

นิพนธ์ฉบับ

ผลของการเติมโคเอนไซม์คิวเทนในน้ำยาแช่แข็งต่อคุณภาพและ การแตกหักของสายดีเอ็นเอในอสุจิที่ผ่านกระบวนการแช่แข็ง แบบเนื้อแก้วในชายที่มีอสุจิปกติ

เกศนิกา นรสิงห์*, เจริญไชย เจียมจรรยา**, พัทธรา วิสุตกุล***, ตรีทิพย์ รัตนวรชัย****

บทคัดย่อ

- บทนำ:** หนึ่งในเทคโนโลยีที่ช่วยในการรักษาภาวะมีบุตรยากจากฝ่ายชายคือการแช่แข็งอสุจิ แต่หลังการละลาย พบว่าอสุจิจะมีการเคลื่อนไหวลดลงร้อยละ ๒๕ ถึง ๗๕ นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการแตกหักของสายดีเอ็นเอของอสุจิอีกด้วย มีรายงานการใช้สารต้านอนุมูลอิสระใส่ลงในน้ำยาแช่แข็งเพื่อช่วยเพิ่มการทำงานของอสุจิและลดการแตกหักของดีเอ็นเอ แต่งานวิจัยเรื่องนี้ยังมีจำนวนน้อยมากและยังไม่มีผลสรุปที่ชัดเจน ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาผลของการเติมโคเอนไซม์คิวเทนในน้ำยาแช่แข็งต่อคุณภาพของอสุจิ
- วิธีการศึกษา:** เชื้ออสุจิของอาสาสมัครชาย ๔๐ รายที่มีน้ำเชื้อปกติ แบ่งเป็น ๔ กลุ่มคือ กลุ่มที่ ๑ : กลุ่มน้ำเชื้อสด (neat หรือ unwashed: UW), กลุ่มที่ ๒ : กลุ่มอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ (washed: W), กลุ่มที่ ๓ : กลุ่มอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิและนำไปแช่แข็ง (washed and frozen: W+F), กลุ่มที่ ๔ : กลุ่มอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิและนำไปแช่แข็งโดยใส่โคเอนไซม์คิวเทน (CoQ10) ปริมาณ ๕๐ ไมโครโมลาร์ (W+F+CoQ10) นำผลการทดลองในกลุ่มต่างๆ มาตรวจวิเคราะห์เปรียบเทียบคุณภาพอสุจิ (semen analysis) ความมีชีวิตของอสุจิ (vitality) โดยวิธี hypo-osmotic swelling test (HOS) ความสมบูรณ์ของการทำงานของอสุจิ โดย Hyaluronan binding assay (HBA) ความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอของอสุจิ (comet assay)
- ผลการศึกษา:** เมื่อใส่ CoQ10 ลงในน้ำยาแช่แข็งอสุจิ พบว่าค่าความเข้มข้นของอสุจิ อัตราอสุจิที่มีชีวิต อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติและการทำงานของอสุจิ โดย HBA ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใส่ CoQ10 แต่จะมีค่าของอัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิ (motility) และอัตราอสุจิที่เคลื่อนไหวไปข้างหน้า (progressive motility) มีค่ามากกว่าและมีค่าความแตกหักของดีเอ็นเอต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใส่ CoQ10
- วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา:** น้ำยาแช่แข็งอสุจิที่ใส่ CoQ10 นั้นทำให้มีประสิทธิภาพการเคลื่อนไหวของอสุจิเพิ่มขึ้น และทำให้การแตกหักของสายดีเอ็นเอของอสุจิลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับน้ำยาแช่แข็งที่ไม่ได้ใส่ CoQ10
- คำสำคัญ:** การแช่แข็งอสุจิแบบเนื้อแก้ว, โคเอนไซม์คิวเทน, การแตกหักของดีเอ็นเอ

