05/0074/34

นิพนธ์ต้นฉบับ

การเจริญของตัวอ่อนในกระต่ายภายหลังจุลศัลยกรรมแบ่งครึ่ง

In Vitro and *In Vivo* Development of Bisected Rabbit Morulae

มงคล เตชะกำพุ[1]

Abstract: **Mongkol Techakumphu. 1991. *In vitro* and *in vivo* development of bisected rabbit morulae. Thai J Hlth Resch 5(2):**

Rabbit embryos at the morula stage (53 – 56 hours after ovulation) were bisected by microsurgical method. Their development was tested by culture and by transfer through oviduct or uterus of synchronized recipients. The ***in vitro*** *development of half morulae was similar to that of the controls (93.8% vs 84.9%, P>0.05). But no survival was obtained after transfer into uterus which was contrary to the controls (0% vs 94.7%). Four point five percent (1/22) of half morula introducing in the zona pellucida covered with thin mucin coat has developed to blastocyst stage after transfer through oviduct of synchronized recipient. This finding indicated that half rabbit embryos can develop if they are well protected before transfer.*

[1] ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร 10330
Department of Obstetrics, Gynaecology and Reproduction, Chulalongkorn University, Bangkok 10330.

01/0075/34

บทคัดย่อ : **มงคล เตชะกำพุ. 2534. การเจริญของตัวอ่อนในกระต่ายภายหลังจุลศัลยกรรมแบ่งครึ่ง. วารสารวิจัย-วิทยาศาสตร์การแพทย์ 5(2) :**

ศึกษาการเจริญของตัวอ่อนกระต่ายระยะมอรูล่าหลังถูกแบ่งครึ่ง โดยการเพาะเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ (B2) ที่อุณหภูมิ 38°ซ ภายใต้บรรยากาศของ 5% CO_2 + 5% O_2 + 90% N_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือโดยการนำไปฝากในตัวรับ โดยผ่านทางมดลูกและทางท่อนำไข่ ผลจากการเพาะเลี้ยงพบว่า ครึ่งตัวอ่อนสามารถเจริญได้ในอัตราที่ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม (93.8% เทียบกับ 84.9%) ซึ่งตรงข้ามกับการเจริญในตัวรับพบว่า ครึ่งตัวอ่อนเมื่อฝากผ่านทางมดลูกไม่สามารถเจริญได้เลย (0% เทียบกับ 94.7% ของกลุ่มควบคุม) การป้องกันครึ่งตัวอ่อนด้วยชั้นเปลือก zona pellucida ที่คลุมด้วยชั้นของ mucin coat บาง ๆ อยู่โดยรอบ และนำไปฝากทางท่อนำไข่ อาจจะเป็นแนวทางในการแก้ปัญหาเพราะ 4.5% (1/22) ของครึ่งตัวอ่อนเจริญเป็นบลาสโตซีสหลังฝากในตัวรับ 3 วัน

คำนำ

วิธีทางจุลศัลยกรรม (microsurgery) เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ศึกษาขบวนการควบคุมการเจริญของตัวอ่อนในระยะก่อนการฝังตัว ในปี 1959 Tarkowski ได้ชี้ให้เห็นว่าแต่ละเซลล์หรือกลุ่มเซลล์ (Blastomeres) ของตัวอ่อน มีความสามารถที่จะเจริญเป็นตัวอ่อนได้ โดยขบวนการควบคุมนี้มีความสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์อย่างใกล้ชิด อาศัยวิธีการและพื้นฐานดังกล่าวได้นำมาศึกษาในแกะและในวัว เพื่อผลิตฝาแฝดเหมือนเพศเดียวกัน (monozygotic twin) จากการแยกเซลล์ของตัวอ่อนระยะ 2, 4 หรือ 8 หรือระยะมอรูล่าจนถึงระยะบลาสโตซีส (Willadsen, 1980; Willadsen *et al.*, 1981; Willadsen and Polge, 1981; Ozil *et al.*, 1982)

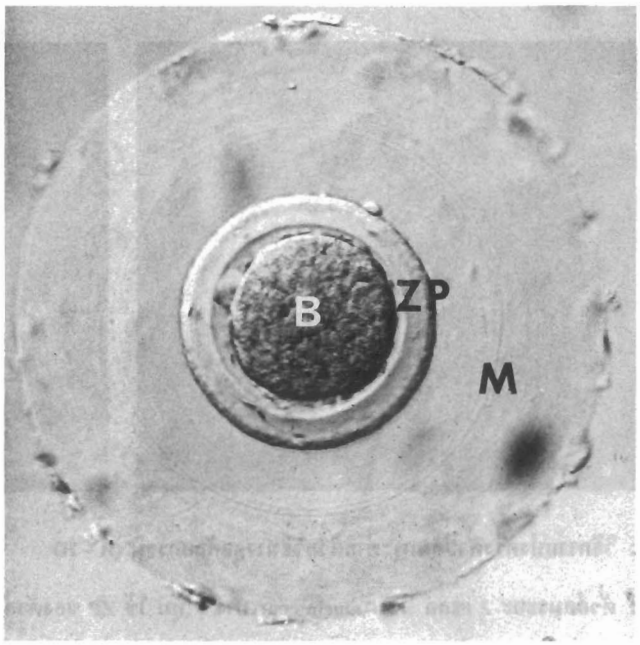
สำหรับในกระต่ายการศึกษาดังกล่าวยังมีน้อย ทั้ง ๆ ที่กระต่ายเป็นสัตว์ทดลองที่ใช้แพร่หลาย ในวงการศึกษาทางสรีรวิทยาของระบบสืบพันธุ์ เพราะง่ายต่อการกำหนดเวลาการตกไข่ จำนวนไข่ตก/ตัวมาก (8 – 12 ใบ ต่อการตกไข่ตามปกติและ 0 – 100 ใบต่อการกระตุ้นฮอร์โมน, มงคล เตชะกำพุ, 2529) ตัวอ่อนของกระต่ายจะแตกต่างกับตัวอ่อนของสัตว์ชนิดอื่น ตรงที่มีชั้น mucin coat ห่อหุ้มรอบชั้น zona pellucida (ZP) อีกทีหนึ่ง ชั้นนี้ในตัวอ่อนระยะมอรูล่าหนาถึง 150 – 200 μ ชั้น mucin coat เป็นส่วนประกอบของสาร mucopolysaccharides (Braden, 1952) และมีความสำคัญต่อการเจริญของตัวอ่อน (Assheton, 1895; Greenwald, 1958, 1962: Adams, 1960; Kane, 1974; Rottmann and Lampeter, 1981) แต่ถึงอย่างไรก็ตาม ตัวอ่อนระยะมอรูล่าก็สามารถเจริญเป็นตัวอ่อนและฝังตัวได้ แม้ว่าความหนาของชั้น mucin coat จะลดลงเหลือ 10 – 12 μ (Adams, 1960; Greenwald, 1962) หรือถูกเปิดให้เป็นรู (Totsukawa *et al.*, 1977)

จุดมุ่งหมายของการทดลองนี้ เพื่อศึกษาการเจริญของครึ่งตัวอ่อนที่ถูกแบ่งด้วยวิธีทางจุลศัลยกรรม หลังเพาะเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ *(in vitro)* และหลังฝากในตัวรับ *(in vivo)* และศึกษาความสำคัญของชั้น mucin coat และ ZP ต่อการเจริญของตัวอ่อนกระต่าย

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอ่อน ตัวอ่อนระยะมอรูล่าได้รับจากกระต่ายพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์และคาลิฟอเนีย หลังฆ่ากระต่ายที่ 53 – 56 ชั่วโมงหลังตกไข่ โดยทำการล้างท่อไข่และมดลูกด้วยน้ำยา PBS (Phosphate Buffer Saline, Whittingham, 1971) จำนวน 10 ซีซี ในแต่ละข้าง ส่องหาตัวอ่อนโดยอาศัยกล้องสเตอริโอไมโครสโคป ด้วยกำลังขยาย 40 เท่า

ตัวอ่อนที่เก็บได้ทำการล้างหลาย ๆ ครั้งในน้ำยา PBS หลังจากนั้นทำการคัดเลือกเฉพาะตัวอ่อนที่แสดงลักษณะปกติเท่านั้นเพื่อใช้ในการทดลอง โดยลักษณะปกติทางสรีรวิทยาของตัวอ่อนระยะนี้จะมีชั้นเปลือกนอก (mucin coat) หนาประมาณ 150 – 200 μ หุ้มรอบชั้นเปลือก ZP และบรรจุด้วยเซลล์ blastomeres อัดกันแน่น (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 : ตัวอ่อนระยะมอรูล่า เก็บที่ 53 – 56 ชม. หลังตกไข่ ประกอบด้วยเซลล์ตัวอ่อน [Blastomeres (B)] อัดกันแน่น โดยมีชั้น mucin coat (M) หนาประมาณ 150 μ หุ้มรอบเปลือกตัวอ่อน zona pellucida (ZP) อีกทีหนึ่ง

ตัวอ่อนขณะรอทำจุลศัลยกรรมจะเก็บไว้ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ B2 (Menezo, 1976) ภายใต้บรรยากาศของ 5% O_2 + 5% CO_2 + 90% N_2

วิธีแบ่งครึ่งตัวอ่อนโดยวิธีจุลศัลยกรรม (รูปที่ 2, A – H)

เทคนิคทางจุลศัลยกรรม

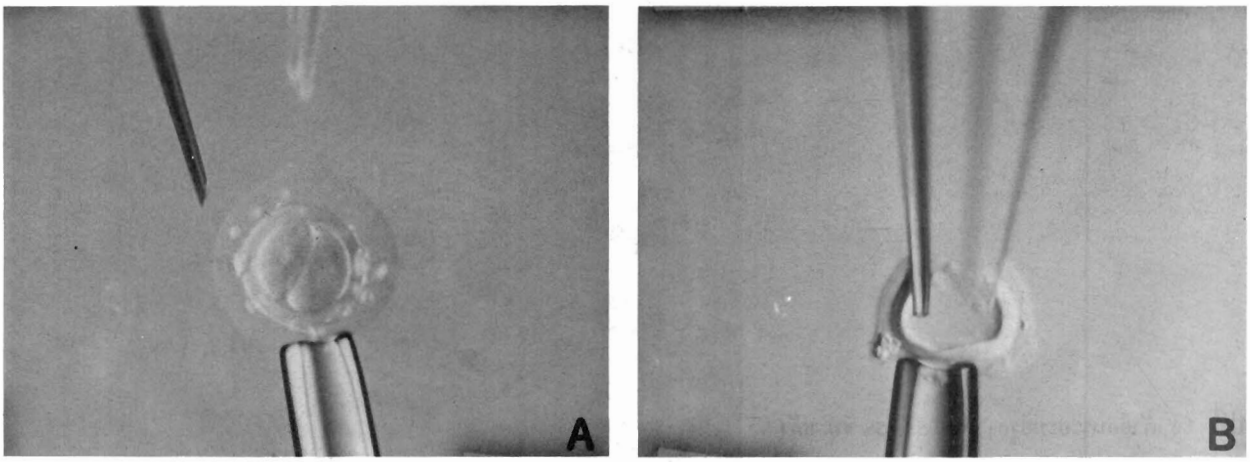
เทคนิคที่ได้ทดลองใช้มาแต่ปี 1949 โดย de Fonbrune เครื่องมือแต่ละชิ้นผลิตจากหลอดแก้วโดยอาศัยเครื่องมือ microforge ประกอบด้วยเส้นใยทองขาวเผาให้แดงโดยผ่านกระแสไฟฟ้า เพื่อทำให้เกิดการหลอมเหลว การดึง การทำให้โค้ง และการตัดของหลอดแก้ว เพื่อผลิตเป็น micropipet และ microneedle เครื่องมือที่ใช้ในการผ่าครึ่งตัวอ่อนจะติดอยู่กับเครื่อง pneumatic micromanipulator ของ de Fonbrune การแบ่งครึ่งทำภายใต้กล้องไมโครสโคปชนิดหัวกลับ กำลังขยาย 100 – 200 เท่า

การกำจัดชั้น mucin coat

ชั้นเปลือก mucin coat ของตัวอ่อนกระต่ายระยะมอรูล่า เป็นอุปสรรคต่อการแบ่งครึ่ง เพราะมีความหนาและมีลักษณะยืดหยุ่น ทำให้ไม่สามารถแยกจากกันด้วยวิธีทางจุลศัลยกรรมได้ การกำจัดชั้น mucin coat ทำโดยใช้ 0.2% pronase ซึ่งเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Mintz, 1962; Totsukawa *et al.*, 1977) น้ำยาดังกล่าวเตรียมใน PBS ซึ่งเป็น isotonic solution ใส่ตัวอ่อนในเอนไซม์ทิ้งไว้ประมาณ 8 – 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (20°ซ) ทำการเฝ้าดูตลอดจนสังเกตเห็นว่าชั้น mucin coat เริ่มถูกย่อย ใช้ micropipet ขนาดประมาณ 130 μ แยกชั้น mucin coat ออก โดยการดูดตัวอ่อนเข้าออกหลายหน หลังจากแยกชั้น mucin coat รีบล้างตัวอ่อนในน้ำยา PBS ประมาณ 7 – 10 ครั้ง เพื่อหยุดยั้งปฏิกิริยาของ pronase

การเตรียมชั้น zona pellucida สำรอง

ชั้น ZP สำรองที่เตรียมไว้มี 2 ชนิด ชนิดแรก เป็นชนิดที่มี mucin coat บาง ๆ หุ้ม ได้จากตัวอ่อนหรือไข่ (oocyte) ที่เก็บจากท่อนำไข่ 12 ชม.หลังตกไข่ กำจัดเซลล์ที่อยู่ชั้นในด้วยการใช้ micropipet ดูดออก (รูปที่ 2A และ B) อีกชนิดหนึ่งได้จากตัวอ่อนปกติหลังย่อยชั้น mucin coat ออกด้วยเอนไซม์ แล้วนำเซลล์ภายในออก



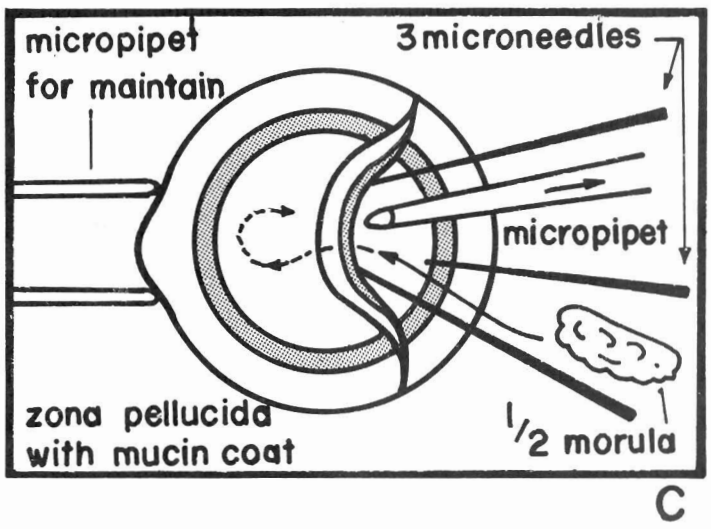
รูปที่ 2 : วิธีการแบ่งครึ่งตัวอ่อนกระต่ายด้วยวิธีทางจุลศัลยกรรม (A – H)

รูปที่ 2A : ตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ มีชั้น mucin coat บาง ๆ หุ้ม ใช้ ZP ของตัวอ่อนนี้สำหรับเป็น ZP สำรอง

รูปที่ 2B : ชั้น ZP สำรองที่มีชั้น mucin coat บาง ๆ หุ้มรอบ เก็บจากท่อนำไข่ 12 ชม. หลังตกไข่ ใช้ไมโครไปเปตดูดเอาเซลล์ที่อยู่ภายในออก

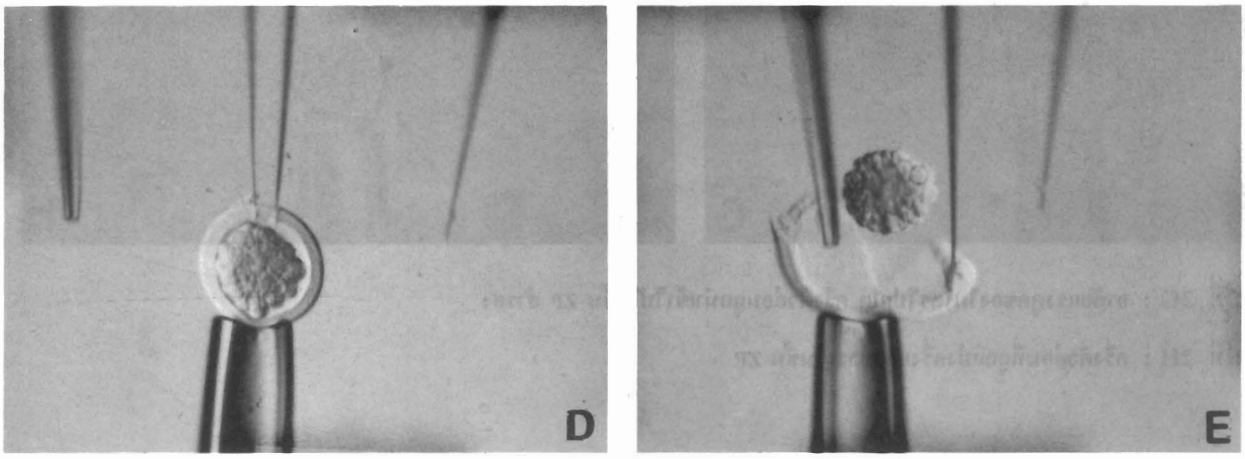
การผลิตครึ่งตัวอ่อน

การแบ่งตัวอ่อน ทำในน้ำยา PBS โดยตัวอ่อนจะถูกแยกออกจากชั้น ZP โดยอาศัยเครื่องมือ 4 – 5 ชิ้น คือ ไมโครไปเปต ดูดตัวอ่อน (micropipet for maintain) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 130 μ เข็มขนาดเล็ก (microneedle) 2 – 3 อัน และไมโครไปเปตขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 μ (micropipet) การทำงานของเครื่องมือดังกล่าวแสดงในรูปที่ 2C



