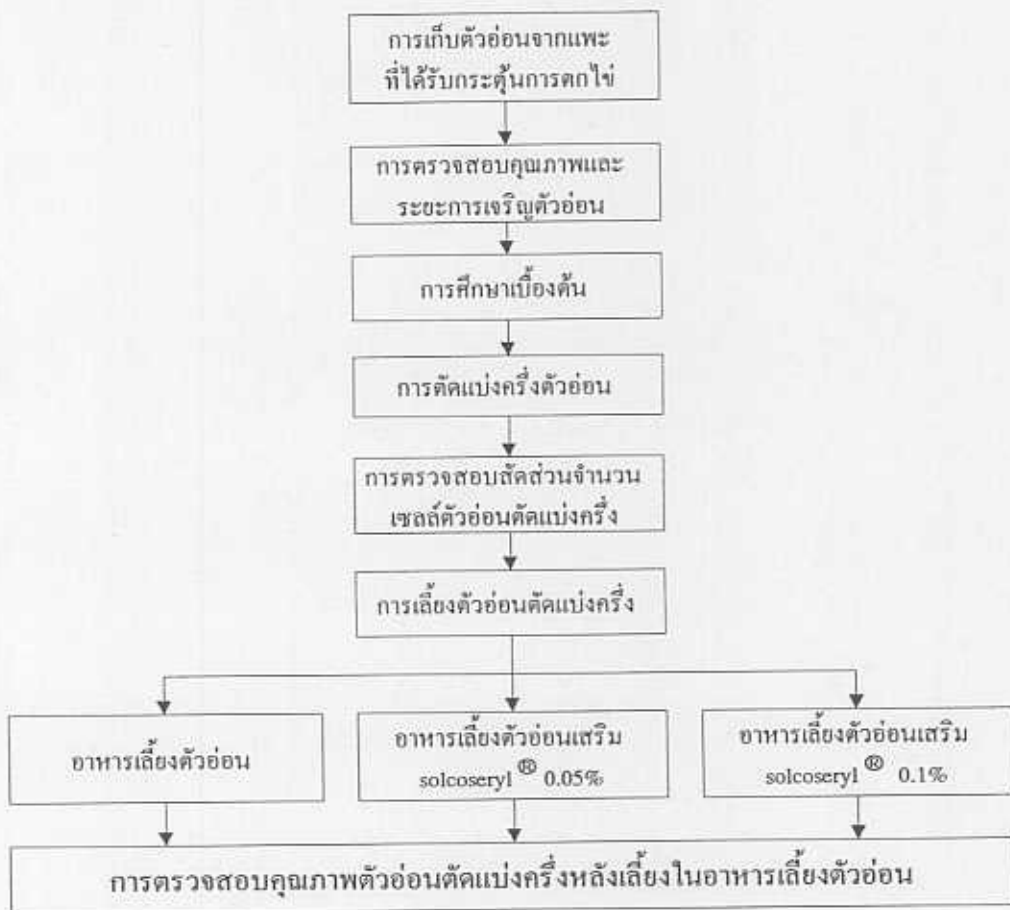


บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ขั้นตอนการดำเนินงาน

การศึกษาการเลี้ยงตัวอ่อนแพะตัดแบ่งครึ่งในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนที่เสริมด้วยสาร solcoseryl[®] มีขั้นตอนการดำเนินงานสำคัญๆ ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 แผนภาพแสดงขั้นตอนการศึกษาการเลี้ยงตัวอ่อนแพะหลังการตัดแบ่งครึ่งในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนที่เสริมด้วยสาร solcoseryl[®]

2. วัสดุการทดลอง

2.1 ฮอร์โมนและอุปกรณ์สำหรับการตกไข่

- 2.1.1 Follicle stimulating hormone (FSH) (Super-OV[®], Webster Pty, Ltd., Vic. Australia หรือ Folltropin[®]-V, Vetrapharm A/Asia Pty, Ltd., Vic. Australia)
- 2.1.2 Pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) (Folligon, Intervet International, Netherland)
- 2.1.3 Cidr-G devices (Progesterone 0.3 กรัม, Carter Holt Harvey Plastic Products, Hamilton, Newzealand) พร้อมอุปกรณ์การใช้
- 2.1.4 กระจกกดฉีดพลาสติกขนาด 3, 5 และ 10 มิลลิลิตร
- 2.1.5 เข็มฉีดยาเบอร์ 20 ยาว 1 นิ้ว

2.2 สารเคมีและอุปกรณ์ชะล้างตัวอ่อน

- 2.2.1 ชุดส่องตรวจภายในช่องท้อง (Laparoscope, Karl Storz, W. Germany) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร
- 2.2.2 เข็มผ่าตัดสำหรับแพะ
- 2.2.3 ยาหล่อประสาท xylazine (Rompun[®], Bayer Vetchem, Korea)
- 2.2.4 ชุดผ่าตัดชุดใหญ่สำหรับการเปิดผ่าช่องท้อง
- 2.2.5 ยาสลบ ketamine hydrochloride (Ketalar[®], Park-Devis and company, USA)
- 2.2.6 ท่อสำหรับเก็บตัวอ่อน (two-way foley catheter) เบอร์ 10 (Bardex[®], Bard Urological Division C.R. Bard, Inc. USA) หรือเบอร์ 12 (Bardia[®], Bard SDN. BHD., Malaysia)
- 2.2.7 กระจกกดฉีดพลาสติกขนาด 5, 10 และ 20 มิลลิลิตร
- 2.2.8 เข็มฉีดยาเบอร์ 20 ยาว 1 นิ้ว
- 2.2.9 น้ำยาสำหรับชะล้าง (flushing medium) ตัวอ่อน (Modified Dulbecco's Phosphate Buffer Saline; DPBS, Cat. No. 310-4190 AG, GibCo Laboratories Life Technologies Inc. Grand Island, N.Y., USA) เสริมด้วย 50 X Modified Dulbecco's Supplement (ViGro, RAB, Australia) 2 เปอร์เซ็นต์

- 2.2.10 ยาปฏิชีวนะ Benzathin Penicillin G, Procain Penicillin G,
Dihydrostreptomycin Sulphate (Shotapen, Virbac laboratories, France)
- 2.2.11 ขวดแก้วขนาด 100 มิลลิลิตร ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อโรคแล้ว
- 2.2.12 Troca canula (Intravenous cannula, Argyle[®] Medicut[®], Sherwood
medical, Tullamore, Ireland) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.7 มิลลิเมตร ยาว
45 มิลลิเมตร
- 2.2.13 แบบฟอร์มบันทึกผลการชะล้างตัวอ่อน

2.3 สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับตรวจหาและประเมินคุณภาพตัวอ่อน

- 2.3.1 กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereomicroscope, Nikon SMZ-2B, Japan)
- 2.3.2 กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereomicroscope, Olympus SZH 10, Japan)
ที่ติดกล้องถ่ายภาพ
- 2.3.3 น้ำยาเก็บรักษา (holding medium) ตัวอ่อน (DBPS, Cat. No. 14287-056,
GibCo BRL Life Technologies Inc. Grand Island, N.Y., USA)
- 2.3.4 ซีรัมจากลูกโค (fetal bovine serum, Cat. No. 10106-102, GibCo BRL Life
Technologies Inc. Grand Island, N.Y., USA)
- 2.3.5 ยาปฏิชีวนะสำหรับเสริมในน้ำยาเก็บรักษาตัวอ่อน Penicillin G Sodium
1,000,000 ยูนิต (M&H manufacturing Co.Ltd., Thailand) Streptomycin
sulfate 1 กรัม (M&H manufacturing Co.Ltd., Thailand)
- 2.3.6 งานพลาสติกกลมปลอดเชื้อขนาด 90 X 20 มิลลิเมตร (Nuclon[®] Delta,
Nunc InterMed, Denmark) ที่ขีดตารางที่ด้านใต้ ขนาด 1 X 1 เซนติเมตร
- 2.3.7 งานพลาสติกกลมปลอดเชื้อขนาด 35 X 10 มิลลิเมตร (Nuclon[®] Delta,
Nunc InterMed, Denmark)
- 2.3.8 งานพลาสติกปลอดเชื้อชนิด 4 หลุม (4-well multidish, Nunclon[®] Delta,
Nunc , InterMed, Denmark)
- 2.3.9 ปิเปตปลอดเชื้อ (pasteur pipette) ที่ขีดปลายออกให้มีเส้นผ่าศูนย์กลาง
ขนาดประมาณ 180-200 ไมครอน
- 2.3.10 จุกยางสำหรับต่อกับปิเปตปลอดเชื้อ
- 2.3.11 ภาชนะอุ่นหมุ่ hot plate (Stage warmer, Kitazato, Japan)
- 2.3.12 Water bath incubator (Yamato BT23, Japan)

