Cryopreservation of embryos and oocytes

วัลลภ ปานพูนทรัพย์, พ.บ.*

บทคัดย่อ Cryopreservation of embryos and oocytes เป็นวิธีเก็บรักษา embryos และ oocytes โดยอาศัยกระบวนการการแช่แข็ง (Freezing) วิธีที่ใช้ได้แก่ slow cooling technique หรือ rapid freezing และ vitrification สารที่นิยมใช้เป็น cryoprotectants ประกอบด้วย 1,2-propanediol (propylene glycol, PROH) หรือ dimethyl sulphoxide (DMSO) หรือ glycerol จากการศึกษาพบอัตราการมีชีวิตรอด (survival rate) ภายหลัง การหลอมละลาย (thawing) ของ embryos สูงกว่า oocytes แต่ survival rate และอัตราการตั้งครรภ์ (pregnancy rate) ของ embryos ที่เก็บรักษาไว้ (cryopreserve) ในระยะ blastocyst ต่ำกว่าระยะอื่นๆ ของ embryos pregnancy rate จากการใช้ frozen-thawed embryos ที่ cryopreserve ใน PROH สูงกว่าที่ cryopreserve ใน DMSO และ survival rate ของ mature oocytes ที่ cyopreserve ไว้สูงกว่าของ immature oocytes

Abstract **Cryopreservation of embryos and oocytes**

Wallobh Parnpoonsup, M.D.*

Cryopreservation of embryos and oocytes is the method of preserving embryos and oocytes by means of freezing. Either slow cooling techinique or rapid freezing and vitrification could be employed. The common used cryo-protectants are 1,2-propanediol (propylene glycol, PROH) or dimethyl sulphoxide (DMSO) or glycerol. The study showed that the survival rate and pregnancy rate of frozen-thawed embryos were higher than frozen-thawed oocytes, however survival rate of freezing blastocyst-stage embryos were lower than other stage. A higher pregnancy rate in patients receiving transferred embryos frozen in PROH, compared with those frozen in DMSO and the cryopreservation of mature oocytes were preferred to immature oocytes.

(MJS 1998 ; 2 : 105-110)

* ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
Department of Obstetrics & Gynecology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University

บทนำ

การนำตัวอ่อน (embryos) มาเก็บรักษาไว้ (crypreservation) เริ่มมีรายงานครั้งแรกตั้งแต่ปี ค.ศ. 1972 โดย Whittingham และ wilmut[1,2] หลังจากนั้นก็ได้มีการพัฒนาวิธีการมาตามลำดับ ประโยชน์ที่ได้จาก cryoperservation มีหลายประการเช่น สตรีมีบุตรยากที่ได้รับการกระตุ้นไข่ (Induction of ovulation) และการตรวจพบ follicles โตเป็นจำนวนมาก แพทย์สามารถเจาะเก็บ oocytes ออกมาเลี้ยงหรือผสม (inseminate) กับเชื้ออสุจิ (sperm) จนได้เป็น embryos แล้วทำ cryopreserve ไว้ หลังจากนั้นจึงนำไปย้ายเข้าสู่โพรงมดลูกในรอบระดูต่อไป เป็นการป้องกันการเกิดภาวะรังไข่กระตุ้นมากเกินไป (ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS) หรือในกรณีที่ได้ทำการย้าย embryos เข้าสู่โพรงมดลูกแล้วไม่ตั้งครรภ์ cryopreservation ก็จะช่วยให้มี embryos เหลือและนำมาใช้ในรอบต่อไปได้โดยไม่ต้อง induction of ovulation อีก ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายได้มาก เนื่องจากฮอร์โมนที่ใช้ใน induction of ovulation มีราคาสูง นอกจากนี้ ยังช่วยให้แพทย์ไม่ต้องใส่ embryos จำนวนมากที่ได้ทั้งหมดกลับไปในโพรงมดลูกเพียงคราวเดียว ทำให้การเกิดภาวะครรภ์แฝด (multifetal pregnancy) และภาวะแทรกซ้อนที่อาจเกิดจากการตั้งครรภ์แฝดลดลงด้วย ในอนาคตเมื่อการเลี้ยง immature oocytes พัฒนาดีขึ้น สตรีอายุน้อยจำเป็นต้องผ่าตัดรังไข่ (ovary) ออกทั้งสองข้างหรือต้องได้รับการฉายรังสีบริเวณ ovary ก็สามารถตัด ovary และนำมา cryopreserve ไว้เพื่อการมีบุตรของตนเองในอนาคตได้

