นิพนธ์ต้นฉบับ

ผลของการเติมโคเอนไซม์คิวเทนในน้ำยาแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว ต่ออัตราการรอดชีวิตของไข่มนุษย์ที่เลี้ยงภายนอกร่างกายจนเจริญเต็มที่

นพรัตน์ จันสนธิ*, เจริญไชย เจียมจรรยา**, พัชรา วิสุตกุล***

บทคัดย่อ

บทนำ: ภาวะมีบุตรยากส่งผลกระทบต่อความสุขสมบูรณ์ของครอบครัว ทำให้ผู้คนหันมาสนใจด้านเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์มากขึ้น หนึ่งในเทคโนโลยีที่ได้รับความสนใจคือ การแช่แข็งไข่ซึ่งถือเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเก็บรักษาภาวะเจริญพันธุ์ของหญิงที่เสี่ยงต่อการสูญเสียการทำงานของรังไข่ แต่ก็พบปัญหาสำคัญคือการรอดชีวิตของไข่แช่แข็งภายหลังการละลายยังมีอัตราการรอดชีวิตค่อนข้างต่ำ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาผลของโคเอนไซม์คิวเทนในการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของไข่ภายหลังผ่านกระบวนการแช่แข็ง

วิธีการศึกษา: นำไข่อ่อนบริจาคที่ได้รับจากผู้เข้ารับการรักษาภาวะมีบุตรยากโดยเพาะเลี้ยงจนสุกสมบูรณ์เต็มที่แล้วแบ่งการทดลองออกเป็น ๒ กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมเป็นกลุ่มที่ไม่ใส่โคเอนไซม์คิวเทนลงในน้ำยาแช่แข็ง (no co-enzyme Q10) กลุ่มทดลอง คือ กลุ่มที่ใส่โคเอนไซม์คิวเทนลงในน้ำยาแช่แข็ง (30 μM co-enzyme Q10)

ผลการศึกษา: พบว่า กลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง ไม่มีความแตกต่างกันในเรื่องของอัตราการรอดชีวิต แต่พบว่ากลุ่มที่ได้รับ 30 μM co-enzyme Q10 supplement มีระดับสารอนุมูลอิสระ (Reactive oxygen species: ROS) น้อยกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา: การเติมสารโคเอนไซม์คิวเทนไม่มีผลต่อการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของไข่ แต่ลดระดับสารอนุมูลอิสระที่อาจก่อให้เกิดความเสียหายต่อไข่

คำสำคัญ: ภาวะมีบุตรยาก, การแช่แข็งไข่เนื้อแก้ว, อัตราการรอดชีวิต, สารอนุมูลอิสระ, โคเอนไซม์คิวเทน

วันที่รับบทความ: ๑๙ พฤษภาคม ๒๕๕๘ **วันที่อนุญาตให้ตีพิมพ์: ๒ มิถุนายน ๒๕๕๘**

* นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

** ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

*** งานบัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

บทนำ

ในปัจจุบันต้องยอมรับว่า ภาวะมีบุตรยากส่งผลกระทบต่อความสุขสมบูรณ์ของครอบครัวเพราะคู่สมรสส่วนใหญ่เมื่อแต่งงานแล้วย่อมมุ่งหวังที่จะมีบุตร แต่ส่วนหนึ่งเมื่อพยายามแล้วก็ยังไม่สามารถมีบุตรได้ คู่สมรสเหล่านี้ มักจะรู้สึกมีปมด้อยสิ้นหวังหรือเสียใจ[๑] ด้วยปัจจัยต่างๆ เหล่านี้ทำให้ผู้คนหันมาสนใจด้านเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์มากขึ้นและมีการพัฒนาศึกษาวิจัยทางด้านนี้มากขึ้นตามไปด้วย หนึ่งในเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ที่ได้รับความสนใจคือการแช่แข็ง โดยการแช่แข็งมีทั้งการแช่แข็งตัวอ่อน การแช่แข็งไข่ และการแช่แข็งอสุจิ ซึ่งการแช่แข็งก็คือ การเก็บรักษาเซลล์ไว้ในถังเก็บไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ -๑๙๖ องศาเซลเซียส ทำให้เกิดการเย็นตัวลงอย่างรวดเร็วและหยุดปฏิกิริยาทุกอย่างของเซลล์ไว้ หรือเรียกว่า หยุดนาฬิกาชีวภาพ จึงสามารถเก็บรักษาไว้ได้นานหลายปี จนกว่าจะพร้อมนำออกมาใช้งานอีกครั้ง[๒] แต่ในที่นี้จะขอกล่าวเน้นในเรื่องของการแช่แข็งไข่ ซึ่งถือเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ ในการเก็บรักษาภาวะเจริญพันธุ์ของผู้หญิงที่เสี่ยงต่อการสูญเสียการทำงานของรังไข่ก่อนวัยอันควร เช่น หญิงที่เป็นโรคที่มีผลต่อการทำงานของรังไข่ ได้แก่ ภาวะเยื่อบุโพรงมดลูกเจริญผิดที่ มีถุงน้ำรังไข่และการอักเสบในอุ้งเชิงกราน หรือในหญิงที่เป็นมะเร็งที่ต้องรักษาด้วยวิธีเคมีบำบัดหรือรังสีบำบัด โดยเฉพาะในรายที่ยังโสด หรือแต่งงานช้า และยังช่วยในกรณีที่คู่สามีภรรยาที่เข้ารับการรักษาด้วยกระบวนการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย เมื่อทำการเก็บไข่จากฝ่ายหญิงแล้วแต่ฝ่ายชายไม่สามารถเก็บเชื้ออสุจิได้จึงต้องทำการแช่แข็งไข่เก็บไว้ก่อน[๓] โดยการแช่แข็งสามารถแบ่งออกเป็น ๒ ชนิดหลักๆ คือ วิธีการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆ ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (slow programmable freezing) และวิธีแช่แข็งโดยการลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว เช่น การแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว (vitrification)

