หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

การเก็บรักษาเอมบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมรวมทั้งในคนให้มีชีวิตรอดอยู่ได้โดยการเก็บรักษาไว้ที่ภายใต้อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสหรือในไนโตรเจนเหลว จากการศึกษาพบว่าสามารถเก็บรักษาไว้ได้เป็นระยะเวลานาน โดยไม่กระทบกระเทือนต่อการเจริญเติบโตภายหลังที่ได้นำเอมบริโอนั้นถ่ายฝากกลับไปยังตัวรับ (recipient)ที่เหมาะสม (Whittingham, 1971a ; Wilmut,1972 ; Bank และ Maurer,1974;Willadsen และคณะ, 1976)

การแช่แข็งเอมบริโอ เริ่มต้นเมื่อปี ค.ศ. 1971 โดย Whittingham ได้ทำการแช่แข็งเอมบริโอของหนูเมาซ์จนประสบความสำเร็จเป็นครั้งแรก จากนั้นได้มีการพัฒนาวิธีการแช่แข็ง จนกระทั่งปัจจุบันสามารถแช่แข็งเอมบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้หลายชนิดเช่น หนูแรท (Whittingham,1975a;Miyamoto และ Ishibashi,1977 ; Chun และ De Reviers,1986) กระต่าย (Bank และ Maurer,1974;Whittingham และ Adam,1974a; Maurer และ Haseman,1976 ;Tsunoda และ Sugie,1977;Renard และคณะ,1984a) แกะ(Willadsen และคณะ,1976;Willadsen,1977) แพะ(Bilton และ Moore,1976) โค (Wilmut และ Rowson,1973; Renard และคณะ ,1981; Leibo,1984 ; Mazur และ Schneider,1986) และ รวมทั้งในคน (Edward และ Steptoe, 1977; Trounson และ Mohr,1983; Cohen และคณะ,1986 ; Testart และคณะ, 1986a) สำหรับเอมบริโอของแฮมสเตอร์สีทอง สามารถเจริญเติบโตถึงระยะบลาสโตซิสได้ภายหลังการแช่แข็งแต่เมื่อนำไปถ่ายฝากไม่สามารถรอดชีวิตอยู่ได้ (Tsunoda และคณะ,1981) ส่วนเอมบริโอของสุกร ไม่สามารถรอดชีวิตอยู่ได้เมื่อลดอุณหภูมิถึง -15 องศาเซลเซียส (Polge และคณะ, 1974)

จากการศึกษาการแช่แข็งเอมบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม พบว่าการแช่แข็งเอมบริโอของหนูเมาซ์เป็นรูปแบบที่ดีรูปแบบหนึ่งสำหรับใช้ในการศึกษาวิจัยปัจจัยต่าง ๆที่มีผลต่อการแช่แข็งและสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการหาปัจจัยพื้นฐานทางสรีรวิทยา อาทิเช่น การอยู่รอดของเอมบริโอในระยะก่อนฝังตัว และผลกระทบของสภาวะแวดล้อมต่อการเจริญเติบโตของเอมบริโอภายหลังการแช่แข็ง เช่นเดียวกับในการศึกษาการเจริญเติบโตของเอมบริโอที่เกิดจากการปฏิสนธินอกร่างกายก็สามารถใช้เอมบริโอของหนูเมาซ์มาเป็นรูปแบบเพื่อศึกษาผลต่าง ๆ ได้

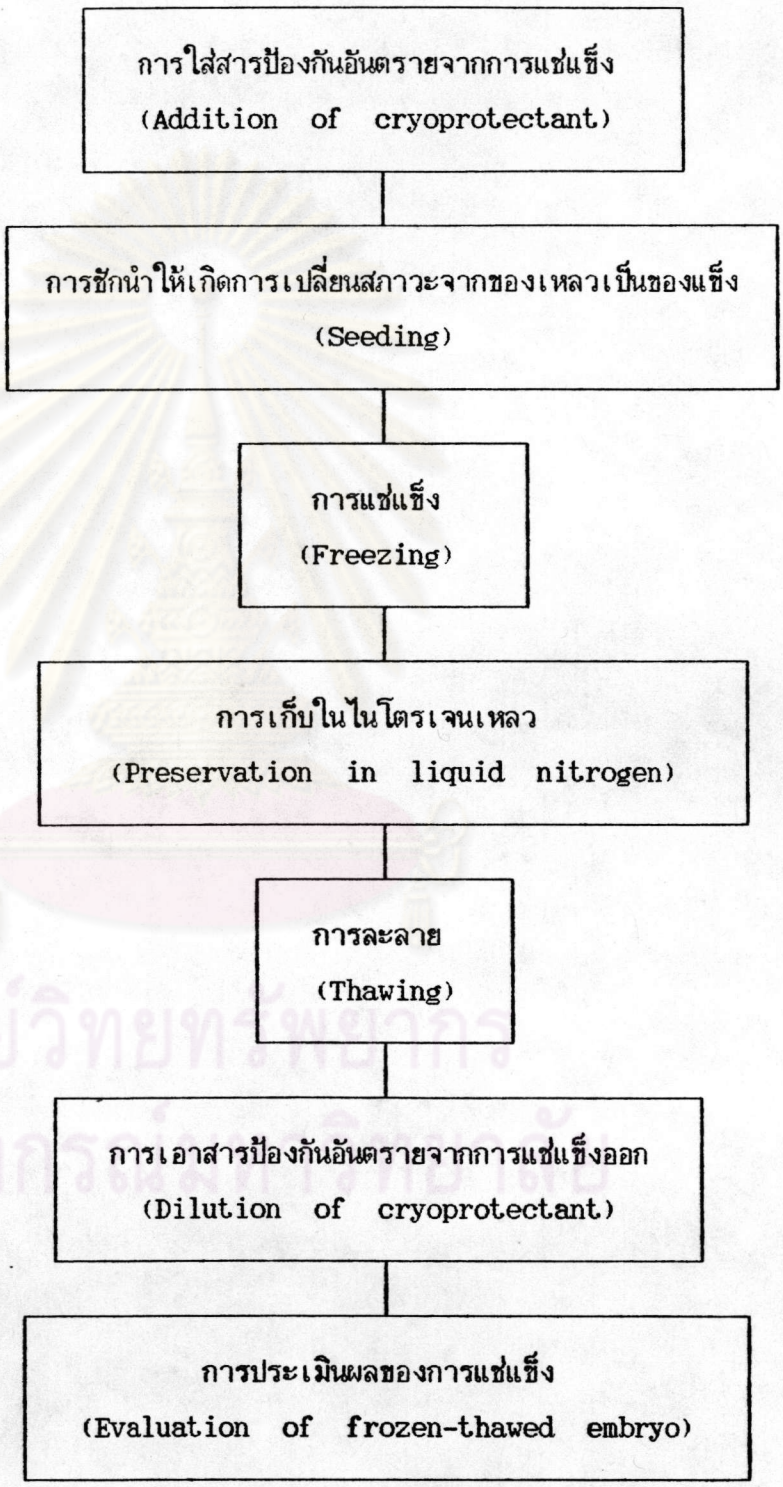
สำหรับการเก็บรักษาเอมบริโอโดยการแช่แข็งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในแง่ต่าง ๆ ดังนี้คือ

