อภินันทนาการ

สัญญาเลขที่ R2557C064

สำนักหอสมุด

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเพิ่มพูนทักษะในการทำ Intracytoplasmic sperm injection และ Embryo freezing ในหนูทดลองเพื่อเตรียมความพร้อมในการให้บริการเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ในคน

คณะผู้วิจัย

นายแพทย์สุรชัย เดชอาคม คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

แพทย์หญิงอภิรดี จิรัฐิกาลโชติ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

แพทย์หญิงพัชรดา อมาตยกุล คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

นางสาวสุวรรธณา แย้มโตนด คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร : จากงบประมาณรายได้ มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 21 ส.ค. 2558
เลขทะเบียน 1 6820209
เลขเรียกหนังสือ
ว QP
19
ส451
2558

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร: ส่วนงบประมาณรายได้ มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์

ข้อสรุปโรงการ

รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย

ชื่อโครงการ	การเพิ่มพูนทักษะในการทำ Intracytoplasmic sperm injection และ Embryo freezing ในหนูทดลองเพื่อเตรียมความพร้อมในการให้บริการเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ในคน
หัวหน้าโครงการ	นายแพทย์สุรชัย เดขอาคม
ที่อยู่	ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000
โทรศัพท์	055-261900 ต่อ 5505
โทรสาร	055-261923
E-mail	surachaid@nu.ac.th
สาขาวิชาที่ทำวิจัย	สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
งบประมาณทั้งโครงการ	150,000 บาท

ระยะเวลาดำเนินโครงการ 1 ปี (ขยายต่อ 6 เดือน)

ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2556 - 30 กันยายน 2557 (ขยายถึง 31 มีนาคม 2558)

ได้รับทุนอุดหนุนจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร: ส่วนงบประมาณรายได้ มหาวิทยาลัยนเรศวรประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์

บทคัดย่อ

เทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ประกอบด้วยกระบวนการหลายขั้นตอนที่ต้องอาศัยเครื่องมือทางห้องปฏิบัติการและทักษะของนักวิทยาศาสตร์ด้านตัวอ่อน โดยเฉพาะทักษะที่ต้องกระทำกับเซลล์สืบพันธุ์และตัวอ่อน ดังนั้นจึงต้องมีการฝึกทักษะดังกล่าวให้ชำนาญในสัตว์ทดลองก่อนแล้วจึงลงมือปฏิบัติจริงกับเซลล์สืบพันธุ์และตัวอ่อนของมนุษย์ ผู้วิจัยจึงทำการเพิ่มพูนทักษะโดยการใช้เซลล์สืบพันธุ์และตัวอ่อนของหนูทดลองเป็นตัวแทนของเซลล์สืบพันธุ์และตัวอ่อนของมนุษย์ ในการทำ Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) เซลล์สืบพันธุ์หนูจำนวน 103 ใบกลายเป็นตัวอ่อน 63 ตัว คิดเป็นอัตราการปฏิสนธิ 61 เปอร์เซ็นต์ ทำการแช่แข็งตัวอ่อนหนูด้วยวิธี Ultrarapid จำนวน 32 ตัว รอดชีวิตหลังละลายตัวอ่อน 16 ตัว คิดเป็นอัตราการรอดชีวิต 50 เปอร์เซ็นต์ และทำการแช่แข็งตัวอ่อนหนูด้วยวิธี Vitrification จำนวน 70 ตัว รอดชีวิตหลังละลายตัวอ่อน 51 ตัว คิดเป็นอัตราการรอดชีวิต 81 เปอร์เซ็นต์ อัตราการปฏิสนธิและอัตราการรอดชีวิตหลังแช่แข็งตัวอ่อนด้วยวิธี Vitrification ใกล้เคียงกับมาตรฐานของห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ทั่วไป ส่วนอัตราการรอดชีวิตหลังการแช่แข็งตัวอ่อนด้วยวิธี Ultrarapid ยังคงต่ำกว่ามาตรฐาน ผู้วิจัยจึงสรุปว่าห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวรสามารถให้บริการแก่คู่สมรสมีบุตรยากด้วยวิธีการ ICSI และแช่แข็งตัวอ่อนด้วยวิธี Vitrification ได้หลังจากฝึกทักษะกับเซลล์สืบพันธุ์และตัวอ่อนหนูทดลอง

ABSTRACT

Asssisted reproductive technologies (ART) consist of several processes including scientific equipments and embryologist's skill, especially manipulation skills on gametes and embryos. Thus, improving of manipulation skills to gametes and embryos in ICR mouse is essential before handling human gametes and embryos. For intracytoplasmic sperm injection (ICSI), one hundred and three oocytes were manipulated and the result showed 61 % of fertilization rate. In the process of freezing, thirty two embryos were frozen by ultrarapid method and the survival rate after thawing was 50 % which was slightly low. On the other hand, freezing and thawing with vitrification method showed the survival rate up to 81 %. The fertilization rate from ICSI and survival rate from vitrification are comparable to other ART laboratories. In conclusion, after training of these skills, the ART laboratory of Naresuan university hospital is capable of operation ICSI with embryo freezing and thawing as a part of infertility service.

