Chulalongkorn Medical Journal

Volume 30
Issue 9 *September 1986*

Article 7

9-1-1986

Cultivation of fertilized mouse ova in vitro

P. Virutamasen

W. Boonkasemsanti

Y. Chandrapresit

V. Yosyingyuad

Follow this and additional works at: https://digital.car.chula.ac.th/clmjournal

Part of the Medicine and Health Sciences Commons

Recommended Citation

Virutamasen, P.; Boonkasemsanti, W.; Chandrapresit, Y.; and Yosyingyuad, V. (1986) "Cultivation of fertilized mouse ova in vitro," *Chulalongkorn Medical Journal*: Vol. 30: Iss. 9, Article 7.
DOI: 10.58837/CHULA.CMJ.30.9.7
Available at: https://digital.car.chula.ac.th/clmjournal/vol30/iss9/7

This Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in Chulalongkorn Medical Journal by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

นิพนธ์ต้นฉบับ

การเลี้ยงตัวอ่อนของหนูในจานทดลอง

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

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

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

*ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
**คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

สัตว์ทดลองและวิธีการ

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

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

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

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

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

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

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

สมบูรณ์, พันธุ์ผสม (ไม่ใช่ Hybrid) พบว่า ได้ผลดีกว่าและสะดวกจึงได้เลือกมาทำการศึกษา

ผลการศึกษา

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

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

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

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

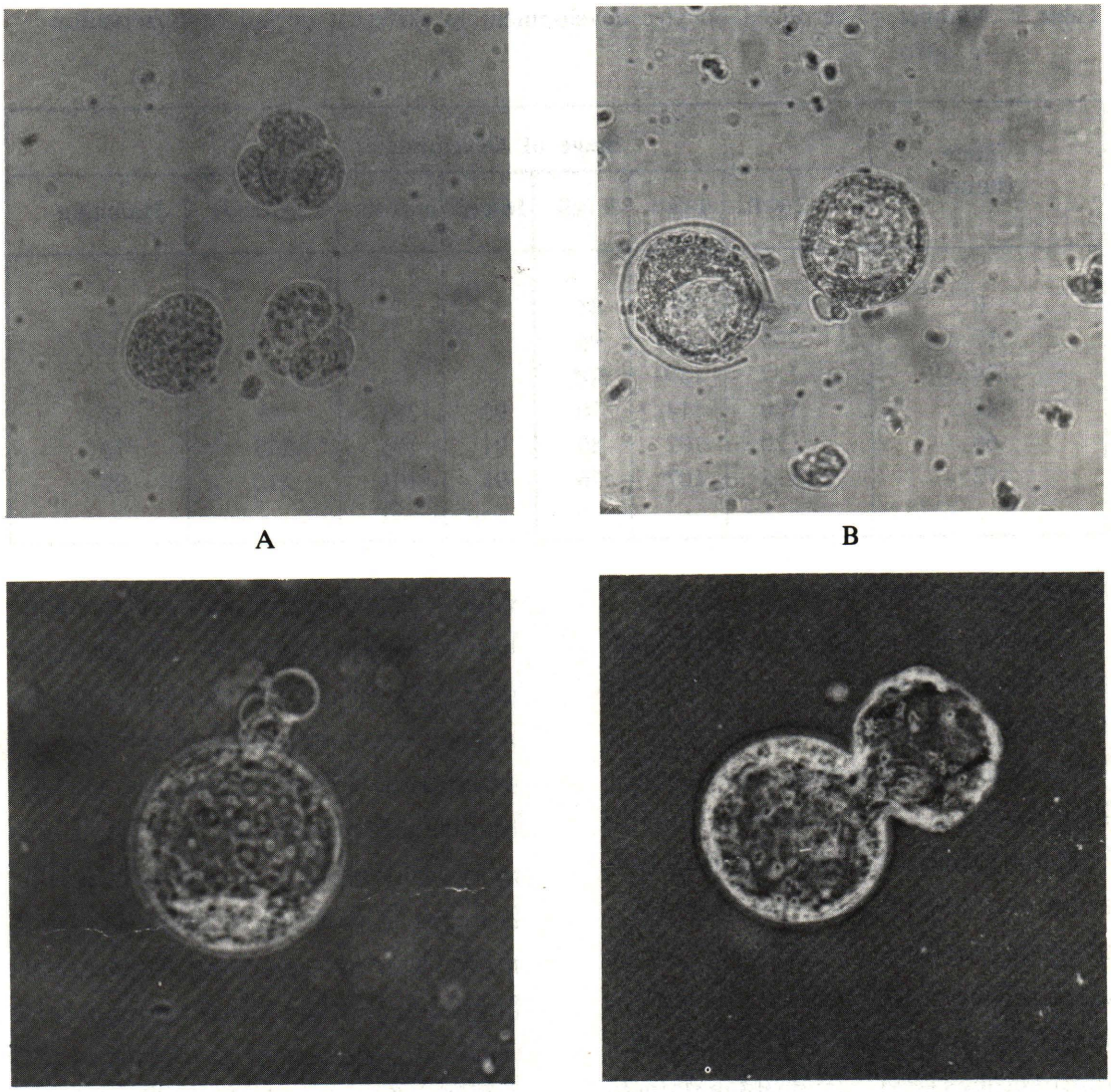

Figure Photographs of fresh mouse embryos
A. Two-cell and three-cell embryo
B. Blastocyst
C. Hatching blastocyst (early)
D. Hatching blastocyst

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

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

วิจารณ์และสรุปผล

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

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

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

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

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

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

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

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ทำการศึกษาขอขอบคุณคณะกรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ ที่จัดสรรเงินทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช-ไชน่าเมดิคัลบอร์ด และขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ นายแพทย์ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์ หัวหน้าภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา ที่ให้การสนับสนุนทรัพยากรทุกอย่างเพื่อให้เป็นจุดเริ่มต้นของการวิจัยทางด้านนี้ต่อไป

อ้างอิง

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

จุฬาลงกรณ์เวชสารได้รับต้นฉบับเมื่อวันที่ 18 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2529