- 2.3.13 ทิปพลาสติกสำหรับปิเปต (plastic pipette tips) ขนาด 2-200 ไมโครลิตร (Elkay[®] products, INC. USA) และขนาด 200-1000 ไมโครลิตร (C200, Gilson. USA)
- 2.3.14 แบบฟอร์มบันทึกการตรวจหาและประเมินคุณภาพตัวอ่อน
- 2.4 สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับการตัดแบ่งตัวอ่อน
- 2.4.1 น้ำยาคัดแบ่งตัวอ่อน (splitting solution, ViGro RAB, Australia)
- 2.4.2 ซีรัมอัลบูมินที่สกัดจากโค (bovine serum albumin: BSA, ViGro RAB, Australia)
- 2.4.3 ชุดตัดตัวอ่อน (micromanipulator motorized joy-stick type, A.B. Technology, Australia)
- 2.4.4 กล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted (PhotoZoomTM cambridge Instruments)
- 2.4.5 ก้านสำหรับยึดใบมีดตัดตัวอ่อน
- 2.4.6 น้ำกลั่นบริสุทธิ์ กลั่น 3 ครั้ง
- 2.4.7 เอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์
- 2.4.8 แอมโมเนีย
- 2.4.9 งานพลาสติกกลมปลอดเชื้อขนาด 90 X 20 มิลลิเมตร (Nunc[®] Delta, Nunc , InterMed, Denmark)
- 2.4.10 งานพลาสติกกลมปลอดเชื้อขนาด 35 X 10 มิลลิเมตร (Nuclon[®] Delta, Nunc InterMed, Denmark)
- 2.4.11 ใบมีดสำหรับตัดตัวอ่อน (Splitting blades, RAB, Australia)
- 2.4.12 ปิเปตปลอดเชื้อที่ยึดปลายออกจามีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 180-200 ไมครอน
- 2.4.13 จุกยางสำหรับต่อกับปิเปตปลอดเชื้อ
- 2.4.14 น้ำยาเก็บรักษากตัวอ่อน (DBPS, , Cat. No. 14287-056, GibCo BRL Life Technologies Inc. Grand Island, N.Y., USA)
- 2.4.15 ปิเปตขนาดเล็ก (micro pipette) ขนาด 40-200 ไมโครลิตร (Finpipette Digital, Labsystems, Finland)
- 2.4.16 กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (Stereomicroscope, Olympus SZH 10, Japan) ที่ติดกล้องถ่ายภาพ

- 2.4.17 ทิปสำหรับปิเปต ขนาด 2-200 ไมโครลิตร (Elkay[®] products, INC. USA) และขนาด 200-1000 ไมโครลิตร (C200, Gilson. USA)
- 2.4.18 แบบฟอร์มบันทึกการตัดแบ่งครั้งตัวอ่อน
- 2.5 สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงตัวอ่อนและการเลี้ยงตัวอ่อน
- 2.5.1 น้ำยาเก็บรักษาตัวอ่อน (DBPS, Cat. No. 14287-056, GibCo BRL Life Technologies Inc. Grand Island, N.Y., USA)
- 2.5.2 สาร solcoseryl[®] (Solco Basle Ltd., Birsfelden Switzerland)
- 2.5.3 น้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนชนิด TCM-199 (Cat. No. 12340-014, GibCo BRL Life Technologies Inc. Grand Island, N.Y., USA)
- 2.5.4 น้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนชนิด Hec-2 holding (ViGro RAB, Australia)
- 2.5.5 Water bath incubator (Yamato BT23, Japan)
- 2.5.6 ซีรัมจากลูกโค (Cat. No. 10106-102, GibCo BRL Life Technologies Inc. Grand Island, N.Y., USA)
- 2.5.7 ยาปฏิชีวนะสำหรับเสริมในน้ำยาเก็บรักษาตัวอ่อน Penicillin G Sodium 1,000,000 ยูนิต (M&H manufacturing Co.Ltd., Thailand) Streptomycin sulfate 1 กรัม (M&H manufacturing Co.Ltd., Thailand)
- 2.5.8 หลอดแก้วทดลองปลอดเชื้อขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร
- 2.5.9 Lamina flow (Equipements Scientifiques&Industrials S.A. ESI. Flufrance, France)
- 2.5.10 งานพลาสติกกลมปลอดเชื้อขนาด 35 X 10 มิลลิเมตร (Falcon 3001, Becton Dickinson Labware, Becton Dickinson and Company, USA) สำหรับใช้เลี้ยงตัวอ่อน
- 2.5.11 งานพลาสติกปลอดเชื้อชนิด 4 หลุม (4-well multidish, Nuclon[®] Delta, Nunc InterMed, Denmark)
- 2.5.12 ทิปสำหรับปิเปต ขนาด 2-200 ไมโครลิตร (Elkay[®] products, INC. USA) และขนาด 200-1000 ไมโครลิตร (C200, Gilson. USA)
- 2.5.13 ปิเปตพลาสติกปลอดเชื้อ (sterile plastic pipette) ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร (LP Italiana SPA, Milano, Italy)
- 2.5.14 น้ำมันแร่ (Mineral oil) (Sigma chemical CO., USA)

- 2.5.15 ไมโครปิเปต ขนาด 5-40, 40-200 และ 200-1000 ไมโครลิตร (Finpipette Digital, Labsystems, Finland)
- 2.5.16 เครื่องดูดปิเปตอัตโนมัติชนิดอัดไฟไหม้ได้ (BibbySterilin, England)
- 2.5.17 ตัวกรองสารละลาย ขนาดรูกรอง 0.22 ไมครอน (Cameo 25 AS, MSI micron separations inc.)
- 2.5.18 ตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ (Carbondioxide incubator, IR CO₂ water jacketed incubator, Labline, USA) ใช้เป็นตู้สำหรับเลี้ยงตัวอ่อน
- 2.5.19 แบบฟอร์มบันทึกการเลี้ยงตัวอ่อน

3. วิธีการทดลอง

ตัวอ่อนที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้จากงานทดลองของกลุ่มงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผสมเทียม กองผสมเทียม กรมปศุสัตว์ โดยมีขั้นตอนและวิธีการดังนี้

3.1 การเก็บตัวอ่อน

แพะที่นำมาเก็บตัวอ่อนในการศึกษาครั้งนี้ เป็นแพะลูกผสมพันธุ์ชาเนนพื้นเมือง จำนวน 31 ตัว นำมาปรับขนานการเป็นสัด (estrous synchronization) โดยสอดไซเดอร์จี (Cidr-G) ผ่านทางปากมดลูก เป็นเวลา 14 วัน กระตุ้นการตกไข่โดยการฉีด FSH ซึ่งเป็น Super-OV[®] จำนวน 7 มิลลิลิตร (52.5 units of NIH-FSH-S1 standard) หรือ Folltropin[®]-V จำนวน 10 มิลลิลิตร (200 มิลลิกรัม NIH-FSH-P1) เข้าใต้ผิวหนัง พร้อมกับฉีด PMSG (Folligon) จำนวน 1 มิลลิลิตร (200 ยูนิต) เข้ากล้ามเนื้อ ในวันที่ 12 หลังจากสอดไซเดอร์จี ถอดไซเดอร์จีออกในวันที่ 14 หลังจากสอด มีผลทำให้แพะเป็นสัดภายใน 24 ชั่วโมง ใช้แพะพ่อพันธุ์ที่ตัดท่อน้ำเชื้อ (vasectomized) ตรวจสอบการเป็นสัดของแพะที่ได้รับการกระตุ้นการตกไข่ และนำแพะตัวที่เป็นสัดไปผสมพันธุ์ตามธรรมชาติกับแพะพ่อพันธุ์ชาเนน

