

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ผลของการเสริมรีดิวซ์กลูต้าไธโอนในระหว่างการแช่แบบเนื้อแก้ว/
การอุ้ง ต่อการรอดชีวิตและการแตกหักของดีเอ็นเอของอสุจิมนุษย์

ผู้เขียน

นางสาวพรรษา ราชิตติกุล

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สรีรวิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษา

ศ. นพ. ชีระพร วุฒยวนิช

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

ผศ. ดร. พรกมล ตั้งชัยสิน

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

กระบวนการแช่แข็งนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระและการเปลี่ยนแปลงของกลไกการต่อต้านอนุมูลอิสระ ส่งผลเสียต่อการอยู่รอดและการทำงานของอสุจิมนุษย์ รีดิวซ์กลูต้าไธโอน เป็น สารเคมี ซึ่งมีหมู่ Thiol อื่นๆ ที่ไม่ใช่โปรตีนที่มีมากที่สุดภายในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สามารถป้องกันความเครียดออกซิเดชันภายในเซลล์

ในการศึกษานี้ สันนิฐานว่า รีดิวซ์กลูต้าไธโอนมีผลป้องกันการแช่แข็งต่ออสุจิมนุษย์ การค้นพบในการศึกษานี้คือ การเสริม 1 มิลลิโมลาร์ของรีดิวซ์กลูต้าไธโอนเข้าไปในน้ำยาแช่แข็งหรือน้ำยาละลายสำหรับการแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว หรือ น้ำยาแช่แข็งหรือน้ำยาละลายสำหรับการแช่แข็งแบบไอไนโตรเจนเหลว สามารถช่วยเพิ่มความอยู่รอดของตัวอสุจิและการเคลื่อนไหวหลังจากการเก็บรักษาโดยใช้การแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว และการแช่แข็งแบบไอไนโตรเจนเหลว น้ำเชื้อที่ปกติจากคู่สมรสที่มีบุตรยากจำนวน 15 คน ซึ่งถูกผ่านการแยกชั้นเพื่อคัดเลือกอสุจิและตะกอนอสุจิ ถูกแบ่งออกเป็น กลุ่มอสุจีก่อนแช่แข็ง, กลุ่มที่แช่แข็งแบบเนื้อแก้ว, กลุ่มที่แช่แข็งแบบเนื้อแก้วที่เสริมด้วยรีดิวซ์กลูต้าไธโอน 1 มิลลิโมลาร์, กลุ่มที่แช่แข็งในไอของไนโตรเจนเหลว และกลุ่มที่แช่แข็งในไอของ

ไนโตรเจนเหลว ที่เสริมด้วยริคิควิลด์ไฮดรอกไซด์ 1 มิลลิโมลาร์ ที่ถูกเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวอย่างน้อย 1 สัปดาห์ และปั่นล้างด้วย EBSS ที่เสริมหรือไม่เสริมด้วยริคิควิลด์ไฮดรอกไซด์ 1 มิลลิโมลาร์ และถูกประเมินความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ, การเคลื่อนที่, การมีชีวิต, ลักษณะรูปร่างปกติของอสุจิ และการแตกหักของดีเอ็นเอ เช่นเดียวกับในกลุ่มที่ไม่แช่แข็ง โดยการประเมินการเคลื่อนที่และลักษณะรูปร่างปกติของอสุจิ จะใช้ CASA ตามข้อกำหนดของ WHO 2010, การประเมินการมีชีวิตอยู่ จะใช้ eosin-Y staining, ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ จะใช้ hypo-osmotic swelling test (HOST) และการแตกหักของดีเอ็นเอ จะใช้ TUNEL assay การศึกษาครั้งนี้พบว่า กลุ่มตัวอย่างหลังการละลายของการแช่แข็งแบบเนื้อแก้ว ที่เสริมด้วยริคิควิลด์ไฮดรอกไซด์ 1 มิลลิโมลาร์ มีอัตราความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตอยู่ (75%, 74.7% และ 72.2%, ตามลำดับ) มากกว่ากลุ่มแช่แข็งแบบเนื้อแก้วปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนี้ กลุ่มการแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลวที่เสริมด้วยริคิควิลด์ไฮดรอกไซด์ 1 มิลลิโมลาร์ มีอัตราความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตอยู่ (63.0%, 49.9% และ 57.8%, ตามลำดับ) มากกว่ากลุ่มแช่แข็งแบบไนโตรเจนเหลวปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่า ไม่มีความแตกต่างของลักษณะรูปร่างปกติของอสุจิทั้งในกลุ่มไม่แช่แข็งและกลุ่มแช่แข็งทั้งหมดที่เสริมหรือไม่เสริมด้วยริคิควิลด์ไฮดรอกไซด์ 1 มิลลิโมลาร์ ($P > 0.05$) (11.2%, 8.5%, 10.2%, 6.7%, และ 9.9%, ตามลำดับ) นอกจากนี้ ยังพบว่า การแตกหักของดีเอ็นเออสุจิจะเพิ่มขึ้นภายหลังจากการแช่แข็ง แต่มีเพียงกลุ่มการแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลวที่มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การที่เสริมหรือไม่เสริมด้วยริคิควิลด์ไฮดรอกไซด์ 1 มิลลิโมลาร์ ในระหว่างการแช่แข็งแบบเนื้อแก้วและการแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลวช่วยลดการแตกหักดีเอ็นเออสุจิ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบระหว่างกลุ่มแช่แข็งปกติ ($P > 0.05$)

ในการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นถึง ประโยชน์ของการเสริม ริคิควิลด์ไฮดรอกไซด์ ในระหว่างการแช่แข็งอสุจิมนุษย์ ต่อ ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ การเคลื่อนที่ การมีชีวิต แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ลักษณะรูปร่างปกติของอสุจิ ซึ่งความเข้มข้นที่ใช้ในการศึกษานี้ช่วยลดการแตกหักของดีเอ็นเอ หลังการแช่แข็งแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในการศึกษาต่อไป ควรที่จะประเมิน อนุพลีอิสระในระหว่างการแช่แข็ง และปริมาณริคิควิลด์ไฮดรอกไซด์ภายหลังจากการเติมระหว่างกระบวนการแช่แข็ง

Thesis Title Effects of Reduced Glutathione Supplementation During
Vitrification/Warming on the Survival and DNA
Fragmentation of Human Sperm

Author Miss Hunsra Rapajittikul

Degree Master of Science (Physiology)

Advisory Committee Prof. Teraporn Vutyavanich, M.D. Advisor
Asst. Prof. Dr. Pornpimon Tangchaisin Co-advisor

ABSTRACT

Cryopreservation leads to increased ROS levels and alteration of antioxidant defense mechanism, resulting in loss of human sperm survival and function. GSH is the most abundant non-protein thiols in mammalian cell for protection against oxidative stress within cell. This study, hypothesized that GSH may offers cryoprotective effect on human spermatozoa during cryopreservation. The major finding in this study was either the supplementation with 1 mM GSH into the vitrification/warming or freezing/thawing medium could be improves sperm survival and motility after cryopreservation by using vitrification and liquid nitrogen vapor technique.

Semen from 15 male partners of infertile couples were processed through density gradients and the final pellet were divided into 5 groups: non-frozen control group, vitrification group, vitrification + 1 mM GSH group, liquid nitrogen vapor technique group, and liquid nitrogen vapor technique + 1mM GSH group. Post-thaw sample after at least 1 weeks of storage in liquid nitrogen were washed in EBSS supplementation with or without 1 mM GSH and immediately assessed for sperm membrane integrity, motility, viability, normal morphology and DNA fragmentation in the same way as

those in the non-frozen control group. The assessment of sperm motility and normal morphology used a computer-assisted semen analyzer (CASA) followed WHO 2010 criteria; viability by eosin-Y staining; membrane integrity by the hypo-osmotic swelling test (HOST) and DNA fragmentation by the TUNEL assay.

Post-thaw sperm membrane integrity, motility, viability were significantly higher ($P<0.05$) in the vitrification + 1 mM GSH group (75%, 74.7% and 72.2%, respectively) than those in the vitrification group (69.5%, 66.4%, and 64.5%, respectively). Moreover, liquid nitrogen vapor technique + 1 mM GSH group (63.0%, 49.9% and 57.8%, respectively) has significantly higher post-thaw sperm motility, vitality and membrane integrity ($P<0.05$) than those in the liquid nitrogen vapor technique group (57.53%, 41.27%, and 52.2%, respectively). There was no significant difference in post-thawed normal sperm morphology ($P>0.05$) in controls, and all freezing/thawing supplementation with or without 1 mM GSH groups (11.2%, 8.5%, 10.2%, 6.7%, and 9.9%, respectively).

In addition, the sperm DNA fragmentation was increased after cryopreservation, but it only reached statistical significance in the liquid nitrogen vapor group ($P<0.05$). Supplementation of vitrification/warming and freezing/thawing media with 1 mM GSH caused a reduction in sperm DNA fragmentation, but the effect was not statistically significant in both cryopreservation groups ($P>0.05$).

This study showed cryoprotective effects on sperm motility, vitality, and membrane integrity, but had no significant effect on morphology. At the dose employed, it decreased DNA fragmentation post cryopreservation, but the effect was not statistically significant. Further study should be performed to evaluate the levels of ROS that were produced during each step of cryopreservation method and detect GSH content after supplementation during each cryopreservation method.