

การมีชีวิตรอดของตัวอ่อนในโคโดยใช้สารละลายวิตามินเคชั่นแช่แข็ง

Survival of Frozen Bovine Embryos Cryopreserved by Vitrified Solution

มงคล โปร่งเจริญ (Mongkol Prongcharoen)^{1*}

อดิศักดิ์ สังข์แก้ว (Adisak Sangkaew)²

สุรจิต ทองสอดแสง (Surajit Thongsoudsang)³

บทคัดย่อ

การทำตัวอ่อนโคแช่แข็ง มีความจำเป็นอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมเพื่อการขยายสายพันธุ์โคที่มีคุณภาพ วิธีการทำตัวอ่อนโคแช่แข็งอย่างง่ายที่สุดคือ การใช้สารละลายป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่มีความเข้มข้นสูงที่เรียกว่า วิตามินเคชั่น ในงานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะทำการศึกษามีชีวิตรอดของตัวอ่อนโคแช่แข็งโดยใช้วิตามินเคชั่น โดยใช้แม่โคจำนวน 12 ตัว กระตุ้นการเจริญของรังไข่ด้วยฮอร์โมน PMSG (pregnant mare serum gonadotropin) 2,500 iu/ตัว แม่โคตอบสนองต่อฮอร์โมนจำนวน 4 ตัว (33.33 %) ทำการเก็บตัวอ่อนหลังจากวันเป็นสัด (วันที่ 0) ไปอีก 7 วัน (วันที่ 7) ได้ตัวอ่อนคุณภาพดีจำนวน 3 ใบ (ระยะ blastocyst 2 ใบ, expanded blastocyst 1 ใบ) และตัวอ่อนเสื่อมสภาพ 2 ใบ และมีแม่โคที่พบถุงน้ำที่รังไข่จำนวน 6 ตัว (50.0%) และมีแม่โคไม่ตอบสนองต่อฮอร์โมน PMSG 1 ตัว ทำการแช่แข็งตัวอ่อนที่เก็บมาได้ (3 ใบ) ในสารละลายวิตามินเคชั่น 25 % (v/v) ethylene glycol (EG) + 25 % (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO) + 20 % fetal calf serum (FCS) ในสารละลาย phosphate buffer saline เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 1 วัน และละลาย ตัวอ่อนแช่แข็งที่ 20 °C นาน 15 นาที แล้วย้ายตัวอ่อนลงไปอยู่ในสารละลาย 0.5 sucrose + 20 % FCS ใน PBS นาน 5 นาที และล้างตัวอ่อนใน PBS + 20 % FCS 3 ครั้ง แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในตู้อบ 5 % CO₂ และอากาศ ประเมินผลอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อน หลังจากเพาะเลี้ยงไป 24 ชั่วโมง พบว่าตัวอ่อนเสื่อมสภาพหมด

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าการทำตัวอ่อนโคแช่แข็งด้วยวิธีวิตามินเคชั่น โดยใช้สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง EG และ DMSO ไม่สามารถทำให้ตัวอ่อนโคมีชีวิตรอดได้ หลังจากละลายตัวอ่อนออกมาแล้ว

Abstract

Bovine embryo freezing is significantly important to the bovine industry for dissemination of qualified breeds. The easiest method, called vitrification, is the use of the high concentration solution of cryoprotectants. Twelve cows were stimulated with single injections of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) at a dose of 2,500 iu/cow. One cow did not respond to the hormone and six other cows were found to develop cystic ovary after the treatment. Three qualified (two blastocysts and one expanded blastocyst) plus two degenerated embryos were recovered from four cows.

Embryos were cryopreserved by the vitrification technique. The vitrification solution was prepared with 25 % v/v dimethyl sulfoxide (DMSO) + 25 % v/v ethylene glycol + 20 % fetal calf serum in phosphate buffer saline solution (PBS). After 24 hours storage in liquid nitrogen, embryos were thawed at 20 °C for 15 min, then incubated in 0.5 M sucrose + 20 % fetal calf serum in PBS for 5 min and finally washed in PBS + 20 % fetal calf serum three times. Embryos were cultured under 5 % CO₂ in air at 39 °C for further viability assessment. None of the embryos demonstrated any sign of development after being cultured for 24 hours. From this research, it can be concluded that the production of bovine embryos by vitrification using EG and DMSO is unable to afford survival of embryos after thaw.

คำสำคัญ: ตัวอ่อนโค สารละลายวิตามินเคชั่น

Keywords: Bovine embryo, vitrification solution

¹ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาสัตวศาสตร์และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

²นักวิชาการสัตวบาล ภาควิชาสัตวศาสตร์และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³อาจารย์ ภาควิชาสัตวศาสตร์และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

*corresponding author, e-mail: prongcharoen@yahoo.com

บทนำ

เทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนได้มีการพัฒนาอย่างมากมาโดยเฉพะอย่างยิ่งในประเทศที่กำลังพัฒนา จำเป็นที่จะให้ได้สายพันธุ์แท้ และมีประสิทธิภาพเพื่อนำมาปรับปรุงพัฒนาในสายพันธุ์พื้นบ้านที่มีอยู่ เมื่อย้อนกลับไปดูในอดีต การปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่เราต้องการแล้ว จะต้องใช้วิธีการย้ายฝากตัวอ่อนเข้าช่วยในการปรับปรุง และขยายพันธุ์ แต่ก่อนนั้นการย้ายฝากตัวอ่อน จะใช้วิธีการทำแบบตัวอ่อนสด จำเป็นต้องใช้วิธีการเหนี่ยวนำให้เป็นสัดพร้อมกันทั้งตัวรับ และตัวให้ ในบางครั้งความแตกต่างในการแสดงอาการเป็นสัดไม่พร้อมเพียงกันโอกาสที่ผสมติดก็จะต่ำ (Adam, 1981) ดังนั้นจึงได้มองเห็นปัญหาในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดพร้อมกัน จึงได้มีการดัดแปลงนำตัวอ่อนที่ได้มาทำการเก็บรักษาโดยการทำตัวอ่อนแช่แข็งเพื่อรอการนำไปย้ายฝากให้กับตัวรับต่อไป

ประมาณ 20 ปีมาแล้วได้มีรายงานประสบความสำเร็จในการทำตัวอ่อนแช่แข็งในหนู mice (Whittingham, 1971) หลังจากนั้นอีก 2 ปีต่อมา ได้มีการศึกษาการทำตัวอ่อนแช่แข็งในโค และได้ย้ายฝากให้กับตัวรับโดยวิธีการผ่าตัดประสบความสำเร็จ (Wilmut and Rowson, 1973) ดังนั้นการย้ายฝากตัวอ่อนโดยใช้ตัวอ่อนแช่แข็งจึงได้มีการพัฒนา และใช้วิธีการหลาย ๆ อย่างในการเก็บรักษาตัวอ่อน ได้แก่ การควบคุมวิธีการแช่แข็ง และการละลาย, วิธีการแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียว (one-step procedure), การแช่แข็งแบบรวดเร็ว (ultrarapid freezing) และการแช่แข็งโดยใช้สารละลายที่มีสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งเข้มข้นสูง (vitrification) (VTF) การแช่แข็งตัวอ่อนจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งซึ่งมีอยู่ 2 ชนิดที่ใช้เป็นสารป้องกันการแช่แข็ง: สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งชนิดซึมผ่านเซลล์ได้ (penetrating cryoprotectants) เช่น glycerol, dimethylsulfoxide (DMSO), 1,2-propanediol (PROH), ethylene glycol เป็นต้น และสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งชนิด

ไม่สามารถซึมผ่านเซลล์ได้ (nonpenetrating cryoprotectant) เช่น polyvinyl pyrrolidone (PVP), sucrose, glucose เป็นต้น (Niemann, 1991) ส่วนสำหรับสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่ใช้ชนิดซึมผ่านเซลล์ได้นั้นจะมีความเข้มข้นที่ใช้แตกต่างกันไปเช่น glycerol 1.4 M ในสารละลาย phosphate buffer saline (PBS) (Niemann, 1991) และ ethylene glycol 1.5 M ซึ่งให้อัตราการมีชีวิตรอดของตัวอ่อนได้ดี (Cocero et al., 1988) และ propanediol 1.5 M (Hernandez-Ledezma et al., 1988) สำหรับการแช่แข็งตัวอ่อนอาจจะจำเป็นต้องใช้เครื่องมือในการแช่แข็งซึ่งมีราคาค่อนข้างแพง และควบคุมการทำงานโดยคอมพิวเตอร์เพื่อสะดวกในการปฏิบัติ และมีความแม่นยำสูง และอัตราการติดท้องหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งด้วยเครื่องมือแช่แข็งแล้วประมาณ 59.4 % (Niemann, 1991) ต่อมาได้ดัดแปลงอุปกรณ์แช่แข็งจากใช้ในโตรเจนเหลวมาใช้แอลกอฮอล์เป็นตัวควบคุมความเย็น (alcohol freezer) เพื่อลดค่าใช้จ่ายของอุปกรณ์ ซึ่งให้ผลอัตราการติดท้องหลังจากการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งประมาณ 60% (Niemann, 1991)

ดังนั้นจึงได้พัฒนาเทคนิคในการแช่แข็งตัวอ่อนมาจนถึงวิธีการใช้สารเคมีที่มีความเข้มข้นสูงในการป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง เพื่อเป็นการลดค่าใช้จ่ายของอุปกรณ์แช่แข็งซึ่งวิธีการนี้เรียกว่า “Vitrification” ลักษณะของสารละลายนี้ประกอบด้วย 3 อย่างคือ: มีความเข้มข้นของสารละลายที่ป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งชนิดซึมผ่านเซลล์ได้สูงอย่างน้อย 1 สารหรือมากกว่า 1 อยู่ในสารละลาย physiological saline และ มีสาร macromolecules เช่น น้ำตาล เพื่อเป็นการนำสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งออกนอกเซลล์ในช่วงที่ละลาย

สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่มีความเข้มข้นสูง (vitrification) (VTF) ครั้งแรกได้ทำการศึกษาในตัวอ่อนของหนูอายุ 8 เซลล์ซึ่งประกอบด้วย DMSO 20.5 % (v/v) โดยปริมาตร, acetamide 15.5 % (v/v), propylene glycol 10 % (v/v) และ ethylene glycol 6 % (v/v) (Rall and Fahy, 1985)

ต่อมาได้ทำการศึกษาในตัวอ่อนของหนูระยะ 8 เซลล์ จนถึงระยะ early blastocyst โดยใช้ glycerol 25 % (v/v) และ propanediol 25 % (v/v) ซึ่งระยะ morula มีอัตราชีวิตรอดสูงสุดเมื่อใช้สารเคมีชนิดนี้ (Valdez et al., 1990) ส่วนตัวอ่อนในโคได้ทำการศึกษาพบว่า ระยะที่เหมาะสมคือ ระยะ morula ในสารละลาย glycerol 25 % (v/v) และ propanediol 25 % (v/v) (Massip et al., 1987) เนื่องจากสารละลายป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่มีความเข้มข้นสูงจำเป็นต้องมีระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับตัวอ่อนที่อยู่ในสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงนี้ Van Der Zwalm et al. (1989) ได้ใช้ตัวอ่อนระยะ early blastocyst และระยะ blastocyst ในสารละลาย glycerol 25 % (v/v) ใน PBS นาน 13 นาทีและย้ายตัวอ่อนไปอยู่ในสารละลาย glycerol 25 % (v/v) และ sucrose 0.25 M เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นนำตัวอ่อนไปอยู่ในสารละลาย vitrification (ประกอบด้วย glycerol 25 % (v/v), propanediol 25 % (v/v) ใน PBS) ที่ 4 °C นาน 30 วินาที และบรรจุในหลอดขนาด 0.25 ml แล้วจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว การละลายออกมาใช้จะละลายในน้ำเย็นที่ 20 °C นาน 10 วินาที แล้วนำตัวอ่อนมาใส่ในสารละลาย sucrose 1 M นาน 10 นาที เพื่อเป็นการนำสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งออก แล้วจึงนำตัวอ่อนมาใส่ในสารละลาย PBS+20 % fetal calf serum (FCM) จากผลการทดลองพบว่าอัตราการติดท้อง 28.6 % สำหรับการทดลองที่ทำในสัตว์ชนิดอื่นให้ความสำเร็จในอัตราชีวิตรอดของตัวอ่อนสูงเช่น ในหนูระยะ morula 97-98 % (Kasai et al., 1990) ในการเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็นระยะ blastocyst, ในกระต่ายระยะ morula และ blastocyst 82.7 % และ 78.5 % ตามลำดับ (Smorag et al., 1989), ในแกะระยะ morula เจริญต่อไปจนถึงระยะ blastocyst และ hatch blastocyst ถึง 94.7 % (McGinnis and Young, 1990), ในแพะระยะ morula และ early blastocyst ให้ผลถึง 76 % ในการเจริญเปลี่ยนของตัวอ่อนและอัตราการติดท้องเมื่อย้ายฝากให้กับตัวรับ 22 % (Yuawiat and Holtz, 1990)

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จะทำการทดลองใช้วิธีการทำตัวอ่อนแช่แข็งด้วยสารละลายที่มีสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งเข้มข้นสูง เพื่อดูอัตราการมีชีวิตรอดของตัวอ่อนหลังจากละลายตัวอ่อนแช่แข็งออกมาแล้ว

อุปกรณ์ และวิธีการศึกษา

1. วัสดุทดลอง

สัตว์ทดลอง แม่โคตัวให้ (donor)

- คัดเลือกแม่โคพันธุ์โฮลส์ไธน์เฟรเชียน อายุ 4 - 6 ปี สุขภาพสมบูรณ์จำนวน 10 ตัว น้ำหนักตัวเฉลี่ย 474.5 ± 43.42 กิโลกรัม จากฟาร์มโคนม ดี เจ ฟาร์ม จังหวัดสระแก้ว ทำการทดลองในช่วงเดือนมกราคม - เมษายน 2537

2. วิธีการศึกษา

2.1 ทำการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยพรอสตาแกรนดิน PGF2a, Lutalyse, Upjohn) 25 mg/ตัว

2.2 หลังจากแสดงอาการเป็นสัดได้ 10 วัน จะทำการเร่งการตกไข่ด้วย pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) 2,500 iu/ตัว

2.3 ในวันที่ 12 จะทำให้เป็นสัดโดยใช้ฮอร์โมนพรอสตาแกรนดิน 25 mg/ตัว และแม่โคจะแสดงอาการเป็นสัดภายใน 72-96 ชั่วโมงหลังจากฉีด

2.4 ทำการผสมเทียมให้กับแม่โคหลังจากเริ่มแสดงอาการเป็นสัดได้ 12 ชั่วโมง และผสมเทียมอีกครั้งห่างกัน 12 ชั่วโมงต่อมา

2.5 ทำการชะล้างตัวอ่อนออกมาโดยใช้สารละลาย phosphate buffer saline (PBS) + 1 % fetal calf serum ในวันที่ 5, 6 และ 7 (วันที่ 0 หมายถึงวันที่เริ่มแสดงอาการเป็นสัด)

2.6 ประเมินคุณภาพตัวอ่อน โดยใช้วิธีการประเมินตัวอ่อนตามวิธีของ Hasler et al. (1995) กล่าวคือ morula grade 1 เซลล์รูปร่างสม่ำเสมอ และเนื้อเซลล์ของตัวอ่อนรวมตัวแน่น morula grade 2 เซลล์รูปร่างไม่สม่ำเสมอ และ/หรือ พบเศษเซลล์ในเนื้อเซลล์ของตัวอ่อน compacted morula (CM) เซลล์ของเนื้อตัวอ่อนอยู่รวมตัวกันแน่นเป็นเนื้อเดียวกัน และพบช่องว่าง

ระหว่างเนื้อเซลล์ของตัวอ่อนกับเปลือกไข่ (perivitelline space)

degenerated embryo (Deg) พบลักษณะเนื้อเซลล์ของตัวอ่อนแตกสลาย ไม่เป็นรูปร่าง

early blastocyst (EB) พบช่องว่างอยู่ภายในตัวอ่อนน้อยกว่า 50 % ของเนื้อตัวอ่อนทั้งหมด

mid blastocyst (MB) พบช่องว่างอยู่ภายในตัวอ่อนมากกว่า 50 % ของเนื้อตัวอ่อนทั้งหมด และเปลือกไข่จะหนาตัวตามปกติ

expanded blastocyst (XB) มีช่องว่างอยู่ภายในตัวอ่อนอยู่เต็ม ตัวอ่อนมีขนาดใหญ่ขึ้น และเปลือกไข่บางกว่าปกติ และพบ inner cell mass

hatch blastocyst (HB) ตัวอ่อนหลุดออกจากเปลือกไข่

2.7 ทำการแช่แข็งตัวอ่อน โดยใช้สารละลาย PBS+20 % FCS ทำการล้างตัวอ่อนที่ได้ แล้วนำตัวอ่อนมาใส่ในสารละลายก่อนทำการแช่แข็ง PBS+10 % (v/v) glycerol + 20 % (v/v) 1,2-propanediol + 20 % FCS นาน 5 นาทีที่ 20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตัวอ่อนย้ายมาใส่ในสารละลายที่จะทำการแช่แข็งประกอบด้วย PBS +20 % FCS + 25 % (v/v) glycerol + 25 % (v/v) 1,2 propanediol นาน 30 วินาที ในหลอดบรรจุ 0.25 ml แล้วจุ่มลงไปไนโตรเจนเหลว

2.8 การละลายตัวอ่อนแช่แข็ง นำหลอดบรรจุตัวอ่อนมาละลายในน้ำ 20 °C นาน 20 วินาที แล้วนำตัวอ่อนออกมาละลายในสารละลาย 1 M sucrose ใน PBS + 20 % FCS นาน 10 นาที

2.9 ประเมินคุณภาพตัวอ่อน ในสารละลาย PBS + 20 % FCS

3 ขั้นตอนวิเคราะห์ข้อมูล

3.1 เปรียบเทียบอายุของตัวอ่อนที่เหมาะสมในการทำตัวอ่อนแช่แข็งโดยใช้สารละลายที่มีความเข้มข้นของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งสูง

ผลการศึกษา

ผลจากการใช้ฮอร์โมน PMSG กระตุ้นการเจริญของรังไข่ ในปริมาณ 2,500 iu/ตัว พบว่าแมโคตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 4 ตัว (33.33 %) และตัวอ่อนที่เก็บได้จำนวน 5 ใบ ประกอบไปด้วยระยะ blastocyst 2 ใบ, expanded blastocyst 1 ใบ และ degenerated embryo 2 ใบ และมีแมโค 1 ตัวไม่ตอบสนองต่อฮอร์โมน และอีก 6 ตัว พบลักษณะผิดปกติที่รังไข่เป็น cystic ovary และอัตราการเก็บชะล้างตัวอ่อนที่ได้จากแมโคที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเป็นเฉลี่ย 45.83 ± 4.67 % ดังแสดงสรุปไว้ในตารางที่ 1 และรูปที่ 1

ผลจากการนำตัวอ่อนที่แช่แข็งในสารละลายวิตามินเคชั้นแล้ว แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในสารละลาย PBS + 20% FCS ในตู้อบ 39 °C ใน 5% CO₂ เพื่อดูอัตราการเจริญของตัวอ่อน พบว่า ตัวอ่อนที่ละลายออกมาทั้งหมดไม่มีการเจริญเติบโตต่อไปอีก เป็นตัวอ่อนที่เสื่อมสภาพ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2 และรูปที่ 2

วิจารณ์ผล

ผลจากการใช้ฮอร์โมน PMSG ในปริมาณ 2,500 iu/ตัว กระตุ้นการเจริญของรังไข่ พบว่ามีการตอบสนองต่อฮอร์โมนต่ำ 33.33 % และได้จำนวนตัวอ่อนคุณภาพดีเพียง 3 ใบเท่านั้น และที่สำคัญพบว่าแมโคเกิดพยาธิสภาพที่รังไข่ เกิด cystic ovary ซึ่งมีการทดลองใช้ฮอร์โมน PMSG กระตุ้นการเจริญของรังไข่และพบปัญหาการตกไข่ล้มเหลวและเกิด cystic ovary โดยอธิบายว่า ฮอร์โมน PMSG จะไปกดการหลั่งฮอร์โมน FSH ของตัวแมโคเอง และฮอร์โมน PMSG นี้ยังไปเพิ่มการหลั่งฮอร์โมน inhibin และ estradiol-17 โค จึงส่งผลทำให้เกิด cystic ovary ตามมาได้ (Kaneko et al., 1992) (Gong et al., 1993)

สำหรับระยะตัวอ่อนที่ใช้ในการทำตัวอ่อนแช่แข็งพบว่า ระยะ blastocyst และ expanded blastocyst ไม่เหมาะสมต่อกระบวนการแช่แข็ง เนื่องจากผนัง zona pellucida บาง และง่ายต่อการซึมผ่านของสารป้องกัน

การเกิดผลึกน้ำแข็ง และเปราะแตกได้ง่ายเมื่อนำไปแช่แข็ง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Van Der Zwalmen et al. (1989) ที่ไม่ประสบผลสำเร็จในการทำตัวอ่อนแช่แข็งระยะ blastocyst และระยะ expanded blastocyst และยังแนะนำว่า ควรทำตัวอ่อนแช่แข็งในระยะ morula และ early blastocyst เท่านั้น (Valdez et al., 1990; Saito et al., 1994) และที่สำคัญ ระยะเวลาที่ตัวอ่อนอยู่ในสารละลาย VTF หากใช้เวลานานเกินไป โอกาสที่ตัวอ่อนจะตายเนื่องจากความเป็นพิษของสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งมีมากขึ้นด้วย ซึ่งการทดลองของ Valdez et al. (1990) แนะนำให้ตัวอ่อนอยู่ในสารละลายที่มีสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งเข้มข้นต่ำก่อน (10% GLY + 20 % PG + 10 % FCS in PBS) นาน 5 นาทีแล้วจึงนำตัวอ่อนย้ายไปอยู่ในสารละลาย VTF และทำการแช่แข็ง แม้ว่าการทดลองนี้ไม่ได้้นำตัวอ่อนไปอยู่ในสารละลายที่มีสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งเข้มข้นต่ำก่อน แต่ระยะเวลาที่ตัวอ่อนอยู่ในสารละลาย VTF เพียง 30 วินาที หรือมากกว่า 30 วินาที (ในขณะที่ตัวอ่อนอยู่ในสารละลาย VTF ตัวอ่อนลอยขึ้นมา ทำให้เสียเวลาหาตัวอ่อนที่จะบรรจุลงในหลอด) แล้วจึงนำตัวอ่อนที่อยู่ในสารละลาย VTF จุ่มลงในไนโตรเจนเหลวทันที ทำให้ตัวอ่อนสัมผัสอยู่กับสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งเป็นเวลานาน และทำให้ตัวอ่อนตายได้ และที่สำคัญ สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้ใช้ DMSO ที่มีเข้มข้นสูง อาจมีผล ทำให้ตัวอ่อนตายได้ ซึ่งมีรายงานพบว่าสาร DMSO นี้เป็นพิษต่อตัวอ่อน นอกจากสาร DMSO แล้วยังมี propanediol ที่เป็นพิษต่อตัวอ่อนด้วย จึงไม่แนะนำให้มาใช้ในการทำตัวอ่อนแช่แข็ง (Santo et al., 1994; Van Der Zwalmen et al., 1989) และยังมีคำแนะนำให้ใช้ glycerol และ propyleneglycol ในการทำตัวอ่อนแช่แข็งซึ่งให้ผลดี และไม่เป็นพิษต่อตัวอ่อนด้วย (Liebo, 1989)

สำหรับตัวอ่อนที่ได้มาจากการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน PMSG เพียง 3 ใบเท่านั้น ซึ่งมีจำนวนน้อย จึงไม่สามารถนำไปศึกษาเปรียบเทียบกับแช่แข็งตัว

อ่อนด้วยสารละลายตัวอื่น เช่น glycerol ดังนั้นในงานศึกษาวิจัยครั้งนี้ การทำตัวอ่อนแช่แข็งด้วยวิธีวิตามินเคชั่นโดยใช้สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง DMSO ไม่สามารถทำให้ตัวอ่อนมีชีวิตรอดอยู่ได้ หลังจากละลายตัวอ่อนแช่แข็งออกมาแล้ว

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่สนับสนุนทุนการวิจัยครั้งนี้ และผู้ที่เกี่ยวข้องทุกท่านที่ทำให้การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ดี

เอกสารอ้างอิง

- Adam, C.E. 1982. Factors affecting the success of egg transfer. In: Adma, C.E.(ed.) Mammalian egg transfer. CRC Press, Boca Raton, Florida, p.175-182.
- Cocero, M.J., Procureur, R., Fuente, J. and Chupin, D. 1988. Glyceral or ethylene glycol for cryoprotection of deep frozen ewe embryos. *Theriogenology* 29(1): 238 (Abstr.)
- Gong, J.G., Bramley, T.A., Wimut, I and Webb, R. 1993. Effect of recombinant bovine somatotropin on the superovulatory response to pregnant mare serum gonadotropin in heifers. *Bio. Reprod.* 48: 1141-1149.
- Hasler, J.F., Henderson, W.B., Hurtgen, P.J., Jin, Z.Q. McCauley, A.D., Mower, S.A., Neely, B., Shuey, L.S., Stokas, J.E and Trimmer, S.A. 1995. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 43: 141-152.
- Hernandez-Ledezma, J.J., Selgrath, J.P and Wright, R.W. 1988. One step sucrose dilution of a cryoprotectant mixture (CPM) of glycerol and 1,2propanediol. *Theriogenology* 29(1): 259 (Abstract)

- Kaneko, H., Watanabe, G., Taya, K. and Sasamoto, S. 1992. Changes in peripheral levels of bioactive and immunoreactive inhibin, estradiol-17 B, progesterone, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone associated with follicular development in cows induced to superovulate with equine chorionic gonadotropin. **Bio. Reprod.** 47: 76-82
- Kasai, M., Komi, J.H., Takakamo, A., Tsudera, H., Sakurai, T. and Machida, T. 1990. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. **J. Reprod. Fert.** 89: 91-97.
- Liebo, S.P. 1989. Equilibrium and nonequilibrium cryopreservation of embryo. **Theriogenology** 31(1): 85-93.
- Massip, A., Van Der Zwalmen, P. and Ectors, F. 1987. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. **Theriogenology** 27: 69-79.
- McGinnis, L.K. and Young, C.R. 1990. Vitrification of ovine embryos. **Theriogenology** 33(1): 287 (Abstract).
- Niemann, H. 1991. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology** 35(1): 109-124.
- Rall, W.F. and Fahy, G.M. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 c by vitrification. **Nature** 313: 573-575.
- Saito, N., Imai, K. and Tomizawa, M. 1994. Effect of sugars-addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced in vitro. **Theriogenology** 41: 1053-1060.
- Smorag, Z., Gajda, B., Wieczorek, B. and Jura, J. 1989. Stage dependent viability of vitrified rabbit embryos. **Theriogenology** 31(6): 1227-1231.
- Valdez, C.A., Mazni, A., Takahashi, Y., Hishinuma, M. and Kanagawa, H. 1990. Effects of equilibration time, precooling and developmental stage on the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. **Theriogenology** 33: 627-633.
- Whittingham, D.G. 1971. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. **Nature** 233: 125-126.
- Wilmut, I. and Rowson, L.E.A. 1973. Experiments on the low temperature preservation of cow embryos. **Vet. Rec.** 92: 686-690.
- Van Der Zwalmen, P., Tonati, K., Ectors, F.J., Massip, A., Beckers, J.F. and Ectors, F. 1989. Vitrification of bovine blastocysts. **Theriogenology** 31(1): 270 (Abstract).
- Yuawati, E and Holtz, W. 1990. Work in progress: successful transfer of vitrified goat embryo. **Theriogenology** 34(4): 629-632.

ตารางที่ 1 ผลจากการใช้ฮอร์โมน PMSG 2,500 iu/ตัว กระตุ้นการเจริญของรังไข่

No.cow	Response ovary	CL on ovary	No.embryo		embryo recovery rate	
			stage of embryo		%	
		LO	RO	LO	RO	
1	response	2	1	1(MB)	-	33.33
2	response	1	1	1(EB)	1(MB)	100
3	response	3	1	2(Deg)	-	50
4	response	1	1	-	-	0
5	Nonresponse					
6	Cystic ovary					
7	Cystic ovary					
8	Cystic ovary					
9	Cystic ovary					
10	Cystic ovary					
11	Cystic ovary					
12	Cystic ovary					
Average± SD		1.75± 0.96	1± 0.00	1.33± 0.58	1.00	45.83 ± 4.67

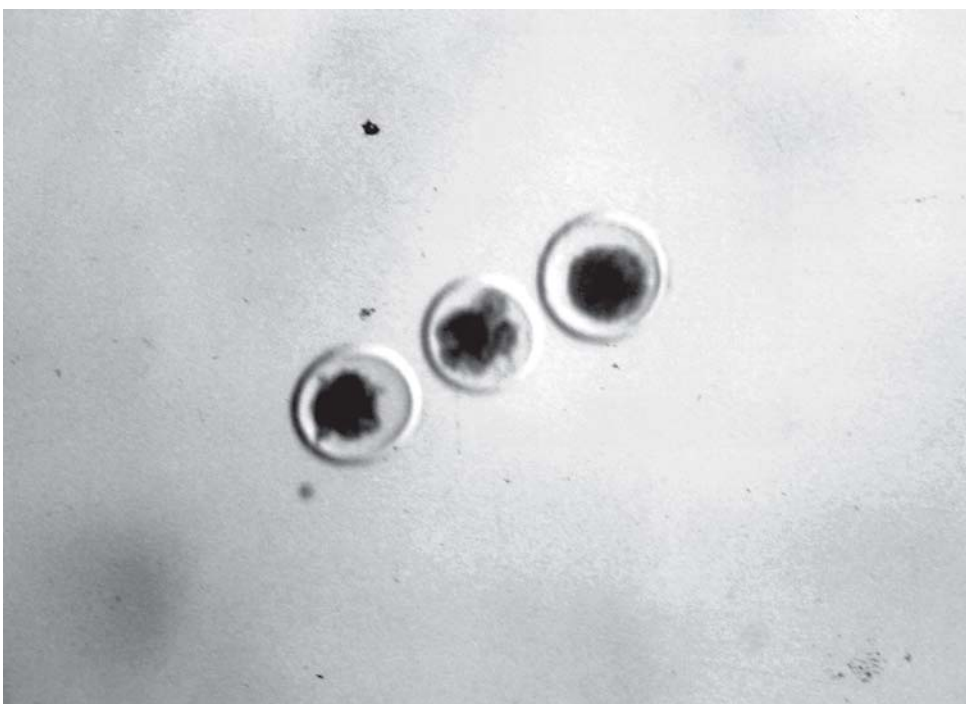
LO รังไข่ซ้าย, RO รังไข่ขวา

ตารางที่ 2 ผลจากการนำตัวอ่อนที่ละลายแล้วนำไปเพาะเลี้ยงในสารละลาย PBS + 20% FCS ที่ 39 °C in CO₂ gas

ระยะตัวอ่อน	จำนวน	% survival
Blastocyst	2	0 (degeneated embryo)
Expanded Blastocyst	1	0 (degeneated embryo)



รูปที่ 1 ตัวอ่อนระยะ mid blastocyst 2 ใบ และ expanded blastocyst 1 ใบ และ degenerated embryo 3 ใบ



รูปที่ 2 degenerated embryos หลังจากละลายตัวอ่อนออกมาและเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง