การวิเคราะห์อสุจิ X และ Y ของคน โดยวิธี Double - Label Fluorescence in situ Hybridization

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้วิจัย

- ศาสตราจารย์นายแพทย์เอนก อารีพรรค
- นางสาวจิราพรณ์ เหงี่ยมวิจาวัฒน์
- นางเย็นจิต จันทร์ประสิทธิ์

หน่วย Andrology

ภาควิชา สูติ-นรีเวชวิทยา

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2539

ตุลาคม 2540

บทคัดย่อ

การแยกอสุจิ X และ Y แล้วนำไปทำผสมเทียมเพื่อเลือกเพศบุตร เป็นวิธีที่ได้รับความสนใจมากในปัจจุบัน มีความเชื่อว่าอสุจิ Y ตัวเล็กกว่า แต่เคลื่อนไหวเร็วกว่า อสุจิ X การตรวจ Chromosome เพศของอสุจิ X และ Y สามารถกระทำได้อย่างแม่นยำโดยวิธี Double-Label Fluorescence in situ Hybridization

คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษา เพื่อพิสูจน์ว่าวิธี Modified Swim-up (ใช้เลือก อสุจิ Y) และ Percoll gradient centrifugation (ใช้เลือก อสุจิ X) สามารถเปลี่ยนสัดส่วนของอสุจิ X และ Y ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

นำน้ำอสุจิจากอาสาสมัคร 15 คนมาทดสอบบันทึกคุณภาพอสุจิของแต่ละตัวอย่าง โดยตรวจจำนวนความเคลื่อนไหวและลักษณะรูปร่าง เสร็จแล้วแบ่งน้ำอสุจิออกเป็น 3 ส่วน ส่วนที่ 1 เป็น Control ส่วนที่ 2 นำไปคัดอสุจิ X ด้วยวิธี Percoll Gradient Centrifugation และส่วนที่ 3 นำไปแยกอสุจิ Y ด้วยวิธี Modified Swim-up ตรวจสอบอสุจิ X และ Y โดยวิธี Double-Label Fluorescence in situ Hybridization รวม slides ทั้งหมดเข้าด้วยกัน และตรวจนับอสุจิ X และ Y โดยนักวิทยาศาสตร์คนเดียวกันตลอดการศึกษาครั้งนี้

ประสิทธิภาพในการทำ Hybridization และ Label อสุจิสูงได้ระดับสากล ระหว่างร้อยละ 96 ถึง 99 พบว่าสัดส่วนของ อสุจิ X และ Y ใน Control 48.53 : 48.94 หลังการทำ Percoll Centrifugation ได้สัดส่วนอสุจิ X และ Y 53.92 : 44.37 และหลังการทำ Modified Swim-up ได้สัดส่วนอสุจิ X และ Y 40.53 : 58.11 ซึ่งมีนัยสำคัญทางสถิติ $p > 0.05$ ถึงแม้ว่าการเปลี่ยนแปลงจะมีไม่มาก แต่มีความสำคัญ ไม่มีตัวอย่างหนึ่งตัวอย่างใดที่สัดส่วนเปลี่ยนไปตรงกันข้ามกับความคาดหวัง การทำวิจัยทางคลินิคจะต้องกระทำต่อไปโดยนำอสุจิไปทำผสมเทียม แล้วดูเพศทารกที่เกิดว่ามีตามความคาดหวังหรือไม่ พร้อมทั้งตรวจสัดส่วน อสุจิ X และ Y ของอสุจิที่นำไปใช้ด้วย

เลขหมู่ วพ
พ. 15
เลขทะเบียน 010 604

ABSTRACT

Alteration of the X and Y bearing spermatozoa by a Modified Swim-up method and the Percoll Gradient-Centrifugation

Anek Aribarg, Jrtaporn Ngeamvijawat, Yenchit Chanprasit

Andrology Unit, Department of Obstetric & Gynecology

Separation of X and Y bearing spermatozoa for artificial insemination is a popular concept of infant sex preselection. This method is based on the hypothesis that "Y" bearing spermatozoa is smaller and moves faster than "X" sperm.

An investigation was undertaken to prove that the Percoll gradient centrifugation and the modified swim-up method can alter the ratio of x and y sperm in sperm prepatations significantly.

Semen samples of 15 donors were collected by masturbation and analysed to record seprm count, motility and morphology using the CASA method. Each semen sample was divided on to 3 equal portions. The first neat semen portion was initially kept as a control. The second portion was treated by the method of 14 step-Percoll gradient motile sperm. Identification of x and y bearing sperm was done in all samples by the method of double-labelled "FISH" using specific DNA probes. The examination was done blindly after pooling all slides together and the labelled x and y sperm were scored by one person throughout the investigation. Results showed that the efficiency of labeling the sperm by specific DNA probes was high (96-99 percent) in all samples. Ratio x and y sperm significantly altered by the modified swim-up method (enriching y sperm) and by the Percoll gradient centrifugation (enriching x sperm). However, the magnitude of change was small and may not effect the ratio of infant sex at birth by artificial insemination. These is a necesity to carry out a clinical trial of sex perselection by artifical insemination using the prepared sperm and stimultaneously identifying the sperm used and sex of the subsequent conception.

SUMMARY OF RESULTS

% Sperm	Control	Percoll Gradients	Modified Swim-up
Labeled	97.82	98.55	98.33
X	48.53	53.92	40.53
Y	48.94	44.37	58.11

$p > 0.05$

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

การวิจัยหาวิธีเลือกเพศบุตรตามความปรารถนาของบิดามารดา เพื่อความพอใจหรือป้องกันโรคถ่ายทอดทางกรรมพันธุ์ในเด็กเพศชาย มีการค้นคว้าเป็นเวลาหลายสิบปีแล้ว[1]

วิธีเลือกเพศบุตรอาจแบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ Pre-conception และ Post-conception สำหรับวิธี Post-conception ที่ได้ผลแน่นอน คือ การทำแท้ง เมื่อวินิจฉัยว่าเด็กในครรภ์มีเพศที่ไม่ต้องการ หรือปล่อยให้เกิด เมื่อพบว่าเด็กมีเพศที่ตั้งใจ การทำเด็กหลอดแก้ว เป็นวิธีที่แพทย์สามารถวินิจฉัยเพศของตัวอ่อนและย้ายตัวอ่อนที่มีเพศที่ต้องการได้ การเลือกเพศวิธี Pre-conception ที่สำคัญคือ การแยกอสุจิ X และ Y ออกจากกัน ด้วยวิธีต่าง ๆ แล้วนำอสุจิที่มี Chromosome เพศที่ต้องการไปผสมเทียมภรรยาอีกทีหนึ่ง เพื่อให้มีการตั้งครรภ์ วิธีนี้ เป็นวิธีที่ได้รับความสนใจมากในปัจจุบัน แต่ปัญหาสำคัญของวิธีนี้คือ มีความขัดแย้งของรายงานต่าง ๆ ว่ามีผลไม่แน่นอน ปัญหาอาจแยกออกเป็นสองประเด็นสำคัญ คือ (ก.) ไม่มีวิธีวิเคราะห์ chromosome เพศของอสุจิที่แม่นยำ (ข.) วิธีแยกอสุจิต่าง ๆ ยังมีประสิทธิภาพไม่ดีและเชื่อถือไม่ได้[2]

การดูรูปร่างลักษณะของอสุจิ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ไม่สามารถบอก chromosome เพศได้ วิธีย้อมอสุจิด้วยสาร Quniacrine hydrochloride ซึ่งใช้กันเป็นเวลาหลายปี เพื่อตรวจดู chromosome Y ในอสุจิ ปัจจุบันพบว่า เชื่อถือไม่ได้และไม่แน่นอนเสียแล้ว เพราะสารนี้อาจย้อมส่วนของ chromosome อื่นของอสุจิ นอกเหนือจาก chromosome เพศ[3] การผสมไข่หนู Hamster กับอสุจิคน เพื่อ decondense chromosome ของอสุจิ แล้วตรวจดู chromosome เพศของอสุจิอีกทีหนึ่งก็สามารถตรวจสอบได้ แต่วิธีนี้ค่อนข้างยุ่งยากในการทำ ถึงแม้จะได้ผลดีเชื่อถือได้[4]

