

นิพนธ์ฉบับ

การศึกษาการเกิด parthenogenesis โดยการกระตุ้นไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ภายนอกร่างกายจากไข่ที่เจริญไม่เต็มที่และไข่ที่มีการปฏิสนธิล้มเหลวโดยใช้สารเคมีและการพัฒนาให้เป็น parthenogenetic stem cell

เจริญไชย เจียมจรรยา*, นันทนา กำนารายณ์**, พัทธรา วิสุตกุล*

บทคัดย่อ

- บทนำ:** Parthenogenesis เป็นกระบวนการที่ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมของเซลล์สืบพันธุ์เพศหญิง (oocyte) จาก ๑ ชุดเป็น ๒ ชุด โดยไม่ต้องมีการปฏิสนธิของเซลล์สืบพันธุ์จากฝ่ายชายและฝ่ายหญิง Parthenote ที่เกิดขึ้นสามารถนำมาใช้ในการพัฒนาเป็นเซลล์ต้นกำเนิด เพื่อประโยชน์ในการศึกษาวิจัยทางการแพทย์ต่อไป ซึ่งสามารถหลีกเลี่ยงประเด็นทางจริยธรรมที่พบในการพัฒนาเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อน (embryo) แต่เนื่องจากกระบวนการ parthenogenesis เกิดขึ้นได้ยากมากในมนุษย์ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาวิธีการทำให้เกิด parthenogenesis ในไข่นิตต่าง ๆ ที่เหลือใช้ในกระบวนการรักษาภาวะมีบุตรยากโดยอาศัยเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพ
- วิธีการศึกษา:** ทำการกระตุ้นไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ภายนอกร่างกาย (In vitro maturation: IVM) ที่เหลือใช้จากกระบวนการรักษาภาวะมีบุตรยาก ไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ ที่มีการปฏิสนธิล้มเหลวที่หน่วยผู้มีบุตรยาก โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ปี ๒๕๕๗ - ๒๕๖๐ โดยใช้สารเคมี ๒ แบบคือแบบที่ ๑ ได้แก่ ionomycin ร่วมกับ 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) แบบที่ ๒ ได้แก่ ionomycin ร่วมกับ cytochalasinB และ cycloheximide แล้วทำการเพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง ๒ สูตร คือ สูตร A ได้แก่ culture medium สูตร B ได้แก่ culture medium ที่มี growth factors โดยที่ในการเพาะเลี้ยงด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยง สูตร B ยังแบ่งกลุ่มย่อยคือกลุ่มที่ไม่มีการกระตุ้นด้วยไฟฟ้าและกลุ่มที่มีการกระตุ้นด้วยไฟฟ้าในระยะที่มีการแบ่งเซลล์ (cleavage stage) แล้วทำการศึกษาเปรียบเทียบอัตราการเกิด parthenogenetic pronuclear stage (PPN), parthenogenetic cleavage stage (PC) และ parthenogenetic blastocyst stage (PB) โดยใช้สถิติ student t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น ๐.๐๕ รวมทั้งได้มีการศึกษาเบื้องต้นของการนำไปพัฒนาเป็น parthenogenetic stem cell
- ผลการศึกษา:** จำนวนไข่ที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมด ๑๙๑ ใบ แบ่งออกเป็นไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ ๑๑๐ ใบ โดยเป็นไข่ที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง ๗๙ ใบ และผ่านการแช่แข็ง ๓๑ ใบ และไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ที่มีการปฏิสนธิล้มเหลว ๘๑ ใบ โดยเป็นไข่ที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง ๗๔ ใบ และผ่านการแช่แข็ง ๗ ใบ พบว่าอัตราการเกิด PPN ในไข่ที่มาจากไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ที่ไม่ผ่านการแช่แข็งและได้รับการกระตุ้นด้วยสารเคมีสูตร ๑ มีค่าต่ำกว่าการกระตุ้นด้วยสารเคมีสูตรที่ ๒ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือร้อยละ ๔๐.๐๐ และ ๖๙.๒๓ ตามลำดับ ($p = 0.008$) โดยเฉพาะอย่างยิ่งยังพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากไข่ระยะ germinal vesicle ร้อยละ ๔๐.๖๓ และ ๗๒.๗๓ ตามลำดับ ($p = 0.009$) อัตราการเกิด PC จากการกระตุ้นด้วยสารเคมีสูตรที่ ๒ ที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาสูตร A มีค่าต่ำกว่าที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาสูตร B อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือร้อยละ ๗๘.๖๗ และ ๘๖.๖๖ ตามลำดับ ($p = 0.014$) ยังพบว่าอัตราการเกิด PC จากไข่ที่เจริญเต็มที่ที่มีการปฏิสนธิล้มเหลวและไม่ผ่านการแช่แข็งจากการกระตุ้นด้วยสารเคมีสูตรที่ ๑ ที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาสูตร A มีค่าน้อยกว่าจากการกระตุ้นด้วยสารเคมีสูตรที่ ๒ เพาะเลี้ยงในน้ำยาสูตร B อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือร้อยละ ๕๗.๑๔ และ ๑๐๐ ตามลำดับที่ $p = 0.05$ อัตราการเกิด PB จากไข่ทั้งหมด

มีค่าเฉลี่ยร้อยละ ๔.๑๙ โดยพบว่ามียัตราการเกิด PB จากไข่ที่มาจากไข่ที่เจริญเติบโตไม่เต็มที่ที่ไม่ผ่านการแช่แข็งคิดเป็นร้อยละ ๔.๗๑ และมียัตราการเกิด PB จากไข่ที่มีการปฏิสนธิล้มเหลวที่ไม่ผ่านการแช่แข็งคิดเป็นร้อยละ ๔.๘๘ และพบว่าอัตราการเกิด PB จากการกระตุ้นด้วยสารเคมีสูตรที่ ๒ ที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาสูตร A มีค่าน้อยกว่าที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาสูตร B ที่ไม่มีการกระตุ้นด้วยไฟฟ้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือร้อยละ ๕.๓๓ และ ๖.๖๗ ตามลำดับ $p = 0.05$ จากการศึกษาครั้งนี้ยังไม่สามารถพัฒนา parthenogenetic derived stem cell ได้สำเร็จจาก parthenogenetic blastocyst stage จำนวน ๗ ตัว จากทั้งหมด ๘ ตัว โดยยังมีเหลือแช่แข็งไว้อีก ๑ ตัว

วิจารณ์ และ การกระตุ้นไข่ให้เกิด parthenogenesis ด้วยสารเคมีสูตรที่ ๒ จะได้ผลดีกว่าการกระตุ้นด้วยสารเคมีสูตร ๑

สรุปผลการศึกษา: ในกรณีไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ภายนอกร่างกายจากไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง การเกิด parthenogenetic blastocyst จะพบได้ทั้งในไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ภายนอกร่างกายจากไข่ที่ยังเจริญไม่เต็มที่และไข่ที่เจริญเต็มที่ที่มีการปฏิสนธิล้มเหลวที่ไม่ผ่านการแช่แข็งโดยใช้สารเคมีทั้ง ๒ สูตร และการเพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงทั้ง ๒ สูตร โดยกลุ่มที่กระตุ้นด้วยสารเคมีสูตรที่ ๒ ที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาสูตร B จะได้ผลดีกว่าเพาะเลี้ยงในน้ำยาสูตร A สำหรับการพัฒนา parthenogenetic derived stem cell นั้นยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป เนื่องจาก parthenogenetic blastocyst ที่ได้จากการศึกษานี้มีจำนวนน้อยเกินไป

คำสำคัญ: parthenogenesis, parthenogenetic activation, parthenogenetic culture, blastocyst, stem cell

