บทความวิชาการ

เทคโนโลยีชีวภาพการแช่แข็งเอ็มบริโอแบบวิทริฟิเกชั่น

ดวงใจ บุญกุศล*

บทคัดย่อ

การแช่แข็งสามารถแบ่งได้เป็น 2 แบบใหญ่ๆ คือ การแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ และแบบลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว หรือวิทริฟิเกชั่น ที่ผ่านมาเอ็มบริโอส่วนใหญ่ถูกแช่แข็งด้วยวิธีการลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ แต่วิธีนี้ยังไม่ประสบความสำเร็จในการแช่แข็งเอ็มบริโอที่มีการเจริญอยู่ในระยะต้นๆ การแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเกชั่นเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่นำมาใช้สำหรับเอ็มบริโอระยะต้นๆ วิทริฟิเกชั่นเป็นวิธีการแช่แข็งที่ไม่ทำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งขึ้นในเซลล์โดยการใช้สารป้องกันการแช่แข็งที่มีความเข้มข้นสูง ดังนั้นวิธีนี้จึงสามารถป้องกันความเสียหายของเซลล์ที่เกิดจากเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ได้ แต่จะประสบปัญหาความเป็นพิษของสารป้องกันการแช่แข็งที่ใช้ในความเข้มข้นสูงมาก ล่าสุดมีรายงานการพัฒนาอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการแช่แข็งแบบวิทริฟิเกชั่น ได้แก่ electron microscope grid, open pulled straw, cryoloop และ solid surface โดยลดปริมาตรสารละลายป้องกันการแช่แข็งให้น้อยที่สุดเพื่อเพิ่มอัตราความเร็วในการแช่แข็งให้สูงขึ้น ซึ่งสามารถช่วยลดความเป็นพิษของสารป้องกันการแช่แข็งที่อุณหภูมิห้องและป้องกันการถูกทำลายจากการเกิดเกล็ดน้ำแข็งได้ บทความนี้ได้รวบรวมผลสำเร็จของการแช่แข็งแบบวิทริฟิเกชั่น ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับผลสำเร็จ และชี้ให้เห็นถึงประสิทธิภาพการแช่แข็งเอ็มบริโอด้วยวิธีวิทริฟิเกชั่นแบบต่างๆ

คำสำคัญ: การแช่แข็ง วิทริฟิเกชั่น เอ็มบริโอ

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: duangjai@swu.ac.th

Biotechnology of Embryo Vitrification

Duangjai Boonkusol*

ABSTRACT

Cryopreservation can be broadly classified into 2 types, including slow freezing and rapid freezing (vitrification) methods. Embryos have been cryopreserved mainly by slow freezing, but this method has not been effective for embryos at early cleavage stage. Vitrification is an alternative method for the early stage embryos. Vitrification enables rapid cooling of samples without ice crystals forming with the use of a very high concentration of cryoprotectant. This method can prevent cell injury from intracellular ice forming, but toxic effects of highly concentrated cryoprotectants on the cell usually result in some problems. Recently, several modified carriers used in vitrification have been devised in order to minimize volume of cryoprotectant solution as much as possible. Electron microscope grid, open pulled straw, cryoloop, and solid surface have been used as special carriers to achieve higher cooling rate which can decrease cryoprotectant toxicity and prevent chilling injury. This article summarized factors supporting or disapproving the use of vitrification, demonstrated its success in assisted reproductive biotechnology, and described the outline of each vitrification method to provide evidence for the potential significance of vitrification.

Keywords: cryopreservation, vitrification, embryo

Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University

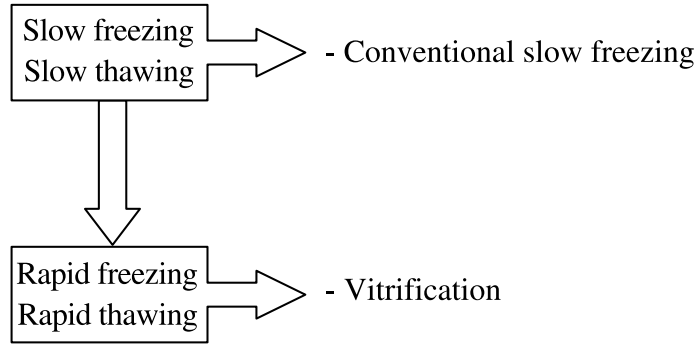
*Corresponding author, e-mail: duangjai@swu.ac.th

บทนำ

การแช่แข็งเอ็มบริโอเป็นวิธีการหนึ่งที่ช่วยเก็บรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสัตว์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ หรือสัตว์ที่ใกล้จะสูญพันธุ์ ซึ่งสามารถเก็บรักษาพันธุกรรมของสัตว์นั้นๆ ไว้ได้โดยการทำธนาคารเอ็มบริโอ (embryo banking) ซึ่งทำให้สามารถเก็บและขนส่งเอ็มบริโอจากที่แห่งหนึ่งไปยังที่อีกแห่งหนึ่งได้ และยังมีประโยชน์เชิงพาณิชย์ในรูปเอ็มบริโอแช่แข็ง ในมนุษย์เทคนิคการแช่แข็งสามารถนำมาใช้ร่วมกับการผลิตเอ็มบริโอภายนอกร่างกาย (*in vitro* embryo production) เพื่อแก้ปัญหาในผู้มีบุตรยาก ซึ่งปัจจุบันเทคนิคนี้ใช้ร่วมกับการย้ายฝากเอ็มบริโอเพื่อช่วยในการปรับปรุงพันธุ์และเพาะพันธุ์สัตว์ได้ บทความนี้เป็นบทความที่เรียบเรียงเกี่ยวกับความก้าวหน้า ผลสำเร็จ และปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการแช่แข็ง รวมถึงแนวทางที่จะช่วยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพการแช่แข็งเอ็มบริโอ

หลังจาก Whittingham และคณะ (1972) [1] ประสบความสำเร็จในการแช่แข็งเอ็มบริโอหนูเมาส์ในปี ค.ศ. 1972 ได้มีการศึกษาค้นคว้า และวิจัยด้านการแช่แข็ง เพื่อพัฒนางานด้านการการแช่แข็งเอ็มบริโอตลอดมา จนถึงปัจจุบันเอ็มบริโอของสัตว์หลายชนิดรวมทั้งเอ็มบริโอมนุษย์สามารถเก็บไว้ในรูปของเอ็มบริโอแช่แข็ง โดยการแช่แข็งได้รับการพัฒนาเป็นเครื่องมือหลักในการเก็บรักษาพันธุกรรมของทั้งสัตว์เลี้ยงและสัตว์ป่า

ในปี ค.ศ. 1973 Wilmut และ Rowson [2] ได้รายงานความสำเร็จในการย้ายฝากเอ็มบริโอโคแช่แข็งด้วยการลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ (slow freezing) และทำละลายโดยการเพิ่มอุณหภูมิอย่างช้าๆ (slow thawing) เรียกว่า การแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิช้าๆ (conventional slow freezing) ซึ่งเป็นรูปแบบของการแช่แข็งเอ็มบริโอที่นิยมจนถึงปัจจุบัน เนื่องจากให้ความปลอดภัยและอัตราการรอดสูงหลังการแช่แข็งและทำละลาย แต่ด้วยข้อจำกัดบางประการของการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆ เช่น ความเสียหายของเซลล์ที่เกิดจากเกล็ดน้ำแข็ง เครื่องมือที่ใช้มีราคาแพง ในปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาการแช่แข็งให้มีรูปแบบที่ลดขั้นตอนและเวลาการแช่แข็งเป็นการใช้ความเร็วในการแช่แข็งสูง (rapid freezing) และความเร็วในการทำละลายสูง (rapid thawing) เรียกว่า การแช่แข็งแบบวิทริฟิเกชั่น (vitrification)



ขั้นตอนโดยทั่วไปของการแช่แข็งเอ็มบริโอ ประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 4 ขั้นตอน คือ

1. การให้เอ็มบริโอสัมผัสกับสารป้องกันการแช่แข็ง (addition of cryoprotectant)

2. การลดอุณหภูมิลงเพื่อทำให้เกิดการแช่แข็งในเซลล์ (freezing) ทั้งนี้การลดอุณหภูมิลงมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับวิธีการแช่แข็ง แล้วจึงใส่เอ็มบริโอลงในไนโตรเจนเหลว

3. การทำละลาย (thawing) ไปยังอุณหภูมิปกติเพื่อให้เซลล์สามารถทำงานได้

4. การเจือจางเอาสารป้องกันการแช่แข็งออกจากเซลล์ (dilution of cryoprotectant)

การแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆ (conventional slow freezing)

Whittingham และคณะ (1972) [1] เป็นนักวิจัยกลุ่มแรกที่รายงานความสำเร็จในการแช่แข็งเอ็มบริโอหนูเม้าส์แบบลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆหลังจากนั้นได้มีการศึกษาและนำวิธีนี้มาใช้ในการแช่แข็งเอ็มบริโอหนูเม้าส์อย่างต่อเนื่อง [3-4] ได้มีการแช่แข็งเอ็มบริโอหนูเม้าส์ด้วยวิธีดังกล่าวจำนวนมากเพื่อเก็บสายพันธุ์ที่สำคัญไว้ [5] หรือเพื่อใช้ผลิต transgenic mice [6] แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังไม่ประสบความสำเร็จในการแช่แข็งเอ็มบริโอระยะต้นๆ

เซลล์ของเอ็มบริโอมีลักษณะแตกต่างจากเซลล์อื่นๆ คือ มีเปลือกโซน่า เพลลูซิด้า (zona pellucida) หุ้มรอบอีกชั้นหนึ่ง สัมประสิทธิ์การซึมผ่านผนังเซลล์ของน้ำ (permeability coefficient) และพื้นที่ผิวต่อปริมาตรต่ำกว่าเซลล์อื่นๆ ทำให้ต้องใช้ความเร็วในการแช่แข็งที่ต่ำและใช้เวลาในการแช่แข็งมากกว่าเซลล์อื่นๆ [7]

ในการแช่แข็งเอ็มบริโอต้องยอมรับสิ่งหนึ่งก็คือ อัตราการรอดหลังการแช่แข็งหรือหลังการย้ายฝากจะต่ำกว่าเอ็มบริโอที่ไม่ได้แช่แข็ง ทั้งนี้เนื่องจากเกิดความเสียหายของเอ็มบริโอในระหว่างการแช่แข็ง เช่น การนำเอ็มบริโอใส่ในสารป้องกันการแช่แข็งที่มีความเข้มข้นมากกว่าหรือการเจือจางสารป้องกันการแช่แข็งออกจากเซลล์ และรวมทั้งจากการแช่แข็งเอง เมื่อเอ็มบริโอเผชิญกับอุณหภูมิต่ำ มักสังเกตความผิดปกติที่เกิดขึ้นในระดับเปลือกโซน่า เพลลูซิด้า ที่แตกออกจากการแช่แข็งและความผิดปกติของเซลล์ การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนได้แสดงถึงความเสียหายในระดับโครงสร้างเซลล์ ผนังเซลล์ ตัวเซลล์ จุดเชื่อมระหว่างบลาสโตเมียร์ (blastomere) [8] ซึ่งหากมีไม่มากเอ็มบริโอสามารถพัฒนาต่อได้จากเซลล์ที่ไม่เสียที่เหลืออยู่ เอ็มบริโอที่มีจำนวนเซลล์เพียงครึ่งเดียวก็สามารถพัฒนาได้ ความเสียหายอาจเกิดขึ้นจากสาเหตุต่างๆ ตั้งแต่เกล็ดน้ำแข็งในเซลล์ การเปลี่ยนแปลงความดันออสโมซิส ความเป็นพิษของสารป้องกันการแช่แข็ง การบวมและการหดตัวของเซลล์จากแรงดันออสโมซิส

จากการรวบรวมของ Vajta และคณะ ในปี ค.ศ. 1997 [9] พบว่ากรณีของการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิช้าๆ ความเสียหายจะเกิดจากความดันออสโมซิส และความเป็นพิษของสารป้องกันการแช่แข็งเป็นสำคัญ ในกรณีของการแช่แข็งวิทริฟิเกชั่นนั้นซึ่งเป็นวิธีแช่แข็งที่กำจัดน้ำแข็งไม่ให้เกิดขึ้นในเซลล์ แต่ความเสียหายจะเกิดจากความดันออสโมซิส และความเป็นพิษจากสารป้องกันการแช่แข็งที่ใช้ในความเข้มข้นสูงมาก แต่ควรใช้ความเร็วในการแช่แข็งและการทำละลายโดยผ่านจุดวิกฤตประมาณ 0 องศาเซลเซียสจะช่วยลดความเสียหายจากการเย็นจัด โดยเฉพาะในส่วนของไขมันที่ประกอบในเซลล์ของเอ็มบริโอ

การแช่แข็งแบบวิทริฟิเกชั่น (vitrification)

การแช่แข็งเซลล์โดยวิธีวิทริฟิเกชั่น เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่นำมาใช้ในการแช่แข็งเอ็มบริโอที่มีการเจริญอยู่ในระยะต้นๆ มีรายงานความสำเร็จในการใช้วิธีวิทริฟิเกชั่นในการแช่แข็งเอ็มบริโอหนูเม้าส์ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1985 โดย Rall และ Fahy [10] หลังจากนั้นมีรายงานจำนวนมากที่ใช้วิทริฟิเกชั่นในการแช่แข็งเอ็มบริโอหนูเมาส์ในระยะโปรนิวเคลียส (pronuclear stage) [11-15]

การแช่แข็งแบบวิทริฟิเกชั่น จำเป็นต้องใช้สารป้องกันการแช่แข็งที่มีความเข้มข้นสูงซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์เอ็มบริโอ โดยเฉพาะเซลล์เอ็มบริโอในระยะ 1 เซลล์ และโอโอไซต์ [16] สารป้องกันการแช่แข็งมีความเหมาะสมในการแช่แข็งเอ็มบริโอของสัตว์แต่ละชนิดแตกต่างกัน เอทิลีน ไกลคอล (ethylene glycol) จัดเป็นสารป้องกันการแช่แข็งที่เหมาะสมในการแช่แข็งเอ็มบริโอหนูเม้าส์มากที่สุด [17-19] ซึ่ง Kasai และคณะ (1990) [18] รายงานความเข้มข้นของเอทิลีน ไกลคอล ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 30% ถึง 40% โดยที่ความเข้มข้น 30% และ 40% อัตราการเจริญหลังการแช่แข็งของเอ็มบริโอหนูเม้าส์ในระยะมอรูลาเท่ากับ 98% และ 84% ตามลำดับ รายงานวิจัยในโคส่วนมากมักใช้กลีเซอรอลเป็นสารป้องกันการแช่แข็งในระดับ 1.5 M ซึ่งให้ผลได้ดีกว่าไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide) ทั้งกลีเซอรอล (glycerol) และพรอพานไดออล (propandiol) เป็นสารป้องกันการแช่แข็งที่มีผู้นิยมใช้โดยกลีเซอรอลมักใช้ในการแช่แข็งเอ็มบริโอของสัตว์หลายๆ ชนิด โดยเฉพาะระยะมอรูลา (morula stage) และระยะบลาสโตซีส (blastocyst stage) ของโค แต่กลับใช้ไม่ได้ผลกับเอ็มบริโอระยะต้นๆ ของกระต่ายหรือโค ในขณะที่พรอพานไดออลใช้ทั้งกับเอ็มบริโอระยะต้นและระยะท้ายของสัตว์ทั้งสองชนิด [20] ข้อดีที่สำคัญ คือ พรอพานไดออลซึมเข้าเซลล์ได้มากกว่า และก่อให้เกิดน้ำแข็งในเซลล์น้อยกว่ากลีเซอรอล และไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ ในปี ค.ศ. 1992 Voelkel และ Hu [21] เปรียบเทียบสารป้องกันการแช่แข็งชนิดต่างๆ 4 ชนิด ที่ใช้ในการแช่แข็งเอ็มบริโอโคอายุ 7.0-7.5 วัน พบว่าอัตราการเจริญของเอ็มบริโอหลังทำละลายในสารเอทิลีน ไกลคอล (70%) ดีกว่าสารพรอไพลีน ไกลคอล (11%) ไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ (25%) และกลีเซอรอล (30%)

ข้อดีของการแช่แข็งแบบวิทริฟิเกชั่น เมื่อเทียบกับการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิลงอย่างช้า คือ วิทริฟิเกชั่นไม่ต้องใช้เครื่องลดอุณหภูมิแบบตั้งโปรแกรม (programmable freezing machine) ซึ่งมีราคาแพง และสามารถลดขั้นตอนและเวลาที่ใช้ในการแช่แข็ง [22] อย่างไรก็ตาม ข้อเสียเปรียบของวิธีวิทริฟิเกชั่น คือ สารป้องกันการแช่แข็งที่มีความเข้มข้นสูงที่ใช้ในวิธีนี้จะมีความเป็นพิษมากที่อุณหภูมิห้อง นักวิจัยหลายกลุ่มพยายามเพิ่มอัตราความเร็วในการแช่แข็งให้สูงขึ้น เพื่อลดความเป็นพิษของสารป้องกันการแช่แข็งที่อุณหภูมิห้อง และป้องกันการถูกทำลายจากการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง โดยการลดปริมาตรสารละลายป้องกันการแช่แข็งให้น้อยที่สุด ดังนั้นจึงมีการพัฒนาอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการแช่แข็งแบบวิทริฟิเกชั่น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการแช่แข็งให้ดียิ่งขึ้น (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 วิธีการแช่แข็งแบบวิทริฟิเกชั่นที่พัฒนาให้มีประสิทธิภาพการแช่แข็งสูงขึ้น

วิธีวิทริฟิเกชั่น	ผู้ศึกษา
electron microscope (EM) grid vitrification	Martino และคณะ (1996) [23]
open pulled straw (OPS) vitrification	Vajta และคณะ (1998) [24]
cryoloop vitrification (CLV)	Lane และคณะ (1999a,b) [25-26]
solid surface vitrification (SSV)	Dinnyes และคณะ (2000) [26]

หลังจากมีการพัฒนาอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการแช่แข็งแบบวิทริฟิเกชั่นขึ้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการแช่แข็งให้ดีขึ้น พบว่าประสิทธิภาพของการแช่แข็งด้วย electron microscope (EM) grid และ open pulled straw (OPS) สามารถเพิ่มอัตราความเร็วในการแช่แข็งให้สูงขึ้น จากอัตราความเร็วในการแช่แข็งวิทริฟิเกชั่นแบบดั้งเดิม (conventional straw vitrification) ซึ่งใช้หลอดพลาสติก 0.25 มิลลิลิตร เป็น 2,500 องศาเซลเซียส/นาที การแช่แข็งแบบวิทริฟิเกชั่น โดยใช้ EM grid เพิ่มอัตราความเร็วในการแช่แข็งเป็น 24,000 องศาเซลเซียส/นาที และวิทริฟิเกชั่นด้วย OPS เพิ่มอัตราความเร็วในการแช่แข็งเป็น 16,700 องศาเซลเซียส/นาที [9] cryoloop vitrification (CLV) เป็นวิธีวิทริฟิเกชั่นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถลดปริมาตรสารละลายป้องกันการแช่แข็ง วิธีนี้ง่ายต่อการเก็บในไนโตรเจนเหลวและไม่มีปัญหาเอ็มบริโอสูญหาย วิธี CLV ได้ถูกนำมาใช้แช่แข็งโอโอไซต์และเอ็มบริโอของสัตว์หลายชนิด เช่น หนูเม้าส์ [25] หนูแฮมสเตอร์ หนูแรท และโค [26] ในปี ค.ศ. 2000 Dinnyes และคณะ [27] รายงานความสำเร็จครั้งแรกของการใช้ solid surface vitrification (SSV) แช่แข็งโอโอไซต์โค พบว่าวิธีนี้สามารถรักษาสภาพเยื่อหุ้มเซลล์ของ โอโอไซต์ได้เป็นอย่างดี และสามารถนำไข่ที่ผ่านการแช่แข็งไปใช้ในการทำโคลนนิ่งได้สำเร็จ หลังจากนั้นวิธีนี้ประสบความสำเร็จและให้ผลดีเมื่อนำมาใช้แช่แข็งเอ็มบริโอหนูเม้าส์ในระยะโปรนิวเคลียส [28-30] ระยะ 8 เซลล์ [31] และเอ็มบริโอที่ถูกผ่าตัดแบ่ง (biopsied embryo) [32] ในปี ค.ศ. 2003 Begin และคณะ [33] ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธี SSV กับ CLV ในการแช่แข็งโอโอไซต์และเอ็มบริโอแกะ พบว่าตัวอย่างที่ผ่านการแช่แข็งทั้ง 2 วิธีมีอัตราการรอดไม่แตกต่างจากตัวอย่างที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง

วิธีวิทริฟิเกชั่นแบบต่างๆ

1. การแช่แข็งแบบวิทริฟิเกชั่นโดยใช้ EM grid

หลักการของวิธีการนี้ คือ พยายามแช่แข็งด้วยความเร็วสูงเนื่องจากโลหะจะเย็นจัดได้เร็วกว่าหลอดพลาสติก 0.25 มิลลิลิตร ที่ใช้ในวิธี conventional straw vitrification และพยายามให้มีปริมาตรของสารละลายที่เอ็มบริโอแขวนลอยน้อยที่สุด

รายละเอียดของการแช่แข็งด้วยวิธีนี้ทำโดยวางกลุ่มเอ็มบริโอประมาณ 10-15 เอ็มบริโอใน 0.1 ไมโครลิตร ของสารละลายที่มีสารป้องกันการแช่แข็ง บนแผ่นตะแกรงโลหะ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.05 มิลลิเมตร หนา 0.037 มิลลิเมตร ช่องตะแกรงแต่ละช่องมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 ไมครอน เอ็มบริโอจะ

เกาะติดกับแผ่นโลหะด้วยแรงดึงผิวจากนั้นทำการจุ่มแผ่นตะแกรงลงในไนโตรเจนเหลวทันทีโดยเอ็มบริโอจะไม่หลุดออกจากแผ่นโลหะ (รูปที่ 1 ก)

ได้มีการทดลองใช้ EM grid แช่แข็งเอ็มบริโอโครยะยะบลาสโตซีส โดยทำเทียบกับวิธี conventional straw vitrification พบว่าอัตราการรอดหลังการแช่แช็งด้วย EM grid สูงกว่า [34] นอกจากนี้ยังมีการทดลองใช้ EM grid แช่แข็งเอ็มบริโอระยะบลาสโตซีสของมนุษย์ พบว่าอัตราการรอดหลังการแช่แข็ง 82.6% อัตราการตั้งครรภ์ 34.1% และอัตราการเกิดลูก 26.8% [35]

ข้อดีของการใช้ EM grid คือ

1. ความเร็วในการแช่แข็งสูงมาก โดยแผ่นตะแกรงโลหะจะเย็นเร็วกว่าหลอดพลาสติก
2. ปริมาตรของสารละลายที่โอโอไซต์แขวนลอยบนตะแกรงนั้นน้อยมากเพียง 0.1 ไมโครลิตรเท่านั้น

2. การแช่แข็งแบบวิทริฟิเกชั่นโดยใช้ OPS

การแช่แข็งแบบวิทริฟิเกชั่นโดยใช้ OPS เป็นวิธีการที่พยายามให้เอ็มบริโอแขวนลอยในน้ำยาที่มีสารป้องกันการแช่แข็งน้อยที่สุดเท่าที่จะทำได้และใช้วิธีการแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเกชั่น Vajta และคณะ (1995) [36] ได้รายงานผลสำเร็จของการแช่แข็งเอ็มบริโอโครยะยะต้นๆ คือ ระยะ 8, 16 เซลล์ และมอรูลาระยะต้นได้เป็นผลสำเร็จ เปรียบเทียบกับเอ็มบริโอที่แช่แข็งด้วยวิธีบรรจุในหลอดพลาสติก 0.25 มิลลิลิตร ซึ่งไม่มีอัตรารอดเลย

รายละเอียดของวิธีนี้ คือ การแช่แข็งในหลอดพลาสติกขนาด 0.25 มิลลิลิตร ที่ใช้กันทั่วไป แต่ทำการดึงให้เส้นผ่าศูนย์กลางและจากความหนาของผนังหลอดลดลงประมาณครึ่งหนึ่งจากเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.7 มิลลิเมตร เป็น 0.8 มิลลิเมตร และความหนาจาก 0.15 มิลลิเมตร เป็น 0.07 มิลลิเมตร (รูปที่ 1 ค) แล้วดูดเอาเอ็มบริโอเข้าไปด้วยแรงดูดอัตโนมัติ เมื่อปลายหลอดสัมผัสกับของเหลว (capillary effect) ทำให้มีปริมาตรของเหลวเพียง 2-3 ไมโครลิตร ไม่ต้องปิดปลายหลอดแล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวทันที

ข้อดีของการใช้ OPS คือ

1. จากการที่ผนังของหลอดบางลงทำให้การเป็นฉนวนความร้อนลดลง
2. ปริมาตรของของเหลวที่เอ็มบริโอแช่อยู่ลดลงเนื่องจากเส้นผ่าศูนย์กลางของหลอดลดลง
3. แรงดูดเอ็มบริโออัตโนมัติจากหลอดบรรจุที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาดเล็กทำให้บรรจุเอ็มบริโอได้รวดเร็วและง่ายขึ้น
4. ใช้เวลาในการแช่แข็งน้อย
5. การทำละลายด้วยการเปิดปลายหลอดทิ้งไว้ทำให้เอ็มบริโอสัมผัสกับสารเจือจางโดยตรง
6. พบว่ามีความเสียหายในระดับของเปลือกโซน่า เพลลูซิด้าน้อยมาก เป็นไปได้ว่าการเปิดปลายหลอดไว้ทำให้ไม่มีอากาศอยู่ภายในหลอด ซึ่งมักจะเกิดความดันเมื่อเวลาแช่แข็งและทำละลาย

3. การแช่แข็งแบบวิทริฟิเกชั่นโดยใช้ cryoloop (CLV)

การแช่แข็งแบบวิทริฟิเกชั่นโดยใช้ cryoloop เป็นวิธีที่พัฒนามาหลังจากการใช้ OPS เพื่อพยายามให้เอ็มบริโอแขวนลอยในน้ำยาที่มีสารป้องกันการแช่แข็งน้อยกว่า ซึ่งส่วนใหญ่จะนำมาใช้กับเซลล์ที่ไวต่อการแช่แข็งมาก เช่น เอ็มบริโอระยะต้นๆ [37] มีรายงานผลสำเร็จของการแช่แข็งเอ็มบริโอมนุษย์ระยะต้น (6-8 เซลล์) โดยใช้ cryoloop ได้เป็นผลสำเร็จ อัตราการตั้งครรภ์ของเอ็มบริโอแช่แข็งเป็น 44% [38]

รายละเอียดของวิธีนี้ คือ การใช้ห่วง (loop) ซึ่งต่อกับด้ามจับโลหะสเตนเลส (stainless steel) ห่วงดังกล่าว ทำจากเส้นด้ายไนลอน (nylon) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของห่วง 20 ไมครอน หลังจากจุ่มห่วงในสารละลายป้องกันการแช่แข็งที่มีเอ็มบริโอเพื่อนำเอ็มบริโอและสารละลายป้องกันการแช่แข็งเพียง 0.5-1 ไมโครลิตร บรรจุอยู่ในห่วงแล้ว ใส่ห่วงพร้อมด้ามจับในหลอด 2 มิลลิลิตร ที่แช่อยู่ในไนโตรเจนเหลวทันที (รูปที่ 1 ข)

ข้อดีของการใช้ cryoloop คือ

1. ไม่มีฉนวนความร้อนระหว่างไนโตรเจนเหลวกับสารละลายและเอ็มบริโอ
2. ปริมาตรของของเหลวที่เอ็มบริโอแช่อยู่ลดลง
3. สามารถบรรจุเอ็มบริโอได้รวดเร็ว
4. ใช้เวลาในการแช่แข็งน้อย
5. การทำละลายง่ายมากขึ้นและทำให้เอ็มบริโอสัมผัสกับสารเจือจางโดยตรง

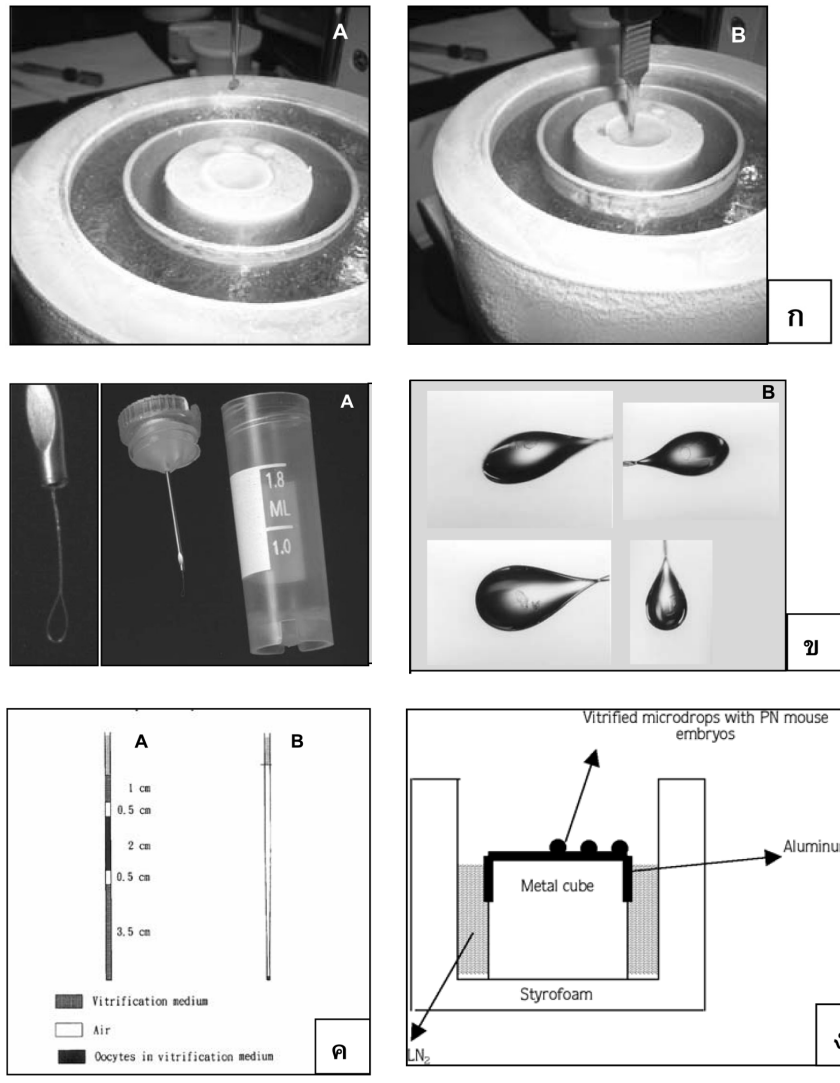
4. การแช่แข็งแบบวิทริฟิเกชั่นโดยใช้ solid surface (SSV)

การแช่แข็งวิธี SSV เป็นวิธีถูกพัฒนาขึ้นในปี ค.ศ. 2000 โดย Dinnyes และคณะ [27] เพื่อพยายามลดปริมาตรสารละลายป้องกันการแช่แข็งให้น้อยที่สุด และเพิ่มอัตราความเร็วในการแช่แข็งให้เร็วมากที่สุดโดยใช้ผิวโลหะเหนี่ยวนำความเย็น

รายละเอียดของการแช่แข็งด้วยวิธีนี้ทำโดยหยดกลุ่มเอ็มบริโอประมาณ 10-15 เอ็มบริโอ ในสารละลายที่มีสารป้องกันการแช่แข็ง 1-2 ไมโครลิตร บนผิวโลหะที่ชักนำให้เย็นโดยหล่อด้วยไนโตรเจนเหลวก่อน (รูปที่ 1 ง)

ข้อดีของการใช้ SSV คือ

1. ไม่มีฉนวนความร้อนระหว่างไนโตรเจนเหลวกับสารละลายและเอ็มบริโอ
2. ปริมาตรของของเหลวที่เอ็มบริโอแช่อยู่น้อยกว่าการใช้หลอดพลาสติกขนาด 0.25 มิลลิลิตรที่ใช้ในวิธี conventional straw vitrification
3. การทำละลายทำให้เอ็มบริโอสัมผัสกับสารเจือจางโดยตรง



รูปที่ 1 อุปกรณ์และการแช่แข็งแบบวิทริฟิเกชั่นแบบต่างๆ

ก. การแช่แข็งแบบวิทริฟิเกชั่นโดยใช้ EM grid ในขั้นตอนขณะการหย่อน EM grid ที่มีเอ็มบริโอลงในถังไนโตรเจนเหลว (A) และจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว (B) [39]

ข. cryoloop และหลอดเก็บที่มีฝาปิด (A) cryoloop ที่บรรจุสารละลายป้องกันการแช่แข็งและเอ็มบริโอ (B) [38]

ค. conventional straw ที่มีสารละลายป้องกันการแช่แข็งและเอ็มบริโอบรรจุอยู่ (A) เปรียบเทียบกับ open pulled straw ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่าจะบรรจุสารละลายป้องกันการแช่แข็งได้ 2-3 ไมโครลิตร (B) [40]

ง. อุปกรณ์และการแช่แข็งแบบ solid surface vitrification [30]

ผลสำเร็จของการแช่แข็งแบบวิทริฟิเกชั่น

การตั้งท้องและ/หรือการคลอดลูกหลังจากย้ายฝากเอ็มบริโอที่ผ่านการแช่แข็งเป็นตัวบ่งชี้ประสิทธิภาพของการแช่แข็งเอ็มบริโอที่พัฒนาสูงสุดและสามารถนำไปใช้ได้ดี ตารางที่ 2 แสดงผลสำเร็จของการเกิดลูกเอ็มบริโอที่ผ่านการแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเกชั่น พบว่าสามารถผลิตลูกโคจากเอ็มบริโอโคในระยะมอรูลาและบลาสโตซีส ที่ผ่านการแช่แข็งด้วย OPS สามารถผลิตลูกสุกรจากเอ็มบริโอสุกรซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่ามีความไวต่อการแช่แข็งมากด้วยวิธี OPS ได้ นอกจากนั้นเอ็มบริโอที่ไวต่อปัจจัยอื่นๆ มากกว่าการแช่แข็ง เช่น เอ็มบริโอของหนูแฮมสเตอร์ค่อนข้างจะไวต่อสิ่งแวดล้อมที่ใช้เลี้ยงในหลอดทดลอง (*in vitro* environment) ยังสามารถทำให้เกิดลูกได้จากเอ็มบริโอที่ผ่านการแช่แข็งด้วยวิธี CLV ได้ สามารถทำให้เกิดลูกได้จากเอ็มบริโอหนูเม้าส์ที่ผ่านการแช่แข็งด้วยวิธี CLV และ SSV ได้ สำหรับในมนุษย์ Mukaida และคณะ (2001) [41] ประสบความสำเร็จหลังจากย้ายฝากเอ็มบริโอระยะบลาสโตซีสที่ผ่านการแช่แข็งด้วย CLV

ตารางที่ 2 ผลสำเร็จของการแช่แข็งเอ็มบริโอด้วยวิธีวิทริฟิเกชั่น (ดัดแปลงข้อมูลจาก Kasai และคณะ [42])

ชนิดสิ่งมีชีวิต	ระยะเอ็มบริโอ	วิธีวิทริฟิเกชั่น	ผู้ศึกษา
hamster	1-2-cell embryo	CLV	Lane และคณะ (1999a) [25]
mouse	blastocyst	CLV	Lane และคณะ (1999b) [26]
pig	unhatched blastocyst	OPS	Berthelot และคณะ (2000) [43]
pig	early blastocyst	OPS	Cameron และคณะ (2000) [44]
cow	morula/blastocyst	OPS	Lazar และคณะ (2000) [45]
human	blastocyst	CLV	Mukaida และคณะ (2001) [41]
human	blastocyst	EM grid	Cho และคณะ (2002) [35]
mouse	1-cell embryo	SSV	Bagis และคณะ (2002) [30]

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับผลสำเร็จของการแช่แข็ง

การแช่แข็งจะประสบความสำเร็จนั้นขึ้นกับหลายปัจจัย ได้แก่

1. อัตราการลดอุณหภูมิระหว่างการแช่แข็ง

อัตราความเร็วของการลดอุณหภูมิระหว่างการแช่แข็งเอ็มบริโอมีส่วนสำคัญต่ออัตราการรอดของตัวอย่างมาก หากใช้ความเร็วมากเกินไป ผลทำให้น้ำในเซลล์มีเวลาออกจากเซลล์ได้น้อยและเหลืออยู่ในเซลล์ กลายเป็นเกล็ดน้ำแข็งอยู่ภายในเซลล์มาก หรือตรงกันข้ามหากใช้ความเร็วน้อยเกินไปจะมีผลให้น้ำในเซลล์มีโอกาสออกจากเซลล์ได้มาก เกิดความเสียหายจากความเข้มข้นของอิเล็กโตรไลด์ภายในเซลล์มีความเข้มข้นสูงเกินไป [46] มีรายงานความเร็วที่เหมาะสมสำหรับแช่แข็งเอ็มบริโอ คือ ประมาณ -3 องศาเซลเซียส/นาที [47]

2. อัตราการเพิ่มอุณหภูมิระหว่างการทำละลาย

ความเร็วของการทำละลายขึ้นกับความเร็วของการแช่แข็งและอุณหภูมิสุดท้ายก่อนจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว ซึ่งทั้งสองกรณีเกี่ยวข้องกับปริมาณของน้ำที่เหลืออยู่ในเซลล์ โดยหากเซลล์มีน้ำเหลือในเซลล์มาก การใช้ความเร็วในการทำละลายช้าจะมีผลทำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งขึ้นในเซลล์ แต่หากมีน้ำเหลืออยู่ในเซลล์น้อย ต้องใช้ความเร็วในการทำละลายช้า เพื่อปรับสภาพความสมดุลของตัวทำละลาย

3. ชนิดและความเข้มข้นของสารป้องกันการแช่แข็ง

สารป้องกันการแช่แข็งมีหน้าที่สำคัญในการป้องกันการถูกทำลายของแซลล์ในระหว่างการแช่แข็งและการทำละลาย ชนิดของสารป้องกันการแช่แข็ง มี 3 กลุ่ม [46] คือ

1. สารที่สามารถซึมผ่านเข้าเซลล์ได้ (permeating cryoprotectants) สามารถเข้าไปแทนที่น้ำในเซลล์ เพื่อช่วยลดการเปลี่ยนแปลงปริมาตรของเซลล์อย่างกะทันหันและช่วยป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง ตัวอย่างเช่น เมทานอล (MW 32.04) เอทิลีน ไกลคอล (MW 62.07) พรอพานไดออล (MW 76.1) ไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ (MW 78.13) บิวทานีไดออล (MW 90.12) และกลีเซอรอล (MW 92.1)

2. สารที่ไม่สามารถซึมผ่านเข้าเซลล์ได้ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low molecular weight nonpermeating cryoprotectants) ทำหน้าที่ร่วมกับสารที่สามารถซึมผ่านเข้าเซลล์ได้ช่วยดึงน้ำออกจากเซลล์ให้เร็วขึ้น ตัวอย่างเช่น กาแลคโตส (MW 180.2) กลูโคส (MW 181.1) ซูโครส (MW 342.3) และทรีฮาโลส (MW 378.3)

3. สารที่ไม่สามารถซึมผ่านเข้าเซลล์ได้ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (high molecular weight nonpermeating cryoprotectants) (MW > 50,000 ดาลตัน) ทำหน้าที่ช่วยป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งรอบนอกของเซลล์ ตัวอย่างเช่น โพลีไวนิล ไพโรลิโดน โพลีไวนิล แอลกอฮอล์ และโซเดียม ไฮยาลูโรเนต

4. อุณหภูมิของการชักนำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็ง

การศึกษาของ Whittingham ในปี ค.ศ. 1977 [48] ในหนูเมาส์พบว่าอุณหภูมิที่ชักนำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งมีผลต่ออัตรารอดของเอ็มบริโอโดยหากต่ำกว่า -6 องศาเซลเซียส/นาที จะมีอัตรารอดจะลดลงอย่างมาก และหลังชักนำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งแล้วควรให้เวลาเอ็มบริโอปรับตัวประมาณ 5-10 นาที เรียกว่า “เวลาสมดุล (equilibration time)”

5. ระยะของเอ็มบริโอ

ความทนทานต่อการแช่แข็งจะเพิ่มมากขึ้นตามระยะของเอ็มบริโอที่พัฒนาขึ้น เอ็มบริโอระยะต้นๆ หลังการปฏิสนธิจะไวต่อการแช่แข็งและมักไม่ประสบความสำเร็จในการแช่แข็งเท่าที่ควร เอ็มบริโอระยะมอรูลา หรือระยะบลาสโตซีส จะมีความทนต่อการแช่แข็งมากกว่าเอ็มบริโอระยะ 2, 4, 8 และ 16 เซลล์ตามลำดับ

6. คุณภาพของเอ็มบริโอ

คุณภาพของเอ็มบริโอสดที่ไม่ได้แช่แข็งมีความสัมพันธ์กับอัตราการตั้งท้องของแม่ตัวรับหลังการย้ายฝาก เช่นเดียวกันคุณภาพของเอ็มบริโอหลังแช่แข็งก็มีผลต่อการพัฒนาในหลอดทดลองและหลังย้ายฝากในแม่ตัวรับ เอ็มบริโอที่ปกติในเกรดดีมากหลังแช่แข็งจะให้อัตราการตั้งท้องสูงกว่าเอ็มบริโอที่อยู่ในเกรดดีประมาณ 10-20% [49]