สารที่ใช้ใน cryopreservation (Cryoprotectants)

สารที่ใช้ในการแช่แข็งต้องมีคุณสมบัติช่วยป้องกันการทำลายโปรตีนและเยื่อหุ้มเซลโดยไม่มีพิษ (toxic) ต่อ embryos หรือ oocytes สารที่นิยมใช้ได้แก่

1.1 1,2-propanediol (propylene glycol หรือ PROH) น้ำหนักโมเลกุล 76.09 ความเข้มข้นที่นิยมใช้สำหรับการแช่แข็ง (freezing) คือ 1.5 M และความเข้มข้นสำหรับกระบวนการละลายผลึกน้ำแข็ง (thawing) เท่ากับ 0.5 M และ 1 M นิยมใช้ในการ cryopreserve embryos ระยะ pronuclear และระยะ early cleavage

1.2 Dimethyl sulphoxide (DMSO) มีน้ำหนักโมเลกุล 78.13 ความเข้มข้นที่ใช้ตั้งแต่ 1.5 – 4.5 M เหมาะสำหรับ embryos ที่กำลัง cleavage ทุกระยะ

1.3 Glycerol มีน้ำหนักโมเลกุล 92.09 ความเข้มข้นที่ใช้ คือ 1 M (8% Glycerol) นิยมใช้กับ embryos ระยะ blastocyst

นอกจาก cryoprotectants ที่กล่าวแล้ว สารอื่นๆ ที่จำเป็นสำหรับกระบวนการ cryopreservation ได้แก่ 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane sulfonic acid (HEPES)-buffered medium ที่มี 10-20% human serum หรือ protein supplements อื่นๆ และ sucrose ซึ่งช่วยรักษา osmotic gradient ภายนอกเซล ป้องกันการ uptake น้ำเข้าภายในเซลมากเกินไปในระหว่าง remove cryoprotectant

ขั้นตอน freezing

1.1 กรณีที่ freezing โดยวิธี Slow cooling techniques วิธีการเริ่มจาก

1.1.1 การปรับความสมดุลย์ระหว่าง embryos หรือ oocytes กับ freezing solution ที่อยู่รอบ ๆ (Equilibration)

เริ่มจากการแช่ embryos ใน freezing solution เพื่อให้เกิดการสมดุลย์ระหว่าง freezing solution กับ embryos หรือ oocytes โดย freezing solution จะซึมผ่านเข้าเซลโดยวิธี osmosis แต่อัตราการซึมผ่านจะช้ากว่าอัตราการซึมผ่านของ น้ำจากเซลออกสู่ภายนอก ผลตามมาคือ เซลจะเหี่ยว

1.1.2 การลดอุณหภูมิ (Cooling)

การลดอุณหภูมิควรลดอย่างช้าๆ เพื่อให้ระยะเวลาที่น้ำใน embryos หรือ oocytes ซึมออกสู่ภายนอกเซลมีเพียงพอเป็นผลให้ปริมาณน้ำภายใน embryos หรือ oocytes น้อยลงจนไม่เกิด ice formation ภายในเซล ทำให้ embryos หรือ oocytes ไม่ถูกทำลายไป Whittingham และคณะ[1,3] ได้รายงานการลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ (น้อยกว่า 1 องศาเซลเซียสต่อนาที) พบว่าได้ผลดี

