

การแช่แข็งโอโอไซด์เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ Oocyte Cryopreservation for Medical Application

ดวงใจ บุญกุลศล*

บทคัดย่อ

การแช่แข็งโอโอไซด์ได้กลายเป็นส่วนหนึ่งของเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ การแช่แข็งโอโอไซด์มีประโยชน์อย่างมากในการเก็บรักษาโอโอไซด์ของผู้ประสบปัญหาเป็นมะเร็งตั้งแต่อายุน้อย และจำเป็นต้องรักษาโดยใช้สารเคมีหรือการฉายแสง ในปัจจุบันวิธีการแช่แข็งที่นิยมใช้กับโอโอไซด์มนุษย์ สามารถแบ่งได้เป็น 2 แบบใหญ่ๆ คือวิธีการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิลงช้าๆ และการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว หรือวิธีวิทริฟิเคชัน แต่อย่างไรก็ตามผลสำเร็จที่ได้จากการทดลองต่างๆ ยังไม่คงที่และยังไม่น่าพอใจที่จะสามารถนำมาใช้อย่างแพร่หลายได้ วิธีวิทริฟิเคชันซึ่งเป็นวิธีการแช่แข็งที่ไม่ทำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งขึ้นในเซลล์ ได้ถูกนำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพหลังการแช่แข็งโอโอไซด์ จากนั้นมีการใช้วิทริฟิเคชันหลากหลายวิธีในการแช่แข็งโอโอไซด์ ไซโกตและเอ็มบริโอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิดรวมทั้งมนุษย์ ซึ่งหลังจากที่มีรายงานการตั้งครรภ์และการคลอดบุตรจากโอโอไซด์แช่แข็งเป็นครั้งแรก จำนวนงานวิจัยที่รายงานเกี่ยวกับความสำเร็จของการแช่แข็งโอโอไซด์มนุษย์ก็มีเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง บทความนี้ได้รวบรวมผลสำเร็จของการแช่แข็งและปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับผลสำเร็จของการแช่แข็งโอโอไซด์มนุษย์เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์

Abstract

Cryopreservation of oocytes is becoming an essential part of assisted reproductive technology. Human oocyte cryopreservation would potentially benefit young women affected by cancer who must undergo fertility threatening chemotherapy or radiation. At present, frequently used protocols for human oocyte cryopreservation can be broadly classified as conventional slow freezing and vitrification. However, the results are still variable and not sufficiently successful to justify routine use. The vitrification method, ice crystal-free cryopreservation, was introduced to improve the success of oocyte cryopreservation and since then various vitrification protocols have been used to cryopreserve oocytes, zygotes, and embryos from a variety of mammalian species, including humans. After the first human pregnancy was achieved from vitrified-thawed human oocytes, the number of reports concerning pregnancies and deliveries following vitrification has steadily increased. This article demonstrated cryopreservation success in assisted reproductive technology and summarized factors supporting or disapproving cryopreservation of human oocyte for medical application.

Keywords: cryopreservation, vitrification, human oocyte

บทนำ

เทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์มีความก้าวหน้าและมีบทบาทอย่างยิ่งในการพัฒนาคุณภาพชีวิตมนุษย์ โดยเทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ยุคใหม่ได้เข้ามามีบทบาทในการแก้ไขปัญหาเรื่องโรคภัยไข้เจ็บ การเสื่อมสภาพของมนุษย์มากขึ้น รวมทั้งการแก้ปัญหาการมีบุตรยาก ซึ่งมีเทคโนโลยีการปฏิสนธิและการผลิตเอ็มบริโอเป็นฐานสำคัญ เซลล์ที่มีความ

* อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

สำคัญในการปฏิสนธิเพื่อสืบทอดเผ่าพันธุ์ได้แก่ โอโอไซต์ของเพศหญิงและเซลล์สุจิของเพศชาย จากการศึกษาค้นคว้าและวิจัยด้านชีววิทยาการเจริญพันธุ์ในระยะ 20 ปีที่ผ่านมา ทำให้แพทย์สามารถช่วยแก้ไขการมีบุตรยากได้ นับตั้งแต่มีรายงานความสำเร็จในการปฏิสนธิภายนอกร่างกายของเซลล์สุจิและโอโอไซต์ (*in vitro* fertilization; IVF) และการย้ายฝากเอ็มบริโอ (*embryo transfer*; ET) จึงมีผู้สนใจเทคโนโลยีนี้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วทั่วโลก ทำให้เกิดเทคโนโลยีชีวภาพการแช่แข็งโอโอไซต์เพื่อจัดตั้งธนาคารโอโอไซต์ (oocyte bank) ร่วมกับธนาคารตัวสุจิ (sperm bank) โดยโอโอไซต์จะถูกนำมาปฏิสนธิกับตัวสุจิแช่แข็งโดยไม่ต้องคำนึงถึงเวลา เพราะสามารถทำละลายมาใช้ได้ตลอดเวลา ซึ่งจะเป็นวิธีการรักษาพันธุ์กรรมได้อย่างยอดเยี่ยม

มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโอโอไซต์หลายประการที่น่าสนใจคือการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ในห้องปฏิบัติการให้เจริญสมบูรณ์เต็มที่ (*in vitro* maturation; IVM) และกระบวนการแช่แข็งโอโอไซต์ (oocyte cryopreservation) ในกระบวนการปฏิสนธิภายนอกร่างกายโดยทั่วไปใช้ฮอร์โมนกระตุ้นให้เซลล์ไข่สุกในรังไข่ ซึ่งสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายของฮอร์โมนและเกิดผลเสียกับรังไข่ได้ ได้มีความพยายามเพาะเลี้ยงเซลล์ไข่ที่เจาะเก็บออกมาจากรังไข่ในจานแก้วด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ (ultrasound) ให้เจริญเติบโตจนสามารถปฏิสนธิกับเซลล์สุจิภายนอกร่างกายและย้ายฝากเอ็มบริโอให้เกิดการตั้งครรภ์ได้ การพัฒนาเครื่องอัลตราซาวด์ให้มีประสิทธิภาพสูง สามารถตรวจพบโอโอไซต์ขนาดเล็กและเจาะเก็บได้ทางช่องคลอด ทำให้ไม่ต้องกระตุ้น รังไข่ด้วยฮอร์โมน และมีแหล่งของโอโอไซต์เพื่อบริจาคเพิ่มขึ้น การแช่แข็งโอโอไซต์ จึงมีประโยชน์ในกรณีที่มีการบริจาคโอโอไซต์จำนวนมาก การเก็บรักษาโอโอไซต์ก่อนที่ผู้ประสบปัญหาการมีบุตรยากจะรับการผ่าตัดรังไข่หรือฉายแสง

การแช่แข็งโอโอไซต์เป็นเทคโนโลยีที่ยุ่ยากและเป็นปัญหามากกว่าการแช่แข็งเซลล์สุจิและเอ็มบริโอ เนื่องจากโอโอไซต์มีน้ำมากและมีขนาดใหญ่ เป็นที่ยอมรับว่าโอโอไซต์เป็นเซลล์ที่มีความเปราะบางต่อการแช่แข็งมากกว่าเอ็มบริโอ วิธีการแช่แข็งสามารถทำได้หลายวิธี ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 แบบใหญ่ๆ คือวิธีการลดอุณหภูมิด้วยความเร็วช้าๆ ด้วยเครื่องลดอุณหภูมิแบบตั้งโปรแกรม (programmable freezing machine) และวิธีการลดอุณหภูมิต่ออย่างรวดเร็ว หรือวิทริฟิเคชัน (vitrification) ซึ่งวิธีนี้ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพง

การแช่แข็งโอโอไซต์แบบลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆ (Oocyte cryopreservation by conventional slow freezing)

Chen ได้รายงานความสำเร็จครั้งแรกของการแช่แข็งโอโอไซต์มนุษย์แบบลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆ โดยใช้ ไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide) เป็นสารป้องกันการแช่แข็ง ในปี ค.ศ. 1986 โดยอัตราการรอดและอัตราการปฏิสนธิของโอโอไซต์หลังการแช่แข็งเท่ากับ 80 และ 83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ งานวิจัยด้านการแช่แข็งโอโอไซต์ได้พัฒนาไปอย่างช้าๆ เนื่องจากประสบปัญหาอัตราการปฏิสนธิและอัตราการเกิดลูกของโอโอไซต์ที่ผ่านการแช่แข็งต่ำ เนื่องจากในช่วงนั้นยังไม่มีเทคนิค intracytoplasmic sperm injection (ICSI) เข้ามาช่วย หลังจากนั้นมียานความสำเร็จในการแช่แข็งโอโอไซต์มนุษย์แบบลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆ โดยใช้ 1.5 M PROH และ 0.2 M sucrose เป็นสารป้องกันการแช่แข็ง (Porcu et al., 2000; Fabbri et al., 2001) Porcu และคณะ ทำการทดลองโดยใช้โอโอไซต์ 338 โอโอไซต์ พบว่าอัตราการรอดของโอโอไซต์หลังการแช่แข็งเท่ากับ 59.5 เปอร์เซ็นต์ อัตราการปฏิสนธิหลังการทำ ICSI เท่ากับ 64.4 เปอร์เซ็นต์ หลังการย้ายฝากเอ็มบริโอเกิดลูก 1 คน Fabbri และคณะ ได้แช่แข็งโอโอไซต์จำนวน 1,769 โอโอไซต์ พบว่าอัตราการรอดและอัตราการปฏิสนธิโดยวิธี ICSI หลังการแช่แข็งเท่ากับ 54.1 และ 57.7 เปอร์เซ็นต์ หลังการย้ายฝากเอ็มบริโอเกิดลูก 9 คน นอกจากนี้ Fabbri และคณะยังพบอัตราการรอดของโอโอไซต์ที่ดีที่สุดเมื่อใช้ 0.2 mol/L sucrose และระยะเวลาที่แช่ในสารป้องกันการแช่แข็งต้องอยู่ในช่วง 10.5-15 นาที ส่วนรายงานอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับอัตราการรอดและอัตราการปฏิสนธิหลังการแช่แข็งซึ่งรายงานโดย Yang และคณะ (2002) และ Fosas และคณะ (2003) นั้นมีค่าใกล้เคียงกับงานของ Porcu และ Fabbri และพบอัตราการตั้งครรภ์ที่สูงอยู่ในช่วง 33-57 เปอร์เซ็นต์

