บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

การพัฒนาทางกายภาพของรังไข่สุกร

Christenson และคณะ (1985) ได้รวบรวมการศึกษาเกี่ยวกับการพัฒนาทางกายภาพของรังไข่สุกรไว้ดังนี้

โกแนดในเอ็มบริโอของสุกรจะพบครั้งแรกหลังการผสมพันธุ์ 24-26 วัน แต่จะพบไพรมอเดียล เจอม เซลล์ ในส่วนของ เจอมินอล ริดจ์ ได้ครั้งแรกราว 18 วัน หลังการผสมพันธุ์ จากจุดที่พบ ไพรมอเดียล เจอม เซลล์ จะเคลื่อนจาก โยค แซค เข้าสู่ กัตมีเซนเตอรี แล้วเข้าสู่ส่วน เจอมินอล ริดจ์ และราว 31 หรือ 32 วันหลังจากผสมพันธุ์ โกแนด ของตัวอ่อนเพศเมียจะเปลี่ยนเป็นรังไข่ซึ่งมีกลุ่มเซลล์สืบพันธุ์ และการแบ่งตัวแบบ ไมโอซิส จะเริ่มต้นราววันที่ 40 และมีลักษณะเป็นรังไข่ ในวันที่ 50 หลังผสมพันธุ์

ระยะพักตัวของโอโอไซต์สุกร (diplotene) พบครั้งแรกที่ 50 วันหลังการผสมพันธุ์ และเมื่อ 20 วันหลังคลอด 99% ของเซลล์สืบพันธุ์ อยู่ในระยะพักตัว

จำนวนเซลล์สืบพันธุ์เพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว จาก 5,000 เซลล์ ในวันที่ 20 หลังการผสมพันธุ์ และมีมากที่สุดราว 1,100,000 เซลล์ ในวันที่ 50 หลังการผสมพันธุ์ และเมื่อคลอดจะมีจำนวน ราว 500,000 เซลล์

เซลล์สืบพันธุ์ทั้งหมดจะรวมอยู่ในกลุ่มเซลล์สืบพันธุ์ จนถึงประมาณวันที่ 60 หลังการผสมพันธุ์ จะสังเกตเห็น ไพรมอเดียล ฟอลลิเคิล เป็นครั้งแรก และ จะมีเปอร์เซนต์เท่าๆ กับ กลุ่มเซลล์สืบพันธุ์ในวันที่ 70 หลังการผสมพันธุ์ หลังจากนั้นเปอร์เซนต์ของกลุ่มเซลล์สืบพันธุ์ จะลดลงตามอายุของฟีตัสที่เพิ่มขึ้น แต่จะยังพบกลุ่มเซลล์สืบพันธุ์ ได้ในรังไข่ลูกสุกรอายุ 20 วัน หรือมากกว่า ไพรมอเดียล ฟอลลิเคิล จะมีประมาณ 80% ของฟอลลิเคิลทั้งหมดในรังไข่นับแต่ 95 วันหลังผสมพันธุ์ จนถึง สุกร อายุ 90 วัน

ไพรมอเดียล ฟอลลิเคิล จะปรากฏครั้งแรกเมื่อตัวอ่อนอายุได้ 70 วันหลังการผสมพันธุ์ และจะพบ เซกันดรี ฟอลลิเคิล ครั้งแรกเมื่อคลอด และจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนมีเกือบ 30% เมื่อสุกรอายุได้ 90 วัน เทอชะรี ฟอลลิเคิล จะพบน้อยมากในสุกรอายุต่ำกว่า 60 วัน แต่จะพบได้มากที่สุดเมื่อสุกรอายุได้ 130 วัน ซึ่งส่วนใหญ่ (67%) จะสลายตัว

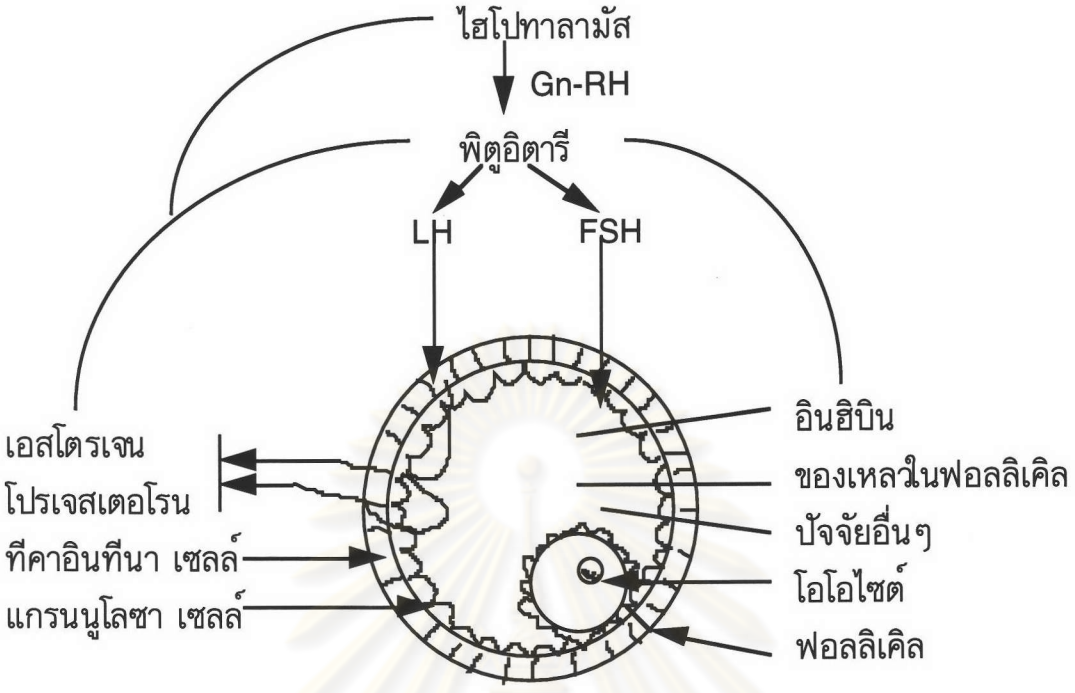
การสุกของฟอลลิเคิล

ระบบฮอร์โมนที่เกี่ยวข้อง

จากการรวบรวมการศึกษากลไกการสุกของฟอลลิเคิลจากของเหลวในฟอลลิเคิลบนรังไข่ ทั้งของสุกร โค และไพรเมท Christenson และคณะ (1985) ได้สรุปและเสนอรูปแบบของฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและการสุกของฟอลลิเคิลในสุกรสาวไว้ดังนี้

นับตั้งแต่เกิดหรือระหว่างระยะเริ่มต้นสู่วัยเจริญพันธุ์ จำนวนของฟอลลิเคิลและโอโอไซต์ที่มีอยู่และการทำงานของ Gn-RH ร่วมกับต่อมพิตูอิตารี ทำให้มีการหลั่ง FSHและLH ในสุกรอายุช่วง 60-100 วัน ฟอลลิเคิลเริ่มจะตอบสนองต่อโกนาโดโทรปิน จำนวนแกรนนูโลซาเซลล์ที่เพิ่มขึ้นในฟอลลิเคิลที่กำลังโต และจำนวนรีเซบเตอร์ของ FSH และ เอสโตรเจน ก็เพิ่มขึ้นด้วย เมื่อขบวนการเจริญเติบโตนี้มีมากขึ้น และ FSH และ เอสโตรเจน ปริมาณน้อยใน เทอชะรี ฟอลลิเคิล จะกระตุ้นการทำงานของ LH รีเซบเตอร์ในทีคาอินทีนาเซลล์ ซึ่งจะทำให้มีการหลั่งแอนโดรเจนและเอสโตรเจน แกรนนูโลซาเซลล์ที่ตอบสนองต่อ FSHและเอสโตรเจน จะเปลี่ยนแอนโดรเจนให้เป็นเอสโตรเจน แกรนนูโลซาเซลล์ทำหน้าที่ผลิตอินฮิบินในฟอลลิเคิล ซึ่งอินฮิบินจะกดกลับที่ต่อมพิตูอิตารีและอาจจะที่รังไข่ด้วย บทบาทของฮอร์โมนที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ต่อการควบคุมการทำงานของรังไข่สุกรยังคงไม่ทราบแน่ชัด

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 แผนภาพฟอลลิเคิลของสุกรและปัจจัยที่ควบคุมการทำงานในฟอลลิเคิล (ดัดแปลงจาก Christenson et al., 1985)

การเปลี่ยนแปลงทางขนาด รูปร่าง

Foxcroft และ Hunter (1985) ได้รวบรวมการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของฟอลลิเคิลในวงรอบการเป็นสัดของทั้งสุกรสาวและแม่สุกรที่หย่านมลูกแล้วสรุปได้ว่า

ในกลุ่มฟอลลิเคิลที่กำลังเจริญขนาด 1-6 มม. มีการเจริญอย่างต่อเนื่องและสลายตัวไป การประมาณการขนาดกลุ่มฟอลลิเคิลที่กำลังเจริญ มีแตกต่างกันไปขึ้นกับระบบการจัดที่ใช้ เช่น Anderson (1980) ประมาณว่าฟอลลิเคิลที่กำลังเจริญมีประมาณ 50 ฟอลลิเคิล มีขนาด 2-5 มม. แต่อาจจะมีมากกว่านี้ ขึ้นอยู่กับพันธุ์ ซึ่งอาจจะทำให้มีไข่ตกมากและทำให้มีขนาดครอกใหญ่ด้วย การเกิดกลุ่มฟอลลิเคิลกำลังเจริญชุดใหม่ จะเกิดราววันที่ 14-16 ของวงรอบการเป็นสัด การเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลที่ถูกเลือกไว้ก่อนที่จะตกไข่ในระยะฟอลลิคูลาเฟส เกิดขึ้นพร้อมกับการสลายตัวอย่างรวดเร็วของฟอลลิเคิลขนาดเล็กและเป็นการปิดกั้นการเป็นฟอลลิเคิลทดแทนในกลุ่ม

ที่กำลังเจริญ อย่างไรก็ตาม มีช่วงที่น่าจะพิจารณาถึงการเปลี่ยนแปลงทางรูปร่างและทางชีวเคมีของฟอลลิเคิลนำในช่วงต้นของฟอลลิคูลาเฟสว่า ฟอลลิเคิลเหล่านั้นเจริญจากฟอลลิเคิลระยะต่างกันหรือเจริญอย่างต่อเนื่องมาด้วยกันจนถึงฟอลลิคูลาเฟส และความสัมพันธ์ของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางกับปริมาตรของเหลวในฟอลลิเคิลได้นำมาเปรียบเทียบกันพบว่า ปริมาตรของเนื้อเยื่อในฟอลลิเคิลค่อยๆ เพิ่มอย่างเป็นสัดส่วนกับปริมาตรของของเหลวในฟอลลิเคิลในการเจริญของฟอลลิเคิลช่วง 2-4 มม. แต่เมื่อโตกว่า 4 มม. ไปแล้ว ความสัมพันธ์นี้ก็แปรเปลี่ยนไป

การเลี้ยงโอโอไซต์สุกรให้สุกนอกร่างกาย

คุณภาพของโอโอไซต์วัดจากปริมาณคูมูลัสเซลล์

การคัดเลือกโอโอไซต์เข้าเลี้ยงโดยดูจากปริมาณคูมูลัสเซลล์ที่ล้อมรอบอยู่ สามารถช่วยทำให้ความสำเร็จในการเลี้ยงโอโอไซต์ให้สุกสูงขึ้น จากการทดลองคัดเลือกโอโอไซต์ที่มีคูมูลัสเซลล์ล้อมรอบต่าง ๆ กันคือ 1,300 3,500 และ 15,000 เซลล์ เข้าเลี้ยงในมีเดียมที่มี โกนาโดโทรปิน พบว่า กลุ่มโอโอไซต์ที่มีคูมูลัสเซลล์ล้อมรอบ 15,000 เซลล์ สามารถเจริญถึงระยะเมตาเฟส II และเกิดการก่อตัวเป็นโปรนิวเคลียสจากอสุจิสูงที่สุด (Nagai et al., 1993) และการเอาคูมูลัสเซลล์ออกหลังเลี้ยงให้สุกแล้วนำไปปฏิสนธินอกร่างกาย พบว่าทำให้เกิดการปฏิสนธิต่ำลง (Kikuchi et al., 1993) การอยู่รวมกันระหว่างไข่กับคูมูลัสเซลล์และเซลล์อื่นๆในฟอลลิเคิลจนถึงระยะเมตาเฟส I ในตัวสัตว์ แสดงให้เห็นถึงความสำคัญในบทบาทของคูมูลัสเซลล์ต่อการเจริญของไข่หลังการปฏิสนธิ (Motlik et al., 1986) ดังนั้น ในการคัดโอโอไซต์เข้าเลี้ยงจึงควรเลือกโอโอไซต์ที่มีคูมูลัสเซลล์หุ้มอย่างหนาแน่นหรือหลายๆชั้น เพื่อความสำเร็จในการเลี้ยงโอโอไซต์ให้สุกและความสำเร็จในการปฏิสนธินอกร่างกาย อย่างไรก็ตามการ เลี้ยงโอโอไซต์ในมีเดียมที่ไม่มีโกนาโดโทรปิน พบว่าแกรนนูโลซาเซลล์จะสร้างสารยับยั้งการแตกตัวของเจอร์มินอลเวสิเคิล (Motlik et al., 1991)

การเสริมด้วยโปรตีนและฮอร์โมน

โดยทั่วไป IVM มีเดียมจะเสริมด้วยโปรตีน เช่น ฟีตอลคลาฟซีรัม (Cheng, 1985; Nagai et al., 1988; Nagai and Moor, 1990) นิวบอร์นพิกซีรัม หรือ โบวายน์ซีรัมอัลบูมิน (Nagai et al., 1984) ในการเลี้ยงโอโอไซต์ด้วยมีเดียม mKRB เสริมด้วย FSH และ ฟีตอลคลาฟ

ซีรัม พบว่ายับยั้งการเจริญของโอโอไซต์ และ Funahashi และ Day (1993a) ก็รายงานว่า การเสริมฟีตอลคลาฟซีรัมและนิวบอร์นพิกซีรัมจะไปลดความสามารถของไข่ในการเกิดการก่อตัวของนิวเคลียสจากอสุจิ และได้แนะนำว่า สาเหตุอาจจะเป็นผลเนื่องจากเป็นการเร่งการเจริญในมีเดียมที่มีฟีตอลคลาฟซีรัมหรือนิวบอร์นพิกซีรัม สำหรับมีเดียมที่มี pFFและFSH หรือ มีบางส่วนของ pFF จะเพิ่มความสามารถของไข่ในการเจริญถึงระยะเมตาเฟส II และการก่อตัวเป็นโปรนิวเคลียสของหัวอสุจิ

Nagaiและคณะ (1993) ได้รายงานว่า โกนาโดโทรปินและเอสตราไดออลมีผลต่อการเจริญของโอโอไซต์และการกระจายตัวของคูมูลัสเซลล์ Mattioliและคณะ (1991) ได้แนะนำว่า LH น่าจะให้ผลในการทำให้นิวเคลียสและไซโตพลาสซึมของโอโอไซต์เจริญมากกว่า FSH แต่การก่อตัวเป็นโปรนิวเคลียสของหัวอสุจิจะเกิดในอัตราสูงในไซโตพลาสซึมของโอโอไซต์ที่เลี้ยงในมีเดียมที่เสริมด้วย PMSG, hCG และเอสตราไดออล ใน 20 ชม. แรกของการเลี้ยง และไม่มีฮอร์โมนเลยในการเลี้ยง 20 ชม.หลัง ในระยะเวลาการเลี้ยงทั้งหมด 40 ชม. ติดต่อกัน (Funahashi and Day, 1993b)

มีการนำมีเดียม 199 มาเลี้ยงโอโอไซต์สุกรที่เจาะมาจากรังไข่ให้เจริญถึงระยะเมตาเฟส II โดยมีการเสริมน้ำตาล ซีรัมและยาปฏิชีวนะต่างๆ กัน เช่น Motlikและคณะ (1984) เสริมกลูโคส 10 มล. (5.5% น้ำหนักต่อปริมาตร) โซเดียมไพรูเวท 4 มก./มล. growth protein จากซีรัมลูกโค 10 มก./มล. เพนนิซิลิน 50 ไอ.ยู./มล. และสเตรปโตมัยซิน 5 มก./มล.

วิธีการปฏิสนธินอกร่างกาย

การเตรียมน้ำเชื้อสำหรับปฏิสนธินอกร่างกาย

Nagai และคณะ (1984) ได้รายงานความสำเร็จในการ คาพาซิเตชันอสุจิสุกรเป็นครั้งแรก โดยใช้อสุจิที่เจาะมาจากท่อ อีพิดิไดมิส และ Cheng (1985) ก็พบว่า น้ำเชื้อสุกรที่รีดมาจากพ่อสุกรต้องใช้เวลาบ่ม 4-5 ชม. ในมีเดียม 199 ที่ปรับให้มีระดับ Ca^{++} สูงขึ้น หลังจากนั้นจึงนำไปผสมกับไข่สุกในมีเดียม 199 ที่เติม คาเฟอิน 2 มิลลิโมลาร์ จึงจะทำให้อัตราการปฏิสนธิสูง Ding และ Foxcroft (1992) ได้รายงานว่ามีลูกสุกรเกิดจากโอโอไซต์ที่สุกและปฏิสนธินอกร่างกาย โดยใช้น้ำเชื้อสดผสมกับโอโอไซต์ใน Tyrode's medium (mTALP) โดยไม่ต้องมีการบ่มน้ำเชื้อมา

ก่อนเลย อย่างไรก็ตาม วิธีการเตรียมน้ำเชื้อสำหรับการปฏิสนธิยังคงเป็นสาเหตุของการแปรปรวนนอกเหนือไปจากพ่อสุกร ในการทำให้สภาวะความสามารถของน้ำเชื้อที่ใช้ปฏิสนธิแตกต่างกันไปได้

Yoshidaและคณะ (1990) ปฏิสนธิไข่โดยบ่มอสุจิสุกรในมีเดียม 199 with Earle's salts เสริมด้วยโซเดียมไพรูเวท 100 มก./ลิตร กลูโคส 550 มก./ลิตร แคลเซียมแลคเตท 900 มก./ลิตร และ ไดเบกาซินซัลเฟต 100 มก./ลิตร นาน 6-7 ชม. ที่ 38.5°ซ ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% แล้วนำไข่ที่เลี้ยงถึงเมตาเฟส II มาผสมกับอสุจินาน 18 ชม. พบว่ามีอัตราการปฏิสนธิ 84.9%