วันที่รับบทความ: ๓ มิถุนายน ๒๕๕๘

วันที่อนุญาตให้ตีพิมพ์: ๗ กรกฎาคม ๒๕๕๘

* นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

** ภาควิชาสูติศาสตร์ - นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

*** งานบัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

**** สถาบันวิทยาศาสตร์ฟิสิกส์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

บทนำ

ในปัจจุบันภาวะมีบุตรยากเป็นภาวะที่เกิดขึ้นกับคู่สมรสหลายคู่ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปัญหาความเครียดในการดำเนินชีวิต เช่น ความเครียดจากการทำงาน สิ่งแวดล้อมมลภาวะ อาหาร และอื่นๆ ซึ่งจากการศึกษาพบว่า สาเหตุของภาวะมีบุตรยากที่เกิดมาจากฝ่ายชายนั้นเกิดขึ้นประมาณร้อยละ ๒๐ - ๓๐ สาเหตุจากฝ่ายหญิงประมาณร้อยละ ๔๐ - ๕๕ สาเหตุจากทั้งฝ่ายชายและหญิงประมาณร้อยละ ๒๐ - ๓๐ และเทคโนโลยีที่มีบทบาทช่วยในการรักษาภาวะมีบุตรยากจากฝ่ายชายเทคโนโลยีหนึ่งคือการแช่แข็งอสุจิ ซึ่งการแช่แข็งอสุจิในปัจจุบันมีไว้เพื่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ในกรณีที่ต้องให้เคมีบำบัด รังสีรักษา (ซึ่งจะทำลายคุณภาพของอสุจิ) หรือการเก็บรักษาอสุจิไว้ก่อนการทำหมันชาย หรือเพื่อความสะดวกในการรักษาภาวะมีบุตรยาก ในกรณีฝ่ายชายไปทำงานต่างประเทศ หรือในกรณีไม่สามารถนำอสุจิมาส่งได้ตามเวลาที่ต้องการ เพื่อใช้ในการฉีดอสุจิเข้าสู่โพรงมดลูก (Intrauterine insemination: IUI) หรือทำเด็กหลอดแก้ว (In vitro fertilization: IVF) หรือสำหรับในบางรายที่มีน้ำเชื้อน้อย ผู้ป่วยอาจมีความประสงค์ที่จะเก็บสะสมอสุจิไว้ เพื่อนำมารวมกันเพื่อใช้ในคราวเดียว และในบางรายที่ต้องเก็บอสุจิจากอัมพาต (Surgical sperm recovery: SSR) เป็นกระบวนการที่ก่อให้เกิดความเจ็บปวด มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อและการเกิดภาวะแทรกซ้อน จึงควรลดจำนวนครั้งในการทำให้น้อยที่สุด ซึ่งวิธีหนึ่งก็คือการแช่แข็ง (Cryopreservation) อสุจิ หรือชิ้นเนื้อจากอัมพาตที่เก็บไว้บางส่วน^๑ แต่อย่างไรก็ตามวิธีการแช่แข็งอสุจิยังมีข้อเสียทั้งในเรื่องการเคลื่อนไหวของอสุจิที่จะลดลงหลังการละลายร้อยละ ๒๕ - ๗๕ ผลกระทบของกระบวนการแช่แข็งและการละลายนั้นส่งผลมาจากการเปลี่ยนแปลงทาง Physical และ Chemical^๒ เช่น การเกิด thermal shock, osmotic shock, การเกิด intracellular และ extracellular ice crystal, cell dehydration และการสูญเสียของ cell membrane integrity ซึ่งทั้งหมดนี้เป็นสาเหตุของความเสียหายที่เกิดจากการแช่แข็งอสุจิ^๓ นอกจากนี้ยังเกิดการแตกหักของสายดีเอ็นเอของอสุจิ (Sperm DNA fragmentation) ซึ่งการสูญเสียการทำงานของอสุจิและการแตกหักของสายดีเอ็นเอจะสัมพันธ์กันกับการสร้าง Reactive oxygen species (ROS) ที่เกิดขึ้นในกระบวนการแช่แข็งและละลาย^๔ จึงได้มีการศึกษานำสารต้านอนุมูลอิสระมาใส่ลงในน้ำยาแช่แข็งเพื่อช่วยเพิ่มการทำงานของอสุจิและลดการแตกหักของสายดีเอ็นเอ

โคเอนไซม์คิวเทน (Coenzyme Q10) หรือโคคิวเทน (CoQ10) มีชื่อเรียกทางเคมีว่า “2,3-dimethoxy-5-methyl-6-decaprenyl benzo-quinone” CoQ10 เป็นสารคล้ายวิตามิน สามารถละลายได้ในไขมัน และร่างกายสามารถผลิตได้เอง พบในเซลล์ทุกเซลล์ที่มีชีวิต โดยจะอยู่ที่ส่วนเยื่อหุ้มของไมโทคอนเดรีย ซึ่ง CoQ10 มีความจำเป็นต่อร่างกาย มีส่วนช่วยในกระบวนการ Oxidation ของสารอาหารภายในเซลล์เพื่อสร้าง Adenosine triphosphate (ATP) ลักษณะเป็น Amphipathic (Biphasic) เนื่องจากในโครงสร้างมีส่วนประกอบส่วนหัวที่เป็น Hydrophilic benzoquinone ring และส่วนหางที่เป็น Lipophilic polyisoprenoid side-chain ส่วน Hydrophilic benzoquinone ring ของโคเอนไซม์คิวเทนมีความสำคัญกับปฏิกิริยารีดอกซ์ โดยทำหน้าที่ร่วมในการส่งต่ออิเล็กตรอนภายใน Lipid bilayer ซึ่งมี Semiquinone radical เป็นสาร Intermediate มีรายงานการวิจัยพบว่าโคเอนไซม์คิวเทนสามารถช่วยในการเคลื่อนที่ของอสุจิ การนำกลับมาใช้ใหม่ของวิตามินอีและการป้องกัน pro-oxidant ได้^๕ จากรายงานการทดลองของ Lewin A. และ Lavon H. ในปี ค.ศ. ๑๙๙๗ พบว่าการใส่โคเอนไซม์คิวเทน ๕๐ ไมโครโมลาร์ ในน้ำยา HAM's F10 แล้วนำไปผสมร่วมกับอสุจิเป็นเวลา ๒๔ ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า สามารถเพิ่มการเคลื่อนไหวของอสุจิอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ป้อนด้วยน้ำยา HAM's F10 เพียงอย่างเดียว ในชายที่มีภาวะ Asthenozoospermia นอกจากนี้ยังวิจัยในผู้ป่วยชายที่เคยได้รับการรักษาโดยวิธี ICSI และมีอัตราการปฏิสนธิต่ำ เมื่อให้รับประทานโคเอนไซม์คิวเทนขนาด ๖๐ มิลลิกรัมต่อวัน เป็นเวลา ๑๐๓ วัน ก่อนได้รับการรักษาโดยวิธี ICSI พบว่าอัตราการปฏิสนธิเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ^๖

ในการวิจัยครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาทดลองการใส่โคเอนไซม์คิวเทนเสริมเข้าไปในกระบวนการแช่แข็งและละลายอสุจิ เพื่อไปทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระช่วยเพิ่มการทำงานของอสุจิโดยเฉพาะการเคลื่อนไหว (motility) และอาจจะช่วยลดการเกิดการแตกหักของสายดีเอ็นเอของอสุจิลง ซึ่งผลของการทดลองครั้งนี้ก็นำไปประยุกต์ใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการช่วยการเจริญพันธุ์ (Assisted reproductive technology: ART) ที่จะนำไปสู่การช่วยเพิ่มอัตราการตั้งครรภ์ของคนไข้ที่มารักษาภาวะมีบุตรยากได้