1. สามารถอนุรักษ์พันธุกรรมของสัตว์ เพื่อเป็นการอนุรักษ์พันธุ์สัตว์ที่กำลังจะสูญพันธุ์
2. เพื่อประโยชน์ในการแพร่ขยายพันธุ์สัตว์ที่ดี
3. เพื่อความสะดวกในการขนย้ายและประหยัดค่าใช้จ่ายในกรณีสัตว์เศรษฐกิจ
4. เพื่อเพิ่มอัตราการตั้งครรภ์ โดยการแช่แข็งเอมบริโอไว้รอการย้ายฝากเมื่อวงจรการเป็นสัดของตัวรับเหมาะสม สำหรับในคน ก็รอจนกระทั่งสตรีพร้อมที่จะตั้งครรภ์ทั้งร่างกายและจิตใจและอยู่ในรอบระดูปกติ ซึ่งจะทำให้โอกาสในการตั้งครรภ์สูงกว่า(Cohen, และคณะ, 1985) สตรีไม่พร้อมในรอบระดูนั้น เช่น เจ็บป่วย เป็นต้น
5. ในสตรีที่มีบุตรยากและทำปฏิสนธินอกร่างกาย (in vitro fertilization) สามารถนำเอมบริโอส่วนที่เหลือนั้นมาเก็บรักษาไว้โดยการแช่แข็ง เพื่อรอการย้ายฝากในรอบระดูต่อไปได้ ถ้าหากไม่ประสบความสำเร็จในการย้ายฝาก อีกทั้งยังช่วยป้องกันการตั้งครรภ์แฝด (multiple pregnancy) ช่วยลดความเจ็บปวดและค่าใช้จ่าย อีกทางหนึ่งด้วย
6. เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัย

<u>หลักการเก็บรักษาเอมบริโอโดยการแช่แข็ง</u>

การเก็บรักษาเอมบริโอโดยการแช่แข็งอาศัยหลัก dehydration ของเอมบริโอให้เพียงพอ เพื่อไม่ให้เกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์ (intracellular ice formation) ด้วยการลดอุณหภูมิด้วยอัตราเร็วอย่างช้า ๆ (slow cooling) และการใส่สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง (cryoprotectant) ซึ่งมีคุณสมบัติผ่านเซลล์เมมเบรนได้โดยตรง และมีจุดเยือกแข็งต่ำกว่าน้ำในขณะที่อุณหภูมิลดต่ำลง ทำให้น้ำภายนอกเซลล์กลายเป็นผลึกน้ำแข็ง ดังนั้นภายนอกเซลล์จึงมีลักษณะสภาพเป็น hyperosmolality เกิดความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นของสารภายในและภายนอกเซลล์ โดยปกติเอมบริโอจะยอมให้น้ำซึมผ่านผนังเซลล์ได้ดีกว่าสารชนิดอื่น ๆ ฉะนั้นน้ำจากภายในเซลล์จึงไหลออกสู่นอกเซลล์ เพื่อปรับให้เข้าสู่ภาวะสมดุลย์เอมบริโอซึ่งอยู่ในสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งจึงเกิดการหดตัว (shrinkage) ขณะเดียวกันสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งก็จะไหลเข้าสู่เซลล์ ทำให้ภายในเซลล์มีจุดเยือกแข็งต่ำกว่าน้ำ (Leibo,1977;Whittingham,1977; Leibo และ Mazur,1978; Rall, และคณะ, 1984)

สำหรับขั้นตอนในการแช่แข็งจนถึงการประเมินผลแสดงสรุปในรูปที่ 1.1 ประกอบด้วย



รูปที่ 1.1 ขั้นตอนในการแช่แข็งเอมบริโอและการประเมินผล

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของเอมบริโอภายหลังการแช่แข็ง

