รายงานผลการวิจัย

ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2536

เรื่อง

# การศึกษาการเจริญของตัวอ่อนสุกรภายหลังฝาก ชั่วคราวในท่อนำไข่กระต่ายและนำฝากในสุกรตัวรับ

# Development of pig embryo in oviduct of rabbit after a short time incubation and retransfer to proper recipient


มงคล เตชะกำหุ

วิชัย ทันเตศุภารัตน์

วันเพ็ญ ศรีอนันต์

จินดา สิงห์ถอ



636.089
8178
ก622
ส.2



ภาควิชาสูติศาสตร์ เวชบริบาลและวิทยาการสืบพันธุ์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2536

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

# การศึกษาการเจริญของตัวอ่อนสุกรภายหลังฝากชั่วคราวในท่อนำไข่กระต่ายและนำฝากในสุกรตัวรับ

โดย

มงคล เตชะกำพุ
วิชัย ทันตศุภารักษ์
วันเพ็ญ ศรีอนันต์
จินดา สิงห์ลอ

ธันวาคม 2536

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19959549 - 6 มี.ค. 2542

**ชื่อโครงการวิจัย**

การศึกษาการเจริญของตัวอ่อนสุกรภายหลังฝากชั่วคราวในท่อนำไข่กระต่ายและนำฝากในสุกรตัวรับ

**ชื่อผู้วิจัย** มงคล เตชะกำพุ
วิชัย ทันตศุภารักษ์
วันเพ็ญ ศรีอนันต์
จินดา สิงห์ลอ

**เดือนและปีที่ทำการวิจัยเสร็จ** ธันวาคม 2536

**บทคัดย่อ**

จุดประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ เพื่อศึกษาการพัฒนาของตัวอ่อนสุกรที่เลี้ยงชั่วคราวในท่อนำไข่กระต่าย เก็บตัวอ่อนสุกรระยะ 1-4 เซลล์ จำนวน 313 ตัวอ่อน จากสุกรสาวก่อนวัยเจริญพันธุ์ น้ำหนักประมาณ 90-100 กก. หลังทำการผสม 2.0-2.5 วัน นำตัวอ่อนสุกรย้ายไปฝากในท่อนำไข่กระต่ายที่ไม่รู้วงจรการเป็นสัด ด้วยการใช้ท่อโปลีเอทีลีนสอดเข้าทางปากแตร โดยให้มีปริมาตรของน้ำยาแขวนลอยน้อยที่สุด วางตัวอ่อนที่ 2.5 ซม จากปากแตร และเลี้ยงตัวอ่อนไว้นาน 48, 72, 96 และ 120 ชม หลังจากนั้นล้างจากท่อนำไข่กระต่าย ผลการเก็บตัวอ่อนได้เท่ากับ 52%(68/131), 60%(57/95), 58%(34/59) และ 0% (0/28) ตามลำดับ ในส่วนอัตราของตัวอ่อนปกติได้เท่ากับ 90%(61/68), 79%(45/57) และ 68% (23/34) ทำการฝากตัวอ่อนที่เลี้ยงไว้นาน 48 ชม และ 72 ชม ในสุกรตัวรับที่มีวงจรการเป็นสัดใกล้เคียงกับตัวอ่อน ในสุกรจำนวน 5 ตัว สุกรกลับเป็นสัดจำนวน 4/5 ตัว และ 1/5 ไม่แสดงอาการเป็นสัดจนครบกำหนดคลอด ผลการตรวจด้วยวิธีการส่องดูในช่องท้องไม่พบมีการตั้งท้อง การศึกษานี้สามารถเลี้ยงตัวอ่อนได้นาน 96 ชมโดยตัวอ่อนเจริญปกติ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์เพื่อประเมินผลการเจริญของตัวอ่อนที่ผ่านการทดลองต่าง ๆ หรือนำไปขนส่งตัวอ่อน

**คำสำคัญ** ตัวอ่อนสุกร กระต่าย ท่อนำไข่

# กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ได้ให้ทุนสนับสนุนในงานวิจัยครั้งนี้ บริษัท Intervet ประเทศไทยที่สนับสนุนฮอร์โมน PG 600® และรองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร สุวรรณี นิธิอุทัย อาจารย์และเจ้าหน้าที่ของภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้ให้ความช่วยเหลือในงานวิจัยครั้งนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**Project title :** Development of pig embryo in oviduct of rabbit after a short time incubation and retransfer to proper recipient

**Name of Investigators:** Mongkol Techakumphu
Wichai Tantasuparak
Wanpen Srianan
Jinda Singlor

**Year** December 1993

## Abstract

The objective of this experiment was to study the development of pig embryos after short time incubation in rabbit oviduct. The embryos at 1-4 cell stage (n= 313) were collected surgically at 2.0-2.5 days after mating from twenty 90-100 kg prepubertal gilts. The embryos were suspended in a small volume of B2 culture medium and were placed in oviducts, 2.5 cm from the fimbria of mature non cyclic does via a sterile 1.0 mm diameter polyethylene tube by midline laparotomy under general anesthesia. They were incubated 48, 72, 96 and 120 h. The embryos were flushed from rabbit oviduct after cervical dislocation. Two hundred and seventy four embryos were incubated in ligated oviducts of matured non-cyclic does for 48, 72, 96 and 120 h. The recovery rates after incubation were 52%(68/131), 60%(57/95) ,58%(34/59) and 0%(0/28) at 48, 72, 96 and 120h respectively, after 72 and 96 h incubation. The rates of normal embryonic development were found to be 90%(61/68),79%(45/57) and 68%(23/34) respectively The recovered embryos were transferred to five synchronized recipient gilts. The pregnancy was confirmed in

one recipient which recieved 6 embryos. This finding indicated that the pig embryos at early stage after fertilization can further develop in oviduct of non-cyclic does at least for 96 h and they can develop to young after retransfering in a proper recipient. This technique will be useful for evaluating the survival of manipulated embryos and for transporting the pig embryos.

**Key words:** pig embryo, rabbit, oviduct

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| กิตติกรรมประกาศ | II |
| บทคัดย่อ | III |
| Abstract | IV |
| สารบัญ | VI |
| รายการประกอบตาราง | VII |
| รายการรูปประกอบ | VIII |
| รายการสัญญลักษณ์และคำย่อ | IX |
| บทนำ | 1 |
| อุปกรณ์และวิธีการ | 3 |
| ผลการทดลอง | 13 |
| วิจารณ์ | 24 |
| เอกสารอ้างอิง | 30 |


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการประกอบตาราง


ตารางที่1 ผลการเก็บตัวอ่อนหลังฝากในท่อนำไข่ที่ไม่ได้ผูกที่ส่วนเชื่อมท่อนำไข่กับมดลูก

ตารางที่ 2 ผลการย้ายฝากตัวอ่อนสุกรในท่อนำไข่กระต่ายนาน 48 ชม

ตารางที่ 3 ลักษณะของตัวอ่อนที่ได้หลังเก็บจากท่อนำไข่นาน 48 ชม

ตารางที่ 4 ผลการย้ายฝากตัวอ่อนสุกรในท่อนำไข่กระต่ายนาน 72 ชม

ตารางที่ 5 ลักษณะของตัวอ่อนที่ได้หลังเก็บจากท่อนำไข่นาน 72 ชม

ตารางที่ 6 ผลการย้ายฝากตัวอ่อนสุกรในท่อนำไข่กระต่ายนาน 96 ชม

ตารางที่ 7 ลักษณะของตัวอ่อนที่ได้หลังเก็บจากท่อนำไข่นาน 96 ชม

ตารางที่ 8 ผลการย้ายฝากตัวอ่อนสุกรในท่อนำไข่กระต่ายนาน 120 ชม

ตารางที่ 9 ผลการฝากตัวอ่อนในสุกรตัวรับ


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการรูปประกอบ

รูปที่ 1 ตัวอ่อนระยะ 1 เซลล์เก็บจากท่อนำไข่สุกรประมาณ 2.0 วัน ก่อนทำการนำฝาก

รูปที่ 2 ตัวอ่อนระยะ 4 เซลล์ เก็บจากท่อนำไข่สุกรประมาณ 2.5 วัน ก่อนการนำฝาก

รูปที่ 3 ภาพแสดงการบรรจุตัวอ่อนในท่อโปลีเอทีลีน

รูปที่ 4 การสอดท่อโปลีเอทีลีนเข้าทางปากแตรของท่อนำไข่

รูปที่ 5 การหนีบท่อนำไข่ด้วยคีมหนีบเส้นเลือด

รูปที่ 6 ภาพรวมของการฝากตัวอ่อนในท่อนำไข่กระต่าย

รูปที่ 7 การไล่ตัวอ่อนจากท่อโปลีเอทีลีนโดยผ่านไซริงค์ 1 มล

รูปที่ 8 ตัวอ่อนสุกรระยะ 4 เซลล์จากการเลี้ยงในท่อนำไข่นาน 48 ชม

รูปที่ 9 ตัวอ่อนสุกรหลังการเลี้ยงในท่อนำไข่นาน 48 ชม

รูปที่ 10 ตัวอ่อนสุกรที่มีลักษณะเสื่อมสลาย หลังฝากไว้นาน 48 ชม

รูปที่ 11 ตัวอ่อนสุกรหลังเลี้ยงในท่อนำไข่นาน 72 ชม

รูปที่ 12 ตัวอ่อนสุกรระยะบลาสโตซีสจากการเลี้ยงในท่อนำไข่นาน 72 ชม แล้วนำมาเลี้ยงในหลอดทดลองอีก 48 ชม

รูปที่ 13 ตัวอ่อนสุกรหลังเลี้ยงในท่อนำไข่นาน 96 ชม

รูปที่ 14 อัตราการเก็บตัวอ่อนหลังฝากชั่วคราวในท่อนำไข่กระต่ายเป็นเวลานาน 48, 72, 96 และ 120 ชม

รูปที่ 15 อัตราของตัวอ่อนที่มีลักษณะปกติหลังฝากชั่วคราวในท่อนำไข่กระต่ายเป็นเวลานาน 48, 72, 96 และ 120 ชม

## รายการสัญญลักษณ์และคำย่อ

กก = กิโลกรัม
ชม = ชั่วโมง
ซม = เซนติเมตร
มล = มิลลิลิตร
ไอยู = อินเตอร์เนชั่นแนล ยูนิต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# การศึกษาการเจริญของตัวอ่อนสุกรภายหลังฝากชั่วคราวในท่อนำไข่กระต่ายและนำฝากในสุกรตัวรับ

# (Development of pig embryo in oviduct of rabbit after a short time incubation and retransfer to proper recipient)

**มงคล เตชะกำพุ, วิชัย พันตศุภารักษ์,**
**วันเพ็ญ ศรีอนันต์ และ จินดา สิงห์ลอ**
ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทนำ

ปัญหาสำคัญในการนำเอาตัวอ่อนของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมาเลี้ยงนอกร่างกายมี 2 ประการ คือ ปัญหาประการที่หนึ่งคือการหยุดการเจริญเติบโตของตัวอ่อน ขณะเลี้ยงนอกร่างกายโดยเฉพาะตัวอ่อนระยะนอกร่างกาย โดยหากเลี้ยงเป็นเวลานาน มีผลต่อการเจริญของตัวอ่อนหลังการย้ายฝาก (Bowman and Mclaren, 1970; Adams, 1970; Renard, 1983) ตัวอ่อนที่เลี้ยงไว้ 24 ชม จะให้ผลของการตั้งท้องใกล้เคียงกับตัวอ่อนที่ย้ายฝากทันที ในขณะที่ทุก ๆ 24 ชม ที่เพิ่มขึ้นในการเลี้ยงตัวอ่อน พบว่าอัตราการเจริญจะลดลงประมาณ 30-40% จนไม่มีการเจริญเลยเมื่อทำการเลี้ยงนานถึง 96 ชม (Adams, 1970) รวมทั้งอัตราการเจริญในหลอดทดลองจะช้ากว่า เมื่อเทียบกับตัวอ่อนที่ยังคงอยู่ในท่อนำไข่หรือมดลูก (Hahn, 1982)

จากข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่า แม้มีการพัฒนาสภาพแวดล้อมของการเลี้ยงตัวอ่อนหรือน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนให้ดีเพียงใด ก็ไม่สามารถเลียนแบบสภาวะธรรมชาติของตัวอ่อนขณะที่อยู่ในท่อนำไข่และมดลูกของตัวแม่ได้ เนื่องจากภายในท่อนำไข่และมดลูกจะมีการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของสารคัดหลั่ง โปรตีน วิตามิน เกลือแร่ ต่าง ๆ

ที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญของตัวอ่อนตลอดเวลา ซึ่งสภาพเช่นนี้ไม่สามารถเลียนแบบให้เกิดขึ้นได้ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน

การนำตัวอ่อนของสัตว์ชนิดหนึ่งไปฝากในท่อนำไข่ของสัตว์อีกชนิดหนึ่ง ได้มีผู้ศึกษาในสัตว์ต่าง ๆ อาทิ Bavister and Minami (1986) ศึกษาพบว่าตัวอ่อนของหนูแฮมสเตอร์ที่เลี้ยงไว้ในท่อนำไข่ส่วน ampulla ของหนูเม้าส์ สามารถผ่านระยะหยุดตัวที่ 2 เซลล์ หรือ Hermann and Holtz (1985) รายงานการฝากตัวอ่อนสุกรเป็นผลสำเร็จในท่อนำไข่กระต่าย เป็นต้น วิธีนี้เป็นวิธีการหนึ่งที่ช่วยแก้ปัญหาการหยุดการเจริญเติบโตในหลอดทดลองที่ระยะ blocking stage ได้ ซึ่งพบเป็นสภาพปกติ เมื่อนำตัวอ่อนของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมาเลี้ยงไว้นอกร่างกาย อาทิ หากนำตัวอ่อนสุกรระยะ 1-4 เซลล์มาเลี้ยงไว้จะไม่มีการพัฒนาไปเป็นระยะ 8 เซลล์ หรือตัวอ่อนแกะหรือโคจะหยุดตัวที่ระยะ 16 เซลล์ เป็นต้น นอกจากนี้วิธีการดังกล่าวยังช่วยรักษาอัตรารอดของตัวอ่อน เมื่อต้องการเลี้ยงไว้เป็นระยะเวลานาน โดยพบว่าตัวอ่อนที่ผ่านการเลี้ยงในท่อนำไข่และนำกลับไปฝากในสัตว์ตัวรับที่เป็นชนิดเดียวกับตัวอ่อนสามารถพัฒนาต่อไปจนถึงเป็นตัวเต็มวัยได้ Boland (1984) ได้ให้ข้อสังเกตว่า อัตราการตั้งท้องหลังทำการย้ายฝากในสัตว์ตัวรับมีแนวโน้มสูงขึ้น หลังคัดเลือกเอาเฉพาะตัวอ่อนปกติที่ผ่านการเลี้ยงในท่อนำไข่กระต่ายไปย้ายฝาก ดังนั้นท่อนำไข่กระต่ายจึงเป็นเสมือนตู้อบที่มีชีวิต (in vivo incubator) สำหรับเลี้ยงตัวอ่อนชั่วคราวและคัดเลือกตัวอ่อนปกติไปในขณะเดียวกัน

การศึกษาการเลี้ยงตัวอ่อนสุกรในประเทศ พบว่าอัตรารอดของตัวอ่อนหากเลี้ยงไว้นาน 24 ชม มีถึง 100% (มงคล และคณะ, 2532) แต่ทั้งนี้ขึ้นกับระยะของตัวอ่อนและชนิดน้ำยาที่เลี้ยงตัวอ่อน โดยหากเลี้ยงไว้มากกว่า 24 ชม สำหรับตัวอ่อนระยะ 1-2 เซลล์ ก็พบปัญหาการหยุดตัวเช่นกัน นอกจากนี้การศึกษาของ มงคลและวิชัย(2534) พบว่าหากนำตัวอ่อนที่เลี้ยงไว้นอกร่างกาย ประมาณ 24 ชม ไปย้ายฝากสามารถทำให้เกิดการตั้งท้องและตัวอ่อนเจริญเป็นลูกสุกรปกติและมีอัตราการเจริญหลังคลอดปกติเช่นเดียวกัน การศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ตัวอ่อนสุกรและท่อนำไข่กระต่ายเป็นแบบในการวิจัย โดยมีจุดประสงค์คือ

1)พัฒนาการเลี้ยงตัวอ่อนสุกรให้มีระยะเวลานานและสามารถผ่านระยะหยุดตัวได้ โดยพัฒนาเทคนิคการฝากในท่อนำไข่ของกระต่าย

2)ศึกษาอัตราการรอดของตัวอ่อนหลังที่เลี้ยงไว้ชั่วคราวในระยะเวลาต่าง ๆ ตั้งแต่ 48-120 ชม

3)ศึกษาการเจริญต่อเนื่องหลังฝากในสุกรตัวรับ

ทั้งนี้เพื่อเป็นแนวทางการนำไปประยุกต์ใช้ในตัวอ่อนของสัตว์ชนิดอื่นและเป็นการรองรับเทคโนโลยีชีวภาพทางวิทยาการสืบพันธุ์ขั้นสูงต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

สุกร : ใช้สุกรสาวสามสายพันธุ์ (แลนด์เรซ × ลาร์จไวท์ × ดูร็อคเจอซี่) ก่อนวัยเจริญพันธุ์ น้ำหนักระหว่าง 90-100 กิโลกรัม จำนวนทั้งสิ้น 40 ตัว โดยแบ่งเป็นสุกรที่ใช้เก็บตัวอ่อนจำนวน 34 ตัว และสุกรที่เตรียมเป็นตัวรับตัวอ่อนหลังเก็บจากท่อนำไข่จำนวน 5 ตัว คัดสุกรดังกล่าวจากโรงเรือนสุกรขุนที่ทำการเลี้ยงรวมกันแบบคละเพศผู้และเพศเมีย มาตรฐานการคัดดูจากความสมบูรณ์พันธุ์ สุขภาพ และน้ำหนัก นำสุกรสาวดังกล่าวเข้าโรงเรือนทดลองโดยให้อาหาร วันละ 2 ครั้ง ๆ ละ 1 กิโลกรัม ในระดับโปรตีน 16% ขังสุกรสาวรวมกันครั้งละ 3-4 ตัว โดยให้ได้ใกล้ชิดกับพ่อพันธุ์ที่โตเต็มที่ตลอดเวลาจนกระทั่งเป็นสัด การกระตุ้นการเป็นสัดทำโดยการฉีดส่วนประกอบของฮอร์โมนแพร็กแนนแมร์ซีรั่ม โกนาโดโทรปิน และอิวแมนโครีออนิค โกนาโดโทรปิน ขนาดอัตราส่วน 400:200 ไอยู* แก่สุกรสาวหลังนำเข้าโรงเรือนประมาณ 3 วัน ทำการสังเกตอาการเป็นสัดวันละ 3เวลา เช้า (6.00 น) กลางวัน (12.00 น) และเย็น (17.00 น) โดยสังเกตการบวมแดงของอวัยวะสืบพันธุ์ภายนอก การมีเมือกเยิ้มบริเวณดังกล่าวและการยอมรับการกดหลังนิ่ง ทำการผสมสุกรที่เป็นสุกรที่เป็นตัวให้ตัวอ่อนโดยการผสมด้วยสุกรพ่อพันธุ์ที่ผ่านการทดสอบคุณภาพน้ำเชื้อด้วยวิธีการผสมแบบธรรมชาติ หรือการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อสดอย่างน้อยตัวละ 2 ครั้ง

---

*(PG 600®, Intervet, Holland)

ห่างกัน 8 ชม สุกรที่จัดเป็นตัวรับเป็นสุกรกลุ่มที่อยู่ในกลุ่มเดียวกับสุกรตัวให้แต่ไม่ได้ผสม ทำการบันทึกรายละเอียดช่วงเวลาระหว่างการฉีดฮอร์โมนถึงการเป็นสัด จำนวนครั้งในการผสม และเวลาในการผสมในแต่ละครั้ง

**การเก็บตัวอ่อน :** ทำการผ่าตัดและเก็บตัวอ่อน ณ ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาฯ ตำบลบ่อพลับ อำเภอเมือง จังหวัด นครปฐม วิธีการเก็บตัวอ่อนทำโดยการผ่าตัดเปิดช่องท้องและล้างท่อนำไข่เพื่อเก็บตัวอ่อน 2-2.5 วันหลังการผสมครั้งแรก ดังวิธีที่รายงานโดย มงคล และวิชัย (2534) โดยมีรายละเอียดพอสรุปได้ คือ

- อดอาหารและน้ำแก่สุกรเป็นเวลา 24 ชม ก่อนทำการผ่าตัดเก็บตัวอ่อน
- ฉีดยากล่อมประสาทชนิด Azaperone* เข้ากล้ามเนื้อหลังใบหูจำนวน 200 มก ต่อตัว หลังจากนั้นประมาณ 15 นาที ทำการฉีดยาชาเข้าไขสันหลังด้วย 2% xylocaine hydrochloride** จำนวน 6 มล เพื่อให้เกิดการชาบริเวณปั้นท้าย หลังจากนั้นให้ thiopentone Sodium เจือจาง 20% เป็นจำนวน 0.8 กรัมเข้าหลอดเลือดหลังใบหู และต่อท่อพลาสติกให้น้ำเกลือ 0.9% ปล่อยให้หยดช้า ๆ ขณะทำการผ่าตัด
- นำสุกรขึ้นเตียงผ่าตัดและควบคุมโดยรัดบริเวณปลายขาทั้ง 4 ข้าง
- โกนขนบริเวณหน้าท้องในระดับเต้านม 4 คู่สุดท้ายและทำการฆ่าเชื้อด้วยทิงเจอร์ไอโอดีนและแอลกอฮอลล์ 90%
- กรีดเปิดช่องท้องบริเวณ เต้านม 3 คู่สุดท้าย เปิดชั้นผิวหนัง เยื่อหุ้มไขมันกล้ามเนื้อ และเยื่อบุช่องท้อง
- ล้วงหามดลูก ท่อนำไข่และรังไข่ ตรวจสอบการมีการตกไข่และนับจำนวนการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน

- ทำการเก็บตัวอ่อนระยะแรก 1-4 เซลล์ (รูปที่ 1 และ 2) ซึ่งตามปกติจะยังอยู่ในท่อนำไข่โดยการตัดเอาท่อนำไข่ออกมาและล้างท่อนำไข่เพื่อตรวจหาตัวอ่อน วิธีการตัดท่อนำไข่ ทำโดยผูกเส้นเลือดที่มาเลี้ยงตัวอ่อนแต่ละเส้นโดยเริ่มจากบริเวณ

---

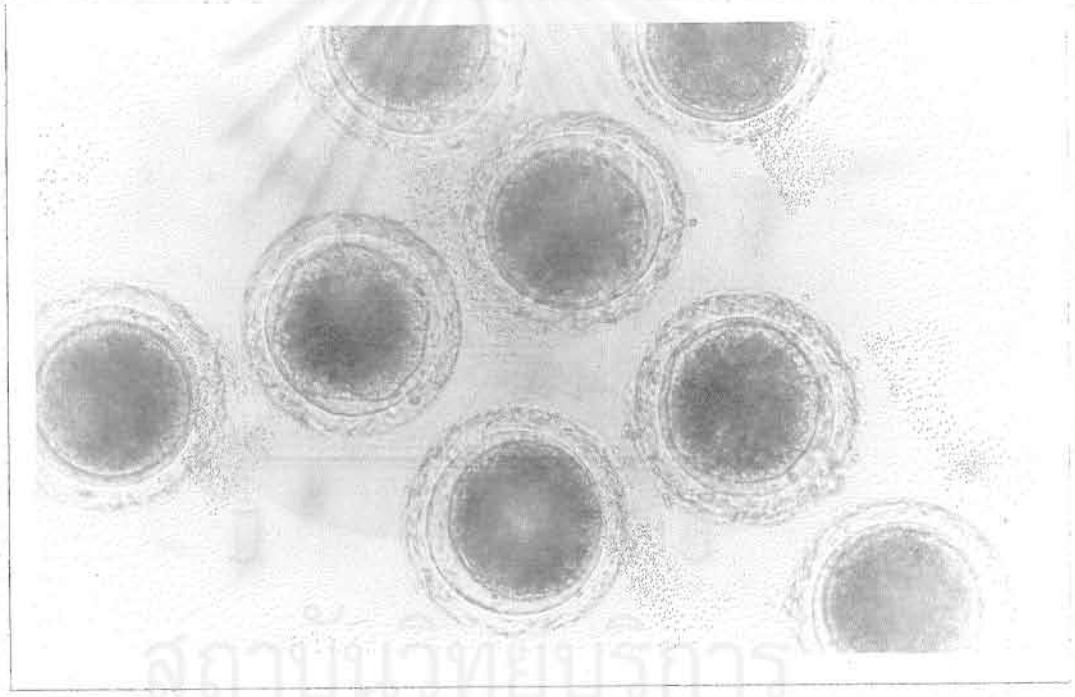
* Stresnil®, Janssen, Belgium]