วิธีการศึกษา

การวิจัยเชิงทดลองทางคลินิกใช้รูปแบบการวิจัยแบบไปข้างหน้า (prospective study) โดยการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้รับใบรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน (MTU-EC-OB-6-092/55) จากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ทำการเก็บตัวอย่างจากอาสาสมัคร ๔๐ ราย ที่หน่วยผู้มีบุตรยาก โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ระหว่างเดือนสิงหาคม พ.ศ. ๒๕๕๖ ถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ. ๒๕๕๗

การเก็บน้ำเชื้ออสุจิและการตรวจน้ำอสุจิ

อาสาสมัครเก็บน้ำเชื้อใส่ภาชนะพลาสติกปราศจากเชื้อโรค ด้วยวิธี Masturbation หลังงดหลังน้ำเชื้อ ๓ - ๗ วัน และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา ๓๐ - ๖๐ นาที หลังจากนั้นนำน้ำอสุจิที่ได้ไปตรวจวัดคุณภาพ ได้แก่ รูปร่างอสุจิที่ปกติ ความเข้มข้นของอสุจิและการเคลื่อนไหว ด้วยเครื่อง Computer-aided sperm analysis (CASA; IVOS, version 10, Hamilton, USA) โดยตรวจรูปร่างอสุจิด้วยวิธีการย้อม Papanicolaou (PAP staining) ซึ่งน้ำอสุจิต้องมีคุณภาพน้ำเชื้อเป็นปกติโดยเทียบจากค่าปรกติมาตรฐานของ World Health Organization (WHO) ปี ค.ศ. ๒๐๑๐ จากนั้นตรวจความมีชีวิตอสุจิ โดย Hypo-osmotic swelling test (HOS)^๔ และตรวจความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิ โดย Hyaluronan binding assay (HBA) ด้วยชุดตรวจ hyaluronan binding assay (HYDAK[®] COATINGS; Bio-coat, Inc. Denmark) และนำไปตรวจวัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast^๕

การเตรียมอสุจิ (Sperm preparation)

เป็นวิธีการคัดเลือกตัวอสุจิปกติที่เคลื่อนที่ได้ดีและขจัดน้ำอสุจิออก โดยจะนำน้ำอสุจิค่อยๆ หยดลงบนน้ำยา Sil-select sperm gradient นำไปปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง

แบบ Swing out rotor โดยใช้ความเร็ว 300 g นาน ๑๕ นาที เมื่อเสร็จแล้วดูดตะกอนอสุจิที่ก้นหลอดมาใส่น้ำยา Fertilizing medium แล้วนำไปปั่นแยกโดยใช้ความเร็ว 300 g นาน ๕ นาที (ทำซ้ำอีก ๑ ครั้งเพื่อล้างน้ำยา Sil-select ออกให้หมด) แล้วดูดเอาตะกอนอสุจิที่ก้นหลอดที่ได้ มาใส่ในหลอดก้นกลมปลอดเชื้อ แล้วนำไปหยดลงบน Makler counting chamber นำไปตรวจวัดความเข้มข้น ความสามารถในการเคลื่อนที่ ด้วยเครื่อง CASA

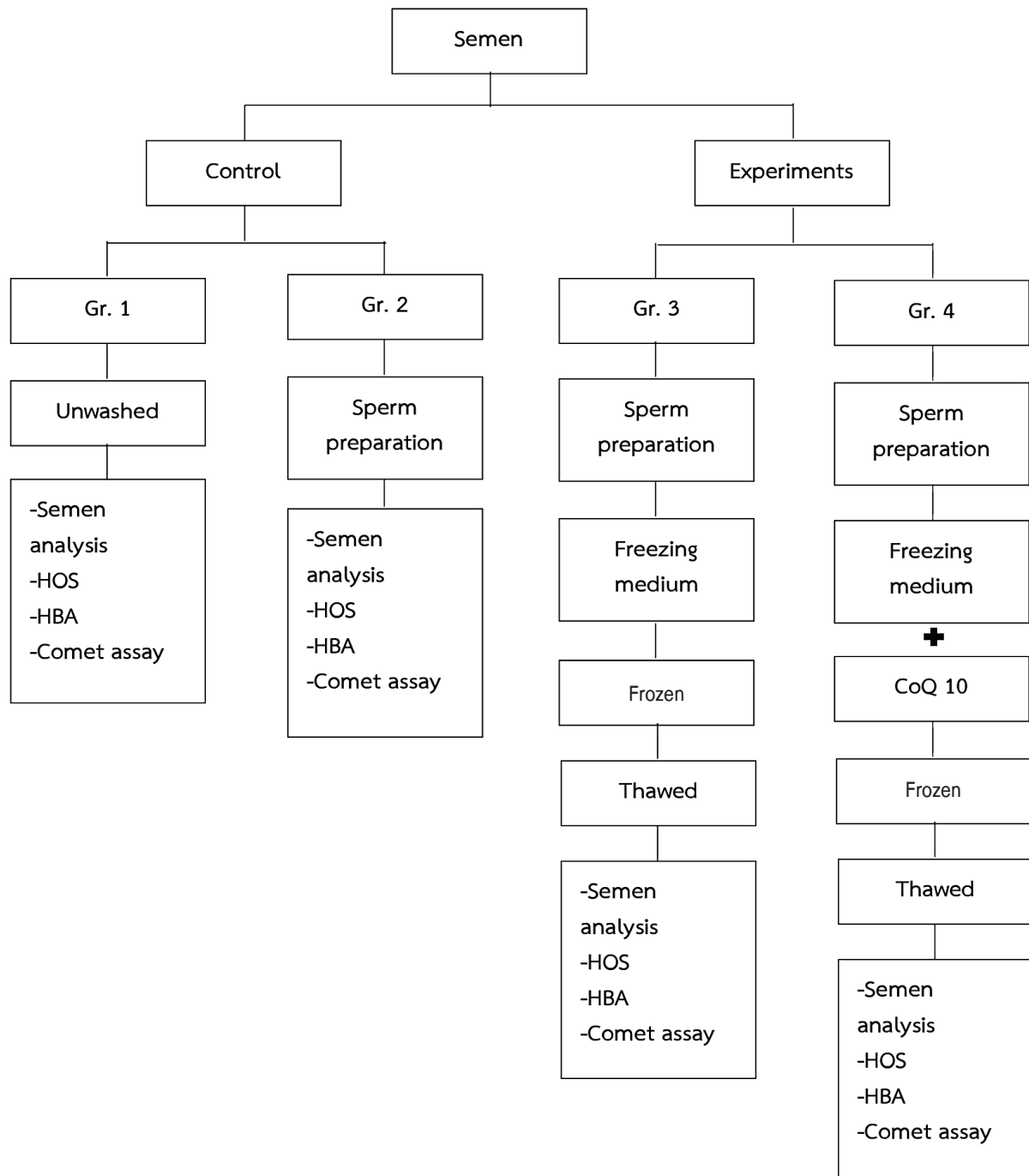
การตรวจหา DNA damage ของสายดีเอ็นเอ

โดยวิธี single cell gel electrophoresis (Comet assay) เป็นวิธีการตรวจการแตกหักของสาย DNA (DNA fragmentation) ใช้สารเคมีจาก Sigma-Aldrich, USA โดยนำอสุจิมาผสมกับ agarose gel แล้วนำไปหยดลงบนสไลด์ทำให้แข็งตัวในอุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียส นำไปทำการสลายเซลล์เพื่อให้ได้ส่วนของนิวเคลียส แล้วนำไปผ่านกระบวนการ electrophoresis จากนั้นนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ ทำการวิเคราะห์อสุจิ ๑๐๐ ตัว โดยการทดสอบมีการทำซ้ำ ๒ สไลด์ต่อหนึ่งตัวอย่าง โดยใช้โปรแกรม Meta-system software, Comet Imager V.2.0.0. เพื่อตรวจวัดพารามิเตอร์ความยาวหาง ในการวิเคราะห์ DNA damage^๖

การแบ่งกลุ่มตัวอย่าง

แบ่งน้ำเชื้ออสุจิ (neat semen) เป็น ๔ ส่วนเท่าๆ กัน กลุ่มที่ ๑ : กลุ่มน้ำเชื้อสด (unwashed: UW) กลุ่มที่ ๒ : กลุ่มอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิ (sperm preparation หรือ washed: W) กลุ่มที่ ๓ : เป็นกลุ่มอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิและนำไปแช่แข็ง (washed and frozen: W+F) กลุ่มที่ ๔ : เป็นกลุ่มอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิและนำไปแช่แข็งโดยใส่ CoQ10 ปริมาณ ๕๐ ไมโครโมลาร์ (W+F+CoQ10)

แผนภาพการทดลอง



HOS = Hypo-osmotic swelling test

HBA = Hyaluronan binding assay

การแช่แข็งอสุจิแบบเนื้อแก้วด้วยวิธี Solid surface vitrification (SSV)

การแช่แข็งจะใช้น้ำยาแช่แข็งอสุจิ (glycerol egg yolk citrate medium) จาก Sigma-Aldrich นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ ๕๖ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๓๐ นาที หลังจากนั้นนำอสุจิที่ผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิผสมกับน้ำยาแช่แข็งทั้งที่ใส่และไมใส่ CoQ10 ในปริมาณเท่ากัน (๑:๑) และดูดตัวอย่าง ๒๐ ไมโครลิตร นำไปหยดบนแผ่นอะลูมิเนียมฟอยด์ที่ลอยอยู่บนผิวของไนโตรเจนเหลว นำหยดตัวอย่างที่แช่แข็งแล้วใส่ใน cryovial (Nunc, Roskilde, Denmark) และเก็บในถังไนโตรเจนเหลว (-๑๙๖ องศาเซลเซียส)^{๑๑} เป็นเวลา ๗ วัน (ดัดแปลงน้ำยาในกระบวนการแช่แข็งมาจากหน่วยผู้มีบุตรยาก โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ กรุงเทพมหานคร)

การวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่ม การทดลองทั้ง ๔ กลุ่ม ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS version 17.0 และกำหนดให้ข้อมูลมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อค่า $p < 0.05$

ผลการศึกษา

ผลการศึกษาคคุณภาพของอสุจิพบว่า กระบวนการเตรียมเชื้อนั้นจะแยกอสุจิที่ตายออกไปส่วนหนึ่ง ทำให้ความเสียหายของดีเอ็นเอลดลงและความเข้มข้นของอสุจิ ลดลงกว่ากลุ่มอสุจีก่อนการเตรียมเชื้อ กลุ่มอสุจิหลังการเตรียมเชื้ออสุจิมีค่าอัตราการเคลื่อนไหว อัตราอสุจิที่เคลื่อนไหวไปข้างหน้า อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติ อัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิ อัตราอสุจิที่มีชีวิตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มอสุจีก่อนการเตรียมเชื้อ (ตารางที่ ๑)

ตารางที่ ๑ คุณสมบัติของอสุจีก่อนการเตรียมเชื้ออสุจิ (UW) เปรียบเทียบกับอสุจิหลังการเตรียมเชื้ออสุจิ (W)

