

# การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโอโอไซตัสสุกรภายหลังการแช่แข็งด้วยวิธี ultrarapid freezing

อดิศร อดิเรกถาวร<sup>1\*</sup> เกริญยศ สัจจเจริญพงษ์<sup>1</sup> ศิริเพ็ญ เวชชการัญย์<sup>3</sup>  
วิมล โพธิวงศ์<sup>1</sup> มงคล เตชะกำพูน<sup>2</sup>

## Abstract

Adisorn Adirekthaworn<sup>1\*</sup> Kriengyot Sajjarengpong<sup>1</sup> Siripen Vethchagarun<sup>3</sup>  
Wimon Pothiwong<sup>1</sup> Mongkol Techakumphu<sup>2</sup>

## ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN PORCINE OOCYTES AFTER ULTRARAPID FREEZING

The objective of the present study was to investigate the ultrastructural changes seen in frozen porcine oocytes at the germinal vesicle and during in vitro maturation when using an ultrarapid freezing technique. The morphological changes were assessed by transmission electron microscopy (TEM). Immature oocytes were collected from pig ovaries at a local slaughter house in Nakorn Prathom province. Some oocytes were matured in vitro for 44 hours at 39°C, 5% CO<sub>2</sub> with high humidity. All oocytes were divided into four groups; immature (control group), the in vitro maturation group (control group), frozen immature and frozen mature oocytes. Electron microscopy was used to examine the fine structure of the frozen oocytes (group 3 and 4). The freezing technique induced ultrastructural changes when compared to the unfrozen oocytes inducing; less electron-lucent in the zona pellucida, degeneration of microvilli, extensive vacuolization, changes in the matrix density of the mitochondria and disruption of lipid droplets and the cytoplasmic vesicles membrane. In conclusion, the study showed that the ultrarapid freezing technique demonstrates similar morphological features for the porcine oocytes at both the germinal vesicle and the maturation stage.

---

**Keywords :** pig, oocyte, ultrarapid freezing, transmission electron microscopy

<sup>1</sup>Department of Anatomy, <sup>2</sup>Department of Obstetrics Gynaecology and Reproduction, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330

<sup>3</sup>Scientific and Technological Research Equipment Centre, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330

\*Corresponding author

---

<sup>1</sup>ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ <sup>2</sup>ภาควิชาสูติศาสตร์ เชนเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

<sup>3</sup>ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

\*ผู้รับผิดชอบบทความ

### บทคัดย่อ

อดิศร อดิเรกถาวร<sup>1\*</sup> เกรียงยศ สัจจเจริญพงษ์<sup>1</sup> ศิริเพ็ญ เวชชการณย์<sup>3</sup> วิมล โพธิวงศ์<sup>1</sup> มงคล เตชะกำพู่<sup>2</sup>

## การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโอโอไซต์สุกรภายหลังการแช่แข็งด้วยวิธี ultrarapid freezing

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษารูปร่างลักษณะของออร์แกนล ภายในไซโทพลาสซึมของโอโอไซต์สุกรชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิเมื่อผ่านการแช่แข็งด้วยเทคนิค ultrarapid freezing และศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงผ่าน ทำการเจาะเก็บโอโอไซต์จากรังไข่สุกรที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์แห่งหนึ่ง ในจังหวัดนครปฐม นำโอโอไซต์ที่ได้ครึ่งหนึ่งของทั้งหมดไปเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นเวลา 44 ชั่วโมงในน้ำยาเลี้ยงจนอยู่ในสภาวะพร้อมปฏิสนธิที่อุณหภูมิ 39°C. คาร์บอนไดออกไซด์ 5% และความชื้น 100% โอโอไซต์ที่ได้ทั้งหมดแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่โอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิ (กลุ่มควบคุม) โอโอไซต์ชนิดพร้อมปฏิสนธิ (กลุ่มควบคุม) โอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิและผ่านการแช่แข็ง (กลุ่มทดลอง) และกลุ่มสุดท้ายเป็นโอโอไซต์ชนิดพร้อมปฏิสนธิและผ่านการแช่แข็ง (กลุ่มทดลอง) หลังจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบการเปลี่ยนแปลงที่คล้ายคลึงกันในโอโอไซต์ที่ผ่านการแช่แข็งทั้งสองชนิด (กลุ่มที่ 3 และ 4) ได้แก่ zona pellucida คัดสีางลง มีการเสื่อมสลายของไมโครวิลไลพบลักษณะคล้ายช่องว่างภายในไมโทคอนเดรีย และการคิดสีต่างไปจากเดิม ผนังหุ้มรอบนอกของเม็ดไขมันและ vesicle ไม่เรียบมีรอยหยักไปมา จากการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่าการแช่แข็งด้วยเทคนิคนี้ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของออร์แกนลภายในไซโทพลาสซึมของโอโอไซต์สุกรทั้งชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิในลักษณะเดียวกัน

คำสำคัญ : สุกร โอโอไซต์ ultrarapid freezing กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

### บทนำ

ในปัจจุบันการแช่แข็งตัวอ่อน น้ำเชื้อและโอโอไซต์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นวิธีการเก็บรักษาพันธุ์กรรมของสัตว์ที่เหมาะสมที่สุด เมื่อใช้เทคนิคนี้ร่วมกับการย้ายฝากตัวอ่อนรวมถึงการย้ายฝากนิวเคลียสจะช่วยให้ประสิทธิภาพในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ได้เป็นอย่างดี ที่ผ่านมามีการพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาโอโอไซต์มนุษย์ และสัตว์ โดยการแช่แข็งโดยใช้เทคนิคที่แตกต่างกัน (Parks and Ruffing, 1992; Vajta et al., 1998; Kong et al., 2000; Matsumoto et al., 2001; Hochi et al., 2004) พบว่าโอโอไซต์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วนใหญ่สามารถแช่แข็ง และนำกลับไปใช้ในการปฏิสนธิ และย้ายฝากในสัตว์ตัวรับได้ แต่ผลที่ได้ยังมีความแตกต่างกัน เนื่องจากโอโอไซต์ของสัตว์ต่างชนิดกันจะมีความไวต่อความเย็น และเทคนิคในการแช่แข็งแตกต่างกัน (Shaw et al., 2000; Vajta, 2000; Ledda et al., 2001 )

การแช่แข็งโอโอไซต์ในสัตว์มีหลายวิธี โดยวิธีหนึ่งคือการแช่แข็งโดยใช้เทคนิค ultrarapid freezing วิธีนี้ใช้ในการลดอุณหภูมิลงในระยะเวลาด้านสั้น โดยโอโอไซต์จะถูกวางลง

บนแผ่นตะแกรงทองแดง (electron microscopic copper grid) ก่อนที่จะสัมผัสกับสารป้องกันการแช่แข็งโดยตรง (Martino et al., 1996; Park et al., 1999) โดยอาศัยคุณสมบัติการดึงน้ำออกจากเซลล์ก่อนแช่แข็ง วิธีนี้จะพบเกล็ดน้ำแข็งเกิดขึ้นทั้งภายใน และภายนอกเซลล์ (Niemann, 1991) Wu และคณะ (2001) ได้ใช้เทคนิคนี้ในการตรวจสอบความสามารถในการเจริญ การปฏิสนธิ รวมถึงการพัฒนาของตัวอ่อนในมนุษย์พบว่าโอโอไซต์สามารถเจริญถึงระยะพร้อมปฏิสนธิ 59% โดยจำนวน 64% ของโอโอไซต์ที่เจริญเต็มที่สมารถเกิดการปฏิสนธิจากตัวสุจิ และเกิดการแบ่งตัวของตัวอ่อนได้ 70% เช่นเดียวกับที่ Martino และคณะ (1996) ได้ทำการแช่แข็งโอโอไซต์โคชนิดพร้อมปฏิสนธิด้วยวิธีการเดียวกัน และตรวจสอบอัตราการรอดด้วยการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย พบว่าอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนอยู่ที่ระดับ 30% และครึ่งหนึ่งของตัวอ่อนสามารถเจริญไปจนถึงระยะบลาสโตซิสต์ได้นอกจากนี้ อนุชา และคณะ (2002) ได้ใช้เทคนิคนี้ในการแช่แข็งโอโอไซต์สุกรที่ไม่พร้อมปฏิสนธิพบว่าโอโอไซต์สุกรมีอัตราการเจริญเข้าสู่ระยะ metaphase II 23-30% ในขณะที่อดิศร และคณะ

(2001) สามารถนำโอโอไซต์สุกรที่ไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิที่ผ่านการแช่แข็งด้วยเทคนิคนี้มาตรวจสอบความสามารถในการเจาะผ่านของตัวอสุจิสุกร อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการเจริญเข้าสู่ระยะ metaphase II หรือความสามารถในการเจาะผ่านพบว่ามิเปอร์เซ็นต์ที่ไม่สูงมากนักเมื่อเทียบกับการใช้ โอโอไซต์สด ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากมีการเปลี่ยนแปลงหรือเกิดความเสียหายขึ้นกับออร์แกนเนลภายในไซโตพลาสซึมของโอโอไซต์ที่ผ่านการแช่แข็ง (Shaw et al., 2000; Ledda et al., 2001) ได้แก่ มีการหนาตัวของผนัง zona pellucida เพิ่มขึ้น (Carroll et al., 1990; Vincent et al., 1990) spindle fiber เกิดความเสียหาย (Aigner et al., 1992) มีการเปลี่ยนแปลงของไมโครวิลไล (microvilli) ที่อยู่รอบเยื่อหุ้มเซลล์ เกิดการบวม และมีช่องว่างเกิดขึ้นภายในไมโทคอนเดรีย รวมถึงคอร์ติคอลล แกรนูล (cortical granules) เจริญได้ไม่เต็มที่ (Vincent et al., 1990; Fuku et al., 1995<sup>ab</sup>) นอกจากนี้อาจพบการกระจายตัวของคอร์ติคอลล แกรนูลที่ผิดปกติไปจากเดิม (Hyttel et al., 2000) จากการเปลี่ยนแปลงของออร์แกนเนลดังกล่าวข้างต้นเป็นผลเนื่องมาจากเทคนิคที่ใช้ในการแช่แข็งโอโอไซต์มีความแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามข้อมูลเบื้องต้นที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของออร์แกนเนลในโอโอไซต์เมื่อแช่แข็งด้วยวิธี ultrarapid freezing ยังมีอยู่น้อยมากโดยเฉพาะในสุกร ซึ่งผลที่ได้นี้จะทำให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงที่อาจเกิดขึ้นกับออร์แกนเนลอื่นเนื่องมาจากการใช้เทคนิคนี้ในการแช่แข็งโอโอไซต์ ซึ่งจะเป็ประโยชน์ต่อไปในการพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งในการเก็บรักษาพันธุ์กรรมของสัตว์หายากรวมถึงสัตว์ที่ใกล้สูญพันธุ์ต่อไป ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของโอโอไซต์สุกรชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิ และชนิดพร้อมปฏิสนธิเมื่อแช่แข็งโอโอไซต์ ด้วยวิธี ultrarapid freezing

### อุปกรณ์และวิธีการ

#### การเก็บโอโอไซต์

ทำการเก็บรังไข่ของสุกรจากโรงฆ่าสัตว์ในเขตอำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม โดยเก็บรังไข่ลงในน้ำเกลือ 0.9% อุณหภูมิ 37°C. จากนั้นนำกลับมายังห้องปฏิบัติการภายใน 30 นาที ทำการล้างอีกครั้งด้วยน้ำเกลือ 0.9% ใช้เข็มพลาสติกเบอร์ 19 ต่อกับไซริงค์พลาสติกขนาด 5 มล. เจาะจุดของเหลวจากฟอลลิเคิลที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-5 มม. แล้วเทของเหลวที่ได้ลงในจานพลาสติกที่บรรจุน้ำยาเลี้ยงโอโอไซต์ชนิด TCM 199 HEPES จากนั้นเลือกโอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้ม

ล้อมรอบ (compact cumulus oocyte) มาล้างในน้ำยา TCM 199 HEPES อีก 3 ครั้ง ก่อนที่จะนำโอโอไซต์ที่ได้มาแยกเซลล์คิวมูลัสออกจากเปลือก (decoronation) หลังจากเก็บไว้ใน 1% hyaluronidase ที่อุณหภูมิ 39°C. นาน 30 นาที ด้วยการใช้ไปแปดที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใกล้เคียงกับขนาดโอโอไซต์ดูดเข้าออกหลายๆ ครั้งจนเซลล์คิวมูลัสที่อยู่ล้อมรอบหลุดออกมาจนหมด โอโอไซต์ดังกล่าวจัดเป็นโอโอไซต์ชนิดที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ

#### การเลี้ยงโอโอไซต์ให้พร้อมปฏิสนธิ

นำโอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหุ้มล้อมรอบที่ได้จากรังไข่สุกรดังวิธีข้างต้น มาเลี้ยงให้เกิดสภาวะพร้อมปฏิสนธิในตู้บิโบนน้ำยาที่มีส่วนประกอบของ TCM 199 NaHCO<sub>3</sub> + FSH/LH 10 ไมโครกรัม/มล. + estradiol 17-β10 ไมโครกรัม/มล. + 10% fetal calf serum นาน 44 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 39°C ภายใต้บรรยากาศ 5% CO<sub>2</sub> และความชื้นเต็มที่ เมื่อครบกำหนดเวลาในการเลี้ยงแล้วนำโอโอไซต์ที่ได้ไปแยกเซลล์คิวมูลัสออกจากเปลือกดังวิธีเดียวกันกับโอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิ ซึ่งโอโอไซต์ที่ได้จัดเป็นโอโอไซต์ชนิดที่พร้อมปฏิสนธิ (มงคล และคณะ, 1993)

#### การแช่แข็งโอโอไซต์

นำโอโอไซต์สุกรที่ไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิกลุ่มละ 15-20 โอโอไซต์มาแช่แข็งด้วยวิธี ultrarapid freezing บนแผ่นตะแกรงทองแดงตามวิธีของ Martino และคณะ (1996) โดยนำโอโอไซต์ทั้งสองชนิดมาล้างในน้ำยา PBS ที่มี 10% fetal calf serum เป็นเวลา 5 นาทีหนึ่งครั้ง ก่อนที่จะใส่ลงในสารป้องกันการแช่แข็งชนิด ethylene glycol ความเข้มข้น 5 M นาน 30 วินาที หลังจากนั้นนำโอโอไซต์วางลงบนแผ่นตะแกรงทองแดง (รูปที่ 1a) และใช้ปากคีบ (watchmaker's forceps) คีบแผ่นตะแกรงทองแดงนี้จุ่มลงในไนโตรเจนเหลว 1 นาที เมื่อครบกำหนดแล้วนำมาทำให้ละลายในสารละลายซูโครสความเข้มข้น 0.5 M, 0.25 M, 0.125 M และน้ำยา PBS + 10% fetal calf serum ตามลำดับนานขึ้นตอนละ 1 นาที โอโอไซต์ที่ผ่านขั้นตอนนี้จัดเป็นโอโอไซต์แช่แข็ง

#### การเตรียมตัวอย่างโอโอไซต์สำหรับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงผ่าน (Transmission electron microscopy; TEM)

นำตัวอย่างโอโอไซต์ที่ได้จากแต่ละกลุ่มมาคงสภาพครั้งแรกทันทีด้วย 2.5% glutaraldehyde ในสารละลาย 0.1 M phosphate buffer ที่ pH 7.4 อุณหภูมิ 4°C ทั้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำตัวอย่าง โอโอไซต์มาล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer

อีก 3 ครั้ง ๆ ละ 15 นาทีก่อนจะคงสภาพซ้ำ (post-fix) ด้วย 1% osmium tetroxide ในสารละลาย 0.1 M phosphate buffer นาน 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนดแล้วนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 3 ครั้งก่อนนำไปผ่านกระบวนการดึงน้ำออก (dehydration) ด้วยเอธานอลที่ความเข้มข้น 35%, 50%, 70%, 95% ตามลำดับนานขึ้นตอนละ 15 นาที และสุดท้ายด้วยเอธานอลเข้มข้น (absolute ethanol) อีก 3 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที ต่อจากนั้นนำไปแทนที่น้ำ (infiltration) ด้วยส่วนผสมระหว่าง absolute ethanol กับ spur's resin ในอัตราส่วน 3:1 1:1 1:3 ตามลำดับนานขึ้นตอนละ 3 ชั่วโมงและ spur's resin อีก 3 ครั้ง ๆ ละ 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปวางลงบนแม่พิมพ์และอบที่อุณหภูมิ 70°C นาน 8 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ได้จะนำไปตัดให้เป็นแผ่นที่ความหนา 60-90 นาโนเมตร เมื่อตัดเรียบร้อยแล้ววางลงบนแผ่นตะแกรงทองแดง ย้อมด้วย 2% uranyl acetate ในสารละลายของ 50% ethanol นาน 10-15 นาที และ lead citrate นาน 5-10 นาทีตามลำดับ

#### การแบ่งกลุ่มการศึกษา

การศึกษาในครั้งนี้แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มได้แก่

- กลุ่มที่ 1 ไอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิ ไม่ได้ผ่านการแช่แข็ง (กลุ่มควบคุม) (n = 9)  
 กลุ่มที่ 2 ไอโอไซต์ชนิดพร้อมปฏิสนธิ ไม่ได้ผ่านการแช่แข็ง (กลุ่มควบคุม) (n = 8)  
 กลุ่มที่ 3 ไอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิ ผ่านการแช่แข็ง (กลุ่มทดลอง) (n = 8)  
 กลุ่มที่ 4 ไอโอไซต์ชนิดพร้อมปฏิสนธิ ผ่านการแช่แข็ง (กลุ่มทดลอง) (n = 6)

ตัวอย่างไอโอไซต์สุกรในแต่ละกลุ่มการทดลอง ที่ผ่านขบวนการเตรียมตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว จะนำมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง และภายใต้กล้อง TEM ความต่างศักย์ 100 กิโลโวลต์ (JEM-200CX, JEOL, Japan)

#### ผล

ลักษณะโดยทั่วไปของไอโอไซต์สุกรทั้งชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิภายหลังการแช่แข็งด้วยวิธี ultrarapid freezing เมื่อตรวจสอบเบื้องต้นโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่างไม่พบความผิดปกติใดๆ กับผนัง zona pellucida และเยื่อหุ้มเซลล์ รวมถึงภายในไซโตพลาสซึมของไอโอไซต์ (รูปที่ 1b)

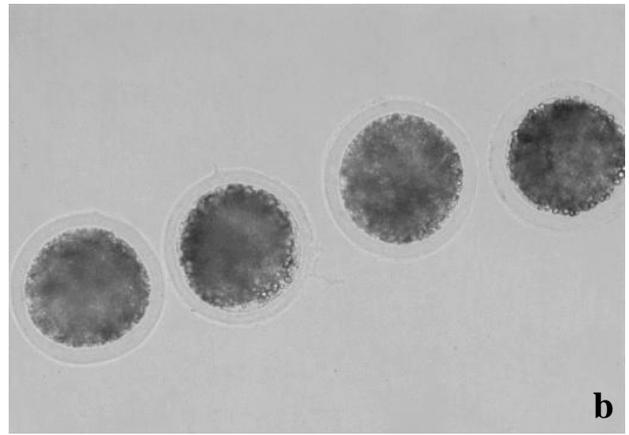
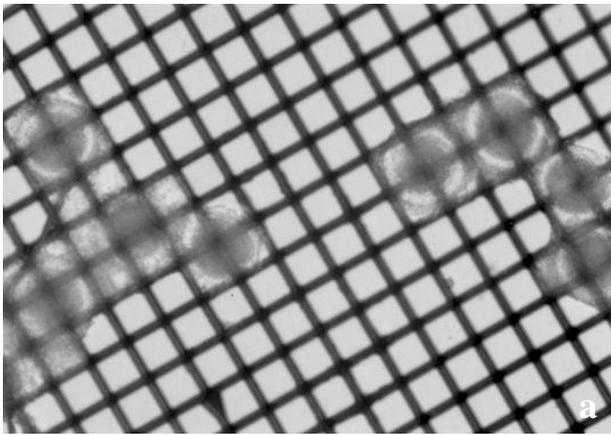
ในกลุ่มไอโอไซต์สุกรชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิที่ไม่ได้ผ่านการแช่แข็ง (กลุ่มควบคุม) เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงผ่าน พบว่าผนังเซลล์ของไอโอไซต์มีลักษณะเรียบมีส่วนของไมโครวิลไลยื่นออกไปโดยรอบ ไอโอไซต์อยู่ภายใน perivitelline space zona pellucida ดิสคิศาจ (electron-lucent) มีความกว้างสม่ำเสมอโดยรอบ (รูปที่ 2) พบไมโทคอนเดรียมีลักษณะกลมหรือรีดิสคิศาจ (electron-dense) ภายในพบแถบสีขาวของ cristae (รูปที่ 3) โดยไมโทคอนเดรียนี้จะกระจายอยู่ทั่วไปในไซโตพลาสซึม (รูปที่ 2 และ 3) พบเม็ดไขมัน (lipid droplets) มีลักษณะแตกต่างกันสองชนิด ชนิดแรกรูปร่างกลม ดิสคิศาจเป็นเนื้อเดียวกันอย่างสม่ำเสมอ (dark and homogenous vesicles) อีกชนิดมีลักษณะกลมขนาดใกล้เคียงกันดิสคิศาจ และมีเส้นใยสีจางปนอยู่แน่น (fibril-contained lipid droplet) (รูปที่ 3) และพบ vesicle ซึ่งมีลักษณะคล้ายช่องว่างอยู่ภายในไซโตพลาสซึม รูปร่างกลมหรือรีมีขนาดแตกต่างกันไป โดยพบเม็ดไขมันทั้งสองลักษณะและ vesicle กระจายทั่วไปในไซโตพลาสซึม (รูปที่ 2 และ 3) นอกจากนี้พบคอร์ติคอล แกรนูลรูปร่างกลมขนาดดิสคิศาจได้ในบางบริเวณของไซโตพลาสซึม (รูปที่ 3)

ในกลุ่มไอโอไซต์สุกรชนิดพร้อมปฏิสนธิที่ไม่ได้ผ่านการแช่แข็ง (กลุ่มควบคุม) เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงผ่าน พบว่าผนังเซลล์ของไอโอไซต์มีลักษณะเรียบ ด้านนอกของผนังเซลล์พบโพลาไรบอดีที่หนึ่ง (the first polar body) ภายใน perivitelline space (รูปที่ 4) zona pellucida ดิสคิศาจมีความกว้างสม่ำเสมอ และพบไมโครวิลไลจำนวนเล็กน้อยอยู่รอบไอโอไซต์ ไมโทคอนเดรียมีลักษณะกลมหรือรีดิสคิศาจหรือสีจางขนาดแตกต่างกันไปจัดเรียงตัวเป็นกลุ่มในบริเวณใกล้กับผนังเซลล์ (รูปที่ 5 และ 6) นอกจากนี้พบคอร์ติคอล แกรนูล มีลักษณะกลมดิสคิศาจขนาดเล็กเป็นจำนวนมาก โดยคอร์ติคอล แกรนูลนี้มีการเรียงตัวกันตามแนวของเยื่อหุ้มเซลล์ทางด้านใน (รูปที่ 5) นอกจากนี้ในไอโอไซต์กลุ่มนี้สามารถพบลักษณะของเม็ดไขมันที่แตกต่างกันสองชนิดได้เช่นเดียวกันกับไอโอไซต์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิที่ไม่ได้ผ่านการแช่แข็ง (รูปที่ 6)

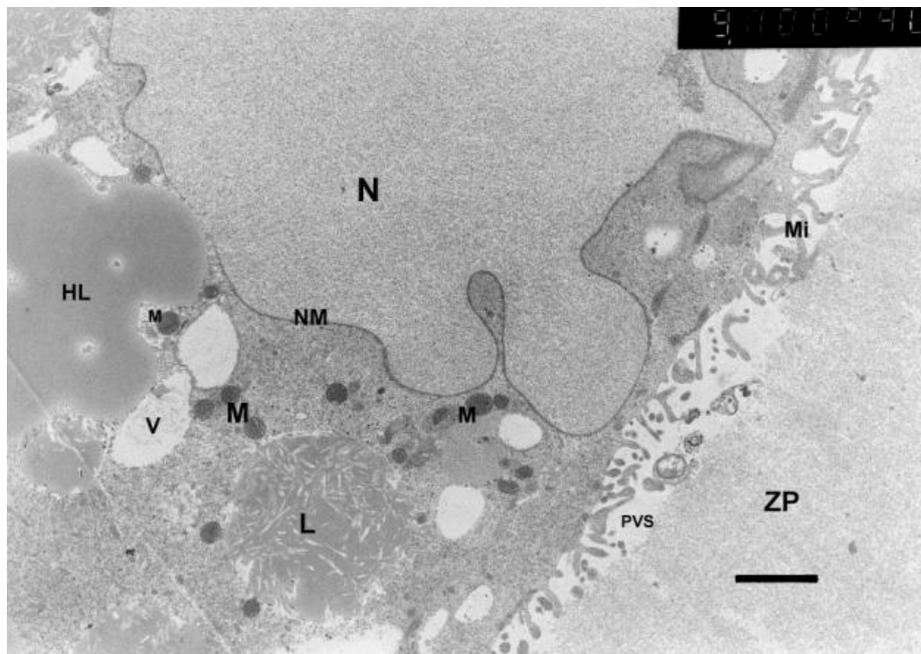
ในกลุ่มไอโอไซต์สุกรชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิภายหลังผ่านการแช่แข็ง (กลุ่มทดลอง) เมื่อศึกษาพบว่าผนังเซลล์ของไอโอไซต์ไม่เรียบ ไม่พบไมโครวิลไลในบริเวณ perivitelline space ส่วน zona pellucida ดิสคิศาจผนังด้านในขอบเขตไม่ชัดเจน และมีความหนาแน่นน้อยกว่าเดิม (รูปที่ 7) ไมโทคอนเดรียกลมดิสคิศาจ ไมโทคอนเดรียจำนวนหนึ่งมี

ลักษณะผิดปกติไปจากเดิม คือ พบลักษณะคล้ายช่องว่าง (vacuolization) ภายใน และการติดสีที่ต่างไปจากเดิม (รูปที่ 8 และ 9) นอกจากนี้ผนัง vesicle ที่อยู่ภายในเซลล์โอโอไซต์กลุ่ม

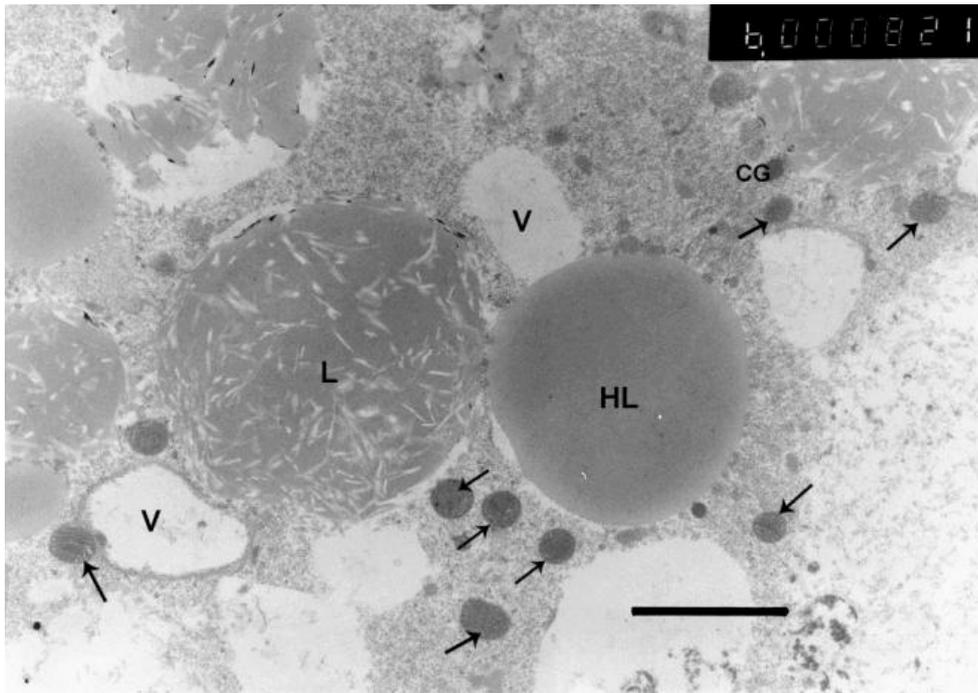
นี้มีรูปร่างผิดปกติไปจากเดิม คือ ลักษณะของผนัง vesicle ไม่เรียบ มีรอยหยักไปมา



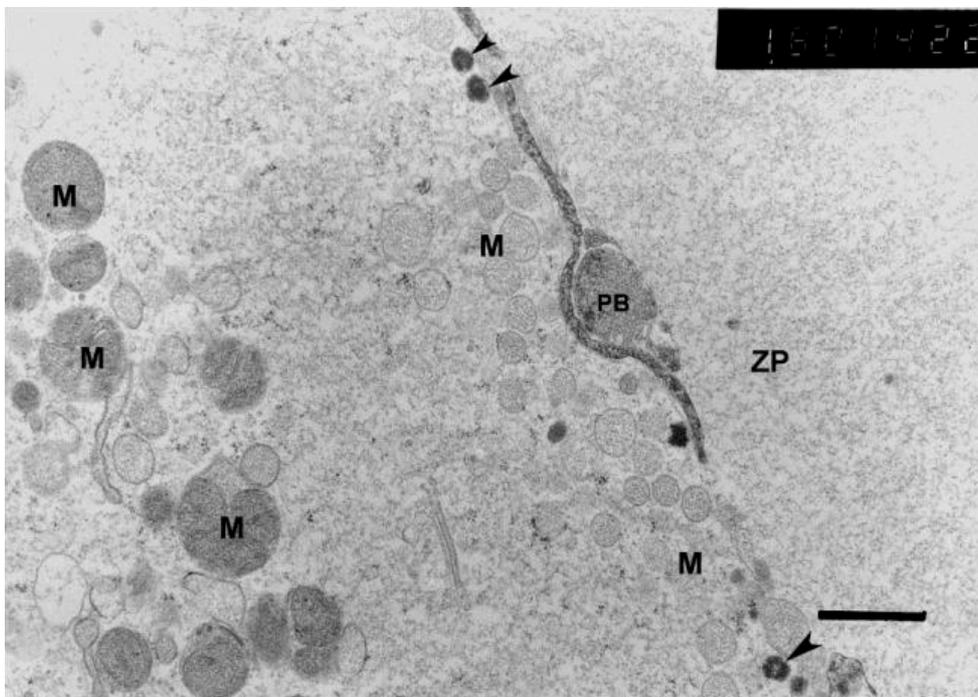
**รูปที่ 1** (a) ภาพแสดงโอโอไซต์สุกรบนแผ่นตะแกรงทองแดงก่อนการแช่แข็ง (X 100)  
(b) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างแสดงโอโอไซต์สุกรที่ผ่านการแช่แข็งและละลาย ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้าง (X 200)



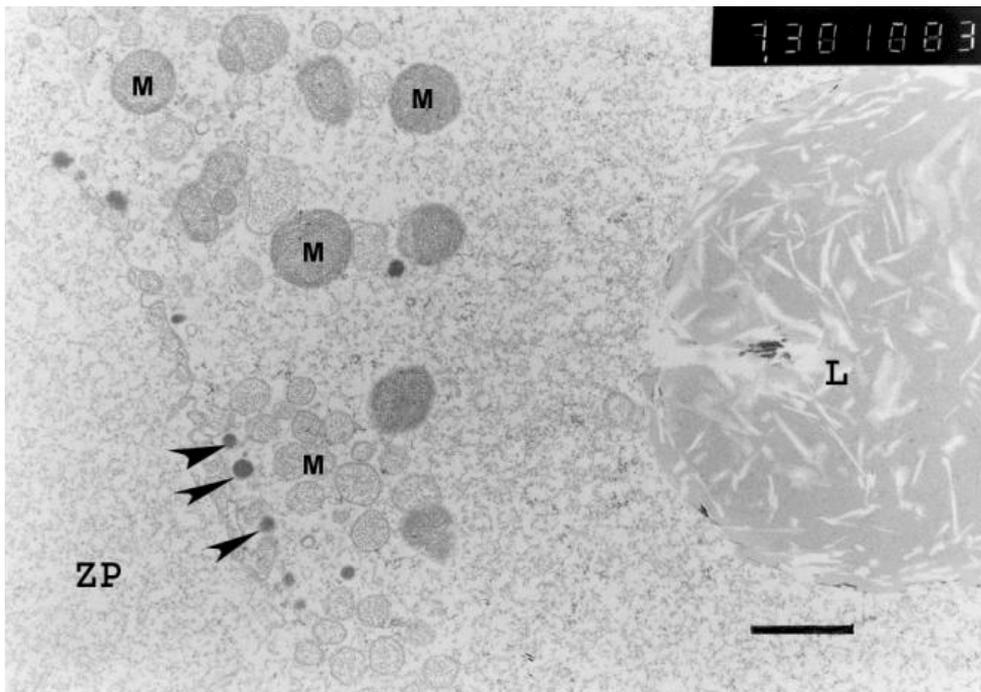
**รูปที่ 2** โอโอไซต์สุกรชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิสุกรที่ไม่ได้ผ่านการแช่แข็ง; นิวเคลียส (N); เยื่อหุ้มนิวเคลียส (NM); zona pellucida (ZP); perivitelline space (PVS); ไมโทคอนเดรีย (M); ไมโครวิลไล (Mi); เม็ดไขมันชนิดที่บลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน (HL); เม็ดไขมันชนิดติดสีไม่สม่ำเสมอ (L); vesicle (V) (Bar = 2  $\mu$ m)



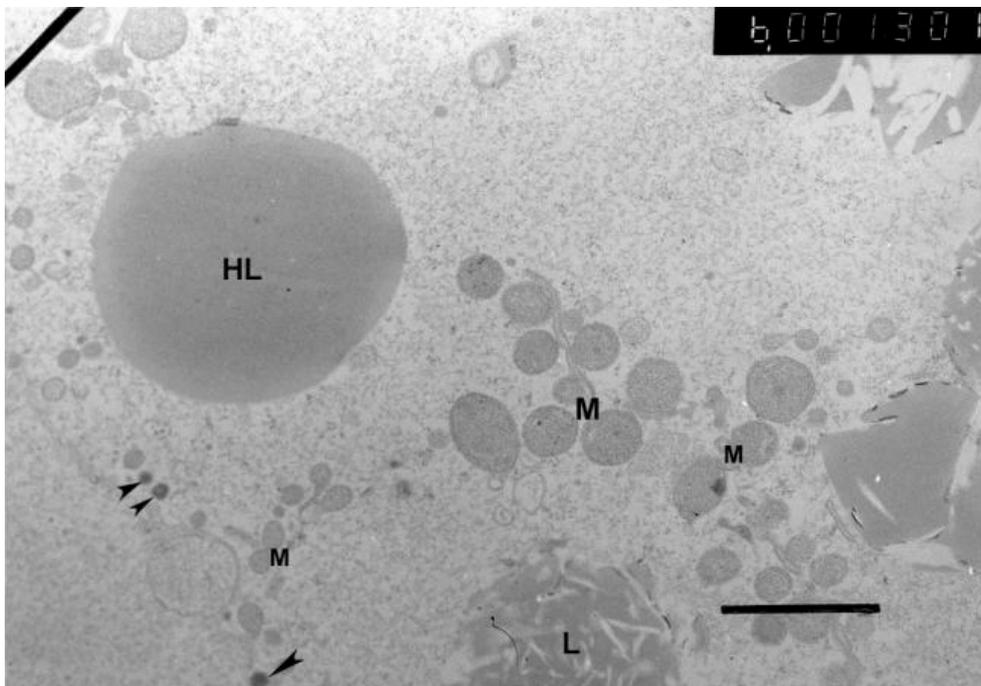
รูปที่ 3 โอโอไซตส์สุกรชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิที่ไม่ได้ผ่านการแช่แข็ง; เม็ดไขมันชนิดที่บดลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน (HL); เม็ดไขมันชนิดเทาดิสที่ไม่สม่ำเสมอ (L); vesicle (V); คอร์ติคอล แกรนูล (CG); ไมโทคอนเดรีย (ลูกศร) (Bar = 2  $\mu$ m)



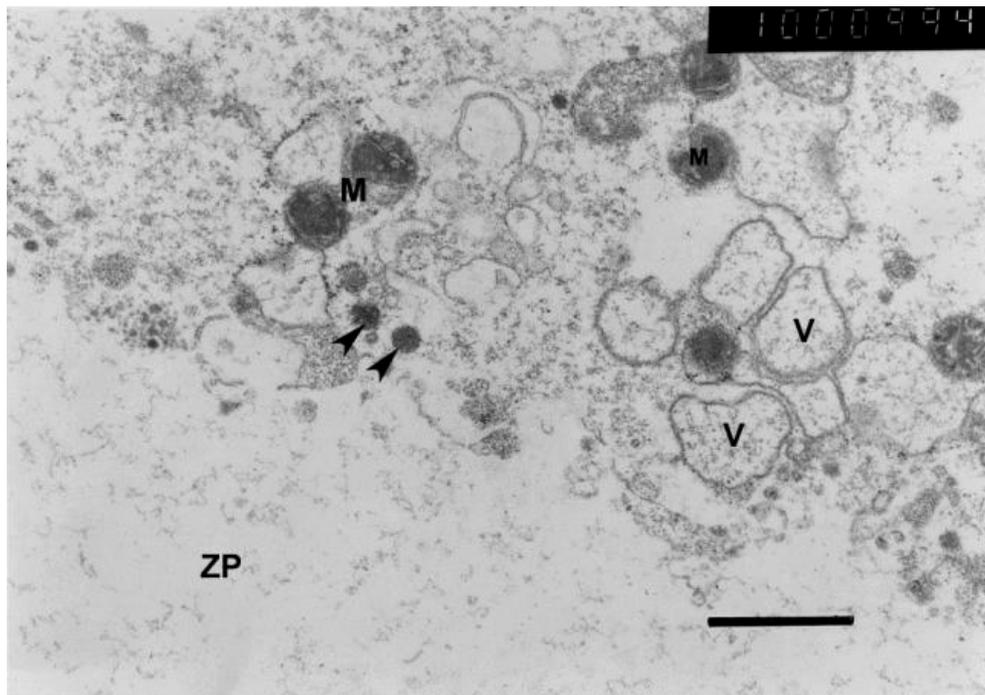
รูปที่ 4 โอโอไซตส์สุกรชนิดพร้อมปฏิสนธิที่ไม่ได้ผ่านการแช่แข็ง; zona pellucida (ZP); โพลาร์บอดีที่หนึ่ง (PB); ไมโทคอนเดรีย (M); คอร์ติคอล แกรนูล (ลูกศร) (Bar = 1  $\mu$ m)



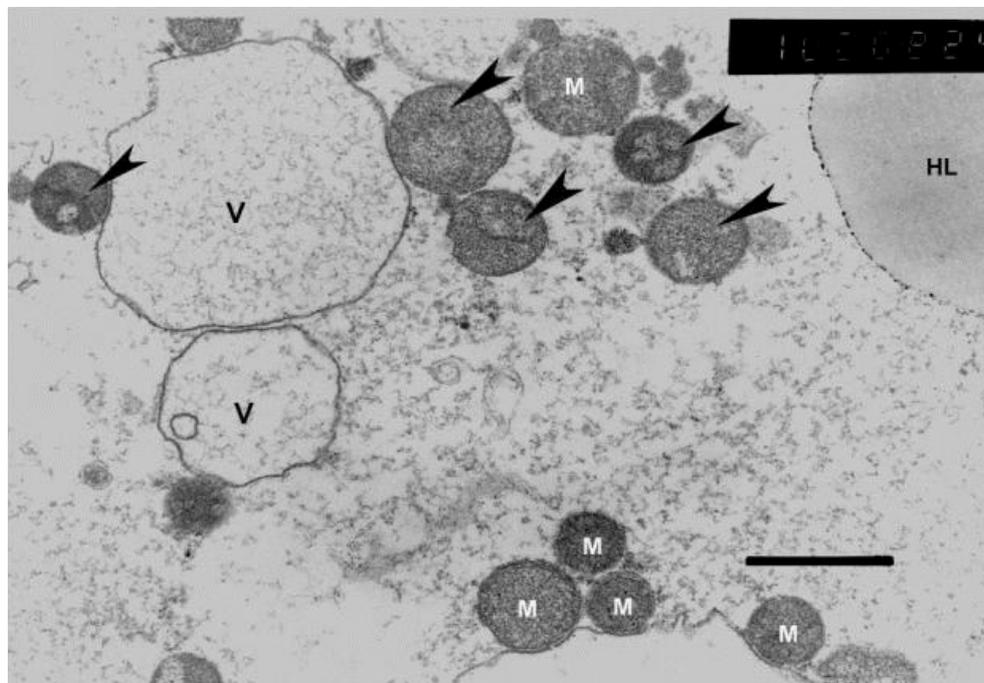
รูปที่ 5 โอโอไซต์สุกรชนิดพร้อมปฏิสนธิที่ไม่ได้ผ่านการแช่แข็ง; zona pellucida (ZP); เม็ดไขมันชนิดเทาดิสีไม่สม่ำเสมอ (L); ไมโทคอนเดรีย (M); คอร์ติคอลล แกรนูล (ลูกศร) (Bar = 1  $\mu$ m)



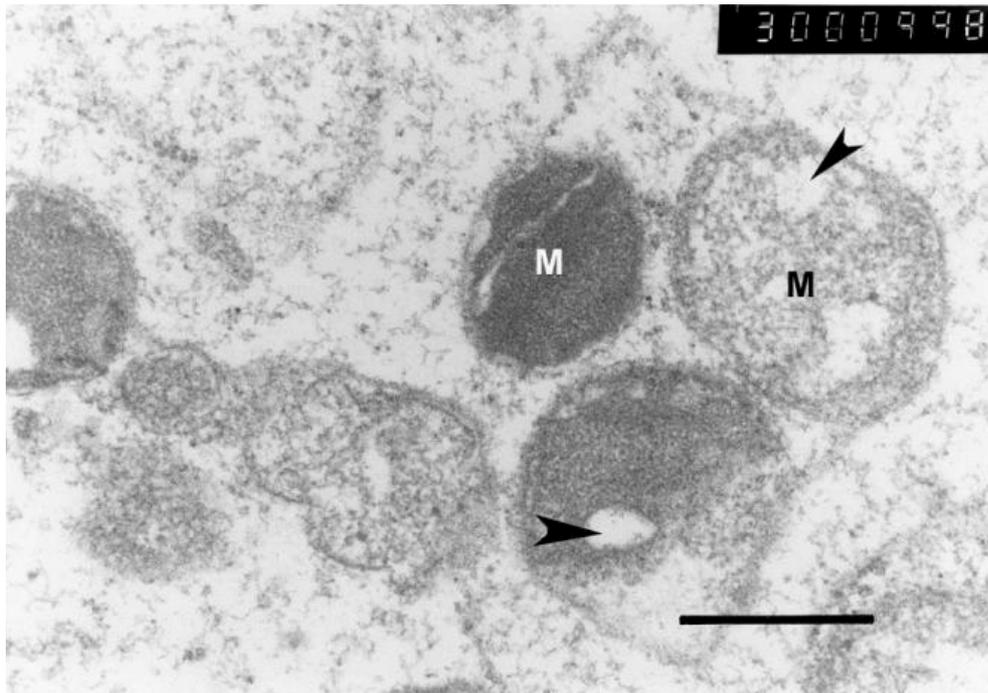
รูปที่ 6 โอโอไซต์สุกรชนิดพร้อมปฏิสนธิที่ไม่ได้ผ่านการแช่แข็ง; เม็ดไขมันชนิดที่บ่งลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน (HL); เม็ดไขมันชนิดเทาดิสีไม่สม่ำเสมอ (L) ไมโทคอนเดรีย (M); คอร์ติคอลล แกรนูล (ลูกศร) (Bar = 2  $\mu$ m)



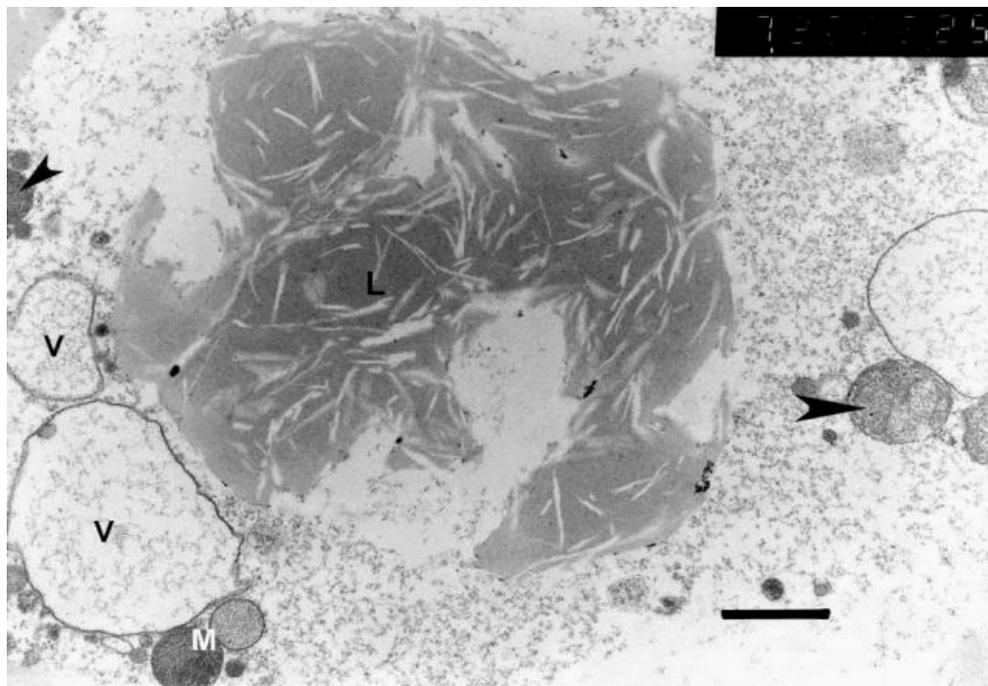
รูปที่ 7 โอโอไซตส์สุกรชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิหลังผ่านการแช่แข็ง พบว่าบางออร์แกเนลมีรูปร่างผิดปกติไป; zona pellucida (ZP); vesicle (V); ไมโทคอนเดรีย (M); คอรัติคอล แกรนูล (ลูกศร) (Bar = 2  $\mu$ m)



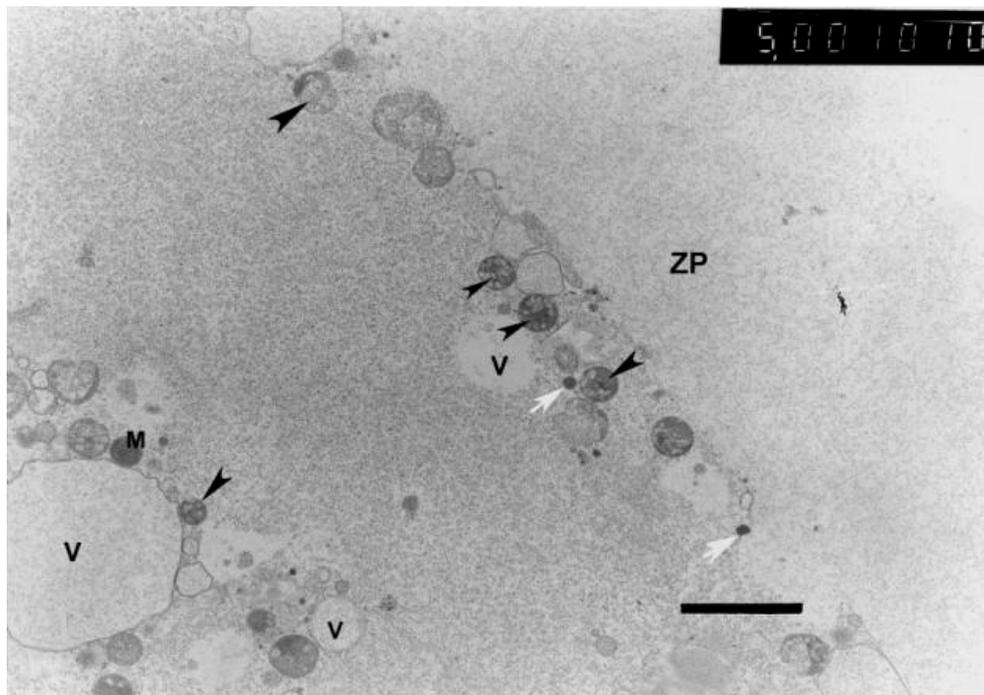
รูปที่ 8 โอโอไซตส์สุกรชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิหลังผ่านการแช่แข็ง; ไมโทคอนเดรียที่ปกติ (M); ไมโทคอนเดรียที่ผิดปกติ พบลักษณะคล้ายช่องว่างอยู่ภายใน (ลูกศร); ผนัง vesicle มีลักษณะบิดเบี้ยวไปจากเดิม (V); เม็ดไขมันชนิดที่บดลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน (HL); (Bar = 1  $\mu$ m)



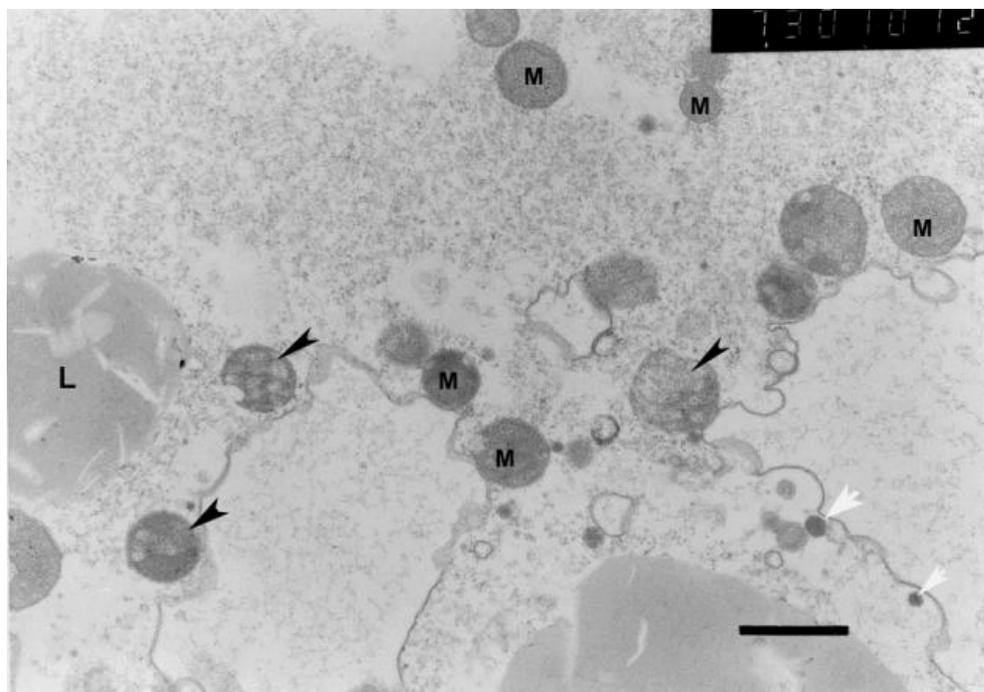
รูปที่ 9 โอโอไซต์สุกรชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิหลังผ่านการแช่แข็ง; ไมโทคอนเดรียที่ผิดปกติ (M) ลูกครีซที่ตำแหน่งช่องว่างภายใน (Bar = 0.5  $\mu\text{m}$ )



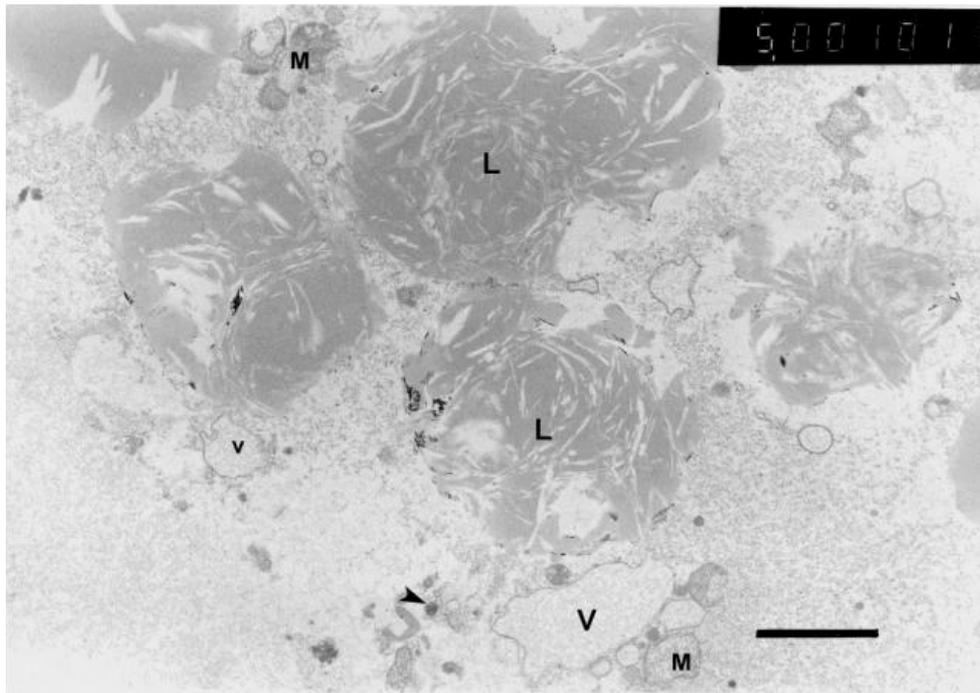
รูปที่ 10 โอโอไซต์สุกรชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิหลังผ่านการแช่แข็ง; ไมโทคอนเดรียที่ผิดปกติ (M); และพบลักษณะคล้ายช่องว่างอยู่ภายใน (ลูกครีซ); ผนัง vesicle มีลักษณะบิดเบี้ยวไป (V); เม็ดไขมันชนิดเทาดิสที่ไม่สม่ำเสมอ เกิดการหลุดหลุดของไขมันบางส่วน (L); (Bar = 1  $\mu\text{m}$ )



รูปที่ 11 โอโอไซต์สุกรชนิดพร้อมปฏิสนธิหลังผ่านการแช่แข็ง; zona pellucida (ZP); ไมโทคอนเดรียที่ปกติ (M); ไมโทคอนเดรียที่ผิดปกติพบ ลักษณะคล้ายช่องว่างอยู่ภายใน (ลูกศรดำ); ผนัง vesicle (V) มีลักษณะบิดเบี้ยวไปจากเดิม; คอรัติคอล แกรนูลปกติ(ลูกศรขาว) (Bar = 2  $\mu$ m)



รูปที่ 12 โอโอไซต์สุกรชนิดพร้อมปฏิสนธิหลังผ่านการแช่แข็ง เม็ดไขมันชนิดเทาคิตส์ไม่สม่ำเสมอ (L); ไมโทคอนเดรียที่ปกติ (M); ไมโทคอนเดรียที่ผิดปกติพบลักษณะคล้ายช่องว่างอยู่ภายใน (ลูกศรดำ); คอรัติคอล แกรนูล (ลูกศรขาว) (Bar = 1  $\mu$ m)



**รูปที่ 13** โอโอไซตฺ์ชนิดสุกรพร้อมปฏิสนธิหลังผ่านการแช่แข็ง ;เม็ดไขมันชนิดเทาคิสีไม่สม่ำเสมอ (L); ไมโทคอนเดรียที่ผิดปกติพบลักษณะคล้ายช่องว่างอยู่ภายใน (M); ผนัง vesicle (V) มีลักษณะบิดเบี้ยวไปจากเดิม; คอร์ติคอล แกรนูล (ลูกศร) (Bar = 1  $\mu$ m)

โดยรอบ (รูปที่ 8 และ 10) ในขณะที่เม็ดไขมันชนิดเทามีการลอกหลุดของเส้นใยบางส่วน (รูปที่ 8 และ 10) รวมถึงคอร์ติคอล แกรนูลมีรูปร่างกลมติดสีเข้มไม่แตกต่างไปจากเดิม (รูปที่ 7) เมื่อเทียบกับโอโอไซตฺ์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิที่ไม่ได้ผ่านการแช่แข็ง

กลุ่มสุดท้ายคือโอโอไซตฺ์สุกรชนิดพร้อมปฏิสนธิภายหลังผ่านการแช่แข็งด้วยวิธี ultrarapid freezing พบว่าผนังเซลล์ของโอโอไซตฺ์ค่อนข้างสม่ำเสมอ ไม่พบไมโครวิลไลในบริเวณ perivitelline space ส่วน zona pellucida ติดสีจางไม่พบการเปลี่ยนแปลงใดๆ แตกต่างไปจากเดิม (รูปที่ 11) พบกลุ่มของไมโทคอนเดรียมีลักษณะกลมติดสีเข้ม และพบช่องว่างภายในไมโทคอนเดรียบางส่วน และมีการติดสีจางลงกว่าเดิม (รูปที่ 11 และ 12) ผนังของเม็ดไขมันและ vesicle มีลักษณะหยักไปมาเช่นเดียวกับโอโอไซตฺ์ชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิที่ผ่านการแช่แข็ง (รูปที่ 12 และ 13 นอกจากนี้สามารถพบคอร์ติคอล แกรนูลตามแนวของผนังหุ้มเซลล์ด้านในเช่นเดิม แต่มีขนาดเล็กลงกว่าไปจากเดิมเมื่อเทียบกับโอโอไซตฺ์ชนิดพร้อมปฏิสนธิที่ไม่ได้ผ่านการแช่แข็ง (รูปที่ 11 และ 12)

### วิจารณ์

การแช่แข็งด้วยเทคนิค ultrarapid freezing เป็นหนึ่งในหลายๆ วิธีที่เหมาะสมสำหรับการแช่แข็ง โอโอไซตฺ์ โดยโอโอไซตฺ์ที่แช่แข็งด้วยเทคนิคนี้จะมีอัตราการเข้าสู่ภาวะพร้อมปฏิสนธิ ความสามารถในการปฏิสนธิ และอัตราการแบ่ง ตัวถึงระยะบลาสโตซิสต์ได้สูงกว่าการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ รวมถึงความเสียหายที่เกิดขึ้นกับออร์แกเนลภายในเซลล์ลดน้อยลง ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากปริมาณ และระยะเวลาในการสัมผัสกับสารป้องกันการแช่แข็งที่ใช้ลดลงจากเดิม (Martino et al., 1996) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโอโอไซตฺ์ นอกเหนือจากข้างต้นอันได้แก่ ความเป็นพิษของสารป้องกันการแช่แข็ง ความเสียหายที่เกิดจากความเย็น การบวมที่เกิดจากความดันออสโมติก และความเหนียวของเซลล์ก็มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นด้วย ซึ่งเทคนิค ultrarapid freezing นี้สามารถทำได้ง่าย สะดวกรวดเร็ว ไม่ต้องใช้อุปกรณ์มากนัก รวมถึงได้ประสิทธิภาพในการเก็บรักษาโอโอไซตฺ์ และตัวอ่อนอยู่ในระดับสูง (Park et al., 1999; Vajta, 2000)

จากผลการศึกษาที่ผ่านมาถึงการเปลี่ยนแปลงในระดับโครงสร้างของออร์แกนภายในโอโอไซต์ เมื่อใช้เทคนิคการแช่แข็งโอโอไซต์ที่แตกต่างกันไป ผลที่ได้จะมีความแตกต่างกันออกไปด้วยเช่นกัน โดย Schmidt และคณะ (1995) ได้ใช้เทคนิคการแช่แข็งโดยลดอุณหภูมิลงช้าๆ (slow freezing) หรือ Hyttel และคณะ (2000) ใช้เทคนิคที่เรียกว่า “open pulled straw” ในการแช่แข็งโอโอไซต์โค ผลที่ได้พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ vesicle ขนาดเล็ก เกิดความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์และคอร์ติคอล แกรนูลภายในมีการจัดเรียงตัวเป็นกลุ่มรวมถึงมีการเสื่อมสลายเกิดขึ้น ในขณะที่บางรายงานได้กล่าวถึงความเสียหายที่เกิดขึ้นของไมโครวิลไล ไมโทคอนเดรีย vesicle และผนังหุ้มเซลล์ (Fuku et al., 1995<sup>ab</sup>) จากรายงานที่ผ่านมาที่สอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ คือ มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นกับออร์แกนภายในโอโอไซต์ทั้งสองระยะ และการเปลี่ยนแปลงของออร์แกนภายในโอโอไซต์ทั้งสองระยะเป็นไปในลักษณะใกล้เคียงกัน พร้อมทั้งมีการเปลี่ยนแปลงของ zona pellucida ด้วย การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไมโทคอนเดรีย vesicle ไมโครวิลไล รวมถึงผนังหุ้มเซลล์โอโอไซต์อาจเป็นผลมาจากความเสียหายที่เกิดขึ้นเนื่องจากความเย็น (chilling injury) ในขณะลดอุณหภูมิลง (Shaw et al., 2000; Ledda et al., 2001)

เมื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับไมโทคอนเดรียภายในโอโอไซต์แช่แข็งทั้งสองระยะนั้น พบว่าไมโทคอนเดรียมีลักษณะบวมขึ้น รวมถึงการเกิดลักษณะของช่องว่างภายในไมโทคอนเดรีย (Fuku et al., 1995<sup>ab</sup>; Schmidt et al., 1995; Hochi et al., 1996) เป็นตัวบ่งชี้ได้ว่าไมโทคอนเดรียเป็นออร์แกนที่มีความไวสูงต่อการเปลี่ยนแปลงเมื่อผ่านการแช่แข็ง เนื่องจากผนังหุ้มด้านนอกของไมโทคอนเดรียยอมให้มีการผ่านเข้าออกของน้ำที่อยู่ภายในเซลล์ในระหว่างการละลายและการเจือจาง (Hochi et al., 1996)

คอร์ติคอล แกรนูลเป็นออร์แกนที่ทำหน้าที่ในการป้องกันการปฏิสนธิของตัวอสุจิในขณะที่เกิดการปฏิสนธิ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นทั้งในด้านจำนวน หรือรูปร่างลักษณะที่เกิดขึ้นกับคอร์ติคอล แกรนูลนั้นจะไปมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงต่อ zona pellucida โดยจะไปมีผลทำให้ผนัง zona pellucida มีความหนาขึ้นและทำให้อัตราการปฏิสนธิลดลง (Carroll et al., 1990; Vincent et al., 1990; Fuku et al., 1995<sup>a</sup>) การเปลี่ยนแปลงของคอร์ติคอล แกรนูลนั้นนอกจากการลดอุณหภูมิจะมีผลแล้ว สารป้องกันการแช่แข็งก็สามารถ

เหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงได้เช่นเดียวกันพบว่าโอโอไซต์ของโคที่สัมผัสกับสารป้องกันการแช่แข็งชนิดที่แตกต่างกันออกไป จะเหนี่ยวนำให้คอร์ติคอลแกรนูลเกิดการเจริญที่ไม่สมบูรณ์ ทำให้ความสามารถในการปฏิสนธิของตัวอสุจิ และอัตราการพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนลดลง (Vincent et al., 1990; Fuku et al., 1995<sup>b</sup>) แต่จากการศึกษาในครั้งนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของคอร์ติคอล แกรนูลแต่อย่างใด

เมื่อดูไขมันภายในโอโอไซต์สุกสามารถพบได้ 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดแรกรูปร่างกลม ดิสคัสเป็นเนื้อเดียวกันอย่างสม่ำเสมอ และอีกชนิดมีลักษณะกลมขนาดใกล้เคียงกันดิสคัสเทา และมีเส้นใยสีจางปนอยู่แน่น ซึ่งเมื่อดูไขมันทั้งสองนี้ใช้สำหรับเป็นแหล่งพลังงานรวมถึงเป็นส่วนประกอบที่สำคัญสำหรับการสร้างและเจริญของเยื่อหุ้มเซลล์หลังจากมีการปฏิสนธิ รวมถึงการพัฒนาของตัวอ่อนต่อไป (Isachenko et al., 1998) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้สามารถพบลักษณะของเมื่อดูไขมันได้สองชนิดเช่นเดียวกัน โดยพบว่าเมื่อดูไขมันชนิดเทามีการหลุดลอกของเส้นใยที่อยู่ภายในบางบริเวณ ในขณะที่เมื่อดูไขมันอีกชนิดไม่มีการเปลี่ยนแปลงใดเกิดขึ้น ซึ่งผลที่ได้นี้ก็คล้ายคลึงกับรายงานของ Isachenko และคณะ (2001) ที่ได้ศึกษาในโอโอไซต์สุกที่พบว่าเมื่อดูไขมันชนิดเทาเปลี่ยนเป็นลักษณะรีและลักษณะการดิสคัสของเส้นใยที่อยู่ภายในจางลงภายหลังการแช่แข็งด้วยวิธี vitrification

เซลล์คิวมูลัส และเซลล์โครมาที่อยู่ล้อมรอบโอโอไซต์มีส่วนช่วยให้โอโอไซต์เกิดการเจริญพร้อมปฏิสนธิและช่วยเพิ่มความสามารถในการปฏิสนธิของตัวอสุจิ (Chian et al., 1995; Tanghe et al., 2003) ในการแช่แข็งโอโอไซต์ถ้าเลือกโอโอไซต์ชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบหลายชั้นมาแช่แข็งพบว่าอัตราการรอดของโอโอไซต์ภายหลังการละลายจะสูงกว่าโอโอไซต์ที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบ (Pellicer et al., 1988) ซึ่งเซลล์คิวมูลัสเหล่านี้จะลดความเร็วในการผ่านเข้าออกของสารป้องกันการแช่แข็งทั้งในช่วงก่อนการแช่แข็งและการละลาย (Hyttel et al., 2000) ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการลอกเซลล์คิวมูลัสที่อยู่รอบนอกออกไป เพื่อให้สารป้องกันการแช่แข็งมีความสามารถในการผ่านเข้าออกจากเซลล์ทั้งในช่วงก่อนการแช่แข็ง และการละลายได้เร็วขึ้นซึ่งมีผลทำให้ความเป็นพิษของสารป้องกันการแช่แข็งมีอันตรายต่อเซลล์น้อยลง (Hyttel et al., 2000) อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติสามารถเตรียม โอโอไซต์ทั้งชนิดที่มีเซลล์คิวมูลัสหรือไม่มีเซลล์คิวมูลัสก็ได้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการศึกษา

สารป้องกันการแช่แข็งเป็นสารที่ช่วยป้องกันการทำลายของเซลล์โอโอไซต์ หรือตัวอ่อน ขณะลดอุณหภูมิลงรวมไปถึงขณะที่เก็บลงในไนโตรเจนเหลว สารป้องกันการแช่แข็งมีมากมายหลายชนิดเช่น ethylene glycol, propylene glycol, glycerol และ dimethyl sulphoxide (DMSO) ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ได้เลือกใช้ ethylene glycol ความเข้มข้น 5 M เป็นสารป้องกันการแช่แข็งโอโอไซต์สุกร ซึ่งมีรายงานถึงผลที่ได้จากการใช้สารป้องกันการแช่แข็งชนิดนี้เมื่อศึกษาในเบื้องต้นถึงอัตราการเจริญไปเป็นระยะพร้อมปฏิสนธิที่ระยะ metaphase II ได้มากที่สุดที่ความเข้มข้นระดับนี้ (อนุชา และคณะ, 2002) นอกจากนี้ ethylene glycol เป็นสารป้องกันการแช่แข็งที่มีความเป็นพิษน้อยกว่าสารป้องกันการแช่แข็งตัวอื่นเมื่อใช้ที่ระดับความเข้มข้นสูง (Bautista and Kanagawa, 1998) แต่มีบางรายงานที่ได้กล่าวถึงความเป็นพิษของ ethylene glycol (Hotamisligil et al., 1996) ที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อ zona pellucida และทำให้เกิดการรั่วไหลของไซโตพลาสซึมอย่างไรก็ตามการแช่แข็งด้วยเทคนิค ultrarapid freezing นี้โอโอไซต์มีการสัมผัสกับสารป้องกันการแช่แข็งในปริมาณที่น้อย และใช้เวลาในการสัมผัสกับสารป้องกันการแช่แข็งสั้นมาก (Martino et al., 1996) ethylene glycol จึงไม่น่าจะมีผลต่อโอโอไซต์มากนัก

### สรุป

จากการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่าการแช่แข็งด้วยเทคนิค ultrarapid freezing นี้มีผลกระทบต่อเปลี่ยนแปลงในระดับโครงสร้างของออร์แกเนลภายในไซโตพลาสซึมของโอโอไซต์สุกรทั้งชนิดไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิในลักษณะเดียวกัน และการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ที่เกิดขึ้นไม่มีความแตกต่างจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงภายหลังการแช่แข็งด้วยเทคนิคอื่นๆ อย่างไรก็ตามเทคนิค ultrarapid freezing เป็นเทคนิคที่สามารถทำได้ง่าย สะดวกรวดเร็ว ไม่ต้องใช้อุปกรณ์และความชำนาญมาก รวมถึงมีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาโอโอไซต์ได้ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการเก็บรักษาพันธุ์กรรมสัตว์ โดยเฉพาะสัตว์หายากหรือใกล้สูญพันธุ์ต่อไป

### กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาในครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยฯ จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปี พ.ศ. 2546

### เอกสารอ้างอิง

มงคล เตชะกำพูน วันเพ็ญ ศรีอนันต์ จินดา สิงห์ล่อ และวิชัย ทันทศุการักษ์ 1993 (2536) การผลิตตัวอ่อนสุกรด้วยวิธีการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย เวชสารสัตวแพทย์ 23(3): 189-199.

อดิสร อดิเรกถาวร มงคล เตชะกำพูน สุดสรร ศิริไวทยพงศ์ และสาโรช งามขำ 2001 (2544) การใช้โอโอไซต์ชนิดสดแช่สารละลายเกลือ และแช่แข็งที่ยังไม่พร้อมปฏิสนธิ และพร้อมปฏิสนธิเพื่อตรวจสอบความสามารถในการเจาะผ่านของตัวอสุจิเพื่อสุกร เวชสารสัตวแพทย์ 31(1): 29-42.

อนุชา สรณรงค์ อภิลิทธิ กิจถาวรรัตน์ รัฐพงศ์ รัตนะภุมมะ นวเพ็ญ ภูติกนิษฐ์ มงคล เตชะกำพูน และวันเพ็ญ อุดุลยานภาพ 2002 (2545) ผลของความเข้มข้นของสารเอทีลินไกลคอลต่อการแช่แข็งโอโอไซต์สุกรด้วยวิธี ultrarapid freezing เวชสารสัตวแพทย์ 32(1): 25-34

Aigner, S., Van der Elst, J., Siebzehnruhl, E., Wildt, L., Lang, N. and Van steirteghem, A.C. 1992. The influence of slow and ultra-rapid freezing on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte. Hum. Reprod. 7: 857-864.

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: 183-191.

Carroll J., Depypere, H., Matthews, C.D. 1990. Freeze-thaw induced changes of the zona pellucida explain decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocyte. J. Reprod. Fertil. 90: 547-553.

Chian, R.C., Okuda, K. and Niwa, K. 1995. Influence of cumulus cells on *in vitro* fertilization of bovine oocytes derived from *in vitro* maturation. Anim. Reprod. Sci. 38: 37-48.

Fuku, E., Xia, L. and Downey, B.R. 1995<sup>a</sup>. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. Cryobiology 32: 139-156.

Fuku, E., Liu, J. and Downey, B.R. 1995<sup>b</sup>. *In vitro* viability and ultrastructural changes in bovine oocytes treated with a vitrification solution. Mol. Reprod. Dev. 40: 177-175.

Hochi, S., Kozawa, M., Fujimoto, T., Hondo, E., Yamada, J. and Oguri, N. 1996. *In vitro* maturation and transmission electron microscopic observation

- of horse oocytes after vitrification. *Cryobiology* 33: 300-310.
- Hochi, S., Terao, T., Kamei, M., Kato, M., Hirabayashi, M. and Hirao, M. 2004. Successful vitrification of pronuclear-stage rabbit zygotes by minimum volume cooling procedure. *Theriogenology* 61: 267-275.
- Hotamisligil, S., Toner, M. and Douglas, P.R. 1996. Changes in membrane integrity, cytoskeletal structure, and developmental potential of murine oocytes after vitrification with ethylene glycol. *Biol. Reprod.* 55: 161-168.
- Hyttel, P., Vajta, G. and Callesen, H. 2000. Vitrification of bovine oocytes with the open pulled straw method: ultrastructural consequences. *Mol. Reprod. Dev.* 56: 80-88.
- Isachenko, V., Soler, C., Isachenko, E., Perez-Sanchez, F. and Grishchenko, V. 1998. Vitrification of immature porcine oocytes: Effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant. *Cryobiology* 36: 250-253.
- Isachenko, V., Isachenko, E., Michelmann, H.W., Alabart, J.L., Vazquez, I., Bezugly, N. and Nawroth, F. 2001. Lipolysis and ultrastructural changes of intracellular lipid vesicles after cooling of bovine and porcine GV-oocytes. *Anat. Histol. Embryol.* 30: 333-338.
- Kong, I.K., Lee, S.I., Cho, S.G., Cho, S.K. and Park, C.S. 2000. Comparison of open pulled straw (OPS) vitrification vs glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. *Theriogenology* 53: 1817-1826.
- Ledda, S., Leoni, G., Bogliolo, L. and Naitana, S. 2001. Oocyte cryopreservation and ovarian tissue banking. *Theriogenology* 55: 1359-1371.
- 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.
- Matsumoto, H., Jiang, J.Y., Tanaka, T., Sasada, H. and Sato, E. 2001. Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology* 42: 139-144.
- Niemann, H. 1991. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: Current status and research needs. *Theriogenology* 35: 109-124.
- 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. *Hum.Reprod.* 14: 2838-2843.
- Parks, J.E. and Ruffing, N.A. 1992. Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes. *Theriogenology* 37: 59-73.
- Pellicer, A., Lightman, A., Parmer, T.G., Behrman, H.R. and de Cherney, A.H. 1988. Morphologic and functional studies of immature rat oocyte-cumulus complexes after cryopreservation. *Fertil. Steril.* 50: 805-810.
- Shaw, J.M., Oranratnachai, A. and Trounson, A.O. 2000. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology* 53: 59-72.
- Shmidt, M., Hyttel, P., Avery, B. and Greve, T. 1995. Ultrastructure of in vitro matured bovine oocytes after controlled freezing in 10% glycerol. *Anim. Reprod. Sci.* 37: 281-290.
- Tanghe, S., Van Soom, A., Mehrzad, J., Maes, D., Duchateau, L. and de Kruif, A. 2003. Cumulus contributions during bovine fertilization *in vitro*. *Theriogenology* 60: 135-149.
- Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, M., Booth, P.J., Jacobsen, H., Greve, T. and Callesen, H. 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryo. *Mol. Reprod. Dev.* 51: 53-58.
- Vajta, G. 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 357-364.
- Vincent, C., Pickering, S.J. and Johnson, M. 1990. The hardening effect of dimethylsulphoxide on the mouse zona pellucida requires the presence of an oocyte and is associated with a reduction in the number of cortical granules present. *J. Reprod. Fertil.* 89: 253-259.
- Wu, J., Zhang, L. and Wang, X. 2001. *In vitro* maturation, fertilization and embryo development after ultrarapid freezing of immature human oocytes. *Reproduction* 121: 389-393.