บทที่ 3
ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและข้อวิจารณ์

3.1 การแช่แข็งโอโอไซท์เพื่อผลิตตัวอ่อนโดยวิธีปฏิสนธิในหลอดแก้ว

ผลการทดลองดังกล่าวได้ถูกนำไปตีพิมพ์แล้วในวารสาร Journal of Reproduction and Development

Sripunya N, Somfai T, Inaba Y, Nagai T, Imai K, Parnpai R. 2010. A comparison of cryotop and solid surface vitrification methods for the cryopreservation of in vitro matured bovine oocytes. **J Reprod Dev.** 56:176-181.

จากการทดลองดังกล่าว สามารถสรุปได้ดังนี้ เมื่อนำโอโอไซท์โคที่แช่แข็งด้วยวิธี Cryotop และ solid surface vitrification (SSV) มาทำละลายพบว่าอัตรารอดหลังการทำละลายไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม เมื่อนำโอโอไซท์แช่แข็งที่มีชีวิตรอดไปทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว พบว่าอัตราการปฏิสนธิ การเกิด pronuclear และ monospermy ไม่แตกต่างกันในกลุ่มการทดลอง อย่างไรก็ตามอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนที่ได้จากโอโอไซท์แช่แข็งด้วยวิธี Cryotop และ SSV มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อัตราการเจริญสู่ระยะบลาสโตซีสของตัวอ่อนที่ได้จากโอโอไซท์แช่แข็งด้วยวิธี Cryotop และ SSV ไม่มีความแตกต่างกันแต่มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพิจารณาคุณภาพของบลาสโตซีสที่ได้ในแง่ของจำนวน inner cell mass, trophectoderm และเซลล์ทั้งหมด พบว่าคุณภาพของตัวอ่อนไม่มีความแตกต่างกันในทุกกลุ่มการทดลอง กล่าวโดยสรุปคือ การแช่แข็งโอโอไซท์โคด้วยวิธี Cryotop และ SSV มีอัตรารอดชีวิตหลังการทำละลายสูง อีกทั้งโอโอไซท์ยังสามารถเจริญสู่จนถึงระยะบลาสโตซีสหลังการทำปฏิสนธิในหลอดแก้วได้

