นิพนธ์ต้นฉบับ

ผลของการเตรียมและไม่เตรียมเชื้ออสุจิก่อนการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วต่อคุณภาพอสุจิหลังการทำละลาย

ชลธิชา สำเร็จกิจเจริญ*, เจริญไชย เจียมจรรยา**, ตรีทิพย์ รัตนวรชัย***, พัชรา วิสุตกุล****

บทคัดย่อ

บทนำ: การแช่แข็งอสุจิเป็นหนึ่งในเทคโนโลยีที่ใช้ประกอบการรักษาภาวะการเจริญพันธุ์ในฝ่ายชาย แต่ภายหลังการแช่แข็งและละลายอาจมีข้อเสียที่ทำให้จำนวนอสุจิและการเคลื่อนที่ของอสุจิที่ลดลง รวมทั้งมีการแตกหักของสายดีเอ็นเอของอสุจิเพิ่มขึ้น ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาเปรียบเทียบผลของการเตรียมอสุจิ (sperm preparation) และการไม่เตรียมอสุจิก่อนการแช่แข็ง และละลายต่อคุณภาพของอสุจิหลังการแช่แข็งและละลาย

วิธีการศึกษา : เก็บตัวอย่างจากอาสาสมัครจำนวน ๔๐ รายที่มีน้ำเชื้ออสุจิปรกติ (ตามเกณฑ์ของ WHO 2010) นำตัวอย่างน้ำอสุจิของแต่ละรายมาแบ่งออกเป็น ๔ กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ ๑ : กลุ่มที่ไม่ผ่านการเตรียมอสุจิ (unprepared), กลุ่มที่ ๒ : กลุ่มที่ผ่านการเตรียมอสุจิ (prepared), กลุ่มที่ ๓: กลุ่มที่ไม่ผ่านการเตรียมอสุจิก่อนนำไปแช่แข็งและละลาย (unprepared, frozen and thawed), กลุ่มที่ ๔ : กลุ่มที่ผ่านการเตรียมอสุจิก่อนแล้วจึงนำไปแช่แข็งและละลาย (prepared, frozen and thawed) จากนั้นนำทั้ง ๔ กลุ่มมาทำการตรวจวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบคุณภาพของอสุจิ (semen analysis) ได้แก่ความเข้มข้นของอสุจิ อัตราการเคลื่อนที่และอสุจิที่มีรูปร่างปรกติ รวมทั้งอัตราความมีชีวิตของอสุจิ (vitality) ที่วัดโดยวิธี Hypoosmotic swelling test (HOS), ความสมบูรณ์ของการทำงานของอสุจิ (sperm maturation and functions) ที่วัดโดยวิธี Hyaluronan binding assay (HBA) และความเสียหายของดีเอ็นเอของอสุจิ (DNA damage) ที่วัดโดยวิธี Comet assay

ผลการศึกษา : พบว่าหลังการเตรียมอสุจิ ความเข้มข้นของอสุจิ และความเสียหายของดีเอ็นเอลดลง ในขณะที่อัตราการเคลื่อนที่ การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปรกติและอัตราอสุจิที่มีชีวิต รวมทั้งความสมบูรณ์ของการทำงานของอสุจิเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อนำอสุจิที่ผ่านการเตรียมอสุจิแล้วไปแช่แข็งและละลายเปรียบเทียบกับกลุ่มอสุจิที่ไม่ได้ผ่านการเตรียมอสุจิก่อนนำไปแช่แข็งและละลายพบว่าทั้งสองกลุ่มมีการลดลงของทุกคุณสมบัติดังกล่าว ยกเว้นความเสียหายของดีเอ็นเอ ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม กลุ่มที่ผ่านการเตรียมอสุจิก่อนแช่แข็งและละลายมีอัตราอสุจิที่มีรูปร่างปรกติมากกว่า และมีความเสียหายของดีเอ็นเอน้อยกว่า แต่มีอัตราอสุจิที่มีชีวิตน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา : จากผลของงานวิจัยนี้แสดงว่า การเตรียมอสุจิอาจสามารถปกป้องคุณภาพของอสุจิได้แทบทุกอย่างรวมทั้งความมีชีวิต ความสมบูรณ์ในการทำงานและการแตกหักของสายดีเอ็นเอ ยกเว้นปริมาณอสุจิ แต่การเตรียมอสุจิไม่สามารถปกป้องคุณสมบัติต่างๆ เหล่านี้ได้ หลังจากการนำไปผ่านการแช่แข็งและละลาย อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการเตรียมและไม่เตรียมอสุจิก่อนการแช่แข็งและละลาย พบว่าอสุจิที่ผ่านการเตรียมอสุจิก่อนการแช่แข็งและละลาย มีผลต่อการปกป้องคุณภาพของอสุจิได้ดีกว่า โดยมีอัตราความเสียหายของดีเอ็นเอน้อยกว่าและมีอัตราอสุจิที่มีรูปร่างปรกติมากกว่า แม้จะมีอสุจิที่มีชีวิตน้อยกว่า ซึ่งอาจนำไปใช้ประโยชน์ในการรักษาภาวะมีบุตรยากต่อไป อย่างไรก็ตามก่อนนำไปประยุกต์ใช้ทางคลินิกควรมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติม

คำสำคัญ: การเตรียมอสุจิ, การแช่แข็งอสุจิแบบเนื้อแก้ว, คุณภาพของอสุจิ, ความสมบูรณ์ของการทำงานของอสุจิ, การแตกหักของสายดีเอ็นเอของอสุจิ

วันที่รับบทความ: ๑๗ พฤษภาคม ๒๕๕๙ **วันที่อนุญาตให้ตีพิมพ์: ๕ กรกฎาคม ๒๕๕๙**

* นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

** ภาควิชาสูติศาสตร์ – นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

*** สถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิก สาขาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

**** โครงการบัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ผู้ให้ติดต่อ: รองศาสตราจารย์ นายแพทย์เจริญไชย เจียมจรรยา ภาควิชาสูติศาสตร์ - นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ โทรศัพท์ ๐๒ ๙๒๖ ๙๓๙๓ โทรสาร ๐๒ ๙๒๖ ๙๙๘๕ อีเมล charoenchai1961@hotmail.com