Sperm characteristics	UW	W
ความเข้มข้นของอสุจิ (Sperm concentration) ($10^6/\text{ml}$)	๑๘๑.๓๘ ± ๕๕.๓๔	๑๔๖.๒๕ ± ๔๘.๕๕*
อัตราการเคลื่อนไหว (%Sperm motility)	๕๒.๒๕ ± ๗.๘๓	๘๖.๗๕ ± ๘.๓๓*
อัตราอสุจิที่เคลื่อนไหวไปข้างหน้า (%Progressive motile)	๔๔.๑๖ ± ๖.๐๐	๗๘.๕๕ ± ๖.๘๘*
อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติ (%Normal morphology)	๘.๔๗ ± ๓.๐๑	๑๖.๔๕ ± ๓.๖๑*
อัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิ (Sperm-Hyaluronan binding assay (%HBA))	๗๖.๑๕ ± ๗.๗๔	๗๘.๖๗ ± ๗.๔๐*
อัตราอสุจิที่มีชีวิต (%Vitality)	๗๓.๕๕ ± ๗.๖๑	๘๕.๕๗ ± ๖.๕๘*
ความเสียหายของดีเอ็นเอ (DNA damage (μm))	๕.๒๖ ± ๕.๐๗	๓.๔๒ ± ๒.๖๕*

แสดงผล ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

หมายเหตุ * คือ ข้อมูลที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยค่า $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม UW

ผลการศึกษากลุ่มอสุจิหลังผ่านกระบวนการเตรียมอสุจิการแช่แข็งและการละลายทั้งในกลุ่มที่ไม่ใส่ CoQ10 (W+F) และที่ใส่ CoQ10 (W+F+CoQ10) พบว่า อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติ และอัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิไม่มีความแตกต่างกันเมื่อเทียบกับกลุ่มอสุจิหลังการเตรียมเชื้อ

แต่พบว่า ค่าความเข้มข้นของอสุจิ อัตราการเคลื่อนไหว อัตราอสุจิที่เคลื่อนไหวไปข้างหน้าและค่าอัตราอสุจิที่มีชีวิต ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีค่าความเสียหายของดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอสุจิหลังการเตรียมเชื้อโดยไม่ได้แช่แข็ง (ตารางที่ ๒)

ตารางที่ ๒ คุณสมบัติของอสุจิที่ผ่านกระบวนการเตรียมเชื้ออสุจิ (W) เปรียบเทียบกับอสุจิหลังผ่านกระบวนการแช่แข็งและละลายทั้งในกลุ่มที่ไม่ใส่ CoQ10 (W+F) และกลุ่มที่ใส่ CoQ10 (W+F+CoQ10)

Sperm characteristics	W	W+F	W+F+CoQ10
ความเข้มข้นของอสุจิ (Sperm concentration) ($10^6/\text{ml}$)	๑๔๖.๒๕ ± ๔๘.๕๕	๑๑๔.๖๒ ± ๓๑.๕๑*	๑๑๓.๕๗ ± ๓๖.๒๕*
อัตราการเคลื่อนไหว (%Sperm motility)	๘๖.๗๕ ± ๘.๓๓	๒๖.๓๕ ± ๑๒.๓๔*	๓๕.๖๐ ± ๑๔.๕๔*
อัตราอสุจิที่เคลื่อนไหวไปข้างหน้า (%Progressive motile)	๗๘.๕๕ ± ๖.๕๘	๑๙.๒๐ ± ๗.๕๙*	๒๖.๖๕ ± ๘.๘๗*
อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติ (%Normal morphology)	๑๖.๔๕ ± ๓.๖๑	๑๕.๒๒ ± ๒.๐๕	๑๕.๐๕ ± ๒.๙๕
อัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิ (Sperm-Hyaluronan binding assay (%HBA))	๗๘.๖๗ ± ๗.๔๐	๗๗.๑๕ ± ๘.๑๐	๗๗.๕๒ ± ๙.๐๗
อัตราอสุจิที่มีชีวิต (%Vitality)	๘๕.๕๗ ± ๖.๕๘	๕๕.๕๒ ± ๑๐.๕๕*	๕๖.๒๗ ± ๘.๙๓*
ความเสียหายของดีเอ็นเอ (DNA damage (μm))	๓.๔๒ ± ๒.๖๕	๙.๖๐ ± ๙.๖๖*	๗.๒๗ ± ๗.๖๓*

แสดงผล ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

หมายเหตุ * คือ ข้อมูลที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยค่า $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มอสุจิหลังการเตรียมเชื้ออสุจิ (W)

ผลการศึกษากลุ่มอสุจิหลังผ่านกระบวนการแช่แข็งและละลายในกลุ่มที่ใส่ CoQ10 (W+F+CoQ10) และไม่ใส่ CoQ10 (W+F) พบว่า ค่าความเข้มข้นของอสุจิ อัตราอสุจิที่มีชีวิต อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติ และอัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใส่ CoQ10 แต่อัตราการ

เคลื่อนไหวและอัตราการเคลื่อนไหวไปข้างหน้าของอสุจิมีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใส่ CoQ10 และมีค่าความเสียหายของดีเอ็นเอน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใส่ CoQ10 (ตารางที่ ๓)

ตารางที่ ๓ เปรียบเทียบคุณสมบัติของอสุจิหลังกระบวนการแช่แข็งและละลายในกลุ่มที่ไม่ใส่ CoQ10 (W+F) และกลุ่มที่ใส่ CoQ10 (W+F+CoQ10)

Sperm characteristics	W+F	W+F+CoQ10
ความเข้มข้นของอสุจิ (Sperm concentration) ($10^6/\text{ml}$)	๑๑๔.๖๒ ± ๓๑.๕๑	๑๑๓.๕๗ ± ๓๖.๒๕
อัตราการเคลื่อนไหว (%Sperm motility)	๒๖.๓๕ ± ๑๒.๓๔	๓๕.๖๐ ± ๑๔.๕๕*
อัตราอสุจิที่เคลื่อนไหวไปข้างหน้า (%Progressive motile)	๑๙.๒๐ ± ๗.๕๙	๒๖.๖๕ ± ๘.๘๗*
อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติ (%Normal morphology)	๑๕.๒๒ ± ๒.๐๕	๑๕.๐๕ ± ๒.๙๕
อัตราความสมบูรณ์ของการทำงานของอสุจิ (Sperm-Hyaluronan binding assay (%HBA))	๗๗.๑๕ ± ๘.๑๐	๗๗.๕๒ ± ๙.๐๗
อัตราอสุจิที่มีชีวิต (%Vitality)	๕๕.๕๒ ± ๑๐.๕๕	๕๖.๒๗ ± ๘.๘๓
ความเสียหายของดีเอ็นเอ (DNA damage (μm))	๙.๖๐ ± ๙.๖๖	๗.๒๗ ± ๗.๖๓*

แสดงผล ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

หมายเหตุ * คือ ข้อมูลที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยค่า $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มอสุจิหลังการเตรียมเชื้ออสุจิ (W)

วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา

กระบวนการแช่แข็งอสุจิเป็นการเก็บรักษาเชื้ออสุจิของชายที่มีภาวะมีบุตรยาก แต่ผลกระทบของกระบวนการแช่แข็งและการละลายนั้นอาจทำให้คุณภาพของอสุจิเปลี่ยนแปลงทั้งในเรื่องรูปร่าง อัตราการเคลื่อนไหว อัตราการรอดชีวิต และความเสียหายของดีเอ็นเอ เป็นต้น ซึ่งการแช่แข็งอสุจิแบบช้านั้นมีจุดสำคัญที่ต้องระวังคือ การเกิด thermal shock, osmotic shock การเกิด intracellular และ extracellular ice crystal, cell dehydration ซึ่งทั้งหมดนี้จะเป็นความเสียหายที่เกิดจากการแช่แข็งอสุจิ แต่การแช่แข็งอสุจิแบบเนื้อแก้วนั้นข้อดีคือ ไม่เกิดผลึกน้ำแข็งทั้งในเซลล์และนอกเซลล์เพราะเป็นการลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว ทำให้ลดความเป็นพิษที่จะเกิดขึ้นกับอสุจิ ลดการเกิด chilling injury อีกทั้งยังประหยัดเวลาและงบประมาณอีกด้วย^{๑๖} แต่การแช่แข็งอสุจิแบบเนื้อแก้วนั้นจะต้องใช้ Cryoprotectant ที่ความเข้มข้นค่อนข้างสูง (ร้อยละ ๓๐ - ๕๐) เมื่อเทียบกับการแช่แข็งแบบช้า และ Cryoprotectant นั้นถ้าใช้ในความเข้มข้นที่สูงก็ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้เช่นกัน^{๑๗}

จากผลการวิจัยในครั้งนี้พบว่าหลังจากที่ทำการเตรียมเชื้ออสุจินั้นพบว่า อัตราการเคลื่อนไหว อัตราอสุจิที่เคลื่อนไหวไปข้างหน้า อัตราความสมบูรณ์ของการทำงานของอสุจิ อัตราอสุจิที่มีชีวิตนั้น มีค่าเพิ่มขึ้นแต่ความเข้มข้นของอสุจิและความเสียหายของดีเอ็นเอ นั้นลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Donnelly ในปี ค.ศ. ๒๐๐๐ พบว่า หลังจากการเตรียมเชื้ออสุจินั้น ทำให้มีการเคลื่อนไหวของอสุจิดีขึ้นเมื่อเทียบกับอสุจิที่ยังไม่ได้ผ่านการเตรียมเชื้อ^{๑๘} และงานวิจัยของ Ahmad และคณะ ในปี ค.ศ. ๒๐๐๗ พบว่า น้ำเชื้อของคนปรกตินั้นเมื่อนำมาผ่านการเตรียมเชื้ออสุจิแล้วพบว่า มีอัตราการแตกหักของดีเอ็นเอลดลงเมื่อเทียบกับก่อนการเตรียมเชื้ออสุจิ^{๑๙} และงานวิจัยของ Petyim และคณะ ในปี ค.ศ. ๒๐๑๔ พบว่า การเตรียมเชื้ออสุจีก่อนการแช่แข็งนั้นเมื่อละลายอสุจิทำให้ลดการตายของเซลล์และคุณภาพอสุจิตีกว่าอสุจิที่ไปแช่แข็งก่อนแล้วจึงนำมาเตรียมเชื้ออสุจิ^{๒๐} จึงได้มีการรายงานว่าการเตรียมเชื้ออสุจีก่อนที่จะนำไปผ่านกระบวนการแช่แข็งนั้นจำเป็นต่อการรักษาคุณภาพและการทำงานของอสุจิที่จะนำมาใช้ในกระบวนการ ART^{๒๑, ๒๒}

เมื่อนำอสุจิที่เตรียมอสุจิแล้วไปเข้ากระบวนการแช่แข็ง และการละลายพบว่า ความเข้มข้นของอสุจิ อัตราการเคลื่อนไหว อัตราอสุจิที่เคลื่อนไหวไปข้างหน้าและอัตราอสุจิที่มีชีวิตลดลง แต่ความเสียหายของดีเอ็นเอมีค่าเพิ่มมากขึ้น เมื่อเทียบกับอสุจิที่ไม่ผ่านกระบวนการแช่แข็ง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Satirapod และคณะ ปี ค.ศ. ๒๐๑๒ ที่รายงานว่า อัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิ อัตราอสุจิที่มีชีวิตนั้นลดลง และความเสียหายของดีเอ็นเอมีค่าเพิ่มมากขึ้นเมื่อนำอสุจิไปผ่านกระบวนการแช่แข็ง^{๑๑} ที่งานวิจัยของ Vutyavanich และคณะ ปี ค.ศ. ๒๐๑๐ รายงานว่าอัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิ อัตราอสุจิที่มีชีวิตลดลง และอัตราอสุจิรูปร่างปกติไม่มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากผ่านกระบวนการแช่แข็ง^{๑๒} ซึ่งเป็นผลที่สอดคล้องกับงานวิจัยครั้งนี้ แต่อสุจิที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งไม่เกิดความเสียหายของดีเอ็นเอซึ่งผลขัดแย้งกับงานวิจัยนี้ สาเหตุอาจเนื่องมาจากการใช้วิธีการแช่แข็งอสุจิที่แตกต่างกันจึงทำให้ความเสียหายของดีเอ็นเอเกิดขึ้นต่างกัน สำหรับการวิจัยครั้งนี้ เมื่อใส่ CoQ10 ลงไปในน้ำยาแช่แข็งอสุจิพบว่า ความเข้มข้นของอสุจิ อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปกติ อัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิและอัตราอสุจิที่มีชีวิต ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างอสุจิหลังผ่านกระบวนการแช่แข็งและละลายในกลุ่มที่ไม่ใส่ CoQ10 (W+F) และกลุ่มที่ใส่ CoQ10 (W+F+CoQ10) แต่ในกลุ่มที่ใส่ CoQ10 อัตราการเคลื่อนไหว อัตราอสุจิที่เคลื่อนไหวไปข้างหน้า มีค่ามากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ใส่ CoQ10 และมีความเสียหายของดีเอ็นเอน้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ใส่ CoQ10 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Fakhridin MB และ Alsaadi RA ปี ค.ศ. ๒๐๑๔ ได้นำน้ำผึ้ง (ร้อยละ ๑๐) ใส่ลงในน้ำยาแช่แข็งอสุจิพบว่า สามารถช่วยเพิ่มคุณภาพอสุจิหลังการละลายได้^{๑๓} และยังมีอีกหลายงานวิจัยที่ได้นำสารต้านอนุมูลอิสระมาใส่ลงในน้ำยาแช่แข็งอสุจิพบว่า มีอัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิและอัตราการมีชีวิตของอสุจิสูงกว่าในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใส่สารต้านอนุมูลอิสระ อีกทั้งยังช่วยลดการแตกหักของดีเอ็นเอได้อีกด้วย^{๑๔, ๒๐, ๒๑} และยังมีงานวิจัยที่ศึกษาผลของ CoQ10 ต่อคุณภาพของอสุจิโดยให้คนไข้รับประทาน เช่น งานวิจัยของ Cakiroglu และคณะ ในปี ค.ศ. ๒๐๑๔ ที่ให้ชายที่มีภาวะมีบุตรยากรับประทาน CoQ10 ขนาด ๑๐๐ มิลลิกรัม ๒ ครั้งต่อวัน เป็นระยะเวลา ๖ เดือน นั้นสามารถช่วยเพิ่มการเคลื่อนไหวของอสุจิและสามารถช่วยเพิ่มอสุจิที่มีรูปร่างปกติ^{๒๒} ทั้งนี้ทั้งงานวิจัยนี้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของอสุจิที่มีรูปร่างปกติอาจเนื่องมาจากการสร้างและการทำให้เกิดรูปร่างของอสุจินั้นจะต้องเกิดขึ้นในอันทะ

ดังนั้นการที่ใส่ CoQ10 ลงในน้ำยาแช่แข็งนั้นจึงไม่สามารถช่วยเกี่ยวกับรูปร่างของอสุจิได้ แต่อย่างไรก็ตาม การที่อสุจิในกลุ่มที่ใส่ CoQ10 ลงในน้ำยาแช่แข็งสามารถช่วยเพิ่มการเคลื่อนไหวได้ อาจเป็นเพราะ CoQ10 ที่ใส่ลงไปนั้นผ่านสู่ผนังเซลล์ของอสุจิเข้าไปยังบริเวณไมโทคอนเดรียซึ่ง CoQ10 ทำหน้าที่ในการพาอิเล็กตรอนเข้าสู่ไมโทคอนเดรีย ทำให้มีการสร้างพลังงานเพิ่มมากขึ้น จึงส่งผลให้อสุจิมีการเคลื่อนไหวมากขึ้นตามไปด้วย

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การเติม CoQ10 ลงในน้ำยาแช่แข็งอสุจิ สามารถช่วยเพิ่ม อัตราการเคลื่อนไหว อัตราอสุจิที่เคลื่อนไหวไปข้างหน้า อีกทั้งยังช่วยลดการเกิดการแตกหักของดีเอ็นเอ ในกระบวนการแช่แข็งและละลายอสุจิ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการรักษาผู้มีบุตรยาก ที่มีสาเหตุมาจากฝ่ายชาย โดยใช้เทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๗ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่หน่วยมีบุตรยาก โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ และคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ที่ให้ความอนุเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

๑. วีระพร วุฒยวนิช. การแช่แข็งแบบเนื้อแก้วในเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์. เชียงใหม่: สันติภาพแพ็คพริ้น; ๒๕๕๖. หน้า ๙๖-๙๘.
๒. Said TM, Gaglani A, Agarwal A. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reprod Biomed Online* 2010;21:456-62.
๓. Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. Human sperm cryopreservation: Update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. *Advances in urology* 2012;2012:854837.
๔. Kalthur G, Raj S, Thiagarajan A, Kumar S, Kumar P, Adiga SK. Vitamin E supplementation in semen-freezing medium improves the motility and protects sperm from freeze-thaw-induced DNA damage. *Fertil Steril* 2011;95:1149-51.