3.2 การเตรียมแพะก่อนผ่าตัดเพื่อเก็บตัวอ่อน

นำแพะที่ผ่านการกระตุ้นการตกไข่ และได้รับการผสมพันธุ์จากพ่อพันธุ์ มาเปิดคำช่องท้องเพื่อเก็บตัวอ่อนในวันที่ 7 หลังจากแพะเป็นสัด ชั่งน้ำหนักแพะ โคนขนบริเวณผนังหน้าท้องที่จะทำการผ่าตัด จากนั้นฉีดยากล่อมประสาท Xylazine (Rompun[®]) ในขนาด 1 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัว 100 กิโลกรัม หรือ 0.22 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เข้ากล้ามเนื้อบริเวณแผงคอหรือขาหลังด้านใน เพื่อให้แพะมีอาการซึมทำให้สะดวกแก่การบังกับสัตว์และการตรวจสอบการตอบสนองต่อฮอร์โมนของแพะ

3.3 การตรวจสอบการตอบสนองต่อฮอร์โมน

นำแพะที่มีอาการซึมจากการให้ยากล่อมประสาทขึ้นเตียงผ่าตัด จัดท่าให้แพะเอนหงาย (dorsal recumbency) ปรับเตียงผ่าตัดให้เอียงทำมุมประมาณ 45 องศาให้หัวแพะเอียงไปทางด้านต่ำ เพื่อให้สะดวกแก่การเจาะส่องดูภายในช่องท้องและเครื่องมือที่ใช้เจาะไม่ทำอันตรายแก่อวัยวะภายในช่องท้อง ทำความสะอาดผิวหนังบนหน้าท้องบริเวณที่จะผ่าตัดด้วยทิงเจอร์ไอโอดีน จากนั้นจึงตรวจการตอบสนองต่อฮอร์โมนของรังไข่โดยการตรวจนับจำนวนคอร์ปัสลูเทียม (corpus luteum) การตรวจสอบคุณภาพของคอร์ปัสลูเทียม และฟอลลิเคิลที่ไม่มีการตกไข่ ปฏิบัติโดยใช้อุปกรณ์ส่องตรวจภายใน (laparoscope) ทำการเจาะช่องท้องที่ตำแหน่งระหว่างสะดือและสวابلบริเวณเอียงกับราวนมไปทางด้านข้างของลำตัวเล็กน้อยด้วย troca canula ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร ก่อนเจาะใช้ใบมีดผ่าตัดกรีดหน้าท้องที่ผิวหนังบริเวณที่เจาะเพื่อให้เจาะได้สะดวก ทำการเจาะทั้งด้านซ้ายและด้านขวา ด้านซ้ายสำหรับใส่กล้องส่องดูภายใน ด้านขวาสำหรับใส่แท่งเหล็กสำหรับเขี่ยหามคลุกและรังไข่ จากนั้นใส่แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ประมาณ 2 ลิตรเข้าทาง canula เพื่อทำให้เกิดช่องว่างภายในช่องท้อง ทำให้เขี่ยหามคลุกและรังไข่ได้สะดวก จากนั้นจึงนำกล้อง laparoscope ซึ่งมีใยแก้วนำแสงนำแสงมาจากแหล่งกำเนิด มาใส่เข้าไปใน canula ด้านซ้ายเพื่อส่องดูรังไข่ หากพบว่าแพะมีการตอบสนองต่อฮอร์โมนดี คือมี คอร์ปัสลูเทียมมากกว่า 6 คอร์ปัสลูเทียม (Szell และคณะ, 1994) และคอร์ปัสลูเทียมมีคุณภาพดี มีสีแดง หรือสีแดงเข้ม จึงเปิดผ่าช่องท้องเพื่อเก็บตัวอ่อนต่อไป

3.4 การเปิดผ่าช่องท้องเพื่อชะล้างตัวอ่อน

3.4.1 วางยาสลบด้วย Ketamine hydrochloride (Ketalar[®]) ขนาด 4.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ฉีดเข้าเส้นโลหิตดำบริเวณคอ (jugular vein) ซ้าย

3.4.2 เมื่อแพะสลบดีแล้วจึงทำการเปิดผ่าช่องท้องบริเวณ ventral mid-line ขาวประมาณ 5-7 ซม. ใช้นิ้วมือเกี่ยวตัวมคลุกขึ้นมาพร้อมกับหารังไข่ นับจำนวนคอร์ปัสลูเทียม และตรวจสอบคุณภาพของคอร์ปัสลูเทียม เพื่อประเมินจำนวนตัวอ่อน และคุณภาพของตัวอ่อนที่เก็บได้

3.5 การชะล้างตัวอ่อน

ขั้นตอนการชะล้างตัวอ่อนจากแพะที่ได้รับการกระตุ้นการตกไข่แสดงในภาพที่ 1 ภาคผนวก โดยมีรายละเอียด ดังนี้

3.5.1 เจาะบริเวณส่วนต้นของปีกมคลุกข้างที่จะเก็บตัวอ่อนโดยใช้ทิมจับเส้นเลือด (artery forcep) ขนาดเล็ก เจาะเป็นรูขนาดพอที่จะใส่ท่อ two-way foley เข้าไปได้

- 3.5.2 สอดท่อ two-way foley เบอร์ 10 หรือเบอร์ 12 (ขึ้นอยู่กับขนาดของมดลูก) ที่ผ่านการทำความสะอาดโดยล้างด้วยน้ำยาชะล้างตัวอ่อน และตรวจสอบการทำงานของลูกโป่งแล้ว เข้าไปลึกประมาณ 3-6 ซม. ขึ้นอยู่กับขนาดของปีกมดลูก
- 3.5.3 เป่าลูกโป่งโดยใส่อากาศเข้าไปประมาณ 3-5 มิลลิลิตร เพื่อยึดท่อ two-way foley และป้องกันไม่ให้น้ำที่ชะล้างตัวอ่อนไหลกลับเข้าไปในมดลูก ขั้นตอนเป่าลูกโป่งต้องกระทำด้วยความระมัดระวังไม่ให้ลูกโป่งมีขนาดใหญ่หรือเล็กจนเกินไป ถ้าหากลูกโป่งมีขนาดใหญ่เกินไป ทำให้เนื้อเยื่อบริเวณรอบๆ ลูกโป่งฉีกขาด ทำให้เกิดการรั่วไหลของน้ำเข้าไปบริเวณข้างเคียงเกิดการบวมน้ำหรือน้ำยาชะล้างตัวอ่อนไหลเข้าไปในมดลูก หรือถ้าลูกโป่งมีขนาดเล็กเกินไปทำให้ท่อ two-way foley หลุดและน้ำที่ชะล้างตัวอ่อนไหลกลับเข้าไปในมดลูก
- 3.5.4 ใช้ troca canula ขนาด 1.7 มิลลิเมตร เจาะบริเวณส่วนปลายของปีกมดลูกที่ใกล้กับบริเวณท่อนำไข่ (uterotubal junction) เพื่อให้สามารถชะล้างตัวอ่อนออกมาได้มากที่สุด ดึง troca ออก คงเหลือไว้แต่เพียง canula สำหรับใส่น้ำยาชะล้างตัวอ่อน
- 3.5.5 ใช้ไซริงค์ขนาด 20 มิลลิลิตรดูดน้ำยาชะล้างตัวอ่อนซึ่งอยู่ในน้ำอุ่นอุณหภูมิประมาณ 37°C 20 มิลลิลิตร ฉีดน้ำยาชะล้างตัวอ่อนเข้าไปทาง canula อย่างช้าๆ เพื่อไม่ให้ทำอันตรายแก่ปีกมดลูก โดยฉีดย้อนเข้าไปทางท่อนำไข่เพื่อชะล้างตัวอ่อนที่อยู่บริเวณส่วนปลายของปีกมดลูก
- 3.5.6 ใช้ขวดเปล่าขนาด 100 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว มารองรับน้ำยาชะล้างตัวอ่อนที่ไหลออกมาจากท่อ two-way foley อีกด้านหนึ่ง
- 3.5.7 ชะล้างตัวอ่อนข้างละ 100 มิลลิลิตร เมื่อครบตามต้องการแล้วพยายามใส่น้ำยาชะล้างที่ยังคงเหลืออยู่ในปีกมดลูกออกให้หมด เพื่อป้องกันไม่ให้มีตัวอ่อนหลงเหลืออยู่ จากนั้นจึงนำอากาศออกจากลูกโป่งและนำท่อ two-way foley ออกมา
- 3.5.8 ชะล้างตัวอ่อนที่ปีกมดลูกข้างที่เหลือโดยใช้วิธีเช่นเดียวกัน
- 3.5.9 บันทึกปริมาณน้ำยาชะล้างตัวอ่อนที่ใส่เข้าไป และปริมาณที่ไหลออกมา

