

บทที่ 3

ผลการทดลอง

ผลการศึกษาเปรียบเทียบน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เติมกรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิด กับ น้ำยาเพาะเลี้ยงที่ไม่เติมกรดอะมิโนต่อการปฏิสนธิและการแบ่งตัวของ เอ็มบริโอของแฮมสเตอร์ในจานทดลอง

ผลการศึกษาการทำปฏิสนธิโดยนำไข่ผสมกับตัวอสุจิในน้ำยาปฏิสนธิ m-TALP และ m-TALP ที่เติมกรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิด (กลูตามีน (Gln, 1.0 mM), เฟนิลอลานีน (Phe, 0.1 mM), ไอโซลิวซีน (Ile, 0.2 mM) และ เมทไธโอนีน (Met, 0.05 mM) โดยแบ่งไข่ผสมกับอสุจิ ในน้ำยาเพาะเลี้ยงแต่ละชนิดจำนวน 180-230 ใบ เป็นเวลานาน 3 - 4 ชั่วโมง ผลการทดลองดังสรุปไว้ในตารางที่ 3.1, รูปที่ 3.1 พบว่าค่าเฉลี่ยของการปฏิสนธิ(ดูจากการ form 2nd polar bodies และ pronuclei) ในน้ำยาปฏิสนธิ m-TALP 91.81% และในน้ำยาปฏิสนธิ m-TALP ที่เติมกรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิด 93.48% และจากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าในน้ำยาปฏิสนธิที่เติมกรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิด ให้ผลในการส่งเสริมการปฏิสนธิของไข่ไม่แตกต่างไปจากน้ำยาปฏิสนธิที่ไม่เติมกรดอะมิโน ($P > 0.05$) (วิธีคำนวณดูจากภาคผนวก)

เมื่อนำไข่ที่ได้จากการปฏิสนธิภายนอกร่างกายเพาะเลี้ยงต่อในน้ำยาเพาะเลี้ยง TL-PVA และ TL-PVA ที่เติมกรดอะมิโน 4 ชนิด เป็นเวลานาน 20-28 ชั่วโมง ผลการทดลองสรุปในตารางที่ 3.2 รูปที่ 3.2-3.4 พบว่าค่าเฉลี่ยของการเจริญและการแบ่งตัวถึงระยะ 2- เซลล์ ของ เอ็มบริโอที่ได้จากการปฏิสนธิใน m-TALP เพาะเลี้ยงในน้ำยา TL-PVA

38.31% (กลุ่มที่ 1'), เพาะเลี้ยงในน้ำยา TL-PVA ที่เติมกรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิด 59.76% (กลุ่มที่ 2') และเอมบริโอที่ได้จากการปฏิสนธิใน m-TALP + 4AA เพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง TL-PVA ที่เติมกรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิด 73.49% (กลุ่มที่ 3') และจากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่า เอมบริโอที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง TL-PVA + 4 AA (กลุ่มที่ 2' และ 3') เจริญดีกว่าพวกที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง TL-PVA (กลุ่มที่ 1') อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ยิ่งกว่านั้นระหว่างเอมบริโอที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง TL-PVA+4AA ด้วยกัน เอมบริโอที่ได้จากการปฏิสนธิใน m-TALP + 4AA (กลุ่มที่ 3') ยังเจริญดีกว่าเอมบริโอที่ได้จากการปฏิสนธิใน m-TALP (กลุ่มที่ 2') อีกด้วย ดังตารางเปรียบเทียบค่า mean ที่ 3.3



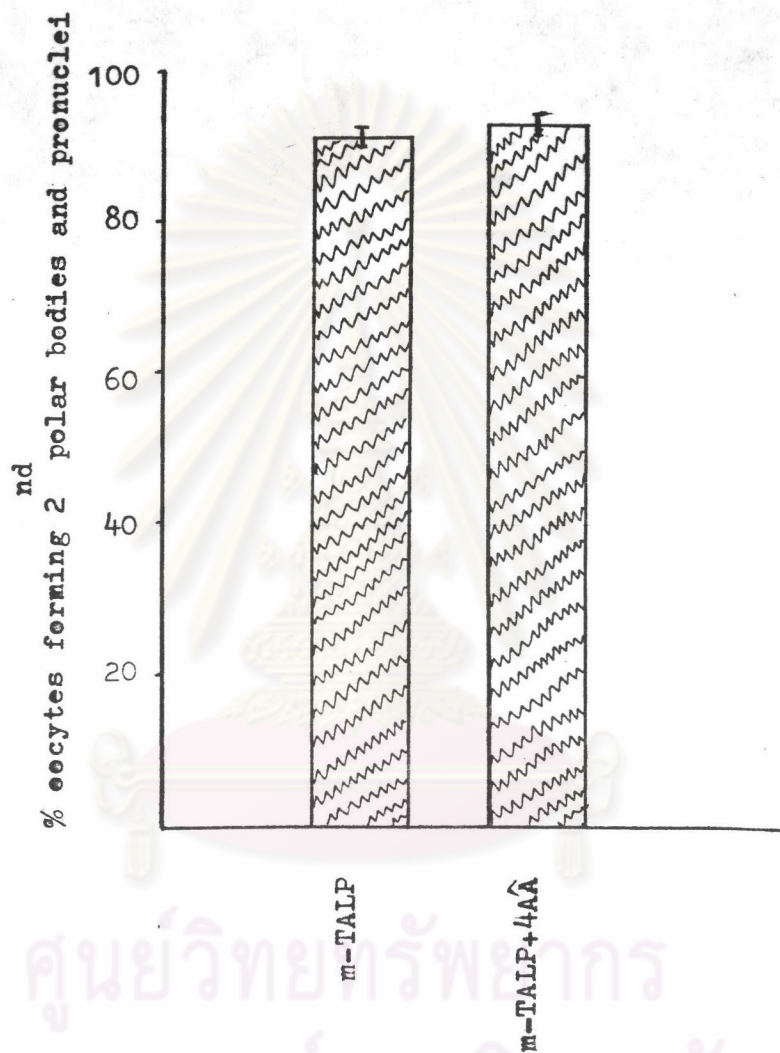
ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.1 แสดงเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิในน้ำยาปฏิสนธิ m-TALP ที่เติมกรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิด (1.0 mM glutamine (Gln), 0.1 mM phenylalanine (Phe), 0.2 mM isoleucine (Ile) และ 0.5 mM methionine (Met) และในน้ำยาปฏิสนธิที่ไม่เติมกรดอะมิโน

กลุ่มที่	treatment	no of exps	no of egg inseminated	no eggs with 2 nd polar bodies and pronuclei (3-4 hrs post inseminated)	%	p
1	m-TALP	8	403	370	91.81	N.S.
2	m-TALP+4AA	4	230	215	93.48	N.S.

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



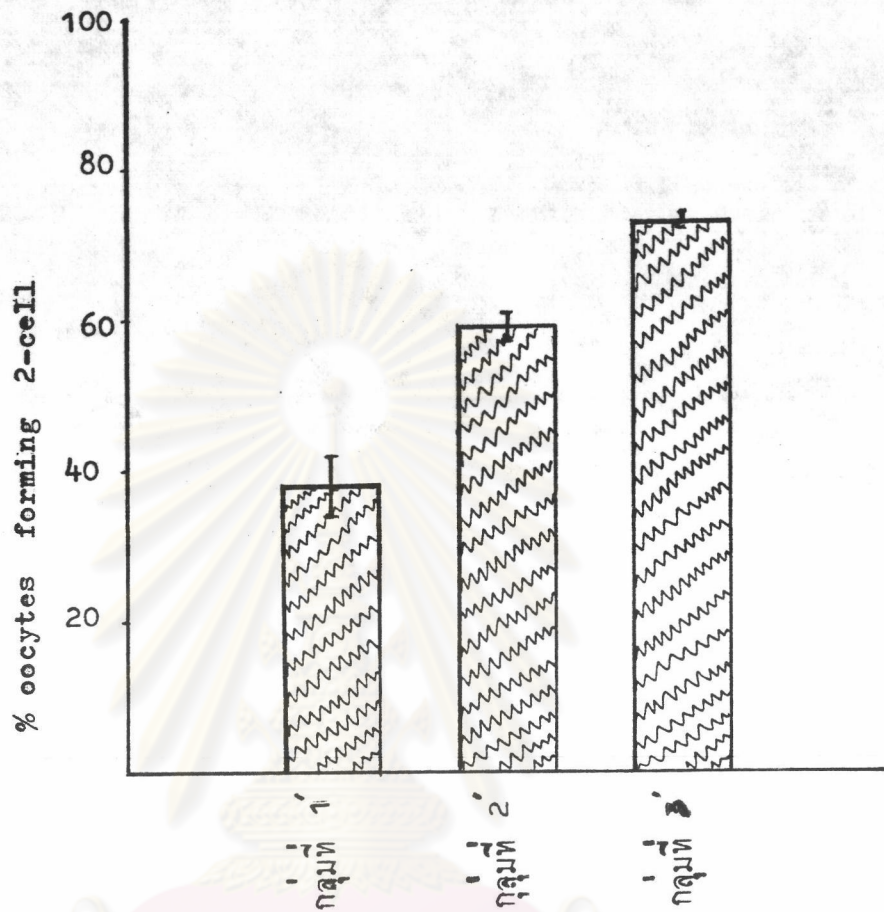
รูปที่ 3.1 แสดงค่า MEAN±S.D. ของเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิในน้ำยาปฏิสนธิ m-TALP ที่เติมกรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิด และในน้ำยาปฏิสนธิที่ไม่เติมกรดอะมิโน

ตารางที่ 3.2 แสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญและการแบ่งตัวของเอมบริโอจากระยะ 1 เซลล์ ที่ได้จากการปฏิสนธิภายนอกร่างกายเป็นเอมบริโอระยะ 2 เซลล์ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง TL-PVA ที่เติมกรดอะมิโน 4 ชนิด (Gln, Phe, Ile, Met) และในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ไม่เติมกรดอะมิโน

กลุ่มที่	treatment	no of exps	no of one-cell ova cultured	no of two-cell ova after 20-28 hrs in culture	%
1'	TL-PVA	4	201	77	38.31
2'	TL-PVA+4AA	4	169	101	59.76
3'	TL-PVA+4AA	4	215	158	73.49

หมายเหตุ กลุ่ม 2' เอมบริโอได้จากการปฏิสนธิในน้ำยาปฏิสนธิ m-TALP และนำมาเพาะเลี้ยงต่อในน้ำยาเพาะเลี้ยง TL-PVA+4AA

กลุ่ม 3' เอมบริโอได้จากการปฏิสนธิในน้ำยาปฏิสนธิ m-TALP+4AA และนำมาเพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง TL-PVA+4AA



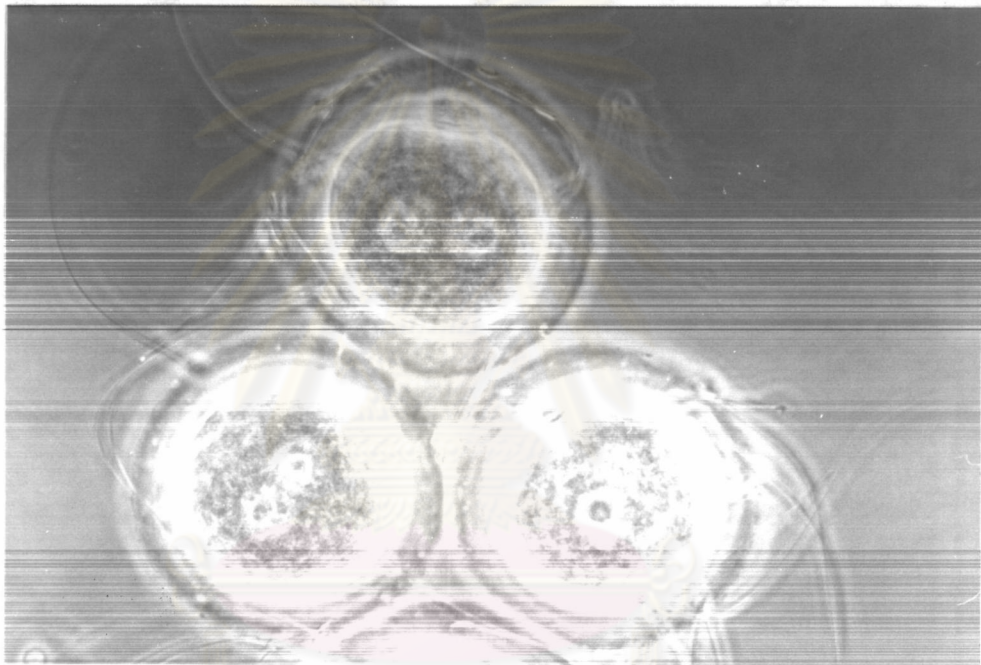
รูปที่ 3.2 แสดงค่า MEAN±S.D. ของเปอร์เซ็นต์การแบ่งตัวของเอมบริโอ
 จากระยะ 1 เซลล์ เจริญเป็นเอมบริโอระยะ 2-เซลล์ ในน้ำยา
 เพาะเลี้ยง TL-PVA ที่เติมกรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิด และในน้ำยา
 เพาะเลี้ยง TL-PVA ที่ไม่เติมกรดอะมิโน

หมายเหตุ กลุ่มที่ 2' เอมบริโอได้จากการปฏิสนธิในน้ำยาปฏิสนธิ m-TALP
 และนำมาเพาะเลี้ยงต่อในน้ำยาเพาะเลี้ยง TL-PVA+4AA
 กลุ่มที่ 3' เอมบริโอได้จากการปฏิสนธิในน้ำยาปฏิสนธิ
 m-TALP+4AA และนำมาเพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง
 TL-PVA+4AA

ตารางที่ 3.2 แสดงการเปรียบเทียบผลต่างของค่า mean ของ treatment เป็นคู่ ๆ ในการส่งเสริมการเจริญและการแบ่งตัวของเอมบริโอจากระยะ 1- เซลล์ เป็นเอมบริโอระยะ 2-เซลล์ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง TL-PVA ที่เติมกรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิด และที่ไม่เติมกรดอะมิโน (t-test, two-tailed tests)

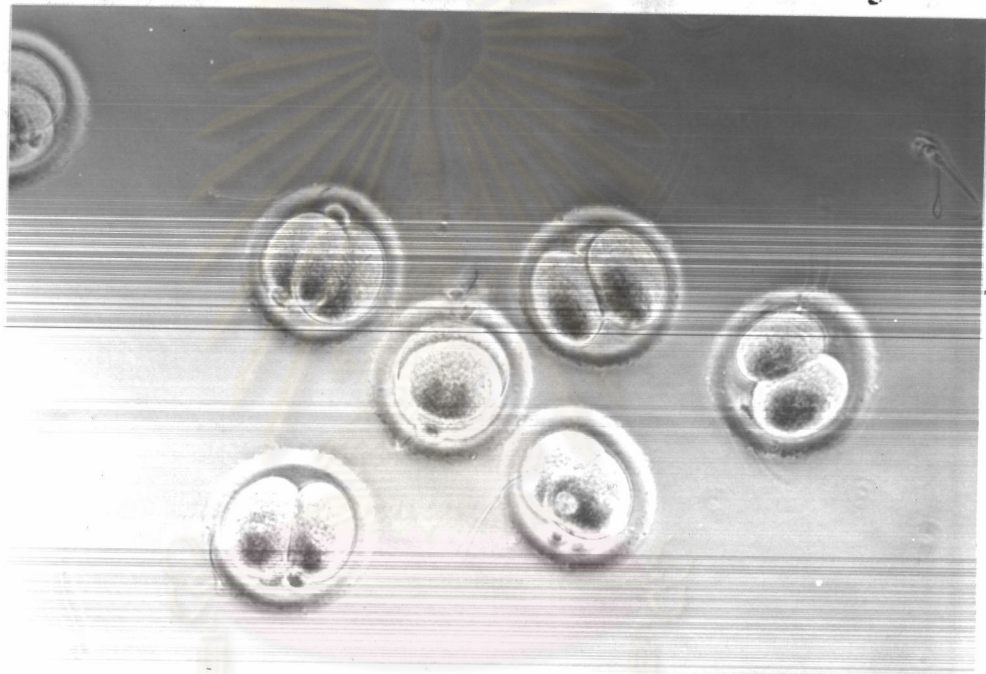
Treatment กลุ่มที่	ผลต่างของค่า mean	LSD	P
1' (TL-PVA)-2' (TL-PVA+4AA)	-21.06		<0.05
1' (TL-PVA)-3' (TL-PVA+4AA)	-34.78	5.20	<0.05
2' (TL-PVA-4AA)-3' (TL-PVA+4AA)	-13.72		<0.05

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.3 แสดงลักษณะ 2nd polar bodies และ pronuclei ภายหลัง
ผสมของไข่และอสุจิของแอมสเตอร์ไว้นาน 3-4 ชั่วโมง



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ๑.๔ แสดงการแบ่งตัวของเอมบริโอจากระยะ 1- เซลล์ เป็น
เอมบริโอระยะ 2- เซลล์

ผลการศึกษาเปรียบเทียบน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เติมกรดอะมิโนเพียง 3 ชนิด ต่อ
การปฏิสนธิและการแบ่งตัวของเอมบริโอของแฮมสเตอร์ในจานทดลอง

จากการศึกษาพบว่ากรดอะมิโน 4 ชนิด ที่เติมในน้ำยาเพาะเลี้ยงมีผลส่งเสริมการเจริญและการแบ่งตัวของเอมบริโอจากระยะ 1- เซลล์ เป็นระยะ 2- เซลล์ ได้เพิ่มมากขึ้น ดังนั้นเพื่อให้ทราบว่ากรดอะมิโนชนิดใดมีความสำคัญต่อการแบ่งตัวของเอมบริโอมากที่สุด จึงได้ทำการทดลองเลี้ยงเอมบริโอในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เติมกรดอะมิโนเพียงครั้งละ 3 ชนิด แล้วดูผลการแบ่งตัวของเอมบริโอในน้ำยาเพาะเลี้ยงเหล่านี้ว่าเปลี่ยนแปลงไปอย่างไร นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของน้ำยาเพาะเลี้ยงเหล่านี้ต่อการปฏิสนธิภายนอกร่างกายด้วย

ผลการทดลองนำไข่ผสมกับตัวอสุจิในน้ำยาปฏิสนธิ m-TALP (กลุ่มที่ 1), m-TALP+4AA (กลุ่มที่ 2), m-TALP+Phe+Ile+Met (กลุ่มที่ 3), m-TALP+Gln+Met+Ile (กลุ่มที่ 4), m-TALP+Gln+Phe+Met (กลุ่มที่ 5) และ m-TALP+Gln+Phe+Ile (กลุ่มที่ 6) พบว่าค่าเฉลี่ยของการปฏิสนธิหลังจากผสมไข่กับอสุจิ 3-4 ชั่วโมง ในน้ำยาปฏิสนธิดังกล่าวมีค่า 92.82%, 93.72%, 93.09%, 92.42%, 91.62% และ 90.53% ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่า เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิในน้ำยาปฏิสนธิที่เติมกรดอะมิโนเพียง 3 ชนิด กับน้ำยาปฏิสนธิที่เติมกรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิด และในน้ำยาปฏิสนธิที่ไม่เติมกรดอะมิโนเลย ไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$) ดังตารางที่ 3.4 รูปที่ 3.5

เมื่อนำไข่ที่ได้จากการปฏิสนธินี้ไปเพาะเลี้ยงต่อในน้ำยาเพาะเลี้ยง TL-PVA (กลุ่มที่ 1'), TL-PVA+4AA (กลุ่มที่ 2'), TL-PVA+Phe+Ile+

Met (กลุ่มที่ 3'), TL-PVA+Gln+Met+Ile (กลุ่มที่ 4'), TL-PVA+Gln+phe+Met (กลุ่มที่ 5') และ TL-PVA+Gln+phe+Ile (กลุ่มที่ 6') เป็นเวลานาน 20-28 ชั่วโมง แล้วดูผลการเจริญและการแบ่งตัวถึงระยะ 2-เซลล์ ผลที่ได้ดังตารางที่ 3.5, รูปที่ 3.6

การเจริญและการแบ่งตัวของเอมบริโอจากระยะ 1- เซลล์ ถึงระยะ 2- เซลล์ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง TL-PVA ที่เติมกรดอะมิโนเพียง 3 ชนิด (กลุ่มที่ 3'-6') เปรียบเทียบกับน้ำยาเพาะเลี้ยง TL-PVA ที่ไม่เติมกรดอะมิโนเลย (กลุ่มที่ 1') พบว่า ในน้ำยาเพาะเลี้ยง TL-PVA ที่เติมกรดอะมิโนต่าง ๆ แต่ไม่เติมเมทไธโอนีน (กลุ่มที่ 6') มีผลทำให้การเจริญและการแบ่งตัวถึงระยะ 2- เซลล์ ไม่ต่างไปจากในน้ำยาเพาะเลี้ยง TL-PVA ที่ไม่เติมกรดอะมิโน (21.51% vs 31.44%) แต่ในน้ำยาเพาะเลี้ยง TL-PVA ที่เติมกรดอะมิโนต่าง ๆ โดยไม่เติมกลูตามีน หรือ เฟนิลอลานีน หรือ ไอโซลิวซีน (กลุ่มที่ 3'-5') ให้ผลในการแบ่งตัวของเอมบริโอถึงระยะ 2 เซลล์ มากกว่าในน้ำยาเพาะเลี้ยง TL-PVA ที่ไม่เติมกรดอะมิโน (กลุ่มที่ 1') อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังตารางการเปรียบเทียบค่า mean ที่ 3.6

เมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญและการแบ่งตัวของเอมบริโอในน้ำยาเพาะเลี้ยง TL-PVA ที่เติมกรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิด (กลุ่มที่ 2') พบว่าน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ไม่เติมเมทไธโอนีน (กลุ่มที่ 6') มีผลทำให้การเจริญและการแบ่งตัวถึงระยะ 2- เซลล์ น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$), (21.51% vs 68.04%) แต่ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ไม่เติมกลูตามีน เฟนิลอลานีน หรือ ไอโซลิวซีน (กลุ่มที่ 3'-5') ให้ผลในการเจริญและการแบ่งตัวเป็นระยะ 2- เซลล์ ไม่ต่างกับในน้ำยาเพาะเลี้ยง TL-PVA ที่เติมกรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิด (กลุ่มที่ 2')

เมื่อเปรียบเทียบการเจริญและการแบ่งตัวของเอมบริโอในกลุ่มของน้ำยาเพาะเลี้ยง TL-PVA ที่เติมกรดอะมิโนเพียง 3 ชนิด (กลุ่มที่ 3'-6')

พบว่าในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ไม่เติมเมทไธโอนีน (กลุ่มที่ 6') ให้ผลส่งเสริม
การเจริญและการแบ่งตัวถึงระยะ 2 เซลล์ น้อยกว่าในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ไม่
เติมกลูตามีน, เฟนิลอลานีน และ ไอโซลูซีน (กลุ่มที่ 3'-5') อย่างมีนัย
สำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังตารางเปรียบเทียบค่า mean ที่ 3.6

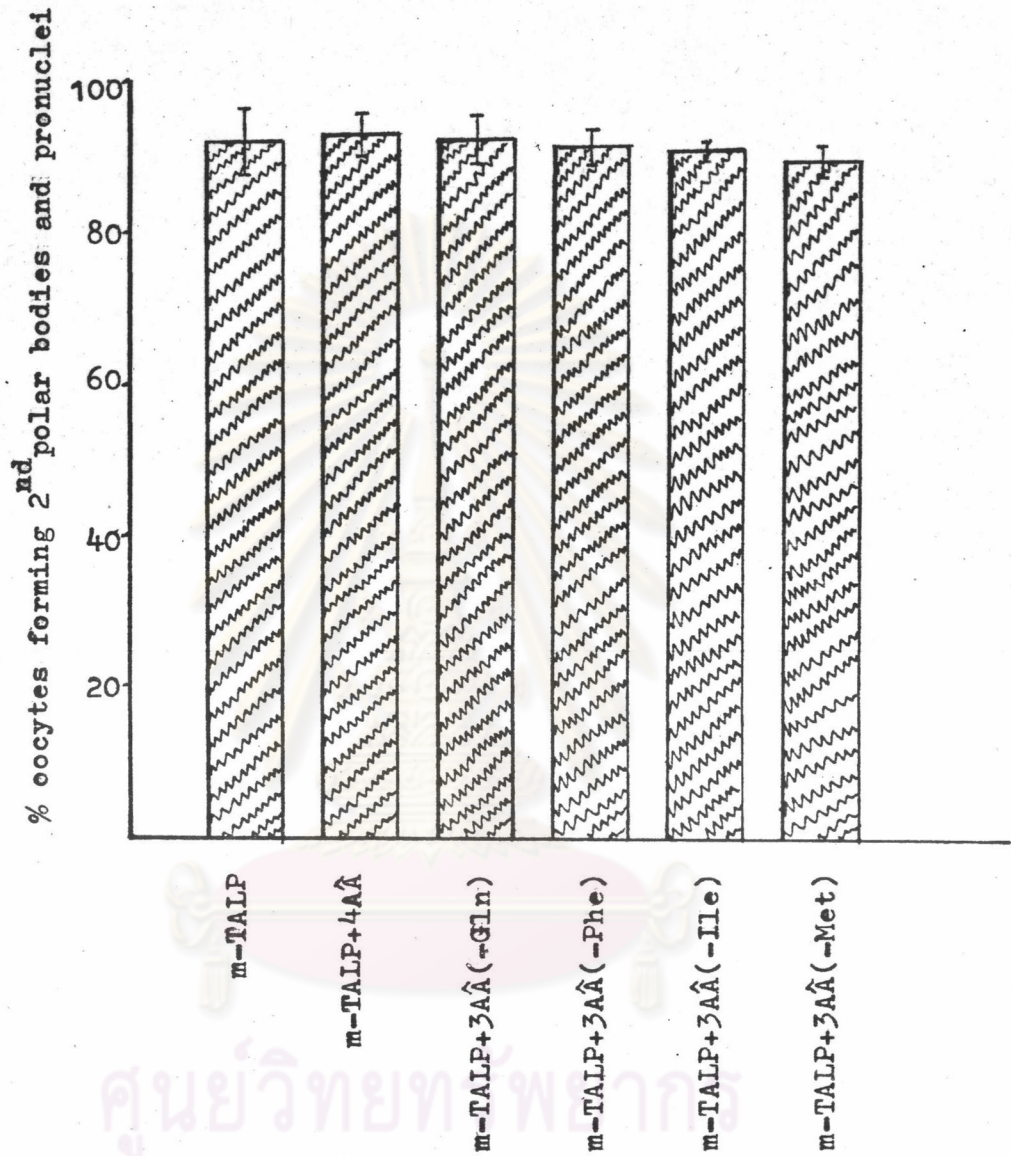


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.4 แสดงเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิของไข่และอสุจิในน้ำยาปฏิสนธิ m-TALP ที่เติมกรดอะมิโนเพียง 3 ชนิด ในจานทดลอง

กลุ่มที่	one amino acids omitted	no of expts	no of egg inseminated	no eggs with 2 nd polar bodied and pronuclei (3-4 hrs post inseminated)	%	p
1	m-TALP	4	209	194	92.82	N.S.
2	m-TALP+4AA	4	207	194	93.72	N.S.
3	m-TALP+3AA(-Gln)	4	217	202	93.09	N.S.
4	m-TALP+3AA(-Phe)	4	211	195	92.42	N.S.
5	m-TALP+3AA(-Ile)	4	167	153	91.62	N.S.
6	m-TALP+3AA(-Met)	4	190	172	90.53	N.S.

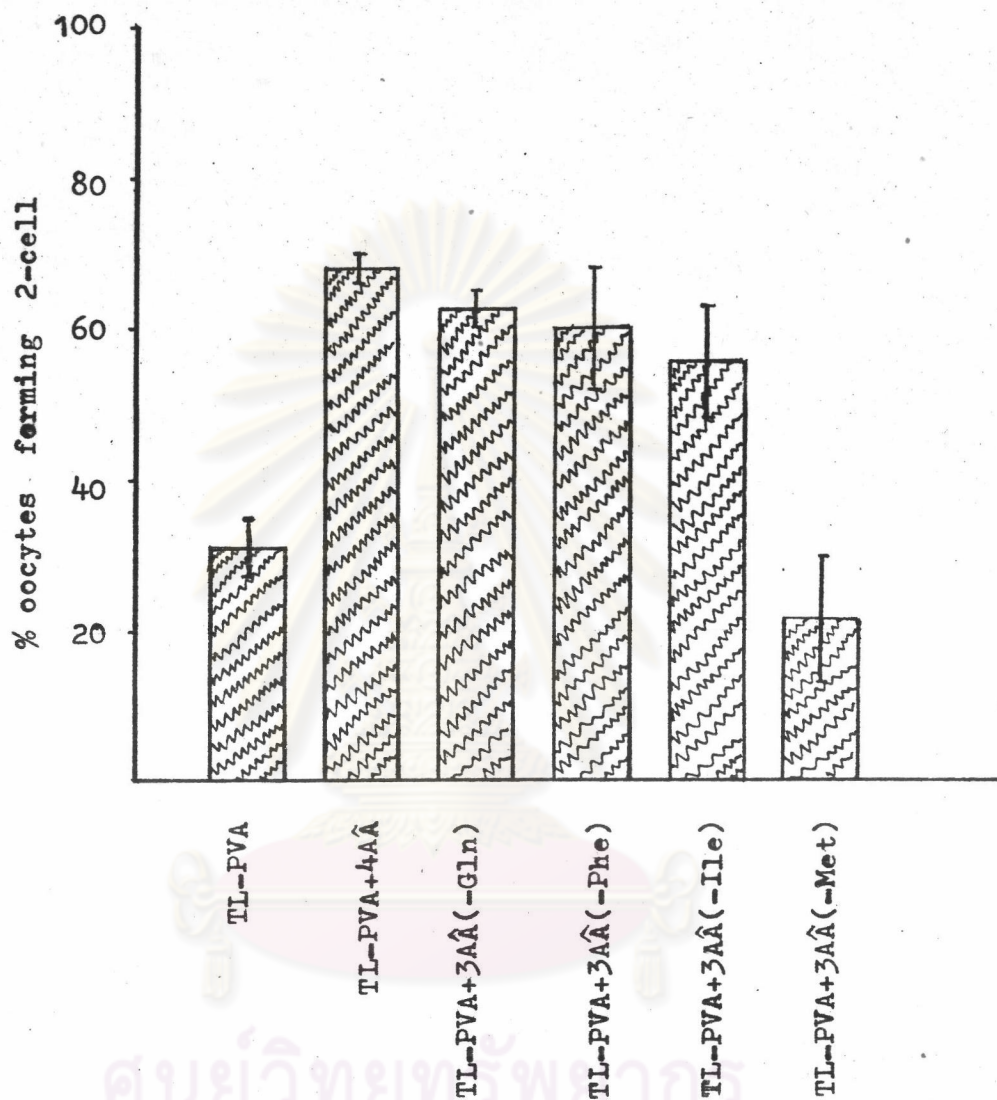
หมายเหตุ N.S. = not significantly different (p > 0.05)



รูปที่ 3.5 แสดงค่า MEAN±S.D. ของเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิในน้ำยาปฏิสนธิ m-TALP ที่เติมกรดอะมิโนเพียง 3 ชนิด ในจานทดลอง

ตารางที่ 3.5 แสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญและการแบ่งตัวของเอมบริโอจากระยะ 1 เซลล์ ที่ได้จากการปฏิสนธิ ภายนอกร่างกายเป็นเอมบริโอรระยะ 2 เซลล์ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง TL-PVA ที่เติมกรดอะมิโนเพียง 3 ชนิด

กลุ่มที่	one amino acids omitted	no of expts	no of one-cell ova cultured	no of two-cell ova after 20-28 hrs in culture	%
1'	TL-PVA	4	194	61	31.44
2'	TL-PVA+4AA	4	194	132	68.04
3'	TL-PVA+3AA(-Gln)	4	202	127	62.87
4'	TL-PVA+3AA(-Phe)	4	195	117	60
5'	TL-PVA+3AA(-Ile)	4	153	85	55.56
6'	TL-PVA+3AA(-Met)	4	172	37	21.51



รูปที่ 3.6 แสดงค่า MEAN±S.D. ของเปอร์เซ็นต์การแบ่งตัวของเอมบริโอจากรยะ 1 เซลล์ เจริญเป็นเอมบริโอรยะ 2-เซลล์ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง TL-PVA ที่เติมกรดอะมิโนเพียง 3 ชนิด ในจานทดลอง

ตารางที่ 3.6 แสดงการเปรียบเทียบผลต่างของค่า mean ของ treatment เป็นคู่ ๆ ในการส่งเสริมการเจริญและการแบ่งตัวของเอมบริโอจากรยะ 1 เซลล์ เป็นเอมบริโอระยะ 2 เซลล์ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง TL-PVA ที่เติมกรดอะมิโนเพียง 3 ชนิด ในจานทดลอง (t-Test, two-tailed test)

Treatment	ผลต่างของค่า mean	LSD	P
TL-PVA - TL-PVA+4AA	-36.48		<0.05
TL-PVA - TL-PVA+3AA(-Gln)	-31.33		<0.05
TL-PVA - TL-PVA+3AA(-Phe)	-29		<0.05
TL-PVA - TL-PVA+3AA(-Ile)	-23.14		<0.05
TL-PVA - TL-PVA+3AA(-Met)	9.46		N.S.
TL-PVA+4AA - TL-PVA+3AA(-Gln)	5.15	11.01	N.S.
TL-PVA+4AA - TL-PVA+3AA(-Phe)	7.48		N.S.
TL-PVA+4AA - TL-PVA+3AA(-Ile)	13.34		<0.05
TL-PVA+4AA - TL-PVA+3AA(-Met)	45.94		<0.05
TL-PVA+3AA(-Gln) - TL-PVA+3AA(-Phe)	2.33		N.S.
TL-PVA+3AA(-Gln) - TL-PVA+3AA(-Ile)	8.19		N.S.
TL-PVA+3AA(-Gln) - TL-PVA+3AA(-Met)	40.79		<0.05
TL-PVA+3AA(-Phe) - TL-PVA+3AA(-Ile)	5.86		N.S.
TL-PVA+3AA(-Phe) - TL-PVA+3AA(-Met)	38.46		<0.05
TL-PVA+3AA(-Ile) - TL-PVA+3AA(-Met)	32.6		<0.05

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการศึกษาความสำคัญของกรดอะมิโนแต่ละชนิดต่อการปฏิสนธิและการแบ่งตัวของเอมบริโอของแอมสเตอร์ในจานทดลอง

เพื่อศึกษาว่ากรดอะมิโนแต่ละชนิดมีผลต่อการปฏิสนธิและการแบ่งตัวของเอมบริโออย่างไร และเพื่อทดสอบว่าเมทาไธโอนีน มีความจำเป็นต่อการเจริญและการแบ่งตัวของเอมบริโอของแอมสเตอร์จริงหรือไม่ จึงได้ทำการปฏิสนธิและเพาะเลี้ยงเอมบริโอที่ได้ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เติมกรดอะมิโนแต่ละชนิดเพียงอย่างเดียว แล้วดูผลการปฏิสนธิและการแบ่งตัวของเอมบริโอ

ผลการศึกษาการทำปฏิสนธิในน้ำยาปฏิสนธิ m-TALP, m-TALP + 4AA, m-TALP-Gln, m-TALP+Phe, m-TALP+Ile และ m-TALP+Met (กลุ่มที่ 1-6 ตามลำดับ) ได้ค่าเฉลี่ยของการปฏิสนธิภายหลังจากผสมไข่กับอสุจิ 3-4 ชั่วโมง ในน้ำยาปฏิสนธิตั้งกล่าวสรุปไว้ในตารางที่ 3.7, รูปที่ 3.7 จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่า การปฏิสนธิไม่มีความแตกต่างกันทั้งในน้ำยาปฏิสนธิที่เติมกรดอะมิโนชนิดใดชนิดหนึ่งกับน้ำยาปฏิสนธิที่เติมกรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิด หรือน้ำยาปฏิสนธิที่ไม่เติมกรดอะมิโน ($p > 0.05$)

เมื่อนำเอมบริโอที่ได้จากการปฏิสนธิมาเพาะเลี้ยงต่อในน้ำยาเพาะเลี้ยง TL-PVA, TL-PVA+4AA, TL-PVA+Gln, TL-PVA+Phe, TL-PVA+Ile และ TL-PVA+Met (กลุ่มที่ 1' - 6' ตามลำดับ) เป็นเวลานาน 20-28 ชั่วโมง แล้วดูผลการเจริญและการแบ่งตัวถึงระยะ 2- เซลล์ ดังตารางที่ 3.8, รูปที่ 3.8 พบว่าในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เติมเมทาไธโอนีน (กลุ่มที่ 6'), เบนนิลอลานีน (กลุ่มที่ 4') และ ไอโซลูซีน (กลุ่มที่ 5') เอมบริโอเจริญและแบ่งตัวถึงระยะ 2- เซลล์ ได้มากกว่าในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ไม่เติมกรดอะมิโน (กลุ่มที่ 1') อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เติมกลูตามีน (กลุ่มที่ 3') ให้ผลส่งเสริมการเจริญและการแบ่งตัวถึงระยะ 2- เซลล์ ไม่แตกต่างไปจากน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ไม่เติมกรดอะมิโน (กลุ่มที่ 1') ($p > 0.05$) ดังตารางเปรียบเทียบค่า mean ที่ 3.9

เมื่อเปรียบเทียบผลการเจริญและการแบ่งตัวของเอมบริโอจากระยะ 1 เซลล์ ถึงระยะ 2- เซลล์ ดังกล่าวข้างต้นกับเอมบริโอที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง TL-PVA ที่เติมกรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิด (กลุ่มที่ 2') พบว่าน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เติมเฟนิลอลานีน หรือ เมทไธโอนีน อย่างเดียวให้ผลไม่แตกต่างกับน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เติมกรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิด แต่ในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เติมเฉพาะกลูตามีน หรือ ไอโซลิวซีน ให้ผลส่งเสริมการเจริญและการแบ่งตัวถึงระยะ 2- เซลล์ น้อยกว่าในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เติมกรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มของน้ำยาเพาะเลี้ยง TL-PVA ที่เติมกรดอะมิโนเพียงชนิดเดียวด้วยกัน (กลุ่มที่ 3'-6') พบว่าในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เติมกลูตามีน ให้ผลในการส่งเสริมการเจริญและการแบ่งตัวถึงระยะ 2-เซลล์ น้อยที่สุด น้อยกว่าในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เติมเฟนิลอลานีน หรือเมทไธโอนีน หรือ ไอโซลิวซีน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รองลงมาได้แก่ ไอโซลิวซีน สำหรับในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เติม เฟนิลอลานีน หรือ เมทไธโอนีน ให้ผลในการส่งเสริมการเจริญและการแบ่งตัวไม่แตกต่างกัน

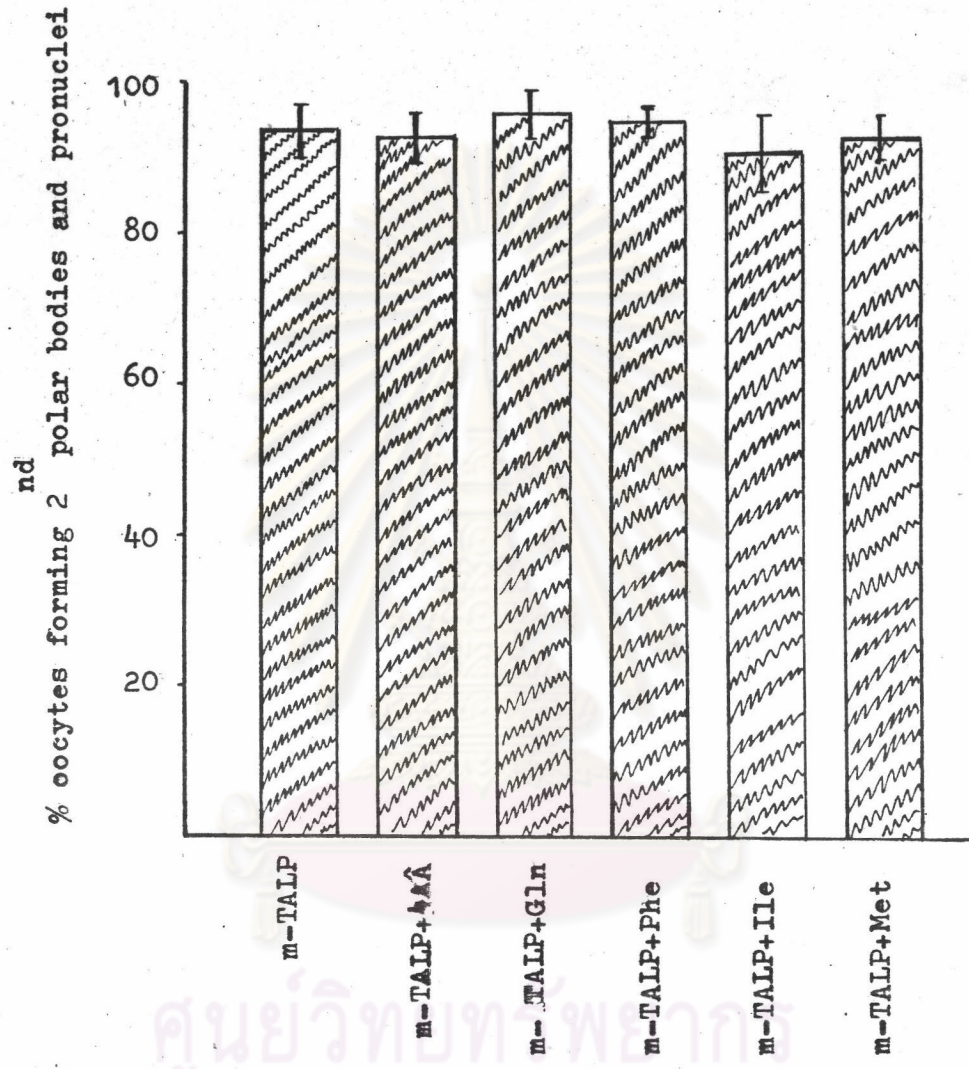
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.7 แสดงเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิในน้ำยาปฏิสนธิ m-TALP ที่เติมกรดอะมิโนชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงชนิดเดียว
ในงานทดลอง

กลุ่มที่	one of amino acids	no of exps	no of egg inseminated	no eggs with 2 nd polar bodies and pronuclei (3-4 hrs post inseminated)	%	P
1	m-TALP	4	213	201	94.37	N.S.
2	m-TALP+4AA	4	212	198	93.40	N.S.
3	m-TALP+Gln	4	225	216	96	N.S.
4	m-TALP+Phe	4	190	181	95.26	N.S.
5	m-TALP+Ile	4	205	188	91.71	N.S.
6	m-TALP+Met	4	196	183	93.37	N.S.

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

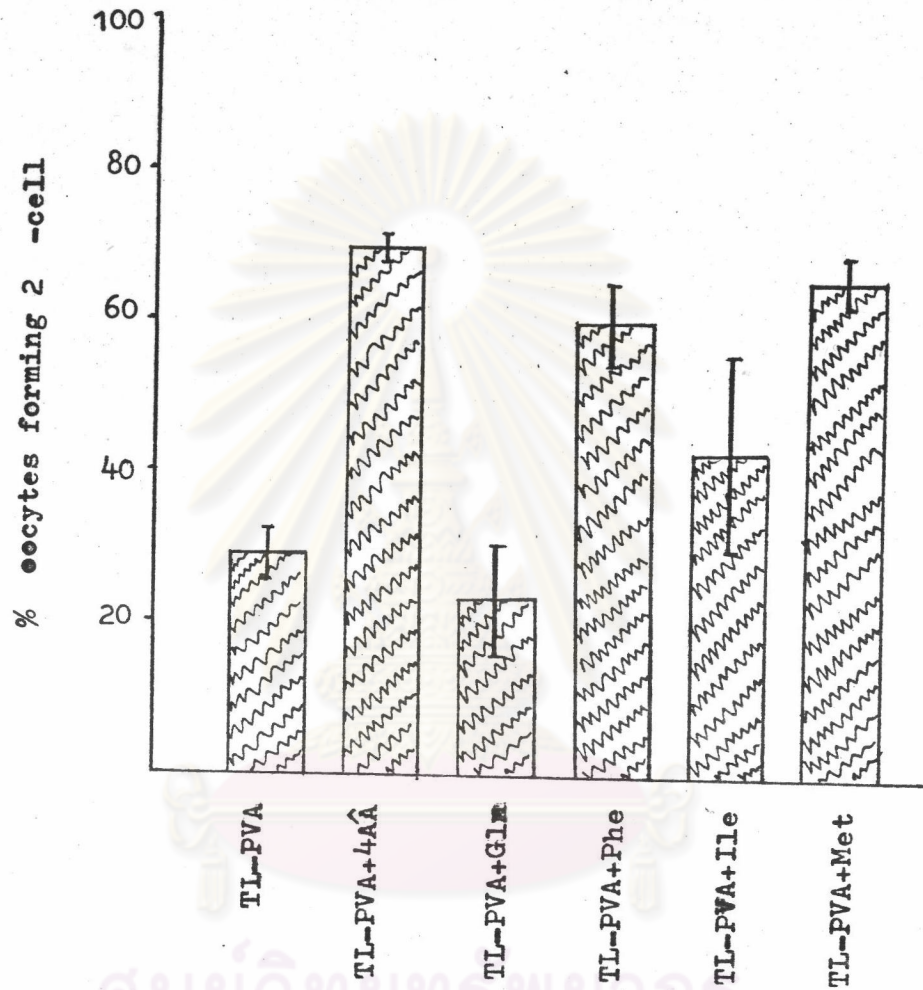




รูปที่ 3.7 แสดงค่า MEAN±S.D. ของเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิในน้ำยาปฏิสนธิ m-TALP ที่เติมกรดอะมิโนชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงชนิดเดียวในงานทดลอง

ตารางที่ 3.8 แสดงเปอร์เซ็นต์การเจริญและการแบ่งตัวของเอมบริโอจากระยะ 1 เซลล์ ที่ได้จากการปฏิสนธิภายนอก ร่างกายเป็นเอมบริโอระยะ 2 เซลล์ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง TL-PVA ที่เติมกรดอะมิโนชนิดใดชนิดหนึ่งเพียง ชนิดเดียว

กลุ่มที่	one of amino acids	no of exps	no of one-cell ova cultured	no of two-cell ova after 20-28 hrs in culture	%
1'	TL-PVA	4	201	60	29.85
2'	TL-PVA+4AA	4	198	139	70.20
3'	TL-PVA+Gln	4	216	44	20.30
4'	TL-PVA+Phe	4	181	110	60.77
5'	TL-PVA+Ile	4	188	81	43.09
6'	TL-PVA+Met	4	183	122	66.67



รูปที่ 3.8 แสดงค่า MEAN±S.D. ของเปอร์เซ็นต์การแบ่งตัวจากระยะ 1 เซลล์ เจริญเป็นระยะ 2-เซลล์ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง TL-PVA ที่เติมกรดอะมิโนชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงชนิดเดียวในจานทดลอง

ตารางที่ 3.9 แสดงการเปรียบเทียบผลต่างของค่า mean ของ treatment เป็นคู่ ๆ ในการ
ส่งเสริมการเจริญและการแบ่งตัวของเอมบริโอจากรยะ 1- เซลล์ เป็นเอมบริโอ
ระยะ 2- เซลล์ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง TL-PVA ที่เติมกรดอะมิโนชนิดใดชนิดหนึ่ง
เพียงชนิดเดียวในจานทดลอง (t-Test, two-tailed test)

Treatment	ผลต่างของค่า mean	LSD	P
TL-PVA - TL-PVA+4AA	-40.2		<0.05
TL-PVA - TL-PVA+Gln	10.67		N.S.
TL-PVA - TL-PVA+Phe	-32.6		<0.05
TL-PVA - TL-PVA+Ile	-14.43		<0.05
TL-PVA - TL-PVA+Met	-36.48		<0.05
TL-PVA+4AA - TL-PVA+Gln	50.87		<0.05
TL-PVA+4AA - TL-PVA+Phe	7.6	12.06	N.S.
TL-PVA+4AA - TL-PVA+Ile	25.77		<0.05
TL-PVA+4AA - TL-PVA+Met	3.72		N.S.
TL-PVA+Gln - TL-PVA+Phe	-43.27		<0.05
TL-PVA+Gln - TL-PVA+Ile	-25.1		<0.05
TL-PVA+Gln - TL-PVA+Met	-47.15		<0.05
TL-PVA+Phe - TL-PVA+Ile	18.17		<0.05
TL-PVA+Phe - TL-PVA+Met	- 3.88		N.S.
TL-PVA+Ile - TL-PVA+Met	-22.05		<0.05

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการทดลองในการถ่ายฝากเอมบริโอระยะ 2- เซลล์ ที่ได้จากการปฏิสนธิ
ภายนอกร่างกาย กับเอมบริโอระยะ 2- เซลล์ ในกลุ่มควบคุมเมื่อถ่ายฝากไป
ยังตัวรับที่ตั้งท้องเทียมได้ 2 วัน

เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่ทราบสถานะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยง
เอมบริโอของแอมสเตอร์ภายนอกร่างกายกันดีนัก โดยเฉพาะการเลี้ยง
เอมบริโอระยะ 2 - เซลล์ ให้เจริญต่อไปในจานเพาะเลี้ยงยังมีขีดจำกัด
(Schini และ Bavister, 1988) ดังนั้นเพื่อศึกษาว่าเอมบริโอที่ได้จาก
การปฏิสนธิและเพาะเลี้ยงภายนอกร่างกายจนถึงระยะ 2- เซลล์ ในน้ำยา
เพาะเลี้ยงชนิดต่าง ๆ ข้างต้น สามารถมีชีวิตรอดได้เหมือนเอมบริโอปกติ
หรือไม่ จึงได้ทำการทดลองถ่ายฝากเอมบริโอเหล่านี้ไปยังตัวรับที่ตั้งท้องเทียม
ได้ 2 วัน แล้วติดตามดูความสามารถในการฝังตัวที่ผนังมดลูกและความอยู่รอด
จนกระทั่งคลอด

กลุ่มควบคุม

จากการถ่ายฝากเอมบริโอระยะ 2- เซลล์ ที่ได้จาก in vivo
จำนวน 120 ตัว ไปยังท่อนำไข่ของตัวรับ ที่ตั้งท้องเทียมในวันที่ 2 จำนวน
10 ตัว โดยทำการถ่ายฝากไปยังท่อนำไข่ทั้ง 2 ข้าง ข้างละ 6 ตัว ทั้งนี้ที่
ได้จาก in vivo หลังจากทำการถ่ายฝากได้ 6 วัน (วันที่ 8 ของการ
ตั้งท้อง) ทำ laparotomy เพื่อดูจำนวนฟัตัสที่ได้จากการถ่ายฝาก พบ
การฝังตัวของเอมบริโอในตัวรับทุกตัวต่ำมาก พบจำนวนฟัตัสทั้งหมด 22 ตัว
(18.33%) แต่เมื่อครบกำหนดคลอดไม่มีแอมสเตอร์ตัวใดคลอดลูกเลย จาก
การทำ autopsy พบว่า ฟัตัสตายและถูก reabsorb หหมด ดังแสดงใน
ตารางที่ 3.10



กลุ่มทดลอง

เมื่อทำการถ่ายฝากเอ็มบริโอระยะ 2-เซลล์ ที่ได้จากการปฏิสนธิ และเพาะเลี้ยงในน้ำเพาะเลี้ยงที่เติมกรดอะมิโนทั้ง 4 ชนิด ภายนอก ร่างกาย ซึ่งเป็นกลุ่มที่ดีที่สุดที่ได้จากการทดลองเพาะเลี้ยงนี้ จำนวน 120 ตัว ถ่ายฝากไปยังท่อไข่ของตัวรับที่ตั้งท้องเทียมจำนวน 10 ตัว โดยทำการถ่ายฝากไปยังท่อไข่ทั้งสองข้าง ข้างละ 6 ตัว หลังจากทำการถ่ายฝาก ได้ 6 วัน (วันที่ 8 ของการตั้งท้อง) ทำ laparotomy เพื่อดูจำนวนฟีตัสที่ผนังมดลูก พบจำนวนฟีตัสทั้งหมด 13 ตัว (10.83%) เมื่อครบกำหนดคลอด พบว่า ฟีตัสเหล่านี้ตายและถูก reabsorb หมด ดังแสดงในตารางที่ 3.11

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่า จำนวนฟีตัสในมดลูกของ ตัวรับของกลุ่มควบคุมมากกว่าจำนวนฟีตัสในมดลูกของกลุ่มทดลองอย่างมีนัย สำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (วิธีคำนวณดูภาคผนวก)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.10 แสดงผลการถ่ายฝากเอ็มบริโอระยะ 2 เซลล์ ที่ได้จาก
in vivo ในกลุ่มควบคุม (control group) ไปยัง
ตัวรับที่ตั้งท้องเทียม

Recipient female No.	no of 2 cell embryo transfered	no of fetuses at laparotomy	no of young born
1	12	1	-
2	12	2	-
3	12	2	-
4	12	3	-
5	12	3	-
6	12	2	-
7	12	3	-
8	12	3	-
9	12	1	-
10	12	2	-
Total	120	22 (18.33%)	-

ศูนย์วิทยุโทรพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.11 แสดงผลการถ่ายฝากเอ็มบริโอระยะ 2 เซลล์ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายนอกร่างกาย (in vitro) ในน้ำยาเพาะเลี้ยง TL-PAV+4AA ไปยังตัวรับที่ตั้งท้องเทียม

Recipient female No.	no of 2 cell embryo transfered	no of fetuses at laparotomy	no of young born
1	12	1	-
2	12	1	-
3	12	2	-
4	12	1	-
5	12	2	-
6	12	1	-
7	12	1	-
8	12	2	-
9	12	1	-
10	12	1	-
Total	120	13	(10.83%)