# เทคนิคการเก็บรักษาคัพภะโคเย็นจัดอย่างรวดเร็ว

นุสสรา วัฒนกุล* วินิจ คำสัง*
พรรณพิไล เสกสิทธิ์* ปาริฉัตร สุขโต*

## บทคัดย่อ

ศึกษาการเก็บรักษาคัพภะโคเย็นจัดอย่างรวดเร็วโดยไม่ต้องใช้เครื่องมือแช่แข็ง แต่จะทำให้เกิดสภาวะ vitrification ของ cryoprotective agent บริเวณที่บรรจุคัพภะอยู่ในหลอด น้ำยาที่ใช้ในการเก็บรักษาคัพภะเย็นจัด (vitrification solution) มี 3 ประเภท ซึ่งประกอบด้วย glycerol, ethylene glycol, sucrose และ dextrose ในสัดส่วนที่แตกต่างกันไป และมี equilibration time ของคัพภะในน้ำยาแต่ละชนิดที่แตกต่างกันไปด้วย ผลการศึกษาพบว่าคัพภะโคทุกระยะมีอัตราการรอดชีวิตสูงทั้งในวัน thaw และหลังการเพาะเลี้ยงต่อไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งในคัพภะระยะ compact morula ($p<0.05$) นอกจากนี้ เทคนิคนี้ยังมีขั้นตอนในการปฏิบัติงานที่ง่ายและใช้เวลาเพียงไม่เกิน 15 นาที จึงน่าจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้เก็บรักษาคัพภะโคในท้องที่ได้

คำสำคัญ : การเก็บรักษาคัพภะเย็นจัด คัพภะโค เทคนิครวดเร็ว

* กองผสมเทียม กรมปศุสัตว์ ถนนพญาไท กรุงเทพฯ

## บทนำ

การเก็บรักษาคัพภะโคหลังการชะล้างออกจากแม่โคตัวให้ (Donor) เพื่อให้คัพภะยังคงคุณภาพที่ดีอยู่ได้เป็นระยะเวลานาน และสามารถถ่ายฝากให้โคตัวรับโดยยังให้อัตราการตั้งท้องที่น่าพอใจนั้น โดยปกติแล้วจะต้องเก็บรักษาโดยวิธีการแช่แข็งเย็นจัด (deep freezing) โดยจำเป็นต้องใช้เครื่องมือแช่แข็ง (freezing machine) ซึ่งมีราคาแพงเป็นเครื่องมือหลัก เนื่องจากจำเป็นต้องมีการลดอุณหภูมิลงอย่างช้า ๆ (slow cooling) จนถึง seeding point แล้วจึงทำให้เกิด crystallization หลังจากนั้นจึงค่อย ๆ ลดอุณหภูมิต่อไปอย่างช้า ๆ อีกจนถึงประมาณ -25 °C ถึง -38 °C แล้วจึงจะนำลงแช่ในไนโตรเจนเหลวได้ เทคนิคนี้จึงใช้เวลาค่อนข้างนาน และไม่สะดวกในการปฏิบัติงานในท้องที่ จึงได้มีผู้พยายามศึกษาหาวิธีที่ง่ายขึ้น โดยใช้เครื่องมือและเวลาให้น้อยที่สุด เทคนิค Quick freezing โดยการแช่แข็งคัพภะในไอของไนโตรเจนเหลวระยะหนึ่งก่อน แล้วจึงนำลงแช่ในไนโตรเจนเหลวภายหลัง เป็นวิธีหนึ่งที่มีผู้ศึกษาอย่างกว้างขวาง แต่ผลที่ได้รับยังไม่ค่อยสม่ำเสมอ ทั้งยังมีขั้นตอนในการปฏิบัติงานที่ไม่สะดวกนัก (Chupin, 1986; Chupin, 1987; Szell and Shelton, 1986; Takahashi and Kanagawa, 1988) ต่อมามีผู้ศึกษาวิธีการเก็บรักษาคัพภะอย่างรวดเร็ว (Ultrarapid cryopreservative technique) โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือแช่แข็ง เรียกว่าวิธี Vitrification ซึ่งสามารถทำได้ในเวลาอันรวดเร็ว เนื่องจากสามารถตัดขั้นตอนของการลดอุณหภูมิลงอย่างช้า ๆ และขั้นตอนการ seeding ออกไป โดยไม่จำเป็นต้องทำให้เกิดสภาวะเกล็ดน้ำแข็ง แต่จะทำให้สาร cryoprotectant ที่ใช้เก็บรักษาคัพภะอยู่นั้นเกิดสภาวะ solidification แทน อันเนื่องมาจากความหนืดที่เพิ่มสูงขึ้นมากในอุณหภูมิที่เย็นจัด และการที่ไม่เกิดสภาวะเกล็ดน้ำแข็ง นี้ยังมีข้อดี คือจะช่วยลดอัตราการเสียหายของคัพภะอันเนื่องมาจากการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ของคัพภะได้ ในระยะแรกได้มีผู้ทดลองใช้เทคนิค vitrification นี้ในการเก็บรักษาอวัยวะต่าง ๆ พบว่าได้ผลดี (Fahy et al., 1984, Takahashi et al., 1986) ต่อมาจึงได้มีการศึกษาในคัพภะของหนู (Rall and Fahy, 1985, Rall et al., 1985, Robertson et al., 1989, Kasai et al., 1990, Kasai et. al., 1992, Miyake et al., 1993) และพัฒนา ต่อมาในคัพภะของโค (Massip et al., 1987, Van der Zwalmen et al., 1989, Dobrinsky et al., 1991, Kuwayama et al., 1992, Yang et al., 1992, Ishimori et al., 1993, Saito et al., 1994) โดยใช้ cryoprotective agent ที่แตกต่างกันไป เพื่อศึกษาให้ได้ชนิดและสัดส่วนของ cryoprotective agent ที่มีอันตราย (toxic) ต่อเซลล์ของคัพภะให้น้อยที่สุด โดยในแต่ละการศึกษาก็มีข้อจำกัดและให้ผลที่แตกต่างกันไปในคัพภะของโคแต่ละระยะ และส่วนใหญ่มักเป็นการศึกษาใน IVF bovine ecbryo โดยการศึกษาที่น่าสนใจที่สุดคือการศึกษาของ Saito et al. (1994) ซึ่งพบว่าได้ผลดีใน IVF bovine embryo ทุกระยะ และยังมีขั้นตอนในการปฏิบัติงานที่ง่ายและใช้เวลาสั้น แต่ยังไม่มีการศึกษาใน *in vivo* embryo

