03/0046/32

บทความปริทัศน์

การเลี้ยงตัวอ่อนนอกร่างกาย
CULTURE OF EMBRYO

*มงคล เตชะกำพุ**

Abstract : **Mongkol Techakumphu. 1989. Culture of Embryo. Thai J Hlth Resch 3(2) : 119-125**

Different steps of embryo culture were reviewed. They comprised of preparation of culture equipment, manipulation and culture of embryo. Kinds of culture media, factors affected on in vitro survival of cultivated embryos and viability test of cultivated embryos by transfer to a suitable recipient.

บทคัดย่อ : **มงคล เตชะกำพุ. 2532. การเลี้ยงตัวอ่อนนอกร่างกาย. วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ 3(2) : 119-125**

การนำตัวอ่อนมาเลี้ยงนอกร่างกายประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ คือ การเตรียมอุปกรณ์และเครื่องมือ การเตรียมและการเลือกใช้น้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน การเตรียมตัวอ่อนและการเลี้ยงตัวอ่อน ชนิดของน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน ปัจจัยที่มีผลต่อการเลี้ยงตัวอ่อนและการวัดผลการเจริญของตัวอ่อน ภายหลังการเพาะเลี้ยงโดยนำไปฝากในสัตว์ตัวรับที่เหมาะสม

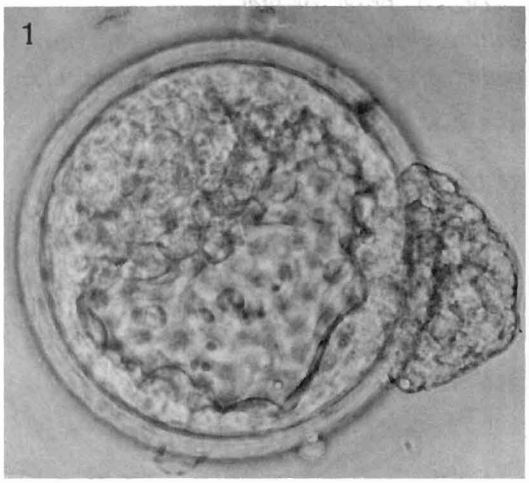
* *ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330.*

Dept of Obstetrics, Gynaecology and Reproduction, Chulalongkorn University, Bangkok 10330.

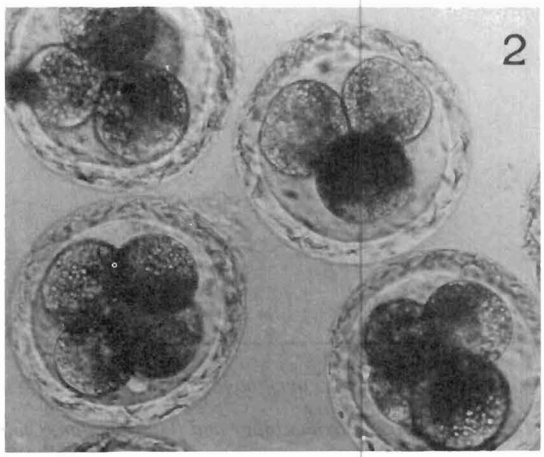
a/0046/32

ตามธรรมชาติในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมภายหลังการปฏิสนธิแล้ว ตัวอ่อน (embryo) จะมีการเคลื่อนตัวอยู่ในท่อนำไข่ประมาณ 3–4 วัน ในช่วงนี้ตัวอ่อนจะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ (segmentation) จนถึงระยะมอรูล่า ก่อนที่จะเข้าไปในมดลูกซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นระยะบลาสโตซีส จนกระทั่งฝังตัวในส่วนของผนังมดลูก ซึ่งระยะเวลาในการฝังตัวก็แตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด ในปัจจุบันนี้พบว่าสามารถที่จะนำตัวอ่อนระยะก่อนการฝังตัว มาทำการเลี้ยงในช่วงระยะเวลาหนึ่งนอกร่างกายสัตว์ที่อุณหภูมิประมาณ 37° ซ โดยให้อยู่ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนที่มีคุณสมบัติทางเคมีใกล้เคียงกับในท่อนำไข่หรือมดลูก ซึ่งพบว่าตัวอ่อนสามารถเจริญได้ในระยะเวลาหนึ่งอย่างน้อยถึง 48 ชม. โดยไม่มีผลกระทบต่อการเจริญต่อเนื่อง เมื่อนำตัวอ่อนกลับไปใส่ในมดลูกของตัวรับ และสามารถเจริญเป็นตัวอ่อนเต็มวัยได้