สุดท้ายวิธีทำได้รับความสนใจมากขึ้นขณะนี้ คือ การใช้ DNA probe จับ X และ Y chromosome ของอสุจิ เพื่อวินิจฉัย chromosome เพศ DNA probe นี้สร้างขึ้นเฉพาะ chromosome X และ Y ของอสุจิ ถ้าใช้ Probe ชนิดใดชนิดหนึ่ง ก็จะวินิจฉัย เพศของอสุจิได้ เพียงร้อยละ 50 เท่านั้น แต่ถ้าใช้ probe ทั้ง X และ Y ผสมกัน แล้วใช้ตรวจอสุจิ ในครั้งเดียวกัน ก็จะสามารถตรวจพบ chromosome เพศ X และ Y พร้อม ๆ กันได้ เกือบร้อยละร้อย แล้วแต่ประสิทธิภาพ และความชำนาญของผู้ทำ แต่อย่างไรก็ตาม ความเชื่อถือไม่ควรต่ำกว่าร้อยละ 95[5]

วิธีแยกอสุจิ X และ Y ที่ใช้ทดลองในปัจจุบัน ยังไม่มีวิธีใดมีประสิทธิภาพสูง และเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไป แต่อาจแยกออกเป็น 2 พวก คือ วิธี Mechanical และ Biochemical ทั้งสองวิธีนี้ค้นคิดขึ้นจากทฤษฎีที่เชื่อว่า อสุจิ X และ Y มีรูปร่าง น้ำหนัก ความไว และความ

คงทนแตกต่างกัน ตัวอย่าง Ericsson's Albumin column เป็นวิธีแยกอสุจิ Y เพื่อให้ได้บุตรชาย โดยสันนิษฐานว่า อสุจิ Y เคลื่อนไหวได้เร็วกว่าอสุจิ X คณะผู้วิจัยได้ทำวิจัย และได้รายงานเรื่องนี้มาก่อนแล้วและพบว่า วิธีนี้ไม่มีประสิทธิภาพในการแยกอสุจิ Y ตามที่ได้รายงานในอดีต[6]

วัตถุประสงค์ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ คือ เพื่อ (ก.) พิสูจน์ประสิทธิภาพในการทำ Double Label Fluorescence in situ Hybridization ในการตรวจสอบ อสุจิ X และ Y (ข.) ตรวจประสิทธิภาพของวิธี Percoll Gradient Centrifugation (Iizuka's method)[7] ในการแยกอสุจิ X และวิธี Modified Swim-up method[8] ในการแยก อสุจิ Y หรือ ต้องการทดสอบว่า 2 วิธีนี้ สามารถเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของอสุจิที่มี chromosome เพศ X และ Y อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่

วัสดุ และ วิธีการ

ตัวอย่างน้ำอสุจิ

เก็บน้ำอสุจิจากอาสาสมัคร (Donor) 15 ราย โดยวิธี Masturbation หลังจากทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวิเคราะห์โดยใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์อสุจิระบบคอมพิวเตอร์ (Computer Assisted Semen Analysis, HTM - IVOS Version 10) และวิธีมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization guideline) เพื่อบันทึกคุณภาพของน้ำเชื้อของแต่ละตัวอย่าง เช่น volume, sperm count, motility, morphology และ movement characteristic ต่าง ๆ

น้ำอสุจิแต่ละตัวอย่าง แบ่งออกเป็น 3 ส่วน ส่วนที่ 1 เป็น control สามารถเตรียม slides ไว้ตรวจสอบทันที ส่วนที่ 2 นำไปแยกอสุจิ X ด้วยวิธี Percoll gradients และส่วนที่ 3 นำไปแยกอสุจิ Y ด้วยวิธี Modified swim-up[8] จากนั้นจึงเตรียม slides ไว้รอตรวจสอบด้วยวิธี double-label fluorescence in situ hybridization

วิธีการแยกอสุจิ X

ตามวิธีการของ Iizuka[7] ซึ่งใช้ความเข้มข้นของสารละลาย Percoll ตั้งแต่ 25% ถึง 95% โดยเพิ่มความเข้มข้นทีละ 5% (14 Steps) โดยเจือจาง isotonic Percoll (100%) ด้วย Ham's F10 Medium (301 mOsm, pH 7.4)

เตรียม 14 ชั้น ๆ ละ 0.5 ml ของ Percoll gradients ใน 15 ml Conical Tubes (Falcon 2099 ; Becton Dickinson , Franklin Lakes, NJ, USA) โดยความเข้มข้นของสาร ละลาย Percoll สูงสุดอยู่ชั้นล่างสุดของหลอด ตามด้วยความเข้มข้นที่ลดลงเรื่อย ๆ ทีละ 5%

น้ำอสุจิส่วนที่ 2 ปริมาตร 0.7 ml overlaid ไว้ส่วนบนสุดแล้ว centrifuge ที่ 250 g เป็นเวลา 30 นาที จึงใช้ pasteur pipette ค่อย ๆ ดูดส่วนของ pellete ที่อยู่ชั้นล่างสุดของ 95% Percoll ล้าง pellete ด้วย 5.0 ml Ham's F10 medium

วิธีการแยกอสุจิ Y

การวิจัยครั้งนี้ได้ใช้ Modified swim-up ตามรายงานของ Check and Katsoff [8] แต่ได้ ปรับปรุงเปลี่ยนแปลงเพียงบางขั้นตอน ด้วยการผสมน้ำอสุจิส่วนที่ 3 ด้วย Ham's F10 medium ในอัตราส่วน 1 : 1 เตรียมหลอด (Conical Tubes, Falcon 2099, USA) โดยใส่ Ham's F10 medium 0.5 ml ลงไป จากนั้นใช้ pasteur pipette (ที่มีปลายแหลมและเล็กที่สุด) ดูดส่วนผสม ของอสุจิดังกล่าว 0.5 ml แทง pipette ลงไปให้ติดก้นหลอด แล้วค่อย ๆ ปล่อยส่วนผสมลงไป แล้ว centrifuge ที่ 620 g เป็นเวลา 5 นาที

หลังจากทิ้งไว้ในตู้อบ 37 °C ที่มี 5% CO_2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ใช้ pasteur pipette (ปลายแหลม) ดูดส่วนบนสุด (supernatant) ประมาณ 0.2 ml ของแต่ละ tube รวมกัน แล้ว centrifuge ที่ 500 g เป็นเวลา 5 นาที ทิ้ง supernatant แล้วล้าง pellete อีกครั้ง

การเตรียมอสุจิเพื่อการตรวจ

กระทำตามวิธีการของ Wyrobek [3] โดยล้างอสุจิส่วนที่ 1 control (Neat semen) ส่วนที่ 2 ซึ่งผ่านการแยกด้วย Percoll gradients และส่วนที่ 3 Modified swim-up ด้วย 0.01 M Tris, 0.15 M Nacl, pH 8.0 4 ครั้ง แล้ว smear บน slides ที่สะอาดโดยให้มีความเข้มข้นของ อสุจิ 50-60 x 10^3 /ml ทิ้ง slides ไว้ให้แห้ง

ทำ sperm decondensation ด้วยการ incubate slide sample ใน 0.01 M dithiothreitol (DTT) in 0.1 M Tris pH 8.0 เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ตามด้วย 0.01 M LIS (3,5 diiodosalicyclic acid lithium salt), 0.001 M DTT in 0.1 M Tris pH 8.0 เป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง จากนั้น rinsed ใน 2xSSC pH 7.0 ปล่อย slide ให้แห้งจึง Fix ด้วย Fixative (methanol : glacial acetic acid (3:1, v/v) เป็นเวลา 30 นาที และปล่อย slide ให้แห้ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Preparation of Mitotic Chromosome Spreads

เตรียม mitotic chromosome จาก male peripheral blood lymphocyte เป็นตัว control ด้วยวิธีของ Buckle and Graig[10]