1.1.3 Seeding

ปกติเมื่อลดอุณหภูมิลงช้าๆ จนต่ำกว่า freezing point (supercool) ทั้ง embryos หรือ

oocytes และ freezing solution จะยังไม่เกิด ice formation ดังนั้นถ้าปล่อยให้เกิด ice formation เอง อาจทำให้เกิด ice nucleation ของ embryos หรือ oocytes ทำให้เซลตาย หรือ ถูกทำลายไปได้ การทำ seeding จึงเป็นวิธีการช่วยชักนำให้เกิดผลึก (crystals) ของ freezing solution รอบๆ embryos หรือ oocytes โดยการใช้วัตถุที่เย็นจัด (precooked object) แตะบริเวณด้านนอกของภาชนะในระยะที่ห่างจาก embryos หรือ oocytes พอสมควรที่อุณหภูมิ −6 ถึง −7 องศาเซลเซียสเป็นผลให้เกิด dehydrate ของ embryos และ oocytes ตามมา โดยเซลไม่ตาย หลังจากนั้นการลดอุณหภูมิช้าๆ จนถึง −60 ถึง −80 องศาเซลเซียส เพื่อให้ระยะเวลา นานเพียงพอที่เซลจะเกิดภาวะ dehydrate จนไม่เกิด ice formation ภายใน cell อย่างไรก็ตาม Whittingham ได้รายงานการลดอุณภูมิลงช้าๆ จนถึงช่วง −36 ถึง −40 องศาเซลเซียส แล้วจึงลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว (rapid cooling) พบว่าสามารถเก็บรักษา embryos ไว้ได้เช่นเดียวกัน[4]

1.2 การลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (Rapid freezing and Vitrification techniques) vitrification คือ ภาวะที่ freezing solution เปลี่ยนจาก liquid state ไปเป็น amorphous หรือ glass state โดยสามารถหลีกเลี่ยงการเกิด ice crystal formation vitrification จะเกิดขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ cryprotectant มากกว่า 40% แต่ความเข้มข้นระดับดังกล่าวมัก toxic ต่อเซล ดังนั้นเวลาที่ embryos สัมผัสกับ freezing solution ต้องสั้นและอุณหภูมิต้องต่ำ เช่น อุณหภูมิที่ 0 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เพื่อลด toxic ของ freezing solution ต่อ embryos หรือ oocytes

Thawing

หลักการ thawing ขึ้นอยู่กับขั้นตอนการ freezing ในกรณีที่ freeze โดยวิธี Slow cooling และหยุดอุณหภูมิที่ −30 องศาเซลเซียส หรือ Rapid freezing และ Vitrification การ thawing ต้องเป็น rapid thawing เพื่อป้องกันการเกิด devitrification และ recrystalization ทำให้เซลตายได้เพราะยังมีน้ำเหลืออยู่ในเซลค่อนข้างมาก สำหรับกรณีที่ freeze โดยวิธี Slow cooling โดยค่อยๆ ลดอุณหภูมิลงไปช้าๆ จนถึงอุณหภูมิ −8 องศาเซลเซียส thawing ควรทำอย่างช้าๆ ด้วย โดยค่อยๆ เพิ่มอุณหภูมิประมาณ +5 ถึง +15 องศาเซลเซียสต่อนาที ทั้งนี้เพื่อป้องกันภาวะ osmotic effect

วิธีต่าง ๆ ที่ใช้ใน cryopreservation

1. Methods used for cryopreservation of human embryos (pronclear to four cell embryos) in PROH

Freezing

– freezing solution

1.5 M PROH + 0.1 M sucrose in PBS + 20% human serum

– Equilibration with 1.5 M PROH 15 min at room temperature, transfer to freezing solution

– Load into ampules/straws ==> Programmed Freezer

– Cooling −2°C/min จาก Room temp (20°C) ถึง −7°C

– Seeding, then −0.3°C/min to −30°C

– 50°C/min from −30°C to −150°C หรือ −160°C

– store in liquid nitrogen

Thawing

– plunge into waterbath 30°C for 40–50 sec. (Rapid thawing)

