ผลของภาวะการเก็บรักษาโอโอไซต์สุกรต่อการสุกและการปฏิสนธินอกร่างกาย

นายสรรเพชญ โสภณ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-634-875-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17632717

EFFECTS OF PORCINE FOLLICULAR OOCYTE STORAGE CONDITIONS ON MATURATION AND FERTILIZATION *IN VITRO*

MR. SUNPETCH SOPHON

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements

for the Degree of Philosophy of Science

Programme of Biological Science

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1996

ISBN 974-634-875-2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของภาวะการเก็บรักษาโอโอไซต์สุกรต่อการสุกและการปฏิสนธินอกร่างกาย
โดย	นาย สรรเพชญ โสภณ
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ศาสตราจารย์ มณีวรรณ กมลพัฒนะ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. วิทยา ยศยิ่งยวด

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาดุษฎีบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีดา บุญหลง)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(ศาสตราจารย์ มณีวรรณ กมลพัฒนะ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. วิทยา ยศยิ่งยวด)

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ นพ. ดร. กนก ภาวสุทธิไพสิฐ)

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ น.สพ. ดร. อรรณพ คุณาวงษ์กฤต)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

สรรเพชญ โสภณ : ผลของภาวะการเก็บรักษาโอโอไซต์สุกรต่อการสุกและการปฏิสนธินอกร่างกาย (EFFECTS OF PORCINE FOLLICULAR OOCYTE STORAGE CONDITIONS ON MATURATION AND FERTILIZATION *IN VITRO*) อ.ที่ปรึกษา : ศ.มณีวรรณ กมลพัฒนะ และ รศ.ดร. วิทยา ยศยิ่งยวด. 92 หน้า ISBN 974-634-875-2

งานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อความสามารถในการเจริญของโอโอไซต์สุกรเพื่อปฏิสนธินอกร่างกายและความเป็นไปได้ในการแช่แข็ง โดยใช้โอโอไซต์ที่เจาะได้จากฟอลลิเคิลขนาด 2-6 มม. ของรังไข่สุกรจากโรงฆ่าสัตว์ และใช้มีเดียม M199B เป็นมีเดียมพื้นฐานในการเก็บและคัดเลือก โอโอไซต์ การเลี้ยงโอโอไซต์ให้สุก เลี้ยงใน IVM มีเดียม ซึ่งเป็นมีเดียม M199B ที่เสริม ฟอลลิเคิล สติมูเลติง ฮอร์โมน 1 หน่วย/มล. ลูทีไนซิง ฮอร์โมน 1 หน่วย/มล. เอสตราไดออล 1 ไมโครกรัม/มล. และของเหลวจากฟอลลิเคิล 10% โดยปริมาตร และได้นำไข่สุกมาได้ทำการปฏิสนธิกับน้ำเชื้อสดที่รีดจากพ่อสุกร ใน IVF มีเดียม ซึ่งเป็นมีเดียม M199B ที่เติม คาเฟอีน 2 มิลลิโมลาร์ ทั้งการเลี้ยงไข่ให้สุกและการปฏิสนธิกระทำในตู้บ่มอุณหภูมิ 39^{0} ซ ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ในอากาศ จากการศึกษาการเจริญของโอโอไซต์ที่เลี้ยงนาน 12-48 ช.ม. โดยตรวจดูทุก ๆ 2 ช.ม. พบว่าโอโอไซต์เจริญถึงระยะเมตาเฟส II ประมาณชั่วโมงที่ 32 และเริ่มมีเปอร์เซนต์การสุกสูง (80.5%) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 เป็นต้นไป และจากการทดสอบการปฏิสนธิของน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์สุกร 7 ตัว พบว่า น้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์สุกรแต่ละตัวให้ผลการปฏิสนธิและการเจริญถึง 2-4 เซลล์แตกต่างกัน เมื่อศึกษาเปรียบเทียบการเจริญของโอโอไซต์ที่ได้จากรังไข่ที่เก็บไว้ที่ 24^{0}ซ ก่อนนำมาเลี้ยงเป็นเวลา 0 8 12 18 หรือ 24 ชม. หลังจากนำรังไข่มาถึงห้องปฏิบัติการ พบว่าสามารถเก็บรังไข่ไว้ได้นาน 8 ช.ม. โดยมีเปอร์เซนต์ไข่สุกที่แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กับโอโอไซต์ที่ได้จากการเจาะรังไข่ทันทีที่มาถึงห้องปฏิบัติการ ในการทดสอบความเป็นพิษของสารป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ 5 ชนิด ได้แก่ กลีเซอโรล (GLY) ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) เอทิลีนไกลคอล (EG) โปรปีลีนไกลคอล (PROH) บิวเทนไดออล (BUOH) พบว่า สารทุกชนิดที่ 1.5 โมลาร์ ไม่เป็นอันตรายต่อโอโอไซต์ที่จะเจริญจนสุก การทดลองลดอุณหภูมิของโอโอไซต์ลงจาก 29^{0}ซ ถึง 4^{0}ซ จะพบว่า เมื่ออุณหภูมิลดลงถึง 15^{0}ซ เปอร์เซนต์ไข่สุกจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) และถ้าอุณหภูมิลดลงต่ำกว่า 15^{0}ซ จนถึง 4^{0}ซ จะไม่มีไข่สุกเลย ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของมีเดียม VTM 3 ชนิด สำหรับการทำไวตริฟิเคชัน คือ VTM 1 ประกอบด้วย EG 7.5 โมลาร์ ใน มีเดียม 199 ที่มี โบวายน์ซีรัมอัลบูมิน (BSA) 6% VTM 2 ประกอบด้วย EG 6.25 โมลาร์ และ GLY 0.7 โมลาร์ ซูโครส 0.1 โมลาร์ ในมีเดียม 199 ที่มี 20 % ฟีตอลโบวายน์ซีรัม และ VTM 3 ประกอบด้วย EG 7.15 โมลาร์ ซูโครส 0.1 โมลาร์ และ ไซโตชลาซิน บี (CB) 1.75 ไมโครกรัม/มล. ในมีเดียม 199 ที่มี 20 % ฟีตอลโบวายน์ซีรัม พบว่าการปรับสมดุลย์แรงดันออสโมติคในมีเดียม VTM ทุกชนิด ไม่มีผลทำให้โอโอไซต์สุกแตกต่างไปจากการเลี้ยงโอโอไซต์ให้สุกตามปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อนำโอโอไซต์มาทำแช่แข็งด้วยวิธีไวตริฟิเคชัน พบว่าโอโอไซต์ที่ผ่านการแช่แข็งจากทุกมีเดียมไม่สามารถเจริญต่อหลังการละลาย เพราะเกิดการทำลายนิวเคลียสและโอโอเลมมา และการทดลองแช่แข็งไข่สุกพบว่าหลังการละลายไข่สุกไม่สามารถทำการปฏิสนธิได้และเกิดการทำลายนิวเคลียสและโอโอเลมมาด้วยเช่นกัน ซึ่งสามารถยืนยันได้จากภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบทรานสมิชชัน

การศึกษาครั้งนี้ทำให้สามารถใช้ประโยชน์จากรังไข่สุกรซึ่งมีอยู่มากให้เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยหาความรู้เกี่ยวกับการเจริญและพัฒนาของเซลล์ไข่ตลอดจนฝึกฝนหาประสบการณ์ในงานปฏิสนธินอกร่างกาย

ภาควิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C526996 : MAJOR BIOLOGICAL SCIENCE
KEY WORD: *IN VITRO* MATURATION/ *IN VITRO* FERTILIZATION/ FOLLICULAR OOCYTE/ STORAGE CONDITION/ PIG

SUNPETCH SOPHON : EFFECTS OF PORCINE FOLLICULAR OOCYTE STORAGE CONDITIONS ON MATURATION AND FERTILIZATION *IN VITRO*. THESIS ADVISOR : PROF. MANEEWAN KAMONPATANA AND ASSOC. PROF. DR. VITHAYA YODYINGYUAD, Ph.D. 92 pp.
ISBN 974-634-875-2

Porcine follicular oocytes obtained from ovaries collected from a slaughter house by aspirating the follicle 2-6 mm in diameter. M199B was used as basic medium for holding the oocytes. The oocytes were cultured in IVM medium which was M199B supplemented with follicle stimulating hormone 1 unit/ml, luteinizing hormone 1 unit/ml, oestradiol 1 microgram/ml and pig follicular fluid 10% v/v. Matured oocytes were fertilized, with sperm from fresh ejaculated semen obtained from boars, in IVF medium which was M199B supplemented with 2 mM caffeine . The oocytes were cultured and fertilized at 39^{o}C in 5% CO_2 in air atmosphere. The oocytes were cultured for the period of 12-48 h and checked the maturation of nucleus every 2 h. The result showed that oocytes developed to metaphase II around 32th h and high maturation rate started from 36th h. The ability of semen from boars were tested. Results showed that there were difference among boars on fertilization ability and the development of fertilized oocytes to reach 2-4 cell stage. The ovaries were kept before oocytes collection at 24^{o}C for 0, 8, 12, 18 or 24 h starting from ovaries were arrived in the laboratory. Oocytes maturation were not significantly different ($P > 0.05$) between oocytes collected from 0 h or 8 h storaged ovaries. Five cryoprotectants were tested for toxicity to the oocytes and it was found that glycerol (GLY), dimethylsulfoxide (DMSO), ethyleneglycol (EG), propyleneglycol (PROH) and butanediol (BUOH), at 1.5 M in M199B did not effect oocytes maturation. Effect of low temperature on oocytes maturation was tested by cooling the oocytes from 29^{o}C to 4^{o}C. Percentage of oocytes maturation was significantly decreased ($P < 0.001$) when cooling to 15^{o}C and beyond 15^{o}C to 4^{o}C the oocytes could not developed to metaphase II. Toxicity of 3 vitrification mediums (VTM), VTM 1 consisted of EG 7.5 M in medium 199 with 6% bovine serum albumin (BSA), VTM 2 consisted of EG 6.25 M, GLY 0.7 M sucrose 0.1 M and 20% feotal bovine serum (FBS) in medium 199 and VTM 3 consisted of EG 7.15 M, sucrose 0.1 M and Cytochalacin B (CB) 7.5 microgram/ml in medium 199, were tested. The equilibrated oocytes in each VTM could mature nonsignificantly different from the unequilibrated oocytes. Cryopreservation oocytes by vitrification with each VTM could not protect the oocytes from damage. Vitrification of matured oocytes with each VTM resulted in unfertilized oocytes with damaged nucleuses after thawing. The photographs by transmission electron-microscope confirmed the damaging of oolemma in both frozen oocytes and matured oocytes.

The imformation and knowledge from this study can be used as a base for further studying. The pig ovaries were easily collected and could be used as a mean for scientists to practise the cryopreservation of oocytes that related to IVM/IVF/IVC research.

ภาควิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2539 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี ด้วยความช่วยเหลือและอนุเคราะห์จากอาจารย์และบุคคลากรต่างๆ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงแด่ ศาสตราจารย์ มณีวรรณ กมลพัฒนะ ที่กรุณารับเป็นที่ปรึกษา ให้คำแนะนำ ข้อคิดต่างๆ สถานที่ อุปกรณ์และสารเคมี ในการวิจัย และข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของท่าน ที่ได้ติดตามเอาใจใส่โดยตลอด รวมทั้งได้กรุณาอนุมัติให้ศึกษาต่อในฐานะผู้บังคับบัญชาตรงในสายงาน

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วิทยา ยศยิ่งยวด ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ตลอดจนให้คำแนะนำด้วยดีเสมอ

ขอขอบคุณ คุณกำพล วงษ์ทองสาลี ที่ให้ความอนุเคราะห์น้ำเชื้อสุกร ตลอดการทดลองนี้

ขอขอบคุณ อาจารย์ น.สพ. ดร. วีระพงศ์ โกยกุล ที่ให้คำปรึกษาในการแปลผลภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

