

ผลของกษัยและฮัยโปทอรัลต่อการเจริญของแอสมาเตอร์เอ็มบีไอระยะ 8-เซลล์ในงานเพาะเลี้ยง
และความอยู่รอดหลังการถ่ายฝาก



นางสาว สุนธิรักษ์ เอี่ยมสมบูรณ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาดำเนินการตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2538

ISBN 974-631-969-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I1c45c38x

EFFECTS OF TAURINE AND HYPOTAURINE ON THE
DEVELOPMENT OF 8-CELL HAMSTER EMBRYOS
IN VITRO AND THEIR VIABILITY
FOLLOWING TRANSFER

Miss. Anuruk Iamsomboon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Inter-Department of Physiology
Graduate School
Chulalongkorn University

1995

ISBN 974-631-969-8

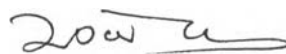
หน้าศึกษาบัณฑิต ผลของทอว์นและฮัยวิงทอว์นต่อการเจริญของแบคทีเรียโอรอะช 8- ไรล์
ในงานเพาะเลี้ยงและความอยู่รอดหลังการถ่ายฝาก
โดย นางสาว อรุณี กิ่งแก้ว เภสัชกร
สาขา สาขา
อาจารย์ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. วิทสา ชัยยิ่งยวด

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หน้าศึกษานิตยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สีนิต ฤงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบบัณฑิต



..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ พญ. ดร. บังอร ช่มเดช)



..... อาจารย์ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. วิทสา ชัยยิ่งยวด)



..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นสพ. ดร. มงคล เตชะกำพ)



..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พนิต ลิงท่าเสา)



พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

อนุรักษ์ เวียมลัมบุญ : ผลของทอรินและฮัยโปทอรินต่อการเจริญของแอมส์เตอร์เอ็มบริโอระยะ 8-เซลล์ ในจานเพาะเลี้ยงและความอยู่รอดหลังการถ่ายฝาก (EFFECTS OF TAURINE AND HYPOTAURINE ON THE DEVELOPMENT OF 8-CELL HAMSTER EMBRYOS IN VITRO AND THEIR VIABILITY FOLLOWING TRANSFER) อ.ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.วิทยา ยศยิ่งยวด, 72 หน้า. ISBN 974-631-969-8.

การทดลองในครั้งนี้ เพื่อศึกษาถึงผลของทอรินและฮัยโปทอรินต่อการเจริญของแอมส์เตอร์เอ็มบริโอระยะ 8-เซลล์ ในจานเพาะเลี้ยงโดยการเติมทอรินและฮัยโปทอรินลงในน้ำยาเพาะเลี้ยง Hamster Embryo Culture Medium-2 (HECM-2) ผลการทดลองพบว่า ภายหลังจากเพาะเลี้ยง 24 - 48 ชั่วโมง เอ็มบริโอในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เติมทอรินและฮัยโปทอรินทุกความเข้มข้น (0.1, 1.0 และ 10.0 มิลลิโมลาร์) สามารถเจริญเป็นบลาสโตซิสต์ได้มากกว่า 90% ซึ่งดีกว่าการเจริญของ เอ็มบริโอในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ไม่ได้เติมกรดอะมิโนอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่าง เอ็มบริโอที่เจริญในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เติมทอรินและฮัยโปทอริน เมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปจนถึง 72 ชั่วโมง พบว่าจำนวน เอ็มบริโอที่มีชีวิตและมีลักษณะปกติในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เติมทอริน นอกจากจะสูงกว่าในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ไม่ได้เติมกรดอะมิโนอย่างมีนัยสำคัญแล้ว ยังมีมากกว่าในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เติมฮัยโปทอรินด้วย และพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดอะมิโนทั้งสองชนิดเท่ากับ 0.1 มิลลิโมลาร์ น้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีทอรินและฮัยโปทอรินร่วมกันไม่ได้ส่งเสริมการเจริญได้ดีไปกว่ามีกรดอะมิโนชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงอย่างเดียว หลังการถ่ายฝากบลาสโตซิสต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในน้ำยาที่มี 0.1 มิลลิโมลาร์ของทอริน, 0.1 มิลลิโมลาร์ของฮัยโปทอริน และ 0.1 มิลลิโมลาร์ของทอริน + 0.1 มิลลิโมลาร์ของฮัยโปทอริน เข้าสู่ตัวรับที่ตั้งท้องเทียม พบเปอร์เซ็นต์ที่ฝังตัวมีชีวิตในกลุ่มที่ถ่ายฝากจากน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เติมกรดอะมิโนทุกกลุ่ม (35.6 - 48.7%) สูงกว่ากลุ่มควบคุม (6.0%) อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ที่ฝังตัวมีชีวิตในกลุ่มที่ถ่ายฝากจากน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เติมทอริน (48.7%) ยังมีเปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่ากลุ่มที่ถ่ายฝากจากน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เติมฮัยโปทอริน (35.6%) และเปอร์เซ็นต์ที่ฝังตัวที่ตายแล้วก็ต่ำกว่ากันอย่างมีนัยสำคัญ (8.2% และ 19.7%, $p < 0.05$) ผลการทดลองครั้งนี้อาจสรุปได้ว่าทอรินและฮัยโปทอรินมีผลส่งเสริมการเจริญของแอมส์เตอร์เอ็มบริโอ โดยทอรินให้ผลดีกว่าฮัยโปทอริน