– stepwise dilution ===> Transfer to culture medium

2. Methods used for cryopreservation of human embryos (pronuclear oocytes to blastocysts) in DMSO

Freezing

– freezing solution

1.5 M DMSO in HEPES – buffered M2 medium with either 20% human serum or 4 mg/ml Human serum albumin

– Equilibration (stepwise cryoprotectant addition) with 10 minute in graded steps of 0.5, 1.0, and 1.5 M DMSO at room temperature

– Load into cryovial or Straw ==> Programmed Freezer

– Cooling –2 °C/min to –7 °C

– Seeding

– then –0.3°C/min from –7°C to –36°C store in liquid nitrogen (type A) or –0.3 °C/min from –7 °C to –45 °C or below (to –80 °C),

– store in liquid nitrogen (type B)

Thawing

– warm in a 35°C water bath until ice melts (freezing type A)

– warm at 5°C to 15°C/min from –80°C to 0 °C then warm rapidly to room temperature (freezing type B)

3. Methods used to freeze human blastocysts in glycerol

Freezing

– freezing solution

1.0 M (8%) glycerol in PBS or HEPES–BUFFERED culture media +20% human serum

– equilibration 10 minute in 1%, 2%, 4%, 6%, 8% glycerol at room temperature

– cooling rapid cooling to –7 °C, ice nucleate then –0.3°C from –7°C to tempertures of –30° C to –36° C

– store in liquid nitrogen

Thawing

– thaw at 30 °C to 37 °C water bath until ice melts

– stepwise removal of glycerol 10 minute each

– transfer to culture medium

Outcome of embryos and oocytes from cryopreservation

จากรายงานการศึกษาของ Friedler และคณะ พบอัตราคงอยู่ (survival rate) ของ frozen embryos โดยวิธี slow cooling เฉลี่ยประมาณ 50% และอัตราการตั้งครรภ์ (pregnancy rate) ภายหลังการย้าย embryos เข้าโพรงมดลูกจากการใช้ thawed embryos ประมาณ 13%[5] ทำนองเดียวกัน Mandelbaum และคณะได้รายงาน survival rate ของ frozen–thawed embryos ใน PROH เท่ากับ 62% และ pregnancy rate 19%[6]

Van steirtegham และคณะรายงานเปรียบเทียบ survival rate และ pregnancy rate ของ embryos โดยการใช้ PROH และ DMSO เป็น cryoprotectant พบว่า กลุ่มที่ใช้ PROH เป็น cryoprotectant มี survival rate 51% และ pregnancy rate 23% สำหรับกลุ่มที่ใช้ DMSO เป็น cryoprotectant มี pregnancy rate 19%[7] Trounson A และคณะรายงานการใช้ PROH เป็น cryoprotectant พบ survival rate สูงถึง 70% และ Pregnancy rate เท่ากับ 20% สำหรับ DMSO พบ survival rate 50% และ pregnancy rate เท่ากับ 17%[8] สำหรับการ cryopreserve embryos ที่ระยะ blastocyst นั้นพบว่าอัตราความสำเร็จค่อนข้างต่ำ Fugger EF ได้รายงานศึกษาในสตรีมีบุตรยากจำนวน 2085 คน โดยทำ cryopreserve embryos ระยะต่างๆ กันพบว่า pregnancy rate จากการใช้ zygotes, cleaved embryos และ blastocysts เท่ากับ 17.4%, 12.5% และ 4.3% ตามลำดับ[9] และจากการศึกษาของ Troup SA พบว่า Survival rate ของ frozen–thawed embryos ระยะ pronucleate, early cleavage และ expanded blastocyst เท่ากับ 72%, 60% และ 38% ตามลำดับ โดยพบ pregnancy rate เท่ากับ 47%, 14% และ 0% ตามลำดับ[10]

สำหรับ survival rate ของ embryos จากการ cryopreserve โดยวิธี Rapid freezing และ Vitrification นั้น จากการศึกษาต่างๆ พบว่าขึ้นอยู่ กับ range ของ freezing solution ที่ใช้[11-14] และความเหมาะสมกับ embryos[15,16] Trounson A และคณะรายงานการใช้ 3 M DMSO ผสมกับ 0.25 M sucrose พบ survival rate 73–75% และ Pregnancy rate 15%[8] Gordts และคณะรายงานการใช้ 2.5 M DMSO และ 0.25 M Sucrose พบ survival rate 69% และ pregnancy rate 20%[17]

การ cryopreserve oocytes พบว่า survival rate and pregnancy rate ต่ำกว่าการ cryopreserve embryos[18-20] ทั้งนี้เนื่องมาจาก zona pellucida มีลักษณะแข็งขึ้น[21] จากการสูญเสีย cortical granules ไปบางส่วน[22] นอกจากนี้การ cryopreserve oocytes ยังมีผลกระทบต่อ cytoskeleton ของ oocytes ทำให้เกิด disorganiztion ของ spindle, chromosomes และทำให้ polar pericentriol material เกิดการแยกตัวด้วย[23] จากการศึกษาของ Trounson A และคณะพบว่าการ cryopreserve oocytes ทำให้ survival rate ต่ำลง โดยพบว่า survival rate ของ frozen–thawed mature oocytes ถึงระยะ 2 เซลเท่ากับ 40% เทียบกับ survival rate ของ nonfrozen oocytes เท่ากับ 91%[8] สำหรับการ cryopreserve mature oocytes โดยวิธี Rapid freezing และ Vitrification Nakagata ได้รายงานการศึกษาใน mouse โดยใช้ modified VS1 : 2.53 M–dimethyl sulphoxide, 2.36 M–acetamide, 1.19 M–propylene glycol, 5.4% (w/v) polyethylene glycol (Mr 8000) in PB1 พบว่า survival rate ของ frozen–thawed oocytes ที่สามารถเจริญเติบโตต่อจนถึงระยะ 2 cellเท่ากับ 78.4%[24] เมื่อเปรียบเทียบการ cryopreserve mature oocytes กับ immature oocytes จะพบว่า การ cropreserve immature oocytes ผล survival จะต่ำกว่าการ cryopreserve mature oocytes Schroeder และคณะได้รายงานผลการวิจัยพบว่า survival rate ของ frozen–thawed immature oocytes ถึงระยะ 2 เซล เท่ากับ 9% และไม่พบ oocytes ที่โตถึงระยะ blastocysts เลย[25]

จากรายงานการศึกษาที่กล่าวมาจะพบว่า มีปัจจัยหลายประการในกระบวนการ cryopreservation ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับ survival rate และ pregnency rate ไม่ว่าจะเป็นวิธีการทำ cryopreservation ชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่ใช้ ระยะของ embryos หรือ oocytes ที่นำมาทำ cryopreserve รวมทั้งลักษณะรูปร่างของ embryos โดยพบว่า survival rate และ pregnancy rate ของ frozen–thawed embryos สูงกว่า oocytes และ survival rate ของ mature oocytes ดีกว่า immature oocytes อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาพบว่า survival rate และ pregnancy rate ของ embryos ที่ cryopreserve ในระยะ blastocyst ต่ำกว่าระยะอื่นๆ ของ embryos และ pregnancy rate จากการใช้ frozen–thawed embryos ที่ cryopreserve ใน PROH สูงกว่าใน DMSO

References

1. Whittinghum DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196 C and -269 C. Science 1972; 178: 411-4.
2. Wilmut I. The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent, and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing. Life sci 1972; 11: 1071-9.
3. Whittingham DG. Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196 C. J Reprod Fertil 1977; 49:89-94.
4. Whittingham DG, Wood M, Farrant J, Lee H, Halsey JA. Survival of frozen mouse embryos after rapid thawing from -196 C. J Reprod Fertil 1979; 56:11-21.
5. Friedler S, Giudice LC, Lamb EJ. Cryopreservation of embryos and ova. Fertil Steril 1988; 49:743-64.
6. Mandelbaum J, Junca AM, Plachot M, Alont MO, Salat-Baroux J, Alvarez S, Alvarez S, et al. Cryopreservation of human embryos and oocytes. Hum Reprod 1988; 63:117-9.
7. Van Steirteghem AC, Van den Abbeel E, Camus M, Van Waseberghe L, Braeckmans P, khan I, et al. Cryoperservation of human embryos obtained after gamete intra-fallopian transfer and or in vitro fertilization. Hum Reprod 1987; 2: 593-8.
8. Trounson A, Kirby C. Problems in the cryopreservation of unfertilized eggs by slow cooling in dimethly sulfoxide. Fertil Steril 1989; 52:778-86.
9. Fugger EF. Clinical status of human embryos cryopreservation of embryos and ova. Fertil Steril 1989; 52:986-6.
10. Troup SA, Matson PI, Critchlow JD, Morroll DR, Lieberman BA, Burslem RW. Cryopreservation of human embryos at the pronucleate, early cleavage, or expanded blastocyst stages. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1990; 38:133-9.
11. Rall WF. Factos affection the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. Cryobiology 1987; 24:387-402.
12. Shaw JM, Diotallevi L, Trounson A. A simple 4.5 M dimethylsulfoxide freezing technique for the cryopreservation of one-cell to blastocyst stage preimplantation mouse embryos. Reporod Fertil Dev 1991; 3:621-6.
13. Trounson A, Sjoblom p. Cleavage and development of human embryos in vitro after ultrarapid freezing and thawing. Fertil Steril 1988; 50:373-6.

14. Trounson A, Peura A, Freemann L, Kirby C. Ultrarapid freezing of early cleavage stage human embryos and eight-cell mouse embryos. Fertil Steril 1988; 49:822-6.
15. Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T, Machida T. A simple method for mouse embryos cryopreservation in a low toxicity vitrificantion solution, without appreciable loss of viability. J Reprod Fertil 1990; 89:91-7.
16. Nakagata N. Cryopreservation of mouse strains by ultrarapid freezing. Exp Anim 1990; 39:303-5.
17. Gordts S, Roziers P, Campo R, Noto V. Survival and pregnancy outcome after ultrarapid freezing of human embryos. Fertil Steril 1990; 53:469-72.
18. Al-Hasani S, Diedrich K, van der Ven H, Reinecke A, Hartje M, Krebs D. Cryopreservation of human oocytes. Hum Reprod 1987; 2:695-700.
19. Chen C. Pregnancy after human oocytes cryopreservation. Lancet 1986; 1:884-6.
20. Van Uem JF, Siebzehnrubl ER, Schuh B, Koch R, Trotnow S, Trotnow S, Lang N. Birth after cryopreservation of unfertilized oocytes. Lancet 1987; 1:752-3.
21. Johnson MH, Pickering SJ, George MA. The influence of cooling on the properties of the zona pellucida of the mouse. Hum Reprod 1988; 3:383-7.
22. Vincent C, Pickering SJ, Johnson MH. The hardening effect of dimethy - sulfoxide on the mouse zona pellucida requires the presence of an oocyte and is associated with a reduction in the number of cortical granules present. J Reprod Fertil 1990; 89:253-9.
23. Johnson MH, Pickering SJ. The effect of dimethylsulphoxide on the microtubular system of the mouse oocyte. Development 1987; 100:313-24.
24. Nakagata N. High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. J Reprod Fertil 1989; 87:479-83.
25. Schroeder AC, Champlin AK, Mobraaten LE, Eppig JJ. Developmental capacity of mouse oocytes cryopreserved before and after maturation in vitro. J Reprod Fertil 1990; 89:43-50.