บทนำ

การแช่แข็งอสุจิเป็นเทคนิคในการเก็บรักษาอสุจิภายใต้สภาวะอุณหภูมิที่เย็นจัด (Ultra low temperature) เพื่อให้สามารถเก็บรักษาอสุจิได้เป็นระยะเวลานาน ซึ่งในปัจจุบันนี้การแช่แข็งอสุจิมีไว้เพื่อสำหรับเก็บรักษาอสุจิในกรณีที่ฝ่ายชายมีความจำเป็นที่จะต้องได้เคมีบำบัด รังสีรักษา การผ่าตัดที่อาจจะทำให้เป็นหมันหรืออาจจะเกิดภาวะมีบุตรยากขั้นรุนแรงได้และการเก็บรักษาอสุจิไว้ก่อนที่จะมีการทำหมันชายรวมทั้งเพื่อความสะดวกในการรักษาภาวะผู้มีบุตรยาก ในกรณีที่ฝ่ายชายไม่สามารถมาเก็บน้ำเชื้ออสุจิได้ในวันที่ฝ่ายหญิงทำการเก็บไข่ หรือในรายที่มีจำนวนอสุจิน้อยสามารถที่จะเก็บน้ำเชื้ออสุจิสะสมไว้ เพื่อนำมารวมกันแล้วใช้ในคราวเดียวได้ หรือในกรณีที่ต้องมีการผ่าตัดเก็บอสุจิจากอัณฑะ (Surgical sperm retrieval : SSR) เช่น การใช้เข็มดูดอสุจิจากท่อพักอสุจิผ่านทางผิวหนัง (Percutaneous epididymal sperm aspiration : PESA), การผ่าตัดจุลศัลยกรรมเพื่อดูดตัวอสุจิจากท่อพักอสุจิ (Microsurgical epididymal sperm aspiration : MESA), การดูดตัวอสุจิจากอัณฑะผ่านทางผิวหนังโดยตรง (Testicular sperm aspiration : TESA) หรือ การตัดชิ้นเนื้อออกจากอัณฑะเพื่อสกัดแยกตัวอสุจิ (Testicular sperm extraction : TESE) ซึ่งกระบวนการเหล่านี้เป็นสิ่งที่ทำให้เกิดการเจ็บตัว เสี่ยงต่อการติดเชื้อและภาวะแทรกซ้อน ทั้งนี้การเก็บรักษาโดยการแช่แข็งอสุจินั้นเป็นทางหนึ่งที่จะลดความเสี่ยงต่อผู้ป่วยลง[๑] แต่อย่างไรก็ตามวิธีการแช่แข็งของอสุจิยังมีข้อเสียที่ทำให้เกิด Reactive oxygen species (ROS) เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นสาเหตุทำให้มีจำนวนอสุจิลดลงและมีผลกระทบต่อคุณภาพของอสุจิ ได้แก่ การเคลื่อนที่ของอสุจิลดลงร้อยละ ๒๕ ถึง ๗๕ และเกิดการแตกหักของ DNA หลังจากผ่านการแช่แข็งและละลายอสุจิ[๒, ๓] เนื่องจากเยื่อหุ้มตัวอสุจิมีไขมันอยู่ในรูปแบบของ polyunsaturated fatty acid ซึ่งจะอ่อนไหวต่อการถูกโจมตีโดย ROS ที่กระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาทางเคมีที่เรียกว่า lipid peroxidation ได้ ปรกติแล้วภายในน้ำอสุจิจะมีสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) คอยช่วยยับยั้งปฏิกิริยาการเกิด ROS แต่ถ้ามี ROS มากสารต้านอนุมูลอิสระไม่สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาได้ทั้งหมด ซึ่งจะทำให้เกิดการทำลายอสุจิต่อไปได้[๔]

งานวิจัยนี้ผู้วิจัยสนใจทำการศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบของการแช่แข็งอสุจิก่อนและหลังการเตรียมอสุจิ (sperm preparation) เพื่อทดสอบดูว่าวิธีไหนจะช่วยให้มีการรักษาคุณภาพของอสุจิ ความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิและการแตกหักของสายดีเอ็นเอได้ดีกว่ากัน เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพของการรักษาภาวะมีบุตรยากต่อไป

วิธีการศึกษา

การวิจัยเชิงทดลองทางคลินิกใช้รูปแบบการวิจัยแบบไปข้างหน้า (prospective study) โดยการวิจัยนี้ได้ใบรับรองจากคณะอนุกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน ชุดที่ ๑ (MTU-EC-OB-1-045/57) จากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ทำการเก็บตัวอย่างอสุจิจากอาสาสมัคร ๔๐ รายที่หน่วยผู้มีบุตรยาก โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ระหว่างเดือนเมษายน พ.ศ. ๒๕๕๘ ถึงเดือนมีนาคม พ.ศ. ๒๕๕๙

การเก็บน้ำอสุจิและการตรวจน้ำอสุจิ

อาสาสมัครเก็บน้ำอสุจิใส่ภาชนะพลาสติกปราศจากเชื้อโรคด้วยวิธี masturbation (หลังงดหลั่งน้ำอสุจิ ๓ - ๕ วัน) ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา ๓๐ นาที หลังจากนั้นจึงนำน้ำอสุจิที่ได้ไปตรวจวัดคุณภาพ (semen analysis) ได้แก่ รูปร่างของอสุจิที่ปรกติ ความเข้มข้นของอสุจิและการเคลื่อนไหวด้วยเครื่อง Computer-aided sperm analysis (CASA; IVOS, version 10, Hamilton, USA) ทำการตรวจรูปร่างอสุจิด้วยวิธีการย้อม Papniculaou (PAP) staining[๕] ซึ่งน้ำอสุจิที่นำมาศึกษาจะต้องมีคุณภาพปรกติโดยเปรียบเทียบกับค่าปรกติมาตรฐานของ World Health Organization (WHO) ปี ค.ศ. ๒๐๑๐[๕] จากนั้นนำมาตรวจหาความสมบูรณ์ของการทำงานของอสุจิโดยวิธี Hyaluronan binding assay (HBA) ด้วยชุดตรวจ hyaluronan binding assay (HYDAK® COATINGS; Bio-coat, Inc. Denmark)[๖] และตรวจอัตราความมีชีวิตของอสุจิด้วยวิธี Hypo-osmotic swelling test (HOS) โดยทำการตรวจวัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast[๗, ๘]