- 3.5.10 เมื่อชะล้างตัวอ่อนเสร็จเรียบร้อยแล้ว ล้างรังไข่และมดลูกภายนอกด้วยน้ำยาชะล้างตัวอ่อนหรือน้ำเกลือ (normal saline) เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดพังผืดติดกับ (adhesion) อวัยวะหรือเนื้อเยื่อภายในช่องท้อง
- 3.5.11 นำมดลูกและรังไข่กลับเข้าไปในช่องท้อง เย็บปิดผนังช่องท้องส่วน linea alba และ peritoneum ตามด้วยชั้นใต้ผิวหนัง (subcutaneous) และหนัง
- 3.5.12 ฉีดยาปฏิชีวนะ (Shotapen) เข็มกลัดเนื้อบริเวณขาหลัง จำนวน 10 มิลลิลิตร ต่อน้ำหนักตัว 100 กิโลกรัมและพ่นบริเวณแผลผ่าตัดภายนอกด้วยยาปฏิชีวนะ (Duphacycline spray, Duphar B.V. Weesp, Holland)
- 3.5.13 นำน้ำยาชะล้างตัวอ่อนที่ได้ไปตรวจหาตัวอ่อน เพื่อที่จะได้นำตัวอ่อนใส่ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนโดยเร็วที่สุด

3.6 การตรวจหาตัวอ่อน

- 3.6.1 เทน้ำยาชะล้างตัวอ่อนประมาณ 35 มิลลิลิตร ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อพลาสติกขนาด 90 x 20 มิลลิเมตร ที่ขีดตารางด้านใต้ขนาด 1 X 1 เซนติเมตร
- 3.6.2 นำจานเลี้ยงเชื้อพลาสติกมาตรวจหาตัวอ่อนภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอที่กำลังขยาย 14 เท่า ตรวจหาอย่างน้อย 2 ครั้ง
- 3.6.3 เมื่อพบตัวอ่อน ใช้ปิเปตปลอดเชื้อที่ได้ขีดปลายออกให้มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 180-200 ไมครอน และต่อกับลูกยางหรือท่อยางที่ปิดปลายด้านหนึ่ง ดูตัวอ่อนขึ้นมาล้างด้วยน้ำยาเก็บรักษาตัวอ่อน 3 ครั้ง
- 3.6.4 และนำไปใส่น้ำยาเก็บรักษาตัวอ่อน ซึ่งอยู่ในจานเลี้ยงเชื้อพลาสติกขนาด 35 X 10 มิลลิเมตร วางอยู่บนถาดรักษาอุณหภูมิที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 37 °ซ
- 3.6.5 บันทึกจำนวนตัวอ่อนที่ตรวจหาได้จากรังไข่แต่ละข้าง

3.7 การจำแนกระยะการเจริญของตัวอ่อน

การจำแนกระยะการเจริญของตัวอ่อน จำแนกได้เป็น 6 ระยะตามหลักเกณฑ์ของ Lindner and Wright (1983) ดังรายละเอียดต่อไปนี้ ซึ่งโครงสร้างของตัวอ่อนระยะต่างๆ แสดงในภาพที่ 2 ภาคผนวก

ตัวอ่อนระยะ morula

มีลักษณะเป็นเซลล์รูปลูกบอล แต่ละ blastomere จะแยกแยะออกจากกันได้ ส่วนที่เป็นเซลล์ของตัวอ่อนกินพื้นที่ส่วนใหญ่ของช่องว่าง perivitelline

ตัวอ่อนระยะ compacted morula (ตัวอ่อนระยะ morula ที่มีการเกาะกลุ่มของเซลล์)

ส่วน blastomere เกาะกันเป็นกลุ่มแน่น ส่วนของเซลล์ตัวอ่อนกินพื้นที่ของช่องว่าง perivitelline ประมาณ 60-70 เปอร์เซ็นต์

ตัวอ่อนระยะ early blastocyst (เป็นตัวอ่อนระยะ blastocyst ตอนต้น)

ตัวอ่อนมีการสร้างช่อง blastocoele ที่มีขนาดเล็กกว่าครึ่งหนึ่งของขนาดตัวอ่อนทั้งตัว ทำให้มีรูปร่างคล้ายแหวน ส่วนของเซลล์ตัวอ่อนกินพื้นที่ของช่องว่าง perivitelline ประมาณ 70 - 80 เปอร์เซ็นต์ สามารถมองเห็นความแตกต่างของส่วน trophoblast และ inner cell mass ได้

ตัวอ่อนระยะ blastocyst

ตัวอ่อนระยะนี้สามารถจำแนกความแตกต่างของชั้น trophoblast และความทึบของ inner cell mass ที่เกิดขึ้น ช่องว่าง blastocoele มีขนาดใหญ่ขึ้นเท่ากับครึ่งหนึ่งของตัวอ่อนทั้งตัวหรือใหญ่กว่าและส่วนที่เป็นเซลล์ของตัวอ่อนกินพื้นที่ส่วนใหญ่ของช่องว่าง perivitelline แต่ zona pellucida ยังไม่บางลง

ตัวอ่อนระยะ expanded blastocyst (blastocyst ช่วงขยายใหญ่)

ตัวอ่อนมีขนาดขยายใหญ่ 1.2 - 1.5 เท่า ความหนาของ zona pellucida ลดลงเหลือเพียงเศษหนึ่งส่วนสามของ zona pellucida ปกติตัวอ่อนที่เก็บได้ในระยะนี้มักพบการยุบตัว (collapse) ของตัวอ่อน ซึ่งเกิดจากการเสียหายของ blastocoele บางส่วน หรือทั้งหมด

ตัวอ่อนระยะ hatched blastocyst (เป็นตัวอ่อนระยะ blastocyst ที่ฟักตัว)

ตัวอ่อนออกมาจาก zona pellucida โดยสมบูรณ์ ตัวอ่อนอาจมีรูปร่างกลมโดยเห็น blastocoele หรือตัวอ่อนอาจยุบตัวแล้ว การจำแนกตัวอ่อนระยะนี้ค่อนข้างยากสำหรับผู้ที่ไม่ชำนาญ

