

การตรวจหา Sex chromosome aneuploidy ของอสุจิ
ที่ได้จากท่อนำอสุจิส่วน epididymis
ในผู้ป่วยที่ตรวจไม่พบอสุจิในน้ำอสุจิ

ผู้วิจัย



ศาสตราจารย์ นายแพทย์ นเรศร สุขเจริญ
นางสาว จิราพรณ์ เจริญมิวจำวัฒน์

ภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทูลงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2544

สารบัญ

บทคัดย่อ	1
Abstracts	2
บทนำ	3
วิธีการตรวจโครโมโซมของอสุจิ	6
ผู้เข้าร่วมการศึกษาและวิธีการวิจัย	10
ผลการศึกษา	15
อภิปราย	22
บทสรุป	24
เอกสารอ้างอิง	25

เลขหม่ กพ
พ.15
เลขทะเบียน 010817
วัน.เดือน.ปี 7 มค. 45

บทคัดย่อ

การฉีดอสุจิเข้าในไข่ (intracytoplasmic sperm injection : ICSI) เป็นวิธีการรักษาภาวะที่ไม่พบอสุจิในน้ำอสุจิซึ่งเกิดจากการอุดตันของท่อนำอสุจิโดยใช้อสุจิจากท่อนำอสุจิ (epididymal spermatozoa) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามยังคงมีความกังวลถึงความเสี่ยงต่อการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมชนิด aneuploidy ในทารกที่เกิดจากวิธีดังกล่าวจากบิดา ในปัจจุบันยังมีข้อมูลน้อยมากเกี่ยวกับอุบัติการณ์ของความผิดปกติของโครโมโซมของ epididymal spermatozoa ในผู้ป่วยที่ไม่พบอสุจิในน้ำอสุจิซึ่งเกิดจากการอุดตันของท่อนำอสุจิ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาถึงอุบัติการณ์ของความผิดปกติของโครโมโซมชนิด aneuploidy และ diploidy ของ epididymal spermatozoa ในผู้ป่วยที่ไม่พบอสุจิในน้ำอสุจิซึ่งเกิดจากการอุดตันของท่อนำอสุจิ ทำการตรวจ epididymal spermatozoa ที่เก็บได้จากผู้ป่วยที่ไม่พบอสุจิในน้ำอสุจิซึ่งเกิดจากการอุดตันของท่อนำอสุจิ จำนวน 24 คน และผู้ชายปกติซึ่งเคยมีบุตรมาแล้วจำนวน 24 คน ด้วยเทคนิค three colour fluorescence in-situ hybridization (FISH) เพื่อตรวจหาอุบัติการณ์ของความผิดปกติของโครโมโซม 18, X และ Y ของ epididymal spermatozoa พบว่า epididymal spermatozoa จากผู้ป่วยที่ไม่พบอสุจิในน้ำอสุจิซึ่งเกิดจากการอุดตันของท่อนำอสุจิ พบอุบัติการณ์ของ total sex aneuploidy, disomy 18 และ diploidy สูงกว่าอสุจิของผู้ชายปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (1.44% vs 0.14%; 0.11% vs 0.02% และ 0.18% vs 0.02% ตามลำดับ, $p < 0.005$) ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ total sperm aneuploidy และ diploidy ในผู้ป่วยซึ่งทำหมันชายและไม่สำเร็จในการแก้หมัน ($n=12$) กับผู้ป่วยที่มีการอุดตันของท่อนำอสุจิจากสาเหตุอื่น ($n=12$) โดยสรุปผู้ป่วยที่มีตรวจไม่พบอสุจิจากการอุดตันของท่อนำอสุจิพบมี aneuploidy และ diploidy rate ใน epididymal spermatozoa สูงกว่าผู้ชายปกติ ผลการศึกษานี้มีประโยชน์ในการนำมาให้คำปรึกษาผู้ป่วยที่มีตรวจไม่พบอสุจิจากการอุดตันของท่อนำอสุจีก่อนการรักษาด้วยการฉีดอสุจิเข้าในไข่

ABSTRACTS

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is an efficient treatment for obstructive azoospermia using epididymal spermatozoa. However, serious concerns about the risk of chromosomal aneuploidies from paternal origin in the children still exist. The data on the frequencies of chromosomal abnormalities in epididymal spermatozoa from obstructive azoospermic men are very few, therefore the frequencies of sperm aneuploidy and diploidy of epididymal spermatozoa from obstructive azoospermic men were evaluated. Epididymal spermatozoa retrieved from 24 obstructive azoospermic men by percutaneous epididymal sperm aspiration (PESA) and ejaculated spermatozoa from 24 healthy fertile donors were analyzed using three colour fluorescence in-situ hybridization (FISH) techniques to evaluate the rates of diploidy and aneuploidy for chromosomes 18, X and Y. Epididymal spermatozoa from obstructive azoospermic men had total sex aneuploidy, disomy 18 and diploidy rates significantly higher than ejaculated spermatozoa from normozoospermic fertile controls (1.44% vs 0.14%, 0.11% vs 0.02% and 0.18% vs 0.02%, respectively; $p < 0.005$). The total sperm aneuploidy and diploidy rates were not statistically different between the vasectomized patients with failed vasectomy reversal ($n=12$) and the patients with other causes of obstructive azoospermia ($n=12$). In conclusion, obstructive azoospermic patients had an elevated epididymal sperm aneuploidy and diploidy rate. These results may be useful in counseling the obstructive azoospermic patients before ICSI treatment



บทนำ

ภาวะมีบุตรยากพบได้ประมาณ 15% ของคู่สมรสทั่วไป⁽¹⁾ ภาวะมีบุตรยากที่มีสาเหตุจากฝ่ายชายพบได้ประมาณครึ่งหนึ่งของคู่สมรสที่มีบุตรยาก การรักษาภาวะมีบุตรยากที่มีสาเหตุจากฝ่ายชายได้มีการพัฒนาไปอย่างรวดเร็ว ในปัจจุบัน การฉีดอสุจิเข้าในไข่ (intracytoplasmic sperm injection : ICSI) เป็นวิธีการรักษาคู่สมรสที่มีบุตรยากซึ่งมีสาเหตุจากฝ่ายชายเป็นที่นิยมอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นวิธีการรักษาที่มีประสิทธิภาพสูง⁽²⁾ กระบวนการ ICSI สามารถทำการฉีดอสุจิที่ได้จากแหล่งต่างๆ เช่น อสุจิที่แยกได้จากน้ำอสุจิ อสุจิที่เก็บมาจากท่ออสุจิส่วน epididymis^(3,4) หรืออสุจิที่เก็บมาจากเนื้ออัณฑะ^(5,6) หรืออาจใช้ spermatid ฉีดเข้าในไข่ได้⁽⁷⁾ การรักษาด้วยวิธี ICSI จะได้อัตราการปฏิสนธิสูง ถึงแม้ว่าจะมีความผิดปกติของน้ำอสุจิมากก็ตาม^(8,9)

ถึงแม้ว่าการรักษาคู่สมรสที่มีบุตรยากซึ่งมีสาเหตุจากเพศชายด้วยวิธี ICSI จะมีความสำเร็จสูง แต่ยังคงมีความกังวลว่าการรักษาดังกล่าวอาจก่อให้เกิดความผิดปกติทางของโครโมโซมแก่ทารกที่เกิดจากวิธีดังกล่าวได้ โดยเฉพาะ sex chromosome aneuploidy เนื่องจากพบว่าอสุจิจากผู้ป่วยที่มีผลการตรวจผิดปกติของอสุจิอย่างรุนแรงจะพบมี chromosomal aneuploidy สูงเมื่อนำมาใช้ฉีดเข้าในไข่โดยไม่ผ่านกลไกการคัดเลือกตามธรรมชาติทำให้ทารกที่เกิดมามีความเสี่ยงที่จะมีความผิดปกติของโครโมโซมสูง⁽¹⁰⁾ รายงานในระยะหลังพบว่าอุบัติการณ์ของทารกที่เกิดจากการวิธี ICSI มีความผิดปกติของโครโมโซมเพศสูงกว่าในกลุ่มประชากรทั่วไป โดยพบมีอุบัติการณ์ของความผิดปกติของโครโมโซมแตกต่างกันไปในแต่ละรายงาน ระหว่าง 2.6%-33%⁽¹¹⁻¹⁷⁾ (ตารางที่ 1) จะเห็นได้ว่าปัญหาดังกล่าวเป็นปัญหาสำคัญ แต่จำนวนของการศึกษาเกี่ยวกับความผิดปกติของโครโมโซมยังคงน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนทารกที่คลอดจากวิธีดังกล่าว⁽¹⁴⁾

ตารางที่ 1 : อุบัติการณ์ของความผิดปกติของโครโมโซมของทารกที่เกิดจากการรักษาด้วยการฉีดอสุจิเข้าในไข่

ผู้ทำการศึกษา	จำนวนการทารกที่ตั้งครรภ์ด้วยวิธี ICSI	ความผิดปกติของโครโมโซม (%)
In't Veld et al., 1995 ⁽¹¹⁾	15	33.3
van Opstal et al., 1997 ⁽¹³⁾	71	12.8
Loft et al., 1999 ⁽¹⁵⁾	206	3.4
Bonduelle et al., 1999 ⁽¹⁶⁾	1,082	2.6
Aboulghar et al., 2001 ⁽¹⁷⁾	430	3.5

ในระยะหลังได้มีการศึกษาถึงความผิดปกติของโครโมโซมของอสุจิเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะความผิดปกติของโครโมโซมชนิด aneuploidy การศึกษาจำนวนโครโมโซมของอสุจิในรายที่มีความผิดปกติของน้ำอสุจิ เช่น รายที่มีความผิดปกติของอสุจิทั้งจำนวน รูปร่างและการเคลื่อนไหวของอสุจิ (oligoasthenoterato-zoospermia : OAT) พบว่ามีความผิดปกติของจำนวนโครโมโซมทั้ง autosome และ sex chromosome เพิ่มขึ้นกว่าอสุจิปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ^(18,19) โดยพบความผิดปกติของจำนวนโครโมโซมเพศมากกว่า autosome⁽¹⁸⁾ การศึกษาโดยการวิเคราะห์ทาง molecular cytogenetics ในรายที่มีความผิดปกติของน้ำอสุจิมาก (severe oligo-astheno-teratozoospermia : OAT) พบว่ามีความผิดปกติของโครโมโซมของอสุจิสูง โดยพบเป็น haploid น้อยกว่า 2%, diploid 40%, triploid 24% และ aneuploid ของโครโมโซมเพศ 22%⁽²⁰⁾ อย่างไรก็ตามพบความแตกต่างในแต่ละรายงานของความชุกของ diploidy บางรายงานพบว่ามี ความชุกของ diploidy เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ⁽¹⁹⁾ บางรายงานไม่พบว่ามี การเพิ่มขึ้นของ diploidy หรือ disomy⁽²¹⁾

ในปัจจุบันได้นำเทคนิคดังกล่าวมาใช้รักษาผู้ป่วยที่ไม่สามารถตรวจพบอสุจิในน้ำอสุจิ โดยการเก็บอสุจิจากอวัยวะหรือท่อน้ำอสุจิในส่วน epididymis มาใช้ ถึงแม้จะมีรายงานว่า การรักษาด้วยวิธี ICSI จะมีความปลอดภัยสูง ในปัจจุบันแพทย์และนักวิทยาศาสตร์มีความกังวลเพิ่มขึ้นว่าการรักษาผู้ป่วยที่มีบุตรยากด้วยวิธีดังกล่าวอาจทำให้มีการถ่ายทอดความผิดปกติทางพันธุกรรมสู่ลูกหลานได้

การฉีดอสุจิเข้าในไข่ (intracytoplasmic sperm injection : ICSI) โดยการเก็บอสุจิจาก อัณฑะและท่อนำอสุจิส่วน epididymis ช่วยให้คู่สมรสที่ไม่พบอสุจิในน้ำอสุจิ (azoospermia) ซึ่ง ไม่มีโอกาสมีบุตรได้ในอดีต สามารถมีบุตรได้ จากวิธีการรักษาดังกล่าว แต่การศึกษาถึงความ ผิดปกติโครโมโซมเพศที่เก็บจากท่อนำอสุจิส่วน epididymis ยังมีน้อยมาก

การศึกษาถึงอุบัติการณ์ของ aneuploidy ของอสุจิที่ได้จาก epididymis พบว่ามีอุบัติการณ์ ของความผิดปกติของโครโมโซมเพศ (sex aneuploidy) และ diploidy 2.89% และ 0.44% ตาม ลำดับ อย่างไรก็ตามผลการตรวจรายงานนี้มีจำนวนผู้ป่วยเพียง 6 ราย เท่านั้น⁽²²⁾ ต่อมา มี การศึกษาอุบัติการณ์ของ aneuploidy ของอสุจิที่ได้จาก epididymis พบว่ามีอุบัติการณ์ของความ ผิดปกติของโครโมโซมเพศ (sex aneuploidy) และโครโมโซม 18 เป็น 6.27% และ 1.9% ตาม ลำดับ อย่างไรก็ตามผลการตรวจรายงานนี้มีจำนวนผู้ป่วยเพียง 10 ราย เท่านั้น⁽²³⁾ นอกจากนี้ การศึกษาดังกล่าวมีการตรวจอสุจิจำนวนน้อยในผู้ป่วยแต่ละราย อาจทำให้ได้อุบัติการณ์ของ ความผิดปกติของโครโมโซมผิดพลาดได้

การศึกษาถึงอุบัติการณ์ของ aneuploidy ของอสุจิที่ได้จากอัณฑะพบว่ามีอุบัติการณ์ของ ความผิดปกติของโครโมโซมเพศในกลุ่มนี้สูงถึง 32.4% จากการตรวจอสุจิจากอัณฑะในผู้ป่วย 3 ราย อย่างไรก็ตามการตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมในกลุ่มนี้ตรวจได้ยากเนื่องจากอสุจิ ที่ทำตรวจวิเคราะห์มักมีรูปร่างผิดปกติ (dysmorphic) หรืออาจเป็น spermatid ได้⁽²²⁾ อย่างไรก็ตาม มีรายงานขัดแย้งว่าผลการตรวจความผิดปกติของโครโมโซมของอสุจิในผู้ป่วยทั้งหมด 3 ราย พบว่าไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม⁽²⁴⁾

จากข้อมูลที่กล่าวมาในข้างต้นจะเห็นได้ว่าข้อมูลเกี่ยวกับความผิดปกติของโครโมโซม เพศของอสุจิที่ได้มาจากท่อนำอสุจิส่วน epididymis และอัณฑะมีน้อยมาก แต่มีแนวโน้มว่าจะมี อุบัติการณ์สูงกว่าความผิดปกติของโครโมโซมเพศของผู้ชายปกติทั่วไป แต่ข้อมูลจากการศึกษา ที่ผ่านมามีน้อยมาก คณะผู้วิจัยจึงได้ทำการตรวจหา sex chromosome aneuploidy ของอสุจิที่ได้จาก ท่อนำอสุจิส่วน epididymis ในผู้ป่วยที่ตรวจไม่พบอสุจิในน้ำอสุจิ

วิธีการตรวจโครโมโซมของอสุจิ

การศึกษาองค์ประกอบของโครโมโซมของอสุจินุษย์เริ่มจากการใช้สารเรืองแสง (fluorochromes) เช่น quinacrine dihydrochloride หรือ quinacrine mustard ย้อมส่วน heterochromatic region ของโครโมโซม Y⁽²⁵⁾ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันเลิกใช้วิธีย้อมด้วยวิธีดังกล่าวแล้ว เนื่องจากพบว่าเทคนิคในการย้อมสีโครโมโซมส่วนต่างๆเชื่อถือได้ไม่ค่อยดี ต่อมาพบว่าอสุจิสามารถผ่านเข้าไปในไข่ของ hamster (zona-free hamster oocytes) ได้ ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการตรวจโครโมโซมของอสุจิได้⁽²⁶⁾ และได้พัฒนามาใช้ในการตรวจโครโมโซมของอสุจิในเวลาต่อมา⁽²⁷⁾ แต่เทคนิคการตรวจค่อนข้างซับซ้อนและสิ้นเปลืองเวลาในการตรวจมาก ทำให้สามารถตรวจได้เพียงบางห้องปฏิบัติการเท่านั้น และไม่สามารถนำมาใช้ในการตรวจทางคลินิก ในระยะหลังได้มีใช้ probes ที่จำเพาะกับ DNA ของโครโมโซมซึ่งติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีมาใช้⁽²⁸⁾ และพัฒนามาใช้ fluorochromes ในเวลาต่อมา^(29,30) ต่อมามีการใช้ probes ตรวจหลายโครโมโซมพร้อมกัน (multi-colour fluorescence in-situ hybridization) มาใช้ในการตรวจโครโมโซมของอสุจิจำนวนมาก⁽³¹⁾ และนอกจากใช้ตรวจนิวเคลียสของอสุจิแล้วยังสามารถนำมาใช้ตรวจ pronuclei ที่มาจากอสุจิเมื่อผสมกับไข่แล้วได้⁽³²⁾ เทคนิคดังกล่าวทำให้สามารถตรวจพบความผิดปกติของโครโมโซมของอสุจิได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำมาตรวจประเมินวิธีในการคัดเลือกเพศของอสุจิ⁽³³⁾ อย่างไรก็ตามการตรวจโครโมโซมของอสุจิอาจตรวจได้ยากกว่าเซลล์ชนิดอื่นๆ เนื่องจากอสุจิมียีน DNA อัดกันแน่นในนิวเคลียส

ข้อดีของเทคนิคต่างๆสำหรับตรวจโครโมโซมของอสุจิ

การตรวจโครโมโซมของอสุจิโดยใช้ hamster egg พบว่าต้องทำการทดลองหลายครั้งเพื่อให้ได้อสุจิที่มีจำนวน metaphase เพียงพอ (ทั่วไปควรตรวจอสุจิประมาณ 100 ตัว) ส่วนการตรวจโดยใช้ multi-colour FISH โดยทำให้ส่วนหัวอสุจิฟองตัวออกจะสามารถตรวจอสุจิได้หลายพันตัวในช่วงระยะเวลาสั้นกว่า

การตรวจด้วยวิธี FISH มีข้อดีกว่า zona-free hamster egg-human sperm fusion technique หลายประการ เช่น ตรวจได้ง่ายกว่า รวดเร็ว และสามารถตรวจอสุจิได้จำนวนมาก อย่างไรก็ตามการตรวจด้วยวิธี FISH มีข้อจำกัดหลายประการ เช่น การตรวจทำในระยะ interphase ทำให้ไม่สามารถตรวจความผิดปกติของโครงสร้างของโครโมโซมได้⁽³⁴⁾

ข้อจำกัดของเทคนิคต่างๆสำหรับตรวจโครโมโซมของอสุจิ

เนื่องจากโครมาตินของอสุจิอยู่อัดกันแน่นจึงจำเป็นต้องทำให้ส่วนหัวของอสุจิพองออก เพื่อให้ probe สามารถเข้าไปจับกับ DNA ที่จำเพาะกับ probe ได้^(35,36) ประสิทธิภาพในการทำให้ส่วนหัวของอสุจิพองออกมีความสัมพันธ์โดยตรงกับคุณภาพของความเข้มของสัญญาณเรืองแสงที่ได้ ซึ่งมีผลต่อความเชื่อถือได้ของผลการตรวจ