ในการแช่แข็งเอมบริโอ อัตราการอยู่รอดของเอมบริโอขึ้นอยู่กับชนิดของเอมบริโอ (Wilmut, 1972 ; Friedler และ คณะ, 1988) ระยะการเจริญเติบโตของเอมบริโอ (Developmental stage) (Massip และคณะ, 1984; Fehilly และ คณะ, 1985 ; Testart และคณะ,1987 ; Critser และคณะ,1988; Friedler และคณะ, 1988) ชนิดและความเข้มข้นของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง (Whittingham และ Leibo, 1972 ; Wilmut, 1972 ; Maurer, 1976; Smorag และคณะ, 1981 ; Critser และคณะ ,1988) อัตราเร็วในการลดอุณหภูมิ (cooling rate) (Whittingham และ Leibo,1972; Leibo,1977; Smorag และคณะ, 1981 ; Rall และ Fahy,1985) อุณหภูมิต่ำสุดก่อนจุ่มในไนโตรเจนเหลว (Whittingham และ Leibo, 1972; Maurer, 1976, Critser และคณะ,1988) อัตราเร็วในการละลาย (Whittingham และ Leibo,1972; Whittingham,1977; Rall, และ Polge 1984 ;Critser และคณะ, 1988) และปฏิกิริยาระหว่างแต่ละปัจจัยร่วมกัน (Critser และคณะ,1988)

เอมบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมในระยะก่อนการฝังตัวในสัตว์แต่ละชนิด มีอัตราการรอดชีวิตภายหลังการแช่แข็งแตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากขนาดของเซลล์ ความสามารถให้สารผ่านเข้าสู่เซลล์ (cell permeability) (Mazur,1970) ชนิดและจำนวนไขมันในไซโตปลาสซึม อัตราการแบ่งตัวและความสามารถในการเจริญเติบโตในจานเพาะเลี้ยงต่างกัน (Whittingham,1975b) นอกจากนี้อัตราเร็วในการลดอุณหภูมิมีผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์แต่ละชนิดแตกต่างกัน (Mazur ,1980)

เอมบริโอของหนูเมาซ์สามารถรอดชีวิตอยู่ได้ภายหลังการแช่แข็งตั้งแต่ระยะ 1-เซลล์ จนถึงระยะบลาสโตซิส (Whittingham,1975b ;Maurer,1976) แต่อัตราการรอดชีวิตของแต่ละระยะการเจริญเติบโตของเอมบริโอแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวิธีการแช่แข็งและการละลายที่เหมาะสม (Schneider และ Maurer, 1983 ; Massip และคณะ,1984)

ในสัตว์แต่ละชนิด ระยะของการเจริญเติบโตของเอมบริโอซึ่งเหมาะสมที่จะนำมาแช่แข็งแตกต่างกัน (Trounson ,1986) เช่น ในแกะ ,กระต่ายและโค ระยะมอรูล่าและระยะบลาสโตซิสจะให้อัตราการรอดชีวิตสูงกว่าระยะอื่น ๆ (Willadsen และคณะ,1976; Trounson และคณะ, 1978;Mohr และ Trounson, 1981) ส่วนในคน ระยะที่ให้อัตราการรอดชีวิตสูงคือ ระยะ 4-8 เซลล์ (Trounson และ Mohr, 1983 ; Trounson, 1986 ;Testart และคณะ,1987) เป็นต้น

ในการแช่แข็ง สาเหตุสำคัญที่เซลล์ไม่สามารถรอดชีวิตอยู่ได้มี 2 ประการ คือ

1. การเกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์ (intracellular ice formation)

2. ผลของความเข้มข้นของอีเลคโตรไลต์ (solution effects)

จากการศึกษาของ Lovelock (1954) พบว่าเมื่อลดอุณหภูมิถึง -10 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของอีเลคโตรไลต์ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น 20 เท่า นอกจากนี้ ยังพบว่าเอมบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมไม่สามารถรอดชีวิตอยู่ได้ เมื่อลดอุณหภูมิต่ำกว่า -20 องศาเซลเซียส นอกจากใส่สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง ซึ่งมีบทบาทในการลดความเข้มข้นของอีเลคโตรไลต์ และป้องกันผนังเซลล์ของเอมบริโอในขณะที่อุณหภูมิลดลง (Maurer,1978;Whittingham,1981)

สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง แบ่งออกเป็น 2 ชนิด ตามความสามารถในการซึมผ่านผนังเซลล์ (McGann,1978) คือ

1. ชนิดที่สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ได้ (Permeating cryoprotectants) ที่นิยมใช้ ได้แก่ 1,2-Propanediol (PROH),Dimethyl sulfoxide (DMSO),Glycerol, สารในกลุ่มนี้ค่อนข้างมีความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อใช้ในขนาดความเข้มข้นสูง ๆ ขนาดความเข้มข้นที่นิยมใช้ระหว่าง 1-2 โมลา แต่อย่างไรก็ตาม ขนาดความเข้มข้นที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ (Niemann,1984)

1,2 - Propanediol (Propylene glycol,PROH) เป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งที่สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ได้เร็ว มีน้ำหนักโมเลกุล 76.10 มีคุณสมบัติในการลดการเกิดผลึกน้ำแข็งในขณะทำการแช่แข็งและการละลาย(Leibo , 1977;Renard,1984b) นอกจากนี้พบว่าใช้ PROH รวมกับ DMSO จะได้ผลในการแช่แข็งเอมบริโอในระยะ 2-เซลล์ดีกว่าระยะ 8- เซลล์ (Russell และคณะ,1987;Mayer และ Lanzendorf, 1987) PROH นิยมใช้ในการแช่แข็งเอมบริโอหนูเมาซ์ (Kasai และคณะ,1980;Trounson และคณะ 1987; Mayer & Lanzendorf,1987) เอมบริโอกระต่าย (Renard และคณะ, 1984a) เอมบริโอโค (Renard, และคณะ 1981) และเอมบริโอคน (Lassalle และคณะ , 1985 ; Frydman และคณะ, 1986 ;Testart และคณะ, 1986b)