3.8 การประเมินคุณภาพตัวอ่อน

แบ่งคุณภาพของตัวอ่อนที่เก็บได้เป็น 4 ประเภท ตามหลักเกณฑ์ของ Lindner and Wright (1983) โดยพิจารณาจากรูปร่าง สี ความเข้มของไซโตพลาสซึม และส่วนที่ตายของตัวอ่อน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอที่กำลังขยาย 140 เท่า ซึ่งระยะการเจริญของตัวอ่อนต้องตรงกับอายุของตัวอ่อนที่เก็บได้ ตัวอย่างการจำแนกคุณภาพของตัวอ่อนแสดงในภาพที่ 3 ภาคผนวก ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้

คุณภาพดีเยี่ยม (excellent)

ตัวอ่อนมีความสมบูรณ์ที่สุด มีรูปร่างกลม เซลล์แต่ละเซลล์ของตัวอ่อนมีขนาด สี่ และรูปร่างเหมือนกัน

คุณภาพดี (good)

ตัวอ่อนมีลักษณะผิดปกติบางส่วน เช่น มีบางเซลล์ของตัวอ่อนยื่นออกมาจากกลุ่ม (extrude blastomere) มีการเกิดถุงน้ำ (vesiculation) เล็กน้อย มีเซลล์เล็กน้อยที่ รูปร่างไม่เหมือนเซลล์อื่น

คุณภาพพอใช้ (fair)

ตัวอ่อนมีคุณภาพปานกลาง มีความสมบูรณ์ไม่มาก แต่ไม่ก่อให้เกิดปัญหาต่อการ พัฒนามากนัก มีเซลล์ของตัวอ่อนยื่นออกมาจากกลุ่ม มีการเกิดถุงน้ำ เริ่มพบการ ฝ่อ (degenerate) ของเซลล์ (ผิดปกติประมาณ 10 - 30 เปอร์เซ็นต์) หรือมีการ ระยะเวลาเจริญช้ากว่าตัวอ่อนอื่น 1-2 วัน

คุณภาพเลว (poor)

ตัวอ่อนมีลักษณะผิดปกติมาก เช่น มีเซลล์ของตัวอ่อนยื่นออกมาจากกลุ่มมาก มีการฝ่อของเซลล์ มีถุงน้ำขนาดใหญ่ เซลล์ของตัวอ่อนมีการแตกกลุ่มกันมาก รวมทั้งมีขนาด รูปร่างและสีแตกต่างกันมาก แต่ยังคงเห็นส่วนของเซลล์ที่ยังมี ชีวิตอยู่ (ผิดปกติประมาณ 30-50 เปอร์เซ็นต์) ตัวอ่อนมีขนาดเล็กมาก หรือมีการ เจริญช้ากว่าตัวอ่อนอื่น 2 - 4 วัน

ตัวอ่อนที่นำมาใช้ในการคัดแบ่งครั้งใช้ตัวอ่อนคุณภาพดี และดีเยี่ยม

3.9 การศึกษาเบื้องต้น

นำตัวอ่อนส่วนหนึ่งมาคัดแบ่งครั้งเพื่อใช้ในการศึกษาเบื้องต้น เพื่อทดสอบความ เหมาะสมของอาหารเลี้ยงตัวอ่อนที่จะนำมาใช้ในการทดลอง โดยนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อน 3 ชนิด คือ

1. DPBS เสริมด้วยซีรัมลูกโค 20 เปอร์เซ็นต์
2. TCM-199 เสริมด้วยซีรัมลูกโค 20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนประกอบของ TCM-199 แสดงในตารางที่ 2 ภาคผนวก
3. Hec-2 holding เสริมด้วยซีรัมลูกโค 20 เปอร์เซ็นต์

หลังจากเลี้ยงตัวอ่อนคัดแบ่งครั้งครบตามระยะเวลาที่กำหนด ทำการตรวจสอบ ความสามารถในการพัฒนาของตัวอ่อนคัดแบ่งครั้งตามวิธีการที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

3.10 การเตรียมอุปกรณ์ตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อน

- 3.10.1 ติด micro-manipulator เข้ากับขาตั้งโดยให้ส่วนแนวนอนขนานกับแนวราบ และส่วนแนวตั้งขนานกับแนวตั้ง
- 3.10.2 ปรับให้แกนของ micro-manipulator ตามแนวต่างๆ ให้อยู่ตรงกลางโดยใช้ joystick และคู่มือ micrometers ที่แสดงการทำงานของมอเตอร์ ระวังอย่าให้สายไฟและ micro-manipulator ชัดกันเองระหว่างปฏิบัติงาน
- 3.10.3 ใช้ bright field optics ระหว่างการตัดแบ่งตัวอ่อน เพื่อทำให้เห็นความลึกของ field ซึ่งสามารถมองเห็นทั้งตัวอ่อนและใบมีดได้ในขณะเดียวกัน
- 3.10.4 ใช้แสงสะท้อนจากใบมีดตรวจสอบสถานะของใบมีด แนวตัดของใบมีดบนพื้นจานตัดตัวอ่อนควรเป็นแนวเรียบจากปลายใบมีดถึงช่วงความยาว 300 ไมครอน เมื่อดูได้กำลังขยาย 25 - 40 เท่า
- 3.10.5 การติดใบมีดกับ micro-manipulator ต้องติดก้านของใบมีดกับที่ยึดใบมีดเสียก่อน ซึ่งต้องถือให้แน่น ไม่ให้ใบมีดหมุนได้ จากนั้นจึงติดที่ยึดใบมีดเข้ากับ micro-manipulator
- 3.10.6 ตั้งใบมีดให้อยู่ในแนวพหุเหมาะสม เมื่อเลื่อนใบมีดขึ้นสูงสุดสามารถใส่จานตัดแบ่งตัวอ่อนขนาด 90 X 20 มิลลิเมตรได้ และเมื่อเลื่อนใบมีดลงต่ำสุดสามารถตัดตัวอ่อนได้
- 3.10.7 การตั้งใบมีดให้เหมาะสมถูกต้องเป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้การตัดแบ่งตัวอ่อนประสบความสำเร็จ แนวตัดของใบมีดต้องตั้งได้ฉากกับพื้นของจานตัดแบ่งตัวอ่อน และเมื่อเลื่อนใบมีดให้ต่ำลง ปลายของใบมีดต้องสัมผัสกับพื้นของจานตัดแบ่งตัวอ่อนก่อน ถ้าใบมีดทำมุมมากเกินไปอาจเกิดรอยลึกหรือเป็นร่องที่พื้นของจานตัดแบ่งตัวอ่อน การปรับตั้งใบมีดไม่ดีทำให้ไม่สามารถตัดแบ่งตัวอ่อนได้ดี
- 3.10.8 การปรับแนวใบมีดทำได้ง่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted ที่กำลังขยาย 40 เท่า โดยต้องปรับให้เห็นทั้งปลายของใบมีด แนวใบมีดที่ถูกต้อง กือด้านบนและด้านล่างของใบมีดต้องตรงกัน เมื่อปรับใบมีดดีแล้วต้องเห็นเฉพาะสันของใบมีดเป็นเส้นตรง และส่วนมุมของปลายใบมีดทั้งสองด้านต้องสมมาตรกัน
- 3.10.9 การปรับแนวตัดของใบมีดทำได้โดยการกลใบมีดลงบนพื้นของจานตัดแบ่งตัวอ่อน จากรอยตัดที่เกิดขึ้นทำให้เรากำหนดแนวตัดได้ง่าย แนวตัดที่ดีเป็น

รอยเดียวต่อเนื่องกัน และเป็นรอยเรียบ ที่บริเวณปลายใบมีดมีรอยกดหนาแน่น และลึกกว่าบริเวณอื่น แนวคดที่ไม่ดีเป็นรอยกว้างหรือไม่ต่อเนื่องกัน

3.10.10 ก่อนใช้ใบมีดให้นำใบมีดเจือลงบนโฟม เพื่อกำจัดเศษสิ่งสกปรกที่ติดค้างอยู่บนใบมีด

3.10.11 ล้างใบมีดด้วยเอริลอัลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยน้ำกลั่น และน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนจากนั้นแช่ใบมีดไว้ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนเพื่อเตรียมตัดตัวอ่อน