การตรวจดังกล่าวไม่สามารถแยกภาวะที่ไม่มีโครโมโซมที่ตรวจ (nullisomy) จากการที่ probe ไม่สามารถเข้าไปจับกับ DNA ได้ การใช้ probes หลายตำแหน่ง (multicolour FISH) เชื่อว่าถ้ามีการจับของบาง probe ได้ อาจแสดงว่าถ้าไม่มีการแสดงออกของ probe ใดน่าจะเป็น nullisomy ของโครโมโซมนั้น⁽³⁷⁻³⁹⁾ ความผิดปกติของโครโมโซมอาจพบได้จากความผิดปกติของการแบ่งเซลล์ เช่น chromosome lag^(40,41) แต่จากข้อมูลที่มีอยู่พบว่า nullisomy มักเกิดจากความผิดพลาดทางเทคนิคของการตรวจ⁽⁴²⁾ บางครั้งพบว่าชนิดของ probe ก็มีผลต่อการตรวจพบ เช่น locus-specific probe พบ nullisomy ได้มากกว่า centromere probe⁽⁴³⁾ อาจเนื่องมาจากว่า การที่ probe จะเข้าไปจับกับโครโมโซมในตำแหน่งเฉพาะเพียงตำแหน่งเดียวทำได้ยากกว่า ส่วนของโครโมโซมที่มีลักษณะซ้ำๆกัน ข้อจำกัดของการตรวจด้วยวิธี FISH คือไม่สามารถในการตรวจความผิดปกติทางโครงสร้างของโครโมโซมได้ นอกจากส่วนที่มีความผิดปกตินั้นอยู่ในตำแหน่งของ probe พอดี⁽⁴⁴⁾

การตรวจโครโมโซมโดยใช้ hamster egg จะสามารถศึกษารายละเอียดของโครโมโซมได้ทั้งหมด แต่การตรวจด้วยวิธี FISH จะสามารถตรวจบางส่วนของโครโมโซมโดยการตรวจด้วย probe เนื่องจากในระยะหลังมีการใช้ probe หลายสีเพื่อการตรวจโครโมโซมของอสุจิในคราวเดียว แต่ข้อจำกัดคือผิวของหัวอสุจิที่พองตัวออกมีพื้นที่จำกัด พบว่าอุบัติการณ์ของ disomies ของโครโมโซมของอสุจิสูงกว่าอุบัติการณ์ของการเกิด trisomy ในบุตร อย่างไรก็ตามการตรวจโครโมโซมด้วย hamster egg พบว่ามีอุบัติการณ์ของ disomies ใกล้เคียงกับวิธี FISH และยังคงสูงกว่าอุบัติการณ์ของการเกิด trisomy ในบุตร

เทคนิคในการตรวจโครโมโซมด้วยวิธี FISH

การพองตัวของหัวอสุจิ (*Sperm decondensation*)

เนื่องจาก chromatin ในส่วนหัวของอสุจิอยู่อัดกันแน่น ดังนั้นจำเป็นต้องทำให้ส่วนหัวของอสุจิพองออกเพื่อให้ probe ที่ใช้สำหรับ in-situ hybridization สามารถผ่านเข้าไปจับกับ DNA ได้ ความสำเร็จของเทคนิคนี้จึงขึ้นกับประสิทธิภาพของการทำให้หัวของอสุจิพองตัวขึ้น การทำให้หัวของอสุจิพองขึ้นทำได้โดยใช้ reducing agent เช่น dithiothreitol (DTT) ซึ่งจะไปแยก disulphide bond ระหว่างสาย DNA ในโครมาตินของอสุจิ^(35,36) ถ้าการกระบวนการทำให้หัวของอสุจิสั้นเกินไป probes จะผ่านเข้าไปจับกับ DNA ได้ลดลง โดยเฉพาะการใช้ locus-specific probes ดังที่ได้กล่าวแล้วในตอนต้นว่าการที่ probes ไม่สามารถเข้าไปจับกับ DNA ได้ อาจแปลผลผิดได้ว่าเป็น nullisomies ในทางกลับกัน ถ้ามีการทำให้หัวของอสุจิพองมากเกินไป probe ที่จับกับ repetitive DNA sequences อาจทำให้ตรวจพบสัญญาณได้มากกว่าที่ควรเป็น เนื่องจากไปจับกับ DNA หลายตำแหน่ง ทำให้มีอุบัติการณ์ของ disomies เพิ่มขึ้น⁽⁴⁵⁾ การทำให้หัวของอสุจิพองตัวทำให้ probes สามารถไปจับกับ DNA ได้ และทำให้สามารถตรวจพบสัญญาณได้มากขึ้น

การตรวจ aneuploidy ของอสุจิด้วยวิธี FISH ควรตรวจ autosome อื่นด้วย เพื่อแยก ระหว่าง disomy กับ diploidy ถ้าตรวจเฉพาะเพียงโครโมโซมเพศ (โครโมโซม X และ โครโมโซม Y) เท่านั้นจะรวมเอา diploidy เข้าไปอยู่ในกลุ่มของ disomy ได้ ถึงแม้จะมีรายงานว่า อสุจิที่เป็น diploidy จะมีขนาดหัวของอสุจิใหญ่กว่าปกติ^(29,46) แต่อสุจิแต่ละตัวจะมีการอัดกันแน่นของโครมาตินแตกต่างกันไป⁽⁴⁷⁾ ดังนั้นขนาดของนิวเคลียสของอสุจิภายหลังการพองตัวของส่วนหัวของอสุจิจะขึ้นกับปริมาณ DNA และการอัดแน่นของ DNA

หลักเกณฑ์ในการให้คะแนน

การให้คะแนน aneuploidy ขึ้นกับจำนวนและลักษณะของสัญญาณที่ตรวจพบที่หัวของอสุจิ ดังนั้นการตรวจนับที่แตกต่างกันในแต่ละห้องปฏิบัติการอาจทำให้ได้ผลแตกต่างกันได้ จึงมีการกำหนดเกณฑ์ในการให้คะแนนขึ้น⁽⁴⁸⁾ ประกอบด้วย

1. ไม่ทำการนับอสุจิที่มีส่วนหัวทับซ้อนกันและไม่สามารถเห็นขอบเขตของหัวอสุจิชัดเจน
2. ในกรณีที่เป็น disomy หรือ diploidy สัญญาณทุกสัญญาณควรจะมีคามเข้มเหมือนกัน และอยู่ห่างกันเป็นระยะทางมากกว่าเส้นผ่าศูนย์กลางของสัญญาณที่ตรวจพบ

3. การตรวจนับ nullisomy ควรประเมินประกอบกับอุบัติการณ์ของ disomy

ความจำเพาะของ probes

ปัจจัยอื่นที่อาจมีผลต่อการศึกษาโดยวิธี FISH มีส่วนเกี่ยวข้องกับลักษณะของ probes ที่ใช้ในแต่ละราย probe ในอุดมคติควรจะเป็น probe ที่มีความจำเพาะสูงและสัญญาณที่ได้มีความเข้มชัดเจนที่บริเวณของหัวอสุจิและเห็นสัญญาณแยกจากกันชัดเจน

ประโยชน์ของการศึกษาโครโมโซมของอสุจิ

การศึกษาโครโมโซมของอสุจิด้วยเทคนิค FISH อาจนำมาใช้ในการศึกษาหาอุบัติการณ์ของ disomy ของผู้ชายที่มีบุตรได้ แต่ได้รับสารที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagens) หรือในคู่สมรสที่เป็นพาหะของความผิดปกติของโครโมโซมเพศ, สาเหตุของภาวะมีบุตรยากชนิดต่างๆ ได้แก่ ภาวะมีบุตรยากที่ไม่ทราบสาเหตุ หรือในรายที่มีความผิดปกติของผลการตรวจน้ำอสุจิอย่างรุนแรง (severe oligo-astheno-teratozoospermia) เนื่องจากผู้ป่วยดังกล่าวอาจจำเป็นต้องรักษาด้วยวิธีการฉีดอสุจิเข้าไป (intracytoplasmic sperm injection : ICSI) ดังนั้นการศึกษาถึงอุบัติการณ์ของความผิดปกติของโครโมโซมในกลุ่มนี้จึงมีความสำคัญมาก

การศึกษาถึงอุบัติการณ์ของ disomies ในอสุจิของผู้ชายปกติ พบว่ามีโครโมโซมบางตัวมีแนวโน้มที่จะมีความผิดปกติของการแบ่งตัวชนิด non-disjunction โดยพบว่ามี การเกิด disomy ได้บ่อยใน โครโมโซมคู่ที่ 16⁽⁴⁹⁾, โครโมโซมคู่ที่ 21⁽⁴⁸⁾ และโครโมโซมเพศ⁽⁵⁰⁾

ผู้ชายที่มีบุตรยากมักจะมีความผิดปกติของการตรวจน้ำอสุจิ พบว่าผู้ป่วยในกลุ่มนี้มีอุบัติการณ์ของความผิดปกติของโครโมโซมของอสุจิสูงกว่ากลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามพบว่าอุบัติการณ์ของ aneuploidy ของโครโมโซมของอสุจิก็มีความแตกต่างกันมากในแต่ละการศึกษา เช่น การศึกษาของ Martin และคณะ (1996) พบว่ามี aneuploidy ของโครโมโซมที่ 1 ระหว่าง 0.05-0.18%, พบว่ามี XX disomies ระหว่าง 0.03-0.17% และมี YY disomies ระหว่าง 0.10-0.45%⁽⁵⁰⁾ เมื่อเทียบกับการศึกษาของ Blanco และคณะ (1997) พบว่ามี XY disomies ระหว่าง 0.05-0.17% หรือมี YY disomies ระหว่าง 0.08-0.23%⁽⁵¹⁾

เมื่อทำการตรวจโครโมโซมเพศของอสุจิด้วยวิธี FISH ในรายที่ผู้ชายมีความผิดปกติของโครโมโซมเป็น 47,XYY และ Klinefelter mosaics (46,XY/47,XXY) พบว่ามีอุบัติการณ์ของ disomies ของโครโมโซมเพศในกลุ่มดังกล่าวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยในกลุ่มนี้สามารถสร้างอสุจิได้ โดยส่วนใหญ่พบมีโครโมโซมเพศเกินมา

เนื่องจากพบว่าการแท้งเองตามธรรมชาติพบมีอุบัติการณ์ของความผิดปกติของโครโมโซมถึง 50% โดยพบว่ามีความผิดปกติของจำนวนโครโมโซมประมาณ 86%⁽⁵²⁾ และเชื่อว่าในช่วงที่มีการฝังตัวอาจสูงถึง 85%⁽⁵³⁾ จึงเชื่อว่าตัวอ่อนที่มีความผิดปกติของโครโมโซมจะไม่สามารถตั้งครรภ์ได้ตามปกติ อย่างไรก็ตามยังพบว่าอุบัติการณ์ของความผิดปกติของโครโมโซมของอสุจิก็น่าจะสูงกว่าอุบัติการณ์ของทารกที่เป็น trisomies อยู่มาก อาจเป็นไปได้ว่า trisomies ที่เกิดจากพ่อจะมีชีวิตรอดอยู่ได้น้อยกว่า trisomies ที่มาจากแม่⁽⁵⁴⁾

โดยสรุป การตรวจด้วยวิธี FISH ในอสุจิที่ทำให้หัวของอสุจิพุ่งขึ้นสามารถตรวจอุบัติการณ์ของ disomy ของอสุจิได้อย่างแม่นยำ โดยต้องมีหลักเกณฑ์ในการตรวจนับที่ดี เพื่อลดความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นได้ การตรวจด้วยวิธีดังกล่าวช่วยให้สามารถประมาณความเสี่ยงของการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมที่อาจเกิดขึ้นจากนำเอาอสุจิไปฉีดเข้าในอสุจิโดยตรง (ICSI)

ผู้เข้าร่วมการศึกษาและวิธีการวิจัย

ผู้เข้าร่วมการศึกษา

กลุ่มศึกษา

ผู้ป่วยที่ตรวจไม่พบอสุจิในน้ำอสุจิ (Azoospermia) จำนวน 24 คน การตรวจน้ำอสุจิเพื่อยืนยันว่าไม่พบอสุจิในน้ำอสุจิ ทำได้โดยการปั่นน้ำอสุจิที่ 600 x g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนตะกอนที่กั้นหลอด (pellets) มาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แล้วไม่พบอสุจิ อย่างน้อย 2 ครั้ง ผู้ป่วยทุกคนต้องมีขนาดอัณฑะปกติทั้งสองข้าง และมีระดับฮอร์โมน Follicle stimulating hormone (FSH) อยู่ในเกณฑ์ปกติ แสดงว่ายังมีการสร้างอสุจิตามปกติ

กลุ่มเปรียบเทียบ

ผู้ชายที่มีภาวะการเจริญพันธุ์ปกติ โดยมีประวัติเชื่อแน่ว่าเป็นพ่อของเด็กอย่างน้อย 1 คน และมีผลการตรวจน้ำอสุจิตามวิธีมาตรฐานขององค์การอนามัยโลกได้ผลปกติ⁽⁵⁵⁾

วิธีการวิจัย

การเก็บอสุจิในกลุ่มศึกษา

ทำการเก็บอสุจิจาก epididymis ในกลุ่มศึกษาเพื่อนำมาใช้ในการรักษาด้วยการฉีดอสุจิที่ได้จาก epididymis (epididymal sperm) เข้าในไข่ (intracytoplasmic sperm injection : ICSI)

วิธีการเก็บอสุจิจาก epididymis

การเก็บอสุจิจาก epididymis ทำด้วยวิธีใช้เข็มดูดอสุจิจาก epididymis ผ่านทางผิวหนัง (percutaneous epididymal sperm aspiration : PESA) ในห้องผ่าตัด ให้ยาระงับความรู้สึก โดยใช้ Propofol เข้าทางหลอดเลือดดำร่วมกับฉีดยาชาเฉพาะที่ด้วย Bupivacaine ขั้นตอนการดูดอสุจิจาก epididymis ทำได้โดยจับ epididymal caput ด้วยนิ้วหัวแม่มือและนิ้วชี้ ใช้เข็มขนาดเบอร์ 26 (26 gauge) ต่อกับ disposable syringe ขนาด 1 มล. ครอบคลุมส่วนต้นของ epididymis ขณะที่เริ่มดูด ค่อยๆถอนเข็มออกช้าๆ จนถึงตำแหน่งที่สามารถดูดได้น้ำอสุจิจาก epididymis เข้าสู่ syringe จากนั้นนำน้ำอสุจิที่ได้มาตรวจโดยฉีดเข้าไปใน Petri dish ผสมกับ HEPES-buffer อาจทำการดูดด้วยวิธีดังกล่าวจนได้อสุจิเพียงพอต่อการรักษาด้วยวิธี ICSI และเก็บแช่แข็งอสุจิไว้ใช้ในครั้งต่อไป อสุจิที่เหลือจากการใช้ทางคลินิกจะนำมาใช้ในงานวิจัย โดยล้างอสุจิด้วย phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2 ทั้งหมด 3 ครั้งๆละ 10 นาที ครั้งสุดท้ายล้างด้วย 0.01 M Tris, pH 8.0 แล้วป้ายลงบนสไลด์ที่สะอาดให้มีความเข้มข้นของอสุจิ $50-60 \times 10^6$ ต่อมล. ทิ้งสไลด์ให้แห้งแล้วเก็บตัวอย่างสไลด์ไว้ในกล่องป้องกันความชื้นที่ -20°C

การเก็บอสุจิของกลุ่มเปรียบเทียบ

วิธีการเก็บน้ำอสุจิจากกลุ่มเปรียบเทียบจำนวน 24 ราย โดยวิธีสำเร็จความใคร่ด้วยตนเอง (masturbation) หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปตรวจวิเคราะห์ความเข้มข้นของอสุจิ การเคลื่อนไหวของอสุจิและรูปร่างของอสุจิตามวิธีมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก (WHO, 1999) และเครื่องตรวจวิเคราะห์อสุจิด้วยคอมพิวเตอร์ (HTM IVOS version 10)

ล้างอสุจิด้วย phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2 ทั้งหมด 3 ครั้งๆละ 10 นาที ครั้งสุดท้ายล้างด้วย 0.01 M Tris, pH 8.0 แล้วป้ายลงบนสไลด์ที่สะอาดให้มีความเข้มข้นของอสุจิ $50-60 \times 10^6$ ต่อมล. ทิ้ง สไลด์ให้แห้งแล้วเก็บตัวอย่างสไลด์ไว้ในกล่องป้องกันความชื้นที่ -20°C ขั้นตอนการตรวจโครโมโซมของอสุจิด้วยวิธี **Fluorescent in-situ hybridization (FISH)**

Sperm decondensation

เริ่มต้นโดย incubate สไลด์ใน 0.1 M dithiothreitol (DTT, Sigma) ใน 0.1 M Tris, pH 8.0 เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และใน 0.1 M lithium 3,5-diiodosalicylic acid (LIS, Sigma), 0.01 M DTT in 0.1 M Tris, pH 8.0 เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นชะล้างด้วย SSC, pH 7.0 2 ครั้ง และใน Milli Q water จากนั้นทิ้ง สไลด์ให้แห้ง

DNA probes

ตรวจสอบโครโมโซม X และ Y ด้วย specific DNA probes (Vysis, Framingham, MA

- CEP X (alpha satellite) Spectrum orange ซึ่งจะ hybridize กับโครโมโซม X ส่วนของ bands p11.1 – q11.1 locus DXZ1)
- CEP Y (satellite III) Spectrum green ซึ่งจะ hybridize กับโครโมโซม Y ส่วนของ satellite III (bands Y q12, locus DYZ1)
- CEP 18 (alpha satellite) Spectrum aqua ซึ่งจะ hybridize กับโครโมโซมที่ 18 ส่วน centromere (bands p11.1 - q11.1 locus D18 Z1)

Fluorescence in-situ hybridization (FISH)

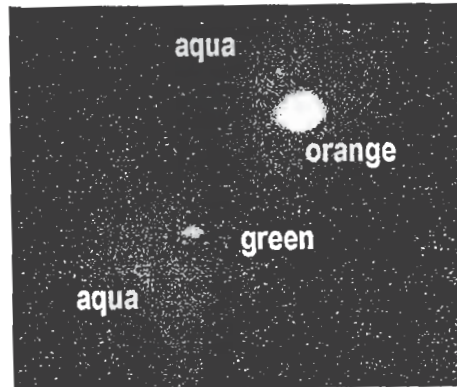
Incubate สไลด์ด้วย RNase, DNase - free 100 µg/ml ใน SSC, pH 7.0 2 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (150 µl แล้วปิดด้วย coverslip) จากนั้นล้าง 3 ครั้งด้วย Milli Q water แล้วทำให้แห้งใน 80% ethanol และ 100% ethanol ตามลำดับ แล้วทิ้งสไลด์ไว้ให้แห้ง

ใช้ triple-probe FISH โดยหยด DNA probes mixture 10 µl (ประกอบด้วย X, Y และ 18 probes, hybridization buffer และ Milli Q water) ลงบนแต่ละสไลด์ จากนั้นปิด coverslip แล้วปิดทับด้วย sealing film นำมา denature ที่ 75°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วทิ้งให้เกิด hybridization ข้ามคืน (ประมาณ 16-18 ชั่วโมง) ที่ 37°C ในภาชนะที่มีความชื้น จากนั้นนำมาล้างด้วย 0.1 x SSC, pH 7.0 ที่ 60°C 4 ครั้งๆ ละ 5 นาที ทิ้ง สไลด์ให้แห้งจึง mount ด้วย DAPI II (Vysis) และปิด coverlip แล้วเก็บสไลด์ไว้ในที่มืด อุณหภูมิ -20°C

การตรวจนับอสุจิ

นำสไลด์ทั้งหมดมาตรวจสอบสัญญาณด้วย Olympus microscope (BX 50, Japan) ซึ่งติดตั้งด้วย multi-band fluorescence filter cube (DAPI / FITC / Texas Red) ทำให้สามารถมองเห็นสัญญาณทั้งสีเขียว สีแดง และ สีฟ้า (aqua) พร้อมกัน ในกรณีที่ไม่สามารถเห็นสีฟ้าได้ชัดเจน จะตรวจสัญญาณอีกครั้งด้วย aqua single filter band pass