๕. Makker K, Agarwal A, Sharma R. Oxidative stress & male infertility. *Indian J Medl Res* 2009;129:357-67.
๖. Lewin A, Lavon H. The effect of coenzyme Q10 on sperm motility and function. *Mol Aspects Med* 1997;18 Suppl:S213-9.
๗. World Health Organization DoRHaR. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010.
๘. Charehjooy N, Najafi MH, Tavalae M, Deemeh MR, Azadi L, Shiravi AH, et al. Selection of sperm based on hypo-osmotic swelling may improve ICSI outcome: A preliminary prospective clinical trial. *Int J Fertil Steril* 2014;8:21-8.
๙. Nijs M, Creemers E, Cox A, Janssen M, Vanheusden E, Castro-Sanchez Y, et al. Influence of freeze-thawing on hyaluronic acid binding of human spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2009;19:202-6.
๑๐. Shamsi MB, Venkatesh S, Tanwar M, Singh G, Mukherjee S, Malhotra N, et al. Comet assay: a prognostic tool for DNA integrity assessment in infertile men opting for assisted reproduction. *Indian J Med Res* 2010;131:675-81.
๑๑. Satirapod C, Treetampinich C, Weerakiet S, Wongkularb A, Rattanasiri S, Choktanasiri W. Comparison of cryopreserved human sperm from solid surface vitrification and standard vapor freezing method: on motility, morphology, vitality and DNA integrity. *Andrologia* 2012;44:786-90.
๑๒. Saki G, Rahim F, Zergani MJ. Vitrification of small volume of normal human sperms: Use of open pulled straw carrier. *J Med Sci* 2009;9:30-5.
๑๓. Moskovtsev S, Lulat A, Librach C. Cryopreservation of human spermatozoa by vitrification vs. slow freezing: Canadian experience: INTECH Open Access Publisher; 2012.
๑๔. Donnelly ET, O'Connell M, McClure N, Lewis SE. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. *Hum Reprod* 2000;15:1552-61.
๑๕. Ahmad L, Jalali S, Shami SA, Akram Z. Sperm preparation: DNA damage by comet assay in normo- and teratozoospermics. *Arch Androl* 2007;53:325-38.
๑๖. Petyim S, Neungton C, Thanaboonyawat I, Laokirkkiat P, Choavaratana R. Sperm preparation before freezing improves sperm motility and reduces apoptosis in post-freezing-thawing sperm compared with post-thawing sperm preparation. *J Assis Reprod Genet* 2014; 31:1673-80.
๑๗. Allamaneni SS, Agarwal A, Nallella KP, Sharma RK, Thomas AJ, Jr., Sikka SC. Characterization of oxidative stress status by evaluation of reactive oxygen species levels in whole semen and isolated spermatozoa. *Fertil Steril* 2005;83:800-3.
๑๘. Vutyavanich T, Piromlertamorn W, Nunta S. Rapid freezing versus slow programmable freezing of human spermatozoa. *Fertil Steril* 2010;93:1921-8.
๑๙. Fakhridin MB, Alsaadi RA. Honey supplementation to semen-freezing medium improves human sperm parameters post-thawing. *J Family Reprod Health* 2014; 8:27-31.
๒๐. Farhmani MA. The effects of antioxidant supplement on human sperm after the freezing-thawing process. *Iran J Reprod Med* 2014;12:53.
๒๑. Gadea J, Molla M, Selles E, Marco MA, Garcia-Vazquez FA, Gardon JC. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology* 2011;62:40-6.
๒๒. Cakiroglu B, Eyyupoglu SE, Gozukucuk R, Uyanik BS. Ubiquinol effect on sperm parameters in subfertile men who have astheno-teratozoospermia with normal sperm concentration. *Nephrourology Mon* 2014;6:e16870.

Abstract

Effects of coenzyme Q10 added in freezing medium on sperm quality and DNA fragmentation after vitrification in normozoospermia

Kadenisa Norasingha*, Charoenchai Chiamchanya**, Pachara Visutakul***, Treetip Ratanavalachai****

* Candidate for M.Sc., Faculty of Medicine, Thammasat University

** Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Thammasat University

*** Graduate Academy, Faculty of Medicine, Thammasat University

**** Department of Preclinical Science, Faculty of Medicine, Thammasat University

Introduction: Semen cryopreservation is a process to preserve male fertility. However, after thawing, spermatozoa motility decreased 25 - 75 percents. Furthermore, it also caused DNA fragmentation of spermatozoa. Some studies used antioxidant supplement in freezing medium to increase sperm function and decrease DNA fragmentation. However, there were only few researchs and the conclusion was still not clear. Therefore, we were interested to study further the effect of coenzyme Q10 added in freezing medium on sperm quality and DNA fragmentation.

Method: Sperm from 40 normospermic male volunteers were divided into 4 groups. Group 1: neat semen (unwashed: UW), group 2: sperm preparation (washed: W), group 3: sperm preparation and frozen (washed and frozen: W+F), group 4: sperm preparation and frozen with coenzyme Q10 50 μ M added (W+F+CoQ10). The semen quality of these four groups were compared i.e. semen analysis, vitality by hypo-osmotic swelling test (HOS), function of spermatozoa by Hyaluronan binding assay (HBA) and DNA damage by comet assay.

Result: Sperm concentration, morphology, vitality and HBA were not significantly changed. Significant increase in motility and progressive motility and decrease in DNA fragmentation were found in the group washed and freezed with coenzyme Q10 compared to the group washed and freezed without coenzyme Q10 supplement.

Discussion and Conclusion: Adding coenzyme Q10 into freezing medium resulted in significant increased sperm motility and progressive motility and decreased DNA fragmentation.

Key words: Sperm cryopreservation, Coenzyme Q10, DNA fragmentation