ผลของการเตรียมและไม่เตรียมเชื้ออสุจิก่อนการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วต่อคุณภาพอสุจิหลังการทำละลาย

โดย

นางสาวชลธิชา สำเร็จกิจเจริญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ มหาวทิยาลัยธรรมศาสตร์

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ผลของการเตรียมและไม่เตรียมเชื้ออสุจิก่อนการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วต่อคุณภาพอสุจิหลังการทำละลาย

โดย

นางสาวชลธิชา สำเร็จกิจเจริญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

Effect of prepared and unprepared semen on semen quality and DNA fragmentation of vitrified normozoospermia

BY

MISS CHONTHICHA SAMREJKIJCHAROEN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIRMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN MEDICAL SCIENCES
FACULTY OF MEDICINE
THAMMASAT UNIVERSITY
ACADEMIC YEAR 2015

COPYRIGHT OF THAMMASAT UNIVERSITY

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์

วิทยานิพนธ์

ของ

นางสาวชลธิชา สำเร็จกิจเจริญ

เรื่อง

ผลของการเตรียมและไม่เตรียมเชื้ออสุจิก่อนการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วต่อคุณภาพอสุจิหลังการทำละลาย

ได้รับการตรวจสอบและอนุมัติ ให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

เมื่อวันที่ 30 มิถุนายน พ.ศ. 2559

ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(รองศาสตราจารย์ ดร. รังสรรค์ พาลพ่าย)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์เจริญไชย เจียมจรรยา)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงพัชรา วิสุตกุล)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร. ตรีทิพย์ รัตรวรชัย)

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กัลยา อารีย์)

คณบดี

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ปรีชา วาณิชยเศรษฐกุล)

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของการเตรียมและไม่เตรียมเชื้ออสุจิก่อนการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วต่อคุณภาพอสุจิหลังการทำละลาย
ชื่อผู้เขียน	นางสาวชลธิชา สำเร็จกิจเจริญ
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา/คณะ/มหาวิทยาลัย	สาขาวิทยาศาสตรการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์เจริญไชย เจียมจรรยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม (ถ้ามี)	รองศาสตราจารย์ ดร.ตรีทิพย์ รัตนวรชัย รองศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงพัชรา วิสุตกุล
ปีการศึกษา	2558

บทคัดย่อ

บทนำ : การแช่แข็งอสุจิเป็นหนึ่งในเทคโนโลยีที่ใช้ในการรักษาภาวะการเจริญพันธุ์ในฝ่ายชาย แต่ภายหลังการละลายก็ยังมีข้อเสียที่ทำให้มีการลดลงของจำนวนอสุจิและ การเคลื่อนที่ของอสุจิ รวมทั้งมีการแตกหักของสาย ดีเอ็นเอของอสุจิเพิ่มขึ้น ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาเปรียบเทียบผลของการเตรียมเชื้ออสุจิ(sperm preparation) และไม่เตรียมเชื้ออสุจิ ก่อนการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วต่อคุณภาพของอสุจิหลังการละลาย

วิธีการศึกษา : เก็บตัวอย่างจากอาสาสมัครจำนวน 40 รายที่มีน้ำเชื้ออสุจิปกติ (ตาม criteria ของ WHO ๒๐๑๐) นำตัวอย่างอสุจิของแต่ละรายมาแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มการทดลอง ได้แก่ กลุ่มที่ 1 : กลุ่มควบคุม เป็นกลุ่มน้ำเชื้ออสุจิสด (fresh/unwashed : UW), กลุ่มที่ 2 : เป็นกลุ่มที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิก่อนนำไปผ่านการแช่แข็งและทำละลาย (unwashed + frozen and thawed : UW+F), กลุ่มที่ 3 : เป็นกลุ่มที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ (washed : W), กลุ่มที่ 4 : เป็นกลุ่มที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิก่อนแล้วจึงนำไปผ่านการแช่แข็งและทำละลาย (washed + frozen and thawed : W+F) จากนั้นนำมาทำการตรวจวิเคราะห์เปรียบเทียบคุณภาพของอสุจิ (semen analysis) ได้แก่ ความเข้มข้นของอสุจิ, การเคลื่อนที่ของอสุจิ, อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติ, ความสมบูรณ์ของการทำงานของอสุจิ โดยวิธี Hyaluronan binding assay (HBA) ,อัตราอสุจิที่มีชีวิต (vitality) ด้วยวิธี Hypoosmotic swelling test และความเสียหายของดีเอ็นเอของอสุจิโดยวิธี comet assay

ผลการศึกษา : พบว่าหลังการเตรียมเชื้ออสุจิคุณภาพของอสุจิได้แก่ ความเข้มข้นของอสุจิและความเสียหายของดีเอ็นเอลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนอัตราการเคลื่อนที่, การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติและอัตราอสุจิที่มีชีวิตรวมทั้งความสมบูรณ์ของการทำงานของอสุจิเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับอสุจิที่ไม่ได้ผ่านการเตรียมอสุจิ และเมื่อนำอสุจิที่ผ่านการเตรียมอสุจิ แล้วมาทำการ แช่แข็งและละลายเปรียบเทียบกับกลุ่มอสุจิที่ไม่ได้ผ่านการเตรียมอสุจิก่อนนำไปแช่แข็งและละลายพบว่ากลุ่มแรกมีอัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติมากกว่า แต่มีอัตราอสุจิที่มีชีวิตและความเสียหายของดีเอ็นเอน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา : จากผลของงานวิจัยครั้งนี้แสดงว่า อสุจิที่ผ่านการเตรียมอสุจิก่อนไปทำการแช่แข็งและละลายจะมี จำนวน อสุจิที่มีชีวิตและความเสียหายของดีเอ็นเอน้อยกว่าแต่มีอัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอสุจิที่ไม่ได้ผ่านการเตรียมอสุจิก่อนนำไปแช่แข็งและละลาย ซึ่งอาจจะนำไปเลือกใช้ประโยชน์ในการรักษาภาวะมีบุตรยาก ที่เกิดจากฝ่ายชาย ได้ด้วยวิธีการและรูปแบบที่เหมาะสมต่อไป

คำสำคัญ : การเตรียมเชื้ออสุจิ, การแช่แข็งอสุจิ, การแช่แข็งอสุจิแบบเนื้อแก้ว, คุณภาพของอสุจิ, การแตกหักของสายดีเอ็นเอ

Thesis Title	Effect of prepared and unprepared semen on semen quality and DNA fragmentation of vitrified normozoospermia
Author	Miss Chonthicha Samrejkijcharoen
Degree	Master of seience
Major	Medical Sciences
Field/Faculty/University	Faculty of Medicine Thammasat University
Thesis Advisor	Associate Professor Charoenchai Chiamchanya, M.D.
Thesis Co-Advisor (If any)	Associate Professor Treetip Ratanavalachai, PhD. Associate Professor Pachara Visutakul, M.D. PhD.
Academic Years	2015

ABSTRACT

Introduction : Semen cryopreservation especially vitrification is an accepted process to preserve male fertility. Although, after thawing, there are some disadvantages i.e. decreased sperm concentration and motility with increased sperm DNA fragmentation. However, we were interested to study further the effect of washed and unwashed semen on semen quality i.e. sperm concentration, morphology, motility and also on sperm maturation by Hyaluronan binding assay and DNA fragmentation by Comet assay after freezing and thawing of vitrified normozoospermia.

Method : 40 normospermic males (according to WHO criteria 2010) volunteers were divided into 4 groups as the followings; group 1 , neat or fresh sperm (unwashed : UW), group 2 , neat sperm and frozen (unwashed and frozen+thawed : UW + F), group 3 , washed sperm (washed : W), group 4 , washed sperm and frozen (washed

and frozen+thawed : W + F). After thawing, semen quality of these 4 groups were compared i.e. semen analysis (SA), vitality by hypo-osmotic swelling test (HOS), sperm function and maturity by hyaluronan binding assay (HBA) and sperm DNA damage by comet assay.

Results : After sperm preparation, sperm quality i.e. sperm concentration and DNA damage were significantly decreased whereas sperm motility, progressive motile sperm, sperm with normal morphology, sperm vitality and functions were significantly increased compared to those of fresh sperm. After freezing and thawing, rate of normal morphology sperm was significantly higher whereas rate of sperm vitality and sperm DNA damage were significantly lower in the prepared sperm group compared to those of unprepared sperm group.

Discussion and conclusion : Our study showed that sperm preparation before freezing and thawing by vitrification resulted in higher percentage of normal morphology sperm with lesser degree of DNA fragmentation and sperm vitality. These findings may be beneficial for application in the treatment of male infertility.

Keyword : Sperm preparation, sperm cryopreservation, vitrification, sperm quality, DNA fragmentation

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือจาก รศ.นพ.เจริญไชย เจียมจรรยา, รศ.ดร.พญ.พัชรา วิสุตกุล, และ รศ.ดร.ตรีทิพย์ รัตนวรชัย อาจารย์ที่ปรึกษาที่ให้คำแนะนำ ชี้แนะและแก้ไขในการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทั้ง 3 ท่านมา ณ โอกาสนี้ นอกจากนี้ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย และ ผศ.ดร.กัลยา อารีย์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิที่เสนอแนะ แก้ไข เพิ่มเติมให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ นางสาวนันทนา ก๋านารายณ์, นางสาวจิรัฐติกาล ไชยา และนางสาวกาญจนา รัตน์ โพธิ์ศรี นักวิทยาศาสตร์ หน่วยผู้มีบุตรยาก โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ที่ช่วยเหลือให้คำแนะนำในการทำวิจัย และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยทางห้องปฏิบัติการ

ขอขอบพระคุณพยาบาลวิชาชีพ หน่วยผู้มีบุตรยาก โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ที่ได้กรุณาให้ความช่วยเหลือ อำนวยความสะดวกในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.จรรยา ภัทรอาชาชัย ที่ให้คำปรึกษาด้านสถิติวิจัย

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ตลอดจนญาติทุกๆคน ที่ให้ผู้วิจัยได้มีโอกาสในการศึกษาต่อในระดับปริญญาโท อีกทั้งยังให้กำลังใจในการศึกษาและทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณครู อาจารย์ ที่ได้อบรม สั่งสอน และประสานวิชา ความรู้ ให้แก่ผู้วิจัย

ขอขอบคุณรุ่นพี่ และเพื่อนๆทุกคน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และเป็นที่ปรึกษาในการทำวิจัยครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ท้ายที่สุดคุณประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ บิดา มารดา ครูอาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่าน

นางสาวชลธิชา สำเร็จกิจเจริญ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(1)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(3)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญตาราง	(10)
สารบัญภาพ	(11)
รายการสัญลักษณ์และคำย่อ	(13)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 บทนำ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	2
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับการสร้างอสุจิ	3
2.1.1 การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศชาย	3
2.1.2 กระบวนการสร้างรูปร่างอสุจิให้สมบูรณ์	4
2.1.3 เซลล์อสุจิที่สมบูรณ์	5
2.1.4 น้ำอสุจิ	6

2.1.5 การเดินทางของอสุจิ 6
2.1.6 การหลั่งน้ำอสุจิ 6
2.2 การเตรียมเชื้ออสุจิ 7
2.3 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับการแช่แข็งอสุจิ 8
2.3.1 การแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว (Vitrification) 8
2.3.2 การแช่แข็งอสุจิไว้เพื่อใช้เอง 13
2.3.3 การแช่แข็งอสุจิเพื่อใช้เป็นธนาคารอสุจิ 14
2.3.4 Cryoprotectant (CPAs) 15
2.3.5 ข้อดีและข้อเสียของการแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว 17
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 20

บทที่ 3 วิธีการวิจัย 24
3.1 ลักษณะตัวอย่างประชากรที่ทำการศึกษา 24
3.1.1 การเลือกตัวอย่าง 24
3.1.2 เกณฑ์การรับอาสาสมัคร 24
3.1.3 การคำนวณขนาดตัวอย่าง 25
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย 28
3.2.1 ขั้นตอนการทำวิจัย 28
3.2.2 สถานที่ศึกษาวิจัยและระยะเวลา 31
3.2.3 การพิจารณาด้านจริยธรรม 31
3.3 การเตรียมอสุจิ (Sperm preparation) 31
3.4 การเตรียมน้ำยาแช่แข็ง 33
3.4.1 การเตรียมน้ำยาแช่แข็งอสุจิ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร 33
3.5 ขั้นตอนการแช่แข็งและละลายอสุจิ 33
3.5.1 การแช่แข็งอสุจิ 33
3.5.2 การละลายอสุจิ 35
3.6 การตรวจวัดทางห้องปฏิบัติการ 36

3.6.1 วิธีการประเมินความเข้มข้นและการเคลื่อนไหวของอสุจิ 36
3.6.2 การตรวจรูปร่างของอสุจิ 36
3.6.3 การทำ Hyaluronan binding assay (HBA) 37
3.6.4 การทำ Hypo-osmotic swelling test (HOS) 38
3.6.5 การทำ Comet Assay (Alkaline single cell gel electrophoresis) 39
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 41
4.1 ข้อมูลทั่วไปของอาสาสมัคร 41
4.2 ความเข้มข้นของอสุจิเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลอง 4 กลุ่ม 44
4.3 อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลอง 4 กลุ่ม 46
4.4 อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลอง 4 กลุ่ม 48
4.5 อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลอง 4 กลุ่ม 50
4.6 อัตราอสุจิที่มีชีวิตเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลอง 4 กลุ่ม 52
4.7 อัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลอง 4 กลุ่ม 54
4.8 ความเสียหายของดีเอ็นเอเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลอง 4 กลุ่ม 56
4.9 การวิเคราะห์ข้อมูล 58
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 59

รายการอ้างอิง 64

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การเตรียมเชื้ออสุจิ (Sperm preparation) 72
ภาคผนวก ข การเตรียมน้ำยาแช่แข็งอสุจิ (Glycerol-egg yolk-citrate medium) 74
ภาคผนวก ค การตรวจวิเคราะห์คุณภาพอสุจิ (Semen analysis) 75
ภาคผนวก ง Hypo-osmotic swelling test 77
ภาคผนวก จ comet assay 78

ภาคผนวก ฉ เอกสารชี้แจงข้อมูลแก่ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย 81
ภาคผนวก ช ใบยินยอมของอาสาสมัคร 85

ประวัติผู้เขียน 87

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

ตารางที่ 2.1 แสดงการแช่แข็งด้วยวิธีต่างๆเพื่อดูผลของการเกิด DNA damage 11

ตารางที่ 4.1 แสดงคุณสมบัติของน้ำอสุจิสด (fresh, neat or Unwashed) 41

ตารางที่ 4.2 แสดงคุณสมบัติของอสุจิ (mean ± SD) เปรียบเทียบระหว่าง กลุ่มการทดลอง 4 กลุ่ม 42

ตารางที่ 4.3 แสดงการเปรียบเทียบค่า mean difference ± SE ของอสุจิเปรียบเทียบ ระหว่างกลุ่มการทดลอง 4 กลุ่ม 43

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
ภาพที่ 2.1 แสดงการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศชาย	3
ภาพที่ 2.2 แสดงการสร้างรูปร่างอสุจิให้สมบูรณ์	4
ภาพที่ 2.3 แสดงเซลล์อสุจิที่สมบูรณ์	5
ภาพที่ 2.4 แสดง ethylene glycol (A) และ dimethylsulfoxide (B)	16
ภาพที่ 2.5 แสดง trehalose (A) และ sucrose (B)	16
ภาพที่ 3.1 แสดงค่าน้ำอสุจิปกติจากค่าปกติมาตรฐานของ WHO ในปี 2010	24
ภาพที่ 3.2 ตารางการคำนวณขนาดตัวอย่างด้วยโปรแกรม MInitab	27
ภาพที่ 3.3 แผนภาพการทำวิจัย	29
ภาพที่ 3.4 เครื่องตรวจวิเคราะห์อสุจิ (Computer-assisted-semen analysis: CASA)	33
ภาพที่ 3.5 แสดงอสุจิที่ผ่านการทำ Hypo-osmotic swelling test (HOS)	39
ภาพที่ 3.6 แสดงอสุจิที่ผ่านการทำ comet assay โดยที่ A เป็นภาพของอสุจิที่ไม่เกิดการแตกหักของสาย DNA และภาพ B เป็นอสุจิที่เกิดการแตกหักของสาย DNA หลังจากที่ผ่านการทำ comet assay	40
ภาพที่ 4.1 แสดงค่าความเข้มข้นของอสุจิของกลุ่มการทดลอง 4 กลุ่ม (mean ± SD)	45
ภาพที่ 4.2 แสดงค่าความแตกต่างของความเข้มข้นของอสุจิ (mean difference ± SE)	45
ภาพที่ 4.3 แสดงอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิของกลุ่มการทดลอง 4 กลุ่ม (mean ± SD)	47
ภาพที่ 4.4 แสดงค่าความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ (mean difference ± SE)	47

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

ภาพที่ 4.5 แสดงอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิของกลุ่มการทดลอง 4 กลุ่ม (mean ± SD) 49

ภาพที่ 4.6 แสดงค่าความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ (mean difference ± SE) 49

ภาพที่ 4.7 แสดงอัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติของอสุจิของกลุ่มการทดลอง 4 กลุ่ม (mean ± SD) 51

ภาพที่ 4.8 แสดงค่าความแตกต่างของอัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติ (mean difference ± SE) 51

ภาพที่ 4.9 แสดงอัตราอสุจิที่มีชีวิตของกลุ่มการทดลอง 4 กลุ่ม (mean ± SD 53

ภาพที่ 4.10 แสดงค่าความแตกต่างของอัตราอสุจิที่มีชีวิต (mean difference ± SE) 53

ภาพที่ 4.11 แสดงอัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิของกลุ่มการทดลอง 4 กลุ่ม (mean ± SD) 55

ภาพที่ 4.12 แสดงค่าความแตกต่างของอัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิ (mean difference ± SE) 55

ภาพที่ 4.13 แสดงความเสียหายของดีเอ็นเอของอสุจิของกลุ่มการทดลอง 4 กลุ่ม (mean ± SD) 57

ภาพที่ 4.14 แสดงค่าความแตกต่างของความเสียหายของดีเอ็นเอ (mean difference ± SE) 57

รายการสัญลักษณ์และคำย่อ

สัญลักษณ์ / คำย่อ คำเต็ม	/ คำจำกัดความ
ART	Assisted reproductive technology
CASA	Computer-assisted-semen analysis
CPAs	Cryoprotectant
DDT	Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxide
EG	Ethylene glycol
GEYC	Glycerol egg-yolk citrate
Gly	Glycerol
HBA	Hyaluronan binding assay
HIV	Human immunodeficiency virus
HOS	Hypo-osmotic swelling test
IDs	Idiopathics
IMV	Instruments de Medicine veterinaire
LMP	Low melting point agarose
MESA	Microsurgical epididymal sperm aspiration
MMP	Mitochondrial membrane potential
NMP	Nomal melting point agarose
OH^-	Hydroxyl
PESA	Percutaneous epididymal sperm aspiration
PGs	Prostaglandins

รายการสัญลักษณ์และคำย่อ

สัญลักษณ์ / คำย่อ	คำเต็ม / คำจำกัดความ
PMI	Plasma membrane integrity
PROH	Propylene glycol
ROS	Reactive oxygen species
SA	Semen analysis
SCSA	Sperm chromatin structure assay
SSR	Surgical sperm recover
SSV	Solid surface vitrification
TESA	Testicular sperm aspiration
TESE	Testicular sperm extraction
TZs	Teratozoospermics
UV	Ultraviolet
UW	unwashed
VS	Vitrification solution
W	Washed
$^{\circ}$c	Celsius
µm	micrometer

บทที่ 1
บทนำ

1.1 บทนำ

ในปัจจุบันภาวะการมีบุตรยากเป็นภาวะที่เกิดขึ้นกับคู่สมรสหลายคู่ ซึ่งก่อให้เกิดผลเสียต่อทั้งสภาพจิตใจและคุณภาพชีวิต ตลอดจนมีผลกระทบต่อสถาบันครอบครัวและสังคมอย่างมาก นับได้ว่าปัญหาการมีบุตรยากเป็นปัญหาที่สำคัญปัญหาหนึ่ง ภาวะมีบุตรยากเกิดได้จากทั้งจากฝ่ายหญิงและฝ่ายชาย[1] ภาวะมีบุตรยากที่มีสาเหตุจากฝ่ายชายนั้นพบประมาณ 25-40 เปอร์เซ็นต์ และภาวะมีบุตรยากที่มีสาเหตุเกิดจากฝ่ายหญิงพบประมาณ 40-55 เปอร์เซ็นต์ สำหรับสาเหตุจากทั้ง 2 ฝ่ายมีประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ [2]

เทคโนโลยีที่มีบทบาทในการช่วยรักษาภาวะมีบุตรยากที่เกิดจากฝ่ายชายอย่างหนึ่งก็คือ การแช่แข็งอสุจิ ซึ่งเป็นเทคนิคในการเก็บรักษาอสุจิภายใต้สภาวะอุณหภูมิที่เย็นจัด (Ultra low temperature) เพื่อให้สามารถเก็บรักษาอสุจิได้เป็นระยะเวลานาน (Long term storage) ในปัจจุบันนี้การแช่แข็งอสุจิมีไว้เพื่อเก็บรักษาอสุจิในกรณีที่ฝ่ายชายมีความจำเป็นที่จะต้องได้เคมีบำบัด, รังสีรักษา, การผ่าตัดที่อาจจะทำให้เป็นหมันหรืออาจทำให้เกิดภาวะมีบุตรยากขั้นรุนแรงได้, การเก็บรักษาอสุจิไว้ก่อนที่จะมีการทำหมันชาย, เพื่อความสะดวกในการรักษาภาวะผู้มีบุตรยากในกรณีทีฝ่ายชายไม่สามารถมาเก็บน้ำเชื้อได้ในวันที่ฝ่ายหญิงทำการเก็บไข่ และสำหรับบางรายที่มีน้ำเชื้ออ่อนก็สามารถที่จะเก็บน้ำเชื้อสะสมไว้เพื่อนำมารวมกันและใช้ในคราวเดียวได้ หรือในกรณีที่ต้องมีการผ่าตัดเก็บอสุจิจากอัณฑะ (Surgical sperm recover : SSR) เช่น การใช้เข็มดูดอสุจิจากท่อพักน้ำเชื้อผ่านทางผิวหนัง (Percutaneous epididymal sperm aspiration : PESA), การผ่าตัดจุลศัลยกรรมเพื่อดูดตัวอสุจิจากท่อพักน้ำเชื้อ (Microsurgical epididymal sperm aspiration : MESA), การดูดตัวอสุจิจากอัณฑะโดยตรงผ่านทางผิวหนัง (Testicular sperm aspiration : TESA) หรือ การตัดชิ้นเนื้อออกมาจากอัณฑะเพื่อสกัดแยกตัวอสุจิ (Testicular sperm extraction : TESE) ซึ่งเป็นสิ่งที่ทำให้เกิดการเจ็บตัวและเสี่ยงต่อการติดเชื้อและภาวะแทรกซ้อนทั้งสิ้น ทั้งนี้การเก็บรักษาอสุจิโดยการแช่แข็งนั้นก็เพื่อช่วยลดความเสี่ยงต่อผู้ป่วยลง[3]

อย่างไรก็ตามวิธีการทำ cryopreservation ของอสุจิ นั้นก็ยังมีข้อเสียที่ทำให้มีผลกระทบต่อ sperm function ได้แก่ การเคลื่อนที่ของอสุจิที่ลดลง 25% - 75% และการเกิดการแตกหักของDNA เพิ่มมากขึ้น หลังจากที่ผ่านการทำละลายอสุจิแช่แข็ง [4] เนื่องจาก plasma membrane ของ spermatozoa นั้นมีไขมันอยู่ในรูปแบบของ polyunsaturated fatty acid ซึ่งอ่อนไหวต่อการถูกโจมตีโดย Reactive oxygen species (ROS) ที่กระตุ้นให้เกิดขบวนการปฏิกิริยาทางเคมีที่เรียกว่า

lipid peroxidation ถ้ามี polyunsaturated fatty acid อยู่ด้วย ปกติแล้วภายใน seminal plasma จะมี antioxidant อยู่เพื่อที่จะเป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยาการเกิดROS แต่ถ้ามี ROS มากก็จะทำให้ antioxidant ไม่สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาได้ทั้งหมด และจะทำให้เกิดการทำลาย spermatozoa ต่อไปได้ [5] ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้ ผู้วิจัยจึงสนใจทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการแช่แข็งเชื้ออสุจิก่อนและหลังการเตรียมเชื้ออสุจิ (sperm preparation) เพื่อที่จะดูว่าระหว่างสองวิธีนี้วิธีใดจะช่วยให้มีการรักษาคุณภาพและประสิทธิภาพของ sperm function ได้ดีกว่ากัน โดยเฉพาะในเรื่องของการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ (sperm motility) และการเกิดการแตกหักของ DNA (DNA fragmention) ของเชื้ออสุจิ ผลของการทดลองครั้งนี้อาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพของขบวนการช่วยการเจริญพันธ์(Assisted reproductive technology : ART) ในชายได้ต่อไปในอนาคต และอาจจะช่วยเพิ่มอัตราการตั้งครรภ์ของคู่สมรสฝ่ายหญิงได้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของกระบวนการแช่แข็งอสุจิด้วยวิธีการแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว (vitrification) ในกลุ่มที่ผ่านและไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ (sperm preparation) ต่อคุณภาพของเชื้ออสุจิและการแตกหักของสายดีเอ็นเอ

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

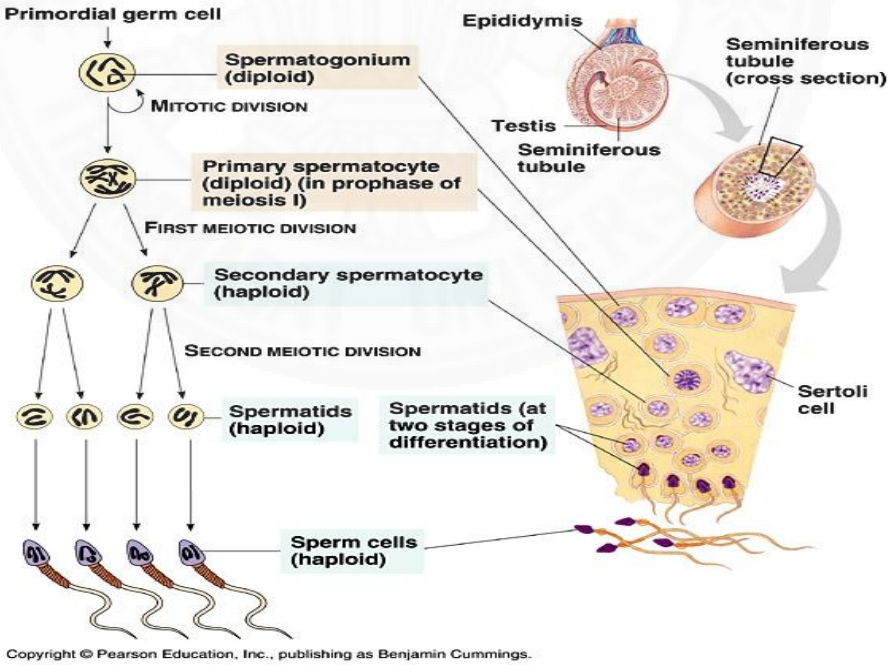
การเปรียบเทียบผลของการแช่แข็งและการละลายของเชื้ออสุจิ ในกลุ่มที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการเตรียมเชื้ออสุจิ เพื่อดูว่าวิธีการแบบใดจะทำให้มีคุณสมบัติและคุณภาพของเชื้ออสุจิที่ดีกว่า ข้อมูลที่ได้สามารถนำมาประกอบการตัดสินใจในการเลือกใช้กระบวนการแช่แข็งและละลายอสุจิเพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดแก่คนไข้และเป็นทางเลือกในกระบวนการช่วยการเจริญพันธุ์

บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับการสร้างอสุจิ

2.1.1 การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศชาย (Spermatogenesis)

การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศชาย เกิดขึ้นภายใน seminiferous tubule โดยจะมีเซลล์ตั้งต้นคือ spermatogonia (2n) ซึ่งปรากฏอยู่ภายใน seminiferous tubule ตั้งแต่ระยะ fetus เมื่อเข้าสู่วัยรุ่น (puberty) spermatogonia จะแบ่งตัวแบบไมโทซิส (mitosis) หลายครั้งและพัฒนาต่อไปเป็น primary spermatocyte จากนั้น primary spermatocyte จะมีการแบ่งตัวแบบ meiosis ครั้งที่ 1 เรียกว่า first meiotic division ได้ secondary spermatocyte ที่มีจำนวนโครโมโซมลดลงครึ่งหนึ่ง (n) 2 เซลล์ ต่อมา secondary spermatocyte จะมีการแบ่งตัวแบบไมโอซิส ครั้งที่ 2 เรียกว่า second meiotic division ได้เป็น spermatid (n) 4 เซลล์ จากนั้น spermatid จะพัฒนาต่อไป โดยกระบวนการ spermiogenesis จนได้เซลล์อสุจิที่สมบูรณ์[2] (ภาพที่ 2.1)



ภาพที่ 2.1 แสดงการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศชาย

ที่มา : http://u18439936.onlinehome-server.com/craig.milgrim/Bio120/Outline/OutlineResources/Spermatogenesis.htm

2.1.2 กระบวนการสร้างรูปร่างอสุจิให้สมบูรณ์ (Spermatogenesis)

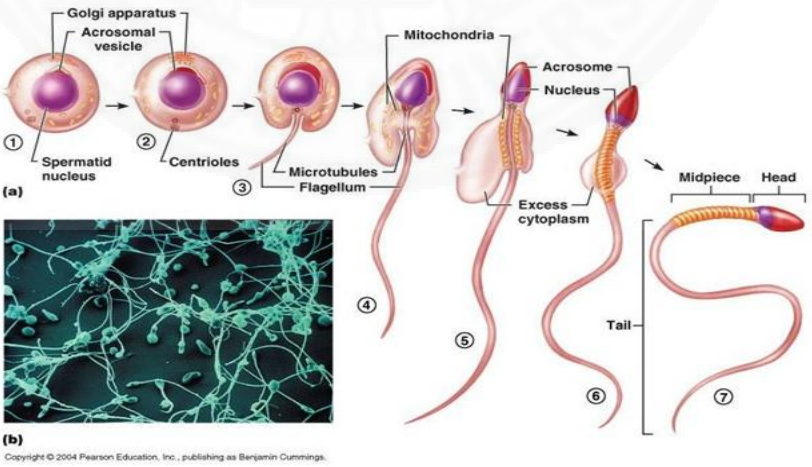
Spermiogenesis เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงขั้นสุดท้ายของ spermatogenesis ประกอบด้วยการเปลี่ยนแปลงหลายอย่างเพื่อเปลี่ยนรูปร่างเซลล์ในระยะ spermatid ที่มีรูปร่างค่อนข้างกลมไปเป็นเซลล์อสุจิที่มีรูปร่างยาวเรียว (ภาพที่ 2.2) เพื่อให้เหมาะสมกับการเคลื่อนที่ไปปฏิสนธิกับเซลล์ไข่ใน female reproductive tract ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวประกอบด้วย

2.1.2.1 การสร้าง acrosome ที่มีลักษณะแบนๆปกคลุมอยู่ทางด้านบน 1/2 - 2/3 ของนิวเคลียส ภายใน acrosome บรรจุเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับการย่อยสลาย corona radiata และ zona pellucida เพื่อให้เซลล์อสุจิสามารถผ่านเข้าไปผสมกับเซลล์ไข่ได้[2]

2.1.2.2 การขดตัวของใยโครมาทินในนิวเคลียส เพื่อทำให้สารพันธุกรรม (DNA) ขดแน่น ทำให้นิวเคลียสมีขนาดเล็กลง เหมาะสมต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ อีกทั้งยังเป็นการป้องกันการเกิดความเสียหายต่อ DNA ขณะที่เซลล์อสุจิเคลื่อนที่ผ่านเข้าไปใน female reproductive tract[2]

2.1.2.3 การสร้างส่วนคอ middle piece และส่วนหาง โดยการจัดเรียงตัวของไมโทคอนเดรียบริเวณที่จะเกิดเป็น middle piece และมีการสร้าง microtubule ในบริเวณส่วนหางของเซลล์อสุจิ[2]

2.1.2.4 การสลัดไซโทพลาสซึมของ spermatid ทำให้เซลล์มีขนาดเล็กลง เหมาะสมต่อการเคลื่อนที่ผ่านเข้าไปใน female reproductive tract[2]



ภาพที่ 2.2 แสดงการสร้างรูปร่างอสุจิให้สมบูรณ์

ที่มา : http://www.majordifferences.com/2013/06/difference-between-spermatogenesis-and.html#.Vznx2PmLTIU

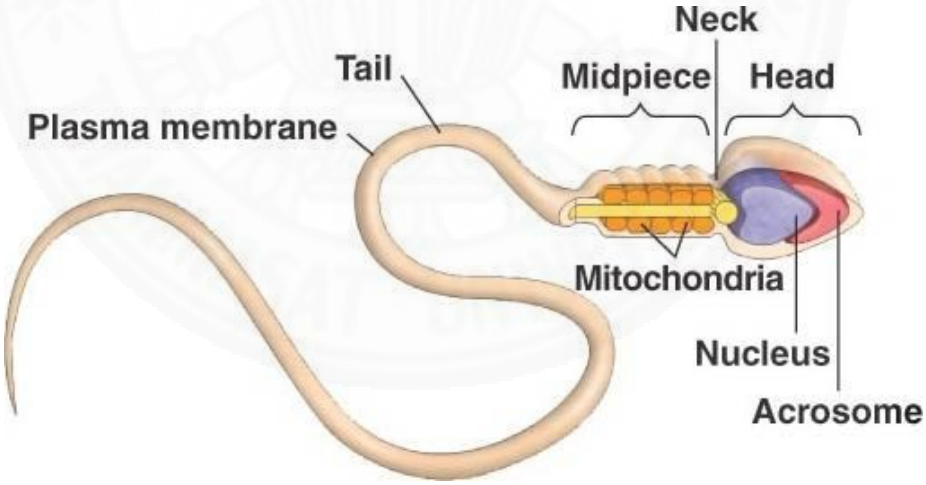
spermatogenesis เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในชายตั้งแต่วัยรุ่นไปจนถึงตลอดชีวิต ระยะเวลาที่ใช้ตั้งแต่ spermatogonia ไปจนกระทั่งได้เซลล์อสุจิที่สมบูรณ์ใช้เวลาทั้งหมด 64 วัน เซลล์อสุจิที่สมบูรณ์ผ่านไปยัง epididymis ที่ขดอยู่ด้านหลังของอัณฑะก่อนที่จะเคลื่อนออกไปทาง vas deferens ต่อไป[2]

2.1.3 เซลล์อสุจิที่สมบูรณ์ ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ

2.1.3.1 ส่วนหัว (head) ประกอบไปด้วย 2 ส่วนที่สำคัญ ได้แก่ นิวเคลียส ซึ่งภายในบรรจุ haploid chromosome และ acrosome ซึ่งคลุมอยู่ประมาณ 1/2 - 2/3 ทางด้านบนของนิวเคลียส ภายใน acrosome บรรจุเอนไซม์เช่น acrosin, hyaluronidase ที่เป็นตัวช่วยย่อยผนังของเซลล์ไข่ ทำให้เซลล์อสุจิสามารถเจาะทะลุชั้นของ corona radiata และชั้น zona pelucida ของเซลล์ไข่และเกิดการปฏิสนธิขึ้นได้[2]

2.1.3.2 ส่วนคอ (neck) เป็นรอยต่อระหว่างส่วนหัวและส่วนหาง[2]

2.1.3.3 ส่วนหาง (tail) ประกอบด้วย 3 ส่วนย่อยคือ middle piece, principal piece และ end piece ส่วนหางทำหน้าที่ในการเคลื่อนไหวโดยได้พลังงานจากไมโทคอนเดรียที่ส่วนของ middle piece ของเซลล์อสุจิ[2]



ภาพที่ 2.3 แสดงเซลล์อสุจิที่สมบูรณ์

ที่มา : http://bio1152.nicerweb.com/Locked/media/ch46/sperm.html

2.1.4 น้ำอสุจิ (semen)

ภายในน้ำอสุจิจะประกอบไปด้วยอสุจิและของเหลวซึ่งส่วนใหญ่จะสร้างและหลั่งมาจาก accessory sex glands ได้แก่ ต่อมสร้างน้ำเลี้ยงอสุจิ (seminal vesicle) (ร้อยละ 60) ต่อมลูกหมาก (prostate gland) (ร้อยละ 13-33) และ bulbourethral gland ของเหลวจาก seminal vesicle จะมีปริมาณของ ฟรุกโตส (fructose) มาก ช่วยในการเดินทางของอสุจิและเป็นแหล่งพลังงานของอสุจิด้วย ส่วนของเหลวจากต่อมลูกหมากจะมีลักษณะใส มีความเป็นกรดอ่อนๆ ประกอบไปด้วย acid phosphatase, citric acid, prostaglandins (PGs) และเอนไซม์ย่อยสลายต่างๆเป็นจำนวนมาก สำหรับของเหลวจาก bulbourethral gland จะหลั่งออกมาเล็กน้อยขณะร่วมเพศเพื่อสร้างความชุ่มชื่นในท่อปัสสาวะ การทำงานของ accessory sex glands เหล่านี้อยู่ภายใต้การควบคุมของแอนโดรเจน [6] เมื่อมีการหลั่งน้ำอสุจิออกมาน้ำอสุจิจะรวมตัวเป็นตะกอน มีลักษณะขุ่นข้นคล้ายวุ้นเนื่องจากโปรตีนใน seminal vesicle และเมื่อตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20-30 นาทีจะมีการละลายตัวโดยเอนไซม์ที่มาจากต่อมลูกหมาก[7] น้ำอสุจิมีความเป็นด่างเล็กน้อย ซึ่งเชื่อว่าอาจจะช่วยป้องกันอันตรายจากของเหลวภายในช่องคลอดซึ่งมีสภาพเป็นกรด ส่วนแรกของน้ำอสุจิที่หลั่งออกมาประกอบด้วยของเหลวจากต่อมลูกหมากและมีอสุจิจำนวนมาก แต่ในส่วนหลังของน้ำอสุจิจะเป็นของเหลวจาก seminal vesicle และมีจำนวนอสุจิน้อยกว่า [6, 8]นอกจากอสุจิแล้วส่วนประกอบที่สำคัญของน้ำอสุจิได้แก่ โปรตีน fructose และ PGs เป็นต้น ซึ่ง ฟรุกโตส ช่วยเป็นแหล่งพลังงานสำหรับอสุจิ ส่วน PGs ทำให้มีการหดรัดตัวของกล้ามเนื้อมดลูกและท่อนำไข่ เป็นการช่วยให้อสุจิเดินทางเข้าไปยังท่อนำไข่ได้อย่างรวดเร็ว[9]

2.1.5 การเดินทางของอสุจิ

อย่างไรก็ตามแม้ว่าอัณฑะจะสร้างอสุจิที่สมบูรณ์เรียบร้อยแล้วแต่ก็ยังไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ จะต้องมีการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีและกายภาพขณะเดินทางไปจนถึงไข่[10] จากอัณฑะอสุจิจะถูกขับเข้าไปสู่ epididymis โดยแรงหดรัดตัวของผนังของ seminiferous tubules (ST) ของเหลวที่สร้างจากเซลล์ sertoli จะช่วยให้การเคลื่อนไหวของอสุจิเป็นไปโดยสะดวกใน epididymis การหดรัดตัวของท่อจะช่วยให้อสุจิเดินทางไปสู่ vas deferens เมื่อผ่าน epididymis แล้วจะเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ทำให้อสุจิเคลื่อนไหวได้ดีจนกระทั่งไปรวมกับของเหลวจาก accessory sex glands ก่อนที่จะหลั่งออกมา[9]

2.1.6 การหลั่งน้ำอสุจิ

การหลั่งน้ำอสุจิจากร่างกายมี 2 ระยะ คือ

- ระยะ emission เป็นระยะที่ของเหลวจากต่อมลูกหมาก seminal vesicle และอสุจิมารวมตัวกันที่ posterior urethra[6, 8]

- ระยะ ejaculation โดยน้ำอสุจิจะถูกขับออกมาทางท่อปัสสาวะ ทั้งนี้เกิดจากการหดรัดตัวของกล้ามเนื้อ perineum และ bulbourethra gland ขณะที่มีการคลายตัวของกล้ามเนื้อหูรูดส่วนนอก ซึ่งถูกควบคุมโดยระบบประสาท[6, 8]

2.2 การเตรียมเชื้ออสุจิ

การเตรียมน้ำเชื้อสำหรับใช้ในเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์นั้นมีจุดมุ่งหมายเพื่อทำการล้างแยกตัวอสุจิที่ปกติออกจาก seminal plasma เพราะในส่วนของ seminal plasma นั้นจะมีสารที่จะยับยั้งการเกิด ปฏิกิริยา capacitation และความสามารถในการปฏิสนธิของอสุจิด้วย และนอกจากนี้ยังมีส่วนของเซลล์เม็ดเลือดขาว ตัวอสุจิที่ผิดปกติหรือตายแล้วและเศษเซลล์อื่นๆปนอยู่ซึ่งจะเป็นส่วนที่ก่อให้เกิดสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมกับตัวอสุจิ การเตรียมอสุจิจะทำให้ได้ตัวอสุจิที่มีคุณภาพดีสำหรับเตรียมใช้ผสมกับไข่ด้วยวิธีการช่วยการเจริญพันธุ์ต่อไป[11]
การเตรียมเชื้ออสุจิ มีหลายวิธีด้วยกัน คือ

1. Centrifugation and washing เป็นการอาศัยหลักการปั่นแยกเซลล์ด้วยแรงเหวี่ยงต่ำๆในเวลาสั้นๆ จากนั้นแยกส่วนที่เป็นน้ำใสทิ้งแล้วนำตะกอนตัวอสุจิ (sperm pellet) ที่ได้มาเติมน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน อาจจะทำเพียงครั้งเดียวหรือสองครั้งก็ได้[11]

2. Layering หรือ Density gradient centrifugation เป็นวิธีแยกตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ได้ออกจากน้ำอสุจิ โดยอาศัยความสามารถในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิโดยการวางชั้นของน้ำยาเพาะเลี้ยงประมาณ 2-3 มล.บนน้ำอสุจิทิ้งไว้ให้ตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ได้ว่ายเข้ามาอยู่ในชั้นของน้ำยาเพาะเลี้ยงเชื้อแล้วดูดเอาส่วนของน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีตัวอสุจิอยู่ไปใช้[11]

3. Swim-up เป็นการประยุกต์มาจาก 2วิธีแรกโดยจะใช้ตะกอนตัวอสุจิที่ได้จากการปั่นแยกมาวางไว้ใต้ชั้นของน้ำยาเพาะเลี้ยงแล้วทิ้งไว้ให้อสุจิเคลื่อนที่ว่ายออกมาจากตะกอนเข้ามาอยู่ในชั้นของน้ำยาเพาะเลี้ยงแล้วค่อยดูดเอาส่วนของน้ำยาเพาะเลี้ยงที่มีตัวอสุจิไปใช้ เป็นต้น[11]

ในงานวิจัยครั้งนี้เลือกการใช้แบบวิธีที่ 1 ซึ่งเป็นวิธีที่ทำง่ายและรวดเร็ว นอกจากนี้การเตรียมอสุจิด้วยวิธีต่างๆก็จะมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันออกไป โดยการประเมินประสิทธิภาพของการเตรียมอสุจิแต่ละวิธีจะทำให้สามารถเลือกวิธีการเตรียมอสุจิให้เหมาะสมกับที่ต้องการได้ การประเมินประสิทธิภาพของการเตรียมอสุจิ อาจจะทำได้หลายวิธี เช่น ผลการตรวจน้ำอสุจิภายหลังการเตรียมอสุจิ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ความเข้มข้นของอสุจิ การเคลื่อนไหวของอสุจิและรูปร่างของอสุจิ การ

คำนวณในรูปของ yield คืออัตราส่วนระหว่างจำนวนอสุจิทั้งหมดที่ได้ภายหลังการเตรียมอสุจิต่อจำนวนอสุจิทั้งหมดก่อนการเตรียมอสุจิ เป็นต้น[12]

2.3 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับการแช่แข็งอสุจิ

2.3.1 การแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว (Vitrification)

เป็นวิธีการที่แช่แข็งเชื้ออสุจิแบบใหม่ในปัจจุบัน โดยเป็นการทำให้เชื้ออสุจิถูกเก็บไว้ในสภาพแช่แข็ง ด้วยเทคนิคทำให้เกิดการเย็นตัวลงอย่างรวดเร็ว เพื่อเป็นการป้องกันอันตรายจากการเกิดเก ล็ดน้ำแข็ง ซึ่งเป็นวิธีการแช่แข็งที่ใช้เวลาน้อยกว่าและประหยัดมากกว่าการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิ[3, 5]

การแช่แข็งอสุจินั้นมี 3 วิธีด้วยกัน ได้แก่

2.3.1.1 การแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ (slow cooling หรือ equilibrium cooling) ใช้เครื่องแช่แข็งที่มีการควบคุมด้วยระบบคอมพิวเตอร์ (Computer-controlled freezer) ที่จะลดอุณหภูมิลงช้าๆ โดยลดจากเครื่องแช่แข็งที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสลง 2 องศาเซลเซียส /นาที จนถึงอุณหภูมิลดลงไปถึง -5 องศาเซลเซียสจึงคงอุณหภูมิของเครื่องไว้ที่ -5 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ในกรณีที่ต้องการชักนำให้เกิดผลึกน้ำแข็ง (seeding) ให้ทำในช่วงนี้โดยการใช้ forceps จุ่มลงในไนโตรเจนเหลวก่อนแล้วนำมาแตะที่ด้านข้างของหลอดจนเห็นผลึกน้ำแข็งเกิดขึ้น จากนั้นจะลดอุณหภูมิลงในอัตรา 10 องศาเซลเซียส /นาที จนอุณหภูมิลงไปถึง -100 องศาเซลเซียส จึงนำหลอดบรรจุอสุจิไปจุ่มลงในไนโตรเจนเหลวซึ่งมีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส[3, 13]

2.3.1.2 การแช่แข็งด้วยการลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วในไอของไนโตรเจนเหลวภายในถังบรรจุไนโตรเจนเหลว (rapid cooling หรือ non-equilibrium cooling) เป็นวิธีการแช่แข็งอสุจิโดยการใส่อสุจิในภาชนะ เช่น straw หรือ cryovials แล้วนำไปวางในแนวราบของไอไนโตรเจนเหลวภายในถังบรรจุไนโตรเจนเหลว โดยให้อยู่เหนือผิวของไนโตรเจนเหลว 25 เซนติเมตรเป็นเวลา 10 นาที สำหรับหลอด IMV (Instruments de Medicine veterinaire) ขนาด 36 เซนติเมตร เป็นเวลา 15 นาที และเหนือระดับไนโตรเจนเหลว 15 เซนติเมตร อีก 15 นาที ก่อนที่จะจุ่มลงไปในไนโตรเจนเหลว แต่หลอดเหล่านี้ห้ามวางซ้อนกัน ต้องเรียงกันเพียงชั้นเดียวเท่านั้น เพราะหลอดแต่ละอันจะมีอัตราการลดความเร็วไม่เท่ากัน จะทำให้อัตราการรอดของอสุจิแตกต่างกันไปด้วย[3, 13]

2.3.1.3 การแช่แข็งด้วยการลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว (vitrification) เป็นวิธีการแช่แข็งโดยการลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว วิธีการนี้กำลังเป็นที่สนใจและศึกษาในปัจจุบัน เพราะเป็นวิธีที่ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย ซึ่งการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วนี้ อาศัยปัจจัยที่สำคัญคือ ความเข้มข้นของน้ำยาแช่แข็งและอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว ซึ่งการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วนี้ สามารถแช่แข็งโดยที่จะใส่หรือไม่ใส่น้ำยาแช่แข็งก็ได้ รวมถึงการแช่แข็งแบบ solid surface vitrification (SSV) ด้วย ซึ่งการแช่แข็งด้วยวิธีนี้จะใช้อลูมิเนียมฟอย ด์วางไว้บนพื้นผิวของไนโตรเจนเหลวเพื่อที่จะทำให้เกิดการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วและยังสามารถป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งได้อีกด้วย[14]

กระบวนการแช่แข็งเป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์อสุจิเกิดความเสียหายและทำให้การทำงานของอสุจิรวมถึงการเคลื่อนไหวและอัตราการอยู่รอดของอสุจิลดลง และยังเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอของอสุจิเพิ่มขึ้นด้วย [15] ซึ่งกลไกที่ทำให้เกิดความเสียหายนั้นอาจจะสัมพันธ์กับ cold shock ที่เกิดจากการเปลี่ยนอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว, osmotic shock ที่เกิดจาก cryoprotectant ในน้ำยาแช่แข็ง และ cellular dehydration ที่เกิดจากการที่เพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลาย[16] นอกจากนี้การที่เกิดผลึกน้ำแข็งทั้งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ ยังมีผลกระทบต่อ cell membrane integrity ด้วย ซึ่ง cool rate จะมีบทบาทที่สำคัญในการเกิด cryoinjury มากหรือน้อย ระหว่างการแช่แข็ง การเกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นใน extracellular matrix จะทำให้เกิด osmotic gradient ทำให้น้ำภายใน intracellular space สามารถผ่านเข้าไปสู่ extracellular space ได้โดยจะผ่านทางเยื่อหุ้มเซลล์ เพราะฉะนั้นถ้ามี rapid cooling rate จะเกิด intracellular ice formation ได้ แต่ถ้ามี slow cooling rate น้ำภายใน intracellular space จะออกไปรวมกับ ice nucleate ใน extracellular space ซึ่งการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ (intracellular ice formation) และการสูญเสีย cell membrane integrity จะทำให้เกิด osmotically inactive[16] ดังนั้น cooling rate จึงมีความสำคัญเป็นอย่างมาก เพราะว่าถ้าเร็วมากเกินไปจะทำให้เกิด severe intracellular ice formation แต่ถ้าหากช้ามากเกินไปก็จะทำให้เกิด cell damage จาก toxicity ที่เกิดจาก intracellular high solution concentration ขึ้นได้

กระบวนการแช่แข็งและละลายพบว่ามีผลกระทบทำให้คุณภาพของอสุจิ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในเรื่องของอัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิ รูปร่างของอสุจิ อัตราอสุจิที่มีชีวิตและความเสียหายของดีเอ็นเอ เป็นต้น และวิธีการทำการแช่แข็งอสุจิแบบช้านั้นยังทำให้เกิดคือ thermal shock, osmotic shock, การเกิด intracellular และ extracellular ice crystal และ cell dehydration[17] แต่กระบวนการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วมีข้อดีคือ จะไม่ทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งทั้งภายนอกและภายในเซลล์ ซึ่งอาจจะเป็นเพราะการลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วทำให้ผลกระทบที่

อาจจะเกิดขึ้นกับตัวอสุจิลดลง รวมทั้งการเกิด chilling injury ด้วย และวิธีการนี้เป็นวิธีที่ราคาไม่สูงและใช้เวลาในการทำสั้น[18]

สรุป การเคลื่อนที่ของอสุจิ, plasma membrane integrity และ mitochondria function จะมีการเปลี่ยนแปลงไปตาม cooling rate[16, 17, 19] โดยที่การเกิด cell membrane integrity นั้นเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเคลื่อนไหวและการมีชีวิตรอดของอสุจิ ซึ่งในระหว่างที่ทำการแช่แข็ง การเกิดความเย็นในระยะเริ่มต้นทำให้เกิดการเปลี่ยนผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ (phase transition) ของ membrane lipid และทำให้หน้าที่ของ membrane protein ที่ทำหน้าที่ขนส่ง ion และเมตาโบลิซึมทำหน้าที่ได้น้อยลง[16] นอกจากนี้กระบวนการแช่แข็งและละลายจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงใน mitochondrial membrane fluidity ซึ่งจะส่งผลให้ mitochondrial membrane potential เพิ่มสูงขึ้นและจะทำให้มีการสร้างและปล่อย ROS ออกมาโดยที่ ROS จะไปทำให้เกิดความเสียหายของดีเอ็นเอในอสุจิ ซึ่งจะพบทั้ง single และ double stand DNA ได้บ่อยมาก นอกจากที่กระบวนการแช่แข็งจะมีส่วนที่ทำให้อสุจิเสียหายแล้ว การละลายอสุจิก็ทำให้อสุจิเกิดความเสียหายได้เช่นกัน เพราะการละลายนั้นทำให้เกิดผลึกน้ำแข็ง จะมีผลต่อความเสียหายของออร์แกเนลล์ภายในอสุจิ อีกทั้ง cryoprotectant เป็นตัวที่ทำหน้าที่ในการป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง แต่ตัวมันเองก็เป็นพิษถ้าใช้ในปริมาณมาก[16]

ตารางที่ 2.1 แสดงการแช่แข็งด้วยวิธีต่างๆเพื่อดูผลของการเกิด DNA damage[17]

Authors	Test to evaluate DNA integrity	Number of samples	Cryopreservation methods	Does the freezing-thawing procedure induce sperm DNA damage"
Hamamah et. al., 1990	Acridine orange staining and Feulgen-DNA quantitative microspectro photometry	10	Unspecified	Yes
Spano et. al., 1999	SCSA (Sperm Chromatin Structure Assay) + Acridine orange staing	19	Equilibration at 37°c, freezing in liquid nitrogen vapour at -80°c and then storaged in liquid nitrogen at -196°c	Yes
Hammadeh et. al., 2001	Acridine orange staining	59	Computerized slow-stage freezer + static liquid nitrogen vapour	Yes
Donnelly et. al., 2001	Comet assay	40	Equilibration at 37°c, freezing in liquid nitrogen vapour at -	Yes

			80°c and then storaged in liquid nitrogen at -196°c	
Gandini et. al., 2006	Acridine orange staining	19	Equilibration at 37°c, freezing in liquid nitrogen vapour at -80°c and then storaged in liquid nitrogen at -196°c	Yes
De Paula et. al., 2006	TUNEL assay	77: (i) 30 normozoospermic (ii) 47 oligozoospermic	Use of freezer at -20°c, freezing in liquid nitrogen vapour, then storaged in liquid nitrogen -196°c	Yes
Petyim and choavaratana, 2006	Acridine orange staining	50	Freezing with liquid nitrogen vapour and computerized program freezer	Yes
Nagamwutti wong and Kunathikom, 2007	Acridine orange staining	20	Freezing with liquid nitrogen vapour	Yes
Dejarkom and Kunathikom, 2007	Acridine orange staining	20	Computerized controlled rate freezing	Yes
Thomson et. al., 2009	TUNEL assay	60	Use of programmable freezer	Yes

Thomson et. al., 2009	TUNEL assay	320	Sample frozen with and without cryoprotectant by slow controlled-rate method using a programmable freezer	Yes
Zribi et. al., 2010	TUNEL assay	15	Equilibration at 37°c, freezing in liquid nitrogen vapour at -80°c and then storaged in liquid nitrogen at -196°c	Yes
Kadenisa et. al., 2014	Comet assay	40	Vitrification	Yes

โดยที่การทดลองครั้งนี้เลือกใช้การแช่แข็งด้วยการลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว (vitrification) ซึ่งเป็นวิธีการที่ทำได้ง่าย, ใช้เวลาน้อยและให้ผลต่อการรอดชีวิตของเชื้ออสุจิหลังการละลาย [20] ในหลายปีที่ผ่านมามีผลงานที่ได้จากการแช่แข็งเชื้ออสุจิมาทำหัตการด้วยวิธีต่างๆได้ผลดีมากขึ้น[21] การแช่แข็งอสุจิเพื่อจุดประสงค์ทางคลินิกนั้น สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ การแช่แข็งอสุจิเก็บไว้เพื่อใช้เอง (semen auto-conservation หรือ client depositor) และการแช่แข็งเพื่อเป็นธนาคารอสุจิให้แก่คนอื่น (donor banking)[3]

2.3.2 การแช่แข็งอสุจิไว้เพื่อใช้เอง มีวัตถุประสงค์ดังต่อไปนี้

2.3.2.1 เพื่อเก็บรักษาภาวะเจริญพันธุ์ก่อนที่จะเริ่มมีการให้เคมีบำบัด, รังสีรักษา หรือการผ่าตัด ซึ่งอาจจะทำให้ผู้ป่วยเป็นหมันหรืออาจจะเกิดภาวะมีบุตรยากขั้นรุนแรงได้ เคยมีรายงานว่ามีเพียง 20% - 50% ของผู้ชายเท่านั้น ที่เคยได้รับเคมีบำบัดมาแล้วสามารถกลับมามีการสร้างตัวอสุจิได้ดีเหมือนเดิม[22] อีกทั้งใน บางกรณีของบางโรคที่มีการดำเนินของโรคเป็นระยะเวลายาวนานก็อาจจะส่งผลต่อการแข็งตัวของอวัยวะเพศชายหรือต่อการหลั่งอสุจิเช่น โรคเบาหวาน โรค

หลอดเลือด กลุ่มอาการที่มีการสร้างภูมิต้านทานต่อตนเอง (autoimmune diseases) เพราะฉะนั้นในกรณีเหล่านี้จึงควรพิจารณาการเก็บอสุจิแช่แข็งไว้ด้วย[3, 23, 24]

2.3.2.2 เพื่อเก็บรักษาอสุจิไว้ก่อนการมีการทำหมันชาย เพื่อเป็นทางเลือกในกรณีที่คู่สมรสอาจจะเกิดการเปลี่ยนใจภายหลังที่ต้องการจะมีบุตรอีกในอนาคต[3, 13, 25]

2.3.2.3 เพื่อความสะดวกในการรับการรักษาภาวะมีบุตรยาก ในกรณีที่ฝ่ายชายไปทำงานต่างประเทศหรือไม่สามารถมาได้ในวันที่มีการเก็บไข่ในฝ่ายหญิง[3, 13, 25, 26]

2.3.2.4 บางรายที่ฝ่ายชายมีน้ำเชื้ออ่อน ก็อาจจะมีการเก็บสะสมอสุจิไว้ เพื่อนำมารวมกันและใช้ในคราวเดียว[3, 13, 26]

2.3.2.5 ในรายที่ต้องมีการเก็บอสุจิจากอัณฑะ (surgical sperm recovery ; SSR) เช่น การใช้เข็มดูดอสุจิจากท่อพักน้ำเชื้อผ่านทางผิวหนัง (percutaneous epididymal sperm aspiration ; PESA), การผ่าตัดจุลศัลยกรรมเพื่อดูดตัวอสุจิจากท่อพักน้ำเชื้อ (microsurgical epididymal sperm aspiration ; MESA), การดูดตัวอสุจิจากอัณฑะโดยตรงผ่านทางผิวหนัง (testicular sperm aspiration ; TESA) หรือการตัดชิ้นเนื้อออกมาจากอัณฑะเพื่อทำการสกัดตัวอสุจิ (testicular sperm extraction ; TESE) เป็นต้น ทั้งหมดนี้ล้วนแต่เป็น กระบวนการที่ต้องมีการเจ็บตัวทั้งสิ้น รวมทั้งยังมีความเสี่ยงที่จะเกิดการติดเชื้อหรือเกิดภาวะแทรกซ้อนตามมาอีกด้วย ดังนั้นจึงควรที่จะมีการลดจำนวนการทำกระบวนการเหล่านี้ให้น้อยที่สุด โดยการทำการแช่แข็งอสุจิหรือชิ้นเนื้อจากอัณฑะเอาไว้[3, 13, 26]

2.3.3 การแช่แข็งอสุจิเพื่อใช้เป็นธนาคารอสุจิ

2.3.3.1 การเก็บอสุจิของผู้บริจาคแช่แข็งไว้ เพื่อรอผลการตรวจต่างๆ เช่น การเพาะเชื้อ การตรวจเชื้อไวรัสตับอักเสบ การตรวจ human immunodeficiency virus (HIV) ฯลฯ เพื่อป้องกันการแพร่ไปติดผู้ใช้ ในส่วนกรณีของ HIV นั้นจะต้องมีการเจาะเลือดตรวจ 2 ครั้ง โดยห่างกัน 6 เดือนก่อนที่จะมีการนำอสุจิแช่แข็งออกมาใช้ได้[3, 13, 26]

2.3.3.2 ธนาคารอสุจินั้นทำให้มีความหลากหลายของลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) และลักษณะที่แสดงออก (phenotype) เช่น หมู่เลือด สีผม สีตา ฯลฯ ทำให้ผู้ใช้บริการสามารถเลือกได้ตามความต้องการเพื่อให้ใกล้เคียงกับคู่สมรสฝ่ายชายได้มากที่สุด [3, 13]

2.3.4 Cryoprotectant (CPAs)

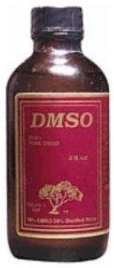
Cryoprotectant เป็นสารที่ช่วยปกป้องเซลล์จากผลเสียของกระบวนการแช่แข็ง สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด[27, 28]

2.3.4.1 Permeating cryoprotectant เป็นกลุ่มที่สารมีขนาดเล็ก มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ระหว่าง 63-97 จึงสามารถแทรกซึมเข้าภายในเซลล์ได้ดี เช่น dimethylsulfoxide (DMSO), propylene glycol (PROH), ethylene glycol (EG) และ glycerol (Gly) เป็นต้น[2, 3, 29] สารกลุ่มนี้สามารถละลายน้ำได้ดีมากเวลาผสมกับน้ำจะคายความร้อน (heat of solution) ออกมาปริมาณมาก ซึ่งจะแสดงถึงความสามารถในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของน้ำโดยการทำลาย hydrogen bonds จับกับโมเลกุลของน้ำ และยังสามารถเข้าแทนที่ได้โดยใช้ hydrogen bonds จับกับโมเลกุลของน้ำ ยกตัวอย่างเช่น 1, 2 propanediol และ glycerol การจับจะเกิดขึ้นระหว่างไฮโดรเจนอะตอมในหมู่ -OH ของ CPAs กับออกซิเจนอะตอมของน้ำหรือในกรณีของ DMSO ออกซิเจนอะตอมของ DMSO จะจับกับไฮโดรเจนอะตอมของน้ำและคายความร้อนออกมา[3, 30] กลไลการออกฤทธิ์ของ permeating CPAs ค่อนข้างซับซ้อนและอาจจะเกิดขึ้นที่หลายตำแหน่ง กล่าวคือ CPAs ช่วยในการลดจุดเยือกแข็งของสารละลาย (freezing point depression) [31] และในกรณีของการแช่แข็งโดยการลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆความเข้มข้นของ CPAs ที่ใช้ค่อนข้างต่ำ จึงจะมีผลในการลดจุดเยือกแข็งเพียง 2-3°c เท่านั้นแต่เมื่อการแช่แข็งดำเนินต่อไปที่อุณหภูมิต่ำกว่า -7°c และเกิดผลึกน้ำแข็งเกิดขึ้นภายนอกเซลล์ ความเข้มข้นของ CPAs จะเพิ่มสูงขึ้นมากในส่วนของน้ำที่ยังไม่เป็นน้ำแข็ง (nonfrozen fraction)[3] ทำให้จุดเยือกแข็งลดลงได้มาก เพราะฉะนั้นในช่วงนี้ CPAs ที่อยู่ภายในเซลล์ยังจะมีบทบาทที่สำคัญอีก 2 ข้อคือ

2.3.4.1.1 CPAs เข้าแทนที่สารละลายบางส่วนในเซลล์ จึงช่วยลดผลเสีย (toxicity) จากการที่มีความเข้มข้นของสารละลายสูงเกินไป โดยเฉพาะความเข้มข้นของพว กเกลือแร่ต่างๆ ซึ่งคุณสมบัตินี้เรียกว่า "salt buffering property"[30, 31]

2.3.4.1.2 CPAs สามารถเข้าแทนที่โมเลกุลของน้ำที่ฉาบอยู่โดยรอบของ macromolecules ที่สำคัญๆ เช่น เอนไซม์ และช่วยป้องกันสารเหล่านี้ไม่ให้เสียโครงสร้างตติยภูมิไปอย่างถาวร (irreversible conformational changes) [30, 31]

นอกจากนี้ CPAs บางชนิด เช่น PROH ยังมีฤทธิ์ในการ depolymerize actin filaments จึงสามารถช่วยป้องกัน meiotic spindle ของไข่จากการถูกทำลาย ส่วน glycerol ช่วยปกป้อง cytoskeleton ของเซลล์โดยทำปฏิกิริยากับ microfilament และ microtubule ภายในเซลล์[31]

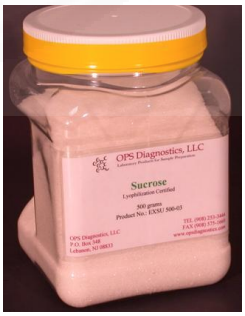


A B

ภาพที่ 2.4 แสดง ethylene glycol (A) และ dimethylsulfoxide (B)

ที่มา : http://www.health911.com/files/3487184/uploaded/DMSO.jpg และ http://www.madgetech.com/media/catalog/product/cache/1/image/9df78eab33525d08d6e5fb8d27136e95/g/l/glycol_web_1_1.jpg

2.3.4.2 Nonpermeating cryoprotectant เป็นกลุ่มน้ำตาลที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ จึงอยู่ได้แต่ภายนอกเซลล์ เช่น sucrose, raffinose, glycine, trehalose และโปรตีน เป็นต้น [2, 3, 29] สารคัดหลั่งในธรรมชาติหลายชนิด เช่น น้ำนม ซีรัม และไข่แดง ก็อาจจะมีองค์ประกอบที่มีคุณสมบัติเป็น CPAs ด้วย สารเหล่านี้มีขนาดใหญ่จึงไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปภายในเซลล์ได้ โดยกลไลการออกฤทธิ์คงเป็นการดูดน้ำ ("free water") ออกจากเซลล์ทำให้โอกาสที่จะเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ลดลง พวก macromolecules ดังกล่าวจะยังเป็นตัวช่วยปกป้องไม่ให้ zona pellucida แตกหักจากการทิ่มแทงของผลึกน้ำแข็ง ดังนั้นในน้ำยาแช่แข็งไข่และตัวอ่อนจึงต้องมีการเติม nonpermeable CPAs เข้าไปด้วยเสมอ[30, 31]



A B

ภาพที่ 2.5 แสดง trehalose (A) และ sucrose (B)

ที่มา : http://lifesci.com/wp-content/uploads/2014/06/1M-Trehalose-Solution- 427x393.jpg และ http://wisbiomed.com/equipment/images/sucrose2.jpg

สำหรับอสุจิของคนจะใช้ ethylene glycol cryoprotectant[29] แต่ในบางแห่งจะใช้ 7.5% glycerol เป็น cryoprotectant แต่ควรจะระวังเรื่อง toxic effect [2, 32-34]

เพื่อที่จะเพิ่มอัตราการอยู่รอดของตัวอสุจิภายหลังที่มีการแช่แข็งจึงมีการเพิ่ม nonpermeable cryoprotectant เช่น glycine, zwitterions, citrate และไข่แดง (egg-yolk) เป็นต้น ใน cryoprotectant ด้วย ในระยะแรกนิยมใช้ extenders ได้แก่ glycerol egg-yolk citrate (GEYC)[35] ซึ่งมีการพัฒนาปรับปรุงสูตรมาจนถึงปัจจุบัน แต่พบว่าการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิหลังการละลายดีกว่าการใช้ glycerol อย่างเดียวเพียงเล็กน้อย[36, 37]

2.3.5 ข้อดีและข้อเสียของการแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว

การแช่แข็งเซลล์ไม่ว่าจะเป็นวิธีไหนก็ตาม ล้วนแต่จะส่งผลทำให้เซลล์ต้องเจอกับสภาวะทั้งภายในและภายนอกที่ผิดไปจากธรรมชาติ เช่น การสูญเสียน้ำออกไปจากเซลล์ การเกิดผลึกน้ำแข็งภายในหรือภายนอกเซลล์ การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่าง ความเข้มข้นของสารละลาย และ ionic strength ภายในและภายนอกเซลล์ ซึ่งหลักการแช่แข็งคือการพยายามกำจัดหรือลดอันตรายต่างๆที่จะเกิดขึ้นกับเซลล์ในกระบวนการแช่แข็งและการละลายเซลล์ให้เหลือให้น้อยที่สุด หรืออย่างน้อยๆ ให้เซลล์อยู่ในสภาวะที่สามารถซ่อมแซมตัวเองได้[3, 38, 39]

เปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของการแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว

2.3.5.1 เครื่องมือ - การแช่แข็งแบบเนื้อแก้วต้องการเพียงแค่ไนโตรเจนเหลวและภาชนะใส่ซึ่งมีราคาถูกกว่าและสามารถนำไปใช้ภาคสนามได้สะดวกกว่าโดยไม่ต้องการการดูแลรักษาเครื่องมือที่ยุ่งยาก ต่างจากการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆ จะต้องการเครื่องมือแช่แข็งที่ควบคุมด้วยคอมพิวเตอร์ ซึ่งมีระบบการทำงานที่ซับซ้อนกว่า มีราคาสูงกว่าและต้องการการดูแลเป็นพิเศษด้วย[11]

2.3.5.2 น้ำยาแช่แข็ง - การแช่แข็งแบบเนื้อแก้วมีการใช้ความเข้มข้นของ CPAs ในขนาดที่สูงกว่าการแช่แข็งแบบช้า [3, 11, 39, 40] โดยมีการใช้ความเข้มข้นของ CPAs ในขนาดต่ำ เช่น 1.5 mol/l ดังนั้นโอกาสที่จะเกิดผลข้างเคียงของ CPAs ต่อเซลล์ในกรณีของการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วจึงมีโอกาสมากกว่า ดังนั้นเพื่อลดผลข้างเคียงควรเลือกใช้ CPAs ที่มีผลเสียต่อเซลล์ให้น้อยที่สุด เช่น ethylene glycol หรือ propylene glycol และควรใช้ร่วมกันมากกว่า 1 ชนิดหรือใช้ทั้ง permeating และ non-permeating CPAs ร่วมกันเพื่อลดผลข้างเคียงของ CPAs แต่ละตัวลง [11, 41, 42]

2.3.5.3 ระยะเวลา - การแช่แข็งแบบเนื้อแก้วจะใช้เวลาในการลดอุณหภูมิ (15,000 - 30,000°c/นาที) เพียงไม่กี่วินาที แต่การลดอุณหภูมิลงช้าๆ (0.3-2°c/นาที) จะต้องใช้เวลาอย่างน้อย 90 นาที [3, 11, 40]

2.3.5.4 ขั้นตอน - การแช่แข็งแบบเนื้อแก้วจะมีแค่นำเซลล์ไปผสมกับน้ำยาแช่แข็ง 1-2 ชนิด แล้วจุ่มลงในไนโตรเจนเหลวเลย ต่างจากการลดอุณหภูมิแบบช้าๆ จะยุ่งยากและมีหลายขั้นตอนกว่า เช่น นอกจากนำเซลล์ไปสัมผัสกับน้ำยาแช่แข็ง 2-3 ชนิดแล้ว ยังจะต้องมีการ seeding เพื่อให้เกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นช้าๆด้วย[3, 11]

2.3.5.5 ความเสี่ยง - โดยปกติแล้วความเสี่ยงต่อเซลล์จากการแช่แข็งอาจจะเกิดได้ทุกระยะของการแช่แข็ง สามารถแบ่งออกเป็น 5 ระยะ ตามช่วงของการลดอุณหภูมิ [41] คือ

2.3.5.5.1 จากช่วงอุณหภูมิห้องจนถึง -5°c จะเรียกว่า chilling injury โดยการลดอุณหภูมิจะมีผลต่อหยดไขมัน (lipid droplet) ภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์และ microtubules รวมทั้ง mitotic spindle ของเซลล์ไข่ในระยะ MII[41, 43] กลไกที่ทำให้เกิด chilling injury ยังไม่ทราบดีนัก [41] แต่พบว่าเซลล์ต่างชนิดกันจะมีความไวต่อ chilling injury ไม่เท่ากัน เช่น ไข่วัวและไข่หมูจะมีหยดไขมันภายในเซลล์จำนวนมากและไวต่อ chilling injury มากกว่าไข่คน[43] ในขณะที่ตัวอสุจิของคนพบว่าไม่มี chilling injury[31] ในการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วจะมีการลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว ทำให้เซลล์ผ่านช่วงของอุณหภูมิที่อาจก่อให้เกิด chilling injury ไปได้ในเวลาเป็นวินาทีหรือสั้นกว่า ซึ่งจะต่างจากการแช่แบบลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆ ซึ่งจะใช้เวลาหลายนาทีจึงทำให้มีโอกาสที่จะเกิด chilling injury ได้มากกว่า [41] ในการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วจึงมีการใช้ CPAs ความเข้มข้นสูง ดังนั้นนอกจากปัญหาเรื่องผลข้างเคียงของ CPAs แล้วอาจจะยังมีปัญหาเรื่อง osmotic shock เกิดขึ้นด้วย เพราะสารละลายของ CPAs ที่มีความเข้มข้นสูงจะดูดน้ำออกจากเซลล์อย่างรวดเร็วในการแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว จึงต้องเลือกใช้ permeating CPAs ที่สามารถซึมเข้าออกจากเซลล์ได้รวดเร็วเพื่อลดปัญหา osmotic imbalance และในบางกรณีอาจจะใช้วิธีสัมผัสกับ vitrification solution เป็น 2 ขั้นตอนโดยค่อยๆทำการเพิ่มความเข้มข้นของ CPAs ขึ้น[3, 42]

2.3.5.5.2 จากช่วงระหว่าง -5°c ถึง -80°c ความเสี่ยงของการแช่แข็งโดยการลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆมักจะเกิดจากการมีผลึกน้ำแข็งเกิดขึ้นภายในเซลล์หรือเกิดจากการที่เซลล์ต้องเผชิญกับความเข้มข้นของสารละลาย โดยเฉพาะพวกเกลือแร่ที่สูงขึ้นมากมายในเซลล์ (solution effect) เนื่องจากน้ำภายในเซลล์จะถูกดูดออกไปและกลายเป็นตกผลึกของน้ำแข็งภายนอกเซลล์ [42, 43] แต่ในการแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว น้ำภายในเซลล์ถูกเปลี่ยนเป็นของแข็งคล้าย

แก้ว โดยไม่มีผลึกน้ำแข็งเกิดขึ้น และไม่มีการสูญเสียน้ำออกไป จึงทำให้เลี่ยงความเสี่ยงจาก solution effect ได้[3, 42]

2.3.5.5.3 จากช่วงระหว่าง -50°c ถึง -150°c มักเป็นช่วงแตกร้าว (fracture damage) ของ zona pellucida หรือไซโทพลาสซึมของเซลล์[3, 41] ความเสี่ยงแบบนี้มักเกิดขึ้นในกรณีที่มีความแตกต่างของอุณหภูมิอย่างมาก ระหว่างอุณหภูมิด้านล่างและด้านบนของหยดอสุจิที่อยู่ในหรือบนไนโตรเจนเหลว ดังนั้นในการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วในปัจจุบันจึงพยายามหลีกเลี่ยงการแตกร้าวนี้โดยการแช่แข็งในปริมาณที่น้อยกว่า 1µl[38, 44, 45]

2.3.5.5.4 จากช่วงระหว่าง -150°c ถึง -196°c ที่อุณหภูมิ -196°c เป็นอุณหภูมิของไนโตรเจนเหลวที่ใช้ในการเก็บรักษาเซลล์ ถือว่าเป็นช่วงที่เป็นอันตรายต่อเซลล์น้อยที่สุด ซึ่งอันตรายที่อาจจะเกิดมี 2 ประเภท คือ

- อาจมีการเพิ่มอุณหภูมิขึ้นโดยบังเอิญจากความพลั้งเผลอของคนหรือจากอุบัติเหตุ
- ผลจากรังสีที่กระจัดกระจายอยู่ในชั้นบรรยากาศ มีผลทำให้เกิดการแตกหักของสารพันธุกรรม (DNA fragmentation) ซึ่งน่าจะมีโอกาสเกิดขึ้นได้เท่ากันทั้งการแช่แข็งแบบช้าและแบบเนื้อแก้ว [3, 11, 41]

2.3.5.5.5 ระหว่างการละลายเซลล์ เพื่อที่จะนำเซลล์กลับมาสู่สภาวะปกติก็อาจจะมีอันตรายต่างๆจากที่กล่าวมาแล้วเช่นกัน เพียงแต่อาจจะเกิดในลำดับที่กลับกันกับตอนที่นำไปแช่แข็ง[3, 11, 38]

2.3.5.6 ความสำเร็จ - ผลสำเร็จของการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วต้องอาศัยความเร็วและความชำนาญของผู้ทำ เพราะวิธีการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วที่ใช้กันส่วนใหญ่จะมีระยะเวลาให้เซลล์สัมผัสกับ vitrification solution (VS) ค่อนข้างสั้น ในขณะที่ความเข้มข้นของสารละลาย (osmolarity) ภายในและภายนอกเซลล์ยังไม่ทันที่จะเท่ากัน (non-equilibrium approach) ก็จุ่มเซลล์ลงไปในไนโตรเจนเหลวแล้ว ดังนั้น ช่วงเวลาที่เซลล์สัมผัสกับ vitrification solution (VS) จึงเป็นตัวแปรที่สำคัญต่อการอยู่รอดของเซลล์ในการแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว ถ้าผู้ทำไม่ชำนาญพออาจใช้เวลานานกว่าและได้ผลสำเร็จที่ต่ำกว่าเพราะจะทำให้เซลล์สัมผัสกับ CPAs นานมากยิ่งขึ้นและความเข้มข้นของ CPAs ภายในเซลล์จะเปลี่ยนไปจากเดิม[40, 45, 46]

2.3.5.7 ความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนหรือการติดเชื้อ - การแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว มักจะใช้ภาชนะที่เปิดให้เซลล์สัมผัสกับไนโตรเจนเหลวได้โดยตรงเพื่อให้อัตราการลด

อุณหภูมิเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว[47] ส่วนการแช่แข็งโดยการลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆเซลล์มักถูกบรรจุในภาชนะปิด เช่น straw หรือ cryovial เป็นต้น ซึ่งวิธีการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วจะมีข้อเสียคือ เปิดโอกาสให้มีการปนเปื้อนหรือการติดเชื้อได้ง่ายขึ้น [48] เพราะเชื้อรา เชื้อไวรัส และเชื้อแบคทีเรียสามารถรอดชีวิตได้ดีในถังบรรจุไนโตรเจนเหลวที่ใช้ในการเก็บเซลล์ที่แช่แข็ง [49] แต่ในปัจจุบันเทคนิคการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วได้มีการพัฒนาขึ้นอีกหลายๆด้านเพื่อป้องกันโอกาสที่จะเกิดการปนเปื้อนหรือการติดเชื้อ เช่น การฆ่าเชื้อในไนโตรเจนเหลวโดยวิธีการฉายแสง อัลตร้าไวโอเลต (ultraiolet : UV) หรือการกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.2 μm (filter sterilization) หรือการซื้อไนโตรเจนเหลวที่ปราศจากเชื้อจากผู้ผลิตโดยตรงเพื่อนำมาใช้ในการสัมผัสกับเซลล์ในการแช่แข็ง [46, 50] หรือเปลี่ยนจากการจุ่มเซลล์ลงในไนโตรเจนเหลวโดยตรงมาเป็นการสัมผัสกับพื้นผิวโลหะ (solid surface vitrification : SSV)[50, 51] นอกจากนี้แทนที่จะเก็บเซลล์ในไนโตรเจนเหลวก็เปลี่ยนเป็นไปเก็บในถังแช่ชนิดที่มีแต่ไอของไนโตรเจนเหลวซึ่งจะมีอุณหภูมิ -190°c เช่น ใน isothermal liquid nitrogen vapor storage system ที่ผลิตโดยบริษัท Custom BioGenic System (มิชิแกน, สหรัฐอเมริกา) [51] หรือแช่ในไนโตรเจนเหลวแต่มีการประดิษฐ์ปลอก หรือจุก หรือภาชนะอื่นมาครอบ ไม่ให้ตัวอ่อนหรือเซลล์ที่แช่แข็งสัมผัสกับไนโตรเจนเหลวในถังแช่โดยตรง[3, 46, 51, 52]

2.3.5.8 ความคุ้มค่า - การแช่แข็งแบบเนื้อแก้วจะมีประสิทธิภาพและความคุ้มทุน (cost-effectiveness) ที่ดีกว่าการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิแบบช้าๆ ซึ่งมีค่าเครื่องแช่แข็งที่ควบคุมด้วยคอมพิวเตอร์ซึ่งมีราคาสูง[3, 31, 50]

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Eilish T.Donnelly.และคณะในปี 2000 ที่พบว่าอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิมาแล้วนั้นจะมีอัตราการแตกหักของสายดีเอ็นเอลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้มีการผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ[53]

Isachenko E และคณะในปี 2004 เมื่อนำอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิแล้วไปเข้ากระบวนการแช่แข็งและละลายพบว่า ความเข้มข้นของอสุจิ อัตราการเคลื่อนที่ อัตราอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิตของอสุจิลดลง แต่มีความเสียหายของดีเอ็นเอและปริมาณของ ROS มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้อแต่ไม่ผ่านการแช่แข็ง[54]

Ahmad L และคณะในปี 2007 ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการเตรียมเชื้ออสุจิต่อการแตกหักของสายดีเอ็นเอโดยใช้วิธี comet assay ในอสุจิ normozoospermia และ teratozoospermics

(TZs) และ idiopathics (IDs) พบว่าการวิเคราะห์รูปร่างของอสุจิมีความผิดปกติที่ส่วนหัวและส่วน midpiece ในกลุ่มของ TZs และกลุ่ม IDs มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.001) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ปกติ และกลุ่มที่ผิดปกติพบว่ามีการแตกหักของสายดีเอ็นเอมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.001) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ปกติ และยังพบว่าในกลุ่ม TZs หลังจากผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิทั้ง2แบบ (swim up และ Percoll) แล้วเกิดการแตกหักของดีเอ็นเอมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.01) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอสุจิที่ปกติและกลุ่ม IDs แต่มีระดับการแตกหักของดีเอ็นเอมากขึ้นเมื่อนำกลุ่ม IDs มาเปรียบเทียบกับกลุ่มอสุจิที่ปกติ[55]

Vutyavanich และคณะในปี 2010 พบว่าอัตราการมีชีวิต อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ ที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิลดลงหลังจากที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งแล้ว[31]

Satirapod C. และคณะในปี 2011 ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการแช่แข็งเชื้ออสุจิโดยวิธี solid surface vitrification (SSV) และ standard vapor เพื่อดูอัตราการเคลื่อนไหว, รูปร่างปกติ, อัตราการรอดชีวิตและ DNA integrity พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตและอัตราการเคลื่อนไหวใกล้เคียงกันแต่ SSV มี DNA damage ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ[14]

Kalthur G และคณะในปี 2011 ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการแช่แข็งและละลายอสุจิ สดแบบ vitrifacation ในอสุจิที่เป็นแบบ normozoospermia และ asthenoospermia โดยได้ทำการนำวิตามินอี 5 ไมโครโมล่าร์ ใส่ลงไปในน้ำยาแช่แข็งอสุจิแล้วเมื่อนำอสุจิไปละลายพบว่า มีการเพิ่มขึ้นของการเคลื่อนที่ของอสุจิและการแตกหักของดีเอ็นเอลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ใส่วิตามินอีลงไปในน้ำยาแช่แข็งอสุจิ[4]

Suhee Kim และคณะในปี 2012 ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับเชื้ออสุจิของหนูโดยการนำไปปั่นล้างและแช่แข็งเปรียบเทียบกับกลุ่มปกติ โดยพบว่าหลังจากที่นำไปแช่แข็งแล้วเชื้ออสุจิของหนูมีอัตราการเคลื่อนไหว , plasma membrane integrity (PMI) และ mitochondrial membrane potential (MMP) ลดลง แต่มีค่า ROS เพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มปกติ[56]

Agha-Rahimi A และคณะ ในปี 2013 ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของการแช่แข็งเชื้ออสุจิแบบ rapid freezing กับการแช่แข็งเชื้ออสุจิแบบเนื้อแก้วเทียบกับกลุ่มควบคุม ในคนไข้เพศชายที่มีคุณภาพน้ำเชื้อปกติ จำนวน 30 คน พบว่า หลังจากที่ละลายเชื้ออสุจิในกลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งแบบ rapid freezing และแช่แข็งแบบเนื้อแก้วนั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงของ sperm parameters, การเคลื่อนที่ (motility) (40.0±13.0% VS 41.9±10.3%) (control = 86.6±5.9%) และ อัตราการรอดชีวิต (viability) (63.2±7.7% VS 64.4±10.0%) (control = 95.8±3.9%) ซึ่งมีค่าลดลงทั้ง 2 กลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและพบว่า DNA fragmentation ใน

กลุ่มที่ทำ rapid freezing มีค่าสูงกว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (16.6±5.6% vs. 11.6±4.5%, P=0.01) แต่ในกลุ่มที่ทำการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วมีค่าสูงขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (15.7±4.4%) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งผลของ hyaluronan binding assay (HBA) ก็ไม่ต่างกันระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง มากไปกว่านั้นการใส่ cryoprotectant agents (CPAs) ไม่ได้มีความจำเป็นต่อการฟื้นคืนของอสุจิสำหรับวิธีการทำการแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว ทั้งนี้การใส่ CPAs อาจจะเป็นการเพิ่มสารพิษก็เป็นได้[5]

Mohammad Ali Khalili และคณะ ในปี 2014 ได้รายงานการศึกษาเกี่ยวกับผลของการแช่แข็งเชื้ออสุจิแบบเนื้อแก้วของมนุษย์ต่อการอยู่รอดและความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอในผู้ชายที่มีเชื้ออสุจิที่ปกติและผิดปกติ โดยแบ่งกลุ่มการคัดเลือกน้ำเชื้อที่มีคุณภาพเชื้ออสุจิปกติ 17 คน และ คุณภาพเชื้ออสุจิผิดปกติ 17 คน โดยทำการทดสอบตามเกณฑ์ของ WHO ปี 2010[57] หลังจากนั้นนำไปทำการวัดค่าคุณสมบัติ (sperm parameters) ก่อนที่จะนำไปทำการแช่แข็ง แล้วจึงนำเชื้อที่เหลือไปทำการแช่แข็งด้วย plunging cryoloops และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 7 วันก่อนที่จะนำมาละลายเพื่อนำมาทำการวัดค่า sperm parametersอีกครั้งหนึ่ง หลังจากที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว ผลจากการทดลองพบว่า เชื้ออสุจิที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วนั้นจะมีระดับของ การเคลื่อนที่ (motility), อัตราการรอดชีวิต (viability), และ รูปร่างปกติ (morphology) ต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งกลุ่มที่มีคุณภาพเชื้ออสุจิปกติและผิดปกติ และยังพบว่ามีอัตราการแตกหักของสายดีเอ็นเอ (DNA fragmentation) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อผ่านกระบวนการแช่แข็งเมื่อเปรียบเทียบกับก่อนที่จะเข้ากระบวนการแช่แข็ง ในกลุ่มที่มีคุณภาพน้ำเชื้ออสุจิปกติ (16.41 ± 4.53 VS 24.76 ± 5.03, P = .002) และในกลุ่มที่มีคุณภาพน้ำเชื้ออสุจิผิดปกติ (23.5 ± 8.31 VS 34.29 ± 10.02, P < .0001) ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากระบวนการแช่แข็งแบบ vitrification มีผลต่อคุณภาพของอสุจิเมื่อดูจากsperm parameters และการแตกหักของสายดีเอ็นเอ[58]

Somsin Petyim, Chanon Neungton และคณะ ในปี 2014 ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการเคลื่อนไหวและอัตราการรอดชีวิตของอสุจิ 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 มีการเตรียมอสุจิ(โดยใช้วิธี swim-up) ก่อนเข้าสู่กระบวนการแช่แข็งเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 2 ที่มีการเตรียมอสุจิหลังการเข้าสู่กระบวนการแช่แข็ง อาสาสมัครคนไข้เพศชายที่เข้ารับการรักษาผู้มีบุตรยากจำนวนทั้งหมด 65 ราย แล้วแบ่งกลุ่มออกเป็น 2 กลุ่มดังกล่าว ผลปรากฏว่าจำนวนของอสุจิและอัตราการเคลื่อนที่โดยรวมของอสุจิทั้ง 2 กลุ่มลดลงหลังจากที่ผ่านกระบวนการแช่แข็ง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (neat sperm) (P < 0.001) มากกว่าไปกว่านั้น อัตราของการตายของอสุจิในกลุ่มที่มีการเตรียมก่อนการผ่านกระบวนการแช่แข็งต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ผ่านการเตรียม (P < 0.05) และยังมีอัตราของอสุจิที่มีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าสูงกว่าในกลุ่มที่มีการเตรียมก่อนการนำไปแช่แข็ง (P < 0.001) ผู้วิจัยสรุปได้ว่า

การเตรียมเชื้ออสุจิด้วยวิธี swim-up ก่อนการแช่แข็งนั้น มีผลต่อคุณภาพของอสุจิดีกว่าและมีการตายของอสุจิน้อยกว่าการเตรียมอสุจิหลังจากผ่านกระบวนการแช่แข็ง[59]

Helena M. และคณะในปี 2014 ก็แสดงให้เห็นว่าอสุจิที่ผ่านกระบวนการเตรียมเชื้ออสุจิจะมีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิมากกว่าอสุจิที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการเตรียมเชื้ออสุจิ[60] จากผลการศึกษา ของจิรัฐติกาล ไชยาในปี 2013 พบว่าอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้อก่อนนำไป แช่แข็งทั้งในแบบ vapor freezing และ vitrification ภายหลังการละลายอสุจิออกมาแล้วจะทำให้คุณสมบัติต่างๆของอสุจิมีคุณภาพลดลง ทั้งอัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิ (Sperm motility), อัตราการเคลื่อนไหวไปข้างหน้าของอสุจิ (Sperm progressive motility), รูปร่างอสุจิปกติ (Normal sperm morphology) และ อัตราการมีชีวิต (Vitality) ของอสุจิ แต่เมื่อเปรียบเทียบผลระหว่างการแช่แข็งอสุจิแบบ vapor freezing กับ vitrification พบว่าภายหลังการละลายอสุจิที่แช่แข็งแบบ vitrification ให้คุณสมบัติของอสุจิดีกว่าในกลุ่มที่แช่แข็งแบบ vapor freezing ทั้งในเรื่องของอัตราการเคลื่อนไหว (42.85±17.320% และ 36.53 ± 17.352%) และรูปร่างอสุจิปกติ (13.86±5.583% และ 9.98±5.599%) ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ[61]

เกศนิษาและคณะในปี 2014 ก็พบว่าอสุจิที่ผ่านกระบวนการเตรียมเชื้อแล้วนั้นจะมีอัตราการเคลื่อนที่ อัตราอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติ อัตราอสุจิที่มีชีวิตและอัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่ความเข้มข้นของอสุจิ, ความเสียหายของดีเอ็นเอและปริมาณของ ROS ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ[15]

งานวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยสนใจทำการศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบระหว่างการแช่แข็งเชื้ออสุจิ ที่ผ่านและไม่ผ่าน การเตรียมเชื้ออสุจิ (sperm preparation) ด้วยวิธีการแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว (vitrification) เพื่อที่จะดูว่าการเตรียมเชื้ออสุจิหรือไม่เตรียมเชื้ออสุจิก่อนการแช่แข็งแบบเนื้อแก้ววิธีใดจะ ช่วยให้มีการ ปกป้องและ รักษาคุณภาพของอสุจิ ความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิและการแตกหักของสายดีเอ็นเอได้ดีกว่ากัน เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพของการรักษาชายผู้มีบุตรยากต่อไป

บทที่ 3
วิธีการวิจัย

3.1 ลักษณะตัวอย่างประชากรที่ทำการศึกษา

3.1.1 การเลือกตัวอย่าง

อาสาสมัครเพศชายอายุระหว่าง 25 - 45 ปี ที่ได้รับการตรวจน้ำอสุจิ (Semen analysis) แล้วพบว่ามีคุณภาพของน้ำอสุจิเป็นปกติโดยเทียบจากค่าปกติมาตรฐานของ WHO ปี 2010 ดังภาพที่ 3.1

Table A1.1 Lower reference limits (5th centiles and their 95% confidence intervals) for semen characteristics

Parameter	Lower reference limit
Semen volume (ml)	1.5 (1.4–1.7)
Total sperm number (10^6 per ejaculate)	39 (33–46)
Sperm concentration (10^6 per ml)	15 (12–16)
Total motility (PR + NP, %)	40 (38–42)
Progressive motility (PR, %)	32 (31–34)
Vitality (live spermatozoa, %)	58 (55–63)
Sperm morphology (normal forms, %)	4 (3.0–4.0)
Other consensus threshold values	
pH	≥7.2
Peroxidase-positive leukocytes (10^6 per ml)	<1.0
MAR test (motile spermatozoa with bound particles, %)	<50
Immunobead test (motile spermatozoa with bound beads, %)	<50
Seminal zinc (μmol/ejaculate)	≥2.4
Seminal fructose (μmol/ejaculate)	≥13
Seminal neutral glucosidase (mU/ejaculate)	≥20

ภาพที่ 3.1 แสดงค่าน้ำอสุจิปกติจากค่าปกติมาตรฐานของ WHO ในปี 2010[57]

หมายเหตุ คนไข้ที่จะเข้าเงื่อนไข (criteria) ของงานวิจัยครั้งนี้ ต้องได้รับการตรวจค่า semen volume, total motility, sperm morphology, vitality, pH, sperm concentration แล้วพบว่าทั้งหมดปกติ โดยมีการตรวจซ้ำ 2 ครั้ง

3.1.2 เกณฑ์การรับอาสาสมัคร

3.1.2.1 เกณฑ์การรับอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการ (Inclusion criteria)

1. อาสาสมัครชายที่มารับการรักษาภาวะมีบุตรยาก ซึ่งมีผลตรวจคุณภาพอสุจิดังนี้ จำนวนเชื้ออสุจิมากกว่า 15 ล้านตัว/มิลลิลิตร, มีอสุจิที่มีการเคลื่อนไหวมากกว่าร้อยละ 40 และมีอสุจิที่มีรูปร่างปกติมากกว่าร้อยละ 4 ตามเกณฑ์ WHO[57]
2. ผู้ป่วยทุกรายต้องมีประวัติการมีเพศสัมพันธ์โดยไม่ได้คุมกำเนิดเป็นเวลาอย่างน้อย 1 ปี แล้วยังไม่สามารถมีบุตรได้
3. ผู้ป่วยชายที่มารับการรักษาภาวะมีบุตรยาก อายุตั้งแต่ 25 ปี ขึ้นไป

3.1.2.2 เกณฑ์การไม่รับอาสาสมัครเข้าร่วมโครงการ (Exclusion criteria)

1. อาสาสมัครที่มีโรคติดเชื้อของระบบสืบพันธุ์ เช่น ภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Human Immunodeficiency Virus : HIV), โรคซิฟิลิส (Syphilis), หนองใน (Gonorrhoea), ไวรัสตับอักเสบชนิดบี (Hepatitis B virus) เป็นต้น
2. อาสาสมัครที่ดื่มเหล้าและสูบบุหรี่ รวมทั้งมีการใช้ยาประจำตัวแบบติดต่อเป็นเวลานาน และมีการกินยาสมุนไพรเป็นประจำ
3. ผู้ที่ไม่สมัครใจเข้าร่วมการศึกษาวิจัยครั้งนี้

3.1.2.3 เกณฑ์การยุติเข้าร่วมโครงการ (Discontinuation criteria)

โครงการวิจัยเป็นการเก็บน้ำอสุจิแค่ครั้งเดียวโดยไม่มีการนัดอาสาสมัครมาทำซ้ำ

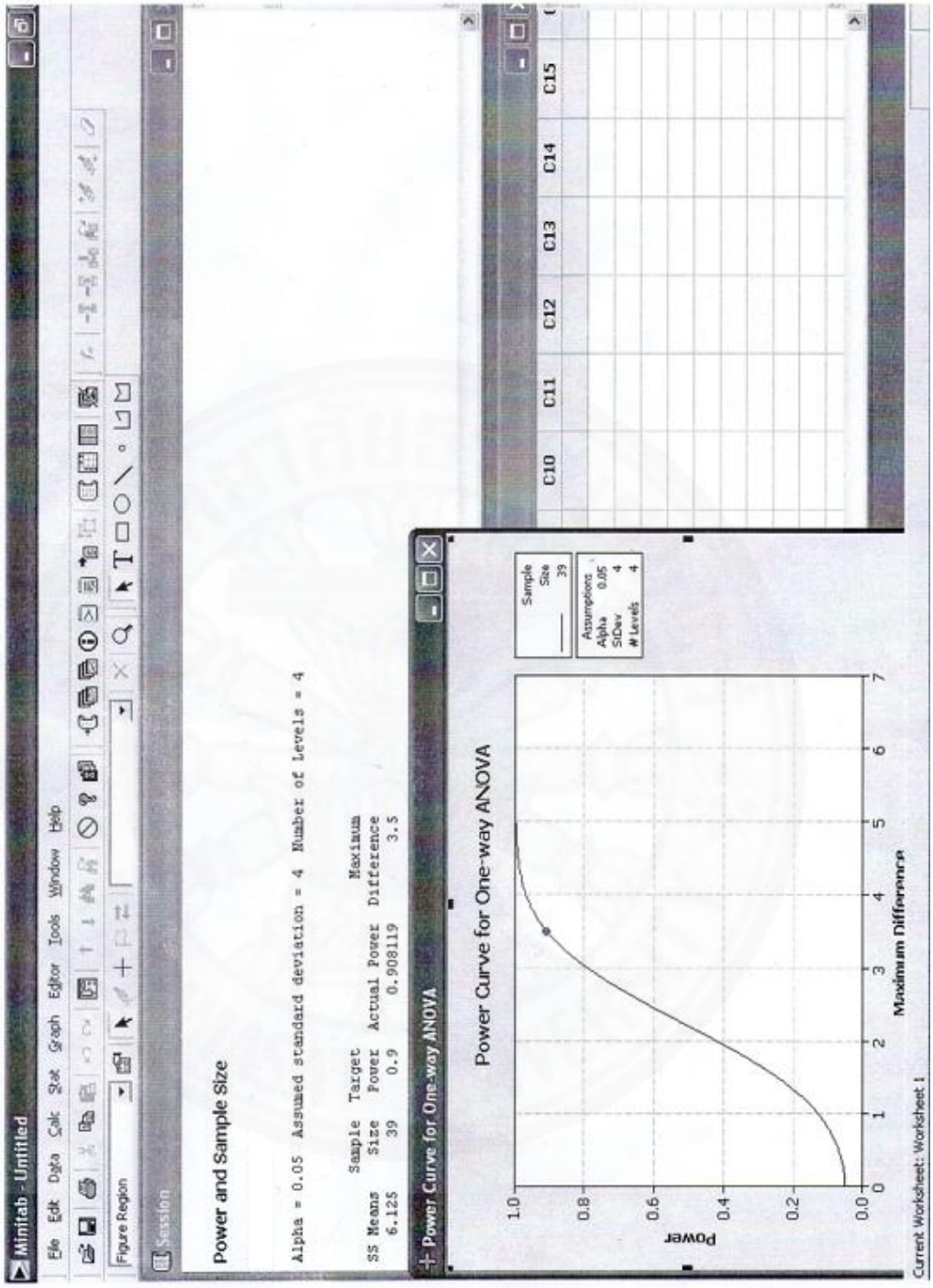
3.1.3 การคำนวณขนาดตัวอย่าง

คำนวณขนาดตัวอย่างโดยใช้โปรแกรม Minitab (ตารางการคำนวณหน้า 27) คำนวณขนาดตัวอย่างสำหรับ One way ANOVA โดยใช้สูตรของJohn Neter[62] ซึ่งเป็นการกำหนดค่าดังนี้

Alpha	=	0.5
Assumed standard deviation	=	4
Number of levels	=	4
Target power	=	0.9 (90%)

เนื่องจากงานวิจัยครั้งนี้เป็นการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มตัวอย่าง 4 กลุ่ม (กลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม และกลุ่มวิจัย 3 กลุ่ม) จึงทำการกำหนดขนาดตัวอย่างสำหรับการทดสอบ 4 กลุ่มตัวอย่างแบบ

สองหาง โดยกำหนดให้ ระดับความเชื่อมั่น 95 % และ power = 90 % ซึ่งจากการใช้โปรแกรม Minitab ในการคำนวณทำให้ได้ขนาดตัวอย่างคือ 39 คนต่อกลุ่ม ซึ่ง semen ที่ได้มาจากคนไข้แต่ละคนจะนำมาแบ่งให้เท่าๆกันเป็น 4 กลุ่ม เพื่อนำไปตรวจวัดคุณสมบัติต่างๆตามกลุ่มที่ได้แบ่งไว้ ในวิธีดำเนินการวิจัย[63]



ภาพที่ 3.2 ตารางการคำนวณขนาดตัวอย่างด้วยโปรแกรม MInitab

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 ขั้นตอนการทำวิจัย

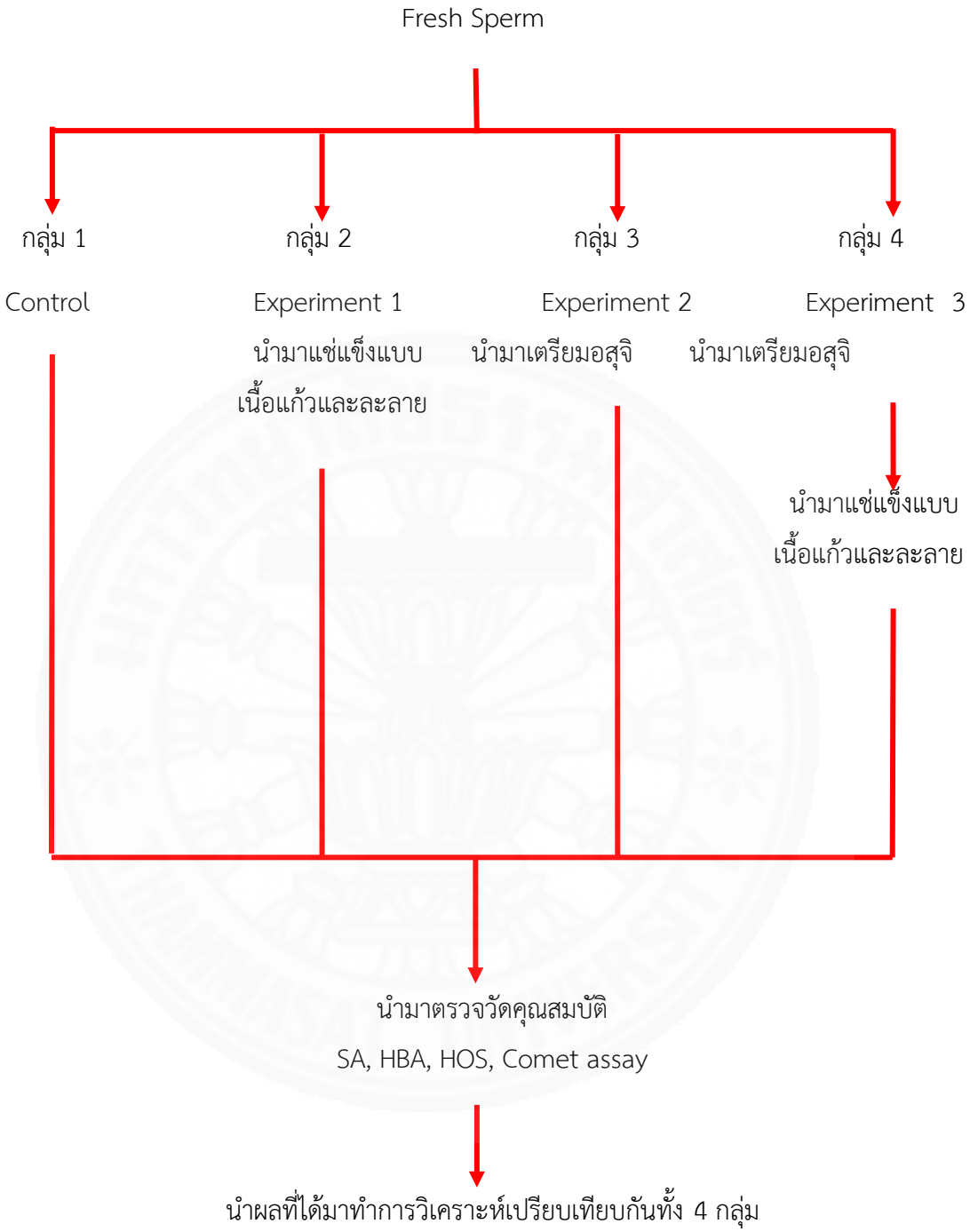
อาสาสมัครเก็บน้ำเชื้ออสุจิใส่ภาชนะพลาสติกปราศจากเชื้อโรคด้วยวิธี masturbation (หลังงดหลั่งน้ำเชื้อ 3 - 7 วัน) และนำไปตรวจวัดคุณภาพอสุจิ โดยที่ผลการตรวจพบว่าน้ำอสุจิปกติ (น้ำอสุจิที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้จะต้องผ่านการเซ็นใบยินยอมจากอาสาสมัครเท่านั้น) จากนั้นนำน้ำอสุจิของอาสาสมัครแต่ละคนมาแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มเท่าๆกันคือ

1. กลุ่มควบคุม เป็นกลุ่มน้ำเชื้อสด (neat / fresh / unwashed : UW) เมื่อได้น้ำอสุจิแล้วนำไปทำการตรวจวัดคุณสมบัติทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ Semen analysis (SA) เพื่อดูความเข้มข้นของอสุจิและการเคลื่อนที่ , Hyaluronan binding assay (HBA) เพื่อดู maturity และความสมบูรณ์ของอสุจิ, Hypo-osmotic swelling test (HOS) เพื่อดูความมีชีวิตของอสุจิและ Comet assay เพื่อดูการแตกหักของสายดีเอ็นเอ

2. กลุ่มที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ (น้ำเชื้อสด) ก่อนนำไปผ่านกระบวนการแช่แข็งและทำละลาย (unwashed + frozen and thawed : UW+F) น้ำอสุจิมาเติมน้ำยาแช่แข็งในอัตรา 1:1 และนำไปทำการแช่แข็งและละลาย (Frozen and thawed) จากนั้นจึงนำอสุจิไปทำการตรวจวัดคุณสมบัติทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ Semen analysis (SA), Hyaluronan binding assay (HBA) , Hypo-osmotic swelling test (HOS) และComet assay

3. กลุ่มที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ (washed : W) เมื่อได้น้ำอสุจิแล้ว นำไปทำการเตรียมเชื้ออสุจิ (Sperm preparation) เพื่อเป็นการคัดเลือกตัวอสุจิปกติที่เคลื่อนที่ได้ดีและขจัด ส่วนน้ำอสุจิออกไป จากนั้นจึงนำอสุจิที่ได้ไปทำการตรวจวัดคุณสมบัติทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ Semen analysis (SA), Hyaluronan binding assay (HBA) , Hypo-osmotic swelling test (HOS) และ Comet assay

4. กลุ่มที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิแล้วนำไปผ่านกระบวนการแช่แข็งและทำละลาย (washed + frozen and thawed : W+F) โดยนำอสุจิทำการเตรียมเชื้ออสุจิ (Sperm preparation) จากนั้นนำมาเติมน้ำยาแช่แข็งในอัตรา 1:1 และนำเข้าสู่การแช่แข็งและละลาย (frozen - thawed) แล้วจึงนำอสุจิไปทำการตรวจวัดคุณสมบัติทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ Semen analysis (SA), Hyaluronan binding assay (HBA) , Hypo-osmotic swelling test (HOS) และComet assay (ดังที่แสดงในภาพที่ 3.3)



ภาพที่ 3.3 แผนภาพการทำวิจัย

<u>การตรวจวัดทางห้องปฏิบัติการของอสุจิ (Sperm analysis) มีวิธีดังต่อไปนี้</u>

- การตรวจน้ำอสุจิ เป็นการตรวจเพื่อทดสอบหาคุณภาพของอสุจิทั้งในด้านความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณของน้ำอสุจิ ความเข้มข้น รูปร่าง การเคลื่อนที่ ตามมาตรฐานของ WHO[57]

- Hyaluronan binding assay (HBA) เป็นวิธีที่ใช้ตรวจสอบความสามารถของตัวอสุจิในการจับกับ hyaluronic acid ที่พบใน cumulus cell ของไข่ วิธีการนี้ใช้ในการประเมิน sperm maturity and efficiency ที่อาจส่งผลต่อขบวนการ fertilization โดยงานวิจัยนี้ใช้ชุดตรวจ hyaluronan binding assay (HYDA$^{K®}$ COATINGS; Biocoat, Inc.) โดยดูจากการจับเกาะของอสุจิบนแผ่นสไลด์ที่มี hyaluronan เคลือบอยู่บนแผ่นสไลด์ แล้วทำการนับจำนวนการเกาะหรือไม่เกาะ 100 ตัว ทั้งหมด 3 รอบ[64]

- Hypo-osmotic swelling test (HOS) เป็นวิธีการตรวจเพื่อดูอัตราการรอดชีวิตของตัวอสุจิ วิธีการทำคือ นำอสุจิมาผสมกับ swelling solution แล้วหยดใส่ slide นำไปส่องดูภายใต้กล้อง phase contrast เป็นวิธีที่ใช้ตรวจจำนวนตัวอสุจิที่มีชีวิตในน้ำเชื้อสดและในน้ำเชื้อหลังผ่านการแช่แข็งและละลายโดยอาศัยหลักการของแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ของน้ำเกลือที่มีแรงดันออสโมติกต่ำ (hypotonic saline) ซึ่งจะสามารถแทรกซึมเข้าไปภายในตัวของอสุจิที่มีชีวิต ทำให้ส่วนปลายหางเกิดการขยายบวม ซึ่งตัวที่หางม้วนงอ แสดงถึงว่า เป็นตัวอสุจิที่มีชีวิต แต่ถ้าอสุจิที่ตายแล้วหางก็จะไม่ม้วนและผู้วิจัยจะวิเคราะห์ผลออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต โดยที่นับจำนวนทั้งหมด 100 ตัว ทำซ้ำ 3 รอบ[65, 66]

- Comet assay เป็นวิธีการตรวจการแตกหักของสายดีเอ็นเอ (DNA fragmentation) โดยใช้น้ำยาเคมีจากบริษัท Sigma-Aldrich, USA โดยจะนำอสุจิมาทำการผสมรวมกับ agarose gel หลังจากนั้นนำไปทำการหยดลงบนสไลด์เพื่อทำให้แข็งตัวที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำไปผ่านกระบวนการ electrophoresis หลังจากนั้นก็นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ เพื่อทำการวิเคราะห์อสุจิ 100 ตัว โดยที่จะมีการทำการทำซ้ำทั้งหมด 2 สไลด์ต่อหนึ่งตัวอย่าง โดยที่ใช้โปรแกรม Meta-system software, Comet Imager V.2.0.0. เพื่อทำการตรวจวัดพารามิเตอร์ความยาวหางเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ DNA damage[67]

<u>หมายเหตุ</u> เมื่อผู้วิจัยทำการวิจัยเสร็จเรียบร้อยแล้ว น้ำอสุจิที่ใช้ในการทดลองจะนำไปทิ้งถังขยะที่เป็นถุงขยะสีแดง (สำหรับขยะติดเชื้อ) และมีการนำไปทำลายโดยเตาเผาที่ได้มาตรฐานของโรงพยาบาล

3.2.2 สถานที่ศึกษาวิจัยและระยะเวลา

ห้องปฏิบัติการวิจัยเวชศาสตร์การเจริญพันธุ์ คลินิกผู้มีบุตรยาก โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ระยะเวลาการทำวิจัย 1 ปี

3.2.3 การพิจารณาด้านจริยธรรม

การวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ชุดที่1 หนังสือรับรองเลขที่ MTU-EC-OB-1-045/57

3.3 การเตรียมอสุจิ (Sperm preparation) (ภาคผนวก ก)

เป็นวิธีการเพื่อทำการล้างแยกตัวอสุจิที่ปกติออกจาก seminal plasma เพราะในส่วนของ seminal plasma นั้นจะมีสารที่จะยับยั้งการเกิด ปฏิกิริยา capacitation และความสามารถในการปฏิสนธิของอสุจิด้วย การเตรียมอสุจิจะทำให้ได้ตัวอสุจิที่มีคุณภาพดีสำหรับเตรียมใช้ผสมกับไข่ด้วยวิธีการช่วยการเจริญพันธุ์ต่อไป ซึ่งวิธีการเตรียมมีอยู่ด้วยกันหลายวิธี แต่ในงานวิจัยนี้จะใช้วิธี Discontinuous density gradient ซึ่งเป็นวิธีที่ดีที่สุดที่จะแยกตัวอสุจิที่มีคุณภาพดีออกจากเซลล์อื่นและน้ำอสุจิ[2, 11]

1. นำเชื้ออสุจิที่เก็บได้มาบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30-60 นาที
2. ตรวจลักษณะทางกายภาพของน้ำอสุจิที่เก็บได้โดยสังเกตสีและลักษณะของน้ำเชื้อที่เก็บได้ น้ำอสุจิที่เก็บได้ใหม่ๆจะมีลักษณะข้นเหนียว สีขาวขุ่น เมื่อทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาทีจะละลายตัว (liquefaction)
3. ตรวจดูความหนืดของน้ำอสุจิ โดยนำน้ำอสุจิที่ทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วมาตรวจสอบการละลายตัวโดยใช้ sterile plastic pipette ขนาด 1 ml มาดูดน้ำเชื้ออสุจิขึ้น แล้วปล่อยลงที่เดิมที่ความสูงประมาณ 10 cm ถ้าน้ำเชื้ออสุจิเหลวเป็นหยดๆแสดงว่ามีการละลายตัวดี แต่ถ้าน้ำเชื้ออสุจิมีความหนืดยาวเป็นสายลงมาเกิน 2 cm แสดงว่าการละลายตัวไม่ดี ให้บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ต่ออีก 10 นาที แล้วจึงนำมาทดสอบอีกครั้ง ทำซ้ำจนกว่าน้ำเชื้ออสุจิจะละลายตัวดี
4. ใช้ pipette ดูดน้ำอสุจิเพื่อทำการวัดปริมาตรของน้ำอสุจิแล้วบันทึกปริมาตรที่วัดได้

5. วัดค่าความเป็นกรด-ด่างโดยหยดน้ำอสุจิ 1 หยดลงบนกระดาษ pH paper แล้วทำการเทียบสีที่เกิดขึ้นกับแถบสีมาตรฐานบนกล่อง pH paper บันทึกค่า pH ที่วัดได้
6. ดูดน้ำอสุจิปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบน Makler counting chamber นำไปตรวจวัดความเข้มข้น, ความสามารถในการเคลื่อนที่, ความมีชีวิต, การจับกลุ่มกันของอสุจิ ด้วยเครื่อง CASA โดยสุ่มตัวอย่าง 7-9 fields ในกรณีที่อสุจิ มีความเข้มข้นสูงต้องทำการเจือจางก่อนการวิเคราะห์และต้องบันทึกระดับความเจือจางด้วย บันทึกข้อมูลที่วิเคราะห์ได้ลงในเครื่องคอมพิวเตอร์และพิมพ์ข้อมูลที่ได้ออกทางเครื่องพิมพ์
7. ดูดน้ำอสุจิแล้วค่อยๆหยดลงบนน้ำยา sil-select sperm gradient ที่เตรียมไว้แล้วใน conical tube ประมาน tube ละ 3 มิลลิลิตร
8. นำไปปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบ swing out rotor โดยใช้ความเร็ว 300g นาน 15 นาที
9. นำอสุจิที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงแล้วซึ่งจะมีการแยกชั้นเกิดขึ้นโดยชั้นบนสุดจะเป็นน้ำเมือก, เศษเซลล์ต่างๆ ชั้นต่อมาเป็นอสุจิที่ตายแล้ว และชั้นสุดท้ายที่ก้นหลอดเป็นตะกอนอสุจิที่มีชีวิต ทำการดูดแยกอสุจิที่ก้นหลอดออกมาใส่หลอดใหม่โดยนำไปผสมกับน้ำยา ferticult flushing medium ที่เตรียมไว้แล้ว
10. นำอสุจิที่ผสมกับน้ำยา ferticult flushing medium ไปปั่นแยกโดยใช้ความเร็ว 300g นาน 5 นาที แล้วดูดเอาตะกอนอสุจิไปใส่ใน conical tube ใหม่ที่มีน้ำยา ferticult flushing medium ที่เตรียมไว้ ทำการล้างเช่นนี้ 2 ครั้งเพื่อล้างน้ำยา sil-select ออกให้หมด
11. แยกอสุจิก้นหลอดที่ได้ มาใส่ในหลอดก้นกลมปลอดเชื้อขนาด 4 ml แล้วincubate ในตู้ CO_2 incubator 10 นาที
12. ดูดอสุจิที่ทำการคัดแยกแล้วจากข้อ 11 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบน makler counting chamber นำไปตรวจวัดความเข้มข้น, ความสามารถในการเคลื่อนที่, ความมีชีวิต, การจับกลุ่มกันของอสุจิ ด้วยเครื่อง CASA โดยสุ่มตัวอย่าง 7-9 fields ในกรณีที่อสุจิ มีความเข้มข้นสูงต้องทำการเจือจางก่อนการวิเคราะห์และต้องบันทึกระดับความเจือจางด้วย บันทึกข้อมูลที่วิเคราะห์ได้ลงในเครื่องคอมพิวเตอร์และพิมพ์ข้อมูลที่ได้ออกทางเครื่องพิมพ์

ภาพที่ 3.4 เครื่องตรวจวิเคราะห์อสุจิ (Computer-assisted-semen analysis: CASA)
ที่มา : http://2.bp.blogspot.com/-RRMe5sPx8GA/Tk31fN2gt-I/AAAAAAAAAD4/dqaT8aRfg3k/s400/IVOS-Black-Trim-on-White-background.jpg

3.4 การเตรียมน้ำยาแช่แข็ง (ภาคผนวก ข)

3.4.1 การเตรียมน้ำยาแช่แข็งอสุจิ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

- ดูดสารละลาย citrate buffer ที่เตรียมไว้ปริมาตร 1,400 ไมโครลิตร
- ดูดสารละลาย egg yolk ที่เตรียมไว้ปริมาตร 400 ไมโครลิตร
- ดูด glycerol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร
- เมื่อเตรียมน้ำยาแช่แข็งเสร็จแล้ว นำมาผสมให้เข้ากันแล้วนำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 56 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที
- หลังจากอุ่นเสร็จแล้ว นำไปแช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วแบ่งเป็นหลอดละ 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปแช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.5 ขั้นตอนการแช่แข็งและละลายอสุจิ

3.5.1 การแช่แข็งอสุจิ

1. ตักไนโตรเจนเหลวใส่กล่องโฟมที่เตรียมไว้แล้วนำกระทงอลูมิเนียมฟอย ด์ไปลอยไว้ด้านบนของผิวไนโตรเจนปิดฝากล่องโฟมเพื่อให้กระทงอลูมิเนียมฟอย ด์นั้นมีอุณหภูมิใกล้เคียงกับไนโตรเจนเหลว

2. นำน้ำยาแช่แข็งอสุจิ มาผสมเข้ากับอสุจิในอัตราส่วนที่เท่าๆกัน 1:1 โดยที่ค่อยๆผสมน้ำยาลงไป แล้วเขย่าให้เข้ากัน

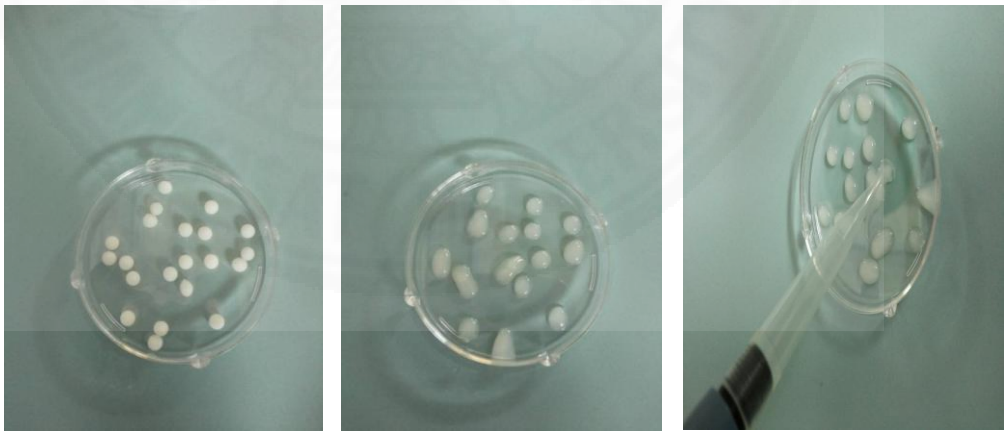
3. นำน้ำอสุจิที่ผสมกันดีแล้วดูดขึ้นมาด้วย autopipette ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วหยดลงไปบนกระทงอลูมิเนียมฟอย ด์อย่างรวดเร็ว ทำจนกว่าจะหมด เม็ดอสุจิที่แช่แข็งแล้วจะมีลักษณะเป็นเม็ดกลมๆสีขาว

4. ใช้forcep คีบเม็ดอสุจิที่แช่แข็งเรียบร้อยแล้วลงใน cryovial จนหมด

5. นำ cryovial ที่ใส่เม็ดอสุจิครบแล้วแช่ลงไปในถังไนโตรเจนเหลว

3.5.2 การละลายอสุจิ

1. นำ cryovial ที่แช่แข็งออกมาจากถังไนโตรเจน แล้วนำมาละลายโดยเทเม็ดอสุจิที่อยู่ภายใน cryovial ลงภายใน plate แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 4 นาที จากนั้นนำ autopipette ดูดเอาอสุจิที่ละลายแล้วใส่กลับเข้าไปในหลอดทดลอง

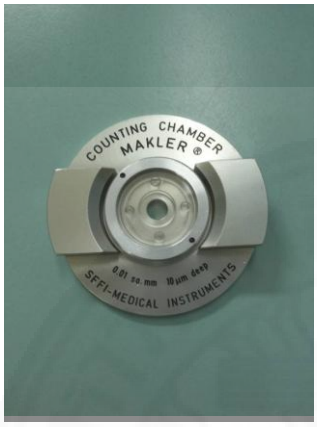


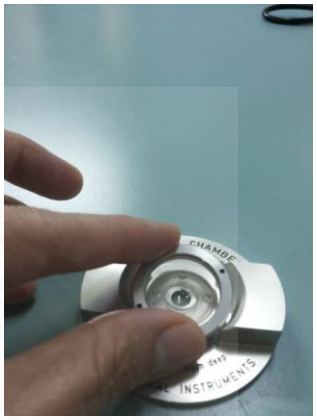
หลังจากได้อสุจิแล้ว นำไปตรวจวัดทางห้องปฏิบัติการ ได้แก่ Semen analysis (SA), Hyaluronan binding assay (HBA), Hypo-osmotic swelling (HOS) และ Comet assay

3.6 การตรวจวัดทางห้องปฏิบัติการ

3.6.1 วิธีการประเมินความเข้มข้นและการเคลื่อนไหวของอสุจิ (ภาคผนวก ค)

1. นำน้ำอสุจิปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงใน Makler counting chamber





2. ใส่ Makler counting chamber เข้าไปในเครื่อง CASA แล้วทำการนับประมาณ 4 - 5 รอบ

3. ค่าที่ได้ออกมาจากเครื่อง CASA คือ ค่าความเข้มข้นของอสุจิ การเคลื่อนที่และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ

3.6.2 การตรวจรูปร่างของอสุจิ

การเตรียมตัวอย่าง

หยดน้ำอสุจิปริมาตร 10 ไมโครลิตรแล้ว smear บางๆลงบนแผ่นกระจกสไลด์ที่สะอาดและทำให้แห้งหรือ fix ใน 95% ethanol เป็นเวลา 5-15 นาที แล้วนำสไลด์ไปย้อมด้วยวิธี Papanicolaou[57]

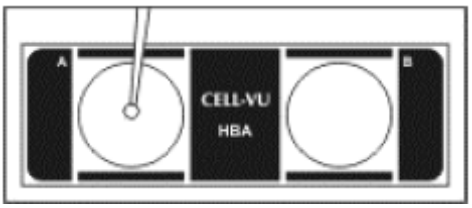
วิธีการย้อม Papanicolaou ของบริษัท Bio-Optica ประเทศ Italy

1. จุ่มใน Ethanol 95%	2 นาที
2. จุ่มใน น้ำกลั่น	2 นาที
3. จุ่มใน Harris hematoxylin	1-2 นาที
4. ให้น้ำประปาไหลผ่าน	5 นาที
5. จุ่มใน Ethanol 95%	15 วินาที
6. จุ่มใน OG 6	2 นาที
7. จุ่มใน Ethanol 95%	15 วินาที
8. จุ่มใน Ethanol 95%	15 วินาที
9. จุ่มใน EA 50	5 นาที
10. จุ่มใน Ethanol 95%	15 วินาที
11. จุ่มใน Absolute Ethanol	30 วินาที
12. จุ่มใน Absolute Ethanol	30 วินาที
13. จุ่มใน Bio-Clear หรือ Xylene	2 นาที
14. จุ่มใน Bio-Clear หรือ Xylene	2 นาที

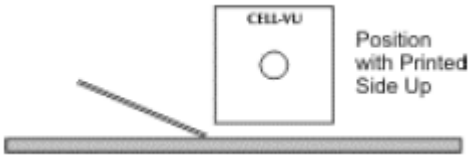
หลังจากที่ย้อมสไลด์เสร็จเรียบร้อยแล้ว นำไปอ่านผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 100 เท่าโดยที่แต่ละตัวอย่างต้องทำการนับอสุจิจำนวน 100 ตัวเพื่อที่จะหาเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่ปกติ

3.6.3 การทำ Hyaluronan binding assay (HBA)

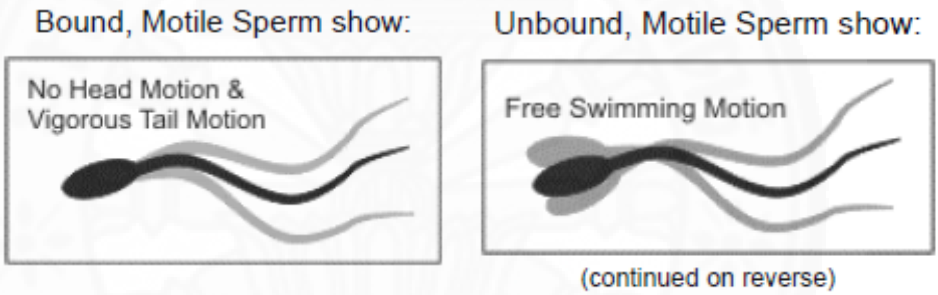
1. ผสมน้ำอสุจิให้เข้ากันแล้วดูดออกมาประมาณ 10 ไมโครลิตร หยดลงตรงกลางของแผ่นสไลด์



2. วางแผ่น CELL-VU gridded cover slip ปิดอย่างระวังอย่างให้เกิดฟองอากาศ



3. นำสไลด์ไปวางทิ้งไว้ประมาณ 10-20 นาที เมื่อถึงเวลาก็นำสไลด์มาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่มีกำลังขยาย 400 เท่า เพื่อนับจำนวนตัวอสุจิที่มีการจับกับสไลด์และไม่จับกับสไลด์



ที่มา: ดัดแปลงจาก HBA® Slide Sperm-Hyaluronan Binding Assay, Origio

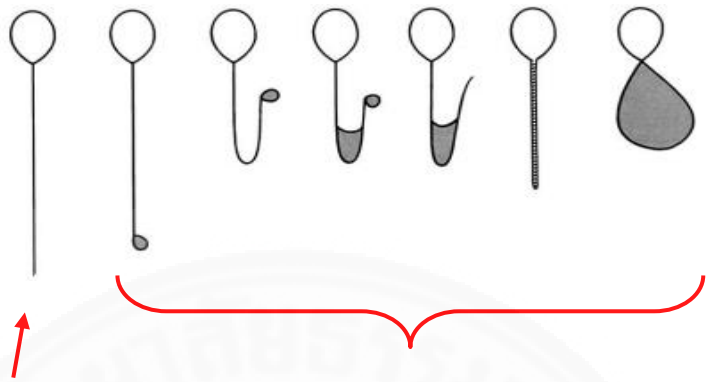
4. คำนวณร้อยละของอสุจิที่จับกับสไลด์ ดังนี้

$$\%\,\text{bound} = 100 \times \frac{\text{bound motile sperm}}{\text{bound motile sperm} + \text{unbound motile sperm}}$$

3.6.4 การทำ Hypo-osmotic swelling test (ภาคผนวก ง)

1. ดูดอสุจิมา 100 ไมโครลิตร มาผสมกับ swelling solution 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 - 40 นาที
2. ดูดส่วนผสมมา 100 ไมโครลิตร แล้วนำมาหยดใส่ในสไลด์ ปิดด้วย coverslip
3. ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast ที่มีกำลังขยาย 400 เท่า

4. นับเซลล์อสุจิ 100 ตัว โดยที่ตัวอสุจิที่ให้ผลบวกหางจะงอ (ดังรูป 3.4) หมายถึงตัวอสุจิที่มีชีวิต คำนวณเป็นร้อยละตัวอสุจิที่มีชีวิต



ภาพที่ 3.5 แสดงอสุจิที่ผ่านการทำ Hypo-osmotic swelling test (HOS)

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก WHO 2010[57]

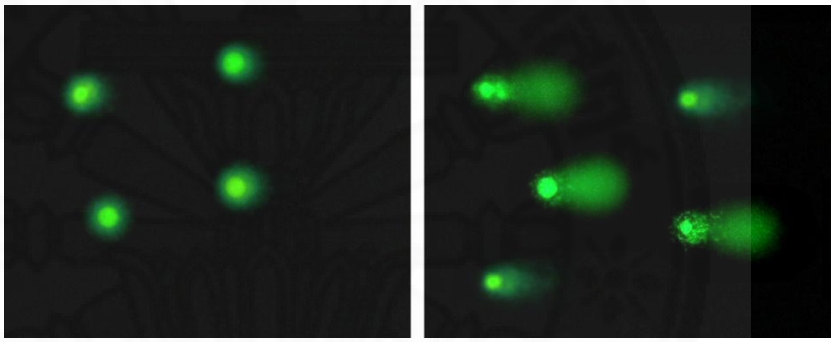
3.6.5 การทำ Comet Assay (Alkaline single cell gel electrophoresis) (ภาคผนวก จ)

วิธีการเตรียมสไลด์

1. นำ nomal melting point agarose (NMP) มา 110 µl หยดลงบน slide แล้วปาดด้วย coverslip เสร็จแล้วนำใส่ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้เจลแข็งตัว (ชั้นเจลที่ 1)
2. นำ sperm [$5x10^6$ ml] มา 10 µl ผสมกับ low melting point agarose (LMP) 90 µl นำส่วนผสมทั้งหมดหยดลงบน slide เดิมที่มี NMP อยู่แล้วนำใส่ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อให้เจลแข็งตัว (ชั้นเจลที่2)
3. นำ LMP 100 µl หยดลงบน slide เดิมแล้วปิดด้วย coverslip เสร็จแล้วนำใส่ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้เจลแข็งตัว (ชั้นเจลที่ 3)
4. เมื่อเจลแข็งตัวแล้วให้นำ coverslip ออก แล้วนำ slide ไปแช่ใน lysis solution เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในขณะนั้นให้ใส่ Dithiothreitol (DDT) ลงไปใน lysis solution
5. เมื่อเสร็จแล้วให้นำ slide ไปทำ electrophoresis โดยที่นำสไลด์ไปวางลงใน electrophoresis chamber ที่ภายในมี electrophoresis solution โดยทำ

electrophoresis ที่ 24 V, 300 mA เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. นำ slide มาล้างด้วย neutralized buffer เป็นเวลา 5 นาที
7. นำ Ethidium bromide solution ที่เตรียมไว้หยดลงไปบน slide แล้วปิดด้วย coverslip
8. วิเคราะห์ผลภายใน 3 ชั่วโมงโดยส่องดูภายใต้ fluorescence microscope เพื่อทำการวิเคราะห์อสุจิ 100 ตัว โดยจะมีการทำซ้ำทั้งหมด 2 สไลด์ต่อหนึ่งตัวอย่าง โดยใช้โปรแกรม Meta-system software, Comet Imager V.2.0.0. เพื่อทำการตรวจวัดพารามิเตอร์ความยาวหางเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความเสียหายของดีเอ็นเอจาก Parameter "Tail length"



A B

ภาพที่ 3.6 แสดงอสุจิที่ผ่านการทำ comet assay โดยที่ A เป็นภาพของอสุจิที่ไม่เกิดการแตกหักของสาย DNA และภาพ B เป็นอสุจิที่เกิดการแตกหักของสาย DNA หลังจากที่ผ่านการทำ comet assay

ที่มา : http://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/STA-350%20Fig%202.jpg

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ข้อมูลทั่วไปของอาสาสมัคร

อาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการมีอายุเฉลี่ย 35.50 ± 6.15 ปี มีปริมาตรน้ำอสุจิเฉลี่ยเท่ากับ 2.92 ± 1.15 มิลลิลิตร มีค่า pH ของน้ำอสุจิเฉลี่ยเท่ากับ 8.0 มีความเข้มข้นของอสุจิเฉลี่ยเท่ากับ 161.94 ± 88.90 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร มีอัตราการเคลื่อนที่ 55.22 ± 9.67 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า 47.15 ± 9.16 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติ 6.90 ± 0.33 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิ 66.31 ± 11.73 เปอร์เซ็นต์และมีค่าของอัตราอสุจิที่มีชีวิต 70.69 ± 8.93 แสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงคุณสมบัติของน้ำอสุจิสด (fresh, neat or unwashed)

Sperm characteristics	**น้ำอสุจิ** (Mean ± SD)
อายุ (ปี)	**35.50 ± 6.15**
ปริมาตรน้ำอสุจิ (มิลลิลิตร)	**2.92 ± 1.15**
ความเข้มข้นของอสุจิ (10^6 /มิลลิลิตร)	**161.94 ± 88.90**
อัตราการเคลื่อนที่ (%)	**55.22 ± 9.67**
อัตราอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า (%)	**47.15 ± 9.16**
อสุจิที่มีรูปร่างปกติ (%)	**6.90 ± 0.33**
อัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิ (%HBA)	**66.31 ± 11.73**
อัตราอสุจิที่มีชีวิต (%Vitality)	**70.69 ± 8.93**
ค่าpH ของน้ำอสุจิ	**8.0**

ตารางที่ 4.2 แสดงคุณสมบัติของอสุจิ (mean ± SD) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลอง 4 กลุ่ม

Sperm characteristics	unwashed (mean ± SD)	Washed (mean ± SD)	unwashed + Frozen – thawed (mean ± SD)	washed + Frozen – thawed (mean ± SD)
ความเข้มข้นของอสุจิ (Sperm concentration 10^6/ml)	161.94 ± 88.90	116.90 ± 80.36 [a]	107.35 ± 55.18 [a]	96.11 ± 39.88 [a]
อัตราการเคลื่อนที่ (Sperm motility)(%)	55.22 ± 9.67	78.97 ± 13.13 [a]	29.45 ± 11.70 [a,b]	28.75 ± 17.10 [a,b]
อัตราอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า (Progressive motile)(%)	47.15 ± 9.16	69.35 ± 15.06 [a]	25.97 ± 10.42 [a,b]	25.07 ± 15.01 [a,b]
อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติ (Normal morphology)(%)	6.90 ± 0.33	10.47 ± 0.60 [a]	6.47 ± 0.46 [b]	8.32 ± 0.33 [a,b,c]
อัตราอสุจิที่มีชีวิต (Vitality)(%)	70.69 ± 8.93	81.30 ± 8.98 [a]	58.38 ± 10.35 [a,b]	54.67 ± 11.24 [a,b,c]
อัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิ (Sperm-Hyaluronan Binding Assay : HBA)(%)	66.31 ± 11.73	78.73 ± 9.23 [a]	64.32 ± 9.29 [b]	66.58 ± 8.70 [b]
ความเสียหายของดีเอ็นเอ (DNA damage)(%)	2.24 ± 0.74	1.91 ± 0.69 [a]	5.00 ± 4.96 [a,b]	4.17 ± 4.55 [a,b,c]

หมายเหตุ a ข้อมูลที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม unwashed

b ข้อมูลที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม washed

c ข้อมูลที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม unwashed + freeze - thawed

ตารางที่ 4.3 แสดงการเปรียบเทียบค่า mean difference ± SE ของอสุจิเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลอง 4 กลุ่ม

Sperm characteristics	UW VS W	UW VS UW + F	W VS W + F	UW + F VS W + F
ความเข้มข้นของอสุจิ (Sperm concentration 10^6/ml)	+45.04 ± 13.87*	+54.58 ± 11.53*	+17.82 ± 11.79	+8.27 ± 8.31
อัตราการเคลื่อนที่ (Sperm motility)(%)	-23.75 ± 2.82*	+25.77 ± 1.79*	+50.22 ± 2.86*	+0.70 ± 2.14
อัตราอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า (Progressive motile)(%)	-22.20 ± 3.14*	+21.17 ± 1.66*	+44.27 ± 3.02*	+0.90 ± 2.00
อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติ (Normal morphology)(%)	-3.57 ± 0.51*	+0.42 ± 0.53	+1.17 ± 0.70	-2.82 ± 0.62*
อัตราอสุจิที่มีชีวิต (Vitality)(%)	-10.60 ± 1.32*	+12.31 ± 1.97*	+26.62 ± 1.81*	+3.71 ± 1.68*
อัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิ (Sperm-Hyaluronan Binding Assay : HBA)(%)	-12.41 ± 1.66*	+1.99 ± 1.80	+12.14 ± 1.92*	-2.26 ± 1.93
ความเสียหายของดีเอ็นเอ (DNA damage)(%)	+0.33 ± 0.15*	-2.76 ± 0.78*	-2.26 ± 0.75*	+0.83 ± 0.38*

หมายเหตุ * ข้อมูลที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

+ แสดงถึงกลุ่มแรกมีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ 2

- แสดงถึงกลุ่มที่แรกมีค่าน้อยกว่ากลุ่มที่

4.2 ความเข้มข้นของอสุจิเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลอง 4 กลุ่มโดยดูค่าจาก mean ± SD

พบว่าค่าความเข้มข้นของอสุจิ มีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆจากกลุ่มควบคุม (161.94 ± 88.90), กลุ่มอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ (116.90 ± 80.36), กลุ่มอสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิก่อนการแช่แข็งและละลาย (107.35 ± 55.18) และกลุ่มอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิแล้วนำไปทำการแช่แข็งและละลาย (96.11 ± 39.88) ความแตกต่างระหว่างกลุ่มแสดงโดย *p-value* ภาพที่ 4.1 และตารางที่ 4.2

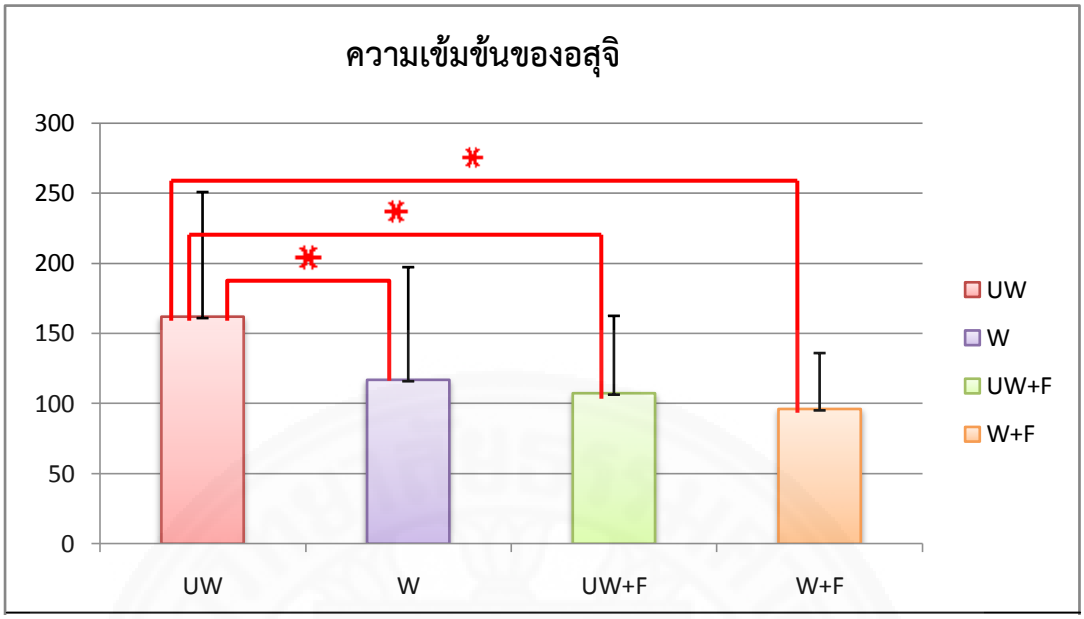
mean difference ± SE

1. อสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ (W) แล้วจะมีความเข้มข้นของอสุจิลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับอสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ (UW)

2. ในกลุ่มอสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิก่อนการแช่แข็งและละลาย (UW) การแช่แข็งและละลาย (UW+F) ทำให้ความเข้มข้นของอสุจิลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

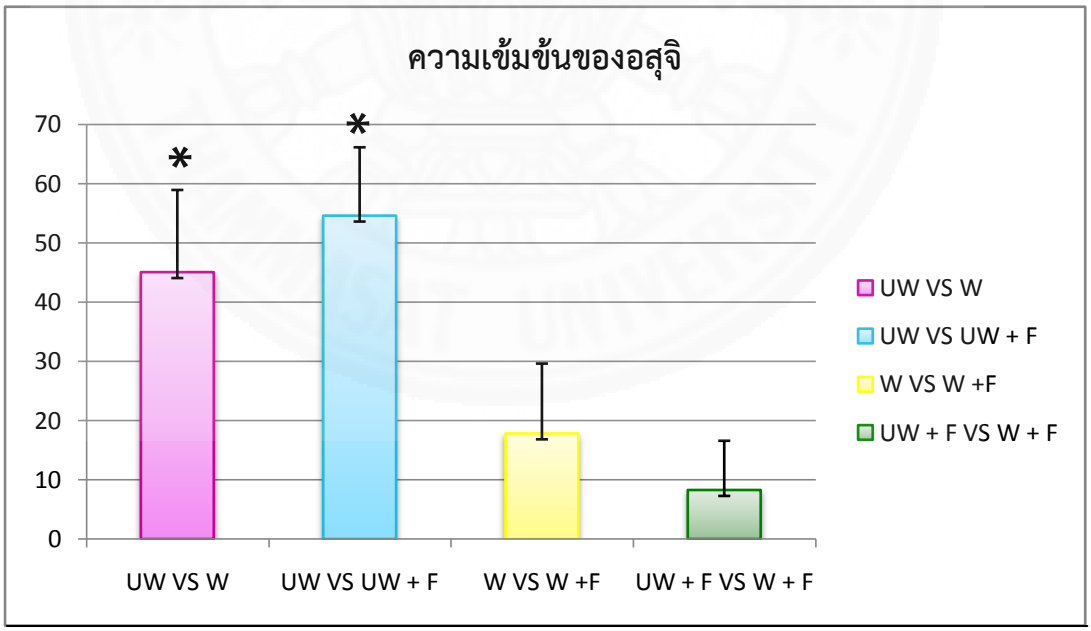
3. ในกลุ่มอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิแล้วนำไปทำการแช่แข็งและละลาย (W+F) การแช่แข็งและละลายไม่ได้ส่งผลทำให้ความเข้มข้นของอสุจิเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีการเตรียมเชื้ออย่างเดียว (W)

4. ในกลุ่มอสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ ก่อนผ่านการแช่แข็งและละลาย (UW+F) มีความเข้มข้นของอสุจิไม่แตกต่างจากกลุ่มอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิแล้วนำไปทำการแช่แข็งและละลาย (W+F) ภาพที่ 4.2 และตารางที่ 4.3



ภาพที่ 4.1 แสดงค่าความเข้มข้นของอสุจิของกลุ่มการทดลอง 4 กลุ่ม (mean ± SD)

* ข้อมูลที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 4.2 แสดงค่าความแตกต่างของความเข้มข้นของอสุจิ (mean difference ± SE)

* ข้อมูลที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4.3 อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลอง 4 กลุ่มโดยดูค่าจาก mean ± SD

พบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ ในกลุ่มของอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้อ (W) มีอัตราการเคลื่อนที่เพิ่มมากขึ้นกว่ากลุ่มของอสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้อ (UW) และเมื่อผ่านกระบวนการแช่แข็งและละลายแล้ว อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลงทั้งในกลุ่มของอสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้อก่อนนำไปผ่านการแช่แข็งและละลาย (UW+F) และกลุ่มของอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้อก่อนนำไปผ่านการแช่แข็งและละลาย (W+F) ภาพที่ 4.3 และตารางที่ 4.2

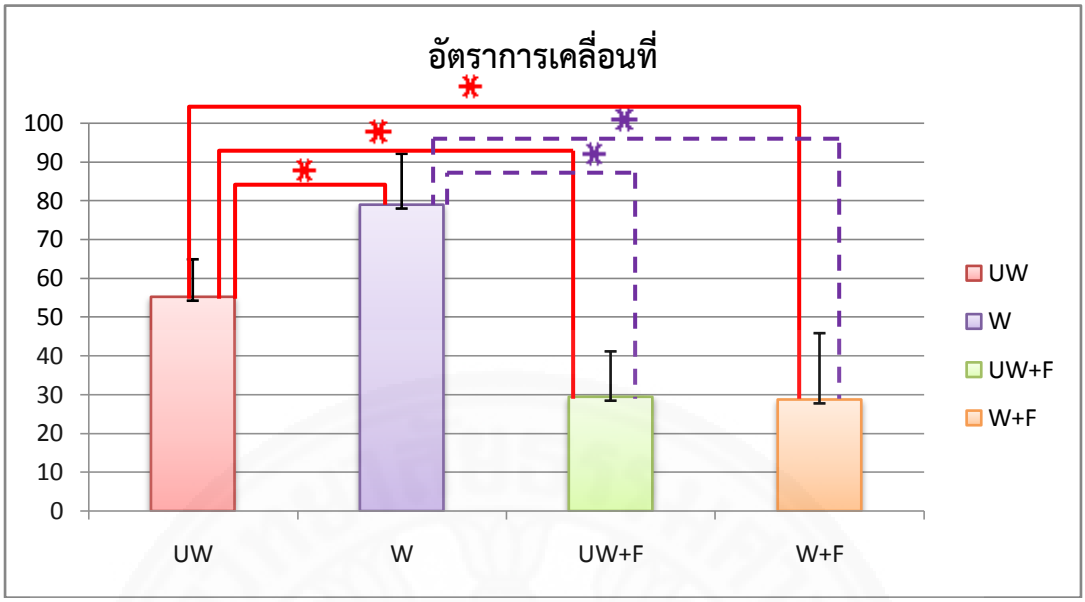
mean difference ± SE

1. อสุจิที่ผ่าน การเตรียม เชื้ออสุจิ (W) แล้วมีอัตราการเคลื่อนที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับอสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ (UW)

2. ในกลุ่มอสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ (UW) เปรียบเทียบกับอสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิแล้วนำไป แช่แข็งและละลาย (UW+F) การแช่แข็งและละลายทำให้อัตราการเคลื่อนที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

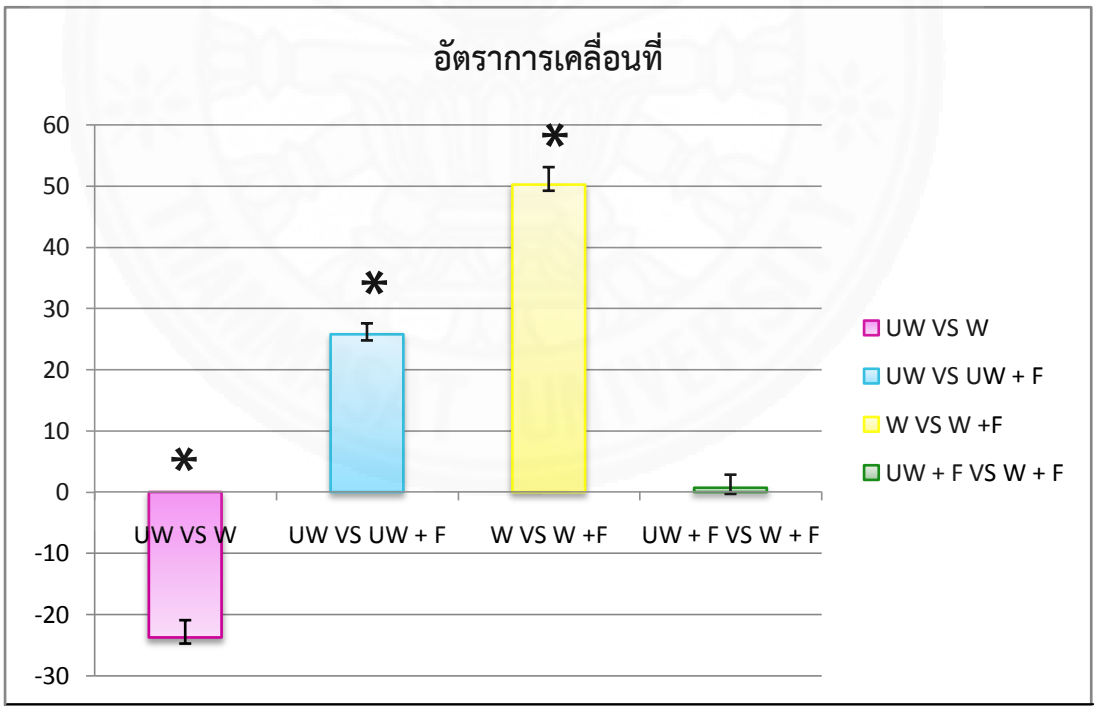
3. ในกลุ่มอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ (W) เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิแล้วนำไปทำการแช่แข็งและละลาย (W+F) การแช่แข็งและละลายส่งผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4. ในกลุ่มอสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิก่อนการแช่แข็งและละลาย (UW+F) จะมีอัตราการเคลื่อนที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกลุ่ม อสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิแล้วนำไปทำการแช่แข็งและละลาย (W+F) ภาพที่ 4.4 และตารางที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 แสดงอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิของกลุ่มการทดลอง 4 กลุ่ม (mean ± SD)

* ข้อมูลที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 4.4 แสดงค่าความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ (mean difference ± SE)

* ข้อมูลที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4.4 อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลอง 4 กลุ่ม โดยดูค่าจาก mean ± SD

อัตราอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า ในกลุ่มของอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้อ (W) จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มของอสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้อ (UW) และเมื่อผ่านกระบวนการแช่แข็งและละลายแล้วจะทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิจะลดลงทั้งในกลุ่มของอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้อ (W+F) และไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ (UW+F) ภาพที่ 4.5 และตารางที่ 4.2

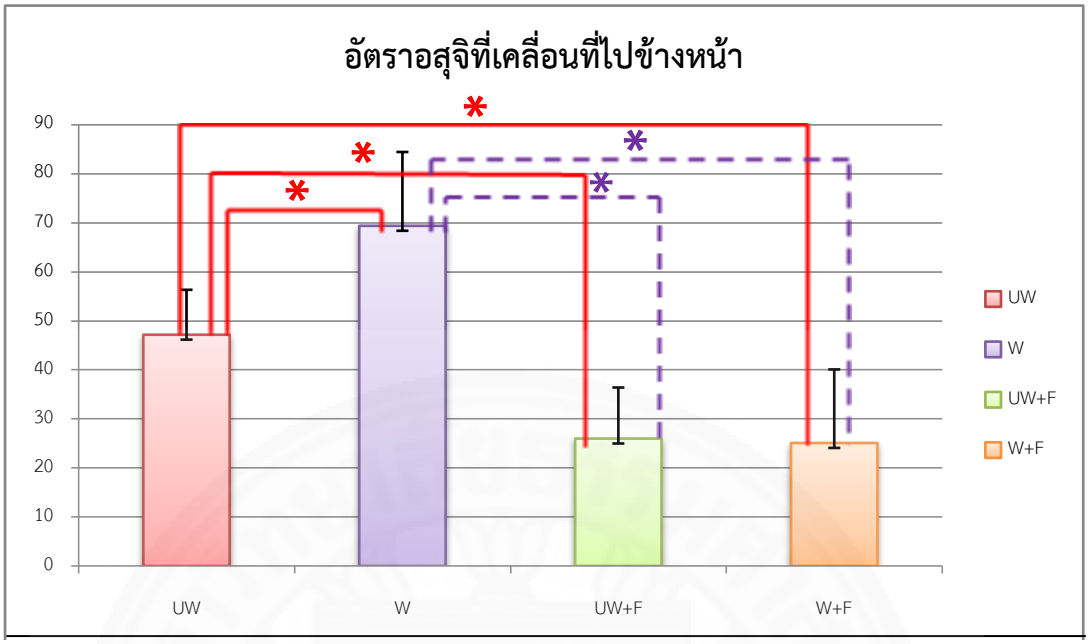
mean difference ± SE

1. อสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ (W) แล้วพบว่าการเตรียมเชื้ออสุจิทำให้มีอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับอสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ (UW)

2. ในกลุ่มอสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิก่อน นำไปแช่แข็งและละลาย (UW+F) การแช่แข็งและละลายทำให้อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ (UW)

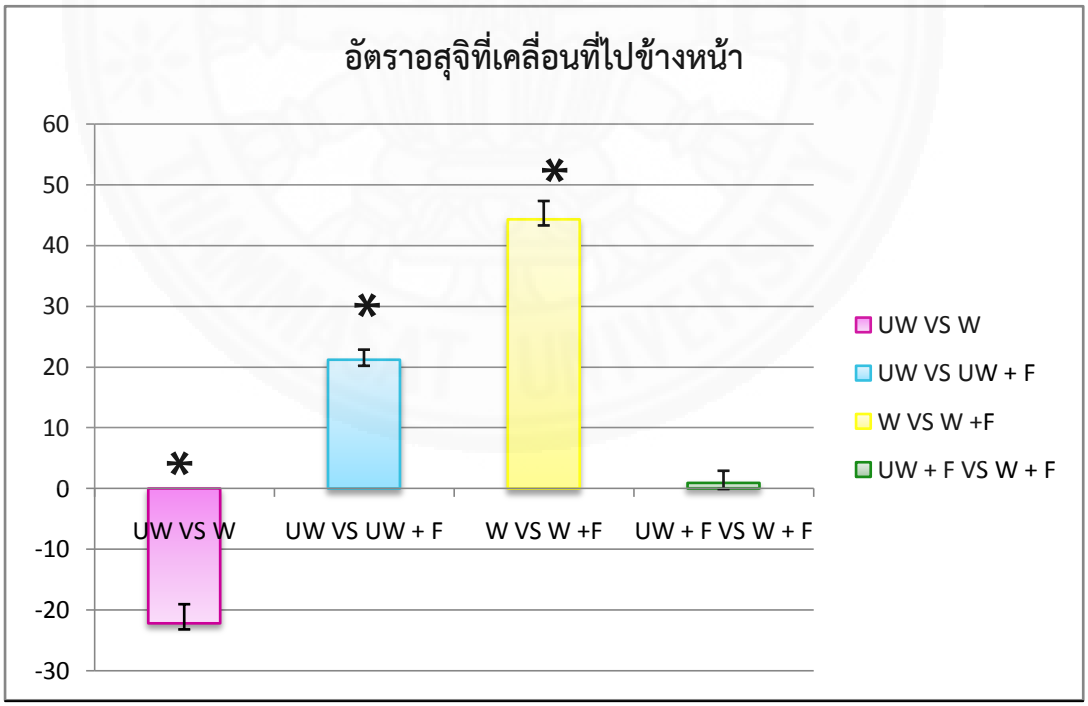
3. ในกลุ่มอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิแล้วนำไปทำการแช่แข็งและละลาย (W+F) การแช่แข็งและละลายส่งผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ (W)

4. ในกลุ่มอสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิก่อนนำไปแช่แข็งและละลาย (UW+F) จะมีอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าไม่แตกต่างจากกลุ่มอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิแล้วนำไปทำการแช่แข็งและละลาย (W+F) ภาพที่ 4.6 และตารางที่ 4.3



ภาพที่ 4.5 แสดงอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิของกลุ่มการทดลอง 4 กลุ่ม (mean ± SD)

* ข้อมูลที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 4.6 แสดงค่าความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ(mean difference ± SE)

* ข้อมูลที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4.5 อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลอง 4 กลุ่ม โดยดูค่าจาก

mean ± SD

ในกลุ่มของอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้อ (W) จะมีอัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มของอสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้อ (UW) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งและละลาย จะพบว่าในกลุ่มของอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้อและนำไปแช่แข็งและละลาย (W+F) จะมีอัตราของอสุจิที่มีรูปร่างปกติมากกว่าในกลุ่มของอสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้อและนำไปแช่แข็งและละลาย (UW+F) ภาพที่ 4.7 และตารางที่ 4.2

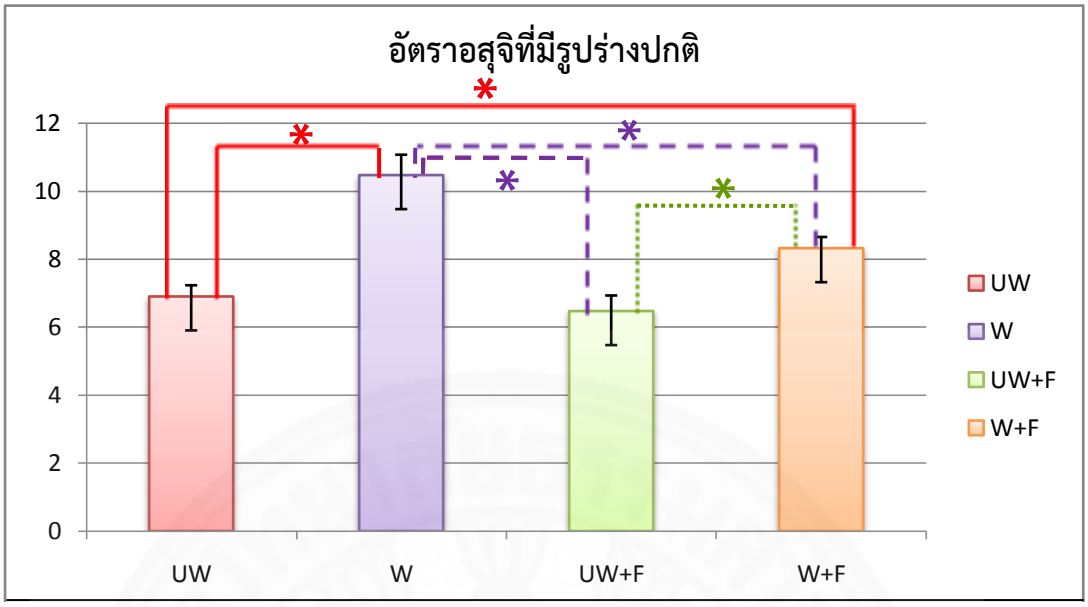
mean difference ± SE

1. อสุจิที่ผ่าน การเตรียม เชื้ออสุจิ (W) แล้วพบว่ามีอัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ (UW)

2. ในกลุ่มอสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิก่อน นำไปแช่แข็งและละลาย (UW+F) การแช่แข็งและละลายทำให้อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติลดลงแต่ไม่มีความสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับอสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ (UW)

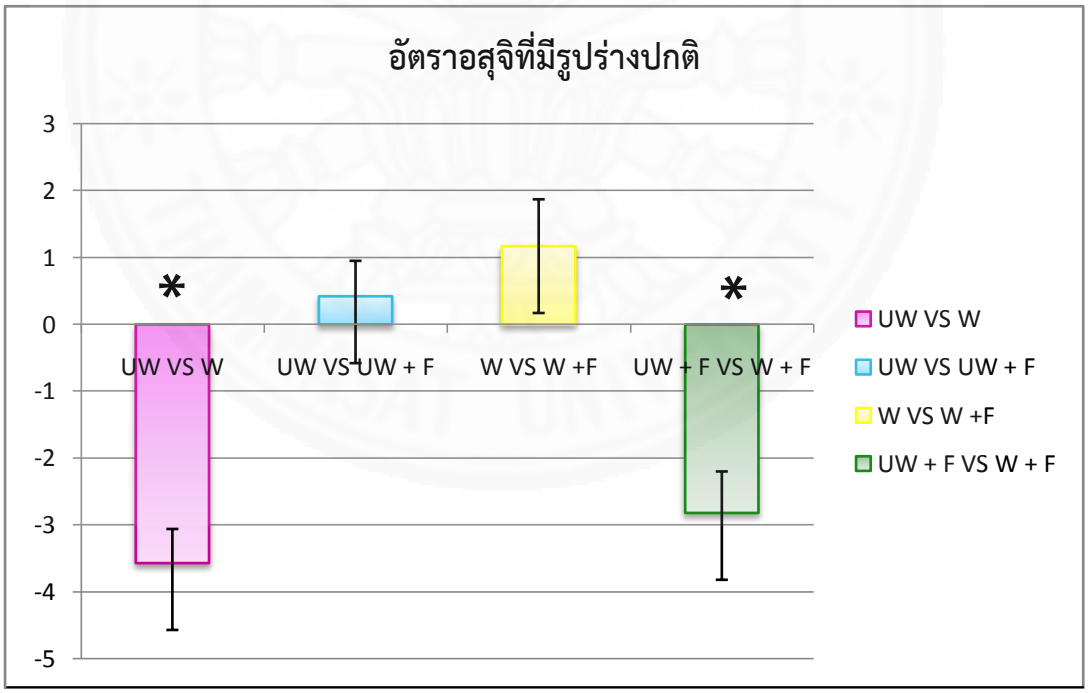
3. ในกลุ่มอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ (W) แล้วนำไปทำการแช่แข็งและละลาย (W+F) การแช่แข็งและละลายมีผลทำให้อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติลดลงแต่ไม่มีความสำคัญทางสถิติ

4. ในกลุ่มอสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิก่อนการแช่แข็งและละลาย (UW+F) จะมีอสุจิที่มีรูปร่างปกติน้อยกว่ากลุ่มอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิแล้วนำไปทำการแช่แข็งและละลาย (W+F) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ภาพที่ 4.8 และตารางที่ 4.3



ภาพที่ 4.7 แสดงอัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติของอสุจิของกลุ่มการทดลอง 4 กลุ่ม (mean ± SD)

* ข้อมูลที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 4.8 แสดงค่าความแตกต่างของอัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติ (mean difference ± SE)

* ข้อมูลที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4.6 อัตราอสุจิที่มีชีวิตเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลอง 4 กลุ่ม โดยดูค่าจาก

mean ± SD

อัตราอสุจิที่มีชีวิต พบว่าเมื่อสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้อ (W) จะมีอัตราอสุจิที่มีชีวิตมากกว่ากลุ่มของอสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้อ (UW) แต่หลังจากที่นำไปผ่านการแช่แข็งและละลายกลับพบว่ากลุ่มของอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้อแล้วนำไปผ่านการแช่แข็งและละลาย (W+F) กลับมีอัตราอสุจิที่มีชีวิตน้อยกว่ากลุ่มของอสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้อแล้วนำไปผ่านการแช่แข็งและละลาย (UW+F) ภาพที่ 4.9 และตารางที่ 4.2

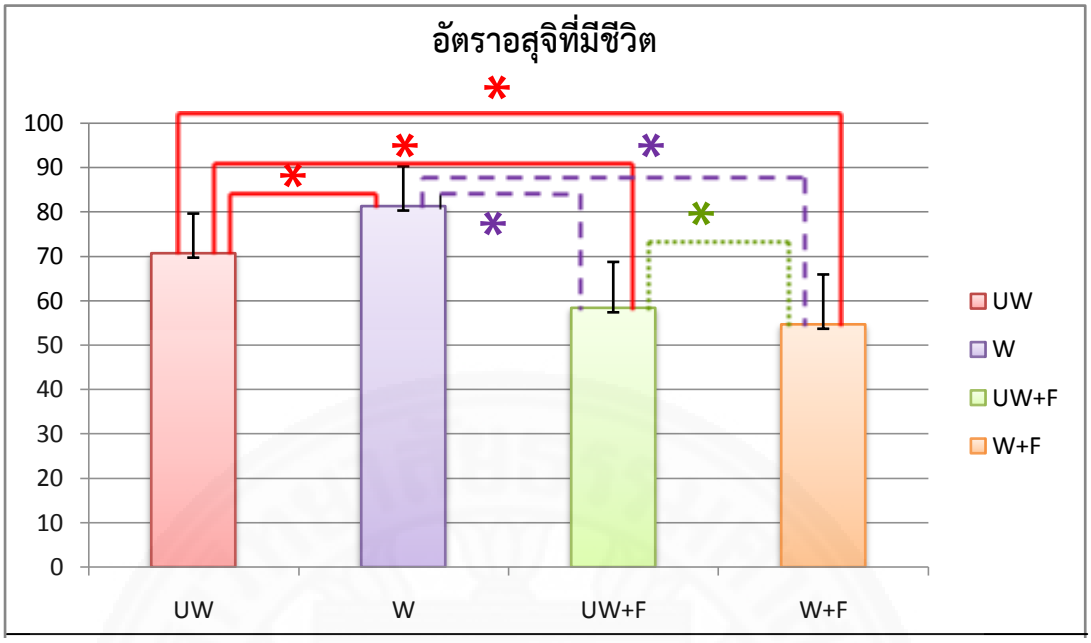
mean difference ± SE

1. อสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ (W) มีอัตราอสุจิที่มีชีวิตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ (UW)

2. ในกลุ่มอสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิก่อนการแช่แข็งและละลาย (UW+F) การแช่แข็งและละลายทำให้อัตราอสุจิที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ (UW)

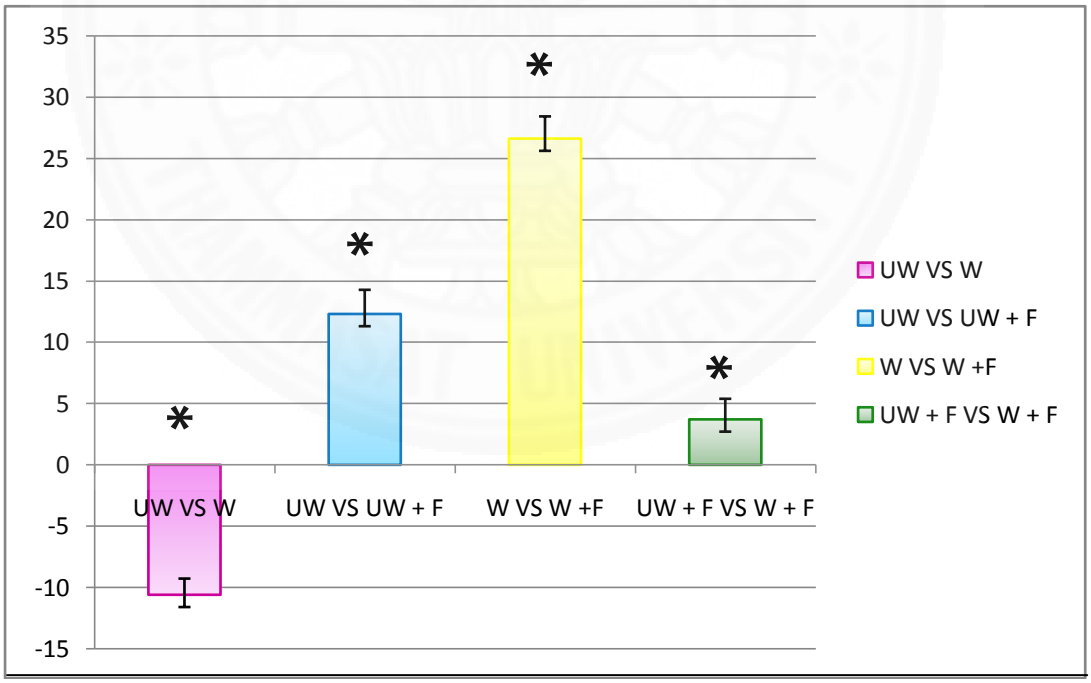
3. ในกลุ่มอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิแล้วนำไปทำการแช่แข็งและละลาย (W+F) การแช่แข็งและละลายส่งผลทำให้อัตราอสุจิที่มีชีวิตลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ผ่านการเตรียมเชื้อ (W)

4. ในกลุ่มอสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิก่อนการแช่แข็งและละลาย (UW+F) จะมีอัตราอสุจิที่มีชีวิตมากกว่ากลุ่ม อสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิแล้ว นำไปแช่แข็งและละลาย (W+F) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ภาพที่ 4.10 และตารางที่ 4.3



ภาพที่ 4.9 แสดงอัตราอสุจิที่มีชีวิตของอสุจิของกลุ่มการทดลอง 4 กลุ่ม (mean ± SD)

* ข้อมูลที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 4.10 แสดงค่าความแตกต่างของอัตราอสุจิที่มีชีวิต (mean difference ± SE)

* ข้อมูลที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4.7 อัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลอง 4 กลุ่มโดยดูค่าจาก mean ± SD

พบว่าในกลุ่มของอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ (W) จะมีอัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ (UW) และหลังจากที่ผ่านการแช่แข็งและละลายแล้วในกลุ่มที่ผ่านการเตรียมเชื้อแล้วนำไปแช่แข็ง (W+F) มีอัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิมากกว่ากลุ่มที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิแล้วนำไปผ่านการแช่แข็งและละลายแต่ไม่มีความสำคัญทางสถิติ (UW+F) ภาพที่ 4.11 และตารางที่ 4.2

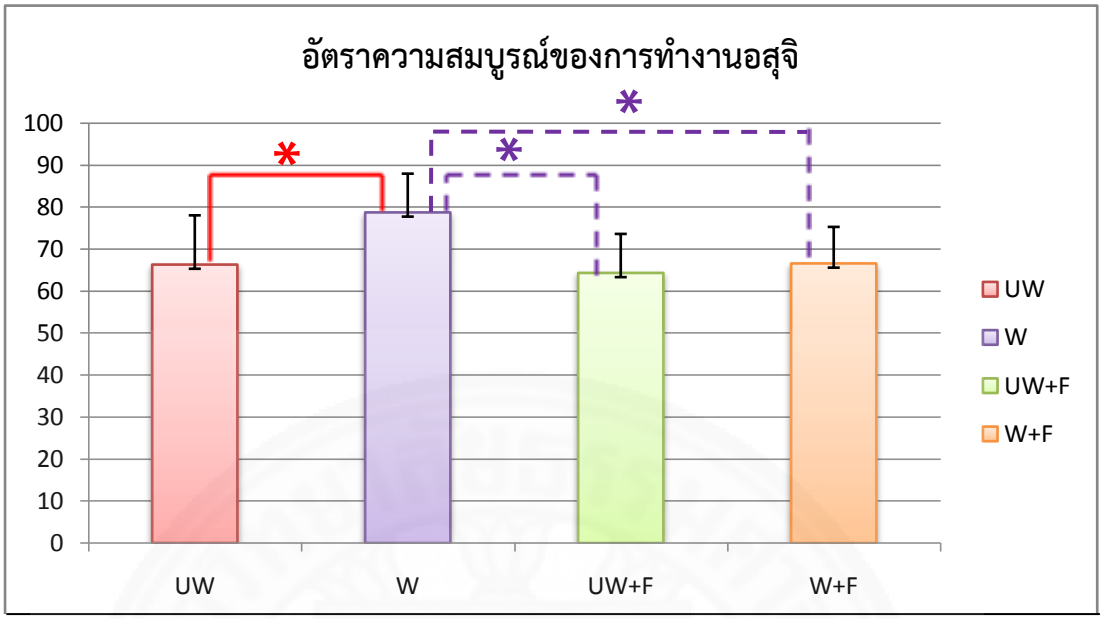
mean difference ± SE

1. อสุจิที่ผ่าน การเตรียม เชื้ออสุจิ (W) การเตรียมเชื้ออสุจิทำให้มีอัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับอสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ (UW)

2. ในกลุ่มอสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ (UW) เปรียบเทียบกับอสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิแล้วนำไป แช่แข็งและละลาย (UW+F) การแช่แข็งและละลายทำให้อัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิลดลงแต่ไม่มีความสำคัญทางสถิติ

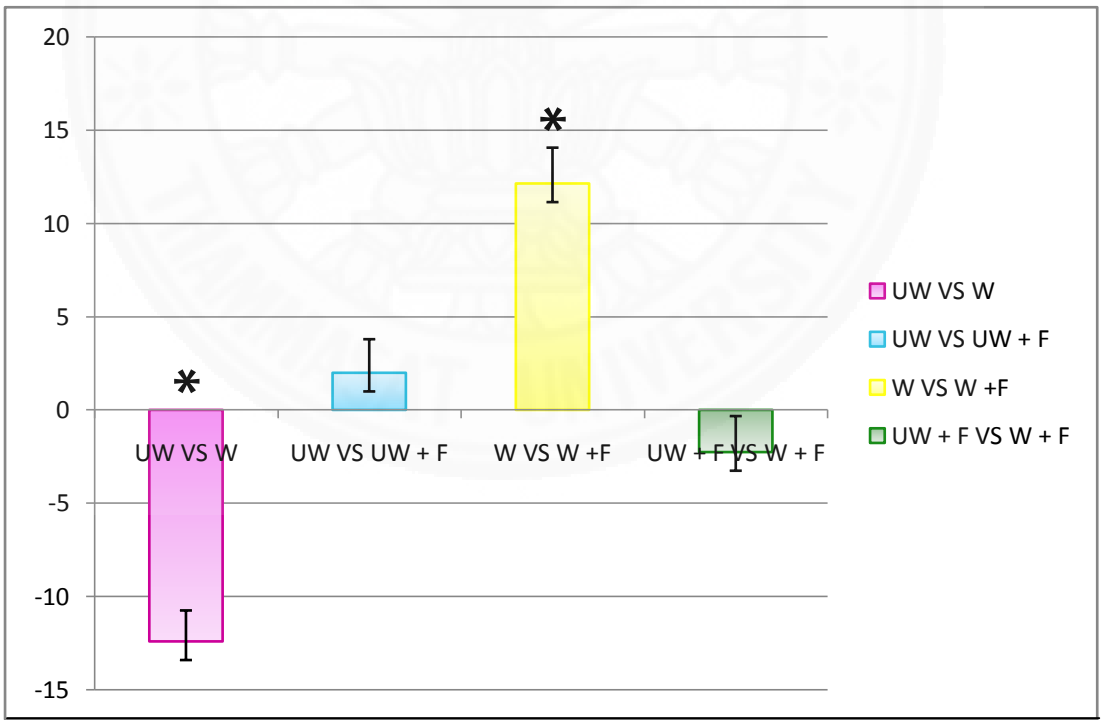
3. ในกลุ่ม อสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิแล้ว (W) เมื่อนำไปทำการแช่แข็งและละลาย (W+F) การแช่แข็งและละลายส่งผลทำให้อัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4. ในกลุ่มอสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิก่อน นำไปแช่แข็งและละลาย (UW+F) จะมีอัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากกลุ่ม อสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิแล้วนำไปทำการแช่แข็งและละลาย (W+F) ภาพที่ 4.12 และตารางที่ 4.3



ภาพที่ 4.11 แสดงอัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิของกลุ่มการทดลอง 4 กลุ่ม (mean ± SD)

* ข้อมูลที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 4.12 แสดงค่าความแตกต่างของอัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิ

(mean difference ± SE)

* ข้อมูลที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4.8 ความเสียหายของดีเอ็นเอเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลอง 4 กลุ่ม โดยดูค่าจาก mean ± SD

กลุ่มของอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ (W) จะมีค่าความเสียหายของดีเอ็นเอลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มของอสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ (UW) และเมื่อนำไปผ่านการแช่แข็งและละลาย กลุ่มของอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิแล้วนำไปผ่านการแช่แข็งและละลาย (W+F) มีค่าความเสียหายของดีเอ็นเอน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มของอสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิก่อนนำไปผ่านการแช่แข็งและละลาย (UW+F) ภาพที่ 4.13 และตารางที่ 4.2

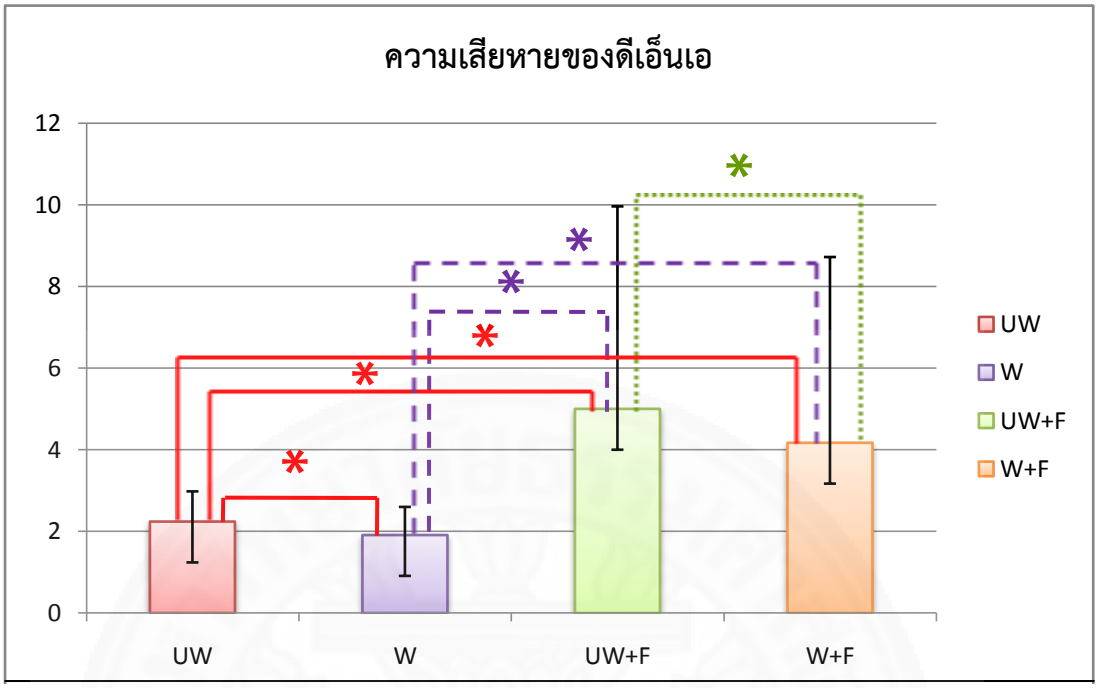
mean difference ± SE

1. อสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ (W) ทำให้มีความเสียหายของดีเอ็นเอลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับอสุจิที่ไม่ได้ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ (UW)

2. ในกลุ่มอสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิก่อน นำไปแช่แข็งและละลาย (UW+F) การแช่แข็งและละลายทำให้ความเสียหายของดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ (UW)

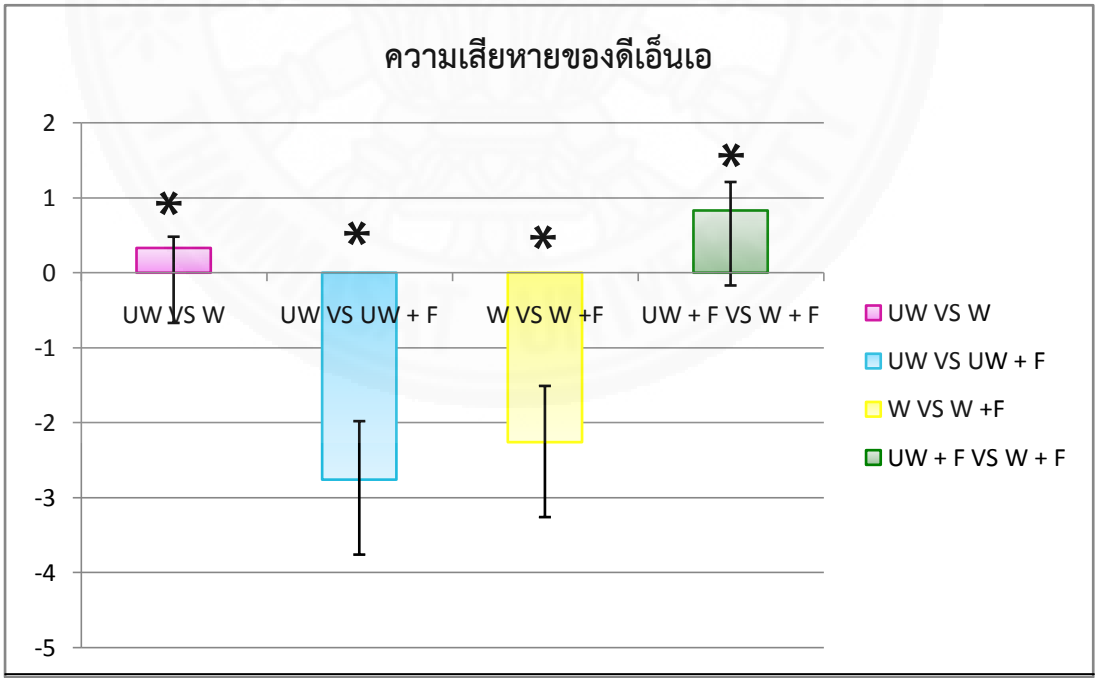
3. ในกลุ่มอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิแล้วนำไปทำการแช่แข็งและละลาย (W+F) การแช่แข็งและละลายทำให้มีความเสียหายของดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีการเตรียมเชื้ออสุจิ (W)

4. ในกลุ่มอสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิก่อนการแช่แข็งและละลาย (UW+F) จะมีความเสียหายของดีเอ็นเอมากกว่ากลุ่มอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิแล้วนำไปทำการแช่แข็งและละลาย (W+F) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ภาพที่ 4.14 และตารางที่ 4.3



ภาพที่ 4.13 แสดงความเสียหายของดีเอ็นเอของกลุ่มการทดลอง 4 กลุ่ม (mean ± SD)

* ข้อมูลที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 4.14 แสดงค่าความแตกต่างของความเสียหายของดีเอ็นเอ (mean difference ± SE)

* ข้อมูลที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4.9 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ผลเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มการทดลองทั้ง 4 กลุ่มด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS version 17.0 โดยกำหนดให้ข้อมูลมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อค่า $p < 0.05$

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การเตรียมเชื้ออสุจิ (Sperm preparation) นั้นเป็นกระบวนการที่ใช้ในการคัดเลือกคุณภาพของอสุจิให้ดียิ่งขึ้นได้แก่ การเคลื่อนที่ รูปร่างของอสุจิที่ปกติ และยังช่วยคัดเลือกตัวอสุจิที่มีความเสียหายของดีเอ็นเอน้อยที่สุดและมีความสมบูรณ์มากที่สุด [60] ในงานวิจัยครั้งนี้พบว่าความเข้มข้นของอสุจิจะลดน้อยลงหลังจากที่ผ่านกระบวนการเตรียมเชื้ออสุจิแล้วซึ่งตรงกันกับงานวิจัยของ เกศนิษาและคณะในปี 2014 [15] และเมื่อนำไปผ่านการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วและละลายก็ยังพบว่ามีความเข้มข้นลดลงทั้งในกลุ่มที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิและกลุ่มที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิก่อนที่จะนำไปผ่านการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วและละลาย แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้น การเตรียมเชื้ออสุจิอาจจะมีผลปกป้องอสุจิต่อการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วและละลายโดยเฉพาะในเรื่องความเข้มข้นของอสุจิ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการที่อสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิหรือไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิก่อนที่จะนำไปทำการแช่แข็งและละลายแบบเนื้อแก้วนั้นมีผลต่อความเข้มข้นของอสุจิไม่แตกต่างกัน

อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ แต่เมื่อนำไปผ่านการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วและละลายแล้ว พบว่ามีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลงทั้งในกลุ่มที่ผ่านและไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิก่อนที่จะนำไปผ่านการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วและละลายไม่แตกต่างกัน ซึ่งตรงกันกับงานวิจัยของเกศนิษาและคณะในปี 2014 [15] ที่พบว่าอสุจิหลังจากผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิจะมีอัตราการเคลื่อนที่เพิ่มมากขึ้น เช่นเดียวกับ Helena M.และคณะ ในปี 2014ก็แสดงให้เห็นว่าอสุจิที่ผ่านกระบวนการเตรียมเชื้ออสุจิจะมีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิมากกว่าอสุจิที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการเตรียมเชื้ออสุจิ[60] และตรงกับ งานวิจัยของ Vutyavanich และคณะในปีค.ศ. 2010 พบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลงหลังจากที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งแล้ว[31] งานวิจัยครั้งนี้สรุปได้ว่าการเตรียมเชื้ออสุจิก่อนการแช่แข็งและละลายไม่มีผลในการปกป้องอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ ที่ลดลงหลังผ่านกระบวนการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วและละลาย และยังพบว่าการเตรียมเชื้ออสุจิได้รับผลกระทบจากการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วและละลายมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้เตรียมเชื้ออสุจิโดยดูจากอัตราการลดลงของการเคลื่อนที่ของกลุ่มที่ผ่านการเตรียมอสุจิจะสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ผ่านการเตรียม อย่างไรก็ตามอาจสรุปได้ว่า ผลกระทบต่อการเตรียมเชื้ออสุจิหรือไม่ทำการเตรียมเชื้ออสุจิก่อนที่จะทำการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วและละลายในเรื่องของอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิไม่มีความแตกต่างกัน

อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ แต่เมื่อนำไปผ่านการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วและละลาย พบว่ามีอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิลดลงทั้งในกลุ่มที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิและกลุ่มที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิก่อนที่จะนำไปผ่านการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วและละลายซึ่งตรงกันกับงานวิจัยของ เกศนิษาและคณะในปี 2014 [15] ที่พบว่าอสุจิหลังจากผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิจะมีอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้งานวิจัยครั้งนี้ยังพบว่าการเตรียมเชื้ออสุจิไม่มีผลต่อการปกป้องผลกระทบต่อการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วและละลายของอสุจิในเรื่องของอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ และยังพบว่าการเตรียมเชื้ออสุจิมีผลกระทบต่อจำนวนอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้ามากกว่ากลุ่มอสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิโดยดูจากอัตราการลดลงของการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าที่มากกว่า อย่างไรก็ตามจากการทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่า การเตรียมเชื้ออสุจิหรือไม่ทำการเตรียมเชื้ออสุจิก่อนที่จะทำการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วและละลายในเรื่องของอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิไม่มีความแตกต่างกัน

อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติของอสุจิจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ แต่เมื่อนำไปผ่านการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วและละลาย พบว่ามีอัตราของอสุจิที่มีรูปร่างปกติลดลงทั้งในกลุ่มที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิและกลุ่มที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิก่อนที่จะนำไปผ่านการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วและละลายซึ่งตรงกันกับงานวิจัยของเกศนิษาและคณะในปี 2014 [15] ที่พบว่าอสุจิหลังจากผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิจะมีอัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติของอสุจิเพิ่มมากขึ้น และ งานวิจัยของ Khalili M.และคณะในปี 2014 ได้แสดงให้เห็นว่าการนำเชื้ออสุจิไปเข้ากระบวนการแช่แข็งนั้นไม่ว่าจะผ่านหรือไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิมาก่อนจะส่งผลกระทบ ทำให้อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติต่ำลง ซึ่งพบได้ทั้งในน้ำเชื้ออสุจิที่ปกติและผิดปกติ [58] นอกจากนี้งานวิจัยครั้งนี้ยังพบว่าการเตรียมเชื้ออสุจิมีผลต่อการปกป้องต่อการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วและละลายของอสุจิในเรื่องของอัตราของอสุจิที่มีรูปร่างปกติ และการที่เตรียมเชื้ออสุจิก่อนนำไปแช่แข็งและละลายมีผลทำให้มีอัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติมากกว่าการที่ไม่เตรียมเชื้ออสุจิแล้วนำไปแช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

อัตราอสุจิที่มีชีวิตจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ แต่เมื่อนำไปผ่านการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วและละลาย พบว่ามีอัตราอสุจิที่มีชีวิตลดลงทั้งในกลุ่มที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิและกลุ่มที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิก่อนที่จะนำไปผ่านการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วและละลายซึ่งตรงกันกับงานวิจัยของ Vutyavanich และคณะในปีค.ศ. 2010 ที่พบว่าอัตราการมีชีวิต ของกลุ่มที่มีการเตรียมเชื้ออสุจิ ลดลง

หลังจากที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งแล้ว[31] และเกศนิษาและคณะในปี 2014 [15] ที่พบว่าอสุจิหลังจากผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิจะมีอัตราอสุจิที่มีชีวิตเพิ่มมากขึ้น และจะมีอัตราอสุจิที่มีชีวิตลดลงหลังจากที่ผ่านการแช่แข็งและละลายแล้ว และงานวิจัยของ Khalili M.และคณะในปี 2014 ได้แสดงให้เห็นว่าการนำเชื้ออสุจิไปเข้ากระบวนการแช่แข็งนั้นไม่ว่าจะผ่านหรือไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิมาก่อนจะ ทำให้อัตราอสุจิที่รอดชีวิตต่ำลงซึ่งพบได้ทั้งในน้ำเชื้ออสุจิที่ปกติและผิดปกติ[58] งานวิจัยครั้งนี้สรุปได้ว่าการเตรียมเชื้ออสุจิหรือไม่เตรียมเชื้ออสุจิไม่มีผลปกป้องต่อการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วและละลายของอสุจิในเรื่องของอัตราอสุจิที่มีชีวิต และพบว่าการที่ไม่เตรียมอสุจิก่อนการแช่แข็งและละลายจะทำให้มีอัตราอสุจิที่มีชีวิตมากกว่าการเตรียมเชื้ออสุจิก่อนการแช่แข็งและละลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

อัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ แต่เมื่อนำไปผ่านการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วและละลาย พบว่ามีอัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิลดลงทั้งในกลุ่มที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิและกลุ่มที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิก่อนที่จะนำไปผ่านการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วและละลายซึ่งตรงกันกับงานวิจัยของ เกศนิษาและคณะในปี 2014 [15] ที่พบว่าอสุจิหลังจากผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิจะมีอัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิเพิ่มมากขึ้น แต่จะมีอัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิลดลงหลังจากที่ผ่านการแช่แข็งและละลายแล้ว นอกจากนี้งานวิจัยครั้งนี้ยังพบว่าการเตรียมเชื้ออสุจิไม่มีผลต่อการปกป้องต่ออัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิจากกระบวนการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วและละลาย ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าการเตรียมเชื้ออสุจิหรือไม่เตรียมเชื้ออสุจิก่อนการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วและละลายในเรื่องของอัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ความเสียหายของดีเอ็นเอจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ แต่เมื่อนำไปผ่านการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วและละลาย พบว่ามีความเสียหายของดีเอ็นเอเพิ่มมากขึ้นทั้งในกลุ่มที่ไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิและกลุ่มที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิก่อนที่จะนำไปผ่านการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วและละลาย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Eilish T.Donnelly.และคณะในปี 2000 ที่พบว่าอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้อมาแล้วนั้นจะมีอัตราการแตกหักของสายดีเอ็นเอลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้มีการผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ [53] และยังตรงกันกับงานวิจัยของ เกศนิษาและคณะในปี 2014 [15] ที่พบว่าอสุจิหลังจากผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิจะมีความเสียหายของดีเอ็นเอลดน้อยลง แต่จะมีความเสียหายของดีเอ็นเอเพิ่มมากขึ้นหลังจากที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งและละลายแล้ว

และ ตรงกับงานวิจัยของ Khalili M.และคณะ ในปี 2014 ที่ได้แสดงให้เห็นว่าการนำเชื้ออสุจิไปเข้ากระบวนการแช่แข็งนั้นไม่ว่าจะผ่านหรือไม่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิมาก่อนจะส่งผลกระทบต่อ ความเสียหายของดีเอ็นเอทำให้เพิ่มมากขึ้นซึ่งพบได้ทั้งในน้ำเชื้ออสุจิที่ปกติและผิดปกติ[58] นอกจากนี้งานวิจัยครั้งนี้ยังพบว่าการเตรียมเชื้ออสุจิไม่มีผลต่อการปกป้องผลกระทบการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วและละลายของอสุจิในเรื่องของความเสียหายของดีเอ็นเอ แต่อย่างไรก็ตามการเตรียมเชื้ออสุจิก่อนนำไปแช่แข็งและละลายจะมีผลทำให้มีค่าความเสียหายของดีเอ็นเอน้อยกว่าการที่ไม่เตรียมเชื้ออสุจิแล้วนำไปแช่แข็งและละลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

นอกจากนี้ในเรื่อง คุณภาพของอสุจิที่เกี่ยวข้องกับ ROS ซึ่ง De Lamirande E และคณะในปี 1993[68], Aitken RJ ในปี 1997[69], De Lamirande E และคณะในปี 1995[70] พบว่าถ้ามีการผลิต ROS เพิ่มมากขึ้นจะเป็นสาเหตุทำให้เกิด oxidative stress และเป็นผลทำให้มีการเคลื่อนไหวของอสุจิและการมีชีวิตของอสุจิลดลง และยังส่งผลให้มีความผิดปกติของส่วน midpiece เพิ่มมากขึ้น รวมทั้งทำให้มีความผิดปกติของกระบวนการ capacitation และ acrosome reaction ต่อมาในปี 1998 Wolff H และคณะ [71] ได้พบว่าการที่มีเม็ดเลือดขาวโดยเฉพาะ granulocytes ในน้ำอสุจิมักจะพบร่วมกับการเกิดภาวะมีบุตรยากที่มีสาเหตุมาจากฝ่ายชาย และจากงานวิจัยของเกศนิษา และคณะในปี 2014 ทำการศึกษาอสุจิภายหลังการเตรียมอสุจิเพียงอย่างเดียวเปรียบเทียบกับอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิแล้วผ่านการแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว พบว่ามีค่าของความเสียหายของดีเอ็นเอเพิ่มมากขึ้น รวมทั้งการเกิด ROS มีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ[15]

โดยปกติแล้วค่าต่างๆของการทำ semen analysis จะมีความแตกต่างกันค่อนข้างสูง (variation) ในแต่ละช่วงเวลา จึงทำให้การตอบสนองต่อการเตรียมเชื้ออสุจิหรือการแช่แข็งและละลายของอสุจิในแต่ละรายอาจได้ผลที่ค่อนข้างแตกต่างกันมาก ทำให้การวิเคราะห์ผลไม่สามารถใช้ค่า mean ± SD ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของแต่ละกลุ่มมาเปรียบเทียบได้ จึงใช้ค่า mean difference ± SE เพื่อตัดสินความแตกต่างของ parameter ต่างๆของแต่ละอาสาสมัครในการเปรียบเทียบผลการศึกษา ซึ่งจะทำให้เกิดความเชื่อมั่นได้มากกว่า

จากการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่า การเตรียมเชื้ออสุจิมีผลทำให้คุณภาพของอสุจิดีขึ้นทุก parameter ยกเว้นความเข้มข้นของอสุจิที่ลดลง รวมทั้งมีการลดลงของความเสียหายของดีเอ็นเอ ส่วนผลการเตรียมเชื้ออสุจิก่อนที่จะนำไปเข้าสู่กระบวนการแช่แข็งและละลายนั้น จะมีอัตราอสุจิที่มีรูปร่าง

ปกติมากกว่าและทำให้มีความเสียหายแตกหักของดีเอ็นเอของอสุจิน้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ผ่านการเตรียมอสุจิ แต่มีอัตราอสุจิที่มีชีวิตน้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิก่อนนำไปแช่แข็งและละลาย ซึ่งผลของการทดลองครั้งนี้อาจจะเป็นประโยชน์ในการที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่มีบุตรยากที่มีสาเหตุมาจากฝ่ายชาย ตาม วัตถุประสงค์ รูปแบบและวิธีการใช้เทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ต่อไป ซึ่งอาจมีผลในการช่วยเพิ่มอัตราการตั้งครรภ์ในฝ่ายหญิงด้วย เป็นต้นว่า ในกรณีที่ต้องการคัดเลือกอสุจิที่มีรูปร่างปกติเพื่อใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่มีบุตรยาก จากผลการศึกษาครั้งนี้ควรทำการเตรียมเชื้ออสุจิก่อนการแช่แข็งและละลาย ส่วนในกรณีที่ต้องการอสุจิที่มีชีวิตจำนวนมากเพื่อใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่มีบุตรยาก ไม่ควรเตรียมเชื้ออสุจิก่อนการแช่แข็งและละลาย หรือสำหรับในกรณีที่ต้องการอสุจิที่มีความเสียหายของดีเอ็นเอน้อยเพื่อใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่มีบุตรยาก ควรทำการเตรียมเชื้ออสุจิก่อนการแช่แข็งและละลาย

รายการอ้างอิง

1. คุณาธิคม , ส., ภาวะมีบุตรยากและเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์. 2545, กรุงเทพฯ.

2. เจียมจรรยา , เ., ภาวะมีบุตรยากและการช่วยการเจริญพันธุ์. 2553.

3. วุฒยวนิช , ธ., การแช่แข็งแบบเนื้อแก้วในเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์, ed. 1. 2552.

4. Kalthur, G., et al., *Vitamin E supplementation in semen-freezing medium improves the motility and protects sperm from freeze-thaw-induced DNA damage.* Fertil Steril, 2011. 95(3): p. 1149-51.

5. Agha-Rahimi, A., et al., *Vitrification is not superior to rapid freezing of normozoospermic spermatozoa: effects on sperm parameters, DNA fragmentation and hyaluronan binding.* Reprod Biomed Online, 2014. 28(3): p. 352-8.

6. C, M.L.J.C., in *The FIGO Manual of Human Reproduction*. 1990, The Parthenon Publishing Group. p. 54-69.

7. Speroff L, G.R.K.N., *clinical gynecologic endocrinology and infertility.* 1999. 6.

8. รัตนโอฬาร , ก., การมีบุตรยากในผู้ชาย. 2533, กรุงเทพมหานคร: ข้าวฟ่าง.

9. อร่าม โรจนสกุล , ส.ช., การปฏิสนธินอกร่างกายทางคลินิค , ed. 1. 2539, กรุงเทพมหานคร: ข้าวฟ่าง.

10. Acosta, A.A., *Process of fertilization in the human and its abnormalities: diagnostic and therapeutic possibilities.* Obstet Gynecol Surv, 1994. 49(8): p. 567-76.

11. วุฒยวนิช , ธ., เทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ (*Assisted Reproductive Technology).* 2546, เชียงใหม่: นพบุรีการพิมพ์.

12. สุขเจริญ , น., การตรวจน้ำอสุจิและการทำงานของอสุจิ , ed. 1. 2543, กรุงเทพมหานคร: เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด.

13. Mortimer, D., *Current and future concepts and practices in human sperm cryobanking.* Reprod Biomed Online, 2004. 9(2): p. 134-51.

14. Satirapod, C., et al., *Comparison of cryopreserved human sperm from solid surface vitrification and standard vapor freezing method: on motility, morphology, vitality and DNA integrity.* Andrologia, 2012. 44 **Suppl** 1: p. 786-90.

15. นรสิงห์ , เ., ผลของการเติมโคเอนไซม์คิวเทนในน้ำยาแช่แข็งต่อคุณภาพและการแตกหักของสายดีเอ็นเอในอสุจิที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วในชายที่มีอสุจิปกติ. 2557 , มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์: ปทุมธานี.

16. Said, T.M., A. Gaglani, and A. Agarwal, *Implication of apoptosis in sperm cryoinjury.* Reprod Biomed Online, 2010. 21(4): p. 456-62.

17. Di Santo, M., et al., *Human Sperm Cryopreservation: Update on Techniques, Effect on DNA Integrity, and Implications for ART.* Adv Urol, 2012. 2012: p. 854837.

18. Saki G, R.F., Zergani MJ. , *Vitrification of small volume of normal human sperms: Use of open pulled straw carrier.* Journal Med Sci 2009: p. 30-5.

19. Zribi, N., et al., *Effect of freezing-thawing process and quercetin on human sperm survival and DNA integrity.* Cryobiology, 2012. 65(3): p. 326-31.

20. Vutyavanich, T., et al., *Repeated vitrification/warming of human sperm gives better results than repeated slow programmable freezing.* Asian J Androl, 2012. 14(6): p. 850-4.

21. Isachenko, V., et al., *Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability.* Biol Reprod, 2004. 71(4): p. 1167-73.

22. Carson, S.A., et al., *Feasibility of semen collection and cryopreservation during chemotherapy.* Hum Reprod, 1991. 6(7): p. 992-4.

23. Anger, J.T., B.R. Gilbert, and M. Goldstein, *Cryopreservation of sperm: indications, methods and results.* J Urol, 2003. 170(4 Pt 1): p. 1079-84.

24. Ranganathan, P., et al., *Sperm cryopreservation for men with nonmalignant, systemic diseases: a descriptive study.* J Androl, 2002. 23(1): p. 71-5.

25. เศรษฐบุตร , โ., การแช่แข็งตัวอสุจิ , in เทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ , ธ. วุฒยวนิช , Editor. 2546, นพบุรีการพิมพ์: เชียงใหม่. p. 157-65.

26. Baumann KH, W.A., Kalff-Suske M, Bock K, *Assisted Reproduction using cryopreserved sperm* Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology, 2007. 4: p. 97-100.

27. P, M., *Principles of cryobiology*. Life in the frozen state, ed. L.N. Fuller BJ, Benson EE. 2004, Boca Raton: CRC.

28. Shaw, J.M. and G.M. Jones, *Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos.* Hum Reprod Update, 2003. 9(6): p. 583-605.

29. Gilmore, J.A., et al., *Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa.* Hum Reprod, 1997. 12(1): p. 112-8.

30. Tao, T., W. Zhang, and A. Del Valle, *Human oocyte cryopreservation.* Curr Opin Obstet Gynecol, 2009. 21(3): p. 247-52.

31. Vutyavanich, T., W. Piromlertamorn, and S. Nunta, *Rapid freezing versus slow programmable freezing of human spermatozoa.* Fertil Steril, 2010. 93(6): p. 1921-8.

32. McLaughlin, E.A., W.C. Ford, and M.G. Hull, *The contribution of the toxicity of a glycerol-egg yolk-citrate cryopreservative to the decline in human sperm motility during cryopreservation.* J Reprod Fertil, 1992. 95(3): p. 749-54.

33. Gao, D.Y., et al., *Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis.* Biol Reprod, 1993. 49(1): p. 112-23.

34. Behrman, S.J. and D.R. Ackerman, *Freeze preservation of human sperm.* Am J Obstet Gynecol, 1969. 103(5): p. 654-64.

35. Pilikian, S., J.C. Czyba, and J.F. Guerin, *Effects of various concentrations of glycerol on post-thaw motility and velocity of human spermatozoa.* Cryobiology, 1982. 19(2): p. 147-53.

36. Friberg, J. and C. Gemzell, *Inseminations of human sperm after freezing in liquid nitrogen vapors with glycerol or glycerol--egg-yolk--citrate as protective media.* Am J Obstet Gynecol, 1973. 116(3): p. 330-4.

37. Harrison, R.F. and B.L. Sheppard, *A comparative study in methods of cryoprotection for human semen.* Cryobiology, 1980. 17(1): p. 25-32.

38. Vajta G, K.M., Vanderzwalmen P., *Disadvantages and benefits of vitrification*. 2007, Informa UK Ltd. p. 33-44.

39. Koutlaki, N., et al., *Human oocyte cryopreservation: past, present and future.* Reprod Biomed Online, 2006. 13(3): p. 427-36.

40. Son WY, T.S., *Comparison between slow freezing and vitrification fro human embryos*. 2009.

41. Vajta, G. and Z.P. Nagy, *Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification.* Reprod Biomed Online, 2006. 12(6): p. 779-96.

42. Pegg, D.E., *The role of vitrification techniques of cryopreservation in reproductive medicine.* Hum Fertil (Camb), 2005. 8(4): p. 231-9.

43. Ambrosini, G., et al., *Oocytes cryopreservation: state of art.* Reprod Toxicol, 2006. 22(2): p. 250-62.

44. Shaw JM, J.G., *teminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos.* Hum Reprod, 2003. 9: p. 583-605.

45. Vajta, G. and M. Kuwayama, *Improving cryopreservation systems.* Theriogenology, 2006. 65(1): p. 236-44.

46. Kuwayama, M., *Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method.* Theriogenology, 2007. 67(1): p. 73-80.

47. T, V., *Cryopreservation*. 2006, Bangkok: Bansuan Dokmai.

48. Bielanski, A., et al., *Viral contamination of embryos cryopreserved in liquid nitrogen.* Cryobiology, 2000. 40(2): p. 110-6.

49. Morris, G.J., *The origin, ultrastructure, and microbiology of the sediment accumulating in liquid nitrogen storage vessels.* Cryobiology, 2005. 50(3): p. 231-8.

50. Vutyavanich, T., et al., *Slow programmable and ultra-rapid freezing of human embryos.* J Obstet Gynaecol Res, 2008. 34(4): p. 457-63.

51. Vutyavanich, T., et al., *Closed-system solid surface vitrification versus slow programmable freezing of mouse 2-cell embryos.* J Assist Reprod Genet, 2009. 26(5): p. 285-90.

52. Kuwayama, M., et al., *Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes.* Reprod Biomed Online, 2005. 11(3): p. 300-8.

53. Donnelly, E.T., et al., *Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa.* Hum Reprod, 2000. 15(7): p. 1552-61.

54. Isachenko, E., et al., *DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification.* Hum Reprod, 2004. 19(4): p. 932-9.

55. Ahmad, L., et al., *Sperm preparation: DNA damage by comet assay in normo- and teratozoospermics.* Arch Androl, 2007. 53(6): p. 325-38.

56. Kim, S., C. Agca, and Y. Agca, *Changes in rat spermatozoa function after cooling, cryopreservation and centrifugation processes.* Cryobiology, 2012. 65(3): p. 215-23.

57. Organization, W.H., *WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen*, ed. F. Edition. 2010, Switzerland: World Health Organization

58. Khalili, M.A., et al., *Vitrification of neat semen alters sperm parameters and DNA integrity.* Urol J, 2014. 11(2): p. 1465-70.

59. Petyim, S., et al., *Sperm preparation before freezing improves sperm motility and reduces apoptosis in post-freezing-thawing sperm compared with post-thawing sperm preparation.* J Assist Reprod Genet, 2014. 31(12): p. 1673-80.

60. Malvezzi, H., et al., *Sperm quality after density gradient centrifugation with three commercially available media: a controlled trial.* Reprod Biol Endocrinol, 2014. 12: p. 121.

61. ไชยา , จ., การศึกษาเปรียบเทียบการแช่แข็งอสุจิแบบเนื้อแก้วโดยเทคนิค *Solid Surface Vitrification* และการแช่เหนือไอไนโตรเจน (*Vapor Freezing).* โครงการวิจัยเพื่อพัฒนางานของโรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ, 2013.

62. John Neter, M.K., William Wasserman,Christopher Nachtsheim, John Neter, *Applied Linear Statistical Models Regression, Analysis of Variance, and Experimental Designs (Third Edition).* 1987.

63. ภัทรอาชัย , จ., ชีวสถิติสาหรับงานวิจัยทางการแพทย์. 2544 , ปทุมธานี: มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

64. Biocoat, *Instructions for Use: HBA®Sperm-Hyaluronan Binding Assay European Patent No.* 1056336 *DBP/*69924472.2.

65. *Document reference: FP*09 *I*12 *R*01 *A.*7*, Hypo-osmotic swelling test for human sperm, Update:* 30/09/2014.

66. Jeyendran, R.S., et al., *Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics.* J Reprod Fertil, 1984. 70(1): p. 219-28.

67. Anderson, D., T.W. Yu, and D.B. McGregor, *Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure.* Mutagenesis, 1998. 13(6): p. 539-55.

68. de Lamirande, E. and C. Gagnon, *Human sperm hyperactivation in whole semen and its association with low superoxide scavenging capacity in seminal plasma.* Fertil Steril, 1993. 59(6): p. 1291-5.

69. Aitken, R.J., *Molecular mechanisms regulating human sperm function.* Mol Hum Reprod, 1997. 3(3): p. 169-73.

70. de Lamirande, E. and C. Gagnon, *Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects.* Hum Reprod, 1995. 10 **Suppl** 1: p. 15-21.

71. Wolff, H. and D.J. Anderson, *Immunohistologic characterization and quantitation of leukocyte subpopulations in human semen.* Fertil Steril, 1988. 49(3): p. 497-504.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมเชื้ออสุจิ
(Sperm preparation)

วัสดุและอุปกรณ์

- ตู้ฟอกอากาศบริสุทธิ์ (Laminar air flow)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบ swing-out rotor
- auto-pipette ขนาดต่างๆ
- conical centrifuge tube
- กระดาษวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH paper)
- sterile cup ขนาด 120 มิลลิลิตร
- เครื่อง computer-aided sperm analysis (CASA)

สารเคมี

1. sil-select sperm gradient kit No. SI-100
   - sil-select upper layer
   - sil-select lower layer
2. Ferticult flushing medium No. Flus 100 (Fertipro, Beernem, Belgium)

การเตรียมน้ำยา sil-select sperm gradient kit เพื่อใช้คัดกรองอสุจิ

- ดูดน้ำยา sil-select upper layer มาปริมาณ 1 มิลลิลิตรด้วย autopipette ที่ต่อกับ microtips 1000 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด conical tube
- ดูดน้ำยา sil-select lower layer ปริมาณ 1 มิลลิลิตรด้วย autopipette ที่ต่อกับ microtips 1000 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด conical tube หลอดเดิมโดยหยอดลงไปข้างใต้น้ำยา sil-select upper layer แล้วค่อยๆปล่อยน้ำยาออกมา น้ำยา sil-select lower layer จะค่อยๆดันชั้นน้ำยา sil-select upper layer ขึ้นมาจนเกิดเป็นชั้นน้ำยา 2 ชั้น
- เก็บหลอดน้ำยาที่ได้ไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ที่ CO_2 6% เป็นเวลา 1 คืนหรือไม่น้อยกว่า 4 ชั่วโมง

การเตรียมน้ำยา Ferticult flushing medium สำหรับล้างอสุจิ

- ดูดน้ำยา Ferticult flushing medium ด้วย serological pipette ที่ต่อกับ pipette aid ปริมาณ 3 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอด conical tube จำนวน 2 หลอด
  เก็บหลอดน้ำยาที่ได้ไว้ที่ 37 องศาเซลเซียสที่ CO_2 6% เป็นเวลา 1 คืนหรือไม่น้อยกว่า 4 ชั่วโมง

ภาคผนวก ข
การเตรียมน้ำยาแช่แข็งอสุจิ
(Glycerol-egg yolk-citrate medium)

วัสดุและอุปกรณ์

- เครื่องชั่งสาร 4 ตำแหน่ง
- ช้อนตักสาร
- ที่กรองสาร

สารเคมี

- glycine (Sigma-Aldrich)
- glucose (Sigma-Aldrich)
- sodium citrate (Sigma-Aldrich)
- egg-yolk (Sigma-Aldrich)
- น้ำเกลือ

1. การเตรียม citrate buffer 100 มิลลิลิตร

-	ชั่ง glycine	1.54	กรัม
-	ชั่ง glucose	2	กรัม
-	ชั่ง sodium citrate	1.75	กรัม

- ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปกรองใส่ภาชนะปราศจากเชื้อ

2. การเตรียม egg yolk

-	ชั่ง egg yolk	0.429	กรัม

- ละลาย egg yolk ในน้ำเกลือ 1 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค
การตรวจวิเคราะห์คุณภาพอสุจิ
(Semen analysis)

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้

- เครื่องคอมพิวเตอร์สำหรับการตรวจวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณอสุจิ (Computer Aid Sperm Analysis; CASA)
- ตู้ฟอกอากาศบริสุทธิ์ (Laminar Air Flow)
- กล้องจุลทรรศน์ ชนิด phase contrast
- เครื่องย้อมสไลด์แบบอัตโนมัติพร้อมย้อมสี
- Makler chamber
- Sterile cup ขนาด 120 ml
- Pasture pipette ยาว $5\frac{3}{4}$ นิ้ว
- Syringe ขนาด 1 ml
- pH paper
- กระจกสไลด์สำหรับย้อมอสุจิ
- Sterile plastic pipette ขนาด 1 ml

<u>วิธีทำ</u>

1. ซักประวัติผู้มารับบริการที่จะทำการเก็บน้ำเชื้อแล้วลงบันทึกข้อมูลผู้มารับบริการ จากนั้นให้ผู้รับบริการทำการเก็บน้ำเชื้อที่ห้องเก็บน้ำเชื้อโดยทำตามคำแนะนำในการเก็บเชื้ออสุจิดังนี้

   - ทำการเก็บน้ำเชื้อขณะที่ร่างกายปกติ หากไม่สบายหรือทานยาใดๆควรแจ้งแพทย์หรือเจ้าหน้าที่
   - รักษาความสะอาดของอวัยวะเพศให้ปราศจากการติดเชื้ออย่างสม่ำเสมอ
   - ทำใจให้สบาย อย่าวิตกกังวลหรือเครียด
   - งดเว้นการหลั่งน้ำอสุจิเป็นเวลาอย่างน้อย 3 วัน แต่ไม่เกิน 7 วัน
   - นอนหลับพักผ่อนให้เพียงพออย่างน้อย 2-3 วันก่อนตรวจ
   - ต้องไม่ดื่มสุราและบุหรี่

- ล้างมือให้สะอาด แล้วทำการเก็บอสุจิโดยตนเอง ห้ามใช้วิธีมีเพศสัมพันธุ์หรือใช้ถุงยางอนามัย
- เก็บอสุจิในภาชนะพิเศษไว้ที่อุณหภูมิปกติ ไม่ร้อนหรือเย็นจนเกินไป
- นำน้ำอสุจิส่งตรวจภายใน 1 ชั่วโมงหลังเก็บ

2. นำน้ำเชื้อที่เก็บได้มาเก็บที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30-60 นาที
3. ตรวจลักษณะทางกายภาพของน้ำอสุจิที่เก็บได้โดยสังเกตสีและลักษณะของน้ำเชื้อที่เก็บได้ ซึ่งน้ำอสุจิที่เก็บได้ใหม่ๆ จะมีลักษณะเหนียวข้น สีขาวขุ่น เมื่อทิ้งไว้ประมาน 30 นาทีจะละลายตัว(liquefaction)
4. ตรวจดูความหนืดของน้ำอสุจิโดย นำน้ำเชื้ออสุจิที่ทิ้งไว้ 30 นาทีแล้วมาตรวจสอบการละลายตัวโดยใช้ Sterile pipette ขนาด 1 ml มาดูดน้ำเชื้ออสุจิขึ้นแล้วปล่อยลงที่เดิมที่ความสูงประมาณ 10 cm ถ้าน้ำเชื้ออสุจิเหลวหยดเป็นหยดๆ แสดงว่ามีการละลายตัวดี แต่ถ้าน้ำเชื้ออสุจิมีความหนืดยาวเป็นสายลงมาเกิน 2 cm แสดงการละลายตัวไม่ดี ให้บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ต่ออีก 10 นาที แล้วนำมาทดสอบอีกครั้ง ทำซ้ำจนกว่าน้ำเชื้ออสุจิจะละลายตัวดี
5. ใช้ pipette ดูดน้ำอสุจิเพื่อทำการวัดปริมาตรของน้ำเชื้ออสุจิแล้วบันทึกปริมาตรที่วัดได้
6. วัดค่าความเป็นกรด-ด่างโดยหยดน้ำอสุจิ 1 หยดลงบนกระดาษ pH paper แล้วทำการเทียบสีที่เกิดขึ้นกับแถบสีมาตรฐานบนกล่อง pH paper บันทึกค่า pH ที่วัดได้
7. เขียนชื่อ, รหัสผู้ป่วย, วันที่ลงบน slide สำหรับย้อมน้ำเชื้ออสุจิ
8. ป้ายน้ำเชื้ออสุจิ 1 หยดลงบน slide (ควรเตรียมอย่างน้อย 2 แผ่น) ทิ้งไว้ให้แห้งนาน 5-10 นาที จากนั้น fix ด้วย 95% alcohol นาน 5 นาทีแล้วตากให้แห้ง เพื่อส่งย้อมสี papanicolaou ดูรูปร่างของอสุจิ (morphology) ที่แผนกพยาธิวิทยา ชั้น 4 ตึกกิตติวัฒนา รพ.ธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ
9. ดูดน้ำเชื้ออสุจิปริมาตร 10 µl หยดลงบน Makler chamber นำไปตรวจวัด concentration, motility, vitality, agglutination ของน้ำเชื้ออสุจิ ด้วยเครื่อง CASA โดยการสุ่มตัวอย่าง 7-9 fields ในกรณีที่อสุจิมีความเข้มข้นสูงต้องทำการเจือจางก่อนการนำมาวิเคราะห์และต้องบันทึกระดับความเจือจางลงไปด้วย บันทึกข้อมูลที่วิเคราะห์ได้ลงในคอมพิวเตอร์และพิมพ์ใบรายงานผล SA

ภาคผนวก ง

Hypo-osmotic swelling test

วัสดุและอุปกรณ์

- เครื่องชั่งสาร 4 ตำแหน่ง
- ช้อนตักสาร
- ที่กรองสาร

สารเคมี

- sodium citrate dehydrate
- D-fructose
- sterile H_2O

การเตรียมสาร

1. ชั่ง sodium citrate dehydrate 0.735 g
2. D-fructose 1.351 g
3. Sterile H_2O 100 ml
4. แบ่งใส่ tube tube ละ 1 ml
5. นำ tube ไปแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส (เวลาใช้ให้นำมาละลายที่อุณหภูมิห้อง)

ภาคผนวก จ

comet assay

วัสดุและอุปกรณ์

- เครื่องชั่งสาร 4 ตำแหน่ง
- ช้อนตักสาร
- กระดาษ pH
- sterer และ sterer rod
- เครื่อง electrophoresis chamber
- auto-pipette ขนาดต่างๆ
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- กล้องจุลทรรศน์ ฟลูออเรสเซ็นต์
- เครื่อง computer comet assay (Metasystem 2007, version 2.2)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบ swing-out rotor
- ที่สำหรับนับตัวอสุจิ (Makler counting chamber, Horwell)
- เครื่อง electrophoresis chamber
- สไลด์แก้วและ cover slip
- เครื่อง computer aided sperm analysis (CASA), (IVOS, Hamiton, verson10)
- Makler counting chamber®

สารเคมี

- sterile H_2O
- agarose (NMP, LMP) (Sigma-Aldrich)
- sodium chlorie (Sigma-Aldrich)
- ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
- Tris (Sigma-Aldrich)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich)
- dimethylsulphoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich)
- ethidium bromide (EtBr) (Sigma-Aldrich)

การเตรียมน้ำยา

1. Neutralizing Buffer
   - ชั่ง tris 48.5 g
   - น้ำ 800 ml
   - ปรับค่า pH ให้ได้ 7.4 ด้วย HCL
2. Lysis solution
   - ชั่ง 10 mM Trisma base 1.2 g
   - ชั่ง 100 mM EDTA 37.2 g
   - ชั่ง 2.5 M Nacl 146.1 g
   - ชั่ง NaOH 8 g
   - ใส่น้ำลงไปให้ได้ปริมาตร 700 ml แล้วทำให้สารละลายโดยใช้ stering rod ประมาณ 20 นาที
   - ปรับค่า pH ให้ได้ 10 แล้วเติมน้ำให้ได้ 890 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
   - ก่อนนำมาใช้ให้เติม 1% triton X -100(10 ml) และเติม 10% DMSO(100 ml) ลงไปแล้วเติมน้ำให้ครบปริมาตร 1000 ml นำไปแช่ตู้เย็นประมาณ 30 นาที
3. Electrophoresis buffer (ปริมาตร 1000 ml)
   3.1. Stock solution
      - ชั่ง 10 N NaOH 260 g ใส่ลงในน้ำ 500 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส
      - ชั่ง 200 mM EDTA 14.89 g ละลายในน้ำ 200 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส
   3.2. Working solution
      - นำสารละลาย NaOH ปริมาตร 30 ml ผสมกับสารละลาย EDTA ปริมาตร 5 ml ใสลงในบิกเกอร์แล้วใส่น้ำให้ได้ ปริมาตร 1000 ml ปรับค่า pH ให้ได้ >13
4. Agarose Gel
   4.1. Low meating point (LMP)

- ชั่ง LMP 0.5 g ใส่ลงใน PBS 100 ml แล้วนำไปละลายด้วย microwave
- แบ่งส่วนใส่ลงใน vial ขวดละ 3 ml เปิดฝาทิ้งไว้จนหายร้อนเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- เวลาใช้ LMP ต้องใส่ลงใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

4.2. Normal meating point (NMP)

- ชั่ง NMP 0.75 g ใส่ลงใน PBS 100 ml แล้วนำไปละลายด้วย microwave
- เวลาใช้ NMP ต้องใส่ลงใน water bath ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส

5. Phosphate buffer saline pH 7.4 (PBS pH 7.4)
   - ชั่ง NaCl 8.0 g
   - ชั่ง KCl 0.2 g
   - ชั่ง Na2HPO4 1.15 g
   - ชั่งKH2PO4 0.2 g
   - Distilled water 1000 ml
   - ปรับ pH เป็น 7.4 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
6. Ethidium bromide solution
   - Stock solution ใส่ Ethidium bromide 1000 µg/ml เตรียม 1 ml
   - Working solution ใส่ Ethidium bromide solution 20 µg/ml เตรียม 10 ml แล้ว Aliquot ใส่ใน appendrop

ภาคผนวก ฉ
เอกสารชี้แจงข้อมูลแก่ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

1. โครงการวิจัยเรื่อง : ผลของการเตรียมและไม่เตรียมเชื้ออสุจิก่อนการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วต่อคุณภาพอสุจิหลังการทำละลาย

2. ชื่อผู้รับผิดชอบโครงการ

หัวหน้าโครงการวิจัย : รองศาสตราจารย์ นายแพทย์เจริญไชย เจียมจรรยา
หน่วยงาน : ภาควิชา สูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์
โทรศัพท์(ที่ทำงาน) : 02-9269162, 081-946-7388

ผู้ร่วมทำการวิจัย : รศ.ดร. ตรีทิพย์ รัตนวรชัย
สถานที่ติดต่อ: ชั้น 5 สถานวิทยาพรีคลินิก อาคารคุณากร
โทรศัพท์(ที่ทำงาน): 02-9269710-11

ผู้ทำการวิจัย : นางสาวชลธิชา สำเร็จกิจเจริญ
นักศึกษากลุ่มวิชาเวชศาสตร์การเจริญพันธุ์ หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
เบอร์โทร 087-913-9950 , 087-567-7111
E-mail cherry_403@hotmail.com

ที่ปรึกษาโครงการ : รศ.ดร.พญ. พัชรา วิสุตกุล
สถานที่ติดต่อ: บัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ เบอร์โทร : 02-926-9757

3. เหตุที่ต้องทำวิจัยและเหตุผลที่ต้องการศึกษาในคน รวมทั้งเหตุผลที่อาสาสมัครที่ได้รับเชิญเข้าร่วมโครงการ

การแช่แข็งอสุจิเป็นเทคนิคในการเก็บรักษาอสุจิภายใต้สภาวะอุณหภูมิที่เย็นจัด เพื่อให้สามารถเก็บรักษาอสุจิได้เป็นระยะเวลานาน ซึ่งในปัจจุบันนั้นการแช่แข็งอสุจิมีไว้เพื่อสำหรับเก็บรักษาอสุจิในกรณีที่ฝ่ายชายจำมีความจำเป็นที่จะต้องมีการให้เคมีบำบัด, รังสีรักษา, การผ่าตัดที่อาจจะทำให้เป็นหมันหรืออาจจะเกิดภาวะมีบุตรยากขั้นรุนแรงได้, การเก็บรักษาอสุจิไว้ก่อนที่จะมีการทำหมันชาย, เพื่อความสะดวกในการรักษาภาวะผู้มีบุตรยาก สำหรับบางรายที่มีน้ำเชื้ออ่อน สามารถที่จะเก็บสะสมไว้เพื่อนำมารวมกันและใช้ในคราวเดียวได้ หรือในกรณีที่ต้องมีการผ่าตัดเก็บอสุจิจากอัณฑะ ซึ่งเป็นสิ่งที่ทำให้เกิดการเจ็บตัวและเสี่ยงต่อการติดเชื้อและการเกิดภาวะแทรกซ้อน ทั้งนี้การเก็บรักษา

โดยการแช่แข็งอสุจินั้นก็เพื่อเป็นทางที่จะลดความเสี่ยงต่อผู้ป่วยลง แต่อย่างไรก็ตามการแช่แข็งนั้นก็ยังมีข้อเสียในเรื่องของ การเคลื่อนที่ของอสุจิที่ลดลง 25% - 75%, การเกิดการแตกหักของDNA, และรวมไปถึงกับคุณภาพของอสุจิที่ลดลง หลังจากผ่านขบวนการทำละลายอสุจิแช่แข็ง ดังนั้น ในการทดลองครั้งนี้ จึงทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการแช่แข็งอสุจิก่อนและหลังการเตรียมเชื้ออสุจิ เพื่อที่จะดูว่าวิธีใดจะมีโอกาสในการเพิ่มคุณภาพของอสุจิ ได้ดีกว่ากัน

ผลของการทดลองครั้งนี้อาจจะนำไปประยุกต์ใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพของขบวนการช่วยการเจริญพันธ์ต่อไปในอนาคตได้ ซึ่งอาจจะนำไปสู่การเพิ่มอัตราการตั้งครรภ์ของคนไข้ ที่มารักษาภาวะมีบุตรยากได้มากขึ้น

ท่านได้รับเชิญให้เป็นอาสาสมัครเข้าร่วมงานวิจัยครั้งนี้ เนื่องจากท่านเป็นอาสาสมัครที่มารับการรักษาภาวะมีบุตรยาก ในโรงพยาบาลธรรมศาสตร์ ซึ่งหลังจากได้รับการตรวจคุณสมบัติของน้ำอสุจิตามปกติเพื่อนำไปใช้ในการรักษาแล้วก็ยังมีน้ำเชื้ออสุจิเหลืออยู่เพียงพอที่ผู้วิจัยจะขออนุญาตนำมาทำการวิจัยครั้งนี้ได้

4. วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาผลของขบวนการแช่แข็งอสุจิ ด้วยวิธีการแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว ก่อนและหลังการเตรียมอสุจิต่อคุณภาพของเชื้ออสุจิและการแตกหักของสายดีเอ็นเอ

5. ขั้นตอนและกระบวนการทำวิจัย

อาสาสมัครทำการเก็บน้ำอสุจิโดยวิธีการช่วยตัวเอง (masturbation) น้ำเชื้อส่วนหนึ่งนำไปทำการวิเคราะห์ (semen analysis) เพื่อทำการตรวจรักษาผู้ป่วยตามปกติ จากนั้นนำอสุจิที่เหลือจากการวิเคราะห์น้ำเชื้ออสุจิแล้วมาแบ่งออกเป็น 4 ส่วนเท่าๆกัน โดยผู้วิจัยจะจัดเป็นกลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม และกลุ่มวิจัย (กลุ่มที่ 2, กลุ่มที่3 และกลุ่มที่ 4) น้ำอสุจิของทุกกลุ่มจะได้รับการตรวจวัดคุณสมบัติดังต่อไปนี้ คือ การตรวจคุณภาพของน้ำเชื้ออสุจิ (Semen analysis ; SA โดยดูปริมาณ, ความเคลื่อนไหว, รูปร่างปกติ), ตรวจความสามารถของเชื้ออสุจิในการเจาะ , ตรวจการแตกหักของสายดีเอ็นเอ, ตรวจความมีชีวิตรอดของตัวอสุจิ

6. ประโยชน์ที่คาดว่าจะเกิดขึ้นจากการทำวิจัย

เพื่อดูการเปรียบเทียบผลของขบวนการแช่แข็งและละลายอสุจิก่อนและหลังการเตรียมอสุจิเพื่อดูว่าวิธีการไหนสามารถเพิ่มคุณสมบัติของเชื้ออสุจิได้ดีกว่า โดยข้อมูลที่ได้สามารถนำมาประกอบการตัดสินใจในการเลือกใช้ขบวนการแช่แข็งและการละลายอสุจิที่มีประโยชน์สูงสุดแก่คนไข้และเป็นทางเลือกใหม่ในขบวนการช่วยการเจริญพันธ์ในอนาคตต่อไปได้

7. สิ่งที่อาสาสมัครจะต้องปฏิบัติและไม่ปฏิบัติระหว่างการศึกษา และระยะเวลาของการวิจัย

เนื่องจากโครงการวิจัยนี้ เป็นการเก็บน้ำอสุจิเพียงครั้งเดียว ไม่มีการนัดอาสาสมัครมาภายหลัง

8. ความเสี่ยงหรืออันตรายที่จะเกิดขึ้น และหรือความไม่สะดวกสบายของอาสาสมัครที่อาจได้รับและมาตรการที่ผู้วิจัยเตรียมไว้ป้องกัน

อาสาสมัครจะไม่ได้รับความเสี่ยงหรืออันตรายจากการวิจัยในครั้งนี้

9. กรณีเกิดภาวะแทรกซ้อนที่เกี่ยวข้องกับการวิจัยผู้วิจัยจะให้การดูแลรักษาพยาบาลหรือชดเชยอาสาสมัครอย่างไร

อาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการจะไม่เกิดความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะแทรกซ้อนใดๆ

10. กรณีการทดสอบยาในอาสาสมัครที่เป็นผู้ป่วย เมื่อผลการวิจัยพบว่ายานั้นเป็นประโยชน์ภายหลังการสิ้นสุดโครงการวิจัย ผู้วิจัยจะให้การสนับสนุนกับอาสาสมัครต่อไปหรือไม่อย่างไร และระยะเวลานานเท่าไร

ในการวิจัยในครั้งนี้ไม่มีการทดสอบยาในอาสาสมัคร

11. ในกรณีที่มีการรักษาหลายรูปแบบให้ระบุทางเลือกอื่นและเปรียบเทียบข้อดี, ข้อเสีย ของวิธีวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ไม่มีการรักษาผู้ป่วยมาเกี่ยวข้อง เป็นเพียงการศึกษาวิจัยเพื่อหาแนวทางในการเก็บรักษาเชื้ออสุจิไว้ใช้ในอนาคต

12. การให้ค่าตอบแทนเป็นเงิน ควรระบุจำนวนและจำนวนครั้งที่ให้อาสาสมัคร

ท่านจะไม่ได้รับค่าตอบแทนใด ๆ จากการเข้าร่วมการศึกษาวิจัยนี้ และอาสาสมัครไม่มีค่าใช้จ่ายที่ต้องรับผิดชอบจากการเข้าร่วมโครงการการวิจัย

13. การรักษาความลับเกี่ยวกับอาสาสมัคร

ผู้วิจัยจะเก็บข้อมูลส่วนตัวที่ท่านไม่ต้องการเปิดเผยเป็นความลับจะถูกเก็บรวบรวมไว้และนำมาใช้เพื่อวัตถุประสงค์ทางการวิจัยทางการแพทย์เท่านั้น หากมีการวิเคราะห์ข้อมูลจะไม่มีการอ้างถึงชื่อท่านในรายงานหรือวารสารใด ๆ แต่คณะกรรมการจริยธรรมอาจขอให้หัวหน้าโครงการวิจัยเปิดเผยผลการวิจัยของท่าน หากท่านตกลงใจเข้าร่วมการศึกษา ทางโรงพยาบาล จะเป็นผู้ควบคุมข้อมูลส่วนตัวท่าน โดยทางโรงพยาบาลจะทำทุกวิถีทางเพื่อให้เกิดความมั่นใจว่าข้อมูลส่วนตัวของท่านจะถูกปกป้องไว้

14. วัตถุทางชีวภาพที่รวบรวมไว้ เช่น ตัวอย่างเลือดที่เหลือหลังจบโครงการจะจัดการอย่างไร

ภาชนะที่ใช้ในการเก็บน้ำอสุจิที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิดใช้แล้วทิ้ง ไม่มีการนำมาใช้ใหม่ ขยะที่ทิ้งเป็นถุงขยะแดง (สำหรับทิ้งขยะติดเชื้อ) และมีการนำไปทำลายโดยเตาเผาที่ได้มาตรฐานของโรงพยาบาล

15. สิทธิของอาสาสมัครในการถอนตัวออกจากโครงการเมื่อไรก็ได้ โดยไม่กระทบต่อการรักษาพยาบาลของอาสาสมัครที่เป็นผู้ป่วย

หลังจากท่านตัดสินใจแล้ว ท่านมีสิทธิที่จะไม่เข้าร่วมการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้ โดยไม่มีผลกระทบใดๆต่อการรักษาของท่าน

16. แหล่งทุนวิจัย

ทุนวิจัยคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

17. โครงการวิจัยได้รับความเห็นชอบจากคณะอนุกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน มธ. ชุดที่ 1 โทรศัพท์ 0-2926-9704, 0-2564-4444 ต่อ 7535

18. ผู้เข้าร่วมวิจัยสามารถขอรับคำปรึกษา/แจ้งเรื่อง/ร้องเรียน ได้ที่สำนักงานคณะอนุกรรมการจริยธรรมการ วิจัยในคน มธ. ชุดที่ 1 คณะแพทยศาสตร์ โทรศัพท์/โทรสาร 02-926-9704 , 0-2564-4444 ต่อ 7535

ขอบคุณทุกท่านที่ให้ความร่วมมือ

รองศาสตราจารย์ นายแพทย์เจริญไชย เจียมจรรยา

หัวหน้าโครงการ

ภาคผนวก ช

ใบยินยอมของอาสาสมัคร

โครงการวิจัยเรื่อง : ผลของการเตรียมและไม่เตรียมเชื้ออสุจิก่อนการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วต่อคุณภาพอสุจิหลังการทำละลาย

วันที่ให้คำยินยอมวันที่ .....เดือน .....พ.ศ.....

ก่อนที่จะลงนามในใบยินยอมให้ทำการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย วิธีการวิจัย อันตรายหรืออาการที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัยหรือจากยาที่ใช้ รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัยอย่างละเอียด และมีความเข้าใจดีแล้ว ซึ่งผู้วิจัยได้ตอบคำถามต่างๆ ที่ข้าพเจ้าสงสัยด้วยความเต็มใจ ไม่ปิดบัง ซ่อนเร้น จนข้าพเจ้าพอใจ และเข้าร่วมโครงการนี้โดยสมัครใจ

ข้าพเจ้ามีสิทธิ์ที่จะบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนี้เมื่อใดก็ได้ ถ้าข้าพเจ้าปรารถนาโดยไม่เสียสิทธิในการรักษาพยาบาลที่จะเกิดขึ้นตามมาในโอกาสต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูล เฉพาะเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าเป็นความลับและจะเปิดเผยได้เฉพาะในรูปแบบที่เป็นสรุปผลการวิจัย

การเปิดเผยข้อมูลเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าต่อหน่วยงานต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกระทำได้เฉพาะกรณีจำเป็นด้วยเหตุผลทางวิชาการเท่านั้นและจะต้องได้รับคำยินยอมจากข้าพเจ้าเป็นลายลักษณ์อักษร

ในการวิจัยครั้งนี้ จะมีการใช้น้ำเชื้อของผู้เข้ารับการรักษาผู้มีบุตรยากและได้รับการตรวจคุณภาพอสุจิ (Semen analysis) แล้วมาทำการวิจัยซึ่งหลังจากผู้วิจัยทำการวิจัย แล้วน้ำเชื้อที่เหลือจะถูกทำลายโดยวิธีมาตรฐาน

ข้าพเจ้ายินยอมให้ผู้กำกับดูแลการวิจัย ผู้ตรวจสอบ คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน และคณะกรรมการที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมยา สามารถเข้าไปตรวจสอบบันทึกข้อมูลทางการแพทย์ของข้าพเจ้า เพื่อเป็นการยืนยันถึงขั้นตอนโครงการวิจัยทางคลินิก โดยไม่ล่วงละเมิดเอกสิทธิ์ ในการปิดบังข้อมูลของการสมัครตามกรอบที่กฎหมายและกฎระเบียบได้อนุญาตไว้

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นแล้ว และมีความเข้าใจดีทุกประการ และได้ลงนามในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ

ในกรณีที่ข้าพเจ้าไม่สามารถอ่านหนังสือได้ ผู้วิจัยได้อ่านข้อความในใบยินยอมนี้ให้ข้าพเจ้าฟังจนเข้าใจดีแล้ว ข้าพเจ้าจึงลงนามในใบยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ

ข้าพเจ้าสามารถติดต่อผู้วิจัยได้ที่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120 โดยหัวหน้าโครงการที่รับผิดชอบเรื่องนี้ คือ รองศาสตราจารย์ นายแพทย์เจริญไชย เจียมจรรยาโทร 02-9269162, 081-946-7388 และผู้ทำการวิจัย นางสาวชลธิชา สำเร็จกิจเจริญ โทร 087-567-7111

ข้าพเจ้ารับทราบว่า ข้าพเจ้าสามารถขอรับคำปรึกษา/แจ้งเรื่อง/ร้องเรียน ได้ที่ สำนักงานอนุกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน มธ. ชุดที่ 1 คณะแพทยศาสตร์ โทรศัพท์ 02-926-9704, 0-2564-4444 ต่อ 7535

ลงนาม.....ผู้ยินยอม

(.....)

ลงนาม.....พยาน

(.....)

ลงนาม.....พยาน

(.....)

ประวัติผู้เขียน

1. ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) : นางสาวชลธิชา สำเร็จกิจเจริญ
   (ภาษาอังกฤษ) : Miss Chonthicha Samrejkijcharoen
2. วันเดือนปีเกิด 2 5 กันยายน 2531
3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักศึกษาปริญญาโท
4. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	วุฒิการศึกษา/ประกาศนียบัตร	สาขาเอก	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
2548	มัธยมศึกษา	วิทย์-คณิต	โรงเรียนบางปะกอกวิทยาคม	ไทย
2552	วิทยาศาสตรบัณฑิต	วิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์	มหาวิทยาลัยรังสิต	ไทย