ถึงแม้ว่าเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ในการแช่แข็งจะมีการพัฒนาไปไกล แต่ก็พบปัญหาหลักที่สำคัญเกิดขึ้นคือ การรอดชีวิตของไข่ที่แช่แข็งภายหลังการละลายยังมีอัตราการรอดชีวิตค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับการแช่แข็งตัวอ่อน โดยแต่เดิมเคยเชื่อว่าไข่ในระยะ metaphase II ไม่สามารถแช่แข็งได้ เพราะ metaphase spindle จะถูกทำลายอย่างถาวรซึ่งเกิดจากผลึกน้ำแข็ง เมื่อมีการตกไข่ ไข่จะอยู่ในระยะ metaphase II ซึ่งในระยะนี้ไข่จะมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ อีกหนึ่งสาเหตุสำคัญที่ทำให้อัตราการรอดชีวิตต่ำภายหลังการแช่แข็งไข่คือ การเกิดสารอนุมูลอิสระ reactive oxidation species (ROS) เชื่อว่าเมื่อเกิด ROS จะส่งผลกระทบมากมายกับเซลล์ ทั้ง mitochondrial damage, adenosine triphosphate (ATP) depletion และเกิดการเปลี่ยนแปลงของ calcium oscillation ในช่วงของการปฏิสนธิซึ่งเป็นผลทำให้การแช่แข็งไข่ไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร[๔]

เห็นได้ชัดว่า เมื่อเกิดปัญหาในจุดใดจุดหนึ่งจะส่งผลไปยังจุดอื่นๆ ต่อกันไปเรื่อยๆ ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาหาแนวทางแก้ไขปัญหาดังกล่าว ด้วยคุณสมบัติของโคเอนไซม์คิวเทนนั้นมีความสำคัญกับปฏิกิริยารีดอกซ์ ซึ่งเป็นปฏิกิริยาเกี่ยวกับการรับส่งอิเล็กตรอน โดยทำหน้าที่ร่วมในการขนส่งต่ออิเล็กตรอนภายใน lipid bilayer โดยทั่วไปโคเอนไซม์คิวเทนจะกระจายอยู่ในส่วน hydrophobic portion ของเยื่อหุ้มไมโตคอนเดรีย ซึ่งมีส่วนช่วยในกระบวนการ oxidation ของสารอาหารภายในเซลล์เพื่อสร้าง adenosine triphosphate (ATP) และมีหน้าที่หลักคือพาอิเล็กตรอนผ่านเข้าสู่ไมโตคอนเดรียและสร้างพลังงานให้แก่เซลล์[๕] ในกระบวนการสร้างพลังงานนอกจากจะเป็นการสร้างพลังงานให้แก่เซลล์แล้ว ยังทำให้เกิด reactive oxygen species (ROS) หรือสารอนุมูลอิสระ โดยสารอนุมูลอิสระนี้จะอยู่ในรูปของ free radical ซึ่งในกระบวนการ electron transport chain ที่เกิดขึ้นในไมโตคอนเดรียนั้นในขั้นตอนของการขนส่งอิเล็กตรอน จะมีโอกาสที่อิเล็กตรอนหลุดรั่วออกมาในกระบวนการขนส่งและเมื่อมีอิเล็กตรอนรั่วออกมา free radical นี้จะเข้าไปแย่งชิงอิเล็กตรอน โมเลกุลนั้นเพื่อให้ตัวมันเองอยู่ในรูปที่เสถียรซึ่งจะเกิดการแย่งชิงอิเล็กตรอนไปเรื่อยๆ เป็นการเพิ่มปริมาณสารอนุมูลอิสระ ดังนั้น โคเอนไซม์คิวเทนเป็นเอนไซม์หลักที่สำคัญในการทำหน้าที่รับส่งอิเล็กตรอนให้สมบูรณ์แบบที่สุดเพื่อที่จะไม่ให้มีอิเล็กตรอนหลุดรั่วออกมาจากกระบวนการ จะเห็นได้ว่า ปริมาณของโคเอนไซม์คิวเทนนั้น ต้องมีในปริมาณที่มากพอเพื่อให้เกิดการทำงานภายในไมโตคอนเดรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ[๖]

การวิจัยเป็นการศึกษาทดลองทางคลินิก โดยวัตถุประสงค์ของงานวิจัยคือ วัตถุประสงค์หลัก เพื่อศึกษาเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของไข่ที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วระหว่างกลุ่มที่ให้โคเอนไซม์คิวเทนและกลุ่มที่ไม่ได้ให้โคเอนไซม์คิวเทน และวัตถุประสงค์รอง เพื่อเปรียบเทียบระดับการเกิดสารอนุมูลอิสระของไข่ที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วระหว่างกลุ่มที่ให้โคเอนไซม์คิวเทนและกลุ่มที่ไม่ได้ให้โคเอนไซม์คิวเทน

วิธีการศึกษา

การศึกษาเป็นแบบ Randomized controlled trial คือ กลุ่มตัวอย่างที่ได้ มาจากการสุ่มทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองโดยจะทำการเปลี่ยนกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมสลับกันไปเรื่อยๆ จนครบตามจำนวนที่กำหนด

การกำหนดกลุ่มตัวอย่าง

การได้มาของไข่อ่อน (immature oocyte) จะนำมาจากห้องปฏิบัติการคลินิกผู้มีบุตรยาก โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ โดยจะเป็นไข่อ่อนที่คัดเลือกออกจากกลุ่มที่ใช้งานจริงของคนไข้ที่เข้ารับการรักษาภาวะมีบุตรยาก ซึ่งเป็นไข่อ่อนระยะ Germinal vesicle stage (GV-stage) หรือ Metaphase I (MI-stage) โดยจะต้องได้รับการเซ็นยินยอมบริจาคไข่เพื่อใช้ในงานวิจัยจากคนไข้ที่เข้ามารับการรักษา

การคัดอาสาสมัครเข้าโครงการ

ผู้ป่วยหญิงที่เข้ารับการรักษาภาวะมีบุตรยากของคู่สมรสที่แต่งงานกันแล้วระยะเวลา ๑ ปี ถึง ๑ ปีครึ่ง มีเพศสัมพันธ์สม่ำเสมอ สัปดาห์ละ ๒ - ๓ ครั้งต่อสัปดาห์ แล้วยังไม่ตั้งครรภ์

