จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี ๒๕๔๐

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การแช่เย็นและการแช่แข็งตัวอ่อนสุกร

(Chilling and Freezing of Pig Embryos)

โดย

มงคล เตชะกำพุ
วันเพ็ญ ยอดยานุภาพ
จินดา สิงห์ถอย

636.089
8178
ม114ก

กันยายน ๒๕๔๑
ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี ๒๕๔๐

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การแช่เย็นและการแช่แข็งตัวอ่อนสุกร

(Chilling and Freezing of Pig Embryos)

โดย

มงคล เตชะกำพุ
วันเพ็ญ อดุลยานุภาพ
จินดา สิงห์ลอ

กันยายน ๒๕๔๑

ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

22 S.A. 2542
I18A34432

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2540-2541
ของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ผู้วิจัยขอขอบคุณ

- ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อัจฉรา ธวัชสิน ที่ช่วยวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ
- บริษัท แอ็ดว๊านซ์ฟาร์ม่า จำกัด ที่อนุเคราะห์ฮอร์โมน PG 600®
- อาจารย์และบุคคลากรของภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์
  จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยให้ความสะดวกในด้านสุกรทดลอง
- เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการปฏิสนธินอกร่างกาย คณะแพทยศาสตร์
  จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุเคราะห์น้ำกลั่นบริสุทธิ์ในการทดลอง
- อาจารย์ นายสัตวแพทย์ ศิริวัฒน์ ทรวดทรง และอาจารย์ สัตวแพทย์หญิง นวเพ็ญ ภูติกนิษฐ์
- บุคคลากรของภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์
  คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มีส่วนให้งานวิจัยลุล่วงไปด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ: การแช่เย็นและการแช่แข็งตัวอ่อนสุกร
ชื่อผู้วิจัย: มงคล เตชะกำพุ วันเพ็ญ อดุลยานุภาพ จินดา สิงห์ลอ
เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ: กันยายน 2541

บทคัดย่อ

ศึกษาความเป็นไปได้ในการแช่เย็นและแช่แข็งตัวอ่อนสุกร โดยเก็บตัวอ่อนอายุ 7 วันจากสุกรสาวหลังกระตุ้นด้วยฮอร์โมน เพรกแนนท์ แมร์ ซีรั่ม โกนาโดโทรปิน และฮิวแมน โคริโอนิก โกนาโดโทรปิน ในอัตราส่วน 400:200 ไอยู แบ่งเป็น 4 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 แช่เย็นตัวอ่อนระยะ morula, early blastocyst, blastocyst และ expanded blastocyst จำนวน 48 ตัวอ่อน ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ในน้ำยา TCM199 2.5 Hepes+10%DMSO นาน 1, 6, 12 และ 24 ชม. ผลปรากฏว่าหลังเลี้ยงนาน 24 ชม. ไม่มีตัวอ่อนใดรอดเลยหลังจากเก็บไว้

การทดลองที่ 2 แช่แข็งตัวอ่อนระยะ blastocyst และ expanded blastocyst จำนวน 69 ตัวอ่อนแบบใช้ลดอุณหภูมินช้า ๆ โดยลดอุณหภูมิจาก -6 °ซ จนถึง -30 °ซ ด้วยความเร็ว 0.3 °ซ/นาที แล้วแช่ในไนโตรเจนเหลว -196 °ซ โดยให้ตัวอ่อนแขวนลอยในน้ำยา TCM 199 2.5 Hepes ที่มีสารป้องกันการแช่แข็ง 3 ชนิด คือ 1.5M glycerol, 1.5M DMSO และ 1.5M ethylene glycol ผลการศึกษาพบว่าตัวอ่อนมีสภาพปกติหลังทำละลาย 47.8%(33/69) ในน้ำยาที่มี ethylene glycol เป็นสารป้องกันการแช่แข็ง มีอัตรารอดเท่ากับ 54.3%(13/24) เทียบกับ glycerol 44%(11/25) และ DMSO 45% (9/20)

การทดลองที่ 3 แช่แข็งตัวอ่อนระยะ blastocyst และ expanded blastocyst แบบวิทรีฟิเคชั่น ในน้ำยา VS3a (6.5M glycerol+6%BSA) จำนวน 102 ตัวอ่อน ที่มีขนาดแตกต่างกัน 3 ขนาดคือ ขนาดเล็ก (<150 μm) ขนาดกลาง (150-300μm) และขนาดใหญ่ (>300μm) ผลการศึกษาพบว่าตัวอ่อนรอดจากการแช่แข็งเท่ากับ 59.8% (61/102) โดยตัวอ่อนขนาดกลางและขนาดใหญ่มีของอัตรารอดสูงกว่าขนาดเล็กเท่ากับ 65.7%(23/35), 65.6%(21/32) เปรียบเทียบกับ 48.6%(17/35) (P>0.05) ตามลำดับ

การทดลองที่ 4 นำตัวอ่อนระยะ blastocyst และ expanded blastocyst ไปแช่ในสารละลายที่มีไซโตคาลาซิน-บี ในขนาดความเข้มข้น 5.0, 7.5 และ 10 μg/ml นาน 30 นาที แล้วจึงนำไปแช่แข็งแบบวิทรีฟิเคชั่น เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3 ผลการศึกษาพบว่าตัวอ่อนที่แช่ในสารไซโตคาลาซิน-บี มีแนวโน้มของอัตรารอดสูงกว่า 60%(50/84) กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารไซโตคาลาซิน-บี เท่ากับ 46.4%(13/28) (P>0.05) โดยในแต่ละกลุ่มได้อัตรารอดหลังทำละลายเท่ากับ 46.4% (13/28), 65%(17/26) และ 67%(20/30) ตามลำดับ

จากการศึกษานี้พบว่ามีความเป็นไปได้ในการแช่แข็งตัวอ่อนแบบใช้ความเร็วช้า ๆ และแบบวิทรีฟิเคชั่น โดยการให้ตัวอ่อนสัมผัสกับสารไซโตคาลาซิน–บี ก่อนการแช่แข็งสามารถเพิ่มอัตรารอดของตัวอ่อนหลังแช่แข็งและทำละลายได้

คำสำคัญ: การแช่เย็น การแช่แข็ง ไซโตคาลาซิน-บี ตัวอ่อน สุกร

Project Title : Chilling and Freezing of Pig Embryos
Name of Investigators : Mongkol Techakumphu Wanpen Adulyanuphab
Jinda Singlor
Year : September 1998

Abstract

The feasibility of embryo chilling and freezing in the pig was studied. Pig embryos at day 7.0, morula, early blastocyst, blastocyst, expanded blastocyst were colllected from PMSG/HCG (400 : 200 iu) stimulated gilts. Four experiments were conducted :

Experiment I : Embryos at different stages (n = 48) were cooled to 4°C in TCM 199 2.5 Hepes + 10% DMSO for 1, 6, 12 and 24 hrs. After culture for 24 hrs, no embryos can develop.

Experiment II : Embryos at blastocyst and expanded blastocyst (n = 69) were slowly frozen to -196°C by using the rate of 3°C/min. from -7°C to -30°C in TCM 199 2.5 Hepes supplemented with 1.5 M glycerol or 1.5 M DMSO or 1.5 M ethylene glycol. After thawing, the average normality rate was 47.8% (33/69) which was not significantly higher (P>0.05) in ethylene glycol group, 54.3% (13/24) compared to 44% (11/25) in glycerol and 45% (9/20) in DMSO groups.

Experiment III : Embryos at blastocyst and expanded blastocyst (n = 102) were frozen by vitrification technique. The embryos were exposed to 25% VS3a (6.5 M glycorol + 6% BSA) for 20 min., 65% VS3a for 1 min. and 100% VS3a for 45 sec., then loaded into 0.25 ml plastic straw with 100% VS3a. The straws were directly plunged into liquid nitrogen (-196°C). The average normality rate of the embryos was 59.8% (61/102), small (100<ø<150μ), medium (150μ< ø <300μ) of the embryos and large (ø>300μ) sizes were 48.6% (17/35), 65.6% (21/32) and 65.7% (23/35), respectively.

Experiment IV: Embryos were exposed to cytochalasin-B with the concentrations of 5, 7.5 and 10μg/ml for 30 min. before vitrification as Exp III, compared to control without exposing to cytochalasin-B. The results revealed higher survival in cytochalasin-B groups than in the control, 60% (50/84) vs 46.4% (13/28) (P<0.05). The survival rates in 5, 7.5 10μg/ml were 46.4% (13/28), 65.4% (17/26) and 66.7% (20/30), respectively.

We concluded from these studies that pig embryos can be frozen by a conventional slow freezing or vitrificantion technique. An exposure of cytochalasin-B increases the survival rate of pig embryos after thawing.

Key words : Chilling, Freezing, Cytochalasin-B, Embryo, Pig

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	II
บทคัดย่อภาษาไทย	III
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	IV
สารบัญ	V
รายการตารางประกอบ	VI
รายการรูปประกอบ	VII
รายการสัญญลักษณ์และคำย่อ	VIII
คำนำ	IX
บทนำ	1
อุปกรณ์และวิธีการ	6
ผลการทดลอง	11
วิจารณ์	18
เอกสารอ้างอิง	24

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

		หน้า
ตารางที่ 1	การตอบสนองของรังไข่และการเก็บตัวอ่อนจากสุกรสาวที่เหนี่ยวนำให้เป็นสัดและการตกไข่	12
ตารางที่ 2	อัตราของตัวอ่อนปกติจากสุกรสาวที่เหนี่ยวนำให้เป็นสัดและการตกไข่	13
ตารางที่ 3	ผลการแช่เย็นตัวอ่อนสุกรที่ 4°ซ	13
ตารางที่ 4	ผลการแช่แข็งตัวอ่อนด้วยการลดอุณหภูมิช้า ๆ ในน้ำยาที่มีสารป้องกันการแช่แข็ง glycerol, DMSO และ ethylene glycol	14
ตารางที่ 5	ผลการแช่แข็งตัวอ่อนด้วยวิธีวิทริฟิเกชั่น	14
ตารางที่ 6	เปรียบเทียบอัตรารอดของตัวอ่อนหลังแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิช้า ๆ และแบบวิทริฟิเกชั่น	15
ตารางที่ 7	ผลของ cytochalasin-B ต่อการแช่แข็งตัวอ่อนแบบวิทริฟิเกชั่น	15

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการรูปประกอบ

		หน้า
รูปที่ 1	ไดอะแกรมสรุปขั้นตอนการทดลอง	10
รูปที่ 2	ภาพของตัวอ่อนที่ได้รับการแช่แข็งแบบความลดอุณหภูมิช้า ๆ	16
รูปที่ 3	ภาพของตัวอ่อนที่ได้รับการแช่แข็งแบบวิทริฟีเกชั่น	17

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการสัญญลักษณ์และคำย่อ

ภาษาไทย	ภาษาอังกฤษ
กก. = กิโลกรัม	DMSO = Dimethylsulfoxide
ชม. = ชั่วโมง	EG= Ethyle glycol
มล. = มิลลิลิตร	G = Glycerol
°ซ = องศาเซลเซียส	μg/ml = microgram/millilitre
ฟีตัล คาร์ฟ ซีรั่ม = fetal calf serum	μM = micron
	°C = degree celcius

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำนำ

ความพยายามที่จะเก็บรักษาตัวอ่อนสุกรในรูปแช่แข็ง เป็นก้าวอีกก้าวหนึ่งของการพัฒนาเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนในสุกร ซึ่งได้พัฒนาอย่างต่อเนื่องในภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทายลัย ด้วยการสนับสนุนอย่างต่อเนื่องจากเงินทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ จากรายงานนี้แสดงให้เห็นความเป็นไปได้ในการแช่แข็งตัวอ่อนสุกร ซึ่งเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศ การพัฒนาดังกล่าวนับว่ามีความสำคัญในเชิงการค้าและการวิจัยขั้นพื้นฐานของวิทยาการสืบพันธุ์ ตลอดจนเป็นรูปแบบของการพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งตัวอ่อนโดยใช้สุกรเป็นต้นแบบเพื่อพัฒนาในสัตว์ชนิดอื่น ๆ ต่อไป บางส่วนของงานวิจัยนี้ได้สนับสนุนเป็นโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ (senior projects) ของนิสิตสัตวแพทย์ชั้นปีที่ 6 ซึ่งได้เสนอในรายงานประชุมจนได้รับรางวัลดีเด่นประจำปีการศึกษา 2540

รศ. น.สพ. ดร. มงคล เตชะกำพุ
ผู้วิจัยหลัก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

การแช่เย็นและการแช่แข็งตัวอ่อนเป็นเทคโนโลยีอีกเทคนิคหนึ่งที่ช่วยเก็บรักษาพันธุกรรมของสัตว์และเป็นประโยชน์ในการแพร่กระจายสัตว์สายพันธุ์ดีจากสถานที่แห่งหนึ่งไปยังอีกแห่งหนึ่งได้โดยง่ายในรูปของตัวอ่อนแช่แข็ง งานวิจัยของการแช่แข็งส่วนใหญ่มักจำกัดในสัตว์ทดลอง เช่น หนูเม้าส์ โค และมนุษย์ โดยเป็นงานวิจัยขั้นพื้นฐาน และงานวิจัยประยุกต์เพื่อประโยชน์ทางการสัตวแพทย์และการแพทย์ ส่วนในสุกรนั้นการวิจัยของการแช่แข็งตัวอ่อนนั้นมีไม่มากนัก เนื่องจากตัวอ่อนสุกรมีลักษณะพิเศษแตกต่างจากสัตว์ทดลองชนิดอื่น ๆ คือค่อนข้างไวต่อการลดอุณหภูมิ อย่างไรก็ตามด้วยเทคโนโลยีใหม่พบว่ามีความเป็นไปได้ในการแช่แข็งตัวอ่อนสุกรแล้ว ดังนั้นหากได้มีการพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งตัวอ่อนสุกรขึ้นในประเทศจะมีประโยชน์อย่างมหาศาลต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกรและการผลิตสุกรที่ปลอดจากโรค (Specific Pathogen Free) เนื่องจากตัวอ่อนจะไม่เป็นตัวนำโรคเข้าสู่ฝูงได้ และหมายถึงการที่ประเทศไทยจะสามารถส่งออกเนื้อสุกรไปยังต่างประเทศได้อีกด้วย อันจะนำรายได้เข้าประเทศได้อีกทาง

ประโยชน์ของการแช่เย็นและแช่แข็งตัวอ่อนสุกร คือ

1) เป็นการขยายเวลาการเก็บรักษาตัวอ่อนสุกรให้มีชีวิตรอดนานขึ้น
2) เป็นการเก็บรักษาพันธุกรรมของสุกรที่มีลักษณะดีเลิศ
3) เป็นประโยชน์ต่อการขนส่งตัวอ่อนจากฟาร์มหนึ่งไปอีกฟาร์มหนึ่ง
4) สามารถปรับใช้ในการกระจายพันธุกรรมของสุกรพันธุ์ดีโดยเฉพาะในฝูงพ่อแม่พันธุ์
5) จะเป็นประโยชน์ต่อการสร้างฝูงสุกรปลอดโรคโดยนำเข้าในรูปตัวอ่อนแช่แข็ง

ความพยายามในการเก็บรักษาตัวอ่อนสุกรในอุณหภูมิต่ำได้มีรายงานมาตั้งแต่ปี 1974 (Polge *et al.*, 1974) โดยนำเอาตัวอ่อนของสุกรมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 10 °ซ พบว่าตัวอ่อนสุกรนั้นเสื่อมสลายหลังทำการเก็บรักษา ในขณะที่ตัวอ่อนของโครระยะ morula และ blastocyst จะมีความทนทานต่ออุณหภูมิต่ำมากกว่าโดยเฉพาะตัวอ่อนโครระยะ expanded blastocyst จะมีความทนต่อการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0 °ซ (Trouson *et al.*, 1976) ในขณะที่ตัวอ่อนสุกรจะสลายตัวเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 °ซ (Green *et al.*, 1984; Plante *et al.*, 1993) แสดงให้เห็นว่า *มีความแตกต่างกันในแง่ของความทนทานต่ออุณหภูมิต่ำระหว่างสัตว์ 2 ชนิด และตัวอ่อนสุกรมีความไวต่อการแช่เย็นและการแช่แข็ง*

ความไวต่อการแช่เย็น (chilling) และการแช่แข็ง (freezing) ซึ่งพบในตัวอ่อนของสุกรนั้นไม่พบในตัวอ่อนของสัตว์ชนิดอื่น ๆ โดยเฉพาะตัวอ่อนระยะ morula หรือ blastocyst ที่เป็นระยะที่เหมาะสมสำหรับการแช่แข็งทั่วไป เช่นตัวอ่อนของโค แกะ หนูหรือกระต่าย เป็นต้น เป็นที่ทราบกันดีกว่าไม่เฉพาะตัวอ่อนเท่านั้น ตัวอสุจิของสุกรก็เช่นเดียวกัน หากเปรียบเทียบอัตรารอดของ

ตัวอสุจิหลังแช่แข็งและละลาย (freezing and thawing) ในสุกรเทียบกับของโค พบว่าอัตราการเคลื่อนไหวจะเหลือเพียง 10-20% เท่านั้น (Dzuik and Henshaw, 1958) เมื่อเทียบกับในโคซึ่งอาจสูงถึง 40-50% หรือใกล้เคียงกับน้ำเชื้อสด ได้มีการทดลองเติมสาร phospholipids ลงในน้ำเชื้อสุกรพบว่าช่วยให้อัตรารอดหลังแช่แข็งดีขึ้นแต่ไม่สามารถช่วยในการแช่แข็งตัวอ่อนสุกรได้ Butler และ Roberts (1975) ได้พยายามแช่เย็นตัวอ่อนสุกรที่อุณหภูมิต่ำกว่า 15 °ซ โดยใช้สารป้องกันการแข็งตัว (cryoprotectants) เช่นเดียวกับที่ใช้กับตัวอ่อนของสัตว์ชนิดอื่น ๆ พบว่าไม่ประสบความสำเร็จ ข้อสันนิษฐานที่เป็นไปได้คือ การที่ตัวอ่อนสุกรไวต่อความเย็นหรือการแช่แข็งนั้นน่าจะเกี่ยวข้องกับปริมาณของไขมันที่มีอยู่เป็นปริมาณมากในตัวอ่อนสุกรเมื่อเทียบกับสัตว์ชนิดอื่น ๆ ซึ่งอาจไปเปลี่ยนแปลงระดับของไขมันภายในผนังเซลล์ (plasma membrane) (Niemann, 1985; Polge, 1977) ดังนั้นการวิจัยล่าสุดโดย Nagashima และคณะ (1994) ได้รายงานความสำเร็จในการแช่แข็งตัวอ่อนสุกร ด้วยการดูดเอาปริมาณไขมันออกด้วยวิธี microaspiration พบว่าตัวอ่อนสามารถถูกแช่แข็งได้ นอกจากนี้พบว่าตัวอ่อนของสุกรในระยะ expanded blastocyst และระยะ hatched blastocyst เป็นระยะที่เหมาะสมในการแช่แข็งได้ดีกว่าระยะอื่น ๆ (Nagashima *et al.*, 1988a)

การศึกษาการแช่แข็งตัวอ่อนสุกรนั้นได้มีรายงานไม่มากนักเมื่อเปรียบเทียบกับในโค ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยการแช่แข็งตัวอ่อนสุกรนั้นมี 2 วิธี คือ

ก) การแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิลงช้า ๆ (conventional slow freezing)

ข) การแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิอย่างเร็ว แบบวิทรีฟิเกชั่น (vitrification)

การแช่แข็งตัวอ่อนแบบ conventional หลักการของการแช่แข็งแบบนี้ คือ การควบคุมอัตราความเร็วของการแช่แข็ง (cooling rate) อย่างช้า ๆ โดยไม่เกิน 1 องศาเซลเซียสต่อนาที และตัวอ่อนต้องอยู่ในสารละลายที่มีสารป้องกันการแช่แข็งชนิดซึมผ่านเซลล์ได้ (permeable cryoprotectants) วิธีนี้มีผู้นิยมในการแช่แข็งตัวอ่อนของสัตว์หลายชนิด ซึ่งค่อนข้างให้ผลเป็นที่ น่าพอใจในแง่อัตราการเจริญหลังเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองและหลังนำกลับไปย้ายฝาก แต่ข้อเสียคือต้องมีเครื่องมือแช่แข็งที่สามารถควบคุมการลดอุณหภูมิได้แน่นอน โดยเฉพาะเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ (automatic programmable freezer) ซึ่งมีราคาค่อนข้างแพง และนอกจากนี้ยังใช้เวลาในการแช่แข็งนานอย่างน้อย 1.5 ถึง 2.0 ชม. การทดลองในสุกรโดยวิธีนี้ รายงานของ Hayashi และคณะ (1989) พบว่าตัวอ่อนระยะ morula และระยะ blastocyst มีอัตรารอดเพียง 15% เท่านั้น หลังเพาะเลี้ยงนาน 3-18 ชม และมีการเกิดของลูกสุกรเพียงครอกเดียว อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยชิ้นนี้พบว่า *มีความเป็นไปได้ในการแช่แข็งตัวอ่อนสุกรและตัวอ่อนสุกรสามารถเจริญทั้งในน้ำยาเพาะเลี้ยงและในสุกรตัวรับ*

ตารางที่ 1 ความสำเร็จของการแช่เย็นหรือแช่แข็งตัวอ่อนสุกร

ระยะตัวอ่อน	น้ำยาแช่แข็ง	วิธีการแช่แข็ง (อุณหภูมิ)	อัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อน	เอกสารอ้างอิง
EXB,HB, Vitro-HB	-/PBS+16%FCS	Slow cooling ($6^{\circ}C$; $11^{\circ}C$)	*In vitro* development day 27 fetus (1/9)*	Nagashima *et al.* (1988b)**
EXB,HB	1.5M DMSO/ PBS+16%FCS	Slow cooling ($-20^{\circ}C$)	*In vitro* development	Nagashima *et al.* (1989)**
EXB	1.5M Gly/ PBS+20%FCS	Slow cooling ($-35^{\circ}C$)	Piglets (5/11)*	Mayashi *et al.* (1989)**
M,B,EXB,HB	1.5M DMSO	Slow cooling ($-196^{\circ}C$)	*In vitro* development	Nagashima *et al.* (1989)
HB	1.4M Gly+ 10% egg yolk/ PBS+50% FCS	Slow cooling ($-196^{\circ}C$)	Piglets (1/8)*	Oguri *et al.* (1990)** Fujino *et al.*(1993)**
EXB	1.5M Gly+ 0.05% lecithin/ PBS+15% FCS	Slow cooling ($-196^{\circ}C$)	Piglets (4/20)*	Kameyama *et al.* (1990)**
Vitro-HB	1.5m Gly/ PBS+20% FCS	Slow cooling ($-196^{\circ}C$)	Piglets	Kashiwazaki *et al.* (1991)
Vitro-HB	1.5M Gly/ PBS+16% FCS	Slow cooling ($-196^{\circ}C$)	*In vitro* development	French *et al.* (1991)**
EXB	1.5M Gly	Slow cooling ($-196^{\circ}C$)	Piglets (2/42)*	Feng *et al.* (1991)
EXB,HB, Vitro-HB	1.5M Gly/ PBS+16% FCS	Slow cooling ($-196^{\circ}C$)	*In vitro* development	Nagashima *et al.* (1992)
M,B,EXB,HB	25% PG+25% Gly 20% PG+20% Gly +10% EG 20% PG+15% Gly +15% EG	Vitrification ($-196^{\circ}C$)	Unsuccess	Weber *et al.*(1992)
EXB,HB	1.5M Gly+ 0.5M trehalose/ PBS+15% FCS	Slow cooling ($-196^{\circ}C$)	*In vitro* development	Cameron *et al.* (1992)**

EXB,HB	6.5m Gly+ 6% BSA/PBS	Vitrification (-196^{0}C)	*In vitro* development	Dobrinsky and Johnson (1993)**
HB	1.5M Gly/ PBS+14% FCS	Slow cooling (-196^{0}C)	Abortion	Chen *et al.* (1993)**
M	Not reported	Slow cooling (0^{0}C)	*In vitro* development	Plante *et al.* (1993)
M,B,EXB,HB	25% Gly+25% PG/mHBT 8M EG/mDPBS-6 VS3a	Vitrification (-196^{0}C)	*In vitro* development	Dobrinsky and Johnson (1994)
B,EXB,HB	8M EG+7% PVP	Vitrification (-196^{0}C)	*In vitro* development	Kobayashi *et al.* (1994)
Early clevage	1.5M PROH+ 0.1M Sucrose	Slow cooling (-196^{0}C)	*In vitro* development	Nagashima *et al.* (1995)
2-4 cells, Oocytes	40% EG+ 1M Sucrose/ 20mM TCM 199Hepes +20% FCS	Vitrification (-196^{0}C)	*In vitro* development	Nagashima *et al.* (1996)
GV, M II oocytes	1.5M Gly+PROH+DMSO+EG/ PBS+15% FCS	Slow cooling (10^{0}C)	*In vitro* development	Huang *et al.* (1997)
M,B,EXB,HB	2.5M Gly+BSA/ DPBS+Cyto-B	Vitrification (-196^{0}C)	*In vitro* development	Dobrinsky *et al.* (1997)

*จำนวนฟีตัสหรือลูกสุกรที่มีชีวิต/จำนวนตัวอ่อนที่ทำการย้ายฝาก

**คัดลอกมาจาก Nagashima และคณะ (1994)

M = Morula ; B = Blastocyst ; EXB = Expanded Blastocyst ; HB = Hatched Blastocyst vitro-HB = *In vitro* blastocyst ; GV = Germinal Vesicle ; M II = Metaphase II ; Gly = Glycerol mHBT = modified Hepes Buffered TALP ; mDPBS = modified Dulbecco's Phosphate Buffered Saline ; VS3a = 6.5M Glycerol, 60 mg./ml. BSA in mDPBS ; PVP = 7% Polyvinylpyrrolidone ; PROH = 1.5M 1,2-propandiol ; cyto-B = cytochalasin-B

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ต่อมา Nagashima และคณะ (1989) ได้เสนอว่าตัวอ่อนสุกรระยะที่เหมาะสมในการแช่แข็งน่าจะเป็นตัวอ่อนระยะ expanded blastocyst และ hatched blastocyst โดยทำการแช่แข็งในสารละลายที่มี DMSO (dimethylsulfoxide) เป็นสารป้องกันการแช่แข็ง พบว่าได้อัตรารอดของตัวอ่อนในระยะหลุดจากเปลือก (hatching) ถึง 83% ในขณะที่ตัวอ่อนระยะ morula ไม่มีการเจริญเลย ความแตกต่างของความทนทานต่อการแช่แข็งระหว่างระยะ morula และระยะ blastocyst น่าจะเกี่ยวข้องกับความเปลี่ยนแปลงของระดับไขมันในเซลล์ที่เกิดขึ้นในช่วงการเปลี่ยนแปลงจากระยะ morula ไปยังระยะ blastocyst การเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของปริมาณไขมันจึงอาจเป็นส่วนหนึ่งที่ช่วยให้ตัวอ่อนระยะ blastocyst ของสุกรให้ทนต่อการแช่แข็งได้ (Nagashima *et al.*, 1994)

งานวิจัยของ Kashiwazaki และคณะ (1991) และ Nagashima และคณะ (1992) ได้รายงานความสำเร็จของการเกิดลูกสุกรหลังนำฝากตัวอ่อนสุกรแช่แข็ง โดยได้อัตราการรอดจากการเลี้ยงในหลอดทดลองประมาณ 11% แต่ทั้งสองรายงานได้พบว่าการรอดของตัวอ่อนแช่แข็งสุกรขึ้นกับอายุหรือระยะของตัวอ่อน โดยตัวอ่อน hatched blastocyst ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 150-300 μm จะเจริญได้ดีกว่าตัวอ่อนที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 300 ไมโครเมตร หลังทำการแช่แข็งแล้ว นอกจากระยะของตัวอ่อนแล้ว ระยะเวลาที่ใช้ก่อนนำไปแช่แข็ง หรือการเติมโปรตีนในสารละลายสำหรับแช่แข็ง (freezing solution) รวมทั้งสายพันธุ์ของสุกรที่ใช้เก็บตัวอ่อนก็มีส่วนเกี่ยวข้องกับความสำเร็จในการแช่แข็งตัวอ่อนสุกรด้วย