วันที่รับบทความ: ๔ สิงหาคม ๒๕๖๐

วันที่อนุญาตให้ตีพิมพ์: ๑๘ เมษายน ๒๕๖๑

* คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

** สาขาสูติ-นรีเวชวิทยา กลุ่มงานแพทย์ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ

บทนำ

ในสภาวะปกติตัวเมียจะปล่อยตัวอ่อนส่วนใหญ่เมื่อเกิดการตกไข่ (ovulation) เซลล์ไข่จะหยุดกระบวนการแบ่งตัวแบบไมโอซิสที่ระยะ metaphase II (MII arrest) จนกว่าจะเกิดการปฏิสนธิ (fertilization) กับอสุจิในธรรมชาติ เมื่อเซลล์ไข่เกิดการปฏิสนธิกับอสุจิ (fertilization) อสุจิจะเป็นตัวชักนำในการกระตุ้นให้ไข่ออกมาจากระยะพักตัว (meiosis resumption) โดยการส่งสัญญาณ (signal transduction) ระหว่างไข่และอสุจิ เกิดกระบวนการ sperm penetration ที่ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมแบบเป็นคลื่นกระจายภายในเซลล์ไข่ (calcium oscillation) และจะสิ้นสุดลงเมื่อมีการเกิด pro-nuclear formation^๑ โดยเรียกระบวนการที่เกิดขึ้นทั้งหมดนี้ว่า การเกิด oocyte activation ซึ่งการเกิด oocyte activation นี้ นอกจากเกิดจากการกระตุ้นจากอสุจิแล้วสามารถเลียนแบบการเกิด oocyte activation ได้ในห้องปฏิบัติการที่เรียกว่าขบวนการ parthenogenesis ซึ่งมีวิธีการกระตุ้นได้หลายรูปแบบได้แก่ การกระตุ้นด้วยไฟฟ้า^{๒, ๓} และการกระตุ้นด้วยสารเคมี ซึ่งจะไปกระตุ้นการส่งสารแคลเซียมภายในเซลล์ (stimulation of calcium signaling) โดยผ่านการกระตุ้นการสร้าง inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) และการไหลเข้าของแคลเซียมจากภายนอกเซลล์^๔ ทำให้เกิดขบวนการปฏิสนธิเลียนแบบธรรมชาติ เช่นการเกิด cortical granule exocytosis, second polar body extrusion, pronuclear formation และการเจริญไปจนกระทั่งเป็นตัวอ่อน (blastocyst) สารเคมีเหล่านั้น ได้แก่ ionomycin, cytochalasin B (CB), cycloheximide (CHX) สารเคมีบางตัวเข้าไปกระตุ้นทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการสังเคราะห์โปรตีน (protein synthesis profile) และ pronuclear formation ภายในเซลล์สารเคมีที่ใช้ในการกระตุ้นได้แก่ 6-dimethylamino-purine (6-DMAP), cycloheximide (CHX) และ trichostatin A (TSA) เป็นต้น อีกวิธีที่สามารถเลียนแบบการเกิด oocyte activation ได้คือ การกระตุ้นด้วยไฟฟ้า (electrical stimulation) สามารถกระตุ้นสารเคมีที่เหนี่ยวนำให้เกิดการไหลของแคลเซียมผ่านรูที่ plasma membrane ไข่เมื่อได้รับการกระตุ้นแล้ว จะถูกเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงจนสามารถเจริญไปเป็นระยะต่างๆ ได้แก่ ระยะ zygote ระยะ cleavage และระยะ blastocyst ได้ Parthenogenesis เป็นขบวนการการสืบพันธุ์จากเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียฝ่ายเดียวโดยไม่ผ่านการปฏิสนธิกับอสุจิและสามารถพัฒนาไปเป็น parthenote ได้ โดยที่ parthenote ที่เกิดขึ้นนั้น จะมีแต่ดีเอ็นเอของแม่

เท่านั้นวิวัฒนาการของการสืบพันธุ์แบบนี้ตามธรรมชาติพบได้ในแมลงและสัตว์บางชนิด เช่น สัตว์เลี้ยงลูกและฉลาม เป็นต้น แต่ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมนี้มีโอกาสเกิดได้ยากมาก^๕

เซลล์ต้นกำเนิดที่ผลิตได้จาก parthenote นี้จะเป็นเซลล์ที่มีลักษณะทางกายภาพคล้ายเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนมนุษย์การพิสูจน์คุณสมบัติความเป็นเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนสามารถทำได้โดย การตรวจสอบการแสดงตัวชี้บ่งบนผิวเซลล์ (surface markers) การเพาะเลี้ยงเซลล์และแยกเซลล์เพื่อดูการเจริญเติบโต (proliferation) และดูการแสดงคุณสมบัติที่แปรเปลี่ยนไปเป็นเซลล์เนื้อเยื่อตัวอ่อนได้ (differentiation) หรือสามารถควบคุมให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ที่ต้องการ ซึ่งเป็นคุณสมบัติของ pluripotent stem cells โดยมีข้อได้เปรียบในประเด็นทางด้านจริยธรรมเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนที่ผลิตมาจากตัวอ่อน (human embryo)

วิธีการศึกษา

ไข่ที่นำมาศึกษามี ๒ กลุ่ม คือ กลุ่มที่ ๑ ได้แก่ ไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ที่หลุดจากกระบวนการปฏิสนธิในร่างกายนำมาเลี้ยงให้เจริญเติบโตเต็มที่ภายนอกในร่างกายด้วยวิธีการ in vitro maturation (IVM) และกลุ่มที่ ๒ ได้จากไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่แต่มีการปฏิสนธิล้มเหลว (fail-fertilized mature oocytes)

ไข่ที่ศึกษาได้จากการกระตุ้นรังไข่ด้วยวิธี controlled ovarian hyperstimulation protocol โดยใช้ recombinant follicle stimulating hormone (rFSH) ทั้ง short หรือ long protocol โดยทำการเก็บไข่ผ่านทางช่องคลอดร่วมกับ transvaginal ultrasound guidance ๓๖ ชั่วโมงหลังการฉีด human chorionic gonadotropins (hCG) แล้วทำการแยกไข่ออกจาก oocyte-cumulus cell complex จากนั้นจึงทำการปฏิสนธิโดยวิธี intracytoplasmic sperm injection ในกรณีที่ เป็น mature oocyte หลังจากนั้นทำการตรวจว่ามี การปฏิสนธิหรือไม่ ถ้าพบว่าไม่มีการปฏิสนธิ (fail-fertilized mature oocytes) จึงนำมาศึกษาต่อ สำหรับไข่ที่ยังเจริญไม่เต็มที่ (immature oocyte) จะนำมาเพาะเลี้ยงให้เจริญเติบโตเต็มที่ภายนอกในร่างกาย (in vitro maturation; IVM) โดยเพาะเลี้ยงไข่ใน IVM medium ๒๔ ชั่วโมง ใน incubator 5% O6% CO₂ ที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส โดยดู maturation จากการเกิด 1st polar body

Chemical activation procedure ทำใน mature oocytes ที่ได้จากการทำ IVM และ fail-fertilized mature oocytes จะนำมากระตุ้นด้วยสารเคมี ๒ กลุ่ม ใน culture medium คือ กลุ่มที่ ๑ ประกอบด้วย inomycin + 6-DMAP กลุ่มที่ ๒ ประกอบด้วย inomycin + CB + CHX แล้วทำการเพาะเลี้ยง parthenotes ในน้ำยาเพาะเลี้ยงได้แก่ สูตร (regimen) A คือ culture medium (Global® medium (Life global®, Canada)) นาน ๕ วัน ทั้ง ๒ กลุ่ม สำหรับกลุ่มที่ ๒ ได้ทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มเติมในน้ำยาเพาะเลี้ยงสูตร (regimen) B คือ culture medium ที่มี growth factor นาน ๕ วัน อีก ๑ กลุ่มย่อย หลังจากการศึกษาเบื้องต้น (preliminary study) ยังมีการแบ่งกลุ่มย่อยเพิ่มเติมอีก ๒ กลุ่มย่อยคือ กลุ่มที่มีการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า electrofusion 100 Volt 20 usec ๑ ครั้ง ในวันที่ ๓ ร่วมด้วยและกลุ่มที่ไม่มีการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า โดยทำการตรวจดูว่ามี parthenotes ในระยะต่างๆ ได้แก่ ระยะ parthnogenetic pronuclear stage (PPN), cleavage stage (PC) และ blastocyst stage (PB) เก็บข้อมูลของอัตราการเกิด PPN, PC และ PB แล้วทำการศึกษาเปรียบเทียบผลที่ได้จากกลุ่มต่างๆ โดยใช้สถิติ student t-test และ chi-square มีระดับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ๐.๐๕

นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบการพัฒนาจาก parthenogenetic blastocyst ไปเป็น parthenogenetic derived stem cell โดยวิธีการเพาะเลี้ยงกับ feeder cell (human foreskin fibroblast; HFF) และเพาะเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ STEMPRO® (Thermo Fisher Scientific; USA) เป็นเวลา ๘ วันเพื่อดูการเกาะตัวบน feeder cell (feeder cell attachment) การเจริญเป็นโคโลนีและการพัฒนาไปสู่ parthenogenetic derived stem cell.

ผลการศึกษา

จำนวนไข่ที่นำมาศึกษามีทั้งหมด ๑๙๑ ใบ แบ่งออกเป็นไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ ๑๑๐ ใบ เป็นไข่ที่ไม่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๗๙ ใบ และไข่ที่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๓๑ ใบ โดยเป็นไข่ในระยะ germinal vesicle (GV) จำนวน ๘๘ ใบ ประกอบด้วยไข่ที่ไม่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๖๕ ใบ และไข่ที่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๒๓ ใบ และเป็นไข่ในระยะ metaphase I (MI) จำนวน ๒๒ ใบ ประกอบด้วยไข่ที่ไม่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๑๔ ใบ และไข่ที่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๘ ใบ ไข่ที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่แต่มีการปฏิสนธิล้มเหลวจำนวน ๘๑ ใบ ประกอบด้วยไข่ที่ไม่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๗๔ ใบ และไข่ที่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๗ ใบ (ตารางที่ ๑)

ตารางที่ ๑ แสดงจำนวนไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ชนิดต่างๆ ที่นำมากระตุ้นให้เกิด parthenogenesis โดยใช้สารเคมี ๒ สูตร

ชนิดของไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่	จำนวนไข่ (ใบ)	สูตรสารเคมีที่ใช้กระตุ้นให้เกิด parthenogenesis		p-value
		สูตรที่ ๑ inomycin + 6-DMAP (จำนวนไข่) (%)	สูตรที่ ๒ inomycin + cytochalasinB + cycloheximide (จำนวนไข่) (%)	
A ไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ที่ภายนอกร่างกาย (IVM) จากไข่ที่ยังเจริญไม่เต็มที่ที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง	๗๙	๔๐/๗๙ (๕๐.๖๓)	๓๙/๗๙ (๔๙.๓๗)	๐.๐๕๙
A1 จากไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ในระยะ GV	๖๕	๓๒/๖๕ (๔๙.๒๓)	๓๓/๖๕ (๕๐.๗๗)	๐.๔๕๓
A2 จากไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ในระยะ MI	๑๔	๘/๑๔ (๕๗.๑๔)	๖/๑๔ (๔๒.๘๖)	๐.๓๘๖
B ไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ที่ภายนอกร่างกาย (IVM) จากไข่ที่ยังเจริญไม่เต็มที่ที่ผ่านการแช่แข็งและละลาย	๓๑	๗/๓๑ (๒๒.๕๘)	๒๔/๓๑ (๗๗.๔๑)	๐.๘๒๔
B1 จากไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ในระยะ GV	๒๓	๖/๒๓ (๒๖.๐๙)	๑๗/๒๓ (๗๓.๙๑)	๐.๔๐๑
B2 จากไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ในระยะ MI	๘	๑/๘ (๑๒.๕)	๗/๘ (๘๗.๕)	๐.๒๘๔
C ไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ที่ปฏิสนธิล้มเหลว (fail-fertilized mature oocytes) ที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง	๗๔	๓๔/๗๔ (๔๕.๙๕)	๔๐/๗๔ (๕๔.๐๕)	๐.๔๘๖
D ไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ที่ปฏิสนธิล้มเหลว (fail-fertilized mature oocytes) ที่ผ่านการแช่แข็ง	๗	๒/๗ (๒๘.๕๗)	๕/๗ (๗๑.๔๓)	๐.๘๐๒
จำนวนไข่ทั้งหมด	๑๙๑	๘๓/๑๙๑ (๔๓.๔๖)	๑๐๘/๑๙๑ (๕๖.๕๔)	๐.๓๒๔

ผลการกระตุ้นไข่ด้วยสารเคมี ๒ สูตรในการทำให้เกิด PPN พบว่าสารเคมีสูตรที่ ๑ (ionomycin + 6-DMAP) ทำให้เกิด PPN จำนวน ๔๓ ตัว จากไข่ชนิดต่างๆ ๘๓ ใบ คิดเป็นร้อยละ ๕๑.๘๐ โดยมีรายละเอียดดังนี้

- ไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ที่ไม่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๔๐ ใบ ได้ PPN ๑๖ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๔๐ แบ่งออกเป็น ไข่ในระยะ GV จำนวน ๓๒ ใบ ได้ PPN ๑๓ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๔๐.๖๓ ไข่ในระยะ MI จำนวน ๘ ใบ ได้ PPN ๓ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๓๗.๕๐

- ไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ที่ผ่านการแช่แข็งและละลายจำนวน ๗ ใบ ได้ PPN ๔ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๕๗.๑๔ แบ่งออกเป็น ไข่ในระยะ GV จำนวน ๖ ใบ ได้ PPN ๓ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๕๐ ไข่ในระยะ MI จำนวน ๑ ใบ ได้ PPN ๑ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๑๐๐.๐๐

- ไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ที่มีการปฏิสนธิล้มเหลวที่ไม่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๓๔ ใบ ได้ PPN ๒๑ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๖๑.๗๖

- ไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ที่มีการปฏิสนธิล้มเหลวที่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๒ ใบ ได้ PPN ๒ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๑๐๐.๐๐

สารเคมีสูตรที่ ๒ (ionomycin + CCB + CHX) ทำให้เกิด PPN จำนวน ๗๘ ตัวจากไข่ชนิดต่างๆ ๑๐๘ ใบ คิดเป็นร้อยละ ๖๙.๔๔ โดยมีรายละเอียดดังนี้

- ไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ที่ไม่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๓๙ ใบ ได้ PPN ๒๗ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๖๙.๒๓ แบ่งออกเป็น ไข่ในระยะ GV จำนวน ๓๓ ใบ ได้ PPN ๒๔ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๗๒.๗๓ ไข่ในระยะ MI จำนวน ๖ ใบ ได้ PPN ๓ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๕๐.๐๐

- ไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ที่ผ่านการแช่แข็งและละลายจำนวน ๒๔ ใบ ได้ PPN ๑๕ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๖๒.๕๐ แบ่งออกเป็น ไข่ในระยะ GV จำนวน ๑๗ ใบ ได้ PPN ๙ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๕๒.๙๔ ไข่ในระยะ MI จำนวน ๗ ใบ ได้ PPN ๖ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๘๕.๗๑

- ไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ที่มีการปฏิสนธิล้มเหลวที่ไม่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๔๐ ใบ ได้ PPN ๓๐ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๗๕

- ไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ที่มีการปฏิสนธิล้มเหลวที่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๕ ใบ ได้ PPN ๓ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๖๐.๐๐

โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการกระตุ้นไข่ทั้ง ๒ กลุ่ม ด้วยสารเคมี ทั้ง ๒ สูตร ($p = 0.01$) ในกลุ่มที่มาจากไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง ($p = 0.008$) โดยเฉพาะในกลุ่มไข่ในระยะ GV ($p = 0.009$) (ตารางที่ ๒)

ตารางที่ ๒ แสดงจำนวนและชนิดต่างๆ ของไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ที่เกิด parthenogenesis จากการกระตุ้นด้วยสารเคมี ๒ สูตร

ชนิดของไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่	จำนวนไข่ก่อนการกระตุ้น (ใบ)	Parthenogenetic pronuclear stage (PPN) ทั้งหมด	สูตรสารเคมีที่ใช้กระตุ้นการเกิด parthenogenesis				p-value
			สูตรที่ ๑ ionomysin + 6DMAP		สูตรที่ ๒ ionomysin + cytochalasinB + cycloheximide		
			จำนวนไข่ก่อนการกระตุ้น	PPN (จำนวน) (%)	จำนวนไข่ก่อนการกระตุ้น	PPN (จำนวน) (%)	
A ไข่จาก IVM ที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง	๗๙	๔๓/๗๙ (๕๔.๔๓)	๔๐/๗๙ (๕๐.๖๓)	๑๖/๔๐ (๔๐)	๓๙/๗๙ (๔๙.๓๗)	๒๗/๓๙ (๖๙.๒๓)	๐.๐๐๘*
A1 จากไข่ระยะ GV	๖๕	๓๗/๖๕ (๕๖.๙๒)	๓๒/๖๕ (๔๙.๒๓)	๑๓/๓๒ (๔๐.๖๓)	๓๓/๖๕ (๕๐.๗๗)	๒๔/๓๓ (๗๒.๗๓)	๐.๐๐๙*
A2 จากไข่ระยะ MI	๑๔	๖/๑๔ (๔๒.๘๕)	๘/๑๔ (๕๗.๑๔)	๓/๘ (๓๗.๕๐)	๖/๑๔ (๔๒.๘๖)	๓/๖ (๕๐.๐๐)	๐.๕๒๙
B ไข่จากระยะ IVM ที่ผ่านการแช่แข็งและละลาย	๓๑	๑๙/๓๑ (๖๑.๒๙)	๗/๓๑ (๒๒.๕๘)	๔/๗ (๕๗.๑๔)	๒๔/๓๑ (๗๗.๔๑)	๑๕/๒๔ (๖๒.๕๐)	๐.๕๖๙
B1 จากไข่ระยะ GV	๒๓	๑๑/๒๓ (๔๗.๘๓)	๖/๒๓ (๒๖.๐๙)	๓/๖ (๕๐.๐๐)	๑๗/๒๓ (๗๓.๙๑)	๙/๑๗ (๕๒.๙๔)	๐.๖๓๕
B2 จากไข่ระยะ MI	๘	๗/๘ (๘๗.๕๐)	๑/๘ (๑๒.๕๐)	๑/๑ (๑๐๐.๐๐)	๗/๘ (๘๗.๕๐)	๖/๗ (๘๕.๗๑)	๐.๘๗๕
C ไข่ที่ปฏิสนธิล้มเหลวที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง	๗๔	๕๑/๗๔ (๖๘.๙๒)	๓๔/๗๔ (๔๕.๙๕)	๒๑/๓๔ (๖๑.๗๗)	๔๐/๗๔ (๕๔.๐๕)	๓๐/๔๐ (๗๕.๐๐)	๐.๑๖๕
D ไข่ที่ปฏิสนธิล้มเหลวที่ผ่านการแช่แข็ง	๗	๕/๗ (๗๑.๔๓)	๒/๗ (๒๘.๕๗)	๒/๒ (๑๐๐.๐๐)	๕/๗ (๗๑.๔๓)	๓/๕ (๖๐.๐๐)	๐.๔๗๖
จำนวนไข่ทั้งหมด	๑๙๑	๑๑๘/๑๙๑ (๖๑.๗๘)	๘๓/๑๙๑ (๔๓.๔๖)	๔๓/๘๓ (๕๑.๘๐)	๑๐๘/๑๙๑ (๕๖.๕๕)	๗๕/๑๐๘ (๖๙.๔๔)	๐.๐๑๓*

ผลการศึกษาการเกิด PC โดยการเพาะเลี้ยงในน้ำยา ๑ สูตรในกลุ่มที่กระตุ้นด้วยสารเคมีสูตรที่ ๑ และในน้ำยา ๒ สูตรในกลุ่มที่กระตุ้นด้วยสารเคมีสูตรที่ ๒ มีผลดังนี้

สารเคมีสูตรที่ ๑ ทำให้เกิด PC จาก PPN ที่เกิดจากไข่ชนิดต่างๆ โดยการเพาะเลี้ยงในน้ำยาสูตร A (culture medium) ดังนี้

- PPN จากไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ที่ไม่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๑๖ ตัว ได้ PC ๑๒ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๗๕.๐๐ แบ่งออกเป็น PPN จากไข่ระยะ GV จำนวน ๑๓ ตัว ได้ PC ๑๑ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๘๔.๖๒ PPN จากไข่ระยะ MI จำนวน ๓ ตัว ได้ PC ๑ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๓๓.๓๓

- PPN จากไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ที่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๔ ตัว ได้ PC ๒ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๕๐.๐๐ แบ่งออกเป็น PPN จากไข่ระยะ GV จำนวน ๓ ตัว ได้ PC ๒ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๖๖.๖๗ PPN ส่วนไข่ระยะ MI ไม่ได้ PC

- PPN จากไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ที่มีการปฏิสนธิล้มเหลวที่ไม่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๒๑ ตัว ได้ PC ๑๒ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๕๗.๑๔

- PPN จากไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ที่มีการปฏิสนธิล้มเหลวที่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๒ ตัว ได้ PC ๒ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๑๐๐.๐๐

สารเคมีสูตรที่ ๒ ทำให้เกิด PC จาก PPN ที่เกิดจากไข่ชนิดต่างๆ โดยการเพาะเลี้ยงในน้ำยา ๒ สูตร (culture medium) ดังนี้

น้ำยาเพาะเลี้ยง สูตร A (culture medium) ได้ PC ดังนี้

- PPN จากไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ที่ไม่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๒๗ ตัว ได้ PC ๒๕ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๙๕.๕๕ แบ่งออกเป็น PPN จากไข่ระยะ GV จำนวน ๒๔ ตัว ได้ PC ๒๒ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๙๑.๖๗ PPN จากไข่ระยะ MI จำนวน ๓ ตัว ได้ PC ๓ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๑๐๐

- PPN จากไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ที่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๑๕ ตัว ได้ PC ๑๑ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๗๓.๓๓ แบ่งออกเป็น PPN จากไข่ระยะ GV จำนวน ๙ ตัว ได้ PC ๗ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๗๗.๗๘ PPN จากไข่ระยะ MI จำนวน ๖ ตัว ได้ PC ๔ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๖๖.๖๗

- PPN จากไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ที่มีการปฏิสนธิล้มเหลวที่ไม่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๓๐ ตัว ได้ PC ๒๐ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๖๖.๖๗

- PPN จากไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ที่มีการปฏิสนธิล้มเหลวที่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๓ ตัว ได้ PC ๓ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๑๐๐.๐๐

น้ำยาเพาะเลี้ยง สูตร B (culture medium + growth factors) ได้ PC ดังนี้

- PPN จากไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ที่ไม่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๕ ตัว ได้ PC ๔ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๘๐ แบ่งออกเป็น PPN จากไข่ระยะ GV จำนวน ๓ ตัว ได้ PC ๒ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๖๖.๖๗ PPN จากไข่ระยะ MI จำนวน ๒ ตัว ได้ PC ๒ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๑๐๐.๐๐

- PPN จากไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ที่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๔ ตัว ได้ PC ๓ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๗๕.๐๐ แบ่งออกเป็น PPN จากไข่ระยะ GV จำนวน ๓ ตัว ได้ PC ๒ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๖๖.๖๗ PPN จากไข่ระยะ MI จำนวน ๑ ตัว ได้ PC ๑ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๑๐๐.๐๐

- PPN จากไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ที่มีการปฏิสนธิล้มเหลวที่ไม่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๖ ตัว ได้ PC ๖ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๑๐๐.๐๐

- ไม่มี PPN จากไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ที่มีการปฏิสนธิล้มเหลวที่ผ่านการแช่แข็ง

และเมื่อรวมไข่ทุกชนิดพบว่าอัตราการเกิด PC จากการกระตุ้นด้วยสารเคมีสูตร ๑ ที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาสูตร A มีค่าน้อยกว่า การกระตุ้นด้วยสารเคมีสูตร ๒ ที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาสูตร B อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือร้อยละ ๖๕.๑๕ และ ๘๖.๖๖ ตามลำดับ ($p = 0.001$) และพบว่าอัตราการเกิด PC จากการกระตุ้นด้วยสารเคมีสูตร ๒ ที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาสูตร A มีค่าน้อยกว่าการกระตุ้นด้วยสารเคมีสูตร ๒ ที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาสูตร B อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติคือ ร้อยละ ๗๘.๖๗ และ ๘๖.๖๖ ตามลำดับ ($p = 0.014$)

นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการเกิด PC จากไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ที่มีการปฏิสนธิล้มเหลวที่ไม่ผ่านการแช่แข็งจากการกระตุ้นด้วยสารเคมีสูตรที่ ๑ ที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาสูตร A มีค่าน้อยกว่าจากการกระตุ้นด้วยสารเคมีสูตรที่ ๒ และเพาะเลี้ยงในน้ำยาสูตร B อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือร้อยละ ๕๗.๑๔ และ ๑๐๐.๐๐ ตามลำดับ ($p = 0.05$) และพบว่าอัตราการเกิด PC จากไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ที่ไม่ผ่านการแช่แข็งจากการกระตุ้นด้วยสารเคมีสูตรที่ ๑ ที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาสูตร A มีค่าน้อยกว่าจากการกระตุ้นด้วยสารเคมีสูตรที่ ๒ และเพาะเลี้ยงในน้ำยาสูตร A อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือร้อยละ ๗๕.๐๐ และ ๙๕.๕๕ ตามลำดับ ($p = 0.001$) (ตารางที่ ๓)

ตารางที่ ๓ แสดงอัตราการเกิด parthenogenetic cleavage stage จากไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ชนิดต่างๆ ที่นำมากระตุ้นให้เกิด parthenogenesis โดยใช้สารเคมี ๒ สูตรและการเลี้ยงโดยใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน ๒ สูตร

ไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ชนิดต่างๆ	Parthenogenetic pronuclear stage (PPN) ทั้งหมด	Parthenogenetic cleavage stage (PC) ทั้งหมด	สูตรสารเคมีที่ใช้กระตุ้นการเกิด parthenogenesis cleavage stage (PC)					
			สูตรที่ ๑ ionomycin + 6DMAP			สูตรที่ ๒ ionomycin + cytochalasinB + cycloheximide		
			Culture medium		PPN (n)	Culture medium		Culture medium + growth factor
			PPN (n)	PC (n) (%)		PPN (n)	PC (n) (%)	
A ไข่จาก IVM ที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง	๔๓	๔๑	๑๖	๑๒/๑๖ (๗๕.๐๐) ^a	๒๗	๒๕/๒๗ (๙๕.๕๕) ^a	๕	๔/๕ (๘๐.๐๐)
A1 จากไข่ระยะ GV	๓๗	๓๕	๑๓	๑๑/๑๓ (๘๔.๖๒)	๒๔	๒๒/๒๔ (๙๑.๖๗)	๓	๒/๓ (๖๖.๖๗)
A2 จากไข่ระยะ MI	๖	๖	๓	๑/๓ (๓๓.๓๓)	๓	๓/๓ (๑๐๐.๐๐)	๒	๒/๒ (๑๐๐.๐๐)
B ไข่จากระยะ IVM ที่ผ่านการแช่แข็งและละลาย	๑๙	๑๖	๔	๒/๔ (๕๐.๐๐)	๑๕	๑๑/๑๕ (๗๓.๓๓)	๔	๓/๔ (๗๕.๐๐)
B1 จากไข่ระยะ GV	๑๑	๑๑	๓	๒/๓ (๖๖.๖๗)	๙	๗/๙ (๗๗.๗๘)	๓	๒/๓ (๖๖.๖๗)
B2 จากไข่ระยะ MI	๗	๕	๑	๐/๑ (๐)	๖	๔/๖ (๖๖.๖๗)	๑	๑/๑ (๑๐๐.๐๐)
C ไข่ที่ปฏิสนธิล้มเหลว ที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง	๕๑	๓๘	๒๑	๑๒/๒๑ (๕๗.๑๔) ^b	๓๐	๒๐/๓๐ (๖๖.๖๗)	๖	๖/๖ (๑๐๐.๐๐) ^b
D ไข่ที่ปฏิสนธิล้มเหลว ที่ผ่านการแช่แข็ง	๕	๕	๒	๒/๒ (๑๐๐.๐๐)	๓	๓/๓ (๑๐๐.๐๐)	๐	๐
จำนวนไข่ทั้งหมด	๑๑๘	๑๐๐	๔๓	๒๘/๔๓ (๖๕.๑๒) ^b	๗๕	๕๙/๗๕ (๗๘.๖๗) ^c	๑๕	๑๓/๑๕ (๘๖.๖๖) ^{b,c}

^a: $p < 0.005$ การกระตุ้นด้วยสารเคมีสูตร ๑ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง A เปรียบเทียบกับการกระตุ้นด้วยสารเคมีสูตร ๒ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง A

^b: $p < 0.005$ การกระตุ้นด้วยสารเคมีสูตร ๑ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง A เปรียบเทียบกับการกระตุ้นด้วยสารเคมีสูตร ๒ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง B

^c: $p < 0.005$ การกระตุ้นด้วยสารเคมีสูตร ๒ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง A เปรียบเทียบกับการกระตุ้นด้วยสารเคมีสูตร ๒ ในน้ำยาเพาะเลี้ยง B

ผลการศึกษาการเกิด PB โดยการเพาะเลี้ยงในน้ำยา ๑ สูตรในกลุ่มที่กระตุ้นด้วยสารเคมีสูตรที่ ๑ และเพาะเลี้ยงในน้ำยา ๒ สูตร ในกลุ่มที่กระตุ้นด้วยสารเคมีสูตรที่ ๒ โดยที่การเพาะเลี้ยงในน้ำยาสูตร B จะมีกลุ่มที่มีการกระตุ้นด้วยไฟฟ้าร่วมด้วยในระยะ PC และกลุ่มที่ไม่มีการใช้ไฟฟ้ากระตุ้น มีดังนี้

สารเคมีสูตรที่ ๑ ทำให้เกิด PB จาก PPN ที่เกิดจากไข่ชนิดต่างๆ โดยการเพาะเลี้ยงในน้ำยาสูตร A

- PPN จากไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ที่ไม่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๑๖ ตัว ได้ PB ๑ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๖.๒๕ แบ่งออกเป็น PPN จากไข่ระยะ GV จำนวน ๑๓ ตัว ได้ PB ๑ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๗.๖๙ PPN จากไข่ระยะ MI จำนวน ๓ ตัว ไม่มีการเกิด PB

- PPN จากไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ที่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๔ ตัว ไม่มีการเกิด PB แบ่งออกเป็น PPN จากไข่ระยะ GV จำนวน ๓ ตัว จากไข่ระยะ MI จำนวน ๑ ตัว ไม่มีการเกิด PB

- PPN จากไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ที่มีการปฏิสนธิล้มเหลวที่ไม่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๒๑ ตัว ได้ PB ๒ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๙.๕๒

- PPN จากไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ที่มีการปฏิสนธิล้มเหลวที่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๒ ตัว ไม่มีการเกิด PB

สารเคมีสูตรที่ ๒ ทำให้เกิด PB จาก PPN ที่เกิดจากไข่ชนิดต่างๆ โดยการเพาะเลี้ยงในน้ำยา ๒ สูตร โดยในน้ำยาสูตร B แบ่งออกเป็น ๒ กลุ่ม คือมีการใช้ไฟฟ้ากระตุ้นในระยะ PC ร่วมด้วย และไม่มีการใช้ไฟฟ้ากระตุ้น มีผลดังนี้

น้ำยาเพาะเลี้ยงสูตร A ได้ PB ดังนี้

- PPN จากไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง จำนวน ๒๗ ตัว ได้ PB ๓ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๑๑.๑๑ แบ่งออกเป็น PPN จากไข่ระยะ GV จำนวน ๒๔ ตัว ได้ PB ๓ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๗.๖๙ PPN จากไข่ระยะ MI จำนวน ๓ ตัว ไม่มีการเกิด PB

- PPN จากไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ที่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๑๕ ตัว ไม่มีการเกิด PB แบ่งออกเป็น PPN จากไข่ระยะ GV จำนวน ๙ ตัว ไม่มีการเกิด PB PPN จากไข่ระยะ MI จำนวน ๔ ตัว ไม่มีการเกิด PB

- PPN จากไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ที่มีการปฏิสนธิล้มเหลวที่ไม่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๓๐ ตัว ได้ PB ๑ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๓.๓๓

- PPN จากไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ที่มีการปฏิสนธิล้มเหลวที่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๓ ตัว ไม่มีการเกิด PB

น้ำยาเพาะเลี้ยงสูตร B ไม่มีการใช้ไฟฟ้ากระตุ้น ได้ PB ดังนี้

- PPN จากไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ที่ไม่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๕ ตัว ไม่มีการเกิด PB แบ่งออกเป็น PPN จากไข่ระยะ GV จำนวน ๓ ตัว ไม่มีการเกิด PB PPN จากไข่ระยะ MI จำนวน ๒ ตัว ไม่มีการเกิด PB

- PPN จากไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ที่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๔ ตัว ไม่มีการเกิด PB แบ่งออกเป็น PPN จากไข่ระยะ GV จำนวน ๓ ตัว ไม่มีการเกิด PB PPN จากไข่ระยะ MI จำนวน ๑ ตัว ไม่มีการเกิด PB

- PPN จากไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ที่มีการปฏิสนธิล้มเหลวที่ไม่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๖ ตัว ได้ PB ๑ ตัว คิดเป็นร้อยละ ๑๖.๖๗

- ไม่มี PPN จากไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ที่มีการปฏิสนธิล้มเหลวที่ผ่านการแช่แข็ง

น้ำยาเพาะเลี้ยงสูตร B และมีการใช้ไฟฟ้ากระตุ้นใน ระยะ PC ได้ PB ดังนี้

- PPN จากไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ที่ไม่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๒ ตัว ไม่มีการเกิด PB แบ่งออกเป็น PPN จากไข่ระยะ GV จำนวน ๑ ตัว ไม่มีการเกิด PB PPN จากไข่ระยะ MI จำนวน ๑ ตัว ไม่มีการเกิด PB

- PPN จากไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ที่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๖ ตัว ไม่มีการเกิด PB แบ่งออกเป็น PPN จากไข่ระยะ GV จำนวน ๔ ตัว ไม่มีการเกิด PB PPN จากไข่ระยะ MI จำนวน ๒ ตัว ไม่มีการเกิด PB

- PPN จากไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ที่มีการปฏิสนธิล้มเหลวที่ไม่ผ่านการแช่แข็งจำนวน ๒ ตัว ไม่มีการเกิด

- ไม่มี PPN จากไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ที่มีการปฏิสนธิล้มเหลวที่ผ่านการแช่แข็ง

โดยพบว่าเมื่อรวมไข่ทุกชนิด อัตราการเกิด PB จากการกระตุ้นด้วยสารเคมีสูตร ๒ ที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาสูตร A มีค่าน้อยกว่าจากการเพาะเลี้ยงในน้ำยาสูตร B ที่ไม่มีการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือร้อยละ ๕.๓๓ และ ๖.๖๗ ตามลำดับ ($p = 0.05$) (ตารางที่ ๔)

ตารางที่ ๔ แสดงอัตราการเกิด parthenogenetic blastocyst stage (PB) จากไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ชนิดต่างๆ ที่นำมากระตุ้นให้เกิด parthenogenesis โดยใช้สารเคมี ๒ สูตร และทำการเพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง ๒ สูตรรวมกับการใช้หรือไม่ใช้การกระตุ้นด้วยไฟฟ้า (electrofusion) ในระยะ cleavage stage

ไข่ที่เจริญเติบโตเต็ม ที่ชนิดต่างๆ		Parthenogenetic ทั้งหมด		สูตรสารเคมีที่ใช้กระตุ้นการเกิด parthenogenesis blastocyst stage (PB)											
				สูตรที่ ๑ ionomysin + 6DMAP						สูตรที่ ๒ ionomysin + cytochalasinB + cycloheximide					
				Culture medium			Culture medium			Culture medium+ growth factor			Culture medium+ growth factors+ electrofusion		
PPN	PC	PB	PPN	PC (%)	PB (%)	PPN (%)	PC (%)	PB (%)	PPN (%)	PC (%)	PB (%)	PPN (%)	PC (%)	PB (%)	
A ไข่จาก IVM															
ที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง	๕๐	๔๓	๔	๑๖/๔๐ (๔๐)	๑๒/๑๖ (๗๕.๐๐)	๑/๑๖ (๖.๒๕)	๒๗/๓๙ (๖๙.๒๓)	๒๕/๒๗ (๙๕.๕๕)	๓/๒๗ (๑๑.๑๑)	๕/๖ (๘๓.๓๓)	๔/๕ (๘๐)	๐/๕ (๐)	๒/๓ (๖๖.๖๗)	๒/๒ (๑๐๐)	๐/๒ (๐)
A1 จากไข่ระยะ GV	๔๑	๓๖	๔	๑๓/๓๖ (๔๐.๖๓)	๑๑/๑๓ (๘๔.๖๒)	๑/๑๓ (๗.๖๙)	๒๔/๓๓ (๗๒.๗๓)	๒๒/๒๔ (๙๑.๖๗)	๓/๒๔ (๗.๖๙)	๓/๔ (๗๕)	๒/๓ (๖๖.๖๗)	๐/๒ (๐)	๑/๒ (๕๐)	๑/๑ (๑๐๐)	๐/๑ (๐)
A2 จากไข่ระยะ MI	๙	๗	๐	๓/๘ (๓๗.๕)	๑/๓ (๓๓.๓๓)	๐/๓ (๐)	๓/๖ (๕๐)	๓/๓ (๑๐๐)	๐/๓ (๐)	๒/๒ (๑๐๐)	๒/๒ (๑๐๐)	๐/๒ (๐)	๑/๑ (๑๐๐)	๑/๑ (๑๐๐)	๐/๑ (๐)
B ไข่จากระยะ IVM															
ที่ไม่ผ่านการแช่แข็งและลาย	๒๙	๒๗	๐	๔/๗ (๕๗.๑๔)	๒/๔ (๕๐)	๐/๒ (๐)	๑๕/๒๔ (๖๒.๕๐)	๑๑/๑๕ (๗๓.๓๓)	๐/๑๕ (๐)	๔/๑๑ (๓๖.๓๖)	๓/๔ (๗๕)	๐/๔ (๐)	๖/๑๑ (๕๔.๕๕)	๔/๖ (๖๖.๖๗)	๐/๔ (๐)
B1 จากไข่ระยะ GV	๑๙	๑๔	๐	๓/๖ (๕๐)	๒/๓ (๖๖.๖๗)	๐/๓ (๐)	๙/๑๗ (๕๒.๙๔)	๗/๙ (๗๗.๗๘)	๐/๙ (๐)	๓/๙ (๓๓.๓๓)	๒/๓ (๖๖.๖๗)	๐/๓ (๐)	๔/๘ (๕๐)	๓/๔ (๗๕)	๐/๓ (๐)
B2 จากไข่ระยะ MI	๑๐	๖	๐	๑/๑ (๑๐๐)	๐/๑ (๐)	๐/๑ (๐)	๖/๗ (๘๕.๗๑)	๔/๖ (๖๖.๖๗)	๐/๖ (๐)	๑/๒ (๕๐)	๑/๑ (๑๐๐)	๐/๑ (๐)	๒/๓ (๖๖.๖๗)	๑/๒ (๕๐)	๐/๒ (๐)
C ไข่ที่ปฏิสนธิล้มเหลว															
ที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง	๕๙	๔๐	๔	๒๑/๓๔ (๖๑.๗๗)	๑๒/๒๑ (๕๗.๑๔)	๒/๒๑ (๙.๕๒)	๓๐/๔๐ (๗๕.๐๐)	๒๐/๓๐ (๖๖.๖๗)	๑/๓๐ (๓.๓๓)	๖/๘ (๗๕)	๖/๖ (๑๐๐)	๑/๖ (๑๖.๖๗)	๒/๒ (๑๐๐)	๒/๒ (๑๐๐)	๐/๒ (๐)
D ไข่ที่ปฏิสนธิล้มเหลว	๕	๕	๐	๒/๒ (๑๐๐)	๒/๒ (๑๐๐)	๐/๒ (๐)	๓/๕ (๖๐)	๓/๓ (๑๐๐)	๐/๓ (๐)	๐/๓ (๐)	๐/๐ (๐)	๐/๐ (๐)	๐/๐ (๐)	๐/๐ (๐)	๐/๒ (๐)
จำนวนไข่ทั้งหมด	๑๔๓	๑๑๕	๘	๔๓/๘๓ (๕๑.๘๐)	๒๘/๔๓ (๖๕.๑๒)	๓/๔๓ (๖.๙๘)	๗๕/๑๐๘ (๖๙.๔๔)	๕๙/๗๕ (๗๘.๖๗)	๔/๗๕ (๕.๓๓)*	๑๕/๒๕ (๖๐.๐๐)	๑๓/๑๕ (๘๖.๖๖)	๑/๑๕ (๖.๖๗)*	๑๐/๑๖ (๖๒.๕๐)	๘/๑๐ (๘๐)	๐/๑๐ (๐)

* : p = 0.05, เปรียบเทียบอัตราการเกิด parthenogenetic blastocyst

ผลการศึกษาการพัฒนา parthenogenetic derived stem cell จาก PC ๑๖ ตัว และ PB ๕ ตัว พบเพียงแค่มีการเกาะกับ feeder cells จำนวน ๑ และ ๒ ตัวอย่าง คิดเป็น

ร้อยละ ๖.๒๕ และ ๔๐ ตามลำดับ แต่ไม่สามารถพัฒนามาเป็น parthenogenetic derived stem cell ได้ (ตารางที่ ๕)

ตารางที่ ๕ แสดงผลการนำ parthenogenetic cleavage stage และ blastocyst stage ไปพัฒนาให้เป็น parthenogenetic derived stem cell

Parthenogenetic stages	จำนวน	มีการเกาะกับ feeder cells (attachment with feeder cells) (%)	มีการพัฒนาเป็น colony (colony formation)	มีการพัฒนาเป็น parthenogenetic derived stem cell
- Cleavage stage	๑๖	๑ (๖.๒๕)	๐	๐
- Blastocyst stage	๕	๒ (๔๐)	๐	๐

วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาพบว่า ไข่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ภายนอก รังกายจากไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ที่ไม่ผ่านการแช่แข็งจะเกิด parthenogenesis โดยการกระตุ้นด้วยสารเคมี ๒ สูตร คิดเป็น ร้อยละ ๔๐ และ ๖๙.๒๓ ตามลำดับ (เฉลี่ย ๕๓.๕๓) แต่ไข่ที่ เจริญไม่เต็มที่และผ่านการแช่แข็งและละลายจะเกิด parthe- nogenesis คิดเป็นร้อยละ ๒๘.๕๗ และ ๖๒.๕๐ ตามลำดับ (เฉลี่ย ๕๓.๑๓) ไข่ที่เจริญเต็มที่ที่มีการปฏิสนธิล้มเหลวที่ไม่ ผ่านการแช่แข็งและละลายจะเกิด parthenogenesis โดยการ กระตุ้นด้วยสารเคมี ๒ สูตร คิดเป็นร้อยละ ๖๑.๗๗ และ ๗๕.๐๐ ตามลำดับ (เฉลี่ย ๖๘.๙๒) ไข่ที่เจริญเต็มที่ที่มีการปฏิสนธิล้ม เหลวที่ผ่านการแช่แข็งและละลายจะเกิด parthenogenesis คิดเป็นร้อยละ ๑๐๐.๐๐ และ ๖๐.๐๐ ตามลำดับ (เฉลี่ย ๗๑.๕๓) เมื่อเปรียบเทียบการกระตุ้นด้วยสารเคมีทั้ง ๒ สูตร พบ ว่าการใช้สารเคมีสูตรที่ ๒ คือ ionomycin และ cytochalasin B ร่วมกับ cycloheximide จะทำให้เกิด parthenogenesis ในไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ที่ไม่ผ่านการแช่แข็งได้ดีกว่าการใช้สารเคมี สูตรที่ ๑ คือ ionomycin และ 6-DMAP โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ที่มาจากไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง

สำหรับอัตราการเกิด PC พบว่าการกระตุ้นด้วยสาร เคมีทั้ง ๒ สูตร ด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยงทั้ง ๒ สูตรมีค่าอยู่ระหว่าง ร้อยละ ๖๐.๘๗ - ๑๐๐ (เฉลี่ย ๗๗.๒๗) โดยพบว่าการกระตุ้น ด้วย ionomycin + CB+ CHX ที่เพาะเลี้ยงในน้ำยา culture medium ที่มี growth factors มีอัตราการเกิด PC ดีกว่าจาก การเพาะเลี้ยงในน้ำยา culture medium อย่างเดียว และพบ ว่าอัตราการเกิด PC ในไข่ที่มีการปฏิสนธิล้มเหลวและไม่ผ่านการ แช่แข็งที่กระตุ้นด้วย ionomycin + 6-DMAP ที่เพาะเลี้ยงใน culture medium อย่างเดียวน้อยกว่าการกระตุ้นด้วย iono- mysin + CB + CHX ที่เพาะเลี้ยงใน culture medium ที่มี growth factors สำหรับอัตราการเกิด PC ในไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ ที่เจริญเติบโตภายนอก รังกายที่ไม่ผ่านการแช่แข็งที่กระตุ้นด้วย ionomycin + 6-DMAP มีน้อยกว่าที่กระตุ้นด้วย ionomycin + CB + CHX ที่เพาะเลี้ยงใน culture medium อย่างเดียว

สำหรับอัตราการเกิด PB จากไข่ทั้งหมดในการศึกษานี้ พบว่า มีค่าเฉลี่ยร้อยละ ๔.๑๙ โดยที่คิดเป็นร้อยละ ๔.๗๑ จากไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง และคิดเป็นร้อย ละ ๔.๘๘ จากไข่ที่มีการปฏิสนธิล้มเหลวที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง โดยไม่พบว่ามี PB จากไข่ที่ผ่านการแช่แข็งและละลาย การแช่ แข็งและละลายอาจมีผลต่อการพัฒนาไปเป็นระยะ blastocyst แต่เนื่องจากการศึกษานี้ไม่ได้แบ่งกลุ่มตัวอย่างแบบสุ่ม จึงต้องมี การศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

และพบว่าอัตราการเกิด PB จากการกระตุ้นไข่ด้วย ionomycin + 6-DMAP มีค่าเท่ากับ ๓.๖๑ ซึ่งน้อยกว่าการ กระตุ้นด้วย ionomycin + CB + CHX ที่มีค่าเท่ากับ ๔.๖๓

เปรียบเทียบกับการศึกษาอื่นๆ พบว่า Alessio Paffoni และคณะ ปี 2007 ที่กระตุ้นไข่ด้วย ionomycin และ 6-DMAP เปรียบเทียบกับไข่ที่ทำ ICSI พบว่าได้ parthenoge- netic blastocyst ร้อยละ ๘.๒ ขณะที่จากการทำ ICSI ไม่พบ ว่ามี parthenogenetic blastocyst เลย^๕ อาจเนื่องมาจาก Alessio Paffoni และคณะ ได้กระตุ้นไข่ภายหลังการเก็บไข่ ทันที โดยไม่ผ่านการเลี้ยงไขภายนอก รังกายหรือการรอผลการ ปฏิสนธิ แต่ Karen Versieren และคณะ ปี ๒๐๑๐ ซึ่งทำการ กระตุ้นไข่ที่เจริญเต็มที่และเจริญไม่เต็มที่ด้วยสารเคมีและวิธีการ หลายชนิด เช่น การกระตุ้นด้วยไฟฟ้าหรือ ionomycin ร่วม กับ cycloheximide หรือ 6-DMAP อย่างไรก็ตามพบว่าการ กระตุ้นไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ที่เจริญเติบโตเต็มที่ภายนอก รังกาย ได้ parthenogenetic blastocyst ไม่ติดนัก เปรียบเทียบกับไข่ ที่เจริญเต็มที่คือ ร้อยละ ๓ และร้อยละ ๑๐ ตามลำดับ^๖

Karen Versieren และคณะ ปี ๒๐๑๐ ก็พบว่า ไข่ที่เกิดจากการปฏิสนธิล้มเหลวและไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ที่กระตุ้น ด้วย ionomycin + 6-DMAP ได้ PB มากกว่าจากการกระตุ้นด้วย ionomycin + CHX อย่างเดียว^๖ ซึ่งอาจเนื่องมาจากการทำงาน ของ 6-DMAP และ CHX ที่เป็นสารยับยั้งการสร้างโปรตีน เหมือนกัน แต่ทำงานในรูปแบบต่างกัน ในขณะที่ CB นั้นมี ผลในการยับยั้ง microfilament ในการเกิด second polar body extrusion ซึ่งจะช่วยให้ไข่ที่เจริญไม่เต็มที่ที่สามารถ ดึงเอา second polar body มาใช้เป็นโครโมโซมอีกชุดหนึ่ง ที่ขาดไปได้^๖ และ CHX ยังเป็นตัวยับยั้งการสร้าง cyclin B ซึ่ง จะมีผลต่อปริมาณการลดลงของสาร MPF ซึ่งเป็นส่วนสำคัญใน การทำให้เกิด second polar body extrusion อีกด้วย ในขณะที่ 6-DMAP นั้นมีคุณสมบัติในการรบกวนการสร้าง short live protein ต่างๆ ที่มีส่วนสำคัญในการทำให้ไขหลุดออกจากระยะ พักตัวเข้าสู่ระยะ meiosis II ได้ อีกทั้ง 6-DMAP ยังทำหน้าที่ใน กระบวนการ protein phosphorylation ซึ่งเป็นการยับยั้งการ สร้างสารจำพวก kinase ซึ่งมีผลในกระบวนการแบ่งเซลล์ระยะ G2/M มากกว่า Alessio Paffoni ได้สันนิษฐานว่าการกระตุ้น ด้วย 6-DMAP นั้นนอกจากจะมีการยับยั้งการสร้าง MPF ในช่วงระยะพักตัวของไข่แล้วยังส่งผลต่อการลดลงของ MPF ในช่วงของการแบ่งตัวระยะ mitosis ด้วย ดังนั้นจึงอาจส่งผลต่อ การเกิด DNA formation ภายในเซลล์ที่จะส่งผลต่อการเจริญ เป็น parthenogenetic blastocyst^{๕,๙} ซึ่งอาจทำให้มีส่วนช่วย ในการกระตุ้นไข่ที่เกิดการปฏิสนธิล้มเหลวได้ดี

จากการศึกษา ยังไม่สามารถพัฒนาการเกิด parthenogenetic derived stem cell ได้เนื่องจากยังมี parthenogenetic blastocyst จำนวนน้อยคือ ๘ ตัว ซึ่งทำการศึกษาไป ๗ ตัว ยังคงเหลือแช่แข็งไว้อีก ๑ ตัว โดยทำลาย ๗ ตัวตายไป ๒ ตัว สามารถนำไปศึกษาได้ ๕ ตัว แต่ก็ยังไม่สามารถพัฒนาไปเป็น parthenogenetic derived stem cell ได้สำเร็จ จึงยังคงต้องดำเนินการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

๑. Williams CJ. Signalling mechanisms of mammalian oocyte activation. Hum Reprod Update. 2002;8(4):313-21.
๒. Montag M, Koster M, van der Ven K, Bohlen U, van der Ven H. The benefit of artificial oocyte activation is dependent on the fertilization rate in a previous treatment cycle. Reprod Biomed Online. 2012, 24(5):521-6.
๓. Liu Y, Cao YX, Zhang ZG, Xing Q. Artificial oocyte activation and human failed-matured oocyte vitrification followed by in vitro maturation. Zygote. 2011:1-6.
๔. Ciapa B, Chiri S. Egg activation: upstream of the fertilization calcium signal. Biol Cell. 2000;92(3-4):215-33.
๕. Paffoni A, Brevini TAL, Somigliana E, Restelli L, Gandolfi F, Ragni G. In vitro development of human oocytes after parthenogenetic activation or intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril. 2007;87(1):77-82.
๖. Versieren K, Heindryckx B, Lierman S, Gerris J, Sutter PD. Developmental competence of parthenogenetic mouse and human embryos after chemical or electrical activation. Reprod Biomed Online 2010 21:769-75.
๗. Versieren K, Heindryckx B, Lierman S, Gerris J, Sutter PD. Developmental competence of parthenogenetic mouse and human embryos after chemical or electrical activation. Reprod Biomed Online. 2010;21:769-75.
๘. Krejčová T, Petr, J, Krejčová, M, Kheilová, K. Effects of cycloheximide or 6-dimethyl aminopurine on the parthenogenetic activation of pig oocytes using pulsatile treatment with nitric oxide donor. Czech J Anim Sci. 2009;54:293-306.
๙. Le Beux G, Richard FJ, & Sirard MA. Effect of cycloheximide, 6-DMAP, roscovitine and butyrolactone I on resumption of meiosis in porcine oocytes. Theriogenology. 2003;60(6): 1049-58.

Abstract

The study of parthenogenesis of immature oocytes with in vitro maturation and fail-fertilized mature oocytes by chemical activation and the preliminary study of parthenogenetic derived stem cell.

Charoenchai Chiamchanya*, Nuntana Gamnarai**, Patchara Visutakul*

* Faculty of medicine, Thammasat University

** Thammasat hospital, Thammasat University

Introduction: Parthenogenesis is a process of transforming from haploid gamete to diploid cell without fertilization process of sexual reproduction. Human parthenogenetic derived stem cell is an ethical advantage alternative resource of human embryonic stem cell for medical research application. However, the human parthenogenesis is very rarely occurred. To study the parthenogenetic activation and culture protocols of immature oocytes with in vitro maturation (IVM) and fail-fertilized mature oocytes.

Method: The immature oocytes and fail-fertilized oocytes donated from infertile couples treated with assisted reproductive technology at Thammasat University Hospital during the years 2014 - 2017 were activated by 2 chemical activation protocols. Protocol I was composed of ionomycin + 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) and Protocol II was ionomycin + cytochalasinB (CB) and cycloheximide (CHX). After activation, all oocyte in both protocols were studied further according to the result of preliminary study as the following: Protocol I The oocytes were cultured with culture medium for 5 days only (regimen A), Protocol II The oocytes were culture with culture medium for 5 days only (regimen A), The oocytes were culture with culture medium for 5 days plus growth factors (regimen B), The oocytes were culture with culture medium for 5 days with growth factors and electrofusion at days 3 (D3) (regimen C) The obtained parthenogenetic blastocysts were aimed to be used for preliminary parthenogenetic derived stem cell study. The parthenogenetic pronuclear (PPN), the cleavage (PC) and blastocyst (PB) rate were compared between subgroups, by Student T test with the level of significance at 0.05.

Result: Total of 191 oocytes studied were 110 immature oocytes (79 fresh and 31 frozen-thawed), 81 fail-fertilized mature oocytes (74 fresh and 7 frozen-thawed). The PPN rate of total oocytes and fresh immature oocytes especially in germinal vesicle sub group with IVM in protocol I were lower significantly than those of in Protocol II (51.80%, 40.00% and 40.63% vs 69.44%, 69.23% and 72.73%; $p = 0.013$, 0.008 and 0.004 respectively). The PC rate of total oocytes and fail-fertilized mature oocytes in protocol I regimen A were significantly lower than those of in protocol II regimen B (65.12% and 57.14% vs 86.66% and 100.00%, $p = 0.001$ and 0.005 respectively). The PC rate in protocol II of total oocytes with regimen A was significantly lower than that of with regimen B (78.67% and 86.66%, $p = 0.014$). The PC rate of immature oocytes with IVM in protocol I regimen A was significantly lower than that of in protocol II with regimen A (75.00% and 95.59%, $p = 0.001$). The PB rate in this study was 4.19%. The PB rate of fresh immature oocytes with IVM was 4.71%. The PB rate of fresh fail-fertilized matured oocytes was 4.88%. The PB rate in protocol II of total oocytes with regimen A was significant lower than that of with regimen B (5.53% vs 6.67%, $p=0.05$). There was no parthenogenetic derived stem cell successfully developed in this study.

Discussion and Conclusion: The results of parthenogenetic activation of fresh immature oocytes with IVM with ionomycin + CB + CHX were better than that of ionomycin + 6DMAP. The parthenogenetic blastocyst could be activated by different chemical oocyte activation and culture protocols with some better results from ionomycin +CB + CHX activation and cultured in culture medium with growth factors. Anyhow, the parthenogenetic derived stem cell would be required further study due to the limit number of parthenogenetic blastocyst yield.

Key words: parthenogenesis, parthenogenetic activation, parthenogenetic culture, blastocyst, stem cell