# บทที่ 5

## การเก็บรักษารังไข่และโอโอไซต์เหนือจุดเยือกแข็ง

### วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาระยะเวลานานที่สุดที่สามารถเก็บรักษารังไข่ที่อุณหภูมิห้อง โดยยังสามารถเลี้ยงโอโอไซต์ให้สุก และปฏิสนธิได้เหมือนปกติ
2. เพื่อทดสอบความเป็นพิษของสารป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งในเซลล์ชนิดต่าง ๆ 5 ชนิด
3. ทดสอบผลของอุณหภูมิที่ลดลงต่อความสามารถในการมีชีวิตรอดของโอโอไซต์ เพื่อหาความเป็นไปได้ในการเก็บรักษาโอโอไซต์ที่เหนือจุดเยือกแข็ง

### วิธีการทดลอง

วิธีการทดลองแบ่งออกเป็น 3 แผนการทดลอง ดังจะกล่าวต่อไปข้างล่างนี้ โดยใช้โอโอไซต์จากแหล่งที่กล่าวไว้ในบทที่ 3 หน้า 27 และเลี้ยงใน IVM มีเดียม ตามวิธีการที่กล่าวไว้ในบทที่ 3 หน้า 24 และปฏิสนธินอกร่างกาย ใน IVF มีเดียม ด้วยน้ำเชื้อที่เตรียมตามวิธีการที่กล่าวไว้ใน บทที่ 3 หน้า 25 และ 30-31

แผนการทดลองที่ 1 แช่รังไข่ที่ล้างแล้วไว้ในบีคเกอร์ที่มีน้ำเกลือผสมกานามัยซินซัลเฟต นำไปเก็บไว้ในห้องปรับอากาศ (อุณหภูมิ 24-25$^{o}$ซ) นาน 8 12 18 หรือ 24 ชม. แล้วจึงนำมาทำการเจาะเอาโอโอไซต์ออกมาเลี้ยงให้สุกและปฏิสนธินอกร่างกาย เหมือนการทดลองที่ 2 ในบทที่ 4 ทำการเปรียบเทียบเปอร์เซนต์การสุกของไข่ และ เปอร์เซนต์การเจริญถึง 2-4 เซลล์ หลังการเติมอสุจิลงไปปฏิสนธินอกร่างกาย 48 ชม. เพื่อเปรียบเทียบว่า เราสามารถเก็บรังไข่ไว้ที่

ปรับอากาศได้นานที่สุดกี่ชั่วโมงที่โอโอไซต์ในรังไข่นั้นยังสามารถเลี้ยงให้สุกและปฏิสนธิได้ไม่ต่างจากการเจาะเอาโอโอไซต์ทันทีที่เก็บรังไข่มา

แผนการทดลองที่ 2 นำโอโอไซต์ที่ล้างแล้วมาปรับสมดุลแรงดันออสโมติค นาน 10 นาที ในมีเดียม M199B ที่มีซูโครส 0.1 โมลาร์ และมีสารป้องกันเกล็ดน้ำแข็ง 1.5 โมลาร์ ชนิดต่าง ๆ 5 ชนิด คือ GLY , DMSO, EG, PROH หรือ BUOH แล้วล้างเอาสารป้องกันเกล็ดน้ำแข็งออก โดยการแช่แข็งไว้ใน M119B นาน 10 นาที ก่อนนำไปเลี้ยงให้สุกและปฏิสนธินอกร่างกายเหมือนการทดลองที่ 1 ในบทที่ 4 ทำการเปรียบเทียบเปอร์เซนต์การสุกของไข่ โดยการตรึงเซลล์และย้อมสีออร์ซีน ตามวิธีภายในบทที่ 3 หน้า 39 ดูการเจริญของโครโมโซม เพื่อเปรียบเทียบว่าสารป้องกันเกล็ดน้ำแข็งชนิดใดที่ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์เท่ากัน จะไม่ทำให้โอโอไซต์มีเปอร์เซนต์การสุกต่างไปจากปกติ

แผนการทดลองที่ 3 นำโอโอไซต์ที่ล้างแล้วมาปรับสมดุลแรงดันออสโมติค นาน 15 นาที ในมีเดียม M199B ที่มีซูโครส 0.1 โมลาร์ และมี EG 1.5 โมลาร์ แล้วนำไปลดอุณหภูมิลงในอ่างน้ำด้วยการค่อย ๆ เติมน้ำแข็งลงในอ่างน้ำทีละน้อย ซึ่งจะมีอัตราลดอุณหภูมิ $1^{o}$ซ ต่อนาที ทั้งนี้เพื่อป้องกันการลดอุณหภูมิแบบฉับพลัน ที่อาจจะมีผลต่อคุณภาพโอโอไซต์ โดยลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิห้อง ($29^{o}$ซ) ลงถึง $24^{o}$ซ $20^{o}$ซ $18^{o}$ซ $17^{o}$ซ $16^{o}$ซ $13^{o}$ซ $11^{o}$ซ $9^{o}$ซ หรือ $4^{o}$ซ แล้วคงอุณหภูมิไว้ที่อุณหภูมิสุดท้ายนาน 5 นาที แล้วจึงนำไปล้างเอา EG ออก ด้วยการแช่ไว้ใน M199B นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนจัดเข้าจานเลี้ยงโอโอไซต์ เหมือนการทดลองที่ 1 ในบทที่ 4 เปรียบเทียบเปอร์เซนต์การสุกของไข่ ด้วยการตรึงเซลล์ และย้อมสีออร์ซีน ( ตามวิธีการในบทที่ 3 หน้า 39 ) หลังจากเลี้ยงโอโอไซต์ 40 ชม. เพื่อเปรียบเทียบว่า โอโอไซต์สามารถทนทานต่ออุณหภูมิที่ลดลง จนถึง $4^{o}$ซ ได้หรือไม่ หรือทนได้ถึงระดับกี่องศา โดยที่ไม่ทำให้อัตราการสุกของไข่เปลี่ยนแปลงไปจากการอยู่ในอุณหภูมิห้องปกติ