ในการแช่แข็งโอโอไซต์ต้องยอมรับสิ่งหนึ่งก็คือ อัตราการรอดหลังการแช่แข็งหรือหลังการย้ายฝากจะต่ำกว่าโอโอไซต์ที่ไม่ได้แช่แข็ง ทั้งนี้เนื่องจากเกิดความเสียหายของโอโอไซต์ในระหว่างการแช่แข็ง ผลกระทบที่สำคัญของการแช่แข็งต่อโอโอไซต์มีหลายระดับตั้งแต่การถูกทำลายเปลือก โซน้า เพลลูซิด้า (zona pellucida) จนถึงระดับไซโทพลาสซึม (cytoplasm) และระดับที่ไม่สามารถมองด้วยตาเปล่า ซึ่งแปลผลจากเมื่อนำโอโอไซต์เหล่านี้ไปทำการปฏิสนธิแล้วเกิดความล้มเหลวในการปฏิสนธิ โอโอไซต์ไม่แบ่งตัว และเสื่อมสลายในที่สุด

ความเสียหายเกิดขึ้นจากการนำไอโอไซด์ใส่ในสารป้องกันการแช่แข็งที่มีความเข้มข้นมากกว่าหรือการเจือจางสารป้องกันการแช่แข็งออกจากเซลล์ รวมทั้งจากการแช่แข็งเอง และเมื่อไอโอไซด์เผชิญกับอุณหภูมิต่ำ เหล่านี้ทำให้เกิดการบวมและการหดตัวของเซลล์จากการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมซิส ความเป็นพิษของสารป้องกันการแช่แข็ง และการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์

การแช่แข็งไอโอไซด์แบบวิทริฟิเคชัน (Oocyte vitrification)

การแช่แข็งเซลล์โดยวิธีวิทริฟิเคชัน เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการแช่แข็งไอโอไซด์และเอ็มบริโอที่มีการเจริญอยู่ในระยะต้นๆ การแช่แข็งแบบวิทริฟิเคชัน จำเป็นต้องใช้สารป้องกันการแช่แข็งที่มีความเข้มข้นสูงซึ่งมีความเป็นพิษต่อไอโอไซด์ (Mukaida et al., 1998) สารป้องกันการแช่แข็งมีความเหมาะสมในการแช่แข็งไอโอไซด์ของสัตว์แต่ละชนิดแตกต่างกัน เอทิลีน ไกลคอล (ethylene glycol) เป็นสารป้องกันการแช่แข็งที่เหมาะสมและนำมาใช้ในการแช่แข็งไอโอไซด์มนุษย์มากที่สุด Kuleshova และคณะ (1999) ได้รายงานการเกิดลูกครั้งแรกหลังการแช่แข็งไอโอไซด์แบบวิทริฟิเคชันด้วยเอทิลีน ไกลคอล (40%) และ 0.6 M/L sucrose ด้วยวิธี open pulled straw vitrification (OPS) หลังจากนั้น Yoon และคณะ (2003) รายงานอัตราการรอดและอัตราการปฏิสนธิหลังการแช่แข็งไอโอไซด์แบบวิทริฟิเคชันด้วยเอทิลีน ไกลคอล (5.5 M) และ 1 M sucrose ด้วยวิธี electron microscopic grids สูงถึง 68.7 และ 71.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับและอัตราการเกิดลูก 21.4 เปอร์เซ็นต์ รายงานวิจัยของ Chian และคณะ (2005) พบว่าเมื่อใช้เอทิลีน ไกลคอลผสมกับพรอพานไดออล (propandiol) ให้ผลได้ดีกว่าคืออัตราการรอดและอัตราการปฏิสนธิเท่ากับ 93.9 และ 74.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ข้อดีของการแช่แข็งแบบวิทริฟิเคชัน เมื่อเทียบกับการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิลงอย่างช้า คือ วิทริฟิเคชันไม่ต้องใช้เครื่องลดอุณหภูมิแบบตั้งโปรแกรม (programmable freezing machine) ซึ่งมีราคาแพง และสามารถลดขั้นตอนและเวลาที่ใช้ในการแช่แข็ง อย่างไรก็ตาม ข้อเสียเปรียบของวิธีวิทริฟิเคชัน คือ สารป้องกันการแช่แข็งที่มีความเข้มข้นสูงที่ใช้ในวิธีนี้จะมีความเป็นพิษมากที่อุณหภูมิห้อง นักวิจัยหลายกลุ่มพยายามเพิ่มอัตราความเร็วในการแช่แข็งให้สูงขึ้น เพื่อลดความเป็นพิษของสารป้องกันการแช่แข็งที่อุณหภูมิห้อง และ

ป้องกันการถูกทำลายจากการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง โดยการลดปริมาตรสารละลายป้องกันการแช่แข็งให้น้อยที่สุด ดังนั้นจึงมีการพัฒนาอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการแช่แข็งแบบวิทริฟิเคชันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการแช่แข็งให้ดียิ่งขึ้นได้แก่ วิธี Electron microscope (EM) grid vitrification (Park et al., 2000) Open pulled straw (OPS) vitrification (Vajta et al., 1998) Cryoloop vitrification (CLV) (Mukaida et al., 2003)

จากการรวบรวมของ Vajta และคณะ ในปี ค.ศ. 1997 พบว่ากรณีของการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ ความเสียหายจะเกิดจากความดันออสโมซิส และความเป็นพิษของสารป้องกันการแช่แข็งเป็นสำคัญ ในกรณีของการแช่แข็งวิทริฟิเคชันนั้นซึ่งเป็นวิธีแช่แข็งที่กำจัดน้ำแข็งไม่ให้เกิดขึ้นในเซลล์ แต่ความเสียหายจะเกิดจากความดัน ออสโมซิส และความเป็นพิษจากสารป้องกันการแช่แข็งที่ใช้ในความเข้มข้นสูงมาก แต่ควรใช้ความเร็วในการแช่แข็งและการทำลายโดยผ่านจุดวิกฤตประมาณ 0 องศาเซลเซียส จะช่วยลดความเสียหายจากการเย็นจัด โดยเฉพาะในส่วนของไขมันที่ประกอบในเซลล์ของไอโอไซด์

หลังจากมีการพัฒนาอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการแช่แข็งแบบวิทริฟิเคชันขึ้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการแช่แข็งให้ดีขึ้นพบว่าประสิทธิภาพของการแช่แข็งด้วย electron microscope (EM) grid และ open pulled straw (OPS) สามารถเพิ่มอัตราความเร็วในการแช่แข็งให้สูงขึ้น จากอัตราความเร็วในการแช่แข็งวิทริฟิเคชันแบบดั้งเดิม (conventional straw vitrification) ซึ่งใช้หลอดพลาสติก 0.25 มิลลิลิตร เป็น 2,500 องศาเซลเซียส/นาที่ การแช่แข็งแบบวิทริฟิเคชัน โดยใช้ EM grid เพิ่มอัตราความเร็วในการแช่แข็งเป็น 24,000 องศาเซลเซียส/นาที่ และวิทริฟิเคชันด้วย OPS เพิ่มอัตราความเร็วในการแช่แข็งเป็น 16,700 องศาเซลเซียส/นาที่ (Vajta et al., 1997) cryoloop vitrification (CLV) เป็นวิธีวิทริฟิเคชันอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถลดปริมาตรสารละลายป้องกันการแช่แข็ง วิธีนี้ง่ายต่อการเก็บในไนโตรเจนเหลวและไม่มีปัญหาไอโอไซด์สูญหาย

1. การแช่แข็งแบบวิทริฟิเคชันโดยใช้ EM grid

หลักการของวิธีการนี้คือพยายามแช่แข็งด้วยความเร็วสูงเนื่องจากโลหะจะเย็นจัดได้เร็วกว่าหลอดพลาสติก 0.25 มิลลิลิตรที่ใช้ในวิธี conventional straw vitrification และพยายามให้มีปริมาตรของสารละลายที่ไอโอไซด์แขวนลอยน้อยที่สุด รายละเอียดของการแช่แข็งด้วยวิธีนี้ทำโดยวางกลุ่ม

ตารางที่ 1 ความเสี่ยงของความเสียหายที่เกิดจากการแช่แข็งตัวอ่อนแบบลดอุณหภูมิช้าๆ และแบบวิทวีภิเกชั่น

สาเหตุของความเสียหาย	การแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิช้าๆ	การแช่แข็งแบบวิทวีภิเกชั่น
Ice crystal formation	+++	-
Osmotic injury	+	+++
Toxic injury	+	+++
Fracture injury	++	++
Chilling injury	+++	+

+++ ความเสี่ยงในระดับสูง ++ ความเสี่ยงระดับปานกลาง + ความเสี่ยงในระดับต่ำ - ไม่มีความเสี่ยง (ที่มา Vajta et al., 1997)

ไอโอไซด์ประมาณ 10-15 ไอโอไซด์ ใน 0.1 ไมโครลิตร ของ สารละลายที่มีสารป้องกันการแช่แข็ง บนแผ่นตะแกรงโลหะ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.05 มิลลิเมตร หนา 0.037 มิลลิเมตร ช่องตะแกรงแต่ละช่องมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 ไมครอน ไอโอไซด์ จะเกาะติดกับแผ่นโลหะด้วยแรงดึงดูดจากนั้นทำการจุ่มแผ่น ตะแกรงลงในไนโตรเจนเหลวทันทีโดยไอโอไซด์จะไม่หลุด ออกจากแผ่นโลหะ

มีการทดลองใช้ EM grid แช่แข็งไซโกตของมนุษย์ โดยใช้เอทิลีน ไกลคอล 30 เปอร์เซ็นต์ พบว่าอัตราการรอด หลังการแช่แข็ง 85.5 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการเจริญเป็น บลาสโตซิส 15.9 เปอร์เซ็นต์ (Park, 2000) ซึ่งยังต่ำกว่า กลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (40.9 เปอร์เซ็นต์)

ข้อดีของการใช้ EM grid คือ

1. ความเร็วในการแช่แข็งสูงมาก โดยแผ่น ตะแกรงโลหะจะเย็นเร็วกว่าหลอดพลาสติก
2. ปริมาตรของสารละลายที่ไอโอไซด์แขวนลอย บนตะแกรงนั้นน้อยมากเพียง 0.1 ไมโครลิตร เท่านั้น

2. การแช่แข็งแบบวิทวีภิเกชั่นโดยใช้ OPS

การแช่แข็งแบบวิทวีภิเกชั่นโดยใช้ OPS เป็นวิธีการ ที่พยายามให้ไอโอไซด์แขวนลอยในน้ำยาที่มีสารป้องกันการ แช่แข็งน้อยที่สุดเท่าที่จะทำได้และใช้วิธีการแช่แข็งด้วย วิธีวิทวีภิเกชั่น Selman และคณะ (2006) ได้รายงานผล สำเร็จของการแช่แข็งไอโอไซด์มนุษย์ด้วยวิธี OPS โดยใช้ เอทิลีน ไกลคอล ผสมกับ ไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ พบว่า อัตราการปฏิสนธิของไอโอไซด์หลังการแช่แข็งเป็น 77.7 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการตั้งครรภ์หลังการย้ายฝากเอ็มบริโอ 33.3 เปอร์เซ็นต์

รายละเอียดของวิธีนี้คือการแช่แข็งในหลอด

พลาสติกขนาด 0.25 มิลลิเมตร ที่ใช้กันทั่วไป แต่ทำการดึงให้ เส้นผ่าศูนย์กลางและจากความหนาของผนังหลอดลดลง ประมาณครึ่งหนึ่ง จากเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.7 มิลลิเมตร เป็น 0.8 มิลลิเมตร และความหนาจาก 0.15 มิลลิเมตร เป็น 0.07 มิลลิเมตร แล้วดูดเอาไอโอไซด์เข้าไปด้วยแรงดูดอัดโนมัต เมื่อ ปลายหลอดสัมผัสกับช่องเหลว (capillary effect) ทำให้มี ปริมาตรของเหลวเพียง 2-3 ไมโครลิตร ไม่ต้องปิดปลาย หลอดแล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวทันที

ข้อดีของการใช้ OPS คือ

1. จากการที่ผนังของหลอดบางลงทำให้การเป็น ฉนวนความร้อนลดลง
2. ปริมาตรของช่องเหลวที่ไอโอไซด์แช่อยู่ลดลง เนื่องจากเส้นผ่าศูนย์กลางของหลอดลดลง
3. แรงดูดไอโอไซด์อัดโนมัตจากหลอดบรรจุที่มี เส้นผ่าศูนย์กลางขนาดเล็กทำให้บรรจุไอโอไซด์ได้รวดเร็ว และง่ายขึ้น
4. ใช้เวลาในการแช่แข็งน้อย
5. การทำละลายด้วยการเปิดปลายหลอดทิ้งไว้ ทำให้ไอโอไซด์สัมผัสกับสารเจือจางโดยตรง
6. พบว่ามีความเสียหายในระดับของเปลือกโซน่า เพลลูซิน้าน้อยมาก เป็นไปได้ว่าการเปิดปลายหลอดไว้ ทำให้ ไม่มีอากาศอยู่ภายในหลอด ซึ่งมักจะเกิดความดันเมื่อเวลา แช่แข็งและทำละลาย

3. การแช่แข็งแบบวิทวีภิเกชั่นโดยใช้ cryoloop (CLV)

การแช่แข็งแบบวิทวีภิเกชั่นโดยใช้ cryoloop เป็น วิธีที่พัฒนามาหลังจากการใช้ OPS เพื่อพยายามให้ไอโอไซด์ แขวนลอยในน้ำยาที่มีสารป้องกันการแช่แข็งน้อยกว่า ซึ่ง

ส่วนใหญ่จะนำมาใช้กับเซลล์ที่ไวต่อการแช่แข็งมาก เช่น โอโอไซต์และเอ็มบริโอระยะต้นๆ มีรายงานผลสำเร็จของการแช่แข็งโอโอไซต์มนุษย์โดยใช้ cryoloop ได้เป็นผลสำเร็จ อัตราการตั้งครรภ์เป็น 44% (Saki และ Dezfuly, 2005)

รายละเอียดของวิธีนี้คือการใช้ห่วง (loop) ซึ่งต่อกับด้ามจับโลหะสแตนเลส (stainless steel) ห่วงดังกล่าว ทำจากเส้นด้ายไนลอน (nylon) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของห่วง 20 ไมครอน หลังจากจุ่มห่วงในสารละลายป้องกันการแช่แข็ง ที่มีโอโอไซต์เพื่อนำโอโอไซต์และสารละลายป้องกันการแช่แข็ง เพียง 0.5-1 ไมโครลิตร บรรจุอยู่ในห่วงแล้ว

ใส่ห่วงพร้อมด้ามจับในหลอด 2 มิลลิลิตร ที่แช่อยู่ในไนโตรเจนเหลวทันที

ข้อดีของการใช้ cryoloop คือ

1. ไม่มีฉนวนความร้อนระหว่างไนโตรเจนเหลวกับสารละลายและโอโอไซต์
2. ปริมาตรของของเหลวที่โอโอไซต์แช่อยู่ลดลง
3. สามารถบรรจุโอโอไซต์ได้รวดเร็ว
4. ใช้เวลาในการแช่แข็งน้อย
5. การทำละลายง่ายมากขึ้นและทำให้โอโอไซต์สัมผัสกับสารเจือจางโดยตรง

ตารางที่ 2 ผลสำเร็จของการแช่แข็งโอโอไซต์แบบลดอุณหภูมิลงช้าๆ และแบบวิธีพิเกชั่น

ผู้แต่ง (ปี)	วิธีการแช่แข็ง	อัตราการรอด (%)	อัตราการปฏิสนธิ (%)	จำนวนโอโอไซต์/ การตั้งครรภ์
Fabbri (2001)	Slow-freeze	796/1,502 (53)	632/796 (79)	94
Chen (2005)	Slow-freeze	119/159 (75)	80/119 (67)	23
Yoon (2003)	Vitrification	325/474* (68.6)	142/198 (71.7)	79
Kuwayama (2005)	Vitrification	58/64 (91)	52/58 (90)	5

* ทำการทดลองโดยใช้โอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัส (cumulus cell) ล้อมรอบ (ดัดแปลงข้อมูลจาก Jain และ Paulson, 2006)

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับผลสำเร็จของการแช่แข็งโอโอไซต์

การแช่แข็งโอโอไซต์ที่จะประสบความสำเร็จนั้นขึ้นกับหลายปัจจัย ได้แก่

1. ปริมาตรของเซลล์และคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์

เมื่อเปรียบเทียบค่าอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรของเซลล์โอโอไซต์ จะน้อยกว่าเซลล์เอ็มบริโอ ดังนั้นการเคลื่อนที่ผ่านเข้าออกของน้ำระหว่างในเซลล์กับนอกเซลล์โอโอไซต์จึงเกิดได้ช้ากว่าเซลล์เอ็มบริโอ ซึ่งเป็นเหตุผลหนึ่งที่ทำให้การแช่แข็งโอโอไซต์แตกต่างและทำได้ยากกว่าการแช่แข็งเอ็มบริโอ (Fabbri *et al.*, 2000) นอกจากนี้คุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์จะเปลี่ยนแปลงไปหลังการปฏิสนธิ เนื่องจากการจัดเรียงตัวใหม่ของเส้นใยแอกตินที่อยู่ใต้เยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของเอ็มบริโอแข็งแรงและทนต่อแรงดันออสโมติกได้มากกว่าเยื่อหุ้มเซลล์โอโอไซต์ (Gook *et al.*, 1993) ดังนั้นจึงต้องมีการปรับวิธีการแช่แข็งสำหรับโอโอไซต์โดยเฉพาะ

2. ระยะการเจริญของโอโอไซต์

โอโอไซต์ที่อยู่ในระยะการเจริญต่างกันมีความทนทานต่อการแช่แข็งแตกต่างกัน ตารางที่ 2 ได้แสดงรายละเอียดเกี่ยวกับปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการรอดหลังการแช่แข็งของโอโอไซต์ที่ระยะการเจริญต่างๆ

3. จำนวนชั้นของเซลล์คิวมูลัส

Miyake และคณะ (1993) และ Park และคณะ (2001) รายงานว่าโอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบมีอัตราการรอดหลังการแช่แข็งดีกว่าโอโอไซต์ที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบ

4. อัตราการลดอุณหภูมิระหว่างการแช่แข็ง

อัตราความเร็วของการลดอุณหภูมิระหว่างการแช่แข็งโอโอไซต์มีส่วนสำคัญต่ออัตราการรอดของตัวอย่างมาก หากใช้ความเร็วมากเกินไป ผลทำให้น้ำในเซลล์มีเวลาออกจากเซลล์ได้น้อยและเหลืออยู่ในเซลล์ กลายเป็นเกล็ดน้ำแข็งอยู่ภายในเซลล์มาก หรือตรงกันข้ามหากใช้ความเร็วน้อย

เกินไปจะมีผลให้น้ำในเซลล์มีโอกาสออกจากเซลล์ได้มาก เกิดความเสียหายจากความเข้มข้นของอิเล็กโทรไลต์ภายในเซลล์ มีความเข้มข้นสูงเกินไป (Liebermann et al., 2002)

5. อัตราการเพิ่มอุณหภูมิระหว่างการทำละลาย

ความเร็วของการทำละลายขึ้นกับความเร็วของการแช่แข็งและอุณหภูมิสุดท้ายก่อนจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว ซึ่งทั้งสองกรณีเกี่ยวข้องกับปริมาณของน้ำที่เหลืออยู่ในเซลล์โดยหากเซลล์มีน้ำเหลือในเซลล์มาก การใช้ความเร็วในการทำละลายช้าจะมีผลทำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งขึ้นในเซลล์ แต่หากมีน้ำเหลืออยู่ในเซลล์น้อย ต้องใช้ความเร็วในการทำละลายช้าเพื่อปรับสภาพความสมดุลของตัวทำละลาย

6. ชนิดและความเข้มข้นของสารป้องกันการแช่แข็ง

สารป้องกันการแช่แข็ง มีหน้าที่สำคัญในการป้องกันการถูกทำลายของเซลล์ในระหว่างการแช่แข็งและการทำละลาย ชนิดของสารป้องกันการแช่แข็ง มี 3 กลุ่ม (Liebermann et al., 2002) คือ

1. สารที่สามารถซึมผ่านเข้าเซลล์ได้ (permeating cryoprotectants) สามารถเข้าไปแทนที่น้ำในเซลล์ เพื่อช่วยลดการเปลี่ยนแปลงปริมาตรของเซลล์อย่างกะทันหันและช่วยป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง ตัวอย่างเช่น เมทานอล (MW 32.04), เอทิลีน ไกลคอล (MW 62.07), พรופןไดออล (MW

76.1), ไดเมทิล ซัลฟอกไซด์ (MW 78.13), บิวทานีไดออล (MW 90.12), กลีเซอรอล (MW 92.1)

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

3. สารที่ไม่สามารถซึมผ่านเข้าเซลล์ได้ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (high molecular weight nonpermeating cryoprotectants) (MW > 50,000 ดาลตัน) ทำหน้าที่ช่วยป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งรอบนอกของเซลล์ ตัวอย่างเช่น โพลีไวนิล ไพโรลิโดน, โพลีไวนิล แอลกอฮอล์, โซเดียม ไฮยา-ลูโรเนต

7. อุณหภูมิของการชักนำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็ง

การศึกษาของ Whittingham ในปี ค.ศ. 1977 ในหนูเมาส์พบว่าอุณหภูมิที่ชักนำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งมีผลต่ออัตราการรอดของเซลล์โดยหากต่ำกว่า -6 องศาเซลเซียส/นาทิจจะมีอัตราการรอดจะลดลงอย่างมาก และหลังชักนำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งแล้วควรใช้เวลาเซลล์ปรับตัวประมาณ 5-10 นาที เรียกว่า “เวลาสมดุล (equilibration time)”

ตารางที่ 3 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการรอดหลังการแช่แข็งของโอโอไซต์ที่ระยะการเจริญต่างๆ

Factors	Stages of oocyte		
	Primordial oocyte	GV stage oocyte	MII stage oocyte
Availability	Abundant, always present	Scarce, only from antral follicles	Scarce, only at mid-cycle
Ease of collection	Easy, e.g. biopsy	Oocyte retrieval	Oocyte retrieval
Size	<50 μm	80 to 300 μm	80 to 300 μm
Nuclear status	Resting prophase I, has nuclear membrane	GV, has nuclear membrane	Resting MII, temperature sensitive spindle, no nuclear membrane
Zona pellucida	No	Yes	Yes
Cortical granules	No	Central	Peripheral
Intracellular lipid	Little	May be abundant	May be abundant
Metabolic rate	Low	Low	Low
Surface:Volume ratio	High	Low	Low

(ดัดแปลงจาก Shaw et al., 1999)

บทสรุป

การแช่แข็งโอโอไซต์มนุษย์เป็นเทคโนโลยีชีวภาพที่ช่วยเก็บรักษาโอโอไซต์ในผู้ประสบปัญหาการมีบุตรยาก และผู้ที่ต้องการผ่าตัดรังไข่หรือฉายแสง หรือในกรณีที่มีการบริจาคโอโอไซต์จำนวนมาก วิธีการแช่แข็งโอโอไซต์มนุษย์มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง และในปัจจุบันสามารถทำได้หลายวิธี ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 แบบใหญ่ๆ คือ วิธีการลดอุณหภูมิด้วยความเร็วช้าๆ โดยใช้เครื่องลดอุณหภูมิแบบตั้งโปรแกรม และวิธีการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว หรือวิทวีภิเกชั่น ซึ่งไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพง มีรายงานผลสำเร็จของการแช่แข็งโอโอไซต์มนุษย์ที่เกิดขึ้นจากทั้งวิธีลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆ และวิธีวิทวีภิเกชั่น โดยสิ่งที่จะต้องคำนึงถึงเมื่อทำการแช่แข็งโอโอไซต์ คือ ระยะเวลาเจริญของโอโอไซต์ จำนวนชั้นของเซลล์คิวมูลัส อัตราการลดอุณหภูมิระหว่างการแช่แข็ง อัตราการเพิ่มอุณหภูมิระหว่างการทำให้ละลาย ชนิดและความเข้มข้นของสารป้องกันการแช่แข็ง นอกจากนี้ความเชี่ยวชาญของนักวิจัยยังเป็นส่วนหนึ่งที่มีผลต่อความสำเร็จในการแช่แข็งโอโอไซต์

เอกสารอ้างอิง

- Chen C. (1986). Pregnancy after human oocyte cryopreservation. **Lancet**. 1:884-886.
- Chian RC, Son WY, Huang JY, Cui SJ, Buckett WM, Tan SL. (2005). High survival rates and pregnancies of human oocytes following vitrification: preliminary report [abstract]. **Fertility and Sterility**. 84(Suppl 1):36.
- Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Primavera MR, Rocchetta G, Ciotti PM, Magrini O, Seracchioli R, Venturoli S, Flamigni C. (2000). Technical aspects of oocyte cryopreservation. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 169:39-42.
- Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, Venturoli S, Flamigni C. (2001). Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. **Human Reproduction**. 16:41-416.
- Fosas N, Marina F, Torres PJ, Jove I, Martin P, Perez N, Arnedo N, Marina S. (2003). The births of five Spanish babies from cryopreserved donated oocytes. **Human Reproduction**. 18:1417-1421.
- Gook DA, Osborn SM, Johnston WL. (1993). Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle. **Human Reproduction**. 8:1101-1109.
- Jain JK, Paulson RJ. (2006). Oocyte cryopreservation. **Fertility and Sterility**. 86(Suppl 3):1037-1046.
- Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A. (1999). Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. **Human Reproduction**. 14:3077-3079.
- Kuwayama M, Vajita G, Kato O, Leibo SP. (2005). Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Reproductive Biomedical Online**. 11:300-308.
- Liebermann J, Tucker MJ. (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.
- Miyake T, Kasai M, Zhu SE, Sakurai T, Machida T. (1993). Vitrification of mouse oocytes and embryos at various stages of development in an ethylene glycol based solution by a simple method. **Theriogenology**. 40:121-134.
- Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, Oka C, Kasai M, Takahashi K. (2003). Vitrification of human blastocysts using cryoloops: clinical outcome of 223 cycles. **Human Reproduction**. 18:384-391.
- Mukaida T, Wada S, Takahashi K, Pedro PB, An TZ, Kasai M. (1998). Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8 cell mouse embryos. **Human Reproduction**. 13:2874-2879.
- Park SE, Chung HM, Cha KY, Hwang WS, Lee ES, Lim JM. (2001). Cryopreservation of ICR mouse oocytes: improved post-thawed preimplantation

- development after vitrification using Taxol TM , a cytoskeleton stabilizer. **Fertility and Sterility**. 75:1177–1184.
- Park SP, Kim EY, Oh JH, Nam HK, Lee KS, Park SY, et al. (2000). Ultra-rapid freezing of human multipronuclear zygotes using electron microscope grids. **Human Reproduction**. 15:1787–1790.
- Porcu E, Fabbri R, Damiano G, Giunchi S, Fratto R, Ciotti PM, Venturoli S, Flamigni C. (2000). Clinical experience and applications of oocyte cryopreservation. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 169:33–37.
- Saki G, Dezfuly FG. (2005). Vitrification of human oocyte using cryoloop. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**. 3:19-24.
- Selman H, Angelini A, Barnocchi N, Brusco GF, Pacchiarotti A, Aragona C. (2006). Ongoing pregnancies after vitrification of human oocytes using a combined solution of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide **Fertility and Sterility**. 86(4):997-1000.
- Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO. (1999). Cryopreservation of oocytes and embryos. **Handbook of IVF**. 2nd Edition. Trounson, A.O., Gardner, D., eds. CRC press, Boca Raton, FL.
- Vajta G, Booth PJ, Holm P, Greve T, 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.
- Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. (1998). Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**. 51:53–58.
- Whittingham DG. (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.
- Yang D, Winslow KL, Blohm PL, Brown SE, Nguyen K, Brubaker C. (2002). Oocyte donation using cryopreserved donor oocytes. **Fertility and Sterility**. 78(Suppl 1):S14–15.
- Yoon TK, Kim TJ, Park SE, Hong SW, Ko JJ, Chung HM, Cha KY. (2003). Live births after vitrification of oocytes in a stimulated in vitro fertilization embryo transfer program. **Fertility and Sterility**. 79:1323–1326.