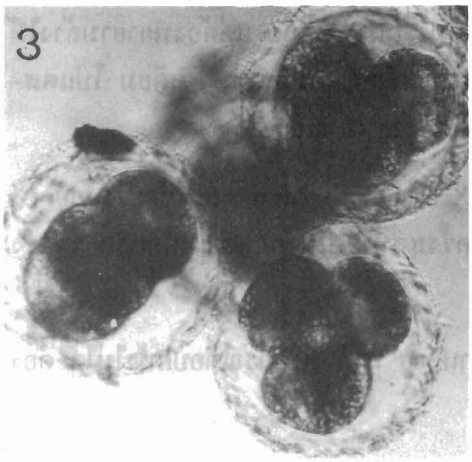
ในบรรดาสัตว์ทดลองที่ใช้พบว่า หนูเม้าส์และกระต่าย เป็นสัตว์ที่เราศึกษาการเจริญของตัวอ่อนมากที่สุด และสามารถที่จะเลี้ยงจากระยะไซโกตจนถึงระยะบลาสโตซีสได้ (รูปที่ 1) ในสัตว์ชนิดอื่น ๆ สามารถทำการเลี้ยงได้เช่นกัน แต่มีปัญหาในการที่จะเลี้ยงตัวอ่อนระยะต้น โดยพบว่ามี blocking stage หมายความว่าตัวอ่อนในระยะที่นำมาเลี้ยง ไม่สามารถเจริญต่อไปได้และหยุดการเจริญในหลอดทดลอง Blocking stage ในแฮมสเตอร์ และในวัวพบที่ระยะ 8 เซลล์ ในสุกรพบที่ระยะ 4 เซลล์ จากการศึกษาของมงคล และคณะ (2532) พบว่า เมื่อนำตัวอ่อนระยะ 4 เซลล์มาเลี้ยงไว้ในน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิด Modified Kreb's Ringer และน้ำยา HAM's F10 นาน 48 ชม. ไม่พบว่าตัวอ่อนระยะนี้เจริญเพิ่มจำนวนเซลล์หรือพัฒนาเป็นระยะอื่นได้ ในขณะที่ตัวอ่อนระยะอื่น ๆ สามารถเจริญได้ในน้ำยาชนิดใดชนิดหนึ่งหรือทั้งสองชนิด (รูปที่ 2 และ 3)



รูปที่ 1 ตัวอ่อนกระต่ายระยะบลาสโตซีส หลังจากเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิด B2 นาน 96 ชม. จากระยะตัวอ่อนเริ่มต้น 2 เซลล์



รูปที่ 2 ตัวอ่อนสุกรระยะ 4 เซลล์เก็บในวันที่ 3 หลังผสม



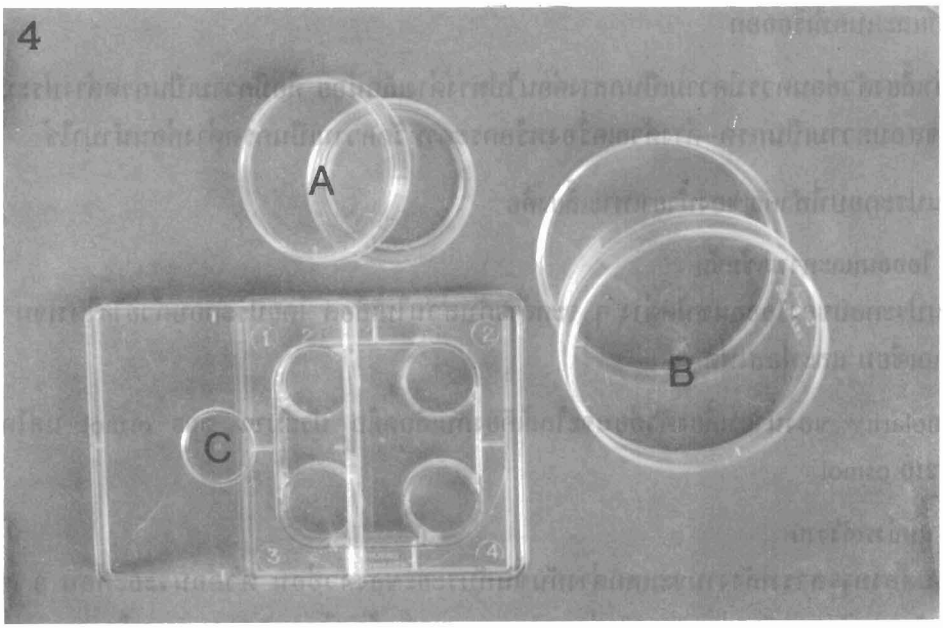
รูปที่ 3 ตัวอ่อนสุกรหลังเพาะเลี้ยงนาน 48 ชม. ไม่พบมีการพัฒนา

ปัญหา blocking stage สามารถแก้ไขโดยนำตัวอ่อนระยะต้น ๆ ดังกล่าว ไปฝากไว้ชั่วคราวในท่อนำไข่ของกระต่ายหรือแกะ หรือเลี้ยงร่วมกับเซลล์ชนิดอื่น ๆ เช่น Trophoblastic vesicle หรือเซลล์ monolayer ชนิดอื่น ๆ เพื่อให้ผ่าน blocking stage แล้วจึงนำกลับมาฝากในสัตว์ตัวรับต่อไป

ในการเลี้ยงตัวอ่อนนี้พบว่าจำเป็นต้องอาศัยขั้นตอนต่าง ๆ คือ

1. การเตรียมเครื่องมือและอุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงตัวอ่อนอาจเป็นแก้วหรือพลาสติก ข้อดีของภาชนะแก้วคือสามารถนำมาใช้อีกได้ แต่อาจมีปัญหาการติดเชื้อเนื่องจากการล้างไม่สะอาด ซึ่งไม่พบกรณีใช้เป็นพลาสติกซึ่งตามปกติจะใช้ครั้งเดียวแล้วทิ้ง (disposible) โดยอาจเป็น petridish ชนิดกลม ขนาด 40 × 12 มม. หรือขนาด 58 × 15 มม. หรือชนิดสี่–เหลี่ยม 4 หลุม (Multidish, Nunclon^{R}) หรือบางห้องปฏิบัติการอาจใช้ test tube สำหรับเลี้ยงตัวอ่อนก็ได้ (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 ตัวอย่างอุปกรณ์สำหรับเลี้ยงตัวอ่อนชนิดพลาสติก

A) Petridish ขนาด 40 × 12 มม.

B) Petridish ขนาด 58 × 15 มม.

C) Petridish ขนาด 4 หลุม ขนาด 66 × 66 มม.

ในบ้านเราการใช้ภาชนะแก้วอาจดีกว่าในแง่ประหยัด เพราะสามารถนำมาใช้อีก แต่ต้องพยายามล้างให้สะอาดและฆ่าเชื้ออย่างดี แก้วที่ใช้ควรเป็นแก้วที่มีคุณภาพดีที่สุด ทนต่อความร้อน และมีพวก โซเดียม โปแตส-เซี่ยม หรือไอออนที่เป็นโลหะในปริมาณที่ต่ำ เพราะสารเหล่านี้อาจละลายในน้ำยาเพาะเลี้ยงได้

การล้างเครื่องแก้วควรล้างโดยใช้น้ำยาซักฟอก เช่น น้ำยา 7X cleaning solution แช่ไว้อย่างน้อย 24 ชม. หลังจากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำประปาอย่างน้อย 5 ครั้ง และควรล้างครั้งสุดท้ายในน้ำกลั่นอย่างน้อยอีก 3 ครั้ง ทิ้งไว้จนแห้งในบริเวณที่ไม่มีฝุ่นละอองเพื่อรอการฆ่าเชื้อ

