อนจากการเลี้ยงตัวอ่อน เป็นวิธีที่ใช้วัดความสามารถในการมีชีวิตรอดของตัวอ่อนได้ดีกว่าการใช้เกณฑ์จากรูปร่างเพียงอย่างเดียว เนื่องจากการเลี้ยงตัวอ่อนเป็นระยะเวลาสั้นๆ ทำให้รู้ว่าตัวอ่อนสามารถพัฒนาได้ต่อไปหรือไม่ (Gardner และ Leese, 1993)

การตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดของตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง สามารถดูได้จากการพัฒนาของตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อน การตั้งท้องของตัวรับเมื่อย้ายฝากตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง การมีชีวิตรอดของตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งในตัวรับจนเป็นลูกสัตว์ นอกจากนี้การพัฒนาของตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งยังตรวจสอบได้จากการข้อมสับจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้น (Saito และ Niemann, 1991; De Armas และคณะ, 1992; Smith และคณะ, 1992; Spark และคณะ, 1994; Tao และคณะ, 1995) จากการติดสี fluorescent (Blakewood และคณะ, 1986; Bredbecka และคณะ, 1991)

การเลี้ยงตัวอ่อนหลังการตัดแบ่งครึ่ง ใช้ในการตรวจสอบความสามารถในการพัฒนาของตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง หรือตรวจสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดของตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง โดยดูจากการสร้างช่องว่าง blastocoele ขึ้นมาอีกครั้ง (Trounson และ Moore, 1974a; Ozil, 1983; Baker และคณะ, 1984; Nagashima และคณะ, 1984; 1989; Baker และ Shea, 1985; Rorie และคณะ, 1986; Shelton และ Szell, 1988; McEvoy และ Sreenan, 1990; Saito และคณะ, 1991; Saito และ Niemann, 1991; Smith และคณะ, 1992; Nowshari และ Holtz, 1993; Riechelt และ Niemann, 1994; Stein-Stefani และ Holtz, 1994) ซึ่งเป็นการพัฒนาสู่ระยะ blastocyst มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ทำให้เหมาะสมในการนำไปย้ายฝาก (Nibart และคณะ, 1988) และเป็นการเพิ่มความสามารถในการมีชีวิตรอดของตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งหลังจากย้ายฝาก (Yong และ Jianchen, 1990; Stein-Stefani และ Holtz, 1994) ตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งหลังจากเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนจะกลับมา มีรูปร่างเกือบกลม มีการพัฒนาถึงระยะ blastocyst โดยเกิดช่องว่าง blastocoele และสามารถมองเห็นส่วน inner cell mass ได้ชัดเจน พิจารณาว่าสามารถมีชีวิตรอด (Nagashima และคณะ, 1984; Baker และ Shea, 1985; McEvoy และ Sreenan, 1990; Saito และคณะ, 1991; Saito และ Niemann, 1991) ตัวอ่อนระยะ morula เมื่อตัดแบ่งครึ่งอาจมี blastomere หลุด และอาจพัฒนาเป็น morula เล็กๆ (Nowshari และ Holtz, 1993)

การใช้ลักษณะรูปร่างของตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งหลังจากเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนเพื่อตรวจสอบความสามารถในการพัฒนาของตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งเป็นวิธีที่เชื่อถือได้ Reichelt และ Niemann (1994) รายงานว่า ตัวอ่อนสุกตัดแบ่งครึ่งที่มีคุณภาพอยู่ในระดับ 2 หลังจากเลี้ยง มีเส้นผ่าศูนย์กลางใหญ่กว่าตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งที่มีคุณภาพระดับ 1 และ 0 ตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งที่มีคุณภาพระดับ 1 มีขนาดใหญ่กว่าตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งคุณภาพระดับ 0 และเส้นผ่าศูนย์กลางของตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งคุณภาพระดับ 2 คล้ายกับเส้นผ่าศูนย์กลางของตัวอ่อนปกติที่เลี้ยงในสภาพเดียวกัน ตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งที่มีคุณภาพระดับ 2 มีจำนวนเซลล์มากกว่าตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งที่มีคุณภาพระดับ 1 และ 0 ตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งที่มีคุณภาพระดับ 1 มีจำนวนเซลล์มากกว่าคุณภาพระดับ 0 และ

ตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่มียุณภาพระดับ 2 มีจำนวนเซลล์น้อยกว่าตัวอ่อนปกติ ซึ่งจำนวนเซลล์และเส้นผ่าศูนย์กลางมีความสัมพันธ์กัน เช่นเดียวกับ Picard และคณะ (1984) ที่พบว่าตัวอ่อนโคตัดแบ่งครั้งที่มียุณภาพดีที่ได้จากการเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง มีจำนวนเซลล์มากกว่าตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่มียุณภาพเลว (45.9 ± 3.4 และ 23 ± 2.1) และ Tao และคณะ (1995) พบว่าจำนวนเซลล์ inner cell mass ของตัวอ่อนสุกรตัดแบ่งครั้งที่มียุณภาพระดับ 2 สูงกว่าระดับ 1 และ 0 และจำนวนเซลล์รวมทั้งหมดของตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่มียุณภาพระดับ 2 สูงกว่าระดับ 0 และตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่มียุณภาพระดับ 2 ไม่มีการสูญเสียเซลล์ inner cell mass และมีการลดจำนวนเซลล์ของ trophoblast 26.5 ถึง 33.1 เปอร์เซ็นต์

Ozil (1983) รายงานว่าการเลี้ยงตัวอ่อนโคระยะ blastocyst ที่ตัดแบ่งครั้งที่มีการซ่อมแซมกลับเหมือนเดิม และสร้างช่องว่าง blastocoele ได้เร็วมาก โดยมีการยึดติดกันระหว่างเซลล์ของ trophoblast และชั้น trophoblast ด้านที่ถูกตัดมีการเชื่อมติดกัน เป็นความสามารถของ trophoblast ในการพัฒนาทดแทน (compensate growth) อย่างต่อเนื่องหลังจากตัดแบ่งครั้งที่ Baker และคณะ (1984) และ Baker และ Shea (1985) รายงานว่าการเลี้ยงตัวอ่อนโคตัดแบ่งครั้งเป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง ก่อนย้ายฝาก ช่วยตรวจสอบการมีชีวิตรอดของตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่ตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่พัฒนามีขนาดใหญ่และเกิดช่องว่าง blastocoele เมื่อนำไปย้ายฝากจะมีอัตราการตั้งท้องสูง (78 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเซลล์ของตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งไม่รวมกันเป็นกลุ่ม ไม่ยึดเกาะกัน (Baker และ Shea, 1985) หรือเมื่อตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งพัฒนาเป็น trophoblastic vesicle โดยไม่มี inner cell mass (Nagashima และคณะ, 1984; McEvoy และ Sreenan, 1990; Saito และ Niemann, 1991; Smith และคณะ, 1992) มีเซลล์ตายมากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ เซลล์ตายทั้งหมดหรือไม่มีการพัฒนา (Nagashima และคณะ, 1989; Saito และคณะ, 1991; Riechelt และ Niemann, 1994) บ่งชี้ว่าไม่มีชีวิตรอด การตรวจสอบการมีชีวิตรอดของตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งก่อนย้ายฝากจึงเป็นสิ่งที่จำเป็น เพื่อให้การย้ายฝากตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งประสบความสำเร็จสูงสุด

4.4 ระบบที่ใช้เลี้ยงตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่

การเลี้ยงตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่ มีการใช้อาหารเลี้ยงตัวอ่อนที่แตกต่างกัน เช่น DPBS เสริมด้วยซีรัมของแพะ 20 เปอร์เซ็นต์ (Nowshari และ Holtz, 1993), PBS เสริมด้วยซีรัมลูกโค 15 เปอร์เซ็นต์ (Yong และคณะ, 1990), PBS เสริมด้วยซีรัมลูกโค 20 เปอร์เซ็นต์ (De Armas และคณะ, 1992), Hams F-10 เสริมด้วยซีรัมลูกโค 10 เปอร์เซ็นต์ (Bredbecka และคณะ, 1991), Whittingham medium (Nagashima และคณะ, 1984) เป็นต้น สภาวะแวดล้อมที่ใช้ในการเลี้ยงตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่ ซึ่งเป็นอุณหภูมิและสภาวะอากาศก็มีหลายสภาวะเช่นกัน เช่น CO₂ 5 เปอร์เซ็นต์ 37°C (Nowshari และ Holtz, 1993), CO₂ 5 เปอร์เซ็นต์ 38°C (Takeda และคณะ,

1987), 37°ซ ในสภาวะอากาศปกติ (McEvoy และ Sreenan, 1990), CO₂ 5 เปอร์เซ็นต์ O₂ 5 เปอร์เซ็นต์ N₂ 90 เปอร์เซ็นต์ 37°ซ (Shelton และ Szell, 1988) เป็นต้น ระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งมีความผันแปรมาก ตั้งแต่ 2-72 ชั่วโมง (Voelkel และคณะ, 1984b; Nowshari และ Holtz, 1993) ขึ้นอยู่กับระยะการเจริญของตัวอ่อนที่นำมาตัดแบ่งครั้ง Lucas-Hahn และ Niemann (1991) รายงานว่าตัวอ่อนโคตัดแบ่งครั้งอ่อนไหวมากกว่าตัวอ่อนปกติเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนที่แตกต่างกัน

PBS เป็นสารตัวกลางที่นำมาใช้หลายขั้นตอน ตั้งแต่เพาะเลี้ยงตัวอ่อน เก็บรักษาตัวอ่อน ย้ายฝากตัวอ่อน และเลี้ยงตัวอ่อน เพราะ PBS มีคุณสมบัติที่มี pH คงที่เมื่อสัมผัสกับอากาศ จึงไม่ต้องใช้ก๊าซ CO₂ เพื่อรักษา pH ให้คงที่ (Kane, 1987) แต่ PBS ไม่สามารถนำมาใช้ในการเลี้ยงตัวอ่อนระยะยาวได้ ส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพดีถ้าเลี้ยงไม่เกิน 24 ชั่วโมง (Saito, 1994) และการเติมซีรัม 10-20 เปอร์เซ็นต์ ลงใน PBS ทำให้สถานะของ PBS เปลี่ยนแปลง เนื่องจากซีรัมมักจะมี HCO₃⁻ 25 mM HCO₃⁻ จับกับ H⁺ ใน PBS ทำให้เปลี่ยนเป็น H₂CO₃ และ CO₂ ซึ่ง CO₂ ถูกปลดปล่อยสู่บรรยากาศทำให้มีความเป็นด่างเพิ่มขึ้นช้าๆ การเพิ่มของ pH อาจไม่มากนัก เนื่องจากคุณสมบัติที่เป็น buffer ของ PBS แต่ระดับ CO₂ ของ PBS จะลดลงในอัตราที่คงที่จนกระทั่ง HCO₃⁻ ถูกใช้หมดไป ปรากฏการณ์นี้อาจมีความสำคัญในการเลี้ยงตัวอ่อนสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมระยะสั้นๆ เพราะตัวอ่อนก็มีความต้องการ CO₂ ในการพัฒนา

การเลี้ยงตัวอ่อนระยะยาวต้องการระบบการเลี้ยงที่สมบูรณ์มาก จึงจำเป็นต้องใช้อาหารที่เป็น bicarbonate buffered เช่น Ham's F10, BMOC-3, Menezes' B2 หรือ TCM-199 การใช้อาหารเลี้ยงตัวอ่อนเหล่านี้ต้องเลี้ยงในสภาวะสภาวะอากาศที่มี CO₂ 5 เปอร์เซ็นต์ เพราะเมื่ออาหารเลี้ยงตัวอ่อนเหล่านี้สัมผัสกับอากาศ pH จะสูงขึ้นอย่างรวดเร็วทำให้อาหารเลี้ยงตัวอ่อนมีสภาวะเป็นด่างมากซึ่งเป็นอันตรายต่อตัวอ่อน หรือเกิดเนื้อตาย (necrosis) ถ้า pH สูงเป็นระยะเวลานาน การแก้ไขปัญหานี้ทางหนึ่งคือ การใช้น้ำมัน เช่น น้ำมันพาราฟิน ปกคลุมเพื่อให้มีการแลกเปลี่ยนก๊าซช้าลงเมื่อจำเป็นต้องนำจานเลี้ยงตัวอ่อนออกมานอกตู้บ่ม เช่น การตรวจสอบการพัฒนาของตัวอ่อน

นอกจากการเลี้ยงตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนแล้ว ยังมีการเลี้ยงตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งด้วยอาหารเลี้ยงตัวอ่อนร่วมกับเซลล์เชื้อทูน่าไข่ซึ่งเป็นการ co-culture และการเลี้ยงตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งในมดลูกของสัตว์ตัวกลาง มีรายงานว่า การ co-culture สามารถเพิ่มการมีชีวิตรอดของตัวอ่อนโคตัดแบ่งครั้งเมื่อเลี้ยงทั้งระยะสั้นและระยะยาว (Voelkel และคณะ, 1985) และยังมีรายงานว่า การเลี้ยงตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งในสัตว์ตัวกลาง มีผลดีต่อการมีชีวิตรอดของตัวอ่อนตัดแบ่ง

กริ่งหลังจากย้ายฝากในโก (Lehn-Jensen และ Willadsen, 1983) และ (Willadsen, 1980) และหนู mouse (Tsunoda และ McLaren, 1983)