หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
วิจารณ์และสรุปผล

จากการศึกษาถึงผลกระทบของการแช่แข็งต่อการอยู่รอดของเอมบริโอ พบว่า เอมบริโอสามารถรอดชีวิตอยู่ได้ภายหลังการแช่แข็ง โดยนำมาเพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม เอมบริโอสามารถเจริญเติบโตต่อไปถึงระยะบลาสโตซิสได้ แต่อัตราการเจริญเติบโตต่ำกว่าเอมบริโอในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้แช่แข็ง ทั้งนี้เนื่องจากในระหว่างการแช่แข็งบลาสโตเมียบางส่วนและเซลล์เมมเบรนถูกทำลาย ทำให้ cell permeability เสียไปหรือคุณสมบัติทางฟิสิกส์ของเซลล์เมมเบรนเปลี่ยนไป (Mazur และคณะ 1984) และในการแช่แข็งเซลล์บางส่วนของเอมบริโออาจจะถูกทำลายจากการเกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์ (Mazur,1970) และการเพิ่มความดันออสโมติก (osmotic pressure) (Jondet และคณะ 1984) เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงต่อภายหลังการทำละลายเอมบริโอไม่สมบูรณ์เท่าตอนก่อนแช่แข็ง จึงทำให้อัตราการอยู่รอดน้อยลง

จากการศึกษา โครงสร้างละเอียด (ultrastructure) ที่เกิดจากผลกระทบของการเกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์ (Trounson,1986) ในขณะลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วและทำการละลาย โดยเฉพาะการละลายอย่างช้า ๆ (slow warming) พบว่าผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นในขณะลดอุณหภูมิจะเกิดการรวมตัวเป็นขนาดใหญ่ (recrystallization) ซึ่งจะทำลายไซโตปลาสซึมและส่วนประกอบภายในเซลล์ ทำให้เซลล์เสียรูปร่างและหน้าที่ไปไม่สามารถรอดชีวิตอยู่ได้ (Bank, 1973; Rall และคณะ 1980) เช่นเดียวกับที่ Mazur (1977b) พบว่าการเกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์และการรวมตัวของผลึกน้ำแข็ง เป็นกระบวนการทาง ฟิสิกส์ ของผลึกน้ำแข็งมีผลทำลายเมมเบรนภายในเซลล์ นอกจากนี้พบว่าเซลล์เอมบริโออาจถูกทำลายเนื่องจากแรงดันออสโมติก (osmotic force) ซึ่งเกิดจากความไม่สมดุลย์ของสารภายในและภายนอกเซลล์ในขณะที่ผลึกน้ำแข็งละลาย (Farrantและคณะ, 1977)

อย่างไรก็ตาม ผลของการแช่แข็งต่ออัตราการรอดชีวิต ยังขึ้นอยู่กับชนิดและระยะของการเจริญเติบโตของเอมบริโอ (developmental stage) ที่นำมาแช่แข็ง (Trounson และคณะ 1978 ; Mohr และ Trounson, 1981) ซึ่งพบว่า ในแต่ละระยะการเจริญเติบโตเอมบริโอสามารถทนต่ออัตราในการลดอุณหภูมิต่างกัน (Massip และคณะ, 1989) ทั้งนี้เนื่องจากความสามารถในการซึมผ่านเซลล์ (cell permeability) และพื้นที่ผิวต่อปริมาตรต่างกัน (Mazur,1970) จากผลการทดลองในครั้งนี้พบว่าเอมบริโอในระยะ 8-เซลล์สามารถรอดชีวิตภายหลังการแช่แข็งได้ในเปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่าเอมบริโอระยะ 2-เซลล์ และ 4-เซลล์ อาจเนื่องจากเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ สามารถทนต่อสภาพการลดอุณหภูมิถึง -30 องศาเซลเซียสได้ดีกว่า