Dimethyl sulfoxide (DMSO, Me_2SO) เป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งที่สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ได้ มีน้ำหนักโมเลกุล 78.13 เริ่มนำมาใช้ในการแช่แข็งมากกว่า 30 ปี และต่อมานำมาใช้ในการแช่แข็งเอมบริโอของหนูเมาซ์ (Whittingham และ Leibo, 1972) หลังจากนั้น ได้นำมาใช้ในการแช่แข็งเอมบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมชนิดต่าง ๆ เช่น หนูแรท (Whittingham, 1975a; Maureen และ Whittingham,1981) กระต่าย (Tsunoda และคณะ, 1981) แกะ (Willadsen, 1977) โค (Fahy และคณะ, 1984) และคน (Fehilly และคณะ, 1985) Kojima และคณะ, 1985)

DMSO เหมาะสำหรับในการแช่แข็งด้วยวิธีการลดอุณหภูมิและการทำละลายอย่างช้า ๆ (Quinn และ Kerin, 1986; Mohr และคณะ,1985; Freeman และคณะ, 1986;

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Trounson, 1986) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Kasai และคณะ (1981) พบว่า อัตราการรอดชีวิตของเอมบริโอที่แช่แข็งด้วย DMSO สูงกว่า Glycerol เมื่อใช้วิธีการแช่แข็งโดยลดอุณหภูมิและการทำละลายอย่างช้า ๆ

จากการศึกษา ความเป็นพิษของ DMSO พบว่า มีความเป็นพิษมากกว่า Glycerol โดยศึกษา ในเอมบริโอหนูเมาส์ระยะมอรูล่า เมื่อใส่ DMSO ความเข้มข้น 1.0 โมลา ที่อุณหภูมิ 0 และ 20 องศาเซลเซียส พบว่า เอมบริโอถูกทำลายหมดภายใน 24 ชั่วโมง โดยไม่ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ แต่เอมบริโอที่ใส่ Glycerol สามารถรอดชีวิตอยู่ได้ (Kasai และคณะ, 1981)

Glycerol เป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 92.02 นำมาใช้ครั้งแรกในการแช่แข็งสเปอร์ม (Polge และ Parkes 1949) ต่อมานำมาใช้ในการแช่แข็งเซลล์ต่าง ๆ ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม รวมทั้งเอมบริโอ เช่นเอมบริโอหนูเมาส์ (Kasai และคณะ, 1981; Miyamoto และ Ishibashi, 1983a; Miyamoto, 1986) เอมบริโอกระต่าย (Tsunoda และคณะ, 1981) เอมบริโอวัว (Leibo, 1984) เอมบริโอลิงบาบูน (Pope และ Beck,1984) และเอมบริโอคน (Bernard และ Fuller, 1984) เป็นต้น

จากการศึกษา ในเอมบริโอหนูเมาส์ ระยะ 8- เซลล์ ด้วยการใช้ Glycerol 1-2 โมลา และแช่แข็งด้วยการลดอุณหภูมิอย่างช้า ๆ และทำการละลายด้วยอัตราที่เร็ว พบว่าอัตราการรอดชีวิตสูงถึงร้อยละ 70-90 (Miyamoto และIshibashi,1983a) นอกจากนี้ Kasai และคณะ (1981) ได้แช่แข็งเอมบริโอหนูเมาส์ระยะมอรูล่า พบว่า Glycerol เป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งที่ทำให้อัตราการรอดชีวิตสูง เมื่อใช้การลดอุณหภูมิอย่างช้าและการทำละลายอย่างเร็วหรือช้า

สำหรับพิษของ Glycerol ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ได้มีการศึกษา ในเอมบริโอหนูเมาส์ ระยะมอรูล่า ใส่ใน Glycerol ความเข้มข้น 1.5 โมลา ภายใน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส พบว่า เอมบริโอสามารถรอดชีวิตอยู่ได้ร้อยละ 50 เมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส สามารถรอดชีวิตอยู่ได้ร้อยละ 75 (Kasai และคณะ 1981)

ความสามารถในการซึมผ่านของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งขึ้นอยู่กับสัมประสิทธิ์ความสามารถในการซึมผ่าน (permeability coefficient) ความแตกต่างของความเข้มข้นของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ อุณหภูมิและพื้นที่ผิวของเซลล์ (Friedler และคณะ,1988)

จากการศึกษาอัตราเร็วในการซึมผ่านของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง ในบลาสโตเมียของหนูเมาส์ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า PROH สามารถซึมผ่านได้เร็วที่สุดใช้เวลา 5-7 นาที สำหรับ DMSO ใช้เวลา 20-30 นาที และ Glycerol สามารถซึมผ่านเซลล์ได้ช้าที่สุด ใช้เวลามากกว่า 60 นาที (Jackowski และคณะ,1980 ;Renard และ Babinet,1984b)

สัมประสิทธิ์ความสามารถในการซึมผ่านของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งมีความแตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิดและแต่ละระยะของการเจริญเติบโตของเอมบริโอ จากการศึกษาในเอมบริโอหนูเมาซ์และคน พบว่า PROH เหมาะสำหรับแช่แข็งเอมบริโอในระยะต้น ๆ (Testart และคณะ,1986b) ส่วน DMSO และ Glycerol เหมาะสมสำหรับการแช่แข็งเอมบริโอในระยะกลาง ๆ (intermediate) และระยะท้าย ๆ ของการเจริญเติบโตตามลำดับ (Fehilly และคณะ,1985;Trounson,1986;Cohen และคณะ,1988)