สารบัญ

บทนำ	1
วัตถุประสงค์การวิจัย	1
ทฤษฎี สมมุติฐานหรือกรอบแนวความคิดการวิจัย	1
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
เนื้อเรื่อง	5
ขั้นตอนการวิจัย	5
การวิเคราะห์ข้อมูล	11
ผลการวิจัย	11
ข้อวิจารณ์	13
สรุปและข้อเสนอแนะ	14
บรรณานุกรม	15

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่ 1 Injection dish setup 8

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ผลการทดลองทำ Intracytoplasmic sperm injection 11

ตารางที่ 2 ผลการทดลองแช่แข็งและละลายตัวอ่อนด้วยวิธี Ultrarapid 12

ตารางที่ 3 ผลการทดลองแช่แข็งและละลายตัวอ่อนด้วยวิธี Vitrification 12

บทนำ

ในปัจจุบันปัญหาคู่สมรสมีบุตรยากพบมากขึ้นเนื่องจากคู่สมรสมีแนวโน้มต้องการมีบุตรเมื่ออายุมากขึ้น จากการประมาณการในปัจจุบันพบว่ามีคู่สมรสที่เข้าเกณฑ์มีบุตรยากประมาณ 10 % ของคู่สมรส การดูแลรักษาเบื้องต้นในโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวรสามารถทำการกระตุ้นไข่ร่วมกับการฉีดน้ำเชื้อเข้าโพรงมดลูก ซึ่งสามารถดูแลรักษาผู้ป่วยได้เพียงบางส่วนเท่านั้น จากข้อมูลของประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศแถบยุโรปพบว่า ประมาณ 1-3 % ของเด็กเกิดใหม่จะเป็นเด็กที่เกิดจากกระบวนการใช้เทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ ทางโรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวรตั้งเป้าหมายเป็นโรงพยาบาลตติยภูมิที่ดูแลรักษาผู้ป่วยซับซ้อนจึงจัดตั้งห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ขึ้น เพื่อดูแลรักษาคู่สมรสที่จำเป็นต้องได้รับการรักษาขั้นสูงขึ้นจากเดิม แต่เนื่องจากกระบวนการทำเด็กหลอดแก้วเป็นกระบวนการที่ต้องอาศัยทักษะในทางห้องปฏิบัติการอย่างสูง และจำเป็นต้องมีการควบคุมคุณภาพของสภาพแวดล้อมของการเลี้ยงตัวอ่อนเป็นอย่างดี จึงจำเป็นต้องทำการทดสอบในหนูทดลองก่อน เพื่อที่จะได้ผลลัพธ์ที่ดีในการดูแลรักษาผู้ป่วยต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อเพิ่มพูนทักษะในการทำ ICSI, การทำ Embryo freezing ในหนูทดลองเพื่อเตรียมความพร้อมในการให้บริการเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ในคน

ทฤษฎี สมมุติฐานหรือกรอบแนวความคิดการวิจัย

เทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์(Assisted reproductive technologies, ART) เป็นกระบวนการที่เกี่ยวกับการจัดการกับ oocytes ภายนอกร่างกาย วิธีการแรกและเป็นวิธีที่นิยมมากที่สุดคือการทำเด็กหลอดแก้ว หรือ In vitro fertilization (IVF)ในปัจจุบันเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์มีความก้าวหน้ามากขึ้นจนมีกระบวนการที่สามารถช่วยแก้ข้อจำกัดบางประการของ conventional IVF ได้ เช่น

-การทำ Intracytoplasmic sperm injection ในกรณีที่มีปัญหา ฝ่ายชายมีอสุจิที่ผิดปกติอย่างมากหรือใช้อสุจิที่ได้จากกระบวนการทางศัลยกรรม

-การแช่แข็งตัวอ่อนในกรณีที่มีตัวอ่อนคุณภาพดีเหลืออยู่เพื่อที่จะสามารถใช้ได้โดยไม่ต้องกระตุ้นไข่ใหม่หรือเพื่อใช้ในกรณีที่ต้องการเก็บรักษาภาวะเจริญพันธุ์ไว้ก่อนการรักษาโรคที่เกี่ยวกับมะเร็ง

-การทำ preimplantation genetic diagnosis เพื่อช่วยเลือกตัวอ่อนที่ไม่มีโรคทางพันธุกรรมมาใส่กลับเข้าโพรงมดลูก

ข้อบ่งชี้ในปัจจุบันของการใช้เทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ ได้แก่

