

การศึกษาเปรียบเทียบการแช่แข็งอสุจิแบบเนื้อแก้วโดยเทคนิค Solid Surface Vitrification และการแช่แข็งไอไนโตรเจน (Vapor Freezing)
Comparative study of sperm cryopreservation between solid surface vitrification and vapor freezing technique.

จิรัฐติกา ไชยา¹

Jirattikan Chaiya

บทคัดย่อ

ศึกษาเปรียบเทียบ อัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิ (Sperm Motility) อัตราการเคลื่อนไหวก้าวหน้าของอสุจิ (Sperm Progressive Motility) จำนวนรูปร่างอสุจิปกติ (Normal Sperm Morphology) และอัตราอสุจิมีชีวิต (Vitality) ภายหลังการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วโดยเทคนิค Solid Surface Vitrification และวิธีแช่แข็งไอไนโตรเจน (Vapor Freezing)

ผู้วิจัยใช้ตัวอย่างน้ำอสุจิจากอาสาสมัคร 52 ราย ที่ผลการตรวจคุณภาพน้ำอสุจิ (Semen Analysis) ผ่านเกณฑ์ปกติมาตรฐานของ World Health Organization (WHO, 2010) ในการทดลองน้ำอสุจิ (Semen) จะถูกคัดแยกตัวอสุจิ (Sperm Preparation) โดยเทคนิค Discontinuous Density Gradient แล้วแบ่งเป็น 2 กลุ่ม เพื่อนำไปผ่านกระบวนการแช่แข็งทั้ง 2 วิธี และนำมาละลายเพื่อตรวจวัดคุณสมบัติต่างๆ

ภายหลังจากละลายอสุจิที่แช่แข็งพบว่าการแช่แข็งแบบ Vitrification ให้ คุณสมบัติของอสุจิ ดีกว่าในกลุ่มที่แช่แข็งแบบ Vapor Freezing ทั้งในเรื่องของอัตราการเคลื่อนไหวก้าวหน้า (42.85±17.320% และ 36.53 ± 17.352%) อัตราการเคลื่อนไหวก้าวหน้าของอสุจิ (34.16 ± 17.08% และ 31.20 ± 17.22%) และรูปร่างอสุจิปกติ (13.86±5.583% และ 9.98±5.599%) ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับอัตราอสุจิมีชีวิต (Vitality) ของอสุจิ พบว่ากลุ่มที่แช่แข็งแบบ Vapor Freezing มีค่า สูงกว่ากลุ่มที่แช่แข็งแบบ Vitrification (72.75±12.317% และ 68.96±12.508%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการทดลองวิธีการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วโดยเทคนิค Solid Surface Vitrification ได้ผล ดีกว่าเมื่อเทียบกับการแช่แข็งแบบ Vapor Freezing

คำสำคัญ Cryopreservation, Human sperm, Solid Surface Vitrification

¹ นักวิชาการวิทยาศาสตร์การแพทย์ หน่วยผู้บริจาค โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ Corresponding E-mail : cjirattikan@gmail.com

Abstract

The present study aims to compare the effect of Solid Surface Vitrification and Vapor Freezing compare sperm motility, sperm progressive motility, normal sperm morphology and vitality. 52 semen samples from sperm donors were rated according to the World Health Organization criteria (WHO, 2010). Semen were sperm prepared by Discontinuous Density Gradient and divided into 2 groups and freezed by Solid Surface Vitrification and Vapor Freezing. Afterwards, thawed for evaluation of sperm characters.

The results showed better significance in sperm motility ($42.85 \pm 17.320\%$ VS $36.53 \pm 17.352\%$), sperm progressive motility ($34.16 \pm 17.08\%$ VS $31.20 \pm 17.22\%$) and normal sperm morphology ($13.86 \pm 5.583\%$ VS $9.98 \pm 5.599\%$) in Solid Surface Vitrification when compared to Vapor Freezing respectively whereas, sperm vitality obtained from Vapor Freezing appeared to be higher significantly when compared to Solid Surface Vitrification ($72.75 \pm 12.317\%$ VS $68.96 \pm 12.508\%$). Solid Surface Vitrification showed better results when compared to those of Vapor Freezing.

Keywords : Cryopreservation, Human sperm, Solid Surface Vitrification

บทนำ

ปัจจุบันการศึกษาวิจัยและการรักษาทางการแพทย์ด้านเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์มีการพัฒนาไปอย่างรวดเร็ว ผู้วิจัยในฐานะนักวิทยาศาสตร์ ของหน่วยผู้มีบุตรยาก โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ มีหน้าที่รับผิดชอบงานทางด้านการวิเคราะห์คุณภาพอสุจิ การเตรียมอสุจิสำหรับเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ และการเก็บอสุจิโดยการผ่าตัด เล็งเห็นว่าห้องปฏิบัติการของหน่วยงานยังขาดองค์ความรู้และการพัฒนางานทางด้าน “การแช่แข็งอสุจิ” ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาองค์ความรู้ดังกล่าว เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนางานต่อไป

ในการแช่แข็งเซลล์ปัจจัยที่บอกถึงโอกาสที่เซลล์จะสามารถทนต่อการแช่แข็งขึ้นกับขนาด รูปร่าง ปริมาณน้ำในเซลล์ permeability ของผนังเซลล์อสุจิซึ่งเป็นเซลล์ขนาดเล็กมีปริมาณของ cytoplasm น้อย โอกาสที่จะถูกกระทบจากการแช่แข็งจึงมีน้อยกว่าเซลล์ตัวอ่อนหรือเซลล์ไข่ การแช่แข็งอสุจิจึงมีวิธีที่แตกต่างและไม่ยุ่งยากเท่าการแช่แข็งตัวอ่อน นอกจากนี้ตัวอสุจิยังสามารถทนต่อการลดอุณหภูมิได้มากกว่าตัวอ่อน จึงมีวิธีการในการลดอุณหภูมิหลายวิธี เช่น การแช่แข็งเนื้ออโนโตรเจน(Vapor Freezing) การแช่แข็งโดยการลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ และการแช่แข็งแบบเร็ว ซึ่งปัจจุบันพัฒนามาเป็นการแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว (Vitrification)(ธีระพร วุฒยวนิช, 2552) การแช่แข็งแบบเนื้อแก้วเป็นทิศทางการใหม่ของการแช่แข็งอสุจิที่ได้รับการแนะนำ(Hammaddeh & et al, 1999) เป็นการแช่แข็งที่ให้อสุจิสัมผัสกับน้ำยาแช่แข็งในขณะที่เย็นและมีการลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว(Nawroth & et al,

2002; Isachenko et al, 2003; Kasai&Mukaida, 2004) การแช่แข็งเนื้ออโนโตรเจน เป็นวิธีที่ง่าย ในการเตรียมอุปกรณ์และน้ำยาที่หาซื้อได้ราคาไม่แพง เมื่อเปรียบเทียบกับแช่แข็งโดยการลดอุณหภูมิอย่างช้าๆด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ที่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพงและมีขั้นตอนที่ยุ่งยากกว่า และจากงานศึกษาของโรงพยาบาลศิริราชพบว่าวิธีการแช่แข็งด้วยการวางไว้เหนือไอของไนโตรเจนกับการใช้คอมพิวเตอร์ควบคุมได้ผลไม่แตกต่างกัน คือมีอัตราการรอดของอสุจิละ 51.2 และ 48.2 ตามลำดับ(สมบูรณ์ คุณานิคม, 2545) ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงเลือกใช้การแช่แข็งเนื้ออโนโตรเจนมาศึกษาเปรียบเทียบกับ การแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว

หลักการโดยรวมของความแตกต่างของ 2 วิธีดังกล่าวคือการแช่เนื้ออโนโตรเจนเป็นขบวนการเก็บรักษาเซลล์/เนื้อเยื่อในสาร Cryopreservatives เช่น ไนโตรเจนเหลว จะทำให้เซลล์สูญเสียน้ำภายในบางส่วนโดย Freeze-induction มักประสบปัญหาการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ตามมาทำให้เซลล์ได้รับอันตราย ปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาการแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว โดยใช้แนวคิดการเปลี่ยนสถานะของน้ำไปเป็นของเหลวชนิดชั้นโดยไม่ผ่านการเป็นผลึกน้ำแข็ง ทำได้โดยการดูดเอาของเหลวที่สามารถเปลี่ยนเป็นผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ออกมาโดยใช้สาร Cryoprotectives เช่น Dimethylsulfoxide, Mannitol, Sorbitol, Polyethyleneglycol เป็นต้น แล้วนำไปแช่ใน liquid nitrogen (สุธาณี เวสวบุตร, ม.ป.ป) ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ประยุกต์การแช่แข็งแบบเนื้อแก้วโดยเทคนิค Solid Surface Vitrification จาก หน่วยเวชศาสตร์การเจริญ

พันธุ์ ภาควิชาสัตวศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยได้ปรับสูตรน้ำยาจาก 15% Glycerol (ผสมกับอสุจิในอัตราส่วน 1:1 จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ Glycerol 7.5%) เป็น 10% Glycerol (เมื่อผสมกับอสุจิในอัตราส่วน 1:1 จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ glycerol 5%) เนื่องจากมีการศึกษาพบว่า Glycerol ในความเข้มข้น 7.5% ที่ใช้กันทั่วไปใน HSPM medium เพื่อแช่แข็งอสุจิแบบช้า (และแบบเหวี่ยงไนโตรเจน) อาจเป็นผลเสีย (Toxic) ต่อตัวอสุจิด้วยกลไกที่ยังไม่ทราบแน่ชัด และการลดความเข้มข้นของ Glycerol ลงเหลือ 5% พบว่า ทำให้ได้ตัวอสุจิเคลื่อนไหวหลังการละลายสูงขึ้นชัดเจน (ธีระพร วัฒนวิช, 2552)

ด้วยเหตุนี้การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วโดยเทคนิค Solid surface vitrification และการแช่แข็งแบบเหวี่ยงไนโตรเจน (Vapor Freezing) จึงต้องการทราบว่าอัตราการเคลื่อนไหว (Motility), อัตราการเคลื่อนไหวไปข้างหน้า (Progressive motility), จำนวนรูปร่างปกติ (Morphology) และอัตราการรอดชีวิต (Vitality) ภายหลังการแช่แข็งของทั้งสองวิธีเป็นอย่างไร เพื่อใช้ข้อมูลการศึกษาดังกล่าวเป็นแนวทางพัฒนางานห้องปฏิบัติการเด็กหลอดแก้ว ของหน่วยผู้มีบุตรยาก โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาเปรียบเทียบ อัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิ (Sperm Motility), อัตราการเคลื่อนไหวไปข้างหน้าของอสุจิ (Sperm Progressive Motility), จำนวนรูปร่างปกติ (Sperm Morphology) และอัตราการมีชีวิต

(Vitality) ภายหลังการแช่แข็งแบบ Solid Surface Vitrification และ Vapor Freezing

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

การศึกษานี้ใช้กลุ่มตัวอย่างของคนไข้เพศชายที่เข้ามารักษาในหน่วยมีบุตรยาก โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติและได้รับการตรวจน้ำเชื้ออสุจิ จำนวน 52 คน โดยคนไข้ที่เข้าเกณฑ์งานวิจัยนี้ กำหนดให้ค่าการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้ออสุจิผ่านเกณฑ์มาตรฐานของ World Health Organization (WHO, 2010) ดังนี้

- ปริมาณน้ำอสุจิมากกว่า 1.5 มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างมากกว่าหรือเท่ากับ 7.2 ลักษณะน้ำอสุจิไม่หนืดเป็นก้อน และมีเมลล์ผสมมากจนไม่สามารถคัดแยกตัวอสุจิที่มีชีวิตได้
- การตรวจคุณภาพอสุจิด้วยเครื่อง Computer-aided sperm analysis (CASA) มีความเข้มข้นของอสุจิมากกว่าหรือเท่ากับ 15 ล้านตัว/มิลลิลิตร มีการเคลื่อนไหวของอสุจิมากกว่าหรือเท่ากับ 40% และอสุจิรูปร่างปกติมากกว่าหรือเท่ากับ 4%

วิธีการศึกษา

การเตรียมน้ำอสุจิ (Sperm preparation)

เก็บน้ำเชื้ออสุจิโดยวิธีสำเร็จความใคร่ด้วยตนเองด้วยภาชนะพลาสติกปากกว้างที่ปลอดเชื้อ นำน้ำเชื้ออสุจิที่เก็บได้มาวางให้เหลวเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 37° C แบ่งมาตรวจวิเคราะห์คุณภาพอสุจิ เพื่อประเมินคุณภาพอสุจิว่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของข้อกำหนดงานวิจัย นำน้ำเชื้ออสุจิที่ผ่านเกณฑ์

มาตรฐานมาคัดแยกด้วยเทคนิค Discontinuous density gradient เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การทดลองแช่แข็งอสุจิ

นำน้ำอสุจิที่ผ่านการคัดแยกด้วยเทคนิค Discontinuous density gradient แบ่งเป็น 2 ส่วน

ส่วนที่ 1 คือ กลุ่มตรวจคุณสมบัติก่อนการแช่แข็ง ใช้อสุจิปริมาตร 0.1 ml สำหรับตรวจคุณสมบัติของเชื้ออสุจิ โดยตรวจนับจำนวนและการเคลื่อนไหวด้วยเครื่อง Computer-aided sperm analysis (CASA) ตรวจรูปร่าง (sperm morphology) ของตัวอสุจิโดยการย้อมสี Papanicolaou แล้วอ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า เพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่ปกติและผิดปกติชนิดต่างๆ ตรวจจำนวนการมีชีวิตโดยการทำ hypo-osmotic swelling test (HOST)

ส่วนที่ 2 คือ กลุ่มทดลองการแช่แข็ง ใช้อสุจิปริมาตร 0.6 ml นำไปแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว โดยใช้เทคนิค solid surface vitrification และ Vapor Freezing วิธีละ 0.3 ml ตามขั้นตอนดังนี้

การแช่โดยเทคนิค solid surface vitrification

- ใส่ไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟมให้ระดับไนโตรเจนได้ประมาณครึ่งกล่อง
- พับกระดาษอะลูมิเนียม (ฟรอยด์) ให้เป็นรูปถ้วยวงกลมเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับขนาดของกล่องโฟม ความลึก 1 เซนติเมตร หย่อนกระดาษอะลูมิเนียม (ฟรอยด์) ลงในกล่อง

โฟม ปิดฝากล่องโฟมให้อุณหภูมิของกระดาษอะลูมิเนียมใกล้เคียงกับอุณหภูมิไนโตรเจนเหลว (-196°C)

- ผสมอสุจิกับน้ำยาแช่แข็งอัตราส่วน 1:1 แล้วหยดส่วนผสมลงบนฟรอยด์ หยดละ 20 μl . จนส่วนผสมหมด จะได้อสุจิแช่แข็งในลักษณะเป็นเม็ดกลม แข็ง สีขาว เกือบเม็ดอสุจิแช่แข็งไว้ใน cryovial แล้วนำไปแช่ในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196°C

การแช่เหนือไอไนโตรเจน

เตรียมน้ำยาและ cryovial สำหรับบรรจุส่วนผสมที่จะแช่แข็ง ผสมอสุจิกับน้ำยาแช่แข็งอัตราส่วน 1:1 ใน cryovial ตั้งเวลา 10 นาที ย้ายไปแช่เหนือไอไนโตรเจนที่ระดับความสูง 1-2 cm. เป็นเวลา 10 นาที (ผูกกับเชือกแล้วแขวนลงไปในถังไนโตรเจน) เกือบแช่ในถังไนโตรเจนที่อุณหภูมิ -196°C

การตรวจคุณสมบัติภายหลังการละลาย

เก็บอสุจิที่ทำการแช่แข็งไว้ในไนโตรเจนเหลวนานอย่างน้อย 24 ชั่วโมง แล้วทำการละลายอสุจิตามขั้นตอนดังนี้

- อสุจิที่แช่แข็งด้วยวิธีเหนือไอไนโตรเจน ให้นำออกจากถังไนโตรเจนแล้วบ่มในตู้อบ อุณหภูมิ 37°C ประมาณ 10 นาที
- อสุจิที่แช่แข็งแบบเนื้อแก้ว โดยใช้เทคนิค solid surface vitrification เมื่อนำออกจากถังไนโตรเจนแล้ว นำไปเทกระจายบนจานพลาสติกสำหรับเลี้ยงตัวอ่อน ให้เม็ดอสุจิที่แช่แข็งวางแยกห่างกัน ปล่อยให้ละลาย เมื่อแต่ละเม็ดละลายแล้วรีบดูดแต่ละหยดรวบรวมใส่ในหลอดกันกลมขนาด 1-2 ml

นำสperm ที่ละลายจากการแช่แข็งทั้ง 2 วิธี ไปตรวจคุณสมบัติด้วยวิธีการเดียวกับส่วนที่ 1 เพื่อเปรียบเทียบผลคุณภาพสperm ก่อนและภายหลังการแช่แข็ง

สถิติที่ใช้ในการศึกษา

นำผลการตรวจคุณภาพสperm จากการแช่แข็งสperm 2 วิธี มาวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบ

ว่าวิธีการแช่แข็งแบบไหนให้ผลที่ดีกว่ากัน โดยดูจากอัตราการเคลื่อนไหว (motility), อัตราการเคลื่อนไหวไปข้างหน้า (progressive motility), จำนวนรูปร่างที่ปกติ (morphology) และอัตราการมีชีวิต (vitality) โดยใช้โปรแกรม SPSS (version 17.0) วิเคราะห์สถิติแบบ pair t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการศึกษา

ผลการเปรียบเทียบค่าคุณสมบัติต่าง ๆ ระหว่างกลุ่มก่อนการแช่แข็ง(Pre-freeze), กลุ่มแช่เหนื่อไอน้ำ(Vapor Freezing)และกลุ่มการแช่แบบเนื้อแก้ว(vitrification) แสดงในตารางที่ 1 และภาพที่ 1

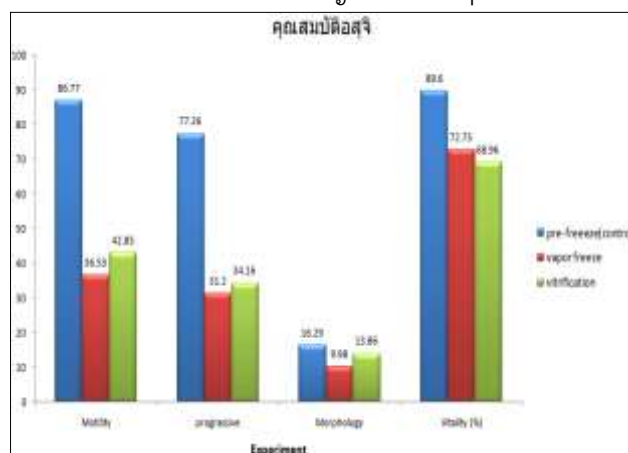
ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบผลของคุณสมบัติสperm ในกลุ่มการทดลองต่างๆ

คุณสมบัติสperm	Pre-freeze	Thaw	
		Vapor Freezing	vitrification
Sperm Motility (%) (p value ≤ 0.05)	86.77±7.347 -	36.53±17.352 (0.00) ^{a,b}	42.85±17.320 (0.00) ^a
Progressive Motility (%) (p value ≤ 0.05)	77.26 ± 6.84 -	31.20 ± 17.22 (0.00) ^a , (0.05) ^b	34.16 ± 17.08 (0.00) ^a
Normal morphology (%) (p value ≤ 0.05)	16.29±6.596 -	9.98±5.599 (0.00) ^{a,b}	13.86±5.583 (0.00) ^a
Vitality (%) (p value ≤ 0.05)	89.6±7.32 -	72.75±12.317 (0.00) ^a , (0.02) ^b	68.96±12.508 (0.00) ^a

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

a = แตกต่างจากกลุ่ม Pre-freeze อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p ≤ 0.05

b = แตกต่างจากกลุ่ม vitrification อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p ≤ 0.05



ภาพที่ 1 แสดงผลรวมของคุณสมบัติสperm ในกลุ่มการทดลองต่าง ๆ

จากตารางที่ 1 และ ภาพที่ 1 แสดงให้เห็นว่าการทดลองแช่แข็งอสุจิทั้งแบบ Vapor Freezing และแบบ Vittrification พบว่าเมื่อละลายอสุจิแล้วอัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิของทั้งสองกลุ่มลดลง ในกลุ่มของ Vapor Freezing ($36.53 \pm 17.352\%$) มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม Pre-freeze ($86.77 \pm 7.347\%$) และ ใน กลุ่ม Vittrification ($42.85 \pm 17.320\%$) อัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Pre-freeze ($86.77 \pm 7.347\%$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่แช่แข็งอสุจิทั้งสองกลุ่มพบว่า กลุ่ม Vittrification ($42.85 \pm 17.320\%$) มีอัตราการเคลื่อนไหวสูงกว่ากลุ่ม Vapor Freezing ($36.53 \pm 17.352\%$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อพิจารณาอัตราการเคลื่อนไหวไปข้างหน้าของอสุจิ(Sperm progressive motility) ในการทดลองแช่แข็งอสุจิทั้งแบบ Vapor Freezing และแบบ Vittrification พบว่าเมื่อละลายอสุจิแล้วอัตราการเคลื่อนไหวไปข้างหน้าของอสุจิของทั้งสองกลุ่มลดลง ซึ่งในกลุ่มของ Vapor Freezing ($31.20 \pm 17.22\%$) และกลุ่ม Vittrification ($34.16 \pm 17.08\%$) มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม Pre-freeze ($77.26 \pm 6.84\%$) แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่แช่แข็งอสุจิทั้งสองกลุ่มพบว่า กลุ่ม Vittrification ($34.16 \pm 17.08\%$) มีอัตราการเคลื่อนไหวสูงกว่ากลุ่ม Vapor Freezing ($31.20 \pm 17.22\%$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สำหรับรูปร่างอสุจิปกติ (Normal sperm morphology) จากการทดลองแช่แข็ง

อสุจิทั้งแบบ Vapor Freezing และแบบ Vittrification พบว่าเมื่อละลายอสุจิแล้วอัตรารูปร่างอสุจิปกติ ของทั้งสองกลุ่ม Vapor Freezing ($9.98 \pm 5.599\%$) และกลุ่ม Vittrification ($13.86 \pm 5.583\%$) มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับ กลุ่ม Pre-freeze ($16.29 \pm 6.596\%$) และในกลุ่ม Vapor Freezing ($9.98 \pm 5.599\%$) ก็ยังมีอัตรารูปร่างอสุจิปกติน้อยกว่ากลุ่ม Vittrification ($13.86 \pm 5.583\%$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในส่วนอัตราการมีชีวิต (Vitality) จากการศึกษาอัตราอสุจิที่มีชีวิต (Vitality) ด้วยวิธี Hypo-osmotic swelling test (HOS-test) พบว่าเมื่ออสุจิผ่านวิธีการแช่แข็งทั้งแบบ Vapor Freezing และแบบ Vittrification และเมื่อละลายอสุจิแล้ว อัตราอสุจิที่มีชีวิตของทั้งสองกลุ่มลดลง ซึ่งอัตราอสุจิที่มีชีวิตทั้งในกลุ่ม Vapor Freezing ($72.75 \pm 12.317\%$) และกลุ่ม Vittrification ($68.96 \pm 12.508\%$) มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม Pre-freeze ($89.6 \pm 7.32\%$) และกลุ่ม Vapor Freezing ($72.75 \pm 12.317\%$) ยังมีอัตราการมีชีวิตของอสุจิสูงกว่ากลุ่ม Vittrification ($68.96 \pm 12.508\%$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

อภิปรายและสรุปผล

การศึกษาในครั้งนี้ได้เปรียบเทียบการแช่แข็งอสุจิแบบเหวี่ยงไอน้ำ (Vapor Freezing) กับ การ แช่ แบบ เหวี่ยง ไก๊ว (Vittrification) ซึ่งผลการศึกษาพบว่า การแช่แข็งทั้งในแบบ Vapor Freezing และ Vittrification ภายหลังการละลายอสุจิออกมาแล้วจะทำให้คุณสมบัติต่างๆของอสุจิมีคุณภาพลดลง ทั้งอัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิ (Sperm Motility), อัตราการเคลื่อนไหวไป

ข้างหน้าของอสุจิ(Sperm Progressive Motility), รูปร่างอสุจิปกติ (Normal Sperm Mophology) และ อัตราการมีชีวิต (Vitality) ของอสุจิ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับผลระหว่างการแช่แข็งอสุจิแบบ Vapor Freezing กับ Vitrification พบว่าภายหลังการละลายอสุจิจากการแช่แข็งอสุจิแบบ Vitrification ให้ผลอัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิ (Sperm Motility) และอัตราการเคลื่อนไหวไปข้างหน้าของอสุจิ (Sperm Progressive Motility) สูงกว่า การแช่แข็งอสุจิแบบ Vapor Freezing ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Moskovtsev และคณะในการแช่แข็งอสุจิแบบ Standard Vapor Freezing เปรียบเทียบกับการแช่แข็งแบบ Vitrification ที่พบว่าอสุจิหลังการแช่แข็งแบบ Vitrification จะมีอัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิ (Sperm Motility) มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับการแช่แข็งแบบ Standard Vapor Freezing (Moskovtsev & et al, 2011)

จากการศึกษาของ Satirapod และคณะที่ศึกษาการแช่แข็งอสุจิแบบ Vitrification และการแช่แข็งอสุจิแบบ Vapor Freezing พบว่าผลของ อัตราการเคลื่อนไหว(Sperm motility), อัตราการเคลื่อนไหวไปข้างหน้าของอสุจิ (Sperm Progressive Motility)และรูปร่างอสุจิปกติ (Normal Sperm Mophology) ไม่แตกต่างกันในทั้งสองกลุ่มการทดลอง(Satirapod & et al, 2011) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการศึกษาของ Satirapod และคณะได้ใช้น้ำยาแช่แข็งอสุจิ HSPM medium มาใช้ในการแช่แข็งอสุจิแบบ Vitrification ซึ่งน้ำยาแช่แข็ง HSPM medium ที่มี 15% Glycerol เป็นส่วนผสมและให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ Glycerol เป็น 7.5 % นั้นอาจส่งผลเสียต่อตัวอสุจิด้วยกลไกที่ยังไม่ทราบแน่ชัด การลดความ

เข้มข้นของ Glycerol ในน้ำยา HSPM medium ให้เหลือ 10% จะช่วยเพิ่มคุณภาพของอสุจิภายหลังการแช่แข็งได้(ธีรพร วุฒยวนิช, 2552, น.109) และการวิจัยนี้ก็ได้รับลดความเข้มข้นของ Glycerol ในน้ำยา Glycerol-Egg yolk-Citrate (GEYC) ซึ่งใช้ในการแช่แข็งแบบ Vitrification จากสูตรเดิมใช้ 15% Glycerol ให้เหลือเพียง 10% Glycerol จึงทำให้ผลการศึกษานี้แตกต่างจากผลการศึกษาของ Satirapod และคณะ

นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำยา Glycerol-Egg yolk-Citrate (GEYC) ในการแช่แข็งแบบ Vitrification เป็นน้ำยาที่มีส่วนผสมของไข่แดง (egg yolk) ซึ่งเป็น Cyoprotectant กลุ่ม Non-permeating CPAs ที่มีคุณสมบัติไม่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์เพราะมีขนาดโมเลกุลใหญ่ การอยู่ภายนอกเซลล์จะช่วยดูดน้ำจากภายในเซลล์ให้ออกมาภายนอก จึงช่วยลดการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ได้ดีกว่าการใช้ น้ำยา HSPM medium จึงเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่ทำให้ผลการศึกษานี้แตกต่างจากการศึกษาของ Satirapodและคณะ อีกทั้งการศึกษานี้ยังได้นำน้ำยา Glycerol-Egg yolk-Citrate ไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 °C ก่อนนำมาผสมกับอสุจิในขั้นตอนการแช่แข็งแบบ Vitrification โดยเทคนิค Solid Surface Vitrification ซึ่งพบว่าช่วยเพิ่มร้อยละของตัวอสุจิที่มีการเคลื่อนไหวดีหลังการแช่แข็งและการละลายอสุจิ เพราะอุณหภูมิของน้ำยาแช่แข็งที่ต่ำสามารถช่วยลด toxicity ของสารที่ใช้ในการปกป้องภัยอันตรายจากการแช่แข็งอสุจิได้ด้วยเช่นกัน(ธีรพร วุฒยวนิช, 2552, น.108) จะเห็นว่าการเลือกใช้ น้ำยาแช่แข็งและเทคนิคในการแช่แข็งที่เหมาะสมมีความสำคัญในการปกป้องอสุจิในกระบวนการแช่แข็ง

เมื่อเปรียบเทียบผลอัตราการมีชีวิต (Vitality) ระหว่างการแช่แข็งอสุจิแบบ Vapor Freezing กับ Vitrification พบว่าการแช่แข็งอสุจิแบบ Vapor Freezing มีอัตราการอสุจิที่มีชีวิตสูงกว่าการแช่แข็งแบบ Vitrification ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวขัดแย้งกับอัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิ (Sperm Motility) และอัตราการเคลื่อนไหวไปข้างหน้าของอสุจิ (Sperm Progressive Motility) เพราะการทดลองนี้พบว่าการแช่แข็งแบบ Vitrification ให้ผลดีกว่าการแช่แข็งแบบ Vapor Freezing ทั้งนี้อธิบายได้ว่าภายหลังการแช่แข็งแบบ Vapor Freezing ได้จำนวนอสุจิที่รอดชีวิตมากกว่าการแช่แข็งแบบ Vitrification แต่จากการตรวจวัดการเคลื่อนไหวของอสุจิด้วยเครื่อง CASA ค่าอัตราการเคลื่อนไหว (Motility) เป็นค่าจากการวิเคราะห์ผลเฉพาะอสุจิที่เคลื่อนไหวเร็วมาก (Rapid Motility) และอสุจิที่เคลื่อนไหวเร็วปานกลาง (Medium Motility) แต่จะไม่วิเคราะห์จำนวนอสุจิที่เคลื่อนไหวช้า (Slow Motility) แสดงว่าการแช่แข็งแบบ Vapor Freezing มีอัตราการเคลื่อนไหวเร็วมาก (Rapid Motility) และอัตราการเคลื่อนไหวเร็วปานกลาง (Medium Motility) รวมกันแล้วน้อยกว่าการแช่แข็งแบบ Vitrification จึงทำให้ผลของอัตราการเคลื่อนไหว (Motility) จากการแช่แข็งแบบ Vitrification สูงกว่าการแช่แข็งแบบ Vapor Freezing กล่าวได้ว่าการแช่แข็งแบบ Vapor Freezing ให้จำนวนอสุจิที่รอดชีวิตสูงแต่มีอัตราการเคลื่อนไหวต่ำกว่าการแช่แข็งแบบ Vitrification ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเกิด Tail defect อันสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Satirapod และคณะที่พบว่าเมื่อละลายอสุจิมาแล้วในกลุ่มของ Vapor Freezing มีอัตรา Tail defect สูงกว่า กลุ่มของ Vitrification ซึ่ง

ความผิดปกติของรูปร่างอสุจิส่วนหางย่อมส่งผลต่อการเคลื่อนไหวของอสุจิตัวเช่นกัน

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า การแช่แข็งแบบ Vapor Freezing เมื่อละลายอสุจิออกมาแล้วคุณสมบัติต่างๆของอสุจิให้ผลต่ำกว่าในกลุ่มที่แช่แข็งแบบ Vitrification ทั้งในเรื่องของ Sperm Motility (%), Progressive Motility (%), Normal morphology (%) สาเหตุหนึ่งมาจากการแช่แข็งอสุจิแบบ Vapor freezing จะทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งในเซลล์หรือนอกเซลล์และมีการเปลี่ยนแปลงออสโมติก ที่อาจทำให้เกิดการหดตัวของเซลล์ที่กว้างซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิด Sperm damage (Gao & et al, 1995) นอกจากนี้ยังพบว่าการแช่แข็งแบบ Vapor freezing ที่ไม่มี cryoprotectant อสุจิตายหมดหลังการละลาย และถ้าใช้ cryoprotectant ความเข้มข้นต่ำๆ ก็จะทำให้ อสุจิเกิดการ toxic และเป็นสาเหตุให้เกิด Osmotic damage (Moskovtsev & et al, 2011) ปัญหาดังกล่าวสามารถแก้ไขได้โดยการแช่แข็งแบบ Solid Surface Vitrification (SSV) ซึ่งเป็นการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วจะทำให้ไม่เกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นทั้งในเซลล์และนอกเซลล์ และสามารถใช้ cryoprotectant ในความเข้มข้นต่ำๆได้ จึงช่วยลดการ Toxic ของอสุจิ (Ghasem S & et al, 2009) อีกทั้งยังป้องกันการเกิด chilling injury และลดการเกิด DNA damage ของอสุจิได้ (Satirapod & et al, 2011) แต่ข้อเสียของการแช่แข็งแบบ Vitrification นั้นพบว่าการที่มีไข่แดง (egg yolk) เป็นส่วนประกอบในน้ำยาแช่แข็ง ซึ่งไข่แดงเป็นโปรตีนที่แปลกปลอมมาจากสัตว์จึงทำให้อสุจิที่ผ่านการแช่แข็งไม่เหมาะที่จะนำมาฉีดเข้าโพรงมดลูก เพราะอาจทำให้มดลูกเกิดการบีบตัวอย่างรุนแรงและเป็นอุปสรรคในการทำ

หัตถการเด็กหลอดแก้ว เช่น การทำ Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) หยดไขมันจากไข่แดงอาจบดบังตัวอสุจิได้

ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองพบว่าการแช่แข็งอสุจิแบบ Vitrification นั้นเมื่อละลายอสุจิออกมาแล้วพบว่าคุณสมบัติของอสุจิมียุติภาพดีกว่าในกลุ่มที่แช่แข็งแบบ Vapor Freezing ทั้งในเรื่องของอัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิ (Sperm motility), อัตราการเคลื่อนไหวไปข้างหน้าของอสุจิ (Sperm Progressive Motility), รูปร่างอสุจิปกติ (Normal Sperm Morphology) ถึงแม้ว่าผลของ อัตราอสุจิที่มีชีวิต (Vitality) ของการแช่แข็งอสุจิแบบ Vapor Freezing จะมีผลดีกว่าก็ตาม แต่อัตราการรอดของอสุจิที่มีชีวิตนั้น รวมเป็นอสุจิที่มีการเคลื่อนไหวช้า (Slow Motility) หรือไม่มีการเคลื่อนไหว (Immotile spermatozoa) ฉะนั้นจากผลการทดลองวิธีการแช่แข็งแบบ Solid Surface Vitrification (SSV) จึงได้ผลดีกว่าเมื่อเทียบกับการแช่แข็งแบบ Vapor Freezing อย่างไรก็ตามการแช่แข็งแบบ SSV นั้นยังคงต้องหาเทคนิคหรือวิธีการคัดแยกอสุจิ (Sperm preparation) ภายหลังจากผ่านการแช่แข็งและละลายแล้ว เพื่อขจัดไข่แดง (Egg Yolk) ออกไปให้หมด ซึ่งวิธีการนั้นจะต้องไม่ทำให้อสุจิตายหรือสูญเสียอสุจิที่มีชีวิตให้น้อยที่สุด เพื่อที่จะนำอสุจิที่ได้มาใช้ในการฉีดเชื้อเข้าโพรงมดลูก (IUI) หรือทำ ICSI ต่อไป หรือในอีกกรณีหนึ่งอาจจะมีการศึกษาหาสารอื่นที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงที่สามารถมาแทนไข่แดงแล้วเมื่อนำมาผสมกับน้ำยาแช่แข็งอสุจิที่ไม่ทำให้เกิดการ Toxic ต่ออสุจิ สามารถทำให้อสุจิมีชีวิตรอด เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำไปประยุกต์ใช้กับการเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการช่วยการเจริญพันธุ์

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยหัวข้อ “การศึกษาเปรียบเทียบการแช่แข็งอสุจิแบบเนื้อแก้วโดยเทคนิค Solid surface vitrification และการแช่แข็งอสุจิแบบไอโนโตรเจน (Vapor freezing)” สำเร็จลุล่วงด้วยความอนุเคราะห์ของรองศาสตราจารย์ นายแพทย์พลุทธิ์ ต่ออุดม ที่กรุณารับเป็นที่ปรึกษาโครงการวิจัย และได้ให้ข้อคิด คำแนะนำ รวมทั้งแนวทางในการทำงาน จนทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงลงด้วยดี ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

นอกจากนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้ร่วมงานในหน่วยผู้มีบุตรยาก โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ที่ให้ความร่วมมือในการวิจัย ขอขอบพระคุณผู้ป่วยที่มาปรึกษาภาวะมีบุตรยากทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างวิจัย และขอขอบคุณน้องเกศนิชา นรสิงห์ และ น้องชลธิชา สำเร็จกิจเจริญ นักศึกษาปริญญาโท สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ วิชาเอกเวชศาสตร์การเจริญพันธุ์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่คอยให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยเป็นอย่างดี

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติปีงบประมาณ 2556

บรรณานุกรม

- ธีระพร วุฒยวนิช. (2552). *การแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว*. เชียงใหม่: บริษัทสันติภาพแพ็คพรีนธ์ จำกัด. น.108
- ธีระพร วุฒยวนิช. (2552). *การแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว*. เชียงใหม่: บริษัทสันติภาพแพ็คพรีนธ์ จำกัด. น.109
- ธีระพร วุฒยวนิช. (2552). *การแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว*. เชียงใหม่: บริษัทสันติภาพแพ็คพรีนธ์ จำกัด. น.161

- สมบูรณ์ คุณานิคม. (2545). *ภาวะมีบุตรยากและเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์*. กรุงเทพฯ: บริษัท พี.เอ.ลีฟวิ่ง จำกัด.
- สุญาณี เวสบุตร, สืบค้นเมื่อวันที่ 15มกราคม 2557 จาก http://www.qsb.org/webboard/webboard_Detail-1.asp?Board_ID=404
- Gao DY, Liu J, Liu C, McGann LE, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Critser JK. (1995). Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Hum Reprod.* 10:1109-1122.
- Ghasem S, Fakher R, Majied JZ. (2009). Vittrification of small volume of normal human sperms: Use of open pulled straw carrier. *J. Med. Sci*, 9(1), 30-35.
- Hammadeh M, Greiner S, Rosenbaum P, Schmidt W. (1999). Comparison Between Human Sperm Preservation Medium and TEST-Yolk Buffer on Protecting Chromatin and Morphology Integrity of Human Spermatozoa in Fertile and Subfertile Men After Freeze-Thawing Procedure. *Journal of Andrology. published online*, 22(6), 1012-1018.
- Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, Dessole S, Nawroth F. (2003). Vittrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reproductive BioMedicine Online*, 6(2), 191-200.
- Kasai M, Mukaida T. (2004). Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reproductive BioMedicine Online*, 9(2), 164-170.
- Moskovtsev SI, Lulat A. G-M, Librach CL. (2011). Cryopreservation of human spermatozoa by vitrification vs. slow freezing : Cannadian eaperience. In :Current Frontiers in Cryobiology. *Agricultural and Biological Sciences*, (3), 78-100.
- Nawroth F, Isachenko V, Dessole S, Rahimi G, et al. (2002). Vittrification of Human Spermatozoa Without Cryoprotectants. *Pubishing technology*, 23(2), 93-102.
- Satirapod C, et al. (2011).Comparison of cryopreserved human sperm from solid surface vitrification and standard vapor freezing method: on motility, morphology, vitality and DNA integrity. *J Andrology*, 44(1), 786-790.
- World Health Organization. (2010). *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*, 5th ed.