การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนของหนูขาวพันธุ์วิสตาร์ในหลอดทดลอง

นางสาว เกศรินทร์ แสงจันทร์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สหสาขาวิชาสรีรวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2530

ISBN 974-567-413-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

012503

CULTIVATION OF WISTAR RAT EMBRYOS IN VITRO

Miss Ketsarin Saengchan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Inter-Department of Physiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1987

ISBN 974-567-413-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนของหนูขาวพันธุ์วิสตาร์ในหลอดทดลอง

โดย นางสาว เกศรินทร์ แสงจันทร์

ภาควิชา สรีรวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.วิทยา ยศยิ่งยวด

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ทวินศรี วรวรรณ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิทยา ยศยิ่งยวด)

..... กรรมการ

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

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ประมวล วีรุตมเสน)

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนของหนูขาวพันธุ์วิสตารในหลอดทดลอง

ชื่อนิสิต นางสาว เกศรินทร์ แสงจันทร์

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.วิทยา ยศยิ่งยวด

สหสาขาวิชา สรีรวิทยา

ปีการศึกษา 2529

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มุ่งทดสอบหาชนิดของน้ำยาเพาะเลี้ยง และสภาวะแวดล้อม ที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนของหนูขาวพันธุ์วิสตาร์ in vitro เอมบริโอที่ได้จากหนูขาวเพศเมียที่กระตุ้นให้มีการตกไข่ครั้งละมาก ๆ ด้วย PMSG และ hCG แล้วผสมกับหนูขาวเพศผู้ ถูกนำไปเพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิดต่าง ๆ (Ham's F-10, M16, T6 และ DMEM) เพื่อหาชนิดของน้ำยาที่เอมบริโอสามารถเจริญได้ดีที่สุด ต่อจากนั้นได้ศึกษาถึงผลของชนิดและปริมาณซีรั่มที่ต่างกัน (3 mg/ml BSA, 2.5% FBS และ 10% FBS) ตลอดจนระดับ pH (6.9-7.9) และ osmolality (290±5, 320±5, 350±5 และ 380±5 mosmol/kg) ของน้ำยาเพาะเลี้ยงต่อการเจริญของเอมบริโอ in vitro นอกจากนี้ ยังได้ทำการถ่ายฝากบลาสโตซิสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง in vitro ไปยังหนูที่ตั้งท้องเทียมเพื่อศึกษาถึงผลกระทบของการเพาะเลี้ยง in vitro ต่อความอยู่รอดของเอมบริโอด้วย

ผลจากการทดลองเพาะเลี้ยงเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ ของหนูขาวในน้ำยาเพาะเลี้ยงทั้ง 4 ชนิดที่เติม 10% FBS พบว่าเอมบริโอเจริญเป็นบลาสโตซิสในน้ำยา DMEM ได้ดีกว่าในน้ำยาอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) นอกจากนี้การเสื่อมสลายของเอมบริโอในน้ำยา DMEM ยังเกิดน้อยกว่าในน้ำยาอื่น ๆ อีกด้วย เอมบริโอเจริญในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM + 10% FBS ได้ดีกว่าใน DMEM + 2.5% FBS อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.005$) ส่วนใน DMEM + 3 mg/ml BSA ไม่พบการแบ่งตัวของเอมบริโอ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากใน FBS มีสารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอซึ่งไม่มีใน BSA อย่างไรก็ตามน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM + 10% FBS นี้ไม่สามารถส่งเสริมการแบ่งตัวของเอมบริโอหนูขาวระยะ 1-, 2- และ

4- เซลล์ ได้ อาจเป็นเพราะในน้ำยาเพาะเลี้ยงดังกล่าวยังขาดองค์ประกอบที่จำเป็นสำหรับเอมบริโอในระยะต้น ๆ ชนิดอื่น ๆ นอกเหนือจากที่มีอยู่ หรือขาดเอนไซม์ หรือสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมเช่นเดียวกับที่พบในท่อนำไข่ ระดับ pH ของน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีผลต่อการเจริญของเอมบริโอหนูขาว in vitro พบว่าเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ เจริญในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ระดับ pH สูง (7.5-7.9) ซึ่งใกล้เคียงกับระดับ pH ของของเหลวจาก ligated uterus ของหนูขาว (7.74) ได้ดีกว่าที่ระดับ pH ต่ำ (6.9-7.3) ผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าเอมบริโอจะเจริญได้ดีที่สุดเมื่อสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง in vitro ใกล้เคียงกับสภาพตามธรรมชาติ osmolality ของน้ำยาเพาะเลี้ยงก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญของเอมบริโอหนูขาว โดยเอมบริโอระยะ 8- เซลล์ เจริญเป็นบลาสโตซิสในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีระดับ osmolality 320-350 mosmol/kg ได้ดีกว่าและการเสื่อมสลายก็น้อยกว่าพวกที่เลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีระดับ osmolality สูงหรือต่ำกว่านี้ อาจเป็นไปได้ว่าระดับ osmolality นี้มีค่าใกล้เคียงกับระดับ osmolality ของของเหลวในมดลูกในช่วงที่เอมบริโอหนูขาวเจริญถึงระยะ 8-เซลล์-บลาสโตซิส ข้อนี้จำเป็นต้องมีการศึกษากันอย่างละเอียดต่อไปเพราะยังไม่เคยพบมีผู้ใดรายงานไว้เลย

ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าเมื่อถ่ายฝากบลาสโตซิสที่เจริญมาจากการเพาะเลี้ยงเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ in vitro ไปยัง recipient ที่ตั้งท้องเทียม เอมบริโอสามารถเข้าฝังตัวและเจริญเติบโตจนครบกำหนดคลอดเช่นเดียวกับการถ่ายฝากเอมบริโอที่เจริญ in vivo

Thesis Title Cultivation of Wistar Rat Embryos In Vitro

Name Miss Ketsarin Saengchan

Thesis Advisor Associate Professor Vithaya Yodyingyuad, Ph.D.

Interdepartment Physiology

Acadamic Year 1986

ABSTRACT

Attempts were made to find out the type and environmental condition of medium suitable for the cultivation of rat embryo in vitro. Embryos recovered from mated superovulated female rats, using PMSG and hCG, were cultured in a wide variety of culture media (Ham's F-10, M16, T6 and DMEM) to obtain the most suitable one for rat embryo culture. Effects of different type and amount of sera (3 mg/ml BSA, 2.5% FBS and 10% FBS), as well as pH (6.9-7.9) and osmolality (290±5, 320±5, 350±5 and 380±5 mosmol/kg.) of the culture medium on the development of rat embryos in vitro were studied. Furthermore, blastocysts developed in vitro were transfered to pseudopregnant recipients to assess their viability.

The 8-cell rat embryos developed significantly better in DMEM + 10% FBS than in any other media tested ($p < 0.01$). Moreover, this study had proved that medium containing higher concentration of FBS (10% v.s. 2.5%) supported better development of rat embryos in vitro ($p < 0.005$). None of the rat embryo cleaved in DMEM + 3 mg/ml BSA. This may suggest that FBS contains substance (s) which support the development of embryos in vitro, but not the BSA. However, DMEM + 10%

FBS could not support the development of rat 1-, 2- and 4-cell embryos either. This perhaps due to the lack of essential factor (s), enzyme (s) or suitable environment like that in the oviduct which is needed for the development of these early stages embryo.

The hydrogen ion concentration in the culture medium affects the development of rat embryos in vitro. More 8-cell embryos developed in the medium at high pH (7.5-7.9) than at low pH (6.9-7.3). This pH is about the same to the pH of fluid in the ligated rat uterus (7.74). The result indicates the fact that development of embryos in vitro would be best when the condition is closed to its nature. Changing the osmolality of the medium also had an effect on the development of rat embryos in vitro. Better development of the 8-cell embryos into blastocysts and less damage to the embryos were obtained when they were cultured in the medium of osmolality ranging 320-350 mosmol/kg. Possibly the value is also closed to the osmolality of the uterine fluid at the time rat embryos reach 8-cell-blastocyst stages. Further study in detail is necessary to clarify this point since it has never been reported in the literature.

This study had also proved that blastocysts developed from the 8-cell embryos in vitro were able to implant and grew to term when transfered to pseudopregnant recipients similar to the transfer of embryos developed in vivo.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร.วิทยา ยศยิ่งยวด อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ของการวิจัยมาด้วยดีตลอด ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. ม.ร.ว.พุฒิพงศ์ วรวุฒิ ท่านหัวหน้าภาควิชาชีววิทยา ตลอดจนคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาฯ ที่ได้กรุณาให้ความรู้ทางวิชาการและความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการ

การศึกษาครั้งนี้จะไม่เสร็จสมบูรณ์ถ้าปราศจากเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ซึ่งช่วยเหลือในเรื่องสัตว์ทดลอง รวมถึงห้องปฏิบัติการหน่วยโรคไต คณะแพทย-ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเนื่องจากทุนการวิจัยครั้งนี้บางส่วนได้รับมาจากทุนอุดหนุนการวิจัยของเงินทุนสมเด็จพระมหิตลาธิเบศร อดุลยเดชวิกรม พระบรมราชชนก และศูนย์พันธุ-วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและการพลังงาน จึงขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

ท้ายนี้ ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา ซึ่งสนับสนุนในด้านการเงินและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

เกศรินทร์ แสงจันทร์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ฉ

กิตติกรรมประกาศ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญรูปและกราฟ ..... ฎ

บทที่

1. บทนำ 1

- การเจริญของไข่, การตกไข่, ขบวนการผสมพันธุ์ และเอมบริโอระยะฝังตัว 1
- การเพาะเลี้ยงเอมบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม 4
- ความต้องการสารให้พลังงานของเอมบริโอในระยะก่อนฝังตัว 8
- ผลของระดับ pH และ osmolality ของน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีต่อการเจริญของเอมบริโอ 10
- ผลของวิตามิน, สารเคมี, และฮอร์โมน ต่อการเจริญของเอมบริโอ
- การถ่ายฝากเอมบริโอ 12
- วัตถุประสงค์ของการศึกษา และประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 16

2. สัตว์ทดลอง อุปกรณ์ สารเคมี และการทดลอง 18

- สัตว์ทดลอง 18
- อุปกรณ์ 18
- สารเคมี 21
- วิธีการทดลอง 24
- Natural ovulation และ Superovulation 24
- การเก็บเอมบริโอ 28
- น้ำยาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง 28

บทที่ หน้า

- การเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยง 32
- การเพาะเลี้ยงเอมบริโอ 32
- การเตรียมเอมบริโอเพื่อการถ่ายฝาก 36
- การเตรียม pseudopregnant recipient 36
- วิธีการถ่ายฝาก 37
- การแปลผลทางสถิติ..... 39

3. ผลการทดลอง 40

4. วิจารณ์และสรุปผล 58

เอกสารอ้างอิง 68

ประวัติผู้เขียน 88

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1.1 แสดงเอมบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลาย ๆ ชนิดที่สามารถเพาะเลี้ยง in vitro จากระยะ 1-เซลล์ ถึงบลาสโตซิสได้สำเร็จ 6

1.2 แสดงส่วนประกอบของน้ำยาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอจากระยะ 1-เซลล์ ถึงบลาสโตซิส in vitro 7

1.3 แสดงความสำเร็จครั้งแรกในการถ่ายฝากเอมบริโอของสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม 13

2.1 แสดงระยะและตำแหน่งที่จะพบเอมบริโอของหนูขาวในการเจริญ in vivo 25

2.2 ส่วนประกอบของน้ำยาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอ 33

3.1 แสดงผลการเจริญเติบโตของเอมบริโอหนูขาวระยะ 8-เซลล์ เป็นบลาสโตซิสในน้ำยาเพาะเลี้ยง 4 ชนิด 41

3.2 แสดงการเปรียบเทียบชนิดของน้ำยาเพาะเลี้ยงในแต่ละคู่ที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอหนูขาวระยะ 8-เซลล์ เป็นบลาสโตซิส in vitro 43

3.3 แสดงผลของการเจริญเติบโตของเอมบริโอหนูขาวระยะ 8-เซลล์ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM ที่ประกอบด้วยซนิดและปริมาณซีรัมต่างกัน .. 45

3.4 แสดงผลการเจริญของเอมบริโอหนูขาวระยะ 8-เซลล์ จนถึงระยะบลาสโตซิสในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM + 10% FBS ที่ระดับ pH ต่าง ๆ 48

3.5 แสดงการเปรียบเทียบระดับ pH เป็นคู่ ๆ ในการส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอหนูขาวระยะ 8-เซลล์ เป็นบลาสโตซิสในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM + 10% FBS 50

3.6 แสดงผลการเจริญของเอมบริโอหนูขาวระยะ 8-เซลล์ เป็นบลาสโตซิสในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM + 10% FBS ที่ระดับ osmolality ต่าง ๆ 52

ตารางที่ หน้า

3.7 แสดงการเปรียบเทียบระดับ osmolalities เป็นคู่ ๆ ในการส่งเสริมการเจริญของเอมบริโอหนูขาวระยะ 8-เซลล์ เป็นบลาสโตซิสในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM + 10% FBS 54

3.8 แสดงผลการถ่ายฝากเอมบริโอหนูขาวระยะ 8-เซลล์ ในกลุ่มควบคุมไปยัง recipient ที่ตั้งท้องเทียม 56

3.9 แสดงผลการถ่ายฝากบลาสโตซิสที่เจริญจากเอมบริโอหนูขาวระยะ 8-เซลล์ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM + 10% FBS 57

สารบัญรูปและกราฟ

รูปที่ หน้า

1.1 แสดงแผนภาพที่ใช้แทนลักษณะการเกิดการเจริญของไข่, การตกไข่, ขบวนการผสมพันธุ์ และเอมบริโอระยะก่อนฝังตัว 2

1.2 สรุปเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นในระบบท่อสืบพันธุ์ของเพศเมียที่นำไปสู่การปฏิสนธิ 3

2.1 แสดงอุปกรณ์และเครื่องมือผ่าตัดที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงและถ่ายฝากเอมบริโอ 20

2.2 แสดงการเตรียม capillary pipette 22

2.3 แสดงเอมบริโอของหนูขาวระยะต่าง ๆ ก่อนการฝังตัว 26

2.4 แสดงการตัดแยกท่อนำไข่ออกจากมดลูก 29

2.5 แสดงแผนภาพท่อนำไข่ของหนูขาว 29

2.6 แสดงการฉีดขับเอาองค์ประกอบภายในท่อนำไข่ลงใน embryological watchglass 30

2.7 แสดงการถ่ายฝากเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ และบลาสโตซิสไปที่บริเวณปีกมดลูกของ recipient 38

3.1 แสดงเปอร์เซนต์ของบลาสโตซิสที่เจริญจากเอมบริโอหนูขาวระยะ 8-เซลล์ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง 4 ชนิด 42

3.2 แสดงเปอร์เซนต์ของบลาสโตซิสที่เจริญจากเอมบริโอหนูขาวระยะ 8-เซลล์ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM ที่ประกอบด้วยซนิดและปริมาณซีรัมต่างกัน 46

3.3 แสดงเปอร์เซนต์การเจริญของเอมบริโอหนูขาวระยะ 8-เซลล์ เป็นบลาสโตซิสในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM + 10% FBS ที่ระดับ pH ต่าง ๆ 49

3.4 แสดงเปอร์เซนต์การเจริญของเอมบริโอหนูขาวระยะ 8-เซลล์ เป็นบลาสโตซิสในน้ำยาเพาะเลี้ยง DMEM + 10% FBS ที่ระดับ osmolality ต่าง ๆ 53