3.11 การเตรียมจานตัดตัวอ่อนเพื่อตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อน

นำจานเลี้ยงเชื้อพลาสติกขนาด 90 X 20 มิลลิเมตร มาใช้เป็นจานตัดแบ่งตัวอ่อน ซึ่งสามารถทำหยดขนาดเล็ก (micro-drops) ได้ 6 หยด โดยทำหยดของน้ำยาที่ใช้ตัดแบ่งตัวอ่อนมีปริมาตร 50 ไมโครลิตร พยายามทำให้หยดกระจายน้อยที่สุด ปกติให้ใส่น้ำมันพาราฟิน (paraffin oils) หรือน้ำมันแร่ ปกคลุมหยดของน้ำยาตัดแบ่งตัวอ่อน เพื่อป้องกันการระเหยของน้ำยาตัดแบ่งตัวอ่อน และป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ แต่ในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ใช้น้ำมันดังกล่าว เนื่องจากทำให้ไม่สะดวกในการปฏิบัติงาน แต่มีการเตรียมหยดของน้ำยาตัดแบ่งตัวอ่อนใหม่ทุกครั้ง และเปลี่ยนน้ำยาตัดแบ่งตัวอ่อนใหม่ทุกครั้งเมื่อตัดตัวอ่อนตัวใหม่

3.12 การตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อน

บันทึกภาพตัวอ่อนก่อนนำตัวอ่อนไปตัดแบ่งครึ่ง การตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.12.1 ใช้ปิเปตปลอดเชื้อที่ยึดปลายให้เล็กลงมีขนาดประมาณ 180-200 ไมครอน คูดตัวอ่อนจากน้ำยาเก็บรักษาตัวอ่อนใส่ในน้ำยาตัดแบ่งตัวอ่อน

3.12.2 ตัวอ่อนระยะ morula, compacted morula, early blastocyst, blastocyst และ hatched blastocyst ตัดแบ่งในน้ำยาตัดแบ่งตัวอ่อนแต่ตัวอ่อนระยะ expanded blastocyst ตัดแบ่งในน้ำยาเก็บรักษาตัวอ่อนในการตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อน

3.12.3 การใช้น้ำยาเก็บรักษาตัวอ่อนเป็นน้ำยาตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อน ต้องทำรอบยากที่พื้นด้านในของจานตัดตัวอ่อนเพื่อช่วยบังคับไม่ให้ตัวอ่อนกลิ้งไปมาระหว่างตัดแบ่งครึ่ง

3.12.4 การนำตัวอ่อนใส่ในหยดของน้ำยาตัดแบ่งตัวอ่อน ต้องให้น้ำยาเก็บรักษาตัวอ่อนติดมาน้อยที่สุด โดยล้างตัวอ่อนด้วยน้ำยาตัดแบ่งตัวอ่อนก่อนใส่ตัวอ่อนลงในน้ำยาตัดแบ่งตัวอ่อน เพื่อป้องกันการสับสนใส่ตัวอ่อน 1 ตัวอ่อนต่อ 1 หยดของน้ำยาตัดแบ่งตัวอ่อน

- 3.12.5 เมื่อนำตัวอ่อนใส่ในน้ำยาตัดแบ่งตัวอ่อน ตัวอ่อนจะลงไปติดที่พื้นของจานตัดตัวอ่อน ทั้งนี้ตัวอ่อนควรอยู่ในน้ำยาตัดแบ่งตัวอ่อนในระยะเวลาสั้นที่สุด (ไม่ควรเกิน 5 นาที) ถ้าใช้น้ำยาเก็บรักษาตัวอ่อนในการตัดแบ่งตัวอ่อนต้องให้ตัวอ่อนอยู่บนรอยบาก 2 รอย เพื่อไม่ให้ตัวอ่อนกลิ้งไปมา ดังแสดงในภาพที่ 4 ภาคผนวก
- 3.12.6 เลื่อนตัวอ่อนให้อยู่ตรงกลางช่องมองภาพของกล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted (กำลังขยาย 100 เท่า) โดยให้โฟกัสอยู่ที่ตัวอ่อน เลื่อนใบมีดลงมาบนหยดของน้ำยาตัดแบ่งจนสามารถมองเห็นใบมีดได้ แต่อยู่นอกโฟกัส
- 3.12.7 เลื่อนใบมีดลงจนถึงส่วนบนของตัวอ่อน ใช้ใบมีดขยับตัวอ่อนให้อยู่ในตำแหน่งที่ถูกต้อง
- 3.12.8 ตัวอ่อนระยะ morula สามารถทำการตัดแบ่งครึ่งได้ทุกด้าน โดยให้ทั้ง 2 ส่วนมีความสมมาตรกัน (symmetrical) แต่ตัวอ่อนระยะ blastocyst ต้องตัดแบ่งครึ่งให้ส่วนของ trophoblast และ inner cell mass มีความสมมาตรกันด้วย ดังแสดงในภาพที่ 5 ภาคผนวก
- 3.12.9 ให้ปลายของใบมีดอยู่พ้นจากตัวอ่อนไปเล็กน้อย (ประมาณ 30 ไมครอน) กดใบมีดลงบนตัวอ่อน โดยให้อยู่กึ่งกลางแนวตัดแบ่งครึ่ง
- 3.12.10 ใช้ joy stick ควบคุมแกน Z (แนวตั้ง) กดใบมีดลงช้าๆ เพื่อตัดตัวอ่อนพร้อมๆ กับเลื่อนใบมีดไปทางด้านหลังโดยใช้แกน Y เพื่อตัดตัวอ่อนเป็น 2 ส่วนเท่าๆ กัน
- 3.12.11 การกดลงของใบมีดโดยใช้การควบคุมที่แกน Z เป็นการตัดแบ่งตัวอ่อนออกเป็นสองส่วน ใบมีดจะเลื่อนไปด้านหน้าเล็กน้อย เมื่อสัมผัสกับพื้นจานตัดแบ่งตัวอ่อน
- 3.12.12 หลังจากตัดตัวอ่อนเป็น 2 ส่วนเท่าๆ กันแล้ว ใช้แกน Z ยกใบมีดขึ้นเพียงเล็กน้อย จากนั้นใช้แกน X ขยับใบมีดไปทางด้านข้างทั้ง 2 ด้านเพื่อแยกตัวอ่อนทั้ง 2 ส่วนออกจากกัน
- 3.12.13 เมื่อตัดตัวอ่อนเสร็จแล้ว ใช้แกน Z ขยับใบมีดขึ้นโดยระวังอย่าให้มีตัวอ่อนติดขึ้นมาด้วย
- 3.12.14 ถ้ามีตัวอ่อนหรือเซลล์ของตัวอ่อนติดใบมีด ให้ใส่ BSA เข้มข้นลงไปที่บริเวณตัวอ่อนติดอยู่ เพื่อทำลายประจุไฟฟ้าระหว่างตัวอ่อนและจานตัดตัวอ่อนทำให้ตัวอ่อนหลุดจากใบมีด

3.12.15 การแช่ตัวอ่อนไว้ในสารละลายที่มีความเข้มข้นของ BSA สูง (0.7 - 4 เปอร์เซ็นต์) ทำให้ความแตกต่างของประจุไฟฟ้าของเปลือกตัวอ่อนกับพื้นของจานตัดตัวอ่อนเพิ่มขึ้น

3.12.16 บันทึกผลการตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อน เวลาที่ใช้ในการตัดแบ่ง บันทึกภาพตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง

3.13 การบันทึกระยะเวลาที่ใช้ในการตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อน

บันทึกระยะเวลาในการตัดแบ่งตัวอ่อนแต่ละตัวอ่อน ในแต่ละระยะการเจริญของตัวอ่อน และแบ่งระดับความเร็วของการตัดแบ่งเป็น 5 ระดับ ดังนี้