** Rompun®, Bayer, South Korea

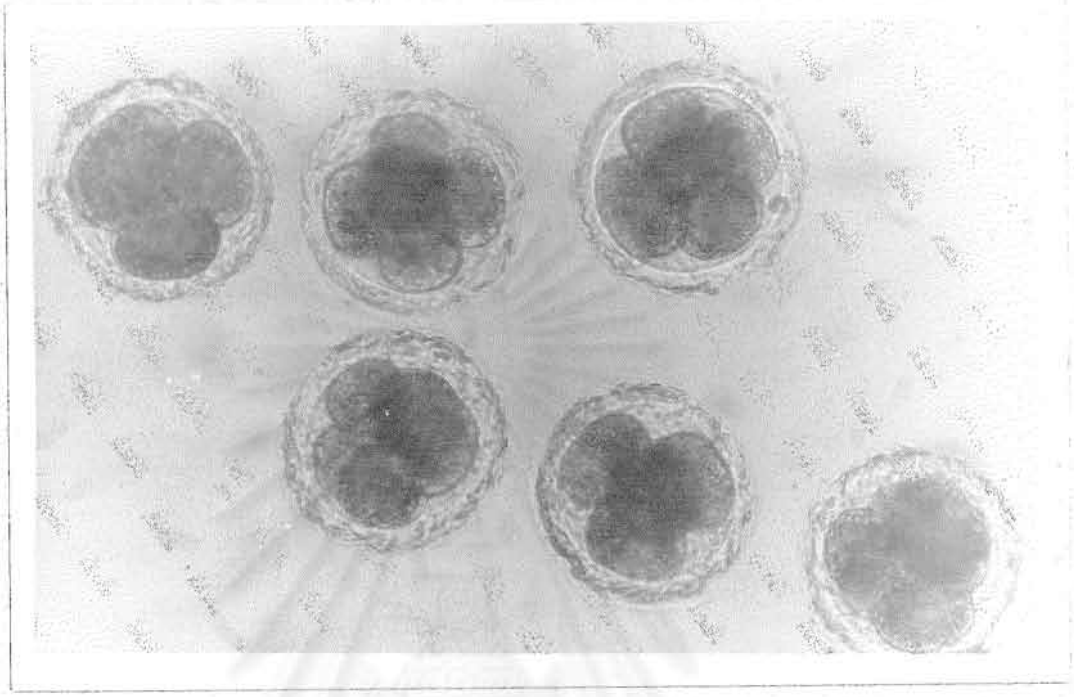
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ส่วนต่อของท่อนำไข่และมดลูก และไล่ผูกจนถึงปากแตร แล้วทำการตัดเลาะท่อนำไข่จากปากแตรจนถึงส่วนที่เชื่อมติดกับ มดลูก ทำการตัดท่อนำไข่ทั้ง 2 ข้าง (ซ้าย-ขวา) ด้วยวิธีเดียวกัน แช่ท่อนำไข่ที่ตัดในน้ำเกลือ 0.9% ที่อุ่นในจานทดลองและนำเข้าห้องปฏิบัติการเพื่อเก็บตัวอ่อน



รูปที่ 1 ตัวอ่อนระยะ 1 เซลล์เก็บจากท่อนำไข่สุกรประมาณ 2.0 วัน ก่อนการนำฝาก



รูปที่ 2 ตัวอ่อนระยะ 4 เซลล์เก็บจากท่อนำไข่สุกรประมาณ 2.5 วัน ก่อนการนำฝาก

– นำท่อนำไข่ทั้งซ้าย-ขวา ออกมาตัดแต่งเลาะเอาไขมันที่ติดอยู่และยืดเป็นเส้นตรงจากปากแตรจนถึงส่วนต่อระหว่างท่อนำไข่และมดลูก ซับเอาเลือดที่ติดออก สอดเข็มตัดปลายเบอร์ 18 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเข้าทางปากแตรและไล่น้ำยาล้างตัวอ่อนชนิด TALP 2.5 mm HEPES* จำนวนข้างละ20 มล ลงในจานทดลองพลาสติก ทำการส่องตรวจหาตัวอ่อนภายใต้กล้องสเตริโอ กำลังขยาย 10 เท่า ตัวอ่อนที่พบนำมาเก็บไว้ในน้ำยาชนิดเดียวกัน และตรวจความปกติภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ล้าง

---

*Gibco, USA

ตัวอ่อนที่ปกติ 1 ครั้งในน้ำยาชนิดเดียวกันและเก็บไว้ในน้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อนชนิด B2* ที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีความชื้นเต็มที่ และภายใต้บรรยากาศของ 5% $CO_2$ ในอากาศ

- ระยะเวลาตั้งแต่ผ่าตัดจนถึงตรวจพบตัวอ่อนใช้เวลาประมาณ 30 นาที

**การนำตัวอ่อนฝากในท่อนำไข่กระต่าย:** คัดเลือกกระต่ายเพศเมีย พันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ ที่โตเต็มที่ อายุ 5 เดือนขึ้นไป น้ำหนัก 2.0 กก นำมาเลี้ยงไว้โดยแยกขังเดี่ยว ประมาณ 2-3 สัปดาห์ โดยให้อาหารและน้ำเต็มที่ ทำการฝากตัวอ่อนโดยทำการวางฉีดยากล่อมประสาท ที่มีส่วนผสมของ ketamine hydrochloride** จำนวน 20 มก และ xylazine hydrochloride จำนวน 8 มก เข้ากล้าม หลังจากนั้น 15 นาที ฉีด thiopentone ขนาดความเข้มข้น 20% จำนวน 20 มก เข้าเส้นเลือดบริเวณใบหู ทำการผ่าเปิดช่องท้องกระต่ายกลางลำตัวต่ำจากสะดือประมาณ 3-4 ซม ความยาวของแผลประมาณ 5-7 ซม แหวกอวัยวะภายในคือลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่และกระเพาะปัสสาวะ รวมทั้งด่างผนังช่องท้องจนถึงมดลูกและท่อนำไข่ ผูกบริเวณส่วนเชื่อมต่อระหว่างท่อนำไข่และมดลูก (utero-tubal junction)เป็นอย่างแรก แล้วทำการตรวจความปกติของท่อนำไข่และรูเปิดของท่อนำไข่ผ่านทางปากแตร โดยสอด forceps ขนาดเล็กเข้าไปในท่อนำไข่เพื่อเป็นการคาดคะเนการนำเอาท่อ catheter ที่บรรจุตัวอ่อนเข้าไปสอดท่อ catheter ชนิดโปลีเอทีลีน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม ยาวประมาณ 15 ซม ที่มีน้ำยา B2 และตัวอ่อนบรรจุอยู่ในปริมาตรประมาณ 10 ไมโครลิตร

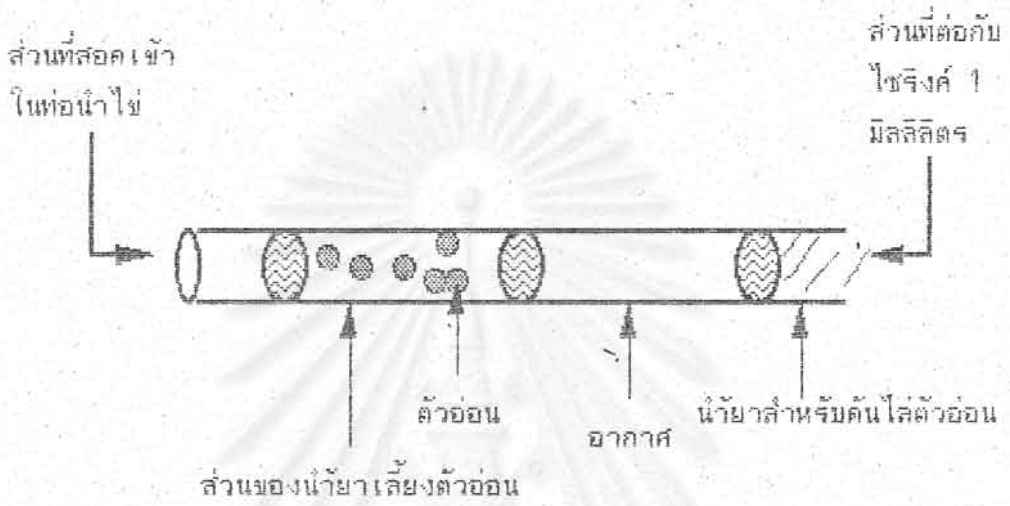
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

---

* B2 = Menezo, France

** Ketalar® ,50mg/ml Parke-Davis, USA

ภาพการบรรจุตัวอ่อนในท่อโปลีเอทีลีนแสดงในรูปที่ 3




รูปที่ 3 ภาพแสดงการบรรจุตัวอ่อนในท่อโปลีเอทีลีน

การผ่านท่อดังกล่าวเข้าทางปากแตรด้วยความระมัดระวัง เข้าไปประมาณ 2.0-2.5 ซม จากปากแตร โดยพยายามไม่จับบริเวณปากแตรเพื่อป้องกันการแตกของเส้นเลือดที่มาเลี้ยงบริเวณนั้น ทำการหนีบท่อโปลีเอทีลีนพร้อมท่อนำไข่ด้วยคีมหนีบเส้นเลือดชนิดพิเศษจำนวน 2 เปลาะ เทคนิคการฝากได้รายงานโดย Techakumphu (1985) หลังทำการฝากแล้วราดน้ำเกลือ 0.9% อุ่น ลงบนผ้าซับเลือดที่คลุมอวัยวะสืบพันธุ์ทั้งหมดไว้และโรยผงยาปฏิชีวนะ ชนิดเพนนิซิลลินและสเตปโตมัยซิน แล้วเย็บปิดช่องท้อง ขั้นตอนของเทคนิคการฝากตัวอ่อนในท่อนำไข่กระต่ายแสดงในรูปที่ 4,5,6,7 ทำฝากตัวอ่อนสุกรในท่อนำไข่เป็นระยะเวลานาน 48, 72,96 และ 120 ชม แล้วล้างเอาตัวอ่อนจากท่อนำไข่ หลังทำการฆ่ากระต่าย การล้างตัวอ่อนทำโดยตัดเอาส่วนมดลูกและท่อนำไข่ออกจากตัวกระต่ายทันทีภายหลังฆ่า เลาะเอาไขมันที่ล้อมรอบและทำการยืดท่อนำไข่เป็นแนวตรง ตัดเอาไหมที่ผูกบริเวณส่วนต่อของท่อนำไข่และมดลูกออก แล้วตัดมดลูกให้เหลือห่างจากส่วนต่อของท่อนำไข่และมดลูกประมาณ 3 ซม ทำการสอดเข็มตัวปลายเบอร์ 21 เข้าทางมดลูกและผ่านเข้าไปในท่อนำไข่ส่วนปลาย (isthmus) ไล่น้ำยาล้างตัวอ่อน

ชนิด TALP 2.5 mm HEPES อย่างช้า ๆ ลงบนจานทดลอง นำมาตรวจหาตัวอ่อนใต้กล้องสเตริโอ กำลังขยาย 10 เท่า บันทึกจำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้ จำนวนตัวอ่อนปกติ และระยะของตัวอ่อนที่พัฒนาขณะอยู่ในท่อนำไข่

แบ่งการศึกษาเป็น 2 ระยะ คือ

1. ศึกษาผลของระยะเวลาในการเลี้ยงตัวอ่อนสุกรชั่วคราวจำนวนตัวอ่อนปกติและระยะของตัวอ่อนที่ได้ โดยใช้เวลานาน 48, 72, 96 และ 120 ชม

2. ศึกษาการเจริญต่อเนื่องของตัวอ่อนดังกล่าวในข้อ 1 โดยนำฝากในสุกรตัวรับที่มีระยะเวลาของวงจรการเป็นสัดใกล้เคียงกับตัวอ่อน (อายุของตัวอ่อนเริ่มต้นรวมกับระยะเวลาที่อยู่ในท่อนำไข่ของกระต่าย)

**การประเมินคุณภาพของตัวอ่อน:** ศึกษาการพัฒนาของตัวอ่อนภายหลังที่เลี้ยงชั่วคราวในท่อนำไข่กระต่าย โดยดูจากการแบ่งเซลล์และการเจริญเป็นตัวอ่อนระยะมอรูล่าและระยะบลาสโตซีส โดยอาศัยหลักเกณฑ์การเจริญปกติของตัวอ่อนสุกรตามธรรมชาติที่ได้มีการศึกษามาก่อนนี้(Oxenreider and Day, 1965) คือ

ก. หากเลี้ยงนาน 48 ชม ตัวอ่อนควรมีการแบ่งตัวอย่างน้อย 2 รอบเซลล์ (cell cycle) เช่นจากระยะเริ่มต้นที่ 1-2 เซลล์ เป็นระยะ 4-8 เซลล์ หรือจากระยะเริ่มต้น 4 เซลล์ เป็นระยะ 16 เซลล์ ถึงระยะมอรูล่า (morula) เป็นต้น

ข. หากเลี้ยงนาน 72 ชม ตัวอ่อนควรมีการแบ่งตัวอย่างน้อย 3 รอบเซลล์ (cell cycle) เช่นจากระยะเริ่มที่ 1-2 เซลล์ เป็นระยะ 8-16 เซลล์ หรือมากกว่า

ค. หากเลี้ยงนาน 96 ชม ตัวอ่อนควรมีการแบ่งตัวอย่างน้อย 4 รอบเซลล์ (cell cycle) เช่นจากระยะเริ่มที่ 1-2 เซลล์ เป็นระยะมอรูล่าหรือ บลาสโตซีส (blastocyst)

ง. หากเลี้ยงนาน 120 ชม ตัวอ่อนควรมีการเจริญเป็นระยะบลาสโตซีส (blastocyst)

**การฝากตัวอ่อนในสุกรตัวรับ:** สุกรตัวรับเป็นสุกรสาวที่มีวงจรการเป็นสัดใกล้เคียงกับอายุของตัวอ่อน ทำการฝากโดยวิธีการผ่าตัดเปิดช่องท้องแนวกลางลำตัว โดยมีขั้นตอนคือ

-วางยาสลบสุกรด้วยวิธีเช่นเดียวกับการวางยาสลบสุกรตัวให้ตัวอ่อน

-เปิดช่องท้องบริเวณเต้านม 3 คู่สุดท้าย จากชั้นผิวหนังจนถึงเยื่อบุช่องท้อง ตรวจการตกไข่ ความยาวของแผลประมาณ 4 ซม

- กรณีเป็นตัวอ่อนระยะ 4-8 เซลล์ จะทำการฝากในท่อนำไข่ดังวิธีของมงคลและวิชัย (2534) โดยบรรจุตัวอ่อนสุกรในท่อโปลีเอทีลีนต่อด้วยกระบอกฉีดยาขนาด 1 มล ดูดน้ำยาพร้อมตัวอ่อนไม่เกิน 30 ไมโครลิตร สอดท่อผ่านปากแตรเข้าไปประมาณ 5 ซม หนีบท่อโปลีเอทีลีนผ่านท่อนำไข่ข้างใดข้างหนึ่งด้วยที่หนีบเส้นเลือด 2 เปลาะ ไล่ตัวอ่อนออกจากท่อโปลีเอทีลีนอย่างช้า ๆ หลังจากนั้นค่อย ๆ เอาท่อโปลีเอทีนออก โรยผงเพนนิซิลลิน-สเตรปโตมัยซิน ทำการเย็บปิดช่องท้องและฉีดยาปฏิชีวนะติดต่อกัน 3 วัน สำหรับตัวอ่อนที่มีระยะมากกว่า 8 เซลล์ ทำการฝากในมดลูกโดยตรง โดยผ่านเข้ามดลูกทางท่อโปลีเอทีลีนที่มีตัวอ่อนบรรจุอยู่

ตรวจตั้งท้องทุก 21 วัน โดยดูจากอาการกลับเป็นสัด และตรวจด้วยเครื่องตรวจท้องชนิด Doppler และ A mode (amplitude) และการทำ laparotomy

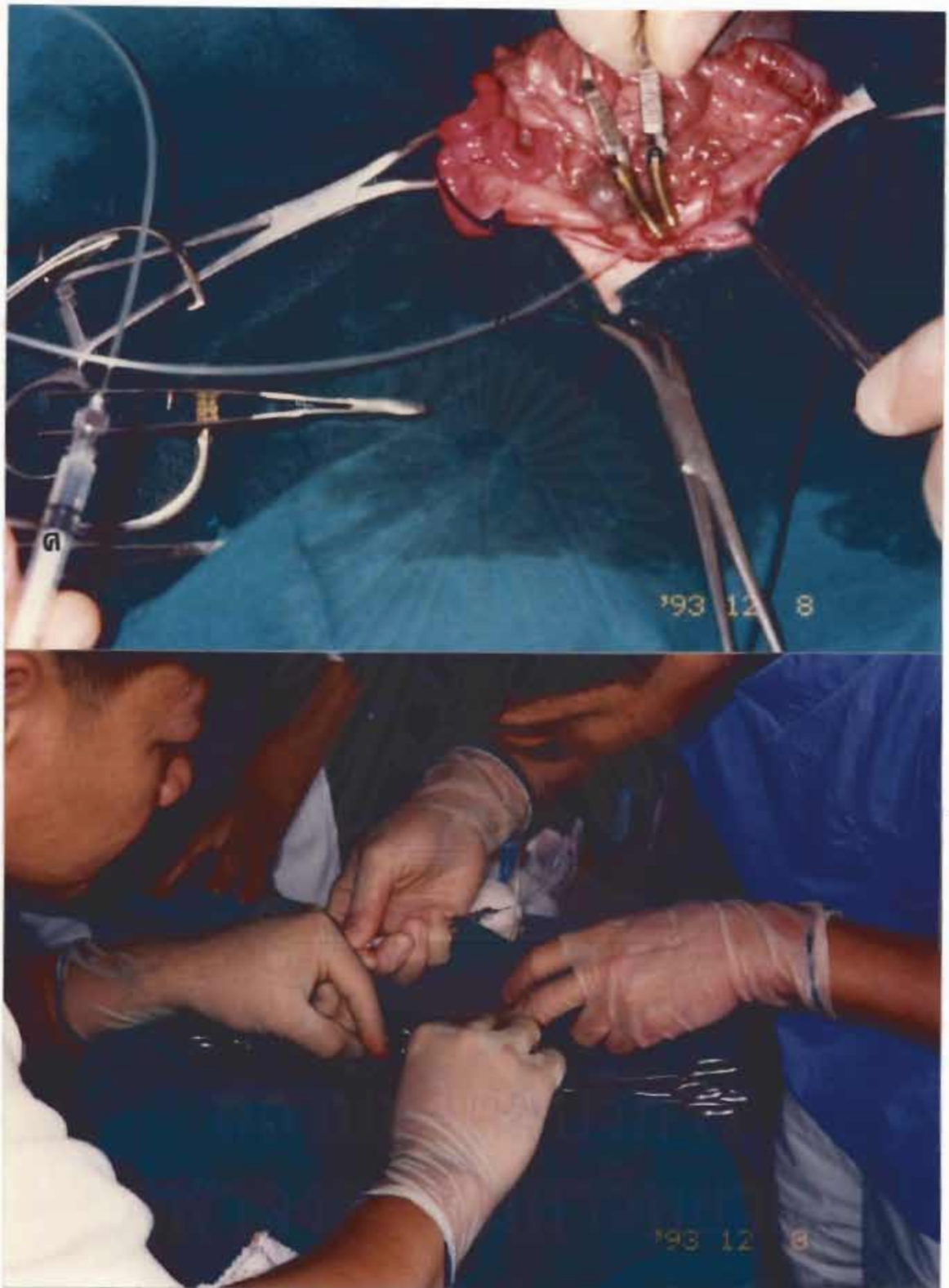
**การประเมินผลการทดลอง**

จากข้อมูลและผลทดลองคือ

1. จำนวนตัวอ่อน และตัวอ่อนปกติที่ได้หลังฝากในท่อนำไข่กระต่าย
2. ระยะของตัวอ่อนที่มีการพัฒนาในท่อนำไข่ของกระต่าย
3. อัตราการตั้งท้องและจำนวนลูกสุกรคลอด

รูปที่ 4 การสอดท่อโปลีเอทีลีนเข้าทางปากแตรของท่อน้ำไข่

รูปที่ 5 การหนีบท่อน้ำไข่ด้วยคีมหนีบเส้นเลือด




รูปที่ 6 ภาพรวมของการฝากตัวอ่อนในท่อนำไข่กระต่าย

ก) คีมหนีบท่อนำไข่ 2 เปลาะ

ข) ท่อโปลีเอทีลีนที่บรรจุตัวอ่อนสุกร

ค) ไซริงค์ที่ต่อกับท่อโปลีเอทีลีน

รูปที่ 7 การไล่ตัวอ่อนจากท่อโปลีเอทีลีนโดยผ่านไซริงค์ 1 มล

ผลการศึกษา

1) ผลการเก็บตัวอ่อนหลังฝากในท่อนำไข่ที่ไม่ได้ผูกที่ส่วนเชื่อมท่อนำไข่กับมดลูก

จากการฝากตัวอ่อนสุกรในท่อนำไข่กระต่าย ที่ไม่ได้ผูกบริเวณส่วนเชื่อมท่อนำไข่และมดลูกพบว่ามีเพียง 5% ของตัวอ่อนเท่านั้นที่ตรวจพบและตัวอ่อนมีลักษณะเสื่อมสลาย (ตารางที่ 1 )

**ตารางที่ 1:** ผลการเก็บตัวอ่อนหลังฝากในท่อนำไข่ที่ไม่ได้ผูกที่ส่วนเชื่อมท่อนำไข่กับมดลูก

| จำนวนตัวอ่อนที่ย้ายฝาก | | | จำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้ | | |
|---|---|---|---|---|---|
| ซ้าย | ขวา | รวม | ซ้าย | ขวา | รวม |
| 10 | 11 | 21 | 0 | 1(5%) | 0 |

2) ผลการย้ายฝากตัวอ่อนสุกรในท่อนำไข่กระต่ายนาน 48 ชม

การฝากตัวอ่อนนาน 48 ชม จำนวน 6 ครั้งพบว่าอัตราการเก็บตัวอ่อนเฉลี่ยเท่ากับ 46% ในท่อนำไข่ข้างซ้ายและ 60% ในท่อนำไข่ข้างขวาคิดเป็นอัตราเฉลี่ยเท่ากับ 52% (68/131) โดยพบว่ามีการผันแปรในอัตราการเก็บตัวอ่อนระหว่า 8.3% จนถึงสูงสุด 88% (ตารางที่ 2) ในส่วนตัวอ่อนปกติพบว่ามีอัตราเฉลี่ยคิดจากตัวอ่อนทั้งหมดที่เริ่มย้ายฝากเท่ากับ 47% (ข้างซ้าย = 41%, ข้างขวา = 54%) และเท่ากับ 90% (ข้างซ้าย = 88%, ข้างขวา = 91%) เมื่อคำนวณเฉพาะตัวอ่อนที่เก็บได้ ตัวอ่อนปกติจะมีการเจริญเป็นระยะ 4-8 เซลล์ หากเริ่มต้นที่ระยะ 1-2 เซลล์และตัวอ่อนสามารถพัฒนาได้ถึง 16 เซลล์ หากเริ่มต้นที่ระยะ 4-6 เซลล์ (ตารางที่ 3) เป็นที่น่าสังเกตว่าจากการทดลองครั้งที่ 3 ได้ใช้ตัวอ่อนระยะ 1 เซลล์เริ่มต้น ตัวอ่อนที่เก็บได้น้อยมากเพียง 1 ใบเท่านั้น หรือการทดลองครั้งที่ 5 ใช้ตัวอ่อนระยะเริ่มต้น เป็นตัวอ่อนระยะ 1 เซลล์ จำนวน 15 ใบและตัวอ่อนระยะ 2 เซลล์ จำนวน 3 ใบ ได้เปอร์เซนต์การเก็บตัวอ่อนเพียง 25% หากคำนึงถึงระยะตัวอ่อนที่ย้ายฝากพบว่า 51% เจริญเป็นตัวอ่อนระยะ 4 เซลล์ (รูปที่ 8) อีก 18% เจริญเป็นตัวอ่อนระยะ 6-8 เซลล์ 21% เป็นตัวอ่อนที่เจริญเป็นระยะ 16 เซลล์หรือตัวอ่อนระยะ early morula ส่วนอีก 10%

พบเป็นตัวอ่อนที่เสื่อมสลาย (รูปที่ 9, 10) ตัวอ่อนที่ได้จะมีชั้นเปลือกที่เรียกว่า mucin coat ล้อมรอบชั้น zona pellucida อีกชั้นหนึ่ง

**ตารางที่ 2:** ผลการย้ายฝากตัวอ่อนสุกรในท่อนำไข่กระต่ายนาน 48 ชม

| การทดลองครั้งที่ | จำนวนตัวอ่อนที่ย้ายฝาก | | | จำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้จากท่อนำไข่กระต่าย | | | จำนวนตัวอ่อนปกติ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ซ้าย | ขวา | รวม | ซ้าย | ขวา | รวม (%) | ซ้าย | ขวา | รวม (%) |
| 1 | 14 | 11 | 25 | 5 | 8 | 13 (52%) | 4 | 8 | 12 (92%) |
| 2 | 13 | 12 | 25 | 11 | 11 | 22 (88%) | 10 | 10 | 20 (91%) |
| 3 | 12 | - | 12 | 1 | - | 1 (8.3%) | 0 | - | 0 |
| 4 | 12 | 12 | 24 | 8 | 8 | 16 (67%) | 8 | 8 | 16 (100%) |
| 5 | 15 | 13 | 28 | 2 | 5 | 7 (25%) | 1 | 5 | 6 (86%) |
| 6 | 8 | 9 | 17 | 7 | 2 | 9 (53%) | 7 | - | 7 (100%) |
| รวม | 74 | 57 | 131 | 34 | 34 | 68 | 30 | 31 | 61 |
| $(\%)^{ก}$ | | | | 46% | 60% | 52% | 41% | 54% | 47% |
| $(\%)^{ข}$ | | | | | | | 88% | 91% | 90% |

$(\%)^{ก}$ = อัตราส่วนคำนวณจากจำนวนตัวอ่อนที่ทำการย้ายฝาก

$(\%)^{ข}$ = อัตราส่วนคำนวณจากจำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้ภายหลังฝากในท่อนำไข่กระต่าย

ตารางที่ 3: ลักษณะของตัวอ่อนที่ได้หลังเก็บจากท่อนำไข่นาน 48 ชม

| การทดลอง | ระยะตัวอ่อนเริ่มต้น | จำนวนตัวอ่อน | ตัวอ่อนที่พัฒนาในท่อนำไข่ | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 4 เซลล์ | 6-8 เซลล์ | ≥16เซลล์ | เสื่อมสลาย |
| 1 | 2-4 เซลล์ | 13 | 3 | 2 | 7 | 1 |
| 2 | 1-2 เซลล์ | 22 | 18 | 2 | - | 2 |
| 3 | 1 เซลล์ | 1 | - | - | - | 1 |
| 4 | 1-2 เซลล์ | 16 | 8 | 8 | - | - |
| 5 | 1-2 เซลล์ | 7 | 6 | - | - | 1 |
| 6 | 4-6 เซลล์ | 9 | - | - | 7 | 2 |
| **รวม** | | **68** | **35(51%)** | **12(18%)** | **14(21%)** | **7(10%)** |

3) <u>ผลการย้ายฝากตัวอ่อนสุกรในท่อนำไข่กระต่ายนาน 72 ชม</u>

ผลการฝากตัวอ่อนสุกรในท่อนำไข่กระต่ายนาน 72 ชม จำนวน 4 การทดลอง ได้อัตราการเก็บตัวอ่อนอยู่ระหว่าง 52-73% เฉลี่ยเท่ากับ 60% (57/95) เป็นอัตราการเก็บในด้านซ้ายเท่ากับ 68% และข้างขวาเท่ากับ 52% อัตราของตัวอ่อนปกติเฉลี่ยเท่ากับ 47% หากคิดจากตัวอ่อนที่ย้ายฝาก และเป็น 79% หากคำนวณจากจำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้ โดยเป็นอัตราซ้ายเท่ากับ 81% และอัตราขวาเท่ากับ 76% ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ในส่วนคุณภาพของตัวอ่อนที่เก็บได้พบว่าตัวอ่อนระยะ 1-4 เซลล์ สามารถพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะ early morula และระยะ morula เท่ากับ 26% ระยะ early blastocyst เท่ากับ 21% และอีก 26% เป็นตัวอ่อนที่ไม่พัฒนาตัวและเกิดการเสื่อมสลาย (ตารางที่ 5) รูปของตัวอ่อนหลังฝากในท่อนำไข่กระต่ายนาน 72 ชม แสดงในรูปที่ 11 ในการศึกษากลุ่มนี้ได้ทดลองเลี้ยงตัวอ่อนระยะ blastocyst ในหลอดเลี้ยงตัวอ่อนอีก 48 ชม พบว่าตัวอ่อนเกิดการเสื่อมสลายทั้งหมด (รูปที่ 12)

I19525412

**ตารางที่ 4:** ผลการย้ายฝากตัวอ่อนสุกรในท่อนำไข่กระต่ายนาน 72 ชม

| การทดลองครั้งที่ | จำนวนตัวอ่อนที่ย้ายฝาก | | | จำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้จากท่อนำไข่กระต่าย | | | จำนวนตัวอ่อนปกติ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ซ้าย | ขวา | รวม | ซ้าย | ขวา | รวม (%)ก | ซ้าย | ขวา | รวม (%)ข |
| 1 | 14 | 14 | 28 | 11 | 6 | 17 (67%) | 10 | 5 | 15 (88%) |
| 2 | 13 | 14 | 27 | 7 | 7 | 14 (52%) | 7 | 6 | 13 (93%) |
| 3 | 13 | 12 | 25 | 9 | 6 | 15 (60%) | 4 | 3 | 7 (47%) |
| 4 | 7 | 8 | 15 | 5 | 6 | 11 (73%) | 5 | 5 | 10 (68%) |
| รวม | 47 | 48 | 95 | 32 | 25 | 57 | 26 | 19 | 45 |
| (%)ก | | | | 68% | 52% | 60% | 55% | 40% | 47% |
| (%)ข | | | | | | | 81% | 76% | 79% |

(%)ก = อัตราส่วนคำนวณจากจำนวนตัวอ่อนที่ทำการย้ายฝาก

(%)ข =อัตราส่วนคำนวณจากจำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้ภายหลังฝากในท่อนำไข่กระต่าย

**ตารางที่ 5:** ลักษณะของตัวอ่อนหลังฝากในท่อนำไข่นาน 72 ชม

| การทดลอง | ระยะตัวอ่อนเริ่มจำนวน | | ตัวอ่อนที่พัฒนาในท่อนำไข่ | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ต้น | ตัวอ่อน | EM | M | EB | เสื่อมสลาย |
| 1 | 1-2 เซลล์ | 17 | 8 | 7 | - | 1 |
| 2 | 2-4 เซลล์ | 14 | 1 | 5 | 7 | 2 |
| 3 | 4-8เซลล์ | 15 | 1 | - | 3 | 1 |
| 4 | 2-4 เซลล์ | 11 | 5 | 3 | 2 | - |
| รวม | | 57 | 15(26%) | 15(26%) | 12(21%) | 15(26%) |

4) **ผลการย้ายฝากตัวอ่อนสุกรในท่อนำไข่กระต่ายนาน 96 ชม**

ผลของอัตราการเก็บตัวอ่อนหลังฝากนาน 96 ชม ได้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 58% (ซ้าย= 33%, ขวา= 71%) โดยมีค่าผันแปร เท่ากับ 29-77% จากการทดลอง 3 ครั้ง อัตราของตัวอ่อนปกติจากตัวอ่อนทั้งหมด เท่ากับ 39%(ซ้าย= 33%, ขวา= 42%) หรือเท่ากับค่าเฉลี่ย 68% (ซ้าย= 100%, ขวา= 59%) ตารางที่ 6 ตัวอ่อนที่เลี้ยงไว้นาน 96 ชม จะมีการพัฒนาสูงสุดเป็นระยะบลาสโตซีสและมีบางส่วนที่กำลังหลุดจากชั้นเปลือก รายละเอียดของระยะตัวอ่อนที่ได้เท่ากับ 3% สำหรับ early morula, 9% สำหรับตัวอ่อนระยะ morula, 18% สำหรับตัวอ่อนระยะ early blastocyst และ 35% สำหรับตัวอ่อนระยะ blastocyst ส่วนอีก 32% เป็นตัวอ่อนที่เกิดการเสื่อมสลาย (ตารางที่ 7) ลักษณะของตัวอ่อนที่เก็บได้แสดงในรูปที่ 13

**ตารางที่ 6:** ผลการย้ายฝากตัวอ่อนสุกรในท่อนำไข่กระต่ายนาน 96 ชม

| การทดลองครั้งที่ | จำนวนตัวอ่อนที่ย้ายฝาก | | | จำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้จากท่อนำไข่กระต่าย | | | จำนวนตัวอ่อนปกติ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ซ้าย | ขวา | รวม | ซ้าย | ขวา | รวม (%)[ก] | ซ้าย | ขวา | รวม (%)[ข] |
| 1 | - | 16 | 16 | - | 11 | 11 (69%) | - | 11 | 11 (100%) |
| 2 | 10 | 11 | 21 | 0 | 6 | 6 (29%) | 0 | 5 | 5 (83%) |
| 3 | 11 | 11 | 22 | 7 | 10 | 17 (77%) | 7 | 0 | 7 (41%) |
| รวม | 21 | 38 | 59 | 7 | 27 | 34 | 7 | 16 | 23 |
| **(%)[ก]** | | | | **33%** | **71%** | **58%** | **33%** | **42%** | **39%** |
| **(%)[ข]** | | | | | | | **100%** | **59%** | **68%** |

(%)[ก] = อัตราส่วนคำนวณจากจำนวนตัวอ่อนที่ทำการย้ายฝาก

(%)[ข] = อัตราส่วนคำนวณจากจำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้ภายหลังฝากในท่อนำไข่กระต่าย

**ตารางที่ 7:** ลักษณะของตัวอ่อนที่ได้หลังเก็บจากท่อนำไข่นาน 96 ชม

| การทดลอง | ระยะตัวอ่อนเริ่มต้น | จำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้ | ตัวอ่อนที่พัฒนาในท่อนำไข่ EM | M | EB | B+(HB) | เสื่อมสลาย |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 4-เซลล์ | 11 | - | 1 | 4 | 5+(1) | |
| 2 | 4-เซลล์ | 6 | 1 | 2 | - | 2 | 1 |
| 3 | 4-เซลล์ | 17 | | | 2 | 5 | 10 |
| รวม | | 34 | 1(3%) | 3(9%) | 6(18%) | 12+(1) (35%) | 11 (32%) |

## 5) ผลการย้ายฝากตัวอ่อนสุกรในท่อนำไข่กระต่ายนาน 120 ชม

ทดลองฝากตัวอ่อนในท่อนำไข่กระต่ายนาน 120 ชม จำนวน 1 ครั้ง จากตัวอ่อนทั้งหมด 28 ตัวอ่อน ไม่พบตัวอ่อนเลยหลังล้างจากท่อนำไข่ (ตารางที่ 8)

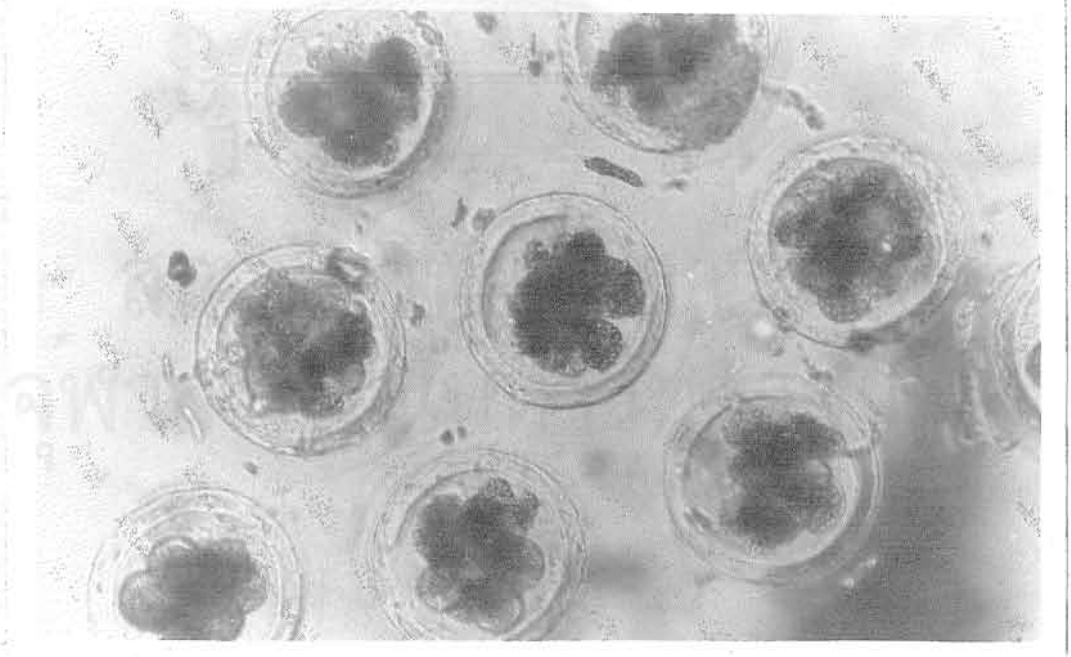
**ตารางที่ 8:** ผลการย้ายฝากตัวอ่อนสุกรในท่อนำไข่กระต่ายนาน 120 ชม

| การทดลอง ครั้งที่ | จำนวนตัวอ่อนที่ย้ายฝาก ซ้าย | ขวา | รวม | จำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้จากท่อนำไข่กระต่าย ซ้าย | ขวา | รวม (%)ก | จำนวนตัวอ่อนปกติ ซ้าย | ขวา | รวม (%)ข |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 14 | 14 | 28 | 0 | 0 | 0 | - | - | - |

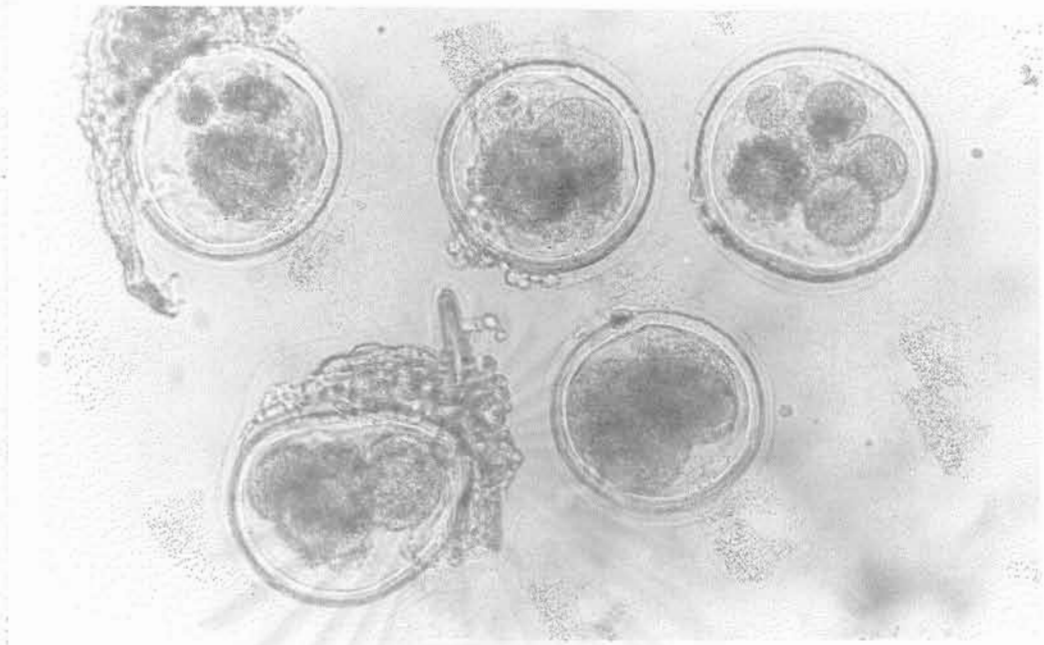
(%)ก = อัตราส่วนคำนวณจากจำนวนตัวอ่อนที่ทำการย้ายฝาก

(%)ข = อัตราส่วนคำนวณจากจำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้ภายหลังฝากในท่อนำไข่กระต่าย

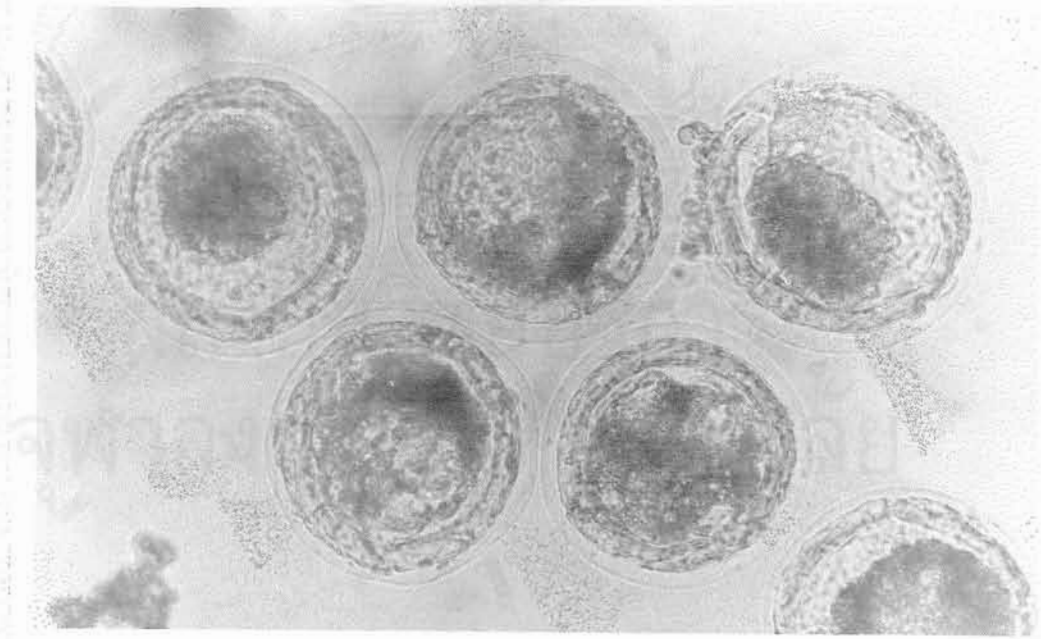
รูปที่ 8 ตัวอ่อนสุกระยะ 4 เซลล์จากระยะเริ่มต้น 1-2 เซลล์ จากการเลี้ยงในท่อนำไข่นาน 48 ชม จะมีชั้น mucin coat (M) ล้อมรอบชั้น zona pellucida (ZP) อีกชั้นหนึ่ง



รูปที่ 9 ตัวอ่อนสุกรหลังเลี้ยงในท่อนำไข่นาน 48 ชม บางตัวอ่อนสามารถเจริญเป็นระยะ 8 เซลล์ และระยะมอรูล่า



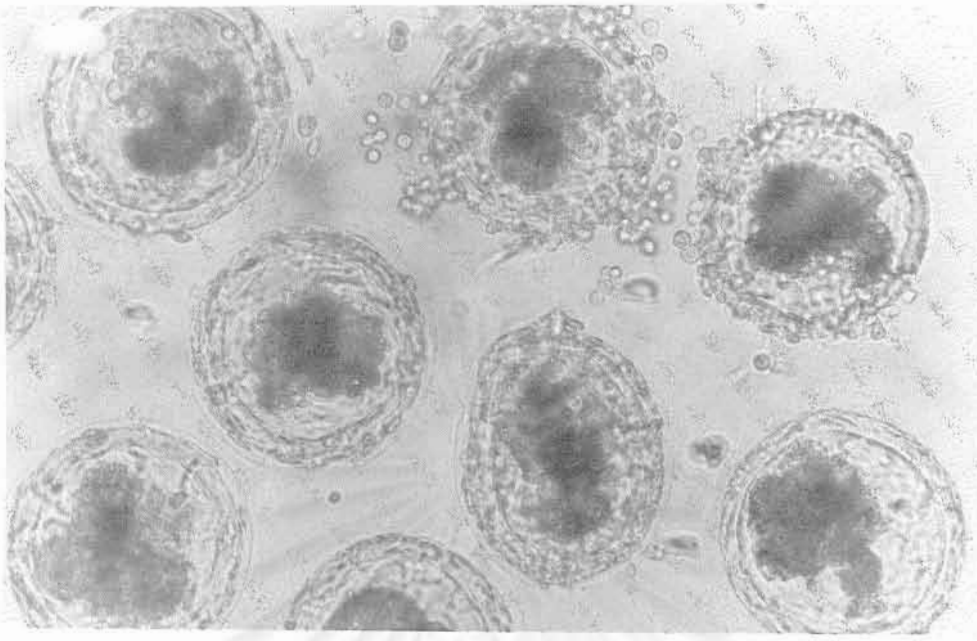
รูปที่ 10 ตัวอ่อนสุกรที่มีลักษณะเสื่อมสลาย หลังฝากไว้นาน 48 ชม



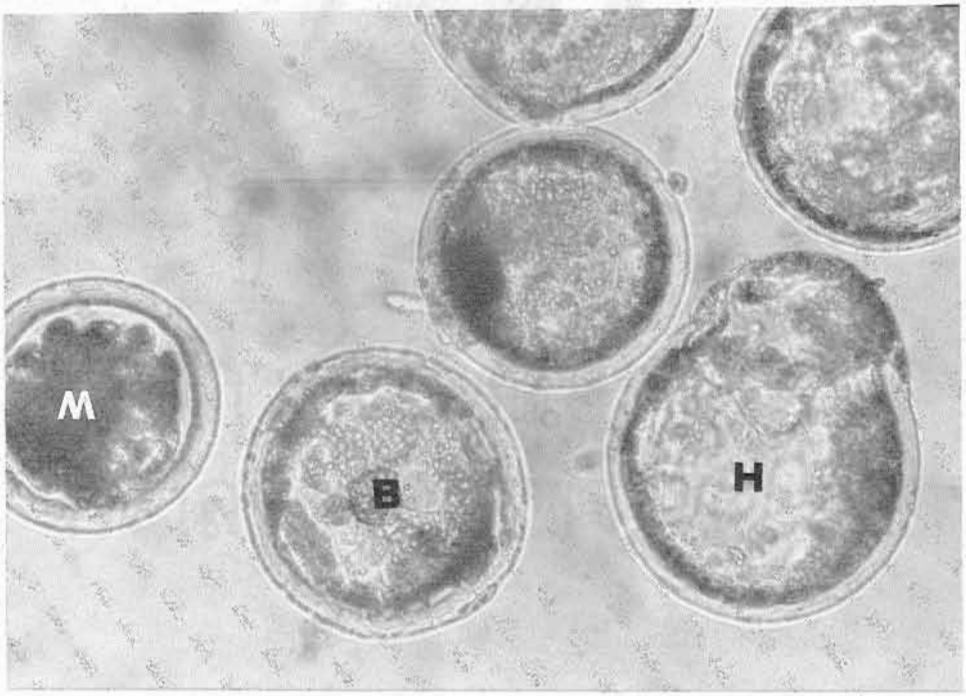
รูปที่ 11 ตัวอ่อนสุกรหลังเลี้ยงในท่อนำไข่นาน 72 ชม ตัวอ่อนเจริญเป็นระยะบลาสโตซีส

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





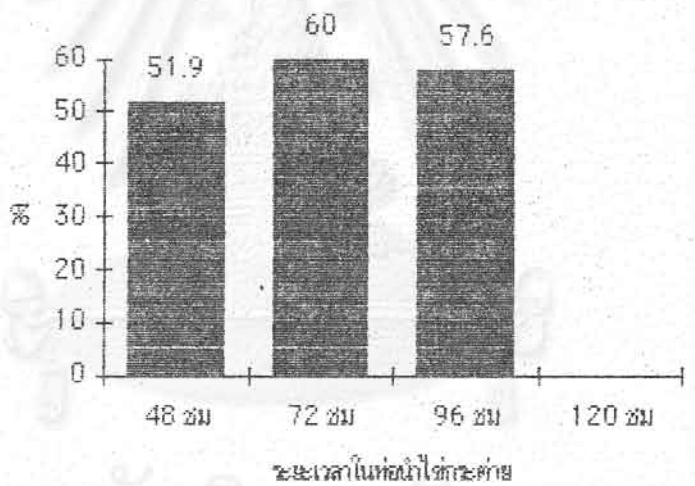
รูปที่ 12 ตัวอ่อนสุกรระยะบลาสโตซีสจากการเลี้ยงในท่อนำไข่นาน 72 ชม และนำมาเลี้ยงต่อในหลอดทดลองอีก 48 ชม แสดงลักษณะเสื่อมสลาย




รูปที่ 13 ตัวอ่อนสุกรหลังเลี้ยงในท่อนำไข่นาน 96 ชม บางตัวอ่อนสามารถเจริญเป็นระยะมอรูล่า(M) ระยะบลาสโตซีส (B) และระยะ hatching blastocyst (H)

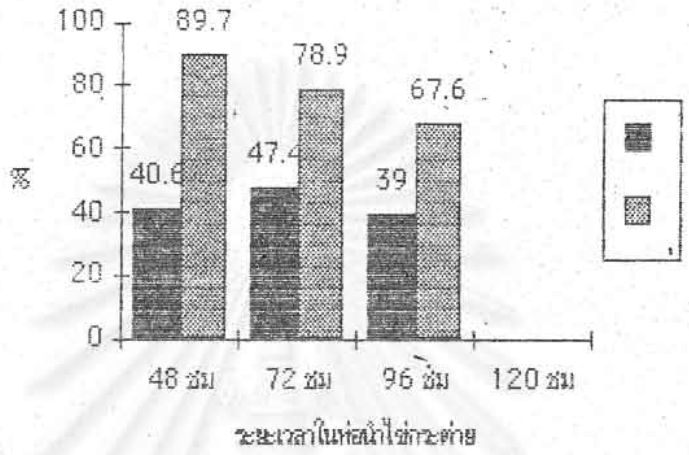
**6) ผลเปรียบเทียบอัตราการเก็บตัวอ่อนสุกรและอัตราตัวอ่อนปกติในท่อนำไข่กระต่ายนาน 48, 72, 96 ชม และ 120 ชม**

จากการเปรียบเทียบพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันในอัตราการเก็บตัวอ่อนที่ระยะเวลา 48-72-96 ชม คือเท่ากับ 52%, 60% และ 58% ตามลำดับ ในขณะที่หากเลี้ยงไว้นาน 120 ชม จะไม่พบตัวอ่อนเลย (รูปที่ 14)




รูปที่ 14 อัตราการเก็บตัวอ่อนหลังฝากชั่วคราวในท่อนำไข่กระต่ายเป็นเวลานาน 48, 72, 96 และ 120 ชม

อย่างไรก็ตามพบว่าอัตราของตัวอ่อนปกติมีแนวโน้มลดลงจาก 90% เมื่อฝาก 48 ชม เทียบกับ 79% ที่ 72 ชม และ 68% ที่ 96 ชม (รูปที่ 15)




รูปที่ 15 อัตราของตัวอ่อนที่มีลักษณะปกติหลังฝากชั่วคราวในท่อนำไข่กระต่ายเป็นเวลานาน 48, 72, 96 และ 120 ชม

**7) ผลการย้ายฝากในสุกรตัวรับ** (ตาราง ที่ 9)

จากการย้ายฝากในสุกรตัวรับ ที่มีวงจรการเป็นสัดใกล้เคียงกับตัวอ่อนโดยคิดรวมจากอายุตัวอ่อนที่เก็บมาและระยะเวลาที่อยู่ในท่อนำไข่ จำนวน 5 ตัว พบว่าสุกรตัวที่ 1, 2, 4 และ 5 แสดงอาการกลับเป็นสัดที่ 21 และ 22 วัน สุกรเบอร์ 3 ไม่แสดงอาการเป็นสัด ผลการตรวจท้องด้วยเครื่อง doppler ที่ 35 และ 42 วัน พบผลบวกจนเลยกำหนดวันคลอด แต่ผลการตรวจภายในด้วยกล้อง laparoscope พบว่าไม่ตั้งท้อง

