บทที่ 3

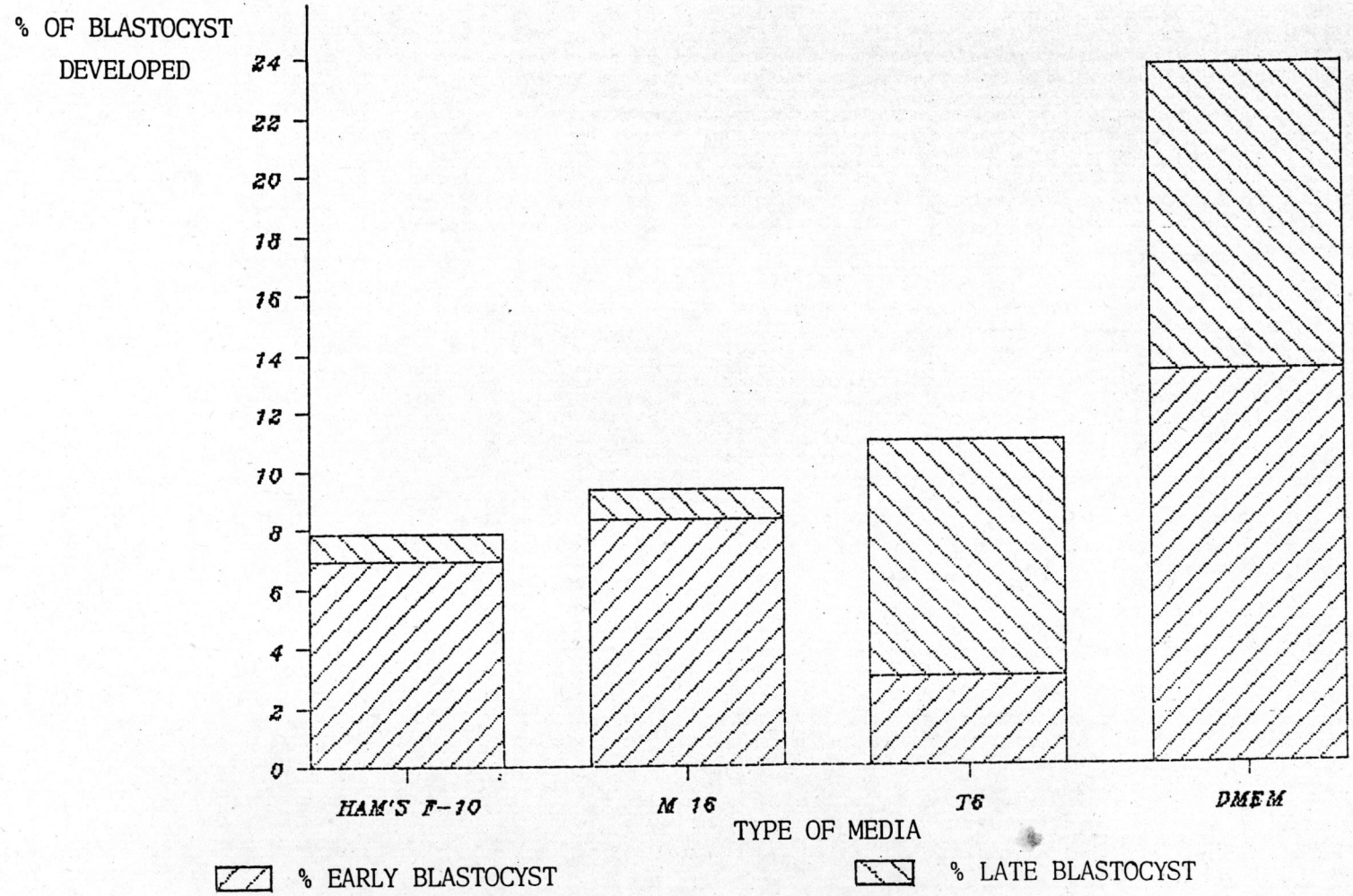
ผลการทดลอง

<u>ผลการเปรียบเทียบชนิดของน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เหมาะต่อการเจริญเติบโตของเอมบริโอหนูขาวระยะ 8-เซลล์ เป็นบลาสโตซิส</u>