ระดับที่ 1 สามารถตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนได้ภายในระยะเวลา 2 นาที

ระดับที่ 2 สามารถตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนได้ภายในระยะเวลา 4 นาที

ระดับที่ 3 สามารถตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนได้ภายในระยะเวลา 6 นาที

ระดับที่ 4 สามารถตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนได้ภายในระยะเวลา 8 นาที

ระดับที่ 5 ใช้ระยะเวลาในการตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนมากกว่า 8 นาที

3.14 การเก็บตัวอ่อนที่ตัดแบ่งครึ่งแล้วออกจากน้ำยาตัดแบ่งตัวอ่อน

3.14.1 ใช้ปิเปตปลอดเชื้อที่ยึดปลายให้เล็กลงดูด BSA เข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 2 ไมโครลิตร หยดลงบนตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งซึ่งอยู่ในหยดของน้ำยาตัดแบ่งตัวอ่อนประมาณ 1 ไมโครลิตร

3.14.2 ดูดตัวอ่อนที่ตัดแบ่งครึ่งเข้ามาในปิเปตปลอดเชื้อจากนั้นนำไปใส่ในอาหารเลี้ยงตัวอ่อน

3.14.3 BSA เข้มข้นมีความหนาแน่นน้อยกว่าน้ำยาตัดแบ่งตัวอ่อนที่มีน้ำตาลซูโครส ส่วนของ BSA ที่เหลือ 1 ไมโครลิตรในปิเปตปลอดเชื้อ ช่วยไม่ให้เซลล์ตัวอ่อนติดอยู่ที่ปิเปต

3.15 การประเมินสัดส่วนจำนวนเซลล์ตัวอ่อนหลังตัดแบ่งครึ่ง

หลังจากตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนแล้ว ประเมินสัดส่วนจำนวนเซลล์ของแต่ละตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งตามขนาดที่ได้จากการตัดแบ่งครึ่ง โดยเปรียบเทียบกับตัวอ่อนปกติ ดังแสดงในภาพที่ 6 ภาคผนวก โดยแบ่งเป็นระดับได้ดังนี้

ระดับ 8 : ตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งที่มีขนาดใหญ่ มีสัดส่วนประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของตัวอ่อนปกติ

ระดับ 7 : ตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งที่มีขนาดใหญ่ มีสัดส่วนประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ของตัวอ่อนปกติ

ระดับ 6 : ตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่มีความใหญ่ มีสัดส่วนประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์
ของตัวอ่อนปกติ

ระดับ 5 : ตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่มีความสัดส่วนประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ หรือครึ่งหนึ่ง
ของตัวอ่อนปกติ

ระดับ 4 : ตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่มีความเล็ก มีสัดส่วนประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์
ของตัวอ่อนปกติ

ระดับ 3 : ตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่มีความเล็ก มีสัดส่วนประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์
ของตัวอ่อนปกติ

ระดับ 2 : ตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่มีความเล็ก มีสัดส่วนประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์
ของตัวอ่อนปกติ

3.16 การล้างใบมีด

3.16.1 การล้างใบมีดเป็นการลดความเสี่ยงจากการติดเชื้อแบคทีเรีย และการติด
ใบมีดของตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง

3.16.2 ก่อนใช้งานล้างใบมีดในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยน้ำกลั่น
และน้ำยาเก็บรักษาตัวอ่อน

3.16.3 หลังจากใช้งานล้างใบมีดด้วยน้ำกลั่น ก่อนและหลังล้างด้วยเอทิลแอลกอฮอล์
95 เปอร์เซ็นต์ เพราะอาจเกิดเกล็ดบนใบมีดทำให้ตัดตัวอ่อนได้ยาก และ
ตัวอ่อนติดใบมีด ทำให้ใบมีดไม่คม

3.16.4 ขณะใช้งานให้แช่ใบมีดในน้ำยาเก็บรักษาตัวอ่อน อย่าให้ใบมีดแห้งอยู่ใน
อากาศ เพราะจะทำให้ตัวอ่อนติดใบมีดได้ง่าย

3.16.5 การล้างใบมีดไม่ต้องถอดใบมีดออกจากด้ามของที่ยึดใบมีด เพียงแต่ใส่
สารละลายลงในจานเลี้ยงเชื้อพลาสติกขนาด 35 X 10 มิลลิเมตร และจุ่มใบ
มีดลงไปโดยใช้ micro-manipulator ควบคุม หรืออาจใช้ไซริงก์ดูดสาร
ละลายฉีดล้างใบมีดก็ได้

3.16.6 เมื่อตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนเสร็จเรียบร้อยแล้ว ล้างใบมีดด้วยน้ำกลั่นตามด้วย
เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำไปเก็บ

3.17 การเตรียมอาหารเลี้ยงตัวอ่อน

3.17.1 น้ำยาเก็บรักษาตัวอ่อน

ใช้ DPBS ซึ่งประกอบด้วย D-glucose 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร sodium
pyruvate 36 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มี phenol-red ดังในตารางที่ 3 ภาคผนวก

จำนวน 8 มิลลิลิตร เสริมด้วยซีรัมลูกโคจำนวน 2 มิลลิลิตร (ผ่านการ inactivated ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที) และยาปฏิชีวนะ Penicillin G Sodium 100 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ Streptomycin sulfate 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการเตรียมอาหารเลี้ยงตัวอ่อนที่มีซีรัมลูกโค 20 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 10 มิลลิลิตร

3.17.2 อาหารเลี้ยงตัวอ่อนสูตรที่ 1

ใช้น้ำยาเก็บรักษาตัวอ่อน เป็นอาหารเลี้ยงตัวอ่อนสูตรที่ 1

3.17.3 อาหารเลี้ยงตัวอ่อนสูตรที่ 2

ใช้น้ำยาเก็บรักษาตัวอ่อน เสริมด้วยสาร solcoseryl® 0.05 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้น้ำยาเก็บรักษาตัวอ่อนจำนวน 10 มิลลิลิตร ผสมด้วยสาร solcoseryl® จำนวน 5 ไมโครลิตร ต่อการเตรียมครั้งละ 10 มิลลิลิตร

3.17.4 อาหารเลี้ยงตัวอ่อนสูตรที่ 3

ใช้น้ำยาเก็บรักษาตัวอ่อน เสริมด้วยสาร solcoseryl® 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้น้ำยาเก็บรักษาตัวอ่อนจำนวน 10 มิลลิลิตร ผสมด้วยสาร solcoseryl® จำนวน 10 ไมโครลิตร ต่อการเตรียมครั้งละ 10 มิลลิลิตร

3.17.5 นำอาหารเลี้ยงตัวอ่อนทั้ง 3 สูตรและน้ำยาเก็บรักษาตัวอ่อน ไปผ่านการกรองโดยใช้ตัวกรองซึ่งมีรูขนาด 0.22 ไมครอน

3.17.6 นำจานเลี้ยงเชื้อพลาสติกขนาด 35 X 10 มิลลิเมตร มาใช้เตรียมหยดของอาหารเลี้ยงตัวอ่อนเพื่อใช้เป็นจานเลี้ยงตัวอ่อน

3.17.7 ใช้ปิเปตขนาด 5-40 ไมโครลิตร ดูดอาหารเลี้ยงตัวอ่อน 5 ไมโครลิตร ใส่ในจานเลี้ยงตัวอ่อนเพื่อทำฐานของหยดอาหารเลี้ยงตัวอ่อน

3.17.8 ทำหยดอาหารเลี้ยงตัวอ่อนในจานเลี้ยงตัวอ่อน 4 หยด ต่อ 1 จาน โดยแต่ละหยดห่างกันพอสมควร เพื่อป้องกันไม่ให้หยดไหลมารวมกัน

3.17.9 ใช้ปิเปตอัตโนมัติพร้อมด้วยปิเปตพลาสติกปลอดเชื้อขนาด 5 มิลลิลิตร ดูดน้ำมันแร่ 4.5 มิลลิลิตร ใส่ในจานเลี้ยงตัวอ่อนเพื่อปกคลุมฐานของหยดอาหารเลี้ยงตัวอ่อน

