Correlations Among Hyaluronan Binding Assay, Annexin-V/Propidium Iodide Staining and Acrosome Reaction for Sperm Quality Assessment

Surachai Dejarkom*, Suwanthana Yamthanod, Warinda Phoonthaweerat**, Kwansuda Supalap***, Patcharada Amatyakul***

*Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Naresuan University, Phitsanulok, **Infertility Unit, Faculty of Medicine, Naresuan University, Phitsanulok, ***Basic Medical Science Research Unit, Faculty of Medicine, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand.

Siriraj Medical Bulletin 2022;15(2): 70-77

Abstract

Objective: To evaluate correlation among Hyaluronan Binding Assay (HBA), Annexin-V binding and Acrosome Reaction (AR) with semen analysis by World Health Organization (WHO) criteria.

Material & Methods: Twenty-seven infertile men underwent semen analysis at the infertility center, Naresuan university hospital using basic quantitative method by WHO criteria and qualitative methods by HBA, Annexin-V binding and AR. The results were calculated for correlations among these methods.

Results: The mean age of the study group was 34.2 ± 5.4 years old. The semen analysis showed normal volume, sperm concentration, progressive motility, total motility and morphology. The result of HBA was 87.5%. According to the annexin-V binding assay, most of sperm (80.47%) was viable without apoptosis. The results of Sperm Spontaneous Acrosome Reaction Rate (SARR) and acrosome reaction after ionophore challenge were within normal ranges. There was no correlation between HBA and sperm parameters evaluated by WHO criteria. However, HBA bound significantly correlated with viable sperm and HBA bound negatively correlated with late apoptotic sperm (r_s 0.466, p = 0.014 and -0.563, p = 0.002, respectively).

Conclusion: Hyaluronic acid binding assay was correlated with viable sperm and low late apoptosis, but not correlated with sperm acrosome reaction.

Keywords: semen analysis; correlation; hyaluronan binding assay; annexin-v binding assay; acrosome reaction

Correspondence to: Surachai Dejarkom
Email: surachaid@nu.ac.th
Received: 21 September 2021
Revised: 29 November 2021
Accepted: 8 December 2021
http://dx.doi.org/10.33192/smb.v15i2.253684

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง Hyaluronan Binding Assay, Annexin-V/ Propidium Iodide Staining และ Acrosome Reaction สำหรับการประเมินคุณภาพของน้ำอสุจิ

สุรชัย เดชอาคม*, สุวรรธณา แย้มโตนด, วรินดา พูนทวีรัตน์**, ขวัญสุดา สุภลาภ***, พัชรดา อมาตยกุล***

*ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก, **ศูนย์รักษาผู้มีบุตรยาก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก, ***หน่วยวิจัยด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์พื้นฐาน คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจ Hyaluronan binding assay, Annexin-V binding และ Acrosome reaction กับการตรวจคุณภาพน้ำอสุจิตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก

วิธีการศึกษา: ผู้ชายมีบุตรยากจำนวน 27 คน มาตรวจน้ำอสุจิที่ศูนย์รักษาผู้มีบุตรยาก โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร ด้วยวิธีการตรวจเชิงปริมาณเบื้องต้นตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลกและการตรวจเชิงคุณภาพด้วยวิธี Hyaluronan binding assay, Annexin-V binding, Acrosome reaction แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณเพื่อหาความสัมพันธ์

ผลการศึกษา: กลุ่มตัวอย่างมีอายุเฉลี่ย 34.2 ± 5.4 ปี ผลการตรวจน้ำอสุจิมีปริมาณ ความเข้มข้นของตัวอสุจิ จำนวนอสุจิที่เคลื่อนที่เร็ว จำนวนอสุจิที่เคลื่อนที่ทั้งหมด และรูปทรงอยู่ในเกณฑ์ปกติ การตรวจ Hyaluronan binding assay (HBA) มีค่าร้อยละ 87.5 การตรวจ Annexin-V binding พบว่าอสุจิส่วนใหญ่เป็นอสุจิที่มีชีวิตและยังไม่เกิด apoptosis (ร้อยละ 80.47) การตรวจ Sperm spontaneous acrosome reaction rate (SARR) และ Acrosome reaction after ionophore challenge อยู่ในเกณฑ์ปกติ ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจ HBA กับ parameters ต่าง ๆ ของอสุจิเมื่อตรวจตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก แต่ HBA bound มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสถิติกับอสุจิที่ยังมีชีวิต และมีความสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ late apoptotic sperm (r_s 0.466, p = 0.014 และ -0.563, p = 0.002 ตามลำดับ)

สรุป: การตรวจ Hyaluronan binding assay สัมพันธ์กับอสุจิที่มีชีวิตและมี late apoptosis ที่ต่ำ แต่ไม่สัมพันธ์กับการเกิด acrosome reaction ของอสุจิ

คำสำคัญ: การตรวจอสุจิ; ความสัมพันธ์; hyaluronan binding assay; annexin-v binding assay; acrosome reaction