1. ปัญหาท่อนำไข่ผิดปกติ (Tubal factor infertility)
2. ปัญหาที่เกิดจากจำนวนหรือคุณภาพของอสุจิฝ่ายชายผิดปกติ (Male factor infertility)
3. ปัญหาฝ่ายหญิงไข่ไม่ตก (Ovulatory dysfunction)
4. ปัญหาฝ่ายหญิงเป็นเยื่อบุโพรงมดลูกเจริญผิดที่ (Endometriosis)
5. ปัญหารังไข่เสื่อมภาพในฝ่ายหญิง (Diminished ovarian reserve)
6. ไม่พบสาเหตุที่ชัดเจน (unexplained infertility)

ก่อนหน้านี้ทางผู้วิจัยเคยทำโครงการทดลองทำ In vitro fertilization ในหนู ซึ่งผลสำเร็จหลังโครงการเสร็จสิ้นสามารถเริ่มทำ In vitro fertilization ในคนได้ แต่เนื่องจากในกระบวนการทำเด็กหลอดแก้วในคนนั้น ในบางกรณีที่ฝ่ายชายมีปัญหาจำนวนตัวอสุจิน้อยมาก ไม่สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้เองตามธรรมชาติ ความก้าวหน้าในปัจจุบันสามารถแก้ไขได้ด้วยการใช้เครื่องจุลหัตถการช่วยฉีดอสุจิ 1 ตัวเข้าไปในไข่ได้ (Intracytoplasmic sperm injection, ICSI) นอกจากนี้ในบางกรณีที่หลังปฏิสนธิแล้วมีตัวอ่อนคุณภาพดีจำนวนมากที่เหลืออยู่ ก็มีความจำเป็นต้องแช่แข็งตัวอ่อน (Embryo freezing) เก็บไว้ใช้สำหรับผู้ป่วยในครั้งถัดไปโดยที่ผู้ป่วยไม่ต้องผ่านกระบวนการกระตุ้นไข่ใหม่ จากปัญหาดังกล่าวทางผู้วิจัยจึงมีความจำเป็นต้องเพิ่มพูนทักษะในการทำ ICSI และ Embryo freezing เพิ่มเติมในหนูทดลองก่อนที่จะเริ่มทำในคนเป็นขั้นตอนถัดไป

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) เป็นกระบวนการที่เลือกอสุจิคุณภาพดีเพียงตัวเดียวฉีดเข้าใน cytoplasm ของเซลล์ไข่ อัตราการปฏิสนธิโดยทั่วไปของการทำ ICSI ใกล้เคียงกับอัตราการปฏิสนธิจาก conventional IVF ที่ทำในรายที่ไม่มีปัญหา male factor (50-70%)[1] ข้อบ่งชี้ที่สำคัญของการทำ ICSI คือ male factor infertility เช่น severe oligospermia (<5x10^6 sperm/ml), asthenospermia (<5% progressive moltility), teratospermia (<4% normal forms ตาม strict criteria) นอกจากนี้ ICSI ยังจำเป็นสำหรับ อสุจิที่เก็บมาจากการผ่าตัด (Surgical sperm retrieved) หรือในรายที่ต้องทำ preimplantation genetic diagnosis สุดท้ายการทำ ICSI ยังจำเป็นในรายที่เคยทำ conventional IVF แล้วมีปัญหาอัตราการปฏิสนธิที่ต่ำกว่าปกติ

ความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีเรื่อง cryobiology ในปัจจุบันทำให้การแช่แข็งตัวอ่อน เป็นส่วนที่สำคัญส่วนหนึ่งของเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ โดยสามารถช่วยเพิ่มอัตราการตั้งครรภ์สะสมที่ได้จากการเก็บไข่ 1 ครั้ง (cumulative pregnancy rate per retrieval) นอกจากนี้การแช่แข็งตัวอ่อนยังมีประโยชน์ในผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงสูงที่จะเกิดภาวะ Ovarian hyperstimulation syndrome[2]

การแช่แข็งตัวอ่อนประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลัก ได้แก่ การแช่แข็ง (Freezing) และการละลายตัวอ่อนที่แช่แข็งออกมาใช้ (Thawing) การแช่แข็งที่ดีต้องหลีกเลี่ยงการเกิด ผลึกน้ำแข็งในเซลล์ ซึ่งจะทำให้เซลล์ตายได้ โดยอาศัย cryoprotectants เช่น dimethyl sulfoxide, propenediol glycerol ไปแทนที่น้ำในเซลล์ โดยค่อยๆเพิ่มความเข้มข้นของ cryoprotectants

วิธีการในการแช่แข็งตัวอ่อนมี 3 วิธี คือ

1. วิธี slow-freeze ใช้ cryoprotecteants ที่มีความเข้มข้นสูงไม่สูงมากเข้าแทนที่น้ำภายในเซลล์ และอาศัยเครื่องมือค่อยๆลดอุณหภูมิลงเพื่อป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ ส่วนภายนอกเซลล์จะเกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นช้าๆ