3.17.10 ใช้ปิเปตขนาด 40-100 ไมโครลิตร ดูดอาหารเลี้ยงตัวอ่อน 95 ไมโครลิตร ใส่เพิ่มให้กับฐานของหยดอาหารเลี้ยงตัวอ่อนที่อยู่ได้น้ำมันแร่ในจานเลี้ยงตัวอ่อนเพื่อทำหยด ขนาด 100 ไมโครลิตร

- 3.17.11 นำจานเลี้ยงตัวอ่อนที่ปิดฝาแล้วใส่ในตู้เลี้ยงตัวอ่อนที่อุณหภูมิ 38.5°ซ (De Smedt และคณะ, 1992; LeGal และคณะ, 1993) ปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์เพื่อรอกการนำไปใช้เลี้ยงตัวอ่อนคัดแบ่งครั้งต่อไป

3.18 การเลี้ยงตัวอ่อนคัดแบ่งครั้ง

- 3.18.1 นำตัวอ่อนคัดแบ่งครั้ง มาประเมินคุณภาพและนำไปล้างด้วยอาหารเลี้ยงตัวอ่อน 3 ครั้ง
- 3.18.2 นำจานเลี้ยงตัวอ่อนที่มีอาหารเลี้ยงตัวอ่อนออกจากตู้เลี้ยงตัวอ่อน
- 3.18.3 นำตัวอ่อนคัดแบ่งครั้งใส่ในหยดของอาหารเลี้ยงตัวอ่อน และทำเครื่องหมายที่ฝาและด้านข้างของจานเลี้ยงตัวอ่อน
- 3.18.4 นำจานเลี้ยงตัวอ่อนใส่ในตู้เลี้ยงตัวอ่อน บันทึกเวลาเริ่มเลี้ยงตัวอ่อนคัดแบ่งครั้งและเวลาที่จะนำออกมาตรวจสอบการพัฒนา
- 3.18.5 ตัวอ่อนคัดแบ่งครั้งที่ได้จากตัวอ่อนระยะ early blastocyst ถึงระยะ hatched blastocyst เลี้ยงในตู้เลี้ยงตัวอ่อนนาน 3 ชั่วโมง ตัวอ่อนคัดแบ่งครั้งที่ได้จากตัวอ่อนระยะ morula เลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง
- 3.18.6 ตรวจสอบการพัฒนาของตัวอ่อนคัดแบ่งครั้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอกำลังขยาย 140 เท่า โดยตัวอ่อนคัดแบ่งครั้งที่ได้จากตัวอ่อนระยะ morula ตรวจสอบการพัฒนาชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 24 หลังจากเลี้ยง โดยความสามารถในการมีชีวิตรอดในชั่วโมงที่ 24 ตัวอ่อนคัดแบ่งครั้งที่ได้จากตัวอ่อนระยะ early blastocyst ถึงระยะ hatched ตรวจสอบการพัฒนาและความสามารถในการมีชีวิตรอดในชั่วโมงที่ 3 หลังจากเลี้ยง
- 3.18.7 บันทึกการมีชีวิตรอดของตัวอ่อนคัดแบ่งครั้ง โดยดูจากการสร้าง blastocoele ขึ้นมาใหม่ ตรวจสอบคุณภาพของตัวอ่อนคัดแบ่งครั้งตามหลักเกณฑ์เดียวกับการตรวจสอบคุณภาพของตัวอ่อนปกติ

3.19 การประเมินคุณภาพตัวอ่อนคัดแบ่งครั้งหลังจากเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อน

การประเมินคุณภาพตัวอ่อนคัดแบ่งครั้งหลังจากเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อน โดยใช้เกณฑ์ของลักษณะรูปร่าง เช่น การพัฒนาของตัวอ่อนคัดแบ่งครั้งจะมีลักษณะกลม มีการเกิดช่องว่าง blastocoele และการเกิดการฝ่อของเซลล์ (Nowshari และ Holtz, 1993; Reichelt และ Niemann, 1994) ใช้หลักเกณฑ์ในการประเมินของ Nagashima และคณะ (1989) และ Nowshari และ Holtz (1993) ดังแสดงในภาพที่ 7 ภาคผนวก โดยมีรายละเอียดดังนี้

คุณภาพระดับ 2 : ตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่หลังเลี้ยงมีการสร้างช่องว่าง blastocoele ทำให้เป็นระยะ blastocyst อีกครั้งหนึ่งภายในระยะเวลาเลี้ยงที่กำหนดคือ ตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่ได้จากตัวอ่อนระยะ morula เลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง ตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่ได้จากตัวอ่อนระยะ early blastocyst ถึง hatched blastocyst เลี้ยงนาน 3 ชั่วโมง ตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่ไม่มีคามผิดปกติของเซลล์หรือมีเพียงเล็กน้อย (น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์) และสามารถมองเห็น inner cell mass ได้ชัดเจน เป็นตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่มีความสามารถในการมีชีวิตรอด

คุณภาพระดับ 1 : เหมือนคุณภาพระดับ 2 แต่มีความผิดปกติของเซลล์หรือเซลล์ฝ่อ 10 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ blastocyst ที่ได้มีเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่าคุณภาพระดับที่ 2 มองเห็น inner cell mass ได้ไม่ชัดเจน มีการเกิดถุงน้ำ (vesicle) เล็กน้อย ยังพิจารณาว่าเป็นตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่มีความสามารถในการมีชีวิตรอด

คุณภาพระดับ 0 : ตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่เลี้ยงไม่มีการสร้างช่องว่าง blastocoele ภายในระยะเวลาเลี้ยงที่กำหนด หรือ blastocyst มีขนาดเล็กมาก มองไม่เห็น inner cell mass มีจำนวนเซลล์ฝ่อมากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ มีการเกิดถุงน้ำมากหรือมี blastomere ที่ไม่เกาะกลุ่มขยายใหญ่ขึ้นหรือตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่ฝ่อทั้งตัวอ่อน เป็นตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่ไม่มีความสามารถในการมีชีวิตรอด

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 เปรียบเทียบระยะเวลาในการตัดแบ่งครั้งที่ตัวอ่อนระยะการเจริญต่างกัน โดยวิธี Analysis of Variance, ANOVA (SAS, 1985)

4.2 เปรียบเทียบความแตกต่างของอัตราการมีชีวิตรอดของตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่เลี้ยงในสูตรอาหารเลี้ยงตัวอ่อนต่างกัน โดยการทดสอบไค-สแควร์ (Chi-square test)

4.3 เปรียบเทียบความแตกต่างของอัตราการมีชีวิตรอดของตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่ได้จากตัวอ่อนที่มีระยะการเจริญต่างกันหลังเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อน โดยการทดสอบไค-สแควร์ (Chi-square test)

4.4 เปรียบเทียบความแตกต่างของอัตราการมีชีวิตรอดหลังเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนของตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่ได้จากการตัดแบ่งครั้งที่ตัวอ่อนคุณภาพดีเยี่ยมและดี โดยการทดสอบไค-สแควร์ (Chi-square test)

4.5 เปรียบเทียบผลของคุณภาพของตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่คุณภาพของตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่หลังเลี้ยง โดยวิธี General Linear Models Procedure, Proc GLM (SAS, 1985)

4.6 เปรียบเทียบผลของระยะเวลาในการตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนต่อคุณภาพของตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งหลังเลี้ยง โดยวิธี General Linear Models Procedure, Proc GLM (SAS, 1985)

5. สถานที่ทำการวิจัย

ศูนย์ผสมเทียมปทุมธานี ถ.ติวานนท์ ต.บางกะดี อ.เมือง จ.ปทุมธานี

6. ระยะเวลาทำการวิจัย

มกราคม 2538 ถึง ธันวาคม 2538