บทนำ

ปัจจุบันพบปัญหาคู่สมรสมีบุตรยากสูงขึ้น ซึ่งมีสาเหตุจากฝ่ายชายร้อยละ 30 การตรวจอสุจิทางห้องปฏิบัติการนิยมใช้ตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก (WHO Semen analysis) ปี ค.ศ.2010[1] การตรวจวิธีนี้มีข้อดีคือสามารถตรวจได้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป ขั้นตอนการตรวจง่าย แต่มีข้อจำกัดเพราะเป็นการตรวจอสุจิในเชิงปริมาณเท่านั้น แม้การตรวจน้ำอสุจิอยู่ในเกณฑ์ปกติ ยังอาจพบปัญหาคุณภาพอสุจิที่ผิดปกติ (sperm dysfunction) ทำให้อัตราการปฏิสนธิต่ำและมีปัญหามีบุตรยากได้[2-4] เพราะในธรรมชาติอสุจิจะต้องเกิด sperm capacitation, acrosome reaction, sperm-zona interaction และ sperm penetration ก่อนเกิดการปฏิสนธิกับไข่ การตรวจอสุจิเชิงคุณภาพสามารถทำได้หลายวิธี[3,5] เช่น การประเมินการจับของอสุจิกับไข่ การประเมินการเกิด acrosome reaction ของอสุจิ การตรวจ DNA fragmentation ของอสุจิ[6,7] และการตรวจ sperm apoptosis การตรวจสารอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species) รวมถึงเทคนิคใหม่ที่คัดเลือกอสุจิจากความสามารถในการเคลื่อนที่ผ่านของเหลว (microfluidics) ผ่านสารเคมี (chemotaxis) ผ่านอุณหภูมิ (thermotaxis)[8] การตรวจเหล่านี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกอสุจิที่คุณภาพดีสำหรับการปฏิสนธิ แต่วิธีการตรวจส่วนใหญ่ยุ่งยาก ใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง ประกอบกับผลการวิจัยยังไม่ชัดเจนเกี่ยวกับอัตราการปฏิสนธิ การพัฒนาของตัวอ่อนและการตั้งครรภ์ จึงยังไม่นิยมใช้ตรวจทั่วไป[9-11]

Annexin-V binding assay เป็นการตรวจ cell apoptosis โดย Annexin-V เป็น phospholipid binding protein ที่ไป

จับกับ Phosphatidylserine (PS) ที่ผิวนอกของ plasma membrane ซึ่งแสดงถึง early apoptosis เมื่อกระบวนการ apoptosis เกิดมากขึ้น cell membrane และ nuclear membrane จะสูญเสีย integrity สาร propidium iodide จึงผ่านเข้าไปติดสีที่ nucleic acid ได้ จากการศึกษาพบว่าชายที่มีบุตรยากมี apoptotic sperm มากกว่าชายปกติ และ apoptotic sperm ที่มากขึ้นสัมพันธ์กับการเคลื่อนไหว (motility) และการมีชีวิต (viability) ของอสุจิที่ลดลง[12]

Acrosome Reaction (AR) เป็นขั้นตอนสำคัญของกระบวนการ capacitation เริ่มจากมี exocytosis ของเซลล์ ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของ acrosomal membrane ที่ด้านนอกของหัวอสุจิและหลั่งเอนไซม์ acrosin ออกมา ซึ่งช่วยให้อสุจิเจาะผ่าน zona pellucida และปฏิสนธิได้ การเกิด AR ตามธรรมชาติ จะถูกกระตุ้นโดยโปรเจสเทอโรนและ ZP3 ซึ่งเป็น glycoprotein ใน zona pellucida ของไข่ ในห้องปฏิบัติการสามารถกระตุ้นให้เกิด AR ได้โดยใช้สารเคมี เช่น calcium ionophore A23187[13] การตรวจ AR พบความผิดปกติได้ 2 แบบ คือ

1. การเกิด AR ไม่เพียงพอ (AR insufficiency) หมายถึงอสุจิที่มีความแตกต่างระหว่างการเกิด AR ในอสุจิที่กระตุ้นด้วย calcium ionophore กับไม่ได้กระตุ้นน้อยกว่าร้อยละ 15

2. การเกิด AR ก่อนกำหนด (AR prematurity) หมายถึงอสุจิที่มี AR เกิดขึ้นเอง (Sperm Spontaneous Acrosome Reaction Rate, SARR) มากกว่าร้อยละ 10-20 ค่าปกติอาจมีความแตกต่างในแต่ละรายงานตามวิธีการตรวจ การทำงานที่ผิดปกติของ AR สัมพันธ์กับความล้มเหลวในการปฏิสนธินอกร่างกาย[14] จากการรวบรวมข้อมูลแบบ meta-analysis พบว่ามี positive predictive value ร้อยละ 75 แต่มี negative predictive ค่อนข้างแตกต่างกันมาก[15] การเปลี่ยนแปลงของ membranes ที่บริเวณหัวของอสุจิจากกระบวนการ acrosome reaction ทำให้พบ phosphatidylserine ที่ผิวนอกของอสุจิซึ่งอาจส่งผลต่อการแปลผล apoptosis จากการตรวจ Annexin-V binding ได้[16]