**ตารางที่ 9** ผลการฝากตัวอ่อนในสุกรตัวรับ

| สุกร | จำนวนตัวอ่อน และลักษณะ ของตัวอ่อน | ระยะเวลา ที่อยู่ในท่อนำไข่ (ชม) | ผลการย้ายฝาก |
|---|---|---|---|
| 1 | 7 (คุณภาพไม่ดี) | 48 ชม | กลับสัดที่ 21 วัน |
| 2 | 16 (คุณภาพดี) | 48 ชม | กลับสัดที่ 21 วัน |
| 3 | 6 (คุณภาพดี) | 48 ชม | ไม่แสดงอาการเป็นสัดจนถึงกำหนด ระยะเวลาคลอดแต่ตรวจด้วย laparotomy ผลไม่ท้อง |
| 4 | 15 (5 ตัวอ่อนดี 10ตัวอ่อนไม่ดี) | 72 ชม | กลับสัดที่ 22 วัน |
| 5 | 10 (คุณภาพดี) | 72 ชม | กลับสัดที่ 21 วัน |

**บทวิจารณ์**

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าตัวอ่อนสุกร สามารถเจริญเติบโตในท่อนำไข่กระต่ายจากระยะหลังการปฏิสนธิจนถึงระยะมอรูล่า และระยะบลาสโตซีสได้โดยอัตราการเก็บตัวอ่อนที่เลี้ยงไว้เป็นเวลา 48 ถึง 96 ชม ได้ประมาณ 50% และอัตราของตัวอ่อนปกติในอัตราประมาณ 70-90% ในการศึกษานี้ได้มุ่งการพัฒนาเทคนิคการเลี้ยงตัวอ่อนโดยใช้ท่อนำไข่เป็นเสมือนตู้อบ (in vivo incubator) การศึกษาคุณภาพของตัวอ่อนหลังจากการย้ายฝากชั่วคราวดังกล่าวและการศึกษาถึงการเจริญต่อเนื่องหลังนำกลับไปฝากในสุกรตัวรับ

ในส่วนที่เกี่ยวกับเทคนิคการฝากตัวอ่อนของสัตว์ต่างชนิดในท่อนำไข่ ได้ดัดแปลงมาจากเทคนิคการย้ายฝากตัวอ่อนที่ทำในกระต่ายโดย Techakumphu (1985)โดยเน้นด้วยกัน 6 จุด เพื่อป้องกันการไหลกลับของตัวอ่อนผ่านทางปากแตร

และให้ตัวอ่อนอยู่ในท่อนำไข่เหลือเป็นจำนวนมากที่สุด คือ จุดแรกต้องควบคุมให้กระต่ายสลบลึกที่สุดในขณะทำการย้ายฝากตัวอ่อน จุดที่สองคือการควบคุมปริมาณของน้ำยาเพาะเลี้ยงและอากาศที่เข้าไปในท่อนำไข่ขณะทำการย้ายฝาก ได้ใช้ท่อพลาสติกอ่อน (teflon) ซึ่งสามารถสอดผ่านท่อนำไข่และโค้งงอได้ง่าย รวมทั้งเส้นผ่าศูนย์กลางขนาดเล็ก และดูดน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนให้น้อยที่สุดเท่าที่จะทำได้ ส่วนการควบคุมปริมาตรของอากาศนั้นได้ใช้ไซริงค์ขนาด 1 มล และพยายามให้อากาศเข้าไปน้อยที่สุดในขณะที่ดันตัวอ่อนจากท่อโปลีเอทีลีน อย่างไรก็ตามพบว่าในส่วนการควบคุมอากาศนี้เป็นจุดบกพร่องในการทดลองครั้งนี้ เนื่องจากไม่สามารถควบคุมปริมาณได้อย่างแน่นอน ในการศึกษาของ Techakumphu (1985) ได้ใช้ Hamilton syringe ซึ่งสามารถควบคุมปริมาตรอากาศและน้ำยาได้อย่างแน่นอน จุดที่สามคือการผูกท่อนำไข่เพื่อป้องกันการไหลเข้าของตัวอ่อนไปในมดลูก จากการศึกษาครั้งนี้เบื้องต้น พบว่าหากไม่ทำการผูกท่อนำไข่บริเวณส่วนต่อระหว่างท่อนำไข่และมดลูก (utero-tubal junction) เหนือขึ้นมาประมาณ 1-2 ซม จะพบตัวอ่อนเพียง 5% เท่านั้น ซึ่งเป็นตัวอ่อนที่อยู่ในมดลูกและตัวอ่อนมีลักษณะเสื่อมสลาย จากการศึกษาครั้งนี้ มีข้อสังเกตว่าสภาวะแวดล้อมภายในมดลูกไม่เหมาะสำหรับการเจริญของตัวอ่อนระยะแรก ๆ หลังการปฏิสนธิ นอกจากนี้จากการศึกษาส่วนตัว (1987) พบว่าไม่มีความจำเป็นที่ต้องผูกท่อนำไข่ทั้ง 2 ด้านคือที่ utero-tubal junction และบริเวณปากแตร เนื่องจากจะทำให้เกิดการอุดตันและผลทำให้มีการสะสมของของเหลวจำนวนมากจนเกิดสภาพการบวมน้ำ (edema) ของท่อนำไข่การศึกษาในกระต่าย ยิ่งกว่านั้นพบว่าหากให้ตัวอ่อนค้างอยู่ในท่อนำไข่เป็นระยะเวลานานจะไม่เอื้ออำนวยต่อการเจริญ และตัวอ่อนจะเกิดการเสื่อมสลายไปเป็นส่วนใหญ่ (Adams, 1973) จุดที่สี่คือ พยายามจับต้อง (manipulate) บริเวณมดลูกและท่อนำไข่ให้น้อยที่สุด เนื่องจากบริเวณดังกล่าวจะมีเส้นประสาทมาเลี้ยงเป็นจำนวนมาก(Black, 1974) การจับต้องมากจะเป็นการกระตุ้นเส้นประสาท และทำให้ตัวอ่อนอาจถูกบีบไล่ออกจากท่อนำไข่ทางปากแตรได้ เทคนิคในจุดนี้จำต้องอาศัยการเปิดแผลให้กว้างพอประมาณ 6-7 ซม และไม่จำต้องบีบกระเพาะปัสสาวะ เพื่อเอาปัสสาวะออกแม้ว่าจะไม่สะดวกต่อการย้ายฝากตัวอ่อน แต่จะช่วยปิดบริเวณท่อนำไข่ทันทีหลังทำการย้ายฝากซึ่งจะเป็นประโยชน์ใน

การลดการเคลื่อนไหวของท่อนำไข่และมดลูกขณะอยู่ในช่องท้องจุดที่ห้ามคือการสอดท่อโปลีเอทีลีนเข้าไปในท่อนำไข่เพียงระยะ 2-2.5 ซม จากปากแตร โดยไม่ต้องฝากเข้าไปลึกถึงท่อนำไข่ส่วน isthmus จากการศึกษาของ Techakumphu (1985) พบว่าเปอร์เซนต์การตั้งท้องจะลดลงหากฝากตัวอ่อนกระต่ายลึกเกินไป เนื่องจากจะต้องจับต้องท่อนำไข่มาก เนื่องจากตามลักษณะทางธรรมชาติของท่อนำไข่กระต่ายจะมีส่วนตรงจากปากแตรลงมาประมาณ 2-3 ซม แล้วจะโค้งเป็นแนวหักการฝากลึกจำเป็นต้องจับต้องท่อนำไข่มากและมักเกิดเลือดออก (Hemorrage) ทำให้เลือดปนกับน้ำยาแขวนลอยและตัวอ่อนด้วย รวมทั้งเกิดการกระตุ้นเส้นประสาทดังได้กล่าวไปแล้ว การศึกษาของ Boland (1984) พบว่า ตำแหน่งที่ดีที่สุดคือประมาณ 3.5 ซม จากปากแตร โดยได้อัตราการเก็บตัวอ่อนโคถึง 95%(21/22) จุดสำคัญจุดสุดท้ายคือ การหนีบท่อนำไข่ด้วยคีมหนีบเส้นเลือดชนิดความแรงอ่อนเพื่อป้องกันการไหลกลับของตัวอ่อน และพยายามนำท่อนำไข่ โดยจับที่คีมหนีบเข้าไปในช่องท้องทันทีเพื่อให้ตัวอ่อนเกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้อยที่สุด

อัตราการเก็บตัวอ่อนค่อนข้างผันแปรทั้งในกลุ่มที่เลี้ยงนาน 48 ชม หรือ 72 ชม หรือ 96 ชม โดยมีค่าต่ำที่สุดประมาณ 8% และสูงที่สุดถึง 88% ความผันแปรนี้เนื่องจากตัวกระต่ายเป็นสำคัญ เนื่องจากได้ใช้เทคนิคในการฝากเช่นเดียวกันทุกครั้ง ความผันแปรนี้แม้จะมีการควบคุมเทคนิคอย่างดีก็พบเช่นกัน (Techakumphu 1985) การศึกษานี้ ไม่พบความแตกต่างของอัตราเฉลี่ยของการเก็บตัวอ่อนระหว่างกลุ่มที่เลี้ยงไว้ในท่อนำไข่นาน 48, 72 หรือ 96 ชม ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Boland (1984) ที่ไม่พบความแตกต่างของอัตราการเก็บตัวอ่อนโคเมื่อฝากในท่อนำไข่กระต่ายนาน 20-36 ชม, 40-50 ชม, 65-75 ชม, 90-100 ชม ผู้วิจัยนี้ได้ยืนยันว่าตัวอ่อนจะมีการสูญหายไปประมาณ 15-30% ขณะฝากในท่อนำไข่ การสูญหายขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง อาทิเช่นจำนวนตัวอ่อนที่ฝาก ระยะเวลาในการฝาก ตำแหน่งที่ฝาก สภาวะแวดล้อมของท่อนำไข่กระต่ายขณะฝาก เป็นต้น จากเอกสารอ้างอิงโดยทั่วไปเสนอแนะให้ใช้กระต่ายที่มีสภาพท้องเทียม (pseudopregnancy) ที่เกิดหลังการผสมจากพ่อพันธุ์กระต่ายที่ทำการตัดท่อส่งน้ำเชื้อ (vasectomized buck) หรือหลังทำการฉีดฮอร์โมนชนิดลูติไนซิ่ง เช่น ฮิวแมนโคริโอนิค โกนาโดโทรปิน (HCG) เป็นต้น ในการศึกษานี้ได้ทดลอง 2

ครั้งในกลุ่ม 72 ชม โดยทำการฉีด HCG จำนวน 100 ไอยูเข้ากล้ามประมาณ 50 ชม ก่อนการนำฝาก จากการสังเกตพบก้อนเนื้อเหลือง (corpus lutea) ในกระต่ายทั้ง 2 ตัว ซึ่งแสดงสภาวะท้องเทียม แต่ผลการเก็บตัวอ่อนก็ไม่พบความแตกต่างกับการใช้กระต่ายที่ไม่ได้เตรียมการตั้งท้องเทียม ดังนั้นเป็นไปได้ว่าความผันแปรของอัตราการเก็บตัวอ่อนที่ได้ในแต่ละกลุ่มน่าจะเป็นสาเหตุจากตัวกระต่าย ร่วมกับความละเอียดของเทคนิคการฝากตัวอ่อน

ในสภาพปกติหลังจากการปฏิสนธิตัวอ่อนสุกร จะมีการพัฒนาตัวในช่วงแรกในท่อนำไข่จนถึงระยะ 4 เซลล์ ซึ่งใช้เวลาประมาณ 3 วัน และหลังจากนั้นตัวอ่อนจะเข้าไปในมดลูกเจริญเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสและฝังตัวในช่วง 14 ถึง 21 วัน การนำเอาตัวอ่อนก่อนหรือระยะ 4 เซลล์ออกมาจากท่อนำไข่หรือมดลูกมาเลี้ยงนอกร่างกายในหลอดทดลองมักพบปัญหาการหยุดพัฒนาของตัวอ่อน โดยจะมีตัวอ่อนเพียงส่วนน้อยหรือไม่มีเลยที่เจริญผ่านระยะ 4 เซลล์ (Polge & Frederick, 1968; Rundell and Vincent 1969; Pope & Day, 1970; 1977) ซึ่งสอดคล้องกับช่วงการเปลี่ยนแปลงภายในตัวอ่อนที่เรียกว่า "maternal-zygotic" ปรากฏการณ์เช่นนี้พบในการเลี้ยงตัวอ่อนของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเกือบทุกชนิดยกเว้นในหนูเม้าส์ ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าตัวอ่อนสุกรระยะ 1 ถึง 4 เซลล์ที่ล้างออกมาจากท่อนำไข่ของสุกรสาวที่ใช้ในการทดลองสามารถเจริญผ่านระยะหยุดตัวจนถึงระยะมอรูล่าและระยะบลาสโตซีสได้ การศึกษาครั้งนี้จึงสามารถแก้ปัญหาการหยุดตัวของตัวอ่อนในหลอดทดลองได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานทั่วไปในสัตว์ต่าง ๆ เช่น Agrawal et al. (1983) รายงานว่าตัวอ่อนของแพะสามารถเจริญ ได้ในท่อนำไข่กระต่าย เช่นเดียวกับในแกะ (Prather et al.,1991) หรือตัวอ่อนของโค (Lawson et al. 1972; Wall and Hawk, 1988) หรือในหนูเม้าส์ (Brinster et al., 1969) รวมทั้งในตัวอ่อนของสุกรเอง (Polge et al., 1972; Hermann and Holtz, 1985) การศึกษา Herrmann & Holtz (1985) ให้ข้อสังเกตว่าหากฝากตัวอ่อนระยะ 1 เซลล์ก่อนเกิดการแบ่งตัวในท่อนำไข่กระต่ายเป็นระยะนานเวลานาน 24-48 ชม จะได้อัตราการเก็บตัวอ่อนน้อยกว่าตัวอ่อนที่แบ่งเซลล์แล้วประมาณ 10-20% รวมทั้งอัตราของตัวอ่อนปกติที่เจริญในท่อนำไข่ การศึกษาครั้งนี้มีข้อสังเกตสอดคล้องกับรายงานดัง

กล่าวเพราะเมื่อฝากตัวอ่อนระยะ 1 เซลล์ เป็นที่น่าสังเกตว่าอัตราตัวอ่อนสุกรที่เจริญปกติมีแนวโน้มลดลงเมื่อทิ้งไว้ในท่อนำไข่นานขึ้นจาก 48 ชม เป็น 72 ชม และ 96 ชม ตามลำดับ ในกรณีที่ฝากตัวอ่อนนานถึง 5 วัน ไม่พบตัวอ่อนเลย Polge et al. (1972) ได้ให้ข้อสังเกตเช่นกันว่าอัตรารอดของตัวอ่อนสุกรจะลดลงเมื่อใช้เวลาอยู่ท่อนำไข่นานขึ้น จากการศึกษาของ Techakumphu (1985) พบว่าหากนำตัวอ่อนของกระต่ายระยะบลาสโตซีสที่เก็บจากมดลูกกลับไปฝากในท่อนำไข่จะมีอัตราการเจริญเป็นฟีตัสเพียง 20 % ต่ำกว่าที่ได้จากตัวอ่อนระยะก่อนบลาสโตซีส นั่นแสดงว่าท่อนำไข่แม้จะเหมาะต่อการแบ่งตัวในระยะแรก แต่ไม่เอื้ออำนวยต่อการเจริญของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส จึงอาจเป็นเหตุผลของการไม่พบตัวอ่อนหลังฝากชั่วคราวนาน 5 วัน

ในส่วนที่เกี่ยวกับการนำตัวอ่อนไปฝากในสุกรตัวรับ ได้ฝากทั้งหมด 5 ตัว สุกร 4 ใน 5 ตัวแสดงอาการกลับเป็นสัดตรงรอบประมาณ 20-21 วัน ในขณะที่ 1 ใน 5 ตัว ไม่แสดงอาการกลับเป็นสัด แต่พบว่าสุกรตัวดังกล่าวมีอวัยวะบวมแดงเล็กน้อยหลังตั้งท้องไว้ประมาณ 100 วัน แต่ไม่ยอมรับการผสมเมื่อเอาเข้าใกล้สุกรพ่อพันธุ์ สุกรดังกล่าวได้ตรวจสอบอีกครั้งหนึ่งหลังเลยกำหนดการคลอด พบมีการบวมของมดลูกเล็กน้อยและมีการตกไข่ปกติ จากข้อมูลนี้อาจเป็นไปได้ว่าตัวอ่อนมีการพัฒนาไประยะหนึ่งหลังจากนั้นก็เกิดการตายซึ่งเรียกว่า "early embryonic death" อย่างไรก็ตามผลของการฝากตัวอ่อนที่ไม่ประสบความสำเร็จน่าจะมาจากเหตุผล 3-4 ประการ ประการแรกคุณภาพของตัวอ่อนโดยเฉพาะตัวอ่อนที่ฝากในสุกรตัวที่ 1 และ 4 มีคุณภาพไม่ดีนัก หรือมีเพียงประมาณ 30% ที่จัดอยู่ในเกรดเหมาะสมสำหรับย้ายฝาก ประการที่สองเป็นที่น่าสังเกตว่าตัวอ่อนที่เก็บจากท่อนำไข่กระต่าย จะมีชั้นหุ้มอีกชั้นหนึ่งซึ่งจะหนามากหรือน้อยขึ้นกับระยะเวลาที่ตัวอ่อนสัมผัสกับท่อนำไข่ และขึ้นกับกระต่ายในแต่ละตัว ตามปกติแล้วหากเป็นตัวอ่อนของกระต่ายจะมีการดันเปลือกชั้น mucin coat และชั้น zona pellucida ออกประมาณวันที่ 6-7 ด้วยแรงดันของของเหลว (blastocoelic fluid) ที่สะสมในช่องว่างของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส ยังไม่มีการศึกษาว่าตัวอ่อนของสุกรจะสามารถดันออกจากเปลือกชั้นที่สองที่หุ้มรอบได้หรือไม่ ในกรณีที่ชั้น mucin coat มีความหนามากประเด็นดังกล่าวได้ทดลองเลี้ยงตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่เก็บจากท่อนำไข่หลังเลี้ยง

ไว้นาน 72 ชม ต่ออีก 48 ชม ในหลอดทดลอง พบว่าตัวอ่อนทั้งหมดเกิดการเสื่อมสลาย อย่างไรก็ตามได้มีรายงานการตั้งท้องในสุกร (Hermann and Holtz, 1985) จากการนำเอาตัวอ่อนหลังฝากในท่อนำไข่นาน 24 และ 48 ชม ไปฝากไว้นาน 3 สัปดาห์ ประการที่ 3 คือจำนวนตัวอ่อนที่ฝากในสุกรตัวที่ 3 มีเพียง 6 ตัวอ่อนเท่านั้น ปกติการตั้งท้องในสุกรจำต้องมีตัวอ่อนอย่างน้อย 4 ตัวอ่อน เพื่อพยุงการตั้งท้องให้ครบ การได้ตัวอ่อนน้อยและคุณภาพที่บางครั้งไม่ควรย้ายฝาก แต่ต้องทำการฝาก เนื่องจากเกี่ยวข้องกับอัตราการเก็บตัวอ่อนและความปกติของตัวอ่อน จากข้อมูลการผลิตตัวอ่อนนั้นได้ประมาณ 15 ตัวอ่อนต่อการเก็บแต่ละครั้ง หลังย้ายฝากจะเหลือเพียง 7-8 ตัวอ่อนที่เก็บได้ (คิดอัตราการเก็บตัวอ่อนเท่ากับ 50%) และจะเหลือเป็นตัวอ่อนให้ย้ายฝากได้ 5-6 ตัวอ่อน (คิดอัตราตัวอ่อนปกติเท่ากับ 70-80%) ดังนั้นในบางครั้งจึงต้องทำการย้ายฝากตัวอ่อนจำนวนน้อย ประเด็นสุดท้าย คือการที่ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสอยู่ในท่อนำไข่นานเกินไปอาจส่งผลเสียในการเจริญเติบโตเหมือนดังที่ Techakumphu (1985) พบว่ามีเพียง 21% ของตัวอ่อนกระต่ายที่ย้ายฝากเจริญเป็นตัวฟีตัสหลังฝากตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสในท่อนำไข่กระต่าย

สรุปการศึกษาครั้งนี้ ชี้ให้เห็นความเป็นไปได้ในการเลี้ยงตัวอ่อนสุกรนอกร่างกายในอีกรูปแบบหนึ่งโดยสามารถเลี้ยงได้นานถึง 96 ชม ซึ่งเป็นก้าวต่อจากงานวิจัยที่ได้เคยรายงานไว้โดย มงคล และคณะ (2532) และ มงคล และวิชัย (2534) ประโยชน์ของงานวิจัยนี้เป็นวิธีที่สามารถดัดแปลง มาใช้ขนส่งตัวอ่อนจากที่หนึ่งไปอีกที่หนึ่งได้โดยใช้กระต่ายซึ่งสะดวกต่อการขนส่ง หรือนำมาช่วยทดสอบการเจริญของตัวอ่อนที่ผ่านการทดลอง (manipulation) ต่าง ๆ อาทิ เช่น หลังจากการตัดแบ่ง หรือการฝากยีนส์ หรือหลังฝากถ่ายนิวเคลียส เป็นต้น เพื่อดูการพัฒนาของตัวอ่อนดังกล่าว

## เอกสารอ้างอิง

- มงคล เตชะกำพุ สุพจน์ อานันทนะสุวงศ์ สุพจน์ เลื่องยศลือชากุล วัชรี ตันติวัฒนเสถียร และ ชัยณรงค์ โลหชิต. 1989(2532). การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนสุกร: ผลของระยะการเจริญเติบโตของตัวอ่อนและชนิดของน้ำยาเพาะเลี้ยง เวชชสาร สัตวแพทย์ 19(3): 157-169.

- มงคล เตชะกำพุ และวิชัย ทันตศุภารักษ์. 1991(2534). การเจริญเติบโตของตัวอ่อนสุกรหลังเพาะเลี้ยงและย้ายฝากในสุกรตัวรับ เวชชสารสัตวแพทย์ 21(4): 191-212.

- Adams, C.E. 1970. The development of rabbit eggs after culture in vitro 1-4 days. J. Embryo. Exp. Morphol., 22: 21-34.

- Adams, C.E. 1973. The development of rabbit eggs in the ligated oviduct and their viability after re-transfer to recipient rabbits. J. Embryo.exp. Morph., 29:133-144.

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

- Bavister, B.D. and Minami, N. 1986. Use of cultured mouse oviducts to by-pass in vitro development block in cleavage stage hamster embryos. Biol. Reprod., 34, Suppl. I 191. (abstr.) 284.

- Black, D.L. 1974. Neural control of oviduct musculature. In : The ovuduct and its functions, pp. 65-118 Eds. A.D. Johnson& C.W. Foley Academic Press. New York.

- Boland, D.M. 1984. Use of the rabbit oviduct as a screening toll for the viability of mammalian eggs. Theriogenology. 21(1): 126-127.

- Bowman, P. and Mclaren, A. 1970. Viability and growth of mouse embryos after in vitro culture and fusion. J. Embryol. exp. Morph., 23: 693-704.

- Brinster, R.L. and TenBroeck, J. T. 1969. Blastocyst development of mouse pre-implantation embryos in the rabbit fallopian tube. J. Reprod. Fert., 19: 417-421.

- Hahn, J. 1982. Technical aspects and perspectives of embryo transfer in laboratory animal. 2eme Congr. Int. de Transfert d'embryons chez les mammiferes. Annecy, Sept. 20-22. p 215-222.

- Hermann, H.H. and Holtz W. 1985. Storage of pig embryos in the ligated rabbit oviduct and its effect on the viability after re-transfer to synchronized gilts. Anim. Reprod. Sci., 8: 159-170.

- 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.

- Oxenreider, S.L. and Day, B.N. 1965. Transport and cleavage of ova in swine. J. Anim. Sci., 24:413-417.

- Polge, C. 1977. Short-term maintenance and culture of embyhros. In "Embryo Tranfer in farm animal" ed K.J. Beterridge Canada, Dept. Agric. Monograph, 16-44.

- Polge, C. and Frederick, C.L. 1968. Culture and storage of fertilized pig eggs. Porc. 6th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Paris, 1 p. 211 (abstr.).

- Polge, C., Adams, C.E. and Baker, R. D. 1972. Development and survival of pig embryo in the rabbit oviduct. Por. 7th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem. Munich, I, pp. 514-517.

- Pope, C.E. and Day, B.N. 1977. Transfer of pre-implantation pig embryos following in vitro culture for 24 or 48 hours. J. Anim. Sci., 44(2) 1036-1044.

- Prather, R.S. Sims, M.M. and First, N.L. 1991., Culture of porcine embyros from one-and two-cell stage to the blastocyst stage in sheep oviducts. Theriogenology. 35(6): 1147-1151.

- Renard, J.P. 1983. La conservation de l'embryon de Mammifere: Etude aux stade preimplantatoires chez plusieurs especes demestiques. These Docteur es Sciences. Univ. Paris VI, 118p.

- Rundell, J.W. and Vincent, C.K. 1969. In vitro culture of swine ova . J. Anim. Sci., 28: 145-146. (abstr).

- Techakumphu, M. 1985. Etude comparre du developpement in vivo des embryons de lapine cultives, congeles et cultives-congeles apres transfert synchrone et asynchrone. These Doctorat de 3eme cycle. Univ. Paris VI, 38p.

- Thibault, C and Crozet, N. 1988. La fecondation in vitro des oocytes de brebris et de vache, peut-elle entrer dands la pratique de l'elevage. Pro. 3rd World Congr. Sheep and Beef Catle breeding. 19-23 Juin 1988, Paris. 79-9i.

- Wall, R.J. and Hawk, H.W.1988. Development of centrifuged cow zygotes culture in rabbit oviducts. J. Rerpod. Fert., 82:673-680.