**ผลการทดลอง**

ผลการทดลองที่ 1

การทดลองนี้ ใช้รังไข่ที่เก็บมาครั้งเดียวกันทั้งสิ้น 98 รังไข่ โดยแบ่งเก็บใน 4 บีคเกอร์ และเก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง ($24^{o}$ซ) นานตั้งแต่ 8-24 ชม. (ตารางที่ 3) หลังจากเก็บรักษารังไข่ใน

น้ำเกลือผสมกานามัยซิน (100 มก./ลิตร) นาน 8 ชม. ลักษณะรังไข่จะขุ่นขาวเป็นฝ้าขึ้น กลิ่นยังไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก โอโอไซต์ที่เจาะได้ยังมีลักษณะและสีของไซโตพลาสซึมยังคงเป็นสีเทาอ่อนเหมือนกับโอโอไซต์ที่ได้จากการเจาะรังไข่ทันทีที่มาถึงห้องปฏิบัติการ แต่เมื่อเก็บไว้ 12 ชม. สีของรังไข่จะขุ่นมากขึ้น และ โอโอไซต์ที่เจาะได้ จะมีคูมูลัสเซลล์เกาะอยู่อย่างหลวมๆ และกระจายตัวออกจากโซนาเพลลูซิดา สีของไซโตพลาสซึมมีสีคล้ำขึ้นจนเป็นสีน้ำตาลอ่อน รังไข่เมื่อเก็บไว้นาน 18 ชม. โอโอไซต์ที่เจาะได้มีไซโตพลาสซึมสีน้ำตาลเข้มเกือบดำ และเลือกไข่ที่จะใช้เลี้ยงได้น้อยลงเหลือประมาณ 66 % รังไข่ที่เก็บไว้นาน 24 ชม. โอโอไซต์ที่เจาะได้ มีไซโตพลาสซึมสีออกดำ จะเห็นได้ว่า ถ้าเก็บรังไข่ไว้ไม่เกิน 8 ชม. จะได้โอโอไซต์ที่ใช้เลี้ยงได้ในช่วง 4.6-4.8 ใบต่อรังไข่ แต่ถ้าเก็บไว้นานเกิน 8 ชม. จนถึง 24 ชม. แล้ว จะได้โอโอไซต์ที่มีลักษณะนำไปเลี้ยงได้ อยู่ระหว่าง 3.0-3.4 ใบ ต่อรังไข่ (ตารางที่ 3) และเปอร์เซนต์การสุกของโอโอไซต์ที่ได้จากรังไข่ที่เก็บไว้ 8 ชม. เท่ากับเปอร์เซนต์การสุกของโอโอไซต์ ที่เจาะจากรังไข่ทันทีที่มาถึงห้องปฏิบัติการ แต่ถ้าเก็บรังไข่ไว้นานเกิน 8 ชม. เปอร์เซนต์การสุกของโอโอไซต์ ก็จะลดลงอย่างเห็นได้ชัด จาก 90.0% เหลือเพียง 66.7% และ 69.7% ในชั่วโมงที่ 12 และ 18 และลดลงเหลือเพียง 39% ในชั่วโมงที่ 4 (ตารางที่ 3 และ รูปที่ 16) ส่วนเปอร์เซนต์การเจริญถึง 2-4 เซลล์ ที่เทียบจากไข่สุกเกิดขึ้นในอัตราที่ต่ำ ซึ่งโอโอไซต์ที่ได้จากรังไข่ที่เก็บไว้นาน 24 ชม. จะให้ผลการปฏิสนธิจนเจริญถึง 2-4 เซลล์ ในเปอร์เซนต์ต่ำที่สุด แต่แตกต่างจากโอโอไซต์ที่ได้จากการเจาะรังไข่ทันทีที่มาถึงห้องปฏิบัติการอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

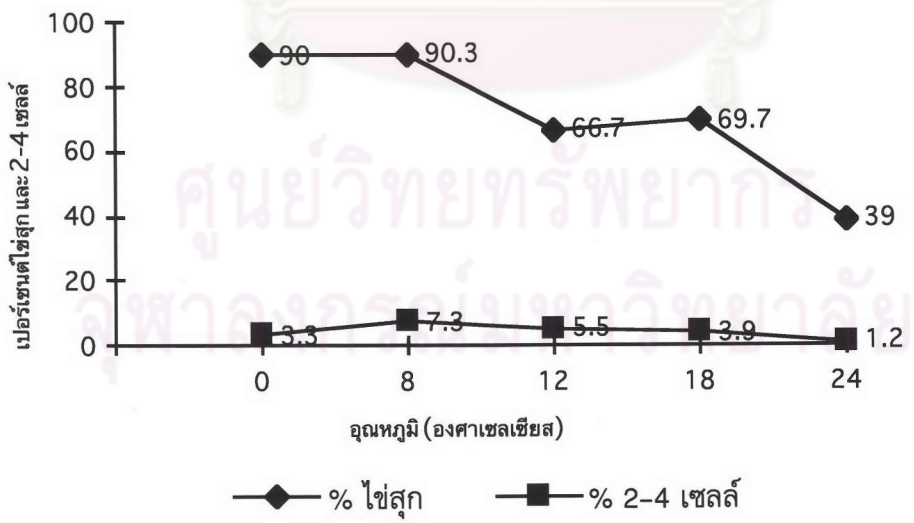
ผลการทดลองที่ 2

ใช้โอโอไซต์ 744 ใบ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ในการทดลองนี้พบว่า DMSO EG และ BUOH ที่ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ ไม่มีผลทำให้เปอร์เซนต์การสุกของไข่ลดลงจากการเลี้ยงโอโอไซต์ตามปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ GLY 1.5 โมลาร์ มีผลทำให้เปอร์เซนต์การสุกของไข่ลดลงจากการเลี้ยงโอโอไซต์ตามปกติ ด้วยผลแสดงไว้ในตารางที่ 4 และรูปที่ 17 แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า EG 1.5 โมลาร์ ช่วยกระตุ้นให้โอโอไซต์สุกมากขึ้นกว่าปกติ 14% ซึ่งสามารถจะใช้ EG PROH และ DMSO เป็นสารป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งในเซลล์สำหรับไข่สุกรได้

ตารางที่ 3 เปอร์เซนต์การสุกของโอโอไซต์และการเจริญจนถึงระยะ 2-4 เซลล์ หลังปฏิสนธินอกร่างกาย ที่ได้จากรังไข่ที่เก็บในน้ำเกลือนาน 0 8 12 18 หรือ 24 ชม. นับตั้งแต่รังไข่มาถึงห้องปฏิบัติการที่ 24°ซ นำมาเลี้ยงใน IVM มีเดียม นาน 40 ชม. แล้วปฏิสนธินอกร่างกายและเลี้ยงนาน 48 ชม. หลังเติมอสุจิ

| จำนวน ชม. ที่เก็บรังไข่ ที่ 24°ซ | จำนวนไข่อ่อนที่เลี้ยงได้ต่อรังไข่ | จำนวนรังไข่ | จำนวนโอโอไซต์ | เปอร์เซนต์ไข่สุก | เปอร์เซนต์ 2-4 เซลล์ |
|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 4.6 | 13 | 60 | 90.0$^{a}$ | 3.3$^{b}$ |
| 8 | 4.8 | 13 | 62 | 90.3$^{a}$ | 7.3$^{a}$ |
| 12 | 3.0 | 24 | 72 | 66.7$^{b}$ | 5.5$^{b}$ |
| 18 | 3.2 | 24 | 76 | 69.7$^{b}$ | 3.9$^{b}$ |
| 24 | 3.4 | 24 | 82 | 39.0$^{c}$ | 1.2$^{b}$ |

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์ หมายถึง a > b ($P < 0.05$) และ a > c, b > c ($P < 0.01$)




รูปที่ 16 แสดงเปอร์เซนต์การสุกของโอโอไซต์และเปอร์เซนต์เจริญถึง 2-4 เซลล์ หลังจากปฏิสนธิ (คิดจากจำนวนไข่สุก) ของโอโอไซต์ที่ได้จากรังไข่ที่ในน้ำเกลือนาน 0 8 12 18 หรือ 24 ชม. นับตั้งแต่รังไข่ถึงห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 4 เปอร์เซนต์การสุกของไข่ที่ผ่านการปรับสมดุลแรงดันออสโมติคในสารป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งในเซลล์ (CPA) จำนวน 5 ชนิด คือ GLY DMSO EG PROH และ BUOH ที่ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง 29°ซ แล้วนำไปเลี้ยงใน IVM มีเดียม นาน 40 ชม.

| CPA * | จำนวนโอโอไซต์ | เปอร์เซนต์การเจริญของโอโอไซต์ในระยะต่าง ๆ + | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | GV | PM | M I | ANA I | TEL I | M II |
| ไม่มี | 142 | 0.7 | 9.8 | 1.4 | 0.0 | 13.4 | 74.6$^{ab}$ |
| GLY | 101 | 26.7 | 3.0 | 0.0 | 0.0 | 6.9 | 63.4$^{b}$ |
| DMSO | 111 | 9.0 | 7.2 | 0.0 | 0.0 | 7.2 | 76.6$^{ab}$ |
| EG | 139 | 3.6 | 5.0 | 0.0 | 0.0 | 2.9* | 88.5$^{a}$ |
| PROH | 138 | 5.8 | 7.2 | 0.7 | 0.7 | 7.2 | 78.3$^{ab}$ |
| BUOH | 113 | 10.6 | 13.3 | 0.9 | 0.0 | 3.5 | 71.7$^{ab}$ |
| รวมทั้งหมด | 744 | | | | | | |

+GV = เจอร์มินอลเวสซิเคิล PM = โปรเมตาเฟส M I = เมตาเฟส I ANA I = อนาเฟส I

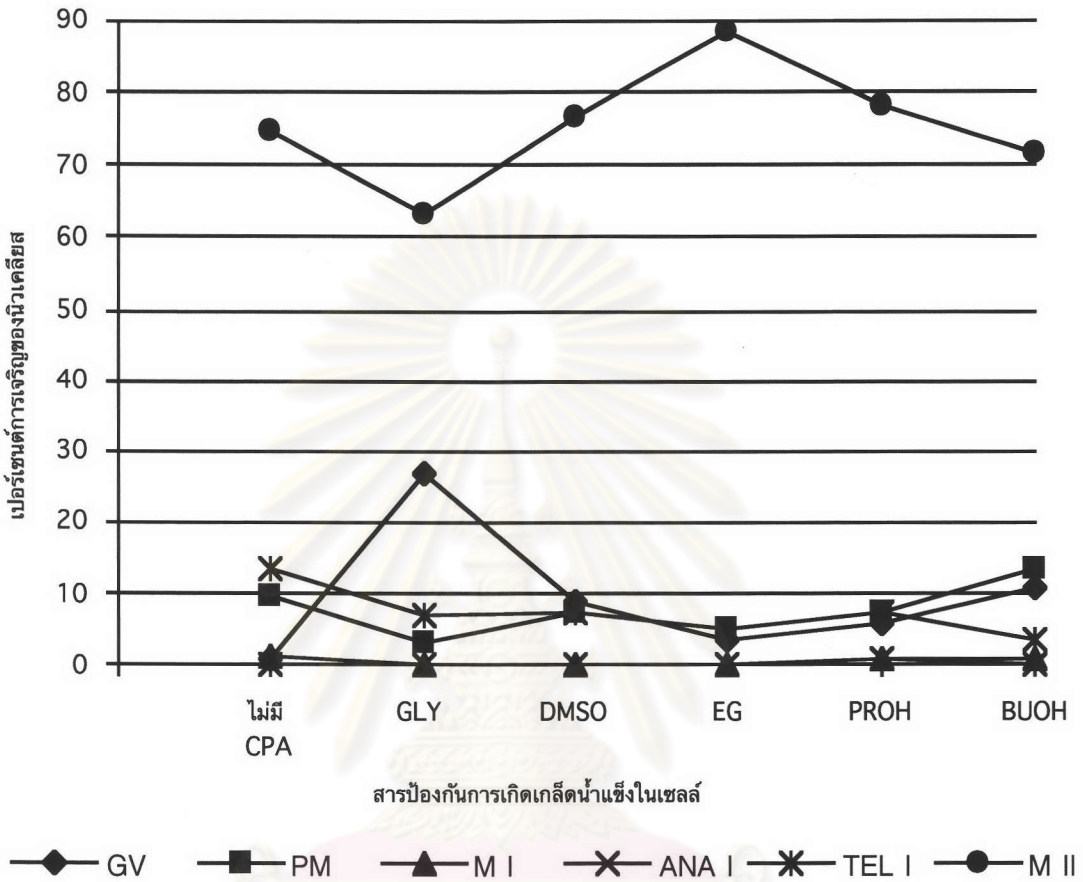
TEL I = ทีโลเฟส I M II = เมตาเฟส II

*GLY = กลีเซอโรล DMSO = ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ EG = เอทิลีนไกลคอล

PROH = โปรปีลีนไกลคอล BUOH = บิวเทนไดออล

ตัวอักษรที่ต่างกันระหว่างคอลัมน์ หมายถึง ต่างกัน ($P < 0.05$)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

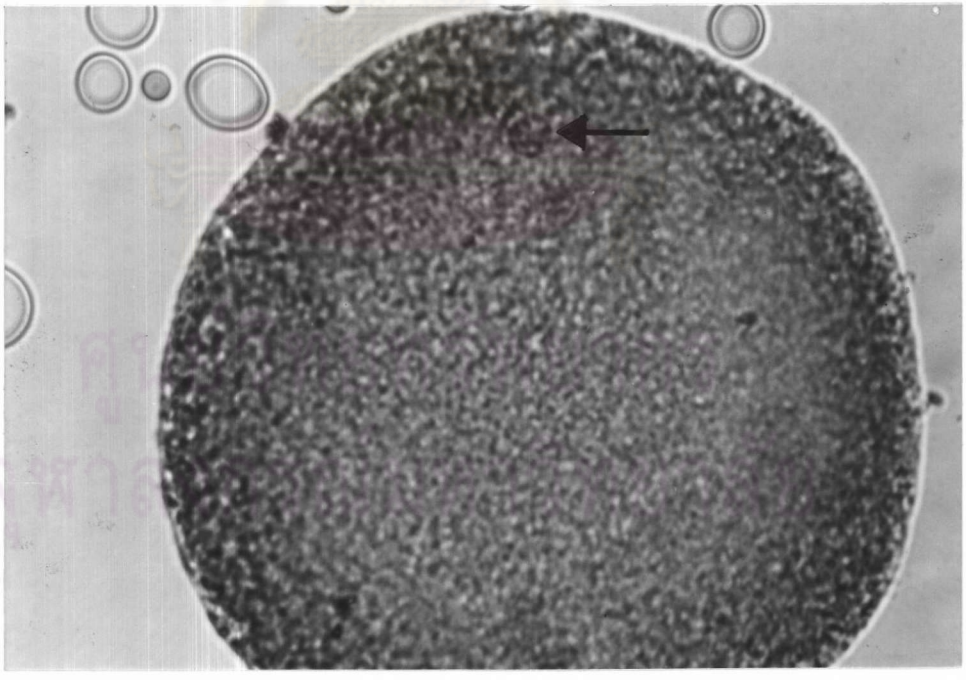



รูปที่ 17 แสดงเปอร์เซนต์การเจริญของนิวเคลียสถึงระยะต่าง ๆ ของโอโอไซต์ที่ผ่านการปรับสมดุลแรงดันออสโมติค ในมีเดียมที่มีกลีเซอโรล (GLY), ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO), เอทิลีนไกลคอล (EG), โปรปีลีน ไกลคอล (PROH) หรือ บิวเทนไดออล (BUOH) เข้มข้น 1.5 โมลาร์ นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (29$^{o}$ซ) แล้วเลี้ยงใน IVM มีเดียม 40 ชม.

ผลการทดลองที่ 3

ผลการทดลองในตารางที่ 5 และ รูปที่ 19 พบว่า โอโอไซต์ที่ทำการเจาะและเลี้ยงทันทีในอุณหภูมิห้อง (29$^{o}$ซ) จะมีเปอร์เซนต์ไข่สุก 96.3% ซึ่งนับเป็นเปอร์เซนต์สูงสุด ที่ใช้ในการเปรียบเทียบกับโอโอไซต์ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิต่ำกว่า นาน 5 นาที โดยวิธีการลดอุณหภูมิ 1$^{o}$ซ ต่อนาที ผลการเก็บ โอโอไซต์ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 29$^{o}$ซ นาน 5 นาที มีผลคือ ลดเปอร์เซนต์ไข่สุก ซึ่งในระหว่างที่อุณหภูมิ 24$^{o}$ซ 20$^{o}$ซ และ 18$^{o}$ซ จะไม่มีผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่ที่อุณหภูมิ 16$^{o}$ซ และ 15$^{o}$ซ มีเปอร์เซนต์ไข่สุกลดจาก 96.3% มาเป็น 32.2-33.3% โดยเฉพาะที่อุณหภูมิ 13$^{o}$ซ 11$^{o}$ซ 9$^{o}$ซ และ 4$^{o}$ซ เปอร์เซนต์ไข่สุกเท่ากับ 0% แสดงให้เห็นว่าโอโอไซต์สุกรไม่สามารถเจริญเป็นปกติได้เมื่ออยู่ในอุณหภูมิต่ำกว่า 15$^{o}$ซ

จากการตรวจโอโอไซต์ที่ย้อมสีพบว่า โอโอไซต์ที่ลดอุณหภูมิถึง 15$^{o}$ซ จะพบส่วนไซโตพลาสซึมเริ่มแตกเป็นเม็ด แต่ก็ยังพบส่วนของนิวเคลียสที่ชะงักการเจริญอยู่ที่ระยะ GV (รูปที่ 18)

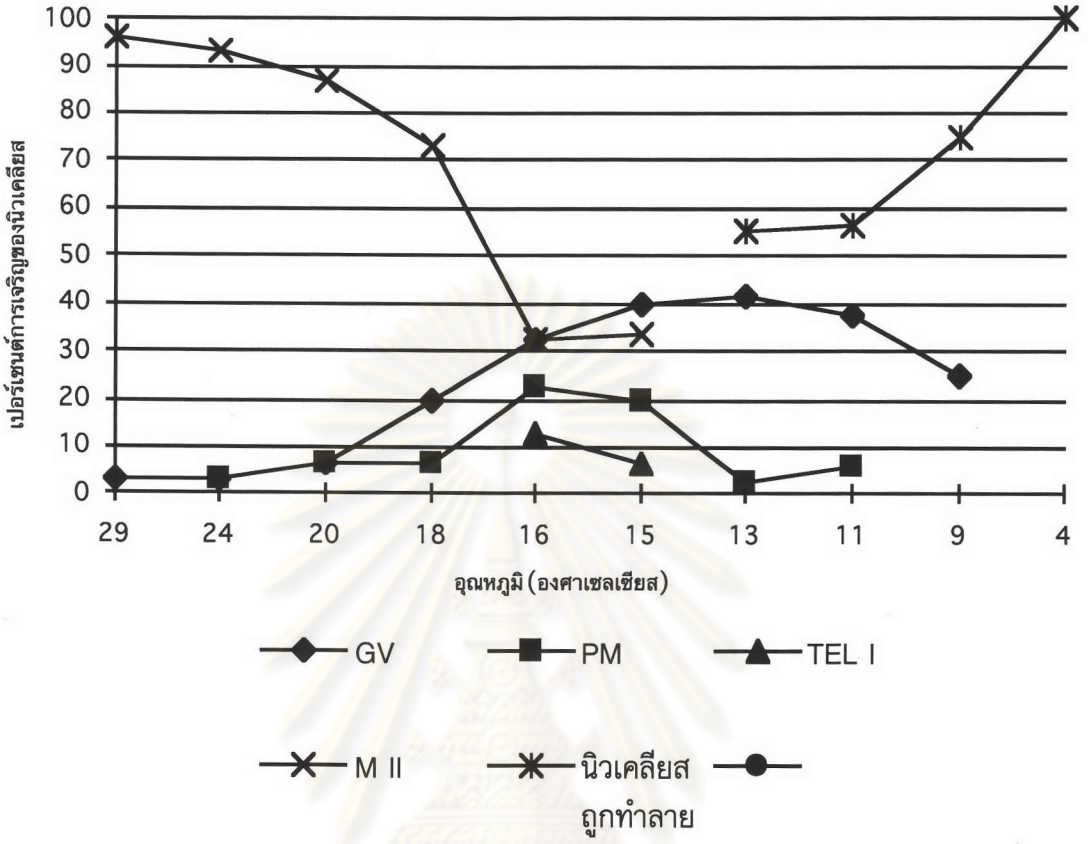


รูปที่ 18 โอโอไซต์ที่ผ่านการลดอุณหภูมิถึง 15$^{o}$ซ แล้วนำไปเลี้ยงใน IVM มีเดียมนาน 40 ชม. แล้วนำมาตรึงสภาพและย้อมสี พบว่า ส่วนไซโตพลาสซึมเริ่มแตกเป็นเม็ด แต่ก็ยังพบส่วนนิวเคลียส ที่ชะงักการเจริญ อยู่ที่ระยะ GV (กำลังขยาย 320 เท่า)

ตารางที่ 5 แสดงเปอร์เซนต์การเจริญถึงระยะต่าง ๆ ของโอโอไซต์ที่ปรับสมดุลย์แรงดันออสโมติคใน M199B ที่มี 1.5 โมลาร์ EG และ 0.1 โมลาร์ ซูโครส แล้วให้อยู่ในอุณหภูมิที่ลดลง นาน 5 นาที โดยการลดอุณหภูมิ 1°ซ ต่อ นาที จนถึงอุณหภูมิที่ต้องการ

| อุณหภูมิที่ต้องการ | จำนวนนาทีที่จะถึงอุณหภูมิที่ต้องการ | จำนวนโอโอไซต์ | เปอร์เซนต์การเจริญของโอโอไซต์ในระยะต่าง ๆ | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | GV | PM | M I | TEL I | M II | นิวเคลียสถูกทำลาย |
| 29 | 0 | 30 | 3.3 | – | – | – | 96.3[a] | – |
| 24 | 5 | 30 | 3.3 | 3.3 | – | – | 93.3[a] | – |
| 20 | 9 | 30 | 6.7 | 6.7 | – | – | 86.7[a] | – |
| 18 | 11 | 30 | 20.0 | 6.7 | – | – | 73.3[b] | – |
| 16 | 13 | 31 | 32.2 | 22.6 | – | 12.9 | 32.2[c] | – |
| 15 | 14 | 30 | 40.0 | 20.0 | – | 6.7 | 33.3[c] | – |
| 13 | 16 | 36 | 41.7 | 2.8 | – | – | – | 55.5 |
| 11 | 18 | 32 | 37.5 | 6.25 | – | – | – | 56.25 |
| 9 | 20 | 42 | 25.0 | – | – | – | – | 75.0 |
| 4 | 25 | 30 | – | – | – | – | – | 100 |

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์ หมายถึง a > b ($P < 0.05$) และ a > c, b > c ($P < 0.001$)




รูปที่ 19 แสดงเปอร์เซนต์การเจริญของนิวเคลียสถึงระยะต่าง ๆ ของโอโอไซต์ที่ปรับสมดุลแรงดันออสโมติค ใน M199B ที่มี เอทิลีนไกลคอล 1.5 โมลาร์ และ ซูโครส 0.1 โมลาร์ แล้วลดอุณหภูมิจาก 29°ซ ถึง 4°ซ ในอัตรา 1°ซ ต่อนาที พักอยู่ในอุณหภูมิที่ต้องการ 5 นาที แล้วนำมาเลี้ยงใน IVM มีเดียมนาน 40 ชม.

**วิจารณ์ผลการทดลอง**

ในการทดลองที่ 1 การเก็บรักษารังไข่ในน้ำเกลือผสมกานามัยซินไว้ในอุณหภูมิห้องปรับอากาศเป็นเวลานาน 8 ชม. ไม่ทำให้โอโอไซต์ที่เจาะได้จากรังไข่นั้นมีจำนวนโอโอไซต์เฉลี่ยต่อรังไข่และเปอร์เซนต์ในการเจริญจนเป็นไข่สุก ไม่ต่างจากโอโอไซต์ที่ได้จากการเจาะรังไข่ทันทีที่กลับมาถึงห้องปฏิบัติการ ดังนั้น ตามสภาพการเก็บรังไข่และปฏิบัติการในเวลากลางคืน จะ

สามารถปรับเปลี่ยนเวลาเพื่อความสะดวกต่อการปฏิบัติงานได้ ซึ่งหมายความว่า เราสามารถจะเก็บรังไข่จากโรงฆ่าสัตว์ในตอนกลางคืนเอาไว้ และเริ่มงานในตอนเช้าได้ แต่การเก็บรังไข่ไว้นาน 12 และ 18 ชม. ทำให้ทั้งจำนวนโอโอไซต์เฉลี่ยต่อรังไข่และเปอร์เซนต์ไข่สุกลดลง ทั้งนี้ อาจจะเป็นเพราะว่า การเก็บรังไข่ไว้นานทำให้คูมูลัสเซลล์เกาะกับโซนาเพลลูซิดาหลวมและกระจายตัวออกจากโซนาเพลลูซิดามาก และสีไซโตพลาสซึมที่เปลี่ยนแปลงไปอาจทำให้การสังเคราะห์สารอาหารและฮอร์โมน และส่งสารที่จำเป็นสำหรับการเจริญของทั้งไซโตพลาสซึม และ นิวเคลียสลดน้อยลงไปได้ จึงทำให้เปอร์เซนต์การสุกของไข่น้อยกว่าโอโอไซต์ที่เจาะจากรังไข่ทันทีที่มาถึง หรือ เก็บไว้นานเพียง 8 ชม. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ดังนั้น หากจะเก็บรังไข่ไว้นาน 12–18 ชม. ควรจะต้องพิถีพิถันในการคัดเลือกโอโอไซต์ โดยคัดทั้งสีไซโตพลาสซึมและปริมาณและความหนาแน่นในการยึดเกาะของคูมูลัสเซลล์กับโซนาเพลลูซิดา อาจจะทำให้ประสบผลสำเร็จใกล้เคียงกับโอโอไซต์ที่เจาะจากรังไข่ทันทีที่มาถึง หรือจากรังไข่ที่เก็บไว้ 8 ชม. ได้ การเก็บรักษารังไข่ในน้ำเกลือผสมกานามัยซินนาน 24 ชม. คงจะไม่เหมาะสมในการปฏิบัติงานโดยทั่วไป เพราะคุณภาพโอโอไซต์ที่ได้ไม่ดี เปอร์เซนต์การสุกของโอโอไซต์ที่ได้จากการเลี้ยงก็ต่ำลงจากปกติมาก และเปอร์เซนต์การเจริญถึง 2–4 เซลล์ ก็ต่ำกว่าเกณฑ์ปกติมาก

ในการทดลองที่ 2 พบว่าโอโอไซต์ที่ผ่านการปรับสมดุลแรงดันออสโมติคในมีเดียม M199B ที่มี EG 1.5 โมลาร์ และ ซูโครส 0.1 โมลาร์ จะมีเปอร์เซนต์การสุกของไข่หรือการเจริญของนิวเคลียสถึงระยะ M II สูงที่สุด 88.5 % ซึ่งสูงกว่าโอโอไซต์ปกติที่ไม่ผ่านการปรับสมดุลย์แรงดันออสโมติค 11.9% ซึ่งเป็นเช่นนี้ในทุกๆ ครั้งที่ทำการทดลอง ส่วน GLY DMSO PROH และ BUOH ไม่มีผลทำให้เปอร์เซนต์การเจริญของนิวเคลียสถึงระยะ M II แตกต่างจากปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เป็นที่น่าสังเกตว่า ในการเลี้ยงโอโอไซต์ตามปกติจะมีโอโอไซต์ที่นิวเคลียส ไม่สามารถเจริญผ่านระยะ M I ไปได้รวม 11.9% แต่โอโอไซต์ที่ผ่านปรับสมดุลย์ในมีเดียม M199B ที่มี 1.5 โมลาร์ ของ CPA ต่อไปนี้คือ GLY BUOH DMSO หรือ PROH จะมีโอโอไซต์ที่ไม่สามารถเจริญผ่านระยะ MI ขึ้นไปได้ภายใน 40 ชม. ของการเลี้ยงได้อยู่ 29.7 24.8 16.2 หรือ 13.7% ตามลำดับ การที่ทั้ง GLY และ BUOH มีเปอร์เซนต์ของโอโอไซต์ที่ไม่สามารถเจริญผ่านระยะ M I ไปได้ สูงกว่าการเลี้ยงโอโอไซต์ตามปกติกว่าเท่าตัว อาจเป็นเพราะว่า GLY และ BUOH มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า EG และ DMSO และ PROH ทำให้การล้าง CPA

ออกจากเซลล์ไข่ก่อนจะนำไปเลี้ยง ทำได้ไม่หมดสมบูรณ์ในเวลาที่เท่ากัน จึงทำให้เกิดผลกระทบต่อการเจริญของนิวเคลียส แต่ในกลุ่มโอโอไซต์ที่ผ่านการปรับสมดุลย์แรงดันออสโมติค ในมีเดียม M199B นี้มี EG รวมอยู่ด้วยนั้น มีเปอร์เซนต์ของโอโอไซต์ที่ไม่สามารถเจริญผ่าน ระยะ M II อยู่เพียง 8.6% ซึ่งต่ำกว่าโอโอไซต์ที่เลี้ยงตามปกติ จึงน่าจะเป็นไปได้ที่ EG สามารถช่วยกระตุ้นให้การเจริญของโอโอไซต์เป็นไปได้ดีกว่าปกติ ซึ่งน่าจะมีการศึกษาถึงผลของ EG ต่อการเจริญของโอโอไซต์สุกรและการปฏิสนธินอกร่างกายต่อไป

จากผลของการทดลองที่ 3 จะเห็นได้ว่า โอโอไซต์เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำลงถึง 18$^{o}$ซ จะเริ่มสังเกตพบความแตกต่างของการเจริญของโอโอไซต์ กล่าวคือ เปอร์เซนต์การเจริญถึงระยะ M II ลดลงจากปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และมีเปอร์เซนต์ของโอโอไซต์ ที่ระยะการเจริญของนิวเคลียส ไม่พัฒนาผ่านระยะ PM สูงถึง 26.7% และเมื่ออุณหภูมิลดลงไปอีก 2-3$^{o}$ซ (ถึง 16 และ 15$^{o}$ซ) เปอร์เซนต์การสุกของไข่ยิ่งลดลงจากปกติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.01$) และเปอร์เซนต์การเจริญของโอโอไซต์ หลังจากที่ลดอุณหภูมิถึง 13$^{o}$ซ พบว่า 44.5% ของโอโอไซต์ที่เลี้ยงมาแล้ว 40 ชม. ตรวจไม่พบนิวเคลียส และตรวจไม่พบนิวเคลียสเลยในกลุ่มของโอโอไซต์ที่ลดอุณหภูมิลงมาถึง 4$^{o}$ซ แสดงว่า อุณหภูมิที่เริ่มมีผลกระทบต่อการเจริญของนิวเคลียสของโอโอไซต์ คือ 16$^{o}$ซ และอุณหภูมิสุดท้ายที่โอโอไซต์สุกรยังพอสามารถเจริญได้ คือ 15$^{o}$ซ ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Didion และคณะ (1990) ที่รายงานว่า โอโอไซต์สุกรที่ระยะ GV ไม่สามารถมีชีวิตรอดถ้าอุณหภูมิเย็นลงถึง 15$^{o}$ซ หรือต่ำกว่านี้ และในเอ็มบริโอสุกรก็มีผลเช่นเดียวกันนี้จากรายงานของ Wilmut (1972), Polge และคณะ (1974) และ Polard และ Leibo (1994) ซึ่ง Polard และ Leibo ได้ทำการทดลองลดอุณหภูมิในเอ็มบริโอสุกรอย่างละเอียดระหว่าง อุณหภูมิ 15$^{o}$ซ ถึง 10$^{o}$ซ พบว่า 90% ของเอ็มบริโอระยะมอรูลาสามารถเจริญถึงบลาสโตซิสได้เมื่อลดอุณหภูมิถึง 15$^{o}$ซ แต่ถ้าลดลงถึง 14$^{o}$ซ มีเพียง 10% เท่านั้นที่เจริญถึงบลาสโตซิสได้ และเมื่อลดถึง 13$^{o}$ซ หรือต่ำกว่านี้ ไม่มีเอ็มบริโอมีชีวิตรอดเลย จากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่า โอโอไซต์สุกรไม่สามารถมีชีวิตรอดถ้าทำการลดอุณหภูมิอย่างช้าลงมาต่ำกว่า 15$^{o}$ซ ดังนั้น การแช่แข็งโอโอไซต์สุกรด้วยวิธีการลดอุณหภูมิช้าๆ จนถึงจุดเยือกแข็ง แล้วชักนำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็ง จึงไม่น่าจะเหมาะสมที่จะใช้กับโอโอไซต์สุกร ควรจะศึกษาต่อไป โดยใช้วิธีการแช่แข็งที่ผ่านจุดเยือกแข็งนี้ไปอย่างรวดเร็ว