เนื่องจากในประเทศไทย การนำเทคนิค vitrification มาใช้ในการเก็บรักษาคัพภะโคเย็นจัดยังไม่ค่อยแพร่หลายในทางปฏิบัตินัก การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ทราบถึงผลของการเก็บรักษาคัพภะโค (*in vivo* embryo) ด้วยวิธี vitrification โดยใช้เทคนิคเดียวกับ Saito et al. (1994) โดยจะศึกษาถึงอัตราการรอดของคัพภะหลังจากการทำละลาย และศึกษาว่าคัพภะสามารถจะเจริญต่อไปได้หรือไม่โดยเพาะเลี้ยงต่อไปในหลอดทดลอง เพื่อให้ทราบถึงความเป็นไปได้ในการเก็บรักษาคัพภะโคด้วยเทคนิคนี้ในสภาวะแวดล้อมของประเทศไทย อันจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปใช้ปฏิบัติงานในท้องที่ เพื่อให้สามารถเก็บรักษาคัพภะได้สะดวกรวดเร็ว และ

ประหยัดมากขึ้น

## อุปกรณ์และวิธีการ

ชะล้างคัพภะอายุ 7 วัน ออกจากแม่โคตัวให้ (donor) ซึ่งได้รับการกระตุ้นให้มีการตกไข่หลายใบพร้อมกัน (superovulation) ด้วยวิธีเดียวกับ นุสสราและคณะ (2538) คัดเลือกเฉพาะคัพภะที่มีคุณภาพดี (grade A) และคุณภาพปานกลาง (grade B) มาทำการศึกษา โดยแบ่งกลุ่มคัพภะเหล่านี้ตามระยะการเจริญเติบโต (embryonic stage) และคุณภาพ (quality) ของคัพภะ กล่าวคือ ระยะ compact morula, early blastocyst, expanding blastocyst และ expanded blastocyst โดยในแต่ละกลุ่มจะมีคัพภะ 30 ใบ ถ่ายรูปคัพภะสดแต่ละใบไว้ก่อน แล้วจึงนำมาเก็บรักษา (cryopreservation) ด้วยวิธี vitrification (Saito et al., 1994) น้ำยาที่ใช้ในการเก็บรักษาคัพภะ (vitrification solution) มี 3 ชนิด ซึ่งมีองค์ประกอบและความเข้มข้นที่แตกต่างกันไป และ equilibration time ของคัพภะในน้ำยาแต่ละชนิดจะเป็น 5 นาที, 5 นาที และ 1 นาที ตามลำดับ (ตาราง 1) หลังจากถ่ายคัพภะลงในน้ำยาชนิดที่ 3 แล้ว จะบรรจุคัพภะแต่ละใบลงในหลอดบรรจุคัพภะขนาด 0.25 มล. ซึ่งมีน้ำยาสำหรับทำละลายคัพภะ (sucrose 1/2 M) บรรจุอยู่แล้วในหลอดส่วนหนึ่งตามวิธีของ Saito และคณะ (1994) แล้วปิดปากหลอดบรรจุคัพภะทั้ง 2 ด้านด้วยความร้อน แล้วแช่ลงในไนโตรเจนเหลวทันที หลังการเก็บรักษาคัพภะไว้ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 เดือน นำคัพภะแต่ละหลอดมาอุ่นในน้ำอุ่น (20 °C) เป็นเวลา 10 วินาที แล้วถ่ายคัพภะนั้นลงในน้ำยา thaw 2 ชนิด คือ sucrose 1/2 M และ sucrose 1/4 M ชนิดละ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (≤28 °C) หลังจากนั้นล้างคัพภะในน้ำยา Dulbecco's phosphate buffered saline* ซึ่งมีโปรตีน 20% 2 ครั้ง แล้วตรวจดูการมีชีวิตรอดของคัพภะแต่ละใบหลังการ thaw ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดอินเวอร์ตกำลัง ขยาย 400 เท่า โดยตรวจดูลักษณะเซลล์ที่มีชีวิต เซลล์ฝ่อ เซลล์ตาย ตลอดจนขนาดและสีของคัพภะที่เปลี่ยน แปลงไป รวมทั้งความผิดปกติอื่นๆ ด้วย แล้วถ่ายรูปไว้เปรียบเทียบกับรูปของคัพภะสดก่อน vitrification หลังจากนั้นถ่ายคัพภะแต่ละใบลงในน้ำยาเพาะเลี้ยงคัพภะชนิด TCM 199* ซึ่งมีโปรตีน 20% แล้วนำไปเพาะเลี้ยงไว้ในตู้เพาะเลี้ยงชนิดบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ (37 °C, 5% $CO_2$) เป็นเวลา 120 ชม. โดยจะศึกษาการรอดชีวิตของคัพภะทุก 24 ชม. ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดอินเวอร์ต และถ่ายรูปไว้เปรียบเทียบกับรูปคัพภะสดก่อน vitrification แล้วบันทึกจำนวนคัพภะที่รอดชีวิตในแต่ละระยะไว้ โดยจะแบ่งเป็น 3 กลุ่มคือ จำนวนคัพภะที่ยังมีเซลล์ที่มีชีวิตเท่าเดิมเหมือนก่อน vitrification จำนวนคัพภะที่มีเซลล์ที่มีชีวิตลดลงแต่ยัง ≥50% (อยู่ในเกณฑ์ที่ถือว่ายังสามารถถ่ายฝากให้โคตัวรับได้) และจำนวนคัพภะที่มีเซลล์ที่มีชีวิตเหลือน้อยกว่า 50% (อยู่ในเกณฑ์ที่ไม่สามารถถ่ายฝากให้โคตัวรับได้

* Gibco Laboratories, Life Technologies, Inc., Grand Island, N.Y.

**ตาราง 1 องค์ประกอบของน้ำยา vitrification solution**

| ชนิดของน้ำยา vitrification solution | Glycerol (%) | Ethylene glycol (%) | Sucrose (M) | Dextrose (M) |
|---|---|---|---|---|
| น้ำยาชนิดที่ 1 | 10 | - | 1/8 | 1/8 |
| น้ำยาชนิดที่ 2 | 10 | 10 | 1/4 | 1/4 |
| น้ำยาชนิดที่ 3 | 20 | 20 | 3/8 | 3/8 |

## ผลและวิจารณ์

การรอดชีวิตของคัพภะระยะต่างๆ ในวันที่ Thaw และหลังการเพาะเลี้ยงที่ชั่วโมงต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2 ถึง 7

**ตารางที่ 2 อัตราการรอดชีวิตของคัพภะระยะต่างๆ ในวันที่ Thaw**

| ชนิดของคัพภะ | | จำนวนคัพภะที่ศึกษา (ใบ) | คัพภะที่ยังมีเซลมีชีวิตเท่าเดิมเหมือนก่อน vitrification (%) | คัพภะที่มีเซลมีชีวิตลดลงแต่ยังเหลือ ≥ 50% (%) | คัพภะที่มีเซลมีชีวิตลดลงเหลือ < 50% (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| ชนิด | คุณภาพ | | | | |
| Compact morula | ดี | 30 | $100^{NS}$ | - | - |
| | ปานกลาง | 30 | $100^{NS}$ | - | - |
| Erly Blastocyst | ดี | 30 | $83.33^{NS}$ | 16.67 | - |
| | ปานกลาง | 30 | $80^{NS}$ | 20 | - |
| Wxpanding Blastocyst | ดี | 30 | $86.67^{NS}$ | 13.33 | - |
| | ปานกลาง | 30 | $83.33^{NS}$ | 16.67 | - |
| Expanded Blastocyst | ดี | 30 | $76.67^{NS}$ | 23.33 | - |
| | ปานกลาง | 30 | $70^{NS}$ | 30 | - |

NS = ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 3 อัตราการรอดชีวิตของคัพภะระยะต่างๆ หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

| ชนิดของคัพภะ | | จำนวนคัพภะ | คัพภะที่ยังมีเซลมีชีวิต | คัพภะที่มีเซลมีชีวิต | คัพภะที่มีเซลมีชีวิต |
|---|---|---|---|---|---|
| ชนิด | คุณภาพ | ที่ศึกษา | เท่าเดิมเหมือนก่อน Vitrification | ลดลงแต่ยังเหลือ ≥ 50% | ลดลงเหลือ < 50% |
| | | (ใบ) | (%) | (%) | (%) |
| Compact morula | ดี | 30 | 73.33[a] | 26.67 | - |
| | ปานกลาง | 30 | 43.33[bc] | 56.67 | - |
| Erly Blastocyst | ดี | 30 | 26.67[b] | 73.33 | - |
| | ปานกลาง | 30 | 6.67[bd] | 83.33 | 10 |
| Expanding Blastocyst | ดี | 30 | 40[bc] | 60 | - |
| | ปานกลาง | 30 | 30[bc] | 70 | - |
| Expanded Blastocyst | ดี | 30 | 26.67[b] | 73.33 | - |
| | ปานกลาง | 30 | 23.33[b] | 76.67 | - |

a และ b แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

c และ d แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 4 อัตราการรอดชีวิตของคัพภะระยะต่างๆ หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

| ชนิดของคัพภะ | | จำนวนคัพภะ | คัพภะที่ยังมีเซลมีชีวิต | คัพภะที่มีเซลมีชีวิต | คัพภะที่มีเซลมีชีวิต |
|---|---|---|---|---|---|
| ชนิด | คุณภาพ | ที่ศึกษา | เท่าเดิมเหมือนก่อน Vitrification | ลดลงแต่ยังเหลือ ≥ 50% | ลดลงเหลือ < 50% |
| | | (ใบ) | (%) | (%) | (%) |
| Compact morula | ดี | 30 | 73.33[a] | 26.67 | - |
| | ปานกลาง | 30 | 16.67[b] | 83.33 | - |
| Erly Blastocyst | ดี | 30 | 26.67[b] | 73.33 | - |
| | ปานกลาง | 30 | - | 90 | 10 |
| Expanding Blastocyst | ดี | 30 | 40[b] | 60 | - |
| | ปานกลาง | 30 | 20[b] | 73.33 | 6.67 |
| Expanded Blastocyst | ดี | 30 | 20[b] | 80 | - |
| | ปานกลาง | 30 | 16.67[b] | 83.33 | - |

a และ b แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

**ตารางที่ 5 อัตราการรอดชีวิตของคัพภะระยะต่างๆ หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง**

| ชนิดของคัพภะ | | จำนวนคัพภะ | คัพภะที่ยังมีเซลมีชีวิตเท่าเดิมเหมือนก่อน Vitrification | คัพภะที่มีเซลมีชีวิตลดลงแต่ยังเหลือ ≥ 50% | คัพภะที่มีเซลมีชีวิตลดลงเหลือ < 50% |
|---|---|---|---|---|---|
| ชนิด | คุณภาพ | ที่ศึกษา (ใบ) | (%) | (%) | (%) |
| Compact morula | ดี | 30 | 73.33[a] | 26.67 | - |
| | ปานกลาง | 30 | 16.67[b] | 83.33 | - |
| Erly Blastocyst | ดี | 30 | 26.67[b] | 73.33 | - |
| | ปานกลาง | 30 | - | 60 | 40 |
| Expanding Blastocyst | ดี | 30 | 26.67[b] | 73.33 | - |
| | ปานกลาง | 30 | 13.33[b] | 60 | 26.67 |
| Expanded Blastocyst | ดี | 30 | 20[b] | 60 | 20 |
| | ปานกลาง | 30 | 13.33[b] | 66.67 | 20 |

a และ b แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

**ตารางที่ 6 อัตราการรอดชีวิตของคัพภะระยะต่างๆ หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง**

| ชนิดของคัพภะ | | จำนวนคัพภะ | คัพภะที่ยังมีเซลมีชีวิตเท่าเดิมเหมือนก่อน Vitrification | คัพภะที่มีเซลมีชีวิตลดลงแต่ยังเหลือ ≥ 50% | คัพภะที่มีเซลมีชีวิตลดลงเหลือ < 50% |
|---|---|---|---|---|---|
| ชนิด | คุณภาพ | ที่ศึกษา (ใบ) | (%) | (%) | (%) |
| Compact morula | ดี | 30 | 73.33[a] | 26.67 | - |
| | ปานกลาง | 30 | 16.67[b] | 70 | 13.33 |
| Erly Blastocyst | ดี | 30 | 20[b] | 80 | - |
| | ปานกลาง | 30 | - | 46.67 | 53.33 |
| Expanding Blastocyst | ดี | 30 | 13.33[b] | 73.33 | 13.33 |
| | ปานกลาง | 30 | 6.67[b] | 56.67 | 36.67 |
| Expanded Blastocyst | ดี | 30 | 10[b] | 70 | 20 |
| | ปานกลาง | 30 | 10[b] | 66.67 | 23.33 |

a และ b แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 7 อัตราการรอดชีวิตของคัพภะระยะต่างๆ หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 120 ชั่วโมง

| ชนิดของคัพภะ | | จำนวนคัพภะ | คัพภะที่ยังมีเซลมีชีวิต | คัพภะที่มีเซลมีชีวิต | คัพภะที่มีเซลมีชีวิต |
|---|---|---|---|---|---|
| ชนิด | คุณภาพ | ที่ศึกษา | เท่าเดิมเหมือนก่อน Vitrification | ลดลงแต่ยังเหลือ ≥ 50% | ลดลงเหลือ < 50% |
| | | (ใบ) | (%) | (%) | (%) |
| Compact morula | ดี | 30 | 50[a] | 50 | - |
| | ปานกลาง | 30 | 16.67[b] | 43.33 | 40 |
| Erly Blastocyst | ดี | 30 | - | 90 | 10 |
| | ปานกลาง | 30 | - | 46.67 | 53.33 |
| Expanding Blastocyst | ดี | 30 | 13.33[b] | 73.33 | 13.33 |
| | ปานกลาง | 30 | 3.33[b] | 56.67 | 40 |
| Expanded Blastocyst | ดี | 30 | 6.67[b] | 60 | 33.33 |
| | ปานกลาง | 30 | 6.67[b] | 66.67 | 26.67 |

a และ b แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่า ในวันที่ทำละลายคัพภะทุกระยะมีอัตราการรอดชีวิตสูง ที่สามารถถ่ายฝากให้โคตัวรับได้ทั้งหมด โดยทุกๆ ระยะของคัพภะมีคุณภาพใกล้เคียงกัน โดยไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า คัพภะระยะ compact morula ทั้งที่มีคุณภาพดีและคุณภาพปานกลาง จะไม่มีจำนวนคัพภะที่มีเซลล์ที่มีชีวิตลดลงเลย จนเมื่อเพาะเลี้ยงไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่า จำนวน compact morula ที่คุณภาพดีจะมีเซลล์ที่มีชีวิตสูงเมื่อเทียบกับคัพภะระยะ early blastocyst, expanding และ expanded blastocyst อย่างมีนัย สำคัญ ($p<0.05$) โดยที่ early blastocyst ที่มีคุณภาพปานกลาง มีอัตราการตายสูงขึ้น โดยมีจำนวนของคัพภะที่มีเซลล์ที่มีชีวิตเหลือน้อยกว่า 50% เป็นจำนวนถึง 10% (ตาราง 3)

เมื่อเพาะเลี้ยงไปจนถึงชั่วโมงที่ 48 จะเห็นว่า compact morula ที่มีคุณภาพดียังคงมีเซลล์ที่มีชีวิตรอดสูงกว่าคัพภะระยะอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4) ในขณะที่คัพภะระยะอื่นๆ ไม่แตกต่างกัน จนเมื่อเพาะเลี้ยงมาจนถึงชั่วโมงที่ 72, 96 และ 120 พบว่าให้ผลในทำนองเดียวกับชั่วโมงที่ 48 โดยที่ในชั่วโมงที่ 72 นั้น จำนวนของคัพภะระยะ early blastocyst ชนิดคุณภาพปานกลางที่มีเซลล์ที่มีชีวิตเหลือน้อนกว่า 50% จะเพิ่มจำนวนมากขึ้นถึง 40% เช่นเดียวกับ expanding และ expanded blastocyst ชนิดคุณภาพปานกลาง ซึ่งมีคัพภะที่มีเซลล์ที่มีชีวิตน้อยกว่า 50% เป็น 26.67 และ 20% ตามลำดับ และจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงนานขึ้น (ตาราง 6, 7) แต่ทั้งนี้ไม่มีเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะไปในทางที่ผิดปกติเลย นอกจากเซลล์ฝ่อลงเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้น ซึ่งเป็นสภาวะปกติของการเพาะเลี้ยงนอกร่างกายสัตว์ (*in vitro* culture) แต่ในระยะ 48 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยงจะเห็นว่า คัพภะส่วนใหญ่ยังมีเซลล์ที่มีชีวิตเหลืออยู่มาก และเซลล์มีลักษณะปกติดี

แสดงว่าการเก็บรักษาคัพภะด้วยเทคนิคนี้ไม่มีผลเสียต่อการเจริญของคัพภะ โดยคัพภะยังมีอัตราการรอดสูงมากในวันทำละลาย และยังมีเซลล์ที่มีชีวิตรอดสูงแม้จะเพาะเลี้ยงต่อไปภายนอกร่างกายสัตว์โดยไม่มีความผิดปกติของรูปร่าง ลักษณะของเซลล์ของคัพภะ หรือทำให้เซลล์ของคัพภะตายมากกว่าปกติเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปเลย ซึ่งตรงกับการศึกษา ใน IVF embryo โดย Saito et al. (1994) ซึ่งใช้เทคนิคเดียวกันนี้ แต่ใช้สาร ß-mercaptoethanol ซึ่งเป็นสารที่ช่วยกระตุ้นการเจริญและการแบ่งตัวของเซลล์ (mitogenic agent) เข้ามาร่วมในอาหารเลี้ยงคัพภะเพื่อเพาะเลี้ยงต่อไปหลังการทำละลาย และพบว่าคัพภะมีอัตราการรอดสูงเช่นเดียวกัน ในขณะที่การศึกษาอื่นๆ ที่เก็บรักษาคัพภะด้วยวิธี vitrification จะใช้น้ำยา (vitification solution) ที่ต่างกันไป และให้ผลที่แตกต่างกันไปในคัพภะแต่ละระยะด้วย น้ำยาที่มีผู้ศึกษาไว้มากได้แก่ glycerol และ propylene glycol (Massip et al., 1986, Scheffen et al., 1986, Van der Zwalmen et al., 1989, Douchi et al., 1990) ซึ่งพบว่าจะใช้ได้ผลดีในคัพภะโครระยะ morula ถึงระยะ early blastocyst เท่านั้น แต่จะให้อัตราการรอดต่ำในคัพภะระยะ blastocyst โดยเฉพาะใน in vivo blastocyst จะไม่สามารถรอดชีวิตได้ (Kuwayama et al., 1992) ในขณะที่ Yang et al. (1992) ทดลองใช้น้ำยาซึ่งประกอบด้วย glyderol และ ethylene glycol โดยศึกษาใน IVF embryo ระยะ expanded blastocyst พบว่าให้อัตราการรอดสูง แต่ Saito et al. (1994) ทดลองใช้น้ำยาชนิดเดียวกันนี้ใน IVF embryo ระยะ early และ expanding blastocyst พบว่าให้ผลไม่ดี ในขณะที่การศึกษาของ Ishimori et al. (1993) ทดลองใช้ ethylene glycol และ dimethylsulfoxide (DMSO) พบว่าให้ผลดีเช่นเดียวกันใน IVF ecbryo และ Tachikawa et al. (1993) ทดลองใช้น้ำยาหลายชนิดรวมกันได้แก่ ethylene glycol, glycerol และ propylene glycol ร่วมกับ ficoll และ sucrose พบว่าให้ผลดีเช่นเดียวกันใน IVF blastocyst

จะเห็นได้ว่า การใช้เทคนิคจากการศึกษานี้ในการเก็บรักษาคัพภะของโค จะให้ผลดีกับคัพภะทุกระยะ ทั้งใน *in vivo* และ IVF embryo โดยคัพภะมีอัตราการรอดสูงทั้งในวันที่ทำละลาย และหลังการเพาะเลี้ยงต่อไป โดยไม่มีเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปในทางที่ผิดปกติใดๆ นอกจากนี้เทคนิคนี้ยังสามารถทำได้ง่าย ประหยัดและใช้เวลาสั้นเพียงไม่เกิน 15 นาที ซึ่งนับว่าเป็นเทคนิคที่ดีเมื่อเทียบกับเทคนิคอื่นๆ ซึ่งอาจมีข้อจำกัดบางประการที่แตกต่างกันไป อย่างไรก็ดีการศึกษาโดยถ่ายฝากคัพภะที่เก็บรักษาด้วยเทคนิคดังกล่าวนี้ให้แก่โคตัวรับ ก็เป็นเรื่องจำเป็นที่จะต้อง ศึกษาต่อไป เพื่อให้ทราบว่าเทคนิคนี้สามารถให้อัตราการตั้งท้องเช่นไรในสภาวะแวดล้อมของประเทศไทย

## สรุป

จากการศึกษานี้จะบ่งชี้ได้ว่า น่าจะสามารถนำเทคนิคนี้มาใช้ในการเก็บรักษาคัพภะโคในท้องที่สภาวะแวดล้อมของประเทศไทยได้ เพื่อช่วยลดค่าใช้จ่ายและเวลาในการผลิตคัพภะเย็นจัดให้น้อยลงอันจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อเกษตรกรในประเทศ

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ นายสัตวแพทย์สัมพันธ์ สิงหจันทร์ ผู้เชี่ยวชาญพิเศษฯ กรมปศุสัตว์ และ Dr. N. Saito, JICA expert ที่ช่วยกรุณาให้การสนับสนุนและคำปรึกษาในการศึกษานี้เป็นอย่างดียิ่ง และขอขอบคุณสัตวแพทย์บุญชู ศรีสุข ที่ช่วยเหลือในการศึกษานี้เป็นอย่างดี

## เอกสารอ้างอิง


นุสสรา วัฒนกุล, ปาริฉัตร สุขโต, พรรณพิไล เสกสิทธิ์, วินิจ คำสังข์, ภาณุพันธ์ พงษ์เพ็ง, และบุญชู ศรีสุข 2538 การผลิตลูกโคนมจากตัวอ่อนครึ่งใบ สัตวแพทยสาร 46(3): 11-25.

Chupin, D. 1986. Quick freezing of bovine blastocysts. Theriogenology 25: 147-155.

Chupin, D. 1987. Quick freezing of day 7 bovine blastocysts: Optimum parameters of dehydration step. Theriogenology 27: 219-223.

Dobrinsky, J.R., Hess, F,F., Duby, R.T. and Rob, J.M. 1991. Cryopreservation of bovine embryos by vitrification. Theriogenology 35: 194-198.

Douchi O., Takakura, H., Imai., K. 1990. Transfer of bovine embryos cryopreserved by vitrification. Jpn. J. Anim. Reprod. 36: 69-72

Fahy, G.M., Mac Farlane, D.R., Angell, C.A. and Meryman, H.T. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. Cryobiology 21: 407-426.

Ishimori, H., Saeki, K., Inai, M., Itasaka, J., Miki, Y., Nozaki, N., Seike, N. and Kainuma, H. 1993. Direct transfer of vitrified bovine embryos. Theriogenology 39: 238. (Abstr).

Kasai, M., Komi, J.H., Takakamo, A., Tsudera, H., Sakurai, T. and Machida, T. 1990. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viabiliby. J. Reprod. Fert. 89: 91-97.

Kasai, M., Nishimori, M., Zhu, S.E., Sakurai, T. and Machida, T. 1992. Survival of mouse morulae vitrified in an ethylene glycol-based solution after exposure to the solution at various temperatures. Biology of Reproduction 47: 1134-1139.

Kuwayama, M., Hamano, S., Nagai, T. 1992. Vitrification of bovine blastocysts obtained by in vitro culture of oocytes matured and ferfilized in vitro. J. Reprod. Fert. 96: 187-193.

Massip, A., Van Der Zwalmen, P. and Ectors, F. 1987. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. Theriogenology 27: 69-79.

Massip, A., Van Der Zwalmen, P., Scheffen, B. and Ectors, F. 1986. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. Cryo-Letters 7: 270-273.

Miyake, T., Kasai, M., Zhu, S.E., Sakurai, T. and 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.

Rall, W.F. and Fahy, G.M. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 °C by vitrification. Nature 313: 573-575.

Rall, W.F., Wood, M.J. and Kirby, C. 1985. In vivo development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. Cryobiology 22: 603 (Abstr.)

Robertson, J.L., Minhas, B.S., Randall, G.W., Dodson, M.G., Palmer, T.V. and Ricker, D.D. 1989. Ultrarapid freezing of mouse embryo with DMSO and trehalose. Theriogenology 31: 250-256.

Saito, N., Imai, K. and Tomizawa, M. 1994. Effect of sugars-addition on the survival of bovine blastocysts produced in vitro. Theriogenology 41: 1053-1060.

Scheffen, B., Van Der Zwalmen, P. and Massip, A. 1986. A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. Cryo-Letters. 7: 260-269.

Szell, A. and Shelton, J.N. 1986. Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. J. Reprod. Fert. 76: 401-408.

Tachikawa, S., Otoi, T., Kondo, S., Machida, T., Kasai, M. 1993. Successful vitrification of bovine blastocysts, derived by in vitro maturation and fertilization. Molecular Reproduction and Development 34: 266-271.

Takahashi, T., Hirsh, A., Erbe, E.F., Bross, J.B., Steere, R.L. and Williams, R.J. 1986. Vitrification of Human monocytes. Cryobiology 23: 103-115.

Takahashi, Y. and Kanagawa, H. 1988. The role of lactose in quick freezing of mousee embryos. Theriogenology 29: 215-318.

Van Der Zwalman, P., Touati, K., Ectors, F.J., Massip, A., Beckers J.F., Ectors, F. 1989. Vitrification of bovine blastocysts. Theriogenology 31: 270 (Abstr.)

Yang, N.S., Lu, K.H., Gordon, I., Polge, C. 1992. Vitrification of blastocysts produced *in vitro*. Theriogenology 37: 326. (Abstr).

# An Ultratapid Technique for Cryopreservation of Bovine Embryo

**Nussara Vadhanakul*** **Vinit Kumsung***
**Panpilai Sekasiddhi*** **Parishat Sukkhato***

## Abstract

An ultrarapid technique for cryopreservation of in vivo bovine embryo without using a freezing machine was studied. This technique is based on vitrification of cryoprotective agent that preserves embryo in a ministraw. Three types of vitrification solution containing different proportion of glycerol, ethylene glycol, sucrose and dextrose were used. Equilibration time of embryosin each solution was also different. The results showed that the survival rate of every stages of embryo was quite high on the day of thawing and further culture, especially for compact morula ($p<0.05$). In addition, this technique is easily operated and takes only less than 15 minutes. This can be very much useful for cryopreservation of bovine embryo under field condition.

**Key words** : Cryopreservation of embryo, vitrification, bovine embryo, ultrarapid technique

* Division of Artificial Insemination, Department of Livestock Development, Pyathai Road, Bangkok.