Hyaluronic Acid (HA) เป็นสาร polysaccharide ที่อยู่ใน extracellular matrix ของเซลล์ cumulus oophorus รอบๆ ไข่ อสุจิที่พัฒนาสมบูรณ์แล้วจะจับกับ zona pellucida ของไข่ได้ การตรวจด้วยวิธี Hyaluronan Binding Assay (HBA) เป็นการนำ HA ไปเคลือบไว้ที่สไลด์ แล้วหยดอสุจิลงบนสไลด์และตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ จากการศึกษาพบว่าอสุจิที่จับกับ HA เป็นอสุจิที่มีคุณภาพดี มี viability, maturity, acrosomal integrity และ low aneuploidy[17,18] ข้อมูลของ systematic review ในปี 2016[19] พบว่า การคัดเลือกอสุจิด้วยวิธี HBA เพื่อการปฏิสนธิ จะทำให้คุณภาพตัวอ่อนดีขึ้น แต่ไม่ได้เพิ่มอัตราการปฏิสนธิและอัตราการตั้งครรภ์ ดังนั้นเทคนิคนี้จึงยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม

แนวทางในการรักษาภาวะมีบุตรยากที่ผลตรวจน้ำอสุจิปกติและไม่พบสาเหตุอื่น (unexplained infertility) การรักษาเริ่มด้วยการกินยากระตุ้นไข่ นับวันมีเพศสัมพันธ์ การฉีดน้ำเชื้อเข้าโพรงมดลูก (intrauterine insemination) และการทำเด็กหลอดแก้ว (in vitro fertilization) ตามลำดับ เนื่องจากการตรวจน้ำอสุจิตามเกณฑ์ WHO มีข้อจำกัดในการประเมินคุณภาพอสุจิ ดังนั้นหากสามารถตรวจคุณภาพของอสุจิร่วมด้วยได้ ก็จะช่วยให้เลือกวิธีการรักษาได้เหมาะสมยิ่งขึ้น การตรวจ Annexin-V binding และ AR เป็นวิธีที่ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนต์ ในขณะที่การตรวจ HBA อาศัยเพียงกล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดา สามารถตรวจได้โดยไม่ต้องเตรียมน้ำยาที่ยุ่งยาก จึงเป็นที่มาของงานวิจัยเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง HBA, Annexin-V binding และ AR สำหรับประเมินคุณภาพอสุจิ

วัตถุประสงค์และวิธีการศึกษา

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจอสุจิด้วยวิธี HBA, Annexin-V/ propidium iodide staining และ AR กับการตรวจคุณภาพน้ำอสุจิตามเกณฑ์ของ WHO

วิธีการศึกษา

คู่สมรสมีบุตรยากที่ฝ่ายชายได้ตรวจน้ำอสุจิที่ศูนย์รักษาผู้มีบุตรยาก โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยนเรศวร ระหว่างมกราคม 2562 – ธันวาคม 2562 (หลังได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมวิจัยในมนุษย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เลขที่โครงการ 879/2559) ซึ่งเก็บตัวอย่างน้ำอสุจิหลังจากงดการหลั่ง 3-7 วัน ด้วยวิธีการช่วยตัวเองและส่งตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อประเมินปริมาณน้ำอสุจิ (volume) ความเข้มข้น (concentration) การเคลื่อนไหวของอสุจิ (motility) โดยใช้ Makler® counting chamber (Sefi-medical instruments LTD) และย้อม Wright stain เพื่อประเมินรูปทรงอสุจิตามเกณฑ์ของ WHO โดยมีเกณฑ์คัดออกคือความเข้มข้นของอสุจิน้อยกว่า 5 ล้านตัวต่อมิลลิลิตรหรือปริมาณน้ำอสุจิน้อยกว่า 1 มิลลิลิตร

นำน้ำอสุจิมาปั่นด้วยวิธี density gradient centrifugation (45% : 90% fractions) โดยใช้น้ำยา Sil-select (CAT No. SIS500, FertiPro NV, Beernem, Belgium) แล้วนำมาเจือจางด้วย phosphate buffered saline (PBS) ให้อสุจิมีความเข้มข้น 1 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร และแบ่งใส่หลอดเพื่อตรวจวิธีต่างๆ ดังนี้

1. การตรวจ Hyaluronan binding assay

ดูดน้ำอสุจิ 10 ไมโครลิตร หยดลงบน HBA® kit slide (CAT No. BCT-HBA-10, Origio, Denmark) แล้วนำไปไว้ในตู้อุณหภูมิ 37°C นาน 15 นาทีเพื่อให้อสุจิจับกับ Hyaluronan ที่เคลือบบนผิวสไลด์ ปิดด้วย cover slip แล้วนับจำนวนอสุจิทั้งหมด 10 ช่องเล็กโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ อสุจิที่มีชีวิตและจับกับ Hyaluronan จะเคลื่อนไหวเฉพาะส่วนหาง (bound motile sperm) แต่อสุจิที่ไม่จับกับ Hyaluronan จะเคลื่อนไหวอย่างอิสระทั้งส่วนหัวและหาง (unbound motile sperm) จากนั้นนำมาคำนวณเป็นค่าร้อยละ

ของ HBA bound โดยใช้สูตรดังนี้

$$\%\ \text{HBA bound} = \frac{\text{bound motile} \times 100}{\text{unbound motile} + \text{bound motile}}$$

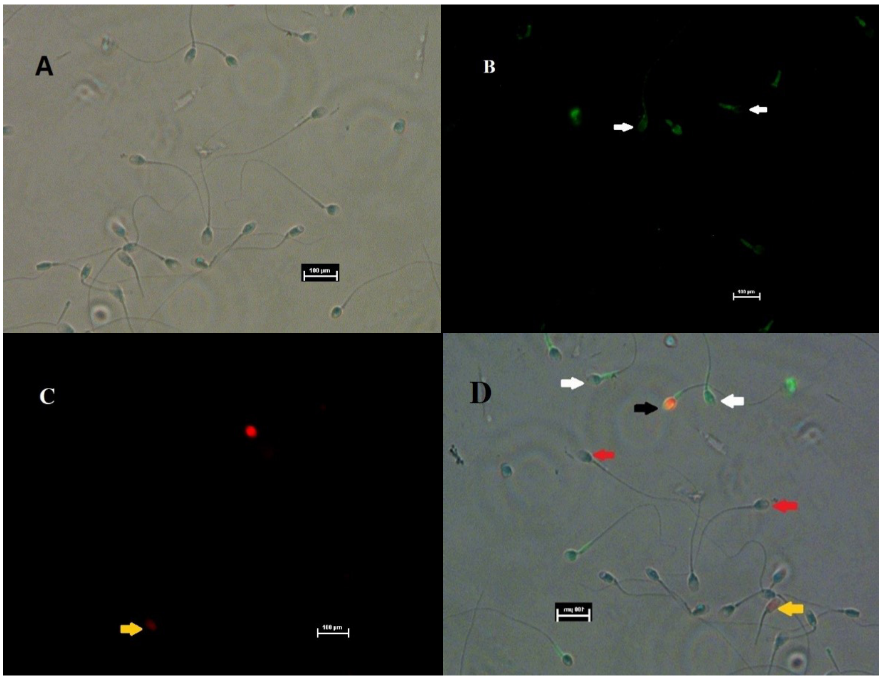
2. การตรวจ Annexin-V/ Propidium Iodide (PI) Staining Assay

ใช้ชุดตรวจ Annexin-V/PI (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, CAT No.556547, BD Pharmagen, USA) นำอสุจิไปปั่นล้างด้วย PBS ที่ 400 x g นาน 5 นาที ดูด supernatant ทิ้ง ละลายตะกอนด้วย 1x binding buffer 500 ไมโครลิตร และเตรียม FITC Annexin-V 10 ไมโครลิตร ผสมกับ PI 5 ไมโครลิตร ใน 1x binding buffer 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมลงในหลอดตัวอย่าง เขย่าหลอดเบา ๆ ให้สารละลายเข้ากัน บ่มในที่มืด 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วปั่นล้างด้วย PBS ที่ 400 x g นาน 5 นาที ดูด supernatant ทิ้ง ละลายตะกอนด้วย 1x binding buffer 500 ไมโครลิตร ดูดตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร หยดลงบนสไลด์ ปิด cover slip แล้วรีบนำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวกลับฟลูออเรสเซนต์ (Nikon ECLIPSE Ti-U, Japan) โดยใช้ Filter ที่มีความยาวคลื่น 450-490 นาโนเมตร (อสุจิที่ย้อมติด FITC Annexin-V จะเห็นสีเขียว) และ Filter ที่มีความยาวคลื่น 510-560 นาโนเมตร (อสุจิที่ย้อมติด PI จะเห็นสีแดง)

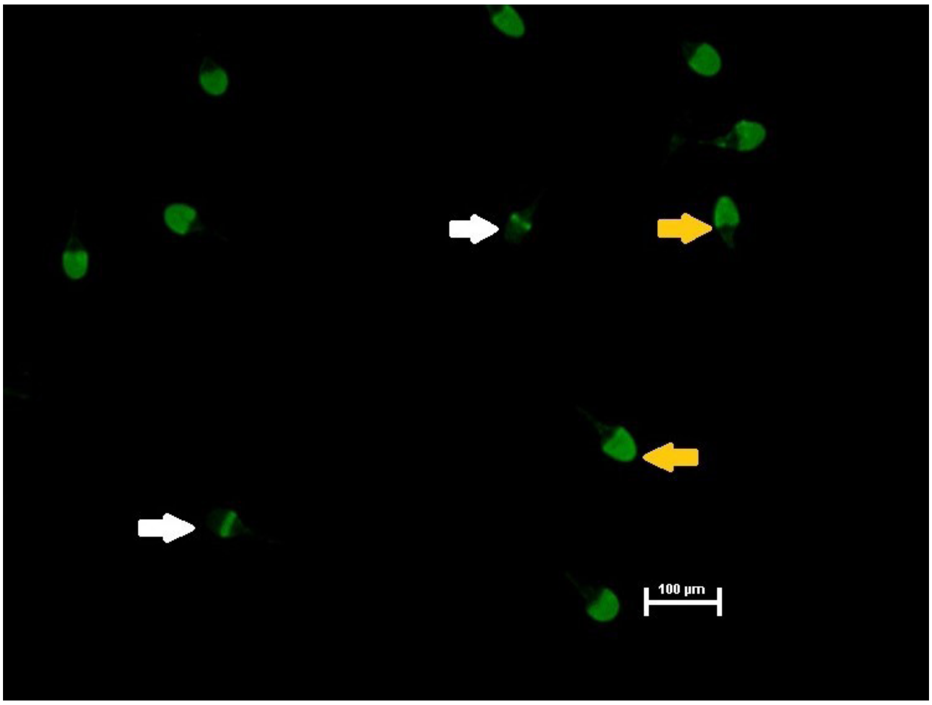
การแปลผล แบ่งได้เป็น 4 แบบคือ อสุจิที่มีชีวิตและยังไม่เกิด apoptosis จะไม่ติดสีทั้งสองสี (Viable sperm: AN-/PI-) อสุจิที่เริ่มเกิด apoptosis จะติดสีเขียวของ FITC Annexin-V (Early apoptotic sperm: AN+/PI-) อสุจิที่เกิด apoptosis มาระยะหนึ่งแล้วแต่ยังไม่ตาย จะติดสี Propidium iodide เห็นเป็นสีส้ม (Late apoptotic sperm: AN+/PI+) และอสุจิที่ตายแล้วจะติดสี Propidium iodide เช่นกัน แต่เห็นเป็นสีแดง (Death sperm: AN-/PI+) (ภาพที่ 1)

3. การตรวจ Acrosome Reaction

นำตัวอย่างอสุจิมาเติม Flushing Media (CAT No. FLUSH100, FertiPro NV, Beernem, Belgium) 1 มิลลิลิตร บ่มในตู้อุณหภูมิ 37°C นาน 3 ชั่วโมง แล้วแบ่งตัวอย่างเป็นสองหลอด หลอดแรกเป็นกลุ่มควบคุม (control) หลอดที่สองเติม calcium ionophore A23187 (CAT No. C7522, Sigma-Aldrich, USA) (100 µM) 10 ไมโครลิตร ทั้งสองหลอดจะถูกบ่มในตู้อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที ปั่นล้างด้วย PBS ที่ 400 x g นาน 5 นาที ดูด supernatant ทิ้ง นำตะกอนอสุจิที่ได้มาป้ายบนสไลด์และทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วจุ่มสไลด์ลงใน 95% ice-cold ethanol นาน 30 นาที นำมาผึ่งทิ้งไว้ให้แห้ง หยด Fluorescein Isothiocyanate Conjugated Pisum Sativum Agglutinin (FITC-PSA) 5 µg/ml บนสไลด์ให้ท่วม วางสไลด์ในถาด ปิดฝาให้มืด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 15 นาที



ภาพที่ 1 (A) ภาพ Bright field (B) ภาพดูด้วย filter 450-490 nm อสุจิติดสีเขียวของ FITC Annexin-V (ลูกศรสีขาว) (C) ภาพดูด้วย filter 510-560 nm อสุจิติดสีแดงของ Propidium iodide (ลูกศรสีเหลือง) (D) Merge แสดงลักษณะอสุจิที่ติดสี FITC Annexin-V และ PI โดย Viable sperm ไม่ติดสี (ลูกศรสีแดง) Early apoptotic sperm ติดสีเขียว (ลูกศรสีขาว) Late apoptotic sperm ติดสีส้ม (ลูกศรสีดำ) และ Death sperm ติดสีแดง (ลูกศรสีเหลือง)
ที่มา: สุรชัย เดชอาคม, สุวรรธณา แย้มโตนด, วรินดา พูนทวีรัตน์ ขวัญสุดา สุภลาภ และพัชรดา อมาตยกุล



ภาพที่ 2 แสดงลักษณะการเกิด Acrosome Reaction ที่อสุจิซึ่งจะติดสีบริเวณ Equatorial Segment (ลูกศรสีขาว) อสุจิที่ไม่เกิด Acrosome Reaction (ลูกศรสีเหลือง)
ที่มา: สุรชัย เดชอาคม, สุวรรธณา แย้มโตนด, วรินดา พูนทวีรัตน์ ขวัญสุดา สุภลาภ และพัชรดา อมาตยกุล

จากนั้นล้างสไลด์เบาๆ ด้วย PBS 10-15 ครั้ง เพื่อล้างสีส่วนเกินออกแล้วหยด Antifade Mounting Medium ปิด Cover Slip นำสไลด์ไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวกลับฟลูออเรสเซนต์ (Nikon ECLIPSE Ti-U) โดยใช้ Filter ที่ความยาวคลื่น 450-490 นาโนเมตร

การแปลผล อสุจิที่ Intact Acrosome จะติดสีเขียวทั่วทั้งส่วน Acrosome ส่วนอสุจิที่เกิด AR จะติดสีเขียวเฉพาะส่วน Equatorial Segment ของ Acrosome (ภาพที่ 2)

Sperm Spontaneous Acrosome Reaction Rate (SARR) คืออัตราของอสุจิที่เกิด AR ขึ้นเองในหลอดควบคุม

Acrosome Reaction After Ionophore Challenge (ARIC) คือค่าความแตกต่างระหว่างการเกิด AR ที่เกิดในหลอดตัวอย่างที่เติม Calcium Ionophore กับ AR ที่เกิดขึ้นเองในหลอดควบคุม

สถิติที่ใช้ในการวิจัย

1. สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) สำหรับข้อมูลที่มีการแจกแจงปกติ จะรายงานค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน สำหรับข้อมูลที่มีการแจกแจงไม่ปกติ จะรายงานค่ามัธยฐาน ค่าต่ำสุดและค่าสูงสุด

2. ความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการตรวจอสุจิกับตัวแปรต่างๆ เช่น อายุ ปริมาณน้ำอสุจิ ความเข้มข้นของอสุจิ จำนวนอสุจิทั้งหมด จำนวนการเคลื่อนไหวของอสุจิ สถิติที่ใช้คือ Spearman rank Correlation Coefficient (r_s) และ Pearson Correlation Coefficient (r) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Stata Version 12.0 (Stata Corporation) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$

ผลการศึกษา

กลุ่มตัวอย่าง จำนวน 27 คน พบว่าอายุเฉลี่ย 34.2 ± 5.4 ปี และมีผลการตรวจน้ำอสุจิ แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลการตรวจน้ำอสุจิ

Parameters	(n=27)
Volume (ml)	2.41 ± 1.10
Concentration ($x10^6$ cells/ml)	37.48 ± 18.71
Total sperm count ($x10^6$ cells)	93.33 ± 12.41
Sperm Motility (%)	53.30 ± 17.32
Normal morphology (%) Median (Range)	18.00 (5.00-45.00)
HBA bound (%) Median (Range)	87.50 (50.00-93.50)
Annexin-V binding	
Viable (%) Median (Range)	80.47 (35.29-95.39)

Parameters	(n=27)
Early apoptosis (%) Median (Range)	1.06 (0.00-9.09)
Late apoptosis (%) Median (Range)	6.80 (0.00-43.27)
Death (%) Median (Range)	8.12 (1.25-30.32)
SARR (%) Median (Range)	16.67 (6.67-85.99)
ARIC Median (Range)	25.13 (6.46-75.05)

HBA bound = Hyaluronan Binding Assay bound

SARR = Sperm Spontaneous Acrosome Reaction Rate

ARIC = Acrosome Reaction to Ionophore Challenge Test

การหาความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของ HBA bound กับตัวแปรต่าง ๆ ไม่พบว่า HBA bound มีความสัมพันธ์กับตัวแปรใดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่าง Hyaluronan Binding Assay bound กับตัวแปรอื่น ๆ

Variables	HBA bound (%)	
	r_s	p
Age (year)	0.230	0.248
Volume (ml)	-0.166	0.407
Concentration ($x10^6$ cells/ml)	0.275	0.164
Total sperm count ($x10^6$ cells)	0.038	0.850
Sperm motility (%)	0.037	0.854
Normal morphology (%)	0.009	0.964
SARR (%)	-0.280	0.157
ARIC	0.319	0.104

r_s = Spearman Rank Correlation

SARR = Sperm Spontaneous Acrosome Reaction Rate

ARIC = Acrosome Reaction to Ionophore Challenge Test

การหาความสัมพันธ์ระหว่าง Annexin-V binding กับตัวแปรต่างๆ พบว่า viable sperm มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ HBA bound (r_s = 0.466, p = 0.014) และมีความสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ SARR (r_s = - 0.554, p = 0.003) Early Apoptosis Sperm ไม่พบมีความสัมพันธ์กับตัวแปรใด แต่ Late apoptosis sperm มีความสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ HBA bound (r_s = -0.563, p = 0.002) ความเข้มข้นของอสุจิ (r_s = -0.464, p = 0.015) และจำนวนอสุจิทั้งหมด (r_s = -0.434, p = 0.024) สำหรับ death sperm พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ SARR (r_s = 0.492, p = 0.009) แสดงดังตารางที่ 3

อภิปรายผล

น้ำอสุจิที่นำมาตรวจในงานวิจัยนี้ส่วนใหญ่มีค่าต่าง ๆ อยู่ในเกณฑ์ปกติและการตรวจน้ำอสุจิในเชิงคุณภาพด้วยวิธี HBA bound, Annexin-V binding, SARR และ ARIC อยู่ในเกณฑ์ปกติ ผลพบว่า HBA bound ไม่มีความสัมพันธ์กับการตรวจ Conventional semen analysis อย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Nijs และคณะ[20] ที่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างการตรวจ HBA และ parameters ต่าง ๆ ของอสุจิเช่นกัน ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ Ye และคณะ[21] พบว่า HBA bound มีความสัมพันธ์กับอสุจิที่เคลื่อนไหวดีกับอสุจิรูปร่างปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่งานวิจัยของ Ye ตรวจอสุจิในคู่มีบุตรยากที่มีข้อบ่งชี้ในการทำเด็กหลอดแก้ว ซึ่งในจำนวนนี้เป็นชายที่มีปัญหาจำนวนอสุจิน้อย เคลื่อนไหวไม่ดีหรือมีรูปร่างผิดปกติ ดังนั้นทำให้ผลการตรวจด้วย HBA bound มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกอสุจิที่ดีได้ชัดเจนกว่าผลการศึกษาครั้งนี้

การตรวจอสุจิในเชิงคุณภาพ พบว่า HBA bound มีความสัมพันธ์กับ viable sperm และมีความสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามกับ late apoptosis sperm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งบ่งชี้ว่าการตรวจ HBA bound สามารถช่วยแยกอสุจิที่มีชีวิตและยังไม่เกิด apoptosis ได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Huszar และคณะ[22] ที่พบว่า HA-binding sperm เป็นอสุจิที่มีชีวิตเท่านั้น อสุจิที่มี late apoptosis เป็นอสุจิที่มีความผิดปกติในเซลล์และทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงก่อนที่เซลล์จะตายในเวลาต่อมา ดังนั้นจึงสัมพันธ์กับ HBA bound ในทางตรงกันข้ามอย่างมีนัยสำคัญ ส่วน death sperm พบว่ามีความสัมพันธ์ในทางตรงข้ามกับ HBA bound แต่ยังไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเนื่องจากจำนวนตัวอย่างน้อย นอกจากนี้พบว่า late apoptotic sperm มีความสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามกับความเข้มข้นของอสุจิและปริมาณอสุจิทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับผลการวิจัยของ Hichri และคณะ[23] ที่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่าง late apoptotic sperm กับความเข้มข้นของอสุจิ ส่วน viable sperm มีความสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามกับ SARR อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน แปลผลได้ว่าอสุจิที่ยังมีชีวิตจะมีโอกาสเกิด spontaneous acrosome reaction น้อย บ่งบอกถึงคุณสมบัติที่ดีของอสุจิ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Li และคณะ รายงานว่าอสุจิที่เคลื่อนไหวไม่ดีและมีรูปทรงผิดปกติจะสัมพันธ์กับการเกิด SARR มากขึ้น[24]

ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่าง Annexin-V binding กับตัวแปรอื่น ๆ

Parameters	Viable (AN-/PI-)		Early apoptosis (AN+/PI-)		Late apoptosis (AN+/PI+)		Death (AN-/PI+)	
	r_s	p	r_s	p	r_s	p	r_s	p
Age (year)	-0.261	0.188	0.026	0.897	0.233	0.242	0.172	0.390
Volume (ml)	0.092	0.648	-0.043	0.833	-0.141	0.484	-0.150	0.454
Concentration (x10^6 cells/ml)	0.219	0.272	0.091	0.652	-0.464	0.015*	-0.002	0.993
Total sperm count (x10^6 cells)	0.129	0.520	0.015	0.942	-0.434	0.024*	0.017	0.933
Motility (%)	0.053	0.786	0.094	0.643	-0.276	0.164	0.132	0.513
Normal morphology (%)	0.037	0.857	-0.183	0.362	0.183	0.362	-0.080	0.690
HBA bound (%)	0.466	0.014*	0.263	0.185	-0.563	0.002*	-0.302	0.126
SARR (%)	-0.554	0.003*	-0.142	0.481	0.359	0.066	0.492	0.009*
ARIC	0.118	0.558	0.195	0.329	-0.057	0.778	-0.207	0.300

ปี 2009 Hoogendijk และคณะ[25] ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง Apoptotic Sperm และรูปทรงอสุจิในกลุ่มที่มีน้ำอสุจิปกติตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก 14 ราย พบว่ากลุ่มอสุจิที่มี Apoptotic จากการย้อมสี Annexin-V และแยกด้วย Flow Cytometry มีรูปทรงอสุจิที่ปกติน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่การศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง Early Apoptotic Sperm และ Late Apoptotic Sperm กับรูปทรงอสุจิที่ปกติซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ Hoogendijk อาจเป็นเพราะวิธีการตรวจ apoptosis ของงานวิจัยทั้งสองใช้วิธีการตรวจแตกต่างกัน จากงานวิจัยนี้ การตรวจ Annexin-V binding พบว่า viable sperm มีความสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามกับ SARR อย่างมีนัยสำคัญ และ death sperm มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับการเกิด SARR อย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Lee และคณะ[26] ที่พบว่า non apoptotic sperm จากการคัดเลือกด้วยวิธี Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS) สามารถ induced acrosome reaction ได้มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษานี้ช่วยยืนยันว่า Viable Sperm มีการเกิด Spontaneous Acrosome Reaction ต่ำซึ่งสัมพันธ์กับอัตราการปฏิสนธิที่ดี

ข้อจำกัดของการศึกษานี้คือกลุ่มตัวอย่างมีจำนวนน้อย และไม่ได้ศึกษาแยกระหว่างกลุ่มที่ผลการตรวจน้ำอสุจิปกติกับไม่ปกติตามเกณฑ์ของ WHO จึงทำให้ผลตรวจอสุจิในเชิงคุณภาพไม่เห็นความสัมพันธ์ที่มีนัยสำคัญชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจ parameters เบื้องต้น การศึกษานี้เป็นการศึกษาเพื่อดู correlation ไม่ได้ทำการศึกษาในอสุจิที่จับหรือไม่จับกับ HBA โดยตรงทำให้ความแม่นยำของการศึกษาลดลง ในอนาคตควรศึกษาถึงผลการตรวจ HBA bound ว่าสัมพันธ์กับผลลัพธ์ในทางคลินิกหรือไม่ เช่น อัตราการปฏิสนธิกับไข่ การพัฒนาของตัวอ่อน และอัตราการตั้งครรภ์

สรุป

การตรวจอสุจิด้วยวิธี Hyaluronan Binding Assay สัมพันธ์กับอสุจิที่มีชีวิตและมี late apoptosis ที่ต่ำ และไม่สัมพันธ์กับการเกิด Acrosome Reaction ของอสุจิ

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปี พ.ศ. 2562

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization; 2010.

2. Lefièvre L, Bedu-Addo K, Conner SJ, Machado-Oliveira GS, Chen Y, Kirkman-Brown JC, et al. Counting sperm does not add up anymore: time for a new equation? Reproduction 2007;133:675-84.

3. Khatun A, Rahman MS, Pang M. Clinical assessment of the male infertility. Obstet Gynecol Sci 2018;61:179-91.

4. Pandruvada S, Royfman R, Shah TA, Sindhwani P, Dupree JM, Schon S, et al. Lack of trusted diagnostic tools for undetermined male infertility. J Assist Reprod Genet 2021;38:265-76.

5. Aitken RJ. Sperm function tests and fertility. Int J Androl 2006;29:69-75.

6. Lewis S, Agbaje I. Sperm DNA tests as useful adjuncts to semen analysis. Syst Biol Reprod Med 2008;54:111-25.

7. Zini A, Sigman M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. J Androl 2009;30:219-29.

8. Oseguera-López I, Ruiz-Díaz S, Ramos-Ibeas P, Pérez-Cerezales S. Novel Techniques of Sperm Selection for Improving IVF and

ICSI Outcomes. Front Cell Dev Biol 2019;7:1-23.

9. Huang C, Lin DP, Tsao H, Cheng T, Liu C, Lee M. Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. Fertil Steril 2005;84:130-40.

10. Lepine S, McDowell S, Searle LM, Kroon B, Glujovsky D, Yazdani A. Advanced sperm selection techniques for assisted reproduction (Review). Cochrane Database Syst Rev 2019;7:CD010461

11. Agarwal A, Majzoub A. Baskaran S, Selvam M, Cho CL, Henkel R, et al. Sperm DNA fragmentation: A new guideline for clinicians. World J Mens Health 2020;38:412-71.

12. Chen Z, Hauser R, Trbovich AM, Shifren JL, Dorer DJ, GodfreyBailey L, et al. The relationship between human semen characteristics and sperm apoptosis: a pilot study. J Androl 2006;27:112-20.

13. Cross NL, Morales P, Overstreet JW. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. Gamete Res 1986; 15:213-16.

14. Cummins JM, Pember SM, Jequier AM, Yovich JL, Hartmann PE. A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge: relationship to fertility and other seminal parameters. J Androl 1991;12:98-103.

15. Oehninger S, Franken DR, Sayed E, Barrogo G, Kolm P. Sperm function assays and their predictive value for fertilization outcome in IVF therapy: a meta-analysis. Hum Reprod Update 2000;6:160-8.

16. Martin G, Sabido O, Durand P and Levy R. Phosphatidylserine externalization in human sperm induced by calcium ionophore A23187: relationship with apoptosis, membrane scrambling and the acrosome reaction. Hum Reprod 2005; 20:3459-68.

17. Huszar G, Vigue L, Oehninger S. Creatine kinase immunocytochemistry of human sperm-hemizona complexes: selective binding of sperm with mature creatine kinase-staining pattern. Fertil Steril 1994;61:136-42.

18. Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovanci E, Ward D, et al. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. Fertil Steril 2005;84:1665-73.

19. Beck-Fruchter R, Shalev E, Weiss A. Clinical benefit using sperm hyaluronic acid binding technique in ICSI cycles: a systematic review and meta-analysis. Reprod Biomed Online 2016;32:286-98.

20. Nijs M, Creemers E, Cox A, Janssen M, Vanheusden E, Van der Elst J, et al. Relationship between hyaluronic acid binding assay and outcome in ART: a pilot study. Andrologia 2010;42:291-6.

21. Ye H, Huang G, Gao Y, LIU DY. Relationship between human sperm-hyaluronan binding assay and fertilization rate in conventional in vitro fertilization. Hum Reprod 2006;21:1545-50.

22. Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavaczhi Z Hansch E, Vigue L. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maurity, viability, and unreacted acrosomal status. Fertil Steril 2003;79:1616-24.

23. Hichri R, Amor H, Khammari M, Harzallah M, Fekih FE, Saad A, et al. Apoptotic sperm biomarkers and the correlation between conventional sperm parameters and clinical characteristics. Andrologia 2018;50:e12813.

24. Li T, Liu W, Xie N, Yang SJ, Zhang C, Fu HL, et al. Value analysis of sperm spontaneous acrosome reaction in male fertility evaluation. Andrology 2017;6:1-5.

25. Hoogendijk CF, Kruger TF, Bouic PD, Henkel RR. A novel approach for the selection of human sperm using annexin-V binding and flow cytometry. Fertil Steril 2009;91(4):1285-92.

26. Lee TH, Liu CH, Shih YT, Tsao HM, Huang CC, Chen HH, et al. Magnetic-activated cell sorting for sperm preparation reduces spermatozoa with apoptotic markers and improves the acrosome reaction in couples with unexplained infertility. Hum Reprod 2010;25:839-46.