เอมบริโอระยะ 2-เซลล์ และ 4-เซลล์ จากการศึกษาของ Jackowski และคณะ, (1980) พบว่าเอมบริโอของหนูเมาซ์ในระยะ 8-เซลล์มีความสามารถในการให้สารชีมผ่านเซลล์เพิ่มขึ้นถึง 10 เท่า ในขณะที่ระยะเกิดการปฏิสนธิเพิ่มขึ้นเพียง 3 เท่า ซึ่งจากการที่ cell permeability เพิ่มขึ้นนี้ ทำให้เซลล์สามารถเกิด dehydration ได้เร็วกว่าดังนั้นการเกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์ ที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียสจึงลดลง ฉะนั้นเมื่อเทียบกับเอมบริโอระยะอื่น ๆ โอกาสที่เซลล์ถูกทำลายจึงย่อมมีน้อยกว่าเอมบริโอระยะ 2-เซลล์ และ 4-เซลล์ นอกจากนี้สัดส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรของเอมบริโอสูงกว่าเอมบริโอระยะ 2-เซลล์และ 4-เซลล์

เมื่อพิจารณาจำนวน blastomere จะเห็นว่าเอมบริโอระยะ 8-เซลล์มีมากกว่าระยะ 2-เซลล์และ 4-เซลล์ เมื่อ blastomere หนึ่งถูกทำลายโอกาสที่เอมบริโอระยะ 8-เซลล์ จะรอดชีวิตอยู่ได้ก็ย่อมสูงกว่า เอมบริโอระยะ 8-เซลล์แม้ถูกทำลาย 1-2 blastomere ส่วนที่เหลือก็เจริญเติบโตต่อและสามารถฝังตัวและคลอดออกมาได้ (Maureen และคณะ, 1987) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Kasai และคณะ, (1980) ซึ่งพบว่า ในหนูเมาซ์เอมบริโอระยะ 8-เซลล์ เหมาะที่จะนำมาแช่แข็งเช่นกัน Friedler และคณะ (1988) ก็พบว่า เอมบริโอระยะ 4-เซลล์และ 8-เซลล์ของหนูเมาซ์ที่นำมาแช่แข็งมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าระยะอื่นๆสัตว์ต่างชนิดระยะเอมบริโอที่เหมาะสมสำหรับการแช่แข็งก็ต่างกัน สำหรับในคนนั้น พบว่า เอมบริโอระยะ 4-เซลล์และ 8-เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตภายหลังการแช่แข็งไม่แตกต่างกัน (Mohr และคณะ,1985) และมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าระยะอื่น ๆ ภายหลังการแช่แข็ง (Trounson และ Mohr, 1983) ในทางตรงกันข้าม Lasselle และคณะ (1985) พบว่า เอมบริโอระยะ 4- เซลล์และน้อยกว่า 4- เซลล์ มีอัตราการอยู่รอดสูงกว่าระยะมากกว่า 4- เซลล์ ในหนูแรท พบว่าเอมบริโอระยะ 2-เซลล์ 4-เซลล์ และ 8- เซลล์ มีอัตราการฝังตัวต่ำ (Whittingham, 1975a) ส่วนในกระต่ายนั้น เอมบริโอระยะ 8- เซลล์ และระยะมอรูล่า มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าระยะอื่น ๆ ภายหลังการแช่แข็ง และลูกกระต่ายที่คลอดออกมาจากเอมบริโอที่แช่แข็งในระยะมอรูล่า มีจำนวนสูงกว่าเอมบริโอระยะ 8- เซลล์ (Tsunoda, 1981)

ระยะเวลาที่เพาะเลี้ยงก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ของเอมบริโอที่เจริญถึงระยะบลาสโตซิสเช่นเดียวกัน เนื่องจากเอมบริโอระยะ 2- และ 4-เซลล์ต้องใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงนานกว่าเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ และการที่ต้องอยู่ในสภาพแวดล้อมที่อาจจะไม่เหมาะสมในการเจริญเติบโตทำให้อัตราการรอดชีวิตลดลง

สำหรับในการทดลองครั้งนี้ เปอร์เซ็นต์เอมบริโอที่เจริญเติบโตถึงระยะบลาสโตซิสภายหลังการแช่แข็ง เอมบริโอระยะ 8- เซลล์ต่ำกว่า การทดลองของ Renard และ Babinet (1984b) ซึ่งพบว่าสูงถึงร้อยละ 89 อาจเนื่องจากใช้หนูเมาซ์คนละพันธุ์ (strain) วิธีการแช่แข็ง และน้ำยาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเอมบริโอต่างกันเป็นต้น จากการศึกษาของ Glenister และ Lyon (1981) พบว่า เอมบริโอที่ได้จากหนูเมาซ์คนละพันธุ์ อัตราการรอดชีวิตภายหลังการแช่แข็งแตกต่างกัน

เอมบริโอของหนูเมาซ์ในระยะก่อนการฝังตัวทุกระยะสามารถรอดชีวิตอยู่ได้ ภายหลังการแช่แข็ง แต่อัตราการรอดชีวิตในแต่ละระยะของเอมบริโอจะแตกต่างกัน (Maurer, 1976b) นอกจากนี้เอมบริโอในระยะเดียวกันที่นำมาแช่แข็ง ก็มีอัตราการรอดชีวิตที่ต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลาย ๆ อย่าง เช่น ชนิดและความเข้มข้นของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง (Smorag และคณะ, 1981; Critser และคณะ, 1988) ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าเอมบริโอที่แช่แข็งโดยใช้ PROH เป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง สามารถเจริญเติบโตถึงระยะบลาสโตซิสได้ในเปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่า DMSO และ Glycerol อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนการแช่แข็งโดยใช้ DMSO และ Glycerol เป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง เอมบริโอสามารถเจริญเติบโตถึงระยะบลาสโตซิสได้ไม่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Renard และ Babinet (1984b) ที่พบว่า PROH เป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งที่มีประสิทธิภาพสูง เอมบริโอสามารถรอดชีวิตได้ถึงร้อยละ 89 เนื่องจาก PROH สามารถช่วยลดจำนวนการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ (Boutron และ Kaufmann, 1979) นอกจากนี้มีความเป็นพิษน้อยกว่า DMSO โดยพบว่าเอมบริโอหนูเมาซ์ระยะ 8-เซลล์อยู่ในสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งเป็นเวลา 40 นาที อัตราการรอดชีวิตของเอมบริโอที่ใส่ PROH (ร้อยละ 84) สูงกว่า DMSO (ร้อยละ 60) แต่อย่างไรก็ตาม Schneider และ Mazur (1984) พบว่า DMSO ไม่เป็นพิษต่อเอมบริโอ จากการศึกษาในเอมบริโอของหนูเมาซ์และคนพบว่าการแช่แข็งด้วย PROH มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า DMSO และ Glycerol (Jackowski และคณะ, 1980; Renard และ Babinet, 1984b) โดยเหตุผลที่ PROH สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ได้เร็วกว่า DMSO และ Glycerol โดยใช้เวลาเพียง 5-7 นาที ในขณะที่ DMSO และ Glycerol ใช้เวลา 20-30 นาที และมากกว่า 60 นาที ตามลำดับ (Friedler และคณะ, 1988) ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ใช้เวลาให้เอมบริโออยู่ในสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งก่อนนำไปแช่แข็ง (equilibration time) 10 นาที ซึ่งเหมาะเพียงพอสำหรับ PROH ที่ซึมผ่านผนังเซลล์ได้เร็ว แต่ DMSO และ Glycerol อาจจะยังไม่สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ เพื่อเข้าไปป้องกันการถูกทำลายของเซลล์ในขณะแช่แข็งได้อย่างเพียงพอ ดังนั้นจึงทำให้เซลล์ถูกทำลายมากกว่า ฉะนั้น PROH จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในการแช่แข็งเอมบริโอหนูเมาซ์ระยะ 8- เซลล์ แต่มีการศึกษาพบว่า PROH ไม่เหมาะสำหรับการแช่แข็งเอมบริโอระยะมากกว่า 8-เซลล์ (Testart และคณะ, 1987) สำหรับ Glycerol นั้นความสามารถในการซึมผ่านของเอมบริโอหนูเมาซ์เปลี่ยนแปลงตามระยะของเอมบริโอ โดยที่เอมบริโอระยะ 8- เซลล์ มอรูล่าและบลาสโตซิสสามารถให้ Glycerol ซึมผ่านผนังเซลล์ได้ดีกว่าเอมบริโอระยะ 1-เซลล์ ถึง 4-เซลล์ (Jackowski และคณะ, 1980)

นอกจากนี้ อุณหภูมิที่ใส่สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งก็มีบทบาทต่อการอยู่รอดของเอมบริโอในการแช่แข็งเช่นเดียวกัน (Szell และ Shelton, 1986b) เช่น ในกระต่าย ที่

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าที่ 0 องศาเซลเซียส (ร้อยละ 37 และ ร้อยละ 3 ตามลำดับ)

อัตราการรอดชีวิตยังขึ้นอยู่กับวิธีการแช่แข็ง ซึ่งพบว่าการแช่แข็งโดยวิธีเร็ว (rapid method;fast freezing procedure) หรือลดอุณหภูมิด้วยอัตราเร็ว 0.3 องศาเซลเซียส ต่อนาที จาก -7 องศาเซลเซียส จนถึงอุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส แล้วจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว มีอัตราการรอดชีวิตต่ำกว่าการแช่แข็งด้วยวิธีช้า (slow method ; slow freezing procedure) หรือลดอุณหภูมิด้วยอัตราเร็ว 0.3 องศาเซลเซียส ต่อนาที ถึง -80 องศาเซลเซียส (Quinn และ Kerin, 1986;Trounson และ Mohr, 1983) แต่การทดลองในครั้งนี้ได้เลือกวิธี rapid method เพราะใช้เวลาในการแช่แข็งสั้นกว่า และจากการศึกษาของ Renard และ Babinet (1984b) พบว่า อัตราการรอดชีวิตสูงถึงร้อยละ 89 นอกจากนี้อัตราการรอดชีวิตยังขึ้นอยู่กับอัตราเร็วในการทำละลาย ซึ่งมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิต่ำสุดก่อนจุ่มในไนโตรเจนเหลว โดยที่ถ้าเป็นวิธี rapid method เวลาทำละลายต้องใช้อัตราที่เร็วจึงจะมีอัตราการอยู่รอดสูง ทั้งนี้เพื่อป้องกันการเกิดการรวมตัวของผลึกน้ำแข็งขึ้น แต่ถ้า slow method อัตราการรอดชีวิตจะเพิ่มขึ้นเมื่อทำละลายด้วยอัตราที่ช้า (Critser และคณะ, 1988) ซึ่งวิธีการแช่แข็งจะเหมาะสมหรือไม่ขึ้นอยู่กับระยะของเอมบริโอที่นำมาแช่แข็งด้วย (Whittingham และ Leibo, 1972 ;Schneider และ Maurer, 1983)

เอมบริโอภายหลังการแช่แข็งก่อนที่จะนำไปถ่ายฝากยังตัวรับหรือเพาะเลี้ยง จำเป็นต้องเอาสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งออกก่อน (Whittingham,1977;Willadsen และคณะ, 1978) ซึ่งการใช้น้ำตาลซูโครส พบว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากช่วยลดการบวมของเซลล์และป้องกันการเกิด osmotic shock ทำให้เซลล์ที่หดตัวสามารถกลับคืนสู่สภาพปกติ (Schneider และ Mazur,1984) สำหรับวิธี stepwise เอมบริโอจะต้องถูกย้ายจากความเข้มข้นหนึ่งไปอีกความเข้มข้นหนึ่ง อาจทำให้เกิดการสูญหายไปและอาจได้รับอันตรายจากแรงดูดระหว่างการย้ายเอมบริโอ ปัจจุบันจึงนิยมใช้น้ำตาลซูโครสเป็นส่วนใหญ่

อนึ่ง ในการแช่แข็งเอมบริโอนั้น อาจจำเป็นต้องเก็บไว้เป็นช่วงเวลานาน เพื่อรอการย้ายฝากของตัวรับเหมาะสม ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาถึงผลกระทบนี้ จากการศึกษา พบว่าเอมบริโอที่แช่แข็งและเก็บในไนโตรเจนเหลวในช่วงเวลา 1,28 และ 56 วันนั้นเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตถึงระยะบลาสโตซิส ภายหลังการแช่แข็งไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าช่วงเวลาในการเก็บเอมบริโอในไนโตรเจนเหลวไม่มีผลกระทบต่ออัตราการอยู่รอดของเอมบริโอภายหลังการแช่แข็งเช่นเดียวกับที่ Whittingham และ Whitten (1974b) Whittingham (1977) พบว่าช่วงเวลาในการเก็บเอมบริโอโดยการแช่แข็งไม่ได้ทำให้อัตราการรอดชีวิตลดลง เอมบริโอยังคงสามารถฝังตัวและคลอดออกมามีลักษณะปกติ

โดยปกติ ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส พบว่าจะไม่มีปฏิกิริยาทางชีวภาพหรือปฏิกิริยาความร้อนเกิดขึ้น (Mazur และคณะ, 1984) แต่มีปฏิกิริยาหนึ่งที่อาจเกิดขึ้นคือ การทำลาย DNA จากรังสี อย่างไรก็ตาม Lyon และคณะ,(1981) พบว่าเอมบริโอที่แช่แข็งและเก็บไว้โดยได้รับรังสีด้วยขนาดต่าง ๆ กันไม่มีผลต่อการอยู่รอดของเอมบริโอ นอกจากนี้ไม่มีหลักฐานว่าการแช่แข็งเอมบริโอจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมหรือยีนส์ขึ้น (Mazur,1984)

การเพาะเลี้ยงเป็นวิธีการประเมินผลอัตราการรอดชีวิตของเอมบริโอภายนอกร่างกาย ส่วนวิธีที่จะประเมินผลการอยู่รอดภายในร่างกายนั้นดูจากการฝังตัวและสามารถคลอดออกมา จากการศึกษาถึง ความอยู่รอดของเอมบริโอภายหลังการแช่แข็งและเพาะเลี้ยง จนถึงระยะบลาสโตซิส แล้วทำการถ่ายฝากเอมบริโอไปยัง recipient ที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดการตั้งท้องเทียมแล้ว เปรียบเทียบจำนวนฟีตัสที่ฝังตัวในมดลูกของ recipient ปรากฏว่าไม่มีความแตกต่างของการฝังตัวของเอมบริโอที่ผ่านการเพาะเลี้ยงและไม่ผ่านการเพาะเลี้ยง แสดงว่าการเพาะเลี้ยงไม่มีผลต่อการฝังตัว ส่วนเอมบริโอที่ผ่านการแช่แข็งและเพาะเลี้ยง พบว่ามีอัตราการฝังตัวต่ำกว่าเอมบริโอที่ไม่ผ่านการแช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แสดงว่าการแช่แข็งมีผลต่อการฝังตัวของเอมบริโอ

ความสำเร็จของการถ่ายฝากจะสัมพันธ์กับระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง (Hahn และ Schneider, 1982) อัตราการแบ่งตัวช่วงเริ่มแรกของเอมบริโอในการเพาะเลี้ยงกับการเจริญใน ท่อทางเดินสืบพันธุ์ (reproductive tract)จะไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อถึงระยะบลาสโตซิส การเจริญของเอมบริโอในน้ำยาเพาะเลี้ยงจะช้ากว่าเอมบริโอในร่างกาย(Harlow และ Quinn, 1979) ได้มีการศึกษาเปรียบเทียบทางโครงสร้างละเอียดของบลาสโตซิสระยะท้าย (Late blastocyst) ที่เจริญภายในร่างกาย (in vivo) และภายนอกร่างกาย (in vitro) พบว่ามีความแตกต่างในโครงสร้างของนิวเคลียส ไรโบโซมและไซโตปลาสซึมของเอมบริโอที่เจริญภายนอกร่างกาย โดยที่จะเจริญได้ช้ากว่าเอมบริโอที่เจริญภายในร่างกายและ heterochromatin ลดลง แสดงว่ามีการแสดงออกของยีนส์ต่ำกว่าปกติ จำนวนไมโตคอนเดรียลดลง แต่ละอันมีจำนวน cristae เพียง 2-3 อัน ความแตกต่างดังกล่าวแสดงว่ามีการสูญเสียทาง metabolic ability เป็นเหตุให้จำนวนฟีตัสที่ได้ภายหลังการถ่ายฝากต่ำ (McReynolds และ Hadek,1972) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าบลาสโตซิสที่ได้จากการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน (superovulation) จะมีผิวเซลล์ยื่นออกไป และมีพื้นผิวเรียบกว่าบลาสโตซิสที่ได้จากการตกไข่ตามธรรมชาติ ซึ่งมี microvilli ที่ผิวเซลล์มากกว่า แสดงถึงอัตราการแบ่งตัวได้ ตามปกติเซลล์ของบลาสโตซิสจะมี microvilli ปานกลางซึ่ง microvilli บนเซลล์ trophoblast ของเอมบริโอสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมหลายชนิด จะไป interdigitate กับ microvilli ของเซลล์ epithelial ของมดลูกระหว่างเริ่มมีการฝังตัว ดังนั้น อาจเป็นไปได้ว่าบลาสโตซิสที่มี microvilli น้อย มีโอกาสฝังตัวได้ต่ำ ถ้าจำนวนของ microvilli สัมพันธ์กับความสำเร็จในการฝังตัวได้จริง ถึงแม้การ

เพาะเลี้ยงจะมีผลดังกล่าว แต่การศึกษาของ Schneider (1982) พบว่าถ้าระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงไม่เกิน 24 ชั่วโมงผลการฝังตัวไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ Techakumphu และคณะ (1987) พบว่าการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมงไม่ได้ทำให้อัตราการรอดชีวิตลดลง ทั้งนี้ก็อาจขึ้นอยู่กับคุณภาพของน้ำยาเพาะเลี้ยง, pH, osmolality และสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงอื่น ๆ เช่น อุณหภูมิ, ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ที่เหมาะสมเป็นต้น ซึ่งการทดลองครั้งนี้ ก็ได้ใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงที่คิดว่าเหมาะสมที่สุด และควบคุมสภาวะแวดล้อมอื่น ๆ อย่างดี จึงไม่พบความแตกต่างของการฝังตัวของเอมบริโอที่ผ่านการเพาะเลี้ยง และไม่ผ่านการเพาะเลี้ยง ส่วนฟีสัสของกลุ่มเอมบริโอที่ผ่านการแช่แข็งแล้วเพาะเลี้ยงก่อนการถ่ายฝาก อาจทำให้ metabolic activity ต่ำกว่าปกติ และ microvilli ไม่เจริญดี ทำให้ฝังตัวได้น้อยก็เป็นได้

จากการศึกษาครั้งนี้ สรุปได้ว่า เอมบริโอระยะ 2-, 4-และ 8-เซลล์ สามารถนำมาแช่แข็งและเจริญเติบโตถึงระยะบลาสโตซิสได้ภายหลังการแช่แข็งและเพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง HTF + FCoS 20% แต่เอมบริโอระยะ 8-เซลล์ มีอัตราการอยู่รอดถึงระยะบลาสโตซิสมากที่สุด และสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งทั้งสามชนิดคือ PROH, DMSO และ Glycerol สามารถใช้ในการแช่แข็งเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ แต่พบว่า PROH เหมาะที่สุดที่นำมาแช่แข็งเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ โดยการใช้วิธี rapid method สำหรับช่วงเวลาในการเก็บเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ในไนโตรเจนเหลวนั้นไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการอยู่รอดของเอมบริโอ นอกจากนี้ เอมบริโอระยะ 8-เซลล์ที่แช่แข็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและเพาะเลี้ยงจนถึงระยะบลาสโตซิสสามารถฝังตัวได้ แต่อัตราการฝังตัวต่ำกว่าบลาสโตซิสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเอมบริโอระยะ 8-เซลล์ที่ไม่ได้แช่แข็งและบลาสโตซิสที่เจริญเติบโตในร่างกาย ทั้งนี้เนื่องจากปัจจัยหลาย ๆ อย่าง เช่น คุณภาพของเอมบริโอ วิธีการแช่แข็งและอื่น ๆ ซึ่งต้องมีการศึกษาวิจัยกันต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย