

เปรียบเทียบการเตรียมอสุจิด้วยปิเปตแก้ว กับปิเปตแบบรามาริบัติ

แอนนา วงษ์กุลลาบ, วท.ด. สาริน อัมฤทธิ์, วท.บ. และ วิษณุ โชคนะศิริ, พบ.

ภาควิชาสัตวศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อประเมินความเสียหายของดีเอ็นเอในการเตรียมอสุจิมนุษย์ โดยใช้นวัตกรรมอุปกรณ์ดูดปล่อยอสุจิแบบรามาริบัติหรือที่เรียกว่า ปิเปตแบบรามาริบัติ

วิธีการศึกษาวิจัย นอสุจิของผู้ชาย 30 คนที่มีความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 20 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร และมีตัวอสุจิเคลื่อนที่มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 50 โดยการวัดค่าจากเครื่องตรวจวิเคราะห์อสุจิ (IVOS version 10) ภายหลังการหลั่งนอสุจิ 30 นาที และแบ่งนอสุจิออกเป็นสองส่วน ส่วนที่ 1 (กลุ่มควบคุม) ทำการเตรียมด้วยปิเปตแก้ว ส่วนที่สองเตรียมด้วยปิเปตแบบรามาริบัติ

ผลการศึกษา พบว่าหลังการเตรียมด้วยปิเปตแบบรามาริบัติเกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอของอสุจิตดลงจากร้อยละ 21.1 เหลือเพียง 9.8 ส่วนการเตรียมด้วยปิเปตแก้วความเสียหายของดีเอ็นเอคงเหลือร้อยละ 10.2

สรุป จากการศึกษาพบว่าได้ว่าการเตรียมด้วยปิเปตแบบรามาริบัติเป็นทางเลือกหนึ่งในงานการเตรียมอสุจิมนุษย์ เพื่อทดแทนปิเปตแก้วได้

คำสำคัญ : อสุจิมนุษย์ การเตรียมอสุจิ ปิเปต ความเสียหายของดีเอ็นเอ

Corresponding Author: สาริน อัมฤทธิ์

ภาควิชาสัตวศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400.

Email : peterpanjaa@hotmail.com



บทนำ

การเตรียมอสุจิมนุษย์เพื่อใช้ในงานด้านเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์เป็นงานที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางทั่วโลก โดยการเตรียมอสุจิมนุษย์เป็นงานที่นักวิทยาศาสตร์หรือบุคลากรทางการแพทย์ผู้ปฏิบัติงานต้องใกล้ชิดกับสารคัดหลั่งอย่างสม่ำเสมอ ดังนั้นในขณะที่ทางคณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดีได้ให้ความสำคัญเรื่องการพัฒนาคุณภาพการป้องกันควบคุมการติดเชื้อ จึงก่อให้เกิดแนวคิดพัฒนานวัตกรรมให้สอดคล้องกับงานที่ได้รับมอบหมายให้ดูแลรับผิดชอบ

จากประสบการณ์ที่ได้มีโอกาสไปศึกษาดูงานทางห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ของศูนย์เด็กหลอดแก้ว (IVF center) ณ VU University เมือง Amsterdam ประเทศเนเธอร์แลนด์ ที่ได้มีการใช้ Serological pipette สำหรับงานการเตรียมอสุจิมนุษย์ ซึ่งเป็นปิเปตที่ได้รับความนิยมในต่างประเทศเพราะความสะดวกหาซื้อได้ง่าย แต่มีความยาวของปิเปตที่ค่อนข้างยาวไม่เหมาะสมกับการใช้งานมากนัก ส่วนราคาค่อนข้างสูงและยังมีค่าใช้จ่ายในส่วนของการควบคุมการดูแลปล่อยน้ำอสุจิ ดังนั้นงานด้านนี้ในประเทศไทยได้มีการสั่งนำเข้าปิเปตแก้วมาใช้งานแทน Serological pipette จากแนวคิดดังกล่าวจึงได้มีการพัฒนาอุปกรณ์ดูดปล่อยอสุจิหรือปิเปตที่มีความเหมาะสมงานการเตรียมอสุจิมนุษย์ที่เทียบเท่ากับการใช้ปิเปตแก้ว เพื่อลดการนำเข้าปิเปตแก้วจากต่างประเทศ โดยประสิทธิภาพการทำงานที่ยังคงไว้ด้วยคุณภาพการเตรียมอสุจิได้ดีและต้องไม่เพิ่มความเสี่ยงต่อติดเชื้อของอสุจิ ซึ่งความเสี่ยงของติดเชื้อจะส่งผลต่ออัตราการปฏิสนธิและการพัฒนาของตัวอ่อนได้^(1,2) การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความเสี่ยงของติดเชื้อในงานการเตรียมอสุจิมนุษย์ โดยใช้ปิเปตแบบรามานิบัติเปรียบเทียบกับปิเปตแก้ว

วิธีการศึกษาวิจัย

กลุ่มอาสาสมัครจากชายสุขภาพแข็งแรงทำการเก็บน้ำอสุจิด้วยวิธี masturbation โดยทำการคัดเลือกน้ำอสุจิของชายที่มีความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 20 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร และตัวเคลื่อนที่มากกว่าหรือเท่ากับ ร้อยละ 50 ตามมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก⁽³⁾ และทำการย้อมดูรูปร่างของตัวอสุจิที่ปกติและผิดปกติ ด้วยวิธี Diff-Quick stain อ่านผลแบบ

Kruker strict criteria และตรวจดู DNA fragmentation ด้วยวิธี TUNEL assay จำนวน 30 คน โดยการวัดค่า semen parameter จากเครื่องตรวจวิเคราะห์อสุจิ (IVOS version 10) ภายหลังจากหลั่งน้ำอสุจิ 30 นาที และแบ่งน้ำอสุจิออกเป็นสองส่วนเท่าๆ กัน ส่วนที่ 1 (กลุ่ม 1) ทำการเตรียมอสุจิด้วยปิเปตแก้ว ดังภาพที่ 1 น้ำอสุจิส่วนที่สอง (กลุ่ม 2) ทำการเตรียมอสุจิด้วยปิเปตแบบรามานิบัติ (RAMA-SP PI-PETTE) ดังภาพที่ 2 และ 3 ซึ่งการเตรียมอสุจิมนุษย์แต่ละกลุ่มทำวิธีการปั่นเหวี่ยง โดย Sil-Select plus[®] และน้ำอสุจิที่ผ่านการเตรียมแต่ละกลุ่มไปทำการตรวจวิเคราะห์ค่า parameter ละ DNA fragmentation หลังการปั่นแยก

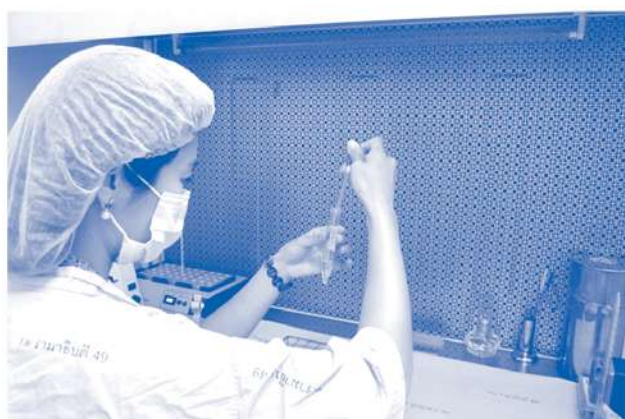
การเตรียมสไลด์สำหรับตรวจวิเคราะห์ค่า DNA fragmentation โดยการนำอสุจิที่เตรียมได้ป้ายลงบนแผ่นสไลด์และวางไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องและนำแผ่นสไลด์ตรึงด้วย Canoy's fixative ที่เตรียมใหม่ๆ แล้วนำแผ่นสไลด์ที่ได้เตรียมตามขั้นตอน TUNEL assay⁽⁴⁾ เพื่อการตรวจเช็คสายดีเอ็นเอที่แตกหัก โดยติดสารเรืองแสงที่ปลาย 3'OH ของดีเอ็นเอ (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated fluorescein dUTP nick end labeling) ซึ่งภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์การแสดงผลสัญญาณสีของอสุจิมนุษย์จะเห็นอสุจิที่ดีเอ็นเอปกติ (normal DNA) ติดสีแดง ส่วนอสุจิที่ดีเอ็นเอเสียหาย (DNA fragmentation) ติดสีเขียว

ผลการศึกษา

ผลการศึกษาค่าพารามิเตอร์ของน้ำอสุจีก่อนการเตรียมอสุจินั้นมีค่าของน้ำอสุจิปกติตามมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก⁽³⁾ โดยค่าเฉลี่ยของการตรวจวิเคราะห์น้ำอสุจิ (semen parameter) ก่อนการเตรียมและหลังการเตรียมของกลุ่ม 1 และกลุ่ม 2 พบว่า ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของตัวอสุจิ เท่ากับ 105.0 ± 47.3 , 39.4 ± 18.7 และ 39.1 ± 18.5 ตามลำดับ ส่วนค่าร้อยละของอสุจิที่เคลื่อนไหวมีค่าเพิ่มขึ้นจากก่อนแยกคือ 61.8 ± 7.9 เป็น 89.3 ± 7.4 และ 88.3 ± 7.4 ตามลำดับ และค่าร้อยละของอสุจิที่มีรูปร่างปกติมีค่าเพิ่มขึ้นจากก่อนแยกคือ 15.0 ± 3.5 เป็น 19.0 ± 2.1 และ 18.0 ± 2.2 ตามลำดับ แต่หลังการเตรียมอสุจิพบความเสี่ยงต่อติดเชื้อของอสุจิจากร้อยละ 21.1 ± 6.2 ลดลงเหลือ 10.2 ± 2.3 หลังการเตรียมด้วยปิเปตแก้ว (กลุ่ม 1) ส่วนกลุ่ม 2 (เตรียมด้วยปิเปตแบบรามานิบัติ) ความเสียหายของดีเอ็นเอเหลือร้อยละ 9.8 ± 2.2 (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ค่าพารามิเตอร์ก่อนการเตรียมสpermatozoa, กลุ่ม 1 (หลังการเตรียมด้วยปิเปตแก้ว) และกลุ่ม 2 (หลังการเตรียมด้วย RAMA-SP PIPETTE)

พารามิเตอร์	ก่อนการเตรียม (mean $\pm$ SD)	กลุ่ม 1 (mean $\pm$ SD)	กลุ่ม 2 (mean $\pm$ SD)
Concentration (mil/ml)	105.0 $\pm$ 47.3	39.4 $\pm$ 18.7	39.1 $\pm$ 18.5
Motile (%)	61.8 $\pm$ 7.9	89.3 $\pm$ 7.4	88.3 $\pm$ 7.4
Normal morphology (%)	15.0 $\pm$ 3.5	19.0 $\pm$ 2.1	18.0 $\pm$ 2.2
DNA fragmentation (%)	21.1 $\pm$ 6.2	10.2 $\pm$ 2.3	9.8 $\pm$ 2.2



ภาพที่ 1 การเตรียมสpermatozoa โดยใช้ ปิเปตแก้ว



ภาพที่ 2 RAMA-SP PIPETTE



ภาพที่ 3 การเตรียมสpermatozoa โดยใช้ RAMA-SP PIPETTE



อภิปรายผลการวิจัย

จากผลการศึกษาทำให้เห็นว่าการคัดแยกอสุจิวิธีการปั่นเหวี่ยงมีผลของค่าร้อยละอสุจิที่เคลื่อนไหว และร้อยละอสุจิที่มีรูปร่างปกติดีกว่าก่อนทำการปั่นแยก แต่ค่าร้อยละของความเสียหายต่อดีเอ็นเอของอสุจิหลังการเตรียมลดลง ซึ่งความเสียหายของดีเอ็นเอมีความสัมพันธ์กับคุณภาพของตัวอสุจิ⁽⁵⁾ และอัตราการตั้งครรภ์ในงานด้านเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์^(6,7) ดังนั้นวิธีการและขั้นตอนในการเตรียมอสุจิที่ส่งผลเสียหายต่อดีเอ็นเอของอสุจิหลังทำการคัดแยกที่มีความเสียหายต่อดีเอ็นเอน้อยย่อมส่งผลที่ดีต่อการปฏิสนธิของไข่กับอสุจิ การพัฒนาของตัวอ่อน และอัตราการตั้งครรภ์ของงานด้านเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ได้

สรุป

จากการศึกษาจึงกล่าวได้ว่าปิเปตแบบรามามีปฏิกิริยาเป็นทางเลือกหนึ่งในงานการเตรียมอสุจิมนุษย์ที่มีความเหมาะสมสำหรับงานการเตรียมอสุจิมนุษย์และสามารถนำมาทดแทน

ปิเปตแก้วได้ รวมทั้งประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ ดังนี้

1. ปิเปตต้นแบบที่เพิ่มความสะดวกและความเหมาะสมสำหรับงานการเตรียมอสุจิมนุษย์
2. ลดอุบัติเหตุจากการแตกหักของวัสดุอุปกรณ์แก้ว
3. ลดค่าใช้จ่ายในการนำเข้าปิเปตแก้วจากต่างประเทศ
4. ลดต้นทุนบุคลากรในงานการเตรียมปิเปตแก้วให้สะอาดปราศจากเชื้อ

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์นายแพทย์อร่าม โรจนสกุล ที่ให้การสนับสนุนก่อเกิดพัฒนานวัตกรรม และศาสตราจารย์แพทย์หญิงสุกพรพรรณ วิลักษณ์ หัวหน้าภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยาที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณกลุ่มอาสาสมัครที่บริจาคอสุจิเพื่อการศึกษาวิจัย และท้ายสุดขอขอบคุณทีมงานศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีช่วยการเจริญพันธุ์ คณะแพทยศาสตร์โรงพยาบาลรามาธิบดีที่ให้ความร่วมมืองานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Meseguer M, Rebeca S, Nicolas G, Sandra GH, Jose R, and Jose LF. Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. Presented in part at the 35th Meeting of the American Society of Andrology, Houston, Texas, 2010 April 10-13.
2. Simon L, Brunborg G, Stevenson M, Lutton D, Joanne MM, and Lewis SE. Clinical significance of sperm DNA damage in assisted reproductive outcome. Hum Reprod 2010;25:1594-608.
3. World Health Organization: WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 4 th. Cambridge University Press, Cambridge, UK.1999.
4. David DF, Maria IC, Jose LB, Rafael O. Human sperm DNA fragmentation correlation of TUNEL results as assessed by flow cytometry and optical microscopy. Cytometry 2007;71:1011-8.
5. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL. DNA integrity in human spermatozoa relationships with semen quality. J Androl 2000;21:33-44.
6. Benchaib M, Braun V, Lornage J, Hadj S, Salle B, Lejeune H, and Guerin JF. Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. Hum Reprod 2003;18:1023-8.
7. Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M, and Giwercman A. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. Asian J Androl 2006;8:11-29.



Comparision of the Glass Pipette and RAMA SP Pipette for Sperm Preparation

Wongkularb A, Ph.D¹, Ammarit S, B.Sc¹ and Choktanasiri W, MD.¹

¹Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

ABSTRACT

Objective: To evaluate the DNA fragmentation on human sperm assessed by Ramathibodi's SP pipette.

Materials and Method: In this experimental study, thirty samples of freshly ejaculated human semen having a sperm density 20 million per ml or more and a percentage of motile sperm 50 percent or more were used in the study. The percentage of sperm motility was measured by a Hamilton Thorn Sperm Analyzer (IVOS version 10). The sperm motility was evaluated within 30 minutes after ejaculation. After semen analysis, the semen was divided into two parts, one part was kept as a control (assessed by glass pipette) and the other used for the experiment (assessed by Ramathibodi's SP pipette).

Results: After sperm preparation, the DNA fragmentation with Ramathibodi's SP pipette was observed to decrease from 21.1 to 9.8 while that of the control (assessed by glass pipette) decreased to 10.2.

Conclusion: Our study indicates that DNA fragmentation of human sperm by using Ramathibodi's SP pipette is superior to that of the glass pipette.

Keywords : Human sperm, Sperm preparation, Pipette, DNA fragmentation

Corresponding Author: Ammarit S, B.Sc

Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Medicine Ramathibodi Hospital, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand. Email: peterpanjaa@hotmail.com