๑) ล้มเหลวจากการฉีดเชื้อ (IUI) อย่างน้อย ๓ รอบ

๒) มีข้อบ่งชี้การทำเด็กหลอดแก้ว (IVF) เช่น ท่อนำไข่ตัน เชื้อสามีไม่แข็งแรง

กลุ่มตัวอย่างจะถูกสุ่มแบ่งออกเป็น ๒ กลุ่ม

กลุ่มควบคุม คือ กลุ่มที่ไม่ใส่โคเอนไซม์คิวเทนลงในการทดลอง

กลุ่มทดลอง คือ กลุ่มที่ใส่โคเอนไซม์คิวเทนลงในการทดลองความเข้มข้น ๓๐ ไมโครโมลาร์ คำนวณขนาดตัวอย่างด้วยวิธีที่พารามิเตอร์เป็นเชิงปริมาณ โดยในการทดลองมีทั้งหมด ๒ กลุ่ม จะได้กลุ่มละ ๓๓ ใบ รวม ๖๖ ใบ

ในการทดลองจะแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น ๒ กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง ซึ่งทั้งสองกลุ่มจะเข้าสู่กระบวนการแช่แข็งไข่แบบเนื้อแก้ว (vitrification) และวัดผลโดยการเปรียบเทียบดูอัตราการรอดชีวิต (survival rate) โดยการย้อมสี fluorescein diacetate (FDA) เพื่อตรวจสอบอัตราการรอดชีวิต (viability) ของไข่ในแต่ละกลุ่ม และนำไปส่องเพื่อตรวจสอบอัตราการรอดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีแสงอุลตราไวโอเลต โดยไข่อ่อนที่ติดสีเรืองแสงสีเขียวแสดงว่าเป็นไข่ที่มีชีวิต ส่วนไข่อ่อนที่ไม่ติดสี แสดงว่า เป็นไข่ตาย รวมทั้งนำไข่มาตรวจดู meitotic spindle โดยการใช้เครื่องมือ Oosight TM Imaging System ในการตรวจวิเคราะห์ผลของแต่ละกลุ่ม อีกทั้งทำการตรวจวัดระดับ ROS โดยใช้ชุดทดสอบ Image-iT ™ LIVE Green Reactive Oxygen Species Detection Kit (I36007) ในการตรวจและนำผลมาเปรียบเทียบกันในแต่ละกลุ่มเพื่อแสดงผลของกลุ่มที่มีการใส่โคเอนไซม์คิวเทนเข้าไปในน้ำยาแช่แข็งไข่นั้น มีส่วนช่วยทำให้ระดับของ ROS มีปริมาณน้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ใส่โคเอนไซม์คิวเทนหรือไม่

๑. การเพาะเลี้ยงไข่อ่อนให้เจริญเติบโตเป็นไข่ที่สมบูรณ์

นำไข่อ่อนระยะ GV-stage หรือ MI-stage ไป culture ให้เป็น mature oocyte (metaphase II stage) โดยผ่านกระบวนการ IVM culture โดยใช้ IVM medium (IVM medium (Medicult) + 100 µl FSH solution 75 mIU/ml + 10 µl hCG solution 100 mIU/ml + 5% Human serum albumin) ทำการเลี้ยงที่ ๓๗ องศาเซลเซียส, 5% CO2 โดย MI-stage จะใช้เวลาในการเลี้ยง ๒๔ ชั่วโมง และ GV-stage ใช้เวลา ๔๘ ชั่วโมงจะได้ mature oocyte และเมื่อได้ mature oocyte ก็จะสุ่มตัวอย่างโดยใช้วิธี random sampling เพื่อแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น ๒ กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่โคเอนไซม์คิวเทน และกลุ่มทดลองที่ใส่โคเอนไซม์คิวเทนที่ความเข้มข้น ๓๐ ไมโครโมลาร์

๒. กระบวนการแช่แข็งไข่แบบเนื้อแก้ว (vitrification)

หลังจากนั้นจะเข้าสู่กระบวนการแช่แข็งไข่แบบเนื้อแก้ว (vitrification) เริ่มต้นจากนำโคเอนไซม์คิวเทนที่ชั่งไว้ผสมกับน้ำยาแช่แข็งไข่ (cryoprotectant) เพื่อเตรียมน้ำยาแช่แข็งที่ความเข้มข้น ๓๐ ไมโครโมลาร์ โดยน้ำยาแช่แข็งทั้งชุดจะมี ๒ ชนิด คือ equilibrium solution (V1: JY Vitrification) และ vitrification solution (V2: JY Vitrification) ซึ่งในการผสมน้ำยาแช่แข็งจะใส่โคเอนไซม์คิวเทนลงในน้ำยา vitrification solution (V2) เท่านั้นเพราะในส่วนประกอบของน้ำยา V2 มี ethylene glycol (EG) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการเป็นตัวทำละลายโคเอนไซม์คิวเทน และเมื่อได้น้ำยาแช่แข็งผสมโคเอนไซม์คิวเทนที่ต้องการแล้ว นำเข้าสู่กระบวนการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วต่อไป โดยเริ่มจากนำน้ำยาแช่แข็งทั้ง ๒ ชนิดไปอุ่นที่ ๓๗ องศาเซลเซียสก่อน เพื่อป้องกันไม่ให้ไข่เกิดภาวะช็อคจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิกะทันหัน จากนั้นย้ายไข่ที่ต้องการแช่แข็งลงในน้ำยาตัวแรกซึ่งเป็น equilibrium solution (V1) ซึ่งจะเห็นการเหี่ยวลงของไข่อย่างชัดเจนเนื่องจากน้ำยา V1 มีความเข้มข้นของสารละลายที่สูงกว่าไซโตพลาสซึมของไข่มากแต่เมื่อทิ้งไว้นาน ๕ นาทีจะเห็นไข่กลับคืนสู่สภาพปรกติ จากนั้นย้ายไข่ลงในน้ำยา vitrification solution (V2 JY Vitrification) ทิ้งไว้ ๑.๓๐ นาที แล้วจึงรีบนำไข่มาวางลงบนภาชนะบรรจุไข่แช่แข็งซึ่งในการทดลองนี้เลือกใช้ cryotop (ต้องรีบ

วางภายใน ๑ นาที) โดยให้มีปริมาตรน้ำยาติดมาด้วยเพียง ๑ ไมโครลิตรหรือน้อยกว่า และรีบจุ่มลงในอ่างที่มีไนโตรเจนเหลวอยู่ทันที จากนั้นนำ cryotop สอดเข้ากับปลอกสวมที่แช่ไว้ในอ่างไนโตรเจนเหลว แล้วจึงย้ายลงเก็บในถังไนโตรเจนเหลวเพื่อเก็บรักษาไว้จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

๓. ขั้นตอนกระบวนการละลายไข่แช่แข็ง (Thawing)

ใช้เวลาในการเก็บตัวอย่าง ๖ เดือน ให้ครบ ๖๖ ใบ เมื่อครบจำนวนตัวอย่างที่ต้องการ จึงนำไข่แช่แข็งมาละลาย (Thawing) โดยจะทำการละลายครั้งละ ๑๑ ใบ ซึ่งในแต่ละกลุ่มจะทำทั้งหมด ๓ รอบดังนั้นจำนวนครั้งที่ทดลอง (number of replicates) ของทั้ง ๒ กลุ่มรวม ๖ ครั้ง ในขั้นตอนการละลายจะเตรียมน้ำยาละลาย thawing solution ลงใน 4-well plate นำน้ำยาละลาย (JY Thawing solution) ซึ่งมี ๔ ชนิด (T1, T2, T3, T4) นำมาอุ่นที่ ๓๗ องศาเซลเซียสในขั้นตอนการละลายไข่เริ่มจากนำไข่ที่แช่แข็งออกจากถังบรรจุไนโตรเจนเหลว แล้วนำ cryotop จุ่มลงในหลุมแรกที่มี thawing solution (T1) แล้วตรวจดูว่าไข่อยู่ในหลุมหรือไม่ซึ่งจะเห็นไข่อยู่บนปลายของ cryotop และค่อยๆ หลุดลงมาใน well จากนั้นย้ายลง (T2) นาน ๓ นาที และย้ายไปหลุม (T3) อีก ๓ นาที จึงย้ายลงน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน (T4) โดยล้างอีก ๒ - ๓ ครั้ง และตรวจดูว่าไข่รอดดีหรือไม่ ตามเกณฑ์วิเคราะห์ลักษณะทางกายภาพ (morphology) เพื่อตัดสินการรอดชีวิตของไข่[๗] และการย้อมสีเพื่อตรวจสอบอัตราการรอดชีวิต (oocyte viability) ก่อนจะเก็บเข้าตู้ incubator

๔. ตรวจสอบอัตราการรอดชีวิต (Viability)

นอกจากการดูลักษณะทางกายภาพของไข่ภายหลังการละลายแล้วผู้วิจัยจะทำการวัดผลโดยการเปรียบเทียบดูอัตราการรอดชีวิต โดยการย้อมสี fluorescein diacetate (FDA) เพื่อตรวจสอบอัตราการรอดชีวิตของไข่ในแต่ละกลุ่มซึ่งในขั้นตอนนี้จะเป็นการประเมินตัดสินอัตราการรอดชีวิตที่ให้ผลชัดเจนยิ่งขึ้นกว่าการดูเพียงลักษณะทางกายภาพเนื่องจากในบางกรณีไข่ที่ลักษณะทางกายภาพที่ดูรอดชีวิตในบางครั้งพบว่าจริงๆ แล้วเซลล์ไข่นั้นตายเพียงแต่ยังไม่แสดงลักษณะภายนอกออกมาอย่างชัดเจน โดยจะนำเซลล์ไข่นำไข่ไปย้อมด้วย ๒.๕ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร FDA (Sigma F-7378) ที่อุณหภูมิ ๓๘.๕ องศาเซลเซียส นาน ๒ นาที แล้วจึงนำไปส่องเพื่อตรวจสอบอัตรารอดชีวิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับที่มีแสงอุลตราไวโอเลต โดยไข่ที่ติดสีเรืองแสงสีเขียวแสดงว่าเป็นไข่ที่มีชีวิต ส่วนไข่ที่ไม่ติดสี แสดงว่าเป็นไข่ตาย[๘]

๕. การตรวจ Meiotic spindle ด้วยเครื่องมือ Oosight TM Imaging System

หลังจากตรวจดูอัตราการรอดชีวิตของไข่จากทุกๆ กลุ่ม แล้วบันทึกผล จากนั้นจะนำไข่ทั้งหมดมาตรวจ meiotic spindle ด้วยเครื่องมือ Oosight TM Imaging System โดยเป็นการตรวจวิเคราะห์ตำแหน่งองศาของ meitotic spindle เพื่อดูว่าไข่ที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งนั้นมีความผิดปรกติหรือไม่[๙] โดยจะแบ่งตามเกรด เพื่อเปรียบเทียบกันทั้ง ๒ กลุ่ม รวมทั้งตรวจวัดระดับสารอนุมูลอิสระ (ROS) เพื่อนำผลมาเปรียบเทียบกันในแต่ละกลุ่ม

๖. การตรวจวัดระดับสารอนุมูลอิสระ reactive oxidation species (ROS)

๖.๑ Induction of cellular ROS production with tert-Butyl hydroperoxide (TBHP)

๖.๑.๑ เตรียม ๑๐๐ มิลลิโมลาร์ stock solution ของ TBHP ใส่ TBHP ๑.๐ ไมโครลิตร ลงในน้ำบริสุทธิ์ (High-purify water) ๗๗ ไมโครลิตร จะทำให้ stock solution มีความเข้มข้นเป็น ๑๐๐ มิลลิโมลาร์ โดยจะต้องใช้ปิเปตต์ดูดเพราะ TBHP ค่อนข้างหนืด

๖.๑.๒ เตรียม ๑๐๐ มิลลิโมลาร์ working solution ของ TBHP โดยเตรียมจาก ๑๐๐ มิลลิโมลาร์ TBHP stock solution (เหมือนที่เตรียมในข้อ ๖.๑.๑) ในอัตราส่วน ๑:๑,๐๐๐ คือ ดูด ๑๐๐ มิลลิโมลาร์ TBHP มา ๑ ไมโครลิตรต่อน้ำบริสุทธิ์ (High-purify water) ๙๙๙ ไมโครลิตร จะได้ ๑๐๐ มิลลิโมลาร์ working solution

๖.๑.๓ Induce ROS production ภายในเซลล์ โดยวางเซลล์ไข่ที่ต้องการนำมาตรวจไว้บนสไลด์และหยด ๑๐๐ ไมโครโมลาร์ TBHP working solution (ที่เตรียมในข้อ ๖.๑.๒) เพื่อให้เซลล์ยึดเกาะกับสไลด์ จากนั้นนำไป incubate ที่ ๓๗ องศาเซลเซียส, 5% CO_2 นาน ๖๐ - ๙๐ นาที ซึ่งในขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่สำคัญมากสำหรับการ ROS production ในเซลล์ และภายหลังจากการ TBPH induction แล้วจะเข้าสู่การ label cell ด้วย carboxy-H2DCFDA

๖.๑.๔ Wash cell ก่อนที่จะนำเซลล์ไป label จะทำการล้างเซลล์ ๒ ครั้งใน HBSS/Ca/Mg

๖.๒ ROS labeling with carboxy-H2DCFDA

๖.๒.๑ เตรียม ๑๐ มิลลิโมลาร์ carboxy-H2DCFDA (stock solution) เติม ๕๐ ไมโครลิตร ของ DMSO ลงใน vial ของ carboxy-H2DCFDA (๒๗๕ ไมโครกรัม) ซึ่งจะได้ ๑๐ มิลลิโมลาร์ carboxy-H2DCFDA (stock solution) แล้วนำไป vortex

๖.๒.๒ เตรียม ๒๕ ไมโครโมลาร์ carboxy-H2DCFDA working solution นำ ๑๐ มิลลิโมลาร์ carboxy-H2DCFDA stock solution (ที่เตรียมไว้ในข้อ ๖.๒.๑) ดูดมา ๒ ไมโครลิตร ใส่ลงใน buffer (HBSS/Ca/Mg) ซึ่งมีอยู่ ๒ มิลลิลิตร

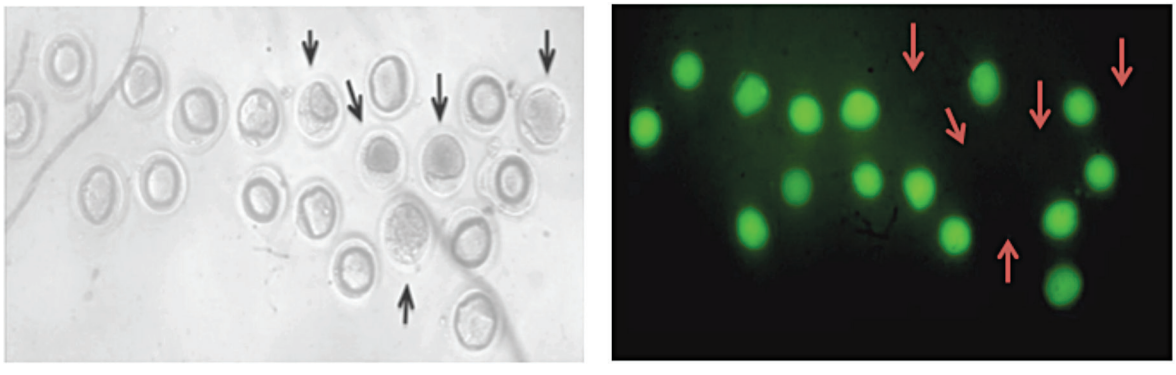
๖.๒.๓ Label cell โดยนำ ๒๕ ไมโครโมลาร์ carboxy-H2DCFDA working solution ในข้อ ๖.๒.๒ นำมาหยดลงบนเซลล์แล้วปิดด้วย coverslip แล้วนำไป incubation ๓๗ องศาเซลเซียสนาน ๓๐ นาที โดยเก็บให้พ้นจากแสง

๖.๒.๔ (Optional) Counterstain with Hoechst 33342 จะมีการใส่ Hoechst 33342 ลงไป ๑.๐ ไมโครโมลาร์ เพื่อเพิ่มความเข้มข้นในช่วงท้ายของการ incubate ของ carboxy-H2DCFDA ในช่วง ๕ นาทีสุดท้ายของข้อ ๖.๒.๓ โดยความเข้มข้นของ Hoechst 33342 ที่ให้มีความเข้มข้น ๑.๐ มิลลิโมลาร์ ดังนั้นทุกๆ ๑.๐ มิลลิลิตรของ carboxy-H2DCFDA จะใส่ Hoechst 33342 ลงไป ๑.๐ ไมโครลิตร

๖.๒.๕ Wash cell ภายหลังจากการ incubate จะล้างเซลล์ให้ coverslip หลุดออกโดยค่อยๆ ล้างประมาณ ๓ ครั้งใน HBSS/Ca/Mg buffer

๖.๒.๖ Mount in warm buffer and image immediately เพื่อให้ผลการทดลองดีที่สุดควรทำทันทีหลังจากล้างเซลล์ในข้อ ๖.๒.๕ โดยทำการติดฉลากสี molecular probe (Hoechst 33342) การเห็นสีของ fluorescence ภายใต้กล้อง Stereo microscope

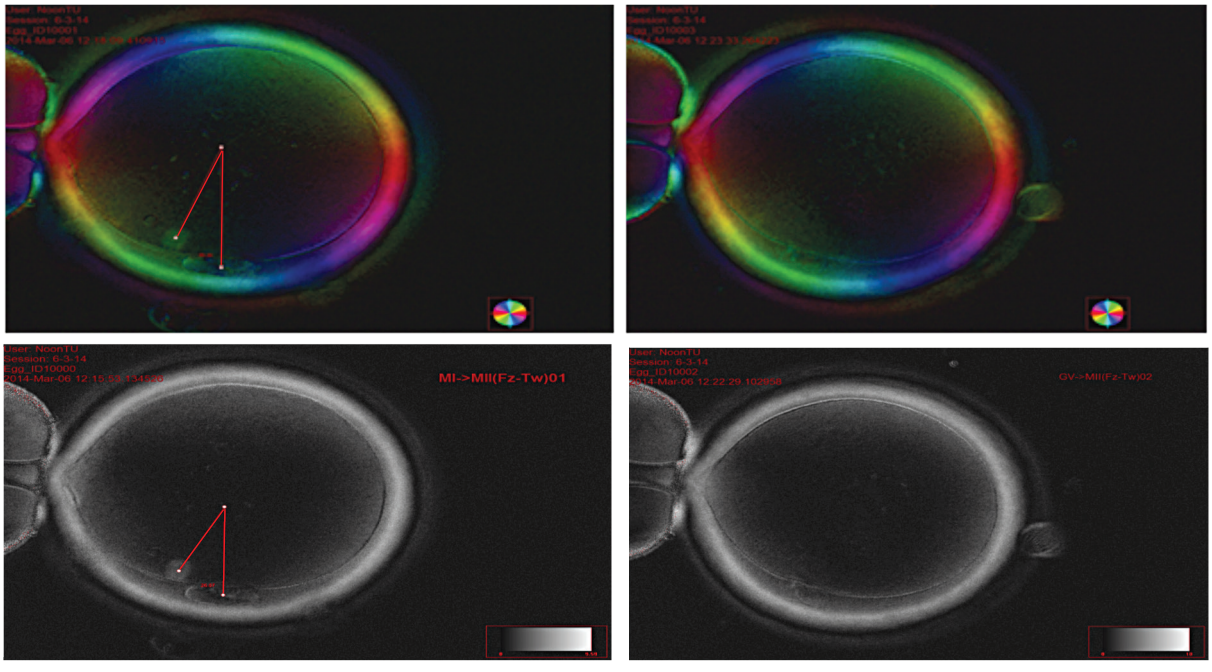
ผลการศึกษา



A B

รูปที่ ๑ การรอดชีวิตหลังผ่านการตรวจอัตราการรอดชีวิตด้วยวิธี FDA

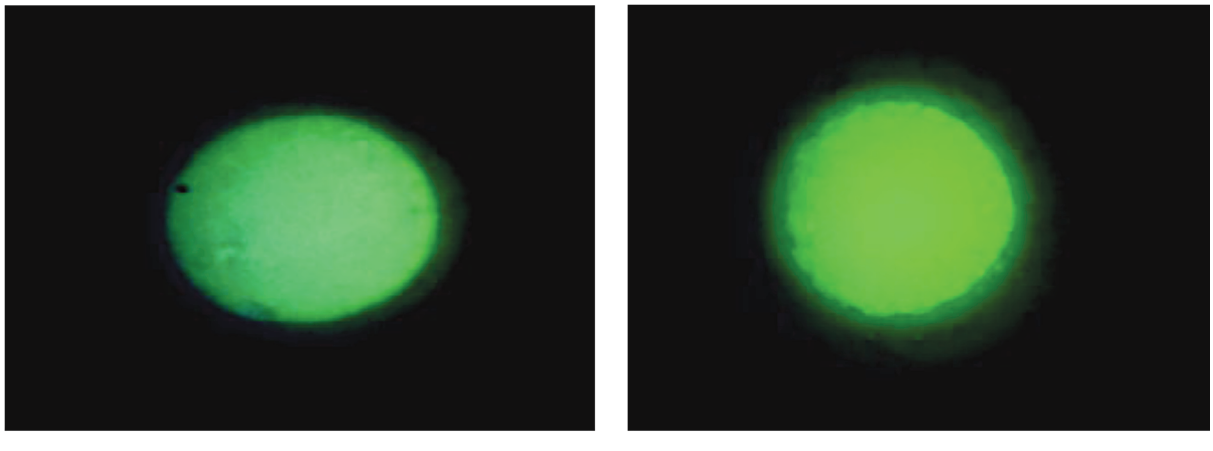
จากผลการทดลองหลังจากนำไข่ที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งมาละลายและนำไปทดสอบอัตราการรอดชีวิตด้วยวิธีย้อม FDA (fluorescein diacetate) ในรูปที่ ๑ A และ B ที่ลูกศรชี้เป็นตำแหน่งที่แสดงให้เห็นว่าเป็นไข่ที่ตายและตำแหน่งที่มีการติดสีเขียวหมายถึง ไข่ที่รอดชีวิต ภายหลังจากนำไข่ไปทดสอบการรอดชีวิตด้วยวิธี FDA ไข่ที่ผ่านกระบวนการตรวจด้วยวิธีนี้จะสามารถนำไปล้างด้วยน้ำยาเพาะเลี้ยง (culture media) ๒ - ๓ ครั้งเพื่อนำไข่ไปใช้ในขั้นตอนต่อไปได้ โดยนำไข่ที่รอดชีวิตมาส่องดู meiotic spindle ต่อไป



C D

รูปที่ ๒ การเห็นของ meiotic spindle

จากรูปที่ ๒ การแสดงการเห็นของ meiotic spindle ด้านบนแสดงภาพในลักษณะภาพสีและภาพด้านล่างถ่ายภาพในลักษณะภาพขาวดำ โดยในรูป C ที่ลูกศรชี้จะเห็นลักษณะของ meiotic spindle ที่ชัดเจนในขณะที่รูป D จะไม่เห็นการแสดงของ meiotic spindle



E F

รูปที่ ๓ การเกิดสารอนุมูลอิสระ Reactive oxidation species (ROS)

จากรูปที่ ๓ E และ F แสดงถึงการเรืองแสง fluorescence ของไข่ ซึ่งถ้าเรืองแสงมากจะมีความสว่างของแสงสีเขียวเรืองแสงออกมา ซึ่งจะแสดงถึงการมีระดับสารอนุมูลอิสระ Reactive oxidation species (ROS) ในปริมาณมาก และในวิเคราะห์ผลการทดลองจะคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของการเรืองแสงโดยใช้โปรแกรม Image J version 1.47 v

ตารางที่ ๑ เปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิต การเห็นของ meiotic spindle และระดับสารอนุมูลอิสระ Reactive oxidation species (ROS) ของกลุ่มควบคุม (no co-enzyme Q10) และกลุ่มทดลอง (30 μM co-enzyme Q10 supplement)

Group / Analysis	no co-enzyme Q10 (n = ๓๓)	30 μM co-enzyme Q10 (n = ๓๓)	p-value
Survival rate (%)	๒๒ (๖๗%)	๒๘ (๘๕%)	๐.๐๘๘**
Meiotic spindle (%)	๑๖ (๔๘%)	๒๐ (๖๐%)	๐.๒๒๑
ROS level (%)			
Mean ± S.D.	๗๒.๓๐ ± ๑๓.๕๐๖	๕๖.๙๔ ± ๑๕.๕๒๘	๐.๐๐๐**

** ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ ๙๕ (p-value < ๐.๐๕)

ตารางที่ ๒ ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการรอดชีวิตของไข่ การเห็นของ meiotic spindle และระดับสารอนุมูลอิสระ Reactive oxidation species (ROS) ของเซลล์ไข่ภายหลังจากการละลาย (Thawing)

	no co-enzyme Q10			30 μM co-enzyme Q10 supplement		
	Survival	Meiotic spindle	ROS	Survival	Meiotic spindle	ROS
Survival	-	๐.๖๘๖**	-๐.๙๑๒**	-	๐.๕๕๙**	-๐.๔๔๙**
	-	(๐.๐๐๐)	(๐.๐๐๐)	-	(๐.๐๐๑)	(๐.๐๐๙)
Meiotic spindle	๐.๖๘๖**	-	-๐.๕๗๔**	๐.๕๕๙**	-	-๐.๖๒๕**
	(๐.๐๐๐)	-	(๐.๐๐๐)	(๐.๐๐๑)	-	(๐.๐๐๐)
ROS	-๐.๙๑๒**	-๐.๕๗๔**	-	-๐.๔๔๙**	-๐.๖๒๕**	-
	(๐.๐๐๐)	(๐.๐๐๐)	-	(๐.๐๐๙)	(๐.๐๐๐)	-

** ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ ๙๕ (p-value < ๐.๐๕)

การวิเคราะห์ผล ในการทดลองวิเคราะห์และคำนวณผลการทดลองโดยใช้โปรแกรม SPSS version 13 วิเคราะห์โดยใช้สถิติ T-test และทดสอบค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson's correlation coefficient) ที่ระดับนัยสำคัญที่ ๐.๐๕

ผลการทดลองพบว่า กลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองโดยรวมไม่มีความแตกต่างกันในเรื่องของอัตราการรอดชีวิตและการเห็น meiotic spindle ภายหลังการละลายเซลล์ไข่ แต่พบว่า กลุ่มตัวอย่างที่ได้รับ 30 μM co-enzyme Q10 supplement มีระดับ ROS น้อยกว่า กลุ่มควบคุมที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ ๙๕

จากการทดสอบค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson's correlation coefficient) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ ๙๕ (p-value < ๐.๐๕) พบว่า ผลลัพธ์ของทั้ง ๒ กลุ่มออกมาเหมือนกันคือ อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ไข่มีความสัมพันธ์ทางบวกกับการเห็น meiotic spindle อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ไข่ มีความสัมพันธ์ทางลบกับระดับ ROS และการเห็นของ meiotic spindle มีความสัมพันธ์ทางลบกับระดับสารอนุมูลอิสระ ROS

สามารถอธิบายได้คือ อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ไข่มีมากขึ้นส่งผลให้การเห็นของ meiotic spindle มีมากขึ้นและมีระดับระดับ ROS ที่ต่ำ ในขณะเดียวกันคือ ถ้าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ไข่ต่ำจะส่งผลให้การเห็นของ meiotic spindle ต่ำและมีระดับ ROS ที่สูง

วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา

ผลการศึกษา จะเห็นได้ว่า อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ไข่ภายหลังจากการละลายในกลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดชีวิตคิดเป็นร้อยละ ๖๗ ในขณะที่กลุ่มทดลองซึ่งได้รับสารโคเอนไซม์คิวเทนมีอัตราการรอดชีวิตคิดเป็นร้อยละ ๘๕ เช่นเดียวกับการเห็น meiotic spindle ในกลุ่มควบคุมคิดเป็นร้อยละ ๔๘ และกลุ่มทดลองคิดเป็นร้อยละ ๖๔ จะเห็นได้ว่าในกลุ่มทดลองมีแนวโน้มของอัตราการรอดชีวิตและการเห็นของ meiotic spindle ที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และผลการทดลองตรวจวัดระดับ ROS นั้นพบว่า กลุ่มทดลองมีระดับ ROS คิดเป็นร้อยละ ๕๖.๙๔ ในขณะที่กลุ่มควบคุมคิดเป็นร้อยละ ๗๒.๓๐ จะเห็นได้ว่ากลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับสารโคเอนไซม์คิวเทนจะมีระดับ ROS ที่สูงกว่ากลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Burstein (ปี ค.ศ. ๒๐๐๙)[๑๐] และงานวิจัยของ Yaakov Bentov (ปี ค.ศ. ๒๐๑๔)[๑๑] ที่กล่าวว่าโคเอนไซม์คิวเทนมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยมีหน้าที่หลักที่สำคัญในการรับส่งอิเล็กตรอนให้สมบูรณ์ที่สุดเพื่อที่จะไม่ให้มีอิเล็กตรอนหลุดรั่วออกมาจากกระบวนการสร้างพลังงาน อีกทั้งมีหน้าที่หลักที่สำคัญในการเป็นตัวพาอิเล็กตรอนผ่านเข้าสู่ไมโตคอนเดรียซึ่งเป็นบทบาทที่สำคัญในการเกิดปฏิกิริยา Oxidative phospholylation เพื่อสร้างพลังงาน ATP[๑๒] ซึ่งแม้ว่าผลการทดสอบทางตรงไม่พบว่า กลุ่มที่ได้รับโคเอนไซม์คิวเทนจะสร้างความแตกต่างในอัตราการรอดชีวิต และ meiotic spindle นั้น แต่เมื่อทำการศึกษาต่อ พบว่า ระดับสารอนุมูลอิสระ ROS มีความสัมพันธ์ทางลบกับอัตราการรอดชีวิต (survival rate) และการเห็น meiotic spindle กล่าวคือ เซลล์ไข่ที่รอดชีวิตจะมีระดับสารอนุมูลอิสระ Reactive oxidation species (ROS) ต่ำ ในขณะที่เซลล์ไข่ที่ตาย (degenerate) จะมีระดับระดับสารอนุมูลอิสระ Reactive oxidation species (ROS) ที่สูง ซึ่งสามารถอธิบายได้ตามรายงานวิจัยของ Larsson (ปี ค.ศ. ๒๐๑๐)[๑๓] ซึ่งพบว่าสารอนุมูลอิสระ ROS จะสร้างความเสียหายและเป็นอันตรายกับเซลล์ไข่เป็นอย่างมากโดยจะเกิดภายในกลไกการสร้างพลังงานของไมโตคอนเดรีย โดยสารอนุมูลอิสระ ROS นี้จะอยู่ในรูปของ free radical ซึ่งในกระบวนการ electron transport chain ที่เกิดขึ้นภายในไมโตคอนเดรียนั้น ขั้นตอนของการขนส่งอิเล็กตรอน จะมีโอกาสที่อิเล็กตรอนหลุดรั่วออกมาในกระบวนการขนส่งและเมื่อมีอิเล็กตรอนรั่วออกมา free radical นี้จะเข้าไปแย่งชิงอิเล็กตรอน โมเลกุลนั้น เพื่อให้ตัวมันเองอยู่ในรูปที่เสถียรซึ่งจะเกิดการแย่งชิงอิเล็กตรอนไปเรื่อยๆ เป็นการเพิ่มปริมาณ ROS ดังนั้น โคเอนไซม์คิวเทนเป็นเอนไซม์หลักที่สำคัญในการทำหน้าที่รับส่งอิเล็กตรอนให้สมบูรณ์แบบที่สุดเพื่อที่จะไม่ให้มีอิเล็กตรอนหลุดรั่วออกมาจากกระบวนการจะเห็นได้ว่า ปริมาณของโคเอนไซม์คิวเทนนั้น ต้องมีในปริมาณที่มากพอเพื่อให้เกิดการทำงานภายในไมโตคอนเดรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ดังนั้น สามารถอธิบายโดยสรุปได้คือ ระดับ ROS ที่น้อย จะส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ไข่มีมากขึ้น ทำให้การเห็นของ meiotic spindle มีมากขึ้น ในขณะเดียวกันถ้าระดับ ROS สูง จะส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ไข่ต่ำ ทำให้การเห็นของ meiotic spindle ต่ำด้วยเช่นกัน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๖ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่หน่วยมีบุตรยาก โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติและคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ที่ให้ความอนุเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

๑. Burney RO SD, Yao MW. Infertility reproductive endocrinology. Gynecology Jonathan S. Berek; editorial assistant, Rebecca D. Rinehart; illustration and graphic design, Timothy C. Hengst. 14th ed Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.

๒. ธีรพร วุฒยวนิช. การแช่แข็งไข่แบบเนื้อแก้ว. ใน: ธีระพร วุฒยวนิช, บรรณาธิการ. การแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว. เชียงใหม่: นพบุรีการพิมพ์ ๒๕๔๖ หน้า ๓๗ - ๕๑.

๓. เจริญไชย เจียมจรรยา. ภาวะมีบุตรยากและการช่วยการเจริญพันธุ์. กรุงเทพมหานคร: คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต; ๒๕๕๔. หน้า ๑๐๐ - ๓๒.

๔. Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Kuriani Karja NW, Farhudin M, et al. Developmental competence of in vitro-fertilized porcine oocytes after in vitro maturation and solid surface vitrification: Effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage. Cryobiology 2007;55:115-26.

๕. Yubero D, Montero R, Armstrong J, Espinos C, Palau F, Santos-Ocana C, et al. Molecular diagnosis of coenzyme Q10 deficiency. Expert review of molecular diagnostics. 2013;15:1049-59.

๖. Bentov Y, Casper RF. The aging oocyte—can mitochondrial function be improved? Fertility and Sterility 2013;99:18-22.

๗. Vutyavanich T. The Oocyte. In: Vutyavanich T, editor. Color atlas of human gametes & Embryos. Bangkok: Verana press; 2006. p.130.

๘. Liang YY, Srirattana K, Phermthai T, Somfai T, Nagai T, Parnpai R. Effects of vitrification cryoprotectant treatment and cooling method on the viability and development of buffalo oocytes after intracytoplasmic sperm injection. Cryobiology 2012;65:151-6.

๙. Sereni E, Sciajno R, Fava L, Coticchio G, Bonu MA, Borini A. A PolScope evaluation of meiotic spindle dynamics in frozen-thawed oocytes. Reprod Biomed Online 2009;19:191-7.

๑๐. Burstein E, Perumalsamy A, Bentov Y, Esfandiari N, Jurisicova A, Casper RF. Co-enzyme Q10 supplementation improves ovarian response and mitochondrial function in aged mice. Fertility and Sterility 2009;92 (3 Supplement):S31.

๑๑. Bentov Y, Hannam T, Jurisicova A, Esfandiari N, Casper RF. Coenzyme Q10 supplementation and oocyte aneuploidy in women undergoing IVF–ICSI treatment. Clin Med Insights Reprod Health 2014;8:31-6.

๑๒. Chappel S. The role of mitochondria from mature oocyte to viable blastocyst. Obstet Gynecol Int 2013;192-220.

๑๓. Larsson NG. Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. Annu Rev Biochem 2010;79:683-706.

Abstract

Effects of co-enzyme Q10 supplement in vitrified solution on survival rate of in vitro maturation human oocytes

Nopparat Junsonti*, Charoenchai Chiamchanya, Pachara Visutakul*****

* 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

Introduction: Infertility has an impact on strong relationship and happiness of the family. As a result, people become more interested in assisted reproductive technology. One of the technologies that get attention is oocyte freezing which is an alternative method for keeping the fertility status of women at risk of losing ovarian function. Anyhow, important problem of this method is relatively low survival rate after thawing of frozen oocytes. So, the aim of this study was to examine the effect of co-enzyme Q10 on the survival rate of vitrification oocytes.

Method: Oocytes donation received from the infertility treatment sample group were divided into 2 groups: the control group was without co-enzyme Q10 added into the vitrified solution and the experiment group was with 30 μM co-enzyme Q10 supplement added into the vitrified solution.

Result: The control group and the experimental group were no significant difference in the survival rate, but the experiment group had lower Reactive oxygen species (ROS) level than the control group with statistically significance.

Discussion and Conclusion: The results indicated that the addition of co-enzyme Q10 had no effect on increasing the survival rate of oocytes, but reduced the free radicals that caused damage to the oocytes.

Key words: Infertility, Vitrification, Survival rate, Reactive oxygen species (ROS), Co-enzyme Q10