Mattioliและคณะ (1989) ปฏิสนธิไข่ในมีเดียม 199 ที่เพิ่มไพรูเวท 1 มิลลิโมลาร์ กลูโคส 3.05 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมแลคเตท 8.76 มิลลิโมลาร์ และ ซีรัมลูกโค 12% โดยปริมาตร โดยปั่นแยกเอาแต่อสุจิที่มีชีวิต ในความเข้มข้นของ เปอร์คอล 65 และ 70% มาใช้ หลังจากผสมร่วมกับไข่ 6-8 ชม. นำไข่มาล้างเอาอสุจิรอบ ๆ ออก แล้วนำไปเลี้ยงต่อใน Brinster's medium ซึ่งหลังผสมไข่กับอสุจิ 14 ชม. มีการปฏิสนธิ 78% และได้เอ็มบริโอระยะ 2-4 เซลล์ 39%

ผลของการแช่เย็นและแช่แข็งโอโอไซต์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

ผลของความเย็นที่ต่ำกว่าอุณหภูมิร่างกายที่มีต่อโอโอไซต์ มีรายงานไว้ในสัตว์หลายชนิด ผลที่ชัดเจนคือทำให้ เซคกันไมโอติค สปินเดิล ในส่วน ไมโครทูบูล แตกแยกออกหรือไม่สามารถก่อตัวขึ้นได้ อันเนื่องมาจากเกิดการแตกตัวของทูบูลิน (Magistrini and Szollosi,1980 ; Pickering and Johnson, 1987; Sathanathan et al., 1988 ; Pickering et al.,1990)

การลดอุณหภูมิก็มีผลต่อ โซนาเพลลูซิดา เช่นกัน (Johnson et al.,1988 ; Miralles et al.,1989) โดยจะมีผลในการลดความไวต่อ ไครโมทริปซิน และลดอัตราการปฏิสนธิในหนูถีบจักร ซึ่งเกิดมาจากผลทางอ้อมจากการที่คอรติคอลแกรนูล(CG) หลุดออกจากไซโตพลาสซึม การแช่เย็นทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและหน้าที่ของเมมเบรน ระหว่างที่อุณหภูมิลดลง (Hunter et al., 1990 ; Didion et al., 1990) อันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของไลปิดที่มีประจุ และเกิดการแยกส่วนประกอบของชั้นเมมเบรน ไข่สุกรที่ยังไม่สุกจะไม่สามารถเจริญต่อได้เลยเมื่อถูกทำให้เย็นลง (Didion et al., 1990) ส่วนในไข่แกะเมื่อทำให้เย็นลง 20-30°ซ เมื่อเลี้ยงให้สุกแล้วนำไปปฏิสนธิภายในตัวสัตว์ เอ็มบริโอสามารถพัฒนาถึงระยะบลาสโตซิสได้น้อยกว่าปกติถึง 4

เท่า (Moor and Crosby, 1985) และในโอโอไซต์โค Park และ Ruffing (1992) สังเกตพบว่า ในระหว่างการเลี้ยงโอโอไซต์ให้สุก ถ้านำไข่มาไว้ที่อุณหภูมิ 0° ซ นาน 2 นาที อัตราการปฏิสนธิลดลง 13% แต่ถ้าเอาไว้นาน 30 นาที จะลดลง 28%

ผลของสารป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งในเซลล์ต่อไข่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

สารป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ (Cryoprotective agents; CPAs) จำเป็นสำหรับการแช่แข็งเนื้อเยื่อและเซลล์ แต่ความเข้มข้นที่ใช้อาจจะทำลายเซลล์ได้เนื่องมาจากผลของแรงดันออสโมติคหรือความเป็นพิษทางเคมี การทดลองของ Johnson และ Pickering (1987) ในโอโอไซต์หนูถีบจักร พบว่าเมื่อใช้ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) เข้มข้น 1.5 โมลาร์ กับโอโอไซต์หนูถีบจักรแล้วจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของทูเบอรลิน เป็นเหตุให้การก่อตัวเป็นแอสเตอร์ที่ขั้วสปินเดิลในไซโตพลาสซึมผิดปกติไป และVincent และคณะ(1991) ยังพบว่า DMSO ทำให้คอร์ติคอลไมโครฟิลาเมนท์แตกออก จากการทดสอบการต้านทานต่อไครโมทริปซิน พบว่า DMSO 1.5 โมลาร์ ทำให้เกิดการแข็งตัวของโซนาเพลลูซิดา แต่การค่อยๆ เพิ่มความเข้มข้นของ DMSO ที่ 4°ซ จะช่วยลดการแข็งตัวของโซนาเพลลูซิดาได้(Johnson, 1989) และการเปลี่ยนแปลงที่โซนาเพลลูซิดา มีผลเกี่ยวข้องกับการปล่อยคอร์ติคอลแกรนูลและลดอัตราการปฏิสนธิ (Schaalkoff et al., 1989; Vincent et al., 1990a; Vincent et al., 1990b)

Shaw และ Trounson (1989) พบว่าโปรปีลีนไกลคอล(PG) มีส่วนกระตุ้นให้เกิดพาทิโนเจเนติคของโอโอไซต์หนูถีบจักร ซึ่ง PG อาจจะมีข้อดีในการใช้เป็น CPA ในการช่วยทำให้สามารถต้านทานแรงดันอันเกิดจากการหดตัวของเซลล์ Boutron (1990) พบว่า 2 , 3-บิวเทนไดออล (BUOH) น่าจะเป็น CPA ที่ดีสำหรับ ไวตริฟิเคชัน เพราะไม่กลายเป็นน้ำแข็งเมื่ออยู่ใน ไนโตรเจนเหลวที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า CPA ชนิดอื่นๆ อีกทั้งความเป็นพิษอยู่ในระดับที่ยอมรับได้และซึมผ่านผนังเซลล์ได้รวดเร็ว (Sutton and Pegg, 1993)

จากการศึกษาของ Arav และคณะ (1994) ที่ได้รวบรวมเกี่ยวกับการเก็บรักษาโอโอไซต์และเอ็มบริโอทั้งระยะสั้นและระยะยาวพบว่า โปรตีนชนิดหนึ่งที่รู้จักกันในชื่อ thermal hysteresis proteins (THPs) หรือ antifreeze proteins (AFP) สามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับผนังเซลล์ และป้องกันโอโอไซต์และเอ็มบริโอระหว่างอยู่ในความเย็นต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (-130° ถึง-196°ซ)

และเหนือจุดเยือกแข็ง(4°ซ) ได้ หน้าที่ในการป้องกันขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและชนิดของ THP ที่ใช้ ถ้าใช้ในการทำไวตริฟิเคชันใช้ THP 40 มก./มล. แต่ถ้าใช้เพื่อช่วยในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำในช่วงเวลาสั้น (1-4วัน) ความเข้มข้นที่ใช้จะอยู่ระหว่าง 0.1-1.0 มก./มล. ทั้งนี้ขึ้นกับชนิด THP ที่ใช้

THP ที่พบมีอยู่ 4 แบบใหญ่ๆ คือ AFGPs, THP type I, THP type II และ THP type III ซึ่งสกัดได้จากปลาแถบขั้วโลก เป็นไกลโคโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 2.6-34 KDa ประกอบด้วยเปปไทด์ 3 สายโดยมีกรดอมิโนอลานีนเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่และมีไดแซคคาไลน์เชื่อมอยู่

ความสามารถของ THPs ในการทำให้ผนังเซลล์คงตัวนี้ นับเป็นคุณสมบัติที่ดีที่จะใช้ในการเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์ของคนและสัตว์

ไซโตสกีลีตันของเอ็มบริโอ

Dobrinsky (1996) ได้สรุปความสำคัญของลักษณะโครงสร้างเซลล์ของเอ็มบริโอ ต่อความสำเร็จในการแช่แข็งว่า

เอ็มบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีลักษณะที่เปราะบาง เพราะโครงสร้างภายในเซลล์ ที่รู้จักกันดีว่าเป็นไซโตสกีลีตัน นั้นจำเป็นสำหรับการควบคุมการทำงานและพัฒนาของเซลล์ ซึ่งจะทำให้เซลล์มีรูปร่างคงที่ มีการเคลื่อนไหวภายในเซลล์ การเคลื่อนย้ายส่วนประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์และการกระจายตัวของโครโมโซม และในขณะเดียวกันก็จะเตรียมทางสำหรับติดต่อกันภายในเซลล์ไซโตสกีลีตันเสมือนเป็นทางด่วนสำหรับการเกิดไซโตคิเนซิส และ คารีโอคิเนซิส และถ้าไซโตสกีลีตันถูกทำลายไปวงจรการเกิดการแบ่งเซลล์ก็จะถูกทำลายไปด้วย

สารป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งในเซลล์ (CPA) เป็นสารละลายอินทรีย์ที่ช่วยป้องกันองค์ประกอบภายในเซลล์ระหว่างการแช่แข็ง แต่ก็สามารถทำให้เกิดอันตรายต่อไซโตสกีลีตันได้เช่นกัน เช่น เกิดเป็นพิษ และเป็นเหตุให้ทำลายระบบปรับสมดุลแรงดันออสโมติคของเซลล์ CPA จำนวนมากมีการทำงานด้วยการทำให้เกิดการกระจายตัวของไมโครฟิลาเมนและไมโครทูบูล ก่อนที่จะทำการแช่แข็ง วิธีนี้เป็นการป้องกันการทำลายส่วนประกอบของไซโตสกีลีตันชั่วคราว ดังนั้นการมีชีวิตรอดของเอ็มบริโอจึงขึ้นกับชนิดของ CPA ชนิดของสัตว์ และระยะการเจริญของเอ็มบริโอ

มีการศึกษาหลายครั้งที่แสดงว่า การทำไวตริฟิเคชันทำให้เกิดการทำลายในส่วนของ ไซโตสกีลีตัน ซึ่งสามารถทำให้ลดลงได้โดยการทำให้เกิดการกระจายตัวของไมโครฟิลาเมนและไมโครทูบูลหรือด้วยการทำให้ ไมโครทูบูลอยู่กับที่ก่อนและระหว่างการแช่แข็ง

การรวบรวมข้อมูลการถูกทำลายภายในเซลล์ระหว่างหรือภายหลังการแช่แข็ง จะให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการทำความเข้าใจถึงความไวขององค์ประกอบของเซลล์ต่อการแช่แข็ง และจะนำไปสู่การปรับปรุงวิธีการสำหรับทำแช่แข็งเอ็มบริโอและเพื่อความเข้าใจอันดีต่อวิทยาการ เอ็มบริโอในปศุสัตว์

ไซโตชลาซิน บี (CB) เป็นอัลคาลอยด์ที่ผลิตโดย รา Helminthosporium และ โมลด์ตัวอื่นอีก CB 1 โมเลกุล สามารถยับยั้งการเกิดการรวมตัวของไมโครฟิลาเมนได้ โดยเข้าไปปิดส่วนปลายของไมโครฟิลาเมน (Wolfe, 1993) ในการทำไวตริฟิเคชันของเอ็มบริโอโค Dorbinsky และคณะ (1995) ได้ทดลองใช้ CB ร่วมในการทำไวตริฟิเคชัน พบว่าจะให้เปอร์เซนต์การเจริญหลังการทำละลายสูงกว่าการทำไวตริฟิเคชันโดยไม่มี CB ถึง 49%

วิธีการแช่แข็ง

วิธีการเก็บรักษาเอ็มบริโอด้วยการแช่แข็งประสบความสำเร็จ จากรายงานครั้งแรกโดย Whittingham และคณะ (1972) ที่ศึกษาในหนูถีบจักร และประสบผลสำเร็จในการแช่แข็งไข่สุกของหนูถีบจักร ในปี 1977 (Whittingham, 1977) โดยใช้วิธีการแช่แข็งที่จะต้องลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆ เพื่อให้น้ำในเซลล์ค่อยๆ ซึมผ่านออกมาในระหว่างการก่อตัวเป็นน้ำแข็งนอกเซลล์ ดังนั้นจึงมีการทำลายเซลล์เนื่องจากการก่อตัวของน้ำแข็งน้อยมาก นับเป็นวิธที่ใช้กันแพร่หลาย แต่ต้องมีเครื่องมือสำหรับควบคุมการลดอุณหภูมิได้อย่างแม่นยำ ซึ่งเครื่องมือนี้มีราคาค่อนข้างแพง

ระหว่างการแช่แข็งแบบทั่วไปหรือแบบสมดุล จะเกิดน้ำแข็งขึ้นภายนอกเซลล์จากการที่อุณหภูมิลดลงต่ำหรือจากการชักนำให้เกิดก็ตาม จะมีการดึงน้ำออกจากส่วนที่ยังไม่กลายเป็นน้ำแข็งที่อยู่ในส่วนประกอบภายในเซลล์ การลดความเย็นที่เร็วเกินไปก่อนที่จะทำให้เกิดการดึงน้ำออกอย่างสมดุลเป็นผลให้เกิดน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์ ฉะนั้นการใช้วิธีการแช่แข็งที่เหมาะสมจะเป็นการหลีกเลี่ยงการทำให้บางส่วนของเซลล์ถูกทำลายไปเนื่องจากการเกิดน้ำแข็งในเซลล์ ในการแช่แข็งแบบที่นิยมกันการเกิดน้ำแข็งภายในเซลล์จะทำให้พลาสมาเมมเบรนถูกทำลาย ซึ่งเป็นสาเหตุ

ให้เซลล์ตาย การลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆ เป็นการหลีกเลี่ยงอันตรายดังกล่าว ทั้งนี้เป็นเพราะเป็นการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายภายนอกเซลล์ขึ้นอย่างช้าๆ และในระหว่างการแช่แข็งและการทำละลายต้องพยายามไม่ให้เกิดผลจากความเย็น และจากสารป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง ที่จะมีต่อส่วนโครงสร้างของเซลล์และไมโอติคสปินเดิล คอร์ติคอลแกรนูล และ โซนาเพลลูซิดา (Rall, 1992)

ถึงแม้ว่าไข่จะได้รับอันตรายได้โดยง่ายจากการแช่แข็ง แต่งานในสาขานี้ก็ก้าวหน้าไปมากและประสบความสำเร็จในการแช่แข็งในสัตว์หลายชนิด ซึ่งพอจะแยกวิธีการที่ใช้แช่แข็งออกได้ 4 วิธี คือ

1. วิธีลดความเย็นอย่างช้าๆ (Slow freezing method หรือ Conventional method)
2. วิธีลดความเย็นอย่างรวดเร็ว (Rapid freezing method)
3. วิธีลดความเย็นอย่างรวดเร็วมาก (Ultra rapid freezing method)
4. วิธีไวตริฟิเคชัน (Vitrification method)

1. วิธีลดความเย็นอย่างช้า ๆ (Slow freezing method หรือ Conventional method)

เป็นการแช่แข็งที่คิดค้นกันมาตั้งแต่เริ่มแรก โดยใช้ CPA ในความเข้มข้นที่ต่ำประมาณ 1-2 โมลาร์ แต่โดยทั่วไปนิยมใช้ 1.5 โมลาร์ โดยการใช้หลักการในการควบคุมความสมดุลย์ของแรงดันออสโมติคตลอดเวลาที่ลดอุณหภูมิลง วิธีการนี้จึงต้องลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ โดยอาจจะเริ่มลดจากอุณหภูมิห้องจนถึงอุณหภูมิจุดเยือกแข็งของมีเดียมที่ใช้แช่แข็ง ประมาณ -5^{o}ซ ถึง -7^{o}ซ ในอัตรา -1^{o}ซ /นาที แล้วทำการชักนำให้เกิดน้ำแข็งขึ้นในหลอดฟางบรรจุไข่ หลังจากพักปรับสมดุล แล้วก็จะลดอุณหภูมิลงไปอีกจนถึง -20^{o} - -35^{o}ซ โดยลดลงในอัตรา 0.3^{o}ซ -0.5^{o}ซ /นาที จึงย้ายหลอดฟางลงเก็บในถังไนโตรเจนเหลว ที่ใช้วิธีนี้ในการแช่แข็งเอ็มบริโอสุกร เช่น Nagashima และคณะ (1988, 1989)

2. วิธีลดความเย็นอย่างรวดเร็ว (Rapid freezing method)

วิธีนี้ใช้ความเข้มข้นของ CPA ต่ำเหมือนวิธีแรก แต่จะต่างกันคือ ตรงช่วงก่อนการชักนำให้เกิดน้ำแข็ง กล่าวคือ จะนำหลอดบรรจุไข่ มาเริ่มลดอุณหภูมิจาก 0^{o}ซ จนถึง -7^{o}ซ ในอัตรา -1^{o}ซ/นาที (Didion et al., 1990) หรือ เริ่มที่ -7^{o}ซ เลย (Rall, 1992) หลังจากทำการชัก

นำให้เกิดน้ำแข็งแล้ว ก็จะลดอุณหภูมิลงไปถึง -30°ซ หรือ -40°ซ ในอัตรา -0.3°ซ - -0.5°ซ /นาที แล้วจึงย้ายหลอดฟางเก็บในถังไนโตรเจนเหลว

3. วิธีลดความเย็นอย่างรวดเร็วมาก (Ultra rapid freezing method)

วิธีนี้จะใช้ CPA ในมีเดียมแช่แข็งมี ความเข้มข้นที่สูง 4.5 โมลาร์ โดยมักจะมีซูโครสรวมอยู่ในมีเดียมแช่แข็งด้วย 0.1-0.25 โมลาร์ หลังจากปรับสมดุลแรงดันออสโมติค และบรรจุไข่ในหลอดฟางแล้ว ทำการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว ด้วยการอังเหนือไอไนโตรเจนเหลว 2-3 นาที แล้วจุ่มลงในไนโตรเจนเหลวทันที โดยในส่วนของมีเดียมแช่แข็งจะกลายเป็นน้ำแข็ง มีการทดลองที่ใช้ เช่น Shaw และคณะ (1991) ใช้ในหนูถีบจักร

4. วิธีไวตริฟิเคชัน (Vitrification method)

วิธีไวตริฟิเคชัน เป็นการแช่แข็งโดยไม่มีการเกิดเป็นน้ำแข็ง ไวตริฟิเคชัน เป็นขบวนการทางกายภาพที่สารละลายถูกเปลี่ยนแปลงรูปให้คงที่กลายเป็นผลึกแก้ว โดยการให้ความเย็นอย่างรวดเร็ว โดยการผ่านการก่อตัวเป็นผลึกน้ำแข็ง ขณะที่ยังคงคุณสมบัติของการเป็นของเหลวในสถานะที่ก่อตัวเป็นของแข็ง (Rall, 1992)

วิธีนี้ทำประสบผลสำเร็จครั้งแรก โดย Rall และ Fahy (1985) โดยใช้ CPA ในมีเดียมแช่แข็งที่มีความเข้มข้นสูงมาก โดยอย่างน้อยที่สุดจะใช้ความเข้มข้นระดับที่ CPA นั้นไม่กลายเป็นน้ำแข็งเมื่อจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว เช่น GLY ที่ 6.5 โมลาร์ และ EG ที่ 7.5 โมลาร์ จะไม่กลายเป็นน้ำแข็งเมื่อจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว วิธีการนี้ อาจจะใช้ CPA ชนิดเดียว (Rall, 1992) หรือมากกว่า 1 ชนิด (Rubinsky et al. 1992, Yoshino et al., 1993) หลังจากที่ปรับสมดุลแรงดันออสโมติคและบรรจุในหลอดฟางแล้ว ทำการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วด้วยการอังเหนือไอไนโตรเจนเหลว 2-3 นาที แล้วจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว หรือจุ่มลงในไนโตรเจนเหลวทันที ที่บรรจุไข่ใส่หลอดฟางเสร็จ (Nagashima et al., 1996)

การแช่แข็งเอ็มบริโอและไข่สุกร

การทนทานต่อความเย็นของเอ็มบริโอสุกร

Pollard และ Leibo (1994) ได้ทำการทดลองปรับอุณหภูมิลดลงกับเอ็มบริโอระยะมอรูลาของหนูเมาส์ โคและสุกร โดยทำให้เย็นลง 1°ซ/นาที จนถึงอุณหภูมิต่าง ๆ ทุก ๆ 5°ซ ระหว่าง +30°ซ ถึง 0°ซ พบว่า เอ็มบริโอหนูเมาส์ยังคงมีชีวิตรอดอยู่ทั้งหมด แม้จะลดอุณหภูมิลงถึง 0°ซ แต่เอ็มบริโอมีชีวิตเพียง 75% (จาก 60 ใบ) เมื่อทำอุณหภูมิให้เย็นลงถึง 10°ซ หรือต่ำกว่า แต่ในสุกรพบว่า 90% จาก 60 เอ็มบริโอสุกรมีชีวิตรอด ถ้าอุณหภูมิไม่ต่ำกว่า +15°ซ แต่ถ้าลดอุณหภูมิต่ำกว่า +10°ซ แล้วจะไม่มีเอ็มบริโอสุกรรอดชีวิตเลย ซึ่งเป็นการยืนยันการสังเกตพบก่อนหน้านี้โดย Wilmut (1972) และ Polge และคณะ (1974) นอกจากนี้ เขาได้ทำการทดลองลดอุณหภูมิลงอย่างละเอียด ระหว่าง 15°ซ ถึง 10°ซ พบว่า 90% ของเอ็มบริโอระยะมอรูลาของสุกร สามารถเจริญถึงบลาสโตซิสได้ เมื่อลดอุณหภูมิถึง 15°ซ แต่ถ้าลดอุณหภูมิถึง 14°ซ มีเพียง 10% เท่านั้นที่สามารถเจริญถึงบลาสโตซิสได้ แต่ถ้าลดถึง 13°ซ หรือต่ำกว่านี้จะไม่มีเอ็มบริโอรอดชีวิตเลย

Dobinsky (1996) ได้รวบรวมผลของ CPA ต่อไซโตสกีลีตันของเอ็มบริโอสุกรไว้ว่า เอ็มบริโอสุกรทนทานต่อการลดอุณหภูมิได้น้อย โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่ำกว่า 15°ซ ซึ่งสภาพภายในเซลล์ประกอบด้วยไลปิด ทำให้มีการทำลายรุนแรง ทำให้ความพยายามในการทำการแช่แข็งเอ็มบริโอสุกรประสบความสำเร็จน้อย แต่ก็มีรายงานว่า เอ็มบริโอสุกรสามารถมีชีวิตรอดหลังจากทำไวตริฟิเคชัน (Dorbrinsky and Johnson, 1993a; Dorbrinsky and Johnson, 1993b; Yoshino et al., 1993; Dorbrinsky and Johnson, 1994; Kobayashi et al., 1995; Nagashima et al., 1996) ซึ่งในการทดลองส่วนใหญ่จะพบว่า เอ็มบริโอระยะแฮชบลาสโตซิสเป็นระยะที่ทนทานต่อการแช่แข็งได้ดีที่สุด ในปัจจุบัน ก็ได้มีการพยายามเปลี่ยนแปลงสภาวะของไลปิด ในเซลล์เอ็มบริโอสุกร ซึ่งการที่ในเอ็มบริโอสุกรมีไลปิดอยู่สูงซึ่งกระจายอยู่ภายในบลาสโตเมีย อาจจะชักนำให้เกิดการก่อตัวของน้ำแข็งภายในเซลล์หรือการเปลี่ยนแปลงสภาวะของไลปิดได้ Nagashima และคณะ (1995) ได้แสดงให้เห็นว่า ถ้าทำการดึงเอาไลปิดออกจากไซโตพลาสซึมของเอ็มบริโอระยะต้น ๆ ก่อนทำการแช่แข็งจะทำให้เอ็มบริโอสามารถมีชีวิตรอดและเจริญเติบโตต่อภายในตัว

สัตว์หลังจากทำละลายได้ ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบว่า การที่มีไลปิดสูงในระยะต้น ๆ ของการแบ่งเซลล์ในสุกร อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ไม่สามารถย้อนกลับมาได้ ในการทำการแช่แข็ง

ไซโตสกีลีตันของสุกรตอบสนองต่อ CPA ค่อนข้างจะต่างกันไปในแต่ละชนิด (Dobrinsky et al., 1994) ภายใต้ความเข้มข้นสูง ๆ ของ GLY ที่ใช้ในการทำไวตริฟิเคชัน ไมโครทูบูล ในเอ็มบริโอสุกรระยะมอรูลาถึงแฮชบลาสโตซิสยังคงรวมกันอยู่ที่เดียวกันตลอดขบวนการทำ ไวตริ-ฟิเคชัน

การแช่แข็งโอโอไซต์สุกร

Didion และคณะ (1990) ได้ทำการแช่เย็นและแช่แข็งโอโอไซต์สุกร โดยใช้มีเดียม บีพี 1 ที่มี GLY 1.5 โมลาร์ และซูโครส 0.5 โมลาร์ เป็นมีเดียมสำหรับทำการแช่เย็นและแช่แข็ง โดยทำการลดอุณภูมิจาก 24^{o}ซ ลงมาที่ 0^{o}ซ โดยการนำโอโอไซต์มาวางในอ่างลดอุณภูมิที่ 0^{o}ซ ทันทีวางไว้นาน 10 นาที หรือแช่แข็งโอโอไซต์โดยทำการลดอุณภูมิด้วยอัตรา -1 ^{o}ซ /นาที จาก 24^{o} ซ ลงมาจนถึง - 7^{o}ซ แล้วทำการชักนำให้เกิดน้ำแข็ง พักโอโอไซต์ไว้ที่ -7^{o}ซ นาน 5 นาที แล้วลดอุณหภูมิต่อด้วยอัตรา -0.5^{o}ซ/นาที จนถึง -35^{o}ซ จึงแช่ลงในไนโตรเจนเหลว ทำการตรวจสอบการมีชีวิตรอด หลังจากทำละลายให้อุ่นขึ้นถึง 37^{o}ซ ด้วยการย้อมสี TB และ FDA และตรวจดูการมีชีวิตจากลักษณะภายนอกโดยดูจากคูมูลัสเซลล์และลักษณะสีของโอโอพลาสซึม พบว่าโอโอไซต์ที่ลดอุณหภูมิลงถึง 0^{o}ซ กลุ่มโอโอไซต์ที่คูมูลัสเซลล์ล้อมรอบอยู่ มีชีวิตรอด 81.0 % ส่วนโอโอไซต์ที่แช่แข็งมีชีวิตรอด 60 % แต่โอโอไซต์สุกรไม่เจริญต่อไป Rubinsky และคณะ (1990) ได้ทำการทดลองลดอุณหภูมิ โอโอไซต์สุกรในมีเดียมแช่แข็งเรียกว่า AVS ซึ่งคือ มีเดียม PBS ที่มี GLY 5 % PROH 35 % ซูโครส 0.1 โมลาร์ และ FCS 20 % โดยปริมาตร โดยใส่โอโอไซต์ในหยดมีเดียม AVS ที่อยู่บนกระจกสไลด์ 1 ใบ ต่อ 1 หยด แล้วเลื่อนกระจกสไลด์จากแท่นอุณหภูมิ 22^{o}ซ มายังแท่นอุณหภูมิ -130^{o}ซ /นาที โอโอไซต์ในมีเดียม AVS คงอยู่ที่แท่น -130^{o}ซ นาน 15 นาที แล้วผลักกลับมายังแท่น 22^{o}ซ ด้วยความเร็วเท่าเดิม โดยอัตราการลดและเพิ่มอุณหภูมิเป็น 1,700^{o}ซ /นาที เช่นกัน โอโอไซต์ 47 ใบ ที่ผ่านความเย็นดังกล่าวไม่มีการเจริญขึ้นมาเลยหลังจากเลี้ยงนอกร่างกาย 44 ชม. เทียบกับ 92 % ของโอโอไซต์ปกติที่นิวเคลียสสามารถเจริญถึง M II ได้ ซึ่งโอโอไซต์ที่ผ่านการลดอุณภูมิส่วนใหญ่จะพบว่า ไม่มีโอโอเลมมาและโอโอไซต์ถูกทำลายโดยสิ้นเชิง ซึ่งสันนิษฐานว่าในช่วงของการลดอุณหภูมิและเพิ่มอุณหภูมิของขบวนการแช่แข็งและทำละลาย

มีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำลายโอโอไซต์ แต่เมื่อทำการทดลองใหม่โดยการเติม $AFGP_S$ 1 ถึง 8 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 2600-33700 KDa ซึ่งได้จาก Antarctic notothenиid fishes 40 mg/ml และเมื่อลดอุณหภูมิและเพิ่มเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 พบว่า 24.5 % (11/45) ของโอโอไซต์เจริญถึง ระยะ MI และ M II แต่ไม่ได้นำไปทำการปฏิสนธิต่อ ซึ่งคาดว่า AFGPs มีผลในการป้องกันโอโอไซต์โดยการมีปฏิสัมพันธ์กับโอโอเลมมา

การดูดเอาไลปิดออกจากไข่สุกและเอ็มบริโอก่อนการแช่แข็ง

Nagashimaและคณะ (1996) รายงานว่า ไข่สุกรที่สุกภายในร่างกาย สามารถแช่แข็งด้วยวิธีไวตริฟิเคชั่น แล้วละลายออกมาผสมกับอสุจิที่เตรียมไว้เพื่อการปฏิสนธินอกร่างกาย โดยการฉีดตัวอสุจิเข้าไปข้างในโซนาเพลลูซิดา ทำให้เกิดการปฏิสนธิ 40% (2/5 ใบ) ในไข่ที่ก่อนการแช่แข็งได้ทำการแช่ในมีเดียมที่มี ไซโตชลาซิน บี 10 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 12500 x g นาน 15 นาที เพื่อให้ไลปิดในไซโตพลาสซึมมารวมอยู่จุดเดียวกันก่อน โดยไม่ดูดเอาส่วนไขมันออก แต่ในไข่กลุ่มที่มีการปฏิบัติดังที่กล่าวข้างต้น แล้วดูดเอาไลปิดออกก่อนการแช่แข็ง จะมีการปฏิสนธิ 44% (12/27 ใบ) และเจริญถึงระยะ 8 เซลล์ และ มอรูลา เพียง 3 ใบ แต่ในการแช่แข็งเอ็มบริโอด้วยวิธีนี้ประสบผลสำเร็จมากกว่าคือ เอ็มบริโอ (ระยะ 2-4 เซลล์) ที่ดูดเอาไลปิดออกก่อนแช่แข็ง จะสามารถแบ่งตัวจนถึงบลาสโตซิสได้ 50% หลังจากทำละลาย แต่เอ็มบริโอที่ไม่ได้ดูดไขมันออก จะเจริญถึงระยะบลาสโตซิสเพียง 9% ของที่แช่แข็ง ซึ่งแสดงว่าเอ็มบริโอและไข่สุกที่ดูดเอาไลปิดออกก่อน สามารถแช่แข็งด้วยวิธีไวตริฟิเคชั่นได้ แต่ถ้าเพียงปั่นเหวี่ยงให้ไลปิดในไซโตพลาสซึมมารวมกันอยู่ที่เดียวกันโดยไม่ดูดออกก่อนแช่แข็ง จะทำให้มีชีวิตรอดหลังละลายน้อยกว่าดูดไลปิดออก