2. ชนิดที่ไม่สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ (Non-permeating cryoprotectants) สารในกลุ่มนี้มีความเป็นพิษน้อยกว่ากลุ่มแรก ที่นิยมใช้ได้แก่ น้ำตาลซูโครส ความเข้มข้นที่เหมาะสม อยู่ในช่วง 0.25-0.50 โมลา (Takeda และคณะ ,1984) แต่มีบางท่านพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 0.5 ,1.0 และ 1.5 โมลา ให้ผลต่ออัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างกัน (Szell และ Shelton, 1986a)

Sucrose เป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ น้ำหนักโมเลกุล 342.3 มักนิยมใช้ร่วมกับสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งที่สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ได้ โดยใช้ในขนาดความเข้มข้นสูงในลักษณะ Hypertonic solution (Mazur และ Schneider, 1986; Schneider, 1986) ในการแช่แข็งเอมบริโอของหนูเมาซ์ (kasai และคณะ 1981; Kasai, 1986) เอมบริโอของกระต่าย (Renard และคณะ, 1984a) เอมบริโอของโค (Leibo, 1983) และเอมบริโอของคน(Lassalle และคณะ, 1985; Frydman และคณะ, 1986; Testart และคณะ, 1986b)

บทบาทของน้ำตาลซูโครส มี 2 ประการ คือ

1. ในขณะทำการแช่แข็ง น้ำตาลซูโครสทำให้เซลล์หดตัวจากการสูญเสียน้ำออกจากเซลล์ น้ำภายในเซลล์น้อยจึงเกิด partial dehydration ลดการเกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์ (Mazur , 1970;Renard และคณะ,1984a) นอกจากนี้สามารถแช่แข็งได้เร็วขึ้น โดยไม่ต้องทำการชักนำให้เกิดผลึกน้ำแข็ง (seeding) (Takeda และคณะ, 1984;Nguyen และคณะ,1983; Szell และ Shelton, 1986a)

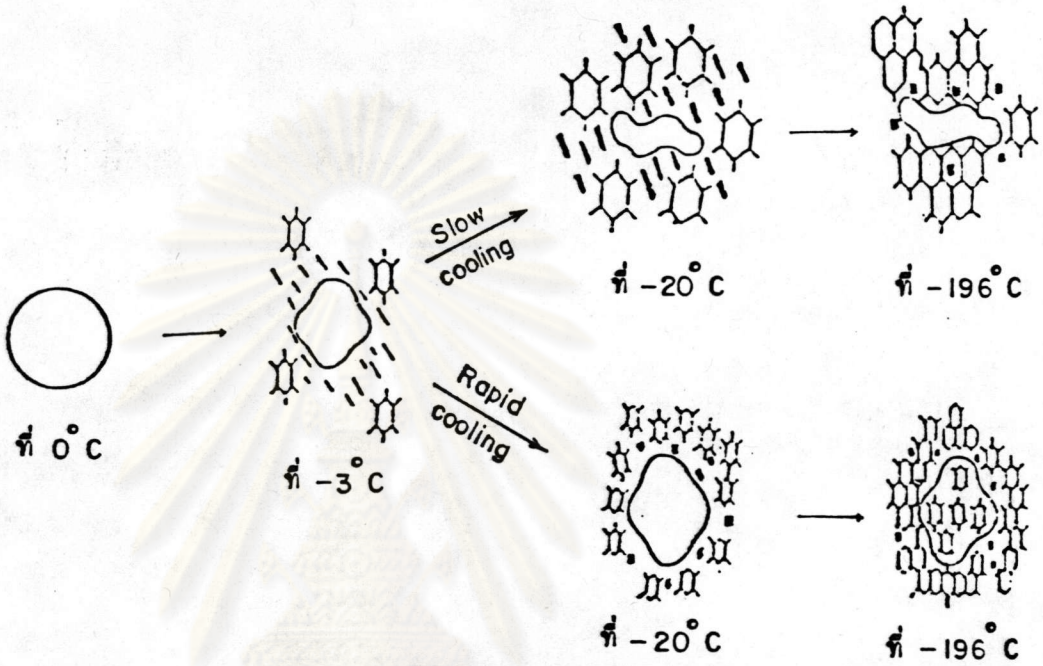
2. ในขณะเอาสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งออกจากเซลล์ภายหลังการแช่แข็ง น้ำตาลซูโครสทำหน้าที่เป็นตัวเจือจาง (dilution) โดยช่วยลดการบวมของเซลล์ ทำให้เซลล์เกิดการหดตัวจากการที่น้ำเคลื่อนที่ออกจากเซลล์และขณะเดียวกันสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งที่สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ได้จะเคลื่อนที่ออกจากเซลล์ (Merry และคณะ,1983; Leibo,1984; Schneider และ Mazur,1984;Szell และ Shelton,1986a)

วิธีการใส่สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง เพื่อป้องกันการเกิด osmotic shock คือ การเริ่มจากสารละลายที่มีความเข้มข้นน้อยไปหามาก (stepwise) เช่น จาก 0.25 โมลา เป็นเวลานาน 5 นาที 0.5 โมลา เป็นเวลานาน 5 นาที จนกระทั่งถึง ความเข้มข้นที่ต้องการ เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อให้เอมบริโอได้มีเวลาในการปรับตัวในสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง (Niemann,1984)

สำหรับการเอาสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งออก ก็สวนทางกับเวลาเติมเข้าไป คือ ลดความเข้มข้นจากมากไปหาน้อยหรืออาจใช้น้ำตาลซูโครสแทน (Kasai และคณะ,1980; Niemann และคณะ ,1982)

จากการศึกษาพบว่า อัตราเร็วในการลดอุณหภูมิมีส่วนสำคัญในการควบคุมการสูญเสียน้ำของเอมบริโอ ซึ่งจะมีผลต่อการเกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์ (Leibo และ McGrath,1978; Leibo,1981 ; Schneider และ Mazur, 1984) ดังรูปที่ 1.2. ถ้าอัตราเร็วในการลดอุณหภูมิช้า ทำให้น้ำสูญเสียออกจากเซลล์ได้มาก เซลล์เกิดการหดตัว ในทางตรงกันข้ามถ้าใช้อัตราการลดอุณหภูมิเร็วเกินไป ทำให้น้ำออกจากเซลล์น้อยและคั่งอยู่ภายในเซลล์ เกิดเป็นผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์เมื่ออุณหภูมิลดต่ำลง ในขณะทำการละลายผลึกน้ำแข็งเหล่านี้ก็เกิดการรวมตัวกันมีขนาดใหญ่ขึ้น (recrystallization) ซึ่งจะทำลายเซลล์เมมเบรนภายในเซลล์ได้ (Mazur,1977a) ระดับความรุนแรงขึ้นอยู่กับปริมาตรและขนาดของผลึกน้ำแข็ง (Van Venrooij และคณะ,1975;Mazur, 1977b) หรือปริมาณและขนาดของผลึกน้ำแข็ง (Mazur,1980) ขนาดของผลึกน้ำแข็งจะแปรผกผันกับอัตราเร็วของการลดอุณหภูมิในการแช่แข็ง นั่นก็คือเมื่อลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วขนาดของผลึกน้ำแข็งขนาดเล็ก ๆ นั้นซึ่งมีพลังงานพื้นที่ผิว (surface energy) สูงกว่าขนาดใหญ่เกิดการรวมตัวเป็นผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ขึ้น ทำลายเซลล์ (Bank, 1973 ; Mazur, 1977b) อัตราการรอดชีวิตจึงลดลงอย่างมาก ในทางกลับกันถ้าการทำละลายด้วยอัตราที่เร็ว ระยะเวลาที่ผลึกน้ำแข็งเกิดการรวมตัวกันก่อนจะถึงจุดหลอมเหลวสั้นกว่า จึงไม่สามารถทำลายเซลล์ได้ (Mazur, 1977a)

สำหรับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมอัตราเร็วในการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ น้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 องศาเซลเซียสต่อนาที ซึ่งจะไม่ทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์ แต่ถ้าอัตราเร็วในการลดอุณหภูมิมากกว่าหรือเท่ากับ 4 องศาเซลเซียสต่อนาทีจะทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์ (Mazur และคณะ, 1984a) โดยที่อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ (Leibo และ Mazur,1971) ทั้งนี้อาจเนื่องจากเซลล์แต่ละชนิดมีความสามารถในการยอมให้น้ำซึมผ่านต่างกัน (Mazur,1980) ซึ่งอัตราเร็วของการลดอุณหภูมิ มีผลต่อการเกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์และส่งผลต่อการอยู่รอดของเอมบริโอ



รูปที่ 1.2 แสดงผลของอัตราเร็วในการลดอุณหภูมิต่อการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ (⛤) (Leibo, 1981)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอมบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมในแต่ละระยะของการเจริญเติบโต ยังมีอัตราเร็วในการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมต่างกัน ได้มีการศึกษาในเอมบริโอของหนูเมาซ์ระยะ 2-เซลล์ 4-เซลล์ และ 8-เซลล์ พบว่าเมื่อค่อย ๆ ลดอุณหภูมิด้วยอัตราเร็ว 0.3 องศาเซลเซียสต่อนาทีจนถึงอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ก่อนจะลดอุณหภูมิลงทันทีทันใดที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสนั้น อัตราการมีชีวิตรอดของเอมบริโอสูงมากกว่าร้อยละ 50 แต่ถ้าลดอุณหภูมิด้วยอัตราเร็วมากกว่าหรือเท่ากับ 7 องศาเซลเซียสต่อนาที พบว่าเอมบริโอไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ (Whittingham และ Leibo, 1972) ซึ่งการลดอุณหภูมิลงอย่างช้า ๆ ทำให้ปริมาตรของเอมบริโอลดลงมากกว่าการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากอัตราการลดอุณหภูมิที่ช้า ทำให้เอมบริโอสูญเสียน้ำจนเกิด dehydration อย่างเพียงพอที่จะไม่ทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอน ถึงความสัมพันธ์ของอัตราการลดอุณหภูมิและปริมาตรของเซลล์ ที่มีผลต่อการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ พบว่าถ้าหากลดอุณหภูมิด้วยอัตราเร็วอย่างช้า ๆ ปริมาตรของเซลล์จะลดลงเนื่องจากการหดตัวของเซลล์ ที่เกิดจากการสูญเสียน้ำออกจากเซลล์ (Schneider และ Mazur, 1984 ; Leibo และ McGrath, 1978; Mazur, 1970)