3.2 การแช่แข็งโอโอไซท์เพื่อผลิตตัวอ่อนโดยโคลนนิ่ง

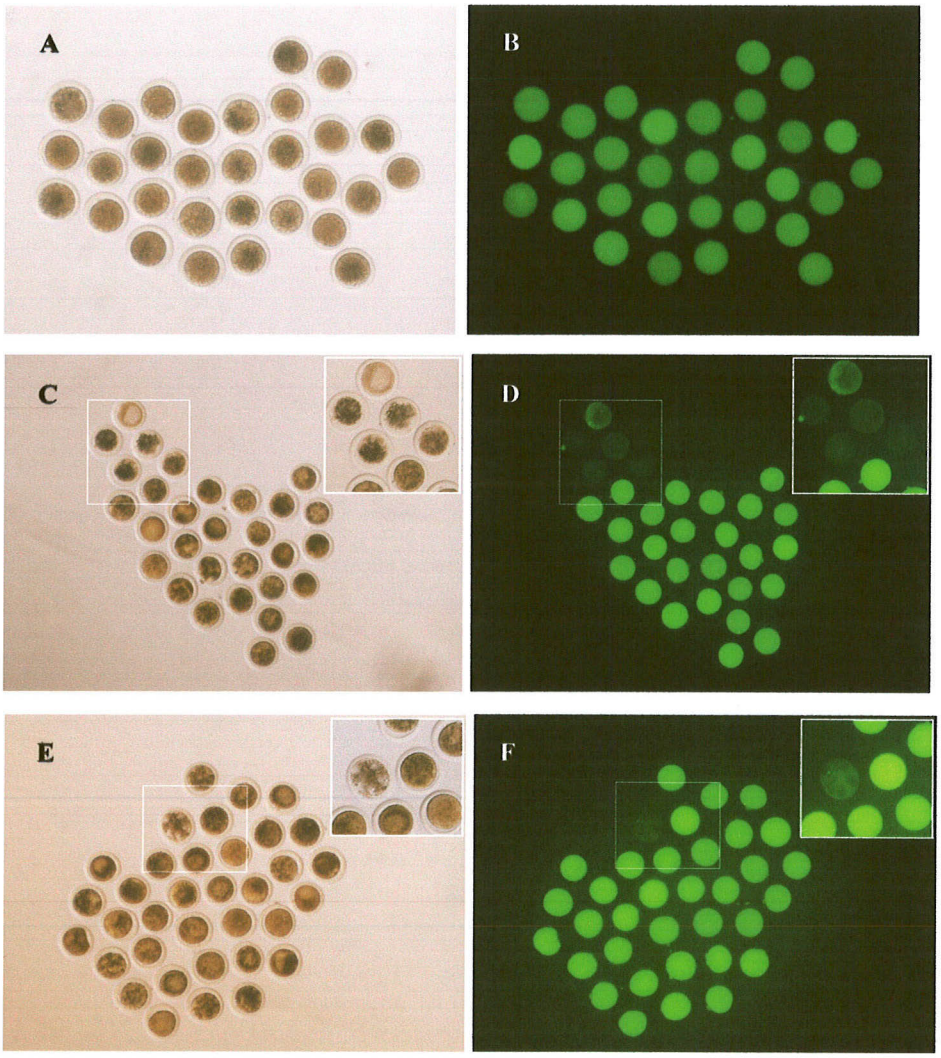
3.2.1 ปริมาณและอัตรารอดของโอโอไซท์หลังการแช่แข็งและละลายด้วย Microdrop และ Cryotop

ผลการทดลองแช่แข็งและละลายโอโอไซท์แสดงในตารางที่ 1 หลังการแช่แข็งและละลายโอโอไซท์พบว่า ปริมาณโอโอไซท์ที่ได้หลังการละลายไม่มีความแตกต่างกันระหว่างวิธี Microdrop และ Cryotop (243/239, 98% vs 244/245, 99% ตามลำดับ) เมื่อย้อมโอโอไซท์ที่ได้จากทั้งสองกลุ่มด้วยสี FDA ดังแสดงในภาพที่ 1 พบว่าโอโอไซท์ที่แช่แข็งโดยใช้ Cryotop มีอัตรารอด (97%) ที่สูงกว่ากลุ่ม Microdrop (91%) แต่อัตรารอดของโอโอไซท์จากทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งโอโอไซท์ทุกใบย้อมติดสีของ FDA (100%)

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณโอโอไซท์ที่ได้ก่อนและหลังการแช่แข็งและแสดงโอโอไซท์ที่มีชีวิตหลังการแช่แข็งและละลายโดยตรวจสอบโดยใช้สี FDA

Treatments	No. of MII	Recovery rate (%)	FDA viability (%)
Microdrop	243	239(98)	217(91)
Cryotop	245	244(99)	237(97)
Control	241	241(100)	241(100)

No significantly different between treatments



ภาพที่ 1 โอโอไซท์หลังจากย้อมด้วยสี FDA ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซน โดยย้อมกลุ่มโอโอไซท์ที่ไม่ได้แช่แข็ง (A และ B) โอโอไซท์ที่แช่แข็งด้วย Microdrop (C และ D) และกลุ่มที่แช่แข็งด้วย Cryotop (E และ F) โอโอไซท์ที่ตายจะไม่เรืองแสงสีเขียวหรือมีการเรืองแสงจางๆ