Chromosome Specific DNA Probes

ตรวจสอบ chromosome X และ Y ด้วย specific DNA probes (Vysis) CEP X (& satellite Spectrum Orange ซึ่งจะ hybridize ส่วนของ centromere (bands p11.1 - q11, locus DXZ1) และ CEP Y (satellite III) Spectrum Green ซึ่งจะ hybridize ที่ส่วนของ satellite III (band Y q12, locus DYZ1)

In Situ Hybridization to Decondensed Sperm Cells

ทำ RNase pretreatment เพื่อกำจัด endogenous RNA โดย incubate ตัวอย่าง slide ด้วย RNase, DNase-free 100 µg/ml in 2xSSC pH7.0 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (150 µl ภายใต้ coverslip) แล้วล้าง 3 และ 4 ครั้ง ด้วย 2xSSC pH7.0 และ deionized water ตามลำดับจึง dehydrate ใน ethanol series 80% , 90% และ 100% ตามลำดับ ทิ้ง slide ให้แห้ง

Denaturation of probe and DNA target ในขั้นตอนเดียวกันโดยหยด 10 µl ของ hybridization mixture ซึ่งประกอบด้วย 7 µl Spectrum CEP Hybridization Buffer, 1 µl Spectrum CEP DNA Probe และ 2 µl purified water ลงบน slide แล้ว denature (ภายใต้ coverslip ที่ sealed ด้วย rubber cement) ที่ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทิ้งให้ hybridized overnight (16-18 ชั่วโมง) ที่ 37 °C ใน moist chamber แล้วล้างด้วย Washing at high stringency , 50% deionized formamide in 2xSSC ที่ 45 °C 1 ครั้ง และ 0.1 x SSC ที่ 60 °C 4 ครั้ง ทิ้ง slide ให้แห้งจึง mounted ด้วย glycerol : PBS ซึ่งประกอบด้วย 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI ; Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA) เป็น nuclear counterstain และ 2% 1,4-diazobicyclo (2,2,2) octane (DABCO ; Sigma) เป็น anti-fade reagent แล้ว sealed coverslips เก็บไว้ที่มืด - 20 °C

นำ slides ทั้ง 45 แผ่นมาคละรวมกัน ตรวจสอบสัญญาณด้วย Olympus microscope (BX 50, Japan) equipped with multi-band fluorescence filter cube (DAPI/FITC Texas Red) ax 100 objective โดยนับ 1000 spermatozoa ในแต่ละ slide spermatozoa ที่เห็นเป็นจุดสีเขียวและสีส้มให้นับเป็น haploid Y และ X ตามลำดับ ในขณะที่ cells ซึ่งเห็นเป็น 2 จุด (XX, YY หรือ XY) จะแยกเป็น disomic และ diploid sperm ขึ้นอยู่กับ head size "ขนาดของ

หัวอสุจิ" หาก sperm ที่เห็น 2 จุดภายใน nucleus ที่ขนาดปกติให้นับเป็น disomic และเป็น diploid เมื่อเห็น 2 จุดใน nucleus ใหญ่ (ประมาณ 2-4 เท่าของขนาดปกติ) ได้ถ่ายภาพ photomicrographs โดยใช้ Fujichrome DX400 colour slide film เพื่อบันทึกผลการทดลอง

Table 1

Semen Characteristics of the 15 Semen Samples

Donor	Volume (mL)	Concentration x 10^6 /mL	Progressive motility %	Morphology % normal
D1	3.0	97.8	52	6
D2	6.2	134.5	68	33
D3	3.5	66.1	60	15
D4	4.5	117.5	79	21
D5	2.7	70.0	62	37
D6	1.9	357.5	79	23
D7	3.6	101.5	61	25
D8	3.7	215.2	51	6
D9	3.2	133.4	55	3
D10	2.4	123.8	43	9
D11	3.1	91.4	64	11
D12	4.0	138.3	45	25
D13	3.0	200.8	41	23
D14	1.8	229.1	47	20
D15	4.5	95.7	85	26
Mean	**3.4**	**145**	**60**	**19**

Table 2

X and Y Labelling Results for Control (Neat Semen)

Donor No.	Neat Semen (Control)						
	O unlabeled	X	Y	XX	YY	XY	XXYY
1	11	488	497	1	-	3	-
2	21	499	476	1	1	2	-
3	40	476	481	2	-	1	-
4	29	477	490	1	1	2	-
5	11	499	487	-	2	1	-
6	8	506	483	1	1	1	-
7	19	480	499	1	-	1	-
8	34	492	481	-	2	1	-
9	35	471	491	1	-	1	1
10	10	497	489	2	-	2	-
11	17	481	499	1	1	1	-
12	32	477	488	1	-	2	-
13	19	482	495	2	-	2	-
14	11	487	499	1	1	1	-
15	39	469	488	1	-	3	-
Total	325	7281	7343	16	9	24	1
	Labeled	X	Y	XX	YY	Y	XXYY
%	97.82	48.53	48.94	0.106	0.059	0.159	0.006

Table 3

. Alteration of ratio of X & Y sperm after Percoll & Swim-up methods

Donor No.	Control (Neat Semen)			Percoll Gradients			Modify Swim-up		
	% Labeled	% X	% Y	% Labeled	% X	% Y	% Labeled	% X	% Y
1	98.9	48.8	48.7	98.8	54.0	44.4	99.7	44.5	55.0
2	97.9	49.9	47.6	99.1	55.4	43.5	98.5	33.1	65.2
3	96.0	47.6	48.1	98.6	56.9	41.5	98.9	37.8	60.8
4	97.1	47.7	49.0	97.8	55.9	41.8	98.3	42.8	55.2
5	98.9	50.6	48.7	98.7	54.3	44.1	99.5	38.6	60.7
6	99.2	48.0	48.3	97.9	53.7	44.0	98.6	40.5	57.9
7	98.1	49.2	49.9	97.9	54.0	44.6	98.1	38.9	58.9
8	97.6	47.1	48.1	98.9	53.9	44.1	97.9	43.9	53.9
9	96.5	49.7	49.1	98.1	55.4	43.6	99.4	44.2	55.0
10	99.0	48.1	48.9	99.3	50.2	49.1	98.7	42.9	55.7
11	98.3	49.7	49.9	97.5	49.7	47.4	99.0	43.0	55.8
12	96.8	48.1	48.8	99.6	51.7	47.7	98.2	38.0	60.1
13	98.1	47.7	49.5	96.9	54.2	42.3	99.6	38.2	61.3
14	98.9	48.2	49.9	99.3	54.6	44.6	99.3	39.6	69.5
15	96.1	46.9	48.8	98.3	55.0	43.0	98.8	42.0	56.7
Mean									
S.D.	97.82	48.53	48.94	98.55	53.92	44.37	98.83	40.53	58.11

Table 4

Summary of Results

%	Control	Percoll Gradient	Modified Swim-up
Labeled	97.82	98.55	98.83
X	48.53	53.92	40.53
Y	48.94	44.37	48.11

Significant $p > 0.05$

ผลการทดลอง

ลักษณะของน้ำอสุจิของอาสาสมัคร 15 คน แสดงใน Table 1 น้ำอสุจิเหล่านี้มีคุณภาพดีและมีปริมาณมาก เพราะต้องนำไปแบ่งทดลองเป็น 3 ส่วน อัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิจะต้องดีเพราะจะได้อสุจิมากๆ หลังจากการแยกด้วยวิธี Modified Swim-up การทำ Control โดยใช้ lymphocyte ของผู้ชายได้ผลดีตรวจพบ double-label อย่างชัดเจน สีส้ม ย้อมติด X chromosome และสีเขียว ย้อมติด Y chromosome Hybridization ที่ทำมีมาตราฐานสูงระดับสากล Control ได้ 97.82%, Percoll ได้ 98.55% และ Swim-up ได้ 98.83% (ดู Table 2 และ 3) Shift ของ ratio ของ X และ Y sperm หลังการทำ วิธี Swim-up และ Percoll เห็นได้ชัดและมีความหมายทางสถิติ ถึงแม้ว่าการเปลี่ยนแปลงจะมีไม่มากก็ตาม Control = 48.53 : 48.94, Swim-up = 40.53 : 58.11 Percoll = 53.92 : 44.37 ($p > 0.05$) (ดู Table 3 และ 4) Aneuploid sperm (XX YY or XY) พบได้ ไม่มาก มีตั้งแต่ 0.006 ถึง 0.106 เมื่อเปรียบเทียบกับรายงานอื่น[5, 12] ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าอสุจิจากอาสาสมัครที่ทำการทดลองมีคุณภาพดี (ดู Table 2)

อภิปราย

การกำหนดเพศในคน ขึ้นอยู่กับการผสมของไข่ ซึ่งมี X chromosome กับตัวอสุจิ ซึ่งอาจมี X หรือ Y chromosome X และ Y chromosome มีขนาดไม่เท่ากันกล่าวคือ X มีขนาดใหญ่กว่าและมีปริมาณ DNA มากกว่า Y อยู่ประมาณ 3.5% แต่ความแตกต่างในน้ำหนักมีน้อยกว่า

Shettle[12] เชื่อว่า Y sperm เล็กกว่า เคลื่อนไหวเร็วกว่า X sperm แต่อายุสั้นกว่า เราไม่สามารถตรวจแยก X และ Y sperm โดยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศ์

ทั้ง X และ Y sperm คงถูกสร้างในจำนวนเท่า ๆ กัน ภายใน Seminiferous tubules เพราะต่างก็เกิดจากการแบ่งตัวของ spermatogonia พร้อมกัน ในปัจจุบันไม่มีหลักฐานบ่งว่าการเจริญหรือการอยู่รอดของอสุจิที่มี X และ Y chromosome มีความแตกต่างกันเมื่ออยู่ใน Vas deferen

เราเคยเชื่อว่า ปลายด้านแขนยาวของ Y chromosome จะติดสีและมีลักษณะเรืองแสง เรียกว่า "Y body" เมื่อย้อมด้วย Quinacrine hydrochloride ความรู้นี้ได้ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางเป็นเวลาหลายปี แต่ปัจจุบันเราเชื่อว่าวิธีนี้ไม่ถูกต้อง และเชื่อถือไม่ได้ เพราะ Quinacrine บางครั้งย้อม antosome ของ sperm ด้วย[3]

จากการศึกษาเปรียบเทียบการใช้วิธี DNA probe กับวิธีย้อมด้วย Quinacrine mustard พบว่าวิธีนี้ใช้ไม่ได้ วิธีวิเคราะห์ Karyotype ของอสุจิคน หลังจากผสมกับไข่หนู Hamster เป็นอีกวิธีหนึ่งซึ่งใช้ในการตรวจ X และ Y sperm จากการศึกษา 3187 ตัวอย่างของการวิเคราะห์ Karyotype ด้วยวิธีนี้พบว่า ratio ของ sex chromosome ของ sperm เท่ากับ 50.2 : 49.8 (1 : 1) Joseph และคณะ[11] ใช้วิธี DNA in situ hybridization ใช้ y chromosome probe โดยเฉพาะ พบ Y sperm 48.3% ต่อมา Han[13] ใช้ Probe X & Y ผสมกันและตรวจ sperm พร้อม ๆ กัน พบว่า อสุจิในน้ำเชื้อมีสัดส่วน X และ Y 47.9% : 47.2% การตรวจ chromosome ทั้งสองพร้อม ๆ กัน ทำให้มีความแม่นยำในการตรวจมากขึ้น จากผลการศึกษาของเราพบว่า ratio X และ Y sperm ในกลุ่ม Control เท่ากับ 48.5 : 48.9 ผลของการทำ Hybridization sperm ได้ผลดีเป็นที่น่าพอใจในระดับสากล คือ 97.5% และไม่ต่ำกว่า 95% ในทุก sample

การทำวิจัยใช้ Double - Label FISH ด้วยวิธี direct คือ การใช้สารเรืองแสง (fluorophores) ติดฉลากเข้ากับสารของ DNA โดยตรง เพื่อตรวจสอบ chromosome X และ Y ในอสุจินั้นได้ผลดี สามารถตรวจสอบสัญญาณได้อย่างชัดเจน ซึ่งบางขั้นตอนแตกต่างจากวิธีมาตรฐาน (Ysis Procedure) คือ

1. ลดความเข้มข้นของ probe ลง ทำให้สามารถตรวจสอบตัวอย่างได้เพิ่มขึ้น และสัญญาณ (signal) ยังคงชัดเจน

2. การ Denatured ในขั้นตอนเดียวกันทั้ง probe และ slide ตัวอย่างที่เป็นอสุจินั้นช่วยให้สะดวกขึ้น[14]

ปัจจุบันมีผู้รายงานการแยก X และ Y sperm หลายวิธีคือ

ก. Ericsson's Albumin Column เพื่อแยก Y sperm[9]

ข. Percoll Multiple gradients Centrification เพื่อแยก X sperm

ค. Sephadex gel filtration เพื่อแยก X sperm วิธีนี้ ได้พิสูจน์ว่าเชื่อถือไม่ได้[15]

ง. Swim-up สามารถแยก Y sperm จาก X ได้[6]

จ. Flow cytometry มีรายงานว่า แยก X sperm ได้ 82.2% และ Y sperm 75.5% โดยJohnson และคณะ[16]

คณะเรา[17] ได้ศึกษาพิสูจน์ Ericsson's Albumin column เพื่อแยก Y sperm ในอสุจิของอาสาสมัคร 15 คน และใช้ Double specific DNA prober พิสูจน์ พบว่า ratio of X & Y sperm ใน Control เท่ากับ 50.0 : 49.8 และหลังการผ่าน Albumin column เท่ากับ 48.8 : 51.0 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกัน Wang[18] รายงานเช่นกันว่าวิธี Ericsson's Albumin column ได้ ratio X & Y sperm เท่ากับ 50.8 : 46.7 (control 48.8 : 48.1) ปัจจุบันเราเชื่อว่า Albumin column method ไม่สามารถทำให้ ratio ของ Y sperm เพิ่มขึ้นได้[15]

ผลของการทดลองพบว่า Modified Swim-up สามารถ shift ratio ของ X & Y sperm จาก 50.0 : 49.8 เป็น 40.5 : 58.1 และ Percoll Multiple Gradient Centrifugation จาก 50.0 : 49.8 เป็น 53.9 : 44.4 ถึงแม้ว่า shift นั้นจะไม่มาก แต่ significant ($p > 0.05$)

การศึกษานี้ได้ผลสรุปเหมือนกับ Wang และคณะ[17] ที่พบว่า Percoll Centrifugation separating X sperm มี ratio shift จาก 49.0 : 48.2 (Control) to 55.1 : 41.1 $p < 0.001$ ผลนี้ดีกว่าของเราแต่ผลของการแยก Y sperm ด้วยวิธี Modified Swim-up ของเราได้ผล significant เมื่อเปรียบ เทียบกับ Han และคณะ[13] ซึ่งได้ผลไม่ significant คือ 47.3 : 46.9 (control) และ 48.4 : 47.1 (Swim-up)

Check และคณะ[8] รายงานว่า ผลของเพศเด็กชายที่เกิดจากการผสมเทียม ด้วยอสุจิ ล้างโดยวิธี Swim up มี 88.5% เมื่อเปรียบเทียบกับ 50% ในกลุ่มที่ไม่ได้ล้างน้ำอสุจิเลย

ถึงแม้ว่าวิธี Percoll และ Swim-up จะทำให้ความเข้มข้นของ X และ Y sperm เพิ่มขึ้นอย่างมีความสำคัญทางสถิติก็ตาม แต่ความแตกต่างยังมีไม่มาก Gledhill[18] แจ้งว่าถ้าจะให้มีความหมาย ทางสถิติ และทำให้เพศของเด็กที่เกิดมีความแตกต่างอย่างชัดเจน อสุจิที่เตรียมด้วยวิธีนี้จะต้องมีอสุจิ X และ Y ในสัดส่วน 80: 20 หรือ 20 : 80 ถึงมีความหมายทางสถิติ

แต่อย่างไรก็ตาม เราจะดำเนินการวิจัยทางคลินิคต่อไป คือ เตรียมอสุจิด้วยวิธี Swim-up หรือ Percoll แล้วนำไปผสมเทียม ขณะเดียวกันก็จะ Smear อสุจิไว้ด้วย เพื่อตรวจดูสัดส่วนของอสุจิ X และ Y ถ้ามีการตั้งครรภ์เกิดขึ้น เพื่อดูว่าเพศของทารกจะตรงกับผลการตรวจอสุจิ X และ Y หรือไม่ การวิจัยทางคลินิคจะต้องใช้เวลาและจำนวนการตั้งครรภ์ต้องมีมากพอสมควร ถึงจะสรุปผลทางคลินิกได้

ขณะเดียวกันจะทำการวิจัยดูสัดส่วนของ อสุจิ Y หลังการทำ Modified Swim-up ต่อไป แต่จะทำ 2 ครั้ง เพื่อดูว่าความเข้มข้นของอสุจิ Y จะเพิ่มขึ้นหรือไม่ เมื่อเปรียบเทียบกับทำครั้งเดียว

การเลือกเพศบุตรมีประโยชน์มากในคู่สมรสที่มีโรค X linked recessive และในการจำกัดขนาดครอบครัว เพราะหากบิดามารดาได้เพศบุตร ตามความต้องการ ก็ไม่มีความจำเป็นต้องพยายามมีลูกต่อไปอีกหลาย ๆ คน บุตรที่เกิดถ้าเป็นเพศที่มีบิดามารดาต้องการก็จะได้รับการเลี้ยงดูอย่างดีไม่ถูกทอดทิ้ง คู่สมรสคนไทยส่วนใหญ่ต้องการมีบุตรทั้ง 2 เพศ

ข้อเสนอแนะในการศึกษาวิจัยต่อไป

งานวิจัยการเพิ่มสัดส่วนอสุจิ X และ Y ด้วยวิธี Modified Swim-up และ Percoll Centrifugation ปรากฏว่าสามารถกระทำได้สำเร็จในระดับหนึ่ง ซึ่งสมควรทำการวิจัยต่อไปด้วยวิธี Modified Swim-up ซึ่งได้พัฒนาวิธีขึ้นมาเองในห้องทดลองของหน่วย Andrology ภาควิชาสูตินรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สิ่งสำคัญที่สุดคือ ต้องทำวิจัยทางคลินิคต่อไป โดยการนำอสุจิที่แยกแล้วไปทำการผสมเทียม เพื่อการตั้งครรภ์ และได้เพศบุตรตามความปรารถนาหรือไม่ การศึกษาขั้นต่อไปนี้จะต้องใช้เวลาและจำนวนคู่สมรสมากพอสมควร

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศาสตราจารย์ นายแพทย์ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์ ที่ได้ให้การสนับสนุนในการพัฒนาบุคลากร และเครื่องมือต่าง ๆ ที่ทันสมัยในห้องทดลองของหน่วย Andrology ภาควิชาสูตินรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

งานวิจัยนี้ได้รับเงินทุนสนับสนุนโดยเงินงบประมาณแผ่นดิน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปี 2539

REFERENCES

1. Aribarg A. Sex preselection of infant. Chula Med J 1977 ; 21 : 91 - 4.
2. Priotrow PT. Sex preselection-notyet-practical. Population Report. George Washington University series I : No2, 1-21, 1975.
3. Van Kooij RJ, Van Oost BA. Determination of sex ratio of spermatozoa with deoxyribonucleic acid probe and quinacrine staining : a comparison. Fert Steril 1992 ; 58 : 384-6.
4. Ueda K, Yanagimachi R. Sperm chromosome analysis as a new system to test human X and Y sperm separation. Gamete Res 1987 ; 17 : 221.
5. Matthews CD. Simultaneous detection of X and Y bearing human sperm by double fluorescence in situ hybridization. Mol Repord. Dev. 1993 ; 38 : 308-13.
6. Ericsson RJ, Langevin CN, Nishino M. Isolation of Fractions rich in human Y sperm. Nature 1973 ; 246 : 421-4.
7. Iizuka R, Kaneko S, Aoki R, Kobayashi T. Sexing of human sperm by discontinous Percoll density gradient. Human Reprod 1987 ; 2 : 211-4.
8. Check JH, Katsoff D. A prospective study to evaluate the efficiency of Modified swim-up preparation for male sex selection. Hum Reprod 1993 ; 8 : 211-4.
9. Wyrobek AJ, Alhborn T, Balhorn R, Stanker L, Pinkel D. Fluorescence in situ hybridization. Mol Repord Dev 1993 ; 34 : 308-13.
10. Buckle VI, Graig IW. In situ hybridization In : Davies KE editor Human Genetic Diseases OxFord Press 1986 ; 85-100.
11. Joseph AM, Gosten JR, Chandley AC, Estimation of Anenploidy levels in human spermatozoa using chromosome specific probes and in situ hybridization. Hum Genet 1984 ; 66 : 234-8.
12. Shettle LB. Factors influencing sex ratio Int. J. Gynecol Obstel 1993 ; 8 : 1733-9.

13. Han TL, Ford JH, Webb GC, Flaherty SP, Correll A, Matthews CD. Simultanous detection of X and Y bearing human sperm by double fluorescence in situ hybridazation . Mol Reprod Dev 1993 ; 38 : 308-13.

14. Munne' S, Weier HUG, Stein J, Grifo J, Cohen J. A Fast and efficient method for simultaneous X and Y in situ hybridization of human blastomeres. J Assisted Reprod Genet 1993 ; 10 : 82-90.

15. Steeno O, Adimoelja A, Steeno J. Separation of X and Y bearing human spermatozoa with the Sephadex-gel filtration method. Andrologia 1975 ; 7 : 95-7.

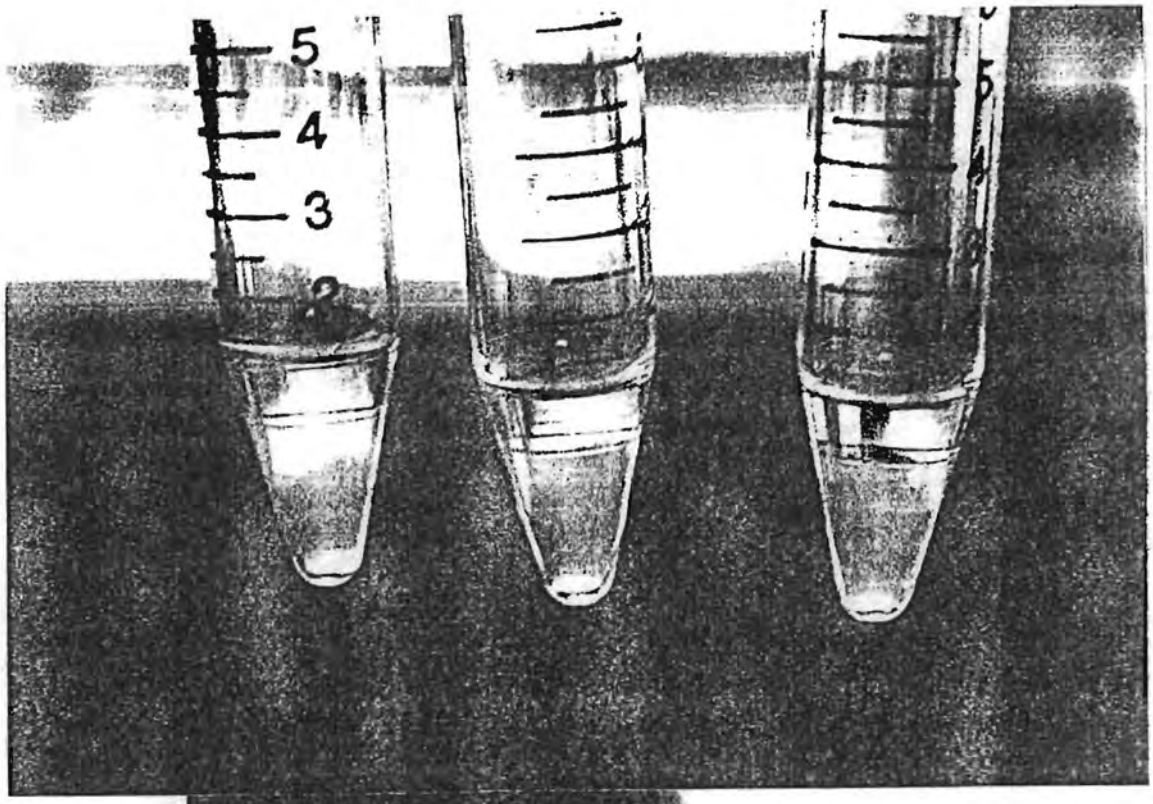
16. Johnson LA, Welch GR, Keyvantar K, Dorfman A, Fugger EF, Schulman JD. Gender preselection in human flew cytometric separation of X and Y spermatozoa for the prevention of X-linked diseases. Hum Reprod 1993 ; 8 : 1733-9.

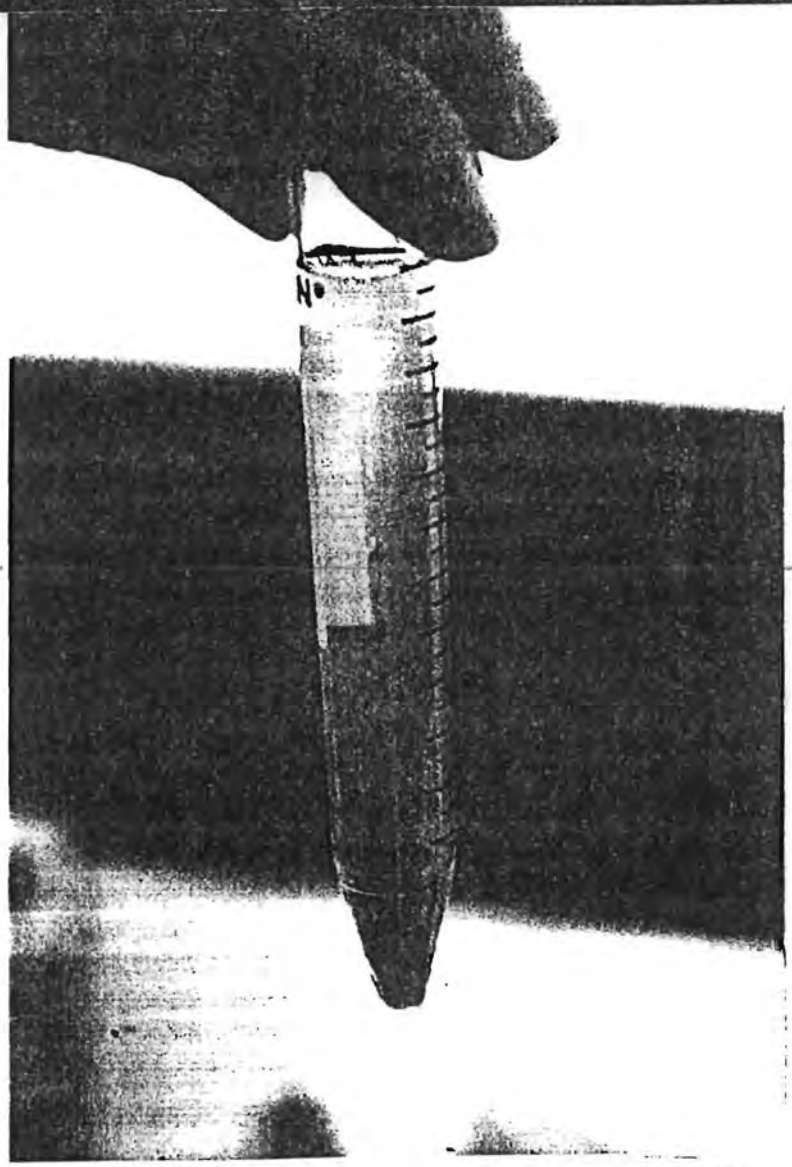
17. Aribarg A, Ngeamvijawal J, Chanprarit Y, Sukcharoen N. Determination of the ratio of X and Y bearing spermatozoa after albumen gradient method using double-label Fluorescence in situ hybridization. J Med assoc Thailand 1996 ; 79. Suppl 1 88-94.

18. Wang HX, Flahterty SP, Swann NJ, Matthew CD. Assessment of the separation of X and Y bearing sperm on albumen gradients using double-label fluorescene in situ hybridization. Fert Steril 1994 ; 61 : 720-6.

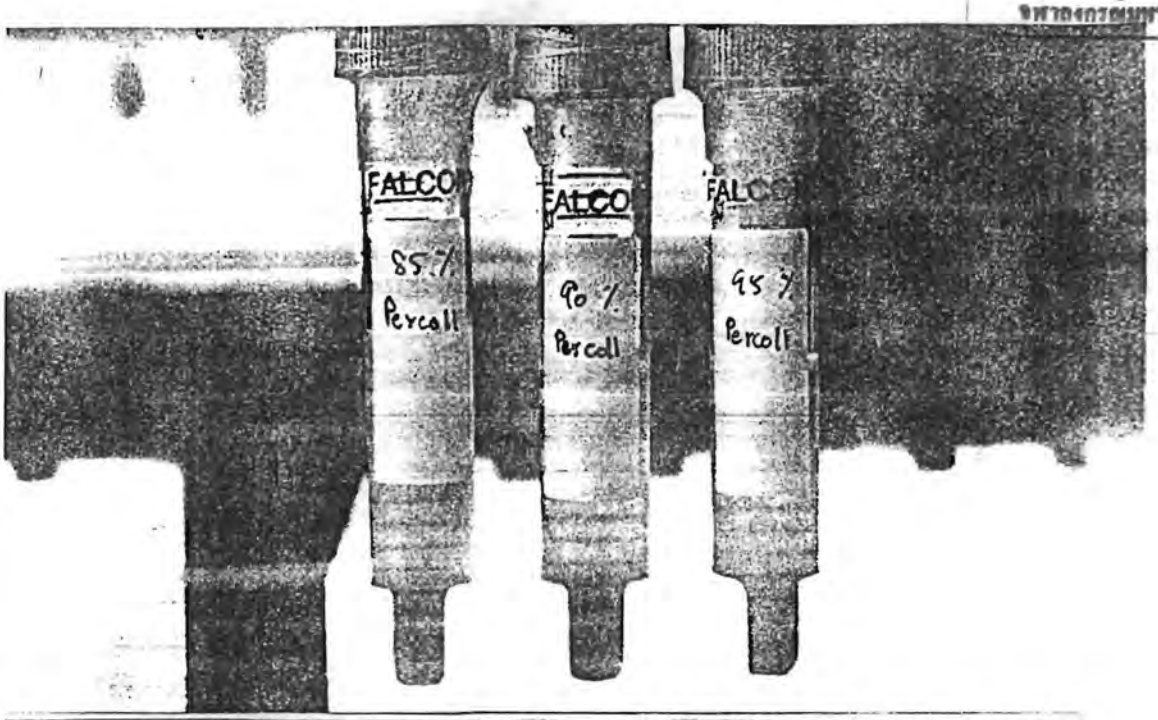
19. Gledhill BL. Selection and separation of X and Y chromosome bearing sperm. Gamete Res 1988 ; 20 : 377-95.

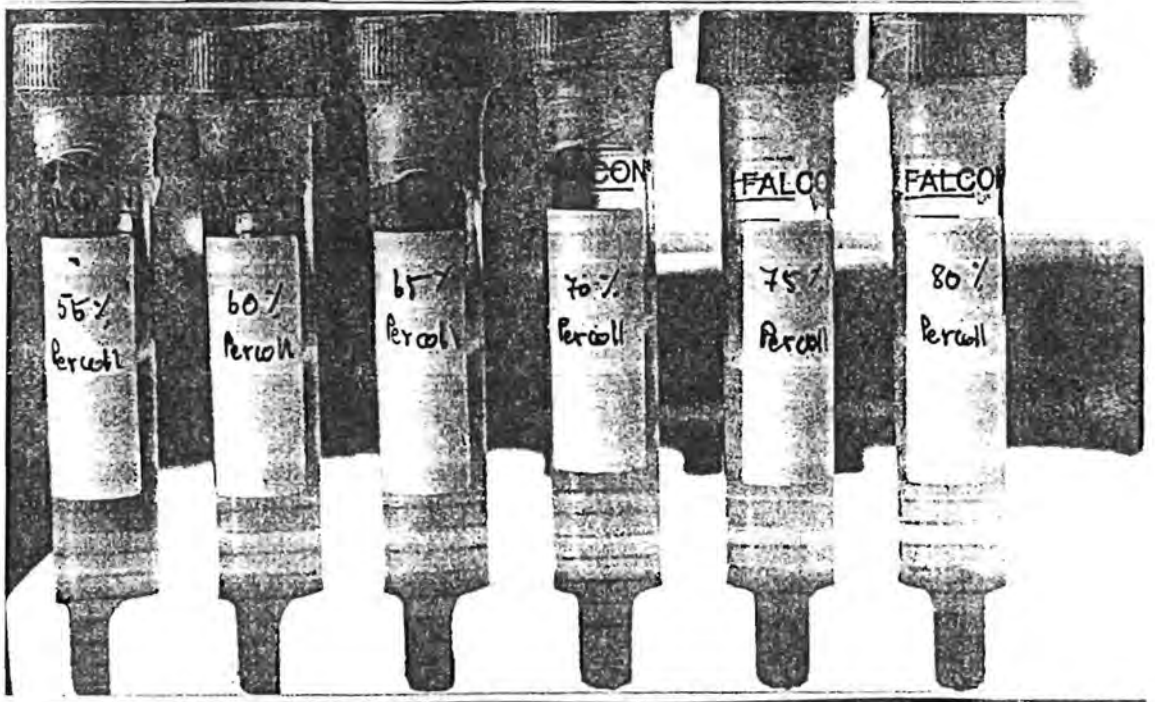
SWIM-UP

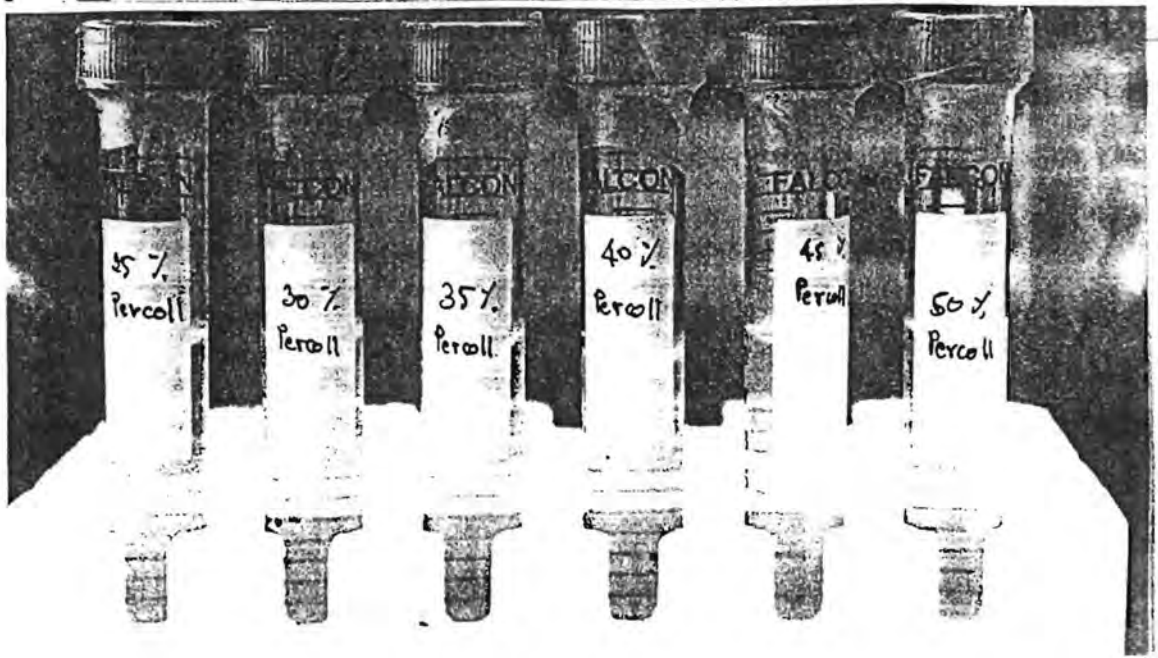


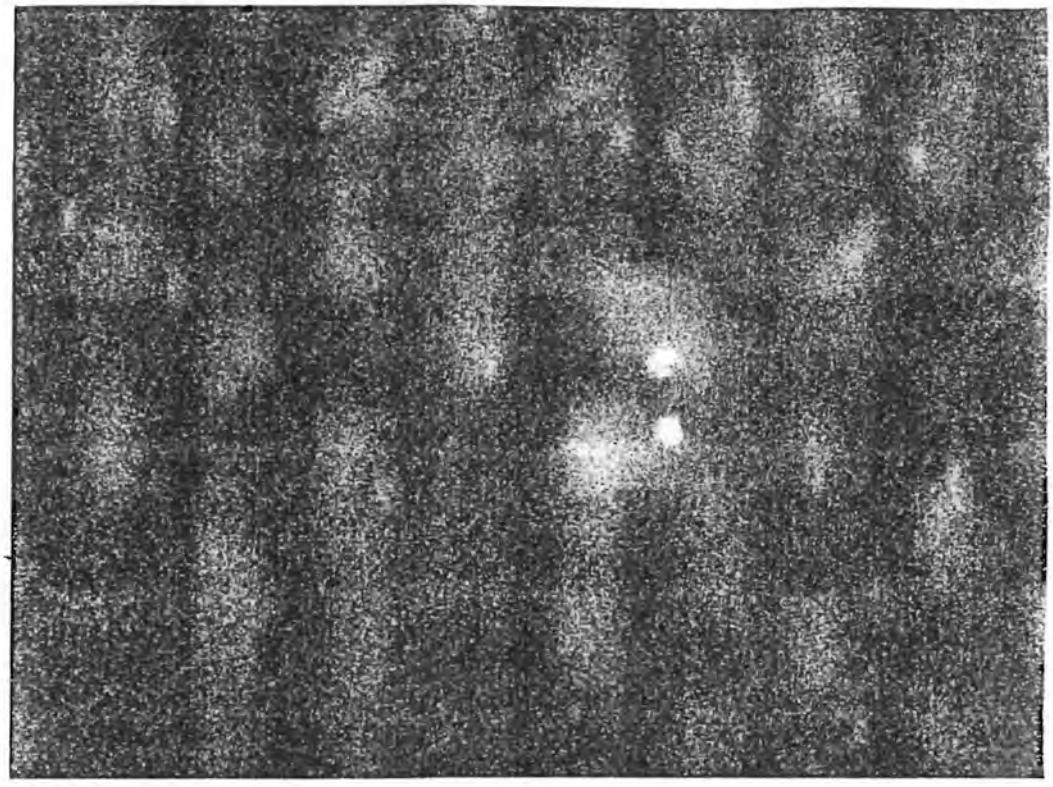


หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

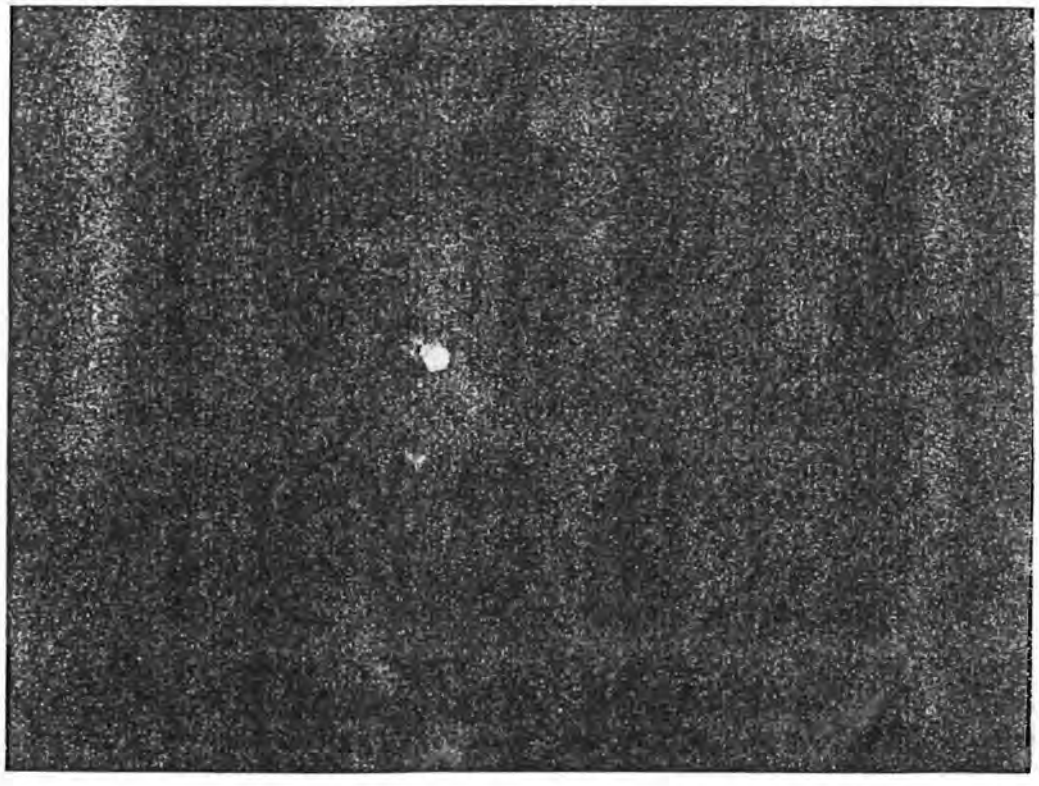




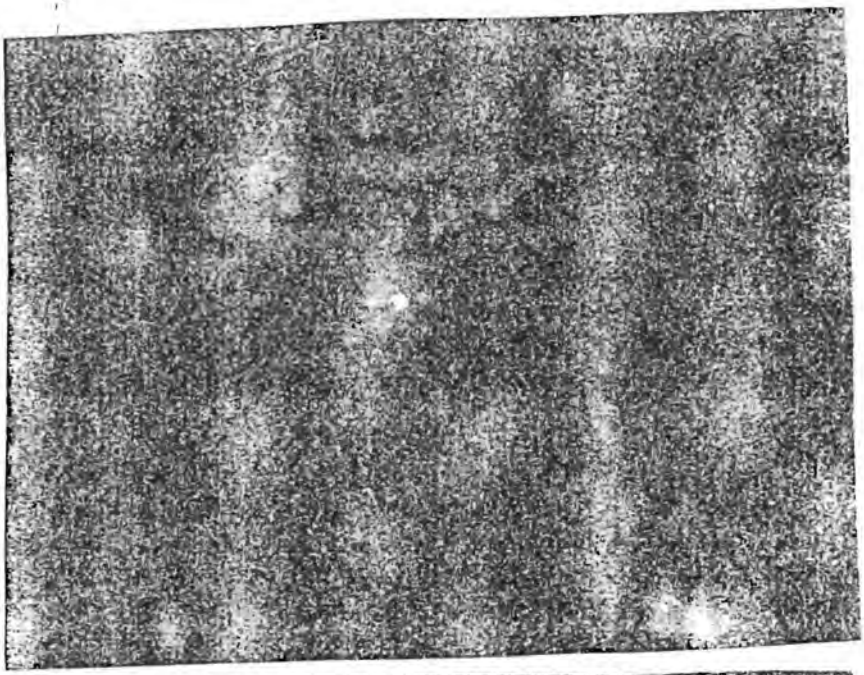




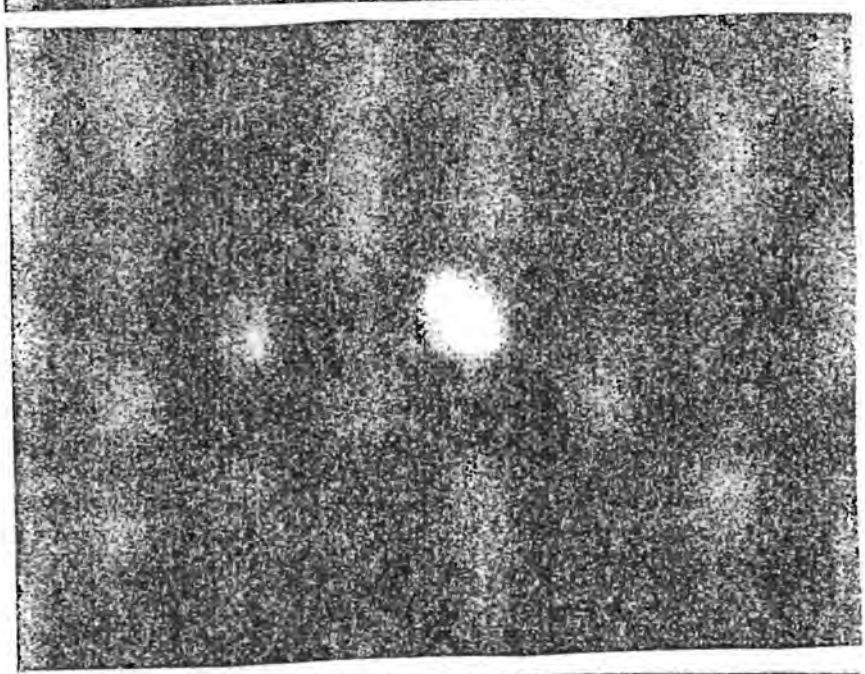
X-RED Y-GREEN SPERM



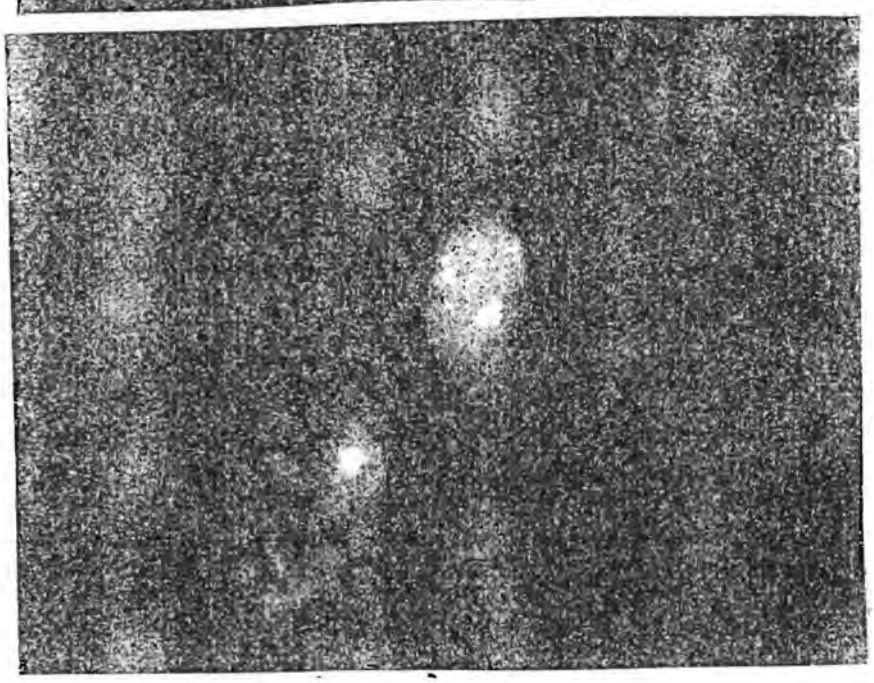
LEUCOCYTE CONTROL



SPERM WITH X & Y CHROMOSOMES



SPERM WITH X & X CHROMOSOMES



SPERM WITH Y & Y CHROMOSOME