7. ระยะเวลาจากการเก็บเอ็มบริโอจนถึงการแช่แข็ง

เป็นที่ทราบกันดีว่าเอ็มบริโอที่เก็บได้หากต้องการแช่แข็งควรทำทันทีเพราะมิฉะนั้นเอ็มบริโอจะมีคุณภาพลดลงเมื่อเวลาที่อยู่นอกร่างกายนานขึ้น ระยะเวลาที่เหมาะสมไม่ควรเกิน 3 ชั่วโมง มิฉะนั้นอัตราการเจริญของเอ็มบริโอจะลดลง โดยควรต้องระวังเป็นพิเศษในสภาพอากาศร้อน เพราะจะทำให้เกิดความเสียหายต่อเอ็มบริโอเร็วขึ้น หากไม่ทำการแช่แข็งทันทีต้องเก็บเอ็มบริโอในตู้อบควบคุมอุณหภูมิ 37-38 องศาเซลเซียส

แนวทางการเพิ่มประสิทธิภาพการแช่แข็งเอ็มบริโอ

แม้ในช่วงที่ผ่านมาจะได้มีการค้นคว้าวิจัยด้านการแช่แข็งเอ็มบริโอด้วยความพยายามลดขั้นตอนที่ไม่จำเป็นหรือความพยายามที่จะเพิ่มอัตรารอดของเอ็มบริโอหลังแช่แข็งรวมทั้งการค้นหาสารป้องกันการแช่แข็งที่ได้ผลดี แต่ผลของการย้ายฝากเอ็มบริโอแช่แข็งของสัตว์บางชนิดยังมีอัตราตั้งท้องและคลอดลูกต่ำกว่าเอ็มบริโอที่ไม่ได้แช่แข็ง ได้มีงานวิจัยที่เป็นแนวทางที่จะช่วยเพิ่มอัตราการรอดของการแช่แข็งเอ็มบริโอ คือ

1. การดูดไขมันออกจากเอ็มบริโอ (embryo delipidization)
2. การใช้สารรักษาโครงร่างเซลล์ (cytoskeleton stabilizers)
3. การใช้โปรตีนป้องกันความเย็น (antifreeze proteins)

1. การดูดไขมันออกจากเอ็มบริโอ

มีการทดลองในเอ็มบริโอโคที่เกิดจากการปฏิสนธินอกร่างกายซึ่งตามปกติจะมีคุณภาพที่ต่ำกว่าและมักไม่ทนต่อการแช่แข็งเท่าเอ็มบริโอที่ได้จากการปฏิสนธิภายในท่อนำไข่ การดูดไขมันออกจึงเป็นวิธีที่มีผู้ศึกษามากขึ้นในปัจจุบัน Leibo และคณะ (1995) [50] ได้ชี้ให้เห็นว่าไขมันในเอ็มบริโอ (intracellular lipid) มีอิทธิพลที่ทำให้เอ็มบริโอไวต่อการแช่แข็ง โดยพบว่าเอ็มบริโอระยะ 8 เซลล์ ซึ่งเจริญมาจากเซลล์ที่ปั่นเอาไขมันออกสามารถทนต่อการแช่เย็นที่ 0 องศาเซลเซียส และต่อการแช่แข็งได้ เช่นเดียวกับรายงานวิจัยของ Diez และคณะ (1995) [51] พบว่าเอ็มบริโอโครยะไซโกตจากการปฏิสนธินอกร่างกายที่ผ่านการดูดไขมันออกจะมีอัตราการแบ่งตัวและอัตราการเจริญเป็นเอ็มบริโอระยะบลาสโตซีสไม่แตกต่างกับเอ็มบริโอที่ไม่ได้ดูดไขมันออก 96.6% เปรียบเทียบกับ 91.5% และอัตราการแบ่งตัว 45.7% เปรียบเทียบกับ 46.2% และเมื่อนำเอาเอ็มบริโอที่ปราศจากไขมัน (lipid free) ไปแช่แข็ง เอ็มบริโอหลังแช่แข็งดังกล่าวจะมีอัตราการเจริญดีกว่าเอ็มบริโอที่ไม่ได้ดูดไขมันออกไป ดังนั้นแนวทางการลดหรือดูดไขมันออกจากไซโทพลาซึมของเอ็มบริโอจึงเป็นวิธีการที่จะช่วยเพิ่มอัตรารอดของเอ็มบริโอโคที่ได้จากการปฏิสนธินอกร่างกายได้

สำหรับเอ็มบริโอสุกร ซึ่งเป็นเอ็มบริโอที่มีปริมาณไขมันในเซลล์สูงจึงมีความไวต่อการแช่แข็งสูง ทำให้ผลสำเร็จในการแช่แข็งเอ็มบริโอสุกรต่ำ รายงานของ Nagashima และคณะ ในปี ค.ศ.1994 [52] พบว่าเอ็มบริโอที่ได้ดูดไขมันออกไปสามารถทนต่อความเย็นที่ 4 องศาเซลเซียส ได้มากขึ้น โดยมีอัตราการเจริญจนถึงระยะบลาสโตซีสดีกว่าเอ็มบริโอที่ไม่ได้ดูดไขมันออกไป และเอ็มบริโอที่ดูดไขมันออกไปบางส่วน (27% เทียบกับ 0% และ 8%) ล่าสุดในปี ค.ศ. 2007 Du และคณะ [53] รายงานอัตราการรอดหลังการแช่แข็งของเอ็มบริโอระยะบลาสโตซีสที่ผลิตจากการทำโคลนนิ่งไข่ที่ดูดไขมันออกไปพบว่าอัตราการรอดหลังการแช่แข็งเอ็มบริโอกลุ่มที่ดูดไขมันออกไปสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ดูดไขมัน (79% และ 32% ตามลำดับ)

การเพิ่มความทนทานของเอ็มบริโอต่อการแช่แข็งด้วยการดูดเอาไขมันบางส่วนออกจากเอ็มบริโอ (parital delipidization) มีขั้นตอนของวิธีการนี้ คือ

1. นำเอ็มบริโอระยะไซโกต (1 เซลล์) ไปสัมผัสกับสารที่รักษาโครงของเซลล์ชนิดไซโตคาลาซิน-บี (cytochalasin-B) ในระดับความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
2. จากนั้นนำเอ็มบริโอไปปั่นด้วยความเร็วสูง 13,000 รอบ/นาที นานประมาณ 5-15 นาที จากแรงเหวี่ยง ทำให้ไขมันจะไปกระจุกตัวที่ขั้วใดขั้วหนึ่งของเอ็มบริโอ
3. ใช้ปิเปต (pipette) ขนาด 20 ไมครอน ดูดเอาไขมันออกมา ด้วยการแทงผ่านเปลือกโซน่า เพลลูซิด้า
4. เอ็มบริโอที่ได้เรียกว่า “delipidated embryo” หรือบางคนเรียกว่า “lipid free embryo” เลี้ยงเอ็มบริโอให้เจริญต่อไปจนถึงระยะมอรูลา หรือระยะบลาสโตซีส
5. นำเอ็มบริโอไปแช่แข็ง

2. การใช้สารรักษาโครงร่างเซลล์

เอ็มบริโอมีโครงของเซลล์เช่นเดียวกับเซลล์ชนิดอื่นๆ โดยเป็นเส้นใยโปรตีน 3 ชนิด คือ ไมโครฟิลาเมนท์ ไมโครทิวบูล และอินเตอร์มีเดียท ฟิลาเมนท์ ส่วนประกอบดังกล่าวทำหน้าที่รักษาโครงสร้างของเซลล์ให้คงรูปและให้มีการแบ่งตัวของเซลล์เอ็มบริโอได้ปกติ

ในการแช่แข็งไม่ว่าจะเป็นวิธีการใดก็ตามจะเกิดความเสียหายเกิดขึ้นในโครงร่างของเซลล์ในขั้นตอนต่างๆ นับตั้งแต่การสัมผัสกับสารป้องกันการแช่แข็งระหว่างการแช่แข็งและ/หรือระหว่างการทำลายความเสียหายดังกล่าวอาจกลับคืนเป็นปกติได้เหมือนเดิม หรือหากความเสียหายดังกล่าวไม่มากนักหรือกระทบเซลล์ของเอ็มบริโอเพียงบางส่วนก็ทำให้เซลล์ของเอ็มบริโอที่เหลืออยู่เกิดการเจริญต่อไปได้เช่นเดียวกับกรณีของครึ่งเอ็มบริโอที่สามารถเจริญได้หลังถูกตัดแบ่งแล้ว

ได้มีผู้ทดลองนำเอาสารรักษาโครงร่างเซลล์มาเสริม โดยให้เอ็มบริโอก่อนการแช่แข็งสัมผัสกับสารดังกล่าวเพื่อเพิ่มความทนทานของโครงร่างเซลล์ เรียกสารนี้ว่า “cytoskeleton stabilizers” เช่น ไซโตคาลาซิน-บี โคลชิซิน เป็นต้น ไซโตคาลาซิน-บี ทำหน้าที่ป้องกันการแตกของสายโพลีเมอร์ของโปรตีนแอคติน (actin) ที่เป็นส่วนประกอบของไมโครฟิลาเมนท์ เรียกสั้นๆ ว่า “microfilament inhibitor” ส่วนสารโคลชิซินเป็น microtubule inhibitor ของโปรตีน ทูบูลิน (tubulin) Dobrinsky และคณะ (2000) [54] พบว่าไซโตคาลาซิน-บี สามารถรักษาโครงสร้างไมโครฟิลาเมนท์ของเอ็มบริโอสุกรระหว่างการแช่แข็งและช่วยเพิ่มอัตราการเจริญของเอ็มบริโอหลังการแช่แข็ง

3. การใช้โปรตีนป้องกันความเย็น

โปรตีนป้องกันความเย็น (antifreeze proteins, AFP) สกัดได้จากแมลง พืชบางชนิด แบคทีเรีย เห็ดบางชนิดและปลาในทวีปแอนตาร์กติก การให้เอ็มบริโอสัมผัสโปรตีนป้องกันความเย็นดังกล่าวก่อนการแช่แข็งทำให้อัตราการรอดของเอ็มบริโอเพิ่มสูงขึ้น [22, 55] โดยเชื่อว่าโปรตีนนี้จะช่วยควบคุมการเกิดเกล็ดน้ำแข็งในเซลล์

สรุป

เทคโนโลยีชีวภาพการแช่แข็งเป็นสิ่งหนึ่งที่ช่วยส่งเสริมการผลิตเอ็มบริโอและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับชีววิทยาการสืบพันธุ์ของสัตว์ให้ดียิ่งขึ้น มีการพัฒนาเทคนิคในการแช่เข็งอย่างต่อเนื่องตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน วิธีการแช่แข็งเพื่อเก็บรักษาเอ็มบริโอของสัตว์ที่ประสบความสำเร็จอย่างสูง คือ วิธีวิทริฟิเกชั่น ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้สะดวก รวดเร็ว และได้ผลดีกว่าวิธีอื่นๆ เช่น วิธีการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิแบบช้าๆ (slow freezing) โดยสิ่งที่ต้องคำนึงถึงเมื่อใช้วิธีวิทริฟิเกชั่น คือ การลดความเป็นพิษ แรงดันออสโมติก และความเสียหายอื่นๆ ที่เกิดขึ้นจากการใช้สารป้องกันการแช่แข็งที่มีความเข้มข้นสูง อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพและผลข้างเคียงระยะยาวของการแช่แข็งต่อเอ็มบริโอของสัตว์แต่ละชนิดจำเป็นต้องมีการพัฒนาและศึกษาเป็นกรณีไป นอกจากนี้โอกาสที่จะประสบความสำเร็จในการแช่แข็งเอ็มบริโอยังขึ้นอยู่กับความเชี่ยวชาญของนักวิจัยด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. Whittingham, D. G., Leibo, S. P., and Mazur, P. 1972. Survival of Mouse Embryos Frozen to -196 Degrees and -269 Degrees C. *Science* 178: 411-414.
2. Wilmut, I., and Rowson, L. E. 1973. Experiments on the Low-Temperature Preservation of Cow Embryos. Veterinary *Record* 92: 686-90.
3. Leibo, S. P., Mazur, P., and Jackowski, S. J. 1974. Factors Affecting Survival of Mouse Embryos During Freezing and Thawing. *Experimental Cell Research* 89: 79-88.
4. Rall, W. F. 1987. Factors Affecting the Survival of Mouse Embryos Cryopreserved by Vitrification. *Cryobiology* 24: 387-402.
5. Glenister, P. H., Whittingham, D. G., and Wood, M. J. 1990. Genome Cryopreservation: A Valuable Contribution to Mammalian Genetic Research. *Genetical Research* 56: 253-258.
6. Leibo, S. P., DeMayo, F. J., and O'Malley, B. 1991. Production of Transgenic Mice from Cryopreserved Fertilized Ova. *Molecular Reproduction and Development* 30: 313-319.
7. Leibo, S. P. 1977. Fundamental Cryobiology of Mouse Ova and Embryos. *Ciba Foundtion Symposium* 18-20: 69-96.
8. Mohr, L. R., and Trounson, A. O. 1981. Structural Changes Associated with Freezing of Bovine Embryos. *Biology of Reproduction* 25: 1009-1025.

9. Vajta, G., Booth, P. J., Holm, P., Greve, T., and Callesen, H. 1997. Successful Vitrification of Early Stage Bovine *in vitro* Produced Embryos with the Open Pulled Straw (OPS) Method. *Cryobiology Letters* 18: 191-195.
10. Rall, W. F., and Fahy, G. M. 1985. Ice-Free Cryopreservation of Mouse Embryos at-196 Degrees C by Vitrification. *Nature* 313: 573-575.
11. Van der Auwera, I., Cornillie, F., Ongkowidjojo, R., Pijnenborg, R., and Koninckx, P. R. 1990. Cryopreservation of Pronucleate Mouse Ova: Slow Versus Ultrarapid Freezing. *Human Reproduction* 4: 619-621.
12. Shaw, J. M., Diotallevi, L., and Trounson, A. O. 1991. A Simple Rapid 4.5 M Dimethylsulfoxide Freezing Technique for the Cryopreservation of 1-Cell to Blastocyst Stage Preimplantation Mouse Embryos. *Reproductive Fertility and Development* 3: 621-626.
13. Bernart, W., Kamel, M., Neulen, J., and Breckwoldt, M. 1994. Influence of the Developmental Stage and the Equilibration Time on the outcome of Ultrarapid Cryopreservation of Mouse Embryos. *Human Reproduction* 9: 100-102.
14. Nowshari, M. A., Nayudu, P. L., and Hodges, J. K. 1995. Effect of Cryoprotectants and Their Concentration on Post-Thaw Survival and Development of Rapid Frozen-Thawed Pronuclear Stage Mouse Embryos. *Human Reproduction* 10: 3237-3242.
15. Van der Elst, J., Van den Abbeel, E., and Van Steirteghem, A. C. 1995. The Effect of Equilibration Temperature and Time on the Outcome of Ultrarapid Freezing of 1-Cell Mouse Embryos. *Human Reproduction* 10: 379-383.
16. Mukaida, T., Wada, S., Takahashi, K., Pedro, P. B., An, T. Z., and Kasai, M. 1998. Vitrification of Human Embryos Based on the Assessment of Suitable Conditions for 8 Cell Mouse Embryos. *Human Reproduction* 13: 2874-2879.
17. Kasai, M., Niwa, K., and Iritani, A. 1981. Effects of Various Cryoprotective Agents on the Survival of Unfrozen and Frozen Mouse Embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 63: 175-180.
18. 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. *Journal of Reproduction and Ffertility* 89: 91-97.
19. Miyamoto, H. 1986. Factors Affecting the Survival of Mouse Embryos During Freezing and Thawing. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer* 3: 15-19.
20. Saito, N., Imai, K., and Tomizawa, M. 1994. Effect of Sugars-Addition on the Survival of Vitrified Bovine Blastocysts Produced *in vitro. Theriogenology* 41: 1053-60.
21. Voelkel, S. A., and Hu, Y. X. 1992. Use of Ethylene Glycol As a cryoprotectant for Bovine Embryos Allowing Direct Transfer of Frozen-Thawed Embryos to Recipient Females.

Theriogenology 37: 687-97.

22. Palasz, A. T., and Mapletoft, R. J. 1996. Cryopreservation of Mammalian Embryos and Oocytes: Recent Advances. *Biotechnology Advances* 14: 127-49.
23. Martino, A., Pollard, J. W., and Leibo, S. P. 1996. Effect of Chilling Bovine Oocytes on Their Developmental Competence. *Molecular Reproduction and Development* 45: 503-512.
24. Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, M., Booth, P. J., Jacobsen, H., Greve, T., and Callesen, H. 1998. Open Pulled Straws (OPS) Vitrification: A New Way to Reduce Cryoinjuries of Bovine Ova and Embryos. *Molecular Reproduction and Development* 51: 53-58.
25. Lane, M., Schoolcraft, W. B., and Gardner, D. K. 1999a. Vitrification of Mouse and Human Blastocysts Using a Novel Cryoloop Container-Less Technique. *Fertility and Sterility* 72: 1073-1078.
26. Lane, M., Bavister, B. D., Lyons, E. A., and Forest, K. T. 1999b. Containerless Vitrification of Mammalian Oocytes and Embryos. *Nature Biotechnology* 17: 1234-1236.
27. Dinnyes, A., Dai, Y., Jiang, S., and Yang, X. 2000. High Development Rates of Vitrified Bovine Oocytes Following Parthenogenetic Activation, *in vitro* Fertilization, and Somatic Nuclear Transfer. *Biology of Reproduction* 63: 513-518.
28. Bagis, H., Odaman, H., Sagirkaya, H., and Dinnyes, A. 2002. Production of Transgenic Mice from Vitrified Pronuclear-Stage Embryos. *Molecular Reproduction and Development* 61: 173-179.
29. Bagis, H., Sagirkaya, H., Mercan, H. O., and Dinnyes, A. 2004. Vitrification of Pronuclear-Stage Mouse Embryos on Solid Surface (SSV) Versus in Cryotube: Comparison of the Effect of Equilibration Time and different Sugars in the Vitrification Solution. *Molecular Reproduction and Development* 67: 186-192.
30. Bagis, H., Mercan, H. O., Cetin, S., and Sekmen, S. 2005. The Effect of equilibration Time on Survival and Development Rates of Mouse Pronuclear-Stage Embryos Vitrified in Solid Surface (SSV) and Convential Straws: *in vitro* and *in vivo* Evaluations. *Molecular Reproduction and Development* 72: 494-501.
31. Boonkusol, D., Gal, A. B., Bodo, S., Gorhony, B., Kitiyanant, Y., and Dinnyes, A. 2006. Gene expression profiles and *in vitro* Development Following Vitrification of Pronuclear and 8-Cell Stage Mouse Embryos. *Molecular Reproduction and Development* 73: 700-8.
32. Baranyai, B., Bodo, S., Dinnyes, A., and Gocza, E. 2005. Vitrification of Biopsied Mouse Embryos. *Acta Veterinaria Hungarica* 53: 103-112.
33. Begin, I., Bhatia, B., Baldassarre, H., Dinnyes, A., and Keefer, C. L. 2003. Cryopreservation of Goat Oocytes and *in vivo* Derived 2- to 4-Cell Embryos Using the Cryoloop (CLV) and Solid-Surface Vitrification (SSV) Methods. *Theriogenology* 59: 1839-1850.
34. Park, S. P., Kim, E. Y., Kim, D. I., Park, N. H., Won, Y. S., Yoon, S. H., Chung, K. S., and

Lim, J. H. 1999. Simple, Efficient and Successful Vitrification of Bovine Blastocysts Using Electron Microscope Grids. *Human Reproduction* 14: 2838-2843.

35. Cho, H. J., Son, W. Y., Yoon, S. H., Lee, S. W., and Lim, J. H. 2002. An Improved Protocol for Dilution of Cryoprotectants from Vitrified Human Blastocysts. *Human Reproduction* 17: 2419-2422.
36. Vajta, G., Holm, P., Greve, T., and Callesen, H. 1995. Direct In-Straw Rehydration after Thawing of Vitrified *in vitro* Produced Bovine Blastocysts. *Veterinary Record* 137: 672.
37. Desai, N., Blackmon, H., Szeptycki, J., and Goldfarb, J. 2007. Cryoloop Vitrification of Human Day 3 Cleavage-Stage Embryos: Post-Vitrification Development, Pregnancy Outcomes and live Births. *Reproductive Biomedicine Online* 14: 208-213.
38. Saki, G., and Dezfuly, F. G. 2005. Vitrification of Human Oocyte Using Cryoloop. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* 3: 19-24.
39. Niederstrasser, H. 1999. Cryo-Freezing the Sample. Available from URL: http://www.snaggledworks.com/em_for_dummies/freeze.html. 9 June 2008.
40. Chen, S. U., Lien, Y. R., Chen, H. F., Chao, K. H., Ho, H. N., and Yang, Y. S. 2000. Open Pulled Straws for Vitrification of Mature Mouse Oocytes Preserve Patterns of Meiotic Spindles and Chromosomes Better Than Conventional Straws. *Human Reproduction* 15: 2598-2603.
41. Mukaida, T., Nakamura, S., Tomiyama, T., Wada, S., Kasai, M., and Takahashi, K. 2001. Successful Birth After Transfer of Vitrified Human Blastocysts with Use of a Cryoloop Containerless Technique. *Fertility and Sterility* 76: 618-620.
42. Kasai, M., Ito, K., and Edashige, K. 2002. Morphological Appearance of the Cryopreserved Mouse Blastocyst As a Tool to Identify the Type of Cryoinjury. *Human Reproduction* 17: 1863-1874.
43. Berthelot, F., Martinat-Botté, F., Locatelli, A., Perreau, C., and Terqui, M. 2000. Piglets Born After Vitrification of Embryos Using the Open Pulled Straw Method. *Cryobiology* 41: 116-124.
44. Cameron, R. D. A., Beebe, L. F. S., Blackshaw, A. W., Higgins, A., and Nottle, M. B. 2000. Piglets Born from Vitrified Early Blastocysts Using a Simple Technique. *Australian Veterinary Journal* 78: 195-196.
45. Lazar, L., Spak, J., and David, V. 2000. The Vitrification of in Vitro Fertilized Cow Blastocysts by the Open Pulled Straw Method. *Theriogenology* 54(4): 571-578.
46. Liebermann, J., and Tucker, M. J. 2002. Effect of Carrier System on the Yield of Human Oocytes and Embryos As Assessed by Survival and Developmental Potential after Vitrification. *Reproduction* 124: 483-489.

47. Mazur, P. 1977. Slow-Freezing Injury in Mammalian Cells. *Ciba Foundation Symposium* 18-20: 19-48.
48. Whittingham, D. G. 1977. Fertilization *in vitro* and Development to Term of Unfertilized Mouse Oocytes Previously Stored at -196°C. *Journal of Reproduction and Fertility* 49: 89-94.
49. Wright, J. M. 1985. Commercial Freezing of Bovine Embryos in Straws. *Theriogenology* 23: 17-29.
50. Leibo, S. P., Pollard, J. W., and Martino, A. 1995. Chilling and Freezing Sensitivity of "Reassembled" *in vitro*-Derived Bovine Embryos. *Theriogenology* 43: 265 (Abstract).
51. Diez, C., Le Bourhis, D., Heyman, Y., and Renard, J. P. 1996. Effect of Partial Lipid Removal from *in vitro* Produced Bovine Zygotes on Further Development *in vitro* and on the Freezing Tolerance of Blastocysts. *Theriogenology* 45: 166 (Abstract).
52. Nagashima, H., Kashiwazaki, N., Ashman, R., Grupen, C. G., Seamark, R. F., and Nottle, M. B. 1994. Removal of Cytoplasmic Lipid Enhances the Tolerance of Porcine Embryos to Chilling. *Biology of Reproduction* 51: 618-622.
53. Du, Y., Zhang, Y., Li, J., Kragh, P. M., Kuwayama, M., Leda, S., Zhang, X., Schmidt, M., Boghg, I. B., Purup, S., Pedersen, A. M., Villemoes, K., Yang, H., Bolund, L., and Vajta, G. 2007. Simplified Cryopreservation of Porcine Cloned Blastocysts. *Cryobiology* 54: 181-187.
54. Dobrinsky, J. R., Pursel, V. G., Long, C. R., and Johnson, L. A. 2000. Birth of Piglets after Transfer of Embryos Cryopreserved by Cytoskeletal Stabilization and Vitrification. Biology of *Reproduction* 62: 564-570.
55. 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. *Theriogenelogy* 45: 174 (Abstract).

ได้รับบทความวันที่ 1 กรกฎาคม 2551
ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 1 สิงหาคม 2551