เมื่อทดลองนำเอมบริโอมาเพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง 4 ชนิด ได้แก่ Ham's F-10, M 16, T 6 และ DMEM ซึ่งมี 10 % FBS อยู่ด้วย โดยแบ่งเอมบริโอเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงแต่ละชนิดจำนวน 96-101 ตัว ผลการทดลองดังที่สรุปไว้ในตารางที่ 3.1 ปรากฏว่าเอมบริโอเจริญจากระยะ 8-เซลล์ เป็นบลาสโตซิส ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 ชั่วโมงใน Ham's F-10 7.92%, M 16 9.37%, T 6 11% และ DMEM 23.71% จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM มีผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเอมบริโอระยะ 8-เซลล์เป็นบลาสโตซิส in vitro แตกต่างจากน้ำยาเพาะเลี้ยงอีก 3 ชนิด อย่างมีนัยสำคัญ โดยเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ มีการเจริญถึงระยะบลาสโตซิสมากที่สุดในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยาเพาะเลี้ยง Ham's F-10 ($p < 0.005$), M 16 ($p < 0.005$) และ T 6 ($p < 0.01$) ส่วนน้ำยาเพาะเลี้ยง Ham's F-10, M 16 และ T 6 นั้น ให้ผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเอมบริโอไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) (ตารางที่ 3.1, 3.2 และรูปที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 แสดงผลการเจริญเติบโตของเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ เป็นบลาสโตซิส ในน้ำยาเพาะเลี้ยง 4 ชนิดคือ Ham's F-10, M 16, T 6 และ DMEM นาน 6 ชั่วโมง in vitro

Type of media	No. of 8-cell embryo cultured	No. of embryo after cultured 6 hr. (%)				
		8-cell embryo - morula	Blastocysts			Degenerated cells
			Early	Late	Total	
Ham's F-10	101	19 (18.81)	7 (6.93)	1 (0.99)	8 (7.92)	74 (73.27)
M 16	96	9 (9.38)	8 (8.33)	1 (1.04)	9 (9.37)	78 (81.25)
T 6	100	12 (12)	3 (3)	8 (8)	11 (11)	77 (77)
DMEM	97	22 (22.68)	13 (13.40)	10 (10.31)	23 (23.71)	52 (53.61)



รูปที่ 3.1 แสดงเปอร์เซนต์ของบลาสโตซิสที่เจริญจากเอมบริโอระยะ 8- เซลล์ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง 4 ชนิด คือ Ham's F-10, M 16, T 6 และ DMEM โดยใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงนาน 6 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.2 แสดงการเปรียบเทียบชนิดของน้ำยาเพาะเลี้ยงในแต่ละคู่ ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเอมบริโอหนูขาวระยะ 8-เซลล์เป็นบลาสโตซิส in vitro

Media	Z	P
DMEM - Ham's F-10	3.11	< 0.005
DMEM - M 16	2.73	< 0.005
DMEM - T 6	2.38	< 0.01
Ham's F-10 - M 16	0.36	N.S.
Ham's F-10 - T 6	0.75	N.S.
M 16 - T 6	0.38	N.S.

N.S. = not significantly different ($P > 0.05$)

ผลของซีรั่มต่อการเจริญของเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ ไปเป็นบลาสโตซิส

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบการเจริญของเอมบริโอหนูขาวระยะ 8-เซลล์ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM ที่ประกอบด้วยชนิดและปริมาณของซีรั่มที่แตกต่างกันดังต่อไปนี้ DMEM + 3 mg/ml BSA ; DMEM + 2.5 % FBS ; DMEM + 10 % FBS แล้วเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของเอมบริโอที่เจริญถึงระยะบลาสโตซิส โดยใช้เอมบริโอระยะ 8-เซลล์ จำนวน 150 ตัว แบ่งเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงแต่ละชนิดเท่า ๆ กัน ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าการแบ่งตัวของเอมบริโอจากระยะ 8-เซลล์ เป็นบลาสโตซิสมีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดคือ เอมบริโอเจริญมากที่สุด (24 %) ในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM + 10 % FBS รองลงมาคือใน DMEM + 2.5 % FBS (6 %) ส่วนใน DMEM + 3 mg/ml BSA ไม่พบการเจริญของเอมบริโอ การเจริญของเอมบริโอใน DMEM + 10 % FBS มีมากกว่าใน DMEM + 2.5 % FBS อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.005$) นอกจากนี้การเสื่อมสลายของเอมบริโอใน DMEM + 10 % FBS (54 %) ยังน้อยกว่าในน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิดอื่นด้วย (ตารางที่ 3.3 รูปที่ 3.2)

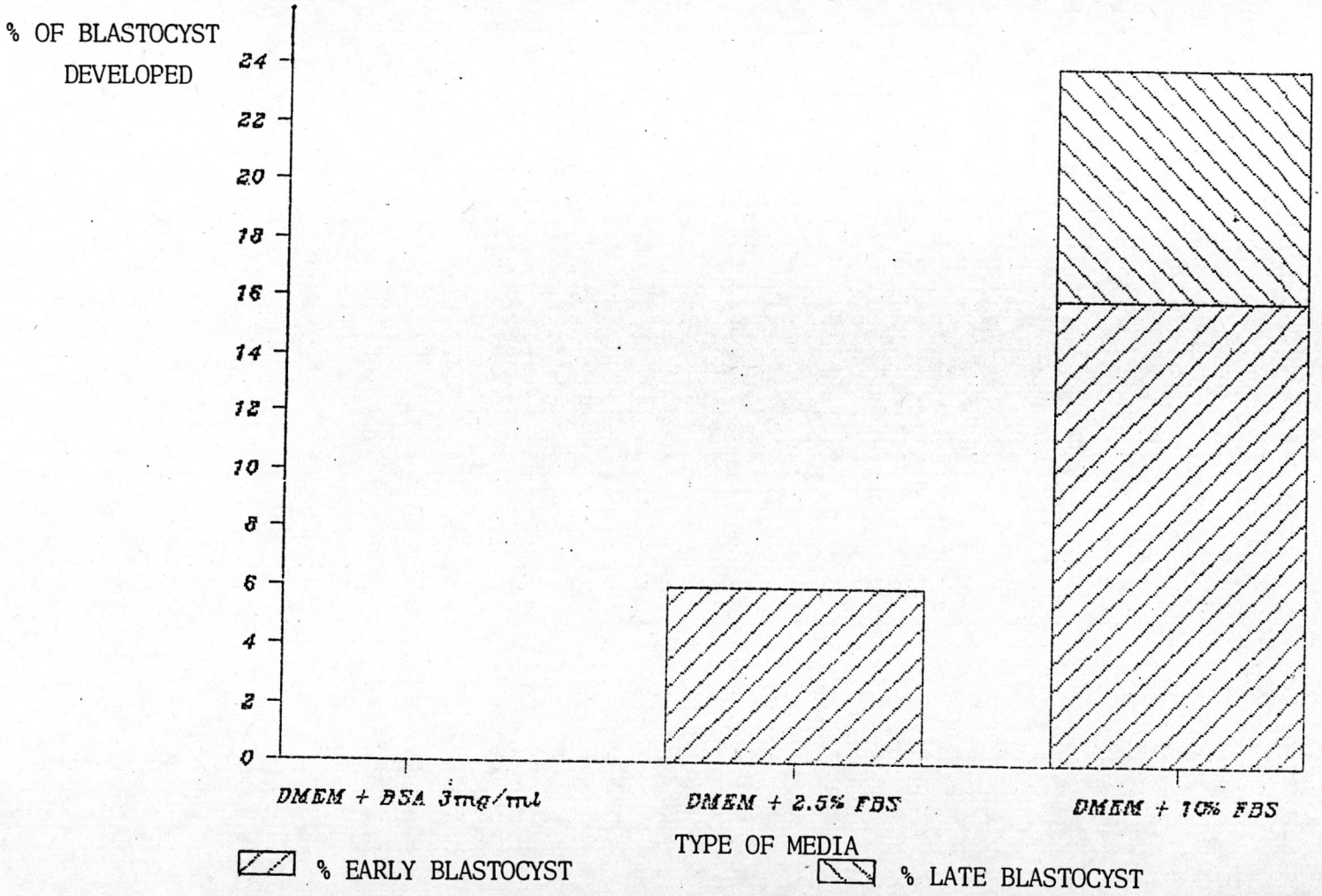
การเจริญของเอมบริโอระยะ 1-, 2- และ 4-เซลล์ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM + 10 % FBS

จากการที่เอมบริโอหนูขาวในระยะ 8-เซลล์ เจริญเป็นบลาสโตซิสในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM + 10 % FBS ได้ดีกว่าในน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิดอื่น จึงนำน้ำยาชนิดนี้มาทดลองเพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูขาวในระยะ 1-, 2- และ 4-เซลล์ เพื่อศึกษาการเจริญของเอมบริโอระยะต่าง ๆ ดังกล่าว in vitro โดยใช้เวลาเพาะเลี้ยง 24-48 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนเอมบริโอที่พบว่ามีการแบ่งตัวภายหลังการเพาะเลี้ยง

ผลการทดลองพบว่าเอมบริโอระยะ 1-เซลล์ (65 ตัว), 2-เซลล์ (67 ตัว) และ 4-เซลล์ (64 ตัว) ไม่มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์เลย เอมบริโอระยะ 1- และ 4-เซลล์ จะเสื่อมสลายทั้งหมดภายหลังการเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง ส่วนเอมบริโอระยะ 2-เซลล์ นั้นพบว่าภายหลังการเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง เอมบริโอส่วนใหญ่จะเสื่อมสลายทั้งหมด แต่มีบางส่วนซึ่งก็นับว่าจำนวนน้อยมากมีการเสื่อมสลายของเซลล์เพียงบางส่วน และสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้นานถึง 36 ชั่วโมง หลังจากนั้นเซลล์ที่เหลือก็เสื่อมสลายไปในที่สุดโดยไม่พบการแบ่งตัวเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 3.3 แสดงผลการเจริญเติบโตของเอมบริโอหนูขาวระยะ 8-เซลล์ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM ที่ประกอบด้วยชนิดและปริมาณซีรัมต่างกัน

Media	No. of 8-cell embryo cultured	No. of embryo after cultured 6 hr. (%)				
		8-cell embryo - morula	Blastocysts			Degenerated cells
			Early	Late	Total	
DMEM + BSA 3 mg/ml	50	3 (6)	-	-	-	47 (94)
DMEM + 2.5 % FBS	50	7 (14)	3 (6)	-	3 (6)	40 (80)
DMEM + 10 % FBS	50	11 (22)	8 (16)	4 (8)	12 (24)	27 (54)



รูปที่ 3.2 แสดงเปอร์เซนต์ของบลาสโตซิสที่เจริญจากเอมบริโอระยะ 8- เซลล์ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM ที่ประกอบด้วย 3 mg/ml BSA ; 2.5% FBS ; 10% FBS ภายหลังการเพาะเลี้ยงนาน 6 ชั่วโมง

ผลของ pH ที่มีต่อการเจริญเติบโตของเอมบริโอระยะ 8-เซลล์

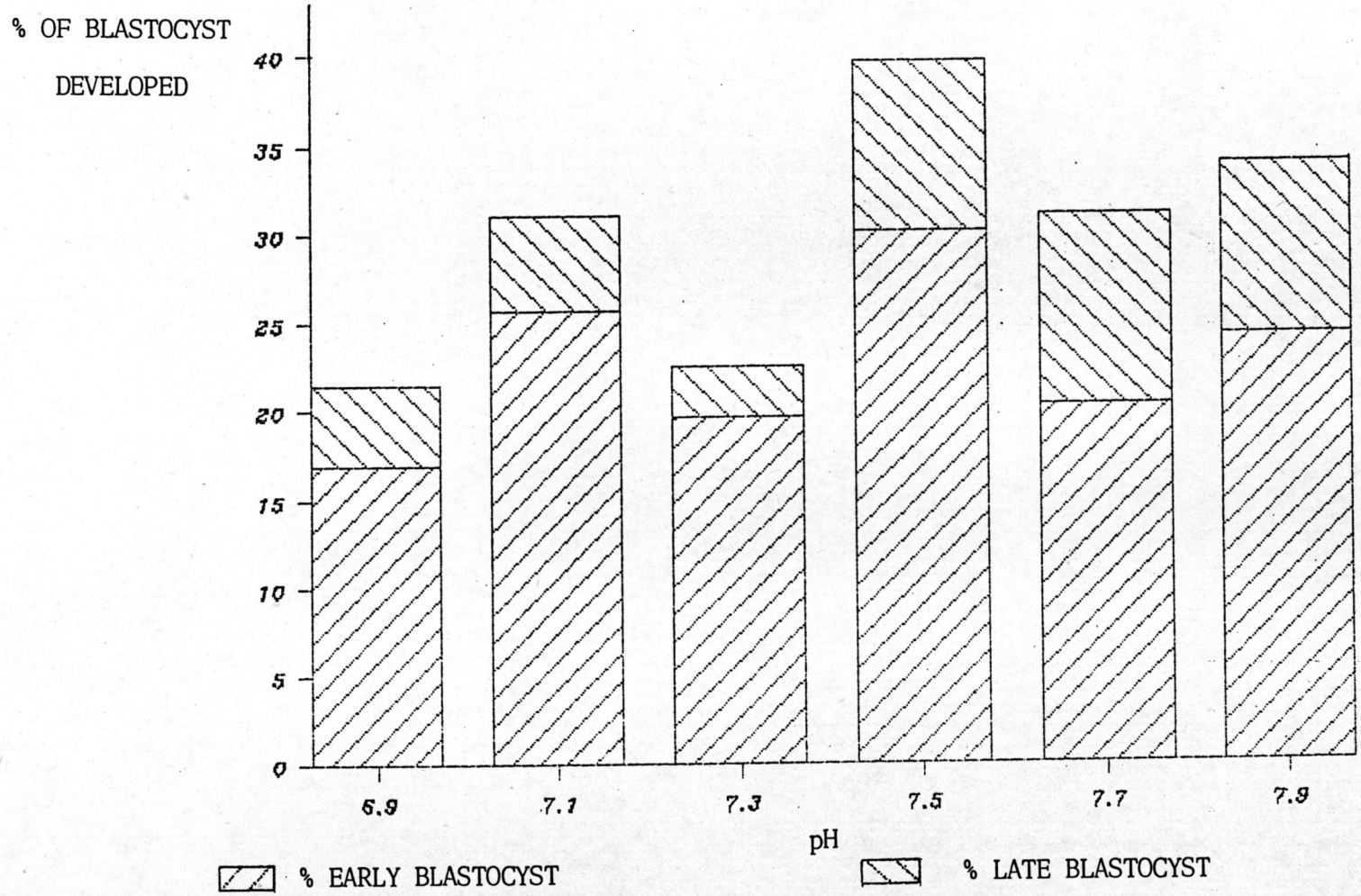
จากการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูขาวระยะ 8-เซลล์ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM + 10 % FBS ที่ระดับ pH 6 ระดับคือ 6.9, 7.1, 7.3, 7.5, 7.7, 7.9 ศึกษาถึงการเจริญสู่ระยะบลาสโตซิสภายหลังการเพาะเลี้ยงนาน 6 ชั่วโมง ผลที่ได้จากการทดลองสรุปไว้ในตารางที่ 3.4 และรูปที่ 3.3 ที่ระดับ pH 7.5 เอมบริโอระยะ 8-เซลล์ มีเปอร์เซนต์การเจริญเป็นบลาสโตซิสถึง 39.33 % ซึ่งสูงกว่าที่ pH ระดับอื่น ๆ และเปอร์เซนต์การเสื่อมสลายของเซลล์ (20.55 %) ก็พบน้อยกว่าที่ระดับ pH สูงหรือต่ำกว่านี้

ค่าทางสถิติของการเจริญเติบโตของเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ เป็นบลาสโตซิสที่ระดับ pH 7.5 มีมากกว่าที่ระดับ pH 6.4 ($p < 0.01$) และระดับ pH 7.3 ($p < 0.05$) อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่แตกต่างจากการเจริญของเอมบริโอที่ระดับ pH อื่น ๆ ($p > 0.05$) ตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.4 แสดงผลการเจริญเติบโตของเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ จนถึง ระยะบลาสโตซิส ในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM + 10 % FBS ที่ระดับ pH ต่าง ๆ

pH	No. of 8-cell embryo cultured	No.of embryo after cultured 6 hr. (%)				
		8-cell embryo -morula	Blastocysts			Degenerated cells
			Early	Late	Total	
6.9	65	27 (41.54)	11 (16.92)	3 (4.62)	14 (21.54)	24 (36.92)
7.1	74	24 (32.43)	19 (25.68)	4 (5.41)	23 (31.09)	27 (36.49)
7.3	71	31 (43.66)	14 (19.72)	2 (2.82)	16 (22.54)	24 (33.80)
7.5	73	29 (39.73)	22 (30.14)	7 (9.59)	29 (39.73)	15 (20.55)
7.7	74	24 (32.43)	15 (20.27)	8 (10.81)	23 (31.08)	27 (36.49)
7.9	62	23 (37.10)	15 (24.19)	6 (9.68)	21 (33.87)	18 (29.03)

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.3 แสดงเปอร์เซนต์การเจริญเติบโตของเอมบริโอระยะ 8- เซลล์ เป็นบลาสโตซิสในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM + 10% FBS ที่ระดับ pH ต่าง ๆ in vitro

ตารางที่ 3.5 แสดงการเปรียบเทียบระดับ pH เป็นคู่ ๆ ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเอมบริโอหนูขาวระยะ 8-เซลล์ เป็นบลาสโตซิสในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM + 10 % FBS

pH	Z	P
6.9 - 7.1	1.29	N.S.
6.9 - 7.3	0.14	N.S.
6.9 - 7.5	2.37	< 0.01
6.9 - 7.7	1.29	N.S.
6.9 - 7.9	1.57	N.S.
7.1 - 7.3	1.17	N.S.
7.1 - 7.5	1.10	N.S.
7.1 - 7.7	0.00	N.S.
7.1 - 7.9	0.35	N.S.
7.3 - 7.5	2.27	< 0.05
7.3 - 7.7	1.17	N.S.
7.3 - 7.9	1.46	N.S.
7.5 - 7.7	1.10	N.S.
7.5 - 7.9	0.71	N.S.
7.7 - 7.9	0.35	N.S.

N.S. = not significantly different ($P > 0.05$)

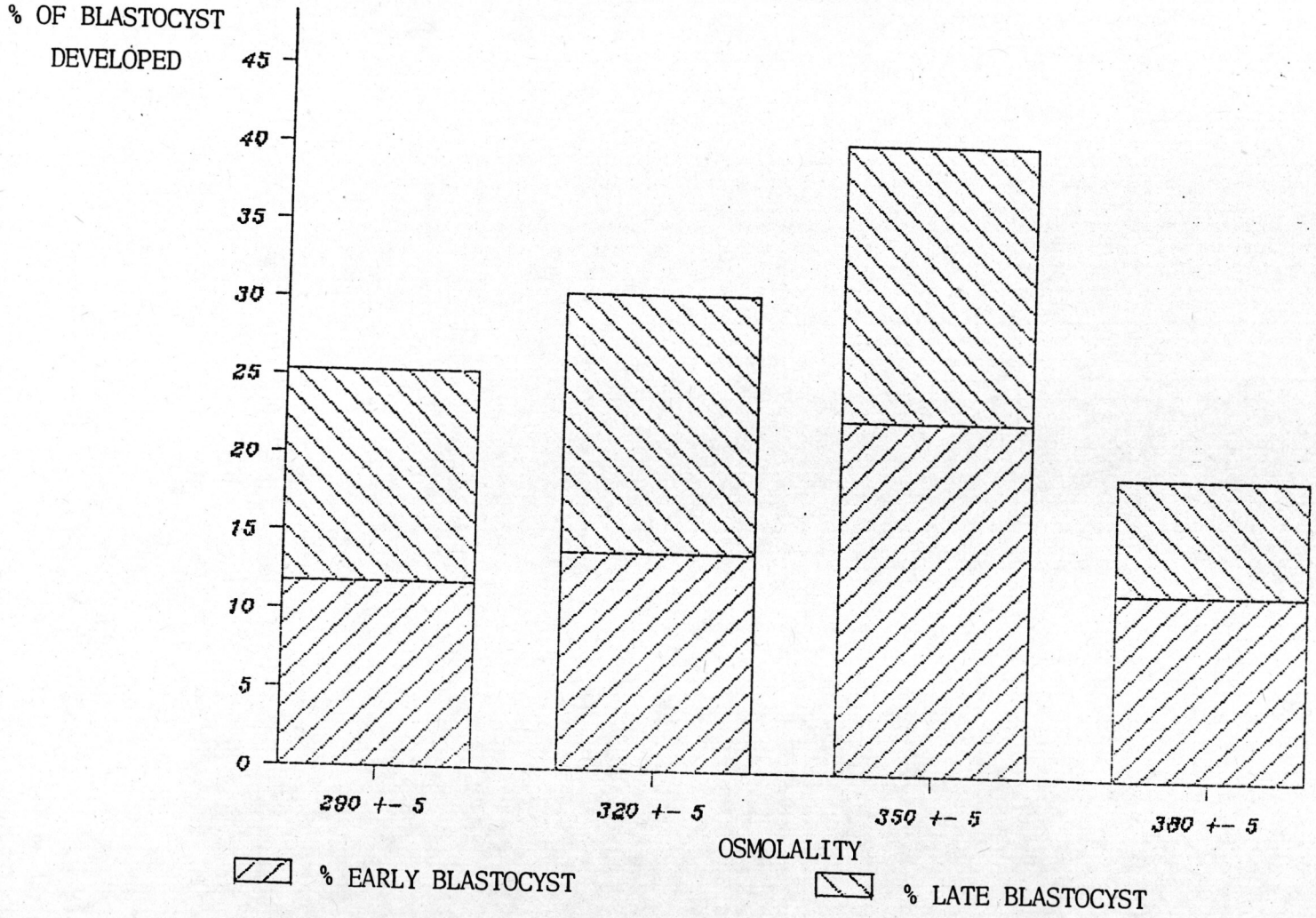
ผลของ osmolality ที่มีต่อการเจริญเติบโตของเอมบริโอระยะ 8-เซลล์

จากการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของหนูขาวระยะ 8-เซลล์ในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM + 10 % FBS ที่ปรับระดับ osmolality เป็น 4 ระดับ คือ 290 $\pm$ 5; 320 $\pm$ 5; 350 $\pm$ 5; 380 $\pm$ 5 mosmol/kg. ภายหลังการเพาะเลี้ยงนาน 6 ชั่วโมง ศึกษาถึงการเจริญสู่ระยะบลาสโตซิส ผลที่ได้จากการทดลองสรุปไว้ในตารางที่ 3.6 และรูปที่ 3.4 พบว่าเปอร์เซ็นต์การเจริญของเอมบริโอมากที่สุดในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ระดับ osmolality 350 $\pm$ 5 mosmol/kg (40.32 %) และพบการเสื่อมสลายของเซลล์เพียง 14.52 %

การเจริญของเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ เป็นบลาสโตซิสในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีระดับ osmolality 350$\pm$5 mosmol/kg มากกว่าที่ระดับ osmolality 290$\pm$5 และ 380$\pm$5 mosmol/kg อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$ และ $p < 0.005$ ตามลำดับ) แต่ไม่แตกต่างจากการเจริญของเอมบริโอในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีระดับ osmolality 320$\pm$5 mosmol/kg ($p > 0.05$) ตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.6 แสดงผลการเจริญเติบโตของเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ เป็นบลาสโตซิส ในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM + 10 % FBS ที่ระดับ osmolality ต่าง ๆ in vitro

Osmolality	No. of 8-cell embryo cultured	No. of embryo after cultured 6 hr. (%)				
		8-cell embryo -morula	Blastocysts			Degenerated cells
			Early	Late	Total	
290 ± 5	59	26 (44.07)	7 (11.86)	8 (13.56)	15 (25.42)	18 (30.51)
320 ± 5	72	36 (50)	10 (13.89)	12 (16.67)	22 (30.56)	14 (19.44)
350 ± 5	62	28 (45.16)	14 (22.58)	11 (17.74)	25 (40.32)	9 (14.52)
380 ± 5	68	35 (51.47)	8 (11.77)	5 (7.35)	13 (19.12)	20 (29.41)



รูปที่ 3.4 แสดงเปอร์เซนต์การเจริญเติบโตของเอมบริโอระยะ 8- เซลล์ เป็นบลาสโตซิส ในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM + 10% FBS ที่ระดับ osmolality ต่าง ๆ in vitro

ตารางที่ 3.7 แสดงการเปรียบเทียบระดับ osmolalities เป็นคู่ ๆ ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเอมบริโอหนูขาวระยะ 8-เซลล์ เป็นบลาสโตซิสในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM + 10 % FBS

Osmolalities (mosmol/kg)	Z	P
290 ± 5 - 320 ± 5	0.65	N.S.
290 ± 5 - 350 ± 5	1.77	< 0.05
290 ± 5 - 380 ± 5	0.85	N.S.
320 ± 5 - 350 ± 5	1.18	N.S.
320 ± 5 - 380 ± 5	1.58	N.S.
350 ± 5 - 380 ± 5	2.70	< 0.005

N.S. = not significantly different ($p > 0.05$)

ผลการทดลองในการถ่ายฝากเอมบริโอที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมงกับเอมบริโอกลุ่มควบคุม เมื่อถ่ายฝากไปยังมดลูกของ recipient ที่มีการตั้งท้องเทียมได้ 4 วัน

เพื่อศึกษาว่าเอมบริโอที่เจริญจากระยะ 8-เซลล์ เป็นบลาสโตซิส in vitro จะมีความสามารถในการอยู่รอดได้เหมือนเอมบริโอปกติหรือไม่ จึงได้ทำการทดลองถ่ายฝากเอมบริโอเหล่านี้ไปยัง recipients ที่ตั้งท้องเทียมได้ 4 วัน

กลุ่มควบคุม

จากการถ่ายฝากเอมบริโอซึ่งมีลักษณะปกติจำนวน 120 ตัวไปยังมดลูกของ recipients จำนวนทั้งหมด 10 ตัว โดยทำการถ่ายฝากเข้าสู่มดลูกทั้ง 2 ข้าง ข้างละ 6 ตัว หลังจากทำการถ่ายฝาก 5 วัน ทำ laparotomy เพื่อดูจำนวนฟีตัสที่ได้จากการถ่ายฝาก พบฟีตัสปกติทั้งหมดจำนวน 64 ตัว (53.33%) resorb 2 ตัว (1.67%) เมื่อครบกำหนดคลอดได้ลูกอ่อนทั้งหมดจำนวน 48 ตัว (40%) ซึ่งมีลักษณะปกติและมีชีวิตรอดจนหย่านม ดังตารางที่ 3.8

กลุ่มทดลอง

เมื่อทำการถ่ายฝากเอมบริโอระยะบลาสโตซิสจำนวน 120 ตัว ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM + 10 % FBS ไปยังมดลูกของ recipients จำนวน 10 ตัว โดยถ่ายฝากเอมบริโอไว้ในมดลูกข้างละ 6 ตัว ภายหลังการถ่ายฝาก 5 วัน ทำ laparotomy พบฟีตัสปกติทั้งหมด 70 ตัว (58.33%) resorb 9 ตัว (7.5%) หลังจากนั้นสามารถเจริญจนครบกำหนดคลอดเป็นลูกอ่อนทั้งหมด 54 ตัว (45%) ซึ่งมีลักษณะปกติและมีชีวิตรอดจนหลังหย่านม (ตารางที่ 3.9)

ค่าสถิติจากการเปรียบเทียบจำนวนฟีตัสในมดลูกของ recipients และจำนวนลูกอ่อนที่ครบกำหนดคลอดของทั้งกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมไม่พบความแตกต่างที่เกิดขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

ตารางที่ 3.8 แสดงผลการถ่ายฝากเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ ในกลุ่มควบคุม (control group) ไปยัง recipients ที่ตั้งท้องเทียม

Recipients[a] female no.	No. of 8-cell embryo transfered[b]	No. of fetuses at laparotomy[c]		No. of young born[d]
		Life	Resorb	
1	12	3	-	3
2	12	9	-	8
3	12	3	-	2
4	12	9	2	6
5	12	7	-	5
6	12	7	-	6
7	12	6	-	4
8	12	5	-	3
9	12	7	-	4
10	12	8	-	7
Total	120	64 (53.33%)	2 (1.67%)	48 (40%)

a. ผสมกับ vasectomized males วันเดียวกับ donors

b. เป็น 8-เซลล์ เอมบริโอที่ flush จากท่อสืบพันธ์ของ donors แล้วล้างด้วย PB1 ต่อจากนั้นนำเอมบริโอมาทำการถ่ายฝากไปยังมดลูกทั้ง 2 ข้าง (ข้างละ 6 ตัว) ของ recipients ทันที

c. ภายหลังการถ่ายฝาก 5 วัน (ตั้งท้องเป็นวันที่ 9)

d. ลูกที่เกิดมาทั้งหมดมีลักษณะปกติและมีชีวิตรอดอยู่จนกระทั่งหย่านม

ตารางที่ 3.9 แสดงผลการถ่ายฝากบลาสโตซิสที่เจริญจากเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM + 10 % FBS

Recipients[a] female no.	No. of balstocyst transfered[b]	No. of fetuses at laparotomy[c]		No. of young born[d]
		Life	Resorb	
1	12	6	-	5
2	12	4	6	3
3	12	6	-	5
4	12	6	-	4
5	12	8	3	7
6	12	11	-	7
7	12	11	-	11
8	12	5	-	3
9	12	8	-	6
10	12	5	-	3
Total	120	70 (58.33%)	9 (7.5%)	54 (45%)

a. ผสมกับ vasectomized males วันเดียวกับ donors

b. เป็นบลาสโตซิสที่เจริญจาก 8-เซลล์ เอมบริโอ หลังการเพาะเลี้ยง 6 ชั่วโมง บลาสโตซิสแต่ละกลุ่มจะทำการถ่ายฝากไปยังมดลูกของ recipients ทั้ง 2 ข้าง ข้างละ 6 ตัว

c. หลังการถ่ายฝาก 5 วัน (ตั้งท้องเป็นวันที่ 9)

d. ลูกที่เกิดมาทั้งหมดมีลักษณะปกติและมีชีวิตรอดอยู่จนกระทั่งหลังหย่านม