ขอขอบคุณ คุณระพีพร เมืองมั่งคั่ง คุณอุษา อาดำ และคุณราตรี จินตนา ที่ช่วยเหลือในการพิมพ์

ขอขอบคุณ นักวิจัย และเจ้าหน้าที่ของโครงการการใช้นิวเคลียร์เทคโนโลยีเพื่อส่งเสริมกิจการผสมเทียมโคนมและกระบือปลัก ทุกๆท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในทุกด้านๆ เป็นอย่างดี จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์

กราบขอบพระคุณ คุณพ่อสุข และ คุณแม่ไฮแก้ว โสภณ ที่ส่งเสริมให้การศึกษาและเป็นกำลังใจตลอดมา และ ขอบใจ คุณเยาวลักษณ์ โสภณ ด.ช.ฤกษ์ระพี โสภณ และ ด.ญ.ปาลีพัชร โสภณ ที่ให้กำลังใจ เข้าใจและอดทน ที่ได้ใช้เวลาส่วนหนึ่งของครอบครัวในการศึกษาครั้งนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญตาราง..... ซ

สารบัญรูป..... ญ

คำย่อ..... ฑ

บทที่

1. บทนำ..... 1
2. การตรวจเอกสาร..... 4
3. วัสดุ อุปกรณ์ และ วิธีการทดลอง..... 18
4. ระบบการเลี้ยงโอโอไซต์ให้สุก และ การปฏิสนธินอกร่างกาย..... 44
5. การเก็บรักษารังไข่และโอโอไซต์เหนือจุดเยือกแข็ง..... 55
6. การเก็บรักษาโอโอไซต์ และไข่สุก ต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง..... 66
7. สรุปผลและข้อเสนอแนะ..... 81

รายการอ้างอิง..... 84

ประวัติผู้เขียน..... 92

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เปอร์เซนต์การเจริญของนิวเคลียสของโอโอไซต์ในระยะต่าง ๆ ระหว่าง 12-48 ชม. ที่เลี้ยงในมีเดียม IVM.....	46
2	ผลของพ่อพันธุ์สุกรต่อเปอร์เซนต์การปฏิสนธินอกร่างกาย และเจริญถึง 2-4 เซลล์หลังจากการเติมอสุจินาน 48 ชม. ใน IVF มีเดียมของโอโอไซต์ที่เลี้ยงใน IVM มีเดียมมาแล้ว นาน 40 ชม.....	51
3	เปอร์เซนต์การสุกของโอโอไซต์และการเจริญจนถึงระยะ 2-4 เซลล์ หลังปฏิสนธินอกร่างกาย ที่ได้จากรังไข่ที่เก็บในน้ำเกลือนาน 0 8 12 18 หรือ 24 ชม. นับตั้งแต่รังไข่มาถึงห้องปฏิบัติการที่ 24°ซ นำมาเลี้ยงใน IVM มีเดียม นาน 40 ชม. แล้วปฏิสนธินอกร่างกายและเลี้ยงนาน 48 ชม. หลังเติมอสุจิ.....	58
4	เปอร์เซนต์การสุกของไข่ที่ผ่านการปรับสมดุลแรงดันออสโมติคในสารป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งในเซลล์ (CPA) จำนวน 5 ชนิด คือ GLY DMSO EG PROH และ BUOH ที่ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง 29°ซ แล้วนำไปเลี้ยงใน IVM มีเดียม นาน 40 ชม.....	59
5	แสดงเปอร์เซนต์การเจริญถึงระยะต่าง ๆ ของโอโอไซต์ที่ปรับสมดุลแรงดันออสโมติคใน M199B ที่มี 1.5 โมลาร์ EG และ 0.1 โมลาร์ ซูโครส แล้วให้อยู่ในอุณหภูมิที่ลดลง นาน 5 นาที โดยการลดอุณหภูมิ 1°ซ ต่อนาที จนถึงอุณหภูมิที่ต้องการ.....	62
6	แสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การสุกของโอโอไซต์ ที่ผ่านการปรับสมดุลแรงดันออสโมติด ในมีเดียมสำหรับทำไวตริฟิเคชัน 3 ชนิด ที่มีสารป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งในเซลล์ (CPA) ต่างกัน คือ VTM 1 (EG 7.5 โมลาร์) VTM 2 (EG 6.25 โมลาร์ GLY 0.5 โมลาร์ และ ซูโครส 0.1 โมลาร์) และ VTM 3 (EG 7.15 โมลาร์ ซูโครส 0.1 โมลาร์ และ CB) แล้วล้างออกก่อนที่จะเลี้ยงให้สุกใน IVM มีเดียมนาน 40 ชม.....	69

สารบัญตาราง (ต่อ)

7 แสดงเปอร์เซนต์การเจริญของโอโอไซต์ที่ผ่านการแช่แข็งโดยการทำไวตริฟิเคชัน ด้วย VTM มีเดียม 3 แบบ แล้วนำมาเลี้ยงใน IVM มีเดียมนาน 40 ชม..... 71

8 แสดงเปอร์เซนต์การปฏิสนธิ ของไข่สุกที่ผ่านการแช่แข็ง ด้วยการทำไวตริฟิชัน ด้วย VTM มีเดียม 3 แบบ แล้วนำมาทำ IVF นาน 14 ชม..... 71

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แผนภาพฟอลลิเคิลของสุกรและปัจจัยที่ควบคุมการทำงานในฟอลลิเคิล (ดัดแปลงจาก Christenson et al., 1985).....	6
2	รังไข่สุกร ที่เก็บมาจากโรงฆ่าสัตว์ เจาะเอาโอโอไซต์จากฟอลลิเคิล (ศรชี้) ขนาด 2-6 มม. (ขนาดรังไข่เป็น ซม.)	29
3	โอโอไซต์ที่คัดเลือกไว้ใช้ในการทดลองมีคูมูลัสเซลล์หุ้มล้อมรอบมากกว่า 4 ชั้น CM = คูมูลัสเซลล์ ZP = โซนาเพลลูซิดา และ CY = ไซโตพลาสซึม (กำลังขยาย 200 เท่า).....	29
4	การเตรียมหยด IVM มีเดียม เมื่อมองจากด้านบน (ขวา) และ ด้านข้าง (ซ้าย)	30
5	การบรรจุไข่เข้าหลอดฟาง เพื่อแช่แข็งแบบไวตริฟิเคชันตามลำดับขั้นตอน.....	35
6	โอโอไซต์สุกรเลี้ยงใน IVM มีเดียมนาน 40 ชม. ผสมรวมกับอสุจิใน IVF มีเดียมนาน 6 ชม. แล้วย้ายมาเลี้ยงใน IVC มีเดียมอีก 42 ชม. เป็นไข่สุก สังเกตจาก โพลาร์บอดี (ศรชี้) แต่ไม่มีการแบ่งตัว (กำลังขยาย 320 เท่า).....	40
7	โอโอไซต์สุกรเลี้ยงใน IVM มีเดียมนาน 40 ชม. ผสมรวมกับอสุจิใน IVF มีเดียมนาน 6 ชม. แล้วย้ายมาเลี้ยงใน IVC มีเดียมอีก 42 ชม. เป็นไข่สุก (สังเกตจากโพลาร์บอดี ที่ลูกศรชี้) ที่ได้รับการผสมและมีการแบ่งตัวเป็น 2 เซลล์ (กำลังขยาย 320 เท่า).....	41
8	โอโอไซต์สุกรเลี้ยงใน IVM มีเดียมนาน 40 ชม. ผสมรวมกับอสุจิใน IVF มีเดียมนาน 6 ชม. แล้วย้ายมาเลี้ยงใน IVC มีเดียมอีก 42 ชม. เป็นไข่สุก (สังเกตจากโพลาร์บอดี ที่ลูกศรชี้) ที่ได้รับการผสมและมีการแบ่งตัวเป็น 4 เซลล์ (กำลังขยาย 320 เท่า).....	41
9	แสดงภาพโครโมโซมของไข่สุกรในระยะการเจริญต่าง ๆ 1). ระยะเจอมินอลเวสิเคิล (GV) 2). ระยะโปรเมตาเฟส (PM) 3). ระยะเมตาเฟส I (M I) 4). ระยะอนาเฟส I (ANA I) 5). ระยะทีโลเฟส I (TEL I) 6). ระยะเมตาเฟส II (MII)...	47

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
10	เปอร์เซนต์การเจริญของนิวเคลียสของโอโอไซต์ใน IVM มีเดียม ระหว่างการเลี้ยง 12-48 ชม.....	48
11	ลักษณะการเจริญของคูมูลัสเซลล์ เมื่อทำการเลี้ยงโอโอไซต์นอกร่างกายใน IVM มีเดียมที่ 39°ซ ในบรรยากาศที่มี คาร์บอนไดออกไซด์ 5% นาน 12 ชม. คูมูลัสเซลล์ชั้นนอก เริ่มแผ่ออกมาเปลี่ยนเป็นรูปกระสวย และเกาะที่พื้นจานเลี้ยง(กำลังขยาย 320 เท่า).....	48
12	ลักษณะการเจริญของคูมูลัสเซลล์ เมื่อทำการเลี้ยงนอกร่างกายใน IVM มีเดียม ที่ 39°ซ ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นาน 18 ชม. คูมูลัสเซลล์ชั้นในแผ่ออกมา เกือบหมด และกระจายเกาะผิวจานเลี้ยงมาก (กำลังขยาย 320 เท่า)	49
13	ลักษณะการเจริญของคูมูลัสเซลล์ เมื่อทำการเลี้ยงนอกร่างกายใน IVM มีเดียม ที่ 39°ซ ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นาน 24 ชม. คูมูลัสเซลล์ ชั้นนอกเริ่มแผ่ ออกมาเปลี่ยนเป็นรูปกระสวย และเกาะที่พื้นจานเลี้ยง (กำลังขยาย 320 เท่า).....	49
14	ลักษณะการเจริญของคูมูลัสเซลล์ เมื่อทำการเลี้ยงนอกร่างกายใน IVM มีเดียม ที่ 39°ซ ในบรรยากาศที่มี คาร์บอนไดออกไซด์ 5% เลี้ยงนาน 24 ชม. จากโอโอไซต์เริ่มต้น มีคูมูลัสเซลล์หุ้มอย่างหนาแน่น (กำลังขยาย 100 เท่า) คูมูลัสเซลล์จะแผ่กระจายออกมากว้างมาก เมื่อเทียบกับขนาดไข่.....	50
15	แสดงเปอร์เซนต์ไข่สุกและเปอร์เซนต์การปฏิสนธินอกร่างกาย จนเจริญถึง 2-4 เซลล์ของพ่อพันธุ์สุกรทั้ง 7 ตัว โดยคิดจากจำนวนโอโอไซต์ที่เข้าปฏิสนธิ และคิดจากจำนวนไข่สุก.....	52
16	แสดงเปอร์เซนต์การสุกของโอโอไซต์และเปอร์เซนต์เจริญถึง 2-4 เซลล์ หลังจากปฏิสนธิ (คิดจากจำนวนไข่สุก) ของโอโอไซต์ที่ได้จากรังไข่ที่ในน้ำเกลือนาน 0 8 12 18 หรือ 24 ชม. นับตั้งแต่รังไข่ถึงห้องปฏิบัติการ.....	58

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
17	แสดงเปอร์เซนต์การเจริญของนิวเคลียสถึงระยะต่าง ๆ ของโอโอไซต์ที่ผ่านการปรับสมดุลแรงดันออสโมติค ในมีเดียมที่มีกลีเซอโรล (GLY), ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO), เอทิลีนไกลคอล (EG), โปรปีลีน ไกลคอล (PROH) หรือ บิวเทนไดออล (BUOH) เข้มข้น 1.5 โมลาร์ นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (29^{o}ซ) แล้วเลี้ยงใน IVM มีเดียม 40 ชม.....	60
18	โอโอไซต์ที่ผ่านการลดอุณหภูมิถึง 15^{o}ซ แล้วนำไปเลี้ยงใน IVM มีเดียมนาน 40 ชม. แล้วนำมาตรึงสภาพและย้อมสี พบว่า ส่วนไซโตพลาสซึมเริ่มแตกเป็นเม็ด แต่ก็ยังพบส่วนนิวเคลียส ที่ชะงักการเจริญอยู่ที่ระยะ GV (กำลังขยาย 320 เท่า)	61
19	แสดงเปอร์เซนต์การเจริญของนิวเคลียสถึงระยะต่าง ๆ ของโอโอไซต์ที่ปรับสมดุลแรงดันออสโมติค ใน M199B ที่มี เอทิลีนไกลคอล 1.5 โมลาร์ และ ซูโครส 0.1 โมลาร์ แล้วลดอุณหภูมิจาก 29^{o}ซ ถึง 4^{o}ซ ในอัตรา 1^{o}ซ ต่อนาที พักอยู่ในอุณหภูมิที่ต้องการ 5 นาที แล้วนำมาเลี้ยงใน IVM มีเดียมนาน 40 ชม.....	63
20	เปรียบเทียบเปอร์เซนต์การสุกของโอโอไซต์ที่ผ่านการปรับสมดุลย์ใน VTM มีเดียม 3 ชนิด คือ VTM 1 VTM 2 และ VTM 3 นาน 1.5 นาที แล้วล้างออก ก่อนเลี้ยงใน IVM มีเดียมนาน 40 ชม.....	70
21	โอโอไซต์ที่แช่แข็งด้วยวิธีไวตริฟิเคชัน ใน VTM 3 มีเดียม ภายหลังการทำละลาย แล้วเลี้ยงใน IVM มีเดียม นาน 40 ชม. ในใบที่พบว่าส่วนของนิวเคลียส ระยะ GV (ลูกศรชี้) ถูกทำลาย (กำลังขยาย 320 เท่า).....	72
22	โอโอไซต์สุกร ที่ไม่ได้ผ่านการแช่แข็ง ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน แบบทรานสมิชชัน กำลังขยาย 2,230 เท่า องค์ประกอบภายในเซลล์ยังสมบูรณ์อยู่ (ZP = โซนาเพลลูซิดา, PV = เพอริวิเทลลีน สเปซ, MV = ไมโครวิลไล และ LD = ไลปิด ดรอบเลท , ____ = 5 มค.).....	77

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
23	โอโอไซต์สุกร ที่ผ่านการแช่แข็งวิธีไวตริฟิเคชัน ด้วย VTM1 มีเดียม ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน แบบทรานสมิชชัน กำลังขยาย 2,270 เท่า องค์ประกอบภายในเซลล์ และโอโอเลมมาถูกทำลาย ไม่ปรากฏ PV และ MV และส่วน LD ถูกทำลายไปมีลักษณะเหมือนแวคูโอล (__ = 5 มค.).....	77
24	โอโอไซต์สุกร ที่ไม่ได้ผ่านการแช่แข็ง ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ อิเลคตรอนแบบทรานสมิชชัน กำลังขยาย 5,940 เท่า สังเกตพบ LD, MV และ PV ชัดเจน (_= 2 มค.).....	78
25	โอโอไซต์สุกรที่ผ่านการแช่แข็งวิธีไวตริฟิเคชัน ด้วย VTM 1 มีเดียม ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน แบบทรานสมิชชัน กำลังขยาย 6,050 เท่า องค์ประกอบต่างๆ ภายใน เซลล์ถูกทำลายเห็นได้ชัด คือ ส่วนของ LD และ ไมโต-คอนเดรีย (M, _____= 2 มค.).....	78
26	ไข่สุกที่ผ่านการปฏิสนธิ 6 ชม. ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบทรานสมิชชัน กำลังขยาย 2,230 เท่า สภาพเซลล์สมบูรณ์ พบแวคูโอล (VC) จำนวนมาก เห็น PV และ MV อย่างชัดเจน , ____ = 5 มค.....	79
27	ไข่สุกที่ผ่านการแช่แข็ง ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบทรานสมิชชัน กำลังขยาย 3,780 เท่า องค์ประกอบภายในเซลล์ถูกทำลาย ที่ชัดเจนคือ LD และ VC เห็นเมมเบรนหดตัวลงมา (ศรชี้) , _____ = 3 มค.....	79
28	ไข่สุกที่ผ่านการปฏิสนธิ 6 ชม. ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบทรานสมิชชัน กำลังขยาย 5,940 เท่า สภาพเซลล์สมบูรณ์ พบคอติคอลแกรนูล (CG) และ MV ที่บริเวณขอบไซโตพลาสซึม เห็น PV ชัดเจน, ____ = 2 มค.....	80
29	ไข่สุกที่ผ่านการแช่แข็ง ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบทรานสมิชชัน กำลังขยาย 6,050 เท่า เป็นสภาพเซลล์ที่ โอโอเลมมาและองค์ประกอบภายในเซลล์ถูกทำลาย และ ถูกขับออกมาบริเวณขอบไซโตพลาสซึม ไม่พบ PV และ MV , ____ = 2 มค.....	80

คำย่อ

^{o}ซ	องศาเซลเซียส
ค.ศ.	คริสต์ศักราช
ชม.	ชั่วโมง
ซม.	เซ็นติเมตร
มก.	มิลลิกรัม
มค.	ไมครอน
มคก.	ไมโครกรัม
มคล.	ไมโครลิตร
มม.	มิลลิเมตร
มล.	มิลลิลิตร
ไอ.ยู	อินเตอร์เนชันแนล ยูนิต

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

AFGP	แอนติ ฟรีส ไกลโค โปรตีน
AFP	แอนติ ฟรีส โปรตีน
ANA I	อนาเฟส I
AVS	แอบเพีย ไวตริไฟ โซลูชัน
BUOH	2,3- บิวเทนไดออล
CB	ไซโตชลาซิน บี
CG	คอติคอลแกรนูล
CM	คูมูลัสเซลล์
CPA	ไครโอโปรเทคทีฟเอเจนต์
CY	ไซโตพลาสซึม
DMSO	ไดเมทิลซัลฟอกไซด์
EG	เอทิลีนไกลคอล
FCS	ฟีตอล คลาฟ ซีรัม
FSH	ฟอลลิเคิล สติมูเลติง ฮอร์โมน
GLY	กลีเซอโรล
GnRH	โกนาโดโทรปิน รีลิสซิ่ง ฮอร์โมน
GV	เจอมินอล เวสิเคิล
hCG	ฮิวแมน คลอริโอนิค โกนาโดโทรปิน
IVC	อินวิโทร คัลเจอ
IVF	อินวิโทร เฟอติไลเซชัน
IVM	อินวิโทร แมทัวเรชัน
KDa	กิโลดาลตัน
LD	ไลปิด ดรอบเลท
LH	ลูทิไนซิง ฮอร์โมน
M I	เมตาเฟส I
M II	เมตาเฟส II
M	ไมโตคอนเดรีย
m KRB	โมดิฟายด์ เครปริงเกอร์ ไบคาร์บอนเนต
MV	ไมโครวิลไล
PBS	ฟอสเฟสบัฟเฟอซาไลน์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ (ต่อ)

pFF	พิกฟอลลิคูลาร์ ฟลูอิด
PM	โปรเมตาเฟส
PMSG	เพรกแนนท์ แมร์ ซีรัม โกนาโดโทรฟิน
PROH	โปรปีลีนไกลคอล
PV	เพอริ วิเทลลีน สเปซ
TB	ไทรแพน บลู
TEL I	ทีโลเฟส I
THP	เทอร์มอล ฮิสเตอรีซิส โปรตีน
VC	แวคูโอล
VTM	ไวตริฟิเคชัน มีเดียม
ZP	โซนาเพลลูซิดา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย