The Thai Journal of Veterinary Medicine

Volume 32
Issue 1 *March, 2002*

Article 2

3-1-2002

THE EFFECT OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF ETHYLENE GLYCOL ON ULTRA-RAPID FREEZING OF PIG OOCYTES

Anucha Sattanawongs

Apisit Kittavornrat

Ruttapong Ruttanapumma

Nawapen Phutikanit

Mongkol Techakumphu

See next page for additional authors

Follow this and additional works at: https://digital.car.chula.ac.th/tjvm

Part of the Veterinary Medicine Commons

Recommended Citation

Sattanawongs, Anucha; Kittavornrat, Apisit; Ruttanapumma, Ruttapong; Phutikanit, Nawapen; Techakumphu, Mongkol; and Adulyanubab, Wanpen (2002) "THE EFFECT OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF ETHYLENE GLYCOL ON ULTRA-RAPID FREEZING OF PIG OOCYTES," *The Thai Journal of Veterinary Medicine*: Vol. 32: Iss. 1, Article 2.
DOI: https://doi.org/10.56808/2985-1130.1868
Available at: https://digital.car.chula.ac.th/tjvm/vol32/iss1/2

This Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in The Thai Journal of Veterinary Medicine by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

THE EFFECT OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF ETHYLENE GLYCOL ON ULTRA-RAPID FREEZING OF PIG OOCYTES

Authors

Anucha Sattanawongs, Apisit Kittavornrat, Ruttapong Ruttanapumma, Nawapen Phutikanit, Mongkol Techakumphu, and Wanpen Adulyanubab

This article is available in The Thai Journal of Veterinary Medicine: https://digital.car.chula.ac.th/tjvm/vol32/iss1/2

นิพนธ์ต้นฉบับ

ผลของความเข้มข้นของสารเอทีลีน ไกลคอล ต่อการแช่แข็งโอโอไซต์สุกรด้วยวิธี ultra-rapid freezing

อนุชา สธนวงศ์* อภิสิทธิ์ กิจถาวรรัตน์* รัฐพงศ์ รัตนะภุมมะ*
นวเพ็ญ ภูติกนิษฐ์* มงคล เตชะกำพุ* วันเพ็ญ อดุลยานุภาพ*

Abstract

Anucha Sattanawongs* Apisit Kittavornrat* Ruttapong Ruttanapumma*
Nawapen Phutikanit* Mongkol Techakumphu* Wanpen Adulyanubab*

THE EFFECT OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF ETHYLENE GLYCOL ON ULTRA-RAPID FREEZING OF PIG OOCYTES

The objective of this study was to investigate the effect of different concentrations of ethylene glycol on the normality and the *in vitro* maturation of pig oocytes, after ultra-rapid freezing on a microscope copper grid. Immature pig oocytes were exposed to different concentrations of ethylene glycol at levels of 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 and 7.0 molar for 20 seconds, at room temperature (25 ^{o}C), laid on a microscope copper grid and then plunged directly to -196 ^{o}C where they were kept for 10 seconds. The oocytes normality after thawing and the percentage that show *in vitro* maturation (MII) were assessed by culturing them in TCM 199+$NaHCO_3$ for 40-44 hrs at 38.5^{o}C in a CO_2 incubator. The results showed that ninety percent normality was found in the pig oocytes exposed to 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 and 6.0 molar and the same results were seen in the *in vitro* maturation rates, which were 21.7, 24.5, 24.4, 20.9 and 19.3% respectively. These results were significantly better than those which used 6.5 and 7.0 molar ethylene glycol which were 85.6% and 78.7% ($p < 0.01$) for the normality rates and 16.0% and 11.4% ($p < 0.05$) for the maturation rates. The study indicated that the concentration of ethylene glycol influenced the normality and the ability of immature pig oocytes to develop *in vitro*. The higher concentrations from 6.5 molar and up affected the oocytes after freezing.

Keywords : pig oocyte, ethylene glycol, ultra-rapid freezing, *in vitro* maturation

***Department of Obstetrics Gynaecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, 10300**

***ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์สัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10300**

บทคัดย่อ

อนุชา สธนวงศ์* อภิสิทธิ์ กิจถาวรรัตน์* รัฐพงศ์ รัตนะภุมมะ*
นวเพ็ญ ภูติกนิษฐ์* มงคล เตชะกำพุ* วันเพ็ญ อดุลยานุภาพ*

ผลของความเข้มข้นของสารเอทีลีน ไกลคอล ต่อการแช่แข็งโอโอไซต์สุกรด้วยวิธี ultra-rapid freezing

จุดประสงค์ของการศึกษาเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารเอทีลีน ไกลคอล ต่อการแช่แข็งโอโอไซต์สุกรที่อยู่ในระยะไม่พร้อมปฏิสนธิ ในระดับความเข้มข้น 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 โมลาร์ นาน 20 วินาที วางโอโอไซต์บนแผ่นตะแกรงทองแดงขนาดเล็ก จุ่มลงในไนโตรเจนเหลวที่ -196 °ซ. เก็บไว้นาน 10 วินาที หลังทำละลายแล้วเลี้ยงให้พร้อมปฏิสนธิจนถึงระยะเมทาเฟส ทู ในน้ำยา TCM 199+$NaHCO_3$ นาน 40-44 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 38.5 °ซ. 5%CO_2 ความชื้นสัมพัทธ์เต็มที่ ผลพบว่า ความเข้มข้นที่ 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 โมลาร์ ให้ผลในความปกติของโอโอไซต์ที่ไม่แตกต่างกันภายหลังการทำละลาย โดยมีค่าประมาณ 90% ดีกว่าความเข้มข้นที่ 6.5 และ 7.0 โมลาร์ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 85.6 และ 78.7% ตามลำดับ ($p < 0.01$) ส่วนผลการเลี้ยงให้พร้อมปฏิสนธิไม่พบความแตกต่างกันระหว่างความเข้มข้นในระดับ 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 โมล่าร์ อยู่ในระดับประมาณ 20% ซึ่งมีค่าสูงกว่าความเข้มข้นในระดับ 6.5 และ 7.0 โมลาร์ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของเอทีลีน ไกลคอล มีผลต่อความปกติหลังทำละลายและหลังเลี้ยงให้พร้อมปฏิสนธิในสุกร โดยความเข้มข้นในระดับสูงมากกว่า 6.0 โมลาร์ มีผลกระทบต่อคุณภาพโอโอไซต์หลังการแช่แข็ง

คำสำคัญ : โอโอไซต์สุกร เอทีลีน ไกลคอล การแช่แข็ง การเจริญพร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลอง

บทนำ

การแช่แข็งตัวอ่อนและน้ำเชื้อมีจุดประสงค์เพื่อเก็บรักษาพันธุกรรมสัตว์ซึ่งมีการศึกษาทดลองกันมาก ส่วนการศึกษาทดลองในโอโอไซต์ยังมีน้อย พบความสำเร็จครั้งแรกในการแช่แข็งโอโอไซต์หนูเมาซ์โดย Whittingham (1977) และสำหรับโอโอไซต์สุกรมีการรายงานกันน้อย เนื่องจากโอโอไซต์สุกรมีความไวต่ออุณหภูมิต่ำ เพราะมีสัดส่วนของไขมันในไซโตพลาสมมากกว่าสัตว์ชนิดอื่นๆ (Smith and Alcinar, 1993) ปัจจัยสำคัญในการแช่แข็งโอโอไซต์สัตว์คือ ชนิดและความเข้มข้นของสารป้องกันการแช่แข็งที่ใช้ (Arav et al., 1993) Schellander et al. (1994) พบว่าการใช้สารกลีเซอรอล โพรเพน ไดออล(PROH) และไดเมทธิลซัลโฟไซด์ (DMSO) ในการแช่แข็งโอโอไซต์โคจะให้ผลไม่แตกต่างกัน ต่างจาก Otoi et al. (1998) พบว่าการแช่แข็งโอโอไซต์โคโดยใช้ เอทีลีน ไกลคอล (EG) 40% (6.0 โมลาร์) เป็นสารป้องกันการแช่แข็งมีอัตราการรอดของโอโอไซต์หลังการละลายมากที่สุด เป็นผล

จาก EG มีมวลโมเลกุลต่ำ (62.07) ทำให้อัตราการแทรกผ่านผนังและผ่านออกจากเซลล์ได้เร็วขณะทำละลาย นอกจากนี้ยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ (Arav et al., 1993; Bautista and Kanakawa,1998) การศึกษาเกี่ยวกับการแช่แข็งตัวอ่อนสุกรนั้นตามการทดลองของ Wu et al. (1999) พบว่าหลังการแช่แข็งรังไข่สุกรโดยใช้ EG จะมีลักษณะโอโอไซต์ปกติมากกว่าการใช้สารป้องกันการแช่แข็งตัวอื่น และจากการศึกษาของธวัชชัยและคณะ (1999) โดยใช้ กลีเซอรอล DMSO และ EG ความเข้มข้น 5.0 โมลาร์ พบว่าการใช้ EG มีแนวโน้มทำให้โอโอไซต์สุกรสามารถเจริญถึงระยะพร้อมปฏิสนธิได้ดีกว่าอีก 2 ชนิด อย่างไรก็ดียังไม่มีรายงานถึงผลของความเข้มข้นของสาร EG ที่เหมาะสมที่ทำให้การแช่แข็งโอโอไซต์สุกรระยะไม่พร้อมปฏิสนธิแล้วเกิดความผิดปกติน้อยที่สุดและมีความสามารถในการเจริญถึงระยะพร้อมปฏิสนธิได้มากที่สุด การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงผลของความเข้มข้นของสาร EG ต่อการแช่แข็งโอโอไซต์สุกรด้วยวิธี ultrarapid freezing ต่อลักษณะและความสามารถในการพัฒนาของโอโอไซต์สุกรเพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมซึ่งนำไปใช้ได้ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

การเตรียมโอโอไซต์ เก็บรังไข่ของสุกรสาวจากโรงฆ่าสัตว์ท้องถิ่น อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม ครั้งละประมาณ 20-30 อัน แช่ในน้ำเกลือ 0.9% ที่ผสม penicillin-streptomycin ขนาด 50,000 ไอยู/100 มล. นำมาที่ห้องปฏิบัติการภายใน 1 ชั่วโมง ใช้กระบอกฉีดยาปลอดเชื้อขนาด 10 มล. ต่อกับเข็มเบอร์ 19 หรือ 20 เจาะดูดของเหลวภายในฟอลลิเคิลขนาด 3-5 มม. บนผิวของรังไข่ เทของเหลวที่เจาะได้ลงในน้ำยา TCM-199 (Gibco GBL, USA) Hepes นำไปตรวจหาโอโอไซต์ภายใต้กล้องสเตอริโอ เลือกโอโอไซต์ที่มีลักษณะเซลล์คิวมูลัสห่อหุ้มหนาแน่น (cumulus-cocyte-complexes, COCs) ลักษณะไซโตพลาสมเนียนเป็นเนื้อเดียวกัน ใส่พักไว้ในน้ำยา TCM-199 Hepes แบ่งการทดลองเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม โอโอไซต์จะไม่ผ่านกระบวนการแช่แข็ง แต่นำไปเลี้ยงให้เกิดสภาพพร้อมปฏิสนธิ กลุ่มทดลอง โอโอไซต์จะผ่านกระบวนการแช่แข็งด้วยความเร็ว ทำละลาย แล้วนำไปเลี้ยงให้เกิดสภาพพร้อมปฏิสนธิ การแช่แข็งโอโอไซต์ เตรียมสารละลาย EG (Sigma, USA) ความเข้มข้น 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 โมลาร์ (M) ในลักษณะหยดเล็กๆ (microdrop) สุ่มเลือกโอโอไซต์ที่คัดเลือกไว้ประมาณ 200 ใบต่อครั้ง ลงในสารละลาย EG แต่ละความเข้มข้นนาน 20 วินาที จากนั้นวางโอโอไซต์ลงบนตะแกรงทองแดงขนาดเล็ก (electron microscope copper grid แล้วใช้ watchmaker forceps คีบ copper grid จุ่มลงในไนโตรเจนเหลวทิ้งไว้ประมาณ 10 วินาที ระยะเวลาจากโอโอไซต์สัมผัสกับสาร EG จนถึงการแช่แข็งไม่เกิน 1 นาที (Martino et al., 1996)

การละลายโอโอไซต์ ทำการละลายโอโอไซต์แช่แข็งและดึงสารละลาย EG ออก โดยการแช่โอโอไซต์ในสารละลายซูโครส 0.5, 0.25 และ 0.125 โมลาร์ ตามลำดับที่อุณหภูมิ 37°ซ.โดยอยู่ในแต่ละความเข้มข้นนาน 1 นาที แล้วย้ายลงในสารละลาย PBS+10%fetal calf serum (FCS) แล้วนำไปตรวจสอบลักษณะโอโอไซต์หลังการแช่แข็ง ได้แก่ ลักษณะของเซลล์คิวมูลัส เปลือกหุ้ม (zona pellucida) และลักษณะของไซโตพลาสมของโอโอไซต์

การเลี้ยงให้โอโอไซต์เจริญพร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลอง นำโอโอไซต์ใส่ลงในน้ำยาที่ใช้เลี้ยงเพื่อให้เจริญพร้อมปฏิสนธิ(IVM-media) ประกอบด้วย TCM-199 $NaHCO_3$ +10%FCS+10(l/มล. FSH/LH (Folltropin, Vetapharm, Canada) +10µl/มล. Estradiol (Marivac, Canada) บรรยากาศ 5%CO_2 เป็นเวลานาน 40 ชั่วโมง (มงคลและวันเพ็ญ, 1997)

การตรวจสภาพพร้อมปฏิสนธิ นำโอโอไซต์ที่ผ่านการเลี้ยงให้เกิดสภาพพร้อมปฏิสนธิมาตรวจดู การแผ่ขยายออกของเซลล์คิวมูลัส ลอกเซลล์คิวมูลัสออก (decoronization) โดยแช่โอโอไซต์ในเอ็นไซม์ไฮยารูโลนิเดส (Sigma, USA) นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 38°ซ. และใช้ปิเปตที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่กว่าโอโอไซต์เล็กน้อย ดูดเป่าโอโอไซต์เข้าออกจนเซลล์คิวมูลัสหลุดออก จากนั้นทำการตรึงโอโอไซต์ในสารละลาย glacial acetic acid:absoluted ethanol ในสัดส่วน 1:3 นาน 14 วัน แล้วนำโอโอไซต์มาย้อมด้วยสี 1% aceto-orcein เพื่อตรวจลักษณะของโครโมโซม (วันเพ็ญ และมงคล, 1994)

การประเมินผลการทดลอง

1. อัตราการเก็บคืนโอโอไซต์ (recovery rate) คิดจากโอโอไซต์ที่เก็บได้หลังการแช่แข็งจากจำนวนโอโอไซต์เริ่มต้น

2. อัตราความปกติของโอโอไซต์ (normality rate) คิดจากลักษณะของโอโอไซต์หลังการแช่แข็ง สังเกตจากลักษณะของเซลล์คิวมูลัสเปลือกหุ้มโอโอไซต์ และลักษณะของไซโตพลาสมของโอโอไซต์ แบ่งออกเป็น 4 ระดับ คือ

เกรด A คือ โอโอไซต์ที่มีลักษณะปกติเหมือนก่อนการทำการแช่แข็ง

เกรด B คือ โอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสหลุดหายไปบางส่วน (partial cumulus oocyte)

เกรด C คือ โอโอไซต์ที่เซลล์คิวมูลัสหายไปทั้งหมด (denude oocyte)

เกรด D คือ โอโอไซต์ที่เสื่อมสลาย (degenerated oocyte)

3. อัตราการแผ่ขยายเซลล์คิวมูลัสของโอโอไซต์ (expansion rate) คิดจากลักษณะการแผ่ขยายของเซลล์คิวมูลัสของโอโอไซต์ภายหลังจากการเกิดสภาพพร้อมปฏิสนธิแล้วโดยแบ่งลักษณะโอโอไซต์ได้เป็น 4 ระดับ คือ

เกรด A คือ ลักษณะโอโอไซต์ปกติและมีการแผ่ขยายตัวออกของเซลล์คิวมูลัสที่อยู่รอบๆ โอโอไซต์

เกรด B คือ ลักษณะโอโอไซต์ปกติและไม่มีการแผ่ขยายตัวออกของเซลล์คิวมูลัส

เกรด C คือ ลักษณะโอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสหายไปบางส่วน

เกรด D คือ ลักษณะโอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสหายไปทั้งหมด

4. อัตราการเกิดสภาพพร้อมปฏิสนธิ (maturation rate) โดยดูจากลักษณะของโครโมโซม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์และคิดจากจำนวนโอโอไซต์ที่มีโครโมโซมในระยะเมทาเฟส ทู จากโอโอไซต์ทั้งหมดที่ทำการตรวจ โดยแบ่งโอโอไซต์ออกเป็นระยะต่างๆ คือ (Coy et al., 1993; Alberts et al., 1994)

ก. โอโอไซต์ที่เจริญไม่ถึงระยะปฏิสนธิ (immature oocyte)

- Germinal vesicle (GV) คือ ลักษณะของนิวเคลียสไม่มีการแบ่งตัว พบเยื่อหุ้มนิวเคลียสและเป็นระยะพักของ meiosis I

- Germinal vesicle breakdown (GVBD) คือ ระยะที่ผนังนิวเคลียสแตกออก พบการแผ่ขยายของสายโครมาตินและไม่พบเยื่อหุ้มนิวเคลียส

- Metaphase I (M I) คือ ระยะที่เห็นโครโมโซมจับเป็นคู่และเรียงตัวเป็นกลุ่ม (equatorial plate)

- Telophase I (T I) คือ ระยะที่เกิดการแยกตัวของโครโมโซมและเซนโทรเมียร์

ข. โอโอไซต์ระยะพร้อมปฏิสนธิ (mature oocyte, M II) คือโอโอไซต์ที่มีโครโมโซมอยู่ในระยะเมทาเฟส ทู ซึ่งพบเมทาเฟส เพลท (metaphase plate) และโพลาร์ บอดี (polar body) 1 อัน

ค. โอโอไซต์ที่เสื่อมสลาย (degenerated oocyte, Deg) คือ โอโอไซต์ที่เกิดการแตกสลายของ

โอโอเลมา (oolemma) และความผิดปกติของไซโตพลาสม

4. โอโอไซต์ที่ไม่สามารถบอกลักษณะได้ (unidentified oocyte, UnI)

การวิเคราะห์ผล แสดงผลค่าพารามิเตอร์โดยใช้ค่าเฉลี่ยและประเมินข้อมูลในส่วนของอัตราความปกติหลังการละลาย อัตราการแผ่ขยายเซลล์คิวมูลัสของโอโอไซต์ และอัตราการเกิดสภาพพร้อมปฏิสนธิซึ่งเปรียบเทียบโดยวิธี chi-square (X2 test) ด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 7.0 กำหนดระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($p < 0.05$)

ผล

ผลของการใช้เอทีลีน ไกลคอลที่ระดับความเข้มข้นที่ 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 โมลาร์ ตามลำดับ โดยวิธี ultra-rapid freezing พบว่าอัตราการเก็บคืนโอโอไซต์หลังจากการทำละลายเท่ากับ 84.1% (440/523), 97.4% (337/346), 82.3% (423/514), 98.0% (301/307), 83.1% (427/514), 98.6% (358/365) และ 93.0% (343/369) ตามลำดับ โดยมีค่าเฉลี่ยของอัตราการเก็บคืนโอโอไซต์หลังจากทำละลายเท่ากับ 89.5%

เมื่อประเมินคุณภาพของโอโอไซต์หลังการทำละลาย A B C D พบว่าโอโอไซต์ที่ระดับความเข้มข้น 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 โมลาร์จะมีความปกติหลังจากทำการแช่แข็งและทำการละลายมากกว่าเมื่อเทียบกับ 6.5 และ 7.0 โมลาร์ ตามลำดับ ($p < 0.01$) โดยในแต่ละระดับความเข้มข้นในช่วง 4 ถึง 6 โมลาร์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนความเข้มข้นที่ระดับ 6.5 โมลาร์จะมีความปกติมากกว่าเมื่อเทียบกับ 7.0 โมลาร์ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 อัตราของโอโอไซต์ปกติภายหลังจากการแช่แข็งและการละลาย

ความเข้มข้นเอทีลีน ไกลคอล (โมลาร์)	จำนวนโอโอไซต์	เปอร์เซ็นต์ของโอโอไซต์			
		เกรด A	เกรด B	เกรด C	เกรด D
4.0	436	91.7[a]	6.2	1.6	0.5
		(400)	(27)	(7)	(2)
4.5	335	91.6[a]	5.1	0.1	2.7
		(307)	(17)	(2)	(9)
5.0	421	92.2[a]	5.7	1.2	1.0
		(388)	(24)	(5)	(4)
5.5	301	93.1[a]	5.3	0.7	0.3
		(282)	(16)	(2)	(1)
6.0	426	93.9[a]	4.7	0.5	0.9
		(400)	(20)	(2)	(4)
6.5	354	85.6[b]	11.0	1.7	1.7
		(303)	(39)	(6)	(6)
7.0	343	78.7[c]	17.5	1.2	2.6
		(270)	(60)	(4)	(9)

( ) จำนวนโอโอไซต์

a, b; a, c มีค่า $p < 0.01$ b, c มีค่า $p < 0.05$

ผลการประเมินคุณภาพของโอโอไซต์ภายหลังเลี้ยงให้เจริญพร้อมปฏิสนธิ A B C D พบว่าการแผ่ขยายของเซลล์คิวมูลัสของโอโอไซต์ที่ผ่านการเลี้ยงเพื่อให้เกิดสภาพพร้อมปฏิสนธิ ที่ระดับความเข้มข้น 5.5 โมลาร์ มีค่าสูงสุดและมากกว่ากลุ่มโอโอไซต์ที่ระดับความเข้มข้น 4.5, 6.5, และ 7.0 โมลาร์ ($p < 0.05$) และระดับความเข้มข้น 4.0, 5.0 และ 6.0 โมลาร์ ($p < 0.001$) ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติภายในแต่ละกลุ่มโอโอไซต์ โดยที่ระดับความเข้มข้น 4.5, 6.5 และ 7.0 โมลาร์ มีการแผ่ขยายเซลล์คิวมูลัสมากกว่ากลุ่มโอโอไซต์ที่ระดับ 4.0, 5.0 และ 6.0 โมลาร์ ($p < 0.001$) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 อัตราการแผ่ขยายเซลล์คิวมูลัสของโอโอไซต์และลักษณะของโอโอไซต์ภายหลังจากเกิดสภาพพร้อมปฏิสนธิ (IVM)

ความเข้มข้นเอทีลีน ไกลคอล (โมลาร์)	จำนวนโอโอไซต์	ลักษณะของโอโอไซต์หลังเกิดสภาพพร้อมปฏิสนธิ (%)			
		เกรด A	เกรด B	เกรด C	เกรด D
4.0	436	60.1[a]	23.2	9.2	7.6
		(262)	(101)	(40)	(33)
4.5	335	86.0[b]	2.7	3.6	7.8
		(288)	(9)	(12)	(26)
5.0	421	64.1[a]	15.4	11.6	8.8
		(270)	(65)	(49)	(37)
5.5	301	91.0[c]	0	3.7	5.3
		(274)	(0)	(11)	(16)
6.0	426	65.3[a]	22.1	6.8	5.9
		(278)	(94)	(29)	(25)
6.5	354	85.3[b]	1.4	5.4	7.9
		(302)	(5)	(19)	(28)
7.0	343	82.8[b]	4.1	5.3	7.9
		(284)	(14)	(18)	(27)

( ) จำนวนโอโอไซต์

a, b; a, c มีค่า $p < 0.001$ b, c มีค่า $p < 0.05$

จากการประเมินสภาพพร้อมปฏิสนธิโอโอไซต์โดยการย้อมด้วยสี 1% aceto-orcein พบว่าโอโอไซต์ที่ระดับความเข้มข้น 4.5 และ 5.0 โมลาร์ มีค่าสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับโอโอไซต์ในกลุ่มอื่นๆ โดยโอโอไซต์ในช่วงระดับความเข้มข้น 4.0 ถึง 6.0 โมลาร์ มีค่ามากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับโอโอไซต์ที่ระดับความเข้มข้น 7.0 โมลาร์ ($p < 0.05$) ซึ่งความเข้มข้นในแต่ละระดับตั้งแต่ 4.0 ถึง 6.0 โมลาร์ นั้นไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่โอโอไซต์ที่ระดับความเข้มข้น 6.5 โมลาร์ มีค่าน้อยกว่าเมื่อเทียบกับโอโอไซต์ในช่วง 4.5 และ 5.0 โมลาร์ ($p < 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับโอโอไซต์ที่ระดับความเข้มข้น 7.0 โมลาร์ และโอโอไซต์ในกลุ่มควบคุมมีอัตราการเกิดสภาพพร้อมปฏิสนธิ 65.1% (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 อัตราการเกิดสภาพพร้อมปฏิสนธิในหลอดทดลอง

ความเข้มข้นเอทีลีน ไกลคอล (โมลาร์)	จำนวนโอโอไซต์	เปอร์เซ็นต์โอโอไซต์แยกตามลักษณะโครโมโซม						
		GV	GVBD	MI	TI	MII	Deg	Un
4.0	217	0.5	2.3	6.0	1.4	21.7[a]	45.6	22.6
		(1)	(5)	(13)	(3)	(47)	(99)	(49)
4.5	200	0	1.5	8.5	0.5	24.5[a]	52.5	12.5
		(0)	(3)	(17)	(1)	(49)	(105)	(25)
5.0	213	0.9	0.9	3.3	1.4	24.4[a]	53.5	15.5
		(2)	(2)	(7)	(3)	(52)	(114)	(33)
5.5	201	0	4.5	4.5	1.5	20.9[a]	56.7	11.9
		(0)	(9)	(9)	(3)	(42)	(114)	(24)
6.0	238	0.4	1.7	4.6	1.7	19.3[a]	58.0	14.3
		(1)	(4)	(11)	(4)	(46)	(138)	(34)
6.5	206	1.0	5.3	6.3	1.0	16.0[b]	58.7	11.7
		(2)	(11)	(13)	(2)	(33)	(121)	(24)
7.0	211	0	4.3	5.2	0	11.4[b]	67.8	11.4
		(0)	(9)	(11)	(0)	(24)	(143)	(24)
Control	355	1.4	2.3	7.3	0.9	65.1	3.4	19.7
		(5)	(8)	(26)	(3)	(231)	(12)	(70)

( ) จำนวนโอโอไซต์

a, b มีค่า $p < 0.05$

วิจารณ์

ผลของการใช้เอทีลีน ไกลคอล ในการแช่แข็งโอโอไซต์สุกร พบว่าอัตราการเก็บคืนโอโอไซต์หลังการแช่แข็งและการทำละลายอยู่ในเกณฑ์สูง แสดงให้เห็นว่ามีความเสียหายเกิดขึ้นระหว่างกระบวนการแช่แข็งน้อย เช่นเดียวกับอัตราความปกติของโอโอไซต์ซึ่งมีค่าสูงเช่นกันโดยอยู่ในช่วง 60-90% ความเข้มข้นของเอทีลีน ไกลคอลในระดับ 6.5 และ 7.0 โมลาร์ ทำให้เกิดลักษณะผิดปกติของโอโอไซต์สูงซึ่งอาจมีสาเหตุจากความเป็นพิษของเอทีลีน ไกลคอล ที่มีความเข้มข้นสูงสอดคล้องกับการทดลองของ Hotamisligil et al. (1996) ซึ่งใช้เอทีลีน ไกลคอลที่ 4.0 ถึง 6.0 โมลาร์ เวลาไม่เกิน 5 นาที ให้ผลการแบ่งตัวของโอโอไซต์หนูเมาซ์หลังปฏิสนธิจนถึงระยะบลาสโตซิสดีกว่า 8.0 โมลาร์ โดยความเข้มข้นสูงทำให้เกิดความผิดปกติของเยื่อหุ้มเซลล์ ไมโครฟิลาเมนต์และเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (Arav et al., 1993) ในส่วนของผลต่อการเกิดสภาพพร้อมปฏิสนธิพบว่า เอทีลีน ไกลคอลที่ระดับความเข้มข้น 4.0 ถึง 6.0 โมลาร์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่มีแนวโน้มว่าที่ระดับความเข้มข้น 4.5 และ 5.0 โมลาร์ เกิดสภาพพร้อมปฏิสนธิดีที่สุด (24.5%)

เซลล์คิวมูลัสและเซลล์โคโรน่าที่อยู่รอบๆ โอโอไซต์จะเป็นส่วนประกอบสำคัญในการเจริญพร้อมปฏิสนธิและการปฏิสนธิ (Familiari et al., 1998) การแช่แข็งโอโอไซต์สุกรชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบหลายชั้นจะมีอัตราการรอดหลังการละลายสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับโอโอไซต์ที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบ (Pellicer et al., 1998) นอกจากนี้ยังมีการใช้ลักษณะการแผ่ขยายของเซลล์คิวมูลัสเป็นปัจจัยหนึ่งในการระบุระยะการเจริญพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์ และโอโอไซต์ที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสก่อนการเกิดสภาพพร้อมปฏิสนธินอกร่างกายจะมีศักยภาพในการเจริญพร้อมปฏิสนธิต่ำกว่าที่ปกคลุมด้วยเซลล์คิวมูลัส (Schroeder et al., 1990) แต่จากการศึกษาครั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ทางสถิติระหว่างการแผ่ขยายเซลล์คิวมูลัสกับสภาพพร้อมปฏิสนธิ โดยพิจารณาเปอร์เซนต์การแผ่ขยายเซลล์คิวมูลัสเปรียบเทียบกับอัตราการเกิดสภาพพร้อมปฏิสนธิในแต่ละความเข้มข้นจะสอดคล้องกับการศึกษาของ Recowsky (1985) ซึ่งพบว่าการเจริญของโอโอไซต์จนถึงระยะพร้อมปฏิสนธิไม่มีความสัมพันธ์กับการแผ่ขยายของเซลล์คิวมูลัส แต่จะเกิดจากฮอร์โมน FSH ที่เจือปนลงไปในน้ำยาเลี้ยงเพื่อให้เกิดสภาพพร้อมปฏิสนธิ (Schroeder et al., 1990; Silva et al., 1994)

การแช่แข็งด้วยวิธี ultra-rapid freezing เป็นวิธีที่เหมาะสำหรับการแช่แข็งโอโอไซต์เพราะให้อัตราการเกิดสภาพพร้อมปฏิสนธิและการแบ่งตัวถึงระยะบลาสโตซิสสูงกว่าการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิช้า (Martino, 1996) ยังช่วยลดการทำลายจากความเย็นเนื่องจากใช้ปริมาณของสารป้องกันการแช่แข็งลดลงและเวลาสั้นลง ซึ่งการเพิ่มอัตราเร็วของการแช่แข็งมีส่วนช่วยลดการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง (Shaw et al., 2000; Vajta, 2000) ส่วนการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิช้าจะทำให้เกิดความผิดปกติกับสารประกอบภายในโอโอไซต์แบบกลับคืนไม่ได้ และไม่สามารถควบคุมปัจจัยที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ เช่น การเกิดเกล็ดน้ำแข็ง ความเสียหายจากความแตกต่างของระดับแรงดันออสโมซิส หรือการแตกหักของเปลือกหุ้ม (Saunders and Park, 1999) นอกจากนี้การใช้ copper grid ในการแช่แข็งจะช่วยลดการเกิดเกล็ดน้ำแข็งเนื่องจากจะเกิดการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วจนข้ามช่วงความแตกต่างของอุณหภูมิซึ่งจะทำลายโอโอไซต์ (Shaw et al., 2000) และให้ผลดีกว่าการแช่แข็งในหลอด straw (Martino et al., 1996) จากการศึกษาของ Arav et al. (1993) พบว่าการใช้เทคนิค minimum drop size (MDS) มีส่วนช่วยลดการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ได้โดยการลดปริมาณสารป้องกันการแช่แข็งลงและให้ผลดีกว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสาร โดยยิ่งทำให้เกิดความเสียหายแก่

โอโอไซต์

ในการแช่แข็งโอโอไซต์ทำได้ยากกว่าการแช่แข็งตัวอ่อนดังการทดลองของ Santhananthan et al. (1988) พบว่าโอโอไซต์จะทนต่อการลดอุณหภูมิต่ำได้น้อยกว่าตัวอ่อน และการผ่านเข้าออกของสารป้องกันเซลล์ขณะแช่แข็งจะช้ากว่าตัวอ่อน ทำให้เกิดความเสียหายจากความดันออสโมซิส (osmotic injury) ได้ (Miyake et al., 1993) ในการแช่แข็งโอโอไซต์พบว่าโอโอไซต์ในระยะพร้อมปฏิสนธินั้นทำได้ยากเนื่องจากหลายปัจจัย เช่น ปริมาตรของโอโอไซต์ เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นเดียว ความไวต่อการลดอุณหภูมิมาก ไมโครฟิลาเมนท์และไมโครทิวบูลของโครโมโซมระยะเมทาเฟส ทู และเปลือกหุ้มถูกทำลายขณะแช่แข็งได้มาก (Shaw et al., 2000) จึงอาจปรับมาแช่แข็งโอโอไซต์ในระยะไม่พร้อมปฏิสนธิ เพราะไมโครทูบูลจะไม่ถูกทำลาย เนื่องจากยังไม่มีการจัดเรียงและสายโครมาตินยังไม่หดสั้น อีกทั้งยังมีเยื่อหุ้มนิวเคลียสอยู่ด้วย (Jewgenow et al., 1998) Isachenko et al. (1998) เสนอแนะว่าการเลือกใช้ชนิดและความเข้มข้นของสารป้องกันการแช่แข็ง รวมถึงการทำละลายที่เหมาะสมมีส่วนสำคัญต่อความสำเร็จในการแช่แข็งโอโอไซต์สุกร

จากการศึกษานี้สรุปได้ว่า การแช่แข็งโอโอไซต์สุกรในระยะไม่พร้อมปฏิสนธิด้วยวิธี ultra-rapid freezing ใช้ความเข้มข้นของเอทีลีน ไกลคอล 4.0 ถึง 6.0 โมลาร์ มีความเหมาะสมที่ทำให้โอโอไซต์ภายหลังการแช่แข็งมีคุณภาพดี มีอัตราการเกิดสภาพพร้อมปฏิสนธิในระดับที่ยอมรับได้ และมีแนวโน้มว่า ความเข้มข้นของเอทีลีน ไกลคอลที่ 4.5 และ 5.0 โมลาร์ ทำให้เกิดสภาพพร้อมปฏิสนธิที่ดีที่สุด ส่วนการใช้เอทีลีน ไกลกอลที่ความเข้มข้นมากกว่า 6.0 โมลาร์ ทำให้เกิดผลเสียต่อโอโอไซต์หลังการแช่แข็งทั้งในด้านลักษณะและความสามารถในการพัฒนาต่อไป และเป็นพื้นฐานสำหรับการพัฒนาการเก็บรักษาโอโอไซต์สุกรเพื่อใช้สำหรับการผลิตสุกรจากการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย แนวทางการวิจัยต่อไป คือ การนำเอาโอโอไซต์ที่แช่แข็งไปปฏิสนธิแล้วดูความปกติของไซโตพลาสมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ธวัชชัย สลับศรี พยุงศักดิ์ พานิชยิ่ง วิสูตร นวลขาว 1999 (2542). การศึกษาถึงผลของสารป้องกันการแช่แข็งชนิดต่างๆที่มีผลต่อความพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์สุกรหลังการแช่แข็งด้วยวิธี ultra-rapid freezing. โครงการเสริมทักษะการวิจัย คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 18 หน้า

มงคล เตชะกำพุ และวันเพ็ญ ศรีอนันต์ 1997 (2540). ผลของคุณภาพโอโอไซต์ต่ออัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนหลังการปฏิสนธินอกร่างกายในสุกร. เวชชสารสัตวแพทย์. 27(1): 78-91.

วันเพ็ญ ศรีอนันต์ และมงคล เตชะกำพุ 1994 (2537). ผลการเติมเซลล์กรานูโลซ่าและซีรั่มต่ออัตราการเกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิของโอโอไซต์สุกร. ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการสัตวแพทยสมาคม ครั้งที่ 21 28-30 พฤศจิกายน กรุงเทพมหานคร หน้า 195-201.

Alberts, B., Lewis, J., Roberts, K., Bray, D., Raff, M. and Watson, J.D. 1994. The cytoskeleton. In: Molecular Biology of the Cell. 3rd ed. New York & London : Garland Publishing, Inc. 863-1033.

Arav, A., Shehu, D. and Mattioli, M. 1993. Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. J. Reprod. Fert. 99: 353-358.

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

Coy, P., Martinez, E., Ruiz, S., Vazquez, J.M., Roca, J., Matas, C. and Pellicer, M.T. 1993. *In vitro* fertilization of pig oocytes after different coincubation intervals. Theriogenology. 39: 1201-1208.

Hotamisligil, S., Toner, M. and Power, R.D. 1996. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification in ethylene glycol. Biol. Reprod. 55: 161-168.

Isachenko, V., Soler, C., Isachenko, E., Perez-Sanchez, F. and Grishchenko, V. 1998. Vitrification of Immature porcine oocytes: Effects of lipid droplets, temperature, cytoskleton,and addition and removal of cryoprotectant. Cryobiology. 36: 250-253.

Jewgenow, K., Penfold, L.M., Deyer, H.H.D. and Wildt, D.E. 1998. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. J. Reprod. Fert. 112: 39-47.

Martino, A., Songsasen, N. and Leibo, S.P. 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. Biol. Reprod. 54: 1059-1069.

Miyake, T., Kasai, M., Zhu, S.E., Sakurai, T. and Machida, T. 1993. Vitrification of mouse oocyte and embryo at various stages of development in an ethylene glycol-based solution by a simple method. Theriogenology. 40: 121-134.

Otoi, T., Yamamoto, K., Koyoma, N., Tachikawa, S. and Suzuki, T. 1998. Cryopreservation of mature bovine oocytes by vitrificaiton in straws. Cryobiology. 37: 77-85.

Pellicer, A., Lightman, A., Parmer, T.G., Behrman, H.R. and Dechemey, A.H. 1988. Morphologic and functional studies of immature rate oocyte-cumulus complexs after cryopreservation. Fertil. Steril. 50(5): 805-810. (Abstr.)

Recowsky, C. 1985. Effect of forskolin on maintenance of meiotic arrest and stimulation of cumulus expansion, progesterone and cyclic AMP production by pig oocyte-cumulus complexes. J. Reprod. Fert. 74: 9-21.

Sathananthan, A.H., Ng, S.C., Trounson, A.O., Bongso, A., Tatnam, S.S., Ho, J., Mok, H. and Lee, M.N. 1988. The effects of ultrarapid freezing on meiotic and mitotic spindles of mouse oocytes and embryos. Gemete Res. 21(4): 385-401. (Abstr.)

Saunders, K.M. and Park, J.E. 1999. Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of *in vitro*-matured bovine oocytes. Biol. Reprod. 61: 178-187.

Schellander, K., Peli, J., Schmoll, F. and Brem, G. 1994. Effects of different cryoprotectants and carbohydrates on freezing of matured and immatured bovine oocytes. Theriogenology. 42(6): 909-915.

Schroeder, A.C., Champlin, A.K., Mobraaten L.E. and Eppig, J. 1990. Developmental capacity of mouse oocytes cryopreserved before and after maturation *in vitro*. J. Reprod. Fert. 89: 43-50.

Shaw, J.M., Oranratnachai, A. and Trouson, A.O. 2000. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. Theriogenology. 53: 59-72.

Silva, M.D., Pearl, A.W. and Butler, W.J. 1994. Thyroid stimulating hormone causes cumulus expansion in mouse oocytes. Theriogenology. 41(4): 899-905.

Smith, L.C. and Alcinar, A.A. 1993. Cytoplasmic inheritance and its effects on development and performance. J. Reprod. Fert.. Suppl. 48(1): 31-43.

Vajta, G. 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. Anim. Reprod. Sci. 60-61: 357-364.

Whittingham, D.G. 1977. Fertilization *in vitro* and development to term of unfertized mouse oocytes previously stored at -196°C. J. Reprod. Fert. 49: 89-94.