3 1 AUG 1992

LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

PORCINE OVIDUCTAL CELLS SUPPORT IN VITRO BOVINE EMBRYO DEVELOPMENT

SOMPORN LHUANGMAHAMONGKOL

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(ANATOMY)

อภินันทนาการ
จาก
IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY

1992

Copyright by Mahidol University

19309

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนโคในหลอดทดลองด้วยเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่สุกร

ผู้วิจัย สมพร เหลืองมหามงคล

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ กนก ภาวสุทธิไพศิฐ M.D.,Ph.D.
เรือน สมณะ Ph.D.,M.D.
ชัยทิพย์ วนิชานนท์ Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 18 พฤษภาคม พ.ศ. 2535

บทคัดย่อ

ในการศึกษาเพื่อดูการส่งเสริมในการพัฒนาของตัวอ่อนโคที่ได้จากการปฏิสนธิในหลอดทดลองด้วยเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ของสุกร, เซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โค, น้ำยาเพาะเลี้ยงที่ไม่มีเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โค, น้ำยาเพาะเลี้ยงที่ไม่มีเซลล์เยื่อบุฯ แต่มีสารที่หลั่งจากเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่สุกร, น้ำยาเพาะเลี้ยงที่ไม่มีเซลล์เยื่อบุฯ แต่มีสารที่หลั่งจากเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โค และเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่สุกรแช่แข็ง การเก็บน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีแต่สารที่หลั่งจากเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ แต่ไม่มีตัวเซลล์นั้นกระทำหลังจากได้เพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุฯ ที่ขูดจากท่อนำไข่ด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ (TCM-199) และ 10% ซีรั่มของลูกวัว (HTFCS) 3 ถึง 5 วัน โดยการปั่นแยกเอาเซลล์ออก เซลล์ที่แยกออกมาสามารถนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ในไนโตรเจนเหลว โดยใช้กลีเซอรอลเป็นตัวช่วยป้องกันการแข็งตัวของน้ำในเซลล์ได้ และสามารถนำเซลล์ที่แช่แข็งนี้มาใช้เพาะเลี้ยงตัวอ่อนได้ โดยการทำให้การแช่แข็งละลาย ผลการทดลองแสดงว่า การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนด้วยเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ และการเพาะเลี้ยงด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ไม่มีตัวเซลล์ แต่มีสารที่หลั่งจากเซลล์เยื่อบุฯนั้น ตัวอ่อนสามารถพัฒนาการเจริญเติบโตจาก 2 เซลล์ จนถึง 6-8 เซลล์ ได้โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในระยะ 16 ถึง 32 เซลล์ และระยะมอรูลานั้น การพัฒนาของตัวอ่อนที่เลี้ยงด้วยน้ำยาที่ไม่มีตัวเซลล์ แต่มีสารที่หลั่งจากเซลล์เยื่อบุฯเป็นไปได้น้อยกว่าการเลี้ยงด้วยเซลล์เยื่อบุฯอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เป็นที่น่าสนใจว่า การเพาะเลี้ยงตัวอ่อนโคด้วยเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่แช่แข็งหลังจากทำให้ละลายแล้วสามารถช่วยพัฒนาได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ของโค และเซลล์เยื่อบุท่อนำ

ไข่แช่แข็งหลังจากทำให้ละลายแล้วสามารถช่วยพัฒนาตัวอ่อนโคได้ด้วย แต่เปอร์เซ็นต์การพัฒนาต่ำกว่าการเลี้ยงด้วยเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ที่ไม่ได้แช่แข็ง ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่หลั่งจากเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ของสุกรและของโคทั้ง 3 ระยะของวงจรของรังไข่ด้วยกระแสไฟฟ้า ซึ่งเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่และโปรตีนที่หลั่งนั้น อาจช่วยในการพัฒนาตัวอ่อนในหลอดทดลอง ผลการทดลองแสดงว่า โปรตีนที่หลั่งจากเซลล์เยื่อบุฯ นั้น มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกันทั้ง 3 ระยะทั้งของสุกรและโคผลการทดลองเหล่านี้สรุปได้ว่า เซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ของสุกรและโคและน้ำยาเพาะเลี้ยงที่ไม่ตัวเซลล์ มีแต่สารที่หลั่งจากเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ช่วยพัฒนาการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคได้ และเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่นี้สามารถทำการแช่แข็ง และทำให้ละลายก่อนนำไปใช้ได้ แต่ประสิทธิภาพในการส่งเสริมการพัฒนาตัวอ่อนจะด้อยกว่าการเลี้ยงด้วยเซลล์ที่ไม่ได้แช่แข็ง นอกจากนี้ โปรตีนที่หลั่งจากเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ของสุกร และโคทั้ง 3 ระยะ ยังมีน้ำหนักโมเลกุลที่ใกล้เคียงกันด้วย เมื่อทดสสอบโดยการใช้กระแสไฟฟ้าเป็นตัวแยกน้ำหนักโมเลกุล (SDS-PAGE)

Copyright by Mahidol University

Thesis Title: Porcine Oviductal Cells Support *In Vitro* Bovine Embryo Development

Name: Somporn Lhuangmahamongkol

Degree: Master of Science (Anatomy)

Thesis Supervisory Commitee:

Kanok Pavasuthipaisit, M.D.,Ph.D.

Reon Somana, Ph.D.,M.D.

Chaitip Wanichanon, Ph.D.

Date of Graduation: 18 May B.E.2535 (1992)

Abstract

This study was designed to investigate the development competency of *in vitro* matured, *in vitro* fertilized bovine embryos co-cultured in a) bovine oviductal cells (BOC), b) porcine oviductal cells (POC), c) bovine condition medium (BCM), d) porcine condition medium (PCM) and e) frozen porcine oviductal cells (FPOC). The oviductal epithelial cells were scrapped from luminal tissue of intact oviduct and cultured in TALP + 10% heat treated fetal calf serum. Condition media were collected from the secretions of similar epithelial cell preparation incubated for 3-5 days. Porcine oviductal epithelial cells were freezed at -196 °C in liquid nitrogen by using glyceral as the cryoprotectant and thawed them before using. The results revealed that the efficiency between the cells and condition media in both species for embryo development were not significantly different at 2- and 6 to 8 cell stages whereas the percentage of development at 16 to 32 cell and morula stage co-cultured in condition media was significantly lower than those co-cultured with epithelial cells. Interesting, POC co-culture could support embryo development better than BOC. Frozen-thawed porcine oviductal epithelial cells could also support bovine embryo development but, it was significantly lower than that of fresh cells. To investigate the mechanisms by which the oviductal cells or condition medium in supporting the bovine embryo development *in vitro*, we examined differences in protein secretion by oviductal cells from both species during three phases of the ovarian cycle by SDS-PAGE. It was found that proteins secreted by oviductal cells in both species during the three phases of estrous cycle were similar in pattern.

The results indicated that both bovine and porcine oviductal epithelial cells and condition medium could support the development of bovine embryos produced *in vitro*. The cells could be frozen, even the efficiency was less than the freshy cells. The protein secretion by oviductal epithelial cells from both species during three phases of the ovarian cycle was similar as demonstrated by SDS-PAGE.