ภาควิชา ลัทธิวิทยา
สาขาวิชา สหสาขาวิชาลัทธิวิทยา

ลายมือชื่อนิสิต อนุรักษ์ เวียมลัมบุญ
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา อ.ที่ปรึกษา

C445536 : MAJOR PHYSIOLOGY

KEY WORD: TAURINE / HYPOTAURINE / IN VITRO / EMBRYO

ANURUK IAMSOMBOON : EFFECTS OF TAURINE AND HYPOTAURINE ON THE DEVELOPMENT OF 8-CELL HAMSTER EMBRYOS IN VITRO AND THEIR VIABILITY FOLLOWING TRANSFER: THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. VITHAYA YODYINGYUAD, Ph.D., 72 pp. ISBN 974-631-969-8

Experiments on the development in vitro of 8-cell hamster embryos in taurine and hypotaurine added HECM-2 medium were carried out. Results showed that 24 - 48 hours after culture, percentages of blastocyst in every concentrations of taurine and hypotaurine supplemented media (0.1, 1.0 and 10.0 mM) were higher than 80% and were significantly different ($p < 0.05$) from that in the medium without amino acid (control). Difference between embryos developed in taurine and hypotaurine supplemented media were not observed during this period. When cultivation time was extended to 72 hours, results indicated that number of survived embryos with normal appearance in medium containing taurine was more than those in medium containing hypotaurine and significantly higher than those in medium without amino acids. Optimal concentrations of both taurine and hypotaurine were 0.1 mM. Adding taurine and hypotaurine together in the same culture medium did not support development better than taurine and hypotaurine alone. Viability of blastocysts obtained from media containing 0.1 mM taurine, 0.1 mM hypotaurine or 0.1 mM taurine + 0.1 mM hypotaurine were assessed by transferring them into uteri of pseudopregnant hamsters. Results showed that percentages of live fetus from all amino acid-added groups (35.6 - 48.7%) were significantly higher than that from the control (6.0%). Furthermore, the percentage of live fetus from taurine added group was higher, and the percentage of resorbed fetus was lower, than those from hypotaurine added group (48.7% vs 35.6% and 9.2% vs 19.7% respectively) significantly ($p < 0.05$). This study suggests that taurine and hypotaurine both support the development of hamster embryos and taurine is more effective than hypotaurine.

ภาควิชา..... สรีรวิทยา

สาขาวิชา..... สหสาขา สรีรวิทยา

ปีการศึกษา..... 2537

ลายมือชื่อนิติ..... *อนงค์ เวียงสมบูรณ์*

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... *Assoc. Prof. Vithaya Yodyingyuad*

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของรองศาสตราจารย์ ดร. วิชา อศิงฮวด อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ของการวิจัยมาด้วยดีตลอด

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ พญ.ดร. บังอร ชมเดช ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นสพ.ดร. มงคล เตชะกำพูน ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พันธุ์ สิงห์อาษา ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ทำนองนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา ที่สนับสนุนด้านการเงิน และเพื่อน ๆ ที่ให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยตลอดมา



นางสาว อนุรักษ์ เอี่ยมสมบูรณ์



สารบัญ

| | หน้า |
|--|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย..... | ง |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... | ฉ |
| กิตติกรรมประกาศ..... | ฅ |
| สารบัญแบบตาราง..... | ญ |
| สารบัญรูปภาพและกราฟ..... | ณ |
| บทที่ | |
| 1. บทนำ..... | 1 |
| - วัตถุประสงค์..... | 19 |
| - ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... | 19 |
| 2. วิธีดำเนินการวิจัย..... | 20 |
| - การเลี้ยงแฮมสเตอร์..... | 20 |
| - สถานที่ทำการทดลอง..... | 22 |
| - อุปกรณ์..... | 22 |
| - สารเคมี..... | 24 |
| - การเตรียมน้ำชาเพาะเลี้ยง..... | 25 |
| - วิธีการทดลอง..... | 28 |
| 2.1 การกระตุ้นให้ตกไข่เพิ่มมากกว่าปกติ..... | 28 |
| 2.2 การเก็บเอ็มบริโอ..... | 28 |
| 2.3 การศึกษาผลของ taurine และ hypotaurine ต่อการ | |
| เจริญของแฮมสเตอร์เอ็มบริโอ..... | 29 |
| 2.3.1 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ taurine และ | |
| hypotaurine ต่อการเจริญของเอ็มบริโอ..... | 29 |
| 2.3.2 การศึกษาการเจริญของเอ็มบริโอในน้ำชาเพาะเลี้ยงที่มี | |
| taurine ร่วมกับ hypotaurine..... | 29 |

| บทที่ | หน้า |
|--|------|
| 2.3.3 การศึกษาความอยู่รอดของเอ็มบริโอหลังทำการถ่ายฝาก..... | 29 |
| 3. ผลการทดลอง..... | 33 |
| - ผลของ taurine และ hypotaurine ต่อการเจริญของเอ็มบริโอ..... | 33 |
| - ผลร่วมของ taurine และ hypotaurine ต่อการเจริญของเอ็มบริโอ... | 41 |
| - ความอยู่รอดของเอ็มบริโอ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในน้ำยา HECM-2 (กลุ่มควบคุม), HECM-2 + 0.1 mM taurine, HECM-2 + 0.1 mM hypotaurine และ HECM-2 + 0.1 mM taurine + 0.1 mM hypotaurine หลังการถ่ายฝาก..... | 46 |
| 4. วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง..... | 54 |
| รายการอ้างอิง..... | 64 |
| ประวัติผู้เขียน..... | 72 |

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | หน้า |
|---|------|
| 2.1 แสดงระยะต่าง ๆ ของวงจรการเป็นสัคของแอมส์เตอร์..... | 21 |
| 2.2 แสดงองค์ประกอบของน้ำยาเพาะเลี้ยง HECM - 2 (Hamster Embryo Culture Medium - 2) ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแอมส์เตอร์เอ็มบริโอ..... | |
| 3.1 การเจริญของแอมส์เตอร์เอ็มบริโอระยะ 8-เซลล์ไปเป็นบลาสโตซิสต์, บลาสโตซิสต์ที่หลุดจากโพรงนอวูลูมิคูลาและดีเจเนอเรท หลังการเพาะเลี้ยง 24 ช.ม. ในน้ำยาเพาะเลี้ยง HECM-2 และ HECM-2 ที่มี taurine และ hypotaurine ความเข้มข้นต่าง ๆ..... | 37 |
| 3.2 การเจริญของแอมส์เตอร์เอ็มบริโอระยะ 8-เซลล์ไปเป็นบลาสโตซิสต์ บลาสโตซิสต์ที่หลุดจากโพรงนอวูลูมิคูลาและดีเจเนอเรท หลังการเพาะเลี้ยง 48 ช.ม. ในน้ำยาเพาะเลี้ยง HECM-2 และ HECM-2 ที่มี taurine และ hypotaurine ความเข้มข้นต่าง ๆ..... | 38 |
| 3.3 การเจริญของแอมส์เตอร์เอ็มบริโอระยะ 8-เซลล์ไปเป็นบลาสโตซิสต์, บลาสโตซิสต์ที่หลุดจากโพรงนอวูลูมิคูลาและดีเจเนอเรท หลังการเพาะเลี้ยง 72 ช.ม. ในน้ำยาเพาะเลี้ยง HECM-2 และ HECM-2 ที่มี taurine และ hypotaurine ความเข้มข้นต่าง ๆ..... | 39 |
| 3.4 การเจริญของแอมส์เตอร์เอ็มบริโอระยะ 8-เซลล์ไปเป็นบลาสโตซิสต์, บลาสโตซิสต์ที่หลุดจากโพรงนอวูลูมิคูลาและดีเจเนอเรท หลังการเพาะเลี้ยง 24 ช.ม. ในน้ำยาเพาะเลี้ยง HECM-2 และ HECM-2 ที่เติม 0.1 mM taurine, 0.1 mM hypotaurine และ 0.1 mM taurine + 0.1 mM hypotaurine..... | 42 |

| | |
|--|-----------|
| <p>3.5 การเจริญของแอสโตรไซต์เอ็มบริโอระยะ 8-เซลล์ไปเป็นบลาสโตซิสต์, บลาสโตซิสต์ที่หลุดจากโซนาเพลนิตาและดีเจนเนอเรท หลังการเพาะเลี้ยง 48 ช.ม. ในน้ำยาเพาะเลี้ยง HECM-2 และ HECM-2 ที่เติม 0.1 mM taurine, 0.1 mM hypotaurine และ 0.1 mM taurine + 0.1 mM hypotaurine.....</p> | <p>43</p> |
| <p>3.6 การเจริญของแอสโตรไซต์เอ็มบริโอระยะ 8-เซลล์ไปเป็นบลาสโตซิสต์, บลาสโตซิสต์ที่หลุดจากโซนาเพลนิตาและดีเจนเนอเรทหลังการเพาะเลี้ยง 72 ช.ม. ในน้ำยาเพาะเลี้ยง HECM-2 และ HECM-2 ที่เติม 0.1 mM taurine, 0.1 mM hypotaurine และ 0.1 mM taurine + 0.1 mM hypotaurine.....</p> | <p>44</p> |
| <p>3.7 แสดงผลการถ่ายฝากเอ็มบริโอระยะบลาสโตซิสต์ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ภายนอกร่างกาย ในน้ำยาเพาะเลี้ยง HECM-2 และ HECM-2 ที่เติม 0.1 mM taurine, 0.1 mM hypotaurine และ 0.1 mM taurine + 0.1 mM hypotaurine เข้าสู่ตัวรับที่ตั้งท้องเทียม.....</p> | <p>50</p> |
| <p>3.8 แสดงจำนวนลูกที่คลอด หลังการถ่ายฝากบลาสโตซิสต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ในน้ำยา HECM-2 และ HECM-2 ที่มี 0.1 mM taurine, 0.1 mM hypotaurine และ 0.1 mM taurine + 0.1 mM hypotaurine..</p> | |

สารบัญรูปภาพและกราฟ

| รูปที่ | หน้า |
|--|------|
| 1.1 แสดงลักษณะของเอ็มบริโอที่ไม่สามารถเจริญผ่านระยะ 2-เซลล์ เปรียบเทียบกับเอ็มบริโอระยะ 2-เซลล์ที่ปกติ..... | 2 |
| 1.2 แสดงปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นกับเอ็มบริโอที่เจริญในน้ำฮาเพาะเลี้ยง ที่เติมและไม่เติมกลูโคสและฟอสเฟต..... | 6 |
| 1.3 แสดง pathway ของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ก่อนเข้า กระบวนการ Krebs Cycle..... | 8 |
| 1.4 แสดง metabolic pathway ที่สัมพันธ์กับ taurine และ hypotaurine..... | 14 |
| 2.1 แสดงเทคนิคการถ่ายภาพเอ็มบริโอระยะบลาสโตซิสต์ ที่ได้จากการเพาะ เลี้ยงนอกร่างกาย เข้าสู่ตัวรับที่เหมาะสม..... | 31 |
| 3.1 แสดงการเจริญของเอ็มบริโอจากระยะ 8-เซลล์ไปเป็น และบลาสโตซิสต์ ที่เพาะเลี้ยงนอกร่างกายในน้ำฮา HECM-2 ที่เติม 0.1 mM. taurine เป็นเวลา 24 ช.ม..... | 35 |
| 3.2 แสดงเอ็มบริโอที่หลุดจากโซนาเพลชิวาและดีเจเนเนอเรท หลังการ เพาะเลี้ยงเอ็มบริโอระยะ 8-เซลล์ ในน้ำฮา HECM-2 ที่เติม 0.1 mM.taurine เป็นเวลา 72 ช.ม..... | 36 |
| 3.3 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเจริญของแอมส์เตอร์ เอ็มบริโอระยะ 8-เซลล์ไปเป็นบลาสโตซิสต์,บลาสโตซิสต์ที่หลุดจาก โซนาเพลชิวาและดีเจเนเนอเรท ในน้ำฮา HECM-2 และ HECM-2 ที่เติม taurine และ hypotaurine ความเข้มข้นต่าง ๆ หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24,48 และ 72 ช.ม..... | 40 |

- 3.4 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเจริญของเอ็มบริโอระยะ 8-เซลล์ ไปเป็นบลาสโตซิสต์, บลาสโตซิสต์ที่หลุดจากโพรงโพรงและดีเจเนอเรท ในน้ำยาเพาะเลี้ยง HECM-2 และ HECM-2 ที่เติม 0.1 mM taurine , 0.1 mM hypotaurine และ 0.1 mM taurine + 0.1 mM hypotaurine หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ช.ม..... 45
- 3.5 แสดงลักษณะของฟัตัสที่มีชีวิต (live fetus) หลังการถ่ายฝาก บลาสโตซิสต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในน้ำยา HECM-2..... 48
- 3.6 แสดงลักษณะของฟัตัสที่ตาย (resorbed fetus) หลังการถ่าย ฝากบลาสโตซิสต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในน้ำยา HECM-2..... 49
- 3.7 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ฟัตัสที่มีชีวิต ที่ฝังมดลูกในวันที่ 8 ของการ ตั้งท้อง หลังการถ่ายฝากบลาสโตซิสต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายนอกในร่างกาย ในน้ำยา HECM-2, HECM-2 + 0.1 mM taurine, HECM-2 + 0.1 mM hypotaurine และ HECM-2 + 0.1 mM taurine + 0.1 mM hypotaurine..... 51
- 3.8 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ฟัตัสที่ตาย ที่ฝังมดลูกในวันที่ 8 ของการตั้งท้อง หลังการถ่ายฝากบลาสโตซิสต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในน้ำยา HECM-2 + 0.1 mM taurine , HECM-2 + 0.1 mM hypotaurine และ HECM-2 + 0.1 mM taurine + 0.1 mM Hypotaurine..... 52
- 4.1 แสดง pathways การสร้างและการทำลาย free oxygen radicals ที่เกิดขึ้นภายในเอ็มบริโอระยะก่อนการฝังตัวในหนูเมาส์และกระต่ายสายพันธุ์ ที่ไม่สามารถเจริญผ่านระยะ 2-เซลล์ และสายพันธุ์ที่เจริญได้ช้ากว่าปกติ..... 57