เครื่องแก้วทุกชนิดต้องทำการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 150° ซ นาน 90 นาที หรือกรณีที่อบแห้งไม่ได้ ต้องใส่ใน autoclave 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นานอย่างน้อย 15 นาที

2. การเตรียมและการเลือกใช้น้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน

ในกรณีที่ต้องเตรียมน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนเองนั้นต้องเลือกน้ำที่สะอาด โดยเฉพาะเป็นน้ำกลั่นที่มีความสะอาดอย่างน้อยมี resistivity เท่ากับ 0.7 mohms โดยได้จากการกลั่นจาก glass distillation น้ำกลั่นที่ได้จากการกลั่น 3 ครั้ง จะให้ผลในการเพาะเลี้ยงดีที่สุดเมื่อเทียบกับการกลั่นเพียงครั้งเดียวหรือสองครั้ง

นอกจากความสะอาดบริสุทธิ์ของน้ำแล้ว ความบริสุทธิ์ของสารเคมี มีความสำคัญเช่นกันต่อการเจริญของตัวอ่อน

น้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนที่ดีจะต้องเตรียมใหม่เสมอ ควรเตรียมใหม่ทุก ๆ วันหากเป็นไปได้ น้ำยาที่เตรียมนานแล้วจะเสื่อมคุณภาพ โดยเกิดขบวนการ decarboxylation ของสาร pyruvate ดังนั้นจึงไม่แนะนำให้ใช้น้ำยาที่เก็บมาแล้วเกิน 1 อาทิตย์

น้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนทุกชนิดจะต้อง sterile โดยผ่านกระดาษกรอง (Millipores) ขนาด 0.45 ไมครอน เพื่อกรองสิ่งสกปรกและแบคทีเรียออก

น้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนควรมีความเป็นกลางค่อนไปทางด่างเล็กน้อย คือมีความเป็นกรดด่างประมาณ 7.2–7.4 ควรทำการตรวจสอบความเป็นกรด–ด่างด้วยเครื่องหรือกระดาษวัดความเป็นกรดด่างก่อนนำมาใช้

ส่วนประกอบที่สำคัญของน้ำยาเพาะเลี้ยงคือ

2.1 ไอออนและความเข้มข้น

ส่วนประกอบของไอออนชนิดต่าง ๆ จะคล้ายกับส่วนในเลือด โดยประกอบด้วยไฮโดรเจน โปแตสเซี่ยม แมกนีเซี่ยม แคลเซี่ยม และฟอสเฟต

Osmolarity ของน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนจะใกล้เคียงกับเลือดคือ ประมาณ 308 osmol แต่โดยทั่วไปจะอยู่ระหว่าง 290 – 310 osmol

2.2 แหล่งพลังงาน

ความต้องการสารพลังงานจะแตกต่างกันขึ้นกับระยะของตัวอ่อน ตัวอ่อนระยะก่อน 8 เซลล์ มีความต้องการแหล่งพลังงานพิเศษ ตัวอย่างเช่น ตัวอ่อนระยะ 1 เซลล์ ต้องมี oxaloacetate หรือ pyruvate เป็นแหล่งพลังงาน ในขณะที่ระยะ 2 เซลล์ จะต้องมี lactate, oxaloacetate, pyruvate หรือ phosphoenol pyruvate

หลังจากระยะ 8 เซลล์ไปแล้ว ตัวอ่อนสามารถใช้แหล่งพลังงานอื่น ๆ ได้หลายแหล่ง เช่น glucose, malate, alpha-ketoglutarate เป็นต้น

2.3 ความต้องการไนโตรเจน

Glycine เป็นแหล่งไนโตรเจนที่จำเป็นสำหรับการเจริญของตัวอ่อน หรือเราอาจเติมสาร bovine serum albumin (BSA) หรือสารที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนในน้ำยาละลาย เพื่อจำเป็นในการพัฒนาของตัวอ่อนระยะต้น ๆ ได้

โดยทั่วไปแล้วในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนมักมี BSA เป็นส่วนประกอบประมาณ 0.1 – 0.4% และมักเติม fetal calf serum ขนาด 10 – 20% ในน้ำยาเพาะเลี้ยง

ตัวอย่างของส่วนประกอบน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนชนิด Modified Kreb's Ringer ซึ่งใช้ได้ผลดีในการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนสุกร (มงคล และคณะ, 2532) แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 *ส่วนประกอบของน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนชนิด Modified Kreb's Ringer*

ส่วนประกอบ	ปริมาณที่ใช้ (มิลลิกรัม)
NaCl	7021
KCl	356
$CaCl_2$	189
KH_2PO_4	162
$MgSO_4\ 7H_2O$	294
$NaHCO_3$	2106
BAS	4000
Glucose	1000
Penicillin G	63
Streptomycin	50

3. การเตรียมตัวอ่อนและการเลี้ยงตัวอ่อน

หลังจากเก็บตัวอ่อนมาแล้ว ควรทำการล้างตัวอ่อนในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนประมาณ 2–3 ครั้ง ก่อนจะนำไปใส่ในน้ำยาจริง ควรระมัดระวังเรื่องต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

- ความสะอาด
- การผันแปรของอุณหภูมิ (ร้อน–เย็น)
- การผันแปรของความเป็นกรด–ด่าง
- การโดนแสงโดยเฉพาะแสงแดด
- การอยู่ในอุณหภูมิที่ร้อนหรือเย็นไป
- เวลาที่ควรเก็บไว้ก่อนทำการเพาะเลี้ยง (ไม่ควรเกิน 3 ชม.)

ตามธรรมดาแล้วหลังเก็บตัวอ่อนมาได้ ควรรีบนำเอาตัวอ่อนเข้าไปเลี้ยงในอุณหภูมิ 37°ซ ทันที

วิธีการเลี้ยงตัวอ่อนนั้นมีหลายวิธี แต่พอแบ่งเป็นวิธีใหญ่ได้ 2 วิธีคือ

1. การเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนใต้ liquid paraffin
2. การเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนโดยไม่มี liquid paraffin

วิธีแรกมีผู้รายงานว่าได้ผลดี เพราะจะป้องกันการเปลี่ยนแปลงของสภาวะเป็นกรดด่างได้ดี โดยเฉพาะน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนที่เป็นชนิดไบคาร์บอเนต

Liquid paraffin ที่ใช้จะต้องมีความถ่วงจำเพาะระหว่าง 0.830 – 0.870 โดยควรทำการฆ่าเชื้อใน autoclave (อบชื้น) อย่านำไปฆ่าเชื้อแบบอบแห้งที่ 150° ซ. เพราะจะเป็นพิษต่อตัวอ่อน

สำหรับบรรยากาศในการเลี้ยงตัวอ่อนต้องมีส่วนประกอบของ 5% CO_2 โดยอาจเป็น 5% CO_2 ในอากาศ (5% CO_2 + 19% O_2 + 76% N_2) หรือ 5% CO_2 + 5% O_2 + 90% N_2 ซึ่งพบว่าไม่ให้ผลต่างกันในการเลี้ยงตัวอ่อนกระต่าย แต่มีรายงานว่าการใช้บรรยากาศชนิดหลังจะเหมาะสำหรับการเลี้ยงตัวอ่อนของสุกร แกะ และวัว

4. ชนิดของน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน

น้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนมีอยู่มากมายหลายชนิด ขึ้นกับระยะและชนิดของตัวอ่อน อาจกล่าวได้ว่าหากแบ่งเป็นชนิดหลัก ๆ นั้นมีด้วยกัน 2 ชนิด

4.1 **Simple salts medium** เช่น Dulbecco PBS, PBI, Hanks' solution, m-KREB, m-TALP 1, 2, 3, 4, Whitten's Medium, BMOC-II, BMOC-III, Tyrode, Synthetic oviductal fluid ovum culture medium เป็นต้น น้ำยาพวกนี้จะมีส่วนประกอบของเกลือโซเดียม, โปแตสเซี่ยม, แมกนีเซี่ยม, แคลเซี่ยม จำพวก lactate, pyruvate, glucose และ bovine serum albumin เป็นต้น