2. วิธี ultra-rapid freezing ใช้ cryoprotecteants ที่มีความเข้มข้นสูงแต่น้อยกว่าวิธี vitrification และลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วโดยการจุ่มลงใน liquid nitrogen โดยตรง ทำให้เกิดเป็นภาวะ solid glass-like state ภายในเซลล์ส่วนภายนอกเซลล์ยังคงเกิดผลึกน้ำแข็งคล้ายวิธี slow-freeze
3. วิธี vitrification ใช้ cryoprotecteants ที่มีความเข้มข้นสูงมาก และลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วโดยการจุ่มลงใน liquid nitrogen โดยตรง ทำให้เกิดเป็นภาวะ solid glass-like state ทั้งภายในและภายนอกเซลล์[3]

การละลายตัวอ่อน จะทำโดยอาศัยการค่อยๆลดความเข้มข้นของ cryoprotectants ในเซลล์ เพื่อให้น้ำกลับเข้าเซลล์ตามปกติ จากนั้นจึงเลี้ยงต่อในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนเพื่อปรับสภาพก่อนที่จะใส่ตัวอ่อนกลับเข้าโพรงมดลูก

อัตราการรอดชีวิตหลังละลายตัวอ่อนสำหรับวิธี slow-freeze อยู่ที่ประมาณ 50-90 % โดยพบว่าการรอดในระยะ zygote สูงกว่าระยะ cleavage และ blastocyst[4] ส่วนวิธี ultra-rapid freezing พบอัตราการรอดชีวิตหลังละลายตัวอ่อนในระยะ zygote ประมาณ 88 %[5] สำหรับวิธี vitrification อัตราการรอดชีวิตหลังละลายตัวอ่อนพบว่าสูงถึง 90-100 % ในเกือบทุกระยะของตัวอ่อน[3]

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถทำการปฏิสนธิด้วยวิธี ICSI ได้โดยมีอัตรา fertilization rate ≥ 60 %
2. สามารถแช่แข็งตัวอ่อนและละลายได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยมีอัตรารอดชีวิตของตัวอ่อนหลังละลาย ≥ 80 %
3. โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวรสามารถเปิดให้บริการเทคโนโลยีการเจริญพันธุ์ได้อย่างมีมาตรฐาน

เนื้อเรื่อง

วิธีดำเนินการวิจัย

กลุ่มตัวอย่าง

หนู ICR mouse อายุ 5 – 10 สัปดาห์ โดยแบ่งเป็น

1. เพศผู้จำนวน 7 ตัว เพศเมียจำนวน 10 ตัวสำหรับการเพิ่มพูนทักษะการทำ Intracytoplasmic sperm injection
2. เพศเมียจำนวน 5 ตัวสำหรับการแช่แข็งตัวอ่อนโดยวิธี Ultra rapid freezing
3. เพศเมียจำนวน 20 ตัวสำหรับการแช่แข็งตัวอ่อนโดยวิธี Vitrification

ขั้นตอนการวิจัย

หนูที่ใช้ในการทำ IVF จะถูกพักไว้ที่ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองอย่างน้อยเป็นเวลา 7 วัน โดยอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงควรเป็น 24±1 องศาเซลเซียส มีความชื้นสัมพัทธ์คือ 50±10% และต้องควบคุมแสงสว่างภายในห้องโดยใช้ Light-dark cycle 12:12 ชั่วโมง จากนั้นจึงจะนำหนูเพศผู้และเพศเมียมาใช้ดังต่อไปนี้

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI)

Isolation of metaphase II oocytes

1. ทำการกระตุ้นไข่ (superovulation) ในหนูตัวเมียพันธุ์ ICR mouse อายุ 5-10 สัปดาห์ด้วยการฉีด pregnant mare serum gonadotropin (PMSG®, Sigma) 10 U เข้าในช่องท้อง (intrapertoneal injection) หลังจากนั้น 48 ชั่วโมงทำการฉีด human chorionic gonadotropin (Pregnyl®, Organon) 10 U เข้าในช่องท้องเพื่อกระตุ้นให้ไข่ตก
2. ทำการเก็บ metaphase II oocytes ภายหลังจากฉีด hCG 16 ชั่วโมง ตามขั้นตอนดังนี้

1) ทำให้หนูตายอย่างสงบด้วยวิธี cervical dislocation แล้วผ่าตัดเปิดหน้าท้องเพื่อตัดท่อนำไข่ทั้งสองข้างส่วน ampulla และ fimbria ออก แล้วแช่ใน fertilization medium (Sydney IVF Fertilization Medium®, Cook Medical) 500 µl ใน plastic culture dish ขนาด 35 mm

2) นำท่อนำไข่วางลงใน fertilization medium ที่มี hyarulonidase (Hyaluronidase in FertiCult® flushing medium, FertiPro)

3) ใช้เข็มขนาด 27G ½ กรีดเปิดท่อนำไข่ส่วน ampulla เพื่อให้ oocytes with attached cumulus cells หลุดออกจากท่อนำไข่ จากนั้นแช่ไข่ไว้ใน hyarulonidase นาน 2-3 นาทีเพื่อให้ cumulus cells หลุดออก

4) ล้าง cumulus cell-free eggs ด้วย fertilization medium จากนั้นย้ายลงใน culture dish และเก็บไว้ใน humidified incubator, 5%CO_2, 5%O_2, 90%N_2, 37°C

Sperm collection and preparation

1. ผสม 100% Sil-Select®(FertiPro) ด้วย flushing medium (FertiCult® flushing medium, FertiPro) ให้เจือจางเป็น 90% และ 45% Sil-Select
2. ใส่ 90% Sil-Select 2 mL ลงใน conical centrifuge tube จากนั้นค่อยๆใส่ 45% Sil-Select 2 mL ลงไปบน 90% Percoll
3. ใส่น้ำเชื้ออสุจิ 1mL ลงไปที่ชั้นบนสุด
4. ปั่นด้วยเครื่อง swing rotor centrifugation ที่ 300g เป็นเวลา 20 นาที
5. ดูดชั้นที่เป็นน้ำอสุจิและชั้น 45% Sil-Select เลยรอยต่อลงไปเล็กน้อยทิ้งไป
6. ใส่ medium 2 mL ลงไปผสมกับ 90% Sil-Select ที่เหลือ
7. ปั่นด้วยเครื่อง swing rotor centrifugation ที่ 200g เป็นเวลา 10 นาที
8. ดูดเอาน้ำส่วนบน (supernatant) ทิ้งไป เหลือส่วนที่เป็นตะกอน (pellet)
9. ใส่ medium 2 mL ลงไปผสมกับตะกอน

10. ปั่นด้วยเครื่อง swing rotor centrifugation ที่ 200g เป็นเวลา 10 นาที

11. ดูดส่วนที่เป็นตะกอน 0.5 ml ใส่ใน conical centrifuge tube เก็บใน humidified incubator, 5%CO_2, 37°C

Intracytoplasmic sperm injection

กระทำโดยใช้ micromanipulator ภายใต้ Olympus IX71 inverted microscope (Olympus) โดยทางด้านซ้ายใช้ holding pipette (OD 75 µm, ID 15 µm, 35°, Cook®, Cook Medical) ดูด metaphase II oocyte โดยให้ polar body อยู่ที่ตำแหน่ง 6 หรือ 12 นาฬิกา ส่วนทางด้านขวาใช้ injection pipette (OD 7 µm, ID 5 µm, 35°, Cook®, Cook Medical) ดูด sperm 1 ตัวจาก Polyvinylpyrrilodone drop (PVP) จากนั้นฉีดเข้า ooplasm ที่ตำแหน่ง 3 นาฬิกา แล้วจึงค่อยๆดึง injection pipette ออก

ภายหลัง ICSI ทำการย้าย oocytes ลงใน culture dish และเก็บไว้ใน humidified incubator, 5%CO_2, 5%O_2, 90%N_2, 37°C

Embryo examination

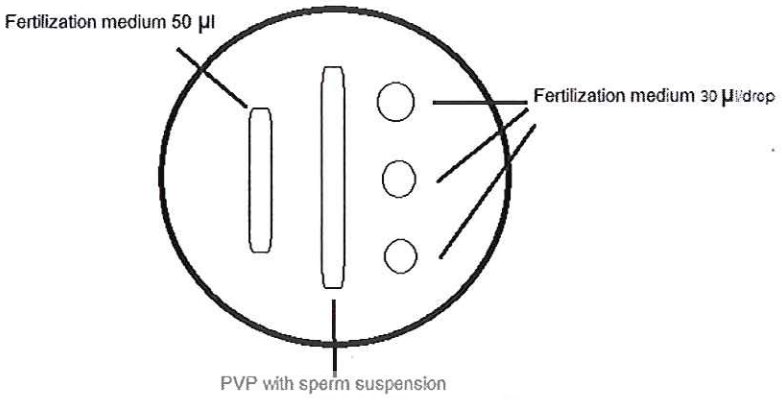
ตรวจระยะการเจริญของตัวอ่อนโดยใช้ inverted microscope เพื่อประเมินอัตราการปฏิสนธิ

Culture dish setup

ใช้ fertilization medium หยดลงใน sterile plastic tissue culture dish ขนาด 35 mm โดยใช้ medium 20 µl/drop และใช้ mineral oil (LiteOli®, LifeGlobal) คลุม medium ไว้ และเก็บใน humidified incubator, 5%CO_2, 37°C

Injection dish setup

จัดเตรียมใน sterile plastic culture dish ขนาด 60 mm ดังรูป และใช้ mineral oil คลุมไว้



รูปภาพที่ 1 Injection dish setup

Embryo freezing

Isolation of two-cell embryo for embryo freezing

1. ทำการกระตุ้นไข่ (superovulation) ในหนูตัวเมียพันธุ์ ICR mouse อายุ 5-10 สัปดาห์ด้วยการฉีด pregnant mare serum gonadotropin (PMSG®, Sigma) 10 U เข้าในช่องท้อง (intrapertoneal injection) หลังจากนั้น 48 ชั่วโมงทำการฉีด human chorionic gonadotropin (Pregnyl®, Organon) 10 U เข้าในช่องท้องเพื่อกระตุ้นให้ไข่ตก จากนั้นจับคู่กับหนูเพศผู้พันธุ์ ICR mouse อายุ 5-10 สัปดาห์

2. ทำการเก็บ metaphase II oocytes ภายหลังจากฉีด hCG 40 ชั่วโมง ตามขั้นตอนดังนี้

1) ทำให้หนูเพศเมียตายอย่างสงบด้วยวิธี cervical dislocation แล้วผ่าตัดเปิดหน้าท้องเพื่อตัดท่อนำไข่ทั้งสองข้างส่วน ampulla และ fimbria ออก แล้วแช่ใน fertilization medium 500 µl ใน plastic culture dish ขนาด 35 mm

2) ใช้ fertilization medium ชะล้างตัวอ่อนในท่อนำไข่ จากนั้นย้ายตัวอ่อนระยะ two-cell ลงใน culture dish เก็บไว้ใน humidified incubator, 5%CO_2, 5%O_2, 90%N_2, 37°C

Freezing-Thawing embryo วิธีการแช่แข็งตัวอ่อนที่ใช้ในโครงการนี้มี 2 วิธี ได้แก่

1. **Ultrarapid freezing (In house medium, Chiangmai University)**

Freezing embryo

1. เตรียม 4 –well plate โดย label URF freeze ที่หลุม 1 และ

2. นำ Freezing medium ใส่ลงหลุม 1 และหลุม 2 หลุมละ 0.5 ml.

3. วาง 4-well plate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10-15 นาที

4. ย้าย embryo จาก culture medium ลงหลุม 1 จากนั้นย้าย embryo ลงหลุม 2 ระยะเวลาที่ embryo อยู่ในหลุม 1 และหลุม 2 รวมกัน 2-2.5 นาที

5. ย้าย embryo จากหลุม 2 วางไว้ปลาย vitrification carrier โดยให้ขนาดหยดเล็กที่สุด เมื่อครบ 2.5 นาที จุ่ม vitrification carrier ลงใน liquid nitrogen ทันที

Thawing embryo

1. เตรียม thawing medium ใส่ 4-well plate โดย label URF thaw ที่หลุม 1 และ 2

2. นำ thawing medium ใส่ลงในหลุม 1 และ 2 หลุมละ 1 ml. (เติมน้ำลงในหลุมกลางของ 4-well ประมาณ 2 ml.)

3. นำ 4-wll plate ที่เตรียมไว้ไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 °c 10 นาที

4. เตรียม embryo ที่ต้องการ thaw ใส่ในกระป๋องที่มี liquid nitrogen

5. นำ vitrification carrier จุ่มลงในหลุมที่ 1

6. ย้าย embryo จากหลุมที่ 1 ลงหลุมที่ 2 ทันที จากนั้นรอ 10 นาที

7.ย้าย embryo จากหลุมที่ 2 ลง excess culture media (1 ml. หรือมากกว่า) ทิ้งไว้ 5-10 นาที จากนั้นย้าย embryo ไป culture media เพื่อเลี้ยง embryo ต่อไป

8. ประเมินอัตราการรอดชีวิตหลังละลายตัวอ่อน และประเมินการเจริญเติบโตต่อจนถึงระยะ blastocyst

2. **Vitrification** โดยใช้ Cryotech ® vitrification/warming kit ทำที่อุณหภูมิห้อง (25-27 °c)

Vitrification embryo

1. เตรียม plate โดยใส่น้ำยา equilibrium solution (ES) ปริมาณ 300 µl, vitrification solution 1 (VS1) ปริมาณ 300 µl และ vitrification solution 2 (VS2) ปริมาณ 300 µl ในหลุมที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ พร้อม label ให้เรียบร้อย

2. กระบวนการ equilibration of embryo วาง embryo ลงบน surface ของ ES ในหลุมที่ 1 จะสังเกตุเห็น embryo จมลงและค่อยๆหดตัวลงช้าๆ จากนั้นจะค่อยๆขยายขนาดกลับมาจนเท่าขนาดเริ่มต้น (กระบวนการนี้ใช้เวลาประมาณ 12 นาที)

3. กระบวนการ vitrification (ทั้งกระบวนการไม่ควรเกิน 90 วินาที)

-ย้าย embryo จาก ES มาที่ VS1 ล้าง embryo ด้วย VS1 ภายในหลุม หลังจากล้างเสร็จให้นำ embryo ไว้ที่ก้นหลุม embryo จะค่อยๆลอยขึ้นด้านบนจนหยุดนิ่ง

-ย้าย embryo มาไว้ที่ VS2 บริเวณกลางหลุม ล้างด้วย VS2 ประมาณ 5 ครั้ง

-ย้าย embryo (โดยให้ VS2 ติดมาน้อยที่สุด) มาวางลงบน vitrification carrier แล้วนำไปแช่ใน liquid nitrogen อย่างรวดเร็ว

Thawing embryo

1. เตรียมนำ warm plate และ warming solution (TS) ไว้ใน incubator 37 °c อย่างน้อย 3 ชั่วโมง ส่วน diluent solution (DS) และ washing solution (WS) ไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 1 ชั่วโมงก่อนทำการละลาย embryo

2. ใส่น้ำยา TS 1 ml ในหลุมที่ 1 DS 300 µl , WS1 300 µl , WS2 300 µl ในหลุมที่ 2, 3, และ 4 ตามลำดับ

3. วาง vitrification carrier ในหลุมละลาย embryo (หลุมที่ 1) นาน 1 นาที

4. ย้าย embryo มาที่ก้นหลุม DS (หลุมที่ 2) รอ 3 นาที

5. ย้าย embryo มาที่ก้นหลุม WS1 (หลุมที่ 3) รอ 5 นาที

6. ย้าย embryo มาที่ surface ของ WS2 (หลุมที่ 4) เมื่อ embryo จมลงถึงก้นหลุมให้นำไปวางไว้ที่ surface ของ WS2 อีกครั้ง ใช้เวลาประมาณ 1 นาที

7. ย้าย embryo ลงไปเลี้ยงต่อใน culture media

8. ประเมินอัตราการรอดชีวิตหลังละลายตัวอ่อน

การวิเคราะห์ข้อมูล

Fertilization rate หมายถึง ร้อยละของจำนวนไข่ที่เกิดการปฏิสนธิประเมินโดยการดูด้วยกล้อง inverted microscope

Survival rate หมายถึง ร้อยละของตัวอ่อนที่รอดชีวิตหลังจากได้รับการแช่แข็งตัวอ่อน (freezing embryo) แล้วละลายออกมา (thawing embryo) ประเมินโดยการดูด้วยกล้อง inverted microscope

ผลการวิจัย

ตารางที่ 1 ผลการทดลองทำ Intracytoplasmic sperm injection

ครั้งที่ทดลอง	จำนวนไข่ (ใบ)	จำนวนไข่ที่เกิดการปฏิสนธิ (ใบ)	อัตราการปฏิสนธิ (%)
1	16	6	38
2	50	31	62
3	21	14	67
4	16	12	75
Total	103	63	61

ตารางที่ 2 ผลการทดลองแช่แข็งและละลายตัวอ่อนด้วยวิธี Ultrarapid

ครั้งที่ทดลอง	จำนวนตัวอ่อนที่แช่แข็งและละลาย (ตัว)	จำนวนตัวอ่อนที่รอดชีวิตหลังละลาย (ตัว)	อัตราตัวอ่อนรอดชีวิต (%)
1	11	2	18
2	6	4	67
3	7	5	71
4	8	5	63
Total	32	16	50

ตารางที่ 3 ผลการทดลองแช่แข็งและละลายตัวอ่อนด้วยวิธี Vitrification

ครั้งที่ทดลอง	จำนวนตัวอ่อนที่แช่แข็งและละลาย (ตัว)	จำนวนตัวอ่อนที่รอดชีวิตหลังละลาย (ตัว)	อัตราตัวอ่อนรอดชีวิต (%)
1	3	2	67
2	3	2	67
3	9	8	89
4	5	4	80
5	9	8	89
6	2	2	100
7	20	17	85
8	6	4	67
9	8	6	75
10	5	4	80
Total	70	57	81

ข้อวิจารณ์

การทดลอง ICSI จำนวน 4 ครั้ง พบว่าอัตราการปฏิสนธิ (fertilization rate) เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในการทดลองครั้งหลัง (จาก 38 เปอร์เซ็นต์ เป็น 61 -75 เปอร์เซ็นต์) แสดงถึงทักษะในการทำ ICSI ที่ดีขึ้นหลังจากได้ฝึกปฏิบัติมากขึ้น เมื่อรวมผลการทดลองทุกครั้งพบว่า fertilization rate ได้ 61 เปอร์เซ็นต์ซึ่งใกล้เคียงกับเป้าหมายที่ตั้งไว้

การทดลองแช่แข็งตัวอ่อนโดยวิธี Ultrarapid freezing พบว่าอัตรารอดชีวิต (survival rate) ในช่วงหลังของการทดลอง (63 เปอร์เซ็นต์) ดีกว่าในช่วงแรก (18 เปอร์เซ็นต์) เนื่องจากทักษะในการแช่แข็งที่ดีขึ้น แต่เนื่องจากมีปัญหาในการสั่งน้ำยาและอัตราการรอดชีวิตที่ยังไม่ดีเท่าเป้าหมายที่ตั้งไว้ (≥ 80 เปอร์เซ็นต์) ทางผู้วิจัยจึงหยุดการทดลองไว้เพียง 4 ครั้ง (เป้าหมายแช่แข็งด้วยวิธี Ultrarapid freezing ทั้งหมด 8 ครั้ง) และเพิ่มการทดลองแช่แข็งด้วยวิธี Vitrification เป็น 10 ครั้ง (เป้าหมายแช่แข็งด้วยวิธี Vitrification ทั้งหมด 8 ครั้ง) เนื่องจากทางผู้วิจัยประเมินแล้วว่าสามารถนำไปใช้ได้จริงในการให้บริการเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ในมนุษย์ในอนาคตของทางโรงพยาบาล

การทดลองแช่แข็งตัวอ่อนโดยวิธี Vitrification พบว่าอัตรารอดชีวิต (survival rate) 81 เปอรเซ็นต์ซึ่งดีกว่าเป้าหมายที่ตั้งไว้เล็กน้อย (≥ 80 เปอร์เซ็นต์) และใกล้เคียงกับมาตรฐานของห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์โดยทั่วไป

การเพิ่มพูนทักษะการทำ Intracytoplasmic sperm injection และการแช่แข็งตัวอ่อนเป็นกระบวนการสำคัญที่ต้องเตรียมพร้อมก่อนการให้บริการเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ในมนุษย์ ซึ่งผลที่ได้จากโครงการวิจัยนี้มีส่วนสำคัญให้หน่วยเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวรได้รับการรับรองเป็นสถาบันที่มีคุณสมบัติตามมาตรฐานในการให้บริการเกี่ยวกับเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ตามประกาศแพทยสภา จากราชวิทยาลัยสูตินรีแพทย์แห่งประเทศไทย นอกจากนี้ความรู้ที่ได้จากการวิจัยได้ถ่ายทอดสู่กลุ่มเป้าหมายซึ่งเป็นบุคคลากรทางการแพทย์ในการประชุมวิชาการประจำปีของภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา ประจำปี 2557

สรุปและข้อเสนอแนะ

การทดลองทำ ICSI และการแช่แข็งด้วยวิธี vitrification โดยใช้ gamate และ embryo จากหนูทดลองเป็นวิธีการเพิ่มพูนทักษะที่ดี สามารถเพิ่มความมั่นใจในการทำหัตถการได้ดี โดยไม่ต้องเริ่มจากการทดลองทำในไข่และตัวอ่อนของมนุษย์

มหาวิทยาลัยนเรศวร

ว QP
ท9
ส451
ป558
1 6820207
21 ส.ค. 2558
สำนักหอสมุด

เอกสารอ้างอิง

1. Gearon CM, Taylor AS, Forman RG. Factor affecting activation and fertilization of human oocyte following intracytoplasmic injection. Hum Reprod 1995;10(4):896-902.
2. D'Angelo A, Amso NN. Embryo freezing for preventing ovarian hyperstimulation syndrome: a Cochrane review. Hum Reprod 2002;17(11):2787-94.
3. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryo Top method. Theriogenology 2007;67:73-80.
4. Salumets A, Tuuri T, Makinen S, Vilska S, Husu L, Tiinio R, Suikkari AM. Effect of developmental stage of embryo at freezing on pregnancy outcome of frozen-thawed embryo transfer. Hum Reprod 2003;18(9):1890-5.
5. Vutyavanich T, Sreshthaputra O, Mongkolchaipak S, Wongtra-ngan S, Piromlertamorn W. Slow programmable and ultra-rapid freezing of human embryos. J Obstet Gynaecol Res. 2008 ;34(4):457-63.

เลขทะเบียน 83

หนังสือยินยอมการเผยแพร่ผลงานทางวิชาการบนเว็บไซต์
ฐานข้อมูล NU Digital Repository (http://obj.lib.nu.ac.th/media/)
สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร

ตามที่ข้าพเจ้า นพ.สุรชัย เดชอาคม (ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์) ได้ส่งผลงานทางวิชาการการรายงานการวิจัย (เรื่อง) รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์การเพิ่มพูนทักษะในการทำ Intracytoplasmic sperm injection และ embryo freezing ในหนูทดลองเพื่อเตรียมความพร้อมในการให้บริการเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ในคน

ปีที่พิมพ์ 2558

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานทางวิชาการเป็นลิขสิทธิ์ของข้าพเจ้า นพ.สุรชัย เดชอาคม (ผู้วิจัยร่วม) และท่านอื่น ๆ เป็นเจ้าของลิขสิทธิ์ร่วม และเพื่อให้ผลงานทางวิชาการของข้าพเจ้าเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาและสาธารณชน จึงอนุญาตให้เผยแพร่ผลงาน ดังนี้

- ☑ อนุญาตให้เผยแพร่
- ☐ ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ เนื่องจาก.....

.....

.....

ลงชื่อ ..... สุรชัย เดชอาคม .....

(.....)

วันที่..... 29 พ.ย. 58 .....

หมายเหตุ ลิขสิทธิ์ใดๆ ที่ปรากฏอยู่ในผลงานนี้เป็นความรับผิดชอบของเจ้าของผลงาน ไม่ใช่ของสำนักหอสมุด