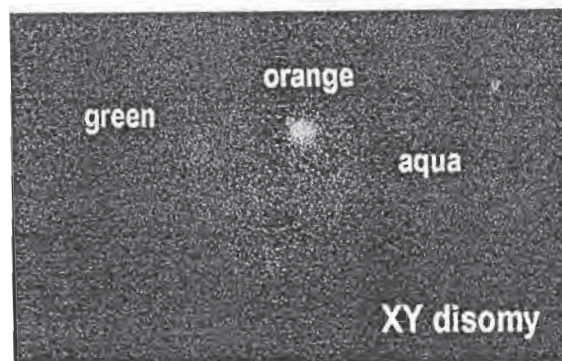
ตัวอย่างภาพที่ได้จากการตรวจสอบสัญญาณดังแสดงในรูปที่ 1 – รูปที่ 3



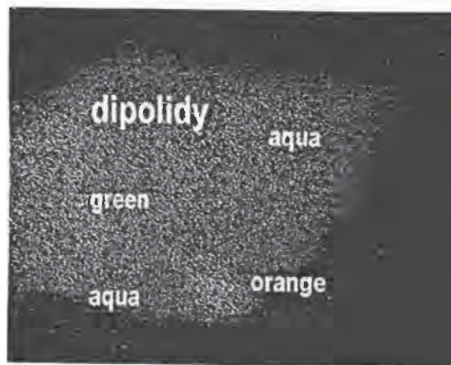
รูปที่ 1 : แสดงลักษณะของนิวเคลียสของอสุจิปกติ

อสุจิที่มีสัญญาณ สีเขียวและฟ้า เป็น Y bearing sperm ปกติ

อสุจิที่มีสัญญาณ สีแดงและฟ้า เป็น X bearing sperm ปกติ



รูปที่ 2 : แสดงลักษณะของนิวเคลียสของอสุจิที่เป็น XY disomy โดยจะพบสัญญาณ สีแดง สีเขียวและสีฟ้า



รูปที่ 3 : แสดงลักษณะของนิวเคลียสของอสุจิที่เป็น diploidy โดยจะพบสัญญาณ สีแดง สีเขียว อย่างละ 1 ตำแหน่ง และสัญญาณ สีฟ้า 2 ตำแหน่ง

การตรวจนับอสุจิใช้หลักเกณฑ์การตรวจนับสัญญาณดังนี้

1. แต่ละสไลด์ต้องมีสัญญาณจากอสุจิมากกว่า 97% ของอสุจิทั้งหมด
2. นับเฉพาะอสุจิที่มีส่วนหางครบ มีการกระจายของอสุจินบนสไลด์สม่ำเสมอ ไม่มีการทับซ้อนของอสุจิ
3. ไม่นับอสุจิที่มีการพองของส่วนหัวมากจนเกินไป เนื่องจากจะทำให้ไม่สามารถแยก ระหว่าง disomy หรือเป็นการที่ส่วนหัวของอสุจิ 2 ตัวพองแตกออกมารวมกัน
4. แยกระหว่าง disomy จาก diploidy ด้วยสัญญาณจากโครโมโซมที่ 18 และขนาดของอสุจิที่เป็น disomy มีขนาดเท่ากับอสุจิปกติ
5. ตรวจนับอสุจิทั้งหมดอย่างน้อย 2,000 ตัวในแต่ละสไลด์

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) ใช้ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน วิเคราะห์ความแตกต่างของ aneuploidy rate ของทั้งสองกลุ่ม การเปรียบเทียบข้อมูลต่อเนื่องระหว่างกลุ่มซึ่งมีการกระจายของข้อมูลปกติใช้ unpaired t-tests การเปรียบเทียบข้อมูลอัตราส่วนใช้ χ^2 test และ Fisher's exact test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 10.05 for Windows โดยกำหนดว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ p value น้อยกว่า 0.05



ผลการศึกษา

ได้ทำการตรวจความผิดปกติของโครโมโซมของ epididymal spermatozoa จำนวน 23,267 อสุจิ จากผู้ป่วย และ ejaculated spermatozoa จำนวน 48,000 อสุจิจากผู้ชายปกติ ด้วยวิธี Fluorescence in situ hybridization (FISH) โดยทำการตรวจ epididymal spermatozoa จำนวนเฉลี่ย 969 อสุจิต่อราย (พิสัย 100-3,057 อสุจิต่อราย) และทำการตรวจ ejaculated spermatozoa จำนวน 2,000 อสุจิต่อราย การตรวจความผิดปกติของโครโมโซมด้วยวิธี FISH ในการศึกษานี้พบว่า probe สามารถเข้าไปจับกับ DNA ของอสุจิอย่างมีประสิทธิภาพ โดยพบว่าสามารถจับกับอสุจิได้ 99.51% (มีค่าอยู่ระหว่าง 98.77% - 100%) และ 99.68% (มีค่าอยู่ระหว่าง 99.25%-99.85%) ในกลุ่มผู้ป่วยและในกลุ่มผู้ชายปกติตามลำดับ พบว่าไม่มีความแตกต่างของประสิทธิภาพของการจับของ probe กับ DNA (hybridization efficiency) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

รายละเอียดผลการศึกษาโครโมโซมของอสุจิในผู้ชายปกติ จำนวน 24 คน แสดงในตารางที่ 2 และรายละเอียดผลการศึกษาโครโมโซมของ epididymal spermatozoa ที่ได้จาก epididymis ของผู้ชายที่ตรวจไม่พบอสุจิในน้ำอสุจิจากการอุดตันของท่อนำอสุจิ จำนวน 24 คน แสดงในตารางที่ 3

กลุ่มควบคุม	Normal		Disomy			Total sex aneuploidy (%)	Normal Ch 18 (%)	Disomy Ch 18 (%)	Diploidy (%)	Labelling (%)	Total cells
	X (%)	Y (%)	XX (%)	XY (%)	YY (%)						
D1	50.80	49.15	0.000	0.050	0.000	0.050	100.00	0.000	0.000	99.80	2,000
D2	49.87	50.08	0.050	0.000	0.000	0.050	100.00	0.000	0.000	99.85	2,000
D3	50.63	49.27	0.000	0.050	0.000	0.050	99.95	0.000	0.050	99.65	2,000
D4	50.68	49.27	0.000	0.050	0.000	0.050	100.00	0.000	0.000	99.75	2,000
D5	49.87	50.08	0.000	0.000	0.000	0.000	99.95	0.000	0.050	99.85	2,000
D6	49.82	49.77	0.000	0.050	0.050	0.100	100.00	0.000	0.000	99.45	2,000
D7	49.55	50.35	0.050	0.050	0.000	0.100	99.90	0.100	0.000	99.80	2,000
D8	50.83	49.02	0.050	0.100	0.000	0.151	100.00	0.000	0.000	99.55	2,000
D9	49.75	50.00	0.100	0.050	0.000	0.151	99.85	0.050	0.101	99.40	2,000
D10	49.82	49.57	0.050	0.000	0.050	0.100	99.50	0.000	0.000	99.65	2,000
D11	49.62	50.13	0.000	0.100	0.100	0.200	99.90	0.050	0.050	99.75	2,000
D12	50.10	49.85	0.050	0.000	0.000	0.050	100.00	0.000	0.000	99.70	2,000

ตารางที่ 2 : ผลการตรวจความผิดปกติของโครโมโซมด้วยวิธี Fluorescence in situ hybridization ในผู้ชายปกติที่เคยมีบุตรมาก่อนและมีผลการตรวจน้ำอสุจิปกติ จำนวน 24 คน

กลุ่มควบคุม	Normal		Disomy			Total sex aneuploidy (%)	Normal Ch 18 (%)	Disomy Ch 18 (%)	Diploidy (%)	Labelling (%)	Total cells
	X (%)	Y (%)	XX (%)	XY(%)	YY (%)						
D1	50.80	49.15	0.000	0.050	0.000	0.050	100.00	0.000	0.000	99.80	2,000
D2	49.87	50.08	0.050	0.000	0.000	0.050	100.00	0.000	0.000	99.85	2,000
D3	50.63	49.27	0.000	0.050	0.000	0.050	99.95	0.000	0.050	99.65	2,000
D4	50.68	49.27	0.000	0.050	0.000	0.050	100.00	0.000	0.000	99.75	2,000
D5	49.87	50.08	0.000	0.000	0.000	0.000	99.95	0.000	0.050	99.85	2,000
D6	49.82	49.77	0.000	0.050	0.050	0.100	100.00	0.000	0.000	99.45	2,000
D7	49.55	50.35	0.050	0.050	0.000	0.100	99.90	0.100	0.000	99.80	2,000
D8	50.83	49.02	0.050	0.100	0.000	0.151	100.00	0.000	0.000	99.55	2,000
D9	49.75	50.00	0.100	0.050	0.000	0.151	99.85	0.050	0.101	99.40	2,000
D10	49.82	49.57	0.050	0.000	0.050	0.100	99.50	0.000	0.000	99.65	2,000
D11	49.62	50.13	0.000	0.100	0.100	0.200	99.90	0.050	0.050	99.75	2,000
D12	50.10	49.85	0.050	0.000	0.000	0.050	100.00	0.000	0.000	99.70	2,000

ตารางที่ 2 : ผลการตรวจความผิดปกติของโครโมโซมด้วยวิธี Fluorescence in situ hybridization ในผู้ชายปกติที่เคยมีบุตรมาก่อนและมีผลการตรวจน้ำอสุจิปกติ จำนวน 24 คน

กลุ่มควบคุม	Normal		Disomy			Total sex aneuploidy (%)	Normal Ch 18 (%)	Disomy Ch 18 (%)	Diploidy (%)	Labelling (%)	Total cells
	X (%)	Y (%)	XX (%)	XY (%)	YY (%)						
P1	46.98	45.30	2.013	2.685	1.007	5.705	98.658	0.336	1.007	99.333	300
P2	47.15	49.74	0.691	1.554	0.518	2.763	99.655	0.173	0.345	99.828	580
P3	47.91	49.55	0.746	1.045	0.299	2.090	99.552	0.149	0.448	99.851	671
P4	50.51	42.42	2.020	4.040	1.010	7.071	92.929	0.000	1.010	99.000	100
P5	49.35	48.52	0.708	1.004	0.295	2.007	99.882	0.118	0.118	99.064	1,710
P6	50.26	48.92	0.131	0.525	0.164	0.821	99.934	0.098	0.033	99.640	3,057
P7	47.75	50.67	0.112	1.011	0.112	1.236	100.000	0.225	0.337	99.441	895
P8	49.66	49.21	0.338	0.788	0.000	1.126	100.000	0.000	0.000	99.775	890
P9	49.40	49.53	0.134	0.602	0.134	0.869	99.933	0.067	0.201	99.733	1,500
P10	49.37	49.12	0.251	0.752	0.334	1.337	100.000	0.084	0.167	99.750	1,200
P11	48.67	49.80	0.307	0.818	0.204	1.329	99.693	0.102	0.204	99.760	980
P12	49.41	48.86	0.365	1.096	0.274	1.735	100.000	0.000	0.000	99.545	1,100

ตารางที่ 3 : ผลการตรวจความผิดปกติของโครโมโซมด้วยวิธี Fluorescence in situ hybridization ในผู้ป่วยที่ตรวจไม่พบอสุจิในน้ำอสุจิจากการอุดตันของท่อนำอสุจิ จำนวน 24 ราย

กลุ่มควบคุม	Normal		Disomy			Total sex aneuploidy (%)	Normal Ch 18 (%)	Disomy Ch 18 (%)	Diploidy (%)	Labelling (%)	Total cells
	X (%)	Y (%)	XX (%)	XY(%)	YY (%)						
P1	46.98	45.30	2.013	2.685	1.007	5.705	98.658	0.336	1.007	99.333	300
P2	47.15	49.74	0.691	1.554	0.518	2.763	99.655	0.173	0.345	99.828	580
P3	47.91	49.55	0.746	1.045	0.299	2.090	99.552	0.149	0.448	99.851	671
P4	50.51	42.42	2.020	4.040	1.010	7.071	92.929	0.000	1.010	99.000	100
P5	49.35	48.52	0.708	1.004	0.295	2.007	99.882	0.118	0.118	99.064	1,710
P6	50.26	48.92	0.131	0.525	0.164	0.821	99.934	0.098	0.033	99.640	3,057
P7	47.75	50.67	0.112	1.011	0.112	1.236	100.000	0.225	0.337	99.441	895
P8	49.66	49.21	0.338	0.788	0.000	1.126	100.000	0.000	0.000	99.775	890
P9	49.40	49.53	0.134	0.602	0.134	0.869	99.933	0.067	0.201	99.733	1,500
P10	49.37	49.12	0.251	0.752	0.334	1.337	100.000	0.084	0.167	99.750	1,200
P11	48.67	49.80	0.307	0.818	0.204	1.329	99.693	0.102	0.204	99.760	980
P12	49.41	48.86	0.365	1.096	0.274	1.735	100.000	0.000	0.000	99.545	1,100

ตารางที่ 3 : ผลการตรวจความผิดปกติของโครโมโซมด้วยวิธี Fluorescence in situ hybridization ในผู้ป่วยที่ตรวจไม่พบอสุจิในน้ำอสุจิจากการดูดต้นของท่อนำอสุจิ จำนวน 24 ราย

การศึกษาโครโมโซมของอสุจิในผู้ชายปกติจำนวน 24 คน พบว่ามี sex aneuploidy rate เฉลี่ย 0.10% (พิสัย 0.00% – 0.35%) ส่วนอสุจิที่ได้จาก epididymis ของผู้ชายที่ตรวจไม่พบอสุจิในน้ำอสุจิ จำนวน 24 คน พบว่ามี sex aneuploidy rate เฉลี่ย 1.91% (พิสัย 0.79% - 7.07%) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของ aneuploidy rate ของอสุจิจากผู้ชายปกติกับอสุจิจาก epididymis ของผู้ชายที่ตรวจไม่พบอสุจิในน้ำอสุจิ (ตารางที่ 4)

การศึกษาโครโมโซมของอสุจิในผู้ชายปกติจำนวน 24 คน พบว่ามี chromosome 18 disomy rate เฉลี่ย 0.02% (พิสัย 0.00% – 0.10%) ส่วนอสุจิที่ได้จาก epididymis ของผู้ชายที่ตรวจไม่พบอสุจิในน้ำอสุจิ จำนวน 24 คน พบว่ามี chromosome 18 aneuploidy rate เฉลี่ย 0.12% (พิสัย 0.00% - 0.34%) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของ aneuploidy rate ของอสุจิจากผู้ชายปกติกับอสุจิจาก epididymis ของผู้ชายที่ตรวจไม่พบอสุจิในน้ำอสุจิ (ตารางที่ 4)

การศึกษาโครโมโซมของอสุจิในผู้ชายปกติจำนวน 24 คน พบว่ามี diploidy rate เฉลี่ย 0.02% (พิสัย 0.00% – 0.10%) ส่วนอสุจิที่ได้จาก epididymis ของผู้ชายที่ตรวจไม่พบอสุจิในน้ำอสุจิ จำนวน 24 คน พบว่ามี diploidy rate เฉลี่ย 0.29% (พิสัย 0.00% - 1.01%) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของ diploidy rate ของอสุจิจากผู้ชายปกติกับอสุจิจาก epididymis ของผู้ชายที่ตรวจไม่พบอสุจิในน้ำอสุจิ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 : เปรียบเทียบความผิดปกติของโครโมโซมของอสุจิระหว่างอสุจิที่ได้จาก epididymis ของผู้ป่วยที่ตรวจไม่พบอสุจิในน้ำอสุจิ กับอสุจิของผู้ชายปกติ

สิ่งตรวจพบ	ผู้ชายปกติ จำนวนของอสุจิ (%)	ผู้ป่วยที่ไม่พบอสุจิในน้ำอสุจิ จำนวนของอสุจิ (%)	P value
Haploid X	23,975 (49.95%)	11,314 (48.63%)	P <0.001
Haploid Y	23,763 (49.51%)	11,311 (48.61%)	P <0.005
Sex aneuploidy	69 (0.14%)	335 (1.44%)	P <0.001
Disomy 18	8 (0.02%)	26 (0.11%)	P <0.001
Diploidy	11 (0.02%)	42 (0.18%)	P <0.001
รวมจำนวนอสุจิที่ตรวจ	48,000	23,267	

อภิปราย

Aneuploidy เป็นความผิดปกติของโครโมโซมที่พบได้บ่อยและมีความรุนแรง ในกลุ่มประชากรทั่วไป พบว่าความผิดปกติของจำนวนโครโมโซมส่วนใหญ่มาจากมารดา⁽⁵⁶⁾ แต่ก็พบว่ามีส่วนเกิดจากอสุจิได้ด้วย⁽⁵⁷⁾ ในระยะหลังที่ผ่านมามีความกังวลเพิ่มขึ้นจากอุบัติการณ์ของความผิดปกติของโครโมโซมที่มีสาเหตุจากบิดาเพิ่มขึ้นในทารกที่เกิดจากวิธี ICSI⁽¹⁵⁻¹⁷⁾

Fluorescence in situ hybridization (FISH) โดยการใช้ DNA probes ที่เฉพาะเจาะจงกับโครโมโซมที่ต้องการตรวจเป็นที่นิยมน้อยกว่าหลายในการตรวจความผิดปกติของโครโมโซมของอสุจิ เนื่องจากเป็นวิธีที่เชื่อถือได้และสามารถตรวจได้อย่างรวดเร็ว ในการศึกษาที่ใช้วิธี FISH โดยใช้ DNA probe ต่อโครโมโซม X, Y และ 18 ทำให้สามารถแยกแยะระหว่าง disomy กับ diploidy ได้ และยังสามารถแยก nullisomy จากกระบวนการ hybridization ล้มเหลว (hybridization failure)

การศึกษานี้ทำการตรวจผู้ป่วยที่ตรวจไม่พบอสุจิในน้ำอสุจิจากการอุดตันของท่อนำอสุจิจำนวน 24 ราย เปรียบเทียบกับผู้ชายปกติที่เคยมีบุตรแล้ว พบว่ามีประสิทธิภาพของกระบวนการ hybridization ประมาณ 99.6% ใกล้เคียงกับการศึกษาในอดีต (99.8%)⁽⁵⁸⁾ นอกจากนั้นพบว่าประสิทธิภาพของกระบวนการ hybridization ของผู้ป่วยและผู้ชายปกติ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (99.51% กับ 99.68% ตามลำดับ)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าอุบัติการณ์ของ disomy 18 ของอสุจิของผู้ชายปกติมีพิสัยระหว่าง 0.05%-0.45%⁽⁵⁸⁻⁶²⁾, 0.23-0.78% สำหรับ sex chromosome aneuploidy^(22,24,58-60,62), 0-0.17% สำหรับ XX disomy, 0-0.62% สำหรับ YY disomy และ 0-0.3% สำหรับ XY disomy^(24,60,61); diploidy rates มีพิสัยระหว่าง 0-0.25%^(22,58-62) การศึกษานี้พบว่าอุบัติการณ์ของ sex chromosome aneuploidy (0.14%), disomy 18 (0.02%) and diploidy (0.02%) ต่ำกว่าการศึกษาที่ผ่านมาในอดีต^(22,58-62) อาจเนื่องจากการศึกษานี้คัดเลือกกลุ่มควบคุมเป็นผู้ชายที่เคยมีบุตรมาก่อนและมีผลการตรวจน้ำอสุจิปกติตามมาตรฐานขององค์การอนามัยโลก ความแตกต่างของอุบัติการณ์มีความแตกต่างกันไป ตามท้องถิ่นต่างๆ, เกณฑ์ในการคัดเลือกกลุ่มควบคุม, วิธีการตรวจ FISH ที่แตกต่างกัน, วิธีการทำให้หัวของอสุจิพองตัว (decondensation procedures) ที่แตกต่างกัน, ชนิดของ probe ที่แตกต่างกัน และความแตกต่างของเกณฑ์การตรวจนับความผิด

ปกติของโครโมโซมของอสุจิ นอกจากนั้น หลายปัจจัยอาจทำให้มีความเสี่ยงต่อการสร้างอสุจิที่มีความผิดปกติของโครโมโซมเพิ่มขึ้น เช่น อายุของฝ่ายชายเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งโครโมโซมเพศ⁽⁶³⁾ และการรักษามะเร็งด้วยเคมีบำบัด⁽⁶⁴⁾ พบว่าการดำเนินชีวิตบางอย่าง เช่น การสูบบุหรี่ การดื่มสุรา และการดื่มกาแฟ ไม่มีความสัมพันธ์กับอุบัติการณ์ของ disomy⁽⁶⁵⁾

จากการศึกษาหาอุบัติการณ์ของความผิดปกติของโครโมโซมของ epididymal spermatozoa จากผู้ป่วยที่ตรวจไม่พบอสุจิในน้ำอสุจิจากการอุดตันของท่อนำอสุจิ พบว่าเป็น sex chromosome aneuploidy อยู่ระหว่าง 2.89%-4.36%, เป็น disomy 18 ประมาณ 0.54% และเป็น diploidy ประมาณ 0.44%^(22,23) อย่างไรก็ตามการศึกษาดังกล่าวมีจำนวนอสุจิที่ใช้ตรวจต่อรายค่อนข้างน้อยมาก การศึกษานี้พบว่ามีอุบัติการณ์ของ sex chromosome aneuploidy เป็น 1.44%, disomy 18 เป็น 0.11% และ diploidy เป็น 0.18% ซึ่งพบว่าต่ำกว่าในการศึกษาที่ผ่านมา^(22,23) ความแตกต่างระหว่างอุบัติการณ์ของ aneuploidies อาจมีสาเหตุจากจำนวนของอสุจิที่ทำการวิเคราะห์น้อยเกินไป, มีจำนวนผู้ป่วยที่ตรวจน้อยจนเกินไป และอาจเป็นเพราะความแตกต่างกันของวิธีการตรวจ

อย่างไรก็ตามการตรวจโครโมโซมเพียง 3 ตัวจะได้อุบัติการณ์ของ aneuploidy น้อยกว่าที่เป็นจริง ในการศึกษาพบว่ามีโครโมโซมเพศมีสัดส่วนของ aneuploidy สูงกว่าโครโมโซม 18 อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งผลการศึกษาใกล้เคียงกับผลการศึกษาในอดีต^(22,23) ผลดังกล่าวสนับสนุนเกี่ยวกับอสุจิเป็นต้นเหตุให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมเพศในทารกที่เกิดจากกระบวนการ ICSI

การศึกษานี้ได้ทำการเปรียบเทียบ aneuploidy rate ของโครโมโซมเพศและโครโมโซม 18 ระหว่างผู้ป่วยและผู้ชายปกติ พบว่า epididymal spermatozoa ที่ได้จากผู้ป่วยที่มีการอุดตันของท่อนำอสุจิมีอุบัติการณ์ของ aneuploidy rate สูงกว่าอสุจิที่ได้จากผู้ชายปกติ ($p < 0.001$) (ตารางที่ 4) เช่นเดียวกับการศึกษาที่ผ่านมา^(22,66) ในการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า epididymal spermatozoa จากผู้ป่วยที่มีการอุดตันของท่อนำอสุจิมี sex chromosome aneuploidy, total aneuploidy และ diploidy สูงกว่าผู้ชายปกติอย่างมีนัยสำคัญ (2.89% vs 0.81%, 4.84% vs 1.47% และ 0.44% vs 0.13%, ตามลำดับ) โดยทำการตรวจผู้ป่วยดังกล่าวเพียง 6 ราย และผู้ป่วย 5 รายใน 6 ราย เป็น CABVD⁽²²⁾ เมื่อไม่นานมานี้ มีรายงานการศึกษา aneuploidy rate ของ epididymal

spermatozoa จากผู้ป่วยทั้งหมด 10 ราย พบว่ามี total aneuploidy rate สูงกว่าอสุจิของผู้ชายปกติ อย่างมีนัยสำคัญ (8.2% vs 1.6%)⁽²³⁾

เมื่อทำการแบ่งผู้ป่วยที่มีการอุดตันของท่อนำอสุจิออกเป็น 2 ส่วน ตามสาเหตุของการอุดตัน พบว่ามีผู้ป่วย 12 รายที่มีสาเหตุจากการทำหมันและได้ทำการแก้หมันไม่สำเร็จ ส่วนผู้ป่วย 12 รายที่เหลือมีสาเหตุจากการอุดตันอื่นๆ ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ sex chromosome aneuploidy, disomy 18 และ diploidy rate ของทั้งสองกลุ่ม เป็นที่น่าสนใจว่า epididymal spermatozoa มีอุบัติการณ์ของความผิดปกติของโครโมโซมค่อนข้างสูง ถึงแม้ว่าในอดีตผู้ชายเหล่านี้เคยมีบุตรได้ตามปกติ แต่ภายหลังการทำหมันมีอุบัติการณ์ของความผิดปกติของโครโมโซมสูงขึ้น อย่างไรก็ตามไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาที่ทำหมันชายถึงปัจจุบันกับอุบัติการณ์ของความผิดปกติของโครโมโซมของอสุจิ

เมื่อไม่นานมานี้มีการศึกษาพบว่า epididymal spermatozoa ที่ได้จากผู้ป่วยที่มีท่อนำอสุจิอุดตันทั้งสองข้างแต่กำเนิด (congenital agenesis of bilateral vas deferens : CABVD) มีอุบัติการณ์ของความผิดปกติของโครโมโซมสูงขึ้น^(22,66) ความแตกต่างของอุบัติการณ์ของความผิดปกติของโครโมโซมระหว่าง epididymal spermatozoa กับอสุจิปกติ อาจเกิดเนื่องจาก ในระหว่างที่อสุจิเดินทางผ่าน epididymis จะมีกระบวนการ sequestration เพื่อแยกทำลายอสุจิที่มีความผิดปกติของโครโมโซมออก⁽²³⁾ หรือ การอุดตันของท่อนำอสุจิจะทำให้มีความดันสูงในท่อนำอสุจิและมีผลทำให้เกิดความผิดปกติของการสร้างอสุจิ

บทสรุป

โดยสรุป การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าความผิดปกติของโครโมโซมของ epididymal spermatozoa จากผู้ป่วยที่ไม่พบอสุจิในน้ำอสุจิเนื่องมาจากการอุดตันของท่อนำอสุจิสูงกว่าอสุจิที่ได้จากผู้ชายปกติ และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความผิดปกติของโครโมโซมจาก epididymal sperm ของผู้ป่วยที่ได้รับการทำหมันกับผู้ป่วยที่มีการอุดตันของท่อนำอสุจิจากสาเหตุอื่น ข้อมูลจากการศึกษาวิจัยนี้สามารถนำมาใช้ในการให้คำปรึกษาผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงสูงในการทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมในทารกที่เกิดจากการใช้ epididymal spermatozoa ซึ่งได้จากผู้ป่วยที่มีการอุดตันของท่อนำอสุจิมาใช้ในการฉีดเข้าปฏิสนธิกับไข่ (intracytoplasmic sperm injection)



เอกสารอ้างอิง

1. Baker HWG, Burger HG, De Krester DM, Hudson B. Relative incidence of etiologic disorders in male infertility. In: Santen RJ, Swerdloff RS, editors. *Male Reproductive Dysfunction: Diagnosis and Management of Hypogonadism, Infertility, and Impotence*. New York: Marcel Dekker, 1986:342-72.
2. Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smits J, et al. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1993;8:1061-6.
3. Liu J, Lissens W, Silber SJ, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. Birth after preimplantation diagnosis of the cystic fibrosis DF508 mutation by polymerase chain reaction in human embryos resulting from intracytoplasmic sperm injection with epididymal sperm. *JAMA* 1994;272:1858-60.
4. Tournaye H, Devroey P, Liu J, Nagy Z, Lissens W, Van Steirteghem A. Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: a new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of vas deferens. *Fertil Steril* 1994;61:1045-51.
5. Devroey P, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Silber SJ, Van Steirteghem AC. Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1994;62:639-41.
6. Silber SJ, Van Steirteghem AC, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Devroey P. High fertilization and pregnancy rate after sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy. *Hum Reprod* 1995;10:148-52.
7. Tesarik J, Mendoza C, Testart J. Viable embryos from injection of round spermatids into oocytes. *N Engl J Med* 1995;333:525.
8. Nagy ZP, Liu J, Joris H, Verheyen G, Tournaye H, Camus M, et al. The result related to any three basic sperm parameters. *Hum Reprod* 1995;10:1123-9.

9. Sukcharoen N, Sithipravej T, Promviengchai S, Chinpilas V, Boonkasemsanti W. Sperm morphology evaluated by computer (IVOS) cannot predict the fertilization rate in vitro after intracytoplasmic injection. *Fertil Steril* 1998;69:564-8.
10. Chandley AC, Hargreave TB. Genetic anomaly and ICSI. *Hum Reprod* 1996;11:930-2.
11. In't Veld R, Brandenburg H, Verhoeff, A Dhont M, Los F. Sex chromosomal abnormalities and intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 1995;346:773.
12. Liebaers I, Bonduelle M, Van Assche E, Devroey P, Van Steirteghem A. Sex chromosome abnormalities after intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 1995;346:1095.
13. Van Opstal D, Los FJ, Ramlakhan S, Van Hemel JO, van den Ouweland AMW, Brandenburg H, et al. Determination of the parent of origin in nine cases of prenatally detected chromosome aberrations found after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997;12:682-6.
14. Tarlatzis BC, Bili H. Survey on intracytoplasmic sperm injection: report from the ESHRE Task Force. *Hum Reprod* 1998;13(Suppl 1):165-77.
15. Loft A, Petersen K, Erb K, Mikkelsen AL, Grinsted J, Hald F, et al. A Danish national cohort of 730 infants born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) 1994-1997. *Hum Reprod* 1999;14:2143-8.
16. Bonduelle M, Camus M, De Vos A, Staessen C, Tournaye H, van Assche E, et al. Seven years of intracytoplasmic sperm injection and follow-up of 1987 subsequent children. *Hum Reprod* 1999;14:243-64.
17. Aboulghar H, Aboulghar M, Mansour R, Serour G, Amin Y, Al-Inany H. A prospective controlled study of karyotyping for 430 consecutive babies conceived through intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2001;76:249-53.

18. Moosani N, Pattinson HA, Carter MD, Cox DM, Rademaker AW, Martin RH. Chromosomal analysis of sperm from men with idiopathic infertility using sperm karyotyping and fluorescence in situ hybridization. *Fertil. Steril* 1996;64:811-7.
19. Lahdetie J, Saari N, Ajosenpaa-Saari M, Mykkanen J. Incidence of aneuploid spermatozoa among infertile men studied by multicolor fluorescence in situ hybridization. *Am J Med Genet* 1997;71:115-21.
20. In't Veld P, Broekmans FJM, de France HF, Pearson PL, Pieters MH, van Kooij RJ. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and chromosomally abnormal spermatozoa. *Hum Reprod* 1997;12:752-4.
21. Guttenbach M, Martinez-Exposito MJ, Michelmann HW, Engel W, Schmid M. Incidence of diploid and disomic sperm nuclei in 45 infertile men. *Hum Reprod* 1997;12:468-73.
22. Bernardini L, Gianaroli L, Fortini D, Conte N, Magli C, Cavani S, et al. Frequency of hyper-, hypohaploidy and diploidy in ejaculate, epididymal and testicular germ cells of infertile patients. *Hum Reprod* 2000;15:2165-72.
23. Levron J, Aviram-Goldring A, Madgar I, Raviv G, Barkai G, Dor J. Sperm chromosome abnormalities in men with severe male factor infertility who are undergoing in vitro fertilization with intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2001;76:479-84.
24. Martin RH, Greene C, Rademaker A, Barclay L, Ko E, Chernos J. Chromosome analysis of spermatozoa extracted from testes of men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2000;15:1121-4.
25. Barlow P, Vosa CG. The Y chromosome in human spermatozoa. *Nature* 1970;226:961-2.
26. Rudak R, Jacobs PA, Yanagimachi R. Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature* 1978;274:911-3.

27. Martin RH, Balkan W, Burns K, Linn CC. Direct chromosomal analysis of human spermatozoa. *Am J Hum Genet* 1982;34:459-68.
28. Joseph AM, Gosden JR, Chandley AC. Estimation of aneuploidy levels in human spermatozoa using chromosome specific probes and in situ hybridisation. *Hum Genet* 1984;66:234-8.
29. Guttenbach M, Schmid M. Determination of Y chromosome aneuploidy in human sperm nuclei by nonradioactive in situ hybridization. *Am J Hum Genet* 1990;46:553-8.
30. Pieters MHEC, Geraedts JPM, Meyer H, Dumoulin JC, Evers JL, Jongbloed RJ, et al. Human gametes and zygotes studied by nonradioactive in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1990;53:15-9.
31. Wyrobek AJ, Robbins WA, Mehraein Y, Pinkel D, Weier HU. Detection of sex chromosomal aneuploidies X-X, Y-Y, and X-Y in human sperm using two-chromosome fluorescence in situ hybridization. *Am J Med Genet* 1994;53:1-7.
32. Martínez-Pasarell O, Márquez C, Coll MD, Egozcue J, Templado C. Analysis of human sperm-derived pronuclei by three-colour fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod* 1997;12:641-5.
33. Aribarg A, Ngeamvijawat J, Chanprasit Y, Sukcharoen N. Determination of the ratio of X and Y bearing spermatozoa after albumin gradient method using double-labeled fluorescence in situ hybridization (FISH). *J Med Assoc Thai* 1997;79 (Suppl 1):88-95.
34. Van Hummelen P, Lowe XR, Wyrobek AJ. Simultaneous detection of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of healthy men by multicolor fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 1996;98:608-15.
35. Wyrobek AJ, Alhorn T, Balhorn R, Stanker L, Pinkel D. Fluorescence in situ hybridization to Y chromosome in decondensed human sperm nuclei. *Mol Reprod Dev* 1990;27:200-8.

36. Vidal F, Moragas M, Català V, Torello MJ, Santalo J, Calderon G, et al. Sephadex filtration and human serum albumin gradients do not select spermatozoa by sex chromosome: a fluorescent in-situ hybridization study. *Hum Reprod* 1993;8:1740-3.
37. Holmes JM, Martin RH. Aneuploidy detection in human sperm nuclei using fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 1993;91:20-4.
38. Lu PY, Hammitt DG, Zinsmeister AR, Dewald GW. Dual color fluorescence *in situ* hybridization to investigate aneuploidy in sperm from 33 normal males and a man with a t(2;4;8) (q23;q27;p21). *Fertil Steril* 1994;62:394-9.
39. Bischoff FZ, Nguyen DD, Burt KJ, Shaffer LG. Estimates of aneuploidy using multicolor fluorescence in situ hybridization on human sperm. *Cytogenet Cell Genet* 1994;66:237-43.
40. Nath J, Tucker JD, Hando JC. Y chromosome aneuploidy, micronuclei, kinetochores and aging in men. *Chromosome* 1995;103:725-31.
41. Zijno A, Leopardi P, Marcon F, Crebelli R. Sex chromosome loss and non-disjunction in women: analysis of chromosomal segregation in binucleated lymphocytes. *Chromosoma* 1996;104:461-7.
42. Márquez C, Egozcue J, Martorell MR, Moreno V, Templado C. Colcemid increases the frequency of chromosome abnormalities in human sperm. *Cytogenet Cell Genet* 196;72:164-70.
43. Egozcue J, Blanco J, Vidal F. Chromosome studies in human sperm nuclei using fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Hum Reprod Update* 1997;3:441-52.
44. Rousseaux S, Chevret E. In-vitro decondensation of human spermatozoa for fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 1995;10:2209-13.
45. Martin RH, Rademaker AW. Reliability of aneuploidy estimates in human sperm: results of fluorescence in situ hybridization studies using two different scoring criteria. *Mol Reprod Dev* 1995;42:89-93.

46. Coonen E, Pieters M, Dumoulin JC, Meyer H, Evers JL, Ramaekers FC, et al. Nonisotopic in situ hybridization as a method for nondisjunction studies in human spermatozoa. *Mol Reprod* 1991;28:18-22.
47. Seligman J, Kosower NS, Weissenberg R, Shalgi R. Thiol–disulfide status of human sperm proteins. *J Reprod Fertil* 1994;101:435-43.
48. Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod* 1996;11:722-6.
49. Williams BJ, Ballenger CA, Malter HE, Bishop F, Tucker M, Zwingman TA. Non-disjunction in human sperm: results of fluorescence in situ hybridization studies using two and three probes. *Hum Mol Genet* 1993;2:1929-36.
50. Martin RH, Spriggs E, Rademaker AW. Multicolor fluorescence in situ hybridization analysis of aneuploidy and diploidy frequencies in 225,846 sperm from 10 normal men. *Biol Reprod* 1996;54:394-8.
51. Blanco J, Rubio C, Simón C, Egozcue J, Vidal F. Increased incidence of disomic sperm nuclei in a 47,XYY male assessed by fluorescent in situ hybridization (FISH). *Hum Genet* 1997;99:413-6.
52. Goddijn M, Leschot NJ. Genetics aspects of miscarriage. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2000;14:855-65.
53. Brambati B, Simoni G, Travi M, Danesino C, Tului L, Privitera O, et al. Genetic diagnosis by chorionic villus sampling before 8 gestational weeks: efficiency, reliability, and risks on 317 completed pregnancies. *Prenat Diagn* 1992;12:789-99.
54. Hall JG. Genomic imprinting: review and relevance to human diseases. *Am J Hum Genet* 1990;46:857-73.
55. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm–cervical mucus interaction, 4rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.

56. Nielsen J, Wohelert M. Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year study in Aarhus, Denmark. *Hum. Genet* 1991;87:81-3.
57. Wyrobek AJ. Methods and concepts in detecting abnormal reproductive outcomes of paternal origin. *J Reprod Toxicol* 1993;7:3-16.
58. Aran B, Blanco J, Vidal F, Vendrell JM, Egozcue S, Barri PN, et al. Screening for abnormalities of chromosomes X, Y, and 18 and for diploidy in spermatozoa from infertile men participating in an in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection program. *Fertil Steril* 1999;72:699-701.
59. Ushijima C, Kumasako Y, Kihai PE, Hirotsuru K, Utsunomiya T, et al. Analysis of chromosomal abnormalities in human spermatozoa using multi-colour fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 2000;15:1107-11.
60. Veggetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyden G, Bianchi M, Bonduelle M, et al. Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men. *Hum Reprod* 2000;15:351-65.
61. Calogero AE, De Palma A, Grazioso C, Barone N, Romeo R, Rappazzo G, et al. Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters. *Hum Reprod* 2001;16:1172-9.
62. Rubio C, Gil-Salom M, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Minguez Y, et al. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod* 2001;16:2084-92.
63. Robbins WA, Baulch JE, Moore D, Weier HU, Blakey D, Wyrobek AJ. Three-probe fluorescence in situ hybridization to assess chromosome X, Y, and 8 aneuploidy in sperm of 14 men from two healthy groups: evidence for a paternal age effect on sperm aneuploidy. *Reprod Fertil Dev* 1995;7:799-809.
64. Robbins WA, Meistrich ML, Moore D, Hagemester FB, Weier HU, Cassel MJ, et al. Chemotherapy induces transient sex chromosomal and autosomal aneuploidy in human sperm. *Nat Genet* 1997;16:74-8.

65. Shi Q, Martin RH. Aneuploidy in human sperm: a review of the frequency and distribution of aneuploidy, effects of donor age and life style factors. *Cytogenet Cell Genet* 2000;90:219-26.
66. Viville S, Warter S, Meyer JM, Wittmer C, Loriot M, Mollard R, et al. Histological and genetic analysis and risk assessment for chromosomal aberration after ICSI for patients with CABVD. *Hum Reprod* 2000;15:1613-8.