4.2 **Complex medium** เช่น B_2 Medium, Ham's F 10, Ham's F 12, TCM 199, MEM ฯลฯ พวกนี้จะมีส่วนประกอบนอกเหนือจากสารใน Simple salts medium แล้ว ยังประกอบด้วยกรดอะมิโน วิตามินต่าง ๆ และสารอื่น ๆ โดยทั่วไปมักทำมาเป็นรูปสำเร็จ อาจเป็นผง หรือน้ำยา มักมีราคาแพงกว่าชนิด Simple salts medium

5. ปัจจัยที่มีผลต่อการเลี้ยงตัวอ่อน

มีปัจจัยหลายประการที่มีผลต่อการเจริญของตัวอ่อนในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน คือ

- อายุของสัตว์ตัวให้
- ระยะของตัวอ่อน
- วิธีของการเลี้ยงตัวอ่อน
- ชนิดของน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน
- ปริมาตรของน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน
- บรรยากาศของการเลี้ยงตัวอ่อน
- จำนวนของตัวอ่อนต่อภาชนะบรรจุ
- อุณหภูมิที่เลี้ยงตัวอ่อน
- ความดันของบรรยากาศ
- การระเหยของน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน
- ความแตกต่างของสัตว์ตัวให้ตัวอ่อน

ในบรรดาปัจจัยต่าง ๆ ดังกล่าวพบว่า ความแตกต่างของสัตว์ตัวให้ต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อน เป็นปัจจัยที่ไม่สามารถควบคุมได้ ดังนั้นในการเลี้ยงตัวอ่อนควรใช้ตัวอ่อนจากสัตว์หลาย ๆ ตัว หรือหากเปรียบเทียบผลของน้ำยาหลาย ๆ ชนิด ต้องพยายามคละตัวอ่อนและควรทำมากกว่า 1 ครั้ง

6. การวัดผลการเจริญของตัวอ่อน

ในการศึกษาผลของการเลี้ยงต่อการเจริญต่อเนื่องหลังเลี้ยงสามารถทำได้ โดยนำตัวอ่อนที่เลี้ยงไว้ไปฝากในสัตว์เลี้ยงตัวรับของตัวอ่อน โดยนำไปฝากในมดลูกหรือท่อนำไข่ทั้งนี้ขึ้นกับระยะของตัวอ่อน โดยตัวอ่อนระยะก่อนมอรูล่า ควรนำไปฝากในท่อนำไข่จะมีโอกาสเจริญมากกว่านำไปฝากในมดลูก

การเจริญของตัวอ่อนเป็นตัวเต็มวัยหลังการเลี้ยงตัวอ่อนขึ้นกับหลายปัจจัย แต่ที่สำคัญคือสภาพแวดล้อมของมดลูกของตัวรับและระยะเวลาในการเลี้ยง ในด้านสภาพแวดล้อมของมดลูกของสัตว์ตัวรับ โดยทั่วไปมักย้ายฝากตัวอ่อนในสัตว์ตัวรับที่มีการตกไข่หลังตัวให้ เนื่องจากความเข้าใจว่า ในช่วงที่ตัวอ่อนอยู่นอกร่างกายในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน เมตาโบลิซึมของตัวอ่อนจะช้าลง การย้ายฝากในสัตว์เลี้ยงตัวรับดังกล่าวจะช่วยรับสภาพความเหมาะสมต่อการเจริญของตัวอ่อนได้ ซึ่งข้อสันนิษฐานดังกล่าวไม่เป็นจริงเสมอไป เพราะจากการศึกษาของ Techakumphu *et al.* (1987) พบว่า การเจริญของตัวอ่อนของกระต่ายระยะ 2–4 เซลล์หลังเลี้ยงตัวอ่อนนานถึง 48 ชม. สามารถเจริญได้ในอัตราพอ ๆ กับตัวอ่อนในระยะเดียวกัน ที่ทำการย้ายฝากโดยตรงโดยไม่ได้นำมาเลี้ยงนอกร่างกาย ทั้งนี้ต้องคำนึงถึง 3 ปัจจัยคือ ชนิดของน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงตัวอ่อน และการควบคุมอุณหภูมิให้ใกล้เคียงกับร่างกายสัตว์ ตั้งแต่การเก็บมาจากตัวสัตว์จนถึงการย้ายฝาก

ปัจจัยอีกอันหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญของตัวอ่อนคือ ระยะเวลาในการเลี้ยง พบว่าการเลี้ยงตัวอ่อนที่ใช้เวลาเกิน 48 ชม. จะมีผลต่อการเจริญต่อเนื่อง ตัวอย่างเช่น ในกระต่ายที่เก็บไว้ 48 ชม. จะมีอัตราการเจริญเพียง 30% หากนานขึ้นเป็น 72 ชม. จะลดลงเหลือประมาณ 10% หรือเหลือ 0% เมื่อยืดระยะเวลาไปถึง 96 ชม. ในสุกรก็เช่นกันตัวอ่อนที่เก็บไว้นาน 48 ชม. มีอัตรารอดเพียง 16% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้ถึง 57% ในวัวพบว่าตัวอ่อนระยะ blastocyst ที่เก็บไว้นาน 2 และ 4 วัน มีอัตรารอดเพียง 27% และ 20% เมื่อตรวจท้องที่ 35 วัน และเหลือเพียง 18% และ 0% เมื่อตรวจท้องที่ 60 วัน แสดงว่าการเลี้ยงตัวอ่อนที่นานไปจะมีผลกระทบต่อการเจริญปกติของตัวอ่อน โดยจะเกิดการตายของตัวอ่อนในช่วงแรกขึ้นได้ และยังมีผลต่อการเลี้ยงตัวอ่อน ทำให้เกิดการเจริญที่ล่าช้าอีกด้วย

การเลี้ยงตัวอ่อนนอกร่างกาย เป็นวิธีหนึ่งมีประโยชน์เพื่อใช้ศึกษาความต้องการพื้นฐาน อาทิเช่น สาร–อาหารต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญของตัวอ่อน ศึกษาผลของสารเคมี ยา เชื้อไวรัส แบคทีเรีย หรือผลของปฏิบัติการต่าง ๆ ต่อตัวอ่อน เช่น การทำการแบ่งครึ่ง การแยกเพศ ฯลฯ ต่อการเจริญของตัวอ่อน การพัฒนาวิธีการเลี้ยงตัวอ่อนจะเป็นอีกก้าวหนึ่งของการศึกษาทางการย้ายฝากตัวอ่อนในสัตว์ ซึ่งได้มีผู้รายงานถึงความสำเร็จในสัตว์ชนิดต่าง ๆ แล้วในประเทศไทย

เอกสารประกอบการเขียน

มงคล เตชะกำพุ, สุพจน์ อานันทะสุวงศ์, สุพจน์ เลื่องยศลือชากุล, วัชรี ตันติวัชรเสถียร, และ ชัยณรงค์ โลหะชิต. 2532. การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนในสุกร : ปัจจัยระยะของตัวอ่อน และชนิดของน้ำยาเพาะเลี้ยงต่อการเจริญเติบโต. เวชชสารสัตวแพทย์. (รอตีพิมพ์).

Davis DL. 1985. Culture and storage of pig embryo. J Reprod Fert (Supply) 33: 115-124.

Renard JP. 1985. La conservation de l'embryon de mammifere: Etude aux stades preimplantatoires chez plusieurs especes domestiques. These Docteur es-sciences. Universite Pierre et Marie Curie. Paris VI. 118 p.

Techakumphu M, Wintenberger-Torres S, Sevellec C, and Menezo Y. 1987. Survival of rabbit embryo after culture or culture/freezing. Anim Reprod 13: 221-228.

Whittingham DG. 1971. Culture of mouse ova. J Reprod Fert (Supply) 14: 7-21.