รูปที่ 2C : แผนภาพ 3 มิติแสดงการทำงานของเครื่องมือ 5 ชิ้น เพื่อนำครึ่งตัวอ่อนเข้าไปในชั้น ZP ที่คลุมด้วยชั้น mucin coat

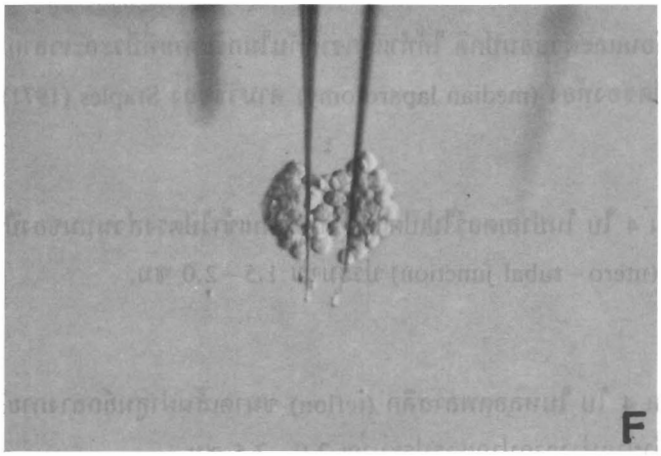
ขั้นแรกของการแบ่งตัวอ่อน ตัวอ่อนจะถูกดูดไว้บนไมโครไปเปตขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 130 μ ทำการเปิด ZP โดยใช้ไมโครไปเปต 2 อัน ที่วางในลักษณะหันหน้าเข้าหาตัวอ่อนดังรูป 2D ใช้ไมโครไปเปตขนาด 30 μ สอดเข้าไปด้านในของ ZP นำตัวอ่อนออกจากชั้น ZP โดยอาศัยแรงดันของน้ำยา PBS ที่อยู่ในไมโครไปเปตด้วยการเป่าไล่ออก (รูปที่ 2E)



รูปที่ 2D : ใช้เข็มแทงเปิดชั้น ZP แล้วทำการแยกออกจากกัน ชั้น ZP จะถูกเปิดออก

รูปที่ 2E : สอดไมโครไปเปต (เส้นผ่าศูนย์กลาง 30 μ) เข้าด้านในของ ZP เป่าไล่ตัวอ่อนออกโดยอาศัยแรงดันของน้ำยา PBS ในไมโครไปเปต

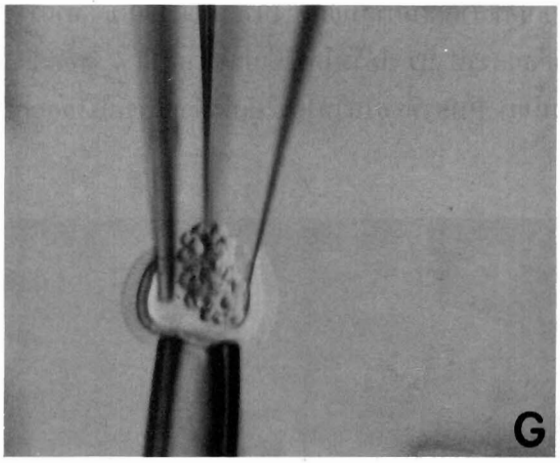
หลังจากที่ตัวอ่อนหลุดออกนอกชั้น ZP แล้ว ทำการแบ่งตัวอ่อนออกเป็น 2 ส่วน โดยอาศัยเข็ม 2 อัน วางทาบตรงกลางบนตัวอ่อนและแยกเข็มออกจากกัน (รูปที่ 2F)

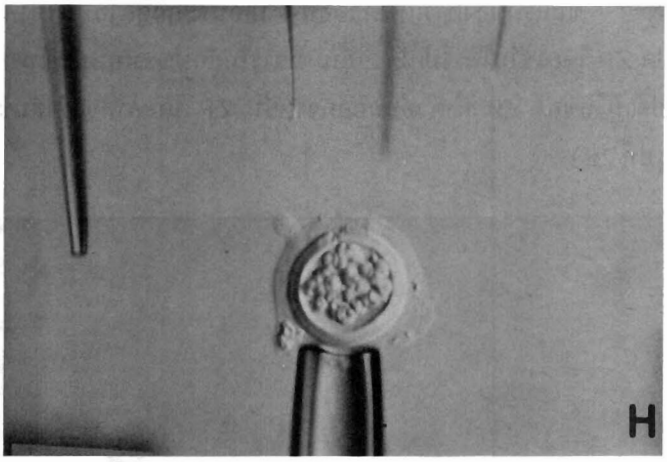


รูปที่ 2F : แยกตัวอ่อนออกเป็น 2 ส่วน โดยอาศัยเข็ม 2 อันวางทาบตรงกลาง และแยกเข็มออกจากกัน

การบรรจุครึ่งตัวอ่อนในชั้น zona pellucida สำรอง

เทคนิคการบรรจุครึ่งตัวอ่อนค่อนข้างละเอียดอ่อน จำเป็นต้องอาศัยการทำงานของเข็มอีก 1 อัน เพื่อเปิดรูของ ZP ให้กว้างเพียงพอ โดยเปิดเป็นลักษณะรูปสามเหลี่ยม สอดไมโครไปเปต (30 μ) เข้าไปในชั้น ZP เคลื่อนครึ่งตัวอ่อนเข้ามาใกล้และดูดครึ่งตัวอ่อนเข้าไปด้วยแรงดูดเบา ๆ ผ่านทางไมโครไปเปต (รูปที่ 2G และ 2H) สำหรับตัวอ่อนอีกครึ่งหนึ่งก็ทำเช่นเดียวกัน





รูปที่ 2G : อาศัยแรงดูดของไมโครไปเปต ครึ่งตัวอ่อนถูกนำเข้าไปในชั้น ZP สำรอง

รูปที่ 2H : ครึ่งตัวอ่อนที่ถูกแบ่งครึ่งแล้วบรรจุในชั้น ZP

การควบคุมการเจริญเติบโตของครึ่งตัวอ่อน ในน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ *(in vitro)*

หลังแบ่งครึ่งตัวอ่อนที่ปราศจากชั้น ZP และที่ใส่ในชั้น ZP ได้นำไปเพาะเลี้ยงในน้ำยา B2 ภายใต้บรรยากาศของ 5% CO_2 + 5% O_2 + 90% N_2 ในตู้อบอัตโนมัติ (Heraeus Type B 5060 EK/2) ที่อุณหภูมิ 38°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของครึ่งตัวอ่อนกับตัวอ่อนปกติ

การนำไปฝากในตัวรับ *(in vivo)*

การนำฝากครึ่งตัวอ่อนและตัวอ่อนปกติ ได้ทำแยกจากกันในกระต่ายที่มีระยะเวลาการตกไข่ในช่วงเดียวกับตัวให้ โดยอาศัยวิธีทางศัลยกรรมเปิดช่องท้อง (median laparotomy) ตามวิธีของ Staples (1971) โดยนำฝาก 2 วิธี

ผ่านทางมดลูก

บรรจุตัวอ่อนจำนวน 4 ใบ ในปาสเตอร์ไปเปตแล้ว สอดผ่านเข้าไปตรงส่วนบนของปีกมดลูก ห่างจากรอยเชื่อมต่อของท่อนำไข่ และปีกมดลูก (utero – tubal junction) ประมาณ 1.5 – 2.0 ซม.

ผ่านทางท่อนำไข่

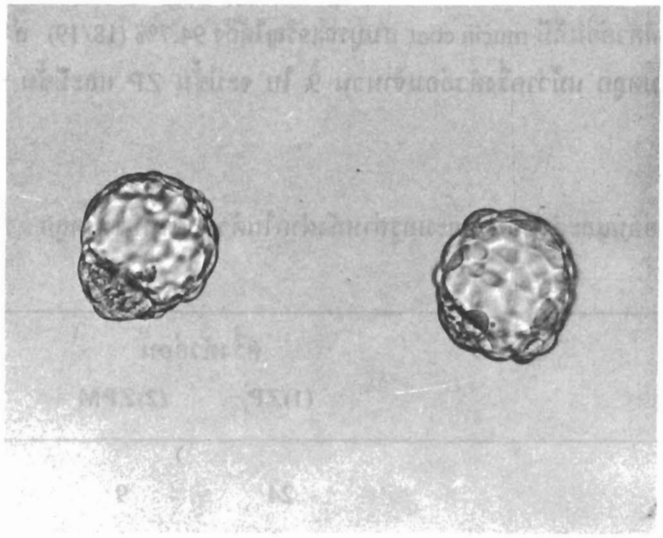
บรรจุตัวอ่อนจำนวน 4 ใบ ในหลอดพลาสติก (teflon) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.56 มม. สอดผ่านทางปากท่อนำไข่ ตัวอ่อนจะถูกนำฝากห่างจากปากแตรประมาณ 2.0 – 2.5 ซม.

การนำฝากตัวอ่อน ทำทั้ง 2 ข้างของปีกมดลูกหรือท่อนำไข่ (bilateral transfer) โดยแต่ละครั้งต้องควบคุมปริมาตรของน้ำยาที่ตัวอ่อนแขวนลอยอยู่ไม่ให้เกิน 0.1 มล. ผลการเจริญเติบโตหลังฝากถ่าย ตรวจสอบหลังฆ่ากระต่ายประมาณ 24 – 90 ชม.

ผลการทดลองและวิจารณ์

ภายหลัง 24 ชม. ในน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ พบว่า 93.8% ของครึ่งตัวอ่อน สามารถเจริญจากระยะมอรูล่าเป็นระยะบลาสโตซีสได้ โดยมีขนาดเล็กกว่ากลุ่มปกติประมาณครึ่งหนึ่ง การแบ่งตัวอ่อนเป็น 2 ส่วน ไม่มีผลกระทบต่อการ

เปลี่ยนแปลงรูปร่างจากตัวอ่อนระยะมอรูล่าเป็นระยะบลาสโตซีส โดยเซลล์บลาสโตเมีย ได้กลายเป็นเซลล์ชนิด trophoblast และเซลล์ชนิด inner cell mass (รูปที่ 3)



รูปที่ 3: คู่ของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส ที่ได้จากการแบ่งตัวอ่อนระยะมอรูล่าเป็น 2 ส่วนและเพาะเลี้ยงในน้ำยา B2 เป็นเวลา 24 ชม.

ในส่วนของการเจริญเติบโตในน้ำยาเพาะเลี้ยง พบว่า ครึ่งตัวอ่อนเจริญได้ในน้ำยาเพาะเลี้ยงเป็นเปอร์เซ็นต์ที่ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม (93.8% เทียบกับ 84.9%) ซึ่งใกล้เคียงกับที่รายงานโดย Nagashima and Ogawa (1981) ซึ่งได้เท่ากับ 95% หลังแบ่งตัวอ่อนระยะเดียวกัน (ตารางที่ 1) นอกจากนี้พบว่าชั้นเปลือกนอกที่หุ้มห่อตัวอ่อนไม่ว่าจะเป็นชั้น mucin coat หรือชั้น ZP ไม่มีผลต่อการเจริญในน้ำยาเพาะเลี้ยง เพราะอัตราการเจริญของครึ่งตัวอ่อนหรือตัวอ่อนกลุ่มควบคุม กรณีมีเปลือกหุ้มหรือไม่มีนั้นใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 1 *การเจริญของครึ่งตัวอ่อนระยะมอรูล่าเทียบกับกลุ่มควบคุมหลังเพาะเลี้ยงนาน 24 ชม.*

	ครึ่งตัวอ่อน			กลุ่มควบคุม			
	(1)ZP	(2)~~ZP~~	รวม	(3)M	(4)~~M~~	(5)~~ZP~~	รวม
จำนวนตัวอ่อน	8	8	16	12	13	8	33
จำนวนครึ่งตัวอ่อนที่เจริญ	7	8	15	9	11	8	28
หลัง 24 ชม. (%)	(87.5)	(100)	(93.8)	(75.0)	(84.6)	(100)	(84.9)

หมายเหตุ

(1) ครึ่งตัวอ่อนที่มีแต่ชั้น zona pellucida หุ้ม
(2) ครึ่งตัวอ่อนที่ไม่มีชั้น zona pellucida หุ้ม
(3) ตัวอ่อนปกติที่มีทั้งชั้น mucin coat และชั้น zona pellucida
(4) ตัวอ่อนที่เอาชั้น mucin coat ออก เหลือแต่ชั้น zona pellucida
(5) ตัวอ่อนที่ไม่มีชั้น zona pellucida หุ้ม

กรณีข้างต้นตรงข้ามกับอัตราการเจริญเติบโตหลังฝากในมดลูกในกระต่ายตัวรับ พบว่าชั้น ZP เพียงอย่างเดียว ไม่สามารถทำให้ตัวอ่อนเจริญได้อย่างปกติ ตัวอ่อนปกติที่ไม่มีชั้น mucin coat มีเพียง 3/16 ใบ (19%) เท่านั้น ที่สามารถพบได้หลังล้างเก็บจากท่อนำไข่และมดลูกจากตัวรับ 24 – 90 ชม. และตัวอ่อนทุกใบมีลักษณะของเซลล์ที่กระจัดกระจายและชั้น ZP ถูกทำลาย ในขณะที่ตัวอ่อนที่มี mucin coat สมบูรณ์เจริญได้ถึง 94.7% (18/19) ส่วนครึ่งตัวอ่อนนั้นไม่สามารถเก็บได้เลยหลังนำฝากผ่านทางมดลูก แม้ว่าครึ่งตัวอ่อนจำนวน 9 ใบ จะมีชั้น ZP และมีชั้น mucin coat หุ้มรอบก็ตาม (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การเจริญครึ่งตัวอ่อนและตัวอ่อนระยะมอรูล่าหลังฝากในตัวรับผ่านทางมดลูก

	ครึ่งตัวอ่อน		ตัวอ่อน	
	(1)ZP	(2)ZPM	(3)M	(4)ZP
จำนวนตัวอ่อน	24	9	24	16
จำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้	0	0	19	3
(%)			(79.0)	(19.0)
จำนวนตัวอ่อนที่มีการเจริญเติบโต	0	0	18	0
(%)			(94.7)	

หมายเหตุ

(1) ครึ่งตัวอ่อนที่หุ้มด้วยชั้น zona pellucida

(2) ครึ่งตัวอ่อนที่หุ้มด้วยชั้น zona pellucida ที่มีชั้น mucin coat บาง ๆ หุ้มรอบ

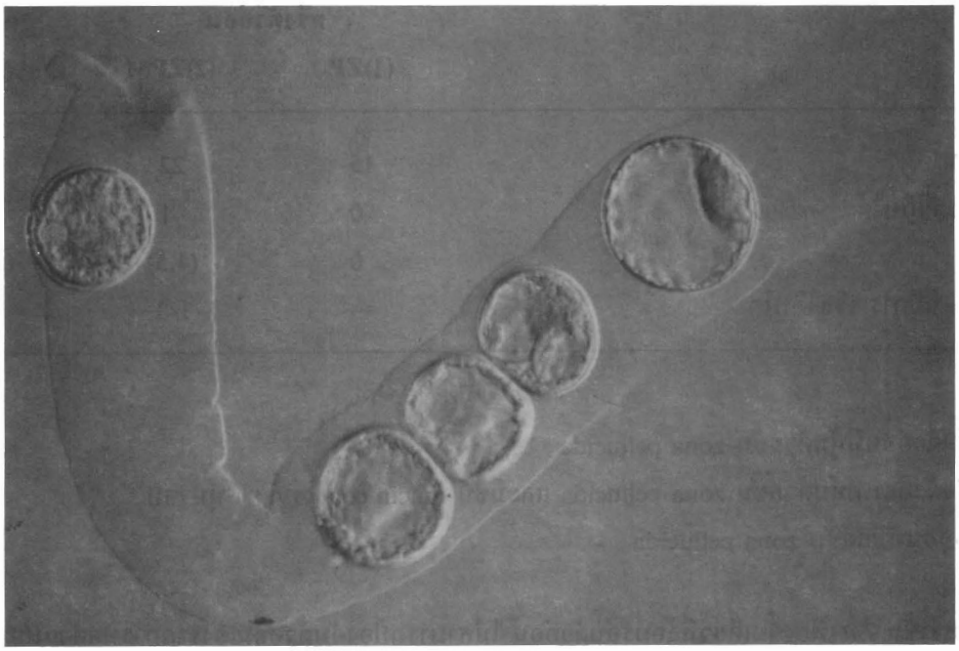
(3) ตัวอ่อนปกติที่หุ้มด้วยชั้น mucin coat และ zona pellucida

(4) ตัวอ่อนมีแต่ชั้น zona pellucida

จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า ชั้น mucin coat เป็นส่วนสำคัญส่วนหนึ่ง ที่ทำให้มีการเจริญต่อเนื่องของตัวอ่อนในกระต่าย โดยอาจทำหน้าที่ในการป้องกันตัวเอง ตามสมมุติฐานของ Assheton (1895) จากสภาวะต่าง ๆ ในมดลูก เช่น ต่อเอ็นไซม์หรือต่อเม็ดเลือดขาว ที่เกิดจากปฏิกิริยาอักเสบหลังการนำฝาก อาจเป็นไปได้ว่าชั้น ZP และเซลล์อาจถูกทำลายด้วยขบวนการดังกล่าว ดังสังเกตได้จากลักษณะตัวอ่อนที่เก็บได้ Change (1950) ได้ให้ความเห็นว่า ตัวอ่อนสามารถถูกขับออกจากตัวรับผ่านทางปากมดลูกได้ภายใน 24 ชม. หลังการนำฝาก หากมีความผิดปกติทางสรีรเกิดขึ้นระหว่างตัวรับกับตัวอ่อน ผลการทดลองข้างต้นสอดคล้องกับ Totsukawa *et al.* (1977) ที่พบว่า ไม่มีการฝังตัวเกิดขึ้น หากฝากบลาสโตซีสของกระต่ายหลังย่อยเอา ZP ในปรากฏการณ์ทางสรีรวิทยา จากการศึกษาของ Denker and Gerdes (1979) พบว่า ในช่วงก่อนการฝังตัวของคัพภะในกระต่าย มีการเปลี่ยนแปลงของชั้นหุ้มรอบตัวอ่อน โดยชั้น ZP จะหายไป และมีชั้น "NEOZONA" ซึ่งเป็นสารหลั่งจาก secretory cells ของมดลูกมาสะสมแทน ส่วนชั้นของ mucin coat ก็มีการเปลี่ยนแปลงเช่นกัน โดยมีชั้นที่เรียกว่า "Gliolemma" เข้ามาแทนที่ ชั้นนี้เป็นสารหลั่งจากเซลล์มดลูกประมาณ 6 วันหลังผสม ชั้นดังกล่าวนี้จะอยู่จนถึงช่วงก่อนการฝังตัวเล็กน้อย ซึ่งจะต่างกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น ๆ ซึ่งตัวอ่อนจะหลุดออกจากชั้น ZP หลายวันก่อนการฝังตัว เหตุผลของความแตกต่างในจุดนี้ยังไม่มีผู้อธิบายได้

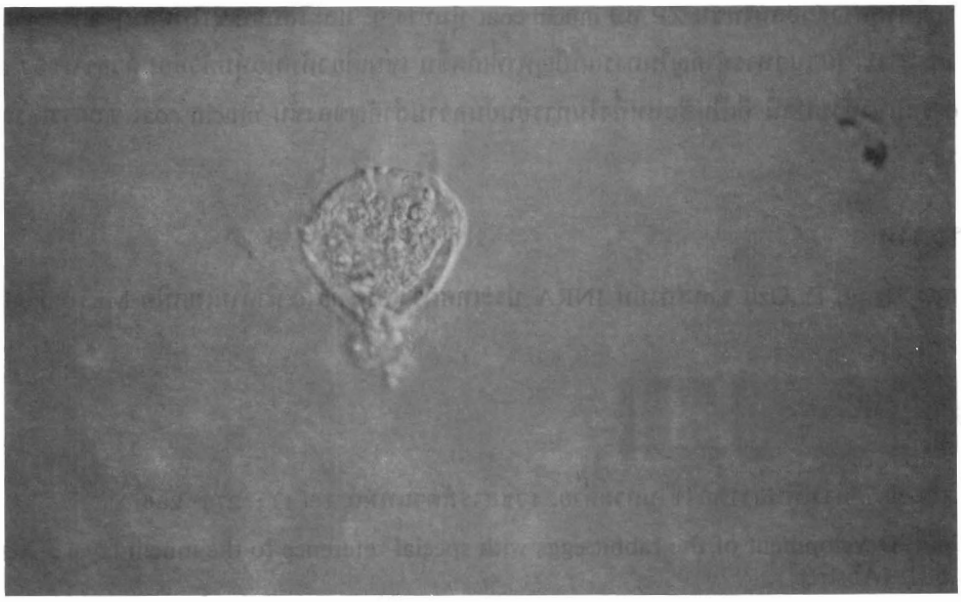
เพื่อทดสอบข้อสันนิษฐานกับความจำเป็นของชั้น mucin coat ได้ทดลองเคลือบตัวอ่อนปกติและครึ่งตัวอ่อนที่ปราศจากชั้น mucin coat ด้วย 1% ของ agar (DIFCO) ซึ่งเตรียมใน 0.9% ของ NaCl เพื่อให้แทนชั้น mucin coat

โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 280 μ ตามวิธีของ Willadsen (1979) จากการศึกษาพบว่ามากกว่า 70% ของตัวอ่อนทั้งสองชนิด เจริญถึงระยะบลาสโตซีสหลังฝากในตัวรับทางมดลูก 24 – 90 ชม. (รูปที่ 4) จึงพอสรุปเบื้องต้นว่า หากปราศจากชั้น mucin coat หรือชั้น ZP ตัวอ่อนของกระต่ายไม่สามารถเจริญต่อเนื่องอย่างสมบูรณ์ได้



รูปที่ 4 : ตัวอ่อนระยะมอรูล่าที่เจริญเป็นระยะบลาสโตซีสห่อหุ้มด้วยชั้น Agar เพื่อแทนชั้น mucin coat เก็บจากมดลูกของกระต่ายหลังฝาก 24 ชม.

ดังนั้น เพื่อทดแทนชั้น mucin coat ให้หุ้มรอบตัวอ่อนที่มีเพียงชั้น ZP และครึ่งตัวอ่อน จึงได้นำกลับไปผ่านทางท่อนำไข่ซึ่งเป็นบริเวณที่ผลิตชั้นนี้ แต่ถึงกระนั้นก็ตามพบว่าเพียง 18% (5/28) ของตัวอ่อนที่มีเพียงชั้น ZP เท่านั้นที่เก็บได้ และมีลักษณะของการเสื่อมสลาย (รูปที่ 5) ส่วนในกลุ่มครึ่งตัวอ่อนพบว่าเก็บตัวอ่อนได้เพียง 1/22 (4.5%) ซึ่งอยู่ในระยะบลาสโตซีส (ตารางที่ 4)



รูปที่ 5 : ตัวอ่อนที่มีเพียงชั้น ZP หุ้ม มีลักษณะเสื่อมสลายหลังเก็บจากกระต่ายตัวรับที่ฝากไว้นาน 24 ชม.

ตารางที่ 4 *การเจริญของตัวอ่อนและครึ่งตัวอ่อนระยะมอรูล่าอายุ 53 – 56 ชม. หลังตกไข่ หลังฝากในตัวรับผ่านทางท่อนำไข่ 24 – 90 ชม.*

	ครึ่งตัวอ่อน		ตัวอ่อน
	(1)ZP	(2)ZPM	(3)ZP
จำนวนตัวอ่อน	15	22	28
จำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้	0	1	5
(%)	0	(4.5)	(17.9)
จำนวนตัวอ่อนที่มีการเจริญเติบโต	—	1/1	0

หมายเหตุ

(1) ครึ่งตัวอ่อนที่หุ้มด้วยชั้น zona pellucida

(2) ครึ่งตัวอ่อนที่หุ้มด้วยชั้น zona pellucida และมีชั้น mucin coat บาง ๆ หุ้มรอบ

(3) ตัวอ่อนที่มีแต่ชั้น zona pellucida

ดูเหมือนว่าชั้น ZP เพียงชั้นเดียวที่ล้อมรอบตัวอ่อน ไม่สามารถป้องกันตัวอ่อนเองจากการหดตัวแบบ peristaltic ในท่อนำไข่ได้ ซึ่งแตกต่างกับตัวอ่อนของแกะ (Hunter *et al.*, 1962) ของวัว (Lawson *et al.*, 1972) และของแพะ (Agrawal *et al.*, 1983) ซึ่งสามารถเจริญได้ดีถึง 4 วันในท่อนำไข่ของกระต่าย และมีชั้นของ mucin coat บาง ๆ หุ้ม

สรุป

การศึกษาการเจริญของครึ่งตัวอ่อนในกระต่ายชี้ให้เห็นว่า

1. ครึ่งตัวอ่อนสามารถเจริญได้ดีในน้ำยาเพาะเลี้ยง *(in vitro)* โดยไม่จำต้องอาศัยเปลือกหุ้มภายนอก (ทำชั้น mucin coat และ ZP) ซึ่งตรงข้ามกับการเจริญในตัวรับ *(in vivo)*

2. ในกรณีที่ใส่ครึ่งตัวอ่อนในชั้น ZP ที่มี mucin coat หุ้มบาง ๆ และใส่กลับเข้าในท่อนำไข่เพื่อเสริมชั้น mucin coat ให้หนาขึ้นมา น่าจะเป็นแนวทางสำคัญในการแก้ปัญหาที่เกิดขึ้น เช่นเดียวกับห่อหุ้มตัวอ่อนด้วยชั้นของ agar

3. ผลการศึกษาทั้งหมดนี้ ก็เป็นส่วนหนึ่งในการยืนยันความสำคัญของชั้น mucin coat ต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนในกระต่าย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ Dr. J. P. Ozil จากสถาบัน INRA ประเทศฝรั่งเศส ที่แนะนำด้านเทคนิค Micromanipulation

เอกสารอ้างอิง

มงคล เตชะกำพุ. 2529. การเพิ่มการตกไข่ในกระต่าย. เวชสารสัตวแพทย์ 16(4) : 272- 286.

Adams C E. 1960. Development of the rabbit eggs with special reference to the mucin layer. Acto Endocr 35(51): 687. (Abstr.)

Agrawal K P, Mongha I V, and Bhattacharyya N K. 1983. Survival of goat embryos in rabbit oviduct. Vet Rec 112: 200.

Assheton R. 1895. A reinvestigation into the early stages of development of the rabbit. Quart J Micr Sci 37: 113 – 164.

Braden A W H. 1952. Properties of the membranes of rat and rabbit eggs. Aust J Sci Res Ser B Biol Sci 5: 460 – 471.

Chang M C. 1950. Development and fate of transferred rabbit ova or blastocyst in relation to the ovulation time of recipients. J Exotl Zool 114: 197 – 216.

Denker HW and Gerdes HJ. 1979. The dynamic structure of rabbit blastocyst coverings. I – Transformation during regular preimplantation development. Anat Embryol 157: 15 – 34.

de Fonbrune P. 1949. Technique de micromanipulation. MASSON et ole ed. Paris.

Greenwald GS. 1958. Endocrine regulation of the secretion of mucin in the tubal epithelium of the rubbit. Anat Rec 130: 477 – 496.

Greenwald G S. 1962. The role of the mucin layer in development of the rabbit blastocyst. Anat Rec 142: 407 – 415.

Hunter G L, Bishop G P, Adams C E, and Rowson L E A. 1962. Successful long – distance aerial transport of fertilized sheep ova. J Reprod Fert 3: 33 – 40.

Kane M T. 1974. Influence of the mucin coat on rabbit blastocysts in culture. J Physiol 236: 30 – 31.

Lawson R A S, Rowson L E A, and Adams C E. 1972. The development of cow eggs in the rabbit oviduct and their viability after re – transfer to heifers. J Reprod Fert 28: 313 – 315.

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

Mintz B. 1962. Experimental study of the developing mammalian egg: removal of the zona pellucida. Science, N Y. 138: 594 – 595.

Nagashima H and Ogawa S. 1981. Studies on the developmental potential and the survival after the deep freezing of microsurgically dichotomized morula embryos in rats and rabbits. Jpn Res Anim Reprod 27(1): 17 – 18.

Ozil J P, Heyman Y, and Renard J P. 1982. Production of monozygotic twins by micromanipulation and cervical transtfer in cow. Vet Rec 110: 126 – 127.

Rottmann O J and Lampeter W W. 1981. Development of early mouse and rabbit embryos without zona pellucida. J Reprod Fertl 61: 303 – 306.

Staples R E. 1971. Blastocyst transplantation in the rabbit. In "Methods in Mammalian Embryology". Daniel J R Ed. 209 pp.

Tarkowski A. 1959. Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs. Nature 184: 1286 – 1287.

Totsukawa K, Sugawara S, and Takeuchi S. 1977. The development of the rabbit blastocyst in the preimplantation after removal of the blastocyst coat *in vitro*. Tohuku J Agric Res 28(1): 50 – 56.

Whittingham D G. 1971. Culture of mouse ova. J Reprod Fert 14: 7 – 21.

Willadsen S M. 1979. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. Nature, Lond. 277: 298 – 300.

Willadsen S M. 1980. The viability of early cleavage stages containing half the normal number of blastomeres in the sheep. J Reprod Fert 59: 357 – 362.

Willadsen S M, Lehn – jensen H, Fehilly C B, and Newcomb R. 1981. The production of monozygotic twins of preselected parentage by micromanipulation of non – surgically collected cow embryos. Theriogenology 15(L1): 23 – 29.

Willadsen S M and Polge C. 1981. Attempt to produce monozygotic quadrapets in cattle by blastomere separation. Vet Rec 108: 211 – 213.