ในส่วนของชนิดของสารป้องกันการแช่แข็ง นั้นได้มีการทดลองใช้ egg-yolk ซึ่งใช้ในการแช่แข็งตัวอสุจิของสุกร พบว่าไม่ช่วยในการแช่แข็งตัวอ่อนสุกรได้ (Fujino *et al.*, 1993) นอกนี้ได้มีผู้นำเอาสารป้องกันการแช่แข็งชนิดไม่ซึมผ่านเซลล์ชนิด เทรฮาโลส (trehalose) ซึ่งเป็นน้ำตาลโมโลกุลคู่ (disaccharide) เพื่อให้ผนังพลาสม่าคงตัว (stabilize) และช่วยลด osmotic shock ร่วมกับglycerol ซึ่งเป็นสารป้องกันการแช่แข็งชนิดซึมผ่านเซลล์ พบว่าอัตราการรอดได้ถึง 50% หลังเลี้ยงตัวอ่อนนาน 24 ชม. (Cameron *et al.*, 1992)

การแช่แข็งตัวอ่อนแบบวิทรีฟีเกชั่น เป็นวิธีการแช่แข็งตัวอ่อนของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ได้มีพัฒนามาประมาณ 10 ปี วิธีการแช่แข็งดังกล่าวเป็นวิธีการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิเร็ว (rapid cooling) โดยใช้สารป้องกันการแช่แข็งชนิดเดียวหรือสองชนิดที่มีความเข้มข้นสูง และไม่มีการเกิดน้ำแข็งขึ้นในเซลล์ (ice crystal formation) สารละลายดังกล่าวจะเกิดเป็นผลึกแก้ว (amorphous glass) ซึ่งเป็นผลจากการใช้ความเร็วสูงในการแช่แข็งและการจุ่มตัวอ่อนซึ่งบรรจุในหลอดพลาสติกทันทีในไนโตรเจนเหลว ดังนั้นสารละลายดังกล่าวจะถูกแช่แข็งในรูป supercool (Rall, 1992) ได้มีการรายงานความสำเร็จในการแช่แข็งตัวอ่อนของหนู กระต่าย และโค ด้วยวิธีวิทรีฟีเกชั่น ล่าสุดมีรายงานในตัวอ่อนโคที่เกิดจากการปฏิสนธินอกร่างกายโดยวิธีนี้เช่นกัน (Dobrinsky *et al.*, 1992)

การแช่แข็งตัวอ่อนของสุกรด้วยวิธีวิทรีฟีเกชั่น ได้มีการศึกษาเปรียบเทียบ Vitrified solution ชนิดต่าง ๆ 3 ชนิด คือ UM-ABSI (Dobrinsky and Johnson, 1993), Ethylene Glycol (Leibo and Oda, 1992) และ 6.5M Glycerol (VS3a, Dobrinsky and Johnson, 1993) โดยทดลองในตัวอ่อนอายุ 5 วัน ซึ่งเป็นระยะ morula หรือ early blastocyst ตัวอ่อนระยะ 6 วัน เป็นระยะ blastocyst หรือ ระยะ expanded blastocyst และตัวอ่อนระยะ 7 วัน เป็นระยะ hatched blastocyst พบว่าตัวอ่อนสุกรสามารถทนต่อการแช่แข็งด้วยวิธีวิทรีฟีเกชั่นได้แต่ขึ้นกับระยะของตัวอ่อนและสารวิทรีฟีเกชั่น ตัวอ่อนที่ทนต่อการแช่แข็งในสารละลายทั้ง 3 ชนิด คือ ตัวอ่อนระยะ morula หรือ blastocyst ประมาณ 65-70% เทียบเท่ากับตัวอ่อนที่ไม่ได้แช่แข็ง ส่วนสารแช่แข็งแบบวิทรีฟีเกชั่นที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการแช่แข็งตัวอ่อนทั้ง 3 ระยะ คือ VS3a ซึ่งเป็น 6.5M glycerol+6%bovine serum albumin การศึกษารายละเอียดของตัวอ่อนสุกรหลังวิทรีฟีเกชั่น พบว่าตัวอ่อนที่ไม่เจริญจะมีการเปลี่ยนแปลงในระดับพลาสม่าเมมเบรน และ/หรือโครงของเซลล์ (cytoskeleton) โดยเฉพาะส่วนของเซลล์ของตัวอ่อน ตัวอ่อนระยะ expanded blastocyst และ hatched blastocyst จะมีเซลล์ที่ถูกทำลายหลังแช่แข็งน้อยกว่า

ในการแช่แข็งไม่ว่าจะเป็นวิธีการใดก็ตามจะเกิดความเสียหายเกิดขึ้นในโครงสร้างของเซลล์นับตั้งแต่การสัมผัสกับสารป้องกันการแช่แข็งระหว่างการแช่แข็งและระหว่างการทำละลาย ความเสียหายดังกล่าวอาจกลับคืนได้ เช่น ในกรณีที่แช่ตัวอ่อนให้สัมผัสกับสารป้องกันการแช่แข็งที่มีความเข้มข้นสูง หลังจากนั้นก็ทำการเจือจางก็จะได้โครงสร้างดังกล่าวกลับเหมือนเดิม เซลล์ตัวอ่อนจึงปกติและแบ่งตัวได้ หรือหากความเสียหายดังกล่าวไม่มากนักหรือกระทบเซลล์ของตัวอ่อนเพียงบางส่วนก็ทำให้เซลล์ของตัวอ่อนที่เหลืออยู่เจริญต่อไปได้เช่นเดียวกับกรณีของครึ่งตัวอ่อนที่สามารถเจริญได้หลังถูกตัดแบ่งแล้ว ได้มีผู้ทดลองนำเอาสารที่รักษาโครงสร้างของเซลล์มาเสริม โดยให้ตัวอ่อนก่อนแช่แข็งสัมผัสกับสารดังกล่าวเพื่อเพิ่มความทนทานของโครงของเซลล์ เรียกสารนี้ว่า "cytoskeleton stabilizers" เช่น cytochalasin-B colchicine เป็นต้น

จากเอกสารอ้างอิงดังกล่าวข้างต้นจึงสรุปได้ว่ามีความเป็นไปได้ในการเก็บรักษาตัวอ่อนในรูปแช่เย็นที่อุณหภูมิต่ำและในรูปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส จุดประสงค์ของการงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการเก็บรักษาตัวอ่อนสุกรในรูปแช่เย็นและแช่แข็ง เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาการย้ายฝากตัวอ่อนของสุกรต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

สุกรตัวให้ตัวอ่อน

เลี้ยงสุกรสาวสามสายพันธุ์ (ดูร็อคxลาร์จไวท์xแลนด์เรซ) อายุประมาณ 7-8 เดือน จำนวน 66 ตัว น้ำหนักประมาณ 90-100 กก. คัดเข้ามาขังรวมกันครั้งละ 3-5 ตัว ในโรงเรือนทดลอง โดยดูจากสุขภาพ ความแข็งแรง และอวัยวะเพศภายนอกสมบูรณ์ ที่ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยา

และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ ตำบลบ่อพลับ อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม นำเข้ามาอย่างน้อย 4-7 วัน ก่อนเริ่มกระตุ้นการเป็นสัดและตกไข่ด้วยฮอร์โมน แพรกแนนท์ แมร์ ซีรั่ม โกนาโดโทรปิน (PMSG) และฮิวแมน โคริโอนิก โกนาโดโทรปิน (hCG) ในอัตราส่วน 400/200 ไอยู (PG 600®, Intervet, Holland) ฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณหลังใบหู ในเวลา 7.00 น สังเกตการเป็นสัดวันละ 2 ครั้ง (เช้า 7.00 น. และเย็น 17.00 น.) จากการบวมแดงของปากช่องคลอดและการยอมรับการผสมโดยการยืนนิ่งจากการกดหลัง

เมื่อสุกรเป็นสัดทำการผสมกับสุกรพ่อพันธุ์สายพันธุ์ดูร็อคที่มีคุณภาพน้ำเชื้อปกติ อายุ 1.5 ปี จำนวน 3 ตัว ด้วยการผสมธรรมชาติหรือผสมเทียม อย่างน้อย 2 ครั้ง ห่างกันประมาณ 12 ชม. สุกรทั้งหมดได้รับอาหารข้นที่มีปริมาณโปรตีนไม่น้อยกว่า 14% วันละ 2 กก. แบ่งให้เช้าและเย็น และให้น้ำอย่างเต็มที่ หลังผสมแล้วนำสุกรเข้าซองยืน

การเก็บตัวอ่อน

เก็บตัวอ่อนอายุ 6-7 วัน ซึ่งเป็นระยะ blastocyst หรือระยะ expanded blastocyst ด้วยการผ่าตัดชะล้างตัวอ่อนในท่อนำไข่และปีกมดลูก ดังรายละเอียดที่เคยรายงานโดย Techakumphu and Tantasuparak (1991)

รายละเอียดในการเก็บตัวอ่อนเริ่มจากการเตรียมตัวสัตว์ด้วยการอดน้ำและอาหารอย่างน้อย 24 ชม. วางยาสลบทั่วตัวด้วยการเหนี่ยวนำการสลบด้วย Azaperone (Stresnil®, Janssen, Belgium) ขนาด 2 มก./กก. ฉีดเข้ากล้ามเนื้อบริเวณหลังใบหู หลังจากนั้น 10-15 นาที ฉีดยาสลบชนิด Thiopentone sodium (Thiopental®, Biopharmchemicals, Czech Republic) ความเข้มข้น 10% เข้าหลอดเลือดดำบริเวณใบหูด้านนอก จำนวน 600 มก. แบบฉีดครั้งเดียวให้สลบทันที (knock down dose) จนกระทั่งสุกรสลบอยู่ในระดับที่สามารถผ่าตัดได้ ยกสุกรขึ้นโต๊ะ ผ่าตัดในท่านอนหงาย สอด endotracheal tube ต่อเข้าเครื่องดมยาสลบ ควบคุมระดับของการสลบด้วยฟลูโอเทนและออกซิเจน โกนขนและทำความสะอาดและฆ่าเชื้อบริเวณเต้านม 3 คู่สุดท้าย ด้วยทิงเจอร์ไอโอดีนและแอลกอฮอลล์ 70% กรีดผ่านชั้นผิวหนังในแนวกลางตัวจากจุดใต้สะดือลงมาประมาณ 10 ซม. ให้มีความยาวของแผลประมาณ 8 ซม. เปิดชั้นกล้ามเนื้อ ไขมันและผนังหุ้มช่องท้อง หาปีกมดลูกข้างใดข้างหนึ่งไล่ไปทางปลายปีกมดลูกจนถึงรังไข่ นับจำนวนการตกไข่ แล้วใช้ท่อแคทตีเตอร์ใสยาวประมาณ 40 ซม. สอดเข้าทางปากแตรของท่อนำไข่ให้ลึกประมาณ 6 ซม. ใช้บูลด็อกแคลิมพ์ 2 อันหนีบพยุงท่อแคทตีเตอร์กับท่อนำไข่ อีกปลายด้านหนึ่งของท่อแคทตีเตอร์นั้นต่อกับไซริงค์ขนาด 20 มล. บรรจุน้ำยาชะล้างตัวอ่อน สอดท่อยางโฟเลย์เบอร์ 16 ห่างจากจุดเชื่อมของท่อนำไข่และมดลูกประมาณ 50 ซม. อัดอากาศ 12-15 มล. ในบอลลูน เพื่อยึดท่อโฟเลย์กับผนังมดลูกและป้องกันไม่ให้น้ำยาชะล้างตัวอ่อนไหลรั่วออกขณะทำการเก็บตัวอ่อน

การเก็บตัวอ่อนทำโดยการฉีดน้ำยาชะล้างตัวอ่อน ชนิด PBS+2% fetal calf serum เข้าทางท่อแคทตีเตอร์ทางท่อนำไข่และไล่น้ำยาเข้าไปในโพรงปีกมดลูก การบรรจุน้ำยาเข้าแต่ละครั้ง

จำนวน 20 มล. รวมทั้งหมด 100 มล. จะสังเกตเห็นว่าปีกมดลูกมีการโป่งพองขึ้น หลังจากนั้นไล่น้ำยาจากโพรงมดลูกด้วยการบีบไล่เป็นระยะ รองรับน้ำยาด้วยขวดบีกเกอร์ เย็บปิดรูเปิดของมดลูกตรงที่สอดท่อโฟเลย์ ใส่ยาเพนนิซิลลิน-สเตรปโตมัยซินลงในช่องท้อง ทำวิธีเดียวกันนี้กับมดลูกอีกข้างหนึ่ง จากนั้นนำน้ำยาชะล้างตัวอ่อนไปตรวจหา เย็บปิดผนังช่องท้อง กล้ามเนื้อและผิวหนัง ฉีดยาปฏิชีวนะแก่สุกรหลังผ่าตัดนาน 3 วัน

การตรวจหาและประเมินคุณภาพของตัวอ่อน

คัดเลือกเฉพาะตัวอ่อนที่ปกติ โดยอาจเป็นตัวอ่อนระยะ morula หรือ blastocyst ที่มี inner cell mass และ blastoceol ชัดเจนมาทดลอง และเก็บไว้ในน้ำยา TCM199 $NaHCO_3$+10%fetal calf serum (FCS, Gibco, USA) ในตู้อบก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5% ที่อุณหภูมิ 39°ซ ก่อนทำการแช่เย็นหรือแช่แข็ง ไม่เกิน 1 ชม. ก่อนเริ่มทดลอง ทำการวัดขนาดของตัวอ่อนแล้วแบ่งเป็นตัวอ่อนขนาดเล็ก <150 μm ไมครอน ตัวอ่อนขนาดกลาง 150-300 μm ตัวอ่อนขนาดใหญ่ >300 μm เพื่อศึกษาผลของขนาดของตัวอ่อนต่อการแช่แข็ง

การแช่เย็นตัวอ่อน (การทดลองที่ 1)

นำตัวอ่อนใส่ในน้ำยา TCM199 2.5Hepes+10%DMSO มาทำการแช่เย็นในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 4°ซ นาน 1, 6, 12 และ 24 ชม. หลังจากนั้นนำมาเลี้ยงในตู้อบก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5% ที่อุณหภูมิ 39°ซ ในน้ำยาเพาะเลี้ยงตัวอ่อนชนิด modified Kreb's Ringer Solution +10% fetal calf serum นาน 24-48 ชม ตรวจอัตราการเจริญของตัวอ่อนจากการเพิ่มปริมาตร และการหลุดจากชั้นเปลือกนอกของตัวอ่อน (Hatching)