การเตรียมอสุจิ

การเตรียมอสุจิโดยเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์มีจุดมุ่งหมายเพื่อล้างแยกอสุจิที่ปรกติออกจากน้ำอสุจิ (semen) เพราะในน้ำอสุจิมีสารยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา capacitation และความสามารถในการปฏิสนธิของอสุจิ นอกจากนี้ยังมีเซลล์เม็ดเลือดขาว อสุจิที่ผิดปรกติหรือตายแล้วและเศษเซลล์อื่นๆ ปนอยู่ซึ่งจะเป็นส่วนที่ก่อให้เกิดสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมกับอสุจิ การเตรียมอสุจิจะทำให้ได้อสุจิที่มีคุณภาพดีเพื่อผสมกับไข่ด้วยวิธีการช่วยการเจริญพันธุ์ต่อไป[๙] โดยจะนำน้ำอสุจิที่เก็บได้ค่อยๆ หยดลงบนชั้นน้ำยา Sil-select sperm gradient (Fertipro, Beernem, Belgium) จากนั้นจะนำไปปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบ swing out rotor โดยใช้ความเร็ว 300 xg เป็นเวลานาน ๑๕ นาที เมื่อปั่นเสร็จแล้วจะทำการดูดเอาส่วนที่เป็นตะกอนอสุจิที่ก้นหลอดออกมาใส่ในน้ำยา Ferticult flushing medium (Fertipro, Beernem, Belgium)

แล้วนำไปปั่นแยกโดยใช้ความเร็ว 300 xg เป็นเวลา ๕ นาที (โดยในขั้นตอนนี้จะทำซ้ำอีก ๑ ครั้งเพื่อล้างเอาส่วนของน้ำยา Sil-select ออกให้หมด จากนั้นดูดตะกอนอสุจิจากก้นหลอดมาใส่ในหลอดก้นกลมปลอดเชื้อ นำไปหยดลงบน Makler counting chamber (Sefi medical instruments ltd., Israel) เพื่อนำไปตรวจวัดคุณภาพของอสุจิด้วยเครื่อง CASA ต่อไป

Hyaluronan binding assay (HBA)

เป็นวิธีที่ใช้ในการหาความสามารถของอสุจิในการจับกับ hyaluronan ที่พบในเซลล์คิวมูลัสของไข่ วิธีนี้ใช้ในการประเมินความสมบูรณ์และประสิทธิภาพของอสุจิ ที่อาจส่งผลต่อกระบวนการปฏิสนธิโดยงานวิจัยนี้ใช้ชุดตรวจ hyaluronan binding assay โดยดูจากการจับของอสุจิกับ hyaluronan บนแผ่นสไลด์ แล้วนับจำนวนการเกาะหรือไม่เกาะของอสุจิ ๑๐๐ ตัว ทำทั้งหมด ๓ รอบ[๖]

Hypo-osmotic swelling test (HOS)

เป็นวิธีการตรวจเพื่อดูอัตราการรอดชีวิตของอสุจิ วิธีการทำคือ นำอสุจิมาผสมกับ swelling solution (sodium citrate dehydrate + D-fructose ละลายในน้ำกลั่น) แล้วหยดใส่ slide นำไปส่องตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast เป็นวิธีที่ใช้ตรวจจำนวนอสุจิที่มีชีวิตในน้ำอสุจิสดและในน้ำอสุจิหลังผ่านการแช่แข็งและละลายโดยอาศัยหลักการของแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ของน้ำเกลือที่มีแรงดันออสโมติกต่ำ (hypotonic saline) ที่สามารถแทรกซึมเข้าไปภายในตัวของอสุจิที่มีชีวิต ทำให้ส่วนปลายหางเกิดการขยายบวม จากนั้นทำการนับจำนวนทั้งหมด ๑๐๐ ตัว ทำซ้ำ ๓ รอบ[๗, ๘]

การตรวจหาการแตกหักของสายดีเอ็นเอ โดยวิธี Comet assay

ใช้วิธี single cell gel electrophoresis ซึ่งเป็นวิธีการตรวจการแตกหักของสายดีเอ็นเอโดยใช้สารเคมีจาก Sigma-Aldrich, USA โดยนำอสุจิมาผสมกับ agarose gel แล้วนำไปหยดลงบนสไลด์แล้วนำไปทำให้แข็งตัวที่อุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการ electrophoresis และนำไปส่องตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ เพื่อทำการวิเคราะห์อสุจิ ๑๐๐ ตัว ทำซ้ำทั้งหมด ๒ สไลด์ต่อหนึ่งตัวอย่าง โดยใช้โปรแกรม Meta-system software, Comet Imager V.2.0.0. ทำการตรวจวัดพารามิเตอร์ความยาวหางในการวิเคราะห์การแตกหักของสายดีเอ็นเอ[๑๐, ๑๑]

การแช่แข็งอสุจิแบบเนื้อแก้วด้วยวิธี Solid surface vitrification (SSV)[๑๒]

การแช่แข็งอสุจิใช้น้ำยาแช่แข็งอสุจิ (glycerol egg yolk citrate medium) จาก Sigma-Aldrich, USA นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ ๕๖ องศาเซลเซียสเป็นเวลา ๓๐ นาที หลังจากนั้นนำอสุจิมาผสมกับน้ำยาแช่แข็งในปริมาตรที่เท่ากัน (๑:๑) ดูดตัวอย่าง ๒๐ ไมโครลิตร ไปหยดลงบนแผ่นอะลูมิเนียมฟอยล์ที่ลอยอยู่บนผิวของไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำหยดตัวอย่างที่แข็งแล้วใส่ลงใน cryovial (Nunc, Roskilde, Denmark) เก็บลงในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -๑๙๖ องศาเซลเซียส น้ำยาที่ใช้ในการแช่แข็งดัดแปลงมาจากน้ำยาแช่แข็งของหน่วยผู้มีบุตรยาก โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ กรุงเทพมหานคร

การละลาย

นำ cryovial ที่แช่แข็งออกมาจากถังไนโตรเจน แล้วนำมาละลายโดยเทเม็ดอสุจิที่อยู่ภายใน cryovial ลงภายในจานเพาะเลี้ยง (plate) แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ ๔ นาที จากนั้นนำ autopipette ดูดอสุจิที่ละลายแล้วใส่กลับเข้าไปในหลอดทดลอง

การแบ่งกลุ่มตัวอย่าง

นำน้ำอสุจิสด (neat หรือ fresh semen) ๔๐ ตัวอย่าง จากอาสาสมัคร ๔๐ ราย ที่ผ่านการชี้แจงและเซ็นใบยินยอมแล้วที่หน่วยผู้มีบุตรยาก โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ มาแบ่งออกเป็น ๔ ส่วนเท่าๆ กัน คือ (แผนภาพที่ ๑)

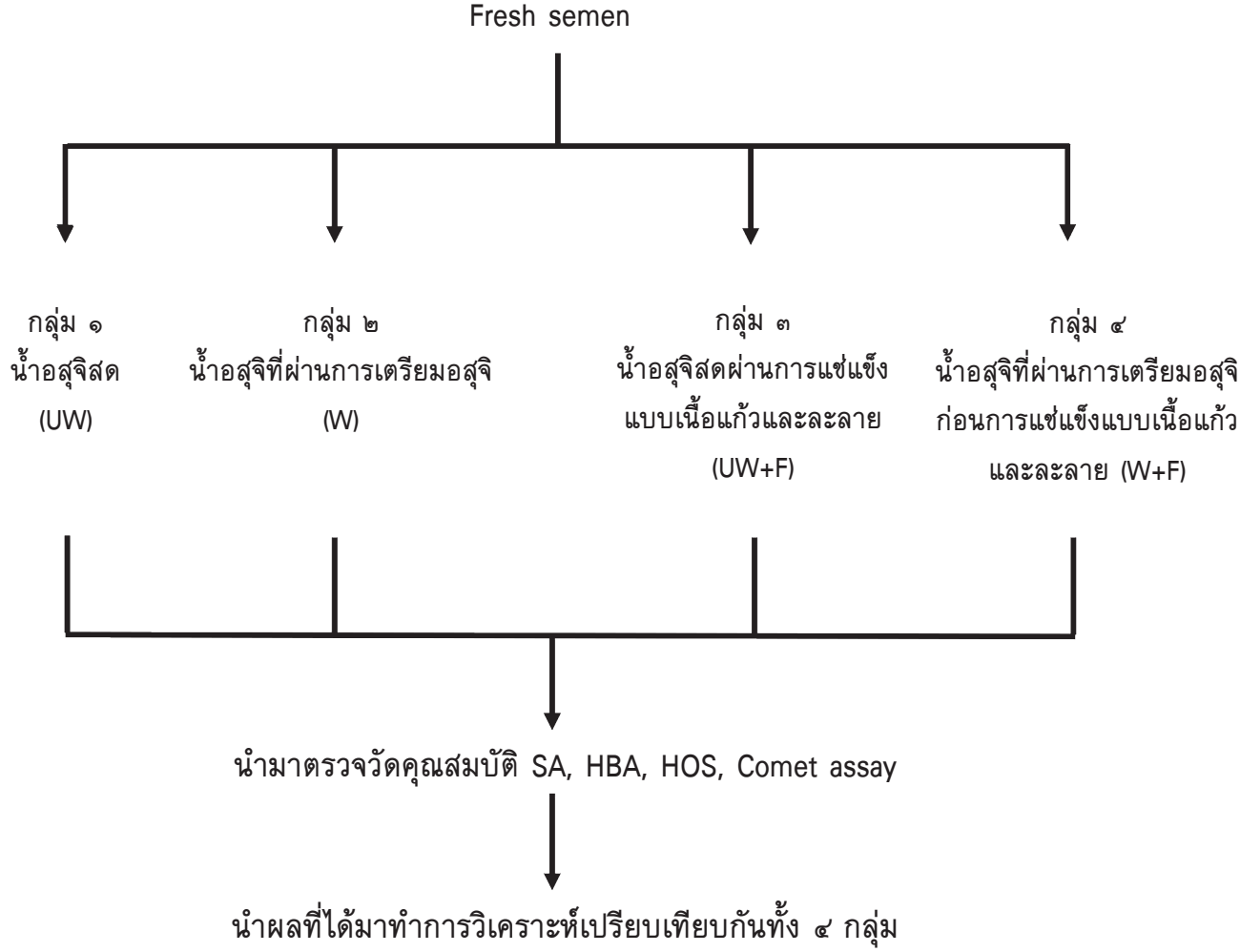
กลุ่มที่ ๑ : กลุ่มควบคุมเป็นกลุ่มน้ำอสุจิสด (neat / fresh / unprepared / unwashed : UW)

กลุ่มที่ ๒ : กลุ่มที่ผ่านการเตรียมอสุจิ (prepared / washed : W)

กลุ่มที่ ๓ : กลุ่มที่ไม่ผ่านการเตรียมอสุจิ (น้ำอสุจิสด) ก่อนนำไปผ่านกระบวนการแช่แข็งและละลาย (unprepared / unwashed + frozen and thawed : UW+F)

กลุ่มที่ ๔ : กลุ่มที่ผ่านการเตรียมอสุจิแล้วนำไปผ่านกระบวนการแช่แข็งและละลาย (prepared / washed + frozen and thawed : W+F)

แผนภาพการทดลอง



SA = Semen analysis

HBA = Hyaluronan binding assay

HOS = Hypo-osmotic swelling test

แผนภาพที่ ๑ แผนภาพการทดลอง

การวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ผลเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มการทดลองทั้ง ๔ กลุ่มโดยวิธี Repeated measure ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS version 17.0 โดยกำหนดให้ข้อมูลมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อค่า $p < 0.05$

ผลการศึกษา

การเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลอง ๔ กลุ่ม

ความเข้มข้นของอสุจิ

ค่าความเข้มข้นของอสุจิ (mean ± SD) ในกลุ่มที่ผ่านการเตรียมอสุจิ (W) และในกลุ่มที่ไม่ผ่านการเตรียมอสุจิก่อนการแช่แข็งและละลาย (UW+F) รวมทั้งในกลุ่มที่ผ่านการเตรียมอสุจิแล้วนำไปทำการแช่แข็งและละลาย (W+F) ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (UW) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ความแตกต่างระหว่างกลุ่มแสดงโดย p-value (ตารางที่ ๑)

อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิและอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ

อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิและอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ (mean ± SD) ในกลุ่มที่ผ่านการเตรียมอสุจิ (W) เพิ่มมากขึ้นกว่ากลุ่มควบคุม (UW) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อนำไปแช่แข็งและละลายอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมทั้งในกลุ่มอสุจิที่ผ่านและไม่ผ่านการเตรียมอสุจิก่อนการแช่แข็งและละลาย (W+F และ UW+F) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ ๑)

อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปรกติ

อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปรกติ (mean ± SD) ในกลุ่มที่ผ่านการเตรียมอสุจิ (W) รวมทั้งกลุ่มที่ผ่านการเตรียมอสุจิและนำไปแช่แข็งและละลาย (W+F) มีค่าเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มของอสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมอสุจิ (UW) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งและละลาย พบว่ากลุ่มที่ผ่านการเตรียมอสุจิก่อนนำไปแช่แข็งและละลาย (W+F) มีอัตราของอสุจิที่มีรูปร่างปรกติมากกว่าในกลุ่มที่ไม่ผ่านการเตรียมอสุจิก่อนนำไปแช่แข็งและละลาย (UW+F) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ ๑)

อัตราอสุจิที่มีชีวิต

อัตราอสุจิที่มีชีวิต (mean ± SD) พบว่ากลุ่มที่ผ่านการเตรียมอสุจิ (W) มีอัตราอสุจิที่มีชีวิตมากกว่ากลุ่มที่ไม่ผ่านการเตรียมอสุจิ (UW) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่หลังจากที่นำไปผ่านการแช่แข็งและละลาย พบว่ากลุ่มของอสุจิทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการเตรียมอสุจิก่อนนำไปแช่แข็งและละลาย (W+F และ UW+F) มีอัตราอสุจิที่มีชีวิตน้อยกว่ากลุ่มควบคุม (UW) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มที่ผ่านการเตรียมอสุจิก่อนการแช่แข็งและละลายมีอัตราอสุจิที่มีชีวิตน้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ผ่านการเตรียมอสุจิก่อนการแช่แข็งและละลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ ๑)

อัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิ

อัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิ (mean ± SD) กลุ่มของอสุจิที่ผ่านการเตรียมอสุจิ (W) มีอัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ผ่านการเตรียมอสุจิ (UW) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และหลังจากที่ผ่านการแช่แข็งและละลายแล้ว ทั้งกลุ่มที่ผ่านและไม่ผ่านการเตรียมอสุจิก่อนนำไปแช่แข็งและละลาย (W+F และ UW+F) มีอัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (UW) แต่ไม่มีความสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ ๑)

ความเสียหายของดีเอ็นเอ

ความเสียหายของดีเอ็นเอ (mean ± SD) พบว่ากลุ่มของอสุจิที่ผ่านการเตรียมอสุจิ (W) มีค่าความเสียหายของดีเอ็นเอลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ผ่านการเตรียมอสุจิ (UW) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อนำไปผ่านการแช่แข็งและละลาย กลุ่มที่ผ่านและไม่ผ่านการเตรียมอสุจิก่อนนำไปแช่แข็งและละลาย (W+F และ UW+F) มีค่าความเสียหายของดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (UW) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่กลุ่มที่ผ่านการเตรียมอสุจิก่อนการแช่แข็งและละลายมีความเสียหายของดีเอ็นเอน้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ผ่านการเตรียมอสุจิก่อนการแช่แข็งและละลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ ๑)

ตารางที่ ๑ แสดงคุณสมบัติของอสุจิเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลอง ๔ กลุ่ม

คุณสมบัติของอสุจิ (Sperm characteristics)	unwashed (mean ± SD)	washed (mean ± SD)	unwashed + frozen – thawed (mean ± SD)	washed + frozen – thawed (mean ± SD)
ความเข้มข้นของอสุจิ (Sperm concentration mill/ml)	๑๖๑.๙๔ ± ๘๘.๙๐[a]	๑๑๖.๙๐ ± ๘๐.๓๖[a]	๑๐๗.๓๕ ± ๕๕.๑๘[a]	๙๖.๑๑ ± ๓๙.๘๘[a]
อัตราการเคลื่อนที่ (Sperm motility %)	๕๕.๒๒ ± ๙.๖๗[a]	๗๘.๙๗ ± ๑๓.๑๓[a, b]	๒๙.๔๕ ± ๑๑.๗๐[a, b]	๒๘.๗๕ ± ๑๗.๑๐[a, b]
อัตราอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า (Progressive motile %)	๔๗.๑๕ ± ๙.๑๖[a]	๖๙.๓๕ ± ๑๕.๐๖[a, b]	๒๕.๙๗ ± ๑๐.๔๒[a, b]	๒๕.๐๗ ± ๑๕.๐๑[a, b]
อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปรกติ (Normal morphology %)	๖.๙๐ ± ๐.๓๓[a]	๑๐.๔๗ ± ๐.๖๐[a, b]	๖.๔๗ ± ๐.๔๖[b, c]	๘.๓๒ ± ๐.๓๓[a, b, c]
อัตราอสุจิที่มีชีวิต (Vitality %)	๗๐.๖๙ ± ๘.๙๓[a]	๘๑.๓๐ ± ๘.๙๘[a, b]	๕๘.๓๘ ± ๑๐.๓๕[a, b, c]	๕๔.๖๗ ± ๑๑.๒๔[a, b, c]
อัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิ (Sperm-hyaluronan binding assay : HBA %)	๖๖.๓๑ ± ๑๑.๗๓[a]	๗๘.๗๓ ± ๙.๒๓[a, b]	๖๔.๓๒ ± ๙.๒๙[b]	๖๖.๕๘ ± ๘.๗๐[b]
ความเสียหายของดีเอ็นเอ (DNA damage %)	๒.๒๔ ± ๐.๗๔[a]	๑.๙๑ ± ๐.๖๙[a, b]	๕.๐๑ ± ๔.๙๖[a, b, c]	๔.๑๗ ± ๔.๕๕[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 + frozen - thawed

วิจารณ์ และสรุปผลการศึกษา

การเตรียมอสุจินั้น เป็นกระบวนการที่ใช้ในการคัดเลือกคุณภาพของอสุจิให้ดียิ่งขึ้น ได้แก่ การเคลื่อนที่ รูปร่างของอสุจิที่ปรกติ และยังช่วยคัดเลือกตัวอสุจิที่มีความเสียหายของดีเอ็นเอน้อยที่สุดและมีความสมบูรณ์มากที่สุด[๑๓] ในงานวิจัยนี้พบว่ากลุ่มอสุจิที่ผ่านการเตรียมอสุจิแม้จะมีความเข้มข้นของอสุจิลดลง แต่มีผลดีต่อคุณภาพของอสุจิในด้านอื่นๆ ได้แก่ อัตราการเคลื่อนที่ อัตราอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปรกติ อัตราอสุจิที่มีชีวิตและอัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิที่เพิ่มมากขึ้น รวมทั้งมีค่าความเสียหายของดีเอ็นเอลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอสุจิที่ไม่ได้ผ่านการเตรียมอสุจิ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Donnelly และคณะในปี ค.ศ. ๒๐๐๐ ที่พบว่าอสุจิที่ผ่านการเตรียมอสุจิมีอัตราการแตกหักของสายดีเอ็นเอลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอสุจิที่ไม่ได้ผ่านการเตรียมอสุจิ[๑๔] และกับงานวิจัยของ Malvezzi H และคณะในปี ค.ศ. ๒๐๑๔ รายงานว่าอสุจิที่ผ่านกระบวนการเตรียมอสุจิจะมีอัตราการเคลื่อนที่มากกว่าอสุจิที่ไม่ได้ผ่านการเตรียมอสุจิ[๑๓] รวมทั้งได้ผลตรงกันกับงานวิจัยของเกศนิษาและคณะในปี ค.ศ. ๒๐๑๔ ที่พบว่าอสุจิที่ผ่านการเตรียมอสุจิแล้วจะมีอัตราการเคลื่อนที่ อัตราอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปรกติ อัตราอสุจิที่มีชีวิตและอัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิเพิ่มมากขึ้น รวมทั้งมีการลดลงของการแตกหักของสายดีเอ็นเอและปริมาณของ ROS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ[๒]

สำหรับการแช่แข็งและละลายอสุจิซึ่งมีบทบาทสำคัญที่ส่งผลต่อผลสำเร็จในการรักษาภาวะมีบุตรยาก โดยการใช้เทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ (ART) มีหลายรายงานวิจัยที่พบว่า การแช่แข็งและละลายอสุจิมีผลกระทบต่อโครงสร้างหน้าที่และคุณภาพของอสุจิ เช่น การเคลื่อนไหว รูปร่าง ความมีชีวิต รวมทั้งผลสำเร็จของการปฏิสนธิและการตั้งครรภ์ที่ลดลง[๑๕ - ๒๐] เนื่องจากระหว่างการแช่แข็งแบบ slow freezing จะเกิด damaging processes ต่างๆ ต่ออสุจิ เช่น thermal shock, intracellular ice crystal, extracellular ice crystal, cell dehydration และ osmotic shock[๒๑] แต่การแช่แข็งแบบเนื้อแก้วมีข้อดีคือ จะไม่ทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งทั้งภายนอกและภายในเซลล์ ซึ่งอาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของ cryoprotectant และการลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว ทำให้ผลกระทบที่อาจจะเกิดขึ้นกับตัวอสุจิลดลง รวมทั้งการเกิด chilling injury ที่น้อยลงด้วย วิธีการนี้เป็นวิธีที่ประหยัดค่าใช้จ่ายเพราะราคาไม่สูงและใช้เวลาในการทำน้อย[๒๒] แต่อย่างไรก็ตามวิธีการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วมีข้อเสียคือ จำเป็นต้องมีการใช้ cryoprotectant ในความเข้มข้นสูง (ร้อยละ ๓๐ - ๖๐) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการแช่แข็งแบบช้า การใช้ cryoprotectant ในปริมาณที่สูงจะส่งผลทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้เช่นกัน จากงานวิจัยของ Vutyavanich และคณะ ในปี ค.ศ. ๒๐๑๐ พบว่าอัตราการมีชีวิต อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลงหลังจากผ่านการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วแล้ว[๒๓] และจากผลของงานวิจัยในครั้งนี้ พบว่ากลุ่มอสุจิสดที่ไม่ผ่านการเตรียมอสุจิเปรียบเทียบกับกลุ่มอสุจิสดที่ไม่ผ่านการเตรียมอสุจิแล้วนำไปแช่แข็งและละลายจะมีความเข้มข้นของอสุจิ อัตราการเคลื่อนที่ อัตราอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าและอัตราอสุจิที่มีชีวิตลดลง รวมทั้งมีค่าความเสียหายของดีเอ็นเอเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับกลุ่มอสุจิที่ผ่านการเตรียมอสุจิเปรียบเทียบกับกลุ่มของอสุจิที่ผ่านการเตรียมอสุจิก่อนนำไปผ่านการแช่แข็งและละลาย พบว่ามีค่าของอัตราการเคลื่อนที่ อัตราอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปรกติ อัตราอสุจิที่มีชีวิตและอัตราความสมบูรณ์ของการทำงานอสุจิลดลงรวมทั้งมีค่าความเสียหายของดีเอ็นเอเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของเกศนิษาและคณะในปี ค.ศ. ๒๐๑๔[๒] และกับ งานวิจัยของ Khalili M และคณะ ในปี ค.ศ. ๒๐๑๔ ที่ได้แสดงให้เห็นว่าการนำอสุจิไปเข้ากระบวนการแช่แข็งไม่ว่าจะผ่านหรือไม่ผ่านการเตรียมอสุจิมาก่อนจะส่งผลกระทบต่อคุณภาพของอสุจิทั้งสิ้น ได้แก่ การเคลื่อนที่ของอสุจิ อัตราการรอดชีวิต อัตราอสุจิที่มีรูปร่างปรกติมีค่าลดต่ำลง รวมทั้งมีค่าความเสียหายของดีเอ็นเอเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งพบได้ทั้งในน้ำอสุจิที่ปรกติและผิดปรกติ[๒๔]

สำหรับงานวิจัยครั้งนี้พบว่า กลุ่มที่ผ่านการเตรียมอสุจิก่อนนำไปผ่านการแช่แข็งและละลายเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ผ่านการเตรียมอสุจิก่อนนำมาผ่านการแช่แข็งและละลายจะมีอัตราอสุจิที่มีรูปร่างปรกติมากกว่ารวมทั้งมีการแตกหักของสายดีเอ็นเอน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อย่างไรก็ดีกลุ่มที่ผ่านการเตรียมอสุจิก่อนการแช่แข็งและละลายตามมีค่าของอัตราอสุจิที่มีชีวิตน้อยกว่าอาจเนื่องจากการขาด protective factors ที่อยู่ใน seminal fluid ที่ถูกล้างออกไป ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ Petyim S. และคณะในปี ค.ศ. ๒๐๑๔ ที่พบว่าอสุจิที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งและละลายในทั้งกลุ่มที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการเตรียมอสุจิ มีจำนวนอสุจิและอัตราการเคลื่อนที่ลดลง แต่มีอัตราการตายของอสุจิในกลุ่มที่มีการเตรียมอสุจิก่อนนำไปผ่านการแช่แข็งน้อยกว่า ซึ่งแสดงถึงการมีอัตราการมีชีวิตที่สูงกว่าในกลุ่มที่ไม่ผ่านการเตรียมอสุจิ[๒๕]

การเตรียมอสุจิจะช่วยลด ROS ลงเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่เตรียมอสุจิ[๒] สำหรับผลการวิจัยครั้งนี้ ซึ่งพบว่าการเตรียมอสุจิก่อนการแช่แข็งและละลายมีความเสียหายของสายดีเอ็นเอน้อยกว่าการไม่เตรียมอสุจิก่อนการแช่แข็งและละลายโดยวิธีแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว ซึ่งแตกต่างจาก Donnelly และคณะ ที่พบว่าการแช่แข็งอสุจิใน seminal plasma จะมี DNA integrity ดีกว่ากลุ่มที่ผ่านการเตรียมอสุจิก่อนการแช่แข็งและละลาย[๑๕] อาจเนื่องมาจากวิธีการแช่แข็งที่แตกต่างกันทำให้มีผลต่อความเสียหายของดีเอ็นเอแตกต่างกัน ดังเช่นในรายงานของ Petyim S และคณะ ที่พบว่าการแช่แข็งแบบช้า (slow freezing) ทำให้เกิดความเสียหายของดีเอ็นเอมากกว่าการแช่แข็งด้วย nitrogen vapor[๒๖] และจิรัฐติกาล ที่พบว่าการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วมีผลต่อคุณภาพอสุจิดีกว่าการแช่แข็งด้วย nitrogen vapor (ถึงแม้จะไม่ได้ศึกษาเรื่องความเสียหายของดีเอ็นเอ) อย่างไรก็ตามผลกระทบจากการแช่แข็งต่อ DNA integrity นั้น ยังเป็นที่ถกเถียงกันอย่างมาก จึงยังสรุปไม่ได้ว่าเกิดจากกลไกใดบ้างและการแช่แข็งนั้นมีผลกระทบโดยตรงหรือไม่[๒๑]

จากผลงานวิจัยนี้แสดงว่าการเตรียมอสุจิมีผลปกป้องอสุจิต่อการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วและละลายโดยเฉพาะในเรื่องอสุจิที่มีรูปร่างปรกติและการแตกหักของสายดีเอ็นเอ แต่มีผลเสียในเรื่องความเข้มข้นของอสุจิและมีผลเสียต่ออัตราการมีชีวิตของอสุจิ ซึ่งอาจเป็นเพราะการขาด protective factors ของ seminal fluid ที่มีผลต่ออัตราการมีชีวิตของอสุจิ แต่ก็อาจจะมีการลดลงของ destructive factors ได้แก่ ROS ที่เป็นสาเหตุของการเกิดความเสียหายของดีเอ็นเอของอสุจิด้วยซึ่งต้องทำการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมต่อไป

จากการศึกษานี้สรุปได้ว่าการเตรียมอสุจิมีผลทำให้คุณภาพของอสุจิดีขึ้น (ยกเว้นความเข้มข้นของอสุจิที่ลดลง) รวมทั้งมีการลดลงของความเสียหายของดีเอ็นเอ ส่วนการเตรียมอสุจิก่อนที่จะนำไปแช่แข็งและละลาย แม้จะไม่สามารถปกป้องผลกระทบจากการแช่แข็งและละลาย แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ผ่านการเตรียมอสุจิก่อนการแช่แข็งและละลาย พบว่ามีอัตราอสุจิที่มีรูปร่างปรกติมากกว่าและมีความเสียหายแตกหักของดีเอ็นเอของอสุจิน้อยกว่าแม้จะมีอัตราการมีชีวิตของอสุจิลดลง ซึ่งผลของการศึกษานี้อาจจะเป็นประโยชน์ในการที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่มีบุตรยากเพื่อเพิ่มอัตราการตั้งครรภ์ เช่น ในกรณีที่ต้องการคัดเลือกอสุจิที่มีรูปร่างปรกติเพื่อใช้ในการรักษาควรทำการเตรียมอสุจิก่อนการแช่แข็งและละลาย ส่วนในกรณีที่ต้องการอสุจิที่มีชีวิตจำนวนมากเพื่อใช้ในการรักษาก็ไม่ควรเตรียมอสุจิหรือใช้อสุจิที่ไม่ผ่านการเตรียมอสุจิก่อนนำไปแช่แข็งและละลาย สำหรับในกรณีที่ต้องการอสุจิที่มีความเสียหายของดีเอ็นเอน้อยเพื่อใช้ในการรักษาควรทำการเตรียมอสุจิก่อนการแช่แข็งและละลาย เป็นต้น ทั้งนี้ยังคงต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงานวิจัยจากกองทุนวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๘ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่หน่วยมีบุตรยาก โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ และคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ที่ให้ความอนุเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

๑. ธีระพร วุฒยวนิช. การแช่แข็งแบบเนื้อแก้วในเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ (Vitrification). เชียงใหม่: สันติภาพแพ็คพริ้ง; ๒๕๕๖. หน้า ๙๕-๙.

๒. เกศนิษา นรสิงห์. ผลของการเติมโคเอนไซม์คิวเทนในน้ำยาแช่แข็งต่อคุณภาพและการแตกหักของสายดีเอ็นเอในอสุจิที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วในชายที่มีอสุจิปรกติ. ธรรมศาสตร์เวชสาร ๒๕๕๗;๑๕:๔๖๒-๗๑.

๓. Kalthur G, Raj S, Thiyagarajan 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. Epub 2010/11/12.

๔. Agarwal A, Prabakaran SA, Said TM. Prevention of oxidative stress injury to sperm. J Androl 2005;26: 654-60.

๕. Organization wh. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen FIFTH EDITION. World Health Organization. 2010:224.

๖. Instructions for Use: HBA® Sperm-Hyaluronan Binding Assay, European Patent No. 1056336 DBP/ 69924472.23.

๗. Document reference: FP09 I12 R01 A.7, Hypo-osmotic swelling test for human sperm, Update: 30/09/2014.

๘. Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Palaez M, Crabo BG, Zaneveld LJD. 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;70:219-228.

๙. ธีระพร วุฒยวนิช. เทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ (Assisted Reproductive Technology). เชียงใหม่: นพบุรีการพิมพ์; ๒๕๕๖, หน้า ๑๑๑-๒๕.

๑๐. Anderson D, Yu TW, McGregor DB. Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. Mutagenesis 1998;13:539-55.

๑๑. Cortés-Gutiérrez EI, López-Fernández C, Fernández JL, Dávila-Rodríguez MI, Johnston SD, Gosálvez J. Interpreting sperm DNA damage in a diverse range of mammalian sperm by means of the two-tailed comet assay. Front Genet 2014;5:404.

๑๒. 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 Suppl 1:786-90.

๑๓. Malvezzi H, Sharma R, Agarwal A, Abuzenadah AM, Abu-Elmagd M. Sperm quality after density gradient centrifugation with three commercially available media: a controlled trial. Reprod Biol Endocrinol 2014;12:121.

๑๔. Donnelly ET, O'Connell M, McClure N, Lewis SE. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. Human Reproduction (Oxford, England) 2000;15:1552-61.

๑๕. Sherman JK. Synopsis of the use of frozen human semen since 1964: state of the art of human semen banking. Fertil Steril 1973;24:397-412.

๑๖. Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. Fertil Steril 2001; 76:892-900.

๑๗. de Paula TS, Bertolla RP, Spaine DM, Cunha MA, Schor N, Cedenho AP. Effect of cryopreservation on sperm apoptotic deoxyribonucleic acid fragmentation in patients with oligozoospermia. Fertil Steril 2006;86: 597-600.

๑๘. Duru NK, Morshedi MS, Schuffner A, Oehninger S. Cryopreservation-thawing of fractionated human spermatozoa is associated with membrane phosphatidylserine externalization and not DNA fragmentation. J Androl 2001;22:646-51.

๑๙. Isachenko E, Isachenko V, Katkov, II, Rahimi G, Schondorf T, Mallmann P, et al. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. Human reproduction (Oxford, England) 2004;19:932-9.

๒๐. Cross NL, Hanks SE. Effects of cryopreservation on human sperm acrosomes. Human reproduction (Oxford, England) 1991;6:1279-83.

๒๑. Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. Human sperm cryopreservation: Update on techniques, Effect on DNA integrity, and implications for ART. Adv Urol 2012;2012:854837.

๒๒. 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.

๒๓. Vutyavanich T, Piromlertamorn W, Nunta S. Rapid freezing versus slow programmable freezing of human spermatozoa. Fertil Steril 2010;93:1921-8.

๒๔. Khalili MA, Adib M, Halvaei I, Nabi A. Vitrification of neat semen alters sperm parameters and DNA integrity. Urol J 2014;11:1465-70.

๒๕. 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 Assist Reprod Genet 2014; 31:1673-80.

๒๖. Petyim S, Choavaratana R. Cryodamage on sperm chromatin according to different freezing methods, assessed by AO test. J Med Assoc Thai 2006;89: 306-13.

Abstract

Effect of prepared and unprepared semen on sperm quality of vitrified normozoospermia

Chonthicha Samrejkijcharoen*, Charoenchai Chiamchanya**, Treetip Ratanavalachai***, Pachara Visutakul****

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

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

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

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

Correspondence: Charoenchai Chiamchanya Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Thammasat University

Tel: 02 926 9343 Fax: 02 926 9485 Email: charoenchai1961@hotmail.com

Introduction: Sperm cryopreservation by vitrification is process to preserve sperm for fertility treatment. However, from previous studies, after freezing and thawing, there are some disadvantages i.e. decreased sperm concentration and motility while increasing sperm DNA fragmentation. Thus, we were interested to study the protective effects of prepared and unprepared semen on sperm quality after freezing and thawing of vitrified normozoospermia.

Method: Semen samples collected from 40 normospermic male volunteers (according to WHO criteria 2010) were divided into 4 groups as the followings; group 1: unprepared or neat semen, group 2: prepared semen, group 3: unprepared semen, frozen and thawed, group 4: prepared semen, frozen and thawed. Semen quality of these 4 groups i.e. sperm concentration, morphology and motility were compared. Also, sperm vitality measured by Hypo-osmotic swelling test (HOS), sperm maturity and functions measured by Hyaluronan binding assay (HBA) and sperm DNA damage measured by Comet assay were performed.

Result: After sperm preparation, sperm concentration and DNA damage were significantly decreased whereas sperm motility, progressive motile sperm, sperm with normal morphology, sperm vitality, sperm maturity and functions were significantly increased compared to those of fresh unprepared sperm. After freezing and thawing of prepared and unprepared sperm, almost all sperm parameters of both groups were decreased except DNA damage which was significantly increased. However, the percentage of normal morphology sperm was significantly higher while sperm DNA damage and sperm vitality were significantly lower in the prepared sperm group.

Discussion and Conclusion: This study revealed that sperm preparation was able to improve all parameters of sperm quality (except sperm concentration) including sperm maturation and functions and sperm DNA damage but could not do so after freezing and thawing. Anyway, sperm preparation before freezing and thawing by vitrification resulted in higher percentage of normal morphology sperm with lesser degree of DNA fragmentation and vitality than those of the unprepared group. These findings may be beneficial for clinical application in the treatment process of infertility. Anyhow, further investigations are still needed for larger scale of data.

Key words: Sperm preparation, Vitrification, Semen analysis, Sperm hyaluronan binding assay, Sperm DNA fragmentation