ผลของเลคตินต่อการเจริญและการฝังตัวของเอมบริโอที่ผนังมดลูกของหนูเมาส์

นางสาว จรัสมล อัศวเดชาชาญยุทธ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2534

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ISBN 974-579-688-3

019201

i17352678

EFFECT OF LECTINS ON EMBRYONIC DEVELOPMENT AND IMPLANTATION IN MOUSE

Miss. Jaratmon Adsawadacharchanyoot

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Dedree of Master of Science

Deparment of Biology

Graduate School

Chulalongkorn University

1991

ISBN 974-579-688-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของเลคตินต่อการเจริญและการฝังตัวของเอมบริโอที่ผนังมดลูกของหนูเมาส์
โดย	นางสาว จรัสมล อัศวเดชาชาญยุทธ์
ภาควิชา	ชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. วิทยา ยศยิ่งยวด

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร. ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. ม.ร.ว. พูนพงศ์ วรวุฒิ)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. วิทยา ยศยิ่งยวด)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. วณง ปัญญานิติ)

จรัสมล อัศวเดชาชาญยุทธ์ : ผลของเลคตินต่อการเจริญและการฝังตัวของเอมบริโอที่ผนังมดลูกของหนูเมาส์ (EFFECT OF LECTINS ON EMBRYONIC DEVELOPMENT AND IMPLANTATION IN MOUSE) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.วิทยา ยศยิ่งยวด, 93 หน้า. ISBN 974-579-688-3

การศึกษานี้มุ่งตรวจสอบผลของเลคติน 2 ชนิดคือ Concanavalin A (Con A) และ Wheat germ agglutinin (WGA) ต่อการเจริญ การออกจากโซนาเพลลูซิดาและการฝังตัวที่ผนังมดลูกของเอมบริโอ ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงของผนังมดลูกในหนูเมาส์ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเอมบริโอนอกร่างกาย การย้ายฝาก และการฉีดเลคตินเข้าสู่มดลูกโดยตรง ผลการเพาะเลี้ยงเอมบริโอระยะ 2-เซลล์ และ 8-เซลล์ในจานเพาะเลี้ยง แสดงว่า เอมบริโอระยะ 2-เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง M16 ที่มี Con A 20, 60 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจริญได้ถึงระยะ 8-เซลล์เท่านั้น (31.82%, 14.53%, และ 11.43%) ส่วนเอมบริโอในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มี WGA 10-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถเจริญต่อไปได้เลยเอมบริโอ 8-เซลล์ที่เพาะเลี้ยงใน Con A 20 และ 60ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจริญได้ถึงระยะบลาสโตซิสประมาณ 6% แต่ไม่สามารถออกจากโซนาเพลลูซิดาได้ และ 6% ของเอมบริโอ 8-เซลล์ที่เพาะเลี้ยงใน Con A 100 และ WGA 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจริญได้ถึงระยะมอรูลา ส่วนเอมบริโอที่เพาะเลี้ยงใน WGA 30 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ เอมบริโอ 8-เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในเลคตินสามารถเข้าฝังตัวติดผนังมดลูกและเจริญจนถึงคลอดได้บ้างหลังการย้ายฝากเข้าสู่มดลูกตัวรับที่ตั้งท้องเทียม แต่เปอร์เซนต์ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) จากการตรวจเนื้อเยื่อมดลูกวันที่ 5 และ 6 ของการตั้งท้องหลังฉีดเลคตินเข้าสู่มดลูกวันที่ 2 ไม่พบความผิดปกติแต่อย่างใด การศึกษานี้ชี้แนะว่าเลคตินทั้งสองน่าจะมีผลโดยตรงต่อการเจริญและการออกจากโซนาเพลลูซิดาของเอมบริโอระยะก่อนฝังตัว มากกว่าที่จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อจนเป็นผลให้จำนวนเอมบริโอเข้าฝังตัวที่ผนังมดลูกและเจริญจนถึงคลอดลดลง

ภาควิชา ชีววิทยา
สาขาวิชา สัตววิทยา
ปีการศึกษา 2534

ลายมือชื่อนิสิต จรัสมล อัศวเดชาชาญยุทธ์
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

MISS JARATMON ADSAWADACHARCHANYOOT : EFFECT OF LECTINS ON EMBRYONIC DEVELOPMENT AND IMPLANTATION IN MOUSE. THESIS ADVISOR : ASSO. PRO VITHAYA YODYINGYUAD, Ph.D. 93 PP. ISBN 974-579-688-3

This study aims to investigate effects of two types of lectin, namely Concanavalin A (Con A) and wheat germ agglutinin (WGA) on the development, hatching and implantation of embryos as well as changes of uterine endometrium in mice. Embryo culture and transfer techinques were employed, and intra-uterine injections of lectins were performed in this study. Cultivations of 2- and 8-cell embryos in vitro indicated that the 2-cell embryos in medium 16 (M16) containing Con A 20, 60 and 100 μg/ml only developed to 8-cell stage (31.82%, 14.53% and 11.43% respectively) while those in M16 containing WGA 10-50 μg/ml were unable to develop at all. About six percents of the 8-cell embryos cultured in M16 containing Con A 20 and 60 μg/ml developed to blastocyst stage, but were unable to hatch. Six percents of those cultured in M16 containing Con A 100 μg/ml and WGA 10 μg/ml developed to morula stage. None of the 8-cell embryos cultured in M16 containing WGA 30 and 50 μg/ml could develop further. A few 8-cell embryos exposed to lectins in culture were capable to implant and develop to term following transfer of these embryos to pseudopregnant recipients, but the numbers were significantly lower than those of the control ($P<0.05$). Histology of uterine tissues on day 5 and 6 of pregnant animals recieving lectins on day 2 were normal. This study suggested that both lectins directly affect the development and hatching of preimplantation embryos rather than causing any change of the uterine endometrium, which resulted in lowering the number of embryos to implant and survive to term.

ภาควิชา ชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต จรัสมล อัศวเดชาชาญยุทธ์

สาขาวิชา สัตววิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2534 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร. วิทยา ยศยิ่งยวด อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำและข้อคิดเห็น ตลอดจนตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ของการศึกษาวิจัยนี้ด้วยดีมาตลอด

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. ม.ร.ว.พุฒิพงศ์ วรวุฒิ ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ ทั้งเป็นผู้ที่สนับสนุนและให้กำลังใจผู้วิจัยมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วณง ปัญญานิติ ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณสัมพันธ์ สุวรรณรัตน์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการทำสไลด์เนื้อเยื่อในการวิจัยครั้งนี้

เนื่องจากทุนวิจัยครั้งนี้บางส่วนได้รับมาจากทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

ท้ายนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา ซึ่งสนับสนุนในด้านการเงิน และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยตลอดมาจนสำเร็จการศึกษา

จรัสมล อัศวเดชาชาญยุทธ์

สารบาญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบาญ ..... ช

สารบาญตาราง ..... ฌ

สารบาญรูปภาพและกราฟ ..... ฎ

บทที่

1 บทนำ 1

วัตถุประสงค์ 13

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 14

2 วิธีดำเนินการวิจัย 15

- สัตว์ทดลอง 15

- ห้องปฏิบัติการ 19

- อุปกรณ์ 20

- สารเคมี 23

- การเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยง 25

- วิธีทำการทดลอง 27

2.1 การศึกษาผลของเลคตินต่อการเจริญและการออกจาก
โซนาเพลลูซิดาของเอมบริโอในจานเพาะเลี้ยง 27

2.2 การศึกษาการฝังตัวและความอยู่รอดหลังย้ายฝาก
ของเอมบริโอที่เพาะเลี้ยงในเลคติน 30

บทที่ หน้า

2.3 การศึกษาการฝังตัวและความอยู่รอดของเอมบริโอ
ในมดลูกที่ฉีดด้วยเลคตินเข้าในช่องว่างมดลูก 32
2.4 การศึกษาผลของเลคตินต่อการเปลี่ยนแปลง
ของเนื้อเยื่อมดลูก 33
- การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 33
3 ผลการทดลอง 34
- การศึกษาเปรียบเทียบผลของเลคตินต่อการเจริญและ
การออกจากโซนาเพลลูซิดาของเอมบริโอในจานเพาะเลี้ยง 34
- ผลการย้ายฝากเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ ที่เพาะเลี้ยงใน
M16 (กลุ่มควบคุม) และในสารละลายเลคติน (กลุ่มทดลอง)
เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนย้ายฝากไปยังตัวรับที่ตั้งท้องเทียม
3 วัน 43
- ผลการศึกษาเปรียบเทียบจำนวนการฝังตัวและความอยู่รอด
ของเอมบริโอในมดลูกของหนูเมาส์ที่ได้รับเลคตินในวันที่ 2
และ 3 ของการตั้งท้อง เทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับเลคติน 47
- ผลของเลคตินต่อเอนโดมีเทรียมของผนังมดลูก 60
4 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง 64
เอกสารอ้างอิง 68
ประวัติผู้เขียน 80

สารบาญตาราง

ตารางที่ หน้า

1.1 แสดงการย้ายฝากตัวอ่อนที่ประสบความสำเร็จ เป็นครั้งแรกในสัตว์ชนิดต่าง ๆ 6

1.2 แสดงชนิดของเลคตินและความจำเพาะกับน้ำตาล 9

2.1 แสดงวงจรการเป็นสัดของหนูเมาส์ 16

2.2 แสดงระยะและตำแหน่งที่พบเอมบริโอของหนูเมาส์ ในการเจริญในสัตว์ทดลอง 19

2.3 แสดงส่วนประกอบของน้ำยาเพาะเลี้ยงของเอมบริโอ ของหนูเมาส์ 26

3.1 แสดงเปอร์เซนต์การเจริญและการออกจากโซนาเพลลูซิดา ของเอมบริโอ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเอมบริโอจากระยะ 2-เซลล์ใน M16 และใน M16+Con A 20, 60 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในจานเพาะเลี้ยง 35

3.2 แสดงเปอร์เซนต์การเจริญและการออกจากโซนาเพลลูซิดา ของเอมบริโอ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเอมบริโอจากระยะ 8-เซลล์ใน M16 และใน M16+Con A 20, 60 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในจานเพาะเลี้ยง 36

3.3 แสดงเปอร์เซนต์การเจริญและการออกจากโซนาเพลลูซิดา ของเอมบริโอ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเอมบริโอจากระยะ 2-เซลล์ใน M16 และใน M16 + WGA 10, 30 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในจานเพาะเลี้ยง 37

ตารางที่ หน้า

3.4 แสดงเปอร์เซนต์การเจริญและการออกจากโซนาเพลลูซิดา ของเอมบริโอ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเอมบริโอจากระยะ 8-เซลล์ใน M16 และใน M16 + WGA 10, 30 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในจานเพาะเลี้ยง 38

3.5 แสดงการย้ายฝากเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเอมบริโอใน M16, ใน M16 + Con A 20, 60 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใน M16+WGA 10, 30 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนทำการย้ายฝากไปยังตัวรับที่ตั้งท้องเทียมในแต่ละตัว 45

3.6 สรุปผลการย้ายฝากเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเอมบริโอใน M16, ใน M16 + Con A 20, 60 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และใน M16 + WGA 10, 30 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรก่อนทำการย้ายฝาก 46

3.7 แสดงจำนวนเอมบริโอที่ฝังตัวในวันที่ 8 ในสัตว์กลุ่มปกติ กลุ่มควบคุม PBI และกลุ่มทดลองที่ฉีด Con A ในปริมาณ 20, 60 และ 100 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตร PBI และ WGA ในปริมาณ 10, 30 และ 50 ไมโครกรัม ต่อ 5 ไมโครลิตร PBI ตามลำดับ เข้าในช่องว่างมดลูกในวันที่ 2 ของการตั้งท้อง 49

3.8 แสดงจำนวนลูกหนูที่คลอดในสัตว์กลุ่มปกติ กลุ่มควบคุม PBI และกลุ่มทดลองที่ฉีด Con A ในปริมาณ 20, 60 และ 100 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตร PBI และ WGA ในปริมาณ 10, 30 และ 50 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตร PBI ตามลำดับ เข้าในช่องว่างมดลูกในวันที่ 2 ของการตั้งท้อง 50

ตารางที่ หน้า

3.9 แสดงจำนวนการฝังตัวและจำนวนลูกที่คลอดต่อตัว ในสัตว์ทดลองเมื่อฉีด PBI, Con A 20, 60 และ 100 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตร PBI (Con A 20, Con A 60, Con A 100) และ WGA 10, 30, และ 50 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตร PBI (WGA 10, WGA 30, WGA 50) ตามลำดับ ในวันที่ 2 ของการตั้งท้อง 51

3.10 แสดงจำนวนเอมบริโอที่ฝังตัวในวันที่ 8 ในสัตว์กลุ่มปกติ กลุ่มควบคุม PBI และกลุ่มทดลองที่ฉีด Con A ในปริมาณ 20, 60 และ 100 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตร PBI และ WGA ในปริมาณ 10, 30 และ 50 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตร PBI ตามลำดับ เข้าในช่องว่างมดลูกในวันที่ 3 ของการตั้งท้อง 54

3.11 แสดงจำนวนลูกหนูที่คลอดในสัตว์กลุ่มปกติ กลุ่มควบคุม PBI และกลุ่มทดลองที่ฉีด Con A 20, 60 และ 100 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตร PBI และ WGA 10, 30 และ 50 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตร PBI ตามลำดับ เข้าในช่องว่างมดลูกในวันที่ 3 ของการตั้งท้อง 55

3.12 แสดงจำนวนการฝังตัวและจำนวนลูกที่คลอดต่อตัวในสัตว์ทดลองเมื่อฉีด PBI, Con A 20, 60 และ 100 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตร PBI (Con A20, Con A 60, Con A 100) และ WGA 10, 30, และ 50 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตร PBI (WGA 10, WGA 30, WGA 50) ตามลำดับ ในวันที่ 3 ของการตั้งท้อง 56

3.13 เปรียบเทียบผลของเลคตินเมื่อฉีดเข้ามดลูกในวันที่ 2 และวันที่ 3 ของการตั้งท้อง ต่อจำนวนเอมบริโอที่ฝังตัว และจำนวนลูกที่คลอดต่อตัว 59

สารบาญรูปภาพและกราฟ

รูปที่		หน้า
1.1	แผนภาพแสดงตำแหน่งของการเกิดปฏิสนธิและการแบ่งตัวของเอมบริโอระยะต่าง ๆ ในท่อนำไข่และการฝังตัวของบลาสโตซิสที่ผนังมดลูก	3
2.1	แสดงเซลล์ในระยะต่าง ๆ ของวงจรการเป็นสัดที่ตรวจพบจากการทำ vagina smear	17
2.2	แสดงตำแหน่งของท่อนำไข่, มดลูกและบริเวณที่ตัดแยกท่อนำไข่และมดลูก	29
2.3	แสดงการย้ายฝากทางมดลูก	31
2.4	แสดงปิเปตที่ใช้ย้ายฝากเอมบริโอ	31
3.1	กราฟแสดงการเจริญของเอมบริโอจากระยะ 2-เซลล์ในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม	39
3.2	กราฟแสดงการเจริญของเอมบริโอจากระยะ 8-เซลล์ในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม	40
3.3	แสดงการเจริญของเอมบริโอในระยะต่าง ๆ	41-42
3.4	กราฟแสดงจำนวนการฝังตัวและจำนวนลูกที่คลอดต่อตัวในสัตว์ที่ฉีดเลคตินเข้าในช่องว่างมดลูกในวันที่ 2 ของการตั้งท้อง	52
3.5	กราฟแสดงจำนวนการฝังตัวและจำนวนลูกที่คลอดต่อตัวในสัตว์ที่ฉีดเลคตินเข้าในช่องว่างมดลูกในวันที่ 3 ของการตั้งท้อง	57

รูปที่ หน้า

3.6 ภาพตัดขวางแสดงลักษณะของเอนโดมีเทรียมที่ผนังมดลูกของหนูเมาส์ ในกลุ่มที่ฉีด Con A 100 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตร PBI ในวันที่ 6 ของการตั้งท้อง 61

3.7 ภาพตัดขวางแสดงลักษณะของเอนโดมีเทรียมที่ผนังมดลูกของหนูเมาส์ ในกลุ่มที่ฉีด WGA 50 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตร PBI ในวันที่ 6 ของการตั้งท้อง 61

3.8 ภาพตัดขวางแสดงเอมบริโอที่ปราศจากโซนาเพลลูซิดา ที่ลอยเป็นอิสระอยู่ในช่องว่างของมดลูกในวันที่ 5 ของการตั้งท้องในหนูเมาส์ ที่ฉีด Con A 100 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตร PBI 62

3.9 ภาพตัดขวางแสดงเอมบริโอที่ปราศจากโซนาเพลลูซิดา ที่ลอยเป็นอิสระอยู่ในช่องว่างของมดลูกในวันที่ 5 ของการตั้งท้องในหนูเมาส์ ที่ฉีด WGA 50 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตร PBI 62

3.10 ภาพตัดขวางแสดงเอมบริโอที่ฝังตัวที่ผนังมดลูกแล้วในวันที่ 6 ของการตั้งท้องในหนูเมาส์ที่ฉีด WGA 50 ไมโครกรัม PBI 63

3.11 ภาพตัดขวางแสดงเอมบริโอที่ฝังอยู่ที่ผนังมดลูกแล้ว ในสัตว์ปกติที่ไม่ได้ฉีดอะไรเลย 63