สำหรับอัตราการทำละลาย (Thawing rate) ขึ้นอยู่กับอัตราการลดอุณหภูมิและอุณหภูมิต่ำสุดก่อนจะลดลงทันทีทันใดที่-196 องศาเซลเซียส (Whittingham และคณะ,1979; Willadsen, 1977) จากการศึกษา พบว่า ถ้าอุณหภูมิต่ำสุดก่อนจะลดลงทันทีทันใดที่ -196 องศาเซลเซียสอยู่ที่ประมาณ -40 องศาเซลเซียส การทำละลายควรจะใช้อัตราที่เร็วเพื่อให้มีอัตราการรอดชีวิตของเอมบริโอสูง แต่ถ้าอุณหภูมิต่ำสุดก่อนจุ่มลงในไนโตรเจนเหลวประมาณ -80 องศาเซลเซียส การทำละลายควรใช้อัตราที่ช้า จึงทำให้อัตราการรอดชีวิตสูง (Leibo และ Mazur, 1978 ;Whittingham และคณะ,1979) นอกจากนี้ยังพบว่า อัตราการมีชีวิตรอดของเอมบริโอสูงมากกว่าร้อยละ 80 เมื่อทำการละลายที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 22-25 องศาเซลเซียส) ซึ่งไม่ทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์เมมเบรน (Rall และ Polge, 1984)

<u>การประเมินผลของการแช่แข็ง</u>

ทำได้ 3 วิธี คือ

1. จากลักษณะรูปร่างของเอมบริโอ ทันทีภายหลังที่เอาสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งออก โดยดูจากเซลล์ blastomere ของเอมบริโอหรือชั้น zona pellucida ที่ล้อมรอบเอมบริโอด้วย กล้องสเตอริโอไมโครสโคป ขนาดกำลังขยาย 10-40 เท่า วิธีนี้เป็นวิธีการประเมินผลขั้นต้น เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงความเหมาะสมของวิธีการแช่แข็งวิธีใดวิธีหนึ่ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. จากการเพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงเอมบริโอ โดยนำเอมบริโอภายหลังการแช่แข็งไปเพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยงชนิดต่าง ๆ เช่น Ham 's F-10 , Modified Kreb 's Ringer solution , Human Tubal Fluid เป็นต้น การเจริญเติบโตของเอมบริโอ ประเมินผลจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างหรือจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้น เช่น จากระยะ 2- เซลล์เป็นระยะบลาสโตซิสภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง แต่วิธีนี้ไม่ได้เป็นวิธีที่บ่งชี้ถึงคุณภาพของเอมบริโอภายหลังการแช่แข็งที่แท้จริง เพราะเอมบริโอทุกตัวที่เจริญเติบโตในน้ำยาเพาะเลี้ยง ไม่ได้หมายความว่าจะเจริญเติบโตภายหลังการถ่ายฝากยังตัวรับ

3. จากการถ่ายฝากไปยังมดลูกของตัวรับที่ตั้งท้องเทียม โดยดูอัตราการรอดชีวิตจากการฝังตัวหรือจนกระทั่งคลอดออกมา ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ดีที่สุดในการประเมินผลคุณภาพของเอมบริโอภายหลังการแช่แข็ง

<u>ข้อบ่งชี้สำหรับใช้ประเมินผลเอมบริโอ ภายหลังการแช่แข็ง</u>

1. เซลล์ blastomere , ชั้น zona pellcuida และลักษณะรูปร่างของเอมบริโอปกติ ไม่มีส่วนใดถูกทำลายจากการแช่แข็ง

2. เมื่อนำเอมบริโอมาเพาะเลี้ยงในน้ำยาเพาะเลี้ยง สามารถเจริญเติบโตถึงระยะบลาสโตซิสได้

3. มีระยะเวลาของการแบ่งตัวและรูปร่างของเซลล์ที่ได้ เหมือนกับเอมบริโออายุเดียวกันที่เจริญภายในร่างกาย

4. เมื่อถ่ายฝากเอมบริโอที่ได้จากการแช่แข็งไปยังมดลูกของตัวรับ (recipient) สามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติ

<u>ข้อบ่งชี้สำหรับใช้ประเมินผลการเจริญเติบโตของเอมบริโอในการเพาะเลี้ยง</u>

1. สามารถเจริญเติบโตถึงระยะบลาสโตซิสได้

2. มีระยะเวลาของการแบ่งตัวและรูปร่างของเซลล์ที่ได้ เหมือนกับเอมบริโออายุเดียวกันที่ได้เจริญภายในร่างกาย

3. สามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติ ภายหลังจากถ่ายฝากเอมบริโอที่ได้จากการเพาะเลี้ยงไปยังมดลูกของตัวรับ (recipient) ที่เหมาะสม

การถ่ายฝากเอมบริโอ (Embryo Transfer)

การถ่ายฝากเอมบริโอเริ่มแรก ใช้ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับมะเร็ง (Fekete และ Little ,1942;) ต่อมามีการถ่ายฝากเอมบริโอระยะบลาสโตซิสที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกาย (Hoppe และ Pitts, 1973; Kasai และ คณะ,1979) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเอมบริโอระยะ 1-เซลล์ (Whitten และ Biggers,1968) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงระยะ 2-เซลล์ (Biggers และ คณะ,1965) และเอมบริโอภายหลังการเก็บรักษาโดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส (Whittingham และคณะ,1979;Nakagata และ Toyoda, 1980)