3.2.2 อิทธิพลของการแช่แข็งโอโอไซท์ต่อความสำเร็จในการโคลนนิ่ง

ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 2 ซึ่งพบว่าหลังจากนำโอโอไซท์ที่ตรวจด้วย FDA ว่ารอดจากการแช่แข็งแล้วโอโอไซท์จะถูกนำมาทำโคลนนิ่งและ PA ผลการทำโคลนนิ่งพบว่า เมื่อเปรียบเทียบโอโอไซท์ที่ไม่ถูกแช่แข็งกับโอโอไซท์ที่แช่แข็งด้วย Microdrop และ Cryotop พบว่าการแช่แข็งทั้งสองไม่มีผลกระทบต่อการ enucleation (98.33, 95.12 และ 100% ตามลำดับ), injection (100, 100 และ 100% ตามลำดับ) และ fusion (70.34, 73.50 และ 70.94% ตามลำดับ)

ตารางที่ 2 ผลการทำโคลนนิ่งโดยใช้โอโอไซท์ที่แช่แข็งต่ออัตราความสำเร็จในการ enucleation, injection และ fusion

Oocyte	No. MII	No. Enucleation (%)	No. Injection (%)	No. Fused (%)
Fresh	120	118	118	83
		(98.33)	(100)	(70.34)
Cryotop	123	117	117	86
		(95.12)	(100)	(73.50)
Microdrop	117	117	117	83
		(100)	(100)	(70.94)

No significantly different between treatments

3.2.3 อัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อน SCNT ที่ผลิตจากโอโอไซท์แช่แข็ง

หลังจากนำโอโอไซท์จากทั้งสองกลุ่มที่แช่แข็งและละลายไปย้อมด้วยสี FDA จะเลือกเฉพาะโอโอไซท์ที่ย้อมติดสีของ FDA ซึ่งเป็นการคัดเลือกโอโอไซท์ที่มีชีวิตรอดจากการแช่แข็งเท่านั้นมาทำการทดลองผลิตตัวอ่อนโดยการทำ SCNT และ PA ดังแสดงในตารางที่ 3 เมื่อพิจารณาการแบ่งตัวของตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ผลิตจากโอโอไซท์ที่แช่แข็งด้วยวิธี Microdrop และ Cryotop พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (32.0% vs 59.26% ตามลำดับ) แต่การแบ่งตัวของตัวอ่อนโคลนนิ่งจากโอโอไซท์กลุ่ม Microdrop (32.0%) มีการแบ่งตัวที่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (81.33%) อย่างมีนัยสำคัญ แต่อัตราการแบ่งตัวของโอโอไซท์จากกลุ่ม Cryotop (59.26%) ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม และพบว่าการเจริญเติบโตสู่ระยะ 8 เซลล์ของตัวอ่อนกลุ่มควบคุม (38.67%) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) กับตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์ของกลุ่มโอโอไซท์ที่แช่แข็งด้วย Cryotop (25.93%) แต่ตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์จากทั้งกลุ่ม Cryotop และกลุ่มควบคุมเจริญเติบโตสู่ระยะ 8 เซลล์ได้สูงกว่ากลุ่ม Microdrop (4.0%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) หลังจากเลี้ยงตัวอ่อนจนนาน 8 วัน พบว่ามีเพียงกลุ่มควบคุมเท่านั้นที่ตัวอ่อนโคลนนิ่งสามารถเจริญเติบโตสู่ระยะบลาสโตซีสได้ (37.70%) แต่

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ผิดจากการใช้โอโอไซท์ที่แช่แข็งทั้ง 2 กลุ่มไม่สามารถเจริญเติบโตผ่านระยะ 8 เซลล์ได้

3.2.4 อัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อน PA ที่ผลิตจากโอโอไซท์แช่แข็ง

เมื่อละลายโอโอไซท์ที่แช่แข็งด้วย Cryotop และ Microdrop โอโอไซท์ส่วนหนึ่งที่ติดสี FDA จะถูกนำมาผลิตเป็นตัวอ่อน PA เพื่อดูอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อน ซึ่งผลการแบ่งตัวของตัวอ่อนมีทิศทางที่แตกต่างกับตัวอ่อนกลุ่มโคลนนิ่ง คือ ตัวอ่อนกลุ่มควบคุม (95.87%) มีอัตราการแบ่งตัวที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) จากตัวอ่อน PA ที่ผลิตจากโอโอไซท์ที่แช่แข็งด้วย Cryotop (61.47%) และ Microdrop (12.12%) นอกจากนี้อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนกลุ่ม Cryotop (61.47%) ยังสูงกว่ากลุ่ม Microdrop (12.12%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกด้วย ($P<0.05$) ตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์พบมากที่สุดในกลุ่มควบคุม (63.63%) รองลงมาคือกลุ่ม Cryotop (24.77) และกลุ่ม Microdrop (4.04) เป็นกลุ่มที่เจริญเข้าสู่ระยะ 8 เซลล์ได้น้อยที่สุด ซึ่งเมื่อเทียบความแตกต่างทางสถิติพบว่า ทุกกลุ่มที่ระยะ 8 เซลล์ล้วนมีความแตกต่างทางสถิติต่อกัน ($P<0.05$) แต่เมื่อตัวอ่อนสามารถเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะมอลูลาแล้วก็จะสามารเจริญเข้าสู่ระยะบลาสโตซีสได้ ตัวอ่อนกลุ่มควบคุมสามารถเจริญระยะมอลูลาและบลาสโตซีสได้มากที่สุด คือ 33 ตัวอ่อน (28.45%) รองลงมาคือกลุ่ม Microdrop (16.67%) และที่น้อยที่สุดคือกลุ่ม Cryotop (2.99%) ซึ่งทั้งสามกลุ่มล้วนมีความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) จากผลการทดลองพบว่าแม้ตัวอ่อนจากกลุ่ม Microdrop จะสามารถแบ่งตัวได้น้อยที่สุดในกลุ่ม แต่หลังจากเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้วตัวอ่อนสามารถเจริญเติบโตสู่ระยะมอลูลาและบลาสโตซีสได้ดีกว่ากลุ่ม Cryotop

3.2.5 อัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อน SCNT และ PA ที่ผลิตจากโอโอไซท์แช่แข็ง

ผลการทดลองพบว่าอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนกลุ่ม Microdrop (32.0%) ที่นำไปทำโคลนนิ่ง (SCNT) มีอัตราการแบ่งตัวที่สูงกว่ากลุ่ม PA (12.12%) แต่ความแตกต่างดังกล่าวไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่การแบ่งตัวของตัวอ่อนกลุ่ม Cryotop (59.26%) ที่นำมาทำโคลนนิ่งมีอัตราการแบ่งตัวต่ำกว่าตัวอ่อนกลุ่ม PA (61.47%; $P>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบตัวอ่อนที่พัฒนาเข้าสู่ระยะ 8 เซลล์ที่ผลิตจากโอโอไซท์แช่แข็งกลุ่ม Microdrop ที่พบว่าที่ระยะ 8 เซลล์ตัวอ่อนจากกลุ่ม SCNT (4.0%) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติต่อกลุ่ม PA (4.04%) แต่เฉพาะโอโอไซท์ที่นำมาทำ PA เท่านั้นที่ตัวอ่อนที่ใช้โอโอไซท์แช่แข็งด้วย Cryotop (2.99%) และ Microdrop (16.67%) สามารถเจริญเข้าสู่ระยะมอลูลาและบลาสโตซีสได้ (ภาพที่ 2)

3.3 ข้อวิจารณ์

การแช่แข็งเซลล์สัตว์ด้วยวิธี vitrification เป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว มีประสิทธิภาพ มีต้นทุนในการดำเนินการต่ำ เนื่องจากเทคนิคนี้ช่วยป้องกันไม่ให้เกิดผลึกน้ำแข็ง ทำให้เซลล์ที่ถูกแช่แข็งไม่ได้รับอันตรายจากผลึกน้ำแข็ง ซึ่งแตกต่างจากวิธีการลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆ ที่ต้องมีการเหนี่ยวนำ

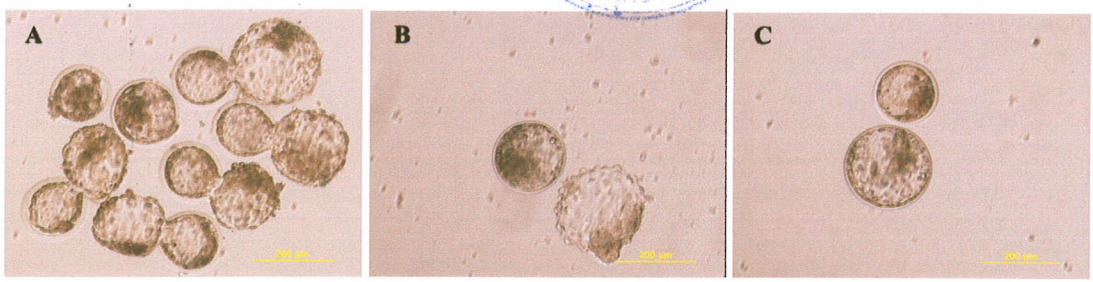
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 1 - ธ.ค. 2553
229468

การเกิดผลึกน้ำแข็ง (Fahy และคณะ, 1984) อย่างไรก็ตาม การแช่แข็งด้วยวิธี vitrification จำเป็นต้องใช้ความเข้มข้นของ cryoprotectant ที่สูงมาก ดังนั้นมีโอกาสที่จะทำให้เซลล์ได้รับผลจากการเปลี่ยนแปลงของแรงดันออสโมติก และหากปล่อยให้เซลล์แช่อยู่ในน้ำยาดังกล่าวเป็นเวลานานจะทำให้เซลล์ได้รับอันตรายจากความเป็นพิษของสารที่ใช้เป็น cryoprotectant ซึ่งมีการศึกษาถึงความเป็นพิษของ cryoprotectant ที่นำมาใช้แล้วว่าสารตัวใดมีความเป็นพิษที่น้อยที่สุดต่อเซลล์ที่ระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการแช่แข็ง (Fuller และคณะ, 2004; Kuwayama และคณะ, 2005) มีการศึกษาและ

ตารางที่ 3 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อน SCNT และ PA ที่ผลิตจากโอโอไซท์แช่แข็งโดย Microdrop และ Cryotop

Treatment		No.Culture	Embryo development			
			Cleavage (%)	8 Cells (%)	Morula (%)	Blastocyst (%)
SCNT	Fresh	75	61 [b] (81.33)	29 [b] (38.67)	23 [a] (37.70)	23 [a] (37.70)
	Microdrop	75	24 [cd] (32.0)	3 [c] (4.0)	0 [b] (0)	0 [b] (0)
	Cryotop	81	48 [bc] (59.26)	21 [b] (25.93)	0 [b] (0)	0 [b] (0)
PA	Fresh	121	116 [a] (95.87)	77 [a] (63.63)	33 [a] (28.45)	33 [a] (28.45)
	Microdrop	99	12 [d] (12.12)	4 [c] (4.04)	2 [b] (16.67)	2 [b] (16.67)
	Cryotop	109	67 [b] (61.47)	27 [b] (24.77)	2 [b] (2.99)	2 [b] (2.99)

SCNT: Somatic cell nuclear transfer PA: Parthenogenetic activation



ภาพที่ 2 แสดงตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสอายุ 7 วัน จากกลุ่มโคลนนิ่งโดยใช้โอโอไซท์ที่ไม่ถูกแช่แข็ง (A) ตัวอ่อน PA จากการแช่แข็งด้วย Microdrop (B) และตัวอ่อนที่แช่แข็งด้วย Cryotop (C)

พัฒนาอุปกรณ์และวิธีการแช่แข็งที่ช่วยให้อัตราการลดอุณหภูมิเกิดได้อย่างรวดเร็ว เช่น Electron microscope grid (Martino และคณะ, 1996) Open pulled straw (OPS; Vajta และคณะ, 1998) Nylon loop (Lane และคณะ, 2001) และ Cryotop (Kuwayama และ Kato, 2000) ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยพบว่าการแช่แข็งโอโอไซท์โดโดยวิธี Microdrop และ Cryotop ส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อน การแช่แข็งโอโอไซท์จะมีความสำเร็จที่น้อยกว่าการแช่แข็งตัวอ่อน เนื่องจากโอโอไซท์ที่ระยะ MII สาย spindle fiber ภายในจะมีความอ่อนไหวต่ออุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไปและการแช่แข็งทำให้โอโอไซท์ได้รับความเสียหายจากความเย็นได้ง่ายกว่าตัวอ่อน (Shaw และคณะ, 2000) เนื่องจากการแช่แข็งด้วยวิธี vitrification ตัวอ่อนหรือโอโอไซท์จะอยู่ในน้ำยาแช่แข็งได้ในระยะสั้นๆ ดังนั้นน้ำยาแช่แข็งจึงต้องมีความเข้มข้นของ cryoprotectant ที่สูงเพื่อให้อัตราการซึมเข้าภายในเซลล์เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเพียงพอที่จะไม่ทำให้เซลล์ได้รับอันตรายจากความเป็นพิษของ cryoprotectant และมีความเข้มข้นที่เพียงพอที่จะทำให้เซลล์ไม่ได้รับอันตรายหลังจากการแช่แข็ง และต้องมีการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วเพื่อให้การลดอุณหภูมิมีความเร็วเพียงพอ ที่จะไม่ทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งเกิดขึ้นในขบวนการแช่แข็งโดยวิธี vitrification ซึ่งการแช่แข็งโอโอไซท์โดยใช้ Microdrop, SSV และ Cryotop สามารถทำให้อัตราเร็วของอุณหภูมิที่ลดลงเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งช่วยให้ไม่เกิดผลึกน้ำแข็งเกิดขึ้นในระหว่างการแช่แข็ง (Papis และคณะ, 2000; Kuwayama และ Kato, 2000; Dinnyés และคณะ, 2000) Cryotop โอโอไซท์หรือตัวอ่อนจะถูกวางไว้ที่ปลายแผ่นพลาสติกบางๆ และมีปริมาณน้ำยาประมาณเพียง 1 µl ที่ปิดโอโอไซท์หรือตัวอ่อนอยู่ ซึ่งมีปริมาณที่น้อยมาก ซึ่งช่วยให้การลดอุณหภูมิเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วภายหลังจากจุ่ม Cryotop ลงในไนโตรเจนเหลวแล้ว (Kuwayama และ Kato, 2000) วิธี Microdrop โอโอไซท์หรือตัวอ่อนจะถูกหยดลงในไนโตรเจนพร้อมกับน้ำยาแช่แข็งปริมาณ 2 µl ซึ่งจะช่วยให้อัตราการลดอุณหภูมิเกิดได้อย่างรวดเร็ว (Papis และคณะ, 2000) ส่วนวิธี SSV เป็นวิธีการประยุกต์จากวิธี Microdrop โดยการให้ Microdrop ตกบนผิวหน้าที่เย็นจัดที่โผล่พ้นไนโตรเจนเหลวของแท่งอลูมิเนียมที่แช่อยู่ในไนโตรเจนเหลว ซึ่งจะช่วยให้การถ่ายเทอุณหภูมิเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว

เช่นเดียวกัน (Dinnyés และคณะ, 2000) ผลการทดลองที่ได้พบว่าการแช่แข็งโอโอไซท์ด้วย Microdrop และ Cryotop ยังคงเกิดความเสียหายขึ้นกับโอโอไซท์โค ทำให้เมื่อนำมาทำโคลนนิ่งตัวอ่อนจึงไม่สามารถเจริญเติบโตผ่านระยะ 8 เซลล์ไปได้ แต่สำหรับตัวอ่อน PA พบว่าการแช่แข็งโอโอไซท์โคด้วย Microdrop จะลดอัตราการแบ่งตัวในระยะแรก แต่ตัวอ่อนยังคงมีศักยภาพในการเจริญเติบโตสู่ระยะบลาสโตซิสได้ การศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่าการแช่โอโอไซท์ในน้ำยาที่มี cryoprotectant อย่างเดียวโดยไม่ได้แช่ในไนโตรเจนเหลวหรือการแช่แข็งโอโอไซท์ระยะ MII จะกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่คล้ายกับขบวนการปฏิสนธิ คือการเกิดการปลี่ยนแปลงของ zona pellucida ที่หนาและแข็งขึ้น ซึ่งเมื่ออสุจิปฏิสนธิกับโอโอไซท์แล้ว zona pellucida จะหนาขึ้นเพื่อป้องกันไม่ให้อสุจิตัวอื่นเข้ามาได้และ/หรืออาจกระตุ้นให้โอโอไซท์เจริญเติบโตได้ โดยไม่ต้องเกิดขบวนการปฏิสนธิ (Parthenogenetic activation) ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าวมีรายงานในสัตว์หลายชนิด (Carroll และคณะ, 1990; Somfai และคณะ, 2007; Van der Elst J และคณะ, 1992; Larman และคณะ, 2006; Matson และคณะ, 1997; Tian และคณะ, 2007)

การแช่แข็งโอโอไซท์เป็นหัวข้อการศึกษาที่ยังคงมีผู้สนใจมากมายเพื่อแช่แข็งโอโอไซท์ ให้ยังคงศักยภาพในการเจริญเติบโตใกล้เคียงกับโอโอไซท์ที่ไม่ถูกแช่แข็ง เพื่อที่จะสามารถเก็บไว้ใช้เป็นแหล่งรองรับการนำมาใช้ในอนาคต ซึ่งสามารถนำมาใช้สำหรับทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว การทำโคลนนิ่ง (Booth และคณะ, 1999; Atabay และคณะ, 2004; Hou และคณะ, 2005; Yang และคณะ 2008) แต่จนถึงปัจจุบันการศึกษาการแช่แข็งโอโอไซท์เพื่อทำโคลนนิ่งยังคงไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร แม้แต่ตัวอ่อนที่ผลิตจาก PA เองก็ยังคงไม่มีศักยภาพที่จะเจริญเติบโตได้เหมือนโอโอไซท์ที่ไม่ถูกแช่แข็ง การแช่แข็งโอโอไซท์นั้นค่อนข้างยากลำบากเนื่องจากขนาดของเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ประกอบกับมีปริมาณน้ำภายในเซลล์สูงทำให้โอโอไซท์เสียหายได้ง่ายภายใต้อุณหภูมิต่ำๆ ในระหว่างการแช่แข็ง และการแช่แข็งโอโอไซท์ยังยากกว่าการแช่แข็งตัวอ่อนระยะคัพภะ (Zygote) เนื่องจากความเสียหายต่อ Spindle microtubule ในระยะ Metaphase เกิดการเสียหายได้ง่าย (Martino และคณะ 1996) อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการแช่แข็งโอโอไซท์ไม่มีผลต่อความสำเร็จในการ enucleation, injection และ fusion แต่อย่างใด แต่การแช่แข็งมีผลกระทบต่ออัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนเมื่อเทียบกับตัวอ่อนที่ผลิตจากโอโอไซท์ที่ไม่ถูกแช่แข็ง Yang และคณะ (2008) รายงานการแช่แข็งโอโอไซท์โดยใช้ Microdrop ว่าอัตรารอดหลังแช่แข็งและละลายโอโอไซท์คือ 92.5% ซึ่งใกล้เคียงกับการทดลองในครั้งนี้ เมื่อนำโอโอไซท์ดังกล่าวมาทำ PA มีตัวอ่อนแบ่งตัว 46.5% และเจริญเติบโตจนถึงระยะบลาสโตซีส 11.1% จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่า อัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนจากการทดลองของ Yang และคณะ (2008) มีอัตราที่สูงกว่าการทดลองนี้ แต่อย่างไรก็ตามอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนสู่ระยะบลาสโตซีสของ PA ยังคงต่ำกว่าการทดลองในครั้งนี้ ซึ่งสามารถผลิตตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสจากโอโอไซท์แช่แข็งได้ 16.67%

การแช่แข็งโอโอไซท์ระยะ MII ยากกว่ากว่าแช่แข็งตัวอ่อนเนื่องจาก spindle fiber ของโอโอไซท์ระยะ MII ค่อนข้างเสียหายง่ายเมื่อทำการแช่แข็ง (Chilling injury; Shaw และคณะ 2000) ดังนั้นอัตราความสำเร็จในการแช่แข็งจึงขึ้นอยู่กับอัตราเร็วในการลดอุณหภูมิ และความเข้มข้นของ cryoprotectant ที่ใช้ มีรายงานว่าการแช่แข็งโดยใช้ Microgrids และ Nylon slush มีอัตราเร็วในการลดอุณหภูมิประมาณ 24,000°C/นาที และวิธี OPS มีอัตราเร็วในการลดอุณหภูมิประมาณ 22,500°C/นาที (Hochi และคณะ 2001; Vajta, 2000) ดังนั้นผลการแช่แข็งโอโอไซท์ด้วย Cryotop และ Microdrop จึงมีโอโอไซท์ที่มีชีวิตในอัตราที่สูงกว่ารายงานอื่น โดย Atabay และคณะ (2004) รายงานว่าหลังการแช่แข็งมีโอโอไซท์รอด 80% Dinnyes และคณะ (2000) รายงานอัตรารอดของโอโอไซท์ที่แช่แข็งโดย SSV ว่ามีโอโอไซท์รอดหลังการแช่แข็ง อยู่ระหว่าง 79-85% อย่างไรก็ตามจากอัตรารอดที่สูงหลังจากแช่แข็งและละลายของโอโอไซท์ แต่ตัวอ่อนมีมีศักยภาพค่อนข้างต่ำในการการเจริญเติบโตเข้าสู่ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส น่าจะมีสาเหตุมาจากการบาดเจ็บที่ไม่ส่งผลกระทบรุนแรงจนทำให้โอโอไซท์ตายในทันที แต่ส่งผลให้โอโอไซท์ดังกล่าวหยุดการเจริญเติบโตในระยะต่อมา ซึ่งสาเหตุน่าจะเกิดจากความเสียหายของ meiotic spindle และ cytoskeleton (Chen และคณะ, 2003; Albarracín และคณะ, 2005) ความเสียหายของ organelles ต่างๆ เช่น mitochondria หรือ endoplasmic reticulum (Fuku และคณะ, 1995; Rho และคณะ, 2002; Lowther และคณะ, 2009) การเสื่อมสลายลงของระดับ mRNA ในไซโตพลาสซึม (Succu และคณะ, 2008) ซึ่งเป็นสาเหตุที่สามารถพบได้ในการแช่แข็งโอโอไซท์ ซึ่งการศึกษาเพื่อพัฒนาการแช่แข็งเพื่อลดความเสียหายดังกล่าวจึงมีความจำเป็น ซึ่งจะช่วยให้อัตราการรอดและอัตราการเจริญเติบโตหลังการปฏิสนธิหลังการแช่แข็งเพิ่มสูงมากยิ่งขึ้น

จากผลการทดลองครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าการแช่แข็งโดยใช้ Microdrop และ Cryotop เพื่อใช้เป็นแหล่งสำหรับการทำโคลนนิ่งนั้นจำเป็นที่จะต้องศึกษาเพิ่มเติม เพื่อให้ได้โอโอไซท์หลังการแช่แข็งที่มีศักยภาพที่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้