การแช่แข็งตัวอ่อน

ทดลองแช่แข็งตัวอ่อนด้วยกัน 2 วิธี คือ

การแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิช้า ๆ (Conventional Slow Freezing) **(การทดลองที่ 2)**

นำตัวอ่อนสุกรแช่ในน้ำยา TCM199 2.5Hepes ที่มี 5% และ 10% ของสารป้องกันการแช่แข็ง นานอย่างละ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง บรรจุตัวอ่อนในหลอดขนาด 0.25 มล. แล้วนำมาแช่แข็งด้วยตู้แช่แข็งอัตโนมัติ (Automatic programmable freezer, Planer, UK) โดยลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิห้อง (25°ซ) ไปยัง -6°ซ ด้วยความเร็ว -5°ซ/นาที ทิ้งไว้นาน 5 นาที แล้วทำการชักนำให้เกิดน้ำแข็ง (seeding) ทิ้งไว้หลัง seeding 5 นาที แล้วลดอุณหภูมิลงจนถึง 30°ซ ด้วยความเร็ว -0.3°ซ/นาที นำตัวอ่อนแช่ในไนโตรเจนเหลวที่ -196°ซ นาน 1-4 เดือน

ทำการทดสอบการอยู่รอดของตัวอ่อนสุกรที่แช่แข็ง โดยละลายหลอดบรรจุตัวอ่อนในน้ำอุ่นที่ 37°ซ นาน 30 วินาที แล้วละลายเอาสารป้องกันการแช่แข็งออกโดยแช่น้ำยาที่มีสารป้องกันการแช่แข็งที่มีความเข้มข้นจาก 5% เป็น 2.5% และ 0% แต่ละขั้นตอนนาน 10 นาที เพื่อให้เกิดความสมดุลย์ แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนเช่นเดียวกับการแช่เย็นตัวอ่อน ทดสอบสาร

ป้องกันการแช่แข็งที่เหมาะสมสำหรับแช่แข็งตัวอ่อน 3 ชนิด คือ Glycerol, DMSO และ Ethylene Glycol

การแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิอย่างเร็ว (Vitrification) (การทดลองที่ 3)

แช่ตัวอ่อนในน้ำยา 25%VS3a (6.5Mglycerol+6%bovine serum albumin) นาน 20 นาที 65%VS3a นาน 1 นาที และ 100% VS3a นาน 45 วินาที บรรจุตัวอ่อนในหลอดพลาสติกขนาด 0.25 มล. โดยดูดน้ำยา 1.0M VS3a เข้าไปก่อน ตามด้วยฟองอากาศและตัวอ่อนและฟองอากาศและปิดท้ายด้วยน้ำยา VS3a ปิดปลายด้วยหลอดพลาสติกที่บันทึกระยะและจำนวนตัวอ่อน ร่วมกับรายละเอียดของวันเดือนปีที่เก็บและแช่แข็งตัวอ่อน นำหลอดบรรจุตัวอ่อนแช่ลงทันทีในไนโตรเจนเหลว นาน 1 สัปดาห์ แล้วทดสอบการเจริญในหลอดทดลอง

การศึกษาผลของการเติมสาร cytochalasin-B ต่อการแช่แข็งตัวอ่อนแบบวิทรีฟิเกชั่น (การทดลองที่ 4)

ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการป้องกันโครงของเซลล์ด้วยการเติมสาร cytochalasin-B ในอัตราความเข้ม 5, 7.5 และ 10 μg/ml ในแต่ละความเข้มข้นนาน 30 นาที สาร cytochalasin-B นั้นละลายในน้ำยา TCM199 $NaHCO_3$+10+fetal calf serum แล้วจึงนำตัวอ่อนไปแช่แข็งตามวิธีข้างต้นด้วยวิธีวิทรีฟิเกชั่น

การย้ายฝากตัวอ่อน

นำตัวอ่อนที่ผ่านการแช่แข็ง เป็นตัวอ่อนที่ผ่านการแช่แข็งแบบความเร็วช้าจำนวน 30 ตัวอ่อน และที่แช่แข็งด้วยวิธีวิทรีฟิเกชั่น อีก 27 ตัวอ่อน ฝากในสุกรสาวตัวรับ 2 ตัว ที่เป็นสัดมาแล้ว 7 วัน โดยการผ่าตัดเปิดช่องท้องด้วยวิธีที่รายงานโดย Techakumphu and Tantasuparak (1991)

การประเมินผลการทดลอง

1. อัตราความปกติของตัวอ่อนหลังแช่เย็นและหลังแช่แข็ง

ประเมินการมีชีวิตของตัวอ่อนโดยดูจากอัตราการเก็บตัวอ่อน และอัตราของตัวอ่อนที่มีลักษณะตัวอ่อนปกติหลังทำการละลาย โดยแบ่งออกเป็น 3 เกรด ซึ่งดัดแปลงมาจาก Niemann และคณะ (1982) คือ

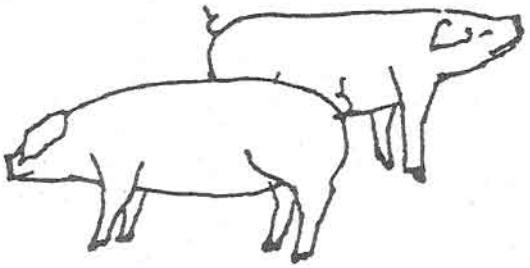
เกรด A : ไม่มีความเปลี่ยนแปลงใด ๆ เกิดขึ้นกับเซลล์ของตัวอ่อน

เกรด B : มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเล็กน้อย เช่น มีการเสียหายของบลาสโตเมียร์และ/หรือ ผนังตัวอ่อนมีการเหี่ยวตัวลงเล็กน้อย

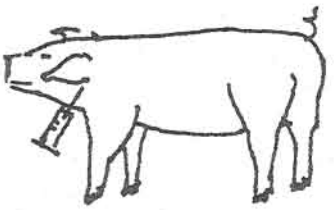
เกรด C: มีการแตกหรือสลายตัวของเปลือกโซน่า เพลลูซิดา และ/หรือเซลล์ของตัวอ่อน

2. อัตราการตั้งท้อง

ไดอะแกรมของแผนการทดลองแสดงในรูปที่ 1

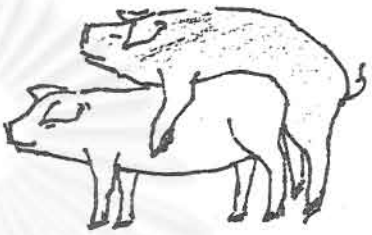


1. สุกรทดลอง



2. เหนี่ยวนำการเป็นสัดและการตกไข่

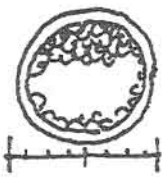
3. เป็นสัดยืนนิ่ง



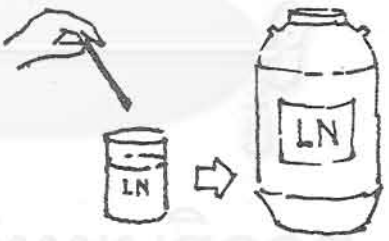
4. ผสมพันธุ์กับพ่อสุกร

5. เก็บตัวอ่อนด้วยวิธีผ่าตัด

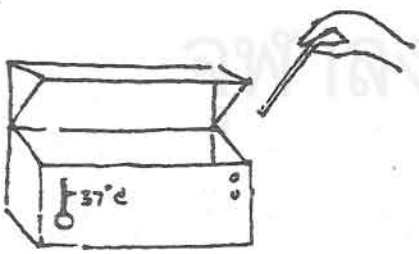
6. ตรวจหาและประเมินคุณภาพตัวอ่อน



7. วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของตัวอ่อน



8. แช่แข็งตัวอ่อนแบบความเร็วช้า ๆ หรือแบบวิทริฟิเคชั่น



9. ทำละลายตัวอ่อน

10. ประเมินผลการแช่แข็งตัวอ่อน

รูปที่ 1 ไดอะแกรมสรุปขั้นตอนการทดลอง

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการตอบสนองของรังไข่และการเก็บตัวอ่อน คำนวณเป็นค่าเฉลี่ยและเปอร์เซ็นต์ ในส่วนของการแช่แข็งวัดการรอดชีวิตของตัวอ่อนระยะ blastocyst ของแต่ละขนาด ประเมินโดยใช้ Chi-square test ดูอัตราการเก็บตัวอ่อนและอัตราของตัวอ่อนที่มีลักษณะปกติ

ผลการทดลอง

จากการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและการตกไข่สุกรสาวจำนวน 66 ตัว ในช่วงการทดลองระหว่างเดือน มิถุนายน 2540 ถึง เดือน มิถุนายน 2541 รวม 13 เดือน ด้วยการฉีดฮอร์โมน พีเอ็ม-เอสจี และเอชซีจี ในอัตราส่วน 400/200 ไอ.ยู. สามารถนับจำนวนไข่ตกได้ 1,116 ใบ แบ่งเป็นจากรังไข่ข้างซ้าย 570 ใบ เฉลี่ย 8.6±5.1 ใบต่อข้าง และจากรังไข่ข้างขวา 546 ใบ เฉลี่ย 8.3±5.3 ใบต่อข้าง เฉลี่ยเท่ากับ 16.9±9.2 ใบต่อตัว และเมื่อทำการชะล้างปีกมดลูกเพื่อเก็บตัวอ่อน สามารถเก็บตัวอ่อนได้จำนวน 605 ตัวอ่อน โดยแบ่งเป็นจากปีกมดลูกข้างซ้าย 303 เฉลี่ย 4.6±4.0 ตัวอ่อนต่อข้าง และจากปีกมดลูกข้างขวา 302 เฉลี่ย 4.6±3.1 ตัวอ่อนต่อข้าง เฉลี่ยแล้วสามารถเก็บตัวอ่อนได้ 9.2±6.0 ตัวอ่อนต่อสุกร 1 ตัว คิดเป็นอัตราการเก็บตัวอ่อนได้เท่ากับ 54.4%(605/1116) โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 44.4% ถึง 66.8% จากนั้นนำมาประเมินคุณภาพตัวอ่อนที่เก็บได้ พบว่าตัวอ่อนที่เก็บได้มีอัตราตัวอ่อนปกติเท่ากับ 75.04%(454/605) โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 42.7% ถึง100% คิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.9±4.6 ตัวอ่อนต่อตัว ดังแสดงรายละเอียดไว้ในตารางที่ 1 และ 2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 การตอบสนองของรังไข่และการเก็บตัวอ่อนจากสุกรสาวที่เหนี่ยวนำการเป็นสัดและการตกไข่

เดือน	จำนวนสุกร	การตอบสนองของรังไข่			ตัวอ่อนที่เก็บได้			(%)การเก็บตัวอ่อน*
		ซ้าย	ขวา	รวม	ซ้าย	ขวา	รวม	
มิย 2540	3	8.7 ±3.8	3.3 ±2.5	12.0 ±2.0	2.7 ±0.6	3.7 ±3.8	6.3 ±4.0	52.5%
กค	3	8.0 ±3.5	11.0 ±2.7	19.0 ±5.5	3.7 ±4.7	7.7 ±2.5	11.3 ±6.0	59.5%
สค	6	7.0 ±2.5	5.2 ±3.1	12.2 ±5.1	1.3 ±1.6	3.2 ±3.3	6.2 ±4.4	50.8%
กย	6	6.5 ±2.4	5.2 ±3.6	11.7 ±4.7	3.5 ±2.3	3.7 ±2.9	7.2 ±4.6	61.5%
ตค	6	5.0 ±1.4	7.5 ±3.1	12.5 ±3.3	2.8 ±1.3	4.8 ±1.3	7.7 ±2.2	61.1%
พย	4	5.3 ±1.7	11.8 ±7.1	17.0 ±8.1	2.3 ±1.9	5.3 ±4.3	7.5 ±6.1	44.7%
ธค	6	11.2 ±1.7	10.8 ±2.6	22.0 ±4.1	7.8 ±1.5	6.8 ±2.1	14.7 ±3.5	66.8%
มก2541	6	5.8 ±3.1	5.3 ±2.9	11.2 ±4.7	3.0 ±1.8	2.7 ±1.5	5.7 ±2.2	59.8%
กพ	8	9.8 ±4.1	7.0 ±3.6	16.8 ±6.3	5.8 ±2.8	3.1 ±3.1	9.6 ±4.9	57.1%
มีค	6	11.7 ±9.0	12.8 ±8.0	24.5 ±16.8	7.8 ±8.5	5.2 ±2.4	14.7 ±14.1	59.7%
เมย	4	5.5 ±3.4	7.3 ±6.3	12.8 ±7.3	2.0 ±1.4	3.8 ±3.9	5.8 ±3.3	53.1%
พค.	3	18.3 ±0.6	18.3 ±1.5	36.7 ±2.1	8.0 ±6.2	7.3 ±6.5	15.3 ±12.6	44.4%
มิย	6	11.3 ±7.3	6.7 ±4.3	18.0 ±10.6	5.3 ±4.5	4.0 ±2.8	9.3 ±6.3	51.7%
รวม	66	570	546	1116	303	302	605	
$\bar{X}$±SD		8.6 ±5.1	8.3 ±5.3	16.9 ±9.2	4.6 ±4.0	4.6 ±3.1	9.2 ±6.0	54.4%

*อัตราการเก็บตัวอ่อนเท่ากับค่าเฉลี่ยของจำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้/ค่าเฉลี่ยของจำนวนการตกไข่ x100

ตารางที่ 2 อัตราของตัวอ่อนปกติจากสุกรสาวที่เหนี่ยวนำการเป็นสัดและการตกไข่

เดือน	จำนวนสุกร	ตัวอ่อนที่เก็บได้ต่อตัว	ตัวออ่อนปกติที่เก็บได้ต่อตัว	(%)การเก็บตัวอ่อน
มิย 2540	3	6.3±4.0	4.3±3.5	68.3%
กค	3	11.3±6.0	10.3±7.6	91.1%
สค	6	6.2±4.4	5.6±4.3	90.3%
กย	6	7.2±4.6	7.0±4.7	97.2%
ตค	6	7.7±2.2	6.3±3.6	81.8%
พย	4	7.5±6.1	7.5±3.6	100%
ธค	6	14.7±3.5	8.8±4.5	59.8%
มก41	6	5.7±2.2	4.0±2.4	70%
กพ	8	9.6±4.9	8.0±3.7	83%
มีค	6	14.7±14.1	6.2±3.3	42.7%
เมย	4	5.8±3.3	4.8±2.5	82.7%
พค.	3	15.3±12.6	11.3±10.3	73.8%
มิย	6	9.3±6.3	7.0±5.8	75.2%
รวม	66	605	454	
$\bar{X}$±SD		9.2±6.0	6.9±4.6	75.04%

*อัตราตัวอ่อนปกติเท่ากับค่าเฉลี่ยของจำนวนตัวอ่อนปกติ/ค่าเฉลี่ยของจำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้ x100

ตารางที่ 3 แสดงผลการเก็บตัวอ่อนไว้ที่ 4°ซ ตัวอ่อนสุกรระยะต่าง ๆ ตั้งแต่ระยะ morula จนถึงระยะ blastocyst ไม่สามารถรอดหลังแช่เย็นที่ 4°ซ ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ (1-24 ชม.)

ตารางที่ 3 ผลของการแช่เย็นตัวอ่อนสุกรที่ 4°ซ

ระยะเวลาในการเก็บ (ชม.)	จำนวนตัวอ่อน	ระยะของตัวอ่อน				อัตรารอดของตัวอ่อน (%)
		M	EB	B	XB	
1	9	0	1	5	3	0
6	18	1	5	7	5	0
12	11	5	2	3	1	0
24	10	1	1	7	1	0
รวม	48	7	9	22	10	0

M = morula, EB = early blastocyst, B= Blastocyst, XB= Expanded blastocyst

จากตารางที่ 4 พบว่าตัวอ่อนสุกรที่แช่แข็งแบบลดอุณหภูมิช้า ๆ ในน้ำยาที่มีสารป้องกันการแช่แข็ง 3 ชนิด คือ glycerol DMSO และ ethylene glycol ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในแง่ของอัตราของตัวอ่อนปกติภายหลังทำละลาย โดยได้ตัวอ่อนปกติ เกรด A เท่ากับ 40%(8/20), 28%(7/25) และ 29.2%(7/24) ส่วนตัวอ่อนปกติรองลงมาคือ เกรด B เท่ากับ 5%(1/20), 16%(4/25) และ 25%(6/24) แต่มีแนวโน้มสำหรับตัวอ่อนที่แช่แข็งในน้ำยา ethylene glycol จะมีอัตรารอดของตัวอ่อน หากคิดรวมเกรด A+B สูงกว่าในกลุ่ม glycerol และ DMSO 54.3%(13/24) เปรียบเทียบกับ 45%(9/20) และ 44%(11/25) สำหรับอัตราของตัวอ่อนผิดปกติที่เสื่อมสลายหลังทำละลาย (เกรด C) ในแต่ละกลุ่มเท่ากับ 55%(11/20), 56%(14/25) และ 45.6%(11/24) ตามลำดับ

ตารางที่ 4 ผลของการแช่แข็งตัวอ่อนด้วยวิธีลดลดอุณหภูมิช้า ๆ ในน้ำยาที่สารป้องกันการแช่แข็ง glycerol, DMSO และ ethylene glycol

ชนิดของสารป้องกันการแช่แข็ง	จำนวนตัวอ่อน	คุณภาพของตัวอ่อนหลังทำละลาย			อัตรารอดของตัวอ่อน(%)
		A	B	C	
Glycerol	20	8 (40%)	1 (5%)	11 (55%)	9 (45%)
DMSO	25	7 (28%)	4 (16%)	14 (56%)	11 (44%)
Ethylene Glycol	24	7 (29.2%)	6 (25%)	11 (45.6%)	13 (54.3%)
รวม	69	22 (31.9%)	11 (15.9%)	36 (52.2%)	33(47.8%)

ตารางที่ 5 แสดงผลของการแช่แข็งของตัวอ่อนแบบบวิทรีฟีเกชั่น คิดเป็นอัตรารอด (เกรด A+B) เท่ากับ 59.8%(61/102) ตัวอ่อนขนาดเล็กมีอัตรารอดต่ำที่สุดเพียง 48.6%(17/35) ในขณะที่ตัวอ่อนขนาดกลางและขนาดใหญ่มีอัตรารอดเท่ากับ 65.7%(23/35) และ 65.6%(21/32) (P>0.05) ตัวอ่อนที่เสื่อมสลายในกลุ่มต่าง ๆ เท่ากับ ขนาดเล็ก 51.4%(18/35) ขนาดกลาง 34.2% (12/35) และขนาดใหญ่ 24.4%(11/32) รวมทั้ง 3 กลุ่มเท่ากับ 40.2% (41/102)

ตารางที่ 5 ผลของการแช่แข็งตัวอ่อนด้วยวิธีวิทรีฟีเกชั่น

ขนาดตัวอ่อน	จำนวนตัวอ่อน	อัตรารอดของตัวอ่อน (%)	อัตราของตัวอ่อนที่เสื่อมสลาย (%)
ขนาดเล็ก (<150 μm)	35	17 (48.6%)	18 (51.4%)
ขนาดกลาง (150-300 μm)	35	23 (65.7%)	12 (34.2%)
ขนาดใหญ่ (>300 μm)	32	21 (65.6%)	11 (34.3%)
รวม	102	61 (59.8%)	41 (40.2%)

หากทำการเปรียบเทียบระหว่างตัวอ่อนที่ถูกแช่แข็งโดยลดอุณหภูมิช้า ๆ และวิธีวิทรีฟีเกชั่น พบว่าอัตราของตัวอ่อนปกติหลังทำละลายมีแนวโน้มสูงในวิธีวิทรีฟีเกชั่นกว่าวิธีลดอุณหภูมิช้า ๆ แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เท่ากับ 47.8% เทียบกับ 59.8%(P>0.05, ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบอัตรารอดของตัวอ่อนหลังแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิช้า ๆ และแบบวิทรีฟีเกชั่น

ชนิดของวิธีการแช่แข็ง	จำนวนตัวอ่อน	อัตราของตัวอ่อนปกติ (%)	อัตราของตัวอ่อนเสื่อมสลาย (%)
แบบช้า ๆ	69	33 (47.8%)	36 (52.2%)
แบบวิทรีฟีเกชั่น	102	61 (59.8%)	41 (40.1%)

จากตารางที่ 7 แสดงผลการเติม cytochalasin-B ต่ออัตรารอดของตัวอ่อนหลังแช่แข็งแบบวิทรีฟีเกชั่น พบว่าระดับความเข้มข้นที่ 7.5 และ 10 μg/ml มีแนวโน้มของอัตรารอดของตัวอ่อนที่สูงกว่าที่ 5.0 μg/ml แต่ไม่มีนัยสำคัญ 65%(17/26) , 67%(20/30) เทียบกับ 46.4% (13/28) ซึ่งมีค่าเฉลี่ยทั้งสามกลุ่มเท่ากับ 60%(50/84) มีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่มี cytochalasin-B 46%(13/28)

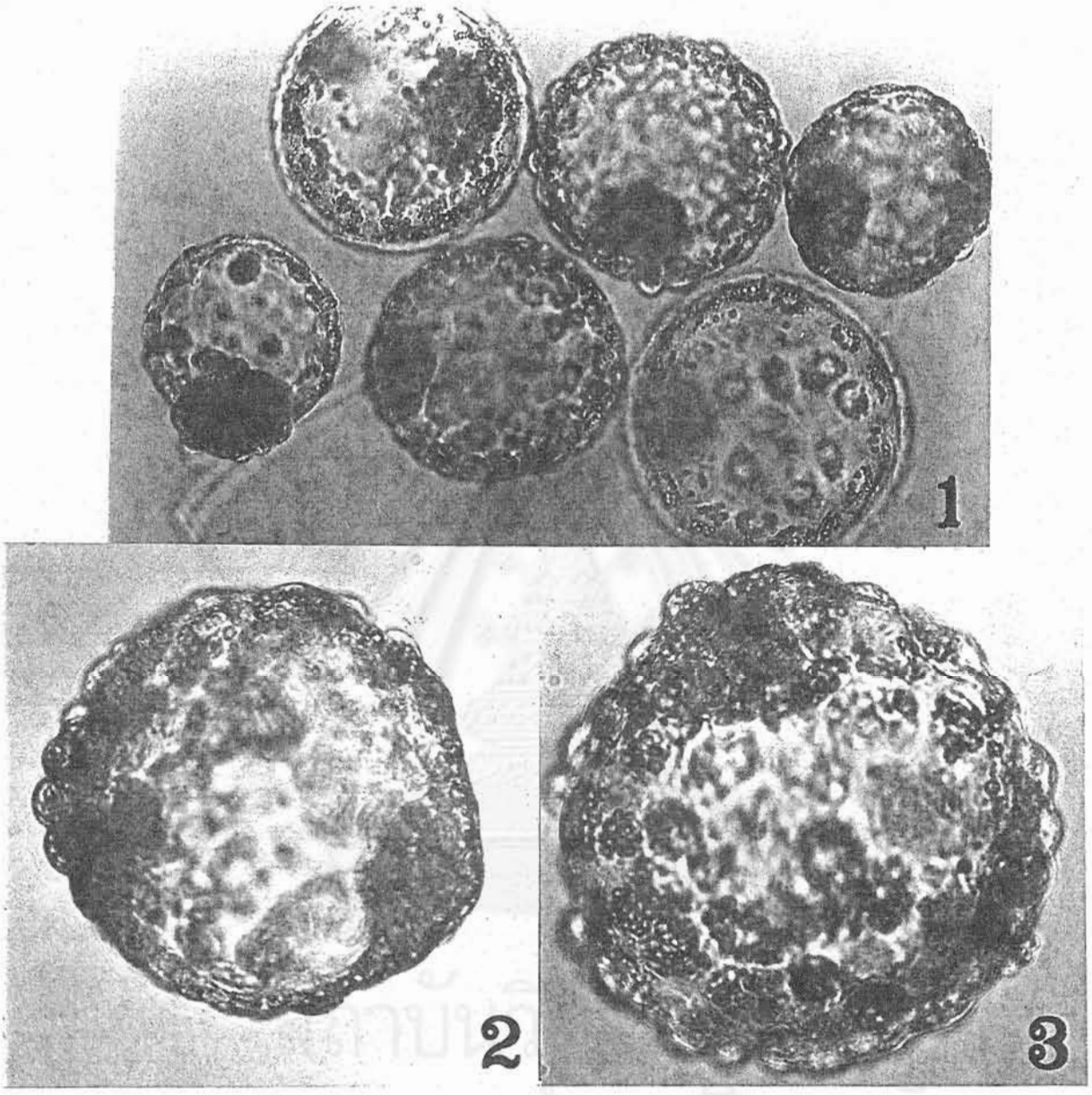
ตารางที่ 7 ผลของ cytochalasin-B ต่อการแช่แข็งตัวอ่อนแบบวิทรีฟีเกชั่น

ความเข้มข้น (μg/ml)	จำนวนตัวอ่อน	คุณภาพของตัวอ่อนหลังทำละลาย			อัตรารอดของตัวอ่อน (%)
		A	B	C	
5	28	4 (14%)	9 (32%)	15 (54%)	13(46.4%)
7.5	26	5 (19%)	12 (46%)	9 (35%)	17 (65%)
10	30	10 (33%)	10 (33%)	10 (33%)	20(67%)
รวม	84	19(27%)	31 (37%)	34 (41%)	50 (60%)
กลุ่มควบคุม*	28	5 (18%)	8 (29%)	15 (54%)	13 (46.4%)

*กลุ่มควบคุม ไม่สัมผัสกับ cytochalasin-B

สำหรับผลการย้ายฝากตัวอ่อนได้ทำการย้ายฝากตัวอ่อนที่ได้จากการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิช้า ๆ จำนวน 30 ตัวอ่อนและวิธีวิทรีฟีเกชั่น จำนวน 27 ตัวอ่อนพบว่าไม่มีสุกรตัวรับแสดงอาการตั้งท้องและมีการกลับการเป็นสัดตรงรอบ

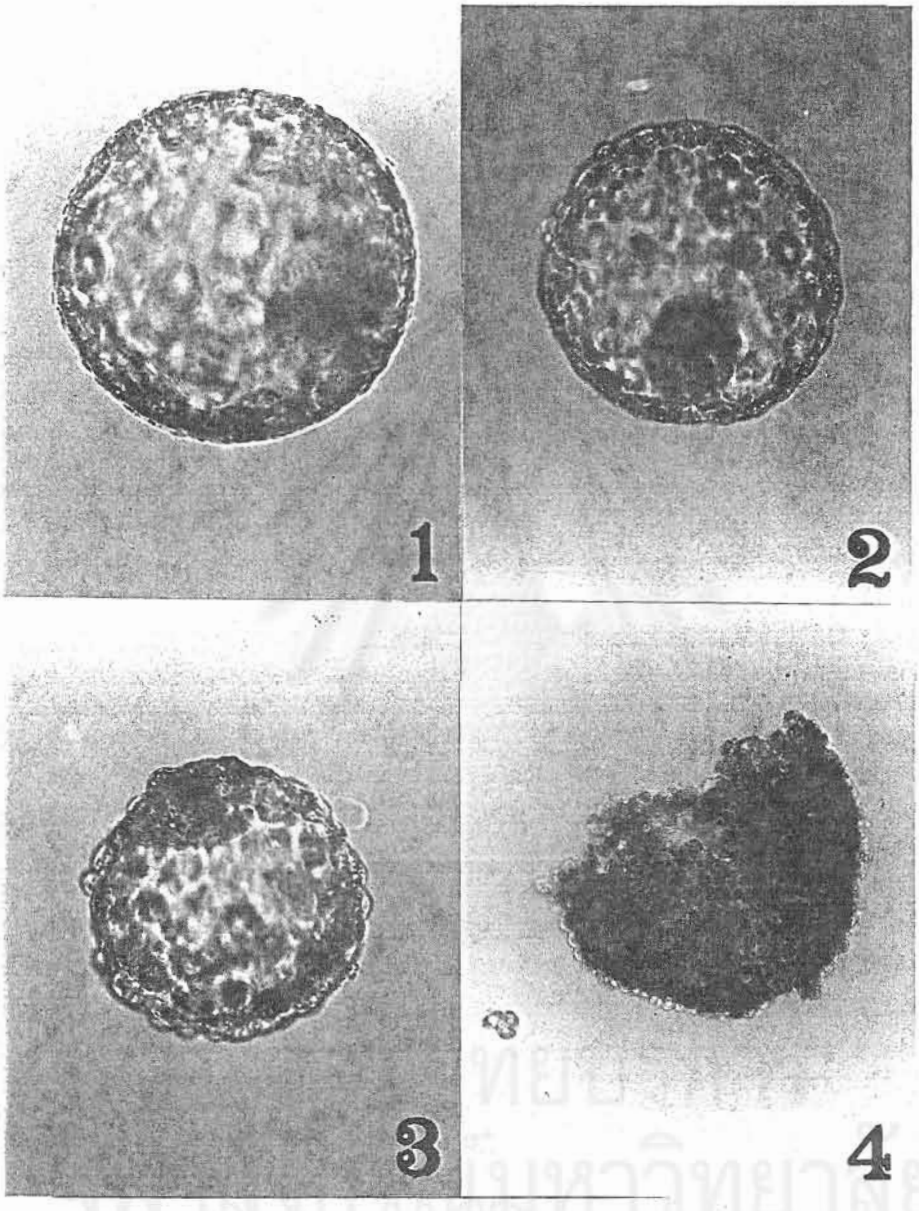
I18434472



รูปที่ 2 ภาพของตัวอ่อนที่ได้รับการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิช้า ๆ

1. ตัวอ่อนระยะ expanded blastocyst ก่อนทำการแช่แข็ง
2. ตัวอ่อนเกรด A หลังแช่แข็ง
3. ตัวอ่อนเกรด B หลังแช่แข็ง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 ภาพของตัวอ่อนที่ได้รับการแช่แข็งแบบวิทรีฟิเกชั่น

1. ตัวอ่อนระยะ expanded blastocyst ก่อนทำการแช่แข็ง
2. ตัวอ่อนเกรด A หลังแช่แข็ง
3. ตัวอ่อนเกรด B หลังแช่แข็ง
4. ตัวอ่อนเกรด C หลังแช่แข็ง

วิจารณ์

ผลของการฉีดฮอร์โมนเหนี่ยวนำการเป็นสัดและการตกไข่พบว่าสอดคล้องกับรายงานของมงคลและคณะ (2530) และ ดวงใจ และคณะ (2538) โดยสุกรแสดงการเป็นสัดและยอมรับการผสมภายหลังการฉีด 4-5 วัน สารประกอบฮอร์โมนดังกล่าวมีผลต่อการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่และกระบวนการสมบูรณ์พันธุ์ของโอโอไซต์ภายในฟอลลิเคิลและยังร่วมทำให้เกิดการตกไข่ได้สูงกว่าระดับปกติ แต่มีข้อควรคำนึงในการใช้คือ การเพิ่มปริมาณของฮอร์โมนนี้ในช่วงปลายของระยะลูเตียลอาจไม่ได้ผลในการกระตุ้นการเป็นสัด และทำให้เกิดถุงน้ำที่รังไข่ได้ ในการทดลองนี้ใช้สุกรสาวเป็นแหล่งผลิตตัวอ่อนซึ่งนับว่ามีราคาถูกและจัดการง่ายในการผสมพันธุ์ การใช้แม่พันธุ์ที่กำลังให้ผลผลิต (ครอกที่ 2-5) อาจมีข้อดีในแง่ของคุณภาพของตัวอ่อนแต่เป็นไปได้ยากในการทดลองที่จะจัดซื้อแม่พันธุ์ที่กำลังให้ผลผลิตในฟาร์ม ยกเว้นในแม่พันธุ์ที่ถูกคัดออกจากฝูง ซึ่งอาจเป็นแม่พันธุ์ที่มีปัญหาด้านสุขภาพหรือความผิดปกติทางระบบสืบพันธุ์ อาทิเช่น มีการติดเชื้อในโพรงมดลูก หรือมีปัญหาลูกต่อครอกต่ำ หรืออาจเป็นแม่แก่ให้ลูกมากครอกแล้ว ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้เลือกเอาสุกรสาวเป็นแหล่งผลิตตัวอ่อน ในการทดลองนี้จำนวนตัวอ่อนที่สามารถเก็บได้จากการทดลองครั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนไข่ที่ตกพบว่ามีประมาณ 50% คาดว่าเป็นผลมาจากเทคนิคการเก็บตัวอ่อน เช่น ตำแหน่งที่เลือกทำการสอดท่อโฟเลย์อยู่ห่างจากจุดเชื่อมของท่อนำไข่และปีกมดลูกไม่มากพอ แม้ในการทดลองนี้ได้เก็บตัวอ่อนจากการวางตำแหน่งของท่อโฟเลย์รับตัวอ่อนห่างจากจุดต่อของท่อนำไข่และมดลูกประมาณ 50 ซม. ก็ตาม ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าตัวอ่อนจะเกิดการเสื่อมสลายในมดลูกเนื่องจากเป็นตัวอ่อนระยะ blastocyst ที่เก็บหลังจากการผสมอย่างน้อย 7 วัน ตัวอ่อนระยะ blastocyst ที่เก็บได้ก็มีความผันแปรในเรื่องของขนาดโดยส่วนใหญ่มีขนาดกลางและใหญ่รวมกันมากกว่า 70% ในขณะที่ขนาดเล็กประมาณ 27% (ไม่ได้แสดงข้อมูลในผลการทดลอง) และระยะของการพัฒนาตัวอ่อนก็มีความผันแปรด้วยคือมีระยะตั้งแต่ early blastocyst, blastocyst, expanded blastocyst และ hatched blastocyst ซึ่งคาดว่าเกิดจากการตกไข่ไม่พร้อมกันและความเร็วของการพัฒนาของตัวอ่อนแต่ละตัวไม่เท่ากัน ตัวอ่อนปกติที่ได้จากกระตุ้นและนำไปใช้ในการแช่แข็งมีประมาณ 75% คิดเป็นตัวอ่อนปกติต่อตัวเท่ากับ 6.9 ตัวอ่อนต่อสุกรสาวตัวให้หนึ่งตัว จากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการผลิตตัวอ่อนเพื่อใช้ในการแช่แข็งเป็นสิ่งที่ทำได้ไม่ง่ายนัก แม้ว่าสุกรจะมีอัตราการตกไข่สูงเมื่อเทียบกับสัตว์ชนิดอื่น ๆ แต่จำนวนตัวอ่อนปกติที่ได้มีไม่มากเท่ากับจำนวนการตกไข่ สิ่งที่ควรพิจารณาคือความเหมาะสมของการใช้สุกรสาวเพื่อเป็นแหล่งผลิตตัวอ่อนและควรปรับปรุงคุณภาพของตัวอ่อนจากการตกไข่ธรรมชาติแทนการกระตุ้นรังไข่ รวมทั้งปรับปรุงวิธีการเก็บตัวอ่อนด้วย สำหรับในการทดลองนี้ได้เลือกเอาเฉพาะตัวอ่อนระยะ blastocyst และระยะ expanded blastocyst ในการแช่แข็งตัวอ่อน

ผลการแช่เย็นของตัวอ่อนของสุกรไม่ประสบความสำเร็จในแง่ของการนำไปแช่เย็นที่ 4°ซ และนำกลับไปวัดผลด้วยการเลี้ยงในหลอดทดลอง พบว่าไม่มีตัวอ่อนใดเลยที่พัฒนาในหลอดทดลองแม้จะเก็บไว้เพียง 1 ชม. ในสารละลายที่มีสารป้องการแช่แข็งชนิด DMSO เนื่องจากตัวอ่อนสุกรมีความไวต่อการแช่แข็งมาก โดยเฉพาะที่อุณหภูมิต่ำกว่า 15°ซ (Wilmut, 1972; Polge *et al.*, 1974; Pollard and Leibo, 1994) Wilmut (1972) พบว่าตัวอ่อนสุกรระยะ 8 เซลล์ที่สัมผัสกับอุณหภูมิ 15°ซ จะมีอัตรารอดสูงถึง 84% แต่ตัวอ่อนไม่รอดเลยหลังจากสัมผัสที่อุณหภูมิ 10°ซ Pollard และ Leibo (1994) ได้เสนอแนะว่าตัวอ่อนสุกรระยะ morula หรือระยะ blastocyst จะค่อนข้างไวต่อการแช่แข็งเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อนระยะเดียวกันของโค และที่อุณหภูมิต่ำกว่า 15°ซ จะมีผลกระทบอย่างมากต่ออัตรารอดของตัวอ่อนสุกร โดยทุก ๆ 1°ซ ที่ลดลงจะทำลายเซลล์ของตัวอ่อน โดยหากทำการแช่เย็นตัวอ่อนสุกรที่อุณหภูมิ 15°ซ จะได้อัตรารอดถึง 90% แต่หากลดลงไปเป็น 14°ซ จะเหลือเพียง 5% เท่านั้น และที่อุณหภูมิน้อยกว่าหรือเท่ากับ 13°ซ จะไม่มีตัวอ่อนรอดชีวิตเลย จากข้อมูลที่ได้นี้เป็นการยืนยันการทดลองข้างต้นที่ไม่สามารถเก็บตัวอ่อนไว้ที่ 4°ซ ซึ่งแตกต่างกับในโคที่ตัวอ่อนระยะ blastocyst ที่สามารถทนต่อความเย็นที่ 0°ซ ได้ (Wilmut, 1972) และยังมีรายงานว่าการแช่แข็งด้วยการลดอุณหภูมิช้า ๆ ก็จะเป็นอันตรายโดยตรงต่อความอยู่รอดของตัวอ่อน เพราะขณะแช่แข็งสารรอบ ๆ ตัวอ่อนจะถูกทำให้เย็นลงประมาณ 1°ซ/นาที ที่อุณหภูมิประมาณ –6°ซ ดังนั้นการแช่แข็งด้วยความเร็วสูงเช่นการแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเคชั่นน่าจะเหมาะสมกับการแช่แข็งตัวอ่อนสุกรเพราะวิธีนี้จะหลีกเลี่ยงอันตรายของเกล็ดน้ำแข็งในเซลล์ ซึ่งเป็นเหตุผลสำคัญในการทำลายของตัวอ่อนจากการแช่แข็ง โดยตัวอ่อนจะถูกทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วด้วยการจุ่มลงไนโตรเจนเหลวโดยตรง (Dobrinsky and Johnson, 1994) ซึ่งสอดคล้องกับ Niemann (1991) และ Kasai และคณะ (1990) ที่เสนอแนะว่าวิธีการแช่แข็งใด ๆ ก็ตามอาทิเช่น วิธีวิทริฟิเคชั่นที่ไม่ทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งทั้งภายในและภายนอกเซลล์ซึ่งเป็นอันตรายต่อตัวอ่อนระหว่างกระบวนการแช่แข็งจะทำให้ตัวอ่อนมีโอกาสรอดมากกว่า ในขณะที่วิธีการลดอุณหภูมิลงอย่างช้า ๆ นั้น ทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งภายนอกเซลล์ และทำให้เซลล์สูญเสียน้ำออกไปมากกว่า ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการตายของตัวอ่อน เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติกอย่างฉับพลันขณะละลายตัวอ่อน (Williums and Johnson, 1986; Men *et al.*, 1997) ส่วนวิทริฟิเคชั่นทำให้เกิดการสูญเสียน้ำออกนอกเซลล์เพียงบางส่วนเท่านั้น โอกาสที่ตัวอ่อนจะตายจากการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติกอย่างฉับพลันจึงมีน้อยกว่า (Valdez *et al.*, 1990) มีรายงานบางฉบับกล่าวว่าการแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเคชั่นมีอัตราความอยู่รอดมากกว่าวิธีลดอุณหภูมิลงอย่างช้า ๆ เล็กน้อย แต่อัตราการฟักออกจากเปลือกหุ้มไม่มีความแตกต่างกัน (Dinnyes *et al.*, 1996) ข้อคิดเห็นดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยนี้เพราะตัวอ่อนสุกรที่แช่แข็งตัวอ่อนแบบวิทรีฟิเคชั่นให้อัตราของการรอดหลังทำละลายสูงกว่าวิธีที่ใช้ความเร็วช้าประมาณ 30%

การแช่แข็งวิธีวิทริฟิเคชั่นยังมีข้อดีอื่น ๆ อีกเช่น ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายเพราะไม่ต้องใช้เครื่องมือควบคุมอัตราการแช่แข็ง ใช้เครื่องมือน้อยชิ้น (Massip *et al.*, 1987; Palasz *et al.*, 1997) และสะดวกต่อการนำไปปฏิบัติจริงในภาคสนาม (Niemann, 1991) แต่อย่างไรก็ตามสารป้องกันการแช่แข็งที่ใช้ในวิทริฟิเคชั่นก็มีพิษต่อตัวอ่อนสุกรด้วย (Weber *et al.*, 1992; Dobrinsky and Johnson, 1993) เพราะการแช่แข็งด้วยวิธีนี้ต้องการความเข้มข้นของสารป้องกันการแช่แข็งสูง เพื่อให้เกิดลักษณะคล้ายแก้วใสที่มีรูปร่างไม่แน่นอน ผลเสียของสารป้องกันการแช่แข็งที่มีความเข้มข้นสูงนี้ จะทำให้ตัวอ่อนหดตัวอย่างรุนแรงและอาจทำให้ผนังเซลล์แตกสลายได้ (Valdez *et al.*, 1990; Men *et al.*, 1997) นอกจากนี้สารป้องกันการแช่แข็งยังทำให้เกิดความเสียหายต่อไมโครฟิลาเมนต์และไมโครทิวบูลซึ่งเป็นโครงของเซลล์อย่างถาวร (Overstrom *et al.*, 1993; Hochi *et al.*, 1996) ดังนั้นเพื่อลดความเสียหายที่เกิดจากสารป้องกันการแช่แข็งที่มีความเข้มข้นสูงจึงควรเพิ่มความเข้มข้นของ สารป้องกันการแช่แข็งทีละขั้น ในขณะเดียวกับลดเวลาที่ตัวอ่อนสัมผัสสารดังกล่าวลงเพื่อให้ตัวอ่อนได้มีเวลาปรับตัว (Rall and Fahy, 1985; Smorag *et al.*, 1989; Zhu *et al.*, 1993) และหลังจากทำการละลายตัวอ่อนแล้วควรนำสารป้องกันการแช่แข็งออกให้มากที่สุด

ในการแช่แข็งตัวอ่อนสุกรส่วนใหญ่ที่ใช้ความเร็วช้า ๆ พบว่ามักใช้สาร glycerol เป็นสารป้องกันการแช่แข็งซึ่งได้อัตรารอดใกล้เคียงกับการทดลอง อัตรารอดของตัวอ่อนระยะ expanded blastocyst เท่ากับ 51.5% (Nagashima *et al.*,1992) และ 36.1% (Wu *et al.*, 1997) glycerol เป็นสารป้องกันเซลล์ของตัวอ่อนชนิดแรก ๆ ที่มีผู้นิยมใช้ทั้งในการแช่แข็งตัวอสุจิสุกรและสัตว์อื่น ๆ รวมทั้งการแช่แข็งตัวอ่อนในระยะแรก ต่อมาได้มีการพัฒนาเลือกใช้สารป้องกันการแช่แข็งชนิดอื่น ๆ เช่น DMSO, propandiol, propylene glycol จนถึงปัจจุบันมีผู้นิยมใช้ ethylene glycol เป็นต้น ในการทดลองนี้ได้เลือกเอาสารป้องกันการแช่แข็งชนิดซึมผ่านเซลล์ได้ 3 ชนิด คือ ethylene glycol DMSO และ glycerol ซึ่งเป็นสารที่นิยมในการแช่แข็งตัวอ่อนโดยทั่วไป และมีความเป็นพิษน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับสารป้องกันการแช่แข็งแบบอื่น ๆ (Valdez *et al.*, 1992) ในการเปรียบเทียบอัตรารอดของตัวอ่อนหลังจากการใช้สารป้องกันการแช่แข็งทั้งสามชนิดพบว่าให้อัตรารอดอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้คือประมาณ 50% ไม่พบว่ามีความแตกต่างของชนิดของสารป้องกันการแช่แข็งตัวอ่อนทั้งสามชนิด แต่มีแนวโน้มว่าตัวอ่อนที่แช่แข็งในสาร ethylene glycol จะมีอัตราของตัวอ่อนปกติสูงกว่า ethylene glycol เป็นสารป้องกันการแช่แข็งที่ปัจจุบันมีผู้นิยมใช้มากเนื่องจากผ่านข้าออกเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว เพราะมีน้ำหนักโมเลกุล (62.07) ที่ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ glycerol (92.1) และ DMSO (78.13) และยังเป็นพิษน้อยกว่าแม้จะให้ตัวอ่อนของหนูเม้าส์สัมผัสในความเข้มข้นถึง 30% นาน 10 นาที โดยมีอัตรารอดสูงถึง 70% ในขณะที่สาร glycerol และ DMSO มีอัตรารอดเพียง 22% และ 25% เท่านั้น (Valdez *et al.*, 1992) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kasai และคณะ (1990) ที่แสดงให้เห็นว่าอัตรารอดของตัวอ่อนหนูเม้าส์ระยะ morula ที่แช่แข็งแบบวิทรีฟิเคชั่นในสารละลายที่มี ethylene glycol สูงกว่า glycerol และ propylene glycol

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Arceo และคณะ (1998) เสนอแนะว่า ethylene glycol ชนิดเดียวในระดับความเข้มข้นสูงถึง 40% ใช้ในการป้องกันตัวอ่อนขณะแช่แข็งได้หรืออาจใช้ ethylene glycol ร่วมกับสารตัวอื่น ๆ ได้ เช่น น้ำยา VS1 (5.5M ethylene glycol+2.5M glycerol) , VS11 (6.0M ethylene glycol+1.8 M glycerol) หรือ VS14 (5.5 ethylene glycol +1M sucrose) เป็นต้น (Ali and Shelton, 1993)

ระยะของตัวอ่อนจะมีผลต่อความสำเร็จในการแช่แข็งโดยตัวอ่อนสุกรระยะแรก ๆ (2-16 เซลล์) ค่อนข้างไวต่อการแช่แข็งและมีอัตรารอดต่ำมากหลังทำละลาย ในขณะที่ตัวอ่อนระยะ morula และ blastocyst เริ่มมีความทนต่อการแช่แข็งมากกว่าระยะแรก ในการแช่แข็งตัวอ่อนโดนิยมใช้ตัวอ่อนระยะ morula หรือ blastocyst ส่วนการแช่แข็งตัวอ่อนสุกรมีความแตกต่างกับการแช่แข็งตัวอ่อนชนิดอื่น ๆ โดยพบว่าระยะที่ดีที่สุดที่ทนต่อการแช่แข็งคือตัวอ่อนระยะ exapanded blastocyst และ hacthed blastocyst (Nagashima *et al.*, 1992) Wu และคณะ (1997) ได้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Nagashima และคณะ (1992) โดยตัวอ่อนระยะ hatched blastocyst มีอัตรารอดสูงถึง 75.6% รองลงมาคือตัวอ่อนระยะ expanded blastocyst 36.1% และตัวอ่อนระยะ early blastocyst 5.9% ซึ่งยังต่ำกว่าตัวอ่อนระยะ morula เท่ากับ 36.1% สำหรับตัวอ่อนระยะ 1-8 เซลล์มีอัตรารอดต่ำกว่า 10% ทั้งสิ้น ในการทดลองนี้พบว่าในการก็บตัวอ่อนแต่ละครั้งในวันที่ 6-7 หลังผสมสุกร มีโอกาสที่จะพบตัวอ่อนระยะต่าง ๆ ตั้งแต่ morula จนถึง expanded blastocyst ทั้งนี้จากความเป็นจริงที่ว่าการตกไข่ในสุกรนั้นเกิดไม่พร้อมกัน โอโอไซต์ที่ได้ปฏิสนธิก่อนมีโอกาสที่จะพัฒนาได้เร็วกว่าหรืออาจเป็นไปได้ว่าตัวอ่อนแต่ละตัวมีอัตราการพัฒนาแตกต่างกัน ในการทดลองนี้ยังพบว่าขนาดของตัวอ่อนระยะ expanded blastocyst มีผลต่อความสำเร็จในการแช่แข็งตัวอ่อน โดยตัวอ่อนขนาดใหญ่ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 300 μm และตัวอ่อนขนาดกลาง ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางระหว่าง 150-300 μm มีโอกาสรอดจากการแช่แข็งมากกว่าตัวอ่อนขนาดเล็กที่มีขนาดน้อยกว่า 150 μm ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Nagashima และคณะ (1992) ทั้งนี้อาจกล่าวได้ว่าขนาดของตัวอ่อนจะมีผลต่อคุณภาพของตัวอ่อนที่เก็บได้ โดยหากเป็นตัวอ่อนที่คุณภาพดีควรมีการขยายตัวที่เต็มที่ ในทางตรงกันข้ามหากเป็นตัวอ่อนขนาดเล็กอาจเป็นตัวอ่อนที่เกิดการขยายตัวไม่เต็มที่หรือเป็นตัวอ่อนที่กำลังเสื่อมลง ดังนั้นการแช่แข็งตัวอ่อนให้ได้ผลสำเร็จจึงควรคัดเลือกตัวอ่อนจากระยะและขนาดของตัวอ่อนที่เหมาะสม

ในการแช่แข็งตัวอ่อนสุกรทั้งวิธีช้าและวิธีวิทรีฟิเกชั่น พบว่ามีตัวอ่อนอย่างน้อย 40-50% เกิดความเสียหายเกิดขึ้น เหตุผลประการแรกคือความเสียหายที่เกิดจากเกล็ดน้ำแข็งนอกเซลล์และในเซลล์ ซึ่งการแช่แข็งแบบวิทรีฟิเกชั่นจะได้เปรียบกว่าการแช่แข็งแบบช้าเพราะไม่เกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ ส่วนเหตุผลประการที่สอง คือการที่ตัวอ่อนสุกรไม่สามารถทนความเย็นได้เพราะมีไขมันอยู่ในเซลล์จำนวนมาก (Nagashima *et al.*, 1992) ซึ่งทำให้ไว (sensitive) ต่อการแช่เย็นได้และปริมาณของไขมันในเซลล์ตัวอ่อนสุกรระยะ blastocyst จะลดลงหลังจากหลุดออกจากเปลือกหุ้ม คาดว่าไขมันเหล่านี้จำเป็นสำหรับการฟักตัวออกจากเปลือกหุ้มและเพื่อให้มี

พัฒนาการเป็นไปอย่างปกติ ดังนั้นอัตราการรอดชีวิตภายหลังการแช่แข็งตัวอ่อนจะสูงสุดในช่วงหลุดออกจากเปลือกหุ้มใหม่ ๆ (Dobrinsky and Johnson, 1994) จึงเป็นเหตุผลที่ใช้ตัวอ่อนระยะ hatched blastocyst ในการแช่แข็งในสุกรมากกว่าตัวอ่อนระยะ early blastocyst มีรายงานหลายฉบับกล่าวว่าตัวอ่อนสุกรที่แช่แข็งแล้วนำมาเลี้ยงเพื่อดูอัตราการรอดชีวิตหลังการละลายตัวอ่อนที่ 24 ชม. อยู่ในเกณฑ์ค่อนข้างต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองนี้ที่ตัวอ่อนที่ได้จะมีอัตรารอดต่ำหลังแช่แข็ง

แนวทางการแก้ไขการแช่แข็งตัวอ่อนเพื่อให้อัตรารอดสูงขึ้น ทำโดยการปรับสภาพตัวอ่อนโดยใช้สาร cytochalasin-B ซึ่งช่วยทำให้โครงสร้างของเซลล์มีความคงทนต่อกระบวนการแช่แข็งดีขึ้น (Nagashima *et al.*, 1995; Nagashima *et al.*, 1996; Dobrinsky *et al.*, 1997) จากผลของการเติม cytochalasin-B ในการทดลองนี้โดยให้ตัวอ่อนสัมผัสกับสารดังกล่าวข้างต้นก่อนนำไปแช่แข็งแบบวิทรีฟิเกชั่นอย่างน้อย 30 นาทีในตู้อบ ทำให้ตัวอ่อนมีอัตราการรอดสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารดังกล่าวอยู่ โดยพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมอยู่ระหว่า 5.0-10 ug/ml โดยแนวโน้มพบว่าความเข้มข้นสูงจะเหมาะสมกว่า สาร cytochalasin-B ทำหน้าที่ป้องกันการแตกของสายโพลีเมอร์ของโปรตีนแอคติน (actin) ที่เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างของไมโครฟิลาเมนท์เรียกสั้น ๆ ว่า "microfilament inhibitor" ส่วน colchicine เป็น microtubule inhibitor ของโปรตีนทิวบูลิน (tubulin) เซลล์ที่สัมผัสกับสารชนิดนี้จะหยุดการแบ่งตัวจึงอาจเรียกว่า "antimitotic drug" colchicine ตามปกติสามารถใช้เป็นยาต้านมะเร็งได้ เช่นเดียวกับยา Taxol ที่สกัดมาจากพืช *Taxus brevifolia* ซึ่งเป็น tubulin stabilizer นอกจากสารรักษาโครงของเซลล์ตัวอ่อนแล้ว ได้มีการใช้ antifreeze proteins (AFP) ซึ่งแยกได้จากปลาในทวีปแอนตาร์กติก โดยให้ตัวอ่อนสัมผัสสารพวกนี้ก่อนการแช่แข็ง พบว่าโปรตีนดังกล่าวไม่สามารถช่วยเพิ่มอัตรารอดของตัวอ่อนหลังแช่แข็งได้โดยอัตรารอดของตัวอ่อนไม่แตกต่างกับกลุ่มตัวอ่อนที่ไม่ได้แช่แข็ง (Ohlrichs *et al.*, 1996)

สำหรับแนวทางอื่นที่เป็นไปได้ในการแช่แข็งตัวอ่อนสุกร วิธีหนึ่งที่มีผู้เสนอคือการดูดเอาไขมันออกจากเซลล์ของตัวอ่อนด้วยวิธีทางจุลศัลยกรรม เรียกว่า "delipidization" (Nagashima *et al.*, 1994, 1995) เพื่อลดปริมาณของไขมันที่เป็นตัวปัญหาในการแช่แข็งตัวอ่อนสุกร แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือต้องอาศัยความชำนาญ ยุ่งยาก ใช้เครื่องมือราคาแพงจึงไม่เป็นที่นิยมในทางปฏิบัติ อีกวิธีหนึ่งซึ่งมีผู้รายงานเมื่อเร็ว ๆ นี้ โดย Vajta และคณะ ในปี 1997 เรียกวิธีนี้ว่า " OPS (Open Pulled Straw) โดยมีจุดประสงค์เพื่อลดปริมาตรของน้ำยาต่อพื้นผิวสัมผัสของตัวอ่อนซึ่งเชื่อว่าหากอัตราส่วนระหว่างปริมาตรต่อพื้นผิวสูงทำให้เกิดความเสียหายได้ (osmotic injuries) วิธีนี้ทำโดยแช่แข็งตัวอ่อนแขวนลอยในน้ำยาที่มีปริมาตรน้อยที่สุดเท่าที่จะทำได้ เพื่อลดการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ (extracellular and intracellular ice formation) ที่เป็นตัวการสำคัญในการทำลายเซลล์ของตัวอ่อน การแช่แข็งทำโดยบรรจุตัวอ่อนในหลอดพลาสติกที่ลดเส้นผ่าศูนย์

กลางจาก 1.7 มม. เป็น 0.8 มม. และจากความหนา 0.15 มม. เหลือ 0.07 มม. ตัวอ่อนจะถูกดูดเข้าไปในหลอดพลาสติกจากแรงดูดภายใน (capillary effect) ซึ่งจะมีปริมาตรเหลือเพียง 1-1.5 ไมโครลิตรเท่านั้น จากนั้นแช่แข็งตัวอ่อนด้วยวิธีวิทรีฟีเกชั่น ด้วยวิธีนี้พบว่าประสบผลสำเร็จในการแช่แข็งตัวอ่อนโคอายุ 2, 3 และ 4 วัน โดยได้อัตรารอดพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะblastocyst ถึง 27, 43 และ 52% (Vajta *et al.*, 1997a) ในขณะที่การแช่แข็งในน้ำยาปริมาตร 180 ไมโครลิตร ในหลอดพลาสติก ไม่มีตัวอ่อนที่พัฒนาเลย ได้มีการทดลองใช้วิธี OPS ในการแช่แข็งตัวอ่อนระยะต่าง ๆ ของสุกร แบบวิทรีฟีเกชั่น พบว่าตัวอ่อนสุกรมีอัตรารอดสูงทั้งตัวอ่อนระยะต้น ๆ (2-8 เซลล์) และตัวอ่อนระยะ morula ส่วนตัวอ่อนระยะ blastocyst มีอัตรารอดในหลอดทดลองถึง 91%(48/53) และมีอัตราการฟักจากเปลือกเท่ากับ 67%(26/39) (Vajta *et al.*, 1997b)

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการแช่แข็งตัวอ่อนสุกรด้วยวิธีวิทรีฟีเกชั่นมีความเป็นไปได้ โดยสังเกตจากอัตราการเก็บตัวอ่อน และลักษณะปกติของตัวอ่อนภายหลังการแช่แข็ง อย่างไรก็ตามพบว่าอัตรารอดของตัวอ่อนในหลอดทดลอง และจากการย้ายฝากยังไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากตัวอ่อนสุกรไวต่อการแช่แข็งมาก จากรายงานโดยทั่วไปพบว่าอัตราการรอดจากการย้ายฝากอยู่ในเกณฑ์ที่ต่ำมากและไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควรเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์เศรษฐกิจชนิดอื่น ๆ เช่น โค แกะ เป็นต้น (Nagashima *et al.*, 1988; Oguri *et al.*, 1990; Fujino *et al.*, 1993; Kashiwazaki *et al.*, 1991; Feng *et al.*, 1992; Weber *et al.*, 1992)

สรุปในการทดลองนี้พบว่า

1. ตัวอ่อนสุกรไม่ทนต่อการเก็บรักษาแบบแช่เย็นแม้จะมีสารป้องกันการแช่แข็งเจือปนในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน
2. มีความเป็นไปได้ในการแช่แข็งตัวอ่อนสุกรด้วยการใช้วิธีการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิช้า ๆ และวิธีวิทรีฟีเกชั่น การแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิลงช้า ๆ มีข้อเสียคือ ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง และใช้ระยะเวลานาน ในขณะที่วิธีวิทรีฟีเกชั่นจะเหมาะสมกว่าทั้งในแง่ผลและวิธีการปฏิบัติ
3. อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้ไม่ประสบความสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนในสุกรตัวรับ เนื่องจากไม่ตั้งท้อง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยในเอกสารอ้างอิงตามตารางที่ 1 เนื่องจากตัวอ่อนสุกรมีความแตกต่างด้านโครงของเซลล์และส่วนประกอบของปริมาณไขมันที่สูงกว่าตัวอ่อนของสัตว์ชนิดอื่น ๆ โดยเฉพาะในโค เป็นต้น
4. การหาวิธีป้องกันโครงของเซลล์ด้วยการเติมสาร cytochalasin-B มีแนวโน้มของการเพิ่มอัตรารอดของตัวอ่อนหลังแช่แข็งและทำละลายในการแช่แข็งแบบวิทรีฟีเกชั่น โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 10μg/ml
5. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมด้วยการใช้วิธีการใหม่ ๆ เช่น delipidization หรือ Open Pulled Straw เป็นต้น เพื่อเป็นแนวทางการเพิ่มประสิทธิภาพของการแช่แข็งตัวอ่อนสุกร

เอกสารอ้างอิง

ดวงใจ พันธ์อารีวัฒนา ชวนพิศ พงษ์สุรพันธ์ เชษฐา พูลภักดี วิชัย ทันตศุภารักษ์ และ มงคล เตชะกำพุ 2538 (1995) การเหนี่ยวนำการเป็นสัดและการตกไข่ในแม่สุกรที่ไม่เป็นสัดหรือเป็นสัดช้าหลังหย่านมและสุกรสาวที่ไม่เป็นสัดด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน เวชชสารสัตวแพทย์ 25(1):39-45

มงคล เตชะกำพุ อังสนา ฮ้อเจริญ บุญญิตา รุจิทิฆัมพร นิภาภรณ์ รักษ์อาริยะธรรม ศิริพงษ์ จึงธนาเจริญเลิศ และ วิเชียร พวงศิลป์ 2530 (1987) การศึกษาเบื้องต้นของการย้ายฝากตัวอ่อนสุกรในฟาร์ม เวชชสารสัตวแพทย์ 17(3):227-242

Ali J. and Shelton J.N. 1993. Vitrification of preimplantation stages of mouse embryos. J. Reprod. Fert. 98:459-465.

Arceo J., Bautista N. and Kanagawa H. 1998. Current status of vitrification of embryos and oocytes in domestic animals: Ethylene glycol as an emering cryoprotectant of choice. Jpn. J. Vet. Res. 45(4):183-191.

Butler W.J. and Roberts T.K. 1975. Effects of some phosphatidyl compounds on boar spermatozoa following cold shock or slow cooling J. Reprod. Fert. 43:183-187.

Cameron R.D.A., Lising R., Nagashima H. and Blackshaw A.W. 1992. Cryopreservation of cultured and uncultured porcine embryos with glycerol and trehalose. Proceedings of the International Pig Veterinary Society, II p476.

Dinnyes A., Carolan C., Lonergan P., Massip A. and Mermillod P. 1996. Survival of frozen or vitrified bovine blastocysts produced *in vitro* in synthetic oviduct fluid. Theriogenology. 46:1425-1439.

Dobrinsky J.R., Balise J.J. and Robl J.M. 1990. Development of vitrified rabbit embryos. Theriogenology. 33:213 (Abstr.)

Dobrinsky J.R., Stice S.L., Phillips P.E., Duby R.T. and Robl J.M. 1992. Development of IVM-IVF bovine embryos following vitrification dilution treatments. Theriogenology. 37:202 (Abstr.).

Dobrinsky J.R. and Johnson L.A. 1993. Effect of vitrification media on the *in vitro* development of porcine embryos. Theriogenology. 39:209. (Abstr.)

Dobrinsky J.R. and Johnson L.A. 1994. Cryopreservation of porcine embryos by vitrification : A study of *in vitro* development. Theriogenology. 42:25-35.

Dobrinsky J.R., Long C.R. and Johnson L.A. 1997. Stability of microfilaments during swine embryo cryopreservation. Theriogenology. 47:343. (Abstr.)

Dzuik P.J. and Henshaw G. 1958. Fertility of boar semen artificially inseminated following *in vitro* storage. J. Anim. Sci. 17:554.

Feng S., Zhang Y., Li S., Ma Z., Wang R. and Lu D. 1991. Piglets from frozen (-20 ^{0}C) embryos were born in China. Theriogenology. 35:199. (Abstr.)

French A.J., Cecil A. and Seamark R.F. 1991. Viability of frozen hatched blastocysts cultured from one-cell zygotes. Proceeding of the 23rd Annual Conference of Australian Society of Reproductive Biology, Sydney, Australia. 119(Abstr.)

Fujino Y., Ujisato Y., Endo K., Tomizuka T., Kojima T. and Oguri N. 1993. Cryoprotective effect of egg yolk in cryopreservation of porcine embryos. Cryobiology 30:299-305.

Green S.T., Boland M.P. and Gordon I. 1984. Studies in the recovery and storage of porcine embryos. Faculty of General Agriculture, University College Dublin, Research Report 1982-1983, Dublin, Republic of Ireland, 100p.

Hayashi D., Koyayashi J., Mizuno J., Saito K. and Hirano S. 1989. Birth of piglets from frozen embryos. Vet. Rec. 125 : 43-44.

Hochi S., Maruyama K. and Oguri N. 1996. Direct transfer of equine blastocysts frozen-thawed in the presence of ethylene glycol and sucrose. Theriogenology. 46:1217-1227.

Huang W.T. and Holtz W. 1997. Survival of porcine GV and M II-oocytes after exposure to cryoprotectants and cooling to 10 ^{0}C. Theriogenology. 47:346. (Abstr.)

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.

Kashiwazaki N., Ohtani S., Miyamoto K. and Ogawa S. 1991. Production of normal piglets from hatched blastocysts frozen at –196 ^{0}C. Vet. Rec. 128:256-257.

Leibo, S.P. and Oda, K. 1992. High survival of mouse zygotes and embryos cooled rapidly or slowly in ethylene glycol plus polyvinylpyrrolidone. Cryo-Letters 14 : 133-144.

Massip A., Van Der Zwalmen P. and Ectors F. 1987. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. Theriogenology. 27:69-79.

Men H.S., Chen J.C., Ju W.Z., Shang E.Y., Yang S.C. and Zou R.J. 1997. Cryopreservation of Kunming mouse oocytes using slow cooling, ultrarapid cooling and vitrification protocols. Theriogenology. 47:1423-1431.

Nagashima H., Kato, Y., Yamakawa H. and Ogawa S. 1988a. Survival of pig hatched blastocysts exposed below 15° C. Jpn. J. Anim. Reprod. 34:123-131.

Nagashima H., Kato Y., Yamakawa H., Matsumoto T. and Ogawa S.1988b. Changes in freezing tolerance of pig blastocysts in peri-hatching stage. Jpn. J. Anim. Reprod. 35:130-134.

Nagashima H., Kato Y., Yamakawa H. and Ogawa S. 1989. Low temperature sensitivity of blastocyst-derived cells in pigs. Theriogenology. 31:232. (Abstr.)

Nagashima H., Yamakawa H. and Niemann H. 1992. Freezability of porcine blastocysts at different peri-hatching stages. Theriogenology. 37:839-850.

Nagashima H., Kashiwazaki N., Ashman R., Grupen C. and Seamark R.F. 1994. Recent advances in cryopreservation of porcine embryos. Theriogenology. 41:113-118.

Nagashima H., Kashiwazaki N., Ashman R.J. and Nottle N.B. 1995. Successful cryopreservation of porcine early cleavage stage embryos following removal of cytoplasmic lipid. Theriogenology. 43:285. (Abstr.)

Nagashima H., Kuwayama M., Grupen C.G., Ashman R.J. and Nottle M.B. 1996. Vitrification of porcine early cleavage stage embryos and oocytes after removal of cytoplasmic lipid droplets. Theriogenology. 45:180. (Abstr.)

Niemann H. 1985. Sensitivity of pig morulae to DMSO/PVP or glycerol treatment and cooling to 10° C. 1985. Theriogenology 23:123.

Niemann H. 1991. Cryopreservation of ova and embryos from livestock : Current status and research needs. Theriogenology. 35:109-124 .

Oguri, N. Recent progress in porcine embryo transfer and cryopreservation. 1990. Jpn. J. Swine Science. 27:80-86.

Ohlrichs, C. L., Steele, T.G., Johnson, D.L. and Looney, C.R. 1996. *In vitro* survival of IVF-derived embryos frozen using antifreeze proteins. Theriogenology. 45 (1):174. (Abstr.)

Overstrom E.W., Duby R.T., Dobrinsky J.R., Robl J.M.,Baguisi A., Lonergan P., Duffy P., Walsh J.H., Roche J.F. and Boland M.P. 1993. Cytoskeletal damage in vitrified or frozen bovine embryos. Theriogenology. 39:276. (Abstr.)

Palasz A.T., Gustafsson H., Rodrigue-Martinez H., Gusta L. and Larsson B. 1997. Vitrification of bovine IVF blastocysts in an ethylene glycol/sucrose solution and heat-stable plant-extracted proteins. Theriogenology. 47:865-879.

Plante C., Pollard J.W., Kobayashi S. and Leibo S.P. 1993. Chilling sensitivity of porcine morulae. Theriogenology. 39:285. (Abstr.)

Pollard J.W. and Leibo S.P. 1994. Chilling sensitivity of mammalian embryos.Theriogenology. 41(1):101-106.

Polge C., Wilmut J. and Rowson L.E.A. 1974. The low temperature preservation of cow sheep and pig embryos. Cryobiology. 11:560 (Abstr.)

Polge, C. 1977. The freezing of mammalian embryos : perspectives and possibilities. Ciba Foundation Symposium., Churchill London, 52:3-18.

Rall W.F. and Fahy G.M. 1985. Vitrification : A new approach to embryo cryopreservation. Theriogenology. 23: 220. (Abstr.)

Rall, W.F. 1992. Cryopreservation of oocytes and embryos : Methods and Applications. Anim. Reprod. Sci. 28 : 237-254.

Smorag Z. and Gajda B., Wieczorek B. and Jura J. 1989. Stage-dependent viability of vitrified rabbit. Theriogenology. 31:1227-1231.

Techakumphu M. and Tantasuparuk W. 1991. *In vitro* development of pig embryo after culture. Thai J. Vet. Med. 21(4) : 191-213.

Trounson, A.O., Willadsen, S.M., Rowson, L.E.A. and Newcomb, R. 1976.The storage of cow eggs at room temperature and at low temperature. J. Reprod. Fert. 46:173-178.

Valdez C.A., Abas Mazni O., 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. 33:627-636.

Vajta, G., Booth P.J, Holm P, Greve T and Callensen H. 1997a. Successful vitrificatin of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. Cryo-letters/ 18:191-195.

Vajta, G., Holm P, Greve T and Callensen H. 1997b. Vitrification of porcine embryos using the open pulled straw (OPS) method. Acta. vet. Scand. 38(4): 349-352.

Weber P.K., McGinnis L.K. and Youngs C.R. 1992. An evaluation of potential vitrification solutions for cryopreservation of porcine embryos. Theriogenology. 37:321. (Abstr.)

Williams T.J. and Johnson S.E. 1986. A method for one-step freezing of mouse embryos. Theriogenology. 26:125-133.

Wilmut I. 1972. The low temperature preservation of mammalian embryos. J.Reprod. Fert. 31:513-514. (Abstr.)

Wilmut I. and Rowson L.E.A. 1973. Experiment on the low-temperature preservation of cow embryos. Vet. Rec. 92:686-690.

Wu M-C., Luoh Y-S., and Liou J-F. 1997. Comparisons on survival rates of porcine embryos cryopreserved by slow cooling for various breeds and cell stages. Taiwan Livestock Res. 30(1):97-109.

Zhu S.E., Kasai M., Otoge H., Sakurai T. and Machida T. 1993. Cryopreservation of expanded mouse blastocysts by vitrification in ethylene glycol-based solutions. J. Reprod. Fert. 98:139-145.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย