ระยะของเอมบริโอและช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเอมบริโอของหนูเมาซ์โดยการแช่แข็ง

นางสาวประภา มหากิจ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาสรีรวิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2532
ISBN 974-577-012-4
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

015982
I17514903

APPROPRIATE STAGES AND PRESERVATION PERIOD OF MOUSE EMBRYO IN CRYOPRESERVATION

Miss Prapa Mahakit

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Inter-Department of Physiology
Graduate School
Chulalongkorn University
1989

ISBN 974-577-012-4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ระยะของเอมบริโอและช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเอมบริโอของหนูเมาซ์โดยการแช่แข็ง
โดย	นางสาวประภา มหากิจ
ภาควิชา	สหสาขาสรีรวิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.วิทยา ยศยิ่งยวด
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ประมวล วีรุตมเสน
	อาจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.มงคล เตชะกำพุ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ประภา ลอยเพ็ชร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิทยา ยศยิ่งยวด)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ประมวล วีรุตมเสน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.มงคล เตชะกำพุ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ทวินศรี วรวรรณ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

ประภา มหากิจ : ระยะของเอมบริโอและช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเอมบริโอของหนูเมาซ์โดยการแช่แข็ง (APPROPRIATE STAGES AND PRESERVATION PERIOD OF MOUSE EMBRYO IN CRYOPRESERVATION) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.วิทยา ยศยิ่งยวด, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.นพ.ประมวล วีรุตมเสน, อ.นสพ.ดร.มงคล เตชะกำพุ, 76 หน้า. ISBN 974-577-012-4

การวิจัยครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาอัตราการอยู่รอดภายหลังการเพาะเลี้ยงเอมบริโอที่แช่แข็งในระยะ 2-, 4- และ 8-เซลล์ โดยสังเกตการเจริญเติบโตของเอมบริโอจนถึงระยะบลาสโตซิสและศึกษาถึงอัตราการอยู่รอดของเอมบริโอระยะ 8- เซลล์ ที่แช่แข็งด้วยสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งชนิดต่าง ๆ กันคือPROH, DMSO และ Glycerol สังเกตการเจริญเติบโตจนถึงระยะบลาสโตซิสรวมทั้งศึกษาผลของช่วงเวลาในการแช่แข็งเอมบริโอไว้ในไนโตรเจนเหลวต่ออัตราการอยู่รอดของเอมบริโอ นอกจากนี้ยังศึกษาถึงการอยู่รอดของบลาสโตซิสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายหลังการแช่แข็ง โดยการถ่ายฝากไปยังมดลูกของหนูเมาซ์ที่ตั้งท้องเทียมด้วย

ผลการวิจัยพบว่า เอมบริโอที่แช่แข็งในระยะ 8-เซลล์ มีอัตราการอยู่รอดจนเจริญถึงระยะบลาสโตซิสมากที่สุด คือร้อยละ 80.8 ซึ่งสูงกว่าเอมบริโอระยะ 2-เซลล์ (ร้อยละ 60.6) และ 4-เซลล์ (ร้อยละ 69.4) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เอมบริโอที่แช่แข็งโดยมี PROH เป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง มีอัตราการเจริญสูงกว่าที่แช่แข็งโดยมีสาร DMSO และ Glycerol อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ร้อยละ 84.6, 63.2 และ 62.5 ตามลำดับ) สำหรับช่วงเวลาในการแช่แข็งเอมบริโอไว้ในไนโตรเจนเหลว 1, 28 และ 56 วัน อัตราการอยู่รอดไม่แตกต่างกัน เอมบริโอระยะบลาสโตซิสที่ได้จากการแช่แข็งสามารถฝังตัวได้เช่นเดียวกับบลาสโตซิสที่ได้จากเอมบริโอที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง หรือที่เจริญเติบโตภายในร่างกายเมื่อถ่ายฝากไปยังมดลูกของหนูตัวเมียที่ตั้งท้องเทียม แต่อัตราการฝังตัวของกลุ่มแช่แข็งร้อยละ 30.9 (26/84) ต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ผ่านการแช่แข็งและกลุ่มที่เจริญเติบโตภายในร่างกาย (ร้อยละ 54.2 [39/72] และร้อยละ 51.2 [43/84] ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

จากการวิจัยในครั้งนี้สรุปว่าเอมบริโอของหนูเมาซ์ระยะ 8-เซลล์เหมาะสมที่สุดในการนำมาเก็บรักษาโดยการแช่แข็ง สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่างชนิดกันมีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเอมบริโอแตกต่างกัน แต่ช่วงเวลาในการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวไม่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเอมบริโอ นอกจากนี้การแช่แข็งมีผลกระทบต่อการฝังตัวของเอมบริโอแต่สภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงไม่มีผลต่อการฝังตัวของเอมบริโอ

ภาควิชา สหสาขาสรีรวิทยา
สาขา สรีรวิทยา
ปีการศึกษา 2532

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

PRAPA MAHAKIT : APPROPRIATE STAGES AND PRESERVATION PERIOD OF MOUSE EMBRYO IN CRYOPRESERVATION.THESIS ADVISOR : ASSO.PROF. VITHAYA YODYINGYUAD,Ph.D.THESIS CO-ADVISOR : ASSO.PROF.PRAMUAN VIRUTAMASEN,M.D.,MONGKOL TECHAKUMPHU,D.V.M.76pp.ISBN 974-577-Ø12-4

This project aims to study the cryosurvival of 2-,4-and 8-cell mouse embryos subjected to frozen/thawed procedures. Different stages of the mouse embryos were cryopreserved using PROH as the cryoprotectant and rapid freezing method on a programmable biological freezer. Viability of frozen/thawed embryos were assessed by counting the number of embryos developed to blastocyst in vitro. The effect of cryoprotectants used on the cryopreservation of 8-cell mouse embryos was also studied. This was carried out by freezing 8-cell mouse embryos in PROH,DMSO or Glycerol using the rapid freezing method .The survival of embryos in different cryoprotectants were assessed by means of the rate of blastocyst formation in vitro of frozen/thawed embryos. Finally,the effect of the length of storage on cryopreservation of 8-cell mouse embryos was studied. The embryos were frozen and stored for 1,28 and 56 days in liquid nitrogen [LN_2] and the survival was assessed by culturing thawed embryos to blastocyst stage as above. The viability of blastocysts developed in vitro from frozen / thawed 8-cell embryos was further investigated by transferring into pseudopregnant recipients.

Results showed that frozen/thawed 2-,4-and 8-cell mouse embryos were able to develop to blastocysts in HTF+20%FCoS medium.The best survival rate was obtained from 8-cell embryos (80.8%).The percentage of blastocyst formation was significantly high ($p<0.05$) in 8-cell compared to 2-cell or 4-cell embryos. No significant difference in the percentage of blastocyst formation was observed between 2-cell and 4-cell embryos. As a cryoprotectant,PROH gave significantly higher(84.6%)($p < 0.05$) rate of survival of 8-cell embryos than DMSO(63.2%) or Glycerol(62.5%).No significant difference in the cryosurvival of embryos was noted between the latter two cryoprotectants.Similar survival rates was observed for 8-cell embryos cryopreserved and stored for 1,28 and 56 day in LN_2.Frozen/thawed 8-cell embryos developed to blastocyst stage in HTF + 20% FCoS were able to implant(30.9%) when transferred to pseudopregnant recipients. However their implantation rate was lower than those obtained from the transferred of blastocysts developed from unfrozen(fresh)8-cell embryos in vitro.

In conclusion,the present study showed that mouse embryos at the 8-cell stage was the most suitable stage for cryopreservation. Various types of cryoprotectant differently affect the rate of embryo survival.However the latter was not affected by the length of storage time in LN_2.Besides cryopreservation also affect implantation but not culture conditions.

ภาควิชา สหสาขาสรีรวิทยา
สาขาวิชา สรีรวิทยา
ปีการศึกษา 2532

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ ด้วยความกรุณาของ รศ.ดร.วิทยา ยศยิ่งยวด อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้ให้คำแนะนำและช่วยตรวจแก้ไขข้อบกพร่องในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้โดยตลอด ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รศ.นพ.ประมวล วีรุตมเสน อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมการทำวิทยานิพนธ์ ที่ให้ข้อแนะนำและให้ใช้ห้องปฏิบัติการหน่วยชีววิทยาการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติ-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นสถานที่ศึกษาวิจัย นอกจากนี้ ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ นสพ.ดร.มงคล เตชะกำพุ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำเกี่ยวกับการทำวิจัย ไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ มารดา และพี่ ๆ ที่ให้ความสนับสนุนและช่วยเหลือด้วยดีตลอดมาและขอขอบคุณ คุณพรภิมล ตั้งชัยสิน ที่ช่วยสอนเทคนิคต่าง ๆ พร้อมทั้งให้คำแนะนำ ท้ายสุดขอขอบคุณเพื่อน ๆ น้อง ๆ ที่ให้กำลังใจ

ประภา มหากิจ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความหมายคำย่อ

มล.	มิลลิลิตร
น.	นาฬิกา
ชม.	ชั่วโมง
ซม.	เซ็นติเมตร
%	เปอร์เซ็นต์
p	ค่าความเชื่อมั่นทางสถิติ
i.u.	ยูนิตสากล
$^{\circ}C$	องศาเซลเซียส
LN_2	ไนโตรเจนเหลว
mOsm	มิลลิออสโมลาลิตี้
PROH	1-2, Propanediol
DMSO	Dimethyl sulfoxide

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
ความหมายคำย่อ..... ช
สารบัญตาราง..... ช
สารบัญรูป..... ฌ

บทที่

1. บทนำ..... 1
   - หลักการเก็บรักษาเอมบริโอโดยการแช่แข็ง..... 2
   - ปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของเอมบริโอภายหลังการแช่แข็ง..... 4
   - การประเมินผลของการแช่แข็ง..... 9
   - ข้อบ่งชี้สำหรับใช้ประเมินผลเอมบริโอภายหลังการแช่แข็ง..... 9
   - ข้อบ่งชี้สำหรับใช้ประเมินผลการเจริญเติบโตของเอมบริโอ ในการเพาะเลี้ยง..... 10
   - การถ่ายฝากเอมบริโอ..... 10
   - ประโยชน์ของการถ่ายฝากเอมบริโอ..... 11
   - วัตถุประสงค์..... 11
   - ความสำคัญหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้..... 12
2. ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย..... 13
   - การเตรียมสัตว์ทดลอง..... 13
   - ธรรมชาติการเจริญพันธุ์ของหนูเมาซ์..... 13
   - เครื่องมือและอุปกรณ์..... 14
   - สารเคมี..... 16
   - สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งที่ใช้สำหรับแช่แข็งเอมบริโอ..... 17
   - น้ำยาที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเอมบริโอ..... 19
   - การเตรียมน้ำยา Phosphate Buffered Saline (PBS)..... 19
   - การเตรียม Fetal Cord Serum (FCoS)..... 19

บทที่ หน้า

- การเตรียมสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง..... 19
- การเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยง Human Tubal Fluid..... 21
- การทำความสะอาดเครื่องแก้ว..... 21
- การเก็บเอมบริโอ..... 23
- การแช่แข็ง..... 23
- การเก็บเอมบริโอไว้ในไนโตรเจนเหลว..... 28
- การละลายและการเจือจางสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง..... 28
- การประเมินผลภายหลังการแช่แข็ง..... 28
- การเพาะเลี้ยงเอมบริโอภายหลังการแช่แข็ง..... 32
- การถ่ายฝากเอมบริโอ..... 32
- สถิติวิเคราะห์..... 39

3. ผลการทดลอง..... 40
- ผลการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตถึงระยะบลาสโตซิสของเอมบริโอระยะต่างๆ ที่ผ่านการแช่แข็งและไม่ผ่านการแช่แข็ง..... 40
- ผลการเปรียบเทียบการแช่แข็งและการเจริญเติบโต ถึงระยะบลาสโตซิสของเอมบริโอระยะ 2-, 4- และ 8- เซลล์..... 46
- ผลการเปรียบเทียบการแช่แข็งและการเจริญเติบโต ถึงระยะบลาสโตซิสของเอมบริโอระยะ 8- เซลล์ ที่แช่แข็งโดยใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งชนิดต่างๆ..... 49
- ผลการเปรียบเทียบการแช่แข็ง และการเจริญเติบโต ถึงระยะบลาสโตซิสของเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ ที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน..... 52
- ผลการเปรียบเทียบการถ่ายฝากเอมบริโอระยะบลาสโตซิสที่ผ่านการแช่แข็งและไม่ผ่านการแช่แข็ง ไปยังมดลูกของหนูตัวรับ (recipient) ที่ตั้งท้องเทียมได้ 3 วัน..... 55

4. วิจารณ์และสรุปผล..... 59

เอกสารอ้างอิง..... 65

ประวัติผู้เขียน..... 76

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 แสดงตำแหน่งที่พบเอมบริโอ และระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆ ภายหลังการฉีด hCG..... 16

2.2 แสดงส่วนประกอบของน้ำยา Phosphate Buffered Saline..... 20

2.3 แสดงส่วนประกอบของน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอ Human Tubal Fluid..... 22

3.1 แสดงการเจริญเติบโตถึงระยะบลาสโตซิสของเอมบริโอหนูเมาซ์ระยะ 2- เซลล์ ภายหลังการแช่แข็ง และเพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง HTF เป็นเวลา 72 ชั่วโมง..... 41

3.2 แสดงการเจริญเติบโตถึงระยะบลาสโตซิสของเอมบริโอหนูเมาซ์ ภายหลังการแช่แข็ง ในน้ำยาเพาะเลี้ยง HTF เป็นเวลา 72 ชั่วโมง..... 42

3.3 แสดงการเจริญเติบโตถึงระยะบลาสโตซิสของเอมบริโอระยะ 8- เซลล์ ภายหลังการแช่แข็ง และเพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง HTF เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง..... 43

3.4 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติถึงผลการเจริญถึงระยะบลาสโตซิส ของเอมบริโอ กลุ่มแช่แข็งและกลุ่มควบคุม ในแต่ละระยะของเอมบริโอ..... 44

3.5 แสดงการเจริญเติบโตถึงระยะบลาสโตซิส ของเอมบริโอระยะ 2-,4- และ 8- เซลล์ ภายหลังการแช่แข็ง..... 46

3.6 แสดงเปรียบเทียบทางสถิติถึงผลของเอมบริโอที่มีลักษณะรูปร่างปกติ ภายหลังการแช่แข็ง ในแต่ละระยะของเอมบริโอ..... 47

3.7 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติถึงผลของการเจริญถึงระยะบลาสโตซิส ของเอมบริโอแต่ละระยะภายหลังการแช่แข็ง..... 47

3.8 แสดงการเจริญเติบโตของเอมบริโอ ระยะ 8- เซลล์ ภายหลังการแช่แข็ง ด้วย cryoprotectant ชนิดต่าง ๆ..... 49

3.9 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติถึงผลของเอมบริโอที่มีลักษณะรูปร่างปกติภายหลังการแช่แข็งด้วย cryoprotectant ชนิดต่าง ๆ..... 50

3.10 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติถึงผลการเจริญเติบโตถึงระยะบลาสโตซิสของเอมบริโอที่แช่แข็งด้วย cryoprotectant ชนิดต่าง ๆ 50

ตารางที่ หน้า

3.11 แสดงการเจริญเติบโตถึงระยะบลาสโตซิส ของเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ ภายหลังการแช่แข็งและเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน..... 52
3.12 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติถึงผลของเอมบริโอที่มีลักษณะรูปร่างปกติ ภายหลังการแช่แข็งโดยการเก็บในไนโตรเจนเหลวในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน..... 53
3.13 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติถึงผลการเจริญเติบโตถึงระยะบลาสโตซิสของเอมบริโอที่เก็บในไนโตรเจนเหลวในช่วงเวลาต่างกัน..... 53
3.14 แสดงผลการถ่ายฝากเอมบริโอระยะบลาสโตซิสที่ได้จากเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ภายหลังการเพาะเลี้ยง ในน้ำยาเพาะเลี้ยง HTF..... 55
3.15 แสดงผลการถ่ายฝากเอมบริโอระยะบลาสโตซิส ในที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเอมบริโอ ระยะ 8- เซลล์ ภายหลังการแช่แข็งที่ได้จากการเจริญเติบโตภายในร่างกาย และกลุ่มควบคุมไปยังมดลูกของหนูตัวรับที่ตั้งท้องเทียมได้ 3 วัน..... 56
3.16 แสดงการเปรียบเทียบผลการฝังตัวของเอมบริโอระยะบลาสโตซิสที่ถ่ายฝากไปยังหนูตัวรับที่ตั้งท้องเทียมได้ 3 วัน..... 57
3.17 แสดงการเปรียบเทียบทางสถิติถึงผลการฝังตัว ภายหลังการถ่ายฝากเอมบริโอในแต่ละกลุ่ม..... 57

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	ขั้นตอนในการแช่แข็งเอมบริโอและการประเมินผล	3
1.2	แสดงผลของอัตราเร็วในการลดอุณหภูมิต่อการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์	9
2.1	แสดงการผ่าตัดหน้าท้อง เพื่อตัดท่อนำไข่ออกจากมดลูก	24
2.2	แสดงการตัดท่อนำไข่ออกจากมดลูก	25
2.3	แสดงการฉีดขับเอมบริโอออกจากท่อนำไข่	25
2.4	แสดงวิธีการดึง Pasteur pipette	26
2.5	แสดงการบรรจุเอมบริโอใน plastic straw	27
2.6	แสดงเครื่อง Programmable biological freezer	29
2.7	แสดงการทำ Seeding	30
2.8	แสดงลำดับขั้นตอนการแช่แข็ง	31
2.9	แสดงเอมบริโอที่มีลักษณะรูปร่างปกติ ภายหลังการแช่แข็ง	33
2.10	แสดงเอมบริโอที่เจริญเติบโตถึงระยะบลาสโตซิส ภายหลังการแช่แข็งและเพาะเลี้ยง	33
2.11	แสดงการทำ Male vasectomy	34
2.12	แสดงการถ่ายฝากเอมบริโอที่มดลูก	36
2.13	แสดงการบรรจุเอมบริโอใน capillary pipette เพื่อนำไปถ่ายฝากยังหนูตัวรับ	37
2.14	แสดงลักษณะมดลูกของหนูตัวรับที่ตั้งท้อง 10 วัน	39
3.1	แสดงเปอร์เซ็นต์ของบลาสโตซิสที่เจริญจากเอมบริโอกลุ่มควบคุมและกลุ่มแช่แข็ง ระยะ 2-, 4- และ 8- เซลล์	45
3.2	แสดงเปอร์เซ็นต์ของเอมบริโอที่เก็บได้, ที่มีลักษณะรูปร่างปกติและสามารถเจริญถึงระยะบลาสโตซิส ภายหลังการแช่แข็งของเอมบริโอที่นำมาแช่แข็งในระยะ 2-, 4- และ 8-เซลล์	48

รูปที่ หน้า

3.3 แสดงเปอร์เซ็นต์ของเอมบริโอที่เก็บได้ ภายหลังการแช่แข็ง ที่มีลักษณะรูปร่างปกติ และที่สามารถเจริญถึงระยะบลาสโตซิส ภายหลังการแช่แข็งและการเพาะเลี้ยงจากเอมบริโอระยะ 8- เซลล์ ที่แช่แข็งด้วย PROH, DMSO และ Glycerol..... 51

3.4 แสดงเปอร์เซ็นต์ของเอมบริโอที่เก็บได้ ภายหลังการแช่แข็ง ที่มีลักษณะรูปร่างปกติ และที่เจริญถึงระยะพลาสโตซิส ภายหลังการแช่แข็งและเพาะเลี้ยงของเอมบริโอระยะ 8- เซลล์ ที่นำมาแช่แข็งและเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวในช่วงเวลา 1, 28 และ 56 วัน..... 54

3.5 แสดงเปอร์เซ็นต์การฝังตัวของบลาสโตซิสที่ได้จากเอมบริโอระยะ 8- เซลล์ ภายหลังการแช่แข็ง-เพาะเลี้ยง, ภายหลังการเพาะเลี้ยงและที่เจริญเติบโตภายในร่างกาย..... 58

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย