บทที่ 6

การเก็บรักษาโอโอไซต์ และไข่สุก ต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบความเป็นพิษของสารป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งในเซลล์ ที่ความเข้มข้นสูง
2. เพื่อทดสอบวิธีการแช่แข็งโอโอไซต์ และไข่สุกด้วยการทำไวตริฟิเคชัน

วิธีการทดลอง

วิธีการทดลองแบ่งออกเป็น 3 แผนการทดลอง ดังจะกล่าวต่อไปข้างล่างนี้ โดยใช้โอโอไซต์จากแหล่งที่กล่าวไว้ในบทที่ 3 หน้า 27 เลี้ยงใน IVM มีเดียม ตามวิธีการที่กล่าวไว้ในบทที่ 3 หน้า 24 และปฏิสนธินอกร่างกายใน IVF มีเดียม ด้วยน้ำเชื้อที่เตรียมตามวิธีการที่กล่าวไว้ในบทที่ 3 หน้า 25 และ 30-31 การเตรียม VTM มีเดียม ทั้ง 3 ชนิด ทำตามที่กล่าวไว้ในบทที่ 3 หน้า 32-33 การบรรจุไข่เข้าหลอดฟาง การทำไวตริฟิเคชัน และการทำละลาย ทำตามที่กล่าวไว้ในบทที่ 3 หน้า 35

แผนการทดลองที่ 1 เพื่อทำการทดสอบความเป็นพิษ ของ EG ที่ความเข้มข้นระดับสูง ก่อนจะใช้ทำไวตริฟิเคชัน โดยนำโอโอไซต์มาปรับสมดุลย์แรงดันออสโมติค ใน VTM มีเดียม ทั้ง 3 ชนิด ต่อไปนี้

1. VTM 1 มีเดียม คือ มีเดียม 199 ที่มี EG 7.5 โมลาร์ และ โบวายน์ซีรัมอัลบูมิน 6 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
2. VTM 2 มีเดียม คือ มีเดียม 199 ที่มี EG 6.25 โมลาร์ GLY 0.7 โมลาร์ ซูโครส 0.1 โมลาร์ และ ฟีตอลโบวายน์ซีรัม 20 % โดยปริมาตร

3. VTM 3 มีเดียม 199 ที่มี EG 7.15 โมลาร์ ซูโครส 0.1 โมลาร์ และ ฟีตอลโบวายน์ซีรัม 20 % โดยปริมาตร

เพื่อไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมดุลย์แรงดันออสโมติคเร็วเกินไป เนื่องจาก VTM มีเดียม มีความเข้มข้นสูง จึงต้องทำการปรับสมดุลแรงดันออสโมติค เป็น 3 ขั้นตอน คือ

1. เริ่มจากปรับสมดุลนมีเดียมเข้มข้นเป็น 25.0 % ของแต่ละ VTM มีเดียมนาน 5 นาที
2. ปรับสมดุลในมีเดียมเข้มข้นเป็น 66.7 % ของแต่ละ VTM มีเดียมนาน 1.5 นาที
3. ขั้นตอนสุดท้าย ปรับสมดุลในมีเดียมเข้มข้น 100 % ของแต่ละ VTM มีเดียม นาน 1.5 นาที

ล้างเอา CPA ออกทันที โดยการปรับสมดุลย้อนขั้นตอน แล้วล้างในขั้นตอนสุดท้าย โดยแช่ในมีเดียม M199B นาน 15 นาที เลี้ยงต่อไปก่อนนำไปเข้าจานเลี้ยงต่อไป

VTM 1 ทำเจือจางเป็น 25.0 % โดยใช้มีเดียม 199 ที่มีโบวายน์ซีรัมอัลบูมิน 6 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 3 ส่วน ผสมกับ VTM 1 1 ส่วน

VTM 1 ทำเจือจางเป็น 66.7 % โดยใช้มีเดียม 199 ที่มีโบวายน์ซีรัมอัลบูมิน 6 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 1 ส่วน ผสมกับ VTM 1 2 ส่วน

VTM 2 ทำเจือจางเป็น 25.0 % โดยใช้มีเดียม 199 ที่มีฟีตอลโบวายน์ซีรัม 20 % โดยปริมาตร 3 ส่วน ผสมกับ VTM 2 1 ส่วน

VTM 2 ทำเจือจางให้เป็น 66.7 % โดยใช้มีเดียม 199 ที่มีฟีตอลโบวายน์ซีรัม 20 % โดยปริมาตร 1 ส่วน ผสมกับ VTM 2 2 ส่วน

VTM 3 ทำเจือจางเป็น 25.0 % โดยใช้มีเดียม 199 ที่มี ฟีตอลโบวายน์ซีรัม 20 % โดยปริมาตร 3 ส่วน ผสมกับ VTM 3 1 ส่วน

VTM 3 ทำเจือจางให้เป็น 66.7 % โดยใช้มีเดียม 199 ที่มี ฟีตอลโบวายน์ซีรัม 20 % โดยปริมาตร 1 ส่วน ผสมกับ VTM 3 2 ส่วน

เมื่อปรับสมดุลแรงดันออสโมติคของโอโอไซต์สุกรในแต่ละมีเดียมและล้างออกเรียบร้อยแล้ว ก็นำเอาโอโอไซต์มาเลี้ยงใน IVM มีเดียม เป็นเวลา 40 ชม. แล้วนำมาตรึงสภาพและย้อมสีออร์ซีน ตามวิธีการในบทที่ 3 หน้า 38-39 แล้วนำมาตรวจดูระยะการเจริญของนิวเคลียสของโอโอไซต์ นับเปอร์เซนต์ที่ไข่มีนิวเคลียสเจริญถึงระยะ M II ของแต่ละ VTM มีเดียม มาเปรียบ

เทียบกับเปอร์เซนต์การเจริญถึงระยะ M II ของโอโอไซต์ที่ไม่ได้ผ่านการปรับสมดุล แล้วนำผลที่ได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

แผนการทดลองที่ 2 เพื่อทดสอบความเป็นไปได้ในการทำไวตริฟิเคชันโอโอไซต์ ด้วย VTM มีเดียม 3 ชนิด

นำโอโอไซต์ที่ล้างแล้วมาปรับสมดุลแรงดันออสโมซิส ใน VTM มีเดียม ซึ่งมีอยู่ 3 ชนิด คือ 1) VTM 1, 2) VTM 2, 3) VTM 3 โดยปรับสมดุลเป็น 3 ขั้นตอน เหมือนในแผนการทดลองที่ 1 แล้วทำไวตริฟิเคชัน เช่นเดียวกับขั้นตอนที่กล่าวไว้ในบทที่ 3 หน้า 34 โดยใช้ VTM เปลี่ยนไปทั้ง 3 ชนิด โอโอไซต์แช่แข็งด้วยวิธีไวตริฟิเคชัน จะถูกเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว 3-7 วัน แล้วจึงนำมาทำละลายเพื่อเลี้ยงทดสอบการมีชีวิตรอดและการเจริญของนิวเคลียสถึงระยะ M II ใน IVM มีเดียม นาน 40 ชม.

แผนการทดลองที่ 3 เพื่อทดสอบความเป็นไปได้ในการทำไวตริฟิเคชันไข่สุก ด้วย VTM มีเดียม 3 ชนิด

นำโอโอไซต์ที่ล้างแล้วมาเลี้ยงใน IVM มีเดียม นาน 40 ชม. ทำการดูด เป่าด้วยพลาสเจอร์ปิเปตยืดปลาย เพื่อเอาคูมูลัสเซลล์ออกไปบางส่วน แล้วทำการแช่แข็งแบบ ไวตริฟิเคชัน โดยใช้ VTM มีเดียม 3 ชนิด เหมือนกับแผนการทดลองที่ 2 โอโอไซต์แช่แข็งด้วยวิธีไวตริฟิเคชัน จะถูกเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว 3-7 วัน แล้วจึงนำมาทำละลายเพื่อปฏิสนธิ ใน IVF มีเดียม นาน 14 ชม. แล้วจึงนำไข่มาตรึงให้คงสภาพ และย้อมสีซีโตออซีน ตามวิธีการย้อมและตรวจผลในบทที่ 3 หน้า 39 และ 40

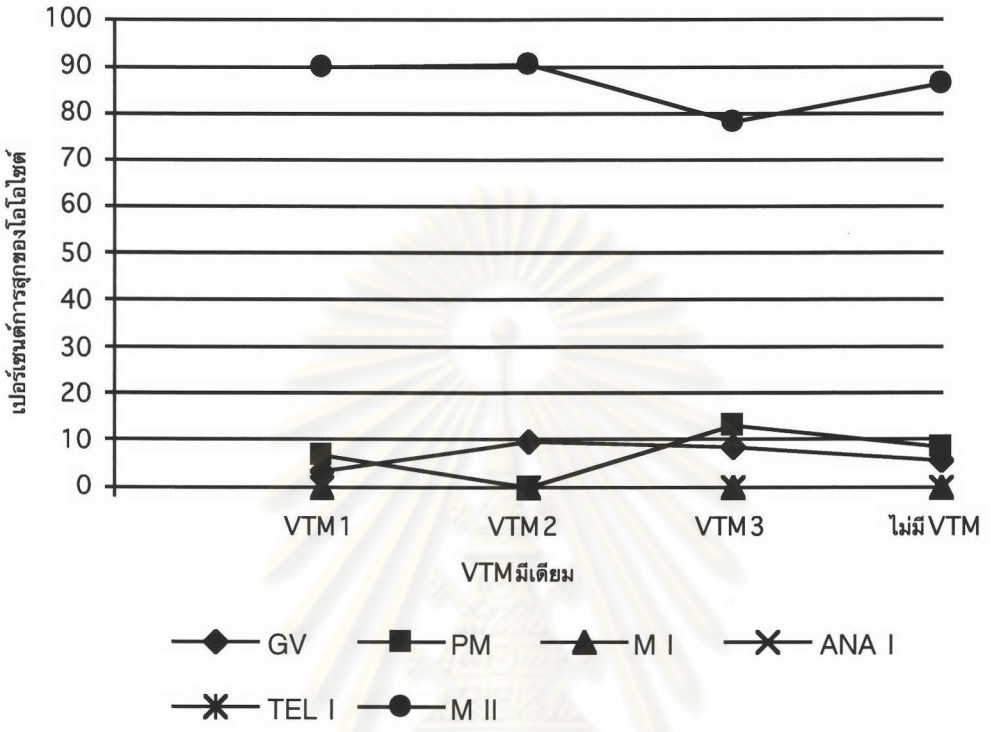
ผลการทดลอง

ผลการทดลองที่ 1 จากตารางที่ 6 และรูปที่ 20 โอโอไซต์ที่ผ่าน VTM มีเดียมทั้ง 3 ชนิด มีเปอร์เซนต์ การเจริญถึงระยะ M II ต่างจากการเลี้ยงไข่ปกติอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.01$) จึงสามารถใช้ VTM มีเดียม ทั้ง 3 ชนิด ในการทำไวตริฟิเคชันในการทดลองต่อไปได้

ตารางที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การสุกของโอโอไซต์ ที่ผ่านการปรับสมดุลแรงดันออสโมติด ในมีเดียมสำหรับทำไวตริฟิเคชัน 3 ชนิด ที่มีสารป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง ในเซลล์ (CPA) ต่างกัน คือ VTM 1 (EG 7.5 โมลาร์) VTM 2 (EG 6.25 โมลาร์ GLY 0.5 โมลาร์ และซูโครส 0.1 โมลาร์) และ VTM 3 (EG 7.15 โมลาร์ ซูโครส 0.1 โมลาร์ และ CB) แล้วล้างออกก่อนที่จะเลี้ยงให้สุกใน IVM มีเดียมนาน 40 ชม.

VTM	จำนวนโอโอไซต์	% การเจริญของนิวเคลียสถึงระยะ					
		GV	PM	M I	ANA I	TEL I	M II
VTM 1	30	3.3	6.7	0	0	0	90.0
VTM 2	21	9.5	0	0	0	0	90.5
VTM 3	23	8.7	13.0	0	0	0	78.3
ไม่มี	36	5.6	8.3	0	0	0	86.1

ผลการทดลองที่ 2 โอโอไซต์ที่ผ่านการแช่แข็งโดยการทำไวตริฟิเคชันในมีเดียมทั้ง 3 แบบ เมื่อทำละลายออกมา สีของไซโตพลาสซึมคล้ำขึ้น และคูมูลัสเซลล์เกาะกับโซนาเพลลูซิดาอย่างหลวมเมื่อล้างแล้วนำเข้าเลี้ยงใน IVM มีเดียม คูมูลัสเซลล์บางส่วนยังสามารถเจริญ และแผ่กระจายตัวออกได้ แต่คูมูลัสเซลล์ซีดลงเมื่อเลี้ยงครบ 40 ช.ม ทำให้คงสภาพและย้อมสีออซีนดูปรากฏว่าโอโอไซต์ที่แช่แข็งด้วยมีเดียม VTM 1 และ VTM 2 หานิวเคลียสไม่พบ ส่วนโอโอไซต์ที่แช่แข็งใน VTM 3 พบ นิวเคลียสอยู่ 6.1% (ตารางที่ 7) แต่ก็มีลักษณะที่ถูกทำลายไปเช่นกัน รวมถึงส่วนของไซโตพลาสซึม ก็แตกเป็นเม็ด (ดังรูปที่ 21)



รูปที่ 20 เปรียบเทียบเปอร์เซนต์การสุกของโอโอไซต์ที่ผ่านการปรับสมดุลย์ใน VTM มีเดียม 3 ชนิด คือ VTM 1 VTM 2 และ VTM 3 นาน 1.5 นาที แล้วล้างออก ก่อนเลี้ยงใน IVM มีเดียมนาน 40 ชม.

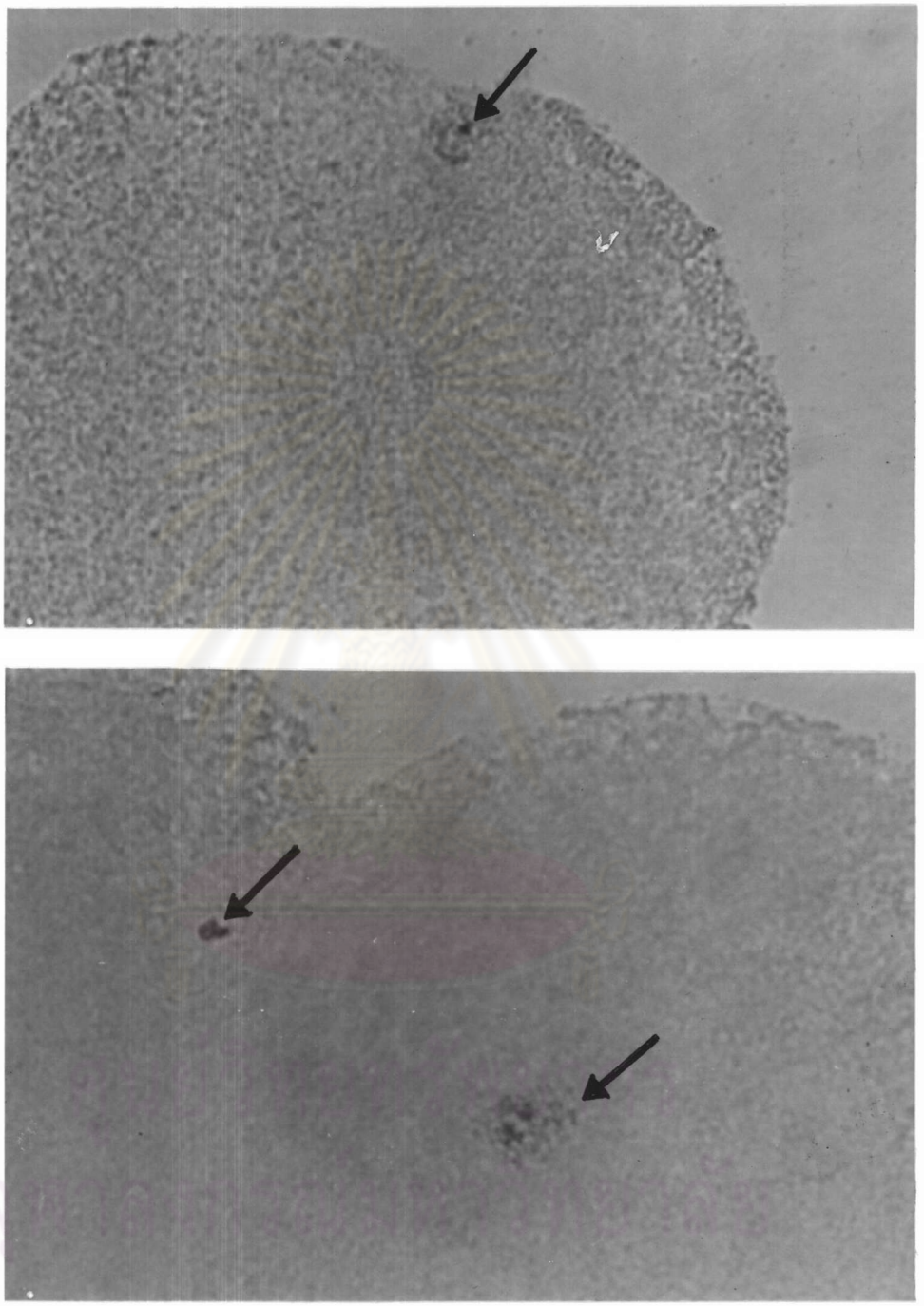
ผลการทดลองที่ 3 ไข่สุกที่ผ่านการแช่แข็งโดยการทำไวตริฟิเคชัน ในมีเดียมทั้ง 3 แบบ เมื่อทำละลาย ล้าง แล้วนำไปปฏิสนธิร่วมกับอสุจินาน 14 ชม. แล้วนำมาทำให้คงสภาพ และย้อมสีอซีโตออซีน ปรากฏว่าไซโตพลาสซึมแตกเป็นเม็ดและนิวเคลียสกระจายตัว สังเกตไม่ได้ว่าอยู่ในระยะอะไร ในการทดลองนี้มีเปอร์เซนต์การสูญหายของไข่ระหว่างการแช่แข็งอยู่ระหว่าง 12.5 - 25% และไม่สามารถทำการปฏิสนธิได้เพราะเกิดการทำลายนิวเคลียส(ตารางที่ 8)

ตารางที่ 7 แสดงเปอร์เซนต์การเจริญของโอโอไซต์ที่ผ่านการแช่แข็งโดยการทำไวตริฟิเคชัน ด้วย VTM มีเดียม 3 แบบ แล้วนำมาเลี้ยงใน IVM มีเดียมนาน 40 ชม.

VTM	จำนวนไข่แช่แข็ง	เปอร์เซนต์สูญหาย	จำนวนไข่เข้าเลี้ยง	ระยะการเจริญ GV	ระยะการเจริญ M II	นิวเคลียสถูกทำลาย
ไม่ได้แช่แข็ง	0	0	17	5.9	94.1	-
VTM 1	180	20.0	144	0	0	100.0
VTM 2	154	14.9	131	0	0	100.0
VTM 3	120	18.3	98	6.1	0	93.9

ตารางที่ 8 แสดงเปอร์เซนต์การปฏิสนธิ ของไข่สุกที่ผ่านการแช่แข็ง ด้วยการทำไวตริฟิชัน ด้วย VTM มีเดียม 3 แบบ แล้วนำมาทำ IVF นาน 14 ชม.

VTM	จำนวนไข่แช่แข็ง	เปอร์เซนต์สูญหาย	จำนวนไข่เข้าเลี้ยง	% ระยะการเจริญ M II	% ระยะการเจริญ ปฏิสนธิ	% นิวเคลียสถูกทำลาย
ไม่ได้แช่แข็ง	0	0	60	87.0	15.0	0
VTM 1	180	180	135	0	0	100
VTM 2	80	80	70	0	0	100
VTM 3	120	120	96	0	0	100



รูปที่ 21 โอโอไซต์ที่แช่แข็งด้วยวิธีไวตริฟิเคชัน ใน VTM 3 มีเดียม ภายหลังการทำละลายแล้วเลี้ยงใน IVM มีเดียม นาน 40 ชม. ในใบที่พบว่าส่วนของนิวเคลียส ระยะ GV (ลูกศรชี้) ถูกทำลาย (กำลังขยาย 320 เท่า)

วิจารณ์ผล

เอทีลีนไกลคอล ความเข้มข้นสูงระหว่าง 6.25 โมลาร์ ถึง 7.5 โมลาร์ ไม่มีผลต่อการรบกวนการเจริญของไข่อ่อน ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะ EG มีความสามารถซึมผ่านเข้าออกเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว จึงทำให้สามารถล้างออกจากเซลล์ได้ง่าย และอาจจะมีส่วนช่วยพาสารอาหารหรืออิออนของธาตุหรือโมเลกุลของฮอร์โมนหรือโปรตีน ซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ดีขึ้น จึงทำให้มีเปอร์เซนต์การสุกของไข่สูงกว่าไข่ปกติ ทั้งที่ความเข้มข้นสูงในการทดลองในบทนี้และที่ความเข้มข้นต่ำในบทที่ 5 ที่ผ่านมา

การทำการแช่แข็งโอโอไซต์สุกรด้วยวิธีไวตริฟิเคชัน ในมีเดียม IVM ทั้ง 3 ชนิด มีการสูญหายของไข่ที่แช่แข็ง ระหว่าง 15-20% หลังจากการทำละลาย และโอโอไซต์ที่ผ่านการแช่แข็งด้วยวิธีไวตริฟิเคชันในมีเดียม IVM ทั้ง 3 ชนิด ทั้งหมดที่เข้าเลี้ยง 373 ใบ โอโอไซต์ในส่วนที่ยังมีคูมูลัสเซลล์เกาะอยู่ คูมูลัสเซลล์บางส่วนก็ยังสามารถเจริญแผ่ออกไปได้ ซึ่งคล้ายกับการทดลองของ Didion และคณะ (1990) ซึ่งได้ทดสอบด้วยการย้อมสี พบว่าคูมูลัสเซลล์ของโอโอไซต์ยังมีชีวิตอยู่หลังจากผ่านการแช่แข็งด้วยการลดอุณหภูมิลงอย่างช้า ๆ แต่การที่โอโอไซต์ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ เนื่องจากนิวเคลียสถูกทำลายและพลาสมาเมมเบรนตลอดจนองค์ประกอบต่าง ๆ ในไซโตพลาสซึมอาจถูกทำลายหรือสูญเสียสภาพการทำหน้าที่ในเซลล์ ซึ่งในการทดลองของ Rubinsky และคณะ (1991) ที่ลดอุณหภูมิโอโอไซต์สุกรอย่างรวดเร็ว จาก 22^{o}ซ ถึง -130^{o}ซ ใน AVS มีเดียม ที่มี PROH 35% GLY 5% และ ซูโครส 0.1 โมลาร์ พบว่า โอโอไซต์สุกรทั้งหมด 47 ใบ ไม่มีชีวิตรอดหลังจากลดอุณหภูมิถึง -130^{o} ซ ซึ่งหลังจากเลี้ยง 44 ชม.แล้วตรึงสภาพย้อมสีพบว่าไข่ที่ผ่านการลดอุณหภูมิไม่มีโอโอเลมมา และไข่ส่วนมากจะถูกทำลายโดยสิ้นเชิง และจากการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า โอโอเลมมาเป็นจุดแรกที่ถูกทำลายในโอโอไซต์ ซึ่งพวกเขาแก้ปัญหานี้โดยการเติมไกลโคโปรตีนป้องกันการกลายเป็นน้ำแข็ง ($AFGP_S$, antifreeze glycoprotein) ลงใน AVS มีเดียมที่ความเข้มข้น 40 มก./มล, แล้วทำการลดอุณหภูมิเหมือนเดิม ปรากฏว่า 24.5% ของโอโอไซต์ 45 ใบ เจริญถึงระยะ MI หรือ MII และ82.2% ของไข่ ยังสังเกตพบโอโอเลมมา ซึ่งจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า $AFGP_S$ มีผลต่อการทำให้โอโอเลมมามีโครงสร้างคงที่ ในสภาพที่เกิดการแช่แข็ง

น่าจะได้มีการนำ $AFGP_S$ มาลองใช้ หรือหาสารประกอบที่โครงสร้างทางเคมีคล้ายกับ $AFGP_S$ มาทดลองใช้ในการแช่แข็งแบบไวตริฟิเคชัน และทดสอบการสุกของไข่และการปฏิสนธิต่อไปคงจะเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยแก้ปัญหาในการทำลายโครงสร้างเซลล์อันเนื่องมาจากการแช่แข็ง

สาเหตุหนึ่งที่ทำให้เอ็มบริโอและไข่ของสุกรทนทานต่อความเย็นได้น้อย เนื่องจากว่ามีไลปิดในไซโตพลาสซึมมากกว่าเอ็มบริโอหรือไข่ของปศุสัตว์ชนิดอื่นๆ ซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อการมีชีวิตรอดระหว่างหรือหลังการแช่แข็ง Edidin และ Pelit (1977) ได้สังเกตพบว่า เมื่อเอาเอ็มบริโอสุกรมาไว้ที่ 15^{o}ซ โครงสร้างภายในจะเปลี่ยนไป โดยภายในจุดไลปิดจะมีการก่อตัวเป็นจุดที่ใหญ่ขึ้น ซึ่ง Mohr และ Trounson (1981) คาดว่าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดอันตรายเมื่อแช่แข็ง แต่ถ้าจะเอาไลปิดออกจากเซลล์ก็อาจจะทำให้ไซโตพลาสซึมทำงานผิดปกติจนถึงกับไปทำลายการเคลื่อนย้ายองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ได้ แต่จากการทดลองของ Nagashima และคณะ (1995, 1996) พบว่าการดูดเอาไลปิดออกจากเอ็มบริโอและไข่สุก สามารถทำให้ทั้งเอ็มบริโอและไข่สุกมีชีวิตรอดหลังจากการแช่แข็งแบบไวตริฟิเคชัน จนสามารถเจริญถึงระยะบลาสโตซิสหรือสามารถทำการปฏิสนธิได้ในไข่สุกที่ผ่านการแช่แข็ง แต่เป็นการปฏิสนธิโดยการฉีดอสุจิเข้าไปใต้โซนาเพลลูซิดา การดูดเอาไลปิดออกจากไข่ก่อนทำการแช่แข็งโดยวิธีไวตริฟิเคชัน อาจจะเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยให้เซลล์ไข่ยังมีชีวิตรอดหลังการแช่แข็ง แต่อาจจะไม่ช่วยแก้ปัญหาการเกิดการแข็งตัวของโซนาเพลลูซิดาภายหลังการแช่แข็งได้ จึงต้องใช้เทคนิคการฉีดอุสจิเข้าไปเพื่อการปฏิสนธิ

การเติมไซโตชลาซิน บี (CB) ใน VTM 3 มีเดียมในอัตรา 75 มคก./มล. ไม่ได้ช่วยป้องกันเซลล์ไข่ให้มีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้นจาก VTM มีเดียมอีก 2 ชนิด เลย ซึ่งต่างจากในการแช่แข็งเอ็มบริโอโคที่ CB สามารถช่วยเพิ่มอัตราการมีชีวิตรอด เพิ่มขึ้นถึง 38 % จากการทำไวตริฟิเคชัน ปกติที่ไม่เติม CB (Dobrinsky et al.,1995) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะไลปิดในเซลล์ไข่สุกรไม่สามารถคืนตัวหลังจากการทำละลาย ทำให้ไม่สามารถใช้ประโยชน์ในการเมตาบอลิซึมในเซลล์ได้ หรืออาจทำให้เกิดการสลายตัวของพลาสมาเมมเบรน ทำให้ไลปิดหลุดออกมานอกเซลล์ ทำให้ขาดไลปิดเพื่อใช้ในเซลล์หรือไมโครทูบูลถูกทำลายเนื่องจากการแช่แข็ง ทำให้มีผลต่อการเคลื่อนที่และขนส่งไลปิดและส่วนประกอบอื่นๆ ในเซลล์ ทั้งนี้จากการทดลองของ Dobrinsky และคณะ (1995) ในเอ็มบริโอโค พบว่าถ้าในไวตริฟิเคชันมีเดียมมีทั้ง CB และดีมีโคลซีน จะทำให้เอ็มบริโอโคมีการเจริญเพิ่มจากการทำไวตริฟิเคชันปกติถึง 49 % หรือเพิ่มจากใช้ CB อย่างเดียว

11 % ดังนั้นในการทำไวตริฟิเคชันไข่สุกร ถ้ามีการทำให้ไซโตสกีลีตันของเซลล์ ทั้งในส่วนไมโครฟิลาเมน และไมโครทูบูลไม่ถูกทำลายระหว่างขบวนการไวตริฟิเคชัน รวมถึงทำให้ไลปิดในเซลล์คงตัว ก็อาจทำให้ไข่สุกรที่ทำไวตริฟิเคชันมีชีวิตรอดหลังการละลายสูงขึ้น

การทดลองการแช่แข็งไข่สุกรด้วยวิธีไวตริฟิเคชันในครั้งนี้ ไม่สามารถทำให้ทั้งโอโอไซต์และไข่สุก เจริญต่อเนื่องไปหลังการทำละลายได้ ซึ่งทั้งนี้เกิดจากการที่ทั้งนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมถูกทำลายระหว่างขบวนการไวตริฟิเคชันหรือระหว่างการทำละลาย จึงควรระมัดระวังในการดำเนินการในขั้นตอนดังกล่าวให้แม่นยำ เที่ยงตรง เพราะขั้นตอนดังกล่าวปฏิบัติด้วยตัวบุคคลอาจมีความแปรปรวนได้มาก

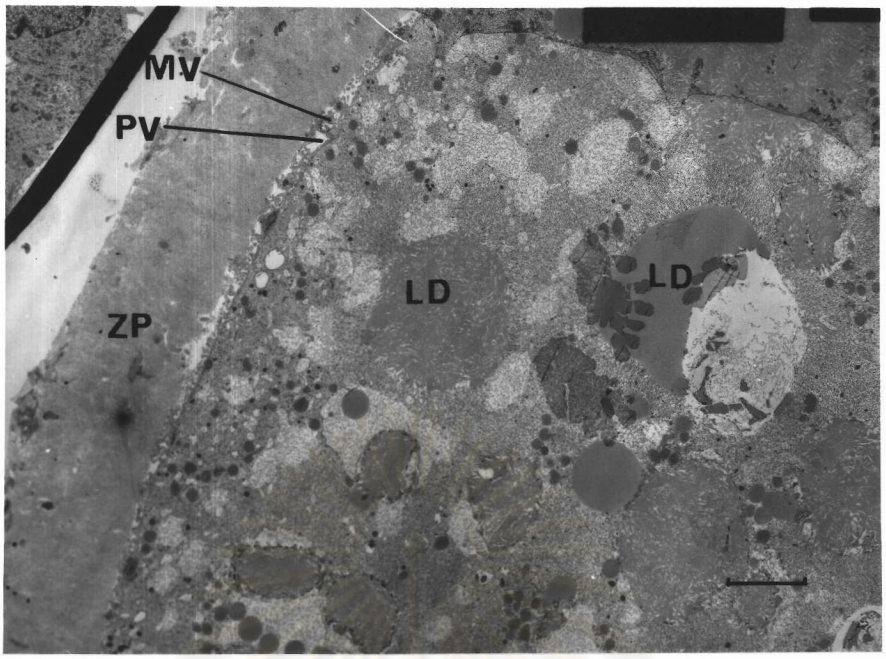
จากการที่ทั้งโอโอไซต์ และไข่สุกไม่สามารถเจริญต่อหลังทำการแช่แข็ง จึงได้ส่งตัวอย่าง 1) โอโอไซต์ 2) โอโอไซต์ที่ผ่านการแช่แข็งวิธีไวตริฟิเคชัน ด้วย VTM 1 3) ไข่สุกที่ผ่านการปฏิสนธิมาแล้ว 6 ชม. และ 4) ไข่สุกที่ผ่านการแช่แข็งวิธีไวตริฟิเคชัน ด้วย VTM 1 ไปทำการถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อีเลคตรอนแบบทรานสมิชชัน (TEM) ณ. ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในไซโตพลาสซึมของไข่ ก่อนและหลังการแช่แข็ง

จากการเปรียบเทียบรูปที่ 22 และ 23 พบว่า โอโอไซต์ที่ผ่านการแช่แข็ง โอโอเลมมาและไมโครวิลไล (MV) ถูกทำลายไป ซึ่งสังเกตจาก ในรูปที่ 23 ไม่มีเพอริวิเทลลีน สเปช (PV) ซึ่งเกิดจากการที่ โอโอเลมมาถูกทำลายจึงทำให้ไซโตพลาสซึมขยายตัวออกมาจนชิดโซนาเพลลูซิดา (ZP) และองค์ประกอบต่างๆ ในไซโตพลาสซึมก็กระจายตัวออกมาด้วยเช่นกัน และยังพบว่า ไลปิดดรอบเลท (LD) ถูกทำลายไปด้วยเช่นกัน จนเห็นเหลือเป็นเพียงลักษณะคล้ายกับแวคูโอล (VC) และบริเวณกลางเซลล์ ก็มีองค์ประกอบอื่นของเซลล์มารวมตัวกันอยู่มาก ซึ่งเปรียบเทียบกันได้ชัดเจนขึ้น ในรูปที่ 24 และ 25

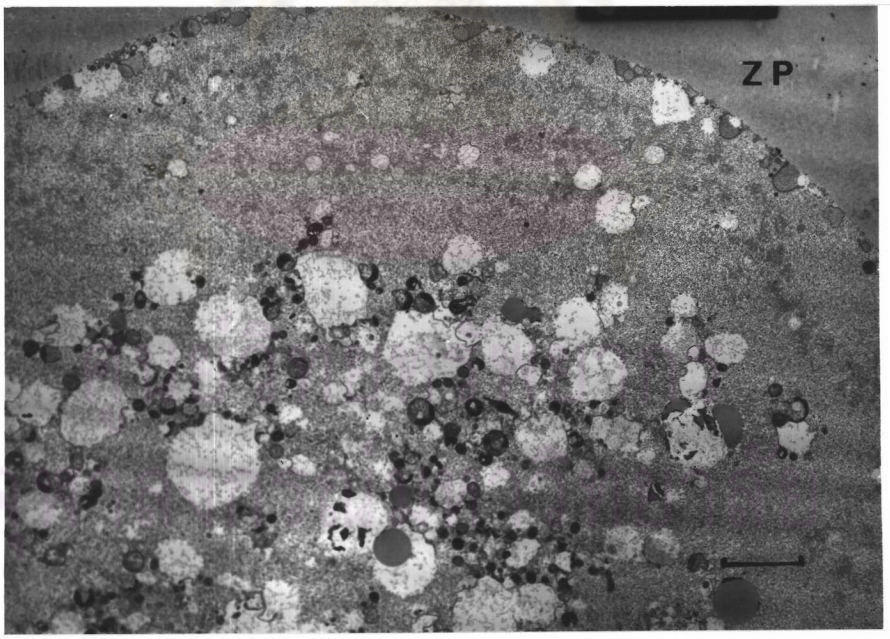
จากรูปที่ 26 และ 27 ซึ่งเป็นรูปของไข่สุกที่ผ่านการปฏิสนธิ กับไข่สุกที่ผ่านการแช่แข็ง พบว่า ในไข่สุก(รูปที่ 26) จะพบแวคูโอลจำนวนมาก ซึ่งคาดว่าเป็นไลปิดดรอบเลทที่หายไประหว่างการเตรียมตัวอย่างเพื่อถ่ายภาพฯ และสามารถเห็น PV, MV, คอร์ติคอลแกรนูล (CG) และ ไมโตคอนเดรีย (M) อย่างชัดเจน (รูปที่ 26 และ 28) แต่ในไข่สุกที่ผ่านการแช่แข็ง (รูปที่ 27 และ 29) พบว่าโอโอเลมมา และ MV ถูกทำลายไป ทำให้ไซโตพลาสซึมและองค์ประกอบภายในเซลล์กระจายตัวออกมาจนชิด ZP (รูปที่ 29) จนไม่เห็น PV

จากภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบทรานสมิชชันนี้ ทำให้ยืนยันได้ว่าการแช่แข็งแบบไวตริฟิเคชันด้วย VTM 1 จะทำให้เกิดการทำลายโอโอเลมมาและองค์ประกอบภายในเซลล์ โดยเฉพาะไลปิดดรอบเลท ทำให้ทั้งโอโอไซต์และไข่สุกไม่สามารถเจริญต่อไปได้หลังจากการทำละลาย

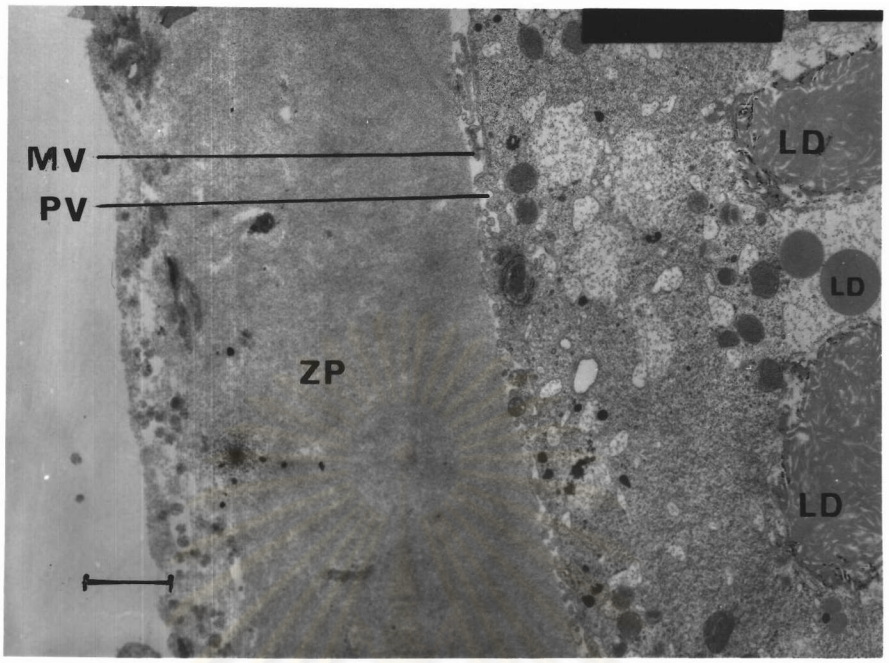
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



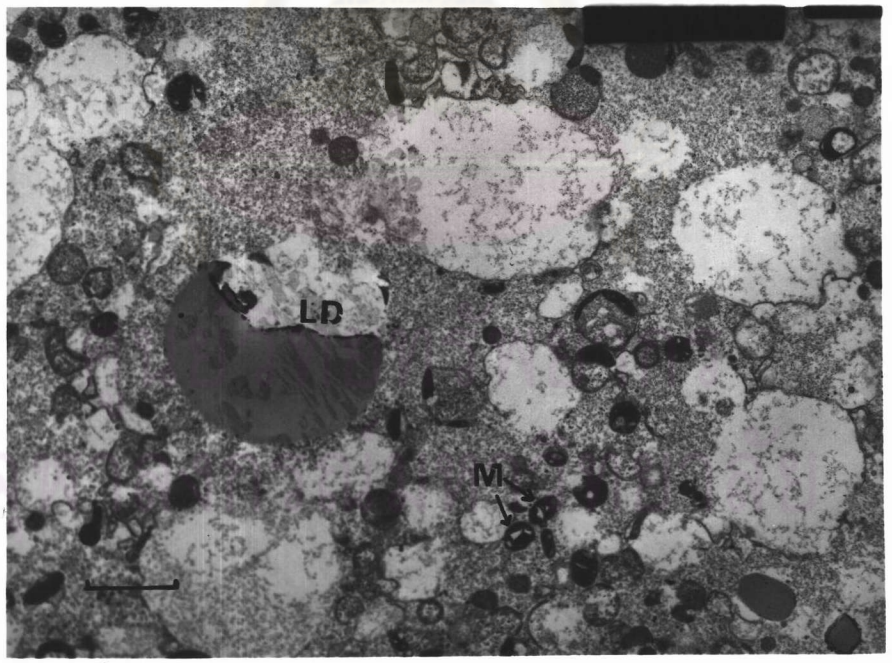
รูปที่ 22 โอโอไซต์สุกร ที่ไม่ได้ผ่านการแช่แข็ง ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน แบบทรานสมิชชัน กำลังขยาย 2,230 เท่า องค์ประกอบภายในเซลล์ยังสมบูรณ์อยู่ (ZP = โซนาเพลลูซิดา, PV = เพอริวิเทลลีน สเปช, MV = ไมโครวิลไล และ LD = ไลปิด ดรอบเลท , ⟵⟶ = 5 มค.)



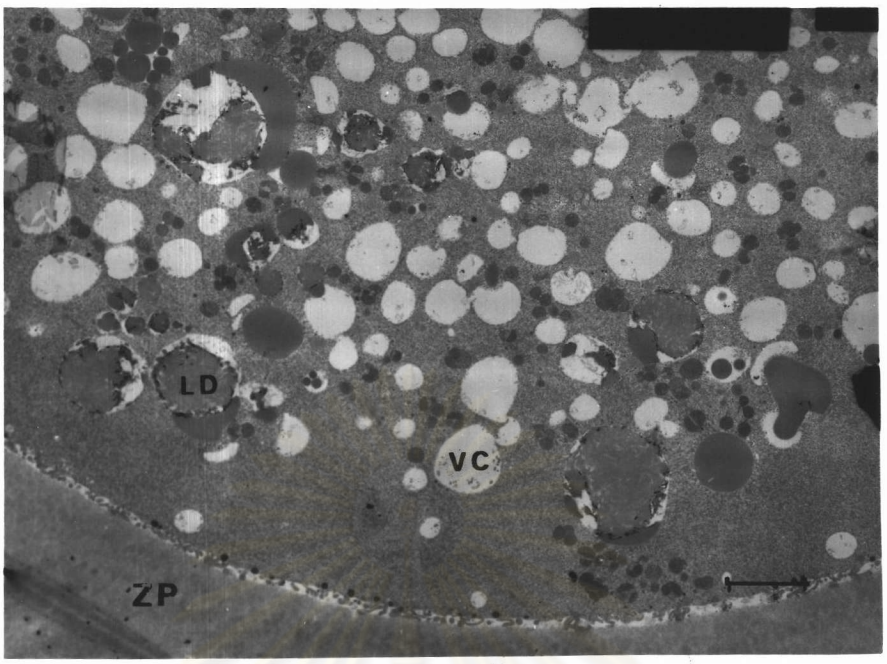
รูปที่ 23 โอโอไซต์สุกร ที่ผ่านการแช่แข็งวิธีไวตริฟิเคชัน ด้วย VTM1 มีเดียม ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน แบบทรานสมิชชัน กำลังขยาย 2,270 เท่า องค์ประกอบภายในเซลล์ และโอโอเลมมาถูกทำลาย ไม่ปรากฏ PV และ MV และส่วน LD ถูกทำลายไปมีลักษณะเหมือนแวคูโอล (⟵⟶ = 5 มค.)



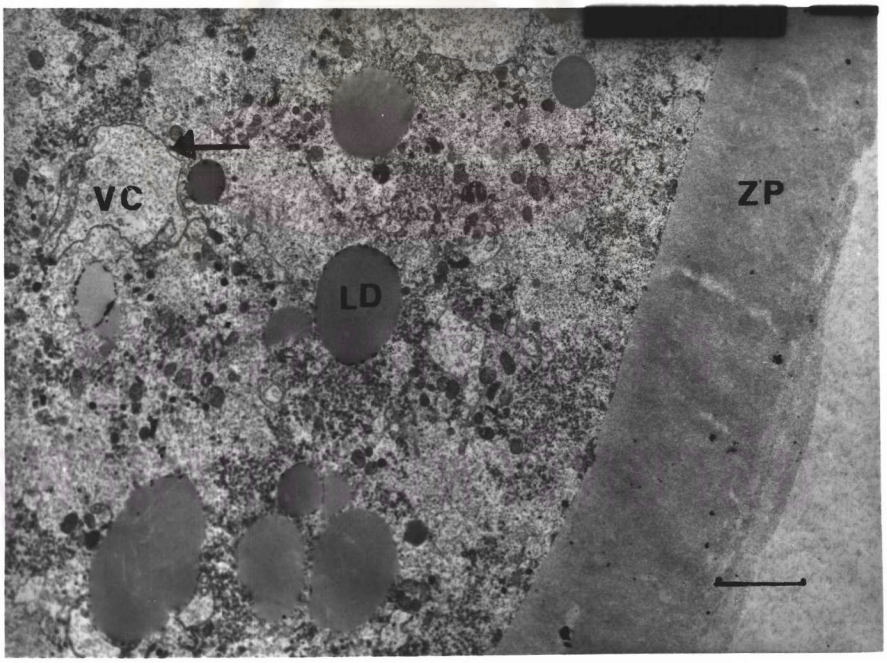
รูปที่ 24 โอโอไซต์สุกร ที่ไม่ได้ผ่านการแช่แข็ง ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ อิเลคตรอนแบบทรานสมิชชัน กำลังขยาย 5,940 เท่า สังเกตพบ LD, MV และ PV ชัดเจน (——— = 2 มค.)



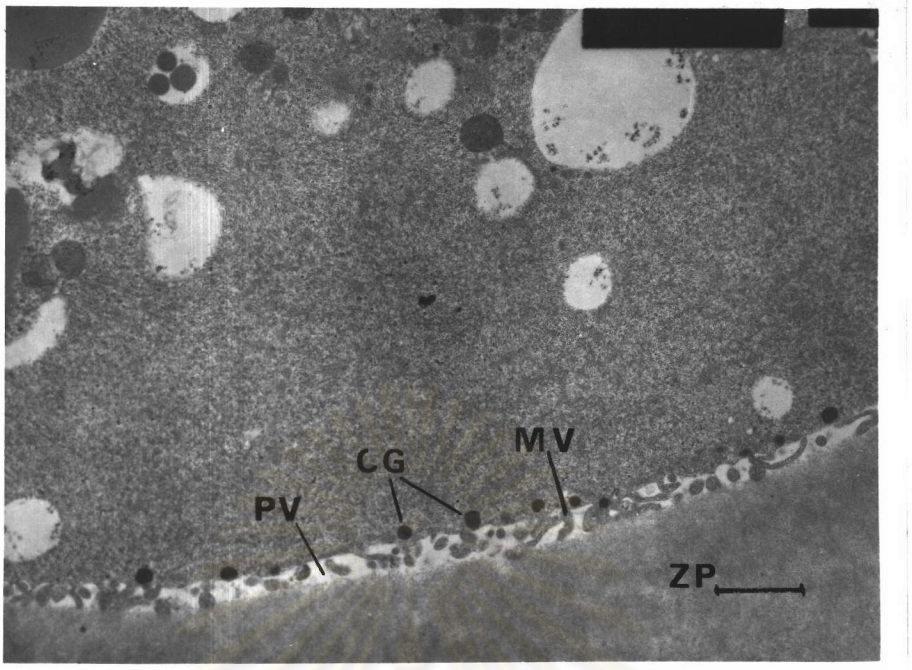
รูปที่ 25 โอโอไซต์สุกรที่ผ่านการแช่แข็งวิธีไวตริฟิเคชั่น ด้วย VTM 1 มีเดียม ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน แบบทรานสมิชชัน กำลังขยาย 6,050 เท่า องค์ประกอบต่างๆ ภายใน เซลล์ถูกทำลายเห็นได้ชัด คือ ส่วนของ LD และ ไมโตคอนเดรีย (M, ——— = 2 มค.)



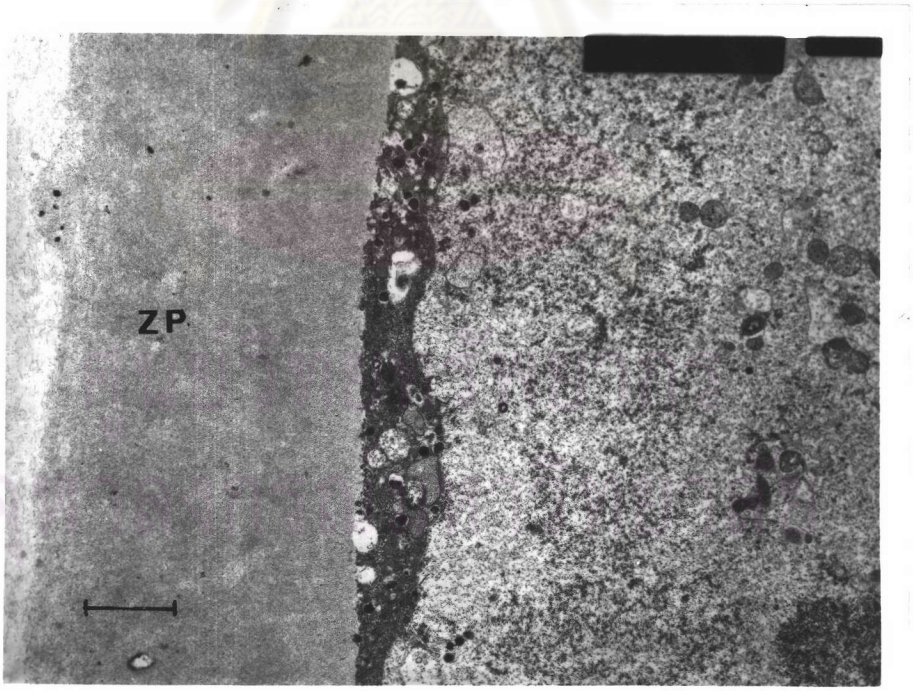
รูปที่ 26 ไข่สุกที่ผ่านการปฏิสนธิ 6 ชม. ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบทรานสมิชชัน กำลังขยาย 2,230 เท่า สภาพเซลล์สมบูรณ์ พบแวคูโอล (VC) จำนวนมาก เห็น PV และ MV อย่างชัดเจน , ⟵⟶ = 5 มค.



รูปที่ 27 ไข่สุกที่ผ่านการแช่แข็ง ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบทรานสมิชชัน กำลังขยาย 3,780 เท่า องค์ประกอบภายในเซลล์ถูกทำลาย ที่ชัดเจนคือ LD และ VC เห็นเมมเบรนหดตัวลงมา (ศรชี้) , ⟵⟶ = 3 มค.



รูปที่ 28 ไข่สุกที่ผ่านการปฏิสนธิ 6 ชม. ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบทรานสมิชชัน กำลังขยาย 5,940 เท่า สภาพเซลล์สมบูรณ์ พบคอติคอลแกรนูล(CG) และ MV ที่บริเวณขอบไซโตพลาสซึม เห็น PV ชัดเจน, ⟵⟶ = 2 มค.



รูปที่ 29 ไข่สุกที่ผ่านการแช่แข็ง ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบทรานสมิชชัน กำลังขยาย 6,050 เท่า เป็นสภาพเซลล์ที่ โอโอเลมมาและองค์ประกอบภายในเซลล์ถูกทำลาย และ ถูกขับออกมาบริเวณขอบไซโตพลาสซึม ไม่พบ PV และ MV , ⟵⟶ = 2 มค.