ปัจจัยที่มีผลต่อการฝังตัวหรือการอยู่รอดของเอมบริโอภายหลังการถ่ายฝากคือความสอดคล้องระหว่างอายุของเอมบริโอที่ถ่ายฝากกับอายุการตั้งท้องเทียมของ recipient ในสัตว์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน เนื่องจากการฝังตัวของเอมบริโอจะเกิดขึ้นในช่วงเวลาที่ไม่ตรงกันเมื่อผ่านลงสู่มดลูกแล้ว เช่น ในโคและแกะ อายุของเอมบริโอและอายุของการตั้งท้องเทียมสามารถเหลื่อมล้ำได้มากที่สุด $\pm$ 2 วัน (Betteridge, 1977) ส่วนในหนูแรทและหนูเมาซ์สามารถสอดคล้องหรือเหลื่อมล้ำได้เพียง 1 วัน (Whittingham และคณะ,1979) แต่ Noyes และคณะ (1963) พบว่าการถ่ายฝากเอมบริโอของหนูเมาซ์หรือหนูแรทระยะ 1-เซลล์ ถึง 2-เซลล์ไปยังมดลูกเอมบริโอจะเสื่อมสลายภายใน 24 ชั่วโมง ดังนั้น เอมบริโอในระยะต้น ๆ (1- เซลล์ ถึง 8-เซลล์) ควรถ่ายฝากไปยังท่อนำไข่ของ recipient และเอมบริโอระยะท้าย ๆ ของการแบ่งตัว ควรถ่ายฝากในมดลูก

- ตำแหน่งการถ่ายฝากเอมบริโอ Tarkowski (1959) มีรายงานว่าเอมบริโอในระยะก่อนฝังตัวทุกระยะ (ระยะ 1- เซลล์ ถึง บลาสโตซิส) สามารถฝังตัวได้ แม้จะถ่ายฝากเอมบริโอไปยังท่อนำไข่ของหนูตัวรับ(recipient) ที่มีอายุการตั้งท้องเทียมได้ 1 วัน แต่อย่างไรก็ตามการถ่ายฝากเอมบริโอในหนูเมาซ์ เพื่อให้มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดควรถ่ายฝากเอมบริโอระยะต้นๆ 1- เซลล์ หรือ 2 เซลล์ ใน ovarian bursa ของหนูตัวรับที่ตั้งท้องเทียมได้ 12 ชั่วโมง และเอมบริโอระยะบลาสโตซิส (อายุ 3.5 วัน) ควรถ่ายฝากในมดลูกของ recipient ที่ตั้งท้องเทียมได้ 2.5 - 3.5 วัน อนึ่งเอมบริโอในระยะต้น ๆ ไม่ควรถ่ายฝากในมดลูก เนื่องจากสภาวะแวดล้อมภายในมดลูกไม่เหมาะสมในการฝังตัวและส่งเสริมการเจริญเติบโตของเอมบริโอ (Noyes และคณะ,1963)

- ภาวะ stress ต่าง ๆ เช่น การเพาะเลี้ยงเอมบริโอในจานทดลอง,การเก็บรักษาเอมบริโอโดยการแช่แข็ง พบว่า ทำให้อัตราการฝังตัวของเอมบริโอลดลง ภายหลังการถ่ายฝาก (Whittingham และ Bavister, 1974c; Hahn และ Schneider, 1982; Shelton และ Carft, 1982) แต่อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาพบว่าเมื่อปรับปรุงสภาวะ

แวดล้อมของการเพาะเลี้ยงในจานทดลองให้มีคุณภาพดีใกล้เคียงกับภายในร่างกายแล้ว จำนวนฟีต้สที่เจริญจากบลาสโตซิสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใกล้เคียงกับบลาสโตซิสที่ได้จากการเจริญภายในร่างกาย (Harlow และ Quinn, 1979)

ประโยชน์ของการถ่ายฝากเอมบริโอ

1. เพื่อศึกษาความอยู่รอดของเอมบริโอภายหลังที่ได้ทำการทดลองภายนอกร่างกาย (in vitro) เช่น การเก็บรักษาโดยการแช่แข็ง การเพาะเลี้ยง หรือภายหลังการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย (in vitro fertilization)

2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแม่และเอมบริโอในระยะต่าง ๆ เช่น การฝังตัว การตั้งท้อง อายุในการถ่ายฝากเอมบริโอ และการควบคุมทางกรรมพันธุ์ (genetic control)

3. ควบคุมโรคทางพันธุกรรม (genetic diseases)

4. เพื่อปรับปรุงพันธุ์สัตว์เลี้ยง

5. ใช้เป็นวิธีการรักษาหญิงที่มีบุตรยาก (infertility) เช่น มีการอุดตันของท่อนำไข่ (Fallopian tube block) หรือในเพศชายที่มีปัญหา Oligospermia

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาผลการแช่แข็งต่อการอยู่รอดของเอมบริโอของหนูเมาซ์ พันธุ์ ICR ในระยะ 2-, 4- และ 8- เซลล์

2. เพื่อศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเอมบริโอของหนูเมาซ์ในไนโตรเจนเหลวต่อการอยู่รอด

3. เพื่อศึกษาผลของการแช่แข็งต่อการฝังตัวของเอมบริโอของหนูเมาซ์ภายหลังจากนำไปถ่ายฝากในหนูตัวรับที่ตั้งท้องเทียม (Pseudopregnancy)

ความสำคัญหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้

1. ทำให้ทราบถึงระยะของเอมบริโอที่เหมาะสมในการนำมาเก็บรักษาไว้โดยการแช่แข็ง เพื่อให้มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด

2. ทราบถึงผลของช่วงเวลาในการเก็บเอมบริโอในไนโตรเจนเหลวต่อการอยู่รอดของเอมบริโอ

3. ทราบผลกระทบของการแช่แข็งต่อการฝังตัวของเอมบริโอที่ผนังมดลูก

4. นำมาประยุกต์ใช้เป็น ตัวควบคุม คุณภาพ (quality control) ของห้องปฏิบัติการในการศึกษาการแช่แข็งเอมบริโอของคนที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกายเพื่อแก้ปัญหาการมีบุตรยาก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย